

网络优先数字出版时间: 2015-08-19

网络优先数字出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/45.1075.N.20150819.0947.010.html>

硝氮和紫外辐射对龙须菜碳氮利用的影响*

Effects of Ultraviolet Radiation and Different Nitrate Concentration on Carbon and Nitrogen Utilization of *Gracilaria lemaneiformis* Grown

徐智广^{1,2}, 朱安成¹, 吴海一^{1,2**}

XU Zhi-guang^{1,2}, ZHU An-cheng¹, WU Hai-yi^{1,2}

(1. 山东省海洋生物研究院, 山东青岛 266104; 2. 青岛市大型海藻工程技术研究中心, 山东青岛 266104)

(1. Marine Biology Institute of Shandong Province, Qingdao, Shandong, 266104, China; 2. Macroalgae Engineering Technology Centre of Qingdao, Qingdao, Shandong, 266104, China)

摘要:【目的】探讨大型海藻龙须菜 (*Gracilaria lemaneiformis*) 碳氮利用对紫外辐射 (UVR) 的响应, 揭示可利用氮在其中的调节作用。【方法】设置 2 种硝氮浓度 (低氮, $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 高氮, $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 3 种不同波长的光辐射处理 (P, 395~700 nm; PA, 320~700 nm; PAB, 295~700 nm), 龙须菜叶状体在上述不同条件下适应培养 25 d 后, 测定藻体的硝氮和无机碳利用情况。【结果】PA 和 PAB 条件下培养的龙须菜, 对硝氮的最大吸收速率显著升高, 尤其在高氮条件下升高更加明显。P 条件下, 高氮适应培养的藻体硝酸还原酶 (nitrate reductase, NR) 活性显著降低; 但在 PA 和 PAB 下没有发现这种氮营养史的影响。UVR 显著降低了龙须菜的最大光合固碳速率 (P_{max}) 和对外源无机碳的半饱和常数 (K_{DIC}), 提高了总碳酸酐酶 (carbonic anhydrase, CA) 的活性。高氮适应下藻体的最大光合固碳速率和总 CA 活性显著升高, 同时半饱和常数显著降低。【结论】UVR 的存在能够促进龙须菜对外源硝氮的吸收利用, 抑制海藻光合固碳能力, 但可利用氮的加富可以缓解 UVR 对龙须菜光合作用的抑制。

关键词: 龙须菜 紫外辐射 硝氮 氮利用 碳利用

中图分类号: P735 文献标识码: A 文章编号: 1002-7378(2015)03-0219-09

Abstract: 【Objective】 To investigate carbon and nitrogen utilization of *Gracilaria lemaneiformis* responding to ultraviolet radiation (UVR), and reveal the regulation of available nitrogen in this process. 【Methods】 Two nitrate treatments with different concentration (L-N, $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and H-N, $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) and three radiation treatments with different

wavelength range (P, 395~700 nm; PA, 320~700 nm; PAB, 295~700 nm) were used, and thalli were cultured under different conditions for 25 d to determine the nitrogen and carbon utilizations. 【Results】 The results showed that the maximal nitrate uptake rate of alga exposed to UVR increased significantly, especially under H-N condition. Adaptive cultivation to H-N remarkably enhanced nitrate reductase activity in alga with UVR, while had no effect on them

收稿日期: 2015-06-11

修回日期: 2015-07-10

作者简介: 徐智广 (1977-), 男, 博士, 主要从事大型藻类环境生理学研究。

* 国家自然科学基金项目 (41376129), 海洋公益性行业科研专项经费项目 (201305005, 201305021), 山东半岛近岸海域生态模拟实验研究项目, 青岛市市南区科技发展资金项目 (2013-12-005-SW) 和山东省海洋生物研究院院长基金项目 (SZJJ201304) 资助。

** 通讯作者: 吴海一 (1973-), 男, 副研究员, 主要从事海洋生态学, E-mail: wuhaiyi1997@163.com。

without UVR. UVR exposure decreased the maximal photosynthetic carbon fixation rate (P_{\max}) and semi saturation constant of carbon utilization (K_{DIC}), while raised carbonic anhydrase (CA) activity in alga. Compared to L-N condition, both P_{\max} and CA activity increased, and K_{DIC} decreased significantly in thalli cultured in H-N condition. **【Conclusion】** These results suggested that UVR exposure stimulated nitrogen uptake and inhibited carbon utilization in *Gracilaria lemaneiformis*. However enrichment of available nitrogen could alleviate the inhibition on photosynthetic carbon fixation caused by UVR exposure.

Key words: *Gracilaria lemaneiformis*, UVR, nitrate, nitrogen utilization, carbon utilization

0 引言

【研究意义】大型海藻不仅是近海初级生产力的重要组成部分,在近海生态系统中扮演着重要的角色,而且由于其能够为人类提供食物及工业原材料,因此又具有非常重要的经济价值^[1]。大型海藻多生活在潮间带和潮下带的渐深带,因而易受到环境因子变化的影响。紫外辐射(UVR, 280~400 nm)是大型海藻一直面临的重要环境因子,近年来由于大气臭氧层的破坏,到达地球表面的UVR强度不断增强^[2],这使得大型海藻的生理生态受到不同程度的影响。氮是海藻生长的营养基础^[3],但是在近海生态系统中又经常成为大型海藻生长的限制性营养^[4]。氮在海水中的浓度还会受到季节变换、生物及理化因素的影响而在一定时空范围内表现出动态分布特征^[5],因而研究氮供应水平对大型海藻的生理生态影响具有重要的意义。龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)因具有巨大的经济价值在中国形成大规模的人工养殖,这也成为减缓中国近海富营养化现象的重要途径^[6]。在修复富营养化海水的同时,龙须菜长期处于高水平的氮营养条件下,因而有关其碳、氮利用以及可利用氮对其生理影响的研究目前已引起学术界的重视。**【前人研究进展】**已有研究表明,龙须菜通过胞外碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA)利用海水中的 HCO_3^- 离子进行光合作用^[7],UVR的存在能够抑制龙须菜的光合速率^[8],而海水中氮营养盐的加富能够通过提高紫外吸收物质^[9]或藻胆蛋白^[10]的含量来降低这种UVR引起的光合抑制。UVR的升高会引起大型海藻DNA损伤^[11]、生长速率降低^[11,12]和光合作用受到抑制^[13]等一系列生理响应。另一方面,大型海藻也在长期的适应中形成各种保护机制,以降低UVR的伤害作用,如合成紫外吸收物质(UVACs)^[10]、修复损伤^[14]等。外源氮的供应影响海藻的生长^[15]、光合作用^[16,17]、光合色素含量^[18]以及对营养盐的吸收情

况^[19]。另外,由于在海藻生理活动中的重要功能,氮的供应水平往往会改变海藻对环境胁迫的响应。比如,氮供应会影响海藻的二氧化碳浓缩机制(CC-Ms),进而调节其在 CO_2 浓度升高情况下对外源无机碳的利用^[17]。同时,氮限制会使UVR对海藻的损伤作用加重,如提高UVR诱导的光抑制^[20],影响海藻对UVR损伤的光修复^[21]和活性氧自由基的清除机制^[22]等。**【本研究切入点】**可利用氮营养的供应水平是否能够改变UVR对龙须菜碳、氮利用的影响,目前仍未见报道。**【拟解决的关键问题】**通过对比在不同硝氮浓度水平下龙须菜碳、氮利用对UVR的响应,揭示可利用氮在龙须菜应对UVR胁迫中的作用及其机理。

1 材料和方法

1.1 材料

龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)采自山东省荣成市近海人工养殖区,采集水深为0.5 m,采完放于4℃保温箱在3 h内运回实验室。

仪器设备:循环水控温装置(CAP-3000, Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan); Ultraphan 395膜(UV Opak, Digepra, Munich, Germany); Folex 320膜(Montagefolie, Nr. 10155099, Folex, Dreieich, Germany); Ultraphan 295膜(UV Opak, Digepra, Munich, Germany); 阳光辐射测定仪(Eldonet broadband filter radiometer, Eldonet XP; Real Time Computer, Möhrendorf, Germany); 阳光模拟器(Sol 1200W; Dr. Hönle, Martinsried, Germany); 氧电极(Model 5300, YSI, Yellow Springs, Ohio, USA); pH计(420A, Orion, Boston, MA, USA)。

反应介质溶液:0.2 mol·L⁻¹, pH值为7.9的磷酸缓冲液;1 mmol·L⁻¹ EDTA;0.1%(V:V)的丙醇(用来增加细胞膜的通透性);过量的 NaNO_3 作为底物;10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的葡萄糖(用来提供还

原力)。

无碳海水: 灭菌海水中加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液, 使其 pH 值降到 3.0 左右, 其目的是把海水中溶解的 HCO_3^- 全部转化成 CO_2 形式, 然后充氮气 2 h 以驱除海水中溶解的 CO_2 。

1.2 方法

1.2.1 暂养

用自然海水将采集的龙须菜于光照培养箱内进行暂养, 暂养条件如下: 温度, 26°C ; 光照为可见光, 光强为 $100 \mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; 光周期为 12 h : 12 h; 所用自然海水氮、磷浓度分别为 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。暂养 24 h 后, 选择健康一致的个体用于后续的实验。

1.2.2 适应培养

将挑选的龙须菜叶状体剪成长 5 cm 左右的小段, 随机称取 2 g 鲜重 (fresh weight, FW) 的藻体, 放于装有 500 mL 灭菌自然海水的石英管 (UVR 和可见光都能穿透) 内于室外进行培养。石英管放于水浴槽中, 通过循环水控温装置保持培养温度为 26°C 。海水中无机磷的浓度用 NaH_2PO_4 加富至最终浓度为 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 以保证培养过程龙须菜的可利用磷不受限制^[23]。所有培养海水用充气泵充气, 以供应水体中海藻对 CO_2 的需求, 同时避免藻体分枝之间的相互遮光。整个培养过程每 48 h 更换一次培养海水, 同时去除生长出的多余分枝, 确保培养海水中龙须菜的培养密度不变。培养过程设置不同的光辐射处理和硝氮浓度, 在不同条件下培养 25 d 后, 测定不同条件下藻体的硝氮和无机碳的吸收利用情况。

1.2.3 不同的光辐射处理

藻体暴露于 3 种不同的光辐射处理。(1) P 处理: 石英管以 Ultraphan 395 膜包裹, 395 膜只能透过波长在 395 nm 以上的光, 这样石英管内的藻体只接受可见光 (PAR) 的照射; (2) PA 处理: 石英管以 Folex 320 膜包裹, 320 膜只能透过波长在 320 nm 以上的光, 因而石英管内的藻体接受 PAR+紫外线 A (UV-A) 的光照射; (3) PAB 处理: 石英管以 Ultraphan 295 膜包裹, 295 膜能够透过波长 295 nm 以上的光, 因而石英管内的藻体接受 PAR+UV-A+紫外线 B (UV-B) 的光照射。3 种膜的透光情况如图 1 所示。辐射光强通过阳光辐射测定仪全天监测, 该仪器具有 3 个通道, 可以分别通过 PAR、UV-A 和 UV-B^[24], 因而能够测定 3 个波段的即时光强。龙须菜培养期间 3 种波长光的日辐射量范围如下:

PAR, $847.12 \sim 7086.74 \text{ kJ} \cdot \text{m}^{-2}$; UV-A, $163.03 \sim 1152.73 \text{ kJ} \cdot \text{m}^{-2}$; UV-B, $3.31 \sim 36.88 \text{ kJ} \cdot \text{m}^{-2}$ (图 2)。

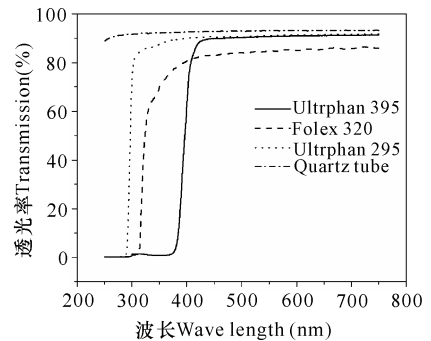


图 1 Ultraphan 395, 295, Folex 320 滤膜和石英的透射波谱

Fig. 1 The transmission spectra of Ultraphan 395, 295, Folex 320 films and quartz

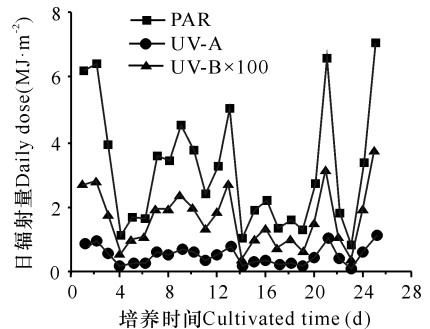


图 2 培养期间 3 种波长光的日辐射量

Fig. 2 Daily dose of PAR, UV-A and UV-B during the culture

1.2.4 不同的硝氮浓度处理

设置两个硝氮浓度条件: 低氮条件 (L-H, 不添加任何额外的氮, 自然海水作为培养基, 其中的硝氮浓度为 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和高氮处理 (H-N, 以 NaNO_3 加富自然海水, 使水体中硝氮最终浓度为 $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。48 h 更换培养基, 更换培养基之前不同氮处理的硝氮浓度: L-N 中接近 0; H-N 中约 $270 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 这说明在 L-N 条件下培养的龙须菜处于氮限制, 而 H-N 下的藻体处于氮饱和^[23]。

1.2.5 硝氮吸收动力学曲线的测定

通过测定适应培养后的藻体在不同底物浓度下对硝氮的吸收速率获得硝氮吸收动力学曲线。实验设置 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $600 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1000 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 7 个硝氮浓度梯度, 各称取 0.1 g FW 的藻体分别放于装有 20 mL 培养水体的石英管中, 分别测定藻体 2 h 内在 7 个浓度下硝氮的吸收速率。测定温度控制在 26°C ; 以阳光模拟器提供

光源(其发射光谱如图3所示),石英管分别包裹 Ultraphan 395,295 和 Folex 320 滤膜得到 P、PA 和 PAB 3 种不同的光处理,以对应各自的培养条件。不同波段的光辐射强度为 PAR, $120 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$; UV-A, $28 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$; UV-B, $1.2 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$, PAR 和 UV-A 水平与测定期间 10:00~12:00 时间段内的平均强度接近,UV-B 比室外同一时间段内自然阳光辐射高 7% 左右。

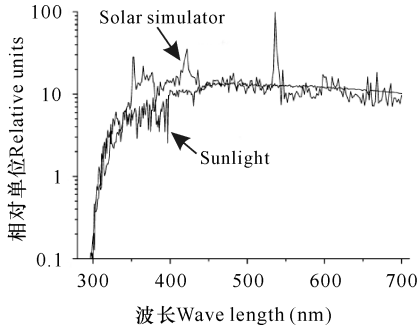


图3 阳光模拟器的发射光谱与太阳光谱比较

Fig. 3 Emission spectra of Hönle lamp and sun, which showed similar energy distribution over the wavelength span (280~700 nm).

硝氮的吸收速率通过间接法测得,即通过测定实验过程培养介质中硝氮的浓度变化,用硝氮在培养水体中的消失速率来表示龙须菜对其的吸收速率,水体中的硝氮浓度采用锌镉还原法^[25]测定。具体计算公式如下:

$$\text{uptake rate} = (N_0 - N_t) \times V \times W_0^{-1} \times t^{-1}.$$

其中, N_0 为测定开始时培养水体中硝氮的浓度, N_t 为培养结束时(2 h 后)硝氮的浓度, V 为测定水体的体积, W_0 为开始时藻体的鲜重, t 为测定时间,单位为小时(h),对硝氮的吸收速率(uptake rate)表示为 $\mu\text{mol NO}_3^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$ 。

测得不同硝氮底物浓度下的吸收速率后,利用米氏方程进行非线性拟合获得吸收动力学曲线^[26]:

$$V = V_{\max} \times S / (K_s + S).$$

其中, S 为底物硝氮的浓度, V 为龙须菜在不同底物浓度下对硝氮的吸收速率,参数 V_{\max} 是对硝氮吸收的最大速率,代表藻体对硝氮的吸收能力, K_s 值为吸收速率达到最大速率一半时的底物浓度,即半饱和常数,代表藻体对硝氮的亲合力, K_s 值越大表示亲合力越小,反之亲合力越大。 V_{\max} 和 K_s 可以从吸收动力学曲线计算得到。

1.2.6 硝酸还原酶活性(NRA)的测定

参照 Corzo and Niell^[27] 的方法,将 0.2 g FW 的活体龙须菜置于 5 mL 反应介质溶液中,充 2 min

氮气除去溶液中的氧气,以防止还原生成的 NO_2^- 被重新氧化成 NO_3^- ,然后密封放于 30°C 、黑暗条件(避免光合作用生成的氧气影响测定结果)下反应 2 h,测定溶液中生成的 NO_2^- 量,用单位鲜重的藻体在单位时间内产生的 NO_2^- 量来表示硝酸还原酶(nitrate reductase, NR)的活性(单位为 $\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$)。

重氮偶氮法测定 NO_2^- 浓度:在酸性条件下,水样中的亚硝酸盐与磺胺进行重氮化反应,反应产物与盐酸萘乙二胺作用,生成深红色的偶氮染料于 543 nm 波长测定溶液的吸光值,通过标准曲线计算 NO_2^- 的浓度,标准曲线用已知浓度的标准 NO_2^- 溶液绘制。

1.2.7 P-C 曲线的测定

通过测定不同无机碳浓度下藻体的光合放氧速率,确定光合速率与无机碳浓度的关系(P-C 曲线)。光合放氧速率用氧电极法测定:称取 0.15 g FW 的藻体,剪成 1 cm 左右的片段,培养 2 h 以避免机械损伤的影响,放于盛有 8 mL 无碳海水的氧电极槽中,在 $600 \mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 的饱和光强(光源由钨灯提供)和 26°C 条件下,通过测定不同无机碳浓度下溶液中氧浓度的变化来计算得到藻体的放氧速率。无机碳浓度设置 $0.1375 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.275 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.55 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $1.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $2.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $4.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $8.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $13.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 8 个梯度,不同无机碳浓度的反应溶液通过向无碳海水中添加 NaHCO_3 获得,即在无碳海水中加入 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Tris 缓冲溶液,再用 HCl 和 NaOH 调节 pH 值到 8.1。最后利用米氏方程进行非线性拟合^[28]:

$$P = P_{\max} \times S / (K_{\text{DIC}} + S).$$

其中, S 为无机碳浓度, P 为对应无机碳浓度下的光合放氧速率, P_{\max} 是最大放氧速率, K_{DIC} 是半饱和常数,代表藻体对无机碳的亲合力。 P_{\max} 和 K_{DIC} 可以从 P-C 曲线中直接计算获得。

1.2.8 碳酸酐酶活性的测定

电极法^[29]测定总 CA 活性:先称取 0.1 g FW 的藻体,于 5 mL 无碳海水中研磨成粉状,加入 1 mL CO_2 饱和水,记录混合溶液的 pH 值下降 0.6 个单位的时间,整个过程在 4°C 条件下进行。胞外 CA 活性的测定,所用藻体不需研磨,用活体海藻作为材料,方法同总 CA 活性测定。酶的相对活性(Relative enzyme activity, REA)通过以下公式计算:

$$\text{REA} = 10 \times (T_b / T_c - 1).$$

这里, T_b 和 T_c 分别代表不加藻样和加入藻样后 pH 值下降 0.6 个单位所用的时间。

1.2.9 数据处理和统计分析

所有的测定结果表示为平均值 \pm 标准差 ($n \geq 3$), 用单因素方差分析 (One way ANOVA, Tukey) 进行统计差异性分析, 以 $P = 0.05$ 作为差异的显著性水平。

2 结果与分析

2.1 硝氮的吸收利用

由图 4 和表 1 可知, UVR 暴露刺激了龙须菜对硝氮的吸收, 无论是低氮还是高氮培养下的藻体, UVR 都使得其对硝氮的最大吸收速率和半饱和常数显著升高 ($P < 0.05$), 这说明经过较长时间的 UVR 适应, 海藻对硝氮的吸收能力升高, 但亲和力却下降。 V_{max}/K_s 值在不同处理之间没有显著性差异 ($P > 0.05$), 说明藻体在较低硝氮浓度下对其利用效率没有受到 UVR 的显著影响。海藻的最大吸

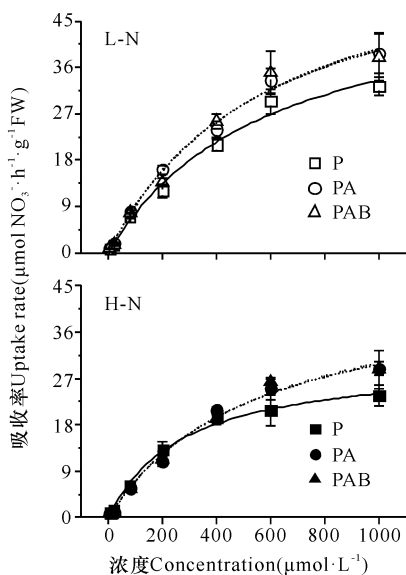


图 4 硝氮吸收动力学曲线

Fig. 4 Dynamic curves of nitrate absorption rate

表 1 硝氮吸收动力学曲线参数表

Table 1 Dynamic parameters of nitrate uptake

培养条件 Culture conditions		最大吸收速率 V_{max} ($\mu\text{mol NO}_3^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$)	半饱和常数 K_s ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	V_{max}/K_s 比值 ($\mu\text{mol NO}_3^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$) / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
L-N	P	49.43 \pm 1.19 ^a	465.17 \pm 52.44 ^a	0.11 \pm 0.02 ^a
	PA	68.09 \pm 6.52 ^b	741.59 \pm 12.59 ^b	0.09 \pm 0.01 ^a
	PAB	66.72 \pm 1.54 ^b	662.00 \pm 28.48 ^b	0.11 \pm 0.02 ^a
H-N	P	31.33 \pm 4.25 ^c	294.08 \pm 10.17 ^c	0.11 \pm 0.03 ^a
	PA	46.20 \pm 8.03 ^a	549.03 \pm 13.96 ^d	0.09 \pm 0.01 ^a
	PAB	47.30 \pm 4.90 ^a	573.65 \pm 10.01 ^d	0.08 \pm 0.01 ^a

注: 同一列不同的小写字母上标表示不同培养条件之间具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

Note: Within each row of the data, different superscript lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

收速率和半饱和常数在 PA 和 PAB 处理之间都没有显著的差异 ($P > 0.05$), 可见 UVR 对二者的影响主要由 UV-A 造成。

此外, 氮的长期加富培养也使得龙须菜对硝氮本身的吸收情况发生变化。相对于低氮条件下培养的藻体, 不论有没有 UVR 暴露, 经过 25 d 的不同氮浓度培养, 生长在高氮浓度下的龙须菜对硝氮的最大吸收速率明显降低 ($P < 0.05$), 这表明藻体对硝氮的潜在吸收能力降低了; 半饱和常数的变化情况与最大吸收速率的趋势相同, 说明高氮条件培养下的藻体对硝氮的亲和力升高了; 而 V_{max}/K_s 比值在不同氮供应水平下没有显著性差异 ($P > 0.05$)。

不同条件下培养的龙须菜, UVR 和氮加富对硝酸还原酶 (NR) 活性的影响与最大氮吸收速率的趋势一致 (图 5): 不管氮的供应水平如何, UVR 都显著提高了藻体的 NR 活性 ($P < 0.05$), 且 PA 和 PAB 处理之间没有显著性差异 ($P > 0.05$); 在不存在 UVR 的情况下, 高氮培养龙须菜的 NR 活性显著低于低氮培养 ($P < 0.05$), 但在 UVR 暴露时未发现这一现象, 高氮和低氮培养之间没有显著性差异 ($P > 0.05$)。

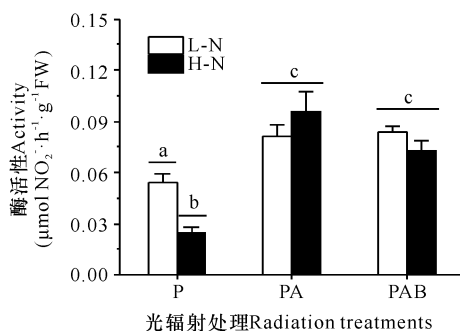


图 5 硝酸还原酶活性

Fig. 5 Activity of nitrate reductase (NR)

不同的小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平具有显著性差异。

Lowercase letters indicate significant differences at $P < 0.05$ among the treatments.

2.2 无机碳的利用

如图6和表2所示,不管氮的浓度水平如何,3种光辐射处理之间的无机碳利用情况都存在着明显的差异($P < 0.05$)。UVR暴露显著降低了最大光合放氧速率 P_{\max} 和半饱和常数 K_{DIC} ,且PAB处理对其降低程度大于PA处理($P < 0.05$)。说明UV-A和UV-B都能够降低海藻对无机碳的利用能力,同时提高对无机碳的亲合力。在低氮条件下, P_{\max}/K_{DIC} 值在3种光辐射处理之间没有显著差异($P > 0.05$);但高氮培养的藻体中,这一比值被UVR暴露提高,且PA和PAB处理之间没有显著差异($P > 0.05$)。

此外,不同的氮浓度培养也会影响龙须菜对无机碳的利用。在没有UVR存在的条件下,高氮培养使得藻体对无机碳利用的最大速率和 P_{\max}/K_{DIC}

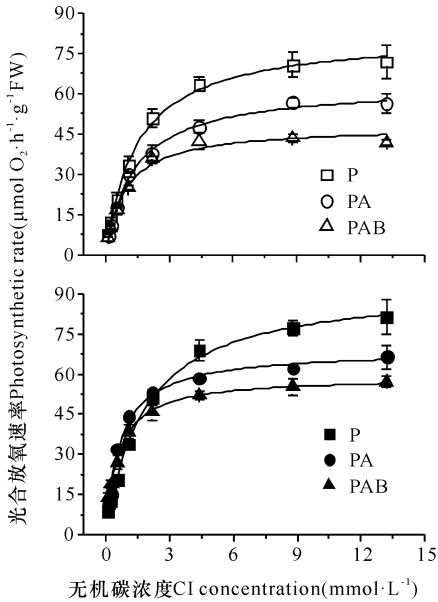


图6 P-C曲线

Fig. 6 P-C curves

表2 P-C曲线参数表

Table 2 Photosynthetic parameters of P-C curves

培养条件 Culture conditions	最大光合放氧速率 P_{\max} ($\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$)	半饱和常数 K_{DIC} ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	P_{\max}/K_{DIC} 比值 ($\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$)/(mmol L ⁻¹)	
L-N	P	82.33 ± 5.55 ^a	1.49 ± 0.02 ^a	55.18 ± 4.58 ^a
	PA	63.11 ± 3.08 ^{bc}	1.35 ± 0.02 ^b	46.94 ± 2.94 ^a
	PAB	47.93 ± 2.92 ^d	0.93 ± 0.13 ^c	52.12 ± 4.30 ^a
H-N	P	93.36 ± 5.76 ^a	1.81 ± 0.02 ^d	51.59 ± 2.64 ^a
	PA	68.84 ± 2.42 ^b	0.70 ± 0.02 ^e	98.17 ± 0.19 ^b
	PAB	58.96 ± 2.15 ^c	0.59 ± 0.06 ^f	100.98 ± 13.85 ^b

注:同一列不同的小写字母上标表示不同培养条件之间具有显著性差异($P < 0.05$)。

Note: Within each row of the data, different superscript lowercase letters or letter combinations indicate significant difference ($P < 0.05$).

值没有显著影响($P > 0.05$),但半饱和常数显著提高($P < 0.05$)。在UVR存在的条件下,高氮培养的藻体对无机碳利用的最大速率高于低氮培养的藻体,且PAB处理的提高程度更加显著;而半饱和常数则被高水平的氮降低;同时, P_{\max}/K_{DIC} 值也被高浓度的氮培养显著提高($P > 0.05$)。这表明,无机碳的利用能力、利用效率和亲和力都被高氮培养提高。

由于大型海藻体内胞外CA活性比较低^[30],本研究用电极法没有测出龙须菜的胞外CA活性。不同氮浓度和光辐射处理对龙须菜总碳酸酐酶(CA)活性的影响如图7所示。高水平的氮供应和UVR的存在都可促进藻体的总CA活性,这与从P-C曲线中得到的不同处理对无机碳亲和力的影响趋势一致。

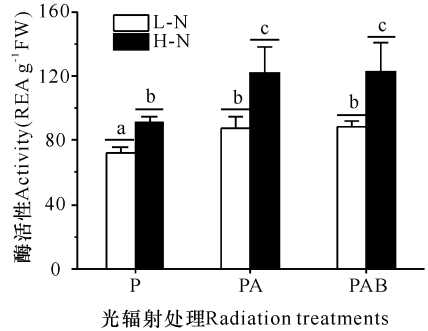


图7 总碳酸酐酶活性

Fig. 7 Relative enzyme activities (REA) of total carbonic anhydrase (CA)

不同的小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平具有显著性差异。

Lowercase letters indicate significant differences at $P < 0.05$ among the treatments.

3 讨论

3.1 硝氮的吸收利用

一般来说, UVR 对大型海藻的生理会产生负面影响, 如损伤 DNA、抑制光合作用、伤害细胞内的某些蛋白和酶等, 为保护自身维持正常的生理活动, 海藻往往会采取一些措施来降低这些损伤。已有的研究表明, 龙须菜在受到 UVR 照射后, 体内的紫外吸收物质(UVACs)含量会显著升高^[22], 呼吸作用速率也会明显加快^[31], 这些生理过程是龙须菜保护自身免受 UVR 损伤的保护机制。但不管是合成 UVACs 还是通过提高呼吸作用来加速修复机制, 都需要氮的参与, 这使得龙须菜藻体对氮的需求增加, 进而通过反馈调节, 提高藻体对硝氮的吸收速率和 NR 活性。

本研究中, 长期的 UVR 暴露培养下的龙须菜, 硝氮的吸收和利用能力显著升高, NR 活性在 PA 处理和 PAB 处理之间不存在显著性差异, 说明 UVR 对 NR 活性的提高主要由 UV-A 起作用, 这与 Viñepla 等^[32]对墨角藻和石莼的研究结果相同。已有报道表明, NR 能够吸收 UVR, 是 UV-A 的光接受器^[33], 并能够吸收利用 UV-A 用于藻类的光合作用和生长^[31, 34], 作为调节碳、氮代谢的重要环境因子^[35], UV-A 也可能是通过提高光合作用和生长来反馈调节藻体对氮的吸收和代谢^[36]。

海藻对硝氮的吸收利用与它本身的营养史密切相关。本研究中发现, 无论 UVR 存在与否, 长期在高氮条件下生长的龙须菜对硝氮的吸收能力都显著降低。这可能是因为高氮条件使得藻体内部不断积累氮, 并形成较大的氮库, 这些氮已经能够满足藻体的生理活动对氮的需求, 因而藻体降低了对氮的吸收。但在 UVR 存在时, 龙须菜的 NR 活性因为高氮培养而降低, 这可能是由于 UVR 导致藻体对氮的大量需求消耗了体内氮, 需要不断从外界补充并参与到代谢中。

3.2 无机碳的利用

UVR 暴露一般会使藻类的光合无机碳利用受到抑制, 这方面的研究已经有很多报道^[22]。这可能与光系统 II (Photosystem II, PS II) 中 D1 蛋白的受损^[37]或光合固碳关键酶 Rubisco 的损伤^[38]密切相关。本研究中 UVR 的存在降低了龙须菜对无机碳利用的最大能力, 提高了对外部无机碳的亲合力, 并且 UV-A 和 UV-B 两种紫外辐射都在中间起了作用; 此外还发现龙须菜 CO₂ 浓缩机制(CCMs)中重

要的酶——碳酸酐酶(CA)的活性被 UVR 暴露所提高, 类似的研究结果已经在很多微藻和大型海藻中被报道^[22, 39]。细胞的 CA 活性与细胞膜的还原活性密切相关^[40], 在微藻的研究中发现, 低强度的 UVR 同时提高了细胞膜的还原性和 CA 酶活性^[39]。本研究中 CA 活性与藻体对无机碳的亲合力都被 UVR 所提高, 表现了相同的趋势, 但是最大的光合固碳速率却被 UVR 降低, 这似乎看起来很矛盾。Beardall 等^[12]在微藻中也发现 UV-B 降低光合固碳, 却提高藻体内的无机碳库。原因可能是 CA 酶活性的增加使得进入藻体细胞的无机碳增多, 有利于海藻减轻和抵制 UVR 引起的光合抑制, 而这种作用在碳限制的条件下更加明显。

4 结论

本文通过对大型经济红藻龙须菜的研究发现, UVR 暴露提高其对氮的利用, 同时抑制其光合固碳作用, 但在氮源供应充足的情况下, UVR 却使得龙须菜对无机碳的利用效率显著升高。这些结果验证了 UVR 对大型海藻的光合抑制, 同时也揭示了可利用氮在海藻面对 UVR 胁迫中的调节作用, 为客观评价近海富营养化背景下阳光紫外辐射增强对大型海藻的可能生理影响提供一定的理论参考。

参考文献:

- [1] Gao K, Mckinley K R. Use of macroalgae for marine biomass production and CO₂ remediation: A review [J]. *Journal of Applied Phycology*, 1994, 6: 45-60.
- [2] McKenzie R L, Aucamp P J, Bais A F, et al. Changes in biologically-active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface [J]. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2007, 6: 218-231.
- [3] Crawford N M. Nitrate: Nutrient and signal for plant growth [J]. *Plant Cell*, 1995, 7: 859-868.
- [4] Lobban C S, Harrison P J. *Seaweed Ecology and Physiology* [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1994: 175.
- [5] 暨卫东. 厦门马銮湾有机污染、富营养化状况下的生化关系 [J]. *海洋学报*, 1998, 20(1): 134-143.
Ji W D. Relationship of biogeochemistry from organic pollution and eutrophication in the Maluan Bay of Xiamen [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 1998, 20(1): 134-143.
- [6] Fei X G. Solving the costal eutrophication problem by large scale seaweed cultivation [J]. *Hydrobiologia*, 2004, 512: 145-151.

- [7] Zou D, Xia J, Yang Y. Photosynthetic use of exogenous inorganic carbon in the agarophyte *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta) [J]. *Aquaculture*, 2004, 237:421-431.
- [8] Gao K, Xu J. Effects of solar UV radiation on diurnal photosynthetic performance and growth of *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta) [J]. *European Journal of Phycology*, 2008, 43:297-307.
- [9] Zheng Y, Gao K. Impacts of solar UV radiation on the photosynthesis, growth and UV-absorbing compounds in *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta) grown at different nitrate concentrations [J]. *Journal of Phycology*, 2009, 45:314-323.
- [10] Xu Z, Gao K. NH_4^+ enrichment and UV radiation interact to affect the photosynthesis and nitrogen uptake of *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta) [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2012, 64(1):99-105.
- [11] Roleda M Y, Hanelt D, Wiencke C. Growth and DNA damage in young *Laminaria* sporophytes exposed to ultraviolet radiation; Implication for depth zonation of kelps on Helgoland (North Sea) [J]. *Marine Biology*, 2006, 148:1201-1211.
- [12] Pang S, Gomez I, Lüning K. The red macroalga *Delesseria sanguinea* as a UVB-sensitive model organism; Selective growth reduction by UVB in outdoor experiments and rapid recording of growth rate during and after UV pulses [J]. *European Journal of Phycology*, 2001, 36:207-216.
- [13] Zacher K, Roleda M Y, Hanelt D, et al. UV effects on photosynthesis and DNA in propagules of three Antarctic seaweeds (*Adenocystis utricularis*, *Monostroma hariotii* and *Porphyra endiviifolium*) [J]. *Planta*, 2007, 225:1505-1516.
- [14] Gröniger A, Häder D P. Effect of radiation on marine macroalgae [J]. *Trends in Photochemistry and Photobiology*, 2001, 8:129-136.
- [15] 徐永健, 钱鲁闽, 王永胜. 氮素营养对龙须菜生长及色素组成的影响 [J]. *台湾海峡*, 2006, 25(2):222-228. Xu Y J, Qian L M, Wang Y S. Effects of nitrogen nutrients on growth rate and pigment compositions of *Gracilaria lemaneiformis* [J]. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 2006, 25(2):222-228.
- [16] Beardall J, Giordano M. Ecological implications of microalgal and cyanobacterial CO_2 concentrating mechanisms, and their regulation [J]. *Functional Plant Biology*, 2002, 29:335-347.
- [17] Giordano M, Beardall J, Raven J A. CO_2 concentrating mechanisms in algae; Mechanisms, environmental modulation, and evolution [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2005, 56:99-131.
- [18] Andria J R, Vergara J J, Pérez-Lloréns J L. Biochemical responses and photosynthetic performance of *Gracilaria* sp. (Rhodophyta) from Cádiz, Spain, cultured under different inorganic carbon and nitrogen levels [J]. *European Journal of Phycology*, 1999, 34:497-504.
- [19] 徐智广, 李美真, 王志刚, 等. 温度、光强和营养史对羊栖菜无机磷吸收的影响 [J]. *南方水产科学*, 2013, 9(3):8-13. Xu Z G, Li M Z, Wang Z G, et al. Effects of temperature, irradiance level and nutritional history on the uptake of inorganic phosphorus in *Hizikia fusiforme* [J]. *South China Fisheries Science*, 2013, 9(3):8-13.
- [20] Litchman E, Neale P J, Banaszak A T. Increased sensitivity to ultraviolet radiation in nitrogen-limited dinoflagellates: Photoprotection and repair [J]. *Limnology & Oceanography*, 2002, 47:86-94.
- [21] Pakker H, Beekman C A C, Breeman A M. Efficient photoreactivation of UVBR-induced DNA damage in the sublittoral macroalga *Rhodomenia pseudopalmeta* (Rhodophyta) [J]. *European Journal of Phycology*, 2000, 35:109-114.
- [22] Foyer C H, Lelandais M, Kunert K J. Photooxidative stress in plants [J]. *Physiologia Plantarum*, 1994, 92:696-717.
- [23] 徐智广. 2种大型经济海藻对海水中营养盐供应的生理响应 [D]. 汕头: 汕头大学, 2007:55-60. Xu Z G. The Physiological Responses of Two Economic Marine Macroalga Species to Nutrients Supplies in Seawater [D]. Shantou: Shantou University, 2007:55-60.
- [24] Häder D P, Lebert M, Marangoni R, et al. ELDONE-T-European light dosimeter network hardware and software [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 1999, 52:51-58.
- [25] Jones M N. Nitrate reduction by shaking with cadmium, alternative to cadmium columns [J]. *Water Research*, 1984, 18:643-646.
- [26] Lobban C S, Harrison P J, Duncan M J. The Physiological Ecology of Seaweeds [M]. New York: Cambridge University Press, 1985:82-83.
- [27] Corzo A, Niell F X. Determination of nitrate reductase activity in *Ulva rigida* C. Agardh by the *in situ* method [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1991, 146:181-191.
- [28] Von Caemmerer S, Farquhar G D. Some relationships

- between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves[J]. *Planta*, 1981, 153: 376-387.
- [29] Giordano M, Maberly S C. Distribution of carbonic anhydrase in British marine macroalgae[J]. *Oecologia*, 1989, 81: 534-539.
- [30] Johnston A M, Maberly S C, Raven J A. The acquisition of inorganic carbon by four red macroalgae[J]. *Oecologia*, 1992, 92: 317-326.
- [31] Xu Z, Gao K. Impacts of UV radiation on growth and photosynthetic carbon acquisition in *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta) under phosphorus-limited and replete conditions[J]. *Functional Plant Biology*, 2009, 36: 1057-1064.
- [32] Viñepla B, Segovia M, Figueroa F L. Effect of artificial UV radiation on carbon and nitrogen metabolism in the macroalgae *Fucus spiralis* L. and *Ulva olivascens* Dangeard[J]. *Hydrobiologia*, 2006, 560: 31-42.
- [33] Stöhr C, Glogan U, Mötschke M, et al. Evidence for the involvement of plasma membrane-bound nitrate reductase in signal transduction during blue light stimulation of nitrate uptake in *Chlorella saccharophila* [J]. *Planta*, 1995, 197: 613-618.
- [34] Gao K, Xu J. Effects of solar UV radiation on diurnal photosynthetic performance and growth of *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta) [J]. *European Journal of Phycology*, 2008, 43: 297-307.
- [35] Figueroa F L, Viñepla B. Effects of solar UV radiation on photosynthesis and enzyme activities (carbonic anhydrase and nitrate reductase) in marine macroalgae from southern Spain[J]. *Revista Chilena de Historia Natural*, 2001, 74: 237-249.
- [36] Tezuka T, Yamaguchi F, Ando Y. Physiological activation of radish plants by UV-A radiation[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 1994, 24: 33-40.
- [37] Long S P, Humphries S, Falkowski P. Photoinhibition of photosynthesis in nature [J]. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1994, 45: 633-662.
- [38] Wilson M I, Ghosh S, Gehardt K E, et al. *in vivo* photomodification of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase holoenzyme by ultraviolet-B radiation [J]. *Plant Physiology*, 1995, 109: 221-229.
- [39] Wu H, Gao K. Ultraviolet radiation stimulated activity of extracellular carbonic anhydrase in the marine diatom *Skeletonema costatum* [J]. *Functional Plant Biology*, 2009, 36: 137-143.
- [40] Nimer N A, Ling M X, Brownlee C, et al. Inorganic carbon limitation, exofacial carbonic anhydrase activity, and plasma membrane redox activity in marine phytoplankton species [J]. *Journal of Phycology*, 1999, 35: 1200-1205.

(责任编辑: 陆 雁)