

李海涛,吴沿友,赵丽华,等.双同位素示踪定量微藻对碳源利用份额的方法研究[J].中国岩溶,2016,35(6):614-618.
DOI:10.11932/karst20160602

双同位素示踪定量微藻对碳源利用份额的方法研究

李海涛^{1,2},吴沿友²,赵丽华²,张开艳²,杭红涛^{1,2}

(1.贵州师范大学喀斯特研究院,贵阳 550001; 2.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)

摘 要:2015 年 8 月,在人工温室培养环境下,以蛋白核小球藻为实验材料,通过向培养液中添加两种标记 $\delta^{13}\text{C}$ 的碳酸氢钠来培养微藻,每天定时监测培养液的无机碳稳定同位素组成和微藻生物量,并测定最终获得的微藻藻体的有机碳稳定同位素组成,运用双同位素示踪模型,通过无机碳稳定同位素和有机碳稳定同位素两种方法,分别成功计算出了微藻利用不同碳源的份额,实验结果分别为:添加 5.0 mmol/L 碳酸氢钠条件下是 0.19、添加 10.0 mmol/L 条件下是 0.37、而添加 20.0 mmol/L 条件下是 0.57。并对这两种算法进行了分析。定量计算微藻对不同无机碳源的利用份额,在岩溶湖泊碳循环研究领域具有重要意义。

关键词:碳酸盐利用能力;稳定碳同位素;微藻

中图分类号:Q945;P642.25

文献标识码:A

文章编号:1001-4810(2016)06-0614-05

温室效应是全球气候变化的重要议题,根源在于人类活动大量消耗石化燃料,造成以二氧化碳为代表的温室气体大量排入大气中,最终导致气候变化。工业革命前,大气中二氧化碳浓度在 280 ppmv 左右,而目前的监测数据显示,它已经超过了 387 ppmv,增长了约 40%^[1-2]。海洋覆盖了地球表面积的 70%,加上陆地的河流、湖泊等自然水体,由海水和淡水等共同构成的水生生态系统在全球碳循环中具有重要意义。其所带来的初级生产力占到了全球净初级生产力的 50%,越来越多的学者已经意识到水生生态系统在全球碳循环中的重要性^[3-5]。

微藻是生活在水中以营浮游为生活方式的微小植物的统称,通常指浮游藻类。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、蛋白核小球藻等,很多种类微藻可以在实验室纯人工培养,这为科学研究提供了便利。研究微藻对不同碳源的利用偏好,并计算微藻对不同碳源的利用份额,为科学计算岩溶湖泊碳的生物地球化学循环通量提供方法,有利于人类科学利用微藻来

固碳增汇。一些学者通过监测微藻的光合作用指标,研究了微藻吸收利用无机碳的机制,也有通过添加各种抑制剂来探讨微藻碳源利用机制的报道,甚至还有通过微藻的藻体有机碳稳定同位素来定量微藻对外源无机碳利用的模式^[6-9]。但随着培养时间的推进,大气中二氧化碳的参与,培养液中添加的无机碳被逐渐稀释,再经过藻体生长代谢等环节的碳同位素分馏,最终造成由微藻藻体有机碳稳定同位素组成计算所得来的微藻对外源无机碳源利用份额的误差会逐渐增大^[10-11]。为此,本研究试图寻找另一种定量微藻吸收利用不同无机碳份额的新方法,以改进现有微藻碳源利用模型的不足。

本研究利用双同位素示踪技术,于 2015 年 8 月通过向培养液中添加两种 $\delta^{13}\text{C}$ 差异较大的碳酸氢钠来培养微藻,辅以每天定时监测微藻生物量变化及培养液的无机碳稳定同位素组成变化,旨在通过无机碳稳定同位素手段来定量计算微藻对添加无机碳的利用份额,另一方面,利用处理后的微藻藻体的有机碳稳定同位素同时来定量计算微藻对添加无机碳的利

基金项目:国家自然科学基金项目(40973060);贵州省科学技术基金(黔科合 J 字[2014]2131 号)

第一作者简介:李海涛(1982-),男,博士,2013 年 7 月毕业于中国科学院大学地球化学专业,研究方向:生物地球化学。E-mail:lisea02@126.com。

通信作者: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。

收稿日期:2016-03-18

用份额,并对这两种测定微藻对不同无机碳利用份额的稳定同位素示踪法进行比较。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

本研究所用的微藻藻种购自中国科学院水生生物研究所淡水藻种库(Freshwater Algae Culture Collection of the Institute of Hydrobiology, FACHB) (<http://algae.ihb.ac.cn/>)。选用的微藻是蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*, FACHB-5)。

采用改进的 Soil Extraction(SE)液体培养的方法^[12],本实验所使用 SE 培养液的具体配方如下:0.25 g/L NaNO₃、0.075 g/L K₂HPO₄·3H₂O、0.075 g/L MgSO₄·7H₂O、0.025 g/L CaCl₂·2H₂O、0.175 g/L KH₂PO₄、0.025 g/L NaCl、0.0005 g/L FeCl₃·6H₂O、1 mL/L EDTA-Fe (0.82 mL/L HCl、0.1802 g/L EDTA-Na₂和 0.9010 g/L FeCl₃·6H₂O)、1 mL/L 微量金属溶液 [2.86 g/L H₃BO₃、1.86 g/L MnCl₂·4H₂O、0.22 g/L ZnSO₄·7H₂O、0.39 g/L Na₂MoO₄·2H₂O、0.08 g/L CuSO₄·5H₂O和 0.05 g/L Co(NO₃)₂·6H₂O]。培养条件为光照强度:150 μmol·m⁻²·s⁻¹;光暗周期:12h/12h;温度:22.0±1.0 °C。通过添加少量 NaOH 或 HCl 调节初始 pH 值,使之保持在 8.00±0.05。

1.2 实验设计

碳酸氢钠浓度梯度设置分别为 5.0、10.0、20.0 mmol/L,标记的两种碳酸氢钠的 δ¹³C 值分别为 -17.4‰和 -28.4‰,同时培养。培养周期为 4 天。所有样品都平行培养 6 瓶,且在实验处理过程中,不断随机调换位置,以消除培养室微环境差异对微藻生长的影响。

1.3 微藻生物量的测定及生物量增殖倍数

微藻蛋白质含量的测定采用考马斯亮蓝比色法^[13]。本研究采用微藻生物量的增殖倍数(P)的形式来表示微藻的生长情况,具体如下:

$$P_i = N_i / N_0 (i = 1, 2, 3, 4) \quad (1)$$

N_i 为每日测定时的微藻蛋白质含量, N_0 为初始接种时的微藻蛋白质含量。

1.4 稳定碳同位素 δ¹³C 的测定

1.4.1 无机碳

微藻培养液无机碳的分离纯化:每天按时离心收集一定量的培养液,然后用 2 mm 的醋酸纤维滤膜过滤,确保藻液充分去除有机碳的干扰。接下来,把水

样注入已抽好真空并装有浓磷酸和磁性转子的特制玻璃瓶中,使用电热磁力搅拌器促进样品中的气体充分提取,再把生成的气体通过专用真空线装置提纯(经过酒精液氮、液氮等过程)。最终获得高纯二氧化碳气体样品^[14]。

1.4.2 有机碳

藻体有机碳的分离纯化:离心收集处理后的微藻样品。上述分离完成后加入适量 1 mol/L 盐酸洗涤微藻以去除无机碳的影响,并用超纯水洗涤微藻。再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,装入石英管(850 °C 预灼烧 3 h)中,并装入过量线状氧化铜丝(850 °C 预灼烧 3 h),然后抽真空,封管。将封好的装有微藻样品的石英管放入马弗炉中灼烧(850 °C, 5 h),缓慢冷却后,将石英管中获得的气体通过专用真空线装置提纯(经过酒精液氮、液氮等过程),最终获得高纯二氧化碳气体样品。

将纯化后的二氧化碳气体样品使用质谱仪 MAT252 测定其 δ¹³C 值,标准品采用国际标准物质(Pee Dee Belemnite, PDB)。测量误差小于 ±0.1‰,其结果表示为:

$$\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = [(R_{\text{样品}}/R_{\text{标准}}) - 1] \times 1000 \quad (2)$$

$R_{\text{样品}}$ 为样品中的 ¹³C 与 ¹²C 的比值; $R_{\text{标准}}$ 为标准物质中 ¹³C 与 ¹²C 的比值。

1.5 微藻吸收利用不同碳源的份额(f_B)

微藻碳同位素组成可以反映其对环境中无机碳的利用^[15]。一般情况下,微藻可利用的无机碳来源有两个,分别是大气中的无机碳和水体中固有的无机碳。相应地,利用双同位素示踪技术(通过向培养液中添加两种标记 δ¹³C 的 NaH¹³CO₃),可以定量微藻对添加碳源的利用比例^[9]。

根据每天的微藻生长的增量和培养液的无机碳稳定同位素组成的日变化,利用双同位素示踪模型,可建立如下方程:

$$f_{B\text{无机}} = \sum (P_i - P_{i-1})(\delta C_{2-i} - \delta C_{1-i}) / (\delta C_2 - \delta C_1) (P_{4-1}) (i = 1, 2, 3, 4) \quad (3)$$

具体到本研究中,方程 3 可以表示为:

$$f_{B\text{无机}} = [(P_1 - 1)(\delta C_{2-1} - \delta C_{1-1}) + (P_2 - P_1)(\delta C_{2-2} - \delta C_{1-2}) + (P_3 - P_2)(\delta C_{2-3} - \delta C_{1-3}) + (P_4 - P_3)(\delta C_{2-4} - \delta C_{1-4})] / (\delta C_2 - \delta C_1) (P_4 - 1) \quad (4)$$

P_i 为微藻生物量的增殖倍数,其中,微藻初始生

物量(P_0)为1; δC_1 :添加的同位素标记1的碳酸氢钠的 $\delta^{13}C$ 值; δC_2 :添加的同位素标记2的碳酸氢钠的 $\delta^{13}C$ 值; δC_{1-i} :添加的同位素标记1的碳酸氢钠的培养液中的无机碳第*i*天的 $\delta^{13}C$ 值; δC_{2-i} :添加的同位素标记2的碳酸氢钠的培养液中的无机碳第*i*天的 $\delta^{13}C$ 值。

由此计算出微藻各培养条件下利用添加的无机碳源的份额 $f_{B无机}$ 。

2 结果与讨论

2.1 微藻生物量的变化

如表1所示,在添加碳酸氢钠处理下,微藻生长情况整体都较旺盛,一般情况下,处理的第一天,属于微藻的适应调节期,生长较慢;从第二天开始,生物量增长速度加快,在添加高浓度碳酸氢钠处理(20.0 mmol/L)的蛋白核小球藻也能快速增殖,且一直持续到实验处理结束(表1)。

表1 碳酸氢钠浓度梯度处理下的微藻生物量增殖倍数

Table 1 Growth folds of biomass of the algae under different concentrations of bicarbonate

微藻类型	处理 [NaHCO ₃] ^a /mmol/L	微藻生物量			
		第一天	第二天	第三天	第四天
蛋白核小球藻	5.00	1.35±0.11	2.43±0.15	3.48±0.21	5.16±0.17
	10.00	1.33±0.12	2.37±0.14	3.41±0.20	5.04±0.21
	20.00	1.33±0.13	2.35±0.16	3.37±0.19	4.99±0.23

注:^a培养液中添加的碳酸氢钠浓度。

2.2 微藻培养液中的无机碳稳定碳同位素组成的变化

从处理过程中微藻培养液每日的无机碳稳定同位素数据来看(表2),添加的碳酸氢钠 $\delta^{13}C$ 值越负,对应培养液的无机碳的 $\delta^{13}C$ 值也越负;具体到各个碳酸氢钠浓度梯度处理来说,添加的碳酸氢钠浓度越高,对应的培养液中的无机碳的 $\delta^{13}C$ 值越接近所添加的碳酸氢钠的 $\delta^{13}C$ 值,说明随着添加的碳酸氢钠浓度的增加,添加的无机碳占总无机碳的份额也相应

增长;从培养时间来说,随着培养时间的推进,添加不同碳酸氢钠的同一处理培养液的 $\delta^{13}C$ 差值在不断缩小,由此说明随着培养时间的推进,大气二氧化碳的占比在不断升高。这是因为培养液中的无机碳是一种动态变化的过程,它不但受添加碳酸氢钠的影响,更受大气二氧化碳的影响,甚至大气二氧化碳的贡献更大。

表2 碳酸氢钠处理下的微藻无机培养液碳同位素组成(‰, PDB)

Table 2 $\delta^{13}C$ values of the inorganic medium under different concentrations of bicarbonate (‰, PDB)

碳同位素	处理 [NaHCO ₃] ^a /mmol/L	微藻生物			
		第一天	第二天	第三天	第四天
δ_{T1}	5.00	-10.3±0.6	-9.6±0.6	-12.8±0.9	-17.5±0.8
	10.00	-13.9±0.5	-10.1±0.6	-9.0±0.6	-10.9±0.9
	20.00	-15.9±0.4	-12.3±0.5	-11.1±0.5	-10.1±0.6
δ_{T2}	5.00	-17.7±0.7	-11.5±0.8	-14.7±0.8	-18.8±0.8
	10.00	-22.1±0.6	-15.6±0.6	-13.5±0.6	-13.0±0.7
	20.00	-24.7±0.5	-20.1±0.5	-17.6±0.4	-14.9±0.4

注:^a培养液中添加的碳酸氢钠浓度; δ_{T1} :添加 $\delta^{13}C$ 为-17.4‰的NaHCO₃培养液; δ_{T2} :添加 $\delta^{13}C$ 为-28.4‰的NaHCO₃培养液。

2.3 微藻藻体的有机碳的稳定碳同位素组成变化

从处理后的微藻稳定碳同位素数据来看,藻体 $\delta^{13}C$ 值随添加碳酸氢钠浓度的变化而变化(表3),尤其是在添加高浓度碳酸氢钠条件下,对微藻藻体的

$\delta^{13}C$ 值的影响较大。

从添加的两种标记 $\delta^{13}C$ 值的碳酸氢钠来看,添加的碳酸氢钠 $\delta^{13}C$ 值越负,对应藻体的 $\delta^{13}C$ 值也越负。在相同条件下,由两种碳酸氢钠所造成的微藻碳

同位素组成的差值也随添加碳酸氢钠浓度的增加而不断扩大。

表 3 碳酸氢钠处理下的微藻藻体有机碳同位素组成(‰, PDB)

Table 3 $\delta^{13}\text{C}$ values of the algae under different concentrations of bicarbonate (‰, PDB)

处理 [NaHCO ₃] ^a /mmol/L	δ_{T1}	δ_{T2}
5.00	-20.3±0.3	-22.1±0.4
蛋白核小球藻 10.00	-22.2±0.5	-26.2±1.0
20.00	-27.2±0.7	-34.1±0.6

注:^a培养液中添加的碳酸氢钠浓度; δ_{T1} :添加 $\delta^{13}\text{C}$ 为-17.4‰的NaHCO₃的培养液所培养出的微藻 $\delta^{13}\text{C}$ 值; δ_{T2} :添加 $\delta^{13}\text{C}$ 为-28.4‰的NaHCO₃的培养液所培养出的微藻 $\delta^{13}\text{C}$ 值。

2.4 无机碳和有机碳两种双同位素计算模型的结果比较

根据实验获得的稳定碳同位素数据,结合方程(4),成功获得微藻对无机碳的利用份额。从表4可以看出,不同培养条件下微藻利用添加的无机碳源的份额明显不同,呈现出随添加碳酸氢钠浓度的增加,微藻利用添加的无机碳源份额越大的趋势。这和实际情况相吻合,而且与通过藻体有机碳同位素计算出来的结果相近(表4),此处的 $f_{B\text{无机}}$ 和 $f_{B\text{有机}}$ 是同一批处理的微藻实验,分别通过培养液的无机碳稳定同位素和收集的微藻有机碳稳定同位素数据计算得来的,整体看来,两种方法所获得的计算结果之间的差异很小,甚至在10.0 mmol/L碳酸氢钠处理下,两者的计算结果达到了一致,表明利用本方法计算出的微藻利用添加的无机碳源的份额具有可靠性。

表 4 碳酸氢钠处理下的微藻利用添加的无机碳的比例

Table 4 Proportion of added inorganic carbon source used by algae under different concentrations of bicarbonate

处理 [NaHCO ₃] ^a /mmol/L	$f_{B\text{无机}}$	$f_{B\text{有机}}$
5.00	0.19	0.16
蛋白核小球藻 10.00	0.37	0.37
20.00	0.57	0.63

注:^a培养液中添加的NaHCO₃浓度; $f_{B\text{无机}}$ 为通过藻液无机碳同位素计算出的微藻利用添加的无机碳占总碳源的份额; $f_{B\text{有机}}$ 为通过藻体有机碳同位素计算出的微藻利用添加的无机碳占总碳源的份额。

3 结 论

本研究利用双同位素示踪技术,建立了一种利用培养液的无机碳稳定同位素组成变化来动态定量计算微藻利用不同无机碳份额的方法。微藻吸收无机碳的过程是一个动态的过程,通过每日定时监测微藻培养液的稳定碳同位素组成变化的无机碳算法准确性比有机碳的算法更高。通过微藻藻体有机碳稳定同位素组成来计算微藻对不同碳源利用份额的方法不足之处主要表现在误差的传递,稳定碳同位素的测定精度为±0.1‰,再加上微藻生长过程中存在一定的同位素分馏,随着微藻培养时间的推进,造成最终累积的误差越来越大^[10]。与利用微藻体有机碳同位素来定量计算微藻利用不同无机碳份额的方法相比,无机碳方法也有自身的不足之处,它需要每日动态监测培养液的同位素组成及微藻生物量,该方法对样品需要量大,且操作相对繁琐;而通过藻体有机碳的方法,只需在培养结束后,一次监测即可获得结果。因此,在利用双同位素示踪模型计算微藻对不同碳源利用份额的实践中,建议同时采用有机碳同位素和无机碳同位素两种算法,互相校正,提升数据的可靠性。

参考文献

- [1] Forster P, Ramaswamy V, Artaxo P, et al. Changes in atmospheric constituents and in radiative forcing [M] // Climate change, Cambridge, Cambridge University Press, 2007: 131-234.
- [2] 王协琴. 温室效应和温室气体减排分析 [J]. 天然气技术, 2008 (6): 53-58.
- [3] Field C B, Behrenfeld M J, Randerson J T, et al. Primary production of the biosphere: Integrating terrestrial and oceanic components [J]. Science, 1998, 281: 237-240.
- [4] Carpenter S R, Fisher S G, Grimm N B, et al. Global change and freshwater ecosystems [J]. Annual Review of Ecology and Systematics, 1992, 23: 119-139.
- [5] Wrona F J, Prowse T D, Reist J D, et al. Climate change effects on aquatic biota, ecosystem structure and function [M]. AMBIO: A Journal of the Human Environment, 2006, 35: 359-369.
- [6] Moazami-Goudarzi M, Colman B. Inorganic carbon acquisition in two green marine stichococcus species [J]. Plant, Cell & Environment, 2011, 34: 1465-1472.
- [7] Moulin P, Andria J R, Axelsson L, et al. Different mechanisms of inorganic carbon acquisition in red macroalgae (rhodophyta) revealed by the use of TRIS buffer [J]. Aquatic Botany, 2011,

- 95: 31-38.
- [8] Ray S, Klenell M, Choo K S, et al. Carbon acquisition mechanisms in *chara tomentosa* [J]. Aquatic Botany, 2003, 76: 141-154.
- [9] 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.
- [10] Burkhardt S, Riebesell, U, Zondervan, I. Effects of growth rate, CO₂ concentration, and cell size on the stable carbon isotope fractionation in marine phytoplankton [J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 1999, 63(22): 3729-3741.
- [11] 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.
- [12] 门玉洁, 胡洪营, 李锋民. 芦苇化感组分对斜生栅藻 *Scenedesmus obliquus* 生长特性的影响 [J]. 生态环境, 2006, 15(5): 925-929.
- [13] 郭颖娜, 孙卫. 蛋白质含量测定方法的比较 [J]. 河北化工, 2008, 31(4): 36-37.
- [14] Atekwana E A, Krishnamurthy R V. Seasonal variations of dissolved inorganic carbon and ¹³C of surface waters: application of a modified gas evolution technique [J]. Journal of Hydrology, 1998, 205(3): 265-278.
- [15] Chen Z, Cheng H M, Chen X W. Effect of Cl⁻ on photosynthetic bicarbonate uptake in two cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* and *Synechocystis PCC6803* [J]. Chinese Science Bulletin, 2009, 54: 1197-1203.

Application of bidirectional labeling method to quantifying carbon utilization in microalgae

LI Haitao^{1,2}, WU Yanyou², ZHAO Lihua², ZHANG Kaiyan², HANG Hongtao^{1,2}

(1. School of Karst Science, Guizhou Normal University, Guiyang, Guizhou 550001, China;

2. State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang, Guizhou 550002, China)

Abstract August 2015, the *Chlorella pyrenoidosa* was cultivated in a greenhouse with different inorganic carbons (NaH¹³CO₃ with different $\delta^{13}\text{C}$ values added) in the culture medium. The $\delta^{13}\text{C}$ of inorganic carbon in the medium and the biomass of the microalgae were detected on a daily basis. In the meantime, the organic stable carbon isotope compositions of the microalgae was also measured. The proportion of the added inorganic carbon used by microalgae was quantified by comparing their stable carbon isotope compositions using the bidirectional labeling method (NaH¹³CO₃ with different $\delta^{13}\text{C}$ values was added). This study compared respectively both inorganic carbon and organic carbon of the stable carbon isotope compositions. The results are as follows, it is 0.19 under 5.0 mmol/L NaHCO₃, 0.37 under 10.0 mmol/L NaHCO₃, and 0.57 under 20.0 mmol/L NaHCO₃. At last, we analyzed the two methods for quantifying the carbon sources in algae. It is very important to calculate the proportion of different inorganic carbon in the carbon cycle research in karst lakes.

Key words inorganic carbon utilization, stable carbon isotope, microalgae

(编辑 张玲)