

基于诊断色素分析的胶州湾浮游藻 功能类群研究*

姚 鹏¹ 于志刚¹ 邓春梅^{2,3} 刘淑霞¹ 甄 毓⁴

(1. 中国海洋大学海洋化学理论与工程技术教育部重点实验室 青岛 266100; 2. 国家海洋局海洋溢油鉴别与损害评估技术重点实验室 青岛 266033; 3. 国家海洋局北海环境监测中心 青岛 266033; 4. 中国海洋大学环境科学与工程学院海洋环境与生态教育部重点实验室 青岛 266100)

摘要 分析了 2003 年 12 月至 2004 年 10 月胶州湾 18 个站位 7 个航次的浮游藻色素组成(包括叶绿素和类胡萝卜素)。使用岩藻黄素、多甲藻黄素、色素组合(别黄素+19'-丁酰氧基岩藻黄素+19'-己酰氧基岩藻黄素+青绿藻黄素)和玉米黄素作为特定功能类群的诊断色素指标定义了四个浮游藻功能类群(PFTs), 即硅藻、甲藻、微型鞭毛藻和蓝细菌, 并根据各浮游藻功能类群的诊断色素(组合)占诊断色素总量的比例研究了各功能类群在胶州湾的时空分布特点, 结果表明硅藻是胶州湾的优势类群(平均占 65.8%), 微型鞭毛藻次之(26.0%), 甲藻和蓝细菌最低(分别为 6.3%和 1.9%)。基于诊断色素指标的浮游藻功能类群分析是一种简便的判断优势浮游藻类群组成和丰度的方法。

关键词 浮游藻, 功能类群, 诊断色素, HPLC, 胶州湾

中图分类号 P734

浮游藻是水生食物网的基础, 影响着生态系统的物质运输和能量传输(Irigoien *et al*, 2002), 不同浮游藻类群在生态系统中发挥的作用也不同。为了更深入地理解海洋生态系统动力学过程, 研究者提出了浮游藻功能类群(phytoplankton functional types, PFTs)的概念(Barlow *et al*, 2008; Nair *et al*, 2008; Aiken *et al*, 2009)。浮游藻功能类群的划分并不一定和生理特征相关, 它主要是基于浮游藻在食物网或生物地球化学循环中具有生态功能(如将有机碳输出到深海的类群与只在本地循环的类群就属于不同的功能类群), 或其它特征(如细胞粒径(Nair *et al*, 2008))。一些典型的浮游藻功能类群包括: 固氮浮游藻(Nitrogen fixers, 如束毛藻 *Trichodesmium*)、钙化浮游藻(Calcifiers, 如颗石藻 *coccolithophores*)、产二甲基硫浮游藻(DMS producers, 如棕囊藻 *Phaeocystis*)和硅化浮游藻(Silicifiers, 如硅藻 *diatoms*) (Barlow *et al*, 2008)。浮游藻功能类群可以作为一个生态系统功能的指标,

并可能在碳循环、气候变化研究中发挥潜在作用(Le Quéré *et al*, 2005; Barlow *et al*, 2008; Nair *et al*, 2008; Raitsos *et al*, 2008; Aiken *et al*, 2009; Cropp *et al*, 2009), 这一概念目前已经引起生物地球化学研究者的广泛关注。

从技术上来说, 可以通过色素特征划分浮游藻类群。比如, 岩藻黄素(Fucoxanthin)在硅藻中很丰富, 多甲藻黄素(Peridinin)通常指示甲藻(Dinoflagellates)的存在, 而叶绿素 *b*(Chlorophyll *b*)、别黄素(Alloxanthin)、19'-丁酰氧基岩藻黄素(19'-butanoyloxyfucoxanthin)和 19'-己酰氧基岩藻黄素(19'-hexanoyloxyfucoxanthin)则代表各种微型鞭毛藻(Nanoflagellates) (Barlow *et al*, 2008)。许多非常重要的浮游藻种类因为粒径微小、不易保存等因素在传统的显微镜鉴定中易被忽略, 但是可以通过特征色素的检出而被发现。如于志刚等(Yu *et al*, 2007)首次在我国海域检测到青绿藻黄素(Prasinanthin)等特征色素, 从而证实了一类含青绿

* 国家自然科学基金面上项目, 40676068 号和国家自然科学基金青年基金项目, 40806029 号。姚鹏, E-mail: yaopeng@ouc.edu.cn

通讯作者: 于志刚, 博士生导师, 教授, E-mail: zhigangyu@ouc.edu.cn

收稿日期: 2010-01-29, 收修改稿日期: 2011-11-07

藻黄素的超微型青绿藻(Prasinophyceae)在胶州湾的大量存在。但是,许多标志色素并不限于一个藻类类群,而是多个藻类类群共有。比如,尽管岩藻黄素是硅藻中优势的类胡萝卜素,它同时也存在于定鞭藻(Prymnesiophytes)和金藻(Chrysophytes)中,在这些藻中其主要是作为 19'-丁酰氧基岩藻黄素和 19'-己酰氧基岩藻黄素的前体化合物(Jeffrey *et al.*, 1997)。同时,在一个藻类门类中,可能根据色素分布模式将其划分为好几类,比如可以将定鞭藻划分成 8 类,其中有些类别的色素特征与硅藻或甲藻是相同的,而甲藻也有 5 种不同的色素模式(邓春梅等, 2010)。因此,从现场样品色素数据获得的浮游藻类群的信息是非常复杂的,对所获信息解释一直是浮游藻生态学研究的一个重点。以 CHEMTAX 软件为代表的色素数据数学解析方法能够根据不同类群浮游藻特征色素比值的差异对浮游藻进行纲一级水平上的分类(Mackey *et al.*, 1996)。但是初始特征色素比值的选取、运算次数等等都会影响 CHEMTAX 的结果准确性(Latasa *et al.*, 2007)。而实际上,有些研究并不需要知道各浮游藻纲是如何分布和变化的,只需要知道优势的浮游藻类群,或不同粒径的浮游藻类群,或一个特定的功能类群的相对丰度。因此,对特征色素数据进行组合、降维处理,进行简单的数学运算从而得到感兴趣

的浮游藻类群组成和丰度信息很有必要。诊断色素分析就是这样一种方法,它利用不同浮游藻的代表性特征色素或其组合作为“诊断色素(组合)”,据此将浮游藻划分为不同的类群,然后利用各诊断色素(组合)占总的诊断色素的百分比指示各类群的丰度(Vidussi *et al.*, 2001; Uitz *et al.*, 2006)。这些类群通常指向一些代表性的浮游藻功能类群,如硅藻、甲藻、微型鞭毛藻(如定鞭藻、金藻、隐藻、绿藻、青绿藻等)、蓝细菌等;或者代表不同粒径的浮游藻类群,如硅藻和甲藻通常在 5—200 μm 之间,微型鞭毛藻一般小于 20 μm (有一些隐藻或绿藻的粒径可能大于 20 μm),而蓝细菌则代表粒径小于 2 μm 的类群(Jeffrey *et al.*, 1997; Barlow *et al.*, 2008)。表 1、2、3 列出了主要的浮游藻色素、色素组合、色素指标和对应的浮游藻功能类群等(据 Barlow *et al.*, 2008 和 Aiken *et al.*, 2009 综合)。

胶州湾是一个半封闭的海湾,通过一个窄口与北黄海相连(Zhao *et al.*, 2005a),平均水深只有 7m 左右,面积约 390 km^2 (Liu *et al.*, 2005)。胶州湾浮游藻的研究已经有 70 余年的历史(Jin, 1939; 李冠国等, 1956; 金德祥等, 1965; 钱树本等, 1983; 刁焕祥, 1984; 郭玉洁等, 1992; 陈怀清等, 1992; 焦念志, 2001; Shen, 2001; 刘东艳等, 2003)。基于传统的显微镜镜检的研

表 1 藻类色素名称、缩写和对应的藻类类群(自 Barlow *et al.*, 2008 和 Aiken *et al.*, 2009 综合)

Tab.1 Abbreviations for phytoplankton pigments and taxonomic designations (modified from Barlow *et al.*, 2008 and Aiken *et al.*, 2009)

色素名称	Pigment	缩写	对应浮游藻类群
叶绿素 a	Chlorophyll a	Chl a	所有藻类
叶绿素 b	Chlorophyll b	Chl b	绿藻、青绿藻
叶绿素 c ₁	Chlorophyll c ₁	Chl c ₁	硅藻、定鞭藻、金藻
叶绿素 c ₂	Chlorophyll c ₂	Chl c ₂	硅藻、甲藻、定鞭藻、金藻
别黄素	Alloxanthin	Allo	隐藻
19'-丁酰氧基岩藻黄素	19'-butanoyloxyfucoxanthin	BUT	金藻(主要)、定鞭藻(次要)
19'-己酰氧基岩藻黄素	19'-hexanoyloxyfucoxanthin	HEX	定鞭藻(主要)、金藻(次要)
胡萝卜素	Carotenes, $\beta\beta$ -carotene+ $\beta\epsilon$ -carotene	Caro	所有藻类
硅甲藻黄素	Diadinoxanthin	Diad	硅藻、定鞭藻、金藻
硅藻黄素	Diatoxanthin	Diato	硅藻、定鞭藻、金藻
岩藻黄素	Fucoxanthin	Fuc	硅藻(主要)、甲藻(次要)、金藻(次要)、定鞭藻(次要)
叶黄素	Lutein	Lut	绿藻、青绿藻
多甲藻黄素	Peridinin	Per	甲藻
紫黄素	Violaxanthin	Viol	绿藻、青绿藻
玉米黄素	Zeaxanthin	Zea	蓝细菌(主要)
青绿藻黄素	Prasinoxanthin	Pra	青绿藻

表 2 藻类色素组合和计算公式(自 Barlow *et al*, 2008 和 Aiken *et al*, 2009 综合)Tab.2 Pigment sums and pigment formulae (modified from Barlow *et al*, 2008 and Aiken *et al*, 2009)

色素组合	缩写	计算式
总叶绿素 <i>a</i> (Total chlorophyll <i>a</i>)	Tchl <i>a</i>	Chl <i>a</i> + Chl <i>a</i> derivatives
总类胡萝卜素 (Total caroteneoids)	TC	Allo+BUT+Caro+Diad+Diato+Fuc+HEX+ Lut+Per+Viol+Zea+Pra
辅助色素 (Accessory pigments)	AP	TC+Chl <i>b</i> +Chl <i>c</i> ₁ +Chl <i>c</i> ₂
总色素 (Total pigments)	TP	Tchl <i>a</i> +AP
光保护类胡萝卜素 (Photoprotective carotenoids)	PPC	Allo+Caro+Diad+Diato+Lut+Viol+Zea
光合类胡萝卜素 (Photosynthetic carotenoids)	PSC	BUT+Fuc+HEX+Per+Pra
诊断色素 (Diagnostic pigments)	DP	Allo+BUT+Fuc+HEX+Per+Zea+Chl <i>b</i>

表 3 藻类色素指标和计算公式(自 Barlow *et al*, 2008 和 Aiken *et al*, 2009 综合)Tab.3 Pigment indices and pigment formulae (Barlow *et al*, 2008 and Aiken *et al*, 2009)

色素指标	缩写	计算式
总叶绿素 <i>a</i> 比总色素 (Total chl <i>a</i> to total pigments)	Tchl <i>a</i> _{TP}	Tchl <i>a</i> /TP
总叶绿素 <i>a</i> 比辅助色素 (Total chl <i>a</i> to accessory pigments)	Tchl <i>a</i> _{AP}	Tchl <i>a</i> /AP
光保护类胡萝卜素比总色素 (Photoprotective carotenoids to total pigments)	PPC _{TP}	PPC/TP
光合类胡萝卜素比总色素 (Photosynthetic carotenoids to total pigments)	PSC _{TP}	PSC/TP
硅藻比例 (Diatom proportion of DP)	Diato _{DP}	Fuc/DP
甲藻比例 (Dinoflagellate proportion of DP)	Dino _{DP}	Per/DP
微型鞭毛藻比例 (Nanoflagellate proportion of DP)	Flag _{DP}	(Allo+BUT+HEX+Chl <i>b</i>)/DP
蓝细菌比例 (Cyanobacteria proportion of DP)	Cyano _{DP}	Zea/DP

究结果表明硅藻和甲藻是胶州湾的优势类群, 仅存在少数几种绿藻、金藻和蓝藻(刘东艳, 2004)¹⁾。近几十年来, 胶州湾浮游藻细胞总量呈下降趋势, 种类多样性持续降低, 但与此同时, 年平均叶绿素 *a* 含量却保持稳定, 并且微型浮游藻 (nanophytoplankton, 2—20 μ m) 和超微型浮游藻 (picophytoplankton, 0.2—2 μ m) 数量呈上升趋势(刘东艳, 2004)¹⁾(焦念志, 2001; Zhao *et al*, 2005a, b; Liu *et al*, 2005; Liu *et al*, 2008; Yao *et al*, 2010)。显然, 微型和微微型浮游生物的作用不可忽视, 仅仅依靠显微镜镜检分析已经不能满足深入研究的需要, 必须引入新的方法来研究胶州湾浮游藻群落结构的变化。粒径分级叶绿素 *a* 和流式细胞仪分析技术可以对超微型浮游藻的生物量给出估计, 但是不能确定是什么种类的超微型浮游藻。从卫星遥感数据获得浮游藻功能类群分布情况也是一个具有潜在重要性的新技术, 它能提供大范围的浮游藻时空分布图, 对研究浮游藻群落结构的连续变化和演化过程具有重要意义(Raitsos *et al*, 2008), 但是这一技术目前在近岸海域和海湾还不能够实际应

用。一系列研究表明, 运用浮游藻诊断色素分析可能是一条研究超微型浮游藻群落结构的有效途径(Yu *et al*, 2007; Barlow *et al*, 2008; Aiken *et al*, 2009)。

本文在对胶州湾藻类进行色素分析的基础上, 利用诊断色素指标研究浮游藻功能类群的组成和时空分布等特点。

1 材料与方法

1.1 样品采集

本研究的调查站位位于胶州湾中部和湾口附近, 北邻大沽河邻近海域、水产养殖区, 东邻墨水河、李村河口及青岛港, 受河流输入、人为活动等的影响较大。湾口附近水较深, 受潮流的影响也较大(杨世伦等, 2003)。采样站点如图 1 所示。

从 2003 年 12 月至 2004 年 10 月 (含 2004 年 5 月) 隔月月末进行采样, 共进行了 7 个航次的现场调查, 其中 2004 年 4 月由于天气原因, 只采集了 1—15 号站位样品。采集表层(0.5m 水深处)海水用于色素分析, 采集好的海水避光保存, 采样结束后带回实验室

1) 刘东艳, 2004. 胶州湾浮游植物与沉积物中硅藻群落结构演替的研究. 青岛: 中国海洋大学博士论文

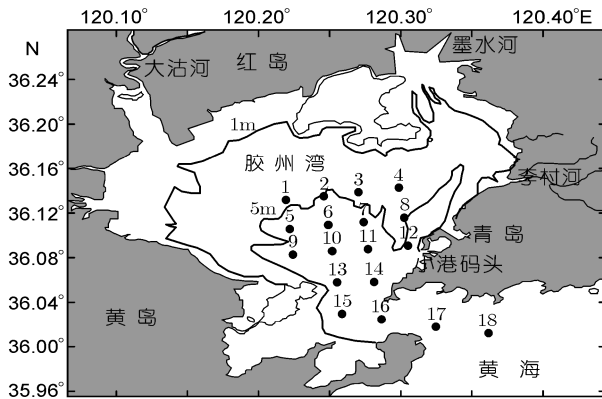


图 1 胶州湾采样站位图

Fig.1 Sampling stations in Jiaozhou Bay, Qingdao, China

进行过滤等处理。海水水样首先通过约 200 μ m 筛绢过滤以去除较大的浮游动物,然后在弱真空(<0.03 MPa)和微光下将 1L 海水过滤到 47mm Whatman GF/F 玻璃纤维滤膜上。滤膜在分析之前于-80 $^{\circ}$ C 下冷冻保存,分批次分析,每批保存时间不超过 3 个月。

1.2 HPLC 色素分析

将冷冻的滤膜剪碎,用 1.5mL 95%甲醇提取色素,并在冰水浴中超声处理 5 分钟。提取物通过直径 13mm 的尼龙滤膜针筒过滤器过滤以去除细胞和滤膜碎屑。为了避免色素峰的变形,250 μ L 的提取液和 50 μ L 的 Milli-Q 水混合(Zapata *et al*, 1991)。混合后立即进样,进样量为 100 μ L。所有的操作均在暗室中进行以避免光照破坏色素。

色素分析采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)技术。色谱设备为 Waters Alliance 2695 HPLC 系统,配 Waters 2996 二极管阵列检测器和 Waters 2475 多波长荧光检测器。HPLC 色素分离方法参照文献(Zapata *et al*, 2000)。固定相为 C₈ 色谱柱(Waters Symmetry, 150 \times 4.6mm, 3.5 μ m 粒径, 100 \AA 孔径),色谱柱前端接保护柱(Waters Symmetry C₈, 10 \times 2.1mm, 3.5 μ m 粒径, 100 \AA 孔径),放置在柱温箱中,恒温 25 $^{\circ}$ C。流动相为: A=甲醇 乙腈 吡啶水溶液 (0.25mol/L 吡啶,用醋酸调节 pH 到 5.0) (50 25 25 v/v/v), B=甲醇 乙腈 丙酮(20 60 20 v/v/v)。使用的有机溶剂均为色谱纯。线性梯度洗脱程序为: 在 22 分钟的时间内 B 从 0% 升到 40%, 在第 28 分钟升到 95%, 并保持 10 分钟, 然后用 2 分钟的时间恢复到初始状态。在每一次分析结束后,使用 1 倍进样环体积(100 μ L)的 30%甲醇清洗进样环,以减少样品间的交叉污染。流速为 1mL/min。

叶绿素和类胡萝卜素用二极管阵列检测器检测

(波长范围 350–750nm, 光谱分辨率 1.2nm)。叶绿素同时也用荧光检测器辅助检测(激发和发射波长分别为 440nm 和 650nm)。色素的定性通过与色素标准、相关文献结果的保留时间和光谱性质进行比较确定,采用外标法进行定量。使用的色素标准包括: 叶绿素 *a*、叶绿素 *b*、叶绿素 *c*₂、硅甲藻黄素、硅藻黄素、岩藻黄素、别黄素、多甲藻黄素、青绿藻黄素、19'-己酰氧基岩藻黄素、玉米黄素、叶黄素和 β , β -胡萝卜素, 购自美国 SIGMA 公司和丹麦 DHI 水与环境研究所。

1.3 诊断色素分析

在本研究中,运用诊断色素分析方法(Diagnostic pigment analysis, DPA) (Vidussi *et al*, 2001; Uitz *et al*, 2006), 利用诊断色素指标(Diagnostic pigment (DP) indices)(各指标定义见表 3)来确定优势浮游藻群落或功能类群(PFTs)的组成。首先根据色素的分类和功能进行色素之间的组合,比如叶绿素 *a* 及其衍生物构成总叶绿素 *a* (Tchl *a*), 一些主要的类胡萝卜素如别黄素、岩藻黄素、胡萝卜素、叶黄素等构成总类胡萝卜素(TC), TC 与叶绿素 *b* 和叶绿素 *c* 则组成了辅助色素(AP), 而总叶绿素 *a* 与辅助色素加起来就是总色素(TP)。根据参与光合作用的过程不同,可以将总类胡萝卜素 TC 分为两类,即光合类胡萝卜素(PSC)和光保护类胡萝卜素(PPC), 前者与叶绿素 *a* 一样参与光合作用, 后者则在光照过强时起到吸收过多的光能、避免对光合器官产生危害的作用(Lin *et al*, 2002); 因此, 光合类胡萝卜素和光保护类胡萝卜素的含量高低在一定程度上能够反映浮游藻生长的光照条件。七种色素被选作诊断色素来确定特定浮游藻功能类群的存在, 即岩藻黄素(Fuc)、别黄素(Allo)、多甲藻黄素(Per)、叶绿素 *b* (Chl *b*)、玉米黄素(Zea)、19'-丁酰氧基岩藻黄素(BUT)和 19'-己酰氧基岩藻黄素(HEX)。共划分了硅藻、甲藻、微型鞭毛藻和蓝细菌四个优势的浮游藻功能类群, 其中微型鞭毛藻类群包括了金藻、定鞭藻、隐藻、绿藻和青绿藻。运用各诊断色素或诊断色素组合占总的诊断色素的百分比指示各功能类群的丰度。指示优势浮游藻功能类群的诊断色素中, 硅藻类群采用岩藻黄素(Fucoanthin, Fuc); 甲藻类群采用多甲藻黄素(Peridinin, Per); 微型鞭毛藻类群则采用诊断色素组合, 其丰度按 $Flag_{DP}=(Allo+ BUT+HEX+Chl\ b)/DP$ 计算, 其中 DP 是诊断色素总量, 别黄素(Allo)、19'-丁酰氧基岩藻黄素(BUT)、19'-己酰氧基岩藻黄素(HEX)和叶绿素 *b* (Chl *b*) 分别是隐藻、金藻、定鞭藻、绿藻和青绿藻的诊断色素; 蓝细

菌类群的诊断色素是玉米黄素(Zea)。

2 结果与讨论

2.1 色素的定性与定量

胶州湾表层水样采集时间自2003年12月至2004年10月,跨越了4个季节,并且站位分布从湾内至湾外,不同的站位所处的环境明显不同,藻类色素种类十分丰富。从样品中共鉴定出33种色素(表4),其中叶绿素类10种,类胡萝卜素23种,主要包括:叶绿素 a 、叶绿素 b 、叶绿素 c_2 和 c_1 、岩藻黄素、多甲藻黄素、青绿藻黄素、别黄素、硅甲藻黄素、19'-丁酰氧基岩藻黄素、19'-己酰氧基岩藻黄素、玉米黄素、叶黄素、新黄素、紫黄素、 β, ϵ -类胡萝卜素和 β, β -类胡萝卜素。从相邻色素分离度数据(表4)可以看出,大部分色素都能获得良好的分离。需要指出的是,普通的HPLC色素分析方法中叶绿素 c_2 和 c_1 往往作为一个峰同时被洗脱,但是在本方法中,这两个色素得到了完全分离;玉米黄素和叶黄素的分离是所有HPLC色素分析方法的难点,很多方法也将其作为一个峰洗脱,在本方法中,虽然未能实现完全分离,但是可以实现部分分离。图2为选取的代表性站位样品的浮游藻色素分析的色谱图,从中可以看出色素的分离

效果。表4为色素分析结果,可以看出,主要色素含量均具有比较宽的变化范围,显示这些样品的多种来源。其中,总叶绿素 a 范围从0.404到15.299 $\mu\text{g/L}$,平均值为1.896 $\mu\text{g/L}$;总叶绿素 a 最高值(15.299 $\mu\text{g/L}$)出现在2004年5月12#站,此时,岩藻黄素含量也高达9.417 $\mu\text{g/L}$,说明在这一站位可能发生了硅藻水华。总叶绿素 a 的次高值为5.709 $\mu\text{g/L}$,也出现在2004年5月,是距离12#站很近的8#站,两个站位都靠近青岛港和李村河、海泊河口,受人为活动的影响较大。

根据检测出的主要色素并结合特征色素与浮游藻类群的对应关系,可判断在胶州湾样品中可能存在的浮游藻类群主要包括硅藻、甲藻、金藻、定鞭藻、青绿藻、绿藻、隐藻和蓝细菌等。

2.2 总叶绿素 a 与色素组合

对胶州湾表层水样总叶绿素 a 与表2中定义的色素组合进行了回归分析(图3)。从图中可以看出,除了光保护类胡萝卜素与总叶绿素 a 之间线性关系略差以外($R^2=0.88$),辅助色素、总类胡萝卜素、总色素、光合类胡萝卜素和诊断色素等均与总叶绿素 a 之间存在良好的线性关系($R^2>0.90$),表明这些色素组合如叶绿素 a 一样能作为有效的浮游藻生物量估计替代指标。同时还可以发现,光保护类色素和光合类色

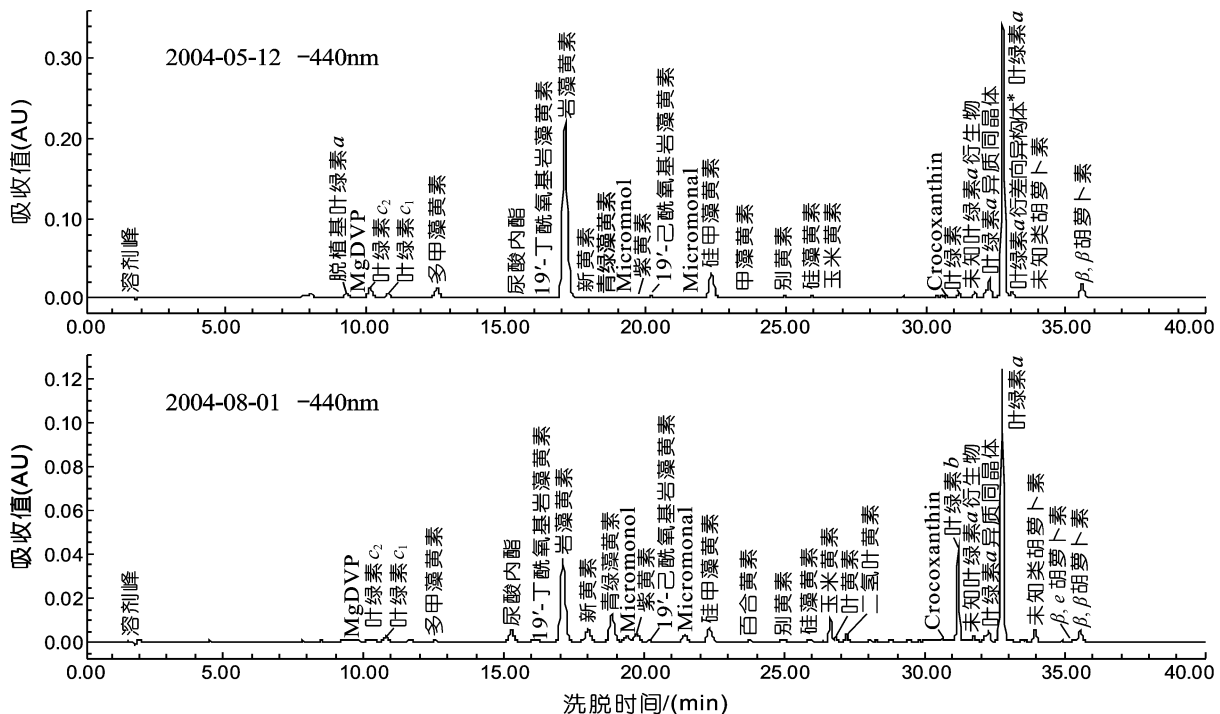


图2 胶州湾代表性航次和站位表层水样品色素分析色谱图(2004.05, 12#和 2004.08, 1#)
Fig.2 Selected HPLC chromatograms of pigments from seawater collected from Jiaozhou Bay, Qingdao, China (2004.05, 12# and 2004.08, 1#)

表 4 胶州湾表层水样品中藻类色素分析结果
Tab.4 Pigment identification of samples collected from Jiaozhou Bay, Qingdao, China

编号	名称	英文名称	色素峰光谱最大吸收峰(nm)	洗脱时间(分钟)	分离度 R_s^*	含量范围(均值)(单位: $\mu\text{g/L}$)
0	溶剂峰	Solvent front		1.59		
1	脱植基叶绿素 a	Chlorophyllide a	430 581 666	9.28		0.004—0.317(0.072)
2	MgDVP	Mg-2,4-divinyl pheoporphyrin a_5 monomethyl ester	440 575 626	9.72	1.18(1/2)	0.004—0.107(0.027)
3	叶绿素 c_2	Chl c_2	452 585 634	10.14	0.98(2/3)	0.004—0.142(0.017)
4	叶绿素 c_1	Chl c_1	450 581 634	10.81		0.004—0.054(0.016)
5	甲基脱植基叶绿素 a	Methyl chlorophyllide a	431 583 663	11.68		0.005—0.133(0.032)
6	多甲藻黄素	Peridinin	476	12.51		0.011—0.823(0.078)
7	尿酸内酯	Uriolide	452 476	15.23		0.004—0.099(0.020)
8	19'-丁酰氧基岩藻黄素	19'-butanoyloxyfucoxanthin	448 472	16.13		0.005—0.188(0.023)
9	岩藻黄素	Fucoxanthin	450	17.07		0.096—9.417(0.791)
10	新黄素	Neoxanthin	413 438 465	17.96		0.004—0.122(0.021)
11	青绿藻黄素	Prasincoxanthin	456	18.82		0.005—0.255(0.036)
12	Micromonol	Micromonol	(405)429 454	19.30	1.17(11/12)	0.004—0.065(0.015)
13	紫黄素	Violaxanthin	417 441 471	19.68	0.93(12/13)	0.004—0.083(0.017)
14	19'-己酰氧基岩藻黄素	19'-hexanoyloxyfucoxanthin	447 470	20.11	1.10(13/14)	0.005—0.245(0.029)
15	Micromonal	Micromonal	462	21.43		0.001—0.068(0.015)
16	硅甲藻黄素	Diadinoxanthin	(422)447 476	22.30		0.009—0.582(0.060)
17	甲藻黄素	Dinoxanthin	417 442 470	23.48		0.006—0.040(0.019)
18	百合黄素	Antheraxanthin	(420)446 474	23.76	0.71(17/18)	0.005—0.011(0.008)
19	别黄素	Alloxanthin	(426)453 480	24.94		0.004—0.263(0.042)
20	硅藻黄素	Diatoxanthin	(427)454 479	25.91		0.004—0.028(0.009)
21	蓝隐藻黄素	Monadoxanthin	(422)448 476	26.17	0.85(20/21)	0.004—0.090(0.013)
22	玉米黄素	Zeaxanthin	(430)453 480	26.61		0.004—0.124(0.016)
23	叶黄素	Lutein	(421)446 474	26.81	0.81(22/23)	0.003—0.021(0.008)
24	二氢叶黄素	Dihydrolutein	(406)429 455	27.22	1.36(23/24)	0.004—0.035(0.013)
25	Crococoxanthin	Crococoxanthin	(426)450 479	30.63		0.004—0.057(0.012)
26	叶绿素 b	Chlorophyll b	464 598 649	31.18	1.26(25/26)	0.029—1.583(0.248)
27	未知叶绿素 a 衍生物	Unknown chl a derivative	431 618 663	31.74		0.015—0.273(0.087)
28	叶绿素 a 异质同晶体	Chlorophyll a allomer	430 614 665	32.27	1.37(27/28)	0.051—1.243(0.162)
29	叶绿素 a	Chlorophyll a	431 616 663	32.75	0.96(28/29)	0.404—13.060(1.713)
30	叶绿素 a 差向异构体	Chl a epimer	430 615 665	33.08	0.86(29/30)	0.017—0.321(0.090)
31	未知类胡萝卜素	Unknown carotenoid from prasinophyceae	(418)443 471	33.93	1.37(30/31)	0.003—0.081(0.015)
32	β, ϵ -胡萝卜素	β, ϵ -carotene	(421)447 476	35.35		0.003—0.056(0.011)
33	β, β -胡萝卜素	β, β -carotene	(427)452 478	35.56	0.72(32/33)	0.003—0.343(0.025)
34	总叶绿素 a^{**}	Total chlorophyll a				0.404—15.299(1.896)

* $R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_{B1} + w_{B2}}$, 其中 t_{R1} 和 t_{R2} 分别为色素峰 1 和 2 的洗脱时间(最大吸收值处对应的洗脱时间), w_{B1} 和 w_{B2} 分别是色素峰 1 和 2 的

宽度(单位为分钟); **总叶绿素 a 为叶绿素 a 及其衍生物之和

素的含量与光照强度的变化关系密切。如图 4 所示, 将各点代表的采样时间和站位标注上(将总叶绿素 a 最高值这一个点去掉, 以便更清楚地看到各点的差异), 则可以非常清晰地显示样品中光保护类胡萝卜

素、光合类胡萝卜素与总叶绿素 a 之间存在着不同的线性关系, 这与采样季节和站位有密切关系。当总叶绿素 $a > 2 \mu\text{g/L}$ 时, 一般来说相同的总叶绿素 a 对应的光保护类胡萝卜素, 8 月份要高于 5、6 月份, 而光合

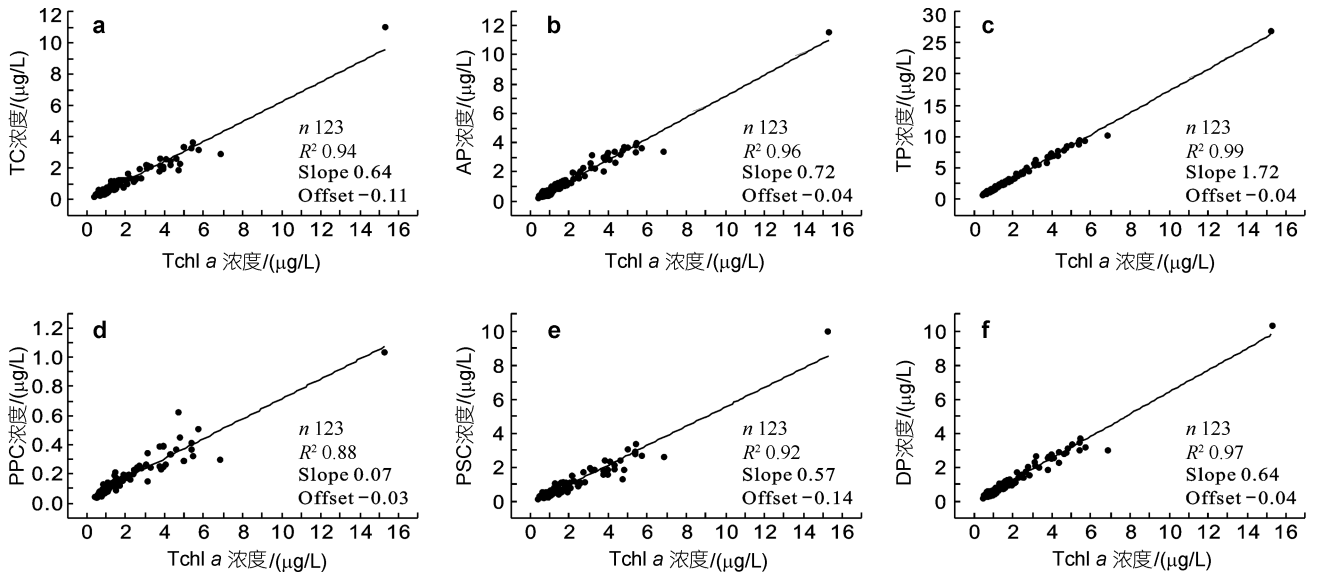


图3 胶州湾表层水样总叶绿素 a 与色素组合的关系

Fig.3 Relationships between pigment combination and TChl a of the samples

a. 总类胡萝卜素-总叶绿素 a ($n=123, R^2=0.94$); b. 辅助色素-总叶绿素 a ($n=123, R^2=0.96$); c. 总色素-总叶绿素 a ($n=123, R^2=0.99$); d. 光保护类胡萝卜素-总叶绿素 a ($n=123, R^2=0.88$); e. 光合类胡萝卜素-总叶绿素 a ($n=123, R^2=0.92$); f. 诊断色素-总叶绿素 a ($n=123, R^2=0.97$)

类胡萝卜素的特点则与此相反。8 月份正值胶州湾夏季, 光照强于 5、6 月, 所以此时浮游藻的光保护类胡萝卜素色素含量最高; 说明光保护类胡萝卜素和光合类胡萝卜素的含量在一定程度上响应光照强度的变化。

2.3 总叶绿素 a 与色素指标

总叶绿素 a 对总色素的贡献是最大的, 平均达 $59.5\% \pm 4.6\%$, 而且总叶绿素 a 对总色素的贡献基本不因总色素含量的变化而变化(图 5)。光合类胡萝卜素对总色素的贡献仅次于叶绿素 a, 为 $28.1\% \pm 6.3\%$, 光保护类胡萝卜素在总色素中占的比例最小, 只有 $5.6\% \pm 1.2\%$ 。光保护类胡萝卜素和光合类胡萝卜素同总叶绿素 a 一样, 其对总色素的贡献也基本稳定。总叶绿素 a 与辅助色素的比值变化比较复杂, 当总叶绿素 a $< 1.0 \mu\text{g/L}$ 时, Tchl a/AP 比值变化范围很大(0.95–2.26), 说明在低叶绿素 a 的情况下, 辅助色素的变化非常剧烈。随着总叶绿素 a 含量的增加, Tchl a/AP 比值变化范围减小。

2.4 总叶绿素 a 与浮游藻功能类群

图 6 是胶州湾表层水样中 4 个浮游藻功能类群的比例与总叶绿素 a 含量关系图, 图 7 为 4 个浮游藻功能类群平均比例。可以看出, 硅藻类群在胶州湾占据绝对优势, 在整

个浮游藻群落中所占比例平均达到 $65.8\% \pm 14.8\%$, 最高达 94.1%, 出现在 2004 年 2 月的 8# 站。其次是微型鞭毛藻类群, 在整个浮游藻群落中所占比例平均达到 $26.0\% \pm 13.1\%$, 在 2004 年 5 月的 2# 站最高(66.1%), 此时硅藻类群的比例只有 21.4%。甲藻类群在整个浮游藻群落中所占比例平均为 $6.3\% \pm 5.2\%$, 在 2004 年 5 月的 18# 站达到最高(36.8%), 仅次于硅藻(42.7%)。而蓝细菌在整个浮游藻群落中所占比例最小, 平均只有 $1.9\% \pm 1.5\%$, 最高也只有 6.0%(2003 年 12 月 15# 站), 可见以蓝细菌为代表的原核生物在胶州湾的生物量较少。

2.5 浮游藻功能类群的时空分布

胶州湾各浮游藻类群的空间分布特点如图 8 所示(以 2004 年 5 月为例)。总的来说, 硅藻类群比例高

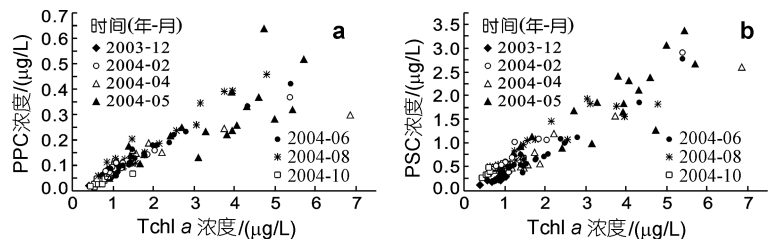


图4 胶州湾表层水样总叶绿素 a 与光保护类胡萝卜素(a)和光合类胡萝卜素(b)的关系(去掉 2004 年 5 月 12# 站位的数据之后)

Fig.4 Relationship between photoprotective carotenoids (PPC) (a) and photosynthetic carotenoids (PSC) (b) and Tchl a of the samples, respectively (after removing the data of station 12#, May 2004)

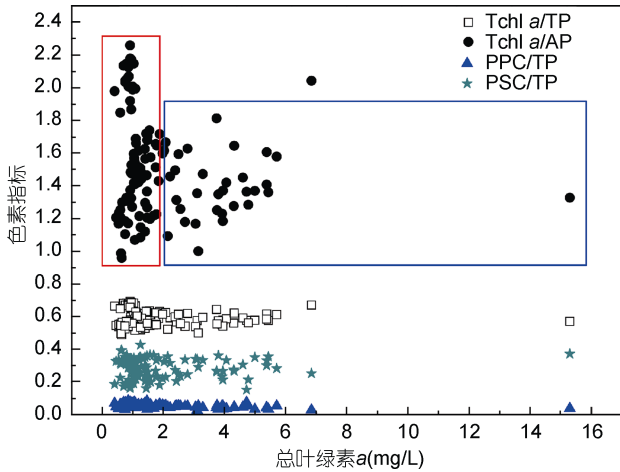


图 5 胶州湾表层水样总叶绿素 a 与色素指标的关系(18 个 站位, 123 个数据)

Fig.5 Relationship between pigment indices and Tchl a of the samples (18 stations, 123 data)

Tchl a/TP: 总叶绿素 a 比总色素; Tchl a/AP: 总叶绿素 a 比辅助色素; PPC/TP: 光保护类胡萝卜素比总色素; PSC/TP: 光合类胡萝卜素比总色素

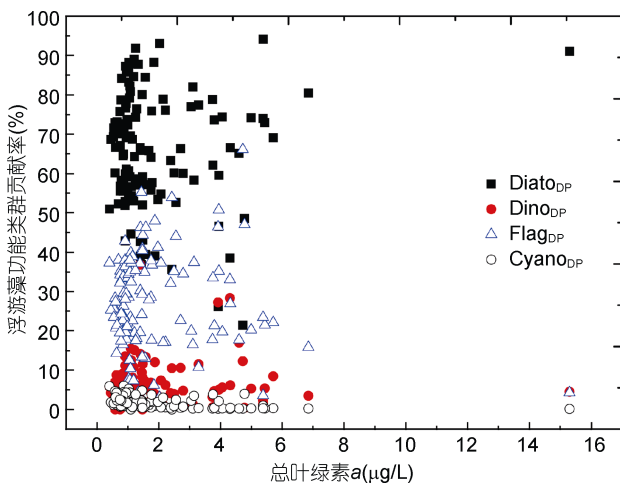


图 6 胶州湾浮游藻四个功能类群占整个浮游藻群落的比例与总叶绿素 a 含量的关系

Fig.6 Regression of the contribution of four phytoplankton functional types to total phytoplankton community versus Tchl a of the samples

DiatoDP: 硅藻比例, %; DinoDP: 甲藻比例, %; FlagDP: 微型鞭毛藻比例, %; CyanoDP: 蓝细菌比例, %

的站位主要集中在青岛小港附近海域, 这一海域受到港口码头、河流(李村河、墨水河等)等输入的工农业废水、生产生活垃圾影响, 是人为活动影响最集中的区域。研究表明, 李村河、墨水河等是胶州湾磷输入的主要来源(Liu *et al.*, 2005), 其富营养化水平的提高是导致该区域硅藻丰度较高的主要原因。而微型鞭

毛藻(Flag_{DP})、甲藻(Dino_{DP})类群等则主要分布在调查海域北部的站位, 这些区域邻近青岛水沙输入最大的大沽河口海域以及青岛的经济贝类养殖区。大沽河 的流量在丰水期、枯水期差别较大, 在丰水期大沽河 的硅和氮的输入通量在输入胶州湾的河流中最高 (Liu *et al.*, 2005), 这种季节性高输入供应的营养盐, 加上养殖区域特殊条件(贝类对个体较大的浮游藻的 选择性滤食和高的氮氮比例(Courties *et al.*, 2004))的 共同作用使该海域成为利于微型和超微型浮游藻生 存的环境。蓝细菌(Cyano_{DP})则主要分布在调查海域西 部和湾口海域, 但是不同的季节分布范围变化较大。

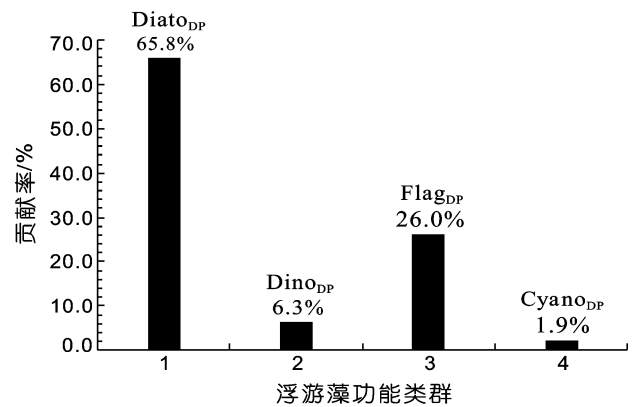


图 7 胶州湾浮游藻四个功能类群占整个浮游藻群落的平均比例

Fig.7 Average contribution of the four phytoplankton functional types to total phytoplankton community of the samples DiatoDP: 硅藻比例, %; DinoDP: 甲藻比例, %; FlagDP: 微型鞭毛藻比例, %; CyanoDP: 蓝细菌比例, %

对 7 个航次各站位的结果取平均值, 给出了胶州湾各浮游藻类群随采样月份的变化情况(图 9)。从图中可以看出, 硅藻和微型鞭毛藻是胶州湾主要的浮游藻功能类群, 它们的丰度之和超过 90%, 其它类群的丰度则很小。硅藻在任何航次均是优势性的类群, 其贡献在 7 个航次内平均达到 65.8%, 其中在 2004 年 2 月的冬季航次最高, 为 86.7%。微型鞭毛藻是胶州湾中丰度仅次于硅藻的浮游藻类群, 7 个航次的平均丰度为 26.0%, 其贡献随时间的变化波动较大, 在 2004 年 6 月达到最高值(36.1%), 在 2004 年 2 月则最低(5.5%)。在近海的微型鞭毛藻类群中, 青绿藻(Yu *et al.*, 2007)、绿藻(Zhu *et al.*, 2009)等都可能对其有较大的贡献。甲藻对胶州湾浮游藻功能类群的贡献相对较小, 高值主要出现在春季 4、5 月份航次, 平均分别为 10.3%和 11.9%, 符合甲藻的一般变化规律, 即硅藻

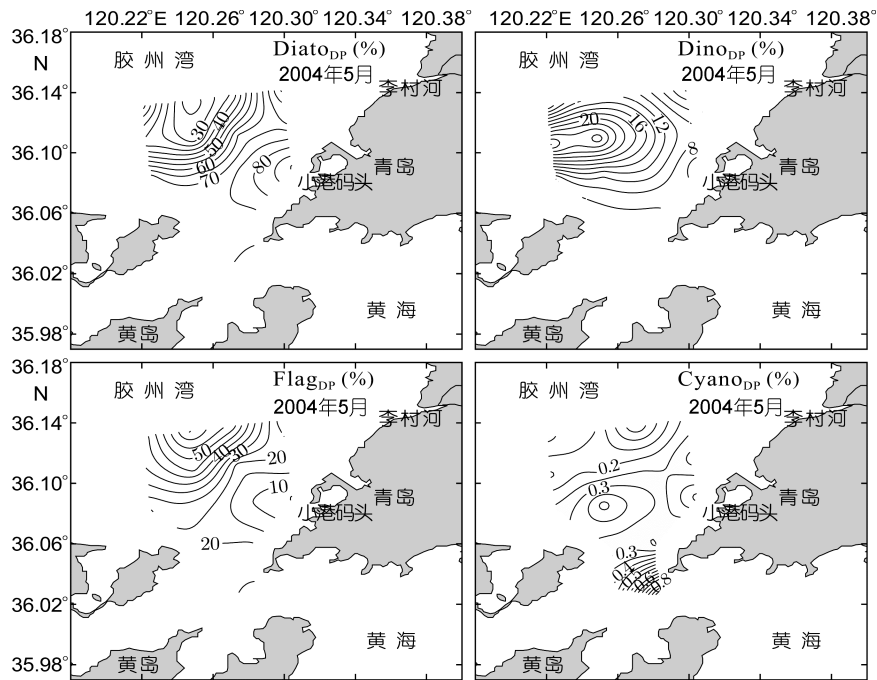


图 8 胶州湾表层水样浮游藻功能类群的空间分布(以 2004 年 5 月为例)

Fig.8 Spatial distribution of phytoplankton functional types of the samples (May, 2004)

Diat_{DP}: 硅藻比例, %; Dino_{DP}: 甲藻比例, %; Flag_{DP}: 微型鞭毛藻比例, %; Cyano_{DP}: 蓝细菌比例, %

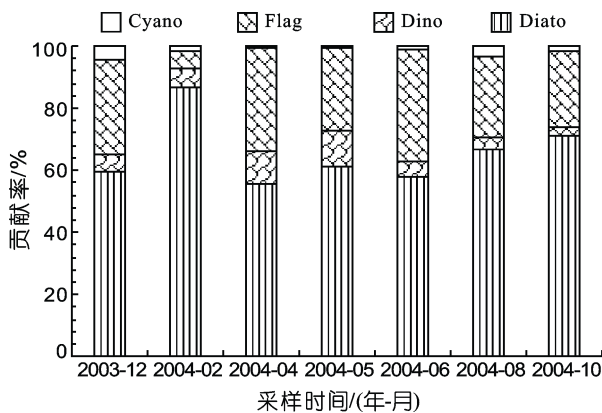


图 9 胶州湾表层水样浮游藻功能类群的时间变化

Fig.9 Temporal variation of phytoplankton functional types of the samples

Diato: 硅藻比例, %; Dino: 甲藻比例, %; Flag: 微型鞭毛藻比例, %; Cyano: 蓝细菌比例, %

的春季水华结束之后, 甲藻会大量出现(刘东艳, 2004)¹⁾。蓝细菌只占胶州湾浮游藻功能类群组成的很小一部分, 所有航次平均不超过 2%, 贡献的最高值

出现在 2003 年 12 月份, 也仅有 4.2%, 这和样品中检测到蓝细菌的代表性色素含量较低是对应的。

3 结论

本研究利用特征色素或其组合作为诊断指标研究了胶州湾浮游藻功能类群的时空分布特点。对总叶绿素 *a* 与色素组合, 比如总类胡萝卜素、辅助色素、总色素、光保护类胡萝卜素、光合类胡萝卜素和诊断色素等进行了回归分析, 发现除光保护类胡萝卜素和光合类胡萝卜素外, 其余的色素组合都和 *Tchl a* 有良好的线性关系, 表明这些色素组合和叶绿素 *a* 一样能作为有效的浮游藻生物量估计替代指标, 而光保护类胡萝卜素和光合类胡萝卜素在夏季和春季具有相反的变化特点, 在一定程度上可以反映浮游藻生长环境光照强度的变化。本文分析了总叶绿素 *a* 与色素指标(如 *Tchl a*/TC、*Tchl a*/AP、PPC/TP 和 PSC/TP)之间的关系, 发现除了 *Tchl a*/AP 比值外, 其它色素指标随着叶绿素 *a* 生物量的增加基本保持不变。当总叶绿素 *a* < 2 μg/L 时, *Tchl a*/AP 比值变化范围较大 (0.95–2.26), 说明在低叶绿素 *a* 的情况下, 辅助色素

1) 刘东艳, 2004. 胶州湾浮游植物与沉积物中硅藻群落结构演替的研究. 青岛: 中国海洋大学博士论文

的变化更剧烈。随着总叶绿素 *a* 含量增加, Tchl *a*/AP 比值变化范围减小, 逐渐趋于稳定。根据各浮游藻功能类群的诊断色素(组合)占诊断色素总量的比例研究了胶州湾四个主要的浮游藻功能类群的相对丰度和时空分布特点, 发现硅藻占绝对优势地位(平均 65.8%), 微型鞭毛藻次之(26.0%), 甲藻和蓝细菌最低(分别为 6.3%和 1.9%)。本研究基于诊断色素指标的浮游藻功能类群分析提供了一种简单方便的判断优势浮游藻类群组成和丰度的方法, 可以获得较为准确的浮游藻类群时空分布变化情况, 在生态动力学等研究中有潜在应用价值。

致谢 作者感谢赵军、李秀芹、何闪英、何会军、孟春霞、冉祥滨和刘鹏霞参与现场工作和实验室分析。

参 考 文 献

- 刁焕祥, 1984. 胶州湾浮游植物与无机环境的相关研究. 海洋科学, 3: 16—19
- 邓春梅, 姚鹏, 刘淑霞等, 2010. 海洋浮游藻色素分析和化学分类研究进展. 中国海洋大学学报, 40: 91—98
- 刘东艳, 孙军, 陈洪涛等, 2003. 2001 年夏季胶州湾浮游植物群落结构的特征. 青岛海洋大学学报, 33: 366—374
- 李冠国, 黄世玫, 1956. 青岛近海浮游硅藻季节变化研究的初步报告. 山东大学学报, 2: 119—143
- 杨世伦, 孟翊, 张经等, 2003. 胶州湾悬浮体特性及其对水动力和排污的响应. 科学通报, 48: 2493—2498
- 陈怀清, 钱树本, 1992. 青岛近海微型、超微型浮游藻类的研究. 海洋学报, 14: 105—113
- 金德祥, 陈金怀, 黄凯歌, 1965. 中国海洋浮游硅藻类. 上海: 上海科学技术出版社, 1—230
- 钱树本, 王菽庆, 陈国蔚, 1983. 胶州湾的浮游藻类. 山东海洋学院学报, 13: 39—56
- 郭玉洁, 杨则禹, 1992. 浮游植物. 刘瑞玉主编. 胶州湾生态学和生物资源. 北京: 科学出版社, 136—169
- 焦念志, 2001. 海湾生态过程与持续发展. 北京: 科学出版社
- Aiken J, Pradhan Y, Barlow R *et al*, 2009. Phytoplankton pigments and functional types in the Atlantic Ocean: a decadal assessment, 1995—2005. Deep-Sea Research II, 56: 899—917
- Barlow R, Kyewalyanga M, Sessions H *et al*, 2008. Phytoplankton pigments, functional types, and absorption properties in the Delagoa and Natal Bights of the Agulhas ecosystem. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 80: 201—211
- Courties C, Vaquer A, Trousselier M *et al*, 1994. Smallest eukaryotic organism. Nature, 370: 255
- Cropp R, Norbury J, 2009. Modelling plankton functional types. 18th World IMACS/MODSIM Congress, Cairns, Australia, 2087—2093
- Irigoien X, Harris R P, Verheye H M *et al*, 2002. Copepod hatching success in marine ecosystems with high diatom concentrations. Nature, 419: 387—389
- Jeffrey S W, Mantoura R F C, Wright S W, 1997. Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. UNESCO Monographs on Oceanographic Methodology, Vol 10, UNESCO, Paris, 1—661
- Jin D X, 1939. Occurrence and seasonal distribution of the marine planktonic diatoms from Tsingtao and vicinity. Philippine Journal of Science, 69(4): 437—455
- Latasa M, 2007. Improving estimations of phytoplankton class abundances using CHEMTAX. Marine Ecology Progress Series, 329: 13—21
- Le Quéré C, Harrison S P, Prentice I C *et al*, 2005. Ecosystem dynamics based on plankton functional types for global ocean biogeochemistry models. Global Change Biology, 11: 1—25
- Lin R C, Xu C C, Li L B *et al*, 2002. Xanthophyll cycle and its molecular mechanism in photoprotection. Acta Botanica Sinica, 44: 379—383
- Liu S M, Zhang J, Chen H T *et al*, 2005. Factors influencing nutrient dynamics in the eutrophic Jiaozhou Bay, North China. Progress in Oceanography, 66: 66—85
- Liu D Y, Sun J, Zhang J *et al*, 2008. Response of the diatom flora in Jiaozhou Bay, China to environmental changes during the last century. Marine Micropaleontology, 66: 279—290
- Mackey M D, Mackey D J, Higgins H W *et al*, 1996. CHEMTAX—a program for estimating class abundances from chemical markers: application to HPLC measurements of phytoplankton. Marine Ecology Progress Series, 144: 265—283
- Nair A, Sathyendranath S, Platt T *et al*, 2008. Remote sensing of phytoplankton functional types. Remote Sensing of Environment, 112: 3366—3375
- Raitos D E, Lavender S J, Maravelias C D *et al*, 2008. Identifying four phytoplankton functional types from space: An ecological approach. Limnology and Oceanography, 53: 605—613
- Shen Z L, 2001. Historical changes in nutrient structure and its influences on phytoplankton composition in Jiaozhou Bay. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 52: 211—224
- Uitz J, Claustre H, Morel C A *et al*, 2006. Vertical distribution of phytoplankton communities in open ocean: An assessment based on surface chlorophyll. Journal of Geophysical Research, 111: CO8005, doi: 10.1029/2005JC003207
- Vidussi F, Claustre H, Manca B B *et al*, 2001. Phytoplankton pigment distribution in relation to upper thermocline circulation in the eastern Mediterranean Sea during winter. Journal of Geophysical Research, 106: 19939—19956
- Yao P, Yu Z G, Deng C M *et al*, 2010. Spatial-temporal distribution of phytoplankton pigments in relation to nutrient status in Jiaozhou Bay, China. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 89(3): 234—244

- Yu Z G, Yao P, Deng C M *et al*, 2007. Prasinocanthin-containing prasinophyceae discovered in Jiaozhou Bay, China. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49(4): 497—506
- Zapata M, Garrido J L, 1991. Influence of injection conditions in reversed phase high-performance liquid chromatography of chlorophylls and carotenoids. *Chromatographia*, 31(11-12): 589—594
- Zapata M, Rodríguez F, Garrido J L, 2000. Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: A new HPLC method using a reversed phase C₈ column and pyridine-containing mobile phases. *Marine Ecology Progress Series*, 195: 29—45
- Zhao S J, Jiao N Z, Shen Z L *et al*, 2005a. Causes and consequences of changes in nutrient structure in the Jiaozhou Bay. *Journal of Integrative Plant Biology*, 47: 396—410
- Zhao S J, Jiao N Z, Wu C W *et al*, 2005b. Evolution of nutrient structure and phytoplankton composition in the Jiaozhou Bay ecosystem. *Journal of Environmental Science*, 17(1): 95—102
- Zhu Z Y, Ng W M, Liu S M *et al*, 2009. Estuarine phytoplankton dynamics and shift of limiting factors: A study in the Changjiang (Yangtze River) Estuary and adjacent area. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 84(3): 393—401

FUNCTIONAL TYPES OF PHYTOPLANKTON IN JIAOZHOU BAY USING DIAGNOSTIC PIGMENT ANALYSIS (DPA)

YAO Peng¹, YU Zhi-Gang¹, DENG Chun-Mei^{2,3}, LIU Shu-Xia¹, ZHEN Yu⁴

(1. Key Laboratory of Marine Chemistry Theory and Technology, Ministry of Education, College of Chemistry and Chemical Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100, China; 2. Key Laboratory of Marine Spill Oil Identification and Damage Assessment Technology, State Oceanic Administration, Qingdao 266033, China; 3. North China Sea Environment Monitoring Centre, State Oceanic Administration, Qingdao 266033, China; 4. Key Laboratory of Marine Environment and Ecology, Ministry of Education, College of Environmental Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100, China)

Abstract Phytoplankton pigment composition (chlorophylls and carotenoids) was analyzed to determine the distribution of pigments and plankton in 18 stations over 7 cruises during Dec. 2003 to Oct. 2004 in Jiaozhou Bay, China. Four phytoplankton functional types (PFTs), i.e. diatoms, dinoflagellates, nanoflagellates, and cyanobacteria were defined using characteristic pigments as diagnostic pigment indices (characteristic properties) of particular PFTs. The spatial-temporal distribution of each PFTs in Jiaozhou Bay was analyzed based on the proportion of each diagnostic pigment in the diagnostic pigment pool. The results showed that the dominated PFTs in the bay were diatoms (65.8% in average), followed by flagellates (26.0% in average), and dinoflagellates and cyanobacteria (6.3% and 1.9%, respectively). Analysis on PFTs based on diagnostic pigment indices provides a simple and easy way to identify the composition and abundance of dominated phytoplankton groups.

Key words phytoplankton; functional types; diagnostic pigment; high-performance liquid chromatography (HPLC); Jiaozhou Bay