

DOI: 10.5846/stxb201406101195

董彬, 韩睿明, 王国祥, 毛丽娜, 冀峰, 马杰. 菹草茎叶微界面 O_2 时空动态. 生态学报, 2015, 35(24): - .

Dong B, Han R M, Wang G X, Mao L, Ji F, Ma J. Micro-optode analysis of the spatio-temporal dynamics of O_2 in the micro-boundary layer around *Potamogeton crispus* leaves and stems. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(24): - .

菹草茎叶微界面 O_2 时空动态

董彬^{1,2}, 韩睿明¹, 王国祥^{1,*}, 毛丽娜¹, 冀峰¹, 马杰¹

¹ 南京师范大学地理科学学院 江苏省环境演变与生态建设重点实验室, 南京 210023

² 临沂大学资源环境学院, 临沂 276000

摘要: 采用高分辨率光纤氧微电极测定了富营养化水体中沉水植物菹草 (*Potamogeton crispus* L.) 茎叶微界面 (0—2.0 mm) 氧 (O_2)。菹草叶微界面 O_2 浓度梯度具明显的时空变化。时间上, 菹草叶微界面 O_2 浓度具有明显的生长阶段变化和昼夜变化。幼苗期和快速生长期微界面 O_2 浓度增加幅度较小, 稳定期叶表 O_2 浓度梯度增加幅度最大, 衰亡期叶微界面 O_2 浓度受附着物影响具明显的空间梯度。菹草叶微界面 O_2 表现为昼高夜低的单峰变化模式, 主要受光照和温度的影响。空间上, 越接近茎叶表面, O_2 浓度越高。顶部幼叶微界面 O_2 浓度梯度增加较平缓, 中部成熟叶微界面 O_2 浓度梯度变化最陡, 波动幅度最大, 中部茎和基部衰老叶微界面 O_2 浓度梯度由于受密集附着物的影响, 在附着物表面达到最大值, 进入附着层后略有下降。结果表明, 菹草茎叶微界面 O_2 时空变化主要受附着物和植物光合放氧能力的影响。光纤微电极是一种分析植物叶微界面氧时空分布的理想工具, 对深入研究植物微界面在富营养化水体中养分的迁移转化具有重要意义, 可为水生植物生理生态研究提供有力工具。

关键词: 微界面; 微电极; 菹草; 氧; 附着物; 时空动态

Micro-optode analysis of the spatio-temporal dynamics of O_2 in the micro-boundary layer around *Potamogeton crispus* leaves and stems

DONG Bin^{1,2}, HAN Ruiming¹, WANG Guoxiang^{1,*}, MAO Lina¹, JI Feng¹, MA Jie¹

¹ College of Geographical Science, Nanjing Normal University, Jiangsu Key Laboratory of Environmental Change and Ecological Construction, Nanjing 210023, China

² College of Resource and Environment, Linyi University, Linyi 276000, China

Abstract: Submerged macrophytes constitute an important natural component in shallow aquatic ecosystems. The submerged aquatic plants are characterized by leaf morphology with a high area-to-volume ratio and a thin cuticula, which facilitates a rapid exchange of gases between the plants and bulk water. The micro-boundary layer around the submerged macrophyte surface plays a significant ecological role in plant growth and nutrient transformation in the aquatic environment. *Potamogeton crispus* is one of the dominant species in eutrophic shallow lakes in China, and oxygen (O_2) is the key parameter shaping the oxidation-reduction heterogeneous microenvironment around submerged plants. Thus, the characterization of the O_2 microgradients in the micro-boundary layer around submerged macrophytes is of particular interest. Using micro-optodes, O_2 in the micro-boundary layer around *P. crispus* leaves and stems was investigated across different growing stages at various leaf positions relating to diurnal variations. The periphyton and rapid light curves were measured by conventional methods and the pulse amplitude modulated fluorometer (Diving-PAM), respectively. Results showed that significant spatio-temporal variations in O_2 concentration gradients existed in the micro-boundary layer around *P. crispus* leaves. In the vertical direction from the stem/leaf surface, the O_2 concentration in the micro-boundary layer increased

基金项目: 国家自然科学基金 (41173078); 江苏省太湖水环境治理专项基金 (TH2012304); 江苏省自然科学基金青年基金 (BK20140922)

收稿日期: 2014-06-10; **网络出版日期:** 2014- -

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: wangguoxiang@njnu.edu.cn

markedly with decreasing distance from the surface of leaf/stem and peaked at the leaf/stem surface. At the temporal scale, O_2 concentration in the micro-boundary layer varied significantly among different growing stages within the entire life cycle. The fluctuation in O_2 concentrations in the micro-boundary layer was the lowest during seedling stages (9.08—9.65 mg/L) while its amplitude peaked (9.28—13.16 mg/L) at stable growing stages. However, O_2 gradients markedly differentiated spatially at declining stages, and O_2 concentrations decreased significantly relative to that of stably growing stages. The O_2 concentration at the surface of the leaf displayed diurnal variations with a significant unimodal pattern. The O_2 concentration increased gradually and reached the maximum of 16.68 mg/L at 15:00, and then decreased with the decreasing light intensity. The O_2 concentration dropped rapidly after sunset and reached the minimum of 6.01 mg/L at 05:10. The O_2 concentration was effected mainly by light and water temperature during the diurnal cycle. At the spatial scale, marked differences in the O_2 concentration were observed in the micro-boundary layer of leaves at different parts of individual plants. O_2 concentrations in the micro-boundary layer around young leaves at the shoot apex fluctuated slightly, while those of the mature leaves at the middle shoot were steep, with the greatest amplitude of fluctuation. However, O_2 concentrations in the micro-boundary layer around stems at the middle shoot and around senescent leaves at the basal shoot maximized at the surface of periphyton which possessed higher dense, and declined slightly when entering the periphyton layer.

In conclusion, among different growing stages, O_2 concentration gradients in the micro-boundary layer around *P. crispus* leaves and stems were mainly affected synergistically by the photosynthetic capability and the attached periphyton. However, among different positions on individual plants, O_2 in the micro-boundary layer was mainly affected synergistically by plant physiological characteristics and the periphyton. The micro-optodes are ideal oxygen microsensors for investigating the micro-boundary layer around submerged macrophytes for fine spatial (<50 μm) and temporal (s) resolutions. This study provides methods for better understanding the ecological role of the micro-boundary layer around submersed macrophytes and for verifying the processes within the micro-boundary layer for regulating nutritional cycling in eutrophic waters.

Key Words: micro-boundary layer; micro optode; *Potamogeton crispus*; oxygen; periphyton; spatio-temporal dynamics

Reddy 发现湿地植物根系附近存在富氧-厌氧微环境,提出并用同位素技术证实了根-沉积物界面的硝化-反硝化理论^[1],并结合微电极取得一系列重要的成果^[2-4]。理论上,沉水植物的茎叶与水之间亦存在类似于根-土壤/沉积物的微环境(界面)。位于水面以下的沉水植物茎叶表面常有各种藻类、微生物、菌胶团、泥沙和碎屑等物质附着,形成了特殊的生物-水微界面^[5,6]。沉水植物光合作用产生的氧气通过茎叶表面散逸到水中,在茎叶表面形成富氧区,而附着层内富集的有机质分解耗氧容易导致茎叶表面成为缺氧微区^[7],这可能将对微界面内物质的迁移转化有重要影响。初步研究表明淡水沉水植物菹草(*Potamogeton crispus* L.)^[7]和海洋植物褐藻(*Fucus vesiculosus*)^[8]叶微界面(0—2.0 mm)内 O_2 浓度空间分布差异比较明显,但仅有的上述研究均集中在光对特定生长阶段水生植物叶微界面 O_2 分布的影响上。不同生长阶段、不同部位沉水植物微界面 O_2 分布有何差异?附着物对沉水植物微界面 O_2 分布有何影响?对此我们还了解甚少。鉴此,本研究利用光纤氧微电极技术,分别从时间(昼夜、季节)和空间(不同部位)尺度上研究了菹草茎叶微界面 O_2 的分布,揭示了造成其时空差异的可能机理,对深入研究富营养化水体中植物衰退机制和养分循环具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

菹草采自南京市富营养化水体(总氮(Total nitrogen, TN) = (1.05 ± 0.07) mg/L, 总磷(Total phosphorus, TP) = (0.11 ± 0.02) mg/L, NH_4^+-N = (0.12 ± 0.03) mg/L, 叶绿素 a = (18.15 ± 3.41) mg/L, 透明度 = (0.40 ± 0.08) m, 化学需氧量(Chemical oxygen demand, COD_{Mn}) = (7.95 ± 0.27) mg/L) 三用河(32°06'N, 118°55'E),自2013年3月上旬至6月上旬,分别在菹草幼苗期、快速生长期、稳定期和衰亡期采集整株植物

5—7 株,置于装有冰袋的保温箱中,同时采集原位水 5000 mL,为避免菹草附着物在运输过程中脱落,植物和水分别装在不同的容器中。2 h 内运回实验室,植物茎叶微界面 O_2 置于原位水中稳定 3 d 后测定,水质指标 12 h 内测定。同时利用水下调制荧光仪 DIVING—PAM (Walz GmbH, Effeltrich, 德国) 现场原位无损伤测定菹草的叶绿素荧光参数。在菹草稳定期,另采集整株成熟菹草 3—5 株(株高 (120.0 ± 5.1) cm,叶片数 52 ± 5) 用于测定不同部位(图 1a) 微界面 O_2 ,幼叶(位于顶端附近且完全展开的叶)、成熟叶(茎中部(叶长 5.0 ± 0.3 cm,叶宽 0.5 ± 0.02 cm),叶面积达到最大但无衰老迹象)、衰老叶(茎基部附近,明显发黄)、茎(中部,成熟叶着生附近)。

1.2 菹草茎叶微界面 O_2 的测定

将整株菹草置于装有原位水的方形玻璃缸中,使整株植物悬浮在水中,茎和叶片用订书针固定在琼脂板上(4% w/w)(图 1b)。通过控温台使水温保持在 20 ± 0.5 °C。在卤素光纤灯(150 W)控制光密度 $100 \mu\text{mol photons/m}^2 \text{ s}$ 下进行测定。采用德国针式光纤氧微电极(PreSens, Regensburg, 德国)进行测定。电极尖端直径 $<50 \mu\text{m}$,快速响应时间小于 3 s,在线温度补偿,检测范围为 0—250% 饱和空气($0—22.6 \text{ mg/L}$),检测下限为 0.2% 饱和空气。使用前用饱和湿空气(100% O_2) 和饱和 Na_2SO_3 溶液(0% O_2) 进行两点校准。将电极固定在三维自动操纵器上,控制电极以设定的步进接近茎叶表面。借助解剖显微镜跟踪电极的移动,用来确定菹草附着物的表面,可结合显微镜与电极信号变化来判断叶表面^[7,8]。数据通过软件 Microx TX3 获取。每个茎叶测定 3 个不同点,由于电极稳定性较好,每个点测 2 个剖面,取 3 个点的平均值作图。

1.3 菹草叶面 O_2 昼夜变化的测定

在菹草稳定期,采集完整成熟菹草 3 株,用原位水置于方形玻璃缸中在温室内驯化培养 3 d 后测定(图 1b)。选择晴朗天气(2013 年 4 月 26 早 6:00—27 日早 6:00)江苏省生态修复平台玻璃温室中进行,借助显微镜和电极信号,找到叶片表面,10 min 自动记录一次数据,连续测定 24 h。测定 O_2 和温度的同时,采用 ZDR—14 型照度记录仪同步记录光强。2013 年 4 月 26 日 6:00—27 日 6:00,温度最高 30 °C,最低 13 °C,据国家授时中心网站(<http://time.kepu.net.cn/>) 查询得监测时段日出、日中、日落时刻。4 月 26 日日出时刻为 05:24,日中时刻为 12:03,日没时刻为 18:42,4 月 27 日日出时刻为 05:23,日中时刻为 12:03,日没时刻为 18:42。故将 26 日 6:00—18:42 及 27 日 05:23—6:00 作为白昼。

1.4 附着生物的分离与测定

从不同菹草植株上采集典型茎叶 10 g 左右装入盛有 200 mL 无菌水的聚乙烯瓶中,每个样品三个重复,带

回实验室。用软毛刷和无菌水轻轻刷洗植物表面,用显微镜观察确保附着物完全刷下且茎叶表面未受损。刷洗液连同软毛刷冲洗液一并收集,将收集的样品定容 500 mL。将得到的附着物悬浊液分成四等份,两份通过预烧和预称重的 Whatman GF/C 滤膜(孔径 $0.45 \mu\text{m}$)(用于干重分析)真空抽滤,另两份通过醋酸纤维滤膜(孔径 $0.45 \mu\text{m}$)(用于叶绿素 a 分析)真空抽滤。附着物干重(DW)通过真空抽滤后将带有附着物的滤膜在 105 °C 下烘 24 h 测定。附着物灰分重(AW)通过抽滤物在马弗炉中 550 °C 燃烧 4 h 测得。附着物的无灰干重(ash-free dry weight, AFDW)通过燃烧损失的质量干重与灰分重之差计算得到,也可表示附着有机物含量^[6]。附着物叶绿素 a (chlorophyll, Chl a) 采用标准方法^[9],用 90% 的丙酮提取,分光光度法测定。得到的结果通过植物单位干重计算。

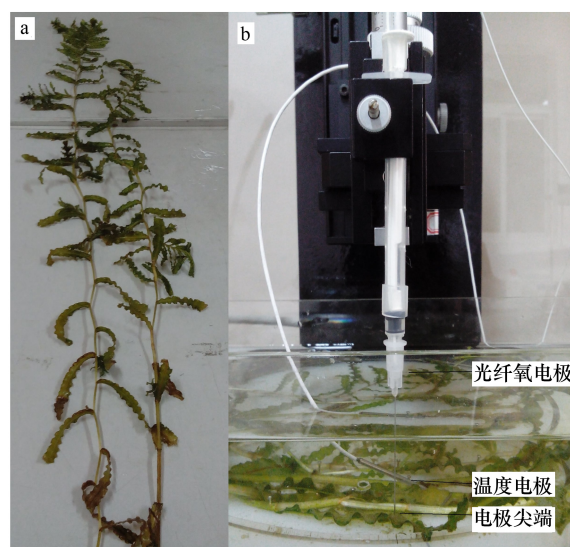


图 1 成熟菹草和测试图

Fig. 1 A mature plant of *Potamogeton crispus* (a) and the picture of measurement (b)

1.5 快速光响应曲线的测定

菹草快速光响应曲线 (Rapid light curves, RLCs) 采用水下荧光仪 Diving—PAM 和数据采集软件 Wincontrol (Walz GmbH, Effeltrich, 德国) 进行原位测定, 测定具体操作方法参考文献^[10, 11]。

1.6 统计分析

采用 SPSS17.0 进行数据统计分析。统计分析前, 对所有的数据先进行正态分布和方差齐性的假设检验。用单因素方差分析 (ANOVA) 检验不同生长阶段附着物干重、灰分重、无灰干重和叶绿素含量的差异, 如果差异显著, 进一步通过 Tukey HSD 用单因素方差分析检验 ($P < 0.01$)。不同部位附着物干重、灰分重、无灰干重和叶绿素含量的差异亦采用上述方法。采用 Origin Pro 8 进行绘图。

2 结果与分析

2.1 菹草附着物特征

在菹草生命周期内, 自幼苗期, 随着菹草的生长, 附着在其叶表面的附着物持续增加 (图 2a), 到衰亡期附着量达到最大。附着物叶绿素 a 含量、干重、灰分重和无灰干重在菹草幼苗期、快速生长期、稳定期和衰亡期均存在显著差异 (图 2a)。处于稳定期的成熟菹草, 幼叶、成熟叶、衰老叶附着物量依次增加, 而茎附着物量介于幼叶和成熟叶的之间。除附着物叶绿素 a 含量外, 幼叶、成熟叶、衰老叶和茎附着物的干重、灰分重和无灰干重均存在显著差异 (图 2b)。

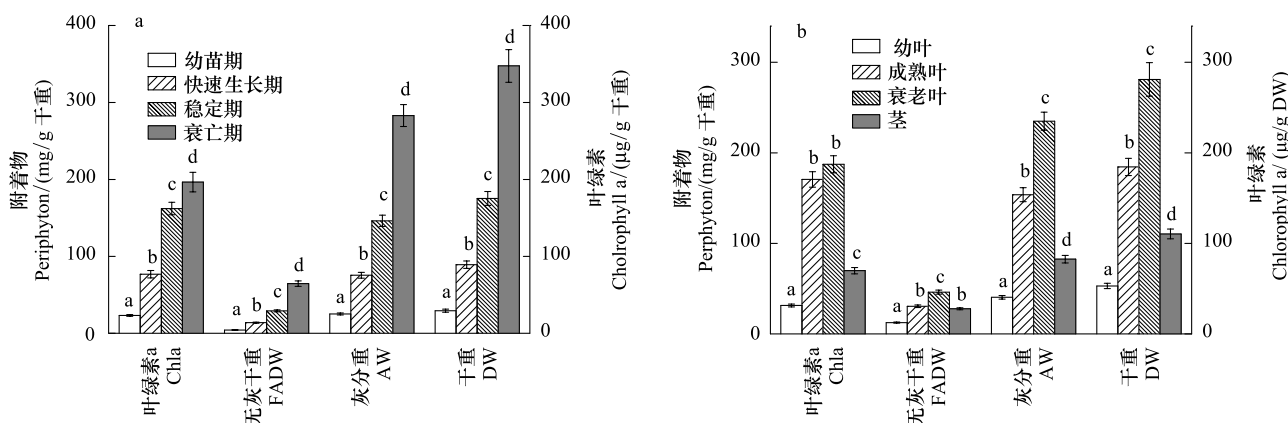


图 2 不同生长阶段菹草附着物和菹草不同部位附着物特征

Fig. 2 Characteristics of periphyton attached on the *Potamogeton crispus* during different growth period and that on the different part of *Potamogeton crispus*

Chla 叶绿素 a, FADW free ash dry weight 无灰干重, AW ash weight 灰分重, DW dry weight 干重

2.2 菹草叶微界面 O_2 的时间动态

2.2.1 生长阶段显著影响菹草叶微界面 O_2 分布

在菹草生命周期内, 不同阶段菹草叶微界面 O_2 浓度梯度具明显的变化 (图 3)。幼苗期, 菹草叶微界面 O_2 浓度随距叶面距离的减小而显著增加, 但增加幅度较小 (叶表面 O_2 浓度为 9.65 ± 0.04 mg/L); 进入快速生长期, 叶微界面 O_2 浓度梯度显著增大 (叶表面 O_2 浓度为 10.90 ± 0.21 mg/L); 稳定期, 叶微界面 O_2 浓度梯度随距离减小而增加幅度最大, 叶表面 O_2 浓度达到生命周内最大 (13.16 ± 0.40 mg/L)。衰亡期, 叶微界面 O_2 浓度增加幅度较小, 但由于附着层较厚, 影响了 O_2 分布的趋势, 进入附着层后 O_2 增加幅度显著降低甚至出现了 O_2 降低的现象。

2.2.2 菹草叶面 O_2 具有明显的昼夜变化

菹草叶表面 O_2 存在明显的昼夜变化, 呈昼高夜低的单峰变化趋势 (图 4)。受光照和温度的影响, 白天, 日出后 O_2 浓度随光照的增强持续升高, 至 15:00 达到全天高峰 16.68 mg/L, 此后 O_2 浓度随光照减弱持续下

降,日落后, O_2 浓度继续下降,至日出前 5:10 降至全天最低 6.01 mg/L。日出后, O_2 浓度又持续回升。

2.2 菹草不同部位微界面 O_2 的变化

不同部位微界面 O_2 的分布显著不同(图 5)。幼叶由于光合活性较弱和附着物较少, O_2 随距叶面距离的减小而增加,但增加幅度相对较小(图 5a),叶面 O_2 浓度为 11.21 ± 0.22 mg/L。而成熟叶微界面中, O_2 浓度梯度增加幅度最大,进入附着层后 O_2 增加幅度显著降低(图 5a),但由于成熟叶较强的光合活性和附着层的屏障作用, O_2 在附着层内继续增大,在叶表面 O_2 浓度达到最大值 13.05 ± 0.61 mg/L。衰老叶和茎微界面中,离附着物越近 O_2 浓度越高,在附着物表面达到最大值,分别为 10.02 ± 0.10 mg/L, 10.55 ± 0.30 mg/L,进入附着层后, O_2 浓度略呈下降趋势(图 5a)。去除附着物后茎叶微界面 O_2 分布发生了明显变化(图 5b)。茎叶表面 O_2 浓度明显降低,幼叶和成熟叶表面 O_2 浓度分别降至 11.07 和 12.67 mg/L。衰老叶和茎由于去除了较厚的附着物呈逐渐增加的趋势。

3 讨论

3.1 微界面 O_2 分布的时间变化机制

作为世界广布种的沉水植物菹草生命周期与多数水生植物不同。秋季发芽,冬春生长,4—5 月开花结果,夏季 6 月后逐渐衰亡腐烂,同时形成石芽(冬芽)以度过不适环境。菹草的光合作用能力主要受光照、水温及自身叶绿素含量等因素的影响。快速光响应曲线(RLCs)是电子传递速率随光强的变化曲线,可衡量植物叶片的光合作用能力,反应实际的光合作用状态^[10, 12]。本研究中,在菹草生长的不同阶段,快速光响应曲线不同(图 6a)。随着环境温度逐渐升高和光照增强,菹草电子传递速率(Electron transport rate, ETR)逐渐增加,至稳定期达到最大。进入衰亡期,由于植物叶绿素含量降低和附着物的持续积累造成的遮荫,使得菹草电子传递速率降至生命周期中的最低。菹草生命周期内不同生长阶段快速光响应曲线的变化趋势与叶微界面 O_2 分布的变化趋势一致(图 3),表明菹草光合放氧能力是影响叶微界面 O_2 浓度的重要因素。

菹草附着物的持续积累影响了叶微界面 O_2 浓度梯度(图 2a, 图 3)。在菹草的幼苗期和快速生长期(2 月—4 月中旬),附着物稀疏, O_2 较容易向周围环境扩散,加之菹草光合放氧能力相对较低,对微界面 O_2 浓度梯度的影响不明显, O_2 波动幅度较小(图 3)。在菹草稳定期(4 月中旬—5 月上旬),随着水环境温度的逐渐上升,更适宜菹草生长,菹草生物量和表面积持续增加,附着生物量持续增多,附着层增厚,使菹草叶面 O_2 浓度波动增大(图 3),离附着层越近, O_2 越高,进入附着层后,由于无机成分和好氧有机成分的存在, O_2 增加幅度略有降低,穿过附着层后,由于附着层的屏障作用,加之菹草光合放氧能力强, O_2 继续增大,在叶表面 O_2 浓度

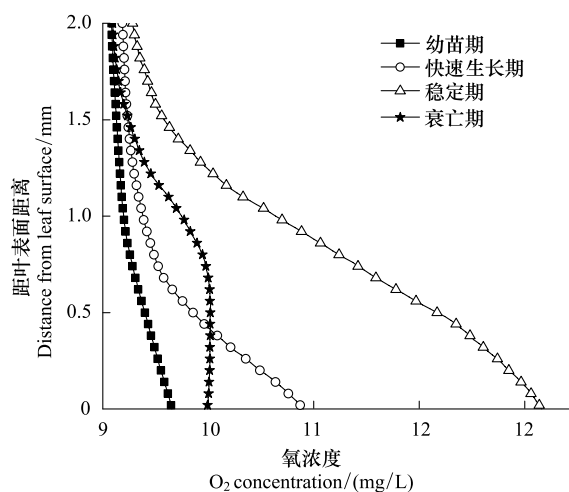


图 3 不同生长阶段菹草叶微界面氧分布

Fig. 3 O_2 concentration in micro-boundary layer around *Potamogeton crispus* leaves during different growth periods. Three profiles were measured in different points on *P. crispus* leaf. 0 indicates leaf surface

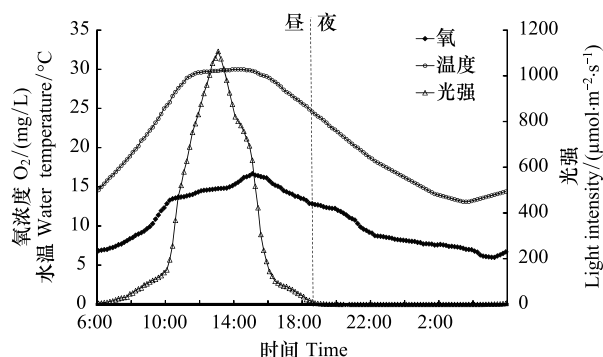


图 4 菹草叶表面 O_2 昼夜变化

Fig. 4 Diurnal variations of oxygen concentration on the surface of *Potamogeton crispus* leaves

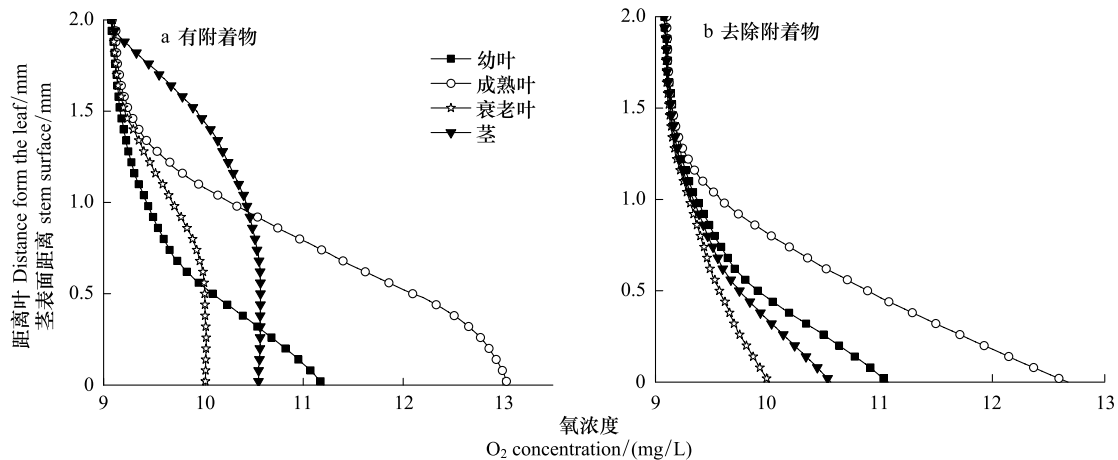


图5 菹草不同部位叶微界面氧分布

Fig. 5 O_2 concentration in micro-boundary layer around different parts on *Potamogeton crispus*. The 0 indicated macrophyte surface

达到最大。此阶段,沉水植物菹草借助碳酸酐酶的作用,通过光合作用等代谢活动,消耗了水中的大量可溶性无机碳(Dissolved inorganic carbon, DIC),并在叶表沉积出碳酸钙。进入衰亡期(5月中旬—6月上旬),菹草生长几乎停止,茎从基部开始出现断裂,叶片出现孔洞,附着物大量增加,叶片通过自溶作用分泌出大量的溶解性有机物^[13],促进附着藻类和菌类的附着和生长,水温的持续升高更适合附着细菌的生长和繁殖,菹草叶面颗粒物大量积累,附着物量达到最大,附着层较厚,虽然氧不易扩散,但由于衰亡期菹草光合放氧能力极弱, O_2 浓度未再出现增加,而是略有降低。该微界面中的附着物阻碍了宿主植物对光的获取、养分的吸收和气体扩散^[14–16],长期持续的附着制约了沉水植物的生长发育^[6,17–19]。

叶表面 O_2 浓度的明显的昼夜变化主要由光照和水温的变化造成的(图4)。光照和水温的变化直接引起了菹草光合放氧能力的变化。菹草叶表 O_2 浓度主要受菹草光合放氧速率和呼吸好氧速率的综合影响。日出后,光照强度逐渐增强,叶面 O_2 浓度逐渐升高。一般来说,水体中 O_2 浓度与水温呈反相关关系,即温度越高,水体 O_2 浓度越低。本研究中,并未观测到随水温升高而 O_2 浓度下降的现象,可能是由于光对植物放氧的影响更大,抵消了因温度升高造成的 O_2 浓度下降的部分。研究已发现菹草适宜的生长温度为15—25℃,适宜的光照为500—1000 $\mu\text{mol photons/m}^2 \text{ s}$,在水温20℃左右和光照强度为1000 $\mu\text{mol photons/m}^2 \text{ s}$ 左右(光饱和点)时菹草光合作用的产氧量最高^[20]。本研究中,在12:00—13:40,光照为923—1107 $\mu\text{mol photons/m}^2 \text{ s}$,虽接近最适宜光照,但温度已超过29℃,由于呼吸作用加强和 O_2 溶解度降低以及向大气放氧,因此此阶段叶表 O_2 浓度并未出现最高,直至15:00才出现峰值。此后,随着光照的减弱,菹草光合放氧能力减弱,叶表 O_2 浓度随之相应降低。日落后,虽然水温持续降低,但由于菹草光合作用停止不再放氧,加之呼吸作用耗氧,所以叶表 O_2 浓度持续降低,至日出前降至最低值6.00 mg/L。这与王锦旗等^[21]研究的菹草种群内 O_2 浓度的昼夜变化趋势一致。Sand—Jensen等运用Unisens Clark微电极测定了菹草叶微界面 O_2 的变化,发现越接近植物叶表 O_2 浓度越高,且随着光照强度增强而升高,叶微界面 O_2 的空间分布差异明显,6月菹草叶微界面 O_2 浓度梯度显著大于8月(衰亡期)^[7]。Sorrell和Dromgoole亦发现水蕴草(*Egeria densa*)茎的放氧能力亦存在昼夜差异,白天放氧能力明显高于夜间^[22],这与本研究结果一致。

3.2 微界面 O_2 随空间变化的可能机理

稳定期,菹草已处于成熟状态,在同一株菹草上自尖端至基部同时存在幼叶、成熟叶和衰老叶,叶片大小、颜色、形态和叶面附着物具有明显差异(图1a)。所以可以根据叶片在植株上着生的位置来对应叶片的发育程度。幼叶、成熟叶和衰老叶光合作用能力具有显著差异(图6,b)。位于顶部的幼叶,由于光合作用能力相对较弱(图6b),加之附着物稀疏,因此幼叶微界面 O_2 浓度增加幅度较小(图5)。位于中部的成熟叶光合作用能力强(图6b),附着物也显著增多(图2b),叶微界面 O_2 浓度梯度较陡,增加幅度最大(图5a)。而位于基部

的衰老叶,由于生理活性的降低(图 6b)和附着物厚度的增加(图 2b),离附着物表面越近叶微界面 O_2 浓度越高,进入附着层后 O_2 浓度增加幅度显著下降。位于中部的茎是成熟叶着生的部位,附着物较密,但由于光合活性相对较低,因此微界面 O_2 浓度在附着物表面达到最高,与幼叶表面的相当,进入附着层后未再继续增加(图 5a)。

一般来说,随着植物的生长发育,附着物的密度和生物多样性逐渐增加。在衰亡期,病原体和细菌可通过受伤的部位侵入叶表皮细胞并迅速扩展,主动地降解周围的细胞壁。侵入的病原体分泌有机酸,破坏了叶片细胞壁的微纤维结构,被侵入细胞和相邻细胞壁聚合物的晶格结构脆弱松散^[23]。在菹草衰老叶片中,可能是附着物尤其是细菌在侵入前分泌的有机酸逐步进入叶肉和表皮,使细胞发生膨胀和解体。本研究中,去除附着物这一屏障后,微界面 O_2 分布产生了明显变化,茎叶表面 O_2 浓度明显降低,可能是 O_2 扩散阻力和距离减小的缘故。因此,附着物大量而持续的附着可能加速了沉水植物衰亡和衰退^[6]。而富营养化水体中营养盐含量和悬浮颗粒过高可显著增加附着物^[6, 19, 24]。因此,菹草茎叶微界面 O_2 浓度的分布可为研究水生植物生理生态和富营养化水体中养分的迁移转化提供了重要信息。

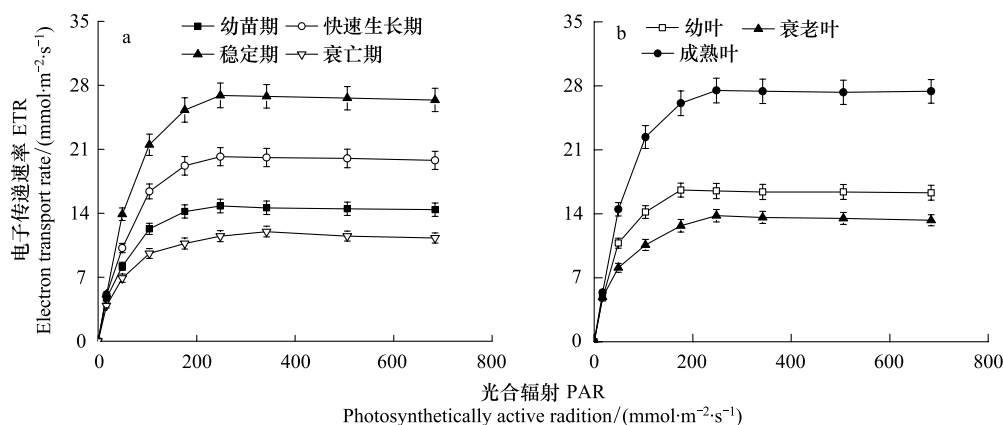


图 6 菹草不同生长阶段和不同部位快速光响应曲线特征

Fig. 6 Characteristics of rapid light curves of *Potamogeton crispus* during different growth period and that on different part of *P. crispus*. Values with bars indicate standard deviations, $n=3$

3.3 光纤微电极测定沉水植物茎叶微界面的可行性评价

固体表面(沉积物、生物膜)与其周围水之间溶解性有机分子、无机离子和气体的交换是海洋和湖泊中重要的生物和地球化学过程^[25]。界面层可限制上覆水与固体间的物质运输,因此影响生物过程。具明显化学梯度的临近活性表面的这一界面层区域通常称为扩散界面层(Diffusive boundary layer, DBL)。相对于周围水体,基质内任何物质的净生产或消耗都可在扩散界面层和基质内形成浓度梯度。通常来说,扩散界面层的厚度仅有几十微米^[25]至几个毫米^[7],因此能测定这一薄层内理化变量的梯度变化而又不对这些梯度生产明显的扰动的方法非常重要。早期对沉积物—水界面的氧分布或厌氧微环境的研究多是基于间接证据和理论计算^[26, 27],存在较大的误差。后来,非侵入光学分析、激光多普勒分析水流、核磁共振成像^[28]和正电子成像术^[29]等技术均能满足测定微界面内理化变量的要求,但多数具高空间分辨率的方法是基于微电极的。

近几十年发展起来的微电极可在较小的时空尺度上测定微界面内理化变量的空间分布且对样品无明显干扰。目前文献中对光纤针式氧电极和电化学氧电极的描述相对较多^[30-33]。早期利用 Clark 型氧微电极对菹草叶微界面^[7, 34]和海洋植物褐藻组织内外的 O_2 分布^[8]进行了研究,揭示了高度动态的微环境。但由于丹麦 Clark 型电极在测定过程中可能发生漂移和耗氧;极化时间较长;要求流速稳定;长期储存可能使其稳定性降低并引起损坏^[35];制作复杂(手工拉制)、价格昂贵和脆弱性等缺点,限制了其应用普及。而近些年德国 PreSens 开发的光纤氧微电极是一种研究微界面的理想工具,可在较小时空尺度上研究微环境中氧的变化。与 Clark 型电极相比,具有如下优点:1)具有较高的时间($t_{90} < 3$ s)和空间(< 50 μ m)分辨率,可测定气相和液

相中的氧,电极本身不耗氧;2)可在比传统方法更大的温度范围内测定;3)较短的预热时间足可得到可靠的数据;4)信号稳定,不受 H_2S 、 CO_2 和其他相关化学因子的影响;5)对待测样品无干扰,可原位测定;6)机械稳定性好,可长期保存,价格相对低廉^[36, 37]。光纤氧电极、温度电极和 pH 微电极已成功应用于沉积物、动物和植物组织等微环境研究^[35, 36, 38]。光纤氧电极在水环境中多用于沉积物、微生物垫和根际中 O_2 梯度的测定^[4, 39-41]。本研究将光纤氧微电极成功拓展到沉水植物茎叶微界面研究上,揭示了菹草茎叶微界面内(2 mm) O_2 浓度的时空变化,证明了富营养化水体中沉水植物茎叶微界面是一个高度动态的微环境。结果表明光纤氧微电极是一种研究沉水植物茎叶微界面 O_2 分布的理想工具。

4 结论

(1)菹草叶微界面 O_2 分布具有明显的生长阶段变化和昼夜变化。不同生长阶段微界面 O_2 浓度梯度变化主要受植物光合作用能力和附着物的影响。叶表面 O_2 浓度显著的单峰昼夜变化主要受光照和温度的影响。

(2)菹草不同部位茎叶微界面 O_2 分布具有明显的差异。这种差异主要受植物生理活性和附着物的综合影响。

(3)光纤氧微电极是一种测定沉水植物茎叶微界面 O_2 分布的理想工具,可在较高的精度上揭示微环境中 O_2 浓度梯度的时空变化。

参考文献 (References):

- [1] Reddy K R, Patrick W H, Lindau C W. Nitrification-denitrification at the plant root-sediment interface in wetlands. *Limnology and Oceanography*, 1989, 34(6): 1004-1013.
- [2] Dong B, Han R M, Wang G X, Cao X. O_2 , pH, and redox potential microprofiles around *Potamogeton malaianus* measured using microsenors. *PLoS ONE*, 2014 9(7): e101825.
- [3] Yang J X, Tam N F -Y, Ye Z H. Root porosity, radial oxygen loss and iron plaque on roots of wetland plants in relation to zinc tolerance and accumulation. *Plant and Soil*, 2014, 374(1/2): 815-828.
- [4] 王文林, 王国祥, 万寅婧, 夏劲, 唐晓燕, 陈昕, 梁斌, 庄巍. 光照和生长阶段对菹蒲根系泌氧的影响. *生态学报*, 2013, 33(12): 3688-3696.
- [5] Sand-Jensen K. Environmental variables and their effect on photosynthesis of aquatic plant communities. *Aquatic Botany*, 1989, 34(1/3): 5-25.
- [6] 董彬, 陆全平, 王国祥, 毛丽娜, 林海, 周锋, 魏宏农. 菹草 (*Potamogeton crispus*) 附着物对水体氮、磷负荷的响应. *湖泊科学*, 2013, 25(3): 359-365.
- [7] Sand-Jensen K, Revsbech N P, Jørgensen B B. Microprofiles of oxygen in epiphyte communities on submerged macrophytes. *Marine Biology*, 1985, 89(1): 55-62.
- [8] Spilling K, Titelman J, Greve T M, Kühl M. Microsensor measurements of the external and internal microenvironment of *Fucus vesiculosus* (phaeophyceae). *Journal of Phycology*, 2010, 46(6): 1350-1355.
- [9] 魏复盛. 水和废水监测分析方法 (第四版). 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [10] Schreiber U, Gademann R, Ralph P J, Larkum A W D. Assessment of photosynthetic performance of *Prochloron* in *Lissoclinum patella* in hospite by chlorophyll fluorescence measurements. *Plant and Cell Physiology*, 1997, 38(8): 945-951.
- [11] 王文林, 万寅婧, 刘波, 王国祥, 唐晓燕, 陈昕, 梁斌, 庄巍. 土壤逐渐干旱对菹蒲生长及光合荧光特性的影响. *生态学报*, 2013, 33(13): 3933-3940.
- [12] Ralph P J, Gademann R. Rapid light curves: a powerful tool to assess photosynthetic activity. *Aquatic Botany*, 2005, 82(3): 222-237.
- [13] Schreiber L, Krimm U, Knoll D, Sayed M, Auling G, Kroppenstedt R M. Plant - microbe interactions: identification of epiphytic bacteria and their ability to alter leaf surface permeability. *New Phytologist*, 2005, 166(2): 589-594.
- [14] Sand-Jensen K. Epiphyte shading: its role in resulting depth distribution of submerged aquatic macrophytes. *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica*, 1990, 25(3): 315-320.
- [15] Stevens C L, Hurd C L. Boundary-layers around bladed aquatic macrophytes. *Hydrobiologia*, 1997, 346(1-3): 119-128.
- [16] 张亚娟, 刘存歧, 张晶, 王军霞. 附着物对菹草光合作用速率的抑制效应. *环境科学研究*, 2014, 27(1): 86-91.
- [17] Liboriussen L, Jeppesen E. Temporal dynamics in epipelic, pelagic and epiphytic algal production in a clear and a turbid shallow lake. *Freshwater*

- Biology, 2003, 48(3): 418-431.
- [18] Tóth V R. The effect of periphyton on the light environment and production of *Potamogeton perfoliatus* L. in the mesotrophic basin of Lake Balaton. Aquatic Sciences, 2013, 75(4): 523-534.
- [19] 秦伯强, 高光, 朱广伟, 张运林, 宋玉芝, 汤祥明, 许海, 邓建明. 湖泊富营养化及其生态系统响应. 科学通报, 2013, 58(10): 855-864.
- [20] 苏胜齐, 沈鑫绿, 唐洪玉, 姚维志. 温度光照和 pH 对菹草光合作用的影响. 西南农业大学学报, 2001, 23(6): 532-534, 537-537.
- [21] 王锦旗, 郑有飞, 王国祥. 菹草种群内外水质日变化. 生态学报, 2013, 33(4): 1195-1203.
- [22] Sorrell B, Dromgoole F. Oxygen transport in the submerged freshwater macrophyte *Egeria densa* planch. II. Role of lacunar gas pressures. Aquatic Botany, 1988, 31(1/2): 93-106.
- [23] Rogers K H, Breen C M. Effects of epiphyton on *Potamogeton crispus* L. leaves. Microbial Ecology, 1981, 7(4): 351-363.
- [24] 宋玉芝, 黄瑾, 秦伯强. 附着生物对太湖常见的两种沉水植物快速光曲线的影响. 湖泊科学, 2010, 22(6): 935-940.
- [25] Jørgensen B B, Revsbech N P. Diffusive boundary layers and the oxygen uptake of sediments and detritus. Limnology and Oceanography, 1985, 30(1): 111-122.
- [26] Bouldin D R. Models for describing the diffusion of oxygen and other mobile constituents across the mud-water interface. The Journal of Ecology, 1968, 56(1): 77-87.
- [27] Jørgensen B B. Bacterial sulfate reduction within reduced microniches of oxidized marine sediments. Marine Biology, 1977, 41(1): 7-17.
- [28] Wieland A, Kühl M. Short-term temperature effects on oxygen and sulfide cycling in a hypersaline cyanobacterial mat (Solar Lake, Egypt). Marine Ecology Progress Series, 2000, 196: 87-102.
- [29] Khalili A, Basu A J, Pietrzyk U. Flow visualization in porous media via positron emission tomography. Physics of Fluids (1994-present), 1998, 10(4): 1031-1033.
- [30] Adams T S, Sterner R W. The effect of dietary nitrogen content on trophic level ¹⁵N enrichment. Limnology and Oceanography, 2000, 45(3): 601-607.
- [31] Armstrong W, Cousins D, Armstrong J, Turner D W, Beckett P M. Oxygen distribution in wetland plant roots and permeability barriers to gas-exchange with the rhizosphere; a microelectrode and modelling study with *Phragmites australis*. Annals of Botany, 2000, 86(3): 687-703.
- [32] Fang F, Yang L Y, Gan L, Guo L Y, Hu Z X, Yuan S J, Chen Q K, Jiang L J. DO, pH, and Eh microprofiles in cyanobacterial granules from Lake Taihu under different environmental conditions. Journal of Applied Phycology, 2014, 26(4): 1689-1699.
- [33] Xu K M, Zhang L P, Zou W B. Microelectrode study of oxygen uptake and organic matter decomposition in the sediments of Xiamen Western Bay. Estuaries and Coasts, 2009, 32(3): 425-435.
- [34] Sand-Jensen K A J, Revsbech N P. Photosynthesis and light adaptation in epiphyte-macrophyte associations measured by oxygen microelectrodes. Limnology and Oceanography, 1987, 32(2): 452-457.
- [35] Gatti S, Brey T, Müller W, Heilmayer O, Holst G. Oxygen microoptodes: a new tool for oxygen measurements in aquatic animal ecology. Marine Biology, 2002, 140(6): 1075-1085.
- [36] Azim M E, Wahab M A, Verdegem M C J, van Dam A A, van Rooij J M, Beveridge M C M. The effects of artificial substrates on freshwater pond productivity and water quality and the implications for periphyton-based aquaculture. Aquatic Living Resources, 2002, 15(4): 231-241.
- [37] Klimant I, Meyer V, Kühl M. Fiber-optic oxygen microsensors, a new tool in aquatic biology. Limnology and Oceanography, 1995, 40(6): 1159-1165.
- [38] Glud R N, Kühl M, Kohls O, Ramsing N B. Heterogeneity of oxygen production and consumption in a photosynthetic microbial mat as studied by planar optodes. Journal of Phycology, 1999, 35(2): 270-279.
- [39] Kühl M. Optical microsensors for analysis of microbial communities. Methods in Enzymology, 2005, 397: 166-199.
- [40] 王永平, 朱广伟, 洪大林, 秦伯强. 太湖草、藻型湖区沉积物—水界面厚度及环境效应研究. 中国环境科学, 2013, 33(1): 132-137.
- [41] Wang W L, Han R M, W Y J, Liu B, Tang X Y, Liang B, Wang G X. Spatio-temporal patterns in rhizosphere oxygen profiles in the emergent plant species *Acorus calamus*. PLoS ONE, 2014, 9(9): e98457.