

4 种海洋绿藻光合放氢特征的研究

管英富, 邓麦村, 虞星炬, 金美芳, 张 卫

(中国科学院 大连化学物理研究所 辽宁 大连 116023)

摘要 四片藻 (*Tetraselmis* sp.)、微绿球藻 (*Nannochloropsis oculata*)、小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 和扁藻 (*Platymonas subcordiformis*) 的放氢特点各不相同。在暗厌氧培养阶段, 四片藻和微绿球藻不释放氢气, 小球藻和扁藻释放微量的氢气。随后的光照培养阶段中, 4 种海藻在天然海水中都释放氢气, 四片藻和小球藻在无硫海水中不释放氢气, 而微绿球藻在无硫海水中释放的氢气比在天然海水中的少, 扁藻在无硫海水中释放的氢气为天然海水中的 10 倍。在 4 种藻中, 亚心型扁藻的光合放氢能力最高。解偶联剂 CCCP (carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazine) 对该 4 种藻的光合放氢的影响各不相同, 并初步推测了扁藻光合放氢的速度限制因素。

关键词 海水绿藻; 无硫; 放氢; 光照

中图分类号: Q178.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2004)09-0032-04

光生物产氢以太阳能为能源, 以水或有机废物为原料, 是潜在的可再生氢能的生产方法之一, 目前研究主要集中在光合细菌和微藻的放氢^[1]。其中绿藻可逆性氢酶光解水放氢的理论量子效率高^[2], 最有可能用来利用自然界中最丰富的资源(太阳光和水)生产可再生氢能。许多淡水绿藻, 如衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*)^[3,4], 小球藻 (*Chlorella fusca*)^[5], 栅藻 (*Scenedesmus obliquus*)^[6] 以及绿球藻 (*Chlorococcum littorale*)^[7] 等都能放氢, 但对海水绿藻氢代谢的研究还比较少。利用海洋微藻光解水大规模制氢, 将节约相对匮乏的淡水资源, 可有效利用丰富的海水资源, 使该技术更具吸引力。

由于绿藻可逆性氢酶的氧抑制现象, 绿藻的放氢现象不能持续进行。Melis 等^[4]发现, 无硫培养能降低莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii* 124) 的光合放氢能力, 而对呼吸耗氧没有显著影响, 从而使光照条件下的衣藻培养液维持厌氧状态, 实现了该衣藻的持续放氢。研究发现, 不同绿藻的光合放氢速度可能受到氢酶活性以及电子、质子在光合作用系统、细胞色素和可逆氢酶之间的传递速度等因素的抑制^[8,9]。所以, 获得更多的产氢藻种, 研究其放氢特性, 是获得高产产氢藻株并实现其产氢功能调控的起点。

四片藻 (*Tetraselmis* sp.)、微绿球藻

(*Nannochloropsis oculata*)、小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 和扁藻 (*Platymonas subcordiformis*) 是中国常用的海洋饵料, 容易实现大规模培养。本文在天然海水、无硫海水和含有解偶联剂 CCCP 的天然海水 3 种条件下, 比较了 4 种海洋绿藻在暗培养和光照培养下的放氢特征。

1 材料与方法

1.1 实验材料

四片藻 (*Tetraselmis* sp.)、微绿球藻 (*Nannochloropsis oculata*)、小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 由澳大利亚 CSIRO 微藻研究中心提供, 亚心型扁藻 (*Platymonas subcordiformis*) 由辽宁省海洋水产研究所提供。所有藻种都在实验室纯化培养。海水取自大连周边海域, 砂滤后以 121℃ 高温灭菌。冷却到室温后,

收稿日期: 2003-05-26; 修回日期: 2004-04-30

基金项目: 国家 973 计划项目(2003CB214506)

作者简介: 管英富 (1970-), 男, 博士研究生, E-mail: mfjin@dicp.ac.cn; 张卫, 通讯作者, 电话: 0411-84379069, E-mail: weizhang@dicp.ac.cn

加入营养盐, 每升海水培养基中的各种盐含量为 1.3 mg FeCl₃, 0.36 mg MnCl₂, 33.6 mg H₃BO₃, 45.0 mg EDTA, 20.0 mg NaH₂PO₄, 100 mg NaNO₃, 0.21 mg ZnCl₂, 0.20 mg CoCl₂, 0.09 mg (NH₄)₄ Mo₇ O₂₄, 0.20 mg CuSO₄, 0.1 μg VB₁₂ 和 1.0 μg VB₁。扁藻置于 2 L 的三角烧瓶中, 放在 25℃, 日光灯光源, 表面光照度为 4 500 lx, 光暗比为 14 h : 10 h 的条件下培养到对数生长后期。微绿球藻和小球藻细胞浓度用 A₅₅₀ 值测量, 扁藻、四片藻细胞浓度用血球计数板在 Olympus BH-2 光学显微镜下计数。

1.2 天然海水中的产氢实验

离心收集对数生长后期的绿藻, 用新鲜培养基离心洗涤 2 次, 微绿球藻和小球藻的细胞浓度调整到 10⁶ 个/mL, 四片藻和扁藻的细胞浓度分别调整到 1.3 × 10⁶ 个/mL 和 1.5 × 10⁶ 个/mL。取容积为 300 mL 的培养瓶, 内装 295 mL 藻液, 密封瓶口, 充氮气 5 min, 放置到 25℃ 中暗培养 30 h 以诱导可逆氢酶^[3,10], 然后放在光照度为 160 μE m/(m² · s)、150 r/min 的回旋震荡条件下光照放氢。用排水取气法收集并测定气体体积。气体分析用 SRI 8 610Q 美国 SRI 科学仪器公司生产) 气相色谱仪(13X 分子筛柱长 2 m, 氩气为载气, 热导式检测器的检测温度为 80℃) 分析。取同样数量的藻液, 在暗诱导 30 h 后加入 10 μmol/L 的 CCCP 5 min 后光照放氢。

1.3 无硫海水中的产氢实验

用去离子水配置无硫的 Fleming 海水和营养盐, 其中硫酸盐用氯化物取代, 121℃ 高压灭菌 20 min。离心收集对数生长后期的 4 种绿藻细胞, 用灭菌后的无硫培养基悬浮、离心洗涤, 并重复 3 次, 按上述方法实验。

2 结果与讨论

2.1 暗培养阶段的放氢

在天然海水和无硫海水中, 四片藻和微绿球藻在暗培养阶段都不释放氢气, 小球藻和扁藻则都释放氢气。小球藻在无硫海水中释放的氢气体量比天然海水中高, 而扁藻在无硫海水中释放的氢气体量比天然海水中低(表 1)。

2.2 光合放氢

2.2.1 小球藻

天然海水中小球藻的光合放氢在 1 h 内停止, 持续时间短, 光合放氢量是暗培养阶段放氢的近 5

倍。无硫海水中, 小球藻在光照下不释放氢气。10 μmol/L 的 CCCP 使天然海水中小球藻的光合放氢量下降约 60%(图 1, 表 1)。

表 1 4 种海洋绿藻在暗培养阶段的放氢量(× 10⁻⁹ L)

Tab.1 Hydrogen production in dark stage by four marine green algae

培养条件	四片藻	微绿球藻	小球藻	扁藻
海水	0	0	163	288
无硫海水	0	0	205	237

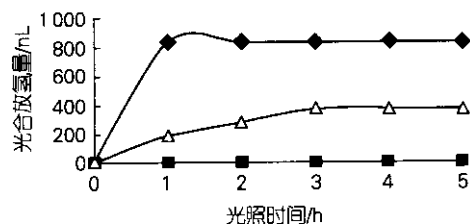


图 1 小球藻的光合放氢

Fig. 1 Photo-hydrogen production by *Chlorella vulgaris*
—◆— 天然海水; —■— 无硫海水; —△— 天然海水 + CCCP

2.2.2 微绿球藻

无硫海水中, 微绿球藻在第 1 h 内没有释放氢气, 在 1~2 h 之间释放出微量氢气, 2 h 左右光合放氢结束。在天然海水, 微绿球藻的光合放氢持续时间约 3 h, 放氢速度基本维持不变, 放氢量为无硫海水中的 3 倍; 天然海水中, 加入 10 μmol/L 的 CCCP 使其光合放氢持续 3 h, 放氢量提高 1 倍(图 2)。可见, 无硫培养部分抑制微绿球藻的光合放氢, CCCP 促进微绿球藻的光合放氢。

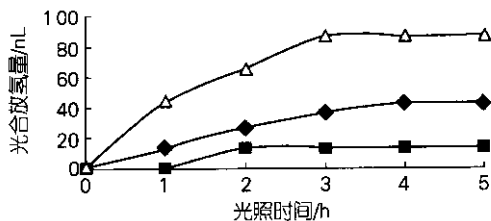


图 2 微绿球藻的光合放氢

Fig. 2 Photo-hydrogen production by *Nannochloropsis oculata*
—◆— 天然海水; —■— 无硫海水; —△— 天然海水 + CCCP

2.2.3 四片藻

在无硫海水中和在含 $10 \mu\text{mol/L}$ 的 CCCP 天然海水中, 四片藻不进行光合放氢。天然海水中, 在光照前 1 h 四片藻没有释放氢气, 1 h 后开始释放氢气, 4 h 后光合放氢停止 (图 3)。CCCP 和无硫培养都抑制四片藻的光合放氢。

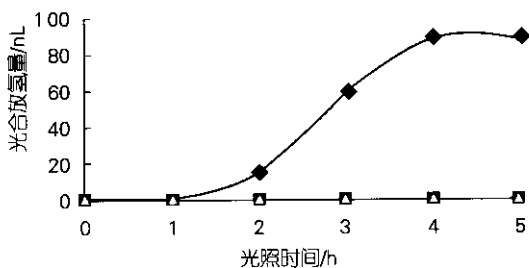


图 3 四片藻的光合放氢

Fig. 3 Photo-hydrogen production by *Tetraselmis* sp.

- ◆ - 天然海水; - ■ - 无硫海水; - △ - 天然海水 + CCCP

2.2.4 扁藻

天然海水中扁藻的光合放氢在 3 h 左右停止。无硫海水中扁藻的光合放氢经过 1 h 的滞后期后, 开始放氢, 到 7 h 接近最大值, 光照放氢量是天然海水中的约 10 倍。天然海水中, 加入 $10 \mu\text{mol/L}$ 的 CCCP 使其光合放氢在 7 h 内达到 0.329 mL (图 4, 表 1)。亚心型扁藻在暗培养阶段放氢很少, 所产生的氢气绝大部分来自光照培养阶段, 说明亚心型扁藻需要吸收利用光能才能释放更多的氢气。无硫海水中扁藻的光照放氢量比天然海水中可高一个数量级, 说明与淡水莱茵

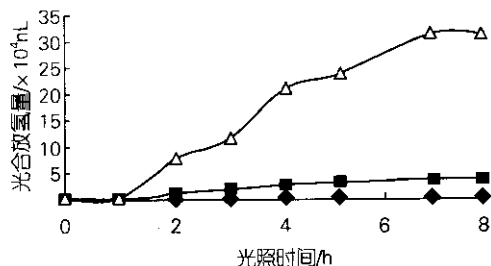


图 4 扁藻的光合放氢

Fig. 4 Photo-hydrogen production by *Platymonas subcordiformis*

- ◆ - 天然海水; - ■ - 无硫海水; - △ - 天然海水 + CCCP

藻类似, 可依靠无硫培养促进扁藻的光合放氢。 $10 \mu\text{mol/L}$ 的解偶联剂 CCCP 并不延长光合放氢时间, 但使扁藻的光合放氢量提高 100 倍, 可能是 CCCP 抑制了扁藻类囊体膜上质子的渗透^[11], 从而为氢酶提供了更高浓度的质子。该现象有待于深入详细的研究。初步说明扁藻的类囊体膜上的跨膜质子梯度是光合放氢的速度限制因素, 但还需要对该过程做详细的研究。四种绿藻放氢特征的显著差别也有待于对绿藻光合放氢机理的深入研究而予以揭示。

3 结论

通过对 4 种海洋绿藻光合放氢的比较, 发现海洋扁藻具有较高的放氢能力。

通过对其光合放氢的调控, 无硫培养使扁藻的光合放氢提高 10 倍。天然海水中加入解偶联剂 CCCP 使其光合放氢提高 100 倍, 初步分析为扁藻类囊体膜上的跨膜质子梯度是扁藻光合放氢的限速因子。

参考文献:

- [1] Asada Y, Miyake J. Photobiological hydrogen production (review)[J]. *J Biosci Bioeng*, 1999, 88 (1): 1-6.
- [2] Ghirardi M L, Zhang L P, Lee J W, et al. Microalgae: a green source of renewable H_2 [J]. *TIBTECH*, 2000, 18: 506-511.
- [3] Melis A, Zhang L P, Forestier M, et al. Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Plant Physiol*, 2000, 122: 127-135.
- [4] Zhang L P, Happe T, Melis A. Biochemical and morphological characterization of sulfur deprived and hydrogen producing *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Planta*, 2002, 214: 552-561.
- [5] Kessler E. Hydrogenase, photoreduction and anaerobic growth of algae[A]. Stewart WDP (ed). *Algal Physiology and Biochemistry*[C]. London: Blackwell, 1974. 456-473.
- [6] Gaffron H, Rubin J. Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae[J]. *J Gen Physiol*, 1942, 26: 219-240.
- [7] Schnackenberg J, Ikemoto H, Miyachi S. Photosynthesis and hydrogen evolution under stress conditions in a CO_2 -tolerant marine green alga, *Chlorococcum littorale*[J]. *J Photochem Photobiol*, 1996, 34: 59-62.
- [8] Courmac L, Mus F, Bernard L, et al. Limiting steps of

- hydrogen production in *Chlamydomonas reinhardtii* and *Synechocystis* PCC 6803 as analysed by light – induced gas exchange transients[J]. **Inter J Hydrogen Energy**, 2002, 27: 1 229 – 1 237.
- [9] Melis A ,Happe T. Hydrogen production. Green algae as a Source of energy[J]. **Plant physiol**, 2001, 127: 740 – 748 .
- [10] Happe T, Mosler B, Naber J D. Induction , localization and metal content of hydrogenase in green alga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. **Eur J Biochem**, 1994, 222: 769 – 776.

Studies of photo – hydrogen evolution by four marine green microalgae

GUAN Ying – fu , DENG Mai – cun , YU Xing – ju , JIN Mei – fang, ZHANG Wei

(Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023 , China)

Received May 26 ,2003

Key words: marine green microalgae ;sulfur – deficient ; hydrogen ; illumination

Abstract: The characters of hydrogen evolution by *Tetraselmis* sp., *Nannochloropsis oculata*, *Chlorella vulgaris* and *Platymonas subcordiformis* are distinct. In dark and anaerobic stage, no hydrogen was evolved by *Tetraselmis* sp. and *Nannochloropsis oculata*, and tiny amount of hydrogen was evolved by *Chlorella vulgaris* and *Platymonas subcordiformis*. In photo – hydrogen production stage, all of the four algal strains evolved hydrogen in natural seawater. No hydrogen was evolved by *Tetraselmis* sp. and *Chlorella vulgaris* in sulfur – deficiency seawater, less hydrogen was evolved by *Nannochloropsis oculata* in sulfur – deficiency seawater than that of in natural seawater About ten – folds of hydrogen was evolved by *Platymonas subcordiformis* in sulfur – deficiency seawater than that of in natural seawater. There are different effects on photo – hydrogen production by uncoupler CCCP (carbonyl cyanide m – chlorophenylhydrazone) in the four algae and the possible limiting step was suggested.

(本文编辑 张培新)