

青岛海域大面积聚集漂浮浒苔的显微观测

牛建峰, 范晓蕾, 潘光华, 朱大玲, 谢嘉琳, 刘伟, 王广策, 孙松, 周百成

(中国科学院海洋研究所, 山东青岛 266071)

摘要: 对近期在青岛海域大面积聚集漂浮的浒苔 (*Enteromorpha prolifera* (Muell) J. Ag.) 进行常规显微镜观察, 发现细胞内存在大小约 1 μm 的可动的颗粒状结构。分别采用鞭毛染色和扫描电镜观察的方法对其进行了初步研究, 均未发现此颗粒状可动结构具有鞭毛。用透射电镜对浒苔细胞的超微结构特征进行了观察, 显示浒苔细胞壁致密而厚, 每个浒苔细胞有 1 个片状叶绿体, 贴近于细胞壁分布, 淀粉粒含量丰富, 但依然未发现胞内颗粒状结构具有鞭毛。

关键词: 浒苔 (*Enteromorpha prolifera* (Muell) J. Ag.); 鞭毛染色; 内部结构; 扫描电子显微镜; 透射电子显微镜

中图分类号: Q949.21⁺ 1; Q942.4

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)08-0030-04

浒苔 (*Enteromorpha prolifera* (Muell) J. Ag.) 是一种大型绿藻, 隶属于绿藻门 (Chlorophyta)、石莼目 (Ulvales)、石莼科 (Ulvaceae)、浒苔属 (*Enteromorpha*), 广泛分布于海洋沿岸中、低潮区的砂砾、岩石、滩涂和石沼中。浒苔对环境的适应能力和繁殖能力极强, 正常的生长不需要很强的光照^[1]。在富营养化条件下生长特别快速, 目前已成为世界范围内“绿潮”形成的主要种类之一^[2,3]。浒苔一般因漂浮、堆积成灾, 历史上曾在意大利、法国、丹麦等多国海域发生过。

中国海域常见的有缘管浒苔 (*Enteromorpha linza*)、扁浒苔 (*Enteromorpha compressa*)、条浒苔 (*Enteromorpha clathrata*)、肠浒苔 (*Enteromorpha intestinalis*) 等^[4]。但近期在青岛海域大面积聚集漂浮的绿藻, 被公认为是浒苔属的浒苔 (*E. prolifera*)。其藻体呈绿色, 管状中空, 分枝细长众多, 主杆不明显, 无根无茎亦无叶片, 藻体呈柔软的丝状漂浮于海面。光镜下观察其细胞, 可发现胞内存在一些可动的颗粒状结构, 关于这些可动颗粒结构, 有人认为是孢子, 有人认为是配子。为此, 作者通过显微镜观察和鞭毛染色的方法对这些可动颗粒进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 材料

藻体分别采自青岛六号码头表层海区、八大峡底层海区及团岛湾底层海区。

1.2 常规显微镜观察

新鲜采集的藻体样品首先进行常规显微镜观察。

1.3 细胞内颗粒物质的分离及鞭毛染色鉴定

选择采自青岛六号码头表层海区的藻体, 以灭

菌海水清洗 3 次, 接着使用组织捣碎机破碎藻体, 300 目筛绢过滤, 滤液先用 300 g 离心 5 min 除去未破碎藻体及大的片断, 上清在 2 000 g 条件下离心 10 min, 获得浓缩的细胞内颗粒物质。光镜下检测并进行鞭毛染色鉴定, 具体方法参照文献[5]。

1.4 扫描电镜观察

取差速离心分离得到的细胞内颗粒状结构以含 0.5% 戊二醛的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.2) 固定 120 min。固定的样品分别以磷酸盐缓冲溶液漂洗 4 次, 乙醇逐级脱水, 醋酸异戊酯置换, 于 HCP-2 型 CO 临界点干燥仪中干燥, IB-3 型离子溅射仪中进行真空喷镀, 用双面导电胶带纸粘于样品台上, 扫描电子显微镜下观察, 通过 KYKY2800B 扫描电镜联机图像分析系统, 在 5 000~8 000 倍下数码拍照, 电脑保存^[6]。

1.5 透射电镜观察

1.5.1 样品处理

1.5.1.1 固定与脱水

将选定的藻枝样品切割成 1 mm 长度的片断, 分别放入瓶中, 用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.2) 配制的 5% 戊二醛固定 2 h, 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.2) 室温下漂洗 3 次, 每次 15 min; 1% 锇酸后固定 120 min。0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.2) 室温下漂洗 3 次, 每次 15 min; 依次用 30%、50%、70%、80%、90%、100% 乙醇梯度脱水。经丙酮: 乙醇 (1: 1) 置换, 最后, 纯丙酮置换 3 次, 以彻底脱去样品块中的水分。

收稿日期: 2008-07-11; 修回日期: 2008-07-18

作者简介: 牛建峰 (1977), 男, 山西榆次人, 助理研究员, 主要从事藻类生理生化研究, 电话: 0532-82898575, E-mail: jf_niu@sina.com.cn; 王广策, 通讯作者, E-mail: gwang@ms.qdio.ac.cn

1.5.1.2 渗透

丙酮包埋剂(体积比 9:1)作用 120 min; 丙酮包埋剂(体积比 1:1)作用 120 min; 纯包埋剂渗透 120 min。

1.5.1.3 包埋

向 21 孔硅化包埋板每孔中先加入少量包埋剂(加 DMP-30), 用牙签挑出样品, 放入包埋孔的两端, 最后将每孔加满。将包埋板放入烘箱中聚合, 36℃预聚合 12 h, 45℃预聚合 12 h, 再 62℃完全聚合 48 h^[7]。

1.5.1.4 修块与超薄切片

将聚合好的包埋块放入专用的样品夹中, 在解剖镜下用单面刀片修去顶端和组织周围多余的包埋剂, 并使包埋材料呈金字塔形。LKBNova 超薄切片机进行超薄切片, 切片厚度 60 nm, 切片成带后, 用眉毛笔将带状切片捞到以 Formvar(聚乙烯醇缩聚甲醛, 0.2%) 作为支持膜的铜网上^[8]。

1.5.1.5 正染色

在一培养皿中灌注蜡, 做成蜡槽, 待凝固。取铂和醋酸铀溶液滴入蜡槽中, 然后用尖头镊子夹取铜网, 将有材料的一面朝下放在染色液中, 染色 120 min。取出铜网, 经过 3 次双蒸水漂洗后, 按照同样方法进行柠檬酸铅染色 60 min。取出铜网, 用滤纸吸干多余的水, 放入切片盒中^[9]。

1.5.2 透射电镜观察

使用 H-7000 透射电镜(日立), 加速电压 75 kV 观察超薄切片并拍照。

2 结果

2.1 浒苔、浒苔细胞及其可动颗粒的常规显微镜观察结果

如图 1a 所示, 浒苔藻体呈管状中空, 分枝细长而众多。值得注意的是在高倍镜下, 每个浒苔细胞内可见若干直径约 1 μm 的颗粒状可动结构(图 1b1; 1b2; 1b3)。用差速离心的方法分离该颗粒状结构,

光镜下检测可发现有少量颗粒状结构仍然可以运动, 大小与细胞内颗粒状结构相似(图 1c)。鞭毛染色结果显示该颗粒状物质并没有鞭毛的存在(图 1d)。

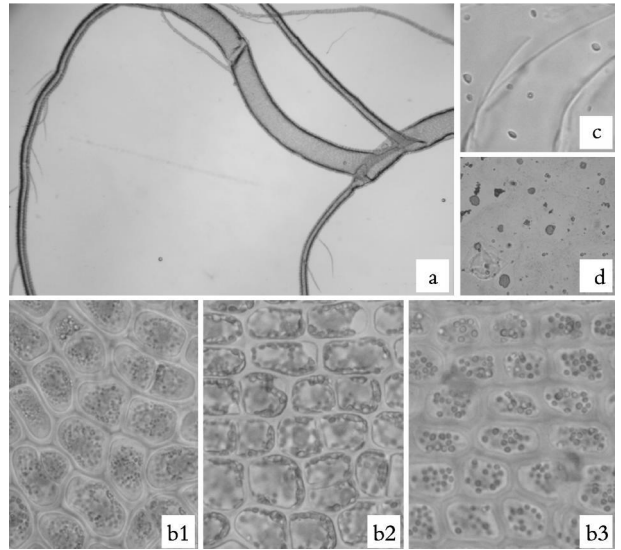


图 1 浒苔、浒苔细胞及胞内可动颗粒状结构的光镜照片

Fig. 1 *E. prolifera* and its mobile particles in the cell

a. 浒苔藻体整体照片(×12); b1. 六号码头表层漂浮藻体细胞(×240); b2. 团岛湾底层海区藻体细胞(×240); b3. 八大峡底层海区藻体细胞(×240); c. 分离得到的浒苔可动颗粒(×600); d. 分离得到的浒苔可动颗粒鞭毛染色结果(×600)

a. the shape of *E. prolifera* (×12); b1. the cell structure of *E. prolifera* from the sixth dock seawater in Qingdao (×240); b2. the cell structure of *E. prolifera* from the Tuandaowan seabed (×240); b3. the cell structure of *E. prolifera* from the Badaxia seabed (×240); c. the mobile particles isolated from the *E. prolifera* (×600); d. the mobile particles isolated from the *E. prolifera* stained with silver (×600)

2.2 扫描电镜观察结果

扫描电镜结果如图 2 所示, 差速离心分离得到的可动颗粒状物质在扫描电镜下未见到有鞭毛的存在(图 2a, 图 2b)。

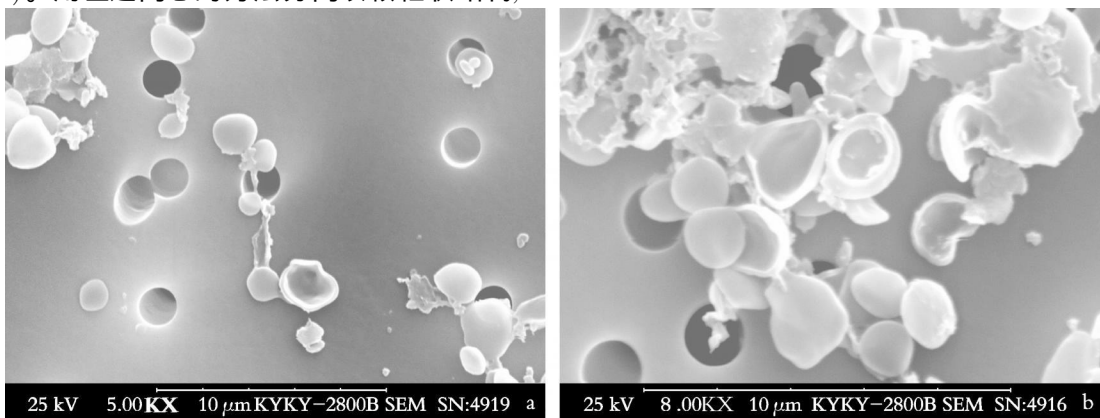


图 2 浒苔藻体内可动颗粒的扫描电镜照片

Fig. 2 The mobile particles isolated from the *E. prolifera* cell

a. 分离得到的浒苔可动颗粒(×5 000); b. 分离得到的浒苔可动颗粒(×8 000)

a. the picture of the mobile particles observed with SEM (×5 000); b. the picture of the mobile particles observed with SEM (×8 000)

2.3 透射电镜观察结果

透射电镜结果显示浒苔细胞壁致密且厚, 每个浒苔细胞有 1 个片状叶绿体, 贴于细胞壁分布。细胞内存在数量相对较多的颗粒状物质, 初步断定为淀粉粒(图 3)。另外在细胞内还发现了蛋白核、脂滴和细胞核, 线粒体难于辨识, 但具有鞭毛的颗粒及鞭毛始终未能观察到。

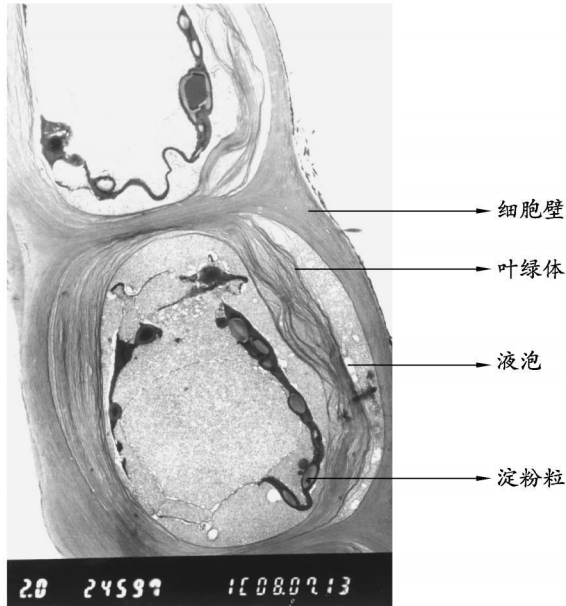


图 3 浒苔细胞的透射电镜照片($\times 3\ 000$)

Fig.3 The picture of the *E. prolifera* cell observed with TEM ($\times 3\ 000$)

3 讨论

对于采自不同海区及不同海水深度的藻体进行观察, 在形态结构上也发现了一些区别。如在六号码头表层海水采集的藻体颜色略深, 细胞内颗粒状物质明显较小而多, 而且内容物充满整个细胞壁内空间。而在团岛湾底泥采集的样品中颗粒状物质数量较少, 且分布于细胞的某一侧, 胞内也出现较大的液泡。究其原因可能是因为沉入海底的藻体由于光照的限制, 不能进行充分的光合作用, 故细胞内累积

物质减少, 甚至出现细胞器的退化。

浒苔的透射电镜照片难于辨识线粒体, 可能是因为其细胞壁较厚, 固定液难于及时渗透进入, 故而导致了线粒体结构的破坏。淀粉粒作为植物的储存物质, 在藻体内大量分布, 说明此藻光合代谢旺盛。

在光镜下观察到的藻细胞内大量的可动颗粒状结构, 使用鞭毛染色、扫描电镜及透射电镜的方法均不能证明该颗粒状结构是孢子或配子。根据透射电镜结果, 作者推测这些颗粒状物质可能是淀粉粒, 因其大小、形状和数量与光镜下观察到的结果最为相近。至于是什么原因导致其在细胞内的运动, 相关研究正在进行中。

参考文献:

- [1] 吴洪喜, 徐爱光. 浒苔实验生态的初步研究 [J]. 浙江海洋学院学报, 2000, 19(3): 230-233.
- [2] Lotze H K, Schramm W. Ecophysiological traits explain species dominance patterns in macroalgal bloom [J]. *Journal of Phycology*, 2000, 36: 287-295.
- [3] Blomster J, Back S, Fewer D P, et al. Novel morphology in *Enteromorpha* (Ulvophyceae) forming green tides [J]. *American Journal of Botany*, 2002, 89: 1756-1763.
- [4] 王建伟, 林阿朋, 李艳燕, 等. 浒苔(*Enteromorpha prolifera*) 藻体发育的显微观察 [J]. 生态科学, 2006, 25(5): 400-404.
- [5] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1981. 35-38.
- [6] 邵邻相, 张均平, 刘艳. 8 种柏科植物叶表皮的扫描电镜观察 [J]. 浙江师范大学学报, 2008, 31(2): 195-200.
- [7] 朱主福, 沈锦德, 许志义, 等. 电子显微镜 [M]. 北京: 机械工业出版社, 1984. 203-231.
- [8] 朱丽霞, 程乃乾, 高信曾. 生物学中的电子显微镜技术 [M]. 北京: 北京大学出版社, 1983. 236-258.
- [9] 张景强, 朴英杰, 蔡福筹, 等. 生物电子显微技术 [M]. 广州: 中山大学出版社, 1987. 113-132.

Observation of *Enteromorpha prolifera* floating in Qingdao sea area by microscope

NIU Jian-feng, FAN Xiao-lei, PAN Guang-hua, ZHU Da-ling, XIE Jia-lin, LIU Wei, WANG Guang-ce, SUN Song, ZHOU Bai-cheng

(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Received: Jul. , 11, 2008

Key words: *Enteromorpha prolifera* (Muell) J. Ag.; flagella staining; internal structure; scanning electron microscope; transmission electron microscope

Abstract: Under the microscope, a few of mobile particles with the size of 1 μm are observed in the cell of *Enteromorpha prolifera* floating in Qingdao sea area recently. We do not find any information about the being of flagella in the mobile particles using the method of silver stain and scanning electron microscope. At the same time, the internal structures of this species are observed using TEM. The results show that the *E. prolifera* possess compact cell wall, there is one chloroplast and it distributes near the cell wall, there are a few of starch grains immerse in alga cell. However, the structure of flagella is not been detected.

(本文编辑: 张培新)