

海带幼孢子体的光合碳利用*

岳国峰 王金霞 王建飞 周百成 曾呈奎

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 于 1999 年 10 月,采用 pH 漂移技术研究了海带幼孢子体的无机碳源利用途径以及无机碳对幼孢子体光合碳利用的影响。结果表明,在天然海水中($\text{pH}=8.1-8.3$),海带幼孢子体外源无机碳的利用形式主要是 HCO_3^- , HCO_3^- 由质膜外碳酸酐酶(CA)将 HCO_3^- 水解成 CO_2 ,以游离 CO_2 形式扩散进入细胞,占全部无机碳供应的 75%。游离 CO_2 只占所吸收总无机碳的 25%;在游离 CO_2 浓度接近于零($\text{pH}=9.1$)时,幼孢子体的全部无机碳源均来自于 HCO_3^- 的水解。提高海水中无机碳的浓度能增加海带对无机碳的利用量,当无机碳浓度达到 3.5mmol/L 时,无机碳的利用速率达到最大值,说明天然海水中的无机碳不能满足其最大生长的需要。

关键词 海带幼孢子体,无机碳, HCO_3^- , 碳酸酐酶

中图分类号 Q945.11

海带是我国养殖规模最大的大型海藻,其养殖产量连续多年居世界首位,干品年产量已达 60 多万 t(Wu, 1998; 费修绶等, 2000)。目前,海带的育苗技术正由传统的采孢子育苗技术向配子体无性系的人为发育调控产生孢子体的细胞工程育苗技术方向转化,以实现良种化养殖(周百成等, 1996)。对海带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。本文报道海带幼孢子体无机碳利用的初步研究结果,以期为海带细胞工程育苗技术产业化及海带养殖过程中无机碳的供应提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 烟杂一号海带(*L. japonica* × *L. longissima*) 幼孢子体光饱和点的测定

长度为 0.8—1.0cm 的海带幼孢子体(1998 年 10 月由烟台市水产开发公司提供)用消毒海水清洗干净后,盛装于 2L 三角瓶中在 10℃ 的冰箱中光照培养,每天更换同温消毒海水。光强由 $80\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 逐步提高到 $250\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,幼孢子体生长良好。每 30ml 消毒海水中加入幼孢子体 0.10g(鲜重)。光强分别为 0、8、10、40、80、120、160、200、240 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,恒温水浴控制温度在 $(10 \pm 0.2)^\circ\text{C}$,用磁力搅拌器进行搅拌(1000r/min)。照光 20min 后测海水 pH 值及碱度的变化,并计算无机碳的利用量。

1.2 材料用量和光照强度对海带幼孢子体 pH 补偿点的影响

处理 I: 在 $200\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光照下,分别称取幼孢子体 0.05、0.10、0.15g,于 30ml 的消

* 国家“九五”科技攻关项目资助,96-C01-05-01 号。岳国峰,男,出生于 1971 年 2 月,博士, E-mail: guofeng~yue@com.cn

毒海水中密闭培养,磁力搅拌器进行搅拌(1000r/min),每隔2h测定一次pH及碱度的变化。处理II:称取幼孢子体0.15g,盛装于30ml海水中,分别在 $80\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 和 $200\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光照下培养,磁力搅拌器进行搅拌(1000r/min),记录pH的变化。

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

1.3 抑制剂Az、SITS、DIDS的抑制率

光温条件同方法1.1,碳酸酐酶的抑制剂Az终浓度为 $100\mu\text{mol}/\text{L}$ (Mercado *et al.*, 1998; 岳国峰等, 2000), HCO_3^- 的直接转运载体蛋白的抑制剂SITS、DIDS的使用终浓度分别为 $1.0\text{mmol}/\text{L}$ (Smith *et al.*, 1989)和 $500\mu\text{mol}/\text{L}$ (Nimer *et al.*, 1997)。抑制率的计算公式为:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{对照组 DIC 的利用量} - \text{抑制剂组 DIC 的利用量}}{\text{对照组 DIC 的利用量}} \times 100$$

1.4 无机碳对海带幼孢子体碳吸收的影响

海带幼孢子体各0.10g(鲜重),于30ml海水中密闭光照培养。光强为 $200\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$,温度为 $(10 \pm 0.2)^\circ\text{C}$,照光为20min,比较不同无机碳浓度下海带对碳的吸收量。总无机碳浓度通过加入 NaHCO_3 调整为2.0、2.5、3.0、3.5、4.0和 $4.5\text{mmol}/\text{L}$ 。照光前用 $0.01\text{mol}/\text{L}$ NaOH将pH调至与对照海水pH相同,照光结束后根据起始碱度和pH的变化测定总无机碳的消耗量。

2 结果

2.1 海带幼孢子体光饱和曲线的测定

为了测定海带幼孢子体的饱和无机碳浓度以及 HCO_3^- 的利用比例,首先测定了海带幼孢子体的光饱和点。当光强在 $8\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 左右时,无机碳的利用量为零,之后无机碳的利用速率随着光强的提高而不断增加,光强为40、80、120、 $160\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 时,无机碳的利用速率分别为12.5、18.9、21.8 $\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{h})$ (鲜重),当光强提高到 $200\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 时,无机碳的利用速率为23.7 $\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{h})$ (鲜重),并且达到了最大值,说明海带幼孢子体光饱和点为 $200\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$,补偿点约为 $8\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 。

2.2 材料用量和光照强度对海带幼孢子体pH补偿点的影响

在密闭培养系统中,随着海藻光合作用对无机碳的利用,无机碳浓度逐渐降低,从而使得海水pH不断升高,当pH升高到一定值时则趋于稳定(每2h pH变化不超过0.01),即达到了pH补偿点(Maberly, 1990)。表1为光照强度和材料用量对海带幼孢子体pH补偿点的影响:同一光照条件下 $[200\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})]$,不同材料用量在不同的时间内均达到了基本相同的pH补偿点,表现为材料量越大,达到pH补偿点的时间越短;相同材料用量(0.15g/30ml)在不同光照条件对海带幼孢子体pH补偿点的影响不同, $80\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 和 $200\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 的光强也使海带幼孢子体在不同的时间内均达到了相同的pH补偿点(9.79), $200\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 的光照条件下达到pH补偿点的时间为12h,而 $80\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 则需要20h。因此,材料用量和光照强度并不影响pH补偿点的准确测定。整个照光过程中,海水的碱度始终保持恒定。由于海水中游离 CO_2 的浓度在pH为9左右接近于零,所以高pH补偿点说明了 HCO_3^- 可以作为海带幼孢子体的无机碳源。

表1 材料用量和光照强度对海带幼孢子体 pH 补偿点的影响

Tab.1 Effect of materials weight and light intensity on pH compensation point of juvenile sporophyte of *L. japonica* × *L. longissima*

光照强度 [$\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$]	每 30ml 海水 中的材料量(g)	pH 补偿点	达到 pH 补偿 点的时间(h)
200	0.05	9.78 ± 0.02	16
	0.10	9.79 ± 0.00	14
	0.15	9.79 ± 0.01	12
80	0.15	9.79 ± 0.02	20

2.3 海带幼孢子体对 HCO_3^- 的利用机理

表2的结果表明了海带幼孢子体对无机碳的吸收机理。质膜外碳酸酐酶(CA)的抑制剂Az显著抑制海带幼孢子体对无机碳的吸收利用,表现为海水pH升高和无机碳利用速度缓慢,在起始pH值为8.1和9.1时,Az的抑制率分别是75%和100%。SITS、DIDS作为 HCO_3^- 的直接转运载体蛋白的抑制剂(Smith *et al.*, 1989; Nimer *et al.*, 1997)均未对海带利用无机碳产生任何影响。这些结果说明: HCO_3^- 是海带幼孢子体无机碳的主要供应形式,质膜外CA催化 HCO_3^- 水解成 CO_2 ,并以 CO_2 的形式扩散进入细胞,不存在 HCO_3^- 的直接转运途径。

表2 抑制剂对海带幼孢子体无机碳利用的影响[$200\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, $(10 \pm 0.2)^\circ\text{C}$, 20min, $n=4$]

Tab.2 Effect of inhibitors on inorganic carbon utilization by juvenile sporophyte of *L. japonica* × *L. longissima*

抑制剂	起始 pH	终点 pH	无机碳利用量 ($\mu\text{mol/L}$)	抑制率(%)
CK	8.10	8.24	54 ± 4.32	0
Az	8.10	8.14	14 ± 2.65	75
	9.10	9.10	0	100
DIDS	8.10	8.24	54 ± 5.21	0
SITS	8.10	8.24	54 ± 3.87	0

2.4 无机碳浓度对海带幼孢子体碳利用的影响

配制不同浓度的无机碳,用0.01mol/L NaOH将pH调至与对照海水pH相同,pH均为8.08。0.1g(鲜重)海带幼孢子体在不同浓度无机碳的海水中密闭照光20min,由于光合作用对无机碳的利用,引起海水pH的升高,虽然pH升高的幅度各不相同,但均在8.30以下,说明这种变化接近于自然海水pH的变化。照光结束后,根据pH和碱度的变化计算海带幼孢子体在不同浓度无机碳的海水中对无机

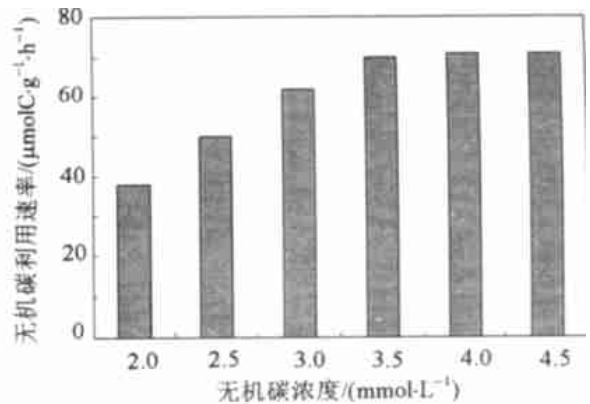


图1 不同无机碳浓度下海带幼孢子体对无机碳的利用
Fig.1 Inorganic carbon acquisition by the juvenile sporophyte of *L. japonica* × *L. longissima* at different concentrations

碳的利用量。结果表明,无机碳浓度在 2.0—3.5mmol/L 范围内,随无机碳浓度的增加,海带幼孢子体对无机碳利用速率也在增加(图 1)。当无机碳浓度达到 3.5mmol/L 时,无机碳的利用速率达到最大值。说明自然海水中的无机碳(2.2mmol/L)不能满足海带幼孢子体最大生长的需要。

3 讨论

3.1 光照强度与海带幼孢子体无机碳利用的关系

曾呈奎等(1981)指出,生长在潮下带海带(*Laminaria japonica*)和裙带菜(*Undaria pinnatifida*)孢子体光饱和点为11 000—12 000k(约 220—240 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$)。作者对烟杂一号海带幼孢子体的试验结果表明幼孢子体同样具有较低的光饱和点[200 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 左右]。而幼孢子体的光补偿点 8 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 左右(约 400k)则比以前报道的海带幼孢子体的光补偿点 500k[约 10 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$](曾呈奎等,1962)要低一些,作者在试验过程中发现幼孢子体在 10 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的光照下仍有少量的碳吸收。海带幼孢子体的培养是海带夏育苗的关键环节,传统的育苗技术是在 7 月份采集游孢子,在室内低温萌发,而幼孢子体的下海时间则在 11 月份。为了保障幼孢子体适时下海养殖,育苗过程中通常采用低光照(2500—4000k),可见传统育苗的幼孢子体始终处于不太适宜的光照环境中,很难保障幼苗的健康生长,这可能是影响育苗成败的因素之一。对细胞工程育苗来说,可以人为地调控孢子体的发生时间,并给以最佳的生长条件来促进幼苗的生长,以缩短育苗周期,节省开支。本文的结果可以为细胞工程育苗幼孢子体的培养光照条件的选择提供理论依据。

3.2 材料用量和光照强度对 pH 补偿点的影响

pH 补偿点是 pH 漂移技术研究藻类碳素营养的重要的生理参数之一,也被用来判别藻类利用 HCO_3^- 能力的一项重要指标。对于海带属中的糖海带(*L. saccharina*)、掌状海带(*L. digitata*)以及极北海带(*L. hyperborea*)的 pH 补偿点, Maberly(1990)和 Surif 等(1989)的结果相差很大。究其原因,是否因为不同的材料用量和光照强度对 pH 补偿点的测定产生影响,从而对藻类光合作用利用 HCO_3^- 能力得出不同的结论? 本文的实验结果排除了这一可能性。因此,上述的差异很可能是由藻类生长的环境条件和藻类本身的健康状况引起的。

3.3 海带幼孢子体对 HCO_3^- 的利用机理

海带属中的糖海带(*L. saccharina*)、掌状海带(*L. digitata*)和极北海带(*L. hyperborea*)能够利用 HCO_3^- 。Surif 等(1989)发现这三种海带均具有质膜外碳酸酐酶。Maberly(1990)也指出这三种海带均具有利用 HCO_3^- 的能力,但均未对 HCO_3^- 的利用机理进行研究。Haglund 等(1992)证实糖海带主要通过质膜外 CA 把 HCO_3^- 转化成 CO_2 ,并以 CO_2 的形式扩散进入细胞。但同时也发现,这仍不能满足其最大光合作用的需要,因而推断可能有 HCO_3^- 的直接转运系统的存在,但未获得直接的实验结果。本文证明了海带幼孢子体无机碳源的吸收形式主要是海水中的 HCO_3^- , HCO_3^- 的吸收是由质膜外 CA 转化成 CO_2 ,以 CO_2 的形式扩散进入细胞,不存在 HCO_3^- 直接转运机制。海带幼孢子体在照光 20min 内 pH 呈线性增加,并且 pH 变化在 8.10—8.30 之间,所以实验结果能够比较真实地反映自然情况下海带对无机碳的吸收。在自然海水中, HCO_3^- 的吸收占总无机碳吸收的 75%,但

从进入细胞的无机碳的形式讲, 游离 CO_2 则占总无机碳吸收的 100%。

3.4 无机碳浓度对海带幼孢子体碳吸收的影响

对于海藻高密度养殖来说, 营养元素的消耗必将加剧。曾呈奎等(1962)发现增施 N、P 肥料能提高海带的产量, 同时也指出提高海水中 CO_2 浓度能促进海带的生长。本文通过测定不同无机碳浓度下海带幼孢子体光合作用对无机碳的利用量, 证明了自然海水中无机碳浓度(2.2mmol/L)远不能满足海带幼孢子体最大生长对碳需求, 这一结果与海带属中的其他几种海藻的结果相类似(Surif *et al.*, 1989), 同时也证明了曾呈奎等(1962)的观点。因此, 保证无机碳的供应, 对于海带孢子体的海面养殖来说, 是提高产量的重要因素之一; 对于幼孢子体, 则是保证种苗健康和快速生长的前提, 而健康的种苗, 也是防止病菌侵害的生理基础。

4 结语

综上所述, 海带(烟杂一号)幼孢子体对无机碳的吸收在光照 $200\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 达到饱和。幼孢子体的无机碳源主要来自于海水中的 HCO_3^- , 质膜外碳酸酐酶(CA)把 HCO_3^- 转化成游离 CO_2 扩散到细胞内。在自然条件下, 这种形式占全部无机碳吸收的 75%, 海水中的游离 CO_2 只占 25%。尽管海带幼孢子体碳源的主要利用形式是 HCO_3^- , 但全部以 CO_2 的形式进入细胞。同时, 海水中的无机碳不能满足海带幼孢子体的最大生长需要。

参 考 文 献

- 岳国峰, 周百成, 2000. 条斑紫菜对无机碳的作用. 海洋与湖沼, 31(3): 246—251
- 周百成, 曾呈奎, 1996. 藻类生物技术与海洋产业发展. 生物工程进展, 16(6): 13—16
- 费修缙, 鲍 鹰, 卢 山, 2000. 海藻栽培——传统方式及其改造途径. 海洋与湖沼, 31(5): 575—566
- 曾呈奎, 吴超元. 1962. 海带养殖学. 北京: 科学出版社, 1—232
- 曾呈奎, 潘忠正, 周百成, 1981. 底栖海藻比较光合作用的研究 II. 潮间带褐藻光合作用与光强的关系. 海洋与湖沼, 12(3): 254—257
- Haglund K, Ramazanov Z, Mtolera M, Pedersen M, 1992. Role of external carbonic anhydrase in light-dependent alkalization by *Fucus serratus* L. and *Laminaria saccharina* (L.) Lamour (Phaeophyta). *Planta*, 188: 1—6
- Maberly S C, 1990. Exogenous source of inorganic carbon for photosynthesis by marine macroalgae. *J Phycol*, 26: 439—449
- 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
- Nimer N A, Iglesias-Rodriguez 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. Pergamon Press, 142—148
- Smith R G, Bidwell R G S, 1989. Mechanism of photosynthetic carbon dioxide uptake by the red macroalgae, *Chondrus crispus*. *Plant Physiol*, 89: 93—99
- Stumm W, Morgan J J, 1970. Aquatic chemistry. An introduction emphasizing chemical equilibrium in natural waters. New York: Wiley-Interscience, 118—160
- Surif M B, Raven J A, 1989. Exogenous inorganic carbon sources for photosynthesis in members of Fucales and the Laminariales (Phaeophyta): ecological and taxonomic implications. *Oecologia*, 78: 97—105
- Wu Chaoyuan, 1998. The Seaweed Resources of China. In: Alan T Critchley, Masao Ohno ed. Seaweed Resources of the World. Japan International Cooperation Agency (JICA), 15—32

INORGANIC CARBON ACQUISITION BY JUVENILE SPOROPHYTE OF LAMINARIALS (*L. JAPONICA* × *L. LONGISSIMA*)

YUE Guo-Feng, WANG Jih-Xia, WANG Jian-Fei, ZHOU Bai-Cheng,
ZENG Cheng-Kui (C. K. Tseng)

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

Abstract Adopting the pH drift technique in Oct. 1999, different forms and mechanisms of inorganic carbon utilization have been investigated on the juvenile sporophyte of *L. japonica* × *L. longissima* in a closed system by means of various inhibitors: acetazolamide (Az), 4,4'-diisothiocyanatosilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS) and 4-acetamid-6-4-isothiocyano-2,2'-stibene disulfonate (SITS). The results suggest that (1) the light saturation point of juvenile sporophyte of *L. japonica* × *L. longissima* is 200 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$. (2) juvenile sporophyte of *L. japonica* × *L. longissima* has a higher pH compensation point—9.79 which is not affected by the weight of material and light intensity, showing HCO_3^- is useful. Az, an inhibitor of external CA, can strongly inhibit carbon uptake of juvenile sporophyte of *L. japonica* × *L. longissima*. External CA dehydrating HCO_3^- to free CO_2 is the main pathway of inorganic carbon utilization by juvenile sporophyte of *L. japonica* × *L. longissima*, accounting for 75% of total inorganic carbon acquisition in natural seawater (pH= 8.1—8.3) and 100% when the concentration of free CO_2 is close to zero (pH= 9.1). (3) With regard to the effect of different concentrations of inorganic carbon on carbon acquisition by juvenile sporophyte of *L. japonica* × *L. longissima* has been studied, the rate of inorganic carbon acquisition by juvenile sporophyte of *L. japonica* × *L. longissima* would increase with an increase in the concentration of inorganic carbon from 2.0 mmol/L to 3.5 mmol/L, indicating that the concentration of inorganic carbon in natural seawater cannot meet the need of optimal growth of *L. japonica* × *L. longissima*.

Key words Juvenile sporophyte of *L. japonica* × *L. longissima*, Inorganic carbon, HCO_3^- , Carbonic anhydrase