

文章编号: 1674 - 5566(2014)05 - 0748 - 05

氮、磷和铁对微拟绿球藻生物量和蛋白含量的影响

孙春晓, 王忠全, 周全利, 乔洪金, 王际英, 张利民

(山东省海洋资源与环境研究院 山东省海洋生态修复重点实验室, 山东 烟台 264006)

摘要: 微拟绿球藻 (*Nannochloropsis*. sp) 作为水产养殖中常用的开口饵料, 其蛋白含量对于水产动物幼苗的生长发育具有重要作用。本文对 N、P、Fe 3 种营养盐采用正交设计的方法进行了三因素三水平的实验, 测定了生物量和蛋白含量, 结果表明, 微拟绿球藻的生物量和蛋白含量均受到 N、P、Fe 3 种营养元素的影响; 在设置的营养盐浓度范围内, P 对生物量的影响最大, 而 Fe 对蛋白含量的影响最大; 当 N、P、Fe 的浓度分别为 24.6、1.1 和 0.2 mg/L 时, 生物量产量和蛋白含量均达到最高。

研究亮点: 微藻是海水养殖中常用的开口饵料, 其蛋白含量对于养殖动物的生长发育至关重要, 本文利用正交实验分析了 N、P、Fe 对微拟绿球藻蛋白含量的影响, 发现 Fe 对蛋白含量的影响最大, 获得了生物量和蛋白含量均最高时的营养盐条件, 为水产育苗过程中培育微藻提供了指导。

关键词: 微拟绿球藻; 氮; 磷; 铁; 蛋白含量

中图分类号: Q 945.1

文献标志码: A

微藻作为水产养殖特别是海水养殖上常用的开口饵料, 富含蛋白、脂肪、色素和多不饱和脂肪酸等营养成分, 在许多水产动物的育苗期是不可缺少的饵料资源。许多研究表明, 微藻的营养成分易受各种营养盐浓度的影响而发生改变^[1-3], 势必会影响到水产动物幼苗的生长和发育。蛋白质作为构成生物机体的主要成分, 在水产动物的生长发育过程中起到非常重要的作用, 因此, 研究饵料微藻的蛋白含量对于水产动物的健康养殖具有重要意义。

综合文献报道来看, 微藻的蛋白含量主要易受 3 个方面的影响: (1) 植物激素, 如植物生长激素奈乙酸对小球藻生长及叶绿素和蛋白质含量的提高具有促进效果^[4-5]; (2) 营养盐, 如李师翁和王毅民^[5]的研究表明培养基中加入乙酸钠可显著提高小球藻的蛋白含量, 尹逊栋等^[6]报道了两种甲藻和两种硅藻在正常培养条件下的蛋白含量均显著高于氮限制时, 但与磷限制相比差异

不显著, 而自养与异养条件的比较研究表明, 与自养生长相比异养过程中小球藻的蛋白含量呈现下降趋势^[7-8]; (3) 环境因子, 如戴俊彪和吴庆余^[9]的研究表明室外培养的球等鞭金藻蛋白含量要比室内培养的有较大下降, 张跃群等^[10]报道了紫外线辐照可显著提高三角褐指藻和湛江等鞭金藻的蛋白含量, 但降低了盐藻的蛋白含量。其中, 营养盐的作用效果好, 而且在实际生产中最易于调整, 因此, 本文以营养盐的浓度对微藻蛋白含量的影响作为主要的研究目的。

微拟绿球藻 (*Nannochloropsis* sp.) 是直径为 2~3 μm 的真核单细胞微藻, 归属于褐藻门 (Ochrophyta), 大眼藻纲 (Eustigmatophyceae), 单珠藻科 (Monodopsidaceae), 在水产养殖业上有着广泛的用途, 可作为鱼虾贝的开口饵料, 并且具有较高的蛋白质和多不饱和脂肪酸含量, 具有重要的商业价值, 目前已有规模化生产的报道, 因此对其蛋白含量进行条件优化具有重要意义。

收稿日期: 2014-03-20 修回日期: 2014-04-29

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(31201973); 国家海洋公益性行业科研专项(201205025); 海洋生物产业水生动物营养与饲料研发创新示范平台资金(201303003); 山东省水生动物营养与饲料泰山学者岗位(2007-2013); 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金(BS2013HZ018)

作者简介: 孙春晓(1982—), 女, 助理研究员, 研究方向为饵料微藻。E-mail: 973035865@qq.com

通信作者: 乔洪金, E-mail: hongjinqiao@gmail.com

目前,营养盐对微拟绿球藻生物量和蛋白含量影响的报道较少,本文选取 N、P 和 Fe 3 种主要的营养元素,研究了其浓度对微拟绿球藻生物量和蛋白含量的影响,对于弄清营养盐是否决定微藻蛋白含量的问题具有重要的意义,同时为在实际生产中获得高蛋白含量的饵料微藻提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

本实验所用微拟绿球藻藻种 (*Nannochloropsis* sp.) 由中国水产科学院黄海水产研究所馈赠,主要保种条件温度为 20 ~ 25 °C,光照强度为 50 ~ 100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,盐度为 28,所用培养基为不含维生素的 f/2 培养基^[11]。

1.2 实验设计

本实验设定 N、P 和 Fe 3 种元素各 3 个水平浓度,以海洋微藻的最适培养基 (f/2) 为中间水平,向上向下各扩展 1 个水平,形成 $L_9(3^3)$ 正交设计表,如表 1 所示,N 元素水平分别为 4.1, 12.3 和 24.6 mg/L;P 元素水平分别为 0.2,1.1 和 2.2 mg/L;Fe 元素水平分别为 0.2,0.6 和 1.2 mg/L。

1.3 培养与分析

取 9 个 500 mL 三角烧瓶,每瓶加盐度为 28 的海水 400 mL,按照正交设计表依次加入营养盐和微量元素母液,然后取 80 mL 对数期藻液 5 000 r/min 离心 5 min,去掉上清,将藻细胞接种于盛有 400 mL 培养基的三角烧瓶中(接种量 20%)。将三角烧瓶置于光照恒温摇床(DHZ-032LR,申能博彩,上海)中振荡培养,温度 23 °C,光照强度 80 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光暗比 14:10,连续培养 10 d 至对数生长期后期,然后取上层藻液 2 mL 于紫外可见分光光度计(U-2010,日立,东京,日本)上测定 OD_{750} 。分别取上层藻液 200 mL,5 000 r/min 离心 5 min 收集藻细胞,沉淀用双蒸水洗涤 2 次,转移至预先称重的 1.5 mL 离心管中,冷冻干燥 24 h,称重,按照公式(1)计算生物量:

$$Y = (m_1 - m_0) / v \quad (1)$$

式中:Y 为生物量(g/L); m_0 为离心管的重量(g); m_1 为冷冻干燥后藻细胞与离心管的重量(g);v 为所取藻液的体积(L)。

干燥后的样品使用 Leco 蛋白质分析仪(FP-528,圣约瑟夫,密歇根州,美国)分析蛋白含量,

计算公式为:

$$P = 6.25 \times N \quad (2)$$

式中:P 为蛋白含量(%);N 为 Leco 蛋白质分析仪所测定出的氮元素的百分含量。

蛋白产量的计算公式为:

$$P_y = Y \times P \times 1000 \quad (3)$$

式中: P_y 为蛋白产量(mg/L);Y 为生物量;P 为蛋白含量。

1.4 数据处理

采用 SPSS 11.0 (SPSS Inc.,芝加哥,伊利诺伊州,美国)对数据进行单因素方差分析(one-way ANOVAs),结果用平均数 \pm 标准差 ($M \pm SD$) 表示。若存在显著差异,则应用 Duncan 氏多重比较法确定组间差异,当 $P < 0.05$ 时,表示差异显著。

2 结果

2.1 主要营养盐对微拟绿球藻生物量的影响

如表 1 所示,N、P 和 Fe 3 种营养盐的浓度对微拟绿球藻生物量和蛋白含量均有影响。 OD_{750} 的值与生物量的值基本成正比关系,表明 OD_{750} 显示的细胞密度可以很好地指示生物量的变化;N、P、Fe 的浓度分别为 24.6,1.1 和 0.2 mg/L 时所获得生物量最高,为 0.053 g/L。如表 2 所示,随着 N 浓度的升高,生物量有上升的趋势;随着 P 浓度的升高,生物量呈现先上升后下降的趋势;随着 Fe 浓度的升高,生物量表现为先下降后升高的趋势,但是在本文的浓度范围内均无显著性差异($P > 0.05$)。从极差水平看,P 浓度对生物量的影响最大。

2.2 主要营养盐对微拟绿球藻蛋白含量的影响

当 N、P、Fe 的浓度分别为 24.6、1.1 和 0.2 mg/L 时所获得的蛋白含量最高,为 42.16%,同时该浓度下所获得的蛋白产量也最高,为 22.34 mg/L(表 1)。如表 2 所示,随着 N 浓度的升高,蛋白含量呈先下降再上升的趋势,但无显著性差异($P > 0.05$);随着 P 浓度的升高,蛋白含量呈现先上升后下降的趋势,但无显著性差异($P > 0.05$);随着 Fe 浓度的升高,蛋白含量表现为先下降后持平的趋势,0.2 mg/L 组与其他两组具有显著性差异($P < 0.05$)。从极差水平看,Fe 浓度对蛋白含量的影响最大,当 Fe 浓度为 0.2 mg/L 时,微拟绿球藻蛋白含量均超过 36% 以上,在各组中最高(表 1)。

表 1 N、P 和 Fe 对微拟绿球藻生物量和蛋白含量影响的正交设计与实验结果
Tab. 1 The orthogonal design and results of the effects of N, P and Fe on the biomass and protein content of *Nannochloropsis* sp.

	因素/(mg/L)			实验结果			
	Fe	N	P	OD ₇₅₀	生物量/(g/L)	蛋白含量/%	蛋白产量/(mg/L)
实验 1	4.1	0.2	0.2	0.213	0.026	39.15	10.18
实验 2	4.1	1.1	0.6	0.304	0.036	30.39	10.94
实验 3	4.1	2.2	1.2	0.302	0.045	30.41	13.68
实验 4	12.3	0.2	0.6	0.256	0.033	26.48	8.74
实验 5	12.3	1.1	1.2	0.341	0.050	29.46	14.73
实验 6	12.3	2.2	0.2	0.252	0.031	36.12	11.20
实验 7	24.6	0.2	1.2	0.300	0.038	29.76	11.31
实验 8	24.6	1.1	0.2	0.335	0.053	42.16	22.34
实验 9	24.6	2.2	0.6	0.282	0.034	27.55	9.37

3 讨论

氮是微藻生长的必需营养元素之一,它是每个活细胞的组成成分,当藻细胞处于缺氮环境时,能够选择性地优先利用 1 种或多种含氮大分子,使胞内的含氮物质(主要是蛋白质)的含量下降,而使胞内的含碳物质(主要是多糖和脂肪酸)

的含量升高^[12-13]。在本文的 3 种氮源浓度条件下,藻细胞的蛋白含量并未发生显著性改变(表 2),因此,本文所采用的最低氮源浓度并不能使微拟绿球藻处于缺氮条件。随着氮源浓度的升高,生物量的积累也随之升高(表 2),这表明了氮源在促进生物量积累方面的显著作用。

表 2 N、P 和 Fe 对微拟绿球藻生物量与蛋白含量作用效果的比较

Tab. 2 The comparison of the effects of N, P and Fe on the biomass and protein content of *Nannochloropsis* sp.

	浓度/(mg/L)	生物量/(g/L)	极差	蛋白含量/%	极差
N	4.1	0.036 ± 0.010	0.006	33.32 ± 5.05	2.63
	12.3	0.038 ± 0.010		30.69 ± 4.94	
	24.6	0.042 ± 0.010		33.16 ± 7.88	
P	0.2	0.032 ± 0.006	0.014	31.80 ± 6.58	2.64
	1.1	0.046 ± 0.009		34.00 ± 7.08	
	2.2	0.037 ± 0.008		31.36 ± 4.36	
Fe	0.2	0.037 ± 0.015	0.010	39.14 ± 3.02*	11.00
	0.6	0.034 ± 0.001		28.14 ± 2.02	
	1.2	0.044 ± 0.006		29.88 ± 0.49	

注: * 表示同组数据相比差异显著, $P < 0.05$ 。

磷广泛存在于动植物组织中,并与蛋白质或脂肪结合成核蛋白、磷蛋白和磷脂等,参与遗传物质的传递和能量代谢等重要生理活动,主要以多聚偏磷酸的形式储存在细胞内^[14]。磷可显著影响微藻的生长速率和脂肪含量^[15],但过高的磷浓度也会减缓微藻的生长^[16]。在本文三种磷浓度条件下,微拟绿球藻生物量和蛋白含量均出现了先升高后下降的趋势(表 2),表明微拟绿球藻的生长和蛋白积累有一个最适的磷浓度(1.1 mg/L)。

铁是微藻不可缺少的微量元素,是光合作

用、生物固氮和呼吸作用中的细胞色素和非血红素铁蛋白的组成部分,在这些氧化还原过程中都起着电子传递的作用。吕秀平等^[17-18]对淡水浮游颤藻和铜绿微囊藻的研究表明,铁对其生长、光合皆有重要影响,当 Fe^{3+} 浓度小于 10 nmol/L 时,浮游颤藻和铜绿微囊藻的生长以及叶绿素和蛋白质的合成均受到明显的抑制,当处于 1 000 ~ 10 000 nmol/L 时基本达到藻体正常生长的浓度范围,当达到 30 000 nmol/L 时,铜绿微囊藻的生长受到抑制,生物量较低。在本文 3 种铁浓度条件下,生物量的积累有升高的趋势但无显著性差

异,而蛋白含量在低铁条件下最高并且差异显著(表2)。LIU 等^[19]曾报道,在 Fe^{3+} 浓度从 1.2×10^{-8} 升高至 1.2×10^{-5} mol/L 时,小球藻的生长无显著性差异,但脂肪含量有显著升高的趋势,从 11.8% 升高至 56.6% 左右,这从侧面证明了蛋白含量随铁浓度升高会出现相对减少的趋势,与本文的报道一致。

综上所述,微拟绿球藻的生物量和蛋白含量均受到 N、P、Fe 3 种营养元素的影响,在本文的营养盐浓度范围内,P 对生物量的影响最大,而 Fe 对蛋白含量的影响最大,当 N、P、Fe 的浓度分别为 24.6、1.1 和 0.2 mg/L 时生物量产量和蛋白含量均达到最高。

参考文献:

- [1] 杨凯,王涌,史全良,等. 不同质量浓度 NaNO_3 对 3 种微藻生长及总脂肪酸含量和组成的影响[J]. 植物资源与环境学报,2010,19(1):43-49.
- [2] 石娟,潘克厚. 不同培养条件对微藻总脂含量和脂肪酸组成的影响[J]. 海洋水产研究,2004,25(6):79-85.
- [3] 王波,梁伟,孔垂雨. 不同营养盐对小球藻 (*Chlorella vulgaris* Beij.) 培养的影响[J]. 现代渔业信息,2006,21(5):11-12.
- [4] 吕富,林伟峰,石祥根. NAA 对小球藻生长及叶绿素和蛋白质含量的影响[J]. 盐城工学院:自然科学版,2006,19(2):42-45.
- [5] 李师翁,王毅民. 几种化学物质对小球藻生长和蛋白质含量的效应[J]. 微生物学通报,1998,25(2):91-92.
- [6] 尹逊栋,葛蔚,柴超,等. 营养条件对四种海洋微藻生化组分的影响[J]. 水产科学,2012,31(11):640-644.
- [7] 王海英,郭祀远,郑必胜,等. 自养、异养和混养下小球藻的生长及生化成分[J]. 华南理工大学学报:自然科学版,2004,32(5):47-55.
- [8] QIAO H, WANG G, ZHANG X. Isolation and characterization of *Chlorella sorokiniana* GXNN01 (Chlorophyta) with the properties of heterotrophic and microaerobic growth [J]. Journal of Phycology, 2009, 45(5):1153-1162.
- [9] 戴俊彪,吴庆余. 室内外培养海洋单细胞微藻的生长及生化组分[J]. 海洋科学,2000,24(6):29-32.
- [10] 张越群,陆德祥,王勇军. 紫外线辐照对 3 种海洋微藻蛋白质含量的效应[J]. 安徽农业科学,2009,37(20):9350-9351.
- [11] GUILLARD R R L, RYTHER J H. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1962, 8:229-239.
- [12] KAPLAN D, RICHMOND A E, DUBINSKY Z, et al. Algal nutrition [M]//RICHMOND A. Handbook of Microalgal Mass Culture. Boca Raton; CRC Press, 1986:147-198.
- [13] SUEN Y, HUBBARD J S, HOLZER C, et al. Total lipid production of the green alga *Nannochloropsis* sp. QH under different nitrogen regimes [J]. Journal of Phycology, 1987, 23(2):289-296.
- [14] WU S, HU C, JIN G J, et al. Phosphorus-limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides* [J]. Bioresource Technology, 2010, 101(15):6124-6129.
- [15] KHOZIN-GOLDBERG I, COHEN Z. The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus* [J]. Phytochemistry, 2006, 67:696-701.
- [16] ZHOU X, GE H, XIA L, et al. Evaluation of oil-producing algae as potential biodiesel feedstock [J]. Bioresource Technology, 2013, 134:24-29.
- [17] 吕秀平,胡晗华,张栩,等. Fe^{3+} 对浮游颤藻生长和光合作用的影响[J]. 水生生物学报, 2005, 29(3):318-322.
- [18] 吕秀平,张栩,康瑞娟,等. Fe^{3+} 对铜绿微囊藻生长和光合作用的影响[J]. 北京化工大学学报, 2006, 33(1):27-30.
- [19] LIU Z, WANG G, ZHOU B. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris* [J]. Bioresource Technology, 2008, 99(11):4717-4722.

The effects of nitrogen, phosphorus and iron on biomass and protein content of *Nannochloropsis* sp.

SUN Chun-xiao, WANG Zhong-quan, ZHOU Quan-li, QIAO Hong-jin, WANG Ji-ying, ZHANG Li-min
(Key Laboratory of Marine Ecological Restoration, Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Yantai 264006, Shandong, China)

Abstract: *Nannochloropsis* sp. is commonly used as weaning feed in aquaculture, the protein content of which plays an important role in the growth and development of seedlings of aquatic animals. In this paper, three kinds of nutrients, N, P and Fe, were tested by orthogonal design methods at three levels on *Nannochloropsis* sp. The biomass and protein content were determined at the end of experiment. Results showed that both biomass and protein content of *Nannochloropsis* sp. were influenced by the levels of N, P and Fe; among the range of nutrient concentrations of this paper, P had the greatest impact on the biomass while Fe had the greatest impact on the protein content; when N, P, Fe concentrations were 24.6, 1.1 and 0.2 mg/L respectively, both the biomass yield and protein content were the highest.

Key words: *Nannochloropsis* sp.; nitrogen; phosphorus; iron; protein content