

光暗周期下一种海洋硅藻荧光 特性和生化组成的研究

I. 营养盐的影响

杨小龙 朱明远 J. J. 库仑

(国家海洋局第一海洋研究所, 青岛) (美国毕格洛海洋研究所)

摘 要

本文采用连续培养方法, 在光暗周期下研究了一种海洋硅藻——伪矮海链藻 (*Thalassiosira pseudonana* 3H) 的荧光特性和生化组成与营养盐的关系。研究表明, 随着营养盐缺乏程度的加剧, 藻类荧光增强比、细胞叶绿素 a、蛋白质含量均降低, 而荧光产额、DCMU 增强荧光产额、细胞碳水化合物含量、碳水化合物: 叶绿素 a、蛋白质: 叶绿素 a、碳水化合物: 蛋白质比值均升高。但是, 取样时间和生长光强不同时, 各参数随营养状态变化而改变的幅度也各不相同。

营养盐不仅影响着海洋浮游植物的密度和分布, 而且对其生长、代谢均有着十分重要的影响 [1-3]。因此, 近几十年来, 人们进行过大量的研究, 研究方法也从一次培养方法发展成为更加定量、准确的连续培养方法。然而, 有关营养盐对海洋浮游植物影响的研究大多是在连续光照下进行的。我们知道, 在自然水域中, 海洋浮游植物不仅生活在不同的营养条件下而且经历着一天中光照和黑暗交替的周期性变化。这种光照和黑暗周期的变化在营养盐对浮游植物的影响中有何重要作用? 这些却很少有人研究过。

本实验是在光暗交替变化 (12L: 12D), 生长在光饱和与光限制两种光强下, 采用连续培养方法研究营养盐对一种海洋硅藻——伪矮海链藻 (*Thalassiosira pseudonana* 3H) 荧光特性和生化组成的影响, 从而为解释现场数据及建立初级生产力模式提供更为可靠的理论依据。由于海洋浮游植物主要受氮限制, 故本实验采用氮作为限制营养盐并通过控制氮流入培养室的速率来控制藻类生长速率, 进而控制其营养状态。

一、材料和方法

(一) 实验条件及培养方法

实验在一个恒温箱中进行, 温度为 $19 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 。采用荧光灯作为光源, 光周期为 12L:12D。光强是用 QSL-100 型光量子仪在培养器中央测得。

实验使用人工海水, 其配方同 Keller (1987)。配好后按图 1 进行过滤消毒。消毒后的人工海水除氮外 (浓度为 $50\mu\text{mol}/\text{dm}^3$), 其他营养成分均按 f/2 配方 [4] 添加成培养液。

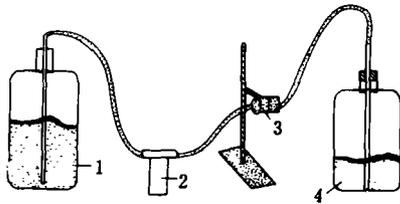


图 1 人工海水过滤消毒装置

1——人工海水 2——蠕动泵 3—— $0.2\mu\text{m}$
培养液过滤器 4——消毒海水

考虑到伪矮海链藻对硒有特殊要求 [5], 在培养液中又添加浓度为 $0.01\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ 的亚硒酸 ($\text{H}_2\text{Se}_2\text{O}_3$)。

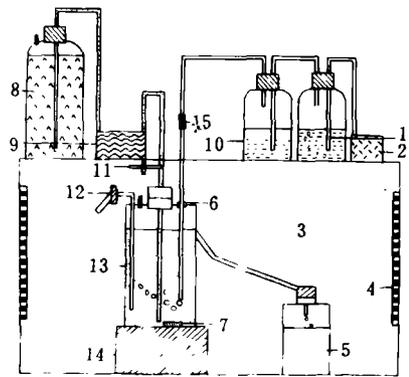
连续培养所用的恒化器装置如图 2 所示。其主要组成包括贮液器、培养器和收集器三部分。用磁力搅拌器将藻液混合均匀并处于悬浮状态。

通入空气以防止碳源缺乏。通过调节蠕动泵流速控制培养液流入培养室的速率。

通过测定生长-光强曲线确定光饱和光强为 $200\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 光限制光强为 $75\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。在 $200\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光强下, 设置生长速率为: 0.2、0.43、0.59、0.84、1.11、1.46 d^{-1} ; 在 $75\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光强下, 设置生长速率为: 0.0、0.13、0.35、0.56、0.61、0.95 d^{-1} 。培养中每天定时监测培养箱温度、蠕动泵流速、流出液体积、藻液 pH 值、细胞数、活体荧光值及叶绿素 a 浓度。当在连续 5 天内培养藻类细胞数、活体荧光值及叶绿素 a 浓度均波动在 $\pm 10\%$ 范围内则藻类达稳态。此时, 生长速率 (μ) 等于培养液的稀释速率 (D)。随后, 每天灯亮后 (早晨) 和灯灭前 (晚上) 连续两天测定各指标。氮饥饿 (生长速率为 0) 实验是停止向在 $75\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光强下, 生长达稳态的连续培养藻液 (低生长速率) 中输入培养液后, 至藻类细胞数在连续 3 天内无明显变化时即可开始取样。

(二) 样品分析及参数含义

活体荧光测定 ($\pm\text{DCMU}$) 是依据 Cullen 等人 (1986) 的方法。藻液经 15 分钟暗适应 (Vincent, 1979) 后测定活体荧光值 F , 加 $1 \times 10^{-5}\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ DCMU [3 (3,4)-二氯



1——2%硫酸 2——充气泵 3——培养箱
4——日光灯 5——收集器 6——通气口
7——搅拌器 8——贮液器 9——蠕动泵
10——去离子水 11——流速测定阀
12——取样口 13——培养器 14——磁力搅
拌器 15——消毒棉花

图 2 恒化培养装置

苯基 1 - 1, 1 - 二甲基脲, 为光合作用抑制剂] 1 分钟后测定DCMU增强荧光值F_d, 取 5 个平行样. 荧光产额和DCMU增强荧光产额分别用F/Chl和F_d/Chl来表示. 叶绿素 a 测定是依据Shoaf & Liem (1976) 及作者实验结果, 用 4 : 6 的二甲亚砷和90% 丙酮的混合液在 - 20℃ 黑暗条件下提取至少 1 小时后测得. 每个藻样取三个平行样. 碳水化合物测定采用硫酚法 [6], 以葡萄糖作标准. 蛋白质测定采用加热双缩脲福林酚法 [7, 8], 以牛血清蛋白 (BSA) 作为标准.

实验中, 光照期开始 (t = 0) 和光照期结束 (t = 12) 分别表示自然条件下的早晨和晚上. 当参数最大值不在光照期结束时, 取最大值为晚上值. μ / μ_{max} 表示相对生长速率, 它是各生长速率与最大生长速率之比.

二、结果和讨论

(一) 荧光特性

F/Chl和F_d/Chl在光饱和与光限制的条件下均随氮缺乏的加剧而增加, 且早晨和最大增加幅度相近. 在光饱和光强下, μ / μ_{max} 由 1 到 0.14, F/Chl增加了30%; 在光限制条件下, μ / μ_{max} 由 1 到 0 时, F/Chl增加了1.6倍. F_d/Chl 的变化幅度小于F/Chl (图 3, 4).

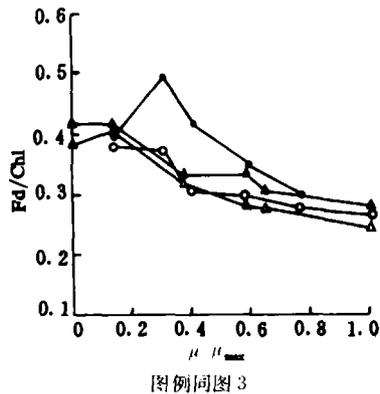
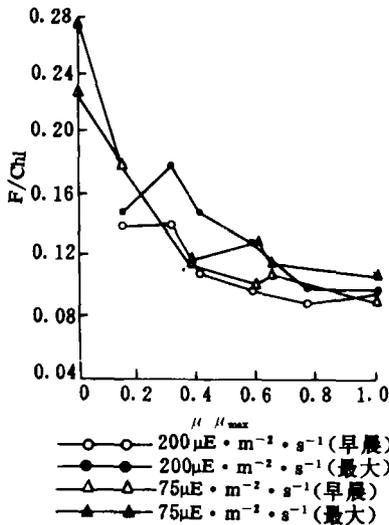
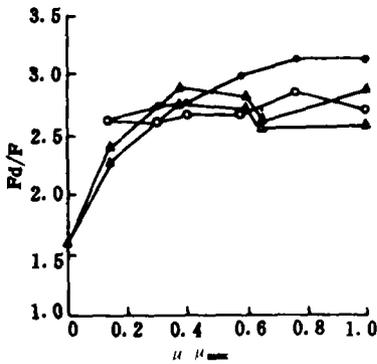


图 3 相对生长速率与荧光产额的关系 图 4 相对生长速率与DCMU增强荧光产额的关系

如图 5 所示, F_d/F随相对生长速率的增加在光饱和与光限制条件下均略有增加. 光饱和时F_d/F在早晨变化不大, 在最大值时增加了16%; 光限制时, μ / μ_{max} 由 0 到 1, F_d/F在早晨和最大值时分别增加了38%和44%。

人们常用叶绿素 a 浓度来表示自然种群的海洋浮游植物的生物量. 自从 Lorenzen (1966) 首先将活体荧光法应用于海洋浮游植物生物量调查以来, 这种方法已为人们广泛应用于海洋浮游植物生理生态的研究中. 此方法有如下假设, 活体荧光(F或F_d)和萃取叶绿素

a 荧光强度的比值 F/Chl (Fd/Chl) 在各种环境下是恒定的。这样，活体荧光值 F (Fd) 即可代表叶绿素 a 浓度。然而这种假设很快就为许多科学家所怀疑。Welschmeyer & Lorenzen(1981)、Sakshaug & Holm-Hansen(1977)和Cleveland & Perry(1987)用一次培养的方法分别对伪矮海链藻(*T. pseudonana*)、中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)、陆氏单鞭金藻(*Monochrysis lutheri*)和角毛藻(*Chaetoceros gracilis*)的荧光特性进行了研究。他们均发现，随着藻类增长接近静止期，生理活性的降低， F/Chl 升高而 Fd/F 降低。Kiefer(1973)首先用连续培养方法证明了 F/Chl 值确实随氮缺乏程度加剧而升高。本实验结果不仅验证了上述研究者用一次培养和连续培养方法得出的结论，而且进一步说明了 Fd/F 在低生长速率下亦随营养盐缺乏而降低。当停止向处于稳定态，低生长速率的连续培养藻液中加入培养液时我们还发现，伪矮海链藻随氮饥饿时间的延长，细胞分裂逐渐停止， F/Chl 、 Fd/Chl 逐渐增加，而 Fd/F 逐渐降低(图6)。因此，我们认为， F/Chl 、 Fd/Chl 和 Fd/F 随营养盐缺乏的变化主要发生在低生长速率($\mu/\mu_{max} < 0.4$ ，见图3，4，5)，特别是在氮饥饿($\mu_{max} = 0$)条件下。



图例同图3

图5 相对生长速率与荧光增强比的关系

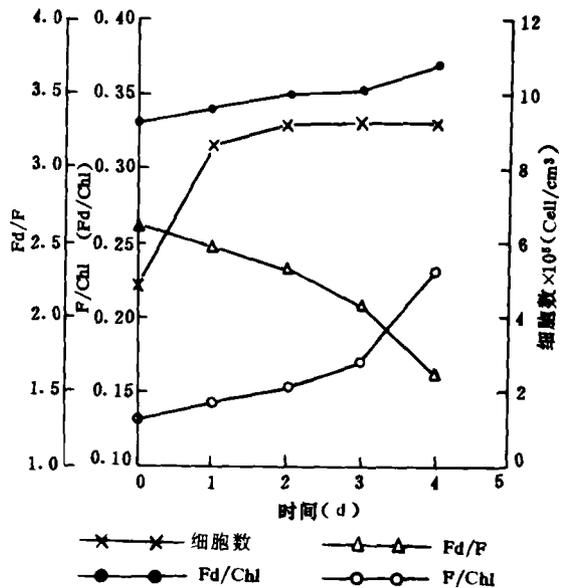


图6 细胞数和荧光参数随氮饥饿时间的变化

浮游植物所吸收的光能在光合作用中未利用的大多以荧光、热辐射等形式散发出来。光合效率越低则发出的荧光越强。 F/Chl 、 Fd/Chl 是表示藻类荧光强度的参数，而 Fd/F 则常常作为藻类光合活性的指标^[9]。因此，随着氮缺乏的增强，浮游植物生理活性和光合作用降低^[10, 11]，必然导致无用能量的增加，即 F/Chl 、 Fd/Chl 值的升高，而 Fd/F 降低的现象。

(二) 叶绿素 a

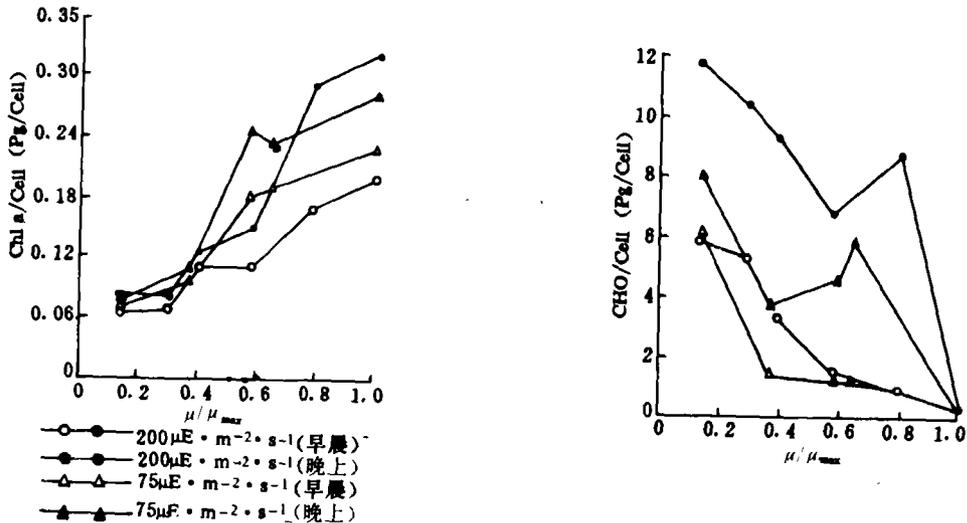
如图7所示，细胞叶绿素 a 含量在氮缺乏时减少的现象与前人的研究结果相同^[1, 10]。

然而前人的研究多是在连续光照下进行的。由本实验结果可以看出,晚上的Chl/Cell值随氮缺乏增强而变化的幅度均明显大于早晨。 μ/μ_{max} 由1降低到0.14,在 $200\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ 光强下Chl/Cell在早晨和晚上分别减少了2.1倍和3倍;在 $75\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ 光强下,Chl/Cell在早晨和晚上则分别减少了2.2倍和2.7倍。由本实验另一部分结果可知,造成这种现象的原因主要是叶绿素a的合成速率在白天明显高于黑夜,且氮充足时高于氮缺乏时。

氮是叶绿素分子重要的组分。因此,随着氮供应速率的减慢、生长速率的降低、浮游植物氮缺乏程度加深,最终导致浮游植物叶绿素a合成减少,Chl/Cell的降低。浮游植物在氮缺乏时叶绿素a含量的减少类似于高等植物的缺绿症。

(三) 碳水化合物

如图8所示,伪矮海链藻细胞碳水化合物的含量随氮缺乏程度的增强而增加。 μ/μ_{max} 由1到0.14,在 $200\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ 光强下,CHO/Cell在早晨由0.026Pg/Cell增加到5.86Pg/Cell,在晚上由0.28Pg/Cell增加到11.77Pg/Cell,分别增加了225倍和42倍;在 $75\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ 光强下,CHO/Cell在早晨和晚上分别增加了102倍和27倍。由此看来,CHO/Cell依营养状态变化的幅度在光饱和和光强下大于光限制,在早晨的样品大于晚上。



图例同图7

图7 相对生长速率与细胞叶绿素a含量的关系 图8 相对生长速率与细胞碳水化合物含量的关系

有关营养盐对海洋浮游植物碳水化合物含量影响的实验大多是用一次培养的方法进行的〔12〕,由此,只能将氮饥饿与氮充足二种藻类营养状态加以比较。而有关中度氮缺乏对浮游植物碳水化合物含量影响的实验却很少〔13〕。图8较好地描述了伪矮海链藻从氮饥饿到氮充足各种营养状态下的碳水化合物含量,全面阐述了营养盐与藻类碳水化合物含量的定量关系。

藻类细胞碳水化合物含量在氮缺乏时增加的原因可作如下解释,在正常营养条件下,

作为光合作用直接产物的碳水化合物一般都用于蛋白质、脂肪、氨基酸等许多细胞重要组分的合成。当氮缺乏时, 浮游植物氮代谢速率降低, 碳代谢速率, 大于氮代谢速率, 从而出现碳氮代谢的不平衡。光合作用产生的碳水化合物不能完全用于含氮化合物的合成, 于是, 碳水化合物就累积起来。由于碳水化合物的日合成速率在氮充足时高于氮缺乏时, 而在早晨细胞碳水化合物含量在氮充足时小于氮缺乏时, 从而使CHO/Cell随生长速率变化而改变的幅度在晚上小于早晨 (未发表数据)。

(四) 蛋白质

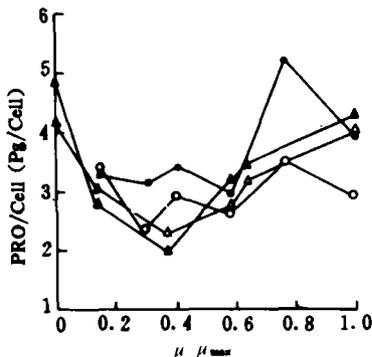
如图 9 所示, 细胞蛋白质含量在较高相对生长速率时有所增加, 而在氮缺乏严重时也略有升高。

Morris (1981) 曾将小球藻移于不含氮的培养液中, 24 小时后却未发现其蛋白质含量没有任何降低。Glover (1974) 将三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricornutum*) 培养于无氮培养液中, 二天内还观察到 C^{14} 同化成蛋白质的比例有所增加。因此, 他们认为浮游植物的蛋白质是较为稳定的化学组分, 在氮饥饿时, 它们可通过消耗贮藏物质而保证蛋白质的合成。由本实验结果也可以看出, 浮游植物的蛋白质含量随氮缺乏加剧而变化的程度较碳水化合物小得多。

(五) 生化组成比率

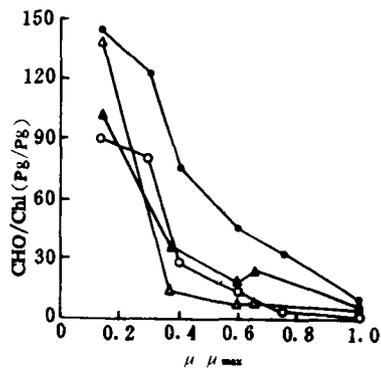
1. 碳水化合物/叶绿素 a (CHO/Chl)

如图 10 所示, μ/μ_{max} 由 1 到 0.14, 在 $200\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光强下, CHO/Chl 在早晨和晚上分别增加了 63 倍和 16 倍; 在 $75\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光强下, CHO/Chl 在早晨和晚上分别增加了 23 倍和 12 倍。因此, CHO/Chl 随氮缺乏加剧而增加, 且增加的幅度在高光强大于低光强, 在早晨大于晚上。



图例同图 7

图 9 相对生长速率与细胞蛋白质含量的关系



图例同图 7

图 10 相对生长速率与碳水化合物/叶绿素 a 比的关系

海洋浮游植物生态学研究中的一个非常重要的问题就是测量自然种群海洋浮游植物的生

长速率. Laws & Bannister (1980)曾依据浮游植物生长速率与C/Chl的关系提出了计算自然种群海洋浮游植物生长的模式. 由于碳水化合物是光合作用的直接产物, 又是浮游植物有机碳的主要组分. 因此, CHO/Chl与生长速率的关系和C/Chl与生长速率的关系非常相似. 然而本实验还发现, 在光暗周期下取样时间的不同对于这种关系的定量描述有着十分重要的影响(图10). 据此, 我们认为, 在用实验室培养藻类的研究结果模拟自然种群海洋浮游植物的生长模式时, 光暗周期的影响是不可忽视的因素.

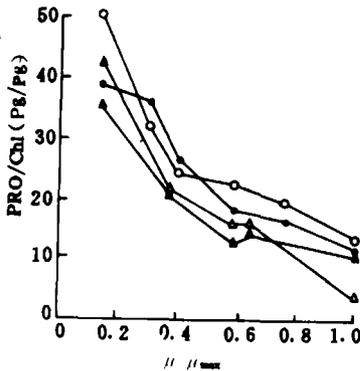
2. 蛋白质 叶绿素a (PRO/Chl)

如图11所示, 伪矮海链藻在两种光强下的 PRO/Chl 值均随相对生长速率减小而降低, 其变化幅度在 $200\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光强下大于 $75\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. 但是取样时间似乎对它的变化影响不大.

叶绿素a都是以色素—蛋白复合体的形式存在的. 在恒定条件下, 蛋白质和叶绿素a应保持一定的比例. 然而, 在氮缺乏情况下, 叶绿素a的减少要比蛋白质大(图7, 9), 从而会导致蛋白质和叶绿素a含量比例的失调, PRO/Chl比值的增加. 由于PRO/Chl可作为浮游植物色素化程度的指标^[14], 因此, 在氮缺乏条件下, PRO/Chl的增加(即Chl/PRO的降低)反映了其色素化程度的降低.

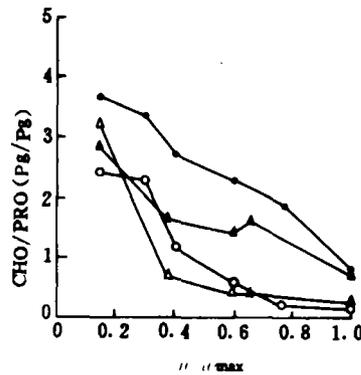
3. 碳水化合物/蛋白质 (CHO/PRO)

由图12可以看出, CHO/PRO随氮缺乏程度增加而升高. μ/μ_{max} 从1到0.14, 在 $200\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光强下, CHO/PRO在早晨由0.18增加到2.44, 在晚上由0.72增加到3.70, 分别增加了12倍和4倍. 在 $75\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光强下, 其值早晨由0.24增加到3.23, 晚上由0.69增加到2.78, 分别增加了12倍和3倍. 因此, CHO/PRO的变化幅度在早晨明显大于晚上.



图例同图7

图11 相对生长速率与蛋白质 叶绿素a比的关系



图例同图7

图12 相对生长速率与碳水化合物 蛋白质比的关系

Myklestad等人(1972, 1974)曾用9种一次培养的藻类研究发现, 它们的CHO/PRO值在指数生长期明显低于静止期. 因此, 他们建议用CHO/PRO作为浮游植物营养状态的指标. 本实验结果较为清楚地证明了CHO/PRO作为浮游植物营养状态的可行性. 但是, 我们也发现, 在光照周期下, CHO/PRO随生长速率变化而改变的幅度在早上要比晚上大3-

4 倍,这可能是碳水化合物合成的日变化造成的。因此,在将CHO/PRO作为自然种群海洋浮游植物营养状态指标时,应该考虑到其日变化的因素。

三、结 语

本文利用连续培养方法描述了一种海洋硅藻的生理指标与营养盐关系,目的是在更接近于自然的环境中研究浮游植物的生长代谢。研究结果说明,生长光强和光暗周期在营养盐对浮游植物的影响中起着十分重要的作用。在这种系统中研究浮游植物的生理特性将有助于我们了解自然种群海洋浮游植物的生长和代谢。

参 考 文 献

- [1] Goldman, J. C. .Physiological process, nutrient availability, and concept of relative growth rate in marine phytoplankton ecology. *Primary Productivity in the Sea*, 1980, 175—199.
- [2] Laws, E. A. and T. T. Bannister, Nutrient- and light-limited growth of *Thalassiosira fluvialilis* in continuous culture, with implications for phytoplankton growth in the ocean, *Limnol. Oceanogr.*, **25** (1980), 457—473.
- [3] Mykkestad, S. and A. Haug, Production of carbohydrates by marine diatom, *Chaetoceros affinis* var. *willei* (Gran) Hustedt. I. Effect of concentration of nutrients in the culture medium, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **9** (1972), 125—136.
- [4] Guillard, R. R. L. and J. H. Ryther, Studies of marine plankton diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula* (Cleve) Gran, *Can. J. Microbiol.*, **8** (1962), 229—239.
- [5] Price, N. M. and P. A. Thompson, Selenium: an essential element for the diatom *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae), *J. Phycol.*, **23** (1987), 234—241.
- [6] Dubros, M. K., A. Gilles and J. K. Hamilton, Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Analyt. Chem.*, **28** (1956), 350—356.
- [7] Lowry, O. H., et al., Protein measurement with folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193** (1951), 265—275.
- [8] Dorsey, T. E. and P. McDonald, Measurements of phytoplankton-protein content with the heated biuret-folin assay, *J. Phycol.*, **14** (1978), 167—171.
- [9] Prezelin, B. B., Light reactions in photosynthesis, *Can. Bull. Fish Aquat. Sci.*, **210** (1981), 1—43.
- [10] Thomas, W. H., and A. N. Dodson, On the nitrogen deficiency in tropical Pacific oceanic phytoplankton. II. Photosynthetic and cellular characteristics of a chemostate-grown diatom, *Limnol. Oceanogr.*, **17** (1972), 515—523.
- [11] Glover, H. E., Assimilation numbers in cultures of marine phytoplankton, *J. Plankton. Res.*, **2** (1980), 69—79.
- [12] Mykkestad, S., Production of carbohydrates by marine planktonic diatoms II. Comparison of nine different species in culture, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **15** (1974), 261—274.
- [13] Morris, I., Photosynthetic products, physiological state, and phytoplankton growth, *Physiological Bases of Phytoplankton Ecology*, 1981, 83—102.
- [14] Chan, A. T., Comparative physiological study of marine diatoms and dinoflagellates in relation to irradiance and cell size, I. Growth under continuous light, *J. Phycol.*, **14** (1978), 428—432.

- [15] Cleveland, S. and M. J. Perry. Quantum yield, relative specific absorption and fluorescence in nitrogen-limited *Chaetoceros gracilis*, *Mar. Biol.*, **94** (1987), 489-497.
- [16] Cullen, J. J., M. Zhu and D. C. Pierson. A technique to assess the harmful effects of sampling and contaminant for determination of primary production, *Limnol. Oceanogr.*, **31** (1986), 1364-1373.
- [17] Glover, H. E., Studies on the Biochemistry and Physiology of *Phaeodactylum tricornutum*, Ph.D Thesis, University of London, 1971.
- [18] Keller, M. D. and R. Selvin. Media for culture of oceanic ultraphytoplankton, *J. Phycol.*, **23** (1987), 633-638.
- [19] Kiefer, D. A. and R. E. Hodson. Effect of nitrogen stress upon the photosynthetic rate and fluorescence of *Thalassiosira pseudonana*. *Atom Energy Comm. Contract AT Gen.*, **10** (1971), 33-39.
- [20] Kiefer, D. A., Chlorophyll a fluorescence in marine diatoms: responses of chloroplasts to light and nutrient stress, *Mar. Biol.*, **23** (1973), 39-46.
- [21] Sakshaug, E. and O. Holm-Hansen. Chemical composition of *Skeletonema costatum* (Grev) Cleve and *Paullista* (Monochrysis) *rutheri* (Dooop) Green as a function of nitrate-, phosphate, and iron-limited growth, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **29** (1977), 1-31.
- [22] Shoaf, W. T. and B. W. Lium. Improved extraction of chlorophyll a and b from algae using dimethyl sulfoxide, *Limnol. Oceanogr.*, **21** (1976), 926-928.
- [23] Welschmeyer, N. A. and C. J. Lorenzen. Chlorophyll-specific photosynthesis and quantum efficiency at subsaturating light intensities, *J. Phycol.*, **17** (1981), 283-293.