

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190319003

http://www.yykxjz.cn/

黄书杰, 徐东, 王东升, 张现盛, 叶乃好. 海洋酸化对颗石藻生理特性的影响. 渔业科学进展, 2020, 41(3): 11–24
Huang SJ, Xu D, Wang DS, Zhang XS, Ye NH. Effects of ocean acidification on physiological characteristics of coccolithophores. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(3): 11–24

海洋酸化对颗石藻生理特性的影响*

黄书杰^{1,2,3,4} 徐东⁴ 王东升⁴ 张现盛⁴ 叶乃好^{4①}

1. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306;
2. 上海海洋大学 中国科学技术部海洋生物科学国际联合研究中心 上海 201306;
3. 上海海洋大学 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室 上海 201306;
4. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛 266071)

摘要 CO₂ 浓度升高引起的海洋酸化对海洋生物尤其是钙化生物颗石藻产生了很大的影响。然而, 有关颗石藻对 CO₂ 浓度升高响应的研究多集中在单一的品系上, 并且在种内或者种间产生了差异甚至相互矛盾的结果。本研究中, 分别以赫氏颗石藻(*Emiliania huxleyi*)和大洋球石藻(*Gephyrocapsa oceanica*) 2 种颗石藻的钙化和非钙化的 4 个品系藻种为研究对象, 设置了 400、750、1000、2000 μatm 共 4 个 CO₂ 浓度梯度, 同时进行分批充气培养, 系统研究了海洋酸化对颗石藻的生长光合、氮源吸收、元素组成和钙化效率等生理影响。结果显示, 随着 CO₂ 浓度升高至 2000 μatm , 不同的颗石藻并未有一致的反应。除了非钙化的 *E. huxleyi* (N-E) 外, 其他 3 个品系颗石藻的生长和颗粒有机碳产率都对 CO₂ 增加表现出积极的响应; 随着 CO₂ 浓度的升高, 4 种品系颗石藻的光合参数 F_v/F_m 、 $Y(\text{II})$ 和叶绿素含量呈整体下降趋势; *E. huxleyi* CS369 (C-E) 和 *G. oceanica* (C-G) 在第 7 天的钙化效率分别下降了 35.4% 和 68.9%; 此外, 4 种品系颗石藻的颗粒有机氮产率都出现增加趋势, 而 POC/PON 和 PIC/POC 均呈现下降趋势。本研究确定了海洋酸化对颗石藻的不同生理影响, 这种差异影响可能会导致未来海洋生物多样性的改变和其他生态系统进程的变化。

关键词 海洋酸化; 颗石藻; 特异性; 生物多样性

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)03-0011-14

浮游植物在海洋食物网和生物地球化学循环中起着至关重要的作用(Falkowski, 2012)。颗石藻作为一种单细胞定鞭藻类, 其细胞表面覆盖着细胞内产生

的方解石小板, 是目前海洋中数量最多、分布最广的钙化浮游生物类群之一(Langer *et al*, 2009; Langer, 2013; Lohbeck *et al*, 2014; Young *et al*, 2014)。此外,

* 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”重点专项(2018YFD0900703; 2018YFD0901503-8)、中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022019006)、青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室渔业科技青年人才计划项目(2018-MFS-T01)和山东省自然科学基金(ZR2017MD025)共同资助 [This work was supported by the National Key R&D Program of China (2018YFD0900703, 2018YFD0901503-8), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, YSFRI, CAFS (20603022019006), and Youth Talent Program Supported by Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (2018-MFS-T01), and Shandong Provincial Natural Science Foundation, China (ZR2017MD025)]. 黄书杰, E-mail: huangshujie1221@163.com

① 通讯作者: 叶乃好, 研究员, E-mail: yenh@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2019-03-19, 收修改稿日期: 2019-04-11

颗石藻参与形成的碳酸盐泵,在碳生物地球化学循环中发挥着重要作用;颗石藻能够形成大规模的赤潮,这些特征被认为对全球气候变化有反馈作用(Hutchins, 2011; Riebesell *et al*, 2011; Jin *et al*, 2013; Beaufort *et al*, 2014)。然而,大气 CO₂ 浓度的增加引起的海洋酸化正在导致海洋表层 pH 值下降(预计到 2100 年和 2300 年分别减少 0.5 和 0.7 个单位)(Caldeira *et al*, 2003; IPCC, 2008; Ross *et al*, 2011),同时改变碳酸盐系统(Beaufort *et al*, 2010)。表层海水的这些变化对颗石藻和其他钙化藻种产生了巨大的影响,预计将影响整个群落和生态系统,甚至破坏整个海洋环境(Turley *et al*, 2010; Hoppe *et al*, 2011; Sinutok *et al*, 2011; Lohbeck *et al*, 2012; Meier *et al*, 2014)。

过去十年间,许多有关实验室培养和大型半封闭野外培养(中试实验)的研究,都集中在单种颗石藻对海洋酸化的响应,这产生了不一致甚至相互矛盾的结果(Young *et al*, 2014)。Riebesell 等(2000)发现,随着 CO₂ 浓度的增加,颗石藻的钙化作用明显减弱,同时伴随着颗粒有机碳(POC)的增加。随后对单一藻种赫氏颗石藻(*Emiliania huxleyi*)的研究也表明,海洋酸化导致该物种的钙化效率降低,但 POC 产量发生不均一(增加、减少或不受影响)变化(Zondervan *et al*, 2002; Sciandra *et al*, 2003; Delille *et al*, 2005; Feng *et al*, 2008; Müller *et al*, 2010; Hoppe *et al*, 2011)。许多其他关于 *E. huxleyi* 藻株应对海洋酸化的研究也显示相互矛盾的结果,例如,颗石藻钙化率的不断增加(Iglesias-Rodriguez *et al*, 2008; Shi *et al*, 2009; Jones *et al*, 2013)或不敏感变化(Langer *et al*, 2009; De Bodt *et al*, 2010; Fiorini *et al*, 2011b)。

此外,前人研究的 3 种钙化颗石藻(*Gephyrocapsa oceanica*, *Caldiscus leptoporus*, *Coccolithus braarudii*),都对 CO₂ 浓度升高表现出不同的响应模式。例如,CO₂ 浓度升高使 *G. oceanica* PC7/1 的钙化效率大幅下降 44.7% (Riebesell *et al*, 2000), *Coccolithus braarudii* 4762 藻株的钙化率则表现出轻微增加(Rickaby *et al*, 2010),而 *Calcidiscus leptoporus* AC370 藻株反应不敏感(Fiorini *et al*, 2011b)。鉴于这种矛盾的结果,已经出现了一些同时测试不同颗石藻品系或种类的研究(Langer *et al*, 2006、2009; Fiorini *et al*, 2011b)。Langer 等(2009)指出,先前海洋酸化研究中使用的不同赫氏颗石藻品系的敏感性在本质上是不同的,这可能是由于存在特异性反应的遗传基础所致。

过去有关海洋酸化对颗石藻钙化作用影响的研究结果是不一致的,利用这些研究结果,在日益酸化的海洋环境中,准确预测未来颗石藻的命运仍然存在着问题。此外,基于短期实验的海洋表层优势种赫氏

颗石藻对海洋酸化的响应也得到了深入的研究,文献范围也在迅速扩大。Langer 等(2006)指出,单一品系颗石藻得到的实验结果,可能会对很好适应当前 CO₂ 条件的不同颗石藻在应对未来可能发生的海洋酸化的响应研究产生偏差,而且实验结果存在着缺乏普遍有效性的问题。此外,由于非钙化的颗石藻藻种在海洋生态系统中发挥着重要的生态作用,非钙化藻株的研究不应该被忽视,并且最近受到越来越多的关注(Kottmeier *et al*, 2014)。因此,当下需要同时研究更多不同的颗石藻品系,并研究 CO₂ 浓度升高对颗石藻的长期生物学效应。

本研究将 CO₂ 浓度从 400 μatm 升高到 2000 μatm ,来分别模拟当今和未来海洋酸化条件。同时,利用颗石藻的 2 个优势种赫氏颗石藻和大洋球石藻,包括非钙化的和钙化的品系,进行一系列实验。通过测定颗石藻的细胞密度、藻体光合参数、氮吸收速率、颗粒无机碳(PIC)产量、颗粒有机碳(POC)产量、颗粒有机氮(PON)以及它们之间的比率等生理参数,以分析不同品系颗石藻在不同 CO₂ 浓度下的潜在生理变化。此外,拟合了 4 个品系颗石藻相对于 CO₂ 变化的氮吸收速率响应曲线,并应用响应曲线中的动力学常数进一步分析 4 种品系颗石藻之间的本质响应差异。这些结果旨在了解类似条件下海洋酸化对不同颗石藻的差异影响,有助于评估未来环境条件下生物多样性和其他生态进程的改变。

1 材料与方法

1.1 实验材料和培养条件

实验所用的钙化和非钙化的赫氏颗石藻(*E. huxleyi*, 简称为 N-E; *E. huxleyi* CS369, 简称为 C-E)以及钙化和非钙化的大洋球石藻(*G. oceanica* NIES-1318, 简称为 N-G; *G. oceanica*, 简称为 C-G)均来源于中国水产科学研究院黄海水产研究所微藻培养中心。藻细胞在天然过滤海水(0.22 μm)培养基中培养,海水中硝酸盐和磷酸盐的浓度分别为 882 $\mu\text{mol/L}$ 和 36.2 $\mu\text{mol/L}$,根据 f/2 培养基向海水中添加金属和维生素(Guillard *et al*, 1962)。细胞培养在含 1 L 培养基的 2 L 三角烧瓶中,放置在植物培养箱中,培养温度为 20 $^{\circ}\text{C}$,盐度为 32。培养光源为白色荧光灯,光强为 300 $\mu\text{mol/m}^2\cdot\text{s}$,光暗比为 16 h/8 h,实验采用处于指数生长期的颗石藻。

1.2 实验内容及方法

1.2.1 实验设置 采用与 Xu 等(2014)类似的方法,在植物培养箱(GXZ, 瑞华, 武汉)中,将空气与

CO₂ 混合, 向 4 种品系颗石藻泵入不同 CO₂ 分压的空气, 设 3 个重复的 1000 ml 培养物进行培养。在准备阶段, 在上述条件下, 4 种品系颗石藻被分别培养到指数生长期。在培养基中用含有不同 CO₂ 分压的空气连续充气, 以提供 400、750、1000 和 2000 μatm 的 CO₂, 各项初始值见表 1。待持续充气 48 h 稳定后, 进行下一步实验。每次实验中, 每个空气-CO₂ 混合物均设 3 份平行样, 以不添加细胞的实验体系作为空白对照, 分别监测细胞密度和 pH 值。在取样点分别测定叶绿素含量、PIC、POC、DIC 和碱度。

1.2.2 碳酸盐体系分析 培养基 pH 值采用 pH 计检测(Orion ROSS, Thermo Electron Corp., 美国)。总碱度(TA)用 Whatman GF/F 膜过滤, 储存在密封的 100 ml 三角烧瓶中, 放置在 -20℃, 使用 848 自动滴定仪(Metrohm, Riverview, FL, 美国)获得总碱度值。利用 CO₂SYST 包获得海水中碳酸盐体系的 pH、温度、盐度和 TA, 其中碱度根据 Pelletier 等(2007)提供的方法计算。

1.2.3 生长测定 在光学显微镜(Nikon, 日本)下用血细胞计数器手动计数, 获得准确的细胞数以估算微藻的生长情况。利用如下公式测定比生长速率(μ):

$$\mu = (\ln C_1 - \ln C_0) / (t_1 - t_0)$$

式中, C_0 和 C_1 分别是初始时间 t_0 和随后时间 t_1 的藻细胞浓度。

1.2.4 叶绿素荧光参数的测定及色素分析 使用 Dual-PAM-100(Walz, Effeltrich, 德国)测定颗石藻的叶绿素荧光参数。测量前将样品暗适应 15 min, 在弱光下测定初始荧光(F_0)。暗适应后的样品在饱和脉冲光下获得最大荧光值(F_m)。代表被照亮后样品的 F_m 产量, F_t 是实时荧光产量。根据公式 $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ 计算最大 PS II 量子产额(F_v/F_m)。有效 PS II 量子产率计算: $Y(II) = (F_m - F_t)/F_m$ 。

为了确定色素含量, 样品被过滤收集到 GF/F 过滤膜(25 mm)上, 然后在 4℃ 的黑暗条件下, 用 10 ml 的 90% 丙酮提取 24 h, 7000 g 离心 10 min 后, 上清液用于室温下色素含量分析。叶绿素含量采用 Jeffrey 等(1975)的方法测定。

1.2.5 氮吸收速率的测定 每个实验体系收集 5 ml 水样, 迅速用醋酸纤维素膜过滤, 置于聚乙烯离心管中, 冷冻保存于 -80℃。营养盐分析前, 将样品解冻至室温, 用营养盐自动分析仪(Bran and Luebbe AA3, 德国)对硝酸盐浓度进行光度分析。氮吸收速率计算公式: $NUR = (C_0 - C_1) V / N / t$, NUR 为氮吸收速率 (pmol of nitrate-N/cell·d), C_0 和 C_1 分别为实验开始和第 7 天硝酸盐浓度 (pmol/L); V 为水的体积(L); N 为

细胞数; t 为时间间隔(d)。此外, 使用米氏方程曲线 (Michaelis *et al*, 1913; Hutchins *et al*, 2013) 拟合每个 CO₂ 浓度下的平行样品关于氮吸收的 CO₂ 响应曲线。使用 Origin Pro 软件进行动力学常数和曲线相关系数的计算。

1.2.6 藻体中碳和氮元素的含量分析 将样品过滤到灼烧过(500℃, 5 h)的 GF/F 膜(25 mm), 保存在 -20℃ 直到分析。在分析之前, 颗粒有机碳的滤膜用浓盐酸熏 24 h, 除去无机碳, 再次干燥。然后将过滤膜装好进行后续分析。POC、PON、TPC 浓度由 Vario EL III 自动元素分析仪(Elemntar Analysensysteme Co., 德国)依次测定。通过 TPC 与 POC 的差异, 计算 PIC 浓度, POC、PIC 或 PON 产量计算公式如下:

$P =$ 比生长速率(μ (d⁻¹) × 细胞中 POC、PIC 或 PON 含量 (pg/cell)。

1.2.7 数据分析 实验数据的统计分析采用 SPSS 17.0 软件, 运用单因素方差分析(One-way ANOVA)来分析各处理之间差异的显著性, 以 $P < 0.05$ 作为差异显著水平。

2 结果

2.1 实验中碳酸盐体系的变化

本实验采用充气法模拟海水酸化, 检测不同处理条件下的海水碳酸盐系统参数的变化, 包括 pH、DIC、HCO₃⁻、CO₃²⁻ 和 CO₂。图 1 和表 1 为不同颗石藻的海水 pH 值随 CO₂ 浓度的变化情况。浓度为 400、750、1000 和 2000 μatm 的 CO₂ 对应的 pH 值分别为 8.06±0.02、7.79±0.01、7.65±0.02 和 7.48±0.02。因为海水中含有引起碱度变化的缓冲液, 本研究设定的实验条件与预期的海洋酸化条件并不完全相同。有些实验测量需要大量的生物量, 因此, 需要较大的细胞密度, 从而导致碳酸盐体系的变化。尽管存在这些变化, 但在整个实验过程中, 培养藻的 4 种梯度的 pH 值始终保持着明显的差异, 使研究结果具有重要意义。

2.2 海洋酸化对颗石藻生长的影响

实验室条件下, 不同 CO₂ 分压对 4 种品系颗石藻生长的影响如图 2 所示。所有处理的藻细胞浓度随着培养时间的延长逐渐升高并达到最大值, 随后, 藻细胞浓度逐渐下降直至实验结束。CO₂ 分压对每种颗石藻的细胞浓度均有显著影响。随着 CO₂ 浓度逐渐增加, C-E、N-E 和 N-G 均显示出积极响应, 然而对于 N-E, CO₂ 分压达到 2000 μatm 时, N-E 的生长被抑制。所有处理的藻细胞在前 7 d 均呈指数级生长, 其

表1 初始碳酸盐系统参数
Tab.1 The data of the original carbonated system

Pumping CO ₂ levels	pH	TA(μmol/L)	TCO ₂ (μmol/L)	DIC (μmol/L)	CO ₃ ²⁻ (μmol/L)	HCO ₃ ⁻ (μmol/L)	Omega calcite
400 μatm	8.06±0.02	2586.71±11.34	21.46±1.21	2444.99±18.35	163.09±5.85	2260.45±23.01	3.46±0.12
750 μatm	7.79±0.01	2606.56±15.24	42.73±1.30	2555.49±17.86	93.69±1.46	2419.06±18.02	1.99±0.03
1000 μatm	7.65±0.02	2636.73±16.94	60.92±3.34	2627.51±22.85	70.08±2.61	2496.51±22.11	1.49±0.06
2000 μatm	7.48±0.02	2787.55±8.26	96.91±4.91	2833.42±15.22	50.97±2.11	2685.53±12.42	1.08±0.04

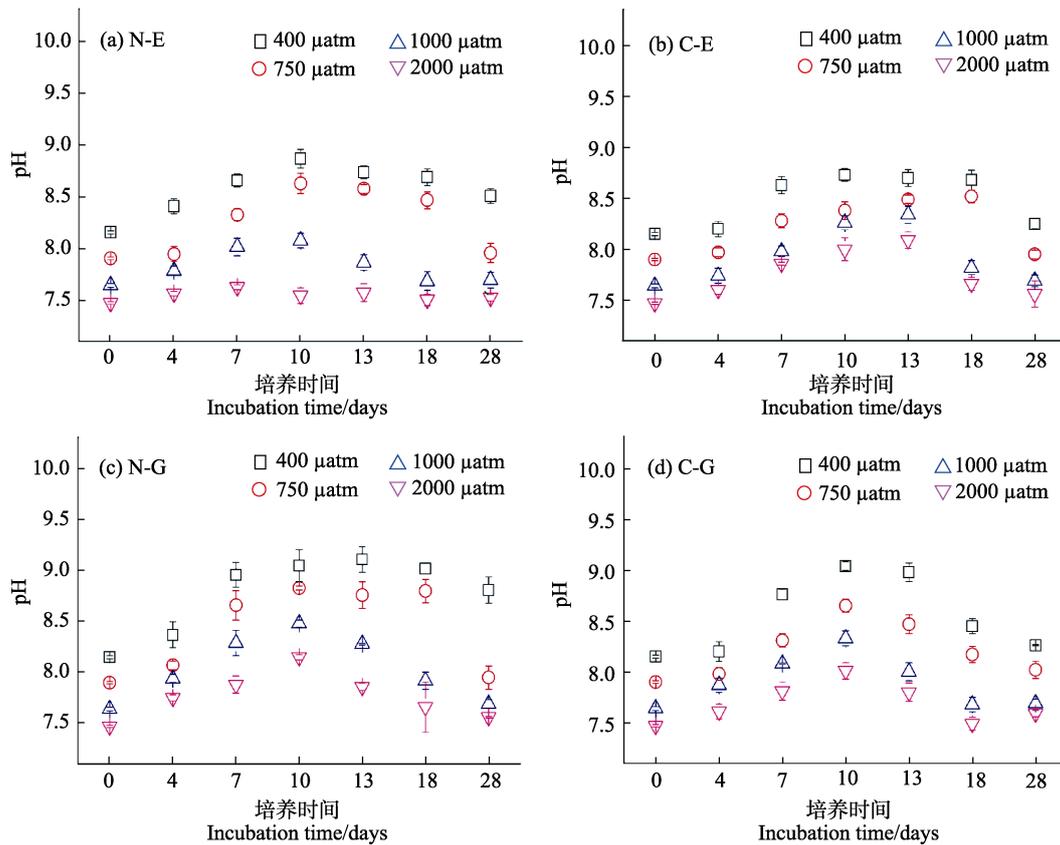


图1 4种品系颗石藻在不同的CO₂浓度下随着培养时间改变的海水pH值变化

Fig.1 Changes of seawater pH of the four strains of coccolithopsis with different incubation time at different CO₂ concentrations [N-E: *E. huxleyi* (a); C-E: *E. huxleyi* CS369 (b); N-G: *G. oceanica* NIES-1318 (c); C-G: *G. oceanica* (d)]

特定生长速率如图 2e~h 所示。CO₂ 浓度持续增加至 2000 μatm，比生长速率分别增大约 53% (C-E)，36% (N-G)和 30% (C-G)。然而，对于 N-E，当 CO₂ 浓度达到 1000 μatm，比生长率增加约 26%。当 CO₂ 连续升至 2000 μatm 时，与对照组相比，海洋酸化导致 N-E 的比生长率下降 14%。

2.3 海洋酸化对颗石藻光合特性的影响

图 3 为海洋酸化对颗石藻 F_v/F_m 和 Y(II) 在内的光系统参数变化的影响。当 CO₂ 升高至 2000 μatm 时，所有处理的 F_v/F_m 和 Y(II) 均显示出负面影响，但响应幅度在 4 种品系颗石藻中不同。随着培养时间的延长，除了 CO₂ 浓度达到 2000 μatm 时，C-E 的参数 F_v/F_m

在第 10 天达到最大值，N-E 一直下降之外，4 种品系颗石藻的光合系统参数在第 7 天达到最大值，随后下降直至实验结束。随着 CO₂ 分压增加到 2000 μatm，对于 N-E、C-E、N-G 和 C-G，海洋酸化对 F_v/F_m 的显著抑制作用分别发生在第 7、4、13 和 10 天，而对 Y(II) 的抑制作用分别发生在第 4、13、13 和 10 天。实验结束后，与对照组相比，当 CO₂ 分压升高至 2000 μatm， F_v/F_m 被抑制，分别下降 60%、45%、55% 和 46%；Y(II) 也被抑制，分别下降 75%、69%、76% 和 39%。此外，与 N-E 和 N-G 的最大 Y(II) 值相比 [低于 400 μatm 时分别为 (0.32±1.90)% 和 (0.34±2.60)%]，C-E 和 C-G 的最大 Y(II) 值 [低于 400 μatm 时分别为 (0.39±3.10)% 和 (0.48±2.30)%] 显著较高，而 F_v/F_m 无显著差异。

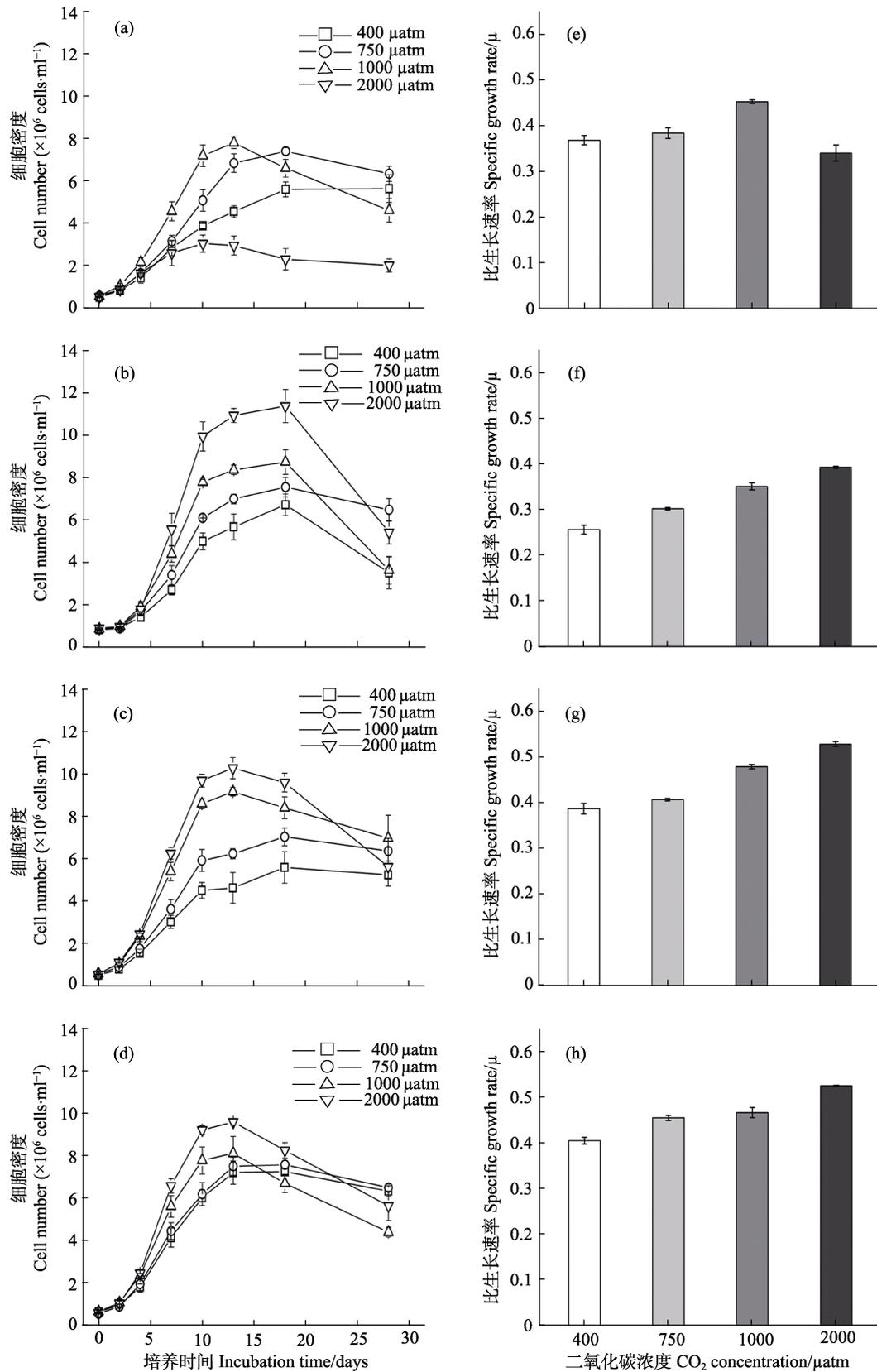


图 2 不同 CO₂ 浓度下 4 种系颗石藻的生长曲线(a~d)和比生长速率(e~h)

Fig.2 The growth curves (a~d) and specific growth rates (e~h) of the four strains *E. huxleyi* (a, e), *E. huxleyi* CS369 (b, f), *G. oceanica* NIES-1318 (c, g), and *G. oceanica* (d, h) for different CO₂ concentrations

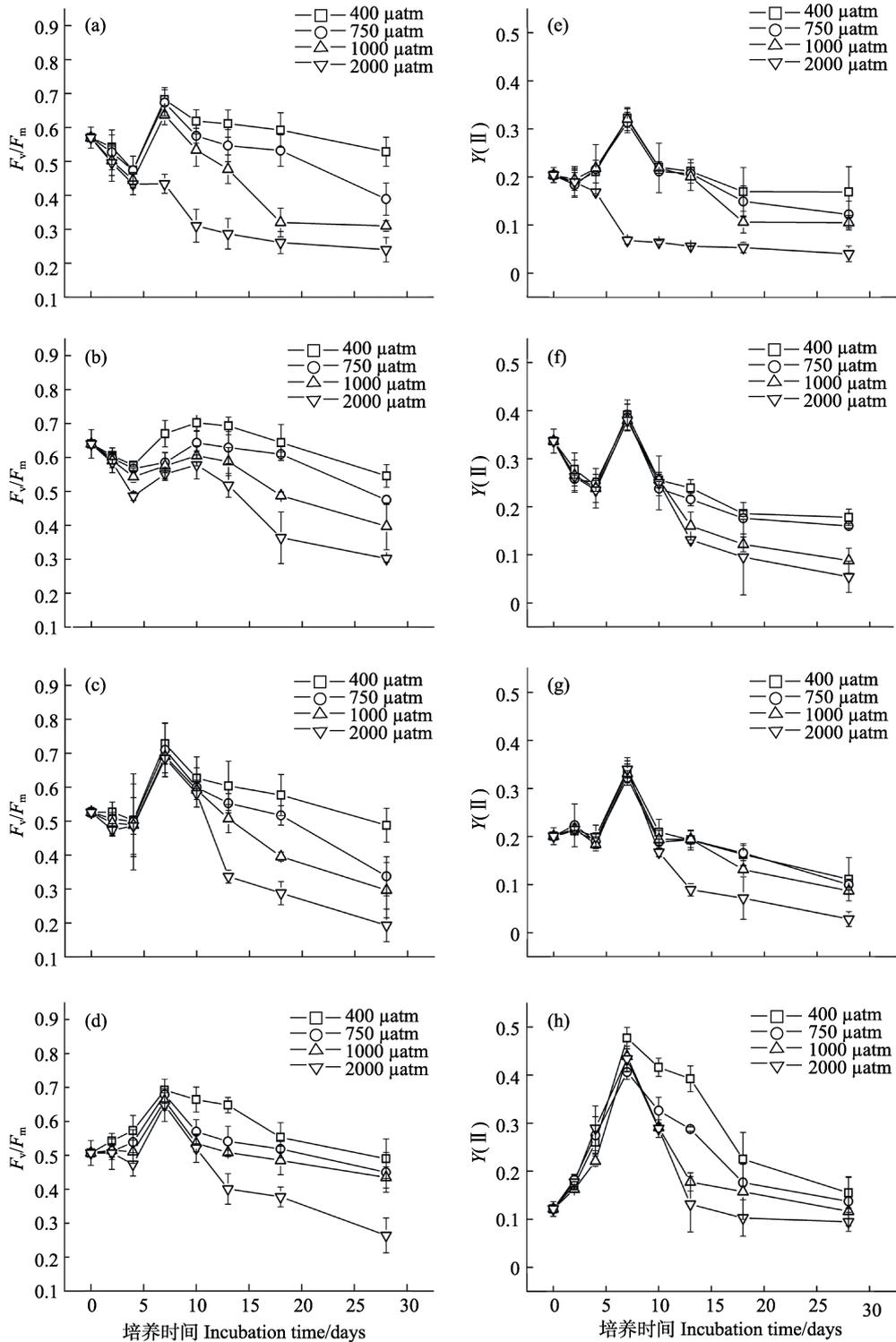


图 3 培养过程 CO_2 浓度升高对 4 种品系颗石藻的光合参数 F_v/F_m (a~d) 和 $Y(\text{II})$ (e~f) 的影响

Fig.3 The effect of ocean acidification by increasing CO_2 concentrations on the changes of F_v/F_m (a~d) and $Y(\text{II})$ (e~f) in the photosystem activity parameter during growth of the four species *E. huxleyi* (a, e), *E. huxleyi* CS369 (b, f), *G. oceanica* NIES-1318 (c, g), and *G. oceanica* (d, h) for different CO_2 concentrations

当 CO_2 浓度从 $400 \mu\text{atm}$ 升高至 $2000 \mu\text{atm}$ 对不同品系颗石藻细胞内叶绿素含量的影响见图 4。细胞叶绿素 *a* 含量在第 20 天(N-E、C-E 和 N-G)和第 7 天(C-G)达到最大值, 在初始值出现微小变化后, 叶绿

素 *a* 含量逐渐下降, 直至实验结束(图 4a~d)。然而, 随着时间的推移, 叶绿素 *c* 呈现出整体稳定下降的趋势(图 4e~f)。然而, 随着 CO_2 浓度从 $400 \mu\text{atm}$ 增加至 $1000 \mu\text{atm}$, 每种颗石藻叶绿素含量以同样模式下

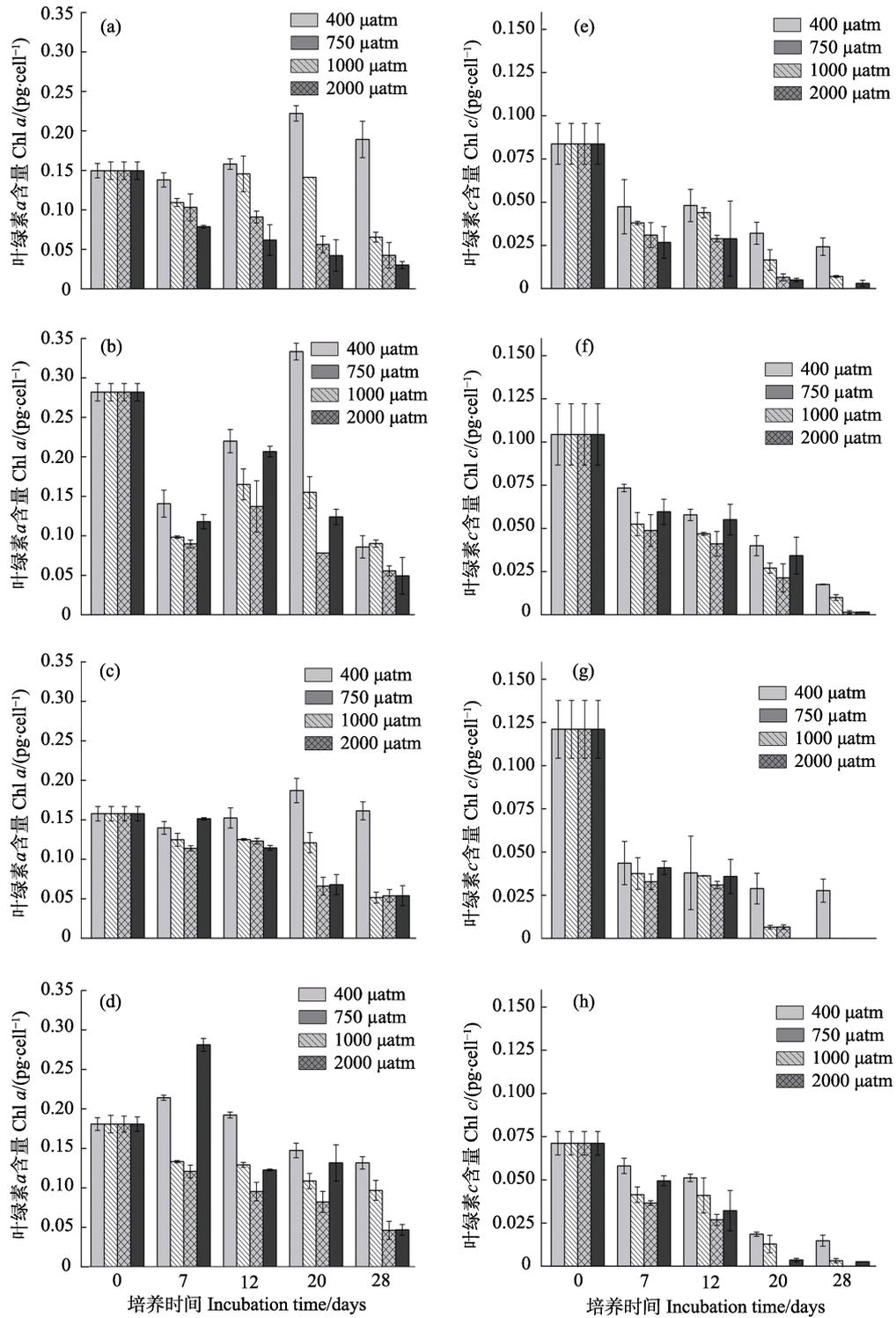


图 4 升高的 CO₂ 对 4 种品系颗石藻叶绿素含量的影响

Fig.4 The change of chlorophyll content of the four strains

a, e: *E. huxleyi*; b, f: *E. huxleyi* CS369; c, g: *G. oceanica* NIES-1318; d, h: *G. oceanica*, at elevated CO₂ conditions

降(除了个别点以不同的方式呈现)。然而,当 CO₂ 浓度达到 2000 μatm 时,测定的结果表现出不同的反应。与 1000 μatm 相比,当 CO₂ 浓度为 2000 μatm 时,在每个采样点,随着培养时间的延长, N-E 的叶绿素 *a* 和 *c* 的含量降低。然而,对于藻株 C-E、N-G 和 C-G,

随着 CO₂ 浓度增加到 1000 μatm,在每个采样点叶绿素含量趋向于增加。

2.4 海洋酸化对颗石藻氮吸收速率的影响

海洋酸化对 4 种品系颗石藻氮吸收速率的影响

如图5所示。随着CO₂从400 μatm升高至2000 μatm, 4种品系颗石藻的氮吸收速率均增加, 分别增加了48.2%(N-E)、33.9%(C-E)、41.6%(N-G)和34.3%(C-G)。氮吸收速率的最大变异值(48.2%, N-E)比最小变异值(33.9%, C-E)增大了近1.5倍。此外, 4种品系颗石藻的

氮吸收速率相对于CO₂增加的响应根据米氏方程曲线拟合, 由响应曲线得到2个半饱和常数(K_m , μatm CO₂)和最大CO₂饱和率(V_{max} , pmol N/cell·d)得到。藻体N-E中, 最大 K_m 和 V_{max} 值分别是307.2 μatm和24.1 pmol N/cell·d, 分别大于C-E最低值约1.7倍和1.3倍。

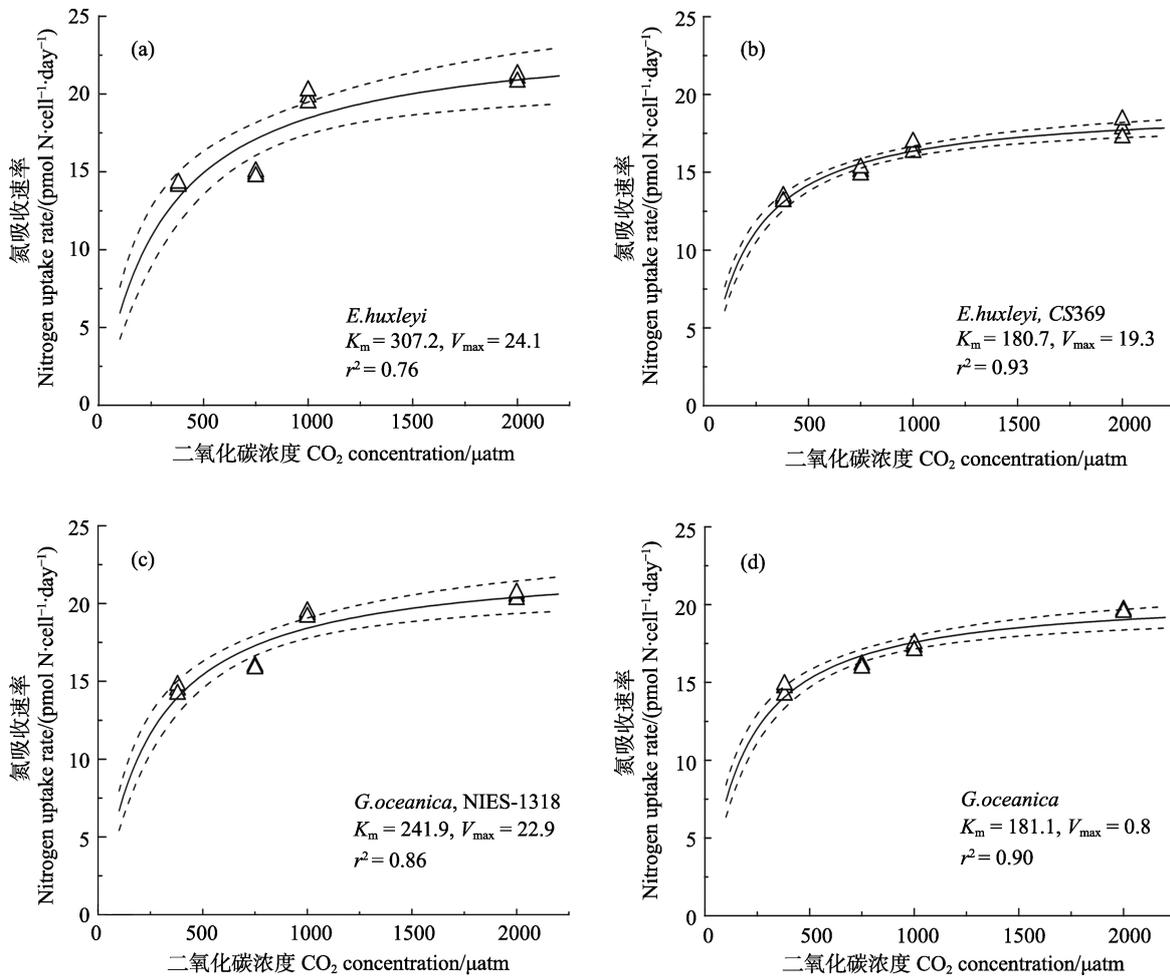


图5 CO₂升高对4种品系颗石藻氮吸收速率的影响

Fig.5 Nitrogen uptake rate response curves relative to CO₂ changing concentrations for four *E. huxleyi* and *G. oceanica* strains a: *E. huxleyi*; b: *E. huxleyi* CS369; c: *G. oceanica* NIES-1318; d: *G. oceanica*

2.5 海洋酸化对颗石藻元素组成及钙化速率的影响

图6为CO₂升高对第7天的4种品系颗石藻的POC和PON的产生情况。当CO₂达到2000 μatm时, 显著刺激颗石藻产生POC和PON(除了N-E)。N-E颗石藻有机碳生产率的变化是巨大的, 在1000 μatm CO₂浓度条件下, 表现出明显的增加, 但在2000 μatm时, 表现出大幅下降。与对照组相比, C-E、N-G和C-G藻种的POC产量分别增长约101%、35%和49%, 其中C-E品系POC产率变化分别为N-G、C-G品种的2.9倍、2.1倍。此外, 在此范围内, PON较对照

组分别增加233%(N-E)、289%(C-E)、148%(N-G)和129%(C-G), 增幅较大。然而, 随着CO₂由400 μatm升高至2000 μatm, 4个藻种的颗粒有机碳和氮的变化导致颗粒有机碳与颗粒有机氮的比值(POC/PON)分别减少76.6%(N-E)、48.3%(C-E)、45.7%(N-G)和34.9%(C-G)。此外, 与400 μatm CO₂相比, 2000 μatm CO₂对颗粒有机碳的产率有负面的影响, 2个钙化品系C-E和C-G的钙化率呈现更大程度的降低, 分别为35.4%和68.9%。当CO₂浓度增大到2000 μatm, C-G比C-E呈现更高的PIC还原力。同时, 这2种藻的PIC/POC值也分别下降67.9%和79.2%。

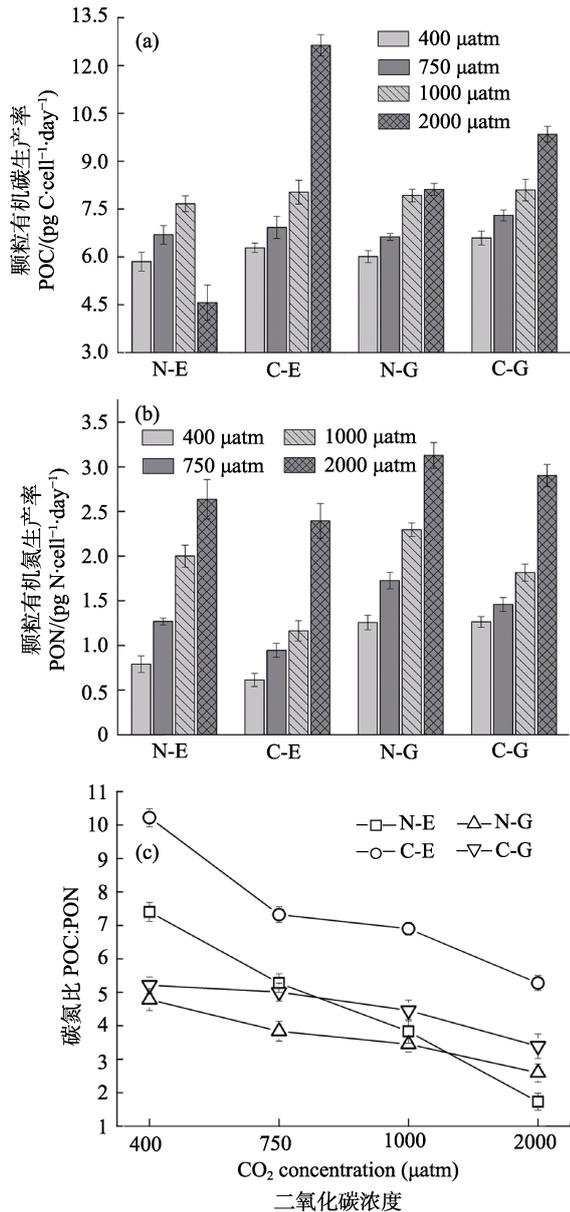


图 6 海水酸化对 4 种品系颗石藻颗粒有机碳和颗粒无机碳的生产率及碳氮比的影响

Fig.6 Effect of seawater acidification by elevated CO₂ concentrations (400, 750, 1000, and 2000 μatm) on POC (a), PON production (b) and POC:PON (c) of the four species (*E. huxleyi*, *E. huxleyi* CS369, *G. oceanica* NIES-1318, and *G. oceanica*)

3 讨论

本研究首次在实验中使用了非钙化品系和钙化品系的 2 种颗石藻, 研究了它们对 CO₂ 升高的响应。同时, 利用氮吸收率拟合的 CO₂ 响应曲线, 获得的动力常数来分析不同颗石藻的遗传变异性。当 CO₂ 浓度升高到 2000 μatm 时, 与其他 3 个藻种不同程度的积极响应相比, N-E 被严重抑制。本结果表明, 海洋酸

化对颗石藻产生生理影响, 不同颗石藻对海洋酸化具有特异响应, 最近的研究表明, 不同的浮游植物对 CO₂ 浓度升高的响应存在种间异质性(马莎等, 2019), 这与本研究结果类似。作者推测, 海洋酸化可能导致未来海洋生物多样性、营养相互作用关系和其他生态系统进程的变化。

3.1 海洋酸化对不同颗石藻生长和光合系统参数的影响

研究表明, 与对照组相比, 除了 N-E, 高 CO₂ 浓度(增加到 2000 μatm)促进藻细胞的生长(图 2)。而 N-E 的生长在 CO₂ 浓度为 2000 μatm 时下降, 其特定生长率在第 7 天显著降低了 7.61%。然而, 在 CO₂ 浓度升高至 1000 μatm 之前, N-E 的生长保持增长状态(图 2a 和 2e)。Fiorini 等(2011b)也得到了类似的结果, 富含 CO₂ (750 μatm) 的水中, 颗石藻藻状细胞的生长呈现增长趋势。

前人的研究表明, 由于细胞外碳酸酐酶的活性较低, 导致其 CO₂ 浓缩机制(CCM)效率相对较低(Herfort *et al*, 2002; Trimborn *et al*, 2007; Rokitta *et al*, 2012a; Jin *et al*, 2013), 所以, 目前海洋中的颗石藻具有碳限制性。因此, 酸化的海水可利用 CO₂ 含量的增加可能会加速 Rubisco 附近 CO₂ 的积累, 以弥补碳供应不足, 进一步促进颗石藻的羧化作用和生长作用(伴随着 POC 的增加) (Barcelose *et al*, 2010; Reinfelder, 2011; Jin *et al*, 2013; Kottmeier *et al*, 2014)。本研究中, 观察到 4 种品系颗石藻在高 CO₂ 条件下的生长情况, N-E 在 1000 μatm 增长 23%, 另外 3 种藻在 2000 μatm 时分别增长 53%(C-E)、36%(N-G)和 30%(C-G)(图 2)。然而, 每个品系对 CO₂ 升高的反应能力和策略不同。此外, 对于 N-E 来说, 在 2000 μatm 条件下, 几乎处于白化状态。

研究表明, 细胞外 pH 值的变化可以通过破坏恒定膜电位平衡和生理参数来影响藻细胞的活性(Langer *et al*, 2006; Taylor *et al*, 2011; Rokitta *et al*, 2012b)。相比于其他 3 种品系颗石藻, 由于 pH 值下降及超过耐受能力(7.48, 2000 μatm), N-E 更加敏感而呈负反应。因为颗石藻是一种丰富的藻种, 具有独特的生理和形态特征(Winter *et al*, 1994; Raven *et al*, 2012), 推测颗石藻对 CO₂ 增加的特异性反应具有遗传基础。Read 等(2013)报道了第一次解析的基因组(来自 *E. huxleyi* CCMP1516)在复合种内的变异性支持了颗石藻在不同生境中的繁荣发展。结合本实验结果, 猜想颗石藻固有的遗传特异性可能导致其对海洋酸化产生特异性反应。

然而,由于光合系统参数和色素含量分析的藻类光合作用(与生长紧密相关)能力随着 CO_2 增加产生多种负反应,尤其 N-E 几乎丧失光合能力(图 3 和 4)。这些涉及到光系统活动的结果表明,由于 pH 值下降(CO_2 升高)对细胞离子平衡的影响,藻细胞仍然处于光合不健康状态(Langer *et al.*, 2006),诱导了叶绿素含量降低(图 4)。特别是当 CO_2 浓度达到 $2000 \mu\text{atm}$, 超过可调节的范围,与其他 3 种品系颗石藻相比,NE 的 F_v/F_m 和叶绿素 *a* 的含量被严重影响(图 3a 和 4a)。与 CO_2 升高对生长的不同反应相类似,不同藻类光合作用对 CO_2 升高响应也具有特异性。对于整个生态系统来说,一部分的微小变化可能会影响整个生态系统,颗石藻对海洋酸化的特异反应可能会影响生物多样性和其他生态过程(Orr *et al.*, 2005; Hendriks *et al.*, 2010)。

3.2 海洋酸化对颗石藻氮吸收速率的影响

考虑到海洋酸化对营养盐吸收的影响,本研究在第 7 天取样测试了不同 CO_2 水平下各品系藻株的氮吸收速率,并拟合了每种颗石藻应对 CO_2 变化的氮吸收速率响应曲线,以供进一步分析。结果表明,当 CO_2 浓度升高至 $2000 \mu\text{atm}$ 时,所有品系的氮吸收速率增加(图 5)。非钙化藻株 N-E 和 N-G 的氮吸收速率显著的增加了 41.6% 和 48.2%(图 5a 和 c),而钙化藻株 C-E 和 C-G 分别在氮吸收速率提高了 33.9% 和 34.3%。Jin 等(2013)的研究表明, CO_2 增加导致颗石藻对无机氮的吸收增强,硅藻硝酸盐还原酶基因上调。此外,各品系藻种之间也存在差异。

先前的研究表明,在海洋酸化条件下,颗石藻细胞具有能量再分配的过程(Raven, 2011; Beaufort *et al.*, 2011),导致额外的 ATP 释放优先支持额外的氮吸收以合成更多的蛋白质(Jin *et al.*, 2013)。然而,与非钙化细胞相比,钙化细胞需要更多的能量来转运钙化作用中的氢离子到酸性环境中(Suffrian *et al.*, 2011; Taylor *et al.*, 2011; Beaufort *et al.*, 2011; Stojkovic *et al.*, 2013)。 CO_2 升高到 $2000 \mu\text{atm}$ 时,钙化品系藻株的氮吸收速率显著低于非钙化藻株。此外,本研究在 CO_2 升高下测定 PON 产量也间接证实了氮吸收的能量再分配偏好(图 6b)。

藻氮吸收速率相对 CO_2 变化的响应曲线,证实了 CO_2 对这些颗石藻的影响行为。由响应曲线推导出的动力学常数(K_m)表示酶对底物的亲和力, K_m 值越大,亲和力越小(Michaelis *et al.*, 1913)。最近, Hutchins 等(2013)通过分析不同的动力学常数,证实了固氮作用与 CO_2 浓度之间的品系特异性差异。在这项研究

中,相比其他 3 种藻株, N-E 显示出最高 K_m 值,即 NO_3^- 还原酶的亲和力最低(图 5)。这一结果与其他测量参数,如生长速率、光合活动等反映出相同的趋势,这表明 CO_2 浓度升高严重抑制了 N-E 的生命活动。

3.3 海洋酸化对不同颗石藻元素组成的影响

浮游植物的化学元素组成会对营养相互作用关系有一定影响,并最终对海洋营养元素的生物地球化学产生影响,因为海洋浮游动物的膳食价值随 POC 与 PON 的比值(C : N)变化而变化(Hutchins *et al.*, 2009; Anderson *et al.*, 2013)。本研究测量了不同品系颗石藻的 C : N 比例,以评估生物有机体的元素组成是否受到 CO_2 浓度的影响,并探讨了影响的程度。结果显示,在 $2000 \mu\text{atm}$ CO_2 浓度下,4 种品系颗石藻的元素组成均发生变化,C : N 分别降低 76%(N-E)、48%(C-E)、45%(N-G)和 35%(C-G)(图 6)。N-E 相对其他 3 种颗石藻的影响较大,C-G 的影响最小。在之前的研究中, Fiorini 等(2011a)和 Rickaby 等(2010)的研究表明,当 CO_2 浓度增强时,颗石藻发生了相似的变化。当 CO_2 浓度从 $400 \mu\text{atm}$ 持续上升到 $2000 \mu\text{atm}$ 时,POC(除了在 $2000 \mu\text{atm}$ 下的 N-E)和 PON 的产率增加(图 6)。

研究还发现,与对照组相比, PON 的增加量比 POC 要高。前面已经讨论过,由于 CO_2 的升高,能量的重新分配导致了更多的氮吸收,增加了 PON 产量。尽管不同颗石藻的品系之间存在差异,这种偏好优势使得 PON 产量超过 POC 产量,导致 C : N 下降的幅度不同(图 6)。与 Riebesell 等(2011)之前的研究结果类似,C : N 比值随着 CO_2 浓度的变化具有高度的物种特异性。此外,这种变异比例可能是不同品系藻株间遗传差异的体现。此外,也存在与目前的研究结果相反的结果,随着 CO_2 浓度的升高,细胞 C : N 比值增加(Feng *et al.*, 2010; Kottmeier *et al.*, 2014)。

产生矛盾结果的原因可能是实验设置的不同,如温度、光照强度、藻种的选择等。此外,最终结果表现出一种非常有趣的现象,非钙化藻的 C : N 比值比钙化藻高。这种现象的原因尚不清楚,但很可能与颗石藻钙化作用有关。这些结果表明, CO_2 浓度的增加影响了颗石藻 C : N 比值,并且对不同颗石藻产生了不同的影响。此外,它还将进一步影响浮游植物的捕食选择压力,并对许多生物地球化学循环过程产生影响(特别是碳输出通量)(Iglesias-Rodriguez *et al.*, 2008)。

3.4 海洋酸化对颗石藻钙化效率的影响

在过去几年里,颗石藻 PIC 生产效率(钙化率)已

被广泛用于颗石藻的研究,以预测海洋酸化的生物学影响。结果表明,当藻细胞生长在高于当前 CO_2 水平时($400 \mu\text{atm}$),主要反应是钙化率下降或者至少减少 PIC/POC 的值(Zon-dervan *et al.*, 2001; Langer *et al.*, 2006; Muller *et al.*, 2010; Hoppe *et al.*, 2011)。本研究中,关于 PIC 的响应与上述的趋势是一致的。同时,当 CO_2 浓度由 $400 \mu\text{atm}$ 升高到 $2000 \mu\text{atm}$ 时,钙化赫氏颗石藻和钙化大洋球藻在第 7 天的钙化率分别下降 35.4% 和 68.9%(图 7)。相比大洋球藻,赫氏颗石藻更容易受海洋酸化的影响,从而导致生态不平衡的因素。但对于实验中所用的非钙化种,由于失去了表面覆盖的钙化外壳, PIC 的产量几乎可以忽略不计。

最近各种生物体的研究显示,钙化很大程度上是由饱和碳酸钙而不是单靠 pH 值控制(Langer *et al.*, 2006; Trimborn, 2007)。海水中的饱和碳酸钙由(DIC)和 pH 值共同控制(Iglesias-Rodriguez *et al.*, 2008)。当表层海水过饱和和碳酸钙由于海洋酸化或其他自然过程条件下饱和程度下降时,分布在贝壳和骨骼中的碳酸盐矿物开始溶解(Feely *et al.*, 2009)。该研究表明,当 CO_2 浓度由 $400 \mu\text{atm}$ 升高到 $2000 \mu\text{atm}$,钙离子的饱和度降低,但依然处于溶解发生的阈值。结果明确表明,与对照组相比, PIC 的产量(钙化效率)最终有所下降(图 7)。

Langer 等(2009)的研究结果也出现同样的现象,虽然钙离子的饱和度大于 1,但颗粒无机碳的溶解仍然发生。为了解释这一现象,我们发现 $400 \mu\text{atm}$ 和 $2000 \mu\text{atm}$ CO_2 在第 7 天的 pH 值介于 8.81~7.62 之间(表 1 和图 1),并且与空白对照相比,细胞的生理状态和 pH 值有一定的变化。这些变化影响了藻细胞的光合作用,这意味着颗石藻细胞不完全适应改变后的 pH 条件。Bach 等(2011)认为,钙化作用对 pH 值降低具有特异性反应。在 CO_2 升高的情况下,颗石藻的钙化作用是一个严格控制的生物进程(Mackinder *et al.*, 2010),将受到 pH 水平下降的影响。

最近,大量的生理和分子研究证据表明,当使用 HCO_3^- 进行钙化作用(产生 H^+ , 并保持细胞 pH 稳态接近中性)时, H^+ 必须通过膜离子通道被清除(Suffrian *et al.*, 2011; Taylor *et al.*, 2011)或者在颗石藻细胞中被总和(Fabry *et al.*, 2008; Rokitta *et al.*, 2012; Stojkovic *et al.*, 2013)。为了维持合适的跨质膜电位差和 H^+ 射流, H^+ 输运过程中需要能量(Raven, 2011)。当 CO_2 升高导致水体 pH 值和/或 $[\text{CO}_3^{2-}]$ 水平降低时,单位钙化输入的能量可能更大,从而导致钙化率降低(Raven *et al.*, 2011; Beaufort *et al.*, 2011)。通过研究 CO_2 增加对颗石藻钙化的不利影响,颗石藻的钙化作用与生物

地球化学循环密切相关,虽然我们对钙化作用的降低给出了合理的解释,但这种解释只是事实的一小部分。目前,海洋酸化对钙化颗石藻影响的原因仍然需要进一步的探索。

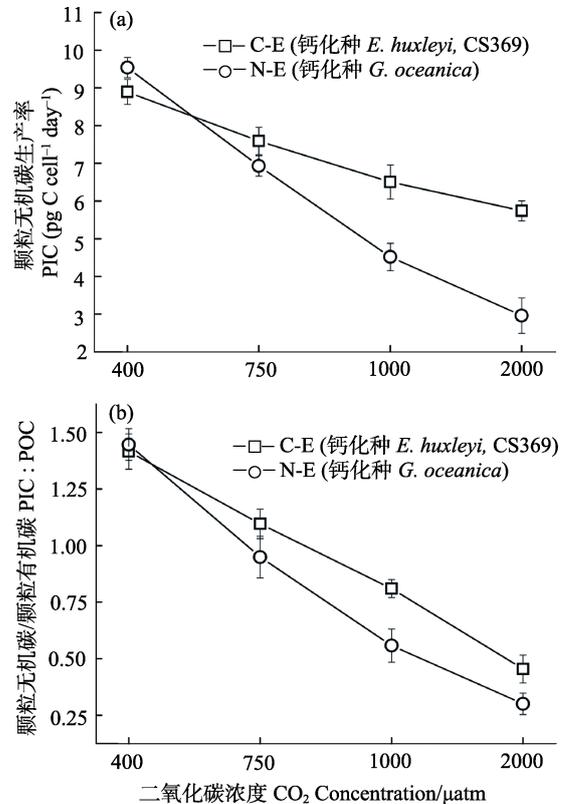


图 7 海水酸化第 7 天对钙化颗石藻的颗粒无机碳生产率以及颗粒无机碳与颗粒有机碳的比值的影响
Fig.7 Effect of seawater acidification by elevated CO_2 concentrations(400, 750, 1000, and 2000 μatm) on PIC production (a) and PIC/POC (b) of the calcifying species (*E. huxleyi* CS369 and *G. oceanica*) on the 7th day

本研究表明,不同颗石藻在应对海洋酸化威胁时表现出了特异的生理响应,随着 CO_2 浓度的逐渐增加,不同颗石藻在维持稳定的原始状态都发生了不同程度的改变。因此,物种分布和丰度的潜在变化可以通过海洋食物网的多种营养水平传递。虽然海洋酸化对生态系统长期影响的研究还处于起步阶段,但这些结果可能指示出在海洋酸化条件下生物多样性、营养相互作用关系、生物地球化学循环和其他生态系统进程的变化。

参 考 文 献

- Anderson TR, Hessen DO, Mitra A, *et al.* Sensitivity of secondary production and export flux to choice of trophic transfer formulation in marine ecosystem models. *Journal of*

- Marine Systems, 2013, 125: 41–53
- Bach LT, Riebesell U, Schulz KG. Distinguishing between the effects of ocean acidification and ocean carbonation in the coccolithophore *Emiliana huxleyi*. *Limnology and Oceanography*, 2011, 56(6): 2040–2050
- Barcelose RJ, Müller MN, Riebesell U. Short-term response of the coccolithophore *Emiliana huxleyi* to an abrupt change in seawater carbon dioxide concentrations. *Biogeosciences*, 2010, 7(1): 177–186
- Beaufort L, Barbarin N, Gally Y. Optical measurements to determine the thickness of calcite crystals and the mass of thin carbonate particles such as coccoliths. *Nature Protocols*, 2014, 9(3): 633–642
- Beaufort L, Probert I, Garidelthoron TD, *et al.* Sensitivity of coccolithophores to carbonate chemistry and ocean acidification. *Nature*, 2011, 476(7358): 80–83
- Caldeira K, Wickett ME. Oceanography: Anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature*, 2003, 425(6956): 365–365
- De Bodt C, van Oostende N, Harlay J, *et al.* Individual and interacting effects of pCO₂ and temperature on *Emiliana huxleyi* calcification: Study of the calcite production, the coccolith morphology and the coccosphere size. *Biogeosciences*, 2010, 7(5): 1401–1412
- Delille B, Harlay J, Zondervan I, *et al.* Response of primary production and calcification to changes of pCO₂ during experimental blooms of the coccolithophorid *Emiliana huxleyi*. *Global Biogeochemical Cycles*, 2005, 19(2): GB2023
- Fabry VJ, Seibel BA, Feely RA, *et al.* Impacts of ocean acidification on marine fauna and ecosystem processes. *ICES Journal of Marine Science*, 2008, 65(3): 414–432
- Falkowski P. Ocean Science: The power of plankton. *Nature*, 2012, 483(7387): S17–20
- Feely RA, Doney SC, Cooley SR. Ocean acidification: Present conditions and future changes in a high-CO₂ world. *Oceanography*, 2009, 22(4): 36–47
- Feng Y, Warner ME, Zhang Y, *et al.* Interactive effects of increased pCO₂, temperature and irradiance on the marine coccolithophore *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae). *European Journal of Phycology*, 2008, 43(1): 87–98
- Fiorini S, Middelburg JJ, Gattuso JP. Effects of elevated CO₂ partial pressure and temperature on the coccolithophore *Syracosphaera pulchra*. *Aquatic Microbial Ecology*, 2011, 64(3): 221–232
- Fiorini S, Middelburg JJ, Gattuso JP. Testing the effects of elevated pCO₂ on coccolithophores (Prymnesiophyceae): Comparison between haploid and diploid life stages. *Journal of Phycology*, 2011, 47(6): 1281–1291
- Hendriks IE, Duarte CM, Álvarez M. Vulnerability of marine biodiversity to ocean acidification: A meta-analysis. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2010, 86(2): 157–164
- Herfort L, Thake B, Roberts J. Acquisition and use of bicarbonate by *Emiliana huxleyi*. *New Phytologist*, 2002, 156(3): 427–436
- Hoppe CJM, Langer G, Rost B. *Emiliana huxleyi* shows identical responses to elevated pCO₂ in TA and DIC manipulations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2011, 406(1): 54–62
- Hutchins DA, Fu FX, Webb EA, *et al.* Taxon-specific response of marine nitrogen fixers to elevated carbon dioxide concentrations. *Nature Geoscience*, 2013, 6(9): 790–795
- Hutchins DA, Mulholland MR, Fu F. Nutrient cycles and marine microbes in a CO₂-enriched ocean. *Oceanography*, 2009, 22(4): 128–145
- Hutchins DA. Oceanography: Forecasting the rain ratio. *Nature*, 2011, 476(7358): 41–42
- Iglesias-Rodriguez MD, Halloran PR, Rickaby REM, *et al.* Phytoplankton calcification in a high-CO₂ world. *Science*, 2008, 320(5874): 336–340
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). Summary for policy makers in climate change 2007: The physical sciences basis, working group I contribution to the fourth assessment report of the IPCC, edited by: Solomon *et al.* Cambridge University Press, Cambridge, 2007, 1–996
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). The fourth assessment report of the IPCC. Cambridge University Press, 2008
- Jeffrey SW, Humphrey GF. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemie und Physiologie Der Pflanzen*, 1975, 167(2): 191–194
- Jin P, Gao K, Beardall J. Evolutionary responses of a coccolithophorid *Gephyrocapsa oceanica* to ocean acidification. *Evolution*, 2013, 67(7): 1869–1878
- Jones BM, Iglesias-Rodriguez MD, Skipp PJ, *et al.* Responses of the *Emiliana huxleyi* proteome to ocean acidification. *PLoS One*, 2013, 8(4): 1–13
- Kottmeier DM, Rokitta SD, Tortell PD, *et al.* Strong shift from HCO₃⁻ to CO₂ uptake in *Emiliana huxleyi* with acidification: New approach unravels acclimation versus short-term pH effects. *Photosynthesis Research*, 2014, 121(2–3): 265–275
- Langer G, Geisen M, Baumann KH, *et al.* Species-specific responses of calcifying algae to changing seawater carbonate chemistry. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, 2006, 7(9): 1–12
- Langer G, Nehrke G, Probert I, *et al.* Strain-specific responses of *Emiliana huxleyi* to changing seawater carbonate chemistry. *Biogeosciences*, 2009, 6(11): 2637–2646
- Langer G. Palaeontology: Plankton in a greenhouse world. *Nature Geoscience*, 2013, 6(3): 164–165
- Lohbeck KT, Riebesell U, Reusch TBH. Adaptive evolution of a key phytoplankton species to ocean acidification. *Nature Geoscience*, 2012, 5(5): 346–351
- Lohbeck KT, Riebesell U, Reusch TBH. Gene expression changes in the coccolithophore *Emiliana huxleyi* after 500 generations of selection to ocean acidification. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2014,

- 281(1786): 20140003
- Ma S, Zhang JH, Liu Y, *et al.* The response of different types of phytoplankton to the elevated CO₂ concentration. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(1): 27–35 [马莎, 张继红, 刘毅, 等. 不同种类浮游植物对 CO₂ 浓度升高的响应. *渔业科学进展*, 2019, 40(1): 27–35]
- Mackinder L, Wheeler G, Schroeder D, *et al.* Molecular mechanisms underlying calcification in coccolithophores. *Geomicrobiology Journal*, 2010, 27(6–7): 585–595
- Meier KJS, Beaufort L, Heussner S, *et al.* The role of ocean acidification in *Emiliana huxleyi* coccolith thinning in the Mediterranean Sea. *Biogeosciences Discussions*, 2014(11): 2857–2869
- Michaelis L, Menten ML. Die kinetik der invertinwirkung. *Biochemische Zeitschrift*, 1913, 49: 333–369
- Müller, MN Schulz KG, Riebesell U. Effects of long-term high CO₂ exposure on two species of coccolithophores. *Biogeosciences*, 2010, 7(3): 1109–1116
- Orr JC, Fabry VJ, Aumont O, *et al.* Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature*, 2005, 437(7059): 681–686
- Pelletier G, Lewis E, Wallace D. CO2Sys. xls: A calculator for the CO₂ system in seawater for microsoft excel/VBA. Washington State Department of Ecology/Brookhaven National Laboratory, Olympia, WA/Upton, NY, USA, 2007
- Raven JA, Crawford K. Environmental controls on coccolithophore calcification. *Marine Ecology Progress Series*, 2012, 470: 137–166
- Raven JA. Effects on marine algae of changed seawater chemistry with increasing atmospheric CO₂. *Biology and Environment-Proceedings of the Royal Irish Academy*, 2011, 111(1): 1–17
- Read BA, Kegel J, Klute MJ, *et al.* Pan genome of the phytoplankton *Emiliana* underpins its global distribution. *Nature*, 2013, 499(7457): 209–213
- Reinfelder JR. Carbon concentrating mechanisms in eukaryotic marine phytoplankton. *Annual Review of Marine Science*, 2011, 3(1): 291–315
- Rickaby REM, Henderiks J, Young JN. Perturbing phytoplankton: Response and isotopic fractionation with changing carbonate chemistry in two coccolithophore species. *Climate of the Past*, 2010, 6(6): 771–785
- Riebesell U, Tortell PD. Effects of ocean acidification on pelagic organisms and ecosystems. *Ocean Acidification*, 2011: 99–121
- Riebesell U, Zondervan I, Rost B, *et al.* Reduced calcification of marine plankton in response to increased atmospheric CO₂. *Nature*, 2000, 407(6802): 364–367
- Rokitta SD, John U, Björn R. Ocean acidification affects redox-balance and ion-homeostasis in the life-cycle stages of *Emiliana huxleyi*. *PLoS One*, 2012, 7(12): e52212
- Rokitta SD, Rost B. Effects of CO₂ and their modulation by light in the life-cycle stages of the coccolithophore *Emiliana huxleyi*. *Limnology and Oceanography*, 2012, 57(2): 607–618
- Ross PM, Parker L, O'Connor WA, *et al.* The impact of ocean acidification on reproduction, early development and settlement of marine organisms. *Water*, 2011, 3(4): 1005–1030
- Sciandra A, Harlay J, Lefèvre D, *et al.* Response of coccolithophorid *Emiliana huxleyi* to elevated partial pressure of CO₂ under nitrogen limitation. *Marine Ecology Progress Series*, 2003, 261: 111–122
- Shi D, Xu Y, Morel FMM. Effects of the pH/pCO₂ control method on medium chemistry and phytoplankton growth. *Biogeosciences*, 2009, 6(7): 1199–1207
- Sinutok S, Hill R, Doblin MA, *et al.* Warmer more acidic conditions cause decreased productivity and calcification in subtropical coral reef sediment-dwelling calcifiers. *Limnology and Oceanography*, 2011, 56(4): 1200–1212
- Stojkovic S, Beardall J, Matear R. CO₂-concentrating mechanisms in three southern hemisphere strains of *Emiliana huxleyi*. *Journal of Phycology*, 2013, 49(4): 670–679
- Suffrian K, Schulz KG, Gutowska MA, *et al.* Cellular pH measurements in *Emiliana huxleyi* reveal pronounced membrane proton permeability. *New Phytologist*, 2011, 190(3): 595–608
- Taylor AR, Chrachri A, Wheeler G, *et al.* A voltage-gated H⁺ channel underlying pH homeostasis in calcifying coccolithophores. *PLoS Biology*, 2011, 9(6): 14–16
- Trimborn S, Langer G, Rost B, *et al.* Effect of varying calcium concentrations and light intensities on calcification and photosynthesis in *Emiliana huxleyi*. *Limnology and Oceanography*, 2007, 52(5): 2285–2293
- Turley C, Eby M, Ridgwell AJ, *et al.* The societal challenge of ocean acidification. *Marine Pollution Bulletin*, 2010, 60(6): 787–792
- Winter A, Henderiks J, Beaufort L, *et al.* Poleward expansion of the coccolithophore *Emiliana huxleyi*. *Journal of Plankton Research*, 2014, 36(2): 316–325
- Winter A, Siesser WG. Coccolithophores. *Coccolithophores*, 1994(95): 252
- Xu D, Wang Y, Fan X, *et al.* Long-term experiment on physiological responses to synergetic effects of ocean acidification and photoperiod in the Antarctic sea ice algae *Chlamydomonas* sp. ICE-L. *Environmental Science and Technology*, 2014, 48(14): 7738–7746
- Young JR, Poulton AJ, Tyrrell T. Morphology of *Emiliana huxleyi* coccoliths on the northwestern European shelf—Is there an influence of carbonate chemistry? *Biogeosciences*, 2014, 11(17): 4771–4782
- Zondervan I, Rost B, Riebesell U. Effect of CO₂ concentration on the PIC/POC ratio in the coccolithophore *Emiliana huxleyi* grown under light-limiting conditions and different daylengths. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2002, 272(1): 55–70

Effects of Ocean Acidification on Physiological Characteristics of Coccolithophores

HUANG Shujie^{1,2,3,4}, XU Dong⁴, WANG Dongsheng⁴, ZHANG Xiansheng⁴, YE Naihao^{4①}

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. International Research Center for Marine Biosciences, Ministry of Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University, Ministry of Education, Shanghai 201306; 4. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao 266071)

Abstract Ocean acidification caused by increasing amounts of carbon dioxide has a great impact on marine organisms, especially calcified coccolithophores. However, culture experiments examining the response of coccolithophores to elevated CO₂ pa have mostly been based on investigations of a single strain and have yielded differences and even contradictory results from experiments between and even within species. Here, four strains of the coccolithophores, which contained naked and calcifying strains, were investigated simultaneously for the first time. Four carbon dioxide concentration gradients (400 μatm, 750 μatm, 1000 μatm, and 2000 μatm) were set up to systematically study the effects of ocean acidification on growth, photosynthesis, nitrogen source absorption, element composition and calcification efficiency of four coccolithophore species by batch aeration culture. The results did not show a uniform response from the different strains to elevated CO₂ concentrations up to 2000 μatm, and the naked strain *Emiliania huxleyi* (N-E) was seriously suppressed, which was in sharp contrast to the positive response of the other three algae to the different levels. On the other hand, photosynthetic parameters F_v/F_m , Y(II) and pigment show overall downward trend for all four strains, and calcification efficiency of C-E and C-G decrease 35.4% and 68.9% respectively, on the seventh day. In addition, the four coccolithophore strains of particulate organic nitrogen production show an increasing trend and the resulting POC/PON and PIC/POC declin. We determined that the responses of coccolithophores to ocean acidification are specific, and this variation may cause changes to biodiversity and other ecosystem processes in the ocean of the future.

Key words Ocean acidification; Coccolithophores; Specific; Biodiversity

① Corresponding author: YE Naihao, E-mail: yenh@ysfri.ac.cn