

介质 pH 缓冲系统选择及其对龙须菜生长的影响

徐永健 韦 玮

(宁波大学生命科学与生物工程学院 浙江宁波 315211)

摘 要 该文选择红藻门大型植物龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)作为研究对象,通过黑白瓶法筛选出有机试剂 POPSO(呱嗪-N,N-双(2-羟基乙烷磺酸)),能较好地缓冲室内龙须菜培养中介质 pH 的波动。在此基础上,探讨了 POPSO 对龙须菜生长的影响,结果表明:15 mmol·L⁻¹及以上浓度的 POPSO 能较好地稳定介质 pH 值,减少系统中 DIC 浓度的急剧变化,但 POPSO 对 CO₂ 浓度波动不起作用,试验结果还表明,介质中的 CO₂ 浓度与龙须菜的生长速率间存在着类似酶动力学方程的关系,当介质中的 CO₂ 浓度下降到 5.25 μmol·L⁻¹以下时,龙须菜生长出现抑制现象。相对稳定 pH 的培养环境,更有利于介质 DIC 中的 HCO₃⁻、CO₃²⁻ 向 CO₂ 的转换,缓解龙须菜生长的 C 抑制。

关键词 龙须菜 pH 缓冲系统 POPSO 生长速率 无机碳

pH BUFFER SELECTION AND ITS EFFECT ON GROWTH OF *GRACILARIA LEMANEIFORMIS*

XU Yong-Jian and WEI Wei

(Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo, Zhejiang 315211, China)

Abstract Background and Aims We examined the effect of acid-alkaline concentrations in media on growth rate and nutrient uptake of a red macroalga, *Gracilaria lemaneiformis*, which has a rapid growth rate, rapid nutrient uptake rate, and high agar content. We address the following questions: 1) can the culture media be kept relatively stabilized, 2) what organic compound best buffers pH, and 3) how does the compound buffer the media and affect growth of the alga?

Methods Utilizing the dark-light bottles method, we selected a suitable zwitterionic organic compound from seven reagents (barbitone, borate, HEPES, TRIS, MOPS, TAPS, POPSO) that did not inhibit photosynthetic production of dissolved oxygen (DO), did not increase depletion of DO in respiration, and adjusted acid-alkaline balance in the culture media. We examined the effects of each buffer on growth rate (SGR) of *G. lemaneiformis*, measured diurnal and weekly variations of pH and dissolved inorganic carbon (DIC), and determined CO₂ concentrations according to pH and DIC. We integrated these with the growth rate of *G. lemaneiformis*, to investigate the mechanisms of growth and carbon uptake.

Key Results POPSO was the zwitterionic organic compound that best met our objectives. During the diurnal experiment of POPSO's effect on algal growth, pH rose continuously during the light cycle, contrary to DIC; however, high concentration of POPSO can buffer this fluctuation. During the one-week experiment, according to results of the diurnal experiment, pH values and DIC at the beginning and end of the light cycle indicated that lower concentrations of POPSO (0 and 5 mmol·L⁻¹) did not buffer pH fluctuations, but higher concentrations (> 15 mmol·L⁻¹) suitably stabilized pH values and leveled off DIC content in the media. Ambient CO₂ concentration determined algal growth rates, with the relationship between SGR of *G. lemaneiformis* and ambient CO₂ concentration similar to a Michaelis-Menton kinetics equation. The saturated concentration of CO₂ was 5.25 μmol·L⁻¹, and the maximum growth rate of the alga was 10.11%·d⁻¹.

Conclusions This study determined that POPSO is a suitable organic compound to buffer *G. lemaneiformis* culture media. A possible mechanism is that, under relative stabilization of acid-alkaline media, HCO₃⁻ and CO₃²⁻ (components of DIC), transformed into CO₂ and accelerated growth rate of the alga.

Key words *Gracilaria lemaneiformis*, pH buffer, POPSO, SGR, DIC

龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)是红藻门江蓠属的大型海藻,为重要的琼胶原料藻和优良的养殖品种,具有较高的经济价值,龙须菜的大规模栽培还能降低海水营养水平,净化近海环境,有着良好的生态效益。除了作养殖生产和污染水体修复植物外,龙须菜还广泛应用于植物生理、生化和遗传学方面的研究(Zhang & van der Meer, 1988; 李幼芷, 1999; 李向峰等, 2000)。

藻类生理生化研究都要进行室内的适应性培养,培养介质的稳定状况就会影响到实验结果的可靠性。其中,环境 pH 因子的影响愈来愈受到关注, pH 变化会对细胞产生不利影响,尤其对植物的光合反应系统(Demmig-Adams & Adams, 1991)。为稳定培养系统的 pH 值,酸碱两性物质常被用来增强介质的 pH 缓冲能力。尽管也有些尝试采用其它一些措施,如定时加酸或碱调节 pH、添加硼酸-硼砂等,但这些方法都存在有不同程度的缺陷,如缓冲容量小、盐度变化大等。采用有机两性物质作酸碱缓冲剂是发展趋势,但要求所添加的这些物质不为藻类细胞吸收,不对细胞的生理活性产生影响等。目前根据研究所需 pH 值的不同,已有 MES、HEPES、TRIS、PIPES 等的不同选择手段,通常的使用浓度为 25~50 mmol·L⁻¹不等(高坤山, 1999)。本文在对龙须菜培养用酸碱缓冲剂筛选的基础上,探讨了筛选所得的缓冲剂对龙须菜生长的影响及其机理所在。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验用龙须菜来自象山港(浙江宁波)筏式养殖海区。带回实验室后,除去杂藻,用过滤海水冲洗干净后,移植到光照培养箱(光周期 12L:12D,光强 120 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,温度 20±0.5 °C),加富海水中暂养(N:100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, P:8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),期间每隔 2 d 添加 N 和 P 1 次,每天不定时搅水 4~6 次;在实验开始前 1 星期,去除藻体主茎,把藻体分成 0.1~0.5 g 大小备用。

筛选试验共选用 7 种缓冲试剂:巴比妥钠盐(Barbitone)、硼酸-硼砂(Borate)(上海产)、HEPES、TRIS、MOPS、TAPS、POPSO(AMRESCO, USA)。预先将各试剂配制成 pH 值为 8.1 的母液,然后与等 pH 值的培养用海水混合,各缓冲剂的终浓度为 25 mmol·L⁻¹。

1.2 实验方法

1.2.1 缓冲剂的筛选试验

采用黑白瓶试验法,在 250 ml 三角烧瓶中分别加入 0.5 g (0.5018±0.0076 g)鲜重龙须菜,分别加入上述配制好的带有各缓冲剂的培养介质 200 ml,白瓶放到有光的光照培养箱中(条件同 1.1 暂养),黑瓶放到黑暗的培养箱中,每个处理设 3 个重复。经过 4 h 培养后,分别测定黑瓶和白瓶中的溶解氧(DO)浓度,与对照组经单因子方差分析(ANOVA)比较,找出龙须菜培养的适合缓冲剂。

1.2.2 缓冲剂对龙须菜生长的影响试验

用所筛选出的酸碱缓冲剂添加到龙须菜培养介质中,考察缓冲剂使用的适合浓度以及缓冲剂对培养系统中 CO₂ 及无机碳(DIC)浓度的影响。试验采用 500 ml 的三角烧瓶,加入 400 ml 培养介质,添加约 0.5 g (0.5035±0.0072 g)龙须菜,共设 5 个处理(各处理的缓冲剂终浓度分别为 0、5、10、15、20 mmol·L⁻¹),每个处理设 3 个重复。周日变化试验:先让龙须菜在各介质中适应 2 h,然后更换培养基再开始试验,每 2 h 测定 pH 值一次,每 4 h 取 DIC 样品一次,7 d 生长试验:根据周日试验确定的一天内极高 pH 值和极低 pH 值时刻进行 pH 测定和 DIC 取样,同时,每 2~3 d 测定龙须菜的增重量,用公式 $SGR = [(W_t/W_0)^{1/t} - 1] \times 100\%$ 计算龙须菜的日平均增长率(SGR, %·d⁻¹)。式中:W₀ 为初始时刻龙须菜鲜重(g),W_t 为 t 时刻龙须菜鲜重(g),t 为两次测定的时间间隔(d)。

1.2.3 DO 和 pH 的测定

黑白瓶试验中的 DO 测定参照 Winkler 法,为了绝对酸化介质,对该方法作了一点调整,加入过量 H₂SO₄ 打破缓冲系统。1.2.2 部分试验中的介质 pH 值用 Orion pH 计在现场试验瓶中直接测定。

1.2.4 DIC 的取样和测定

每次 DIC 样品取样都在测定 pH 值之前,每个样品取 5 ml,装满玻璃管,管内无气泡,加入少许 HgCl₂,密封保藏于 4 °C 冰箱中待测。周日试验 DIC 样品待全部采齐后即刻上机测量,根据温度、介质 pH 值和 DIC 浓度等参数计算介质中 CO₂ 浓度;后续样品(只采集根据周日试验得出的每日极高和极低值样品)集中在试验结束后测量,DIC 测定用 Apollo SCITech DIC 分析仪(LI-COR, USA)。

1.3 数据分析

用 SPSS 统计软件进行方差分析及多重比较。

2 实验结果

2.1 合适 pH 缓冲系统的选择

白瓶各处理中 DO 浓度的增加量和黑白瓶中的消耗量见表 1。从表中可以看出,在 4 h 内,白瓶中 MOPS 和 POPSO 两种试剂对龙须菜的光合产氧与不加缓冲剂的对照间无显著差异,也就是说两者都不影响龙须菜的光合产氧作用。而在这 7 种试剂中,巴比妥盐和硼砂两种是对龙须菜的光合产氧作用抑制最大;在黑瓶中,只有硼砂、TRIS 和 POPSO 处理中龙须菜呼吸耗氧没有增加,即这 3 种试剂不刺激龙须菜呼吸耗氧,可认为对龙须菜的生理活动没有产生影响。综上,只有有机缓冲剂 POPSO 对龙须菜的光合产氧及呼吸都不影响,认为是龙须菜培养合适的酸碱缓冲剂,POPSO 的中文名为哌嗪-N,N-双(2-

羟基乙烷磺酸),分子式为 $C_{10}H_{22}N_2O_8S_2 \cdot 2H_2O$ (MW406.4), $pK_a(25\text{ }^\circ\text{C})$ 为 7.8,缓冲范围为 7.2~8.5。

2.2 POPSO 缓冲剂对龙须菜生长的影响

2.2.1 pH 和 DIC 的周日变化

图 1 为不同 POPSO 浓度处理中的 pH 和 DIC 的周日变化。两个参数的周日变化表明:一天内开灯时刻(7:00)的 pH 值为当天极低值,DIC 浓度为当天极高值;关灯时刻(19:00)的 pH 值为当天极高值,DIC 反之。根据这一规律,在接下来的 7 d 试验中,每日只测定各处理中这两个时刻的 pH 和 DIC,可大致把握一天内的 C 源利用和变化情况。

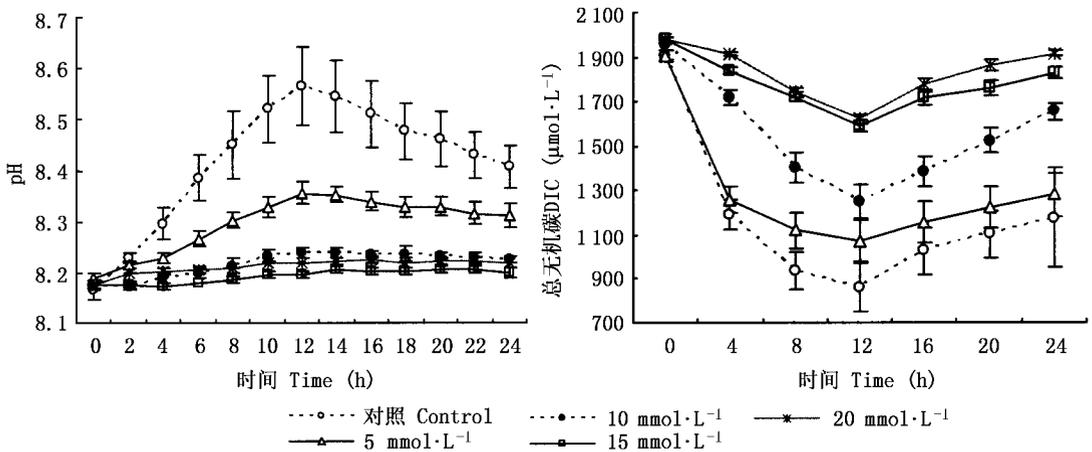


图 1 各处理中 pH 和 DIC 的周日变化

Fig.1 Diurnal variations of pH and dissolved inorganic carbon (DIC) in different treatment

表 1 黑白瓶试验中各处理的溶解氧浓度变化

Table 1 Variations of dissolved oxygen (DO) in dark and light bottles (Mean \pm SD, $mg \cdot L^{-1}$)

处理 Treatment	白瓶 Light bottle	黑瓶 Dark bottle
对照 Control	1 790.41 \pm 61.94	- 927.13 \pm 71.58
巴比妥盐 Barbitone	428.45 \pm 79.29 ^b	- 1 273.49 \pm 66.88 ^B
硼砂 Borate	540.50 \pm 45.85 ^b	- 853.41 \pm 62.57 ^A
HEPES	1 257.01 \pm 32.95 ^b	- 2 053.35 \pm 49.22 ^B
TAPS	1 221.04 \pm 44.37 ^b	- 1 462.34 \pm 67.44 ^B
MOPS	1 694.86 \pm 65.08 ^a	- 1 394.55 \pm 79.12 ^B
TRIS	1 355.84 \pm 78.95 ^b	- 776.97 \pm 37.09 ^A
POPSO	1 823.25 \pm 79.59 ^a	- 918.804 \pm 44.63 ^A

'a' 'A' 表示该处理与对照差异不显著; 'b' 'B' 表示差异显著
'a' and 'A' show the value no difference with the control, 'b' and 'B' show the difference

从图 1 还可以看到,经过一个光暗周期后,各系统的 pH 值和 DIC 浓度都很难再恢复到初始状态(值),各处理都或多或少的有所下降,只是在添加

POPSO 缓冲剂的处理中,后一周期初始时两个参数的值比空白对照相对恢复得要好,但与对照一样也与前一周期的初始值有一些差异,这种恢复程度与添加缓冲剂的浓度有着正相关关系。

2.2.2 试验期间 pH 值、DIC 和 CO₂ 浓度变化

根据周日试验结果,一天中只检测开灯(极低值)和关灯(极高值)时刻各处理系统的 pH 值和 DIC 浓度,并且为了便于作图,对每天所测得值取平均(图 2)。

从图 2 可以看出,在 7 d 试验中,各处理系统中的 pH、DIC 及 CO₂ 都发生了明显变化。其中 pH 值在低浓度(空白和 5 mmol·L⁻¹)处理中,试验第二天即突破了 POPSO 的缓冲范围,试验结束时这两组的 pH 值都比初始时升高了 1 个多单位;10 mmol·L⁻¹ 处理中的 pH 值第四天后也超过 8.5;其余的两个高浓度(>15 mmol·L⁻¹)处理中,试验期间的 pH 值尽

管略有波动,但始终保持在 8.5 以下,即在 POPSO 的缓冲容量内;此外,周日 pH 差值(当天极高 pH 值与极低 pH 值之差)在低浓度处理最大曾达到 0.6 个单位,但在高浓度处理中,该差值相对要少得多。

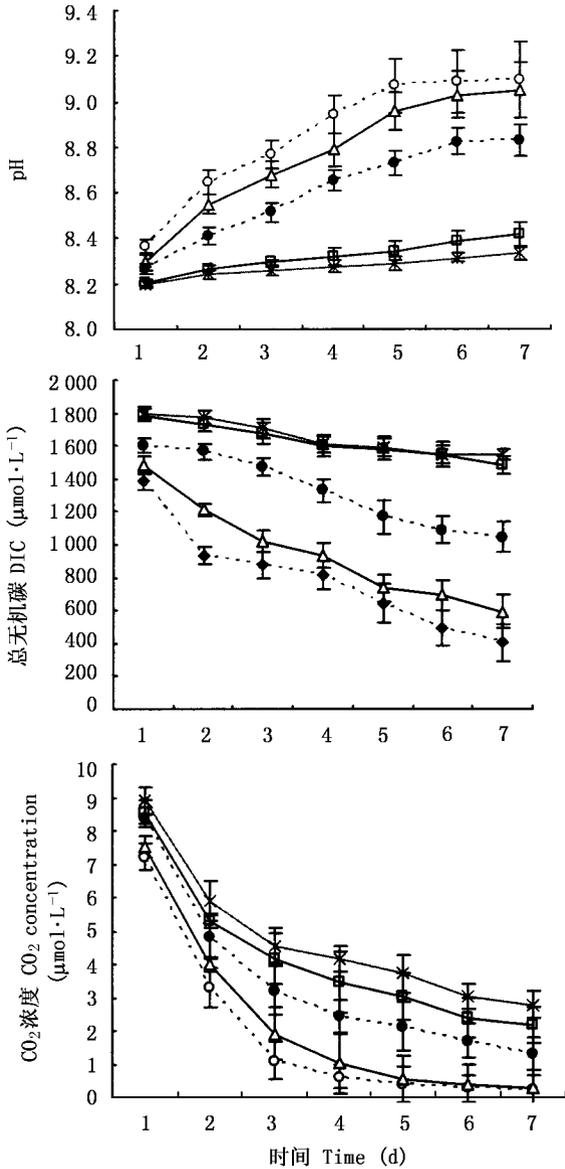


图2 各处理的 pH、DIC 及 CO₂ 变化情况

Fig.2 Variations of pH, dissolved inorganic carbon (DIC) and CO₂ in different treatment

图例见图 1 Legend see Fig. 1

另外,在各处理中 DIC 与 CO₂ 浓度在总体上都有下降,只是在高浓度处理时 DIC 降幅不大,一般表现为:有光时,介质 pH 值上升, DIC 下降;无光时,介质的 DIC 得到补充, pH 值也回落;介质中的 CO₂ 浓度与 DIC 变化类似,只是其降幅更大,尤其在实验开始几天,介质中的 CO₂ 基本上被消耗殆尽了。此现象在低浓度处理中表现得尤为明显。然而,尽管在

有光时,各处理中的 CO₂ 消耗严重,但是,在实验中,所有处理中的周日 CO₂ 浓度的变化幅度都不大,这与相应的 pH 及 DIC 的大锯齿状变化不完全一致。

2.2.3 各处理龙须菜的 SGR 变化

图 3 为各处理中龙须菜生长情况,从图中看,试验初始 2 d 内,各处理间龙须菜的日平均 SGR 相差不大,差异不显著($p > 0.05$);至第四天时,低浓度(空白和 5 mmol·L⁻¹)与高浓度(> 15 mmol·L⁻¹)处理间龙须菜的生长出现差异,并达到显著水平($p < 0.05$),但低浓度处理与 10 mmol·L⁻¹处理间的差异还不显著;至试验结束时(第七天),高浓度处理与 10 mmol·L⁻¹处理间以及 10 mmol·L⁻¹处理与低浓度处理间的差异都达到显著水平,而高浓度与低浓度间差异极其显著($p < 0.01$)。

另外,从图中还可以看出,随着试验时间的延长,各处理中龙须菜的 SGR 都有所下降。但就其降幅而言,低浓度比高浓度处理要大得多,两者降幅相差近 1 倍。

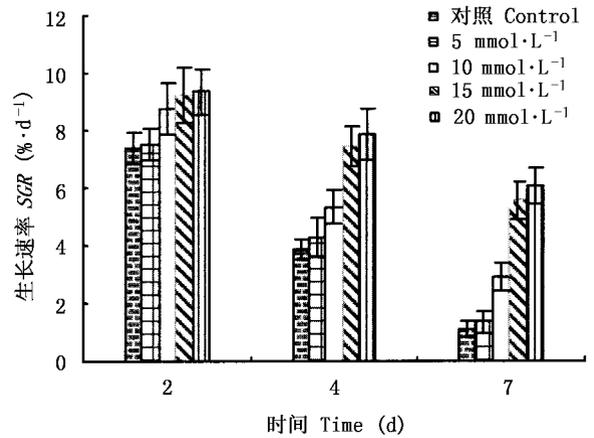


图3 各处理中龙须菜的日平均生长率变化

Fig.3 Specific growth rate (SGR) variations of *Gracilaria lemaneiformis* in different treatment

2.2.4 DIC 与 CO₂ 浓度与 SGR 的相互关系

对各系统中的 CO₂ 浓度与其相对应的龙须菜的 SGR 进行分析处理,可以发现两者之间存在着一个类似于酶动力学方程(米氏方程)的关系,经双倒数法作图(图 4a),可得到如下回归方程: $1/SGR = 0.2593(1/[CO_2]) + 0.0989$, $R^2 = 0.8834$

经计算可得,本试验中龙须菜的 CO₂ 饱和浓度为 5.25 μmol·L⁻¹时,龙须菜的最大生长速率为 10.11%·d⁻¹,即在本试验中,CO₂ 浓度小于 5.25 μmol·L⁻¹将会抑制了龙须菜的生长,CO₂ 成为龙须菜生长的主要限制因子。

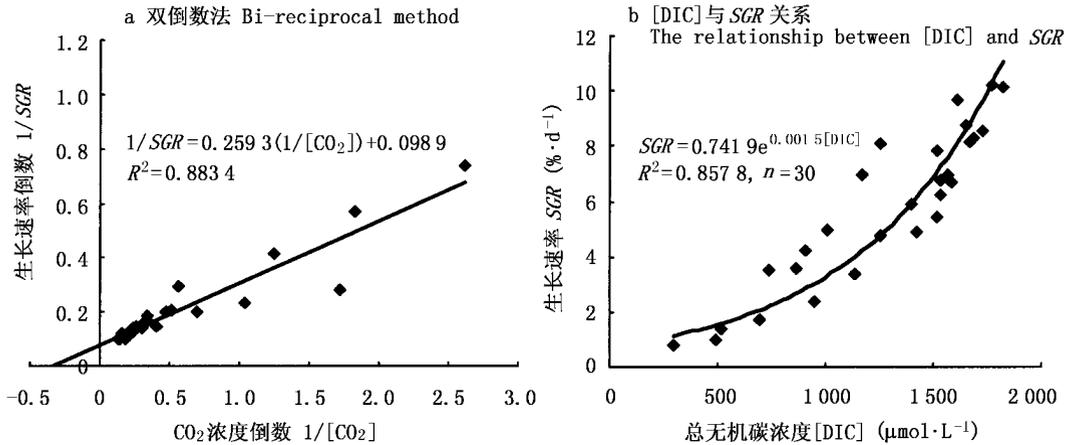


图 4 DIC 和 CO_2 浓度与龙须菜生长速率的关系

Fig. 4 The relationships between specific growth rate (SGR) of *Gracilaria lemaneiformis* and concentration of DIC ([DIC]) and CO_2 ([CO_2])

DIC 浓度也与 SGR 有一定的相关关系(图 4b), 从图中看, 在试验的 DIC 范围内, 随着介质中 DIC 浓度的升高, 龙须菜的生长速率呈指数增长, 两者关系公式为 $SGR = 0.7419e^{0.0015[DIC]}$, 相关性非常好 ($R^2 = 0.8578, n = 30$)。

3 讨论

pH 值的大幅上升是大型海藻室内培养过程中的一个常见问题。pH 值的升高是海藻光合作用过程中吸收和同化介质中 C 源和 N 源所致, 其中 CO_2 的利用是导致介质中 pH 值升高的主要原因 (Kaplan *et al.*, 1986)。随着 pH 值的升高, 介质中的 CO_2 浓度会急剧下降, 而 CO_2 在海水中的扩散速度很慢 (比在空气中要慢 1 万倍), 因此, 大型海藻会处于 CO_2 太少或限制的环境中, 就有可能发生光抑制, 导致海藻生长速率的降低, 甚至会造成光合器官的永久性伤害 (Kaplan *et al.*, 1986; Demmig-Adams & Adams, 1991; Hanelt *et al.*, 1993)。本试验中, 显然也存在着这种情况, 培养介质中 CO_2 浓度的下降, 是造成龙须菜生长速率降低的主要原因。尤其在低浓度处理中, 试验开始 2 d 的光合作用消耗了介质中的大部分 CO_2 , 使得龙须菜在后续试验中生长受到抑制。从 CO_2 浓度与龙须菜生长速率间的关系看, 两者存在着类似酶动力学方程的关系, 用 $1/[\text{CO}_2]$ 和 $1/SGR$ 双倒数法作图, 得到当介质中的 CO_2 浓度在 $5.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上时, 龙须菜能达到最大生长速率 $10.11\% \cdot \text{d}^{-1}$ 。显然在自然状况下, 龙须菜的生长一般不会出现碳限制现象 (自然海水的 CO_2 浓度一般在 $8 \sim 14 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 左右, 高于龙须菜的 CO_2 饱和浓

度), 但是在高密度龙须菜或其它海藻养殖生产或高密度放养进行池塘海湾营养污染修复、以及室内培养作生理遗传材料时, 就有可能出现 C 限制现象, 就必须要注意。

有机两性物质 POPSO 的使用, 可以使得介质的 pH 值得以相对稳定, 降低 pH 值的大幅波动; POPSO 的良好缓冲和保持效果的机理还未见有报道, 也许该物质有吸收空气中 CO_2 和增加介质中 DIC 的能力, 这还需要进一步的证明。POPSO 不为生物所利用 (Falk & Palmqvist, 1992), 本试验黑白瓶法也可表明其对龙须菜的生长不会产生影响, 还可作为介质中重金属的络合剂 (Falk & Palmqvist, 1992) 等, 上述的这些特性都表明 POPSO 是一个较好的缓冲剂。其它的有机两性物质, 也有报道在不同的海藻室内培养过程中使用, 它们各有优势, 但对于龙须菜只有 POPSO 不对其光合和呼吸产生影响, 最适合于龙须菜的培养使用。本试验中, POPSO 稳定了介质的 pH 值, 减缓了介质中 HCO_3^- 浓度的快速下降 (图 2)。海产红藻仅具有很弱的 HCO_3^- 利用能力, 使得红藻在环境 pH 值超过 9 时也能利用介质中的 HCO_3^- 作碳源 (Johnston *et al.*, 1992), 这可能是本试验低 POPSO 浓度处理中后期龙须菜略有生长的主要原因, 一般在实验中能利用 HCO_3^- 的藻类的最终 pH 值都大于 9 (Maberly & Spence, 1983)。但是龙须菜生长的 C 源主要还是依赖于环境中的 CO_2 , 这从本试验的 CO_2 浓度与龙须菜生长速率间存在着类似酶动力学方程关系可以证明, 因此, 相对稳定 pH 的培养环境, 更有利于介质中 HCO_3^- 、 CO_3^{2-} 向 CO_2 的转换, 缓解海藻生长的 C 抑制。

参 考 文 献

- Demmig-Adams B, Adams WW (1991). Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43, 599 – 626.
- Falk S, Palmqvist K (1992). Photosynthetic light utilization efficiency, photosystem II heterogeneity and fluorescence quenching in *Clamydomonas reinhardtii* during the induction of the CO₂-concentrating mechanism. *Plant Physiology*, 100, 685 – 691.
- Gao KS (高坤山) (1999). Research techniques and methods in characterizing photosynthetic carbon fixation by algae. *Marine Science (海洋科学)*, (6), 37 – 41. (in Chinese)
- Hanelt D, Huppertz K, Nultsch W (1993). Daily course of photosynthesis and photoinhibition in marine macroalgae investigated in the laboratory and field. *Marine Ecology Progress Series*, 97, 31 – 37.
- Johnston AM, Maberty SC, Raven JA (1992). The acquisition of inorganic carbon by four red macroalgae. *Oecologia*, 92, 317 – 326.
- Kaplan D, Richmond AE, Dubinsky Z, Aaronson S (1986). Algal nutrition. In: Richmond A ed. *Handbook of Microalgal Mass Culture*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 147 – 198.
- Li RZ (李纫芷) (1999). Studies on physiological characters and functions of creeping tissue of *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta). *Oceanologia et Limnologia Sinica (海洋与湖沼)*, 30, 41 – 44. (in Chinese with English abstract)
- Li XF (李向峰), Sui ZH (隋正红), Zhang XC (张学成) (2000). Using RAPD technique to detect genomic change of pigment mutants of *Gracilaria lemaneiformis*. *Oceanologia et Limnologia Sinica (海洋与湖沼)*, 31, 392 – 397. (in Chinese with English abstract)
- Maberly SC, Spence DHN (1983). Photosynthesis inorganic carbon use by freshwater plants. *Journal of Ecology*, 71, 705 – 709.
- Zhang X, van der Meer JP (1988). A genetic study on *Gracilaria sjoestedtii*. *Canadian Journal of Botany*, 66, 2022 – 2026.

责任编辑:于丹 责任编辑:刘丽娟