

文章编号: 1000-0615(2017)09-1400-07

DOI: 10.11964/jfc.20161110621

萱藻丝状体对无机碳的利用

王吉, 宫相忠*, 高伟, 罗伟, 夏云捷, 张红霞

(中国海洋大学海洋生命学院, 山东青岛 266003)

摘要: 应用pH漂移技术和pH电极法并结合相关抑制剂对萱藻丝状体无机碳的利用进行了研究, 并探索了不同浓度CO₂对萱藻丝状体碳酸酐酶(CA)的影响。结果显示, (1)萱藻丝状体pH补偿点为9.21, CO₂补偿点为0.74 μmol/L。抑制剂乙酰唑胺(AZ, acetazolamide)对萱藻丝状体pH补偿点无显著影响, 作用的前3个小时对无机碳的利用量无抑制作用。抑制剂乙氧苯丙噻唑磺胺(EZ, ethoxzolamide)和钒酸盐(Van)使萱藻丝状体的pH补偿点均下降到8.82, 2种抑制剂作用的前3个小时对无机碳利用量的抑制率分别为55.93%和56.72%。自然条件下萱藻丝状体以游离CO₂和HCO₃⁻作为无机碳源, 且HCO₃⁻的利用依赖于ATP酶和胞内CA。(2)0.35%、0.70%和1.20%的CO₂使萱藻丝状体胞内CA活性分别降低6.29%、17.44%和27.15%, CO₂浓度越高对萱藻丝状体胞内CA活性抑制作用越强。

关键词: 萱藻; 丝状体; 无机碳; pH; CO₂; 碳酸酐酶

中图分类号: S 917.3

文献标志码: A

萱藻(*Scytosiphon lomentaria*)隶属于褐藻门(Phaeophyta), 是一种泛温带性大型海藻, 在全球海域范围分布广泛, 在中国主要分布于辽东半岛至广东海陵岛之间海域^[1-2]。萱藻氨基酸含量高(11.30%)且组成均衡, 二十碳五烯酸(EPA)含量高达10.99%, 味道鲜美, 深受东亚国家沿海居民喜爱, 被视为海藻珍品^[3]。萱藻同时还具有很高的医药保健价值。陈瑜等^[4]报道了富含多酚的萱藻提取物具有良好的抗过敏效果; Kuda等^[5]报道了萱藻的抗氧化性; Demirel等^[6]也发现萱藻的二氯甲烷提取物有较强的抗氧化活性; 牛荣丽等^[7]认为萱藻对A-549和HL-60肿瘤细胞的抑制率均大于80%; 徐年军等^[8]报道了萱藻对人口腔上皮鳞癌KB细胞和HT29肿瘤细胞具有强的选择活性; 刘志峰等^[9]报道了萱藻多糖抗凝血活性。因此, 萱藻具有极高的开发潜力, 实现大规模人工养殖将会带来巨大的经济效益。研究萱藻生活史是实现人工养殖的重要前提, 目前关于萱藻生活史的研究报道中, 邢永泽等^[1]认为萱藻生

活史为异形世代交替, 包括大型的叶状配子体世代和微小的孢子体世代, 孢子体世代有垫状体、类垫状体和丝状体3种形式。萱藻丝状体是产生单室孢子囊释放游孢子的主要形式, 游孢子进一步发育为萱藻叶状体, 目前萱藻丝状体的扩增主要是利用三角瓶和光生物反应器进行通气培养, 扩增效率还不能达到萱藻大规模人工养殖的需求, 导致这种结果的其中一个原因是培养过程中, 海水中的萱藻丝状体可利用的无机碳耗尽, 而空气中CO₂含量较低又难溶于水。尽管天然海水中含有大量的无机碳, 其中HCO₃⁻占99%, 浓度约2.2 mmol/L, 但CO₂所占比例不足1%, 仅为1 μmol/L, 其余以CO₃²⁻、H₂CO₃形式存在^[10-11], 但是海藻对无机碳的利用能力和形式存在显著差异, 所以要实现光生物反应器高密度扩增萱藻丝状体, 必须解决无机碳对萱藻丝状体光合作用的限制问题。藻类对无机碳的利用主要分为直接利用游离CO₂、碳酸酐酶(CA)催化间接利用HCO₃⁻和直接吸收利用HCO₃⁻

收稿日期: 2016-11-30 修回日期: 2017-03-05

资助项目: 山东省重点研发计划(2016GSF115042); 国家“八六三”高新技术研究发展计划(2012AA10A413)

通信作者: 宫相忠, E-mail: gxzhw@163.com

3种方式^[12],而且不同海藻在利用HCO₃⁻、CO₂的能力方面存在差异,甚至同一种海藻生活史的不同阶段对无机碳利用也存在差异。岳国峰等^[13-14]报道了海带雌配子体只能利用CO₂,不能利用HCO₃⁻,而海带幼孢子体主要是通过胞外CA将HCO₃⁻水解成CO₂再利用。邹定辉等^[15]发现坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)叶状体是通过胞外CA催化间接利用HCO₃⁻作为光合碳源;而骆其君等^[16]认为坛紫菜丝状体无机碳利用以HCO₃⁻的主动运输为主。目前尚未有关于萱藻丝状体无机碳的利用能力和形式的报道,本团队对萱藻丝状体无机碳的利用进行了相关研究,并探讨了通入不同浓度CO₂对萱藻丝状体CA活性的影响,旨在阐明萱藻丝状体对无机碳的利用能力和形式以及相关酶的活性,为萱藻丝状体高效扩增时外源无机碳的添加提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

实验所用萱藻丝状体由本实验室种质库提供,首先将萱藻丝状体进行扩增培养,获得一定数量的萱藻丝状体,实验前使用打碎机将藻团打碎,使丝状体平均长度为200~300 μm,通过76 μm纱绢回收,并用灭菌海水多次冲洗,培养液为F₁,按1:1000添加,培养条件:温度21℃,光周期L:D=14:10,光照强度(82.0±3.0) μmol/(m²·s)^[2, 17]。

1.2 萱藻丝状体pH补偿点及无机碳浓度的测定^[14]

利用pH漂移技术测定pH补偿点,称取处于快速生长期、细胞以长圆形为主、细胞颜色较淡、具有假根结构的丝状体3.0 g,灭菌海水混合均匀后置于1 L锥形瓶中,橡胶塞密封,磁力搅拌器搅拌,持续光照,其他培养条件同“实验材料”。设置3个平行样,每小时取1次样,利用pH计快速准确测定pH。按Parsons等^[18]的方法测定碱度,并计算碳酸碱度(Calk),按Stumm等^[19]的方法计算无机碳浓度:

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

$$\alpha_1 = 1 / (1 + [\text{H}^+] / K_1 + K_2 / [\text{H}^+])$$

$$\alpha_2 = 1 / (1 + [\text{H}^+] / K_1 K_2 + [\text{H}^+] / K)$$

$$\alpha_0 = 1 / (1 + K_1 / [\text{H}^+] + K_1 K_2 / [\text{H}^+]^2)$$

$$[\text{CO}_2] = [\text{DIC}] \cdot \alpha_0,$$

DIC表示总溶解无机碳。

K₁、K₂分别为H₂CO₃的一级、二级解离常数,按Goyet等^[20]给出的公式计算:

$$pK_1 = 812.27 / \text{Tabs} + 3.356 - 0.0017 \times S \times \ln(\text{Tabs}) + 0.000091 \times S^2$$

$$pK_2 = 1450.87 / \text{Tabs} + 4.604 - 0.00385 \times S \times \ln(\text{Tabs}) + 0.000182 \times S^2$$

Tab_s为绝对温度,S表示盐度,α₀、α₁、α₂分别表示CO₂、HCO₃⁻、CO₃²⁻的存在比例系数。

1.3 不同抑制剂对萱藻丝状体pH补偿点的影响及对无机碳利用量抑制作用的测定

称取1.50 g萱藻丝状体,接种到装有灭菌海水的500 mL锥形瓶中,分别加入乙酰唑胺(AZ)、乙氧苯丙噻唑磺胺(EZ)、钒酸盐(Van)使最终浓度分别为100、100和500 μmol/L,橡胶塞密封、磁力搅拌器搅拌,每个实验设置3个平行,持续光照,每小时测定1次pH,其他培养条件同“实验材料”。

分别称取1.50 g萱藻丝状体接种到盛有500 mL灭菌海水的锥形瓶中,调节至相同初始pH,其他培养方法同“实验材料”,空白对照组不添加任何抑制剂。测定前3 h的pH变化,并计算无机碳利用量以及抑制剂对无机碳利用量的抑制率^[10]。

抑制率(%) =

$$\frac{\text{对照组DIC的利用量} - \text{抑制剂DIC的利用量}}{\text{对照组DIC的利用量}} \times 100$$

1.4 CA活性测定及不同CO₂浓度对CA活性的影响

按照以往学者的方法,用pH电极法测定碳酸酐酶活性^[21-22]。胞外CA活性的测定使用完整萱藻丝状体细胞;胞内CA活性测定时将萱藻丝状体细胞破碎。称取1.00 g新鲜萱藻丝状体,用4℃预冷的20 mmol/L巴比妥缓冲液(pH=8.2)冲洗1次后重新收集萱藻丝状体,将冲洗过的萱藻丝状体置于15 mL 4℃预冷的巴比妥缓冲液中混合均匀,再加入5 mL 4℃预冷的CO₂饱和蒸馏水(向冰水中充60 min的纯CO₂气体获得)后,记录pH值从8.2下降至7.2所需的时间。整个反应过程的温度控制在4℃左右。酶的活性单位用EU=10×(T₀/T-1)表示,T₀表示饱和CO₂蒸馏水中未加入萱藻丝状体细胞(空白对照组)反应所需时间(s),T代表加入萱藻丝状体或细胞破碎液时反应所需时间(s)。

将1.00 g经预处理萱藻丝状体接种到500 mL锥形瓶中，分别通入空气、0.35%、0.70%和1.20% CO₂，其他培养条件同“实验材料”，培养1周后按上述方法测定CA活性变化。

1.5 数据分析

用SPSS 19.0和Sigmaplot 10.0软件进行单因素方差分析和制图。

2 结果

2.1 在密闭条件下萱藻丝状体培养体系pH及CO₂含量的变化

在密闭条件下，随着培养时间的延长，萱藻丝状体培养体系pH在前10 h快速升高，之后缓慢升高，最终稳定在9.21(图1)。可以得出萱藻丝状体pH补偿点为9.21，根据公式计算得出CO₂补偿点为0.74 μmol/L(图2)。

2.2 不同抑制剂作用下萱藻丝状体pH补偿点和无机碳利用量抑制率比较

抑制剂AZ作用下萱藻丝状体培养体系终点

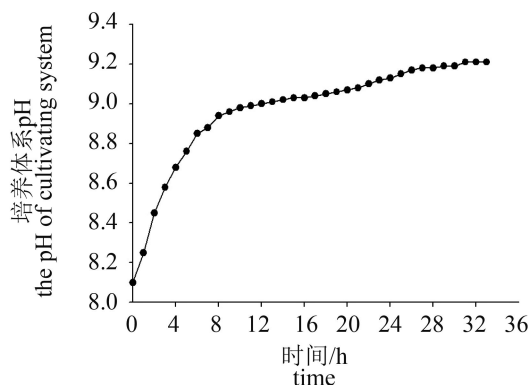


图1 密闭条件下萱藻丝状体培养体系pH变化

Fig. 1 The change of pH of cultivating system under the condition of airtight

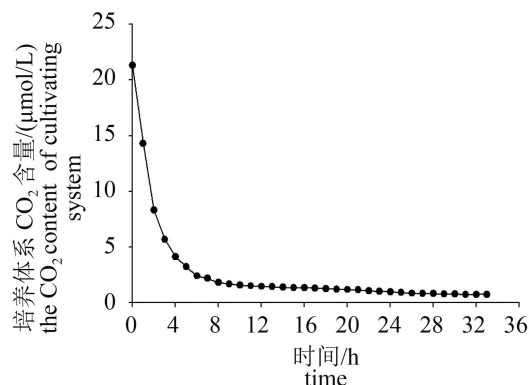


图2 密闭条件下萱藻丝状体培养体系中CO₂含量变化

Fig. 2 The change of CO₂ content of cultivating system under the condition of airtight

pH为9.21，与空白对照组差异不显著($P>0.05$)，AZ作用的前3个小时，萱藻丝状体无机碳利用量与空白对照组差异不显著($P>0.05$)。添加抑制剂EZ和Van后萱藻丝状体培养体系pH均稳定在8.82，抑制剂EZ、Van对萱藻丝状体无机碳利用量与空白对照组差异显著($P<0.05$)，无机碳利用抑制率分别为55.93%和56.72%(表1)。

2.3 CA活性及在不同浓度CO₂作用下的活性变化

未添加萱藻丝状体的空白对照组反应体系pH从8.2降至7.2用时37 min 30 s，充空气实验组反应体系pH从8.2降至7.2用时与空白对照组差异不显著($P>0.05$)。充空气培养的萱藻丝状体细胞经破碎处理后检测到胞内CA活性，反应体系pH从8.2降至7.2用时27 min 35 s，计算得胞内CA活性为3.60 EU/g鲜重。充入0.35%、0.70%和1.20% CO₂培养的萱藻丝状体胞内CA活性分别为3.37、2.97和2.62 EU/g鲜重，相比充空气组活性分别降

表1 不同抑制剂作用下萱藻丝状体pH补偿点和无机碳利用抑制率比较

Tab. 1 The comparison of pH compensation points of filaments of *S. lomentaria* and inhibition ratios of inorganic carbon uptake under the action of different inhibitors

抑制剂 inhibitors	初始pH initial pH	第3小时pH pH at the third hour	前3 h无机碳利用量/(μmol/L) the inorganic carbon uptake amount in the first three hours	抑制率/% inhibition ratio	终点pH final pH
空白对照 control	8.09	8.60±0.01	270.55±5.22		9.21±0.01
乙酰唑胺 AZ	8.09	8.60±0.02	270.64±7.83	0	9.21±0.02
乙氧苯丙噻唑磺胺 EZ	8.09	8.30±0.01	119.22±1.02	55.93	8.82±0.01
钒酸盐 Van	8.10	8.30±0.01	119.52±2.75	56.72	8.82±0.01

低6.29%、17.44%和27.15%，且1.20%CO₂培养的萱藻丝状体胞内CA活性与空气组CA活性差异显著($P<0.05$)(图3)。

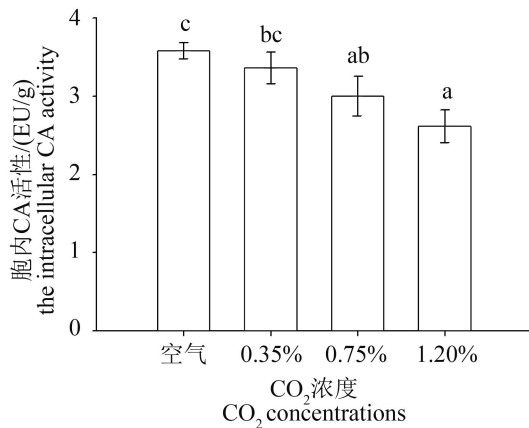


图3 胞内CA活性在不同浓度CO₂作用下的变化

上标字母不相同的表示各组之间的差异显著($P<0.05$)

Fig. 3 The change of the intracellular CA activity at different CO₂ concentrations

Different letters in the same day indicate significant difference ($P<0.05$)

3 讨论

pH漂移技术是现在广泛使用的研究无机碳利用能力和机制的方法，其原理是将海藻置于密闭培养环境中，在一定碱度海水、适宜光照强度和温度等条件下，对海藻进行持续光照，由于藻类进行光合作用利用无机碳，海水中无机碳含量不断下降，致使pH持续上升，当海水中无机碳含量减少到一定水平，pH将稳定在一个最大值，这个值就是检测的pH补偿点和无机碳的补偿点^[20-21]。在pH等于9时，海水中游离CO₂浓度非常低，接近于零，只利用游离CO₂的海藻无法对无机碳(主要为HCO₃⁻)进一步利用来使pH继续升高，所以只利用游离CO₂的水生植物pH补偿点在9左右。Maberly^[23]利用pH漂移技术研究了35种大型海藻对无机碳的利用能力，结果显示可以将HCO₃⁻作为碳源的29种海藻pH补偿点均高于9.2，只利用游离CO₂的6种红藻的pH补偿点均在9.0以下。本研究利用pH漂移技术测定萱藻丝状体pH补偿点的实验中前10 h pH快速上升，这是由于CO₂可以自由穿过细胞膜，快速供给光合作用所需无机碳，实验11 h之后CO₂含量接近零，在此阶段HCO₃⁻作为无机碳源，pH继续升高，直到达到pH补偿点9.21。由此认为萱藻丝状

体对CO₂有较高的亲和力，HCO₃⁻同样可以作为无机碳源被利用，测定的pH补偿点与Axelsson等^[24]报道的褐藻由于无机碳的利用所导致的pH上升范围相一致，他认为海黍子(*Thallus sargassi*) pH补偿点为9.10，不仅对海水中的CO₂具有较高的亲和力，而且还可以利用海水中的HCO₃⁻作为光合作用的无机碳源，且对HCO₃⁻的吸收具备2条途径：既可以通过胞外CA催化转化为CO₂后进入细胞，也可通过阴离子交换蛋白直接吸收海水中的HCO₃⁻。

AZ被认为是一种不能透过细胞膜的CA抑制剂，只能对胞外CA起到抑制作用。本实验中AZ对萱藻丝状体pH补偿点和无机碳利用均无显著影响。EZ是一种能够穿过细胞膜的CA抑制剂，可以同时抑制胞外和胞内CA，实验中EZ使萱藻丝状体pH补偿点由9.21降至8.82，主要原因是胞内EZ催化HCO₃⁻向CO₂转化的过程受阻，光合作用无法获得足够的CO₂而不能继续进行，封闭条件下海藻培养体系pH也就无法继续上升，因此可以确定萱藻丝状体能通过胞内CA直接利用HCO₃⁻。同时结合采用pH电极法未检测到萱藻丝状体胞外CA活性，只检测到胞内CA活性，排除萱藻丝状体通过胞外CA间接利用HCO₃⁻方式。Van可以抑制膜ATP酶的活性，所以也是细胞膜对CO₂主动运输的抑制剂^[24]，实验中Van使萱藻丝状体pH补偿点下降至8.82。EZ和Van对萱藻丝状体无机碳利用抑制率分别为55.93%和56.72%，二者差异性不显著($P>0.05$)，由此认为萱藻丝状体对HCO₃⁻的利用是通过胞内CA的直接利用途径，并且此过程依赖膜ATP酶。HCO₃⁻的直接吸收利用约占总吸收无机碳的56.29%，游离CO₂占总吸收无机碳的43.71%。萱藻丝状体依赖ATP酶主动转运HCO₃⁻的具体机制还有待进一步研究。

在不同CO₂浓度对CA活性影响的实验中，0.35%、0.70%和1.20%的CO₂使萱藻丝状体胞内CA活性分别降低了6.29%、17.44%和27.15%，CO₂浓度越高对胞内CA活性抑制作用越强。孙颖颖^[25]认为3%和5%的CO₂作用球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)时，胞外CA活性随CO₂浓度增加而降低。夏建荣等^[26]报道了5% CO₂在短时间内(12 h)即可导致小新月菱形藻(*Nitzschia closterium* var. *minutissima*)的胞外CA活性下降75.4%。出现这种结果的主要原因为CA是一种诱导酶，当通入高浓度CO₂时，溶液pH降低呈酸性，溶液中游离CO₂大量增加，CO₂直接穿过质膜供给光合作

用,培养液中游离CO₂能够满足萱藻丝状体细胞生长和光合作用的需求,所以CA的活性受到抑制^[25, 27]。由此可以推测萱藻丝状体在CO₂充足时,光合作用主要利用海水中游离的CO₂,而依赖ATP酶主动转运的HCO₃⁻直接利用将会减少。

因此,在利用光生物反应器培养萱藻丝状体时通入适量的CO₂或者添加适量的碳酸氢盐,将有助于降低光生物反应器高密度扩增培养萱藻丝状体时无机碳的限制,促进萱藻丝状体持续快速生长,萱藻丝状体生物量与无机碳添加量之间的关系有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 邢永泽, 宫相忠, 高伟, 等. 生态因子对萱藻(*Scytosiphon lomentaria*)孢子体生长发育的影响[J]. 海洋与湖沼, 2011, 42(1): 101-106.
- Xing Y Z, Gong X Z, Gao W, *et al.* Effect of ecological factors on growth and development of sporophytes of *Scytosiphon lomentaria*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2011, 42(1): 101-106(in Chinese).
- [2] 高伟, 宫相忠, 张必达. 环境因子对萱藻(*Scytosiphon lomentaria*)丝状体孢子放散的影响[J]. 海洋与湖沼, 2012, 43(2): 244-248.
- Gao W, Gong X Z, Zhang B D. Effect of environmental factors on spore releasing of filaments of *Scytosiphon lomentaria*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012, 43(2): 244-248(in Chinese).
- [3] 张宇, 付晓婷, 林洪, 等. 萱藻营养品质的分析和评价[J]. 营养学报, 2011, 33(6): 619-620, 623.
- Zhang Y, Fu X T, Lin H, *et al.* Analysis and evaluation of nutritional quality of *Scytosiphon lomentaria*[J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2011, 33(6): 619-620, 623(in Chinese).
- [4] 陈瑜, 李振兴, 朱珍, 等. 萱藻中多酚类抗过敏活性成分纯化方法的研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(4): 1061-1066.
- Chen Y, Li Z X, Zhu Z, *et al.* Purification of polyphenols with anti-allergic activity from *Scytosiphon lomentaria*[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2014, 5(4): 1061-1066(in Chinese).
- [5] Kuda T, Tsunekawa M, Goto H, *et al.* Antioxidant properties of four edible algae harvested in the Noto Peninsula, Japan[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2005, 18(7): 625-633.
- [6] Demirel Z, Yilmaz-Koz F F, Karabay-Yavasoglu U N, *et al.* Antimicrobial and antioxidant activity of brown algae from the Aegean Sea[J]. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 2009, 74(6): 619-628.
- [7] 牛荣丽, 范晓, 韩丽君, 等. 海藻抗A-549和HL-60肿瘤细胞及抗菌活性研究[J]. 中国海洋药物, 2003, 22(4): 1-4.
- Niu R L, Fan X, Han L J, *et al.* Anticancer and antibacterial activity of the methanol extracts from Chinese algae[J]. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2003, 22(4): 1-4(in Chinese).
- [8] 徐年军, 范晓, 韩丽君, 等. 山东沿海海藻抗肿瘤活性的筛选[J]. 海洋与湖沼, 2001, 32(4): 408-413.
- Xu N J, Fan X, Han L J, *et al.* Screening marine algae from Shandong coast for antitumor activity[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2001, 32(4): 408-413(in Chinese).
- [9] 刘志峰, 宫晓黎, 魏淑贞, 等. 五种海藻多糖体外抗血小板聚集作用的观察[J]. 中国海洋药物, 2001, 20(2): 36-38.
- Liu Z F, Gong X L, Wei S Z, *et al.* Observation the effects of five kinds algal polysaccharides on platelets aggregation[J]. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2001, 20(2): 36-38(in Chinese).
- [10] 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(3): 246-251.
- Yue G F, Zhou B C. Inorganic carbon utilization by *Porphyra yezoensis* Ueda[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2000, 31(3): 246-251(in Chinese).
- [11] Raven J A, Falkowski P G. Oceanic sinks for atmospheric CO₂[J]. *Plant, Cell & Environment*, 1999, 22(6): 741-755.
- [12] 邹定辉, 高坤山. 大型海藻类光合无机碳利用研究进展[J]. 海洋通报, 2001, 20(5): 83-90.
- Zou D H, Gao K S. Progress in studies on photosynthetic inorganic carbon utilization in marine macroalgae[J]. *Marine Science Bulletin*, 2001, 20(5): 83-90(in Chinese).
- [13] 岳国峰, 戢勇骋, 王建飞, 等. 海带雌配子体对无机碳的利用[J]. 海洋科学, 2000, 24(6): 33-35.
- Yue G F, Ji Y C, Wang J F, *et al.* Inorganic carbon acquisition by the female gametophytes of *Laminaria japonica*[J]. *Marine Sciences*, 2000, 24(6): 33-35(in Chinese).
- [14] 岳国峰, 王金霞, 王建飞, 等. 海带幼孢子体的光合碳

- 利用[J]. 海洋与湖沼, 2001, 32(6): 647-652.
- Yue G F, Wang J X, Wang J F, *et al.* Inorganic carbon acquisition by juvenile sporophyte of Laminarials (*L. Japonica*×*L. Longissima*)[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2001, 32(6): 647-652(in Chinese).
- [15] 邹定辉, 高坤山. 坛紫菜光合作用对重碳酸盐的利用[J]. 科学通报, 2002, 47(19): 1629-1633.
- Zou D H, Gao K S. Photosynthetic bicarbonate utilization in *Porphyra haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta)[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2002, 47(19): 1629-1633(in Chinese).
- [16] 骆其君, 裴鲁青, 潘双叶, 等. 坛紫菜自由丝状体对无机碳的利用[J]. 水产学报, 2002, 26(5): 477-480.
- Luo Q J, Pei L Q, Pan S Y, *et al.* Utilization of inorganic carbon in free-living conchocelis of *Porphyra haitanensis*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2002, 26(5): 477-480(in Chinese).
- [17] 张文健, 宫相忠, 高伟. 环境因子对萱藻(*Scytosiphon lomentaria*)孢子附着的影响[J]. 海洋与湖沼, 2013, 44(6): 1661-1666.
- Zhang W J, Gong X Z, Gao W. Effect of environmental factors on spore attachment of *Scytosiphon lomentaria*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2013, 44(6): 1661-1666(in Chinese).
- [18] Parsons T R, Maita Y R, Lalli C M. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis[M]. London: Pergamon Press, 1984: 142-148.
- [19] Stumm W, Morgan J J. Aquatic chemistry: an introduction emphasizing chemical equilibria in natural water[M]. New York: Wiley-Interscience, 1970: 118-160.
- [20] Goyet C, Poisson A. New determination of carbonic acid dissociation constants in seawater as a function of temperature and salinity[J]. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*, 1989, 36(11): 1635-1654.
- [21] Wilbur K M, Anderson N G. Electrometric and colorimetric determination of carbonic Anhydrase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1948, 176(1): 147-154.
- [22] 孙新健, 罗生军, 范晓蕾, 等. 产油藻株 *Scenedesmus* sp 胞外碳酸酐酶活性及光合作用活性的研究[J]. 可再生能源, 2012, 30(11): 99-103.
- Sun X J, Luo S J, Fan X L, *et al.* The study on extracellular carbonic anhydrase activity and photosynthesis activity of oil-producing alga *Scenedesmus* sp[J]. *Renewable Energy Resources*, 2012, 30(11): 99-103(in Chinese).
- [23] Maberly S C. Exogenous sources of inorganic carbon for photosynthesis by marine macroalgae[J]. *Journal of Phycology*, 1990, 26(3): 439-449.
- [24] Axelsson L, Uusitalo J. Carbon acquisition strategies for marine macroalgae[J]. *Marine Biology*, 1988, 97(2): 295-300.
- [25] 孙颖颖. 环境因子对球等鞭金藻生长的影响[D]. 大连: 大连理工大学, 2007: 108-109.
- Sun Y Y. Effect of environmental factors on growth of *Isochrysis galbana*[D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2007: 108-109 (in Chinese).
- [26] 夏建荣, 余锦兰. 高浓度CO₂对小新月菱形藻胞外碳酸酐酶活性和光合作用的影响[J]. 广州大学学报(自然科学版), 2009, 8(3): 49-53.
- Xia J R, Yu J L. Effects of high CO₂ concentration on extracellular carbonic anhydrase activity and photosynthesis in *Nitzschia closterium* var. *minutissima*[J]. *Journal of Guangzhou University (Natural Science Edition)*, 2009, 8(3): 49-53(in Chinese).
- [27] 程苗, 吴海一, 詹冬梅, 等. 海黍子对外源无机碳利用机制的初步研究[J]. 植物生理学报, 2015, 51(5): 679-685.
- Cheng M, Wu H Y, Zhan D M, *et al.* Preliminary study on exogenous Inorganic carbon utilization in *Sargassum muticum*[J]. *Plant Physiology Communications*, 2015, 51(5): 679-685(in Chinese).

Utilization of inorganic carbon in filaments of *Scytosiphon lomentaria*

WANG Ji, GONG Xiangzhong*, GAO Wei, LUO Wei, XIA Yunjie, ZHANG Hongxia

(College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: The utilization of inorganic carbon in filaments of *Scytosiphon lomentaria* was investigated by pH-drift technique and pH electrode method combined with related inhibitors. The influence of different concentrations of carbon dioxide on the activity of intracellular carbonic anhydrase (CA) was also explored at the same time. The results showed that (1) the pH compensation point of filaments of *S. lomentaria* was 9.21 and the CO₂ compensation point was 0.74 μmol/L. Acetazolamide (AZ) has no significant influence on the pH compensation and the inorganic carbon uptake amount in the first three hours of the inhibitor experiment. Ethoxzolamide (EZ) and vanadate (Van) decreased the pH compensation point to the same value 8.82 and the inorganic carbon uptake amount inhibition rates were 55.93% and 56.72%, respectively, in the first three hours of the inhibitor experiment. Under natural conditions, filaments of *S. lomentaria* use free CO₂ and HCO₃⁻ as inorganic carbon source, and the utilization of HCO₃⁻ depends on ATPase and intracellular CA. (2) 0.35%, 0.70% and 1.20% CO₂ can inhibit the activity of intracellular CA of filaments of *S. lomentaria* and the inhibition rates were 6.29%, 17.44% and 27.15%, respectively. The higher CO₂ concentration, the stronger inhibition effect of the activity of intracellular carbonic anhydrase.

Key words: *Scytosiphon lomentaria*; filaments; inorganic carbon; pH; CO₂; carbonic anhydrase

Corresponding author: GONG Xiangzhong. E-mail: gxzhw@163.com

Funding projects: the Key Research and Development Program of Shandong Province (2016GSF115042); The National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (2012AA10A413)