

# 氮源对杜氏盐藻生长及光合系统 II 的影响

杨宋琪, 王丽娟, 谢 婷, 罗光宏, 祖廷勋\*

(河西学院, 甘肃省微藻工程技术研究中心, 甘肃省河西走廊特色资源利用重点实验室, 甘肃张掖 734000)

**摘 要:**以  $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 、 $\text{NaNO}_2$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  作为氮源, 并设无氮处理, 研究杜氏盐藻 (*Dunaliella salina*) 生长及其 PSII 对不同氮源的响应特征, 以明确杜氏盐藻对不同氮源的利用情况, 为盐藻培养基的优化和营养盐的筛选提供理论依据。结果表明: (1) 杜氏盐藻在  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  环境中具更高的比增长速率 [ $\mu_{\max}$ ,  $(0.482 \pm 0.032)/\text{d}$ ]。 (2)  $\text{NaNO}_2$ 、 $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  作氮源时, 杜氏盐藻快速光响应曲线的初始斜率 ( $\alpha$ )、最大光量子产率 ( $F_v/F_m$ ) 及反应活性中心所捕获的光能 (ABS/RC)、反应活性中心捕获的激发能用于还原  $\text{Q}_A$  的能量 ( $\text{TR}_0/\text{RC}$ )、最大光化学效率 ( $\varphi_{P_0}$ )、 $t=0$  时捕获的激子将电子传递到电子传递链中超过  $\text{Q}_A$  的其他电子受体的概率 ( $\varphi_0$ ) 和  $t=0$  时用于电子传递的量子产额 ( $\varphi_{E_0}$ ) 在处理间均差异不显著 ( $P>0.05$ ), 但三者与无氮和  $\text{NH}_4\text{Cl}$  处理组相比均具有显著差异。 (3) 与  $\text{NaNO}_2$ 、 $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  处理组相比, 无氮环境使得盐藻相对可变荧光 ( $V_j$ ) 显著升高, 盐藻光合电子从  $\text{Q}_A^-$  到  $\text{Q}_B$  的传递受阻, 导致  $\text{Q}_A^-$  大量积累; 而  $\text{NH}_4\text{Cl}$  做氮源时, 杜氏盐藻叶绿素荧光动力学曲线的 K 相出现, 使得其 PSII 放氧复合体 (OEC) 受损。研究认为, 杜氏盐藻在  $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 、 $\text{NaNO}_2$  作为唯一氮源时均可良好生长, 并在  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  环境中生长得更快; 缺氮胁迫使得盐藻生长受到显著抑制, PSII 反应活性中心的数量降低, 电子传递受阻; 而  $\text{NH}_4\text{Cl}$  对杜氏盐藻的毒性效应使得其 PSII 放氧复合体 (OEC) 受损, 藻体在短期内开始死亡。

**关键词:** 杜氏盐藻; 氮源; 光系统 II; 叶绿素荧光

中图分类号: Q945.11; Q945.79

文献标志码: A

## Effect of Nitrogen on Growth and Photosystem II of *Dunaliella salina*

YANG Songqi, WANG Lijuan, XIE Ting, LUO Guanghong, ZU Tingxun\*

(Hexi University, Gansu Engineering Technology Research Center for Microalgae, Key Laboratory of Hexi Corridor Resources Utilization of Gansu, Zhangye, Gansu 734000, China)

**Abstract:** In order to investigate the response of growth and PSII of *Dunaliella salina* to different nitrogen sources, we performed experiments by using  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ,  $\text{NaNO}_2$ , and  $\text{NH}_4\text{Cl}$  as nitrogen sources and -N control was set in this study. Our results showed that: (1) *D. salina* grew faster under  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  with a maximum growth rate [ $\mu_{\max}$ ,  $(0.482 \pm 0.032)/\text{d}$ ] per day than under other nitrogen sources. (2) Results of chlorophyll fluorescence indicated no significantly different in the initial slope of the RLC before the onset of saturation ( $\alpha$ ), the maximum potential ETR (rETRmax), the maximum photochemistry efficiency ( $F_v/F_m$ ), the maximum quantum yield of primary photochemistry ( $\varphi_{P_0}$ ), quantum yield for electron transport ( $\varphi_{E_0}$ ), probability ( $t=0$ ) that a trapped exit on moves an electron into the electron transport chain beyond  $\text{Q}_A^-$  ( $\varphi_0$ ), absorption flux per RC (ABS/RC) and trapped energy flux per RC ( $t=0$ ) ( $\text{TR}_0/\text{RC}$ ) among  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ , and  $\text{NaNO}_2$  groups ( $P>0.05$ ), while there is significantly

收稿日期: 2017-02-27; 修改稿收到日期: 2017-05-15

基金项目: 甘肃省科技支撑计划-社会发展类项目 (1604FKC090); 河西学院青年基金 (QN2015-03)

作者简介: 杨宋琪 (1988—), 男, 硕士, 助教, 主要从事藻类生理生态学方面研究。E-mail: sqyang@hxy.edu.cn

\* 通信作者: 祖廷勋, 硕士, 教授, 主要从事微藻资源开发与利用研究。E-mail: zutingxun@163.com

different in these parameters when compared with  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and  $-\text{N}$  controls ( $P<0.05$ ). (3) Compared with the  $\text{NaNO}_2$ ,  $\text{NaNO}_3$ , and  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  groups, the relative variable fluorescence ( $V_j$ ) of *D. salina* increased significantly under nitrogen free treatment ( $P<0.05$ ), which suggesting restriction of photosynthetic electron transport of *D. salina* from  $\text{Q}_\text{A}^-$  to  $\text{Q}_\text{B}$  and accumulation of  $\text{Q}_\text{A}^-$ . However, we can infer destroy of the oxygen evolving complex (OEC) of *D. salina* by the  $\text{NH}_4\text{Cl}$  from the appearance of K phase under  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . As a whole, these results showed that *D. salina* grew much faster under  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  than that under  $\text{NaNO}_3$  and  $\text{NaNO}_2$ , whereas the growth of *D. salina* was inhibited significantly by nitrogen deficiency, and the number of reactive centers in PS II was decreased, and the electron transport was blocked. However, toxicity effect of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  on *D. salina* caused its death in a short time and the OEC of *D. salina* was damaged.

**Key words:** *Dunaliella salina*; nitrogen sources; photosystem II; chlorophyll fluorescence

氮是蛋白质和叶绿素等物质的重要组成部分,对植物光合速率、暗反应主要酶以及光呼吸等都有显著影响<sup>[1]</sup>。当藻细胞受到氮限制时,其光合作用中光能的捕获、能量的转移、碳固定等过程均会受到限制<sup>[2-3]</sup>。自然界中,藻类能够利用的氮源主要包括硝酸盐、亚硝酸盐、铵盐、尿素、氨基酸等,其中,硝酸盐和铵盐是藻类生长繁殖的主要氮源<sup>[4]</sup>。在海洋环境中,氮源常缺乏而成为藻类生长的主要限制因子。除部分具有固氮能力的蓝藻外,其他所有藻类必须从外界环境中摄取氮素以满足自身的需要,且不同藻种对氮源形态和浓度的需求不同<sup>[5]</sup>。

杜氏盐藻(*Dunaliella salina*)隶属于绿藻门盐藻科盐藻属,是一种不具细胞壁的嗜盐单细胞绿藻。迄今所知,盐藻是植物界中 $\beta$ -类胡萝卜素含量最高的植物,可达干重的14%,同时又含有丰富的蛋白质和甘油,因此,盐藻具有良好的经济价值而倍受关注<sup>[6]</sup>。目前,更多研究主要着眼于氮浓度对盐藻生长和 $\beta$ -类胡萝卜素积累的影响方面,Uriarte指出盐藻生长与氮浓度呈正相关<sup>[7]</sup>,且10 mmol/L的 $\text{NO}_3^-$ 环境中其生长最优<sup>[8]</sup>,同时氮限制又是盐藻积累 $\beta$ -类胡萝卜素的必要条件之一<sup>[9]</sup>。目前,关于不同氮源对杜氏盐藻PS II影响的研究尚未见报道。因此,本研究通过探究不同氮源对杜氏盐藻生长和光合作用机制影响,揭示杜氏盐藻对不同氮源的利用情况,为盐藻培养基的优化和营养盐的筛选提供理论支持。

# 1 材料和方法

## 1.1 藻种培养

实验所用藻种杜氏盐藻(*Dunaliella salina*)由天津开发区天光高科技开发有限公司提供。将藻种置于杜氏盐藻培养基中培养,培养条件为:pH 7.5,温度 $(25\pm1)^\circ\text{C}$ ,光照强度 $80\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,光暗比12 h:12 h,培养期间每天定时摇动藻液3次。

## 1.2 实验处理

以杜氏盐藻培养基氮含量为基准(氮为5 mmol/L),分别以 $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 、 $\text{NaNO}_2$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 等4种不同形态的氮为唯一氮源,并设置无氮处理,各处理设置3个重复。将对数期藻液进行离心、洗涤,并转接至无氮培养基中饥饿培养3 d。然后将饥饿的藻细胞分别接入含有不同氮源的300 mL杜氏盐藻培养基中,初始藻密度为 $1.1\times10^5\text{ cells/mL}$ ,每隔24 h取样进行藻密度和叶绿素荧光参数的测定。

## 1.3 测定指标及方法

**1.3.1 藻密度** 每个处理各取3 mL藻液加100  $\mu\text{L}$ 鲁哥固定,运用浮游生物计数框于奥林巴斯CX-41显微镜下计数50~100个视野,计算藻密度。

比生长速率( $\mu$ )计算公式为:

$$\mu = \frac{\ln(x_2/x_1)}{(t_2 - t_1)}$$
$$\mu_{\max} = \max(\mu_1, \mu_2, \mu_3, \dots, \mu_n)$$

式中: $\mu$ 表示杜氏盐藻在某一时间段内的比生长速率, $\mu_{\max}$ 表示最大比生长速率, $x_2$ 表示 $t_2$ 时间的藻类现存量, $x_1$ 表示 $t_1$ 时间的藻类现存量。

**1.3.2 快速光响应曲线** 待培养的藻种进入对数期后,利用PHYTO-PAM荧光仪(PhytoPAM Phytoplankton Analyzer 德国Walz公司)测定盐藻快速光响应曲线,测定参数包括光响应曲线的起始斜率 $\alpha$ 、最大光量子产率( $F_v/F_m$ )、最大PS II表观电子传递速率( $\text{ETR}_{\max}$ )、非光化学淬灭( $\text{NPQ}$ )。测定前将藻液暗适应20 min,然后分别在1、32、64、128、192、320、448、576、960、1 472和1 856  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光强下测定其光响应曲线。相对电子传递速率通过下列方程计算获得<sup>[10]</sup>:

$$r\text{ETR} = \text{ETR}_{\max} \times (1 - e^{-\alpha \text{PAR} / \text{ETR}_{\max}}) \times e^{\beta \text{PAR} / \text{ETR}_{\max}}$$

式中: $\alpha$ 为光响应曲线的起始斜率, $\beta$ 为光曲线下降时的斜率(光抑制参数), $\text{ETR}_{\max}$ 为最大PS II

表观电子传递速率,  $PAR$  为光照强度。

1.3.3 叶绿素荧光动力学曲线(OJIP)及 JIP-test

**参数** 取对数期藻液 2.3 mL 暗适应 20 min 后,采用植物效率分析仪(英国汉莎科技有限公司)测定 OJIP 曲线及荧光参数,测定光强为  $3\,000\,\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,最大激发波长 650 nm,记录 10  $\mu\text{s}$  到 2 s 叶绿素荧光的变化过程,从而准确记录 O-J-I-P 等相<sup>[10]</sup>。根据 Strasser 等<sup>[11]</sup>建立的高度简化的能量流动理论模型(图 1),分析杜氏盐藻 PSⅡ 单位反应中心能量流动比活性能参数( $ABS/RC$ 、 $TR_0/RC$  和  $ET_0/RC$ )和能量分配比参数( $\varphi_{P_0}$ 、 $\psi_0$  和  $\varphi_{E_0}$ ),各参数意义见表 1<sup>[12]</sup>。

1.4 数据统计

实验数据用 SPSS 13.0 进行单因素方差分析(One Way ANOVA),并用 LSD 法进行多重比较,使用 Origin 8.5 软件作图。

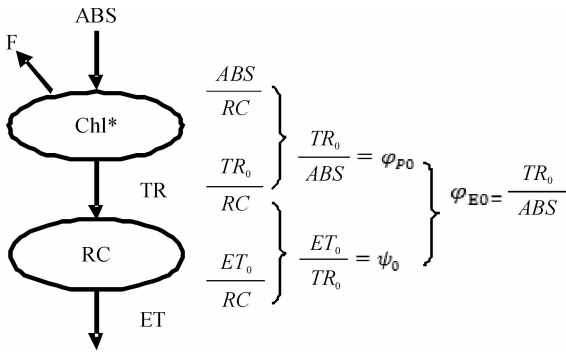


图 1 光合器官中能量流动模型图<sup>[11]</sup>

Fig. 1 A highly simplified working model of the energy fluxes of PSⅡ <sup>[11]</sup>

2 结果与分析

2.1 杜氏盐藻在不同氮源条件下的生长情况

图 2 显示,在  $\text{NaNO}_2$ 、 $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  作氮源时,杜氏盐藻生长率均在培养的第 3~4 天时达到最大,此时最大比增长率( $\mu_{\text{max}}$ )分别为 0.387、0.458 和 0.482  $\text{d}^{-1}$ ;同时,其细胞密度也随着培养时间推移而显著增加( $P<0.05$ ),在培养的第 8~9 天时进入稳定期,此时细胞密度分别为  $5.20\times 10^5$ 、 $5.49\times 10^5$  和  $5.63\times 10^5$  cells/mL。在无氮和  $\text{NH}_4\text{Cl}$  处理组,杜氏盐藻  $\mu_{\text{max}}$  均出现在培养的第 2 天,其值分别为 0.228 6 和 0.101  $\text{d}^{-1}$ ;同时,无氮处理组细胞密度在培养期间没有显著变化,一直维持在初期接种水平,而  $\text{NH}_4\text{Cl}$  处理组细胞密度在第 3 天时开始下降后维持在较低水平。以上结果说明添加  $\text{NaNO}_2$ 、 $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  氮源有利于杜氏盐藻生长,而添加  $\text{NH}_4\text{Cl}$ (5 mmol/L)反而显著抑制盐藻生长。

2.2 杜氏盐藻在不同氮源条件下的光响应曲线及相关参数

光响应曲线结果表明(图 3),在不同氮源条件下,杜氏盐藻最大 PSⅡ 表观电子传递速率( $rETR_{\text{max}}$ )表现为  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2>\text{NaNO}_3>\text{NaNO}_2>-\text{N}>\text{NH}_4\text{Cl}$ ,且除  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  和  $\text{NaNO}_3$  两氮源处理组外,各组间  $rETR_{\text{max}}$  差异均达到显著水平( $P<0.05$ )。同时,由表 2 可知,杜氏盐藻快速光曲线的初始斜率( $\alpha$ )、最大光量子产率( $F_v/F_m$ )和非光化学淬灭值( $NPQ$ )在  $\text{NaNO}_2$ 、 $\text{NaNO}_3$  和  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  处理组间均差异不显著( $P>0.05$ ),但其  $\alpha$  和  $F_v/F_m$

表 1 JIP 测定所用的叶绿素荧光动力学参数<sup>[12]</sup>

术语及公式 Formula and term	含义 Illustration
$\varphi_{P_0}=1-F_0/F_m$	最大光化学效率( $t=0$ ) The maximum quantum yield of primary photochemistry( $t=0$ )
$\psi_0=1-V_j$	反应中心捕获的激子中用来推动电子传递到电子传递链中超过 $Q_A$ 的其它电子受体的激子 占用来推动 $Q_A$ 还原激子的比率( $t=0$ ) Probability( $t=0$ ) that atrapped excit on moves an electron into the electron transport chain beyond $Q_A^-$
$\varphi_{E_0}=(1-F_0/F_m)\psi_0$	用于电子传递的量子产额( $t=0$ ) Quantum yield for electron transport( $t=0$ )
$ABS/RC=M_0\cdot(1/V_j)\cdot(1/\varphi_{P_0})$	单位反应中心吸收的光能 Absorption flux per RC
$TR_0/RC=M_0\cdot(1/V_j)$	单位反应中心捕获的用于还原 $Q_A$ 的能量( $t=0$ ) Trapped energy flux per RC( $t=0$ )
$ET_0/RC=M_0\cdot(1/V_j)\cdot\psi_0$	单位反应中心捕获的用于电子传递的能量( $t=0$ ) Electron transport flux per RC( $t=0$ )

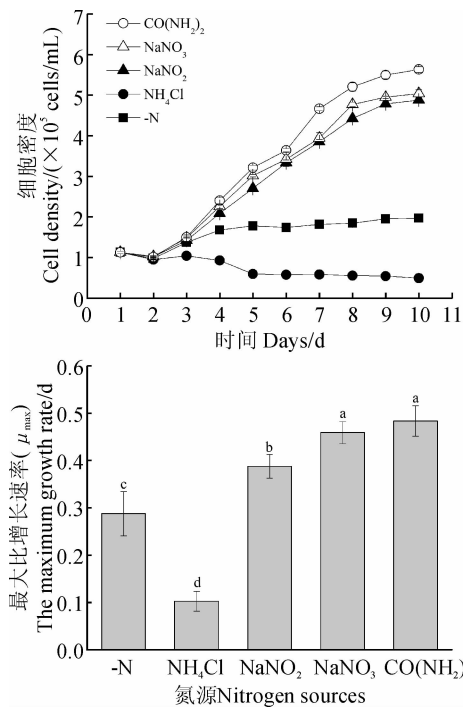


图 2 杜氏盐藻在不同氮源处理中的生长曲线及最大比增长速率

Fig. 2 Effects of different phosphorus substrates on growth and the maximum specific growth rate of *Dunaliella salina*

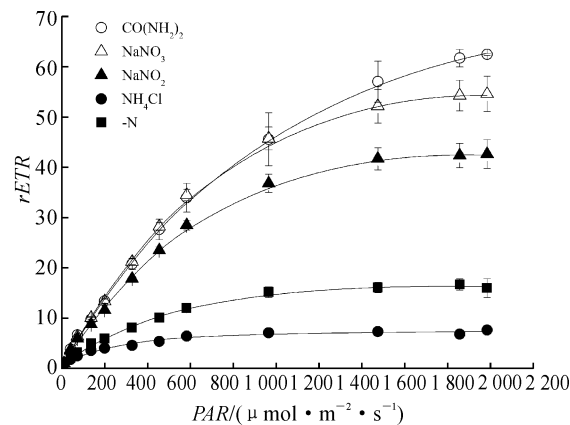


图 3 杜氏盐藻在不同氮源处理条件下的光响应曲线

Fig. 3 The electron transport rates (ETR) for the treatment responses of *D. salina* in different nitrate substrates

均显著高于无氮和 NH<sub>4</sub>Cl 处理组 ( $P < 0.05$ ), 而其 NPQ 则反而显著低于无氮和 NH<sub>4</sub>Cl 处理组 ( $P < 0.05$ ); NH<sub>4</sub>Cl 处理组  $\alpha$ 、 $F_v/F_m$  和 NPQ 均显著低于无氮处理。以上结果说明缺氮和 NH<sub>4</sub>Cl 处理使得杜氏盐藻受到一定的胁迫, 导致其光捕获能力和光能利用效率明显降低而热耗散增加。

表 2 不同氮源处理条件下杜氏盐藻光响应曲线参数

Table 2 Parameters of rapid light-responding curves of the responses of *D. salina* in different nitrate substrates

氮源 Nitrate substrate	$\alpha$	$F_v/F_m$	NPQ
CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	0.28±0.015a	0.71±0.003a	0.110±0.008a
NaNO <sub>3</sub>	0.28±0.030a	0.70±0.003a	0.126±0.012a
NaNO <sub>2</sub>	0.27±0.002a	0.70±0.005a	0.136±0.008a
NH <sub>4</sub> Cl	0.08±0.004c	0.38±0.020c	0.180±0.005c
-N	0.15±0.012b	0.47±0.011b	0.163±0.012b

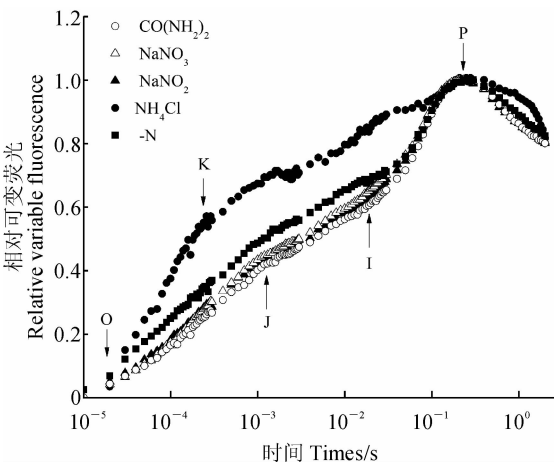


图 4 不同氮源处理对杜氏盐藻快速叶绿素荧光诱导动力学曲线(OJIP)的影响

Fig. 4 Effect of different nitrate substrates on chlorophyll fluorescence transients(OJIP) of *D. salina*

2.3 杜氏盐藻在不同氮源条件下的叶绿素荧光动力学

不同氮源处理条件下, 杜氏盐藻快速叶绿素荧光诱导动力学曲线(OJIP)的变化情况如图 4 所示。其中, 杜氏盐藻的相对可变荧光在 NaNO<sub>2</sub>、NaNO<sub>3</sub>、CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> 作氮源时差异不显著 ( $P > 0.05$ ); 无氮处理组的相对可变荧光显著高于前 3 组氮源处理 ( $P < 0.05$ ); 在 NH<sub>4</sub>Cl 做氮源时, OJIP 曲线的 K 相出现, J、I、P 等相消失。

同时, 在不同氮源处理条件下, 杜氏盐藻 PS II 单位反应中心能量流动比活性能参数 ( $ABS/RC$ 、 $TR_0/RC$  和  $ET_0/RC$ ) 和能量分配比参数 ( $\varphi_{P_0}$ 、 $\psi_0$  和  $\varphi_{E_0}$ ) 变化情况如图 5 所示。结果表明, 杜氏盐藻反应活性中心所捕获的光能 ( $ABS/RC$ ) 和反应活性中心捕获的激发能用于还原 Q<sub>A</sub> 的能量 ( $TR_0/RC$ ) 在 NaNO<sub>2</sub>、NaNO<sub>3</sub>、CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> 氮源处理组显著低于无氮和 NH<sub>4</sub>Cl 处理组, 无氮组又大幅显著低于 NH<sub>4</sub>Cl 处理组 ( $P < 0.05$ ); 而其反应活性中心捕获的

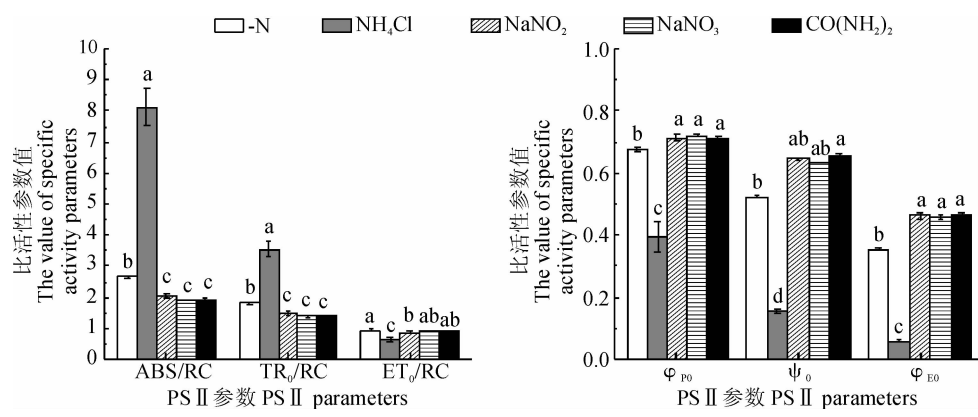


图5 不同氮源处理对杜氏盐藻 JIP-test 参数的影响

Fig. 5 Effect on JIP test parameters of *D. salina* in different nitrate substrates

光能用于电子传递的能量( $ET_0/RC$ )在  $NH_4Cl$  组中显著低于其他 4 组处理( $P<0.05$ )。另外,杜氏盐藻的最大光化学效率( $\varphi_{P0}$ )、 $t=0$  时捕获的激子将电子传递到电子传递链中超过  $Q_A$  的其他电子受体的概率( $\psi_0$ )和  $t=0$  时用于电子传递的量子产额( $\varphi_{E0}$ ) 在  $NaNO_3$ 、 $NaNO_2$ 、 $CO(NH_2)_2$  处理组间差异不显著,但均显著高于无氮和  $NH_4Cl$  处理组,而无氮又显著高于  $NH_4Cl$  处理组( $P<0.05$ )。以上结果说明,相比于  $NaNO_2$ 、 $NaNO_3$ 、 $CO(NH_2)_2$  处理,无氮胁迫和  $NH_4Cl$  的毒性使得杜氏盐藻 PS II 电子传递受到抑制,从而导致叶绿素荧光诱导动力学曲线及 JIP-test 参数发生显著变化。

### 3 讨 论

自然界氮源种类丰富,包括无机氮如硝酸盐、亚硝酸盐、铵盐、氮气等,有机氮源如尿素、腐殖质、氨基酸等<sup>[13]</sup>。有研究表明,铵氮是藻类能够优先利用的氮源<sup>[14]</sup>,其次为硝酸盐、尿素和亚硝酸盐。而 Il-yash 研究发现海洋藻类 *Pseudonitzschia delicatissima*、*Thalassiosira weissflogii* 和 *Tetraselmis viridis* 在尿素和甘氨酸作为唯一氮源时能够良好地生长,而且这两种有机氮源使得以上 3 种海洋藻类的可变荧光、最大光量子传递速率和光饱和点值增加,光合作用强度增加<sup>[15]</sup>。

本研究结果发现,杜氏盐藻在  $NaNO_2$ 、 $NaNO_3$ 、 $CO(NH_2)_2$  分别作为唯一氮源时均可良好生长,且在尿素环境中获得了更高的比生长率( $0.482\text{ d}^{-1}$ )和细胞密度( $5.63\times10^5\text{ cells/mL}$ )。Mccarthy 发现浮游植物吸收  $NH_4\text{-N}$  需要耗费更低的能量,以  $NH_4\text{-N}$  作为氮源是一种经济的竞争策略<sup>[16]</sup>,然而魏东等研究表明当铵盐作为藻类生长的唯一氮源时,随着  $NH_4^+$  被吸收利用,导致培养液 pH 下降,

抑制藻类生长<sup>[17]</sup>;张清春等发现细胞内  $NH_4^+$  浓度的增加会对藻细胞产生一定的毒性<sup>[18-19]</sup>,从而抑制藻类的生长;王培磊研究也发现,当  $NH_4Cl$  浓度为  $4.0\text{ mmol/L}$  时, $NH_4^+$  对盐藻细胞的生长和分裂具有抑制作用<sup>[9]</sup>。本研究也得出相同的结果,即氯化铵初始浓度为  $5\text{ mmol/L}$  时,杜氏盐藻在培养的第 3 天便开始死亡。因此,对于杜氏盐藻而言,铵盐不适合作为其生长所需的氮源。

当植物受外界环境作用时,其光合结构与功能的变化,以及光系统对光能的吸收、传递、耗散和分配等均可通过叶绿素荧光诱导动力学技术进行检测<sup>[20-21]</sup>。其中, $F_v/F_m$  是表征植物光化学反应的重要参数,其下降被认为是植物受到胁迫的首要条件<sup>[22]</sup>。本实验结果表明,当  $NaNO_2$ 、 $NaNO_3$ 、 $CO(NH_2)_2$  作氮源时,杜氏盐藻  $F_v/F_m$  均显著高于无氮和  $NH_4Cl$  处理组( $P<0.05$ ),并在  $CO(NH_2)_2$  组中  $F_v/F_m$  值最高。梁英等<sup>[23]</sup> 研究也发现, $CO(NH_2)_2$  环境使得筒柱藻在生长的前期获得更高的  $F_v/F_m$  值,暗示了杜氏盐藻可能含有尿素酶而能够迅速水解尿素所致<sup>[24]</sup>。当受到氮限制时,本研究中杜氏盐藻  $F_v/F_m$  大幅下降,该结果与 Young 等、尹翠玲等研究结果相吻合<sup>[25-27]</sup>。另外,光响应曲线中, $rETR_{max}$  表示最大 PS II 表观电子传递速率; $\alpha$  表示藻细胞光能利用效率, $\alpha$  值的增减可直观反映藻类捕光色素吸收的光能的增减,由此可推断其光合机构捕光色素蛋白复合体合成情况;NPQ 是指 PS II 天线色素吸收的光能不能用于光化学电子传递的份额,一般以热的形式耗散掉,是藻类对自身光合机构的一种保护机制<sup>[21]</sup>。本研究发现,在  $NaNO_2$ 、 $NaNO_3$ 、 $CO(NH_2)_2$  氮源环境中,杜氏盐藻  $rETR_{max}$  和  $\alpha$  显著高于无氮和  $NH_4Cl$  处理组,而 NPQ 则呈现相反的特征。说明无氮和  $NH_4Cl$  处理使得杜氏

盐藻 PS II 反应中心的开放程度降低,导致电子由 PS II 的氧化侧向 PS II 反应中心的传递受阻,热耗散增加,能量利用效率降低。

快速叶绿素荧光诱导动力学曲线包括 O、J、I、P 等相,相对可变荧光值( $V_j$ )的变化是电子受体连续还原、PS II 反应中心逐渐关闭的过程。PS II 反应中心受光激发后使  $Q_A$  被还原为  $Q_A^-$ ,由于  $Q_B$  不能及时从  $Q_A^-$  接受电子将它氧化,造成  $Q_A^-$  的大量积累,从而引起 J 相的出现<sup>[28]</sup>。本研究结果发现,无氮环境中杜氏盐藻具有较高的  $V_j$ ,说明电子从  $Q_A^-$  到  $Q_B$  的传递受阻,导致  $Q_A^-$  大量积累,荧光值升高,此时可知盐藻受到了明显的缺氮胁迫;而  $NaNO_2$ 、 $NaNO_3$ 、 $CO(NH_2)_2$  作氮源时  $V_j$  值差异不显著,又说明杜氏盐藻均能很好利用这 3 种氮源而不受氮限制。另有研究表明,光合植物 PS II 供体侧受到伤害时,其水裂解系统会被抑制,放氧复合体(OEC)受损,从而在植物照光后大约 300  $\mu s$  时出现特征位点(OJIP 曲线 J 点之前),此时叶绿素荧光产量会迅速上升,出现 K 点,多相荧光 O-J 变为 O-K-J<sup>[29]</sup>。本研究中,当  $NH_4Cl$  做氮源时,OJIP 曲线的 K 相出现,说明  $NH_4Cl$  使得杜氏盐藻 PS II 放氧复合体(OEC)受损。

JIP-test 参数能够直观反映 PS II 反应中心及电

子供体侧和受体侧的生理状态<sup>[20]</sup>。与  $NaNO_2$ 、 $NaNO_3$ 、 $CO(NH_2)_2$  这 3 种氮源相比,无氮和  $NH_4Cl$  处理使得杜氏盐藻 ABS/RC 和  $TR_0/RC$  显著增加( $P < 0.05$ ),表明无氮和  $NH_4Cl$  处理使得部分藻类反应中心失活或裂解,导致剩余的有活性的反应中心负担加重,迫使剩余的有活性的反应中心效率提高,从而更好地耗散电子传递链中的能量<sup>[29]</sup>。 $\varphi_{P0}$  反映藻暗适应后 PS II 最大光化学效率,表征 PS II 反应中心供体侧的电子传递性能<sup>[30]</sup>, $\phi_0$  和  $\varphi_{E0}$  反映 PS II 受体侧  $Q_A$ 、 $Q_B$  和 PQ 库的变化情况。本实验结果发现,氮饥饿(N-)和  $NH_4Cl$  处理显著降低了杜氏盐藻的  $\varphi_{P0}$ 、 $\phi_0$  和  $\varphi_{E0}$  值,表明此时杜氏盐藻电子传递链能量的传递受抑制,PS II 受体侧电子传递受到抑制, $Q_A$  传递电子的能力下降,有活性反应中心的开放程度下降。

综上所述, $NaNO_2$ 、 $NaNO_3$ 、 $CO(NH_2)_2$  氮源均可供杜氏盐藻良好地生长,而缺氮胁迫使得盐藻生长受到显著抑制,PS II 反应活性中心的数量降低,PS II  $Q_A^-$  到 PQ 库的电子传递受阻,进而导致 OJIP 曲线中 J 点的显著升高。当  $NH_4Cl$  作为唯一氮源时,杜氏盐藻 PS II 放氧复合体(OEC)受损,藻体在短期内则开始死亡。

## 参考文献:

- [1] 赵平,孙谷畴,彭少麟.植物氮素营养的生理生态学研究[J].生态科学,1998,17(2):37-42.  
ZHAO P, SUN G C, PENG S L. Ecophysiological research on nitrogen nutrition of Plant[J]. *Ecological Science*, 1998, 17(2): 37-42.
- [2] HERZIG, R & FALKOWSKI, P G. Nitrogen limitation in *Isochrysis galbana* (Haptophyceae). I. Photosynthetic energy conversion and growth efficiencies[J]. *Journal of Phycology*, 1989, 25: 462-71.
- [3] GEIDER R J, LAROCHE J, GREENE R M, *et al.* Response of the photosynthetic apparatus of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) to nitrate, phosphate, or iron starvation[J]. *Journal of Phycology*, 1993, 29: 755-66.
- [4] 刘春光,金相灿,孙凌,等.不同氮源和曝气方式对淡水藻类生长的影响[J].环境科学,2006,27(1):101-104.  
LIU C G, JIN X C, SUN L, *et al.* Effects of nitrogen source and aeration mode on algae growth in freshwater[J]. *Environmental Science*, 2006, 27(1):101-104.
- [5] XU N, ZHANG X, XIAO F, *et al.* Effects of nitrogen source and concentration on growth rate and fatty acid composition of *Ellipsoidion* sp.(Eustigmatophyta)[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2001, 13(6):463-469.
- [6] OREN A. A hundred years of *Dunaliella* research; 1905-2005[J]. *Saline Systems*, 2005, 04: 1-14.
- [7] URIARTE I, FARIAS A, HAWKINS A J S, *et al.* Cell characteristics and biochemical composition of *Dunaliella prismolecta* Butcher conditioned at different concentrations of dissolved nitrogen[J]. *Journal of Applied Phycology*, 1993, 5(4): 447-453.
- [8] SOSIK H M & MITHELL B. Effects of temperature on growth, light absorption, and quantum yield in *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae)[J]. *Journal of Phycology*, 2010, 30(5): 833-840.
- [9] 王培磊. 盐生杜氏藻研究[M]. 济南: 山东人民出版社, 2013, 70-82.
- [10] PLATT T, GALLEGOS C L, HARRISON W G. Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton[J]. *Journal Marine Research*, 1980, 38: 687-701.
- [11] STRASSER B J, STRASSER R J. Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: The JIP test[M]// In: Mathis P ed. Photosynthesis: from light to biosphere. Dordrecht: KAP Press, 1995: 977-980.
- [12] STRASSER R J, TSIMILL, MICHAEL M, *et al.* Analysis of the Chlorophyll a Fluorescence Transient[M]. Nether-

- lands; KAP Press. 2004; 1-47.
- [13] BERMAN T. Dissolved organic nitrogen utilization by an Apha-nizomenon bloom in Lake Kinneret [J]. *Journal of Plankton Research*, 1997, **19**(5): 577-586.
- [14] CHRISTINA W C, PEDRO A C. Factors in fluenceing the development of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Microcystis aeruginosa* in the Para2 noa Reserv oir, Brasilia, Brazil [J]. *Algological Studies/Archiv fur hydrobiologie*, 1994, 75:85- 96.
- [15] ILYASH L V, BELECICH T A, Ulanova A Y, *et al.* Fluorescence parameters of marine plankton algae at the assimilation of organic nitrogen[J]. *Moscow University Biological Sciences Bulletin*, 2007, **62**(3): 111-116.
- [16] MCCARTHY J J, WYNNE D, BERMAN T. The Uptake of Dissolved Nitrogenous Nutrients by Lake Kinneret (Israel) Microplankton[J]. *Limnology & Oceanography*, 1982, **27**(4): 673-680.
- [17] 魏 东, 张学成, 隋正红, 等. 氮源和 N/P 对眼点拟微球藻的生长、总脂含量和脂肪酸组成的影响[J]. *海洋科学*, 2000, **24**(7): 46-51.  
WEI D, ZHANG X C, SUI Z H, *et al.* Effect of nitrongen and N/P ration on cell growth, total lipid content and fatty acid composition of *Nannochloropsis oculata* [J]. *Marine Science*, 2000, **24**(7): 46-51.
- [18] 张清春, 于仁诚, 周名江, 等. 不同类型含磷营养物质对微小亚历山大藻(*Alexandrium minutum*) 生长和毒素产生的影响[J]. *海洋与湖沼*, 2005, **36**(5): 465- 474.  
ZHANG Q C, YU R C, ZHOU M J, *et al.* Effect of different phosphorus substrates on growth and toxin generation of *Alexandrium minutum* [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2005, **36**(5): 465-474.
- [19] 颜 天, 周名江, 邹景忠, 等. 香港及珠江口海域有害赤潮发生机制初步探讨[J]. *生态学报*, 2001, **21**(10): 1 634-1 641.  
YAN T, ZHOU M J, ZOU J Z, *et al.* Preliminary studies on red tide formation mechanism in Hong Kong and Pearl River Estuary [J]. *Acta Ecological Sinica*, 2001, **21**(10): 1 634-1 641.
- [20] STRASSER R J, SRICASTACA A, GOVINDJEE. Polyphasic chlorophyll alpha fluorescence transient in plants and cyanobacteria [J]. *Photochemistry and Photobiology*, 1995, 61: 32-42.
- [21] 李 晓, 冯 伟, 曾晓春. 叶绿素荧光分析技术及应用进展 [J]. *西北植物学报*, 2006, **26**(10): 2 186-2 196.  
LI X, FENG W, ZENG X C. Advances in chlorophyll fluorescence analysis and its uses [J]. *Acta Botanica Boreal-Occidental Sinica*, 2006, **26**(10): 2 186-2 196.
- [22] PARKHILL J, MAILLET G, CULLEN J J. Fluorescence-based maximal quantum yield for psii as a diagnostic of nutrient stress [J]. *Journal of Phycology*, 2001, **37**(4): 517-529.
- [23] 梁 英, 孙明辉, 田传远, 等. 氮磷源对筒柱藻叶绿素荧光特性和生长的影响[J]. *水产科学*, 2014, 5: 269-276.  
LIANG Y, SUN M Y, TIAN C H, *et al.* Effects of nitrogen and phosphorus sources on chlorophyll fluorescence characteristics and growth of green alga *Cylindrotheca* sp. [J]. *Fisheries Science*, 2014, 5: 269-276.
- [24] FAN C, GLIBERT P M, BURKHOLDER J A M. Characterization of the affinity for nitrogen, uptake kinetics, and environmental relationships for proroentrum minimum, in natural blooms and laboratory cultures [J]. *Harmful Algae*, 2003, **2**(4): 283-299.
- [25] YOUNG E B, BEARDALL J. Photosynthetic function in *Dunaliella tertiolecta*, (chlorophyta) during a nitrogen starvation and recovery cycle [J]. *Journal of Phycology*, 2003, **39**(5), 897-905.
- [26] 尹翠玲. 营养盐限制对 6 株微藻叶绿素荧光特性的影响 [D]. 山东青岛:中国海洋大学, 2006.
- [27] 陈元印, 唐运来, 陈 梅. 限氮培养对小球藻水分含量和叶绿素荧光参数的影响 [J]. *西北植物学报*, 2012, **32**(3): 491-497.  
CHEN Y Y, TANG Y L, CHEN M. Effects of nitrogen-limited culture on water content and chorophyll fluorescence parameters in *Chlorella sorokiniana* [J]. *Acta Botanica Boreal-Occidental Sinica*, 2012, **32**(3): 491-497.
- [28] LUKAC M, AEGERTER R. Influence of trace metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa* [J]. *Toxicon*, 1993, 31: 293-305.
- [29] 李鹏民, 高辉远, STRASSER J. 快速叶绿素荧光诱导动力学分析在光合作用研究中的应用 [J]. *植物生理与分子生物学报*, 2005, **31**(6): 559-566.  
LI P M, GAO H Y, STRASSER J. Application of the chlorophyll fluorescence induction dynamics in photosynthesis study [J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2005, **31**(6): 559-566.
- [30] BUENO B, FILLAT M F, STRASSER R J, *et al.* Effect of lindance on the photosynthetic apparatus of the cyanobacterium Anabaena: fluorescence induction studies and immunocalization of ferredoxin NADP<sup>+</sup> reductase [J]. *Environmental Science Pollution Research*, 2004, 11: 98-106.

(编辑:裴阿卫)