

文章编号: 1674 - 5566(2014)02 - 0306 - 07

培养液铁离子浓度对单生卵囊藻和月牙藻细胞组成的影响

黄旭雄^{1,2,3}, 严佳琦¹, 黄征征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. 上海海洋大学 水产动物遗传育种中心, 上海 201306)

摘要: 研究了培养液中添加不同量柠檬酸铁(0、0.0039、0.039和0.39 mg/L)对单生卵囊藻(*Oocystis solitaria*)和月牙藻(*Selenastrum* sp.)细胞组成的影响。结果表明,单生卵囊藻和月牙藻分别在柠檬酸铁添加量为0.039 mg/L和0.39 mg/L时具有最大的蛋白、总糖、叶绿素 a 和类胡萝卜素含量。单生卵囊藻和月牙藻均在柠檬酸铁添加量为0.39 mg/L时具有最大的总脂肪含量,分别为13.76%和22.78%,比相应未添加铁组分别提高了318%和160%。单生卵囊藻富含18:3n3,月牙藻富含18:2n6。培养液中高的铁离子浓度诱导两种藻细胞合成更多的饱和脂肪酸。相比单生卵囊藻,月牙藻对培养液中高铁离子浓度的耐受力更强,更适合作为生物柴油的原料。

研究亮点: 微藻是具有潜在开发价值的重要微生物资源,铁是参与藻类基本生理功能的必需营养素。本文研究了培养液中不同铁离子浓度对单生卵囊藻和月牙藻细胞组成的影响,分析了高浓度铁影响藻细胞组成的生理机制,并评估了高浓度铁离子诱导下两种微藻作为生物柴油原料的开发潜力。

关键词: 单生卵囊藻;月牙藻;铁离子;生化组成;脂肪酸

中图分类号: TK 6

文献标志码: A

单生卵囊藻(*Oocystis solitaria*)隶属于绿藻纲(Chlorophyceae),绿球藻目(Chlorococcales),卵囊藻科(Oocystaceae),卵囊藻属(*Oocystis*),是夏季淡水池塘中常见微藻。目前国内外对单生卵囊藻的研究很少,刘彦等^[1]报道了单生卵囊藻对溶解无机碳(DIC)的利用及其对CaCO₃沉积影响的研究。严佳琦等^[2]报道了单生卵囊藻生长的适宜温度范围为35.9~40.5℃,适宜光照强度为46~70 mmol/(m²·s),是典型的耐高温种类。而月牙藻(*Selenastrum* sp.)隶属于绿藻纲,绿球藻目,月牙藻属(*Selenastrum*)。来自淡水的月牙藻(*S. capricornutum*)作为实验生物被广泛用于评估化学物质的毒性^[3-4]。月牙藻培养的适宜温度范围为29.7~32.8℃,适宜光照强度为17~54 mmol/(m²·s)^[2],在生态适应上也属于喜高温种类。因此,单生卵囊藻和月牙藻是适宜在室外封闭式光生物反应器中大量培养的种类。铁是微藻生长过程中必需的常量营养素,在光合

作用及呼吸作用的电子传递、还原硝酸盐及亚硝酸盐、还原硫酸盐、氮固定和解毒氧自由基等代谢过程中发挥重要功能^[5]。自然水体中铁元素的浓度常因季节和地域而出现巨大差异。LIU等^[6]研究表明培养液中高浓度铁能诱导小球藻(*Chlorella vulgaris*)细胞增加脂肪积累。在葡萄藻(*Botryococcus*)^[7]和斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)^[8]中也证实高铁离子浓度有利于藻细胞的脂肪积累。本文研究了培养液中柠檬酸铁浓度对单生卵囊藻和月牙藻细胞组成的影响,以期为该藻的进一步开发与应用积累基础数据。

1 材料与方法

1.1 藻种来源

试验用单生卵囊藻(*O. solitaria*)和月牙藻(*Selenastrum* sp.)藻株由上海海洋大学生物饵料研究室提供。藻株克隆采用不含硅的f/2配方^[9]淡水培养液进行扩种培养。

收稿日期: 2013-10-12 修回日期: 2013-12-17

基金项目: 国家海洋局项目(SHME2011SW02)

作者简介: 黄旭雄(1971—),男,博士,教授,研究方向为水产动物营养与生物饵料。E-mail: xxhuang@shou.edu.cn

1.2 实验设计

实验设 4 个铁添加量。将预先在不含铁及硅的 f/2 培养液中培养 7 d 的两种微藻分别离心收集藻泥,然后分别接种至柠檬酸铁质量浓度分别为 0、0.003 9 (f/2 配方铁浓度)、0.039 和 0.39 mg/L 的培养液中。各处理组设 3 平行。

1.3 微藻培养

微藻培养在恒温光照培养箱内进行,起始藻细胞接种浓度均为 1×10^6 cells/mL。光照周期 24 L:0 D,单生卵囊藻培养温度为 $(40 \pm 1)^\circ\text{C}$,光照强度 $60 \text{ mmol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$;月牙藻培养温度为 $(32 \pm 1)^\circ\text{C}$,光照强度 $20 \text{ mmol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。培养期间每天定时摇瓶。

1.4 微藻生长及细胞组成的检测

培养结束后离心收集藻细胞,经 -46°C 冷冻干燥后测定细胞干重,用于细胞组成的分析。色素含量测定采用分光光度法^[10];蛋白含量测定采用福林-酚法^[11];总糖含量测定采用苯酚-硫酸法^[12];总脂肪含量测定采用氯仿-甲醇法^[13]。提取的脂肪经氢氧化钾-甲醇溶液及苯-石油醚溶液处理后,提取脂肪酸甲酯在 HP-6890A 型气相色谱仪上分析^[2]。以 Sigma 脂肪酸混合标准品为参

照,归一化法计算脂肪酸的百分含量,每个样品测定 3 平行,取平均值。

1.5 数据处理和分析

结果以平均值 \pm 标准差表示,采用 PASW. Statistics. 18.0 软件进行方差分析并作 Duncan 氏多重比较, $P < 0.05$ 表示差异显著。参照 PILOTO-RODRÍGUEZ 等^[14]的方法,根据各处理脂肪酸组成预测脂肪酸甲酯的理论烷基值。

2 结果

2.1 培养液铁离子添加量对两种微藻细胞生化组成的影响

铁添加量对单生卵囊藻各类生化组成的影响见表 1。柠檬酸铁添加量为 0.039 mg/L 时,单生卵囊藻的蛋白、总糖、叶绿素 a 和类胡萝卜素含量最高,柠檬酸铁添加量为 0.39 mg/L 时,细胞脂肪含量最高。细胞叶绿素 b 含量随培养液铁离子浓度升高而降低。

月牙藻的总糖含量在柠檬酸铁添加量为 0.039 mg/L 时最高;蛋白、总脂肪和色素含量均随着铁离子添加量的增大而显著升高(表 2)。

表 1 培养液中铁添加量对单生卵囊藻细胞生化组成的影响

Tab. 1 Effect of iron supplementation in medium on the biochemical components of *O. solitaria*

FeC ₆ H ₅ O ₇ 添加量 / (mg/L)	蛋白含量 / %	总糖含量 / %	总脂含量 / %	叶绿素 a / %	叶绿素 b / %	类胡萝卜素 / %
0	26.57 \pm 0.18 ^d	16.87 \pm 0.95 ^b	3.29 \pm 0.28 ^c	1.08 \pm 0.12	0.21 \pm 0.03 ^a	0.39 \pm 0.04 ^a
0.003 9	27.62 \pm 0.19 ^c	22.00 \pm 0.40 ^a	5.05 \pm 0.01 ^c	1.04 \pm 0.05	0.18 \pm 0.00 ^a	0.37 \pm 0.01 ^{ab}
0.039	30.95 \pm 0.24 ^a	23.59 \pm 1.76 ^a	10.72 \pm 1.53 ^b	1.20 \pm 0.02	0.19 \pm 0.02 ^a	0.41 \pm 0.02 ^a
0.39	30.43 \pm 0.05 ^b	17.08 \pm 1.90 ^b	13.76 \pm 0.25 ^a	0.93 \pm 0.18	0.14 \pm 0.00 ^b	0.30 \pm 0.04 ^b

注:同一行内相同字母上标表示差异不显著,下表同。

表 2 培养液中铁添加量对月牙藻生化组成的影响

Tab. 2 Effect of iron supplementation in medium on biochemical components of *Selenastrum* sp.

FeC ₆ H ₅ O ₇ 添加量 / (mg/L)	蛋白含量 / %	总糖含量 / %	总脂含量 / %	叶绿素 a / %	叶绿素 b / %	类胡萝卜素 / %
0	24.23 \pm 0.22 ^b	20.41 \pm 0.51 ^d	8.74 \pm 0.09 ^c	2.35 \pm 0 ^c	0.55 \pm 0.01 ^c	0.71 \pm 0.01 ^c
0.003 9	28.06 \pm 0.11 ^b	21.99 \pm 0.60 ^c	9.35 \pm 0.45 ^c	2.19 \pm 0.07 ^c	0.64 \pm 0.01 ^c	0.69 \pm 0.01 ^c
0.039	32.75 \pm 0.37 ^a	39.25 \pm 0.24 ^a	18.62 \pm 1.23 ^b	3.41 \pm 0.07 ^b	0.92 \pm 0.01 ^b	1.28 \pm 0 ^b
0.39	36.37 \pm 4.33 ^a	32.66 \pm 0.00 ^b	22.78 \pm 1.09 ^a	4.10 \pm 0.03 ^a	1.17 \pm 0.11 ^a	1.80 \pm 0.03 ^a

2.2 培养液铁离子添加量对两种微藻脂肪酸组成的影响

表 3 为添加不同浓度柠檬酸铁的培养液中单生卵囊藻的脂肪酸组成。单生卵囊藻的主要脂肪酸为 14:2,16:0,18:1n-9 和 18:3n-3。总

16 碳脂肪酸先随铁浓度的升高而增加,在 0.039 mg/L 时达到最大值,之后下降。总 18 碳脂肪酸含量随铁添加量的升高而持续显著增加。16:0 和 MUFA 含量随铁添加量的升高而持续显著增加,而 PUFA 含量随铁添加量的升高而持续显著

降低。据脂肪酸组成预测的烷基值在添加 0.39 mg/L 柠檬酸铁组(50.76)显著高于其他组。

表 3 培养液铁离子添加量对单生卵囊藻脂肪酸组成 (%) 及理论烷基值的影响

Tab.3 Effect of iron concentration on fatty acid profiles (%) and predicted CN values of *O. solitaria*

脂肪酸	FeC ₆ H ₅ O ₇ 浓度/ (mg/L)			
	0	0.003 9	0.039	0.39
14:2	16.87 ± 0.30 ^a	14.40 ± 0.81 ^b	7.0 ± 0.02 ^d	10.47 ± 1.11 ^c
16:0	16.89 ± 0.12 ^c	15.57 ± 0.12 ^d	20.55 ± 0.04 ^b	21.90 ± 0.28 ^a
16:1n-9	0.97 ± 0 ^c	1.08 ± 0.01 ^b	0.71 ± 0.04 ^d	1.42 ± 0.03 ^a
16:1n-7	2.77 ± 0.01 ^b	2.91 ± 0.04 ^b	3.50 ± 0.15 ^a	2.73 ± 0.08 ^b
16:2n-9	0.68 ± 0 ^c	0.77 ± 0.01 ^b	1.30 ± 0 ^a	0.69 ± 0.01 ^c
16:2n-6	2.95 ± 0.03 ^c	3.57 ± 0.08 ^b	4.28 ± 0.04 ^a	2.12 ± 0.11 ^d
16:3n-3	4.46 ± 0.04 ^a	3.85 ± 0.17 ^b	1.90 ± 0.04 ^d	2.82 ± 0.16 ^c
16:4n-3	3.97 ± 0.02 ^c	5.73 ± 0.21 ^a	4.82 ± 0.04 ^b	3.98 ± 0.09 ^c
Σ16C	32.68 ± 0.21 ^c	33.49 ± 0.22 ^c	37.06 ± 0.27 ^a	35.66 ± 0.77 ^b
17:1	4.28 ± 0.11 ^a	3.74 ± 0.04 ^b	3.59 ± 0.01 ^b	2.21 ± 0.05 ^c
18:0	0.56 ± 0 ^b	0.67 ± 0.02 ^b	0.60 ± 0.01 ^b	3.35 ± 0.14 ^a
18:1n-9	7.44 ± 0.16 ^b	6.28 ± 0.14 ^c	5.04 ± 0.02 ^d	12.10 ± 0.45 ^a
18:1n-7	2.65 ± 0.06 ^c	3.05 ± 0.07 ^c	3.67 ± 0.01 ^b	8.49 ± 0.31 ^a
18:2n-6	5.58 ± 0.14 ^d	6.26 ± 0.09 ^c	9.69 ± 0.06 ^a	7.14 ± 0.24 ^b
18:3n-6	0.84 ± 0.02 ^b	0.90 ± 0.01 ^b	0.87 ± 0.03 ^b	1.00 ± 0.03 ^a
18:3n-3	19.05 ± 0.34 ^b	19.60 ± 0.43 ^b	22.97 ± 0.20 ^a	14.36 ± 0.56 ^c
18:4n-6	3.49 ± 0.06 ^c	3.73 ± 0.07 ^b	4.57 ± 0.06 ^a	3.29 ± 0.11 ^c
Σ18C	39.61 ± 0.82 ^b	40.50 ± 0.82 ^b	47.41 ± 0.39 ^a	49.73 ± 1.83 ^a
20:0	5.89 ± 0.54 ^b	7.22 ± 0.24 ^a	3.81 ± 0.13 ^c	0.20 ± 0.02 ^d
20:4n-6	0.19 ± 0	0.21 ± 0.06	0.18 ± 0	0.32 ± 0.01
20:5n-3	0.07 ± 0.06 ^b	0.08 ± 0.02 ^b	0.21 ± 0.19 ^b	0.59 ± 0.03 ^a
22:0	0.24 ± 0 ^b	0.23 ± 0.02 ^b	0.38 ± 0.03 ^a	0.36 ± 0.03 ^a
22:6n-3	0.16 ± 0.13 ^b	0.13 ± 0.06 ^b	0.28 ± 0.06 ^a	0.44 ± 0.03 ^a
ΣSFA	23.58 ± 0.37 ^b	23.69 ± 0.12 ^b	25.34 ± 0.08 ^a	25.84 ± 0.12 ^a
ΣMUFA	18.11 ± 0.13 ^b	17.06 ± 0.11 ^c	16.51 ± 0.15 ^c	26.95 ± 0.59 ^a
ΣPUFA	58.31 ± 0.24 ^b	59.24 ± 0.23 ^a	58.15 ± 0.08 ^b	47.21 ± 0.47 ^c
理论烷基值	48.01 ± 0.81 ^b	47.74 ± 0.64 ^b	47.30 ± 0.57 ^b	50.76 ± 0.71 ^a

月牙藻的主要脂肪酸为 14:2, 16:0, 16:4n-3, 18:1n-9, 18:2n-6 和 18:3n-3。总 16 碳脂肪酸随铁添加量的升高呈先增加后下降的趋势, 在 0.003 9 mg/L 时达到最大值。总 18 碳脂肪酸含量随铁添加量的升高先降后升, 在 0.0039 mg/L 时达到最小值。16:0, 18:2n-6 和 SFA 含量随铁浓度的升高而持续显著增加, 而 PUFA 含量随铁添加量的升高而持续显著降低。根据脂肪酸组成预测的烷基值在添加 0.39 mg/L 柠檬酸铁组(51.86)显著高于其他组。

3 讨论

铁是浮游植物生长的必需营养素, 参与藻类细胞基本生理功能如光合作用和呼吸作用。水环境中铁的可利用程度影响浮游植物的生产力、群落结构和生态功能^[6,15-16]。在藻类进行碳氮同化、色素合成及光合作用的过程中铁是必不可

少的元素^[17]。适宜的铁浓度对浮游植物的生长具有促进作用^[18]。STORCH 和 DUNHAM^[19]研究表明缺铁会限制藻类对磷的利用从而影响藻类的生长。左冬梅等研究表明铁缺乏会减少获光复合物的横断面积, 导致光吸收及光合电子传递活性的降低^[20]。大量实验表明, 富铁条件下, 藻类叶绿素、蛋白、糖类和脂肪含量均显著高于缺铁条件^[6, 20-23]。然而, 培养液铁过量会引起藻细胞产生氧化胁迫, 导致细胞内铁蛋白生成^[24]并抑制叶绿素 a 和蛋白的合成^[25]。过量铁还可以通过 Fenton 式反应产生反应性氧(ROS)^[26], 而 ROS 通过脂质过氧化、DNA 和蛋白巯基氧化对细胞产生伤害^[27-28]。本研究中, 随着培养液中柠檬酸铁添加量的逐步增大, 单生卵囊藻细胞中蛋白、总糖、叶绿素 a 和类胡萝卜素的含量也相应增加, 并在柠檬酸铁添加量为 0.039 mg/L 时达到最大值, 之后显著下降; 而月牙藻细胞中蛋白、总

糖、叶绿素 a 和类胡萝卜素的含量则在柠檬酸铁添加量为 0.39 mg/L 时达到最大值。表明两种微藻对培养液中柠檬酸铁的耐受能力存在差异,

月牙藻比单生卵囊藻表现出更强的耐受高铁离子浓度的能力。

表 4 铁浓度对月牙藻脂肪酸组成 (%) 及理论烷基值的影响

Tab. 4 Effect of iron concentration on fatty acid profiles (%) and predicted CN values of *Selenastrum* sp.

脂肪酸	FeC ₆ H ₅ O ₇ 浓度/ (mg/L)			
	0	0.0039	0.039	0.39
14:2	9.76 ± 0.14 ^b	14.33 ± 0.10 ^a	10.25 ± 0.83 ^b	6.05 ± 0.03 ^c
16:0	10.88 ± 0.13 ^b	10.56 ± 0.03 ^b	12.52 ± 2.46 ^b	16.34 ± 0.13 ^a
16:1n-9	0.78 ± 0.01 ^b	1.01 ± 0 ^a	0.81 ± 0.05 ^b	0.67 ± 0 ^c
16:1n-7	0.92 ± 0.17	0.81 ± 0	0.97 ± 0.24	0.65 ± 0
16:2n-9	3.07 ± 0.02 ^a	2.76 ± 0.01 ^b	2.95 ± 0.14 ^{ab}	1.67 ± 0.01 ^c
16:2n-6	2.16 ± 0.04 ^c	2.85 ± 0.01 ^b	2.36 ± 0.33 ^c	3.88 ± 0.06 ^a
16:3n-3	2.61 ± 0.04 ^b	3.79 ± 0.02 ^a	2.65 ± 0.09 ^b	1.53 ± 0.01 ^c
16:4n-3	8.71 ± 0.03 ^a	7.71 ± 0.04 ^b	8.31 ± 0.54 ^{ab}	6.66 ± 0.06 ^c
Σ16C	38.89 ± 0.58 ^b	43.84 ± 0.01 ^a	40.82 ± 3.31 ^{ab}	37.44 ± 0.24 ^b
17:0	0.93 ± 0.14 ^b	0.95 ± 0.01 ^b	0.91 ± 0.11 ^b	2.43 ± 0.03 ^a
17:1	2.10 ± 0.01 ^a	1.73 ± 0.01 ^b	1.90 ± 0.26 ^b	1.17 ± 0.01 ^c
18:0	0.23 ± 0 ^b	0.38 ± 0.01 ^a	0.27 ± 0.06 ^b	0.30 ± 0 ^{ab}
18:1n-9	6.18 ± 0.10	6.91 ± 0.02	7.02 ± 1.29	7.40 ± 0.11
18:1n-7	1.99 ± 0.04	1.95 ± 0	2.12 ± 0.24	2.25 ± 0.03
18:2n-6	14.75 ± 0.17 ^b	14.57 ± 0.04 ^b	15.36 ± 1.03 ^b	20.33 ± 0.31 ^a
18:3n-6	3.15 ± 0.03 ^b	2.91 ± 0.01 ^c	3.11 ± 0.03 ^b	4.48 ± 0.05 ^a
18:3n-3	12.97 ± 0.13 ^a	10.01 ± 0.03 ^b	12.11 ± 1.08 ^a	8.54 ± 0.34 ^b
18:4n-6	3.46 ± 0.02 ^a	2.95 ± 0.02 ^c	3.37 ± 0.11 ^{ab}	3.20 ± 0.05 ^b
Σ18C	42.73 ± 0.48 ^b	39.67 ± 0.13 ^c	43.38 ± 1.40 ^b	46.51 ± 0.89 ^a
20:1	8.07 ± 0.48	7.90 ± 0.01	6.00 ± 3.42	5.44 ± 0.06
22:0	0.11 ± 0.01	0.12 ± 0	0.10 ± 0.02	0.08 ± 0.05
22:1n-9	0.24 ± 0.00 ^b	0.24 ± 0.02 ^b	0.25 ± 0.01 ^b	0.35 ± 0.01 ^a
22:6n-3	2.49 ± 0.05	1.12 ± 0.05	1.73 ± 0.29	1.02 ± 0.03
24:0	0.90 ± 0.03	0.72 ± 0.03	0.68 ± 0.04	0.88 ± 0.01
24:1	3.53 ± 0.71	3.71 ± 0.06	4.28 ± 0.28	4.68 ± 1.23
ΣSFA	13.06 ± 0.30 ^b	12.76 ± 0.01 ^b	14.49 ± 2.32 ^b	20.03 ± 0.12 ^a
ΣMUFA	23.82 ± 0.86	24.25 ± 0.03	23.31 ± 1.57	22.61 ± 1.01
ΣPUFA	63.12 ± 0.56 ^a	63.00 ± 0.02 ^a	62.20 ± 0.75 ^a	57.36 ± 0.89 ^b
理论烷基值	49.17 ± 0.11 ^b	49.78 ± 0.15 ^b	49.70 ± 0.08 ^b	51.86 ± 0.91 ^a

已有的研究表明,培养液中高的铁离子浓度有利于藻类细胞积累脂肪。LIU 等^[6]研究表明,海水小球藻的细胞脂肪含量在含 1.2×10^{-2} mmol/L FeCl₃ 培养液中显著高于其在低铁浓度的培养液中。在含 20 mg/L Fe³⁺ 的培养液中,斜生栅藻 *S. obliquus* 具有最大的总脂含量 (28.12%)^[8]。缺氮条件下葡萄藻 *Botryococcus* 的总脂肪含量随培养液中 Fe³⁺ 含量的升高而升高,当 Fe³⁺ 浓度超过 0.037 mmol/L, Fe³⁺ 浓度的升高不再引起细胞脂肪含量的增加^[7]。本研究中,单生卵囊藻和月牙藻的总脂肪含量均在柠檬酸铁添加量为 0.39 mg/L 时达到最大值,相比柠檬酸铁添加量为 0 mg/L 组,添加 0.39 mg/L 组单

生卵囊藻和月牙藻的总脂肪含量分别提高了 318% 和 160%。推测培养液中高铁离子浓度诱导两种藻细胞蓄积脂肪的原因可能是:首先,培养液中高铁离子浓度可抑制磷酸烯醇丙酮酸羧化酶(PEPC)活性^[29]。PEPC 是藻类中广泛存在于细胞质内的 CO₂ 固定酶,在 HCO₃⁻ 和二价金属离子(Mg²⁺, Mn²⁺)存在下 PEPC 不可逆地催化 β-羧化反应生成草酰乙酸。草酰乙酸是三羧酸循环(TCA)的中间产物,为生物合成及氮同化提供碳链骨架^[29-30]。抑制的 PEPC 活性导致进入 TCA 的草酰乙酸减少,随后抑制了氮的同化促进脂肪的积累。COURCHESNE 等研究证实下调 PEPC 基因表达或降低 PEPC 活性有利微藻生成

脂肪^[31]。其次, NADP 苹果酸脱氢酶 (NADP-ME) 活性能被草酰乙酸抑制, 低水平的草酰乙酸诱导高的 NADP-ME 活性。NADP-ME 催化苹果酸的氧化脱羧, 在 NADP⁺ 作为辅酶的情况下, 生成丙酮酸, CO₂ 和 NADPH。NADPH 在脂肪酸的生物合成及生物膜的损伤修复中具有重要作用^[29]。多个研究证实细胞 NADP-ME 活性和细胞脂肪积累显著相关^[32-33]。

培养液中铁添加量不但影响藻细胞的脂肪含量, 还影响其脂肪酸的组成。单生卵囊藻在柠檬酸铁添加量为 0.003 9 mg/L 时多不饱和脂肪酸 (PUFAs) 百分含量最高, 之后随着铁浓度的升高而下降。月牙藻 PUFAs 随柠檬酸铁浓度的升高而降低, 不添加铁时 PUFAs 百分含量最高。表明培养液中高的铁离子浓度诱导藻细胞合成更多的饱和脂肪酸。这与 HUANG 等^[34] 对微绿球藻 (*Nannochloropsis oculata*) 的结论相一致。推测过高的铁离子浓度引起藻细胞产生 ROS 并造成脂质过氧化是高柠檬酸铁添加组藻细胞饱和脂肪酸比例增大的原因。同时, 过高的铁离子还可能影响微藻去饱和酶的活性, 致使细胞内饱和脂肪酸下降^[35]。

利用微藻生产生物柴油是当前可再生新能源开发的热点。生物柴油的化学本质是长链脂肪酸甲酯。脂肪酸的种类和组成影响生物柴油的品质。过多的不饱和脂肪酸形成的生物柴油容易形成焦炭^[36] 且具有低的烷基值和氧化稳定性^[37]。本研究中, 无论单生卵囊藻还是月牙藻, 根据其脂肪酸预测的理论烷基值均大于 47, 且在柠檬酸铁添加量为 0.39 mg/L 时具有最大的烷基值, 符合美国生物柴油标准^[38]。0.39 mg/L 柠檬酸铁添加量的月牙藻的脂肪酸甲酯烷基值更是超过了 51, 同时达到了欧盟生物柴油标准^[38]。因此, 考虑到其细胞脂肪含量及脂肪酸组成, 从微藻生物柴油原料角度, 月牙藻比单生卵囊藻更有开发潜力。

参考文献:

- [1] 刘彦, 张金流, 何媛媛, 等. 单生卵囊藻对 DIC 的利用及其对 CaCO₃ 沉积影响的研究[J]. 地球化学, 2010, 39(2): 191-196.
- [2] 严佳琦, 黄旭雄, 马坤俊, 等. 单生卵囊藻 (*Oocystis solitaria*) 和月牙藻 (*Selenastrum* sp.) 的培养条件及其细胞组成[J]. 生态学杂志, 2011, 30(12): 2761-2766.
- [3] MCLAMON-RICHES C J, ROLPH C E, GREENWAY D L A, et al. Effects of environmental factors and metals on *Selenastrum capricornutum* lipids [J]. *Phytochemistry*, 1998, 49(5): 1241-1247.
- [4] FRÄNZLE O. Bioindicators and environmental stress assessment [J]. *Trace Metals and other Contaminants in the Environment*, 2003, 6: 41-84.
- [5] SUNDA W G, HUNTSMAN S A. Interrelated influence of iron, light and cell size on marine phytoplankton growth [J]. *Nature*, 1997, 390: 389-392.
- [6] LIU Z Y, WANG G C, ZHOU B C. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris* [J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(11): 4717-4722.
- [7] YEESANG C, CHEIRSILP B. Effect of nitrogen, salt, and iron content in the growth medium and light intensity on lipid production by microalgae isolated from freshwater sources in Thailand [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(3): 3034-3040.
- [8] BAKY H H A I, EL-BAROTY G S, BOUAID A, et al. Enhancement of lipid accumulation in *Scenedesmus obliquus* by optimizing CO₂ and Fe³⁺ levels for biodiesel production [J]. *Bioresource Technology*, 2012, 119: 429-432.
- [9] 成永旭. 生物饵料培养学 [M]. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2007: 75-84.
- [10] RITCHIE R J. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents [J]. *Photosynthesis Research*, 2006, 89(1): 27-41.
- [11] LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1951, 193: 265-275.
- [12] DUBOIS M, GILLES K A, HAMILTON J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. *Analytical Chemistry*, 1956, 28(3): 350-356.
- [13] PRUYOST J, VOOREN G V, GOUIC B L, et al. Systematic investigation of biomass and lipid productivity by microalgae in photobioreactors for biodiesel application [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(1): 150-158.
- [14] PILOTO-RODRIGUEZ R, SÁNCHEZ-BORROTO Y, LAPUERTA M, et al. Prediction of the cetane number of biodiesel using artificial neural networks and multiple linear regression [J]. *Energy Conversion Manage*, 2013, 65: 255-261.
- [15] GLEDHILL M, BUCK K N. The organic complexation of iron in the marine environment: a review [J]. *Front Microbiology*, 2012, 3: 1-17.
- [16] 姚波, 席北斗, 胡春明, 等. 铁限制对浮游植物生长和群落组成的影响研究综述 [J]. *生态环境学报*, 2010, 19(2): 459-465.
- [17] THAKUR A, KUMAR H D. Nitrate and phosphate uptake by the cells of *Dunaliella salina* [J]. *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology*, 1999, 62: 70-78.
- [18] MARTIN J H, Gordon R M, Fitzwater S E. Iron in Antarctic

- waters [J]. Nature, 1990, 345: 156 – 158.
- [19] STORCH T A, DUNHAM V L. Iron mediated changes in the growth of lake Erie phytoplankton and axenic algae culture [J]. Journal of Applied Phycology, 1986, 22(2): 109 – 117.
- [20] 左冬梅, 韩志国, 武宝歼. 铁对尖刺拟菱形藻生长及光合作用的影响[J]. 暨南大学学报:自然科学版, 2002, 23(5): 81 – 87.
- [21] 朱明远, 牟学延, 李瑞香, 等. 铁对三角褐指藻生长、光合作用及生化组成的影响[J]. 海洋学报, 2000, 22(1): 110 – 116.
- [22] LI D X, CONG W, CAI Z L, et al. Response of growth and photosynthesis of marine red tide alga *Heterosigma akashiwo* to iron and iron stress condition [J]. Biotechnology Letters, 2002, 24(9), 24: 743 – 747.
- [23] 安振珍, 张铁明, 李玉华, 等. Fe^{3+} 对脆杆藻增殖的影响 [J]. 世界科技研究与发展, 2008, 30(4): 407 – 409.
- [24] BRIAT J F, FOBIS-LOISY I, GRIGNON N, et al. Cellular and molecular aspects of iron metabolism in plants [J]. Biology of Cell, 1995, 84(1/2): 69 – 81.
- [25] CAI Z P, HUANG W W, DUAN S S. Iron concentration-induced changes in growth and biochemical compositions of marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae) [J]. Ecology and Environment, 2008, 17(4): 1327 – 1333.
- [26] LEBEL C, ISCHIROPOULOS H, BONDY S. Evaluation of the probe 2', 7' -Dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress [J]. Chemical Research and Toxicology, 1992, 5(2): 227 – 231.
- [27] KADAR E, TARRAN G E, JHA A W, et al. Stabilisation of engineered zero-valent nanoiron with Na-acrylic copolymer enhances spermotoxicity [J]. Environment Science and Technology, 2011, 45(8): 3245 – 3251.
- [28] KEENAN C, GOTH-GOLDSTEIN R, LUCAS D, et al. Oxidative stress induced by zero-valent iron nanoparticles and $Fe(II)$ in human bronchial epithelial cells [J]. Environment Science and Technology, 2009, 43(2): 4555 – 4560.
- [29] DOUBNEROVÁ V, RYŠLAVÁ. What can enzymes of C4 photosynthesis do for C3 plants under stress [J]. Plant Science, 2011, 180(4): 575 – 583.
- [30] IZUI K, MATSUMURA H, FURUMOTO T, et al. Phosphoenolpyruvate carboxylase: a new era of structural biology [J]. Annual Review on Plant Biology, 2004, 55: 69 – 84.
- [31] COURCHESNE N M D, PARISIEN A, WANG B, et al. Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches [J]. Journal of Biotechnology, 2009, 141(1/2): 31 – 41.
- [32] WYNN J P, HAMID A B A, RATLEDGE C. The role of malic enzyme in the regulation of lipid accumulation in filamentous fungi [J]. Microbiology, 1999, 145(8): 1911 – 1917.
- [33] ZHANG Y, ADAMS I P, RATLEDGE C. Malic enzyme: the controlling activity for lipid production? Overexpression of malic enzyme in *Mucor circinelloides* leads to a 2.5-fold increase in lipid accumulation [J]. Microbiology, 2007, 153(7): 2013 – 2025.
- [34] HUANG X X, WEI L K, HUANG Z Z, et al. Effect of high ferric ion concentrations on total lipids and lipid characteristics of *Tetraselmis subcordiformis*, *Nannochloropsis oculata* and *Pavlova viridis* [J]. Journal of Applied Phycology, 2013: 1 – 10. DOI 10.1007/s10811 – 013 – 0056 – x.
- [35] 魏东, 张学成. 微藻脂肪酸去饱和酶及其基因表达的生态调控研究新进展 [J]. 海洋科学, 2000, 24(8): 42 – 46.
- [36] BRUTON T, LYONS H, LERAT Y, et al. A review of the potential of marine algae as a source of biofuel in Ireland [R]. Dublin: Sustainable Energy Ireland-SEI, 2009, 30 – 31.
- [37] RAMOS M J, FERNÁNDEZ C M, CASAS A, et al. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties [J]. Bioresource Technology, 2009, 100(1): 261 – 268.
- [38] WADUMESTHRIGE K, SMITH J C, WILSON J R, et al. Investigation of the parameters affecting the cetane number of biodiesel [J]. Journal of American Oil Chemist Society, 2008, 85(11): 1073 – 1081.

Effect of ferric ion supplementation in medium on the biochemical components of two microalgae, *Oocystis solitaria* and *Selenastrum* sp.

HUANG Xu-xiong^{1,2,3}, YAN Jia-qi¹, HUANG Zheng-zheng¹, WEI Li-kun¹

(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 Breeding Center, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The biochemical components of two freshwater microalgae, *Oocystis solitaria* and *Selenastrum* sp., which were cultured in the media supplemented with different ferric citrate (0, 0.0039, 0.039 and 0.39 mg/L), were studied in this paper. The results indicated that *O. solitaria* in medium added with 0.039 mg/L ferric citrate had the highest protein content, carbohydrate content, chlorophyll a content and carotenoid content, while *Selenastrum* sp. in medium with 0.39 mg/L ferric citrate had the highest protein content, carbohydrate content, chlorophyll a content and carotenoid content. Both the microalgae in media with 0.39 mg/L ferric citrate had the highest total lipid contents, which were 13.7% and 22.78% for *O. solitaria* and *Selenastrum* sp. respectively, and increased 318% and 160% of that in media without ferric citrate supplementation. 18:3n3 and 18:2n6 were the dominant fatty acids in *O. solitaria* and *Selenastrum* sp. respectively. A higher ferric citrate concentration in medium induced higher level of saturated fatty acids in both the microalgae. It is therefore suggested that compared to *O. solitaria*, *Selenastrum* sp. has stronger tolerance with high ferric ion concentration and is more suitable for production of microalgae biodiesel.

Key words: *Oocystis solitaria*; *Selenastrum* sp.; ferric ion; biochemical component; fatty acid