

不同无机氮源对微藻 HCO_3^- 同化的影响 ——以蛋白核小球藻为例

孙涛^{1,2}, 吴沿友^{1,*}, 吴沿胜^{1,2}, 方蕾^{1,2}, 周英^{1,2}, 童成英^{1,2}, 张开艳³

(1. 中国科学院地球化学研究所 环境地球化学国家重点实验室, 贵阳 550081;
2. 中国科学院大学 北京 100049; 3. 贵州师范大学 喀斯特研究院, 贵阳 550001)

摘要: 碳循环和氮循环一直是全球变化领域的研究焦点, 水生生物作为水环境物质循环的主要驱动者, 在水生生态系统中发挥着重要的作用。微藻作为水环境中重要的光合作用单元, 其对无机碳的利用机制, 无机碳利用途径的定量方法均有报道, 但其 HCO_3^- 同化对不同比例氮源的响应尚不清楚。因此, 本研究通过实验室特定营养体系培养实验, 模拟重碳酸盐体系, 结合双向同位素标记方法研究了不同无机氮源下蛋白核小球藻(模式藻) HCO_3^- 同化的影响。结果表明: 在氮素营养条件一定(18 mmol/L)的情况下, 不同比例无机氮对蛋白核小球藻的生长有不同的影响, 当硝态氮: 铵态氮为16:2(少量铵态氮)时, 促进了蛋白核小球藻的生长繁殖, 但当铵态氮占比增大时, 则会抑制蛋白核小球藻的生长繁殖; 不同比例的无机氮对蛋白核小球藻 HCO_3^- 同化也具有不同的影响, 随着铵态氮占比的不断增大, 蛋白核小球藻藻体的碳氮比会不断下降且趋于稳定, 同时蛋白核小球藻对添加的 HCO_3^- 的利用份额也不断降低; 微藻在生长繁殖时, 其碳氮营养的同化相互影响, 存在着一种共轭关系。也就是在不同形态氮盐处理时, 微藻对添加的无机碳存在着耦合的利用模式。该研究可为微藻碳氮代谢及喀斯特水体环境变化响应的相关研究提供理论依据。

关键词: 微藻; HCO_3^- 同化; 氮源; 铵态氮

中图分类号: X143 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-9250(2023)01-0125-07 **doi:** 10.14050/j.cnki.1672-9250.2022.50.043

自人类文明进入工业化时代以来, 人类活动的影响, 如化石燃料的燃烧、森林退化, 工业排放等, 导致了大气中的二氧化碳含量急剧增加。不仅导致了温室效应, 也引起了全球碳循环的变化^[1-2]。与此同时, 大量的污染物排入河流、湖泊、水库等地表水体, 不但会改变水体的相关理化特性, 也影响了一些物质的循环过程, 比如氮循环^[2-3]。碳氮循环过程是当前科学界研究的热点问题。而水生生物作为水体物质循环过程的主要载体, 在水生生态系统中有着至关重要的作用。水生光合生物在稳碳、固碳中的作用, 不仅可以指示喀斯特水体碳汇的相关科学研究, 还可以对其他物质(如氮、锌、铁等)的循环过程产生影响^[4-6]。

微藻作为水体环境中重要的光合作用单元, 通常是指一类生活在水体中, 以浮游生活方式为主的

微小植物的总称。一般情况下, 微藻的光合效率都很高, 尽管它们的生物量只占了地球生物圈初级生产者的0.2%, 却为整个地球贡献了50%的初级生产力^[7]。微藻可以利用包括无机氮源和有机氮源的氮素营养。一般情况下, 微藻同化的氮素营养主要以无机氮为主^[8]。20世纪70年代末, 稳定碳同位素便开始应用于土壤碳循环研究, 之后迅速推广。作为一种优秀的研究工具, 稳定同位素技术近年来更是在全球尺度的生态系统物质循环和全球生态变化领域大放异彩^[9-14]。因此, 利用稳定碳同位素技术来研究微藻碳氮同化变得尤为重要。

研究表明, 在短时间尺度上, 由于硅酸盐的风化速率较低, 碳酸盐风化才是陆地水生生态系统的主要风化碳汇, 占岩石风化碳汇的94%。这使得喀斯特地表水生生态系统成为了重要的研究对象^[15]。

收稿日期: 2021-04-06; **改回日期:** 2022-05-21

基金项目: 贵州省科学技术基金资助项目(黔科合基础[2020]1Y172); 国家自然科学基金项目(U1612441); 国家重点研发计划课题(2016YFC0502602)。

第一作者简介: 孙涛(1995-), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为生物地球化学。E-mail: @mail.gyig.ac.cn.

*** 通讯作者:** 吴沿友(1966-), 男, 博士, 研究员, 研究方向为环境地球化学和生物地球化学。E-mail: wuyanyou@mail.gyig.ac.cn.

喀斯特水体中,微藻对其生态特性有着独特的适应机制,对无机碳有着独特的利用策略。溶解无机碳(DIC)浓度越高,水生光合生物量越多,生物生长越快,存在“DIC 施肥效应”^[16]。受 DIC 施肥效应的影响,蓝绿藻等浮游植物生物量的增多可能导致水体向富营养化方向发展^[17-18]。在独特的喀斯特环境下,微藻对无机碳的利用机制、碳源碳汇的调节作用、无机碳利用途径的定量方法均有报道,研究表明微藻利用 HCO_3^- 占所利用的总无机碳的份额随添加浓度变化而变化,总体来看其利用重碳酸盐份额随着添加碳酸氢钠浓度的增大而变大,但过高浓度的碳酸氢钠对其利用重碳酸盐的能力具有抑制作用^[18]。微藻对于 HCO_3^- 的同化会受到无机氮的影响,微藻对不同的无机氮源的响应机制如何? 这个科学问题亟待研究。迄今,微藻 HCO_3^- 的同化对不同比例无机氮源的响应也鲜有报道。因此,本研究通过实验室特定营养体系培养实验,模拟重碳酸盐体系,结合双向同位素标记方法研究了蛋白核小球藻 HCO_3^- 利用对不同比例氮源的响应。该研究可为微藻碳氮共轭代谢及水体环境变化响应的相关研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

藻种:蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*, FACHB-5),藻种为种群数量占绝对优势的较纯藻种,购于中国科学院水生生物研究所的淡水藻种库(Freshwater Algae Culture Collection of the Institute of Hydrobiology, FACHB)。

培养基:BG11 培养基,配比如表 1 所示。其中碳源和氮源根据实验条件改进。表 2 为培养基中 A5 组份的配比和浓度。

表 1 配比 1 L 的 BG11 培养基所需母液的组份、浓度及用量

Table 1 Composition, concentration and dosage of mother solution required for BG11 medium with a ratio of 1 L

编号	组份	母液浓度	用量
1	K_2HPO_4	2 g/500 mL H_2O	10 mL/L
2	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.75 g/500 mL H_2O	10 mL/L
3	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.8 g/500 mL H_2O	10 mL/L
4	Citric acid	0.3 g/500 mL H_2O	10 mL/L
5	柠檬酸铁氨	0.3 g/500 mL H_2O	10 mL/L
6	EDTANa_2	0.05 g/500 mL H_2O	10 mL/L
7	A5		1 mL/L

表 2 A5 的组份配比及浓度

Table 2 Proportion and concentration of A5 components

组份	浓度
H_3BO_3	2.86 g/L H_2O
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.86 g/L H_2O
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.22 g/L H_2O
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.39 g/L H_2O
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.08 g/L H_2O
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.05 g/L H_2O

1.2 实验设计

BG11 培养基中的氮素营养约为 17.7 mmol/L,为了便于实验培养基的配置和实验条件的控制,本研究将培养体系中的氮素营养设置为 18 mmol/L。实验设置 4 种不同比例氮源,即硝态氮:铵态氮摩尔比为 18:0、16:2、9:9 和 2:16。碳源的碳同位素值分别是 -27‰ (A 组)和 $+4\text{‰}$ (B 组),培养体系的碳素营养为 5 mmol/L 的碳酸氢钠。分别双向培养研究不同比例氮源对蛋白核小球藻生长繁殖和无机碳同化的影响,实验均设置 3 次重复。

培养地点在中国科学院地球化学研究所环境地球化学国家重点实验室的无菌培养温室。培养条件:光照强度,150 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$;光暗周期,12 h/12 h;温度,22.0 \pm 1.0 $^\circ\text{C}$ 。调节培养基初始 pH 在 8.00 \pm 0.05。为保持实验的稳定和准确,接种极少量(50 mL 培养基仅接种 1 mL 原藻种液离心浓缩洗涤后的藻种)相同数量藻种,接种后培养基蛋白质浓度均值为 1.9 mg/L,培养 12 天,不断进行继代培养保持微藻旺盛的生长状态。

1.3 分析测定方法

1.3.1 微藻生物量的测定

根据微藻的生长特性,生物量的指标用微藻培养液蛋白质含量和微藻培养液叶绿素 a 的浓度来表征。具体测定方法采用考马斯亮蓝比色法^[19]和热乙醇-紫外分光光度法^[20],测量误差均为系统误差。

1.3.2 稳定碳同位素的测定

微藻有机碳的分离纯化:将培养后的微藻样品分组离心收集,加入适量 1 mol/L 盐酸洗涤以去除无机碳的影响,再用超纯水洗涤微藻 4 次后,用冷冻干燥机充分干燥微藻样品并利用玛瑙研钵将固体粉末样品充分研磨后备测。

固体粉末样品使用气体同位素质谱仪(MAT253)测定其 $\delta^{13}\text{C}$ 值,标准品采用国际标准物质(Pee Dee Belemnite, PDB)。测量误差小于 \pm

0.1‰,其结果表示为:

$$\delta^{13}\text{C}(\text{‰}) = [(R_{\text{样品}}/R_{\text{标准}}) - 1] \times 1000 \quad (1)$$

式中, $R_{\text{样品}}$ 表示样品种的 ^{13}C 和 ^{12}C 的比值; $R_{\text{标准}}$ 表示标准物质中 ^{13}C 和 ^{12}C 的比值。

1.3.2 碳氮含量和碳氮比的测定

对测定碳含量和氮含量的样品分开预处理。碳含量测定:将培养后的微藻样品分组离心收集,加入适量 1 mol/L 盐酸洗涤以去除无机碳的影响,再用超纯水洗涤样品 4 次后,用冷冻干燥机充分干燥并利用玛瑙研钵将微藻固体粉末样品充分研磨后备测。氮含量测定:为了避免盐酸洗涤对微藻有机氮含量产生影响,需用超纯水洗涤微藻 5 次,用冷冻干燥机充分干燥微藻样品并利用玛瑙研钵将微藻固体粉末样品充分研磨后备测。

微藻固体粉末样品使用元素分析仪 (CM-CRDS) 测定样品的碳氮元素含量,仪器误差在 $\pm 2.5\%$ 以内。选用 1 mol/L 盐酸洗涤后的样品测定碳元素含量和未用盐酸洗涤过的样品测定氮元素含量,并计算微藻样品的 C/N 值。

2 结果与讨论

2.1 AB 两组实验生物量表征数据相关性检验

由于两组实验采用相同的无机氮处理,故对两组实验的蛋白质浓度及叶绿素浓度结果用 SPSS19.0 数据分析软件做相关性检验。检验结果如表 3 所示。

结果表明,两组实验组中的结果相关性显著,即不存在显著性差异。故而,下文中的研究结果及讨论内容对 AB 两组实验的相关数据合并处理。

表 3 两组实验相关性检验结果

Table 3 Correlation test results of the two groups of experiments

数据组别	P	R ²
蛋白质浓度/(mg/L)	0.015	0.985
叶绿素 a 浓度/(mg/L)	0.048	0.952

2.2 研究结果

2.2.1 不同无机氮源比例对微藻生长的影响

在氮素营养条件一定的情况下,不同无机氮源比例处理下各组中藻液蛋白质含量和叶绿素含量会随着培养基中无机氮源比例的变化而变化(图 1)。图 1a 中,硝态氮:铵态氮为 18:0 处理组为对照组,表示 18 mmol/L 硝态氮营养下蛋白质浓度表征的生长状况。对照组蛋白质表征的种群数量增值倍数为 40 倍左右。当硝态氮:铵态氮摩尔浓度比为 16:2 时,藻液中蛋白质浓度和对照组相比增加不显著。而当硝态氮:铵态氮摩尔浓度比为 9:9 时,蛋白质浓度与对照组相比显著下降。当培养基铵态氮的浓度增加到 16 mmol/L (硝态氮:铵态氮摩尔浓度比为 2:16) 时,藻液中的蛋白质浓度进一步下降。这说明在氮素营养条件一定的情况下,随着铵态氮氮源占比增大,藻液中蛋白质浓度会下降,蛋白核小球藻增殖的生物量会下降。图 1b 中,硝态氮:铵态氮摩尔浓度比为 18:0 处理组为对照组,表示 18 mmol/L 硝态氮营养下藻液叶绿素 a 浓度表征的生长状况。当硝态氮:铵态氮摩尔浓度比为 16:2 时,藻液中叶绿素 a 浓度与对照组相比显著增加。而当硝态氮:铵态氮摩尔浓度比为 9:9 时,藻液中叶绿素 a 浓度显著减少。当培养基铵态氮的浓度增加到 16

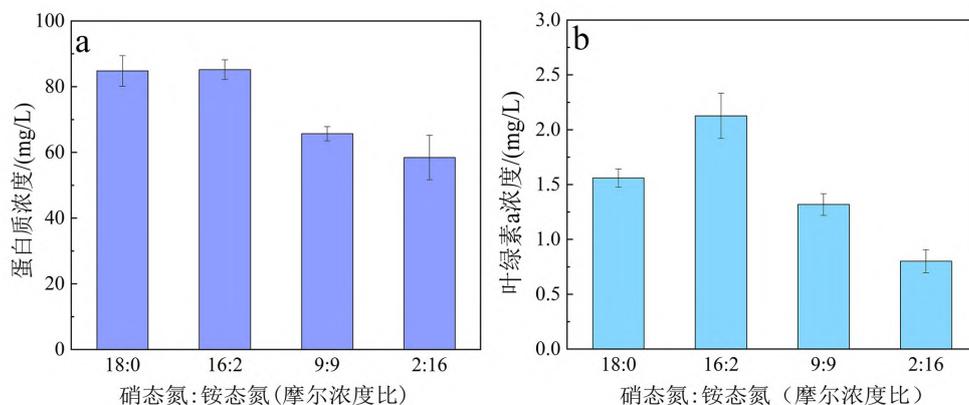


图 1 不同比例氮源对蛋白核小球藻的蛋白质 (a) 和叶绿素 (b) 含量的影响

Fig.1 Protein (a) and chlorophyll (b) contents of *Chlorella proteinosa* with different proportions of nitrogen sources

mmol/L(硝态氮:铵态氮摩尔浓度比为2:16)时,与硝态氮浓度高的实验组相比,藻液中叶绿素a的浓度是显著减少的。

结果表明,在氮素营养条件一定的情况下,蛋白核小球藻种群数量在低于K值时,少量铵态氮的添加会增强藻体中叶绿素a的合成。但当铵态氮占比进一步增大时,会对蛋白核小球藻中叶绿素a合成和种群增长繁殖产生抑制作用。

2.2.2 不同氮源比例对微藻碳含量、氮含量和碳氮比的影响

在氮素营养条件一定的情况下,蛋白核小球藻固体样品的含碳量、含氮量以及碳氮比会随着培养基中无机氮源比例的变化而变化(表4)。结果表明,随着铵态氮氮源占比的不断增大,微藻藻体的碳含量从 $52.30\% \pm 1.57\%$ 增加到 $55.39\% \pm 0.16\%$ 后趋于稳定,微藻藻体的氮含量从 $6.39\% \pm 0.85\%$ 增加到 $9.87\% \pm 0.76\%$ 后趋于稳定。利用微藻藻体的碳含量和氮含量计算出其碳氮比。结果表明,微藻藻体碳氮比显著下降后并趋于稳定。已知原始藻种的碳氮比为8.12,当氮源为硝态氮时,藻体碳氮比为8.75,这表明对照组中碳氮比符合正常生长的预期。当硝态氮:铵态氮的摩尔浓度比为16:2时,藻体碳氮比为7.76,基本符合正常生长的预期。而当硝态氮:铵态氮的摩尔浓度比为9:9和2:16时,即铵态氮占比为50%或50%以上,碳氮比会显著下降。由于含碳量增加的幅度与含氮量增加的幅度不相称,导致了碳氮比的显著下降。

表4 不同比例氮源对蛋白核小球藻含碳量、含氮量和C/N值的影响

Table 4 Effects of different proportions of nitrogen sources on carbon content, nitrogen content and C/N value of *Chlorella proteinosa*

硝态氮:铵态氮 (摩尔浓度比)	碳含量/%	氮含量/%	C/N
18:0	52.30 ± 1.57	6.39 ± 0.85	8.75
16:2	53.39 ± 1.15	7.47 ± 0.82	7.76
9:9	55.39 ± 0.16	9.87 ± 0.76	6.94
2:16	54.68 ± 0.20	9.60 ± 0.91	7.14

2.2.3 不同氮源比例对微藻 HCO_3^- 同化的影响

根据气体质谱同位素方法测定的同位素数据和双向同位素示踪原理模型^[19]估算得到蛋白核小球藻在该实验条件下 HCO_3^- 的利用份额(表5)。

两端元同位素混合模型可以表示为:

$$\delta_{T_i} = (1-f_{B_i})\delta_A + f_{B_i}\delta_{B_i} \quad (i=1,2) \quad (2)$$

表5 各组藻体有机碳同位素值及估算的碳酸氢根利用份额

Table 5 organic carbon isotope values and estimated bicarbonate utilization share of each group of algae

	A组 $\delta^{13}\text{C}/\text{‰}$	B组 $\delta^{13}\text{C}/\text{‰}$	利用份额(f_B)/%
A ₁	-20.92 ± 0.03	B ₁ -11.37 ± 0.26	30.7
A ₂	-19.43 ± 0.23	B ₂ -13.80 ± 0.23	18.1
A ₃	-20.01 ± 0.21	B ₃ -15.90 ± 0.05	13.2
A ₄	-18.80 ± 0.04	B ₄ -16.03 ± 0.12	8.9

在方程(2)中, δ_{T_i} 为微藻藻体的 $\delta^{13}\text{C}$ 值, δ_A 为假定微藻完全利用空气的无机碳源时藻体的 $\delta^{13}\text{C}$ 值, δ_{B_i} 为假定微藻完全利用添加的无机碳源时藻体的 $\delta^{13}\text{C}$ 值, f_{B_i} 为微藻利用添加的无机碳占总碳源的份额。对于添加的两种标记的 HCO_3^- 来说,方程(2)可以分别如下:

$$\delta_{T_1} = (1-f_{B_1})\delta_A + f_{B_1}\delta_{B_1} \quad (3)$$

$$\delta_{T_1} = (1-f_{B_2})\delta_A + f_{B_2}\delta_{B_2} \quad (4)$$

在方程(3)和(4)中, δ_{T_1} 和 δ_{T_2} 分别为添加第一种或第二种已知 $\delta^{13}\text{C}$ 的 HCO_3^- 培养的微藻藻体的 $\delta^{13}\text{C}$ 值, δ_A 为假定微藻完全利用空气的无机碳源时藻体的 $\delta^{13}\text{C}$ 值, δ_{B_1} 和 δ_{B_2} 分别为假定微藻完全利用添加的第一种或第二种 HCO_3^- 时藻体的 $\delta^{13}\text{C}$ 值, f_{B_1} 和 f_{B_2} 分别为微藻利用添加的第一种或第二种 HCO_3^- 占总碳源的份额。

在联立以上两个方式求解的过程中,不论添加哪种标记的碳酸氢根,只要在同一 HCO_3^- 浓度等培养条件下,同一种微藻利用添加的 HCO_3^- 所占总碳源的份额是相同的,其生长参数也是没有显著性差异的,由此可以得到: $f_{B_1} = f_{B_2} = f_B$ 。由方程(3)和方程(4)得到:

$$f_B = (\delta_{T_1} - \delta_{T_2}) / (\delta_{B_1} - \delta_{B_2}) \quad (5)$$

公式(5)中 $(\delta_{B_1} - \delta_{B_2})$ 可以换算成添加的同位素标记1和2 $\delta^{13}\text{C}$ 的差,进一步简化方程为:

$$f_B = (\delta_{T_1} - \delta_{T_2}) / (\delta_{C_1} - \delta_{C_2}) \quad (6)$$

根据方程(6)和添加的两种 HCO_3^- 的 $\delta^{13}\text{C}$ 值和其对应的处理组的微藻藻体的 $\delta^{13}\text{C}$ 值估算出微藻利用添加的 HCO_3^- 占总碳源的份额 f_B 。

结果表明(表5),随着铵态氮氮源占比的不断增大,A组中微藻藻体的 $\delta^{13}\text{C}$ 从 $-20.92\text{‰} \pm 0.03\text{‰}$ 增加到 $-18.80\text{‰} \pm 0.04\text{‰}$,B组中微藻藻体的 $\delta^{13}\text{C}$ 从 $-11.37\text{‰} \pm 0.26\text{‰}$ 减少到 $-16.03\text{‰} \pm 0.12\text{‰}$ 。不同无机氮处理条件对微藻藻体的 $\delta^{13}\text{C}$ 影响显著。表中 f_B 表示估算的 HCO_3^- 利用份额。对照组中(当氮源均为硝态氮时), HCO_3^- 利用份额约为30.7%。

当硝态氮:铵态氮的摩尔浓度比为16:2时, HCO_3^- 利用份额约为 18.1%。当硝态氮:铵态氮的摩尔浓度比为9:9时, HCO_3^- 利用份额约为 13.2%。当铵态氮的占比增加到 16 mmol/L(硝态氮:铵态氮的摩尔浓度比=2:16)时, HCO_3^- 利用份额仅有 8.9%。结果表明,随着铵态氮氮源占比的不断增加, HCO_3^- 的利用份额呈显著下降趋势。

2.3 讨论

根据以往的研究工作,不同浓度的无机氮营养下,微藻(蛋白核小球藻)的生长状况表现出随着添加无机氮浓度的增加,其生物量会有较显著的增加,但是以铵态氮作为培养基单一氮源的生长状况表现比起以硝态氮作为培养基单一氮源的生长状况要逊色很多。在低浓度(0.2 mmol/L)时,以蛋白质浓度表征的生长状况相差不大,但是当无机氮浓度超过 2 mmol/L 时,以铵态氮作为培养基单一氮源的蛋白质浓度比硝态氮作为培养基单一氮源的蛋白质浓度减少近一倍^[22]。这说明,把硝态氮作为唯一氮源的实验组作为对照组,若培养基中无机氮源为铵态氮且浓度超过 2.0 mmol/L 时,会抑制微藻生长。

本研究中,在控制氮素营养一定的情况下,藻液中蛋白质浓度和叶绿素 a 浓度会随着实验组中铵态氮源占比的增大而变化。当硝态氮:铵态氮的摩尔浓度比为16:2时,促进了蛋白核小球藻的生长繁殖,而当铵态氮源占比过大时,则会抑制微藻的生长,这与上述的工作具有良好的一致性。结果表明,少量的铵态氮添加,会促进叶绿素 a 的合成。但从蛋白质浓度的变化来看,铵态氮的浓度为 2 mmol/L(硝态氮:铵态氮摩尔浓度比为16:2时)实验组的蛋白质浓度和硝态氮作为唯一氮源的对照组相比,差异不显著,这是因为蛋白质浓度表征了藻液中总体的种群数量,其中包括了死亡藻体分解后积累的藻蛋白质和活体微藻的藻蛋白质。而叶绿素浓度 a 则表征了藻液中活体微藻的种群数量。当铵态氮源占比过大时,会抑制微藻的生长繁殖,铵态氮源起到了一种“毒害”作用。

众所周知,光是光合自养生物正常生长所必需的条件之一。但是在光照强度过高的条件下,植物的光合系统会受到光损伤,其中以 PSII 的损伤响应最为灵敏。PSII 在藻类囊体膜上以二聚体的形式存在,每个 PSII 单体都由反应中心蛋白(由 D1、D2 蛋白组成)、放氧复合体(Oxygen evolution

complex, OEX)、以及捕光色素复合体组成^[23]。有研究表明在铵处理条件下,PSII 的活性也会有所下降,造成 PSII 的损伤,铵能够加速 PSII 的光损伤,对 PSII 的修复则不存在抑制作用^[24]。本研究中,这种“铵毒害”作用,可能是铵处理使 PSII 的活性降低,从而影响了其生长繁殖。在本研究的营养体系中,由于铵态氮占比的变化,可能形成了不同的缓冲体系。在铵源占比较小的体系中,藻体同化无机碳时,其中 HCO_3^- 也是重要的碳源,从而在对照组和 A₂、B₂ 实验组中估算的 HCO_3^- 利用份额相对较高。而在 A₃、B₃ 和 A₄、B₄ 实验组中,同化无机碳时会更多的选择非添加的无机碳源(通过气液两相扩散作用进入营养体系的无机碳)。而在缓冲体系下,由于 CO₂ 受到了相对较大的扩散阻力,其扩散进入营养体系的无机碳含量并不高。各组碳氮比显著下降且趋于稳定,其本质的原因是培养体系中的不同无机氮处理影响了蛋白核小球藻的无机碳同化。这在一定程度上表明了本研究蛋白核小球藻种群的生长繁殖受到了限制。在这种营养体系下,由于“铵毒害”的作用,微藻 PSII 的活性下降,微藻选择了非添加的无机碳来同化。虽然营养体系是富碳源的,而微藻的生长繁殖却可能受到了碳限制。相反,硝态氮的利用则会促进蛋白核小球藻对 HCO_3^- 的同化。这一方面可能与硝酸盐能够为无机碳的同化提供电子有关^[25],另一方面可能与硝酸盐还原促进叶绿素的合成有关。整体而言,微藻的碳氮同化过程具有复杂的共轭效应,即硝态氮的利用则会促进蛋白核小球藻对 HCO_3^- 的同化,氨态氮处理则相反。

本研究中,使用了叶绿素 a 和蛋白质含量指示生物量。实际上,在整个培养体系中,叶绿素 a 所指示的生物量反映的是取样时鲜活微藻的生物量。但是微藻在繁殖迭代的过程中,不可避免的会存在微藻个体的死亡消逝。而在微藻死亡分解后,蛋白质则依旧存在于培养体系中。所以,本研究中用蛋白质和叶绿素 a 含量指示的生物量不完全相同。当研究者在研究微藻长时间尺度的种群科学问题时,选用蛋白质含量来指示生物量较为合适。当研究者在研究微藻毒性逆境时的类似科学问题时,选用叶绿素 a 含量来指示生物量较为合适。在科学实验中,建议选用两种方式来指示生物量,可在研究中相互补充和印证。

3 结论

在氮素营养一定的条件下,不同比例氮源的营养条件会对蛋白核小球藻的生长繁殖产生明显不同的影响。少量的铵态氮会促进蛋白核小球藻的生长繁殖,当铵态氮比例超过50%时,会对蛋白核小球藻的生长繁殖产生明显的抑制作用。

不同比例的氮源对蛋白核小球藻 HCO_3^- 同化也会产生影响。随着铵态氮氮源占比不断增大,蛋白核小球藻对添加的 HCO_3^- 同化不断降低,蛋白核小球藻的碳氮比不断下降且趋于稳定。这表明蛋白核小球藻在生长繁殖时,其碳氮营养的同化相互影响,存在着复杂的共轭效应。

参 考 文 献

- [1] Hudson R J M, Gherini S A, Goldstein R A. Modeling the global carbon cycle Nitrogen fertilization of the terrestrial biosphere and the “missing” CO_2 sink [J]. *Global Biogeochemical Cycles*, 1994, 8:307-333.
- [2] IPCC. Climate change 2007: Synthesis report. Intergovernmental panel on climate change fourth assessment report [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 44-45.
- [3] 鲍颖. 全球碳循环过程的数值模拟与分析 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.
- [4] Poulter B, Frank D, Ciais P, et al. Contribution of semi-arid ecosystems to interannual variability of the global carbon cycle [J]. *Nature*, 2014, 509(7502): 600-603.
- [5] Morel F M M, Reinfelder J R, Roberts S B, et al. Zinc and carbon co-limitation of marine phytoplankton [J]. *Nature*, 1994, 369: 740-742.
- [6] Falkowski P G. Evolution of the nitrogen cycle and its influence on the biological sequestration of CO_2 in the ocean [J]. *Nature*, 1997, 387(6630): 272-275.
- [7] Behrenfeld M J, Randerson J T, McClain C R, et al. Biospheric primary production during an ENSO transition [J]. *Science*, 2001, 291(5513): 2594-2597.
- [8] Li X, Hu H Y, Gan K, et al. Growth and nutrient removal properties of a freshwater microalgae *Scenedesmus* under different kinds of nitrogen sources [J]. *Ecological Engineering*, 2010, 36(4): 379-381.
- [9] Acton P, Fox J, Campbell E. Carbon isotopes for estimating soil decomposition and physical mixing in well-drained forest soils [J]. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 2013, 118:(1) 532-545.
- [10] Yang Y H, Ji C J, Chen L Y. Edaphic rather than climatic controls over ^{13}C enrichment between soil and vegetation in alpine grasslands on the Tibetan Plateau [J]. *Functional Ecology*, 2015, 29: 839-848.
- [11] Harrison K A, Bol R, Bardgett R D. Do plant species with different growth strategies vary in their ability compete with soil microbes for chemical forms of nitrogen [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2008, 40: 228-237.
- [12] Zhou Y C, Fan J W, Zhong H P, et al. Relationships between altitudinal gradient and plant carbon isotope composition of grassland communities on the Qinghai-Tibet Plateau [J]. *Science China: Earth Sciences*, 2013, 43(1): 120-130.
- [13] Marshall J D, Zhang J W. Carbon isotope discrimination and water-use efficiency in native plants of the North-Central Rockies [J]. *Ecology*, 1994, 75(7): 1887-1895.
- [14] Li H T, Wu Y Y, Zhao L H. Effects of carbon anhydrase on utilization of bicarbonate in microalgae: A case study in Lake Hongfeng [J]. *Acta Geochimica*, 2018, 7(4): 519-525.
- [15] Liu Z H, Dreybrodt W, Wang H J. A new direction in effective accounting for the atmospheric CO_2 budget: Considering the combined action of carbonate dissolution, the global water cycle and photosynthetic uptake of DIC by aquatic organisms [J]. *Earth-Science Review*, 2010, 99: 162-172.
- [16] Zeng S, Liu H, Liu Z, et al. Seasonal and diurnal variations in DIC, NO_3^- and TOC concentrations in spring-pond ecosystems under different land-uses at the Shawan Karst Test Site, SW China: Carbon limitation of aquatic photosynthesis [J]. *Journal of Hydrology*, 2019, 574: 811-821.
- [17] Van Dam B R, Tobias C, Holbach A, et al. CO_2 limited conditions favor cyanobacteria in a hypereutrophic lake: An empirical and theoretical stable isotope study [J]. *Limnology and Oceanography*, 2018, 63(4): 1643-1659.
- [18] 吴沿友, 李海涛, 谢腾祥, 等. 微藻碳酸酐酶生物地球化学作用 [M]. 北京: 科学出版社, 2015: 228-231.
- [19] 郭颖娜, 孙卫. 蛋白质含量测定方法的比较 [J]. *煤炭与化工*, 2008, 31(4): 36-37.
- [20] Chen S C, Chen M D, Wang Z. Toxicological effects of *chlorpyrifos* on growth, enzyme activity and chlorophyll a synthesis of freshwater microalgae [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2016, 45: 179-186.
- [21] 李海涛, 吴沿友, 赵丽华, 等. 双同位素示踪定量微藻对碳源利用份额的方法研究 [J]. *中国岩溶*, 2016, 35(6): 614-618.
- [22] 李海涛, 吴沿友. 微藻无机氮利用过程中的稳定氮同位素分馏 [J]. *地球与环境*, 2019, 47(6): 839-843.
- [23] Guskov A, Kern J, Gabdulkhakov A, et al. Cyanobacterial photosystem II at 2.9-angstrom resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride [J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2009, 16: 334-342.

- [24] Zouni A, Witt H T, Kern J, et al. Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 angstrom resolution [J]. *Nature*, 2001, 409:739-743.
- [25] Lu Y, Wu Y Y, Zhang K Y. Does bicarbonate affect the nitrate utilization and photosynthesis of *Orychophragmus violaceus*? [J]. *Acta Geochimica*, 2018, 37: 875-885.

Effects of Nitrogen Sources of Different Proportions on HCO_3^- Assimilation in Microalgae

SUN Tao^{1,2}, WU Yanyou¹, WU Yansheng^{1,2}, FANG Lei^{1,2}, ZHOU Ying^{1,2},
TONG Chengying^{1,2}, ZHANG Kaiyan³

(1. State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry,
Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550081, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3. School of Karst Science, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China)

Abstract: Carbon and nitrogen cycles have always been the focus of research in the field of global change. Aquatic organisms, as the main drivers of the material cycle in the water environment, play an important role in aquatic ecosystems. Microalgae are important photosynthetic units in the aquatic environment. The utilization mechanism of inorganic carbon and quantitative methods of inorganic carbon utilization pathway have been reported, but the response of HCO_3^- assimilation to different proportions of nitrogen sources is still unclear. Therefore, in this study, the response of HCO_3^- assimilation of *Chlorella proteinosa* to nitrogen sources in different proportions were investigated through culture experiments in the laboratory, combined with bidirectional isotope labeling method and stable carbon isotope technique. The results showed that: under the condition of certain nitrogen nutrition, different proportions of nitrogen sources had significant effects on the growth and reproduction of *Chlorella proteinosa*. When the nitrogen supply (in form of nitrate and ammonia) was constant at 18 mmol/L, a small proportion of ammonia produced the highest growth of *Chlorella proteinosa*, but when the ratio of ammonia nitrogen increased, the growth and reproduction of *Chlorella proteinosa* would be inhibited. However, a higher proportion of ammonia will inhibit the growth of *Chlorella proteinosa*. Different ratios of nitrogen sources also have significant effects on HCO_3^- assimilation of *Chlorella proteinosa*. With the increase of the proportion of ammonia nitrogen, the C/N ratio of *Chlorella proteinosa* decreased at first and then tended to be stable. Meanwhile, the utilizing share of HCO_3^- also decreased continuously. During the growth and reproduction of microalgae, the assimilation of carbon and nitrogen nutrients influenced each other with a complex conjugate relationship. This study can provide a theoretical basis for the study of carbon and nitrogen metabolism of microalgae in response to karst water environment changes.

Key words: microalgae; HCO_3^- assimilation; nitrogen source; ammonia nitrogen