

# 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

吴运东<sup>1</sup>, 吴沿友<sup>1,2\*</sup>, 李 潜<sup>3</sup>, 赵 宽<sup>1</sup>

(1.现代农业装备与技术省部共建教育部重点实验室/江苏省重点实验室 江苏大学农业工程研究院, 江苏 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.江苏大学环境学院, 江苏 镇江 212013)

**摘 要:**本文研究了不同 pH(5.0、7.0 和 9.0)和 F 浓度(0.1、1、10、50、100、200 mmol·L<sup>-1</sup>)对莱茵衣藻和蛋白核小球藻的胞外碳酸酐酶活性、PS II 实际光合效率  $\Phi_{PSII}$  和叶绿素 a 合成量的共同影响。结果表明:在低于 1 mmol·L<sup>-1</sup> 的 F 作用下,两种微藻的生理和生长指标主要受 pH 影响;酸性条件下,两种微藻胞外碳酸酐酶活性显著低于中性和碱性条件时, $\Phi_{PSII}$  随 pH 升高而增大,叶绿素 a 合成量随 pH 升高而增加。在高于 1 mmol·L<sup>-1</sup> 的 F 作用下,两种微藻的生理及生长指标受 F 和 pH 共同影响,且 F 的作用大于 pH 的作用,胞外碳酸酐酶活性随着 F 浓度升高先增加后降低,同时随着 pH 下降而降低; $\Phi_{PSII}$  和叶绿素 a 合成量则随着 F 浓度升高和 pH 下降而迅速下降。胞外碳酸酐酶活性、 $\Phi_{PSII}$  和叶绿素 a 合成量都能够作为指示微藻受氟胁迫的指标,以微藻为材料除去自然界氟超标水体中的超标 F,理论上是可行的。

**关键词:**pH; 氟; 莱茵衣藻; 蛋白核小球藻; 胞外碳酸酐酶; 光合效率

**中图分类号:**X172    **文献标志码:**A    **文章编号:**1672-2043(2011)10-1972-06

## Effect of pH and Fluoride on Extracellular Carbonic Anhydrase Activity and Photosynthetic Efficiency of *Chlamydomonas Reinhardtii* and *Chlorella Pyrenoidosa*

WU Yun-dong<sup>1</sup>, WU Yan-you<sup>1,2\*</sup>, LI Qian<sup>3</sup>, ZHAO Kuan<sup>1</sup>

(1.Key Laboratory of Modern Agricultural Equipment and Technology, Ministry of Education & Jiangsu Province, Institute of Agricultural Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 2.State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, China; 3.School of Environment, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

**Abstract:** *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella pyrenoidosa* were cultured in SE media at three pH levels(5.0, 7.0, 9.0) with added fluoride(NaF) of six concentrations(0.1, 1, 10, 50, 100 and 200 mmol·L<sup>-1</sup>), and extracellular carbonic anhydrase activity, photosynthetic efficiency and chlorophyll-a content of the two microalgae were determined. The results indicated that physiologic activity and growth factors of the two microalgae were mainly affected by pH rather than fluoride under the combination of pH and less than 1 mmol·L<sup>-1</sup> fluoride. Extracellular carbonic anhydrase activity of the two microalgae was significantly lower under acidic media than under neutral and alkaline media.  $\Phi_{PSII}$  and chlorophyll-a synthesis of the two microalgae decrease with pH descending. Physiologic activity and growth factors were significantly affected by the combination of pH and more than 1mmol·L<sup>-1</sup> fluoride concentration. Extracellular carbonic anhydrase activity first increased and then decreased until disappear with fluoride concentration increasing. The  $\Phi_{PSII}$  and chlorophyll-a synthesis decreased with pH descending. Extracellular carbonic anhydrase activity,  $\Phi_{PSII}$  and chlorophyll-a synthesis can indicate whether microalgae suffer from adversity. Physiologic activity and growth factors of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella pyrenoidosa* are better under alkaline environment than under neutral and acidic environment. The results also indicated it's theoretically feasible to remove excessive fluoride in rich-fluoride water using microalgae.

**Keywords:** pH; fluoride; *Chlamydomonas reinhardtii*; *Chlorella pyrenoidosa*; extracellular carbonic anhydrase; photosynthetic efficiency

收稿日期:2011-04-04

基金项目:国家自然科学基金(40973060)

作者简介:吴运东(1984—),男,江苏徐州人,硕士研究生,研究方向为微藻生理生态学。E-mail: wu41831@163.com

\* 通讯作者:吴沿友 E-mail: yanyouwu@ujs.edu.cn

氟是人体健康必需的微量元素之一, 氟缺乏对人体健康不利, 然而过多的氟会导致氟中毒, 症状是氟斑牙和氟骨病<sup>[1]</sup>。氟是环境中广泛存在的天然元素, 同时会因工农业生产和使用造成环境的污染<sup>[2]</sup>。由于氟离子( $F^-$ )呈游离态, 迁移性强, 在自然水体中 $F^-$ 浓度往往很低, 但是氟具有生物富集的特征, 而且摄入后很难排出, 长期饮用 $F^-$ 超标的水就会对人体产生毒害。医学研究表明, 氟对人体健康的影响是长期的, 尽管有时并没有表现出氟斑牙和氟骨病等典型症状, 但机体已发生器官或组织的病变, 导致内分泌失调、器官损伤、免疫力低下等严重后果<sup>[3]</sup>, 因此除去水体中浓度虽低但超标的 $F^-$ 是十分必要的。目前, 工业污水除氟主要是 $Ca^{2+}$ 沉淀法, 虽然该法能降低工业废水中较高浓度的 $F^-$ , 但是出水仍难以达到国家排放标准, 同时产生的大量碱性污泥也会导致二次污染<sup>[4]</sup>。由于 $CaF_2$ 溶解度为 $40\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 若采用 $Ca^{2+}$ 沉淀法去除自然水体中 $F^-$ , 非但不能除去低浓度的 $F^-$ , 反而会使水质恶化, 使污染加剧。利用微藻吸附去除污染水体中重金属离子具有成本低、易培养、工艺简单等特点, 有很好的应用前景, 利用微藻吸附 $F^-$ 的研究目前尚未见报道。

莱茵衣藻和蛋白核小球藻是常见的微藻, 具有光合能力强、生长速率快、世代周期短等特点, 且对元素具有吸收净化作用, 对环境保护很重要。 $F^-$ 超标水体的pH往往不稳定, 已有研究证明 $F^-$ 对微藻的生长会产生影响<sup>[5]</sup>, 同时pH也是微藻生长繁殖的重要影响因素之一<sup>[6]</sup>, pH对微藻光合作用有显著影响<sup>[7]</sup>, 生长在水体中的微藻受到pH和 $F^-$ 的共同作用。微藻的胞外碳酸酐酶通过催化 $CO_2$ 的可逆水合反应, 促进水环境中的无机碳向微藻细胞内流动<sup>[8]</sup>, 为光合作用固定无机碳源源不断地提供原料, 胞外碳酸酐酶还与微藻的抗逆性有关, 在逆境下其活性会升高。叶绿素荧光参数中的光合效率 $\Phi_{PSII}$ 反映微藻将光能转化成不稳定的化学能的能力<sup>[9]</sup>, 是光合作用的限速步骤。

目前, 有关pH影响重金属对微藻毒性影响研究是国内外研究者感兴趣的内容<sup>[10-11]</sup>, 而pH和 $F^-$ 对微藻的生理作用的交互影响尚未见报道。本文以莱茵衣藻和蛋白核小球藻为实验材料, 研究pH和 $F^-$ 对这两种微藻胞外碳酸酐酶活性和PS II实际光合效率的交互作用, 初步探讨两种因子对微藻抗逆性和光合效率的影响, 并为微藻除氟的可行性提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 藻种与培养基

供试莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)和蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)由中国科学院武汉水生生物研究所淡水藻种库提供。使用SE培养基<sup>[12]</sup>培养, 培养温度约为 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 在光强 $2\,500\text{ lx}$ 、光暗周期比 $14\text{ h}:10\text{ h}$ 条件下, 于三角瓶中培养, 每天人工摇瓶2~3次。

### 1.2 培养条件和方法

将处于对数生长期的藻液离心浓缩( $3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $5\text{ min}$ ), 接种于调好pH并灭菌的培养基中, 接种后的吸光值约为 $0.5A$ 。按需要用HCl或NaOH溶液调节培养基pH值为 $5.0$ 、 $7.0$ 、 $9.0$ 。添加NaF使培养基中 $F^-$ 终浓度分别为 $0.1$ 、 $1$ 、 $10$ 、 $50$ 、 $100$ 、 $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。培养期为 $10\text{ d}$ , 每组处理设置3个平行样。

### 1.3 胞外碳酸酐酶活性的测定

使用铈微电极开放电路法<sup>[13]</sup>进行测定。培养结束后, 离心收集藻细胞( $5\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $5\text{ min}$ ), 用巴比妥缓冲液( $\text{pH}=8.3$ ,  $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )冲洗后再如上离心一次, 加入巴比妥缓冲液悬浮细胞, 细胞悬浮液终体积为 $3\text{ mL}$ ; 于 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 迅速加入 $2\text{ mL }0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 饱和 $CO_2$ 蒸馏水, 记录反应体系中变化1个pH所需时间 $t$ , 同时记录对照体系变化1个pH所需时间 $t_0$ 。碳酸酐酶活性(EU)的计算公式为: $EU=(t-t_0)/t_0$ 。同时用分光光度法测定反应体系中叶绿素a的含量<sup>[14]</sup>。碳酸酐酶活性单位(以叶绿素a计)为 $EU\cdot\mu\text{g}^{-1}$ , 每个数据测定3次。

### 1.4 PS II 实际光合效率 $\Phi_{PSII}$ 的测定

在培养的第 $9\text{ d}$ 测定 $\Phi_{PSII}$ 。将待测定的微藻暗处理 $20\text{ min}$ , 使用便携式IMAGING—PAM调制式荧光仪测定<sup>[15]</sup>。

### 1.5 叶绿素a合成量的计算

在接种和培养结束时分别测定叶绿素a含量<sup>[16]</sup>初始值 $C_0$ 和叶绿素a含量终值 $C$ , 合成量为 $\Delta C_{chl-a}=(C/C_0-1)\%$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 pH对莱茵衣藻和蛋白核小球藻胞外碳酸酐酶活性及 $\Phi_{PSII}$ 的影响

以未添加 $F^-$ 但调整了pH的对照组研究pH对莱茵衣藻和蛋白核小球藻胞外碳酸酐酶活性及 $\Phi_{PSII}$ 的影响。

由图1可见, 莱茵衣藻和蛋白核小球藻的碳酸酐

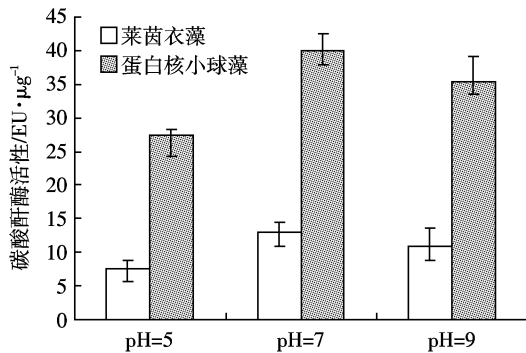


图1 pH对莱茵衣藻和蛋白核小球藻胞外碳酸酐酶活性的影响  
Figure 1 Effect of pH on extracellular carbonic anhydrase activity of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella pyrenoidosa*

酶活性对pH的响应现象相同,表现为:在pH=5培养条件下低于pH=7和9时,pH=7和9相比则差异较小。pH影响水体中可溶性无机碳(DIC)的存在形式。Janette等<sup>[9]</sup>认为,在酸性pH条件下,培养液中DIC主要以CO<sub>2</sub>形式存在,自由穿过细胞膜的CO<sub>2</sub>能够满足光合作用需求,因此莱茵衣藻在酸性pH时胞外碳酸酐酶活性较低。碳酸酐酶是一种诱导酶,环境中CO<sub>2</sub>含量过低会诱导该酶的合成以加速转运CO<sub>2</sub>至细胞内。在碱性pH条件下,DIC主要以HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>形式存在,需要依赖胞外碳酸酐酶催化HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>转化成CO<sub>2</sub>进入细胞,以满足光合作用的需求,从而莱茵衣藻的胞外碳酸酐酶活性升高。从本研究的结果(图1)可以看到,蛋白核小球藻和莱茵衣藻的碳酸酐酶活性在pH=5时显著低于pH=7和9时,莱茵衣藻胞外碳酸酐酶活性受pH的影响情况与Janette等的结论相符。同时发现蛋白核小球藻也具有较高的胞外碳酸酐酶活性,且受pH的影响与莱茵衣藻类似。

由图2可见,pH=5时莱茵衣藻Φ<sub>PSII</sub>显著低于pH=7和9时,在pH=7和9差异较小;蛋白核小球藻

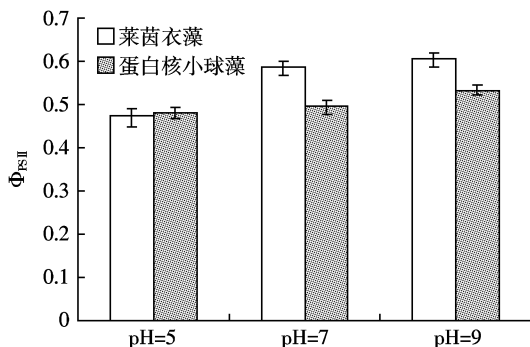


图2 pH对莱茵衣藻和蛋白核小球藻Φ<sub>PSII</sub>的影响  
Figure 2 Effect of pH on Φ<sub>PSII</sub> of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella pyrenoidosa*

Φ<sub>PSII</sub>在pH=9时略高于pH=7和5,但3种pH条件下没有明显差异。

pH=5时,莱茵衣藻和蛋白核小球藻的Φ<sub>PSII</sub>值低,表明实际光合效率低;在pH=7和9时,两种微藻Φ<sub>PSII</sub>值略高于pH=5,表明中性和碱性pH下微藻具有比酸性pH时更高的光合效率。

## 2.2 pH和F对莱茵衣藻和蛋白核小球藻胞外碳酸酐酶活性的影响

pH和F对莱茵衣藻和蛋白核小球藻胞外碳酸酐酶活性的影响如图3所示。两种微藻在同一pH且F<1 mmol·L<sup>-1</sup>培养基中培养时,其胞外碳酸酐酶活性变化甚微,而在相同F浓度(0.1 mmol·L<sup>-1</sup>和1 mmol·L<sup>-1</sup>)但不同pH条件时,它们各自的胞外碳酸酐酶活性随pH下降而降低。由此可见,当F浓度为0.1 mmol·L<sup>-1</sup>和1 mmol·L<sup>-1</sup>时,微藻胞外碳酸酐酶活性主要受pH变化的影响。当F>1 mmol·L<sup>-1</sup>时,两种微藻的胞外碳酸酐酶活性受F浓度和pH的共同影响,但受F浓度的影响更大。当pH一定时,胞外碳酸酐酶活性随着F浓度的增加而逐渐升高,到一定峰值后活

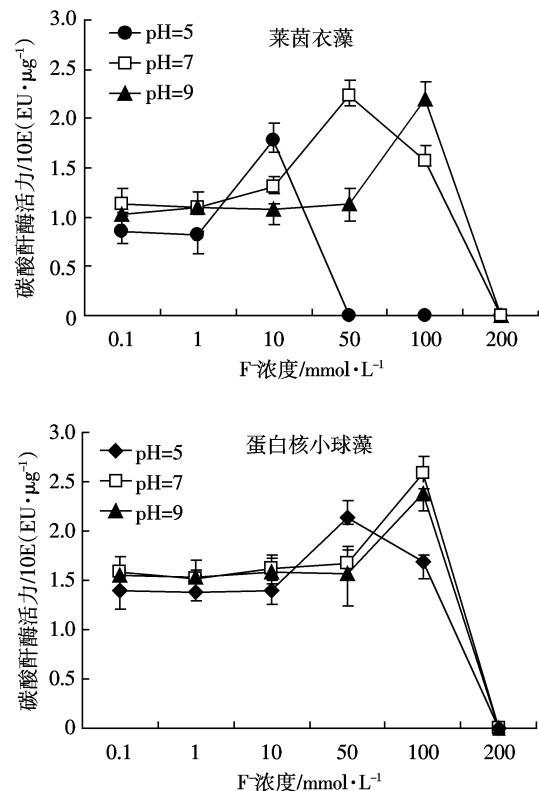


图3 pH和F对莱茵衣藻和蛋白核小球藻胞外碳酸酐酶活性的影响

Figure 3 Effect of pH and fluoride on extracellular carbonic anhydrase activity of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella pyrenoidosa*

性降低直至检测不出。一定范围内,较高浓度的F能够显著提高莱茵衣藻和蛋白核小球藻胞外碳酸酐酶的活性。在不同pH条件下,莱茵衣藻和蛋白核小球藻表达出最高碳酸酐酶活性时的F浓度不同;pH分别为5、7、9时,莱茵衣藻分别在F浓度为10、50、100 mmol·L<sup>-1</sup>时有最高的胞外碳酸酐酶活性;蛋白核小球藻在F浓度为50、100、100 mmol·L<sup>-1</sup>时有最高的胞外碳酸酐酶活性。

### 2.3 pH和F对莱茵衣藻和蛋白核小球藻 $\Phi_{PSII}$ 的影响

pH和F对莱茵衣藻和蛋白核小球藻 $\Phi_{PSII}$ 的影响如图4所示,在F $\leq 10$  mmol·L<sup>-1</sup>范围内,在同一pH但F浓度不相同,两种微藻的 $\Phi_{PSII}$ 变化较小,而当F浓度相同但pH值不同时,两种微藻的 $\Phi_{PSII}$ 随pH降低而下降。在F $>10$  mmol·L<sup>-1</sup>范围内,两种微藻的 $\Phi_{PSII}$ 都随着F浓度增加而显著( $P<0.05$ )下降,直至检测不出,说明高浓度的F对莱茵衣藻和蛋白核小球藻的 $\Phi_{PSII}$ 表现为抑制作用。在受到F和pH共同作用

时,F浓度的升高和pH的下降均导致 $\Phi_{PSII}$ 降低。

### 2.4 pH和F对莱茵衣藻和蛋白核小球藻叶绿素a合成量的影响

叶绿素a的含量变化一定程度上反映微藻叶绿体的含量变化,同时叶绿素a作为一种色素,其净增加量能表现微藻合成有机物量的能力。当接种量相同时,在相同pH条件和相同生长时间下,莱茵衣藻叶绿素a合成量明显高于蛋白核小球藻(图5),表明莱茵衣藻具有比蛋白核小球藻更强的生长繁殖能力。从图5可以看出,pH影响微藻叶绿素a合成,碱性和中性环境中两种微藻叶绿素a的合成量比酸性环境中高,说明酸性环境不利于微藻的生长和有机物的积累。当F $<1$  mmol·L<sup>-1</sup>时,两种微藻叶绿素a的变化量并不明显,可见低浓度的氟对两种微藻的生长没有显著影响( $P>0.05$ )。当F $>1$  mmol·L<sup>-1</sup>时,随着F浓度的升高,叶绿素a含量迅速降低,说明高浓度的F抑制莱茵衣藻和蛋白核小球藻的生长。在受到

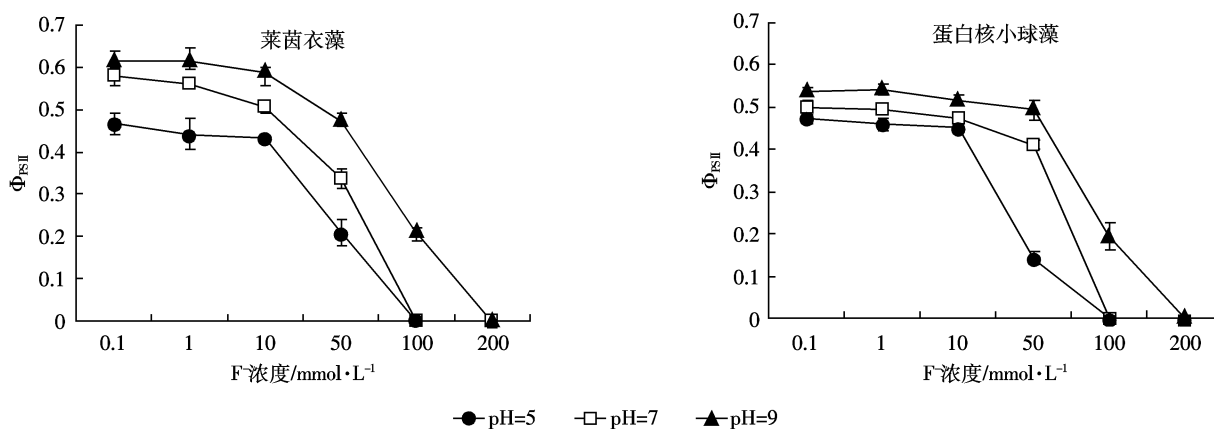


图4 pH和F对莱茵衣藻和蛋白核小球藻 $\Phi_{PSII}$ 的影响

Figure 4 Effect of pH and fluoride on  $\Phi_{PSII}$  of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella pyrenoidosa*

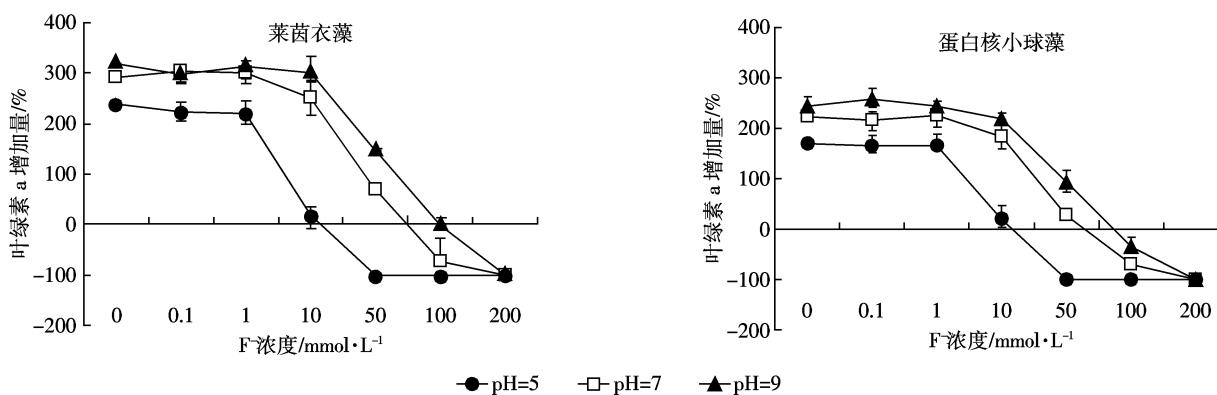


图5 pH和F对莱茵衣藻和蛋白核小球藻叶绿素a合成量的影响

Figure 5 Effect of pH and fluoride on synthesis of Chlorophyll a of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella pyrenoidosa*

F<sup>-</sup>和 pH 共同作用时, F<sup>-</sup>浓度的升高和 pH 的下降导致叶绿素 a 合成量减少。

### 3 讨论

逆境胁迫对植物的影响是多方面的, 不仅影响各种酶的活性, 同时也直接导致光合结构的损伤和光合效率的降低<sup>[17]</sup>。在本实验条件下, 莱茵衣藻和蛋白核小球藻的生理指标呈现出相似的变化趋势, 总的来说, 在 F<sup>-</sup><1 mmol·L<sup>-1</sup> 情况下, 莱茵衣藻和蛋白核小球藻几乎不受 F<sup>-</sup>浓度变化的影响, 而受 pH 变化影响较大, 表现为胞外碳酸酐酶活性在酸性环境中低于中性和碱性环境中, Φ<sub>PSII</sub>和叶绿素 a 合成量随着 pH 的升高而增加。在 F<sup>-</sup>>1 mmol·L<sup>-1</sup> 时, 两种微藻生理指标受到 F<sup>-</sup>和 pH 共同作用, 表现为胞外碳酸酐酶活性先升高后降低, Φ<sub>PSII</sub>和叶绿素 a 合成量则随着 F<sup>-</sup>浓度增加而迅速下降。在本实验高 F<sup>-</sup>浓度造成的逆境中, 胞外碳酸酐酶活性随 F<sup>-</sup>浓度变化波动较大, 在 10~100 mmol·L<sup>-1</sup> 范围内酶活显著 ( $P<0.05$ ) 高于 0~10 mmol·L<sup>-1</sup> 范围, 表明胞外碳酸酐酶活性能够作为指示微藻处于高 F<sup>-</sup>逆境的指标。Φ<sub>PSII</sub>和叶绿素 a 合成量在逆境中均下降, 且与 F<sup>-</sup>浓度有一定的对应关系, 可见 Φ<sub>PSII</sub>和叶绿素 a 合成量也可以作为指示微藻处于高 F<sup>-</sup>逆境的指标。

交互作用指在一定条件下, 两个或多个元素的结合生理效应小于或超过它们各自效应之和<sup>[18]</sup>。在本实验中, pH=5 时较低浓度 F<sup>-</sup>的作用下两种微藻的胞外碳酸酐酶活性即达到最高值, 而在 pH=7 和 9 时, 诱导出两种微藻最高胞外碳酸酐酶活性所需的 F<sup>-</sup>浓度更高。导致这一现象的可能原因是, 在酸性环境下, 微藻生长状况较差, H<sup>+</sup>和 F<sup>-</sup>的协同作用下 F<sup>-</sup>的效应被放大, 故微藻胞外碳酸酐酶活性最高点出现在较低 F<sup>-</sup>浓度水平。LeBlanc<sup>[19]</sup>的研究也揭示 pH 6.0 条件下生长的普通小球藻能够耐受的 F<sup>-</sup>浓度低于 pH 6.8 时。碱性环境对微藻的生长有利, OH<sup>-</sup>部分抵消了 F<sup>-</sup>的胁迫作用, 表现为在更高浓度 F<sup>-</sup>作用下两种微藻胞外碳酸酐酶活性才达到最高。在偏碱性环境中, 微藻生长状况最好, 叶绿素的合成量和总无机碳固定量大于中性和酸性环境中。叶绿素含量的多少影响了光合效率的高低。酸性环境和高 F<sup>-</sup>逆境下, 两种微藻叶绿素合成量减少, 导致 PS II 实际光合效率下降。碱性环境中莱茵衣藻和蛋白核小球藻叶绿素 a 合成量明显增加, 表明碱性环境有利于叶绿素的合成, 保证较高的 PS II 实际光合效率, 即莱茵衣藻和蛋白核小球藻更适于

生长在碱性环境下。

总之, 胞外碳酸酐酶活性、光合效率和叶绿素 a 的变化情况都表明碱性环境对莱茵衣藻和蛋白核小球藻的生长有利, 能够耐受的 F<sup>-</sup>浓度也较中性和酸性环境下高。低于 1 mmol·L<sup>-1</sup> 的 F<sup>-</sup>对莱茵衣藻和蛋白核小球藻的胞外碳酸酐酶活性和光合效率影响甚微, 对叶绿素 a 的合成也没有显著影响。自然水体中 F<sup>-</sup>浓度变化很大但均远低于 1 mmol·L<sup>-1</sup><sup>[20]</sup>, 说明两种微藻在自然界高氟水体内部均能正常生长。已有研究表明, 水生植物体内氟含量随环境中 F<sup>-</sup>升高以及培养时间的增加而上升<sup>[9]</sup>, 可见微藻可以作为除去水体中低浓度超标 F<sup>-</sup>的材料。

### 4 结论

(1) 在不同 pH 和低于 1 mmol·L<sup>-1</sup> 的 F<sup>-</sup>共同作用下, 两种微藻主要受 pH 的影响; 在 pH 和高于 1 mmol·L<sup>-1</sup> 的 F<sup>-</sup>作用下, 则受 F<sup>-</sup>和 pH 共同影响。

(2) 胞外碳酸酐酶活性、Φ<sub>PSII</sub>和叶绿素 a 合成量都能够作为指示微藻是否受氟胁迫的指标。

(3) 以微藻为材料除去自然水体中的超标 F<sup>-</sup>理论上是可行的。

### 参考文献:

- [1] 陈庆沐, 刘玉兰. 氟的土壤地球化学与地方性氟中毒[J]. 环境科学, 1981, 2(6): 5-9.  
CHEN Qing-mu, LIU Yu-lan. Fluoride in soil geochemistry and endemic fluorosis[J]. *Environmental Science*, 1981, 2(6): 5-9.
- [2] 谢正苗, 吴卫红, 徐建民. 环境中氟化物的迁移和转化及其生态效应[J]. 环境科学进展, 1999, 7(2): 40-53.  
XIE Zheng-miao, WU Wei-hong, XU Jian-min. Fluoride in the environment and the ecological effects of migration and conversion[J]. *Advances in Environmental Science*, 1999, 7(2): 40-53.
- [3] 李永华, 王五一, 侯少范. 我国地方性氟中毒病区环境氟的安全阈值[J]. 环境科学, 2002, 23(4): 118-122.  
LI Yong-hua, WANG Wu-yi, HOU Shao-fan. Safety threshold of fluoride in endemic fluorosis regions in China[J]. *Environmental Science*, 2002, 23(4): 118-122.
- [4] 李雪玲, 刘俊峰, 李培元. 石灰沉淀法除氟的应用[J]. 水处理技术, 2000, 26(6): 359-361.  
LI Xue-ling, LIU Jun-feng, LI Pei-yuan. Principle and application of fluoride removal by lime sedimentation method[J]. *Technology of Water Treatment*, 2000, 26(6): 359-361.
- [5] Camargo J A. Fluoride toxicity to aquatic organisms: A review[J]. *Chemosphere*, 2003, 50(3): 251-264.
- [6] Bhatti S, Colman B. Inorganic carbon acquisition in some synurophyte algae[J]. *Physiologia Plantarum*, 2008, 133(1): 33-40.
- [7] Semes I S, Juma K, Mats B. Alterations in seawater pH and CO<sub>2</sub> affect

- calcification and photosynthesis in the tropical coralline alga, *Hydroclithon* sp. (Rhodophyta)[J]. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2009, 84(3):337-341.
- [8] Coleman J. Carbonic anhydrase and its role in photosynthesis[J]. *Photosynthesis*, 2004, 9:353-367.
- [9] Masojidek J, Vonshak A, Torzillo J. Chlorophyll fluorescence applications in microalgal mass cultures[J]. *Developments in Applied Psychology*, 2010, 4:277-292.
- [10] 赵娜, 冯鸣凤, 朱琳. 不同pH值条件下Cr<sup>6+</sup>对小球藻和斜生栅藻的毒性效应[J]. 东南大学学报(医学版), 2010, 29(4):382-386.  
ZHAO Na, FENG Ming-feng, ZHU Lin. Toxic effects of chromium (Cr<sup>6+</sup>) on *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus* at different pH [J]. *Journal of Southeast University (Medical Science Edition)*, 2010, 29(4):382-386.
- [11] Boullemant A. Uptake of Hydrophobic Metal complexes by three freshwater algae: Unexpected influence of pH[J]. *Environmental Science and Technology*, 2009, 43(9):3308.
- [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.  
MEN Yu-jie, HU Hong-ying, LI Feng-min. Effects of an allelopathic fraction from *Phragmites communis* Trin on the growth characteristics of *Scenedesmus obliquus*[J]. *Ecology and Environment*, 2006, 15(5):925-929.
- [13] 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.  
SHI Qian-qian, WU Yan-you, ZHU Yong-li, et al. Comparison on activities of extracellular enzyme of carbonic anhydrase in *Broussonetia papyrifera* and *Morus alba* leaves[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2010, 38(16):8376-8377.
- [14] Lichtenthaler H K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes[J]. *Methods Enzymol*, 1987, 148:350-382.
- [15] 吴惠芳, 刘鹏, 龚春风, 等. Mn胁迫对龙葵和小飞蓬生长及叶绿素荧光特性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(4):653-658.  
WU Hui-fang, LIU Peng, GONG Chun-feng. Effects of Manganese stress on growth, chlorophyll fluorescence parameters of *Solanum nigrum* L. and *Conyza Canadensis* L. [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(4):653-658.
- [16] Janette P E, John R C. Regulation of periplasmic carbonic anhydrase expression in *Chlamydomonas reinhardtii* by acetate and pH[J]. *Plant Physiology*, 1994, 106:103-108.
- [17] 吴沿友, 邢德科, 朱咏莉, 等. 营养液pH对3种藤本植物生长和叶绿素荧光的影响[J]. 西北植物学报, 2009(2):338-343.  
WU Yan-you, XING De-ke, ZHU Yong-li, et al. Effects of pH on growth characters and chlorophyll fluorescence of three vine plants[J]. *Acta Bot Boreal*, 2009(2):338-343.
- [18] 祖艳群, 李元, Bock L, 等. 重金属与植物N素营养之间的交互作用及其生态学效应[J]. 农业环境科学学报, 2008, 27(1):7-14.  
ZU Yan-qun, LI Yuan, Bock L, et al. Interactions between heavy metals and nitrogen and their ecological effects[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2008, 27(1):7-14.
- [19] LeBlanc G A. Interspecies relationships in acute toxicity of chemicals to aquatic organisms[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1984, 3:47-60.
- [20] Amini M, Mueller K, Abbaspour K C, et al. Statistical modeling of global geogenic fluoride contamination in groundwaters[J]. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42(10):3662-3668.