

纤细角毛藻培养条件优化

田治立¹, 王长海¹, 于贞², 金海珠²

(1. 大连理工大学生物工程系, 辽宁 大连 116023 2. 烟台大学海洋生化工程研究所, 山东 烟台 264005)

摘要: 采用正交实验的方法, 对影响纤细角毛藻 (*Chaetoceros gracilis*) 生长的主要营养因素进行了优化, 获得了以海水为基础的优化培养基配方: NaHCO_3 0.15g/L, $\text{Na}_2\text{SiO}_3(9\text{H}_2\text{O})$ 0.20g/L, NaNO_3 1.00g/L, KH_2PO_4 0.02g/L, VB_1 2.7mg/L, VB_{12} 1.5 μg /L。实验表明, 用该优化配方培养纤细角毛藻具有生长速度快、产量高的显著优势, 为该微藻在光生物反应器中的进一步高密度培养提供了良好条件。

关键词: 纤细角毛藻 (*Chaetoceros gracilis*); 培养; 优化

中图分类号: Q949.27 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2005)02-0005-03

纤细角毛藻 (*Chaetoceros gracilis*) 属于硅藻门、中心藻纲、盒形藻目、角毛藻科、角毛藻属, 细胞较小, 多为 5~7 μm , 大部分呈单细胞, 有时 2~3 个细胞组成链状, 属耐高温种类, 适合夏季培养, 是双壳贝类、海胆、海参、甲壳类等幼体的优质饵料^[1~2]。目前实验室及生产上培养该微藻多为采用 f/2 配方的室外开放式培养, 存在着易受污染、培养条件难以控制、生长周期受季节限制、培养环境不稳定等缺点导致培养效率低、细胞密度小(室外培养密度最大仅为 $2 \times 10^6/\text{mL}$ 左右), 常因投入过多藻液使育苗池的水污染, 进而影响育苗水质, 特别是投入被污染和老化的饵料时更为严重^[3~4]。与之相比, 密闭式光生物反应器培养由于具有光能、 CO_2 利用率高、培养条件易于控制、产率高并可实现无菌培养等优点, 成为近年来研制和开发的热点, 而气升环流式光生物反应器则是其中的典型代表^[5]。作者对影响角毛藻生长的主要营养因素进行了优化, 为提高纤细角毛藻的生物量产量从而为该藻在气升环流式光生物反应器中的进一步高密度培养奠定基础。

1 材料与方法

1.1 藻种

实验用纤细角毛藻由青岛海洋大学微藻种质库提供。

1.2 培养基

微藻海水基础培养基 SBM: NaHCO_3 0.04g/L, $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 0.03g/L, NaNO_3 1.20g/L, KH_2PO_4

0.12g/L, VB_1 0.9mg/L, VB_{12} 0.5 μg /L, f/2 微量元素 1mL/L (ZnSO_4 23mg, MnCl_2 178mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 10mg, $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 3.9g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 7.3mg, $\text{oCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 12mg, Na_2EDTA 4.35g, 蒸馏水 1000mL 配制), 过滤海水配制。

f/2 培养基: NaNO_3 74.8mg/L, NaH_2PO_4 4.5mg/L, f/2 维生素 1mL/L (VB_1 100mg, VB_{12} 0.5mg, 生物素 500mg, 蒸馏水 1000mL 配制), f/2 微量元素 1mL/L, 过滤海水配制, 海水取自烟台近海, pH 约 8.3。

1.3 接种

取培养至对数生长末期之藻液适量, 然后于无菌室接种。

1.4 培养条件

正交实验采用 300mL 三角瓶(150mL 培养基)在 ZPG-350 型智能光照培养箱中进行, 光照 4000lx, 光暗时间比为 14:10, 温度为 $23^\circ\text{C} \pm 0.2^\circ\text{C}$, 每天摇瓶 3 次。对照实验在 1000mL 三角瓶(800mL 培养基)中进行, 通气量 $25 \times 10^6 \text{m}^3/\text{s}$, 光照为 6000lx。放大实验在

收稿日期: 2003-06-12; 修回日期: 2004-01-15

作者简介: 田治立(1977-), 男, 河南永城市人, 硕士研究生, 研究方向: 海洋微藻的高密度培养, E-mail: tzlzhm@vip.sina.com; 王长海, 通讯作者, E-mail: chwang2001@sina.com



10 L 广口瓶 (8 L 培养基) 中进行, 通气量 $133 \times 10 \times 6 \text{ m}^3/\text{s}$, 光照为 8000 lx, 对照及放大实验均在 22 °C 下进行。

1.5 藻体细胞测量

藻体细胞计数: 培养液经适当稀释后以血球计数板计数。藻体细胞生物量干质量测量: 取 10 mL 培养液于 4500 r/min 转速下离心 15 min 后弃上清液, 以 pH = 4 的酸化水洗 2 遍后用 Pall A/B 膜过滤, 于 105 °C 烘至恒质量后以精密分析天平称量。

生长参数计算^[6]: 比生长常数 $K = 2.303(\lg N - \lg N_0)/t$

平均世代 $T = 0.693/K$

N_0 是起始细胞密度; N 是经过 t 时间的细胞密度; t 代表生长时间, 单位为 d。

2 结果与讨论

2.1 纤细角毛藻培养条件优化

实验表明, Na_2SiO_3 , KH_2PO_4 等对角毛藻生长影响较大, 在光强、温度等培养条件固定的情况下, 以海水为基础, 针对 KH_2PO_4 、 NaNO_3 、 Na_2SiO_3 、 $\text{VB}_1/\text{VB}_{12}$ 、 NaHCO_3 等主要因素设计了五因素四水平正交实验 $L_{16}(4^5)$ 水平安排及实验结果分别见表 1 表 2。

表 1 正交试验因素水平

Tab.1 Factors and levels of orthogonal tests

| 水平 | 因素 | | | | |
|----|---------------------------|--|-----------------------------------|--------------------------|--|
| | NaHCO_3 (g/L) | $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (g/L) | KH_2PO_4 (g/L) | NaNO_3 (g/L) | VB_1 (mg/L) VB_{12} (μg /L) |
| 1 | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.20 | 0.09 0.05 |
| 2 | 0.05 | 0.10 | 0.08 | 1.00 | 0.45 0.25 |
| 3 | 0.10 | 0.20 | 0.15 | 2.00 | 1.35 0.75 |
| 4 | 0.15 | 0.30 | 0.25 | 3.00 | 2.70 1.50 |

表 2 方差分析结果

Tab.2 Variance analysis of orthogonal tests

| 方差来源 | 方差平方和 | 自由度 | 均方 | F 比 | 显著性 |
|------------------------------|--------|-----|-------|-------|-----|
| KH_2PO_4 | 61.57 | 3 | 20.52 | 14.45 | ** |
| Na_2SiO_3 | 38.99 | 3 | 13.00 | 9.15 | * |
| NaNO_3 | 9.92 | 3 | 3.31 | 2.33 | |
| NaHCO_3 | 6.49 | 3 | 2.16 | 1.5 | |
| $\text{VB}_1/\text{VB}_{12}$ | 2.02 | 3 | 0.67 | 0.475 | |
| 误差 | 8.52 | 6 | 1.42 | | |
| 总和 | 127.51 | 21 | | | |

注: $F_{0.05}(3, 6) = 4.76$, $F_{0.01}(3, 6) = 9.78$; ** 表示高度显著, * 表示显著, 每组实验设三个平行样, 最终结果取其平均值。

由表 2 可见, KH_2PO_4 对纤细角毛藻生长的影响高度显著, $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 影响显著, 其它因素影响不显著, 数据直观分析表明五因素对该藻生长影响程

度为 $\text{KH}_2\text{PO}_4 > \text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O} > \text{NaNO}_3 > \text{NaHCO}_3 > \text{VB}_1/\text{VB}_{12}$ 。通过对各因素和水平的优化比较, 获得下述优化配方: $\text{NaHCO}_3 0.15 \text{ g/L}$, $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O} 0.20 \text{ g/L}$, $\text{NaNO}_3 1.00 \text{ g/L}$, $\text{KH}_2\text{PO}_4 0.02 \text{ g/L}$, $\text{VB}_1 2.7 \text{ mg/L}$, $\text{VB}_{12} 1.5 \mu\text{g/L}$ 。

2.2 优化配方的验证

2.2.1 不同培养基的对比培养

为验证优化配方, 与其它培养基进行了对照实验, 共培养 7 d, 结果如表 3 所示。

结果显示, 优化配方具有很大的生长优势, 各项指标均比对照组高, 其中细胞培养终了密度分别是海水基础和 f/2 培养基的 3.08 ~ 7.55 倍, 生物量则分别比对照组高 2.37 ~ 4.92 倍, 反映细胞生长速度的比生长常数则分别是对照组的 1.36 ~ 1.94 倍。细胞在优化配方中的生长具有延迟期不明显, 指数生长期

表 3 纤细角毛藻在不同培养基中的培养效果

Tab.3 The cultivation result of *Chaetoceros gracilis* in different medium

| 培养基 | 起始密度 ($\times 10^4/\text{mL}$) | 培养密度 ($\times 10^4/\text{mL}$) | 比生长常数 (d^{-1}) | 平均世代 (h) | 生物量 (g/L) |
|------|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|-------------|--------------|
| 优化配方 | 60 | 4000 | 0.60 | 27.72 | 0.64 |
| 海水基础 | 60 | 1300 | 0.44 | 37.90 | 0.27 |
| f/2 | 60 | 530 | 0.31 | 53.48 | 0.13 |



长,在整个培养期中生长迅速等优点,特别是培养至第7天,当对照组进入稳定期后优化组仍有显著增长。

2.2.2 放大培养

表4 10 L广口瓶中培养条件对纤细角毛藻生长的影响

Tab.4 Effect of cultivation conditions on growth of *Chaetoceros gracilis* in 10 L wide neck flask

| 培养基 | 起始密度 ($\times 10^4/\text{mL}$) | 培养密度 ($\times 10^4/\text{mL}$) | 比生长常数 (d^{-1}) | 平均世代 (h) | 生物量 (g/L) |
|------|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|-------------|-------------------------|
| 优化流加 | 340 | 6800 | 0.33 | 50 | 0.86 |
| 优化配方 | 340 | 5700 | 0.31 | 54 | 0.72 |
| 海水基础 | 340 | 1800 | 0.19 | 88 | 0.26 |

结果显示,放大培养中该配方的优化效果更加显著,与海水基础组相比细胞培养密度由对照培养的3.05倍提高到3.08倍、生物量由2.37倍提高到2.77倍、比生长常数则由对照培养的1.36倍提高到1.74倍。本实验还显示,微生物培养中常用的流加营养等方法也可有效用于微藻的培养研究,优化流加组细胞培养密度和生物量分别为优化组的1.20~1.21倍,海水基础组的3.64~3.31倍。

光是光生物反应器时间设计与放大过程中非常重要的工程参数^[7],一般而言,光生物反应器的采光面积与培养体积的比值(A/V)越大,就越能使其充分利用光能并实现微藻的高密度培养,从而提高整体运转效率,故目前光生物反应器设计倾向于不断向小光径,高 A/V 比发展^[8]。与对照实验($A/V = 40.14\text{m}^2/\text{m}^3$)相比,放大培养($A/V = 22.40\text{m}^2/\text{m}^3$)具有较小的 A/V 比和通气量,却能获得更好的培养效果,显然取决于高光强和好的通气效果(装有气体分布器,使得培养系统内能产生更大的湍流强度获得更好的混合效果从而提高了藻体细胞的光能利用率)这也说明了光照强度和通气混合效果对该藻的生长影响很大。本实验室所拥有的PhR-L20C气升式光生物反应器具有 A/V 比高(大于 $50\text{m}^2/\text{m}^3$)、通气效果好、光照强度高(最大可达20000 lx)等显著优点,因此可以预期该藻在反应器中培养条件的进一步优化会达到更高的培养密度。

与陆地微生物相比,绝大部分微藻仅能利用无机盐进行光合自养生长,其生长速度比较慢,细胞生物量产量也比较低^[9],如何解决这个问题是实现微藻高密度培养的关键技术。作者的研究结果表明,与普通微生物培养相似,通过对主要营养及培养条件的优化

为进一步检验该配方的优化效果,作者在10L广口瓶中进行了放大培养实验,实验共设优化、优化流加、海水基础等三组,结果如表4所示,其中优化流加组为在优化配方培养的第4天流加一倍营养盐。

以及利用流加营养等微生物培养常用方法也能地有效提高微藻的生长速率和生物量产量。

3 结论

(1)通过对主要营养元素的优化,获得了以海水为基础,稳定高产的纤细角毛藻培养基优化配方: KH_2PO_4 0.02 g/L, $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 0.20 g/L, NaHCO_3 0.15 g/L, NaNO_3 1.0 g/L, VB_1 2.7 mg/L, VB_{12} 1.5 $\mu\text{g/L}$ 。

(2)对照实验表明与海水基础及1/2培养基相比,用优化配方培养该藻具有生长速度快,生物量产量高的显著优势,为该藻在光生物反应器中实现大规模高密度培养奠定了良好基础。

(3)微生物培养常用的培养条件优化,流加等方法也适用于微藻的培养研究。

参考文献:

- [1] 梁象秋,方红组,杨和荃.水生生物学[M].北京:中国农业出版社,1995.56-58.
- [2] 孙颖民,石玉,郝彦周,等.水生生物饵料培养实用技术手册[M].北京:中国农业出版社,2000.24-26.
- [3] 梁英,麦康森.不同培养基对纤细角毛藻生长的影响[J].海洋科学,2001.25(1):16-17.
- [4] 王丽卿,黄旭雄.不同营养盐浓度下微绿球藻生长及水体中氮磷的变化[J].上海水产大学学报,2002,11(3):215-218.
- [5] 王长海,欧阳藩,周碱.光生物反应器及其研究进展[J].海洋通报,1998,17(6):79-83.
- [6] Sunda W, Guillard R R L. The relationship between cupric ion activity and the toxicity of copper to phytoplankton[J]. J Mar Res, 1976, 24(4): 511-529.

(下转 36 页)

(上接第7页)

[7] Ogbonna J C. Light supply coefficient: A new engineering parameter for photobioreactor design[J]. **J Ferment and Bioeng**, 1995, **80**(4): 369 – 376.

[8] Richmond A. Efficient utilization of high irradiance for

production of photoautotrophic cell mass: a survey[J].

J Appl Phycol, 1996, 8: 381 – 387.

[9] 王长海, 温少红. 紫球藻培养条件优化[J]. 化工冶金, 1999, **20**(3): 272 – 277.

Optimization of culture condition for *Chaetoceros gracilis*

TIAN Zhi – li¹, WANG Chang – hai¹, YU Zhen², JIN Hai – zhu²

(1. Institute of Bioengineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China; 2. Institute of Marine Bioengineering, Yantai University, Yantai 264005, China)

Received: Jun., 12, 2003

Key words: *Chaetoceros gracilis*; culture; optimization

Abstract: Major nutrient factors were optimized by means of orthogonal tests. The optimum medium was obtained: NaHCO₃ 0.15g/L, Na₂SiO₃ · 9H₂O 0.20 g/L, NaNO₃ 1.00g/L, KH₂PO₄ 0.02 g/L, VB₁ 2.7 mg/L, VB₁₂ 1.5μg/L, which evidently increased the growth speed and cell biomass productivity of *Chaetoceros gracilis* compared to well-known medium f/2. The new media established a basis for high density culture of *Chaetoceros gracilis* in airlift loop photobioreactor.

(本文编辑 张培新)