

文章编号: 1000-0615(2002)05-0477-04

• 研究简报 •

## 坛紫菜自由丝状体对无机碳的利用

骆其君, 裴鲁青, 潘双叶, 王 勇, 费志清

(宁波大学海洋生物工程实验室, 浙江 宁波 315211)

关键词: 坛紫菜; 自由丝状体; 无机碳; 主动运输

中图分类号: Q946.2 文献标识码: A

### Utilization of inorganic carbon in free-living conchocelis of *Porphyra haitanensis*

LUO Qi-jun, PEI Lu-qing, PAN Shuang-ye, WANG Yong, FEI Zhi-qing

(Key Laboratory of Marine Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

**Abstract:** Free-living *Porphyra haitanensis* conchocelis was cultured under continual light, then it was treated with Van, DIDS and SITS, the inhibitors of inorganic carbon utilization, to study the mechanism of inorganic carbon utilization in the conchocelis. The results indicate that Van inhibits the utilization of inorganic carbon most, with a rate of 71.3%, and the rates of DIDS and SITS are relatively lower, 42% and 35.5% respectively. The inhibition rate of Az is 25.3%, which indicates the external CA is not an important part of its inorganic carbon uptake. A complementary conclusion is that the main part of inorganic carbon absorption in *P. haitanensis* conchocelis is through active transport of  $\text{HCO}_3^-$  and  $\text{CO}_2$ .

**Key words:** *Porphyra haitanensis*; free-living conchocelis; inorganic carbon(Ci); active transport

海水中的无机碳主要以离子( $\text{HCO}_3^-$  和  $\text{CO}_3^{2-}$ )形式存在(>99%),在 pH 8.0、20℃条件下, $\text{HCO}_3^-$ 浓度为  $1.8\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在海水的碱性环境下  $\text{HCO}_3^-$  很难释放出游离的  $\text{CO}_2$ ,所以海水中游离的  $\text{CO}_2$  含量非常低,约为  $10\sim 12\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。而游离的  $\text{CO}_2$  是藻类光合作用的原料,许多研究表明藻类主要利用三种机制提高细胞内的  $\text{CO}_2$  含量,包括通过自由扩散或主动运输方式将海水中游离的  $\text{CO}_2$  运入细胞<sup>[2,3]</sup>,利用胞外碳酸酐酶(Carbonic anhydrase, CA)将  $\text{HCO}_3^-$  解离成  $\text{CO}_2$  后运入细胞<sup>[4]</sup>;以主动运输形式将  $\text{HCO}_3^-$  直接运往细胞,利用内碳酸酐酶(CA)将  $\text{HCO}_3^-$  解离成  $\text{CO}_2$ <sup>[5]</sup>。

国内外的相关研究中,研究方法多采用 Az(acetazolamide), Ez(ethoxyzolamide)和 DIDS 等细胞膜通道的酶的蛋白抑制剂研究藻类无机碳利用的途径,其中 Az 是胞外碳酸酐酶的抑制剂, Ez 有细胞膜通透性,是胞外和胞内碳酸酐酶的抑制剂, DIDS 是氯通道的阻断剂,抑制带 @蛋白对  $\text{HCO}_3^-$  的转运<sup>[4,6]</sup>。Axelsson 认为在温度和酸碱度恒定的情况下,海水中的无机碳浓度变化可以通过 pH 值变化推算<sup>[7]</sup>,可以用于检测抑制剂对实验材料利用无机碳的抑制程度,本实验采用 pH 法测定无机碳的变化。研究表明,紫菜叶状体无机碳利用机制主要是利用胞外碳酸酐酶解离  $\text{HCO}_3^-$ ,游离的  $\text{CO}_2$  扩散

收稿日期: 2001-11-22

资助项目: 国家海洋 863 项目资助(819-03-b)

作者简介: 骆其君(1965-),男,浙江宁波人,硕士,从事藻类生物技术研究。Tel: 0574-87600556, E-mail: luogj@eastday.com

进入细胞内<sup>[8]</sup>,而有关紫菜自由丝状体对有机碳利用途径的工作尚未见报道。本文初步研究坛紫菜自由丝状体利用无机碳途径,旨在为紫菜自由丝状体光生物反应器培养提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

坛紫菜自由丝状体的品系为HML,由本实验室提供。培养用海水取自象山港,经脱脂棉过滤后,煮沸消毒,冷却备用,盐度为28。pH仪为托勒姆-梅特勒公司MP225型。实验试剂中乙酰磺胺(acetazolamide, Az),钒酸盐(Van),4,4'-diisothiocyanato silbene-2,2'-disulfonic acid(DIDS)和4-acetamido-4'-isothiocyanato-2,2'-silbene-disulfonate(SITS)均购自Sigma公司。

### 1.2 方法

称取两份鲜重5g坛紫菜自由丝状体放入培养瓶,加150mL消毒海水,温度22℃,光辐照度 $140\mu\text{Em}^{-2}\text{S}^{-1}$ 。在不同的实验中分别加入Az, Van, DIDS和SITS等无机碳利用的抑制剂,实验中各抑制剂的浓度分别为 $100\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $200\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $500\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $1\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,再用消毒海水培养作为对照。每隔3h,测定pH值并计算海水中无机碳的含量。通过计算无机碳吸收的抑制率,研究自由丝状体利用无机碳的主要途径。

按Stumm和Morgan<sup>[9]</sup>的方法计算无机碳浓度

$$\alpha_1 = \left[ 1 + \frac{[H^+]}{K_1} + \frac{K_2}{[H^+]} \right]^{-1}, \quad \alpha_2 = \left[ 1 + \frac{[H^+]^2}{K_1K_2} + \frac{[H^+]}{K_2} \right]^{-1};$$

$$\alpha_0 = \left[ 1 + \frac{K_1}{[H^+]} + \frac{K_1K_2}{[H^+]^2} \right]^{-1} \quad [CO_2] = \alpha_0 \cdot C_i$$

$K_1, K_2$  分别是 $H_2CO_3$ 的一级和二级解离常数,计算公式如下:

$$pK_1 = 812.27/T + 3.356 - 0.0017 \times S \times \ln T + 0.000091 \times S^2$$

$$pK_2 = 1450.87/T + 4.604 - 0.00385 \times S \times \ln T + 0.000182 \times S^2$$

$T$ 为绝对温度,  $S$ 为盐度,  $C_i$ 是无机碳浓度,计算公式如下:

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

Calk为按照Parsons等<sup>[10]</sup>的方法测定的碳酸碱度

抑制率  $S$  计算公式为:  $S = \Delta C_{i\text{抑制剂}} - \Delta C_{i\text{对照}} / \Delta C_{i\text{对照}}$

## 2 结果

### 2.1 抑制剂对 $HCO_3^-$ 主动运输的影响

实验中使用的抑制剂Van( $500\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), DIDS( $500\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )和SITS( $1\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )均是 $HCO_3^-$ 主动运输的抑制剂。Van抑制与质膜相连ATP酶的活性<sup>[11]</sup>, DIDS抑制带④蛋白和ATP酶对 $HCO_3^-$ 的主动运输<sup>[4,6]</sup>, SITS既可抑制带④蛋白的活性又可以抑制 $Na^+ / HCO_3^-$ 协同转运系统对 $HCO_3^-$ 的转运<sup>[12]</sup>。

由于Van和SITS都可以抑制膜ATP酶的活性,所以也是质膜对 $CO_2$ 主动运输的抑制剂。图1分别显示加抑制剂的实验组与未加抑制剂的对照组在连续培养中的pH变化。

通过实验开始3h内pH值变化情况,计算出无机碳的利用量,得出Van, SITS和DIDS对坛紫菜自由丝状体无机碳利用的平均抑制率分别为71.3%, 42%和35.5%。其中加入Van的实验组在3h内无机碳含量降低 $0.1061\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,而对对照组中无机碳的含量降低 $0.37\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,表明Van对坛紫菜丝状无机碳利用的抑制最大。

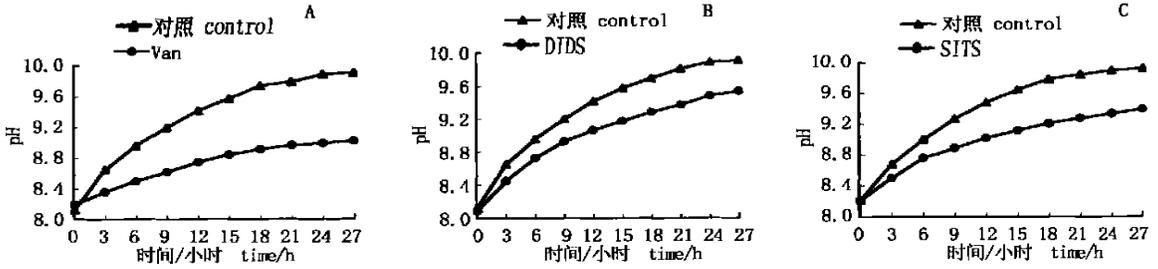


图1 Van, DIDS 和 SITS 对坛紫菜自由丝状无机碳利用的抑制  
 Fig. 1 Inhibition of inorganic carbon utilization by Van, DIDS and SITS  
 in *P. haitanensis* free-living conchocelis

### 2.2 Az 对胞外碳酸酐酶的抑制作用

以条斑紫菜叶状体为实验材料表明,  $100\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 Az 对碳酸酐酶抑制作用最大<sup>[8]</sup>。本实验中 Az 对坛紫菜自由丝状体的无机碳利用也有抑制作用(图 2)。

通过实验开始 3h 内 pH 值的变化, 计算出 Az 的平均抑制率为 25.3%。由于 Az 无法透过细胞膜, 只作用于胞外碳酸酐酶, Az 处理过的自由丝状体经消毒海水洗脱后, 重复实验的结果与对照组的 pH 值变化相同。

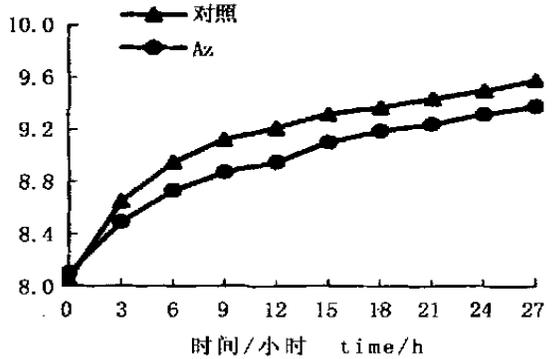


图2 Az 对坛紫菜自由丝状无机碳利用的抑制  
 Fig. 2 Inhibition of inorganic carbon utilization  
 by Az in *P. haitanensis* free-living conchocelis

### 3 讨论

许多实验表明藻类对无机碳的利用途径差别很大, *Porphyridium crentum*, *Nannochloris maculata* 和 *Nannochloris atomus* 的无机碳利用以细胞外游离  $\text{CO}_2$  的主动运输为主, 没有发现胞外碳酸酐酶(CA)的活性<sup>[1]</sup>; *Halophila ovalis*, *Cymodocearotundata* 及条斑紫菜叶状体利用无机碳的主要途径是转运胞外碳酸酐酶(CA)解离  $\text{HCO}_3^-$  产生的  $\text{CO}_2$ <sup>[8, 13]</sup>; *P. cruetum* 可以用主动运输形式利用  $\text{HCO}_3^-$ <sup>[1]</sup>。本实验中, 膜 ATP 酶抑制剂 Van 的抑制率最大, 达到 71.3%, SITS 和 DIDS 的抑制率也分别达到 42% 和 35.3%, 均高于 Az 的抑制率 25.3%。而 Van, DIDS 和 SITS 是与  $\text{HCO}_3^-$  和  $\text{CO}_2$  主动运输相关的 ATP 酶和蛋白的抑制物, 所以推测坛紫菜自由丝状体利用无机碳的机制可能以  $\text{HCO}_3^-$  和  $\text{CO}_2$  的主动运输为主。另外, 当 pH 值接近 9 时, 游离的  $\text{CO}_2$  几乎为零, 即当海水的 pH 值大于 9 时, 藻类只能以  $\text{HCO}_3^-$  作为碳源。本实验得出初步结论认为坛紫菜自由丝状体的无机碳利用以对  $\text{HCO}_3^-$  的主动运输为主。条斑紫菜叶状体也具有这种主动运输的能力, 但效率很低<sup>[8]</sup>。

碳酸酐酶是一种水解酶, 可以将  $\text{HCO}_3^-$  解离成  $\text{CO}_2$ , 由另外一种和胞外碳酸酐酶结合的载体将  $\text{CO}_2$  转运到细胞内<sup>[14]</sup>, 这种途径是条斑紫菜利用无机碳的主要途径, 占全部无机碳利用的 73%<sup>[8]</sup>。本实验由 Az 的抑制率推测这种途径占全部无机碳利用的 25%。紫菜叶状体与丝状体在无机碳利用途径上的这种显著差异有待于进一步探讨。

由于培养用海水的 pH 值大于 9 时, 藻类以  $\text{HCO}_3^-$  作为唯一碳源, 所以藻类培养时的 pH 值补偿点反映了其利用无机碳的能力。本实验中, pH 值达到 9.95 附近时不再升高, 所以坛紫菜自由丝状体的 pH 值补偿点约为 9.95, 这一结果高于条斑紫菜叶状体的 pH 值补偿点 9.83, 说明坛紫菜丝状体具有更高的无机碳利用能力。而一些无法利用  $\text{HCO}_3^-$  的藻类如 *N. maculata*, *N. atomus* 和 *phyllariopsis pupurascens* 的 pH 值补偿点均低于 9.0。这些藻类的生长容易受到环境中碳源不足的胁迫<sup>[1, 15]</sup>。光生物反应器已用于紫菜自由丝状体大规模培养的研究通过上述结论认为, 在光生物反应器培养液中, 加入适量的碳酸氢盐和充入含  $\text{CO}_2$  气体都有利于坛紫菜自由丝状体的生长。

## 参考文献:

- [1] Emma I, Colman Brian, George S, et al. Active transport of CO<sub>2</sub> by three species of marine microalgae[J]. J Phycol, 2000, 36: 314–320.
- [2] Riebesell U, Wolf G D, Smetacek V. Carbon dioxide limitation of phytoplankton growth rate[J]. Nature, 1993, 361: 249–251.
- [3] Rotatore C, Colman B, Kuzma M. The active uptake of carbon dioxide by the marine diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Cydotella* sp[J]. Plant Cell Environ, 1995, 18: 913–918.
- [4] Nimer N A, Iglesias R M D, Merrett M J. Bicarbonate utilization by marine phytoplankton species [J]. J Phycol, 1997, 33: 625–361.
- [5] Merrett M J, Nimer N A, Dong L F. The utilization of bicarbonate ions by the microalga *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibbered[J]. Plant Cell Environ, 1996, 19: 478–484.
- [6] Santos F T. A novel role of 4,4' - disothiocyanatosilbene- 2, 2 - disulfonic acid as an activator of the phosphatase activity catalyzed by plasma membrane Ca<sup>2+</sup> - ATPase[J]. Biochem, 1999, 38: 1552–1558.
- [7] Axelsson L. Changes in pH as a measure of photosynthesis by marine macroalgae[J]. Mar Biol, 1988, 97: 287–294.
- [8] Yue G F, Zhou B C. Inorganic carbon utilization by *Porphyra yessoensis*[J]. Oceanol et Limnol, 2000, 31: 247–251. [岳国峰,周百成. 条斑紫菜对无机碳的利用[J]. 海洋与湖沼, 2000, 31: 247–251.]
- [9] Stumm W, Morgan J J. Aquatic chemistry. An introduction emphasizing chemical equilibria in natural water[M]. New York: Wiley-Interscience, 1970. 118–160.
- [10] Parson T, Maita Y R, Lalli C M. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis[M]. London: Pergamon Press, 1989. 142–148.
- [11] Beer S, Rehnberg J. The acquisition of inorganic carbon by the seagrass *Loxera marima*[J]. Aquac Bot, 1997, 56: 277–283.
- [12] Smith R G. Inorganic carbon transport in biological systems[J]. Comp Biochem Physiol, 1998, 90B: 639–654.
- [13] Bjork M, Weil A, Semesi S, et al. Photosynthetic utilization of inorganic carbon by seagrasses from Zanzibar, East Africa[J]. Mar Biol, 1997, 129: 363–366.
- [14] Jesus M, Xavier F, Felix L, et al. Regulation of the mechanism for HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> use by the inorganic carbon level in *Porphyra leucositata* Thur. in Le Jolis (Rhodophyta)[J]. Planta, 1997, 201: 319–325.
- [15] Antonio Flores-Moya, Jose A. Fernandez. The role of external carbonic anhydrase in the photosynthetic use of inorganic carbon in the deep water alga *Phyllariopsis purpurascens* (Laminariales, Rhodophyta)[J]. Planta, 1998, 207: 115–119.

## 欢迎订阅 2003 年《水产科学》

《水产科学》是由辽宁省水产学会主办的水产科技期刊,创刊于 1982 年,国内外公开发行。主要刊载水产资源、海淡水捕捞、水产养殖与增殖、水产生物病害及防治、水产品保鲜与加工综合利用、渔船、渔业机械与仪器及水产基础科学等方面研究的新进展、新技术、新方法等。设有科学实验、实用技术、渔业管理、综合述评、问题探讨与建议、科普讲座、科技信息等栏目。读者对象为水产科技人员,大中专院校水产、生物、环保等专业师生,渔业行政事业和企业单位有关管理和技术人员,以及广大知识渔民。

本刊为双月刊, A4 开本, 56 页, 逢单月 25 日出版, 定价 5.00 元, 全年 30.00 元。邮发代号 8-164。订阅者可到邮局订阅, 也可直接汇款到本刊编辑部订阅或通过银行汇款。

编辑部地址: 大连市沙河口区黑石礁街 50 号辽宁省海洋水产研究所《水产科学》编辑部

邮编: 116023

电话: 0411-4679512

开户行: 工商银行大连星海支行, 帐号: 3400202309008900681