

大气 CO₂ 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, CO₂ 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 CO₂ 浓度水平, 以及自然海水加入浓度 0、500 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaNO₃ 2 种 N 肥施用水平。结果表明, 在自然海水培养的条件下, 倍增 CO₂ 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 CO₂ 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 NO₂⁻ 过多积累, 而 CO₂ 升高使水体 pH 值降低, 在藻体内形成 HNO₂ 产生的毒害作用。

关键词: 羊栖菜; CO₂; 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 CO₂ 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 CO₂ and increased N supply to investigate the effects of increased CO₂ concentration and N supply on the growth, photosynthesis, and other related physiological and biochemical traits in this species. The experiment was designed for two CO₂ levels which was 350 and 700 $\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$, and two NO₃⁻ levels which was added 0, 500 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaNO₃ in seawater. The algae cultured under non-N-enriched seawater, elevated CO₂ concentration had no significant effects on growth and biochemical traits. However, the algae cultured under N-enriched seawater, elevated CO₂ 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 NO₂⁻, and elevated CO₂ concentration caused pH value to decrease. This condition was well to form HNO₂, which is toxic effect on *H. fusiformis*.

Key words: *Hizikia fusiformis*; CO₂; photosynthesis; biochemical composition

大气 CO₂ 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

CO₂ 浓度正逐步上升, 目前已由 100 多年前的 260 ~ 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^[1]。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^[2]。

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^[3]。在高CO₂浓度条件下,可以促进某些藻类^[4]的生长。也有研究表明CO₂浓度升高不能促进藻体的生长^[5-6]。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^[7],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^[8],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^[9]。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Na₂HPO₄浓度为50 μmol·L⁻¹作为磷素营养补充,在人工气候箱(E7 Convrin,加拿大)中培养,光照强度为100 μmol·m⁻²·s⁻¹,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⁻¹(C-N-);通入过滤空气并加入NaNO₃浓度为500 μmol·L⁻¹(C-N+);通入浓度为700 μmol·L⁻¹的过滤空气(C+N-);通入浓度为700 μmol·L⁻¹的过滤空气并加入浓度为500 μmol·L⁻¹的NaNO₃(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 $RGR = \ln(W_t/W_0) \times t^{-1} \times 100$,W₀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⁻²·s⁻¹的光照下放置至少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蓝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≥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。

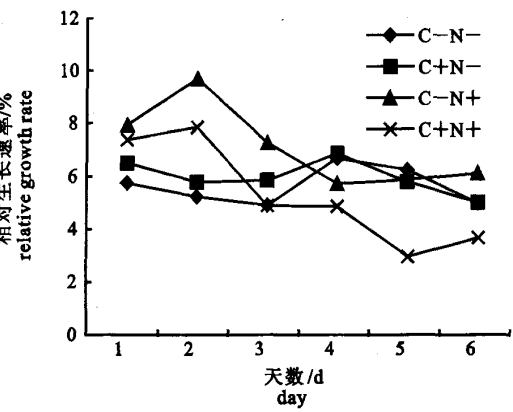


图1 不同C、N水平对羊栖菜相对生长速率的影响 (n=2)

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,CO₂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+)2d的短期培养会提高藻体的相对生长速率,2d后开始抑制藻体的生长,CO₂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,CO₂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 (α)	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±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CO₂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 α 值差异不显著(P>0.1)(表1)。

2.2.2 光化学活性 在培养初期CO₂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CO₂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CO₂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CO₂条件培养的藻体(C-N-, C+N-)(图2)。

2.3 生化组成

CO₂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-),CO₂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+),CO₂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-

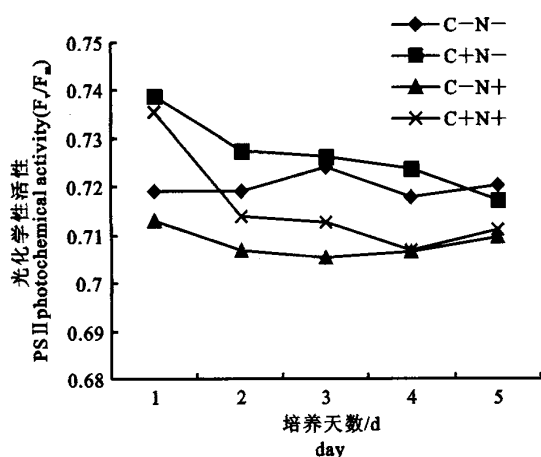


图2 不同C、N条件对羊栖菜光系统Ⅱ光化学活性 (F_v/F_m) 的影响 ($n=5$)

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, 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 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, CO_2 升高对藻体的生长、光合参数的影响不显著。 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”^[10] 和 CO_2 浓缩机制 (CCM) 的存在^[11] 所导致的。CCM 的存在是为了增加 CO_2 与 rubisco 的亲和力, 它建立在有效的利用 HCO_3^- 基础上, 利用碳酸酐酶使 HCO_3^- 水解产生 CO_2 为藻体所利用。在 N 加富的条件下, 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 (α) 降低, 这表明, 在海水富营养化条件下, 大气 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^[5] 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

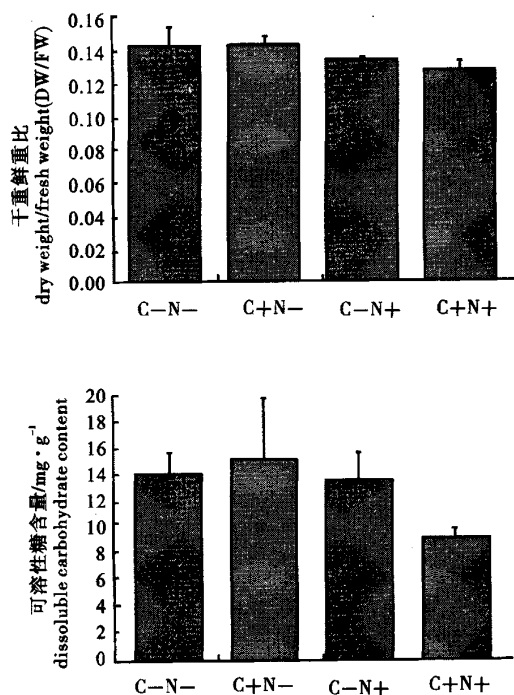
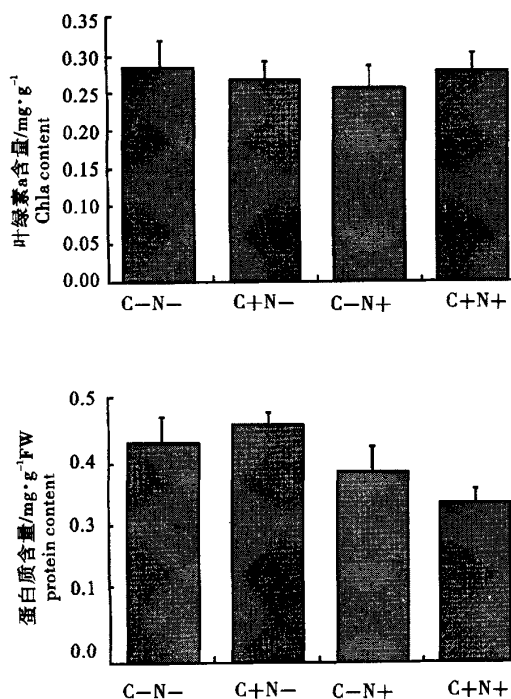


图3 在不同C、N条件下叶绿素a含量、蛋白质含量、干重/鲜重和可溶性糖含量变化 ($n=5$)

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

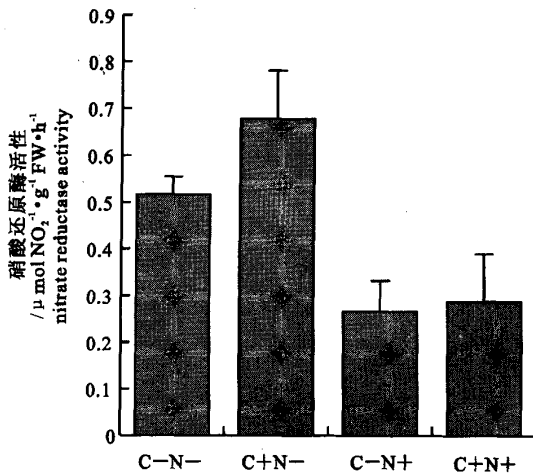


图4 在不同 C、N 条件下羊栖菜的硝酸还原酶活性 ($n=5$)

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, CO₂ 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 NO₃⁻ 的途径是 NO₃⁻ 在硝酸还原酶 (NR) 的作用下还原成 NO₂⁻, 再在亚硝酸还原酶 (NiR) 的作用下转化成 NH₄⁺ 后进一步被藻体所利用。NR 是一种诱导酶, 有报道表明 CO₂ 加富可以提高它的活性并提高了硝酸盐的吸收^[12]。本试验结果也表明, 在低 N 条件下, CO₂ 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 CO₂ 加富会提高藻体的 C/N^[13], 本实验结果显示, CO₂ 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 NO₃⁻ 在体内转化成 NH₄⁺, 并在体内积累导致的毒害作用^[14]。也可能是由于在 N 加富条件下藻体内积累了过量的 NO₂⁻ 离子产生的毒害作用^[15]。也有

学者认为是由于营养不均衡而产生的抑制现象^[9]。在本实验条件下, 硝酸盐在藻体内转化成 NO₂⁻ 离子, 而藻体的亚硝酸还原酶 (NiR) 没有及时转化利用 NO₂⁻, 使其在藻体内积累, 而 CO₂ 加富使水体 pH 值下降, 在低 pH 条件下 NO₂⁻ 与 H⁺ 结合形成了 HNO₂ 强氧化物质产生的影响^[16]。

参考文献:

- [1] JOHNSTON A M, RAVEN J A. Effects of culture in high CO₂ 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 CO₂ 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, ARUCA Y, ASADA K, et al. Enhanced growth of the red alga *Porphyra yezoensis* Ueda in high CO₂ 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 CO₂ concentrations [J]. *Global Change Biol*, 2002, 8 (9): 831–840.
- [6] 邹定辉, 高坤山, 阮作禧. 高 CO₂ 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 CO₂ 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 CO₂ 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 CO₂ 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.