

海带雌配子体对无机碳的利用*

岳国峰 戢勇骋 王建飞 周百成

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 采用 pH 漂移技术(pH drift technique),对海带雌配子体克隆的碳素营养进行了研究。结果表明,海带雌配子体对无机碳的利用能力较弱,其 pH 补偿点为 8.85,CO₂ 补偿点为 1.635 μmol/L。与 HCO₃⁻ 利用有关的抑制剂: Acetazolamide (Az), 4,4'-diisothiocyanatosilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS), 4-acetamidobenzothioisocyanate 2,2'-disulfonate (SITS) 均未对海带雌配子体无机碳的利用产生任何影响,进一步说明了海带雌配子体只以游离的 CO₂ 为无机碳源,不能利用 HCO₃⁻;同时还发现,海带雌配子体利用无机碳的过程中,并未引起碱度的变化,从而可以用 pH 指示密闭培养过程中无机碳的变化。

关键词 海带,雌配子体,无机碳,CO₂

海水中的无机碳是海洋藻类光合作用的碳源,也是藻类生长利用量最大的营养成分。尽管海水中无机碳高达 2.2 mmol/L,但 91%左右是以 HCO₃⁻ 的形式存在,游离的 CO₂ 只占 0.5%,其余为 CO₃²⁻。藻类利用无机碳的形式不同,因此,不同藻类即使在相同的生长条件下可利用的无机碳浓度也大不相同。

海带是我国主要养殖的大型海藻,其生活史有孢子体和配子体两个阶段。自从 1978 年方宗熙等首次建立配子体无性系后,海带的育苗方式正由传统的采孢子育苗向配子体无性系的细胞工程育苗方式转化^[1]。在细胞工程育苗走向产业化之前,配子体无性系的大量扩增是大规模生产的前提,当用光生物反应器高密度培养时,无机碳必将成为最主要的限制因子。因此,对海带配子体无性系利用无机碳的形式及机理的研究是指导高密度培养碳素供应的理论基础,本文报道了海带雌配子体碳素营养的初步研究结果。

1 材料与方 法

1.1 碱度及无机碳浓度的测定

PHS3B 精密 pH 计(上海雷磁仪器厂)经标定后测 pH 值,按 1989 年 Parsons 方法测定碱度,并计算碳酸碱度(Calk)。按 Stumm 等 1981 年的方法计算无机碳浓度:

$$[\text{DIC}] = (\text{Calk} + [\text{H}^+] - [\text{OH}^-]) / (\alpha + 2\alpha_0),$$

$$\alpha_1 = \left[1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_1} + \frac{K_2}{[\text{H}^+]} \right]^{-1},$$

$$\alpha_2 = \left[1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_1 K_2} + \frac{[\text{H}^+]}{K_2} \right]^{-1},$$

$$\alpha_0 = \left[1 + \frac{K_1}{[\text{H}^+]} + \frac{K_1 K_2}{[\text{H}^+]^2} \right]^{-1},$$

$$[\text{CO}_2] = [\text{DIC}] \cdot \alpha,$$

K_1, K_2 分别是 HCO₃⁻ 的一级、二级解离常数,按 1989 年 Goyet 给出的公式算:

$$pK = 812.27 / T_{\text{abs}} + 3.356 - 0.0017 \times S \times \ln(T_{\text{abs}}) + 0.000091 \times S^2$$

$$pK = 1450.87 / T_{\text{abs}} + 4.604 - 0.00385 \times S \times \ln(T_{\text{abs}}) + 0.000182 \times S^2$$

T_{abs} 为绝对温度, S 表示盐度。 $\alpha_0, \alpha_1, \alpha_2$ 分别表示 CO₂, HCO₃⁻, CO₃²⁻ 的存在比例系数。

1.2 海带雌配子体对无机碳利用能力

海带(*Laminaria japonica*)雌配子体克隆系,保存

* 国家“九五”科技攻关项目 96C01-05-01 号;中国科学院海洋研究所研究报告第 3772 号;中国科学院海洋研究所实验海洋开放研究实验室研究报告第 245 号。

收稿日期:1999-07-14;修回日期:1999-10-21

于 12 °C 的光照培养箱中。镜检无污染,生长健康。取 0.1 g(FW) 配子体,于 50 ml 过滤煮沸的海水中密闭光照培养,用 1 000 r/min 的磁力搅拌器使之混合均匀。培养基中含 40 μmol/L NO_3^- 和 4 μmol/L PO_4^{3-} , 温度 15 ± 0.5 °C, 光强 50 μmol/(m²·s)。按方法 1.1 测定碱度及无机碳浓度的变化。

1.3 海带利用无机碳的形式及机理

1.3.1 新鲜配制的 Acetazolamide (Az), 4,4'-diisothiocyanatosilbene-2, 2'-disulfonic acid (DIDS), 4-acetamidobenzylisothiocyanate, 2'-sulfobenzyl disulfonate (SITS) 海水培养基分别为 500 μmol/L 和 1.0 mmol/L。100 μmol/L Az 使海水 pH 升高约 0.1 个 pH 单位,用 0.01 mol/L HCl 调节 pH 与对照海水相同, DIDS 和 SITS 均使海水的 pH 略有降低,用 0.01 mol/L NaOH 调节(以上 3 种试剂均购自 Sigma 公司)。

1.3.2 等量配子体的制备: 称取配子体 0.5 g (FW), 置于 20 ml 消毒海水中,于 1 000 r/min 的磁力搅拌器中搅拌 4 h, 配子体呈现近似于单胞藻的均匀悬浮状后,在搅拌的同时,用移液管各吸取 5 ml 配子体悬浮液,分别置于 A,B 两个光照瓶中,各加入 50 ml 消毒海水培养基,于上述光温条件下连续密闭照光 4 h,发现 A,B 两瓶 pH 同步变化,说明等量配子体制备成功。滤除海水后,A 瓶加入对照海水,B 瓶加入含抑制剂的海水,密闭光照培养的同时,记录 pH 的变化。

2 实验结果

2.1 海带配子体克隆对无机碳的利用能力

随着海带配子体光合作用对无机碳的利用,海水培养基中总无机碳和游离 CO₂ 的浓度逐渐降低,pH 不断升高,但随着 pH 升高,配子体对无机碳的利用量在逐渐降低(图 1a,b,c)。当 pH 升高到 8.85 后达到最大值(pH 补偿点),

此时,总无机碳和游离 CO₂ 的浓度不再下降,即达到了总无机碳和游离 CO₂ 补偿点,分别为 1.871 mmol/L 和 1.635 μmol/L。图 1c 的结果还表明,海带雌配子体在一次性培养(不补充无机碳或更新培养基)时,只能利用海水中总无机碳的 14.5% (海水总碳由起始 2.19 mmol/L 减少到终点的 1.871 mmol/L),说明配子体利用无机碳的能力较弱。同时还发现,海带雌性配子体在利用无机碳的过程中,并未引起海水碱度的变化(图 1d)。因为海水中总无机碳浓度主要由海

水的 pH、碱度、温度和盐度决定,所以在其他培养条件一致的情况下(温度恒定,盐度变化微小,可忽略不计),pH 可以直接显示无机碳的变化。

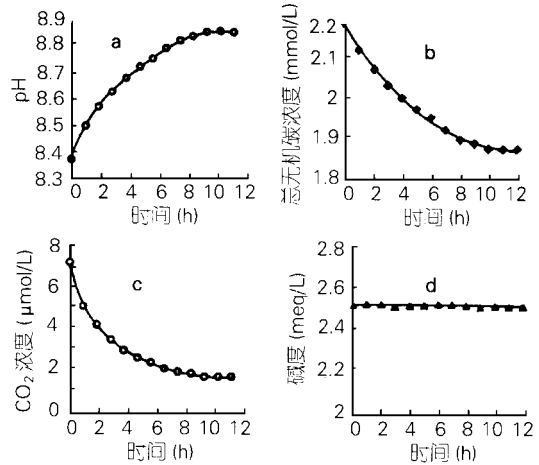


图 1 海带配子体利用无机碳过程中 pH、总无机碳、游离 CO₂ 及碱度的变化

Fig.1 Changes of pH, total inorganic carbon, free CO₂ and alkalinity in the course of carbon acquisition by female gametophytes of *Laminaria japonica*

表 1 抑制剂对海带雌配子体无机碳利用的影响

Tab.1 Effects of inhibitors on carbon acquisition by female gametophytes of *Laminaria japonica*

处理	起始	2 h 后	4 h 后	6 h 后
	pH	pH	pH	pH
CK	8.11	8.29	8.45	8.58
Az(100 μmol/L)	8.11	8.30	8.45	8.58
CK	8.17	8.39	8.56	8.62
DIDS(500 μmol/L)	8.17	8.39	8.56	8.62
CK	8.22	8.37	8.44	8.54
SITS(1.0 mmol/L)	8.22	8.37	8.45	8.54

2.2 抑制剂 Az, DIDS, SITS 对海带配子体无机碳利用的影响

胞外碳酸酐酶(CA)是藻类获取外源无机碳的关键酶,普遍存在于大多数海藻中。在胞外,CA把 HCO₃⁻ 催化水解成游离的 CO₂ 供藻类利用是多数海藻利用 HCO₃⁻ 的主要方式,

Az 是胞外碳酸酐酶的抑制剂,50 μmol/L 便可以

达到最大抑制作用^[4]。本实验中雌配子体在浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ Az 的海水中经 6 h 的连续光照培养, pH 的变化与对照海水相同(表 1), 说明没有胞外碳酸酐酶参与无机碳的吸收。另外, 与 HCO_3^- 直接吸收有关的载体蛋白的抑制剂 SITS 和 DIDS^[5] 均未对配子体无机碳的利用产生任何影响(表 1), 说明海带雌配子体也不具有 HCO_3^- 的直接转运机制。

3 讨论

Skirrow 等 1975 年研究表明, 海水中游离的 CO_2 浓度随 pH 的升高而逐渐降低, 当 pH 接近于 9 时, 游离的 CO_2 浓度接近于零。因此, 对于只利用海水中游离 CO_2 的海藻, 不会因无机碳的利用而使海水的 pH 超过 9。Maberly 于 1990 年采用 pH 漂移技术对 35 种大型海藻利用无机碳能力的实验结果表明, 能够利用 HCO_3^- 的 29 种海藻 pH 补偿点均在 9.2 以上, 游离 CO_2 补偿点大多小于 0.1 $\mu\text{mol/L}$, 而只利用游离 CO_2 的 6 种红藻的 pH 补偿点均在 9.0 以下, CO_2 补偿点在 1.362 ~ 2.049 $\mu\text{mol/L}$ 之间。Haugland 等 1992 年采用其他方法验证了 Maberly 的结论。因此, 本文中海带雌配子体的低 pH 补偿点 (8.85) 和高 CO_2 补偿点 (1.635 $\mu\text{mol/L}$) 的实验结果说明, 海带雌配子体只能以游离 CO_2 为碳源。与 HCO_3^- 利用有关的抑制剂的实验结果进一步验证了海带雌配子体只利用海水中的游离 CO_2 , 不能利用 HCO_3^- 。作者已观察到海带的孢子体则是以海水中 HCO_3^- 为主要的无机碳源(结果另文发表), Fei, X. G. 等 1989 年发现海带配子体的致死光强远远低于幼孢子体, 这种生活史不同阶段碳源利用形式的不同, 很可能是导致配子体与孢子体光耐受能力差异的主要原因。

海带细胞工程育苗技术正向产业化和规模化方向发展, 实验室保存的配子体无性系远远不能满足大规模生产对原材料的需求。用光生物反应器对配子体高密度的大量扩繁能减少生产成本和占地面积, 并能保证细胞工程育苗产业化对原种需要。健康生长的配子体是保证发育的前提。海带雌配子体只利用游离的 CO_2 的结果, 预示着配子体必将生长缓慢, 不能忍受高光强。海水中 10 $\mu\text{mol/L}$ 左右的游离 CO_2 浓度不能满足用光生物反应器对配子体高密度快速扩增碳的需求, 并且, 随着海水 pH 的升高, 游离 CO_2 的浓度降低很快, 由方法 1.1 的公式可知: 当 pH 每升高 0.1 个单位, 游离 CO_2 的浓度降低 20%。海带配子体通常采用低光强培养的必要性在于: 一方面抑制杂藻的快速繁殖。因为杂藻的大量繁殖, 尤其是能利用 HCO_3^- 的杂藻数量过多, 会使海水中溶解的 CO_2 很快趋近于零, 配子体处于碳饥饿状态, 而能利用 HCO_3^- 的杂藻则会生长良好, 必然导致配子体在与杂藻竞争无机碳过程中因无可利用的碳而很快死亡; 另一方面是高光强而可利用的无机碳浓度极低, 也会导致光抑制。因此, 如何保证无机碳的供应, 以及碳的供应并相应提高光强对配子体营养生长的影响需要深入研究。

主要参考文献

- 1 曾呈奎, 吴超元主编. 海带养殖学. 北京: 科学出版社, 1962, 1 ~
- 2 周百成, 曾呈奎. 生物工程进展, 1996, 16(6): 13 ~ 16
- 3 Axelsson, L., Ryberg, H., Beer, S. . . *Plant Cell Environ.*, 1995, 18: 439 ~ 445
- 4 Mercado, J. M., Nell, F. X., Figueroa, F. L. . . *Planta*, 1997, 201: 319 ~ 325
- 5 Nmer, N. A., Iglesias-Rodriguez, M. D. *et al.* . *J. Phycol.*, 1997, 33: 625 ~ 631

INORGANIC CARBON ACQUISITION BY THE FEMALE GAMETOPHYTES OF *Laminaria japonica*

YUE Guo-feng JI Yong-cheng WANG Jian-fei ZHOU Bai-cheng
(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

Received: July, 14, 1999

Key words: *Laminaria japonica*, Female gametophytes, Inorganic carbon, Free CO_2

Abstract

The mechanisms and forms of inorganic carbon utilization by the female gametophytes of *Laminaria japonica* have been investigated by pH drift technique in a closed system. The results suggest that: female gametophytes of *L. japonica* have weak ability of inorganic carbon utilization, which have lower pH compensation point 8.85 but higher CO_2 compen-

sation point $1.635 \mu\text{mol/L}$. Various inhibitors of HCO_3^- uptake: acetazolamide (Az), 4,4'-diisothiocyanatobenzene-2,2'-disulfonic acid (DIDS) and 4-acetamidobenzene-2,2'-disulfonate (SITS) have no effect on the carbon utilization by the female gametophytes of *L. japonica* at different concentration of $100 \mu\text{mol/L}$, $500 \mu\text{mol/L}$ and 1.0mmol/L respectively, which indicate only free CO_2 can be utilized by the female gametophytes of *L. japonica*, but HCO_3^- . In the course of inorganic carbon acquisition, alkalinity of natural seawater remains stable, so pH can be used monitoring the change of inorganic carbon in a close system.

(本文编辑 :张培新)