

海水酸化和 Cu^{2+} 暴露对虫黄藻 *Cladocodium goreau* 营养同化和能量分配的影响

唐 佳^{1,3}, 蔡文启², 闫慧聪², 赵建民¹, 周 智²

(1. 中国科学院烟台海岸带研究所 牟平海岸带环境综合试验站, 山东 烟台 264003; 2. 海南大学海洋学院, 海南 海口 570228; 3. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 近年来, 全球气候变化和人类活动导致的环境胁迫加剧了珊瑚礁白化事件的发生; 其中, 海水酸化和 Cu^{2+} 污染已成为部分礁区面临的主要胁迫因子。本研究设置 2 个 pH 水平 (pH 8.1 和 pH 7.6) 和 2 个 Cu^{2+} 水平 ($4.25 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $16.47 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 的暴露实验, 以探讨海水酸化和 Cu^{2+} 污染短期暴露对虫黄藻 *Cladocodium goreau* 营养同化、能量消耗和能量分配的影响。结果发现, 短期海水酸化暴露能够增加虫黄藻的营养同化(糖类和蛋白质含量增加), 同时显著减少了虫黄藻的能量消耗, 进而增加了虫黄藻细胞内的能量分配比例; 然而, 单独 Cu^{2+} 暴露显著增加了虫黄藻的能量消耗, 进而降低了虫黄藻细胞内的能量分配比例; 此外, 与单独 Cu^{2+} 暴露相比, 海水酸化和 Cu^{2+} 复合暴露促进了虫黄藻的营养同化和能量分配。综上, 本研究表明, 礁区海水酸化和 Cu^{2+} 污染能够对虫黄藻的营养代谢和能量分配带来负面影响, 长期持续暴露可能会对其生长和繁殖构成潜在威胁。

关键词: 虫黄藻; 海水酸化; 铜污染; 营养同化; 能量分配

中图分类号: X55, X173 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2022)04-0098-08

DOI: 10.11759/hyxx20210425001

虫黄藻是一类黄褐色的单细胞甲藻, 主要分布于亚热带和热带海域, 是珊瑚礁生态系统中最主要的初级生产者^[1]。按照染色体数目、营养期和移动期细胞大小以及叶绿体的大小、数目和排列等方面的差异, 研究人员将虫黄藻划分为 9 个系群 (Clade A-I)^[2], 目前这些系群被正式定为属^[3]。虫黄藻可在珊瑚礁区营浮游生活, 也可与造礁石珊瑚、海葵和砗磲等礁栖生物营共生生活。其中, 与造礁石珊瑚共生的虫黄藻主要来自 *Symbiodinium* (Clade A)、*Breviolum* (Clade B)、*Cladocodium* (Clade C)、*Durusdinium* (Clade D) 和 *Fugacium* (Clade F) 5 个属^[3]。在造礁石珊瑚与虫黄藻形成的共生联合体中, 共生虫黄藻可为造礁石珊瑚输送光合作用衍生物(糖类、脂质和氨基酸), 该过程可满足珊瑚宿主 95% 以上的能量需求^[4-5]。作为交换, 造礁石珊瑚也可为共生虫黄藻提供二氧化碳 (CO_2) 和其他无机氮磷等营养物质^[6-7]。此外, 在造礁石珊瑚成礁过程中, 虫黄藻具有促进其钙化的重要作用^[1]。

近年来, 造礁石珊瑚的生存面临着全球气候变化和人类活动的双重胁迫, 导致全球范围内 33%~50% 的珊瑚礁生态系统濒临退化^[8]。根据联合国政

府间气候变化专门委员会 (IPCC) 的预测, 2100 年海水 pH 预计将下降至 7.6 左右^[9]。研究发现, 许多珊瑚礁区海水 pH 在短时间内可发生较大幅度的变化, 从而影响到局部海域的文石饱和度; 例如, 大堡礁南部的伊丽特女士岛海域, 其文石饱和度变化范围为 1.1~6.5, 文石饱和度的下降将严重影响到礁区生物的钙化过程^[10]。此外, 调查表明, 部分珊瑚礁礁区 Cu^{2+} 浓度已严重超过了我国《海水水质标准 (GB 3097-1997)》中第 I 类海水水质标准的阈值 ($5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)^[11]; 诸如香港东部海水中 Cu^{2+} 平均浓度达到 $21.4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[12], 百慕大珊瑚礁区附近的 Cu^{2+} 浓度亦可达 $18.4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[13]。尽管铜是生物所必须的元素, 但高浓度 Cu^{2+} 会对生物体产生毒性^[14]。由此可见, 部分珊瑚礁区同时面临着海水酸化和 Cu^{2+} 污染的双重威胁。

收稿日期: 2021-04-25; 修回日期: 2021-11-05

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFC1406503)

[Foundation: National Key R&D Program of China, No. 2018YFC1406500]

作者简介: 唐佳 (1996—), 女, 甘肃天水人, 硕士研究生, 主要从事海洋酸化的生态效应研究, E-mail: tangjz3@163.com; 赵建民 (1978—), 通信作者, 研究员, E-mail: jmzhao@yic.ac.cn; 周智 (1983—), 通信作者, 研究员, E-mail: zhouzhi@hainanu.edu.cn

目前, 较少的研究关注虫黄藻对海水酸化和 Cu^{2+} 暴露的生理响应。已有研究表明, 海水酸化能够影响虫黄藻的生长^[15]、多样性^[16]、光合作用^[15, 17-19]、脂肪酸含量^[17]和代谢物组成^[20]。 Cu^{2+} 暴露也可以对虫黄藻的生长和光合作用产生负面影响^[21-22]。最新的研究表明, 珊瑚能量获取能力的受限能够改变共生体的营养循环过程, 从而导致珊瑚和虫黄藻间共生关系的破裂^[23], 提示营养物质循环和能量分配对于虫黄藻生长和繁殖的重要性。然而, 目前关注海水酸化和 Cu^{2+} 暴露对虫黄藻营养同化和细胞内能量分配的研究尚不多见。

虫黄藻 *Cladocopium goreau* 属于 Clade C, 该属虫黄藻广泛分布于太平洋的热带和亚热带浅海海域^[24], 也是我国南海造礁石珊瑚中共生虫黄藻的主要属^[25-26]。本研究以虫黄藻 *C. goreau* 为研究对象, 开展了为期 7 d 的海水酸化和 Cu^{2+} 暴露实验, 以评估酸化和 Cu^{2+} 单独与复合暴露对虫黄藻碳氮稳定同位素含量、能量储备物质含量、能量消耗和细胞内能量分配的影响, 研究结果有助于理解环境变化对虫黄藻的胁迫机制, 同时也可为珊瑚礁生态系统的保护和恢复提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验藻种和暴露实验

实验所用虫黄藻(*C. goreau*)由厦门大学海洋与地球学院的林森杰教授课题组提供。虫黄藻培养于 L1 培养基中^[27], 培养光强为 $110 \pm 10 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 温度为 $26 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 光周期为 12L : 12D。

本研究共设置 2 个 pH 水平(pH 8.1 和 pH 7.6)和 2 个 Cu^{2+} 水平($4.25 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $16.47 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)。其中, pH 8.1 代表目前采样海域的实际 pH 值, pH 7.6 模拟 IPCC 预测的 2100 年海水 pH 值^[9], 通过 CO_2 气体流量控制系统调节水体 pH 至 7.6; Cu^{2+} 的暴露浓度参考了采样海域和其他珊瑚礁区的环境 Cu^{2+} 浓度。每个处理组设置 6 个生物学重复, 分别进行为期 7 d 的暴露实验。暴露实验中, 初始藻密度均为 6.68×10^4 个/mL, 培养体积为 250 mL, 光强为 $110 \pm 10 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 温度为 $26 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 光周期为 12L : 12D。

实验起始前, 利用电感耦合等离子体质谱仪 (Agilent, 7800 ICP-MS, 美国)测定了各处理组培养基中的实际 Cu^{2+} 浓度; 实验期间, 每日采用标准液校准的 pH 计(Mettler toledo, 瑞士)测定水体 pH, 同

时利用盐度计(上海精密, 中国)和温度计(生工生物工程股份有限公司, 中国)分别测定水体的盐度和温度, 相关海水化学参数见表 1。

表 1 暴露实验期间相关海水化学参数

Tab. 1 Relevant chemical parameters of seawater during the exposure experiment

处理组	pH	Cu^{2+} 实测浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	盐度	温度/ $^\circ\text{C}$
对照组	8.16 ± 0.02	4.25 ± 0.07	30.2 ± 0.3	25.9 ± 0.5
pH 处理组	7.58 ± 0.03	4.25 ± 0.07	30.1 ± 0.1	26.6 ± 0.5
Cu 处理组	8.13 ± 0.03	16.47 ± 0.67	30.1 ± 0.2	26.5 ± 0.4
复合处理组	7.57 ± 0.04	16.47 ± 0.67	30.3 ± 0.2	26.8 ± 0.5

1.2 虫黄藻 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 含量的测定

虫黄藻经暴露 7 d 后, 分别从各处理组采集 5 mL 藻液, 过滤至 Whatman 公司 GF/F 滤膜(450°C 预烧 4 h)上; 50°C 干燥 24 h, 经 1 mol/L 盐酸酸化后, 采用稳定同位素质谱仪(Sercon HS20-22, 英国)测定虫黄藻中的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$, 具体测定方法参照 Sturaro 等^[28]。在分析过程中, 碳、氮同位素标准样品分别为美国白垩纪皮狄组织层位中的拟箭石化石和空气中的氮气。 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 的计算参照以下公式^[29]:

$$\delta X(\%) = [R_{\text{sample}}/R_{\text{standard}} - 1] \times 1000,$$

式中, X 指 ^{13}C 或 ^{15}N , R 表示 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 的丰度比值或 $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 的丰度比值。

1.3 虫黄藻能量储备的测定

虫黄藻经处理 7 d 后, 分别从各处理组收集 50 mL 藻液, $5000 \times g$ 4°C 离心收集藻细胞; 经磷酸盐缓冲液 (PBS, 0.14 mol/L NaCl、8 mol/L Na_2HPO_4 、1.5 mmol/L KH_2PO_4 和 3 mmol/L KCl; pH 7.4)洗涤 3 次, 采用 1 mL PBS 重悬藻细胞沉淀, 分别加入适量氧化锆破碎珠 (0.5 mm, Biospec, 美国), 并借助生物均质仪(杭州奥盛仪器有限公司, Bioprep-24, 中国)完全破碎虫黄藻。藻细胞破碎后, $12000 \times g$ 4°C 离心 10 min, 收集上清液用于虫黄藻能量储备物质含量(糖类、脂质和蛋白质)的测定。

糖类含量的测定参考 Aderemi 等^[30]描述的方法, 以葡萄糖为标准品; 脂质含量的测定参照 Bligh 等^[31]的方法, 并以三棕榈酸甘油三酯作为标准品; 同时, 采用 BCA 法蛋白定量试剂盒(生工生物工程股份有限公司, 中国)测定上清液的蛋白质含量, 具体操作步骤和计算参考说明书。根据经验常数($17500 \text{ mJ}/\text{mg}$

糖类、35 900 mJ/mg 脂质和 24 000 mJ/mg 蛋白质), 将虫黄藻储能物质的含量转换为其能量值。同时, 以这 3 种储能物质的能量值加和作为虫黄藻中的能量储备^[30]。

1.4 虫黄藻能量消耗和分配的测定

将上述获得的虫黄藻上清液, 用于线粒体电子传递链活性的测定。根据 Kenner 等^[32]描述的方法, 测定虫黄藻的线粒体电子传递链活性。测定方法简述如下: 50 μL 待测样品中加入 100 μL BSS 溶液 (100 mmol/L Tris-HCl, 0.2% Triton X-100)和 50 μL 底物溶液(1.17 mmol/L NADH 和 250 μmol/L NADPH), 随后添加 100 μL 对碘硝基四唑紫(8 mmol/L)起始反应。波长 490 nm 处测定反应液 10 min 内吸光值的变化, 并根据电子转移系统每消耗 1 μmol/L 氧气形成 2 μmol/L 碘硝基四唑紫甲磺计算耗氧量。最终将耗氧量转化为能量(480 kJ/mol O₂), 即为能量消耗。能量储备和能量消耗的比值作为细胞内能量分配值^[33]。

1.5 统计分析

所有生理指标均以平均值±标准差表示, 每个指标均测定 6 个重复。使用 SPSS(IBM, Statistics 20)

软件进行统计分析, 利用 Shapiro-Wilk 和 Bartlett's 分别检验数据的正态性和方差齐性。符合正态分布和方差齐性的数据进行双因素方差分析(Two-way ANOVA)和 Tukey 检验。显著性差异水平设定为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 海水酸化和 Cu²⁺暴露对虫黄藻 δ¹³C 和 δ¹⁵N 的影响

海水酸化和 Cu²⁺暴露 7 d 后, 采用稳定同位素质谱仪测定了虫黄藻内的 δ¹³C 和 δ¹⁵N。其中, 双因素方差结果分析表明, 海水酸化和 Cu²⁺复合暴露对 δ¹³C 存在交互作用, 而对 δ¹⁵N 不存在显著($P > 0.05$)交互作用(表 2)。pH 处理组(-33.94%±0.21%)和复合处理组(-34.68%±0.21%)中的虫黄藻 δ¹³C 值显著($P < 0.05$)低于对照组(-14.02%±0.07%)和 Cu 处理组(-14.09%±0.08%), 且后两者间无显著差异(图 1a)。对于虫黄藻内的 δ¹⁵N 值, pH 处理组(-7.14%±0.51%)和 Cu 处理组(-7.09%±1.04%)均与对照组(-8.58%±0.72%)无显著差异($P > 0.05$), 而复合处理组(-6.80%±1.24%)显著($P < 0.05$)高于对照组(图 1b)。

表 2 双因素方差分析: 海水酸化和 Cu²⁺暴露对虫黄藻生理指标的影响

Tab. 2 Two-way analysis of variance: effects of seawater acidification and Cu²⁺ exposure on the physiological indices of *Cladocodium goreaui*

	因素		
	pH	Cu ²⁺	pH×Cu ²⁺
δ ¹³ C	F (1, 16)=33.683 P<0.001	F (1, 16)=83 525.846 P<0.001	F (1, 16)=22.291 P<0.001
δ ¹⁵ N	F (1, 16)=4.916 P=0.041	F (1, 16)=4.412 P=0.052	F (1, 16)=1.924 P=0.184
糖类	F(1, 16)=65.121 P<0.000 1	F(1, 16)=1.619 P=0.221	F(1, 16)=1.051 P=0.320
脂质	F (1, 16)=0.271 P=0.610	F (1, 16)=10.119 P=0.006	F (1, 16)=17.175 P=0.001
蛋白质	F (1, 16)=255.219 P<0.001	F (1, 16)=30.911 P<0.001	F (1, 16)=7.385 P=0.015
能量储备	F (1, 16)=58.677 P<0.001	F (1, 16)=0.003 P=0.956	F (1, 16)=21.116 P<0.001
能量消耗	F (1, 16)=337.103 P<0.001	F (1, 16)=67.766 P<0.001	F (1, 16)=0.493 P=0.493
能量分配	F (1, 16)=544.241 P<0.001	F (1, 16)=67.247 P<0.001	F (1, 16)=20.369 P<0.001

注: 显著性差异加粗表示, $P < 0.05$

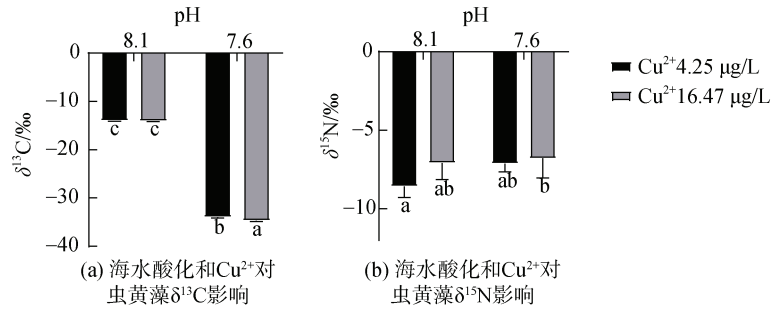


图 1 海水酸化和 Cu^{2+} 对虫黄藻 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 的影响。数据由平均值 \pm 标准差表示($n = 6$)

Fig. 1 Effects of seawater acidification and Cu^{2+} exposure on $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of *Cladocopium goreau*. Data points represent means, and error bars represent standard deviations ($n = 6$)

注: 不同字母表示在相同 pH 条件下不同 Cu^{2+} 浓度处理之间存在显著差异($P < 0.05$)

2.2 海水酸化和 Cu^{2+} 暴露对虫黄藻糖类、脂质和蛋白质含量的影响

海水酸化和 Cu^{2+} 暴露 7 d 后, 分别测定了虫黄藻内的糖类、脂质和蛋白质含量变化。分析可见, 海水酸化和 Cu^{2+} 复合暴露对脂质和蛋白质含量存在显著 ($P < 0.05$) 交互作用, 而对糖类不存在显著 ($P < 0.05$) 交互作用(表 2)。pH 处理组 ($0.05 \pm 0.01 \text{ mg}/10^6$ 个) 和复合处理组 ($0.06 \pm 0.01 \text{ mg}/10^6$ 个) 中虫黄藻的糖类含量显著 ($P < 0.05$) 高于对照组 ($0.017 \pm 0.01 \text{ mg}/10^6$ 个) 和 Cu

处理组 ($0.02 \pm 0.00 \text{ mg}/10^6$ 个)(图 2a)。pH 处理组 ($0.13 \pm 0.01 \text{ mg}/10^6$ 个)、Cu 处理组 ($0.11 \pm 0.01 \text{ mg}/10^6$ 个) 和复合处理组 ($0.15 \pm 0.04 \text{ mg}/10^6$ 个) 中虫黄藻的脂质含量均显著 ($P < 0.05$) 低于对照组水平 ($0.19 \pm 0.02 \text{ mg}/10^6$ 个)(图 2b)。对于虫黄藻内的蛋白质含量, pH 处理组 ($0.30 \pm 0.03 \text{ mg}/10^6$ 个) 显著 ($P < 0.05$) 高于对照组 ($0.18 \pm 0.01 \text{ mg}/10^6$ 个) 和 Cu 处理组 ($0.20 \pm 0.01 \text{ mg}/10^6$ 个), 而显著 ($P < 0.05$) 低于复合处理组 ($0.38 \pm 0.03 \text{ mg}/10^6$ 个) (图 2c)。

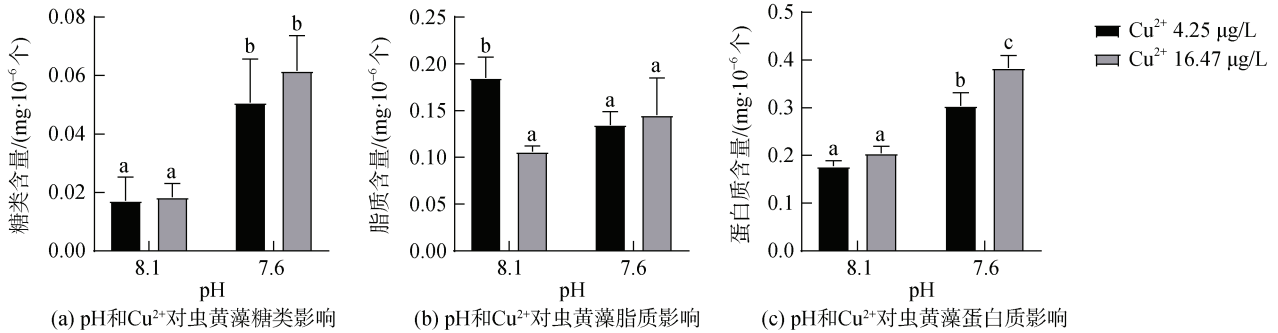


图 2 海水酸化和 Cu^{2+} 对虫黄藻糖类、脂质和蛋白质含量的影响。数据由平均值 \pm 标准差表示($n=6$)

Fig. 2 Effects of seawater acidification and Cu^{2+} exposure on carbohydrate, lipid, and protein content of *Cladocopium goreau*. Data points represent means, and error bars represent standard deviations ($n = 6$)

注: 不同字母表示在相同 pH 条件下不同 Cu^{2+} 浓度处理之间存在显著差异($P < 0.05$)

2.3 海水酸化和 Cu^{2+} 暴露对虫黄藻能量储备、能量消耗和细胞内能量分配的影响

海水酸化和 Cu^{2+} 暴露 7 d 后, 分析了各处理组中虫黄藻内的细胞能量储备、能量消耗以及细胞内能量分配。根据双因素方差分析结果, 海水酸化和 Cu^{2+} 复合暴露对能量储备和细胞内能量分配均存在显著 ($P < 0.05$) 交互作用, 而其对能量消耗不存在显著 ($P < 0.05$) 交互作用(表 2)。各处理组间的能量储备、能量消耗和细胞内能量分配两两比较均存在显著

性差异 ($P < 0.05$)。虫黄藻内的能量储备从高到低依次为复合处理组 ($16\ 018.32 \pm 1\ 872.51 \text{ mJ} \cdot 10^{-6}$ 个)、pH 处理组 ($13\ 520.07 \pm 1\ 083.54 \text{ mJ} \cdot 10^{-6}$ 个)、对照组 ($11\ 873.82 \pm 903.92 \text{ mJ} \cdot 10^{-6}$ 个) 和 Cu 处理组 ($9\ 435.63 \pm 522.33 \text{ mJ} \cdot 10^{-6}$ 个)(图 3a)。对虫黄藻的能量消耗而言, Cu 处理组 ($189.29 \pm 27.88 \text{ mJ} \cdot 10^{-6}$ 个 $\cdot\text{h}^{-1}$) 最高, 对照组 ($123.49 \pm 10.36 \text{ mJ} \cdot 10^{-6}$ 个 $\cdot\text{h}^{-1}$) 次之, 复合处理组 ($76.68 \pm 7.71 \text{ mJ} \cdot 10^{-6}$ 个 $\cdot\text{h}^{-1}$) 和 pH 处理组 ($53.71 \pm 4.48 \text{ mJ} \cdot 10^{-6}$ 个 $\cdot\text{h}^{-1}$) 依次降低(图 3b)。同时, 根据虫黄藻能量储备

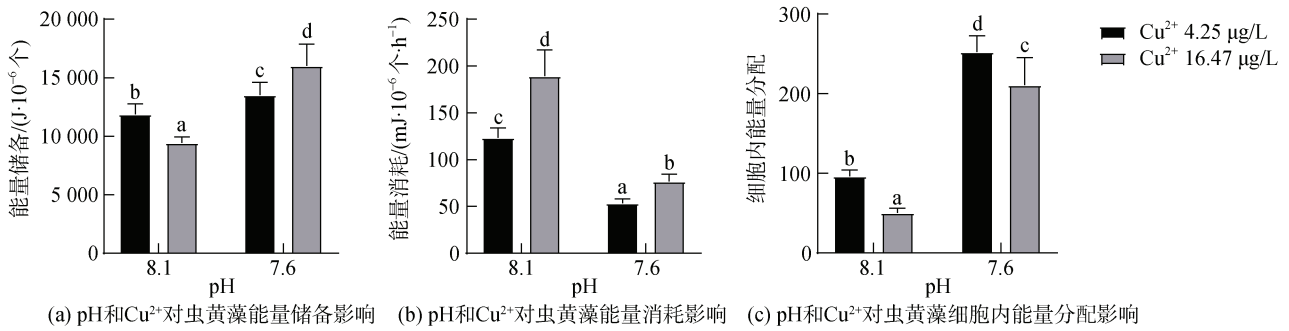


图3 海水酸化和 Cu²⁺对虫黄藻能量储备、能量消耗和细胞内能量分配的影响。数据由平均值±标准差表示(n=6)

Fig. 3 Effects of seawater acidification and Cu²⁺ exposure on energy reserve, energy consumption, and cellular energy allocation of *Cladocopium goreau*. Data points represent means, and error bars represent standard deviations (n = 6)

注: 不同字母表示在相同 pH 条件下不同 Cu²⁺浓度处理之间存在显著差异(P<0.05)

和能量消耗的比值, 计算出细胞内能量分配值, 其从高到低排序为: pH 处理组(252.47±20.45)、复合处理组(210.77±34.58)、对照组(96.44±7.59)和 Cu 处理组(50.46±5.55)(图 3c)。

3 讨论

近年来, 全球范围内的调查均已发现, 部分珊瑚礁区同时存在着海水酸化和 Cu²⁺污染现象, 但其对共生虫黄藻的生理影响研究仍十分有限。本研究探讨了海水酸化和 Cu²⁺暴露对虫黄藻营养同化、能量消耗和能量分配的影响, 本研究结果可为深入了解海水酸化和 Cu²⁺暴露对虫黄藻的胁迫机制提供基础数据, 也可为珊瑚礁生态系统的保护和恢复提供参考依据。

通常而言, 藻类会优先吸收轻同位素(¹²C 和 ¹⁴N)^[34]。因此, δ¹³C 常被用于评估大气 pCO₂ 和海洋初级生产力的变化, 而 δ¹⁵N 则能够反映藻类对硝酸盐等营养物的利用程度^[35]。在已开展的研究中, 珊瑚中共生虫黄藻的 δ¹³C 通常为负值, 而 δ¹⁵N 通常为正值^[36], 而本研究观察到的 δ¹³C 和 δ¹⁵N 值均为负值, 推测可能是虫黄藻在体(珊瑚)和离体(培养基)环境的差异所导致。类似地, OECD 培养基中小球藻的 δ¹⁵N 也为负值^[37]。在本研究中, 单独酸化以及酸化和 Cu²⁺复合暴露均能够导致虫黄藻 δ¹³C 的显著降低。与之相类似, 刘天琪^[38]对东海原甲藻进行不同浓度的 CO₂ 处理, 也观察到高 CO₂ 处理组藻细胞中的 δ¹³C 值下降。自然海水中碳稳定同位素以 ¹²C 和 ¹³C 形式存在, 且 ¹²C 较 ¹³C 更容易被藻类所吸收^[39]。本研究通过充入 CO₂ 气体来实现海水酸化, 该过程增加了水体中 ¹²CO₂ 的浓度, 进而降低了单独酸化以及复合暴露组对 ¹³C 的吸收,

提示未来气候变化背景下水体中 CO₂ 浓度增加能够为虫黄藻含碳化合物的合成提供充足的碳源。此外, 娄亚迪^[40]的研究表明, 新月菱形藻、塔玛亚历山大藻和赤潮异弯藻优先吸收水体中的 ¹⁴N, 而在氮源不足的情况下, 藻类会被迫吸收水体中的 ¹⁵N, 从而导致藻体 δ¹⁵N 值的增加。在本研究中, 复合处理组的 δ¹⁵N 值显著高于对照组, 提示复合暴露能够显著改变虫黄藻的营养吸收作用, 藻体需要从水体中吸收更多的氮源以合成含氮化合物, 这于藻体内较高的蛋白质含量结果也相吻合, 表明虫黄藻可能需要累积更多的蛋白质抵御复合暴露带来的不利影响。

糖类、脂质和蛋白质是生命活动所必须的 3 大营养物质, 虫黄藻中的能量储备对于虫黄藻维持正常的生命活动具有重要作用。在本研究中, 单独酸化以及酸化和 Cu²⁺复合暴露均能够造成虫黄藻的糖类和蛋白质含量显著上升, 且复合暴露比单独酸化暴露更能显著促进蛋白质的累积。类似的现象在其他藻类中也有报道, 如短期海水酸化暴露增加了小球藻细胞中的糖类和蛋白质含量^[41]。虫黄藻中糖类和蛋白质含量的提高, 提示海水酸化能够促进虫黄藻的光合作用, 包括促进光合作用相关酶类的蛋白含量增加以及光合作用产物(糖类)的累积。复合暴露组中虫黄藻的蛋白质含量增加幅度最大, 提示该条件下虫黄藻可能需要累积更多的蛋白质以抵御复合暴露带来的不利影响。此外, 相较于对照组水平, 其余处理组中虫黄藻的脂质累积均显著下降。与本研究类似, Napan 等^[42]观察到高浓度的重金属(包括 Cu²⁺)暴露能够抑制微藻 *Scenedesmus obliquus* 的脂质累积。虫黄藻中脂质含量下降可能是由于环境变化诱导脂类物质转化为能够支持虫黄藻生命活动的其他

成分。总体而言,海水酸化和 Cu^{2+} 单独以及复合暴露均能够扰乱虫黄藻的能量储备物质含量。

环境变化能够扰乱机体分配到基础代谢、生长和生存方面的能量。细胞内能量分配常被用于指示机体应对环境压力时能量状态的变化,是反应生物生理状态的重要指标^[30]。在本研究中,单独酸化暴露以及酸化和 Cu^{2+} 复合暴露均显著增加了虫黄藻的能量储备,且复合暴露组增加幅度最大,而单独 Cu^{2+} 暴露则显著降低了虫黄藻的能量储备。结合储能物质含量可知,单独酸化以及复合暴露通过增加糖类、蛋白质含量促进了虫黄藻中总能量的增加,且复合处理组中蛋白质含量的显著增加促使能量储备显著高于单独酸化组。然而,脂质含量的降低是 Cu^{2+} 暴露导致虫黄藻能量储备减少的主要原因。同时,单独酸化以及复合暴露显著降低了虫黄藻的能量消耗,该过程可能与碳浓缩机制密切相关,即使在 Cu^{2+} 存在的情况下,海水酸化也能够增加自由扩散进入虫黄藻细胞内的 CO_2 含量,从而减少了碳浓缩机制的能量消耗^[43]。此外,复合处理组中虫黄藻的能量消耗显著高于单独酸化处理组,以及 Cu^{2+} 处理组中虫黄藻的能量消耗显著高于对照组,提示藻类需要消耗更多的能量用于抵御 Cu^{2+} 的负面影响。单独酸化以及复合暴露显著降低了藻类能量消耗,从而促进虫黄藻细胞内能量分配显著增加。单独 Cu^{2+} 暴露显著增加了虫黄藻能量消耗,同时降低了能量储备,导致虫黄藻细胞内能量分配显著降低。总之,海水酸化和 Cu^{2+} 单独以及复合暴露均能够扰乱虫黄藻的能量收支平衡状态,进而可能影响到虫黄藻的生长。

4 结论

本文以虫黄藻 *C. goreau* 为研究对象,探讨了海水酸化和 Cu^{2+} 暴露对其营养同化、能量消耗和分配的影响,主要结论如下:单独酸化暴露以及酸化和 Cu^{2+} 复合暴露均能够导致虫黄藻细胞能量分配比例的增加和能量消耗的减少,且复合暴露组虫黄藻能量储备增加。然而,单独 Cu^{2+} 暴露增加了虫黄藻的能量消耗,同时降低了藻细胞的能量分配。本研究提示,海水酸化和 Cu^{2+} 单独暴露以及复合暴露能够扰乱虫黄藻的营养状态和能量分配,可能会对虫黄藻的生长和繁殖构成潜在负面影响。

参考文献:

[1] 徐林通,郑艳坤,郝俊,等. 珊瑚共生虫黄藻研究进

展[J]. 河北渔业, 2018(8): 56-59, 62.

XU Lintong, ZHENG Yankun, HAO Jun, et al. The research progress of symbiosis of zooxanthella in coral[J]. Hebei Fisheries, 2018(8): 56-59, 62.

- [2] LAJEUNESSE T C. Investigating the biodiversity, ecology, and phylogeny of endosymbiotic dinoflagellates in the genus *Symbiodinium* using the ITS region: in search of a “species” level marker[J]. Journal of Phycology, 2001, 37(5): 866-880.
- [3] LAJEUNESSE T C, PARKINSON J E, GABRIELSON P W, et al. Systematic revision of Symbiodiniaceae highlights the antiquity and diversity of coral endosymbionts[J]. Current Biology, 2018, 28(16): 2570-2580.
- [4] BOURNE D G, MORROW K M, WEBSTER N S. Insights into the coral microbiome: underpinning the health and resilience of reef ecosystems[J]. Annual Review of Microbiology, 2016, 70: 317-340.
- [5] GIBBIN E, GAVISH A, KRUEGER T, et al. *Vibrio coralliilyticus* infection triggers a behavioural response and perturbs nutritional exchange and tissue integrity in a symbiotic coral[J]. The ISME Journal, 2019, 13(4): 989-1003.
- [6] WANG J T, DOUGLAS A. Essential amino acid synthesis and nitrogen recycling in an alga-invertebrate symbiosis[J]. Marine Biology, 1999, 135(2): 219-222.
- [7] ROSIC N, KANIEWSKA P, CHAN C K, et al. Early transcriptional changes in the reef-building coral *Acropora aspera* in response to thermal and nutrient stress[J]. BMC genomics, 2014, 15(1): 1-17.
- [8] BABBIN A R, TAMASI T, DUMIT D, et al. Discovery and quantification of anaerobic nitrogen metabolisms among oxygenated tropical Cuban stony corals[J]. The ISME Journal, 2021, 15(4): 1222-1235.
- [9] KEN C, WICKETT M. Oceanography: Anthropogenic carbon and ocean pH[J]. Nature, 2003, 425(6956): 365.
- [10] SHAW E C, MCNEIL B I, TILBROOK B. Impacts of ocean acidification in naturally variable coral reef flat ecosystems[J]. Journal of Geophysical Research: Oceans, 2012, 117: C03038.
- [11] 国家环境保护局. 海水水质标准 GB 3097-1997[S]. 北京: 中国标准出版社, 1997.
State Department of Environmental Conservation. Sea water quality standard GB 3097-1997[S]. Beijing: China Standards Press, 1997.
- [12] KWOK C K, LAM K Y, LEUNG S M, et al. Copper and thermal perturbations on the early life processes of the hard coral *Platygyra acuta*[J]. Coral Reefs, 2016, 35(3): 827-838.
- [13] JONES R. Environmental contamination associated with a marine landfill (“seafill”) beside a coral reef[J]. Marine Pollution Bulletin, 2010, 60(11): 1993-2006.

- [14] FLEMMING C A, TREVORS J T. Copper toxicity and chemistry in the environment: a review[J]. *Water, Air, and Soil Pollution*, 1989, 44(1): 143-158.
- [15] BRADING P, WARNER M E, DAVEY P, et al. Differential effects of ocean acidification on growth and photosynthesis among phylotypes of *Symbiodinium* (Dinophyceae)[J]. *Limnology and Oceanography*, 2011, 56(3): 927-938.
- [16] WEE H B, KURIHARA H, REIMER J D. Reduced Symbiodiniaceae diversity in *Palythoa tuberculosa* at a heavily acidified coral reef[J]. *Coral Reefs*, 2019, 38(2): 311-319.
- [17] HILL L J, PARADAS W C, WILLEMES M J, et al. Acidification-induced cellular changes in *Symbiodinium* isolated from *Mussismilia braziliensis*[J]. *PLoS One*, 2019, 14(8): e0220130.
- [18] BIELMYER G, GROSELL M, BHAGOOI R, et al. Differential effects of copper on three species of scleractinian corals and their algal symbionts (*Symbiodinium* spp.)[J]. *Aquatic Toxicology*, 2010, 97(2): 125-133.
- [19] BEDWELL-IVERS H E, KOCH M S, PEACH K E, et al. The role of in hospite zooxanthellae photophysiology and reef chemistry on elevated $p\text{CO}_2$ effects in two branching Caribbean corals: *Acropora cervicornis* and *Porites divaricata*[J]. *ICES Journal of Marine Science*, 2017, 74(4): 1103-1112.
- [20] JIANG J Y, LU Y D. Metabolite profiling of *Breviolum minutum* in response to acidification[J]. *Aquatic Toxicology*, 2019, 213: 105215.
- [21] GOH B P L, CHOU L M. Effects of the heavy metals copper and zinc on zooxanthellae cells in culture[J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 1997, 44(1): 11-19.
- [22] GHOORA M D, PILLY S S, CHUMUN P K, et al. Short-term effects of heavy metal and temperature stresses on the photophysiology of *Symbiodinium* isolated from the coral *Fungia repanda*[J]. *Ocean Life*, 2018, 2(1): 11-20.
- [23] RÄDECKER N, POGOREUTZ C, GEGNER H M, et al. Heat stress destabilizes symbiotic nutrient cycling in corals[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2021, 118(5): e2022653118.
- [24] SU Y L, ZHANG K D, ZHOU Z, et al. Microplastic exposure represses the growth of endosymbiotic dinoflagellate *Cladocopium goreau* in culture through affecting its apoptosis and metabolism[J]. *Chemosphere*, 2020, 244: 125485.
- [25] GONG S Q, XU L J, YU K F, et al. Differences in Symbiodiniaceae communities and photosynthesis following thermal bleaching of massive corals in the northern part of the South China Sea[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2019, 144: 196-204.
- [26] ZHOU G W, HUANG H. Low genetic diversity of symbiotic dinoflagellates (*Symbiodinium*) in scleractinian corals from tropical reefs in southern Hainan Island, China[J]. *Journal of Systematics and Evolution*, 2011, 49(6): 598-605.
- [27] GUILLARD R R L, HARGRAVES P E. *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte[J]. *Phycologia*, 1993, 32(3): 234-236.
- [28] STURARO N, HSIEH Y E, CHEN Q, et al. Toward a standardised protocol for the stable isotope analysis of scleractinian corals[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2020, 34(8): e8663.
- [29] 刘雨蒙, 章守宇, 周曦杰, 等. 枸杞岛海藻场大型海藻凋落物碳氮稳定同位素分析[J]. *上海海洋大学学报*, 2016, 25(3): 438-444.
- LIU Yumeng, ZHANG Shouyu, ZHOU Xijie, et al. C/N stable isotope analysis of macro algae litters in kelp bed in Gouqi Island[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2016, 25(3): 438-444.
- [30] ADEREMI A O, NOVAIS S C, LEMOS M F, et al. Oxidative stress responses and cellular energy allocation changes in microalgae following exposure to widely used human antibiotics[J]. *Aquatic Toxicology*, 2018, 203: 130-139.
- [31] BLIGH E G, DYER W J. A rapid method of total lipid extraction and purification[J]. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 1959, 37(8): 911-917.
- [32] KENNER R A, AHMED S I. Measurements of electron transport activities in marine phytoplankton[J]. *Marine Biology*, 1975, 33(2): 119-127.
- [33] VERSLYCKE T, GHEKIERE A, JANSSEN C R. Seasonal and spatial patterns in cellular energy allocation in the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) of the Scheldt estuary (The Netherlands)[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2004, 306(2): 245-267.
- [34] 王海霞, 刘瑀, 关春江, 等. 营养条件对微藻碳、氮稳定同位素组成的影响[J]. *中国环境科学*, 2014, 34(3): 727-733.
- WANG Haixia, LIU Yu, GUAN Chunjiang, et al. Effects of nutritional conditions on the stable carbon and nitrogen isotope of microalgae[J]. *China Environmental Science*, 2014, 34(3): 727-733.
- [35] 李铁刚, 熊志方. 海洋硅藻稳定同位素研究进展[J]. *海洋与湖沼*, 2010, 41(4): 645-656.
- LI Tiegang, XIONG Zhifang. A review of diatom stable isotopes in palaeoceanography[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2010, 41(4): 645-656.
- [36] FOX M D, ELLIOTT SMITH E A, SMITH J E, et al. Trophic plasticity in a common reef-building coral: Insights from $\delta^{13}\text{C}$ analysis of essential amino acids[J]. *Functional Ecology*, 2019, 33(11): 2203-2214.

- [37] 刘娜. 基于蛋白组学和同位素分馏对小球藻吸收氮机制的研究[D]. 湘潭: 湘潭大学, 2015.
LIU Na. Mechanisms of ammonium assimilation in *Chlorella vulgaris* based on proteomic and isotope fractionation techniques[D]. Xiangtan: Xiangtan University, 2015.
- [38] 刘天琪. 典型藻华种东海原甲藻碳同化机制研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2018.
LIU Tianqi. Studies on carbon assimilation mechanism of a typical algal bloom species *Prorocentrum donghaiense*[D]. Xiamen: Xiamen University, 2018.
- [39] LIU Y, LI N, LOU Y D, et al. Effect of water accommodated fractions of fuel oil on fixed carbon and nitrogen by microalgae: Implication by stable isotope analysis[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020, 195: 110488.
- [40] 娄亚迪. 海洋赤潮藻生长过程中碳源的作用机制[D]. 大连: 大连海事大学, 2020.
LOU Yadi. Carbon mechanism on the growth of marine blooms microalgae[D]. Dalian: Dalian Maritime University, 2020.
- [41] 杨晓. 长期酸化和短期酸化下普通小球藻生理及分子调控机制的研究[D]. 青岛: 青岛科技大学, 2019.
YAN Xiao. Physiological and molecular responses of the green algae *Chlorella variabilis* to long-term and short-term elevated CO₂[D]. Qingdao: Qingdao University of Science & Technology, 2019.
- [42] NAPAN K, TENG L, QUINN J C, et al. Impact of heavy metals from flue gas integration with microalgae production[J]. *Algal Research*, 2015, 8: 83-88.
- [43] WU Y, GAO K, RIEBESELL U. CO₂-induced seawater acidification affects physiological performance of the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*[J]. *Biogeosciences*, 2010, 7(9): 2915-2923.

Effects of seawater acidification and Cu²⁺ exposure on nutrient assimilation and energy allocation of *Cladocopium goreau*

TANG Jia^{1, 3}, CAI Wen-qi², YAN Zhi-cong², ZHAO Jian-min¹, ZHOU Zhi²

(1. Muping Coastal Environmental Research Station, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264117, China; 2. College of Marine Sciences, Hainan University, Haikou 570228, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Received: Apr. 25, 2021

Key words: zooxanthellae; seawater acidification; copper pollution; nutrient assimilation; energy allocation

Abstract: Recently, environmental stress due to global climate changes and human activities has exacerbated the occurrence of coral reef bleaching events. Ocean acidification and copper pollution have become the main stressors in reef areas. In this study, exposure experiments were performed at two pH levels (8.1 and 7.6) and two Cu²⁺ levels (4.25 and 16.47 μg/L) to explore the effects of seawater acidification and Cu²⁺ exposure on nutrient assimilation, energy consumption, and allocation of *Cladocopium goreau*. Short-term seawater acidification exposure was found to increase the nutrient assimilation (carbohydrate and protein content) and decrease the energy consumption of *C. goreau*, thereby increasing its energy allocation. Meanwhile, Cu²⁺ exposure significantly increased the energy consumption of *C. goreau*, thereby reducing its energy allocation. Further, compared with the Cu²⁺ exposure alone, the combination of seawater acidification and Cu²⁺ exposure promoted the nutrient assimilation (increased carbohydrate and protein content) and energy allocation of *C. goreau*. In general, these results show that seawater acidification and Cu²⁺ pollution in reef areas could negatively affect the nutritional metabolism and energy allocation of *C. goreau*, possibly affecting its growth and reproduction in the future.

(本文编辑: 赵卫红 杨悦)