

海黍子对外源无机碳利用机制的初步研究

程苗^{1,2}, 吴海一^{2,3,4}, 詹冬梅^{2,3}, 绳秀珍¹, 徐智广^{2,3,4,*}

¹中国海洋大学水产学院, 山东青岛266003; ²山东省海洋生物研究院藻类研究中心, 山东青岛266104; ³青岛市大型海藻工程技术研究中心, 山东青岛266104; ⁴山东省海水健康养殖工程技术研究中心, 山东青岛266104

摘要: 为了探讨海黍子的外源无机碳利用机制, 本文以光合放氧为指标研究了不同pH (6.5、8.0和9.5)及添加不同抑制剂(AZ、EZ和DIDS)对海黍子光合固碳特性的影响。结果显示, 随着外源碳浓度的增加, 海黍子的光合放氧速率逐渐增加, 随着pH的升高, 藻体的最大光合作用速率(V_{max})逐渐降低, 而无机碳半饱和常数($K_{0.5}$)逐渐升高。碳酸酐酶抑制剂acetazolamide (AZ)、6-ethoxyzolamide (EZ)及阴离子交换蛋白抑制剂4,4'-diisothiocyano-stilbene-2,2'-disulfonate (DIDS)对海黍子的光合固碳速率均有强烈的抑制作用。以上结果说明, 海黍子不仅对海水中的 CO_2 具有较高的亲和力, 而且还可以利用海水中的 HCO_3^- 作为光合作用的无机碳源, 且对 HCO_3^- 的吸收具备两条途径: 既可以通过胞外碳酸酐酶催化转化为 CO_2 后进入细胞, 也可通过阴离子交换蛋白直接吸收海水中的 HCO_3^- 。

关键词: 海黍子; 光合固碳; AZ; EZ; DIDS

Preliminary Study on Exogenous Inorganic Carbon Utilization in *Sargassum muticum*

CHENG Miao^{1,2}, WU Hai-Yi^{2,3,4}, ZHAN Dong-Mei^{2,3}, SHENG Xiu-Zhen¹, XU Zhi-Guang^{2,3,4,*}

¹Fishery College, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266003, China; ²Algal Research Centre, Marine Biology Institute of Shandong Province, Qingdao, Shandong 266104, China; ³Macroalgae Engineering Technology Centre of Qingdao, Qingdao, Shandong 266104, China; ⁴Engineering Research Center of Healthy Marine Aquaculture of Shandong Province, Qingdao, Shandong 266104, China

Abstract: The inorganic carbon utilization in *Sargassum muticum* was investigated under different pH (6.5, 8.0 and 9.5) and different inhibitors (AZ, EZ and DIDS). The results showed that photosynthetic O_2 evolution rates in *S. muticum* increased gradually with increasing exogenous inorganic carbon concentration. V_{max} declined while $K_{0.5}$ rose remarkably along with increasing pH level. Both of carbonic anhydrase inhibitors [acetazolamide (AZ) or ethoxyzolamide (EZ)] and anion exchanger inhibitor [4,4'-diisothiocyano-stilbene-2,2'-disulfonate (DIDS)] notably suppressed photosynthetic O_2 evolution rates of *S. muticum*. These results suggested that *S. muticum* not only had a high affinity for CO_2 , but also could use HCO_3^- as a source of Ci for photosynthesis. Moreover, two ways to use HCO_3^- were found in this alga, one was transforming HCO_3^- into CO_2 through carbonic anhydrase outside of the cell membrane, and the other was absorbing HCO_3^- directly by anion-exchange protein.

Key words: *Sargassum muticum*; photosynthetic carbon fixation; AZ; EZ; DIDS

大气 CO_2 浓度升高引起的海水酸化和近海海水富营养化问题目前已经引起社会各界的广泛关注。大气 CO_2 浓度升高导致海水的pH降低, 使海水中 CO_2 和 HCO_3^- 含量升高(Feely等2004), 海水富营养化则导致水体透明度降低的同时, 使海水pH升高, 大大降低水体中溶解性无机碳的含量(刘玲玲2011)。海水酸化与富营养化在改变海水pH值的同时, 也改变海水的碳酸盐系统, 进而对藻体碳酸酐酶活性产生影响, 造成大型海藻无机碳利用特性的适应性变化。研究表明, 在酸性pH条件下, 海藻的碳酸酐酶活性低, 而在碱性条件下, 碳酸酐酶

活性高(Fett和Coleman 1994; Axelsson等2000)。大型海藻是近海最重要的初级生产力, 近些年由于社会各界对其碳汇和近海富营养修复功能的关注, 有关大型海藻无机碳利用机制的研究成为学术界热点问题之一。

收稿 2014-11-12 修定 2015-03-27

资助 国家自然科学基金(41376129)、海洋公益性行业科研专项经费项目(201305021、201405040、201505022和201305005)和青岛市市南区科技发展资金项目(2013-12-005-SW)。

* 通讯作者(E-mail: bigwide@163.com; Tel: 18678919993)。

自然海水pH为8.0~8.2, 无机碳主要以 HCO_3^- 和 CO_3^{2-} 的形式存在, 而游离 CO_2 的浓度很低。为了保证这种低 CO_2 浓度下的光合作用效率, 大型海藻形成了独特的无机碳利用机制(徐军田等2013), 许多种类的大型海藻均可利用海水中的 HCO_3^- , 以此来适应海水中的低 CO_2 (Axelsson和Uusitalo 1988; Beer和Rehunberg 1997)。大型海藻对 HCO_3^- 的利用主要有2种方式, 一种是在胞外碳酸酐酶催化下, HCO_3^- 水解为游离的 CO_2 , 经扩散进入细胞; 另一种是 HCO_3^- 的直接吸收, 即通过阴离子交换蛋白使 HCO_3^- 进入胞内, 在胞内转化为 CO_2 。不同的种类可能具备不同的 HCO_3^- 利用途径, 如坛紫菜自由丝状体可直接吸收 HCO_3^- (骆其君等2002), 条斑紫菜叶状体则通过碳酸酐酶在胞外解离 HCO_3^- 后吸收利用(岳国峰和周百成2000), 而江蓠同时具备这两种方式(Andria等1999)。

海黍子为多年生大型褐藻, 隶属于马尾藻科(Sargassaceae)马尾藻属(*Sargassum*), 广泛分布于我国黄海和渤海沿岸(马伟伟等2013), 是潮下带的常见种, 也是近海海藻场的重要组成品种。海黍子是制造褐藻胶的重要原料, 其提取物具有较高的抗氧化活性, 是我国传统的药用海藻(陈震和刘红兵2012)。由于海黍子可作为海参养殖中的替代饲料, 随着北方海参养殖业的迅速发展, 对这种藻的需求量也不断增大, 因而对于海黍子人工育苗技术的研究受到关注并取得了一定进展(柴丽等2012)。另外, 海黍子对水体中的重金属如镉、镍具有良好地吸附作用, 且成本低, 对环境无污染, 成为海水生态修复藻类的重要可选品种(王一兵2013)。由于其重要的经济和生态价值, 对于海黍子的研究也越来越为大家所重视, 但有关海黍子无机碳利用机制的研究仍未见报道。本文以海黍子为实验材料, 设置3种不同pH值, 通过添加3种抑制剂AZ、EZ和DIDS探讨海黍子对无机碳的利用形式及可能的利用机制, 试图为海洋酸化和富营养化等环境变化背景下的大型海藻生态修复功能研究提供一定的理论参考。

材料与方法

1 实验材料

海黍子(*Sargassum muticum* Yendo)于2014年4月25日采自山东省荣成市俚岛镇自然海区, 藻体

采集后清洗干净, 置于恒温箱(0~4 °C)于3 h内运回实验室, 在自然海水中暂养。暂养条件: 光照强度为 $150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 光照周期为12 h/12 h, 温度为20 °C, 充气, 每24 h换水一次。暂养48 h后, 选择健康一致的藻体用于实验。

2 光合固碳速率的测定

采用氧电极(Chlorolab 3, 英国Hansatech公司)法测定海黍子光合放氧, 以光合放氧速率 $[\mu\text{mol}(\text{O}_2)\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}]$ 表示藻体的光合固碳速率。氧电极法测定时以恒温循环器(DTY-5A, 北京德天佑科技发展有限公司)控制反应槽温度为20 °C, 光照用碘钨灯提供, 光照强度设定为 $600 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 光照强度以光量子计(QRT1, 英国Hansatech公司)测定。

取海黍子叶状体, 剪成1 cm左右长的小段, 恢复培养1 h避免机械损伤对光合作用的影响。称取约0.15 g鲜重(fresh weight, FW)的藻体, 置于氧电极的反应杯中, 加入8 mL无碳海水, 盖上反应杯, 打开光照, 适应一段时间, 以消耗掉海水及藻体自身储存的碳, 当放氧速率为负值或接近零时, 表明藻体几乎无光合作用, 此时藻体接近碳耗竭状态(此阶段约10 min), 然后加入一定浓度的 NaHCO_3 母液, 为藻体提供外源性无机碳, 待放氧稳定, 记录光合放氧速率。

3 缓冲剂TRIS对光合固碳速率的影响测定

保持其他条件不变, 在无碳海水中加入TRIS, 不加TRIS的作为对照, 添加 NaHCO_3 作为碳源, 通过氧电极法测定海黍子光合放氧速率。无碳海水的配制如下: 取500 mL过滤灭菌海水, 加入1:1盐酸(使用时现配), 采用pH计(PHS-3CW, 上海理达仪器厂)测定pH, pH计使用前采用pH校正液校准, pH降至4.0以下后, 充氮气2 h, 加入TRIS缓冲液(最终浓度为 $25 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 以 $1 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaOH (使用时现配)调节pH值至6.5、8.0和9.5, 密封备用。

4 不同无机碳浓度下光合放氧速率曲线(P-C曲线)的获得

通过测定不同无机碳浓度下藻体的光合放氧速率来获得P-C曲线。放氧速率用氧电极法测定, 不同的无机碳反应溶液是通过向无碳海水中添加不同量的 NaHCO_3 获得。研究设定9种不同的无机碳浓度, 分别为0.1375、0.275、0.55、1.1、2.2、4.4、8.8、13.2和 $17.6 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 其中 $2.2 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为自然海水中无机碳浓度。

获得不同无机碳浓度下的光合放氧速率后, 利用米氏方程(如下)进行非线性拟合(Von Caemmerer和Farquhar 1981): $V=V_{\max} \times S/(K_{0.5}+S)$ 。其中, S 为不同的无机碳浓度, V 为不同无机碳浓度下的光合放氧速率, V_{\max} 是最大固碳速率, $K_{0.5}$ 值是半饱和常数, $1/K_{0.5}$ 代表着藻体对无机碳的亲合力。 V_{\max} 和 $K_{0.5}$ 的值可以从拟合P-C曲线后计算获得。

5 抑制剂对光合放氧速率的影响测定

取500 mL灭菌海水(无机碳浓度为 $2.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 加入或不加入TRIS, 终浓度为 $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 加入 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH或者1:1 HCl调节pH至6.5、8.0和9.5, 封口备用。称取0.15 g (FW)左右的藻体, 放入氧电极反应杯, 加入8 mL不同pH的自然海水, 待放氧曲线稳定后, 加入碳酸酐酶抑制剂acetazolamide (AZ)、6-ethoxazolamide (EZ)或者阴离子交换蛋白抑制剂4,4'-diisothiocyano-stilbene-2,2'-disulfonate (DIDS), AZ和EZ使用终浓度为 $200 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, DIDS使用终浓度为 $300 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 待放氧曲线稳定后记录放氧速率。抑制率(%)=(对照组放氧速率-抑制剂组放氧速率)/对照组放氧速率 $\times 100$ 。

6 pH补偿点的测定

称取0.5 g左右的藻体, 加入20 mL灭菌海水于25 mL刻度管中, 分别加入抑制剂AZ、EZ或DIDS, 对照不加, 密封, 放于光照培养箱(MGC-250P型, 上海一恒科技有限公司), 光照强度设置为 $150 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 温度为 $25 \text{ } ^\circ\text{C}$, 每隔1 h, 测定pH直至pH不再变化为止, 此时的pH值为藻体在该条件下的pH补偿点, 这段时间内pH的变化曲线称为pH漂移曲线。

7 统计分析

所有的测定结果表示为平均值 \pm 标准差($n \geq 3$), 用单因子方差分析(ANOVA)和Tukey's检验进行统计差异性分析, 以 $P < 0.05$ 作为差异的显著性水平。

实验结果

1 缓冲液TRIS对海黍子光合固碳的影响

由表1可以看出, 在3种pH条件下, 对照与TRIS、AZ与AZ+TRIS、EZ与EZ+TRIS、DIDS与DIDS+TRIS均无显著性差异, 表明加入TRIS对海黍子的光合放氧无影响。添加抑制剂AZ、EZ和DIDS均显著抑制海黍子的光合放氧速率($P < 0.05$)。

表1 缓冲液TRIS和3种抑制剂对海黍子光合放氧速率的影响

Table 1 Effects of TRIS buffer and three inhibitors on the photosynthetic O_2 evolution rates of *S. muticum*

处理	光合放氧速率/ $\mu\text{mol} (\text{O}_2) \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$		
	pH 6.5	pH 8.0	pH 9.5
对照	96.12 \pm 7.98 ^a	45.96 \pm 2.35 ^a	15.60 \pm 3.67 ^a
TRIS	95.46 \pm 2.85 ^a	42.82 \pm 1.90 ^a	15.91 \pm 3.40 ^a
AZ	33.78 \pm 5.69 ^b	13.05 \pm 3.14 ^b	6.56 \pm 0.51 ^b
AZ+TRIS	32.20 \pm 4.54 ^b	14.00 \pm 0.14 ^b	8.81 \pm 1.76 ^b
EZ	36.53 \pm 2.82 ^b	15.99 \pm 1.75 ^b	9.21 \pm 2.60 ^b
EZ+TRIS	33.82 \pm 2.99 ^b	14.18 \pm 1.09 ^b	7.24 \pm 1.66 ^b
DIDS	11.86 \pm 0.70 ^c	7.82 \pm 1.22 ^c	6.29 \pm 0.72 ^b
DIDS+TRIS	10.35 \pm 2.15 ^c	4.94 \pm 0.66 ^c	7.04 \pm 0.38 ^b

同一列中不同的小写字母表示数值之间存在显著性差异($P < 0.05$), $n=3$; mean \pm SD。

在pH为6.5或8.0时, AZ和EZ处理之间海黍子光合放氧速率无显著差异, 但二者均与DIDS处理的有显著性差异($P < 0.05$); 在pH为9.5时, 加入3种抑制剂对光合放氧速率均无显著影响。同时, 在不同的pH值下, 相同处理的海黍子光合放氧速率不同, 随着pH值由6.5升到9.5, 光合放氧速率显著下降, 说明pH值影响海黍子的光合放氧速率。

2 不同抑制剂和pH对海黍子光合放氧的影响

从图1可以看出, 随着pH的增加, 海黍子的光合放氧速率降低, pH显著影响海黍子的光合放氧

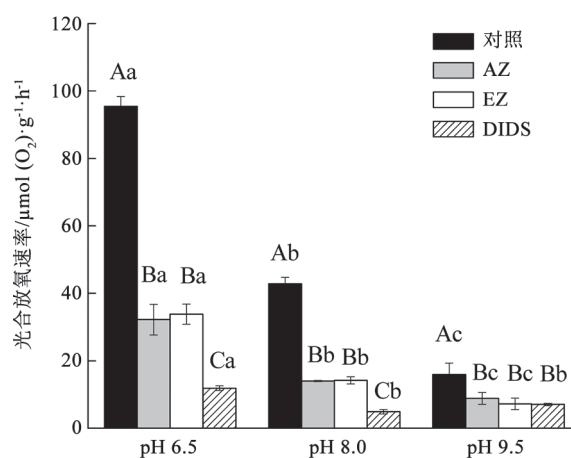


图1 不同pH值下抑制剂对海黍子光合放氧速率的影响
Fig.1 Effects of inhibitors on the photosynthetic O_2 evolution rates of *S. muticum* under different pH levels

不同的大写和小写字母分别表示相同pH下不同处理及不同pH下相同处理之间具有显著性差异($P < 0.05$). 下同此。

速率($P<0.05$)。在pH为6.5时, $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ 的比例最大, 此时具有最大的光合放氧速率; 在pH为9.5时, $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ 的比例最小, 此时光合放氧速率最小。pH 9.5的光合放氧速率为pH 8.0的0.37倍, 而pH 6.5的光合放氧速率约为pH 8.0的2.23倍。

在3种pH条件下, 胞外碳酸酐酶抑制剂AZ、胞内碳酸酐酶抑制剂EZ和阴离子交换蛋白抑制剂DIDS均显著地抑制光合放氧速率(图2) ($P<0.05$), 抑制率分别为66%、64%和87% (pH 6.5), 67%、67%、88% (pH 8.0), 44%、55%、55% (pH 9.5)。pH为6.5或8.0时, DIDS具有最大的抑制作用, AZ和EZ的抑制作用无显著差别, 均与DIDS有显著性差别($P<0.05$)。pH为9.5时, 3种抑制剂的抑制作用无显著差别。

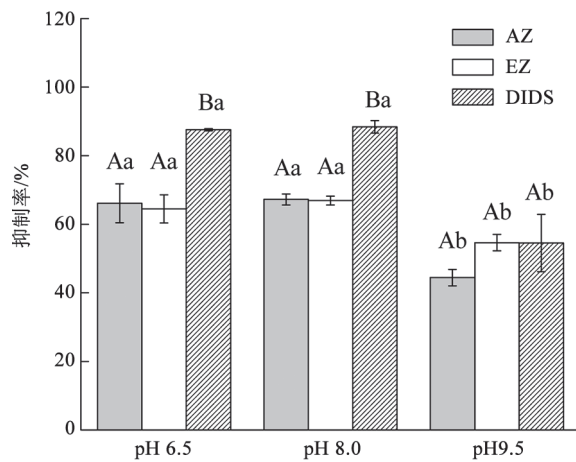


图2 不同pH值下3种抑制剂的抑制率
Fig.2 Inhibition ratio of three inhibitors under different pH levels

3 不同pH值下海葵子的P-C曲线

图3显示, 随着无机碳浓度的增加, 海葵子的光合放氧速率也逐渐增加。当海水中的碳浓度为 $8.8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 光合放氧速率在pH 8.0和9.5这两种条件下达到最大值; 在pH为6.5时, 光合放氧速率在碳浓度为 $2.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时达到最大值。

从表2可以看出, pH为6.5和8.0的最大放氧速率无显著性差异; 与pH 8.0相比, pH为9.5的海葵子最大光合放氧速率下降了56%。随着pH的上升, 半饱和常数也逐渐增加, pH为6.5的半饱和常数最小, pH为9.5的半饱和常数最大。相比于pH 8.0, pH

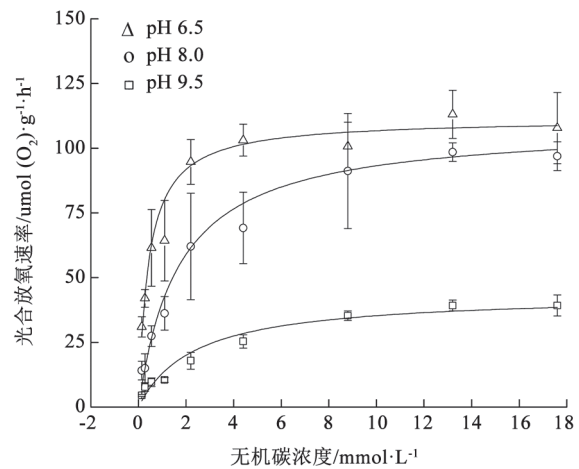


图3 不同pH值下海葵子光合放氧速率对无机碳浓度升高的响应

Fig.3 Responses of photosynthetic O_2 evolution rate of *S. muticum* to increasing inorganic carbon concentration under different pH levels

表2 不同pH值下海葵子的最大光合放氧速率(V_{\max})和半饱和浓度($K_{0.5}$)

Table 2 The carbon-saturating maximum photosynthetic rate (V_{\max}) and half saturation constant ($K_{0.5}$) of *S. muticum* under different pH levels

pH值	V_{\max}	$K_{0.5}$
6.5	112.15 ± 2.97^a	0.52 ± 0.14^a
8.0	109.73 ± 9.32^a	1.97 ± 0.58^{ab}
9.5	47.86 ± 3.93^b	3.42 ± 0.86^b

同一列中不同的小写字母表示数值之间存在显著性差异($P<0.05$)。

为6.5的半饱和常数下降了74%, 而pH为9.5的半饱和常数上升了74%。

4 海葵子的pH补偿点

在密闭系统中, 藻类通过主动吸收和被动扩散的方式吸收海水中的有关离子 HCO_3^- 和分子 CO_2 来进行光合作用, 同时释放出代谢产物, 影响海水的化学性质, 因此, 可根据海水pH值的变化来衡量藻类的生命活动最主要的为光合作用(邹定辉和高坤山2002)。由图4可以看出, 在未加入任何抑制剂的密闭系统中, 随着时间的延长, 海水的pH逐渐升高, pH补偿点为9.1。而在加入抑制剂AZ和EZ的密闭系统中, 海水pH最终达到8.75, 且AZ与EZ处理的pH补偿点相同。加入抑制剂DIDS的密闭系

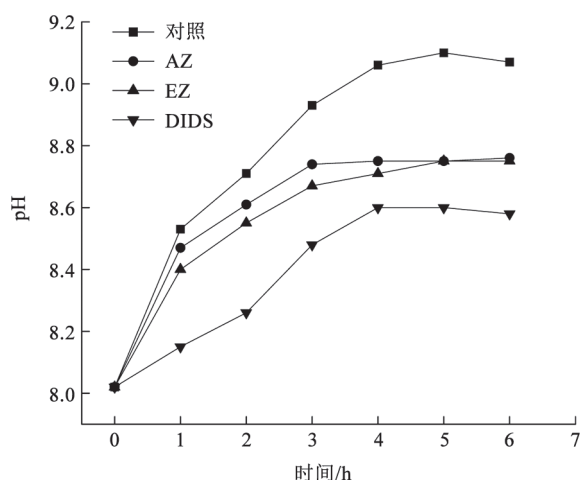


图4 不同抑制剂对海黍子pH漂移曲线的影响
Fig.4 Effects of different inhibitors on pH-drift curves of *S. muticum*

统中, 海水pH值明显低于对照, pH补偿点为8.60, 较其它几组低。

讨 论

有报道指出, 缓冲液TRIS可能对大型海藻的光合放氧产生抑制作用, 如TRIS能够显著抑制甜褐藻和墨角藻的光合放氧, 且逐渐提高TRIS的浓度会导致甜褐藻的净光合作用的降低, 但对石莼和紫菜却无抑制作用(Axelsson等2000)。Zou等(2004)在研究龙须菜的光合固碳中发现TRIS对龙须菜的光合放氧无显著影响。本研究中, 加入TRIS对海黍子的光合放氧没有显著影响, 因而我们选择了TRIS作为不同pH值调节时的缓冲剂。

当海水中的pH由8.0降到6.0时, 海水中(总无机碳浓度为 $2.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)游离 CO_2 的浓度由 $15 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 升到 $1000 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 当海水的pH高于8.0或者更高时, 海水中的无机碳多以 HCO_3^- 的形式存在; 当pH由8.0升高到10.0时, 游离 CO_2 的浓度由 $15 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 降到接近0 (Merian 1982)。本研究中, 当pH值由8.0降到6.5时, 海黍子的光合放氧速率显著性升高($P < 0.01$), 而当pH值由8.0升到9.5时, 海黍子的光合放氧速率显著下降($P < 0.01$), 这说明海黍子对 CO_2 具有很高的亲和力。另一方面, 本研究还发现, 随着外源总碳浓度的增加, 海黍子的光合放氧速率逐渐增加, 且添加抑制剂AZ、EZ或DIDS均可抑制海黍子光合放氧和pH补偿点, 这表明海黍子同样具

有利用 HCO_3^- 的能力。许多大型海藻都被证实有利用 HCO_3^- 的能力, 以此来适应海水中的低 CO_2 环境。

藻类对 HCO_3^- 的利用能力与碳酸酐酶相关 (Mercado等1997; Kaplan和Reinhold 1999), 胞外碳酸酐酶的作用就是将靠近细胞表面的 HCO_3^- 脱水成 CO_2 , 供藻体的光合作用, 这部分的光合作用可被抑制剂AZ抑制, AZ不能穿透细胞膜, 仅对胞外碳酸酐酶具有抑制作用(Larsson和Axelsson 1999)。而胞内碳酸酐酶的作用是协助无机碳在胞内的转运, 最终使无机碳以 CO_2 的形式固定于Rubisco的羧化位点上, 胞内碳酸酐酶的活性可被EZ抑制, 且EZ可以穿透细胞膜, 也可抑制胞外碳酸酐酶的活性 (Moroney等2001)。本研究中, 在3种pH (6.5、8.0和9.5)条件下, 海黍子的光合放氧速率均被抑制剂AZ和EZ所抑制, 但两者间的抑制作用无显著性差别。这表明海黍子可以通过胞外碳酸酐酶的催化吸收利用 HCO_3^- , 同时由于胞外碳酸酐酶活性决定着进入细胞内部的无机碳的量, 当胞外碳酸酐酶活性受到抑制时, 进入细胞内部的无机碳减少, 无法满足细胞内碳同化对底物的需求, 此时胞内碳酸酐酶活性没有得到充分发挥, EZ对胞内碳酸酐酶的抑制效果被胞外碳酸酐酶的抑制效果所掩盖, 这可能是AZ和EZ抑制率没有差异的重要原因。另一方面, 在pH为8.0 (正常海水pH)和pH 9.5的无碳海水中, 添加不同浓度的 NaHCO_3 作为碳源, 此时海水中的游离 CO_2 浓度很低(pH 8.0)或几乎为0 (pH 9.5), 但海黍子仍有较高的光合放氧速率, 并且随着碳浓度的增加, 光合放氧速率也逐渐增加, 直至 $8.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时达到饱和, 这说明海黍子能够通过碳酸酐酶利用海水中的 HCO_3^- 作为光合作用的碳源。这种方式是大型海藻无机碳利用的重要方式之一 (Mercado等1999), 绝大多数大型海藻如褐藻中的海带(岳国峰等2001)、红藻中的坛紫菜(王淑刚等2013)和绿藻中的石莼(Axelsson等1995)都具有胞外碳酸酐酶, 并通过在胞外把 HCO_3^- 转化为 CO_2 后进入细胞, 从而实现 HCO_3^- 利用。

大型海藻对 HCO_3^- 的利用也可通过阴离子交换蛋白直接转运 HCO_3^- 来实现, 而这种形式的无机碳利用可以被特定的阴离子蛋白抑制DIDS所抑制 (Nimer等1997)。本研究中, 当加入DIDS后, 海黍子的光合放氧速率明显受到抑制, 其抑制作用在

pH为6.5与8.0时与AZ、EZ有显著性差别($P<0.05$)。有研究表明,在pH 9.5较高的条件下,由碳酸酐酶催化 HCO_3^- 水解的利用方式在高pH下会受到抑制(Axelsson等1995; Larsson等1997),但本研究中海黍子在pH为9.5时依然具有一定的光合放氧速率,这种现象在其他大型褐藻如海带中也有发现(Ryberg等1990),说明海黍子存在 HCO_3^- 直接吸收方式。

在密闭系统中,光合作用消耗无机碳源是使培养液pH升高的主要因素,因此,pH补偿点在一定程度上也能反映藻类对无机碳的利用。Maberly和Spence (1983)的研究发现,在pH-drift实验中,可利用 HCO_3^- 进行光合作用的藻类最终pH一般都大于9.0。韩博平等(2003)也认为若pH补偿点高于9.0,则该藻具有利用 HCO_3^- 的能力。其他一些对 HCO_3^- 无利用能力的藻类如*Phyllariopsis purpurascens* pH补偿点均低于9.0 (Dreohsler等1993)。海黍子的pH补偿点为9.1,且加入的抑制剂AZ、EZ和DIDS均可使pH补偿点降低,这进一步说明海黍子可以利用 HCO_3^- 进行光合作用。

综上所述,海黍子除了可以利用海水中的游离 CO_2 外,还可以利用 HCO_3^- 作为光合作用的无机碳源,且同时具备两种利用机制,既能够通过胞外碳酸酐酶催化 HCO_3^- 水解,又可以直接通过阴离子交换蛋白直接吸收海水中的 HCO_3^- 。但有研究表明,在 HCO_3^- 的利用中,直接吸收 HCO_3^- 要比由胞外碳酸酐酶催化 HCO_3^- 水解的利用方式有效(Axelsson等1995; Larsson等1997; Larsson和Axelsson 1999)。本研究也可看出,在pH为6.5和8.0时,DIDS的抑制作用最大,与AZ、EZ存在显著性差异,且加入DIDS的pH补偿点也低于添加AZ。由此推测,在这两种机制中,海黍子对 HCO_3^- 的利用可能更偏向于通过阴离子交换蛋白进行的直接吸收。

参考文献

- 柴丽,王丽梅,宋广军,高杉(2012). 海黍子新生枝条的室内培养及有性生殖同步化. 海洋渔业, 34 (4): 423~428
- 陈震,刘红兵(2012). 马尾藻的化学成分与生物活性研究进展. 中国海洋药物杂志, 31 (5): 41~51
- 韩博平,韩志国,付翔(2003). 藻类光合作用机理与模型. 北京: 科学出版社, 217~252
- 刘玲玲(2011). 三种沉水植物无机碳利用机制研究[学位论文]. 湖北: 华中师范大学
- 骆其君,裴鲁青,潘双叶,王勇,费志清(2002). 坛紫菜自由丝状体对无机碳的利用. 水产学报, 26 (5): 477~480
- 马伟伟,李丽,周革非(2013). 海黍子硫酸多糖体外免疫与抗肿瘤活性. 食品科学, 34 (7): 270~274
- 王淑刚,杨锐,周新倩,宋丹丹,孙雪,骆其君(2013). 高温胁迫下坛紫菜(*Pyropia haitanensis*)对无机碳的利用. 海洋与湖沼, 44 (5): 1378~1385
- 王一兵,柯珂,张荣灿,高程海,何碧娟(2013). 海藻生物吸附重金属研究现状及展望. 海洋科学进展, 31 (4): 574~582
- 徐军田,王学文,钟志海,姚东瑞(2013). 两种浒苔无机碳利用对温度响应的机制. 生态学报, 33 (24): 7892~7897
- 岳国峰,王金霞,王建飞,周百成,曾呈奎(2001). 海带幼孢子体的光合碳利用. 海洋与湖沼, 32 (6): 647~652
- 岳国峰,周百成(2000). 条斑紫菜对无机碳的利用. 海洋与湖沼, 31 (3): 246~251
- 邹定辉,高坤山(2002). 坛紫菜光合作用对重碳酸盐的利用. 科学通报, 47 (12): 926~930
- Andria JR, Perez-Llorens JL, Vergara JJ (1999). Mechanisms of inorganic carbon acquisition in *Gracilaria gaditana* nom. prov. (Rhodophyta). Planta, 208: 564~573
- Axelsson L, Mercado JM, Figueroa FL (2000). Utilization of HCO_3^- at high pH by the brown macroalga *Laminaria saccharina*. Eur J Phycol, 35: 53~59
- Axelsson L, Ryberg H, Beer S (1995). Two modes of bicarbonate utilization in the marine green macroalga *Ulva lactuca*. Plant Cell Environ, 18: 439~445
- 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 *Zostera marina*. Aquat Bot, 56: 277~283
- Drechsler Z, Sharkia R, Cabantchik ZI, Beer S (1993). Bicarbonate uptake in the marine macroalga *Ulva* sp. is inhibited by classical probes of anion exchange by red blood cells. Planta, 191: 34~40
- Feely RA, Sabine CL, Lee K, Berelson W, Kleypas J, Fabry VJ, Millero FJ (2004). Impact of anthropogenic CO_2 on the CaCO_3 system in the oceans. Science, 305: 362~366
- Fett JP, Coleman JR (1994). Regulation of periplasmic carbonic anhydrase expression in *Chlamydomonas reinhardtii* by acetate and pH. Plant Physiol, 106: 103~108
- Kaplan A, Reinhold L (1999). CO_2 concentrating mechanisms in photosynthetic microorganisms. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 50: 539~570
- Larsson C, Axelsson L (1999). Bicarbonate uptake and utilization in marine macroalgae. Eur J Phycol, 34: 79~86
- Larsson C, Axelsson L, Ryberg H, Beer S (1997). Photosynthetic carbon utilization by *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta) from a Swedish rockpool. Eur J Phycol, 32: 49~54
- Maberly SC, Spence DHN (1983). Photosynthetic inorganic carbon use by freshwater plants. J Ecol, 71: 705~724

- Merian E (1982). A review of: "aquatic chemistry (An introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters)". Intern J Environ Anal Chem, 12: 317~318
- Mercado JM, Figueroa FL, Niell FX (1997). A new method for estimating external carbonic anhydrase activity in macroalgae. J Phycol, 33: 999~1006
- Moroney JV, Bartlett SG, Samuelsson G (2001). Carbonic anhydrases in plants and algae. Plant Cell Environ, 24: 141~153
- Nimer NA, Iglesias-Rodriguez MD, Merrett MJ (1997). Bicarbonate utilization by marine phytoplankton species. J Phycol, 33: 625~631
- Ryberg H, Axelsson L, Carlberg S, Larsson C, Uusitalo J (1990). CO₂ storage and CO₂ concentrating in brown seaweeds I. Occurrence and ultrastructure. Curr Res Photosynth, 18: 517~520
- Von Caemmerer S, Farquhar GD (1981). Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. Planta, 153: 376~387
- Zou D, Xia J, Yang Y (2004). Photosynthetic use of exogenous inorganic carbon in the agarophyte *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta). Aquaculture, 237: 421~431