

应用光合色素标记物研究 2001 年 2~6 月 厦门西海域浮游植物群落结构

何学佳¹, 高亚辉², 彭兴跃²

(1. 暨南大学赤潮与水环境研究中心, 广东 广州 510632;

2 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005)

摘要:利用反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 对厦门西海域 2001 年 2~6 月的浮游植物色素进行了测定, 并首次运用 CHEMTAX 软件对该海域进行了浮游植物群落组成的分析, 同时分析了环境因子对群落组成的作用. 我们首先改进了 RP-HPLC 分离方案, 分离的时间缩短了近 1/3, 达到了提高分离效率的目的. 利用改进后的 RP-HPLC 方案进行色素分析显示, 厦门西海域 2001 年 2~6 月期间, 主要的特征色素是岩藻黄素 (fucoxanthin)、19'-丁酰基氧化岩藻黄素 (19'-butanoyloxyfucoxanthin)、19'-己酰基氧化岩藻黄素 (19'-hexanoyloxyfucoxanthin) 和多甲藻素 (peridinin), 月平均含量分别在 267.824~655.076、20.118~126.764、65.693~214.115、26.955~203.927 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 的范围变动. CHEMTAX 计算的结果进一步表明: 硅藻是主要优势类群, 其次是定鞭金藻和甲藻, 分别占总生物量的 36.14%~79.27%、4.50%~37.40% 和 4.83%~21.37%. 总生物量从 2 月到 6 月呈增长趋势, 温度是主要的决定因子. 硅藻和定鞭金藻所占生物量的份额呈相反趋势变化, 表明种间竞争也是重要的因素之一.

关键词:海洋生物学; 特征色素; 浮游植物群落结构; 厦门西海域

DOI 10.3969/J. ISSN.1000-8160.2010.02.012

中图分类号: P 735

文献标识码: A

文章编号: 1000-8160(2010)02-0228-06

特征的叶绿素、类胡萝卜素, 可以单独地, 或以色素对组合的形式, 作为浮游植物进行化学分类的指示物, 化学分类方式一般达到纲的分类水平^[1]. 类胡萝卜素化学性质稳定, 而且即使生物死亡, 作为标记的色素的特征依然在一定程度上保留. 因此, 利用色素来标记浮游植物可以为海区浮游植物群落结构提供准确的信息. 分离色素常用反相高效液相色谱 (RP-HPLC), 在此基础上, 结合二极管阵列检测器, 色素的定性和定量可以更加准确和高效, 特别适合海区的浮游植物调查. 长久以来, 研究者们尝试了用各种方法 (线性回归分析、多线性分析和矩阵因子分析) 来分析 HPLC 测得的色素浓度数据, 定量地估算不同浮游植物类群的数量. 一套好的计算方法可以使运用 HPLC 色素数据进行藻类鉴定快速而且半自动化, 其快捷的速度会有利于增进浮游植物的丰度和分布的调查的广泛程度, 是细胞计数和流式细胞术无法比拟的. CHEMTAX 正是在矩阵因子分析法基础上开发的一种计算软件, 可以简便地计算浮游植物类群对生物量的贡献, 该软件已得到广泛的应用^[2]. 厦门西海域的生物资源较为丰富, 部分受到河流冲淡水的影响, 水体中营养盐丰富, 常爆发赤潮, 因此对该海域的浮游植物种群构成和数量的调查对赤潮监测有重要意义. 已有学者就厦门西海域的浮游植物生态展开调查研究, 然而, 还没有工作应用 CHEMTAX 对 HPLC 色素数据分析对该海域的浮游植物群落进行较为长期的调查. 本文将利用色素对浮游植物的标记这一原理, 首次对厦门西海域 2001 年 2~6 月的色素进行 CHEMTAX 算法分析, 来阐明该海域浮游植物群落的时间和数量分布特征.

收稿日期: 2009-06-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (49806004); 暨南大学博士启动基金资助项目 (51208049); 广东省自然科学基金资助项目 (9451063201002243)

作者简介: 何学佳 (1978~), 女, 助理研究员, 博士研究生; E-mail: hexuejia@hotmail.com

通讯作者: 彭兴跃 (1966~), 男, 副教授; E-mail: xypeng@xmu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 藻种及培养

为帮助色素的定性研究,选取厦门大学生命科学学院硅藻实验室保存的 7种微藻作为参考藻种进行单种纯培养,它们分属于 4个纲:硅藻纲 (Bacillariophyceae):威氏海链藻 (*Thalassiosira weissfloyi*);定鞭金藻纲 (Prymnesiophyceae):湛江叉鞭金藻 (*Isochrysis galbana*);绿藻纲 (Chlorophyceae):杜氏藻 (*Dunaliella* sp.),自养小球藻 (*Chlorella autotopica*),扁藻 (*Platymonas* sp.);蓝藻纲 (Cyanophyceae):螺旋藻 (*Spinalina* sp.),聚球藻 (*Synechococcus* sp.).

藻种的培养是以 f/2培养基为基底,在 20℃ 下培养,光照强度 12 000 lx,光周期 12 L/12 D;定时摇晃培养瓶.

1.2 色素样品的收集

藻生长进入指数生长期后收获,量取一定体积的藻液,抽气负压 ($P < 266\text{hPa}$)过滤于玻璃纤维滤膜上 (Whatman GF/C, $\phi = 47\text{mm}$, Cat No. 1825047). 过滤前滴入约 1cm^3 碳酸镁悬浮液,过滤后将滤膜折叠,置于自制铝箔袋中,冰冻保存.

1.3 色素样品的现场采集

2001年 2~6月在鼓浪屿观潮站 (图 1)以每 3d采一次样的方式进行连续观测采样.用 5dm^3 有机玻璃采水器采集各标准层海水 1.6dm^3 ,先通过 $130\mu\text{m}$ 筛绢去除浮游动物,之后过滤和保存与纯种藻细胞的操作相同.

1.4 样品的预处理

先将滤膜剪切成几毫米宽的长条,放入 5cm^3 具塞刻度试管中,加内标 $\text{-Apo-8' carotenol (trans)}$ (Sigma-Aldrich, USA),加入 5cm^3 丙酮,超声 3~5min,于暗处低温 (-20°C)萃取 24h. 滤液用玻璃纤维滤膜 (Whatman GF/C, $\phi = 24\text{mm}$)抽滤 ($P < 266\text{hPa}$)后,用氮气吹至一定体积 (一般不多于 2.0cm^3)后分析. 整个操作过程应在尽量低的光照强度下进行,以最大限度地减少色素的光降解.

1.5 HPLC分析

所用的 HPLC系统为 Agilent HP1100 Series,用 Hewlett Packard 反相柱来分离色素,以光电二极管阵列分光光度计 (DAD)在 440nm 检测洗出峰并记录 300~750nm 光谱.

两种流动相的组成分别是:流动相 A:甲醇 0.5mol/dm^3 醋酸铵缓冲液 丙酮 = 65/20/15 (V/V, pH 值为 7.2);流动相 B:甲醇 丙酮 = 60/40 (V/V). 梯度洗脱的程序是:在 16min 以内,由流动相 A 按线性梯度变化过渡到流动相 B,并继续保持 8min,回到初始条件.

1.6 色素的定性与定量

色素的定性是依据色素谱图上洗出峰的保留时间及 DAD 检测所得的特征色素扫描图谱对比本实验参考藻种的谱图和相关文献所提供的谱图进行定性. 用内标法进行色素的定量.

1.7 浮游植物类群生物量的计算

我们使用 CHEMTAX 程序因子分析方法 (CHEMTAX 1.95)对特征色素进行分析,分析的浮游植物类群包括了甲藻纲 (Dinophyceae),硅藻纲 (Bacillariophyceae),定鞭金藻纲 (Prymnesiophyceae),绿藻纲 (Chlorophyta)和蓝藻纲 (Cyanophyceae). 特征光合色素与叶绿素比值初始值主要参考了王海黎 (1999)^[3]和 Mackey (1996)^[2]等的方案.

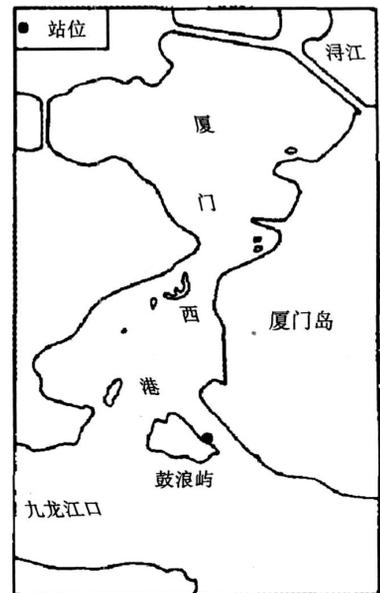


图 1 采样站点

Fig.1 Sampling Stations

2 结果与讨论

2.1 实验方案对纯藻种色素的分离

本方案有效分离的色素为 18 种 [包括内标 - β -Apo-8'-carotenol(trans)] (表 1). 其中除了主要藻群的特征色素外,还包括了顺式岩藻黄素(cis-fucoxanthin)、叶绿素 *a* 的异质同晶体和差向异构体. 该方案能否分离到叶绿素的降解产物、脱植基叶绿素 *a* (chlorophyllide *a*)、脱植基叶绿素 *b* (chlorophyllide *b*) 还无法确定,对于青绿藻(Prasinophyceae)和隐藻(Cryptophyceae)的两个纲的特征色素青绿素(prasinoxanthin)和别藻黄素(alloxanthin),由于无法培养这两种纯种藻,所以还不能确定.

由于目前用于色素分析的市售的色素标准太少,纯种藻培养以获得多种特征色素成为普遍的方法,较之薄层色谱(TLC)或者高效薄层色谱(HPTLC)从对色素的提取、分离和纯化,直接利用二极管阵列检测器对 HPLC 分离的纯种藻的洗脱峰来进行色素的定性,提高了色素定性的效率,高效而且准确,即使在流动相稍有差别的情况下,特征色素的吸收光谱仍具有极高的可比性. 本实验结果还表明,对于色素的分离鉴定还可以在更短的时间里面完成. 本实验的 HPLC 分离方案是在王海黎(1999)^[3]和 Nelson(1993)方案^[4]的基础上改进确定的,流动相 A 不同,同时分离时间也缩短了 1/3 (从 36min 降到 24min),而结果表明可有效分离的色素仍然是 18 种,因此基本达到了在原方案的基础上提高分离速度的目的,这对于大量样品的测量效率更高一些. 同时,我们运用了藻细胞处理前加内标的方法,使色素定量更为准确,消除了全过程可能产生的损失而造成的实验结果的偏差.

表 1 HPLC 分离鉴定的色素种类及 DAD 检测吸光光谱特征

Tab 1 Pigments separated and identified using HPLC with characteristics measured using DAD

峰号	色素英文名称	保留时间 /min	中文名称	最大吸收波长 / nm	缩写
1	chlorophyll C_1+C_2	4.40	叶绿素 C_1+C_2	445, 440, 469	CHL C_1+C_2
2	peridine	6.30	多甲藻素	445, 468	PER D
3	19'-butanoyloxyfucoxanthin	6.76	19'-丁酰基氧化岩藻黄素	444, 467	BUT-FUCO
4	fucoxanthin	7.28	岩藻黄素	452, 468	FUCO
5	neoxanthin	8.00	新叶黄素	417, 440, 469	NEO
6	violaxanthin	8.25	紫黄素	418, 441, 470	V DLA
7	19'-hexanoyloxyfucoxanthin	9.15	19'-己酰基氧化岩藻黄素	446, 476	HEX-FUCO
8	cis-fucoxanthin	9.50	cis-岩藻黄素	446, 476	cis-FUCO
9	diadinoxanthin	9.94	硅甲藻黄素	447, 465	D IAD NO
10	alloxanthin	10.21	别藻黄素	420, 446, 473	ALLO
11	diatoxanthin	11.00	硅藻黄素	420, 442, 470	D IAT O
12	zeaxanthin	11.20	玉米黄素	452, 479	ZEA
13	lutein	11.50	叶黄素	441, 469	LUT
	β -Apo-8'-carotenol(trans)	13.80	色素内标	460*	-
14	chlorophyll <i>b</i>	15.72	叶绿素 <i>b</i>	446, 650	CHL <i>b</i>
15	chlorophyll <i>a</i> (epimer)	16.75	叶绿素 <i>a</i> (差向同晶体)	432, 666	CHL <i>a</i> EPM
16	chlorophyll <i>a</i>	17.23	叶绿素 <i>a</i>	430, 666	CHL <i>a</i>
17	chlorophyll <i>a</i> (allomer)	18.18	叶绿素 <i>a</i> (异质同晶体)	430, 665	CHL <i>a</i> ALLOM
18	β -carotene	19.85	胡萝卜素	452, 476	β -CAR

注:上标 * 为本实验计算出

2.2 厦门西海域样品分析

2.2.1 色素分析 应用 HPLC 技术分离测定发现,方案能分离鉴定的 18 特征色素中,除玉米黄素 (zeaxanthin) 以外的色素在厦门西海域都有分布,色素的含量见表 2 可以看出,含量较大的是岩藻黄素 (fucoxanthin)、19'-丁酰基氧化岩藻黄素 (19'-butanoyloxyfucoxanthin)、19'-己酰基氧化岩藻黄素 (19'-hexanoyloxyfucoxanthin) 和多甲藻素 (peridinin),其月平均含量分别在 267.824~655.076、20.118~126.764、5.693~214.115 和 26.955~203.927 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 的范围变动。其他种类特征色素含量处于较低水平,均不超过 100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 。

2.2.2 厦门西海域浮游植物类群组成 经 CHEMTAX 分析,观潮站海水浮游植物的各个种群的叶绿素 *a* 含量 (表 3),同时可以得到浮游植物类群结构的基本情况 (图 2)。2001 年 2~6 月厦门西海域叶绿素 *a* 的含量在 736.685~1570.882 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 变化,与陈纪新等 (2003) 对同一站点的调查结果相似^[5]。从图 2 可以看出硅藻是厦门西海域浮游生物量的主要贡献者,其生物量占总生物量的 36.14%~79.27%,其次是定鞭金藻和甲藻,它们分别对总量的贡献是 4.50%~37.40% 和 4.83%~21.37%,绿藻所占比率仅为 6.84%~14.77%,而所有月份都没有测出有蓝藻的存在。硅藻在该海域的绝对优势的结果与许多以往光学显微技术和同类色素调查的结果相符合^[5-6],而且 3 月得出的份额 (53.97%) 与王海黎 1995 年到 1996 年同月调查利用线性回归分析得到的结果: 55.78%、59.51%、47.84% 相似^[6],同时,在王海黎的调查中,金藻和甲藻也是另外两种主要的种类。比较陈纪新等 (2003) 调查中对同一站点的研究结果^[5],绿藻和隐藻是除硅藻外重要的种类,与本调查有差异,目前我们还不能解释其中的原因。然而,由于在分析时,我们没有考虑青绿藻 (Prasinophyceae) 和隐藻 (Cryptophyceae) 两个门类,因此对于其他门类的生物量,可能存在低估现象。

调查站点生物量从春季到夏季呈增长的趋势,在 6 月份达到高值。硅藻生物量在 6 月也出现最高值。从 2 月到 5 月,硅藻所占比例由 66.79% 逐月减少,6 月达最高值 79.27%,表明硅藻在夏季的大量繁殖,并且据调查 6 月下旬厦门西港爆发了一次硅藻赤潮。定鞭金藻生物量和对叶绿素 *a* 的贡献变化趋势与硅藻相反 (图 2),5 月份达最高值,所占份额与硅藻相仿。甲藻数量在 5 月份达最高值 (291.330 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)。林金美 (1990) 用传统的显微计数得出厦门附近甲藻类细胞总量在 6 月出现高值^[7],与本实验的结果接近。总的看来,硅藻和其他藻类特别是定鞭金藻数量的相互消长说明了在海区中存在着广泛的种间竞争现象。

表 2 2001 年 2~6 月厦门西海域主要特征类胡萝卜素、叶绿素、胡萝卜素含量

Tab 2 Concentrations of diagnostic carotenoids, chlorophyll and carotene in western Xiamen waters from February to June, 2001

项目	色素含量 / $\mu\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$				
	2月	3月	4月	5月	6月
PER	26.955	90.073	48.064	203.927	89.995
BUT-FUCO	20.118	131.310	105.116	126.764	0.000
HEX	99.967	103.52	65.693	214.115	111.110
FUCO	309.288	493.851	267.824	363.341	655.076
NEO	30.933	12.261	10.204	10.727	14.779
V DLA	28.062	20.992	24.897	37.666	26.598
D IAD NO	1.295	1.756	1.610	1.666	1.605
D IAT O	42.226	25.489	29.817	60.378	83.584
ZEA	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
LUT	7.417	8.8050	10.465	22.142	15.398
CHL <i>b</i>	19.399	19.886	13.511	43.811	42.015
-CAR	39.813	35.696	42.657	130.119	115.012
CHL <i>a</i>	736.685	1186.626	711.899	1363.382	1570.882

注: 2 月份样品数为 9, 其余月份为 10

表 3 2001年 2~6月厦门西海域主要浮游植物类群的叶绿素 a含量

Tab 3 Biomass (chlorophyll a) of major phytoplankton groups of southern Xiamen waters from February to June, 2001

项目	叶绿素 a含量 / $\mu\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$				
	2月	3月	4月	5月	6月
甲藻	35.577	123.900	67.203	291.330	125.854
硅藻纲	492.031	640.476	288.903	492.695	1245.226
定鞭金藻	101.883	341.809	266.256	416.018	70.723
绿藻	108.830	81.137	91.936	155.345	127.932
蓝藻	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
其他	0.000	0.000	0.000	7.993	1.148
总生物量	736.685	1186.626	711.899	1363.382	1570.882

2.2.3 浮游植物群落和环境因子分析 同时我们还测定了站点的温度、盐度、无机氮和无机磷等指标。在站点对水温和的持续测定表明在调查期间,水温持续升高,月平均温度自 2月份的 15.4 升至 5月份的 25.0 (图 3),与生物量的增长相似,海水温度是海洋环境中最重要的生态因子,水温对生物起着重要的作用。在适温范围内,当温度升高时将加速生物的新陈代谢,增加繁殖速度。然而就某一类的生物来讲,其它因素同时制约生物量,比如,种间竞争。海区的盐度在调查期间在 25左右波动(图 3),处于基本平稳的状态,因此对浮游植物生物量和群落的组成并非主要因素。

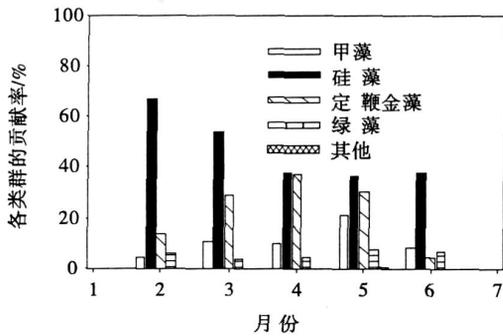


图2 2001年2~6月厦门西海域浮游植物群落结构
Fig. 2 Phytoplankton community structure in western Xiamen waters from February to June, 2001

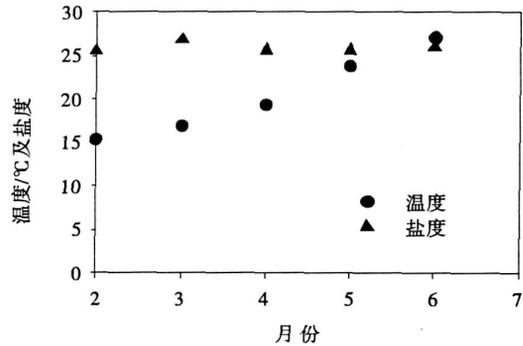


图3 2001年2~6月厦门西海域温度和盐度
Fig. 3 Monthly average temperature and salinity of western Xiamen waters during spring and summer, 2001

2、3、5、6月站点溶解无机氮的平均含量分别是 0.69、0.65、0.50、0.36 mg/dm^3 ,溶解无机磷的平均含量分别是 0.04、0.03、0.02、0.02 mg/dm^3 ,虽然缺失 4月份的数据,但是不难看出,主要溶解无机盐、氮、磷浓度都呈减少的趋势,反映了这是浮游植物(主要是硅藻)大量繁殖的结果,因为它们生长消耗大量的营养盐,造成了海水中的营养盐浓度下降。由此看来,各类群之间对营养盐的竞争始终以硅藻占绝对优势,这为 6月下旬的硅藻赤潮的爆发准备了条件。

3 结论

本研究缩短了反相 HPLC分离浮游植物光合色素的时间,并利用改进的反相 HPLC方案,对 2001年 2~6月厦门西海域的浮游植物的特征色素进行了定量分析,并利用 CHEMTAX分析方法利用色素对浮游植物类群的标记作用对 2001年 2~6月该海域的浮游植物群落组成做了剖析。结果表明,硅藻是该海域数量最大,占绝对优势的类群,其生物量达总生物量的 36.14%~79.27%,其次是定鞭金藻和甲藻。生物量的增长与海区温度的持续升高相对应,而硅藻和定鞭金藻之间的种间竞争也是决定浮游植物群落结构的因素之一。

参考文献:

- [1] Fawley M W, Lee C M. Pigment composition of the scaly green flagellate *Mesostigma viride* (Micromonadophyceae) is similar to that of the siphonous green alga *Byropsis plumose* (Ulvophyceae) [J]. Journal of Phycology, 1990, 26: 666-670.
- [2] Mackey M D, Mackey D J, Higgins H W, et al. CHEMTAS—a program for estimating chlorophyll abundances from chemical markers: application to HPLC measurements of phytoplankton [J]. Marine Ecology Progress Series, 1996, 144: 265-283.
- [3] 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.
- [4] Nelson J R. Rates and possible mechanism of light-dependent degradation of pigments in detritus derived from phytoplankton [J]. Journal of Marine Research, 1993, 51: 155-179.
- [5] 陈纪新, 黄邦钦, 贾锡伟, 等. 利用光合色素研究厦门海域超微型浮游植物群落结构 [J]. 海洋环境科学, 2003, 22(3): 16-21.
- [6] 王海黎, 洪华生. 近岸海域光合色素的生物标志作用研究——台湾海峡特征光合色素的分布及其对浮游植物类群结构的指示 [J]. 海洋学报, 2000, 22(3): 94-102.
- [7] 林金美. 厦门附近海域浮游甲藻类的分布 [J]. 生态学报, 1990, 10(2): 139-144.

Phytoplankton community structure in western Xiamen waters from February to June 2001 from analysis of photosynthetic pigments

HE Xue-jia¹, GAO Ya-hui², PENG Xing-yue²

(1. Research Center for Harmful Algae and Aquatic Environment, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Photosynthetic pigments were quantified, using RP-HPLC, from phytoplankton samples collected in western Xiamen waters from February to June in 2001. Diagnostic pigment data were converted into chlorophyll a biomass values to assess phytoplankton community structure using CHEMTAX software. The effects of environmental factors on phytoplankton community were also analyzed. An improved RP-HPLC protocol was employed which consistently reduced the separating time by a third. The separation of pigments using the improved RP-HPLC protocol suggested that the prime diagnostic pigments in this area during the investigation were Fucoxanthin, 19'-butanoyloxyfucoxanthin, 19'-hexanoyloxyfucoxanthin and peridinin with average monthly concentrations varying in the following ranges: 267.824 ~ 655.076, 20.118 ~ 126.764, 65.693 ~ 214.115 and 26.955 ~ 203.927 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, respectively. CHEMTAX calculations demonstrated that the dominant group was diatoms with a contribution of 36.14% to 79.27% to total phytoplankton biomass, followed by prymnesiophytes and dinophytes, which accounted for 4.50% ~ 37.40% and 4.83% ~ 21.37%, respectively. Total phytoplankton biomass increased from February to June, in response to the continuously increasing temperature. The relative contribution of diatoms varied in a trend opposite to that of prymnesiophytes, suggesting that inter-species competition was an important factor for phytoplankton community structure in this area.

Key words: marine biology; diagnostic pigments; phytoplankton community structure; western Xiamen waters

DOI 10.3969/J. ISSN. 1000-8160. 2010. 02. 012

(责任编辑:杜俊民)