第 14 卷 第 4 期
2002 年 12 月

湖 泊 科 学
JOURNAL OF LAKE SCIENCES

Vol.14,No.4
Dec.,2002

Zn^{2+} 浓度对固氮鱼腥藻(*Anabaena azotica* Ley)光能转化特性的影响*

王山杉　　刘永定**　　金传荫　　李敦海

(中国科学院水生生物研究所,武汉 430072)

提　要　本实验对在不同 Zn^{2+} 浓度条件下培养的固氮鱼腥藻(*Anabaena azotica* Ley)的生长、光合放氧速率和叶绿素荧光参数 Fv/Fm 进行了测定.结果表明,当 Zn^{2+} 浓度为 1.0μmol/L 时,其比生长速率(Specific growth rate)最大,光合放氧速率和 Fv/Fm 值最高.当 Zn^{2+} 浓度大于等于 5.0μmol/L 时会抑制 *A. azotica* Ley 的生长和光合作用.对在 0μmol/L 和 5.0μmol/L Zn^{2+} 浓度下生长的藻细胞藻胆体-类囊体膜复合物吸收光谱的比较和对与 5.0μmol/L Zn^{2+} 发生反应的藻蓝蛋白溶液的可见光吸收光谱的分析,发现前者 624nm 处藻胆体的吸收峰和后者 620nm 处藻蓝蛋白的吸收峰都因 Zn^{2+} 的作用而下降,推测藻蓝蛋白为 Zn^{2+} 影响光合作用的位点之一.碳酸酐酶活性的测定表明 Zn^{2+} 的浓度水平会影响其活性大小,推测是 Zn^{2+} 影响光合作用的另一途径.

关键词　固氮鱼腥藻　锌离子　光合作用　藻蓝蛋白　碳酸酐酶

分类号　Q949.22　X52

近一个世纪以来,人口激增和工业发展使排放的放弃物对生态环境的污染愈来愈严重.工业废水、污泥、垃圾或大气中存在的重金属元素如 Zn,Cd,Ni,Cu,Hg 等都会对生态系统造成危害,迄今已有许多关于重金属离子对植物生长造成抑制甚至死亡的报道.Zn 也是造成水污染的重金属元素之一,它对植物的危害主要是源于对光合系统的损伤[1].目前已经有一些关于 Zn 对高等植物及真核藻类光合系统影响的报道[1~4],但是对作为水生态系统中初级生产者的原始蓝藻,其光合系统怎样受环境中 Zn 浓度影响还知之甚少.固氮鱼腥藻(*Anabaena azotica* Ley)是淡水环境中一种常见的原核蓝藻,其生长繁殖快,可作为很好的稻田绿肥和家畜饲料,有一定的经济价值.对其生理生态学进行研究对农业生产会具有一定意义.本文选取固氮鱼腥藻为材料,依次从其生长及叶绿素合成,作为 PSⅡ活性指标的光合放氧速率及叶绿素荧光水平、捕光色素藻蓝蛋白和别藻蓝蛋白以及参与无机碳吸收利用的酶—碳酸酐酶等几个方面,研究 Zn^{2+} 在不同浓度下如何对蓝藻的光合系统发生影响.

藻胆体是原核蓝藻和真核红藻中特有的超分子捕光色素蛋白复合体,有序分布在类囊体膜的外表面,专门捕获光合作用吸收光谱中较弱的一部分,将其高效地传给 PSⅡ,在光合作用中具有重要的功能和地位.本实验通过测定不同 Zn^{2+} 浓度培养条件下生长的藻细胞和与不同浓度 Zn^{2+} 反应的藻细胞的吸收光谱,研究 Zn^{2+} 对固氮鱼腥藻的藻胆体和藻蓝蛋白、别藻蓝蛋

* 国家湖泊重点研究课题(K99-05-35-01)资助;中国科学院水生生物研究所创新领域前沿项目(220316)资助.
收稿日期:2002-03-18;收到修改稿日期:2002-06-03.王山杉,女,1976 年生,硕士.
** 通讯联系人

白的作用. Murthy 等[5]和李建宏等[6]曾分别就 Hg^{2+} 和 Cu^{2+} 对藻胆蛋白的作用作过报道，本文证明 Zn^{2+} 也会对藻胆蛋白产生类似的作用.

在蓝藻的光合作用中，碳酸酐酶（Carbonic Anhydrase，CA，EC4.2.1.1）参与 CO_2 浓缩（Carbon Dioxide Concentrating Mechanism，CCM），Zn^{2+} 作为辅酶，通过影响碳酸酐酶的活性而对光合作用产生影响. Randall 和 Bouma 曾经报道 Zn^{2+} 的缺失会抑制菠菜中的 CA 活性[2]，Haroto 等人曾报道，Zn^{2+} 的缺失，引起水稻中 CA 的 mRNA 量下降[3]；Todd 和 Francois 报道，海洋中硅藻的 CA 受低 CO_2 浓度的诱导，诱导水平依赖于 Zn^{2+} 的水平[4]. 关于 Zn^{2+} 对淡水中原核蓝藻碳酸酐酶的影响还未见报道. 本文研究了 Zn^{2+} 对固氮鱼腥藻碳酸酐酶活性的影响.

1 材料与方法

1.1 藻种、培养基与培养

固氮鱼腥藻由中国科学院典型培养物保藏委员会淡水藻种库（FACHB-Collection）提供. 培养采用无氮 BG－11[7]培养基，置 500mL 锥形瓶中连续通气培养，光源为冷白荧光灯，光照强度为 30μmol photons/（m^2·s），温度保持在 28℃±1℃.

1.2 藻细胞生长测定

在培养基中分别加入 0.1、1.0、5.0、10.0、20.0、50.0μmol/L 的 $ZnSO_4$，以不加 Zn^{2+} 为对照，每天测定叶绿素含量. 叶绿素含量的测定采用李敦海[8]描述的方法：以 95% 乙醇提取，置 4℃ 冰箱 24h. 用 752 分光光度计，在 649nm，665nm 波长下测定光吸收值 A_{649} 和 A_{665}，以公式 $C = 13.7 \times A_{665} - 5.76 \times A_{649}$ 计算叶绿素含量，单位为 μg/mL.

1.3 光合放氧的测定

取培养物 2mL，以 Clark 型 DW1（Hansatech，U.K.）氧电极测定放氧速率，光照强度为 250μmol photons/（m^2·s），水浴温度为 25℃. 放氧稳定后记录时间不少于 5min. 测定完毕将反应槽内藻体完全取出，离心去液体，以 95% 乙醇提取叶绿素.

1.4 叶绿素荧光的测定

叶绿素荧光的初始值 F_0、最大值 F_m 和荧光的可变部分 F_v（$F_v = F_m - F_0$）用便携式植物效率分析仪（PEA，Hansatech[9]，U.K.）测定. 测定在室温下进行，暗适应时间不少于 15min，激发光强约为 1500μmol photons/m^2·s）. 所有数据重复次数不少于 3 次，用可变荧光（*Fv*）与最大荧光（*Fm*）之比表示光合效能的大小.

1.5 碳酸酐酶活性的测定

离心收集对数期藻细胞，以 12mmol/L Veronal Buffer（pH 8.30）清洗一次并重新悬浮，采用 Wilbur-Anderson 量电法[9]对碳酸酐酶的活性进行测定. 在细胞匀浆液中注入 2mL 饱和 CO_2 溶液，记录 pH 值从 8.30 下降到 7.30 的时间. 以公式 $U = T_0/T - 1$ 计算碳酸酐酶的活性，其中 T 和 T_0 分别代表含有碳酸酐酶和不含碳酸酐酶时溶液 pH 值下降的时间.

1.6 藻胆体－类囊体膜的制备

按路荣昭等[10]描述的方法制备藻胆体-类囊体膜复合物，并在岛津 UV－1601 紫外，可见光分光光度计上测定其可见光吸收光谱.

1.7 藻蓝蛋白的分离

藻蓝蛋白和别藻蓝蛋白的分离和浓度测定按照 Siegleman 和 Kycia[11]的方法.

1.8 藻蓝蛋白和 Zn^{2+} 的反应

参考李建宏等[6]的方法,在藻蓝蛋白的提取液中加入与藻蓝蛋白的摩尔数之比分别为 1/2、3/4、4/4、5/4、的 $ZnSO_4$ 溶液,45℃保温 25min 后测定吸收光谱.

2 结果与讨论

2.1 Zn^{2+} 对固氮鱼腥藻生长及叶绿素含量的影响

在未加 Zn^{2+} 的培养基中,藻细胞因缺少这种必需的微量元素,生长受到影响,其生长速率低于在 Zn^{2+} 浓度为 0.1μmol/L 到 10.0μmol/L 范围条件下培养的藻.1.0μmol/LZn^{2+} 条件下生长的藻细胞在对数期比生长速率为 0.437,为各种浓度中最高值(从 0μmol/L 到 20.0μmol/L 6 个浓度下的对数期比生长速率分别为 0.096,0.422,0.437,0.374,0.147 和 -0.841),为固氮鱼腥藻生长所需的最适浓度(图 1).以含 20.0μmol/L Zn^{2+} 的培养基培养的藻细胞在培养 2d 后颜色发生了轻微的黄化,其光合作用和其它各种代谢被抑制.在 50.0μmol/L Zn^{2+} 条件下,藻细胞在 1~2d 内完全死亡.曾有文献报道[12],单细胞绿藻栅藻(*Scenedesmus subspicatus*)的 Zn^{2+} 浓度适应范围为 10^{-12}~10^{-6}.这个结论与本文对固氮鱼腥藻的测定结果基本相符 还有报道,在小球藻和裸藻的培养基中加入 Zn^{2+} 会使它们的总叶绿素含量降低[13,14],由本实验可以看出,在 20.0μmol/L 的 Zn^{2+} 作用下,固氮鱼腥藻的叶绿素合成也会逐渐受到影响.

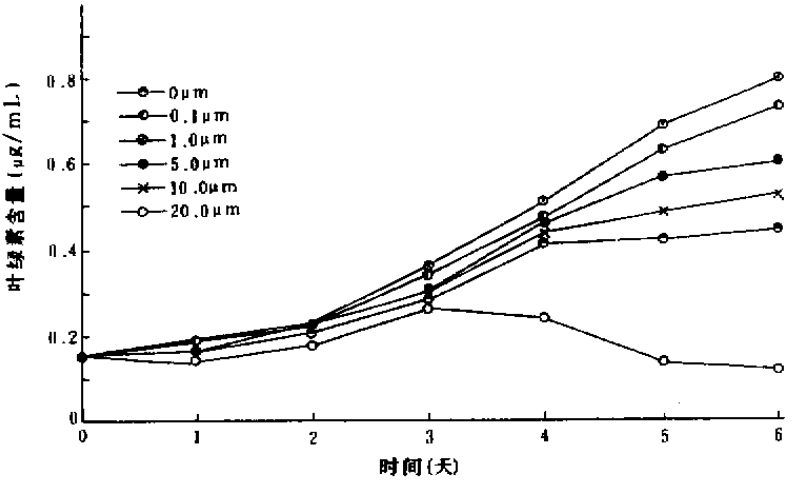

图 1 Zn^{2+} 对固氮鱼腥藻生长的影响

Fig.1 Effect of Zn^{2+} on the growth of *A. azotica* Ley

2.2 Zn^{2+} 对固氮鱼腥藻光合放氧速率的影响

Zn^{2+} 对固氮鱼腥藻的光合放氧速率也有影响.当 Zn^{2+} 为 0.1μmol/L 的低浓度时,Zn^{2+} 对藻细胞的光合放氧起到促进作用,在 1.0μmol/L 时达到最大值,≥5.0μmol/L 时的放氧速率下降(表 1).光合放氧涉及光合电子传递、磷酸化和碳素固定,取决于光合器内同化力的形成以及光合器内外膜的完整.Baker 等人的研究表明,Zn^{2+} 是一种光合电子传递抑制剂[1],推测当 Zn^{2+} 浓度超过 5.0μmol/L 时,可能会强烈地作用于光合电子传递系统中的作用位点,减弱电子传递的流量,从而抑制光合作用,降低放氧速率.

表 1　Zn^{2+} 对活体固氮鱼腥藻细胞光合放氧速率和叶绿素荧光的影响

Tab.1　Effect of Zn^{2+} on the photosynthetic O_2 evolution rate and chlorophyll fluorescence of *A. azotica* in vivo

Zn^{2+} 浓度（μmol/L）	光合放氧速率（μmol/（mg·h））	占最大值的百分含量（%）	*Fv/Fm*	占最大值的百分含量（%）
0	180.08	66.04	0.583 ± 0.007	94.34
0.1	264.35	96.95	0.601 ± 0.013	97.25
1.0	272.68	100.00	0.618 ± 0.007	100.00
5.0	236.89	86.87	0.596 ± 0.010	96.44
10.0	193.62	71.01	0.589 ± 0.027	95.31

2.3 Zn^{2+} 对固氮鱼腥藻叶绿素荧光的影响

叶绿素荧光的可变部分（*Fv*）与最大荧光（*Fm*）的比值 *Fv/Fm* 可以反映藻细胞光系统Ⅱ原初的光化学效率[8]．本实验取在不同浓度 Zn^{2+} 下生长的样品对它们的 *Fv/Fm* 进行比较；Zn^{2+} 对 *Fv/Fm* 值（表 1）．曾有报道[15]，Zn^{2+} 会在 0.4 ~ 1.0mmol/L 的浓度范围内影响菠菜、大麦等高等植物 PSⅡ的活性；在本实验中，5.0μmol/L 的浓度会抑制原核蓝藻固氮鱼腥藻 PSⅡ的最大光能转换效率．

2.4 Zn^{2+} 对固氮鱼腥藻碳酸酐酶活性的影响

碳酸酐酶（Carbonic anhydrase，CA）催化 CO_2 和 HCO_3^- 相互转变的可逆反应（$CO_2 + H_2O \longleftrightarrow HCO_3^- + H^+$）[16]．它是一种含 Zn^{2+} 的金属酶，Zn^{2+} 对于其催化作用具有重要的意义[17]．Guliev 等[18]曾报道，在体外除去 CA 的 Zn^{2+} 会造成 CA 催化活性不可逆的损失．在水化反应中，CO_2 在酶反应活性中心与中介物 Zn – OH 反应；在脱水反应中，HCO_3^- 与 Zn – H_2O 反应[16]．

本实验中，在 1.0μmol/L Zn^{2+} 条件下培养的藻细胞具有最高的 CA 活性．当 Zn^{2+} 浓度升高时，酶蛋白的活性就会因辅酶 Zn^{2+} 的浓度过高而受到抑制，5.0μmol/L，10.0μmol/L 时的活性分别为 1.0μmol/L 时的 96.02% 和 81.92%；无 Zn^{2+} 条件下培养的藻细胞 CA 活性也较低，仅为 1.0μmol/L 时的 76.56%（图 2）．曾有报道[3]，缺少 Zn^{2+} 的水稻叶片（Zn^{2+} 含量为 0.19mg/m^2）的 CA 活性会降低，为 Zn^{2+} 充足叶片（Zn^{2+} 含量为 0.51mg/m^2）CA 活性的 14%，相比之下本实验中的 CA 活性降低并不剧烈．

2.5 Zn^{2+} 对固氮鱼腥藻藻胆体-类囊体膜吸收光谱的影响

在实验中，对固氮鱼腥藻的藻胆体-类囊体膜进行了制备分离，藻胆体 – 类囊体膜的吸收光谱有 5 个峰，分别位于 678，624，490，438 和 418nm（图 3）．678nm 是类囊体叶绿素 a 的吸收峰，624nm 是藻胆体的吸收峰，490nm 是类胡萝卜素的吸收峰．438 和 418nm 是叶绿素 a 蓝区吸收峰．从图 3 可看出该制备物为完整的藻胆体 – 类囊体膜复合物．在含 5.0μmol/L Zn^{2+} 培养基中生长的藻细胞的吸收光谱，624nm 处的吸收峰有一定程度的下降（图 4）；Murthy 等[5]和李建宏[6]曾分别报道，Hg^{2+} 和 Cu^{2+} 处理均影响藻胆蛋白的吸收峰，本文证明 Zn^{2+} 也会对藻胆蛋白产生类似作用，推测藻胆蛋白是对重金属敏感区域，易受到重金属的伤害．藻胆体是否就是 Zn^{2+} 的作用位点，还需要进一步研究．

2.6 Zn^{2+} 与蓝藻蛋白的反应

从藻细胞中提取出具有捕光作用的色素藻蓝蛋白（PC）和别藻蓝蛋白（APC），它们分别在可见光的 620nm 和 650nm 处具有特征吸收峰．在室温下分别以与 PC 亚基的摩尔数之比为 1/

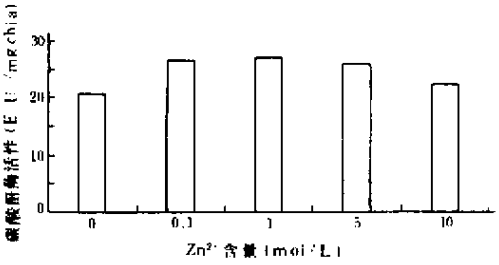

图2 Zn^{2+}对固氮鱼腥藻碳酸酐酶活性的影响

Fig.2 Effects of Zn^{2+} on the CA activity of *A. azotica*

2、3/4、4/4、5/4的量加入Zn^{2+}，并在45℃下保温25min，UV－1601分光光度计测定吸收光谱，可见Zn^{2+}的加入降低了620nm处PC的吸收值，以3/4的量加入的Zn^{2+}比以1/2的量加入的Zn^{2+}更明显地减弱了620nm的吸收值(图5)，随后再增加Zn^{2+}的浓度，620nm处的吸收值不再降低，即以3/4的量加入的Zn^{2+}对藻蓝蛋白的作用已达到最大程度.

同时，Zn^{2+}对别藻蓝蛋白的吸收峰也具有影响.当Zn^{2+}与APC的亚基摩尔数之比达到3/4时，在45℃下保温25min后，对APC在650nm的吸收峰的减弱达到了最大程度(表2).

表2 Zn^{2+}对别藻蓝蛋白吸收光光谱的影响

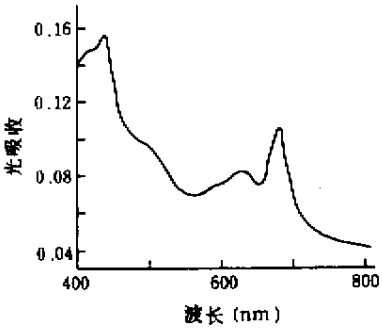

图3 藻胆体－类囊体膜复合物的可见光吸收光谱

Fig.3 The absorption spectrum of phycobilisome-thylakoid membrane

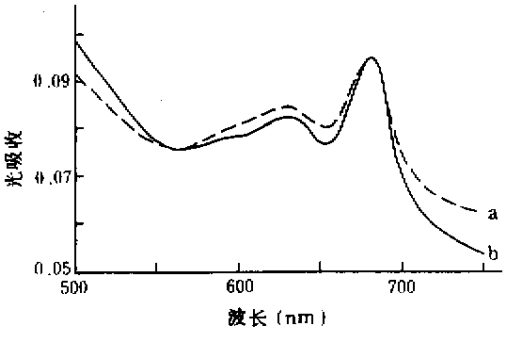

图4 Zn^{2+}对*A. azotica* Ley吸收光谱的影响

a.对照 b.Zn^{2+}含量5.0μmol/L

Fig.4 Effect of Zn^{2+} on the absorption of *A. azotica* Ley

Tab.2 Effects of Zn^{2+} on the absorption spectra of allophycocyanin

样品	$[Zn^{2+}]/[APCs]$	波长(nm)	光吸收
APC	–	650nm	0.200
APC + Zn^{2+}	1/2	650	0.183
APC + Zn^{2+}	3/4	650	0.176
APC + Zn^{2+}	4/4	650	0.177
APC + Zn^{2+}	5/4	650	0.177

由藻蓝蛋白和别藻蓝蛋白的吸收光谱可见，Zn^{2+}对于二者都有影响作用，由于在*A. azotica* Ley中光能的传递途径可能是

类胡萝卜素————

藻蓝蛋白⟶别藻蓝蛋白⟶叶绿素a[19]

因此 Zn^{2+} 有可能是先作用于藻蓝蛋白上，减少了藻蓝蛋白可见光的吸收，使别藻蓝蛋白对光能的吸收和传递也降低，从而降低了光合效率.

在实验中还进行了 PC 和 APC 含量的测定，未发现 PC 与 APC 的含量因 Zn^{2+} 浓度不同而改变(数据未出示).

根据上述实验，可以得到以下结论：

(1) 1.0μmol/L 浓度的 Zn^{2+} 是维持固氮鱼腥藻 *A. azotica* Ley 最适生长和最高光合放氧速率、最高 *Fv/Fm* 所必需的；当 $Zn^{2+} \geqslant 5.0$μmol/L 时就会对其光合作用产生抑制，光合放氧速率和叶绿素荧光 *Fv/Fm* 都有所降低. 培养其中加入 2.0μmol/LZn^{2+} 时藻体很快发生黄化、直至死亡.

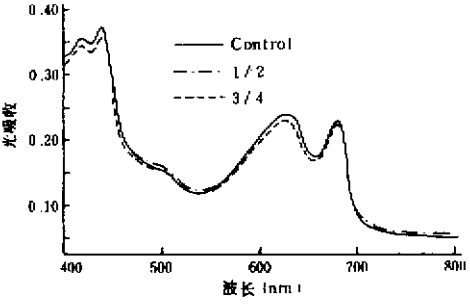

图 5　Zn^{2+} 对藻蓝蛋白吸收峰的影响，图中 1/2 和 3/4 代表 PC 亚基与 Zn^{2+} 的摩尔数之比

Fig.5　Effect of Zn^{2+} on the absorption spectrum of phycocyanin of *A. azotica* Ley, 1/2 and 3/4 represent the ratios of PC subunits and Zn^{2+}

(2) 碳酸酐酶作为转运 CO_2 和在光合作用中为 Rubisco 提供局部高浓度 CO_2 底物所必需的酶，它的活性对于整个光合作用的运作过程都具有影响. 它以 Zn^{2+} 作为辅酶因子，当培养基中不加入 Zn^{2+} 时，碳酸酐酶的活性只有最适 Zn^{2+} 浓度条件下的 76.56%，而当 Zn^{2+} 浓度升高到 5.0μmol/L 后，又会逐渐抑制碳酸酐酶的活性，从而影响蓝藻的光合效率.

(3) 关于重金属对蓝藻光合作用的影响机理和与藻胆体的作用关系，迄今只有关于 Hg^{2+} 和 Cu^{2+} 可影响藻胆体光能传递的报道[5,6]. 在蓝藻的类囊体膜上，藻胆体颗粒位于 PSⅡ外侧，易于受到进入细胞内的重金属离子的作用[6]. 从藻胆体和藻蓝蛋白溶液的吸收光谱推测，Zn^{2+} 可能作用于藻胆体中的藻蓝蛋白，影响光能传递，但影响程度没有 Cu^{2+} 和 Hg^{2+} 剧烈.

参 考 文 献

1　Baker N R, Fernyhough P. Meek I T. Light-dependent inhibition of photosynthetic electron transport by zinc. *Physiol Plant*, 1982, **56**: 217 ~ 222

2　Randall P J, Bouma D. Zinc deficiency, carbonic anhydrase, and photosynthesis in leaves of spinach. *Plant Physiol*, 1973, **52**: 229 ~ 232

3　Sasaki H, Hirose T, Watanabe Y, *et al*. Carbonic anhydrase activity and CO_2-transfer resistance of Zn-Deficient rice leaves. *Plant Physiol*, 1998, **118**: 929 ~ 934

4　Lane T W, Morel F M M. Regulation of carbonic anhydrase expression by zinc, cobalt, and carbon dioxide in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Plant Physiol*, 2000, **123**: 345 ~ 352

5　Murthy S D S, Mohanty P. Mercury induces alteration of energy transfer in phycobilisome by selectively affecting the pigment protein, phycocanin, in the cyanobacterium, *Spirulina platensis*. *Plant Cell Physiol*, 1991, **32**(2): 231

6　李建宏，邰子厚，曾昭琪. Cu^{2+} 对蓝藻 *Spirulina maxima* 光合作用的抑制机理. 植物生理学报，1997，**23**(1): 77 ~ 82

7　Rippka R, Deruelles J, Waterbury J B, *et al*. Genetic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobaceria. *J Gen Mircobiol*, 1979, **111**: 1 ~ 61

8　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

9 Wilbur K M, Anderson N G. Electrometric and colorimetric detemination of carbonic anhydrase. *J Biol Chem*, 1948, **176**:147 ~ 154

10 路荣昭,刘 斌,于延利.多变鱼腥藻(*Anabaena variabilis*)藻胆体 – 类囊体膜光能传递的研究.生物物理学报,1989,**5**:125 ~ 132

11 Siegelman H W, Kycia J H. Alga biliprotein. In: Gantt E ed. Handbook of Phycological Method. Cambridge: Cambridge University Press, 1978:72

12 Knauer K, Behra R, Sigg L. Effects of free Cu^{2+} and Zn^{2+} ions on growth and metal accumulation in fresh water algae. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1997, **16**(2):220 ~ 229

13 De Filippis L F, Pallaghy C K. The effects of sub-lethal concentrations of mercury and znic on *Chlorella*. Ⅱ. Photosynthesis and pigment composition. *Z Pflanzenphysiol*, 1976, **78**:314 ~ 322

14 De. Filippis L F, Pallaghy C K. The effects of zinc, cadmium and mercury on *Euglena*. Growth and pigments. *Pflanzenphysiol* 1981, **101**:37 ~ 47

15 Clijsters H, Van Assche F. Inhibition of photosynthesis by heavy metals. *Photosynthesis Research*, 1985, **7**:31 ~ 40

16 吴天福.蓝藻高 CO_2 需求突变株的筛选及分析.中国科学院博士学位研究生学位论文,1999

17 Silveerman D N. The catalytic mechanism of carbon anhydrase. *Can J Bot*, 1991, **69**:1070 ~ 1078

18 Guliev N M, Briramov S M, Aliev D A. Functional organization of carbon anhydrase in higher plants. *Sov. Physiol*. 1992, **39**:537 ~ 544

19 梅镇安,方昭希,高继亮等.固氮鱼腥藻(*Anabaena azotica* Ley)色素间的能量传递.中国科学(B辑),1986, **4**:369 ~ 378

Effects of Zinc Ion on Photosynthetic System of *Anabaena azotica* Ley

WANG Shanshan LIU Yongding JIN Chuanyin LI Dunhai

(*Institute of Hydrobiology*, *Chinese Academy of Sciences*, *Wuhan* 430072, *P. R. China*)

Abstract

It was found that the concentration of Zn^{2+} at about 1.0μmol/L was essential to keep optimal growth of *Anabaena azotica* Ley and also important to keep a quite high value of photosynthetic oxygen evolution rate, chlorophyll fluorescence (Fv/Fm) level and carbonic anhydrase activity, whereas the relative high concentration of Zn^{2+} ($\geqslant$5.0μm) would inhibit the growth of *A. azotica* Ley, decrease its photosynthetic oxygen evolution rate, chlorophyll fluorescence and CA activity. The study of the absorption spectra of the phycobilisome – thylakoid membrane complex and the extraction of phycocyanin indicate that Zn^{2+} may affect the photosynthesis by its effect on the phycobilisome especially the phycocyanin. Since CA is a Zn^{2+}-containing metalloenzyme and may provide a high concentration of CO_2 to Rubisco in the process of CO_2 fixation, it is suggested that Zn^{2+} may affect the photosynthesis by acting on CA.

Keywords: *Anabaena azotica* Ley; Photosynthesis; Zinc Ion; Phycocyanin; Carbonic Anhydrase