

温度和盐度对球形棕囊藻细胞 DMSP 产量的影响

王 艳¹ 齐雨藻¹ 沈萍萍¹ 李韶山² 吕颂辉¹

(1. 暨南大学生命科学技术学院, 广州 510632; 2. 华南师范大学生命科学学院, 广州 510631)

摘要:球形棕囊藻汕头株(Shantou strain, ST)和香港株(Hongkong, HK)是 DMSP 与 DMS 的高产株, 在 20℃、40‰盐度的培养条件下, 二者 DMSP 产量分别达到 1561.35 和 437.60 nmol/10⁶ cells。细胞内 DMSP 的积累与释放到细胞外 DMS 量受盐度、温度等环境因子的影响; 在高盐低温条件下, 单位藻细胞的 DMSP 与 DMS 产量较高。香港株 DMSP/DMS 的积累和释放与生长期有关, 稳定期细胞内的 DMSP 含量高达 3898.53 nmol/10⁶ cells, 是指数期的 12.3 倍。

关键词:球形棕囊藻; 温度; 盐度; 二甲基硫丙酸(DMSP); 二甲基硫化物(DMS)

中图分类号:Q949.25 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-3207(2003)04-0367-005

藻类在氧、碳、磷及硫的生物地球化学循环中起重要作用, 驱动这些化学循环的关键化合物常常是分子量小和(或)挥发性的物质。在硫循环中, 这一物质主要是二甲基硫化物(DMS, CH₃S-CH₃)。DMS 是海洋中最丰富的挥发性硫化物, Lovelock 等首次测出海水中 DMS 并指出 DMS 在海洋挥发性硫化物中占主导地位^[1], DMS 占海洋中硫释放量的 55%—80%, 占全球天然硫排放总量的 50%以上^[2]。DMS 通过海-气交换进入大气, 在大气中氧化形成甲基磺酸(CH₃-SO₃H)、二氧化硫、硫酸等, 不仅与酸雨、酸雾的形成有关, 并进一步形成硫酸盐气溶胶, 后者是重要的云凝结核(CCN)。云凝结核的形成对气候的调节起重要作用。DMS 主要来自海洋微藻, 它的前体物质是二甲基硫丙酸(DMSP, (CH₃)₂S-CH₂-COOH), 发生水华时在海水常发现有大量的 DMSP 与 DMS。许多海洋藻类(浮游微藻及大型藻类)都具有合成与积累 DMSP 的能力, 而且不同藻类产生 DMSP 的能力有很大差异; 定鞭藻类、甲藻及某些硅藻是 DMSP 的高产种(400 mmol/L cell), 许多含叶绿素 a/b 的单细胞藻类是微量 DMSP 的生产者(50 mmol/L cell)^[2]。而在高 DMSP 产生者中, 棕囊藻(*Phaeocystis*)和 *Emiliania huxleyi* 被认为是其中最为重要的种类。尤其是棕囊藻, 其释放 DMS 的潜力极

高, 因此在发生棕囊藻赤潮时, 特别在接近其生长稳定期与衰亡期时藻体产生的 DMSP 及释放到外界中的 DMS 对于局部甚至整个海域、大气状况以及酸雨、酸雾形成的影响都具有重要的意义。1997 年和 1999 年, 在广东福建等海域爆发大规模棕囊藻赤潮, 对沿海海域及大气环境产生重大影响。在对赤潮原因种——球形棕囊藻的分类和生活史进行了研究后^[3,4], 该文报道了温度、盐度等环境因子对球形棕囊藻香港株和汕头株产生 DMSP 的影响, 初步阐明了球形棕囊藻赤潮对大气硫的贡献。

1 材料与方法

1.1 藻类样品培养与收集 球形棕囊藻藻种的分离与培养条件见前文^[3], 棕囊藻细胞在常规条件下(F/2 培养液, 25℃, 光强 4000 lx, 光暗比为 12/12h)进行预培养, 取等量生长状况良好的同步细胞, 分别接种于盐度为 22‰、33‰和 40‰的培养液中, 分别置于 20℃和 27℃的光照培养箱中培养, 每个处理均设 3 个重复。计数培养液中的初始细胞密度, 培养 96h 后再次计数细胞密度。取 20mL 培养物, 4000r/min 离心 10min, 取细胞沉淀物和上清液用于产硫量测定。

1.2 不同生长时期球形棕囊藻香港株细胞产硫量测定 经预培养的球形棕囊藻香港株细胞接种于盐

收稿日期: 2002-03-18; 修订日期: 2002-05-08

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 30200030); 国家重点基础研究发展规划(973)项目(编号: 001CB409704); 广东省“十五”科技重大专项(编号: 2002A3050103); 广东省教育厅环保科技项目(粤高教科[1998]75 号); 广州市科委重点攻关计划项目(计划编号: 98-J-008-01)

作者简介: 王艳(1970—), 女, 陕西省西安市人; 博士, 副教授; 研究方向: 藻类生理生态学

通讯作者: 齐雨藻, E-mail: tqyz@jnu.edu.cn, yanwang7018@163.com

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

度为 33‰培养液中,置于 27℃ 的光照培养箱中培养,分别取培养 96h 和 192h 的培养物 20mL,作为指数生长期和稳定期的样品,同上述方法收集细胞沉淀物和上清液用于细胞产硫量测定。

1.3 培养液中 DMS 和藻体中 DMSP 含量的测定

上清液直接用于气相色谱-质谱联仪(GC-MS)吹扫捕集法测定 DMS 含量。由于 DMSP 在碱性条件下能够分解为 DMS 和丙烯酸,在细胞沉淀物中加入 1mL 5mol/L NaOH 溶液后立即密封,室温下碱解至少 12h,加入等量盐酸溶液中和稀释后即可用于 DMS 含量测定,方法同上。DMSP 与 DMS 的摩尔(分子数量)比值为 1:1,因此由 DMS 的浓度可以计算藻细胞内 DMSP 含量。

1.4 DMS 测定条件

测定仪器为气相色谱

(HP6890)-质谱(HP5973)联用仪。气相色谱条件:HP-1 毛细管柱,载气为高纯氦气(99.999%),流速为 0.5mL/min,进样口温度为 200℃,分流比为 10:1,柱温恒定 45℃。质谱条件:接口温度为 280℃,EI 源电子轰击能 70eV,电子倍增器 2500V,质量扫描范围 29—250AMU,为提高检测灵敏度和避免杂质干扰,采用选择离子法(SIM)检测定量。

2 结果

2.1 温度和盐度对球形棕囊藻细胞产硫的影响

表 1 和 2 分别列出了球形棕囊藻香港株和汕头株在不同的温度和盐度下细胞积累和释放 DMSP/DMS 的量。

表 1 不同温度和盐度下球形棕囊藻香港株细胞 DMSP 和 DMS 含量的变化

Tab.1 DMSP and DMS production in *P. globosa*(HK strain)at different temperature and salinities

盐度(‰) Salinity	细胞内 DMSP 含量(nmol/10 ⁶ cells)			培养液中 DMS 含量(nmol/10 ⁶ cells)		
	DMSP in the cells			DMS in the culture media		
	20℃	27℃	比值	20℃	27℃	比值
22	241.20	228.47	1.06	50.08	26.53	1.89
33	424.20	317.09	1.31	68.96	49.52	1.39
40	437.60	342.98	1.28	82.60	61.88	1.33
最高值/最低值	1.81	1.50		1.65	2.33	

表 2 不同温度和盐度下球形棕囊藻汕头株细胞 DMSP 和 DMS 含量的变化

Tab.2 DMSP and DMS production in *P. globosa*(ST strain)at different temperature and salinities

盐度(‰) Salinity	细胞内 DMSP 含量(nmol/10 ⁶ cells)			培养液中 DMS 含量(nmol/10 ⁶ cells)		
	DMSP in the cells			DMS in the culture media		
	20℃	27℃	比值	20℃	27℃	比值
22	235.00	193.38	1.21	46.61	41.90	1.11
33	442.38	202.02	2.19	48.68	42.80	1.14
40	1561.35	1092.10	1.43	116.44	78.60	1.48
最高值/最低值	6.64	5.63		2.50	1.88	

表 1 和 2 的结果显示,盐度对球形棕囊藻细胞内 DMSP 的累积有较大影响。比较不同盐度培养的藻细胞内的 DMSP 含量发现,单位藻细胞内的 DMSP 含量随着盐度的增加而升高。以 20℃ 条件下培养的藻细胞为例,当盐度从 22 上升到 40 时,香港株细胞中的 DMSP 含量升高了 1.81 倍,而汕头株的升幅达 6.64 倍。并且,随着盐度的升高,藻细胞释放到培养液中的 DMS 数量也明显升高,与藻体内 DMSP 累积的趋势相同,同样在 20℃ 条件下,当盐度从 22 上升到 40 时,香港株和汕头株培养液中 DMS 含量

分别上升了 1.65 和 2.50 倍。

实验结果表明温度对棕囊藻细胞内 DMSP 的积累和释放也有明显的影响。培养温度从 20℃ 上升至 27℃,单位细胞的 DMSP 及其向培养液中释放的 DMS 浓度下降。

2.2 球形棕囊藻香港株和汕头株细胞产硫的差异

尽管两株球形棕囊藻单位细胞 DMSP 产生与 DMS 释放均随盐度的升高而增加,其总体趋势是一致的,但比较发现二者仍存在明显的差异。如:在盐度低于 33‰时,香港株单位细胞产生的 DMSP 及释

放到培养液中的 DMS 浓度均高于相同培养条件下的汕头株细胞;而在盐度达到 40‰时,汕头株单位细胞的 DMSP 产量远高于香港株,在 20℃和 27℃的培养中,其细胞内 DMSP 含量分别是后者的 3.57 和 3.18 倍,同样释放到细胞外的 DMS 含量也明显高于后者(表 1 和 2)。因此可以认为,盐度升高对汕头株细胞 DMSP 含量的影响明显高于对香港株的影响,反映了两株棕囊藻细胞生理代谢对盐度敏感性的差异,表明藻类的 DMSP 产量不仅有种间差异,还具有明显的株间差异,与藻类的生长环境及生态适应性有关。

2.3 DMSP 与 DMS 的转化比率

藻体内累积的 DMSP 在一定条件下,被细胞内的 DMSP 裂解酶分解,以 DMS 的形式渗透到培养液中。单位藻细胞所释放的 DMS 与它所产生的总的 DMSP(这里以细胞内 DMSP 与培养液中 DMS 的总和计算)之间的比例关系反映了 DMSP 的转化效率。由表 3 的结果可以看出,香港株细胞内 DMSP 在 20℃的转化比率普遍高于 27℃的转化率,而汕头株的结果则相反。香港株的最适生长温度在 20—25℃,而汕头株的最适生长温度较高,在 30℃左右^[3]。由此可见,在两个藻株的最适生长温度范围内,其 DMSP 的转化率较高。

DMSP 转化比率与盐度之间的相关性分析发现,在不同的藻株和不同的温度条件下,两者的相关性却不一致。计算结果表明,香港株在 27℃时,其 DMSP 的转化率与盐度之间呈极显著的正相关($R^2=0.999, n=3$),而在 20℃时相关性不显著;汕头株在 20℃时,其 DMSP 转化率与盐度之间呈极显著的负相关性($R^2=0.992, n=3$),而在 27℃时相关性不显著。说明盐度对球形棕囊藻细胞的 DMSP 转化率的影响较为复杂。

表 3 球形棕囊藻细胞 DMSP 转化为 DMS 的百分率

Tab.3 Percentage of DMS transformed from DMSP in *P. globosa*

盐度(‰) Salinity	香港株(%) HK strain		汕头株(%) ST strain	
	20℃	27℃	20℃	27℃
22	17.19	10.40	16.55	17.77
33	14.28	13.51	9.91	17.48
40	15.88	15.28	6.94	6.71

2.4 不同生长时期对球形棕囊藻香港株产硫的影响

以球形棕囊藻香港株为材料的实验结果表明,

在 27℃、盐度为 33‰条件下生长的藻细胞,在不同的生长时期 DMSP 和 DMS 的产量有较大差异(表 4),稳定期细胞产生和释放的 DMSP/DMS 浓度远高于指数生长期的细胞,表明在发生大规模棕囊藻赤潮时,当细胞生长达到稳定期后,所产生的高浓度的 DMSP 在细胞衰亡后释放到环境中去,将会引起水体中溶解态的 DMSP 及 DMS 浓度的骤然升高,具有影响局部甚至整个大气环境的潜力。

表 4 球形棕囊藻香港株不同生长时期 DMSP 与 DMS 产量

Tab.4 DMSP/DMS production in different growth phases of *P. globosa* Hong Kong Strain

生长时期 Growth stage	细胞内 DMSP 含量 (nmol/10 ⁶ cells) DMSP in cells	培养液中 DMS 含量 (nmol/10 ⁶ cells) DMS in culture media
指数生长期 Exponential phase	317.09	49.50
稳定期 Stable phase	3898.53	159.20
比值 Ratio	12.3	3.2

3 讨论

3.1 温度和盐度对球形棕囊藻 DMSP 与 DMS 产量的影响

3.1.1 盐度的影响 实验结果表明,盐度升高对球形棕囊藻细胞合成与积累 DMSP 有显著的促进作用。在对 *Hymenomonas carterae* 的研究中发现随着培养基中盐度的增加,细胞内 DMSP 浓度与 DMS 排放速率都增加^[5],野外观察中也发现,水体中 DMS 浓度与盐度呈正相关^[6]。这些报道与本文的实验结果一致。DMSP 是藻体内的一种渗透调节剂,其主要功能是调节细胞渗透压,因此当环境盐度升高时,藻细胞必然会合成并积累更多的 DMSP 来维持体内渗透压平衡,尤其是在高盐和氮不足的情况下,DMSP 更容易取代含氮的渗透调节剂如:甘氨酸-甜菜碱、脯氨酸等,这些有机物质被称为“兼容性液体”,因为它们对酶和代谢功能的毒性较低,DMSP 在结构上类似于季铵化合物,因此被认为具有类似“兼容性液体”的功能。而在盐度下降时,细胞会将高浓度的 DMSP 释放到体外,其释放的速率几乎是瞬时增加的^[7]。

已有研究证实,棕囊藻细胞内含有 DMSP 裂解酶,该酶的活性随内源 DMSP 水平的升高而增加,但是在衰老的细胞以及细胞内 DMSP 耗尽时,其活性

下降^[8]。因此随着环境盐度的增加,藻体内产生的 DMSP 量上升,DMSP 裂解酶活性随之升高,必然会有更多的 DMS 产生并释放到细胞外,导致海水 DMS 含量的上升。

3.1.2 温度的影响 研究结果表明温度对球形棕囊藻产硫有显著影响,随着温度的升高,藻体内 DMSP 的含量降低,即在较低的温度下,藻类易于产生更多的 DMSP,释放的 DMS 也增多。DMSP 除了具有调节渗透压的功能,还具有抗低温和冰冻的作用,这一观点被许多野外实验观察结果所证实。Karsten 等观测到极地海洋中绿藻 DMSP 含量(40—70 mmol · kg⁻¹),高于温带地区绿藻种类 DMSP 平均含量(25—30 mmol kg⁻¹)^[10],表明藻体 DMSP 含量与环境温度具有一定的关系。在研究光照和温度对南极棕囊藻(*P. antarctica*)和三种硅藻释放 DMS 的作用时发现,低温条件下释放更多的 DMS^[9],这一报道与本研究的结果一致,说明浮游植物产生和释放 DMS 具有温度依赖性,暗示了 DMS 产量与温度胁迫有关。

3.2 DMSP 转化为 DMS

完整藻细胞内具有 DMSP 裂解酶,能将 DMSP 裂解为 DMS 与丙烯酸,无菌培养液中 DMS 主要来源于 DMSP 的酶促裂解作用。研究表明浒苔(*Enteromorpha clathrate*)的 DMSP 裂解酶活性最大出现 25℃、pH 6.2—6.4,而且其活性对温度的敏感性高于 pH^[11]。单细胞藻类中有关 DMSP 裂解酶研究最多的是棕囊藻,尽管细胞内 DMSP 裂解酶的活性较高,但完整藻细胞释放 DMS 的贡献非常不显著^[12]。实验结果表明,完整藻细胞释放的 DMS 占总 DMSP 产量的比例很小(表 3),香港株在 20℃ 时 DMS/(DMSP+DMS)比率普遍高于 27℃,而汕头株在 20℃ 时 DMS/(DMSP+DMS)比率低于 27℃,说明温度对 DMSP 转化为 DMS 有较大影响。温度的变化必然影响体内酶系的活性,可以猜测不同种类藻体的 DMSP 裂解酶其温度适应性也存在差异,香港株最适生长温度介于 20—25℃,而汕头株最适生长温度接近 30℃,在最适生长范围内,藻体内各种酶系活性较高,生理代谢较强,这可以解释两株球形棕囊藻产 DMS 比例的差异。而在实际海洋环境中,DMS 的释放除了细胞的自体溶解途径,浮游动物的摄食、细菌与病毒等微生物的酶裂解等也导致 DMSP 转变为 DMS。

3.3 不同生长期球形棕囊藻 DMSP 产生与 DMS 释放

不同生长时期的香港株球形棕囊藻产 DMSP 与

DMS 存在显著差异,稳定期及衰亡期产量远远大于对数生长期。Keller 等的实验研究认为:指数生长期 DMS 积累很少,而在稳定期后期细胞外 DMSP 浓度很高(暗示高浓度的 DMS)^[13]。无菌培养的微小原甲藻(*Prorocentrum minimum*)细胞内 DMSP 与细胞外 DMSP 浓度在衰亡期显著升高^[14]。与之相反,无菌培养的波切棕囊藻,指数期产生的 DMS 高于稳定期,认为可能与藻类细胞外酶有关^[15]。

作者测定的是稳定期初期的藻细胞,细胞数量维持恒定,此时藻细胞产生大量的 DMSP 还没有完全释放到基质中,可以预见,藻细胞内高浓度的 DMSP 在稳定期后期和衰亡期会逐步释放到细胞外,造成水体中 DMSP/DMS 浓度的上升,从而提高了通过海-气交换进入大气的 DMS 浓度。因此在发生棕囊藻赤潮的海区,其大气生源硫化物浓度的提高值得重视。

参考文献:

- [1] Lovelock J E, Maggs R J, Rasmussen R A. Atmospheric dimethyl sulphide and the natural sulphur cycle[J]. *Nature*, 1972, **237**: 452—453
- [2] Malin G, Kirst G. Algal production of dimethyl sulfide and its atmospheric role[J]. *J Phycol*, 1997, **33**: 889—896
- [3] Shen PP, Wang Y, Qi Y Z, et al. Growth characteristics and life cycle of *Phaeocystis globosa* Scherffel[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2000, **24**(6): 635—643. [沈萍萍、王艳、齐雨藻,等.球形棕囊藻的生长特性及生活史研究.水生生物学报,2000, **24**(6): 635—643]
- [4] Qi Y Z, Shen P P, Wang Y. Taxonomy and lifecycle of genus *Phaeocystis*(Prymnesiophyceae)[J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2001, **9**(2): 174—184. [齐雨藻、沈萍萍、王艳,等.棕囊藻属(*Phaeocystis*)的分类与生活史.热带亚热带植物学报,2001, **9**(2): 174—184]
- [5] Variamuthy A, Andreae M A, Iverson R L. Biosynthesis of dimethylsulfide and dimethylpropionethin by *Hymenomonas carterae* in relation to sulfur source and salinity variations[J]. *Limnol Oceanogr*, 1985, **30**: 59—70
- [6] Iverson R L, Nearhoof F L, Andreae M O. Production of dimethylsulfonium propionate and dimethylsulfide by phytoplankton in estuarine and coastal waters[J]. *Limnol Oceanogr*, 1989, **34**: 53—67
- [7] Stefels J, Van Leeuwe M. Effects of iron and light stress on the biochemical compound of antarctica *Phaeocystis* sp. (Prymnesiophyceae). I. Intracellular DMSP concentrations[J]. *J Phycol*, 1998, **34**: 186—195
- [8] de Sorza M P, Chen Y P, Yoch D C. Dimethylsulfoniopropionate lyase from the marine macroalga *Ulva curvata*; purification and characterization of the enzyme[J]. *Planta*, 1996, **199**: 433—438
- [9] Baumann M E M, Brandini F P, Staubes R. The influence of light and temperature on carbon-specific DMS release by cultures of *Phaeocystis*

- antarctica* and three antarctic diatoms [J]. *Mar Chem.*, 1994, **45**: 129—136
- [10] Karsten U, Wiencke C, Kirst G O. DMSP accumulation in green macroalgae from polar to temperate regions; interactive effects of light versus salinity and light versus temperature [J]. *Pola. Biol.*, 1992, **12**: 603—607
- [11] Kiene R P, Visscher P T, Keller M D, et al. Biological and environmental chemistry of DMSP and related sulfonium compounds [M]. New York: Plenum Press. 1996, **99**: 317—324
- [12] Stefels, J, Dijkhuizen L. Characteristics of DMSP-lyase in *Phaeocystis* sp. (Prymnesiophyceae) [J]. *Mar Ecol Prog Ser.*, 1996, **131**: 307—313
- [13] Saltzman E S, Cooper W J. Biogenic sulfur in the environment [M]. Washington D C: American Chemical Society. 1989, **393**: 167—182
- [14] Matrai P A, Keller M D. Total organic sulfur and DMSP in marine phytoplankton; intracellular variations [J]. *Mar Biol.*, 1994, **119**: 61—68
- [15] Stefels J, Van Boekel W H M. Production of DMS from dissolved DMSP in axenic cultures of the marine phytoplankton species *Phaeocystis* sp [J]. *Mar Ecol Prog Ser.*, 1993, **97**: 11—18

EFFECTS OF TEMPERATURE AND SALINITY ON DMSP PRODUCTION IN *PHAEOCYSTIS GLOBOSA*

WANG Yan¹, QI Yu-Zao¹, SHEN Ping-Ping¹, LI Shao-Shan² and LÜ Song-Hui¹

(1. School of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632;

2. School of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631)

Abstract: The algal osmolyte dimethylsulfoniopropionate (DMSP) is recognized as the major precursor of marine dimethylsulfide (DMS), a volatile sulfur compound that affects atmospheric chemistry and global climate. In method of GC-MS, effects of temperature and salinity on DMSP production in both Shantou and Hong Kong strains of *Phaeocystis globosa* were investigated in the present study. DMSP production in Shantou strain at 20°C and salinity 40‰ was 1561.35 nmol/10⁶ cells, but in Hong Kong strain under the same culture condition was only 437.60 nmol/10⁶ cells which was about one third to one fourth that in Hong Kong strain. Intracellular DMSP accumulation and release of DMS were greatly affected by temperature and salinity. DMSP/DMS productivity in both strains was increased by high salinities and low temperatures. *P. globosa* at different growth phases showed different DMSP/DMS productivity. The content of the intracellular DMSP in the stable phase was much higher than that exponential phase. In stable phase of Hong Kong strain, DMSP content was 3898.53 nmol/10⁶ cells, which was 12.3 times of that in exponential phase. Intraspecific differences in DMSP production in *P. globosa* under laboratory conditions were observed in the present study. The results indicated that both Shantou and Hong Kong strains of *P. globosa* were HAB (harmful algal bloom) species with high DMSP production. It was suggested that DMSP may play additional important roles in biogeochemistry of the surface ocean when *P. globosa* red tide occurred in the South China Sea.

Key words: *Phaeocystis globosa*; Temperature; Salinity; Dimethylsulfoniopropionate (DMSP); Dimethylsulfide (DMS)