

# 微藻及其碳酸酐酶对石灰岩土壤系统中 钙元素迁移的驱动作用实验研究

李 为<sup>1,2</sup>, 曾宪东<sup>1</sup>, 栗茂腾<sup>1,2</sup>, 周蓬蓬<sup>1,2</sup>, 余龙江<sup>1,2</sup>

1. 华中科技大学 生命科学与技术学院 生物技术系资源生物学与生物技术研究所, 武汉 430074;

2. 分子生物物理教育部重点实验室, 武汉 430074

**摘 要:** 本文以微藻(莱茵衣藻)为材料, 通过室内模拟石灰岩土壤系统, 对接种微藻的土柱进行不同淋滤条件的处理, 系统监测了淋出液的电导率、Ca<sup>2+</sup>浓度和碳酸酐酶的活性。结果表明, 以双蒸水进行淋滤的土柱, Ca<sup>2+</sup>总淋出量在24 d时仅为以微藻培养液进行淋滤土柱的11.9%, 且淋出液碳酸酐酶的平均活性与Ca<sup>2+</sup>总淋出量间有较好的相关性, 说明微藻及其碳酸酐酶对石灰岩土壤系统中的Ca元素迁移有较强的驱动作用。本文的研究结果为探讨藻类碳酸酐酶在岩溶发育中的作用提供了一定的科学依据, 进一步深入研究将有助于弄清藻类及其碳酸酐酶对岩溶碳汇的作用。

**关 键 词:** 土壤-灰岩岩溶系统; 淋滤; Ca<sup>2+</sup>; 碳酸酐酶; 元素迁移

中图分类号: P595 文献标识码: A 文章编号: 1007-2802(2011)03-0261-04

## Experimental Study on Driving Effects of Microalgae and its Carbonic Anhydrase on Migration of Calcium in a Simulative Soil-limestone Karst System

LI Wei<sup>1,2</sup>, ZENG Xian-dong<sup>1</sup>, LI Mao-teng<sup>1,2</sup>, Zhou Peng-peng<sup>1,2</sup>, YU Long-jiang<sup>1,2</sup>

1. Institute of Resource Biology and Biotechnology, Department of Biotechnology, College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430074, China;

2. Key Laboratory of Molecular Biophysics, Ministry of Education, Wuhan 430074, China

**Abstract:** *Chlamydomonas reinhardtii* was selected as the target microalgae and was inoculated onto simulative soil-limestone columns. This study systematically measured dynamics of electric conductivity, Ca<sup>2+</sup> concentration and carbonic anhydrase activity in leachates under different leaching conditions. The results showed that, when the columns were leached with redistilled water, the total amount of leached Ca<sup>2+</sup> at the time of 24 d was 11.9% of that leached with culture liquid of microalgae, and that the average activity of carbonic anhydrase in the leachates was correlated well with the total amount of leached Ca<sup>2+</sup>. These results implied that microalgae and its carbonic anhydrase have significant driving effect on calcium migration in the soil-limestone karst system. The results of this paper provide scientific basis for studying the role of algae carbonic anhydrase in karst development. It is expected that a deepen investigation following this study will help in clarifying the role of algae and the carbonic anhydrase in carbon sequestration of karst areas.

**Key words:** soil-limestone system; leaching; Ca<sup>2+</sup>; carbonic anhydrase; element migration

生物在岩溶发育过程中的作用已愈来愈受到学者们的重视。目前在藻类<sup>[1]</sup>、地衣<sup>[2]</sup>、苔藓<sup>[3]</sup>等对碳酸盐岩浅表层钻孔溶蚀形成的生物岩溶微形态和形

成机理等有过较为深入的研究, 而从Ca迁移的角度来研究这些生物的岩溶作用效应则报道很少, 尤其是关于这些生物的酶的岩溶作用的研究则鲜见报

收稿日期: 2011-03-11 收到, 04-14 改回

基金项目: 中国地质调查局地质调查工作项目(1212011087120)

第一作者简介: 李 为(1969—), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 资源生物技术, 地质生物学. E-mail: hulwei\_009@163.com.

通讯作者: 余龙江(1966—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 资源生物学与生物技术. E-mail: yulongjiang@mail.hust.edu.cn.

道。碳酸酐酶(Carbonic anhydrase, CA, EC4. 2. 1. 1)是一种在哺乳动物、植物和原核生物中普遍存在的金属酶,可催化  $\text{CO}_2$  进行可逆水合反应<sup>[4]</sup>。在淡水微藻和大型海藻中都发现存在碳酸酐酶,但有关这些藻类碳酸酐酶的研究主要集中在光合作用及其机制方面<sup>[5,6]</sup>。研究表明,如果在岩溶动力系统中加入牛碳酸酐酶,则石灰岩的溶解速率可提高 10 倍<sup>[7]</sup>。我们也发现来源于微生物的碳酸酐酶对石灰岩具有显著的溶蚀驱动作用<sup>[8~10]</sup>。然而有关藻类碳酸酐酶对于碳酸盐岩的溶蚀及其元素迁移的影响研究鲜见报道。本文以绿色淡水微藻莱茵衣藻为材料,通过土壤-石灰岩岩溶系统的土柱模拟实验,研究微藻及其碳酸酐酶对该系统中 Ca 元素迁移的影响,探讨微藻碳酸酐酶与岩溶系统 Ca 元素淋失量之间的相关性,为研究藻类碳酸酐酶在岩溶发育中的作用提供一定的科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试微藻

实验所采用的莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*, FACHB479)藻种购自典型培养物保藏委员会淡水藻种库(FACHB);采用 SE 培养基进行培养。

### 1.2 供试土壤与石灰岩试片

实验所用土壤采自广西桂林丫吉村岩溶实验场洼地,为表层 0~20 cm 的湿润钙质淋溶土<sup>[11]</sup>。土样经风干、磨碎,先后过 65 目和 200 目筛子,取介于两筛子孔径之间的颗粒,备用。供试岩石为纯石灰岩,做成长 1 cm、宽 1 cm、厚度为 2 mm 的方形试片,表面细磨光滑。

### 1.3 实验装置及设计

土柱模拟实验方法见文献[8]。土柱内径为 5 cm,高度为 16 cm,在土柱下部的玻璃纤维上平行放置两块石灰岩试片。土柱内装土约 180 g,土层厚度约 10 cm。土柱最上部用玻璃纤维和石英砂覆盖,顶端用 12 层纱布和牛皮纸封盖扎紧,底部通过硅胶管与收集瓶相连。土柱装置经过灭菌后,在无菌条件下分别接入 20 mL 衣藻培养物。3 h 后各土柱以 40 mL 双蒸水淋洗,使土壤吸水饱和后,再分别以下列淋溶液淋滤:A 号土柱采用衣藻培养液进行淋滤,B 号土柱采用无菌双蒸水进行淋滤。每 2 d 淋滤 1 次,每次 20 mL,每 4 d 收集 1 次淋出液。用于测定电导率、 $\text{Ca}^{2+}$  浓度和碳酸酐酶活性。实验重复两次。

### 1.4 分析方法

pH 值采用 Mettled Toledo S-326 型 pH 计测

量,电导率采用 Mettled Toledo 326 型电导率仪测量, $\text{Ca}^{2+}$  浓度采用 Perkin Elmer AA300 型原子吸收光谱仪测定,碳酸酐酶活性采用 pH 计法测定,具体测定方法参见文献[8]。所有数据为三次平行测定的平均值。

## 2 结果与分析

### 2.1 淋出液碳酸酐酶活性的变化

装柱后接种前土柱经过灭菌,土壤的碳酸酐酶活性视为零。因此,随后的淋滤实验所测得的碳酸酐酶活性主要来源于接种的衣藻在生长过程中分泌的胞外碳酸酐酶。如图 1 所示,在碳酸酐酶活性随时间变化的过程中,用衣藻培养液淋滤的土柱 A 淋出液中的酶活性明显高于用双蒸水淋滤的土柱 B。土柱 A 淋出液中的酶活性变化表现为起始阶段酶活性明显下降,继而活性逐渐增强且趋于稳定,而土柱 B 淋出液中的酶活性始终在一个较低的水平波动。

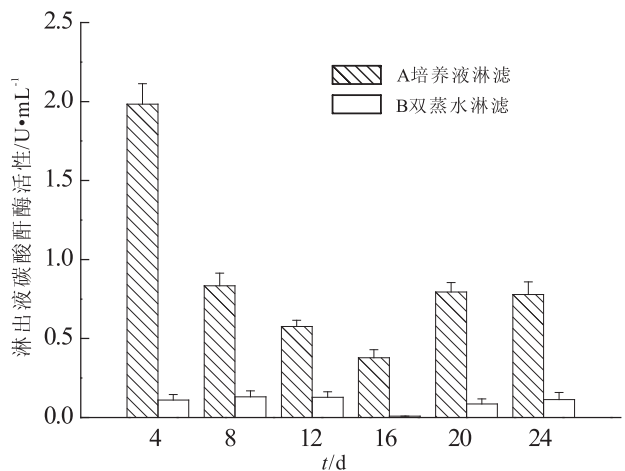


图 1 不同淋滤条件对淋出液中碳酸酐酶活性变化的影响  
Fig. 1 Effect of different leaching conditions on carbonic anhydrase activity in leachates

### 2.2 淋出液电导率的变化

淋出液电导率的变化趋势比较一致(图 2),前 12 d 电导率急剧下降,随后电导率平缓下降,逐渐趋于稳定。这是因为土壤中的水溶性无机离子在淋滤前期迅速被淋出,后期淋出的无机离子主要来源于土壤中的交换性离子和石灰岩缓慢溶出的离子,而该过程离子的释放很缓慢。初始电导率相差不大,后期以培养液进行淋滤的土柱 A 的淋出液电导率比双蒸水淋滤的土柱 B 要高,第 24 d 时土柱 A 的淋出液电导率是土柱 B 的 2.35 倍。

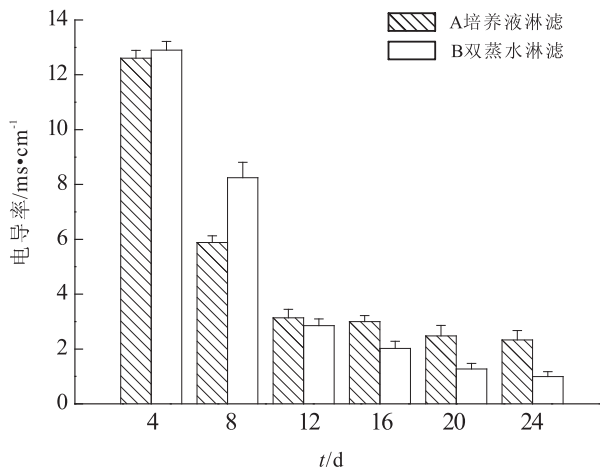
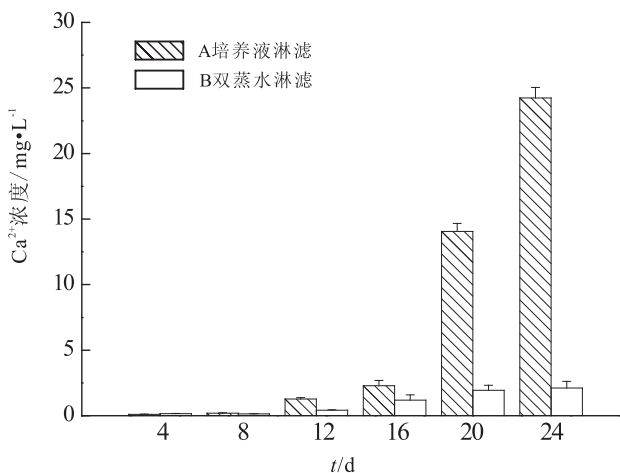


图2 不同淋滤条件对淋出液电导率变化的影响

Fig. 2 Effect of different leaching conditions on the electric conductivity of leachates

### 2.3 Ca<sup>2+</sup>的淋出动态

不同淋滤条件下 Ca<sup>2+</sup> 的淋出动态如图 3 所示。淋滤初期,以培养液淋滤的土柱 A 和以双蒸水淋滤的土柱 B 的淋出液中 Ca<sup>2+</sup> 浓度相当,第 8 d 开始 Ca<sup>2+</sup> 浓度均缓慢增加,但土柱 A 的增加幅度稍大于土柱 B,第 12 d 开始土柱 A 的 Ca<sup>2+</sup> 浓度增加较快,第 16 d 后迅速增加,增加幅度远远大于土柱 B,土柱 B 则是缓慢增加,到第 24 d 时土柱 B 淋出液的 Ca<sup>2+</sup> 浓度显著低于土柱 A,仅为土柱 A 的 8.7%,这与相应的电导率状况完全吻合。

图3 不同淋滤条件下 Ca<sup>2+</sup> 的淋出动态Fig. 3 Changes of Ca<sup>2+</sup> in leachates under different leaching conditions

## 3 讨论

岩溶地区碳酸盐岩表面分布着多种类型的藻类,它们通过新陈代谢和特有的生活习性,调整和改变所附着微环境的微环境,从而对碳酸盐岩的风化产生重

要影响<sup>[12]</sup>。目前在研究藻类促进碳酸盐岩风化的机制时较少考虑藻类碳酸酐酶的作用。本文以微藻莱茵衣藻为材料,通过土柱模拟实验,比较了不同淋滤条件下微藻及其碳酸酐酶对土壤-石灰岩岩溶系统中钙元素迁移的影响。

土柱实验所得淋出液的电导率变化趋势一致,前期电导率高且快速下降,而后期(12 d 后)电导率缓慢下降到较低的水平并相对稳定。然而,在此过程中,以培养液淋滤的土柱 A 淋出液的 Ca<sup>2+</sup> 浓度则呈完全相反的趋势:淋滤初期淋出液中 Ca<sup>2+</sup> 浓度平稳地维持在低水平,而后期淋出液中 Ca<sup>2+</sup> 浓度却开始快速增高。此结果与我们采用细菌进行土柱模拟实验时的结果不太一致<sup>[8]</sup>。其原因可能是由于淋滤初期,土壤中大量的水溶性离子被迅速淋出,而初期衣藻的生长要消耗较多的 Ca<sup>2+</sup>,因此虽然初期电导率高,但淋出液中 Ca<sup>2+</sup> 浓度却较低;而后期土壤系统从扰动状态变化到平衡状态,衣藻生长及其产生的胞外碳酸酐酶活性也都比较稳定,此时石灰岩试片的溶蚀在衣藻及其酶的驱动作用下加快,导致淋出液的 Ca<sup>2+</sup> 浓度快速增高,同时电导率处在一个相对稳定的低水平。

根据 Ca<sup>2+</sup> 的淋出动态,计算求得每个土柱所有淋出液的 Ca<sup>2+</sup> 总量和淋滤所用的所有淋溶液中所含的 Ca<sup>2+</sup> 总量,二者之间的差值即为对应的土柱在淋滤过程中的 Ca<sup>2+</sup> 总淋出量。结果表明,用培养液淋滤和用双蒸水淋滤出的 Ca<sup>2+</sup> 总淋出量分别为 1.24±0.03 和 0.15±0.01 mg;可见后者明显低于前者(仅其 11.9%)。对照土柱中衣藻的生长情况,以培养液淋滤的土柱中衣藻生长较好,而以双蒸水进行淋滤的土柱中衣藻生长情况较差,这些说明土柱中的衣藻对灰岩土壤系统中 Ca 元素的迁移具有较大促进作用。

不同淋滤条件下土柱淋出液中碳酸酐酶的平均活性与 Ca<sup>2+</sup> 总淋出量的相关分析发现,二者有较好的正相关性( $r=0.82, p<0.01$ ),说明微藻胞外碳酸酐酶对石灰岩土壤系统中的 Ca 迁移有较强的驱动作用,这与我们对微生物碳酸酐酶的研究结果相类似<sup>[8~10]</sup>。文献<sup>[13]</sup>的作者在衣藻培养液中加入石灰岩颗粒,根据碳酸酐酶抑制剂能抑制衣藻对石灰岩颗粒的溶解过程,指出衣藻胞外碳酸酐酶能促进石灰岩的溶解,与本研究结论相一致。

以上研究结果为评价藻类及其碳酸酐酶在生物岩溶中的作用提供了一定的科学依据,进一步的研究将有助于弄清藻类及其碳酸酐酶对岩溶碳汇的作用,有助于了解藻类生物岩溶的机理。

## 参考文献 (References):

- [1] 田友萍,张捷,宋林华,包浩生. 云南石林碳酸盐岩表面气生蓝藻(蓝细菌)研究[J]. 生态学报,2002,22(11):1793-1802.  
Tian Youping, Zhang Jie, Song Linhua, Bao Haosheng. A study on aerial cyanophyta (cyanobacteria) on the surface of carbonate rock in Yunnan tone Forest, Yunnan Province, China[J]. Acta Ecologica Sinica, 2002, 22(11): 1793-1802. (in Chinese with English abstract)
- [2] Viles H A. A quantitative scanning electron microscope study of evidence for lichen weathering of limestone, Mendip Hills, Somerset[J]. Earth Surface Process Landforms, 1987(12): 467-473.
- [3] 张朝晖,王智慧,祝安. 黄果树喀斯特洞穴群苔藓植物岩溶的初步研究[J]. 中国岩溶, 1996, 15(3): 224-232.  
Zhang Chaohui, Wang Zhihui, Zhu An. A preliminary study on bryokarst of caves in Huangguoshu area[J]. Carsologica Sinica, 1996, 15(3): 224-232. (in Chinese with English abstract)
- [4] Tripp B C, Smith K, Ferry J G. Carbonic anhydrase: New insights for an ancient enzyme [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2001, 276: 48615-48618.
- [5] Park Y I, Karlsson J, Rojdestvenski I, Pronina N, Klimov V, Oquist G, Samuelsson G. Role of a novel photosystem II-associated carbonic anhydrase in photosynthetic carbon assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. FEBS Letters, 1999, 444: 102-105.
- [6] 陈雄文,高坤山. CO<sub>2</sub> 浓度对中肋骨条藻的光合无机碳吸收和胞外碳酸酐酶活性的影响[J]. 科学通报, 2003, 48(21): 2274-2279.  
Chen Xiongwen, Gao Kunshan. Effects of CO<sub>2</sub> concentration on photosynthetic inorganic carbon uptake and activity of extracellular carbonic anhydrase of *Skeletonema costatum* [J]. Chinese Science Bulletin, 2003, 48(21): 2274-2279. (in Chinese)
- [7] Liu Z H. Role of carbonic anhydrase as an activator in carbonate rock dissolution and its implication for atmospheric CO<sub>2</sub> sink[J]. Acta Geologica Sinica, 2001, 75: 275-278.
- [8] Li W, Yu L J, He Q F, Wu Y, Yuan D X, Cao J H. Effects of microbe and their carbonic anhydrase on Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> migration in column-built leached soil-limestone karst systems [J]. Applied Soil Ecology, 2005, 29: 274-281.
- [9] Li W, Yu L J, Wu Y, Jia L P, Yuan D X. Enhancement of Ca<sup>2+</sup> release from limestone by microbial extracellular carbonic anhydrase[J]. Bioresource Technology, 2007, 98: 950-983.
- [10] 李为,贾丽萍,余龙江,朱敏,周蓬蓬. 不同种类微生物及其碳酸酐酶对土壤-灰岩系统钙镁锌元素迁移作用的土柱模拟实验研究[J]. 土壤, 2007, 39(3): 453-459.  
Li Wei, Jia Liping, Yu Longjiang, Zhu Min, Zhou Pengpeng. Effect of different kinds of microbes and their carbonic anhydrase on element migration of Ca, Mg and Zn in soil-limestone systems: stimulated column experiments [J]. Soils, 2007, 39(3): 453-459. (in Chinese with English abstract)
- [11] 龚子同. 中国土壤系统分类: 理论·方法·实践[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 537-607.  
Gong Zitong. Taxonomy of China soil systems: Theory methods practice [M]. Beijing: Science Press, 1999: 537-607. (in Chinese)
- [12] 连宾,陈烨,朱立军,杨瑞东. 微生物对碳酸盐岩的风化作用[J]. 地学前缘, 2008, 15(6): 90-99.  
Lian Bin, Chen Ye, Zhu Lijun, Yang Ruidong. Progress in the study of weathering of carbonate rock by microbes [J]. Earth Science Frontiers, 2008, 15(6): 90-99. (in Chinese with English abstract)
- [13] Wu Y Y, Wang B L, Liu C Q. *Chlamydomonas reinhardtii*'s influence on the corrosion of rocks [A]. Martin-Duque J F, Brebbia C A, Godfrey A E, Dian de Teran J R, eds. Geo-environment [C]. Southampton: WIT Press, 2004: 145-150.