

Effects of Calcium Concentration on Biocalcification of *Synechococcus*

Fei Liu, Xiaomin Li, Wenhong Fan

School of Chemistry and Environment, Beihang University (BUAA), 37 Xue Yuan Road, Haidian District, Beijing, China
Email: xiaominli@buaa.edu.cn

Received 2013

Abstract: Biocalcification of microalgae is important for the precipitation of calcium carbonate and carbon cycle in nature. Getting knowledge of biocalcification is in favor of dealing with the global climate changes. However, the research of biocalcification is not sufficient at present. In this study, the effects of calcium concentration on biocalcification of *Synechococcus* PCC 7942 were investigated on laboratory scale. The growth of algae, the solution pH, alkalinity and the concentration of Ca^{2+} were measured during the experiments, while the precipitation was detected with scanning electron microscopy at the same time. The results showed that the existence of *Synechococcus* PCC 7942 promoted the precipitation of calcium carbonate in solution. But higher calcium concentration in solution has no active effects on the precipitation process. Under the experimental conditions, the most suitable concentration of calcium was 190 mg / L.

Keywords: *Synechococcus*; Biocalcification; Calcium Concentration

钙离子浓度对聚球藻 *Synechococcus* 钙化过程的影响

刘 菲, 李晓敏, 范文宏

北京航空航天大学化学与环境学院, 北京, 中国, 100191
Email: xiaominli@buaa.edu.cn

收稿日期: 2013

摘 要: 微藻的生物钙化现象是自然界水体中沉积物形成和碳循环的重要组成部分, 对生物钙化现象的研究, 有利于人类更好的应对全球气候变化。但目前对微藻生物钙化现象的研究还不充分。本文中对典型钙化蓝藻聚球藻 *Synechococcus* 的生物钙化现象进行了实验室研究, 考察了水体中钙离子的初始浓度对生物钙化过程的影响。实验测定了藻类生长的变化、溶液 pH 值、碱度及钙离子浓度的变化, 并用扫描电子显微镜观察了沉淀的生成情况。结果表明, 聚球藻的存在明显促进了溶液中碳酸钙沉淀的生成。但是溶液中钙离子浓度过高未对碳酸钙沉淀过程产生积极影响。实验条件下, 钙离子初始浓度 190 mg/L 是形成碳酸钙沉淀的最佳条件。

关键词: *Synechococcus*; 聚球藻; 生物钙化; 钙离子浓度

1 引言

碳酸钙沉淀是碳循环的一个基本阶段, 钙化作用尤其是海洋生物钙化对碳酸钙沉淀的形成和碳循环具有重要的意义。生物钙化现象在自然界中一直都存

在。Turne^[1]发现蓝藻钙化在新元古代时期 (Neoproterozoic) 就存在了。钙化生物的种类也很多, 如不同种类的蓝藻^[2, 3], 真核微藻^[4, 5]等浮游植物, 还有一些光营养细菌^[6]。其中蓝藻是水环境中分布最广泛的藻类, 适应性强^[7], 且易于基因重组, 是研究比较多的钙化生物。

*本论文工作由国家自然科学基金项目 (51178019) 资助。

蓝藻钙化现象在淡水中^[8]和海水中^[3]都有发生。关于蓝藻钙化机制的研究有很多，主要集中在两个方面：藻类光合作用的影响和藻细胞表面的结构及性质。例如蓝藻光合作用和活性离子过膜交换对蓝藻生物钙化成核的影响^[9]；蓝藻光合作用对水体 pH 值、方解石饱和度以及沉淀速率的影响^[10]；蓝藻细胞表面带负电荷，对细胞表面吸附 Ca^{2+} 的作用^[11]；蓝藻存在对碳酸钙成核能量的影响^[12]；蓝藻细胞外聚合物 (EPS)^[13]对碳酸钙形成的作用；细胞表面半结晶态带电荷蛋白质 (S-层结构)^[14]对钙化成核位点的影响。蓝藻促进钙化的可能原因包括藻细胞表面可以为生物钙化提供碳酸钙成核位点；藻的光合作用会吸收水体中的 CO_2 和 HCO_3^- ，使细胞周围微环境呈碱性， CO_3^{2-} 浓度增加，碳酸钙过饱和度增加等，但目前的报道中对蓝藻钙化成核的细节依然没有很好的解释。

蓝藻生物钙化过程的影响因素很多，如藻类的生长状态、可利用的碳源、溶液的 Ca^{2+} 浓度、光照条件和温度等。本实验选用典型钙化蓝藻 *Synechococcus* PCC 7942，研究了溶液中不同钙离子初始浓度下藻的生长状态，以及藻的存在对碳酸钙沉淀的影响。

2 实验材料与方法

2.1 蓝藻培养

试验用藻种购自中国科学院武汉水生生物研究所国家淡水藻种库 (FACHB-805)，培养在人工气候箱中进行，培养基为 Z/10，培养条件为 23°C 、4000 lx，光暗周期比 16: 8。

2.2 沉淀实验

沉淀实验在人工气候箱中进行。向容积为 1.2 L 的五口玻璃瓶中加入 2.0 mM 碳酸氢钠溶液，以流速 30 ml/min 持续通入空气。将培养至对数期的藻细胞过滤洗涤，加入到玻璃瓶中，藻细胞浓度为 1×10^5 个/ml。然后缓慢加入 CaCl_2 溶液，使得溶液中 Ca^{2+} 的初始浓度分别为 290, 230, 210, 190 mg/L。实验持续时间为 100 小时，实验过程中连续测定溶液的 pH 值，每隔一定的时间取样测定藻细胞的密度、溶液的碱度及 Ca^{2+} 浓度，并对生成的晶体用扫描电子显微镜进行分析。以未加入藻细胞的溶液做为空白。

2.3 检测方法

溶液 pH 值采用 WTW 电导率仪进行测定。藻细胞浓度利用分光光度法测定。溶液用 0.2 μm 聚碳酸酯膜 (Whatman, UK) 过滤后分析其碱度及 Ca^{2+} 浓度。溶液的碱度采用滴定法测定，钙离子浓度采用 ICP-AES (IRIS Intrepid II, Thermo, USA) 进行测定。过滤后的藻细胞及沉淀用扫描电子显微镜 (Apollo 300, OXFORD, CamScan) 进行观察。

3 结果与讨论

本次实验包含了四种不同浓度的钙离子溶液实验和一组空白对照试验，目的是为了确定溶液中钙离子的初始浓度对 *Synechococcus* PCC 7942 钙化的影响。在实验中测量了藻细胞量、溶液的 pH 值、碱度和 Ca^{2+} 浓度，同时用扫描电子显微镜观察过滤后的物质，确定溶液中是否有碳酸钙沉淀生成。

3.1 藻的生长情况

在实验条件范围内，蓝藻的生长呈现出相同的生长趋势 (图 1)。前期生长速度较慢，然后逐渐加快，最后趋于平稳。这是因为新接种的藻需要适应环境，在调整和驯化阶段生长缓慢；对环境适应之后，藻类快速生长，生命活性和活力都有所增高；在后期则由于营养物质的消耗以及代谢产物不断积累，致使藻生长速度降低，增殖速度与死亡速度相近，生物量保持稳定。

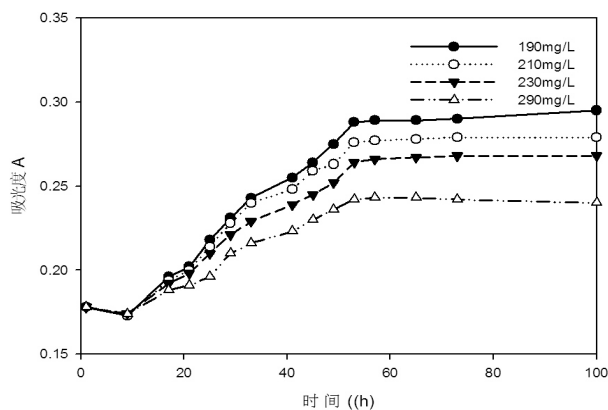


Figure 1. The growth of *Synechococcus* in the solution
图 1. 溶液中聚球藻的生长情况

从图 1 中可以发现，藻的生长速度和最终的生物

量都是随着钙离子初始浓度增高而降低。在钙离子浓度为 290 mg/L 的溶液中生长的藻, 实验后期生物量出现下降, 溶液颜色变黄。

3.2 溶液 pH 值的变化

对溶液 pH 值的测定表明在实验过程中溶液 pH 值表现出明显的上升, 如图 2 所示。而溶液碱性增强有利于碳酸钙沉淀过程的进行。从图中可以看出在 0~10 h 内溶液的 pH 值处于平衡阶段。空白溶液的 pH 值随后稳定在 7.9 左右。而当溶液中有藻存在时, pH 值表现出明显的峰型变化趋势。

不同初始钙离子浓度的溶液其 pH 值出现峰值变化的时间和变化幅度均有所不同。初始钙离子浓度越高, 溶液的 pH 变化越小, 出现峰值的时间也越早。当钙离子浓度为 190 mg/L 时, pH 值的变化幅度最大, 在 37 h 达 8.78。当钙离子浓度为 210 mg/L 时, pH 的最大值出现在 31 h, 约为 8.3。当钙离子浓度是 230 mg/L 时, pH 值在 27 h 达到最大值 8.23。当钙离子浓度为 290 mg/L 时, pH 在 19 h 已达到最大值 8.15。

溶液 pH 值的升高可通过藻的光合作用过程来解释^[7]。而实验后期由于藻细胞生长达到稳定期后产生大量的次级代谢产物, 引起溶液 pH 值的下降。

3.3 碱度

由于碳酸钙的形成是 Ca^{2+} 与 CO_3^{2-} 反应的结果, 因此溶液中碳酸根及碳酸氢根的浓度对碳酸钙的形成也存在重要影响。实验中测定了溶液中碱度随时间的变化, 如图 3 所示。实验开始时溶液的碱度约为 2.35 mmol/L。实验开始后, 碱度快速下降, 之后逐渐变缓至趋于稳定。溶液碱度下降最快的是初始钙离子浓度为 290 mg/L 的溶液。溶液碱度的下降, 是细胞光合作用与碳酸钙的形成所消耗共同作用的结果。

3.4 钙离子浓度

表 1 列出了不同初始钙离子浓度溶液中钙离子浓度的降低比例。从表中可以看出, Ca^{2+} 的最大降低率的发生在初始 Ca^{2+} 浓度为 190 mg/L 的溶液中, 降低率为 19.9%。而初始 Ca^{2+} 浓度为 290 mg/L 时, 钙离子浓度降低率仅为 10.1%。原因可能是由于溶液中 Ca^{2+} 浓度过高会影响细胞的新陈代谢, 从而降低了细胞的钙化作用。从表 1 中还可以看出, 藻的存在可加大钙离子的消耗, 低初始浓度条件下这种效应更为明显。表明加入藻细胞后, 沉淀过程被大大增强。

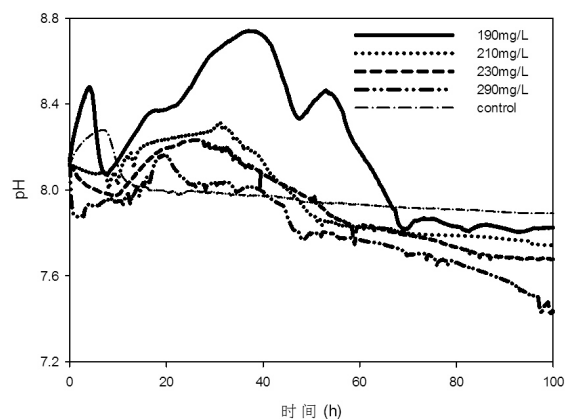


Figure 2. The changes of pH in the four solution of different Ca^{2+} concentration

图 2. 四种不同浓度的 Ca^{2+} 溶液 pH 值随时间的变化

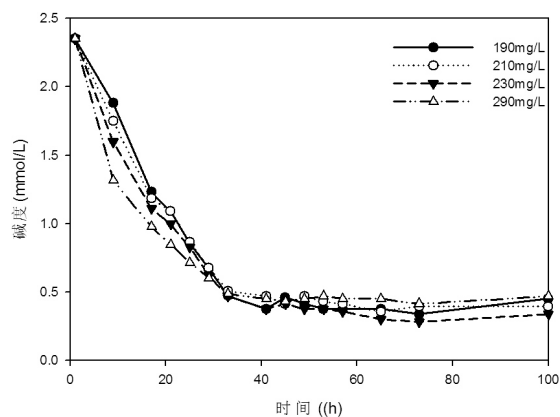


Figure 3. The changes of alkalinity in the four solution of different Ca^{2+} concentration

图 3. 四种不同浓度的 Ca^{2+} 溶液的碱度随时间的变化

Table 1. Consumption of Ca^{2+} during experiments
表 1. 溶液中钙离子浓度的变化

初始 Ca^{2+} 浓度(mg/L)	290		230		210		190	
	藻溶液	空白	藻溶液	空白	藻溶液	空白	藻溶液	空白
Ca^{2+} 浓度降低值(mg/L)	29.6	28.0	30.8	21.3	40.4	19.4	38.0	18.1
Ca^{2+} 浓度降低率 (%)	10.1	9.4	13.4	9.3	19.2	9.2	19.9	9.2

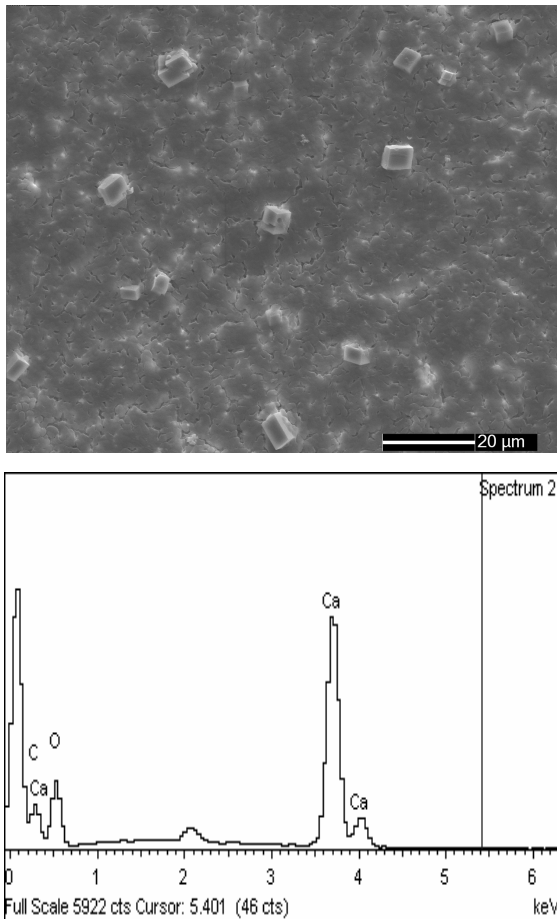


Figure 4. SEM photo and spectroscopy of calcite precipitation
图 4. 碳酸钙晶体扫描电镜图片及晶体能谱图

对比溶液 pH 值和 Ca^{2+} 浓度的变化, 可以看出溶液 pH 值的变化与 Ca^{2+} 浓度的变化密切相关。溶液 pH 值升高, Ca^{2+} 与 CO_3^{2-} 生成了沉淀, Ca^{2+} 浓度降低。

为确定碳酸钙沉淀的形成, 对实验中的藻细胞溶液进行了扫描电镜观察。结果表明滤膜上有明显的白色矿物晶体(图 4), 对晶体进行能谱扫描, 得到的能谱图。能谱图中有明显的 Ca 波峰, 因此可以确定其为方解石晶体。

4 结论

溶液中有聚球藻 *Synechococcus* PCC7942 存在时, 会促进碳酸钙沉淀的生成, 表现出明显的生物钙

化现象。但钙离子浓度增高并未增强碳酸钙沉淀的生成, 原因可能是溶液中 Ca^{2+} 浓度过高会影响藻的新陈代谢活动。实验条件下, 溶液钙离子浓度为 190 mg/L 时, 生成的碳酸钙量最大, 此时钙离子减少率为 19.9%。

参考文献 (References)

- [1] T. C. Elizabeth, M. N. Guy, P. J. Noel. Neoproterozoic reef microstructures from the Little Dal Group. *Northwestern Canada. Geology*, 1993, 21 (3) : 259-262.
- [2] B. D. Lee, W. A. Apel, M. R. Walton. Screening of Cyanobacterial Species for Calcification. *Biotechnology Progress*, 2004, 20 (5) : 1345-1351.
- [3] S. A. Kranz, Dieter Wolf-GLADROW, Gernot Nehrke, *et al.* Calcium carbonate precipitation induced by the growth of the marine cyanobacterium *Trichodesmium*. *Limnology and Oceanography*, 2012, 55(6): 2563-2569.
- [4] K. W. Demes, S. S. Bell, C. J. Dawes. The effects of phosphate on the biomineralization of the green alga, *Halimeda incrassata* (Ellis) Lam. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2009, 374(2): 123-127.
- [5] Giulia Santomauro, Johannes Baier, Wanjing Huang, *et al.* Formation of Calcium Carbonate Polymorphs Induced by Living Microalgae. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 2012, 3: 413-420.
- [6] I. A. Bundeleva, L. S. Shirokova, P. Bénézech, O. S. Pokrovsky, E. I. Kompantseva, S. Balor. Calcium carbonate precipitation by anoxygenic phototrophic bacteria. *Chemical Geology*, 2012, 291: 116-131.
- [7] C. Jansson, T. Northen. Calcifying cyanobacteria—the potential of biomineralization for carbon capture and storage. *Current Opinion in Biotechnology*, 2010, 21(3): 365-371.
- [8] M. Pedley, M. Rogerson, R. Middleton. Freshwater calcite precipitates from in *vitro* mesocosm flume experiments: a case for biomediation of tufas. *Sedimentology*, 2009, 56(2): 511-527.
- [9] M. Dittrich, M. Obst. Are Picoplankton Responsible for Calcite Precipitation in Lakes? *Ambio*, 2004, 33: 559-564.
- [10] F. Hammes, W. Verstraete. Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate. *Environmental Science & Bio/Technology*, 2002, 1: 3-7.
- [11] M. Obst, M. Dittrich. Calcium adsorption and changes of the surface microtopography of cyanobacteria studied by AFM, CFM, and TEM with respect to biogenic calcite nucleation. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, 2006, 7(6): 1-15.
- [12] M. Obst, B. Wehrli, M. Dittrich. CaCO_3 nucleation of cyanobacteria: laboratory evidence for a passive surface-induced mechanism. *Geobiology*, 2009, 7(3): 324-347.
- [13] T. Kawaguchi, A. W. Decho. A laboratory investigation of cyanobacterial extracellular polymeric secretions (EPS) in influencing CaCO_3 polymorphism. *Journal of Crystal Growth*, 2002, 240 (1-2) : 230-235.
- [14] T. J. Beveridge, P. H. Pouwels, M. Sára, *et al.* V. Function of S-layers. *FEMS Microbiology Reviews*, 1997, 20: 99-149.