

胞外碳酸酐酶对湖泊微藻稳定碳同位素组成的影响

李海涛^{1,2}, 吴沿友^{1*}, 徐莹^{1,2}

(1. 中国科学院地球化学研究所 环境地球化学国家重点实验室, 贵阳 550002; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 本文以红枫湖、百花湖和阿哈水库中的微藻为研究对象, 通过测定湖水中的 DIC 含量、微藻胞外碳酸酐酶活力和藻体的稳定碳同位素组成等信息, 来研究湖泊微藻的碳同位素组成对全球气候变化的响应。结果发现: 水体无机碳和微藻胞外碳酸酐酶活力是影响湖泊微藻稳定碳同位素组成变化的决定性因素。本研究所获得的认识将在全球气候变化方面具有重要意义。

关键词: 微藻; 稳定碳同位素; 碳酸酐酶

中图分类号: Q94-3; P593 文献标识码: A 文章编号: 1672-9250(2014)02-0174-05

藻类稳定碳同位素分析是研究水生态环境的重要手段之一, 现有的藻类稳定碳同位素分馏模型是建立在水体中 CO_2 浓度与藻类 $\delta^{13}\text{C}$ 值呈线性关系的基础上的^[1,2]。但, 依据这个模型在一些水体中用来验证时, 发现存在较大偏差, 甚至存在不相关的情况^[3]。这意味着还有一些重要因素未被认识, 具有较强生化动力学分馏作用的碳酸酐酶在其中可能起着重要作用。

碳酸酐酶(EC 4. 2. 1. 1) 是一种含锌的金属酶, 催化 CO_2 与 HCO_3^- 之间的快速可逆转化, 进而加快植物光合作用固定无机碳的速度^[4]。依据不同碳酸酐酶在细胞中的功能和所处的位置, 碳酸酐酶可分为质膜内和质膜外两种。

质膜内碳酸酐酶(胞内碳酸酐酶) 主要包括细胞质、叶绿体、线粒体中的碳酸酐酶。一般情况下, 胞内碳酸酐酶是过量的, 因此, 它对稳定碳同位素分馏作用的影响很小^[5,6]。

质膜外碳酸酐酶(又称胞外碳酸酐酶) 分布在质膜上, 通过金属离子与细胞壁内表面相连接, 催化细胞扩散层中碳酸氢根离子迅速水解成游离 CO_2 , 从而加快细胞的 CO_2 供应速率, 这是藻类最重要、最复杂的无机碳获取方式^[7]。胞外碳酸酐酶活性在不同微藻中差异悬殊, 相差可达几十倍、甚

至上百倍^[7]。它的强弱, 将直接影响到微藻稳定碳同位素分馏的大小^[8]。此外, 由于不同种类的微藻细胞大小、生长速率等差异, 也会产生一定的稳定碳同位素分馏作用^[9]。

从空间上来说, 在自然水体中, 由于不同地域等因素造成各种环境的差异, 不同湖泊中的微藻种群差异较大, 相应地, 它的胞外碳酸酐酶活性也存在较大差异。从时间上来说, 在同一个湖泊中, 由于不同季节的光照、温度和营养环境等因素的差异, 微藻种群也存在季节性变化, 最终也会造成不同季节的湖泊微藻胞外碳酸酐酶活性变化^[10]。总之, 湖泊微藻的胞外碳酸酐酶活性存在较大的地域差异性和季节差异性, 最终都将影响湖泊微藻的稳定碳同位素组成的变化。

1 实验材料与方法

1.1 样品采集

本研究选择在贵阳市著名的“两湖一库”: 红枫湖($\text{N}26^\circ32'20''$, $\text{E}106^\circ25'44''$)、百花湖($\text{N}26^\circ38'53''$, $\text{E}106^\circ31'12''$) 和阿哈水库($\text{N}26^\circ32'24''$, $\text{E}106^\circ39'48''$) 为研究对象, 从2010年5月到2011年4月, 连续12个月, 按月采集湖泊表层水体中的微藻样品, 并及时带回实验室做进一步处理。首先采用分级

收稿日期: 2013-04-11; 改回日期: 2013-09-25

基金项目: 国家重大科学研究计划(2013CB956701) 和国家自然科学基金项目(40973060) 。

第一作者简介: 李海涛(1982 -) 男, 博士研究生, 专业方向为微藻碳循环。E-mail: lihaitao@mails.gyig.ac.cn.

* 通讯作者: 吴沿友(1966 -) 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 专业方向: 生物地球化学。E-mail: wuyanyou@vip.skleg.cn.

过滤,去除各种杂质等。选择一部分样品用对应的湖水进行暂时培养,并及时测定碳酸酐酶活性、叶绿素含量等信息。其余部分用来做藻体碳同位素组成分析。

1.2 常规指标及测定方法

碳酸氢根离子含量的测定采用现场滴定法,叶绿素含量的测定采用分光光度法^[11]。

1.3 碳酸酐酶活力测定

碳酸酐酶活力的测定参照 Wilbur and Anderson 法^[12],并做适当改进,采用铈微电极开路电路法^[13]。具体操作如下:离心收集适量的微藻样品,用巴比妥钠缓冲液(pH=8.3, 20.0 mmol/L)悬浮细胞并定容终体积。接下来,使用电化学工作站,在0℃条件下,采用开路电位法监测该反应体系pH值的变化,同时采集电位变化过程曲线,最后用 Origin 软件将匀速变化的一段数据进行线性拟合。在测定样品的同时,交叉进行空白实验(以巴比妥钠缓冲液代替样品)。分别计算 pH 下降一个单位所需要的时间(T)。

胞外碳酸酐酶活力的计算公式为: $WAU = T/T_0 - 1$, T_0 代表空白所需要的时间, T 代表样品所需要的时间。碳酸酐酶活性单位(以叶绿素 a 计)为 $WAU/mg \text{ Chl-a}$ 。

1.4 微藻碳同位素组成的测定

离心收集藻体,接下来用适量 1.0 mol/L 盐酸浸泡微藻以去除无机碳等杂质,最后用冷冻干燥机充分干燥微藻样品。

取适量充分干燥的微藻样品和线状氧化铜丝,装入石英管,抽真空,封口,并放入马弗炉中灼烧(850℃, 5 h)。将石英管中获得的样品气体经过专用真空线装置提纯,最终将获得的高纯二氧化碳气体样品在质谱仪 MAT252 测定其 $\delta^{13}\text{C}$ 值(仪器测量精度为小于 $\pm 0.1\%$)。稳定碳同位素数据采用 PDB 标准。

所有样品都做 3 个平行,最后,使用统计软件 SPSS 19.0 对数据进行统计分析。

2 结果与讨论

2.1 湖泊水体中微藻的叶绿素含量变化

叶绿素 a 是叶绿素的主体,一般情况下,湖泊的微藻生物量常用叶绿素 a 来表示。本研究选取的三个湖泊水体中的微藻叶绿素 a 含量都存在季节性周期变化的规律(如图 1 所示),它们的最大值都出

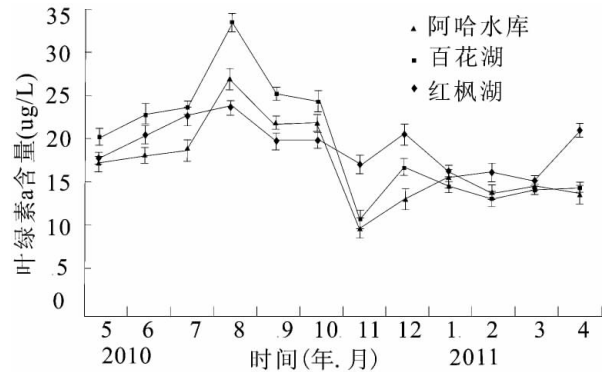


图 1 湖泊中的叶绿素 a 含量

Fig. 1 The content of chlorophyll - a in lakes

现在夏季(8月份)。

2.2 湖泊水体中的碳酸氢根离子浓度与藻体 $\delta^{13}\text{C}$ 的关系

三个湖泊中的碳酸氢根离子含量与藻体稳定碳同位素组成之间都呈现负的相关关系(如图 2),其中在两个湖泊中,相关性很好,分别是:阿哈水库($y = -0.21x - 4.03$, $R^2 = 0.88$, $P < 0.01$, $n = 12$);百花湖($y = -0.19x - 3.63$, $R^2 = 0.88$, $P < 0.01$, $n = 12$)。而在红枫湖中,碳酸氢根离子含量与其对应的藻体稳定碳同位素组成之间虽存在负相关关系,但是相关性不显著($y = -0.05x + 0.65$, $R^2 = 0.17$, $P = 0.19 > 0.05$, $n = 12$)。

三个湖泊水体中的碳酸氢根离子含量相近,且都具有相似的季节性变化规律,碳酸氢根离子最高浓度都出现在冬季,最低浓度都出现在夏季,这可能主要受温度和当地降雨量的影响^[14,15]。冬季水温低,由大气 CO_2 进入水体中的可溶性无机碳增加,再加上冬季降水稀少稀释作用弱,最终造成冬季水体中的碳酸氢根离子含量升高。随着夏季气温和水温的升高,水体可溶性无机碳大量释放到大气中,再加上大量降水所带来的稀释作用,最终造成水体中的碳酸氢根离子含量下降,同时,夏季微藻生长旺盛,光合作用大量消耗无机碳,进一步加剧了表层水体中可溶性无机碳含量的下降^[16]。

湖泊中碳酸氢根离子浓度的变化带来水体中可溶性无机碳同位素组成($\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$)的变化, $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ 具有夏季偏正,冬季偏负的特征,这跟相关研究结果一致^[16]。一方面,由于夏季气温升高,流域侵蚀增加,造成富含 ^{13}C 的无机碳进入水体的量增加;另一方面气温升高,溶于水中的大气二氧化碳减少,两者共同作用造成水体中的 $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ 偏正。相应地,藻类吸

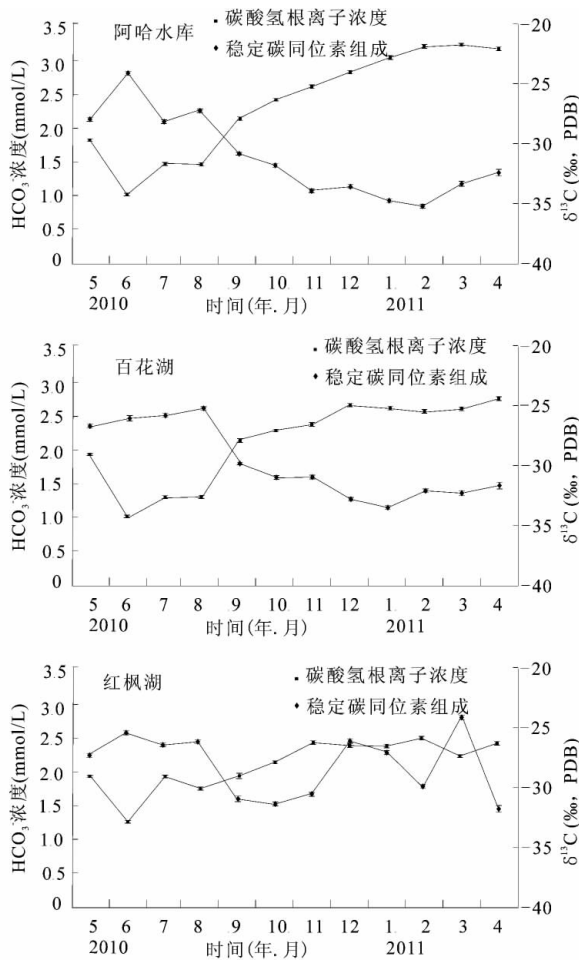


图2 湖泊中碳酸氢根离子浓度与藻体稳定碳同位素组成

Fig. 2 The content of bicarbonate in lakes and the stable carbon isotopic composition of algae

收利用偏正的 $\delta^{13}C_{DIC}$, 导致藻体 $\delta^{13}C$ 偏正。反之, 冬季藻体 $\delta^{13}C$ 偏负。因而, 水体中碳酸氢根离子浓度与藻体稳定碳同位素组成之间呈现出负的相关关系。

Laws et al (1995) 认为, 浮游生物的 $\delta^{13}C$ 与环境中的 CO_2 浓度的倒数呈负相关关系^[1], 而本研究发现微藻 $\delta^{13}C$ 与湖水中 DIC 浓度呈负相关关系。两者之间存在差异, 这主要是因为前者是从大尺度上建立起来的浮游生物的 $\delta^{13}C$ 与环境中的 CO_2 浓度之间的相关性, 忽略了短时间内无机碳的浓度变化; 而本研究是从季节变化的小尺度上建立的微藻 $\delta^{13}C$ 与湖水中 DIC 浓度之间的关系, 综合了温度等环境变化所带来的水体中无机碳含量的月变化信息。

2.3 湖泊微藻的胞外碳酸酐酶活力与藻体 $\delta^{13}C$ 的

关系

三个湖泊的微藻胞外碳酸酐酶活力都具有典型的季节性变化规律。夏季(7、8月份)的微藻胞外碳酸酐酶活力较大, 冬季(1、2月份)的微藻胞外碳酸酐酶活力很低(如图3)。同时, 不同湖泊的微藻胞外碳酸酐酶活力也具有一定的差异性, 以红枫湖的微藻胞外碳酸酐酶活力最大, 这可能跟红枫湖的微藻种群以绿藻为主, 且绿藻的胞外碳酸酐酶活力较大有关^[10]。在阿哈水库6月份的胞外碳酸酐酶活力出现剧烈变化, 这可能是由于季节变化所引起的水体中微藻种群发生剧烈变化, 正在由胞外碳酸酐酶活力较弱的种群向胞外碳酸酐酶活力较强的种群转变, 故在此时出现了一个较大波动。

由图3可以看出, 湖泊藻体 $\delta^{13}C$ 与微藻的胞外碳酸酐酶活力都具有相似的季节变化规律, 湖泊微

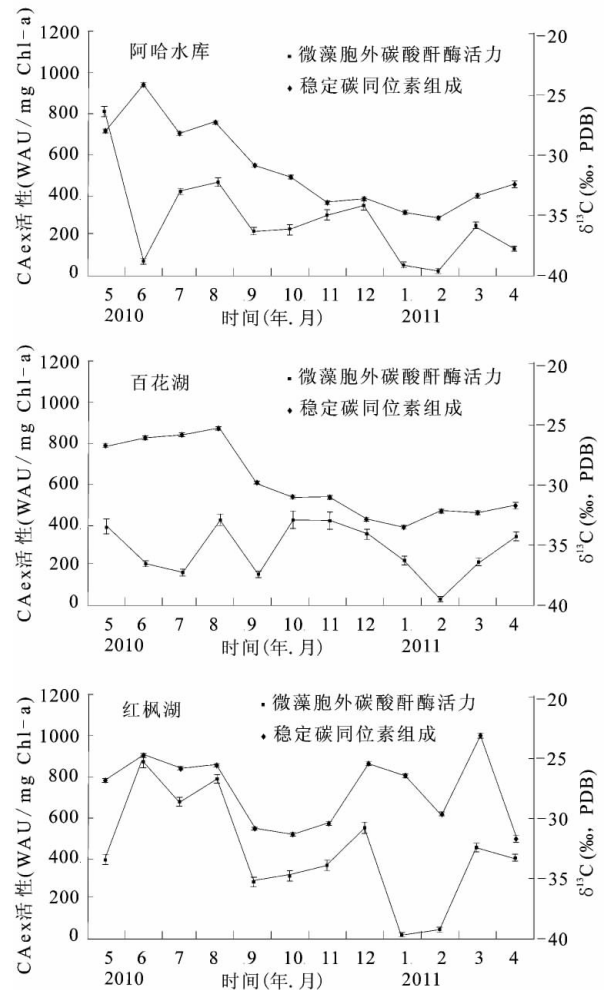


图3 湖泊中的微藻胞外碳酸酐酶活力与藻体稳定碳同位素组成

Fig. 3 The activity of CAex and the stable carbon isotope composition of algae

藻的胞外碳酸酐酶活力较高的夏季,对应的藻体 $\delta^{13}\text{C}$ 偏正;湖泊微藻的胞外碳酸酐酶活力较低的冬季,对应的藻体 $\delta^{13}\text{C}$ 偏负。因为胞外碳酸酐酶能够催化无机碳进入细胞的过程,在有足够胞外碳酸酐酶快速催化的过程中,只存在约1.1‰的稳定碳同位素分馏;而在无胞外碳酸酐酶催化的情况下,将产生约10‰的稳定碳同位素分馏^[17,18]。此外,胞外碳酸酐酶活力大小也会影响到微藻吸收无机碳过程中的稳定碳同位素分馏程度^[19]。

本研究发现:水体无机碳和碳酸酐酶胞外酶活力是影响藻体稳定碳同位素组成变化的两个重要因素,最终带来自然水体中藻体 $\delta^{13}\text{C}$ 的变化范围较大(-23.30‰~-35.08‰,PDB)。在阿哈水库和百花湖中,碳酸氢根离子浓度与藻体稳定碳同位素组成之间的相关性显著,说明水体无机碳对藻体 $\delta^{13}\text{C}$ 的影响超过了碳酸酐酶胞外酶对藻体 $\delta^{13}\text{C}$ 的影响;而红枫湖的碳酸氢根离子浓度与藻体稳定碳同位素组成之间的相关性不显著,说明碳酸酐酶胞

外酶对藻体 $\delta^{13}\text{C}$ 的影响超过了水体无机碳对藻体 $\delta^{13}\text{C}$ 的影响。

3 结 论

自然水体中微藻 $\delta^{13}\text{C}$ 受水体中DIC含量及其 $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ 的季节变化的影响,再加上微藻种群及其胞外碳酸酐酶活力的季节变化,这些因素共同叠加,造成了自然水体中微藻 $\delta^{13}\text{C}$ 的季节变化。总之,气候的季节变化是原因, $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ 的季节变化是基础,水体微藻种群变化所带来的胞外碳酸酐酶活性变化是重要因素,微藻 $\delta^{13}\text{C}$ 变化是最终表现结果。

通过本研究可以获得以下认识:在通过微藻稳定碳同位素组成来追溯古气候变化时,需要考虑较小尺度上的年内季节变化、微藻种群及其胞外碳酸酐酶活力等因素,需要筛选合适的微藻种类,获取具有代表性的典型样品,以便提高利用稳定同位素技术来辨识气候变化的精确度。

参 考 文 献

- [1] Laws E A, Popp B N, Bidigare R R, *et al.* Dependence of phytoplankton carbon isotopic composition on growth - rate and $[\text{CO}_2]_{\text{aq}}$: Theoretical considerations and experimental results [J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1995, 59: 1131 - 1138.
- [2] Popp B N, Laws E A, Bidigare RR, *et al.* Effect of phytoplankton cell geometry on carbon isotopic fractionation [J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1998, 62: 69 - 77.
- [3] Bade D L, Pace M L, Cole J J, *et al.* Can algal photosynthetic inorganic carbon isotope fractionation be predicted in lakes using existing models? [J]. *Aquatic Sciences - Research Across Boundaries*, 2006, 68: 142 - 153.
- [4] Badger M R, Price G D. The role of carbonic anhydrase in photosynthesis [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 1994, 45: 369 - 392.
- [5] Edwards G E, Mohamed A K. Reduction in carbonic anhydrase activity in zinc - deficient leaves of *phaseolus vulgaris* [J]. *Crop Science*, 1973, 13: 351 - 354.
- [6] Randall P, Bouma D. Zinc deficiency, carbonic anhydrase and photosynthesis in leaves of spinach [J]. *Plant physiology*, 1973, 52: 229 - 232.
- [7] Colman B, Huertas I E, Bhatti S, *et al.* The diversity of inorganic carbon acquisition mechanisms in eukaryotic microalgae [J]. *Functional Plant Biology*, 2002, 29: 261 - 270.
- [8] Cousins A B, Badger M R, Von Caemmerer S. Carbonic anhydrase and its influence on carbon isotope discrimination during C_4 photosynthesis. Insights from antisense RNA in *flaveria bidentis* [J]. *Plant Physiology*, 2006, 141: 232 - 242.
- [9] Burkhardt S, Riebesell U, Zondervan I. Effects of growth rate, CO_2 concentration, and cell size on the stable carbon isotope fractionation in marine phytoplankton [J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1999, 63: 3729 - 3741.
- [10] Wu Y Y, Li P P, Wang B L, *et al.* Composition and activity of external carbonic anhydrase of microalgae from karst lakes in china [J]. *Phycological Research*, 2008, 56: 76 - 82.
- [11] 丛海兵, 黄廷林, 周真明, 等. 藻类叶绿素测试新方法 [J]. *给水排水*, 2007, 33: 28 - 32.
- [12] Wilbur K M, Anderson N G. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1948, 176: 147 - 154.
- [13] 施倩倩, 吴沿友, 朱咏莉, 等. 构树与桑树叶片的碳酸酐酶胞外酶活力比较 [J]. *安徽农业科学*, 2010, 36: 8376 - 8377.
- [14] 侯继灵, 于洋. 渤海海峡冬季表层海水中溶解无机碳分布特征分析 [J]. *海洋科学*, 2012, 36: 56 - 61.

- [15] 王宝利. 高原湖泊微藻和微量金属元素的相互作用过程及实验模拟研究[D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2005.
- [16] 李干蓉. 河流梯级拦截及其浮游植物演化的碳同位素示踪[D]. 贵阳: 贵州师范大学, 2009.
- [17] Mook W, Bommerson J, Staverman W. Carbon isotope fractionation between dissolved bicarbonate and gaseous carbon dioxide [J]. *Earth and Planetary Science Letters*, 1974, 22: 169 – 176.
- [18] Marlier J F, O'Leary M H. Carbon kinetic isotope effects on the hydration of carbon dioxide and the dehydration of bicarbonate ion [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1984, 106: 5054 – 5057.
- [19] Wu Y Y, Xu Y, Li H T, *et al.* Effect of acetazolamide on stable carbon isotope fractionation in *chlamydomonas reinhardtii* and *chlorella vulgaris* [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2012, 57: 786 – 789.

Effect of Extracellular Carbonic Anhydrase on the Stable Carbon Isotopic Composition of Microalgae in Lake

LI Hai – tao^{1 2}, WU Yan – you^{1 *}, XU Ying^{1 2}

(1. State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: In this study, the Lakes Hongfeng, Baihua and Aha were studied as the research areas. We focused on the carbon isotopic composition of microalgae in response to global climate change by comparing the concentrations of the dissolved inorganic carbon (DIC), the activity of the extracellular carbonic anhydrase and the stable carbon isotope compositions in microalgae. From this study, we have got the following conclusions. Both the DIC and the activity of extracellular carbonic anhydrase were the key factors affecting the stable carbon isotopic composition of microalgae. It will be very important for the study of global climate change.

Key words: microalgae; stable carbon isotope; carbonic anhydrase