

越冬浮游植物光合作用活性的原位研究*

吴晓东^{1,2}, 孔繁翔^{1**}, 曹焕生^{1,2}, 张 民^{1,2}, 刘桂民^{1,2}, 赵巧华^{1,2}

(1: 中国科学院南京地理与湖泊研究所, 南京 210008)

(2: 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘 要: 水体中浮游植物在越冬期间数量少, 关于湖泊中越冬浮游植物如蓝藻、绿藻、硅藻等浮游植物的光合作用活性情况少见报道. 本实验通过 Phyto-PAM (Pulse Amplitude Modulation) 对最大光量子产量 F_v/F_m (可变荧光和最大荧光之比) 和快速光曲线的测定, 结合显微镜镜检结果, 并在室内进行了硫酸铜处理以及鲁哥氏液处理实验, 对太湖、巢湖和玄武湖处于越冬期间的浮游植物进行了原位光合作用活性的研究. 显微镜镜检结果表明太湖和玄武湖水体中以绿藻和硅藻为主, 而蓝藻很少, 巢湖水体中有大量蓝藻、绿藻和硅藻. Phyto-PAM 在对玄武湖和太湖水样原位测定时未检测出蓝藻, 而绿藻和硅藻有光合作用活性, 其 F_v/F_m 在 0.5 左右; 对巢湖的水体检测到的蓝藻、绿藻、硅藻都具有光合作用活性, 其中绿藻和硅藻的 F_v/F_m 在 0.5 左右, 蓝藻的 F_v/F_m 在 0.3 左右; 用硫酸铜处理实验在巢湖水样中发现水体仅有硅藻活性 (F_v/F_m 下降至 0.2 左右), 而用鲁哥氏液处理后无任何藻类光合作用活性. 上述实验结果表明, 即使处于越冬期间, 以较多数量出现在水体中的蓝藻、绿藻和硅藻仍然具有较高的光合作用活性.

关键词: 浮游植物; 越冬; 原位; 光合作用活性; Phyto-PAM; F_v/F_m

In situ study on the photochemical vitality of overwintering phytoplankton

WU Xiaodong^{1,2}, KONG Fanxiang^{1**}, CAO Huansheng^{1,2}, ZHANG Min^{1,2}, LIU Guimin^{1,2} & Zhao Qiaohua^{1,2}

(1: Nanjing Institute of Geography & Limnology, Nanjing 210008, P. R. China)

(2: Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, P. R. China)

Abstract: Photochemical vitality of overwintering phytoplankton including cyanobacteria chlorophyta and bacillariophyta was not known because of the general small biomass. In present study, Phyto-PAM (Pulse Amplitude Modulation) was applied to measure F_v/F_m (ratio of variable to maximal fluorescence) and rapid light curves of phytoplankton to study the photochemical vitality in situ of overwintering phytoplankton sampled from Lake Taihu, Lake Chaohu and Lake Xuanwu. Both microscopic determination of cyanobacteria, chlorophyta and bacillariophyta and treatment of copper sulfate and Lugol's solution to water samples were performed. The results from microscopy determination showed that there were chlorophyta and bacillariophyta but without cyanobacteria in Lake Taihu and Lake Xuanwu. However, a large amount of cyanophyta was detected in Lake Chaohu besides chlorophyta and bacillariophyta. F_v/F_m and rapid light curves from Phyto-PAM showed that there was no photochemical vitality of cyanobacteria in Lake Taihu and Lake Xuanwu but presented with photochemical vitality of chlorophyta and bacillariophyta (F_v/F_m was about 0.5). In Lake Chaohu, all the three kinds of phytoplankton showed photochemical vitality (F_v/F_m was about 0.5 in chlorophyta and bacillariophyta; F_v/F_m was about 0.3 in cyanophyta). Samples treated with copper sulfate only showed the bacillariophyta photochemical vitality, while even this disappeared when treated with Lugol's solution. The results from Phyto-PAM combined with chemical treatment experiments suggested that the photochemical vitality of phytoplankton was still active in overwintering period.

* 国家自然科学基金项目(40471045), 国家重点基础研究发展计划(2002CB412305), 中国科学院资源环境领域野外台站研究基金项目和中国科学院百人计划项目联合资助. 2006-04-05 收稿; 2006-09-07 收修改稿. 吴晓东, 男, 1981 年生, 博士研究生; E-mail: wxd565@163.com.

** 通讯作者.

Keywords: Phytoplankton; overwintering; in situ; photochemical vitality; Phyto-PAM; F_v/F_m

湖泊富营养化已经成为一个严重的水环境问题,其重要特征之一就是水华的频繁发生.关于水华形成机理的研究已经取得了很多成果^[1].近年来很多学者注意到水华蓝藻的越冬与复苏过程对于蓝藻水华的夏季爆发可能有重要作用^[2],但是关于越冬过程中浮游植物的生理特征研究很少,这主要是因为冬季水体中的浮游植物含量少,研究困难.作为处于越冬期间浮游植物的最基本的生理指标的光合作用活性情况,目前报道也很少.

叶绿素荧光研究在过去几十年里取得了很大进展,在植物学研究中也得到了广泛的应用^[3].调制荧光仪(PAM, Pulse Amplitude Modulated)即基于叶绿素荧光原理设计,可以提供光合作用的复杂过程中包括光量子的吸收,能量转换等许多信息,已经成为用来研究植物光合作用的有效工具. PAM 测量的样品经过充分暗适应后(15 min),首先打开光通量密度很弱的 MR(Measuring Radiation),仪器检测到的荧光为 F_0 ,随后打开饱和脉冲(Saturation Pulse),得到的荧光值为 F_m . F_v/F_m 即为最大可变荧光($F_m - F_0$)与 F_m 的比值, F_v/F_m 反映了植物对光量子的最大利用潜能.如果仪器每隔 20 s 可以加以强度逐渐增大的光化光(Actinic Light),同时记录光量子产量,则得到快速光曲线(Rapid light curves, RLC). F_v/F_m 通常情况下是一个相当稳定的值,但是在植物受到胁迫时则明显降低,因此 F_v/F_m 是用来研究植物受到的胁迫对光合作用影响的重要指标^[4].快速光曲线通常情况下与光合作用放氧量之间存在很好的线性关系,因此也可以反映植物的光合作用活性^[5].目前已经研发出各种各样的 PAM,其中 Phyto-PAM 可以对水体中蓝藻、绿藻和硅/甲藻进行定性定量的分析.

利用 Phyto-PAM 来研究越冬期间水体的光合作用活性,需要采用实验室培养的纯种藻作为参照,因为获得野外条件下的纯种藻作为参照极为困难.野生藻类和实验室培养的藻在许多生理指标方面存在差异,加之自然水体中可能存在很多因素例如腐殖质等会对光谱的吸收产生影响,这些因素都会影响 Phyto-PAM 对野外水体的分析结果.因此,本实验采用显微镜镜检法,并设计了化学药物处理实验,对比 Phyto-PAM 的测定结果,对处于越冬期间浮游植物光合作用活性进行了原位研究.

1 材料和方法

1.1 采样

太湖与巢湖为大型浅水湖泊,玄武湖为城市湖泊,位于南京市.具体采样时间为 2006 年 3 月 2 日在巢湖采样,采样点为 $31^{\circ}35'46''N$, $117^{\circ}24'21''E$; 3 月 3 日在玄武湖采样测定,采样点为 $32^{\circ}03'40.3''N$, $118^{\circ}48'23.9''E$; 3 月 5 日在太湖采样,采样点为 $31^{\circ}34'37.5''N$, $117^{\circ}26'40.1''E$. 采样用 5 L 有机玻璃采水器从表层水体开始,并且每隔 50 cm 进行分层取样.采样时水体的温度、溶氧、pH、浊度和叶绿素水质仪 YSI6600 (Yellow Spring Instruments, USA)测定.

1.2 浮游植物镜检

取 1000 ml 混合水样,加鲁哥氏液固定,静置沉淀 48 h 后,取底层 30 ml 液体,用 0.1 ml 计数框进行显微镜镜检.为满足本实验需要,每个样品计数 10 个小方格,并根据浮游植物个体重量一般不大于 0.02×10^{-4} mg/个,其平均含水量为 90%,而叶绿素约占干重的 20%^[6],考虑到 Phyto-PAM 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 叶绿素的检测限,仅仅对蓝藻、绿藻和硅藻出现频率较高(个体较大的藻平均每小格不少于 0.5,个体较小的平均每小格不少于 2)的种类进行记录.

1.3 F_v/F_m 和快速光曲线的测定

F_v/F_m 和 RLC 通过 Phyto-PAM (Phyto-PAM, ED, Walz, Effeltrich, Germany)测定,控制软件为 Phyto win1.47 (Walz).本实验采用实验室培养的微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)和小球藻(*Chlorella vulgaris*)作为蓝藻和绿藻的参照,硅藻采用系统配置参照,校零采用 0.2 μm 滤器过滤的相应水样.由于时间限制,按不同深度各取一份样品测定 F_v/F_m ,并且记录快速光曲线.

1.4 硫酸铜处理和鲁哥氏液处理实验

巢湖水样实验室标准条件下(25°C 、12 h 光照、 $120 \mu\text{mol}/(\text{s} \cdot \text{m}^2)$)培养 3 d 后,取深度为 0 cm(表层),50

cm, 100 cm 和 150 cm 巢湖水样三份, 参照相关方法^[7], 分别用 1 mg/L 硫酸铜和 1% 鲁哥氏液处理 30 min, 并用 0.2 μm 的相应过滤水体对仪器调零. 实验设对照组, 用 Phyto-PAM 测定 F_v/F_m 和快速光曲线.

2 结果与分析

2.1 太湖、巢湖和玄武湖采样时的理化参数

采样时对水体理化指标检测结果表明, 不同水体中的指标不一样, 但是在相同的水体中, 从表层水体直到上覆水的各个指标差别不大. 具体结果见表 1.

表 1 不同水体中的理化指标
Tab. 1 Physical and Chemical characteristics of the different lakes

指标	温度(°C)	溶解氧(mg/L)	pH	浊度(Ntu)	叶绿素($\mu\text{g/L}$)
太湖(T)	10.30 \pm 0.68	8.95 \pm 2.28	7.87 \pm 0.07	49.0 \pm 6.6	10.2 \pm 2.2
巢湖(C)	5.26 \pm 0.33	11.75 \pm 1.18	8.39 \pm 0.10	55.9 \pm 3.4	19.0 \pm 1.6
玄武湖(X)	7.03 \pm 0.24	11.64 \pm 2.15	8.03 \pm 0.10	3.6 \pm 1.5	4.5 \pm 1.1

2.2 太湖、巢湖和玄武湖的浮游植物镜检结果

为了解太湖、巢湖和玄武湖水体中主要蓝藻、绿藻和硅藻的组成情况, 采用了显微镜镜检法对水样进行了分析. 结果表明, 在处于越冬期间的 3 月初, 太湖和玄武湖水体浮游植物数量较少, 种类主要为绿藻和硅藻, 而蓝藻门中仅仅有少数铜绿微囊藻或者水华微囊藻个体出现, 数量很少. 巢湖水体中浮游植物数量较多, 其中以蓝藻门的水华鱼腥藻(*Anabaena flos-aquae*) 最多, 蓝藻门的其他一些种类也有出现, 而硅藻和绿藻在数量也较多(表 2).

表 2 不同水体中蓝藻、绿藻和硅藻的主要浮游植物种类
Tab. 2 Major phytoplankton compositions of Lake Xuanwu, Lake Chaohu and Lake Taihu

	藻类名称	太湖	巢湖	玄武湖
Cyanobacteria	<i>Anabaena flos-aquae</i>		+	
	<i>Phormidium foveolarum</i>		+	
	<i>Spirulina major</i>		+	
	<i>Dactylococopsis acicularis</i>			+
	<i>Microcystis flos-aquae</i>	+	+	
Chlorophyta	<i>Microcystis aeruginosa</i>	+	+	+
	<i>Scenedesmus bijuga</i>	+	+	+
	<i>Chlorella vulgaris</i>		+	+
	<i>Pediastrum boryanum</i>		+	
	<i>Ulothrix oscillarina</i>	+	+	
	<i>Ulothrix moniliformis</i>	+		+
	<i>Pediastrum biradiatum</i>	+		+
	<i>Hormidium flaccidum</i>	+	+	
	Bacillariophyta	<i>Melosira granulata</i>	+	+
<i>Cyclotella bodanica</i>		+	+	+
<i>Navicular cuspidata</i>			+	

+ 表示发现有相应的藻

2.3 太湖、巢湖和玄武湖浮游植物 Phyto-PAM 测定结果

利用 Phyto-PAM 测定了太湖、巢湖和玄武湖水体中浮游植物 F_v/F_m , 结果如图 1 所示. 太湖和玄武水体

中绿藻和硅藻的 F_v/F_m 值都在 0.5 左右(图 1a, 1c), 而其相应的快速光曲线形状也相当典型, 表明绿藻, 硅藻具有光合作用活性. 蓝藻的 F_v/F_m 值为 0, 也没有产生快速光曲线, 说明未检测到蓝藻的光合作用活性(图 2a, 2c, 分别为太湖和玄武湖表层水体). 巢湖水体的荧光实验结果与玄武湖、太湖不同, 蓝藻、绿藻、硅藻的测定时都显示出较高的 F_v/F_m (图 1b), 其快速光曲线测定结果符合藻类在正常条件下的规律(图 2b 为巢湖表层水体), 说明蓝藻、绿藻和硅藻都具有较好的光合作用活性.

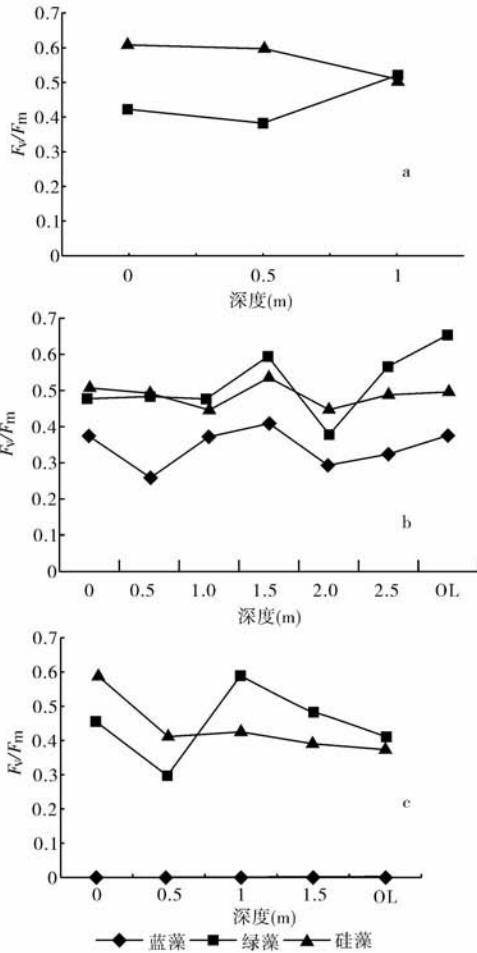


图 1 太湖(a)、巢湖(b)和玄武湖(c)的 F_v/F_m 测定结果(OL为上覆水)

Fig. 1 F_v/F_m of Lake Taihu, Lake Chaohu and Lake Xuanwu at different depths(OL means overlying water)

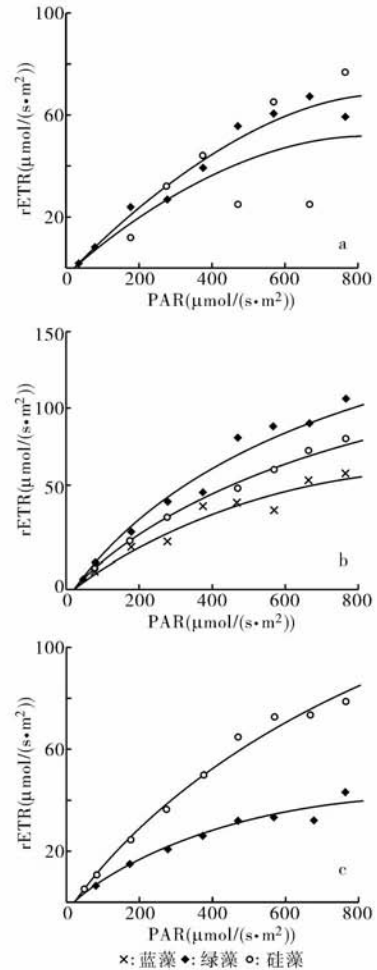


图 2 太湖(a)、巢湖(b)和玄武湖(c)表层水体的快速光曲线

Fig. 2 Rapid light curves of surface sample of Lake Taihu, Lake Chaohu and Lake Xuanwu

2.4 硫酸铜和鲁哥氏液处理前后水体的 Phyto-PAM 测定结果

为研究 Phyto-PAM 测定野外样品光合作用活性的变化可信性, 设计了对蓝藻、绿藻有很强毒性的硫酸铜和可以杀死浮游植物的鲁哥氏液固定剂处理实验. 取经过实验室培养的 0 cm(表层), 50 cm, 100 cm, 150 cm 的巢湖水样进行实验. 对照组 F_v/F_m 测定结果如图 3a 所示, 硅藻和绿藻较高, 蓝藻的 F_v/F_m 稍低, 约 0.3, 符合蓝藻 F_v/F_m 较低的特点. 对照组快速光曲线形状都较为正常(图 4a 为 0 cm 水样光曲线). 经过硫酸铜处理 30 min 后测定, 水体中蓝藻和绿藻的 F_v/F_m 值变为零(图 3b), 其快速光响应曲线消失(图 4b 为 0 cm 水样光曲线), 表明水样中蓝藻、绿藻已检测不到活性. 经硫酸铜处理后, 硅藻的 F_v/F_m 值下降(图 2b),

其快速光曲线的形状也出现变化(图3b),说明硅藻的光合作用活性受到抑制。

经过鲁哥氏液处理后,水体蓝藻、绿藻和硅藻的 F_v/F_m 值全部变为零,三种藻的快速光曲线也都消失。

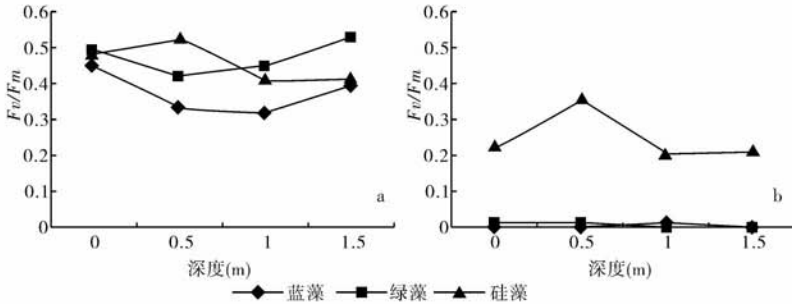


图3 硫酸铜处理对不同深度水样 F_v/F_m 的影响(a:对照;b:硫酸铜处理)

Fig.3 Effect of copper sulfate treatment on F_v/F_m (a:control, b:treated with copper)

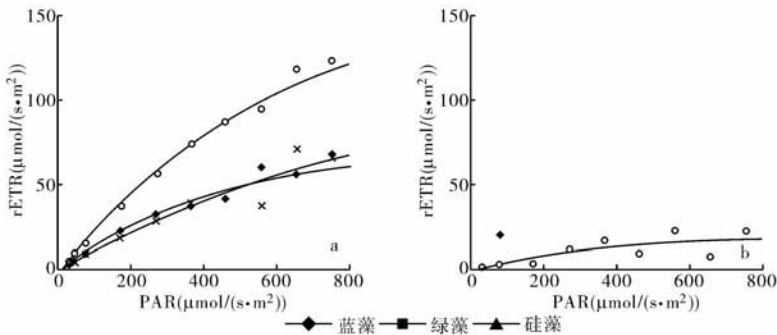


图4 硫酸铜处理对不同藻快速光曲线的影响(a:对照;b:硫酸铜处理)

Fig.4 Effect of copper sulfate treatment on rapid light curves of different algae (light-E_{TR}, a: no treatment of copper sulfate; b: treatment of copper sulfate)

3 讨论

目前关于越冬期间浮游植物的研究多集中在微囊藻的越冬以及复苏方面^[2,8],但是关于浮游植物的冬季生理状态方面的研究较少.本实验通过显微镜镜检发现,在处于越冬期间的太湖和玄武湖水体中,浮游植物数量较少,且主要为硅藻和绿藻门的一些种,这和绿藻门的一些种以及硅藻比较耐低温的生理学特征相符^[9].太湖和玄武湖夏季经常发生微囊藻水华,本研究发现在越冬期间玄武湖和太湖水体中的蓝藻门的其他种较为罕见,但是有少数铜绿微囊藻和水华微囊藻个体出现,这些仍然处于越冬期间的微囊藻可能在例如风浪等因素的影响下从底泥进入水体^[10].通常情况下,蓝藻一般在冬季不会在水体中形成水华,但是在磷浓度较高的情况下,水华鱼腥藻也会在冬季形成水华^[11].太湖与巢湖在夏季都频繁发生微囊藻水华,但巢湖富营养化水平更为严重.本实验于三月初在巢湖水体中除发现有绿藻和硅藻外,还发现了有相当多的水华鱼腥藻,甚至在沿岸带某些区域大量聚集而形成水华(未发表资料).尽管如此,巢湖三月初的水体中微囊藻数量也很少,这说明越冬期间水体中鱼腥藻的数量较多可能和夏季以微囊藻为主体的水华发生并无直接联系.

调制荧光仪(PAM)在植物学领域已经得到了广泛的应用^[3].近来出现的专为浮游植物研究设计的Phyto-PAM室内研究中也取得了许多成果,例如用来研究紫外辐射、营养盐对藻类的影响^[12].对于应用PAM研究野外藻类,已有报道采用Mini-PAM和Phyto-PAM研究野外蓝藻的光合作用能力^[13,14].但是,由于Phyto-PAM的原理是基于对由四个不同波长光激发而产生的荧光进行测定,并对比参照藻的吸收光谱进行

不同藻的定性定量分析,但是用来作为参照的纯种藻和野生藻是不一样的^[15],因而可能会影响 Phyto-PAM 的准确性,这也限制了 Phyto-PAM 在野外研究中的应用.最近就有报道发现利用 Phyto-PAM 测定的荧光值来计算叶绿素含量和初级生产力时都有较大偏差^[16].本实验并不考虑定量方面的计算,而是利用 Phyto-PAM 来研究采用研究越冬浮游植物的光合作用活性情况,结果表明太湖和玄武湖中仅检测到绿藻和硅藻的光合作用活性,但是巢湖水体中蓝藻、绿藻和硅藻都有光合作用活性,显微镜镜检结果肯定了 Phyto-PAM 的测定结果,这与 Phyto-PAM 在区分三大类藻的可靠性方面的报道相符^[15].本实验利用 Phyto-PAM 灵敏性的优点,对处于越冬期间水体的浮游植物光合作用活性进行了分析,结合显微镜镜检结果,表明越冬期间水体中的以较多数量出现的蓝藻、绿藻和硅藻具有较好的光合作用活性.

硫酸铜对蓝藻和绿藻有很强的毒性作用,可以很快杀灭蓝藻和绿藻中的丝藻,但是短时间内某些硅藻对铜、锌等重金属则具有一定的抵抗力^[17].鲁哥氏液作为常用的固定剂,可以很快杀死水体中的浮游植物.本实验设计了硫酸铜和鲁哥氏液处理实验,Phyto-PAM 测定结果表明,化学药物处理前,样品有蓝藻、绿藻和硅藻活性,但硫酸铜处理后,蓝藻和绿藻的 F_v/F_m 值变为零,其快速光曲线消失,硅藻的 F_v/F_m 显著下降,快速光曲线也显示其活性受到了抑制.鲁哥氏液处理后样品中蓝藻、绿藻和硅藻的快速光曲线全部消失,说明浮游植物的光合作用活性全部丧失.由此可见,Phyto-PAM 的测定结果与硫酸铜和鲁哥氏液的作用特点一致,结果表明了 Phyto-PAM 测定水体光合作用活性结果的可信性,肯定了 Phyto-PAM 原位测定浮游植物光合作用活性的结果.

Verspagen 等人的研究未报道冬季水体中藻类的光合作用情况,但是发现底泥中的微囊藻全年都具有光合作用活性,并且冬季和春季时活性较低^[18],这与本实验的结果相符.本研究利用 Phyto-PAM 测定结果和显微镜镜检结果结合,通过化学药物处理实验对照,结果表明处于越冬期间水体中存在有较多的蓝藻、绿藻或(和)硅藻时,这几类藻都具有较强的光合作用活性.在利用 Phyto-PAM 研究的过程中发现,蓝藻的 F_v/F_m 值一般较低,符合蓝藻的生理特点,但是绿藻和硅藻的 F_v/F_m 值则较高,多次达到 0.5 甚至 0.6 以上,比相关报道要高^[15],这可能与实验水体中腐殖质等有机物含量过高,在用过滤水体调零时降低了信号与噪音的比相关,该结果说明应用 Phyto-PAM 在野外研究某些准确性较高的指标时需要慎重.

4 参考文献

- [1] 孔繁翔,高 光.大型浅水富营养化湖泊中蓝藻水华形成机理的思考.生态学报,2005,25(3):589-595.
- [2] Burnberg A K, Blomqvist P. Benthic overwintering of *Microcystis* colonies under different environmental conditions. *J Plankton Res*, 2002, 24:1247-1252.
- [3] Schreiber U, Neubauer C, Schliwa U. PAM fluorometer based on medium-frequency pulsed-Xe flash measuring light: a highly sensitive new tool in basic and applied photosynthesis research. *Photosynth. Res*. 1993, 36:65-72.
- [4] Höder D P, Porst M, Santas R. Photoinhibition by solar radiation in the Mediterranean alga *Peyssonnelia squamata* measured on site. *Plant Ecol*, 1998, 139:167-175.
- [5] Admiraal W. Influence of light and temperature on the growth rate of estuarine benthic diatoms in culture. *Marine Biols*, 1976, 39(1):1-9.
- [6]. 章宗涉,黄祥飞.淡水浮游生物研究方法.北京:科学出版社,1991:340-344.
- [7] Richardson R J, Aquatic weed control. In: 2005 North Carolina agricultural chemicals manual. College of Agriculture and Life Sciences, NC State University. 2005:39-46.
- [8] Paerl H W. Growth and reproductive strategies of blue-green algae (Cyanobacteria). In: Sandgren CD ed. Growth and Reproductive strategies of freshwater phytoplankton. Cambridge: Cambridge University Press. 1988,261-315.
- [9] Suzuki Y, Takahashi M. Growth responses of several diatom species isolated from various environments to temperature. *J Phycol*, 1995, 31(6):880-888.

- [10] Schelske C L, Carrick H J, Aldridge F J. Can wind induced resuspension of meroplankton affect phytoplankton dynamics? *J N Am Benthol Soc*, 1995, **14**:616 – 630.
- [11] Jacoby J M, Gibbons H L, Hanowell R, Bouchard D D. Wintertime blue-green algal toxicity in a mesotrophic lake. *J Freshw Ecol*, 1994, **9**(3):241 – 252.
- [12] Grinten E V, Janssen M, Simis S G H, Barranguet C, Admiraal W. Phosphate regime structures species composition in cultured phototrophic biofilms. *Freshw Biol*, 2004, **49**: 369 – 381.
- [13] Rascher U, Lakatos M, B del B, L ttge U. Photosynthetic field capacity of cyanobacteria of a tropical inselberg of the Guiana Highlands. *Euro J Phycol*, 2003, **38**: 247 – 256.
- [14] Schreiber U, Gademann R, Bird P, Ralph PJ, Larkum AWD, K hl M. Apparent light requirement for activation of photosynthesis upon rehydration of desiccated beachrock microbial mats. *J Phycol*, 2002, **38**: 125 – 134.
- [15] Schreiber U. Chlorophyll fluorescence: new instruments for special applications. In: Garab G ed. *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998: 4253 – 4258.
- [16] Kruskopf M, Flynn K J. Chlorophyll content and fluorescence responses cannot be used to gauge reliably phytoplankton biomass, nutrient status or growth rate. *N Phytol*, 2006, **169**(3): 525 – 536.
- [17] Clements W H, Cherry D S, Van Hassel J H. Assessment of the impact of heavy metals on benthic communities at the Clinch River (Virginia): evaluation of an index of community sensitivity. *Can J Fish Aqua Sci*, 1992, **49**: 1686 – 1694.
- [18] Verspagen J M H, Snelder EOFM, Visser P M *et al*. Recruitment of benthic *Microcystis* (Cyanophyceae) to the water column: internal buoyancy changes or resuspension? *J Phycol*, 2004, **40**: 260 – 270.