

微囊藻碳酸酐酶活性在不同环境因素下的调节与适应

王山杉^{1,2}, 刘永定^{1,*}, 邹永东¹, 李敦海¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 华南理工大学轻工食品学院, 广州 510640)

摘要:测定了 3 种微囊藻水华中的优势种类, 即铜锈微囊藻 (*Microcystis aeruginosa* Kütz.), 绿色微囊藻 (*Microcystis viridis* (A. Br.) Lemm), 惠氏微囊藻 (*Microcystis wesenbergii* (Kom.) Kom.), 以及微囊藻 573 (*Microcystis* sp. 573) 的碳酸酐酶活性; 研究了无机碳、pH、温度、光强、N/P 比等环境因素和外源葡萄糖对铜锈微囊藻碳酸酐酶活性的影响, 发现微囊藻碳酸酐酶活性受环境中碳酸氢根浓度的调节, 故推断碳酸氢根是铜锈微囊藻利用的主要无机碳形式; 相比添加葡萄糖进行混合营养培养的细胞, 无外源葡萄糖和暗饥饿培养的微囊藻细胞会产生高约 6 倍的碳酸酐酶活性; 光强的改变也会影响碳酸酐酶的活性。

关键词:碳酸酐酶活性; 无机碳; 铜锈微囊藻; 水华

文章编号: 1000-0933(2006)08-2443-06 中图分类号: Q178 文献标识码: A

Modulation and adaptation of carbonic anhydrase activity in *Microcystis* spp. under different environmental factors

WANG Shan-Shan^{1,2}, LIU Yong-Ding^{1,*}, ZOU Yong-Dong¹, LI Dun-Hai¹ (1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan, 430072, China; 2. College of Light Industry and Food Engineering, South China University of Technology, Guangzhou, 510640, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(8): 2443 ~ 2448.

Abstract: The carbonic anhydrase (CA) activities were determined in three cyanobacterial species, namely *Microcystis aeruginosa* Kütz., *Microcystis viridis* (A. Br.) Lemm, *Microcystis wesenbergii* (Kom.) Kom, which are dominant in a lake (Lake Dianchi) subject to major blooms. In more detailed experiments on *M. aeruginosa*, the effects of inorganic carbon, pH, temperature, nitrogen/phosphorus ratio, glucose, and light intensity on CA activity were also investigated. The results showed that the CA activity of *M. aeruginosa* was influenced dramatically by the concentration of bicarbonate. Consequently, it is suggested that bicarbonate ions were the main form of inorganic carbon *M. aeruginosa* could utilize. Cultures grown in the dark exhibited CA activity 6 times higher than that of cells cultured mixotrophically with the addition of glucose. Features of eutrophic water bodies promote an increase in CA activity, and the resulting higher CA activity would accelerate the utilization of inorganic carbon and favour the growth and blooming of *Microcystis* spp. in eutrophic lakes. Although the experiments were carried out under controlled experimental conditions, they may provide some basic data that will prove useful for the control of cyanobacterial blooms in nature.

Key words: carbonic anhydrase activity; inorganic carbon; *Microcystis aeruginosa* Kütz.; algal bloom

我国众多湖泊的富营养化持续加重并引起蓝藻水华暴发而造成严重的生态灾变。滇池和其它一些淡水湖泊频繁爆发蓝藻水华, 微囊藻是滇池水华的主要优势种类。水华的发生, 会使湖水中溶解无机碳 (Dissolved

基金项目:中国科学院知识创新工程重大资助项目 (KZCX1-SW-12); 国家 973 资助项目 (2002CB412306); 国家高技术研究发展专项资助项目 (2002AA601013); 国家 973 资助项目 (2003CB716801)

收稿日期: 2005-06-08; **修订日期:** 2006-01-20

作者简介: 王山杉 (1976 ~), 女, 河北南宫人, 博士生, 主要从事藻类生理生态学研究. E-mail: wss1976@vip.sina.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: liuyd@ihb.ac.cn

Foundation item: The project was supported by Knowledge Innovation Program of Chinese Academy of Sciences (No. KZCX1-SW-12); National 973 Project (No. 2002CB412306); National 863 Project (No. 2002AA601013); National 973 Project (No. 2003CB716801)

Received date: 2005-06-08; **Accepted date:** 2006-01-20

Biography: WANG Shan-Shan, Ph.D. candidate, mainly engaged in algae physiology and phycology. E-mail: wss1976@vip.sina.com

inorganic carbon, DIC) 的浓度降低, 湖水 pH 值升高^[1]。为适应低浓度的 DIC, 一些种类利用二氧化碳浓缩机制 (Carbon dioxide concentrating mechanism, CCM) 以保持较快的生长速率。碳酸酐酶 (Carbonic anhydrase, CA, EC4.2.1.1) 是 CCM 的一个重要组成成分, 对维持从质膜内到 Rubisco 位点稳定的水溶 CO₂ 流量, 避免 CO₂ 从胞内 CO₂ 库向外流失具有关键的作用^[2]。关于 CA 活性和无机碳浓度在蓝藻水华发生中的作用以及在自然生态系统中与 CA 活性相关的光合速率的研究报道迄今还很少, 只有 Berman-Frank 等报道, Kinneret 湖中两次季节性甲藻水华中 *Peridinium gatunense* 的 CA 活性变化被证明与环境 CO₂ 的浓度相关, 当总可溶性无机碳的浓度低于 1.8 mmol/L 时 *P. gatunense* 会产生高的 CA 活性^[1]。滇池中可能存在类似的情况, 但是除了 CO₂ 外, 我国湖泊中的有机污染 (有机碳源) 可能使问题更复杂。为探求湖泊中微囊藻水华的生物学动因, 本文首先测定了 4 种微囊藻的碳酸酐酶活性, 然后集中研究了无机碳、外源葡萄糖、pH、N/P 比、温度和光照等因素对铜锈微囊藻 CA 活性的影响。

1 材料与方法

1.1 藻种、培养基与培养

实验所用的 4 种微囊藻, 铜锈微囊藻 (*Microcystis aeruginosa* Kütz.), 绿色微囊藻 (*Microcystis viridis* (A. Br.) Lemm), 惠氏微囊藻 (*Microcystis wesenbergii* (Kom.) Kom.) 以及微囊藻 573 (*Microcystis* sp. 573) 由中国科学院典型培养物保藏委员会淡水藻种库 (FACHB) 提供, 采用 MA 培养基^[3], 置 500 ml 锥形瓶中静置培养; 24h 连续光照, 光源为冷白荧光灯, 光照强度 30 μmol photons·m⁻²·s⁻¹, 温度保持在 (28 ± 1) °C。

1.2 碳酸酐酶活性测定

离心收集对数生长期藻细胞, 以 12 mmol/L Veronal Buffer (pH8.30) 清洗一次并重新悬浮, 采用 Wilbur-Anderson 量电法测定 CA 活性^[4]。迅速将 2ml 冰浴中的饱和 CO₂ 溶液 (向蒸馏水中充 60min 的纯 CO₂ 气体获得) 注入由超级恒温水浴调控为 2°C 的细胞匀浆液中, 用 pH 计监测反应体系 pH 值变化, 记录 pH 值从 8.30 下降到 7.30 的时间。CA 活性以单位叶绿素 E.U. 计算, E.U. 以公式 $U = T_0/T - 1$ 计算, T 和 T_0 分别代表含有和不含 CA 时溶液 pH 值下降的时间。用以同样缓冲液清洗的完整藻细胞进行胞外 CA 的测定。

1.3 叶绿素 a 含量的测定

参照文献^[5], 利用 95% 乙醇进行抽提。按下述公式计算叶绿素 a 的含量: $\text{Chl a} (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}) = 13.7 \times \text{OD}_{665} - 5.76 \times \text{OD}_{649}$

1.4 不同无机碳浓度下碳酸酐酶的活性

设置 3 个不同的 CO₂ 浓度, 分别在加入 10 mmol/L 1,3-bis[tris(hydroxymethyl)methylamino]propane (BTP) 的培养基中通入 0.01%, 0.03%, 1% 的 CO₂。收集对数生长中期藻细胞, 测定 CA 活性以后, 将 0.01% CO₂ 中的藻细胞离心收集转移到 0.03% CO₂ 条件下, 测定转移后 24h 内的 CA 活性变化; 反之亦然。另一组实验设置了 6 个不同的 [HCO₃⁻], 分别在含有 10 mmol/L BTP 的培养基中加入 1, 2, 5, 10, 20 mmol/L 的 KHCO₃, 以不加 KHCO₃ 者为对照。测定在生长至对数中期后, 从 0 mmol/L HCO₃⁻ 转移到含 20 mmol/L HCO₃⁻ 培养基及相反方向转移的藻细胞 24h 内的 CA 活性变化。

1.5 不同葡萄糖浓度下碳酸酐酶的活性

在对数生长期藻细胞的悬浮液中分别加入 1, 2, 5 和 10 mmol/L 的葡萄糖, 以一个不加葡萄糖的样品作为对照, 另一个不加葡萄糖的样品进行黑暗培养。诱导 24h 后测定 6 个样品的 CA 活性。

1.6 不同氮/磷比、温度、pH 值、光强下的碳酸酐酶活性 在上述基本培养条件下, 按不同的批次试验, 分别设定了 5 个水平的 N/P 比: 8/1.6、8/2、8/3、8/4、8/5, 氮的量固定不变, 改变磷的量; 4 个不同的温度水平: 21 °C, 24 °C, 27 °C 和 30 °C; 4 个不同的 pH 水平: pH8.0, pH8.3, pH8.6 和 pH9.0; 4 个不同的光强水平: 30, 50, 60 和 90 μmol photons·m⁻²·s⁻¹。

本文所有数据均重复 3 次以上, 取平均值。

2 结果

2.1 4 种微囊藻碳酸酐酶活性的测定

测定了 4 种微囊藻藻株胞内和胞外的 CA 活性,在 4 种微囊藻藻株中都没有发现有胞外 CA 的存在,它们的胞内 CA 活性值分别为: *M. aeruginosa*, (64.09 ± 5.83) E.U./mg chla; *M. viridis*, (61.55 ± 3.11) E.U./mg chla; *M. wesenbergii*, (38.02 ± 2.03) E.U./mg chla; *M. sp 573.*, (19.99 ± 1.56) E.U./mg chla。

2.2 不同无机碳浓度下铜锈微囊藻的碳酸酐酶活性

在微囊藻生长的最适 pH 值 8.0~9.0,介质中无机碳的主要形式是 HCO_3^- 。以中和滴定法测定液相-气相平衡后培养基中的 $[\text{HCO}_3^-]$ 。*M. aeruginosa* 的 CA 活性与 $[\text{HCO}_3^-]$ 成反比,溶液中的 $[\text{HCO}_3^-]$ 升高,会极大地抑制 CA 活性,反之,诱导其活性增加(图 1, A)。当藻细胞从含 20mmol/L HCO_3^- 向含 0mmol/L HCO_3^- 培养基转移时, $[\text{HCO}_3^-]$ 急剧降低,CA 活性最初为 37.17E.U./mg chla,在 9h 后被诱导到最高值 148.62 E.U./mg chla,是最初的 4.0 倍,以后逐渐下降。活性的下降可能是由于长期在高无机碳环境下培养,细胞内富含 CA 的羧体数目较正常条件培养为少^[6];并且碳酸酐酶基因的表达可能在转录或者翻译水平进行了调控,使酶分子的数目较少,酶活在短暂的应激反应下被诱导上升,之后又回复到高碳培养条件下的水平。从低 $[\text{HCO}_3^-]$ 向高 $[\text{HCO}_3^-]$ 转移的微囊藻,CA 活性从 74.42E.U./mg chla 被逐渐抑制到 14.48E.U./mg chla,是原来的 19.5%(图 1, B)。尽管 CO_2 只在 pH 低于 4.4 时占优势,但当向培养基中大量通入 CO_2 后, CO_2 很快转变为 HCO_3^- , $[\text{HCO}_3^-]$ 提高,相应地抑制了 CA 活性(图 2, A)。微囊藻从通入 0.03% CO_2 的培养基转移到通入 0.01% CO_2 的培养基或相反方向转移时,介质中无机碳浓度的变化是一个缓慢的过程,CA 活性向一个方向变化,没有出现图 1B 中见到的波峰(图 2, B; C)。

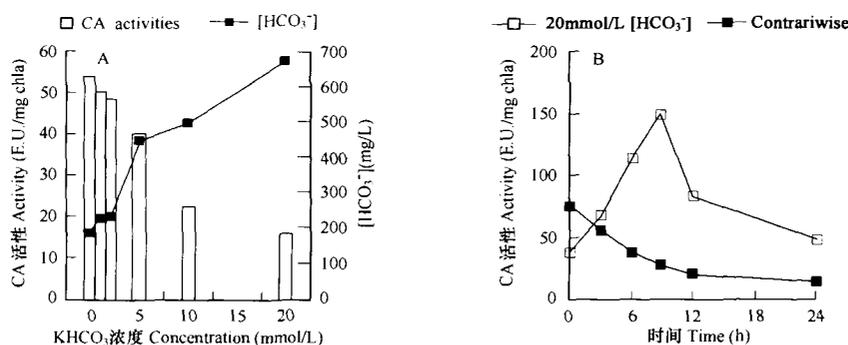


图1 $[\text{HCO}_3^-]$ 对铜锈微囊藻 CA 活性的影响

Fig.1 Effect of HCO_3^- on CA activity of *M. aeruginosa*

A:不同 $[\text{HCO}_3^-]$ 培养条件下的 CA 活性,于培养开始时测定 $[\text{HCO}_3^-]$; B:从含 0mmol/L HCO_3^- 转移到含 20mmol/L HCO_3^- 培养基(■)及向相反方向(□)转移 *M. aeruginosa* CA 活性的变化 A: CA activities at different bicarbonate concentrations that determined at the beginning of the culture; B: Time courses of CA activities of *M. aeruginosa* after transferring from 0mmol/L HCO_3^- to 20mmol/L HCO_3^- (■) and contrariwise(□)

2.3 不同葡萄糖浓度下铜锈微囊藻的碳酸酐酶活性

在无外源葡萄糖添加和暗饥饿的实验条件下,铜锈微囊藻细胞行化能自养生长,以 CO_2 为主要碳源并大量消耗无机碳。由于环境中无机碳源逐渐耗竭,饥饿细胞的 CA 活性在 24h 后为 127.64E.U./mg chla,为对照 (63.74E.U./mg chla) 的 2.0 倍;加入 10 mmol/L 葡萄糖的细胞,24h 后 CA 活性为 20.10E.U./mg chla,只有对照的约 1/3(图 3)。*M. aeruginosa* 在外源无机碳与有机碳同时存在的混合营养条件下可利用葡萄糖作为有机碳源,葡萄糖的衍生物 6-磷酸葡萄糖是卡尔文循环的光合产物之一。丰富的葡萄糖含量会提高 6-磷酸葡萄糖的量,其参与到光合途径中;同时减少了对无机碳源的利用,大量没有参与同化反应生成碳水化合物的无机碳源因此抑制 CA 的活性。

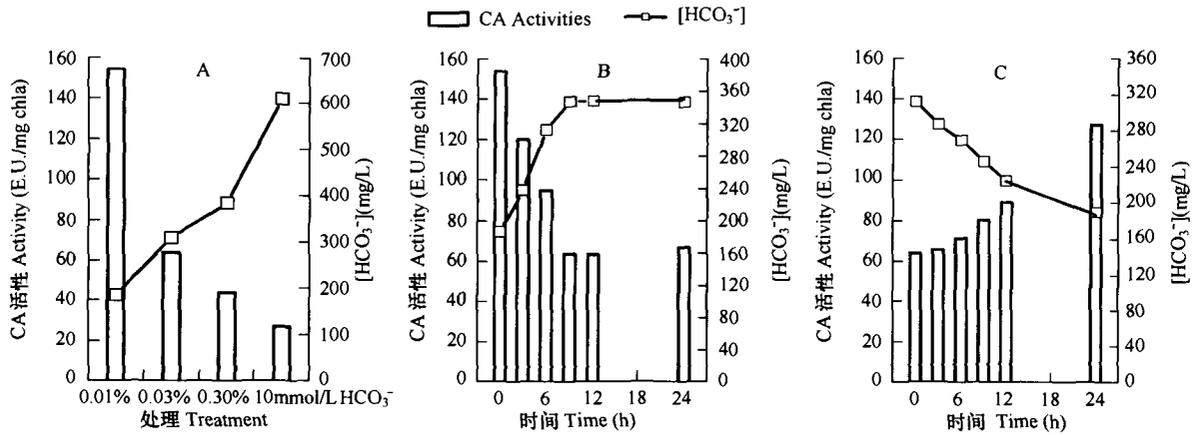


图2 CO₂对 *M. aeruginosa* CA活性的影响

Fig.2 Effects of CO₂ on CA activities of *M. aeruginosa*

A: 通入不同浓度 CO₂ 及加入 10mmol/L HCO₃⁻ 时 *M. aeruginosa* 的 CA 活性; B: 从 0.01% 转移到 0.03% CO₂ 浓度后 24h 内 *M. aeruginosa* CA 活性变化; C: 从 0.03% 转移到 0.01% CO₂ 后 24h 内的变化 A: CA activities of *M. aeruginosa* when aerated with different concentrations of CO₂; B: Time course of CA activities of *M. aeruginosa* after transferring from 0.01% to 0.03% CO₂; C: Time course of CA activities of *M. aeruginosa* after transferring from 0.03% to 0.01% CO₂

2.4 不同氮/磷比条件下铜锈微囊藻的碳酸酐酶活性

对不同氮/磷比条件下生长的铜锈微囊藻进行生长曲线测定并取对数中期藻细胞测定 CA 活性。在实验条件下,低氮/磷比培养的 *M. aeruginosa* 生长较快(8/5 时比生长速率为 0.22,8/1.6 时为 0.185)(图 4, A), CA 活性较高,8/5 时为 87.89 E.U./mg chla,是 8/1.6(34.66 E.U./mg chla)时的 2.5 倍(图 4, B)。

2.5 不同 pH、温度、光照强度下碳酸酐酶的活性

长期的营养输入是蓝藻水华暴发的主要原因,高 pH 及较高的水温及低速率垂直混和有利于蓝藻水华的形成^[7]。本实验中,高 pH 和高温培养的微囊藻具有较高的 CA 活性(表 1)。pH 对 CA 活性的影响比温度更强烈,当 pH 为 9.0 时,CA 活性约是 8.0 时的 2 倍,而 21℃ 和 30℃ 条件下 CA 活性只相差 1.4 倍。

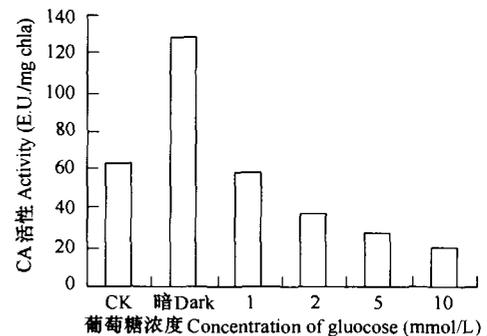


图3 不同葡萄糖浓度下的铜锈微囊藻 CA 活性

Fig.3 CA activity of *M. aeruginosa* at different concentrations of glucose

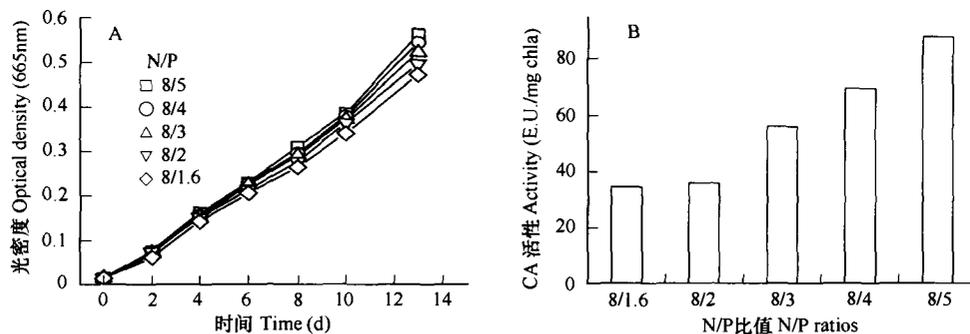


图4 不同 N/P 比对 *M. aeruginosa* 生长的影响

Fig.4 Effects of different N/P ratios on growth

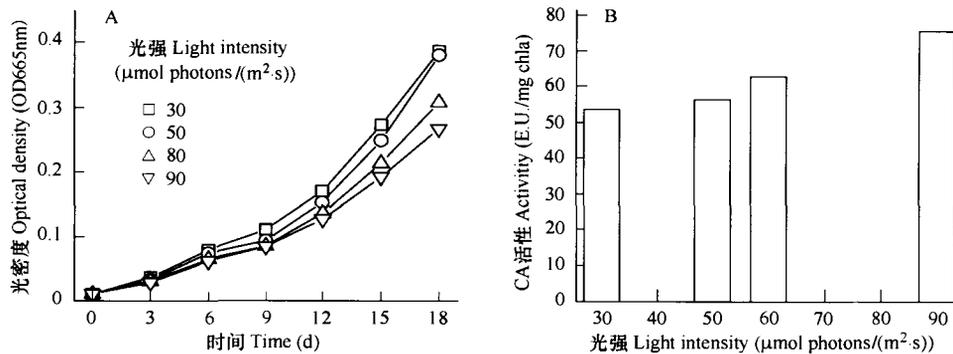
表 1 不同 pH 和不同温度下培养的铜锈微囊藻的碳酸酐酶活性

Table 1 CA activities of *Microcystis aeruginosa* cultured at different pH and temperatures

项目 Item	pH				温度 Temperature			
	8.0	8.3	8.6	9.0	21℃	24℃	27℃	30℃
[HCO ₃ ⁻](mg/L)	118.34	90.28	73.2	48.8	137.86	87.89	68.45	51.96
CA 活性/CA Activity(E.U./mg chla)	46.510	64.212	75.612	97.167	48.787	61.562	64.304	69.052

[HCO₃⁻]测定于对数中期 [HCO₃⁻] were determined in the middle logarithmic phase

取不同温度下对数生长中期细胞进行 CA 活性测定。当在一个比最适温度稍低的温度 22℃ 下培养 *M. aeruginosa* 时,它在 20~30 μmol photons·m⁻²·s⁻¹ 的弱光下生长较快,但在 90 μmol photons·m⁻²·s⁻¹ 下生长时,却具有最高的 CA 活性;最适光强并不会引发最高的 CA 活性(图 5)。曾有报道,豌豆类囊体中的 CA 活性可以被参与光合系统中环式电子传递的 PSII 组分调节^[8]。另有报道表明在莱茵衣藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 中,CA 活性的诱导与能流速率有关,加入 10 μmol/L DCMU 会完全地抑制 CA 活性的诱导;并且推测光合作用在 CA 转录本丰度的调节中是必需的,还有一种蓝光的刺激机制包含在 CA 转录本的调节过程中^[9]。因此,光照强度对 CA 活性的效果应该不仅存在于对生长和无机碳浓度的调节中,也存在于对 CA 转录和表达的直接诱导中,和对环式电子传递一些 PSII 组分的调控中。尽管高光强对于 *M. aeruginosa* 的生长并不是最有利的,但是 CA 活性仍然被高光强所诱导(图 5)。

图 5 不同光强对 *M. aeruginosa* 生长(A)和对数中期藻细胞 CA 活性(B)的影响Fig. 5 Effects of different light intensities on growth(A) and CA activities (B) of *M. aeruginosa* in logarithmic phase

3 讨论

M. aeruginosa 的 CA 活性与培养基中的 [HCO₃⁻] 具有密切的关系(图 2)。介质中 [HCO₃⁻] 降低时,CA 活性提高;反之则活性下降。当培养基中 [HCO₃⁻] 为 5 mmol/L 时,CA 活性能够保持在它的正常水平。在静置条件下,CA 活性也会在 [HCO₃⁻] 升高到 6 mmol/L 以上时被抑制到对照时的 1/2(图 1A)。因此,有理由推断, HCO₃⁻ 是 *M. aeruginosa* 利用的主要无机碳形式。

本实验可能从两个层次为微囊藻水华的暴发提供生物学解释:①同其它已报道过的部分真核绿藻的 CA 活性值相比,微囊藻具有较高的 CA 活性。如在通入空气的情况下,在 *Chlamydomonas reinhardtii* 中,CA 活性为 49.6~185.8 E.U./mg chla^[10], *Chlorella* spp. 的 CA 活性为 5.8~41.2 E.U./mg chla^[11];在本实验中 *M. aeruginosa* 的 CA 活性为 (64.09 ± 5.83) E.U./mg chla, 这使它可较好地根据外界环境进行调整以使机体更好地适应外界的低无机碳浓度。微囊藻水华的暴发往往与 DIC 耗竭相联系^[11], 这时 CO₂ 含量会低于 10 μmol/L。低碳条件下微囊藻可能会利用相对其它种类更高的 CA 活性和更有效的 CCM, 对有限的无机碳源进行有力的竞争, 从而在生物量上超过湖泊中的其它种类成为优势种, 引起水华的暴发。浮游植物所具有的 CCM 会使它们在 CO₂ 浓度为 3~32 μmol/L 的广泛范围内保持一个较快的生长速率^[12], 当生长较快时, 微囊藻对 DIC 的大

量利用使湖面稠密的蓝藻中发生碳限制;这种碳限制又会进一步被微囊藻高效的 CCM 和高 CA 活性竞争性地利用,进一步迅速地繁殖,造成恶性循环。②滇池的自然条件有利于 *M. auginosa* 的生长^[12] 和对其 CA 活性的诱导。除了无机碳, pH、温度、氮/磷比、光强和有机碳等物理或化学因素的变化都会通过调节环境中 $[\text{HCO}_3^-]$ 引起 CA 活性的波动。实验中引起富营养化湖泊微囊藻水华暴发所需要的最适条件,如水中大量磷的存在(图 4),较高的水温(表 1),高 pH 条件下(表 1),都会因引发 *M. auginosa* 的快速生长从而使介质中无机碳源发生耗竭,从而诱导出最高的 CA 活性。

另外,还有几个可能:微囊藻可能具有较高的光合效率;对无机碳的同化可能能够在更短的时间内完成;在自然水体中,它常以群体方式存在,并且具有胶被来作为物理阻隔,防止了无机碳的泄漏。这些推测还有待于进一步实验来证实。

References:

- [1] Berman-Frank Ilana, Kaplan Aaron. Carbonic anhydrase activity in the bloom-forming dinoflagellate *Peridinium Gatunense*. *Journal of Phycology*, 1995, 31: 906 ~ 913.
- [2] Tsuzuki M, Miyachi S. The function of carbonic anhydrase in aquatic photosynthesis. *Aquatic Botany*, 1989, 34: 85 ~ 104.
- [3] Ichimura T. Media for blue-green algae. In K. Nishizawa and M. Chihara eds *Methods in algae studies*. 1979, Tokyo, Kyoritsu.
- [4] Wilbur K M, Anderson N G. Electronic and colorimetric determination of carbonic anhydrase. *Journal of Biological Chemistry*, 1948, 176: 147 ~ 154.
- [5] Li D H, Song L R, Liu Y D. The effect of salt stress on some physiological and biochemical characteristics of *Nostoc sphaeoides* Kütz. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1999, 23(5): 420 ~ 424.
- [6] Wu T F, Song L R, Liu Y D. An inducible CO₂ concentrating mechanism in cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC7120. *Chinese Science Bulletin*, 1999, 44: 1527 ~ 1531.
- [7] Paerl H W. A comparison of cyanobacterial bloom dynamics in freshwater, estuarine and marine environments. *Phycologia*, 1996, 35(suppl.): 25 ~ 35.
- [8] Moskvina O V, Ovchinnikova V I, Ivanov B N. Effect of light on the carbonic anhydrase activity of pea thylakoids. *Biophysics*, 1996, 41(5): 1067 ~ 1072.
- [9] Dionisio M L, Fukuzawa H, Miyachi S. Light-induced carbonic anhydrase expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 1990, 94: 1103 ~ 1110.
- [10] Tsuzuki M, Shimamoto T, Yang S Y, *et al.* Diversity in intracellular locality, nature, and function of carbonic anhydrase in various plants. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1984, 429: 238 ~ 240.
- [11] Klemmer A R. Effects of nutritional status on cyanobacteria buoyancy, bloom, and dominance with special reference to inorganic carbon. *Canadian Journal of Botany*, 1991, 69: 2293 ~ 2297.
- [12] Tortell P D, Rau G H, Morel F M M. Inorganic carbon acquisition in coastal *Pacific phytoplankton* communities. *Limnology and Oceanography*, 2000, 45(7): 1485 ~ 1500.

参考文献:

- [5] 李敦海,宋立荣,刘永定. 葛仙米光合活性对盐胁迫的反应. *水生生物学报*, 1999, 23(5): 420 ~ 424.
- [6] 吴天福,宋立荣,刘永定. 蓝藻 *Anabaena* sp. Strain PCC7120 中一种可诱导的 CO₂ 浓缩机制(CCM). *科学通报*, 1999, 44(14): 1527 ~ 1531.