

利用光合色素研究厦门海域超微型浮游植物群落结构

陈纪新¹, 黄邦钦¹, 贾锡伟¹, 洪华生¹, 谢廷贵²

(1. 厦门大学 环境科学研究中心, 海洋环境科学教育部重点实验室; 2. 厦门大学 电子工程系, 福建 厦门 361005)

摘要: 应用反相高效液相色谱(RP-HPLC)方法对厦门海域9个站位水样进行分析, 对色素数据进行换算, 结果表明在厦门海域超微型浮游植物优势类群是绿藻, 而总浮游植物优势类群是硅藻; 超微型浮游植物对总浮游植物生物量贡献为总生物量1.5%~11%, 超微型粒级细胞在一些类群中(绿藻、金藻)中占有很大比重。在超微型浮游类群组成中没有甲藻纲, 而蓝藻丰度也非常低。超微型浮游植物组成结构厦门港富营养化水域呈单优势类群结构, 在九龙江河口区域受冲淡水与陆源成分影响, 结构较为复杂。

关键词: 特征色素; 超微型浮游植物; 群落结构; 厦门海域

中图分类号: X17; Q145 文献标识码: A 文章编号: 1007-6336(2003)03-0016-06

Community structure of marine ultraphytoplankton in Xiamen waters using photosynthetic pigments

CHEN Ji-xin¹, HUANG Bang-qin¹, JIA Xi-wei¹, HONG Hua-sheng¹, XIE Ting-gui²

(1. Environmental Science Research Center, Marine Environmental Laboratory of Ministry of Education, Xiamen University;

2. Department of Electric Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Photosynthetic pigments were measured by RP-HPLC in seawater samples of Xiamen in winter (December, 2002), and the diagnostic pigment data were converted into chlorophyll a biomass to assess the community structure both in total and ultra-size phytoplankton. The result showed that chlorophyte was dominant group in ultra-phytoplankton community, while diatoms was prevailed in total phytoplankton community. The biomass of ultra-phytoplankton only occupied about 1.5% to 11% biomass of all phytoplankton (indicated by Chlorophyll a), however, the ultra-size phytoplankton contributed a large proportion of biomass in chlorophyte and prymnesiophyceae. Both dinophyceae and cyanobacteria were not detected in ultraphytoplankton community. Community structure of ultraphytoplankton was simple in eutrophic aquacultural waters, while complicated in Jiulong River estuary.

Key words: diagnostic pigments; ultraphytoplankton; community structure; Xiamen waters

目前对超微型浮游植物的研究主要集中于大洋海域^[1], 对近海与海湾水体的研究很少。厦门海域具有典型的亚热带海湾的特点, 是研究陆海交界区域海洋生物群落良好的研究对象。由于超微型浮游植物个体小, 形态学特征不明显, 传统的基于形态学的研究方法如光学显微技术, 荧光显微技术^[2]等均受到限制。近年发展于研究海洋微型浮游生物群落

的技术包括分子生物学技术与光合色素分析技术。由于不同种类的浮游植物具有不同的特征性光合色素, 以这些特征光合色素为标记物, 可以分析海水中浮游植物组成, 提供较高分类学水平上群落结构信息^[3]。反相高效液相色谱是应用于分析浮游植物色素组成的常用方法, 其可以快速、有效、方便地对色素进行定性定量分析^[4]。

收稿日期: 2003-01-27, 修改稿收到日期: 2003-04-14

基金项目: 国家自然科学基金(40276039; 40076031)

作者简介: 陈纪新(1978), 男, 福建平潭县人, 博士研究生, 主要从事海洋生态学和分子生态学研究。

本文利用反相高效液相色谱对厦门海域12月份超微型浮游植物色素组成进行分析,研究了其在厦门海域的分布特点。

1 材料与方法

1.1 藻种及其培养

选用12种单种纯培养藻种作为参考藻种进行色素光谱定性,标准色素制备实验。培养纯藻种分属于不同的纲:硅藻纲(Bacillariophyceae):三角褐指藻(*Phaeodactylum tricoratum*)、威氏海链藻(*Thalassiosira*)、角毛藻(*Chaetoceros* sp.);甲藻纲(Dinophyceae):具齿原甲藻(*Prorocentrum trietinum*)、亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*);定鞭金藻纲(Prymnesiophyceae):赫氏球石藻(*Emiliana. Huxleyi*)、湛江叉鞭金藻(*Dicrateria zhanjiangensis*)、*Isocrypsis galbana*、棕囊藻(*Phaeocystis* sp.);绿藻(*chlorophyceae*):小球藻(*Chlorella* sp.)、盐生杜氏藻(*Dunaliella salina*);蓝藻纲(Cyanophyceae):聚球藻 *synechococcus* sp. (CCMP1379)。

培养采用 f/2 培养基,温度 21℃,光照强度 6 000 lx,光周期 12:12; *synechococcus* sp. 培养光强不宜超过 500 lx。

1.2 海水样品的采集与处理

2002年12月在厦门海域,包括了西面海港以及东面开放海域,进行现场样品采集。站位如图1(包括17、19、21、24、26、27、29、30、31共九个站点)。用2.5 L的有机玻璃采水器采集海水,取2 L海水过滤,先用5 μm孔径 Isopore 滤膜进行预过滤,再将样品收集于0.2 μm孔径混合纤维酯滤膜上,滤膜折叠后置于PE培养皿中,于-22℃速冻保存。

1.3 样品预处理

将滤膜剪碎,用3 mL乙醇萃取,超声波处理5~10 min,于-22℃暗置12~24 h,其间至少摇晃一次。萃取液在-4℃下675 g离心10 min,上清液再用PTFE滤膜(0.45 μm)或GF/F滤膜过滤。整个过程均在低光照强

度、低温度条件下进行,以减少色素的降解。

1.4 HPLC 分析

分析系统为 Agilent 1100 Series 液相色谱工作站。通过二极管阵列检测器 DAD 来检测洗出峰。色谱柱为 Eclipse XDB C8 柱(Agilent, Germany)。流动相 A 为甲醇:1 mol/L 醋酸铵缓冲液=80:20,流动相 B 为甲醇。梯度洗脱程序:22 min 内流动相 B 由初始 5% 上升至 95%,保持 95% B 7 min,2 min 内返回初始条件。

1.5 色素的定性定量

根据色素洗出峰的保留时间(t_R)和扫描图谱(350~700 nm),参照文献^[5,6]所提供的色素扫描图谱来进行定性。用外标法进行定量。色素标准样品叶绿素 a (CHLA)、β胡萝卜素(BCAR)、叶黄素(LUT)购自 Sigma-Aldrich 公司。其他色素标准样品由本实验室从纯培养藻种提取液经 HPLC 分离制备得到,应用分光光度法定量。

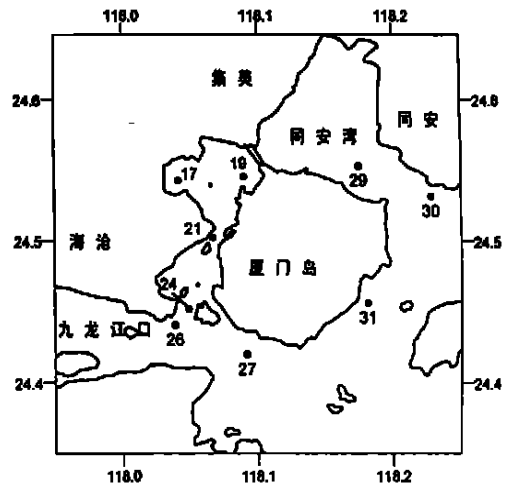


图1 2002年12月厦门海域采样测站设置

Fig. 1 Sampling sites of Xiamen Waters in December, 2002

2 结果与讨论

2.1 纯培养藻种色素的分离与鉴定

通过该系统有效分离鉴定20种色素,如

表1所示。

由于商业化色素标准产品目前种类仍较少,价格昂贵,而且缺乏购买途径。这在很大程度上限制了高效液相色谱在海洋浮游植物研究中的应用。本实验室通过分离纯培养藻类提取物来制备少量可用于HPLC定量的光合色素。

在主要的特征色素中,我们没有分离到19'-丁酰基氧化岩藻黄素(19'-butanoyloxy-fucoxanthin)、青绿素(Prasincoxanthin)以及二乙烯叶绿素a、b。虽然有文献表明 *Isocrypsis galbana*^[4] 与 *Pheocytis* sp.^[7] 中可以分离到19'-丁酰基氧化岩藻黄素,但我们

表1 经HPLC方法分离鉴定的光合色素

Tab. 1 Pigments separated and identified by HPLC method

峰号	保留时间/min	色素中文名称	英文名称	缩写*	最大吸收波长/(nm)**
1	3.63	叶绿素 c3	chlorophyll c3	CHL C3	458, 590
2	4.12	叶绿素酸酯 a	chlorophyllide a	CHLIDE A	434, 622, 670
3	4.75	叶绿素 c1	chlorophyll c1	CHL C2	450, 586, 634
4	5.86	多甲藻素	peridinin	PERID	476
5	8.08	岩藻黄素	fucoxanthin	FUCO	454
6	9.48	19'-己酰基氧化岩藻黄素	19'-hexanoyloxyfucoxanthin	HEX-FUCO	450, 470
7	9.68	新黄素	neoxanthin	NEO	416, 438, 466
8	10.21	堇菜色素	violaxanthin	VIOLA	420, 442, 470
9	11.38	硅甲藻黄素	diadinoxanthin	DIADINO	448, 476
10	12.05	甲藻黄素	dinoxanthin	DINO	416, 440, 470
11	13.32	别藻黄素	alloxanthin	ALLO	452, 480
12	13.83	硅藻黄素	diatoxanthin	DIATO	446, 470
13	14.85	玉米黄素	zeaxanthin	ZEA	480, 454
14	15.03	叶黄素	lut ein	LUT	446, 474
15	19.80	叶绿素 b 同系物	chlorophyll b allomer1	CHL B ALLOM	468, 602, 652
16	20.63	叶绿素 b	chlorophyll b	CHL B	468, 602, 652
17	22.34	叶绿素 a 同系物	chlorophyll a allomer1	CHL A ALLOM1	436, 620, 666
18	23.11	叶绿素 a	chlorophyll a	CHL A	432, 620, 666
19	23.62	叶绿素 a 同系物	chlorophyll a allomer2	CHL A ALLOM2	434, 622, 666
20	27.11	β 胡萝卜素	β- carotene	β- CAR	452, 476

* 参照 Jeffrey S W (1997)^[10]

** 根据二极管阵列检测器(DAD)的吸光光谱检测

对这两种藻类不同生长时期提取色素分析结果均没有发现19'-丁酰基氧化岩藻黄素的特征流出峰。Laurie V. H. 在2001年发表的一篇文章中对 *Isocrypsis* sp. 的分析结果也没有检测出19'-丁酰基氧化岩藻黄素^[5]。本实验室纯培养的单细胞藻中缺乏具有青绿素(Prasincoxanthin)与二乙烯叶绿素a、b色素的种类。王海黎^[4]对台湾海峡光合色素组成分析中未发现青绿素的检出。二乙烯叶绿素a、b是原绿藻(*Prochlorophyte*)所特有的色素,现在已经知道在热带与亚热带海域中原绿藻是初级生产力的重要贡献者。国内焦念志等^[8]利用流式细胞仪发现在中国海域也存在

大量原绿球藻(*Prochlorococcus*)分布;王海黎^[9]对HPLC分析结果进行分析,认为在台湾海峡存在大量的原绿藻。但在河口海域(如厦门海域)目前尚未有原绿藻的报道。因此,我们没有对这三种色素以及它们所代表的类群进行统计。

本实验所采用的高效液相色谱分离方法对绝大部分色素有较好的分离效果,但对叶绿素c1/叶绿素c2、β、β-胡萝卜素/β、ε胡萝卜素较差,而在定量上没有区分开。在较高浓度时玉米黄素(Zeaxanthin)与叶黄素(Lutein)两个峰分离效果也不佳($R < 1$)。

2.2 厦门海域样品分析

2.2.1 超微型浮游群落主要光合特征色素含量及群落组成分析

P 经 HPLC 法分离测定, 厦门海域超微型浮游植物主要叶绿素类光合色素为叶绿素 a, b, c1+ c2, 未检出叶绿素 c3。各个站点普遍检测出的特征性色素为岩藻黄素(fucoxanthin), 硅甲藻黄素(diadinoxanthin) 和别藻黄素(alloxanthin), 部分站点检测出玉米黄素(zeaxanthin)、叶黄素(lutein) 和 19'-己酰基氧化岩藻黄素(19'-hexanoyloxyfucoxanthin)。在所有的站点中, 均无多甲藻素(peridinin) 的检出。对西海域总浮游植物 HPLC 分析检出多甲藻素。各特征类胡萝卜素与叶绿素 a、胡萝卜海水中含量如表 2 所示。

部分站点检测出玉米黄素(zeaxanthin)、叶黄素(lutein) 和 19'-己酰基氧化岩藻黄素(19'-hexanoyloxyfucoxanthin)。在所有的站点中, 均无多甲藻素(peridinin) 的检出。对西海域总浮游植物 HPLC 分析检出多甲藻素。各特征类胡萝卜素与叶绿素 a、胡萝卜海水中含量如表 2 所示。

表 2 各站主要特征类胡萝卜素、叶绿素、胡萝卜素含量(μg/m³)

Tab. 2 Concentration of chlorophyll, carotene and diagnostic carotenoids in sampling sites

站位	PERI	DIATO	ZEAX	LUT	FUCO	19HEX	DIADIN	ALLO	CHLB	CAR	CHLA_ALL
17	0.000	0.000	1.583	0.000	7.500	1.905	3.495	12.300	91.500	34.125	264.150
19	0.000	0.000	0.000	0.000	10.125	0.000	3.638	3.323	32.550	15.300	130.950
21	0.000	0.000	0.000	0.000	15.000	0.000	7.073	5.445	27.975	187.500	171.750
24	0.000	0.000	0.000	0.000	4.095	0.965	3.495	1.658	6.263	10.275	76.275
26	0.000	0.000	0.000	8.475	4.958	5.663	4.350	8.475	22.950	32.925	302.250
27	0.000	0.000	3.908	0.000	6.735	0.000	3.563	10.050	64.800	35.700	300.000
29	0.000	0.000	5.865	0.000	7.178	1.920	2.985	14.700	112.500	48.900	404.850
30	0.000	0.000	3.713	0.000	5.955	0.000	2.520	5.250	49.875	23.475	212.400
31	0.000	0.000	4.440	0.000	12.150	2.498	4.080	26.100	147.750	63.300	655.050

参照 Letelier 等^[11] 所给出的色素换算公式(表 3), 我们可以对浮游植物类群结构进行

定量(表 4)。从推算结果来看, 绿藻门在超微型浮游植

表 3 不同藻类对生物量(叶绿素 a) 贡献的色素换算公式(Letelier 等, 1993)^[11]

Tab. 3 Contribution of different phytoplanktons to biomass(chlorophyll a)

浮游植物类群	公 式
硅藻纲(Bacillariophyceae)	$[CHL A]_{luci} = 1.9\{ [FUCO] - (0.03 [HEX - FUC] + 1.2 [BUT - FUC]) \}$
定鞭金藻纲(Prymnesiophyceae)	$[CHL A]_{prym} = 0.9 [HEX - FUC]$
绿藻门* (Chlorophyta)	$[CHL A]_{chloro} = 2.4 [CHL B]$
甲藻纲(Dinophyceae)	$[CHL A]_{dino} = 1.4 [PERI]$
隐藻纲(Chryptophyceae)	$[CHL A]_{chryto} = 4.2 [ALLO]$
蓝藻纲(Cyanophyceae)	$[CHL A]_{cyan} = 2.1\{ [ZEA] - 0.07 [CHL B] \}$
其他藻类	$[CHL A]_{others} = [CHL A]_{all} - [CHL A]_{(luci+ prym+ chloro+ dino+ chryto+ cyan)}$

* 包括绿藻纲(Chlomphyceae) 与青绿藻纲(Prasiophyceae)。

表 4 公式推算得到主要超微型浮游植物类群的生物量(叶绿素 a, μg/m³)

Tab. 4 Biomass(chlorophyll a) of different ultraphytoplankton by calculation

站位	硅藻	定鞭毛藻	绿藻	甲藻	隐藻	蓝藻	其他	总生物量
17	14.141	1.714	219.600	0.000	51.660	0.000	0.000	264.150
19	19.237	0.000	78.120	0.000	13.954	0.000	19.638	130.950
21	28.500	0.000	67.140	0.000	22.869	0.000	53.241	171.750
24	7.725	0.868	15.030	0.000	6.961	0.000	45.689	76.275
26	9.096	5.096	55.080	0.000	35.595	0.000	197.382	302.250
27	12.796	0.000	155.520	0.000	42.210	0.000	89.474	300.000
29	13.528	1.728	270.000	0.000	61.740	0.000	57.854	404.850
30	11.314	0.000	119.700	0.000	22.050	0.464	58.871	212.400
31	22.943	2.247	354.600	0.000	109.620	0.000	165.640	655.050

物结构中含量最多(占总生物量 18.2% ~ 83.1%),其次是隐藻与硅藻,分别占总生物量 9.1% ~ 19.6% 和 3.0% ~ 35.0%,定鞭金藻的贡献较小,占总生物量 0.0% ~ 1.14%,蓝藻仅在 30 号站位显阳性检出,在总生物量中起 0.22% 的贡献。而甲藻在超微型浮游植物中未检出。

2.2.2 厦门港超微型浮游植物群落结构的空
间变化

9 个站点超微型浮游植物主要类群组成
结构所图 2 所示。

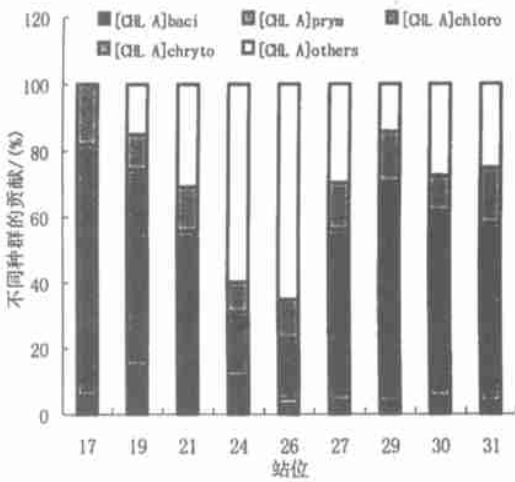


图 2 2002 年 12 月厦门海域各测站超微型
浮游植物群落结构

Fig. 2 Ultraphytoplankton community structure
of sampling sites in Xiamen Waters in December, 2002

表 5 2002 年 12 月厦门港西海域主要浮游植物类群的生物量(叶绿素 a, $\mu\text{g}/\text{m}^3$)

Tab. 5 Biomass(Chlorophyll a) of major phytoplankton of Xiamen Sea in December, 2002

站位	硅藻	定鞭毛藻	绿藻	甲藻	隐藻	蓝藻	其他	总生物量
17	10 941.606	37.800	1 807.200	129.570	1 430.100	0.000	3 293.724	17 640.000
19	1 020.300	0.000	486.000	20.622	475.020	0.000	744.558	2 765.500
21	566.893	4.063	612.000	350.700	1 052.100	0.000	568.744	3 154.500
24	438.646	4.009	432.000	50.400	292.950	0.000	390.444	1 608.450
26	529.855	3.861	558.000	179.130	648.900	0.000	627.254	2 547.000

综合来看,超微型浮游植物的类群组成与
总浮游植物群落组成差异较大,在超微型植物
类群中,以绿藻为优势种群,在全部采样测站
都是生物量的最主要贡献者。另外隐藻在厦

在图中可知,除了站位 24 与 26 以外,其
他几个站位都具有类似的群落结构。以绿藻
为优势种群。而 24 号与 26 号站位超微浮游
植物种群结构基本一致。处于厦门东海域的
4 个站点 27、29、30、31 也具有相似的种群结
构。从 17 号站位至 24 号(26 号)站位,绿藻
在群落中的优势度逐渐降低。由于从 17 号至
26 号站位是沿西海港分布,其中 24 号与 26
号站位最靠近九龙江入海口,可以认为绿藻优
势度的下降与九龙江冲淡水相关。

超微型浮游植物总生物量空间分布,西海
域 5 个站点平均叶绿素 a 浓度为 189.08
 $\mu\text{g}/\text{m}^3$,而东海域的平均叶绿素 a 浓度达到
 $393.08 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 。从空间分布特点来看,河口区
域由于九龙江的冲淡水的影响,群落结构复
杂。站位 17 与站位 29 分别位于富营养化养
殖水体区域杏林湾与同安湾,其生物群落结
构的多样性降低,群落为呈单优势类群结构。

2.2.3 厦门西海域全粒级谱浮游植物群落结
构

用 HPLC 分析了厦门西海域 5 个站位的
水样(粒级 0.2 μm 以上)。换算结果见表 5。

硅藻是生物量最主要的贡献者,为
18.0% ~ 62.0%;其次是绿藻与隐藻,分别为
10.2% ~ 26.9% 和 8.1% ~ 33%;而甲藻占了
总生物量 0.70% ~ 11.1%;定鞭金藻贡献很
小,占 0% ~ 0.025%。

门海域超微型生物量与总浮游植物生物量中
均占有较大的比重,这是以往文献中尚未发现
的。在超微型浮游植物类群中没有甲藻类群,
甚至蓝藻在海水中丰度也非常低,而黄邦钦等

1997年10月与1999年4月应用荧光显微镜计数, 结果表明蓝藻在厦门海域超微型浮游群落中具有较高比例(细胞数量比)^[2]。厦门海域总浮游植物群落以硅藻为主要优势种, 这与以往光学显微技术研究的结果相同。彭兴跃等1999年对厦门西海域海水样品HPLC分析表明金藻与硅藻是主要的优势类群, 甲藻也有一定贡献^[3]。而本实验对同一水域(24号站位)的分析并没有发现大量的金藻类群。

从超微型浮游植物对总浮游植物生物量的贡献来看, 总体来说, 在近岸海域超微型浮游植物的生态比重还较小(1.5%~11.5%), 但是各个类群的贡献来看, 绿藻、金藻、蓝藻等类群中超微型部分均占了本类群中很大一部分生物量, 金藻中超微型粒级比例甚至可以达到100%(26号站位)。

超型浮游植物对富营养化环境的应答与总浮游植物应答并不相同, 从5个测站超微型浮游植物生物量与总生物量的比值来看, 不同站点超微型粒级贡献并不相同, 而且差异很大。在17号站点是总生物量最大的位点, 其叶绿素a较其他站位高出5~15倍。但超微型浮游植物丰度没有发生很大的变化。生物量高的水域, 单种的优势度往往最高, 而其群落的多样性却降低。在17号站点, 总生物量中, 优势类群硅藻所占有的比重是所有站点中最高; 而在超微型粒级的生物量中, 优势类群绿藻同样也是所有站点中优势度最高的。

3 结 论

综上所述, 在高效液相色谱技术结合DAD检测器分析的基础上, 我们首次对厦门海域超微型浮游植物生物群落的光合色素组成和类群组成进行研究。利用这种方法我们分析与鉴定出20种光合色素, 并分析了2002年12月厦门海域6种类群的超微型浮游植物空间分布与生物量贡献。结果表明超微型浮

游植物对总生物量贡献达到1.5%~11.5%; 而超微型浮游植物群落的多样性程度与九龙江口冲淡水与近岸水富营养状况有关联。今后工作中拟结合营养盐与盐度数据开展厦门海域超微型浮游植物群落季度动态研究。

参考文献:

- [1] MACHEY D J, BLANCHOT J, HIGGINS H W, *et al.* Phytoplankton abundances and community structure in the equatorial Pacific [J]. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 2002, 49: 256-2582.
- [2] 黄邦钦, 林学举. 厦门西侧海域超微型浮游植物的时空分布及其调控机制[J]. *台湾海峡*, 2000, 19(3): 329-336.
- [3] 彭兴跃, 洪海征, 黄明, 等. 厦门港海水光合色素特征[J]. *台湾海峡*, 2001, 21(1): 79-84.
- [4] 王海黎, 洪华生, 徐立. 反相高效液相色谱法分离、测定海洋浮游植物的叶绿素和类胡萝卜素[J]. *海洋科学*, 1999, 124(4): 6-9.
- [5] LAURIE V H, CRYSTAL S T. Computer-assisted high-performance liquid chromatography method development with applications to the isolation and analysis of phytoplankton pigments [J]. *Journal of Chromatography*, 2001, 910: 31-49.
- [6] JOANNA S. Qualitative and quantitative analysis of Baltic phytoplankton pigments [J]. *Oceanologia*, 2000, 42(4): 449-471.
- [7] JEFFREY S W, JAN M A. *Emiliania Huxley* (Haptophyta) holds promising insights for photosynthesis [J]. *Journal of Phycology*, 2000, 36: 449-452.
- [8] 焦念志, 杨燕辉. 中国海原绿球藻研究[J]. *科学通报*, 2002, 47(7): 485-491.
- [9] 王海黎, 洪华生. 近岸海域光合色素的生物标记作用研究[J]. *海洋学报*, 2000, 22(3): 94-100.
- [10] JEFFREY S W, MANTOURA R F C, WRIGHT S W. *Phytoplankton pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Methods* [M]. Paris: UNESCO, 1997. 207.
- [11] LETELIER R M, BIDIGARE R R, HEBEL D V, *et al.* Temporal variability of phytoplankton community structure based on pigment analysis [J]. *Limnology and Oceanography*, 1993, 38(7): 1420-1437.