

PhytoPAM浮游植物分析仪用于微藻光合作用研究中几种参数设定的优化

张曼, 曾波*

西南大学三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆市三峡库区植物生态与资源重点实验室, 生命科学学院, 重庆 400715

Optimal Parameterization of PhytoPAM Phytoplankton Analyzer in Microalgae Photosynthesis Analysis

ZHANG Man, ZENG Bo*

Key Laboratory of Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education, Chongqing Key Laboratory of Plant Ecology and Resources in Three Gorges Reservoir Region, School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China

提要: PhytoPAM 浮游植物分析仪是一种用于藻类生长、光合作用、叶绿素荧光动力学研究的仪器。文章以蛋白核小球藻为材料探讨PhytoPAM浮游植物分析仪用于量子产量测定和快速光响应曲线分析中最佳参数设定。结果表明, 饱和脉冲档位的选取对测定最大量子产量(Φ_{\max})影响不大, 但脉冲时长对其影响显著, 脉冲时长以0.2 s为宜。稳态光照时长对有效量子产量(Φ_{PSII})有影响, 测定中设定的稳态光照时长以120 s为宜。在快速光响应曲线(RLC)分析中, 步长(即照光时间)以30 s为宜, 适宜的最大测量光照强度(MML)应为藻培养光照强度的3倍左右。

关键词: PhytoPAM 浮游植物分析仪; 小球藻; 参数优化; 量子产量; 快速光响应曲线

自1931年Kautsky发现叶绿素荧光诱导现象之后, 叶绿素荧光诱导动力学技术已成为研究植物生长和光合作用的方法(张守仁1999; 韩博平等2003; White和Critchley 1999; Ralph和Gademann 2005)。20世纪80年代, 叶绿素荧光测定仪问世后, 研究者能更为方便地研究植物光合机理, 揭示植物生长及光合作用与环境因子的关系(White和Critchley 1999; Jesus等2005; Ralph和Gademann 2005; Strain等2006)。在微藻研究中, 人们用叶绿素荧光测定仪测定微藻生长、分析水体中不同微藻类群组成和阐释环境因子对微藻光能利用机理的影响(Kolber和Falkowski 1993; Schreiber等1994; Kashino等2002; Strzepek和Harrison 2004; Ivanov等2006), 有力促进了水体初级生产力的估测, 以及水华爆发的检测和藻类光合机制的研究。目前, 在诸多分析浮游植物的叶绿素荧光测定仪中, 德国Walz公司生产的PhytoPAM浮游植物分析仪(PhytoPAM Phytoplankton Analyzer)可用于测定不同类群微藻(如绿藻、硅藻和蓝藻)的生长和光合生产、叶绿素含量、光能利用效率等, 并可用于确定水体中不同类群微藻含量。此种仪器由于功能多、测定耗时少且精度高, 在国

外已成为用于微藻研究的重要设备, 为很多研究机构所使用(Kühl等2001; Jesus等2005; Juneau等2005; Juneau和Harrison 2005; Strain等2006), 国内对此仪器的使用目前尚处于起始阶段(韩志国等2005)。尽管PhytoPAM浮游植物分析仪已成为微藻研究中的重要设备, 但到目前为此, 如何正确使用该仪器以使测定的结果更为准确和高效, 国内外尚无系统的研究和报道。

应用PhytoPAM浮游植物分析仪研究微藻时, 常需分析微藻的光能利用效率和光合特征, 其中包括微藻的最大量子产量(maximal Φ_{PSII} , Φ_{\max})、有效量子产量(Φ_{PSII})以及基于电子传递速率的快速光响应曲线(rapid light curve, RLC)。 Φ_{\max} 和 Φ_{PSII} 是衡量光合能力的指标(Lambers等1998)。基于电子传递速率的光响应曲线类似于通常意义上的基于CO₂固定的光响应曲线(photosynthetic rate-light curve)(McMinn等2003; Serôdio等2005),

收稿 2006-10-31 修订 2006-12-30
资助 教育部“春晖计划”项目(2004-7)、重庆市科技项目(2003-7858)和新世纪优秀人才支持计划。
*通讯作者(E-mail: bzeng@swu.edu.cn; Tel: 023-68334839)。

通过此光响应曲线, 可以分析得到光响应曲线线性区段斜率(α)、最大电子传递速率(ETR_{max})及饱和光照强度点(I_k)。在用此仪器测定微藻的上述指标时, 其结果受相关参数设定的影响, 具体表现为: (1) 在 Φ_{max} 和 Φ_{PSII} 的测定中, 给予的饱和脉冲强度大小和饱和脉冲持续时间对量子产量有影响(Gmbh 2003), 饱和脉冲强度过小或饱和脉冲时间过短会导致量子产量测定值比真实值低; (2) 在测定某光照强度下微藻的 Φ_{PSII} 时, 需要对处于测定杯中的微藻样液给予一定时间与原生长环境一样强度的光照(以下简称稳态光照), 稳态光照时间长短会影响测得的 Φ_{PSII} 值; (3) 在分析微藻的基于电子传递速率的光响应曲线时, 要保证所设定的最大光照强度足够高以获得微藻的 ETR_{max} 。但是, 最大光照强度过高所导致的光抑制现象又会使仪器测得的 ETR_{max} 偏低。另一方面, 在光响应曲线测定中, 对于任一光照强度, 理论上的光照时间应足够长以保证微藻完全适应此光照环境, 并表现出与此光照强度相对应的 ETR_{max} , 但在实际测定中对任一光照强度都给予很长的光照时间却难以做到。在实际测定中, 最大测量光照强度(maximal measuring light, MML)以及光照强度的曝光时间(步长)都需要由研究者自行设定, 设定值的大小将影响 I_k 、 ETR_{max} 以及 α 测定值的大小(Gmbh 2003)。

为了正确而有效地使用PhytoPAM浮游植物分析仪, 保证此仪器用于微藻研究的科学性和可靠性, 并促进其在实验研究中的应用, 我们对微藻光能利用和光合特征分析中相关参数的最优设定从以下3个方面进行了研究: (1) Φ_{max} 测定中的最适饱和脉冲强度和最适饱和脉冲持续时长的确定; (2) Φ_{PSII} 测定中的稳态光照强度的最适光照时长的确定; (3) 光响应曲线测定中最适MML及步长的确定。

材料与方 法

1 实验材料

以分离自嘉陵江(长江支流)的蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa* Chick.)为实验材料, 于HGZ培养液(华汝成1981)中在光照强度 $150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、温度 20°C 下静止培养。培养5 d后, 取对

数生长期的藻液进行测定。

2 实验方法

用PhytoPAM浮游植物分析仪(PhytoPAM Phytoplankton Analyzer, 德国Walz公司生产)测定并分析小球藻的 Φ_{max} 、 Φ_{PSII} 和RLC。在实际测定中, 每个指标用相同浓度的小球藻培养液(约 $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)重复测定3次。

PhytoPAM浮游植物分析仪饱和脉冲共有10个强度设置, 分别以档位1~10表示, 从1~10强度依次增大。为分析饱和脉冲强度和脉冲时长对 Φ_{max} 的影响, 确定最适饱和脉冲强度, 实验中共选用5个不同饱和脉冲强度(分别为2、4、6、8、10档)和5个饱和脉冲时长(分别为0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 s)。分别测定不同饱和脉冲强度和不同饱和脉冲时长设定下小球藻的 Φ_{max} , 测定前小球藻的样液预先在 20°C 下暗适应处理20 min。

为分析稳态光照时长对 Φ_{PSII} 的影响以确定最适稳态光照时长, 实验中设定7个不同稳态光照时长(分别为20、40、60、120、150、180、210 s), 测定不同稳态光照时长下小球藻的 Φ_{PSII} 。实验中饱和脉冲档位为8档, 饱和脉冲时长为0.2 s。

为分析RLC测定时最大光照强度和每一光照强度曝光时长的影响, 确定RLC测定时最适的MML和步长, 实验中设定4个不同步长(10、20、30、40 s)和4个不同光照强度步数(8、10、12、15步)。测定光强步数为8步时, 依次设定光量子通量密度(PFD)为1、32、64、128、192、256、320、384 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; 步数为10步时, 依次设定PFD为1、32、64、128、192、256、320、384、448、512 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; 步数为12步时, 依次设定PFD为1、32、64、128、192、256、320、384、448、512、576、640 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; 步数为15步时, 依次设定PFD为1、32、64、128、192、256、320、384、448、512、576、640、704、832、960 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。8、10、12、15步所对应的MML分别为384、512、640、960 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。分析不同光照强度和不同光照时长下小球藻的光响应曲线的 ETR_{max} 、 I_k 和 α 。

3 数据分析

所有实验数据处理均用Spss 11.5和Microsoft

Excel 2003 进行统计分析。检验饱和脉冲大小和时长对 Φ_{\max} 以及 RLC 步长与 MML 大小对测定 I_k 、 ETR_{\max} 和 α 的影响, 采用双因素方差分析, 稳态光照时长对 Φ_{PSII} 的影响采用单因素方差分析。

结果与讨论

1 饱和脉冲大小和时长对测定 Φ_{\max} 的影响

档位选择对小球藻 Φ_{\max} 测定没有影响(表1), 但不同饱和脉冲时长对 Φ_{\max} 影响显著, Φ_{\max} 随着饱和脉冲时长的增加先升后降(图1)。饱和脉冲时长为0.2 s时的 Φ_{\max} 最高, 且高于饱和脉冲时长为0.3、0.4、0.5 s时的 Φ_{\max} (图1)。

表1 饱和脉冲档位和脉冲时长对小球藻 Φ_{\max} 的影响

变量	双因素方差分析		
	自由度	F值	显著性水平
档位	4	1.278	0.291
时长	4	2.639	0.045
档位×时长	16	0.370	0.984

档位选取5个不同饱和脉冲强度, 分别为2、4、6、8、10档; 时长选取0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 s。

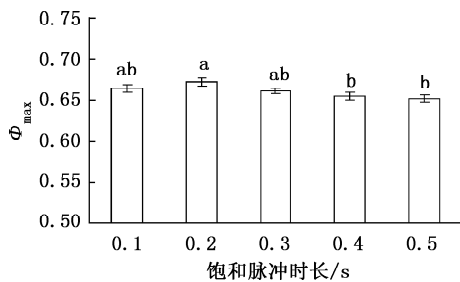


图1 饱和脉冲时长对小球藻 Φ_{\max} 的影响

图中数据为平均值 \pm 标准误, 不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。下图同此。

在 Φ_{\max} 测定时, 选择的代表不同强度的5个饱和脉冲档位对其影响不大, 即使低档位的饱和脉冲, 其强度也能保证 Φ_{\max} 测定对光强的要求。但是, 饱和脉冲时长对 Φ_{\max} 有明显影响(图1、表1), Φ_{\max} 随饱和脉冲时长的增加先升后降。这是由于当饱和脉冲时长过短时, 不足以引发其电子传递通路完全堵塞, 测得的 Φ_{\max} 就会偏小(Gmbh 2003); 另一方面, 当饱和脉冲时长过长时, 微藻

又处于光抑制状态, 荧光的非光化学猝灭成分增加, 以致测得的 Φ_{\max} 偏小(韩博平等 2003)。据此认为, 饱和脉冲时长以 0.2 s 为宜。

2 稳态光照时长对测定 Φ_{PSII} 的影响

从图2可见: 稳态光照时长从 20 s 增长到 120 s 时, Φ_{PSII} 随着稳态光照时长的增长而增加; 而稳态光照时长从 120 s 继续增长到 210 s 时, Φ_{PSII} 增加不明显, 不同稳态光照时长所对应的 Φ_{PSII} 没有明显差异。

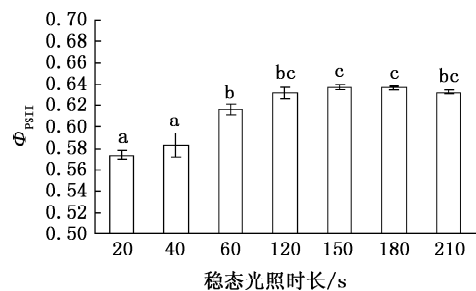


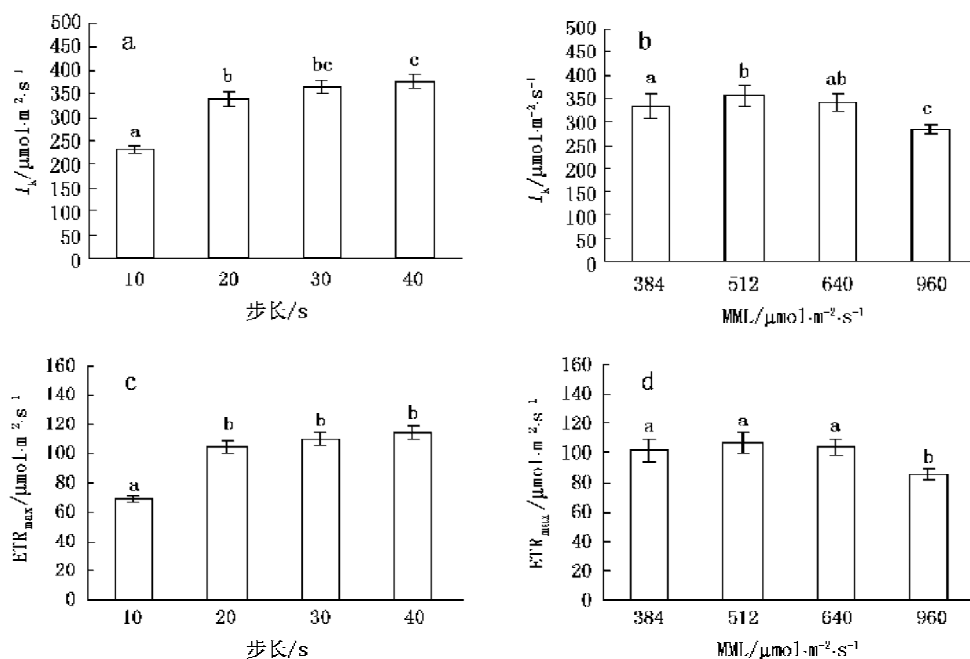
图2 稳态光照时长对小球藻 Φ_{PSII} 的影响

在环境中的光照强度发生变化的情况下, 处于该环境中的微藻的 Φ_{PSII} 与微藻对新的光环境的适应程度有关。在新光照强度环境中的时间越长, 测得的量子产量越接近该光照强度环境应具有的实际量子产量。时长过短测得的 Φ_{PSII} 偏低, 这可能是所释放的荧光还不稳定, 藻细胞没有足够的时间适应稳态光照之故。因此, 当稳态光照时长从 20 s 增大到 120 s 时, Φ_{PSII} 逐渐增大。由此可见, 稳态光照时长 120 s 就能够正确地测定 Φ_{PSII} , 同时还能在一定程度上减少测定所花费的时间。

3 RLC 测定中步长与 MML 的大小对 I_k 、 ETR_{\max} 和 α 影响

研究表明, I_k 和 ETR_{\max} 均随着 RLC 步长(即每测量光照强度的照光时间)的增加而呈现增加的趋势; 同时, 随着 MML 增加, I_k 和 ETR_{\max} 均呈现先增后减的趋势(图3)。

步长为 40 s 时测得的 I_k 显著高于 10 和 20 s 时的 I_k , 与步长为 30 s 时测得的 I_k 值差异不显著(图 3-a)。当 MML 为 $512 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 时, I_k 最高, 显著高于 MML 为 384 和 $960 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 时的 I_k , 与 MML 为 $640 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 时的 I_k 差异不显著(图 3-

图3 RLC的步长与步数对测定 I_k 和 ETR_{\max} 的影响

b)。

步长为20、30、40 s时测得的 ETR_{\max} 差异不明显,但显著高于步长为10 s时的 ETR_{\max} 值(图3-c)。MML为384、512、640 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 时测得的 ETR_{\max} 差异不明显,但显著高于MML为960 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 时测得的 ETR_{\max} 值(图3-d)。

步长和MML大小对 α 的影响均差异不显著,且二者无交互作用(表2)。

表2 RLC分析步长和MML对小球藻 α 的影响

变量	双因素方差分析		
	自由度	F值	显著性水平
步长	3	1.589	0.211
MML	3	0.530	0.665
步长×MML	9	0.802	0.617

由以上结果可见, ETR_{\max} 和 I_k 均随步长的增加而增加,这是由于步长越长,在每一测量光照强度下照光越久,藻液就越能有更多的时间适应不同的光环境并反映出与光环境相应的荧光。 ETR_{\max} 和 I_k 均随MML的增加呈现先增后减的趋势,这是由于当MML偏大时,微藻开始受到光

抑制,以致使高光照强度下的 ETR 值降低,从而低估 ETR_{\max} 和 I_k 的值。 α 可反映藻类对光能的利用效率(Juneau等2005),步长和MML大小对 α 均无显著影响,这表明步长和MML对光能利用率影响不明显。

为得到较好的光响应曲线和较为准确的 ETR_{\max} 、 I_k 、 α ,我们以在短时间内同时可以测得三者的最大值为标准,综合分析步长和MML的合适选择。结果表明,最适步长为30 s(图3-a、c),最适MML为512 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (图3-b、d)。由于MML为512 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,而本研究中小球藻培养的光强为150 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,据此认为,在RLC的测定中,步数设定时选取的MML以藻类培养光照强度的3~4倍为宜。

PhytoPAM浮游植物分析仪的参数设置对分析测定结果有明显影响。因此,在使用PhytoPAM浮游植物分析仪进行藻类量子产量测定和光响应曲线分析时,需要考虑合适的参数设置。本文虽然测定的只是蛋白核小球藻的结果,但这些参数对大多数藻类的分析测定可能也有借鉴意义。如果研究的藻种不同,为得到最佳测定结果,在正式研究工作之前,应先确定所研究微藻的最适参数,以保证研究工作的顺利进行。

参考文献

- 韩博平, 韩志国, 付翔(2003). 藻类光合作用机理与模型. 北京: 科学出版社
- 韩志国, 雷腊梅, 韩博平(2005). 光暗循环中三角褐指藻和具齿原甲藻快速光曲线的变化. 热带海洋学报, 24 (6): 13~21
- 华汝成(1981). 单细胞藻类的培养与利用. 北京: 农业出版社
- 张守仁(1999). 叶绿素荧光动力学参数的意义及讨论. 植物学通报, 16 (4): 444~448
- Gmbh HW (2003). Phytoplankton analyzer Phyto-PAM and Phyto-Win software V1.45. system components and principles of operation. Effeltrich, Germany
- Ivanov AG, Sane PV, Krol M, Gray GR, Balseris A, Savitch LV, Öquist G, Hüner NPA (2006). Acclimation to temperature and irradiance modulates PSII charge recombination. FEBS Lett, 580: 2797~2802
- Jesus B, Brotas V, Marani M, Paterson DM (2005). Spatial dynamics of microphytobenthos determined by PAM fluorescence. Estuarine Coastal Shelf Sci, 65: 30~42
- Juneau P, Green BR, Harrison PJ (2005). Simulation of pulse-amplitude-modulated (PAM) fluorescence: limitations of some PAM-parameters in studying environmental stress effects. Photosynthetica, 43 (1): 75~83
- Juneau P, Harrison PJ (2005). Comparison by PAM fluorometry of photosynthetic activity of nine marine phytoplankton grown under identical conditions. Photochem Photobiol, 81 (3): 649~653
- Kashino Y, Kudoh S, Hayashi Y, Suzuki Y, Odate T, Hirawake T, Satoh K, Fukuchi M (2002). Strategies of phytoplankton to perform effective photosynthesis in the North Water. Deep-Sea Res II, 49: 5049~5061
- Kolber Z, Falkowski PG (1993). Use of fluorescence to estimate phytoplankton photosynthesis *in situ*. Limnology, 38: 1646~1665
- Kühl M, Glud RN, Borum J, Roberts R, Rysgaard S (2001). Photosynthetic performance of surface-associated algae below sea ice as measured with a pulse-amplitude-modulated (PAM) fluorometer and O₂ microsensors. Mar Ecol Prog Ser, 223: 1~14
- Lambers H, Chapin III FS, Pons TL (1998). Plant Physiological Ecology. New York: Springer-Verlag
- McMinn A, Ryan K, Gademann R (2003). Diurnal changes in photosynthesis of Antarctic fast ice algal communities determined by pulse amplitude modulation fluorometry. Mar Biol, 143: 359~367
- Ralph PJ, Gademann R (2005). Rapid light curves: a powerful tool to assess photosynthetic activity. Aquat Bot, 82: 222~237
- Schreiber U, Bilger W, Neubauer C (1994). Chlorophyll fluorescence as a non-intrusive indicator for rapid assessment of *in vivo* photosynthesis. In: Schulze ED, Caldwell MM (eds). Ecophysiology of Photosynthesis. Ecological Studies. Vol 100. Berlin: Springer-Verlag, 49~70
- Serôdio J, Vieira S, Cruz S, Barroso F (2005). Short-term variability in the photosynthetic activity of microphytobenthos as detected by measuring rapid light curves using variable fluorescence. Mar Biol, 146: 903~914
- Strain E, Beardall J, Thomson R, Roberts S, Light B (2006). Spatio-temporal variability in the photosynthetic characteristics of *Zostera tasmanica* measured by PAM. Aquat Bot, 85: 21~28
- Strzepek R, Harrison PJ (2004). Photosynthetic architecture differs in coastal and oceanic diatoms. Nature, 431: 689~692
- White AJ, Critchley C (1999). Rapid light curves: a new fluorescence method to assess the state of the photosynthetic apparatus. Photosyn Res, 59: 63~72