

微囊藻 CO₂-浓缩机制基因型的动态变化及其对 CO₂的竞争效应*

杜雨欣¹, 郑保海¹, 李佳欣¹, 李玉鑫¹, 黄立成², 施军琼¹, 吴忠兴^{1**}

(1: 西南大学三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆市三峡库区植物生态与资源重点实验室, 重庆 400715)

(2: 昆明市滇池高原湖泊研究院, 昆明 650228)

摘要: 由于具有高效的 CO₂-浓缩机制, 蓝藻在低 CO₂ 浓度条件下具有竞争优势。然而, 随着大气中 CO₂ 浓度急剧增加, 蓝藻 CO₂-浓缩机制如何响应的研究较少。因此, 本文以常见水华蓝藻——微囊藻为研究对象, 通过对滇池微囊藻水华动态及不同 CO₂-浓缩机制基因型进行监测, 探讨蓝藻 CO₂-浓缩机制基因的微进化特征及其动态变化。同时, 设置高 (0.08%)、中 (0.04%)、低 (0.02%) CO₂ 浓度 (V/V) 进一步揭示微囊藻不同 CO₂-浓缩机制基因微进化对 CO₂ 的竞争效应。结果表明: 滇池无机碳浓度在 4 个采样点存在空间差异性, 均呈现先降低后升高的趋势, 并以 HCO₃⁻ 为主要无机碳存在形式。调查期间, 东大河、观音山、洛龙河和生态所 4 个采样点的微囊藻均以 *sbtA* 基因型占绝对优势, 相对丰度远高于 *bicA* 基因型。在不同水华时期, *bicA* 基因型和 *sbtA* 基因型呈现相反的变化趋势, 即从水华前期到水华中期, *sbtA* 基因型的相对丰度逐渐升高, 而到水华后期, 出现 *bicA* 基因型增多的现象。室内竞争实验同样表明高浓度 CO₂ 培养环境下, *bicA* 基因型具有明显竞争优势, 随 CO₂ 浓度的降低, 呈现 *bicA* 基因型向 *sbtA* 基因型转变的趋势。这些结果表明水华中期无机碳浓度相对较低, 能适应碳限制环境的 *sbtA* 基因型的微囊藻表现出竞争优势, 而对 CO₂ 浓度变化敏感的 *bicA* 基因型的微囊藻随无机碳浓度的升高逐渐增多; 同时, 在总碱度, pH 和 Chl. *a* 影响下, 微囊藻基因型在滇池不同微囊藻水华期呈现 *bicA* → *sbtA* → *bicA* 转变。这些结果说明微囊藻能通过调节不同 CO₂-浓缩机制基因藻株响应水体无机碳浓度, 保持种群竞争优势, 并维持水华的形成。

关键词: 微囊藻; CO₂-浓缩机制; 微进化; 无机碳; 演替; 滇池

Dynamic changes of genotypes of *Microcystis* CO₂-concentration mechanism and their competitive effects on CO₂ *

Du Yuxin¹, Zheng Baohai¹, Li Jiixin¹, Li Yuxin¹, Huang Licheng², Shi Junqiong¹ & Wu Zhongxing^{1**}

(1: Key Laboratory of Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education, Chongqing Key Laboratory of Plant Ecology and Resources in Three Gorges Reservoir Region, Southwest University, Chongqing 400715, P.R.China)

(2: Kunming Dianchi and Plateau Lakes Institute, Kunming 650228, P.R.China)

Abstract: The highly efficient CO₂ concentration mechanism (CCM) gives cyanobacteria a competitive advantage under low CO₂ conditions. However, with the rapid increase in atmospheric CO₂ concentration, little information has been presented on how the CO₂ concentration mechanism of cyanobacteria responds. Therefore, this study takes a common blooming cyanobacterium, *Microcystis*, to investigate in the present by monitoring the dynamic changes and different CCM genotypes of *Microcystis* in Lake Dianchi. At the same time, the microevolutionary characteristics and dynamic changes of CCM genotypes in *Microcystis* were also discussed. Furthermore, the competing effects of different CCM genotypes in *Microcystis* at high (0.08%), medium (0.04%) and low (0.02%) CO₂ concentrations (V/V) were compared. The results showed that the concentration of inorganic carbon (IC) in Lake Dianchi was spatially variable at four sampling sites, but all sites showed a trend of first decreasing and then increasing IC concentrations, and HCO₃⁻ was the major form of IC. At the four sampling sites of DDH, GYS, LLH and STS, the *sbtA* genotype *Microcystis* was dominant and its relative abundance was much higher than that of the *bicA* genotype *Microcystis*. In different bloom periods,

* 2022-12-12 收稿; 2023-03-02 收修改稿。

国家自然科学基金项目 (41877410, 42177055) 联合资助。

** 通信作者; E-mail: wuzhx@swu.edu.cn。

the *bicA* and *sbtA* genotypes of *Microcystis* showed opposite trends, i.e. the relative abundance of the *sbtA* genotype *Microcystis* gradually increased from early to mid-bloom, while the *bicA* genotype *Microcystis* increased only in late bloom. The competition experiments showed that the *bicA* genotype had an apparent competitive advantage in a high CO₂ environment and showed a trend of transition from the *bicA* genotype to the *sbtA* genotype with decreasing CO₂ concentration. These indicate that the IC concentration was relatively low in the middle of the bloom period, resulting in the *sbtA* genotype showing a competitive advantage in a carbon-limited environment, while the *bicA* genotype, a sensitive type to changing CO₂ concentration, gradually increased with increasing IC concentration. In addition, the genotypes of *Microcystis* showed a *bicA*→*sbtA*→*bicA* transition during different *Microcystis* bloom periods in Lake Dianchi due to the effects of total alkalinity, pH and Chl.*a*. These results suggest that *Microcystis* can maintain its competitive advantage and sustain the bloom by regulating the algal strains with different CCM genotypes in response to the IC concentration in the water.

Keywords: *Microcystis*; CO₂-concentration mechanism; micro-evolution; inorganic carbon; succession; Lake Dianchi

自工业革命开始,化石燃料的使用快速增加,同时伴随着乱砍滥伐、过度开垦等环境问题的发生,使得大气中的 CO₂ 浓度以前所未有的速度持续增加,预计将在 21 世纪末超过 0.08% (V/V)^[1]。CO₂ 作为光合作用的主要原料,在藻类的繁殖和生长中发挥着重要作用^[2]。而大气中 CO₂ 浓度的升高会影响海洋和湖泊等水体表面的 CO₂ 气体交换,使得水体环境发生变化,影响水体中浮游植物细胞的新陈代谢过程,进而对水生生态系统和生物地球化学循环产生深远影响^[3]。因而,关于浮游植物应对大气 CO₂ 浓度升高的生理和生态响应一直是热点问题^[4-6],但是目前的相关研究较多集中于海洋浮游植物,而关于大气 CO₂ 浓度升高对淡水藻类生长的具体作用研究甚少^[7]。

蓝藻作为最古老的原核生物之一,由于世代时间短和高种群密度,所以有充足的时间和能力快速进化以适应外界环境的变化^[8]。面对环境 CO₂ 浓度的变化,蓝藻经过长期进化,形成了一套高效的 CO₂ 浓缩机制 (CO₂-concentrating mechanisms, CCM)。Shapiro^[9] 的研究结果表明与真核藻类相比,水华蓝藻 CCM 更能适应低 CO₂ 和高 pH 值环境,使其容易形成水华。迄今为止,在蓝藻 CCM 的结构研究中发现了 5 个不同的碳吸收系统,其中 2 个为 CO₂ 吸收系统,3 个为碳酸氢盐吸收系统^[10]。2 个 CO₂ 吸收系统分别是 NDH-1₃ CO₂ 吸收系统和 NDH-1₄ CO₂ 吸收系统,前者表现出对 CO₂ 高亲和力 ($K_{0.5} = 1 \sim 2 \mu\text{mol/L CO}_2$) 和低通量率,后者对 CO₂ 低亲和力 ($K_{0.5} = 10 \sim 15 \mu\text{mol/L CO}_2$) 和高通量率。3 个碳酸氢盐吸收系统分别为 2 个依赖 Na⁺-碳酸氢盐运输系统 (*bicA* 和 *sbtA*) 和 1 个依赖 ATP-碳酸氢盐运输系统 (BCT1),其中 *bicA* 表现为碳酸氢盐低亲和力 ($K_{0.5} = 70 \sim 350 \mu\text{mol/L HCO}_3^-$) 和高通量率,*sbtA* 为碳酸氢盐高亲和力 ($K_{0.5} < 5 \mu\text{mol/L HCO}_3^-$) 和低通量率,而 BCT1 则为碳酸氢盐中等亲和力 ($K_{0.5} = 10 \sim 15 \mu\text{mol/L HCO}_3^-$) 和低通量率。研究表明,NDH-1₃ CO₂ 吸收系统、NDH-1₄ CO₂ 吸收系统和 BCT1 存在于大多数淡水蓝藻中,而 *bicA* 和 *sbtA* 2 种碳酸氢盐吸收系统则存在着明显的个体差异^[10]。根据 *sbtA* 和 *bicA* 基因是否存在,可以将蓝藻划分为 *sbtA* 型、*bicA* 型以及 *bicA*+*sbtA* 3 种不同的 CCM 基因型。不同微囊藻个体 CCM 差异可能影响其竞争策略和优势的形成。目前,对于微囊藻 CCM 机制及其对 CO₂ 的响应,主要集中在碳酸酐酶和 Rubisco 酶等相关研究,而对微囊藻 CCM 基因型的多样性以及微进化对 CO₂ 的响应关注较少。

因此,本研究在云南滇池对微囊藻水华过程进行跟踪采样,分析微囊藻水华前、中、后和末期 CCM 基因型的动态变化特征,并在室内模拟低、中和高 3 种 CO₂ 浓度条件,分析不同 CCM 基因型的微囊藻对外界环境中 CO₂ 浓度变化的适应策略,旨在探究自然水体条件下 CCM 微进化与微囊藻种群演替的关系,进而为揭示环境 CO₂ 升高对微囊藻水华演替和发展以及水华形成机制提供重要的理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 研究区域概况与样品采集

滇池 (24°40'~25°02'N, 102°36'~102°40'E) 位于云贵高原,属亚热带高原季风气候。年平均气温 15℃。平均水域面积 310 km²,平均水深 4.7 m,流域面积 2920 km²。滇池被海埂大堤划分为草海和前海两部分。其中前海占湖区总面积的 96.7%。本研究分别在前海的 4 个方位设置了 4 个采样点 (图 1)。分别是

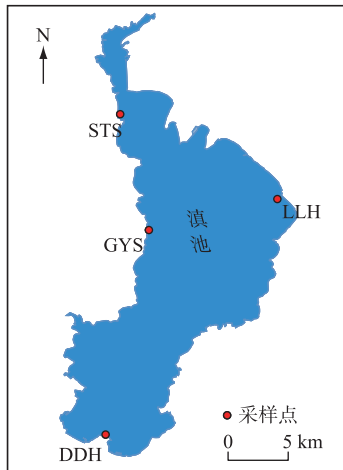


图1 滇池采样点分布示意

Fig.1 Distributions of sampling sites at Lake Dianchi

东大河 (DDH)、观音山 (GYS)、洛龙河 (LLH) 和生态所 (STS)。于 2021 年 5—11 月的每月采集水样 1~2 次。使用水样采集器采集表层水样 (距水面 0.5 m), 重复采样 3 次, 混合后立即放入冰盒中于当天带回实验室做进一步分析。

1.2 水体理化指标的测定

使用多参数水质分析仪 DS5 /DS5X (Hydrolab, 美国) 现场测定表层水体的水温 (WT)、pH 及溶解氧 (DO)。采用钼酸铵分光光度法测定总磷 (TP), 采用紫外分光光度法测定总氮 (TN)。用酸性滴定法测定高锰酸盐指数 (COD_{Mn}), 采用丙酮浸提分光光度法测定叶绿素 *a* 的含量。采用酸碱指示剂滴定法测定水样总碱度 (ALK)。总碱度 = $[\text{HCO}_3^-] + 2[\text{CO}_3^{2-}] + [\text{OH}^-] - [\text{H}^+]$, 根据温度查表得到 H_2CO_3 的化学平衡常数 K_1 、 K_2 , 结合 pH 值计算水体中的碳酸盐、碳酸氢盐以及 CO_2 (aq) 含量。总溶解性无机碳 $C_T = [\text{HCO}_3^-] + [\text{CO}_3^{2-}] + [\text{CO}_2(\text{aq})]$ 。

1.3 基因组 DNA 的提取

取 250 mL 混匀后的水样经 0.22 μm 滤膜抽滤, 含藻滤膜于 -80°C 冰箱中冻存。滤膜剪碎后采用改良 CTAB 法提取 DNA^[11]。

1.4 扩增引物及荧光定量 PCR 标准曲线的构建

本研究所选用的引物如表 1 所示。其中引物对 16S-F/16S-R 和引物对 *sbtA*-F2/*sbtA*-R2 由 Giovanni 等设计^[12-13], 分别用于特异性扩增微囊藻的 16S rDNA 基因和 *sbtA* 基因。引物对 *bicA*-F/*bicA*-R 通过软件 DNAMAN 设计, 用于特异性扩增微囊藻 *bicA* 基因。所有引物由生工生物技术有限公司合成。3 个基因片段的 PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后, 对目的条带进行胶回收。纯化后的产物通过 TA 克隆与 PMD-19T 载体连接, 并转入感受态 *E. coli* 细胞 DH5 α 中。挑取阳性克隆过夜摇菌, 采用质粒小体试剂盒 (天根, 北京) 提取质粒。将质粒线性化片段溶于 ddH₂O 制备成标准品。采用微量分光光度计 NanoDrop 1000 (Thermo, 美国) 测定标准品中的质粒浓度。标准品基因拷贝数 (copies/mL) = 质粒浓度 $\times 10^{-9} \times 6.02 \times 10^{23} / [\text{质粒长度 (bp)} + \text{目的片段 (bp)} \times 660]$ 。将制备的标准品 10 倍梯度稀释构建标准曲线。3 条标准曲线扩增效率分别为 85.71%、94.61% 和 89.34%。

表 1 本研究所用引物序列

Tab.1 Primer sequences used in this study

引物	序列(5'-3')	目标基因	登录号 (Genbank)	目的片段大小/bp	来源
16S-F	GTCGAACGGGAATCTTCGGAT	16S rDNA	AM778951.1	157	参考文献[12]
16S-R	GCTAATCAGACGCAAGCTCTTC				
<i>bicA</i> -F	TTGTCTATCAAGGCTGGTCTCTC	<i>bicA</i>	NO	163	本研究
<i>bicA</i> -R	CTAGCCATGATCGCCCTTG				
<i>sbtA</i> -F2	CTGGCCTTTTGTATTGGTGG	<i>sbtA</i>	AP09552.1	143	参考文献[12]
<i>sbtA</i> -R2	AGGTTGGAATTGCGGATGG				

1.5 荧光定量 PCR

定量 PCR 反应体系为 20 μL , 其中含有 TB GreenPremix Ex TaqII 10 μL 、ROX Reference Dye II 0.4 μL , 上下游引物各 0.8 μL 、DNA 模板 2 μL 、超纯水 6 μL 。反应程序如下: 95°C 预变性 2 min, 95°C 变性 10 s, 52°C 退火 30 s, 72°C 15 s, 40 个循环。每个样品重复测定 3 次。将得到的 C_t 值代入标准曲线计算样品中 16S rDNA、*bicA* 和 *sbtA* 基因的拷贝数。以微囊藻 16S rDNA 基因的拷贝数表征水体微囊藻总量, 以 *bicA* 和 *sbtA* 基因拷贝数与 16S rDNA 拷贝数的比值表征两种基因型微囊藻的相对丰度。

1.6 藻种培养与室内实验设计

实验所用微囊藻藻株 FACHB-908 (*sbtA* 型) 来自中国科学院淡水藻种库, A5 (*bicA* 型) 分离自三峡水库, 纯化后的微囊藻藻种于 MA 培养基中进行扩大培养。培养温度 (25±1) °C, 光照强度 30 μmol photons / (m²·s), 光照周期 12 h:12 h (光照:黑暗)。

实验将等生物量的两种 CCM 基因型的微囊藻分别在浓度为 0.02%、0.04% 和 0.08% 的 CO₂ 条件下进行混合培养。培养体积为 400 mL, 初始藻细胞接入量为 OD₆₈₀ = 0.07, 每个处理设置 3 个重复。不同浓度的 CO₂ 通过空气及纯氮气以一定比例的流量混合实现。所有气体进入之前均经过 0.22 μm 无菌滤膜过滤, 经复合气体分析仪检测校正 CO₂ 浓度后用于实验。第 0、3、7、11 和 15 天对各处理进行了取样, 样品的 DNA 提取及定量 PCR 方法同前。

1.7 数据处理及分析

采用 Excel 和 SPSS 24 (IBM Inc., Chicago, IL, 美国) 进行数据的统计分析, $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义, 并使用 Origin 2021 (Origin Lab Inc., Northampton, MA, 美国) 进行绘图。不同基因型微囊藻和环境因子 Mantel 检验分析在 R 4.2.2 中使用 linkET 包和 dplyr 包进行分析和绘制^[14], 其中 Bray-curtis 距离用于物种分析, 欧几里得距离 (Euclidean distance) 用于环境因子分析。

2 结果

2.1 滇池各样点叶绿素 *a* 浓度的动态变化

为确定滇池水华的发生状况, 测定了 4 个样点 5—11 月份的叶绿素 *a* 浓度。结果显示, 滇池的叶绿素 *a* 浓度在时间上变化较大, 且不同样点的变化不一致 (图 2)。根据叶绿素 *a* 浓度的变化, 发现各样点均有水华的发生, 其发生的时间和程度在不同样点间有着一定的差异, 但最大值都超过了 150 μg/L (图 2)。根据 Wu^[15] 的研究, 将叶绿素浓度高于 150 μg/L 的月份划定为水华中期, 8—9 月为水华后期, 10—11 月为水华末期。

2.2 滇池不同样点无机碳浓度的动态变化

通过测定滇池的无机碳发现, 各无机碳浓度在时空上的变化趋势并不完全相同。各样点中的 C_T 和 HCO_3^- 浓度相对较高, 两者具有相似的变化趋势, 基本表现出水华前期和末期高于中、后期的趋势, 在 LLH 中更加明显 (图 3c)。整体上, 滇池中的 CO₂(aq) 浓度的最小值出现在水华的中期或者后期, 但在水华前、末期有所升高, 在 GYS 和 DDH 中尤其明显, 而 LLH 中 CO₂(aq) 浓度的变化相对比较稳定 (图 3)。相比于其它形态的无机碳, 滇池的 CO₃²⁻ 浓度的时空变化较大, 尤其是在空间上, 各样点没有明显一致的变化趋势, DDH 和 GYS 中的 CO₃²⁻ 浓度相对较低, 而 LLH 和 STS 中的 CO₃²⁻ 浓度相对较高 (图 3)。在整个水华过程中, DDH 和 GYS 中的 CO₃²⁻ 浓度变化趋势较为一致, 均是先升高后降低, 在水华中、后期达到了最大值; LLH 中的 CO₃²⁻ 浓度则表现出先升高后降低的趋势, 在水华后期达到了最大值; 而 STS 中的 CO₃²⁻ 浓度逐渐升高, 并在水华末期达到最大值 (图 3)。总之, 在水华过程中 CO₂(aq) 浓度变化较为平缓, CO₃²⁻ 的起伏较大, C_T 和 HCO_3^- 同步性较强, 并且在空间上都表现出了一定的差异性。

2.3 滇池不同基因型微囊藻在水华过程中的竞争

对滇池中不同基因型微囊藻鉴定的结果显示。在滇池的各样点中, 不同基因型微囊藻的相对丰度在空间上具有一定的差异, 并且在整个水华过程中 *sbtA* 基因型微囊藻和 *bicA* 基因型微囊藻的变化趋势相反。相同的是, *sbtA* 基因型微囊藻在各样点中始终占据绝对优势, 相对丰度远远高于 *bicA* 基因型微囊藻 (图 4)。在整个水华过程中, 除 STS 外, 滇池的 *bicA* 基因型微囊藻的相对丰度表现出了先降低后升高的趋势, DDH 与 LLH 的结果相一致, 最小值均出现在水华中期, 且显著低于其它 3 个时期, 水华后期显著低于末期 ($P < 0.05$, 图 4a 和 c); GYS 的最小值出现在水华后期, 与水华中期无显著差异, 但显著低于水华前和末期 ($P < 0.05$, 图

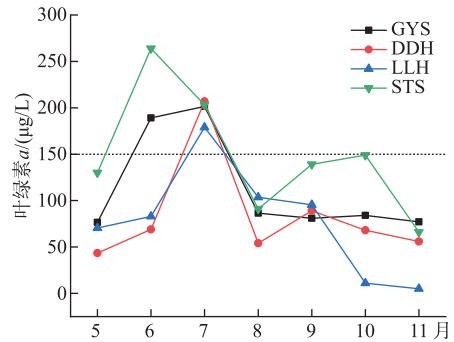


图 2 不同时期滇池各采样点的叶绿素 *a* 浓度
Fig.2 Chl. *a* concentration at different sampling points in Lake Dianchi at different periods

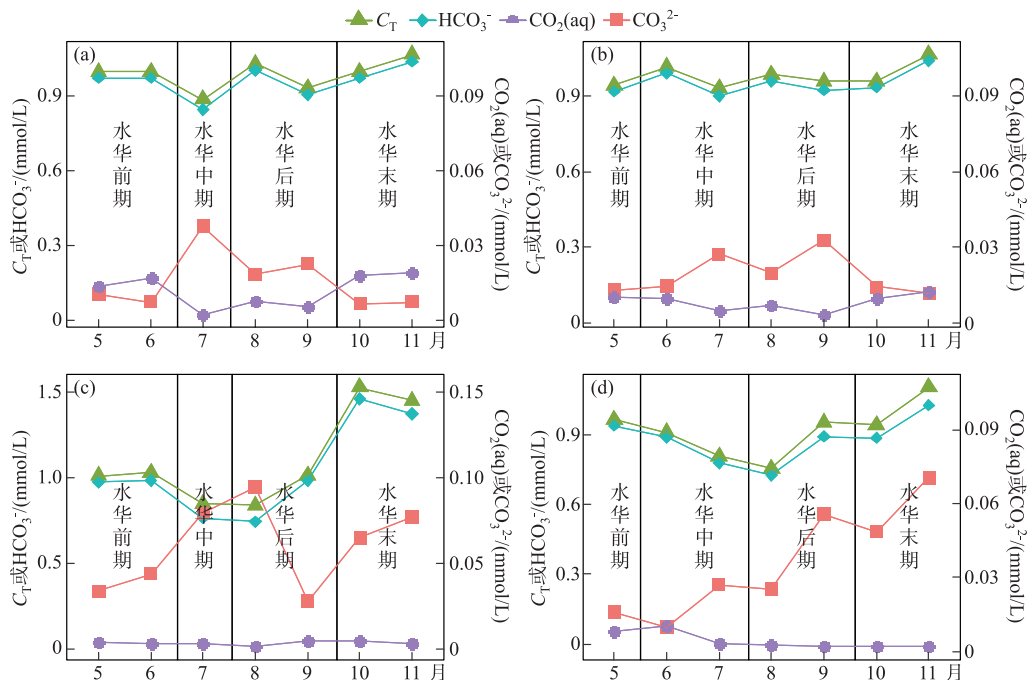


图3 水华过程中滇池各样点的无机碳浓度变化

(a:东大河(DDH); b:观音山(GYS); c:洛龙河(LLH); d:生态所(STS))

Fig.3 Changes in inorganic carbon concentration at different locations in Lake Dianchi during bloom

4b); STS 的变化趋势与其他样点不同, *bicA* 基因型微囊藻的相对丰度逐渐降低, 水华后、末期具有最小值, 且显著低于前、中期 ($P < 0.05$, 图 4d)。对于 *sbtA* 基因型微囊藻, 其相对丰度表现出的趋势则恰恰相反, DDH 和 STS 表现一致, 在水华中期达到最大并显著高于另外 3 个时期 ($P < 0.05$, 图 4a 和 d); GYS 则表现为水华中、后期显著高于水华末期 ($P < 0.05$, 图 4b); LLH 同样也是在水华中期达到最大值, 且显著高于水华后期 ($P < 0.05$, 图 4c)。

2.4 理化因子对水华过程中不同基因型微囊藻的影响

为探究水体理化因子与 *bicA* 基因型和 *sbtA* 基因型微囊藻之间的关系, 经 Mantel 检验分析发现, 在不同的水华时期, 与两种基因型微囊藻显著相关的理化因子并不一致, 且多表现出与 *sbtA* 基因型微囊藻显著相关 (图 5)。结果显示, 在水华前期, *bicA* 基因型微囊藻与 Chl. *a* 和 TP 的相关性系数较高, 分别为 0.59 和 -0.41, 但并无显著性差异 (图 5a), *sbtA* 基因型微囊藻则与 Chl. *a* 呈显著正相关 ($r = 0.57, P < 0.05$, 图 5a); 水华中期的 *bicA* 基因型微囊藻仅与 Alk 相关性较高但不显著 ($r = 0.36$, 图 5b), *sbtA* 基因型微囊藻则与 Alk 呈显著正相关 ($P < 0.05$, 图 5b); 在水华后期, *bicA* 基因型微囊藻与 TN 显著正相关 ($P < 0.05$, 图 5c), 而无理化因子与 *sbtA* 基因型微囊藻显著相关 (图 5c); 水华末期与 *sbtA* 基因型微囊藻显著相关的理化因子有 pH 和 $\text{CO}_2(\text{aq})$ ($P < 0.05$, 图 5d), 并无与 *bicA* 基因型微囊藻显著相关的理化因子。对整个水华期两种基因型微囊藻和理化因子的 Mantel 检验分析结果显示 *sbtA* 基因型微囊藻与 pH 和 $\text{CO}_2(\text{aq})$ 显著正相关, *bicA* 基因型微囊藻与 Chl. *a* 显著正相关 ($P < 0.05$, 图 5e); 结果还表明 C_T 与 *sbtA* 基因型微囊藻负相关, 与 *bicA* 基因型微囊藻正相关。

2.5 不同基因型微囊藻对不同浓度 CO_2 的响应

为了进一步探究不同基因型微囊藻对 CO_2 的响应, 使用针对微囊藻的特异性引物对不同组合微囊藻的 DNA 进行荧光定量 PCR。结果显示, 在不同浓度 CO_2 处理下 *bicA* 和 *sbtA* 两种基因型微囊藻的基因拷贝数在培养过程中均出现了明显分异 (图 6)。在低浓度 CO_2 处理组中, *sbtA* 型的微囊藻基因拷贝数从共培养开始

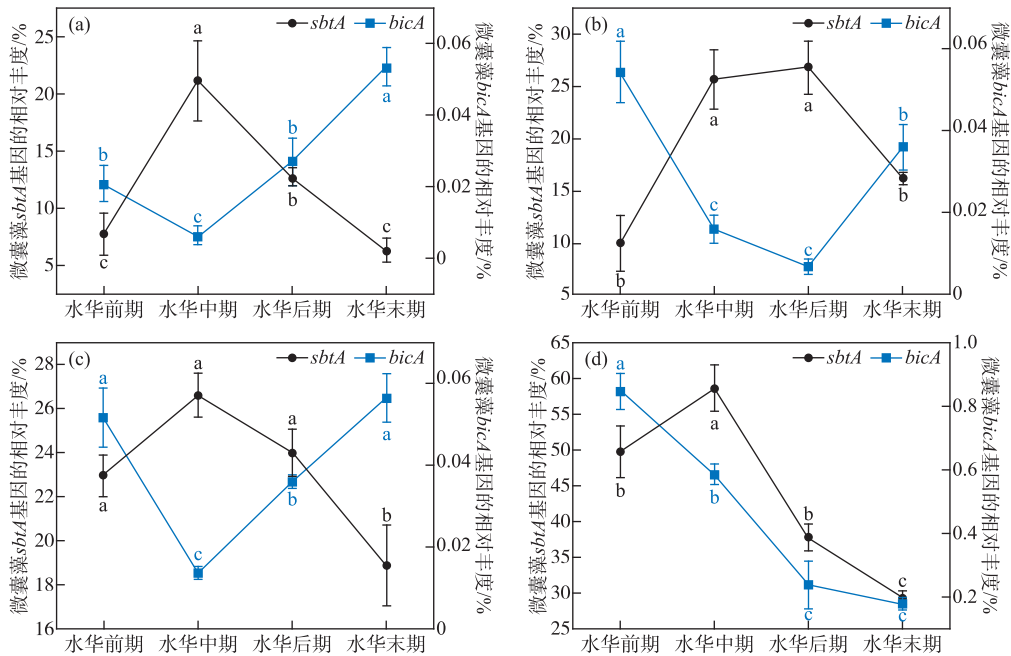


图4 微囊藻水华过程中滇池微囊藻不同基因型的相对丰度变化:
(a) 东大河(DDH); (b) 观音山(GYS); (c) 洛龙河(LLH); (d) 生态所(STS)
(不同的小写字母表示有显著性差异, $P < 0.05$)

Fig.4 Variation in the relative abundance of different *Microcystis* genotypes in Lake Dianchi during *Microcystis* bloom

至结束逐渐升高且始终显著高于 *bicA* 基因型微囊藻 ($P < 0.001$), 具有绝对优势, 而 *bicA* 基因型微囊藻一直保持比较低的数量(图6); 在中浓度 CO₂ 处理组中, *sbtA* 型的微囊藻随着共培养时间的增加, 其基因拷贝数也增加, 同样显著高于 *bicA* 基因型微囊藻 ($P < 0.001$) (图6); 在高浓度 CO₂ 处理组中, 两种基因型微囊藻的基因拷贝数均随着共培养时间的增加而增加, 并且从第3天开始发生明显的分异, 第3天以前是 *sbtA* 型微囊藻占多数, 第3天以后则是 *bicA* 基因型微囊藻占绝对优势, 其基因拷贝数要显著高于 *sbtA* 型微囊藻 ($P < 0.05$)。因此, 随着 CO₂ 浓度的降低, 处于竞争中的不同基因型微囊藻会发生从 *bicA* 基因型占优势到 *sbtA* 基因型占优势的转变。

3 讨论

CO₂ 作为蓝藻光合作用的重要原料, 对蓝藻尤其是具有不同 CCM 机制的微囊藻水华的形成具有重要的影响。滇池作为云南省内最大的淡水湖频繁暴发蓝藻水华^[16-17], 已经引起了广泛的关注。

3.1 滇池不同水华期 CCM 基因型微囊藻的动态变化

李原等^[18]和代龚圆等^[19]的研究发现滇池水华期常出现在6、7月份, 并且以微囊藻水华为主, 通过对滇池4个采样点7个月的监测结果发现(图2), 虽然各个观测点蓝藻水华暴发的时间有所不同, 但都集中在6和7月份, 而且位于滇池北部的生态所的水华程度最高, 这与先前的研究结果基本一致^[19]。CO₂ 是藻类进行光合作用的重要原料^[2], 由于 CO₂ 易溶于水且溶解后的离子形态也受到 pH 的调节^[16], 伴随着藻类的繁殖, 水体中的无机碳浓度往往会发生变化。滇池水体中溶解的 C_T 和 HCO₃⁻ 在水华前期和末期高于水华中期和后期(图3), 这和蓝藻水华暴发的程度正好相反, 说明藻类的大量繁殖可能会在水体中发生碳限制的现象。

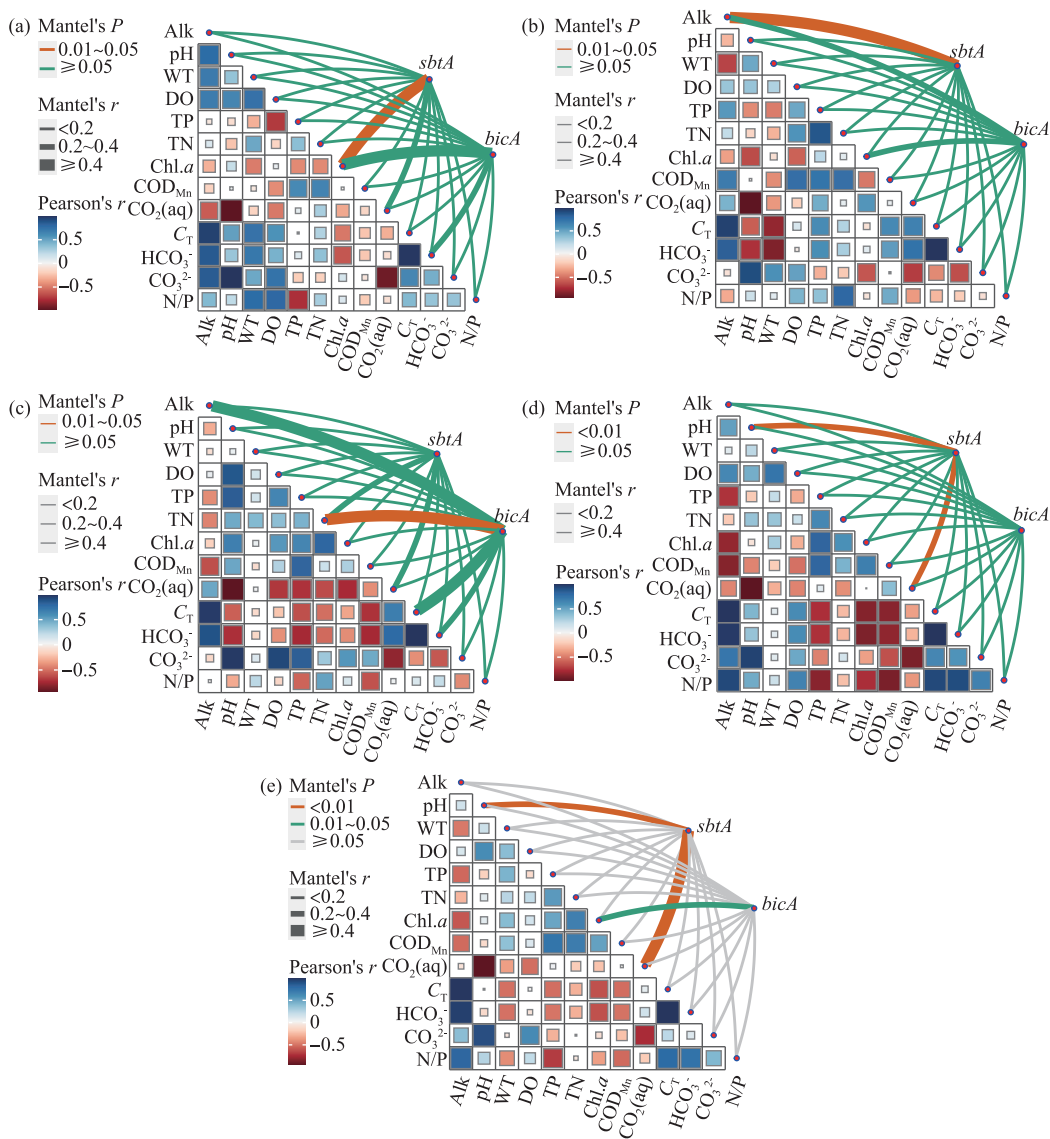


图5 在不同水华期理化因子与两种基因型微囊藻的相关性分析 (a、b、c、d、e 分别代表水华前、中、后、末期、整个水华时期)
 Fig.5 Correlation analysis between physicochemical factors and two genotypes of *Microcystis* at different bloom stages

不同水华期滇池 CCM 微囊藻特异性引物荧光定量 PCR 结果显示(图 4),滇池中所有采样点的 *sbtA* 基因型相对丰度均高于 *bicA* 基因型微囊藻,占绝对优势。这与曾佳颖等^[20]对滇池不同 CCM 基因型微囊藻的研究结果一致。产生这种现象的原因可能与水体中低 CO_2 浓度有关,已有研究发现低浓度 CO_2 条件下更有利于 *sbtA* 基因型微囊藻获得竞争优势^[21],促使 *bicA* 基因型向 *sbtA* 基因型微囊藻的转化^[22]。

滇池 4 个采样点 *sbtA* 基因型和 *bicA* 基因型微囊藻在不同水华期相对丰度的变化趋势说明,除生态所 *bicA* 基因型微囊藻以外,所有点位的 *bicA* 基因型微囊藻均出现了水华中、后期高于初期和末期的现象,在洛龙河和观音山还产生了显著性差异,这和 HCO_3^- 在这些采样点的浓度变化趋势相反,而与 CO_2 浓度的变化趋

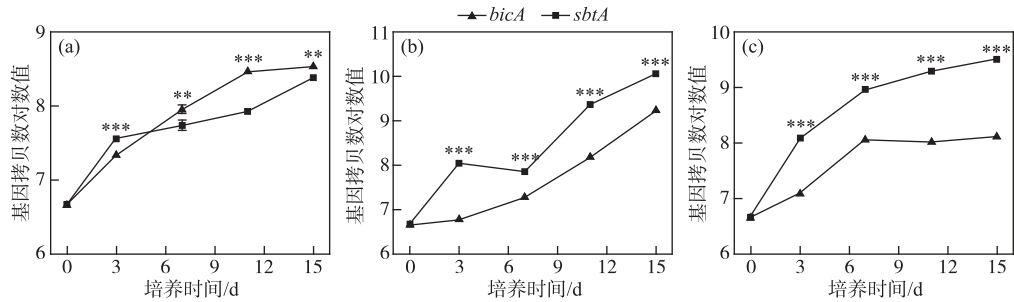


图 6 *bicA* 和 *sbtA* 基因型微囊藻在不同浓度 CO₂ 处理下的竞争响应
(a、b、c 分别为两种基因型藻株在 0.08%、0.04%、0.02% CO₂ 浓度下的竞争;
* 表示 0.01 < P < 0.05; ** 表示 0.001 < P < 0.01; *** 表示 P < 0.001)

Fig.6 Competitive reaction of *Microcystis* with *bicA* and *sbtA* genotypes at different CO₂ concentrations

势一致。进一步说明 *bicA* 基因型微囊藻能在高无机碳和 CO₂ 浓度的条件下表现出竞争优势^[21,23]。另外,在所有样点我们都发现 *sbtA* 基因型微囊藻相对丰度在中后期高于后期和末期,特别是在东大河和观音山这种现象更为明显。这和 *sbtA* 基因型微囊藻在低无机碳的条件下具有竞争优势的结果一致^[21,23],也说明在水华中后期蓝藻水华的暴发程度较高,蓝藻大量繁殖促使水体中出现了碳限制现象^[24-26]。为了在水体中获得种群竞争优势,微囊藻类群发生了从 *bicA* 基因型向 *sbtA* 基因型的转变。随着蓝藻水华强度的降低,在水华末期碳限制减弱,微囊藻类群又发生了从 *sbtA* 基因型向 *bicA* 基因型的转变,使微囊藻始终能够在浮游植物的竞争中处于优势^[18],显示出了微囊藻的快速进化适应能力^[12]。

3.2 环境因子对不同 CCM 基因型微囊藻的影响

滇池水华前中后末期理化因素对不同 CCM 基因型微囊藻的相关性分析结果显示(图 5),在野外条件下微囊藻的生长受到除无机碳外的其他理化因素的影响。在水华早期,Chl. *a* 与 *bicA* 基因型正相关,与 *sbtA* 基因型显著正相关。由于 Chl. *a* 浓度能反映浮游植物的生物量^[27],说明滇池中的浮游植物以微囊藻为主,尤其是 *sbtA* 基因型微囊藻(图 5a),这与 2.3 节的结果中滇池 *sbtA* 基因型微囊藻在微囊藻中占绝对优势一致。

sbtA 基因型微囊藻在水华中期与 Alk 显著正相关,*bicA* 基因型微囊藻在水华中后期也与 Alk 相关程度很高,并且与 TN 显著正相关(图 5b 和 5c)。偏碱性的环境和充足的氮源更有利于微囊藻的生长^[19,28]。浮游植物在水华中期的大量生长导致了 CO₂ 浓度的大幅下降,CO₂ 和氮磷营养盐等营养物质的同化增加了水华发展过程中的碱度和 pH 值^[29-30]。pH 值和碱度的增加使无机碳成分向碳酸氢盐转移^[31],由于 *sbtA* 基因型微囊藻对碳酸氢盐具有高亲和力,因此在水华中后期 *sbtA* 基因型微囊藻的相对丰度高于水华早期和末期。

pH 能够影响微囊藻的生长^[25]和水体中的无机碳^[26],曾佳颖等^[20]对滇池的研究发现,pH 与 *sbtA* 基因型的相对优势度呈正比,而与 *bicA* 基因型呈反比。而本研究发现这种现象出现在滇池水华末期,并且 pH 与 *sbtA* 基因型微囊藻呈正比(图 5d)。在滇池水华末期水体中的 pH 均值(8.6)低于水华中后期(8.7 和 8.8),CO₂ 浓度的增加引起了水体 pH 的下降^[32],使水华末期 *sbtA* 基因型微囊藻丰度降低(图 4)。同样的现象也出现在对滇微囊藻和理化因子的整体 Mantel 检验分析中。同时在对滇池整体的分析中还发现 C_T 的浓度和 *sbtA* 基因型微囊藻负相关,与 *bicA* 基因型微囊藻正相关(图 5e)。这和先前研究发现 *sbtA* 基因型微囊藻在低 C_T 条件下会更好的生长,但在较高的 C_T 环境中则生长较差;反之,*bicA* 基因型微囊藻在低 C_T 环境下生长较差,但在高 C_T 条件下表现良好的实验结果一致^[20]。同时在研究中还发现水体中 CO₂ 浓度的升高同样也有利于 *sbtA* 基因型微囊藻的生长,可能的原因是 CO₂ 作为光合作用的重要原料,其浓度的升高对微囊藻的生长和繁殖具有促进作用。通过对两种基因型微囊藻和环境变量之间的相关性分析结果可知,不同 CCM 基因型微囊藻对不同无机碳的利用相对复杂,基本和先前的研究结果一致^[12,21],但也出现像 *bicA* 基因型在生态所的 4 个水华时期比较特殊的情况,本研究认为这可能和环境因子、物种之间的交互作用有关。

3.3 不同 CCM 基因型微囊藻对不同 CO₂ 浓度响应

对 *bicA* 和 *sbtA* 基因型微囊藻竞争培养的结果表明,在高 CO₂ 浓度条件下 *bicA* 基因型相较于 *sbtA* 基因型微囊藻形成明显的竞争优势,而在低 CO₂ 浓度条件下则相反,*sbtA* 基因型微囊藻具有竞争优势(图 6)。Price^[33] 曾指出 *bicA* 基因型藻株对 HCO₃⁻ 亲和力低,表现为低浓度下对碳酸氢盐转运的有效性不高;而 *sbtA* 基因型藻株不具备高通量,在高浓度下对碳酸氢盐的转运速率不高。此外,Sandrini 等^[13] 的竞争实验表明当 *sbtA* 基因型微囊藻处于高无机碳水平的环境中时,其生长速率会逐渐下降,因此它们常常在低无机碳的水体中具有明显的竞争优势从而在微囊藻水华中占据优势地位;而 *bicA* 基因型微囊藻藻株表现为碳酸氢盐低亲和力和高通量率,竞争实验表明其在高无机碳条件下的生长速率明显高于低无机碳条件下的生长速率。野外实验也支持了室内研究结果,即当水体中的无机碳在水华后期逐渐增加时,*bicA* 相对丰度会逐渐增加。这表明了微囊藻能够调节不同 CCM 基因型来适应外界 CO₂ 浓度,当大气中的 CO₂ 浓度逐渐增加时,溶解于水体中的无机碳也会逐渐增加,此时 *bicA* 基因型藻株具有明显的竞争优势;而当水体中的无机碳水平下降时,基因型为 *sbtA* 的微囊藻藻株的生长速率增加,形成竞争优势。

4 结论

云南滇池不同采样点之间空间差异较小。不同水华时期,*sbtA* 基因型微囊藻始终占据绝对优势,随滇池水体无机碳浓度的变化促使微囊藻基因型呈现 *bicA*→*sbtA*→*bicA* 转变的趋势,使得具有 CCM 机制的微囊藻能够在生态系统中处于竞争优势。环境变量中,Chl.*a* 浓度对水华早期的微囊藻有较强的相关性,总碱度和 TN 在水华中后期对两种基因型影响较大,而 pH 和 CO₂ 浓度对水华后期 *sbtA* 基因型产生了显著影响。室内模拟实验进一步验证了高浓度 CO₂ 适合 *bicA* 生长,而 *sbtA* 基因型对低浓度 CO₂ 具有更强的适应性。因此,CO₂ 浓度对两种 CCM 机制微囊藻的演替起着重要的调控作用。

5 参考文献

- [1] Pachauri RK, Allen MR, Barros VR *et al.* Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of working groups I, II and III to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Geneva, Switzerland: IPCC, 2014.
- [2] Li N, Bi YH, Gao DW *et al.* Effects of elevated CO₂ concentration on growth of *Microcystis aeruginosa*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, **35**(4): 698-702. [李娜, 毕永红, 高大文等. 大气 CO₂ 浓度变化对铜绿微囊藻生长的影响. *水生生物学报*, 2011, **35**(4): 698-702.]
- [3] Hargrave CW, Hamontree S, Gary KP. Direct and indirect food web regulation of microbial decomposers in headwater streams. *Oikos*, 2010, **119**(11): 1785-1795.
- [4] Low-Decarie E, Fussmann GF, Bell G. The effect of elevated CO₂ on growth and competition in experimental phytoplankton communities. *Global Change Biology*, 2011, **17**(8): 2525-2535.
- [5] Tortell PD, Trimbom S, Li Y *et al.* Inorganic carbon utilization by ross sea phytoplankton across natural and experimental CO₂ gradients. *Journal of Phycology*, 2010, **46**(3): 433-443.
- [6] Hopkinson BM, Xu Y, Shi D *et al.* The effect of CO₂ on the photosynthetic physiology of phytoplankton in the Gulf of Alaska. *Limnology and Oceanography*, 2010, **55**(5): 2011-2024.
- [7] Zhao XH, Tang LS, Shi XL *et al.* Effects of simulated elevation of atmospheric CO₂ concentration on the physiological features of spring phytoplankton in Taihu Lake. *Environmental Science*, 2013, **34**(6): 2126-2133. [赵旭辉, 汤龙升, 史小丽等. 模拟大气 CO₂ 水平升高对春季太湖浮游植物生理特性的影响. *环境科学*, 2013, **34**(6): 2126-2133.]
- [8] Collins S. Many possible worlds: Expanding the ecological scenarios in experimental evolution. *Evolutionary Biology*, 2011, **38**(1): 3-14.
- [9] Shapiro J. Current beliefs regarding dominance by blue-greens: The case for the importance of CO₂ and pH. *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie*, 1990, **24**(1): 38-54.
- [10] Price GD, Badger MR, Woodger FJ *et al.* Advances in understanding the cyanobacterial CO₂-concentrating-mechanism (CCM): Functional components, C₄ transporters, diversity, genetic regulation and prospects for engineering into plants. *Journal of Experimental Botany*, 2008, **59**(7): 1441-1461.
- [11] 刘洋. 太湖水华鱼腥藻的多样性、时空分布及生理特性研究[学位论文]. 武汉: 中国科学院大学, 2013.
- [12] Sandrini G, Ji X, Verspagen JMH *et al.* Rapid adaptation of harmful cyanobacteria to rising CO₂. *PNAS*, 2016, **113**(33): 9315-9320.
- [13] Sandrini G, Tann RP, Schuurmans JM *et al.* Diel variation in gene expression of the CO₂-concentrating mechanism during a harmful cyanobacterial bloom. *Frontiers in Microbiology*, 2016, **7**: 551.

- [14] Sunagawa S, Coelho LP, Chaffron S *et al.* Structure and function of the global ocean microbiome. *Science*, 2015, **348**(6237).
- [15] Wu GZ, Xu ZX. Prediction of algal blooming using EFDC model: Case study in the Daoxiang Lake. *Ecological Modelling*, 2011, **222**(6): 1245-1252.
- [16] Wang JH, He LQS, Yang C *et al.* Comparison of algal bloom related meteorological and water quality factors and algal bloom conditions among Lakes Taihu, Chaohu, and Dianchi (1981-2015). *J Lake Sci*, 2018, **30**(4): 897-906. DOI:10.18307/2018.0403. [王菁哈, 何吕奇妹, 杨成等. 太湖、巢湖、滇池水华与相关气象、水质因子及其响应的比较(1981—2015年). 湖泊科学, 2018, **30**(4): 897-906.]
- [17] 范玉燕. 三峡库区支流水库流域非点源污染特征及其变化规律研究[学位论文]. 重庆: 重庆交通大学, 2014.
- [18] Li Y, Zhang M, Wang RN. The temporal and spation variation of the cyanobacteria which caused the water bloom in the Dianchi Lake, Kunming China. *Journal of Yunnan University (Natural Sciences Edition)*, 2005, (3): 272-276. [李原, 张梅, 王若南. 滇池的水华蓝藻的时空变化. 云南大学学报(自然科学版), 2005, (3): 272-276.]
- [19] Dai GY, Li J, Li L *et al.* The spatio-temporal pattern of phytoplankton in the north basin of Lake Dianchi and related environmental factors. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, **36**(5): 946-956. [代龚圆, 李杰, 李林等. 滇池北部湖区浮游植物时空格局及相关环境因子. 水生生物学报, 2012, **36**(5): 946-956.]
- [20] Zeng JY, Jiang JY, Zuo J *et al.* Response of cyanobacteria with different inorganic carbon transport genotypes to environmental CO₂ changes. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2023, **47**(7): 1069-1077. [曾佳颖, 江婧宇, 左俊等. 不同无机碳转运基因型蓝藻对环境 CO₂ 变化的响应. 水生生物学报, 2023, **47**(7): 1069-1077.]
- [21] Sandrini G, Matthijs HCP, Verspagen JMH *et al.* Genetic diversity of inorganic carbon uptake systems causes variation in CO₂ response of the cyanobacterium *Microcystis*. *ISME Journal*, 2014, **8**(3): 589-600.
- [22] Sandrini G, Jakupovic D, Matthijs HCP *et al.* Strains of the harmful Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* differ in gene expression and activity of inorganic carbon uptake systems at elevated CO₂ levels. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, **81**(22): 7730-7739.
- [23] Price GD, Shelden MC, Howitt SM. Membrane topology of the cyanobacterial bicarbonate transporter, *sbtA*, and identification of potential regulatory loops. *Molecular Membrane Biology*, 2011, **28**(5): 265-275.
- [24] Talling JF. Depletion of carbon-dioxide from lake water by phytoplankton. *Journal of Ecology*, 1976, **64**(1): 79-121.
- [25] Maberly SC. Diel, episodic and seasonal changes in pH and concentrations of inorganic carbon in a productive lake. *Freshwater Biology*, 1996, **35**(3): 579-598.
- [26] Gu BH, Schelske CL, Coveney MF. Low carbon dioxide partial pressure in a productive subtropical lake. *Aquatic Sciences*, 2011, **73**(3): 317-330.
- [27] Xu DM, Chen XS, Shao B. Oxidative Damage and cytotoxicity of perfluoro octane sulfonate on *Chlorella vulgaris*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2017, **98**(1): 127-132.
- [28] Yang B, Chu ZS, Jin XC *et al.* Influence of CO₂/pH on growth and photosynthesis of three kinds of algae. *China Environ Sci*, 2007, **27**(1): 54-57. [杨波, 储昭升, 金相灿等. CO₂/pH 对三种藻生长及光合作用的影响. 中国环境科学, 2007, **27**(1): 54-57.]
- [29] Wolf-Gladrow DA, Zeebe RE, Klaas C *et al.* Total alkalinity: The explicit conservative expression and its application to biogeochemical processes. *Marine Chemistry*, 2007, **106**(1-2): 287-300.
- [30] Schindler DW, Turner MA, Hesslein RH. Acidification and alkalization of lakes by experimental addition of nitrogen-compounds. *Biogeochemistry*, 1985, **1**(2): 117-133.
- [31] Verspagen JMH, Van de Waal DB, Finke JF *et al.* Rising CO₂ levels will intensify phytoplankton blooms in eutrophic and hypertrophic lakes. *PLoS One*, 2014, **9**(8): e104325
- [32] Shi X, Zhao X, Zhang M *et al.* The responses of phytoplankton communities to elevated CO₂ show seasonal variations in the highly eutrophic Lake Taihu. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2016, **73**(5): 727-736.
- [33] Price GD. Inorganic carbon transporters of the cyanobacterial CO₂ concentrating mechanism. *Photosynthesis Research*, 2011, **109**(1/2/3): 47-57.