

文章编号: 1000-0615(2016)09-1451-11

DOI: 10.11964/jfc.20150810040

## 盐度—光照强度—温度对角毛藻生长及高不饱和脂肪酸含量的影响

黄旭雄<sup>1,2,3\*</sup>, 曾蓓蓓<sup>1</sup>, 穆亮亮<sup>1</sup>, 蔡敬<sup>1</sup>, 危立坤<sup>1</sup>

(1. 上海海洋大学农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306;

2. 上海海洋大学上海市水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306;

3. 上海海洋大学水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心, 上海 201306)

**摘要:** 为获知盐度—光照强度—温度对半咸水硅藻——角毛藻SHOU-B98生长及高不饱和脂肪酸含量的影响, 实验采用 $L_9(3^4)$ 正交设计探讨其不同盐度(6、12和18)、光照强度[10、30和50  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ ]及温度(10、20和30  $^{\circ}\text{C}$ )组合条件下的生长及藻细胞ARA、EPA和DHA含量的变化。结果显示, 盐度、光照强度、温度三因素对角毛藻SHOU-B98的生长及高不饱和脂肪酸含量均有显著影响, 且存在因素间的交互作用。角毛藻SHOU-B98在盐度12、光照强度30  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 和温度30  $^{\circ}\text{C}$ 及盐度18、光照强度50  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 和温度20  $^{\circ}\text{C}$ 的组合条件下生长最快, 第4天后这2组微藻的生物量显著高于其他组( $P<0.05$ )。角毛藻细胞积累不同高不饱和脂肪酸的最佳培养条件也不同, 细胞积累ARA的最优培养组合条件为盐度6、光照强度50  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 和温度30  $^{\circ}\text{C}$ ; 细胞积累EPA和DHA的最优培养组合条件为盐度18、光照强度50  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 和温度20  $^{\circ}\text{C}$ 。研究表明, 角毛藻SHOU-B98生长快且细胞脂肪酸营养价值高的培养条件为盐度18、光照强度50  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 和温度20  $^{\circ}\text{C}$ 的组合。

**关键词:** 角毛藻; 盐度; 光照强度; 温度; 高不饱和脂肪酸

**中图分类号:** S 968.4

**文献标志码:** A

硅藻因其细胞中富含二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳六烯酸(DHA)和花生四烯酸(ARA)等高不饱和脂肪酸及其他生理活性物质, 是虾、蟹、贝等无脊椎水生动物早期幼体的重要饵料, 在水产动物苗种生产中被广泛应用<sup>[1]</sup>。已有的研究表明, 当生活环境发生改变时微藻细胞能够产生生理及生化反应以适应新的环境条件<sup>[2]</sup>。具体表现: 一方面, 同一种微藻不同来源的藻株, 其最适宜培养条件存在差异<sup>[3]</sup>; 另一方面, 不同培养条件下同一株微藻的细胞生化组成也会有显著的差异, 从而使其作为饵料的营养价值<sup>[4]</sup>。

生长期<sup>[5]</sup>、培养基的营养成分<sup>[6]</sup>、温度<sup>[7]</sup>、光照强度<sup>[8]</sup>、盐度<sup>[9]</sup>、通气量<sup>[10]</sup>、pH<sup>[11]</sup>等因素均已证实可以影响微藻细胞的生化组成。但各因素的交互作用对藻类EPA、DHA和ARA含量的影响却鲜有报道。姜宏波等<sup>[12]</sup>在实验室条件下研究了温度(10、15、20和25  $^{\circ}\text{C}$ )和光照强度[20、60、100、140和180  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ ]对鼠尾藻(*Sargassum thunbergii*)生长和生化组成的影响, 结果表明, 温度、光照强度及二者的交互作用对鼠尾藻生长均具有极显著的影响, 在10和15  $^{\circ}\text{C}$ 下, 较高的光照强度抑制鼠尾藻的生长, 而在20和25  $^{\circ}\text{C}$ 下, 其生长速率随光照强度的增加而增加。茅

收稿日期: 2015-08-21 修回日期: 2016-04-26

资助项目: 上海市科技兴农项目[沪农科攻字(2015)第1-2号]; 上海市科技兴农项目[沪农科推字(2013)第2-1号]; 上海高校水产学一流学科建设项目

通信作者: 黄旭雄, E-mail: xxhuang@shou.edu.cn

华等<sup>[13]</sup>研究了温度、光照、盐度及pH对旋链角毛藻(*Chaetoceros curvisetus*)生长的影响,并做了盐度和光照的正交实验,设置2个盐度梯度(25和30)和3个光照梯度[29.3、78.12和126.95  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ ]的正交实验,结果显示:盐度与光照强度之间存在交互作用,旋链角毛藻在盐度25的条件下适应较高的光照强度,而在盐度30的条件下适应较低的光照强度,且温度对旋链角毛藻生长的影响比盐度、光照明显。

因此,对于特定来源的微藻,研究培养条件以及培养条件间的交互作用对其重要营养物质含量的影响,是深度开发微藻资源的重要工作。角毛藻(*Chaetoceros* sp.) SHOU-B98是一株分离自河口地区半咸水养殖池塘的硅藻,而河口半咸水区是具有很高生物多样性和初级生产力的生态域,是很多濒危物种和经济物种繁殖和幼体保育的场所。角毛藻SHOU-B98细胞中同时具有ARA、EPA和DHA,具有很高的潜在饵料价值<sup>[14]</sup>。在单因子实验条件下,角毛藻SHOU-B98生长的最适盐度、光照强度和温度分别为12.6、28.0  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 和22.3  $^{\circ}\text{C}$ <sup>[14]</sup>。本研究在前期实验研究的基础上,探讨不同温度、光照强度及盐度组合对角毛藻SHOU-B98生长及细胞内ARA、EPA和DHA含量的影响,以期角毛藻SHOU-B98后续的合理开发利用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 藻种来源及培养

角毛藻SHOU-B98由上海海洋大学生物饵料藻种室提供,从上海市奉贤区一半咸水(盐度为7)养殖池塘分离而得。采用f/2培养液<sup>[3]</sup>进行逐级扩种培养。藻种扩培的盐度、光照强度和温度条件分别为12.6、28.0  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 和22.3  $^{\circ}\text{C}$ 。

### 1.2 正交实验设计

设计 $L_9(3^4)$ 正交实验(表1),分别设置盐度为6、12和18,光照强度为10、30和50  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ ,温度为10、20和30  $^{\circ}\text{C}$ 。共9个处理组,每组设置3个平行。在恒温光照培养箱内(光周期24L:0D)培养。将角毛藻接种于1000 mL三角烧瓶中,初始接种密度为 $50\times 10^4$  cells/mL,采用f/2培养液进行为期10 d的培养,每天定时摇瓶3次。

表1 正交实验设计表

Tab. 1  $L_9(3^4)$  orthogonal test used for study

实验号 treatments no.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
盐度 salinity	6	6	6	12	12	12	18	18	18
光强/ $[\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})]$ light intensity	10	30	50	10	30	50	10	30	50
温度/ $^{\circ}\text{C}$ temperature	10	20	30	20	30	10	30	10	20

### 1.3 生物量干重及脂肪酸组成的测定

在培养至2、4、6、8和10 d时分别摇匀后取50 mL藻液,经0.45  $\mu\text{m}$ 纤维滤膜抽滤后采用恒重法测定其生物量。同时取100 mL藻液经冷冻离心收集藻细胞用于脂肪酸含量的测定。

细胞脂肪酸含量的测定:移取一定量藻液冷冻离心获得藻细胞,参照Griffiths等<sup>[15]</sup>的方法,依次加入甲醇钠(NaOMe, 0.5 mol/L)和 $\text{BF}_3$ -甲醇溶液(14%)进行两步甲酯化,以C19为内标。然后采用Agilent 7890A/5975C气-质联用仪分析脂肪酸甲酯,毛细管柱为Supelco Omegawax320 (30.0 mm $\times$ 0.25  $\mu\text{m}$ )。根据Sigma脂肪酸标准品的分析图谱和保留时间对样品脂肪酸进行定性,按内标法<sup>[16]</sup>计算ARA、EPA和DHA的绝对含量(mg/g DW)。每组样品平行测量3次。

### 1.4 数据分析和处理

结果以平均值 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示,采用PASW Statistics 18.0软件进行方差分析和Duncan氏多重比较,并对三因素不同水平均值求算估计边际均值和两两比较分析,以 $P<0.05$ 表示差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同盐度—光照强度—温度组合对角毛藻SHOU-B98生物量的影响

各实验组藻细胞生物量自培养第4天时产生显著差异。实验期间,组5[12、30  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 和30  $^{\circ}\text{C}$ ]和组9[18、50  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 和20  $^{\circ}\text{C}$ ]生物量增长最快且第10天达到最大生物量,干重均为0.14 g/L,显著高于其他组( $P<0.05$ )(图1)。其次为组3[6、50  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 和30  $^{\circ}\text{C}$ ]、组4[12、10  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 和20  $^{\circ}\text{C}$ ]和组7[18、10  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 和30  $^{\circ}\text{C}$ ]。组1[6、10  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 和10  $^{\circ}\text{C}$ ]生物量略有下降。

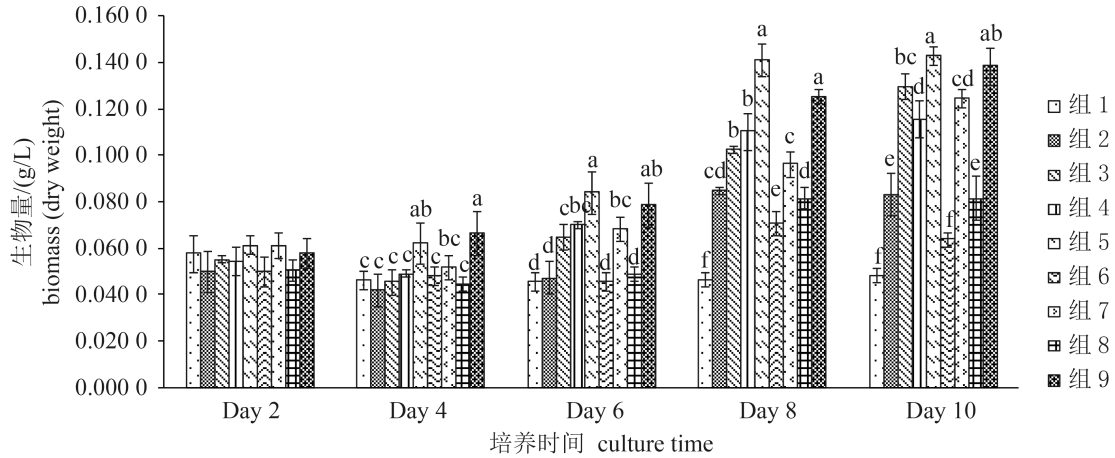


图 1 不同培养时间下盐度-光强-温度组合对角毛藻SHOU-B98生物量的影响

上标不同小写字母表示同一时刻不同实验组之间存在显著差异(P<0.05)

Fig. 1 Effect of salinity-light intensity-temperature combinations on the biomass of Chaetoceros sp. SHOU-B98 at different culture time

The column super-marked with different letters means significant difference among the treatments at the same time (P<0.05)

### 2.2 不同盐度—光照强度—温度组合对角毛藻SHOU-B98的ARA、EPA和DHA含量的影响

盐度—光照强度—温度组合条件对角毛藻SHOU-B98细胞ARA、EPA和DHA含量有显著影响。从细胞ARA水平看, 组3[6、50 μmol/(m<sup>2</sup>·s)和30 °C]藻细胞的ARA含量始终是9个实验组中最高, 显著高于其他组(P<0.05), 且该组ARA含量在第10天时达到最大, 为3.49 mg/g DW。从细胞EPA水平看, 在第2、8和10天, 组9[18、50 μmol/(m<sup>2</sup>·s)和20 °C]藻细胞中EPA含量最高, 且该组EPA含量在第10天时达到最大, 为14.10 mg/g DW; 在第4和6天, 藻细胞EPA含量分别在组8[18、30 μmol/(m<sup>2</sup>·s)和10 °C]和组7[18、10 μmol/(m<sup>2</sup>·s)和30 °C]中最高。从细胞DHA水平看, 第4天时组4[12、10 μmol/(m<sup>2</sup>·s)和20 °C]藻细胞DHA含量(2.47 mg/g DW)最高, 其余时间组9[18、50 μmol/(m<sup>2</sup>·s)和20 °C]藻细胞的DHA含量最高, 且该组在第6天时到达最大(1.88 mg/g DW)(表2)。

对不同盐度—光照强度—温度组合下角毛藻SHOU-B98的ARA含量的方差分析表明: 盐度始终对角毛藻SHOU-B98的ARA含量有显著或极显著影响; 培养第4天后, 温度对藻细胞ARA含量有极显著性影响; 培养第6天后, 光照强度对藻细胞ARA含量有极显著性影响; 第4天后盐度、光照强度和温度的交互作用对角毛藻

SHOU-B98的ARA含量均有极显著影响[F<sub>误差D</sub>>F<sub>0.01(2,16)</sub>]。培养第2天, 盐度对藻细胞ARA含量的影响最大。培养第6天后, 温度对藻细胞ARA含量的影响最大。三因素对藻细胞ARA含量影响的主次顺序为温度>光照强度>盐度(表3)。

根据三因素不同水平均值的估计边际均值和两两比较分析, 第2、4、6和8天时角毛藻SHOU-B98细胞积累ARA的最优培养条件是[6、50 μmol/(m<sup>2</sup>·s)和30 °C]; 第10天时, 培养盐度对细胞积累ARA含量无显著影响, 且细胞积累ARA的最优光照强度和温度条件分别是50 μmol/(m<sup>2</sup>·s)和30 °C。因此, 角毛藻SHOU-B98细胞积累ARA的最优培养组合条件为盐度6、光照强度50 μmol/(m<sup>2</sup>·s)和温度30 °C(表4)。

对不同盐度—光照强度—温度组合下角毛藻SHOU-B98的EPA含量的方差分析表明: 盐度始终对藻细胞EPA含量有极显著影响; 第2、6、8和10天光照强度对藻细胞EPA含量有极显著影响; 在第8天和第10天, 温度对藻细胞EPA含量有极显著影响; 第4、6和10天, 盐度、光照强度和温度的交互作用对角毛藻SHOU-B98的EPA含量有极显著影响[F<sub>误差D</sub>>F<sub>0.01(2,16)</sub>]。实验期间, 盐度始终是三因素中影响角毛藻SHOU-B98 EPA含量的最主要因素(表5)。

根据三因素不同水平均值的估计边际均值和两两比较分析, 实验期间, 高盐度(18)、强光

表 2 不同盐度—光强—温度组合条件对角毛藻SHOU-B98细胞ARA、EPA和DHA含量(mg/g DW)的影响  
 Tab. 2 Effect of salinity-light intensity-temperature combinations on ARA, EPA and DHA contents (mg/g DW) of *Chaetoceros* sp. SHOU-B98 at different culture time

脂肪酸/ (mg/g DW) fatty acids	时间/d time	实验组 treatments								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
ARA	2	0.77±0.19 <sup>bcA</sup>	0.90±0.09 <sup>abB</sup>	1.02±0.18 <sup>ac</sup>	0.35±0.02 <sup>cd</sup>	0.59±0.01 <sup>cdC</sup>	0.54±0.06 <sup>cdA</sup>	0.53±0.14 <sup>cdD</sup>	0.58±0.02 <sup>cdB</sup>	0.74±0.1 <sup>bcd</sup>
	4	0.56±0.11 <sup>cb</sup>	1.32±0.02 <sup>ba</sup>	2.28±0.34 <sup>ab</sup>	1.12±0.06 <sup>bcA</sup>	0.91±0.11 <sup>cdBC</sup>	0.57±0.04 <sup>ca</sup>	1.06±0.14 <sup>bcdB</sup>	0.79±0.01 <sup>deA</sup>	1.04±0.14 <sup>bcdC</sup>
	6	0.57±0.07 <sup>cdB</sup>	1.02±0.12 <sup>cb</sup>	2.21±0.55 <sup>ab</sup>	0.98±0.15 <sup>bcdB</sup>	1.16±0.54 <sup>bb</sup>	0.54±0.07 <sup>cdA</sup>	0.89±0.00 <sup>bcdBC</sup>	0.48±0.05 <sup>cdC</sup>	1.19±0.07 <sup>bcB</sup>
	8	0.47±0.06 <sup>deB</sup>	0.49±0.06 <sup>deC</sup>	2.05±0.4 <sup>ab</sup>	0.44±0.07 <sup>deD</sup>	0.99±0.13 <sup>cdBC</sup>	0.29±0.01 <sup>cb</sup>	0.76±0.17 <sup>cdC</sup>	0.31±0.04 <sup>de</sup>	1.43±0.21 <sup>bb</sup>
	10	0.26±0.04 <sup>fc</sup>	0.62±0.16 <sup>deC</sup>	3.49±0.25 <sup>aa</sup>	0.75±0.07 <sup>dc</sup>	3.14±0.21 <sup>ba</sup>	0.32±0.02 <sup>fb</sup>	1.32±0.09 <sup>ca</sup>	0.42±0.02 <sup>efD</sup>	3.19±0.18 <sup>ba</sup>
EPA	2	2.61±0.42 <sup>db</sup>	2.88±0.26 <sup>cdB</sup>	3.27±0.51 <sup>bcdC</sup>	3.05±0.11 <sup>cdD</sup>	3.64±0.19 <sup>bcdC</sup>	4.82±1.03 <sup>bc</sup>	4.43±1.42 <sup>bcC</sup>	6.44±1.49 <sup>ac</sup>	7.77±0.69 <sup>ac</sup>
	4	2.87±0.35 <sup>cb</sup>	5.16±0.68 <sup>da</sup>	7.25±0.87 <sup>ca</sup>	11.46±0.61 <sup>aa</sup>	7.67±0.71 <sup>ca</sup>	7.12±0.52 <sup>caB</sup>	11.02±0.76 <sup>aa</sup>	11.61±0.60 <sup>aa</sup>	9.07±0.65 <sup>bb</sup>
	6	3.79±0.08 <sup>ca</sup>	4.96±0.04 <sup>ba</sup>	5.01±1.18 <sup>bbB</sup>	7.69±0.91 <sup>ab</sup>	5.01±0.84 <sup>bb</sup>	7.85±0.16 <sup>ca</sup>	8.71±0.50 <sup>ab</sup>	8.22±0.72 <sup>ab</sup>	8.28±0.64 <sup>abC</sup>
	8	3.46±0.36 <sup>da</sup>	3.09±0.15 <sup>db</sup>	2.81±0.18 <sup>deC</sup>	4.53±0.08 <sup>cc</sup>	2.14±0.52 <sup>cd</sup>	4.87±0.20 <sup>cc</sup>	4.38±0.24 <sup>cc</sup>	5.94±0.8 <sup>bc</sup>	7.79±0.66 <sup>ac</sup>
	10	2.39±0.19 <sup>fb</sup>	4.71±1.44 <sup>da</sup>	3.32±0.53 <sup>efC</sup>	6.92±0.46 <sup>cb</sup>	5.07±0.23 <sup>db</sup>	6.58±0.52 <sup>cb</sup>	4.57±0.20 <sup>deC</sup>	8.96±1.00 <sup>bb</sup>	14.10±0.72 <sup>aa</sup>
DHA	2	1.17±0.37 <sup>bcdA</sup>	1.02±0.12 <sup>cdA</sup>	1.31±0.17 <sup>bcA</sup>	0.73±0.12 <sup>cd</sup>	0.87±0.11 <sup>deBC</sup>	1.32±0.22 <sup>bcA</sup>	0.84±0.13 <sup>deB</sup>	1.45±0.03 <sup>bb</sup>	1.71±0.16 <sup>aa</sup>
	4	0.72±0.07 <sup>fb</sup>	1.01±0.02 <sup>efA</sup>	1.67±0.30 <sup>bcA</sup>	2.47±0.05 <sup>ca</sup>	1.28±0.05 <sup>deA</sup>	1.44±0.15 <sup>cdA</sup>	1.97±0.17 <sup>ba</sup>	2.02±0.04 <sup>ba</sup>	1.83±0.41 <sup>ba</sup>
	6	0.84±0.08 <sup>caB</sup>	0.99±0.03 <sup>ca</sup>	1.43±0.40 <sup>ca</sup>	1.88±0.08 <sup>ab</sup>	1.09±0.25 <sup>deAB</sup>	1.37±0.13 <sup>cdA</sup>	1.77±0.50 <sup>abA</sup>	1.46±0.23 <sup>bcA</sup>	1.88±0.10 <sup>aa</sup>
	8	0.74±0.16 <sup>cb</sup>	0.26±0.13 <sup>db</sup>	0.53±0.04 <sup>cb</sup>	0.64±0.09 <sup>cd</sup>	0.63±0.05 <sup>bc</sup>	0.49±0.07 <sup>cb</sup>	0.53±0.03 <sup>cc</sup>	0.59±0.09 <sup>bc</sup>	1.39±0.13 <sup>ab</sup>
	10	0.31±0.06 <sup>cc</sup>	0.37±0.09 <sup>cb</sup>	0.73±0.09 <sup>cdB</sup>	1.18±0.12 <sup>cb</sup>	0.89±0.14 <sup>cb</sup>	0.68±0.10 <sup>db</sup>	0.64±0.02 <sup>dbc</sup>	0.91±0.05 <sup>cbC</sup>	1.59±0.18 <sup>abB</sup>

注：同一脂肪酸同一行数据上标不同小写字母表示不同实验组之间差异显著(P<0.05)；同一脂肪酸同一列数据上标不同大写字母表示不同培养时间之间差异显著(P<0.05)

Notes: the data in the same line super-marked with different letters means significant difference among the treatments (P<0.05). the data in the same column of same fatty acid super-marked with different capital letters means significant difference among different culture time (P<0.05)

表 3 在不同培养时间下三因素对角毛藻SHOU-B98的ARA含量影响的方差分析

Tab. 3 Analysis of variance for the effect of the three factors on ARA content of *Chaetoceros* sp. SHOU-B98 at different culture time

来源 source	df	MS <sub>2d</sub>	MS <sub>4d</sub>	MS <sub>6d</sub>	MS <sub>8d</sub>	MS <sub>10d</sub>	F <sub>2d</sub>	F <sub>4d</sub>	F <sub>6d</sub>	F <sub>8d</sub>	F <sub>10d</sub>	Fa
重复 repeat	2	0.03	0.03	0.06	0.00	0.00	1.27	0.30	1.12	0.11	0.03	
处理 treatment	8	0.13	0.81	0.83	1.06	5.62	5.06**	8.03**	15.67**	28.45**	256.8**	F <sub>0.05(8,16)</sub> =2.59
盐度 salinity	2	0.29	0.70	0.47	0.43	0.14	11.44**	6.98**	8.81**	11.42**	6.44*	F <sub>0.01(8,16)</sub> =3.89
光强 light intensity	2	0.13	0.36	0.66	1.38	5.52	5.20	3.60	12.38**	37.09**	252.6**	F <sub>0.05(2,16)</sub> =3.63
温度 temperature	2	0.05	1.40	1.82	1.87	12.11	2.11	14.01**	34.26**	50.09**	553.9**	F <sub>0.01(2,16)</sub> =6.23
误差 D error D	2	0.04	0.76	0.38	0.57	4.69	1.57	41.14**	7.24**	15.20**	214.3**	
误差 E error E	16	0.02	0.02	0.05	0.04	0.02						
总误差 total error	18	0.03	0.10	0.09	0.10	0.54						
总变异 total variations	26											

注：数据上标\*表示差异显著(0.01<P<0.05)；上标\*\*表示差异极显著(P<0.01)，下同

Notes: The data super-marked with \* means the significance is 0.01<P<0.05 and data with \*\* means the significance is P<0.01, the same below

表 4 角毛藻SHOU-B98细胞ARA含量的三因素不同水平均值的估计边际均值和两两比较分析

Tab. 4 Estimated marginal means and pairwise comparisons of means on cellular ARA content of *Chaetoceros* sp. SHOU-B98 at different levels of the three factors

培养时间/d culture time	各因素的水平均值 means of different levels of each factor									标准误 standard error
	盐度 salinity			光强/[ $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ ] light intensity			温度/ $^{\circ}\text{C}$ temperature			
	6	12	18	10	30	50	10	20	30	
2	0.90 <sup>a</sup>	0.50 <sup>c</sup>	0.62 <sup>b</sup>	0.55 <sup>b</sup>	0.69 <sup>a</sup>	0.77 <sup>a</sup>	0.63 <sup>a</sup>	0.66 <sup>a</sup>	0.71 <sup>a</sup>	0.036
4	1.39 <sup>a</sup>	0.86 <sup>b</sup>	0.96 <sup>b</sup>	0.91 <sup>b</sup>	1.00 <sup>ab</sup>	1.30 <sup>a</sup>	0.64 <sup>b</sup>	1.16 <sup>a</sup>	1.42 <sup>a</sup>	0.102
6	1.27 <sup>a</sup>	0.89 <sup>b</sup>	0.86 <sup>b</sup>	0.81 <sup>b</sup>	0.89 <sup>b</sup>	1.31 <sup>a</sup>	0.53 <sup>c</sup>	1.01 <sup>b</sup>	1.42 <sup>a</sup>	0.098
8	1.00 <sup>a</sup>	0.57 <sup>c</sup>	0.83 <sup>bc</sup>	0.56 <sup>b</sup>	0.59 <sup>b</sup>	1.25 <sup>a</sup>	0.35 <sup>c</sup>	0.79 <sup>b</sup>	1.27 <sup>a</sup>	0.098
10	1.46 <sup>a</sup>	1.40 <sup>a</sup>	1.64 <sup>a</sup>	0.77 <sup>b</sup>	1.39 <sup>b</sup>	2.33 <sup>a</sup>	0.33 <sup>c</sup>	1.52 <sup>b</sup>	2.65 <sup>a</sup>	0.232

注: 同一行同一因素数据上标不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ ), 下同

Notes: The data of the same factor in the same line super-marked with different letters means significant difference among the treatments ( $P < 0.05$ ), the same below

表 5 在不同培养时间下三因素对角毛藻SHOU-B98的EPA含量影响的方差分析

Tab. 5 Analysis of variance for the effect of the three factors on EPA content of *Chaetoceros* sp. SHOU-B98 at different culture time

来源 source	df	$MS_{2d}$	$MS_{4d}$	$MS_{6d}$	$MS_{8d}$	$MS_{10d}$	$F_{2d}$	$F_{4d}$	$F_{6d}$	$F_{8d}$	$F_{10d}$	$F_{\alpha}$
重复 repeat	2	0.27	0.04	0.12	0.05	0.31	0.41	0.01	0.37	0.25	0.60	
处理 treatment	8	9.32	26.59	10.60	9.11	37.32	14.36**	7.31**	31.93**	46.36**	72.06**	$F_{0.05(8,16)}=2.59$
盐度 salinity	2	26.00	69.94	33.14	20.76	74.13	40.08**	19.22**	99.85**	105.63**	143.15**	$F_{0.01(8,16)}=3.89$
光强 light intensity	2	8.32	0.91	2.26	4.92	25.60	12.82**	0.25	6.82**	25.03**	49.43**	$F_{0.05(2,16)}=3.63$
温度 temperature	2	2.01	5.94	1.19	10.44	41.36	3.10	1.63	3.58	53.13**	79.87**	$F_{0.01(2,16)}=6.23$
误差 D error D	2	0.93	29.58	5.80	0.33	8.18	1.52	74.58**	17.46**	1.67	15.80**	
误差 E error E	16	0.61	0.40	0.33	0.20	0.52						
总误差 total error	18	0.65	3.64	0.94	0.21	1.37						
总变异 total variations	26											

照强度[ $50 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ ]和适中温度( $20^{\circ}\text{C}$ )始终有利于角毛藻SHOU-B98细胞合成EPA。因此, 角毛藻SHOU-B98细胞积累EPA的最优培养组合条件为盐度18、光照强度 $50 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 和温度 $20^{\circ}\text{C}$ (表6)。

对不同盐度—光照强度—温度组合下角毛藻SHOU-B98的DHA含量的方差分析表明: 第4、6、8和10天盐度对藻细胞DHA含量有显著或极显著影响; 第2、6、8和10天光照强度对藻细胞DHA含量有极显著影响; 第6、8和10天温度对藻细胞DHA含量有极显著影响。培养期间盐度、

光照强度和温度的交互作用始终对角毛藻SHOU-B98的DHA含量有显著或极显著影响[ $F_{\text{误差D}} > F_{0.05(2,16)}$ ]。培养第6天后, 盐度是三因素中影响藻细胞DHA含量的首要因素(表7)。

根据三因素不同水平均值的估计边际均值和两两比较分析, 高盐度(18)、强光照强度[ $50 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ ]和适中温度( $20^{\circ}\text{C}$ )始终有利于角毛藻SHOU-B98细胞合成DHA。因此, 培养中后期角毛藻SHOU-B98细胞积累DHA的最优培养组合条件为盐度18、光照强度 $50 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 和温度 $20^{\circ}\text{C}$ (表8)。

表 6 角毛藻SHOU-B98细胞EPA含量的三因素不同水平均值的估计边际均值和两两比较分析

Tab. 6 Estimated marginal means and pairwise comparisons of means on cellular EPA content of *Chaetoceros* sp. SHOU-B98 at different levels of the three factors

培养时间/d culture time	各因素的水平均值 means of different levels of each factor									标准误 standard error
	盐度 salinity			光强/[ $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ ] light intensity			温度/ $^{\circ}\text{C}$ temperature			
	6	12	18	10	30	50	10	20	30	
2	2.92 <sup>c</sup>	3.84 <sup>b</sup>	6.21 <sup>a</sup>	3.36 <sup>c</sup>	4.32 <sup>b</sup>	5.29 <sup>a</sup>	4.62 <sup>a</sup>	4.57 <sup>a</sup>	3.79 <sup>b</sup>	0.261
4	5.09 <sup>c</sup>	8.75 <sup>b</sup>	10.56 <sup>a</sup>	8.45 <sup>a</sup>	8.15 <sup>a</sup>	7.81 <sup>a</sup>	7.20 <sup>a</sup>	8.56 <sup>a</sup>	8.65 <sup>a</sup>	0.604
6	4.59 <sup>c</sup>	6.85 <sup>b</sup>	8.40 <sup>a</sup>	6.73 <sup>ab</sup>	6.06 <sup>b</sup>	7.05 <sup>a</sup>	6.62 <sup>a</sup>	6.97 <sup>a</sup>	6.25 <sup>a</sup>	0.309
8	3.12 <sup>c</sup>	3.85 <sup>b</sup>	6.04 <sup>a</sup>	4.12 <sup>b</sup>	3.72 <sup>b</sup>	5.16 <sup>a</sup>	4.76 <sup>b</sup>	5.13 <sup>a</sup>	3.11 <sup>c</sup>	0.147
10	3.48 <sup>c</sup>	6.19 <sup>b</sup>	9.21 <sup>a</sup>	4.63 <sup>c</sup>	6.25 <sup>b</sup>	8.00 <sup>a</sup>	5.98 <sup>b</sup>	8.57 <sup>a</sup>	4.32 <sup>c</sup>	0.375

表 7 在不同培养时间下三因素对角毛藻SHOU-B98的DHA含量影响的方差分析

Tab. 7 Analysis of variance for the effect of the three factors on DHA content of *Chaetoceros* sp. SHOU-B98 at different culture time

来源 source	df	$MS_{2d}$	$MS_{4d}$	$MS_{6d}$	$MS_{8d}$	$MS_{10d}$	$F_{2d}$	$F_{4d}$	$F_{6d}$	$F_{8d}$	$F_{10d}$	Fa
重复 repeat	2	0.01	0.15	0.00	0.00	0.00	0.08	0.75	0.02	0.16	0.18	
处理 treatment	8	0.36	0.79	0.44	0.29	0.47	4.92**	3.89**	13.51**	27.11**	39.56**	$F_{0.05(8,16)}=2.59$
盐度 salinity	2	0.25	1.08	0.96	0.26	0.84	3.43	5.35*	29.28**	24.50**	69.83**	$F_{0.01(8,16)}=3.89$
光强 light intensity	2	0.83	0.31	0.33	0.22	0.24	11.36**	1.56	10.00**	20.46**	19.81**	$F_{0.05(2,16)}=3.63$
温度 temperature	2	0.11	0.43	0.29	0.10	0.41	1.49	2.16	8.97**	9.66**	33.88**	$F_{0.01(2,16)}=6.23$
误差 D error D	2	0.25	1.31	0.19	0.57	0.42	4.86*	20.82**	5.77*	53.82**	34.73**	
误差 E error E	16	0.05	0.06	0.03	0.01	0.01						
总误差 total error	18	0.07	0.20	0.05	0.07	0.06						
总变异 total variations	26											

表 8 角毛藻SHOU-B98细胞DHA含量的三因素不同水平均值的估计边际均值和两两比较分析

Tab. 8 Estimated marginal means and pairwise comparisons of means on cellular DHA content of *Chaetoceros* sp. SHOU-B98 at different levels of the three factors

培养时间/d culture time	各因素的水平均值 means of different levels of each factor									标准误 standard error
	盐度 salinity			光强/[ $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ ] light intensity			温度/ $^{\circ}\text{C}$ temperature			
	6	12	18	10	30	50	10	20	30	
2	1.17 <sup>b</sup>	0.98 <sup>b</sup>	1.40 <sup>a</sup>	0.91 <sup>b</sup>	1.12 <sup>b</sup>	1.51 <sup>a</sup>	1.32 <sup>a</sup>	1.22 <sup>a</sup>	1.01 <sup>b</sup>	0.069
4	1.13 <sup>c</sup>	1.73 <sup>b</sup>	1.94 <sup>a</sup>	1.72 <sup>a</sup>	1.43 <sup>a</sup>	1.65 <sup>a</sup>	1.40 <sup>b</sup>	1.77 <sup>a</sup>	1.64 <sup>a</sup>	0.088
6	1.09 <sup>c</sup>	1.45 <sup>b</sup>	1.71 <sup>a</sup>	1.50 <sup>a</sup>	1.18 <sup>b</sup>	1.56 <sup>a</sup>	1.23 <sup>b</sup>	1.59 <sup>a</sup>	1.43 <sup>ab</sup>	0.072
8	0.51 <sup>c</sup>	0.59 <sup>ab</sup>	0.84 <sup>a</sup>	0.64 <sup>ab</sup>	0.49 <sup>b</sup>	0.80 <sup>a</sup>	0.61 <sup>a</sup>	0.77 <sup>a</sup>	0.56 <sup>a</sup>	0.085
10	0.47 <sup>b</sup>	0.91 <sup>a</sup>	1.05 <sup>a</sup>	0.71 <sup>b</sup>	0.72 <sup>b</sup>	1.00 <sup>a</sup>	0.63 <sup>b</sup>	1.05 <sup>a</sup>	0.75 <sup>b</sup>	0.075

### 3 讨论

环境因子的交互作用对藻类生长的影响在鼠尾藻<sup>[12]</sup>、旋链角毛藻<sup>[13]</sup>和两栖盖丝藻(*Geitlerinema amphibium*)<sup>[17]</sup>上已得到了证实。本研究中, 从生物量的变化图可知, 不同盐度、光照强度和温度组合对角毛藻SHOU-B98有显著影响。盐度12、光强30  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 和温度30  $^{\circ}\text{C}$ 的组合及盐度18、光强50  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 和温度20  $^{\circ}\text{C}$ 的组合下角毛藻SHOU-B98生物量增长最快。而曾蓓蓓等<sup>[14]</sup>采用单因子实验方法得到的角毛藻SHOU-B98生物量生长的最适盐度、光照强度和温度分别为12.6、28  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 和22.3  $^{\circ}\text{C}$ , 其生长最佳培养条件与本研究结果略有差别, 表明盐度、温度和光照强度的交互作用或许也是影响到角毛藻SHOU-B98的的生长的重要因素。

环境因素在影响微藻生长的同时, 也影响微藻的代谢过程, 从而导致细胞营养物质的含量发生变化。光照可以通过一系列铁氧还原蛋白和硫氧还原蛋白参与信号传导, 激活质体中的乙酰辅酶A羧化酶(ACCCase), 诱导ACCCase酶调节脂肪酸的合成<sup>[18]</sup>。光照强度过高很容易导致多不饱和脂肪酸的氧化损伤, 但是会促进饱和脂肪酸(SFA)和单不饱和脂肪酸(MUFA)的合成<sup>[2]</sup>。曹春晖等<sup>[19]</sup>对4株海洋绿藻的脂肪酸组成研究发现, 4株绿藻的ARA含量和多不饱和脂肪酸(PUFA)总量均随光照强度的增加而降低。郭兵等<sup>[20]</sup>发现球等鞭金藻(*I. sphaerica*)中ARA含量随光照强度的增强而降低; 李荷芳等<sup>[21]</sup>研究指出前沟藻(*Amphidinium* sp.)的DHA含量随光照强度的增大而降低; 蒋霞敏等<sup>[22-23]</sup>对微绿球藻(*Nannochloropsis oculata*)和绿色巴夫藻(*Pavlov viridis*)的研究中发现PUFA含量随光强的增强而降低。然而, 对纤细角毛藻(*C. gracilis*)的研究则表明高光有利于ARA在其细胞内的积累, 50  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 时ARA占总脂肪酸的比例为1.69%, 而在140  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 时上升到4.81%<sup>[24]</sup>; Lee等<sup>[25]</sup>指出紫球藻(*Porphyridium cruentum*) EPA含量同样随光照强度的增加而增加, 这与本实验的研究结果相似。本研究所采用的3个光照强度梯度[10、30和50  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ]中, 在50  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的光照强度下, 角毛藻SHOU-B98细胞的ARA、EPA和DHA含量均最大。上述研究中, 光照强度改变引起微藻脂肪酸组成产生不同变化的原因, 推测一方面

与藻种有关, Renaud等<sup>[26]</sup>认为由于不同的微藻细胞中存在不同类型的去饱和酶, 而这些酶的活性受光强的影响不同, 所以不同种微藻其ARA、EPA和DHA随光照强度的变化也会有差异。另一方面与实验所采用的光照强度的范围有关。从生物量增长情况看, 由于温度、盐度和光照强度之间存在交互作用, 50  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的光照强度依然处于角毛藻SHOU-B98的最适宜生长的光照强度范围。

温度能够调节脂肪酸合成过程中相关酶的活性, 从而影响微藻细胞的脂肪酸组成<sup>[27]</sup>。通常高温会引起微藻细胞SFA含量的增加、PUFA含量的减少。在低温环境中, 某些微藻细胞通过提高细胞中脂肪酸的不饱和程度来增加细胞膜的流动性从而保证细胞进行正常的生理活动<sup>[28-29]</sup>。而高温时SFA含量的增加被认为是维持细胞膜完整性的一种策略<sup>[30-31]</sup>。高秀芝等<sup>[32]</sup>发现不同培养温度对2株曼氏骨条藻(*Skeletonema munzelii*) SM-1和SM-2脂肪酸组成的影响极显著( $P < 0.01$ ), 二者ARA和EPA含量都随温度的升高呈先上升后下降的趋势, 15  $^{\circ}\text{C}$ 时达到最高, 此时ARA含量分别为0.53%和0.43%, EPA含量分别为18.87%和19.97%。蒋霞敏等<sup>[23]</sup>指出温度对微绿球藻脂肪酸组成的影响较明显, EPA在20  $^{\circ}\text{C}$ 时最高, 为30.57%, 30  $^{\circ}\text{C}$ 时急剧下降, 为11.94%。低温胁迫可有效提高裂壶菌(*Schizochytrium* sp. FJU-512)细胞内DHA的含量, 15  $^{\circ}\text{C}$ 时最高, 为64.11%<sup>[33]</sup>。在本研究中, 角毛藻SHOU-B98细胞内的ARA含量在高温(30  $^{\circ}\text{C}$ )组最大, 而EPA和DHA含量则在中温(20  $^{\circ}\text{C}$ )时最高。表明高温对藻细胞不同PUFA的含量有不同的影响。这或许与不同脂肪酸的生物学功能有关。EPA和DHA作为极性膜脂的重要组分, 除了其固有的生物学功能外, 还影响细胞膜的流动性, 在高温条件下, 藻细胞无需通过合成更多的EPA和DHA来增加细胞膜的流动性。而ARA则有助于生物体提升抗高温胁迫的能力<sup>[34]</sup>, 因此高的培养温度下, 角毛藻SHOU-B98细胞蓄积了高的ARA含量。类似的结果在小环藻(*Cyclotella* sp.) SHOU-B108中也得到证实。

Azachi等<sup>[35]</sup>认为盐度的变化能够影响微藻细胞的 $\beta$ -酮脂酰-CoA合成酶[ $\beta$ -ketoacyl-coenzyme A (CoA) synthases (Kcs)]和脂肪酸去饱和酶的合成,  $\beta$ -酮脂酰-CoA合成酶是催化脂肪酸碳链延长步骤

的关键限速酶, SFA在去饱和酶的作用下形成MUFA或PUFA。盐度还会影响微藻的光合作用和呼吸作用的电子传递系统, 从而影响细胞脂肪酸的合成。微藻细胞在高盐度下生长需要消耗更多的能量, 因此细胞内储存的脂肪含量相应增加, 叶绿素含量增加, 细胞光合作用增强。但是, 在高盐度下, 细胞膜流动性和渗透性较差, PUFA含量下降, 而总脂含量增加<sup>[36]</sup>。绿色巴夫藻在低盐度条件下有利于PUFA (n-3)及EPA的合成<sup>[22]</sup>。冯雷等<sup>[37]</sup>对4株海洋绿藻的EPA含量研究发现, 在低盐度(16)时4株海洋绿藻细胞蓄积有最大的EPA。而曼氏骨条藻SM-1和SM-2的ARA和EPA含量随盐度的增加呈先上升后下降的趋势, ARA含量分别在盐度20和15时最高, EPA含量在盐度15时达到最高<sup>[32]</sup>。缪锦来等<sup>[38]</sup>指出, 绿藻*Pyramimonas* sp.细胞中C20:4脂肪酸的含量随着盐度的下降而上升。Teshima等<sup>[39]</sup>报道了一种小球藻(*Chlorella saccharophial*)在盐度4~30内其细胞脂肪酸组成及含量并无显著变化。吴瑞珊等<sup>[40]</sup>报道了眼点拟微球藻(*Nannochloropsis oculata*)积累EPA的最适盐度范围为27.0~29.0, 盐度处于14.5~33.5对EPA的含量无显著影响。本研究中, 低盐度(6)有利于角毛藻SHOU-B98细胞蓄积高含量的ARA, 高盐度(18)有利于角毛藻SHOU-B98细胞蓄积高含量的EPA和DHA。上述结果显示, 盐度对微藻细胞脂肪酸的影响, 不但具有微藻种的特异性, 而且还具有脂肪酸的特异性。

综上所述, 盐度、光照强度、温度三因素对角毛藻SHOU-B98的生长及高不饱和脂肪酸含量均有显著影响, 且存在因素间的交互作用。在盐度12、光照强度30  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 和温度30  $^{\circ}\text{C}$ 的组合及盐度18、光照强度50  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 和温度20  $^{\circ}\text{C}$ 的组合条件下角毛藻SHOU-B98能获得最大的生物量, 细胞积累ARA的最优培养组合条件为盐度6、光照强度50  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 和温度30  $^{\circ}\text{C}$ 。细胞积累EPA和DHA的最优培养组合条件为盐度18、光照强度50  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 和温度20  $^{\circ}\text{C}$ 。

#### 参考文献:

- [1] Yongmanitchai W, Ward O P. Screening of algae for potential alternative sources of eicosapentaenoic acid[J]. *Phytochemistry*, 1991, 30(9): 2963-2967.
- [2] Guschina I A, Harwood J L. Algal lipids and effect of

the environment on their biochemistry[M]//Kainz M, Brett M T, Arts M T. *Lipids in Aquatic Ecosystems*. New York: Springer, 2009: 1-24.

- [3] 成永旭. 生物饵料培养学[M]. 2版. 北京: 中国农业出版社, 2005.
- Cheng Y X. *Living Food Cultivatology*[M]. 2nd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2005 (in Chinese).
- [4] 杨秀霞, 于浩, 曾晓起. 影响微藻脂肪酸组成因素概述[J]. *海洋湖沼通报*, 2001(1): 76-82.
- Yang X X, Yu H, Zeng X Q. Summarization of the factors affecting the fatty acid composition of microalgae[J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2001(1): 76-82 (in Chinese).
- [5] 黄旭雄, 周洪琪, 朱建忠, 等. 不同生长阶段微绿球藻的营养价值[J]. *水产学报*, 2004, 28(4): 477-480.
- Huang X X, Zhou H Q, Zhu J Z, *et al.* The nutritional value of *Nannochloropsis oculata* in different growth phases[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2004, 28(4): 477-480 (in Chinese).
- [6] 王蒙, 李纯厚, 戴明, 等. C/N对牟氏角毛藻生长速率和总脂含量的影响[J]. *水产学报*, 2010, 34(10): 1518-1524.
- Wang M, Li C H, Dai M, *et al.* The effect of C/N on the growth and total lipid content of *Chaetoceros muelleri*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(10): 1518-1524 (in Chinese).
- [7] 华雪铭, 周洪琪, 丁卓平. 温度和光照对微藻的生长、总脂肪含量及脂肪酸组成的影响[J]. *上海水产大学学报*, 1999, 8(4): 309-315.
- Hua X M, Zhou H Q, Ding Z P. Effect of temperature and illumination on the microalgae's growth, total lipid and fatty acid composition[J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 1999, 8(4): 309-315 (in Chinese).
- [8] He Q N, Yang H J, Wu L, *et al.* Effect of light intensity on physiological changes, carbon allocation and neutral lipid accumulation in oleaginous microalgae[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 191: 219-228.
- [9] Pancha I, Chokshi K, Maurya R, *et al.* Salinity induced oxidative stress enhanced biofuel production potential of microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 189: 341-348.
- [10] 胡晗华, 高坤山. CO<sub>2</sub>浓度倍增对牟氏角毛藻生长和光合作用的影响[J]. *水生生物学报*, 2001, 25(6): 636-639.
- Hu H H, Gao K S. Effects of doubled atmospheric CO<sub>2</sub>



- on the growth and photosynthesis of *Chaetoceros muelleri*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2001, 25(6): 636-639 (in Chinese).
- [11] 张虎, 张桂艳, 温小斌, 等. pH对小球藻*Chlorella* sp. XQ-200419光合作用、生长和产油的影响[J]. 水生生物学报, 2014, 38(6): 1084-1091.  
Zhang H, Zhang G Y, Wen X B, *et al.* Effects of pH on the photosynthesis, growth and lipid production of *Chlorella* sp. XQ-200419[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2014, 38(6): 1084-1091 (in Chinese).
- [12] 姜宏波, 田相利, 董双林, 等. 温度和光照强度对鼠尾藻生长和生化组成的影响[J]. 应用生态学报, 2009, 20(1): 185-189.  
Jiang H B, Tian X L, Dong S L, *et al.* Effects of temperature and light intensity on the growth and biochemical composition of *Sargassum thunbergii*[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2009, 20(1): 185-189 (in Chinese).
- [13] 茅华, 许海, 刘兆普. 温度、光照、盐度及pH对旋链角毛藻生长的影响[J]. 生态科学, 2007, 26(5): 432-436.  
Mao H, Xu H, Liu Z P. Effects of water temperature, illumination, salinity and pH on the growth of *Chaetoceros curvisetus*[J]. Ecological Science, 2007, 26(5): 432-436 (in Chinese).
- [14] 曾蓓蓓, 黄旭雄, 危立坤, 等. 3种半咸水硅藻的适宜培养条件及其细胞生化成分[J]. 海洋渔业, 2014, 36(4): 320-328.  
Zeng B B, Huang X X, Wei L K, *et al.* Suitable culture conditions and cellular biochemical composition of three diatoms from brackish water[J]. Marine Fisheries, 2014, 36(4): 320-328 (in Chinese).
- [15] Griffiths M J, van Hille R P, Harrison S T L. Selection of direct transesterification as the preferred method for assay of fatty acid content of microalgae[J]. Lipids, 2010, 45(11): 1053-1060.
- [16] 黄旭雄, 冯隆峰, 温文, 等. 日本鬼鲉胚胎及卵黄囊仔鱼发育过程中脂肪及脂肪酸特性变化[J]. 水产学报, 2013, 37(4): 526-535.  
Huang X X, Feng L F, Wen W, *et al.* The changes in lipid and fatty acid profiles of devil stinger *Inimicus japonicas* during the development of embryo and yolk sac larvae[J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(4): 526-535 (in Chinese).
- [17] Jodłowska S, Latała A. Combined effects of light and temperature on growth, photosynthesis, and pigment content in the mat-forming cyanobacterium *Geitlerinema amphibium*[J]. Photosynthetica, 2013, 51(2): 202-214.
- [18] Kozaki A, Kamada K, Nagano Y, *et al.* Recombinant carboxyltransferase responsive to redox of pea plastidic acetyl-CoA carboxylase[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(14): 10702-10708.
- [19] 曹春晖, 孙世春, 麦康森, 等. 光照强度对四株海洋绿藻总脂含量和脂肪酸组成的影响[J]. 生态学报, 2010, 30(9): 2347-2353.  
Cao C H, Sun S C, Mai K S, *et al.* Effect of light intensity on the total lipid contents and fatty acid composition in 4 strains of marine green algae[J]. Acta Ecologica Sinica, 2010, 30(9): 2347-2353 (in Chinese).
- [20] 郭兵, 龚阳敏, 万霞, 等. 光强和温度对球等鞭金藻(*Isochrysis sphaerica*)生长及其脂肪酸的影响[J]. 中国油料作物学报, 2011, 33(3): 295-301.  
Guo B, Gong Y M, Wan X, *et al.* Effect of light intensity and temperature on growth and fatty acid composition of *Isochrysis sphaerica*[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2011, 33(3): 295-301 (in Chinese).
- [21] 李荷芳, 周汉秋. 光照强度对海洋微藻脂肪含量及脂肪酸组成影响的研究[J]. 海洋科学集刊, 2001(43): 178-183.  
Li H F, Zhou H Q. Effects of light intensity on the content of total lipid and fatty acid composition of marine microalgae[J]. Studia Marina Sinica, 2001(43): 178-183 (in Chinese).
- [22] 蒋霞敏, 柳敏海, 邢晨光. 不同生态条件对绿色巴夫藻生长与脂肪酸组成的影响[J]. 水生生物学报, 2007, 31(1): 88-93.  
Jiang X M, Liu M H, Xing C G. Effect of different ecological conditions on the growth and fatty acid composition of *Pavlov viridis*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2007, 31(1): 88-93 (in Chinese).
- [23] 蒋霞敏. 温度、光照、氮含量对微绿球藻生长及脂肪酸组成的影响[J]. 海洋科学, 2002, 26(8): 9-13.  
Jiang X M. Effects of temperatures, light intensities and nitrogen concentrations on the growth and fatty acid compositions of *Nannochloropsis oculata*[J]. Marine Sciences, 2002, 26(8): 9-13 (in Chinese).
- [24] 孙利芹, 孙惠, 王长海. 环境因素对纤细角毛藻脂肪酸组成含量的影响[J]. 食品工业科技, 2006, 27(3): 95-97, 99.

- Sun L Q, Sun H, Wang C H. The effect of environmental factors on the composition and content of fatty acids in *Chaetoceros gracilis* cell[J]. Science and Technology of Food Industry, 2006, 27(3): 95-97, 99 (in Chinese).
- [25] Lee Y K, Tan H M. Effect of temperature, light intensity and dilution rate on the cellular composition of red alga *Porphyridium cruentum* in light-limited chemostat cultures[J]. MIRCEN Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, 1988, 4(2): 231-237.
- [26] Renaud S M, Parry D L, Thinh L V, *et al.* Effect of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis* sp. and *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture[J]. Journal of Applied Phycology, 1991, 3(1): 43-53.
- [27] Zhu C J, Lee Y K, Chao T M. Effects of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* TK1[J]. Journal of Applied Phycology, 1997, 9(5): 451-457.
- [28] Šajbidor J. Effect of some environmental factors on the content and composition of microbial membrane lipids[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 1997, 17(2): 87-103.
- [29] Suutari M, Laakso S. Microbial fatty acids and thermal adaptation[J]. Critical Reviews in Microbiology, 1994, 20(4): 285-328.
- [30] Jiang Y, Chen F. Effects of temperature and temperature shift on docosahexaenoic acid production by the marine microalga *Cryptocodinium cohnii*[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2000, 77(6): 613-617.
- [31] Chen G Q, Jiang Y, Chen F. Variation of lipid class composition in *Nitzschia laevis* as a response to growth temperature change[J]. Food Chemistry, 2008, 109(1): 88-94.
- [32] 高秀芝, 蒋霞敏, 叶丽. 温度、光照和盐度对2株曼氏骨条藻生长及脂肪酸组成的影响[J]. 生物学杂志, 2014, 31(6): 64-70.
- Gao X Z, Jiang X M, Ye L. Effects of temperature, light intensity and salinity on the growth and fatty acid composition of *Skeletnema munzelii* SM-1 and SM-2[J]. Journal of Biology, 2014, 31(6): 64-70 (in Chinese).
- [33] 刘静, 高媛媛, 江贤章, 等. 低温胁迫对裂殖壶菌DHA生物合成及SOD表达的影响[J]. 药物生物技术, 2010, 17(1): 50-55.
- Liu J, Gao Y Y, Jiang X Z, *et al.* Effects on docosahexaenoic acid biosynthesis and expression of super-oxide dismutase in *Schizochytrium* at low temperature[J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2010, 17(1): 50-55 (in Chinese).
- [34] Ogata H Y, Emata A C, Garibay E S, *et al.* Fatty acid composition of five candidate aquaculture species in central Philippines[J]. Aquaculture, 2004, 236(1-4): 361-375.
- [35] Azachi M, Sadka A, Fisher M, *et al.* Salt induction of fatty acid elongase and membrane lipid modifications in the extreme halotolerant alga *Dunaliella salina*[J]. Plant Physiology, 2002, 129(3): 1320-1329.
- [36] 陈峰, 姜悦. 微藻生物技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
- Chen F, Jiang Y. Microalgae Biotechnology[M]. Beijing: China Light Industry Press, 1999 (in Chinese).
- [37] 冯雷, 郭永恩. 盐度对四株海洋绿藻总脂含量和脂肪酸组成的影响[J]. 天津科技大学学报, 2009, 24(4): 22-24, 28.
- Feng L, Guo Y E. Effects of salinity on the total lipids contents and fatty acids composition of 4 strains of marine green algae[J]. Journal of Tianjin University of Science & Technology, 2009, 24(4): 22-24, 28 (in Chinese).
- [38] 缪锦来, 王波, 阚光锋, 等. 环境因子对2种南极绿藻脂肪含量和脂肪酸组成的影响[J]. 海洋科学, 2005, 29(1): 4-11.
- Miao J L, Wang B, Kan G F, *et al.* The influence of environment factors on lipid content and fatty acid composition in two species of Antarctic green microalga[J]. Marine Sciences, 2005, 29(1): 4-11 (in Chinese).
- [39] Teshima S, Yamasaki S, Kanazawa A, *et al.* Effects of water temperature and salinity on eicosapentaenoic acid level of marine *Chlorella*[J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1983, 49(5): 805-807.
- [40] 吴珊珊, 魏东. 盐度及其调节方式对眼点拟微球藻的生长和EPA积累的影响[J]. 现代食品科技, 2007, 23(12): 5-8, 22.
- Wu R S, Wei D. Effects of salinity and its regulation ways on growth and EPA accumulation of *Nannochloropsis oculata*[J]. Modern Food Science and Technology, 2007, 23(12): 5-8, 22 (in Chinese).

## Effects of salinity-light intensity-temperature combinations on the growth and highly unsaturated fatty acids of *Chaetoceros* sp. SHOU-B98

HUANG Xuxiong<sup>1,2,3\*</sup>, ZENG Beibei<sup>1</sup>, MU Liangliang<sup>1</sup>, CAI Jing<sup>1</sup>, WEI Likun<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Genetic Resources for Freshwater Aquaculture and Fisheries, Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Aquatic Animal Genetic Breeding Center Collaborative Innovation Center in Shanghai, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** Orthogonal experiments  $L_9(3^4)$  were applied to investigate the effects of different salinity (6, 12 and 18), light intensity [ $10, 30$  and  $50 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ] and temperature ( $10, 20$  and  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ) combinations on the growth and cellular contents of arachidonic acid (ARA), eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) in *Chaetoceros* sp. SHOU-B98. The results showed that salinity, light intensity, temperature and the interaction of the three factors had significant effects on growth and highly unsaturated fatty acid contents of the microalgae. Under salinity 12, light intensity  $30 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  and temperature  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  combination and salinity 18, light intensity  $50 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  and temperature  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  combination, the microalgae displayed the fastest growth and highest biomass since the 4th day ( $P < 0.05$ ). The best culture conditions for cell to accumulate different highly unsaturated fatty acids were also different. The optimal combined culture condition for *Chaetoceros* sp. SHOU-B98 cell to accumulate ARA was combination of salinity 6, light intensity  $50 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  and temperature  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . While the optimal culture condition to accumulate EPA or DHA was combination of salinity 18, light intensity  $50 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  and temperature  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Therefore the suitable culture condition for microalgae *Chaetoceros* sp. SHOU-B98 with fast growth and high fatty acid nutrition value is the combination of salinity 18, light intensity  $50 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  and temperature  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

**Key words:** *Chaetoceros* sp.; salinity; light intensity; temperature; highly unsaturated fatty acids

**Corresponding author:** HUANG Xuxiong. E-mail: xxhuang@shou.edu.cn

**Funding projects:** Shanghai Municipal Agricultural Commission [1-2(2015); 2-1(2013)]; Shanghai Universities First-class Disciplines Project of Fisheries