

研究报告

一株扎布耶盐碱湖伪盐生杜氏藻的分离鉴定及生长影响因素分析

郭敏¹, 韩睿², 陶宇杰¹, 高翔¹, 邢江娃¹, 王嵘¹, 朱德锐^{*1}

1 青海大学 医学院 基础医学研究中心, 青海 西宁 810016

2 青海大学 农林科学院 蔬菜遗传与生理重点实验室, 青海 西宁 810016

郭敏, 韩睿, 陶宇杰, 高翔, 邢江娃, 王嵘, 朱德锐. 一株扎布耶盐碱湖伪盐生杜氏藻的分离鉴定及生长影响因素分析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(11): 4502-4516.

GUO Min, HAN Rui, TAO Yujie, GAO Xiang, XING Jiangwa, WANG Rong, ZHU Derui. Isolation, identification, and analysis of growth influencing factors of a *Dunaliella pseudosalina* strain from Zabuye Salt Lake[J]. Microbiology China, 2024, 51(11): 4502-4516.

摘要: 【背景】杜氏藻(*Dunaliella*)具有独特的生理特性和丰富的胞内次级代谢物, 在医药、食品、养殖业、化工、轻工等领域具有广泛的应用价值。【目的】分析影响杜氏藻生物量的生长因素和最优培养条件, 以期提高杜氏藻的生物量; 明确最佳培养条件下杜氏藻胞内次级代谢物的种类。

【方法】采用纯培养法分离伪盐生杜氏藻(*Dunaliella pseudosalina*) ZBY-1, 18S rRNA 基因测序明确其分类学地位; 采用单因素试验探究其生长最佳条件以及营养盐种类及浓度; 采用正交试验优化分离藻株的培养条件; 利用液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)检测藻株 ZBY-1 在最佳培养条件下的次级代谢产物。【结果】藻株 ZBY-1 的最适生长盐度为 10%, 最适生长 pH 值为 8.5, 最适生长温度为 25 °C。单因素分析显示最适碳源、氮源、磷源的种类和浓度分别为 NaHCO₃ 1.26、CO(NH₂)₂ 0.84、NaH₂PO₄ 0.06 g/L。优化生长条件后, 藻株 ZBY-1 的细胞密度可达(2.57±0.12)×10⁷ 个/mL, 较优化前提高了 1.25 倍。LC-MS 分析表明胞内次级代谢物的种类主要是萜类、生物碱类、苯丙素类、氨基酸相关化合物等; 显著富集的代谢物通路是辅助因子生物合成、植物类次级代谢物合成和 ABC 转运等途径。【结论】扎布耶盐碱湖的地理位置特殊, 藻类资源未被深入挖掘。分离藻株 ZBY-1 可适应高盐碱环境, 为后续胞内次级代谢物的应用开发提供一定的参考依据。

关键词: 伪盐生杜氏藻; 分离; 生长特性; 正交试验; 代谢组学

资助项目: 青海省基础应用研究计划(2022ZJ914)

This work was supported by the Basic and Applied Research Program of Qinghai Province (2022ZJ914).

*Corresponding author. E-mail: zhuderui2005@126.com

Received: 2024-03-21; Accepted: 2024-03-27; Published online: 2024-04-24

Isolation, identification, and analysis of growth influencing factors of a *Dunaliella pseudosalina* strain from Zabuye Salt Lake

GUO Min¹, HAN Rui², TAO Yujie¹, GAO Xiang¹, XING Jiangwa¹, WANG Rong¹, ZHU Derui^{*1}

¹ Research Center for Basic Medical Science, Medical College, Qinghai University, Xining 810016, Qinghai, China

² Key Laboratory of Vegetable Genetics and Physiology, Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Qinghai University, Xining 810016, Qinghai, China

Abstract: **[Background]** With rich metabolites and unique physiological properties, *Dunaliella* has wide applications in the pharmaceutical, food, aquaculture, chemical, and light industries. **[Objective]** To analyze the factors affecting the biomass of *Dunaliella* and the optimal culture conditions with a view to increasing the biomass of *Dunaliella* and identify the secondary metabolites of *Dunaliella* under the optimal culture conditions. **[Methods]** *D. pseudosalina* ZBY-1 was isolated by the culture method and identified by 18S rRNA gene sequencing. The growth conditions (nutrients and concentrations) were optimized by single factor and orthogonal experiments. The secondary metabolites of strain ZBY-1 cultured under the optimal conditions were then analyzed by LC-MS. **[Results]** The strain ZBY-1 showcased the best growth performance at 10% NaCl, pH 8.5, and 25 °C. The optimal carbon, nitrogen, and phosphorus sources and their concentrations for this strain were NaHCO₃ 1.26 g/L, CO(NH₂)₂ 0.84 g/L, and NaH₂PO₄ 0.06 g/L, respectively. The cell density of strain ZBY-1 cultured under the optimal conditions reached $(2.57 \pm 0.12) \times 10^7$ cells/mL, which increased by 1.25 times compared with that before optimization. LC-MS results showed that secondary metabolites were mainly terpenoids, alkaloids, phenylpropanoids, and amino acid-related compounds. The enriched metabolite pathways were the cofactor biosynthesis pathway, plant-derived metabolite biosynthesis pathway, and the ABC transport pathway. **[Conclusion]** Zabuye Salt Lake has a special geographical location, whereas the algal resources remain to be exploited. The isolated strain ZBY-1 can adapt to the high saline-alkali environments, which provide a basis for subsequent development and application of the metabolites of this strain.

Keywords: *Dunaliella pseudosalina*; isolation; growth characteristics; orthogonal experiment; metabolomics

杜氏藻(*Dunaliella*)是一种单细胞真核藻类, 分类隶属于绿藻门(*Chlorophyta*)绿藻纲(*Chlorophyceae*)团藻目(*Volvocales*)盐藻科(*Dunaliellaceae*)杜氏藻属(*Dunaliella*), 广泛栖息于海洋、盐湖、盐井等生境之中^[1]。截至目前, 研究者们已鉴定出杜氏藻属 28 个种^[2], 其中 5 个种源

自淡水环境, 分别为嗜酸杜氏藻(*D. acidophila*)、鞭毛杜氏藻(*D. flagellata*)、侧杜氏藻(*D. lateralis*)、斜杜氏藻(*D. obliqua*)和贫瘠杜氏藻(*D. paupera*), 23 个种源自海洋或盐碱环境^[3], 如盐生杜氏藻(*D. salina*)、伪盐生杜氏藻(*D. pseudosalina*)^[4]、巴氏杜氏藻(*D. bardawil*)和微型杜氏藻(*D. minuta*)

等。杜氏藻的生物量容易受到多种生长条件因素所制约,如碳、氮、磷营养盐、温度、盐度以及 pH^[1]。伪盐生杜氏藻源自极端盐环境,属于极端盐藻种类,具有独特的应用潜力,常用于水生动物优质饵料^[5],或盐胁迫高产 β -胡萝卜素^[6]、甘油和不饱和脂肪酸^[7]等次级代谢物,或作为高盐环境研究的模式藻株。

扎布耶盐湖 (Zabuye Salt Lake, 83°57′–84°15′E, 31°27′–31°34′N) 位于青藏高原西藏日喀则地区,水体富集各种矿物质[如 Li_2CO_3 、 $\text{Na}_3\text{Mg}(\text{CO}_3)_2\text{Cl}$ 和 NaHCO_3],属于典型的碳酸型盐湖^[8]。1982年,郑绵平等^[9]首次从扎布耶盐碱湖中发现杜氏藻属和衣藻属 (*Chlamydomonas*),尚未进行系统研究。崔金龙等^[10]发现廓琼岗日冰湖的真核浮游植物,以 *Chlamydomonas* 和隐藻属 (*Cryptomonas*) 为优势属。Oren^[11]研究非洲大裂谷的盐碱湖,发现杜氏藻属和盐地杆菌 (*Salinibacter*) 为优势属;杨欣兰等^[12]分析西藏哲古错(湖)的浮游藻类多样性,显示优势属是针杆藻属 (*Synedra*)、等片藻属 (*Diatom*) 和舟形藻属 (*Navicula*)。青藏高原碳酸型盐碱湖资源丰富,涉及野生耐盐碱藻种的分离筛选、生理特性以及胞内次级代谢物等相关基础研究较少,值得深入探讨。本研究以扎布耶盐碱湖所分离藻种为实验对象,分析其最适生长条件(盐度/pH/温度)和最佳的碳源/氮源/磷源,并采用正交试验优化其培养条件(碳、氮、磷以及盐浓度水平),以期为后续伪盐生杜氏藻的大规模培养与胞内次级代谢物的发酵研究提供一定的基础参考依据。

1 材料与amp;方法

1.1 水样来源

2021年7月中旬,采集扎布耶盐碱水样(5.0 L),呈浑浊状态,记录海拔4 379 m,采样

深度为10–25 cm,温度19.30 °C。样本储存于4 °C车载冰箱,返回实验室立即进行藻种分离。

1.2 培养基

杜氏藻基础培养基 (*Dunaliella* medium, DM) 成分: NaCl 87.69 g/L, NaNO_3 0.42 g/L, NaH_2PO_4 15.60 mg/L, KCl 74.00 mg/L, MgSO_4 1.23 g/L, CaCl_2 44.00 mg/L, NaHCO_3 0.84 g/L, 1% $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 0.5 mL, 微量元素溶液[包括含 H_3BO_3 2.86 g/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.82 g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.22 g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.08 g/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.39 g/L, $\text{CO}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g/L] 1.0 mL。

1.3 主要试剂和仪器

NaCl 等分析纯,天津大茂公司;高效植物基因组DNA提取试剂盒和琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒,天根生化科技公司;引物合成,生工生物工程(上海)股份有限公司;0.22 μm 聚醚砜醋酸纤维膜,默克公司。PCR仪, Bio-Rad 公司; pH计,上海雷磁公司;光照培养箱,上海堪鑫公司;紫外分光光度计, Cyvita 公司;光学显微镜,徕卡公司;超高效液相色谱串联傅里叶变换质谱,赛默飞世尔科技公司; HSS T3 色谱柱 (100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm), 沃特世公司。

1.4 伪盐生杜氏藻的分离、纯化和鉴定

取扎布耶水样10 mL加入90 mL DM培养基中,25 °C静置培养15 d。取培养液100 μL 涂布于DM固体培养基,并倒置培养10 d。挑取单藻菌落进行平板划线,反复操作3–4次,获得纯化藻种,40%甘油冻存。采用光学显微镜观察藻种的形态结构。参照DNA提取试剂盒说明书提取基因组DNA。利用真核生物18S rRNA基因进行PCR扩增与测序。PCR引物为18N5 (5′-TGGTGCCAGCAGCCGCGGTA-3′) 和18N11R (5′-CTCAGTAAGCTTGATCCTTCGCAGGTTCCACC-3′)。PCR反应体系(50 μL): 2 \times PCR Mix 25 μL , DNA模板(10 ng/ μL) 2 μL ,

ddH₂O 19 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 2 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物纯化后由生工生物工程(上海)股份有限公司完成测序。将藻种的 18S rRNA 基因序列进行 NCBI 数据库 BLAST 程序比对分析, 并利用 MEGA 10.0 软件构建系统发育树(采用 neighbor-joining 法, bootstrap 为 1 000)。

1.5 藻细胞全波长扫描与生长因素

采用紫外分光光度计进行藻液全波长扫描(350–750 nm)。将对数生长期(第 10 天)的藻液梯度稀释, 确定光密度值(optical density, OD_{698})为 0.2、0.4、0.6、0.8 及 1.0, 并用血球计数板计算细胞密度。以 OD 值为横坐标, 以细胞密度为纵坐标绘制藻细胞的标准曲线。分别设置盐梯度范围为 5%–30% (间隔为 5%), pH 梯度范围为 5.5–10.5 (间隔为 1.0), 温度梯度范围为 22–28 °C, 以此探究伪盐生杜氏藻的最适单因素生长条件。将活化藻种($OD_{698}=0.2$)接种于 DM 液体培养基(100 mL 摇瓶)进行光照培养 12 d (25 °C, 12 h:12 h, 光强 6 000 lx)。上述每个梯度实验 3 个重复, 每隔 48 h 检测藻细胞的密度。

1.6 碳、氮、磷源与正交试验

基于 DM 基础培养基, 设置碳源(NaHCO_3 、 $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 、 $\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$ 和 CH_3COONa)浓度为 0–2.52 g/L (间隔为 0.84 g/L); 氮源(NaNO_3 、 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 和 NH_4Cl)浓度为 0–1.26 g/L (间隔为 0.42 g/L); 磷源(NaH_2PO_4 和 KH_2PO_4)浓度为 0–0.112 5 g/L (间隔为 0.037 5 g/L), 探究伪盐生杜氏藻生长的最适碳(C)、氮(N)、磷(P)种类及最佳单因素浓度。藻细胞的培养条件和细胞浓度检测方法见 1.5。分析单因素(NaCl、碳、氮、磷源)的实验结果, 采用 Latin v3.1 和 SPSS 软件进行正交试验设计($n=3$)和数据分析, 设计四因

素三水平的正交试验(表 1), 以藻细胞密度为响应值, 优化 DM 培养基成分配比并验证。运用 SPSS 26 进行直观分析和多元方差分析法分析 NaCl、碳源、氮源、磷源的主效应。数据采用 $\bar{x} \pm \text{SD}$ 表示, 差异显著性 $P < 0.05$ 。

1.7 光合色素含量的测定

取培养 12 d 的藻液 2.0 mL, 4 722×g 离心 5 min 弃上清, 1.0 mL 水重悬洗涤 1 次, 4 722×g 离心 5 min 弃上清, 后加入 2 mL 无水乙醇低频超声(400 W, 50 °C, 30 min), 4 °C 冷藏过夜后低频超声(400 W, 50 °C, 30 min)。4 722×g 离心 5 min 后取上清液, 测定吸光度值 A_{665} 、 A_{649} 和 A_{470} , 并计算光合色素含量。 $C_a=13.95 \times A_{665} - 6.88 \times A_{649}$; $C_b=24.96 \times A_{649} - 7.32 \times A_{665}$; $C_{\text{carot}}=(1\ 000 \times A_{470} - 2.05 \times C_a - 144.8 \times C_b)/245$; 总叶绿素(chlorophyll)= $21.21 \times A_{649} + 8.02 \times A_{665}$, 式中: C_a 、 C_b 和 C_{carot} 分别表示叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素质量浓度(mg/g)。

1.8 代谢组学分析流程

收集最佳培养条件下的藻株溶液($n=6$)于 4 722×g 离心 15 min 去上清, 等渗盐溶液洗涤 3 次后 4 722×g 离心 15 min, 沉淀干燥。称取 50 mg 样品, 400 μL 提取液(甲醇:水体积比为 4:1)含 0.02 mg/mL 的内标(L-2-氯苯丙氨酸)进行代谢产物提取。样本溶液进行冷冻组织研磨 6 min (–10 °C, 50 Hz)后低温超声提取 30 min (5 °C, 40 kHz)。将样品静置于–20 °C, 30 min 后于 4 °C、13 000×g 离心 15 min, 移取上清液上机分析。采用超高效液相色谱串联傅里叶变换

表 1 正交试验表

Table 1 Orthogonal experiment table

水平 Level	A: NaCl (%)	B: NaHCO ₃ (g/L)	C: CO(NH ₂) ₂ (g/L)	D: NaH ₂ PO ₄ (g/L)
1	8	1.26	0.63	0.060
2	10	1.68	0.84	0.075
3	12	2.10	1.05	0.090

质谱分析平台进行代谢组学成分分析, 色谱条件: 3 μL 样本经 HSS T3 色谱柱分离后进入质谱检测。流动相 A 为含 0.1% 甲酸的水: 乙腈 (95:5), 流动相 B 为含 0.1% 甲酸的乙腈: 异丙醇: 水 (47.5:47.5:5)。流速为 0.40 mL/min, 柱温为 40 $^{\circ}\text{C}$ 。质谱条件: 样品质谱信号采用正负离子扫描模式, 质量扫描范围 70–1 050 m/z 。

LC-MS 原始数据导入代谢组学处理软件 Progenesis QI (Waters Corporation, Milford) 进行基线过滤、峰识别、积分、保留时间校正、峰对齐, 最终得到一个保留时间、质荷比和峰强度的数据矩阵。再将 MS 和 MSMS 质谱信息与代谢公共数据库 HMDB (<http://www.hmdb.ca/>)、Metlin (<https://metlin.scripps.edu/>) 以及美吉自建库进行匹配注释, 获得代谢物信息。对搜库后的代谢物进行预处理[过滤去除组内缺失值均大于 20% 的特征值, 保留相对标准偏差值 (relative standard deviation, RSD) \leq 30% 变量并进行 \log_{10} 对数化处理]得到用于生物信息学分析的数据矩阵。采用 KEGG 数据库 (<https://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>) 进行代谢物通路注释, Python 软件包 `scipy.stats` 进行通路富集分析。

2 结果与分析

2.1 伪盐生杜氏藻的分离、纯化和鉴定结果

采用 DM 基础培养基分离获得扎布耶盐碱湖的纯化藻株 ZBY-1 (图 1), 藻悬浮液呈绿色 (图 1A)。细胞显微外形呈椭圆纺锤形, 长 10–12 μm , 宽 4–6 μm (图 1B), 头部具有两条较长的鞭毛, 上部有眼点, 细胞内部有一杯状叶绿体, 靠近基部有一较大蛋白核 (图 1C)。藻株 ZBY-1 的基本形态特征与杜氏藻一致。基于藻株 ZBY-1 的 18S rRNA 基因序列 (1 162 bp) 与 *Dunaliella* 类群的 NCBI BLAST 比对结果, 采用 neighbor-joining 法

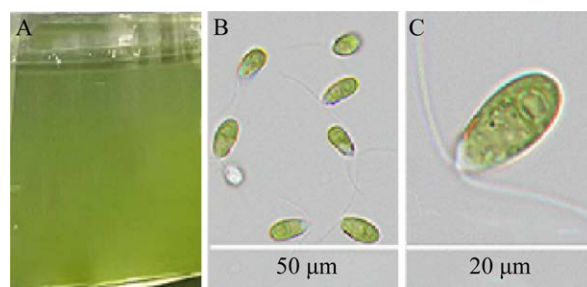


图 1 藻株 ZBY-1 的形态特征 A: 液体培养. B: 光学显微镜形态 (40 \times). C: 光学显微镜形态 (100 \times)
Figure 1 Isolated and purified strain ZBY-1. A: Liquid culture of ZBY-1. B: Morphology of ZBY-1 under light microscope (40 \times). C: Morphology of ZBY-1 under light microscope (100 \times).

构建系统发育树 (图 2)。分析显示, 藻株 ZBY-1 与伪盐生杜氏藻 (*D. pseudosalina*) MAH (KU641615.1) 聚类同一分支, 序列相似性 99%, 表明进化同源。结合形态学特征初步认定藻株 ZBY-1 隶属于伪盐生杜氏藻 (*D. pseudosalina*) ZBY-1 (GenBank 登录号为 OR939361.1)。

2.2 伪盐生杜氏藻的全波长扫描与标准曲线

利用紫外分光光度计进行藻液全波长扫描, 并采用细胞密度与 OD 值绘制标准曲线。结果显示: 698 nm 处有最大吸收峰。因为盐藻细胞内的主要色素是叶绿素, 而叶绿素主要吸收 430–450 nm 的蓝紫光以及 630–700 nm 的红光。因此, 选定 698 nm 为后续藻液浓度测定的参考波长 (图 3A)。藻细胞检测的标准曲线为 $Y=5\ 940\ 476X-178\ 571$ ($R^2=0.990\ 4$, 图 3B), 显示光密度值 OD_{698} 与细胞密度之间具有良好的相关性。

2.3 伪盐生杜氏藻的最佳生长因素

设置不同的盐浓度 (5%–30%)、pH 值 (5.5–10.5) 和温度梯度 (22–28 $^{\circ}\text{C}$), 分析藻株 ZBY-1 的细胞密度和光合色素的积累量。生长盐浓度分析显示, 在 5%–15% 的盐浓度范围内, 藻株 ZBY-1 具有良好的生长趋势。在 10% 盐度下, 藻株的生物量最高, 细胞密度为

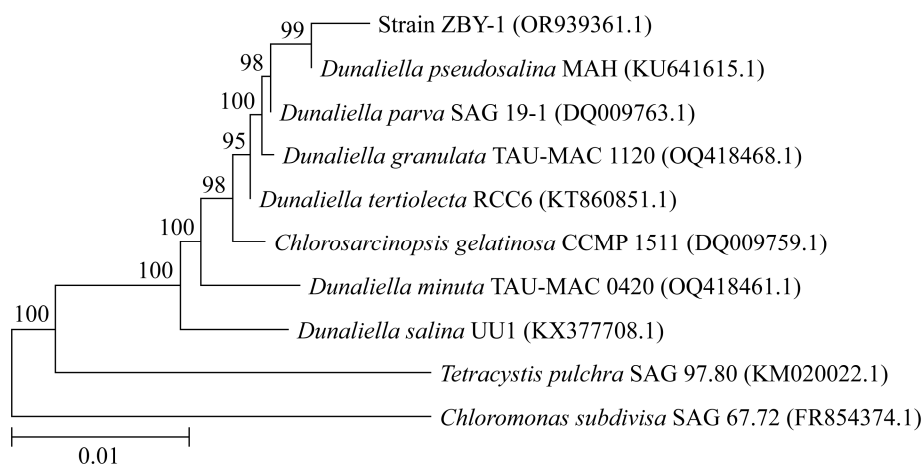


图2 基于18S rRNA基因序列构建藻株ZBY-1的系统发育树 分支数字代表Bootstrap值；图内最下方标尺是进化距离；括号中的序号为藻株的GenBank登录号

Figure 2 Construction of a phylogenetic tree of the algal strain ZBY-1 based on the 18S rRNA gene sequence. Branch numbers represent Bootstrap values; The bottom scale in the figure is the evolutionary distance, and the sequence number in parentheses is the GenBank accession number of the algal strain.

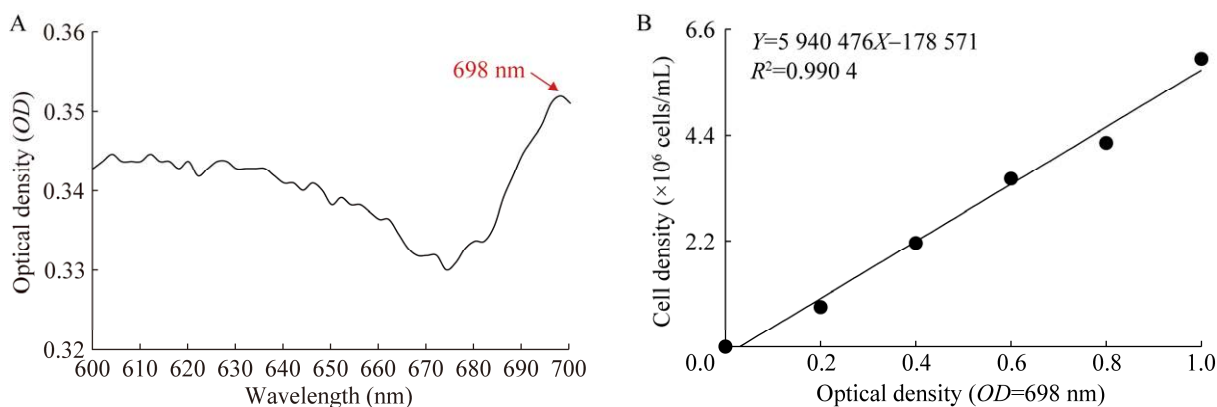


图3 藻株ZBY-1的全波长扫描(A)与标准曲线(B)

Figure 3 Full wavelength scan (A) and standard curve (B) of strain ZBY-1.

$(1.23 \pm 0.02) \times 10^7$ 个/mL (图4A); 色素最高含量(总叶绿素含量、叶绿素a、叶绿素b和类胡萝卜素)分别为 (18.51 ± 0.05) mg/g (图4B)、 (10.70 ± 0.02) mg/g、 (4.88 ± 0.02) mg/g 和 (2.39 ± 0.01) mg/g (图4C)。因此,明确藻株ZBY-1的最佳生长盐度为10%。pH梯度实验显示,藻株在pH为7.5–10.5时具有良好的生长趋势。在pH为8.5时,藻株的生物量最高,细胞数达到 $(1.53 \pm 0.04) \times 10^7$ 个/mL (图4D),

色素最高含量(总叶绿素含量、叶绿素a、叶绿素b和类胡萝卜素)分别为 (25.93 ± 0.15) mg/g (图4E)、 (14.67 ± 0.04) mg/g、 (7.14 ± 0.10) mg/g、 (3.31 ± 0.02) mg/g (图4F)。因此确定藻株ZBY-1的最适生长pH为8.5。温度梯度分析显示,藻株ZBY-1在3个温度下均能较好生长。其中温度为25℃时具有最高的生物量,细胞密度为 $(1.51 \pm 0.01) \times 10^7$ 个/mL (图4G), 色素最高含量(总叶

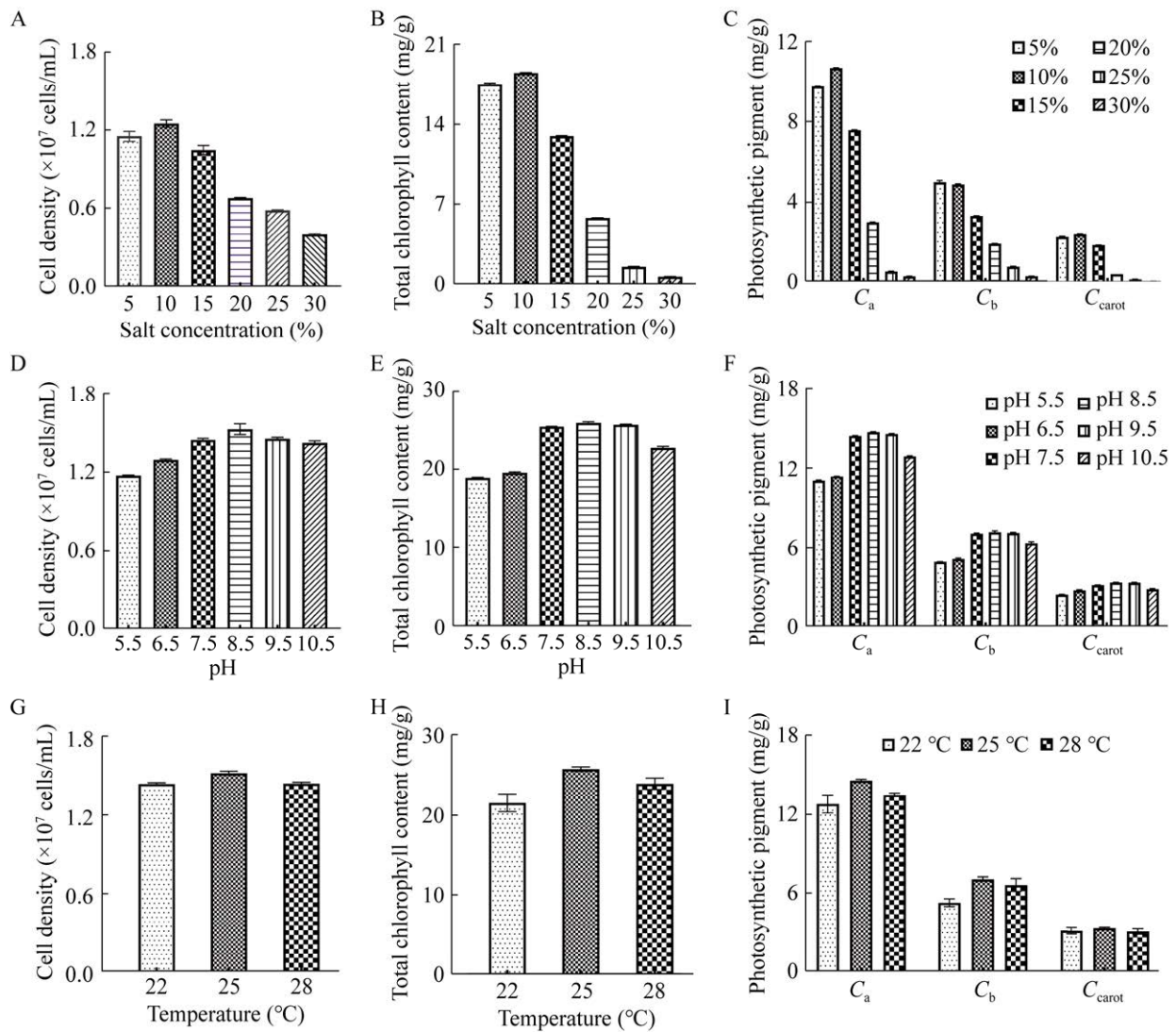


图4 不同条件下藻株 ZBY-1 的生长情况以及色素含量 A、B、C: 盐浓度. D、E、F: pH. G、H、I: 温度. C_a 、 C_b 和 C_{carot} 分别表示叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素

Figure 4 Growth and pigment content of strain ZBY-1 under different conditions. A, B, C: Salt concentration. D, E, F: pH. G, H, I: Temperature. C_a , C_b and C_{carot} denote chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoids, respectively.

绿素含量、叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素)分别为(25.77±0.28) mg/g (图 4H)、(14.60±0.08) mg/g、(7.08±0.16) mg/g 和(3.34±0.05) mg/g (图 4I)。因此, 明确藻株 ZBY-1 的最适生长温度为 25 °C。

2.4 伪盐生杜氏藻的最佳碳、氮、磷源研究

甄选不同种类和浓度的碳、氮、磷源, 分析藻株 ZBY-1 的细胞密度及光合色素积累量。碳

源组分析显示: NaHCO_3 、葡萄糖($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)、蔗糖($\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$)及乙酸钠(CH_3COONa)的 3 个浓度下的细胞密度和色素含量均高于空白对照组(图 5A)。碳源 NaHCO_3 浓度为 1.68 g/L 时, 藻株具有最高的生物量, 细胞密度为 $(1.830\pm 0.023)\times 10^7$ 个/mL, 色素最高含量(总叶绿素含量、叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素)分别

为(30.41±0.43) mg/g (图 5B)、(16.98±0.13) mg/g、(8.61±0.28) mg/g 和(4.02±0.15) mg/g (图 5C)。因此优选 NaHCO₃ 为最佳碳源, 浓度为 1.68 g/L。氮源组分析显示: CO(NH₂)₂ 组和 NaNO₃ 组 3 个

浓度下的藻细胞密度均高于空白对照组, 0.42 g/L NH₄Cl 也可促进藻株 ZBY-1 的生长, 但高浓度的 NH₄Cl 会抑制藻株 ZBY-1 的生长(图 5D)。氮源 CO(NH₂)₂ 浓度为 0.84 g/L 时, 藻株具有最高生

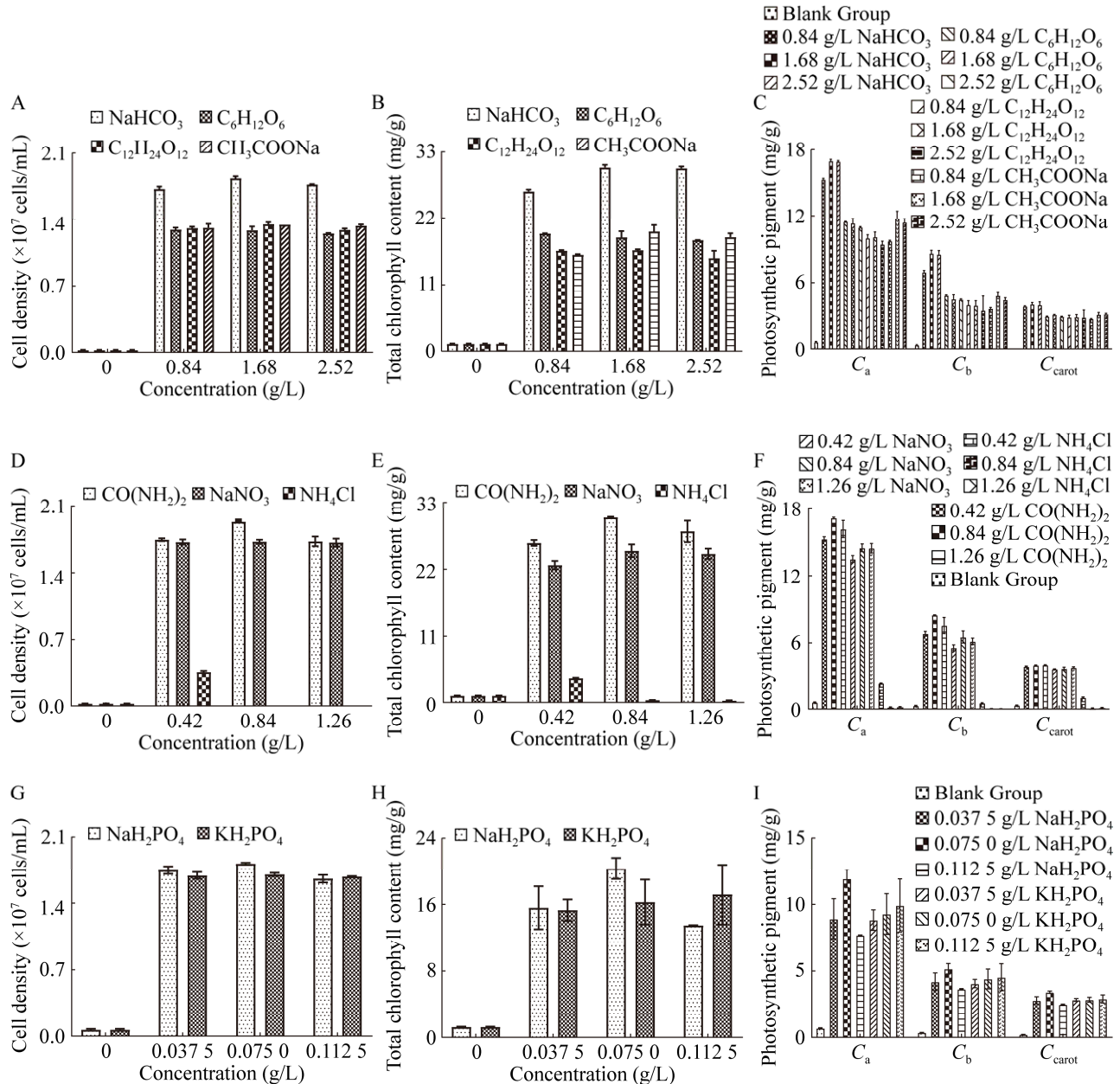


图 5 不同碳源、氮源、磷源浓度下 ZBY-1 的生长情况以及色素含量 C_a、C_b 和 C_{carot} 分别表示叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素

Figure 5 The growth and pigment content of strain ZBY-1 at different concentrations of carbon/nitrogen/phosphorus. C_a, C_b and C_{carot} denote chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoids, respectively.

物量, 细胞密度为 $(1.930 \pm 0.008) \times 10^7$ 个/mL。色素最高含量(总叶绿素含量、叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素)分别为 (30.48 ± 0.11) mg/g (图 5E)、 (17.17 ± 0.08) mg/g、 (8.48 ± 0.02) mg/g、 (3.94 ± 0.03) mg/g (图 5F)。综合优选 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 做氮源, 最佳浓度为 0.84 g/L。磷源组分析显示: NaH_2PO_4 组和 KH_2PO_4 组 3 个浓度下的藻细胞密度均高于空白对照组, 说明 NaH_2PO_4 和 KH_2PO_4 均可以促进 ZBY-1 的生长。磷源 NaH_2PO_4 浓度为 0.075 g/L 时, 藻株具有最高生物量, 细胞密度为 $(1.82 \pm 0.01) \times 10^7$ 个/mL (图 5G), 色素最高含量(总叶绿素含量、叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素)分别为 (20.33 ± 1.28) mg/g (图 5H), (11.92 ± 0.68) mg/g、 (5.17 ± 0.40) mg/g、 (3.41 ± 0.08) mg/g (图 5I), 较其他组所有浓度下积累的色素含量高。因此, 优选 NaH_2PO_4 做磷源, 最佳浓度为 0.075 g/L。

2.5 正交试验结果

利用 Latin v.3.1 软件绘制正交试验(表 2), 结果分析显示: 不同因素组合对藻株 ZBY-1 的生长都存在一定的影响作用, 极差分析影响因素依次为氮源>碳源>磷源>盐度。根据各因素水平, A 取 A_2 , B 取 B_1 , C 取 C_2 , D 取 D_1 为最优选择, 即培养基最佳组合为 $A_2B_1C_2D_1$, 具体为 NaCl 10 g/L; $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 0.84 g/L; NaH_2PO_4 0.06 g/L; KCl 74 mg/L; MgSO_4 1.23 g/L; CaCl_2 44 mg/L; NaHCO_3 1.26 g/L; $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (1%) 0.5 mL; 微量元素溶液 1 mL。利用 SPSS 软件进行实验数据方差分析和 F 检验(表 3), 结果显示: 4 个因素[NaCl 、 NaHCO_3 、 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 和 NaH_2PO_4] 对藻株 ZBY-1 的细胞密度影响显著($P < 0.05$), 模型设计有效, 可用于后续规模化培养。

2.6 培养条件优化前后对比

以基础培养基 DM 为空白组对照($n=3$), 以正交优化培养基为实验组($n=3$), 对比分析藻株

表 2 正交试验及结果分析

Table 2 Experiments and analysis of orthogonal results

编号 No.	A	B	C	D	藻细胞密度 Algal cell density ($\times 10^7$ cell/mL)
1	8%	1.260	0.630	0.060	2.56
2	8%	1.680	0.840	0.075	2.35
3	8%	2.100	1.050	0.090	1.05
4	10%	1.260	0.840	0.090	2.41
5	10%	1.680	1.050	0.060	2.26
6	10%	2.100	0.630	0.075	2.20
7	12%	1.260	1.050	0.075	1.81
8	12%	1.680	0.630	0.090	1.95
9	12%	2.100	0.840	0.060	1.99
K_1	1.988	2.261	2.238	2.270	
K_2	2.288	2.188	2.252	2.120	
K_3	1.918	1.745	1.704	1.804	
R	0.369	0.516	0.547	0.466	
Optimal solution	A_2	B_1	C_2	D_1	

K 为同一因素的平均值; R 为极差($R = k_{\max} - k_{\min}$); $n=3$

K is the mean of the same factor; R is the extreme variance ($R = k_{\max} - k_{\min}$); $n=3$.

表 3 方差分析结果

Table 3 ANOVA results

项目内容 Project content	III类平方和 III sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F value	P value
Revised model	4.935 ^a	8	0.617	39.280	<0.05
A	0.785	1	0.392	24.980	<0.05
B	1.278	2	0.639	40.689	<0.05
C	1.826	2	0.913	58.119	<0.05
D	1.047	2	0.523	33.324	<0.05
Error	0.283	2	0.016		
Total	121.125	18	0.392		
Corrected total	5.218	27			

^a: $R^2=0.946$ (adjusted $R^2=0.922$); $n=3$.

ZBY-1 的生长量及色素积累量(图 6)。结果显示: 优化培养基对藻株 ZBY-1 具有显著的生长促进作用, 细胞密度最高为 $(2.57 \pm 0.12) \times 10^7$ 个/mL (图 6A), 总叶绿素、叶绿素 a、叶绿素 b 和类

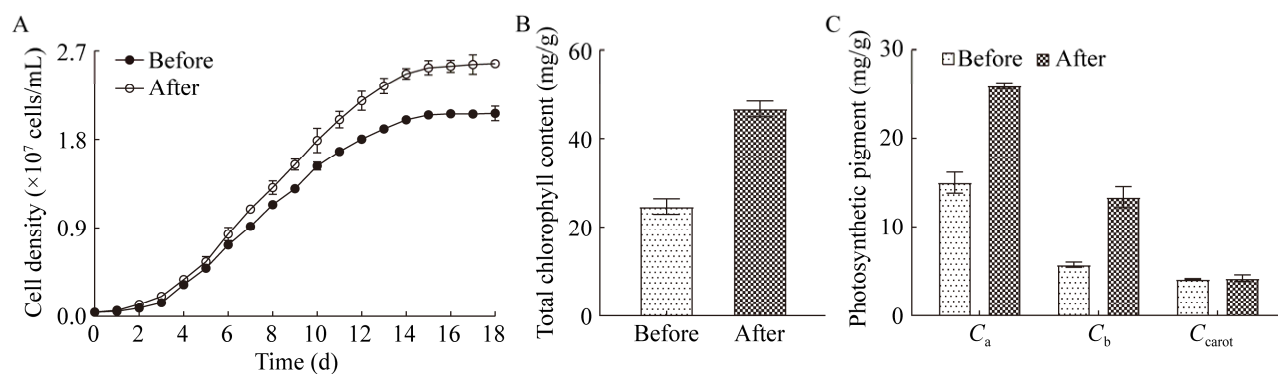


图 6 培养基优化前后藻株 ZBY-1 的生长情况以及色素含量 C_a 、 C_b 和 C_{carot} 分别表示叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素

Figure 6 The growth and pigment content of strain ZBY-1 before and after media optimization. C_a , C_b and C_{carot} denote chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoids, respectively.

胡萝卜素含量分别为 46.71 ± 1.79 mg/g (图 6B)、 (25.95 ± 0.32) mg/g、 (13.36 ± 1.19) mg/g 和 (4.22 ± 0.36) mg/g (图 6C)。

2.7 藻株 ZBY-1 的代谢组学分析结果

非靶代谢组学 LC-MS 正/负离子条件分析鉴定的具体次级代谢物分别有 1 169 和 1 234 个。KEGG compound 数据库比对获得代谢物的分类概况(图 7A), 主要类型依次为 63 种萜类(terpenoids, 比例为 33.7%)、55 种生物碱类(alkaloids, 比例为 29.4%)、17 种苯丙素类(phenylpropanoids, 比例为 9.1%)、16 种氨基酸相关化合物类(amino acid related compounds, 比例为 8.6%)、13 种脂肪酸相关化合物类(fatty acids related compounds, 比例为 7.0%)、9 种类黄酮类(flavonoids, 比例为 4.8%)、7 种莽草酸/醋酸-丙二酸途径衍生的化合物(shikimate/acetate-malonate pathway derived compounds, 比例为 3.7%)、3 种多酮类(polyketides, 比例为 1.6%)等。萜类化合物包括类胡萝卜素、龙胆苦苷、葫芦素 A/D、紫杉醇等, 生物碱类化合物包括毛果芸香碱、番茄碱、葫芦巴碱等, 苯丙素类化合物包括 2-羟基肉桂酸、五味子素等, 氨基酸相关化合物类包括葡萄糖苷、 β -氨

基甲酸等, 脂肪酸相关化合物主要包括亚麻酸、亚油酸、二十二碳六烯酸、二十碳五烯酸、棕榈酸等。KEGG 富集分析共筛选出 92 个通路(图 7B), 显著性(前 10)丰度类别分别是辅助因子生物合成(biosynthesis of cofactors, 63 个)、植物类次生代谢产物生物合成(biosynthesis of plant secondary metabolites, 48 个)、ABC 转运系统(ABC transporters, 36 个)、甘氨酸/丝氨酸/苏氨酸代谢(glycine, serine and threonine metabolism, 33 个)、癌相关的胆碱代谢(choline metabolism in cancer, 30 个)、核苷酸代谢(nucleotide metabolism, 26 个)、蛋白质消化与吸收(protein digestion and absorption, 22 个)、癌症的中心碳代谢(central carbon metabolism in cancer, 20 个)、嘧啶代谢(pyrimidine metabolism, 18 个)以及丙氨酸/天冬氨酸/谷氨酸代谢(alanine, aspartate and glutamate metabolism, 13 个)。

3 讨论

3.1 盐境杜氏藻种与应用价值

杜氏藻(*Dunaliella*)是一种生长盐度范围极广(0.05 – 5.50 mol/L)且极度耐盐的真核绿藻生

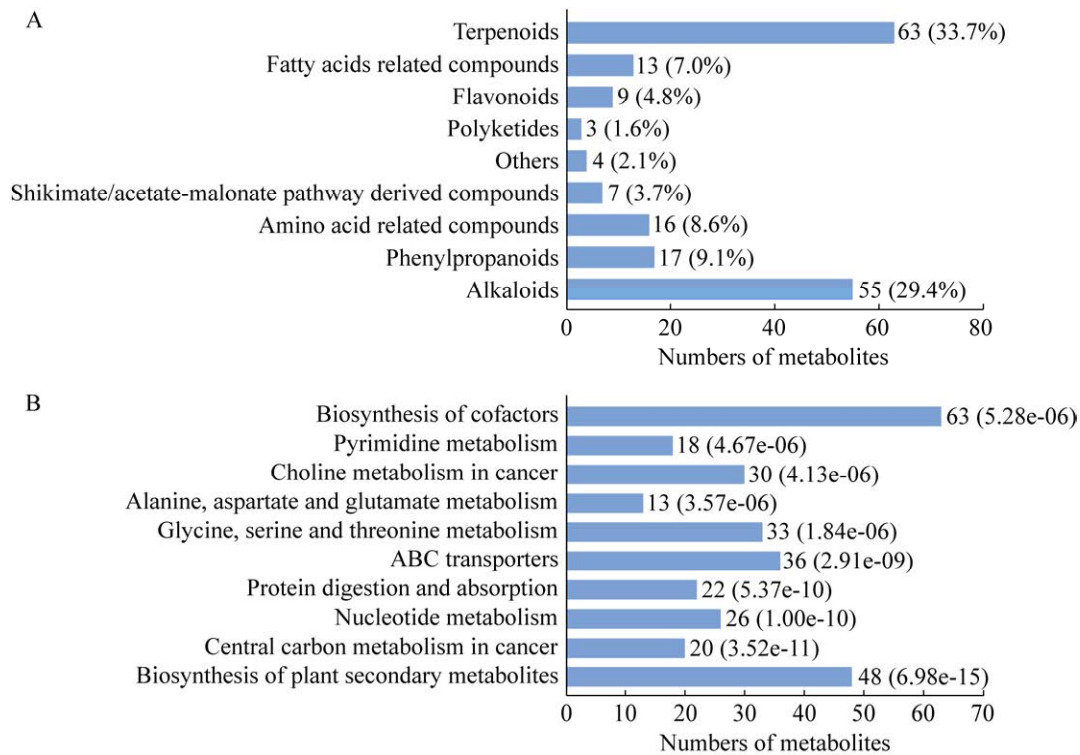


图7 KEGG 化合物分类(A)和 KEGG 代谢通路富集分析图(B)

Figure 7 Classification of KEGG compounds (A) and KEGG metabolic pathway enrichment analysis (B).

物,常栖息于各种高盐生境(如海洋、盐湖和盐井等)^[13],属于常见的典型盐藻,如杜氏盐藻(*D. salina*)、绿色杜氏藻(*D. viridis*)和特氏杜氏藻(*D. tertiolecta*)。Teodoresco^[14]从罗马尼亚盐湖中首次发现 *D. salina* 和 *D. viridis*; 1959年 Butcher等^[15]从英国沿海水域中分离出藻株 *D. viridis*。杜氏藻细胞是单倍体,缺乏细胞壁,适应生存盐度较为宽泛,易于培养,具有巨大的规模化培养和生产应用的潜力^[16]。国内外研究主要涉及耐盐基因筛选^[17]、渗透调节机制研究、遗传改造^[18]或原生质体制备、生物反应器^[19]或基因表达底盘构建等。本研究分离一株伪盐生杜氏藻(*D. pseudosalina*) ZBY-1,盐度生存范围为5%–30%,生长 pH 范围为 5.5–10.5,具有良好的高盐碱生存能力。

在特定生长条件下,杜氏藻胞内可大量积

累有活性的次级代谢物^[20],在医药保健、食品、生物燃料等领域中具有独特的经济价值。我们的代谢组学分析发现,藻株 ZBY-1 胞内可能存在 2 403 种化合物参与各类代谢,主要包括 63 种萜类(如类胡萝卜素、葫芦素 A/D 等)、55 种生物碱类(如毛果芸香碱、葫芦巴碱等)以及 13 种脂肪酸相关化合物类(如亚麻酸、二十二碳六烯酸等)。萜类化合物是一类具有广泛生物活性和重要经济价值的天然有机化合物;如萜类化合物 β -胡萝卜素可下调诱导 NO 合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)和环氧化酶-2 (COX-2)的表达量,减少肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)和白细胞介素-6 (IL-6)的释放^[21]。脂肪酸类化合物是一类具有长碳链的羧酸,其在医药、工业等重要领域具有广泛的应用价值;如 α -亚麻酸(α -linolenic acid, ALA)可通过抑制

脂肪酸合成酶来控制骨肉瘤的增殖和侵袭^[22]。二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)对于视觉系统的发育、神经系统的功能以及大脑的发育具有显著的重要性,已被广泛应用于保健品行业中^[23]。此外,杜氏藻含有较高比例的油脂,可以转化制备生物柴油^[24]。

3.2 伪盐生杜氏藻的影响生长因素分析

盐度、pH 和温度是影响盐藻细胞生长的主要非生物环境因子^[25],不仅影响藻类的生长和活性物质的积累,也会影响藻细胞对碳、氮、磷的吸收利用。本研究明确伪盐生杜氏藻 ZBY-1 的最适生长盐度为 10%,最适生长 pH 为 8.5,温度为 25 °C。首先,盐度是直接影响藻类生物量生产的限制性因素^[26],也是影响微藻光合作用效率和生长动力学的关键环境因子。盐度波动引发的渗透胁迫可能对微藻细胞的渗透平衡机制构成挑战,导致细胞发生脱水或过度吸水,进而影响细胞膜的完整性和稳定性。张晓钗等^[27]研究发现杜氏藻的生长盐度范围宽泛(0.29%–31.90%),但较高的盐度仍然会抑制盐藻的生长。焉翠蔚等^[28]研究显示 NaCl 影响杜氏藻的生长较为显著,最适生长盐度为 14%;武振晋^[29]研究显示杜氏藻 558 的最适生长盐度为 8.7%。上述研究结果与本研究一致,盐浓度为 10%时,藻株 ZBY-1 具有最大生物量,而随着盐浓度的升高,藻细胞密度则随之下降。其次,pH 值也是影响藻类培养的重要因素,影响细胞膜的负载电荷。例如,王俊^[30]研究发现杜氏盐藻的最适 pH 值为 7.0–9.0,改变细胞膜的通透性影响营养物质的吸收和代谢产物的排出。此外,温度也对藻细胞的生长和发育具有一定的调节作用,影响营养物的吸收利用效率、有机物质的合成和积累、酶的活性及细胞分裂的周期等^[31]。Seepratomrosh 等^[32]研究发现 *D. tertiolecta* 的最佳生长温度范围为 25–35 °C,

在此温度范围内,藻类的生长速率和光合作用效率较高;而在高温(35 °C和 40 °C)下,藻株的光化学效率降低,细增长率也随之降低。

3.3 伪盐生杜氏藻的最佳碳、氮、磷源分析

营养盐(碳、氮、磷)是藻类生长的必要条件,因分离藻株来源不同,最佳碳、氮、磷源可能存在偏好性选择,略有差异。本研究中,伪盐生杜氏藻 ZBY-1 的最佳碳、氮、磷源分别是 NaHCO_3 、 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 、 NaH_2PO_4 ,浓度分别为 1.26、0.84 和 0.06 g/L。碳源是藻细胞生长不可或缺的主要影响因素^[33],也是直接调节藻细胞光合作用与碳同化的重要因子,涉及参与糖酵解、三羧酸循环、戊糖磷酸化途径等物质代谢和藻细胞的结构形成^[34]。White 等^[35]发现,添加 1 g/L 碳酸氢钠可以提高四片藻(*Tetraselmis suecica*)和微绿球藻(*Nannochloropsis salina*)的细胞密度;Colman 等^[36]发现环境中的 HCO_3^- 离子可被盐藻直接利用,借助转运蛋白输送至叶绿体,转换为 CO_2 参与自身代谢。本研究中,扎布耶盐碱湖隶属于饱和碳酸型盐湖(总盐度 243–396 g/L),所以藻株 ZBY-1 能有效利用碳源 NaHCO_3 进行代谢生长。

氮源是藻类生长和代谢必需的营养元素之一,氮源的种类及不同浓度均会影响藻类的生长代谢过程^[37]。魏晓雪等^[38]发现藻细胞吸收铵态氮时,会释放出大量 H^+ ,降低培养基 pH 值,从而抑制藻株的生长;汪本凡^[39]与梁英等^[40]研究发现尿素 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 分解产物 NH_4HCO_3 或 NH_4OH ,易被藻株吸收,促进盐藻细胞的分裂,并且不改变培养基的 pH。Mulholland 等^[41]研究表明,束毛藻(*Triehodesmium*) nibb1967 在利用尿素 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 作为氮源时的生长速率超过了其他氮源,这一发现与本实验的研究结果相吻合。此外,磷元素也是构成细胞膜、遗传物质和 ATP 等物质的主要元素,参与藻细胞的生命

活动和物质代谢循环^[42]。例如,陈晓江等^[43]研究发现 NaH_2PO_4 可促进斜生栅藻的生长代谢;梁英等^[44]比较分析磷源 NaH_2PO_4 、甘油磷酸钠和三磷酸腺苷二钠时,发现 NaH_2PO_4 是盐生杜氏藻的最佳磷源。综合分析上述结果,发现藻株 ZBY-1 的最佳氮源和磷源分别为 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 和 NaH_2PO_4 , 与大多数盐生杜氏藻的生长特性相似。

4 结论

本研究从扎布耶盐碱湖分离鉴定一株伪盐生杜氏藻(*D. Pseudosalina*) ZBY-1, 细胞呈椭圆纺锤形, 头部具有两条鞭毛。最佳生长盐浓度为 10%, pH 值为 8.5, 温度为 25 °C。基于正交试验, 优化培养条件是 NaCl 10%、碳源(NaHCO_3) 1.26 g/L、氮源(尿素) 0.84 g/L 和磷源(NaH_2PO_4) 0.06 g/L。优化培养基后, 藻株 ZBY-1 的生长量和胞内色素含量均显著提高, 细胞密度可达 $(2.57 \pm 0.12) \times 10^7$ 个/mL (提高 1.25 倍)。代谢组学揭示藻株 ZBY-1 的次级代谢产物主要包括萜类化合物、生物碱、苯丙素衍生物及氨基酸类衍生物, 代谢通路显著性富集于辅助因子、植物类次级代谢产物的生物合成途径和 ABC 转运途径等通路, 此为藻株的后续大规模培养与次级代谢物的研发提供一定的理论支持。

REFERENCES

- [1] 高帆, 尹旭岗, 冯佳, 吕俊平, 刘琪, 南芳茹, 刘旭东, 谢树莲. 不同品系杜氏藻的多相特征研究[J]. 水生生物学报, 2021, 45(4): 925-934.
GAO F, YIN XG, FENG J, LÜ JP, LIU Q, NAN FR, LIU XD, XIE SL. Study on polyphasic characteristics of different strains of *Dunaliella*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2021, 45(4): 925-934 (in Chinese).
- [2] OREN A. A hundred years of *Dunaliella* research: 1905–2005[J]. Saline Systems, 2005, 1: 2.
- [3] GARCÍA-GONZÁLEZ M, MORENO J, CAÑAVATE JP, ANGUIS V, PRIETO A, MANZANO C, FLORENCIO FJ, GUERRERO MG. Conditions for open-air outdoor culture of *Dunaliella salina* in southern Spain[J]. Journal of Applied Phycology, 2003, 15(2): 177-184.
- [4] HIGHFIELD A, WARD A, PIPE R, SCHROEDER DC. Molecular and phylogenetic analysis reveals new diversity of *Dunaliella salina* from hypersaline environments[J]. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 2021, 101(1): 27-37.
- [5] MA K, CHEN SW, WU Y, MA YT, QIAO HC, FAN JH, WU HZ. Dietary supplementation with microalgae enhances the zebrafish growth performance by modulating immune status and gut microbiota[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2022, 106(2): 773-788.
- [6] CAPA-ROBLES W, GARCÍA-MENDOZA E, de JESÚS PANIAGUA-MICHEL J. Enhanced β -carotene and biomass production by induced mixotrophy in *Dunaliella salina* across a combined strategy of glycerol, salinity, and light[J]. Metabolites, 2021, 11(12): 866.
- [7] HE QH, LIN YQ, TAN H, ZHOU Y, WEN YL, GAN JJ, LI RW, ZHANG QL. Transcriptomic profiles of *Dunaliella salina* in response to hypersaline stress[J]. BMC Genomics, 2020, 21(1): 115.
- [8] LIU TY, DAI JJ, ZHAO YY, TIAN SF, NIE Z, YE CY. Using remote sensing technology to monitor salt lake changes caused by climate change and melting glaciers: insights from Zabuye Salt Lake in Xizang[J]. Journal of Oceanology and Limnology, 2023, 41(4): 1258-1276.
- [9] 郑绵平, 刘文高, 向军. 西藏扎布耶盐湖嗜盐菌、藻的发现和地质生态学综述[J]. 地质学报, 1985, 59(2): 162-171, 188.
ZHENG MP, LIU WG, XIANG J. The discovery of halophilic algae and halobacteria at Zabuye Salt Lake Xizang and preliminary study on the geoecology[J]. Acta Geological Sinica, 1985, 59(2): 162-171, 188 (in Chinese).
- [10] 崔金龙, 童银栋, 赵锋, 麦富源, 李胜楠, 李明月, 王洁, 孙学军, 张强弓. 基于高通量测序技术的西藏冰湖真核浮游植物群落组成特征分析[J]. 北京师范大学学报(自然科学版), 2023, 59(2): 218-229.
CUI JL, TONG YD, ZHAO F, MAI FY, LI SN, LI MY, WANG J, SUN XJ, ZHANG QG. Eukaryotic phytoplankton community composition in Xizang glacial lakes analyzed by high throughput sequencing[J]. Journal of Beijing Normal University (Natural Science Edition), 2023, 59(2): 218-229 (in Chinese).

- [11] OREN A. The microbiology of red brines[J]. *Advances in Applied Microbiology*, 2020, 113: 57-110.
- [12] 杨欣兰, 潘瑛子, 何文佳, 扎西拉姆, 刘飞. 西藏哲古错水源河流夏季浮游植物群落特征差异及其与水环境的关系[J]. *西藏农业科技*, 2022, 44(4): 47-54.
YANG XL, PAN YZ, HE WJ, ZHAXILAMU, LIU F. Differences in summer phytoplankton community characteristics and their relationship with water environment in chugu-tso lake and source rivers in Xizang[J]. *Tibet Journal of Agricultural Sciences*, 2022, 44(4): 47-54 (in Chinese).
- [13] OREN A. The ecology of *Dunaliella* in high-salt environments[J]. *Journal of Biological Research*, 2014, 21(1): 23.
- [14] TEODORESCO EC. Organisation et développement du *Dunaliella*, nouveau genre de volvocaceo-polyblepharidacee[J]. *Micrographe Preparateur*, 1905(1): 215-232.
- [15] BUTCHER RW. An Introductory Account of the Smaller Algae of British Coastal Waters. 1: Introduction and Chlorophyceae[EB/OL]. London: Her Majesty's Stationery Office, 1959.
- [16] YANG SF, FAN YW, CAO Y, WANG YX, MOU HJ, SUN H. Technological readiness of commercial microalgae species for foods[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2023: 1-25.
- [17] MATALIN DA, KHRAMOV DE, SHUVALOV AV, VOLKOV VS, BALNOKIN YV, POPOVA LG. Cloning and characterization of two putative P-type ATPases from the marine microalga *Dunaliella maritima* similar to plant H⁺-ATPases and their gene expression analysis under conditions of hyperosmotic salt shock[J]. *Plants*, 2021, 10(12): 2667.
- [18] FENG SY, HU LN, ZHANG QH, ZHANG FQ, DU JX, LIANG GF, LI AF, SONG GN, LIU Y. CRISPR/Cas technology promotes the various application of *Dunaliella salina* system[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(20): 8621-8630.
- [19] MASOJÍDEK J, LHOTSKÝ R, ŠTĚRBOVÁ K, ZITTELLI GC, TORZILLO G. Solar bioreactors used for the industrial production of microalgae[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2023, 107(21): 6439-6458.
- [20] SUI YX, VLAEMINCK SE. *Dunaliella* microalgae for nutritional protein: an undervalued asset[J]. *Trends in Biotechnology*, 2020, 38(1): 10-12.
- [21] WU SL, CHEN R, CHEN JY, YANG N, LI K, ZHANG Z, ZHANG RQ. Study of the anti-inflammatory mechanism of β -carotene based on network pharmacology[J]. *Molecules*, 2023, 28(22): 7540.
- [22] FAN HJ, HUANG WY, GUO Y, MA XF, YANG JH. α -linolenic acid suppresses proliferation and invasion in osteosarcoma cells via inhibiting fatty acid synthase[J]. *Molecules*, 2022, 27(9): 2741.
- [23] LV WW, XU DX. Docosahexaenoic acid delivery systems, bioavailability, functionality, and applications: a review[J]. *Foods*, 2022, 11(17): 2685.
- [24] YANG YN, GE SH, PAN YT, QIAN WY, WANG SN, ZHANG J, ZHUANG LL. Screening of microalgae species and evaluation of algal-lipid stimulation strategies for biodiesel production[J]. *The Science of the Total Environment*, 2023, 857(Pt 1): 159281.
- [25] 秦瑞阳, 李永富, 刘建国. 盐度、光强和温度对盐生杜氏藻生长的影响及其交互作用[J]. *海洋科学*, 2021, 45(11): 73-81.
QIN RY, LI YF, LIU JG. Effects of salinity, light, and temperature and their interactions on *Dunaliella salina* growth[J]. *Marine Sciences*, 2021, 45(11): 73-81 (in Chinese).
- [26] SHETTY P, GITAU MM, MARÓTI G. Salinity stress responses and adaptation mechanisms in eukaryotic green microalgae[J]. *Cells*, 2019, 8(12): 1657.
- [27] 张晓钗, 李亮, 何宁芳, 龚雪晴, 主明月, 王晓阳. 不同盐度胁迫下杜氏盐藻全转录组测序及注释[J]. *微生物学报*, 2019, 59(7): 1342-1353.
ZHANG XC, LI L, HE NF, GONG XQ, ZHU PY, WANG XY. Gene expression profiling of *Dunaliella salina* under different salinity stress[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(7): 1342-1353 (in Chinese).
- [28] 焉翠蔚, 卢元芳, 李延团, 赵可夫. NaCl 对杜氏盐藻生长的效应[J]. *曲阜师范大学学报(自然科学版)*, 1995, 21(1): 65-68.
YAN CW, LU YF, LI YT, ZHAO KF. Effect of NaCl on the growth of *Dunaliella salina*[J]. *Journal of Qufu Normal University (Natural Science Edition)*, 1995, 21(1): 65-68 (in Chinese).
- [29] 武振晋. 两株不同杜氏盐藻培养条件的优化及 β -胡萝卜素积累的研究[D]. 太谷: 山西农业大学硕士学位论文, 2017.
WU ZJ. Two different strains of *Dunaliella salina* optimization of culture conditions and the accumulation of β -carotene[D]. Taigu: Master's Thesis of Shanxi Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [30] 王俊. 杜氏盐藻、青岛大扁藻对营养盐变化的生理生态学响应机制[D]. 舟山: 浙江海洋大学硕士学位论文

- 文, 2012.
- WANG J. The physiological responses of *Dunahella sauna* and *Playtmonas subcordiformis* (wille) hazen to nutrients changes[D]. Zhoushan: Master's Thesis of Zhejiang Ocean University, 2012 (in Chinese).
- [31] GOLDMAN JC, MANN R. Temperature-influenced variations in speciation and chemical composition of marine phytoplankton in outdoor mass cultures[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1980, 46(1): 29-39.
- [32] SEEPRATOOMROSH J, POKETHITIYOOK P, MEETAM M, YOKTHONGWATTANA K, YUAN WQ, PUGKAEW W, KANGVANSACHOL K. The effect of light stress and other culture conditions on photoinhibition and growth of *Dunaliella tertiolecta*[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2016, 178(2): 396-407.
- [33] 王玲玲, 李兆河, 马贵范, 王齐安. 碳源对杜氏盐藻株生长的影响及其培养基的优化[J]. *水产学杂志*, 2019, 32(6): 54-58.
- WANG LL, LI ZH, MA GF, WANG LA. Effect of carbon sources on growth and optimization of culture medium in green *Alga Dunaliella salina*[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2019, 32(6): 54-58 (in Chinese).
- [34] 孔维宝, 汪洋, 杨红, 葱玉琴, 韩锐, 牛世全. 不同营养方式对普通小球藻生长代谢及生化组分的影响[J]. *微生物学报*, 2015, 55(3): 299-310.
- KONG WB, WANG Y, YANG H, XI YQ, HAN R, NIU SQ. Effects of different trophic modes on growth characteristics, metabolism and cellular components of *Chlorella vulgaris*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2015, 55(3): 299-310 (in Chinese).
- [35] WHITE DA, PAGARETTE A, ROOKS P, ALI ST. The effect of sodium bicarbonate supplementation on growth and biochemical composition of marine microalgae cultures[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2013, 25(1): 153-165.
- [36] COLMAN B, HUERTAS IE, BHATTI S, DASON JS. The diversity of inorganic carbon acquisition mechanisms in eukaryotic microalgae[J]. *Functional Plant Biology*, 2002, 29(3): 261-270.
- [37] 宋雨晴, 靳翠丽, 胡文峰, 封克, 周晓见. 氮源对盐藻生长及细胞物质组成的影响[J]. *生态环境学报*, 2017, 26(2): 268-274.
- SONG YQ, JIN CL, HU WF, FENG K, ZHOU XJ. The effect of nitrogen supply on the growth and cell chemical composition of *Dunaliella salina*[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2017, 26(2): 268-274 (in Chinese).
- [38] 魏晓雪, 石峰, 陈子熙, 冯剑丰, 朱琳. 三角褐指藻及其藻际细菌对不同无机氮源的响应[J]. *海洋科学*, 2022, 46(1): 10-21.
- WEI XX, SHI F, CHEN ZX, FENG JF, ZHU L. Responses of *Phaeodactylum tricornutum* and its bacteria in the phycosphere to different inorganic nitrogen sources[J]. *Marine Sciences*, 2022, 46(1): 10-21 (in Chinese).
- [39] 汪本凡. 杜氏盐藻纯化及生物学特性研究[D]. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文, 2004.
- WANG BF. The purification and research of biologic characteristic of *Dunaliella salina*[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui Agricultural University, 2004 (in Chinese).
- [40] 梁英, 孙明辉, 刘春强, 田传远. 氮源对三角褐指藻、盐藻和米氏凯伦藻生长和种间竞争的影响[J]. *海洋环境科学*, 2015, 34(1): 29-35.
- LIANG Y, SUN MH, LIU CQ, TIAN CY. Effects of nitrogen sources on the growth and interspecific competition of *Phaeodactylum tricornutum*, *Dunaliella salina* and *Karenia mikimotoi*[J]. *Marine Environmental Science*, 2015, 34(1): 29-35 (in Chinese).
- [41] MULHOLLAND MR, OHKI K, CAPONE DG. Nitrogen utilization and metabolism relative to patterns of N_2 fixation in cultures of *Trichodesmium nubb1067*[J]. *Journal of Phycology*, 1999, 35(5): 977-988.
- [42] 郁彬琦, 靳翠丽, 刘青, 周晓见. 氮磷和盐度对杜氏盐藻生产性能的正交优化试验[J]. *饲料工业*, 2021, 42(3): 54-60.
- YU BQ, JIN CL, LIU Q, ZHOU XJ. Effects of nitrogen, phosphorus and salinity on the production performance of *Dunaliella salina*[J]. *Feed Industry*, 2021, 42(3): 54-60 (in Chinese).
- [43] 陈晓江, 董英羽, 刘晓峰. 营养盐磷浓度对斜生栅藻生长的影响[J]. *湖北农业科学*, 2021, 60(16): 28-32.
- CHEN XJ, DONG FY, LIU XF. Effects of phosphate concentration on the growth of *Scenedesmus obliquus*[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2021, 60(16): 28-32 (in Chinese).
- [44] 梁英, 李泽邦, 刘春强, 田传远, 黄徐林. 不同磷源对3种海洋微藻生长和种间竞争的影响[J]. *海洋湖沼通报*, 2017(5): 132-140.
- LIANG Y, LI ZB, LIU CQ, TIAN CY, HUANG XL. Effects of different phosphorus source on the growth and interspecific competition in 3 marine microalgal species[J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2017(5): 132-140 (in Chinese).