



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103074411 B

(45) 授权公告日 2014.06.04

(21) 申请号 201310001831.6

(22) 申请日 2013.01.05

(73) 专利权人 中国科学院地球化学研究所  
地址 550002 贵州省贵阳市观水路 46 号

(72) 发明人 吴沿友 谢腾祥 李海涛 杭红涛  
刘丛强 王宝利 刘莹

(74) 专利代理机构 贵阳中新专利商标事务所  
52100

代理人 吴无惧

(51) Int. Cl.

C12Q 1/02(2006.01)

(56) 对比文件

CN 102586117 A, 2012.07.18, 摘要、权利要求 1-2、9.

CN 102827916 A, 2012.12.19, 摘要、权利要求 1、说明书第 0004-0018 段.

Wu YanYou et al. effect of acetazolamide on stable carbon isotope fractionation in chlamydomonas reinhardtii and chlorella vulgaris. 《chinese science bulletin》. 2012, 第 57 卷 (第 7 期), 摘要、第 786-787 页 materials and methods、第 789 页左栏结论.

赵统. 表示稳定同位素组成中的几个常数推导及应用. 《西北地质》. 1984, 第 67-70 页.

审查员 罗洋

权利要求书 1 页 说明书 10 页

(54) 发明名称

一种微藻利用碳酸钙碳源的检测与定量方法

(57) 摘要

本发明公开一种微藻利用碳酸钙碳源的检测与定量方法, 分别添加两种  $\delta^{13}\text{C}$  值差异悬殊且晶型相同的碳酸钙粉末同时培养待测微藻, 测定不同培养时间藻体的蛋白质含量和收获后藻体稳定碳同位素组成  $\delta^{13}\text{C}$  值; 然后, 利用起始藻体的蛋白质含量和  $\delta^{13}\text{C}$  值对收获时测定的藻体  $\delta^{13}\text{C}$  值进行校正, 再利用两端元的同位素混合模型获取微藻利用来自于添加的碳酸钙碳源的份额; 利用不同培养时间藻体的蛋白质含量数据和 Redfield 值, 用指数生长方程拟合生物量随时间变化; 最后, 根据微藻利用添加的碳酸钙碳源的份额和生物量随时间变化的方程, 计算出单位生物量的被考察微藻在单位时间内获取的碳酸钙碳源的量。

1. 一种微藻利用碳酸钙碳源的检测与定量方法,其特征在于:它包括以下步骤:

第一,选择两种  $\delta^{13}\text{C}$  值差值大于 8 %且晶型相同的碳酸钙粉末作为同位素标记 1 和同位素标记 2 分别添加到培养液中来培养待测微藻,并测定起始的待测微藻的稳定碳同位素组成  $\delta^{13}\text{C}$  值和蛋白质含量  $N_0$ ;碳同位素标记 1 的碳酸钙的  $\delta^{13}\text{C}$  值为  $\delta_{c1}$ ,碳同位素标记 2 的碳酸钙的  $\delta^{13}\text{C}$  值为  $\delta_{c2}$ ;起始的待测微藻的稳定碳同位素组成  $\delta^{13}\text{C}$  值为  $\delta_0$ ;

第二,在培养过程中,测定各培养条件下不同培养时间微藻的蛋白质含量,待培养 7 至 9 天后,收获藻体,分别测定两种同位素标记的培养液培养的相对应的各培养条件下的、被考察微藻的稳定碳同位素组成  $\delta^{13}\text{C}$  的值  $\delta_{T1}^h$ 、 $\delta_{T2}^h$  和蛋白质含量  $N_1$ 、 $N_2$ ;

第三,利用起始藻体的蛋白质含量  $N_0$  和稳定碳同位素组成  $\delta^{13}\text{C}$  值  $\delta_0$  与收获时微藻的蛋白质含量  $N_1$ ,通过校正公式: $\delta_{T1}^h = (N_0/N_1) \delta_0 + (1-N_0/N_1) \delta_{T1}$  对收获时测定的藻体  $\delta^{13}\text{C}$  值  $\delta_{T1}^h$  进行校正,计算出校正后的藻体  $\delta^{13}\text{C}$  值  $\delta_{T1}$ ;

第四,通过方程  $f_B = \frac{\delta_{T1} - \delta_{T2}}{\delta_{c1} - \delta_{c2}}$ ,计算出微藻各培养条件下利用添加的碳酸钙碳源的份额  $f_B$ ;

第五,计算不同培养时间不同培养条件下两种同位素标记的培养液培养的微藻蛋白质含量的平均值,利用指数生长方程拟合微藻的蛋白质计量的生物量随时间变化,得出各培养条件下的、被考察微藻生物量  $Q_t$  随时间  $T$  变化的方程,  $Q_t = q + ae^{bt}$ , 其中  $Q_t$ :代表在时间  $T$  时以蛋白质计量的微藻生物量,  $q$ 、 $a$  和  $b$ :代表拟合参数,  $e$ : 2.7183 ; $b$  的生物学意义为单位生物量的被考察微藻在单位时间内增加的生物量;

第六,依据收获时各培养条件下微藻利用添加的碳酸钙碳源的份额  $f_B$ 、单位生物量的被考察微藻在单位时间内增加的生物量  $b$  和换算因子  $F$ ,利用公式  $d = F \cdot b \cdot f_B$ ,计算出单位质量生物量的被考察微藻在单位时间内获取的碳酸钙碳源的量  $d$ ,其中

$F = \frac{N \cdot 16\% - 5.7}{N \cdot 16\% - 29} \times 1000 = 197$  从生物学意义来说,  $F$  代表每增加单位质量的生物量增加的有

机碳含量,  $N$  代表蛋白质含量, 16% 代表蛋白质中氮元素的百分比, 5.7 代表浮游植物的碳氮比, 29 代表在浮游植物中单位氮元素对应的质量生物量, 1000 是将毫克生物量换算成克生物量。

## 一种微藻利用碳酸钙碳源的检测与定量方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种微藻利用碳酸钙碳源的检测与定量方法,属于应对气候变化和海洋生物工程领域。

### 背景技术

[0002] 在工业革命前,空气中二氧化碳的浓度仅为 280 ppmv,而现在空气中的二氧化碳的浓度达到 391 ppmv,已增加了 40%。由大气中二氧化碳的浓度增加为主导的全球变化,给全世界不仅带来生态和经济问题,也带来了政治问题。全球碳酸盐岩中的碳含量为  $5 \times 10^{21}$  mol,被认为是最大的碳库。碳酸钙又是碳酸盐岩最主要的成分,其在碳酸盐岩中所占的比例大于 50%。此外,现代深海沉积物中,碳酸钙沉积物约占 32.2%(平均值)。海洋和湖泊不仅是碳酸盐岩的产生场所,也是主要的储存库。海洋和湖泊覆盖了地球表面的 70%,含有大量的浮游植物,它贡献约 50% 的地球上的净初级生产力。因此,海洋生态系统是最重要的碳汇和碳源。

[0003] 微藻(microalgae)包括所有生活在水中营浮游生活方式的微小植物,通常就指浮游藻类。微藻结构简单,其生理过程也相对简单,有些种类是科学研究的模式植物,如:莱茵衣藻、小球藻,很多种类还可以人工培养,这为我们的研究提供了便利。

[0004] 目前海洋碳汇的估算利用的数据为大气中的二氧化碳的通量,忽视了海洋生态系统中水生生物对碳酸钙这一巨大碳库的利用,这严重影响碳汇估算的精度,导致一些应对气候变化的政策和措施的有效性降低。定量微藻对碳酸钙无机碳源的利用量将有助于科学估算碳汇,切实有效地制定应对气候变化的政策和措施,同时,也为微藻生物技术的发展和赤潮的治理提供科学依据。

### 发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是,提供一种微藻利用碳酸钙碳源的检测与定量方法,填补了碳汇估算中的空白。

[0006] 本发明采取以下技术方案:它包括以下步骤:第一,选择两种  $\delta^{13}\text{C}$  值差值大于 8‰且晶型相同的碳酸钙粉末作为同位素标记 1 和同位素标记 2 分别添加到培养液中来培养待测微藻,并测定起始的待测微藻的稳定碳同位素组成  $\delta^{13}\text{C}$  值和蛋白质含量  $N_0$ ;碳同位素标记 1 的碳酸钙的  $\delta^{13}\text{C}$  值为  $\delta_{C1}$ ,碳同位素标记 2 的碳酸钙的  $\delta^{13}\text{C}$  值为  $\delta_{C2}$ ;起始的待测微藻的稳定碳同位素组成  $\delta^{13}\text{C}$  值为  $\delta_0$ ;

[0007] 第二,在培养过程中,测定各培养条件下不同培养时间微藻的蛋白质含量,待培养 7 至 9 天后,收获藻体,分别测定两种同位素标记的培养液培养的相对应的各培养条件下的、被考察微藻的稳定碳同位素组成  $\delta^{13}\text{C}$  的值  $\delta_{T1}^h$ 、 $\delta_{T2}^h$  和蛋白质含量  $N_1$ 、 $N_2$ ;

[0008] 第三,利用起始藻体的蛋白质含量  $N_0$  和稳定碳同位素组成  $\delta^{13}\text{C}$  值  $\delta_0$  与收获时微藻的蛋白质含量  $N_i$ ,通过校正公式:  $\delta_{Ti}^h = (N_0/N_i) \delta_0 + (1-N_0/N_i) \delta_{Ti}$  对收获时测定的藻体  $\delta^{13}\text{C}$  值  $\delta_{Ti}^h$  进行校正,计算出校正后的藻体  $\delta^{13}\text{C}$  值  $\delta_{Ti}$ ;

[0009] 第四,通过方程  $f_B = \frac{\delta_{C1} - \delta_{C2}}{\delta_{C1} - \delta_{C2}}$ , 计算出微藻各培养条件下利用添加的碳酸钙碳源的份额  $f_B$ ;

[0010] 第五,计算不同培养时间不同培养条件下两种同位素标记的培养液培养的微藻蛋白质含量的平均值,利用指数生长方程拟合微藻的蛋白质计量的生物量随时间变化,得出各培养条件下的、被考察微藻生物量  $Q_T$  随时间  $T$  变化的方程,  $Q_T = q + ae^{bt}$ , 其中  $Q_T$  :代表在时间  $T$  时以蛋白质计量的微藻生物量,  $q$ 、 $a$  和  $b$  :代表拟合参数,  $e$  : 2.7183 ; $b$  的生物学意义为单位生物量的被考察微藻在单位时间内增加的生物量。

[0011] 第六,依据收获时各培养条件下微藻利用添加的碳酸钙碳源的份额  $f_B$ 、单位生物量的被考察微藻在单位时间内增加的生物量  $b$  和换算因子  $F$ ,利用公式  $d = F \cdot b \cdot f_B$ ,计算出单位质量生物量的被考察微藻在单位时间内获取的碳酸钙碳源的量  $d$ 。

[0012] 本发明的优点如下:

[0013] 微藻对水体无机碳的利用有两种方式,(1)利用大气中的二氧化碳。 $CO_2$  作为线性非极性分子,呈电中性,它可以自由扩散进入细胞双层脂膜,进入细胞中的  $CO_2$  为微藻细胞的光合作用所利用;(2)利用溶液中碳酸氢根离子。而胞外碳酸酐酶的二氧化碳(碳酸酐)可逆水合催化作用( $CO_2 + H_2O \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$ ) 在微藻对无机碳的利用中起到重要的促进作用。

[0014] 在生物的参与下,碳酸钙在海洋或湖泊中存在如下反应:



[0016] 因此,微藻完全具备利用碳酸钙中的碳的条件。前人普遍认为碳酸盐岩的风化和溶蚀既不是碳汇也不是碳源,溶解的碳酸钙很快又会沉淀下来,很少人注意到微藻能够利用碳酸钙中的碳,更没有人对微藻利用碳酸钙碳源进行定量。

[0017] 自然界中碳元素有两种稳定同位素: $^{12}C$  和  $^{13}C$ ,它们的天然平均丰度分别为 98.89% 和 1.11%。稳定碳同位素组成通常用  $\delta^{13}C(\%)$  表示,自然界中  $\delta^{13}C$  的变化为  $-90\% \sim +20\%$ 。稳定碳同位素的强烈分馏特征是识别微藻无机碳来源的基础。质量平衡原理以及同位素混合模型和化学计量学方法,是定量识别微藻无机碳来源的基础。

[0018] 本发明采取如下的思路:分别添加两种  $\delta^{13}C$  值差异悬殊且晶型相同的碳酸钙粉末同时培养待测微藻,测定不同培养时间藻体的蛋白质含量和收获后藻体稳定碳同位素组成  $\delta^{13}C$  值。然后,利用起始藻体的蛋白质含量和  $\delta^{13}C$  值对收获时测定的藻体  $\delta^{13}C$  值进行校正,再利用两端元的同位素混合模型获取微藻利用来自于添加的碳酸钙碳源的份额。接着,利用不同培养时间藻体的蛋白质含量数据,用指数生长方程拟合生物量随时间变化。最后,根据微藻利用添加的碳酸钙碳源的份额和生物量随时间变化的方程,计算出单位生物量的被考察微藻在单位时间内获取的碳酸钙碳源的量。

[0019] 获取碳酸钙碳源份额的原理:

[0020] 在不同培养条件下培养藻体,藻体的  $\delta^{13}C$  值是不同的。所以,处理培养后所测定的藻体的  $\delta^{13}C$  值是最初接种时藻体的  $\delta^{13}C$  值和培养过程中生长的藻体的  $\delta^{13}C$  值混合后的结果,而在培养过程中生长的藻体的  $\delta^{13}C$  值更能反映藻体对不同碳源的利用情况。因此,我们可以运用同位素混合模型对收获时测定的藻体的  $\delta^{13}C$  进行校正。

[0021] 其计算公式可以表示为:

$$[0022] \quad \delta_{Ti}^h = (N_0/N_i) \delta_0 + (1-N_0/N_i) \delta_{Ti} \quad (1)$$

[0023] 这里  $\delta_{Ti}^h$  为收获时测定的微藻的  $\delta^{13}C$  值,  $\delta_0$  为接种时测定的微藻的  $\delta^{13}C$  值,  $\delta_{Ti}$ :校正后的微藻的  $\delta^{13}C$  值,  $N_0$ :起始的藻体生物量,  $N_i$ :不同标记物培养下收获时藻体的生物量。

[0024] 微藻利用的无机碳源为添加的碳酸钙中的碳和除添加的碳酸钙碳源以外的无机碳。因此,可以利用两端元的同位素混合模型获取微藻利用添加的碳酸钙碳源的份额和来自于添加的碳酸钙碳源以外的无机碳源的份额。

[0025] 两端元的同位素混合模型可以表示为:

$$[0026] \quad \delta_{Ti} = \delta_{Ai} - f_{Bi} \delta_{Ai} + f_{Bi} \delta_{Bi} \quad (i=1,2,3, \dots) \quad (2)$$

[0027] 这里  $\delta_{Ti}$  为校正后的微藻的  $\delta^{13}C$  值,  $\delta_{Ai}$  为假定为微藻完全利用来自于添加的碳酸钙碳源以外的无机碳源时藻体的  $\delta^{13}C$  值,  $\delta_{Bi}$  为假定为微藻完全利用添加的碳酸钙碳源时藻体的  $\delta^{13}C$  值,  $f_{Bi}$  为该考察微藻利用添加的碳酸钙碳源所占的份额。

[0028] 很显然,只知道  $\delta_{Ti}$  很难求出  $f_{Bi}$ ,因此,本发明采用具有较大差异的  $\delta^{13}C$  值碳酸钙粉末分别同时培养微藻,以稳定碳同位素双向标记来识别微藻利用添加的碳酸钙碳源的份额。

[0029] 对于同位素标记 1 ( $i=1$ ) 来说,方程 (2) 表示如下式:

$$[0030] \quad \delta_{T1} = \delta_{A1} - f_{B1} \delta_{A1} + f_{B1} \delta_{B1} \quad (3)$$

[0031] 这里  $\delta_{T1}$  为用第一种已知  $\delta^{13}C$  值的碳酸钙粉末培养的微藻藻体校正后的  $\delta^{13}C$  值,  $\delta_{A1}$  为假定为微藻完全利用来自于添加的碳酸钙碳源以外的无机碳源时藻体的  $\delta^{13}C$  值,  $\delta_{B1}$  为假定为微藻完全利用添加的碳酸钙碳源时藻体的  $\delta^{13}C$  值,  $f_{B1}$  为该考察微藻利用添加的碳酸钙碳源所占的份额。

[0032] 对于同位素标记 2 ( $i=2$ ) 来说,方程 (2) 表示如下式:

$$[0033] \quad \delta_{T2} = \delta_{A2} - f_{B2} \delta_{A2} + f_{B2} \delta_{B2} \quad (4)$$

[0034] 这里  $\delta_{T2}$  为用第二种已知  $\delta^{13}C$  值的碳酸钙培养的微藻藻体校正后的  $\delta^{13}C$  值,  $\delta_{A2}$  为假定为微藻完全利用来自于添加的碳酸钙碳源以外的无机碳源时藻体的  $\delta^{13}C$  值,  $\delta_{B2}$  为假定为微藻完全利用添加的碳酸钙碳源时藻体的  $\delta^{13}C$  值,  $f_{B2}$  为该考察微藻利用添加的碳酸钙碳源所占的份额。

[0035] (3) 和 (4) 两个方程中  $\delta_{A1} = \delta_{A2}$ ,  $f_B = f_{B1} = f_{B2}$ , 联立求解

$$[0036] \quad f_B = \frac{\delta_{T1} - \delta_{A1}}{\delta_{B1} - \delta_{A1}} \quad (5)$$

[0037] (5) 式中  $\delta_{B1} - \delta_{A1}$  则可以换算成同位素标记 1 的碳酸钙的  $\delta^{13}C$  值  $\delta_{C1}$  与同位素标记 2 的碳酸钙的  $\delta^{13}C$  值  $\delta_{C2}$  的差,则:

$$[0038] \quad f_B = \frac{\delta_{T1} - \delta_{A1}}{\delta_{C1} - \delta_{C2}} \quad (6)$$

[0039] 因此,可以通过测定同位素标记 1 的碳酸钙的  $\delta^{13}C$  值  $\delta_{C1}$  与同位素标记 2 的碳酸钙的  $\delta^{13}C$  值  $\delta_{C2}$ ,同时测定用对应的标记的碳酸钙培养的微藻  $\delta^{13}C$  值,即测定出  $\delta_{T1}$  和  $\delta_{T2}$  值,依 (6) 式计算出该考察微藻利用添加的碳酸钙碳源所占的份额。

[0040] 生物体中的氮几乎全部存在于蛋白质当中,而蛋白质中的氮元素含量约为 16%。同时,根据经典 Redfield 值可以知道,海洋浮游植物的  $O_2:C:N:P$  普遍接近 138:106:16:1。而

浮游植物中有机质含量占了总质量的 90% 以上。这样,只要知道蛋白质的含量就可以计算出藻体的有机碳含量和生物量。

[0041] 根据不同时间微藻的生物量数据,用指数生长方程拟合生物量  $Q_T$  随时间  $T$  变化 ( $Q_T=q+ae^{bt}$ ),这里  $q$ 、 $a$  和  $b$  为方程参数,对该指数生长方程求导,则得出微藻生物量的增长速率方程,即:  $V_T=abe^{bt}$ , 这里  $V_T$  为微藻生物量的增长速率。微藻生物量的增长速率  $V_T$  与生物量  $Q_T$  成线性关系,其斜率为  $b$ ,  $b$  的生物学意义为单位生物量的被考察微藻在单位时间内增加的生物量。单位质量生物量的被考察微藻在单位时间内获取的碳酸钙碳源的量  $d$  则为单位生物量的被考察微藻在单位时间内增加的生物量  $b$  与该考察微藻中来自添加碳酸钙碳源的份额  $f_b$  和换算因子  $F$  的乘积,即:  $d= F \cdot b \cdot f_b$ 。根据经典 Redfield 值可以知道,浮游植物每增加单位质量的生物量将增加对应质量的碳。因此,  $F = \frac{N-16\%-5.7}{N-16\%-29} \times 1000 = 197$

,从生物学意义来说,  $F$  代表每增加单位质量的生物量增加的有机碳含量,  $N$  代表蛋白质含量,  $16\%$  代表蛋白质中氮元素的百分比,  $5.7$  代表浮游植物的碳氮比,  $29$  代表在浮游植物中单位氮元素对应的质量生物量,  $1000$  是将毫克生物量换算成克生物量。而上式  $F \cdot b$  的生物学意义为单位质量生物量的被考察微藻在单位时间内增加的有机碳的质量。

[0042] 本发明的优点如下:

[0043] 1) 本方法能检测和定量微藻利用碳酸钙碳源的量,填补了碳汇能力估算中的空白;

[0044] 2) 本方法不需要获取两端元的同位素  $\delta^{13}C$  的绝对值,只需测定两个同位素标记的碳酸钙的  $\delta^{13}C$  值,因此需步骤少,计算简单;

[0045] 3) 本方法需要测定参数较少,实验简单,成本低;

[0046] 4) 本方法在完全相同的实验条件下开展两组培养实验,且通过大量实验注意到碳酸钙晶型对实验结果影响的问题,因此,获取微藻利用碳酸钙碳源的量的数据更为可靠,不同藻类和不同处理下微藻利用添加碳酸钙碳源的量也具有可比性。

[0047] 本发明的实施例:第一步骤,测定不同厂家生产的碳酸钙稳定碳同位素组成  $\delta^{13}C$  值和晶型,选择两种  $\delta^{13}C$  值差值大于  $8\%$  且晶型相同的碳酸钙粉末作为同位素标记 1 和同位素标记 2 分别加到培养液中来培养待测微藻,并测定起始的待测微藻的稳定碳同位素组成  $\delta^{13}C$  值  $\delta_0$  和蛋白质含量  $N_0$ 。同位素标记的碳酸钙的  $\delta^{13}C$  值记为  $\delta_{c1}$ ,其中同位素标记 1 的碳酸钙的  $\delta^{13}C$  值为  $\delta_{c1}$ ,同位素标记 2 的碳酸钙的  $\delta^{13}C$  值为  $\delta_{c2}$ 。

## 具体实施方式

[0047] 本发明的实施例:第一步骤,测定不同厂家生产的碳酸钙稳定碳同位素组成  $\delta^{13}C$  值和晶型,选择两种  $\delta^{13}C$  值差值大于  $8\%$  且晶型相同的碳酸钙粉末作为同位素标记 1 和同位素标记 2 分别加到培养液中来培养待测微藻,并测定起始的待测微藻的稳定碳同位素组成  $\delta^{13}C$  值  $\delta_0$  和蛋白质含量  $N_0$ 。同位素标记的碳酸钙的  $\delta^{13}C$  值记为  $\delta_{c1}$ ,其中同位素标记 1 的碳酸钙的  $\delta^{13}C$  值为  $\delta_{c1}$ ,同位素标记 2 的碳酸钙的  $\delta^{13}C$  值为  $\delta_{c2}$ 。

[0048] 第二步骤,在培养过程中,测定各培养条件下不同培养时间微藻的蛋白质含量,待培养结束后,收获藻体,分别测定两种同位素标记的培养液培养的相对应的各培养条件下的、被考察微藻的稳定碳同位素组成  $\delta^{13}C$  值  $\delta_{T1}^h$  和蛋白质含量  $N_1$ ,由同位素标记 1 培养的、各培养条件下的、被考察微藻的  $\delta^{13}C$  值和蛋白质含量分别作为  $\delta_{T1}^h$  和  $N_1$ ,由同位素标记 2 培养的、相对应的培养条件下的、被考察微藻的  $\delta^{13}C$  值和蛋白质含量分别作为  $\delta_{T2}^h$  和  $N_2$ 。

[0049] 第三步骤,利用起始藻体的蛋白质含量  $N_0$  和稳定碳同位素组成  $\delta^{13}C$  值  $\delta_0$  与收获时微藻的蛋白质含量  $N_1$ ,通过校正公式:  $\delta_{T1}^h = (N_0/N_1) \delta_0 + (1-N_0/N_1) \delta_{T1}$  对收获时测定的藻体  $\delta^{13}C$  值  $\delta_{T1}^h$  进行校正,计算出校正后的藻体  $\delta^{13}C$  值  $\delta_{T1}$ ,由同位素标记 1 培养的、各培

养条件下的、被考察微藻的校正后的  $\delta^{13}\text{C}$  值为  $\delta_{T1}$ ，由同位素标记 2 培养的、相对应的培养条件下的、被考察微藻的校正后的  $\delta^{13}\text{C}$  值作为  $\delta_{T2}$ 。

[0050] 第四步骤，将  $\delta_{C1}$ 、 $\delta_{C2}$ 、 $\delta_{T1}$  和  $\delta_{T2}$  带入  $f_B = \frac{\delta_{T1} - \delta_{C2}}{\delta_{C1} - \delta_{C2}}$ ，计算出各个培养条件下被考察微藻利用添加的碳酸钙碳源的份额  $f_B$ 。

[0051] 第五步骤，计算不同培养条件下不同培养时间下两种同位素标记的培养液培养的微藻蛋白质含量的平均值，并利用指数生长方程拟合微藻的蛋白质计量的生物量  $Q_T$  随时间  $T$  变化，得出对应各培养条件下的、被考察微藻生物量随时间变化的方程， $Q_T = q + ae^{bt}$ ；

[0052] 第六步骤，依据收获时各培养条件下微藻利用添加的碳酸钙碳源的份额  $f_B$ 、单位生物量的被考察微藻在单位时间内增加的生物量  $b$  和换算因子  $F$ ，利用公式  $d = F \cdot b \cdot f_B$ ，计算出单位质量生物量的被考察微藻在单位时间内获取的碳酸钙碳源的量  $d$ 。

[0053] 不同浓度乙酰唑胺处理下衣藻利用添加碳酸钙碳源量的测定：

[0054] 培养材料为：衣藻。基本培养液采用 SE 培养基，基本培养条件为：光周期 L/D：12h/12h；温度 25℃；光照强度为  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ，pH 值 8.0（用盐酸和氢氧化钠调节）。分别添加 1g  $\delta^{13}\text{C}$  值差值大于 8‰ 且晶型相同的碳酸钙粉末到基本 SE 培养液、含有 0.1mmol/L 的胞外碳酸酐酶抑制剂乙酰唑胺 (AZ) 的 SE 培养液和含有 10mmol/L 的胞外碳酸酐酶抑制剂乙酰唑胺 (AZ) 的 SE 培养液，添加的碳酸钙的  $\delta^{13}\text{C}$  值分别为 0.34‰ (PDB) ( $\delta_{C1}$ ) 和 -15.80‰ (PDB) ( $\delta_{C2}$ )。接种藻后测定起始的衣藻藻体的  $\delta^{13}\text{C}$  值  $\delta_0$  和蛋白质生物量  $N_0$ 。在普通的盖有透气膜的培养瓶中培养衣藻，并测定各处理下不同培养时间衣藻的蛋白质含量。收获培养 7 天后的衣藻，测定不同处理下两种碳酸钙标记物分别培养的衣藻藻体的  $\delta^{13}\text{C}$  值  $\delta_{T1}^h$ 、 $\delta_{T2}^h$  和蛋白质生物量  $N_1$ 、 $N_2$  (表 1)。利用校正公式： $\delta_{T1}^h = (N_0/N_1) \delta_0 + (1 - N_0/N_1) \delta_{T1}$  对收获时测定的衣藻藻体  $\delta^{13}\text{C}$  值  $\delta_{T1}^h$  进行校正，计算出不同处理下校正后的衣藻藻体  $\delta^{13}\text{C}$  值  $\delta_{T1}$  (表 1)。再用方程  $f_B = \frac{\delta_{T1} - \delta_{C2}}{\delta_{C1} - \delta_{C2}}$ ，得出不同处理下衣藻利用添加的碳酸钙碳源的份额  $f_B$  (表 1)。

[0055]

表 1 不同处理下衣藻利用添加的碳酸钙碳源的份额  $f_B$

处理	$\delta_{T1}^h$ ‰ (PDB)	$\frac{N_0}{N_1}$	$\delta_{T1}$ ‰ (PDB)	$\delta_{T2}^h$ ‰ (PDB)	$\frac{N_0}{N_2}$	$\delta_{T2}$ ‰ (PDB)	利用添加碳酸钙碳源的份额 $f_B$
0mmol/L AZ	-19.17	0.15	-19.28	-19.36	0.12	-19.47	0.01
0.1mmol/L AZ	-19.75	0.16	-19.99	-20.20	0.16	-20.52	0.03
10mmol/L AZ	-23.31	0.18	-24.39	-27.17	0.18	-29.08	0.29

[0056] 计算不同处理不同培养时间下两种同位素标记的培养液培养的衣藻蛋白质含量的平均值，并利用指数生长方程拟合衣藻的蛋白质计量的生物量  $Q_T$  随时间  $T$  变化，得出对应各培养条件下的、被考察衣藻生物量随时间变化的方程， $Q_T = q + ae^{bt}$  (表 2)。

[0057]

表 2 衣藻生物量随时间变化的方程

处理	生物量随时间变化的方程	R <sup>2</sup>	n	P
0mmol/L AZ	$Q_t = 1.91 + 4.89e^{0.28T}$	0.99	5	0.009
0.1mmol/L AZ	$Q_t = -7.15 + 13.89e^{0.15T}$	0.99	5	0.008
10mmol/L AZ	$Q_t = -49.42 + 54.25e^{0.06T}$	0.97	5	0.027

[0058] 根据收获时各培养条件下衣藻利用添加的碳酸钙碳源的份额  $f_b$ 、单位生物量的被考察衣藻在单位时间内增加的生物量  $b$  和换算因子  $F$ ，利用公式  $d = F \cdot b \cdot f_b$ ，计算出单位质量生物量的被考察衣藻在单位时间内获取的碳酸钙碳源的量  $d$  (表 3)。

[0059]

表 3 不同处理下单位生物量的衣藻在单位时间内获取的碳酸钙碳源的量  $d$  (毫克/克·天)

处理	换算因子 $F$ (毫克/克)	单位生物量的衣藻在单位 时间内增加的生物量 $b$ (毫克/毫克·天)	利用添加的 无机碳源的 份额 $f_b$	单位生物量的衣藻在单位 时间内获取的碳酸钙碳源 的量 $d$ (毫克/克·天)
0mmol/L AZ	196	0.28	0.01	0.55
0.1mmol/L AZ	196	0.15	0.03	0.88
10mmol/L AZ	196	0.06	0.29	3.41

[0060] 低  $CO_2$  浓度胁迫和不同浓度乙酰唑胺处理下衣藻利用添加碳酸钙碳源量的测定：

[0061] 培养材料为：衣藻。基本培养液采用 SE 培养基，基本培养条件为：光周期 L/D：12h/12h；温度 25℃；光照强度为  $100\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ，pH 值 8.0 (用盐酸和氢氧化钠调节)。分别添加 1g  $\delta^{13}\text{C}$  值差值大于 8‰ 且晶型相同的碳酸钙粉末到基本 SE 培养液、含有 0.1mmol/L 的胞外碳酸酐酶抑制剂乙酰唑胺 (AZ) 的 SE 培养液和含有 10mmol/L 的胞外碳酸酐酶抑制剂乙酰唑胺 (AZ) 的 SE 培养液，添加的碳酸钙的  $\delta^{13}\text{C}$  值分别为 0.34‰ (PDB) ( $\delta_{c1}$ ) 和 -15.80‰ (PDB) ( $\delta_{c2}$ )。接种藻后测定起始的衣藻藻体的  $\delta^{13}\text{C}$  值  $\delta_0$  和蛋白质生物量  $N_0$ 。在配有除  $CO_2$  装置的培养瓶中培养待测衣藻，并测定各处理下不同培养时间衣藻的蛋白质含量。

[0062] 收获培养 7 天后的衣藻，测定不同处理下两种碳酸钙标记物分别培养的衣藻藻体的  $\delta^{13}\text{C}$  值  $\delta_{T1}^h$ 、 $\delta_{T2}^h$  和蛋白质生物量  $N_1$ 、 $N_2$  (表 4)。利用校正公式： $\delta_{T1}^h = (N_0/N_1) \delta_0 + (1 - N_0/N_1) \delta_{T1}^h$  对收获时测定的衣藻藻体  $\delta^{13}\text{C}$  值  $\delta_{T1}^h$  进行校正，计算出不同处理下校正后的衣藻

藻体  $\delta^{13}\text{C}$  值  $\delta_{Ti}$  (表 4)。再用方程  $f_b = \frac{\delta_{Ti} - \delta_{c2}}{\delta_{c1} - \delta_{c2}}$ ，得出不同处理下衣藻利用添加的碳酸钙

碳源的份额  $f_b$  (表 4)。

[0063]



表 4 不同处理下衣藻利用添加的碳酸钙碳源的份额  $f_B$ 

处理	$\delta^{13}C_{T1}\text{‰}$ (PDB)	$\frac{N_0}{N_1}$	$\delta^{13}C_{T2}\text{‰}$ (PDB)	$\delta^{13}C_{T3}\text{‰}$ (PDB)	$\frac{N_0}{N_2}$	$\delta^{13}C_{T4}\text{‰}$ (PDB)	利用添加碳酸钙碳源的份额 $f_B$
0mmol/L AZ	-12.88	0.19	-20.02	-9.81	0.20	-20.38	0.55
0.1mmol/L AZ	-12.09	0.23	-19.66	-4.93	0.22	-19.98	0.61
10mmol/L AZ	-20.89	0.20	-25.07	-21.77	0.18	-26.53	0.31

[0064] 计算不同处理不同培养时间下两种同位素标记的培养液培养的衣藻蛋白质含量的平均值, 并利用指数生长方程拟合衣藻的蛋白质计量的生物量  $Q_T$  随时间  $T$  变化, 得出对应各培养条件下的、被考察衣藻生物量随时间变化的方程,  $Q_T = q + ae^{bT}$  (表 5)。

[0065]

表 5 衣藻生物量随时间变化的方程

处理	生物量随时间变化的方程	$R^2$	n	P
0mmol/L AZ	$Q_T = -73.55 + 80.14e^{0.04T}$	0.99	5	0.015
0.1mmol/L AZ	$Q_T = -96.61 + 102.04e^{0.02T}$	1	5	0.002
10mmol/L AZ	$Q_T = -300.69 + 306.39e^{0.01T}$	1	5	0.003

[0066] 根据收获时各培养条件下衣藻利用添加的碳酸钙碳源的份额  $f_B$ 、单位生物量的被考察微衣藻在单位时间内增加的生物量  $b$  和换算因子  $F$ , 利用公式  $d = F \cdot b \cdot f_B$ , 计算出单位质量生物量的被考察衣藻在单位时间内获取的碳酸钙碳源的量  $d$  (表 6)。

[0067]

表 6 不同处理下单位生物量的衣藻在单位时间内获取的碳酸钙碳源的量  $d$  (毫克/克·天)

处理	换算因子 $F$ (毫克/克)	单位生物量的衣藻在单位时间内增加的生物量 $b$ (毫克/毫克·天)	利用添加的无机碳源的份额 $f_B$	单位生物量的衣藻在单位时间内获取的碳酸钙碳源的量 $d$ (毫克/克·天)
0mmol/L AZ	196	0.04	0.55	4.31
0.1mmol/L AZ	196	0.02	0.61	2.39
10mmol/L AZ	196	0.01	0.31	0.61

[0068] 不同浓度乙酰唑胺处理下小球藻利用添加碳酸钙碳源量的测定:

[0069] 培养材料为: 小球藻。基本培养液采用 SE 培养基, 基本培养条件为: 光周期 L/D: 12h/12h; 温度 25°C; 光照强度为  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , pH 值 8.0 (用盐酸和氢氧化钠调节)。分别添加 1g  $\delta^{13}C$  值差值大于 8% 且晶型相同的碳酸钙粉末到基本 SE 培养液、含有 0.1mmol/L 的胞外碳酸酐酶抑制剂乙酰唑胺 (AZ) 的 SE 培养液和含有 10mmol/L 的胞外碳酸酐酶抑制剂乙酰唑胺 (AZ) 的 SE 培养液, 添加的碳酸钙的  $\delta^{13}C$  值分别为 0.34‰ (PDB) ( $\delta_{c1}$ ) 和 -15.80‰ (PDB) ( $\delta_{c2}$ )。接种藻后测定起始的小球藻藻体的  $\delta^{13}C$  值  $\delta_0$  和蛋白质生物量  $N_0$ 。在普通的盖有透气膜的培养瓶中培养小球藻, 并测定各处理下不同培养时间小球藻

的蛋白质含量。收获培养 7 天后的小球藻,测定不同处理下两种碳酸钙标记物分别培养的小球藻藻体的  $\delta^{13}\text{C}$  值  $\delta^{h_{T1}}$ 、 $\delta^{h_{T2}}$  和蛋白质生物量  $N_1$ 、 $N_2$  (表 7)。利用校正公式： $\delta^{h_{T1}} = (N_0/N_i) \delta_{0+} + (1-N_0/N_i) \delta_{T1}$  对收获时测定的小球藻体  $\delta^{13}\text{C}$  值  $\delta^{h_{T1}}$  进行校正,计算出不同处理下校正后的小球藻体  $\delta^{13}\text{C}$  值  $\delta_{T1}$  (表 7)。再用方程  $f_B = \frac{\delta_{T1} - \delta_{T2}}{\delta_{C1} - \delta_{C2}}$ , 得出不同处理下小球藻利用添加的碳酸钙碳源的份额  $f_B$  (表 7)。

[0070]

表 7 不同处理下小球藻利用添加的碳酸钙碳源的份额  $f_B$

处理	$\delta^{h_{T1}}/‰$ (PDB)	$\frac{N_0}{N_1}$	$\delta_{T1}/‰$ (PDB)	$\delta^{h_{T2}}/‰$ (PDB)	$\frac{N_0}{N_2}$	$\delta_{T2}/‰$ (PDB)	利用添加碳酸钙碳源的份额 $f_B$
0mmol/LAZ	-22.22	0.29	-21.52	-22.05	0.28	-21.33	-0.01
0.1mmol/LAZ	-22.74	0.42	-21.88	-22.41	0.30	-21.75	-0.01
10mmol/LAZ	-27.06	0.42	-29.35	-28.47	0.42	-31.68	0.15

[0071] 计算不同处理不同培养时间下两种同位素标记的培养液培养的小球藻蛋白质含量的平均值,并利用指数生长方程拟合小球藻的蛋白质计量的生物量  $Q_T$  随时间 T 变化,得出对应各培养条件下的、被考察小球藻生物量随时间变化的方程,  $Q_T = q + ae^{bT}$  (表 8)。

[0072]

表 8 小球藻生物量随时间变化的方程

处理	生物量随时间变化的方程	$R^2$	n	P
0mmol/L AZ	$Q_T = 5.47 + 9.87e^{0.22T}$	1	5	0.001
0.1mmol/LAZ	$Q_T = 15.63 + 0.89e^{0.45T}$	0.98	5	0.022
10mmol/LAZ	$Q_T = 17.60e^{0.10T}$	0.95	5	0.046

[0073] 根据收获时各培养条件下小球藻利用添加的碳酸钙碳源的份额  $f_B$ 、单位生物量的被考察小球藻在单位时间内增加的生物量 b 和换算因子 F,利用公式  $d = F \cdot b \cdot f_B$ ,计算出单位质量生物量的被考察小球藻在单位时间内获取的碳酸钙碳源的量 d (表 9)。

[0074]

表 9 在不同处理下单位生物量的小球藻在单位时间内获取的碳酸钙碳源的量 d (毫克/克·天)

处理	换算因子 F (毫克/克)	单位生物量的小球藻在 单位时间内增加的生物 量 b (毫克/毫克·天)	利用添加的 无机碳源的 份额 $f_B$	单位生物量的小球藻在单 位时间内获取的碳酸钙碳 源的量 d (毫克/克·天)
0mmol/L AZ	196	0.22	0.00	0.00
0.1mmol/LAZ	196	0.45	0.00	0.00
10mmol/LAZ	196	0.10	0.15	2.94

[0075] 低  $\text{CO}_2$  浓度胁迫和不同浓度乙酰唑胺处理下小球藻利用添加碳酸钙碳源量的测定:

[0076] 培养材料为:小球藻。基本培养液采用 SE 培养基,基本培养条件为:光周期 L/

D:12h/12h;温度 25℃;光照强度为  $100\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , pH 值 8.0 (用盐酸和氢氧化钠调节)。分别添加 1g  $\delta^{13}\text{C}$  值差值大于 8 ‰且晶型相同的碳酸钙粉末到基本 SE 培养液、含有 0.1mmol/L 的胞外碳酸酐酶抑制剂乙酰唑胺 (AZ) 的 SE 培养液和含有 10mmol/L 的胞外碳酸酐酶抑制剂乙酰唑胺 (AZ) 的 SE 培养液,添加的碳酸钙的  $\delta^{13}\text{C}$  值分别为 0.34 ‰ (PDB) ( $\delta_{c1}$ ) 和 -15.80‰ (PDB) ( $\delta_{c2}$ )。接种藻后测定起始的小球藻藻体的  $\delta^{13}\text{C}$  值  $\delta_0$  和蛋白质生物量  $N_0$ 。在配有除  $\text{CO}_2$  装置的培养瓶中培养待测小球藻,并测定各处理下不同培养时间小球藻的蛋白质含量。收获培养 7 天后的小球藻,测定不同处理下两种碳酸钙标记物分别培养的小球藻藻体的  $\delta^{13}\text{C}$  值  $\delta_{T1}^h$ 、 $\delta_{T2}^h$  和蛋白质生物量  $N_1$ 、 $N_2$  (表 10)。利用校正公式:  $\delta_{T1}^h = (N_0/N) \delta_0 + (1-N_0/N) \delta_{T1}$  对收获时测定的小球藻体  $\delta^{13}\text{C}$  值  $\delta_{T1}^h$  进行校正,计算出不同处理下校正后的小球藻体  $\delta^{13}\text{C}$  值  $\delta_{T1}$  (表 10)。再用方程  $f_B = \frac{\delta_{T1} - \delta_{c2}}{\delta_{c1} - \delta_{c2}}$ , 得出不同处理下小球藻利用添加的碳酸钙碳源的份额  $f_B$  (表 10)。

[0077]

表 10 不同处理下小球藻利用添加的碳酸钙碳源的份额  $f_B$

处理	$\delta_{T1}^h$ ‰ (PDB)	$\frac{N_0}{N_1}$	$\delta_{T1}$ ‰ (PDB)	$\delta_{T2}^h$ ‰ (PDB)	$\frac{N_0}{N_2}$	$\delta_{T2}$ ‰ (PDB)	利用添加碳酸钙 碳源的份额 $f_B$
0mmol/LAZ	-20.09	0.41	-17.38	-20.16	0.39	-17.72	0.02
0.1mmol/LAZ	-20.59	0.44	-18.02	-20.28	0.39	-17.95	0.00
10mmol/LAZ	-26.52	0.44	-28.59	-29.18	0.37	-32.30	0.19

[0078] 计算不同处理不同培养时间下两种同位素标记的培养液培养的小球藻蛋白质含量的平均值,并利用指数生长方程拟合小球藻的蛋白质计量的生物量  $Q_T$  随时间 T 变化,得出对应各培养条件下的、被考察小球藻生物量随时间变化的方程,  $Q_T = q + ae^{bT}$  (表 11)。

表 11 小球藻生物量随时间变化的方程

处理	生物量随时间变化的方程	$R^2$	n	P
[0079] 0mmol/L AZ	$Q_T = 6.65 + 9.31e^{0.17T}$	0.99	5	0.008
0.1mmol/LAZ	$Q_T = -96.90 + 113.17e^{0.027T}$	0.96	5	0.039
10mmol/LAZ	$Q_T = -6.93 + 23.51e^{0.087T}$	0.96	5	0.040

[0080] 根据收获时各培养条件下小球藻利用添加的碳酸钙碳源的份额  $f_B$ 、单位生物量的被考察小球藻在单位时间内增加的生物量 b 和换算因子 F,利用公式  $d = F \cdot b \cdot f_B$ ,计算出单位质量生物量的被考察小球藻在单位时间内获取的碳酸钙碳源的量 d (表 12)。

[0081]

表 12 在不同处理下单位生物量的小球藻在单位时间内获取的碳酸钙碳源的量(毫克/克·天)

处理	换算因子 F (毫克/克)	单位生物量的小球藻在 单位时间内增加的生物 量 b (毫克/毫克·天)	利用添加的 无机碳源的 份额 $f_b$	单位生物量的小球藻在单 位时间内获取的碳酸钙碳 源的量 d (毫克/克·天)
0mmol/L AZ	196	0.17	0.02	0.67
0.1mmol/L AZ	196	0.02	0.00	0.00
10mmol/L AZ	196	0.08	0.19	2.98

[0082] 应用效果：

[0083] 综上所述可以看出,在无乙酰唑胺处理的培养条件下,单位时间每增加单位质量的衣藻对碳酸钙碳源的利用量大于小球藻对碳酸钙碳源的利用量。这与衣藻胞外碳酸酐酶活力大于小球藻的胞外碳酸酐酶活力的事实相符。同时,对同种藻体而言,在低  $\text{CO}_2$  浓度胁迫的条件下单位时间每增加单位质量的微藻对碳酸钙碳源的利用量普遍大于在高  $\text{CO}_2$  浓度条件下微藻对碳酸钙碳源的利用量。这与低  $\text{CO}_2$  浓度下微藻可用的大气  $\text{CO}_2$  较少而被迫利用碳酸钙碳源的事实相符。此外,当无低  $\text{CO}_2$  浓度胁迫时,在高浓度的胞外碳酸酐酶抑制剂 AZ (10mmol/L) 作用的情况下单位时间每增加单位质量的微藻对碳酸钙碳源的利用量大于低浓度的胞外碳酸酐酶抑制剂 AZ 或者无胞外碳酸酐酶抑制剂 AZ 作用的情况下微藻对碳酸钙碳源的利用量。这与在高浓度的胞外碳酸酐酶抑制剂 AZ (10mmol/L) 作用下,微藻的胞外碳酸酐酶活性几乎全部丧失,使得微藻不能通过胞外碳酸酐酶的水合催化作用来利用大气中的  $\text{CO}_2$ ,从而降低了微藻对大气  $\text{CO}_2$  的利用量的事实相符。在本发明的实施例中,小球藻出现了两个碳酸钙碳源利用份额为负值的情况,这是因为此时的小球藻对碳酸钙碳源利用量较少,实验误差导致这些值微弱地偏负,因此,在对其利用碳酸钙碳源利用量的计算中将其校正为 0。总之,以上众多结论都能表明本发明所发明的微藻利用碳酸钙碳源的定量检测方法是可信的。