

缺硫对莱茵衣藻叶绿素荧光参数和产 H₂ 速率的影响

贺立静 (暨南大学水生生物研究所, 广东广州 510632)

摘要 采用 TAP 及 TAP-S 培养基培养莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii* D.), 测定了该藻叶绿素荧光参数及产氢气能力。结果表明: 莱茵衣藻在 TAP 培养基内生长良好, 有微量氢气产生, 最高产氢速率只有 1.4×10^{-4} ml/(mgChl·h)。在 TAP-S 培养基内, 莱茵衣藻的荧光参数 Fv/Fo、PSII、 q_p 分别在 40~48 h 下降到初始值的 50%。说明缺硫对藻光合作用的影响首先发生在天线色素到 PS 反应中心的传能过程以及光合作用暗反应所需的酶。TAP-S 培养基内藻最高产氢速率达 0.22 ml/(mgChl·h), 缺硫可以显著提高莱茵衣藻氢气产生的速率。

关键词 缺硫; 莱茵衣藻; 叶绿素荧光; 氢气

中图分类号 Q945.12 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)08-02222-03

Effects of Sulfur Deficiency on Chlorophyll Fluorescence and Hydrogen Production in *Chlamydomonas reinhardtii*

HE Li-jing (Institute of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632)

Abstract Chlorophyll fluorescence and hydrogen production was measured in a unicellular green alga (*Chlamydomonas reinhardtii*). In TAP medium *C. reinhardtii* slowly produced hydrogen. The maximum rate of H₂ evolution was 1.4×10^{-4} ml/(mgChl·h). In TAP-S medium chlorophyll fluorescence parameters Fv/Fo, PSII, q_p decreased 50% of their initial values at 40~48 h, respectively. This result showed that sulfur deficiency inhibited the activity of enzymes involving dark reaction and energy transport process from antenna chlorophyll to react center of PS. The maximum rate of H₂ produced by *C. reinhardtii* in sulfur-deprived medium was 0.22 ml/(mgChl·h). The rate of H₂ evolution was markedly improved in TAP-S culture medium.

Key words Sulfur deprivation; *Chlamydomonas reinhardtii*; Chlorophyll fluorescence; Hydrogen

硫是植物生长所需的主要元素之一, 是蛋白质生物合成的必需元素。植物吸收无机硫元素后可以转化为半胱氨酸和甲硫氨酸 2 种氨基酸为植物生长所需。当植物缺硫时降解植物组织中的硫库, 释放硫元素, 表现为总蛋白和叶绿素含量降低^[1]。

莱茵衣藻是衣藻属的一种单细胞绿藻, 在缺乏硫元素的培养基中生长时, 莱茵衣藻停止分裂^[2], 其光合放氧能力降低, 在缺乏硫元素 24 h 后, 氧气的产生能力下降到初始值的 30% 左右。笔者分别用正常 TAP 培养基 (简称为 TAP⁺) 和缺硫 TAP 培养基 (简称为 TAP-S) 培养莱茵衣藻。在测定产 H₂ 速率的同时测定其叶绿素荧光的参数变化, 旨在探讨莱茵衣藻在连续光照条件下, 硫元素对叶绿素荧光参数和光照产 H₂ 速率的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 藻株: 莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii* D.)。

1.2 方法

1.2.1 培养条件。莱茵衣藻培养: 在 1 000 ml 的三角瓶内加入 800 ml BG110 培养基接种莱茵衣藻, 通气培养 5 d 左右, 光暗时间比是 12 h 12 h, 光照强度 165 μ E/(m²·s) PAR, 温度 25 \pm 1)。

1.2.2 测试藻体的处理。培养好的莱茵衣藻 3000 r/min 离心 5 min, 收集藻体。收集后的藻体用 TAP-S 培养基洗 2 次, 然后悬浮在 TAP-S 培养基内, 作为缺硫培养的藻体; 收集后的藻体直接悬浮在新鲜的 TAP 培养基中作为 TAP 培养的藻体。分别装在 500 ml 的培养瓶内, 藻细胞浓度是 $4 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ Cell/ml, 培养瓶上方留 20 ml 的空间, 立刻用翻口橡皮塞塞紧培养瓶, 放在连续光照的条件下培养, 光强温度同上。TAP-S 培养基配制时, TAP 培养基内的硫酸盐用相应的

氯盐代替。

1.2.3 叶绿素荧光参数的测定方法。采用 XE-PAM 荧光仪 (Walz 德国)。测定莱茵衣藻的叶绿素荧光诱导曲线。首先, 每隔 8 h 取 2~3 ml 待测的藻液进行 1 min 暗适应处理。然后照射测量光 ($<0.10 \mu$ E/(m²·s)), 荧光水平达到稳定后得到原初荧光 (F₀)。随后, 进行饱和脉冲光 (6 000 μ E/(m²·s)) 处理, 一个脉冲后关闭, 得到黑暗中的最大荧光 (F_m)。打开可以引起藻株光合作用的作用光 (600 μ E/(m²·s)), 1 min 后藻株光合作用达到稳态, 得到荧光参数 F_s。这时再进行饱和脉冲光处理, 一个脉冲后关闭, 得到光下最大荧光 (F_m)^[3]。每次 3 个重复。计算以下的荧光参数: 充分暗适应的 PS 的最大光化学量子产量 (F_v/F_m), 天线色素到 PS 反应中心的传能效率 (F_v/F₀), 光合电子传递量子效率 (PSII), 光化学猝灭系数 (q_p), 非光化学猝灭系数 (q_N)。

1.2.4 H₂ 的测定。每隔 12 h, 用 GC9800 型气相色谱 (上海科创色谱仪器有限公司, 载气为氩气, 热导池) 检测气体组成。

2 结果与分析

2.1 硫对莱茵衣藻 F_v/F_m、F_v/F₀ 和 PSII 的影响 (图 1、2) 随着培养时间的延长, 在 TAP 培养基内莱茵衣藻的 F_v/F_m 开始略有升高, 最高 F_v/F_m 值比初始状态的 F_v/F_m 值增加了 4%; 40~48 h 后低于初始状态, 但数值相对比较恒定。而在 TAP-S 培养基内, F_v/F_m 值一直保持下降趋势, 最终下降到初始值的 61%。在 TAP 培养基内的藻液 PSII 开始有显著升高, 在 40 h 后升到最高, 比初始值增加了 65%, 随后逐渐下降。在 TAP-S 培养基内, PSII 值一直下降, 在 40~48 h 左右则下降到初始状态的 50%。

在 TAP 培养基内 F_v/F₀ 的变化趋势与 F_v/F_m 的相似, 但是它的升高程度要高于 F_v/F_m。在 24 h 最高, 比初始值增加了 22%, 48 h 后低于初始值。在 TAP-S 培养基内, F_v/F₀ 一直呈下降趋势, 在 48 h 左右下降到初始状态的 50% (图 2)。

2.2 硫对莱茵衣藻 q_p 和 q_N 的影响 (图 3) 随着密封培养

基金项目 广东省科技攻关项目 (2004B33401002); 国家“863”计划项目 (2002AA515030)。

作者简介 贺立静 (1976-), 女, 河北故城人, 博士研究生, 研究方向: 藻类制氢与光合作用。

收稿日期 2006-12-11

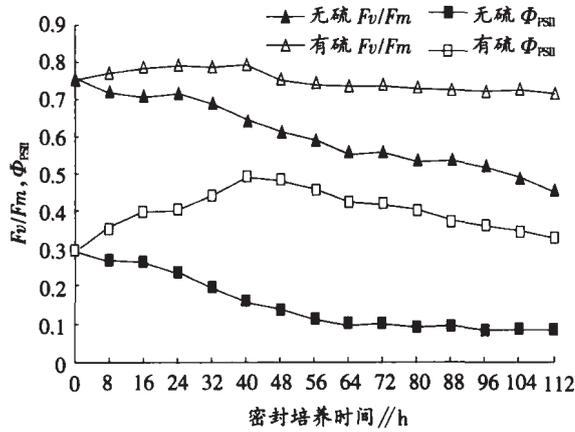


图 1 有硫与无硫培养基生长条件下莱茵衣藻的 Fv/Fm 和 Φ_{PSII} 的变化

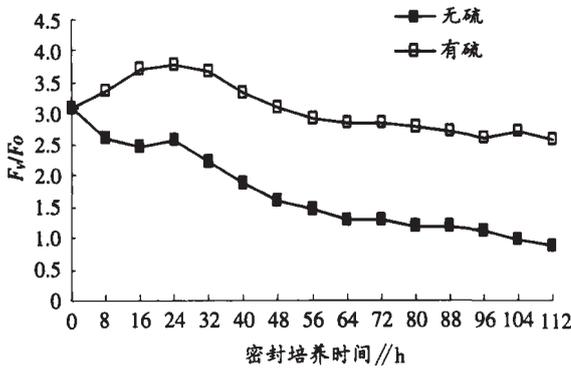


图 2 有硫与无硫培养基生长条件下莱茵衣藻的 Fv/Fo 的变化

时间增加,在 TAP 培养基内培养的莱茵衣藻 q_p 提高,在 48 h 时达到最高,比初始值增加了 46%。q_n 则呈下降趋势,48 h 后接近于 0。在 TAP-S 培养基内莱茵衣藻 q_p 和 q_n 均呈下降趋势,q_p 在 48 h 前显著下降,在 48 h 后下降缓慢,在 40 h 后,q_n 降低为 0。

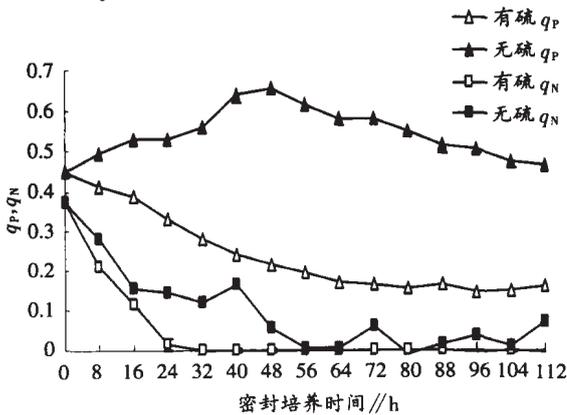


图 3 有硫与无硫培养基生长条件下莱茵衣藻 qp 和 qn 的变化

2.3 硫对莱茵衣藻生长及产 H₂ 的影响 图 4、5) 在 TAP 培养基内生长的莱茵衣藻叶绿素浓度在前 96 h 呈直线上升,其后变化不大。在 TAP-S 培养基内生长的莱茵衣藻叶绿素浓度在 96 h 前略微升高,其后下降,说明缺硫抑制了莱茵衣藻的生长。

在 TAP 培养基内培养的莱茵衣藻在第 12 小时有 H₂ 产生,持续到 60 h,但量非常少,最高产 H₂ 速率只有 1.4 × 10⁻⁴ ml/(mgChl) · h。而在 TAP-S 培养基内莱茵衣藻产 H₂ 速率如图 5 所示,在第 36 小时有 H₂ 产生,到 144 h 持续产氢 108 h,最高产氢速率达到 0.22 ml/(mgChl) · h。

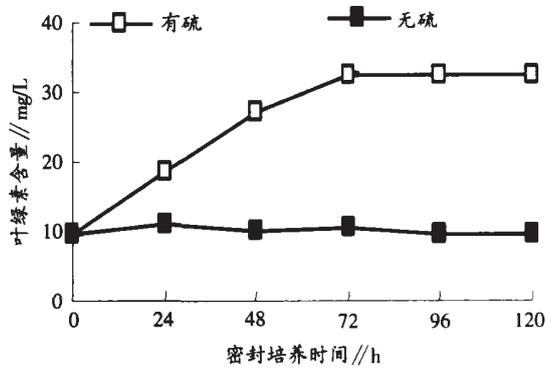


图 4 有硫与无硫培养基生长条件下莱茵衣藻的叶绿素含量变化

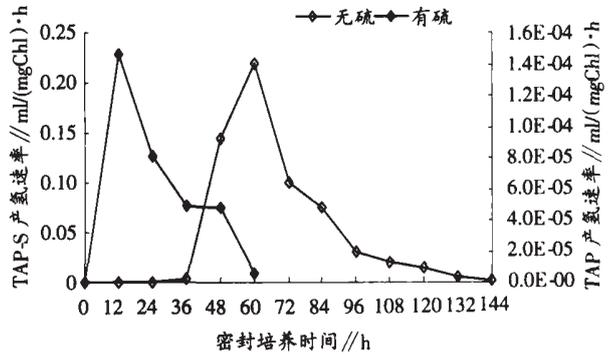


图 5 有硫与无硫培养基生长条件下莱茵衣藻的产 H₂ 速率变化

3 结论与讨论

在室温下绝大部分的叶绿素荧光来自 PSII, 叶绿素荧光的变化主要反映了 PSII 的状态,故叶绿素荧光参数可以作为高等植物和藻对逆境响应的重要生理参数^[1]。参数 Fv/Fm 是充分暗适应的光合机构潜在的 PSII 光化学效率,代表了原初的光能转化效率;Fv/Fo 代表了天线色素到 PSII 反应中心的传能效率;Φ_{PSII} 是 PS 非环式电子传递的量子效率即打开光化光时的有效量子产量,反应了 PS 反应中心在环境胁迫中有部分关闭情况下的实际原初光能捕获效率,可反映实际的 PS 反应中心进行光化学反应的效率。在 TAP 培养基内莱茵衣藻 3 个叶绿素荧光参数中,Fv/Fm 相对比较稳定,说明莱茵衣藻在 TAP 培养基内没有受到明显的胁迫。Φ_{PSII} 值比初始值增加了 65%,说明莱茵衣藻在正常的 TAP 培养基内实际 PS 反应中心进行光化学反应的效率。在 TAP-S 培养基中生长的藻,随着缺硫时间的延长,3 个荧光参数一直呈下降趋势,Fv/Fo 和 Φ_{PSII} 的数值在 24 h 后下降了约 30%。Fv/Fo 和 Φ_{PSII} 的数值在 48 h 左右则下降到初始状态的 50%,而 Fv/Fm 的值在 112 h 后为初始状态的 61%,说明缺硫对莱茵衣藻光和作用影响比较严重的首先是暗反应所需的酶,其次才是 PS;PS 非环式电子传递的量子效率和从天线色素到 PS 反应中心的传能效率均明显受到缺硫的影响。Fv/Fo 和 Φ_{PSII} 更能反映缺硫状态下实际的光合效率。

叶绿素荧光光化学猝灭系数 q_p 代表可变叶绿素荧光的光化学猝灭,反映了光适应状态下开放的 PSII 反应中心所占的比例。非光化学猝灭系数 q_n 则代表 PSII 天线色素吸收的光能不能用于光化学电子传递而被用于非光化学反应如热耗散等的程度,q_n 与叶绿体光合膜质子梯度的建立及膜的高能态有关。随着培养时间的增加,在 TAP 培养基内莱茵衣藻 q_p 升高,q_n 降低,这表明 TAP 培养基适合莱茵衣

藻生长,增加了 PS 天线色素吸收的光能中被用于光化学反应的比例,减少了非光化学反应如热耗散等的比例。在 TAP-S 培养基内随着缺硫时间的延长, q_p 在 24 h 左右下降到初始值的 30% 左右,说明 q_p 可以很好地反映藻的光合作用。 q_p 在缺硫 40 h 后降低为 0,表明 PS 对热能的耗散能力已经丧失殆尽。

在 TAP 培养基内莱茵衣藻生长速度很快,呼吸作用很强故形成了局部的缺氧环境,尽管可以产 H_2 ,但速率很低。在 TAP-S 培养基内由于缺硫降低了 PS 的光合效率,产氧能力下降,而在缺硫后的 70 h 内细胞的呼吸作用基本保持不变,其后也只是轻微的下降,呼吸作用消耗的氧气大于光合产氧,所以即使是在光照的条件下也可以形成一个无氧的环境,诱导氢酶产生^[4-9],结果表明,莱茵衣藻在 TAP-S 培养基内产 H_2 时间可以持续 108 h。

参考文献

[1] NIKIFOROVA V J, KOPKA J, TOLSTIKOV V, et al. Systems rebalancing of metabolism in response to sulfur deprivation, as revealed by metabolome analysis of arabidopsis plants [J]. Plant Physiology, 2005(138) : 304- 318.
 [2] HASE E, MORIMUA Y, MIBARA S, et al. The role of sulfur in the cell division of Chlorella [J]. Arch Mikrobiol, 1958(31) : 87- 95.
 [3] HARRIS E H. The Chlamydomonas sourcebook: a comprehensive guide to biology and laboratory use[M]. San Diego: Academic Press, 1989: 575- 580.

[4] MELIS A, ZHANG L, FORESTIER M, et al. Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga Chlamydomonas reinhardtii [J]. Plant physiology, 2000(122) : 127- 136.
 [5] WYKOFF D D, DAVIES J P, MELIS A, et al. The regulation of photosynthetic electron transport during nutrient deprivation in Chlamydomonas reinhardtii [J]. Plant Physiol 1998(117) : 129- 139.
 [6] 韩博平, 韩志国, 付翔. 藻类光合作用机理与模型 [J]. 北京: 科学出版社, 2003: 57- 76.
 [7] 王庆仁, 林葆. 硫胁迫对油菜超微结构及超细胞水平硫分布的影响. 植物营养与肥料学报, 2004, 5(1) : 46- 49.
 [8] APPEL J, SCHULZ R. Hydrogen metabolism in organisms with oxygenic photosynthesis: hydrogenases as important regulatory devices for a proper redox poising [J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 1998(47) : 1- 11.
 [9] FERREIRA R, TEIXEIRA A. Sulfur starvation in Lemna leads to degradation of ribulose-bisphosphate carboxylase without plant death [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1992, 267(11) : 7253- 7257.
 [10] GHIRARDI M L, TOGASAKI R K, SEIBERT M. Oxygen sensitivity of algal H_2 -production, Appl [J]. Biochem Biotechnol, 1997(63) : 141- 151.
 [11] SCHREIBER U. Chlorophyll fluorescence and photosynthetic energy conversion: Simple introductory experiments with the TEACHING-PAM Chlorophyll fluorometer [J]. Heinz Walz GmbH, 1997(2) : 23- 24.
 [12] SCHREIBER U, BILGER W, NEUBARER C. Chlorophyll fluorescence as a non-invasive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis [M]. Schulze E D, Caldwell M M (Eds). Ecophysiology of photosynthesis. Berlin: Springer, 1994: 49- 70.

(上接第 2218 页)

存在极值点。对 Y 进行岭分析, Y 取最大值时各因素的优化水平如表 4。分析可知 3 个因素的最优试验点 X_1, X_2, X_3 代

码值为 0.461, 0.108, -0.369, 即取值为 3.23%, 1.05%, 0.08%, 此时多糖的产量最高值为 $1.977\ 970 \times 10^{-2} \text{g/ml}$ 。

在以上优化条件下进行试验验证, 共进行 3 批次 250 ml

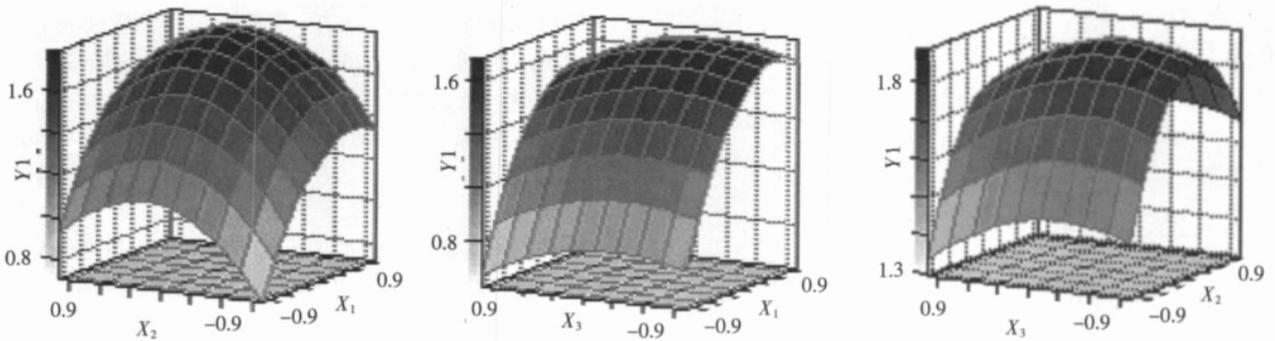


图 1 交互因素响应面

表 4 响应面的岭脊分析

自变量	编码值	取值 %	Y
X_1	0.461 143	3.230 572	1.977 970
X_2	0.108 394	1.054 197	
X_3	-0.369 690	0.081 516	

摇瓶试验, 所测得多糖的产量结果分别为 1.980×10^{-2} 、 1.976×10^{-2} 、 $1.969 \times 10^{-2} \text{g/ml}$, 平均值为 $1.975 \times 10^{-2} \text{g/ml}$, 与预测结果基本一致, 证明了用 RSM 法寻求北虫草多糖的产量的最佳培养基浓度是可行的。

3 结论

运用响应面法进行北虫草产多糖培养基最佳浓度的优

选, 取得了良好的结果, 用 SAS 软件进行岭脊分析, 得到蔗糖、蛋白胨和 KH_2PO_4 3 因素的最佳浓度: 3.23%, 1.05%, 0.08%, 培养液多糖含量为 $1.975 \times 10^{-2} \text{g/ml}$ 。

参考文献

[1] 张士善. 冬虫夏草和人工培养虫草菌丝的药理作用比较 [J]. 药学通报, 1981(16) : 11.
 [2] 尹萍, 涂艳丽, 王飞, 等. 北虫草液体发酵培养基优化研究, 江西农业学报, 2006, 18(4) : 102- 103.
 [3] BOX G E P, BCHKEN D W. Technometrics [J]. Science, 1960(2) : 455- 476.
 [4] 吴有炜. 试验设计与数据处理 [M]. 苏州: 苏州大学出版社, 2003.