

## 小新月菱形藻碳酸酐酶活性和光合作用对高盐度胁迫的响应

余锦兰<sup>1,2</sup>, 夏建荣<sup>1,2\*</sup>, 邹永东<sup>3</sup>

(1. 广州大学植物抗逆基因功能广州市重点实验室, 广东 广州 510006;

2. 广州大学环境科学与工程学院, 广东 广州 510006;

3. 深圳大学生命科学学院, 广东 深圳 518060)

**摘要:** 以浮游硅藻小新月菱形藻为实验材料, 研究其在不同盐度下的生长、胞外碳酸酐酶活性、光合速率和叶绿素 a 荧光参数的变化。结果显示, 与正常海水培养相比, 最高盐度(70)培养的细胞比生长速率下降了 59.2%; 同时, 胞外碳酸酐酶活性、叶绿素 a、c 含量分别降低了 66.3%、50.0% 和 45.7%。高盐度培养下, 最大光合速率( $P_m$ )、光合效率( $\alpha$ )、最大光化学效率( $F_v/F_m$ )、实际光化学效率( $Yield$ )和光化学淬灭系数( $qP$ )下降, 但非光化学淬灭系数( $qN$ )升高, 对无机碳的亲合力明显下降。以上结果表明, 盐度升高对小新月菱形藻生长和光合作用具有明显抑制作用, 但小新月菱形藻可以通过胞外碳酸酐酶活性变化、对无机碳的亲合力和调整光系统 II 的能量流动与能量利用效率以应对高盐度的胁迫。

**关键词:** 小新月菱形藻; 盐度; 碳酸酐酶活性; 叶绿素 a 荧光参数

**中图分类号:** Q 55; S 917

**文献标识码:** A

海水盐度是影响海洋藻类生长发育的重要生态因子<sup>[1]</sup>。盐胁迫会导致微藻细胞生理和生物化学过程发生变化, 如生物大分子和脂质代谢率增加、能量转换效率降低、细胞膜渗透性增大<sup>[2]</sup>、抑制光合作用速率<sup>[3]</sup>等。盐度增加明显抑制大型海藻石莼(*Ulva lactuca*)的生长和光合作用速率<sup>[4]</sup>。盐胁迫也显著降低了螺旋藻(*Spirulina platensis*) PS II 活性<sup>[5]</sup>, 抑制莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*) PS II 电子传递的量子产率<sup>[6]</sup>。SATO 等<sup>[7]</sup>对红藻(*Porphyra perforata*)的研究表明, 盐胁迫导致到达反应中心的光能总量减少并抑制 PS II 氧化侧电子传递。GONZÁLEZ-MORENO 等<sup>[8]</sup>对裸藻的研究也表明盐胁迫抑制电子传递, 可见盐度对光合作用的影响与其光系统 II 的活性密切相关。

藻类主要利用核酮糖二磷酸羧化氧化酶(rubisco)固定 CO<sub>2</sub>, 在低 CO<sub>2</sub> 浓度环境中, 部分藻类细胞能利用其体内的二氧化碳浓缩机制(CO<sub>2</sub> concentrating mechanism, CCM)来维持较

高的光合作用速率<sup>[9]</sup>, 这种机制主要包括:(1)通过质膜主动转运 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 进入胞液, 在细胞内通过碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA)的作用将 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 转变为 CO<sub>2</sub>; (2) 直接通过胞外碳酸酐酶催化细胞表面的 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 转变为 CO<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> 通过扩散作用进入细胞内, 通过以上胞内、外碳酸酐酶的作用保持细胞内稳定的 CO<sub>2</sub> 流给 rubisco, 以维持在 CO<sub>2</sub> 浓度限制的环境中较高的光合作用效率<sup>[10-11]</sup>, 因此碳酸酐酶在藻类光合固碳中起着非常重要的作用。藻类在不同盐度浓度培养过程中表现出不同的光合作用特性, 可能与其无机碳利用有关。小新月菱形藻(*Nitzschia closterium* f. *minutissima*) 在分类上属于硅藻门(Bacillariophyta), 羽纹纲(Pennatae), 双菱形藻目(Surirellales), 菱形藻科(Nitzschiaceae), 菱形藻属(*Nitzschia*), 是一种我国沿海较常见的饵料硅藻。本文利用叶绿素 a 荧光仪测定了高盐度对小新月菱形藻叶绿素 a

收稿日期:2010-09-24 修回日期:2011-01-31

资助项目:国家自然科学基金项目(40676079, 40976078); 广东省自然科学基金(10151009101000001); 广州市植物抗逆基因功能研究广州市重点实验室开放基金

通讯作者:夏建荣, E-mail:jrxia@gzhu.edu.cn

光参数的影响,同时结合高盐度培养下小新月菱形藻无机碳利用和胞外碳酸酐酶活性变化,探讨海洋硅藻对高盐度的光合响应机制,以期作为饵料硅藻的大量培养提供重要的理论依据和实践基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验所用藻种 2007 年底购自中国科学院海洋研究所,2009 年用于本实验。

### 1.2 微藻培养

将藻种于 f/2 培养液中扩大培养,培养温度为  $(18 \pm 1)^\circ\text{C}$ ,光强为  $30 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ,光照周期 12L:12D,通入过滤空气培养至指数生长期收获用于以下实验。

### 1.3 不同盐度下的培养与生长曲线测定

取一定量处于指数生长期的藻细胞置于新鲜的不同梯度盐度的培养液中,盐度分别为 32(自然海水盐度)、40、45、50、55、60、70 培养。

在培养过程中每天定时吸取一定量的藻培养液,用血球计数板在显微镜下直接计数,每一样品取样 3 次,取平均值。比生长速率按以下计算公式得出:

$$\text{比生长速率}(\mu) = (\ln X_2 - \ln X_1) / (t_2 - t_1)$$

式中, $X_1$  为  $t_1$  时的细胞密度, $X_2$  为  $t_2$  时的细胞密度。

### 1.4 碳酸酐酶活性的测定

采用完整细胞电量法测定胞外碳酸酐酶活性<sup>[12]</sup>。具体方法如下:用离心机  $4\ 000 \times g$  离心 10 min 后收集藻细胞,用巴比妥缓冲液(pH 8.3, 20 mmol/L)洗涤一次,离心后再用巴比妥缓冲液悬浮,细胞悬浮液最终体积为 8 mL。在  $4^\circ\text{C}$  下迅速加入 5 mL  $0^\circ\text{C}$   $\text{CO}_2$  饱和水,用 pH 计监测反应体系 pH 变化,记录 pH 从 8.3 降至 7.3 所需的时间,碳酸酐酶活性(U)的计算公式为:  $\text{EU} = 10 \times (t_0/t - 1)$ ,其中  $t_0$  为反应体系中未加藻细胞时 pH 下降所需的时间, $t$  为反应体系中加藻细胞时 pH 下降所需的时间。碳酸酐酶活性单位(以 *Chl. a* 计)为 EU/mg。

### 1.5 叶绿素含量测定

离心收获藻细胞,加入 90% 丙酮,在  $4^\circ\text{C}$  下抽提 12 h,分别于 630 nm 和 664 nm 处测其光密度值(OD 值),通过以下公式计算色素含量(mg/

L)<sup>[13]</sup>。

$$\text{Chl. a} = 11.47 \times \text{OD}_{664} - 0.40 \times \text{OD}_{630}$$

$$\text{Chl. c} = 24.36 \times \text{OD}_{630} - 3.73 \times \text{OD}_{664}$$

### 1.6 叶绿素 a 荧光参数的测定

用便携式调制叶绿素荧光仪(PAM-2100, Walz)进行叶绿素 a 荧光参数的测定。测定前将微藻样品暗适应 10 min。基础荧光  $F_o$  用弱测量光 [ $0.01 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ] 测量,最大荧光  $F_m$  用饱和脉冲 [ $4\ 000 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ,持续时间为 0.8 s] 激发。当达到稳定荧光时打开饱和脉冲,荧光又上升至光适应状态下的最大荧光即  $F'_m$ ,当关闭光化光并打开远红光后荧光下降至光适应状态下的最低值即  $F'_o$ 。具体叶绿素 a 荧光参数用以下公式计算<sup>[14-15]</sup>:

$$\text{PSII 的最大光能转化效率 } F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$$

$$\text{PSII 的实际光能转化效率 } \text{Yield} = (F'_m - F'_o)/F'_m$$

$$\text{光化学淬灭系数 } qP = (F'_m - F'_o)/(F'_m - F_o)$$

$$\text{非光化学淬灭系数 } qN = (F_m - F'_m)/(F_m - F_o)$$

### 1.7 光合作用光响应曲线(P-I 曲线)测定

取一定量不同培养条件下处于指数生长期的藻离心,重悬于新鲜的 f/2 培养基中,取 5 mL 藻液加入反应槽中,开启磁力搅拌,用恒温水浴槽控制温度在  $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ ,调整卤钨灯与反应槽之间的距离获得不同光照强度,用氧电极(YSI 5300A, USA)测定不同光强下藻细胞光合放氧速率,用下列公式对 P-I 曲线进行非线性拟合<sup>[16]</sup>:

$$P = P_m \times \tanh(\alpha \times I/P_m) + R_d$$

其中, $I$  为光照强度; $P$  是光照强度  $I$  时所对应的光合速率; $P_m$  为最大光合速率,即光饱和的光合速率; $\alpha$  是光合作用在光限制部分的初始斜率,可以表示光合效率; $R_d$  为暗呼吸速率;光补偿点  $I_c = -R_d/\alpha$ 。

### 1.8 光合作用对无机碳的响应曲线(P-C 曲线)测定

用盐酸(11.9 mol/L)调节海水 pH 小于 4.0,通氮气 30 min 驱走海水中的  $\text{CO}_2$  气体,得到无碳海水,用此无碳海水配置 pH 8.2 的 25 mmol/L Tris 缓冲液。

收获不同培养条件下处于对数生长期的藻,离心后,用 Tris 缓冲液洗涤数次并重悬。于  $20^\circ\text{C}$   $400 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  光强条件下,用氧电极(YSI5300A, USA)测定光合放氧速率。当反应槽中藻的光合放氧速率为 0 时(无机碳补偿点),注入不同浓度的  $\text{NaHCO}_3$  溶液得到反应体系中的

DIC 浓度梯度,测定各自的光合放氧速率,得到光合放氧速率对 DIC 浓度的响应曲线( $P-C$  曲线)。用下列公式对  $P-C$  曲线进行非线性拟合:

$$V = V_{\max} \times [\text{DIC}] / (K_{0.5} + [\text{DIC}])$$

其中, $V$  为光合放氧速率, $V_{\max}$  为最大光合放氧速率; $[\text{DIC}]$  为反应介质中总无机碳浓度; $K_{0.5}$  是当光合放氧速率达到最大速率一半时对应的无机碳浓度。

使用 Origin 6.0 软件进行曲线拟合,实验数据用方差分析和多重比较(LSD)进行统计分析, $P < 0.05$  为显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 不同盐度对小新月菱形藻生长的影响

不同盐度培养下的小新月菱形藻生长曲线和比生长速率如图 1 和图 2 所示。不同盐度对小新月菱形藻的生长具有明显影响( $P < 0.05$ )。在 32~50 盐度培养下前 7 天细胞数量迅速增长,到第 7 天细胞密度达到最大值,而后进入稳定期;在 55~70 盐度下的细胞生长缓慢,到第 9 天才进入稳定期。盐度越高,小新月菱形藻的比生长速率

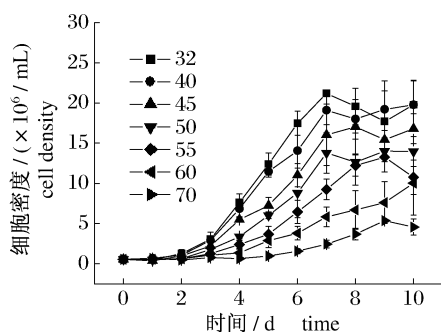


图 1 不同盐度培养下小新月菱形藻的生长曲线

Fig. 1 Effect of different salinity on the growth curves of *N. closterium f. minutissima*

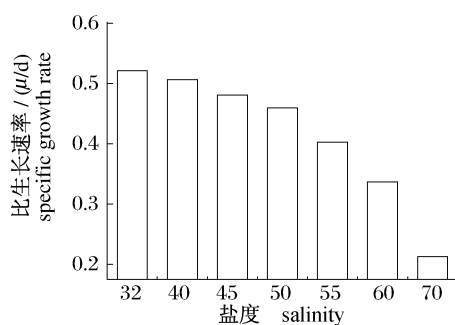


图 2 不同盐度培养的小新月菱形藻的比生长速率  
Fig. 2 Effect of different salinity on the specific growth rate of *N. closterium f. minutissima*

( $\mu$ ) 和最大藻细胞密度越小,其中高盐度(70)海水中生长的细胞比生长速率比正常海水(32)的下降了 59.2%。

### 2.2 不同盐度对小新月菱形藻胞外碳酸酐酶活性和色素含量的影响

图 3 和图 4 分别为不同盐度对小新月菱形藻胞外碳酸酐酶活性和色素含量的影响。盐度对胞外 CA 活性有明显影响( $P < 0.05$ )。小新月菱形藻胞外 CA 活性随着盐度的升高逐渐降低,其中 70 盐度培养的细胞胞外 CA 活性比正常海水培养降低了 66.3%。高盐度对小新月菱形藻色素含量的影响如图 4 所示,高盐度培养对其色素含量有明显影响( $P < 0.05$ ),随着盐度的升高逐渐下降,当盐度高于 50 时,叶绿素 a、c 含量明显下降,其中 70 盐度培养的细胞叶绿素 a、c 含量比正常海水培养分别降低了 50.0% 和 45.7%。

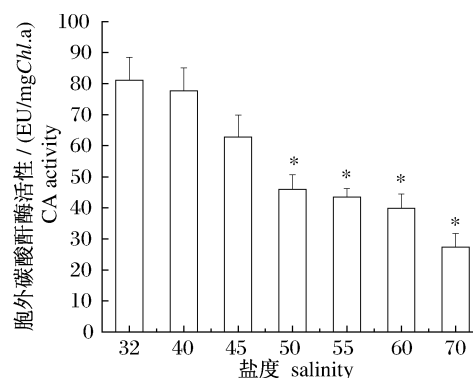


图 3 不同盐度对小新月菱形藻胞外碳酸酐酶活性的影响

Fig. 3 Effect of different salinity on extracellular CA activity of *N. closterium f. minutissima*

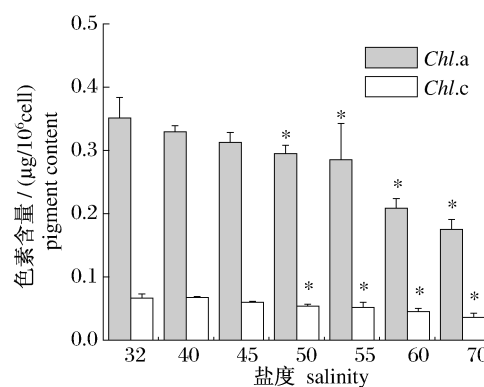


图 4 不同盐度对小新月菱形藻叶绿素 a 和 c 含量的影响

Fig. 4 Effects of different salinity on *Chl. a* and *Chl. c* contents of *N. closterium f. minutissima*

### 2.3 不同盐度对小新月菱形藻叶绿素 a 荧光参数的影响

不同盐度对小新月菱形藻叶绿素 a 的影响如图 5 所示,盐度对小新月菱形藻的 PS II 最大光能转化效率 ( $F_v/F_m$ )、PS II 的实际光能转化效率

( $Yield$ )、光化学淬灭系数 ( $qP$ ) 和非光化学淬灭系数 ( $qN$ ) 均有明显影响 ( $P < 0.05$ )。高盐度 (70) 下培养的藻细胞的  $F_v/F_m$  比正常海水培养的降低 9.1%。 $Yield$  随着盐度的升高逐渐下降,高盐度 (70) 比正常海水降低了 50.4%。高盐度 (70)

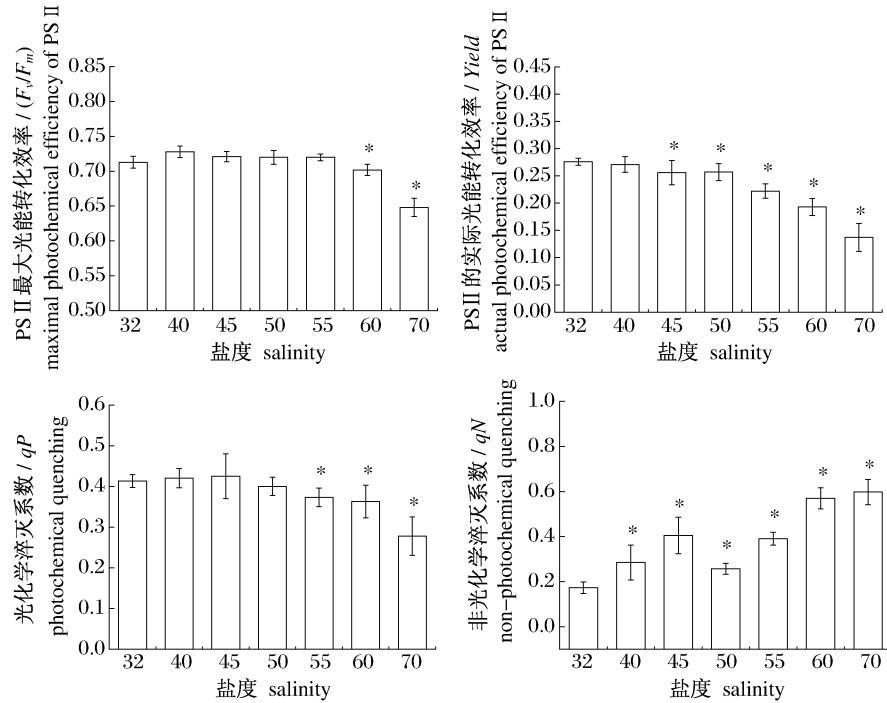


图 5 不同盐度对小新月菱形藻叶绿素 a 荧光参数的影响

Fig. 5 Effects of different salinity on the Chl. a fluorescence parameters of *N. closterium f. minutissima*

的  $qP$  比正常海水降低了 32.6%,但  $qN$  随着盐度的升高具有明显的上升趋势,高盐度 (70) 培养的  $qN$  比正常海水升高了 71%。

### 2.4 盐度对小新月菱形藻 P-I 曲线的影响

不同盐度培养下的小新月菱形藻光合作用对光照强度的响应关系如图 6 和表 1 所示。盐度对最大光合速率 ( $P_m$ ) 和光合效率 ( $\alpha$ ) 均有明显影响 ( $P < 0.05$ )。最大光合速率 ( $P_m$ ) 随着盐度的升高而降低,盐度 70 培养时的  $P_m$  比正常海水培养的降低 40.6%。盐度 50 和 70 培养时的  $\alpha$  比正常海水分别降低 40.2% 和 56.7%。暗呼吸速度  $R_d$  随着盐度的升高而减小,盐度 50 和 70 培养时的  $R_d$  比正常海水分别降低 12.3% 和 22.4%,而光补偿点  $I_c$  随着盐度的升高而升高。

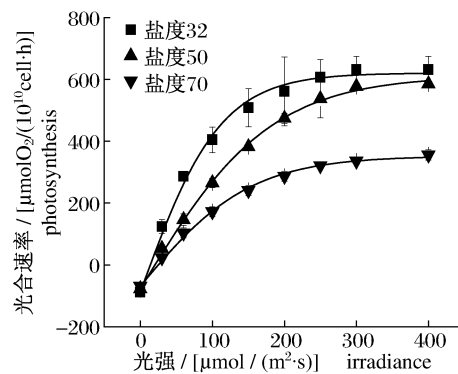


图 6 不同盐度培养的小新月菱形藻光合作用对光照强度的响应曲线

Fig. 6 P-I curves in *N. closterium f. minutissima* grown in different salinity

表 1 不同盐度培养下小新月菱形藻的光合作用光响应曲线参数  
Tab.1 Parameters of photosynthetic-light responses ( $P-I$ ) curves in *N. closterium f. minutissima* cultured under different salinity

盐度 salinity	最大光合速率 $P_m$	光合效率 $\alpha$	暗呼吸速率 $R_d$	光补偿点 $I_c$
32	709.2 ± 12.0	6.4 ± 0.3	-88.8 ± 0.8	13.9 ± 1.2
50	689.9 ± 9.7	3.8 ± 0.1 *	-77.9 ± 2.5 *	20.4 ± 1.1
70	421.1 ± 6.5 *	2.8 ± 0.1 *	-68.9 ± 0 *	25.0 ± 3.1 *

## 2.5 盐度对小新月菱形藻 $P-C$ 曲线的影响

不同盐度培养下的小新月菱形藻光合速率对不同无机碳浓度的响应关系如图 7 和表 2 所示。盐度对小新月菱形藻的最大光合速率 ( $V_{max}$ ) 和达到最大光合速率一半时的无机碳浓度 ( $K_{0.5}$ ) 均有明显影响 ( $P < 0.05$ )。随着培养液中盐度的逐渐升高,小新月菱形藻最大光合速率 ( $V_{max}$ ) 逐渐下降,盐度为 50 和 70 时分别比正常海水降低了 41.4% 和 49.2%。盐度 70 培养下的  $K_{0.5}$  ( $CO_2$ ) 为正常海水时的 1.59 倍,即在高盐胁迫下,小新月菱形藻光合作用对  $CO_2$  的亲合力明显小于正常海水培养的细胞。

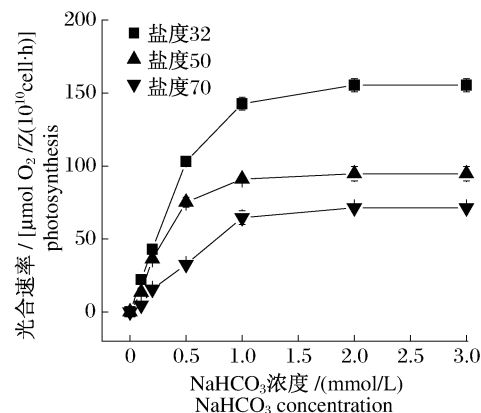


图 7 不同盐度下小新月菱形藻的  $P-C$  曲线  
Fig. 7  $P-C$  curves in *N. closterium f. minutissima* grown in different salinity

表 2 不同盐度培养下小新月菱形藻的最大光合速率和达到最大光合速率一半时的无机碳浓度  
Tab.2 The maximum photosynthetic rate ( $V_{max}$ ) and the concentration of inorganic carbon ( $K_{0.5}$ ) supporting half of  $V_{max}$  in *N. closterium f. minutissima* under different salinity

盐度 salinity	$V_{max}$ [ $\mu\text{mol O}_2 / (10^{10} \text{ cell} \cdot \text{h})$ ]	$K_{0.5}$ ( $\mu\text{mol/L}$ )		
		DIC	$CO_2$	$HCO_3^-$
32	193.3 ± 6.3	503.9 ± 8.9	3.62 ± 0.1	456.1 ± 8.1
50	113.3 ± 5.7 *	356.7 ± 11.7	2.34 ± 0.1	316.1 ± 10.4
70	98.2 ± 0.6 *	829.0 ± 94 *	5.76 ± 0.7 *	734.3 ± 83.8 *

## 3 讨论

### 3.1 盐度对小新月菱形藻生长的影响

新月菱形藻是一种广盐性的种类,盐度在 18 ~ 61.5 之间均能生长<sup>[17]</sup>,我们的实验结果也证实了在分类上属于同一属的小新月菱形藻也具有对高盐度的较强耐受能力,在盐度高达 60 ~ 70 时,尽管生长速率明显下降,但还能维持一定程度的生长。在高盐度培养初期,生长均出现不同程度的延滞期,即需要有一定的适应时期,而且盐度越高,适应时间越长,这与 ALYABYEV 等<sup>[2]</sup>有关盐藻研究的结果相似。高盐度下生长受到抑制在钝顶螺旋藻<sup>[18]</sup>和念珠藻<sup>[19]</sup>中均有类似的报道,但不同藻类由于生长的环境不同,高盐度对其影

响的程度也存在差异。有研究表明在较高盐度下,鱼腥藻 (*Anabaena doliolum*) (20 ~ 200 mmol/L NaCl) 和耐盐绿藻 (*Nannochloris*) 随盐度的增加,叶绿素含量均出现明显下降<sup>[20-21]</sup>,本结果与其一致。叶绿素含量随着盐度升高而下降,可能是由于盐胁迫使捕光色素蛋白复合体和反应中心复合体受损或部分降解<sup>[1]</sup>,影响了色素的合成;同时 NaCl 也能促进叶绿素酶活性增强,使叶绿素分解<sup>[22]</sup>。

### 3.2 盐度对小新月菱形藻光合作用的影响

叶绿素 a 荧光是光合作用的良好指标和探针,通过对荧光参数的分析,可以得到有关光能利用途径的信息。 $F_v/F_m$  表示 PS II 最大光化学效率,是研究在胁迫环境中微藻光合作用变化的一

个非常重要的参数<sup>[23]</sup>。本研究结果表明,高盐度培养的藻细胞的最大光化学效率、实际光能捕获效率均有所下降,这与梁英等<sup>[1]</sup>、EL-SHEEKH等<sup>[24]</sup>和 ALLAKHVERDIEV 等<sup>[25]</sup>的研究结果是一致的,这可能与盐胁迫使 PS II 反应中心受损,抑制光合作用的原初反应,阻碍光合电子传递过程有关。有关螺旋藻的研究也表明,高盐度下  $Q_A^-$  积累剧增,电子传递速率下降<sup>[5]</sup>。 $qP$  为光化学淬灭,反映了 PS II 天线色素吸收的光能用于光化学电子传递的份额,在一定程度上反映了 PS II 反应中心的开放程度。 $qP$  越大,表明 PS II 的电子传递活性越大<sup>[26]</sup>。有关盐胁迫对螺旋藻<sup>[27]</sup>和石莼(*Ulva lactuca*)<sup>[4]</sup>光合作用影响的研究表明,盐胁迫引起 PS II 反应中心的关闭, $Q_A^-$  到  $Q_B$  的电子传递受抑,使  $Q_A^-$  在细胞内积累,这与 *Yield* 的下降和  $qN$  上升是吻合的。 $qN$  即非光化学淬灭,反映的是 PS II 吸收的光能不能用于光合电子传递而以热的形式耗散掉的光能部分,对光合机构起一定的保护作用<sup>[28]</sup>。盐胁迫下小新月菱形藻的  $qN$  逐渐增加,表明其卡尔文循环的活性受抑制的程度增大,PS II 的潜在热耗散能力增强,对藻体本身可能是一种保护作用。光合作用光响应曲线参数是衡量光合生理特性的重要指标<sup>[29]</sup>。高盐度下小新月菱形藻最大光合作用速率( $P_m$ )和光合效率( $\alpha$ )明显下降,这与叶绿素荧光参数的变化是一致的。BLUMWALD 等<sup>[19]</sup>的研究表明念珠藻通过降低光合作用速率和积累胞内渗透剂蔗糖来应对高盐环境。但是当盐度超过了藻细胞所能承受的范围时, $Na^+$  和  $Cl^-$  在细胞内大量积累,不仅会改变细胞膜系统的结构和功能,而且会导致光合作用中起重要作用的酶活性降低<sup>[30]</sup>。高盐度也可导致光合作用 PS II 结构的破坏<sup>[31]</sup>,类囊体膜上的藻胆体分离<sup>[18]</sup>。高盐度培养下小新月菱形藻暗呼吸速率  $R_d$  明显减少,可能是在高盐度下质膜的通透性增大, $Na^+$  大量进入细胞内导致线粒体内酶活性受到影响所致<sup>[18]</sup>。

### 3.3 盐度对小新月菱形藻无机碳利用和 CA 活性的影响

高盐度对不同藻类胞外 CA 活性影响存在明显差异,高盐度(500 mmol/L NaCl)对三角褐指藻(*Phaeodactylum tricorutum*)、盐藻(*Dunaliella salina* 和 *Dunaliella parva*)胞外 CA 活性具有明显的抑制作用,而对 *Pleurochrysis carterae* 胞外

CA 有激活作用,这与细胞积累  $Cl^-$  的能力存在差异有关,微藻细胞内积累  $Cl^-$  浓度越高,CA 活性容易受到抑制, $NaCl$  对 CA 活性的影响主要体现在  $Cl^-$  而不是  $Na^+$ <sup>[32]</sup>, $Cl^-$  也是碳酸酐酶的阻化剂,对其活性具有明显的抑制作用<sup>[33]</sup>。LINDSKOG<sup>[34]</sup>认为阴离子对 CA 活性影响是非竞争性的,主要是取代活性中心与锌原子结合的羟基位点。小新月菱形藻无机碳利用的方式主要通过胞外 CA 催化  $HCO_3^-$  转化为  $CO_2$ ,后者自由扩散透过质膜进入细胞,同时还存在  $HCO_3^-$  直接吸收<sup>[35]</sup>,因此胞外碳酸酐酶的活性变化将影响光合无机碳的利用。本研究表明,在 32 ~ 45 盐度环境下,小新月菱形藻的胞外 CA 活性没有明显变化,而在大于 45 时活性明显下降,可见小新月菱形藻细胞内  $Cl^-$  只有积累到一定浓度才对 CA 活性起到抑制作用,导致细胞对无机碳的亲合力明显下降。高盐度环境下胞外 CA 活性降低表明通过胞外 CA 催化  $HCO_3^-$  转化为  $CO_2$  的能力降低,而  $HCO_3^-$  直接吸收是一个需要能量的过程,高盐度下电子传递速率降低,导致 ATP 的合成量也明显减少,因此高盐度环境中无机碳提供速率也有所降低,但细胞可以通过 rubisco 在蛋白核和基质中重新分配使得细胞在胁迫环境下维持一定的光合作用速率<sup>[36]</sup>,这也可能是小新月菱形藻能在高盐度环境下维持一定程度生长的原因。

总之,高盐度对小新月菱形藻光合生理的影响是多方面的,从我们的研究结果可以看出,高盐度可以通过调整光合色素含量和改变叶绿素 a 荧光参数降低细胞光合作用光能吸收和利用效率,抑制胞外碳酸酐酶的活性以改变无机碳利用和细胞内无机碳的积累,从而影响光合作用速率,导致生长受到抑制。

### 参考文献:

- [1] 梁英,冯力霞,田传远,等. 盐胁迫对塔胞藻生长及叶绿素荧光动力学的影响[J]. 中国海洋大学学报,2006,36(5):726-732.
- [2] ALYABYEV A J, LOSEVA N L, GORDON L K, et al. The effect of changes in salinity on the energy yielding processes of *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella maritima* cells [J]. Thermo Acta, 2007, 458(1-2):65-70.
- [3] KIRST G O. Salinity tolerance of eukaryotic marine algae [J]. Annu Rev Plant Physiol and Plant Mol

- Biol,1990,41:21-53.
- [4] XIA J R, LI Y J, ZOU D H. Effects of salinity stress on PS II in *Ulva lactuca* as probed by chlorophyll fluorescence measurements [J]. Aqua Bot, 2004, 80: 129-137.
- [5] LU C M, VONSHAK A. Effects of salinity stress on photosystem II function in cyanobacterial *Spirulina platensis* cells [J]. Physiol Plant, 2002, 114 (3): 405-413.
- [6] ENDO T, SCHREIBER U, ASADA K. Suppression of quantum yield of photosystem II by hyperosmotic stress in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Plant Cell Physiol, 1995, 36: 1253-1258.
- [7] SATOH K, SMITH C M, FORK D C. Effects of salinity on primary processes of photosynthesis in the red *Porphyra perforate* [J]. Plant Physiol, 1983, 73: 643-647.
- [8] GONZÁLEZ-MORENO S, GÓMEZ-BARRERA J, PERALES H, et al. Multiple effects of salinity on photosynthesis of the protest *Euglena gracilis* [J]. Physiol Plant, 1997, 101(4): 777-786.
- [9] GORDILLO F J L. Inorganic carbon utilization by freshwater and marine photosynthetic microorganisms [J]. Physiol Plant, 2008, 133(1): 1-3.
- [10] MARTIN C L, TORTELL P D. Bicarbonate transport and extracellular carbonic anhydrase in marine diatoms [J]. Physiol Plant, 2008, 133(1): 106-116.
- [11] TRIMBORN S T, LUNDHOLM N, THOMS S, et al. Inorganic carbon acquisition in potentially toxic and non-toxic diatom: the effect of pH-induced change in seawater carbonate chemistry [J]. Physiol Plant, 2008, 133(1): 92-105.
- [12] WILLBUR K M, ANDERSON N G. Electronic and colorimetric determination of carbonic anhydrase [J]. J Biol Chem, 1948, 176: 147-154.
- [13] JEFFREY S W, HUMPHREY G F. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c<sub>1</sub> and c<sub>2</sub> in higher plants, algae and natural phytoplankton [J]. Biochem Physiol Pflanzen, 1975, 167: 191-194.
- [14] VAN KOOTEN O, SNEL J F H. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology [J]. Photosyn Res, 1990, 25 (3): 147-150.
- [15] GENTY B E, BRIANTAIS J M, BAKER N R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence [J]. Biochim Biophys Acta, 1989, 990: 87-92.
- [16] HENLEY W J. Measurement and interpretation of photosynthetic light-response curves in algae in the context of photoinhibition and diel changes [J]. J Phycol, 1993, 29(6): 729-739.
- [17] 王彩理, 任建国. 密封袋半连续培养新月菱形藻 [J]. 信阳师范学院学报: 自然科学版, 2004, 17(1): 88-91.
- [18] VONSHAK A, GUY R, GUY M. The response of the filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis* to salt stress [J]. Arch Microbiol, 1988, 150(5): 417-420.
- [19] BLUMWALD E, TEL-OR E. Osmoregulation and cell composition in salt-adaptation of *Nostoc muscorum* [J]. Arch Microbiol, 1982, 132 (2): 168-172.
- [20] SINGH D P, KSHATRIYA K. NaCl-induced oxidative damage in the Cyanobacterium *Anabaena doliolum* [J]. Curr Microbiol, 2002, 44 (6): 411-417.
- [21] HENLEY W J, MAJOR K M, HIRONAKA J L. Response to salinity and heat stress in two halotolerant chlorophyte algae [J]. J Phycol, 2002, 38(4): 757-766.
- [22] 刘家尧, 衣艳君, 张其德. 盐胁迫对不同抗盐性小麦叶片荧光诱导动力学的影响 [J]. 植物学通报, 1998, 15(2): 46-49.
- [23] 韩博平, 韩志国, 付翔. 藻类光合作用机理与模型 [M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [24] EL-SHEEKH M M. Inhibition of the water splitting system by sodium chloride stress in the green alga *Chlorella vulgaris* [J]. Braz J Plant Physiol, 2004(1), 16: 25-29.
- [25] ALLAKVERDIEV S I, KLIMOV V V, HAGEMANN M. Cellular energization protects the photosynthetic machinery against salt-induced inactivation in *Synechococcus* [J]. Biochem Biophys Acta, 2005, 1708(2): 201-208.
- [26] 王可玢, 许春辉, 赵福洪, 等. 水分胁迫对小麦旗叶某些体内叶绿素 a 荧光参数的影响 [J]. 生物物理学报, 1997, 13(2): 273-278.
- [27] 龚红梅. 盐胁迫对螺旋藻光合作用影响的研究 [D]. 北京: 中国科学院植物研究所, 2006.
- [28] 张守仁. 叶绿素荧光动力学参数的意义及讨论 [J]. 植物学通报, 1999, 16(4): 444-448.
- [29] MACLNTYRE H L, KANA T M, ANNING T, et al. Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria [J]. J Phycol, 2002,

- 38:17-38.
- [30] 史庆华,朱祝军, KHALIDA AL-AGHABARY, 等. 等渗  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  和  $\text{NaCl}$  胁迫对番茄光合作用的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2004, 10(2): 188-191.
- [31] SHEN J R, IKEUCHI M, INOUE Y. Stoichiometric association of extrinsic cytochrome  $c_{550}$  and 12 kDa protein with a highly purified oxygen-evolving photosystem II core complex from *Synechococcus vulcanus*[J]. FEBS Lett, 1992, 301(2): 145-149.
- [32] DIONISIO-SESE M L, MIYACHI S. The effect of sodium chloride on carbonic anhydrase activity in marine microalgae [J]. J Phycol, 1992, 28(5): 619-624.
- [33] 李西腾,赵新政,阙小峰,等. 盐分胁迫对油菜碳酸酐酶活性的影响[J]. 农机化研究, 2006, 8: 134-136.
- [34] LINDSKOG S. Carbonic anhydrase [M] // EICHORN G L, MARIZILLE L G. Advances in Inorganic Biochemistry. Vol 4. New York: Elsevier, 1982: 115-170.
- [35] 黄瑾. 小新月菱形藻的无机碳利用机制及其碳酸酐酶的环境调控[D]. 汕头: 汕头大学, 2008.
- [36] LIN S, CARPENTER E J. Rubisco of *Dunaliella tertiolecta* is redistributed between the pyrenoid and the stroma as a light/shade response[J]. Mar Biol, 1997, 127(3): 521-529.



## Response of carbonic anhydrase activity and photosynthesis to high salinity stress in *Nitzschia closterium* f. *minutissima*

YU Jin-lan<sup>1,2</sup>, XIA Jian-rong<sup>1,2\*</sup>, ZOU Yong-dong<sup>3</sup>

(1. Guangzhou Key Laboratory for Functional Study on Plant Stress-Resistant Genes, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China;

2. School of Environmental Science and Engineering, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China;

3. College of Life Science, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

**Abstract:** Salinity is an important ecological factor in the algal growth. Water loss would lead to the increase of salinity in mass culture of fish food diatom, which could affect the algal photosynthesis and inorganic carbon utilization. In this paper, impacts of salinity on the growth, carbonic anhydrase activity, photosynthesis (P-I curve) and chlorophyll a fluorescence parameters in *Nitzschia closterium* f. *minutissima* were investigated to explore the photosynthetic mechanism of the diatom under the high salinity. The results showed that the specific growth rate when *Nitzschia closterium* f. *minutissima* was grown in high salinity (70) was decreased by 59.2% compared with the normal seawater, but it can maintain the growth to a certain degree in salinity up to 60–70, which suggested that *Nitzschia closterium* f. *minutissima* had a stronger tolerance to high salinity. The extracellular carbonic anhydrase activity which was measured by an electrometric method was reduced by 66.3%, and *Chl. a* and *Chl. c* contents which was determined spectrophotometrically were also decreased by 50.0% and 45.7% in high salinity (70). The extracellular CA activity was inhibited in high salinity environment which showed that capacity of  $\text{HCO}_3^-$  catalyzed by extracellular CA into  $\text{CO}_2$  declined, and high salinity stress can damage the *Chl. a/b* light harvesting complex (LHCII) and reaction-center complex and affect pigment synthesis. The chlorophyll a fluorescence parameters were measured by saturation pulse, and the maximal efficiency of PS II photochemistry ( $F_v/F_m$ ), actual photochemical efficiency of PS II (*Yield*), photochemical quenching co-efficient (*qP*) decreased, whereas non-photochemical quenching co-efficient (*qN*) increased when the algae were grown in high salinity. These results showed that the high salinity stress would damage the PS II reaction center, inhibit primary reaction of photosynthesis as well as the process of photosynthetic electron transport. The photosynthetic rate in the varied light intensity and inorganic carbon concentration was determined with a Clark-type oxygen electrode, and maximal photosynthetic rate ( $P_{\max}$ ), photosynthetic efficiency ( $\alpha$ ) and the affinity for inorganic carbon ( $K_{0.5}$ ) obtained by non-linear fitting from *P-I* and *P-C* curves also declined in high salinity. All the above results suggested that the growth and photosynthesis in *Nitzschia closterium* f. *minutissima* could be partially inhibited by higher salinity, but it also could adapt to high salinity stress through adjusting the activity of extracellular carbonic anhydrase, the affinity for inorganic carbon and photosystem II energy flow and energy utilization efficiency.

**Key words:** *Nitzschia closterium* f. *minutissima*; salinity; carbonic anhydrase activity; *Chl. a* fluorescence parameters

**Corresponding author:** XIA Jian-rong. E-mail: jrxia@gzhu.edu.cn