

不同氮源加富对海带生长、光合固碳和氮吸收特性的影响

徐智广^{1,2}, 吴海一^{1,2}, 孙福新^{1,2}, 吕芳^{1,2}, 詹冬梅^{1,2*}

(1. 山东省海洋生物研究院, 山东 青岛 266104;

2. 青岛市大型海藻工程技术研究中心, 山东 青岛 266104)

摘要: 为比较海带在适应不同氮源加富后的生理特点, 本研究设置了自然海水、氨氮加富和硝氮加富3种不同的氮培养条件, 在不同氮条件下适应培养7 d后, 分别测定海带孢子体的生长、不同无机碳浓度下的光合速率(P-Ci曲线)和氮吸收情况。结果显示, 2种氮源加富均能促进藻体的生长, 但二者之间没有显著差异。P-Ci曲线符合饱和和动力学曲线, 2种氮源加富均提高了最大光合速率(V_{max})和半饱和常数(K_s), 但 V_{max} 在2种氮源加富培养中没有显著差异, 而氨氮加富的藻体具有较大的 K_s 值。与自然海水相比, 硝氮加富提高了 V_{max}/K_s 比值, 氨氮加富对其没有影响。叶绿素a(Chl.a)和类胡萝卜素(Car)的含量均被氮加富提高, 且在氨氮加富和硝氮加富之间没有显著差异。可溶性糖含量被2种氮加富降低, 且在氨氮加富中具有更低的值。与自然海水相比, 氨氮加富促进了海带对氨氮的吸收, 同时抑制了对硝氮的吸收; 而硝氮加富仅提高了硝氮的吸收速率, 对氨氮吸收没有影响。综上所述, 2种氮源加富虽都能提高海带的碳、氮吸收速率, 但氨氮加富在氮利用中具有优势, 而硝氮加富在碳固定中的促进作用更加明显, 氨氮加富对氮利用的促进和硝氮加富对碳固定的促进作用互相抵消, 因而2种氮源加富培养藻体之间的生长速率未出现显著差异。

关键词: 海带; 氮源; 光合固碳; 氮吸收; 生长

中图分类号: S 968.42⁺¹

文献标志码: A

由于淡水注入和海水养殖业的迅猛发展, 中国近海很多海域已处于较严重的富营养化状态^[1-4]。基于对近海生态环境的巨大负面影响, 富营养化问题已经引起了社会各界的普遍关注^[5]。海水富营养化的主要表现为氮磷营养盐的浓度升高, 分布于近岸海域的大型海藻能够快速吸收并固定氮、磷营养^[6-7], 其大规模增殖成为缓解近海富营养化的重要途径^[8]。在富营养化修复过程中, 大型海藻本身也将长期处于高浓度氮磷供应状态, 因此关于大型海藻营养盐代谢以及富营养化对海藻生理生态影响的研究成为当前学术界的热点^[9]。

氮是大型海藻正常生理活动所必需的基本营

养元素, 但它在自然海水中的浓度相对较低, 且具有明显的季节性变化, 常常成为海藻生长的限制性营养盐^[10]。海水中的氮存在多种形式, 大型海藻对氮的吸收利用以硝氮(NO_3^- -N)和氨氮(NH_4^+ -N)为主, 但对二者的吸收机制截然不同, 对 NO_3^- -N的吸收为主动运输, 需要耗费能量, 而对 NH_4^+ -N的吸收为被动扩散, 不需耗费能量。当2种氮源同时存在时, 大型海藻可能更倾向于对 NH_4^+ -N的吸收利用, 这已经在某些海藻种类中得到证实^[11-12]。然而在不同的海藻种类中也有不同的报道, Wheeler等^[13]报道了褐藻类的巨型海带(*Macrocystis integrifolia*)能同时利用 NO_3^- -N和 NH_4^+ -N两种氮源; 而张永正等^[14]发现

收稿日期: 2015-07-10 修回日期: 2015-11-11

资助项目: 国家自然科学基金(41376129); 国家海洋公益性行业科研专项(201305005, 201205001); 山东省农业生物资源创新利用研究课题; 山东半岛近岸海域生态模拟实验研究项目; 青岛市市南区科技发展资金(2013-12-005-SW)。

通信作者: 詹冬梅, E-mail: zdm1011@126.com

石莼(*Ulva lactuca*)、铁钉菜(*Ishige foliaceoakamurai*)和蜈蚣藻(*Grateloupia filicina*)均表现出优先利用 NO_3^- -N的趋势。对不同氮源吸收利用的不同,往往导致大型海藻生长、生化组分、营养盐吸收等生理过程的差异^[15],但不同氮源对大型海藻光合固碳特性的影响目前仍未见报道。

海带(*Saccharina japonica*)是一种重要的大型经济褐藻,是世界上产量最高的人工养殖大型海藻品种,我国是世界上最大的海带养殖国家,产量接近世界总产量的90%^[16]。海带在近海的大规模养殖,不仅为食品、化工、药品等工业提供了丰富的原料,而且能够在缓解和修复近海富营养化过程中发挥重要的作用^[18]。近年来,科技工作者围绕海带繁育技术及环境生理学方面取得了重要的研究进展^[17-19],较清楚地揭示海带配子体和孢子体的光合无机碳利用机制^[20-21],初步探讨了海带孢子体光合作用对氮营养的需求^[22],比较了海带对硝氮和氨氮2种不同氮源的吸收利用特点^[23],阐述了海带孢子体无机磷吸收特性及温度、氮浓度等环境因子对其的影响^[24]。本研究在此基础上,通过对比添加 NO_3^- -N和 NH_4^+ -N两种不同氮源后海带孢子体的生长和光合固碳特点,结合对不同氮源的吸收情况比较,验证不同氮源加富下海带光合生理将产生不同响应的假设,并探讨不同氮条件下碳、氮代谢与生长之间的关系。

1 材料与方法

1.1 实验材料

海带于2014年3月2日采自山东省荣成市俚岛镇近海人工养殖区。采集时选取长3~5 cm健康且形态一致的孢子体,置于4 °C保温箱3 h内运回实验室。采回的海带用自然海水清洗干净,于灭菌海水中恢复培养48 h后用于后续实验。培养条件:温度15 °C,光照强度100 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光照周期L:D=12 h:12 h, NO_3^- -N浓度30.5 $\mu\text{mol/L}$, NH_4^+ -N浓度13.0 $\mu\text{mol/L}$,无机磷(Pi)浓度4.3 $\mu\text{mol/L}$,每24 h换水1次,连续充气。

1.2 不同氮培养条件的设置

设置3种氮培养条件,①自然海水: NO_3^- -N浓度30.5 $\mu\text{mol/L}$, NH_4^+ -N浓度13.0 $\mu\text{mol/L}$;②氨氮加富:向自然海水中添加 NH_4Cl 母液至 NH_4^+ -N最终浓度为200 $\mu\text{mol/L}$;③硝氮加富:向

自然海水中添加 NaNO_3 母液至 NO_3^- -N最终浓度为200 $\mu\text{mol/L}$ 。分别称取恢复培养后的海带孢子体片段4 g(湿重,FW)置于装有2 L海水的锥形瓶中,在不同的氮条件下培养7 d,每种处理3个重复。3种处理的Pi都添加至20 $\mu\text{mol/L}$,其他营养元素按F/2配方加富^[25]。培养的光温条件同“实验材料”中的恢复培养条件,每24 h更换培养基。培养结束分别测定藻体的生长、光合固碳、色素含量、可溶性糖含量及氮营养盐吸收速率等指标。

1.3 生长速率测定

不同氮条件下适应培养7 d后,分别测定 t 时间段内藻体的初始湿重(W_0)和结束湿重(W_t),通过公式计算藻体的相对生长速率(relative growth rate, RGR): $\text{RGR}(\%/d)=\ln(W_t/W_0)/t \times 100$,式中, W_t 和 W_0 分别为初始和结束时的藻体湿重,单位为g,时间 t 的单位为d。

1.4 光合固碳能力分析

通过测定藻体在不同外源无机碳(Ci)浓度下的光合速率(P),获得P-Ci曲线来分析不同氮条件适应后海带的光合固碳能力。光合速率通过氧电极(Chlorolab-3, Hansatech, 英国)测定的放氧速率表示。测定时,先将待测海带样品剪成0.6 cm×0.6 cm的小片段,分别在各自适应培养条件下恢复2 h后称取0.15 g FW藻体放入盛有8 mL无碳海水的氧电极反应杯中,用恒温循环器(DTY-5A, 北京德天佑科技发展有限公司)控制反应杯温度为15 °C,以碘钨灯提供600 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的光照,光照强度用光量子计(QRT1, Hansatech, 英国)测定。不同的外源Ci浓度通过向无碳海水中添加不同量的 NaHCO_3 母液获得。无碳海水的配制过程:过滤灭菌海水中加入1 mol/L盐酸(使用时现配)使pH降到4.0以下,充氮气2 h,加入最终浓度为25 mmol/L的Tris缓冲液,以1 mol/L的NaOH(使用时现配)调节pH至8.1。P-Ci曲线通过如下公式^[26]拟合获得, $V=V_{\max} \times [S]/(K_s + [S])$ 。式中, V 为不同Ci浓度([S])下的光合速率,最大光合速率 V_{\max} 和半饱和常数 K_s 的值直接通过曲线拟合获得,最大光合速率和半饱和常数的比值(V_{\max}/K_s)用来评价海藻对外源Ci的利用效率。

1.5 光合色素含量测定

称取0.2 g左右FW的藻体,用丙酮研磨提

取, 定容至10 mL, 5000 r/min离心后取上清液测定其在波长450、666和730 nm处的吸光值。通过如下公式计算叶绿素a(Chl. α)和类胡萝卜素(Car)的含量^[27]: $\text{Chl.}\alpha$ [mg/(g FW)] = $(\text{OD}_{666} - \text{OD}_{730}) \times V \times 10 / (890 \times M)$; Car [mg/(g FW)] = $\text{OD}_{450} \times V \times 10 / (2500 \times M)$ 。式中, OD为吸光值, V 为定容后的液体体积(mL), M 为藻体湿重(g)。

1.6 可溶性糖含量测定

用苯酚硫酸法^[25]测定。称取0.2 g左右FW的藻体, 蒸馏水研磨后定容至25 mL, 70 °C水浴提取30 min。待提取液冷却后过滤, 取2 mL待测液加入6%苯酚试剂1 mL和浓硫酸5 mL, 冷却后485 nm波长测定吸光值, 对照标准曲线计算可溶性糖含量。标准曲线以葡萄糖为标准绘制。

1.7 氮吸收速率测定

通过测定培养前后藻体培养液中氮的浓度, 用氮营养盐的减少速率来表示海带对其的吸收速率。计算公式: $\text{uptake rate} [\mu\text{mol}/(\text{d} \cdot \text{g FW})] = (N_0 - N_t) \times V / M / t$ 。式中, N_0 为测定培养开始时水体中氮营养盐的浓度, N_t 为培养结束时氮的浓度, V 为培养水体的体积(mL), M 为培养开始时藻体的湿重(g), t 为培养时间(d)。NO₃⁻-N浓度的测定采用锌镉还原法, NH₄⁺-N浓度的测定采用次溴酸钠氧化法^[28]。

1.8 统计分析

所有测定结果表示为平均数±标准差(mean±SD)($n \geq 3$), 用单因素方差分析(One-Way ANOVA)和 t -检验进行统计显著性分析(Origin 9.0), 以 $P < 0.05$ 作为差异的显著性水平。

2 结果

2.1 生长

在自然海水中海带的RGR为 $(3.32 \pm 0.52) \%$ /d, 氨氮和硝氮的加富, 分别使RGR提高了61.3%和76.0%, 但2种氮加富培养之间没有显著性差异($P > 0.05$) (图1)。

2.2 光合固碳能力

随着外源Ci浓度的增加, 3种处理适应后的藻体光合速率都逐渐增大, 当Ci浓度增加到一定值时趋向饱和, 达到最大光合速率(V_{max}) (图2)。

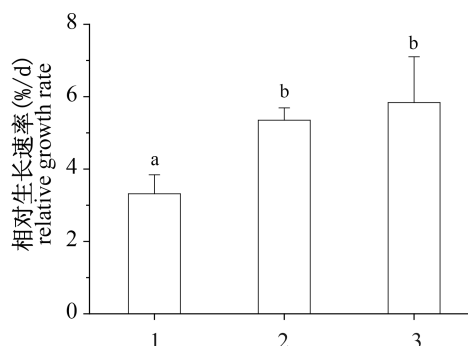


图1 不同氮条件适应培养后海带的生长速率

1. 自然海水; 2. 氨氮加富; 3. 硝氮加富; 不同的小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平具有显著性差异, 下同

Fig. 1 Relative growth rate of *S. japonica* cultured under different nitrogen conditions

1. natural seawater; 2. enrichment of NH₄⁺; 3. enrichment of NO₃⁻; lowercase letters indicate significant differences at $P < 0.05$ among the treatments, the same below

氮加富可显著促进最大光合速率, 与自然海水相比, 氨氮加富和硝氮加富分别使最大光合速率提高了2.4倍和1.8倍, 但2种氮源加富之间没有显著性差异($P > 0.05$) (表1)。半饱和常数(K_s)也被氮加富显著提高, 且最大值出现在氨氮加富的处理过程中(表1)。因此藻体对外源Ci的亲合力在氨氮加富中最低, 而在自然海水中最高。与自然海水相比, 硝氮加富显著提高了最大光合速率与半饱和常数的比值(V_{max}/K_s) ($P < 0.05$), 而氨氮加富对这一比值没有显著影响($P > 0.05$) (表1)。

2.3 色素含量

2种氮源加富都显著升高了Chl. α 和Car在藻体

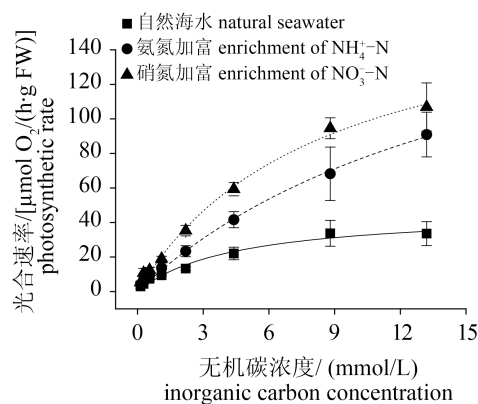


图2 不同氮条件适应培养后海带的P-Ci曲线

Fig. 2 P-Ci curves in *S. japonica* cultured under different nitrogen conditions

表 1 不同氮条件适应培养后海带的P-Ci曲线参数

Tab. 1 Parameters of P-Ci curves in *S. japonica* cultured in different nitrogen conditions

	自然海水 natural seawater	氨氮加富 enrichment of NH ₄ ⁺	硝氮加富 enrichment of NO ₃ ⁻
最大光合速率/[$\mu\text{mol O}_2/(\text{h}\cdot\text{g FW})$] V_{max}	47.24 \pm 14.63 ^a	205.82 \pm 48.45 ^b	180.81 \pm 34.42 ^b
半饱和常数/mmol K_s	4.42 \pm 1.67 ^a	16.91 \pm 2.68 ^b	8.61 \pm 1.80 ^c
最大光合速率与半饱和常数的比值 V_{max}/K_s	10.94 \pm 0.98 ^a	12.13 \pm 1.71 ^a	21.11 \pm 1.28 ^b

注: 同行中不同的小写字母表示在 $P<0.05$ 水平具有显著性差异

Notes: within each line of the data, lowercase letters indicate significant differences at $P<0.05$ among the treatments

内的含量($P<0.05$), 但2种色素在氨氮加富和硝氮加富之间都没有显著性差异($P>0.05$) (图3)。

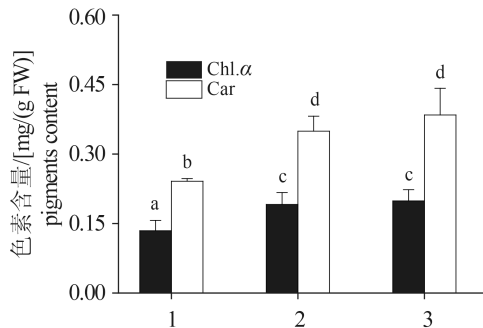


图 3 不同氮条件适应培养后海带的色素含量

Fig. 3 Pigment contents in *S. japonica* cultured under different nitrogen conditions

2.4 可溶性糖含量

2种氮源加富都显著降低了海带中可溶性糖的含量, 与自然海水培养相比, 氨氮加富和硝氮加富分别使可溶性糖含量降低了40.9%和20.8%(图4)。同时, 可溶性糖含量在2种氮源加富培养之间也具有显著性差异($P<0.05$), 最低值出现在氨氮加富培养的藻体中, 为(0.96 \pm 0.08) mg/(g FW)。

2.5 氮吸收速率

氨氮的吸收速率在自然海水和硝氮加富之间没有显著性差异($P>0.05$), 在氨氮加富处理中显著升高($P<0.05$); 而硝氮的吸收速率被氨氮加富显著降低($P<0.05$), 在硝氮加富中显著升高($P<0.05$) (图5)。由此可知, 2种氮源同时存在时, 海带倾向于对氨氮的优先利用。综合氨氮和硝氮的吸收, 3种氮条件下海带对总无机氮的吸收速率由小到大排序为自然海水<硝氮加富<氨氮加富。

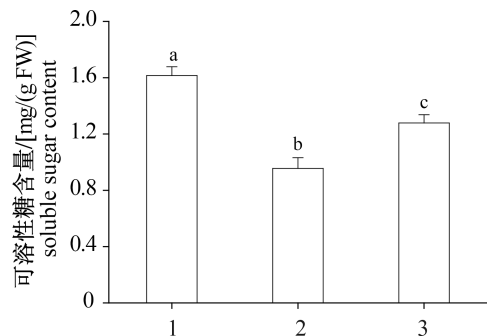


图 4 不同氮条件适应培养后海带的可溶性糖含量

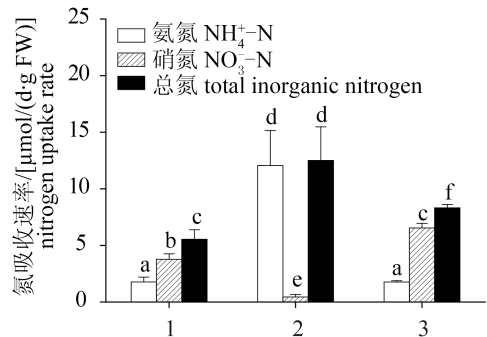
Fig. 4 Soluble sugar contents in *S. japonica* cultured under different nitrogen conditions

图 5 不同氮条件适应培养后海带的氮吸收速率

Fig. 5 Nitrogen uptake rate of *S. japonica* cultured under different nitrogen conditions

3 讨论

3.1 不同氮源加富对海带生长的影响

大型海藻的生长是一个复杂的生理过程, 是碳、氮代谢产物积累和调节分配的综合结果^[29], 与外源碳、氮的可利用情况密切相关。氮是植物生长的营养基础和外部信号^[30], 氮营养盐的加富使海藻植物氮代谢底物浓度升高, 在一定范围内可能使氮同化作用加强, 从而促进其快速

生长。本研究中, 氨氮加富和硝氮加富培养的海带都具有较高的氮吸收速率, 进而也获得了较高的生长速率, 这与绝大多数的大型海藻研究结果相同^[31]。另外, 本研究中的光合色素在高氮培养中也具有较高的含量, 与氮对海带生长的影响趋势相同, 这种氮在色素中分配与海藻生长良好的相关性在对假微型海链藻 (*Thalassiosira fluviatilis*) 的研究中也得到了证实^[29]。

本研究还发现氨氮加富和硝氮加富对海带生长的促进作用没有显著差别。对多数大型海藻来说, 由于在能量消耗方面氨氮吸收具有更大的优势, 因而氨氮比硝氮更易于被藻体吸收利用^[12, 32], 这一现象在本研究中也得到验证。但是, 在储存能力方面, 硝氮则具有更明显的优势。相关研究表明, 海藻细胞能够将吸收后的硝氮大量储存于细胞内的液泡中, 胞内外硝氮浓度比可达到1000:1^[33], 细胞内大量储存的硝氮能够保证海藻细胞在快速光合固碳过程中所需的大量氮元素供应。本研究中硝氮加富比氨氮加富的海带具有更高的碳固定效率和可溶性糖含量, 这些结果间接表明了硝氮比氨氮加富对碳代谢具有更显著的促进作用。氨氮加富在氮代谢方面的优势和硝氮加富在碳代谢方面的优势互相补偿, 可能导致了2种条件下海带的生长不具有显著差异的结果。

3.2 不同氮源加富对海带氮吸收的影响

如上所述, 本研究中2种氮源加富都促进了总氮的吸收, 但氨氮和硝氮同时存在时, 海带优先吸收利用氨氮, 这与Prichard等^[12]在红藻中的研究结果类似。这是因为大型海藻对氨氮的吸收为被动扩散, 不需耗费能量, 而对硝氮的吸收是耗能的主动运输过程, 因而2种氮源同时存在时海藻常常优先选择低能耗的氨氮^[10]。但毛玉泽等^[23]在对海带的研究中报道了不同的结果, 发现海带藻片对硝氮的吸收速率大于对氨氮的吸收速率。不同研究结果的出现, 可能与海藻本身的营养状态、培养条件和吸收速率的测定时机有关。

3.3 不同氮源加富对海带光合固碳的影响

主动运输是大型海藻吸收营养盐离子的主要方式, 这种方式一般遵循着饱和动力学曲线模型: $V = V_{\max} \times [S] / (K_s + [S])$ 。最大速率与半饱和常

数的比值($V_{\max} : K_s$)被认为是评价海藻对该营养盐吸收能力更加准确的指标, 反映了营养盐的吸收效率^[10], 这一比值在海藻无机碳利用效率评价中也获得了应用^[34]。本研究也使用这一指标来衡量不同氮培养下海带的光合固碳能力, 结果显示与自然海水相比, 虽然氨氮加富和硝氮加富都促进了海带的最大光合固碳速率, 但硝氮加富比氨氮加富培养的藻体有着更高的 $V_{\max} : K_s$ 比值, 这体现了硝氮加富在光合固碳过程中的优势作用。这种优势作用的可能原因, 除了与硝氮具有在细胞内较强的储存能力有关外^[33], 也可能是由于与氨氮相比, 硝氮能够激活细胞内的氧化磷酸化这一为光合固碳供能的生化反应过程^[35]。

综上所述, 硝氮和氨氮2种不同氮源的加富培养虽然对海带的生长、光合固碳以及氮营养盐吸收都起到了促进作用, 但是, 氨氮加富对氮吸收的促进作用更加明显, 而硝氮加富在加速碳固定方面具有优势。2种氮源对海带生长速率相近的促进作用, 是两者各自在碳、氮吸收利用2个方面优势互补的综合体现。

参考文献:

- [1] 林长清. 大连近海富营养化评价与探讨[J]. 海洋环境科学, 1994, 13(4): 63-68.
Lin C Q. Assessment and inquiry on the eutrophication in the Nearshore of Dalian[J]. Marine Environmental Science, 1994, 13(4): 63-68 (in Chinese).
- [2] 戴纪翠, 高晓薇, 倪晋仁, 等. 深圳近海海域营养现状分析与富营养化水平评价[J]. 环境科学, 2009, 30(10): 2879-2883.
Dai J C, Gao X W, Ni J R, et al. Status analysis of nutrients and eutrophication assessment in Shenzhen coastal waters[J]. Environmental Science, 2009, 30(10): 2879-2883 (in Chinese).
- [3] 洪雄业. 莆田市近海水体富营养化状况及对策研究[J]. 化学工程与装备, 2010(11): 173-176, 83.
Hong X Y. Study on eutrophication status and countermeasures of coastal waters in Putian[J]. Chemical Engineering & Equipment, 2010(11): 173-176, 83 (in Chinese).
- [4] 徐晓甫, 聂红涛, 袁德奎, 等. 天津近海富营养化及环境因子的时空变化特征[J]. 环境科学研究, 2013, 26(4): 396-402.

- Xu X F, Nie H T, Yuan D K, *et al.* Temporal-spatial changes analysis of eutrophication and environmental factors in Tianjin coastal waters[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2013, 26(4): 396-402 (in Chinese).
- [5] Andersen J H, Conley D J. Eutrophication in coastal ecosystems: towards better understanding and management strategies[M]. Netherlands: Springer, 2009.
- [6] 王翔宇, 詹冬梅, 李美真, 等. 大型海藻吸收氮磷营养盐能力的初步研究[J]. *渔业科学进展*, 2011, 32(4): 67-71.
- Wang X Y, Zhan D M, Li M Z, *et al.* Preliminary studies on the nitrogen and phosphorus absorption capability of macroalgae[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2011, 32(4): 67-71 (in Chinese).
- [7] 李恒, 李美真, 徐智广, 等. 不同营养盐浓度对3种大型红藻氮、磷吸收及其生长的影响[J]. *中国水产科学*, 2012, 19(3): 462-470.
- Li H, Li M Z, Xu Z G, *et al.* Effect of nutrient supply on nitrogen and phosphorus uptake and growth in three species of macroalgae[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, 19(3): 462-470 (in Chinese).
- [8] Fei X G. Solving the coastal eutrophication problem by large scale seaweed cultivation[J]. *Hydrobiologia*, 2004, 512(1-3): 145-151.
- [9] 邹定辉, 夏建荣. 大型海藻的营养盐代谢及其与近岸海域富营养化的关系[J]. *生态学杂志*, 2011, 30(3): 589-595.
- Zou D H, Xia J R. Nutrient metabolism of marine macroalgae and its relationship with coastal eutrophication: a review[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2011, 30(3): 589-595 (in Chinese).
- [10] Lobban C S, Harrison P J. Seaweed ecology and physiology[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1996.
- [11] Brenchley J L, Raven J A, Johnston A M. Resource acquisition in two intertidal fucoid seaweeds, *Fucus serratus* and *Himantalia elongata*: seasonal variation and effects of reproductive development[J]. *Marine Biology*, 1997, 129(2): 367-375.
- [12] Pritchard D W, Hurd C L, Beardall J, *et al.* Restricted use of nitrate and a strong preference for ammonium reflects the nitrogen ecophysiology of a light-limited red alga[J]. *Journal of Phycology*, 2015, 51(2): 277-287.
- [13] Wheeler W N, Srivastava L M. Seasonal nitrate physiology of *Macrocystis integrifolia* Bory[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1984, 76(1): 35-50.
- [14] 张永正, 王萍, 桂福坤, 等. 石莼、铁钉菜和蜈蚣藻对氮源利用的研究[J]. *海洋环境科学*, 2012, 31(3): 341-345.
- Zhang Y Z, Wang P, Gui F K, *et al.* Utilization of nitrogen of *Ulva lactuca*, *Ishige foliaceaokamurai* and *Grateloupia filicina*[J]. *Marine Environmental Science*, 2012, 31(3): 341-345 (in Chinese).
- [15] Sun K M, Li R X, Li Y, *et al.* Responses of *Ulva prolifera* to short-term nutrient enrichment under light and dark conditions[J]. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2015, 163(suppl.): 56-62.
- [16] 金振辉, 刘岩, 张静, 等. 中国海带养殖现状与发展趋势[J]. *海洋湖沼通报*, 2009, (1): 141-150.
- Jin Z H, Liu Y, Zhang J, *et al.* Breeding actuality and developing direction of *Laminaria* in China[J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2009, (1): 141-150 (in Chinese).
- [17] 李大鹏, 吴超元, 刘晚昌, 等. 海带单倍体无性繁殖系育苗技术的研究[J]. *海洋学报*, 2003, 25(5): 141-146.
- Li D P, Wu C Y, Liu W C, *et al.* A new technology of *Laminaria japonica* sporeling culture by the use of gametophyte clones[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2003, 25(5): 141-146 (in Chinese).
- [18] 朱明远, 吴荣军, 李瑞香, 等. 温度对海带幼孢子体生长和光合作用的影响[J]. *生态学报*, 2004, 24(1): 22-27.
- Zhun M Y, Wu R J, Li R X, *et al.* The impacts of temperature on growth and photosynthesis of *Laminaria japonica* juvenile sporophytes[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(1): 22-27 (in Chinese).
- [19] 刘素. 海带(*Laminaria japonica* Aresch)早期发育对UV-B辐射增强及其与其它环境因子交互作用的响应[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009.
- Liu S. The early developmental stages of *Laminaria japonica* Aresch in response to the interaction of enhanced UV-B radiation and other environmental factors[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2009 (in Chinese).
- [20] 岳国峰, 戢勇骋, 王建飞, 等. 海带雌配子体对无机碳的利用[J]. *海洋科学*, 2000, 24(6): 33-36.
- Yue G F, Ji Y C, Wang J F, *et al.* Inorganic carbon

- acquisition by the female gametophytes of *Laminaria japonica*[J]. Marine Sciences, 2000, 24(6): 33-36 (in Chinese).
- [21] 岳国峰, 王金霞, 王建飞, 等. 海带幼孢子体的光合碳利用[J]. 海洋与湖沼, 2001, 32(6): 647-652.
Yue G F, Wang J X, Wang J F, *et al.* Inorganic carbon acquisition by juvenile sporophyte of *Laminariales* (*L. japonica* × *L. longissima*)[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2001, 32(6): 647-652 (in Chinese).
- [22] 吴荣军, 朱明远, 李瑞香, 等. 海带 (*Laminaria japonica*) 幼孢子体生长和光合作用的N需求[J]. 海洋通报, 2006, 25(5): 36-42.
Wu M J, Zhu M Y, Li R X, *et al.* Nitrogen requirement of growth and photosynthesis in the juvenile sporophyte of *Laminaria japonica*[J]. Marine Science Bulletin, 2006, 25(5): 36-42 (in Chinese).
- [23] 毛玉泽, 叶乃好, 王金叶, 等. 海带藻片对氮营养盐吸收特性研究[C]. 中国水产学会学术年会论文摘要集. 重庆: 中国水产学会, 2008.
Mao Y Z, Ye N H, Wang J Y, *et al.* Nitrogen uptake by the discs from different parts of *Laminaria japonica* under laboratory conditions[C]. Summary of the academic year of the Chinese Aquatic Society. Chongqing: China Society of Fisheries, 2008 (in Chinese).
- [24] 高尚德, 董良峰, 张维. 海带孢子体吸收磷酸盐的初步研究[J]. 山东海洋学院学报, 1984, 14(4): 63-67.
Gao S D, Dong L F, Zhang W. Preliminary studies on the uptake of phosphate conducted by sporophytes of *Laminaria japonica*[J]. Journal of Shandong College of Oceanology, 1984, 14(4): 63-67 (in Chinese).
- [25] Borowitzka M A, Borowitzka L J. Micro-algal biotechnology[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1988.
- [26] von Caemmerer S, Farquhar G D. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves[J]. Planta, 1981, 153(4): 376-387.
- [27] Hellebust J A, Craigie J S. Handbook of phycological methods: physiological and biochemical methods[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1978.
- [28] Lobban C S, Chapman D J, Kremer B P. Experimental phycology: a laboratory manual[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1988.
- [29] Wirtz K W, Pahlow M. Dynamic chlorophyll and nitrogen: carbon regulation in algae optimizes instantaneous growth rate[J]. Marine Ecology Progress Series, 2010, 402: 81-96.
- [30] Crawford N M. Nitrate: nutrient and signal for plant growth[J]. Plant Cell, 1995, 7(7): 859-868.
- [31] Wiencke C, Bischof K. Seaweed biology: novel insights into ecophysiology, ecology and utilization[M]. Berlin Heidelberg: Springer, 2012.
- [32] Rees T A V. Safety factors and nutrient uptake by seaweeds[J]. Marine Ecology Progress Series, 2003, 263: 29-42.
- [33] Gordillo F J L, Dring M J, Savidge G. Nitrate and phosphate uptake characteristics of three species of brown algae cultured at low salinity[J]. Marine Ecology Progress Series, 2002, 234: 111-118.
- [34] Xu Z G, Gao K S. Impacts of UV radiation on growth and photosynthetic carbon acquisition in *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta) under phosphorus-limited and replete conditions[J]. Functional Plant Biology, 2009, 36(12): 1057-1064.
- [35] Huppe H C, Vanlerberghe G C, Turpin D H. Evidence for activation of the oxidative pentose phosphate pathway during photosynthetic assimilation of NO_3^- but not NH_4^+ by a green alga[J]. Plant Physiology, 1992, 100(4): 2096-2099.

Effects of enrichment with different nitrogen sources on growth, photosynthetic carbon fixation and nitrogen uptake of *Saccharina japonica*

XU Zhiguang^{1,2}, WU Haiyi^{1,2}, SUN Fuxin^{1,2}, LÜ Fang^{1,2}, ZHAN Dongmei^{1,2*}

(1. Marine Biology Institute of Shandong Province, Qingdao 266104, China;

2. Macroalgae Engineering Technology Centre of Qingdao, Qingdao 266104, China)

Abstract: To investigate physiological characteristics of *Saccharina japonica* cultured in enriched media with different nitrogen sources, kelp were cultured for 7 days in three nitrogen conditions, including natural seawater, enrichment of ammonia and nitrate, and then growth rate, photosynthesis at different carbon levels (P-Ci curve) and nitrogen uptake rate were determined, respectively. The results showed that both enrichments of ammonia and nitrate remarkably enhanced growth of kelp, but no significant difference between the two treatments. P-Ci curve conformed to the saturated kinetics equation, and both the maximal photosynthetic rate (V_{\max}) and half saturated constant (K_s) were notably raised by enriched nitrogen. However, V_{\max} showed no significant difference between the two nitrogen enrichment, while K_s exhibited a higher value in ammonia than in nitrate enrichment. Compared to natural seawater, the ratio of V_{\max}/K_s increased in enrichment of nitrate and kept no change in enrichment of ammonia. Contents of Chl. α and Car were enhanced by enrichment of nitrogen, with no significant difference between the two nitrogen sources enrichments. Content of soluble sugar was decreased by enriched nitrogen, and showed a lower value in enrichment of ammonia than nitrate. Compared with natural seawater, ammonia enrichment enhanced ammonia uptake and inhibited nitrate uptake, while enrichment of nitrate increased nitrate uptake and had no remarkable effect on ammonia uptake. In conclusion, enrichments with both two nitrogen sources could enhance uptake of carbon and nitrogen, but ammonia enrichment had advantage in nitrogen uptake, while nitrate enrichment showed more remarkable influence on carbon fixation. Therefore, the balance of carbon and nitrogen utilization affected by enrichment of ammonia or nitrate resulted in no significant difference in growth rate between the two treatments.

Key words: *Saccharina japonica*; nitrogen sources; photosynthetic carbon fixation; nitrogen uptake; growth

Corresponding author: ZHAN Dongmei. E-mail: zdm1011@126.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (41376129); National Special Research Fund for Non-Profit Marine Sector(201305005, 201205001); Shandong Agriculture Breeding Engineering Biological Resources Innovation of Research ProjectPublic; Experimental Research Project of Ecological Simulation in the Coastal Area of Shandong Peninsula; Shinan District Science and technology Development Funds of Qingdao City (2013-12-005-SW).