

藻类光合固碳的研究技术与解析方法*

RESEARCH TECHNIQUES AND METHODS IN CHARACTERIZING PHOTOSYNTHETIC CARBON FIXATION BY ALGAE

高坤山

(汕头大学海洋生物广东省重点实验室 515063)

(中国科学院水生生物研究所 武汉 430072)

藻类的光合固碳构成水域初级生产力的基础。藻类固碳的研究是藻类生理生态学的重要部分,对认识藻类在水域物质循环中的作用有重要意义。特别是近年来大气 CO_2 浓度升高与水域生物圈的关系倍受关注;大气 CO_2 浓度升高是否会通过影响水域中无机碳浓度和 pH 影响水域生态系统,藻类的光合固碳对大气 CO_2 浓度的作用如何等是目前科学界所关心的问题。因此,研究 CO_2 浓度变化与藻类的关系十分重要。开展此研究的基础是藻类固碳的研究技术与解析方法。尽管有关藻类光合作用以及固碳特性的研究已有很长的历史,但是目前尚没有任何专业书籍或文章系统并全面地论述过藻类光合固碳特性的研究技术与解析方法。

1 藻类光合固碳的理论基础

藻类光合作用时首先由核酮糖二磷酸羧化酶(Rubisco)将 CO_2 固定,再经过 Calvin-Benson 循环合成各种有机物。藻类的这种途径与其他的 C_3 植物完全一样。但是,在 Rubisco 的特性和 CO_2 的利用等方面,藻类有其独特的机制^[2]。藻类光合作用时, CO_2 由细胞外的扩散层(Boundary layer)依次传递到细胞壁、细胞膜、细胞质、叶绿体膜和间质,最后到达 Rubisco。在各个传递过程中都存在 CO_2 输送及扩散的阻力,成为限制 CO_2 固定的原因。另外,“ CO_2 ”(总无机碳)在水中以 CO_2 (H_2CO_3 的量可忽视)、 HCO_3^- 和 CO_3^{2-} 的形式存在,三者之间的关系如下:

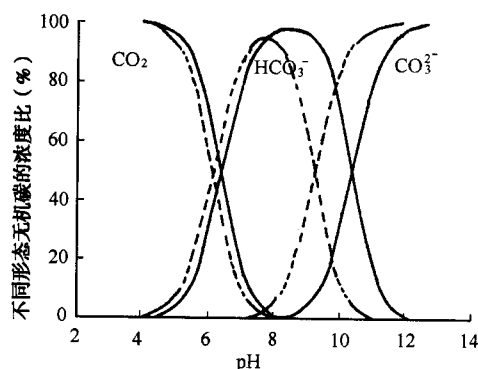
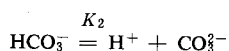
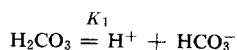
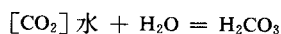


图1 25℃时不同 pH 条件下海水(虚线,盐度 35)与淡水(实线)中各种无机碳浓度的相对比例

3 种不同形态无机碳之间存在着动态平衡,其量的比例,主要受 pH 的影响(图 1),另外也受盐度和温度的左右。凡影响以上解离常数(K_1 , K_2)的因子都会不同程度地影响三者的浓度比。藻类究竟利用哪种形态无机碳的问题,也就是说, CO_2 , HCO_3^- 或 CO_3^{2-} 哪种透过细胞膜被吸收、哪种被利用的问题是一个很重要的植物生理学问题。就至今的研究进展而论,大部分的微藻只吸收 CO_2 , 只有少数吸收 HCO_3^- ; 大型的藻类有些能够利用 HCO_3^- , 但极少数是直接吸收 HCO_3^- , 通常是借助于细胞表面的碳酸酐酶(CA)将 HCO_3^- 转化为 CO_2 , 后者被吸收和固定^[5]。这种 HCO_3^- 离子的利用可视为“假吸收”或“伪装性吸收”。Rubisco 的反应底物是 CO_2 , 而不是 HCO_3^- , 这一点早在

* 国家自然科学基金资助项目 39830060 号;中科院“百人计划”和国家杰出青年科学基金项目 39625002 号。

收稿日期:1998-05-07;修回日期:1999-06-21

1969 年就被 Cooper T. G. 等证明了。然而,藻类主动吸收 HCO_3^- 离子,然后利用细胞内存在的 CA 将其转化为 CO_2 供 Rubisco 固定的可能性也是有的^[6]。这方面的研究还有待于深化。一般认为藻类不直接利用 CO_3^{2-} 离子。总之,不管是微型还是大型藻类都吸收 CO_2 (CO_2 分子本身具有生物膜透性)。在大部分藻类生活适宜的中性或偏碱性 pH 阈值内,“ CO_2 ”的大部分是 HCO_3^- 离子, CO_2 的浓度仅仅占百分之几(例如, pH 为 8.3,与空气中 CO_2 达到平衡的海水中 90 % 以上的“ CO_2 ”是 HCO_3^- , CO_2 低于 1 %)。因此,对于只能利用 CO_2 的藻类来说,在适应环境变化的过程中必须为自己装备利用 CO_2 的特别机制;藻类在细胞内浓缩 CO_2 ,或者提高对 CO_2 的亲合力,都是其有效利用 CO_2 的特征。

研究藻类对 CO_2 的亲合力及其光合作用速度是揭示并解释藻类对“ CO_2 ”利用机理和效率的有效途径。为此,植物生理学工作者利用酶学中的酶与底物间亲和性的解释方法,来解释细胞与底物间的关系。光合作用的反应速度和 CO_2 的亲合性与底物 CO_2 浓度的关系,可以参考酶反应与底物的解释方法(Michaelis-Menten 公式)进行解释。因为光合作用有各种各样的反应参与,所以将“细胞”当成“酶”来解释实际上是有困难的。细胞内复杂反应系列的存在使得细胞-底物曲线不象酶与底物反应那样规范,常出现变形的情况。

要解释光合作用与 CO_2 浓度的关系,首先需要测定各种 CO_2 浓度下的光合作用速度,然后作出光合作用对 CO_2 浓度变化依赖的曲线,求出最大光合作用速度 ($V_{\max}$) 和 $1/2 V_{\max}$ 时的 CO_2 浓度 ($K_{m[\text{CO}_2]}$);以藻类最大光合作用速度与底物(CO_2)浓度限制条件下的光合作用速度来衡量其对底物 CO_2 的亲合性。

要准确测定种种 CO_2 浓度下藻类的光合作用速度,首先需要将反应液中“ CO_2 ”浓度调到零,同时也需要将细胞内部的“ CO_2 ”浓度调到零。如果反应液和细胞内的“ CO_2 ”不是零的话,在向反应液添加一定量“ CO_2 ”之前藻类还保持较明显的光合作用速度,这样测定的数据就不能准确反映 CO_2 浓度与光合作用速度的关系,也就无法准确地推测出 ($K_{m[\text{CO}_2]}$) 和 $V_{\max}$ 。本文重点是光合作用对 CO_2 浓度依赖性的研究技术以及解析方法。

2 藻类光合作用的测定方法

2.1 溶氧测定法

通过对溶解氧的定量分析,求出藻类单位时间内的产氧量,决定其光合作用速度。溶解氧的测定可采用 Clark 型的氧电极、Winkler 滴定法、气透膜质谱仪以及检容器等。氧电极本身和光合作用测定时用的反应槽的大小与形状各有差异,但是基本原理是相同的,都是测定一定时间内反应槽中溶解氧浓度的变化;根据溶解氧浓度的变化、引起此变化所需的时间以及反应槽的容积求出光合作用的速度。

2.2 固碳测定法

可利用同位素 ^{14}C 测定细胞同化无机碳的量,推算出光合作用速度。这种方法,因为使用放射性同位素,所以使用上受限制。另外, ^{14}C 法只能测定总光合作用,不能测定呼吸作用,所以具有局限性。另外一种方法是测定一定时间内反应液中无机碳浓度的变化,推算出光合作用速度。反应液中无机碳浓度测定的基本方法是,用 20 % 左右的盐酸将反应液酸化 ($\text{pH} < 5$) 后,将所有形式的无机碳以 CO_2 的形式用氮气 (N_2) 充出,然后利用红外线气体分析法测定释放出的 CO_2 。如果使用总碳仪 (TOC),选用无机碳定量的功能,就可自动地完成反应液中无机碳浓度的测定。

2.3 无 CO_2 缓冲液(反应液)的配制

通常将具有缓冲作用的培养液作为光合作用测定时的反应液。如果测定能在短时间内完成的话,只用缓冲液作为反应液也可以。无 CO_2 (CO_2 -free) 缓冲液在调配各种 CO_2 浓度反应液时是必需的。测定海产藻类时用低浓度的盐酸将海水处理到酸性 ($\text{pH} < 5$),将 HCO_3^- 与 CO_3^{2-} 离子转化为 CO_2 后,再以 N_2 充气将 CO_2 驱出水面。充 N_2 气的时间控制在 10~20 min 就行,水量多时可适当延长。将海水中的 CO_2 除掉之后,边充氮气,边向海水中添加缓冲剂,再以 NaOH 溶液(将过饱和的 NaOH 溶液用带密封盖子的离心管离心,离心后取上清液作为无 CO_2 的 NaOH 溶液)调节 pH。碱性溶液中通常溶解有很多 CO_3^{2-} ,但在过饱和 NaOH 溶液中“ CO_2 ”在离心时沉淀下去。测定淡水藻类可直接用 N_2 向蒸馏水充气,驱逐蒸馏水中少量的“ CO_2 ”,然后如上所述,边充气、搅拌边添加缓冲剂,最后以 NaOH 溶液调节 pH。因为调配好的缓冲液中还会有极少量的 CO_2 溶入,所以最好用吸气器再进行脱气。

光合作用测定时的反应液,通常使用浓度为 25~50 mmol/L 的缓冲液(根据设定 pH 值的不同,选择 MES, HEPES, Bis-Tris-Propane, Tricine, PIPES 等)。这些缓冲液均不被细胞吸收,所以对细胞的生理活性不产生影响。

2.4 试验材料的制备

实验材料是单细胞微藻的情况下,将培养液离心后,藻体成团状,用吸气器将上清液吸去后,在适当的温度(比培养温度低)、弱光下保存。使用时,将藻团放入缓冲液或反应液中让其重新悬浮。保存时间的长短与光合作用活性是有一定关系的,不同的藻类需要个别探讨。以藻团的形态保存小球藻,其光合作用活性可以维持 6 h^[3]。通过离心将微藻制成藻团时,少量的培养液会保留在其中或细胞的表面,培养液中的“CO₂”会影响反应液中的“CO₂”浓度,因此需要将第一次制备的藻团用无 CO₂ 的缓冲液悬浮一次,然后再离心得到藻团。实验时,反应液中悬浮藻类的浓度可以用叶绿素 a 或细胞数量来表示。细胞浓度应该设定为使得光合作用速度最大时的浓度。如果浓度过低,单位时间内溶解氧的浓度变化不够大,则测定上有困难;如果浓度过高,细胞间产生互相遮挡,则光合作用会受光的约束。

多细胞的丝状体或大型藻类的材料制备比较容易。如果光合作用反应槽容积有限,可取藻体的一部分。但是,由于大型藻类的不同部位具有不同的光合作用活性,因此最好使用完整的藻体。特别是,在进行比较性实验或生产力推算的情况下不能忽视这一点。这种场合下,可以采用开放系统的流水测定法^[1],则使大型藻类的完整个体不受反应槽容积的限制。

2.5 细胞内“CO₂”浓度的调零

藻类的细胞液中含有一定量的“CO₂”。为了分析光合作用与 CO₂ 浓度的关系,必须使细胞内的“CO₂”耗竭,否则难以正确判断藻类对 CO₂ 的亲性和性。在无 CO₂ 的缓冲液或具有缓冲作用的培养液中,让藻类进行光合作用,利用其光合固碳的能力使细胞内积累的“CO₂”耗竭。将光合放氧消失时的状态(CO₂ 补偿点)假定为 CO₂ 浓度为零。无 CO₂ 缓冲液的配制不当或藻类材料的清洗不完全,都会使得藻类光合放氧达到零所需的时间拉长。这种情况下,细胞在强光照和低 CO₂ 浓度下容易受损伤,导致光合作用活性降低;同时也会增加细胞对低 CO₂ 浓度的适应性,影响光合作用对 CO₂ 亲和程度的判断。使细胞内“CO₂”耗竭所需的时间一般不能超过 30 min^[3]。如果超过 30 min,应该重新配制无 CO₂ 缓冲液和实验材料。

3 测定条件的确定

除了 CO₂ 以外影响光合作用速度的主要因子有

光照强度、光质、温度、溶解氧浓度及水流等。因此,在测定某种藻类光合作用与 CO₂ 浓度关系之前,首先需要确定光合作用速度饱和时的光照强度,然后在此光照条件下确定其最适温度。在测定过程中,必须保持光照与温度条件的恒定,进行搅拌,在短时间内完成测定。通常测定是在封闭系统中进行的,因此反应容器中的溶解氧浓度随着时间延长而增大。为了获得具有可重复性、可靠的数据,考虑到氧气对光合作用的阻碍作用,需要按时用氮气充气,使得反应液中的溶解氧浓度不超过 30 %。大型藻类的光合作用可以采用开放系统的流水测定法^[1]。用此方法进行光合作用测定时,新鲜的海水不断地流过藻体,不易发生“瓶效应”(封闭系统测定时氧浓度增高、无机碳浓度降低等导致光合作用低下的现象)。

4 光合作用的测定

将细胞悬浮液注入反应容器,使细胞内的“CO₂”耗竭之后,添加 NaHCO₃,在各种“CO₂”浓度下测定藻类的光合作用速度。添加 NaHCO₃ 溶液,反应容器内的水位会有变化,需要调整,保持一定的容量,避免数据处理时因反应液容积的差异造成误差。在记录仪上记录伴随光合作用的溶氧浓度变化,记录纸上显示出直线性变化之后,再重复另一种浓度下的操作。在光合放氧速度相当慢的情况下,提高记录仪的灵敏度,调节记录纸的传送速度,以便能记录下有一定倾斜度的溶氧浓度变化的直线。测定结束时切断光照电源,确认光合放氧停止,也就是说,确认切断光源之前的光合放氧是光合作用的结果。但是,切断光源后短时间内所观察到的 O₂ 浓度的降低(细胞对 O₂ 的吸收),并不能正确地反应暗呼吸作用的速度(切断光源之后短时间内 O₂ 的减少由暗呼吸与光呼吸两种作用导致)。切断光源后,在暗处保持 15 min 左右,溶氧的减少呈直线性后,方能准确地求出暗呼吸作用速度。

光合作用速度,通常表示为单位叶绿素量、单位时间的放氧量($\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{h})$)或单位叶绿素量、单位时间固碳量($\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{h})$);或单位细胞数、单位时间的放氧量($\mu\text{mol}/(\times 10^7 \text{ 个} \cdot \text{h})$)或单位细胞数、单位时间的固碳量($\mu\text{mol}/(\times 10^7 \text{ 个} \cdot \text{h})$);或单位细胞容积(PCV, Packed cell volume)的放氧量($\mu\text{mol}/(\text{ml} \cdot \text{h})$)或单位细胞容积的固碳量($\mu\text{mol}/(\text{ml} \cdot \text{h})$)。大型藻类的光合作用速度,通常表示为单位藻体重量(干重或湿重)、单位时间的放氧量($\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{h})$)或单位藻体重量(干重或湿重)、单位时间固碳量($\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot$

h))。

叶状的藻类(如紫菜、海带等)的光合作用速度也可表示为单位叶面积、单位时间的放氧量($\mu\text{mol}/(\text{dm}^2 \cdot \text{h})$)或单位叶面积、单位时间的固碳量($\mu\text{mol}/(\text{dm}^2 \cdot \text{h})$)。

5 光合作用反应底物浓度的计算

调节“ CO_2 ”浓度需要向无“ CO_2 ”的缓冲液中添加 NaHCO_3 。 HCO_3^- 和 CO_2 的关系如下:



CO_2 与 HCO_3^- 浓度的比例存在下列关系: $\text{pH} = \text{pK}' + \log [(\text{HCO}_3^-)/(\text{CO}_2)]$, 也就是说, 添加 NaHCO_3 之后, 反应液中 HCO_3^- 和 CO_2 的比例依赖于 pH。因此, 在 pH 和温度恒定的情况下, 根据 pK' 常数和添加的 NaHCO_3 浓度可以求出 CO_2 与 HCO_3^- 浓度。譬如, 使用盐度很低的、pH 为 8 的缓冲液作为反应液的情况下, 25 °C 时 $\text{pK}' = 6.365$, 30 °C 时 $\text{pK}' = 6.34$, HCO_3^- 与 CO_2 浓度(表示为 $[\text{CO}_2]$)的计算如下: $8.00 = 6.365 + \log [(\text{HCO}_3^-)/(\text{CO}_2)]$, $[\text{HCO}_3^-] : [\text{CO}_2] = 43.2 : 1$ (30 °C 时是 44.7 : 1)。以上的比例表示添加 NaHCO_3 后部分 HCO_3^- 转化为 CO_2 , 达到平衡浓度时的浓度比值。假设添加的 NaHCO_3 浓度为 2 mmol/L, 则 $[\text{CO}_2]$ 为 $2000(\mu\text{mol/L}) \times 1/(43.2 + 1) = 45.2 \mu\text{mol/L}$ (30 °C 时是 43.8 $\mu\text{mol/L}$); $[\text{HCO}_3^-]$ 浓度为 $2(\text{mmol/L}) \times 43.2/44.2 = 1.955 \text{ mmol/L}$ (30 °C 时是 1.956 mmol/L)。在“ CO_2 ”浓度或 pH 很低的情况下, 通常不能忽视光合作用所消耗 CO_2 的量, 在此基础上再添加 NaHCO_3 , 就需要进行浓度的补正。这种情况下, 累计前一种浓度下光合放氧量, 按光合放氧与 CO_2 固定 $\text{O}_2 : \text{CO}_2$ 为 1 : 1 进行换算, 求出消耗的 CO_2 量, 然后减去此值, 方能得出添加前的实际 CO_2 浓度, 再加上添加 NaHCO_3 导致的 CO_2 量, 才能准确把握每次添加 NaHCO_3 后的 CO_2 浓度。

6 细胞内“ CO_2 ”调零不完全情况下的处理

按以上步骤进行无 CO_2 操作和 CO_2 耗竭处理后, 如果反应器内光合放氧仍长时间不停止的话, 这意味着反应液或细胞内尚没有达到 CO_2 耗竭状态。有些微藻细胞结构容易受伤, 细胞悬浮液调节之前不能进行较强的离心, 因此不能完全除去含有“ CO_2 ”的上清液。细胞内“ CO_2 ”积累量过多, 也会使得 CO_2 枯竭处

理的时间拉长。这类情况下难以得到光合作用对底物 CO_2 的可靠依赖曲线, 因此只有利用下述校正法进行补正, 才能推测出分析光合作用对底物浓度依赖关系所需的参数。第一种补正方法是, 将得到的光合作用-底物浓度曲线沿着横轴 (x 轴的正方向) 平行移动, 使得曲线与 x 轴的交点(负值)与原点重合。第二种方法是, 从各种底物浓度下测定的光合作用速度中减去添加 NaHCO_3 之前的光合作用速度, 重新绘制曲线。这种方法会导致 V_{max} 的变化, 但适宜于推测 $K_m(\text{CO}_2)$ 。第三种方法是, 使用高浓度底物的数据, 将其转化为倒数后绘制成图, 这样就可以避免低底物浓度的情况下实际浓度与理论浓度之间的误差, 利用高浓度反应底物下的光合作用速度推算 K_m 和 V_{max} 。

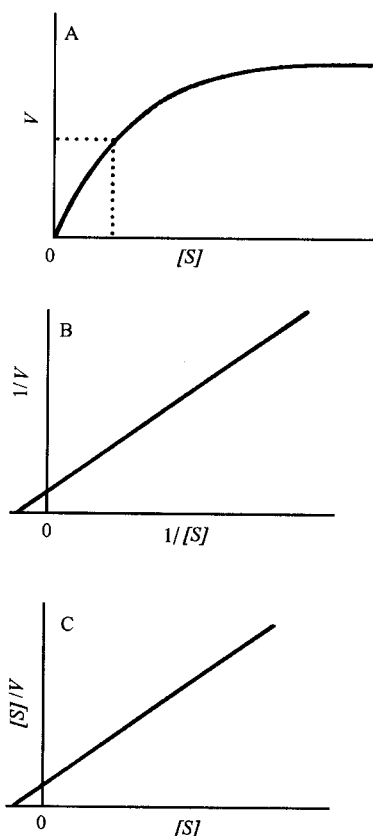


图2 藻类固碳特性解析模式

A. 光合作用-底物浓度 (CO_2 , NaHCO_3 或 HCO_3^-) 依赖曲线; B. 两倒数法; C. $[\text{S}]/v \sim [\text{S}]$ 解析法。[S] 底物浓度; V 光合作用速度。

7 光合作用-底物浓度曲线的解释

将按照以上方法测定的数据绘制成光合作用-底物浓度曲线。底物浓度可以表示为 CO_2 、 HCO_3^- 或 DIC (Dissolved inorganic carbon)。如上所述,解释光合作用与 CO_2 浓度关系的关键值是最大光合作用速度 ($V_{\max}$) 和 $1/2 V_{\max}$ 时的底物浓度 $K_m(\text{CO}_2)$ 。求出 $V_{\max}$ 和 K_m 的方法有几种:(1)从饱和曲线中直接读出(图 2A);(2)两倒数法(图 2B);(3) $[S]/v \sim [S]$ 绘图法(图 2C)。应用酶反应解析方法,图 2B 所示的两倒数绘图线的倾斜度是 $K_m/V_{\max}$, x 轴(底物浓度的倒数)的截距是 $-1/K_m$ 。 y 轴(光合作用的倒数)的截距是 $1/V_{\max}$ 。图 2C 中所示的 $[S]/v \sim [S]$ 直线关系中,倾斜度为 $1/V_{\max}$, 纵轴上的截距为 $K_m/V_{\max}$, 横轴上的截距是 $-K_m$ 。

高浓度 CO_2 (5 %) 充气条件下培养的藻类对 CO_2 的亲合力降低, $V_{\max}$ 增大。这种特性在微藻与海藻中都有报道。在 CO_2 饱和与限制两种条件下评价光合作用特性的重要性是不言而喻的。比较高 CO_2 浓度下培养的细胞(高 CO_2 细胞)与低 CO_2 浓度下培养的细胞(低 CO_2 细胞),可以看出,高 CO_2 细胞的 $V_{\max}$ 比低 CO_2 的高。但是,在与空气达到平衡的溶液中, CO_2 浓度仅仅是 $10 \mu\text{mol}$, 高 CO_2 细胞的光合作用速度还达不到其最大光合作用的一半(譬如,高 CO_2 浓度下培养的小球藻, K_m 是 $20 \sim 25 \mu\text{mol}$); 而低 CO_2 细胞在这种浓度下几乎能达到其最大光合作用速度。

因此,解析光合作用对底物浓度的依赖曲线对理解藻类光合作用特性是很重要的。特别是,从生态学的视点评估某种藻类光合作用特性的情况下,单单凭其高 CO_2 浓度下的光合作用速度并不能把握其光合作用对 CO_2 的依赖特性。

8 结语

CO_2 在水中的不同存在形式决定了藻类光合固碳的复杂性。在实验室微观水平上进行的藻类固碳特性的研究,特别要注意无 CO_2 反应液的配制和细胞内“ CO_2 ”调零的操作,避免人为的实验误差。在此基础上,应用可靠的解析方法对所得数据进行解析,才能正确把握藻类的固碳特性。

参考文献

- 1 高坤山、华文青。海洋科学,1997,6: 33~35
- 2 都筑辦夫、白岩善博。藻类的光合成。见:宫地重远编 现代植物生理学第1卷,光合成。东京:朝仓书店,1992。125~133
- 3 佐藤郎、小林宽等。藻类(sorui)。1997,45:21~28
- 4 白岩善博、广川丰康。クロレラ(クラミドモナス,セネデイスムス)。见:江上信雄(编)实验生物学讲座1,生物材料调制法。东京:丸善,1982。235~349
- 5 Larsson, C. and Axelsson, L. et al. Eur. J. Phycol, 1997, 32: 49~54