

赵丽华, 吴沿友, 谢腾祥, 等. 微藻 CO<sub>2</sub> 同化过程的稳定碳同位素分馏值[J]. 中国岩溶, 2016, 35(4): 357-362.  
DOI:10.11932/karst20160402

## 微藻 CO<sub>2</sub> 同化过程的稳定碳同位素分馏值

赵丽华<sup>1,2</sup>, 吴沿友<sup>1</sup>, 谢腾祥<sup>1,2</sup>, 李海涛<sup>1,2</sup>, 张开艳<sup>1,2</sup>, 杭洪涛<sup>1,2</sup>

(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, 贵州 贵阳 550002;

2. 中国科学院大学地球科学学院, 北京 100039)

**摘 要:** 研究微藻 CO<sub>2</sub> 同化过程中的碳同位素分馏值, 对研究微藻在碳效应过程中的作用具有重要意义。目前还没有获取微藻 CO<sub>2</sub> 同化过程的稳定碳同位素分馏值的在体实验方法。文章以莱茵衣藻、蛋白核小球藻、及野外红枫湖混合藻三种岩溶湖泊微藻为例, 利用双向标记建立了能在体获得此分馏值的方法, 并通过此分馏值定量了微藻的各种无机碳利用途径份额。获得各自 CO<sub>2</sub> 同化过程中的碳同位素分馏值分别为 15.3‰、14.8‰、21.7‰。三种藻分馏值差异主要与藻的种类及其细胞体积大小有关。利用此分馏值计算出衣藻、小球藻、混合藻自然培养下的碳酸氢根离子途径利用份额分别为 100%、81.1%、97.8%, 表明了生长在岩溶湖泊的微藻利用无机碳的途径主要为碳酸氢根离子。

**关键词:** 微藻; 稳定碳同位素分馏值; 无机碳利用; 碳酸氢根离子

中图分类号: P642.25; P593

文献标识码: A

文章编号: 1001-4810(2016)04-0357-06

### 0 引 言

微藻(microalgae)是指所有生活在水中采取浮游生活方式的微小植物,通常指浮游藻类。微藻在同化二氧化碳(CO<sub>2</sub>)成藻体形成碳汇时,发生稳定碳同位素分馏,不同藻体因为大小、结构等的差异,其分馏值明显不同。微藻在 CO<sub>2</sub> 同化过程中产生稳定碳同位素分馏,包括:① CO<sub>2</sub> 经自由扩散进入细胞双层脂膜<sup>[1]</sup>,进入细胞内为微藻光合作用利用所产生的碳同位素分馏;②作为水体 CO<sub>2</sub> 储存库的碳酸氢根离子(HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>)被微藻直接利用或间接利用<sup>[1-4]</sup>所产生的碳同位素分馏。同化过程中,CO<sub>2</sub> 通过扩散作用进入微藻细胞发生的质量差异的碳同位素分馏与光合羧化阶段发生的生化动力学稳定碳同位素分馏,以及在 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 被微藻利用的过程中,通过碳酸酐酶(CA)催化的细胞区室化和生化代谢的偶联反应所产生稳定碳同位素分馏<sup>[5]</sup>等过程,都影响微藻同化过程中的稳

定碳同位素分馏值。

了解不同微藻在 CO<sub>2</sub> 同化过程中的稳定碳同位素分馏值,对分析水体微藻的种群结构、定量微藻不同类型的碳汇具有重要的意义。Farquhar 等<sup>[6]</sup>通过步骤分析提出植物体内的碳同位素分馏值的计算方法,由于涉及每个过程中系数的估算,导致此方法计算出的分馏值与实际分馏值存在一定误差。本文采用的获取微藻 CO<sub>2</sub> 同化过程中的稳定碳同位素分馏值的方法,弥补了前人对碳同位素分馏值计算方法的繁琐以及精确度不高的缺点,能在体(in vivo)确定稳定碳同位素分馏值,获得单个微藻种及混合藻的稳定碳同位素分馏值。通过此分馏值,建立了微藻的各种无机碳利用途径份额的计算方法,与 pH 漂移、无机碳平衡动力、同位素分馏效应及光谱分析等方法相比<sup>[7]</sup>,能成功定量并区分微藻的不同途径无机碳的利用份额。

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973)专题“岩溶植被及微藻碳源利用策略及份额估算(2013CB956701)”

第一作者简介:赵丽华(1992-),女,硕士研究生,现主要从事环境生物地球化学等研究工作。E-mail: zhaolihua@mail.gyig.ac.cn.

通讯作者:吴沿友(1966-),男,博士,研究员,博士生导师,主要从事生态环境和环境地球化学等研究工作。E-mail: wuyanyou@mail.gyig.ac.cn

收稿日期:2016-03-29

# 1 研究方法和内容

## 1.1 培养材料与实验设置

培养材料:莱茵衣藻、蛋白核小球藻和红枫湖中提取的混合微藻。基本培养基为去除土壤提取液的 SE 培养基<sup>[23]</sup>,光周期 L/D:12 h/12 h;温度 25 °C;光照强度为 100 μmol · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup>;通过添加少量 NaOH 或 HCl 调节初始 pH 值为 8.2。

实验设置:在基本培养液中分别添加稳定碳同位素值 δ<sup>13</sup>C 为 -17.4‰ (PDB)和 -28.4‰ (PDB)的碳酸氢钠(NaHCO<sub>3</sub>)及乙酰唑胺(AZ,含 1, 3, 4-噻二唑环的杂环磺酰胺类碳酸酐酶胞外酶抑制剂,是能够专一地抑制碳酸酐酶胞外酶的碳酸酐酶胞外酶抑制剂<sup>[9]</sup>)进行实验处理,图 1 为实验设置示意图。在实验设置中,16 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>和 10 mmol/L AZ 浓度下,莱茵衣藻、蛋白核小球藻依赖于胞外碳酸酐酶的碳酸氢根离子的间接转运途径和碳酸氢根离子的直接转运途径将同时被完全抑制<sup>[8]</sup>,20 mmol/L 碳酸氢钠和 10 mmol/L AZ 浓度下,混合微藻的碳酸氢根离子转运途径被完全抑制<sup>[8]</sup>,可根据方法 1.2 定量微藻 CO<sub>2</sub>同化过程中稳定碳同位素分馏值(Δ),并

利用此分馏值计算出衣藻、小球藻、混合藻自然培养下的碳酸氢根离子途径利用份额(f<sub>bi</sub>)。具体实验设置如表 1。

表 1 定量微藻 CO<sub>2</sub>同化过程中稳定碳同位素分馏值的实验设置

Table 1 The experiment treatments of calculation of the fractionation value

编号	样品	NaHCO <sub>3</sub> /mmol/L	AZ/mmol/L
1	莱茵衣藻	16	10
2		0	0
3	蛋白核小球藻	16	10
4		0	0
5	混合微藻	20	10
6		0	0

以上处理均需测定待测微藻的起始生物量 M<sub>0</sub>和微藻的起始稳定碳同位素组成 δ<sup>13</sup>C 的值 δ<sub>0</sub>。将待测微藻在添加同位素标记的检测培养液中培养 4 天后,测定待测微藻的最终生物量 M<sub>N</sub>和两种同位素标记的检测培养液培养的被考察微藻的稳定碳同位素组成 δ<sup>13</sup>C 的值 δ<sub>S1</sub>和 δ<sub>S2</sub>。

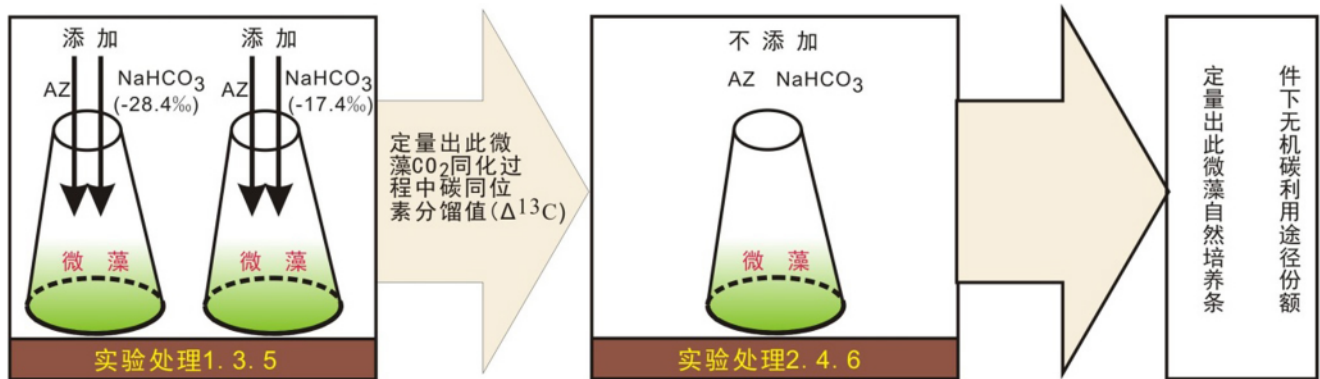


图 1 实验设置示意图

Fig.1 sketch of experimental treatments

## 1.2 研究方法的建立

### 1.2.1 两端元的同位素混合模型

微藻对两种无机碳利用途径的不同造成同位素分馏差异明显。利用大气中的二氧化碳途径可造成最大的同位素分馏(Δ)。碳酸氢根离子的直接转运和依赖于胞外碳酸酐酶的碳酸氢根离子的间接转运途径造成的同位素分馏比利用大气中的 CO<sub>2</sub>途径造成同位素分馏小 9‰(PDB)<sup>[8]</sup>。

微藻可以利用大气的无机碳和添加的无机碳,且对于每一种来源的无机碳都存在 CO<sub>2</sub>和 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>两种利用途径,故建立如下两端元的同位素混合模型:

$$\begin{aligned}
 \delta_{Ti} &= (1 - f_{Bi})\delta_{TA} + f_{Bi}\delta_{TB} \\
 &= (1 - f_{Bi})[(1 - f_{bi})(\delta_{air} - \Delta) + f_{bi}(\delta_{air} - \Delta + 9‰)]\delta_{TA} + \\
 & f_{Bi}[(1 - f_{bi})(\delta_{Ci} - \Delta) + f_{bi}(\delta_{Ci} - \Delta + 9‰)]\delta_{TB} \quad (i=1, 2) \quad (1)
 \end{aligned}$$

$\delta_{TA}$ 是指微藻利用大气来源的无机碳,包括 CO<sub>2</sub> 和 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 这两种利用途径; $\delta_{TB}$ 是指微藻利用添加的碳酸氢钠来源的无机碳,同样包括 CO<sub>2</sub> 和 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 这两种利用途径。 $\delta_{Ti}$ 为添加已知  $\delta^{13}C$  的某一碳酸氢钠培养的微藻藻体的  $\delta^{13}C$  值; $f_{Bi}$ 为微藻利用添加的无机碳占总碳源的份额; $(1-f_{Bi})$ 为微藻利用大气 CO<sub>2</sub> 占总碳源的份额; $f_{bi}$ 为微藻利用碳酸氢根离子途径; $(1-f_{bi})$ 为微藻 CO<sub>2</sub> 利用途径份额。 $\delta_{air}$ 、 $\Delta$ 以及  $\delta_{Ci}$  分别为环境中大气 CO<sub>2</sub> 的平均稳定碳同位素组成  $\delta^{13}C$  的值、CO<sub>2</sub> 同化过程中的稳定碳同位素分馏值以及同位素标记的碳酸氢钠的  $\delta^{13}C$  值。

### 1.2.2 微藻利用添加的碳酸盐所占总碳源的份额 ( $f_B$ )

在相同培养条件下,同一种微藻利用添加的碳酸盐所占总碳源的份额是相同的,由此可以得到: $f_{B1} = f_{B2} = f_B$ ;相同培养条件下,同一种微藻利用碳酸氢根离子途径所占的份额也是相同的,由此可以得到: $f_{b1} = f_{b2} = f_b$ 。通过添加不同同位素组成碳酸氢钠,同位素标记 1 的碳酸氢钠的  $\delta^{13}C$  值为  $\delta_{C1}$ ,同位素标记 2 的碳酸氢钠的  $\delta^{13}C$  值为  $\delta_{C2}$ ,建立如下关系:

$$\delta_{T1} = (1-f_{B1}) [(1-f_{b1})(\delta_{air} - \Delta) + f_{b1}(\delta_{air} - \Delta + 9\%)] + f_{B1} [(1-f_{b1})(\delta_{C1} - \Delta) + f_{b1}(\delta_{C1} - \Delta + 9\%)] \quad (2)$$

$$\delta_{T2} = (1-f_{B2}) [(1-f_{b2})(\delta_{air} - \Delta) + f_{b2}(\delta_{air} - \Delta + 9\%)] + f_{B2} [(1-f_{b2})(\delta_{C2} - \Delta) + f_{b2}(\delta_{C2} - \Delta + 9\%)] \quad (3)$$

由方程(2)与方程(3)做差、化简可得:

$$f_B = (\delta_{T1} - \delta_{T2}) / (\delta_{C1} - \delta_{C2}) \quad (4)$$

定量出微藻利用添加的重碳酸盐所占总碳源的份额<sup>[8]</sup>。

### 1.2.3 微藻 CO<sub>2</sub> 同化过程中的稳定碳同位素分馏值的确定方法

在高浓度碳酸氢钠和 10 mmol/L AZ 的作用下,依赖于胞外碳酸酐酶的碳酸氢根离子的间接转运途径和碳酸氢根离子的直接转运途径将同时被完全抑制<sup>[8]</sup>,所以

$$f_{b1} = f_{b2} = f_b = 0 \quad (5)$$

这样,此时的(2)和(3)式可分别简化成:

$$\Delta = \delta_{air} + f_B \delta_{C1} - \delta_{T1} - f_B \delta_{air} \quad (6)$$

$$\Delta = \delta_{air} + f_B \delta_{C2} - \delta_{T2} - f_B \delta_{air} \quad (7)$$

$\delta_{Ti}$ 为添加第一种已知  $\delta^{13}C$  的碳酸氢钠培养的微藻藻体的  $\delta^{13}C$  值; $\delta_{T2}$ 为添加第二种已知  $\delta^{13}C$  的碳酸氢钠培养的微藻藻体的  $\delta^{13}C$  值;培养 4 天后的微藻藻体的  $\delta^{13}C$  值,并不完全是新生成的藻体的  $\delta^{13}C$ ,而是含有培养时的原始藻体加新生成的藻体的综合  $\delta^{13}C$  值,因此,为了获取新生成的藻体的  $\delta^{13}C$  值  $\delta_{Ti}$  或  $\delta_{T2}$ ;建立了如下方程:

$$\delta_O + (P-1) \times \delta_{Ti} = P \times \delta_{Si} \quad (8)$$

$P$ 为微藻增值倍数; $P = \text{实验处理后的微藻生物量}(M_N) / \text{初始接种时的微藻生物量}(M_O)$ (一般采用蛋白质数据来表征生物量);

$\delta_O$ 为初始接种的微藻藻体碳同位素组成( $\delta^{13}C$ ); $\delta_{Si}$ 为实验处理后的微藻藻体碳同位素组成( $\delta^{13}C$ )( $i=1,2$ ); $\delta_{Ti}$ 为实验处理新生成的藻体碳同位素组成( $\delta^{13}C$ )( $i=1,2$ )。

(8)式变形后为:

$$\delta_{Ti} = (P\delta_{Si} - \delta_O) / (P-1) \quad (i=1,2) \quad (9)$$

知道了  $\delta_{Ti}$ 、 $\delta_{Ci}$  以及培养期间培养环境中大气 CO<sub>2</sub> 平均碳同位素组成  $\delta^{13}C$  的值  $\delta_{air}$ ,由(6)和(7)式计算微藻 CO<sub>2</sub> 同化过程中的碳同位素分馏值  $\Delta$ 。而培养环境中大气 CO<sub>2</sub> 的平均碳同位素组成  $\delta^{13}C$  的值  $\delta_{air}$ 可根据双向标记培养植物测定大气 CO<sub>2</sub> 稳定碳同位素组成的方法<sup>[10]</sup>获得。

### 1.2.4 微藻利用不同形态无机碳的途径份额计算方法

$$\begin{aligned} \delta_{Ti} &= (1-f_{Bi})\delta_{TA} + f_{Bi}\delta_{TB} \\ &= (1-f_{Bi})[(1-f_{bi})(\delta_{air} - \Delta) + f_{bi}(\delta_{air} - \Delta + 9\%)] + \\ & f_{Bi}[(1-f_{bi})(\delta_{Ci} - \Delta) + f_{bi}(\delta_{Ci} - \Delta + 9\%)] \quad (i=1,2) \end{aligned}$$

将(1)式化简可得:

$$f_{bi} = [f_{Bi}(\delta_{Ci} - \delta_{air}) + (\Delta + \delta_{Ti} - \delta_{air})] / 9\% \quad (10)$$

由(6)和(7)式计算微藻 CO<sub>2</sub> 同化过程中的稳定碳同位素分馏值  $\Delta$ 和培养环境中大气 CO<sub>2</sub> 的平均稳定碳同位素组成  $\delta_{air}$ 即可求得微藻利用不同形态无机碳的途径份额。

## 2 结果及分析

### 2.1 微藻 CO<sub>2</sub> 同化过程中的稳定碳同位素分馏值 $\Delta$

实验处理 1、3、5 的实验结果见表 2,莱茵衣藻、蛋白核小球藻及混合微藻依赖于胞外碳酸酐酶的碳酸氢根离子的间接转运途径和碳酸氢根离子的直接

转运途径被完全抑制,根据实验结果及本文的计算方法(详见 1.2),可以计算出三种微藻莱茵衣藻和蛋白核小球藻以及混合微藻新生藻体稳定碳同位素,并定量出微藻  $\text{CO}_2$  同化过程中的稳定碳同位素分馏值( $\Delta$ )(表 3)。

表 2 不同处理下的微藻  $\delta^{13}\text{C}$  值Table 2 The  $\delta^{13}\text{C}$  values of the microalgae under different treatments

编号	样品	$\delta_0/\text{‰}$	$\delta_{s1}/\text{‰}$	$\delta_{s2}/\text{‰}$	p	$\delta_{\text{air}}/\text{‰}$
		PDB	PDB	PDB		PDB
1	莱茵衣藻	-23.0	-29.5	-33.9	4.34	-14.6
3	蛋白核小球藻	-22.7	-28.9	-33.3	4.16	-14.6
5	混合微藻	-27.3	-33.4	-36.0	2.53	-14.6

表 3 微藻  $\text{CO}_2$  同化过程中的稳定碳同位素分馏值  $\Delta$ Table 3 Stable carbon isotope fractionation( $\delta^{13}\text{C}$ ) on  $\text{CO}_2$  assimilation of microalgae

编号	样品	$\delta_{\text{T1}}/\text{‰}$	$\delta_{\text{T2}}/\text{‰}$	$f_{\text{B}}$	$\Delta_1/\text{‰}$	$\Delta_2/\text{‰}$
		PDB	PDB		PDB	PDB
1	莱茵衣藻	-31.4	-37.2	0.527	15.3	15.3
3	蛋白核小球藻	-30.9	-36.7	0.527	14.8	14.8
5	混合微藻	-37.4	-41.7	0.390	21.7	21.7

由表 3 可知,莱茵衣藻、蛋白核小球藻及野外红枫湖混合藻三种岩溶湖泊微藻的  $\text{CO}_2$  同化过程中的稳定碳同位素分馏值分别为 15.3‰、14.8‰ 和 21.7‰。此结果与前人研究的  $\text{CO}_2$  同化过程中的稳定碳同位素分馏值<sup>[11-12]</sup>结果相符。莱茵衣藻的分馏值比蛋白核小球藻大。此结果一方面与莱茵衣藻细胞体积比蛋白核小球藻大有关,藻类细胞体积越大,同位素分馏反应过程阻力越大和反应时间越充分,分馏值越大;另一方面与微藻胞外碳酸酐酶活性有关,根据微藻碳酸酐酶的催化与  $\text{CO}_2$  同化过程的相互耦合,衣藻胞外碳酸酐酶活性大于小球藻胞外碳酸酐酶活力<sup>[13]</sup>与衣藻的稳定碳同位素分馏值大于蛋白核小球藻的呈现一定相关性。红枫湖中混合微藻同化过程的稳定碳同位素分馏值比莱茵衣藻和蛋白核小球藻大,与混合微藻的微藻种类有关,红枫湖微藻以绿藻、蓝藻和硅藻为主<sup>[14-17]</sup>,几乎所有硅藻种都以壳环带套合形成硅质细胞壁,厚的细胞壁造成  $\text{CO}_2$  进入

硅藻细胞受到的阻力较大,使得硅藻具有较大碳同位素分馏,导致混合微藻分馏值远大于来茵衣藻和蛋白核小球藻。

## 2.2 微藻在自然培养条件下的无机碳利用途径的份额

实验处理 2、4、6 中,莱茵衣藻、蛋白核小球藻以及混合微藻在无外源添加  $\text{NaHCO}_3$  培养条件下,三种微藻新生藻体稳定碳同位素组成  $\delta^{13}\text{C}$  结果如表 4 中  $\delta_{\text{T}}$  值,由于没有额外添加  $\text{NaHCO}_3$ ,故  $f_{\text{B}}$  值为零。根据上述微藻  $\text{CO}_2$  同化过程中的稳定碳同位素分馏值( $\Delta$ )的计算结果,可以计算出自然培养条件下的微藻无机碳利用途径份额值  $f_{\text{b}}$ (详见 1.2.4),见表 4。

表 4 微藻的无机碳利用份额

Table 4 inorganic carbon utilization of microalgae

编号	样品	$\delta_{\text{T}}/\text{‰}$	$\Delta/\text{‰}$	$\delta_{\text{air}}/\text{‰}$	$f_{\text{b}}$
		PDB	PDB	PDB	
2	莱茵衣藻	$-20.3 \pm 0.1$	15.3	-14.6	1(1.067)
4	蛋白核小球藻	$-22.1 \pm 0.2$	14.8	-14.6	0.811
6	混合微藻	$-27.5 \pm 0.1$	21.7	-14.6	0.978

根据莱茵衣藻、蛋白核小球藻  $\text{CO}_2$  同化过程中的稳定碳同位素分馏值计算出微藻碳酸氢根离子途径的利用份额  $f_{\text{bi}}$ (表 4),在没有添加碳酸氢钠和 AZ 自然培养条件下,蛋白核小球藻碳酸氢根离子利用途径利用份额各占 81.1%,混合微藻的为 97.8%。考虑因微藻生长过程所带来的  $\delta^{13}\text{C}$  误差校正莱茵衣藻的碳酸氢根离子利用途径份额为 100%<sup>[18]</sup>。此结果与李海涛<sup>[19]</sup>等微藻利用碳酸氢根离子途径所占的份额结果具有一致性,在低浓度  $\text{HCO}_3^-$  条件下,微藻的胞外碳酸酐酶活性较高,通过碳酸酐酶催化的无机碳利用的碳酸氢根离子途径份额较高。三种不同的藻类在无外源添加的  $\text{HCO}_3^-$  和 AZ 的情况下,碳酸氢根离子途径高利用份额表明,微藻为适应岩溶湖泊环境,进行了长期选择性的生存策略。在岩溶湖泊中,水体 pH 值在 8 左右波动<sup>[17,20-21]</sup>,此时水体环境缺乏  $\text{CO}_2$ ,无机碳以  $\text{HCO}_3^-$  为主<sup>[22]</sup>。微藻在低  $\text{CO}_2$ 、高  $\text{HCO}_3^-$  的生存环境中,形成主要是以碳酸氢根离子途径为主的无机碳利用模式。微藻利用的无机碳,无论是来源于大气中的  $\text{CO}_2$ ,还是水体中的  $\text{HCO}_3^-$ ,主要是以碳酸氢根离子为主。

### 3 结 论

(1) 本文通过双向标记计算出单个藻种莱茵衣藻、蛋白核小球藻及野外红枫湖的混合藻微藻 CO<sub>2</sub> 同化过程中的碳同位素分馏值, 弥补了前人对碳同位素分馏值计算方法需分析体外繁琐反应且精确度不高的缺点, 可在体确定稳定碳同位素分馏值。

(2) 莱茵衣藻、蛋白核小球藻及野外红枫湖混合藻三种岩溶湖泊微藻的 CO<sub>2</sub> 同化过程中的碳同位素分馏值分别为 15.3‰、14.8‰、21.7‰。三种藻分馏值差异主要与藻种及细胞体积大小有关, 藻类细胞体积越大, 同位素分馏反应过程阻力越大, 反应时间越充分, 分馏值越大。

(3) 利用微藻 CO<sub>2</sub> 同化过程中的稳定碳同位素分馏值, 定量出微藻所吸收利用的不同无机碳来源及其份额, 三种微藻的碳酸氢根离子途径高利用份额表明在岩溶湖泊中, 微藻利用的无机碳不管是来源于大气中的 CO<sub>2</sub> 还是水体的 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 主要是以碳酸氢根离子为主。

### 参考文献

- [1] Sültemeyer D. Carbonic anhydrase in eukaryotic algae: characterization, regulation, and possible function during photosynthesis [J]. *Canadian Journal of Botany*, 1998, 76(6): 962–972.
- [2] Sharkia R, Beer S, Cabantchik Z I. A membrane-located polypeptide of *Ulva* sp. which may be involved in HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake is recognized by antibodies raised against the human red-blood-cell anion-exchange protein [J]. *Planta*, 1994, 194(2): 247–249.
- [3] Invers O, Pérez M, Romero J. Bicarbonate utilization in seagrass photosynthesis: role of carbonic anhydrase in *Posidonia oceanica* (L.) Delile and *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1999, 235(1): 125–133.
- [4] Tsuzuki M, Miyachi S. The function of carbonic anhydrase in aquatic photosynthesis [J]. *Aquatic Botany*, 1989, 34(1–3): 85–104.
- [5] McNevin D B, Badger M R, Whitney S M, et al. Differences in carbon isotope discrimination of three variants of d-ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase reflect differences in their catalytic mechanisms [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(49): 36068–36076.
- [6] Farquhar G D, Ehleringer J R, Hubick K T. Carbon isotope discrimination and photosynthesis [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 1989, 40(1): 503–537.
- [7] Rost B, Kranz S A, Richter K-U, et al. Isotope disequilibrium and mass spectrometric studies of inorganic carbon acquisition by phytoplankton [J]. *Limnology and Oceanography Methods*, 2007, 5(3): 328–337.
- [8] 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(7): 786–789.
- [9] Moroney J V, Tolbert N E. Inorganic carbon uptake by *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Plant Physiology*, 1985, 77(2): 253–258.
- [10] 杭红涛, 吴沿友, 谢腾祥. 双向标记培养植物测定大气二氧化碳稳定碳同位素组成 [J]. *广西植物*, 2015, 35(2): 269–272.
- [11] Hélie J F, Hillaire Marcel C, Rondeau B. Seasonal changes in the sources and fluxes of dissolved inorganic carbon through the St. Lawrence River— isotopic and chemical constraint [J]. *Chemical Geology*, 2002, 186(1): 117–138.
- [12] Myrbo A, Shapley M. Seasonal water-column dynamics of dissolved inorganic carbon stable isotopic compositions ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ ) in small hardwater lakes in Minnesota and Montana [J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2006, 70(11): 2699–2714.
- [13] 吴沿友, 李西腾, 郝建朝, 等. 不同植物的碳酸酐酶活力差异研究 [J]. *广西植物*, 2006, 26(4): 366–369.
- [14] 王宝利, 刘丛强, 吴沿友, 等. 岩溶湖泊微藻的生物地球化学作用和微量元素分布 [A] // 中国矿物岩石地球化学学会第十届学术年会论文集 [C]. 2005.
- [15] 夏品华, 马健荣, 李存雄, 等. 红枫湖水库冬春季浮游生物群落与环境因子的典范对应分析 [J]. *环境科学研究*, 2011, 24(4): 378–386.
- [16] 黄国佳, 李秋华, 陈椽, 等. 贵州高原红枫湖水库浮游植物功能分组及其时空分布特征 [J]. *生态学报*, 2015, 35(17): 5573–5584.
- [17] 龙胜兴, 陈椽, 郭云, 等. 红枫湖水库水体富营养化及浮游植物群落结构特征 [J]. *中国环境监测*, 2013, 29(1): 23–29.
- [18] Burkhardt S, Riebesell U, Zondervan I. Effects of growth rate, CO<sub>2</sub> concentration, and cell size on the stable carbon isotope fractionation in marine phytoplankton [J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1999, 63(22): 3729–3741.
- [19] 李海涛, 吴沿友, 谢腾祥. 微藻利用不同无机碳途径的定量方法 [J]. *地球与环境*, 2014, 42(1): 116–121.
- [20] 彭希, 刘丛强, 王宝利等. 河流—水库体系水体表层 pCO<sub>2</sub> 时空变化特征及其扩散通量: 以六冲河, 洪家渡水库, 红枫湖为例 [J]. *地球与环境*, 2013, 41(2): 4–10.
- [21] 任启飞, 陈椽, 李荔, 等. 红枫湖秋季浮游植物群落与环境因子关系研究 [J]. *环境科学与技术*, 2010, 33(S2): 59.
- [22] 刘再华, W Dreybrodt, 韩军, 等. CaCO<sub>3</sub>—CO<sub>2</sub>—H<sub>2</sub>O 岩溶系统的平衡化学及其分析 [J]. *中国岩溶*, 2005, 24(1): 1–14.
- [23] Yuan J, Liu S S, Wang L J, et al. Optimization of microplate toxicity analysis method based on *Chlorella pyrenoidosa* [J]. *Research of Environmental Sciences*, 2011, 24(5): 553–558.

## Stable carbon isotope fractionation ( $\delta^{13}\text{C}$ ) of microalgae on $\text{CO}_2$ assimilation

ZHAO Li-hua<sup>1,2</sup>, WU Yan-you<sup>1</sup>, XIE Teng-xiang<sup>1,2</sup>, LI Hai-tao<sup>1,2</sup>, ZHANG Kai-yan<sup>1,2</sup>, HANG Hong-tao<sup>1,2</sup>

(1. State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang, Guizhou 550002, China;

2. College of Earth Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract** A study on the stable carbon isotopic fractionation ( $\delta^{13}\text{C}$ ) in the process of  $\text{CO}_2$  assimilation of microalgae is very significant to investigate the role of microalgae in estimate of potential carbon dioxide ( $\text{CO}_2$ ) sink. However, till now it is yet unknown how to measure the fractionation on  $\text{CO}_2$  assimilation of microalgae in vivo. Bidirectional tracers, which two types of sodium bicarbonate have different  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$  values, are used as the carbon isotope labeling to establish the method of calculation of the fractionation value in this study. Furthermore, the different proportions of metabolic pathways of inorganic carbon utilization are quantified by the fractionation value in microalgae. The carbon isotope fractionation ( $\delta^{13}\text{C}$ ) value of three types of algae, *Chlamydomonas reinhardtii* (CR), *Chlorella pyrenoidosa* (CP), and compound algae collected from surface water of Hongfeng Lake, are 15.3‰, 14.8‰, and 21.7‰, respectively in this paper. The difference of the fractionation values are closely related to cell size of these microalgae. That means, the bigger cell size of microalgae, the greater the resistance produces and the longer the reaction time of process in the  $\text{CO}_2$  assimilation. This leads to greater fractional values. The percent share of bicarbonate ions calculated by the fractionation values are 100%, 81.1% and 97.8% respectively in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella pyrenoidosa* and compound algae. The results demonstrate that the main pathway of inorganic carbon utilization of microalgae is the bicarbonate ions in karst lakes.

**Key words** microalgae, stable carbon isotope fractionation, bicarbonate ions utilization, bicarbonate ion

(编辑 张玲)