

# 海洋硅藻三角褐指藻生长及光合作用对阳光 UV 辐射的响应\*

吴红艳<sup>1\*\*</sup> 吴海燕<sup>1</sup> 赵杰<sup>2</sup>

1. 汕头大学海洋生物研究所, 汕头 515063; 2. 汕头大学理学院生物系, 汕头 515063

**摘要** 以海洋硅藻三角褐指藻为研究对象, 将其置于全波段阳光辐射(PAB, 280—700 nm)、阳光辐射滤除 UV-B(PA, 320—700 nm)以及光合有效辐射 PAR(P, 400—700 nm)3种辐射处理下进行培养, 以探讨阳光 UVR 对其生长及光合作用的影响. 研究发现, 在低 PAR 条件下(日辐射剂量小于 1.34 MJ/m<sup>2</sup> 时), UVR 的存在对三角褐指藻的生长表现促进作用; 而随着辐射剂量的增加, UVR 对生长的抑制效应突显. 在 73.6 W/m<sup>2</sup> UV-A 及 2.24 W/m<sup>2</sup> UV-B 辐射水平下, 三角褐指藻 PSII 的有效光化学效率下降为 P 处理下的 24%, 碳酸酐酶活性被完全抑制, 其光合固碳速率被抑制 84%, 表明高辐射水平下 UVR 显著抑制三角褐指藻的光合作用, 从而导致生长速率降低.

**关键词** 三角褐指藻 阳光 UV 辐射 生长 光合固碳

人类活动大量释放氟氯烃(CFCs)等大气污染物使得臭氧层不断损耗, 从而导致到达地面的阳光 UV-B(280—320 nm)辐射增强<sup>[1,2]</sup>. 增强的 UV 辐射会对水生生态系统产生各种潜在的危害. 浮游植物作为水域初级生产力的主要组成部分, 不可避免地受到 UV 辐射的影响. 研究显示, 增强的 UV-B 辐射会影响浮游植物的细胞形态、色素含量、光合作用以及生长速率, 并损伤其细胞蛋白质及 DNA<sup>[3—5]</sup>. 尽管对于 UV 辐射与浮游植物关系的研究在国内外都已逐步展开, 但 UV 辐射对海洋硅藻类影响的研究还相对较少. 在近海海域, 海洋硅藻占浮游植物数量和种类的 90% 以上, 其光合产量达到海洋初级生产力的 40%<sup>[6,7]</sup>, 因此, 研究阳光 UV 辐射与海洋硅藻的关系具有重要的生态意义.

三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)是一种广温广盐性浮游硅藻, 也是一种重要的饵料藻, 被广泛应用于藻类生理、生态学研究. 目前, 国内

外对三角褐指藻的研究多集中在其无机碳吸收机制<sup>[8,9]</sup>以及有机毒物、氮源和碳源等对其生长影响等方面<sup>[10,11]</sup>, 而有关 UV 辐射对三角褐指藻影响方面的报道却相对较少. 少数利用 UV-B 灯(312 nm)进行的研究指出, UV-B 辐射可抑制三角褐指藻的生长, 损伤 DNA, 导致细胞体积变大<sup>[12,13]</sup>. 尽管这些研究成果使我们对 UV-B 辐射与三角褐指藻的关系有了初步的认识, 但 UV 辐射如何影响三角褐指藻的光合作用及其他生理生化过程还尚未可知.

因此, 本研究利用自然阳光 UV-B(280—320 nm)辐射, 及其同 UV-A(320—400 nm)或可见光 PAR(400—700 nm)的协同作用来探讨阳光 UV 辐射对三角褐指藻生长、有效光化学效率及光合固碳作用的影响, 以进一步了解阳光 UV 辐射的生物学效应, 同时也为阐明海洋浮游植物初级生产力对阳光 UV 辐射的响应提供一定的信息基础.

2008-12-22 收稿, 2009-01-16 收修稿

\* 国家自然科学基金(批准号: 30800128)和国家重点基础研究发展计划(批准号: 2009CB421207)资助项目

\*\* E-mail: wuhy@stu.edu.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 藻种及其培养条件

三角褐指藻(*Phaeodactylum tricorneratum*)取自厦门大学生命科学院硅藻实验室。藻细胞采用f/2加富培养基充空气培养(0.35 L/min),光照强度为 $160 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,光暗周期为12 h:12 h,温度( $20 \pm 1$ ) $^{\circ}\text{C}$ 。

### 1.2 UV辐射处理

将对数生长期的三角褐指藻细胞收集、洗涤,接种于新鲜的f/2培养基中,使细胞浓度约为 $1 \times 10^6$  cells/mL。然后,将细胞培养液分装于可透紫外线的石英试管中,流水控温在 $\sim 20^{\circ}\text{C}$ ,使其接受UV辐射。

3种辐射处理如下:(1)PAB处理 石英管包裹 Ultraphan 295(UV Opak, Munich, Germany)滤膜,得到全波长辐射,即 PAR + UV-A + UV-B(280–700 nm);(2)PA处理 石英管用 Folex 320(Montagefolie, Nr 110155099, Folex, Dreieich, Germany)滤膜包裹,切断UV-B而得到 PAR + UV-A(320–700 nm);(3)P处理 石英管用 Ultraphan 395(UV Opak, Digepra, Munich, Germany)包裹,切断紫外线得到光合有效辐射 PAR(400–700 nm)。每种辐射处理设置三个平行。

本实验利用室外自然阳光辐射或在太阳模拟器(Sol 1200, Dr Hönle GmbH, Germany)下进行研究,UV-B(280–320 nm)、UV-A(320–400 nm)及PAR(400–700 nm)辐射水平采用一种宽带辐射计(ELDOENT, Real Time Computers Inc., Germany)测定。

细胞在太阳模拟器下接受的辐射水平设定为 PAR  $320 \text{ W}/\text{m}^2$ , UV-A  $73.6 \text{ W}/\text{m}^2$ , UV-B  $2.24 \text{ W}/\text{m}^2$ ,辐射处理时间为1 h。

### 1.3 生长速率的测定

将三角褐指藻在P, PA, PAB三种辐射处理条件下进行半连续培养,其相对生长速率( $\mu$ )由公式 $\mu = (\ln x_2 - \ln x_1) / (t_2 - t_1)$ 计算得到,其中 $x_1$ 和 $x_2$ 分别代表培养时间为 $t_1$ 和 $t_2$ 时单位体积藻液中的细胞数目。细胞数目在显微镜下用血球计数板计数得到。

### 1.4 叶绿素荧光的测定

叶绿素荧光参数利用可调制式荧光仪 PAM(PAM-WATER-ED, Walz, Germany)进行测定。光系统II的有效光量子产量( $\Phi_{\text{PSII}}$ )通过测定光适应细胞的即时最大荧光( $F'_m$ )和稳定态的荧光( $F_t$ ),并根据 Weis 等<sup>[11]</sup>和 Genty 等<sup>[15]</sup>的公式计算如下:

$$\Phi_{\text{PSII}} = (F'_m - F_t) / F'_m$$

### 1.5 光合固碳速率的测定

采用 $^{14}\text{C}$ 示踪法测定光合固碳量。样品中加入 $2.5 \mu\text{Ci}$ 的 $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (ICN Radiochemicals)。培养1 h后,样品用 Whatman GF/F 玻璃纤维滤膜过滤,置于HCl烟雾中驱除无机碳,最后干燥并置于闪烁杯中,加入闪烁液,用液体闪烁计数器(Beckman, USA)测定放射量(计数/min)。

### 1.6 碳酸酐酶活性的测定

碳酸酐酶活性测定参考 Wilbur 等<sup>[16]</sup>的方法。将细胞离心( $6500 g$ ,  $5 \text{ min}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ )收集、洗提,悬浮在 $20 \text{ mmol/L}$ 的巴比妥缓冲海水中(pH 8.2)。将藻液放入 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻1 h,取出自然解冻至冰水混合,用超声波细胞破碎仪(CPX 600)破碎藻体细胞60 s(冰浴,3 s破碎3 s间隙)。测定装置应用氧电极的反应槽,反应槽周围水浴温度为 $4^{\circ}\text{C}$ (用超级恒温水箱控制)。1 mL的藻样匀浆加入到4 mL的巴比妥缓冲液中搅拌,再加入2 mL饱和 $\text{CO}_2$ 冰水,记录反应从pH 8.10降到7.70所需的时间( $T$ ),对照为不加藻样的时间进程( $T_0$ )。pH值用pH计(420 A, Orion)测定。酶的活性单位用公式 $EU = 10 \times (T_0/T - 1)$ 来计算。

### 1.7 叶绿素a的测定

取5 mL藻液抽滤并用无水甲醇提取( $>12 \text{ h}$ ),离心( $3500 g$ ,  $10 \text{ min}$ ),取上清液,用紫外分光光度计(UV-2501-PC, Shimadzu, Kyoto, Japan)测定其吸收光谱,叶绿素a浓度根据 Porra<sup>[17]</sup>的计算公式得到。

### 1.8 数据统计与分析

对数据结果进行成组数据的 $t$ -检验,以 $P < 0.05$ 为差异的显著水平。

## 2 结果

### 2.1 阳光 UV 辐射与生长的关系

从2008年3月26日到4月30日,我们对三角褐指藻在不同辐射处理下的生长情况进行了监测.在此实验期间,大部分为阴天或多云天气,日辐射量变化如图1(a),最高日辐射量为 PAR  $6.06 \text{ MJ/m}^2$ , UV-A  $1.00 \text{ MJ/m}^2$ , UV-B  $0.03 \text{ MJ/m}^2$ ,而在夏季晴朗的天气当地日辐射量可达到 PAR  $11.6 \text{ MJ/m}^2$ , UV-A  $1.97 \text{ MJ/m}^2$ , UV-B  $0.06 \text{ MJ/m}^2$ .由此可见,实验期间的阳光辐射强度较低,最高的 UVR 日辐射剂量约仅为夏天晴朗天气时的 50.7%.

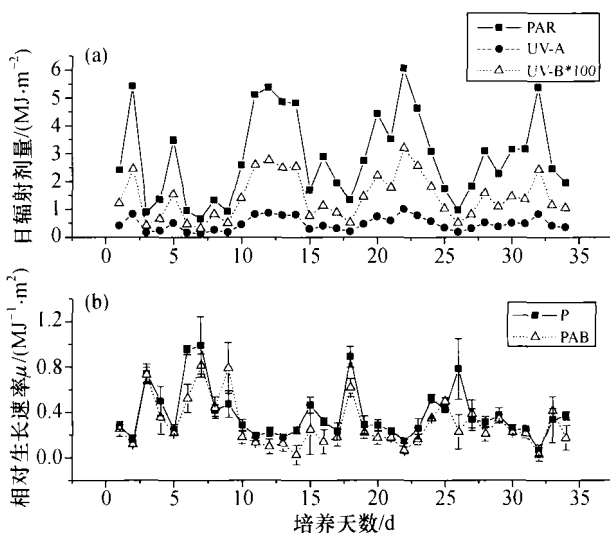


图1 实验期间三角褐指藻所接受的日辐射量及其生长情况  
(a) 三角褐指藻所接受的 PAR、UV-A 和 UV-B 的日辐射剂量;  
(b) 单位辐射剂量上三角褐指藻的相对生长率 ( $n=4$ )

本实验期间,三角褐指藻的相对生长率随日辐射量的变动而变化.无论在有 UVR (PAB 处理)还是无 UVR 存在下 (PAR 处理),单位辐射剂量上藻的相对生长率与藻细胞所接受到的日辐射剂量呈现负相关关系,即日辐射剂量较高时,相对生长效率较低,而日辐射剂量较低时,相对生长率较高(图 1(b), 2).在低 PAR 条件下(日辐射剂量小于  $1.34 \text{ MJ/m}^2$  时),UVR 对三角褐指藻的生长表现促进作用;而随着辐射剂量的增加,UVR 对生长的抑制效应表现明显(图 2).

### 2.2 UV 辐射对有效光化学效率及光合固碳的影响

为研究阳光辐射对三角褐指藻光合作用的抑制

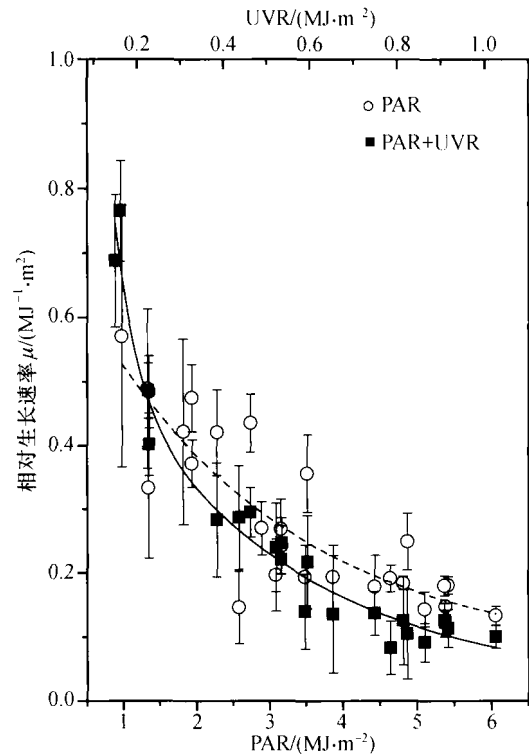


图2 三角褐指藻生长情况与日辐射剂量变化的关系 ( $n=4$ )

效应及机制,我们利用太阳模拟器在辐射水平为  $320 \text{ W/m}^2$  PAR、 $73.6 \text{ W/m}^2$  UV-A 及  $2.24 \text{ W/m}^2$  UV-B 条件下进行了探讨.研究发现,UV 辐射及高 PAR 辐射都显著抑制三角褐指藻光合系统 II 的有效光化学效率 ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ).如图 3 所示,三角褐指藻从低 PAR ( $43.2 \text{ W/m}^2$ ) 转移到高 PAR ( $320 \text{ W/m}^2$ ) 时,  $\Phi_{\text{PSII}}$  下降为 0.4 左右,为低 PAR 条件下的 72.7% ( $p < 0.01$ ).尽管高强度的 PAR 对  $\Phi_{\text{PSII}}$  产生了明显的抑制作用,但 UVR 的存在进一步加剧了这种抑制效应. UV-A 存在时,即 PA 条件下,  $\Phi_{\text{PSII}}$  被抑制了 64.5% ( $p < 0.01$ ),仅为 P 处理下的 35.5%,而 PAB 处理 (UV-B 存在) 则使  $\Phi_{\text{PSII}}$  进一步下降了 11.8% ( $p < 0.01$ ).

三角褐指藻的光合固碳作用也受到阳光 UV 辐射的显著抑制(图 4).与 P 处理相比,UV-A 使得光合固碳速率下降了 80.3%,而 UV-A 和 UV-B 同时存在时,即 PAB 条件下,光合固碳速率进一步受到抑制,仅为 P 条件下的 16.3%,PA 和 PAB 两种辐射处理间未表现显著差异 ( $p > 0.05$ ).

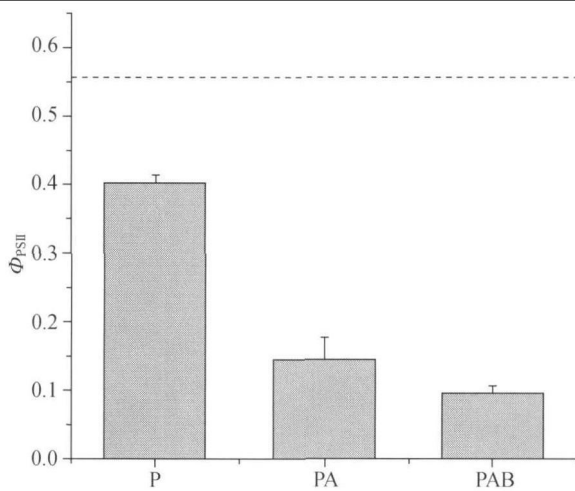


图3 不同辐射处理(P, 400—700 nm; PA, 320—700 nm; PAB, 280—700 nm)对三角褐指藻有效光化学效率的影响  
虚线显示为辐射处理前, 低 PAR (43.2 W/m<sup>2</sup>)  
条件下藻细胞的  $\Phi_{psII}$  值 (n=6)

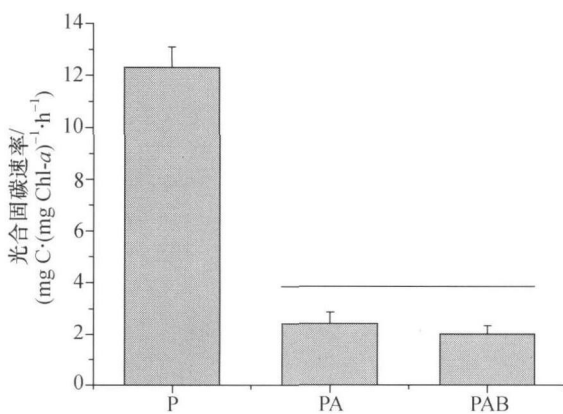


图4 不同辐射处理(P, PA及PAB)对三角褐指藻光合固碳的影响 (n=3)

### 2.3 UV辐射对三角褐指藻碳酸酐酶活性的影响

碳酸酐酶是三角褐指藻光合固碳过程中的关键酶之一, 其催化 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 和 CO<sub>2</sub> 之间的转化, 从而为 Rubisco 羧化位点提供可利用的 CO<sub>2</sub>. 本研究发  
发现, 阳光 UV 辐射显著抑制碳酸酐酶的活性(图 5). 与 P 处理相比, PA 条件下, 碳酸酐酶活性被抑制了 62%, 而当 UV-A 和 UV-B 同时存在时, 即 PAB 条件下, 未检测到其活性.

## 3 讨论

阳光 UV 辐射对浮游植物可能产生的影响效应

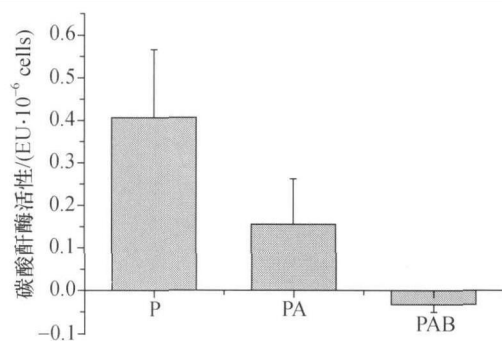


图5 不同辐射处理(P, PA及PAB)对三角褐指藻碳酸酐酶活性的影响 (n=4)

取决于多种因素, 如 UV 辐射的强度、波谱组成以及辐射处理时间, 生物有机体的敏感性等<sup>[5,18]</sup>. 本实验中, 我们利用可见光 PAR 同 UV-A 和 UV-B 的协同作用来探讨 UV 辐射对海洋硅藻三角褐指藻生长和光合固碳作用的影响. 研究结果显示, 在阳光辐射水平较低时, UVR 对三角褐指藻的生长表现促进作用, 而随着阳光辐射水平的提高, UVR 的抑制作用表现明显(图 2). 近年来, UVR 的正面作用已逐渐被研究者们所认识. 我们前期的研究发现, UVR 存在条件下浮游植物在阴天时具有较高的光合固碳速率, 而晴天时其固碳速率降低, 其中, UVR, 尤其是 UV-A, 可被海洋浮游植物利用进行光合固碳<sup>[19,20]</sup>. 本实验中, 低辐射水平下, UVR 可能被三角褐指藻光合固碳所利用, 补偿了低 PAR 的光限制作用, 从而对生长表现促进作用; 而随着阳光辐射水平的提高, UVR 通过对光合作用的抑制, 导致其生长速率降低.

为探讨 UVR 对三角褐指藻光合作用过程的抑制效应, 我们在高辐射水平(根据实验地夏季 8, 9 月份晴朗天气情况下的阳光辐射水平设定)条件下对其进行了研究. 研究发现 UVR 显著抑制三角褐指藻光系统 II 的有效光化学效率( $\Phi_{psII}$ , 图 3), 降低 PSII 活性. 与单独 PAR 条件下相比, UVR 的存在使得  $\Phi_{psII}$  降低 76% 之多. 有报道指出, UV-B 可通过破坏 PS II 反应中心的 D1/D2 蛋白, 而明显抑制 PS II 活性<sup>[21,22]</sup>. 当 D1 蛋白受到伤害甚至被降解而没有得到及时修复补充时, 光反应电子传递受阻, ATP 及 NADPH<sub>2</sub> 的产生率降低<sup>[23]</sup>, 进而导致光合固碳量降低(图 4). 此外, 在藻类的光合固碳

机制中, 碳酸酐酶在藻细胞对无机碳的获取过程中起着重要的作用, 其催化  $\text{HCO}_3^-$  和  $\text{CO}_2$  之间的相互转化, 从而为 Rubisco 羧化位点提供可利用的  $\text{CO}_2$ <sup>[24]</sup>. 本研究发现, 三角褐指藻的碳酸酐酶活性也显著受到 UVR 的抑制. UV-A 和 UV-B 同时存在时, 其碳酸酐酶活性无法检测到(图 5). 对碳酸酐酶活性的抑制大大降低了光合固碳所需要的  $\text{CO}_2$  浓度, 从而在 Rubisco 酶作用位点产生了碳限制环境, 使得光合固碳量下降.

应对 UVR 的损伤效应, 三角褐指藻细胞可能会具备一定的修复对抗策略. 本实验中我们对三角褐指藻细胞内能够屏障 UV 辐射, 从而减少 UVR 伤害效应的 UV 吸收物质进行了检测, 发现 UVR 并未诱导三角褐指藻细胞产生 UV 吸收物质(数据未显示). 有报道指出中等水平的 UV-B 能激发三角褐指藻细胞内硅甲藻黄素(DD-DT)循环, 加强热耗散途径, 从而保护光合机构免受 UVR 高能损伤<sup>[25]</sup>. 此外, D1 蛋白的从头合成可能在修复 UV-B 导致的 PSII 水平的损伤过程中起到重要作用, 该研究正在本实验室进行中.

总之, 本研究显示 UVR 可降低光反应过程中光系统 II 活性, 影响光合电子传递; 抑制光合无机碳获取过程中关键酶碳酸酐酶活性, 使得可利用的  $\text{CO}_2$  量减少, 从而导致三角褐指藻光合固碳作用下降, 进而对其生长产生影响.

### 参 考 文 献

- Crutzen PJ. Ultraviolet on the increase. *Nature*, 1992, 356: 104-105
- Kerr JB, McElroy CT. Evidence for large upward trends of ultraviolet-B radiation linked to ozone depletion. *Science*, 1993, 262: 1032-1034
- Buma AGJ, Zemmeling HJ, Sjollem K, et al. UVB radiation modifies protein and photosynthetic pigment content, volume and ultrastructure of marine diatoms. *Mar Ecol Prog Ser*, 1996, 142: 47-54
- Helbling EW, Barbieri ES, Marcoval MA, et al. Impact of solar ultraviolet radiation on marine phytoplankton of Patagonia, Argentina. *Photochem Photobiol*, 2005, 81: 807-818
- Litchman E, Neale PJ. Effects of ultraviolet radiation on photosynthesis, growth and acclimation of estuarine phytoplankton: A comparison of the diatom *Thalassiosira pseudonana* and the cryptomonad *Cryptomonas* sp. *Mar Ecol Prog Ser*, 2005, 300: 53-62
- 林更铭, 杨清良, 林金美. 厦门岛周围海域浮游植物的种类组成及风度. *台湾海峡*, 1994, 13(4): 353-358
- Strzpek RF, Narrison PJ. Photosynthetic architecture differs in coastal and oceanic diatoms. *Nature*, 2004, 431: 689-692
- Matsuda Y, Satoh K, Harada H, et al. Regulation of the expressions of  $\text{HCO}_3^-$  uptake and intracellular carbonic anhydrase in response to  $\text{CO}_2$  concentration in the marine diatom *Phaeodactylum* sp. *Funct Plant Biol*, 2002, 29: 261-270
- Chen X, Qiu C, Shao J. Evidence for  $\text{K}^+$ -dependent  $\text{HCO}_3^-$  utilization in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiol*, 2006, 141: 731-736
- 吴志辉, 聂湘平, 杨宇峰. 邻苯二甲酸二甲酯(DMP)对海洋微藻的生态毒理研究. *生态科学*, 2006, 25(2): 168-170
- 刘晓娟, 段舜山, 李爱芬. 有机碳源和氮源对三角褐指藻生长的影响. *水生生物学报*, 2008, 32(2): 252-257
- Behrenfeld MJ, Hardy JT, Lee H. Chronic effects of ultraviolet-B radiation on growth and cell volume of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae). *J Phycol*, 1992, 28: 757-760
- 刘成圣, 唐学玺, 王艳玲, 等. UV-B 辐射对三角褐指藻 DNA 伤害的研究. *海洋水产研究*, 2002, 23(2): 45-48
- Weis E, Berry A. Quantum efficiency of photosystem II in relation to the energy dependent quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta*, 1987, 894: 198-208
- Genty BE, Briantais JM, Baker NR. Relative quantum efficiencies of the two photosystems of leaves in photorespiratory and non-photorespiratory conditions. *Plant Physiol Biochem*, 1989, 28: 1-10
- Wilbur KM, Anderson NG. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. *Biol Chem*, 1948, 176: 147-154
- Porra RJ. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls *a* and *b*. *Photosynth Res*, 2002, 73: 149-156
- Smith RC, Prézélin BB, Baker KS, et al. Ozone depletion: Ultraviolet radiation and phytoplankton biology in Antarctic waters. *Science*, 1992, 255: 952-959
- Gao K, Wu YP, Li G, et al. Solar UV radiation drives  $\text{CO}_2$  fixation in marine phytoplankton: A double-edged sword. *Plant Physiol*, 2007, 144: 54-59
- Gao K, Li G, Helbling EW, et al. Variability of UVR effects on photosynthesis of summer phytoplankton assemblages from a tropical coastal area of the South China Sea. *Photochem Photobiol*, 2007, 83: 802-809
- Sass L, Spetea C, Máté Z, et al. Repair of UV-B induced damage of photosynthesis II via de novo synthesis of the D1 and D2 reaction center subunits in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photosynth Res*, 1997, 54: 55-62

- 22 Campbell D, Eriksson MJ, Öquist G, et al. The cyanobacterium *Synechococcus* resists UV-B by exchanging photosystem II reaction-center D1 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 364- 369
- 23 Schofield O, Kroon BMA, Prézelin B. Impact of ultraviolet-B radiation on photosystem II activity and its relationship to the inhibition of carbon fixation rates for antarctic ice algae communities. *J Phycol*, 1995, 31(5): 703- 715
- 24 Giordano M, Beardall J, Raven JA. CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in algae: Mechanisms, environmental modulation, and evolution. *Annu Rev Physiol*, 2005, 56: 99-131
- 25 Goss R, Mewes H, Wilhelm C. Stimulation of the diadinoxanthin cycle by UV-B radiation in the diatom *Phaeodactylum tri-cornutum*. *Photosynth Res*, 1999, 59: 73-80