

黄炳惠,李 强,房君佳,等.CO₂浓度梯度对两种岩溶微藻碳酸酐酶活性的影响[J].中国岩溶,2018,37(1):91-100.
DOI:10.11932/karst20180105

CO₂ 浓度梯度对两种岩溶微藻碳酸酐酶活性的影响

黄炳惠^{1,2},李 强^{2,3},房君佳¹,曹建华^{2,3},靳振江¹,彭文杰¹,卢晓漩⁴,梁月明²

1. 桂林理工大学环境科学与工程学院,广西 桂林 541004;

2. 中国地质科学院岩溶地质研究所/自然资源部、广西岩溶动力学重点实验室,广西 桂林 541004;

3. 联合国教科文组织国际岩溶研究中心,广西 桂林 541004;

4. 西南大学地理科学学院/重庆喀斯特环境重点实验室,重庆 400715)

摘 要:以经岩溶水驯化的小球藻(*Chlorella vulgaris*)和喜钙念珠藻(*Nostoc calcicola* Breb.)为实验对象,在封闭体系中用 Willbur 和 Anderson 方法比较研究两种不同微藻在不同 CO₂ 浓度下碳酸酐酶活性变化情况。结果表明:在低于 3%CO₂ 浓度的环境中岩溶微藻可通过快速调节自身碳酸酐酶活性来应对 CO₂ 升高带来的生境影响,在影响最大的 2.5%的环境下小球藻与喜钙念珠藻碳酸酐酶活性分别提高了 1.46 倍和 2.12 倍;岩溶微藻应对 CO₂ 浓度增大带来的 pH 下降有着重要的恢复作用,随培养时间增长培养环境中的 pH 得到恢复;随着 CO₂ 浓度的增大,岩溶因子对碳酸酐酶有着重要的影响;培养 48 h 时 Ca²⁺ 与喜钙念珠藻碳酸酐酶的相关性最高,而电导率(EC)与小球藻碳酸酐酶相关程度最高。

关键词:岩溶微藻;CO₂ 浓度;碳酸酐酶;HCO₃⁻;相关性分析

中图分类号:P642.25; Q945

文献标识码:A

文章编号:1001-4810(2018)01-0091-10

0 引 言

碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA)含一条卷曲的蛋白质链和一个锌离子,分子量约为 30 kDa。在动物、植物、蓝细菌中均能发现碳酸酐酶的存在^[1],其主要作用是催化 CO₂ 与 HCO₃⁻ 的相互转化反应,是红细胞的主要蛋白质成分之一,在红细胞中的地位仅次于血红蛋白,是呼吸作用的关键酶。在植物光合作用中碳酸酐酶能增加 1,5-二磷酸核酮糖(ribulose-1,5-bis-phosphate, RuBP)及磷酸烯醇式丙酮酸(phosphoenolpyruvate, PEP)的羧化活性,降低 RuBP 的加氧活性。在高等植物光合碳代谢中,CA 可加速无机碳向羧化酶活性部位的扩散,通过提高羧化酶周围无机碳的浓度增加 CO₂ 的固定速率^[2]。碳酸酐酶分为 α、β、γ、δ 和 ε 共 5 个家族,5 个家族之间不存在显著的序列同源性,显示它们是趋同

进化的典型^[3],国内外对碳酸酐酶有了深入的认识。碳酸酐酶不仅可以促进碳酸盐岩的风化,还可以通过吸收大气中的 CO₂ 来固定碳源,从而参与到岩溶动力系统的碳循环过程中,并起到不可忽视的驱动作用,就灰岩而言,加入 CA 后,其溶解速率在高 CO₂ 分压时可增加 10 倍,而对白云岩,其溶解速率增加主要在低 CO₂ 分压时,可达 3 倍左右^[4],微生物碳酸酐酶能使灰岩溶出的导电离子总量和提高 40% 以上,从而对灰岩有显著的酶促溶蚀驱动作用^[5]。近年来,研究发现碳酸酐酶能够加速 CO₂ 的水合反应,吸收大气中的 CO₂,产生 HCO₃⁻,使岩溶环境的 pH 值降低,从而溶蚀碳酸盐岩、活化岩石圈,进而促进元素的生物地球化学循环^[6],对石生蓝藻而言,阴生生境碳酸酐酶的活性明显高于阳生环境下生长的同类,最终导致阴生生境下生长的蓝藻对石灰岩溶蚀的速率也明显快于阳生生境下的蓝藻^[7]。岩溶湖泊的微藻利

基金项目:广西自然科学基金:岩溶典型水藻的碳酸酐酶及其在无机碳利用过程中的碳同位素分馏效应(2014GXNSFCA118012)

第一作者简介:黄炳惠(1992-),男,硕士研究生,主要从事岩溶藻类研究。E-mail:294042514@qq.com。

通信作者:李强(1978-),男,博士,研究员,主要从事岩溶生物地球化学研究。E-mail:glqiangli@163.com。

收稿日期:2017-07-20

用无机碳的途径主要为碳酸氢根离子,碳酸酐酶则是连接。碳酸盐岩中的碳库容量占全球总碳量的 99.5%,是地球上最重要的碳库,因此岩溶作用的强度决定着全球碳循环的速率与进程,即该系统可通过驱动岩溶作用调节大气中 CO₂ 含量,从而对全球碳循环起到重要的源汇作用^[8]。随着全球气候变化,面对日益增多的二氧化碳的挑战,岩溶碳库发挥了重要的调节作用。当前对于在高浓度 CO₂ 下岩溶碳酸酐酶参与岩溶作用驱动碳循环尚未有深入的研究。本文以蓝、绿藻为研究对象,探究在 CO₂ 浓度梯度下对两种微藻碳酸酐酶的影响,以期为岩溶碳库应对全球气候变化下大气 CO₂ 浓度增加提供科学参考。

1 材料与方法

1.1 藻种来源

小球藻(*Chlorella vulgaris*)为绿藻门小球藻属普生性单细胞绿藻,真核生物,是地球最古老的生物之一,出现在 20 多亿年前,其生命力强,分布广,可在潮湿土壤、岩石、树干上生长;为球形单细胞淡水藻,直径在 3~8 μm,有着高效的光合作用能力,通过光合自养方式生长繁殖^[9-10]。研究所用小球藻来自中国科学院水生植物研究所。

喜钙念珠藻(*Nostoc calcicola* Breb.)属于蓝藻门,典型的原核生物,重要的环境初级生产者;在水环境中广泛存在,也存在于土壤及荒漠环境,其核糖体作为唯一细胞器,无以核膜为界的细胞核;藻体为多细胞的丝状体,聚集成块状^[11]。研究所用小球藻来自中国科学院藻类研究所。

1.2 岩溶水来源

实验所需岩溶水来自桂林丫吉岩溶试验场,水化学指标见表 1。

表 1 丫吉村 S31 号泉水化学指标
Table 1 Chemical index of spring water S31

	Ca ²⁺ / mg · L ⁻¹	HCO ₃ ⁻ / mg · L ⁻¹	温度 / ℃	溶解氧 / mg · L ⁻¹	pH	氧化还原 电位 /mv	电导率 / μs · cm ⁻¹	盐度	固形物 / mg · L ⁻¹	固定 CO ₂ / mg · L ⁻¹	游离 CO ₂ / mg · L ⁻¹	总硬度 (CaCO ₃) / mg · L ⁻¹
4 月	100.60	5.20	21.00	12.81	7.39	288.00	457.70	0.25	268.90	108.13	4.22	268.64
5 月	103.00	5.00	23.60	16.15	8.08	264.50	450.60	0.25	258.45	105.51	4.02	248.56

1.3 培养实验

取 4 支无菌试管,2 支分别加入 10 mL 无菌水,另外 2 支分别加入 100 mL 无菌水备用;分别取 1 mL 小球藻和喜钙念珠藻藻液置于两支 10 mL 的试管中,充分混合均匀,利用血球计数板法计数两支试管中的藻细胞。根据两支 10 mL 试管中藻细胞数量关系分别各取适量,制成 100 mL 两种等细胞藻液,密度为 1.6×10¹⁰ 个 · L⁻¹。再用 0.22 μm 微孔滤膜抽滤岩溶水,作为藻类培养基,分装培养基 100 mL,并分别加入小球藻和喜钙念珠藻 20 mL 藻液于体积为 150 mL 的细胞培养瓶中。此后,分装 72 个细胞培养瓶,小球藻和喜钙念珠藻培养瓶各 36 瓶,两种微藻为 6 组,每组 3 个平行,分别为 A、B、C、D、E、F,把 B、C、D、E、F5 组置于 CO₂ 培养箱,在 1%、1.5%、2%、2.5%、3% 浓度下分别培养,而 A 组在空气中培养,在培养 24 h 和 48 h 后取出测定相关数据。

1.4 测试方法及仪器

采用 Willbur 和 Anderson 方法测定胞内、外碳

酸酐酶活性。将离心收集的对数期藻细胞,悬浮于 8 mL、pH 为 8.3 的巴比妥缓冲液中,在 4 ℃ 下迅速加入 4 mL 4 ℃ CO₂ 饱和水,用 pH 计检测反应体系中 pH 值的变化,记录 pH 值从 8.3 降至 7.3 所需的时间。碳酸酐酶活性(EU)的计算公式为:

$$EU = 10 \times (T_0 / T - 1)$$

式中: T₀ 为反应体系中未加藻细胞时 pH 值下降所需的时间; T 为反应体系中加藻细胞时 pH 值下降所需的时间。利用血球计数板来计数培养体系中的藻细胞数;利用 WTW350i 多功能水质参数分析仪来测量 pH、溶解氧(DO)、电导率(EC); Ca²⁺ 浓度和 HCO₃⁻ 浓度分别用德国 Merck 公司生产的硬度试剂盒和碱度试剂盒测定。

2 结果与分析

2.1 CO₂ 浓度梯度对微藻碳酸酐酶的影响

碳酸酐酶是催化 CO₂(g) + H₂O → H₂CO₃ 反

应的重要酶,从图 1 可知在分别培养 24 h 及 48 h 后,CO₂浓度增至 2.5%期间,小球藻与喜钙念珠藻胞外碳酸酐酶活性随 CO₂浓度增大而升高,当 CO₂浓度从 2.5%增大至 3%期间,胞外碳酸酐酶活性反而下降。培养 24 h 的小球藻在 CO₂浓度为 2.5%时碳酸酐酶活性最高,为 9 EU·μg⁻¹,比在空气中培养的 3.65 EU·μg⁻¹增大了 146%,培养 24 h 小球藻碳酸酐酶活性同比培养 48 h 时的活性要高,但胞内碳酸酐酶活性要比 48 h 的低。培养 24 h 的喜钙念珠藻在 CO₂浓度为 2.5%时碳酸酐酶活性最高,为 8.9 EU·μg⁻¹,比在空气中培养的 2.85 EU·μg⁻¹增大了 212%,培养 24 h 与 48 h 的喜钙念珠藻胞外碳酸酐酶两者相比变化不大,喜钙念珠藻胞内碳酸酐酶随 CO₂浓度增大而减少,这与小球藻胞内碳酸酐酶相反。从图中数据来看小球藻碳酸酐酶活性响应 CO₂浓度变化程度比喜钙念珠藻强烈。在一定浓度范围内增大 CO₂含量能促进碳酸酐酶活性的上升,但在 CO₂高于 3%条件下碳酸酐酶活性开始被抑制。由

于碳酸酐酶是一种诱导酶,在高浓度 CO₂下培养时,培养液中的 CO₂能够满足细胞生长和光合作用的需要,细胞胞外 CA 的活性常受到抑制^[12],本研究结果也证实了这一点。同时,CO₂在蓝藻细胞内以 HCO₃⁻形式累积。细胞质中累积的 HCO₃⁻经扩散进入羧体,后经碳酸酐酶催化脱水形成 CO₂,引起 Rubisco(光合作用碳反应中重要的羧化酶)周围 CO₂浓度的升高,其中,相当一部分 CO₂被 Rubisco 固定,余下的 CO₂在向外扩散过程中被依赖于光能的 CO₂转运途径部分回收^[13-16]。绿藻中莱因衣藻 90% Rubisco 位于蛋白核中,而高浓度 CO₂培养的细胞中有 50%位于蛋白核内^[17]。碳酸酐酶能催化 HCO₃⁻和 CO₂的相互转变,更有利于 CO₂的固定。小球藻碳酸酐酶活性响应 CO₂浓度变化程度比喜钙念珠藻强烈,可能是因为蓝藻与绿藻的细胞结构不同,碳酸酐酶在细胞内分布情况以及含量不同导致酶蛋白跨膜运输到细胞外量的差异。

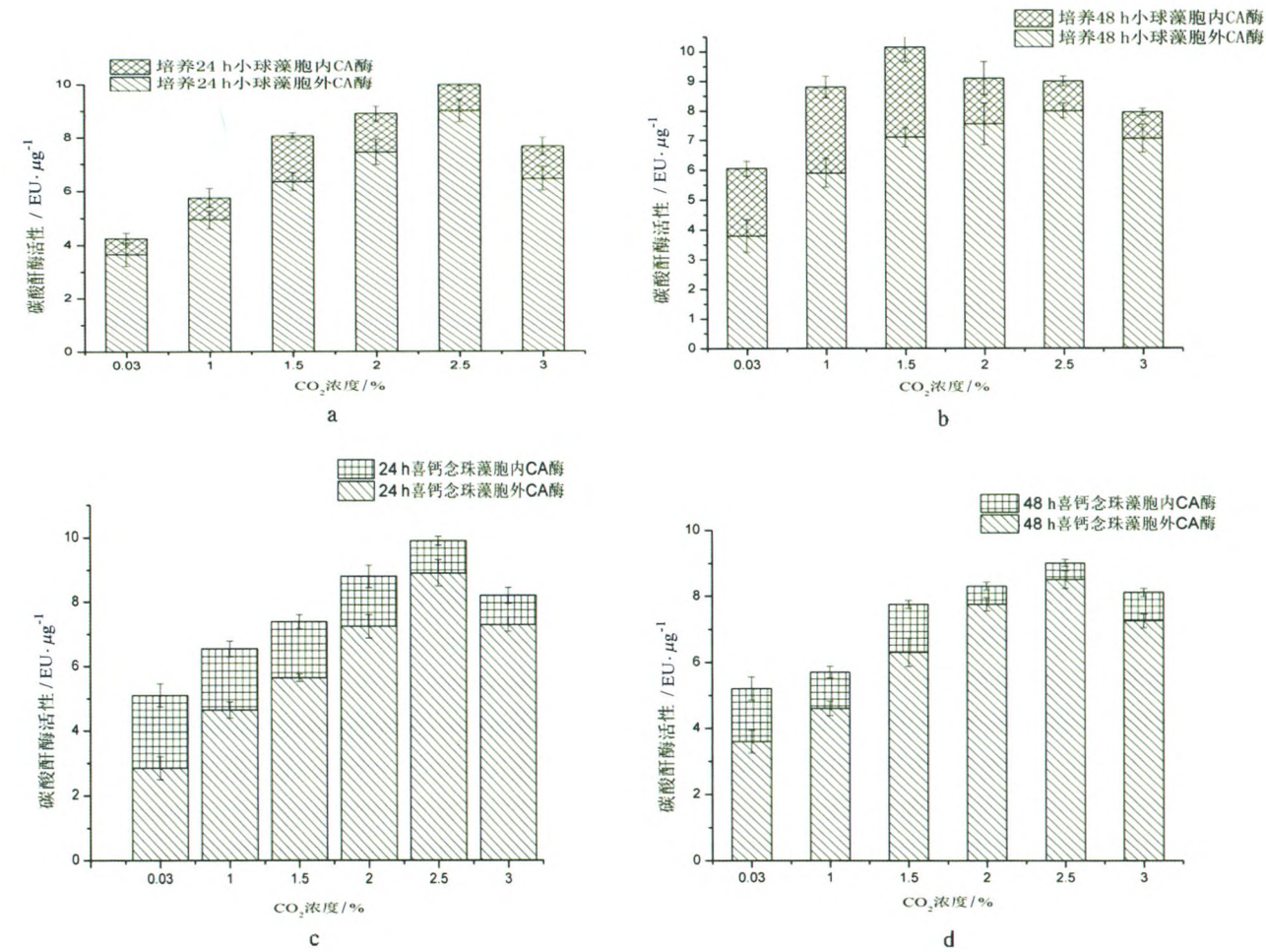


图 1 CO₂浓度梯度对碳酸酐酶的影响

Fig. 1 Effects of concentration gradient CO₂ on microalgae carbonic anhydrase

2.2 CO₂ 浓度对环境因子的影响

2.2.1 CO₂ 浓度梯度对 pH 的影响

pH 是重要的水质监测指标,在岩溶水体中 pH 反映着水中无机碳离子的存在方式,影响着水体中碳酸酐酶的活性^[18]。由图 2 可知,在培养 24 h 后两种微藻的 pH 随着 CO₂ 的增大而下降,在 48 h 后 2%CO₂ 浓度的 pH 略高于 1.5%,在 CO₂ 的影响下小球藻在 3%时培养 24 h 的 pH 比在空气中培养的下降了 30%,比培养 48 h 的下降了 27.3%。喜钙念珠藻在 3%时培养 24 h 的 pH 比在空气中培养的下降了 30.4%,比培养 48 h 的下降了 22.5%。在封闭体系中的两种微藻 pH 随着 CO₂ 的浓度增大由碱性向着酸性转变,这是由于 CO₂ 与水反应生成碳酸使得水

体 pH 下降导致的。结合图 1 可知,小球藻和喜钙念珠藻的碳酸酐酶的活性随 pH 的下降先增大后减小,在 pH 为 7.0 左右时两种微藻的碳酸酐酶活性最高。环境中 CO₂ 含量过低会诱导该酶的合成以加速转运 CO₂ 至细胞内。在酸性 pH 条件下,培养液中溶解无机碳(DIC)主要以 CO₂ 形式存在,自由穿过细胞膜的 CO₂ 能够满足光合作用需求^[19]。在碱性条件下,DIC 主要以 HCO₃⁻ 形式存在,需要依赖胞外碳酸酐酶催化 HCO₃⁻ 转化成 CO₂ 进入细胞,以满足光合作用的需求。在 CO₂ 浓度为 1.5%~2.5% 的期间,碳酸酐酶的量达到最大值,微藻更多的利用水体中的 HCO₃⁻ 转化成 CO₂ 进入细胞,使细胞中 CO₂ 水合反应的化学平衡被破坏。

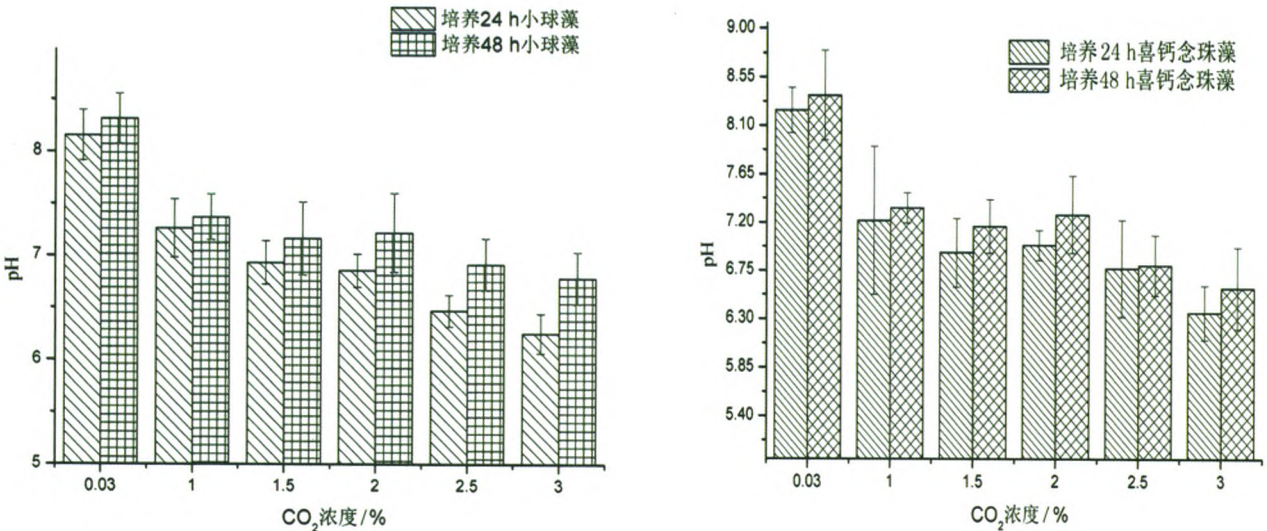


图 2 CO₂ 浓度梯度对小球藻和喜钙念珠藻 pH 的影响
Fig. 2 Effect of CO₂ concentration gradient on pH of *Chlorella vulgaris* and *Nostoc calcicola* Breb.

2.2.2 CO₂ 浓度梯度对 Ca²⁺ 的影响

Ca²⁺ 是机体各项生理活动不可缺少的离子,对于维持细胞膜两侧的生物电位,以及正常的神经传导功能有重要作用,对于很多生物体来说是重要的结构成分以及生理所需元素;在生物代谢以及调节不同生理结构上起到重要作用,是机体各项生理活动不可缺少的离子^[20]。由图 3 可知,在培养 24 h 后小球藻与喜钙念珠藻体系中 Ca²⁺ 的含量随 CO₂ 的变化呈先下降后上升,然后随着 CO₂ 增大而下降。在培养 48 h 后随着 CO₂ 浓度的增大,小球藻和喜钙念珠藻培养液中 Ca²⁺ 的含量呈先下降后上升再下降的变化,小球藻 Ca²⁺ 含量在 1% 时达到最大值,喜钙念珠藻培养

液中 Ca²⁺ 含量在 CO₂ 浓度为 2% 时达到最大值,喜钙念珠藻培养液 Ca²⁺ 含量在 CO₂ 浓度为 1.5% 时比在 1% 时略低。小球藻 Ca²⁺ 量相比于在空气中培养增加了 6 mg · L⁻¹。喜钙念珠藻 Ca²⁺ 量相比于在空气中培养增加了 5 mg · L⁻¹,CO₂ 浓度超过 2% 后 Ca²⁺ 含量变低。藻细胞吸收岩溶水中 Ca²⁺ 来维持细胞壁的结构和功能,还对一些胞外膜蛋白或酶起调节作用^[21];钙很容易进入质外体并在细胞质膜的外表面以可交换态的形式与细胞壁结合^[22]。对于蓝藻来说,Ca²⁺ 是控制生命体生长和死亡的重要信号因子,生物细胞内 Ca²⁺ 必须保持在 5 × 10⁻⁷ mol · L⁻¹ 左右,过高的 Ca²⁺ 会对细胞产生毒害作用^[23]。结合

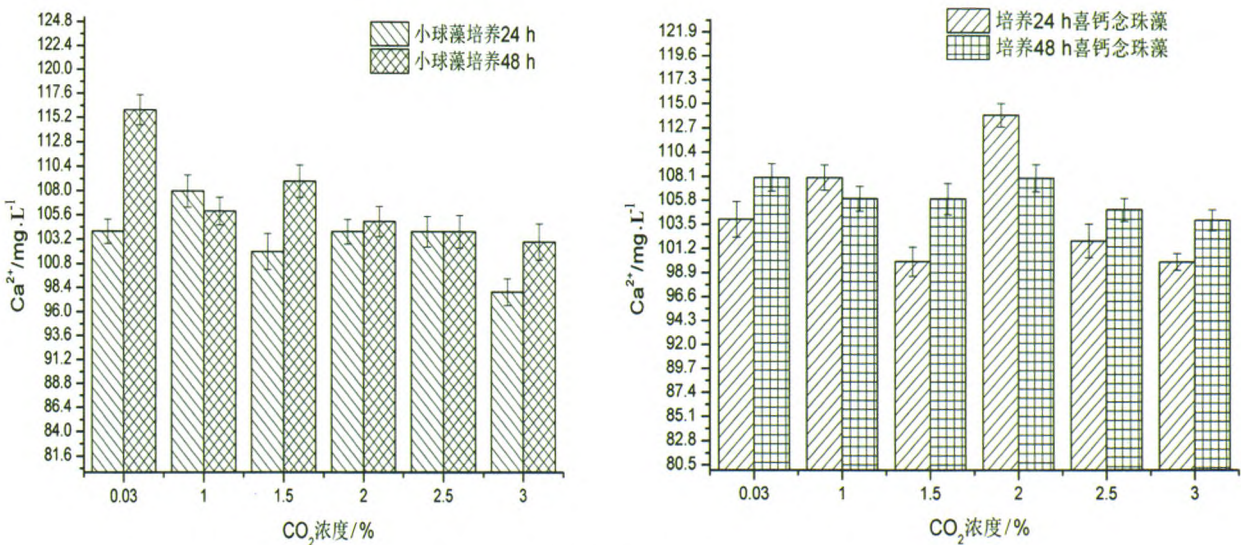


图 3 CO₂ 浓度梯度对小球藻和喜钙念珠藻 Ca²⁺ 的影响

Fig. 3 Effect of CO₂ concentration gradient on Ca²⁺ of *Chlorella vulgaris* and *Nostoc calcicola* Breb.

图 1 可知,在 CO₂ 浓度为 1.5 % 时,喜钙念珠藻水体中 Ca²⁺ 含量最少,这可能是由于岩溶水体中藻类利用 Ca²⁺ 使其大量积累在细胞内。微藻利用水体中大量存在的 HCO₃⁻ 进行光合作用合成有机物的同时,生成碳酸钙,而生成的碳酸钙在 CO₂ (或者说是碳酸)过量时会让碳酸钙形成溶解度更大的碳酸氢钙而溶解在水中,导致 CO₂ 浓度在培养到 2% 的期间,水中 Ca²⁺ 含量上升。在 CO₂ 浓度大于 2% 时两种微藻 Ca²⁺ 含量下降,这可能存在两个原因:一是小球藻与喜钙念珠藻生物量变大,更多利用水体中 Ca²⁺ 维持自身的生长发育,导致水中 Ca²⁺ 含量下降,从而使体系内 Ca²⁺ 下降;二是更多 CO₂ 与水中的 Ca²⁺ 结合生成碳酸钙沉淀从而导致水体中 Ca²⁺ 下降。

2.2.3 CO₂ 浓度梯度对 HCO₃⁻ 的影响

HCO₃⁻ 是诱导微藻产生碳酸酐酶的重要底物,由图 4 可知,培养 24 h 的小球藻及喜钙念珠藻的 HCO₃⁻ 随 CO₂ 的增大呈先增大后减少的趋势,均在 1% 浓度下的 HCO₃⁻ 含量最高,在 1%~3% 范围内 HCO₃⁻ 在持续下降。在培养 48 h 后两种微藻在空气中培养至 1% 浓度过程中 HCO₃⁻ 是不断下降的,而在 1%~1.5% 区间 HCO₃⁻ 反而上升,而后随 CO₂ 的增大反而下降。在微藻利用 CO₂ 受限制的条件下,微藻可一方面以主动运输的方式将 HCO₃⁻ 转运到细胞内,由细胞内的碳酸酐酶将 HCO₃⁻ 转变为 CO₂,另一方面胞外的碳酸酐酶可直接将细胞表面的 HCO₃⁻ 转

变为 CO₂,此 CO₂ 以自由扩散的形式进入细胞。胞外转变和胞内运输这两种方式满足了微藻 Calvin cycle(卡尔文循环)对 CO₂ 的要求^[24]。碳酸酐酶是 CCM(Carbon Concentrating Mechanism) 中的重要组成部分^[25],促进 Rubisco 的羧化作用,当水体中 DIC 主要以 HCO₃⁻ 形式存在时,碳酸酐酶可加速 HCO₃⁻ 向 CO₂ 的转化,为 Rubisco 提供有效底物,可维持 CO₂ 恒定,不断地向细胞供应以进行光合作用。在以 CO₂ 为核心的 CO₂—水—碳酸岩盐三相不平衡岩溶动力系统中,岩溶水中 HCO₃⁻ 的含量比外源水含量高,微藻 Calvin cycle 中碳酸酐酶对 HCO₃⁻ 的吸收有极其重要的作用^[26]。结合图 1 推断,在培养 24 h 随 CO₂ 浓度的增大水中 CO₂ 向 HCO₃⁻ 转变,使在 CO₂ 为 1% 的水体中 HCO₃⁻ 的含量快速上升。在 HCO₃⁻ 的诱导下引起了碳酸酐酶的活性上升,在 CO₂ 浓度由 1% 增至 3% 时体系中 HCO₃⁻ 含量在不断下降而碳酸酐酶的活性在上升,这可能由于存在于水中 HCO₃⁻ 的量仍处于可诱导碳酸酐酶状态,但随 CO₂ 的增大,CO₂ 便能满足微藻生长所需,从而在 3% 浓度下抑制碳酸酐酶活性。

2.2.4 CO₂ 浓度梯度对 DO 的影响

DO 的浓度反映了水生生物的活动状况。在水生生态系统中藻类通过碳酸酐酶的作用,大量利用水体中的 HCO₃⁻ 进行光合作用,在生成有机碳的同时,放出氧气,影响着水中的溶解氧含量,是水生生物的活动状况指标^[27]。由图 5 可知两种微藻培养 24 h

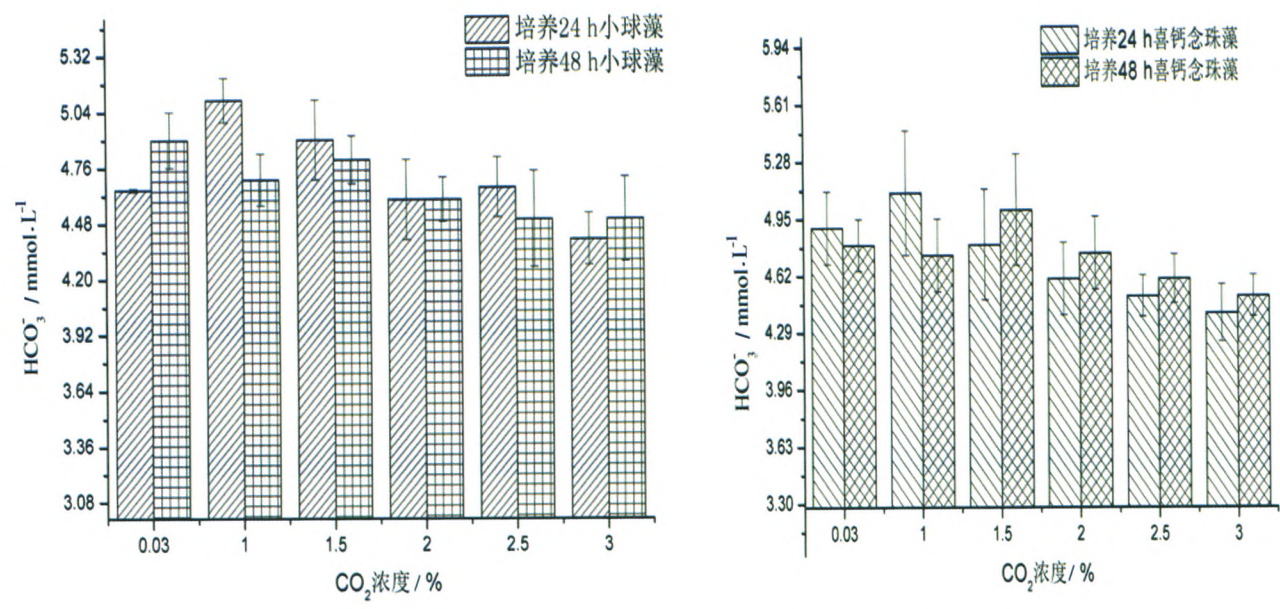


图 4 CO₂ 浓度梯度对小球藻和喜钙念珠藻 HCO₃⁻ 的影响

Fig. 4 Effect of CO₂ concentration gradient on HCO₃⁻ of *Chlorella vulgaris* and *Nostoc calcicola* Breb.

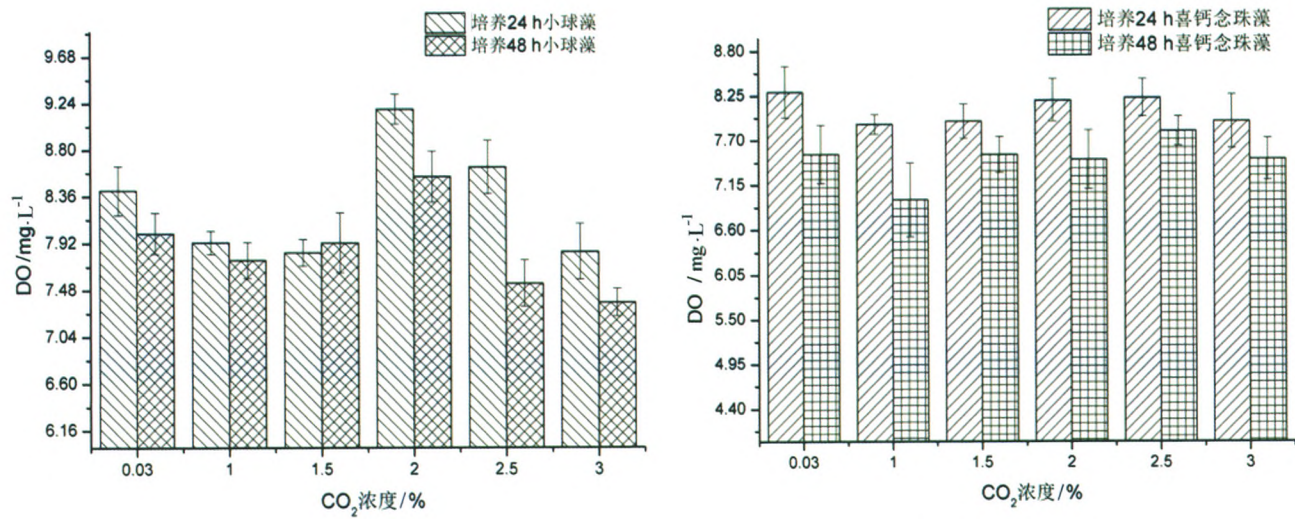


图 5 CO₂ 浓度梯度对小球藻和喜钙念珠藻 DO 的影响

Fig. 5 Effect of CO₂ concentration gradient on DO of *Chlorella vulgaris* and *Nostoc calcicola* Breb.

的溶解氧含量总体高于 48 h 的,小球藻溶解氧含量在 2%处达到最大值,为 9.815 mg · L⁻¹,比在 3%下高出 14.6%,同比喜钙念珠藻在 2%时高出 19.7%。与小球藻不同,喜钙念珠藻溶解氧含量在 CO₂ 的影响下稍有变化,但两种微藻的溶解氧含量变化趋势相似,本研究中两种微藻溶解氧的下降或许在于二氧化碳溶于水导致,但小球藻在 2%及喜钙念珠藻在 1.5%时溶解氧的上升很大程度是由于水生植物通过碳酸酐酶的作用,大量利用水体中的 HCO₃⁻ 进行光

合作用,在生成有机碳及氧气的同时,形成碳酸钙的沉积^[27]。造成小球藻溶解氧含量比喜钙念珠藻高,主要原因是绿藻属于真核生物,跟高等植物相似,有细胞核和叶绿体,有相似的色素、贮藏养分及细胞壁的成分,而喜钙念珠藻属于蓝藻,属于原核生物,没有细胞核,细胞中央有核物质,通常呈颗粒状或网状,色素均匀的分布在细胞质中,在同一环境中小球藻固定的 CO₂ 量更多^[28],产生更多的 O₂。在 CO₂ 浓度大于 2%之时,两种微藻的 DO 随着碳酸酐酶活性的下

降而下降。

2.2.5 CO₂ 浓度梯度对 EC 的影响

电导率是指水的导电性,即水的电阻的倒数,通常用于表示水的纯净度。水的电导率的大小取决于水中离子数目的多少,电导率越高说明水中的离子含量越多^[29]。图 6 表明,在 24 h 随浓度增大的情况下两种微藻电导与碳酸酐酶活性有着相似的变化趋势,

在培养 48 h 时小球藻随 CO₂ 浓度的增大而下降,喜钙念珠藻在 1% 的 CO₂ 浓度下比在空气中培养高,而后随着 CO₂ 浓度增大而下降。在岩溶水中 HCO₃⁻ (r=0.93)、Ca²⁺ (r=0.92) 与电导率有极高的相关关系^[30],因为岩溶水中离子以 Ca²⁺、HCO₃⁻ 为主,促使 Ca²⁺、HCO₃⁻ 成为影响电导率的主要因素。

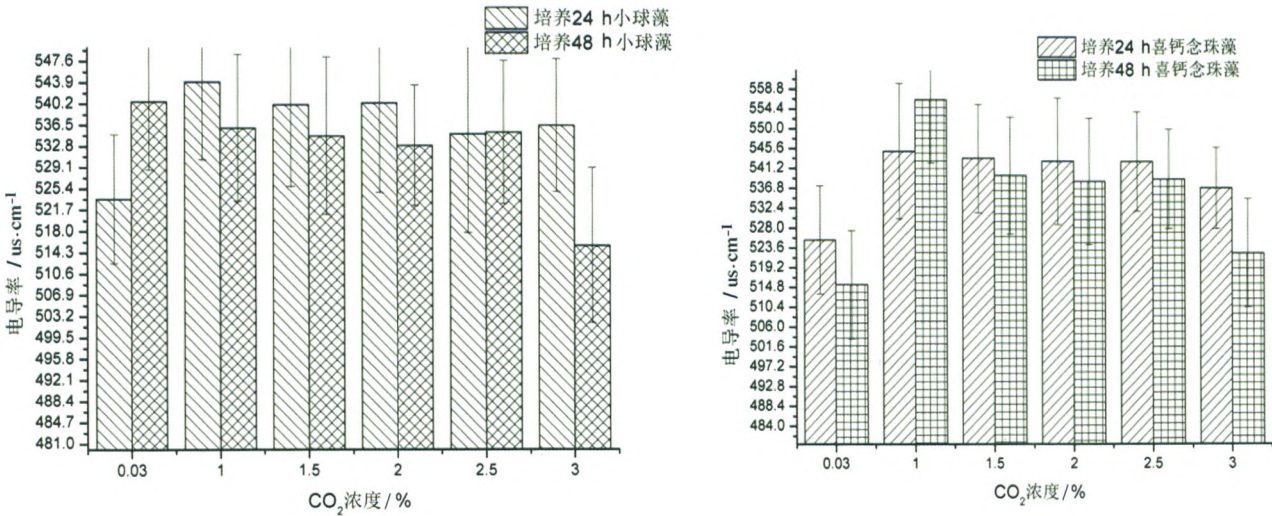


图 6 CO₂ 浓度梯度对小球藻和喜钙念珠藻 EC 的影响

Fig. 6 Effect of CO₂ concentration gradient on EC of *Chlorella vulgaris* and *Nostoc calcicola* Breb.

2.3 CO₂ 浓度梯度下 CA 与岩溶因子的相关性分析

岩溶因子在物理、化学、生物尺度上制约着岩溶微藻的生长,在 CO₂ 浓度梯度下微藻 CA 与岩溶因子相互影响、相互制约。对 CA 与岩溶因子进行双变量相关性分析。

2.3.1 喜钙念珠藻 CA 与岩溶因子相关性

由表 2 可知:在 CO₂ 浓度梯度下,喜钙念珠藻的

CA 与 pH 是极弱相关的关系,与 DO 存在强相关的关系,与 Ca²⁺、HCO₃⁻ 以及 EC 是显著相关的。在 CO₂ 浓度梯度封闭体系中 pH 与 Ca²⁺、HCO₃⁻、DO、EC 存在中等相关的关系;EC 与 Ca²⁺、DO 有着显著相关的关系;HCO₃⁻ 与 EC 有着强相关的关系。在 CO₂ 浓度梯度下,CO₂ 是最关键的环境因子,是导致水体 pH 下降的主因。喜钙念珠藻利用 CA 转化

表 2 喜钙念珠藻 CA 与岩溶因子相关性

Table 2 Correlation between *Nostoc calcicola* Breb. CA and karst factors

	CA	pH	Ca ²⁺	HCO ₃ ⁻	DO	EC
CA	1	-0.072	0.859 *	0.838 *	0.760	0.803 *
pH		1	0.348	-0.388	-0.276	0.211
Ca ²⁺			1	-0.114	0.574	0.832 *
HCO ₃ ⁻				1	0.646	0.791
DO					1	0.861 *
EC						1

注: * 为在 0.05 水平(双侧)上显著相关。

HCO_3^- 进行光合作用,一方面通过细胞吸收岩溶环境中的 Ca^{2+} ,另一方面在藻体生长过程中还能产生胞外 CaCO_3 沉淀,并形成“藻体- CaCO_3 ”复合体。喜钙念珠藻将一部分由岩溶作用产生的 HCO_3^- 再沉淀也可看作是在岩溶水生生态系统中藻类生物的净碳汇作用^[20]。喜钙念珠藻对封闭体系中无机碳的利用是先利用培养体系中的游离 CO_2 ,再利用水体中的 HCO_3^- 进行光合作用,其对 HCO_3^- 的利用引起体系 pH 和 DO 的升高,这可能是导致 DO 与 CA 相关性强的原因。但由于在 CO_2 浓度梯度下,pH 的不断下降是 CO_2 在水中解离为 HCO_3^- 所致,因此水中 pH 与 CA 变化曲线没有一致性,pH 与 CA 的相关性远低于实际值。钙和镁在岩溶生态系统土壤中的含量较高,一定浓度的钙、镁离子能促进实验菌株胞外酶的活性,这可能是该微生物对富钙、镁岩溶环境长期适应的结果^[31],同时也有可能是水中的 Ca^{2+} 在 Zn^{2+} 缺乏时能够代替 Zn^{2+} 的活性中心位置,从而形成以 Ca^{2+} 为活性中心、催化能力较弱的蛋白钙酶,以促进水中 HCO_3^- 的转化,维持微藻生物光合作用的进行。

2.3.2 小球藻 CA 与岩溶因子相关性

由表 3 可知,小球藻 CA 与 HCO_3^- 、EC、 Ca^{2+} 有着显著相关的关系,与 pH 存在负中等程度相关关系,与 DO 存在强相关的关系。小球藻 pH 与 Ca^{2+} 是极弱相关,与 HCO_3^- 、EC、DO 有着负中等程度相关关系; Ca^{2+} 与 DO 存在显著相关。藻类生长繁殖利用岩溶水中无机碳的过程中,有一部分无机碳以胞外 CaCO_3 的形式被固定;在利用 HCO_3^- 的过程中,细胞表面会产生 CaCO_3 晶体^[32]。同时, Ca^{2+} 与 HCO_3^- 是岩溶环境 EC 的主导因子, HCO_3^- 、EC、 Ca^{2+} 三者的关系相互形成了与 CA 的显著相关关系。在岩溶水环境中,微藻利用 HCO_3^- 进行光合作用进而产生 O_2 ,CA 与 DO 存在强相关性。在 CO_2 浓度梯度下,随 pH 的下降 CA 是先升高后降低的,其在一定程度内存在负相关关系。由于藻类生物作用有利于 CaCO_3 的析出和沉淀,光合作用促进了对 CaCO_3 的沉淀,而呼吸作用则相反^[33],因此 Ca^{2+} 与 DO 存在显著相关。

表 3 小球藻 CA 与岩溶因子相关性
Table 3 Correlation between *Chlorella vulgaris* CA and karst factors

	CA	pH	Ca^{2+}	HCO_3^-	DO	EC
CA	1	-0.443	0.864 *	0.860 *	0.698	0.873 *
pH		1	-0.010	-0.175	-0.309	-0.433
Ca^{2+}			1	-0.397	0.909 *	0.754
HCO_3^-				1	-0.124	0.179
DO					1	0.897 *
EC						1

注: * 为在 0.05 水平(双侧)上显著相关。

3 结 论

(1)在低于 3% CO_2 浓度的环境中,岩溶微藻可通过快速调节自身碳酸酐酶活性来应对 CO_2 升高带来的生境影响,在影响最大的 2.5% CO_2 浓度环境下小球藻与喜钙念珠藻碳酸酐酶活性分别提高了 1.46 倍和 2.12 倍,从而促进对无机碳的吸收,增大岩溶区的碳循环能力,以应对全球气候变暖的挑战。在研究应对温室效应的策略时,生存在岩溶区的微藻及其碳酸酐酶的固碳增汇作用是不可忽视的重要环节。

(2)岩溶微藻在应对 CO_2 浓度增大带来的 pH 及 HCO_3^- 下降有着重要的恢复作用。随培养时间的增长,pH 及 HCO_3^- 得到恢复,表明微藻在岩溶区是恢复自然环境的重要参与者及岩溶区在应对全球气候变暖起着重要调控作用。

(3)在培养 48 h 时, Ca^{2+} 、 HCO_3^- 与喜钙念珠藻碳酸酐酶的相关性为 85.9%、83.8%,在此阶段 Ca^{2+} 、 HCO_3^- 对碳酸酐酶的相关程度最大,但在培养 48 h 时, Ca^{2+} 、 HCO_3^- 、EC 对小球藻碳酸酐酶的相关达到了 86%、86%、87%,在此阶段 EC 对小球藻碳酸

酐酶相关程度最大。由于碳酸酐酶与 Ca²⁺ 的相关性,在研究岩溶区微藻碳酸酐酶与岩溶动力学关系时,Ca²⁺ 的影响是不可忽视的。

参考文献

- [1] Brodersen J. Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the alpha-, beta-, and gamma-carbonic anhydrase gene families[J]. *Molecular Phylogenetics & Evolution*, 1996, 5(1):50-77.
- [2] 李强,何媛媛,曹建华,等. 植物碳酸酐酶对岩溶作用的影响及其生态效应[J]. *生态环境学报*, 2011, 20(12):1867-1871.
- [3] Bahn Y S, Mühlischlegel F A. CO₂, sensing in fungi and beyond [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2006, 9(6):572-578.
- [4] 李强. 碳酸酐酶及多肽类生物大分子与岩溶动力学理论的思考[J]. *中国岩溶*, 2010, 29(3):253-257.
- [5] 余龙江,吴云,李为,等. 微生物碳酸酐酶对石灰岩的溶蚀驱动作用研究[J]. *中国岩溶*, 2004, 23(3):225-228.
- [6] 张小菊,杨翠珍,杨娟. 微生物碳酸酐酶在岩溶发育中的研究现状及展望[J]. *化学与生物工程*, 2011, 28(2):9-11.
- [7] 聂磊,萧洪东,侯雨佳,等. 不同光照条件下石灰岩表面蓝藻生物岩溶侵蚀能力与生理活性研究[J]. *地学前缘*, 2012, 19(6):254-259.
- [8] 吴雁雯,张金池. 微生物碳酸酐酶在岩溶系统碳循环中的作用与应用研究进展[J]. *生物学杂志*, 2015, 32(3):78-83.
- [9] Hu H J, Li Y Y, Wei Y X, et al. *Chinese Freshwater Algae* [M]. Shanghai: Science and Technology Press, 1980:1-318.
- [10] Wei Y X. *Chinese Freshwater Algae Records (Vol. II)* [M]. Beijing: Science Press, 2003: 1-84.
- [11] 史顺玉. 溶藻细菌对藻类的生理生态效应及作用机理研究[D]. 武汉:中国科学院研究生院(水生生物研究所), 2006.
- [12] Xia J R, Gao K S. Impacts of elevated CO₂ concentration on biochemical composition, carbonic anhydrase, and nitrate reductase activity of freshwater green algae[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2005, 47(6):668-675.
- [13] Miller A G, Espie G S, Canvin D T. Physiological aspects of CO₂ and HCO₃⁻ transport by cyanobacteria: a review[J]. *Revue Canadienne De Botanique*, 1990, 68(6):1291-1302.
- [14] Badger M R, Bassett M, Comins H N. A model for HCO₃⁻ accumulation and photosynthesis in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. theoretical predictions and experimental observations[J]. *Plant Physiology*, 1985, 77(2):465-471.
- [15] Kaplan A, Reinhold L. CO₂ Concentrating Mechanisms In Photosynthetic Microorganisms[J]. *Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology*, 1999, 50(50):539.
- [16] Kaplan A, Reinhold L. Nature of the Inorganic Carbon Species Actively Taken up by the Cyanobacterium *Anabaena variabilis* [J]. *Plant Physiology*, 1984, 76(3):599.
- [17] 沈佳. CO₂ 和光照强度对蛋白核小球藻 CO₂ 浓缩机制(CCM)的影响[D]. 宁波:宁波大学, 2015.
- [18] 王山杉,刘永定,邹永东,等. 微囊藻碳酸酐酶活性在不同环境因素下的调节与适应[J]. *生态学报*, 2006, 26(8):2443-2448.
- [19] Fett J P, Coleman J R. Regulation of Periplasmic Carbonic Anhydrase Expression in *Chlamydomonas reinhardtii* by Acetate and pH[J]. *Plant Physiology*, 1994, 106(1):103.
- [20] 王培,胡清菁,曹建华,等. 念珠藻对岩溶水中 Ca²⁺、HCO₃⁻ 利用效率实验研究[J]. *广西植物*, 2014, 34(6):799-805.
- [21] Marcelle R D. Predicting storage quality from preharvest fruit mineral analyses. A review[J]. *Acta Horticulturae*, 1990, 274(38):305-314.
- [22] Hanson J B. The functions of calcium in plant nutrition[J]. *Advances in Plant Nutrition*, 1984, 1(1):149-208.
- [23] Harr M W, Distelhorst C W. Apoptosis and autophagy: decoding calcium signals that mediate life or death[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2010, 2(10):a005579.
- [24] 徐敏. 蓝藻 CCM 的无机碳转运系统的理化功能研究[D]. 北京:中国科学院研究生院;中国科学院大学, 2008.
- [25] 周红,任久长,蔡晓明. 沉水植物昼夜光补偿点及其测定[J]. *环境科学学报*, 1997, 17(2):256-258.
- [26] 何媛媛. 岩溶生态系统中土壤及典型植物碳酸酐酶对岩溶作用的影响[D]. 桂林:广西师范大学, 2010.
- [27] 王培,曹建华,李亮,等. 不同来源小球藻对岩溶水 Ca²⁺、HCO₃⁻ 利用的初步研究[J]. *水生生物学报*, 2013, 37(4):626-631.
- [28] 叶澍. 地球上最早出现的藻类:蓝藻[J]. *海洋世界*, 2016, 37(2):6-7.
- [29] 高樱红. 降水离子浓度总和与电导率的关系[J]. *化学分析计量*, 2002, 11(2):62-63.
- [30] Walker J E, Saraste M, Runswick M J, et al. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold[J]. *Embo Journal*, 1982, 1(8):945.
- [31] 李为,余龙江,余俊峰,等. 岩溶环境因子对细菌胞外碳酸酐酶表达及活性的影响[J]. *微生物学通报*, 2005, 32(5):35-39.
- [32] 王培. 几种水生藻类的碳汇效应研究[D]. 桂林:广西师范大学, 2013.
- [33] 李强. 水生藻类碳酸酐酶(CA)对碳酸钙沉积速率控制的试验研究[D]. 桂林:广西师范大学, 2004.

Effects of CO₂ concentration gradient on carbonic anhydrase of two karst microalgae

HUANG Binghui^{1,2}, LI Qiang^{2,3}, FANG Junjia⁴, CAO Jianhua^{2,3}, JIN Zhenjiang¹,
PENG Wenjie¹, LU Xiaoxuan⁴, LIANG Yueming²

(1. College of Environmental Science and Engineering, Guilin University of Technology, Guilin, Guangxi 541004, China;

2. Institute of Karst Geology, CAGS /Key Laboratory of Karst Dynamics, MNR&GZAR, Guilin, Guangxi 541004, China;

3. The International Research Center on Karst under the Auspices of UNESCO, Guilin, Guangxi 541004, China;

4. Chongqing Key Laboratory of Karst Environment /School of Geographical Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract In response to the challenge of global warming, it is important to study karst microalgae and its carbonic anhydrase for greenhouse effect owing to carbon sequestration. Yaji experimental site is an independent karst hydrological-geological system located in the peak-cluster depression and the peak-forest plain border zone. The experiment was conducted on the *Chlorella vulgaris* and *Nostoc calcicola* Breb. cultured on the spring water which sources from the limestone of Rongxian formation, the upper Devonian at the site. We compared the carbonic anhydrase activities of two different microalgae under different carbon dioxide concentrations by using the methods of Willbur and Anderson in a closed system and analyzed the changes of karst factor by using the WTW350i multifunctional water quality analyzer and the hardness and alkalinity kits. The results showed that the karst micro-algae could deal with the habitat impact of elevated carbon dioxide by rapidly regulating its carbonic anhydrase activity in the environment of less than 3% carbon dioxide concentration. The activities of carbonic anhydrase in *Chlorella vulgaris* was increased by 1.46 times and *Nostoc calcicola* Breb. was increased by 2.12 times respectively in the environment of 2.5%. The increase of carbon dioxide concentration leads to the change of karst factor, resulting in the decrease of pH, HCO₃⁻ and dissolved oxygen (DO) and the increase of electrical conductivity (EC). Karst microalgae play an important role in coping with the decrease of pH and HCO₃⁻ induced by the increase of carbon dioxide concentration. With the increase of incubation time, the pH and the HCO₃⁻ in the culture environment is recovered, indicating that the karst area is an important participant in response to global warming. With the increase of carbon dioxide concentration, karst factors have an important influence on carbonic anhydrase. The correlation between calcium ion of *Nostoc calcicola* Breb. and carbonic anhydrase was the highest at 48 h, but the correlation between EC and carbonic anhydrase of (*Chlorella vulgaris*) reached it highest at 48 h. Due to the correlation between carbonic anhydrase and calcium ion, the influence of calcium ion can not be neglected when we study the relationship between carbonic anhydrase and karst dynamics in karst area.

Key words karst microalgae, CO₂ concentration, carbonic anhydrase, HCO₃⁻, correlation analysis

(编辑 黄晨晖)