

季 祥, 乔 岩, 成 杰, 等. 拟微绿球藻生长条件优化[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(2): 154–156.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.02.046

拟微绿球藻生长条件优化

季 祥^{1,2}, 乔 岩¹, 成 杰^{1,2}, 刘鲜艳¹, 赵昕宇^{1,2}, 郑添慧¹, 徐迪华¹, 蔡 禄^{1,2}

(1. 内蒙古科技大学数理与生物工程学院, 内蒙古包头 014010; 2. 内蒙古自治区生物质能源化利用重点实验室, 内蒙古包头 014010)

摘要:采用单因素试验和正交试验 $L_{16}(4^5)$, 研究不同浓度的 N、P、Fe、Mg 以及维生素混合液对拟微绿球藻生长的影响。结果表明, 拟微绿球藻最适生长的条件是 $f/2$ 培养基中添加 0.225 g/L NaNO_3 、0.015 g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.018 9 g/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.025 g/L MgCl_2 , 1 L 维生素混合液体积为 0.05 mL。

关键词:拟微绿球藻; 矿质元素; 维生素; 正交设计; 生长条件

中图分类号: S968.41⁺9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)02-0154-03

拟微绿球藻是一类属于真眼点藻纲 (Eustigmatophyceae), 近似球形的单细胞真核生物^[1], 具有较高的光合作用效率和油脂含量^[2], 长速度快, 适合作水生动物的饵料。藻中的多不饱和脂肪酸如二十碳五烯酸 (EPA)、二十二碳六烯酸 (DHA) 等对水产动物的影响效果明显^[3-5]。但由于拟微绿球藻易受环境和不同营养盐等多种条件的影响, 其质量和产量不稳定。在生产过程中资金投入大, 成本高, 产量和生物量都较低。针对这种情况, 本研究对拟微绿球藻的营养盐含量进行单因素试验和正交试验, 旨在优化其生长条件, 以使其能满足微藻现代化的大批量运用。

1 材料与方法

1.1 材料

材料为拟微绿球藻, 内蒙古自治区生物质能源利用重点实验室保存。

1.2 方法

采用 $f/2$ 培养基为基本培养基, 培养基配方为 0.075 g/L

NaNO_3 、0.005 g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 微量元素溶液是由 4.16 g Na_2EDTA 、3.15 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.01 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.022 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.01 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.18 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、0.006 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶于去离子水中, 并定容至 1 000 mL, 每 1 L 培养基取 1 mL; 维生素混合溶液由 0.1 g 维生素 B_1 、0.005 g 维生素 B_{12} 、0.005 g 生物素溶于去离子水中, 并定容至 1 000 mL, 每 1 L 培养基取 1 mL。

培养基中分别添加 NaNO_3 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 MgCl_2 、维生素混合液, 以考察不同浓度 N、P、Fe、Mg 和维生素混合液对藻生长影响。 NaNO_3 浓度梯度分别为 0.019、0.038、0.075、0.150、0.225 g/L; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 浓度梯度分别为 0.001、0.003、0.005、0.011、0.017 g/L; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 浓度梯度分别为 0.000 79、0.001 57、0.003 15、0.006 30、0.009 45 g/L; MgCl_2 浓度梯度分别为 1.245、2.491、4.981、9.962、14.943 g/L; 维生素混合液加入体积梯度分别为 0.25、0.50、1.00、2.00、3.00 mL/L。

为研究 N、P、Fe、Mg 和维生素混合液浓度对拟微绿球藻生长交互作用, 采用 5 因素 4 水平正交设计, 各因素水平如表 1 所示。

2 结果与分析

2.1 NaNO_3 浓度对拟微绿球藻生长的影响

氮源是藻类生长的限制因子之一。在藻细胞中, 氮是控制光合作用的元素。当氮源不足时, 光合作用减弱且有利于饱和脂肪酸的合成; 但当氮源浓度过高时, 微藻生长也会受到

收稿日期: 2015-12-04

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金 (编号: 2015MS0335); 内蒙古自治区教育厅自然科学重点项目 (编号: NJZZ14162); 大学生创新基金 (编号: 2014026)。

作者简介: 季 祥 (1978—), 男, 内蒙古包头人, 副教授, 从事生物质能、微藻生物技术研究。E-mail: jixiang@imust.cn。

通信作者: 蔡 禄, 教授, 博士生导师, 从事分子生物学、生物质能源及生物信息学研究。E-mail: nmcailu@163.com。

(2) 体质量 = $-353.458 + 3.085 \times \text{胸围} + 1.186 \times \text{体斜长}$ ($R=0.907, P<0.01$); (3) 体质量 = $-359.525 + 2.428 \times \text{胸围} + 1.052 \times \text{体斜长} + 0.707 \times \text{腹围}$ ($R=0.913, P<0.01$)。

参考文献:

- [1] 苏金明, 傅荣华, 周建斌, 等. 统计软件 SPSS for Windows 实用指南[M]. 北京: 电子工业出版社, 2000: 418–439.
- [2] 田亚磊, 高腾云, 张花菊, 等. 鲁山牛腿山羊体重与体尺性状相关性分析[J]. 江苏农业科学, 2009(6): 288, 291.

- [3] 焦平林. 秦川淮北及秦淮 F1 黄牛体尺体重回归分析[J]. 黄牛杂志, 1998, 24(4): 6–7.
- [4] 李永禄, 邱 怀, 冯仰廉, 等. 养牛学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1987: 235–236.
- [5] Faroppa V. Standard of the breed and regulations[J]. La Razza Bovina Piemontese, 1993(4): 9–19.
- [6] 曹红鹤. 意大利皮埃蒙特肉牛线性体型评分方法[J]. 黄牛杂志, 1999, 25(4): 17–19.
- [7] 王占红, 何永涛, 郭维春, 等. 沿江牛成年母牛体重与体尺指标的相关与回归分析[J]. 中国畜牧杂志, 2007, 43(1): 12–13.

表 1 拟微绿球藻生长环境因素优化 L₁₆ (4⁵) 正交试验设计

水平	A:NaNO ₃ (g/L)	B:NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O (g/L)	C:FeCl ₃ · 6H ₂ O (g/L)	D:MgCl ₂ (g/L)	E:维生素混合液 (mL/L)
1	0.075	0.001	0.000 32	0.005	0.05
2	0.225	0.015	0.004 73	0.025	0.25
3	1.125	0.025	0.012 60	0.149	1.50
4	1.875	0.050	0.018 90	1.494	4.00

抑制,不利于饱和脂肪酸的合成^[6-7]。硝酸盐一直是培养拟微绿球藻的一种普通氮源,不同藻类对氮源的需求量和敏感度不同。NaNO₃ 浓度对拟微绿球藻生长的影响如图 1 所示。NaNO₃ 在较低浓度时,由于缺少氮源,导致拟微绿球藻的生长缓慢。在一定范围内,随着 NaNO₃ 浓度的增加,其细胞数目呈上升趋势。相关分析表明,NaNO₃ 浓度与拟微绿球藻生物量呈极显著正相关 ($P < 0.01$),当 NaNO₃ 的浓度为 0.15 g/L 时,拟微绿球藻的 $D_{680\text{ nm}}$ 值最高,说明在此浓度下其细胞生长量最大,生长状况最佳。因此,NaNO₃ 最适浓度为 0.15 g/L。

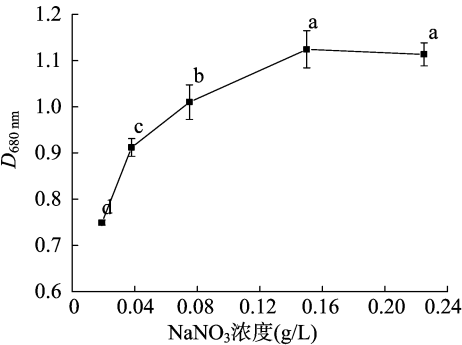


图1 NaNO₃不同浓度梯度对拟微绿球藻生长的影响

2.2 NaH₂PO₄ · 2H₂O 浓度对拟微绿球藻生长的影响

磷元素是构成细胞膜、ATP、DNA 和 RNA 的必需元素^[8],大多数藻类贮存磷源的方式为主动吸收^[9]。本试验以 NaH₂PO₄ · 2H₂O 作为磷源,对拟微绿球藻生长的影响,结果如图 2 所示。在一定范围内,NaH₂PO₄ · 2H₂O 浓度的增加,促进拟微绿球藻对磷的吸收,其细胞的内含物大量增加,细胞数目呈上升趋势。相关分析可知,NaH₂PO₄ · 2H₂O 浓度与拟微绿球藻生物量呈极显著正相关 ($P < 0.01$),当 NaH₂PO₄ · 2H₂O 的浓度为 0.011 g/L 时,拟微绿球藻的 $D_{680\text{ nm}}$ 值最高,此时磷对拟微绿球藻的影响最显著。

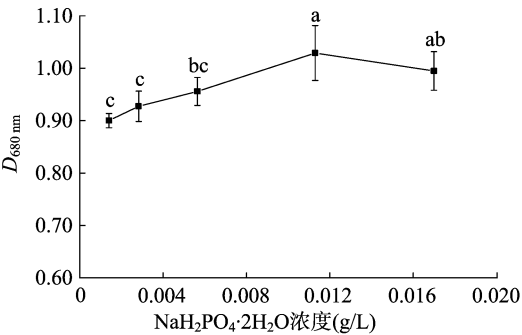


图2 NaH₂PO₄ · 2H₂O 不同浓度梯对拟微绿球藻生长的影响

2.3 FeCl₃ · 6H₂O 浓度对拟微绿球藻的生长影响

铁离子是构成藻细胞内一些氧化还原酶的辅基,并能以

各种形式与蛋白结合,铁元素缺乏会影响藻类细胞的正常代谢^[10]。FeCl₃ · 6H₂O 对拟微绿球藻生长的影响,结果如图 3 所示。FeCl₃ · 6H₂O 浓度较低时,拟微绿球藻细胞数目少,这是因为低浓度的铁不利于拟微绿球藻的代谢,随着铁浓度的增加,拟微绿球藻细胞数目在一定范围内呈上升趋势,当 FeCl₃ · 6H₂O 浓度为 0.006 3 g/L 时 $D_{680\text{ nm}}$ 达到最大值,说明在此浓度下最适合拟微绿球藻生长。

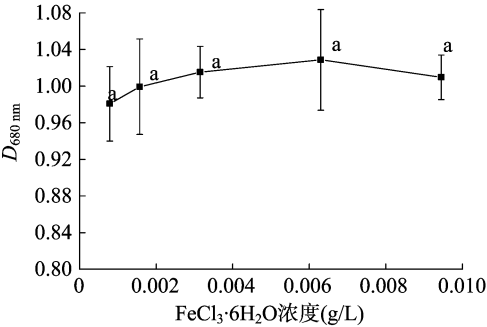


图3 FeCl₃ · 6H₂O 不同浓度对拟微绿球藻生长的影响

2.4 MgCl₂ 浓度对拟微绿球藻生长的影响

镁是构成叶绿素的必需元素,在叶绿素合成和光合作用中起着重要作用,应异常会影响藻类的生长^[11]。MgCl₂ 对拟微绿球藻生长的影响,结果如图 4 所示。MgCl₂ 浓度与拟微绿球藻生物量呈极显著正相关 ($P < 0.01$),当 MgCl₂ 在浓度为 1.245 ~ 2.491 g/L 测出的 $D_{680\text{ nm}}$ 值较高,且十分接近,随着 MgCl₂ 浓度不断增加, $D_{680\text{ nm}}$ 值出现下降趋势。表明低浓度的镁离子促进拟微绿球藻的生长,高浓度对拟微绿球藻的生长起抑制作用。

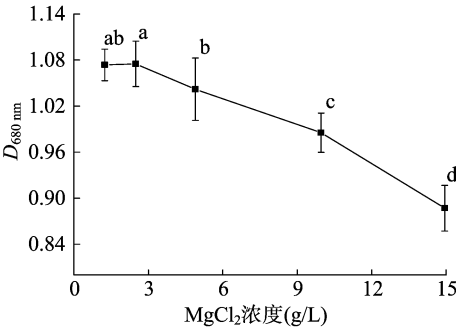


图4 MgCl₂不同浓度梯度对拟微绿球藻生长的影响

2.5 维生素混合液浓度对拟微绿球藻生长的影响

维生素是影响微藻生长的重要因素之一。维生素混合液包括维生素 B₁、维生素 B₁₂ 和生物素。维生素 B₁ 是常用的藻类生长促进剂,维生素 B₁₂ 常作为催化甲基转移反应的酶的辅基。维生素混合液浓度对拟微绿球藻生长的影响结果如图 5 所示。1 L 培养基维生素混合液的体积量在 0.5 mL 时,拟微

绿球藻的 $D_{680\text{ nm}}$ 值相对较大,此时是维持微藻细胞生长的最佳条件。1 L 培养基维生素混合液的体积量在 1~3 mL,拟微绿球藻 $D_{680\text{ nm}}$ 值下降幅度大,说明这个阶段的维生素混合液对微藻的生长有抑制作用。

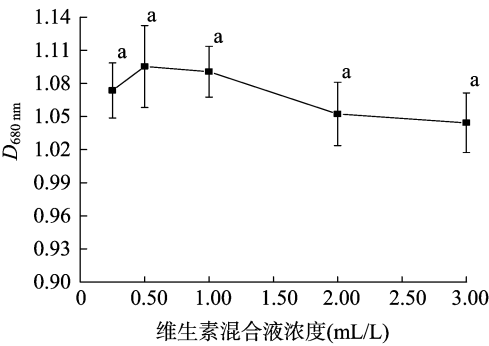


图5 维生素混合液不同体积梯度对拟微绿球藻生长的影响

2.6 5 种营养盐浓度对拟微绿球藻生长影响相互作用和优化组合

由表 2 可知,5 种因素对拟微绿球藻生长影响的主次顺序为 $B>A>D>E>C$,可见 B、A 为影响藻细胞生长的主要因素,磷源的质量浓度水平对拟微绿球藻生长的影响最大,其次是氮源质量浓度水平对其生长的影响。通过分析 5 因素的均值可知,5 种营养盐最优的水平组合为 $A_2B_2C_4D_2E_1$,即 NaNO_3 浓度为 0.225 g/L, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 浓度为 0.015 g/L, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 浓度为 0.018 90 g/L, MgCl_2 浓度为 0.025 g/L,1 L 维生素混合液体积为 0.05 mL。正交试验中 NaNO_3 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 的优化浓度与单因素试验的结果较吻合,而铁、镁、维生素混合液的最适浓度较单因素试验低。由于正交试验考虑了各因子的交互作用,因此后续试验均以正交试验的结果所得培养基配方进行藻体培养,以获得最大生物量。

表 2 拟微绿球藻正交试验结果

编号	A	B	C	D	E	$D_{680\text{ nm}}$
1	1	1	1	1	1	0.581
2	1	2	2	2	2	0.724
3	1	3	3	3	3	0.63
4	1	4	4	4	4	0.673
5	2	1	2	3	4	0.633
6	2	2	1	4	3	0.799
7	2	3	4	1	2	0.795
8	2	4	3	2	1	0.856
9	3	1	3	4	2	0.605
10	3	2	4	3	1	0.819
11	3	3	1	2	4	0.843
12	3	4	2	1	3	0.731
13	4	1	4	2	3	0.678
14	4	2	3	1	4	0.792
15	4	3	2	4	1	0.816
16	4	4	1	3	2	0.737
k_1	0.652	0.624	0.740	0.725	0.768	
k_2	0.771	0.784	0.726	0.775	0.715	
k_3	0.750	0.771	0.721	0.705	0.710	
k_4	0.756	0.749	0.741	0.723	0.735	
R	0.119	0.160	0.020	0.070	0.058	

2.7 优化后生长情况测定

拟微绿球藻在优化后的培养基与 f/2 培养基中的生长相比,拟微绿球藻在优化后的培养基中生长情况良好(图 6),优化后拟微绿球藻的生物量在第 4 天开始超过 f/2 培养基。

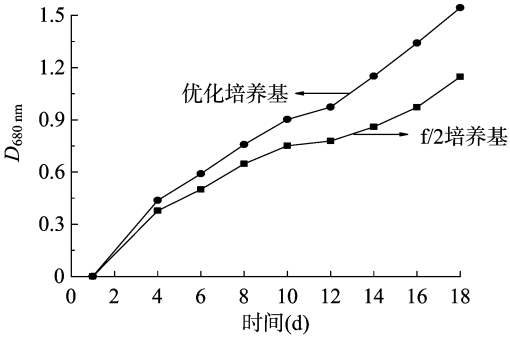


图6 优化培养基与 f/2 培养基对拟微绿球藻生长的影响

3 结论

采用单因素和正交试验,研究了 NaNO_3 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 MgCl_2 以及维生素混合液浓度对拟微绿球藻生长的影响。结果表明,拟微绿球藻最佳培养基配方为 NaNO_3 0.225 g/L、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.015 g/L、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.018 90 g/L、 MgCl_2 0.025 g/L,1 L 维生素混合液体积 0.05 mL。优化后拟微绿球藻的最大生物量($D_{680\text{ nm}}$)可达 1.544,是优化前的 1.35 倍。通过优化,提高了拟微绿球藻的生物量,可以满足微藻现代化的大批量生产。

参考文献:

[1]陈常杰. 海洋微拟球藻 microRNA 测序鉴定及其转基因体系的建立[D]. 青岛:中国海洋大学,2012.

[2]Jinkerson R E,Radakovits R,Posewitz M C,et, al. Genomic insights from the oleaginous model alga *Nannochloropsis gaditana*[J]. Bioengineered,2013,4;37-43.

[3]陈晓琳,刘镜恪,徐世宏,等. 微粒饲料中鱼油 n-3 HUFA 的分子结构对真鲷仔稚鱼生长、存活的影响[J]. 海洋水产研究,2004,25(6):13-18.

[4]刘镜恪,雷霖霖. 人工调节轮虫 n-3 HUFA 对黑鲷仔鱼生长、存活的影响[J]. 科学通报,1997,42(12):1330-1333.

[5]邱小琼,周洪琪,曾庆华,等. 营养强化的轮虫、卤虫对牙鲆仔鱼的成活、生长及体脂脂肪酸组成的影响[J]. 水产科学,2004,23(2):4-8.

[6]Redfield A C. The biological control of chemical factors in the environment[J]. American Scientist,1958,46:205-221.

[7]黄一江,郑明刚,孙中涛,等. 不同温度和 N 、 Fe^{3+} 质量浓度对微拟球藻脂肪酸组成及 SCD 基因表达的影响[J]. 海洋科学进展,2014,32(1):92-98.

[8]黄冠华,陈峰,魏东,等. 两步培养法提高蛋白核小球藻的油脂含量[J]. 华南理工大学学报,2008,36(12):97-101.

[9]华汝成. 单细胞藻类的培养与利用[M]. 北京:农业出版社,1983:135-137.

[10]Stewart W D P. Algal physiology and biochemistry[M]. London: Black Well Scientific Publications,1974:610-625.

[11]Finkle B J,Appleman D. The effect of magnesium concentration on growth of *Chlorella*[J]. Plant Physiology,1953,28(4):664-673.