

文章编号: 1674-5566(2023)03-0522-10

DOI:10.12024/jsou.20220403837

培养液中添加硫酸链霉素对蛋白核小球藻生长、细胞组成及 α -亚麻酸含量的影响

穆亮亮¹, 黄旭雄^{1,2,3}

(1. 上海海洋大学 农业农村部鱼类营养与环境生态研究中心, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306; 3. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306)

摘要: 在培养液中分别添加 0(对照组)、20、60、180 和 540 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的硫酸链霉素(STRS), 研究 STRS 作用下蛋白核小球藻 SHOU-1002(*Chlorella pyrenoidosa* SHOU-1002) 生长、细胞组成及 α -亚麻酸含量。结果表明: 前 6 天, 对照组藻细胞密度显著高于各 STRS 处理组, 第 10 天对照组生物量及单个细胞干质量均显著大于各 STRS 处理组。STRS 处理组的生物量随培养液中 STRS 质量浓度的升高不断降低。对照组、20、60 和 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ STRS 处理组藻细胞叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素含量均随培养时间的延长先降低后升高; 540 $\mu\text{g}/\text{mL}$ STRS 处理组藻细胞叶绿素 a 和叶绿素 b 含量随培养时间的延长持续下降, 而类胡萝卜素前 4 天快速下降随后趋于稳定。 α -亚麻酸是蛋白核小球藻 SHOU-1002 细胞脂肪酸组成中的优势脂肪酸, 且 4 天后各 STRS 处理组藻细胞中 α -亚麻酸含量显著高于对照组。第 10 天, 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ STRS 处理组藻细胞 α -亚麻酸的绝对含量最高(52.09 mg/g), 较对照组提升了 108.19%; 同时 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ STRS 处理组的 α -亚麻酸产量(35.34 mg/L) 也最高。藻细胞色素(% DW) 和脂肪酸(%) 的相关性分析显示 α -亚麻酸含量和叶绿素 a 含量呈极显著负相关。结果表明, 培养液中 STRS 降低蛋白核小球藻 SHOU-1002 叶绿素 a 含量和生物量的同时促进了藻细胞中 α -亚麻酸的蓄积。

关键词: 蛋白核小球藻; 硫酸链霉素; 生长; 色素; 细胞组成; α -亚麻酸

中图分类号: S 968.4 **文献标志码:** A

α -亚麻酸(C18:3n-3, ALA) 是一种十八碳三烯酸, 在 9、12 和 15 位上有 3 个顺式双键, 属 n-3 系列多不饱和脂肪酸(PUFAs)^[1]。作为二十碳五烯酸(C20:5n-3, EPA) 和二十二碳六烯酸(C22:6n-3, DHA) 等长链 n-3PUFAs 的前体, α -亚麻酸在生物体中具有重要作用。膳食中合理的 α -亚麻酸具有保持身体健康、改善内皮功能障碍、降低血脂与血压、免疫调节、抗炎、抗菌和抗癌作用^[2-4]。由于哺乳类动物细胞缺乏脂肪酸甲基端第 9 位碳原子之后的去饱和酶, 因此 α -亚麻酸只能通过食物摄入, 是人体的必需脂肪酸^[5]。常见的富含 α -亚麻酸的原料有亚麻(*Linum usitatissimum*, 22.8 g/100 g)、紫苏(*Perilla frutescens*, 58 g/100 g) 和大豆(*Glycine max*, 6.8 g/100 g) 等^[5]。多数微藻具有合成 α -亚麻酸及更

长链的 n-3PUFAs 的能力, 且具有光合效率高、环境适应能力强、生长周期短和不占用耕地等突出特点^[6], 是生产 α -亚麻酸等必需脂肪酸的重要潜在生物载体。

硫酸链霉素(STRS) 属氨基糖苷类抗生素, 可与细菌核糖体 30S 亚基结合, 通过抑制细菌启动 mRNA 翻译和异常校对引起遗传密码的错误解读, 进而阻碍细菌蛋白质的合成^[7]。有趣的是 STRS 也可作用于微藻叶绿体中的核糖体, 通过抑制叶绿体蛋白质的合成, 影响微藻光合系统的各项参数, 从而对微藻产生胁迫^[8]。胁迫状态下藻细胞的生理生化组成会发生一系列的变化。SRINIVAS 等^[9]发现 UV-A 辐射显著增加了微球藻(*Nannochloropsis oculata*) 的 PUFAs 含量。ZHU 等^[10]通过低温胁迫(将培养温度从 25 $^{\circ}\text{C}$ 下

收稿日期: 2022-04-30 修回日期: 2022-05-19

基金项目: 沪科技兴农项目(2021-02-08-00-12-F00761)

作者简介: 穆亮亮(1991—), 男, 博士研究生, 研究方向为水产动物营养与饲料。E-mail: 1173432686@qq.com

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

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

降到 10 °C)使球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)中 α -亚麻酸和二十二碳六烯酸含量显著增加。CHOI 等^[11]对小球藻(*Chlorella* sp. KR-1)进行轻度电刺激后,其细胞中 α -亚麻酸含量从 11.3 mg/g 升高至 17.7 mg/g。上述研究表明微藻应对外界胁迫的策略之一是提高细胞内 PUFAs 的含量。STRS 是混合营养及异养培养微藻时常用的抑菌剂,但 STRS 处理下的微藻是否也具有类似的应对策略尚未见报道。

本研究以 1 株富含 α -亚麻酸的蛋白核小球藻 SHOU-1002 为研究对象,探究不同质量浓度 STRS 对混合营养条件下蛋白核小球藻生长、细胞组成和 α -亚麻酸含量的影响,以期探究蛋白核小球藻 SHOU-1002 应对 STRS 胁迫的生理效应,并为提升微藻细胞中 α -亚麻酸等 PUFAs 产量探索新的诱导措施。

1 材料与方法

1.1 微藻培养

试验用蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)藻株(编号 SHOU-1002)来自上海海洋大学藻种室,藻种经扩培后用于试验。取处于指数增长期藻液,离心去上清(4 °C, 4 025 g, 3 min),藻泥用无菌水清洗两遍后接种到含 1.5 g/L 酵母浸出物的 f/2 培养液^[12]中,在 3 L 三角烧瓶中(培养液体积 2.5 L)中进行混合营养培养。初始接种密度为 285×10^4 cells/mL。设置 0(对照)、20、60、180 和 540 $\mu\text{g/mL}$ 等 5 个 STRS 质量浓度,每组 3 个平行。设定光周期 24:0(L:D),光照强度 70 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,温度 28 °C,在光照培养箱中静置培养,每天定时摇瓶 3 次,试验进行 10 d。培养期间每 2 天定时摇匀在超净工作台中取样,用于生长性能和细胞组成的测定。

1.2 生长性能测定

藻液样品经鲁戈氏碘液固定后采用血球计数板法测定藻细胞密度,并计算其相对生长率(μ):

$$\mu = (\ln N_t - \ln N_0) / t \quad (1)$$

式中: N_0 为培养初始藻细胞密度; N_t 为经过 t 时间后培养液中的藻细胞密度; t 为培养时间。

每组取 40 mL 藻液经预先恒重过的 0.45 μm 微孔滤膜抽滤,置于鼓风干燥箱中 105 °C 烘至恒重,计算生物量干质量(B)。

$$B = (W_1 - W_0) / V \quad (2)$$

式中: W_0 为预恒重过的 0.45 μm 微孔滤膜的质量,g; W_1 为恒重过后 0.45 μm 微孔滤膜 + 抽滤下来的藻泥的总质量,g; V 为抽滤的藻液体积,L。

1.3 色素、总糖、蛋白、总脂和脂肪酸的测定

每次移取 4.0 mL 藻液经离心(4 °C, 4 025 g, 3 min)获得藻泥,并用蒸馏水悬浮清洗两遍后用于藻细胞色素含量的测定^[13]。培养过程中视藻细胞密度每次移取 20 ~ 40 mL 藻液,经离心并清洗后用于藻细胞脂肪酸组成的测定。第 10 天除检测上述指标外,分别移取 8.0 mL 藻液用于蛋白质和碳水化合物含量的测定,剩余藻液全部抽滤清洗后,一部分用于测定脂肪酸绝对含量,另一部分经冷冻干燥用于总脂肪含量的测定。采用苯酚-硫酸法测定碳水化合物含量^[14]。采用福林酚法测定蛋白质含量^[15]。采用氯仿:甲醇(体积比为 2:1)法测定总脂肪含量^[16]。

采用直接甲酯化法测定脂肪酸组成^[17]。脂肪酸相对含量(%)的测定:取藻泥(约 50 ~ 100 mg 湿样)转入带硅胶衬里螺旋帽的 15 mL 棕色螺纹口空瓶中,加 2 mL 甲醇钠(NaOMe, 0.5 mol/L),涡旋混匀后,置超声波清洗机中 80 °C 水浴混匀 20 min,冷却至室温后,加 2 mL BF3-甲醇溶液,再置超声波清洗机中 80 °C 水浴混匀 20 min,冷却至室温后,加 800 μL 去离子水和 1 200 μL 正己烷,旋涡混匀后,1 644 g 离心 3 min,将上层含有脂肪酸甲酯的正己烷层经 0.22 μm 针式滤器过滤至 2 mL 进样瓶中,于气相-质谱联用仪上检测脂肪酸含量。参照 WEI 等^[18]设置色谱检测条件。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分析。按归一化法计算各脂肪酸的相对百分含量,阈值设定值为 16。第 10 天时,测定藻细胞脂肪酸的绝对含量(mg/g):取藻泥(约 50 ~ 100 mg 湿样)转入带硅胶衬里螺旋帽的 15 mL 棕色螺纹口空瓶中,加入 1 mL 质量浓度为 1 mg/mL 的 C19-甲苯溶液(内标)后,继续按照上述步骤完成样品甲酯化及上机检测,脂肪酸绝对含量的计算公式:

$$C_x = (C_{19} \times V_{19} \times M_x \times S_x) / (M_{19} \times S_{19} \times m) \quad (3)$$

式中: C_x 表示某脂肪酸在样品中的含量,mg/g; C_{19} 为内标物质量浓度,mg/mL; V_{19} 为内标物加入的体积,mL; M_{19} 为内标物甲酯分子量; S_{19} 为内标

物的峰面积; M_x 为某脂肪酸甲酯的分子量; S_x 为某脂肪酸的峰面积; m 为测定样品的干质量, g。

1.4 数据统计

数据以平均值 \pm 标准误表示; 采用 IBM SPSS Statistics 26 软件进行单因素方差分析 (One-way ANOVA) 和 Duncan 氏多重比较, $P < 0.05$ 表示差异显著。采用 Pearson 相关性检验分析色素与脂肪酸的相关性, $P < 0.05$ 表示显著相关, $P < 0.01$ 表示极显著相关。

2 结果

2.1 硫酸链霉素对蛋白核小球藻生长的影响

对照组和各 STRS 组藻细胞均能正常生长。前 6 天, 对照组的藻细胞密度显著高于各 STRS 组 ($P < 0.05$), 见图 1。第 10 天, 对照组和各 STRS 组的相对生长率无显著差异 ($P > 0.05$), 但藻细胞生物量和单个藻细胞干质量均随 STRS 质量浓度的升高而降低, 对照组的生物量和单个藻细胞干质量最高, 分别为 0.9 g/L 和 35.93 ng/cell, 显著高于其他各 STRS 组 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 第 10 天不同质量浓度硫酸链霉素处理下蛋白核小球藻 SHOU-1002 相对生长率、生物量和细胞干质量
Tab. 1 Relative growth rate, biomass and cell mass of *Chlorella pyrenoidosa* SHOU-1002 treated with different mass concentrations of Streptomycin Sulfate on the 10 th day

项目 Item	硫酸链霉素质量浓度 Streptomycin sulfate mass concentration/($\mu\text{g/mL}$)				
	0	20	60	180	540
相对生长率 Relative growth rate	0.21 \pm 0	0.21 \pm 0	0.21 \pm 0	0.2 \pm 0	0.20 \pm 0
生物量 Biomass/(g/L)	0.90 \pm 0.01 ^a	0.72 \pm 0.01 ^b	0.75 \pm 0.00 ^b	0.65 \pm 0.03 ^c	0.63 \pm 0.03 ^c
单个细胞干质量 Cell mass/(ng/cell)	35.93 \pm 0.81 ^a	28.29 \pm 1.99 ^{bc}	30.91 \pm 0.98 ^b	27.41 \pm 1.57 ^c	26.5 \pm 0.81 ^c

注: 同一行的不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

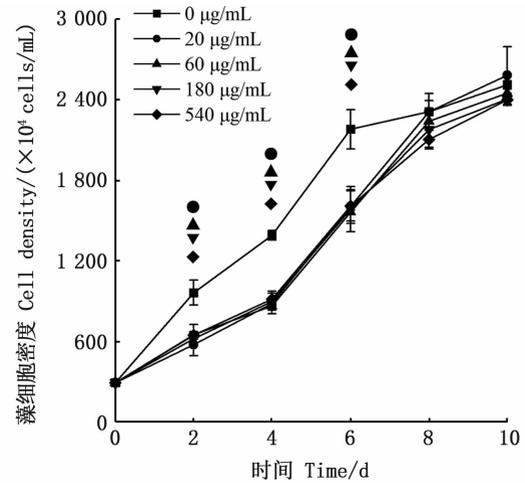
Notes: Different lowercase letters in the same line indicate significant differences ($P < 0.05$).

2.2 硫酸链霉素对蛋白核小球藻细胞蛋白质、碳水化合物和总脂肪含量的影响

第 10 天, 藻细胞蛋白质和总脂肪含量随培养液中 STRS 质量浓度升高呈降低趋势, 各 STRS 组藻细胞蛋白质含量无显著差异 ($P > 0.05$), 但均显著低于对照组 ($P < 0.05$); 对照组、20 和 60 $\mu\text{g/mL}$ STRS 组藻细胞总脂肪含量无显著差异 ($P > 0.05$), 但均显著高于 180 和 540 $\mu\text{g/mL}$ STRS 组 ($P < 0.05$); 对照组和各 STRS 组藻细胞碳水化合物含量无显著差异 ($P > 0.05$)。见图 2。

2.3 硫酸链霉素对蛋白核小球藻细胞色素含量的影响

STRS 显著影响藻细胞色素含量。对照组、



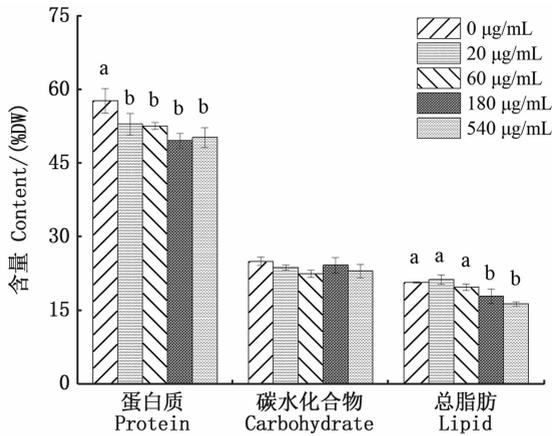
不同图标表示对照组和处理组差异显著 ($P < 0.05$)。

Different icons indicate significant differences between the control and treatment groups ($P < 0.05$).

图 1 不同质量浓度硫酸链霉素处理下蛋白核小球藻 SHOU-1002 的生长情况

Fig. 1 Growth performance of *Chlorella pyrenoidosa* SHOU-1002 treated with different mass concentrations of Streptomycin Sulfate

20、60 和 180 $\mu\text{g/mL}$ STRS 组藻细胞叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素含量随培养时间的延长均先降低后升高, 但各色素回升的时间节点有所不同。其中叶绿素 a 在对照组、20、60 和 180 $\mu\text{g/mL}$ STRS 组分别于第 2、4、4、8 天开始回升; 叶绿素 b 则分别于第 2、4、4、4 天开始回升, 类胡萝卜素均于第 4 天降至最低, 随后升高; 540 $\mu\text{g/mL}$ STRS 组藻细胞叶绿素 a 和叶绿素 b 含量均随培养时间的延长持续下降, 而类胡萝卜素含量前 4 天快速下降, 随后趋于稳定。4 天后, 叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素含量随 STRS 浓度的升高不断降低, 而类胡萝卜素与叶绿素的比值则不断升高。见图 3。



同一生化指标中的不同小写字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters in the same biochemical index indicate significant differences between groups ($P < 0.05$).

图2 第10天不同质量浓度硫酸链霉素处理下蛋白核小球藻 SHOU-1002 细胞蛋白质、碳水化合物和总脂肪含量

Fig.2 Protein, carbohydrate, and lipid content of *Chlorella pyrenoidosa* SHOU-1002 treated with different mass concentrations of Streptomycin Sulfate on the 10 th day

表2 不同质量浓度硫酸链霉素处理下第10天蛋白核小球藻 SHOU-1002 脂肪酸绝对含量

Tab.2 Absolute contents of fatty acids of *Chlorella pyrenoidosa* SHOU-1002 treated with different mass concentrations of Streptomycin sulfate on the 10 th day

脂肪酸 Fatty acid	硫酸链霉素质量浓度 Streptomycin sulfate mass concentration/($\mu\text{g}/\text{mL}$)				
	0	20	60	180	540
C16:0	16.47 \pm 0.64 ^a	17.49 \pm 0.02 ^a	15.08 \pm 0.52 ^b	15.04 \pm 0.04 ^b	14.12 \pm 0.19 ^b
C16:1	8.70 \pm 1.16 ^{ab}	9.52 \pm 0.02 ^a	7.56 \pm 0.29 ^{bc}	6.65 \pm 0.10 ^c	8.81 \pm 0.14 ^{ab}
C16:2n-6	10.63 \pm 0.38 ^{bc}	10.07 \pm 0.17 ^c	11.76 \pm 0.27 ^a	11.33 \pm 0.42 ^{ab}	7.91 \pm 0.09 ^d
C16:3n-3	17.20 \pm 0.43 ^c	18.91 \pm 0.07 ^d	20.70 \pm 0.69 ^c	24.99 \pm 0.41 ^a	22.37 \pm 0.37 ^b
C18:0	1.23 \pm 0.03 ^b	1.16 \pm 0 ^b	1.22 \pm 0.05 ^b	1.46 \pm 0.01 ^a	1.43 \pm 0.04 ^a
C18:1	4.18 \pm 0.25 ^a	3.44 \pm 0.10 ^b	2.26 \pm 0.13 ^c	1.38 \pm 0.09 ^d	1.49 \pm 0.08 ^d
C18:2n-6	24.02 \pm 0.74 ^a	20.69 \pm 0.23 ^b	17.54 \pm 0.32 ^c	14.01 \pm 0.12 ^d	12.12 \pm 0.26 ^e
C18:3n-3	25.02 \pm 0.76 ^c	41.27 \pm 0.30 ^b	42.40 \pm 1.31 ^b	52.09 \pm 1.89 ^a	41.93 \pm 0.20 ^b
SFAs	17.70 \pm 0.68 ^a	18.66 \pm 0.02 ^a	16.31 \pm 0.58 ^b	16.50 \pm 0.03 ^b	15.55 \pm 0.24 ^b
MUFAs	12.89 \pm 1.32 ^a	12.96 \pm 0.13 ^a	9.83 \pm 0.41 ^b	8.04 \pm 0.19 ^c	10.31 \pm 0.18 ^b
PUHAs	76.88 \pm 2.31 ^d	90.94 \pm 0.43 ^b	92.41 \pm 2.55 ^b	102.43 \pm 2.60 ^a	84.34 \pm 0.59 ^c
n-3PUHAs	42.23 \pm 1.19 ^d	60.18 \pm 0.37 ^c	63.10 \pm 1.98 ^{bc}	77.08 \pm 2.30 ^a	64.31 \pm 0.34 ^b
n-6PUHAs	34.65 \pm 1.12 ^a	30.76 \pm 0.05 ^b	29.30 \pm 0.58 ^b	25.34 \pm 0.29 ^c	20.03 \pm 0.27 ^d

注:同一行的不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Notes: Different lowercase letters on the same line indicate significant differences ($P < 0.05$).

2.6 硫酸链霉素对蛋白核小球藻 α -亚麻酸和相关 PUFAs 产量的影响

第10天时,藻细胞中 α -亚麻酸和 n-3PUFAs 的产量随 STRS 质量浓度的升高先升高后降低,均在 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ STRS 组达到最高,分别为 35.34 和 52.29 mg/L ,较对照组分别提升了 56.51% 和

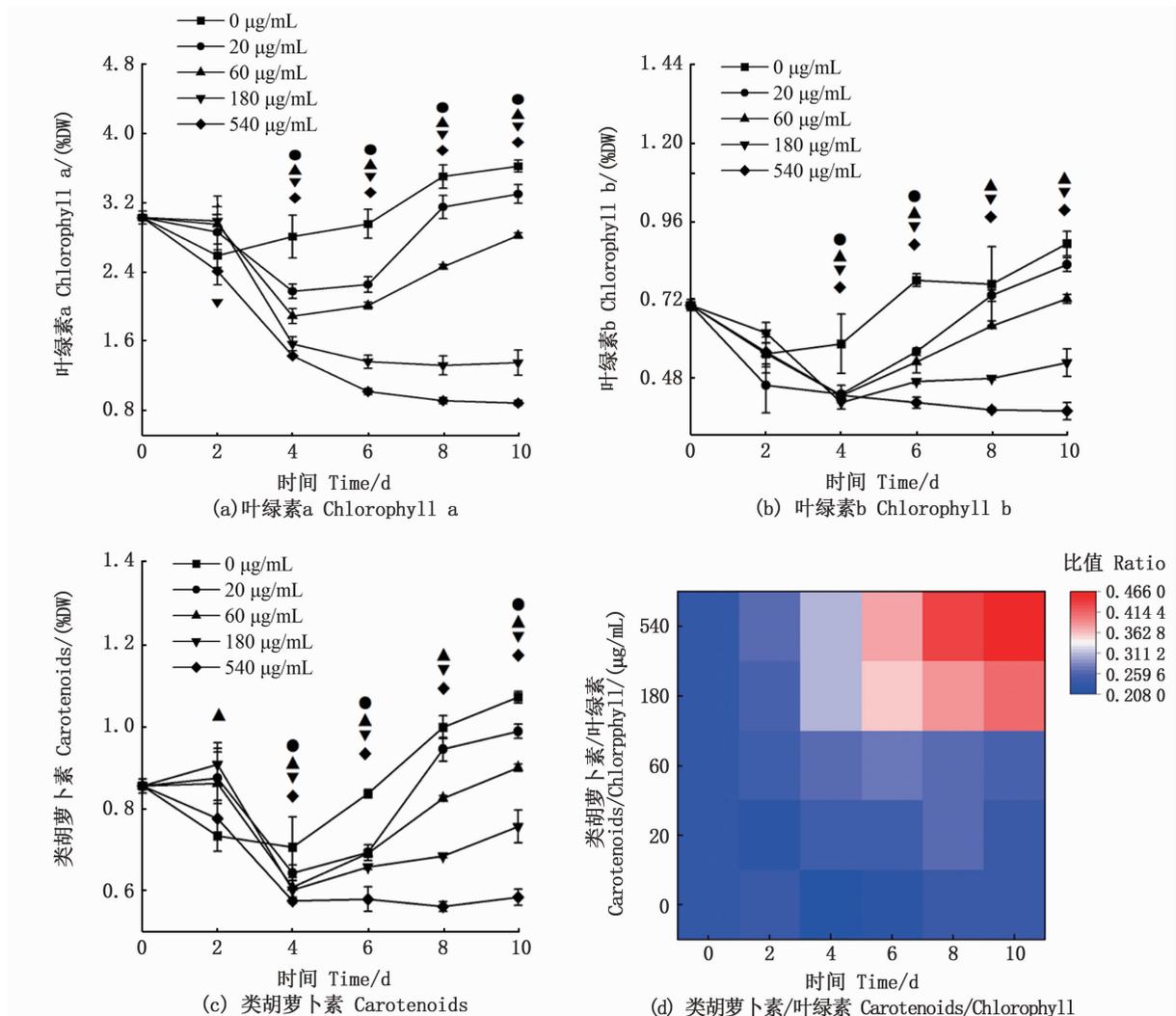
2.4 硫酸链霉素对蛋白核小球藻脂肪酸相对含量的影响

α -亚麻酸 (C18:3n-3) 是蛋白核小球藻 SHOU-1002 细胞脂肪酸组成中占比最大的脂肪酸,最高可达 38.60%。其余的优势脂肪酸有 C16:3n-3, C18:2n-6 和 C16:0。对照组 α -亚麻酸先升高后持续降低,各 STRS 组 α -亚麻酸则先升高后降低再升高,4 d 后,各 STRS 组 α -亚麻酸含量 (%) 显著高于对照组 ($P < 0.05$)。C18:2n-6 的变化趋势与 α -亚麻酸的变化趋势相反,见图 4。

2.5 硫酸链霉素对蛋白核小球藻脂肪酸绝对含量的影响

第10天,藻细胞中 α -亚麻酸、n-3PUFAs 和 PUFAs 的绝对含量随 STRS 浓度的升高先升高后降低,均在 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ STRS 组达到最高,分别为 52.09、77.08 和 102.43 mg/g ,较对照组分别提升了 108.19%、82.52% 和 33.23%。n-6PUFAs 的绝对含量则随 STRS 浓度升高不断降低,540 $\mu\text{g}/\text{mL}$ STRS 组最低 (20.03 mg/g),较对照组下降了 42.19%,见表 2。

37.24%。n-6PUFAs 的产量随 STRS 质量浓度的升高不断降低,540 $\mu\text{g}/\text{mL}$ STRS 组的产量为 12.75 mg/L ,较对照组下降了 59.21%。20、60、180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ STRS 组 PUFAs 产量与对照组无显著差异 ($P > 0.05$),但均显著高于 540 $\mu\text{g}/\text{mL}$ STRS 组 ($P < 0.05$),见图 5。



不同图标表示对照组和处理组差异显著 ($P < 0.05$)。

Different icons indicate significant differences between the control and treatment groups ($P < 0.05$).

图3 不同质量浓度硫酸链霉素处理下蛋白核小球藻 SHOU-1002 色素含量的变化
Fig.3 Changes in pigment contents in *Chlorella pyrenoidosa* SHOU-1002 treated with different mass concentrations of Streptomycin Sulfate

3 讨论

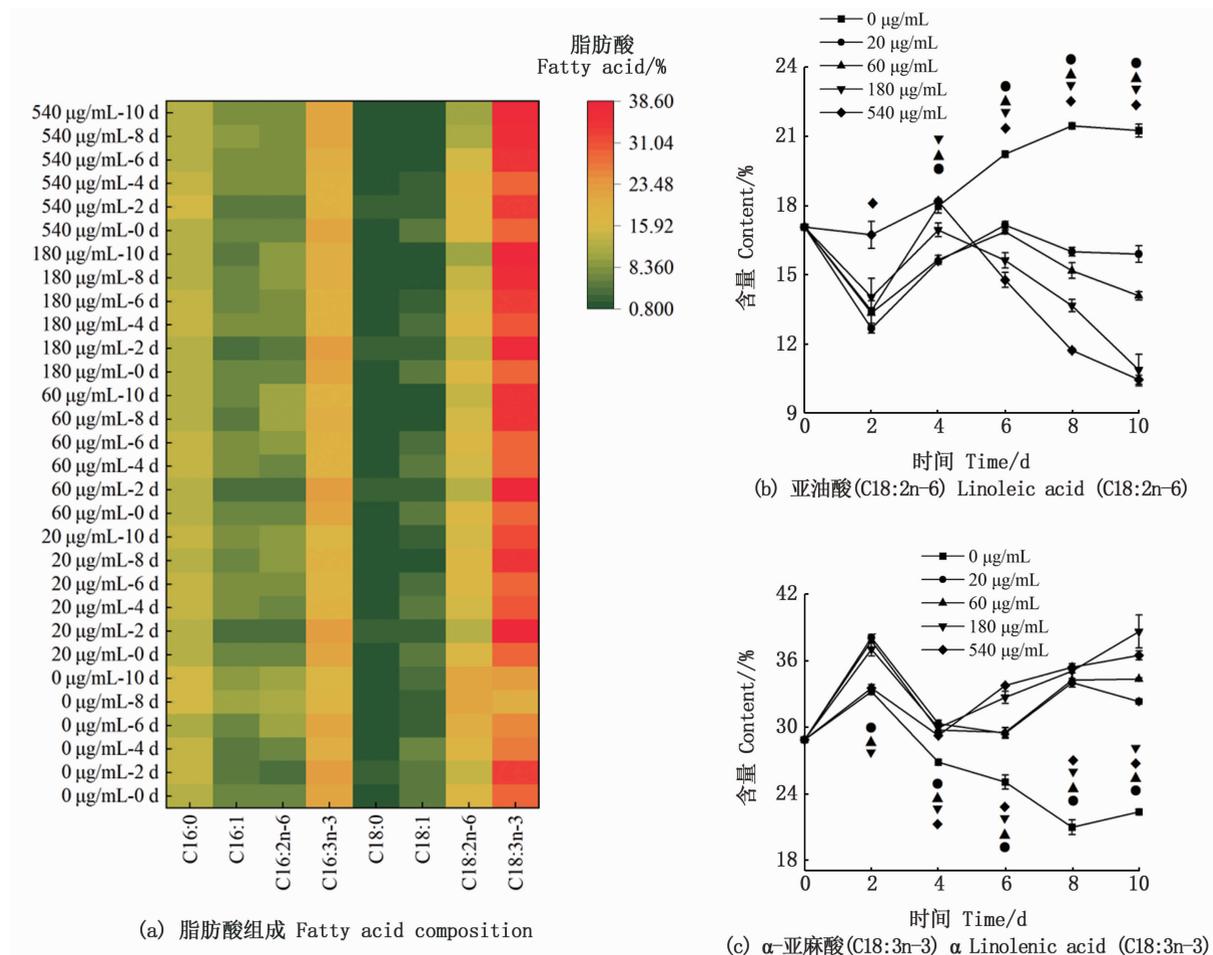
3.1 硫酸链霉素对蛋白核小球藻生长的影响

已有研究^[19]发现,低质量浓度抗生素对微藻具有促生长的毒物刺激效应,而高质量浓度抗生素会抑制藻细胞的生长。黄健等^[20]发现 30 µg/mL STRS 能促进亚心形扁藻 (*Platymonas subcordiformis*)、新月菱形藻 (*Nitzschia closterium*)、小球藻 (*Chlorella* sp.)、球等鞭金藻 8701 (*Isochrysis galbana* 8701)、三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricorutum*) 和牟氏角毛藻 (*Chaetoceros müelleri*) 等 6 株微藻的生长。50 µg/mL 庆大霉素可促进湛江等鞭金藻 (*Isochrysis zhanjiangensis*) 的生长,当质量浓度为 1 000 µg/

mL 时则抑制其生长^[21]。本研究中,即使 20 µg/mL STRS 组在培养前 6 天也表现出抑制蛋白核小球藻 SHOU-1002 藻株生长的作用,没有出现毒物刺激效应,这可能与各种抗生素对不同藻株的毒性差异有关,是否更低质量浓度的 STRS 刺激能促进该株蛋白核小球藻的生长尚需要进一步证实。环境中的抗生素可通过光降解、生物降解、水解和沉积物吸附等途径不断衰减^[22]。已知 STRS 的分解受水体中温度、光照、有机质、表面活性剂、重金属和 pH 等因素的影响,酸性和中性条件下 STRS 的降解产物分别为链霉胍、链霉糖和 N-甲基葡萄糖酸胺,而在碱性条件下除生成上述产物外,还会产生麦芽酚^[23]。微藻在遭受胁迫时其生长和生理机能会受到抑制,当胁迫解除后

藻细胞的相对生长率显著高于未受胁迫藻细胞,即微藻存在生长补偿效应。微藻生长补偿效应在铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*)、斜生栅藻 (*Scenedesmus obliquus*)、东海原甲藻 (*Prorocentrum donghaiense*)、三角褐指藻 (*P. tricornutum*) 和绿色

巴夫藻 (*Pavlova viridis*) 中均有报道^[24-28]。培养 6 d 后,各 STRS 处理组的藻细胞生长较对照组快,可能是培养液中 STRS 随培养时间的延长不断衰减,对该株蛋白核小球藻的抑制作用不断降低,并表现出补偿生长效应。



不同图标表示对照组和处理组差异显著 ($P < 0.05$)。

Different icons indicate significant differences between the control and treatment groups ($P < 0.05$).

图 4 不同质量浓度硫酸链霉素处理下蛋白核小球藻 SHOU-1002 主要脂肪酸相对含量的变化

Fig. 4 Relative contents of fatty acids of *Chlorella pyrenoidosa*

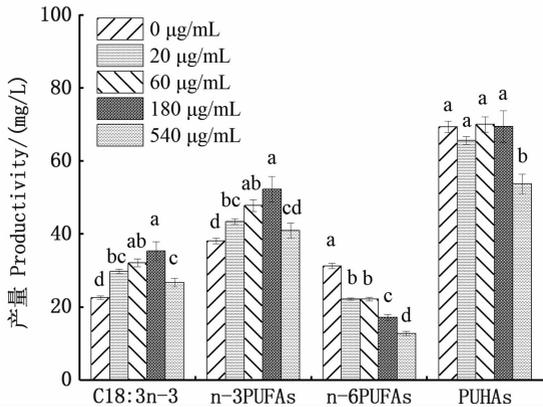
SHOU-1002 treated with different mass concentrations of Streptomycin sulfate

3.2 硫酸链霉素对蛋白核小球藻色素的影响

叶绿体是微藻进行光合作用的重要场所,其中的光合色素是藻类进行光合作用的物质基础,其含量变化能较好地反映其生长情况^[29]。STRS 可以抑制微藻叶绿素和类胡萝卜素的合成,在纤细裸藻 (*Euglena gracilis*)^[30] 和小球藻 (*Chlorella vulgaris*)^[8] 中均有报道。本研究中,4 d 后各 STRS 组藻细胞叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素含量均显著低于对照组,且含量均随 STRS 质量

浓度的升高不断降低。相反,藻细胞类胡萝卜素与叶绿素的比值却随 STRS 质量浓度的升高不断增大,且 STRS 质量浓度越高,类胡萝卜素与叶绿素的比值越大。这表明藻细胞受到的胁迫随 STRS 质量浓度的升高而增强,这与杜氏盐藻 (*Dunaliella salina*)^[31]、绿球藻 (*Chlorococcum* sp.)^[32] 受到胁迫时的表现类似。类胡萝卜素作为一种非酶抗氧化剂可以有效清除藻细胞因各种胁迫产生的活性氧自由基,当受到胁迫时,微

藻往往能够增加类胡萝卜素的比例来应对自身的氧化损伤,维持藻细胞正常的生理功能^[33]。因此,本研究中在高质量浓度 STRS 胁迫下,叶绿素相较于类胡萝卜素下降得更快,其类胡萝卜素/叶绿素更大。



同一指标中的不同小写字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$)。Different lowercase letters in the same index indicate significant differences between groups ($P < 0.05$).

图5 第10天不同质量浓度硫酸链霉素处理下蛋白核小球藻 SHOU-1002 C18:3n-3 和相关 PUFAs 产量

Fig.5 Productivity of C18:3n-3 and related PUFAs of *Chlorella pyrenoidosa* SHOU-1002 treated with different mass concentrations of Streptomycin sulfate on the 10th day

3.3 硫酸链霉素对蛋白核小球藻蛋白质和总脂肪的影响

抗生素是由微生物(包括细菌、真菌、放线菌属)或高等动植物产生的能干扰其他生物活细胞发育功能的化学物质。根据抗生素的作用机理,其大致可以分成4类:抑制细菌细胞壁合成、增强细菌细胞膜通透性、干扰细菌蛋白质合成以及抑制细菌核酸复制转录。有关抗生素的使用降低藻细胞蛋白含量的研究在铜绿微囊藻(*M. aeruginosa*)^[34]和斜生栅藻(*S. obliquus*)^[35]中均

有报道。本研究中,各 STRS 组第10天藻细胞蛋白质含量显著低于对照组,可能与 STRS 能特异性地抑制叶绿体蛋白质的合成有关^[8]。KOHANSKI 等^[36]发现氨基糖苷类(如 STRS)抗生素可以通过依赖于三羧酸循环的电子传递链刺激 NADH 的氧化,电子传递链的过度激活又刺激细胞中超氧化物的大量合成,超氧化物进一步破坏铁硫簇,使其释放出的亚铁离子通过芬顿反应产生大量的羟基自由基,不仅会造成细胞内 DNA 和蛋白质的损伤,也会造成脂质的损伤。第10天,藻细胞总脂肪含量随 STRS 质量浓度的升高呈下降趋势,20 和 60 µg/mL STRS 组总脂肪与对照组无显著差异,而 180 和 540 µg/mL STRS 组总脂肪则显著低于对照组,表明较高质量浓度的 STRS 对藻细胞脂质合成造成了损伤,因而藻细胞总脂肪含量显著降低。

3.4 硫酸链霉素对蛋白核小球藻 α-亚麻酸的影响

不饱和脂肪酸作为构成叶绿体膜骨架的主要成分,对类囊体起着重要的稳定作用,可调控光合作用的活性^[37]。UPCHURCH^[38]也指出脂肪酸去饱和作用在植物应对各种胁迫中起重要作用。GOMBOS 等^[39]研究发现烟草中 PUFAs 含量的下降是导致低温胁迫下光抑制加重的主要原因,而膜脂不饱和程度的增加有助于烟草光抑制的恢复。本研究中随 STRS 质量浓度的升高,叶绿素 a 含量不断降低,而 α-亚麻酸作为该株蛋白核小球藻优势脂肪酸,其占总脂肪酸的比例则不断升高。对整个培养期间藻细胞色素和脂肪酸做相关性分析发现 α-亚麻酸和叶绿素 a 呈极显著负相关 ($P < 0.01$, 表3),表明该株蛋白核小球藻能通过提升细胞内 α-亚麻酸含量来应对 STRS 胁迫造成的叶绿体损伤,证实了前人关于植物可以通过提高自身 PUFAs 含量来应对外界胁迫的结论。

表3 蛋白核小球藻 SHOU-1002 色素和脂肪酸相关性分析

Tab.3 Correlation analysis between pigments and fatty acids of *Chlorella pyrenoidosa* SHOU-1002

色素组成 Pigment composition	脂肪酸组分相关参数 Fatty acids composition and related parameters												
	C16:0	C16:1	C16:2n-6	C16:3n-3	C18:0	C18:1	C18:2n-6	C18:3n-3	SFAs	MUFAs	PUFAs	n3-PUFAs	n6-PUFAs
叶绿素 a Chlorophyll a	0.208	-0.223 *	0.044	-0.092	0.090	0.384 **	0.545 **	-0.418 **	0.216	0.104	-0.168	-0.364 **	0.399 **
叶绿素 b Chlorophyll b	-0.045	-0.191	0.182	0.053	-0.110	0.029	0.394 **	-0.266 *	-0.089	-0.114	0.127	-0.197	0.362 **
类胡萝卜素 Carotenoids	0.184	-0.188	0.202	-0.169	-0.117	0.070	0.422 **	-0.263 *	0.099	-0.085	0.028	-0.264 *	0.391 **

注: * 表示在 0.05 水平上显著相关, ** 表示在 0.01 水平上显著相关。

Notes: * indicates significantly correlated at 0.05 level, ** indicates significantly correlated at 0.01 level.

微藻作为水体中重要的初级生产者,其生产的藻油是 PUFAs 的重要来源,且与鱼油相比,藻油中的 PUFAs 更容易被人体吸收及代谢,生物利用度更高^[40]。因此,微藻是 PUFAs 的优质来源。本研究中,从 α -亚麻酸产量上看,第 10 天时 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ STRS 组最优,其 α -亚麻酸产量显著高于其他各组,但使用高质量浓度的 STRS 作为胁迫因子去诱导微藻 α -亚麻酸等 PUFAs 产量的提升可能涉及到生态及食品安全等问题。因此,后续将应用多组学分析的手段去筛选 STRS 胁迫中影响蛋白核小球藻 SHOU-1002 脂肪酸代谢的关键蛋白或基因及其作用机制,有可能为提升微藻细胞中 α -亚麻酸等 PUFAs 产量提供新的诱导措施。

参考文献:

- [1] LIN Y M, GE J P, ZHANG Y Y, et al. *Monoraphidium* sp. HDMA-20 is a new potential source of α -linolenic acid and eicosatetraenoic acid [J]. *Lipids in Health and Disease*, 2019, 18(1): 56.
- [2] 吴洪号,张慧,贾佳,等. 功能性多不饱和脂肪酸的生理功能及应用研究进展[J]. *中国食品添加剂*, 2021, 32(8): 134-140.
WU H H, ZHANG H, JIA J, et al. Research progress of physiologic function and application of functional polyunsaturated fatty acids [J]. *China Food Additives*, 2021, 32(8): 134-140.
- [3] LI G H, WANG X P, YANG H Y, et al. α -Linolenic acid but not linolenic acid protects against hypertension: critical role of SIRT3 and autophagic flux [J]. *Cell Death & Disease*, 2020, 11(2): 83.
- [4] YADAV R K, SINGH M, ROY S, et al. Short communication: evaluation of α -linolenic acid-based intramammary nanosuspension for treatment of subclinical mastitis [J]. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103(3): 2701-2706.
- [5] BARCELÓ-COBLIJN G, MURPHY E J. Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n-3 fatty acids; benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels[J]. *Progress in Lipid Research*, 2009, 48(6): 355-374.
- [6] CHISTI Y. Biodiesel from microalgae [J]. *Biotechnology Advances*, 2007, 25(3): 294-306.
- [7] PELCHOVICH G, ZHURAVLEV A, GOPHNA U. Effect of ribosome-targeting antibiotics on streptomycin-resistant *Mycobacterium* mutants in the rpsL gene [J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2013, 42(2): 129-132.
- [8] PERALES-VELA H V, GARCÍA R V, GÓMEZ-JUÁREZ E A, et al. Streptomycin affects the growth and photochemical activity of the alga *Chlorella vulgaris* [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2016, 132: 311-317.
- [9] SRINIVAS R, OCHS C. Effect of UV - A irradiance on lipid accumulation in *Nannochloropsis oculata* [J]. *Photochemistry and Photobiology*, 2012, 88(3): 684-689.
- [10] 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.
- [11] CHOI S A, LEE S Y, LEE J, et al. Rapid induction of edible lipids in *Chlorella* by mild electric stimulation [J]. *Bioresource Technology*, 2019, 292: 121950.
- [12] 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. *Live food cultivation* [M]. 2nd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2005.
- [13] RITCHIE R J. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents [J]. *Photosynthesis Research*, 2006, 89(1): 27-41.
- [14] DUBOIS M, GILLES K A, HAMILTON J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. *Analytical Chemistry*, 1956, 28(3): 350-356.
- [15] LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1951, 193(1): 265-275.
- [16] PRUVOST J, VAN VOOREN G, LE GOUIC B, et al. Systematic investigation of biomass and lipid productivity by microalgae in photobioreactors for biodiesel application [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(1): 150-158.
- [17] 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.
- [18] WEI L K, HUANG X X, HUANG Z Z, et al. Orthogonal test design for optimization of lipid accumulation and lipid property in *Nannochloropsis oculata* for biodiesel production [J]. *Bioresource Technology*, 2013, 147: 534-538.
- [19] STEBBING A R D. Hormesis - The stimulation of growth by low levels of inhibitors [J]. *Science of the Total Environment*, 1982, 22(3): 213-234.
- [20] 黄健,宫相忠,唐学玺,等. 链霉素对海洋微藻的毒物刺激效应[J]. *青岛海洋大学学报*, 2000, 30(4): 642-644.
HUANG J, GONG X Z, TANG X X, et al. Hormesis of streptomycin on 6 species of marine microalgae [J]. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 2000, 30(4): 642-644.
- [21] 黄振华,刘晓娟,胡章喜,等. 湛江等鞭藻对抗生素的反应及无菌化培养[J]. *生态科学*, 2007, 26(2): 120-121, 125.
HUANG Z H, LIU X J, HU Z X, et al. Effects of antibiotics on the growth of *Isochrysis zhangjiangensis* and axenic culture [J]. *Ecologic Science*, 2007, 26(2): 120-121, 125.
- [22] 吕凯. 典型抗生素在河流中的衰减规律及其机制研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2019.

- LYU K. Attenuation and its mechanism of selected antibiotics in river systems[D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2019.
- [23] 申彦茹. 链霉素在水环境中的降解[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2016.
- SHEN Y R. The degradation of streptomycin in water environment[D]. Hohhot: Inner Mongolia University, 2016.
- [24] 李婷, 景元书, 韩玮. 不同磷条件下高温胁迫对铜绿微囊藻增殖的影响及其恢复[J]. 环境工程学报, 2015, 9(10): 4780-4788.
- LI T, JING Y S, HAN W. Effect of high temperature on cell proliferation and recovery of *Microcystis aeruginosa* at different initial phosphate concentrations [J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2015, 9(10): 4780-4788.
- [25] 谢晓玲, 周蓉, 邓自发. 光、温限制后铜绿微囊藻和斜生栅藻的超补偿生长与竞争效应[J]. 生态学报, 2014, 34(5): 1224-1234.
- XIE X L, ZHOU R, DENG Z F. Overcompensation and competitive effects of *Microcystis aeruginosa* and *Scenedesmus obliquus* after low temperature and light stresses [J]. Acta Ecologica Sinica, 2014, 34(5): 1224-1234.
- [26] 夏荣霜, 徐兆礼, 高倩. 东海原甲藻在氮、磷限制胁迫下的补偿生长[J]. 中国水产科学, 2014, 21(6): 1200-1210.
- XIA R S, XU Z L, GAO Q. Compensatory growth of *Prorocentrum donghaiense* Lu under nitrogen and phosphorus deficiency stress[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(6): 1200-1210.
- [27] 张小兵. 三角褐指藻在营养限制胁迫下的补偿生长效应[D]. 广州: 暨南大学, 2007.
- ZHANG X B. Compensatory growth of *Phaeodactylum tricorutum* in response to the stress of nutrients limitation [D]. Guangzhou: Jinan University, 2007.
- [28] 刘晓娟, 段舜山, 李爱芬. 绿色巴夫藻受紫外(UV-B)胁迫后的超补偿生长效应[J]. 应用生态学报, 2007, 18(1): 169-173.
- LIU X J, DUAN S S, LI A F. Overcompensation effect of *Paurova viridis* under ultraviolet (UV-B) stress[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2007, 18(1): 169-173.
- [29] DAI H Y, HUA J S, ZHANG R P, et al. Effects of low temperature stress on seedling growth of Plateau Japonica Rice[J]. Plant Diseases and Pests, 2015, 6(3): 39-43.
- [30] DUBERTRET G, LEFORT-TRAN M. Functional and structural organization of chlorophyll in the developing photosynthetic membranes of *Euglena gracilis* Z. I. Formation of System II photosynthetic units during greening under optimal light intensity [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 1978, 503(2): 316-332.
- [31] XU Y N, IBRAHIM I M, HARVEY P J. The influence of photoperiod and light intensity on the growth and photosynthesis of *Dunaliella salina* (chlorophyta) CCAP 19/30[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2016, 106: 305-315.
- [32] 纪鹏, 王伟隆, 戴颖, 等. 光照度对绿球藻生长和营养成分的影响[J]. 淡水渔业, 2020, 50(5): 99-105.
- JI P, WANG W L, DAI Y, et al. Effect of illuminance on the growth and nutritional composition of *Chlorococcum* sp. [J]. Freshwater Fisheries, 2020, 50(5): 99-105.
- [33] 顾聃, 赵永腾, 乔腾生, 等. 抗氧化剂耦合非生物胁迫调控微藻油脂和类胡萝卜素合成的研究进展[J]. 中国油脂, 2022, 47(7): 132-138.
- GU D, ZHAO Y T, QIAO T S, et al. Research progress of combination of antioxidant and abiotic stress in the regulation lipid and carotenoid product in microalgae [J]. China Oils and Fats, 2022, 47(7): 132-138.
- [34] 尚爱花. 四环素类抗生素对铜绿微囊藻生理效应研究[D]. 上海: 上海应用技术学院, 2015.
- SHANG A H. Investigation of physiological effects of tetracyclines on *Microcystis aeruginosa* [D]. Shanghai: Shanghai Institute of Technology, 2015.
- [35] 张迪, 厉圆, 沈忱思, 等. 金霉素及其异构体降解产物对斜生栅藻的毒性效应研究[J]. 农业环境科学学报, 2019, 38(4): 756-764.
- ZHANG D, LI Y, SHEN C S, et al. Understanding the toxic effects of chlortetracycline and its isomer degradation products on *Scenedesmus obliquus* [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2019, 38(4): 756-764.
- [36] KOHANSKI M A, DWYER D J, HAYETE B, et al. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics[J]. Cell, 2007, 130(5): 797-810.
- [37] BROUN P, SOMERVILLE C. Accumulation of ricinoleic, lesquerolic, and densipolic acids in seeds of transgenic arabidopsis plants that express a fatty acyl hydroxylase cDNA from castor bean [J]. Plant Physiology, 1997, 113(3): 933-942.
- [38] UPCHURCH R G. Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress [J]. Biotechnology Letters, 2008, 30(6): 967-977.
- [39] GOMBOS Z, WADA H, MURATA N. The recovery of photosynthesis from low-temperature photoinhibition is accelerated by the unsaturation of membrane lipids: a mechanism of chilling tolerance [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994, 91(19): 8787-8791.
- [40] 陈殊贤, 郑晓辉. 微藻油和鱼油中DHA的特性及应用研究进展[J]. 食品科学, 2013, 34(21): 439-444.
- CHEN S X, ZHENG X H. Research progress in characteristics and applications of DHA in microalga oil and fish oil[J]. Food Science, 2013, 34(21): 439-444.

Effects of supplementation of streptomycin sulfate in culture medium on growth, cellular biochemical composition and α -Linolenic acid content of *Chlorella pyrenoidosa*

MU Liangliang¹, HUANG Xuxiong^{1,2,3}

(1. Centre for Research on Environmental Ecology and Fish Nutrition, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The growth, cellular biochemical composition, and α -Linolenic acid content of *Chlorella pyrenoidosa* SHOU-1002 treated with streptomycin sulfate (STRS) at mass concentrations of 0 (CK), 20, 60, 180 and 540 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were examined. The results showed that the microalgal cell density in the CK group was significantly higher than those in STRS treated groups in the first 6 days. The biomass and single cell weight of the CK group on the 10 th day were significantly higher than those of STRS treated groups. The biomass of STRS treated group decreased continuously with the increasing of STRS mass concentration in medium. The contents of Chlorophyll a, Chlorophyll b, and carotenoids in microalgae of CK, 20, 60, and 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ STRS groups, firstly decreased then increased with prolongation of the culture time. The contents of Chlorophyll a and Chlorophyll b continuously declined while carotenoids sharply decreased in the first 4 days then stabilized in the treatments of 540 $\mu\text{g}/\text{mL}$ STRS group. During the whole culture period, α -Linolenic acid was the dominant in the fatty acid profiles of *C. pyrenoidosa* SHOU-1002. The α -Linolenic acid contents (%) in STRS treated groups were significantly higher than that in the CK group since the 4th day. On the 10 th day, the microalgae in 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ STRS group had the highest content of α -Linolenic acid (52.09 mg/g), which increased by 108.19% as compared to that of the CK group. Moreover, the microalgae in 180 μg STRS /mL group also had the highest α -Linolenic acid yield (35.34 mg/L). The correlation analysis illustrated that α -Linolenic acid content and chlorophyll a content of the microalgae were negatively, highly, and significantly correlated. It is therefore suggested that STRS in culture medium decreased the chlorophyll a content and biomass, but promoted the accumulation of α -Linolenic acid in *C. pyrenoidosa* SHOU-1002.

Key words: *Chlorella pyrenoidosa*; streptomycin sulfate; growth; pigment; cellular biochemical composition; α -Linolenic acid