

## 几种海藻和赤潮藻的 DCMU 增益荧光 比率及其与增殖速率的关系\*

武宝玕 蒋海鹰 齐雨藻

臧汝波

(暨南大学水生生物研究所 广州 510632) (中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

### 摘 要

本文研究了红藻海膜 (*Halymenia sinensis*), 绿藻孔石莼 (*Ulva pertusa*), 褐藻裙带 (*Underia pinnatifida*) 及蓝藻钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*) 的 DCMU 增益荧光比率 ( $F_D/F_N$ )。其中海膜的比率最高 (3.9), 石莼及螺旋藻次之 (2.5 和 2.8), 裙带 (采自夏季) 的比率最低 (1.7)。脱水及热处理下和藻体老化时,  $F_D/F_N$  值显著下降。在实验室条件下分批培养的两种赤潮藻海洋原甲藻 (*Prorocentrum micans*) 和微小角毛藻 (*Chaetoceras minutissimus*), 其增殖过程中最大增益荧光比率较最大增殖速率出现早, 这一结果为赤潮的预报提供了依据。

关键词: DCMU 增益荧光比率; 增殖速率; 海藻; 赤潮藻; 光合潜力

近年来叶绿素荧光技术已较广泛地用于水生生物学, 海洋及湖沼学的研究, 成为一项重要的研究手段, 并开拓出新的研究领域<sup>[7]</sup>。各种荧光参数陆续被用于海藻生理学研究之中<sup>[14]</sup>。如 DCMU 增益荧光比率 ( $F_D/F_N$ ) 可以在一定程度上反映植物的光合潜力 (photosynthetic capacity)<sup>[20]</sup>, 但迄今人们对于各类海藻 (seaweeds) 和海洋浮游藻类 (phytoplankton) 的增益荧光比率知之甚少。用叶绿素荧光方法测定光合潜力在海藻养殖中具有一定的实用意义。另外, 我国近海区域赤潮 (red tides) 的发生日益频繁<sup>[1]</sup>, 赤潮藻类的大量增殖是以其高的光合同化能力作为基础, 因而研究其增殖过程中光合潜力和增殖速率 ( $\mu$ ) 的变化以及二者间的关系具有重要意义。海洋原甲藻和角毛藻是广泛分布的赤潮藻类, 在中国, 日本及新西兰, 葡萄牙等国海域发生的赤潮中均有报道<sup>[19]</sup>。本文用叶绿素荧光方法研究了荧光增益与藻体增殖速率的关系。

### 材料与方 法

#### 一、藻类材料

红藻海膜 (*Halymenia sinensis*), 褐藻裙带 (*Underia pinnatifida*), 绿藻孔石莼 (*Ulva pertusa*) 采自青岛栈桥附近海域中的海带养殖筏上。采到的藻体放入盛海水的大玻缸内, 给予照光

\* 本工作受中国科学院青岛海洋研究所实验海洋生物开放研究实验室 (EMBL) 及国家自然科学基金重大项目“我国东南沿海赤潮发生机理研究”的资助。

(4×40W 日光灯)和通气(空气),约 12h 后藻体用作荧光测定。蓝藻海水钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*)取自中国科学院海洋研究所。海洋原甲藻 (*Prorocentrum micans*)和微小角毛藻 (*Chaetoceras minutissimus*)均得自该所,在光照培养箱内(3000lx, 25℃±1℃, 光暗比 12:12)用 f/2 的海水营养液进行培养。两种海洋浮游藻的接种浓度分别为 10<sup>4</sup> 个/ml 和 10<sup>5</sup> 个/ml。

## 二、DCMU 增益荧光比率和增殖速率的测定

本实验用日立(HITACHI)850 型荧光分光光度计测定三种海藻和钝顶螺旋藻的荧光动力学曲线(即 Kautsky 效应),预暗期为 5min,测定时还需采用固体表面荧光测定附件。激发光分别为 565nm(对海膜),440nm(对裙带和石莼),620nm(对螺旋藻),检测光波长均为 685nm。处理三种海藻的 DCMU 浓度为 5×10<sup>-4</sup>mol/L,处理螺旋藻的 DCMU 浓度减半,处理时间都是 30min,分别测定处理前后稳态(steady state)荧光的相对强度,计算出 F<sub>0</sub>/F<sub>N</sub> 值;另用岛津(Shimadzu)RF-5000 型荧光分光光度计测定两种赤潮藻的增益荧光比率,激发光为 575nm,检测光波长为 673nm。DCMU 处理是在 3ml 藻液中加入 0.5ml 浓度为 5.8mg/250ml 的 DCMU 海水,20min 后进行测定。F<sub>N</sub> 代表藻类在正常状态下未能用于光合作用而以荧光形式散失掉的那部分激发能,当加入 DCMU 后,截断了光系统 I 中的电子流,使系统 I 反应中心处于关闭态,此时由天线色素传递来的激发能不能用于光化反应,其衰减方式主要以荧光形式发射出来,因而荧光增强成 F<sub>0</sub>,这一总的荧光(F<sub>0</sub>)与部分荧光(F<sub>N</sub>)的比率,在一定程度上反映了藻类的光合潜力和生理状态<sup>[17]</sup>。细胞计数采用 0.1ml 的计数框进行,并根据下列公式计算增殖速率 μ:

$$\mu = (\log N_t - \log N_0) \times 3.32 / (T_t - T_0)$$

N<sub>t</sub> 为时间 T<sub>t</sub> 时的细胞数, N<sub>0</sub> 为时间 T<sub>0</sub> 时的细胞数<sup>[3,9]</sup>。

## 结果和讨论

### 一、三种海藻和钝顶螺旋藻的 DCMU 增益荧光比率及其在逆境下和衰老时的变化

DCMU(二氯苯基二甲基脲)是一种光合作用电子传递抑制剂,它作用于光系统 I 的电子受体 Q<sub>B</sub> 与 D<sub>1</sub> 多肽的结合部位,从而阻断了电子由 Q<sub>B</sub> 向质醌的传递,使 Q<sub>A</sub> 在光照下有最大还原。由于还原的 Q<sub>A</sub> 已不具猝灭荧光的作用,因而引起叶绿素荧光的显著增强。DCMU 相对易于渗入藻体,在处理 20min 后荧光显著上升,随后曲线超平。图 1 表示红藻海膜在 DCMU 处理下荧光的增益。增益荧光强度约为未处理的 3.6 倍。经 30min 的自然脱水(含水量由 86% 降至 69%),荧光增益显著减少,仅为 DCMU 处理前的 2 倍[图 1(B)]。F<sub>0</sub>/F<sub>N</sub> 值的下降表明短时间的干燥胁迫导致藻体光合潜力显著降低。<sup>[11,20]</sup>

热胁迫引起类似的反应。当海膜被放到 40℃ 的海水中 2h,再将其放回到 26℃ 下 0.5h 使之恢复,荧光比率就由处理前的 3.9 降到 1.4,下降约 64%,表明可能热胁迫引起海膜光合器的不可逆损伤。由于 PS I 在整个叶绿体中对热较敏感,其反应中心易受阻(blockage)失活<sup>[15]</sup>,故 PS I 的热抑制可能是海膜增益荧光比率明显下降的原因,它直接反映出海膜光合潜力的降低。

除热胁迫作用外,F<sub>0</sub>/F<sub>N</sub> 值也随藻体的衰老而变化。取室内分批培养(batch culture)生长

良好(呈蓝绿色)和处于衰老(呈黄绿色)的两类钝顶螺旋藻,分别测定其荧光动力学曲线以及 DCMU 的影响,结果见图 2。

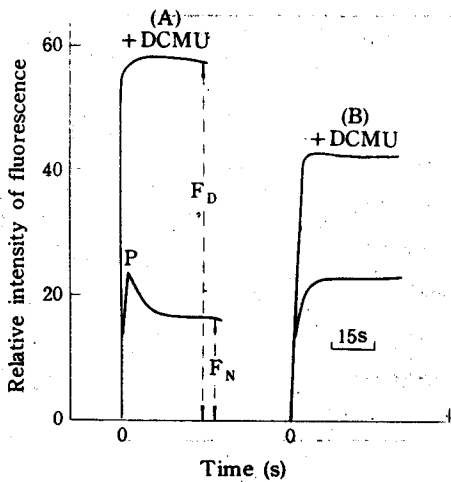


图 1 红藻海膜的荧光动力学曲线及其在 DCMU ( $5 \times 10^{-5} \text{mol/L}$ ) 作用下的变化  
(A) 正常叶状体(含水量 86%), (B) 自然脱水 30min 的叶状体(含水量为 69%)

Fig. 1 Fluorescence kinetics of red alga *Halymenia sinensis* and its changes under DCMU ( $5 \times 10^{-5} \text{mol/L}$ ) treatment  
(A) Normal thallus (water content = 86%)  
(B) The thallus after 30' natural dehydration (water content=69%)

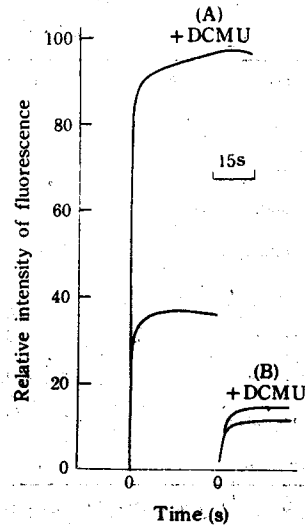


图 2 蓝藻钝顶螺旋藻的荧光动力学曲线及其在 DCMU ( $2.5 \times 10^{-5} \text{mol/L}$ ) 作用下的变化  
(A) 正常藻体 (B) 衰老藻体

Fig. 2 Fluorescence kinetics of blue green alga *Spirulina platensis* and its changes under DCMU ( $2.5 \times 10^{-5} \text{mol/L}$ ) treatment  
(A) Normal algae  
(B) Aged algae

从图中可见,衰老藻体的稳态荧光强度仅为正常藻体的 1/3,增益荧光比率为正常藻的 1/2,反映其光合活性随藻体衰老出现显著的变化。此外,荧光动力学曲线中的 P 峰不显著,在其它蓝藻中也有类似的报道<sup>[16]</sup>。Vincent 曾指出某些蓝藻对 DCMU 不敏感<sup>[22]</sup>,本文结果表明,螺旋藻的 DCMU 增益荧光还是很显著的。各种藻类的 DCMU 增益荧光比率总结于表 1 中。

从表中看出,海膜的  $F_D/F_N$  值最高(约 3.9),藻体脱水和受热时此比率显著降低,如脱水 0.5h 后为原来的 49%,在  $50^\circ\text{C}$  下仅 25min 即下降为对照的 41%;老化螺旋藻的荧光比率下降了 50%;培养 17 天老化的海洋原甲藻的比率由 2.5 降至 1.7,而培养 19 天的角毛藻的荧光比率接近为 1,即荧光增益为零。在  $34^\circ\text{C}$  (原甲藻的耐受温度上限)和  $44^\circ\text{C}$  (角毛藻的耐受温度上限)下 24h 后,两种赤潮藻的荧光比率均下降至 1,表明藻体受到严重伤害或已死亡。褐藻裙带的荧光比率相对较低,这可能与采集材料的时间有关,裙带不耐热,夏季水温已不适宜它的生长。以上结果表明,对于供试的几种海藻和赤潮藻,DCMU 增益荧光比率都能灵敏地反映它们的不同生理状态,故该比率可作为一种有用的生理指标,加以测定上的简便迅速,故具有一定的实际应用价值。

表 1 几种海藻和赤潮藻的  $F_D/F_N$  值及其在逆境作用下和衰老时的变化

Table 1 The  $F_D/F_N$  values and their changes caused by stresses and algal senescence in various seaweeds and red tide species

Algal species & treatment	$F_D/F_N$	Algal species & treatment	$F_D/F_N$
<i>Halymenia siucensis</i>		<i>Prorocentrum micans</i>	
30s dehydration	3.9+0.21*	2 dculture	2.5
2 h under 40 C	2.0+0.07*	17 dculture	1.7
25s under 50 C	1.4	one day under 34 C	1.0
<i>Ulteria pinnatifida</i>		<i>Chaetoceros minutissimus</i>	
	1.6	2 d culture	1.5
<i>Ulva pertusa</i>	1.7+0.19*	19 d culture	1.0
<i>Spirulina platensis</i>	2.5+0.55*	one day under 44 C	1.0
normal algae	2.8		
aged algae	1.4		

\* 从三个以上实验中计算出的平均值和标准差

The average and standard error were calculated from more than three experiments.

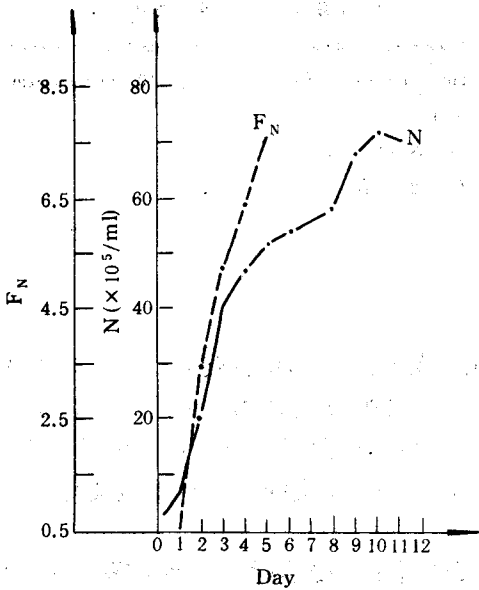


图 3 微小角毛藻在  $30 \pm 0.5$  C 下培养时细胞数(N)、正常荧光强度( $F_N$ )与培养时间的关系

Fig. 3 The relationship between cell number (N), normal fluorescence ( $F_N$ ) and culturing time for *Ch. minutissimus* growing at  $30 \pm 0.5$  C

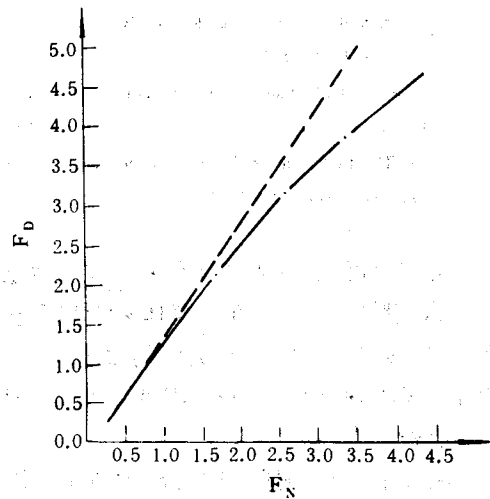


图 4 微小角毛藻在 25 C 下培养 6 天内  $F_D$  和  $F_N$  的关系

Fig. 4 The relationship between  $F_D$  and  $F_N$  for *Ch. minutissimus* within 6 days at 25 C

-----represent the linear relationship

(虚线代表线性关系)

## 二、两种赤潮藻的增殖速率与 DCMU 增益荧光比率的关系

在分批培养增殖过程中,两种赤潮藻的正常荧光强度( $F_N$ )随藻细胞数目( $N$ )的增加而增强,如图 3,它代表该藻正常生长的状态。

与此同时,随  $F_N$  的升高增益荧光  $F_D$  也升高,如图 4,但二者并不完全保持线性关系(如图中虚线那样),而是逐渐朝下弯曲。这表明增益荧光比率有所下降,因而在整个培养周期中存在有最大增益荧光比率,它代表了最大光合潜力,在海洋原甲藻中也得到类似的结果。

在此基础上,探测了两种赤潮藻生长周期中的最大  $F_D/F_N$  值,并同时测定增殖速率  $\mu$ ,结果见图 5 和图 6。

在预备试验中已测出原甲藻的最适生长温度约为  $23^\circ\text{C}$ ,角毛藻的最适生长温度为  $30^\circ\text{C}$ ,故本实验选择了这两种温度分别进行培养。由图 5 和图 6 看出, $F_D/F_N$  和  $\mu$  均随培养时间而发生变化。开始时上升,达最高点后则下降,但角毛藻的变化要比原甲藻快,当后者仍处于上升阶段时,前者已下降至低点。引人注意的是无论原甲藻还是角毛藻,其最大增益荧光比率均较最大生长速率出现早,一般提前一至两天,这可能表示赤潮藻的快速增殖需要高的光合同化能力作为基础,此种现象不仅在全营养的天然海水培养中见到,在缺氮或缺磷的人工海水培养中也多次得到重复,如缺氮和缺磷培养下的海洋原甲藻,其最大  $F_D/F_N$  值的出现均比最大  $\mu$  值的出现提早一至二天。

早在 70 年代初,Blasco<sup>[6]</sup> 及 Halldal<sup>[10]</sup> 等就指出 DCMU 增益荧光与藻类的生理状态有关,并建议用它来评价浮游藻的生理状态。Kiefer 等<sup>[13]</sup> 开始用 DCMU 增益荧光测定浮游藻的光化效率。Samuelsson 等<sup>[20]</sup> 发现在 DCMU 增益荧光和光合潜力间保持良好的正

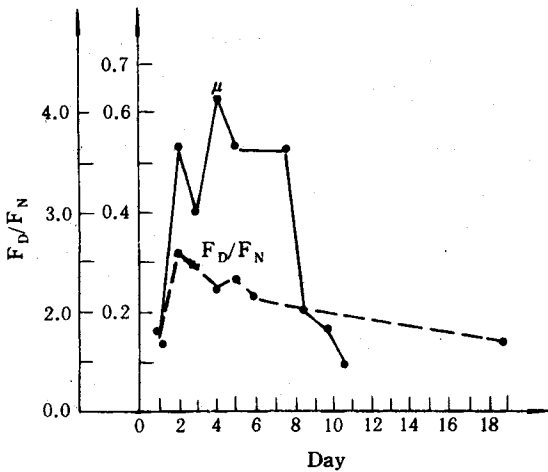


图 5 海洋原甲藻在  $23 \pm 0.5^\circ\text{C}$  培养时,增殖速率  $\mu$ 、 $F_D/F_N$  值与培养时间的关系

Fig. 5 The relationship between growth rate ( $\mu$ ),  $F_D/F_N$  and culturing time for *P. micans* growing at  $23 \pm 0.5^\circ\text{C}$

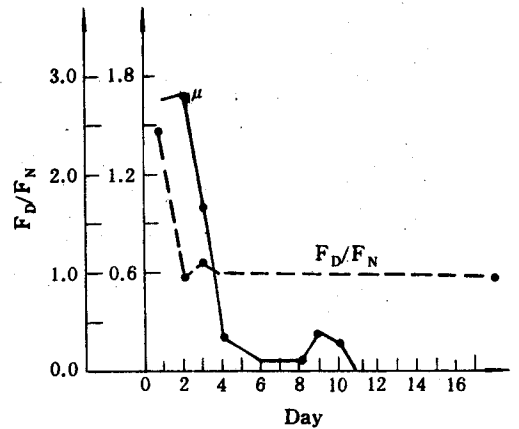


图 6 微小角毛藻在  $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$  下培养时,增殖速率  $\mu$ 、 $F_D/F_N$  与培养时间的关系

Fig. 6 The relationship between growth rate ( $\mu$ ),  $F_D/F_N$  and culturing time for *Ch. minutissimus* growing at  $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$

相关。此后对增益荧光比率的研究日益增多(Røy 等<sup>[17,18]</sup>; Fujita 等<sup>[8]</sup>; Fukazawa 等<sup>[9]</sup>; Vincent<sup>[21]</sup>; Bates 等<sup>[4,5]</sup>; Keller 等<sup>[11,12]</sup>)。这些工作均以浮游藻类为对象,有关大型海藻的情况则未见有报道。本研究表明 DCMU 增益荧光方法也同样适用于大型海藻(特别是呈叶状体的种类)。

赤潮主要是由海洋中各种浮游藻类的异常增殖和聚集而引起的自然现象。赤潮发生时海水变色,水质变劣和缺氧,往往造成海域中其它生物的大量死亡,破坏海产养殖业。另外有毒赤潮藻还可直接危及人畜的生命。近年来赤潮灾害日益严重,有全球扩张之势,已引起各国的关注。但迄今赤潮发生的原因仍无一致的看法,也很难对它进行监测和预报。体内叶绿素荧光作为一种灵敏的内探针<sup>[16]</sup>,曾被用来研究赤潮的发生。Fukazawa<sup>[9]</sup>曾报道在日本由赤潮异湾藻(*Olisthodiscus luteus*)所引发的赤潮,并用 DCMU 增益荧光比率代表光合潜力(称为 DCMU photosynthetic capacity)从事研究,发现在最大增益荧光比率出现后两天,发生了赤潮,提出了用增益荧光方法预报赤潮的可能性。这个结果与我们在室内对海洋原甲藻和微小角毛藻的研究结果相一致。即最大荧光比率(光合潜力)出现在最大增殖速率之前,说明海洋中赤潮的发生可能与浮游藻的光合过程有关,而且多种与赤潮发生关系密切的因素(如光、温及营养盐等)可能正是通过对光合过程的影响而影响赤潮的形成。因此,今后在赤潮发生机理的探讨中,加强对赤潮藻光合作用的研究实属必要。由于海上条件的复杂性,目前要把这一荧光方法用在赤潮预测报上还有一定困难,但本结果已在实验室条件下为实现这一前景提供了依据。当前国际上对体内叶绿素荧光及其应用的研究正方兴未艾,由于该技术本身所具有的许多优点,我们相信,它将在我国赤潮发生机理的研究中发挥重要作用。

### 参 考 文 献

- [1] 齐雨藻等,中国沿海的赤潮——深圳湾富营养化与赤潮研究。暨南大学学报,赤潮研究专刊,1989,10—21。
- [2] 武宝环,抑制光合作用型除草剂对植物光合系统的作用机制。植物生理学通讯,1983(4):14—20。
- [3] 陈淑芬等,光照时间、强度和温度对角毛藻增殖率的影响。海洋科学,1982(2):38—40。
- [4] Bates, S. S. and T. Platt, Fluorescence induction as a measure of photosynthetic capacity in marine phytoplankton; response of *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae) and *Dinahiella tertiolecta* (Chlorophyceae). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1984, 18: 67—77。
- [5] Bates, S. S. and T. Platt, Fluorescence induction of chlorophyll a in the Sargasso sea and on the Grand Banks; correlation with photosynthetic capacity. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1985, 27:29—38。
- [6] Blasco, D and R. Dexter, Spectrophotometric and fluorescence determinations. In "Phytoplankton Growth Dynamics, Chemostat Methodology and Chemical Analyses—Technical Series 1. Spec. Rep. Dep. Oceanogr. Univ. Wash. , 1972; 52:102—108。
- [7] Ernst, D., Application of chlorophyll fluorescence in hydrobiology. In "Application of Chlorophyll Fluorescence", p261. (ed. by H. K. Lichtenthaler, 1988 Kluwer Academic Publishers)。
- [8] Fujita, Y and Isgimaru, Development of the system to measure photosynthetic activity of phytoplankton in situ with use of in vivo chlorophyll fluorescence (in Japanese). Final Report for Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, p20, 1980, Japan。
- [9] Fukazawa, N et al., A mechanism of red tide formation. I. Growth rate estimate by DCMU-induced fluorescence increase. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 1980, 3:217—222。
- [10] Halldal, P and K. Halldal, Phytoplankton, chlorophyll and submarine light conditions in Kings Bay, Spitsbergen, July 1971. *Norw. J. Bot.* 1973, 20:99—108。
- [11] Keller, A. A., Mesocosm studies of DCMU-enhanced fluorescence as a measure of phytoplankton photosynthesis. *Mar. Biol. (Berl.)* 1987, 96: 107—114。
- [12] Keller, A. A and R. L. Rice, Variation in DCMU-enhanced fluorescence relative to chlorophyll a: correlation with the brown bloom. *J. Phycol.* 1990, 26: 202-205。
- [13] Kiefer, D. A and Hodson, Effects of nitrogen stress upon the photosynthetic rate and fluorescence of *Thalassiosira pseudonana*. Prog. Rep. U. S. Atom. Energy Commn. Contract AT (11-1), Gen. 10, P. A. 20 Part I, 1974, p33—39。

- [14] Lichtenthaler, H. K. , In vivo chlorophyll fluorescence as a tool for stress detection in plants. In "Application of Chlorophyll Fluorescence", p129. (ed. by H. K. Lichtenthaler, 1988, Kluwer Academic Publishers).
- [15] Oquist, G. , Environmental stress and photosynthesis. In "Progress in Photosynthesis Research", Vol. 4, P:—10, (ed. by J. Biggins, 1987, Martinus Nijhoff Publishers. )
- [16] Papageorgiou, G. , Chlorophyll fluorescence; an intrinsic probe of photosynthesis. In "Bioenergetics of Photosynthesis". p319—371. (ed. by Govindjee, 1975, Academic Press, New York).
- [17] Roy, S and L. Legendre. , DCMU-enhanced fluorescence as an index of photosynthetic activity in phytoplankton. *Marine Biology*. 1979, **55**:93—101.
- [18] Roy, S and L. Legendre. , Field studies of DCMU-enhanced fluorescence as an index in situ phytoplankton photosynthetic activity. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1980, **37**(1):1028—1031.
- [19] Sampayo, M. A. De. M. , Red tides off the Portuguese coast. In "Red Tides Biology, Environmental Science And Toxicology". p89. (ed. by Tomotoshi Okaichi et al. ,1989, Elsevier Science Publishing Co., Inc. )
- [20] Samuëlsson, G and G. Oquist. , A method for studying photosynthetic capacities of unicellular algae based on in vivo chlorophyll fluorescence. *Physiol. Plant*, 1977, **40**:315—319.
- [21] Vincent, W. F. , Photosynthetic capacity measured by DCMU-induced chlorophyll fluorescence in an oligotrophic lake. *Fresh Water Biol.* 1981, **11**:61—78.
- [22] Vincent, W. F. , Fluorescence properties of the fresh water phytoplankton; three algal classes compared. *Br. Phycol. J.* 1983, **18**:5—21.

## DCMU-ENHANCED FLUORESCENCE RATIO AND ITS RELATION TO GROWTH RATE IN VARIOUS SEAWEEDS AND RED TIDE SPECIES

Wu Baogan, Jiang Haiying and Qi Yuzao

(Institute of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632)

Zang Rubo

(Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao 266071)

### Abstract

DCMU-enhanced chlorophyll fluorescence ratio of marine algae [*Halymenia sinensis* (red alga), *Ulva pertusa* (green alga), *Underia pinnatifida* (brown alga) and *Spirulina platensis* (blue-green alga)] was studied. It was found that the red alga had the highest ratio (3.9) among these species. The green one and blue-green alga had the value of 2.5 and 2.8 respectively. The ratio for *U. pinnatifida* (collected in summer season) was as low as 1.7.  $F_D/F_N$  values declined obviously under the effects of stresses (dehydration or heat). It also reduced when the algae senesced. So this ratio can be used as a sensitive index of photosynthetic capacities of marine algae. In addition, the  $F_D/F_N$  values of two phytoplanktons (red tide species) *Prorocentrum micans* and *Chaetoceros minutissimus* both in batch culture, and their relation to growth rate were investigated. The results indicated that both  $F_D/F_N$  value and  $U$  changed with the time of culture, but the important fact was that the maximum value of fluorescence ratio was reached always prior to the appearing of the maximum of growth rate. This results presented a good prospect for using fluorescence in vivo in the research of red tide occurrence.

**Key words:** DCMU-enhanced fluorescence ratio; Growth rate; Seaweeds; Red tide species; Photosynthetic capacity