

充气在几种饵料单细胞藻二级培养中的应用

李 锋¹, 毛玉泽¹, 于守团², 杜美荣¹, 叶乃好¹, 方建光¹

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 2. 青岛红岛蛤原良种发展有限公司, 山东 青岛 266114)

摘要:采用实验与生产结合的方法,研究了充气条件下几种饵料单胞藻的生长特性。结果表明,充气能大幅度提高4种饵料单胞藻的生长速度。在充气条件下,新月菱形藻、金藻3011、3012和扁藻的最大培养密度分别为 2.957×10^7 、 1.7×10^7 、 2.355×10^7 和 3.5×10^6 细胞/mL,分别是对照组最大培养密度的3.2倍、6.5倍、4.1倍和5倍;实验组(充气)与对照组(不充气)在细胞数目、特定生长率(SGR)、相对生长率(RGR)和绝对生长率(AGR)等方面均有显著差异。二级充气培养的藻液可以直接扩种到大池进行生产培养,能有效延长生长时间,显著提高生产培养效率。

关键词:单胞藻;充气培养;生长率

中图分类号:S963.8

文献标识码:A

文章编号:1008-0864(2008)02-0094-06

Application of Air Bubbling Method on Amplified Incubation of Microalgae

LI Feng¹, MAO Yu-ze¹, YU Shou-tuan², DU Mei-rong¹, YE Nai-hao¹, FANG Jian-guang¹

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;

2. Hongdao Clam Original and Eugenic Breed Development Ltd., Qingdao 266114, China)

Abstract: Growth characteristics of 4 microalgae in bubble condition were studied using experiment combined with production method. The results showed that bubble incubation could improve the growth rate of 4 microalgae dramatically. Under bubble condition, the maximum cell density of *N. closterium*, *I. galbana* Parke 3011, *I. galbana* Parke 3012 and *P. subcordiformis* were 2.957×10^7 , 1.7×10^7 , 2.355×10^7 and 3.5×10^6 cell per milliliter, and which was 3.2, 6.5, 4.1 and 5 times of the control group under the same conditions respectively. The experiment group showed significant difference with the control one in cell number, special growth rate (SGR), relative growth rate (RGR) and absolute growth rate (AGR). The air-charging incubation seed can be directly used for amplified culture. Air-charging incubation can effectively prolong the growth period of the algae cell, and remarkably enhance the production efficiency.

Key words: microalgae; air-charging incubation; growth rate

单细胞藻类是贝类育苗幼体培育过程中的主要饵料,是决定贝类育苗的关键因素之一。但是在贝类育苗中常常出现饵料供应不足、不及时以及生产池饵料污染严重,藻种又不能及时供应等情况,从而造成饵料生长高峰期和幼体需求不协调的现象^[1,2]。为保证饵料供应,有关单细胞藻类高密度培养的研究较多^[3-7],大多集中于不同培养条件、营养盐水平和病害防制等方面的研究,关于充气对单细胞藻类培养的研究较少。一般认为,充气培养

能使藻细胞和培养环境充分接触,从而增加藻细胞的生长速度,但因为充气容易使培养环境受到污染,也同时加大了管理的难度,因此具有一定风险性。有些生产单位采取传统的充气培养法,因为管理不善、操作不规范等原因往往引起藻种全部污染,导致贝类幼体饵料严重短缺,甚至使育苗失败。本课题组根据多年积累的经验,对二级培养的方法进行了改进,经过几年的生产实验验证,该方法具有操作方便,藻类生长稳定快速、无污染等优点。

收稿日期:2008-01-03;修回日期:2008-01-23

基金项目:国家973项目(2006CB400608),国家863计划项目(2006AA10Z414,2006AA100304),中国博士后科学基金资助项目(2006039313),山东省博士后择优基金项目(200603061)和国家自然科学基金项目(40776090,40706050,40706048,30700619)资助。

作者简介:李 锋,工程师,主要从事饵料单细胞藻培养的研究。E-mail: lifeng@ysfri.ac.cn。通讯作者:方建光,研究员,博士生导师,主要从事海水养殖生态学的研究。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验用小新月菱形藻 *Nitzschia closterium* (以下简称硅藻), 等鞭金藻 3011 *Isochrysis galbana* Parke (以下简称 3011), 等鞭金藻 3012 (以下简称 3012) 和亚心型扁藻 *Platymonas subcordiformis* (以下简称扁藻) 均来自中国水产科学研究院黄海水产研究所。



1.2 充气和培养装置

用小型充气泵或鼓风机充气, 充气管先通过 2~3 个空气过滤器, 然后通过气排分散到培养瓶 (图 1)。采用 18.9 L 的透明塑料纯净水瓶作为一级或二级培养瓶, 培养瓶用相应型号的橡胶塞密封, 在每个橡胶塞上钻两个直径为 0.8~1 cm 的孔, 每个孔插入一段 10 cm 长, 粗细与孔径一致的玻璃管, 一个玻璃管用于穿充气管, 另一个玻璃管用于通风, 上面加少许消毒处理的脱脂棉以防止灰尘污染。



图 1 充气培养单细胞藻系统

Fig. 1 Bubble incubation system of microalgae.

注: 左, 培养瓶; 右, 空气过滤装置

Note: Left, incubation bottle; Right, air filtrate equipments.

1.3 培养方法

培养瓶、充气设备和其他培养工具先用稀盐酸洗刷, 再经海水冲洗 2~3 次备用。培养瓶加满过滤海水, 加入 100 mL 次氯酸消毒液, 使有效氯含量达到 40~80 mg/L, 充气混匀, 使多余的水溢出刚好消毒培养瓶表面, 用消毒的橡胶塞塞紧。消毒 12~18 h 后, 第二天清晨向培养瓶中加入等浓度的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 中和, 经淀粉碘化钾试剂滴定为无色后, 可以加入营养盐。

营养盐基础配方: Na_2NO_3 120 g, KH_2PO_4 4 g; 硅藻培养增加 Na_2SiO_3 5g, $\text{FeC}_5\text{H}_5\text{O}_7$ 2.5 g; 扁藻培养增加 $\text{FeC}_5\text{H}_5\text{O}_7$ 0.5 g, 金藻培养增加维生素 B_1 100 mg, 维生素 B_{12} 0.5 mg。上述营养液溶于 1 000 mL 蒸馏水中, 配置成母液备用, 使用时每升水加上述母液 1 mL。

接种: 选择藻液颜色正常, 镜检藻细胞形状规则、分裂正常、无污染, 处于指数生长期的藻种, 按照 1:5~1:10 的比例一次性将培养瓶加满。

在自然温度和光照下培养, 每天上午 10:00

和下午 15:30 测定温度和光照, 温度和光照为每天两次测量的平均值。培养用水与育苗用水相同, 是经过沙滤的自然海水。

1.4 计数和计算

每 3 d 取样一次, 在显微镜下用血球计数板计数藻细胞数量, 每个样品计数 4 次。通过公式 $\text{SGR} = 100 \times (\ln N_t - \ln N_0) / t$ 计算特定增长率; $\text{RGR} = (N_t - N_0) / N_0$ 计算相对增长率; $\text{AGR} = N_t / N_0$ 计算绝对增长率。其中 N_t 和 N_0 分别指培养到时间 t 和开始时的藻细胞数量 (万/mL), t 指培养时间 (d)。

1.5 统计分析

应用 SPSS11.0 进行方差分析 (ANOVA), 用 S-N-K 进行多重比较。

2 结果

2.1 温度和光照条件对单细胞藻生长的影响

温度和光照是影响单细胞藻生长的两个关键

因子。本实验中饵料室没有升温设施,但棚顶采用透光性较好的玻璃缸瓦建造,室内采光和保温性较好。温度和光照主要取决于天气情况,实验期间变化幅度较大,变化范围为 18.6 ~ 33.8℃,平均温度 25.8℃;光照范围为 3 785 ~ 32 500 lux,平均为 17 062 lux。

2.2 充气对几种饵料单胞藻生长的影响

不同培养条件下几种饵料单胞藻的生长曲线如图 2 所示。几种饵料微藻在充气 and 摇瓶两种培养模式下生长相差很大。

硅藻在前 2 d 培养中两种生长模式相差不大(图 2A),第 5 d 开始出现差异($F = 11.860, P = 0.014 < 0.05$) (表 1),不同培养模式的特点生长率(SGR)、相对生长率(RGR)和绝对生长率(AGR)分别为 56.63,51.50;16.0,12.1 和 16.97,13.13。8 d 后出现显著差异($F = 592.206, P = 0.000 < 0.01$),传统摇瓶法的培养密度(对照组,下同)为 635 万/mL,而充气组(实验组,下同)的藻细胞密度为 1670 万/mL,是对照组的 2.63 倍,

SGR,RGR 和 AGR 分别是对照组的 1.33,2.76 和 2.67 倍(表 2)。对照组在第 11 d 达到最大值,藻细胞密度为 930 万/mL,然后开始下降,而实验组藻细胞仍在指数增长期,到第 14 d 达到最大值 2 957 万/mL,RGR 和 AGR 都达到最大值,此时对照组已经达到终止期,藻细胞密度已经有所下降。

金藻 3011 的生长曲线如图 2B 所示。培养第 2 d 实验组和对照组藻细胞就出现显著差异($P < 0.05$),第 5 d 以后差异均为极显著($P < 0.01$) (表 1)。对照组藻密度在第 11 d 时达到最大值为 262 万/mL,实验组藻细胞密度推迟 3 d,在第 14 d 达到最大值为 1 700 万/mL,此时 SGR,RGR 和 AGR 分别是对照组的 1.8,10.8 和 9.8 倍。可见,增长效果非常明显。

金藻 3012 实验组和对照组的生长曲线(图 2C)与 3011(图 2B)略有不同。在培养 5 d 内两个处理组差异不显著($F = 0.027, P = 0.875 > 0.05$),培养 8 d 后出现极显著差异($P < 0.01$)。对照组和实验组藻细胞数量都是在第 11 d 时达到

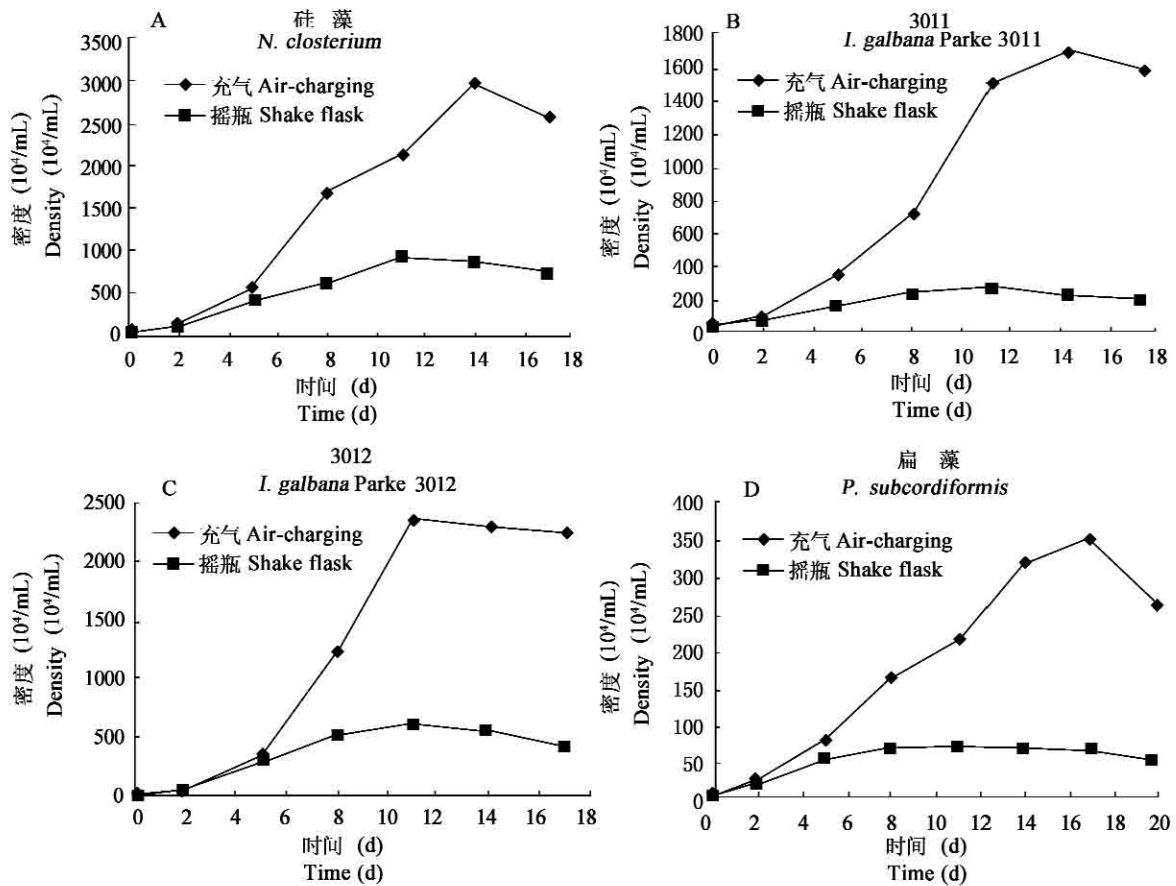


图 2 不同处理下 4 种饵料单胞藻的生长曲线

Fig. 2 Growth curve of 4 microalgae in different treatments.

最大值,分别为 575 万/mL 和 2 355 万/mL,以后对 验结束时藻细胞密度为 2 275 万/mL,SGR,RGR 和 对照组出现明显的下降,而实验组基本保持不变,实 AGR 分别为对照组的 1.6,7.9 和 7.0 倍(表 2)。

表 1 不同处理下 4 种饵料单胞藻生长密度方差分析结果 ($n=8$)Table 1 ANOVA results of 4 microalgae cell density in different treatments ($n=8$).

种类 Species	统计指标 Statistical index	0 d	2 d	5 d	8 d	11 d	14 d	17 d	20 d
硅藻 <i>N. closterium</i>	F	0.03	0.70	11.86	592.21	468.36	2 635.76	1 063.23	
	P	0.88	0.44	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	
3011 <i>I. galbana</i> Parke 3011	F	4.50	7.18	49.37	748.43	1 163.47	1 319.43	1 300.93	
	P	0.08	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
3012 <i>I. galbana</i> Parke 3012	F	3.03	0.26	0.03	504.63	3 234.90	3 284.70	3 078.14	
	P	0.13	0.63	0.88	0.00	0.00	0.00	0.00	
扁藻 <i>P. subcordiformis</i>	F	2.17	5.24	18.14	507.26	717.87	3 558.09	4 001.59	373.72
	P	0.19	0.06	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

表 2 不同处理 4 种饵料单胞藻生长情况的比较

Table 2 Comparison of growth rate of 4 microalgae between experiment group and control group.

种类 Species	培养 时间 Cultivation time	瞬时生长率 SGR(%/d) Special growth rate(%/d)			相对生长率 RGR(%) Relative growth rate(%)			绝对生长率 AGR(%) Absolute growth rate(%)		
		充气 Bubbling	摇瓶 Shaking	R1	充气 Bubbling	摇瓶 Shaking	R2	充气 Bubbling	摇瓶 Shaking	R3
<i>N. closterium</i>	2	64.55	59.45	1.09	2.6	2.3	1.15	3.64	3.28	1.11
	5	56.63	51.50	1.10	16.0	12.1	1.32	16.97	13.13	1.29
	8	49.05	36.78	1.33	49.6	18.0	2.76	50.61	18.96	2.67
	11	37.86	30.21	1.25	63.4	26.8	2.37	64.39	27.76	2.32
	14	32.11	23.56	1.36	88.6	26.1	3.40	89.61	27.07	3.31
	17	25.60	18.29	1.40	76.6	21.4	3.58	77.64	22.39	3.47
3011 <i>I. galbana</i> Parke 3011	2	104.59	79.26	1.32	7.1	3.9	1.83	8.10	4.88	1.66
	5	71.16	50.09	1.42	34.1	11.2	3.03	35.10	12.24	2.87
	8	53.42	36.27	1.47	70.8	17.2	4.12	71.80	18.20	3.95
	11	45.50	27.66	1.65	148.2	20.0	7.42	149.20	20.96	7.12
	14	36.68	20.42	1.80	169.0	16.4	10.28	170.00	17.44	9.75
	17	29.80	16.65	1.79	157.5	16.0	9.87	158.50	16.96	9.35
3012 <i>I. galbana</i> Parke 3012	2	87.89	76.12	1.15	4.8	3.6	1.34	5.80	4.58	1.27
	5	67.69	63.70	1.06	28.5	23.2	1.23	29.50	24.17	1.22
	8	60.35	47.23	1.28	124.0	42.8	2.90	125.00	43.75	2.86
	11	49.65	35.18	1.41	234.5	46.9	5.00	235.50	47.92	4.91
	14	38.91	27.39	1.42	231.0	45.3	5.10	232.00	46.25	5.02
	17	31.92	20.48	1.56	226.5	31.5	7.19	227.50	32.50	7.00
扁藻 <i>P. subcordiformis</i>	2	97.30	77.53	1.25	6.0	3.7	1.62	7.00	4.71	1.48
	5	65.92	53.58	1.23	26.0	13.6	1.92	27.00	14.57	1.85
	8	49.71	36.90	1.35	52.3	18.1	2.88	53.33	19.14	2.79
	11	38.75	27.23	1.42	70.0	19.0	3.68	71.00	20.00	3.55
	14	33.24	21.09	1.58	104.0	18.1	5.73	105.00	19.14	5.49
	17	28.00	16.72	1.67	115.7	16.1	7.17	116.67	17.14	6.81
	20	22.31	13.30	1.68	85.7	13.3	6.45	86.67	14.29	6.07

注:R1,R2 和 R3 分别表示试验组和对照组 SGR,相对生长率和绝对生长率的比值

Note: R1, R2 and R3 are the ratios of special growth rate, relative growth rate and absolute growth rate of experiment group to control group, respectively.

扁藻实验组和对照组的生长曲线如图 2D 所示。培养到第 5 d 后两者开始显现出显著差异($P < 0.01$),对照组在第 11 d 藻细胞数量达到最大值为 70 万/mL,实验组高峰期推迟 6 d,在第 17 d 时达到最大值为 350 万/mL,此时 SGR, RGR 和 AGR 分别为对照组的 1.7, 7.2 和 6.8 倍(表 2)。

2.3 用充气培养的二级藻种进行大池生产效果

用充气培养获得的一级、二级藻种进行大池生产,采用一次性接种的方法,接种 6 桶硅藻(18.9 L,藻细胞密度为 3 000 万/mL)到事先处理好的约 6 m³的消毒海水中,初始密度为 55 万/mL;金藻 3011 和 3012 各接种 4 桶(藻细胞密度为 1 500 万/mL 左右),初始浓度分别为 18 万/mL 和 21 万/mL。几种藻类生产效果如图 4 所示,硅藻的细胞数量在 4 d 时达到 175 万/mL,接近生产投喂的饵料浓度,第 7 d 达到最大值 470 万/mL,最佳投喂时间为第 5 ~ 10 d,藻细胞密度超过 300 万/mL。两种金藻的生长相对缓慢,但也在第 6 d 左右达到较适宜的投喂密度 200 万/mL,最佳投喂时间为第 6 ~ 11 d,持续时间 6 d。

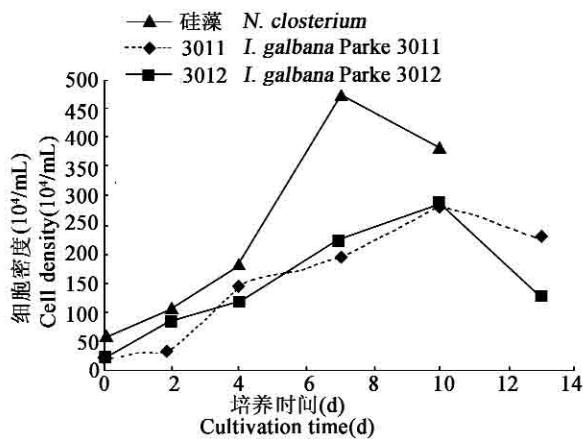


图 3 用充气培养的二级藻种进行大池生产效果

Fig. 3 Results of large-scale cultivation using the microalgae seed from air-charging incubation.

3 讨论

单细胞藻类培养是贝类育苗的基础,是决定贝类育苗成败的关键,但是影响单细胞藻类生长的因素较多,如温度、光照、营养盐和碳源等^[6-8]。曹善茂等^[7]的研究表明添加碳源(NaHCO_3)能有效提高单细胞藻的培养密度,添加 400 mg/L

NaHCO_3 能使新月菱形藻藻细胞的密度从 300 万/mL 提高到 520 万/mL;添加 600 mg/L NaHCO_3 能使金藻 3011 的藻细胞密度从 300 万/mL 提高到 750 万/mL。使用不同培养方法,氮源对单细胞藻类的生长也具有一定的影响^[9, 10]。

在单细胞藻类培养过程中,充气可以使藻细胞和其表面周围的营养物质(C、N、P)进行充分的混合,尽管空气中 CO_2 的浓度很低($3 \times 10^{-6} \sim 4 \times 10^{-6}$),但普遍认为充气可以向培养介质提供无机碳(CO_2)^[11]。Margalef 等^[12]认为充气能给培养介质中增加辅助能量(subsidiary energy)。Aguilera 等^[13]的研究表明辅助能与单细胞藻类的生产率具有相关性,藻细胞对氮营养盐的吸收率与充气带入的辅助能呈直线相关。Jimenez 等^[14]的研究表明在相同的无机碳浓度下,充气和不充气对 *Dunaliella* 的培养差异显著,充气能显著提高该藻的生长速率,甚至在不充气培养的无机碳浓度是充气培养的 4 倍时,这种差异仍然存在。

李元广等^[15]的研究也表明,在立袋式培养系统中,增大通气量可使三角褐指藻的培养密度增大且使培养后期的藻细胞死亡速率明显减小。通气量由 4 L/min 增加至 48 L/min 的通气量下,藻细胞最高密度由 560 万/mL 增加至 672 万/mL,增加了 20%,藻细胞密度达到最大值后的死亡速率由 605.5 万/mL/d 下降为 92.3 万/mL/d。本文的研究结果也表明充气能大幅度提高几种单细胞藻类的培养密度,可以使新月菱形藻、金藻 3011、3012 和扁藻的最大培养密度分别达到 2 957 万/mL, 1 700 万/mL, 2 355 万/mL 和 350 万/mL,远远超过常规方法培养的水平。

参 考 文 献

- [1] 刘延晓. 浅谈单细胞藻类的培养及在海水育苗中的不同效果[J]. 齐鲁渔业, 2007, 2: 3-4.
- [2] 周朝生. 饵料对青蛤 *Cyclina sinensis* (Gmelin) 人工育苗幼虫生长的影响试验[J]. 现代渔业信息, 2006, 21(7): 35-36.
- [3] 吴松. 单细胞藻类培养中敌害生物的防治试验[J]. 齐鲁渔业, 2007, 2: 1-3.
- [4] 刘青. 微绿球藻的培养及保存技术[J]. 水产养殖, 2007, 3: 35-37.
- [5] 朱艺峰, 林霞, 朱鹏, 等. 混合氮源对扁藻与金藻共培养和单种培养生长的影响[J]. 海洋科学, 2006, 34(8): 34-40.
- [6] 刘春光, 金相如, 邱金泉, 等. 光照与磷的交互作用对两种淡水藻类生长的影响[J]. 中国环境科学, 2005, 25

- (1): 32-36.
- [7] 曹善茂. 碳酸氢钠在单胞藻生产性培养中的应用[J]. 大连水产学院学报, 1997, 12(3): 52-58.
- [8] 叶林超, 叶均安, 徐国忠, 等. 碳酸氢铵等不同氮源对小球藻生长的影响[J]. 水产科学, 2007, 6: 319-322.
- [9] 梁 英, 麦康森, 孙世春, 等. 不同的营养盐浓度对三角褐指藻生长的影响[J]. 海洋湖沼通报, 1999, 4: 43-47.
- [10] 何振平, 王秀云, 樊晓旭, 等. 温度和光照对塔胞藻生长的影响[J]. 水产科学, 2007, 4: 218-221.
- [11] Rodriguez-maroto J M, Jimenez C, Aguilera J, et al.. Air bubbling results in carbon loss during microalgal cultivation in bicarbonate-enriched media: experimental data and process modeling[J]. Aquacultural Engineering, 2005, 32(3-4): 493-508.
- [12] Margalef R. Life-forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment[J]. Oceanol. Acta, 1978, 1: 493-509.
- [13] Aguilera J, Jiménez C, Rodríguez-Maroto J M, et al.. Influence of subsidiary energy on growth of *Dunaliella viridis* Teodoresco; the role of extra energy in algal growth[J]. J. Appl. Phycol., 1994, 6: 323-330.
- [14] Jiménez C, Mercado J, Aguilera J, et al.. Effect of turbulence and inorganic carbon supply on growth of *Dunaliella viridis* Teodoresco[J]. Int. J. Salt Lake Res., 1995, 4:223-232.
- [15] 李元广, 杨 东, 程 鑫, 等. 封闭式光生物反应器中饵料微藻的高密度培养[A]. 见: 国家 863 计划资源环境技术领域第三届“海洋生物高科技论坛”论文集[C], 2005, 323-330.

【新书推介】



《畜牧投资纵向一体化项目管理 及评价指标体系创新》

杨秋林 主编 中国农业科学技术出版社

出版日期: 2007.3

I S B N: 9787802332164

定 价: 28.00 元

开 本: 16 开

页 数: 378 页

受国家自然科学基金资助, 中国农业大学杨秋林教授等历时三年, 先后在内蒙古、河北、天津、山东、福建、北京、广西等省(区、市)进行了调查研究, 并对山东春雪集团肉鸡纵向一体化项目和福建上杭槐猪产业纵向一体化项目的管理及评价进行了深入的定点调研, 同时搜集查阅了大量相关文献资料, 形成了研究性专著《畜牧投资纵向一体化项目管理及评价指标体系创新》。

为适应农业产业结构调整、农业产业化经营以及市场经济新形势的要求, 我国畜牧业投资项目正在经历一场政府主导型制度变迁, 这不仅仅是项目管理的问题, 更是一场深刻的产业革命。

该书通过案例分析方法、数理模型分析与计量模型分析、模糊综合评价方法、层次分析法、对比分析法等五种方法, 提出了六个相关概念的界定, 指出畜牧投资纵向一体化项目设计理念的创新必须以“项目产出品”的市场需求”为中心; 遵

循一体化的项目设计思想, 构建完整产业链, 应注重一体化项目各环节的协调及整体运作, 实现项目整体效益最大化和不同环节利益主体的利益协调; 项目设计要充分发挥区域优势。

作者运用产权经济学理论, 探讨了畜牧投资纵向一体化项目组织模式的发展方向, 针对现实中的实际问题, 提出畜牧投资纵向一体化项目组织机制在五个方面的创新, 畜牧投资纵向一体化项目营销管理应该以关系营销理论为指导并以此贯穿畜牧投资纵向一体化项目管理的全过程。作者通过认真研究国内外项目纵向一体化发展理论、项目评价方法和理论, 结合新形势下不同用户对畜牧业纵向一体化投资项目的评价指标需求和这类项目的特点, 并在大量实际案例研究的基础上, 提出改进的评价方法和指标体系, 使其更具科学性和针对性, 以提高投资决策水平服务。