

# 氮、磷、铁对三角褐指藻诱变株生长、总脂及脂肪酸的影响

梁晶晶 蒋霞敏\* 叶 丽 韩庆喜

(宁波大学海洋学院, 浙江宁波 315211)

**摘 要** 为了优化微藻培养条件, 采用单因子试验研究了不同氮浓度(5、10、15、20、25、30 和 35  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )、不同磷浓度(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 和 3.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )、不同铁源( $\text{FeCl}_3$ 、 $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$  和  $\text{FeSO}_4$ ) 和铁浓度(0、0.10、0.25、0.50 和 1.00  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 对三角褐指藻紫外诱变株 MP-2 的影响。结果表明: 氮、磷、铁对 MP-2 的生长、总脂含量和脂肪酸组成影响显著 ( $P < 0.05$ ); MP-2 生长最适氮浓度为 20  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 其生长速率  $K$  值和生物量分别为  $(0.384 \pm 0.004)$  和  $(0.25 \pm 0.01) \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 氮浓度为 30  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时总脂积累量最高  $(26.51 \pm 1.96)\%$ , 氮浓度 25  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时 PUFA 积累最高  $[(37.78 \pm 0.35)\%]$ ; MP-2 生长最适磷浓度为 2.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 生长速率  $K$  值和生物量分别为  $(0.305 \pm 0.010)$  和  $(0.28 \pm 0.02) \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 磷浓度 1.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时总脂积累量最高  $[(21.79 \pm 0.89)\%]$ , 磷浓度为 2.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时 PUFA 积累最高  $[(39.33 \pm 0.38)\%]$ ;  $\text{FeSO}_4$  为铁源时生长最佳, 显著优于其余各组 ( $P < 0.05$ ), 生长最适铁浓度为 0.50  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 生长速率  $K$  值和生物量分别为  $(0.495 \pm 0.006)$  和  $(0.87 \pm 0.04) \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 铁浓度 0.25  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时总脂积累量最高  $[(28.86 \pm 0.50)\%]$ , 铁浓度 1.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时 PUFA 积累最高  $[(41.73 \pm 0.42)\%]$ 。由此可见, MP-2 生长、总脂和 PUFA 积累所需的氮、磷、铁需求量不同, 在生产性培养时最好采用二次培养。

**关键词** 氮; 磷; 铁; 三角褐指藻诱变株; 生长; 总脂; 脂肪酸

**Effects of nitrogen, phosphorus and iron on the growth, total lipid content and fatty acid composition of *Phaeodactylum tricornutum* mutant strain.** LIANG Jing-jing, JIANG Xia-min\*, YE Li, HAN Qing-xi (School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, Zhejiang, China).

**Abstract:** To optimize the cultivation conditions of microalgae, single-factor test was performed to reveal the effects of different nutritional conditions on *Phaeodactylum tricornutum* mutant strain MP-2, including nitrogen (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), phosphorus (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), iron sources ( $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ,  $\text{FeSO}_4$ ) and their concentrations (0, 0.10, 0.25, 0.50, 1.00  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ). The results showed that all these factors exerted significant effects on the growth, total lipid content and fatty acid composition of MP-2 ( $P < 0.05$ ). The highest growth rate was obtained with the nitrogen concentration of 20  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , with the growth rate  $K$  values and biomass of  $0.384 \pm 0.004$  and  $(0.25 \pm 0.01) \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectively. The highest total lipid content  $(26.51 \pm 1.96)\%$  was achieved when the nitrogen concentration was 30  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , and the highest PUFA content  $(37.78 \pm 0.35)\%$  occurred when it was 25  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . MP-2 got the fastest growth and highest lipid content when the phosphorus concentration was 2.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , and the growth rate  $K$  value and biomass were  $0.305 \pm 0.010$  and  $(0.28 \pm 0.02) \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectively. The total lipid content achieved the highest value  $(21.79 \pm 0.89)\%$  when the phosphorus concentration was 1.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , and the highest PUFA content occurred when it was 2.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ .  $\text{FeSO}_4$  was proved to be the optimal iron source, and showed significant difference from other iron sources ( $P < 0.05$ ). The optimal  $\text{FeSO}_4$  concentration was 0.50

mg · L<sup>-1</sup>, with growth rate *K* value and biomass of (0.495±0.006) and (0.87±0.04) g · L<sup>-1</sup>, respectively. The highest total lipid content (28.86±0.50) % was achieved when the FeSO<sub>4</sub> concentration was 0.25 mg · L<sup>-1</sup>, and the highest PUFA content occurred when it was 1.0 mg · L<sup>-1</sup>. The highest growth rate and total lipid and PUFA contents were obtained with different concentrations of nitrogen, phosphorus and iron, so a cultivation strategy should be adopted in mass culture.

**Key words:** nitrogen; phosphorus; iron; *Phaeodactylum tricornutum* mutant strain; growth; total lipid; fatty acid.

微藻因其富含蛋白质、多不饱和脂肪酸、虾青素和类胡萝卜素等,同时具有生长繁殖快和单位面积产量高等特点,近些年来被广泛开发用于保健食品和优质水产饵料等(夏嵩等, 2014),具有较高的经济价值。微藻培养的营养条件对其生化组成特别是脂类和脂肪酸的组成密切相关(黄旭雄等, 2004)。海洋微藻的脂类组成不仅受自身遗传决定,而且受光照、温度、盐度和 pH 等环境因素和营养因素(氮、磷、铁)的影响(马若欣等, 2009)。氮、磷构成藻的蛋白质分子,参与生物的新陈代谢,铁是藻细胞叶绿素合成和细胞代谢的必需元素,也是限制藻生长的主要因素之一,在海洋系统中起重要作用(Sunda *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2003)。

关于营养因子对藻生长、总脂及脂肪酸的影响国内外报道较多,主要研究藻株有小球藻(*Chlorella* sp.) (张桂艳等, 2011)、普通小球藻(*Chlorella vulgaris*) (Liu *et al.*, 2008)、微绿球藻(*Nannochloris oculata*) (魏东等, 2000; 黄旭雄等, 2003)、球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*) (王学魁等, 2006)、牟氏角毛藻(*Chaetoceros mueller*) (王扬才, 2006; Wang, 2006; 于瑾等, 2006; 张贵杰等, 2006; 张国庆等, 2013)等。

三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)诱变株 MP-2 是一株生长速率快、脂肪酸含量高的藻株,是进行多不饱和脂肪酸研究的理想材料(叶丽等, 2015)。本文以 MP-2 为研究对象,通过单因子试验研究氮、磷、铁对该藻的细胞生长、总脂和脂肪酸组成的影响,从而为更好地开发利用该藻提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 藻种及培养

试验藻种三角褐指藻诱变株 MP-2 由紫外线照射诱变得到,保藏于宁波大学饵料生物培养室。试验用药品均为分析纯。培养用水采用舟山市朱家尖海域天然海水,经沙滤、暗沉淀、次氯酸钠消毒及硫代硫酸钠中和;以改良的宁波大学 3#母液配方(表 1)

表 1 改良的宁波大学 3#母液配方  
Table 1 Composition of improved 3# culture medium

营养盐成分	质量浓度(g · L <sup>-1</sup> )
KNO <sub>3</sub>	100
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2.5
MnSO <sub>4</sub>	0.25
EDTANa <sub>2</sub>	10
V <sub>B1</sub>	6×10 <sup>-3</sup>
V <sub>B12</sub>	5×10 <sup>-5</sup>

作为基础培养液配方,母液加入量 1 : 1000(蒋霞敏等, 2010)。试验开始前,藻种于 75 L 塑料白桶中活化和扩大培养。培养条件:盐度 25, pH 8.06, 温度 (20±1) °C, 自然光照, 充气培养。选取指数生长期的藻液进行试验。

1.2 试验方法

**1.2.1 氮浓度试验** 采用 KNO<sub>3</sub> 作为氮源, 缺氮的 3#母液为基础培养液, 设置氮浓度 5、10、15、20、25、30 和 35 mg · L<sup>-1</sup> 7 个梯度进行单因子试验。培养容器为 75 L 塑料白桶, 培养液为 50 L。试验前藻经氮饥饿处理, 试验接种密度 11×10<sup>4</sup> cell · mL<sup>-1</sup>, 各 3 平行, 培养条件: 盐度为 25, pH 为 8.06, 温度为 (20±1) °C, 自然光照, 充气培养。培养时间 10 d。

**1.2.2 磷浓度试验** 采用 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 作为磷源, 缺磷的 3#母液为基础培养液, 设置磷浓度 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 和 3.5 mg · L<sup>-1</sup> 7 个梯度进行单因子试验。试验前藻经磷饥饿处理, 接种密度 22×10<sup>4</sup> cell · mL<sup>-1</sup>, 其余条件同 1.2.1。

**1.2.3 铁源试验** 以缺铁的 3#母液为基础培养液, 设置铁源为 FeCl<sub>3</sub>、FeC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>、FeSO<sub>4</sub> 起始铁浓度均为 0.25 mg · L<sup>-1</sup>。试验前藻经铁饥饿处理, 接种密度 18×10<sup>4</sup> cell · mL<sup>-1</sup>, 其余条件同 1.2.1。

**1.2.4 铁浓度试验** 以缺铁的 3#母液为基础培养液, 采用 FeSO<sub>4</sub> 作为铁源, 设置铁浓度 0、0.1、0.25、0.5 和 1.0 mg · L<sup>-1</sup> 5 个梯度进行单因子试验。试验前藻经铁饥饿处理, 接种密度 20×10<sup>4</sup> cell · mL<sup>-1</sup>, 其余条件同 1.2.1。

### 1.3 藻细胞密度与生长速率的测定

每天定时取样,藻细胞密度测定采用血球计数板法计数。生长速率计算公式为:

$$K = (\ln N_t - \ln N_0) / t$$

式中, $t$ 为培养时间 $d$ , $N_t$ 为培养 $t$ 天后的细胞数, $N_0$ 为初始细胞数目。

生物量的测定:取一定体积培养至对数生长末期的藻液 $v(L)$ , $6000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 $10\text{ min}$ ,蒸馏水洗涤两次。将收集的藻泥放入冰箱, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下冷冻。 $1\text{ d}$ 后经 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻干燥(FD5-3T,Gold-SIM),藻粉称重 $m(g)$ ,以单位体积干重来表示,生物量 $(g \cdot L^{-1}) = m/v$ 。

### 1.4 总脂含量及脂肪酸的测定

**1.4.1 总脂抽提与测定** 采用改良的 Bligh-Dyer 法(Bligh *et al.*, 1959; 徐继林等, 2006)。

**1.4.2 脂肪酸组成分析** 采用 KOH 甲醇水法(Reiser *et al.*, 1997; 蒋霞敏等, 2007)。

**1.4.3 GC-MS 分析** 用日本 SHIMADZU 公司 QP2010 气相色谱-质谱分析仪、氢火焰离子化检测器(FID)和 HP-5 毛细管柱( $30\text{ m} \times 0.25\text{ mm}$ )检测脂肪酸成分。程序升温: $170\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温 $1\text{ min}$ ,然后以 $3\text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的升温速率升到 $210\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,保持 $17\text{ min}$ 。进样口温度为 $210\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。载气为高纯 $\text{N}_2$ ,流速 $45\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , $\text{H}_2$ 流速为 $40\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,空气流速为 $450\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,分流比为 $1:20$ ,进样量 $1\text{ }\mu\text{g}$ 。面积归一法计算各组分的相对百分含量(Chen, 2012; Ma *et al.*, 2013)。

### 1.5 数据处理

试验均采用3平行,所得数据用平均值( $M$ ) $\pm$ 标准差( $SD$ )表示,采用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素方差分析(ANOVA)和 Duncan 多重比较分析( $\alpha = 0.05$ ),用 Excel 进行图表制作。

## 2 结果与分析

### 2.1 氮浓度对三角褐指藻诱变株 MP-2 生长速率、总脂及脂肪酸的影响

试验结果表明(图1),不同氮浓度对三角褐指藻诱变株 MP-2 生长速率影响显著,随着氮浓度的升高,该藻的生长速率呈先升高后降低的趋势,并在氮浓度为 $20\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时得到最大值( $0.384 \pm 0.004$ ),且显著高于其他各组( $P < 0.05$ );当氮浓度超过 $30\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,该藻的生长速率显著低于其余各组( $P < 0.05$ ), $K$ 值仅( $0.281 \pm 0.011$ )。

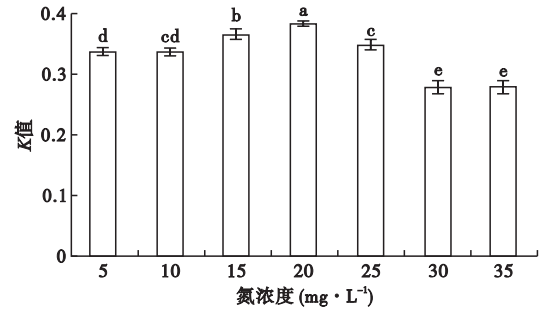


图1 不同氮浓度对三角褐指藻诱变株 MP-2 生长速率的影响  
Fig.1 Effect of nitrogen concentration on the growth rate of *Phaeodactylum tricornutum* mutant MP-2

不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ ),相同字母表示差异不显著( $P > 0.05$ )。下同。

不同氮浓度对三角褐指藻诱变株 MP-2 生物量的影响显著(图2),随着氮浓度的升高,该藻的生物量呈先增加后减少的趋势,在氮浓度为 $20\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时达到了最大生物量( $0.25 \pm 0.01$ ) $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,且显著高于其他各组( $P < 0.05$ );当氮浓度超过 $30\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,该藻的生物量( $0.14 \pm 0.01$ ) $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,显著低于其余各组( $P < 0.05$ )。

不同氮浓度对三角褐指藻诱变株 MP-2 总脂含量影响显著(图2),在氮浓度为 $30\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $35\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,该藻总脂含量可达( $26.51 \pm 1.96$ )%和( $24.79 \pm 0.67$ )%,且显著高于其余各组( $P < 0.05$ )。

在试验设定氮浓度下,共检出19种主要脂肪酸,其中饱和脂肪酸(SFA)8种、单不饱和脂肪酸(MUFA)4种、多不饱和脂肪酸(PUFA)7种。三角褐指藻诱变株 MP-2 的主要脂肪酸为 $\text{C14:0}$ 、 $\text{C16:0}$ 、 $\text{C16:1}$ (n-7)、 $\text{C16:2}$ (n-4)、 $\text{C18:0}$ 和EPA(表2),

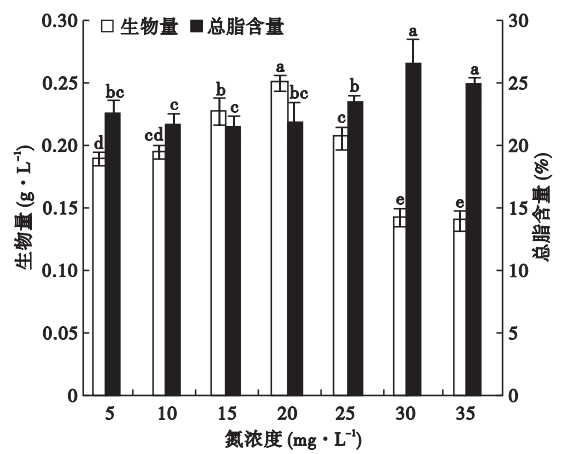


图2 不同氮浓度对三角褐指藻诱变株 MP-2 生物量和总脂的影响  
Fig.2 Effect of nitrogen concentration on the biomass and total lipid of *Phaeodactylum tricornutum* mutant MP-2

表 2 不同氮浓度对三角褐指藻诱变株 MP-2 的脂肪酸组成的影响  
Table 2 Effect of nitrogen concentration on the composition of fatty acid of *Phaeodactylum tricornutum* mutant MP-2

脂肪酸	处理(氮浓度)						
	5 mg · L <sup>-1</sup>	10 mg · L <sup>-1</sup>	15 mg · L <sup>-1</sup>	20 mg · L <sup>-1</sup>	25 mg · L <sup>-1</sup>	30 mg · L <sup>-1</sup>	35 mg · L <sup>-1</sup>
C14:0	7.32±0.15 c	7.45±0.13 bc	8.07±0.12 a	7.68±0.14 b	6.44±0.16 e	7.07±0.09 d	7.76±0.13 b
C15:0	0.37±0.12	0.38±0.10	0.37±0.11	0.28±0.08	ND	0.38±0.13	0.19±0.12
C16:0	18.61±0.23 a	18.26±0.19 a	16.73±0.20 b	15.2±0.21 d	15.97±0.17 c	15.81±0.19 c	15.26±0.24 d
C16:1(n-7)	26.36±0.22 d	27.3±0.21 c	27.91±0.24 b	27.19±0.20 c	28.32±0.25 b	29.1±0.28 a	27.54±0.22 c
C16:2(n-4)	6.48±0.16 a	5.78±0.15 b	3.44±0.14 d	5.58±0.17 b	6.65±0.17 a	6.38±0.19 a	4.65±0.16 c
C18:0	7.38±0.20 a	6.67±0.18 b	4.23±0.14 d	5.01±0.17 c	5.09±0.13 c	5.15±0.15 c	6.67±0.19 b
C18:1(n-9)	2.21±0.15 d	3.04±0.14 b	4.9±0.18 a	2.92±0.12 b	1.71±0.11 e	2.56±0.17 c	2.62±0.14 c
C18:2(n-6)	2.23±0.11 b	2.38±0.14 b	2.78±0.16 a	2.41±0.11 b	2.43±0.10 b	2.13±0.12 c	2.14±0.13 c
C18:3(n-6)	0.66±0.09 b	0.75±0.09 b	1±0.12 a	0.69±0.07 b	0.73±0.11 b	0.71±0.08 b	ND
C18:3(n-3)	0.2±0.10 ab	0.26±0.08 ab	0.17±0.04 b	0.33±0.10 a	0.39±0.12 a	0.27±0.07 ab	0.46±0.14 a
C20:0	0.17±0.07 b	0.16±0.08 b	0.12±0.05 b	0.3±0.08 a	0.13±0.04 b	0.24±0.06 a	0.37±0.12 a
C20:4(n-6)	2.74±0.12 e	3.09±0.11 c	3.89±0.16 a	3.43±0.14 b	2.82±0.10 d	3.11±0.12 c	2.24±0.11 f
C20:5(n-3)	18.96±0.19 e	19.86±0.19 d	21.9±0.17 c	22.57±0.19 b	24.15±0.26 a	21.14±0.18 d	19.03±0.20 e
C22:0	0.41±0.09 d	0.32±0.07 de	0.23±0.05 e	1.61±0.12 b	0.33±0.11 de	0.89±0.10 c	3.98±0.19 a
C22:1(n-9)	3.06±0.18 a	1.33±0.12 cd	1.12±0.10 d	1.43±0.15 c	1.48±0.14 c	2.01±0.15 b	0.74±0.13 e
C22:6(n-3)	0.51±0.07 b	0.65±0.08 ab	0.78±0.13 a	0.65±0.09 ab	0.61±0.08 ab	0.61±0.10 ab	ND
C24:0	2.01±0.10 c	2.04±0.09 c	2.05±0.12 c	2.47±0.14 b	2.5±0.13 b	2.17±0.11 c	5.7±0.16 a
C24:1(n-9)	0.32±0.10	0.28±0.08	0.31±0.11	0.25±0.07	0.25±0.06	0.27±0.04	ND
SFA	36.27±0.40 b	35.28±0.38 c	31.8±0.32 e	32.55±0.34 d	30.46±0.31 f	31.71±0.35 e	40.58±0.45 a
MUFA	31.95±0.31 b	31.95±0.32 b	34.24±0.37 a	31.79±0.35 b	31.76±0.29 b	33.94±0.33 a	30.9±0.28 c
PUFA	31.78±0.30 e	32.77±0.38 d	33.96±0.36 c	35.66±0.33 b	37.78±0.35 a	34.35±0.32 c	28.52±0.28 f
n-3PUFA	19.67±0.20 f	20.77±0.23 e	22.85±0.25 c	23.55±0.28 b	25.15±0.30 a	22.02±0.24 d	19.49±0.28 f
n-6PUFA	5.63±0.15 d	6.22±0.24 bc	7.67±0.20 a	6.53±0.23 b	5.98±0.18 c	5.95±0.16 c	4.38±0.14 e

ND:未检出;同一行中小写字母表示  $P<0.05$  水平下的显著性,相同字母表示差异不显著。下同。

试验结果表明,不同氮浓度对该藻 C15:0 和 C24:1(n-9)的含量无显著影响( $P>0.05$ ),但对其余脂肪酸含量影响显著( $P<0.05$ ),其中该藻 EPA 和 DHA 的含量随氮浓度的增加呈先上升后降低的趋势,EPA 含量在氮浓度为 25 mg · L<sup>-1</sup>时达到最大值,且显著高于其余各组( $P<0.05$ ),DHA 含量在氮浓度为 15 mg · L<sup>-1</sup>时达到最大值(0.78±0.13)%,高于其余各组;在 5~30 mg · L<sup>-1</sup>氮浓度条件下,该藻中的 SFA 含量随着氮浓度的上升而降低,但在 35 mg · L<sup>-1</sup>氮浓度条件下,该藻 SFA 含量显著高于其他各组( $P<0.05$ ),为(40.58±0.45)%。MUFA 的含量在 15 mg · L<sup>-1</sup>和 30 mg · L<sup>-1</sup>的氮浓度条件下,显著高于其他各组( $P<0.05$ ),为(34.24±0.37)%和(33.94±0.33)%;随着氮浓度的增加,PUFA 含量先上升后降低,在 25 mg · L<sup>-1</sup>氮浓度下,PUFA 含量显著高于其他各组( $P<0.05$ ),为(37.78±0.35)%;氮浓度 35 mg · L<sup>-1</sup>条件下,PUFA 含量显著低于其他各组( $P<0.05$ ),为(28.52±0.28)%(表 2)。

2.2 磷浓度对三角褐指藻诱变株 MP-2 生长速率、总脂及脂肪酸的影响

试验结果表明(图 3),不同磷浓度对三角褐指

藻诱变株 MP-2 生长速率影响显著( $P<0.05$ ),随着磷浓度的升高,该藻的生长速率呈先升高后降低的趋势,在磷浓度为 2.5 mg · L<sup>-1</sup>和 3.0 mg · L<sup>-1</sup>时,该藻生长速率可达(0.305±0.010)和(0.301±0.010),显著高于其他各组( $P<0.05$ )。

不同磷浓度对三角褐指藻诱变株 MP-2 的生物量的影响显著(图 4),随着磷浓度的升高,该藻的生物量呈先增加后减少的趋势,在磷浓度为 2.5 mg · L<sup>-1</sup>和 3.0 mg · L<sup>-1</sup>时,该藻生物量可达(0.28±0.02) g · L<sup>-1</sup>和(0.27±0.01) g · L<sup>-1</sup>,显著高于其他

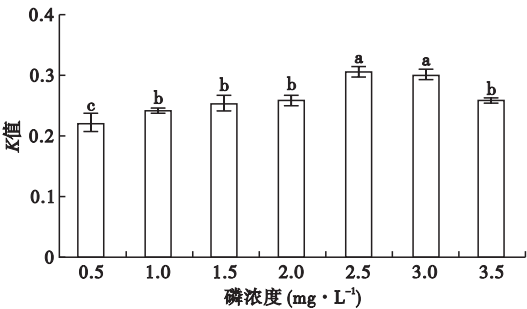


图 3 不同磷浓度对三角褐指藻诱变株 MP-2 生长速率的影响  
Fig.3 Effect of phosphorus concentration on the growth rate of *Phaeodactylum tricornutum* mutant MP-2



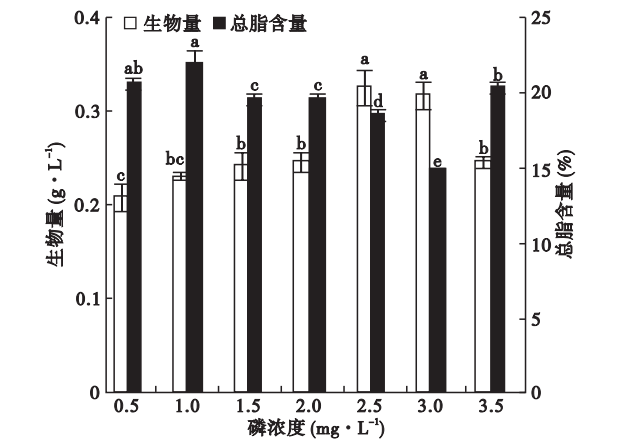


图 4 不同磷浓度对三角褐指藻诱变株 MP-2 生物量和总脂的影响  
Fig.4 Effect of phosphorus concentration on the biomass and total lipid of *Phaeodactylum tricornutum* mutant MP-2

各组 ( $P<0.05$ )。不同磷浓度对该藻总脂含量影响显著 (图 4)。随着磷浓度的升高,总脂含量显著降低,在磷浓度为  $1.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,该藻总脂含量可达  $(21.79\pm0.89)\%$ ,与依次降低的  $3.5$ 、 $2.0$ 、 $1.5$ 、 $2.5$  和  $3.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  各组之间差异显著 ( $P<0.05$ )。

在试验设定磷浓度下,共检出 17 种主要脂肪酸 (表 3),其中饱和脂肪酸 (SFA) 7 种、单不饱和脂肪酸 (MUFA) 3 种、多不饱和脂肪酸 (PUFA) 7 种。该藻的主要脂肪酸为  $\text{C14:0}$ 、 $\text{C16:0}$ 、 $\text{C16:1 (n-7)}$ 、 $\text{C16:2 (n-4)}$  和 EPA,其中磷浓度对该藻  $\text{C15:0}$  和  $\text{C18:3 (n-3)}$  含量的影响不显著 ( $P>0.05$ ),对其余脂肪酸含量影响显著 ( $P<0.05$ );当磷浓度为  $3.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,该藻细胞中 EPA 含量最低 ( $14.22\pm0.21\%$ ),显著低于其他各组 ( $P<0.05$ ),当磷浓度为  $2.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $2.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,藻中 EPA 含量最高为  $(25.82\pm0.34)\%$  和  $(25.85\pm0.33)\%$ ,显著高于其他组 ( $P<0.05$ );当磷浓度为  $1.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,该藻 DHA 的含量最低仅  $(0.24\pm0.06)\%$ ,显著低于其他各组 ( $P<0.05$ ),磷浓度为  $0.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,DHA 含量最高达  $(0.62\pm0.12)\%$ ,显著高于其他各组 ( $P<0.05$ )。磷浓度为  $1.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $2.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $2.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $3.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $3.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  各组之间无显著差异 ( $P>0.05$ );SFA 的含量在磷浓度为  $3.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时高达  $(44.98\pm0.44)\%$ ,显著高于其他各组 ( $P<0.05$ );该藻 MUFA 含量随着磷浓度的上升而降低;PUFA 的含

表 3 不同磷浓度下三角褐指藻诱变株 MP-2 的脂肪酸组成  
Table 3 Effect of phosphorus concentration on the composition of fatty acid of *Phaeodactylum tricornutum* mutant MP-2

脂肪酸	处理 (磷浓度)						
	$0.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$1.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$1.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$2.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$2.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$3.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$3.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$
C14:0	$7.62\pm0.13\text{ bc}$	$7.89\pm0.16\text{ b}$	$8.27\pm0.15\text{ a}$	$7.6\pm0.14\text{ bc}$	$7.39\pm0.10\text{ c}$	$6.88\pm0.11\text{ d}$	$7.47\pm0.17\text{ bc}$
C15:0	$0.3\pm0.04$	$0.33\pm0.10$	$0.32\pm0.07$	$0.3\pm0.11$	$0.24\pm0.05$	$0.33\pm0.08$	$0.26\pm0.09$
C16:0	$17.24\pm0.25\text{ a}$	$16.22\pm0.21\text{ b}$	$17.03\pm0.20\text{ a}$	$16.12\pm0.22\text{ b}$	$14.94\pm0.18\text{ c}$	$14.34\pm0.22\text{ c}$	$15.81\pm0.25\text{ b}$
C16:1 (n-7)	$31.21\pm0.31\text{ a}$	$30.65\pm0.33\text{ b}$	$29.22\pm0.28\text{ c}$	$29.31\pm0.25\text{ c}$	$28.14\pm0.24\text{ d}$	$26.62\pm0.20\text{ e}$	$28.4\pm0.29\text{ d}$
C16:2 (n-4)	$4.17\pm0.12\text{ e}$	$5.09\pm0.16\text{ d}$	$6.87\pm0.18\text{ a}$	$5.8\pm0.15\text{ c}$	$6.24\pm0.15\text{ b}$	$3.79\pm0.13\text{ f}$	$6.19\pm0.19\text{ b}$
C18:0	$2.79\pm0.18\text{ d}$	$2.43\pm0.12\text{ e}$	$3.15\pm0.15\text{ c}$	$3.16\pm0.12\text{ c}$	$3.96\pm0.14\text{ b}$	$6.33\pm0.20\text{ a}$	$4.19\pm0.18\text{ b}$
C18:1 (n-9)	$3.24\pm0.15\text{ b}$	$3.48\pm0.13\text{ b}$	$2.08\pm0.12\text{ d}$	$3.97\pm0.17\text{ a}$	$2.43\pm0.10\text{ c}$	$2.16\pm0.14\text{ d}$	$1.27\pm0.11\text{ e}$
C18:2 (n-6)	$1.31\pm0.10\text{ c}$	$2.07\pm0.11\text{ a}$	$1.88\pm0.10\text{ ab}$	ND	$1.94\pm0.09\text{ ab}$	$1.46\pm0.08\text{ c}$	$1.78\pm0.08\text{ b}$
C18:3 (n-6)	$0.92\pm0.08\text{ a}$	$0.86\pm0.05\text{ a}$	$0.75\pm0.09\text{ a}$	$0.91\pm0.08\text{ a}$	$0.9\pm0.10\text{ a}$	$0.49\pm0.04\text{ b}$	$0.84\pm0.06\text{ a}$
C18:3 (n-3)	$0.1\pm0.06$	$0.2\pm0.04$	ND	$0.2\pm0.06$	ND	ND	ND
C20:0	$0.1\pm0.05\text{ b}$	$0.09\pm0.03\text{ b}$	ND	$0.09\pm0.04\text{ b}$	$0.09\pm0.03\text{ b}$	$0.56\pm0.08\text{ a}$	ND
C20:4 (n-6)	$3.19\pm0.11\text{ d}$	$3.32\pm0.10\text{ cd}$	$3.53\pm0.15\text{ b}$	$3.59\pm0.16\text{ ab}$	$3.9\pm0.17\text{ a}$	$2.45\pm0.12\text{ e}$	$3.44\pm0.13\text{ bc}$
C20:5 (n-3)	$23.62\pm0.28\text{ c}$	$23.98\pm0.26\text{ c}$	$19.31\pm0.26\text{ d}$	$25.82\pm0.34\text{ a}$	$25.85\pm0.33\text{ a}$	$14.22\pm0.21\text{ e}$	$24.91\pm0.25\text{ b}$
C22:0	$0.24\pm0.08\text{ b}$	$0.2\pm0.05\text{ c}$	$0.42\pm0.11\text{ b}$	$0.24\pm0.09\text{ bc}$	$0.26\pm0.08\text{ bc}$	$6.61\pm0.15\text{ a}$	$0.33\pm0.10\text{ bc}$
C22:1 (n-9)	$1.59\pm0.11\text{ c}$	$1.44\pm0.13\text{ c}$	$2.29\pm0.13\text{ a}$	$1.94\pm0.12\text{ b}$	$1.58\pm0.11\text{ c}$	$2.25\pm0.14\text{ a}$	$2.08\pm0.11\text{ ab}$
C22:6 (n-3)	$0.62\pm0.12\text{ a}$	$0.48\pm0.09\text{ a}$	$0.24\pm0.06\text{ c}$	$0.5\pm0.10\text{ a}$	$0.5\pm0.09\text{ a}$	$0.41\pm0.05\text{ b}$	$0.47\pm0.10\text{ ab}$
C24:0	$1.74\pm0.17\text{ cd}$	$1.27\pm0.12\text{ d}$	$4.64\pm0.16\text{ b}$	$1.45\pm0.14\text{ d}$	$1.64\pm0.18\text{ cd}$	$9.93\pm0.18\text{ a}$	$1.75\pm0.15\text{ c}$
SFA	$30.03\pm0.30\text{ c}$	$28.43\pm0.32\text{ d}$	$33.83\pm0.35\text{ b}$	$28.96\pm0.33\text{ d}$	$28.52\pm0.29\text{ d}$	$44.98\pm0.44\text{ a}$	$29.81\pm0.31\text{ c}$
MUFA	$36.04\pm0.42\text{ a}$	$35.57\pm0.35\text{ a}$	$33.59\pm0.38\text{ b}$	$35.22\pm0.40\text{ a}$	$32.15\pm0.31\text{ bc}$	$31.03\pm0.33\text{ d}$	$31.75\pm0.37\text{ c}$
PUFA	$33.93\pm0.39\text{ d}$	$36\pm0.34\text{ c}$	$32.58\pm0.31\text{ e}$	$35.82\pm0.40\text{ c}$	$39.33\pm0.38\text{ a}$	$23.99\pm0.28\text{ f}$	$38.44\pm0.32\text{ b}$
n-3PUFA	$24.34\pm0.30\text{ c}$	$24.66\pm0.23\text{ c}$	$19.55\pm0.24\text{ d}$	$26.52\pm0.28\text{ a}$	$26.35\pm0.24\text{ a}$	$14.63\pm0.20\text{ e}$	$25.38\pm0.22\text{ b}$
n-6PUFA	$5.42\pm0.11\text{ c}$	$6.25\pm0.19\text{ b}$	$6.16\pm0.12\text{ b}$	$4.5\pm0.14\text{ d}$	$6.74\pm0.18\text{ a}$	$4.4\pm0.10\text{ d}$	$6.06\pm0.15\text{ b}$

量也随着磷浓度的改变而有所不同。

2.3 铁源对三角褐指藻诱变株 MP-2 生长速率和生物量的影响

不同铁源对三角褐指藻诱变株 MP-2 的生长速率影响显著 (图 5), 3 种铁源中,  $\text{FeSO}_4$  最适合该藻生长, 此时生长速率可达  $(0.363 \pm 0.006)$ , 且显著高于其余两种 ( $P < 0.05$ )。

不同铁源对该藻生物量的影响显著 (图 5), 当铁源为  $\text{FeSO}_4$  时藻有最大生物量  $(0.34 \pm 0.01) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 且显著高于其余两种 ( $P < 0.05$ )。以  $\text{FeSO}_4$  作为铁源时三角褐指藻诱变株 MP-2 有较高生长速率和较大生物量, 三角褐指藻诱变株 MP-2 培养应选取  $\text{FeSO}_4$  作为铁源。

2.4 铁源为  $\text{FeSO}_4$  时铁浓度对三角褐指藻诱变株 MP-2 生长速率、总脂和脂肪酸的影响

以  $\text{FeSO}_4$  作为铁源, 不同铁浓度对三角褐指藻诱变株 MP-2 生长速率的影响显著 (图 6)。高浓度的  $\text{FeSO}_4$  更有利于该藻的生长, 当铁浓度为  $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 该藻生长速率可达

$(0.495 \pm 0.006)$  和  $(0.494 \pm 0.003)$ , 显著高于其他组 ( $P < 0.05$ )。

试验结果表明 (图 7), 不同铁浓度对三角褐指藻诱变株 MP-2 的生物量影响显著, 当铁浓度为  $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 该藻生物量可达  $(0.87 \pm 0.04) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $(0.87 \pm 0.02) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 显著高于其他组 ( $P < 0.05$ )。铁浓度为  $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 藻细胞也能良好生长, 其生物量达  $(0.79 \pm 0.03) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 略高于  $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组  $(0.69 \pm 0.09) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组  $(0.78 \pm 0.03) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 但 3 组之间无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

不同铁浓度对该藻总脂含量影响显著 (图 7), 随着铁浓度的升高, 该藻的总脂含量呈先上升后降低的趋势, 并在铁浓度为  $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时有最大值, 为  $(28.86 \pm 0.50) \%$ , 显著高于其他组 ( $P < 0.05$ )。

试验结果表明 (表 4), 不同铁浓度对三角褐指藻诱变株 MP-2 的 C22:0 影响不显著 ( $P > 0.05$ ), 但对其余脂肪酸含量影响显著 ( $P < 0.05$ )。当铁浓度  $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 该藻 EPA 含量达  $(31.59 \pm 0.34) \%$ , 显著高于其余各组 ( $P < 0.05$ ); 当铁浓度为  $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 该藻中未检测到 DHA, 铁浓度  $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 该藻 DHA 含量仅有  $(0.32 \pm 0.08) \%$ , 显著低于其余各组 ( $P < 0.05$ ); 当铁浓度为  $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, SFA 含量最高, 达  $(51.60 \pm 0.52) \%$ , 显著高于其他各组 ( $P < 0.05$ ); 该藻 MUFA 的含量随着铁浓度的增加而逐渐降低,  $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, MUFA 含量最高, 为  $(42.9 \pm 0.43) \%$ , 显著高于其他各组 ( $P < 0.05$ ); 高浓度的  $\text{FeSO}_4$  有利于 PUFA 的合成。铁浓度大于  $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 该藻 PUFA 的含量占总脂

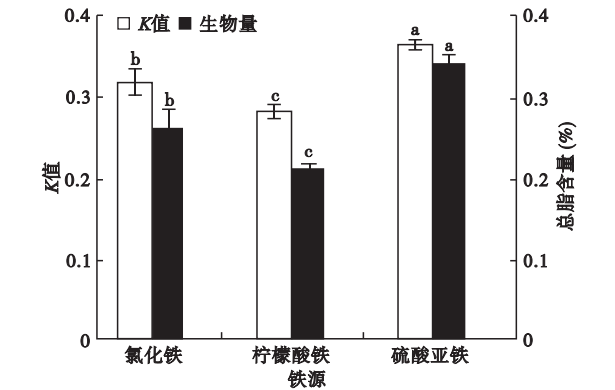


图 5 不同铁源对三角褐指藻诱变株 MP-2 生长速率和生物量的影响  
Fig.5 Effect of iron source on the growth rate and the biomass of *Phaeodactylum tricornutum* mutant MP-2

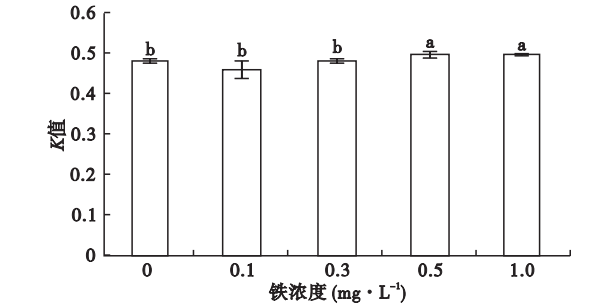


图 6 不同铁浓度对三角褐指藻诱变株 MP-2 生长的影响  
Fig.6 Effect of iron concentration on the growth rate of *Phaeodactylum tricornutum* mutant MP-2

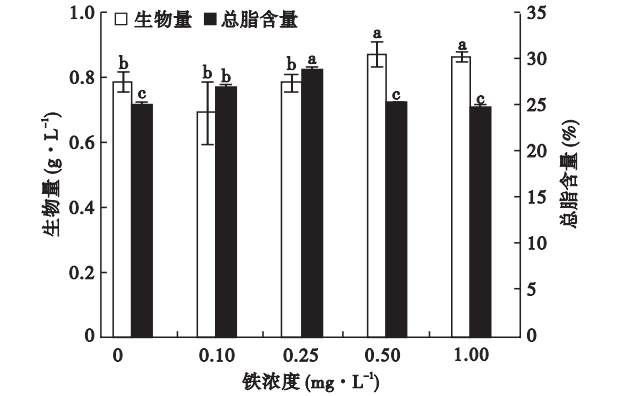


图 7 不同铁浓度对三角褐指藻诱变株 MP-2 生物量和总脂的影响  
Fig.7 Effect of iron concentration on the biomass and total lipid of *Phaeodactylum tricornutum* mutant MP-2

表 4 不同铁浓度对三角褐指藻诱变株 MP-2 的脂肪酸组成影响

Table 4 Effect of iron concentration on the composition of fatty acid of *Phaeodactylum tricornutum* mutant MP-2

脂肪酸	处理(铁浓度)				
	0.00 mg · L <sup>-1</sup>	0.10 mg · L <sup>-1</sup>	0.25 mg · L <sup>-1</sup>	0.50 mg · L <sup>-1</sup>	1.00 mg · L <sup>-1</sup>
C14:0	7.46±0.18 b	11.33±0.29 a	5.76±0.16 d	5.91±0.17 cd	6.18±0.20 c
C15:0	0.6±0.07 a	0.75±0.09 a	0.34±0.06 b	0.19±0.04 c	0.35±0.05 b
C16:0	28.02±0.28 b	31.8±0.34 a	16.7±0.21 cd	16.85±0.23 c	16.32±0.18 d
C16:1(n-7)	35.1±0.38 a	28.54±0.30 b	26.08±0.23 d	27.94±0.25 c	25.86±0.20 d
C16:2(n-4)	3.06±0.14 c	4.22±0.13 b	5.6±0.17 a	5.5±0.17 a	5.7±0.18 a
C18:0	2.56±0.11 a	2.5±0.12 a	1.66±0.10 b	1.15±0.12 c	1.52±0.13 b
C18:1(n-9)	7.8±0.20 a	5.4±0.19 c	5.02±0.15 d	6.41±0.21 b	5.01±0.16 d
C18:2(n-6)	ND	1.6±0.11 b	2.53±0.12 a	2.69±0.13 a	2.49±0.12 a
C20:4	ND	0.33±0.03 c	1.05±0.10 a	0.72±0.08 b	0.62±0.07 b
C20:5(n-3)	11.07±0.20 d	7.99±0.18 e	30.5±0.31 b	28.47±0.28 c	31.59±0.34 a
C22:0	ND	0.38±0.08 a	0.17±0.09 b	0.12±0.05 b	ND
C22:6(n-3)	ND	0.32±0.05 c	2.06±0.10 a	1.81±0.12 b	1.95±0.11 ab
C24:0	4.33±0.16 b	4.84±0.15 a	2.53±0.13 c	2.24±0.10 d	2.41±0.12 cd
SFA	42.97±0.45 b	51.6±0.52 a	27.16±0.26 c	26.46±0.25 d	26.78±0.27 cd
MUFA	42.9±0.43 a	33.94±0.36 b	31.1±0.30 c	34.35±0.38 b	30.87±0.31 c
PUFA	14.13±0.25 d	14.13±0.26 d	40.69±0.40 b	38.47±0.36 c	41.73±0.42 a
n-3PUFA	11.07±0.21 d	8.31±0.19 e	32.56±0.32 b	30.28±0.30 c	33.54±0.36 a
n-6PUFA	ND	1.93±0.11 c	3.58±0.14 a	3.41±0.12 a	3.11±0.10 b

肪酸的40%以上;而0 mg · L<sup>-1</sup>和0.10 mg · L<sup>-1</sup>时,该藻 PUFA 的含量仅为(14.13±0.26)%,显著低于其他组( $P<0.05$ )。

3 讨 论

3.1 氮浓度对藻的生长和组分影响

氮是微藻生长必需的大量元素之一,在细胞中参与氨基酸、嘧啶、卟啉、嘌呤、氨基糖和胺类化合物等合成(Seppälä *et al.*, 1999),在藻类的生长代谢中起着重要的作用(胡章喜等, 2009)。

不同藻类对氮源的需求有不同。纤细角毛藻(*Chaetoceros gracilis*)、赤潮异弯藻(*Heterosigma akashiwo*)、亚历山大藻(*Alexandrium* sp.)在NH<sub>4</sub>Cl环境中的增殖速率高于CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(张青田等, 2005)。以等浓度的NH<sub>4</sub>Cl和CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>为氮源时,NH<sub>4</sub>Cl可使中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)获得较高的生长率(滕亚娟, 2006),简单双眉藻(*Ampirhora exigua*)则对两种氮源均能很好地利用(周银环, 2008)。

不同的藻种对氮浓度的需求也有差异。链状亚历山大藻(*Alexandrium catenella*)生长适合氮浓度为221~8830 μmol · L<sup>-1</sup>(Siu *et al.*, 1997);微小亚历山大藻(*Alexandrium minutum*)生长适合氮浓度为882~2646 μmol · L<sup>-1</sup>(李昌伟等, 2014)。本研究表明,MP-2生长适合氮浓度为5~35 mg · L<sup>-1</sup>,生长最

佳氮浓度为20 mg · L<sup>-1</sup>。该藻在达到最适氮浓度前,增殖速率与氮的浓度呈正相关;超过最适浓度的氮浓度反而会抑制藻的生长。这可能是由于生长后期,磷源被耗尽,导致培养液中的氮/磷比例失调所致(Kolber *et al.*, 1988)。

氮浓度不仅会对细胞的生长速度造成影响,甚至也会到对微藻细胞内物质的合成和积累产生影响。普通小球藻,浮水小球藻(*Chlorella emersonii*),原始小球藻(*Chlorella protothecoides*),小球藻(*Chlorella sorokiniana*),微小小球藻(*Chlorella minutissima*)在低氮培养条件下的油脂含量平均比高氮培养下增加一倍,最高达到干重的63%(Illman *et al.*, 2000)。低氮浓度下微绿球藻的总脂含量高,高氮浓度下总脂含量反而低(黄旭雄等, 2003)。本文中,氮浓度对MP-2总脂的影响表现出与上述结论完全相反的趋势,随着氮浓度的升高,MP-2的总脂含量逐渐升高,在氮30 mg · L<sup>-1</sup>下达到最大值(26.51±1.96)%。氮浓度对该藻的影响表现为生长不利条件下促进油脂积累。

氮浓度对微藻的脂肪酸组成也有显著影响(Masaki *et al.*, 2011)。微绿球藻的脂肪酸随氮浓度的增加而升高,PUFA和EPA均呈上升趋势(黄旭雄等, 2003)。一般来说,微藻的PUFA和EPA的比例随氮浓度的增加而增加(Yongmanitchai *et al.*, 1991;易翠平等, 1998)。本研究表明,在氮浓

度为  $5 \sim 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,随着氮浓度增加,PUFA 和 EPA 含量逐渐上升;当培养液中氮浓度达到  $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , PUFA 和 EPA 含量达到最大 ( $37.78 \pm 0.35\%$  和  $24.15 \pm 0.26\%$ ),并随着氮浓度的进一步增加而降低。但并非所有的藻都遵循这种趋势,一种绿藻 (*Parietochloris incisa*) 在氮饥饿的条件合成较多的 PUFA (Goldberg *et al.*, 2002),说明氮浓度对微藻脂肪酸组成的影响因种而异。

### 3.2 磷浓度对藻生长和组分的影响

磷是构成生命的最重要的元素之一,对藻类生长有着重要的作用,不同的微藻对磷源的利用率也不同 (Chae *et al.*, 1996)。牟氏角毛藻 (*Chaetoceros muelleri*) 在  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  中的生长速度高于  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (张国庆等, 2013)。原甲藻 (*Prorocentrum lima*) 在  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  中的生长速率高于  $\beta$ -甘油磷酸钠和 ATP (杨维东等, 2008)。 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  和  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  对直链藻 (*Melosira* sp.) 生长的影响差异不大,但  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  稍优于  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (王珺等, 2013)。

微藻对磷浓度的适应范围因藻种而异。过低或过高的磷浓度都会抑制微藻的生长和光合作用,影响微藻的基本生理功能。塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*) 生长适合的磷浓度在  $4.0 \sim 4.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 当磷浓度超过  $5.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,其生长便会受到抑制 (张宜辉等, 1999)。链状亚历山大藻 (东海株) (*Alexandrium catenella*) 在  $0.60 \sim 4.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的磷酸盐浓度范围内,磷酸盐浓度增加能够显著提高比增长率 (李天深等, 2009)。当磷低于  $1.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,微藻处于缺磷状态;高于  $600 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,微藻的生长受到严重抑制;  $30 \sim 120 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  为最适生长浓度 (朱明等, 2004; 石岩峻等, 2003)。本研究表明,MP-2 在磷浓度  $0.5 \sim 3.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  均能良好生长,生长的最佳磷浓度为  $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。该藻在达到最适磷浓度前,随着磷浓度增加,生长速率逐渐增大;超过最适浓度后,磷浓度升高并不能提高生长速率,反而抑制了微藻的生长。这可能是由于磷浓度过高,导致氮/磷比例失调,从而抑制了微藻的生长。

磷浓度不仅对微藻的生长产生影响,对微藻的生物活性物质的积累也有一定的影响。低磷有利于 MP-2 总脂的积累,在磷含量  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  条件下,该藻总脂含量最高 ( $21.79 \pm 0.89\%$ )。磷对该藻总脂含量的影响表现为不利生长的磷浓度促进油脂积累 (李荷芳等, 2000)。

磷含量显著影响细胞内 PUFA 的含量,主要是

因为细胞中的多不饱和脂肪酸 (PUFA) 多以极性脂的形式存在,如磷脂 (Qu *et al.*, 2008)。本研究中,磷浓度对 MP-2 脂肪酸也产生了显著的影响,与上述结论相同。在最佳生长磷浓度 ( $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 下,MP-2 的 EPA 和 PUFA 含量显著高于其他组。磷浓度对该藻 EPA 和 PUFA 的影响表现为适宜生长的磷浓度促进 EPA 和 PUFA 的合成。

### 3.3 铁源及其浓度对藻的生长和组分影响

铁是限制藻生长的主要因素之一,是浮游植物叶绿素合成和细胞代谢的必需元素,在海洋系统中起重要作用。

海水中 Fe 有多种形态 ( $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA、 $\text{Fe}^{2+}$ -EDTA、胶体水合氧化铁),藻类对铁的形态要求因藻种而异。有机络合态铁和胶体水合氧化铁更适合作为海生小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 的铁源 (欧明明等, 2002)。本试验 3 种铁源 ( $\text{FeCl}_3$ 、 $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 、 $\text{FeSO}_4$ ) 中, $\text{FeSO}_4$  作为 MP-2 的铁源显著优于其他两种铁源,这和  $\text{FeCl}_3$  更有利于球等鞭金藻的生长 (王珺等, 2002) 不一致。

藻类的生长需要适宜的铁浓度,铁浓度过高或过低时均会抑制藻的生长 (Wang, 2006)。三角褐指藻培养基中添加  $11.64 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$  最为适宜,低于此浓度不利于藻的生长,高于此浓度不利于油脂积累 (王晓青等, 2011)。双眉藻 (*Amphora exigua*) 在铁浓度  $0 \sim 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  内均能良好生长,最适的铁浓度为  $0.1 \sim 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  (周银环, 2008)。本研究表明,MP-2 在铁浓度范围为  $0 \sim 1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  内均能生长,低浓度 ( $\leq 0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的铁不利于该藻生长,其生长的最适铁浓度为  $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。该藻的最佳产脂铁浓度为  $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 该藻在达到最适铁浓度前,随着铁浓度增加,总脂含量逐渐增大;超过最适浓度后,铁浓度升高并不能继续促进总脂积累,反而抑制了微藻总脂的合成。因此,在规模化培养时可采用二次培养法,即首先在最适铁浓度下培养,获得较高生物量,后转入低浓度铁条件培养,使其积累较高的总脂,这还有待于进一步研究。

脂肪酸双键的形成是由去饱和酶催化完成的,脂肪酸去饱和酶存在 3 个保守的组氨酸簇,它们与  $\text{Fe}^{2+}$  结合形成酶的活性中心 (魏东等, 2000)。因此,培养基中铁的存在量还可能会影响微藻的去饱和酶的活性,影响微藻的生理生化过程,进而影响微藻脂肪酸的组成。小球藻在一定的范围内随着铁浓



度的提高脂肪酸含量升高(李荷芳等, 2000)。在小球藻的生长后期补加不同浓度的  $\text{Fe}^{3+}$  对其脂肪酸含量影响显著, 不补加  $\text{Fe}^{3+}$  时脂肪酸含量为 7.8%, 补加  $\text{Fe}^{3+}$   $0.012 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时其脂肪酸含量升至 56.6%(Liu *et al.*, 2008)。本研究表明, MP-2 的 EPA、DHA 和 PUFA 含量均随着铁浓度的升高而逐渐增加, 在铁浓度  $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, EPA 和 PUFA 的含量均达到最大 ( $31.59 \pm 0.34$ )% 和 ( $41.73 \pm 0.42$ )%; 缺铁或低铁条件下, 该藻中 EPA 和 DHA 的含量极低, 甚至检测不到, PUFA 的含量也极低, 但 SFA 含量达到 ( $42.97 \pm 0.45$ )%, 显著高于铁浓度较高时。这可能是由于培养基中缺少  $\text{Fe}^{2+}$ , 脂肪酸去饱和酶的保守组氨酸簇无法与  $\text{Fe}^{2+}$  结合形成酶的活性中心, 脂肪酸去饱和酶失效, 无法将饱和脂肪酸去饱和所致。

#### 参考文献

- 胡章喜, 安民, 段舜山, 等. 2009. 不同氮源对布朗葡萄藻生长总脂和总烃含量的影响. 生态学报, **29**(6): 3288-3294.
- 黄旭雄, 周洪琪, 袁灿东, 等. 2003. 氮源及浓度对微绿球藻营养价值的影响. 上海水产大学学报, **12**(2): 113-116.
- 黄旭雄, 周洪琪, 朱建忠, 等. 2004. 不同生长阶段微绿球藻的营养价值. 水产学报, **28**(4): 477-480.
- 蒋霞敏, 柳敏海, 邢晨光. 2007. 不同生态条件对绿色巴夫藻生长及脂肪酸组成的影响. 水生生物学报, **31**(1): 88-93.
- 蒋霞敏, 黄旭雄, 朱艺峰, 等. 2010. 营养与饵料生物培养试验教程. 北京: 高等教育出版社.
- 李昌伟, 冯超, 江天九. 2014. N、P、Fe、Mn 对微小亚历山大藻生长及产毒的影响. 海洋环境科学, **33**(3): 341-343.
- 李荷芳, 周汉秋. 2000. 营养盐对小球藻的生长、脂肪酸含量及 EPA 含量影响的研究. 海洋科学集刊, (42): 55-64.
- 李天深, 于仁成, 周名江. 2009. 链状亚历山大藻(东海株)对磷营养物质的需求与吸收策略. 海洋环境科学, **28**(4): 355-359.
- 马若欣, 王学魁, 曹春晖. 2009. 氮浓度和光照强度对小新月菱形藻生长和总脂含量的影响. 天津科技大学学报, **24**(3): 31-34.
- 欧明明, 张曼平, 冯媛媛. 2002. 海水中铁的几种形态对海生小球藻生长的影响. 青岛海洋大学学报, **32**(4): 627-633.
- 石岩峻, 胡晗华, 马润宇, 等. 2003. 塔玛亚历山大藻对氮和磷的吸收及其生长特性. 应用生态学报, **14**(7): 1143-1146.
- 滕亚娟. 2006. 不同氮源对骨条藻生长的影响. 水利渔业, **26**(4): 55-56.
- 王珺, 李红, 王嫣. 2002. 球等鞭金藻 3011 的生长与其营养盐关系的研究. 海南大学学报, **20**(4): 319-323.
- 王珺, 王爱雯, 陈国华, 等. 2013. 几种主要营养元素对直链藻生长速率的影响. 海南大学学报自然科学版, **31**(3): 218-223.
- 王晓青, 王嫁, 江雪, 等. 2011. 三角褐指藻油脂富集培养的研究. 四川大学学报: 自然科学版, **48**(3): 691-696.
- 王学魁, 王云生, 孙之南, 等. 2006.  $\text{NaNO}_3$  浓度对球等鞭金藻生长及所含脂肪酸的影响. 生物技术, **16**(1): 61-63.
- 王扬才. 2006. 氮磷铁营养盐浓度对牟氏角毛藻生长的影响. 海洋渔业, **28**(2): 173-176.
- 魏东, 张学成, 隋正红, 等. 2000. 氮源和对眼点拟微球藻的生长、总脂含量和脂肪酸组成的影响. 海洋科学, **24**(7): 46-51.
- 魏东, 张学成. 2000. 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. 海洋科学, **21**(8): 42-46.
- 夏嵩, 万凌琳, 李爱, 等. 2014. 微藻生物质产品和生物活性物质的研究与开发. 天然产物研究与开发, **26**(1): 463-469.
- 徐继林, 严小军, 周成旭, 等. 2006. 19 种(株)海洋微藻脂肪酸组成及充气产生的影响. 宁波大学学报: 理工版, **19**(2): 180-185.
- 杨维东, 钟娜, 刘洁生, 等. 2008. 不同磷源及浓度对利玛原甲藻生长和产毒的影响研究. 环境科学, **29**(10): 2760-2765.
- 叶丽, 蒋霞敏, 毛欣欣, 等. 2015. 温、光、盐对三角褐指藻紫外诱变株生长、总脂及脂肪酸的影响. 生态学杂志, **34**(2): 454-457.
- 易翠平, 周洪琪, 丁卓平, 等. 1998. 氮源及其浓度对微绿球藻生长、总脂肪含量及脂肪酸组成的影响. 上海水产大学学报, (7): 332-337.
- 于瑾, 蒋霞敏, 梁洪, 等. 2006. 氮、磷、铁对牟氏角毛藻生长速率的影响. 水产科学, **25**(3): 121-124.
- 张贵杰, 孟二力. 2006. 不同氮源对牟氏角毛藻增殖的影响. 河北渔业, (2): 25-26.
- 张桂艳, 温小斌, 梁芳. 2011. 重要理化因子对小球藻生长和油脂产量的影响. 生态学报, **31**(8): 2076-2085.
- 张国庆, 邓湘云, 李建保, 等. 2013. 氮磷铁硅营养盐对牟氏角毛藻生长的影响. 河北渔业, (3): 8-11.
- 张青田, 董双林, 胡桂坤, 等. 2005. 海洋科学不同氮源对微藻增殖的影响. 海洋科学, **29**(2): 8-11.
- 张宜辉, 连玉武. 1999. 磷对赤潮生物塔马亚历山大藻的增殖效应. 海洋环境科学, **18**(4): 24-27.
- 周银环. 2008. 氮、磷、铁、硅对简单双眉藻生长的影响. 广东海洋大学学报, **28**(1): 35-39.
- 朱明, 张学成, 茅云翔. 2004. 海链藻对氮磷需求量的研究. 水产养殖, **25**(1): 33-36.
- Bligh EG, Dyer WJ. 1959. A rapid method of lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, **37**: 911-917.
- Chae HL, Ozkanca R, Flint P. 1996. The effect of osmotic

- stress on survival and alkaline phosphatase activity of *Aeromonas hydrophila*. *FEMS Microbiology Letters*, **137**: 19–24.
- Chen M, Robert CH, Wang WX. 2003. Marine diatom uptake of iron bound with natural colloids of different origins. *Marine Chemistry*, **81**: 177–189.
- Chen YC. 2012. The biomass and total lipid content and composition of twelve species of marine diatoms cultured under various environments. *Food Chemistry*, **131**: 211–219.
- Goldberg KI, Bigogno C, Shrestha P, et al. 2002. Nitrogen starvation induces the accumulation of arachidonic acid in the freshwater green alga *Parietochloris incise* (Trebuxiophyceae). *Journal of Phycology*, **38**: 991–994.
- Illman AM, Scragg AH, Shales SW. 2000. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme and Microbial Technology*, **27**: 631–635.
- Kolber Z, Zehr J, Falkowski P. 1988. Effects of growth irradiance and nitrogen limitation on photosynthetic energy conversion in photosystem II. *Plant Physiology*, **88**: 923–929.
- Liu ZY, Wang GC, Zhou BC. 2008. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulagris*. *Bioresource Technology*, **99**: 4717–4722.
- Ma YB, Wang ZY, Zhu M, et al. 2013. Increased lipid productivity and TAG content in *Nannochloropsis* by heavy-ion irradiation mutagenesis. *Bioresource Technology*, **136**: 360–367.
- Masaki O, Yoshitaka K, Masaru W, et al. 2011. Effects of nitrate and oxygen on photoautotrophic lipid production from *Chlorococcum littorale*. *Bioresources Technology*, **102**: 3286–3292.
- Qu CB, Wu ZY, Shi XM. 2008. Phosphate assimilation by *Chlorella* and adjustment of phosphate concentration in basal medium for its cultivation. *Biotechnology Letters*, **30**: 1735–1740.
- Reiser S, Somerville C. 1997. Isolation of mutants of *Acinetobacter calcoaceticus* deficient in wax ester synthesis and complementation of one mutation with a gene encoding a fatty acyl-coenzyme A reductase. *Journal of Bacteriology*, **179**: 2969–2975.
- Seppälä J, Tamminen T, Kaitala S. 1999. Experimental evaluation of nutrient limitation of phytoplankton communities in the Gulf of Riga. *Journal of Marine Systems*, **23**: 107–126.
- Siu GKY, Young MLC, Chan DKO. 1997. Environmental and nutritional factors which regulate population dynamics and toxin production in the dinoflagellate *Alexandrium catenella*. Asia-Pacific Conference on Science and Management of Coastal Environment. Netherlands: Springer: 117–140.
- Sunda WG, Huntsman SA. 1997. Interrelated influence of iron, light and cell size on marine phytoplankton growth. *Nature*, **390**: 389–392.
- Wang YC. 2006. Effects of nitrogen, phosphorus and iron on the growth of *Chaetoceros muelleri*. *Marine Fisheries*, **28**: 173–176.
- Yongmanitchai W, Ward OP. 1991. Growth of and omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricornutum* under different culture conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, **57**: 419–425.

---

作者简介 梁晶晶,女,1990年生,硕士研究生,主要研究方向为微藻生态。E-mail: 1245558982@qq.com  
责任编辑 李凤芹

---