

3种处理对纤细角毛藻生长及细胞生化组成的影响

张娜¹, 胡文峰¹, 靳翠丽^{1,2}, 李嘉梁¹, 周晓见^{1,2}

(1. 扬州大学环境科学与工程学院, 江苏 扬州 225127; 2. 扬州大学海洋科学与技术研究所, 江苏 扬州 225127)

摘要: 纤细角毛藻 (*Chaetoceros gracilis*) 是海水养殖育苗过程中重要的饵料生物, 其生长速度和营养成分组成对育苗的效率和品质都有重要意义. 本研究通过单因子试验研究了温度、盐度和超声波3种处理方式对纤细角毛藻生长、蛋白质和总脂占比的影响. 结果表明, 温度和盐度都显著影响纤细角毛藻的生长, 5~40 min 的超声波处理不影响纤细角毛藻的生长; 纤细角毛藻生长的最适条件是温度为 25℃, 盐度为 25; 3种处理方式对纤细角毛藻的蛋白质和总脂占比都有显著影响, 其中超声波处理影响最显著, 短时间处理 (5 min) 能使蛋白质占比达到最高值, 长时间处理 (40 min) 能使总脂占比达到最高值. 本研究的实验结果可以作为饵料微藻二段培养所采用条件的参考依据.

关键词: 海洋生物学; 纤细角毛藻; 生长; 细胞物质组成; 二段培养

DOI: 10.3969/J. ISSN. 2095-4972. 2018. 02. 012

中图分类号: P735

文献标识码: A

文章编号: 2095-4972(2018)02-0248-07

单胞藻作为一种海洋生物资源, 在饵料、医药、食品、能源等领域均具有广泛的应用价值^[1-2]. 单胞藻作为生物饵料、能源物质的生物反应器或其它工业原料, 不仅需要在其细胞内合成和积累大量的目标物质, 还应该能够在较短的时间内形成充足的生物量^[3-4]. 单胞藻的细胞增殖和生长受生活环境等多方面的影响, 如光照、温度、盐度、酸碱度、营养盐等都是影响其生长的主要因素. 另外, 不同环境下培养的单胞藻细胞所含有的蛋白质、脂肪、糖类的产量和质量都有着明显的差异. 因此可以通过控制或优化微藻的培养条件, 来获得更多的微藻生物产品^[5]. 大量的研究表明, 丰富的藻类生物量与目标物质占比往往不能在同一条件下获得, 因此, Markou 等(2013)提出了“二段培养”的方法, 该方法的基本设想是第一阶段为单胞藻提供最适生长的培养条件以获得最大藻细胞生物量, 在第二阶段, 将这些单胞藻细胞转换到最适合目标物质生产的培养条件下进行短期培养, 在第一阶段获得的较大生物量的基础上, 第二阶段的短期培养不会显著降低生

物量, 但在第二阶段培养优化了单胞藻的物质组成, 可提高目标物质占比^[6]. 当然, 两个阶段采用的最优培养条件往往因藻种和目标物质的不同而各不相同, 也可能种间区别很大. 所以, 就具体某一特定的藻种而言, 其二段培养条件往往是根据藻种和目标物质分别进行确定.

纤细角毛藻 (*Chaetoceros gracilis*) 是硅藻的一种, 属于中心藻纲、盒形藻目、角毛藻科、角毛藻属 (*Chaetoceros*). 纤细角毛藻细胞内含有丰富的脂肪酸、蛋白质、多糖等营养物质, 是海水育苗过程中重要的生物饵料, 在多种双壳贝类和甲壳类以及海胆、海参的幼体孵育过程中是不可或缺的优质饵料^[7]. 单胞藻的生长和光合作用受温度的影响, 而且胞内理化成分的合成和积累也和温度密切相关^[8]. 而盐度决定藻细胞的渗透压, 影响质膜的通透性, 从而影响物质的交换、环境水体的中 CO₂ 和 O₂ 的多寡以及藻细胞的代谢速率^[9]. 已有的研究表明, 纤细角毛藻对温度和盐度都比较敏感, 二者都是影响纤细角毛藻生长的重要因素. 而超声波在生物技术中的

收稿日期: 2017-07-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(41776156, 41271521); 教育部科学技术研究重点资助项目(211065); 扬州大学大学生科技创新资助项目(2017 环境学院 19 号)

作者简介: 张娜(1993~), 女, 硕士研究生; E-mail: 1449513095@qq.com

通讯作者: 周晓见(1976~), 男, 教授, 博士; E-mail: zhouxiaojian@yzu.edu.cn

应用是近年来比较新的研究领域. 许多研究发现, 超声作用可以激活酶或细胞的某些反应过程. 一般来说, 较低强度的超声波可以通过改进反应体系的质量传输机制, 提高酶的催化活性或加速细胞的新陈代谢过程. 因为超声技术本身是一种简单而廉价的技术, 操作简单方便, 无二次污染, 其在废水处理、水华控制领域中的应用已经取得显著效益, 它在生物技术中其它领域中的应用范围也日益扩大^[10]. 已有的一些研究发现, 超声波处理能使单胞藻细胞膜的通透性、光合反应活性或叶绿素含量发生改变, 但超声波对于单胞藻细胞内物质积累影响的研究, 相对缺乏^[11]. 因此, 本研究以纤细角毛藻为研究对象, 研究温度、盐度、超声波处理对纤细角毛藻生长和细胞物质组成的影响, 通过分析比较, 以期筛选出纤细角毛藻最适的生长条件, 以及有利于积累蛋白质和总脂占比的最佳处理方式和强度. 为纤细角毛藻的规模化培养与开发提供实验依据.

1 材料和方法

1.1 藻种来源

受试藻种为纤细角毛藻, 由香港科技大学海洋海岸实验室提供.

1.2 培养条件和试验设计

纤细角毛藻的基础培养基采用人工海水(盐度为 30)配置的 f/2 培养基. 第一阶段培养的条件是: 温度为 28℃, 光照强度为 3 000 lx, 光周期为 L:D = 12:12^[12].

第二阶段培养实验采用单因素实验. 温度设置 15、25、35℃ 等 3 个梯度. 人工海水的盐度在 20~40 之间设置 5 个梯度, 分别为 20、25、30、35、40, 并以此配置各处理组的培养基. 超声波(300 W、80 kHz)在 0~40 min 的处理时间内设置 6 个梯度(0、5、15、25、35、40 min). 所有实验均有 3 个重复.

取已经培养了 7 d 处于指数生长期的角毛藻藻液, 4 000 r/min 离心 10 min, 收集藻细胞, 用人工海水清洗 2 次后, 转接入新培养基, 每个 150 cm³ 的锥形瓶中藻液体积为 100 cm³, 藻细胞的初始密度在 4.200 × 10⁶ ~ 4.698 × 10⁶ 个/cm³ 之间. 所有接种后的三角瓶根据实验设置进行相应处理之后, 置于光照培养箱静置培养 6 d, 每天定时摇动 3 次, 且随机改变其位置使受光均匀. 每天取样测量藻液在 495 nm 处的 OD 值, 在第 6 天测量藻液的蛋白质和脂肪占比.

1.3 测定方法

1.3.1 生长情况测定 用血球计数板计数纤细角

毛藻的细胞密度, 并计算比生长速率, 其公式为:

$$\mu = (\ln N - \ln N_0) / T \quad (1)$$

式(1)中: μ 为比生长速率(d⁻¹); N_0 是起始细胞密度(10⁶ 个/cm³); N 是经过 T 时间之后的细胞密度(10⁶ 个/cm³); T 代表生长时间(d)^[13].

1.3.2 藻干重测定 培养 6 d 后, 取摇匀后的藻液 30 cm³ 于已烘干至恒重的 0.22 μm 滤膜上进行抽滤, 用蒸馏水清洗 2 次后, 将滤纸置于 85℃ 烘箱烘干至恒重, 精密电子天平称重, 计算藻的干重^[8].

1.3.3 蛋白质和总脂占比的测定 采用考马斯亮蓝染色法测定角毛藻细胞内蛋白质占比^[14]. 具体方法为: 取 30 cm³ 藻液离心(4 000 r/min) 10 min, 弃上清, 加蒸馏水定容至 30 cm³ 后摇匀, 冰浴中超声粉碎(700 W, 超声 5 s, 间隔 3 s) 10 min. 离心, 取 1 cm³ 上清液, 加入考马斯亮蓝染色液 5 cm³ 后摇匀, 静置反应 5 min, 于 595 nm 处测定吸光值, 计算蛋白质占比.

采用氯仿/甲醇抽提法测定总脂的占比^[15]. 具体的方法如下: 取摇匀的藻液 50 cm³, 离心(4 000 r/min) 10 min, 藻细胞用蒸馏水洗 2 次后, 加入 20 cm³ 氯仿甲醇混合溶剂(体积比为 2:1), 摇匀后浸泡过夜. 冰浴中超声粉碎 10 min(700 W, 超声 3 s, 间隔 5 s) 后, 摇床(150 r/min) 振荡 10 min, 再离心(4 000 r/min) 10 min, 弃去水层及含有藻细胞碎片的混合层, 收集下面的氯仿层, 加入等体积的水后摇匀, 离心(4 000 r/min) 10 min, 收集氯仿层并置于 60℃ 烘箱内干燥至恒重, 称量后计算总脂占比.

1.3.4 蛋白质和总脂占比计算 蛋白质和总脂占比计算公式为:

$$P = n/m \times 100\% \quad (2)$$

式(2)中: P 代表蛋白质或总脂占比(%), n 代表单位体积藻液中蛋白质或总脂的质量(mg/cm³), m 代表单位体积藻液中藻细胞的干重(mg/cm³)^[16].

1.4 数据分析

所有实验重复 3 次, 数据采用 IBM SPSS22 软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 多重比较采用 LSD 或 Dunett's T3 方法, 各分析指标差异显著性以 $p = 0.05$ 或 $p = 0.01$ 作为标准^[17].

2 结果与讨论

2.1 不同处理对纤细角毛藻生长的影响

纤细角毛藻经过第一阶段的培养, 细胞密度的范围为 4.200 × 10⁶ ~ 4.698 × 10⁶ 个/cm³(表 1~3). 在不同温度、盐度以及不同时间的超声波处理条件下, 在第二阶段新的培养基中培养, 细胞密度在第二

阶段培养的 6d 内均持续增加至最终密度。

经检验分析,温度对纤细角毛藻的生长影响极显著(表 1,比生长速率群组间 $p = 0.000$)。25℃ 是角毛藻生长的最适温度,35℃ 次之,最差的是 15℃。25℃ 处理的最终细胞密度可达 9.886×10^6 个/cm³,

而 15℃ 时角毛藻的最终细胞密度只有 6.576×10^6 个/cm³,前者是后者的 1.5 倍。25℃ 处理的比生长速率是 15℃ 处理的 2 倍左右,35℃ 处理的细胞密度和比生长速率均处于 25℃ 和 15℃ 处理之间。

表 1 纤细角毛藻在不同温度下的比生长速率

Table 1 Specific growth rates of *Chaetoceros gracilis* under treatments of different temperature

温度/℃	培养物起始密度/10 ⁶ 个·cm ⁻³	培养物最终密度/10 ⁶ 个·cm ⁻³	比生长速率/d ⁻¹
15	4.200 ± 0.101	6.576 ± 0.171C	0.075 ± 0.004C
25	4.200 ± 0.101	9.886 ± 0.324A	0.143 ± 0.006A
35	4.200 ± 0.101	8.319 ± 0.272B	0.114 ± 0.005B

注:n=3;不同字母表示处理组间差异极显著, $p < 0.01$;无字母表示处理组间差异不显著, $p > 0.05$;下同

盐度也是影响角毛藻生长的显著性因素(表 2,比生长速率群组间 $p = 0.002$)。纤细角毛藻在盐度为 20~30 的范围内均可生长。其中,最适盐度是 25,最终细胞密度可达 9.896×10^6 个/cm³,比生长速率最高(0.124 d⁻¹)。盐度超过 35 对角毛

藻生长不利,35 的最终细胞密度只有 9.118×10^6 个/cm³,统计学分析表明在盐度为 35、40 的条件下最终细胞密度和比生长速率均显著低于盐度为 25 处理组。

表 2 纤细角毛藻在不同盐度下的比生长速率

Table 2 Specific growth rates of *Chaetoceros gracilis* under treatments of different salinity

盐度	培养物起始密度/10 ⁶ 个·cm ⁻³	培养物最终密度/10 ⁶ 个·cm ⁻³	比生长速率/d ⁻¹
20	4.698 ± 0.132	9.533 ± 0.157AB	0.118 ± 0.003B
25	4.698 ± 0.132	9.896 ± 0.255A	0.124 ± 0.004A
30	4.698 ± 0.132	9.533 ± 0.190AB	0.118 ± 0.003B
35	4.698 ± 0.132	9.118 ± 0.136B	0.110 ± 0.002C
40	4.698 ± 0.132	9.284 ± 0.072B	0.114 ± 0.001BC

不同时长的超声波处理对角毛藻生长的影响不大(表 3,比生长速率群组间 $p = 0.150$)。不同时长的超声波处理条件下,角毛藻的最终细胞密度都在 $8.848 \times 10^6 \sim 9.533 \times 10^6$ 个/cm³ 之间,比生长速率

在统计分析上无显著性差异。

总体而言,纤细角毛藻的生长受温度、盐度的控制,最适温度是 25℃,最适盐度是 25,5~40 min 的超声波处理不影响纤细角毛藻的生长。

表 3 纤细角毛藻在不同超声波处理时间下的比生长速率

Table 3 Specific growth rates of *Chaetoceros gracilis* treated by ultrasonic wave with different time

超声波处理时间/min	培养物起始密度/10 ⁶ 个·cm ⁻³	培养物最终密度/10 ⁶ 个·cm ⁻³	比生长速率/d ⁻¹
0	4.231 ± 0.291	9.533 ± 0.190	0.135 ± 0.003
5	4.231 ± 0.291	9.222 ± 0.336	0.130 ± 0.006
15	4.231 ± 0.291	9.087 ± 0.271	0.127 ± 0.005
25	4.231 ± 0.291	8.848 ± 0.583	0.123 ± 0.011
35	4.231 ± 0.291	9.035 ± 0.118	0.126 ± 0.002
40	4.231 ± 0.291	9.522 ± 0.218	0.135 ± 0.004

2.2 不同处理对纤细角毛藻细胞蛋白质占比的影响

如图 1 所示,温度、盐度、超声波 3 种处理对纤细角毛藻的蛋白质占比都有极显著的影响. 低温有利于纤细角毛藻积累蛋白质,25℃ 时蛋白质占比只有 11.3%,15℃ 时蛋白质占比达到 15.6%,是 25℃ 处理组的 1.4 倍(图 1a). 较高盐度有利于纤细角毛藻积累蛋白质,在盐度为 20~30 范围内,蛋白质占比只有 11.0%~11.6%,盐度为 35 使蛋白质占比提高到 13.2%,是 30℃ 处理组的 1.2 倍(图 1b). 短时间超声波处理(5~35 min)有利于提高纤细角毛藻的蛋白质占比,未经过超声处理的蛋白质占比是 11.0%,5 min 超声波处理使蛋白质占比达到 18.7%,是其 1.7 倍(图 1c). 比较而言,虽然 3 种处理方式都能在一定程度上提高纤细角毛藻的蛋白质占比,但 5 min 超声波处理使蛋白质占比提高的幅度最大,最有利于纤细角毛藻积累蛋白质,可以使得蛋白质的占比最高提升至 18.7%,是未经处理的 1.7 倍.

2.3 不同处理对纤细角毛藻总脂占比的影响

如图 2 所示,温度、盐度、超声波处理对纤细角毛藻的总脂占比均有极显著的影响. 较高温度有利于纤细角毛藻积累脂肪,15℃ 时脂肪占比为 27.9%,25℃ 和 35℃ 时分别能达到 39.1% 和 36.0%,最高能提高至 1.4 倍(图 2a). 盐度对纤细角毛藻积累脂肪也有显著影响,盐度为 20 和 35 时总脂占比分别可以达到 56.3% 和 56.1%,均接近盐度为 30 处理组脂肪占比的 1.3 倍(图 2b). 长时间的超声波处理有利于纤细角毛藻积累脂肪,超声波处理 40 min 使细胞的总脂占比达到 57.1%,是对照组的 1.3 倍(图 2c).

比较而言,改变温度对角毛藻总脂占比的绝对提升幅度最小,改变盐度和使用一定时长的超声波处理都能使纤细角毛藻总脂占比大幅度提高,其中经过超声波处理 40 min 可以使总脂占比最高提升至 57.1%.

2.4 讨论

供应生物量充足、营养丰富的单胞藻饵料是海水养殖育苗中幼体孵育的基本保障;海洋单胞藻的培养,对海水养殖育苗而言,是一个重要的环节^[18]. 纤细角毛藻生长快、繁殖迅速、容易培养,同时富含大量的脂肪酸、蛋白质等营养物质^[7]. 但在实际生产中由于营养盐浓度低,往往存在培养效率低、细胞密度小(室外培养密度最大仅为 2×10^6 个/ cm^3 左右)的问题^[12].

温度是影响单胞藻生长的重要环境因子,对单

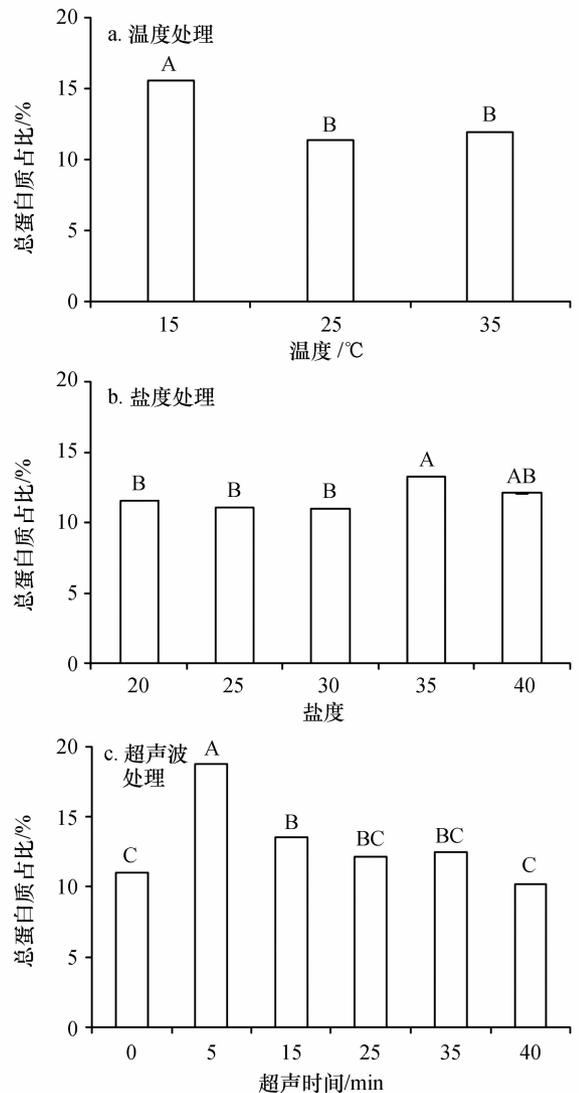


图 1 不同处理条件下纤细角毛藻细胞的蛋白质占比
Fig. 1 Total protein content of *Chaetoceros gracilis* under different treatments

$n=3$; 数据上方的不同字母说明处理组间差异极显著 ($p < 0.01$), 下同

胞藻的季节丰度和地理分布都有重要作用^[19]. 单胞藻大多对温度的变化很敏感,在合理的范围内提升培养温度,可促进大多数单胞藻的生长,但过高的温度也可能导致光合作用效率变换和营养盐缺乏而抑制单胞藻生长^[20]. 本研究结果表明,温度对纤细角毛藻的生长影响很大,纤细角毛藻喜高温,在低温 15℃ 时生长缓慢,细胞密度很低,在 25~35℃ 范围内生长良好,而最适温度是 25℃,细胞密度可达 9.886×10^6 个/ cm^3 ,这与孙利芹等(2004)报道纤细角毛藻的最适温度为 23℃ 的结果^[21]接近,与闫爱菊等(2009)报道的纤细角毛藻在温度为 25℃ 时呈现最佳生长的结果一致^[22].

盐度影响藻细胞的渗透压、营养盐吸收效率、细

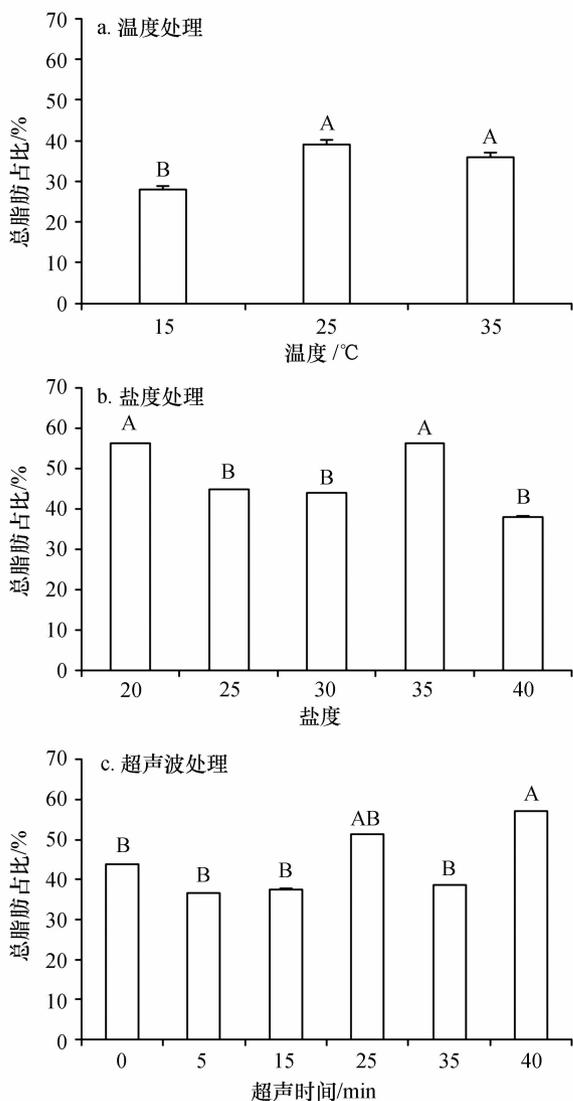


图2 不同处理条件下纤角毛藻细胞的脂肪占比

Fig. 2 Total lipid content of *Chaetoceros gracilis* under different treatments

胞悬浮性,超出合理范围的过高或者过低的盐度对藻类细胞而言,均会造成伤害,并可能导致细胞死亡^[12,23]. 本研究结果表明,适合纤角毛藻生长的盐度范围是20~30,最适盐度是25,此结果与闫爱菊等报道的纤角毛藻生长的最佳盐度为30较为接近^[22].

超声波对单胞藻生长的影响,不同的藻类和不同的超声强度和處理时间,往往研究结果不统一. 有许多研究表明,超声波处理能抑制藻类(绿藻、硅藻、蓝藻)的生长^[24]. 也有研究认为,超声波处理不影响单胞藻的生长,如四尾栅藻(*Scenedesmus quadricauda*)接受短时间的超声波处理(200 W, 40 kHz)后进行二次培养,生物量与对照差异不大,生长基本不受影响^[11]. 还有研究表明,在频率为20 kHz、功率为6 W、辐射时间为10s 3次时,牟氏角毛藻

(*Chaetoceros muelleri*)的平均生长速率最高,并推测因为短时间低能量的超声辐射产生的机械振动能刺激物质经细胞半透膜的弥散,加速了营养成分的传输,从而增强了新陈代谢作用,有利于单胞藻的生长^[25]. 可见,超声波对单胞藻生长的影响效果不仅受藻的种类的影响,同时还可能受超声波的频率、功率、时间、是否间隔等多方面因素的影响. 本研究结果表明,5~40 min的超声波处理(300 W, 80 kHz)对纤角毛藻的生长未发现明显影响. 相比较而言,对纤角毛藻生长影响最显著的因素是温度,其次是盐度,而超声波时间在0~40 min内对纤角毛藻生长基本无影响. 因此,纤角毛藻生长的最适条件是温度为25℃,盐度为25.

单胞藻作为生物饵料,对养殖动物(包括幼体)的营养价值,不仅与单胞藻的大小、可消化性有关,更取决于单胞藻的生化组成对动物(包括幼体)的营养需求的满足程度^[26]. 单胞藻的生化组成会直接影响到苗种培育的成活率,其中,蛋白质和脂肪的占比尤为重要^[8]. 温度、盐度和超声波均被报道可影响单胞藻细胞合成脂肪和蛋白质. 钱振明等(2009)关于8种硅藻的研究结果表明,温度不仅影响硅藻的生长和光合作用,而且还对胞内理化成分的合成和积累有较大影响,当温度超出15~30℃的范围,无论高低均不利于细胞生长和胞内成分的积累^[8]. 朱松玲等(2005)研究盐度对杜氏盐藻(*Dunaliella salina*)的生理生化效应时发现,在最适盐度中盐藻的光合速率、细胞增长速率、光合色素增长速率、游离氨基酸总量及多聚不饱和脂肪酸总量均高于生活在其它盐度的藻^[27]. 另外,有研究发现四尾栅藻接受短时间的超声波处理(200 W, 40 kHz)后进行二次培养,细胞的脂肪占比可大幅度提高^[11]. 超声辐射也可以提高亚心形扁藻(*Platymonas subcordiformis*)、球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)以及牟氏角毛藻的生长速率和脂肪酸不饱和度及主要不饱和脂肪酸的占比^[25,28-29]. 本研究的实验结果表明,温度、盐度、超声波处理对纤角毛藻蛋白质和脂肪的占比都有极显著的影响. 低温(15℃)、较高盐度(35)和短时间超声波处理(5 min)均都有利于纤角毛藻积累蛋白质. 其中5 min超声波处理使蛋白质占比提高的幅度最大,是纤角毛藻积累蛋白质的最有利条件. 改变盐度和超声波处理时长对于提升纤角毛藻的脂肪占比的效果比改变温度更高效,低盐(20)、长时间超声波处理(40 min)都能使总脂占比大幅度提高,其中超声波处理40 min可以使总脂占比提升至最高值. 综合分析来看,超声波处理无论对

纤细角毛藻的蛋白质占比还是脂肪占比都有显著影响,短时间处理(5 min)可以达到蛋白质占比的最高值,长时间处理(40 min)可以使脂肪占比达到最高值. 超声波处理对培养液中的单胞藻产生的影响机制目前尚未完全明确. 但是,超声波辐照的机械机制作用必然使液体质点运动增强,使边界层、细胞膜、细胞壁附近及胞液中的质量传输加速^[10]. 更为重要的是,藻液被超声处理之后会发生空化效应,即产生空化气泡,气泡绝热收缩至崩溃的瞬间会造成极端的温度和压力. 在合适的参数条件下,该极端的温度和压力可使单胞藻加速细胞内脂肪或其它物质的合成^[11]. 另外,超声波处理技术简单、费用低廉,已在规模化废水处理和水质控制等领域中有较为成熟的应用,也使其具有应用于大量单胞藻培养液处理的可能^[10].

所以,在利用“二段培养”法对纤细角毛藻进行培养时,可以先在第一阶段提供纤细角毛藻的最适生长条件(温度为 25℃,盐度为 25)培养到较高的

细胞密度,之后更换新的培养基进行第二阶段培养,根据需求选择合适的处理以获得丰富的目标物质产量,包括超声波处理 5 min 以提高细胞的蛋白质占比,或超声波处理 40 min 以提高细胞的总脂占比.

3 结论

就纤细角毛藻的生长而言,温度和盐度都是其显著影响因素,而本研究所使用的 5 ~ 40 min 的超声波处理对其无显著影响. 本研究所使用 3 种处理方式对纤细角毛藻的蛋白质和总脂占比都有显著影响,其中超声波处理的影响最显著;较短时间处理可获得最高蛋白质占比,较长时间处理可获得最高总脂占比. 以二段培养的方式培养纤细角毛藻可采用以下方案:一段培养条件在温度为 25℃、盐度为 25 以获得较高的细胞密度;二段培养条件为超声波处理 5 min 以获得较高的蛋白质占比,或超声波处理 40 min 以获得较高的总脂占比.

参考文献:

- [1] 李冰, 张学成, 高美华. 钝顶螺旋藻藻蓝蛋白和多糖的抗肿瘤免疫活性研究[J]. 中国海洋大学学报:自然科学版, 2004, 34(3): 396-402.
- [2] 李桂菊, 段永梅, 赵茹玉. 小球藻热解特性及其液化制油实验分析[J]. 天津科技大学学报, 2014, 29(2): 30-35.
- [3] 陈文煊, 王志红. 不同形态氮对富营养化水源藻华暴发的潜在影响[J]. 给水排水, 2008, 34(9): 22-27.
- [4] 王溢, 符茹, 裴国风, 等. 2012. 不同氮源对三角褐指藻生长和脂类含量的影响[J]. 湖北农业科学, 2012, 51(23): 5 310-5 314.
- [5] Harun R, Singh M, Forde G M, et al. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2010, 14: 1 037-1 047.
- [6] Markou G, Nerantzis E. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: a review with focus on cultivation under stress conditions[J]. Biotechnology Advances, 2013, 31: 1 532-1 542.
- [7] 梁英, 麦康森, 孙世春, 等. 不同培养基对纤细角毛藻生长的影响[J]. 海洋科学, 2001, 25(1): 16-17.
- [8] 钱振明, 邢荣莲, 吴春雪, 等. 温度对 8 种底栖硅藻生长及其理化成分的影响[J]. 烟台大学学报:自然科学与工程版, 2009, 22(1):30-34.
- [9] 张亚丽, 席北斗, 许秋瑾. 盐度作为咸水湖富营养化基准指标的可能性初探[J]. 环境工程技术学报, 2011, 1(3): 260-263.
- [10] 丁彩梅, 丘泰球. 超声-生物法在废水处理中的研究进展[J]. 应用声学, 2003, 22(3): 45-48.
- [11] Han F, Pei H, Hu W, et al. The feasibility of ultrasonic stimulation on microalgae for efficient lipid accumulation at the end of the logarithmic phase[J]. Algal Research, 2016, 16: 189-194.
- [12] 田治立, 王长海, 于贞, 等. 纤细角毛藻培养条件优化[J]. 海洋科学, 2005, 29(2): 5-7.
- [13] Kong Q X, Zhu L Z, Shen X Y. The toxicity of naphthalene to marine *Chlorella vulgaris* under different nutrient conditions [J]. Journal of Hazardous Materials, 2010, 178, 282-286.
- [14] 李娟, 张耀庭, 曾伟, 等. 应用考马斯亮蓝法测定总蛋白含量[J], 中国生物制品学杂志, 2000, 13(2): 118-120.
- [15] 刘建国, 赵学武, 王玉君, 等. 胁迫条件下盐藻 β -胡萝卜素及其异构体累积的研究-盐度的影响[J]. 海洋与湖沼, 1994, 25(1): 71-76.
- [16] 王蒙, 李纯厚, 戴明, 等. 不同因素对牟氏角毛藻生长和总脂含量的影响[J]. 贵州农业科学, 2011, 39(1): 47-51.
- [17] 高忠江, 施树良, 李钰. SPSS 方差分析在生物统计的应用[J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(11): 2 116-2 120.
- [18] 王扬才. 氮磷铁营养盐浓度对牟氏角毛藻生长的影响[J]. 海洋渔业, 2006, 28(2): 173-176.

- [19] Wilson S, Blake C, Berges J A, et al. Environmental tolerances of free-living coralline algae (maerl): implications for European marine conservation[J]. *Biological Conservation*, 2004, 120(2): 279-289.
- [20] 梁英, 冯力霞, 尹翠玲, 等. 高温胁迫对三角褐指藻和纤细角毛藻叶绿素荧光动力学的影响[J]. *中国海洋大学学报: 自然科学版*, 2006, 36(3): 427-433.
- [21] 孙利芹, 郭尽力, 王长海. 影响纤细角毛藻生长的因素及其脂肪酸组成的研究[J]. *食品与发酵工业*, 2004, 30(12): 31-34.
- [22] 闫爱菊, 吴惠仙, 薛俊增, 等. 纤细角毛藻种群增长最适培养因子研究[J]. *水产养殖*, 2009, 30(4): 38-41.
- [23] 朱明, 张学成, 茅云翔, 等. 温度、盐度及光照强度对海链藻(*Thalassiosira* sp.)生长的影响[J]. *海洋科学*, 2003, 27(12): 58-61.
- [24] 姜登岭, 倪国葳, 高林, 等. 低频、低功率超声波抑制藻类生长的效果[J]. *生态环境学报*, 2009, 18(5): 1 732-1 735.
- [25] 李文权, 张元标, 陈清花, 等. 超声辐射对牟氏角毛藻的生物效应研究[J]. *海洋科学*, 2001, 25(10): 39-42.
- [26] 周洪琪, Renaud S M, Parry D L, 等. 温度对新月菱形藻、铲状菱形藻和杷夫藻的生长、总脂肪含量以及脂肪酸组成的影响[J]. *水产学报*, 1996, 20(3): 235-240.
- [27] 朱松玲, 王怡洁. 盐度变化对杜氏盐藻的游离氨基酸和脂肪酸含量的影响[J]. *海洋科学*, 2005, 29(3): 8-11.
- [28] 张元标, 李文权, 陈清花. 超声辐射提高亚心形扁藻脂肪酸不饱和度研究[J]. *台湾海峡*, 2001, 20(s1): 91-96.
- [29] 李文权, 王清池, 陈清花, 等. 超声波对球等鞭金藻脂肪酸组成的效应研究[J]. *海洋科学*, 2000, 24(4): 7-9.

Effect of three factors on the growth and cell chemical composition of *Chaetoceros gracilis*

ZHANG Na¹, HU Wen-feng¹, JIN Cui-li^{1,2}, LI Jia-liang¹, ZHOU Xiao-jian^{1,2}

(1. College of Environmental Science & Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China;

2. Marine Science & Technology Institute, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China.)

Abstract: The growth rate and the nutrient composition of *Chaetoceros gracilis* cells, as one of important food organisms for breeding marine commercial animals, significantly affect the breeding efficiency and the quality of aquaculture larvae. The effects of three factors, including temperature, salinity and ultrasonic wave, on growth, protein and lipid contents of *C. gracilis* were studied in respective single factor experiments. The results indicate that temperature and salinity significantly affected the growth of *C. gracilis* while the 5 ~ 40 min treatments with ultrasonic wave did not have significant difference in growth. The optimal conditions for *C. gracilis* growth are at temperature 25 °C and salinity 25. The protein and lipid contents of *C. gracilis* were significantly affected by all three factors, among which ultrasonic wave treatment brought the highest difference. The short time (5 min) ultrasonic wave treatment resulted in highest protein content and long time (40 min) ultrasonic wave treatment led to the highest lipid content in *C. gracilis* cells. The experimental results in present study provided an important reference basis for designing treatment in the second stage of two-stage culture for microalgae.

Key words: marine biology; *Chaetoceros gracilis*; growth; cell chemical composition; two-stage culture

DOI:10.3969/J.ISSN.2095-4972.2018.02.012

(责任编辑:方建勇)