

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2014.05.009

氟离子对莱茵衣藻和蛋白核小球藻的生理效应*

李 潜^{1**} 吴沿友^{2,3} 吴运东³

(1. 江苏大学环境与安全工程学院, 镇江, 212013; 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;
3. 江苏大学农业工程研究院, 镇江, 212013)

摘 要 以莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)和蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)为受试生物,研究了F⁻对藻叶绿素含量、胞外碳酸酐酶(CA_{ex})活性及稳定碳同位素组成($\delta^{13}\text{C}$)的影响,以探讨F⁻对微藻的生理效应。结果表明,当F⁻浓度不超过10 mmol·L⁻¹时,随F⁻浓度增大,蛋白核小球藻叶绿素a、b含量和CA_{ex}活性基本不变,而莱茵衣藻叶绿素a、b含量降低,CA_{ex}活性小幅增加;当F⁻浓度在10—200 mmol·L⁻¹之间时,随F⁻浓度的增加,蛋白核小球藻和莱茵衣藻的叶绿素a、b含量均明显下降,CA_{ex}活性显著增大,且在F⁻浓度为100 mmol·L⁻¹时达最大,200 mmol·L⁻¹时两种藻均不能生存,无CA_{ex}活性和叶绿素含量表征。莱茵衣藻对F⁻具有更灵敏的CA_{ex}响应机制,对F⁻的影响更为敏感,而蛋白核小球藻对F⁻的耐受性更好;在实验浓度范围内,莱茵衣藻和蛋白核小球藻的 $\delta^{13}\text{C}$ 值均随F⁻浓度的增大呈现出更大的负偏差,F⁻促使二者优先利用较轻的¹²C,说明两种微藻光合作用固定无机碳模式发生改变。

关键词 F⁻, 莱茵衣藻, 蛋白核小球藻, 叶绿素, 胞外碳酸酐酶, $\delta^{13}\text{C}$ 。

Physiological effect of fluoride ions on *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella pyrenoidosa*

LI Qian^{1**} WU Yanyou^{2,3} WU Yundong³

(1. School of Environment and Safety Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang, 212013, China;
2. State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang, 550002, China; 3. Institute of Agricultural Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang, 212013, China)

Abstract: Using *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella pyrenoidosa* as tested organisms, effects of fluoride ion (F⁻) on chlorophyll (Chl) content, extracellular carbonic anhydrase (CA_{ex}) activity and stable carbon isotope composition were investigated, to understand the physiological effects of F⁻ on microalgae. Results showed that when F⁻ concentration was below 10 mmol·L⁻¹, Chl-a and Chl-b contents of *C. reinhardtii* decreased, while CA_{ex} activity of the algae increased with increasing F⁻ concentration. In contrast, those of *C. pyrenoidosa* were almost unchanged. When F⁻ concentration was between 10 and 200 mmol·L⁻¹, Chl-a and Chl-b contents of the two algae decreased significantly, whereas CA_{ex} activity of them increased with the F⁻ concentration and reached maximum at 100 mmol·L⁻¹ F⁻ concentration. When F⁻ concentration was 200 mmol·L⁻¹, the two algae were not able to survive, and chlorophyll content and CA_{ex} activity could not be detected. *C. reinhardtii* was more sensitive to F⁻, whereas *C. pyrenoidosa* had a higher tolerance to F⁻. In the range of the concentrations studied, the values of $\delta^{13}\text{C}$ of the two algae were all more negatively skewed than those of the controls, indicating that the algal cells preferred the utilization of the lighter ¹²C isotope in the presence of F⁻. Thus ways of the photosynthetic utilization of inorganic

2013年7月15日收稿

* 国家自然科学基金项目(40973060)资助。

** 通讯联系人, E-mail: liq@ujs.edu.cn

carbon in the two algae have changed.

Keywords: fluoride ion, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella pyrenoidosa*, chlorophyll, extracellular carbonic anhydrase (CA_{ex}), $\delta^{13}\text{C}$

氟是元素周期表中电负性最大的元素,具有极高的化学活性,几乎可以与周期表中所有元素作用形成化合物^[1].无机氟化物(F⁻)具有较强的迁移性,能够广泛存在于水环境和水生生物体内,当其浓度超过一定限度时,就会成为水生生物的毒物^[2],影响其生理生化作用.

微藻作为水生生态系统的初级生产者,其个体及种群结构对外界刺激的反应非常敏感^[3].光合作用是微藻生命活动最基本的生理作用,而叶绿素是微藻进行光合作用的主要色素^[4],其含量受藻生长环境的影响.同时光合作用还需要无机碳,而微藻胞外碳酸酐酶(CA_{ex})参与无机碳转运,是无机碳浓缩机制的重要组成部分^[5],其活性受到环境因素的直接影响^[6].水中溶解性无机碳(DIC)主要以HCO₃⁻形式存在^[7],HCO₃⁻作为除CO₂外微藻重要的无机碳源已得到普遍认可^[8].微藻利用无机碳形式的调节是微藻对环境条件的变化做出的生理反应,能够吸收HCO₃⁻的微藻比只能利用CO₂的微藻具有更高的生存能力^[9].自然界中存在¹³C和¹²C两种稳定碳同位素,¹³C存在量远远低于¹²C,两种同位素在水体中不同形式DIC中的分布存在差异,¹³C在HCO₃⁻中的含量更高^[10],因此可以用微藻光合产物中¹³C的含量来研究微藻对HCO₃⁻的利用情况.植物体内的稳定碳同位素,虽然由遗传因子控制,但环境效应仍然存在^[11].已有研究证明植物的稳定碳同位素组成($\delta^{13}\text{C}$)受光强、光质、温度、CO₂浓度、营养等环境因子的影响^[12],但有关F⁻对微藻 $\delta^{13}\text{C}$ 影响的研究还鲜见报道.

本文以模式生物莱茵衣藻和自然界普遍存在的蛋白核小球藻为受试对象,从叶绿素含量、CA_e活性和无机碳(¹³C)比率的变化等3个方面研究了两种微藻对不同浓度F⁻的生理应答,为探讨F⁻对微藻的生理毒性机制及评价F⁻的生态风险和F⁻排放标准的修订等提供依据.

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验生物为莱茵衣藻和蛋白核小球藻,藻种均购自中国科学院武汉水生生物研究所淡水藻种库.购回后接种于已灭菌的SE培养基^[13]中进行扩培,培养条件为:光照强度10—20 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,光暗比14 h:10 h,温度(25±1) °C,每天摇瓶2—3次.实验用F⁻来源于市售的分析纯氟化钠试剂.

1.2 实验处理

取适量上述经扩培后除去原培养液的对数生长期莱茵衣藻和蛋白核小球藻,分别接入100 mL添加F⁻浓度分别为0、1、10、50、100、200 mmol·L⁻¹的SE培养基中,每个浓度设3个平行,同时设一组不添加F⁻的空白样接入同样量对数期藻以作为对照,培养条件同上,培养时间为5 d.处理结束后取样分别测定藻的叶绿素含量、胞外碳酸酐酶活力及稳定碳同位素组成 $\delta^{13}\text{C}$.

1.3 叶绿素含量的测定

叶绿素(chlorophyll)可分为叶绿素a、叶绿素b和叶绿素c,是浮游植物的主要光合色素,其含量大小能够反映出微藻生物量的多少,采用丙酮提取分光光度法测定^[14].取10 mL藻液,5000 r·min⁻¹离心5 min,弃去上清液,沉淀加5 mL 90%丙酮充分溶解,于4 °C冰箱中浸提24 h.取出离心管,13000 r·min⁻¹离心10 min,用分光光度计(UV-2102 PCS, Unico)测定上清液在663、645、630、750 nm等4个波长下的吸光度OD值,将前3个OD值分别减去最后一个浊度校正OD值后,按式(1)—(3)分别计算叶绿素a(Chl-a, mg·L⁻¹)、叶绿素b(Chl-b, mg·L⁻¹)和叶绿素c(Chl-c, mg·L⁻¹)含量:

$$\text{Chl-a} = (11.64\text{OD}_{663} - 2.16\text{OD}_{645} + 0.10\text{OD}_{630}) V_e / (V \cdot \delta) \quad (1)$$

$$\text{Chl-b} = (20.97\text{OD}_{645} - 3.94\text{OD}_{663} - 3.66\text{OD}_{630}) V_e / (V \cdot \delta) \quad (2)$$

$$\text{Chl-c} = (55.22\text{OD}_{630} - 14.81\text{OD}_{645} - 5.53\text{OD}_{663}) V_e / (V \cdot \delta) \quad (3)$$

式中, V_e 为提取液定容后的体积(mL), V 为藻液原体积(mL), δ 为比色皿光程(cm).

1.4 胞外碳酸酐酶活性的测定

参考施倩倩等的梯微电极开放电路法^[15-16],采用完整细胞进行测定.取 40 mL 藻液离心收集藻细胞,用巴比妥缓冲液($\text{pH} = 8.3$ $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)冲洗后再离心 1 次,加入巴比妥缓冲液悬浮细胞,细胞悬浮液终体积为 3 mL;在 0°C 下迅速加入 2 mL 0°C 饱和 CO_2 蒸馏水,监测该反应体系 pH 的变化,保存反应过程的电位变化曲线,以 Origin 软件导出数据,取匀速变化的一段进行线性拟合,根据直线斜率得到相当于 1 个 pH 单位的电位值变化所需时间,同时测定藻液叶绿素 a 含量(Chl-a),按式(4)计算 CA_{ex} 活性:

$$\text{CA}_{\text{ex}} \text{ 活性 } (\text{EU} \cdot \text{mg}^{-1}) = (t_0 - t) / (n \cdot t \cdot \text{Chl-a}) \quad (4)$$

式中 t_0 与 t 分别为样品与空白相当于 1 个 pH 单位的电位值变化所需时间, n 为藻样与藻细胞悬浮液总体积之比, Chl-a 为藻样的叶绿素 a 含量.

1.5 稳定碳同位素组成 $\delta^{13}\text{C}$ 的测定

取待用藻液离心(3000 g, 10 min),弃上清液,用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸浸泡藻细胞 24 h,再离心,弃去酸液,沉淀用蒸馏水洗涤 3 次,收集细胞,真空冷冻干燥得到待测样品.取 5 mg 微藻样品,放入事先在马弗炉中烧制过的石英管中,加入 3 g 线状氧化铜后封管.将封好的石英管放入马弗炉中 850°C 烧 5 h,冷却后提纯石英管中的 CO_2 气体,封入样品管中.用气体同位素质谱仪(Finnigan MAT252)分析 CO_2 样,与稳定碳同位素标准(Pee Dee Belemnite, PDB)相比较得到的稳定碳同位素组成($\delta^{13}\text{C}$),见式(5):

$$\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = [(R_{\text{样品}}/R_{\text{标准}}) - 1] \times 1000\text{‰} \quad (5)$$

式中 $R_{\text{样品}}$ 和 $R_{\text{标准}}$ 分别为样品与标准的 ^{13}C 与 ^{12}C 的比值.

2 结果与讨论

2.1 F^- 对藻叶绿素含量的影响

经过 5 d 处理的微藻叶绿素含量随 F^- 浓度的变化关系见图 1.由图 1 可知 $0-1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 F^- 对莱茵衣藻和蛋白核小球藻的叶绿素 a、叶绿素 b 和叶绿素 c 含量没有显著影响($n=9$, $P>0.05$);在 $\text{F}^- \geq 10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 3 种叶绿素含量均随 F^- 浓度的升高而明显下降($n=9$, $P<0.05$),因此,高浓度 F^- 能抑制微藻的叶绿素合成,甚至造成叶绿素分解破坏,从而显示出对微藻生长的毒害作用,这与 Smith 和 Woodson^[17]的研究结果基本一致;当 F^- 浓度为 $1-10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,随 F^- 浓度的升高,莱茵衣藻的叶绿素 a 和叶绿素 b 含量呈现出下降趋势,而蛋白核小球藻的叶绿素 a 和叶绿素 b 含量则基本不变,说明莱茵衣藻对环境变化的响应更加灵敏,较低浓度的 F^- 即能够胁迫莱茵衣藻,而蛋白核小球藻则表现出更强的适应性,受环境变化的影响较小,这符合两种微藻的生长特性^[4].此外,莱茵衣藻的叶绿素 c 含量接近零,而蛋白核小球藻则含有极少量的叶绿素 c,表明同为绿藻的莱茵衣藻和蛋白核小球藻具有不同的叶绿素组成,前者叶绿素组成更接近于高等植物,而后的叶绿素组成与低等植物类似.

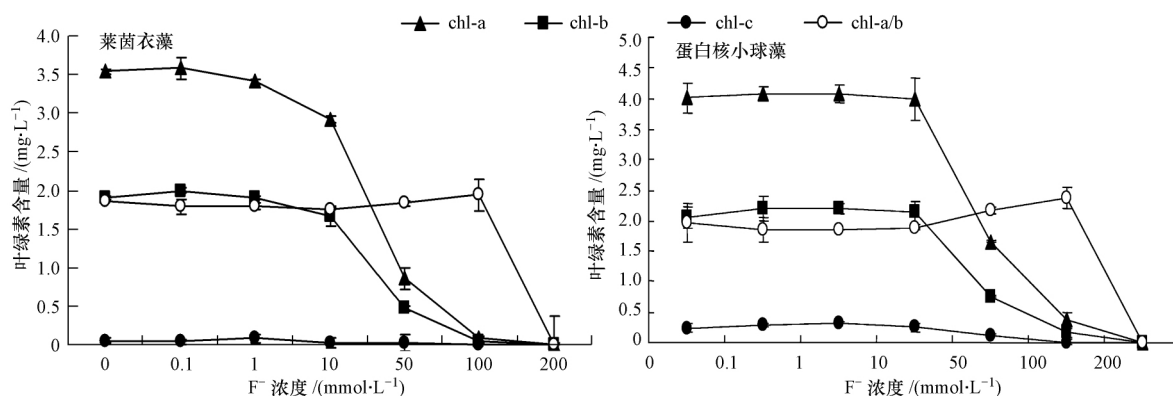


图 1 F^- 对莱茵衣藻和蛋白核小球藻叶绿素含量的影响

Fig. 1 Effect of F^- on chlorophyll content of *C. reinhardtii* and *C. pyrenoidosa*

叶绿素 a 和叶绿素 b 的比值能反映植物对光能的利用能力^[18], 其值不仅与植物本身的光合特性有关, 还受环境的影响, 如杜敏华等^[19]和高厚强等^[20]的研究结果表明大气污染可以造成植物叶绿素 a/b 值升高. 本实验中莱茵衣藻的叶绿素 a 与叶绿素 b 的比值(图 1) 在 0—100 mmol·L⁻¹ F⁻ 浓度范围内基本不变, 表明 F⁻ 胁迫下的莱茵衣藻吸收利用光能的机制基本不变; 蛋白核小球藻叶绿素 a 与叶绿素 b 的比值在 50 mmol·L⁻¹和 100 mmol·L⁻¹ F⁻ 处理组中高于对照组, 表明在高氟胁迫情况下, 蛋白核小球藻的叶绿素 a 和叶绿素 b 都受到破坏而分解, 并且具较多辅助及保护作用的叶绿素 b 比对藻类光合作用起主要作用的叶绿素 a 在受到高氟胁迫的环境中更易分解, 致使叶绿素 a/b 值升高.

2.2 F⁻ 对藻胞外碳酸酐酶(CA_{ex}) 活性的影响

不同 F⁻ 浓度影响下的莱茵衣藻和蛋白核小球藻 CA_{ex} 活性见图 2. 由图 2 可知, 当 F⁻ 浓度不超过 10 mmol·L⁻¹ 时, 随 F⁻ 浓度的增大, 莱茵衣藻的 CA_{ex} 活性呈增加趋势, 但增幅小, 而蛋白核小球藻 CA_{ex} 活性基本不变, 低 F⁻ 浓度(0.1、1 mmol·L⁻¹ 和 10 mmol·L⁻¹) 组与对照组没有显著性差异($n = 12, P > 0.05$), 说明较低浓度的 F⁻ 对藻的生理影响较小; 当 F⁻ 浓度高于 10 mmol·L⁻¹ 时, 随 F⁻ 浓度的增大, 莱茵衣藻和蛋白核小球藻的 CA_{ex} 活性均显著增加, 且当 F⁻ 浓度增大到 100 mmol·L⁻¹ 时, 二者的 CA_{ex} 活性达最大, 此后降低致零, 方差分析亦表明高 F⁻ 浓度(50 mmol·L⁻¹ 和 100 mmol·L⁻¹) 组 CA_{ex} 活性与其他浓度组均具有显著性差异($n = 18, P < 0.05$). 两种藻对 F⁻ 的抗性在 100 mmol·L⁻¹ 左右达最大, 200 mmol·L⁻¹ 时均难以生存. 从实验现象可以看出, 瓶中的藻液已不是绿色, 而是淡黄色且沉底, 表明藻已死亡. Kandler^[21] 的研究亦表明, F⁻ 浓度高于 1900 mg·L⁻¹(100 mmol·L⁻¹) 时, 蛋白核小球藻难以生存. 此外, 由图 2 还可看出, 不受 F⁻ 胁迫情况下, 莱茵衣藻的 CA_{ex} 活性为 $12.68 \pm 2.22 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$, 低于 Tsuzuki^[22] 的研究结果(49.6—185.8 EU·mg⁻¹), 因为 Tsuzuki 是在“通入空气”的情况下获得的, 与本研究条件不同, 而与 Klemmer^[11] 实验具有类似培养条件的蛋白核小球藻 CA_{ex} 活性($43.68 \pm 3.64 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$) 则与其测定结果(5.8—41.2 EU·mg⁻¹) 基本相符. 吴运东等^[23] 的研究结果表明氟胁迫下的微藻 CA_{ex} 活性还与培养基 pH 条件有关, 因此, 可以通过改变微藻的生长条件来提高其对不利环境的抗性. 另外, 不同类型的藻, 对环境毒物的敏感性和耐受性不同^[24], 本研究中莱茵衣藻 CA_{ex} 活性的增幅要明显大于蛋白核小球藻 CA_{ex} 活性的增幅, 前者的最大值($1423.77 \pm 25.35 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$) 远大于后者($166.25 \pm 18.84 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$), 说明莱茵衣藻对氟胁迫的响应更灵敏, 对氟的耐受性不如蛋白核小球藻. 因此, 莱茵衣藻更适合作为水环境氟污染生物监测的指示生物, 而蛋白核小球藻却在利用微藻除 F⁻ 方面更有优势, 但也应注意控制进水 F⁻ 浓度, 使蛋白核小球藻能正常生长.

2.3 F⁻ 对稳定碳同位素组成 $\delta^{13}\text{C}$ 的影响

不同 F⁻ 浓度影响下的莱茵衣藻和蛋白核小球藻 $\delta^{13}\text{C}$ 变化见图 3. 在实验 F⁻ 浓度范围内, 莱茵衣藻和蛋白核小球藻的 $\delta^{13}\text{C}$ 值均随 F⁻ 浓度的升高而呈降低的趋势, 即 F⁻ 胁迫下的藻 $\delta^{13}\text{C}$ 值具有更大的负偏差, 表明 F⁻ 能使两种藻优先利用较轻的稳定碳同位素¹²C, 使两种微藻光合作用固定无机碳模式发生改变, 光合产物中¹³C 比率下降, 导致更负偏差的 $\delta^{13}\text{C}$ 值和更高的碳同位素分馏.

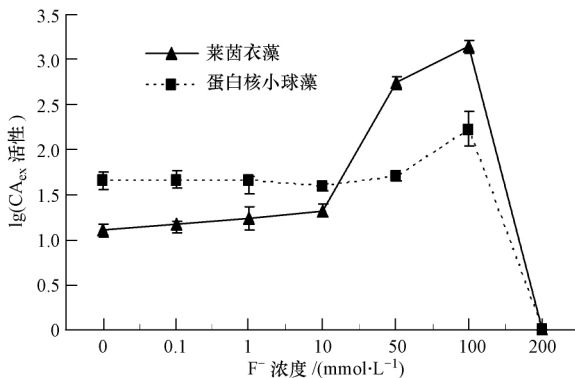


图 2 F⁻ 对莱茵衣藻和蛋白核小球藻 CA_{ex} 活性的影响

Fig. 2 Effect of F⁻ on CA_{ex} activity of *C. reinhardtii* and *C. pyrenoidosa*

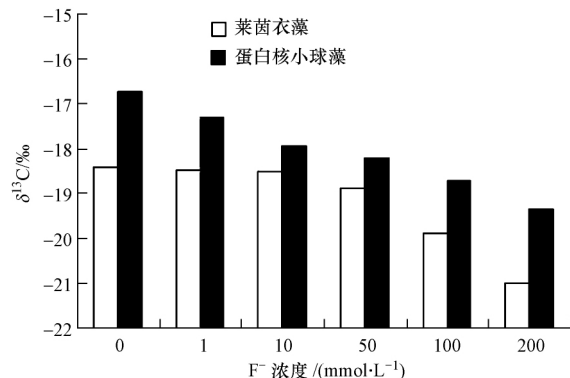


图 3 F⁻ 对莱茵衣藻和蛋白核小球藻 $\delta^{13}\text{C}$ 值的影响

Fig. 3 Effect of F⁻ on $\delta^{13}\text{C}$ values of *C. reinhardtii* and *C. pyrenoidosa*

此外,藻 $\delta^{13}\text{C}$ 值反应其对水中溶解性无机碳的利用^[25],光合产物中 ^{13}C 含量偏差低于28‰的微藻可以利用水中的 HCO_3^- ^[26],本实验中两种微藻的 ^{13}C 含量偏差均低于28‰,表明二者均具有利用 HCO_3^- 的能力,具有比只能利用 CO_2 的微藻更高的生存能力。

高 CA_{ex} 活性和低 CA_{ex} 活性之间的微藻碳同位素分馏差异性更大^[27]。该研究中,两种微藻的 CA_{ex} 活性均以 F^- 浓度为 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组的最大,且莱茵衣藻的 CA_{ex} 活性变化幅度高于蛋白核小球藻,与对照组相比,该 F^- 浓度组表现出更大的 $\delta^{13}\text{C}$ 值变化,且莱茵衣藻的 $\delta^{13}\text{C}$ 值降低更多,由此可知胞外碳酸酐酶在微藻无机碳的转换中起着重要的作用。

植物光合途径的不同也是导致 $\delta^{13}\text{C}$ 不同的重要原因之一^[28]。高等植物固定 CO_2 的途径有3种:卡尔文循环(C3)途径,二羧酸循环(C4)途径和景天酸代谢(CAM)途径。C3植物 $\delta^{13}\text{C}$ 值约为 -20‰ — -35‰ (平均为 -26‰),C4植物约为 -7‰ — -15‰ (平均为 -12‰),CAM植物约为 -10‰ — -22‰ (平均为 -16‰)^[29]。多种植物可以在C3与CAM途径之间相互转换,如高光可诱导植物可进行C3和CAM途径转换,且该转换是可逆的^[30]。本研究中 F^- 胁迫下的莱茵衣藻和蛋白核小球藻平均 $\delta^{13}\text{C}$ 值分别为 -19.36‰ 和 -18.32‰ ,对照组的 $\delta^{13}\text{C}$ 值分别为 -18.42‰ 和 -16.75‰ ,均位于 -10‰ — -22‰ 区间,因此, F^- 胁迫下的两种微藻光合途径为类似于高等植物的CAM途径。

3 结论

以莱茵衣藻和蛋白核小球藻为受试生物,通过研究 F^- 对藻叶绿素含量、胞外碳酸酐酶活性及稳定碳同位素组成的影响,得到以下主要结论:

(1) 当 F^- 浓度较低(不超过 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)时,随 F^- 浓度增大,蛋白核小球藻叶绿素a、b含量和 CA_{ex} 活性基本不变,而莱茵衣藻叶绿素a、b含量降低, CA_{ex} 活性小幅增加;当 F^- 浓度较高(10 — $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)时,随 F^- 浓度的增加,蛋白核小球藻和莱茵衣藻的叶绿素a、b含量均明显下降, CA_{ex} 活性显著增大,且在 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时达最大, $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时两种藻均不能生存,无 CA_{ex} 活性和叶绿素含量表征。

(2) 莱茵衣藻对 F^- 具有更灵敏的 CA_{ex} 响应机制,其生长更易受 F^- 的影响,而蛋白核小球藻对 F^- 的耐受性更好, $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以下的 F^- 对其生长基本上无影响,但高浓度 F^- 胁迫下的蛋白核小球藻叶绿素含量大幅下降,其生长亦受到严重的抑制。

(3) 在实验浓度范围内,莱茵衣藻和蛋白核小球藻的 $\delta^{13}\text{C}$ 值均随 F^- 浓度的增大呈现出更大的负偏差, F^- 使二者优先利用较轻的 ^{12}C ,使光合产物中 ^{13}C 比率下降,说明两种微藻光合作用固定无机碳模式发生改变。

参 考 文 献

- [1] Dolbier W R. Fluorine chemistry at the millennium[J]. Journal of Fluorine Chemistry, 2005, 126: 157-163
- [2] Ghosh A, Mukherjee K, Ghosh S K, et al. Sources and toxicity of fluoride in the environment[J]. Research on Chemical Intermediates, 2013, 39: 2881-2915
- [3] Adolf Eisentraeger, Wolfgang Dott, Joern Klein, et al. Comparative studies on algal toxicity testing using fluorometric microplate and Erlenmeyer flask growth-inhibition assays[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2003, 54: 346-354
- [4] 华汝成. 单细胞藻类的培养与利用[M]. 北京: 农业出版社, 1983: 86-92
- [5] Moroney J V, Ma Y B, Frey W D, et al. The carbonic anhydrase isoforms of *Chlamydomonas reinhardtii*: Intracellular location, expression, and physiological roles[J]. Photosynthesis Research, 2011, 109: 133-149
- [6] 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
- [7] 赵旭辉, 孔繁翔, 谢薇薇, 等. 全球 CO_2 水平升高对浮游植物生理和生态影响的研究进展[J]. 生态学报, 2012, 32(21): 6880-6891
- [8] 夏建荣, 高坤山. 绿藻 CO_2 浓缩机制的研究进展[J]. 应用生态学报, 2002, 13(11): 1507-1510
- [9] Mercado J M, Gordillo F J L, Figueroa F L, et al. External carbonic anhydrase and affinity of inorganic carbon in intertidal macroalgae[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 1998, 221: 209-220
- [10] O'Leary M H. Carbon Isotopes in Photosynthesis[J]. BioScience, 1988, 38(5): 328-336

- [11] Klemer A R. Effects of nutritional status on *Cyanobacteria buoyancy*, bloom, and dominance with special reference to inorganic carbon[J]. Canadian Journal of Botany, 1991, 69: 2293-2297
- [12] Dawson T E, Mambelli S, Plamboeck A H, et al. Stable isotopes in plant ecology[J]. Annual Review of Ecology and Systematics, 2002, 33: 507-559
- [13] 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
- [14] Lichtenthaler H K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes[J]. Methods Enzymol, 1987, 148: 350-382
- [15] 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, 38(16): 8376-8377
- [16] 施倩倩. 全固态 pH 微传感器的制备及其在碳酸酐酶活力检测中的应用[D]. 镇江: 江苏大学农业工程研究院硕士论文, 2010
- [17] Smith A O, Woodson B R. The effects of fluoride on the growth of *Chlorella pyrenoidosa*[J]. Virginia J Sci, 1965, 16: 1-8
- [18] Chen T F, Zheng W J, Luo Y, et al. Effects of selenium stress on photosynthetic pigment contents and growth of *Chlorella vulgaris*. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2005, 31(4): 369-373
- [19] 杜敏华, 张乃群, 李玉英, 等. 大气污染对城市绿化植物叶片叶绿素含量的影响[J]. 中国环境监测, 2007, 23(2): 86-88
- [20] 高厚强, 张晓玲. 合肥市大气污染对植物叶绿素(a、b) 含量比例的影响[J]. 安徽农业科学, 2003, 31(3): 367-368
- [21] Kandler O. Hemmungsanalyse der lichtabhängigen phosphorylierung[J]. Z Natur Sch, 1955, 10b: 38-46
- [22] Tsuzuki M, Shimamoto T, Yang S Y, et al. Diversity in intracellular locality, nature, and function of carbonic anhydrase in various plants[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 1984, 429: 238-240
- [23] 吴运东, 吴沿友, 李潜, 等. pH 与氟对莱茵衣藻和蛋白核小球藻胞外碳酸酐酶活性及光合效率的影响[J]. 农业环境科学学报, 2011, 30(10): 1972-1977
- [24] Camargo J A. Fluoride toxicity to aquatic organisms: A review[J]. Chemosphere, 2003, 50(3): 251-264
- [25] Chen Z, Cheng H M, Chen X W. Effect of Cl^- on photosynthetic bicarbonate uptake in two cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* and *Synechocystis* PCC6803[J]. Chin Sci Bull, 2009, 54: 1197-1203
- [26] Maberly S C. Exogenous sources of inorganic carbon for photosynthesis by marine macroalgae[J]. J Phycol, 1990, 26: 439-492
- [27] 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
- [28] Farquhar G D, Ball M C, Caemmerer S, et al. Effect of salinity and humidity on $\delta^{13}\text{C}$ value of halophytes—Evidence for diffusional isotope fractionation determined by the ratio of intercellular/atmospheric partial pressure of CO_2 under different environmental conditions[J]. Oecologia, 1982, 52(1): 121-124
- [29] 蒋高明. 植物生理生态学研究中的稳定碳同位素技术及其应用[J]. 生态学杂志, 1996, 15(2): 49-54
- [30] Franco A C, Ball E, Lyttge U. The influence of nitrogen, light and water stress on CO_2 exchange and organic acid accumulation in the tropical C_3 -CAM tree, *Clusia minor*[J]. Journal of Experimental Botany, 1991, 42: 597-603.