

## 大气 $\text{CO}_2$ 浓度升高和氮加富对羊栖菜生理生化特征的影响

张 鑫, 邹定辉, 徐智广, 刘树霞

(汕头大学海洋生物研究所, 广东 汕头 515063)

**摘要:** 以褐藻门马尾藻科马尾藻属羊栖菜 (*Hizikia fusiformis*) 为试验材料, 探讨了在 2 种氮 (N) 水平下,  $\text{CO}_2$  浓度升高对羊栖菜生长、光合作用和生化组成的影响。试验设 350 和 700  $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$  2 种  $\text{CO}_2$  浓度水平, 以及自然海水加入浓度 0、500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{NaNO}_3$  2 种 N 肥施用水平。结果表明, 在自然海水培养的条件下, 增加  $\text{CO}_2$  对羊栖菜生长、光合作用和生化组成的影响不明显。而在 N 加富海水中培养的藻体升高  $\text{CO}_2$  较明显的抑制了藻体的生长, 并且干重鲜重比、体内蛋白质和可溶性多糖的含量分别降低 4.5%、15%、32%。这可能主要是由于 N 加富使藻体内  $\text{NO}_2^-$  过多积累, 而  $\text{CO}_2$  升高使水体 pH 值降低, 在藻体内形成  $\text{HNO}_2$  产生的毒害作用。

**关键词:** 羊栖菜;  $\text{CO}_2$ ; 光合作用; 生化组成

中图分类号: S917

文献标识码: A

文章编号: 1673-2227-(2007)03-0035-06

## Effects of increased atmospheric $\text{CO}_2$ and N supply on some physiological and biochemical traits in the economic brown seaweed, *Hizikia fusiformis* (Sargassaceae, Phaeophyta)

ZHANG Xin, ZOU Dinghui, XU Zhiguang, LIU Shuxia

(Marine Biology Institute, Science Center, Shantou University, Shantou 515063, China)

**Abstract:** The marine macroalgae *Hizikia fusiformis* (Harvey) Okamura (Sargassaceae, Phaeophyta) was cultured under the condition of elevated atmospheric  $\text{CO}_2$  and increased N supply to investigate the effects of increased  $\text{CO}_2$  concentration and N supply on the growth, photosynthesis, and other related physiological and biochemical traits in this species. The experiment was designed for two  $\text{CO}_2$  levels which was 350 and 700  $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ , and two  $\text{NO}_3^-$  levels which was added 0, 500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaNO}_3$  in seawater. The algae cultured under non-N-enriched seawater, elevated  $\text{CO}_2$  concentration had no significant effects on growth and biochemical traits. However, the algae cultured under N-enriched seawater, elevated  $\text{CO}_2$  could effectively depress the growth. The ratio of fresh weight (FW) to dry weight (DW), the concentrations of soluble protein and soluble carbohydrate were decreased 4.5%, 15% and 32%. It suggested that increased N supply led to the accumulation of  $\text{NO}_2^-$ , and elevated  $\text{CO}_2$  concentration caused pH value to decrease. This condition was well to form  $\text{HNO}_2$ , which is toxic effect on *H. fusiformis*.

**Key words:** *Hizikia fusiforme*;  $\text{CO}_2$ ; photosynthesis; biochemical composition

大气  $\text{CO}_2$  浓度升高和海水富营养化是现在面临的 2 大生态环境问题。自工业革命以来, 大气

$\text{CO}_2$  浓度正逐步上升, 目前已由 100 多年前的 260  $\sim 280 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$  上升到 360  $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$  左右, 有

收稿日期: 2006-12-19; 修回日期: 2007-03-21

资助项目: 国家自然科学基金 (30670396 和 30470343); 国家 863 计划项目 (2006AA10A416); 广东省科技计划项目 (2006B20601005)

作者简介: 张 鑫 (1981-), 男, 硕士研究生, 从事藻类生物学研究。E-mail: xinzhang18@163.com

学者估计, 到 21 世纪末将加倍<sup>[1]</sup>。人类的活动使陆源污染物向海中排放无机营养物质不断增加, 近海水体富营养化程度越来越严重。这些环境因素加快改变了生物种群的丰盛度和生态系统的平衡<sup>[2]</sup>。

碳 (C) 和氮 (N) 的代谢途径之间是同等和联系的关系, C 修饰和 N 同化彼此竞争代谢所需的能量<sup>[3]</sup>。在高 CO<sub>2</sub> 浓度条件下, 可以促进某些藻类<sup>[4]</sup>的生长。也有研究表明 CO<sub>2</sub> 浓度升高不能促进藻体的生长<sup>[5-6]</sup>。N 营养作为引发赤潮的一个重要因素在一些赤潮藻中做了较多的工作<sup>[7]</sup>, 一些大型海藻则利用其对营养盐的吸收回收水体中过量的无机营养<sup>[8]</sup>, 这些研究都认为 N 营养可以明显提高藻体的生长。少部分研究认为 N 营养会对藻体生长产生抑制作用<sup>[9]</sup>。而在 C、N 共同作用下对藻体生理、生化组成方面的研究还较少。

褐藻门马尾藻科马尾藻属羊栖菜 (*Hizikia fusiformis*) 是一种重要的大型经济褐藻, 具有较高的营养和药用价值。在我国浙江和福建等地已有一定规模的养殖生产。本文以羊栖菜为试验材料来研究不同 C、N 水平对其生长、光合作用及生化组成的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验于 2005 年 11 月 ~ 2006 年 1 月在汕头大学海洋生物学实验室进行。低潮时从汕头南澳岛云澳湾低潮带采集羊栖菜藻体, 放入盛有少量海水的塑料袋中, 再装于 5℃ 左右的低温箱中, 在 3 h 内运回实验室。在实验室中暂养 2 d, 以适应实验室条件。藻体置于装有 2 L 灭菌的自然海水的三角瓶中, 4 个处理中均加入 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 浓度为 50 μmol · L<sup>-1</sup> 作为磷素营养补充, 在人工气候箱 (E7 Conviron, 加拿大) 中培养, 光照强度为 100 μmol · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup>, 光周期为 (L : D 12 h : 12 h) 24 h, 温度 20℃, 分成 4 个处理: 通入过滤空气浓度约为 350 μmol · L<sup>-1</sup> (C-N-); 通入过滤空气并加入 NaNO<sub>3</sub> 浓度为 500 μmol · L<sup>-1</sup> (C-N+); 通入浓度为 700 μmol · L<sup>-1</sup> 的过滤空气 (C+N-); 通入浓度为 700 μmol · L<sup>-1</sup> 的过滤空气并加入浓度为 500 μmol · L<sup>-1</sup> 的 NaNO<sub>3</sub> (C+N+)。

### 1.2 方法

1.2.1 生长的测定 相对生长速率 (relative growth rate, RGR) 通过测定藻体在实验期间鲜重 (fresh weight, FW) 的变化, 利用公式  $RGR = \ln (W_t/W_0) \times t^{-1} \times 100$ ,  $W_0$  为初始 FW,  $W_t$  为  $t$  天后的 FW, 藻样在称量前用吸水纸擦干。培养后在烘箱中 80℃ 烘干测得干重 (dry weight, DW)。

1.2.2 光合放氧测定 用灭菌的自然海水, 在不同的光照条件下, 用氧电极 (Chlorolab3 Hansatech) 进行羊栖菜藻体的光合放氧速率测定。测定之前, 把藻体用锋利的小剪刀剪成约 0.4 mm 长度的小段。在反应介质中及 100 μmol · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup> 的光线下放置至少 1 h (室温), 以减小藻体损伤对光合作用所造成的影响。然后称取大约 0.5 g 鲜重的藻片放入装有 10 mL 反应介质的反应槽中, 测定时不断搅拌反应介质。用循环水浴控制反应槽内的温度。光源为卤钨灯 (500 W), 通过改变光源与反应槽之间的距离调整不同的光照强度。每次测定在 10 min 之内完成。光化学活性 ( $F_v/F_m$ ) 用植物效能仪 (PEA, Hansatech) 测定。

1.2.3 硝酸还原酶 (NR) 活性测定 称取 0.1 g 经历 10 h 光照的藻样加入配好的缓冲液 10 mL, 充氮气 2 min 后密封, 在 30℃ 温箱中黑暗条件保温 1 h 后取出藻体, 中止反应。取 1 mL 反应液为待测液。

1.2.4 生化指标的测定 叶绿素 a 用分光光度法。0.1 g FW 藻体在 10 mL 90% 丙酮中研磨提取后 3 000 g 离心 10 min, 90% 丙酮定容后为待测液。可溶性蛋白含量测定采用考马斯亮兰 G-250 (Coomassie Brilliant Blue G-250) 染料结合法。0.1 g FW 藻体在 10 mL 蒸馏水中研磨提取后 3 000 g 离心 10 min, 蒸馏水定容后即为待测液。可溶性碳水化合物含量的测定采用苯酚-硫酸法。0.1 g DW 藻体放入加有 20 mL 蒸馏水的具塞试管中, 在 80℃ 水浴中保持 1 h, 定容后为待测液。比色采用 DU530 紫外分光光度计。

1.2.5 统计分析 所测结果表示为平均数 ± 标准差 ( $n \geq 3$ ), 用  $t$  检验检测平均数之间的差异, 以  $P < 0.05$  作为差异的极显著水平,  $P < 0.1$  为较显著水平。

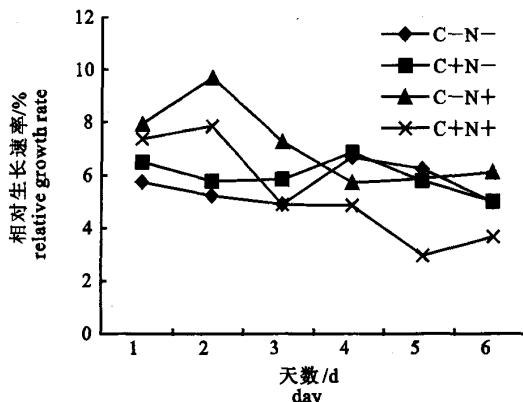


图1 不同 C、N 水平对羊栖菜相对生长速率的影响 ( $n=2$ )

Fig. 1 The relative growth rate of *H. fusiforme* at different C and N levels ( $n=2$ )

## 2 结果

### 2.1 相对生长速率

在自然海水中培养的藻体 (C-N-, C+N-) 相对生长速率比较稳定, CO<sub>2</sub> 对生长有促进作用但影响不是很明显。在 N 加富条件下 (C-N+, C+N+) 2 d 的短期培养会提高藻体的相对生长速率, 2 d 后开始抑制藻体的生长, CO<sub>2</sub> 加富条件相对未加富条件抑制了藻体的生长 (图 1)。

### 2.2 光合作用

2.2.1 光合溶氧 在自然海水中, CO<sub>2</sub> 倍增的条件 (C+N-) 相对空气条件 (C-N-) 下培养的羊栖菜的光合参数的影响不显著 ( $P > 0.05$ ), 而氮加富条件 (C-N+, C+N+) 相对自然海水

表1 不同 C、N 水平对羊栖菜 P-I 曲线的光合参数的影响

Tab. 1 Photosynthetic parameters of the P-I curves in *H. fusiforme* at different C and N levels

	C-N-	C+N-	C-N+	C+N+
暗呼吸/ $\mu\text{mol O}_2 \cdot (\text{g FW} \cdot \text{h})^{-1}$ dark respiration rate (Rd)	$-6.12 \pm 0.749$	$-6.76 \pm 0.364$	$-7.45 \pm 0.519$	$-9.19 \pm 1.55$
光合效率/ $\mu\text{mol O}_2 \cdot (\text{g FW} \cdot \text{h})^{-1} / \mu\text{mol}$ photon $\cdot (\text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1})$ photosynthetic efficiency ( $\alpha$ )	$0.0916 \pm 0.00647$	$0.0961 \pm 0.00328$	$0.0982 \pm 0.00412$	$0.0929 \pm 0.0120$
最大光饱和合速率/ $\mu\text{mol O}_2 \cdot (\text{g FW} \cdot \text{h})^{-1}$ maximum net photosynthetic rate (Pmax)	$36.5 \pm 1.22$	$36.2 \pm 0.577$	$44.4 \pm 0.911$	$44.2 \pm 2.83$

注: 平均值  $\pm$  标准差 ( $n=3$ )

Note: Date was Mean  $\pm$  SD.

条件 (C-N-, C+N-) 可以显著地提高藻体的最大光合速率 ( $P < 0.05$ ), 高 CO<sub>2</sub> 条件培养的藻体 (C+N-, C+N+) 的暗呼吸速率大于空气条件下培养的藻体 (C-N-, C-N+) ( $P < 0.05$ ), 不同条件处理的  $\alpha$  值差异不显著 ( $P > 0.1$ ) (表 1)。

2.2.2 光化学活性 在培养初期 CO<sub>2</sub> 加富条件培养的藻体 (C+N-, C+N+) 光化学活性 ( $F_v/F_m$ ) 较高, 在培养过程中逐渐降低, 在第 5 天时 CO<sub>2</sub> 加富培养的藻体 (C+N-, C+N+) 和未加富的藻体 (C-N-, C+N-) 光化学活性已经非常接近。在 N 加富条件下, 不同 CO<sub>2</sub> 条件培养的羊栖菜 (C-N+, C+N+) 的光化学活性始

终低于在自然海水中培养的不同 CO<sub>2</sub> 条件培养的藻体 (C-N-, C+N-) (图 2)。

### 2.3 生化组成

CO<sub>2</sub> 与氮对藻体的叶绿素 a 含量没有显著影响 ( $P > 0.1$ )。在自然海水中培养的藻体 (C-N-, C+N-), CO<sub>2</sub> 加富可以提高干重/鲜重、蛋白质含量、可溶性糖含量, 但差异不显著 ( $P > 0.05$ )。在氮加富条件下 (C-N+, C+N+), CO<sub>2</sub> 加富使藻体的干重/鲜重、蛋白质含量、可溶性糖含量显著下降 ( $P < 0.05$ ) (图 3)。

### 2.4 硝酸还原酶 (NR) 活性

N 加富条件培养的藻体 (C-N+, C+N+) 的 NR 的活性低于在自然海水中培养的藻体 (C-

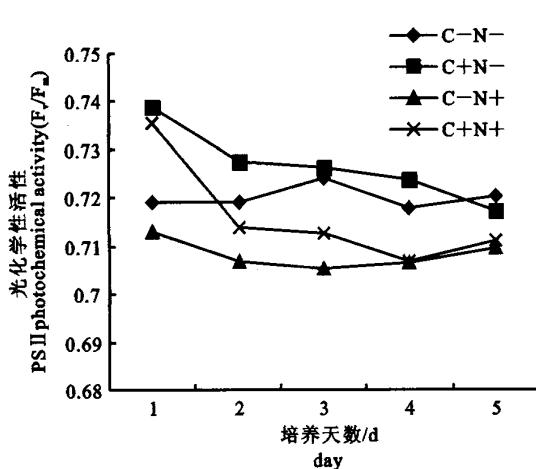


图2 不同C、N条件对羊栖菜光系统Ⅱ光化学活性( $F_v/F_m$ )的影响( $n=5$ )

Fig. 2 Optimal quantum yield for PS II charge separation ( $F_v/F_m$ ) of *H. fusiforme* under different C and N conditions ( $n=5$ )

N-, C+N- ( $P < 0.05$ )。在自然海水培养条件下,  $\text{CO}_2$  加富条件下培养的藻体 (C+N-) 的 NR 活性高于在空气中培养的藻体 (C-N-) ( $P <$

0.1), 在 N 加富条件下培养的藻体的 NR 活性在不同  $\text{CO}_2$  处理之间没有差异 ( $P > 0.1$ ) (图 4)。

### 3 讨论

在自然海水条件下,  $\text{CO}_2$  升高对藻体的生长、光合参数的影响不显著。 $\text{CO}_2$  作为光合作用的底物, 在升高的条件下并不能提高生长和光合作用的主要原因是不敏感的光合作用<sup>[10]</sup> 和  $\text{CO}_2$  浓缩机制 (CCM) 的存在<sup>[11]</sup> 所导致的。CCM 的存在是为了增加  $\text{CO}_2$  与 rubisco 的亲和力, 它建立在有效的利用  $\text{HCO}_3^-$  基础上, 利用碳酸酐酶使  $\text{HCO}_3^-$  水解产生  $\text{CO}_2$  为藻体所利用。在 N 加富的条件下,  $\text{CO}_2$  升高使藻体暗呼吸, 光合速率-光强响应曲线的初始斜率 ( $\alpha$ ) 降低, 这表明, 在海水富营养化条件下, 大气  $\text{CO}_2$  升高 (同时导致海水 pH 下降) 可能使得羊栖菜光合作用光能利用效率下降。ISRAEL<sup>[5]</sup> 认为 pH 降低会对褐藻的生长和光合作用产生较大的负面影响。

$F_v/F_m$  是 PSII 的最大光化学量子产量, 它是研究各种胁迫环境对光合作用影响的重要指标, 当藻

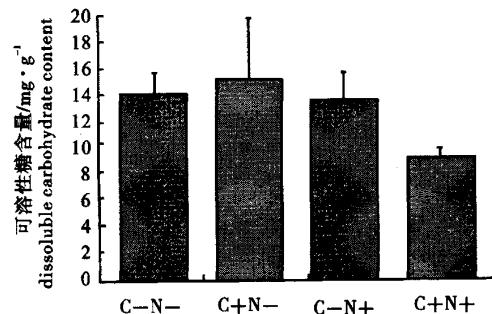
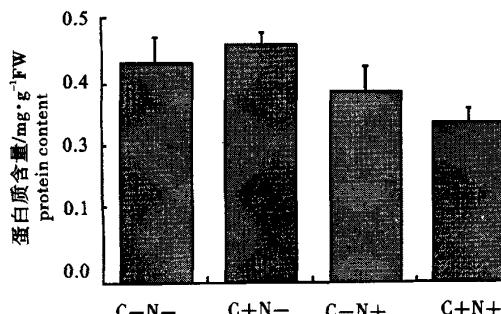
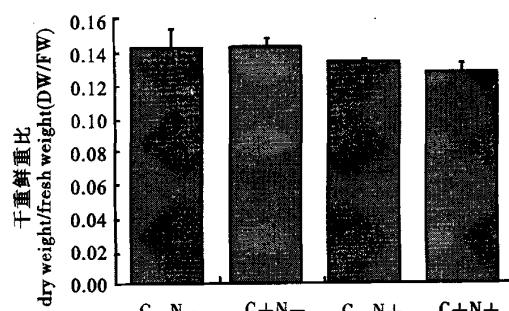
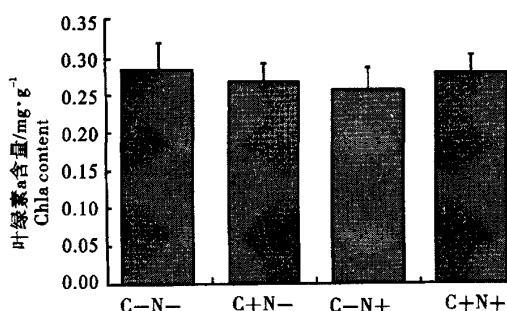


图3 在不同C、N条件下叶绿素a含量、蛋白质含量、干重/鲜重和可溶性糖含量变化( $n=5$ )

Fig. 3 The effect of different C and N condition on Chla, protein, DW/FW and soluble carbohydrate ( $n=5$ )

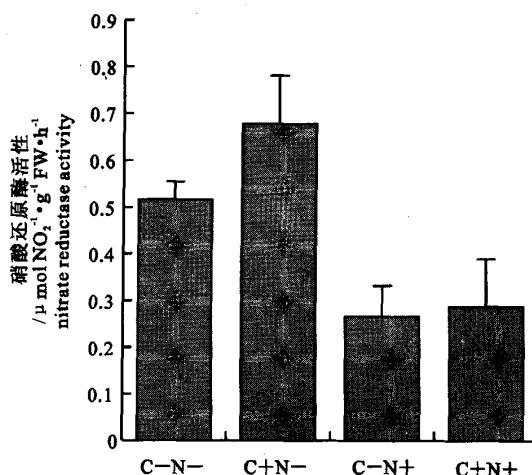


图 4 在不同 C、N 条件下羊栖菜的硝酸还原酶活性 ( $n=5$ )

Fig. 4 Nitrate reductase (NR) activity in *H. fusiforme* under different C and N conditions ( $n=5$ )

体受到胁迫时  $F_v/F_m$  显著下降。N 加富条件下的藻体  $F_v/F_m$  明显低于未加富条件下的藻体, 而叶绿素 a 的含量在 4 个处理中没有显著差异, 说明 C、N 处理对光合作用产生的影响不是由光合单位的数量变化引起的, 而是由一些间接因素所导致的。蛋白质含量、可溶性多糖含量和干重/鲜重得到了比较一致的结果, 在海水培养的条件下差异不显著, 而在 N 加富条件下, CO<sub>2</sub> 升高使蛋白质含量和可溶性多糖含量降低, 干重/鲜重减小。

藻体利用 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 的途径是 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 在硝酸还原酶 (NR) 的作用下还原成 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, 再在亚硝酸还原酶 (NiR) 的作用下转化成 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 后进一步被藻体所利用。NR 是一种诱导酶, 有报道表明 CO<sub>2</sub> 加富可以提高它的活性并提高了硝酸盐的吸收<sup>[12]</sup>。本试验结果也表明, 在低 N 条件下, CO<sub>2</sub> 加倍提高了硝酸还原酶 (NR) 的活性; 但是 N 加富抑制了 NR 的活性。很多研究认为 CO<sub>2</sub> 加富会提高藻体的 C/N<sup>[13]</sup>, 本实验结果显示, CO<sub>2</sub> 在 N 加富条件则成为一种胁迫条件, 具体原因还需进一步研究。有学者认为, N 胁迫可能是由于藻体吸收了大量的 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 在体内转化成 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, 并在体内积累导致的毒害作用<sup>[14]</sup>。也可能是由于在 N 加富条件下藻体内积累了过量的 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 离子产生的毒害作用<sup>[15]</sup>。也有

学者认为是由于营养不均衡而产生的抑制现象<sup>[9]</sup>。在本实验条件下, 硝酸盐在藻体内转化成 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 离子, 而藻体的亚硝酸还原酶 (NiR) 没有及时转化利用 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, 使其在藻体内积累, 而 CO<sub>2</sub> 加富使水体 pH 值下降, 在低 pH 条件下 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 与 H<sup>+</sup> 结合形成了 HNO<sub>2</sub> 强氧化物质产生的影响<sup>[16]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] JOHNSTON A M, RAVEN J A. Effects of culture in high CO<sub>2</sub> on the photosynthetic physiology of *Fucus serratus* [J]. Br Phycol J, 1990, 25 (1): 75–82.
- [2] VALIELA I, MCCLELLAND J, HAUXWELL J, et al. Macroalgal blooms in shallow estuaries: controls and ecophysiological and ecosystem consequences [J]. Limnol Oceanogr, 1997, 42 (5/2): 1105–1118.
- [3] LARA C, ROMERO J M, CORONIL T, et al. Interactions between photosynthetic nitrate assimilation and CO<sub>2</sub> fixation in cyanobacteria [M] // ULLRICH W R, APARICIO P J, SYRETT P J, et al. Inorganic Nitrogen Metabolism. Berlin: Springer-Verlag, 1987: 45–52.
- [4] GAO K, ARUGA Y, ASADA K, et al. Enhanced growth of the red alga *Porphyra yezoensis* Ueda in high CO<sub>2</sub> concentrations [J]. J Appl Phycol, 1991, 3 (4): 355–362.
- [5] ISRAEL A, HOPHY M. Growth, photosynthetic properties and Rubisco activities and amounts of marine macroalgae grown under current and elevated seawater CO<sub>2</sub> concentrations [J]. Global Change Biol, 2002, 8 (9): 831–840.
- [6] 邹定辉, 高坤山, 阮祚禧. 高 CO<sub>2</sub> 浓度对石莼光合作用及营养盐吸收的影响 [J]. 青岛海洋大学学报, 2001, 31 (6): 877–882.
- [7] 张清春, 于仁诚, 周名江, 等. 不同氮源对微小亚历山大藻生长和毒素产生的影响 [J]. 海洋学报, 2005, 27 (6): 138–145.
- [8] NEORI A, COHEN I, GORDIN H. *Ulva lactuca* biofilters for marine fish pond effluents. II. Growth rate, yield and C: N ratio [J]. Bot Mar, 1991, 34: 483–489.
- [9] NAKAJI T, TAKENAGA S, KUROHA M, et al. Photosynthetic responses of *Pinus densiflora* seedlings to high nitrogen load [J]. Environ Sci, 2002, 9 (4): 269–282.
- [10] ISRAEL A, BEER S. Photosynthetic and growth responses of macroalgae to globally changing CO<sub>2</sub> concentrations [C] // First Mediterranean Symposium on Marine Vegetation. Ajaccio, Corsica, 2000, 10: 3–4.
- [11] SMITH R G, BIDWELL R G S. Mechanisms of photosynthetic carbon dioxide uptake by the red macroalga, *Chondrus crispus* [J]. Plant Physiol, 1989, 89 (1): 93–99.

- [12] ZOU D. Effects of elevated atmospheric CO<sub>2</sub> on growth, photosynthesis and nitrogen metabolism in the economic brown seaweed, *Hizikia fusiforme* (Sargassaceae, Phaeophyta) [J]. *Aquac*, 2005, 250 (3/4): 726 - 735.
- [13] 邹定辉, 陈雄文. 高浓度 CO<sub>2</sub> 对条浒苔 (*Enteromorpha clathrata*) 生长和一些生理生化特征的影响 [J]. *海洋通报*, 2002, 21 (5): 38 - 45.
- [14] 邱昌恩, 况琪军, 刘国祥, 等. 不同氮浓度对绿球藻生长及生理特性的影响 [J]. *中国环境科学*, 2005, 25 (4): 408 - 411.
- [15] WELLBURN A R. Why are atmospheric oxides of nitrogen usually-phytotoxic and not alternative fertilizers [J]. *New Phytol*, 1990, 115 (3): 395 - 429.
- [16] NAKAJI T, KOBAYASHI T, KUROHA M, et al. Growth and nitrogen availability of Red Pine Seedlings under high nitrogen load and elevated ozone [J]. *Water Air Soil Pollut: Focus*, 2004, 4 (6): 277 - 287.