

条斑紫菜对无机碳的利用*

岳国峰 周百成

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 于1998年3月在青岛太平角采集条斑紫菜,在室内光照强度为 $120\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的培养架上培养,通过测定其光合作用引起密闭海水体系 pH 值及无机碳浓度的变化,借助于各种无机碳利用的抑制剂(Az、Van、DIDS、SITS)对其无机碳利用机制进行了研究。结果表明,(1)条斑紫菜可间接吸收 HCO_3^- 。胞外碳酸酐酶(CA)催化 HCO_3^- 水解成 CO_2 扩散进入胞内是条斑紫菜无机碳利用的主要形式,占全部无机碳利用的73%以上。Az是胞外CA的抑制剂,可直接检测胞外CA的存在,它不能透过细胞膜。(2)条斑紫菜可依赖于细胞膜上ATP酶对 HCO_3^- 直接转运。但未发现带III蛋白(band 3 Protein)及 $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ 协同转运系统的参与。(3)条斑紫菜 pH 值补偿点为9.83, CO_2 补偿点为 $0.04\mu\text{mol/L}$ 。

关键词 条斑紫菜 无机碳 间接吸收 直接转运 碳酸酐酶

学科分类号 Q945.11

海水中无机碳(DIC)的存在形式以 HCO_3^- 为主(90%左右),而游离的 CO_2 不足1%(Skirrow, 1975)。大量研究结果表明:除 CO_2 外, HCO_3^- 也是海洋植物的主要无机碳源(Gao *et al*, 1994; Mercado *et al*, 1997a, b, 1998; Merrett *et al*, 1993; Sultemeyer *et al*, 1993)。 HCO_3^- 的利用有两种机制:一是通过膜阴离子交换蛋白直接将 HCO_3^- 转运到胞内,在胞内经CA水解成 CO_2 被RUBP羧化/加氧酶固定;另一种是在胞外CA催化下, HCO_3^- 水解成 CO_2 扩散进入细胞,许多藻类同时具有这两种机制。

条斑紫菜是中国养殖的主要经济海藻之一,其细胞工程育苗技术正在向规模化和工程化方向发展,当用藻类生物反应器进行高密度培养时,无机碳源的供应将成为关键问题。目前,对条斑紫菜无机碳的利用机制尚未进行深入研究,仅Gao等(1991)在研究 CO_2 培养条斑紫菜时,推断出条斑紫菜具有利用 HCO_3^- 的能力。本文报道条斑紫菜叶状体的初步研究结果,以期为其碳素供应提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)叶状体

于1998年3月采自青岛太平角高潮带,采回后用消毒海水反复冲洗干净,装在具塞三角瓶中密闭光照培养。每100ml海水中紫菜用量为0.3g。荧光灯2只,光强为 $120\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,温度为 $(10 \pm 0.5)^\circ\text{C}$,每2h测量一次海水 pH 值及无机碳浓度。

* 国家“九五”科技攻关项目,96-C01-05-01号。岳国峰,男,出生于1971年2月,博士生, Fax:0086-0532-2963219

收稿日期:1998-08-10,收修改稿日期:1999-03-26

1.2 抑制剂及其抑制率

无机碳利用的抑制剂: acetazolamide (Az); 钒酸盐 (Van) (上海试剂厂); 4' 4' -diisothiocyanatosilbene-2, 2-disulfonic acid (DIDS) (Sigma 公司); 4-acetamido-4'-isothiocyanato-2, 2'-stibene-disulfonate (SITS)。

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照组 DIC 的利用量} - \text{抑制剂组 DIC 的利用量}}{\text{对照组 DIC 的利用量}}$$

1.3 pH 值及无机碳浓度的测定

PHS-3B 精密 pH 值计 (上海雷磁仪器厂) 经标定后测 pH 值, 按 Parsons 等 (1989) 方法测定碱度, 并计算碳酸碱度 (Calk)。按 Stumm 等 (1970) 方法计算无机碳浓度:

$$[\text{DIC}] = (\text{Calk} + [\text{H}^+] - [\text{OH}^-]) / (\alpha_1 + 2\alpha_2)$$

$$\alpha_1 = \left(1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_1} + \frac{K_2}{[\text{H}^+]} \right)^{-1} \quad \alpha_2 = \left(1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_1 K_2} + \frac{[\text{H}^+]}{K_2} \right)^{-1}$$

$$\alpha_0 = \left(1 + \frac{K_1}{[\text{H}^+]} + \frac{K_1 K_2}{[\text{H}^+]^2} \right)^{-1} \quad [\text{CO}_2] = [\text{DIC}] \cdot \alpha_0$$

式中, K_1 、 K_2 分别是 H_2CO_3 的一级、二级解离常数, 按 Goyet 等 (1989) 给出的公式计算:

$$\text{p}K_1 = 812.27/T + 3.356 - 0.0017 \times S \times \ln T + 0.000\ 091 \times S^2$$

$$\text{p}K_2 = 1\ 450.87/T + 4.604 - 0.00385 \times S \times \ln T + 0.000\ 182 \times S^2$$

T 为绝对温度, S 为盐度。

1.4 胞外碳酸酐酶的检测

将 5g 条斑紫菜 (鲜重) 置于 1 000ml 100 $\mu\text{mol/L}$ Az 的消毒海水中光照培养 4h 后 [光强为 120 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 温度为 $(17 \pm 0.5)^\circ\text{C}$], 取出紫菜, 用消毒海水冲洗三次。称取二份 0.3g 处理过的紫菜, 一份继续在 100 $\mu\text{mol/L}$ Az 的消毒海水中光照培养; 另一份直接在消毒海水中培养。另取未经任何处理的条斑紫菜 0.3g, 在消毒海水中光照培养。海水体积均为 100ml, 培养条件同上。按方法 1.2 测定 pH 值及无机碳浓度的变化。

2 研究结果

2.1 条斑紫菜无机碳的利用及 Az 的影响

在密闭培养系统中, 随着条斑紫菜光合作用对无机碳的利用, 使海水 pH 值不断升高, 无机碳浓度逐渐降低 (图 1a, b), 但海水的碱度保持恒定 (数据未列)。pH 值升至 9.83 后不再升高, 即达到了 pH 值补偿点, 此时 CO_2 浓度接近于零 (图 1c), 实测值为 0.04 $\mu\text{mol/L}$ 。Az 是胞外 CA 的抑制剂。实验表明, 100 $\mu\text{mol/L}$ 可达到最大抑制效果。加入 100 $\mu\text{mol/L}$ Az 可强烈抑制条斑紫菜对无机碳的利用, 使 pH 值上升缓慢。在光照 2h 内, 未加 Az 的对照使无机碳降低 0.41mmol/L, 而加入 Az 的只降低 0.11mmol/L, 即 Az 抑制无机碳利用的 73% (图 1d)。同时从图 1a 可观察到, 经 Az 处理后的 pH 值仍不断缓慢升高。

2.2 胞外 CA 与无机碳的利用

Az 是 CA 的抑制剂, 大多数研究者认为它不可透过细胞膜, 但 Williams 等 (1987) 认为 Az 可透过胞膜抑制胞内 CA。本实验以不加 Az 为对照, 通过对 Az 处理经洗脱后的条斑紫菜对无机碳的利用的观察, 发现 Az 的处理经洗脱后的条斑紫菜对无机碳的利用与对照没

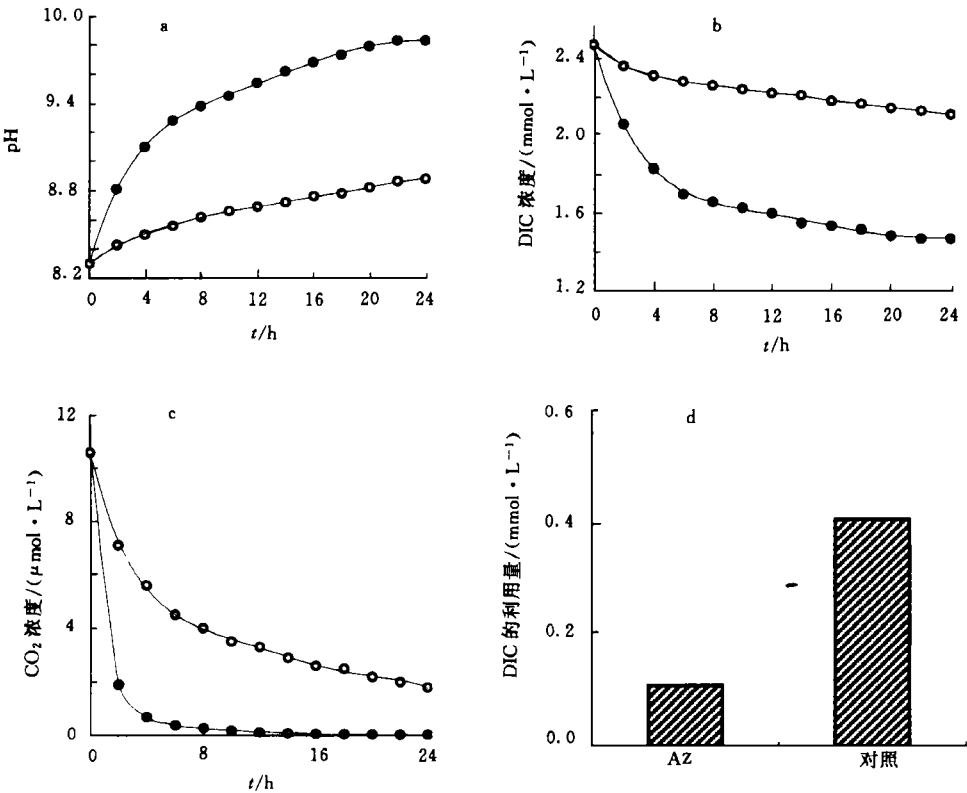


图1 条斑紫菜的光合作用引起密闭系统pH值及无机碳浓度随时间的变化

Fig.1 pH and inorganic carbon concentration variation vs time caused by photosynthesis of *Porphyr a yezoensis* in a closed system

—○—添加100 $\mu\text{mol/L}$ Az; —●— 对照

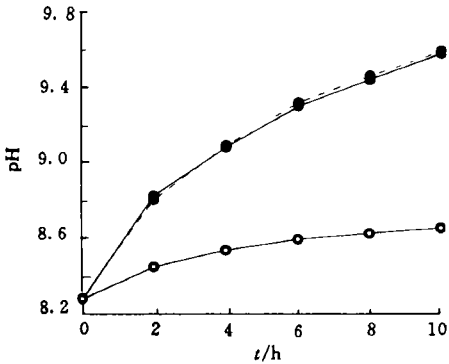


图2 胞外碳酸酐酶对条斑紫菜无机碳利用的影响

Fig.2 Effect of external CA on inorganic carbon utilization by *Porphyr a yezoensis*

...○... 对照; —●— 经100 $\mu\text{mol/L}$ Az处理后, 经消毒海水反复冲洗; —○— 100 $\mu\text{mol/L}$ Az处理

有任何差别(图2),说明Az只是通过抑制胞外CA来影响无机碳的利用,它既未对条斑紫菜造成伤害,又未透过细胞膜。

2.3 条斑紫菜对 HCO_3^- 的直接转运

HCO_3^- 可被与膜相连的蛋白或酶直接转运到胞内,在胞内水解成 CO_2 被 RUBP 羧化/加氧酶固定。Van 抑制与胞膜相连 ATP 酶的活性, DIDS 抑制带 III 蛋白 (band 3 protein) 和 ATP 酶对 HCO_3^- 直接转运, SITS 既可抑制带 III 蛋白的活性,又可抑制 $\text{Na}^+ / \text{HCO}_3^-$ 协同转运系统对 HCO_3^- 直接转运。表1的结果表明, Van 和 DIDS 均能抑制条斑紫菜对无机碳的利用。当对照 pH 值由 8.12 升至 9.47、无机碳由 2.10mmol/L 降至 1.26mmol/L 时,经 100 $\mu\text{mol/L}$ Van、500 $\mu\text{mol/L}$ Van 和 500 $\mu\text{mol/L}$ DIDS 处理, pH 值分别升至

表1 几种抑制剂对条斑紫菜无机碳利用的影响 (n=4)

Tab.1 Effect of several inhibitors on inorganic carbon acquisition by *Porphyra yezoensis* (n=4)

抑制剂	pH值		[DIC](mmol/L)		抑制率(%)
	起始	照光后	起始	照光后	
对照组	8.12	9.47±0.07	2.10	1.26±0.02	0
Van(100μmol/L)	8.12	9.34±0.03	2.10	1.31±0.02	6.0±2.15
Van(500μmol/L)	8.12	9.26±0.06	2.10	1.35±0.03	10.7±3.26
DIDS(500μmol/L)	8.12	9.35±0.01	2.10	1.32±0.02	7.1±1.80
SITS(1mmol/L)	8.12	9.47±0.07	2.10	1.26±0.01	0.0±2.16
Az(100μmol/L)	8.12	8.64±0.04	2.10	1.72±0.02	54.8±2.17

9.34、9.26 和 9.35, 无机碳浓度分别降至 1.31mmol/L、1.35mmol/L 和 1.32mmol/L, 对无机碳利用的抑制率分别为 6.0%、10.7% 和 7.1%。经 1mmol/L SITS 处理的条斑紫菜对无机碳的利用能力与对照未见任何差异。

3 讨论

3.1 条斑紫菜对无机碳的利用能力

Axelsson 等(1988)对 7 种红藻——*Furcellaria fastigiata*(叉红藻属的一种)、*Cystoclonium purpureum*(囊枝藻属的一种)、*Dilsea carnosa*(红藻属的一种)、微黑多管藻(*Poly-siphonia nigrescens*)、仙菜(*Ceramium rubrum*)、增厚胶粘藻(*Dumontia incrassata*)和脐形紫菜(*Porphyra umbilicalis*)光照培养的结果表明,在达到 pH 值补偿点前,这几种红藻对无机碳的利用均未引起碱度的变化。它们 pH 值补偿点分别为:9.27、9.45、9.46、9.68、9.76、9.82 和 9.91。Maberly(1990)报道了 6 种红藻的 pH 值补偿点均低于 9.0, CO₂ 补偿点在 1.12—1.30μmol/L 之间。条斑紫菜在光合作用利用无机碳的过程中,碱度始终保持恒定,这与 Axelsson 等(1988)的结论相符。其 pH 值补偿点为 9.83, CO₂ 补偿点为 0.04μmol/L。由于碱度保持恒定,海水中无机碳的浓度只取决于 pH 值的高低。pH 值补偿点越高,表明利用无机碳能力越强。本实验的研究结果不仅表明条斑紫菜具有较强的无机碳利用能力,还可为其人工养殖培养条件的优化中以 pH 值监测无机碳的变化提供了理论依据。

3.2 条斑紫菜对 HCO₃⁻ 的间接吸收

胞外碳酸酐酶催化 HCO₃⁻ 水解成 CO₂, 从而加速了 CO₂ 的供应。因此,胞外碳酸酐酶的存在是 HCO₃⁻ 被间接吸收的证据。目前,对大型海藻胞外碳酸酐酶直接检测方法很多,但大部分是基于一定质量藻体在一定体积的缓冲液中催化 CO₂ 转化成 HCO₃⁻ 导致 pH 值下降的速度来检测。这些方法都很不完善:一是灵敏度较低,检测条件不一致,缺乏统一的定量标准,导致了許多矛盾的结果(Mercado *et al*, 1997b);二是每种方法定量标准也不完善,以每 ml 若干 ng 的标准 CA 为标准,标准酶是均相分布在整個测试系统中,酶与底物充分接触,而藻体胞外 CA 则集中在膜体表面和内部,CA 与测试系统中 CO₂ 的接触既受藻体表面积的影响,也受藻体不同结构的影响,必将使测试结果偏低。同时也不能排除藻体本身非 CA 对测试系统的干扰。

Mercado 等(1997b)新建的方法把胞外 CA 的活性与其在光合作用中的作用结合起来,克服了传统方法的诸多不足,提高了灵敏度。但这种方法仍基于 Az 对细胞膜的不可透过性。对于 Az 的细胞透性问题,一直存有争议(Bjork *et al*, 1997; Mercado *et al*,

1997b, 1998; Williams *et al*, 1987)。Williams 等(1987)将 Az 加入到莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)的突变体中导致胞内无机碳浓度的积累,认为 Az 透过胞膜抑制了胞内 CA。本实验中 Az 抑制作用经洗脱后消失(图 2),说明 Az 是通过抑制胞外 CA 来影响条斑紫菜对无机碳的利用,它可以直接检测胞外 CA, Az 既未对条斑紫菜造成伤害,又不能透过细胞膜。这一结果也支持了图 1d 的结果:条斑紫菜是主要依赖于胞外 CA 来利用无机碳的,这种方式占全部无机碳利用的 73%。

3.3 条斑紫菜对 HCO_3^- 的直接转运

钒酸盐(Thielmann *et al*, 1990; Beer *et al*, 1997)和 DIDS(Nimer *et al*, 1997)被用作膜 ATP 酶主动运输 HCO_3^- 的抑制剂,Smith(1988)详细论述了带 III 蛋白(受 DIDS、SITS 的抑制)及 $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (受 SITS 抑制)协同转运系统对 HCO_3^- 直接转运的作用。综合表 1 的实验结果,条斑紫菜具有依赖于膜 ATP 酶对 HCO_3^- 的直接转运能力,但效率并不高。SITS 未对条斑紫菜无机碳利用产生影响,说明 $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ 和带 III 蛋白协同转运系统并未参与无机碳的利用。

4 结语

综上所述,条斑紫菜具有依赖于胞外 CA 对 HCO_3^- 间接吸收的能力,又具有依赖于膜 ATP 酶对 HCO_3^- 的直接转运能力。但依赖于胞外 CA 对 HCO_3^- 的水解,以游离的 CO_2 扩散进入胞内被 RUBP 羧化/加氧酶固定是其无机碳利用的最主要方式。

参 考 文 献

- Axelsson L, Uusitalo J, 1988. Carbon acquisition strategies for marine macroalgae. I. Utilization of proton exchanges visualized during photosynthesis in a closed system. *Mar Biol*, 97:295—300
- Beer S, Rehnberg J, 1997. The acquisition of inorganic carbon by the seagrass *Lostera marima*. *Aquat Bot*, 56:277—283
- Bjork M, Weil A, Semes S *et al*, 1997. Photosynthetic utilization of inorganic carbon by seagrass from Zanzibar, East Africa. *Mar Biol*, 129:363—366
- Gao Kunshan, Yugho Aruga, Kozi Asada *et al*, 1991. Enhanced growth of the red alga *Porphyra yezoensis* Ueda in high CO_2 concentrations. *J Appl Phycol*, 3:355—362
- Gao K, Mckinley K K, 1994. Use of macroalgae for marine biomass production and CO_2 remediation. *J Appl Phycol*, 6:45—60
- Goyet C, Poisson A, 1989. New determination of carbonic acid dissociation constants in seawater as a function of temperature and salinity. *Deep-Sea Res*, 36(11):1 635—1 654
- Maberly S C, 1990. Exogenous source of inorganic carbon for photosynthesis by marine macroalgae. *J Phycol*, 26:439—449
- Mercado J M, Niell F X, Figueroa F L, 1997a. Regulation of the mechanism for HCO_3^- use by the inorganic carbon level in *Porphyra leucosticta* Thur. in LeJollis. *Planta*, 201:319—325
- Mercado J M, Figueroa F L, Niell F X, 1997b. A new method for estimating external carbonic anhydrase activity in macroalgae. *J Phycol*, 33:999—1 006
- Mercado J M, Gordillo F J L, Figueroa F L *et al*, 1998. External carbonic anhydrase and affinity of inorganic carbon in intertidal macroalga. *J Exp Mar Biol Ecol*, 221:209—220
- Merrett M J, Dong L F, Nimer N A, 1993. Nitrate availability and calcite production in *Emiliania huxleyi* Lohmann. *Eur J Phycol*, 28:243—246
- Nimer N A, Iglesias-Rodríguez M D, Merrett M J, 1997. Bicarbonate utilization by marine phytoplankton

species. *J Phycol*, 33:625—631

Parsons T, Maita Y R, Lalli C M, 1989. *A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis*. London: Pergamon Press, 142—148

Skirrow G, 1975. The Dissolved Gases Carbon Dioxide. In: Riley J P, Skirrow G ed. *Chemical Oceanography*. London: Academic Press, 1—92

Smith R G, 1988. Inorganic carbon transport in biological systems. *Comp Biochem Physiol*, 90B(4):639—654

Stumm W, Morgan J J, 1970. *Aquatic Chemistry. An Introduction Emphasizing Chemical Equilibria in Natural Water*. New York: Wiley-Interscience, 118—160

Sultemeyer D, Schmidt C, Fock H P, 1993. Carbonic anhydrase in higher plants and aquatic microorganisms. *Physiol Plant*, 88:179—190

Thielmann J, Tolbert N E, Goyal A *et al*, 1990. Two system for concentrating CO₂ and bicarbonate during photosynthesis by *Scenedesmus*. *Plant Physiol*, 92:622—629

Williams T G, Turpin D H, 1987. Role of external carbonic anhydrase in organic carbon acquisition by *Chlamydomonas reinhardtii* at alkaline pH. *Plant Physiol*, 83:92—96

INORGANIC CARBON UTILIZATION BY *PORPHYRA YEZOENSIS* UEDA

YUE Guo-feng, ZHOU Bai-cheng

(*Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071*)

Abstract The mechanisms of inorganic carbon utilization were studied on the red macroalga *Porphyra yezoensis* Ueda (collected in the Taiping Bay Qingdao in Mar., 1998) by pH drift technique in a closed system by means of various inhibitors: Acetazolamide (Az), Vanadate (Van), 4', 4' -diisothiocyanatosilbene-2,2-disulfonic acid (DIDS) and 4-acetamido-4' -isothiocyano-2,2' -stibene-disulfonate (SITS). The results indicate that (1) *Porphyra yezoensis* can uptake HCO₃⁻ indirectly. Inorganic carbon utilization of *Porphyra yezoensis* can be strongly inhibited by 100μmol/L Az which inhibits external CA and regain its full photosynthetic capacity after rinsed three times. Dissolved inorganic carbon was reduced 0.41mmol/L in two hours due to photosynthesis and only 0.11mmol/L by addition of Az. Hence, external carbonic anhydrase dehydrating HCO₃⁻ to CO₂ is the main pathway of inorganic carbon utilization by *Porphyra yezoensis*, accounting for at least 73 percentage of total inorganic carbon acquisition. External CA can be detected simply by Az which cannot penetrate the plasma membrane. (2) *Porphyra yezoensis* can also transport HCO₃⁻ directly dependent-ATPase as viewed by Van and DIDS inhibition. Band three protein and Na⁺/HCO₃⁻ cotransport system have not been found involving in the direct HCO₃⁻ transportation since SITS has no affection on carbon acquisition. (3) *Porphyra yezoensis* has a higher pH compensation point and a lower CO₂ compensation point: 9.83 and 0.04μmol/L, respectively.

Key words *Porphyra yezoensis* Ueda Inorganic carbon Indirect uptake Direct transportation Carbonic anhydrase

Subject classification number Q945.11