

超声辐射对牟氏角毛藻的生物效应研究*

李文权 张元标 陈清花 王清池

(厦门大学海洋系、厦门大学亚热带海洋研究所 361005)

摘要 设计了一个超声频率、超声功率和辐射时间 3 因素 4 水平的正交实验,研究超声辐射对牟氏角毛藻的生物效应。实验结果表明,超声频率对牟氏角毛藻的生物效应显著,而超声功率和辐射时间的影响相对较小。在正交实验所确定的最佳超声辐射条件下,牟氏角毛藻生长速率常数最高可达 0.348 d^{-1} , 是对照组的 1.78 倍,其脂肪酸不饱和度最高可达 68.4%, 比对照组提高 5.2%, 主要不饱和脂肪酸的百分含量均可得到不同程度的提高。

关键词 超声辐射, 牟氏角毛藻, 生物效应

 已有研究表明超声波可以加速蓝绿藻细胞的生长,使细胞密度增加 30% ~ 40%, 蛋白质可增加 2 ~ 3 倍, 且未导致细胞形态的任何变化; 利用超声波对亚

* 国家自然科学基金资助项目 39870565 号和福建省自然科学基金资助项目 C97006 号。

收稿日期: 2000-09-14; 修回日期: 2000-11-05

心形扁藻进行短期处理,可得到比对照组高 30% 的细胞密度^[1]。目前国内在超声辐射对海洋藻类生物效应的基础研究方面尚十分薄弱。如何利用超声波的作用,促进海洋微藻生长,对于海洋微藻生物活性物质开发利用有积极的指导意义。

1 材料和方法

1.1 微藻的培养

取砂滤过的海水,经 0.45 μm 醋酸纤维滤膜过滤后,高压消毒灭菌。采用 f/2 配方用消毒的过滤海水(盐度 28.4, pH 7.90)配制培养液。试验藻种为牟氏角毛藻(*Chaetoceros muelleri*),于生化培养箱(SPX250 型)中培养,光强为 4 000 lx,光暗周期为 12 h/12 h,温度为 26 $^{\circ}\text{C}$,每天振荡 4 次。本实验所用试剂和玻璃仪器都经高压消毒灭菌。

1.2 正交实验设计

本实验采用超声生物促进生长仪(CY5D 型,宁波新芝科器研究所),设计了一个包括超声频率、超声功率和辐射时间 3 因素 4 水平的正交实验。根据仪器的条件,超声频率水平选定 18, 20, 24, 30 kHz,为了得到更合理的分析结果,频率水平高低顺序采取随机组合。超声功率是超声和生物系统相互作用的重要参数之一,对于单细胞藻类,宜采用较低功率,如超声功率过大,则细胞形态容易发生改变,因此采用 2, 3, 4, 6 W。本研究组在球等鞭金藻超声实验中,超声时间采用 60 s^[2],在三角褐指藻的实验中,采用 15~90 s^[3],都取得较好的实验结果。因此辐射时间选定 30 s 1 次、40 s 1 次、15 s 两次、10 s 3 次(间隔时间均为 10 s)。采用间歇辐射主要是考察间歇辐射和连续辐射之间的差别。实验结果采用方差分析^[4],经过一系列数学推导,得到各个因素的方差和公式,从而判断各个因素影响的显著程度。最佳超声辐射条件就是最大实验结果平均值所对应的因素水平。

1.3 微藻脂肪酸甲脂的制备和气相色谱分析

平行移取对数生长期的藻液(细胞密度 120 000 个/ml) 50 ml,按正交设计进行超声实验。过滤藻样,从滤膜上刮下藻体,冷冻干燥 48 h 后移入带螺帽的水解管中。微藻脂肪酸甲脂的制备和气相色谱分析按已报道的方法^[2]进行。本实验以 C19:0 为内标,采用美国 SIGMA 公司脂肪酸标准。取平行样品的测定数据计算平均值。本流程脂肪酸回收率 95.1%~103.7%,检测限 0.007 2 μg ,相对偏差 0.53%~5.49%。

2 结果与讨论

2.1 对生长速率常数的影响

实验结果如表 1 所示。可以看出,适宜的超声条

件可以促进牟氏角毛藻的生长,但是如果超声条件不当,则适得其反。对照组的生长速率常数 K 为 0.196 d^{-1} 。表中的 2, 5, 7, 8, 15 号样品藻类生长较快,生长速率常数达 0.301, 0.331, 0.348, 0.334 和 0.319 d^{-1} ,分别是对照组的 1.53, 1.69, 1.78, 1.71 和 1.63 倍。而在另一些超声条件下,牟氏角毛藻生长速率常数不仅没有提高,反而降低,如表中的 1, 3, 9, 12, 13, 14 号样品。

方差分析结果表明,超声频率的改变对促进牟氏角毛藻生长的作用十分显著,而超声功率和辐射时间的改变对藻类生长的影响很小,可归因于误差而忽略不计。当超声频率为 20 kHz 时,平均生长速率常数有最大值(0.319 d^{-1})。综合正交实验结果,对牟氏角毛藻生长的影响,在本实验设计的因素水平范围内,最佳超声辐射条件是频率 20 kHz,功率 6 W,辐射时间为 10 s 3 次。

2.2 对脂肪酸不饱和度的影响

牟氏角毛藻属硅藻,其细胞较小,是海水养殖良好的生物饵料。在牟氏角毛藻脂肪酸组成中, C16:1 和 C16:0 含量较高,其次是 C14:0, C16:2, C20:5 和 C16:3。未经超声辐射的对照组和正交实验的 16 组样品牟氏角毛藻脂肪酸组成如表 2 所示,各样品号的超声辐射因素水平与表 1 相同。

从表 2 的数据可以看出,与对照组脂肪酸不饱和度 63.2% 相比较,经过超声辐射的牟氏角毛藻脂肪酸

表 1 超声辐射对牟氏角毛藻生长速率常数的影响^{*}

Tab.1 Effect of ultrasonic radiation on the constant of growth rate of *Chaetoceros muelleri*

样品号	频率 (kHz)	时间 (s)	功率 (W)	生长速率 常数 K (d^{-1})	同一频率水 平 K 平均值 (d^{-1})
1	24	30	2	0.124	0.204
2	24	15(两次)	3	0.301	
3	24	10(3次)	4	0.178	
4	24	40	6	0.211	
5	20	30	3	0.331	
6	20	15(两次)	2	0.262	0.319
7	20	10(3次)	6	0.348	
8	20	40	4	0.334	
9	18	30	4	0.140	
10	18	15(两次)	6	0.263	0.201
11	18	10(3次)	2	0.246	
12	18	40	3	0.155	
13	30	30	6	0.176	
14	30	15(两次)	4	0.158	
15	30	10(3次)	3	0.319	0.225
16	30	40	2	0.246	

^{*} 生长速率常数 $K = (\ln N - \ln N_0) / (t - t_0)$, 式中 N 为超声后的细胞密度, N_0 为超声前的细胞密度, t 为实验终了时间, t_0 为开始时间。

不饱和度均得到不同程度的提高。其中脂肪酸不饱和度提高幅度较大的为 13, 14 和 15 号样品, 其不饱和度为 67.1 %, 67.1 % 和 68.4 %, 分别比对照组提高了 3.9 %, 3.9 % 和 5.2 %。几种含量较高的不饱和脂肪酸如 C16: 1, C16: 2, C20: 5 和 C16: 3 的百分比明显提高, 于 30 kHz 达最大值(表 3)。与此同时, 原本含量较高的饱和脂肪酸 C14: 0 和 C16: 0, 经超声辐射后, 其百分比明显下降, 而且随着频率的提高呈降低趋势, 于 30 kHz 达最低值。方差分析结果同样表明,

超声频率对提高牟氏角毛藻的脂肪酸不饱和度的作用特别显著, 而超声功率和辐射时间的影响相对较小。可以看出, 频率从 18 kHz 增大到 24 kHz, 牟氏角毛藻脂肪酸不饱和度变化不大, 当频率从 24 kHz 增大到 30 kHz 时, 其影响显著增强, 于 30 kHz 时有最大不饱和度。脂肪酸不饱和度随功率的变化相对较小, 当功率 4 W 时, 有最大不饱和度。综合正交实验结果, 在本实验设计的因素水平范围内, 提高牟氏角毛藻脂肪酸不饱和度最佳超声辐射条件是频率 30 kHz, 功率

表 2 超声辐射对牟氏角毛藻脂肪酸组成的影响(%TFA)

Tab.2 Effect of ultrasonic radiation on fatty acid composition of *Chaetoceros muelleri*

样品号	对照组	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
C14: 0	9.27	9.17	8.93	9.18	9.29	9.01	9.29	9.15	9.23	9.67	9.60	9.37	9.59	8.98	8.52	9.26	8.77
C15: 0	0.43	0.46	0.45	0.42	0.45	0.46	0.42	0.44	0.45	0.48	0.46	0.40	0.45	0.47	0.45	0.45	0.46
C16: 4	1.78	1.86	1.78	1.78	1.78	1.75	1.72	1.77	1.76	0.25	1.74	1.42	1.77	1.80	1.45	1.84	1.81
C16: 2	8.05	8.82	8.49	8.78	8.31	8.32	8.27	8.35	8.81	9.08	8.84	8.87	8.73	8.98	9.39	9.75	8.95
C16: 1	34.2	36.3	35.4	35.9	35.2	34.9	35.4	34.9	36.4	35.7	35.8	35.3	35.1	35.1	35.4	35.3	34.0
C16: 3	5.39	5.99	5.30	5.54	5.37	5.92	5.82	5.31	5.79	5.59	5.65	5.81	5.25	5.62	5.75	6.35	5.57
C16: 0	24.9	23.3	23.9	22.8	24.0	23.4	23.7	23.8	22.9	23.0	22.8	23.1	23.2	21.6	22.3	21.1	22.3
C17: 0	0.16	0.18	0.22	0.19	0.21	0.23	0.20	0.23	0.18	0.18	0.16	0.25	0.19	0.21	0.19	0.18	0.30
C18: 4	0.27	0.27	0.28	0.33	0.28	0.29	0.27	0.37	0.20	0.33	0.32	0.27	0.28	0.27	0.30	0.43	0.27
C18: 2	1.88	0.88	1.55	0.93	1.56	1.66	1.41	1.77	0.84	1.13	0.90	1.31	1.47	1.63	1.73	0.98	2.50
C18: 3	1.86	1.61	1.73	1.59	1.75	1.74	1.65	1.75	1.50	1.54	1.49	1.70	1.67	1.86	1.72	1.45	1.99
C18: 1	1.40	1.72	1.58	1.76	1.56	1.63	1.66	1.60	1.40	1.80	1.90	1.87	1.76	1.77	1.54	1.57	1.82
C18: 0	1.97	0.66	1.26	0.64	1.31	1.28	1.18	1.44	0.67	0.97	0.67	0.82	1.16	1.69	1.46	0.56	1.23
C20: 4	1.61	1.74	1.79	2.01	1.77	1.90	1.78	1.81	1.89	2.04	1.96	1.97	1.90	1.91	1.95	2.14	1.95
C20: 5	6.43	6.76	6.90	7.72	6.80	7.07	6.82	6.89	7.61	7.68	7.30	7.17	7.04	7.49	7.43	8.14	7.63
C22: 6	0.33	0.30	0.45	0.46	0.33	0.42	0.42	0.44	0.34	0.46	0.44	0.35	0.46	0.66	0.41	0.47	0.40
不饱和度 ¹⁾	63.2	66.2	65.2	66.8	64.7	65.6	65.2	64.9	66.5	65.6	66.3	66.1	65.5	67.1	67.1	68.4	66.9

1) 不饱和度 = $\text{TUFA} / \text{TFA} \times 100\%$, 式中 TUFA 为总不饱和脂肪酸(Total Unsaturated Fatty Acids), TFA 为总脂肪酸(Total Fatty Acids)。

4 W, 辐射时间为 10 s 3 次。

2.3 对主要不饱和脂肪酸百分含量的影响

C16: 1 是牟氏角毛藻脂肪酸中含量最高的脂肪酸, 在对照组中, C16: 1 占总脂肪酸(TFA) 的 34.2 %。从表 2 数据可知, 经过超声辐射之后, 除了 16 号样品外, 其他样品 C16: 1 相对百分含量明显提高, 以 1 和 8 号样品最显著, 百分含量为 36.3 % 和 36.4 %, 分别提高了 2.1 % 和 2.2 %。

C16: 2 在对照组中占 TFA 的百分含量为 8.05 %, 经超声辐射后 C16: 2 的百分含量得到不同程度的提高。尤以 9, 14 和 15 号样品提高幅度显著, C16: 2 的百分含量分别为 9.08 %, 9.39 %, 9.75 %, 比对照组分别提高了 1.03 %, 1.34 % 和 1.70 %。

C20: 5 (EPA) 在对照组中占 TFA 6.43 %, 经超声辐射后牟氏角毛藻 EPA 的百分含量均得到不同程度的提高, 其中 3, 8, 9, 15 和 16 号样品的 EPA 百分含量较高, 分别为 7.72 %, 7.61 %, 7.68 %, 8.14 % 和

7.63 %, 比对照组分别提高了 1.29 %, 1.18 %, 1.25 %, 1.71 % 和 1.20 %。1 号样品提高幅度最小, 其 EPA 占 TFA 为 6.76 %, 仅比对照组提高 0.33 %。

C16: 3 在对照组中占 TFA 5.39 %, 经超声辐射后大多数样品 C16: 3 的百分含量有不同程度的提高。在 16 个正交实验样品中, 以 1, 5, 15 号样品百分含量较高, 分别达到 5.99 %, 5.92 % 和 6.35 %, 比对照组相分别提高了 0.60 %, 0.53 % 和 0.96 %。

实验结果经方差分析表明, 超声频率的改变对提高 C16: 2 和 EPA 百分含量的影响特别显著, 超声功率的改变有一定的影响, 而辐射时间变化的影响很小。从 20 kHz 起, 随着频率的提高, C16: 2 百分含量增加, 并于 30 kHz 达到最大值(表 3)。超声频率从 18 kHz 增加到 24 kHz, EPA 百分含量呈减少的趋势, 当频率从 24 kHz 提高到 30 kHz, EPA 百分含量出现一个突跃式的增加, 达到其最大值。当超声功率为 4 W 时, C16: 2 和 EPA 百分含量达到最大值。在本实

表 3 超声频率和功率对牟氏角毛藻脂肪酸组成影响分析(%TFA)¹⁾Tab.3 Analyses of the influence of ultrasonic frequency and power on fatty acid composition of *Chaetoceros muelleri*

因素水平		不饱和度	C16: 1	C16: 2	C20: 5	C16: 3	C16: 0	C14: 0
频率(kHz)	18	65.9	35.5	8.88	7.30	5.58	23.0	9.56
	20	65.6	35.4	8.44	7.10	5.71	23.4	9.17
	24	65.7	35.7	8.60	7.04	5.55	23.5	9.14
	30	67.4	35.0	9.27	7.67	5.82	21.8	8.88
功率(W)	2	66.0	35.2	8.72	7.10	5.80	23.1	9.15
	3	66.2	35.2	8.82	7.30	5.70	22.9	9.20
	4	66.5	35.8	9.02	7.60	5.68	22.8	9.15
	6	65.8	35.2	8.62	7.12	5.50	23.0	9.26
对照组		63.2	34.2	8.05	6.43	5.39	24.9	9.27

1) 表中数据是同一频率水平和功率水平实验结果的平均值。

验设计的因素水平范围内,提高 C16: 2 和 EPA 百分含量最佳超声辐射条件是频率 30 kHz,功率 4 W,辐射时间为 10 s 3 次。方差分析还表明,超声频率、功率、时间 3 种因素对于 C16: 1 和 C16: 3 百分比的影响都很小。

以上实验结果表明,在适宜超声辐射条件下,超声波能产生积极的生物效应。在本实验设计的因素水平范围内,提高牟氏角毛藻生长速率常数最佳超声频率为 20 kHz,提高脂肪酸不饱和度和主要不饱和脂肪酸百分比的最佳超声频率为 30 kHz,宜采用较低的超声功率(4~6 W),超声时间以短时间多次间歇辐照(10 s 3 次)的效果最佳。短时间低能量的超声辐射产生的机械振动能刺激物质经细胞半透膜的弥散,加速了营养成分的传输,从而增强了新陈代谢作用,有利于微藻的生长。同时由于多次辐照之间存在短期间隙,因此不会产生激烈的空化效应,避免了对细胞造成局部的损伤。海洋微藻中不饱和脂肪酸的存在,脂

肪酸脱饱和酶起着关键作用,它催化在脂肪酸碳链上形成双键^[5]。经超声辐射后,海洋微藻脂肪酸不饱和度提高,可能是超声波的作用使脂肪酸脱饱和酶的活性提高,加强了催化能力,从而使不饱和脂肪酸含量增加。

3 结语

研究表明,在适宜超声频率条件下,采用低功率、短时间多次间歇超声

辐照,牟氏角毛藻的生长速率常数、脂肪酸不饱和度和主要不饱和脂肪酸百分比均有不同程度的提高。方差分析表明,超声频率对牟氏角毛藻的生物效应显著,而超声功率和辐射时间的影响相对较小。对牟氏角毛藻的生长,最佳超声辐射条件为 20 kHz,6 W,10 s 3 次;对提高牟氏角毛藻脂肪酸不饱和度和主要不饱和脂肪酸百分比,最佳超声辐射条件为 30 kHz,4 W,10 s 3 次。

参考文献

- 1 章之蓉,谢瑞生,何家林等.水生生物与物理因子.北京:科学出版社,1994. 112~113
- 2 李文权,王清池,陈清花等.海洋科学,2000,24(4):7~9
- 3 王清池,廖启斌,陈清花等.厦门大学学报(自然科学版),2000,39(1):32~35
- 4 郑用熙.分析化学中的数理统计方法.北京:科学出版社,1991. 180~208
- 5 张羽航,鲍时翔,郑学勤等.生物技术通报,1998,4:1~9

BIOLOGICAL EFFECTS OF ULTRASONIC RADIATION ON *Chaetoceros muelleri*

LI Wenquan ZHANG Yuan-biao CHEN Qing-hua WANG Qing-chi

(Department of Oceanography, Institute of Subtropical Oceanography, Xiamen University, 361005)

Received: Sep., 14, 2000

Key Words: Ultrasonic radiation, *Chaetoceros muelleri*, Biological effects

Abstract

A three-factor and four-level orthogonal experiment, composed of ultrasonic frequency, power and radiative duration, was designed to study the biological effect of ultrasonic radiation on *Chaetoceros muelleri*. The experimental results suggested that ultrasonic frequency had significant biological effect, and radiative duration and ultrasonic power had less influence on the alga. The maximum constant of growth rate of *C. muelleri* could be 0.348 d^{-1} which was greater than that of the controlled by a factor of 1.78, the maximum unsaturation could be 68.4%, an increase of 5.2% as compared with that of the controlled, and the percentages of major unsaturated fatty acids in TFA could increase more or less under the optimum ultrasonic condition deduced by the orthogonal experiment.

(本文编辑:张培新)