

# 雨生红球藻光合和呼吸速率研究\*

刘建国 张京浦

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

**提要** 于 1994 年在青岛以单细胞雨生红球藻为实验材料, 利用 MCM 改良配方制作培养液, 采用测溶解氧的方法, 进行了光合和呼吸速率测定。结果表明, 雨生红球藻光合速率、呼吸速率不仅与温度、光照强度有密切关系, 同时还与其生活史中不同发育阶段有关。17℃、25℃、33℃时, 雨生红球藻游动细胞光饱和点光强分别为 260 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、320 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、320 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  左右, 光补偿点光强分别为 80 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、70 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、100 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  左右。25℃时, 不动细胞的光合和呼吸速率均明显低于游细胞, 其光补偿点和光饱和点光强均比游细胞的高, 分别为 90 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、360 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  左右。

**关键词** 光合速率 呼吸速率 光强 温度 溶解氧 雨生红球藻

**学科分类号** Q28

虾青素作为天然色素有很广阔的市场开发前景(Torrissen *et al*, 1989; Sommer *et al*, 1991; Benemann, 1992; Kranzfelder, 1994)。雨生红球藻因能在特定环境条件下大量累积虾青素(Goodwin *et al*, 1954; Borowitzka *et al*, 1990; Boussiba *et al*, 1990)而倍受重视。

光是光自养生物最重要的环境因子之一, 直接影响细胞生长和虾青素的累积, 常常成为决定养殖成败的关键。目前培养该藻的光照强度很不一致, 一般在 6—430 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  之间(Renstrom *et al*, 1981; Borowitzka *et al*, 1991; Grung *et al*, 1992; Hagen *et al*, 1994; Lee *et al*, 1991; Lu *et al*, 1994; Yong *et al*, 1991; Zlotnik *et al*, 1993), 有的直接利用太阳光为光源(Bubrick, 1991)。要规模养殖雨生红球藻, 就必须了解适合其生长的光照强度。本文研究雨生红球藻的光合作用曲线, 以期生产提供基础数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验藻种

雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis* CCCFA712)于 1994 年取自中国科学院水生生物研究所, 为单细胞低等植物, 隶属绿藻门、团藻目、红球藻科。在实验前经过了充分的暗处理, 同时也进行了恒温(同实验选用温度)预处理。

### 1.2 培养方法

取洁净淡水, 经 100℃热消毒 5min, 冷却至室温, 按照修正的 MCM 配方(Borowitzka

\* 国家自然科学基金资助项目, 39500114 号; 山东省科学技术委员会资助项目, 9565 号。刘建国, 男, 出生于 1964 年 6 月, 博士, 研究员, E-mail: jgliu@ms.qdio.ac.cn

收稿日期: 1998-01-19, 收修改稿日期: 1998-08-27

et al, 1991) 制作培养液, pH 值约为 7.0。

将处于对数生长期的游细胞藻种离心, 加入上述培养液中使细胞密度维持在较低水平(每 ml 溶液含红球藻 6 万个左右), 摇匀均分数瓶, 置于 22℃ 恒温水浴中, 黑暗 12h, 备用; 将已大量累积虾青素, 处于不动细胞时期的藻种按上述方法同样处理备用。

### 1.3 光照强度调控

以可固定在一平行轨道上的碘钨灯为光源, 通过移动光源至光合反应室的距离调节光照强度, 在光线到达反应室前, 预先经过循环水屏蔽层, 滤掉热量, 用 GOSSEN 产 PAN-LUX 光照计测定光照强度, 并记录好光照强度及碘钨灯在轨道上的位置。

### 1.4 溶解氧的测定

利用 Yanaco 生产的 Model PO-100A 溶氧仪和 YR-101 自动记录仪, 通过测水中溶解氧变化的方法, 测定红球藻光合速率和呼吸速率。光合反应室(体积约为 100ml, 也可以通过添加填充材料进一步减少体积) 为封闭体系, 藻液由蠕动泵驱动循环通过光合反应室; 反应室外槽与恒温水浴相连, 通过循环水完成反应室内藻液的温度调控; 仪器在不同灵敏度下的溶解氧量值预先用 Winkler 法标定。显微镜镜检法细胞计数。将测得数据折算到单位时间内每个细胞吸收或放出的氧量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 游动细胞光合和呼吸速率

不同光照强度和温度条件下, 游动细胞的光合速率曲线(图 1) 表明: 光合速率分别受光照强度和温度变化的影响, 并且二种环境因子之间还存在着协同影响。第一, 在低光照

强度范围内, 光照强度增加雨生红球藻表观光合速率和总光合速率几乎呈正相关增加; 但光强超过一定范围之后, 光合速率的增加转慢, 甚至开始下降。第二, 温度增加总光合速率增加, 三者中以 33℃ 最快, 17℃ 时最慢。表观光合速率对温度的反应比总光合速率复杂些, 一般来说, 光强在 120—140  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  以下时, 低温培养的红球藻游动细胞表观光合速率高; 而光强高于 120—140  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  时, 温度高的光合速率快。第三, 室温(25℃) 条件下, 光照为 320  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  时, 光合速率不再增加, 呈现光饱和, 即光饱和点光强为 320  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。17℃ 时该藻的光饱和点光强发生了移动, 为 260  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ , 而 30℃ 同 25℃ 时一样。这一实验结果同 Zlotnik 等(1993) 的工作基本一致, 甚至折算到每个细胞的光合放氧速率数据上也基本相似。第四, 红球藻游动细胞的补偿点光强与温度有一定关系, 17、25、33℃ 时的光合补偿点光强分别为 80、70 和 100  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。另外, 温度明显地影响雨生红球藻暗呼吸速率。在 17—

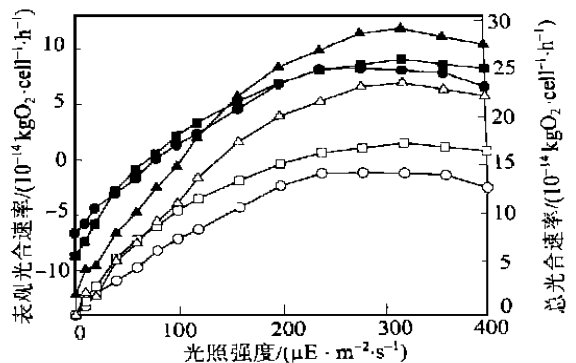


图 1 雨生红球藻游动细胞光合速率曲线

Fig. 1 Photosynthesis rate curves of motile cells of *H. pluvialis*

17℃: ○, ●; 25℃: □, ■; 33℃: △, ▲;

○、□、△ 为总光合速率; ●、■、▲ 为表观光合速率

17—

33℃实验范围内,温度越低,暗呼吸速率越慢(图4结果可进一步说明);这也是造成低光强[ < (120—140) μE / (m<sup>2</sup>·s) ]条件下,低温培养的红球藻游动细胞表观光合速率比高温培养的光合速率大的主要原因。

### 2.2 游动细胞光和呼吸速率等值分析

尽管红球藻游动细胞在较宽的恒定温度和连续光照条件下,表观光合速率和总光合速率均为正值,为培养该藻提供了较大的选择温度、光照强度范围。但是自然界存在昼夜交替,虽然夜间光合作用停止了,但细胞维持正常代谢的暗呼吸仍在进行,消耗光合净累积。因此有必要综合光和呼吸速率进一步模拟,一天内光合累积等值分析结果见图2。

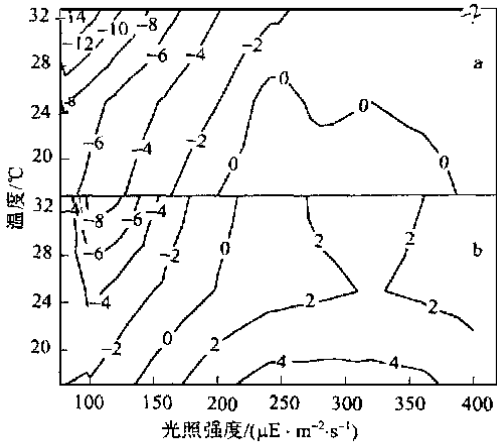


图2 雨生红球藻游动细胞光合速率的等值分析

Fig. 2 The equivalence analysis for photosynthesis rate of *H. pluvialis* motile cells

- a. 12h: 12h 光周期、恒温条件下的净光合累积;
- b. 12h: 12h 光周期、8℃昼夜恒温温差条件下的净光合累积

假定将红球藻游动细胞恒温培养在 12h: 12h 的光暗周期条件下(图2a),该藻只有在相对低的温度(26℃以下)和适宜光强[170—380 μE / (m<sup>2</sup>·s)]时,光合净累积才足以抵偿夜间呼吸消耗量,也就是说游动细胞才有长期生存、生长的可能性。温度超过 26℃,无论光照强度如何变化游动细胞将入不敷出,特别是低光强高温条件下更严重,最终必然导致细胞衰亡(除非细胞形态结构发生变化成为其它形式)。

实际上,水温是在不停地变化的,昼夜水温也存在很大的温差。我们曾经测定过开放式跑道池内,夏季盐藻培养液平均日水温变化(具体结果未列出),表明培养藻液同气体相比较有更明显的“记忆力”,即水温变化比气温约迟缓 2—3h,日平均水温为 26.5℃,最低水温和最高温度之间相差 6.5℃,日昼夜水温平均差约为 4℃。Richmond 等(1993)报道开放式跑道培养池、温室内开放式跑道培养池和生物反应器培养螺旋藻,昼夜最高和最低温度差分别为 12℃、15℃、18℃,估计平均温差为 8—12℃。由此,假设培养红球藻游动细胞于 12h: 12h 光暗周期、8℃昼夜温差的条件下,该藻对温度和光强的适应范围都增大了(图2b)[即光强超过 210 μE / (m<sup>2</sup>·s)],游动细胞光合累积为正值;光强在 210—140 μE /

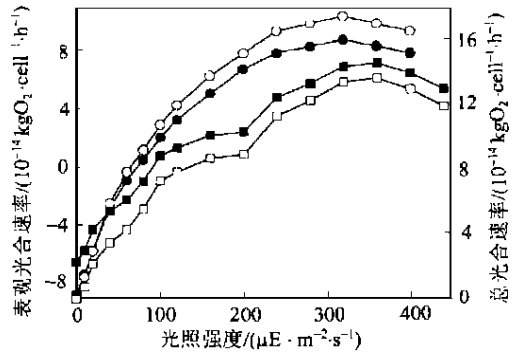


图3 雨生红球藻生活史不同发育阶段细胞的光合速率

Fig. 3 Photosynthesis rate of the cells at different development stages in *H. pluvialis* life cycles

- 、□: 总光合速率; ●、■: 表观光合速率。
- 、●: 流动细胞; □、■: 不动细胞

( $\text{m}^2 \cdot \text{s}$ ) 范围内, 温度较低时, 游动细胞光合累积也可以为正值。十分有意思的是,  $25^\circ\text{C}$  处出现一个等值狭口, Lu 等 (1994) 也报道红球藻游动细胞最适生长温度为  $25-28^\circ\text{C}$ , 二者之间是否有一定关系, 还是巧合, 需进一步研究。

### 2.3 不动细胞和游动细胞的光合、呼吸速率比较

图 3 示  $25^\circ\text{C}$  条件下, 红球藻游动细胞和不动细胞的光合速率。由图 3 可知, 第一, 光合速率不仅与光照强度、温度有关, 而且还与生活史发育阶段有密切关系。实验光照强度范围内, 不论不动细胞的表观光合速率还是总光合速率都比游动细胞的低。第二, 光照强度达到  $360\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  左右时, 不动细胞呈现光饱和, 说明: 1) 该藻不动细胞的光饱和点光强为  $360\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ; 2) 不动细胞比游动细胞抗高光强胁迫的能力强。另外, 该藻不动细胞的光补偿点光强为  $90\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。

为进一步阐明不动细胞较游动细胞光合速率低的原因, 本实验测定了二种细胞形态的暗呼吸速率 (图 4)。结果表明, 不动细胞的呼吸速率低于游动细胞。因此排除了暗呼吸消耗多导致不动细胞光合速率低的因素。从图 4 中还可以看出, 无论游动细胞还是不动细胞, 在低温条件下的呼吸速率比高温条件下的要低, 这一结果也进一步证实了图 1 结果。

作者测定了不动细胞和游动细胞的大小。游动细胞直径为  $10-20\mu\text{m}$ , 不动细胞直径为  $20-60\mu\text{m}$ , 即不动细胞直径一般比游动细胞的大 2—5 倍。因此, 细胞表面积和体积应比游动细胞分别大 4—25 和 8—125 倍。细胞表面积和体积的增加, 意味着每个细胞可以获得更多的光线。同时, 不动细胞已大量累积一种类胡萝卜素——虾青素 (通常认为类胡萝卜素是光合作用的天线色素, 吸收

光能并传递给光合作用中心)。而图 3 和图 4 却表明, 不动细胞不仅不比游动细胞的光合速率快, 相反光合速率还慢, 说明: (1) 不动细胞的光能利用率低; (2) 虾青素并不增加用于光合作用的光能吸收, 相反可能起屏障性过滤光线, 保护细胞生存的作用, 这一结果从另一角度间接、部分证实了 Hagen 等 (1994)、Yong 等 (1991) 的观点。

体积大、内含物多的不动细胞暗呼吸速率低, 意味着不动细胞基础代谢速率慢。这可能是由于细胞无运动器官鞭毛, 失去运动能力, 从而降低了代谢消耗的原因。

另外, 不动细胞的光饱和点光强比游动细胞高, 表明不动细胞较游动细胞对高光强胁迫的适应能力增强, 这对细胞的生存有利。但是应当看到光饱和点增加幅度并不太大, 说明不动细胞对高光强胁迫适应能力也是有限的。本结果部分支持 Hagen 等 (1994) 和 Yong 等 (1991) 的观点。不动细胞暗呼吸速率低而光补偿点高, 进一步说明不动细胞光合速率低的同时也证实虾青素不增加光能吸收, 相反对光线起屏障性过滤作用。

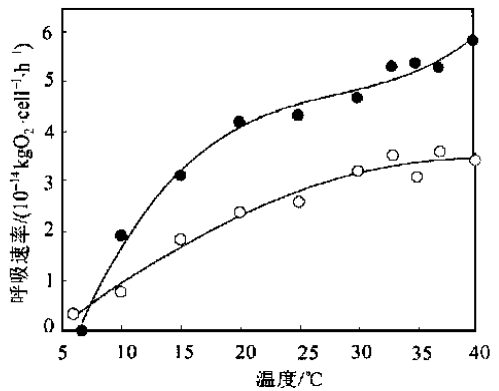


图 4 雨生红球藻生活史不同发育阶段细胞的暗呼吸速率

Fig. 4 Respiration rate of the cells at different development stages in *H. pluvialis* life cycles

○: 不动细胞; ●: 游动细胞

应当提出,红球藻的光合速率呈现光饱和后,随光照强度继续增高立即出现下降趋势,不同于传统光照-光合速率关系曲线。造成该现象的原因还需进一步探讨。我们初步分析与虾青素在细胞内移动及其作用有关。Ben-Amotz 等(1989)报道了盐藻累积 $\beta$ -胡萝卜素于叶绿体内的脂质小体内,起屏障性过滤强光,具有生理性保护光合中心免受光损伤的作用。雨生红球藻累积虾青素于细胞质中(Santos *et al.*, 1984),在强光诱导下虾青素能从靠近细胞核的中央位置逐渐向边缘移动(Yong *et al.*, 1991),更有效地过滤光线(Hagen *et al.*, 1994),同时也降低了该藻的光合速率。另外该藻具有较复杂的生活史(Elliot, 1934),环境条件会诱导细胞形态发生改变。推测上述强光抑制光合速率的现象还可能还与红球藻细胞转化有一定关系,但是目前尚无直接证据。

依据上述红球藻不同发育阶段细胞的光合速率和呼吸速率结果,建议生产养殖雨生红球藻时,应依据当地和当时的光照强度、温度,适当采取调节培养细胞密度、培养水体深度和以及搅拌混匀速度等措施,尽可能使藻液中红球藻细胞成均匀分布,平均能够获得光照在  $200-320\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$  的光照强度,同时任何增加昼夜温差的措施也有利于该藻的生长。

### 参 考 文 献

- Ben-Amotz A, Shaish A, Avom M, 1989. Mode of action of the massively accumulated  $\beta$ -carotene of *Dunaliella bardawil* in protecting the alga against damage by excess irradiation. *Plant Physiol*, 91: 1 040-1 043
- Benemann J R, 1992. Microalgae aquaculture feeds. *J Appl Phycol*, 4: 233-245
- Borowitzka M A, Huisman J M, 1990. Growth and Carotenogenesis in *Haematococcus pluvialis* strains. In: Abstracts of the 5th International Conference of the Society of Applied Agology. Tiberias, Isreal, 14
- Borowitzka M A, Huisman J M, Osborn A, 1991. Culture of the astaxanthin-producing green alga *Haematococcus pluvialis*. I. Effects of nutrients on growth and cell type. *J Appl Phycol*, 3: 295-304
- Boussiba S, Vonshak A, 1990. Growth Condition Affecting Astaxanthin Accumulation in the Green alga *Haematococcus pluvialis*. In: Abstracts of the 5th International Conference of the Society of Applied Agology. Tiberias, Isreal, 18
- Bubrick P, 1991. Production of astaxanthin from *Haematococcus*. *Bioresource Technology*, 38: 237-239
- Elliot A M, 1934. Morphology and life history of *Haematococcus pluvialis*. *Arkiv fur Protistenkunde*, 82: 250-272
- Grung M, D'Souza F M L, Borowitzka M A *et al.*, 1992. Algal carotenoids 51. secondary carotenoids 2, *Haematococcus pluvialis* aplanospore as a source of (3s, 3s')-astaxanthin esters. *J Appl Phycol*, 4: 165-171
- Goodwin T W, Jamikorn M, 1954. Studies in carotenogenesis. II. carotenoid synthesis in the alga *Haematococcus pluvialis*. *Biochemistry J*, 57: 376-381
- Hagen M, Braune W, Bjorn L O, 1994. Functional aspects of secondary carotenoids in *Haematococcus lacustris* (Volvocales). *J Phycology*, 30: 241-248
- Kranzfelder J A, 1994. Carotenoids from microalgal. *J Phycology*, 27(3)(Supplement): 11
- Lee Y-K, Soh C-W, 1991. Accumulation of astaxanthin in *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta). *J Phycology*, 27: 575-577
- Lu F, Vonshak A, Boussiba S, 1994. Effect of temperature and irradiation on growth of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *J Phycol*, 30: 829-833
- Richmond A, Boussiba S, Vonshak A *et al.*, 1993. A new tubular reactor for mass production of microalgae outdoors. *J Appl Phycol*, 5: 327-332
- Renstrom B, Borch G, Skulberg O M *et al.*, 1981. Optical purity of (3s, 3s')-astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Phytochemistry*, 20(11): 2 561-2 564
- Santos M F, Mesquita J F, 1984. Ultrastructural study of *Haematococcus lacustris* (Gimod.) Rostafinski (Volvocales).

I. Some aspects of carotenogenesis. *Cytologia*, 49: 215—228

Sommer T R, Potts W T, Morrissy N M, 1991. Utilization of microalgal astaxanthin by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 94: 79—88

Torrissen O J, Hardy R W, Shearer K D, 1989. Pigmentation of salmonids. Carotenoid deposition and metabolism. *Aquatic Sci* 1: 209—225

Yong Y Y, Lee Y-K, 1991. Do carotenoids play a photoprotective role in the cytoplasm of *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta)? *Phycologia*, 30(3): 257—261

Zlotnik I, Sukenik A, Dubinsky Z, 1993. Physiological and photosynthetic changes during the formation of red aplanospore in the chrobophyte *Haematococcus pluvialis*. *J Phycology*, 29(4): 463—469

## PHOTOSYNTHETIC AND RESPIRATION RATE OF *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*

LIU Jian-guo, ZHANG Jing-pu

(*Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071*)

**Abstract** Photosynthetic and respiration rate of *Haematococcus pluvialis* cultured in modified MCM medium under artificial conditions was calculated by measuring the rate of oxygen production and consumption in 1994 in Qingdao. The results show that 1) both photosynthetic rate and respiration rate are typically associated with light intensity and temperature; 2) light intensity at photosynthetic saturated point of motile cells is 260, 320, 320  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ , respectively when cultured at 17°C, 25°C and 33°C, meanwhile, light intensity at photosynthetic compensation points is 80, 70, 100  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ; and 3) photosynthetic capacity increases with light intensity until light saturated point, and then decreases with further increase of illumination which is called photoinhibition. The results also indicate that cell development stages of this unicellular alga play an important role in photosynthetic and respiration rate, that light intensities at compensation point and saturated point of non-motile cells are 90 and 360  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ , both higher than those of motile cells, whereas both photosynthetic capacity and respiration rate of non-motile cells are lower than those of motile cells. Based on the above results and exact natural environment discussed, radiation for each cell ranging from 200 to 320  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  and large temperature difference between day and night are expected by various means of regulation such as cell density, culture depth, mixing and so on, and are valuable for the cultivation of this algae.

**Key words** Photosynthesis rate    Respiration rate    Light intensity    Temperature    Dissolved oxygen

*Haematococcus pluvialis*

**Subject classification number**    Q28