科学通报 2009 年 第 54 卷 第 3 期: 294 ~ 298
专 题
《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

青岛海域漂浮和沉降浒苔的光合作用研究

林阿朋[①②], 王超[①②], 乔洪金[①②], 潘光华[③], 王广策[①*], 宋厉芸[③], 王志远[③], 孙松[①], 周百成[①]

① 中国科学院海洋研究所, 青岛 266071;
② 中国科学院研究生院, 北京 100049;
③ 天津科技大学海洋科学与工程学院, 天津 300457
* 联系人, E-mail: gcwang@ms.qdio.ac.cn

2008-09-04 收稿, 2008-11-25 接受
国家自然科学基金(批准号: 30830015)、国家科技支撑计划(批准号: 2006BAD09A04)和国家高技术研究发展计划(批准号: 2006AA10A402, 2007AA09Z406, 2006AA05Z112, 2006AA10A413)资助项目

Lin A P, Wang C, Qiao H J, et al. Study on the photosynthetic performances of *Enteromorpha prolifera* collected from the surface and bottom of the sea of Qingdao sea area. Chinese Science Bulletin, 2009, 54(3): 399—404, doi: 10.1007/s11434-009-0025-6

摘要 以青岛海域浒苔藻体中光合活性较强的青岛奥帆基地 A 赛区南侧海域水表漂浮藻体和团岛湾海域的泥表沉降藻体为研究对象, 通过叶绿素荧光技术配合氧电极技术研究了它们的光合作用情况. 结果表明, 虽然漂浮藻体光合活性较强, 但潜在光合活性明显低于正常值, 而泥表藻体的光合活性极弱, 表明目前该海域的漂浮浒苔藻体已受到了较严重的环境胁迫, 泥表藻体已经死亡或正处于死亡的边缘. 另一方面, 实验室培养的结果表明, 团岛湾海域中沉降至泥表的藻体即使重新获得光照也不能恢复其光合活性, 提示该海域的沉降浒苔藻体即使能够上升到水表也无法成为次生浒苔的种质来源. 根据本实验的结果可初步认为, 截至 2008 年 7 月中旬, 青岛海域自然环境已不适于浒苔的生长, 该海域浒苔生物量可能正处于下降之中.

关键词
绿潮
浒苔
光合作用
叶绿素荧光
氧电极

浒苔*Enteromorpha prolifera* (Mailer) J. Ag. 属于绿藻门、绿藻纲、石莼目、石莼科、浒苔属, 是一种常见大型海洋绿藻, 藻体管状, 膜质, 细胞单层, 主枝明显, 分枝细长. 幼体时期通过假根附着于固体基质生长, 广泛地分布于潮间带区砂砾、岩石、泥滩上, 成体藻体和断裂的成体藻体碎片可漂浮生长. 它的繁殖方式多样, 既可以通过具鞭毛可游动的孢子和配子生殖, 又可通过藻体片段再生的方式增殖. 因此浒苔具有着在一定条件下短时间内快速增殖的能力[1,2].

2008 年 6 月中下旬青岛海域爆发了大规模的由浒苔引起的绿潮. 海域内出现了大量漂浮生长的浒苔藻体. 藻体在风浪较小的海湾积聚, 局部海域海面漂浮的藻体厚度一度达到了 0.5 m. 大面积的漂浮浒苔藻体随风浪扩散蔓延, 使相关海域的生态景观受到了严重影响. 漂浮的浒苔藻体还在海域内沉降下来, 一方面腐烂的藻体对该海域的生态环境造成了一定影响, 另一方面沉降的藻体还有可能成为次生绿潮的种质来源. 目前, 对于漂浮浒苔的形态学和分子生物学等已有一些报道[3~5], 但对其光合作用和呼吸作用研究相对较少, 对沉降至海底藻体的生理过程的研究则未见报道.

本研究以自然水体中采集的新鲜浒苔藻体和经短时间实验室培养后的藻体为研究对象, 通过调制叶绿素荧光技术配合氧电极法, 研究了从水表漂浮藻体和泥底沉降藻体的光合作用和呼吸作用, 从而了解该海域浒苔藻体的生存状态.

1 材料与方法

(ⅰ) 实验材料. 浒苔叶状体由专人乘中国科学院海洋研究所"创新号"考察船于绿潮爆发期间在海况允许的情况下间断出海采集. 本文选择经比较检测表明目前光合活性最高的 2008 年 7 月 12 日采集的青岛奥帆基地 A 赛区南侧海域(36°00′N, 120°24′E)水

表藻体以及采自团岛湾(36°20′N, 120°17′E)泥表(图 1)藻体, 作为水表漂浮藻体和泥底沉降藻体的代表. 用毛笔轻轻洗净藻体表面污泥和附生杂藻, 并经显微镜镜检确认藻体无杂藻污染后待用.

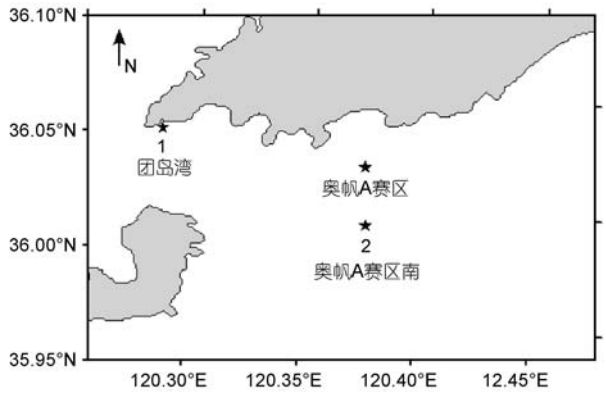


图 1　团岛湾采样点(1)和奥帆 A 赛区南采样点(2)的位置

实验采用两组平行实验: 一组实验对象为新鲜采集的藻体, 另一组实验对象为模拟青岛海域的自然环境实验室培养 24 h 后的藻体. 培养基采用自然海水, 培养条件为光照培养箱 20℃, 光强 250 μmol·m^{-2}·s^{-1}, 光周期 12 h/12 h.

(ⅱ) 叶绿素光谱特性及含量的测定. 丙酮抽提藻体中的色素成分. 取新鲜浒苔藻体, 用滤纸轻轻吸干藻体表面水分, 称取 0.5 g 藻体放入研钵中液氮研磨, 藻体磨碎后加少许石英砂和 5 mL 丙酮继续研磨成匀浆状, 加入 5 mL 80%丙酮抽提, 10000×g 室温离心 10 min, 弃沉淀, 80%丙酮定容上清至 20 mL. 光密度测定通过紫外可见分光光度计 UV757CRT 进行. 以 80%丙酮作为空白对照, 对样品进行 350~800 nm 的波长扫描, 读取 663 (叶绿素 a 光吸收波长)和 645 nm (叶绿素 b 光吸收波长)处的光密度值. 重复 3 次以上, 计算平均值.

叶绿素a的浓度(C_a)、叶绿素b的浓度(C_b)和总叶绿素浓度(C_T)分别按照公式$C_a = 12.7A_{663}-2.69A_{645}$, $C_b = 22.9A_{645}-4.68A_{663}$, $C_T = C_a + C_b = 8.02A_{663} + 21.21A_{645}$[6] 计算, 单位为mg/L. 最后根据稀释倍数分别计算每克鲜重藻体中的色素含量, 单位为mg/g.

(ⅲ) 叶绿素荧光参数的测定. 利用调制叶绿素荧光技术(pulse amplitude modulation, PAM), 用 IMAGING-PAM Microscopy调制脉冲荧光仪(Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany), 通过叶绿素荧光诱导动力学曲线和光响应曲线测定了不同来源的浒苔叶状体叶绿素荧光动力学参数. 样品暗适应 15 min 以弱调制测量光(3~7 μmol·m^{-2}·s^{-1})测定初始荧光(minimal fluorescence, F_0); 以强饱和脉冲(SP)激发后测量最大荧光(maximum fluorescence, F_m), 光化光下的最大荧光记为$F_{m'}$; 重复 5 次. 可变荧光(variable fluorescence, F_v)按公式$F_v = F_m - F_0$ 计算, 其中F_v/F_m为PSⅡ最大(潜在)光化学量子产量(maximal PSⅡ quantum yield); Y(Ⅱ)为PSⅡ光化学能量转化的有效量子产量, 按公式Y(Ⅱ) = $(F_{m'} - F)/F_{m'}$计算, 其中F为实时荧光(fluorescence yield), 通过将饱和脉冲之前 0.2 s内的荧光进行平均获得; PSⅡ相对电子传递速率按公式rETR = Y×PAR×0.5 计算[7], 其中PAR为光合有效辐射(photosynthetic active radiation), 0.5 为光能在PSⅡ的近似分配系数; PSⅡ的调节性能量耗散Y(NPQ)(regulated energy dissipation)和非调节性能量耗散Y(NO)(nonregulated energy dissipation)分别通过公式 $Y(NPQ) = 1 - Y(Ⅱ) - 1/(NPQ + 1 + qL(F_m/F_0 - 1))$和$Y(NO) = 1/(NPQ + 1 + qL(F_m/F_0-1))$计算, 其中qL为光化学淬灭(coefficient of photochemical quenching).

样品的快速光响应, 同样通过 IMAGING-PAM Microscopy 调制脉冲荧光仪测定. 将经过光适应 5 min 的样品, 暴露在连续光强梯度(PAR 3, 26, 46, 65, 102, 146, 195, 259, 337, 418 和 497 μmol·m^{-2}·s^{-1})下, 每步 20 s, 测定相对电子传递速率 ETR.

(ⅳ) 光合放氧速率测定. 样品预处理: 取 0.06 g 新鲜(FW)样品于 20℃循环水浴(Thermo, CoolTech320)中温浴 15 min. 氧电极 Oxygraph (Hansatech)测定其光合放氧速率, 反应介质为 20℃消毒海水, 光照强度选择预实验测定的浒苔叶状体饱和光强 600 μmol·m^{-2}·s^{-1}. 光合速率表示为每单位鲜重藻体的放氧速率(nmolO_2·min^{-1}·g^{-1} FW). 以净光合放氧速率与呼吸耗氧速率之比获得 P/R 的值.

(ⅴ) 呼吸耗氧速率测定. 样品预处理: 取 0.06 g新鲜样品于20℃恒温水浴中温浴15 min, 暗适应20 min. 呼吸耗氧速率通过氧电极 Oxygraph (Hansatech)测定, 反应介质为20℃消毒海水. 呼吸速率表示为每单位鲜重藻体的耗氧速率(nmolO_2·min^{-1}·g^{-1} FW).

(ⅵ) 数据统计分析和作图. 实验数据通过 STATISTICA 7.0 软件进行统计分析, 统计图用绘图软件 SIGMA PLOT 9.0 绘制.

2 结果

2.1 色素吸收光谱

图 2 为浒苔样品提取色素的吸收光谱, 叶绿素 *a* 的最大吸收波长在 436 和 663 nm, 叶绿素 *b* 的最大吸收波长为 463 和 645 nm. 如图 2 所示, 奥帆 A 赛区南部水表(a)和团岛湾泥表(b)浒苔提取的色素样品具有相似的波形. 由此可见, 奥帆 A 赛区南部表层和团岛湾泥表浒苔具有相近的色素组成与比例. 然而在色素含量方面却截然不同: 奥帆 A 赛区南部水表漂浮浒苔的色素含量明显高于团岛湾泥表沉降浒苔. 经计算, 水表藻体叶绿素 a 和叶绿素 b 含量都明显比泥表藻体高, 然而叶绿素 a 与叶绿素 b 的含量比却非常接近(表 1).

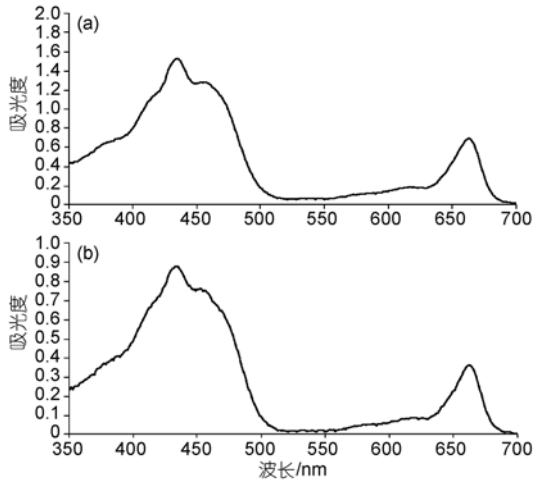


图 2 奥帆 A 赛区南部水表(a)和团岛湾泥表(b)浒苔藻体提取色素的吸收光谱扫描图(350~700 nm)

表 1 奥帆 A 赛区南部水表(A)和团岛湾泥表(B)浒苔藻体叶绿素 a 和叶绿素 b 的含量

	Chl a	Chl b	叶绿素总量	Chl a/Chl b
A	0.258 ± 0.052	0.151 ± 0.034	0.409 ± 0.082	1.73
B	0.208 ± 0.038	0.119 ± 0.025	0.326 ± 0.062	1.76

2.2 叶绿素荧光动力学参数

从浒苔藻体的光响应曲线(图 3)可以看出, 奥帆 A 赛区南部表层藻体的光响应曲线培养前后保持了比较稳定的状态, 除了光饱和点(418→337 μmol·m^{-2}·s^{-1})和 ETR 值(54.12→43.86)培养前和培养后相比略有下降外, 在培养前和培养后保持了比较稳定的水平; 而由图 3(a)可见团岛湾泥表藻体的光响应在培养前就表现得比较微弱, 在培养后则完全失去了光响应(图 3(b)).

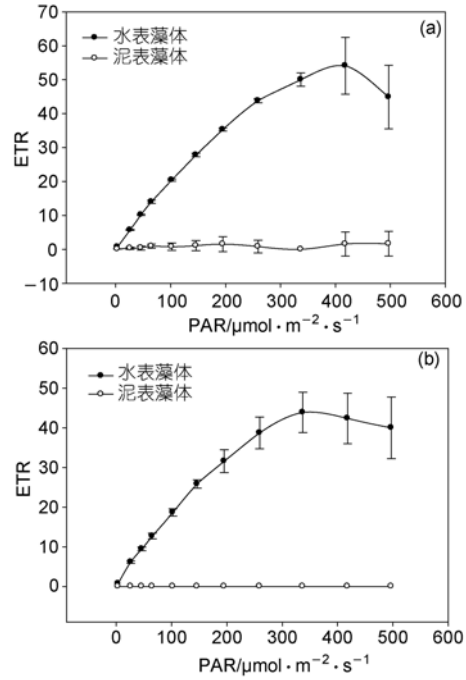


图 3 奥帆 A 赛区南部水表和岛湾泥表浒苔藻体的快速光响应曲线

(a) 采样后立即测量的结果; (b) 采样后于光照培养箱中培养 24 h 后的情况

从图 4(a)可以看出, 奥帆 A 赛区南部水表藻体的参数 F_v/F_m 值约为 0.6 (PSⅡ潜在最大量子产量), 比团岛湾泥表的藻体高出了 7 倍多, 奥帆 A 赛区南部水表藻体的参数 Y(Ⅱ)(PSⅡ的实际量子产量)更是比团岛湾泥表的藻体高出了 15 倍有余. 而从参数 Y(NPQ)(调节性能量耗散)和 Y(NO) (非调节性能量耗散)的值来看, 团岛湾泥表的藻体都比奥帆 A 赛区南部水表藻体高出了 1 倍. 培养 24 h 后可以看出, 对于奥帆 A 赛区南部水表的藻体来说, 参数 F_v/F_m 出现了明显的下降, 从 0.6 左右下降到了 0.5 左右; 参数 Y(Ⅱ)稍有下降, 而参数 Y(NPQ)和 Y(NO)都略有上升. 对于团岛湾泥表的藻体, 在培养 24 h 后参数 F_v/F_m, Y(Ⅱ)和 Y(NPQ)降至 0; 与此同时 Y(NO)上升到 1 (图 4(b)).

2.3 光合放氧和呼吸

从图 5(a)和 5(c)来看, A 赛区南部水表浒苔藻体的放氧速率、呼吸速率和 P/R 都显著高于团岛湾泥表藻体, 其中放氧速率高出约达 26.6 倍, 呼吸高出约 3.5 倍, *P*/*R* 高出约 5 倍; 从图 5 的比较中可以看出, 在培养 24 h 后团岛湾泥表藻体的放氧速率和 *P*/*R* 表现为负值, 呼吸速率明显升高; 而 A 赛区南部水表浒苔

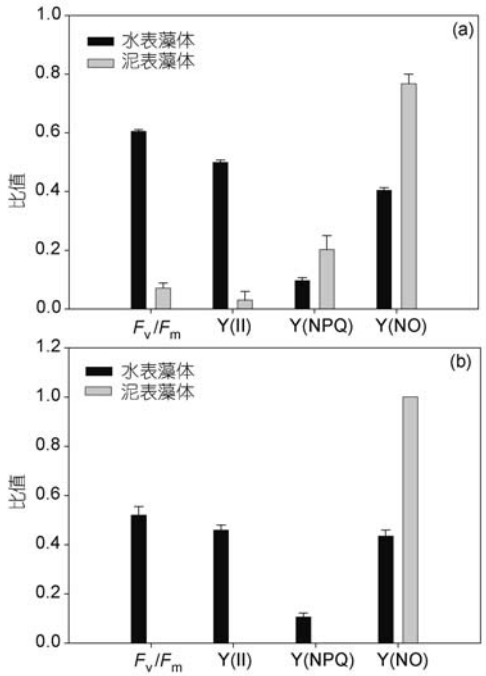


图 4　奥帆 A 赛区南部水表和团岛湾泥表浒苔藻体的荧光动力学参数的比较

(a) 采样后立即测量; (b) 采样后于光照培养箱中培养 24 h 后的情况

藻体的放氧速率和 *P*/*R* 仅稍有降低, 呼吸速率有略微升高.

3　讨论

截至 2008 年 7 月中旬, 青岛海域漂浮的浒苔藻体已大大减少, 绿潮得到了有效控制, 海域的自然环境得到了显著改善. 但是, 少量仍在水表漂浮的遗留藻体生存状态如何, 大量在海域里沉降累积的泥表藻体是否已经死亡, 漂浮的藻体能否再次快速增殖, 底泥上的沉降藻体能否重新漂浮增殖等等, 一系列的问题需要解决.

实地调查表明: 一方面, 该海域内一般情况下只能在水表和泥表找到浒苔藻体, 处于中间的藻体鲜有发现; 另一方面, 由于水表藻体具有随风飘移的特点, 加上沉降的藻体随着时间的推移会腐烂分解, 因此在水表有藻体的地方在一定时间内底泥表层不一定能采到藻体; 同样底泥有藻体的地方水表也不一定能采到水表藻体. 从而, 水表和泥表藻体难以对应, 即使能够对应, 对应的意义不大. 因此, 本研究采用了青岛海域浒苔藻体中光合活性较强的青岛奥帆基地 A 赛区南侧海域水表漂浮藻体和团岛湾海域的泥表沉降藻体作为研究对象, 来分别代表水表漂浮藻体和泥底沉降藻体.

叶绿素是植物最重要的光合色素. 因此光合作用情况的好坏与植物体中叶绿素的含量息息相关. 从而, 通过叶绿素荧光技术能够反映含叶绿素植物

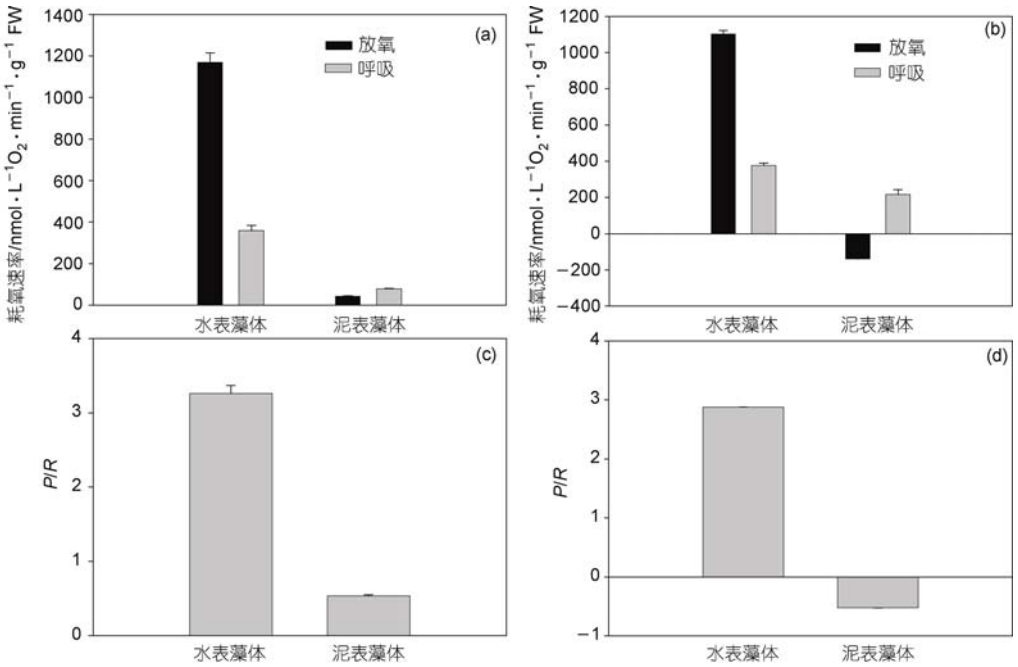


图 5　奥帆 A 赛区南部水表和团岛湾泥表浒苔藻体的放氧速率、呼吸速率和 *P*/*R* 的比较

(a)和(c)为采样后立即测量; (b)和(d)为采样后于光照培养箱中培养 24 h 后的情况

对光能的利用情况, 并且几乎所有光合作用过程的变化都可以通过研究叶绿素荧光反映出来[7]. 由于该技术具有迅速、灵敏、简便和不损伤植物体等特点, 近年来在海藻光合作用领域得到了广泛的应用[8~12]. 从浒苔样品提取色素的吸收光谱(图 2)和计算结果(表 1)来看, 沉降浒苔的色素组成没有发生太大变化, 然而色素含量却明显减少. 这可能是由于底层沉降浒苔缺少阳光从而影响了色素合成, 加上藻体已有一定程度的腐烂, 色素分解所致. 另一方面由于从水表沉降至泥表的时间较短, 色素含量和组成未能发生太大的变化. 这一点可以从采集的藻体已经完全变白和失去光合活性的其他底泥藻体样品中得到证实. 从藻体的光响应来看(图 3), 水表藻体表现出了比较正常的光响应, 而沉降至泥表的藻体则只表现出了微弱的光响应, 提示了在光合作用方面水表藻体要明显强于泥表藻体. 这一点可以从测定的A赛区南部水表和团岛湾泥表浒苔藻体的荧光动力学参数(图 4)中得到证实: 水表藻体PS II 潜在最大量子产量比泥表藻体高出了约 7 倍, PS II 的实际量子产量更是高出了约 15 倍; 而反映能量耗散的参数Y(NPQ)和Y(NO), 水表藻体的都明显低于泥表藻体. 因此水表藻体的光合作用显著地强于泥表藻体. 水表藻体放氧速率、呼吸速率和P/R都显著高于泥表藻体, 这也可进一步证实这一结论(图 5).

参数F_v/F_m表示PS II 的潜在最大量子产量, 即当所有PS II 反应均处于开放状态时的量子产量, 反映了植物的潜在最大光合能力, 是反应植物体生长状态的最重要的和最常用的参数. 通常认为绿藻的F_v/F_m介于 0.7~0.75 之间[10,12]. 从本研究的结果(图 4)来看, 水表藻体的F_v/F_m值约为 0.6, 明显低于正常藻体, 说明即使是仍在水表漂浮的藻体受威胁也很严重, 生存状态较差; 而底泥藻体F_v/F_m值只有约 0.07, 因此可以认为其基本失去了光合作用的能力. 氧电极的检测结果证实了这一点: 水表藻体的P/R值约 3.26, 显著低于绿藻的正常P/R值 4[13], 而底泥藻体P/R值只有约 0.53(图 5(c)). 进一步地, 光响应(图 3(b))、荧光动力学参数(图 4(b))、氧电极检测的光合放氧和呼吸的结果(图 5(b)和(d))都证实, 在模拟该海域自然环境的实验室培养的 24 h后底泥藻体光合活性未能有所恢复, 反而进一步恶化而失去光合活性. 这些结果表明, 虽然漂浮藻体光合活性较强, 但潜在光合活性明显低于正常值, 而泥表藻体的光合活性极弱, 提示截至 2008 年 7 月中旬该海域的漂浮浒苔藻体已受到了较严重的环境胁迫, 表明青岛海域自然环境已不适于浒苔的生长, 该海域浒苔生物量可能正处于下降之中; 而泥表藻体已经死亡或正处于死亡的边缘, 这种泥表藻体即使能够偶然随着上升流上升到水表, 从而重新获得适宜的光合作用条件, 也已不能恢复其光合活性, 因此可以初步认为泥表藻体已处于不可逆的藻体死亡进程之中, 从而不能够成为该海域内的浒苔新的浒苔种质来源. 然而, 由于沉降下来的藻体状态会随着在底层时间的延长而恶化, 另一方面, 由于客观条件的限制, 采集沉降藻体的批次是有限的, 而所取得的底泥藻体沉降下来的时间又难以判断, 因此泥表藻体上升到水表后究竟能不能重新成为浒苔的种质来源还需要进一步研究.

参考文献

1 Lin A P, Shen S D, Wang J W, et al. Reproduction diversity of *Enteromorpha prolifera*. J Integr Plant Biol, 2008, 50(5): 622—629[doi]
2 王晓坤, 马家海, 叶道才, 等. 浒苔(*Enteromorpha prolifera*)生活史的初步研究. 海洋通报, 2007, 26(5): 112—116
3 Blomster J, Bäck S, Fewer D P. Novel morphology in *Enteromorpha* (Ulvophyceae) forming green tides. Am J Bot, 2002, 89(11): 1756—1763[doi]
4 Fong P, Fong J J, Fong C R. Growth, nutrient storage, and release of dissolved organic nitrogen by *Enteromorpha intestinalis* in response to pulses of nitrogen and phosphorus. Aquat Bot, 2004, 78: 83—95[doi]
5 Ho Y B. Inorganic mineral nutrient level studies on *Potamogeton pectinatus* L. and *Enteromorpha prolifera* in Forfar Lock, scotland. Hydrobiologia, 1979, 62: 7—15
6 Arnon D I. Cooper enzymes in isolated chloroplast polyphenoloxidaese in *Beta vulgaris*. Plant Physiol, 1949, 24: 1—15[doi]
7 Schreiber U, Bilger W, Neubauer C. Chlorophyll fluorescence as a non-intrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: Schulze E D, Caldwell M M, eds. Ecophysiology of Photosynthesis, Ecological Studies. Berlin: Springer-Verlag, 1994. 49—70
8 Beer S, Ilan M. *In situ* measurements of photosynthetic irradiance responses of two Red Sea sponges growing under dim light conditions. Mar Biol, 1998, 131: 613—617[doi]
9 Bischof K, Hanelt D, Wiencke C. UV-radiation can affect depth-zonation of Antarctic macroalgae. Mar Biol, 1998, 131: 597-605[doi]
10 Longstaff B J, Kildea T, Runcie J W, et al. An *in situ* study of photosynthetic oxygen exchange and electron transport rate in the marine macroalga *Ulva lactuca* (Chlorophyta). Photosynth Res, 2002, 74: 281—293[doi]
11 陈莲花, 刘雷. 叶绿素荧光技术在藻类光合作用中的应用. 江西科学, 2007, 25(6): 788—806
12 Häder D P, Lebert M, Jiménez C. Pulse amplitude modulated fluorescence in the green macrophytes, *Codium adherens*, *Enteromorpha muscoides*, *Ulva gigantea* and *Ullva rigida*, from the Atlantic coast of Southern Spain. Environ Exp Bot, 1999, 41: 247—255[doi]
13 Melis A, Melnicki M R. Integrated biological hydrogen production. Int J Hydrogen Energ, 2006, 31: 1563—1573[doi]