

• 方法 •

# 颗石藻颗石粒形态的原子力显微镜观测方法： 以赫氏艾密里藻为例

王 雨<sup>1</sup> 张会勇<sup>2</sup> 项 鹏<sup>1</sup> 叶又茵<sup>1</sup> 林更铭<sup>1</sup> 杨清良<sup>1</sup> 林 茂<sup>1\*</sup><sup>1</sup> (国家海洋局第三海洋研究所, 福建厦门 361005)<sup>2</sup> (泽泉科技有限公司开放实验室, 上海 200333)

**摘要:** 颗石藻(coccolithophore)作为一种模式生物, 在重建古海洋气候和环境以及预测未来全球气候变化中起着很重要的作用, 赫氏艾密里藻(*Emiliania huxleyi*)是颗石藻最为典型的代表种。钙质颗石粒(coccolith)是颗石藻形态分类的主要依据, 有着非常精细和复杂的结构, 在样品收集过程中很容易遭到破坏, 这是颗石藻鉴定中经常遇到的一个技术问题。国际上还没有统一的颗石藻定量采样和样品分析方法。本文采用原子力显微方法(atomic force microscopy, AFM)对赫氏艾密里藻的颗石粒形态进行了超显微观察研究, 获取不同扫描范围的高度图(height image)和形貌图(deflection image)以观测其形态结构, 并建立了针对颗石藻的原子力显微样品制备方法。通过离心与膜过滤两种方法收集赫氏艾密里藻, 比较后得出了一种简单、快速的适合于观测颗石藻在大气环境成像的样品处理、制备和图像采集方法: 3,000–4,000 rpm, 20℃离心5 min, 收集颗石藻, 去除有机杂质后取白色沉淀, 将沉淀物悬浮于0.05 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>溶液中, 悬浮液滴加于盖玻片表面, 20℃晾干后于样品台在AFM接触模式(contact mode)下原子级扫描, 扫描范围50 μm, 频率1 Hz, 可以得到优质的颗石粒形态图像, 有助于颗石藻的分类鉴别。该方法可用于室内不同环境梯度或参数下的颗石粒形态结构及颗石藻藻华的检测与研究。

**关键词:** *Emiliania huxleyi*; 颗石粒; 形态特征; 原子力显微法; 高度图; 形貌图

## Observing the morphological features of *Emiliania huxleyi* coccoliths using atomic force microscopy

Yu Wang<sup>1</sup>, Huiyong Zhang<sup>2</sup>, Peng Xiang<sup>1</sup>, Youyin Ye<sup>1</sup>, Gengming Lin<sup>1</sup>, Qingliang Yang<sup>1</sup>, Mao Lin<sup>1\*</sup><sup>1</sup> Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen, Fujian 361005<sup>2</sup> Zealquest Open Laboratory of Zealquest Technology Limited Company, Shanghai 200333

**Abstract:** Coccolithophores are important components of the phytoplankton community that play a unique role in the global ocean biogeochemical cycle through carbon fixation and calcium carbonate production. In addition, coccolithophores are good indicators of climate change as they have indicative organic and inorganic remnants in sediments. *Emiliania huxleyi* is the most typical representative of coccolithophores. Classification of coccolithophores is mainly based on coccoliths, which have very fine and complex structures and are easily destroyed during the sample collection process. It becomes a technical problem to identify coccolithophores. In this study, atomic force microscopy (AFM) was employed to observe coccoliths of *Emiliania huxleyi* with the purpose of establishing an AFM sample preparation method for coccolithophores. Centrifugation was found to be an appropriate method to deal with the AFM samples compared with filtration. An optimized protocol was established: cells are centrifuged at 3,000–4,000 rpm, 20℃, over 5 minutes, a precipitate is suspended in 0.05 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> solution, and then a droplet of solution containing suspended coccoliths is pipetted onto a glass attached to the sample holder. High resolution images had been captured under the contact mode of AFM in air conditioning with a scan range of 50 μm and frequency of 1 Hz. The method is applicable to analyze the morphological features of coccoliths under various environ-

收稿日期: 2015-11-16; 接受日期: 2016-04-15

基金项目: 国家自然科学基金(41506217, 41506136)、科技部基础专项(GASI-01-02-04)和科技部海洋公益性行业科研专项(201005015)

\* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: linmao@tio.org.cn

mental parameters or gradients in the laboratory and is also suitable for coccolithophore bloom detection.

**Key words:** *Emiliana huxleyi*; coccolith; morphological feature; atomic force microscopy (AFM); height image; deflection image

颗石藻(coccolithophore)是海洋中重要的初级生产者之一,在分类上属于定鞭藻门(Haptophyta)定鞭藻纲(Prymnesiophyceae) (Jordan & Kleijne, 1994),是海洋光合自养单细胞真核微藻,细胞相对较小(3–40  $\mu\text{m}$ ),大部分呈球形。颗石藻生活史的特定阶段具有钙质的甲片即颗石粒(coccolith),大小约1–20  $\mu\text{m}$ ,是颗石藻分类鉴定的重要依据(Young, 1994)。颗石粒具有圆盘状、圆玻璃杯状、喇叭状等各种形状,其中最典型的是倒扣在细胞表面的圆盘状结构。根据组成颗石粒的单位晶体大小、形状,可以分为全颗石粒(holococcolith)和异颗石粒(heterococcolith)两大类(Cros & Fortuño, 2002; Quintero-Torres et al, 2006)。颗石藻通过光合作用产生有机碳并通过胞内机制产生无机碳酸钙质颗石粒,胞内产生的颗石粒再通过特殊的机制转运到胞外(Westbroek et al, 1989),因而被认为是地球上生产力最大的钙化微型生物。

颗石藻在世界范围广泛分布,尤其在副极地高纬度海区 and 相对高硝酸盐、低磷酸盐且高光的水体中,是大洋和高纬度海域发生藻华的常见类群(孙军, 2007; 孙军等, 2011; 李杨等, 2002)。在现存的约200种颗石藻中,赫氏艾密里藻(*Emiliana huxleyi*)与大洋桥石藻(*Gephyrocapsa oceanica*)可以形成季节性的藻华。在这两种颗石藻中,更重要的是前者,它广泛分布于全球海域,尤其在亚极地高纬度海区,每年都能够暴发大规模藻华(Brown & Yoder, 1994; Iglesias-Rodríguez et al, 2002; Tyrrell & Merico, 2004; Sun et al, 2014)。颗石藻大规模赤潮后残留的钙质颗石粒是深海软泥和白垩的最主要成分,占总 $\text{CaCO}_3$ 沉降量的80%以上(Fabry, 1989),并可从中找到同位素标记、生物标记等反映全球气候变化的信号,赫氏艾密里藻等颗石藻类所独有的化石记录使得它们成为生物地层非常重要的组分,并赋予它们检验进化假说的特殊潜力(Rost & Riebesell, 2004)。

钙质颗石粒是颗石藻分类鉴定的主要依据。很显然,颗石粒对颗石藻必然起着某种作用,但目前为止,我们还无法确定颗石粒的确切功能是什么。

大量的研究推测颗石粒可能有多重功能,如保护藻细胞防止被捕食,调节藻细胞在海洋里上升和下降,以及适应环境,在高光条件下起保护作用等(Paasche, 2001; Brownlee & Taylor, 2004; Quintero-Torres et al, 2006)。颗石粒的细胞面通过有机质与细胞或者其他颗石粒相连,不同种类的颗石藻具有不同形状的颗石粒,这些有着微妙差异的颗石粒可能决定着它们在海洋中的生态位。然而,钙质颗石粒有着非常精细和复杂的结构,在样品收集过程中很容易遭到破坏,这是颗石藻形态分类经常会遇到的一个技术问题。

## 1 颗石藻形态分类及定量研究方法概述

荧光计(fluorometer)、定量PCR和卫星遥感(remote sensing)被广泛用于水体中颗石藻的研究,但由于某些局限性,这些手段并不能提供精确的水体中颗石藻的物种及细胞丰度信息(Winter et al, 1994)。目前估算水体中今生颗石藻(living coccolithophore)一般有两种基本的研究手段:Utermöhl法和膜过滤(filtration)法。Utermöhl法主要适用于定量分析水体样品中总浮游植物组成(孙军等, 2002),而膜过滤法则只适用于在对颗石藻进行分析时,通过压力差抽滤富集样品。Utermöhl法在样品制备时需要较长时间用于水体中颗粒的沉降,而在此期间,颗石粒上的碳酸钙有可能会溶解。Utermöhl法一般是使用倒置显微镜,分辨率有限,只能检测出个体较大的颗石藻物种,如大洋桥石藻等。膜过滤法的样品常用偏光显微镜(Polarizing Optical Microscopy)和扫描电子显微镜(Scanning Electronic Microscopy, SEM)进行检测分析。偏光显微镜受分辨率的限制,在分析膜过滤法样品尤其是有小颗石球和结构精细的种时会出现一定的误差。而扫描电子显微镜则能有效地辨别这些物种,但扫描电子显微镜运行费用昂贵,而且相对较难得到准确的样品分析体积。所以,使用何种手段来进行颗石藻样品的分析,应依据科研目的来取舍。

国内目前采用的颗石藻形态研究方法多为扫

描电子显微镜(Yang et al, 2003; 钟权伟<sup>①</sup>, 2005; Chen et al, 2007)和偏光显微镜(孙军等, 2011; 孙军和荆少非, 2011), 工作集中在黄海、东海黑潮区和南海的今生颗石藻的物种组成与分布(Yang et al, 2001; Chen et al, 2007; 王俊等, 2008; 孙军等, 2011; Jin et al, 2015; 刘海娇等, 2015)。孙军(2007, 2011)选择南海作为颗石藻与全球碳循环相互作用研究的典型海域, 首次报道了我国南海西部上层水体今生颗石藻的物种组成、群落结构和分布。由于国内今生颗石藻研究起步不久, 各主要物种和关键类群的自然分布信息还很匮乏, 今后需要时空尺度上的扩展调查, 以及进一步的理论和技术层面的研究。

原子力显微技术(atomic force microscopy, AFM)最早应用于材料科学领域, 其样品预处理过程比电子显微技术简单得多, 20世纪80年代后期逐渐应用于生物科学领域, 已成为研究生物表面形貌的有力工具(Dufrène, 2002)。近年来, 原子力显微镜也开始广泛应用于海洋微生物学领域, 对于海洋颗石藻的研究也有少量报道(Henriksen et al, 2004a, b)。对于颗石藻的研究, 原子力显微镜相对于扫描电子显微镜来说具有许多优点, 包括: 不需要在样品表面进行镀膜等复杂的预处理, 不会改变样品表面的形貌; AFM原子级的分辨率扫描能提供关于样品表面的更多信息。完整的颗石粒结构是非常复杂的, 如海洋颗石藻(*Coccolithus pelagicus*)、卡特旋筏球藻(*Helicosphaera carteri*)、脆弱卵石藻(*Oolithotus fragilis*)具有不同结构的颗石粒, 而且它们的颗石粒通过有机物质相互连接在一起, 排布在颗石藻藻体的外面, 通过原子力显微技术观测发现, 这种连接颗石粒之间以及颗石粒和藻体之间的有机物具有不同的结构, 有的是管状, 有的是纤维状(Henriksen et al, 2003; 2004a, b)。颗石粒相关多糖(coccolith associated polysaccharides, CAP)和颗石粒的形成紧密相关, 并且这种多糖可能决定了颗石粒碳酸钙晶体形状(Henriksen et al, 2004b)。

颗石藻的钙质颗石粒有着非常精细和复杂的结构, 在样品收集过程中很容易遭到破坏。对于应用原子力显微方法进行观测分析的样品, 其制备和固定是一个非常关键的前期步骤, 制备效果决定了

后续操作是否顺利进行以及获取的显微图像的好坏。由于今生颗石藻还没有国际统一的定量采样和样品分析方法, 本研究使用原子力显微观测手段, 以赫氏艾密里藻为例, 采用两种不同的处理方法收集颗石粒, 经原子力显微扫描分析, 以探求一种比较适合于颗石粒收集和固定的方法, 并获取清晰的形态学图像加以辨别。该方法可用于不同海洋酸化条件下颗石粒的变形程度的观测, 也可针对白令海颗石藻藻华等生态事件的检测与研究。

## 2 赫氏艾密里藻的观测

### 2.1 颗石藻培养

藻种: 赫氏艾密里藻, 藻株CCMP371购自美国海洋浮游植物保藏中心(Center for Culture of Marine Phytoplankton, CCMP)。用0.22  $\mu\text{m}$ 聚碳酸酯膜过滤的大洋海水经过高压灭菌后配置f/2-Si培养液(Guillard, 1975)。大洋海水取自东赤道太平洋EPR03-04站位, 中国大洋第17航次。在超净工作台将藻种接种至盛有500 mL培养液的1 L培养瓶中, 再放置于植物生长气候箱培养, 温度为20℃, 光暗周期为12:12, 光照强度约为60  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 。

### 2.2 主要仪器和试剂

主要仪器: 植物气候生长箱(Conviron, 加拿大); 原子力显微镜(AFM)系统, 美国威科公司(DI Instruments Inc.) Nanoscope IIIa Multimode; Si3N4探针, 弹性系数0.06 N/m; 高速冷冻离心机(Eppendorf, 德国); Millipore真空抽滤系统; Millipore PC膜。试剂为0.05 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 溶液。

### 2.3 原子力显微镜样品制备

目前用来制备原子力显微镜生物样品的方法大致有以下几种: (1)直接将样品滴在基底上(如新鲜的云母片表面), 等自然晾干之后再扫描检测; (2)重力过滤或者抽滤, 膜的孔径略小于样品的直径, 过滤之后样品陷在模孔中(Kasas & Ikai, 1995); (3)通过聚合物粘附并交联, 利用各种带电荷的聚合物, 通过正负电荷的相互吸引来固定细菌, 如利用聚亮氨酸带正电来吸附大多数的细菌(Wagner, 1998), 或者是氨基酸之间的共价连接来粘附(Thierstern & Young, 2004)。对于颗石藻的形态观察, 首选通过重力过滤或者抽滤获得浓缩样品的方法(Vadillo-Rodríguez et al, 2004)。

<sup>①</sup> 钟权伟 (2005) 南海北部海域钙板金藻群落的时空变异. 硕士学位论文, “中山大学”海洋生物研究所, 台湾高雄。

### 2.3.1 抽滤制取原子力样品

指数生长期的藻液细胞用3  $\mu\text{m}$  PC膜真空过滤, 负压0.02 Kpa, 待膜快抽干时加适量的0.05 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 溶液冲洗。抽干的膜在室温晾干, 之后剪取合适大小的膜通过双面胶粘贴在圆形金属片上, 金属片放置于AFM样品台, 大气环境下接触模式(contact mode)扫描, 扫描频率1 Hz。

### 2.3.2 离心收集藻细胞制取原子力样品

离心收集指数生长期的藻液细胞, 离心速度4,000 rpm, 温度20 $^{\circ}\text{C}$ , 离心5 min, 离心沉淀的藻细胞采用0.05 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 溶液轻轻吹洗打匀, 并反复离心3次, 直到管壁上出现明显的白色沉淀为止。用0.05 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 溶液轻轻从管壁上吹洗掉有机质, 弃除有机杂质, 留取白色沉淀, 之后用3 mL的0.05 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 溶液把管壁上的白色沉淀吹洗下来, 低温保存, 或者直接制成AFM样品。

吸取少量的上述样品溶液, 滴加在预先用酒精擦洗好, 并已经通过双面胶粘在圆形金属片的盖玻片上, 室温晾干之后放置于AFM的样品台。在控制面板上选择AFM Mode, 根据本次样品, 采用 $\text{Si}_3\text{N}_4$ , 弹性系数为0.06 N/m的探针, 把探针小心放置在悬梁臂固定器上。采用7469j扫描头, 然后调整光探测器, 使红点聚在样品台中央。接触模式下, 水平分量值(HORZ)调整在0.0 volts左右, 垂直分量值(VERT)调在-1至2.0 volts左右, 光强值SUM调到最大。分析控制软件为DI 5.30 r3. sr3, 选择接触模式, 开始的扫描范围为50  $\mu\text{m}$ , 频率为1 Hz。

### 2.4 膜过滤制取原子力样品的检测结果

原子力显微镜扫描时可同时获取高度图(height

image)和形貌图(deflection image)。高度图给出的是立体空间轴上的信息, 当样品表面比较粗糙时, 高度图不能很好地记录和反映样品表面形貌, 而形貌图则可以做到这一点。因此, 同时获取两种图像是非常必要的(Henriksen et al, 2004a, b)。

图1和图2分别展示了抽滤藻液处理的样品在AFM的20  $\mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$ 和5  $\mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$ 两种扫描范围大小的成像。可以看出颗粒的堆积、重叠, 单个颗粒藻含有多个颗粒粒, 过滤的作用会使得这些颗粒粒脱落, 并杂乱地重叠在一起。使用膜过滤法把藻细胞过滤在孔径小于藻细胞直径的膜上, 由于受藻细胞胞外有机质的影响, 颗粒粒不能完全分离出来, 在抽滤的过程中会埋藏在有机质里面, 同时膜基底上也存在大量有机质, 颗粒粒在抽滤过程中会发生滑动、重叠。即使在过滤之后用 $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 溶液冲洗, 也不能消除这些影响。

过滤到膜上的方法不需要化学处理和表面修饰, 相对来说, 对细胞表面的形貌和物理化学特性影响更小。但是在负压过滤的过程中, 压力会轻微改变细胞表面的形貌, 例如在负压作用下细胞变得扁平, 细胞表面的物理化学特性都会受到影响, 这在负压越大的情况下表现得越明显。但是这种方法自使用以来, 已经得到了众多科学家的肯定(Kasas & Ikai, 1995; Méndez-Vilas et al, 2007), 如用来固定细胞, 观察其分裂过程(Touhami et al, 2004)。

### 2.5 离心制取原子力显微样品检测结果

图3显示, 离心可以把密度不同的细胞有机质和颗粒粒分离开来, 离心重悬处理得到的样品比较干净完整, 扫描获得了很好的图像, 并且在更精细

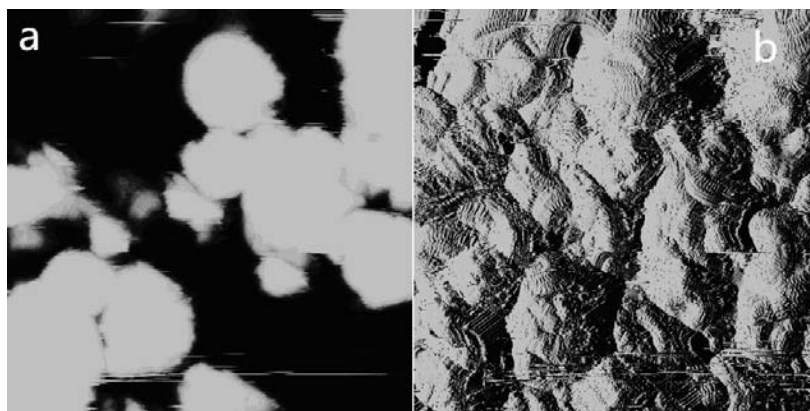


图1 藻液过滤制样条件下赫氏艾密里藻颗粒的原子力20  $\mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$ 扫描范围高度图(a)和形貌图(b)

Fig. 1 Height (a) and deflection (b) images at 20  $\mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$  in AFM of *Emiliana huxleyi* coccoliths collected by filtration



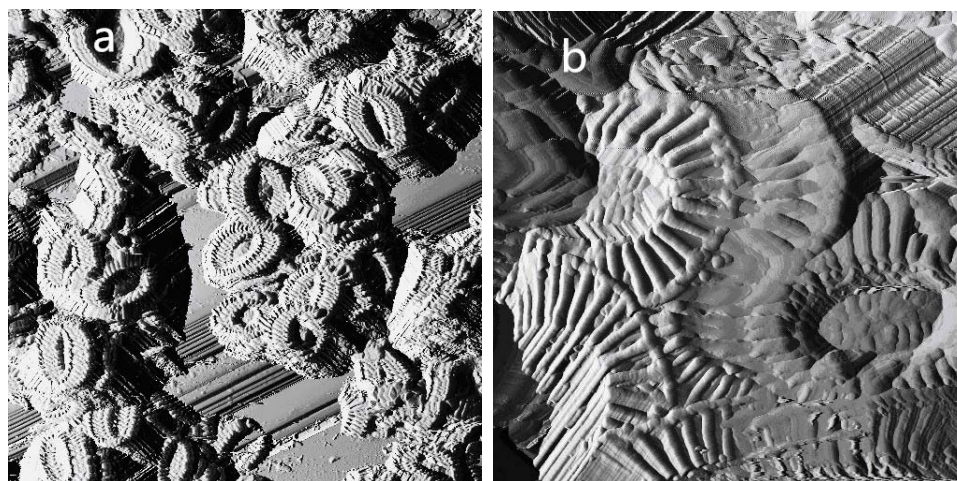


图2 藻液过滤制样条件下赫氏艾密里藻颗石粒的原子力 $20\ \mu\text{m}\times 20\ \mu\text{m}$ (a)与 $5\ \mu\text{m}\times 5\ \mu\text{m}^2$ (b)扫描范围形貌图

Fig. 2 Deflection images at  $20\ \mu\text{m}\times 20\ \mu\text{m}$  (a) and  $5\ \mu\text{m}\times 5\ \mu\text{m}$  (b) in AFM of *Emiliana huxleyi* coccoliths collected by filtration

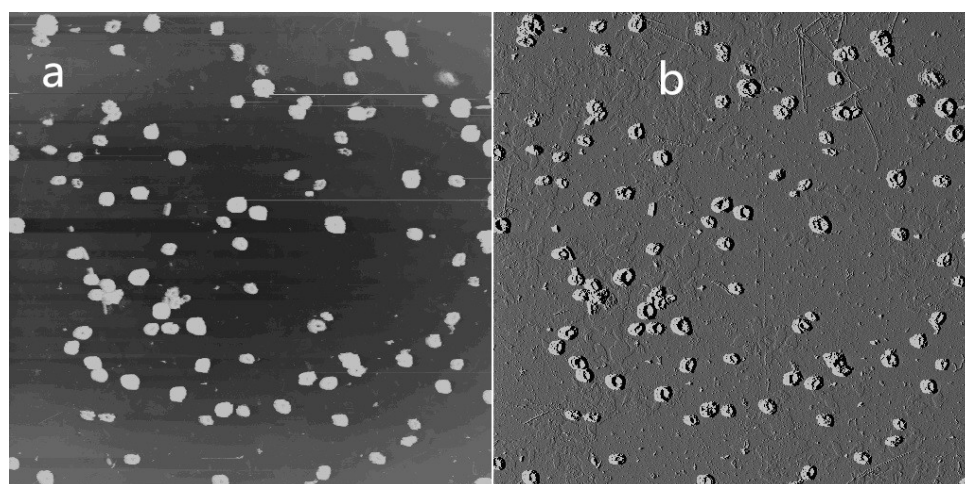


图3 离心收集条件下赫氏艾密里藻颗石粒的原子力 $100\ \mu\text{m}\times 100\ \mu\text{m}$ 扫描范围高度图(a)与形貌图(b)

Fig. 3 Height (a) and deflection (b) images at  $100\ \mu\text{m}\times 100\ \mu\text{m}$  in AFM of *Emiliana huxleyi* coccoliths collected by centrifugation

的尺度水平上扫描得到了较好的图像。图4、5展示了完整的颗石粒形态, 图6、7可以看出一个单独颗石粒的结构, 依次展示了更小扫描范围上的成像, 即离心法制备颗石粒样品可以看到更为精细的颗石粒结构。

离心速度对颗石粒的分离是一个关键的因素。经过多次离心试验, 得出3,000–4,000 rpm是一个较佳的离心速度范围。速度太高会导致颗石粒破碎, 速度太低则无法把有机质和颗石粒分离开来(Henriksen et al, 2004a; Vadillo-Rodríguez et al, 2004)。

原子力显微镜扫描之前, 将含有颗石粒的溶液直接滴加在预先用酒精擦洗好的盖玻片上, 盖玻片预先和圆形金属片用双面胶粘贴好。样品自然风干

之后, 颗石粒牢固粘附在盖玻片上, 不需要用云母片和高定向裂解石墨, 也不需要多聚左旋赖氨酸和长链聚合物聚醚酰亚胺来粘附, 样品的固定过程简化, 而且更加快捷。通过原子力显微扫描得到的图像可见, 直接过滤在膜上的样品, 颗石粒容易重叠在一起, 并且由于有机质的覆盖, 不能真实反映颗石粒的形貌(图1, 2); 而经过离心收集的整个样品表面颗石粒则比较均匀, 而且没有受到有机质的干扰而影响扫描成像(图3, 4, 5)。

原子力显微针尖的扫描频率(Hz)也是一个重要的影响因素, 要根据扫描面积的大小来设定扫描的频率: 面积大, 扫描频率可以快些; 面积小, 扫描频率就调小。速度太快容易引起针尖拖尾, 而速度

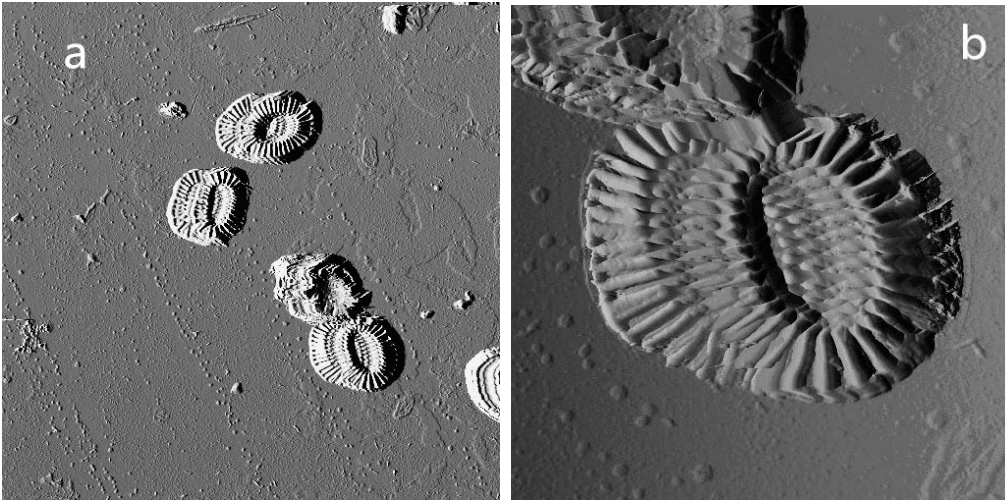


图4 离心收集条件下赫氏艾密里藻颗石粒的原子力 $20\text{ }\mu\text{m}\times 20\text{ }\mu\text{m}$ (a)与 $5\text{ }\mu\text{m}\times 5\text{ }\mu\text{m}$ (b)扫描范围形貌图  
Fig. 4 Deflection image at  $20\times 20\text{ }\mu\text{m}^2$  (a),  $5\text{ }\mu\text{m}\times 5\text{ }\mu\text{m}^2$  (b) in AFM of *Emiliana huxleyi* coccoliths collected by centrifugation

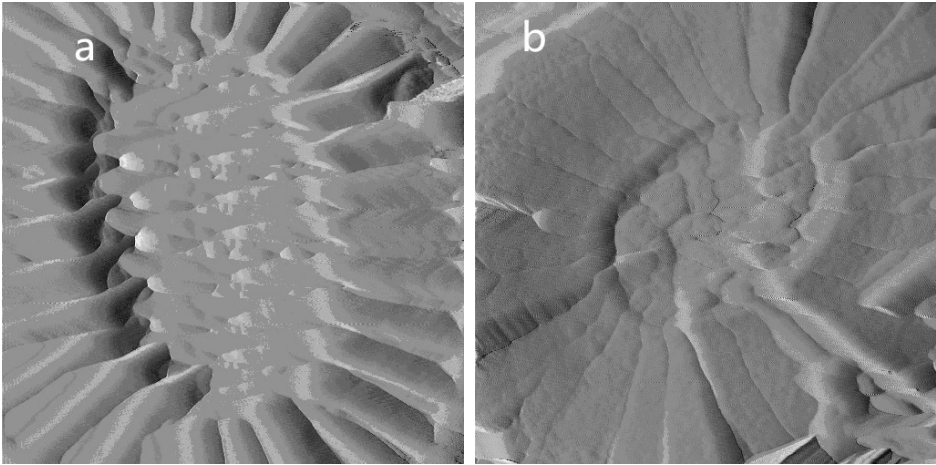


图5 离心收集条件下赫氏艾密里藻颗石粒的原子力 $2\text{ }\mu\text{m}\times 2\text{ }\mu\text{m}$ 扫描范围正面(a)与反面(b)形貌图  
Fig. 5 Frontal (a) and inverse (b) deflection image at  $2\text{ }\mu\text{m}\times 2\text{ }\mu\text{m}$  in AFM of *Emiliana huxleyi* coccoliths collected by centrifugation

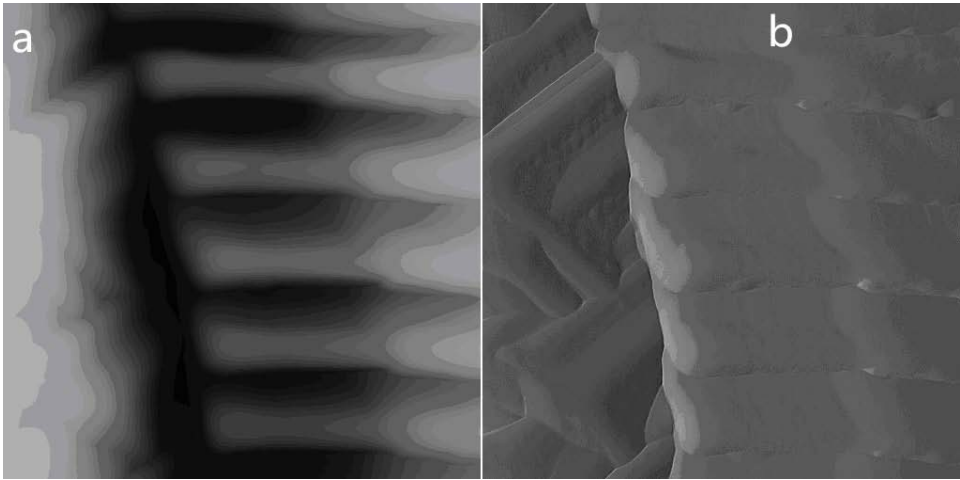


图6 离心收集条件下赫氏艾密里藻颗石粒(正面) 的原子力 $1\text{ }\mu\text{m}\times 1\text{ }\mu\text{m}$ 扫描范围高度图(a)与形貌图(b)  
Fig. 6 Frontal height (a) and deflection (b) image at  $1\text{ }\mu\text{m}\times 1\text{ }\mu\text{m}$  in AFM of *Emiliana huxleyi* coccoliths collected by centrifugation



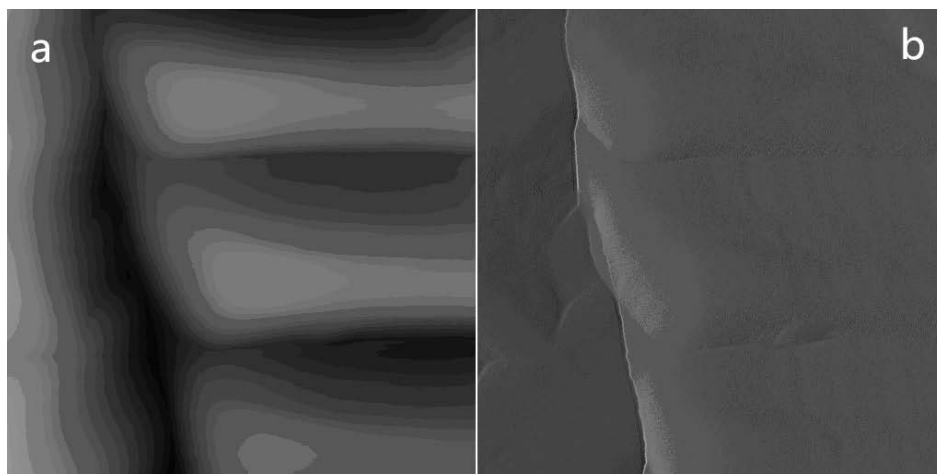


图7 离心收集条件下赫氏艾密里藻颗石粒(正面)的原子力500 nm×500 nm扫描范围高度图(a)与形貌图(b)

Fig. 7 Frontal height (a) and deflection (b) image at 500 nm×500 nm in AFM of *Emiliana huxleyi* coccoliths collected by centrifugation

太慢则针尖容易粘附到样品表面。

### 3 讨论与结论

原子力显微方法的样品制备和固定对获得良好的扫描图片是一个非常重要的前提。本文通过实验比较得出,较之于直接滴加颗石粒悬浮液于盖玻片自然风干、抽滤富集到膜上的方法,离心收集颗石粒是一种快捷简单的处理方法。经过离心收集的赫氏艾密里藻的表面颗石粒分布比较均匀,而且没有受有机质的干扰而影响扫描成像,这为进一步研究颗石粒的结构和功能提供了很好的前提,也为其他种类颗石藻的颗石粒样品处理提供了启示。

不同种类颗石藻的颗石粒在形貌上相差甚远,已有研究表明这些不同形状的颗石粒可能在决定不同种类颗石藻的生态位上起了很大的作用。不同种类颗石藻的无机颗石粒的矿化方式和结构不一样,其和有机质的连接机制也存在差异。颗石粒的矿化过程和影响因素都可以通过原子力显微镜来探明。目前大气环境二氧化碳浓度急剧升高,对海洋颗石藻产生了重大的影响,其中一个方面就是颗石粒矿化受到影响(Riebesell et al, 2000)。至于是如何影响的,这或许可以通过原子力显微镜研究获得答案。原子力显微镜已成为研究海洋颗石藻的得力工具,其在颗石藻分类鉴定、定量研究以及应对全球气候变化方面也将得到更加广泛的应用。

### 参考文献

Brown CW, Yoder JA (1994) Coccolithophorid blooms in the

global ocean. *Journal of Geophysics Research*, 99, 7467–7482.

Brownlee C, Taylor A (2004) Calcification in coccolithophores: a cellular perspective. In: *Coccolithophore: From Molecular Process to Global Impacts* (eds Theirstein HR, Young JR), pp. 31–50. Springer-Verlag Press, Berlin

Chen YLL, Chen HY, Chung CW (2007) Seasonal variability of coccolithophore abundance and assemblage in the northern South China Sea. *Deep Sea Research Part II Topical Studies in Oceanography*, 54, 1617–1633.

Cros L, Fortuño JM (2002) Atlas of northwestern Mediterranean coccolithophores. *Scientia Marina*, 66, 7–182.

Dufrène YF (2002) Atomic force microscopy, a powerful tool in microbiology. *Journal of Bacteriology*, 184, 5205–5213.

Fabry VJ (1989) Aragonite production by pteropod molluscs in the subarctic Pacific. *Deep Sea Research Part A Oceanographic Research Papers*, 36, 1735–1751.

Guillard RRL (1975) Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: *Culture of Marine Invertebrate Animals* (eds Smith WL, Chanley MH), pp. 26–60. Plenum Press, New York.

Henriksen K, Stipp SLS, Young JR, Bown PR (2003) Tailoring calcite: Nanoscale AFM of coccolith biocrystals. *American Mineralogist*, 88, 2040–2044.

Henriksen K, Stipp SLS, Young JR, Marsh ME (2004a) Biological control on calcite crystallization: AFM investigation of coccolith polysaccharide function. *American Mineralogist*, 89, 1709–1716.

Henriksen K, Young JR, Bown PR, Stipp SLS (2004b) Coccolith biomineralisation studied with atomic force microscopy. *Palaeontology*, 47, 725–743.

Iglesias-Rodríguez MD, Brown CW, Doney SC, Joan K, Dorota K, Kolber Z, Hayes PK, Falkowski P (2002) Representing key phytoplankton functional groups in ocean carbon cycle models: coccolithophorids. *Global Biogeochemical Cycles*, 16, 47–1–47–20.

- Jin HL, Feng YY, Li XQ, Zhai WD, Sun J (2015) Spring and autumn living coccolithophores in the Bohai Sea and Yellow Sea, China. *Acta Oceanologica Sinica*, 34, 132–146.
- Jordan RW, Kleijne A (1994) A classification system for living coccolithophores. In: *Coccolithophores* (eds Winter A, Siesser WG), pp. 83–106. Cambridge University Press, Cambridge.
- Kasas S, Ikai A (1995) A method for anchoring round shaped cells for atomic force microscope imaging. *Biophysical Journal*, 68, 1678–1680.
- Li Y, Gao YH, Huang DQ (2002) Advances in study of marine coccolithophorids. *Marine Sciences*, 26, 13–16. (in Chinese with English abstract) [李杨, 高亚辉, 黄德强 (2002) 海洋球石藻研究进展. *海洋科学*, 26(3), 13–16.]
- Liu HJ, Sun J, Feng YY (2015) Study on modern coccolithophores in coastal region along the east Hainan Island. *Acta Oceanologica Sinica*, 37(12), 27–40. (in Chinese with English abstract) [刘海娇, 孙军, 冯媛媛 (2015) 琼东海域今生颗石藻群落研究. *海洋学报*, 37(12), 27–40.]
- Méndez-Vilas A, Gallardo-Moreno AM, González-Martín LM (2007) Atomic force microscopy of mechanically trapped bacterial cells. *Microscopy and Microanalysis*, 13, 55–64.
- Paasche E (2001) A review of the coccolithophorid *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae), with particular reference to growth, coccolith formation and calcification-photosynthesis interaction. *Phycologia*, 40, 503–529.
- Quintero-Torres R, Aragon JL, Torres M, Estrada M, Cros L (2006) Strong far-field coherent scattering of ultraviolet radiation by holococcolithophores. *Physical Review E*, 74, 032901.
- Riebesell U, Zondervan I, Rost BM, Tortell PD, Zeebe RE, Morel FMM (2000) Reduced calcification of marine plankton in response to increased atmospheric CO<sub>2</sub>. *Nature*, 407, 364–367.
- Rost B, Riebesell U (2004) Coccolithophores and the biological pump: responses to environmental changes. In: *Coccolithophores: From Molecular Processes to Global Impact* (eds Theirstein R, Young R), pp. 99–125. Springer-Verlag Press, Berlin.
- Sun J (2007) Organic carbon pump and carbonate counter pump of living coccolithophorid. *Advances in Earth Science*, 22, 1231–1239. (in Chinese with English abstract) [孙军 (2007) 今生颗石藻的有机碳泵和碳酸盐反向泵. *地球科学进展*, 22, 1231–1239.]
- Sun J, An BZ, Dai MH, Li TG (2011) Living coccolithophores in the western South China Sea in summer 2007. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 42, 170–178. (in Chinese with English abstract) [孙军, 安佰正, 戴民汉, 李铁刚 (2011) 夏季南海西部今生颗石藻. *海洋与湖沼*, 42, 170–178.]
- Sun J, Jing SF (2011) Species diversity of living coccolithophores in Chinese sea waters. *Biodiversity Science*, 19, 787–797. (in Chinese with English abstract) [孙军, 荆少非 (2011) 中国近海今生颗石藻物种多样性初步研究. *生物多样性* 19, 787–797.]
- Sun J, Gu XX, Feng YY, Jing SF, Jiang WS, Jin HY, Chen JF (2014) Summer and winter living coccolithophores in the Yellow Sea and the East China Sea. *Biogeosciences*, 11, 779–806.
- Sun J, Liu DY, Qian SB (2002) A quantitative research and analysis method for marine phytoplankton: an introduction to Utermöhl method and its modification. *Journal of Oceanography of Huanghai & Bohai Seas*, 20, 105–112. (in Chinese with English abstract) [孙军, 刘东艳, 钱数本 (2002) 一种海洋浮游植物定量研究分析方法—Utermöhl方法的介绍及其改进. *黄渤海海洋*, 20, 105–112.]
- Thierstern HR, Young JR (2004) *Coccolithophores: From Molecular Processes to Global Impact*. Springer-Verlag Press, Berlin.
- Touhami A, Jericho MH, Beveridge TJ (2004) Atomic force microscopy of cell growth and division in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 186, 3286–3295.
- Tyrrell T, Merico A (2004) *Emiliania huxleyi*: bloom observations and the conditions that induce them. In: *Coccolithophores: From Molecular Processes to Global Impact* (eds Theirstein R, Young R), pp. 75–97. Springer-Verlag Press, Berlin.
- Vadillorodríguez V, Busscher HJ, Norde W, de VJ, Dijkstra RJ, Stokroos I, Van der Mei HC (2004) Comparison of atomic force microscopy interaction forces between bacteria and silicon nitride substrata for three commonly used immobilization methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 5541–5546.
- Wagner P (1998) Immobilization strategies for biological scanning probe microscopy. *FEBS Letters*, 430, 112–115.
- Wang J, Zuo Y, Chen RS (2008) Species composition of coccolithophorides in the Yellow Sea. *Marine Fisheries Research*, 29, 137–138. (in Chinese with English abstract) [王俊, 左涛, 陈瑞盛 (2008) 黄海球石藻的种类组成. *海洋水产研究*, 29, 137–138.]
- Westbroek P, Young JR, Linschooten K (1989) Coccolith production (biomineralisation) in the marine alga *Emiliania huxleyi*. *Journal of Protozoology*, 36, 368–373.
- Winter A, Jordan RW, Roth PH (1994) Biogeography of living coccolithophores in ocean waters. In: *Coccolithophores* (eds Winter A, Siesser WG), pp. 161–177. Cambridge University Press, UK.
- Yang TN, Wei KY, Chen LL (2003) Occurrence of coccolithophorids in the northeastern and central South China Sea. *Taiwania*, 48, 29–45.
- Yang TN, Wei KY, Gong GC (2001) Distribution of coccolithophorids and coccoliths in surface ocean off northeastern Taiwan. *Botanical Bulletin of Academic Sinica*, 42, 287–302.
- Young JR (1994) Functions of coccoliths. In: *Coccolithophores* (eds Winter A, Siesser WG), pp. 63–82. Cambridge University Press, Cambridge.

(责任编辑: 孙军 责任编辑: 时意专)