

氮、磷供给水平对纤细角毛藻生长及细胞物质组成的影响

周泽鹏¹, 周晓见^{1,2}, 宋雨晴¹, 刘青^{1,2}, 靳翠丽^{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*)具有丰富的营养组成,是重要的生物饵料微藻。该试验以 f/2 培养基中标准的氮磷供给水平为基准,进行不同氮磷供给水平对纤细角毛藻生长及细胞物质组成的研究。结果表明,基准浓度的 1/2 倍及以下的低氮供给使纤细角毛藻的生物量减少严重,而基准浓度的 2 倍、3 倍高氮供应下仍与基准氮供给相差不大。高于基准磷浓度供给促进纤细角毛藻的生长,其中基准磷浓度的 3/2 倍最优。在提高纤细角毛藻生物量产量方面,改变磷供给浓度比氮更有效。在细胞物质组成方面,基准浓度的 3/2~3 倍的高氮供给是提升细胞蛋白质含量的有效手段,而磷浓度变化对蛋白质含量的影响较低。细胞总糖含量的提升可通过降低磷供给水平(1/8~1 倍基准浓度)实现。降低氮供应至基准浓度的 1/8~1/4 倍或者降低磷供应至基准浓度的 1/8~1/4 倍的寡营养条件,均能有效提高细胞脂肪含量,其中 1/8 倍的磷供给浓度对于提高脂肪含量效果最好。综合而言,纤细角毛藻的生长和细胞物质组成受磷营养供给的影响大于氮供给。

关键词: 纤细角毛藻(*Chaetoceros gracilis*); 氮磷供给; 生长; 细胞物质组成

中图分类号: S917.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-2091(2020)10-0024-06

微藻通过光合作用将大气中的 CO₂ 固定,转化为以碳水化合物为主的有机碳,一方面用于构建微藻细胞结构,扩增微藻细胞形成更大生物量,另一方面以各种复合形式储存化学能和还原力^[1]。藻类细胞壁由各种己糖和戊糖直接结合而成,β-1,3 葡聚糖储存光合作用产生的部分化学能和还原力,还有一些还原力和化学能储存在脂类中作为分子池,用作生产细胞所需原材料的替代能源^[1-2]。蛋白质构成的碳库,还起到氮储存的作用,并且这个生化参数的变化可以反映细胞生长/分裂的活跃度^[1]。研究发现,不同条件下生长的微藻,其细胞物质组成具有一定的差异^[3-4]。

微藻细胞内含有丰富的脂类、蛋白质和碳水化合物,使其成为水产养殖中浮游动物、双壳类、蟹类幼虫和鱼类幼体的重要饵料,同时也适用于其他各种商业用途^[5]。海洋微藻饵料的培养是海水养殖育苗过程中的重要环节,微藻饵料生物量充足、细胞组成营养丰富是海水养殖育苗中幼体孵育的基本

保障。纤细角毛藻(*Chaetoceros gracilis*)生长速度快、繁殖迅速、容易培养,同时细胞富含多种营养物质,是重要的饵料微藻^[6]。该试验研究氮磷供给浓度对纤细角毛藻的影响,对于节约培养成本、扩大纤细角毛藻生物量生产、改善细胞营养组成,进一步提高纤细角毛藻的培养效益具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 试验设计与纤细角毛藻培养方法

纤细角毛藻由中国海洋大学教育部海水养殖重点实验室提供,用人工海水配制的 Guillard 的 f/2 培养基保种。

改变氮、磷供给浓度进行试验。氮供给设置 7 个浓度(NaNO₃, μmol/L),分别为 110.31、220.61、441.23、882.46、1 323.69、1 764.91 和 2 647.37。磷供给设置 7 个浓度(NaH₂PO₄·H₂O, μmol/L),分别为 4.01、8.01、16.03、32.05、48.08、64.10 和 96.15。其中氮供给浓度 882.46 μmol/L 和磷供给浓度 32.05 μmol/L 与 f/2 配方中基准浓度相同,记为 1 倍浓度(对照),

资助项目:国家自然科学基金(41271521);江苏省大学生创新创业训练计划(201911117109Y)

作者简介:周泽鹏,男,本科生,主要研究方向水生生物学

通信作者:靳翠丽,女,博士,副教授,研究方向为水生生物学. E-mail: cljin@yzu.edu.cn

从低到高依次将上述氮磷供给浓度分别标记为 1/8 倍、1/4 倍、1/2 倍、1 倍、3/2 倍、2 倍和 3 倍基准浓度。纤细角毛藻在 250 mL 锥形瓶中进行一次性培养,不充气,每天摇动 2 次。在 23 ℃、光强 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、光:暗比为 12 h:12 h 的光照培养箱中培养。初始密度为每毫升 0.61×10^6 ,7 d 后收获。所有试验设置 3 个重复。

1.2 纤细角毛藻生长情况测定

用血球计数板计数,再使用酶标仪测定相应细胞密度下藻液在 520 nm 下的吸光度(OD_{520}),建立 OD_{520} 与藻细胞密度间的标准曲线。每 24 h 测定藻液的 OD_{520} ,计算细胞密度^[3]。

1.3 纤细角毛藻细胞内蛋白质、总糖和脂肪含量测定

蛋白质和总糖含量测定方法如下,收集 30 mL 藻液,4 000 r/min 离心 10 min,用 30 mL 蒸馏水重新悬浮藻细胞成悬液,用冰浴超声(700 w,超声 5 s,间隔 3 s)破碎 10 min,4 000 r/min 离心 10 min,取上清液用于测量蛋白质或总糖含量。采用考马斯蓝法以牛血清白蛋白(BSA)为标准测定蛋白质含量^[5]。采用苯酚-硫酸法以 D-葡萄糖为标准测定总糖含量^[6]。

脂肪含量测定方法如下,收集 50 mL 藻液,4 000 r/min 离心 10 min,沉淀用蒸馏水洗两次,加入 20 mL 甲醇:氯仿=2:1(v/v)混合物,剧烈震荡后 4 ℃ 放置过夜。悬液冰浴超声(700 w,超声 5 s,间隔 3 s)破碎 10 min 后,4 000 r/min 离心 10 min,取氯仿层加等量蒸馏水摇匀,4 000 r/min 离心 10 min,收集氯仿相至烘干并称重的试管中,蒸发溶剂,放置 50 ℃ 烘箱中烘 30 min,称重记录^[3]。

1.4 统计分析

所有处理均设置 3 个重复。数据分析采用 IBM SPSS22 软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA),利用最小显著差数法(Least Significant Difference, LSD)或 Dunnett T3 进行多重比较,分别用大、小写字母代表极具统计学意义($P \leq 0.01$)和具统计学意义($P \leq 0.05$)的差异^[7]。

2 结果

2.1 不同氮磷供给浓度对纤细角毛藻生长的影响

纤细角毛藻在不同氮磷供给浓度的培养基中都能生长(图 1-A, 1-B),从每毫升细胞数量 0.61×10^6 逐渐上升,在 1 倍氮磷浓度的培养基(即对照)中,每毫升纤细角毛藻的最终细胞数量在培养 7 d 时达到 8.00×10^6 (图 2-A, 2-B)。氮供给浓度低于对照时,纤细角毛藻的生长受到抑制,1/8、1/4 和 1/2 倍氮供给浓度培养基的最终细胞数量都低于对照,1/8 倍氮供给浓度时每毫升细胞数量为 4.72×10^6 ,只有对照密度的 59%。但是氮供给浓度超过对照时,对纤细角毛藻生长的促进作用并不明显,收获时每毫升细胞数量未超过对照。磷供给浓度的变化对于纤细角毛藻的生长也有明显影响,1/8、1/4 和 1/2 倍磷供给浓度的每毫升细胞数量都低于对照,1/8 倍磷供给浓度时每毫升细胞数量只有 4.29×10^6 ,只是对照密度的 54%。然而,与氮供给不同的是,提高磷供给浓度能明显促进纤细角毛藻的生长,3/2 倍磷供给浓度下,每毫升细胞数量高达 13.41×10^6 ,是对照的 1.7 倍。磷供给浓度继续升高,促进生长的效果有所下降,但每毫升细胞数量仍远远高于对照,2 倍和 3 倍磷供给浓度的最终细胞数量相差不大,都是

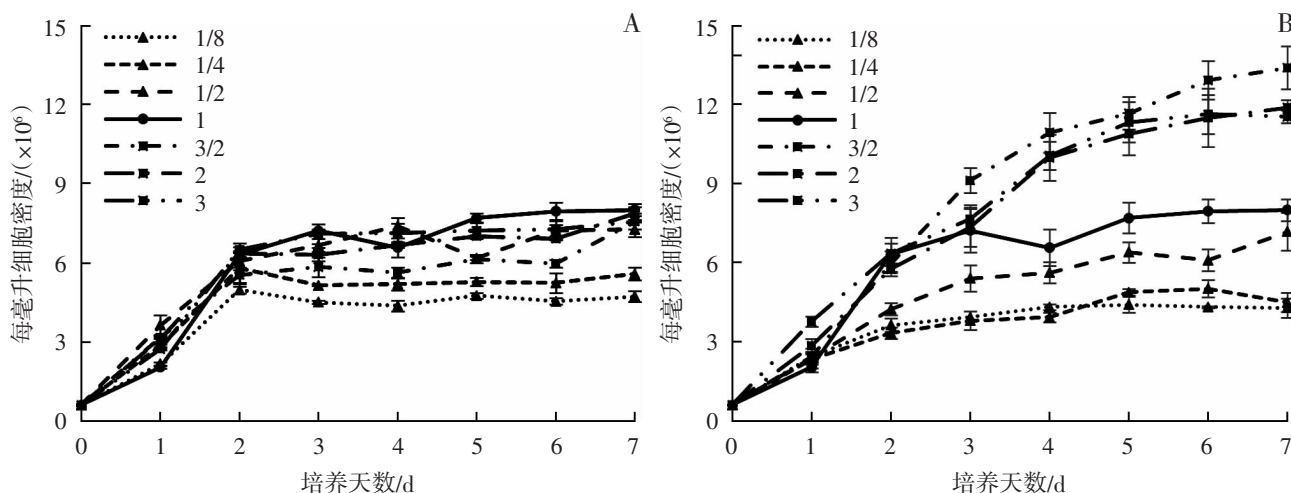


图 1 不同氮(A)、磷(B)供给浓度条件下纤细角毛藻的生长情况

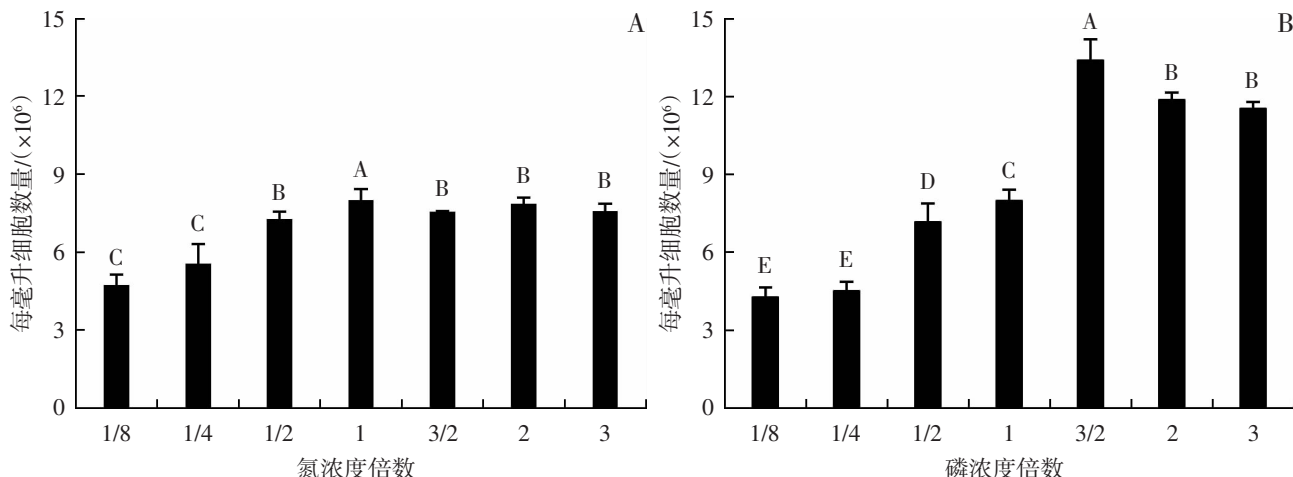


图2 不同氮(A)、磷(B)供给浓度条件下每毫升纤细角毛藻的最终细胞数量

对照的1.5倍左右。

2.2 不同氮磷供给浓度对纤细角毛藻细胞物质组成的影响

氮供给浓度对纤细角毛藻细胞内蛋白质含量影响极显著(图3-A)。在低于和等于对照氮供给浓度的范围内,蛋白质含量与氮供给浓度呈现线性相关,氮供给浓度越低,蛋白质含量越低。氮供给浓度超过对照时,细胞蛋白质含量极显著提高($P=0.01$),3/2~3倍氮供给浓度的单个细胞平均蛋白质含量为9.067 pg,而1/8~1倍氮供给浓度的细胞平均蛋白质含量为2.072 pg,不足前者的1/4。磷供给浓度对于纤细角毛藻的蛋白质含量也有影响,在1/4和1/2倍磷供给浓度时的细胞蛋白质含量较高,而其他磷浓度下的蛋白质含量均与对照没有统计学意义差异($P=0.05$,图3-B)。

氮供给浓度对纤细角毛藻细胞的总糖含量也有影响(图4-A)。对照的单个细胞总糖含量最高,可达2.870 pg,其他氮供给浓度下的总糖含量区别不大。磷供给浓度极显著影响纤细角毛藻的总糖含量($P=0.01$),低磷供给浓度有利于细胞积累总糖,高浓度带来总糖含量下降(图4-B)。1/8至1倍磷供给浓度范围内,细胞总糖含量较高,平均值为2.519 pg,3/2到3倍磷供给浓度范围内的细胞总糖含量较低,平均值只有1.459 pg,只有前者的58%。

氮供给浓度对纤细角毛藻细胞的脂肪含量有显著影响(图5-A)。3倍氮供给浓度时单个细胞脂肪含量最低,仅17.600 pg,且1/2~3倍氮供给浓度间的脂肪含量无统计学差异($P=0.05$),所以,高氮供给浓度不利于细胞积累脂肪。低氮供给浓度(1/8和1/4倍)使纤细角毛藻脂肪含量显著增加($P=0.05$),

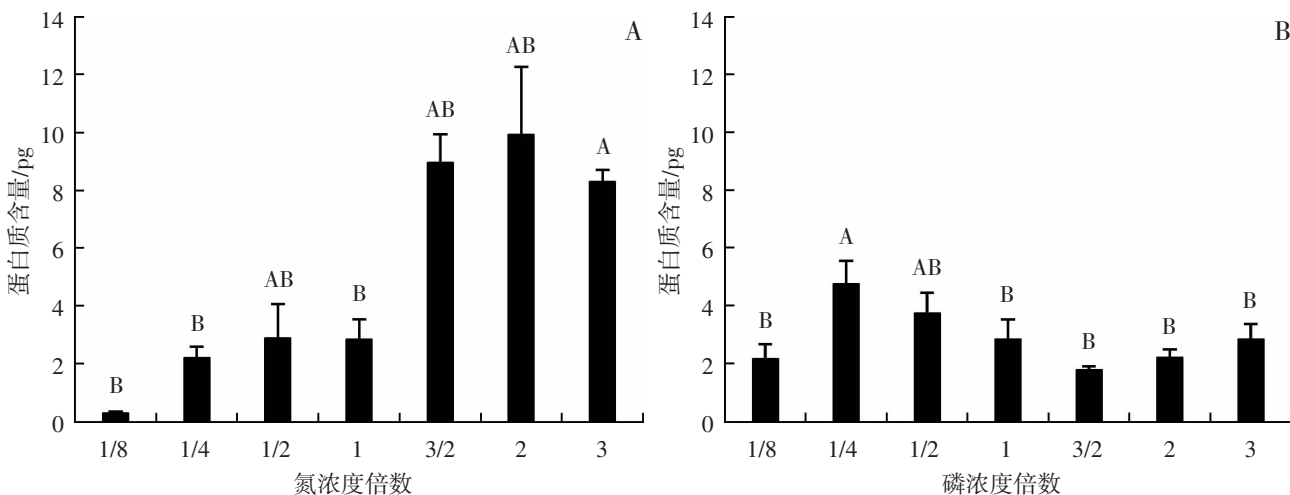


图3 不同氮(A)、磷(B)供给浓度条件下纤细角毛藻单个细胞的蛋白质含量

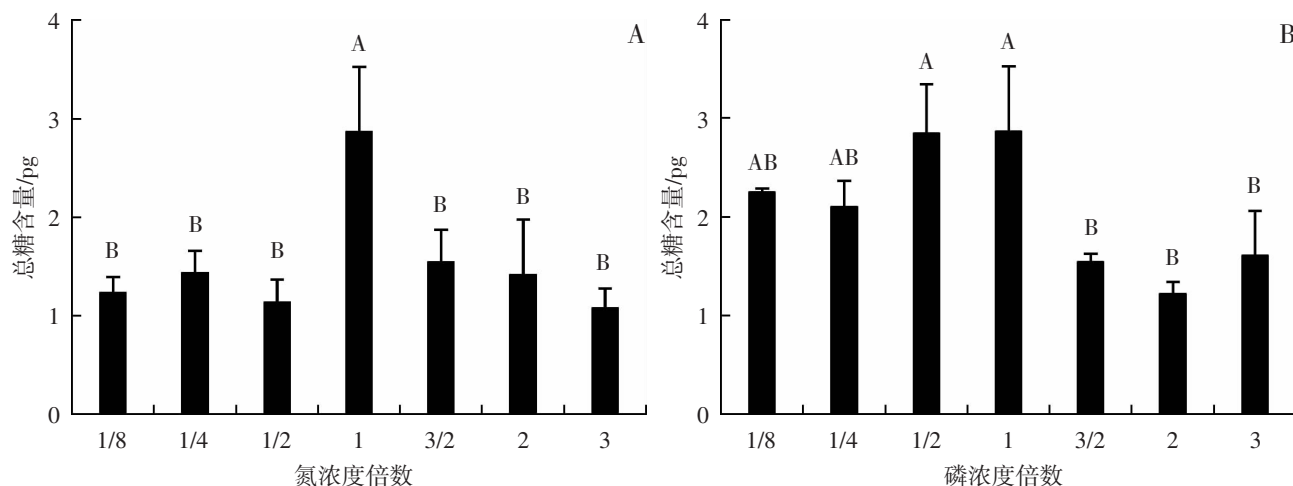


图4 不同氮(A)、磷(B)供给浓度条件下纤细角毛藻单个细胞的总糖含量

分别是对照的 1.8 倍和 1.3 倍。磷供给浓度对于纤细角毛藻的脂肪含量也有显著影响,尤其是降低磷供给浓度能显著提高脂肪含量($P=0.05$,图 5-B)。1/8和

1/4 倍磷供给浓度使脂肪含量分别达到 55.453 pg 和 50.571 pg,分别是对照的 2.6 倍和 2.4 倍。磷供给浓度高于对照,脂肪含量无统计学差异,均不利于

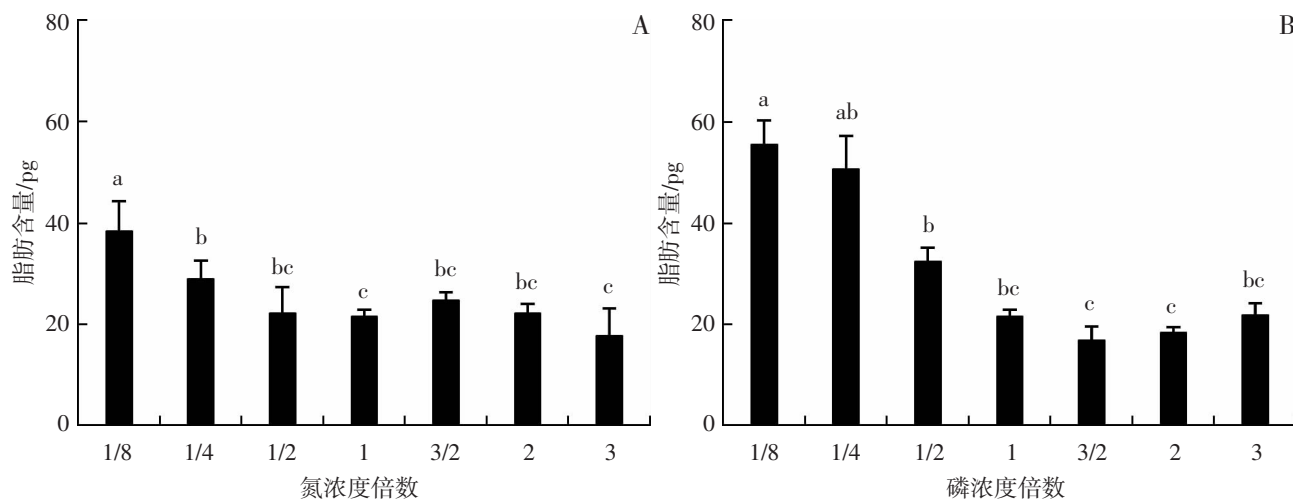


图5 不同氮(A)、磷(B)供给浓度条件下纤细角毛藻单个细胞的脂肪含量

纤细角毛藻细胞积累脂肪。

3 讨论

微藻通过光合作用固定二氧化碳,固定的碳如何分配取决于微藻的种类及生长环境条件^[4,8-9]。为了提高微藻培养效益,人们采取了许多生物和非生物因素的策略,比如改变温度、盐度和营养盐等,这些因素会导致微藻生长情况和生化成分的变化^[10]。营养盐中的氮、磷供给水平是决定微藻生物量生产的重要因素,已被证明是改变微藻质量的有效因素^[4,11-12]。氮在微藻生物量中的占比约为 7%~10%(w/w),主要以硝酸盐的形式从培养基中吸收,是细胞蛋白

质、核酸、磷脂和叶绿素等的基本元素,在微藻生命活动中占有首要地位^[13]。磷是微藻 3 大必需元素之一,参与微藻各种代谢活动,在细胞膜结构、物质代谢以及信号传导、光合作用等方面都起着极为重要的作用^[14]。

该研究结果表明,在提高纤细角毛藻生物量产量方面,改变磷供给浓度比氮更有效。低氮(1/2 倍及以下)使纤细角毛藻的生物量减少严重,而高氮(2 倍、3 倍)培养的细胞密度虽高于低氮,但仍与一倍氮相当,说明通过提高氮供应促进纤细角毛藻生长的意义不大。在该营养水平下,其他因素(如光)

可能成为限制因素^[15]。低磷(1/8、1/4倍)使纤细角毛藻生长缓慢,高磷(大于1倍磷)培养的生长情况明显改善,3/2倍磷在整个培养过程中的生长状况都明显好于其他培养基。对于氮磷两种营养素来说,3倍浓度在纤细角毛藻的生长方面均不具有明显优势。因此,为了提升纤细角毛藻的生长速度,可以适度提高磷浓度,3/2倍的磷供给浓度比较适宜。在改善纤细角毛藻细胞营养物质组成方面,高氮(3/2~3倍)是提升细胞蛋白质含量的有效手段,磷浓度变化对于细胞蛋白质含量的影响较低。低磷(1/8~1倍)有助于提高总糖含量。低氮(1/8~1/4倍)和低磷(1/8~1/4倍)都能有效提高细胞脂肪含量,其中1/8倍的磷供给浓度对于提高脂肪含量效果最好。

闫爱菊等^[16]在纤细角毛藻氮磷比(N/P)的研究中发现,纤细角毛藻在低N/P水体中的生长好于高N/P水体,而且当N/P大于16:1时纤细角毛藻生长速率受到抑制。因此认为纤细角毛藻生长受磷供给的影响要大于氮供给的作用。该文的研究结果证明,纤细角毛藻不仅生长速率受磷供给影响大于氮供给,而且对于改变细胞物质组成而言,除了蛋白质含量,调节磷供给浓度比氮更为有效。实际生产中,可调整培养基的氮磷供应水平,达到不同的培养目标。

参考文献:

[1] Chen Y, Vaidyanathan S. Simultaneous assay of pigments, carbohydrates, proteins and lipids in microalgae[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2013, 776: 31–40.

[2] Palmucci M, Ratti S, Giordano M. Ecological and evolutionary implications of carbon allocation in marine phytoplankton as a function of nitrogen availability: a fourier transform infrared spectroscopy approach[J]. *Journal of Phycology*, 2011, 47: 313–323.

[3] 张娜,胡文峰,靳翠丽,等. 3种处理对纤细角毛藻生长及细胞生化组成的影响[J]. *应用海洋学报*, 2018, 37(2): 248–254.

[4] Breuer G, Lamers P P, Martens D E, *et al.* The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalga strains[J]. *Bioresource Technology*, 2012,

124: 217–226.

[5] 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.

[6] 罗毅,潘细贵,刘刚,等. 苯酚-硫酸法测定多糖含量显色方式的优选[J]. *中国中医药信息杂志*, 2005, 12(1): 45–46.

[7] 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): 2116–2120.

[8] Hildebrand M, Abbriano R M, Polle J E, *et al.* Metabolic and cellular organization in evolutionarily diverse microalgae as related to biofuels production[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2013, 17: 506–514.

[9] Garali S M B, Sahraoui I, Iglesia P D L, *et al.* Effects of nitrogen supply on *Pseudo-nitzschia calliantha*, and *Pseudo-nitzschia cf. seriata*: field and laboratory experiments[J]. *Eco-toxicology*, 2016, 25(6): 1–15.

[10] Xin L, Hu H Y, Ke G, *et al.* Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp.[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101: 5494–5500.

[11] Chakraborty S, Mohanty D, Ghosh S, *et al.* Improvement of lipid content of *Chlorella minutissima*, MCC 5 for biodiesel production [J]. *Journal of Bioscience & Bioengineering*, 2016, 122(3): 294–300.

[12] Mujtaba G, Choi W, Lee C G, *et al.* Lipid production by *Chlorella vulgaris*, after a shift from nutrient-rich to nitrogen starvation conditions[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 123(4): 279–283.

[13] Ghosh S, Roy S, Das D. Improvement of biomass production by *Chlorella* sp. MJ 11/11 for use as a feedstock for biodiesel [J]. *Applied Biochemistry & Biotechnology*, 2015, 175: 3322–3335.

[14] 李绍长. 低磷胁迫对植物光合和呼吸作用的影响[J]. *石河子大学学报*, 2003, 7(2): 157–160.

[15] Fernandes T, Fernandes I, Andrade C A, *et al.* Marine microalgae growth and carbon partitioning as a function of nutrient availability[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 214: 541–547.

[16] 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.

(收稿日期: 2020-07-30)



Effects of nitrogen and phosphorus supplies on the growth and intracellular composition for *Chaetoceros gracilis*

Zhou Zepeng¹, Zhou Xiaojian^{1,2}, Song Yuqing¹, Liu Qing^{1,2}, Jin Cuili^{1,2}

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

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

Abstract: *Chaetoceros gracilis* is an important biological food microalgae with rich nutritional composition. In the experiment, the respective nitrogen and phosphorus supply levels in the standard f/2 medium were used as the reference to study the growth and intracellular composition of *C. gracilis* under different nitrogen and phosphorus supplies. The results showed that the low nitrogen supply of 1/2 folds of the reference nitrogen concentration and below reduced the biomass of *C. gracilis* seriously, while the high nitrogen supply of 2 and 3 folds of the reference nitrogen concentration was still not much different from the reference nitrogen supply. Phosphorus supply higher than the reference phosphorus concentration promotes the growth of *C. gracilis*, and 3/2 fold the reference phosphorus concentration was optimal one. Aiming on increasing the biomass production of *C. gracilis*, increasing the concentration of phosphorus was more effective than increasing the concentration of nitrogen. In terms of intracellular composition, a high nitrogen supply of 3/2–3 folds of reference nitrogen concentration was an effective means to increase cell protein content, while changes in phosphorus concentration had a lower impact on protein content. The increase in sugar content could be achieved by reducing the phosphorus supply to 1/8–1 folds of reference phosphorus concentration. Oligotrophic conditions that reduce the nitrogen supply to 1/8–1/4 folds or reduce the phosphorus supply to 1/8–1/4 folds of respective the reference concentration could effectively increase the cell lipid content, among which 1/8 folds of the reference phosphorus concentration had the highest increased lipid content. In summary, the growth and intracellular composition of *C. gracilis* was more significantly affected by phosphorus supply than nitrogen supply.

Key words: *Chaetoceros gracilis*; nitrogen and phosphorus supplies; growth; intracellular composition

~~~~~  
(上接第 23 页)

## Analysis of environmental factors affecting the culture of *Marsupenaeus japonicus* and its healthy culture technology

Zhao Sizhe<sup>1</sup>, Liu Sen<sup>1</sup>, Zhang Qingqi<sup>3</sup>, Yan Binlun<sup>1,2</sup>

(1.Jiangsu Ocean University a. College of Marine Life and Fisheries; b. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Lianyungang 222100, China; 2.Jiangsu Agricultural Germplasm Resources Protection and Utilization Platform, Nanjing 210014, China; 3.Lianyungang GanyuJiaxin Aquatic products Development Co., Ltd., Lianyungang 222100, China)

**Abstract:** Water environment has always been one of the important factors that affect the benefits of shrimp culture. In this paper, the effects of the main influencing factors on the survival, growth and immunity of *Marsupenaeus japonicus* in water environment were summarized, and the key healthy culture techniques of *M. japonicus* were summarized in order to provide guidance and help for improving the success rate of culture of *M. japonicus*.

**Key words:** *Marsupenaeus japonicus*; Water environment; Influence factor; Culture technology