

# 一株产碳酸酐酶附生菌对铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 生长的影响\*

邓洁<sup>1</sup>, 李建宏<sup>1\*\*</sup>, 管章玲<sup>1</sup>, 胡碧洋<sup>1</sup>, 赵蕾<sup>1</sup>, 李朋富<sup>2</sup>

(1: 南京师范大学生命科学学院, 南京 210046)

(2: 南京大学生命科学学院, 南京 210093)

**摘要:** 为研究生长环境中微生物对铜绿微囊藻碳代谢的影响, 本文分析太湖典型微囊藻水华样品附生菌中产碳酸酐酶 (CA) 细菌的比例, 结果显示 CA 菌占 11.6%; 从微囊藻群体中分离获得了一株高胞外 CA 附生菌 P201, 通过 ITS 基因鉴定, 该菌为一株荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescense*). 并研究了该菌在不同浓度  $\text{HCO}_3^-$  条件下对铜绿微囊藻生长的影响, 结果表明无论是高  $\text{HCO}_3^-$  浓度还是低  $\text{HCO}_3^-$  浓度环境中, 加入该菌对铜绿微囊藻的生长均有促进作用, 说明产 CA 酶附生菌对铜绿微囊藻的生长有一定的促进作用.

**关键词:** 铜绿微囊藻; 荧光假单胞菌; 附生菌; 碳酸酐酶

## Effect of attached bacteria of carbonic anhydrase on the growth of *Microcystis aeruginosa*

DENG Jie<sup>1</sup>, LI Jianhong<sup>1</sup>, GUAN Zhangling<sup>1</sup>, HU Biyang<sup>1</sup>, ZHAO Lei<sup>1</sup> & LI Pengfu<sup>2</sup>

(1: Life Sciences College of Nanjing Normal University, Nanjing 210046, P. R. China)

(2: School of Life Science, Nanjing University, Nanjing 210093, P. R. China)

**Abstract:** To study the effect of attached bacteria on the carbon metabolism of *M. aeruginosa*, the percentage of carbonic anhydrase (CA) produced bacteria in total attached bacteria was analyzed. The result showed that the ratio of CA produced bacteria is 11.6% in a typical cyanobacterial bloom from Lake Taihu. An attached bacterium strain P201, which produced large amount of extracellular carbonic anhydrase, was isolated from *M. aeruginosa* assemblage. It was identified as a strain of *Pseudomonas fluorescense* by its ITS molecular characteristic. Effects of P201 on the growth of *M. aeruginosa* in different  $\text{HCO}_3^-$  concentrations were investigated. The results showed that no matter in the higher or the lower  $\text{HCO}_3^-$  culture medium, P201 could promote the growth of *M. aeruginosa*, which suggested that CA produced attached bacteria could enhance the growth of *M. aeruginosa* by regulating the ambient carbon environment.

**Keywords:** *Microcystis aeruginosa*; *Pseudomonas fluorescense*; attached bacteria; carbonic anhydrase

天然水体中, 藻类光合作用的碳源主要来自空气中的  $\text{CO}_2$ . 藻类暴发形成水华时, 会大量消耗水中的无机碳, 使外源溶解无机碳 (DIC) 浓度降低, 同时导致 pH 值升高<sup>[1]</sup>. 由于  $\text{CO}_2$  在水体中的扩散速率很低, 导致水体中  $\text{CO}_2$  供应量很少<sup>[2]</sup>. DIC 的供应量与水华的发生有着密切关系<sup>[3]</sup>, 低 DIC、高 pH 值的环境不利于藻类生长. 为适应低 DIC 供应的环境, 蓝藻在长期的进化中形成了有效的  $\text{CO}_2$  浓缩机制 (CCM) 以维持碳供给<sup>[4,5]</sup>. 通过这一机制, 蓝藻把胞外低浓度的 DIC 转运到胞内以高浓度  $\text{HCO}_3^-$  的形式富集, 再由羧体中的碳酸酐酶 (Carbonic Anhydrase, CA) 催化脱水形成  $\text{CO}_2$ , 使 Rubisco 周围  $\text{CO}_2$  浓度升高到满足其完成卡尔文循环的浓度, 维持光合作用过程. 很显然胞外 DIC 的浓度对这一过程有着重要的影响.

\* 国家重点基础研究发展计划项目 (2008CB418004)、国家基础科学人才培养基金项目 (J1103507) 和江苏高校优势学科建设工程项目联合资助. 2011-07-15 收稿; 2011-12-02 收修改稿. 邓洁, 女, 1988 年生, 硕士研究生; E-mail: dengjie0324@163.com.

\*\* 通信作者; E-mail: lijianhong@nju.edu.cn.

空气中  $\text{CO}_2$  通过扩散进入水体后主要转化成  $\text{HCO}_3^-$ , 水体中的 CA 可以催化  $\text{CO}_2$  快速形成  $\text{HCO}_3^-$  达到平衡<sup>[6]</sup>. 在天然水体中, 微囊藻的群体外裹着胶被, 胶被上附着着多种细菌, 形成菌-藻密切相关的微环境<sup>[7-8]</sup>. 细菌和微囊藻在生长过程中均会向外释放一些酶类<sup>[9-10]</sup>, 从而影响彼此的生活环境. 微囊藻细胞周围的产 CA 菌有可能对其周围的碳环境也产生一定的影响从而影响其生长. 迄今为止, 关于微囊藻附生菌对其碳代谢的影响尚未见详细研究. 本文分析了天然微囊藻水华中产 CA 附生菌的比例, 同时从微囊藻水华群体中筛选出一株高 CA 产生菌, 研究该菌在不同  $\text{HCO}_3^-$  浓度条件下对铜绿微囊藻生长的影响, 以期对附生菌与铜绿微囊藻碳代谢之间相互关系的研究奠定基础.

## 1 材料与方法

### 1.1 藻种与培养

铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) XW01 (以下简称 XW01) 由本实验室分离保存. 采用 BG-11 培养基<sup>[11]</sup> 28℃、24 h 连续光照培养, 光照强度为  $60 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ , 培养期间间隙震荡.

### 1.2 产碳酸酐酶附生菌的分离与培养

2009 年 9 月 在无锡采集太湖水华水样, 用 200 目筛绢过滤收集藻体, 用无菌的 BG-11 培养基过滤洗涤 3 次. 将收集的藻体悬浮在无菌 BG-11 培养基中. 用无菌的石英砂将微囊藻用涡旋振荡器振荡破碎, 静置 15 min, 上层清液中分离附生菌<sup>[12]</sup>. 200  $\mu\text{l}$  含菌上清液涂布于固体 LB 培养基上, 待平板上长出菌落后, 随机从中挑出 500 个菌落, 测定其 CA 酶活. CA 活性测定用 96 孔板显色进行筛选. 在每个孔中, 加入 100  $\mu\text{l}$  pH 8.2 的巴比妥缓冲液和 1% 溴麝香草酚蓝试剂的混合液, 50  $\mu\text{l}$  菌液、150  $\mu\text{l}$  冰冷的  $\text{CO}_2$  饱和水, 记录每个菌落加入  $\text{CO}_2$  饱和水后从蓝色变成黄色的时间. 变色时间越短, 则 CA 活性越强. 从中筛选出一株 CA 酶活性高的菌株.

### 1.3 菌种的分子鉴定

提取菌株基因组 DNA, 通过 PCR 扩增 16S rRNA ~ 23S rRNA ITS 序列<sup>[13]</sup>, 所用引物序列为: 上游引物 5'-AACTGAAGAGTTTGATCCTGGCTC-3'; 下游引物 5'-TACGTTACCTTGTACGACTT-3' (上海生工生物工程有限公司). PCR 产物经过测序 (上海生工生物工程有限公司), 获得的序列进行 BLAST 比对 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), 运用 Clustal X (Version 1.83) 进行比对分析, MEGA5.0 中 N-J 法进行系统树的构建, 1000 次随机取样, 计算 bootstrap 值以评估系统发生树的置信度.

### 1.4 不同 $\text{HCO}_3^-$ 浓度下产 CA 菌对铜绿微囊藻生长的影响

根据太湖溶解性无机碳浓度年变化<sup>[14]</sup>, 设定了两个不同的  $\text{HCO}_3^-$  浓度 (高  $\text{HCO}_3^-$  浓度, 设定为 35 mg/L; 低  $\text{HCO}_3^-$  浓度, 设定为 10 mg/L), 比较不同  $\text{HCO}_3^-$  浓度下产 CA 菌对微囊藻生长的影响. 对照组用正常的 BG-11 培养基<sup>[11]</sup>, 实验组用改良的 BG-11 培养基, 即用  $\text{NaHCO}_3$  代替  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . 把正常生长的培养至对数期的藻用 BG-11 培养基离心洗涤, 分别接种于 100 ml 的三角瓶中, 每瓶 60 ml.

菌藻共培养时, 接种 0.4 ml 用改良的  $\text{M}_0$  液体培养基 (葡萄糖浓度 1 g/ml) 培养的处于对数生长期的菌液, 菌液的浓度为  $1.25 \times 10^6$  cells/ml. 每个浓度 3 个重复. 定时取样, 藻浓度用分光光度计测定  $\text{OD}_{750}$ .

### 1.5 各生理指标的测定

叶绿素 a (Chl. a) 采用 DMF 法测定<sup>[15]</sup>; 蛋白含量采用考马斯亮蓝法测定<sup>[16]</sup>.

藻 CA 酶活性采用 pH 电极法测定<sup>[17]</sup>. 离心收集藻细胞, 用 pH 8.2 的巴比妥缓冲液反复离心洗涤 3 次, 去除胞外的成分, 测定藻细胞 CA 活性. 1 ml 藻悬浮液加入 2 ml pH 8.2 巴比妥缓冲液, 加入 2 ml 冷的  $\text{CO}_2$  饱和水 (向去离子水中充入饱和  $\text{CO}_2$  半小时所得), 立刻用 pH 计测量 pH 下降一个单位的时间. 对照则加入 3 ml 的巴比妥缓冲液、2 ml  $\text{CO}_2$  饱和水. 整个实验在低温 (冰浴) 下进行. CA 活性以单位蛋白酶单位 (E. U) 计算:

$$E. U = 10 \left( \frac{T_0}{T} - 1 \right)$$

式中,  $T$  和  $T_0$  分别代表含有和不含 CA 时溶液 pH 值下降的时间.

细菌胞外 CA 酶活性测定:细菌培养液 7000 r/min 离心去除细胞,用 pH 电极法测上清液的酶活.

菌藻共培养物中胞外 CA 活性测定:培养 2 d 的藻液 7000 r/min 离心去除细胞,用 pH 电极法测上清液的酶活.

## 1.6 数据统计分析

数据采用 Excel 分析,差异显著性检验采用 SPSS 软件, $P < 0.05$  表示有显著差异.

## 2 结果

### 2.1 附生菌中产 CA 菌的数量比例

从太湖微囊藻样品中分离出大量的附生菌,从附生菌平板上随机挑取 500 个菌落进行 CA 活性测定,结果表明有 58 株菌具有 CA 活性,占附生菌总数的 11.6%. 由此可见,微囊藻水华附生菌中,有相当数量的 CA 产生菌,它们的代谢活动会对藻细胞的 DIC 环境产生直接的影响.

### 2.2 产酶菌株的鉴定

从微囊藻附生的产 CA 菌中筛选出一株 CA 活性较强的菌株(P201). 形态学观察菌落呈白色,粘稠状表面,镜检观察此菌细胞呈杆状. 对 PCR 获得的 ITS 基因进行序列测定(序列提交 GenBank, 登录号 JN228208). 通过 Blast 比对([www.ncbi.nlm.gov](http://www.ncbi.nlm.gov))分析,P201 属于假单胞菌属(*Pseudomonas*),与荧光假单胞菌 GU475123 遗传距离最近(图 1),故初步鉴定 P201 为一株荧光假单胞菌(*P. fluorescence*).

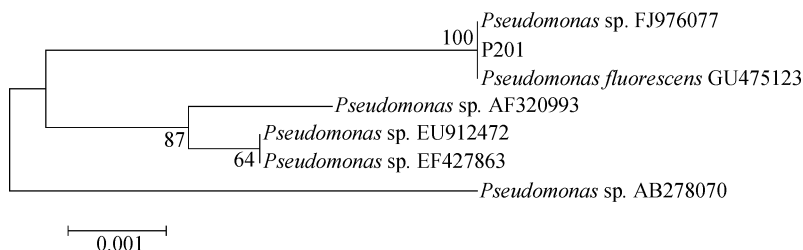


图 1 基于 16S rRNA ~ 23S rRNA ITS 的 P201 菌系统发生树图

Fig. 1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA - 23S rRNA ITS

### 2.3 附生菌 P201 的产酶特性

对 P201 菌进行液体培养,培养液中胞外 CA 活性随着菌浓度增长同步增加(图 2). 菌浓度的增加基本没有延缓期,这和已报道的关于微囊藻附生假单胞菌的生长曲线基本一致<sup>[18]</sup>. 培养液的 CA 活性则是先缓慢增长,在 8 h 之后快速增长,说明处于对数生长期的菌产 CA 能力最强.

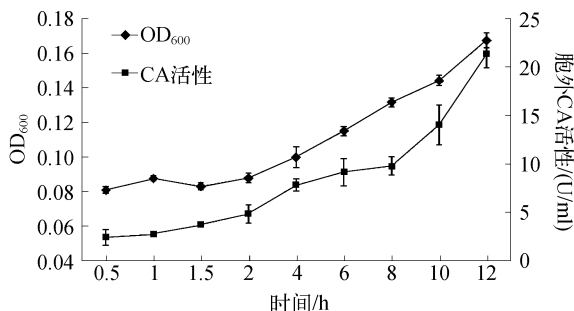


图 2 不同培养时间下附生菌浓度和胞外 CA 活性变化

Fig. 2 P201 concentrations and extracellular CA activities of culture medium at different culture times

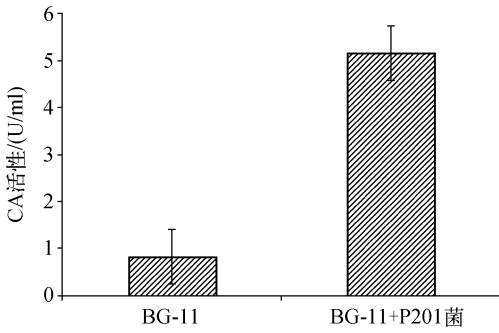


图3 加入 P201 对铜绿微囊藻培养液中胞外 CA 的影响

Fig. 3 Effect of adding P201 on the extracellular CA activities in the *Microcystis aeruginosa* culture medium

说明 P201 菌对铜绿微囊藻的生长有促进作用. 培养液中叶绿素浓度的变化与铜绿微囊藻的生长曲线一致(图4), 培养 5 d 后, 无论是高  $\text{HCO}_3^-$  浓度条件还是低  $\text{HCO}_3^-$  浓度条件下, 加入 P201 菌的铜绿微囊藻培养液中叶绿素含量均显著高于对照.

选取培养 6 d 的铜绿微囊藻的叶绿素含量进行比较, 在高  $\text{HCO}_3^-$  浓度和低  $\text{HCO}_3^-$  浓度条件下, 加入 P201 菌的藻比没有加入 P201 菌的藻叶绿素 a 含量分别提高 12.6% 和 49.0% (图4), 两种条件下 P201 菌对叶绿素 a 含量的增加效果显著 ( $P < 0.05$ ), 在低  $\text{HCO}_3^-$  浓度条件下作用效果更明显.

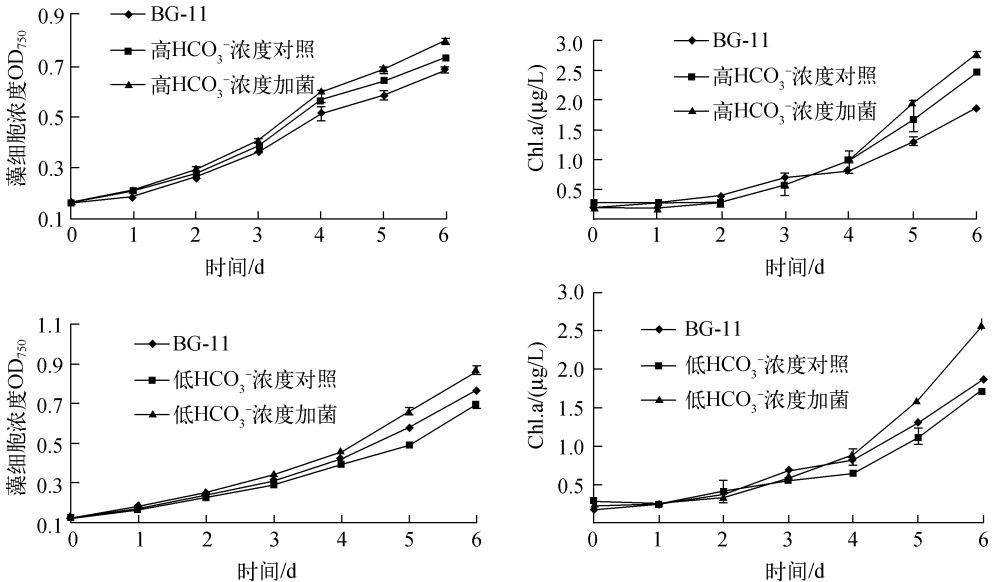


图4 不同  $\text{HCO}_3^-$  浓度条件下 P201 菌对铜绿微囊藻生长的影响

Fig. 4 Effect of P201 on the growth of *M. aeruginosa* under different  $\text{HCO}_3^-$  culture conditions

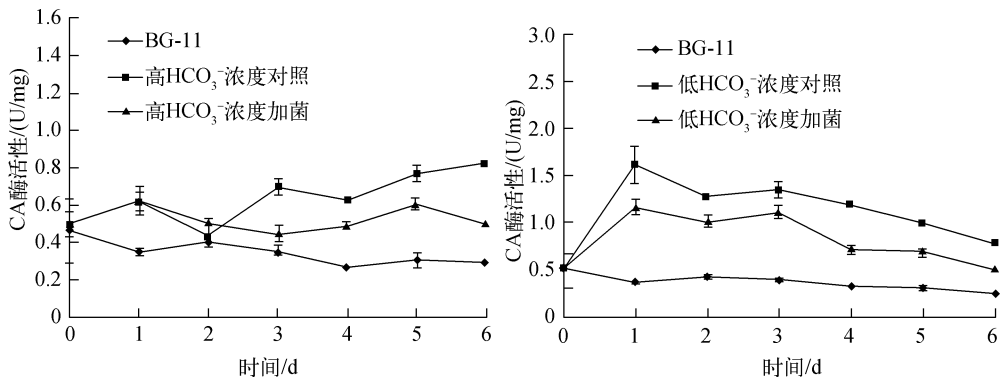
## 2.5 不同 $\text{HCO}_3^-$ 浓度下 P201 菌对铜绿微囊藻 CA 活性的影响

P201 的加入会影响铜绿微囊藻整体藻细胞的 CA 活性. 在 BG-11 培养基中, 铜绿微囊藻细胞的 CA 酶活性比较低(图5). 在低  $\text{HCO}_3^-$  环境下铜绿微囊藻 CA 的活性有一定程度的升高(图5), 这可能是因为  $\text{HCO}_3^-$  浓度低, 导致碳营养的供给不足, 诱导了铜绿微囊藻 CA 的表达. 加入附生菌后铜绿微囊藻的 CA 活性显著

## 2.4 不同 $\text{HCO}_3^-$ 浓度下产 CA 附生菌对铜绿微囊藻生长的影响

为了确定 P201 加入藻培养液中是否还具有活性, 测定藻培养液中胞外 CA 的活性. 由于铜绿微囊藻不产生胞外 CA<sup>[19-21]</sup>, 因此培养液中 CA 活性应该主要由 P201 产生. 实验结果(图3)表明, 除去细胞后的培养液中 CA 活性显著提高. 胞外 CA 活性的显著增加, 理论上会对铜绿微囊藻的生长产生影响.

在不同的碳供给条件下铜绿微囊藻的生长速度不同, 与 BG-11 培养基相比, 在高  $\text{HCO}_3^-$  条件下铜绿微囊藻的生长速度更快(图4), 而在低  $\text{HCO}_3^-$  浓度条件下铜绿微囊藻生长则受一定的抑制(图4). 加入 P201 菌后, 铜绿微囊藻的生长速度在两种  $\text{HCO}_3^-$  浓度下都呈现上升的趋势, 第 6 d 时高  $\text{HCO}_3^-$  浓度和低  $\text{HCO}_3^-$  浓度条件下藻细胞浓度分别增加了 8.52% 和 27.60%, 说

图5 不同 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 条件下 P201 菌对铜绿微囊藻 CA 活性的影响Fig. 5 Effects of P201 on the CA activities of *M. aeruginosa* XW01 cultured under different HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> culture conditions

降低,第6 d 铜绿微囊藻的 CA 活性与没有加入附生菌相比降低了 31.7%。

高 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 浓度条件同样也诱导了铜绿微囊藻产生较高的 CA (图 5),酶活性随着时间的延长而增长,在第 6 d 时比 BG-11 培养基中的 CA 活性提高了 1.8 倍.高 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 导致铜绿微囊藻 CA 升高的原因可能是培养基中较高含量的 NaHCO<sub>3</sub> 引起 pH 升高导致<sup>[3]</sup>.加入附生菌后,第 6 d 铜绿微囊藻的 CA 活性与没有加入附生菌相比降低了 39%。

因此无论是在低 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 还是高 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 浓度下,附生菌 P201 的存在都使铜绿微囊藻细胞的整体 CA 活性水平降低.这种 CA 活性的相对下降,可能反映了藻细胞获得较好的 CO<sub>2</sub> 供给.同时,从藻细胞代谢能量消耗的角度,这也可使铜绿微囊藻减少为适应环境改变而导致的新蛋白合成,有益于减少细胞额外的消耗,有利于生长。

### 3 讨论

#### 3.1 关于低碳环境下 P201 菌作用机理的讨论

对于蓝藻水华暴发原因的研究目前多集中于氮、磷营养方面,相对而言关于碳限制供给对于水华暴发的影响的研究较少.在低 CO<sub>2</sub> 浓度或高 pH 的水体中,蓝藻往往成为优势种<sup>[22]</sup>,这与蓝藻高效的 CCM 浓缩机制有关.蓝藻独特的 CCM 浓缩机制使藻类在低 DIC 环境下也能维持高效的光合效率<sup>[23]</sup>.蓝藻水华的暴发会使湖水中碳限制加剧,碳限制条件会诱导蓝藻产生更多的胞内 CA 来获得无机碳,以保证水中的蓝藻进一步繁殖<sup>[3]</sup>.在低 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 浓度条件下微囊藻细胞的 CA 活性升高是对低碳环境的响应.除了蓝藻本身的 CCM 浓缩机制,生活在藻细胞微环境内的细菌也可以减轻蓝藻的 CO<sub>2</sub> 限制作用<sup>[10]</sup>.有研究表明假单胞菌与藻共同培养可以促进栅藻和小球藻的生长<sup>[9]</sup>.在一定 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 浓度范围中,无机碳 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 浓度与细菌胞外 CA 活性成正比<sup>[24]</sup>.从本实验的结果来看,藻附生菌 P201 可能通过胞外 CA 的作用,促进环境中 CO<sub>2</sub> 向水体中溶解,提供较多的碳供给,从而促进铜绿微囊藻在低 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 浓度环境下生长。

#### 3.2 关于高碳环境下 P201 菌作用机理的讨论

本文选用的高 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 浓度为 0.417 mmol/L,高于 Rubisco 的 *K<sub>m</sub>* 值<sup>[25]</sup>,藻细胞在充足 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 的环境条件下,较容易获得足够的碳供给,胞外 CA 理应对碳的供应没有显著的影响.但本研究多次重复实验的结果却表明 P201 菌对微囊藻的生长有一定的促进作用,原因可能是胞外 CA 加速了碱性环境条件(光合作用所导致)下空气中 CO<sub>2</sub> 的溶入,从而一定程度上减缓了细胞环境的 pH 上升。

由于本研究要考察胞外附生菌对铜绿微囊藻的作用,所以培养物中无法加入有机缓冲物维持 pH 的恒定.因此,培养系统中 pH 值的变化受到培养基组成和藻生长两方面的影响.对高 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 培养藻的 pH 测定显示:培养到第 4 d 时,pH 从 7.91 上升到 11.74,而加入 P201 菌的培养物 pH 为 11.60,这一降低可能是胞外

CA 催化空气中  $\text{CO}_2$  溶入的结果. 从另一方面来看, 已有研究表明, 高 pH 可提高微囊藻 CA 的活性<sup>[3]</sup>, P201 菌使高  $\text{HCO}_3^-$  浓度下培养液中铜绿微囊藻 CA 活性下降的结果也与 pH 的降低相一致.

胞外 CA 的另一作用可能与蓝藻细胞的 CCM 机制有关. 在高  $\text{HCO}_3^-$  条件下, 藻细胞较易获得高浓度的胞内  $\text{HCO}_3^-$ , 它们在胞内 CA 的作用下产生高浓度的  $\text{CO}_2$ , 能否有效地克服胞内  $\text{CO}_2$  逃逸可能是 CCM 机制的关键之一<sup>[26]</sup>. P201 菌提供的胞外 CA 有可能在藻细胞周围更有效地使溢出细胞的  $\text{CO}_2$  迅速转化成  $\text{HCO}_3^-$ , 从而阻止  $\text{CO}_2$  逃逸. 但对于这一过程的详细机制目前尚不明了.

### 3.3 关于 CCM 和 CA 的讨论

关于蓝藻的 CCM 机制已有很多研究报道. 微囊藻不产生胞外的 CA, 其细胞膜内侧、羧体以及细胞膜上的  $\text{HCO}_3^-$  运输载体都具有 CA 活性<sup>[4,5,27]</sup>. 在一定条件下测得的细胞 CA 活性实际上是整个细胞的表现活性, 这一活性可能受到外界环境和细胞生理状态的共同影响. 因此, 本研究中测得的细胞 CA 活性变化趋势与生长之间并未显示出相关性.

水体中的藻细胞无法直接暴露于足够高浓度的  $\text{CO}_2$  中, 因此即使环境中存在高  $\text{HCO}_3^-$  浓度, 无机碳也必须通过复杂的碳运输机制进入细胞, 满足 Rubisco 固定  $\text{CO}_2$  的需求. 研究已表明<sup>[4]</sup>, 蓝藻细胞膜上存在  $\text{CO}_2$  和  $\text{HCO}_3^-$  的运输载体, 为保证细胞的碳供给, 在不同的环境条件下, 各种运输机制可协调作用, 相互补充. 同时, 在不同的 pH 条件下,  $\text{CO}_2$  溶入水中又存在着溶解与解离平衡, 这就使得藻细胞在生长过程中始终处于一种碳供给的动态平衡状态, 包括供给量和供给形态两方面. 因此, 胞外 CA 对藻细胞碳代谢的调节过程, 可能也存在较为复杂的机制. 从本文的研究结果来看, 通过多次实验验证, 无论是高  $\text{HCO}_3^-$  浓度, 还是低  $\text{HCO}_3^-$  浓度下, 胞外 CA 产生菌都表现出有利于藻生长的作用, 除了上文所讨论到的维持 pH 和可能阻止  $\text{CO}_2$  逃逸外, 是否还有其他的作用机制有待进一步深入研究.

## 4 参考文献

- [1] Berman-Frank I, Kaplan A. Carbonic anhydrase activity in the bloom-forming dinoflagellate *Peridinium gatunense*. *Journal of Phycology*, 1995, **31**: 906-913.
- [2] Smith KS, Ferry JG. Prokaryotic carbonic anhydrases. *FEMS Microbiology Reviews*, 2000, **24**(4): 335-366.
- [3] 王山杉, 刘永定, 邹永东等. 微囊藻碳酸酐酶活性在不同环境因素下的调节与适应. *生态学报*, 2006, **26**(8): 2443-2448.
- [4] 邱保胜, 高坤山. 蓝藻浓缩二氧化碳的机制. *植物生理学通讯*, 2001, **37**(5): 385-392.
- [5] 黄瑾, 夏建荣, 邹定辉. 微囊藻碳酸酐酶的特性及其环境调控. *植物生理学通讯*, 2010, **46**(7): 631-636.
- [6] Tripp BC, Smith K, Ferry JG. Carbonic anhydrase: new insights for an ancient enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, **276**: 48615-48618.
- [7] 王霞, 吕宪国, 张学林等. 松花湖铜绿微囊藻无菌株和单藻株生长因素的研究. *生态学杂志*, 2005, **24**(5): 518-522.
- [8] 朱丽萍, 高光, 汤祥明等. 微囊藻水华期间水体及藻体上细菌的动态. *湖泊科学*, 2009, **21**(3): 395-400.
- [9] 王少沛, 曹煜成, 李卓佳等. 水生环境中细菌与微藻的相互关系及其实际应用. *南方水产*, 2008, **4**(1): 76-80.
- [10] 李福东, 张诚, 邹景忠. 细菌在浮游植物生长过程中的作用. *海洋科学*, 1996, **6**: 30-33.
- [11] Allen MM. Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. *Journal of Phycology*, 1968, **4**: 1-4.
- [12] 赵婕, 李建宏, 管章玲等. 一株产碱性磷酸酶附生菌对微囊藻生长的影响. *湖泊科学*, 2011, **23**(1): 49-55.
- [13] 张桂山, 贾小明, 马晓航等. 一株多菌灵降解细菌的分离、鉴定及系统发育分析. *微生物学报*, 2004, **44**(4): 417-421.
- [14] 张发兵, 胡维平, 胡雄星等. 太湖湖泊水体碳循环模型研究. *水科学进展*, 2008, **19**(12): 171-178.
- [15] Porra RJ. Chlorophylls and bacteriochlorophylls. *Advances in Photosynthesis and Respiration*, 2006, **25**: 95-107.
- [16] 李娟, 张推庭, 曾伟等. 应用考马斯亮蓝法测定总蛋白含量. *中国生物制品学杂志*, 2000, **13**(2): 118-120.
- [17] 郭敏亮, 高煜珠, 王忠. 用酸度计测定植物碳酸酐酶活性. *植物生理学通讯*, 1988, **6**: 59-61.
- [18] 周子元, 罗屿, 马文涛等. 太湖中 4 种细菌的分离、鉴定及生长曲线的测定. *湖泊科学*, 1998, **10**(4): 60-62.
- [19] Aizawa K, Miyachi S. Carbonic anhydrase and  $\text{CO}_2$  concentrating mechanisms in microalgae and cyanobacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 1986, **39**: 215-233.

- [20] Badger MR, Price GD. The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 1994, **45**: 369-392.
- [21] Tu CK, Apiller M, Winns GC *et al.* Carbonic anhydrase and the uptake of inorganic carbon by *Synechococcus* sp. (UTEX 2380). *Plant Physiology*, 1987, **85**: 72-77.
- [22] Rigobello-Masini M, Aida E, Jorge C. Extra and intracellular activities of carbonic anhydrase of the marine microalga *Tetraselmis gracilis* (Chlorophyta). *Brazilian Journal of Microbiology*, 2003, **34**: 267-272.
- [23] Shapiro J. Current beliefs regarding dominance by blue-greens: The case for the importance of CO<sub>2</sub> and pH. *International Vereinigung fuer Theoretische und Angewandte Limnologie*, 1990, **24**(1): 38-54.
- [24] 支彦丽, 储昭升, 钟 远等. 铜绿微囊藻和四尾栅藻光合利用碳酸氢盐探讨. *湖泊科学*, 2008, **20**(4): 443-449.
- [25] Badger MR. Kinetic properties of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from *Anabaena variabilis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1980, **201**(1): 233-242.
- [26] Miller AG, Espie GS, Canvin DT. Physiological aspects of CO<sub>2</sub> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport by cyanobacteria: a review. *Canadian Journal of Botany*, 1990, **68**(6): 1291-1302.
- [27] 付 翔, 韩博平, 林秋奇. 蓝细菌 CO<sub>2</sub>浓缩机制的研究概况. *海洋科学*, 2003, **27**(4):13-17.