近海聚球藻*Synechococcus* PCC7002在不同生长期对环境CO₂浓度升高的生理响应

牟善莉¹, 李刚^{1,2}, 李鸿妹¹, 李法中³, 邵智生³, 李劲松³, 曲长风⁴, 张永雨^{1*}

1. 中国科学院青岛生物能源与过程研究所生物燃料重点实验室, 山东省能源生物遗传资源重点实验室, 青岛 266101;

2. 中国科学院南海海洋研究所热带海洋生物资源与生态重点实验室, 广州 510301;

3. 中国海洋石油有限公司湛江分公司, 湛江 524000;

4. 国家海洋局第一海洋研究所海洋生物活性物质重点实验室, 青岛 266101

* 通讯作者: zhangyy@qibebt.ac.cn

收稿日期: 2018-04-24; 收修改稿日期: 2018-05-22; 接受日期: 2018-05-28; 网络版发表日期: 2018-07-23

国家重点研发计划项目(编号: 2016YFA0601402)、国家海洋局“全球变化与海气相互作用”专项项目(编号: GASI-03-01-02-03)、南海西部海洋碳汇时间序列观测服务项目(编号: CNOOC-KJ 125 FZDXM 00 ZJ 001-2014)和国家自然科学基金项目(批准号: 41606092和41676156)资助

摘要 为探讨环境CO₂浓度升高对近海蓝细菌的影响, 选择了代表性海洋聚球藻*Synechococcus* sp. PCC7002, 在正常CO₂(400ppm)和高浓度CO₂(1000ppm)条件下, 研究其处于不同生长时期的光合生理特性. 结果表明: 在稳定期, CO₂浓度升高可显著促进细胞生长、提高培养体系内最高细胞浓度值. 在高浓度CO₂条件下, 聚球藻适应期为2天, 而在正常CO₂条件下, 聚球藻适应期长达6天. 高浓度CO₂可以提高聚球藻在适应期和指数期的光合作用能力, 但会降低其稳定期的光合作用能力. 此外, 与正常条件下相比, 高浓度CO₂条件下处于指数期和稳定期的聚球藻的饱和光强较低, 光能利用效率较高, 藻胆体/Chl *a*比值较高. 高浓度CO₂降低聚球藻在适应期和稳定期颗粒有机碳:Chl *a*(POC:Chl *a*)和颗粒有机氮:Chl *a*(PON:Chl *a*)的比值, 且该比值在指数生长期较高. 以上结果表明, 处于不同生长期的聚球藻PCC7002对CO₂浓度升高的生理响应不同, 前期的多数研究仅在指数期开展, 取得的结果未能全面反映CO₂浓度升高对海洋蓝细菌的影响. 本研究将为全面了解CO₂浓度升高对海洋微藻的影响提供重要参考.

关键词 聚球藻, CO₂浓度升高, 不同生长时期, 生理响应

1 引言

大气中二氧化碳(CO₂)浓度已从工业革命前期的285ppm(Indermühle等, 1999)增至2017年的407ppm

(<https://www.co2.earth/>) (1ppm=1mg/L). 如果以此耗能速率持续下去, CO₂浓度将在2100年达到1000ppm(Gattuso等, 2015). 大气中CO₂浓度升高已经成为21世纪人类所面临的最大的环境问题之一(Harley, 2011;

中文引用格式: 牟善莉, 李刚, 李鸿妹, 李法中, 邵智生, 李劲松, 曲长风, 张永雨. 2018. 近海聚球藻*Synechococcus* PCC7002在不同生长期对环境CO₂浓度升高的生理响应. 中国科学: 地球科学, 48: 1620–1628, doi: 10.1360/N072018-00126

英文引用格式: Mou S, Li G, Li H, Li F, Shao Z, Li J, Qu C, Zhang Y. 2018. Differential physiological responses of the coastal cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7002 to elevated pCO₂ at lag, exponential, and stationary growth phases. Science China Earth Sciences, 61: 1397–1405, <https://doi.org/10.1007/s11430-017-9206-5>

Kroeker等, 2013). 海洋中的藻类可以通过光合作用, 利用光能、固定CO₂(Gao等, 2012). 目前, 有关CO₂浓度升高对海洋藻类生理的影响已开展大量研究, 主要包括浮游藻类(Lomas等, 2012; Xu等, 2014; Li等, 2017)、珊瑚藻(Gao等, 1993; McCoy和Kamenos, 2015; Nash等, 2016)以及其他藻类. 结果表明, CO₂浓度升高会对海洋藻类生理活性产生不同程度的影响, 例如CO₂浓度升高可以增强海洋藻类的光合作用(Suárez-Álvarez等, 2012; Olischläger和Wiencke, 2013)、促进藻类生长(Olischläger等, 2013)以及无机营养盐的吸收(Qu等, 2017), 降低生长速率(Gao和Zheng, 2010)等, 也有可能无显著影响(Flynn等, 2015; Gao和Campbell, 2014). 此外, 还有研究证实, 环境CO₂浓度升高可以提高光系统II(PS II)的光失活对高光的敏感性(Li和Campbell, 2013). 可见, 海洋藻类对CO₂浓度变化的响应存在种间差异性, 因此CO₂浓度升高可以改变浮游藻类群落组成(Yoshimura等, 2010; Reinfelder, 2011; Wulff等, 2016).

相对于大洋而言, 近海海洋物理和化学环境更易受到人类活动的影响(Drupp等, 2011). 近海海洋环境因子是动态变化的, 其中包括海水中CO₂的浓度(Wootton等, 2008). 这些动态变化的环境因子在一定程度上影响浮游植物的生理状态. 前期研究表明, 近海和大洋的真核微藻对环境CO₂浓度升高的能力存在较大差异(Li等, 2016). 目前, 有关CO₂浓度升高对原核微藻的影响研究相对较少, 尤其是蓝细菌. 蓝细菌在全球海洋中广泛分布, 是海洋浮游植物的主要组成部分(Flombaum等, 2013), 其生物固碳约占全球总固碳量的25%, 在海洋生态系统中发挥重要作用(Chiu等, 2014; Axmann等, 2014). 聚球藻是海洋蓝细菌的一个重要类群, 也是海洋生物碳泵的主要驱动者之一(Dufresne等, 2008). 目前, 关于聚球藻的研究大多数都集中在对其丰度、生态分布, 以及与温度、光照和营养物质的关系(Partensky等, 1999; Moisan等, 2010; Flombaum等, 2013); 而室内开展CO₂浓度对聚球藻光合作用影响的研究主要是针对大洋藻种(Fu等, 2007; Traving等, 2014), 而对近海聚球藻光合生理响应的研究较少.

聚球藻PCC7002主要分布在近海和河口海域, 受理化环境及水体动力学变化影响, 这些海域的CO₂浓度波动较大(Woodger等, 2007). 目前, 只有少数研究探讨了CO₂浓度升高对聚球藻PCC7002生理的影响

(Onizuka等, 2002; Mou等, 2017). 如Mou等(2017)指出, CO₂浓度升高和无机氮(N)缺乏可以降低聚球藻PCC7002胞内叶绿素 a 和碳氮比; 还有研究显示, CO₂浓度升高可以降低该藻氯霉素乙酰转移酶基因表达和活性(Onizuka等, 2002). 然而, 这些研究均针对处于指数生长期的聚球藻, 而有关不同生长期(适应期、指数期和稳定期)聚球藻如何响应环境CO₂浓度升高还未见报道, 这将限制我们全面了解CO₂浓度对聚球藻生理特性的影响. 另一方面, 受自然环境变化的影响, 自然环境中的藻类并非一直处于指数生长状态, 因此本研究分析了CO₂浓度升高对不同生长期聚球藻PCC7002光合性能、营养盐吸收及胞内碳氮含量的影响, 旨在了解不同生长期聚球藻PCC7002对高浓度CO₂的生理响应.

2 材料与方法

2.1 藻种及培养条件

实验所用聚球藻藻种PCC7002(*Synechococcus* sp. PCC 7002)由中国科学院青岛生物能源与过程研究所微生物代谢工程研究组提供. 聚球藻PCC7002培养采用A+培养基(NO₃⁻-N浓度为12mmol L⁻¹; PO₄³⁻-P浓度为0.37mmol L⁻¹), 培养温度为25℃、光照强度为40μmol photons m⁻² s⁻¹、光暗周期为12h:12h. 实验设定CO₂浓度为400ppm(当前环境CO₂水平)和1000ppm(IPCC 2011预测的至2100年大气CO₂水平). CO₂浓度采用二氧化碳加富器(CE100D-3, 武汉瑞华仪器设备有限公司)进行控制. 将指数生长期的藻细胞接种到上述两种CO₂浓度充气预处理的新鲜培养基, 充气速率为30mL min⁻¹, 接种初始浓度为OD₇₅₀=0.1. 每个实验组分别设置3个平行. 实验持续22天, 每2天取样进行测定.

2.2 藻细胞密度和色素含量测定

实验中, 每两天取样测定色素含量和藻液光密度. 将10mL藻液经醋酸纤维素膜(孔径, 0.22μm)过滤, 滤膜于-20℃冷冻保存. 测定样品时, 将含藻细胞的滤膜用10mL 90%丙酮在4℃黑暗条件下过夜提取. 提取液5000g离心后, 取上清液利用分光光度计(Lambda 25, PerkinElmer, USA)测定吸光度值, 叶绿素 a (Chl a)和类胡萝卜素(Carot)按照式(1)和(2)进行计算,

$$\text{Chl } a = 12.7 \times (A_{663} - A_{750}) - 2.69 \times (A_{645} - A_{750}), \quad (1)$$

$$\text{Carot} = 2.11 \times (A_{663} - A_{750}) - 10.01 \times (A_{645} - A_{750}) + 4.37 \times (A_{470} - A_{750}). \quad (2)$$

培养过程中, 取3mL藻液, 以空白培养基作为对照, 使用分光光度计测定藻细胞在波长为750、680和630nm的吸光度值(A₇₅₀、A₆₈₀、A₆₃₀). 参照Fraser等(2013)的方法, 利用(A₆₈₀-A₇₅₀)/A₇₅₀和(A₆₃₀-A₇₅₀)/(A₆₈₀-A₇₅₀)来估算细胞中Chl *a*含量以及藻胆体/Chl *a*比.

2.3 叶绿素荧光参数测定

使用Dual-PAM-100叶绿素荧光仪(Walz, Germany), 参照(Krause和Weis, 1991)方法测定叶绿素荧光参数. 具体如下, 测量前将藻液样品暗适应15min, 开启测量光获得初始叶绿素荧光(*F*₀), 打开饱和脉冲(10000 μmol m⁻² s⁻¹, 300ms)获取最大荧光值(*F*_m), 然后打开光化光, 待荧光稳定后再次开启饱和脉冲获取光照条件下的最大荧光值(*F*_m′). 计算暗适应后藻细胞PSII的最大光化学效率: *F*_v/*F*_m=(*F*_m-*F*₀)/*F*_m(Mackey等, 2013). 另外, 将藻细胞在光辐照强度为6、13、22、53、95、126、216、339、531和825 μmol m⁻² s⁻¹的强度下测定光响应曲线, 利用Dual-PAM-100软件采用Platt等(1980)提出的双指数衰减函数拟合快速光曲线, 获得光吸收效率(α)、最大相对电子传递速率(rE-TRmax)及饱和光强(I_k)等生理参数.

2.4 氮、磷营养盐含量测定

取10mL藻液, 用醋酸纤维素膜进行过滤(孔径, 0.45 μm), 随后将滤液储存在棕色玻璃瓶中, 于-20℃冷冻保存. 测定样品时, 将样品室温解冻, 利用分光光度法测定硝酸盐(NO₃⁻)和磷酸盐(PO₄³⁻)浓度, 测定方法分别参照Norman等(1985)和Murphy和Riley(1962). NO₃⁻和PO₄³⁻的测定精度分别为0.04和0.02 μmol L⁻¹.

2.5 有机碳和有机氮含量测定

测定正常CO₂浓度和高CO₂浓度条件下聚球藻在适应期、指数期和稳定期胞内的颗粒有机碳(POC)、颗粒有机氮(PON)及溶液中溶解有机碳(DOC)含量. 正常环境CO₂浓度培养条件下的取样时间点为2、18和

22天, 高CO₂条件下的取样时间点为2、12和22天. 在上述不同时间点分别取20mL藻液, 用GF/F玻璃纤维滤膜(预先于450℃灼烧6h)过滤收集细胞, 于-20℃冷冻储存. 样品分析前, 将滤膜置于浓盐酸酸雾中进行酸熏过夜以除去无机碳, 再于60℃烘干6h. 细胞内的POC和PON利用全自动元素分析仪(Vario EL III, Elemental Analysensysteme Co., Germany)进行分析.

将上述经GF/F滤膜过滤后的滤液保存在棕色玻璃瓶(预先酸泡, 超纯水清洗并于450℃灼烧6h)中, 于-20℃冷冻储存. 测定样品时, 滤液室温解冻并用一次性滤器过滤(0.22 μm), 利用全自动总有机碳分析仪(TOC-VCSH, Shimadzu, Kyoto, Japan)测定DOC. 由于本试验培养聚球藻采用A+培养基, 培养基含有Tris、EDTA和维生素B12, 它们均属于有机碳, 含量约400.2mg DOC L⁻¹. 因此, 藻细胞分泌的溶解有机碳含量为溶液总有机碳扣减A+培养基本底有机碳含量.

2.6 数据分析

所有测定结果表示为平均值±标准差(*n*=3), 用单因素方差分析(ANOVA)和*t*检验进行统计显著性分析, 以*p*<0.05作为差异的显著性水平.

3 结果与讨论

在400ppm CO₂条件下, 培养体系中的Chl *a*浓度在前4天内从0.34mg L⁻¹升高至0.78mg L⁻¹, 在第18天时升至6.64mg L⁻¹, 在随后4天内维持较为稳定的水平(7.57mg L⁻¹). 正常CO₂和高CO₂条件下, 培养体系内Chl *a*浓度在前4天内没有显著性差异. 从第6天开始, 高CO₂浓度条件下, Chl *a*含量明显升高, 并在第22天达到最大值, 其含量提高90.7%. 表明, CO₂浓度升高会提高培养体系内聚球藻PCC7002最大生物量. 通常情况下, 微藻培养体系内细胞浓度较高时会出现无机碳的限制(Li等, 2012). 本试验中, 高CO₂浓度可以提供更多的碳源用于细胞生长, 从而获得较高的细胞浓度(图1a). 在正常CO₂和高CO₂条件下, Chl *a*/Carot比值在第12天时快速升高, 并一直维持至第22天. 由于藻细胞合成类胡萝卜素需要消耗更多的能量, 所以我们推测聚球藻在生长的中后期可能通过降低类胡萝卜素的合成, 来维持较高Chl *a*/Carot比值(图1b). 此外, 在整个培养过程中, CO₂浓度升高对聚球藻PCC7002 Chl *a*/Carot

图 1 聚球藻PCC7002在不同CO₂浓度条件下Chl *a*含量(a)和Chl *a*/Carot比值的变化(b)

图 2 培养体系中细胞浓度变化趋势(a)、叶绿素*a*变化趋势(b)、单位细胞内Chl *a*含量变化趋势(c)以及藻胆体/Chl *a*比值变化趋势(d)

(a)和(b)中实线代表线性回归, 虚线代表95%置信区间

比值没有显著性影响。

ln(A₇₅₀)可用于表示聚球藻PCC7002培养体系内的细胞浓度(图2a)。我们绘制了ln(A₇₅₀)曲线并拟合得到最佳线(含95%的置信区间), 选取最佳拟合线内培养时间段作为聚球藻指数生长期, 指数生长期前后部分的培养期分别为适应期和稳定期。在正常CO₂条件下, 聚球藻PCC7002从第6天进入指数生长期并一直持续至第20天(图2a)。而在高CO₂条件下, 聚球藻PCC7002适应期缩短至2天, 即指数期从第2天持续至第12天, 该结果与图1a中Chl *a*浓度变化结果一致。在正常CO₂和高CO₂条件下, 聚球藻PCC7002生长速率分别为(0.11±0.02)和(0.19±0.05), 该结果与利用ln(A₆₈₀-A₇₅₀)计算得到的生长速率相一致(图2a和图2b)。在正常CO₂条件下, 溶液中可利用的CO₂含量较低, 蓝细菌的生长易受到无机碳限制(Badger和Price, 2003)。通常, 聚球藻PCC7002具有CO₂浓缩机制(CCMs), 可以转运多种无机碳, 包括CO₂和HCO₃⁻, 来满足聚球藻对无机碳源的获取(Badger和Price, 2003; Woodger等, 2007)。在高CO₂条件下, 聚球藻PCC7002具有较高的生长速率, 可能是由于CCM机制的下调和培养液中可利用的

CO₂增加引起的(Gao等, 1991). 聚球藻转运其他无机碳源(如HCO₃⁻)需要消耗能量, 而CO₂分子可通过自由扩散作用直接进入藻细胞而被利用. CO₂浓度升高可为聚球藻PCC7002提供较多的可利用的游离CO₂, 以此节省的能量用于其他生理代谢过程, 如生长(Li等, 2012; Hopkinson等, 2011); 同时, 其他的生理过程也能降低对能量的消耗, 最终有利于藻细胞的生长, 或增加其对胁迫环境的适应(图2a和b). 此外, 高浓度CO₂可改变培养液中碳酸盐体系, 引起培养液pH降低, 进而影响藻类的生长(Gao等, 1991; Hong等, 2017); 但在本试验中, 我们没有测定pH的变化, 从而无法对pH如何影响聚球藻PCC7002的生理特性展开讨论.

聚球藻单位细胞内Chl *a*的含量用(A680-A750)/A750来表示(图2c). 在正常CO₂和高CO₂条件下, 单位细胞Chl *a*的含量在整个生长周期内均没有显著性变化. 该试验结果与我们前期研究结果相一致(Mou等, 2017). 在细胞培养过程中, 随着细胞数目不断增加, 细胞之间会相互遮挡, 用吸光度法可能会低估单位细胞中Chl *a*含量(Owens和Wold, 1986), 但在本试验中其对估算Chl *a*含量的影响较小, 也许是我们的培养体系内细胞浓度还未达到有显著影响的水平. 随培养时间的延长, 藻胆体与Chl *a*比值(藻胆体/Chl *a*)不断升高(图2d). 高CO₂条件下, 藻胆体/Chl *a*比值明显高于正常CO₂条件下的, 表明CO₂浓度升高可提高聚球藻单位细胞内藻胆体的含量. 藻胆体是聚球藻重要的捕光色素蛋白复合物, 可以吸收和传递光能(Sidler, 1995; Gan和Bryant, 2015). 因此, 藻胆体含量的增加可使聚球藻细胞捕获更多的光能, 用于光合作用过程.

在正常CO₂条件下, F_v/F_m 为(0.23±0.01), 并且在整个培养期间变化较小(图3a). 高CO₂条件下, 聚球藻PCC7002在培养的前8天, F_v/F_m 由(0.22±0.004)升高到(0.30±0.002); 随着培养时间延长, F_v/F_m 逐渐降低, 在第18天时降至(0.21±0.002). 在2~12天, 高CO₂可以提高聚球藻PCC7002光合能力($p<0.05$), 这一结果与图2a和图2b中细胞生长相一致, 该结果也与其他相关研究相一致(Suárez-Álvarez等, 2012; Olischläger和Wiencke, 2013). 而在稳定期(18~24天), CO₂浓度升高可降低 F_v/F_m . 在正常CO₂条件下, 聚球藻PCC7002的Ik为(97±2.3)~(147±25.6) μmol photons m⁻² s⁻¹, 在培养期间内没有显著变化(图3b). 在高CO₂条件下, Ik明显降低, 在指数期和稳定期分别降低了27.2%和37.4%. 在正常

图3 聚球藻PCC7002在不同CO₂浓度条件下的光合生理参数变化趋势

CO₂条件下, α 在适应期和指数期为(0.061±0.015), 在稳定期变化较大(图3c). 在不同生长时期, α 受高浓度

CO₂影响不同. 在适应期, α 受高浓度CO₂影响较小; 在指数期和稳定期 α 分别升高12%和40.1%. 高CO₂条件下, α 升高和Ik降低可能是由于藻胆体/Chl *a*比值升高引起的. rETR_{max}在聚球藻不同生长时期明显不同, 其中在稳定期达到最大值(12.7±0.49)(图3d). 但在整个生长时期, CO₂浓度升高对rETR_{max}没有显著影响. 此外, rETR_{max}升高趋势与Chl *a*升高趋势相似, 说明随着细胞浓度的增加, 藻细胞之间会产生遮挡作用从而对rETR_{max}产生影响. 高浓度CO₂可提高指数生长期藻细胞的Fv/Fm和 α , 降低Ik, 该结果与较高的生长速率(μ)一致(图2a和b). 在CO₂浓度升高条件下, Ik降低可增强藻细胞对强光的敏感性(Chen等, 2015).

正常CO₂条件下, NO₃⁻浓度在不同的生长时期没有显著性变化(图4a). 高CO₂条件下, NO₃⁻在指数生长期后期和稳定期明显降低, 表明高浓度CO₂可以提高聚球藻PCC7002对NO₃⁻的吸收能力, 从而促进细胞生长. 在正常和高CO₂浓度条件下, 随着培养时间的增加PO₄³⁻浓度不断降低, 说明聚球藻细胞在整个生长期

图4 在不同CO₂浓度条件下聚球藻PCC7002培养体系中营养盐浓度变化趋势

间一直吸收磷酸盐. 但聚球藻PCC7002对PO₄³⁻的吸收受CO₂浓度升高的影响不显著.

在本试验中, 我们利用POC/Chl *a*和PON/Chl *a*表示单位细胞内碳、氮含量(图5a和b). 在正常和高CO₂条件下, POC/Chl *a*和PON/Chl *a*在适应期均高于指数期和稳定期. 其中, 在适应期和稳定期, 高CO₂浓度降低单位细胞内碳、氮含量, 但在指数期提高单位细胞碳、氮含量. 此外, 我们估算了指数生长期POC和PON的同化速率, 如图5c. 发现, CO₂浓度升高明显促进碳、氮同化速率. 目前, 已有大量的研究报道CO₂浓度升高对藻类营养盐吸收的影响, 包括对营养盐的吸收有促进作用(Qu等, 2017), 抑制作用(Riebesell等, 2000)或没有影响(Riebesell等, 2007; Xu等, 2014). 这些研究结果的不同可能与藻细胞所处的生长期不同有关(图4). 在指数期, CO₂浓度升高可以促进细胞对氮的吸收, 细胞合成更多的有机物储存在细胞内或释放到周围环境中(Gordillo等, 1998). 该推论与图4中培养液

图5 聚球藻PCC7002不同生长时期单位细胞内碳、氮含量((a)和(b))以及指数期碳、氮同化速率(c)

*代表差异显著

中氮浓度降低一致。高 CO₂ 浓度影响藻类对氮的吸收, 从而可以改变细胞内 C/N 比(Mou 等, 2017)。

4 结论

大气 CO₂ 浓度升高对藻类生理的影响已开展了大量研究, 但多数研究主要集中在 CO₂ 浓度升高对真核藻类影响, 并且都是针对指数生长期的藻细胞进行研究(Li 和 Campbell, 2013; Li 等, 2016; McCarthy 等, 2012)。本试验中, 我们发现 CO₂ 浓度升高对处于不同生长时期的聚球藻 PCC7002 的影响不同。还发现, CO₂ 浓度升高可以促进聚球藻细胞生长, 缩短聚球藻 PCC7002 的适应期和指数生长期, 提高稳定期的最大细胞浓度。此外, CO₂ 浓度升高对不同生长期聚球藻 PCC7002 的光合生理和单位细胞碳、氮含量产生不同程度的影响。该结果将有助于更全面地了解 CO₂ 浓度升高对聚球藻生理的影响。总之, 在研究探讨 CO₂ 浓度升高对藻类影响时需要考虑整个生长期藻细胞的生理响应。

参考文献

- Arnon D I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts: Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol*, 24: 1–15
- Axmann I M, Hertel S, Wiegand A, Dörrich A K, Wilde A. 2014. Diversity of kaic-based timing systems in marine cyanobacteria. *Mar Genomics*, 14: 3–16
- Badger M R, Price G D. 2003. CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: Molecular components, their diversity and evolution. *J Exp Bot*, 54: 609–622
- Chen S W, Gao K S, Beardall J. 2015. Viral attack exacerbates the susceptibility of a bloom-forming alga to ocean acidification. *Glob Change Biol*, 21: 629–636
- Chiu W, Dai W, Fu C, Raytcheva D, Flanagan J, Khant H A, Liu X, Rochat R H, Haase-Pettingell C, Piret J, Ludtke S J, Nagayama K, Schmid M F, King J A. 2014. Visualizing virus assembly intermediates inside marine cyanobacteria by zernike phase contrast electron cryo-tomography. *Microsc Microanal*, 20: 202–203
- Drupp P, De Carlo E H, Mackenzie F T, Bienfang P, Sabine C L. 2011. Nutrient inputs, phytoplankton response, and CO₂ variations in a semi-enclosed subtropical embayment, Kaneohe Bay, Hawaii. *Aquat Geochem*, 17: 473–498
- Dufresne A, Ostrowski M, Scanlan D J, Garczarek L, Mazard S, Palenik B P, Paulsen I T, Tandeau de Marsac N, Wincker P, Dossat C, Ferriera S, Johnson J, Post A F, Hess W R, Partensky F. 2008. Unravelling the genomic mosaic of a ubiquitous genus of marine cyanobacteria. *Genome Biol*, 9: R90–16
- Flombaum P, Gallegos J L, Gordillo R A, Rincón J, Zabala L L, Jiao N, Karl D M, Li W K W, Lomas M W, Veneziano D, Vera C S, Vrugt J A, Martiny A C. 2013. Present and future global distributions of the marine Cyanobacteria *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110: 9824–9829
- Flynn K J, Clark D R, Mitra A, Fabian H, Hansen P J, Glibert P M, Wheeler G L, Stoecker D K, Blackford J C, Brownlee C. 2015. Ocean acidification with (de) eutrophication will alter future phytoplankton growth and succession. *Proc R Soc B-Biol Sci*, 282: 20142604
- Fraser J M, Tulk S E, Jeans J A, Campbell D A, Bibby T S, Cockshutt A M. 2013. Photophysiological and photosynthetic complex changes during iron starvation in *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *PLoS One*, 8: e59861
- Fu F X, Warner M E, Zhang Y, Feng Y, Hutchins D A. 2007. Effects of increased temperature and CO₂ on photosynthesis, growth, and elemental ratios in marine *Synechococcus* and *Prochlorococcus* (Cyanobacteria). *J Phycology*, 43: 485–496
- Gan F, Bryant D A. 2015. Adaptive and acclimative responses of cyanobacteria to far-red light. *Environ Microbiol*, 17: 3450–3465
- Gao K, Campbell D A. 2014. Photophysiological responses of marine diatoms to elevated CO₂ and decreased pH: A review. *Funct Plant Biol*, 41: 449–459
- Gao K, Xu J, Gao G, Li Y, Hutchins D A, Huang B, Wang L, Zheng Y, Jin P, Cai X, Häder D P, Li W, Xu K, Liu N, Riebesell U. 2012. Rising CO₂ and increased light exposure synergistically reduce marine primary productivity. *Nat Clim Change*, 2: 519–523
- Gao K, Zheng Y. 2010. Combined effects of ocean acidification and solar UV radiation on photosynthesis, growth, pigmentation and calcification of the coralline alga *Corallina sessilis* (Rhodophyta). *Glob Change Biol*, 16: 2388–2398
- Gao K, Aruga Y, Asada K, Ishihara T, Akano T, Kiyohara M. 1991. Enhanced growth of the red alga *Porphyra yezoensis* Ueda in high CO₂ concentrations. *J Appl Phycol*, 3: 355–362
- Gao K, Aruga Y, Asada K, Ishihara T, Akano T, Kiyohara M. 1993. Calcification in the articulated coralline alga *Corallina pilulifera*, with special reference to the effect of elevated CO₂ concentration. *Mar Biol*, 117: 129–132
- Gattuso J P, Magnan A, Billé R, Cheung W W L, Howes E L, Joos F, Allemand D, Bopp L, Cooley S R, Eakin C M, Hoegh-Guldberg O, Kelly R P, Pörtner H O, Rogers A D, Baxter J M, Laffoley D, Osborn D, Rankovic A, Rochette J, Sumaila U R, Treyer S, Turley C. 2015. Contrasting futures for ocean and society from different

- anthropogenic CO₂ emissions scenarios. *Science*, 349: aac4722
- Gordillo F J L, Jiménez C, Figueroa F L, Niell F X. 1998. Effects of increased atmospheric CO₂ and N supply on photosynthesis, growth and cell composition of the cyanobacterium *Spirulina platensis* (arthrospira). *J Appl Phycology*, 10: 461–469
- Harley C D G. 2011. Climate change, keystone predation, and biodiversity loss. *Science*, 334: 1124–1127
- Hong H, Shen R, Zhang F, Wen Z, Chang S, Lin W, Kranz S A, Luo Y W, Kao S J, Morel F M M, Shi D. 2017. The complex effects of ocean acidification on the prominent N₂-fixing cyanobacterium *Trichodesmium*. *Science*, 356: 527–531
- Hopkinson B M, Dupont C L, Allen A E, Morel F M M. 2011. Efficiency of the CO₂-concentrating mechanism of diatoms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108: 3830–3837
- Indermühle A, Stocker T F, Joos F, Fischer H, Smith H J, Wahlen M, Deck B, Mastroianni D, Tschumi J, Blunier T, Meyer R, Stauffer B. 1999. Holocene carbon-cycle dynamics based on CO₂ trapped in ice at Taylor Dome, Antarctica. *Nature*, 398: 121–126
- IPCC. 2001. Climate change 2001: The scientific basis. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge: Cambridge University Press. 881
- Kroeker K J, Kordas R L, Crim R, Hendriks I E, Ramajo L, Singh G S, Duarte C M, Gattuso J P. 2013. Impacts of ocean acidification on marine organisms: Quantifying sensitivities and interaction with warming. *Glob Change Biol*, 19: 1884–1896
- Li F, Beardall J, Collins S, Gao K. 2017. Decreased photosynthesis and growth with reduced respiration in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum* grown under elevated CO₂ over 1800 generations. *Glob Change Biol*, 23: 127–137
- Li F Y, Wu Y P, Hutchins D A, Fu F, Gao K. 2016. Physiological responses of coastal and oceanic diatoms to diurnal fluctuations in seawater carbonate chemistry under two CO₂ concentrations. *Biogeosci Discuss*, 13: 1–39
- Li G, Campbell D A. 2013. Rising CO₂ interacts with growth light and growth rate to alter photosystem II photoinactivation of the coastal diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Plos One*, 8: e55562
- Li W, Gao K, Beardall J. 2012. Interactive effects of ocean acidification and nitrogen-limitation on the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plos One*, 7: e51590
- Lomas M, Hopkinson B, Losh J, Ryan D, Shi D, Xu Y, Morel F. 2012. Effect of ocean acidification on cyanobacteria in the subtropical North Atlantic. *Aquat Microb Ecol*, 66: 211–222
- Mackey K R M, Paytan A, Caldeira K, Grossman A R, Moran D, McIlvin M, Saito M A. 2013. Effect of temperature on photosynthesis and growth in marine *Synechococcus* spp. *Plant Physiol*, 163: 815–829
- McCarthy A, Rogers S P, Duffy S J, Campbell D A. 2012. Elevated Carbon dioxide differentially alters the photophysiology of *Thalassiosira pseudonana* (bacillariophyceae) and *Emiliania huxleyi* (haptophyta). *J Phycology*, 48: 635–646
- McCoy S J, Kamenos N A. 2015. Coralline algae (Rhodophyta) in a changing world: Integrating ecological, physiological, and geochemical responses to global change. *J Phycol*, 51: 6–24
- Moisan T A, Blattner K L, Makinen C P. 2010. Influences of temperature and nutrients on *Synechococcus* abundance and biomass in the southern Mid-Atlantic Bight. *Cont Shelf Res*, 30: 1275–1282
- Mou S L, Zhang Y Y, Li G, Li H M, Liang Y T, Tang L L, Tao J C, Xu J J, Li J, Zhang C L, Jiao N Z. 2017. Effects of elevated CO₂ and nitrogen supply on the growth and photosynthetic physiology of a marine cyanobacterium, *Synechococcus* sp. PCC7002. *J Appl Phycol*, 29: 1755–1763
- Murphy J, Riley J P. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal Chim Acta*, 27: 31–36
- Nash M C, Martin S, Gattuso J P. 2016. Mineralogical response of the Mediterranean crustose coralline alga *Lithophyllum cabiochae* to near-future ocean acidification and warming. *Biogeosciences*, 13: 5937–5945
- Norman R J, Edberg J C, Stucki J W. 1985. Determination of nitrate in soil extracts by dual-wavelength ultraviolet spectrophotometry. *Soil Sci Soc Am J*, 49: 1182–1185
- Olischläger M, Bartsch I, Gutow L, Wiencke C. 2013. Effects of ocean acidification on growth and physiology of *Ulva lactuca* (Chlorophyta) in a rockpool-scenario. *Phycol Res*, 61: 180–190
- Olischläger M, Wiencke C. 2013. Ocean acidification alleviates low-temperature effects on growth and photosynthesis of the red alga *Neosiphonia harveyi* (Rhodophyta). *J Exp Bot*, 64: 5587–5597
- Onizuka T, Akiyama H, Endo S, Kanai S, Hirano M, Tanaka S, Miyasaka H. 2002. CO₂ Response Element and Corresponding trans-acting Factor of the Promoter for Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/oxygenase Genes in *Synechococcus* sp. PCC7002 Found by an Improved Electrophoretic Mobility Shift Assay. *Plant Cell Physiol*, 43: 660–667
- Owens T G, Wold E R. 1986. Light-harvesting function in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*: II. Distribution of excitation energy between the photosystems. *Plant Physiol*, 80: 739–746
- Partensky F, Blanchot J, Vaulot D. 1999. Differential distribution and ecology of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* in oceanic waters: A review. In: Charpy L, Larkum A, eds. Marine Cyanobacteria. Monaco: Musée Océanographique. 457–475

- Platt T, Gallegos C L, Harrison W G. 1980. Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. *J Mar Res*, 38: 687–701
- Qu C F, Liu F M, Zheng Z, Wang Y B, Li X G, Yuan H M, Li N, An M L, Wang X X, He Y Y, Li L L, Miao J L. 2017. Effects of ocean acidification on the physiological performance and carbon production of the Antarctic sea ice diatom *Nitzschia* sp. ICE-H. *Mar Pollut Bull*, 120: 184–191
- Reinfelder J R. 2011. Carbon concentrating mechanisms in eukaryotic marine phytoplankton. *Annu Rev Mar Sci*, 3: 291–315
- Riebesell U, Schulz K G, Bellerby R G J, Botros M, Fritsche P, Meyerhöfer M, Neill C, Nondal G, Oschlies A, Wohlers J, Zöllner E. 2007. Enhanced biological carbon consumption in a high CO₂ ocean. *Nature*, 450: 545–548
- Riebesell U, Zondervan I, Rost B, Tortell P D, Zeebe R E, Morel F M M. 2000. Reduced calcification of marine plankton in response to increased atmospheric CO₂. *Nature*, 407: 364–367
- Sidler W A. 1995. The molecular biology of cyanobacteria. *Photosynth Res*, 45: 177–179
- Suárez-Álvarez S, Gómez-Pinchetti J L, García-Reina G. 2012. Effects of increased CO₂ levels on growth, photosynthesis, ammonium uptake and cell composition in the macroalga *Hypnea spinella* (Gigartinales, Rhodophyta). *J Appl Phycol*, 24: 815–823
- Traving S J, Clokie M R J, Middelboe M. 2014. Increased acidification has a profound effect on the interactions between the cyanobacterium *Synechococcus* sp. WH7803 and its viruses. *Fems Microbiol Ecol*, 87: 133–141
- Wellburn A R. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J Plant Physiol*, 144: 307–313
- Woodger F J, Bryant D A, Price G D. 2007. Transcriptional regulation of the CO₂-concentrating mechanism in a euryhaline, coastal marine cyanobacterium, *Synechococcus* sp. Strain PCC 7002: Role of NdhR/CcmR. *J Bacteriology*, 189: 3335–3347
- Wootton J T, Pfister C A, Forester J D. 2008. Dynamic patterns and ecological impacts of declining ocean pH in a high-resolution multi-year dataset. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 18848–18853
- Wulff A, Karlberg M, Olofsson M, Torstensson A, Riemann L, Steinhoff F, Mohlin M, Ekstrand N, Chierici M. 2016. Climate-driven change in a Baltic Sea summer microplanktonic community-desalination play a more important role than ocean acidification. *BiogeoSci Discuss*, 1–32
- Xu D, Wang Y T, Fan X, Wang D S, Ye N H, Zhang X W, Mou S L, Guan Z, Zhuang Z M. 2014. Long-term experiment on physiological responses to synergetic effects of ocean acidification and photoperiod in the Antarctic Sea ice algae *Chlamydomonas* sp. ICE-L. *Environ Sci Technol*, 48: 7738–7746
- Yoshimura T, Nishioka J, Suzuki K, Hattori H, Kiyosawa H, Watanabe Y W. 2010. Impacts of elevated CO₂ on organic carbon dynamics in nutrient depleted Okhotsk Sea surface waters. *J Exp Mar Biol Ecol*, 395: 191–198

(责任编辑: 张锐)