

CO₂对微拟球藻(*Nannochloropsis* sp.)利用有机碳和光合作用的影响

胡晗华^{1,*} 高坤山^{1,2}

¹中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; ²汕头大学海洋生物研究所, 广东汕头 515063

提要 CO₂浓度提高时, 微拟球藻吸收醋酸钠的速率增加2倍。混养生长的藻细胞最大光合作用速率、光合作用效率、无机碳半饱和常数和无机碳饱和的光合作用速率均显著低于光自养条件下生长的。

关键词 CO₂; 醋酸盐; 光合作用; 微拟球藻(*Nannochloropsis* sp.); 有机碳

Effects of CO₂ on the Organic Carbon Utilization and Photosynthesis of *Nannochloropsis* sp.

HU Han-Hua^{1,*}, GAO Kun-Shan^{1,2}

¹Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; ²Marine Biology Institute, Shantou University, Shantou, Guangdong 515063, China

Abstract Effects of elevated CO₂ on photosynthetic activity and the utilization of dissolved organic carbon (DOC) of *Nannochloropsis* sp. were studied in this paper. When elevated CO₂ reached 2800 μL·L⁻¹, the organic carbon uptake increased 2 times compared with that of 350 μL·L⁻¹ in mixotrophic culture. Light-saturated photosynthetic rate (P_m), photosynthetic efficiency (α), half saturation coefficient ($K_{1/2}$), and inorganic carbon-saturated photosynthesis rate (V_m) for mixotrophic cells were significantly lower than those of photoautotrophic ones. It indicated that the uptake of acetate by *Nannochloropsis* sp. required energy, and enhanced CO₂ decreased the energy cost for the operation of CO₂ concentration mechanism, hence providing more energy for the uptake of organic carbon and accelerating the organic carbon uptake rate.

Key words CO₂; acetate; photosynthesis; *Nannochloropsis* sp.; organic carbon

藻类培养过程中常受CO₂供应速率的限制, 特别是高密度培养条件下, 无机碳浓度不足会限制藻细胞的生物量(Riebesell等1993)。补加无机碳或有机碳可以促进藻细胞生物量的增加。有研究显示, 自养条件下提高液相CO₂浓度或补加NaHCO₃, 混养条件下补加醋酸盐或葡萄糖均可在不同程度上促进藻细胞生长并导致藻细胞二十碳五烯酸(EPA)产率的增加(夏建荣和高坤山2002; Hu和Gao 2003; Kang等2004; Xu等2004)。

由于微拟球藻属(*Nannochloropsis*)的种类通常具有很高含量的EPA, 因而被认为有望成为EPA产品生产的生物资源(Sukenik 1999)。微拟球藻(*Nannochloropsis* sp.)是一种单细胞的海洋绿藻, 具有利用乙醇、醋酸盐和葡萄糖等有机碳进行混合营养生长的能力。提高培养液中CO₂浓度或添加葡萄糖, 可以促进微拟球藻细胞的生长和EPA产率(Hu和Gao 2003; Xu等2004)。添加醋酸盐也可以促进微拟球藻细胞的生长(Hu和Gao

2003)。混养条件下, 细胞对无机碳的代谢可能受有机碳的影响(Vonshak等2000; Kang等2004)。但培养液中无机碳与细胞对有机碳利用之间的关系却少见报道。本文根据液相CO₂浓度升高前后细胞对溶解性无机碳和醋酸钠吸收速率的比较以及对无机碳的亲合力和光合活性的变化, 探讨无机碳和有机碳在细胞代谢中的相互作用。

材料与方法

微拟球藻(*Nannochloropsis* sp.)由国家海洋局第一海洋研究所李瑞香先生馈赠。接种一定量的藻细胞(最终OD_{665 nm} ≤ 0.04)到盛有4 L f/2AW培养基(Harrison等1980)的5 L血清瓶中, 通入过滤空气, 在温度为22℃、光强为50 μmol·m⁻²·s⁻¹的条件下培养至对数生长中期(OD_{665 nm} = 0.554), 然后

收稿 2005-12-22 修定 2006-04-10

资助 国家自然科学基金(30070582)。

*E-mail: hanhuahu@ihb.ac.cn, Tel: 027-66044779

将光强提高到 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 继续培养10 h, 离心收集藻细胞, 用新鲜的 f/2AW 洗涤1次, 再用4.8 L f/2AW 重悬藻细胞并等分至12个500 mL的三角瓶中($\text{OD}_{665 \text{ nm}}=0.551$)。实验共4组(每组重复3次): 2组光合自养, 用 f/2AW 培养基, 1组通过过滤空气(CO_2 浓度为 $350 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$), 1组通2800 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ CO_2 的过滤空气; 另外2组为混养, 用含有2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸钠的 f/2AW 培养基, 同样分别通入的 CO_2 浓度为350或2800 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 过滤空气。用流量计(LZB-3WB, 常州热工仪表总厂)将通气速率控制在 $200 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 置于温度为 22°C 、光强为 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 连续光照的人工气候箱(E7 Conviron)中培养。通气开始时取样, 每隔1~2 h测定培养液中溶解性有机碳(dissolved organic carbon, DOC)、溶解性无机碳(dissolved inorganic carbon, DIC)和pH值; 每隔12 h测 $\text{OD}_{665 \text{ nm}}$ 一次; 培养3 d后, 测定藻细胞光合放氧活性和对无机碳的响应曲线。

用紫外分光光度计测定光密度值($\text{OD}_{665 \text{ nm}}$), 通过 $\text{OD}_{665 \text{ nm}}$ 和干重的线性关系式计算: 藻细胞干重 $[\text{mg}(\text{DW})\cdot\text{L}^{-1}]=386.42\times\text{OD}_{665 \text{ nm}}-3.4854$ ($n=10$, $P<0.01$)。按照Parsons和Strickland (1963)的方法(在90%的丙酮中)计算: 叶绿素a (chl a)含量 $(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})=11.41\times\text{OD}_{664 \text{ nm}}$; pH值用pH计(420A, Orion)测定; 用总碳分析仪(TOC-5000A, Shimadzu)测定培养上清液中DIC和总碳(TC)的含量, 并由此计算出DOC的含量($\text{DOC}=\text{TC}-\text{DIC}$)。

不同培养条件下生长3 d的藻经离心后重新悬浮于新鲜的 f/2AW 培养基中。温度以循环水浴控制在 22°C 左右, 以Clark型氧电极(Hansatech, 英国)测量不同光强下藻的光合放氧速率。根据Henley (1993)的方法, 以方程: $P=P_m\times\tanh(a\times I/P_m)+R_d$ 对实验数据进行非线性参数估计, 并计算各参数。其中, I 为光强; P 是光强为 I 时所对应的光合速率; P_m 为最大光合速率, 即光饱和的光合速率; a 是光合作用在光限制部分的初始斜率, 可以表示光合效率; R_d 为暗呼吸速率。 $I_k=P_m/a$, 表示光饱和点; $I_c=-R_d/a$, 表示光补偿点。

不同培养条件下生长3 d的藻经离心后, 用含 $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 1,3-双[(三羟甲基)甲基氨基]丙烷的

无碳缓冲反应液(pH 8.0)洗涤数次并重新悬浮。于 22°C 和 $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光强条件下, 测定各种无机碳浓度($[S]$)下藻细胞的光合作用速率(V)。实验数据以米氏(Michaelis-Menten)动力学方程: $V=V_m\times[S]/(K_{1/2}(\text{DIC})+[S])$ 进行非线性参数估计, 得出参数 V_m 和 $K_{1/2}$ 。其中, V_m 为无机碳饱和的光合速率; $K_{1/2}$ 为光合速率达到最大值一半时所需的无机碳浓度。

结果与讨论

1 微拟球藻的生长

图1显示, 提高 CO_2 浓度和添加醋酸钠对微拟球藻的生物量均有不同程度的促进作用。液相 CO_2 浓度由 $350 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 提高到 $2800 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 经过培养36 h后, 光自养条件下的净增生物量由 $217 \text{ mg}(\text{DW})\cdot\text{L}^{-1}$ 增加至 $364 \text{ mg}(\text{DW})\cdot\text{L}^{-1}$, 提高68%; 添加 $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸钠的混养条件下的净增生物量由 $248 \text{ mg}(\text{DW})\cdot\text{L}^{-1}$ 增加至 $351 \text{ mg}(\text{DW})\cdot\text{L}^{-1}$, 提高42%。低 CO_2 浓度下, 添加醋酸钠的净生物量增加14%; 相反, 提高 CO_2 浓度下, 添加醋酸钠的净生物量减少约4%。高密度培养条件下, 藻细胞的生长可能受碳源供应的限制, 从而影响细胞的生长。提高液相 CO_2 浓度(Hu和Gao 2003)、添加无机碳或有机碳(Hu和Gao 2003; Kang等2004; Xu等2004)均可能促进藻细胞生物量增加。从本文结果来看, 提高 CO_2 浓度对微拟球藻生长可能是一种更为有效的方法。

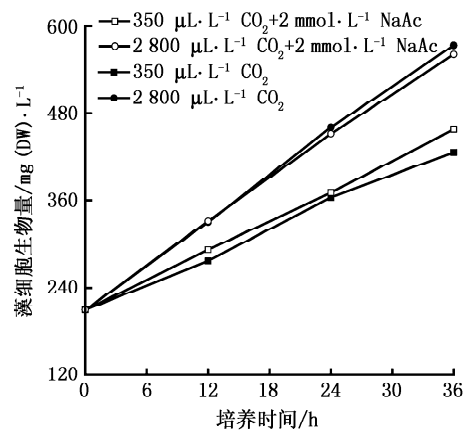


图1 不同碳源条件下微拟球藻的生长
Fig. 1 Growth of *Nannochloropsis* sp. in different carbon sources

2 微拟球藻对有机碳和无机碳的吸收

图2显示, 低浓度CO₂下, 对数生长期的微拟球藻细胞培养液中, DIC随着时间增加而略有降低, 而且在自养培养条件下的这种降低趋势比混养培养条件下明显。表1显示, 自养条件下藻细胞对DIC的吸收速率比混养条件高1倍多。醋酸抑制与光捕获和无机碳固定相关的叶绿体蛋白的表达(Kindle 1987), Heifetz等(2000)的研究也证实醋酸的代谢对无机碳的利用有负面影响。因而, 藻细胞对无机碳的吸收在有醋酸的条件受到了抑制。高浓度CO₂时, 培养基中的DIC随着时间进程而增加, 吸收速率表现为负值, 特别是在混养条件下, 培养基中的DIC显著升高(表1), 说明在高CO₂条件下, 培养基中的DIC已达到饱和状

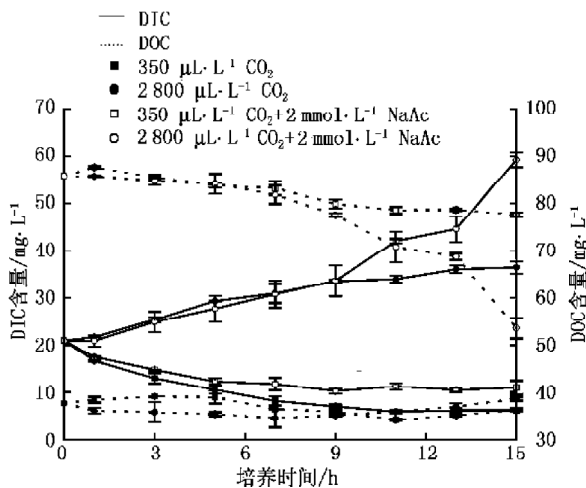


图2 不同碳源培养条件下微拟球藻培养液中DIC和DOC含量的变化

Fig. 2 Changes in DIC and DOC contents in the media of *Nannochloropsis* sp. cultivated in different carbon sources

表1 不同碳源培养下的微拟球藻对碳源的吸收速率

Table 1 Carbon uptake rates of *Nannochloropsis* sp. cultivated in different carbon sources

培养条件	吸收速率/ mg·L ⁻¹ ·mg ⁻¹ (chl a)·h ⁻¹	
	DIC	DOC
350 μL·L ⁻¹ CO ₂	1.10	0.11
2800 μL·L ⁻¹ CO ₂	-0.49	-0.03
350 μL·L ⁻¹ CO ₂ + 醋酸钠	0.52	0.42
2800 μL·L ⁻¹ CO ₂ + 醋酸钠	-1.40	1.18

态。这一点与藻细胞生长是相关的, 尽管添加醋酸钠可提供更多可利用形式的碳源, 但高CO₂浓度下培养基中DIC处于过饱和状态, 相反, 藻细胞对醋酸钠的吸收需消耗细胞额外的能量(Heifetz等2000), 因而, 添加醋酸钠生物量略有下降。另外, 碳浓度过高可能会产生底物抑制。Wolf-Gladrow和Riebesell (1997)曾提出, 只有当CO₂的消耗速率超过扩散供应的速度时, CO₂的限制作用才会出现。

从对数期藻细胞培养液中DOC变化时间进程可以看出, 自养条件下, 由于藻细胞生长过程中分泌或细胞死亡所产生的少量有机物导致的培养液具有较低的DOC含量, 其变化并不明显(图2)。在含有醋酸钠的培养液中, DOC的含量随时间进程而下降, 特别是在高浓度CO₂条件下, 培养基中的DOC含量显著降低(图2), 其细胞对有机碳的吸收速率比低CO₂浓度下增加约2倍(表1)。显示提高液相CO₂浓度可以显著促进藻细胞对醋酸的消耗速率。高浓度CO₂可以减少藻细胞无机碳浓缩对代谢能的分流(Kaplan和Reinhold 1999)而较多地用于有机碳的吸收。

3 藻细胞的光合特性

提高CO₂浓度对藻细胞以chl a为单位的P_m和α均无显著影响(图3-a和表2)。添加醋酸钠的藻细胞P_m和α分别从296.9~306.2 μmol (O₂)·mg⁻¹ (chl a)·h⁻¹和2.3~2.8 [μmol (O₂)·mg⁻¹ (chl a)·h⁻¹·[μmol·m⁻²·s⁻¹]⁻¹]减少至121.0~134.3 μmol (O₂)·mg⁻¹ (chl a)·h⁻¹和1.2~1.3 [μmol (O₂)·mg⁻¹ (chl a)·h⁻¹·[μmol·m⁻²·s⁻¹]⁻¹]。光自养条件下, R_q差异不显著, 混养条件下的R_q低于自养条件下的, 特别是在高浓度CO₂下, 藻细胞的R_q最低, 仅为19.2 μmol (O₂)·mg⁻¹ (chl a)·h⁻¹。提高CO₂浓度的藻细胞I_c升高(表2)。

低CO₂条件下培养至对数生长期的微拟球藻转入高CO₂或混养条件下培养3 d后, 测定藻细胞对无机碳的亲力的结果(图3-b和表3)表明, 培养基中不同碳源的短期效应可引起藻细胞对无机碳的半饱和常数发生较大变化。pH 8.0时, 其范围在72.7~162.9 μmol·L⁻¹之间, 即K_{1/2} (CO₂)为0.70~1.58 μmol·L⁻¹。混养或高浓度CO₂下的藻细胞对无机碳的半饱和常数均减小, 即藻细胞对无

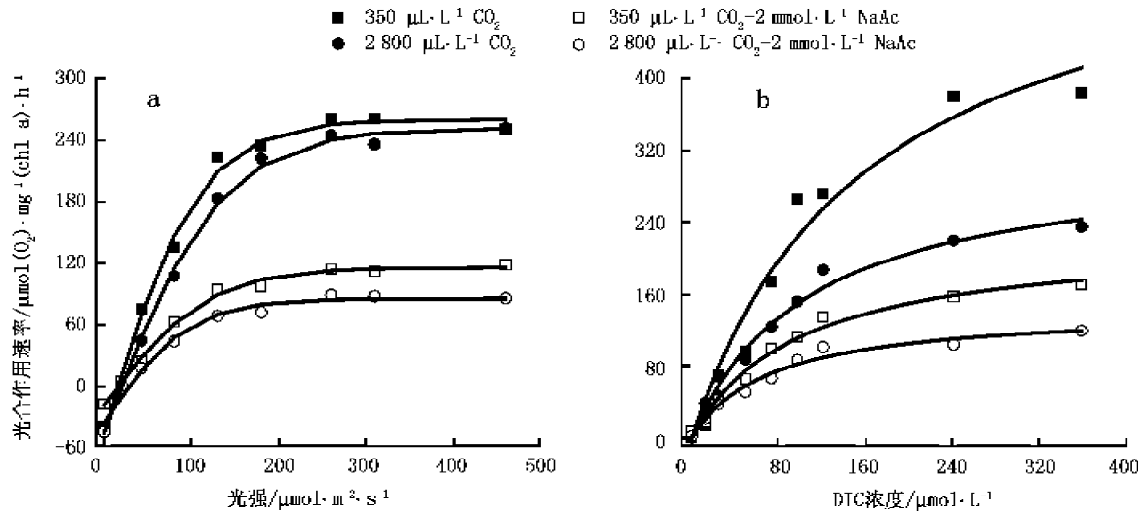


图3 不同碳源下微拟球藻光合作用的光强响应曲线和DIC亲和力曲线

Fig. 3 Photosynthetic O_2 evolution of *Nannochloropsis* sp. as a function of photo flux density and DIC in the media with different carbon sources

表2 不同碳源下微拟球藻光合作用对光强响应曲线参数

Table 2 Parameters of photosynthetic-light response ($P-I$) curves of *Nannochloropsis* sp. cultivated in different carbon sources

碳源(CO_2 浓度/ $mL \cdot L^{-1}$)	光合作用参数					
	$P_m / mmol(O_2) \cdot mg^{-1}(chl\ a) \cdot h^{-1}$	$\alpha / [mmol(O_2) \cdot mg^{-1}(chl\ a) \cdot h^{-1}] \cdot [mmol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}]^{-1}$	$R_p / mmol(O_2) \cdot mg^{-1}(chl\ a) \cdot h^{-1}$	$I_k / mmol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$	$I_c / mmol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$	
光自养	350	306.2±8.1	2.8±0.2	-46.1±7.2	108.0±8.4	16.3±1.0
	2800	296.9±8.1	2.3±0.2	-45.3±6.8	132.8±12.4	20.3±2.5
混合营养	350	134.3±5.4	1.2±0.1	-19.2±4.7	117.3±10.2	16.8±1.0
	2800	121.0±5.5	1.3±0.2	-36.4±4.9	94.9±11.5	28.5±2.4

N=3。

表3 不同碳源下微拟球藻光合作用对DIC的亲合力曲线参数

Table 3 Parameters of the responses of photosynthesis to DIC of *Nannochloropsis* sp. cultivated in different carbon sources

碳源(CO_2 浓度/ $\mu L \cdot L^{-1}$)	光合作用参数			
	$V_m / \mu mol(O_2) \cdot mg^{-1}(chl\ a) \cdot h^{-1}$	$K_{1/2}(DIC) / \mu mol \cdot L^{-1}$	$K_{1/2}(CO_2) / \mu mol \cdot L^{-1}$	
光自养	350	598.1±60.9	162.9±35.3	1.58±0.04
	2800	317.6±43.6	110.0±29.8	1.06±0.03
混合营养	350	222.5±12.2	97.7±12.3	0.95±0.03
	2800	143.3±10.0	72.7±15.8	0.70±0.03

N=3。

机碳表现亲和力升高。光自养条件下微拟球藻的

V_m 显著高于混养条件。

Heifetz等(2000)报道,随着培养基中醋酸浓度的增加,混养生长的莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)细胞光合放氧速率和无机碳固定显著降低。我们的结果也显示,混养生长的微拟球藻细胞光合作用速率显著低于光自养条件。由此可见,在真核微藻中醋酸的代谢对细胞光合无机碳固定有负面影响。与此相反,外源有机碳可促使蓝藻细胞光合系统的能量转化加强(王永红等2000),因而混养生长的聚球藻7002(*Synechococcus* sp. PCC 7002, Kang等2004)和集胞藻6803(*Synechocystis* sp. PCC 6803, 王永红等2000)的最大净光合放氧速率或光系统II活性显著高于光自养条件下的。

总之,微拟球藻具有利用醋酸钠进行混合营

养生长的能力, 这种绿藻细胞对醋酸钠的吸收是一个明显的耗能过程, 提高液相 CO_2 浓度可以减少细胞对无机碳浓缩的能量消耗(邱保胜和高坤山 2001), 因而才会有更多的能量用于有机碳的吸收, 最终促进细胞吸收有机碳的速率。由于能量的分流或对光系统的抑制, 混养条件下, 藻细胞的光合活性明显降低。尽管提高 CO_2 浓度对藻细胞光系统活性没有显著影响, 但从低 CO_2 浓度下培养的微拟球藻细胞转入高浓度 CO_2 下培养后, 细胞对无机碳的亲合力即明显升高, 这样藻细胞利用无机碳的能耗即进一步降低。据此认为, 在微拟球藻混合营养培养过程中, 适当提高液相 CO_2 浓度可明显促进藻细胞利用有机碳的效率, 并可能增加藻细胞的 EPA 含量。

参考文献

- 邱保胜, 高坤山 (2001). 蓝藻浓缩二氧化碳的机制. 植物生理学通讯, 37 (5): 385~392
- 王永红, 叶济宇, 米华玲, 李元广, 张嗣良 (2000). 集胞藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 利用葡萄糖生长与光合能量转化的关系. 植物学报, 42 (11): 1122~1125
- 夏建荣, 高坤山 (2002). CO_2 浓度升高对斜生栅藻生长和光合作用的影响. 植物生理学通讯, 38 (5): 431~433
- Harrison PJ, Waters RE, Taylor FJR (1980). A broad spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton. J Phycol, 16: 28~35
- Heifetz PB, Förster B, Osmond CB, Giles LJ, Boynton JE (2000). Effects of acetate on facultative autotrophy in *Chlamydomonas reinhardtii* assessed by photosynthetic measurements and stable isotope analyses. Plant Physiol, 122: 1439~1445
- Henley WJ (1993). Measurement and interpretation of photosynthetic light-response curves in alga in the context of photoinhibition and diel changes. J Phycol, 29: 729~739
- Hu H, Gao K (2003). Optimization of growth and fatty acid composition of a unicellular marine picoplankton, *Nannochloropsis* sp., with enriched carbon sources. Biotechnol Lett, 25: 421~425
- Kang R, Wang J, Shi D, Cong W, Cai Z, Ouyang F (2004). Interactions between organic and inorganic carbon sources during mixotrophic cultivation of *Synechococcus* sp.. Biotechnol Lett, 26: 1429~1432
- Kaplan A, Reinhold L (1999). CO_2 concentrating mechanisms in photosynthetic microorganisms. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 50: 539~570
- Kindle KL (1987). Expression of a gene for a light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein in *Chlamydomonas reinhardtii*: effect of light and acetate. Plant Mol Biol, 9: 547~563
- Parsons TR, Strickland JDH (1963). Discussion of spectrophotometric determination of marine plant pigments, with revised equations for ascertaining chlorophylls and carotenoids. J Mar Res, 21: 155~163
- Riebesell U, Wolf-Gladrow DA, Smetacek V (1993). Carbon dioxide limitation of marine phytoplankton growth rates. Nature, 361: 249~251
- Sukenik A (1999). Production of eicosapentaenoic acid by the marine eustigmatophyte *Nannochloropsis*. In: Cohen Z (ed). Chemicals from Microalgae. London: Taylor & Francis Press, 41~56
- Vonshak A, Cheung SM, Chen F (2000). Mixotrophic growth modifies the response of *Spirulina (Arthrospira) platensis* (cyanobacteria) cells to light. J Phycol, 36: 675~679
- Wolf-Gladrow D, Riebesell U (1997). Diffusion and reactions in the vicinity of plankton: a refined model for inorganic carbon transport. Mar Chem, 59: 17~34
- Xu F, Hu H, Cong W, Cai Z, Ouyang F (2004). Growth characteristics and eicosapentaenoic acid production by *Nannochloropsis* sp. in mixotrophic conditions. Biotechnol Lett, 26: 51~53