

文章编号: 1674 - 5566(2016)03 - 0406 - 09

DOI:10.12024/jsou.20151101606

盐度-光照强度-温度对小环藻 *Cyclotella* sp. SHOU-B108 生长及 ARA 和 EPA 含量的影响

蔡 敬¹, 王星宇¹, 曾蓓蓓¹, 黄旭雄^{1,2,3}, 穆亮亮¹, 危立坤¹

(1. 上海海洋大学 农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306; 2. 上海市水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306; 3. 水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心, 上海 201306)

摘 要: 采用 $L_9(3^4)$ 正交实验法, 研究了盐度(3、6、9)、光照强度[20、40、60 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$]和温度(10、20、30 $^{\circ}\text{C}$)3 因素对半咸水小环藻(*Cyclotella* sp.) SHOU-B108 生长及细胞中 ARA 和 EPA 含量的影响。结果表明: 培养 10 d 后小环藻在盐度 6、光照强度 40 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 和温度 30 $^{\circ}\text{C}$ 组具有最大生物量(干重)。盐度、光照强度和温度对小环藻细胞 ARA 和 EPA 含量的影响均有显著的交互作用, 但温度是影响藻细胞 ARA 和 EPA 含量的主要因素。低的盐度(3)和高的温度(30 $^{\circ}\text{C}$)有利于小环藻细胞积累 ARA; 而高的光照强度[60 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$]则有利于细胞积累 EPA。本研究表明环境因子对小环藻细胞中不同的脂肪酸会产生不同的诱导效应, 通过调控小环藻的培养条件, 能够获得特定营养物质含量丰富的饵料微藻。

关键词: 小环藻; 盐度; 光照强度; 温度; 花生四烯酸; 二十碳五烯酸

中图分类号: Q 949.2 **文献标志码:** A

微藻作为水域初级生产者的主要组成部分, 具有分布广泛、种类繁多、生长快速和营养丰富等优点, 是水体中有机物和能量的主要提供者^[1]。在水产养殖中, 硅藻门(Bacillariophyta) 种类通常被视为虾、蟹、贝类等无脊椎动物幼体的优质开口饵料, 因硅藻细胞通常含有高水平二十碳五烯酸(20:5n-3, eicosapentaenoic acid, EPA) 等高不饱和脂肪酸^[2], 这些高不饱和脂肪酸是海洋动物发育和存活的必需脂肪酸。研究表明, 海洋动物中的高不饱和脂肪酸主要由微藻合成并通过食物链向高营养级进行传递^[3]。

小环藻(*Cyclotella* sp.) 隶属于硅藻门(Bacillariophyta)、中心纲(Centriales)、圆筛藻目(Coscinodiscales)、圆筛藻科(Coscinodiscus)、小环藻属(*Cyclotella*), 在淡水、半咸水及海水中通常是季节性的优势种, 且在中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*) 蚤状幼体^[4]、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)^[5]和大型蚤(*Daphnia magna*)^[6]的培

养中具有很好的应用效果。小环藻 *Cyclotella* sp. SHOU-B108 是一株从河口地区半咸水池塘中分离得到的硅藻, 其细胞富含 EPA 和花生四烯酸(20:4n-6, arachidonic acid, ARA) 等高不饱和脂肪酸^[7], 具有较高的潜在开发价值。有关环境因子对小环藻生长的影响已有报道。如曾蓓蓓等^[7]采用单因子实验方法, 获得小环藻 SHOU-B108 的最适宜生长温度、盐度和光照强度分别为 20.6 $^{\circ}\text{C}$ 、6.1 和 40.2 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。曾艳艺和黄翔鹤^[8]的研究结果表明温度和光照对小环藻生长有极显著影响。王珺等^[9]筛选出微小环藻(*Cyclotella caspia*) 的最适温度、最适光照、最适盐度、最适 pH 和氮、磷、铁、硅等营养液配方。覃宝利等^[10]发现梅尼小环藻(*Cyclotella meneghiniana*) 在恒温条件下的生长显著优于波动温度下的生长。环境因子对小环藻细胞组成的影响研究仅见温度和光照对小环藻细胞叶绿素及温度变化对细胞多糖的影响^[8,10]。微藻脂肪

收稿日期: 2015-11-24 修回日期: 2016-02-27

基金项目: 上海市科技兴农项目[沪农科推字(2013)第 2-1 号]; 上海市科技兴农项目[沪农科攻字(2015)第 1-2 号]; 国家海洋局项目(SHME2011SW02)

作者简介: 蔡 敬(1992—), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产动物营养与生物饵料。E-mail: 190458130@qq.com

通信作者: 黄旭雄, E-mail: xxhuang@shou.edu.cn

酸组成是影响其饵料价值的重要因素。微藻的脂肪含量和脂肪酸组成也可随环境因子(如营养盐组成、生长因子、温度和 pH 等)改变而变化^[11]。然而,关于环境因子对小环藻细胞高不饱和脂肪酸的影响研究较少,本研究采用正交实验法,研究盐度、光照强度和温度 3 因素组合对小环藻 SHOU-B108 生长及 ARA 和 EPA 含量的影响,以期优化小环藻 SHOU-B108 培养条件,为更合理地开发应用小环藻 SHOU-B108 积累基础数据。

1 材料与方法

1.1 藻种来源及培养

实验用小环藻 (*Cyclotella* sp.) SHOU-B108 来自于上海海洋大学生物饵料藻种室。采用 f/2 配方培养液^[12]进行逐级扩大培养。培养的温度、光照强度和盐度条件分别为 20.6 °C、40.2 μmol/(m²·s) 和 6.1。

1.2 正交实验设计

设计盐度(3、6、9)、光照强度[20、40、60 μmol/(m²·s)]和温度(10、20、30 °C)3 因素 3 水平的正交实验(表 1),实验共 9 组(简述为组 1,组 2,组 3,组 4,组 5,组 6,组 7,组 8,组 9),每组设置 3 个平行。将扩大培养后的藻液接种于 1 000 mL 三角烧瓶中培养,用海水晶调节不同盐度并采用 f/2 培养液培养,初始接种密度为 1.0 × 10⁶ cells/mL,置于光照培养箱内培养。培养周期为 10 d,每天定时摇瓶 3 次。

表 1 正交实验设计表

Tab. 1 L₉(3⁴) orthogonal test used for the study

实验组 treatments No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
盐度 salinity	3	3	3	6	6	6	9	9	9
光照强度 /[μmol/(m ² ·s)] light intensity	20	40	60	20	40	60	20	40	60
温度/°C temperature	10	20	30	20	30	10	30	10	20

1.3 生物量干重及 ARA 和 EPA 含量的测定

培养过程中隔天(第 2、4、6、8 和 10 天)取藻液 30 mL 经 0.45 μm 滤膜(半岛,上海)抽滤,滤膜经恒温鼓风干燥箱(DHG9240A,上海)烘干后称量恒重测定其生物量干重。

细胞脂肪酸组成的测定参照 GRIFFITHS

等^[13]的方法,移取一定量藻液经冷冻离心(5 000 r/min, 3 min)后依次加入甲醇钠(NaOMe, 0.5 mol/L)和 BF₃-甲醇溶液(14%)进行两步甲酯化,提取出含有脂肪酸甲酯的正己烷-甲苯混合物,转移至进样瓶。然后采用气-质联用仪(Agilent 7890A/5975C)分析脂肪酸甲酯,毛细管柱为 Supelco Omegawax320 (30.0 m × 0.32 mm × 0.25 μm)。根据脂肪酸标准品(Sigma, 美国)的分析图谱和保留时间对样品脂肪酸进行定性分析,利用峰面积归一化法计算各脂肪酸的相对百分含量^[14],每组样品平行测量 3 次。

1.4 数据分析和处理

结果以平均值 ± 标准差表示,采用 PASW Statistics 18.0 软件进行单因素和多因素方差分析和 Duncan 氏多重比较,并对 3 因素不同水平均值求算估计边际均值和两两比较分析,以 P < 0.05 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 盐度-光照强度-温度对小环藻 SHOU-B108 生物量干重的影响

不同盐度-光照强度-温度对小环藻生物量干重有显著影响(P < 0.05),纵观实验期间,组 2 [3, 40 μmol/(m²·s), 20 °C]、组 3 [3, 60 μmol/(m²·s), 30 °C]、组 5 [6, 40 μmol/(m²·s), 30 °C]和组 9 [9, 60 μmol/(m²·s), 20 °C]的生物量干重一直较高(图 1)。但不同培养阶段,最大生物量出现在不同的实验组。组 9 在培养第 2、4 和 8 天收获的生物量干重均显著高于其他组(P < 0.05);培养第 6 天,组 2 收获的生物量干重最大;培养结束时(第 10 天),组 5 收获的生物量干重最大(0.250 9 g/L),显著高于其他组(P < 0.05),其次为组 9、组 3 和组 2(图 1)。

2.2 盐度-光照强度-温度对小环藻 SHOU-B108 的 ARA 和 EPA 含量的影响

不同盐度-光照强度-温度组合条件下小环藻的 ARA 含量有显著变化。培养至第 4 天时,组 3 的 ARA 含量显著高于其他组(P < 0.05);培养至第 6 天时,组 5 的 ARA 含量显著高于其他组(P < 0.05);培养第 8 天和第 10 天时,组 2 的 ARA 含量最高(表 2)。不同培养条件下藻细胞 ARA 含量随着培养时间的延长呈现不同的变化,组 2、组 5 随培养时间的延长其细胞 ARA 含量逐

渐增加,组 1、组 6 和组 8 则出现相反的趋势。(6.43% ± 0.38%),见表 2。
ARA 含量最大值出现在培养 10 d 的组 2

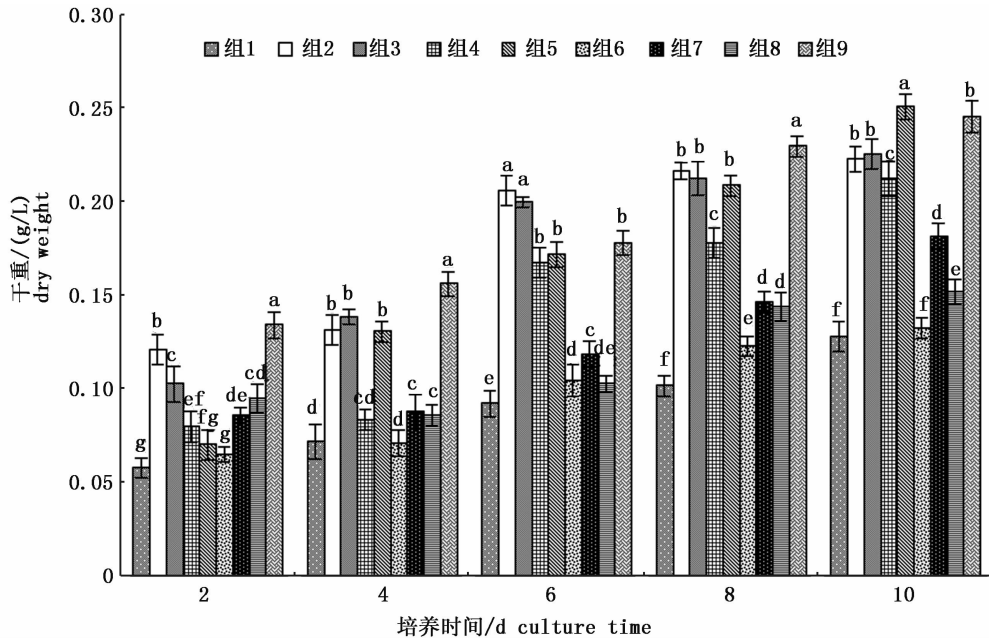


图 1 不同培养时间下盐度-光照强度-温度对小环藻 SHOU-B108 生物量干重的影响

Fig. 1 Effect of salinity-light intensity-temperature on the dry weight of *Cyclotella* sp. SHOU-B108 at different culture time

上标不同小写字母表示同一时刻不同实验组之间存在显著差异 ($P < 0.05$)。

The column super-marked with different letters means significant difference among the treatments at the same time ($P < 0.05$).

小环藻的 EPA 含量受盐度、光照强度和温度 3 因素影响显著。培养第 4 天,组 1 [3, 20 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 10 $^{\circ}\text{C}$] 和组 6 [6, 60 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 10 $^{\circ}\text{C}$] 的 EPA 含量显著高于其他组 ($P < 0.05$); 培养第 6 天,组 1、组 6 和组 8 [9, 40 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 10 $^{\circ}\text{C}$] 的 EPA 含量均显著高于其他组 ($P < 0.05$); 培养第 8 天,组 6 的 EPA 含量显著高于其他组 ($P < 0.05$); 培养第 10 天,组 2 的 EPA 含量达到最高,且显著高于同期的其他组 ($P < 0.05$)。不同培养条件下藻细胞 EPA 含量随着培养时间的延长呈现不同的变化,实验期间,细胞 EPA 含量的最大值出现在第 4 天的组 6,占总脂肪酸的 18.36% (表 2)。

根据 3 因素水平下小环藻 ARA 含量的方差

分析,不同培养阶段盐度、光照强度和温度对小环藻的 ARA 含量均有显著或极显著的交互作用。各培养阶段温度始终对小环藻的 ARA 含量有极显著的影响 ($P < 0.01$)。第 2 天时,光照强度是影响细胞 ARA 含量的最主要因素;第 4、6、8 和 10 天时,温度是影响细胞 ARA 含量的最主要因素 (表 3)。

对 3 因素水平下小环藻的 EPA 含量进行方差分析,结果表明,第 4、8 和 10 天盐度、光照强度和温度对 EPA 含量的影响有极显著的交互作用。培养温度始终对小环藻的 EPA 含量有极显著的影响 ($P < 0.01$),且是影响细胞 EPA 含量的主要因素。培养液盐度仅在培养前期 (第 2、4 和 6 天) 对小环藻的 EPA 含量有极显著影响 (表 3)。

表2 不同培养时间下盐度-光强-温度对小环藻 SHOU-B108 的 ARA 和 EPA 含量的影响
 Tab.2 Effects of salinity-light intensity-temperature on ARA and EPA contents in *Cyclotella* sp.

		SHOU-B108 at different culture time					%
实验组 treatments No.	培养时间/d culture time						
	2	4	6	8	10		
ARA							
1	2.39 ± 0.24 ^{bcA}	1.58 ± 0.08 ^{dB}	0.79 ± 0.03 ^{cC}	0.55 ± 0.05 ^{dD}	0.35 ± 0.06 ^{dE}		
2	1.85 ± 0.17 ^{deE}	3.19 ± 0.22 ^{cD}	3.78 ± 0.32 ^{bcC}	5.06 ± 0.40 ^{abB}	6.43 ± 0.38 ^{aA}		
3	3.34 ± 0.17 ^{aB}	5.54 ± 0.2 ^{aA}	3.85 ± 0.29 ^{bcB}	4.93 ± 0.8 ^{abA}	5.09 ± 0.71 ^{bA}		
4	2.25 ± 0.00 ^{cC}	3.26 ± 0.1 ^{cA}	2.19 ± 0.18 ^{dC}	2.74 ± 0.31 ^{dB}	3.17 ± 0.38 ^{cA}		
5	2.58 ± 0.94 ^{abcC}	4.2 ± 0.2 ^{bB}	4.44 ± 0.11 ^{aB}	4.43 ± 0.14 ^{abcB}	5.77 ± 0.63 ^{bA}		
6	1.96 ± 0.15 ^{cdA}	1.3 ± 0.15 ^{deB}	0.63 ± 0.04 ^{cC}	0.53 ± 0.16 ^{cC}	0.33 ± 0.06 ^{dD}		
7	3.14 ± 0.58 ^{abC}	4.51 ± 0.32 ^{bB}	3.96 ± 0.12 ^{bB}	4.10 ± 0.17 ^{bcB}	5.39 ± 0.3 ^{bA}		
8	1.27 ± 0.13 ^{dA}	0.85 ± 0.18 ^{eB}	0.66 ± 0.05 ^{cC}	0.33 ± 0.03 ^{dD}	0.23 ± 0.04 ^{dD}		
9	1.29 ± 0.1 ^{dB}	1.4 ± 0.92 ^{deB}	3.49 ± 0.35 ^{cA}	3.63 ± 0.67 ^{cA}	3.49 ± 0.75 ^{cA}		
EPA							
1	15.93 ± 0.07 ^{aA}	16.56 ± 0.17 ^{aA}	13.97 ± 0.61 ^{aB}	11.89 ± 0.32 ^{bcC}	8.81 ± 0.48 ^{deD}		
2	8.76 ± 0.61 ^{deC}	10.47 ± 0.45 ^{deB}	9.09 ± 0.39 ^{cC}	10.84 ± 0.81 ^{bcB}	13.65 ± 0.66 ^{aA}		
3	8.41 ± 0.17 ^{efBC}	10.29 ± 1.17 ^{deA}	7.62 ± 0.29 ^{cC}	9.01 ± 0.78 ^{deB}	9.43 ± 0.23 ^{cdB}		
4	10.72 ± 0.00 ^{eB}	14.64 ± 0.25 ^{bA}	8.88 ± 0.76 ^{cC}	10.04 ± 0.52 ^{cdB}	10.52 ± 0.47 ^{bcB}		
5	13.63 ± 1.94 ^{bA}	8.75 ± 0.13 ^{eB}	7.86 ± 0.36 ^{eB}	7.61 ± 0.34 ^{dB}	8.01 ± 0.67 ^{eB}		
6	14.7 ± 0.37 ^{bB}	18.36 ± 1.00 ^{aA}	13.15 ± 0.59 ^{aC}	13.30 ± 0.64 ^{aC}	11.46 ± 0.74 ^{bD}		
7	9.84 ± 0.41 ^{cdB}	11.75 ± 0.71 ^{cdA}	8.40 ± 0.35 ^{cC}	8.43 ± 0.16 ^{cdC}	8.43 ± 0.50 ^{deC}		
8	10.41 ± 1.57 ^{cdB}	12.94 ± 3.17 ^{bcAB}	14.25 ± 2.20 ^{aA}	10.76 ± 0.51 ^{bcB}	10.34 ± 0.94 ^{bcB}		
9	6.97 ± 0.13 ^{dB}	10.34 ± 0.38 ^{deA}	11.41 ± 0.59 ^{bA}	10.41 ± 0.64 ^{cA}	10.88 ± 1.16 ^{bA}		

注:同一列数据上标不同小写字母表示不同实验组之间差异显著($P < 0.05$);同一行数据上标不同大写字母表示不同培养时间之间差异显著($P < 0.05$)。

Note: the data in the same column super-marked with different letters mean significant difference among the treatments ($P < 0.05$); The data in the same line super-marked with different capital letters mean significant difference among different culture time ($P < 0.05$).

表3 不同培养时间下3因素对小环藻 SHOU-B108 的 ARA 和 EPA 含量影响的方差分析
 Tab.3 Analysis of variance for the effect of three factors (salinity-light intensity-temperature) on ARA and EPA contents in *Cyclotella* sp. SHOU-B108 at different culture time

脂肪酸 fatty acids	来源 source	F_{2d}	F_{4d}	F_{6d}	F_{8d}	F_{10d}	df	$F\alpha$
ARA	重复 repeat	0.23	0.62	1.94	1.51	1.99	2.00	$F_{0.05(2,18)} = 3.55$
	处理 treatment	7.87	34.14	202.12	86.62	137.34	8.00	$F_{0.01(8,18)} = 3.71$
	盐度 salinity	5.69*	12.95**	9.71**	17.84**	17.31**	2.00	$F_{0.01(2,18)} = 6.01$
	光强 light intensity	10.64**	1.68	25.25**	11.61**	30.02**	2.00	$F_{0.05(2,16)} = 3.63$
	温度 temperature	7.17**	115.19**	742.46**	311.54**	476.54**	2.00	$F_{0.01(8,16)} = 3.89$
	误差 D error D	61.24**	23.90**	31.06**	5.50*	25.47**	2.00	$F_{0.01(2,16)} = 6.23$
EPA	重复 repeat	1.32	0.84	3.00	0.08	1.39	2.00	$F_{0.05(2,18)} = 3.55$
	处理 treatment	54.97	21.39	34.52	33.94	26.54	8.00	$F_{0.01(8,18)} = 3.71$
	盐度 salinity	77.74**	7.95**	7.73**	4.29*	4.22*	2.00	$F_{0.01(2,18)} = 6.01$
	光强 light intensity	37.58**	20.32**	0.47	11.83**	16.37**	2.00	$F_{0.05(2,16)} = 3.63$
	温度 temperature	100.98**	53.12**	126.46**	110.54**	60.87**	2.00	$F_{0.01(8,16)} = 3.89$
	误差 D error D	5.30*	6.93**	3.42	9.09**	24.69**	2.00	$F_{0.01(2,16)} = 6.23$

注: *表示差异显著($0.01 < P < 0.05$); **表示差异极显著($P < 0.01$)。

Note: The data super-marked with * means the significance is $0.01 < P < 0.05$ and data with ** means the significance is $P < 0.01$.

根据3因素不同水平的估计边际均值和两两比较分析,在培养第2和4天时小环藻积累ARA含量的最佳盐度-光照强度-温度组合是[3, 20 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 30 $^{\circ}\text{C}$];在培养6、8和10 d时

积累ARA含量的最佳盐度-光照强度-温度组合是[3, 40 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 30 $^{\circ}\text{C}$],见表4。此结果表明低的盐度和高的温度始终有利于小环藻细胞积累ARA。小环藻积累EPA的最适培养盐度-

光照强度-温度也随培养时间不同而有所差异,在培养第 2、4 和 6 天时小环藻积累 EPA 含量的最佳盐度-光照强度-温度组合是[9,60 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$],30 $^{\circ}\text{C}$];在培养第 8 天时小环藻积累 EPA 含

量的最佳盐度-光照强度-温度组合是[3,60 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,10 $^{\circ}\text{C}$];在培养第 10 天时小环藻积累 EPA 含量的最佳盐度-光照强度-温度组合是[9,60 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,20 $^{\circ}\text{C}$],见表 4。

表 4 3 因素不同水平均值的估计边际均值和两两比较分析

Tab. 4 Estimated marginal means and pairwise comparisons of means of different levels of the three factors

脂肪酸/% fatty acid	培养时间/d culture time	各因素水平均值 means of different levels of each factor									标准误 Std. error
		盐度 salinity			光照强度/[$\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] light intensity			温度/ $^{\circ}\text{C}$ temperature			
		3	6	9	20	40	60	10	20	30	
ARA	2	2.52 ^a	2.26 ^{ab}	1.90 ^c	2.59 ^a	1.90 ^b	2.20 ^b	1.88 ^b	1.80 ^b	3.02 ^a	0.129
	4	3.43 ^a	2.92 ^b	2.25 ^c	3.12 ^a	2.75 ^a	2.75 ^a	1.24 ^c	2.61 ^b	4.75 ^a	0.161
	6	2.81 ^a	2.42 ^a	2.70 ^a	2.32 ^b	2.96 ^a	2.65 ^{ab}	0.69 ^c	3.15 ^b	4.08 ^a	0.130
	8	3.51 ^a	2.57 ^b	2.69 ^b	2.46 ^b	3.27 ^a	3.02 ^a	0.47 ^c	3.81 ^b	4.49 ^a	0.149
	10	3.96 ^a	3.09 ^b	3.03 ^b	2.97 ^b	4.14 ^a	2.97 ^b	0.30 ^c	4.36 ^b	5.42 ^a	0.233
EPA	2	7.57 ^b	9.30 ^b	12.73 ^a	7.58 ^b	9.85 ^{ab}	12.16 ^a	8.59 ^b	8.34 ^b	12.66 ^a	1.124
	4	7.78 ^b	11.80 ^a	12.95 ^a	6.52 ^b	11.69 ^a	14.31 ^a	11.11 ^a	9.55 ^a	11.87 ^a	1.252
	6	6.92 ^a	8.53 ^a	9.80 ^a	5.77 ^b	9.06 ^a	10.42 ^a	7.46 ^a	7.97 ^a	9.82 ^a	1.073
	8	10.58 ^a	10.32 ^b	9.87 ^b	10.12 ^b	9.74 ^b	10.91 ^a	11.98 ^a	10.43 ^b	8.35 ^c	0.227
	10	10.63 ^a	10.00 ^a	9.88 ^a	9.25 ^b	10.67 ^a	10.59 ^a	10.21 ^b	11.69 ^a	8.62 ^c	0.363

注:同一行同一因素数据上标不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Note: The data of the same factor in the same line super-marked with different letters mean significant difference among the treatments($P < 0.05$).

3 讨论

3.1 盐度-光照强度-温度对小环藻 SHOU-B108 生长的影响

温度、盐度和光照条件等环境因素可影响微藻细胞的生长和生化组成,而不同藻种的最适生长温度、盐度和光照条件存在一定差异^[12]。光照是影响微藻生长繁殖的重要生态因子之一,光照强度直接影响微藻的光合作用速率。藻类对光照强度有一个饱和点,低于饱和点,随着光照强度增加,微藻光合速率加快;超过饱和点会产生光抑制作用,导致生物量降低^[15]。光照也是微藻细胞内重要的信号源,影响微藻对环境的适应行为^[16]。FIGUEROA 等^[17]证实温度和光照强度会同时影响微藻光合作用相关酶的活性和光合作用的过程,进而影响营养物质的吸收利用效率及藻细胞分裂周期等。在大多数藻细胞中,光合作用、硅酸盐的利用速度、细胞内酸碱平衡的调节及氨基酸的合成均需要钠离子的参与,因此,盐度的变化会引起微藻细胞渗透压的变化并且影响微藻细胞光合作用中电子转移,从而影响微藻细胞的生长^[18-19]。曾蓓蓓等^[7]采用单因子试验方法,获得小环藻 SHOU-B108 的最适宜生长温度、盐度和光照强度分别为 20.6 $^{\circ}\text{C}$ 、6.1 和

40.2 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。本实验中,采用正交实验法,培养至第 10 天小环藻在盐度 6、光照强度 40 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 和温度 30 $^{\circ}\text{C}$ 组收获生物量干重最高(0.2509 g/L)。单因子试验和正交试验得到的结果并不完全一致,表明影响藻类生长的温度、盐度和光照强度等因子之间存在交互作用。类似的结果在其他藻类,如鼠尾藻(*Sargassum thunbergii*)^[20]、旋链角毛藻(*Chaetoceros curvisetus*)^[21]和两栖盖丝藻(*Geitlerinema amphibium*)^[22]中也得到了证实。

3.2 盐度-光照强度-温度对小环藻 SHOU-B108 的 ARA 和 EPA 含量的影响

微藻的油脂积累及脂肪酸组成与环境因子(温度、光照强度、盐度等)有密切关系,且环境因子对微藻合成高不饱和脂肪酸的影响具有种间差异性。温度对不同种类微藻脂肪酸组成的影响相对有较高的共性,通常高温会引起微藻细胞饱和脂肪酸(SFA)含量的增加,多不饱和脂肪酸(PUFA)含量的下降,低温会诱导藻细胞大量合成不饱和脂肪酸以维持膜流动性和正常生理功能^[23-24],而高温时 SFA 含量的增加被认为是维持细胞膜完整性的一种策略^[23,25]。RENAUD 等^[26]对角毛藻(*Chaetoceros* sp.)、红细胞藻(*Rhodomonas* sp.)和隐藻(*Cryptomonas* sp.)的研

究发现,在较高的生长温度下,5种微藻的 EPA 占总脂肪酸的比例都较低。李文权等^[27]的研究结果表明,随着培养温度上升,球等鞭金藻 (*Isochrysis galbana*) 和三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricorutum*) 的不饱和脂肪酸百分含量下降。本研究中,各培养阶段温度始终对小环藻的 ARA 和 EPA 含量有极显著的影响,是影响藻细胞 ARA 和 EPA 含量的主要因素。总体上高温有利于小环藻细胞积累更多的 ARA。培养前期(第 1~6 天)藻细胞 EPA 含量在高温组较高,在培养后期(第 8~10 天)表现为高温组 EPA 含量较低,与上述研究结果相似。表明温度对小环藻细胞 EPA 含量的影响还与培养阶段有关。高温有利于细胞蓄积更多的 ARA 的现象或许与 ARA 有助于细胞增加抗高温胁迫的生理作用有关。研究表明,生活于热带的海洋生物通常比温带的海洋生物含有更高的 ARA 水平。AZACHI 等^[28]认为盐度的变化能够影响微藻细胞的 β -酮脂酰-CoA 合成酶 (β -ketoacyl-coenzyme A (CoA) synthases (Kcs)) 和脂肪酸去饱和酶的合成。盐度还会影响微藻的光合作用和呼吸作用的电子传递系统,从而影响细胞脂肪酸的合成。研究表明,低盐度条件有利于绿色巴夫藻 (*Pavlova viridid*) 合成 PUFA(n-3) 及 EPA^[29]。4 株海水小球藻的 EPA 含量均在低盐度(16)时达到最大值^[30]。本研究中 ARA 含量的变化也具有相似的结果,即低盐度有助于小环藻细胞 ARA 含量的增加。然而从细胞 EPA 含量看,培养前期在高盐度(9)条件下更有利细胞 EPA 的蓄积,到了培养末期,低盐度(3)下小环藻细胞的 EPA 含量较高。表明盐度对小环藻 EPA 的影响与培养阶段有关。而 TESHIMA 等^[31]报道了一种海水小球藻 (*C. saccharophial*) 在盐度 4~30 之间变化时并未引起脂肪酸组成的变化。微绿球藻 (*Nannochloropsis oculata*) EPA 含量在盐度处于 14.5~33.5 之间无显著变化^[32]。而事实上海水小球藻 (*Cyclotella* sp.) 和眼点拟微球藻 (*Nannochloropsis* sp.) 对盐度的适应范围都很广。因此,上述研究结果表明盐度对微藻细胞脂肪酸的影响具有种间差异性,影响规律也与培养条件的选择有关。

光照可调节藻细胞代谢,因此藻细胞的脂肪酸组成也受光照条件的影响而产生变化。光照通过一系列铁氧还原蛋白和硫氧还原蛋白参与

的信号转导,激活质体中的乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACCCase),诱导 ACCCase 酶调节脂肪酸的合成。低光照强度可以促进极性脂合成,尤其是与叶绿体连接的极性膜脂,而高光照强度会增加中性脂含量^[33]。此外,尽管光照强度过高很容易导致多不饱和脂肪酸的氧化损伤,但是会促进 SFA 和单不饱和脂肪酸 (MUFA) 的合成^[34]。THOMPSON 等^[35]认为大多数海水微藻在低光照强度下合成高水平 EPA,而 DHA 含量通常会随着光照强度升高而增加^[36]。曹春晖等^[37]也发现 2 株小球藻 (*Chlorella* sp.) 的 EPA 含量随光照强度增加而明显降低,4 株绿藻的 ARA 含量和 PUFA 总量均随光照强度的增加而降低。蒋霞敏^[38]报道在 1 000~7 000 lx 光照范围内微绿球藻 EPA 含量随光照强度升高而降低。本实验中光照强度对小环藻细胞 ARA 和 EPA 含量存在不同的诱导效果,高的光照强度 [$60 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] 始终有利于细胞积累 EPA;较低的光照强度则有利于细胞积累 ARA,而且在培养前期效果更明显。上述研究结果也再次表明,环境因子对微藻细胞脂肪酸组成的影响具有种间差异性和脂肪酸差异性,推测这种差异性与微藻对环境的适应能力及实验参数的选择有关。

综上所述,有利于小环藻生物量生长的盐度-光照强度-温度组合条件与有利于藻细胞积累 ARA 或 EPA 含量的组合条件并不完全一致。小环藻在盐度 6,光照强度 $40 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 和温度 30°C 组收获生物量干重最高;但低的盐度(3)和高的温度 (30°C) 始终有利于小环藻 SHOU-B108 细胞积累 ARA,而高的光照强度 [$60 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] 则始终有利于细胞积累 EPA。通过选择特定的培养条件,可以按需获得特定营养物质含量高的小环藻细胞。

参考文献:

- [1] 李荷芳,周汉秋. 海洋微藻脂肪酸组成的比较研究[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(1): 34-40.
LI H F, ZHOU H Q. Comparative studies on fatty acid composition of marine microalgae [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1999, 30(1): 34-40.
- [2] YONGMANITCHAI W, WARD O P. Screening of algae for potential alternative sources of eicosapentaenoic acid [J]. Phytochemistry, 1991, 30(9): 2963-2967.
- [3] DALSGAARD J, JOHN M S, KATTNER G, et al. Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment [J].

- Advances in Marine Biology, 2003, 46: 225 – 340.
- [4] 尹绍武, 王德安. 饵料对河蟹溞状幼体变态发育的影响[J]. 生态学报, 2003, 23(4): 725 – 730.
YIN S W, WANG D A. The effects of different diet on metamorphosis and development of *Eriocheirsinensis* zoeae larvae[J]. Acta Ecologica Sinica, 2003, 23(4): 725 – 730.
- [5] 黄光华, 江林源, 卢小花, 等. 小环藻在罗氏沼虾人工育苗中的应用研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(13): 7849 – 7850, 7853.
HUANG G H, JIANG L Y, LU X H, et al. Study on the application of *Cyclotella* sp. in the artificial breeding of *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2011, 39(13): 7849 – 7850, 7853.
- [6] 史文, 刘其根, 吴晶, 等. 不同藻类对大型溞存活和生殖的影响[J]. 生态学杂志, 2009, 28(6): 1128 – 1133.
SHI W, LIU Q G, WU J, et al. Effects of different algae on the survival and reproduction of *Daphnia magna* [J]. Chinese Journal of Ecology, 2009, 28(6): 1128 – 1133.
- [7] 曾蓓蓓, 黄旭雄, 危立坤, 等. 3种半咸水硅藻的适宜培养条件及其细胞生化成分[J]. 海洋渔业, 2014, 36(4): 320 – 328.
ZENG B B, HUANG X X, WEI L K, et al. Suitable culture conditions and cellular biochemical composition of three diatoms from brackish water[J]. Marine Fisheries, 2014, 36(4): 320 – 328.
- [8] 曾艳艺, 黄翔鹤. 温度、光照对小环藻生长和叶绿素 a 含量的影响[J]. 广东海洋大学学报, 2007, 27(6): 36 – 40.
ZENG Y Y, HUANG X H. Effects of temperature and illumination on growth and chlorophyll-a of *Cyclotella* sp. [J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2007, 27(6): 36 – 40.
- [9] 王珺, 赖秋明, 姚发壮, 等. 人工培养条件下环境因子对微小环藻生长的影响[J]. 海洋渔业, 2013, 35(2): 195 – 201.
WANG J, LAI Q M, YAO F Z, et al. Effects of ecological factors on the growth of *Cyclotellacaspia* under cultivated conditions[J]. Marine Fisheries, 2013, 35(2): 195 – 201.
- [10] 覃宝利, 扬州, 张民. 温度波动对浮游藻类生长及多糖组成的影响[J]. 湖泊科学, 2014, 26(3): 432 – 440.
QIN B L, YANG Z, ZHANG M. The effect of temperature fluctuation on the growth and polysaccharide composition of phytoplankton[J]. Journal of Lake Sciences, 2014, 26(3): 432 – 440.
- [11] YONGMANITCHAI W, WARD O P. Growth of and omega – 3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricoratum* under different culture conditions[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57(2): 419 – 425.
- [12] 成永旭. 生物饵料培养学[M]. 2版. 北京: 中国农业出版社, 2005.
CHENG Y X. Live food cultivatology[M]. 2nd ed. Beijing: Chinese Agricultural Press, 2005.
- [13] GRIFFITHS M J, VAN HILLE R P, HARRISON S T L. Selection of direct transesterification as the preferred method for assay of fatty acid content of microalgae [J]. Lipids, 2010, 45(11): 1053 – 1060.
- [14] WEI L K, HUANG X X, HUANG Z Z, et al. Orthogonal test design for optimization of lipid accumulation and lipid property in *Nannochloropsis oculata* for biodiesel production [J]. Bioresource Technology, 2013, 147: 534 – 538.
- [15] 欧阳峥嵘, 温小斌, 耿亚红, 等. 光照强度、温度、pH、盐度对小球藻(*Chlorella*)光合作用的影响[J]. 武汉植物学研究, 2010, 28(1): 49 – 55.
OUYANG Z R, WEN X B, GENG Y H, et al. The effects of light intensities, temperatures, pH and salinities on photosynthesis of *Chlorella*[J]. Journal of Wuhan Botanical Research, 2010, 28(1): 49 – 55.
- [16] LEPETIT B, DIETZEL L. Light signaling in photosynthetic eukaryotes with ‘green’ and ‘red’ chloroplasts [J]. Environmental and Experimental Botany, 2015, 114: 30 – 47.
- [17] FIGUEROA FL, JIMÉNEZ C, LUBIÁN LM, et al. Effects of high irradiance and temperature on photosynthesis and photoinhibition in *Nannochloropsis gaditana* Lubián (Eustigmatophyceae) [J]. Journal of Plant Physiology, 1997, 151(1): 6 – 15.
- [18] MOHAN S V, DEVI M P. Salinity stress induced lipid synthesis to harness biodiesel during dual mode cultivation of mixotrophic microalgae[J]. Bioresource Technology, 2014, 165: 288 – 294.
- [19] KHATOON H, RAHMAN N A, BANERJEE S, et al. Effects of different salinities and pH on the growth and proximate composition of *Nannochloropsis* sp. and *Tetraselmis* sp. isolated from South China Sea cultured under control and natural condition [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2014, 95: 11 – 18.
- [20] 姜宏波, 田相利, 董双林, 等. 温度和光照强度对鼠尾藻生长和生化组成的影响[J]. 应用生态学报, 2009, 20(1): 185 – 189.
JIANG H B, TIAN X L, DONG S L, et al. Effects of temperature and light intensity on the growth and biochemical composition of *Sargassum thunbergii*[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2009, 20(1): 185 – 189.
- [21] 茅华, 许海, 刘兆普. 温度、光照、盐度及 pH 对旋链角毛藻生长的影响[J]. 生态科学, 2007, 26(5): 432 – 436.
MAO H, XU H, LIU Z P. Effects of water temperature, illumination, salinity and pH on the growth of *Chaetoceros curvisetus*[J]. Ecological Science, 2007, 26(5): 432 – 436.
- [22] JODŁOWSKA S, LATAŁA A. Combined effects of light and temperature on growth, photosynthesis, and pigment content in the mat-forming cyanobacterium *Geitlerinema amphibium* [J]. Photosynthetica, 2013, 51(2): 202 – 214.

- [23] JIANG Y, CHEN F. Effects of temperature and temperature shift on docosahexaenoic acid production by the marine microalga *Cryptocodinium cohnii* [J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2000, 77(6): 613-617.
- [24] LOS D A, MURATA N. Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2004, 1666(1/2): 142-157.
- [25] CHEN G Q, JIANG Y, CHEN F. Variation of lipid class composition in *Nitzschia laevis* as a response to growth temperature change [J]. Food Chemistry, 2008, 109(1): 88-94.
- [26] RENAUD S M, THINH L V, LAMBRINIDIS G, et al. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures [J]. Aquaculture, 2002, 211(1/4): 195-214.
- [27] 李文权, 李芊, 廖启斌, 等. 温度对四种海洋微藻脂肪酸组成的影响 [J]. 台湾海峡, 2003, 22(1): 9-13.
- LI W Q, LI Q, LIAO Q B, et al. Effect of temperature on fatty acid composition of four species of marine microalgae [J]. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 2003, 22(1): 9-13.
- [28] AZACHI M, SADKA A, FISHER M, et al. Salt induction of fatty acid elongase and membrane lipid modifications in the extreme halotolerant alga *Dunaliella salina* [J]. Plant Physiology, 2002, 129(3): 1320-1329.
- [29] 蒋霞敏, 柳敏海, 邢晨光. 不同生态条件对绿色巴夫藻生长与脂肪酸组成的影响 [J]. 水生生物学报, 2007, 31(1): 88-93.
- JIANG X M, LIU M H, XING C G. Effect of different ecological conditions on the growth and fatty acid composition of *Paulaviridis* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2007, 31(1): 88-93.
- [30] 冯雷, 郭永恩. 盐度对四株海洋绿藻总脂含量和脂肪酸组成的影响 [J]. 天津科技大学学报, 2009, 24(4): 22-24, 28.
- FENG L, GUO Y E. Effects of salinity on the total lipids contents and fatty acids composition of 4 strains of marine green algae [J]. Journal of Tianjin University of Science & Technology, 2009, 24(4): 22-24, 28.
- [31] TESHIMA S, YAMASAKI S, KANAZAWA A, et al. Effect of water temperature and salinity on eicosapentaenoic acid level of marine *Chlorella* [J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1983, 49(5): 805-807.
- [32] 吴瑞珊, 魏东. 盐度及其调节方式对眼点拟微球藻的生长和 EPA 积累的影响 [J]. 现代食品科技, 2007, 23(12): 5-8, 22.
- WU R S, WEI D. Effects of salinity and its regulation ways on growth and EPA accumulation of *Nannochloropsis oculata* [J]. Modern Food Science and Technology, 2007, 23(12): 5-8, 22.
- [33] KOZAKI A, KAMADA K, NAGANO Y, et al. Recombinant carboxyltransferase responsive to redox of pea plastidic acetyl-CoA carboxylase [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(14): 10702-10708.
- [34] GUSCHINA I A, HARWOOD J L. Algal lipids and effect of the environment on their biochemistry [M]//KAINZ M, BRETT M T, ARTS M T. Lipids in Aquatic Ecosystems. New York: Springer, 2009: 1-24.
- [35] THOMPSON P A, HARRISON P J, WHYTE J N C. Influence of irradiance on the fatty acid composition of phytoplankton [J]. Journal of Phycology, 1990, 26(2): 278-288.
- [36] SUKENIK A, CARMELI Y, BERNER T. Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. [J]. Journal of Phycology, 1989, 25(4): 686-692.
- [37] 曹春晖, 孙世春, 麦康森, 等. 光照强度对四株海洋绿藻总脂含量和脂肪酸组成的影响 [J]. 生态学报, 2010, 30(9): 2347-2353.
- CAO C H, SUN S C, MAI K S, et al. Effect of light intensity on the total lipid contents and fatty acid composition in 4 strains of marine green algae [J]. Acta Ecologica Sinica, 2010, 30(9): 2347-2353.
- [38] 蒋霞敏. 温度、光照、氮含量对微绿球藻生长及脂肪酸组成的影响 [J]. 海洋科学, 2002, 26(8): 9-13.
- JIANG M X. Effects of temperatures, light intensities and nitrogen concentrations on the growth and fatty acid compositions of *Nannochloropsis oculata* [J]. Marine Sciences, 2002, 26(8): 9-13.

Effects of salinity, light intensity and temperature on the growth, ARA and EPA contents in diatom *Cyclotella* sp. SHOU-B108

CAI Jing¹, WANG Xingyu¹, ZENG Beibei¹, HUANG Xuxiong^{1,2,3}, MU Liangliang¹, WEI Likun¹

(1. Key Laboratory of Freshwater Fishery Germplasm Resources, Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai 201306, China; 3. Aquatic Animal Genetic Breeding Center Collaborative Innovation Center in Shanghai, Shanghai 201306, China)

Abstract: Effects of different levels of factors including salinity (3, 6, 9), light intensity [$20, 40, 60 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] and temperature (10, 20, 30 °C) on the growth, ARA and EPA contents in diatom *Cyclotella* sp. SHOU-B108 were studied by orthogonal experiments. The results showed that the highest biomass (dry weight) of *Cyclotella* sp. was obtained in the treatment of salinity 6, light intensity $40 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ and temperature 30 °C on 10th day. There were significant interactions among salinity, light intensity and temperature on the ARA and EPA contents in *Cyclotella* sp. . Temperature was the main factor influencing the ARA and EPA contents of the diatom. Lower salinity (3) combined with higher temperature (30 °C) was beneficial to accumulating ARA but high light intensity ($60 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$) was beneficial for accumulating EPA in the cells of *Cyclotella* sp. . It is therefore suggested that different fatty acids in the cell display different reflections of the same environmental change, and *Cyclotella* sp. SHOU-B108 cells with specific high nutritional value could be harvested by optimizing the salinity-light intensity-culture temperature combinations.

Key words: *Cyclotella* sp. ; salinity; light intensity; temperature; ARA; EPA