

氮、磷对小新月菱形藻无机碳利用与碳酸酐酶活性的影响

夏建荣^{1,*}, 黄 瑾²

(1. 广州大学环境科学与工程学院, 广东广州 510006; 2. 汕头大学海洋生物研究所, 广东汕头 515063)

摘要: 在实验室条件下研究了氮磷浓度变化对小新月菱形藻无机碳利用与碳酸酐酶活性的影响, 结果显示小新月菱形藻随培养液中氮、磷浓度的升高比生长速率明显提高。低氮浓度导致胞外碳酸酐酶活性丧失, 但胞内碳酸酐酶活性依然存在。高氮浓度下胞内、外碳酸酐酶活性均明显升高。胞内碳酸酐酶活性在高磷浓度下明显升高, 但胞外碳酸酐酶活性并没有受到磷浓度变化的影响。高氮、磷浓度培养下的小新月菱形藻的最大光合作用速率 ($V_{\max}$)、对 CO_2 亲和力 ($K_{0.5}(\text{CO}_2)$) 和光系统 II 最大光化学效率 (F_v/F_m) 均明显提高。以上结果表明小新月菱形藻可以通过改变胞内、外碳酸酐酶活性调节无机碳利用以适应不同氮磷浓度的环境。

关键词: 氮; 磷; 小新月菱形藻; 无机碳利用; 碳酸酐酶

Impacts of nitrogen and phosphorus on inorganic carbon utilization and carbonic anhydrase activity in *Nitzschia closterium* f. *minutissima*

XIA Jianrong^{1,*}, HUANG Jin²

1 School of Environmental Science and Engineering, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China

2 Marine Biology Institute, Shantou University, Shantou 515063, China

Abstract: The increase in the input of nutrients, mainly nitrogen (N) and phosphorus (P), to marine water-with eutrophication as consequence-is a worldwide phenomenon. The supply of these nutrients would usually result in the occurrence of the red tide. *Nitzschia closterium* f. *minutissima*, a red tide alga, is distributed in coastal marine water in China. In this paper, impacts of different nitrogen and phosphorus concentrations on inorganic carbon utilization and carbonic anhydrase activity in *N. closterium* f. *minutissima* were investigated. The results showed that the algal growth was significantly stimulated by high levels of nitrogen and phosphorus. The specific growth rate was increased by 60% and 128% in the highest nitrogen ($880 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) and phosphorus ($18.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) concentrations, respectively, compared with the ambient level in natural seawater. Extracellular carbonic anhydrase activity in *N. closterium* f. *minutissima* was not detected potentiometrically, but intracellular carbonic anhydrase activity still existed under lower nitrogen conditions ($2 - 14 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$). Both extracellular and intracellular carbonic anhydrase activity were evidently increased by the elevation of nitrogen levels ($220 - 880 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$). The activity of intracellular carbonic anhydrase was significantly enhanced under high phosphorus concentrations ($9.2 - 18.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), but the extracellular carbonic anhydrase activity was insignificantly affected by phosphorus enrichment. The values of maximal photosynthetic rate ($V_{\max}$) and CO_2 concentration supporting half of $V_{\max}$ ($K_{1/2} \text{CO}_2$) appeared to be higher values when the algae were grown under high nitrogen and phosphorus concentrations. The relationship between photosynthetic O_2 evolution rate and dissolved inorganic carbon (DIC) concentrations showed that the photosynthesis was fully saturated in the ambient DIC levels in natural seawater, regardless of nitrogen and phosphorus concentrations. The maximal photochemical efficiency (F_v/F_m) was also markedly increased with

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(40676079, 40976078); 广州市植物抗逆基因功能研究重点实验室开放基金

收稿日期: 2009-12-27; **修订日期:** 2010-06-25

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: jrxia@gzhu.edu.cn

nitrogen and phosphorus enrichment, and was higher by 36.8% and 19.4% in the highest nitrogen ($880 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and phosphorus ($18.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) concentration than the ambient level in natural seawater. The above results suggested that the alga could adapt to the different nitrogen and phosphorus circumstances through the change of intracellular and extracellular carbonic anhydrase activity to regulate inorganic carbon utilization.

Key Words: nitrogen; phosphorus; *Nitzschia closterium* f. *minutissima*; inorganic carbon utilization; carbonic anhydrase

营养盐是海洋浮游植物生长所必需的成分,海洋中营养盐浓度过低如氮限制可导致浮游植物叶绿素 a、光系统 I 和 II 反应中心蛋白合成减少、光能的利用效率降低,从而影响浮游植物光合作用^[1-3]。而磷限制则可以通过腺苷酸限制、1,5-二磷酸核酮糖再生能力下降和质膜 H^+ -ATP 酶、核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶(Rubisco)活性的降低,影响细胞各方面代谢,从而限制植物生长^[4-5]。海洋中营养盐浓度如氮、磷浓度过高则会导致富营养化的发生。在富营养化的海区(如上升流,河口区以及人工增殖养殖区等),高浓度无机氮(N)和磷(P)往往是引发赤潮硅藻爆发的主要原因之一^[6],赤潮硅藻的大量繁殖常引起海水中 CO_2 浓度明显下降,但它们常能利用细胞内的二氧化碳浓缩机制(CO_2 Concentrating Mechanism, CCM)维持一定的光合速率^[7],这种机制主要包括:1)通过质膜主动转运 HCO_3^- 进入胞液,在胞液内通过碳酸酐酶的作用将 HCO_3^- 转变为 CO_2 ,或2)直接通过胞外碳酸酐酶催化细胞表面的 HCO_3^- 转变为 CO_2 , CO_2 通过扩散作用进入细胞内,通过以上胞内、外碳酸酐酶的作用维持细胞内稳定的 CO_2 流提供给 Rubisco^[8-9],因此碳酸酐酶(Carbonic anhydrase, CA)在赤潮藻类光合固碳中起着非常重要的作用。近几年来,赤潮藻类与海洋富营养化关系的研究日益得到重视,但现有的研究主要集中于 N、P 对赤潮藻类生长、营养盐吸收的影响等方面^[10-13]。不同赤潮藻类其大量繁殖对 N、P 的需求明显不同,因此研究富营养化(如 N、P)与赤潮藻类生理生态特性的关系有利于了解赤潮的发生机制。本文利用我国较常见的赤潮硅藻小新月菱形藻作为实验材料,研究了不同氮磷浓度下小新月菱形藻无机碳利用和碳酸酐酶活性的变化,探讨碳酸酐酶在赤潮藻类光合固碳中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所需藻种小新月菱形藻(*Nitzschia closterium* f. *minutissima*)购自中国科学院海洋研究所。

1.2 微藻培养与生长曲线测定

将小新月菱形藻藻种扩大培养至对数期,离心接种入含不同氮磷浓度的 f/2 培养液,氮磷单因子实验设计如下:

(1) 氮浓度控制实验,在天然海水中加入除 N 以外的所有 f/2 培养液的其它成分,然后加入 NaNO_3 ,氮浓度梯度($[\text{N-NO}_3^-]$)分别设置为 $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (天然海水)、 $14 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $55 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $110 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $220 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $440 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $880 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,磷浓度保持不变(为 f/2 培养液中磷浓度);

(2) 磷浓度控制实验,在天然海水中加入除 P 以外的所有 f/2 培养液的其它成分,磷酸盐浓度梯度($[\text{P-PO}_4^{3-}]$)分别设置为 $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (天然海水)、 $0.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $2.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $4.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $9.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $18.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,氮浓度保持不变(为 f/2 培养液中氮浓度)。

通过滤空气,光强 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,连续光照,温度控制在 20°C ,在恒温培养箱中培养。每天定时吸取一定量的藻培养液,用颗粒度计数器测定细胞数目。小新月菱形藻的比生长速率按以下计算公式:

$$\mu = (\ln X_1 - \ln X_0) / (T_1 - T_0)$$

式中, X_0 为 T_0 时的细胞密度, X_1 为 T_1 时的细胞密度。

1.3 P-C 曲线测定

收获对数期藻体,悬浮于 pH8.2 的 $25 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris 缓冲液中,取 4mL 悬浮藻液加入反应槽,在温度 20°C ,光强为 $400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 条件下,用液相氧电极(Chlorolab3, Hansatech, UK)测定光合放氧速率。当反

应槽中藻样光合放氧速率为 0 时(无机碳补偿点),注入不同浓度的 NaHCO_3 溶液得到反应体系中的 DIC 浓度梯度,测定各自之光合放氧速率,得到光合放氧速率对 DIC 浓度的响应曲线(P-C 曲线)。用下列公式对 P-C 曲线进行非线性拟合:

$$V = V_{\max} \times [\text{DIC}] / (K_{0.5} + [\text{DIC}])$$

其中, V 为光合放氧速率, $V_{\max}$ 为最大光合放氧速率; $[\text{DIC}]$ 为反应介质中总无机碳浓度; $K_{0.5}$ 是当光合放氧速率达到最大速率一半时对应的无机碳浓度。

1.4 碳酸酐酶活性测定

采用 Willbur 和 Anderson 方法测定胞内、外碳酸酐酶活性^[14]。具体方法将离心收集对数期藻细胞,悬浮于 8mL pH8.3 巴比妥缓冲液中。在 4℃ 下迅速加入 4mL 4℃ CO_2 饱和水,用 pH 计检测反应体系中 pH 值变化,记录 pH 值从 8.3 降至 7.3 所需的时间,碳酸酐酶活性(U)的计算公式为: $\text{EU} = 10 \times (T_0/T - 1)$, 其中 T_0 为反应体系中未加藻细胞时 pH 值下降所需的时间, T 为反应体系中加藻细胞时 pH 值下降所需的时间。胞外和总碳酸酐酶活性分别通过测定整个细胞和细胞经超声破碎后的碳酸酐酶活性获得。碳酸酐酶活性单位(以 chla 计)为 $\text{EU} \cdot \text{mg}^{-1}$, 胞内碳酸酐酶活性 = 总碳酸酐酶活性 - 胞外碳酸酐酶活性。

1.5 叶绿素 a 荧光参数 F_v/F_m 测定

利用叶绿素荧光仪(Water-PAM, Walz, Germany)测定叶绿素荧光参数 F_v/F_m , 藻体需要暗适应 10min, 饱和脉冲(Saturation Pulse, SP)强度为 $5600 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (持续 0.8s)。

1.6 叶绿素含量测定

在 4℃ 下 90% 丙酮抽提 12h, 分别于波长 630nm 和 664nm 处测其光密度值(OD 值), 通过以下公式计算色素含量($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)^[15]:

$$\text{Chl a} = 11.47 \times \text{OD}_{664} - 0.40 \times \text{OD}_{630}$$

$$\text{Chl c} = 24.36 \times \text{OD}_{630} - 3.73 \times \text{OD}_{664}$$

1.7 数据分析

实验均设置 3 个平行样, 实验数据以平均值或平均值 $\pm$ 标准偏差表示。数据利用方差分析及多重比较进行分析, 以 $P < 0.05$ 为差异的显著水平。

2 实验结果

2.1 不同氮磷浓度培养对小新月菱形藻生长的影响

不同 N、P 浓度培养下小新月菱形藻生长曲线如图 1, 2 所示, 高 N、P 浓度培养的小新月菱形藻从第 2 天起生长速度明显加快, 至实验结束时高 N、P 浓度培养的细胞密度较高 (Fig. 1, 2)。对数期比生长速率随培养

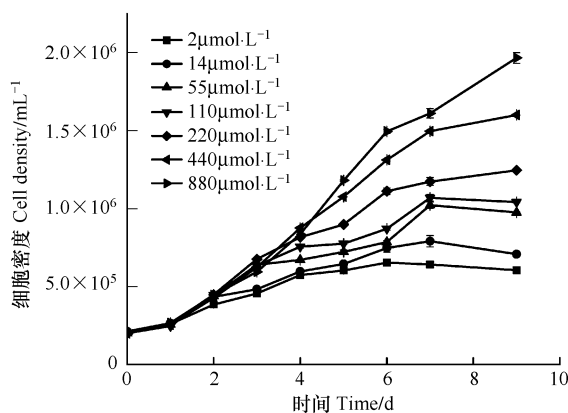


图 1 不同 N 浓度下小新月菱形藻的生长曲线

Fig. 1 Growth curve in *Nitzschia closterium* f. *minutissima* grown in different N concentrations

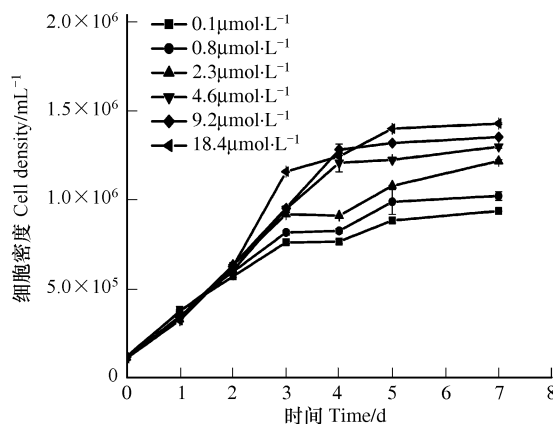


Fig. 2 不同 P 浓度下小新月菱形藻的生长曲线

Fig. 2 Growth curve in *Nitzschia closterium* f. *minutissima* grown in different P concentrations

液中氮、磷浓度的升高而明显增加,其中高氮浓度($880\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)下培养的藻细胞的比生长速率是低氮浓度($2\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)培养的 1.6 倍。高磷浓度($18.4\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)培养下的藻细胞比生长速率比低磷浓度($0.1\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)培养升高约 128%。

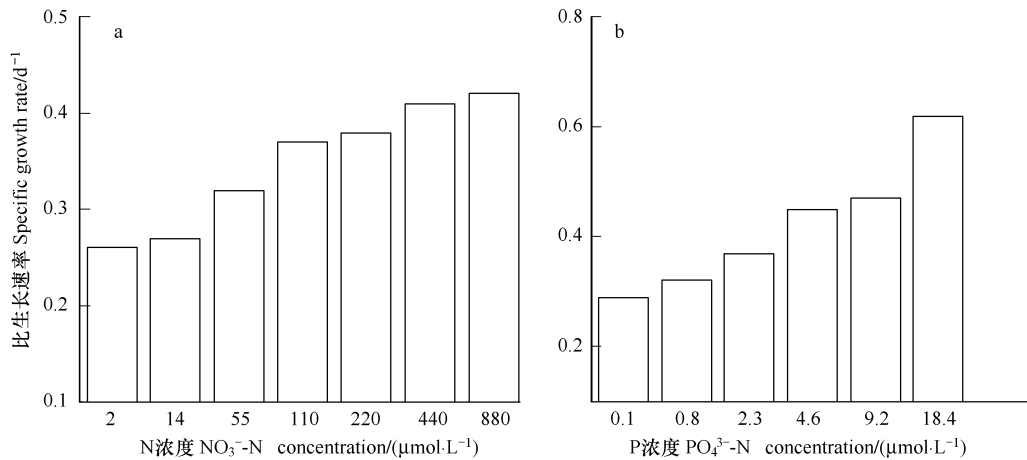


图3 不同 N(a)、P (b) 浓度下小新月菱形藻的比生长速率

Fig. 3 The specific growth rate in *Nitzschia closterium* f. *minutissima* grown in different N and P concentrations

2.2 不同氮磷浓度对小新月菱形藻叶绿素荧光参数(F_v/F_m)影响

图4、5 分别表示不同 N、P 浓度培养下小新月菱形藻光合作用光系统 II 最大光化学效率的变化, N 和 P 浓度变化对 F_v/F_m 值均有明显影响($P < 0.05$), 当培养液中 N 浓度高于 $55\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, F_v/F_m 明显升高, 而在不同 P 浓度培养下, F_v/F_m 随磷浓度升高呈现较为明显的上升趋势, 其中最高 N、P 浓度培养比天然海水 N、P 浓度培养分别提高 36.8% 和 19.4%。

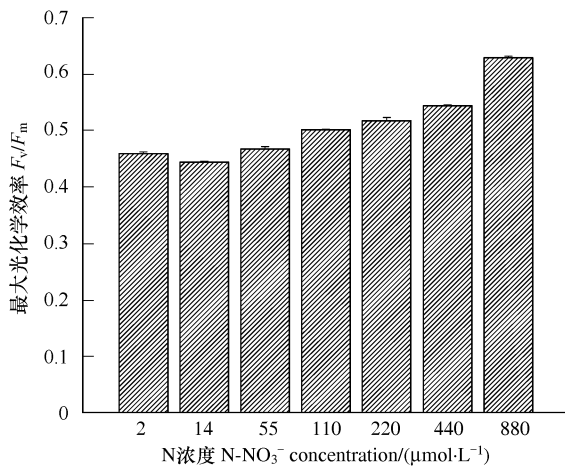


图4 N 浓度对小新月菱形藻光合作用光系统 II 最大光化学效率 (F_v/F_m) 的影响

Fig. 4 Effects of N concentration on the maximal photochemical efficiency of PSII (F_v/F_m) in *Nitzschia closterium* f. *minutissima*

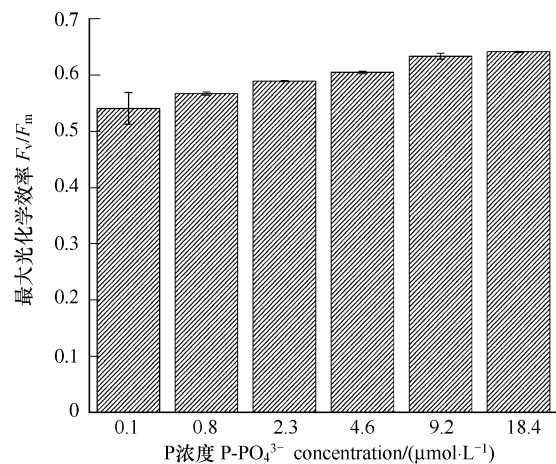


图5 P 浓度对小新月菱形藻光合作用光系统 II 最大光化学效率 (F_v/F_m) 的影响

Fig. 5 Effects of P concentration on the maximal photochemical efficiency of PSII (F_v/F_m) in *Nitzschia closterium* f. *minutissima*

2.3 不同氮磷浓度对小新月菱形藻 P-C 曲线的影响

三种不同氮(2、110 和 $880\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、磷浓度(0.1、2.3 和 $18.4\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)培养的小新月菱形藻光合速率对无机碳浓度的响应关系如图 6、7 和表 1、2 所示。氮浓度对最大光合速率($V_{\max}$)和达到最大光合速率一半

时的无机碳浓度($K_{0.5}$)均有明显影响($P < 0.05$)。培养液中无机氮浓度越高,小新月菱形藻最大光合速率(V_{max})越大,880 和 $110\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 培养时的 V_{max} 比 $2\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时分别提高 97.9% 和 66.3%。 $2\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氮浓度培养下的 $K_{0.5}(\text{CO}_2)$ 约为 $882\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时的 50%,即在低氮浓度条件下,小新月菱形藻光合作用对 CO_2 的亲合力远远大于高氮浓度培养下的细胞。不同磷浓度对小新月菱形藻的最大光合速率(V_{max})和 $K_{0.5}$ 均有明显影响($P < 0.05$)。 V_{max} 和 $K_{0.5}$ 随着磷浓度升高而升高。磷浓度 $0.1\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时的 V_{max} 和 $K_{0.5}(\text{CO}_2)$ 分别为 $(88.7 \pm 9.2)\mu\text{molO}_2\cdot\text{mg}^{-1}\text{chl}a\cdot\text{h}^{-1}$ 和 $(0.06 \pm 0.01)\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,磷浓度 2.3 和 $18.4\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时的 V_{max} 分别比低磷浓度($0.1\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 培养时提高 80.6% 和 99.2%,高磷浓度($18.4\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 条件下的 $K_{0.5}(\text{CO}_2)$ 是低磷浓度($0.1\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 2.2 倍,即低磷浓度培养的小新月菱形藻光合作用对 CO_2 的亲合力远远高于高磷浓度培养的细胞。

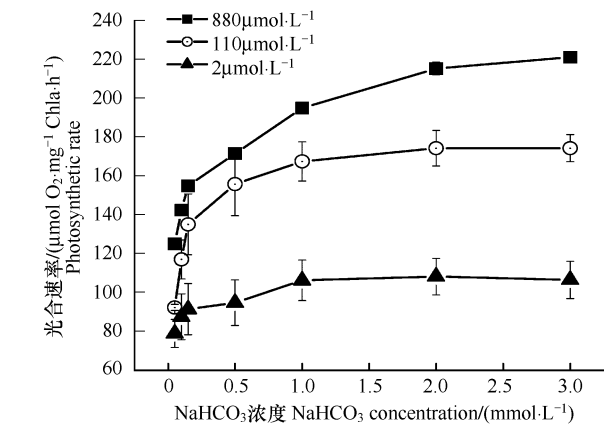


图 6 不同 N 浓度培养下小新月菱形藻的 P-C 曲线
Fig. 6 P-C curve in *Nitzschia closterium* f. *minutissima* grown under different N concentrations

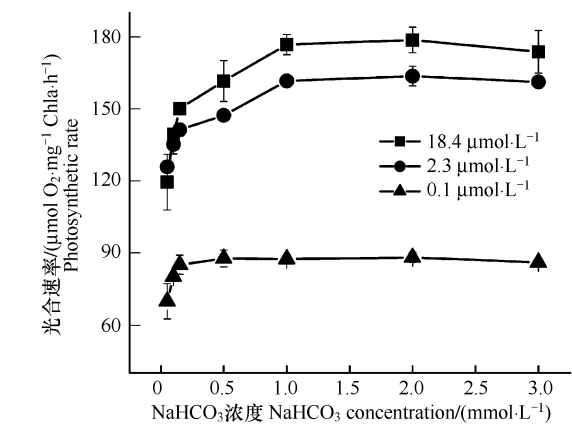


图 7 不同 P 浓度培养下小新月菱形藻的 P-C 曲线
Fig. 7 P-C curve in *Nitzschia closterium* f. *minutissima* grown under different P concentrations

表 1 不同 N 浓度培养下小新月菱形藻的最大光合速率和达到最大光合速率一半时的无机碳浓度
Table 1 The maximal photosynthetic rate (V_{max}) and the concentration of inorganic carbon ($K_{0.5}$) supporting half of V_{max} in *Nitzschia closterium* f. *minutissima* under different concentrations of nitrogen

N 浓度 N concentration /($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	最大光合速率 V_{max} /($\mu\text{molO}_2\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	达到最大光合速率一半时无机碳浓度 $K_{0.5}$ /($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)		
		DIC	CO_2	HCO_3^-
2	$105.6 \pm 9.3\text{a}$	$19.24 \pm 8.9\text{a}$	$0.1 \pm 0.02\text{a}$	$17.0 \pm 5.4\text{a}$
110	$175.6 \pm 8.7\text{b}$	$47.36 \pm 6.7\text{b}$	$0.2 \pm 0.01\text{b}$	$41.8 \pm 9.2\text{b}$
880	$209.0 \pm 2.4\text{c}$	$43.42 \pm 4.3\text{b}$	$0.2 \pm 0.05\text{b}$	$38.4 \pm 7.6\text{b}$

带不同字母的值具有明显差异($P < 0.05$)

表 2 不同 P 浓度培养下小新月菱形藻的最大光合速率和达到最大光合速率一半时的无机碳浓度
Table 2 The maximal photosynthetic rate (V_{max}) and the concentration of inorganic carbon ($K_{0.5}$) supporting half of V_{max} in *Nitzschia closterium* f. *minutissima* under different concentrations of phosphorus

P 浓度 P concentration /($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	最大光合速率 V_{max} /($\mu\text{molO}_2\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	达到最大光合速率一半时无机碳浓度 $K_{0.5}$ /($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)		
		DIC	CO_2	HCO_3^-
0.1	$88.7 \pm 9.2\text{a}$	$12.0 \pm 1.1\text{a}$	$0.06 \pm 0.01\text{a}$	$10.6 \pm 0.8\text{a}$
2.3	$160.2 \pm 9.8\text{b}$	$16.0 \pm 0.9\text{b}$	$0.08 \pm 0.01\text{b}$	$14.1 \pm 1.2\text{b}$
18.4	$176.7 \pm 10.2\text{b}$	$25.5 \pm 1.3\text{c}$	$0.13 \pm 0.02\text{c}$	$22.5 \pm 1.7\text{c}$

带不同字母的值具有明显差异($P < 0.05$)

2.4 不同氮磷浓度对小新月菱形藻碳酸酐酶活性的影响

不同无机氮浓度对小新月菱形藻的胞内、外 CA 活性影响如图 8 所示,氮浓度对胞内、外 CA 活性均有明

显影响 ($P < 0.05$), 在氮浓度为 2 和 14 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 未发现藻细胞胞外 CA 活性, 当培养液中氮浓度大于 55 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时胞外 CA 活性明显升高 ($P < 0.05$), 高氮浓度 (220—880 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 下的胞外 CA 活性分别是 55 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养下的 3.4、7.4 和 15.8 倍; 胞内 CA 活性在氮浓度 2—220 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 下无明显差异 ($P > 0.05$), 高氮浓度 (440—880 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 下的胞内 CA 活性分别是低氮浓度 (2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 下的 2.2 和 3.7 倍。

图 9 表示小新月菱形藻在不同磷浓度下的胞内、外 CA 活性变化。磷浓度对小新月菱形藻的胞外 CA 活性无明显影响 ($P > 0.05$); 胞内 CA 活性在低磷浓度培养下变化并不明显, 在高磷浓度下明显升高, 高磷浓度 (18.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 培养下的胞内 CA 活性是低磷浓度 (0.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 3.9 倍。

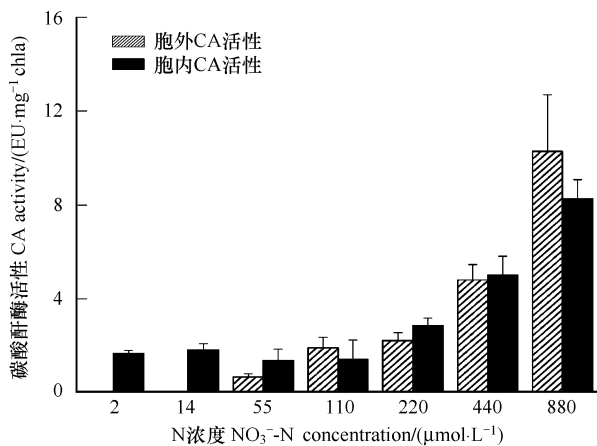


Fig. 8 N 浓度变化对小新月菱形藻碳酸酐酶活性的影响

Fig. 8 Effects of N concentration on CA activity in *Nitzschia closterium f. minutissima*

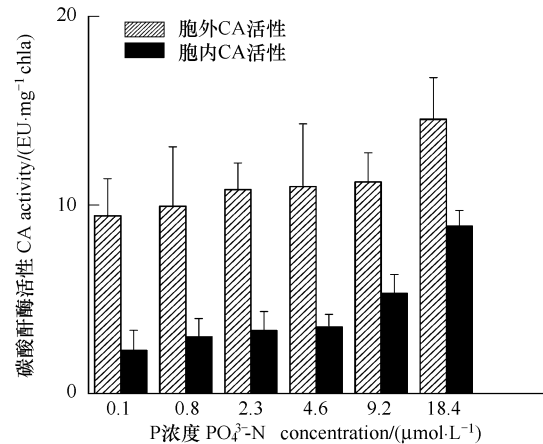


Fig. 9 P 浓度变化对小新月菱形藻碳酸酐酶活性的影响

Fig. 9 Effects of P concentration on CA activity in *Nitzschia closterium f. minutissima*

3 讨论

3.1 N、P 浓度变化对小新月菱形藻生长和光合作用的影响

N、P 等溶解性无机态营养盐是限制海洋浮游植物生长的主要营养物质^[16]。胡晗华和石岩峻等的研究表明不同氮磷水平对微小原甲藻营养盐的吸收、稳定期生物量和光合作用特性均有明显影响^[12]。中肋骨条藻在低氮环境下, 可以通过减少叶绿素的合成以降低对光能的吸收, 防止过量光能对光合机构的破坏, 从而维持其光合机构正常运行, 同时在低氮环境中, 藻细胞体内 Rubisco 合成减少, 导致细胞的实际光合固碳能力降低^[17-18]。在目前的研究中, 藻细胞的比生长速率和稳定期细胞密度随氮浓度增加而增加 (图 1, 图 3a), 表明无机氮浓度升高能促进小新月菱形藻的细胞分裂。不同氮浓度下光系统 II 最大光化学效率和 $V_{\max}$ 的变化也与其生长变化趋势相一致, 说明氮浓度的增加可能通过增加细胞内蛋白质和叶绿素的合成, 提高光系统 II 的最大光化学效率 (F_v/F_m) 和光合速率, 促进藻类的生长。磷参与细胞内能量转换和遗传信息的传递, 调节酶活性, 进而影响光合作用的许多方面^[19-20]。研究表明, 微藻受到磷限制时, F_v/F_m 比值和光合放氧速率均明显下降^[21], 与本研究有关低磷环境中 F_v/F_m 变化相一致。本研究结果显示磷浓度越低, 小新月菱形藻的比生长速率越低, 这是因为缺磷会影响微藻光合作用中的卡尔文循环和 ATP 的合成^[19], 从而影响细胞的分裂。磷浓度变化对小新月菱形藻生长的影响与最大光合速率和光系统 II 最大光化学效率的变化趋势也是一致的, 这表明磷可以通过改变光合作用速率和光化学效率影响小新月菱形藻的生长。

3.2 N、P 浓度变化对小新月菱形藻无机碳利用和碳酸酐酶活性的影响

小新月菱形藻利用无机碳的方式主要是通过胞外 CA 催化海水中 HCO_3^- 转化为 CO_2 , 后者通过自由扩散进入细胞内, 同时细胞也能直接吸收海水中的 HCO_3^- ^[22]。具有 CCM 机制的微藻细胞通常可以通过胞内、外 CA 的作用调节细胞内 CO_2 浓度变化, 维持胞内 CO_2 的供应。Beardall 等的研究发现 N 限制导致小球藻细胞出

现低 CO_2 补偿点和较高浓度的细胞内 CO_2 池,以允许细胞维持合理的 CO_2 固定速率,同时减少 N 在 Rubisco 合成上的投入^[23]。陈雄文等的研究表明,低氮浓度下莱氏衣藻胞外 CA 活性明显降低^[24],本研究有关小新月菱形藻结果与之相似,其原因可能在于低氮导致胞外 CA 的合成量减少从而使酶活性降低。Majeau 和 Coleman 证实了 Rubisco 和 CA 基因表达存在一定的协同性,在光合固碳过程中 Rubisco 和 CA 维持一定的比例是非常重要的^[25],而低氮浓度明显降低 Rubisco 的合成量,因此为了维持正常的光合作用,低氮环境中 CA 合成量也可能下降。在低氮浓度下,无胞外 CA 活性,而高氮浓度下的胞外 CA 活性随氮浓度升高而升高(图 8),表明无机氮是胞外 CA 活性的诱导因子。在低氮环境中小新月菱形藻胞外 CA 活性的缺失而胞内较高 CA 活性的存在,表明在氮限制环境中藻细胞只能通过主动转运方式将胞外 HCO_3^- 转运进入细胞内,再通过胞内 CA 作用转化为 CO_2 ,以维持细胞内一定浓度的 CO_2 池。小球藻(*Chlorella emersonii*) 在光和无机碳饱和的情况下,磷限制导致其光合速率下降和 CCM 能力的部分抑制^[26]。微藻在 HCO_3^- 主动转运过程中需要 ATP 作为能量,磷是 ATP 合成的主要原料,磷缺乏可能影响 HCO_3^- 转运。本研究结果中显示,小新月菱形藻在高磷浓度($9.1\text{--}18.4\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)下的胞内外 CA 活性明显升高,表明高磷浓度下通过胞内外 CA 作用将 HCO_3^- 转化成为 CO_2 速度加快,将有利于光合速率的提高。低氮、磷浓度下,光合作用对无机碳的亲合力远远大于高氮、磷浓度下,这表明在低氮、磷浓度下小新月菱形藻细胞可能具有较低的 CO_2 补偿点,这与低氮、磷浓度下小新月菱形藻光合无机碳(HCO_3^- 和 CO_2) 利用方式调整有关,小新月菱形藻通过提高藻细胞对无机碳的亲合力来适应低氮、磷的环境。

近海海域海水中 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 等营养盐浓度不断提高,高浓度无机氮(N)和磷(P)往往是引发赤潮的主要原因之一。齐雨藻等认为,海水富营养化的阈值为 DIN 大于 $21.43\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, DIP 大于 $0.65\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[27]。在本研究所使用的 N、P 浓度中,特别是高 N、P 浓度设置明显处于富营养化的范围,当海水中 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 明显提高时,可能会使小新月菱形藻大量繁殖而引发赤潮。赤潮暴发时细胞密度很高,导致海水 pH 明显升高,海水中 CO_2 浓度将明显降低,其光合固碳将可能更明显依赖 CA 的存在,而大量 N、P 的存在有利于 CA 活性的表达,可见目前的研究也间接证实了小新月菱形藻暴发时 CA 存在的重要性。

References:

- [1] Herig R, Falkowsk P G. Nitrogen limitation in *Isochrysis galbana* (Haptophyceae). I. photosynthetic energy conversion and growth efficiencies. *Journal of Phycology*, 1989, 25: 462-471.
- [2] Gerider R, La Roche J, Greene R, Olaizola M. Response of the photosynthetic apparatus of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) to nitrate, phosphate, or iron starvation. *Journal of Phycology*, 1993, 29: 755-766.
- [3] Falkowski P G, Sukenik A, Herzig R. Nitrogen limitation in *Isochrysis galbana* (Haptophyceae). II. Relative abundance of chloroplast proteins. *Journal of Phycology*, 1989, 25: 471-478.
- [4] Jacob J, Lawlor D W. Exterme phosphate deficiency decreases the in vivo CO_2/O_2 specificity factor of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase in intact levels of sunflower. *Journal of Experimental Botany*, 1993, 44: 1635-1641.
- [5] Fredeen A L, Raab T K, Rao I M, Terry N. Effects of phosphorous nutrition on photosynthesis in *Glycine max* (L.) Merr. *Planta*, 1990, 181: 399-405.
- [6] Granel E, Weberg M, Saloman P S. Harmful algal blooms of allelopathic microalgal species: the role of eutrophication. *Harmful Algae*, 2008, 8: 94-102.
- [7] Kaplan A, Reinhold L. CO_2 concentrating mechanisms in photosynthetic microorganisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1999, 50: 539-570.
- [8] Martin C L, Tortell P D. Bicarbonate transport and extracellular carbonic anhydrase in marine diatoms. *Physiologia Plantarum*, 2008, 133: 106-116.
- [9] Nimer N A, Warren M, Merrett M J. The regulation of photosynthetic rate and activation of extracellular carbonic anhydrase under CO_2 -limiting conditions in the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Plant Cell Environment*, 1998, 21: 805-812.
- [10] Yuan M L, Wang Z H, Li Y F. Effects of nitrogen and phosphorus limitation on the growth of *Chattonella marina*. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28: 430-435.

- [11] Hu Z X, Xu N, Li A F, Duan S S. Effects of different N: P ratios on the growth of *Pseudo-nitzschia pungens*, *Prorocentrum donghaiense* and *Phaeocystis globosa*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, 32: 482-485.
- [12] Shi Y J, Hu H H, Ma R Y, Cai Z L. Photosynthetic characteristics of *Prorocentrum minimum* and its nutrient uptake at different nitrogen and phosphorus levels. *The Chinese Journal of Process Engineering*, 2004, 4 (6): 554-559.
- [13] Cochlan W P, Herndon J, Kudela R M. Inorganic and organic nitrogen uptake by the toxigenic diatom *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae). *Harmful Algae*, 2008, 8: 111-118.
- [14] Willbur K M, Anderson N G. Electronic and colorimetric determination of carbonic anhydrase. *Journal of Biological Chemistry*, 1948, 176: 147-154.
- [15] Jeffrey S W, Humphrey G F. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c_1 and c_2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemie und Physiologie Pflanzen*, 1975, 167: 191-194.
- [16] Rhee G Y. Effects of N: P atomic ratios and nitrate limitation on algal growth, cell composition and nitrate uptake. *Limnology and Oceanography*, 1978, 23: 10-25.
- [17] Chen X W, Gao K S. Response of photosynthesis of the bloom-forming marine diatom *Skeletonema costatum* to changes in pH and inorganic nitrogen concentrations in seawater. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, 28 (6): 632-639.
- [18] Terashima I, Evans J R. Effects of light and nitrogen nutrition on the organization of the photosynthetic apparatus in spinach. *Plant Cell Physiology*, 1988, 29: 143-155.
- [19] Kozłowska-Szerenos B, Bialuk I, Maleszewski S. Enhancement of photosynthetic O_2 evolution in *Chlorella vulgaris* under high light and increased CO_2 concentration as a sign of acclimation to phosphate deficiency. *Plant Physiological Biochemistry*, 2004, 42: 403-409.
- [20] Rao I M. The Role of Phosphorus in Photosynthesis, *Handbook of Photosynthesis*. New York: Marcel Dekker, 1997: 173-194.
- [21] Dennis D W, John P D, Anastasios M. The regulation of photosynthetic electron transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 1998, 117: 129-139.
- [22] Huang J. Utilization of Inorganic Carbon and Environmental Regulation of Carbonic Anhydrase in *Nitzschia closterium* f. *minutissima*. Shantou: Shantou University, 2008.
- [23] Beardall J, Griffiths H, Raven J A. Carbon isotope discrimination and the CO_2 accumulating mechanism in *Chloroella emersonii*. *Journal of Experimental Botany*, 1982, 33: 729-737.
- [24] Chen X W, Dai X B, Zhang R X. Effect of pH value and nitrogen on activities of extracellular carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2000, 23(1): 27-79.
- [25] Majeau N, Coleman J R. Correlation of carbonic anhydrase and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase expression in pea. *Plant Physiology*, 1994, 104: 1393-1399.
- [26] Matsuda Y, Bozzo G G, Colman B. Regulation of dissolved inorganic carbon transport in green algae. *Canadian Journal of Botany*, 1998, 76: 1072-1083.
- [27] Qi Y Z, Zhang J P, Wu K D. Coastal red tide in China—eutrophication and red tide in Shen zhen Bay. *Journal of Jinan University (red tide supplement)*, 1989, 10-21.

参考文献:

- [10] 袁美玲,王朝晖,李友富. N、P 营养盐对海洋卡盾藻 (*Chattonella marina*) 生长的影响. *生态学报*, 2008, 28: 430-435.
- [11] 胡章喜,徐宁,李爱芬,段舜山. 氮磷比率对 3 种典型赤潮藻生长的影响. *水生生物学报*, 2008, 32: 482-486.
- [12] 石岩峻,胡晗华,马润宇,丛威,蔡昭玲. 不同氮磷水平下微小原甲藻对营养盐的吸收和光合作用特性. *过程工程学报*, 2004, 4(6): 554-559.
- [17] 陈雄文,高坤山. 赤潮藻中肋骨条藻的光合作用对海水 pH 和 N 变化的响应. *水生生物学报*, 2004, 28(6): 632-639.
- [22] 黄瑾. 小新月菱形藻的无机碳利用机制及其碳酸酐酶的环境调控. 汕头: 汕头大学, 2008.
- [24] 陈雄文,戴新宾,张荣铎. pH 值和氮素对莱氏衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 胞外碳酸酐酶活性的影响. *南京农业大学学报*, 2000, 23(1): 27-79.
- [27] 齐雨藻,张家平,吴坤东. 中国沿海的赤潮—深圳湾富营养化与赤潮研究. 暨南大学学报(赤潮专刊), 1989, 10-21.