静止和充气培养条件下短期紫外辐射对钝顶螺旋藻光化学效率的影响

吴红艳[1,2,3]　高坤山[2]　渡[illegible]辉夫[4]
(1. 中国科学院水生生物研究所,武汉　430072;2. 汕头大学海洋生物研究所,汕头　515063;
3. 中国科学院研究生院,北京　100039;4. 海南迪爱生微藻有限公司,海口　570102)

摘要:为了研究短期太阳紫外辐射对钝顶螺旋藻的影响,作者将静止和充气培养的藻体,暴露在全波长太阳辐射 PAB(PAR + UVA + UVB),去除 UVB 辐射 PA(PAR + UVA)及切断所有紫外辐射的光合有效辐射 P(PAR)三种光处理条件下,测定了其光化学效率的变化。结果表明,紫外辐射(UVP)及光合有效辐射(PAR)均能导致钝顶螺旋藻的光化学效率降低,表现出了明显的光抑制,但是,UVR 可导致更大程度的光抑制。充气培养条件下,与早晨(07:00)初始值相比,PAR 导致了 11 %～20 %的光抑制,而 UVR(PAB-P)所产生的额外光抑制占 9 %～31 %;静止培养条件下,UVR 的存在使得螺旋藻的光化学效率趋近于零(无法检出)。在两种培养条件下,藻细胞所受最大光抑制均发生在中午,下午(17:00)表现出不同程度的恢复。紫外辐射使得类胡萝卜素及藻蓝蛋白与叶绿素 a 含量的比例增大。与 PAB 和 P 相比,PA 处理使得螺旋藻类胡萝卜素和藻蓝蛋白与叶绿素含量之比明显升高,UVA 可能会诱导类胡萝卜素及藻蓝蛋白的合成。

关键词: 太阳紫外辐射;钝顶螺旋藻;光化学效率;色素
中图分类号:Q945.79　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1000-3207(2005)06-0673-05

钝顶螺旋藻作为一种重要的经济蓝藻,在功能食品、饲料、医药及化妆品等领域得到广泛应用[1-3]。从上个世纪 70 年代起,螺旋藻的生产规模不断扩大,优化其生长条件已成为普遍关注的问题之一[4-6]。pH,污染物,培养深度,搅拌速率及过量的太阳辐射等都是影响螺旋藻生长的因素[3,7-9],其中太阳辐射引起的光抑制是降低螺旋藻产量的主要因子之一。

近年来,由于大气臭氧层的破坏导致到达地面的紫外辐射增强[10],从而对水体中藻类的代谢也产生了种种影响[11-15]。紫外辐射也会影响螺旋藻的代谢与生产。然而,这方面的研究报道甚少[16,17]。室外大规模养殖的螺旋藻,在太阳光下,其光化学效率随着光强的增加而降低,表现出了明显的光抑制现象[18-20]。然而,这些研究并未区分紫外辐射(UVR)或光合有效辐射(PAR)所导致的光抑制效应。紫外辐射如何且何种程度地影响螺旋藻生长与生理是有待于研究的一个重要问题。为了探讨紫外辐射对螺旋藻的短期影响,本文在静止与充气两种培养条件下研究了太阳紫外辐射对钝顶螺旋藻的光化学效率及色素的影响。

1　材料和方法

1.1　藻种及室内培养　钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis* 439)取自中国科学院水生生物研究所淡水藻种保藏室。藻种采用 Zarrouk 培养基培养,温度 25 ℃,光照强度为 70μmol/m^2/s(12:12LD),于恒温光照培养箱(LRH-250-G,广东)中充气培养。取对数生长期的螺旋藻作为实验用藻。

1.2　室外培养及紫外辐射处理　紫外辐射实验于 2002 年 10 月 20 日在汕头大学校园(116.6 °E,23.3 °N)内进行。光合有效辐射(PAR)的日变化用光量子测定仪(SKP-200,Skye Instruments Ltd,U.K.)测定。紫外线 UVA(315 - 400nm)和 UVB(280 - 315nm)的辐射量,根据其与 PAR 的比值获得(图 1)。PAR 与 UVA 和 UVB 的比例,根据从美国 NASA 获得的当天汕头的臭氧浓度与计算模型(265DU, http://toms.gsfc.nasa.gov/ozone)计算得出。

收稿日期:2004-01-02;**修订日期**:2004-03-25
基金项目:日本 DIC 海南微藻有限公司资助项目;国家自然科学基金项目(批准号:30070582)
作者简介:吴红艳(1976 —),女,山东泰安人;博士研究生;研究方向:藻类生理生态
通讯作者:高坤山;教授;博导;E-mail:ksgao@stu.edu.cn

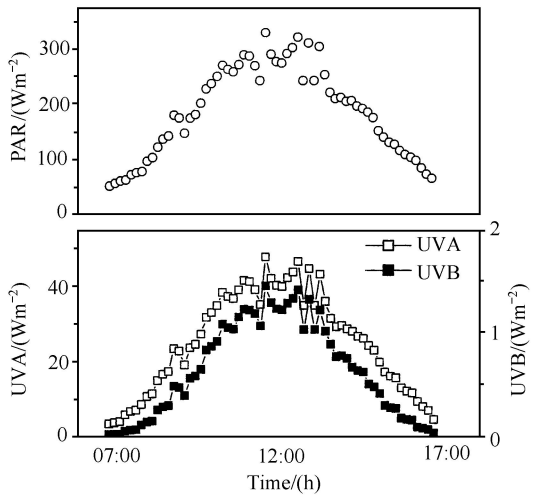

图 1 太阳光合有效辐射(PAR)及紫外辐射(UVA,UVB)的日变化

Fig. 1 Diurnal changes of photosynthetically active radiation (PAR) and ultraviolet radiation (UVA and UVB) of the solar irradiance on 20 October, 2002

将处于对数生长期的藻,分装于可透紫外线的树脂玻璃瓶中(藻浓度为 OD560nm 0.3)。树脂玻璃瓶外包裹不同的紫外切断滤膜得到不同的辐射处理:1) 包裹 Ultraphan 295 (Digefra, Munich, Germany) 滤膜,得到全波长辐射,即 PAR + UVB + UVA (PAB);2) 包裹 Folex 320 (Montagefolie, Nr. 10155099, Folex, Dreieich, Germany) 滤膜,切断 UVB 而得到 PAR + UVA (PA);3) 包裹 Ultraphan 395 (UV Opak, Digefra, Munich, Germany) 滤膜,切断紫外辐射得到 PAR (P)。滤膜及树脂玻璃的透射光谱参见文献[21,22]。将藻从早晨 7 点到下午 5 点置于室外接受自然太阳光辐射,并放置在水槽中用流水控温在 28 ℃左右。实验时,同时设置充气与静止培养各一组。

1.3 光化学效率测定 将螺旋藻暗适应 3min 后,采用植物效率分析仪 (Hansatech Instrument Ltd, U. K.) 测定其光系统 II的光化学效率 (Fv/ Fm)。研究表明, Fv/ Fm 与光合作用的量子产率成正比关系[23]。

1.4 光合色素测定 色素含量变化在藻细胞经过 10h 的辐射处理之后进行测定:将一定体积的藻样过滤,用无水甲醇提取 (> 12h),离心,紫外分光光度计 (Shimadzu UV-1206, Japan) 测定上清液吸收光谱,根据 Parsons 和 Strickland 的计算公式计算出叶绿素及类胡萝卜素的浓度[24]。将一定体积的藻样过滤,溶于含有 0.2mol/L NaCl 的 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液中,反复冻融破细胞,离心后测定上清液吸收光谱,根据 Siegelman 的计算公式得到其藻蓝蛋白浓度[25]。

2 结 果

无论在静止还是充气培养条件下,钝顶螺旋藻在 PAB, PA 及 P 三种辐射处理下,其光化学效率都明显降低,然而,在静止培养条件下被抑制的程度较大(图 2)。PAB 处理处在静止培养条件下的藻体,早上和中午时间都没有检测到 Fv/ Fm 值,直到下午 17:00 才检测到初始值的 43.8 % ($P < 0.01$, T-test);PA 处理下,早上 2h 的辐射之后,其 Fv/ Fm 即被抑制 58.7 %,到中午时没有检测到数值,下午 17:00 时才显示出 47.3 %的恢复 ($P < 0.01$, T-test);P 处理下,光化学效率在 9:00, 13:00 分别被抑制了 47.1 %, 62.3 %,下午恢复了 55.4 % ($P < 0.01$, T-test)。与此相比,充气培养的样品,其光化学效率也有降低,但抑制程度较轻,中午三种处理条件下都显示出了光化学活性。中午 13:00 时 PAB 和 PA 条件下分别被抑制了 46.5 %和 32.7 % ($P < 0.01$, T-test),P 条件下被抑制了 19.8 % ($P < 0.05$, T-test);下午 17:00 时都有不同程度的恢复, PAB, PA 及 P 处理下分别恢复到初始值的 80.8 %, 85.6 %及 89.4 %。

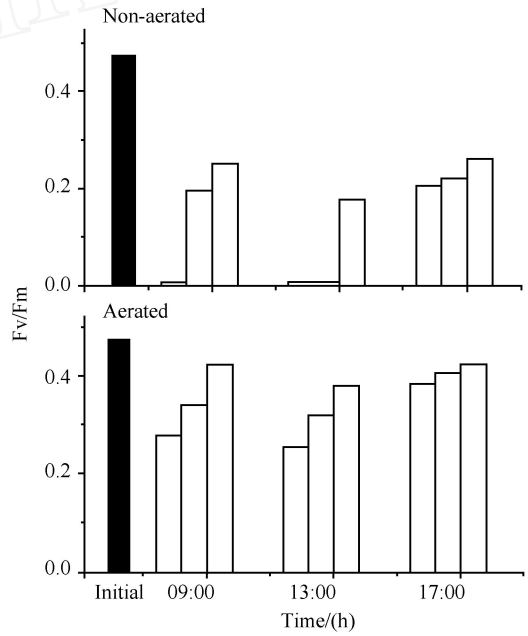

图 2 静止和充气培养的钝顶螺旋藻在全波长辐射 (PAB),去除 UVB 辐射 (PA) 及去除总紫外辐射 (P) 条件下,其光化学效率的日变化

Fig. 2 Changes in the photochemical efficiency (Fv/ Fm) of *S. platensis* in aerated and non-aerated cultures under full spectrum solar radiation (PAB), solar radiation depleted of UVB (PA) and solar radiation deprived of total UVR (P). Data are the means ±SD of triplicate samplings

光合色素在紫外辐射下也受到了明显影响,类

胡萝卜素及藻蓝蛋白与叶绿素含量的比例显著增大,且充气培养的样品中增加程度较大(图 3)。在静止培养条件下,PA 处理使类胡萝卜素及藻蓝蛋白与叶绿素含量之比分别增长了 95 %($P < 0.05$, T-test)和 123 %($P < 0.01$, T-test),明显高于 PAB 及 P 处理下的比率。P 处理也明显地诱导色素比的增长,但与紫外条件下相比,其增长率比较低,这一点在充气培养的样品中尤为明显。

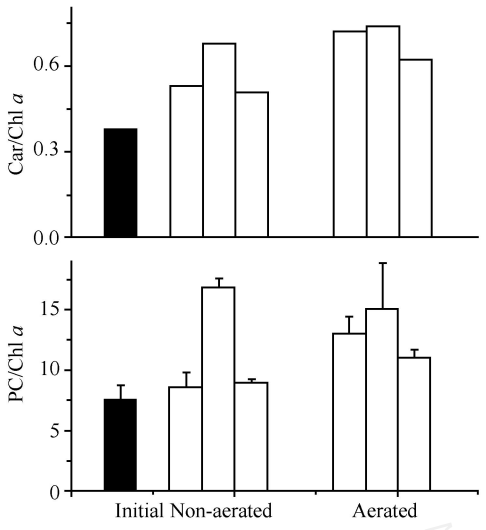

图 3　静止和充气培养的钝顶螺旋藻,在全波长辐射(PAB),去除 UVB 辐射(PA)及去除总紫外辐射(P)条件下,类胡萝卜素和藻蓝蛋白与叶绿素 a 的比值

Fig. 3　Ratios of carotenoids (Car) or phycocyanin (PC) to chlorophyll *a* (Chl *a*) of *Spirulina platensis* in aerated and non-aerated cultures under full spectrum solar radiation (PAB), solar radiation depleted of UVB (PA) and solar radiation deprived of total UVR (P). Data are the means ±SD of triplicate samplings

3　讨　论

本研究发现,紫外辐射(UVR)及可见光(PAR)均能导致钝顶螺旋藻的光化学效率降低,表现出了明显的光抑制,但是,UVR 可导致更大程度的光抑制。充气培养条件下,PAR 导致了 11 %—20 %的光抑制,而 UVR 所产生的光抑制占 9 %—31 %;静止培养条件下,UVR 的存在使得螺旋藻的光化学效率趋近于零(无法检出)。在两种培养条件下,藻细胞所受最大光抑制均发生在中午,下午表现出不同程度的恢复。光胁迫时光合活性的这种下调作用实际上是一种保护性的调节机制,藻细胞通过这种机制以散发过量的激发能量,降低量子产量[26]。静止培养的螺旋藻,其光合活性受到严重抑制,后期恢复也仅为初始值的一半左右,表明藻细胞内某些蛋白质或 DNA 可能受到了损伤。许多研究发现,UVB 可破坏反应中心的 D1/D2 蛋白,而明显抑制 PS Ⅱ活性[16,27,28]。D1 蛋白是 PS Ⅱ电子传递的一个必不可少的环节,其在 300nm 处有最大吸收峰,所以会受 UVB 的影响。藻细胞内需要启动 D1/D2 蛋白的从头合成以进行有效修复[28],因此,细胞的活性恢复也就需要较长的时间。同时,静止培养的样品由于光合作用产生的氧没有通过混合作用将其有效驱除,而积累在培养液中,形成高浓度的溶解氧。培养液中氧的分压增大,使得细胞内 CO_2/O_2 比例减小,有利于 Rubisco 酶的氧化作用,并促进藻细胞的光呼吸,导致光合作用效率降低。这也会反馈性地对光系统 Ⅱ的化学活性产生作用。另外,藻经 UVA 和 UVB 照射后可产生活性氧等自由基,高浓度的溶解氧也为此提供了"有利"条件。活性氧会导致脂的过氧化反应,色素的光漂白,也直接影响到 PS Ⅱ的 D1/D2 蛋白的稳定性。

紫外辐射使得类胡萝卜素及藻蓝蛋白与叶绿素 a 含量的比例增大。色素比的增大为螺旋藻抵抗高可见光及紫外辐射提供了一种非破坏性的能量耗散机制。类胡萝卜素可与三线态叶绿素分子相互作用,猝灭单线态氧或以热量的形式耗散过量的激发能,从而起到减少藻细胞受紫外线伤害的作用,它是在藻细胞内除紫外吸收物质(如三苯甲咪唑类氨基酸)之外的另一种重要的屏障物质。与 PAB 和 P 相比,PA 处理使得螺旋藻类胡萝卜素与叶绿素含量之比明显升高,UVA 可能会诱导类胡萝卜素的合成。有报道指出,UVA 可诱导 *Dunaliella bardawil* 累积大量的类胡萝卜素,并且,在 P 辐射量恒定条件下,其累积量随 UVA 辐射强度的增加而增加。藻蓝蛋白由于其本身的蛋白性质强烈吸收 250～300nm UV 区段,而成为 UVB 的主要攻击目标。UVA 也可能促进藻蓝蛋白的合成,因而使得 PA 条件下具有较高的藻蓝蛋白含量。在本实验中,充气培养的藻其色素比的增长要高于静止培养的藻,静止培养的藻可能由于色素的漂白作用而使其含量降低。

紫外辐射降低钝顶螺旋藻的光化学效率,而钝顶螺旋藻在短期影响内本身也有适应紫外辐射的基本策略:如,光合活性的下调,类胡萝卜素浓度的提高等。在培养和生产过程中,通过搅拌以驱除培养液中的溶解氧,减少由紫外辐射所带来的伤害也是十分必要的。长期暴露在紫外辐射条件下的藻是否具有类似的生理变化,以及如何适应等还有待于进一步的研究。

参考文献:

[1] Chinese Algal Society. Studies on *Spirulina* [M]. Qingdao: Qingdao News press. 1997, 7[中国藻类学会. 螺旋藻资料汇编. 青岛: 青岛新闻出版社. 1997, 7]

[2] Hu H J. Current statuses and emerging prospects of the biotechnology of *Spirulina* in overseas [J]. *Journal of Wuhan Botanical Research*. 1997, **15**(4): 360—374[胡鸿钧. 国外螺旋藻生物技术的现状及发展趋势, 武汉植物学研究. 1997, **15**(4): 360—374]

[3] Hu H J. Biology and biotechnology of *Spirulina* [M]. Beijing: Science Press. 2003, 10. [胡鸿钧. 藻类生物学及生物技术原理. 北京: 科学出版社. 2003, 10]

[4] Xia J R, Gao K S. Studies on photoinhibition of *Spirulina maxima* grown in high CO_2 concentration [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*. 2002, **26**(1): 14—18. [夏建荣, 高坤山. 高浓度 CO_2 培养条件下极大螺旋藻光抑制的研究. 水生生物学报. 2002, **26**(1): 14—18]

[5] Xia J R, Gao K S. Effects on high CO_2 concentration on growth and photosynthesis of *Spirulina maxima* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*. 2001, **25**(5): 474—480. [夏建荣, 高坤山. 高浓度 CO_2 对极大螺旋藻生长和光合作用的影响. 水生生物学报. 2001, **25**(5): 474—480]

[6] Li Y G, Hu H J, Zhang L J, Chen Z X. Studies on CO_2 supply technique for *Spirulina* production [J]. *Journal of Wuhan Botanical Research*. 1996, **14**(4): 349—356. [李夜光, 胡鸿钧, 张良军, 陈志祥. 以 CO_2 为碳源工业化生产螺旋藻工艺艺术的研究. 武汉植物学研究. 1996, **14**(4): 349—356]

[7] Li Y G, Hu H J, Gong X M. Studies on the mechanism of pH value change and carbon conversion ratio of *Spirulina* media [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*. 1996, **13**: 242—248. [李夜光, 胡鸿钧, 龚晓敏. 螺旋藻培养液 pH 变化的机理和碳源利用率的研究. 生物工程学报. 1996, **13**: 242—248]

[8] Richmond A, Grobbelaar J U. Factors affecting the output rate of *Spirulina platensis* with reference to mass cultivation [J]. *Biomass*. 1986, **10**: 253—264

[9] Vonshak A, Guy R. Photoadaptation, Photoinhibition and productivity in the blue-green alga, *Spirulina platensis* grown outdoors [J]. *Plant Cell Eviron*. 1992, **15**: 613—616

[10] Smith R C, Prézelin B B, Baker K S, *et al*. Ozone depletion: ultraviolet radiation and phytoplankton bilology in Antarctic waters [J]. *Science* 1992, **255**: 952—959

[11] Li G C, Song L R. Effects of ultraviolet radiation on cyanobacterial cells activity [J]. *Journal of Microbiology*, 2002, **22**(4): 31—33[李国才, 宋立荣. 紫外线辐射对蓝藻细胞活性的影响. 微生物学杂志. 2002, **22**(4): 31—33]

[12] Yu J, Tang X X, Li Y Q. Effect of UV-B radiation on marine microalgaes [J]. *Marine Sciences*, 2002, **26**(2): 6—8[于娟, 唐学玺, 李永祺. 紫外线-B 辐射对海洋微藻生长效应. 海洋科学. 2002, **26**(2): 6—8]

[13] Qi Y Z, Huang C J, Ying Z H, Qian F. The ecological effects of UV radiation on a toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* [J], *Oceanologia &Limnologia Sinica*. 1997, **28**(2): 113—120. [齐雨藻, 黄长江, 应浙鸿, 钱锋. 紫外光对有毒甲藻塔玛亚历山大藻的生态学效应. 海洋与湖沼. 1997. **28**(2): 113—120]

[14] Underwood G J G, Nilsson C, Sundbäck K, *et al*. Short-term effects of UVB radiation on chlorophyll fluorescence, biomass, pigments, and carbohydrate reactions in a benthic diatom mat [J]. *J. Phycol*. 1999, **35**: 656—666

[15] Häder D-P. Effects of solar UV-B radiation on aquatic ecosystems [J]. *Adv. Space Res*. 2000, **26**: 2029—2040

[16] Rajagopal S, Murthy S D S, Mohanty P. Effect of ultraviolet-B radiation on intact cells of the cyanobacterium *Spirulina platensis*: characterization of the alterations in the thylakoid membranes [J]. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol*. 2000, **54**: 61—66

[17] Rajagopla S, Jha I B, Murthy S D S, Mohanty P. Ultraviolet-B effects on *Spirulina platensis* cells: modification of chromophore-protein interaction and energy transfer characteristics of phycobilisome [J]. *Biochem. Biophy. Res. Communications*. 1998, **249**: 172-177

[18] Vonshak A, Torzillo G, Tomaselli L. Use of chlorophyll fluorescence to estimate the effect of photoinhibition in outdoor cultures of *Spirulina platensis* [J]. *J. Appl. Phycol*. 1994. **6**: 31—34

[19] Vonshak A, Torzillo G, Accolla P, *et al*. Light and oxygen stress in *Spirulina platensis* (cyanobacteria) grown outdoors in tubular reactors [J]. *Physiol. Plant*. 1996, **97**: 175—179

[20] Lu C M, Vonshak A. Photoinhibition in outdoor *Spirulina platensis* cultures assessed by polyphasic chlorophyll fluorescence transients [J]. *J. Appl. Phycol*. 1999, **11**: 355—359

[21] Figueroa F L, Salles S, Aguilera J, *et al*. Flores-Moya A, Altamirano M. Effects of solar radiation on photoinhibition and pigmentation in the red alga *Porphyra leucosticta* [J]. *Mar. Ecol. Prog. Ser*. 1997, **151**: 81—90

[22] Underwood G J C, Nilsson C, Sundbäck K, Short-term effects of UVB radiation on chlorophyll fluorescence, biomass, pigments, and carbohydrate reactions in a benthic diatom mat [J]. *J. Phycol*. 1999, **35**: 656—666

[23] Krause G H, Weis E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics [J]. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant mol. Biol*. 1991. **42**: 313—349

[24] Parsons T R, Strickland J D H. Discussion of spectrophotomertic determination of marine plant pigments, with revised equation for ascertaining chlorophylls and carotenoids [J]. *J. Mar. Res*. 1963, **21**: 155—163

[25] Siegelman H W, Chapman D J, Cole W J, The bile pigments of plants [J]. *Biochem. Soc. Symp*. 1968, **28**: 107—120

[26] Osmond C B, Chow W S. Ecology of photosynthesis in the sun and shade: summary and prognostications [J]. *J. Phycol*. 1988, **15**: 1—9

[27] Campbell D, Eriksson M-J, Öquist G, *et al*. The cyanobacterium *Synechococcus* resists UV-B by exchanging photosystem Ⅱ reaction-center D1 proteins [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1998, **95**: 364—369

[28] Sass L, Spetea C, Máté Z, *et al*. Repair of UV-B induced damage of photosynthesis Ⅱ via *de novo* synthesis of the D1 and D2 reaction center subunits in *Synechocystis* sp. PCC 6803 [J]. *Photosyn. Res*. 1997, **54**: 55—62

SHORT-TERM EFFECTS OF SOLAR ULTRAVIOLET RADIATION ON THE PHOTOCHEMICAL EFFICIENCY OF *SPIRULINA PLATENSIS* IN NON-AERATED AND AERATED CULTURES

WU Hong-Yan[1,2,3], GAO Kun-Shan[2] and TERUO Watanabe[4]

(1. *Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan* 430072; 2. *Marine Biology Institute, Shantou University, Shantou* 515063; 3. *Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100039; 4. *Hainan DIC Microalgae CO., LTD., Haikou* 570102)

Abstract: Continuous depletion of the stratospheric ozone layer results in increasing solar ultraviolet radiation (UVR) reaching the earth's surface. Which has been considered to affect living organisms. Solar UVR may also affect a variety of physiological and biochemical processes in the economic cyanobacterium, *Spirulina platensis*. However, little has been documented on this aspect. The present study evaluated the short-term effects of UVR on photochemical efficiency of *S. platensis* in aerated and non-aerated cultures while exposing it to full-spectrum solar radiation (PAB), solar radiation depleted of UVB (PA) and solar radiation deprived of total UV (P: PAR).

It was found that both UVR and PAR inhibited the photochemical efficiency during noontime (11:00-13:00), however, UVR + PAR (PAB) resulted in higher inhibition. In aerated cultures, PAR resulted in 11 %～20 % compared to the initial value in the morning (07:00), UVR (PAB-P) brought about 9 %～31 % extra photoinhibition. While in non-aerated cultures, the photochemical effciency could not be detected when exposed to UVR. The greatest inhibition was observed at noontime, and the recovery was achieved in late afternoon (17:00) in both the aerated and non-aerated cultures. UVR increased the ratio of carotenoids or phycocyanin to chlorophyll *a*. Compared with PAB and P treatments, cells exposed to PA showed higher values of the pigment ratios, indicating a possibility that UVA may enhance the synthesis of carotenoids and phycocyanin. Although *S. platensis* was negatively affected by UVR, it tended to develop mechanisms counteracting the damaging effects of UVR during this short-term exposure period, such as down-regulation of the photosynthetic activity of accumulation of the carotenoids.

Key words: Solar ultraviolet radiation; *Spirulina platensis*; Photochemical efficiency; Pigments