

doi: 10.7541/2019.023

光强调控三角褐指藻对海洋酸化的生理学响应

曾晓鹏 徐锦涛 邓子权 方逸麟 何铭华 夏建荣

(广州大学环境科学与工程学院, 广州 510006)

摘要: 光和海洋酸化(CO_2 浓度升高)分别对海洋硅藻的光合能力具有不同程度的影响, 但两者的耦合响应被较少关注。研究以三角褐指藻作为实验材料, 测定了不同光强下 CO_2 浓度升高对三角褐指藻的生长、净光合速率、生化组分、胞外碳酸酐酶(eCA)活性和核酮糖-1,5-二磷酸羧化/氧化酶(Rubisco)活性的影响。结果显示在低光下, CO_2 浓度对三角褐指藻的生长和净光合速率(P_n)并没有显著影响, 而在高光下, 具有明显的影响。无论是在高光或是低光下, eCA活性、叶绿素和可溶性蛋白的含量都随着 CO_2 浓度的升高而降低。在低光下, 高浓度 CO_2 (HC)培养下的Rubisco活性分别是低浓度 CO_2 (LC)和中浓度 CO_2 (MC)的2.42和1.39倍, 而在高光下, HC培养下的Rubisco活性分别是LC和MC的6.72和3.45倍。以上结果表明硅藻能够通过调节光合生理特征和CCM运行中能量的分配来适应环境中光强和 CO_2 浓度的变化。

关键词: 光强; 海洋酸化; 三角褐指藻; 碳酸酐酶; 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/氧化酶

中图分类号: Q948.11

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2019)01-0189-07

硅藻作为海洋浮游植物的重要类群, 贡献了近20%的全球初级生产力^[1, 2]。硅藻通过光合作用将溶解性无机碳(Dissolved inorganic carbon, DIC)转移到深海的过程是全球海洋生物泵的重要组成部分^[3], 对全球碳循环具有重要的意义。由于水气界面的存在, CO_2 在海水中的扩散速率是缓慢的, 导致了海水中 CO_2 浓度仅为海洋硅藻核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/氧化酶(Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, Rubisco) $K_{1/2}$ (CO_2)的1/4—1/3^[4-6], 但大部分的硅藻拥有 CO_2 浓缩机制(CO_2 Concentrating Mechanisms, CCMs), 用于克服海洋环境中低 CO_2 浓度对光合作用的限制^[7, 8]。在工业革命后, 人为排放 CO_2 不断的增加, 预计到2100年大气中的 CO_2 浓度将会达到1000 ppmv^[9], 而大气中的 CO_2 有近1/3被海洋吸收并导致表层海水pH下降0.3, 出现海洋酸化的现象^[10, 11]。海洋酸化将导致海水中 CO_2 和 HCO_3^- 浓度增加, 对海洋浮游植物的初级生产力和浮游植物的群落结构造成影响^[12, 13], 这种影响可能是正面的也可能是负面的^[14, 15]。在高浓度 CO_2 条件下培养的藻会通过下调CCMs活性来节省

CCMs运行过程中的能量消耗, 而在低浓度 CO_2 条件下培养的藻细胞则通过增强CCMs活性以获取更多碳源用于光合作用^[13, 16, 17]。

硅藻CCMs的运行是个耗能的过程, 其活性不仅取决于外部无机碳(Inorganic carbon, Ci)浓度, 还与光能的获取有着密切的联系^[5, 18]。藻类的光合作用为Ci的转运提供能量, 对CCMs的活性具有直接的影响^[19-21]。光和 CO_2 浓度是2个重要的环境因子, 其对藻类的相互作用会影响藻类的光合生理和海洋生态环境^[22]。在酸化和200 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的光强下, 三角褐指藻能够减少CCMs运行过程中的能量支出, 并将这部分能量用于细胞的生长^[16]。此外, CO_2 和光强的交互作用还会对浮游植物群落造成影响。当 CO_2 浓度升高时, 低光强能够促进浮游植物群落的生长和碳的固定, 而在高光强下浮游植物群落初级生产力下降^[23]。光和 CO_2 对藻的生长和光合特性的影响是存在差异的, 涉及藻类对光和海洋酸化的响应机制还需要进一步探索^[15, 22]。

本文利用海洋浮游硅藻的模式藻种三角褐指藻作为实验材料, 通过测定不同光强和 CO_2 浓度下

收稿日期: 2018-03-21; 修订日期: 2018-06-14

基金项目: 国家自然科学基金(41376156和40976078)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China(41376156 and 40976078)]

作者简介: 曾晓鹏(1985—), 男, 广东揭阳人; 在读博士研究生; 主要从事藻类生理生态学研究。E-mail: lzxpl23@126.com

通信作者: 夏建荣(1968—), 男, 博士, 教授; 主要从事藻类生理生态学研究。E-mail: jrxia@gzhu.edu.cn

三角褐指藻光合生理、碳酸酐酶(Carbonic anhydrase, CA)和Rubisco活性的变化, 探讨光强和CO₂浓度对于三角褐指藻CCM的调节作用。

1 材料与方法

三角褐指藻bac-2 (*Phaeodactylum tricornutum* Bohlin)取自中国科学院海洋研究所。藻细胞被培养在f/2加富的天然海水中, 温度为(20±1)℃, 设置高、低光的光强分别为160和50 μmol photons/(m²·s), 培养液的pH分别控制在7.80±0.05、8.00±0.05和8.20±0.05, 相当于CO₂浓度分别为25 μmol/L (High carbon dioxide concentration, HC)、16 μmol/L (Medium carbon dioxide concentration, MC)和11 μmol/L (Low carbon dioxide concentration, LC)。三角褐指藻的接种起始密度为500 cell/mL, 通过添加饱和CO₂海水以维持培养液中pH。培养至18—20代后用0.45 μm聚酰胺滤纸过滤收集用于实验。

1.1 海水碳酸盐化学

通过滴定法测定海水[温度: (20±1)℃; 盐度: 30‰]的总碱度(Total alkalinity, TA)^[24, 25]。通过TA、pH和硼酸浓度计算培养液中的碳酸碱度^[26], CO₂的浓度通过碳酸碱度计算获得^[27]。

1.2 生长测定

用血球计数板在显微镜下对藻细胞进行计数。比生长速率(Specific growth rate, SGR)通过以下公式计算: $\mu = (\ln X_2 - \ln X_1) / (T_2 - T_1)$, 其中, X_1 和 X_2 分别代表三角褐指藻在 T_1 和 T_2 时的细胞密度。

1.3 光合作用测定

采用Clark型氧电极(YSI 5300A, YSI, USA)在400 μmol photons/(m²·s)的光强下测定藻细胞的净光合放氧速率。用恒温循环水浴连接反应槽, 使反应槽中的温度维持在(20±0.1)℃, 测定过程中三角褐指藻的细胞密度约为6.0×10⁶ cell/mL。

1.4 可溶性蛋白含量测定

用考马斯亮蓝G-250染料结合法测定可溶性蛋白(Soluble protein, SP)含量^[28]。将培养样品在4℃, 12000×g的条件下离心3min收集藻细胞。在收集的藻细胞中加入5 mL的蒸馏水, 然后用超声波细胞破碎仪破碎藻细胞, 并在5000 r/min下离心10min。取1 mL上清液, 再加入5 mL考马斯亮蓝G-250溶液, 用紫外可见分光光度计(UV-1800, 岛津, 日本)测定其在595 nm处的吸光度, 再用标准曲线计算SP含量。用牛血清蛋白作为标准。

1.5 叶绿素含量测定

通过离心(12000×g, 5min)收集藻细胞, 弃上清

液, 加入5 mL 90%的丙酮, 然后在4℃的暗环境中静置12h。提取液在20℃, 5000 r/min的条件下离心10min后, 取上清液, 于紫外可见分光光度计(UV-1800, 岛津, 日本)上测定各波长下的吸光度。根据以下公式计算藻细胞的Chl. a, c含量^[29]:

$$\text{Chl. a } (\mu\text{g/mL}) = 11.47 \times A_{664} - 0.40 \times A_{630}$$

$$\text{Chl. c } (\mu\text{g/mL}) = 24.36 \times A_{630} - 3.73 \times A_{664}$$

式中, A_{630} 和 A_{664} 分别代表在波长630和664 nm下的吸光度。

1.6 碳酸酐酶活性测定

CA活性用调整后的电量法进行测定^[30]。将纯水置于4℃恒温循环水浴中, 通入高纯度CO₂气体约60min, 制取CO₂饱和水。将反应槽连接在恒温水浴循环器上, 使反应槽中的温度维持在4℃。取5 mL含藻细胞(6.0×10⁶ cell/mL)的巴比妥溶液(20 mmol/L, pH_{nbs} 8.3)置于反应槽中, 然后加入4 mL的CO₂饱和水(4℃)测定pH_{nbs} 8.3降至pH_{nbs} 7.3所需的时间。CA活性通过以下公式测定: Units CA=10×(T₀/T-1), 其中, T₀和T分别表示不存在和存在酶的情况下pH从8.3下降到7.3所需的时间。

1.7 Rubisco活性测定

Rubisco活性测定参照Helbling等^[31]的方法。离心收集藻细胞后, 将酶粗提取液加入到离心管中, 摇匀后将细胞置于4℃的冷水浴中用超声波进行破碎, 然后在12000×g, 4℃下离心15min, 取上清液。酶粗提的缓冲溶液(pH_{nbs} 8.00)包含50.00 mmol/L Tris-HCl、20.00 mmol/L MgCl₂、0.20 mmol/L EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)和5.00 mmol/L Glutathione。Rubisco活性测定混合溶液(pH_{nbs} 8.00)中包含0.20 mmol/L还原性辅酶 I (Nicotinamide adenine dinucleotide, NADH)、3.00 mmol/L ATP (Adenosine triphosphate, ATP)、5.00 mmol/L磷酸肌酸(Phosphocreatine, CP)、25.00 mmol/L碳酸氢钠(Sodium Bicarbonate, NaHCO₃)、22.00 units磷酸肌酸激酶(Creatine phosphokinase, CPK)、18.00 units 3-磷酸甘油磷酸激酶(3-Phosphoglyceric phosphokinase)和9.00 units甘油醛-3-磷酸脱氢酶(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)。将酶粗提取液加入到Rubisco测定的混合溶液中, 然后用紫外可见分光光度计(UV-1800, 岛津, 日本)在20℃下测定NADH在340 nm下吸光度的变化。藻细胞Rubisco活性以mAbs 340/mg protein·s表示。

1.8 数据分析

应用软件Excel和Origin 8.51进行数据处理与分析, 用单因素方差分析(One-way ANOVA)和Student's *t*-test分析不同实验处理间的差异性。直方图

上不同字母表示在同一光强下不同浓度 CO_2 处理之间的显著差异, 以 $P<0.05$ 为差异显著水平。数值表示为平均值 $\pm$ SD, $n=3$ 。

2 结果

2.1 生长

如图1所示, 在低光强下, 不同的 CO_2 浓度下培养的三角褐指藻比生长速率并没有存在显著的差异($P>0.05$); 而在高光强下, HC条件下培养的三角褐指藻比生长速率比MC和LC条件下培养的分别增加了2.20% ($P<0.05$)和3.2% ($P>0.05$)。

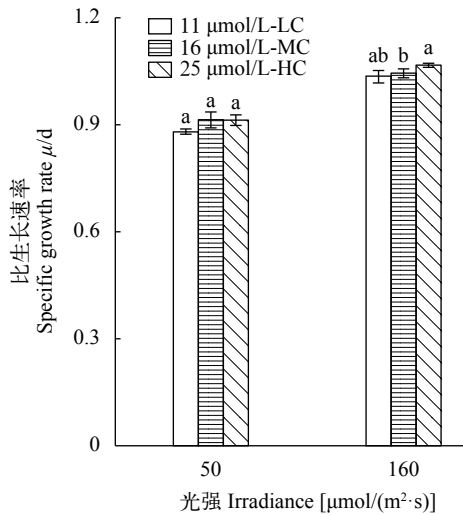


图1 不同光强和 CO_2 浓度对三角褐指藻比生长速率的影响

Fig. 1 Effect of light intensity and CO_2 concentration on specific growth rate of *Phaeodactylum tricornutum*

2.2 净光合速率

在低光强下, 不同浓度 CO_2 下培养的三角褐指藻的净光合速率并无显著差异($P>0.05$) (图2)。而在高光强下培养的三角褐指藻的净光合速率随着 CO_2 浓度的增加而显著升高($P<0.05$), 在HC下培养的三角褐指藻的净光合速率分别是在MC和LC下培养的1.37 ($P>0.05$)和1.78倍($P<0.05$) (图2)。

2.3 叶绿素含量

在低光强下, 不同浓度 CO_2 下培养的三角褐指藻Chl. *a*和Chl. *c*含量并无显著差异($P>0.05$) (图3)。在高光强下, LC下培养的Chl. *a*含量分别是MC和HC下培养的1.38 ($P>0.05$)和2.17倍($P<0.05$); LC下培养的Chl. *c*含量分别是在MC和HC下培养的1.20 ($P>0.05$)和2.24倍($P<0.05$) (图3)。

2.4 可溶性蛋白含量

在低光强下, 不同浓度 CO_2 下培养的三角褐指藻可溶性蛋白含量并无显著差异($P>0.05$) (图4)。

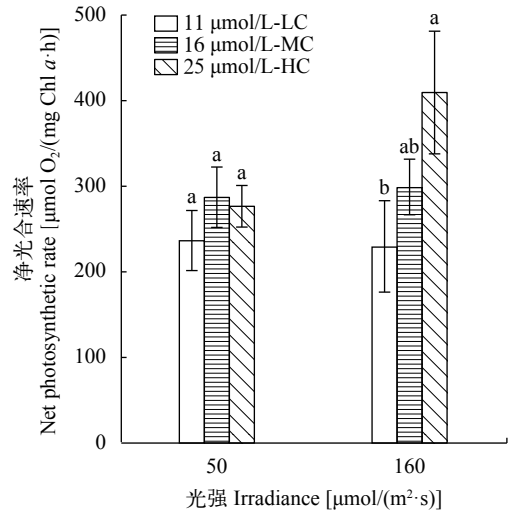


图2 不同光强和 CO_2 浓度对三角褐指藻净光合速率的影响

Fig. 2 Effect of light intensity and CO_2 concentration on net photosynthetic rate of *Phaeodactylum tricornutum*

而在高光强下, MC和HC下培养的可溶性蛋白含量比在LC下培养的分别下降了20.0% ($P<0.05$)和28.8% ($P<0.05$) (图4)。

2.5 碳酸酐酶活性

如图5所示, 无论在高光强或低光强下, 三角褐指藻的胞外碳酸酐酶(eCA)活性均随 CO_2 浓度升高而降低。在低光强下, MC和HC下培养的细胞其eCA活性分别是LC下培养的59.09% ($P<0.05$)和22.73% ($P<0.05$)。在高光强下, MC和HC下培养的eCA活性分别是LC下培养的62.71% ($P<0.05$)和39.98% ($P<0.05$) (图5)。

2.6 Rubisco活性

如图6所示, 在低光强下, Rubisco活性随 CO_2 浓度增加而升高, 其均值分别为0.52、0.91和 1.27×10^{-3} mAbs/ $\mu\text{g}(\text{SP}) \cdot \text{s}$, 其中在HC下培养的Rubisco活性分别是LC和MC下培养的2.42 ($P<0.05$)和1.39倍($P<0.05$)。在高光强下Rubisco活性随 CO_2 浓度增加而升高, 其均值分别为0.89、1.74和 6.0×10^{-3} mAbs/ $\mu\text{g}(\text{SP}) \cdot \text{s}$, 其中HC下培养的Rubisco活性分别是LC和MC下培养的6.72 ($P<0.05$)和3.45倍($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 生长与光合作用

光和 CO_2 浓度是重要的环境因子, 对于藻类的光合作用和生长有重要的影响。早期的研究表明, 高浓度的 CO_2 和光强的增加将有利于促进藻的生长^[13, 16, 32]。本研究结果表明, 在低光强下, CO_2 浓度变化对三角褐指藻的净光合速率和生长并无显著影响, 而在高光强下, CO_2 浓度的增加能够提高净光

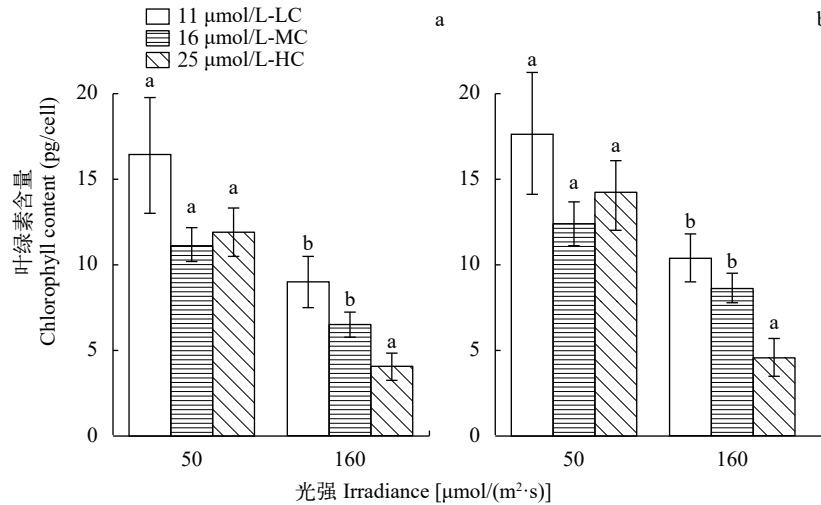


图3 不同光强和CO₂浓度对三角褐指藻Chl. a (a) 和Chl. c (b)含量的影响

Fig. 3 Effect of light intensity and CO₂ concentration on the contents of Chl. a (a) and Chl. c (b) of *Phaeodactylum tricornutum*

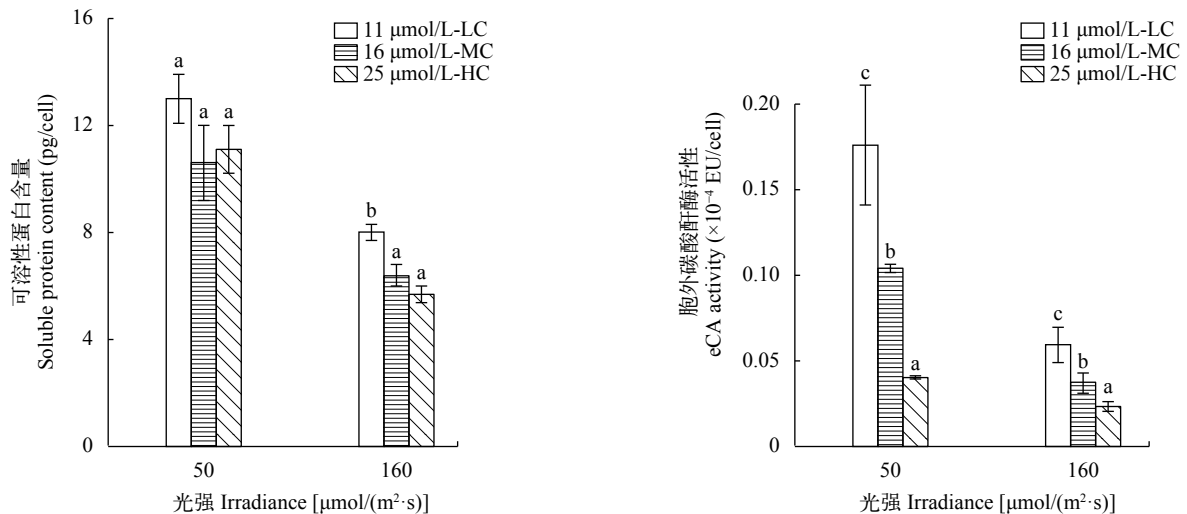


图4 不同光强和CO₂浓度对三角褐指藻可溶性蛋白含量的影响

Fig. 4 Effect of light intensity and CO₂ concentration on soluble protein content of *Phaeodactylum tricornutum*

合速率和促进三角褐指藻的生长。CO₂浓度升高能够促进藻细胞生长, 往往与藻细胞在高浓度CO₂下减少了用于转运HCO₃⁻的能量输出并将这部分能量用于促进生长有关^[33]。在低光条件下, 藻细胞获取光能的量减少, 对无机碳(Inorganic carbon, Ci)的利用能力受到限制^[21, 34], 使得藻细胞的光合作用达到饱和状态, 削弱了CO₂浓度升高对净光合速率和生长的影响。因此, 在低光下, CO₂浓度的变化对三角褐指藻的净光合速率和生长并无显著影响。而在高光和高浓度CO₂条件下, 藻细胞能够获取更加充足的光能和碳源, 有利于提高净光合速率。此外, 酸化条件下的藻细胞CCM的下调减少了能量消耗, 并将这部分能量用于藻细胞的生长^[17, 35]。

Sinutok等^[36]的研究结果显示, 在光强250 $\mu\text{mol}/$

图5 不同光强和CO₂浓度对三角褐指藻eCA活性的影响

Fig. 5 Effect of light intensity and CO₂ concentration on eCA activity of *Phaeodactylum tricornutum*

($\text{m}^2 \cdot \text{s}$)和海洋酸化条件下*Halimeda macroloba*和*Halimeda cylindracea*的叶绿素含量明显下降, 这与我们的结果是相似的。在低光强下, 藻细胞通过增加叶绿素含量来提高光的捕获能力, 为CCM的运行提供更充足的能量^[16]; 而在高光下, 藻细胞通过减少色素含量以达到光保护的目的^[37]。此外, 在酸化条件下CCMs活性被削弱, 减少了能量的消耗, 促使藻细胞通过减少叶绿素含量来避免过度的光能吸收以达到光保护的目的^[34]。叶绿素和SP的合成需要大量的N, 在低光下, ATP的合成减少, 导致藻细胞对N的同化能力受到限制并影响叶绿素和SP的合成, 从而削弱CO₂浓度对叶绿素和SP含量的影响^[38]。而在高光强下, CO₂浓度的升高导致三角褐指藻SP的含量减少, 这是由于在酸化条件下, 更多的

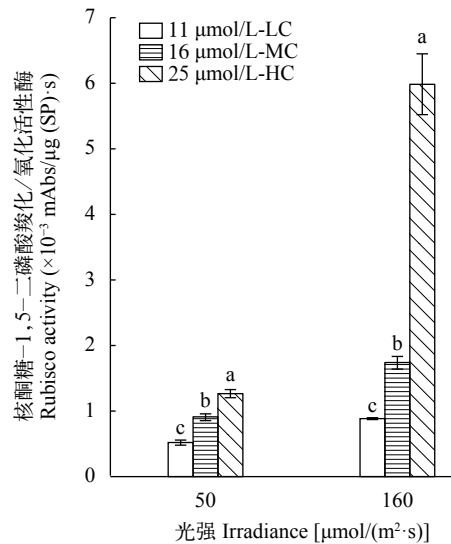


图6 不同光强和 CO_2 浓度对三角褐指藻Rubisco活性的影响

Fig. 6 Effect of light intensity and CO_2 concentration on Rubisco activity of *Phaeodactylum tricornutum*

N被用于藻细胞生长过程中的氮代谢和结构同化^[39,40]。

3.2 酶活性

CA和Rubisco是硅藻CCMs和固碳的重要组成部分, CA通过催化 CO_2 和 HCO_3^- 相互转化的可逆反应以调节细胞内的 CO_2 浓度, 而Rubisco是催化 CO_2 进入生物圈的关键酶, 两者对于藻的光合固碳效率有着极为重要的影响。本研究结果表明在高、低光强下, CA活性均值随着 Ci 浓度的升高而降低, 这与Martin等^[41,42]的研究结果是相一致的。 CO_2 浓度的升高使得通过自由扩散进入藻细胞内部的 CO_2 含量增加, 削弱了藻细胞对于eCA的依赖, 导致eCA活性降低。高光强对Rubisco活性是有促进作用的^[43], 这是由于一方面, 光照能够增加Rubisco的表达量^[44]; 另一方面, 光强的增加有利于生成更充足的ATP用于Rubisco的活化^[45], 从而提高Rubisco活性。Wu等^[46]的研究结果显示Rubisco活性随着 CO_2 浓度的升高而增强, 这与我们的结果是相一致的。在酸化条件下, 藻细胞CCMs下调, 节省的能量能够用于Rubisco的活化, 提高Rubisco的活性^[17,35,45]。此外, 增加 CO_2 的浓度将提高细胞内 CO_2/O_2 值和促进Rubisco的羧化作用, 最终使藻细胞的光合效率得到增强^[47]。而在低 CO_2 浓度下, 卡尔文循环相关酶(包括Rubisco)活性的降低将导致生长所需底物和能量的缺乏, 最终影响藻细胞的生长^[46]。在三角褐指藻光合作用过程中, 充足的光能有助于提高CCM的效率, CO_2 浓度的增加也有利于减少CCM的能量消耗, 提高光合固碳效率。因此,

增加光强和提高 CO_2 浓度能够优化硅藻CCM运行过程中的能量分配, 进而提高硅藻的光合固碳效率。

参考文献:

- [1] Field C B, Behrenfeld M J, Randerson J T, *et al.* Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components [J]. *Science*, 1998, **281**(5374): 237—240
- [2] Granum E, Raven J A, Leegood R C. How do marine diatoms fix 10 billion tonnes of inorganic carbon per year [J]? *Canadian Journal of Botany*, 2005, **83**(7): 898—908
- [3] Honjo S, Eglinton T I, Taylor C D, *et al.* Understanding the role of the biological pump in the global carbon cycle: An imperative for ocean science [J]. *Oceanography*, 2014, **27**(3): 10—16
- [4] Badger M R, Price G D. The role of carbonic anhydrase in photosynthesis [J]. *Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology*, 1994, **45**: 369—392
- [5] Badger M R, Andrews T J, Whitney S M, *et al.* The diversity and co-evolution of Rubisco, plastids, pyrenoids and chloroplast-based CCMs in the algae [J]. *Canadian Journal of Botany-revue Canadienne de Botanique*, 1998, **76**(6): 1052—1071
- [6] Whitney S P, Baldet P, Hudson G S, *et al.* Form I Rubiscos from non-green algae are expressed abundantly but not assembled in tobacco chloroplasts [J]. *Plant Journal*, 2001, **26**(5): 535—547
- [7] Burkhardt S, Amoroso G, Riebesell U, *et al.* CO_2 and HCO_3^- uptake in diatoms acclimated to different CO_2 concentrations [J]. *Limnology and Oceanography*, 2001, **46**(6): 1378—1391
- [8] Morel F M M, Cox E H, Kraepiel A M L, *et al.* Acquisition of inorganic carbon by the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* [J]. *Functional Plant Biology*, 2002, **29**(2): 301—308
- [9] IPCC. Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [A]. In: Core Writing Team, Pachauri R K, Meyer L A (Eds.), IPCC, Geneva, Switzerland [C]. 2014, 151
- [10] Sabine C L, Feely R A, Gruber N, *et al.* The oceanic sink for anthropogenic CO_2 [J]. *Science*, 2004, **305**(5682): 367—371
- [11] Meehl G A, Covey C, Taylor K E, *et al.* The WCRP CMIP3 multimodel dataset: a new era in climate change research [J]. *Bulletin of the American Meteorological Society*, 2007, **88**(9): 1383—1394
- [12] Tortell P D, Payne C D, Li Y, *et al.* CO_2 sensitivity of Southern Ocean phytoplankton [J]. *Geophysical Research Letters*, 2008, **35**(4): 228—236
- [13] Reinfelder J R. Carbon concentrating mechanisms in eukaryotic marine phytoplankton [J]. *Annual Review Marine*

- Science*, 2011, **3**(1): 291—315
- [14] Wu Y, Gao K, Riebesell U. CO₂-induced seawater acidification affects physiological performance of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* [J]. *Biogeosciences*, 2010, **7**(9): 2915—2923
- [15] Gao K S, Campbell D A. Photophysiological responses of marine diatoms to elevated CO₂ and decreased pH: a review [J]. *Functional Plant Biology*, 2014, **41**(5): 449—459
- [16] Li Y H, Xu J T, Gao K S. Light-modulated responses of growth and photosynthetic performance to ocean acidification in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum* [J]. *PLoS One*, 2014, **9**: e96173
- [17] Hopkinson B M, Dupont C L, Allen A E, *et al.* Efficiency of the CO₂-concentrating mechanism of diatoms [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, **108**(10): 3830—3837
- [18] Gordillo F J L, Aguilera J, Wiencke C, *et al.* Ocean acidification modulates the response of two Arctic kelps to ultraviolet radiation [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2015, **173**: 41—50
- [19] Giordano M, Beardall J, Raven J A. CO₂ concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental modulation, and evolution [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2005, **56**: 99—131
- [20] Harada H, Nakatsuma D, Ishida M, *et al.* Regulation of the expression of intracellular β -carbonic anhydrase in response to CO₂ and light in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* [J]. *Plant Physiology*, 2005, **139**: 1041—1050
- [21] Ow Y X, Uthricke S, Collier C J. Light levels affect carbon utilisation in tropical seagrass under ocean acidification [J]. *PLoS One*, 2016, **11**(3): e0150352
- [22] Gao K S, Helbling E W, Häder D-P, *et al.* Responses of marine primary producers to interactions between ocean acidification, solar radiation, and warming [J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2012, **470**: 167—189
- [23] Gao K S, Xu J T, Gao G, *et al.* Rising CO₂ and increased light exposure synergistically reduce marine primary productivity [J]. *Nature Climate Change*, 2012, **2**(7): 519—523
- [24] Gran G. Determination of the equivalence point in potentiometric titrations, II [M]. *Analyst*, 1952, 661—671
- [25] Millero F J, Zhang J Z, Lee K, *et al.* Titration alkalinity of seawater [J]. *Marine Chemistry*, 1993, **44**(2-4): 153—165
- [26] Millero F J. Thermodynamics of the carbon dioxide system in the oceans [J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1995, **59**(4): 661—667
- [27] Prieto F J M, Millero F J. The values of pK₁+pK₂ for the dissociation of carbonic acid in seawater [J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2002, **66**(14): 2529—2540
- [28] Kochert G. Protein determination by dye binding. In: Hellebust J A, Craigie J S (Eds.), *Handbook of Phycological Methods: Physiological and Biochemical Methods* [C]., Cambridge, UK: Cambridge University Press. 1978, 92—93
- [29] Jeffrey S W, Humphrey G F. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton [J]. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, 1975, **167**(2): 191—194
- [30] Wilbur K M, Anderson N G. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1948, **176**(1): 147—154
- [31] Helbling E W, Buma A G J, Boelen P, *et al.* Increase in Rubisco activity and gene expression due to elevated temperature partially counteracts ultraviolet radiation-induced photoinhibition in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* [J]. *Limnology and Oceanography*, 2011, **56**(4): 1330—1342
- [32] Wu Y P, Campbell D A, Irwin A J, *et al.* Ocean acidification enhances the growth rate of larger diatoms [J]. *Limnology and Oceanography*, 2014, **59**(3): 1027—1034
- [33] Beardall J, Giordano M. Ecological implications of microalgal and cyanobacterial CO₂ concentrating mechanisms and their regulation [J]. *Functional Plant Biology*, 2002, **29**(2-3): 335—347
- [34] Schwarz A M, Bjork M, Buluda T, *et al.* Photosynthetic utilisation of carbon and light by two tropical seagrass species as measured in situ [J]. *Marine Biology*, 2000, **137**(5-6): 755—761
- [35] Wu Y, Gao K, Riebesell U. CO₂-induced seawater acidification affects physiological performance of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* [J]. *Biogeosciences*, 2010, **7**(9): 2915—2923
- [36] Sinutok S, Hill R, Doblin M A, *et al.* Microenvironmental changes support evidence of photosynthesis and calcification inhibition in Halimeda under ocean acidification and warming [J]. *Coral Reefs*, 2012, **31**(4): 1201—1213
- [37] Gordillo F J L, Figueroa F L, Niell F X. Photon- and carbon-use efficiency in *Ulva rigida* at different CO₂ and N levels [J]. *Planta*, 2003, **218**(3): 315—322
- [38] Trimborna S, Thomsa S, Brenneisa T, *et al.* Two Southern Ocean diatoms are more sensitive to ocean acidification and changes in irradiance than the prymnesiophyte *Phaeocystis Antarctica* [J]. *Physiologia Plantarum*, 2017, **160**: 155—170
- [39] Andria J, Vergara J, Perez-Llorens J L. Biochemical responses and photosynthetic performance of *Gracilaria* sp. (Rhodophyta) from Cádiz, Spain, cultured under different inorganic carbon nitrogen levels [J]. *European Journal of Phycology*, 1999, **34**(4): 497—504
- [40] Chen B B, Zou D H, Ma J H. Interactive effects of elevated CO₂ and nitrogen- phosphorus supply on the physiological properties of *Pyropia haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta) [J]. *Journal Applied Phycology*, 2016,

- 28(2): 1235—1243
- [41] Martin C L, Tortell P D. Bicarbonate transport and extracellular carbonic anhydrase activity in Bering Sea phytoplankton assemblages: Results from isotope disequilibrium experiments [J]. *Limnology and Oceanography*, 2006, **51**(5): 2111—2121
- [42] Swarnalatha G V, Hegde N S, Chauhan V S, *et al.* The effect of carbon dioxide rich environment on carbonic anhydrase activity, growth and metabolite production in indigenous freshwater microalgae [J]. *Algal Research*, 2015, **9**: 151—159
- [43] Machler F, Nosberger J. Regulation of ribulose biphosphate carboxylase activity in intact wheat leaves by light, CO₂, and temperature [J]. *Journal of Experimental Botany*, 1980, **31**(125): 1485—1491
- [44] Fouilland E, Courties C, Ddescolas-Gros C. Size-fractionated phytoplankton carboxylase activities in the Indian sector of the Southern Ocean [J]. *Journal of Plankton Research*, 2000, **22**(6): 1185—1201
- [45] Ihnken S, Eggert A, Beardall J. Exposure times in rapid light curves affect photosynthetic parameters in algae [J]. *Aquatic Botany*, 2010, **93**(3): 185—194
- [46] Wu S C, Huang A Y, Zhang B Y, *et al.* Enzyme activity highlights the importance of the oxidative pentose phosphate pathway in lipid accumulation and growth of *Phaeodactylum tricornutum* under CO₂ concentration [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, **8**(1): 1—11
- [47] Raven J A. Physiology of inorganic C acquisition and implication for resource use efficiency by marine phytoplankton: relation to increased CO₂ and temperature [J]. *Plant, Cell & Environment*, 1991, **14**(8): 779—794

LIGHT-MODULATED PHYSIOLOGICAL RESPONSE TO OCEAN ACIDIFICATION IN *PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM*

ZENG Xiao-Peng, XU Jin-Tao, DENG Zi-Quan, FANG Yi-Lin, HE Ming-Hua and XIA Jian-Rong

(School of Environmental Science and Engineering, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: There is increasing evidence that different light intensities or ocean acidification (OA) induced by elevated atmospheric CO₂ concentration can affect the photosynthetic capacity of marine diatom to different degrees, respectively however, little attention had been paid to their interaction on diatom. In this study, the growth rate, net photosynthetic rate (P_n), biochemical composition, extracellular carbonic anhydrase (eCA) activity, and Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) activity were investigated when *Phaeodactylum tricornutum* was grown under different light intensities and CO₂ concentrations. The results showed that the specific growth rates and P_n in *P. tricornutum* were not significantly affected by CO₂ concentration under low light intensity (LL), whereas in presence of the high light intensity (HL), elevated CO₂ concentration was beneficial to promote the increase of the rate of P_n . The eCA activity, chlorophyll content, and soluble protein content decreased with increase of CO₂ concentration, regardless of the high or low light. Under LL, Rubisco activity of HC-grown algae was 2.42 and 1.39 times higher than that of LC- or Medium-CO₂ (MC)-grown ones. However, Rubisco activity of HC-grown algae was 6.72 and 3.45 times greater than that of LC- or MC-grown ones under high light. These results indicate that the algae can adapt to changes of light intensity and CO₂ concentrations in the environment by adjusting the allocation of energy during the operation of the CO₂-concentrating mechanism and photosynthesis.

Key words: Light intensity; Ocean acidification; *Phaeodactylum tricornutum*; Carbonic anhydrase; Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase