

国外扁藻连续性培养的现状

周光正

(山东省海水养殖研究所, 青岛 266002)

单胞藻是动物体的基础饵料, 海水养殖的发展在很大程度上依赖单胞藻, 而扁藻广泛应用于贝苗和虾苗生产中。本文集有关国外扁藻培养的生长、生态因子和生产性分析方法的有关文献、资料, 借此向读者作一介绍, 可以他山之石, 为我所用。

1 扁藻的生长

扁藻的生长可以分为生长潜伏期、指数生长期、稳定生长期和生长下降期。

1.1 生长潜伏期

接种在新鲜的培养基中, 并不能立即生长繁殖。

1.2 指数生长期

扁藻细胞代谢活泼, 细胞以最高的速度增长, 其化学、形态和生理性质比较一致, 细胞数目按几何级数增加: $1 \rightarrow 2 \rightarrow 4 \rightarrow 8$ 即 $2^0 \rightarrow 2^1 \rightarrow 2^2 \rightarrow 2^3 \rightarrow \dots \rightarrow 2^n$ 。其生长速度与培养物的浓度成比例。

$$C = C_0 2^{ut} \quad (1)$$

$$u = \frac{\log C - \log C_0}{(t - t_0) \log 2} \quad (2)$$

其中, u 为单位时间的细胞分裂数; C 为时间 t 的细胞浓度; C_0 为时间 t_0 的细胞浓度, 在指数生长期 $u > 0$ 。

(1)式更改为: $C = C_0 e^{Kt}$

其中 K 为环境容纳量(饱和常数)。从生物学意义来说 K 值是单位时间细胞分裂的极限, 从几何意义来说 K 值是罗辑斯谛方程(Logistic)的渐近线。 K 值是时间的倒数。

1.3 稳定生长期

此时培养基的营养盐逐渐减少, 积累了有害的代谢, 从而使细胞分裂数减少, 以致增殖细胞数和死亡的细胞数达到平衡状态, 生物量维持平衡, 在稳定生长期 $u = 0$ 。

1.4 生长下降期

扁藻细胞死亡速度超过生长速度, 在生长下降期 u

< 0 。扁藻在稳定的环境条件下, 即采用不断增添营养物和排除相同体积培养液, 使 pH、营养物质浓度、代谢产物基本保持恒定, 生长方程曲线一般即为罗辑斯谛方程:

$$N = \frac{K}{1 + e^{-at}}$$

其中 N 为种群数量, a, b 为常数。罗辑斯谛方程说明, 扁藻增长有其极限, 最终将趋于稳定平衡点。

2 影响大量培养扁藻的生态因子

1981 年 Laing, I. [3] 和 Helm, M. M. 将扁藻保持在 200L 容器中, 用 80W 日光灯在池内进行照射, 补充新鲜的培养基达到日收获量 400 细胞/μl, 并且用 4~8 支日光灯分别照射作试验, 发现用 6 支日光灯照射效果最佳。细胞分裂率(K)回归方程式为:

$$K = a \cdot e^{PHCD \cdot b}$$

K 为细胞分裂率, PHCD 为最后收获的细胞密度; a, b 为回归系数。

在 6 支日光灯照射下, 分别在 2~11 周后接种进行培养试验, 结果见表 2。长期的培养并没有观察到有污染。在 18~22℃ 范围内, 温度对生产并没有影响, 但是如果 CO_2 提供的不充分, 维持 pH 不足 7.8 就会减产。在 200L 池内照射的水体, 生产成本约比 20L 水体减少 1/5。

1985 年 Fabregas, J. [2] 等用 $NaNO_3$ 4 种浓度: 2, 4, 8, 16mmol/L (盐度 35) 进行扁藻的大量培养试验。以 15L/min 充气维持 CO_2 , 使 pH < 8.4。利用 4 次非线性最小二乘法得到细胞密度回归方程式为:

$$f(t) = a + bt + ct^2 + dt^3 + et^4$$

$f(t)$ 为细胞密度或蛋白质数/ml 或碳水化合物/ml 或叶绿素/ml; t 为时间(d); a, b, c, d, e 为回归系数。 $NaNO_3$ 分别用 8 和 16mmol/L 扁藻获得了最大细胞浓度为 7.83×10^6 和 7.15×10^6 细胞/ml。蛋白质最大值达到 306μg/ml 或 59.8 色素/细胞。在营养浓度增加时, 硝酸盐转化为蛋白质的效率就减少, 这说明, 营养浓度 2mmol/L

NaNO₃可以获得最低的成本费用。叶绿素 a/细胞在稳定生长期达到 3.1~3.8 色素/细胞。叶绿素 a 含量的变化和氮的用量有关。碳水化合物/细胞在指数生长期和稳定生长期是不变的,在 19.84~28.68 色素/细胞之间,而且和氮的用量无关。RNA/细胞变动在 4.17~

5.48 色素/细胞之间(除了 NaNO₃在 2mmol/L 以外)。DNA/细胞含量在试验的全部营养浓度中是不变的,只在 0.1~1.09 色素/细胞之间变动。可见大量培养扁藻一定要紧密结合营养浓度的变化,否则就会影响扁藻作为海水养殖饲料的营养价值。

3 扁藻培养的生产分析

1990 年 Camacho, F. 等^[1]作藻连续性培养(即把藻种连续地转移到新鲜培养基中,并不断地排除相同体积的培养液,使接种和输出保持恒定,而延长指数生长期),其营养浓度为:NaNO₃ 2mmol/L, NaH₂PO₄ 100mmol/L, ZnCl₂ 1μmol/L, MnCl₂ 1μmol/L, Na₂MoO₄ 1μmol/L, CO₂ 0.1μmol/L, CuSO₄ 0.1μmol/L, 柠檬酸铁 20μmol/L, 三盐酸 5μmol/L, 然后加 HCl 调整 pH=8。连续培养设备的设置为:1. 海水泵;2. 营养盐水塔;3. 沉淀池;4. 流量压缩机;5. 消毒过滤器;6. 培养的水体;7. 调节培养深度的溢流;8. 培养采集瓶;9. 循环泵;10. 热量交换器;11. 冰箱;12. 冷/热恒温水槽;13. 热度计;14. 恒温流循环泵;15. CO₂气缸;16. 压力调节器;17. 流量计;18. 压缩机;19. 增湿器;20. 增湿器的恒温调节泵;21. 调节湿度的温度计;22. 无菌空气过滤器;23. 气体分配器;24. 经调节恒温流循环泵作控制生物量温度的温度计。

在非稳定状态连续系统中,按照生物量相平衡原理来计算细胞平均生长率为:

$$G_m = F \cdot C + \left(\frac{dc}{dt}\right) \cdot V$$

假定池中已充分地混合,产生的生物量用如下方程来计

算:

$$F \cdot C = \frac{F}{t_e - t_0} \int_{t_0}^{t_e} C(t) dt$$

其中, $C(t)$ 为时间的多项式函数; C 为池中生物量浓度(g/L); C_0 为池中开始生物量浓度(g/L); F 为流入和流出池子的流量数(L/h); $F \cdot C$ 为产生的生物量(g/h); G_m 为生物量的平均生长率(g/h); t_e 为连续试验的结束时间(h); t_0 为连续试验的开始时间(h); V 为池中悬浮细胞的体积(L)。

池中生物量的变化由浓度-时间曲线的斜率来计算,它受生长率 μ 和稀释率 D 两因素的影响。

$$\frac{dc}{dt} = C(\mu - D)$$

其中, μ 为生长率; D 为稀释率(h⁻¹)

当 $\mu > D$, $\frac{dc}{dt} > 0$ 时,细胞浓度增大,当 $\mu < D$, $\frac{dc}{dt} < 0$ 时,细胞浓度减少,当 $\mu = D$, $\frac{dc}{dt} = 0$ 时,则 C 为常数,达到稳定状态。

细胞平均生长率 G_m 是稀释率的抛物线函数

$$G_m = aD^2 + bD + c$$

系数 $a = -9.08$, $b = 1.79$, $c = 7.33 \times 10^{-2}$, 而且稀释率 $\approx 0.09/h$ 时,则 $G_m = G_{max}$, G_{max} 为生物量最大平均生长率(g/h)。

试验还表明光强对生长的限制适合于指数形式:

$$G_m = G_{max} [1 - e^{-I_0/I_s}]$$

其中, I_0 为对养殖表面来测定的平均入射光强度(W/m²)。 I_s 为相当于饱和光强度(W/m²)。

参考文献

- [1] Camacho, F. et al., 1990. *Aquaculture* 90:75-84.
- [2] J. Fabregues et al., 1985. *Aquaculture* 49(3,4):231.
- [3] I. Laing et al., 1981. *Aquaculture* 22(1,2):137.

