

半连续培养氮磷浓度、更新率对三角褐指藻采收量的影响*

朱艺峰¹ 吴松杰² 郭小强[†]

(¹ 宁波大学水产系 315211)

(² 宁波市水产研究所 315010)

专家点评

微藻培养已经从一次性培养发展到半连续性、全连续性培养,从人工培养,发展到半自动化甚至全自动化的连续培养。如何在一个半连续,甚至全连续的培养体系中,研究各生长要素(如光强、营养盐(N、P等)、微量元素、维生素等)需求量实时动态相关与量间的关系,已是当今微藻培养研究的前沿课题,也是微藻全封闭式工厂化生产中亟待解决的问题。本刊本期发表的朱艺峰等关于《半连续培养氮磷浓度、更新率对三角褐指藻采收量的影响》一文,研究了半连续培养体系中浓度、更新率与采收量间的动态关系,从三维的角度探讨了它们的内在关系规律。文章从实验设计数据处理、结论推导,乃至逻辑性上都给人留下了作者力求严谨、求实的作风和进取创新的精神,是一篇言之有据、言之有物,不浮不夸的有质量的文章。值得读者一读。

提要 采用均匀设计,在室温下研究了半连续培养中氮、磷浓度,更新率对三角褐指藻采收量的动态变化关系。结果显示,对16 d更新期,氮、磷浓度分别在0.5~35.9 mg/L和0.3~12.1 mg/L范围对采收量无影响,但氮浓度在8 d前宜用0.5 mg/L。更新率增加,藻浓度下降,藻生长率增大。据16 d方程,最适更新率为18.2%,每ml培养体积日采收量可达667 000细胞。

关键词 三角褐指藻,半连续培养,一次性培养,更新率,均匀设计

在海水人工育苗过程中,单胞藻培养是育苗成败的主要因素之一。为获得良好的培养效果,除微量元素及微生物外,在培养液中需添加N、P营养元素。三角褐指藻(*Phaeodactylum tricostatum*)是海水人工育苗的优良饵料之一,尽管Hayward 1968年,马志珍 1983年,陈明耀 1995年^[1]曾对其生态条件、不同N源、营养盐配方作了不同程度的研究,但绝大部分研究使用了10 mg/L以上N营养浓度,而且浓度差异也较大。考虑到生产中一次性培养时间较短,生长速度较慢,或进行不同于光生物反应器的半连续培养,因此,仍按一次性培养或光生物反应器所使用的营养浓度必要性是值得怀疑的;其次,在培养过程中是否存在动态施肥的问题,以节约N、P开支。作者从三角褐指藻半连续培养着手,研究了不同N、P浓度及更新率对三角褐指藻采收量的动态变化关系,为藻类的动态施肥提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 藻种与培养

浙江品系ZS06(水滴法分离,单细胞克隆)三角褐指藻由宁波大学水产系中心实验室提供。实验所用同批海水取自宁波奉化湖头渡,盐度23.7,pH 8.1,含N 0.032 mg/L(NO_3^- -N),含P 0.007 mg/L(总P),海水经脱脂棉过滤、煮沸消毒。三角褐指藻经预培养(N:P=13.9:2.3)至指数生长期后,再经缺N、P培养液饥饿培养3 d后启动更新实验,启动浓度 $443.6 \times$

* 本实验得到蒋霞敏、陆开宏两位老师的大力支持和帮助,进修生潘传法、徐礼明和陈志银参加了部分工作,在此一并致谢。

† 郭小强,宁波大学水产系96级学生。

收稿日期:2000-01-25;修回日期:2000-03-30

10⁴ 细胞/ml。

1.2 更新培养液配制

按实验号分别配制不同水平 N (X₁, A.R. 级 NaNO₃)、P (X₂, A.R. 级 KH₂PO₄) 浓度的更新培养液。培养液中其他成分按 f₂ 培养基(不加生物素和硅酸钠),含量相同。更新培养液每 3~4 d 配制一次,每次称量所引起 N、P 浓度误差 < 0.05 mg/L。

1.3 实验方法

在 250 ml 三角烧瓶中,按实验设计的不同更新率 (X₃) 移取相应更新培养液及经饥饿培养的同瓶三角褐指藻,使最终培养体积为 200 ml (V),每组实验 3 重复。室温 9.4~15.2 °C (12.2 ± 0.5 °C, 平均值 ± 标准误)。日光灯光源,光强 1 200 ± 100 lx,光暗周期 10 h: 14 h,光照期间每日随机调换三角瓶并摇动 2~3 次。

每日定时更新并取样(更新时从各瓶已采收藻液中取),用 721 型分光光度计(上海第三分析仪器厂),以消毒海水为参比液,测定更新前藻吸光度值 (656 nm, 光程 1 cm),每瓶测定一次,3 重复取平均。更新后藻浓度按更新前藻浓度 (B) 及更新率折算。藻浓度 (C) 与吸光度值 (A) 转换公式经曲线拟合获得 (C = 1 534.824 A^{0.4}, R² = 0.999, P < 0.01)。采收量 (Y) 按 Y = V × X₃ × B 计算; 生长率 (D) 按 Fabregas 等 1985

年公式计算, K = (ln N₁ - ln N₀) / (ln 2 × T)。式中: K 表示分裂速率/d (记 dbls/d); N₁ 为实验结束时藻细胞浓度; N₀ 为实验开始时藻细胞浓度; T 为实验时间。

实验采用均匀设计 U₇(7⁴), 按使用表选择 2, 3, 4 列, 偏差 D = 0.213 2²¹。因素水平设置见表 1, 实验方案见表 2。

表 1 实验因素与水平

Tab.1 Experimental factors and their levels

水平	因素		
	X ₁ (mg/L)	X ₂ (mg/L)	X ₃ (%)
1	0.5	0.3	5.0
2	6.1	2.1	10.0
3	11.9	4.1	15.0
4	17.3	5.9	20.0
5	23.8	8.1	25.0
6	29.7	10.1	30.0
7	35.9	12.1	35.0

1.4 数据处理

数据经自然对数转换, 统计分析在 SPSS 软件包^[3]下进行, 逐步回归变量筛选按概率设置阈值 (P_m = 0.05 或 0.10)^[4], 回归方程寻优计算按方开泰^[2]介绍的网格法编程。

表 2 实验方案与结果

Tab.2 Experimental scenario and results

实验号	X ₁ (mg/L)		X ₂ (mg/L)		X ₃ (%)		Y (× 10 ⁴ 细胞)	
	水平	浓度	水平	浓度	水平	更新率	8 d	16 d
1	3	11.9	5	8.1	7	35.0	17 092.8	11 811.3
2	6	29.7	2	2.1	6	30.0	15 838.9	12 673.9
3	1	0.5	7	12.1	5	25.0	17 529.5	12 979.5
4	4	17.3	4	5.9	4	20.0	15 148.3	14 126.2
5	7	35.9	1	0.3	3	15.0	12 263.8	12 730.0
6	2	6.1	6	10.1	2	10.0	10 245.1	11 715.3
7	5	23.8	3	4.1	1	5.0	5 483.3	6 586.0

注: 8 d 或 16 d 分别代表 8 d 或 16 d 采收量平均值。

2 结果与讨论

2.1 三角褐指藻的更新浓度变化

经 16 d 更新, 三角褐指藻浓度随不同的更新率呈不同的变化, 见图 1。5% 和 10% 的浓度始终高于起始浓度, 15% 基本平衡, 20% 略有下降, 而 25%, 30%, 35% 低于起始浓度。当更新浓度降至 70 × 10⁴ ~ 140 ×

10⁴ 细胞/ml 时, 藻浓度达到相对稳定, 其他更新率浓度于第 13 天后达到稳定。培养方式不同, 藻类浓度达到稳定所需的时间明显不同, 在光生物反应器下只需 4~6 d^[5-6]。

2.2 回归方程

8 d 和 16 d 平均采收量结果见表 2, 对 8 d 和 16 d 采收量行回归, 用以分析 N、P 浓度及更新率对三角

褐指藻采收量的动态变化过程,分别得(1)和(2)方程,相应网线图见图2(a,b)。

$$Y = -2313.7 - 351.4 \ln X + 6021.1 \ln X - 76.4 \ln X \ln X, (R^2 = 0.982, P < 0.01) \quad (1)$$

$$Y = -14258.5 + 19045.1 \ln X - 3284.5 (\ln X)^2, (R^2 = 0.800, P < 0.05) \quad (2)$$

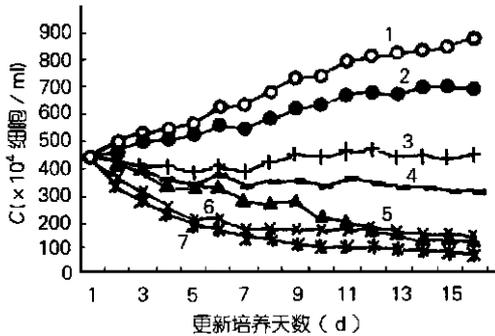


图1 三角褐指藻的更新浓度曲线

Fig.1 Cell density curve of different renewal rate for *Phaeodactylum tricornutum*

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 分别表示 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%

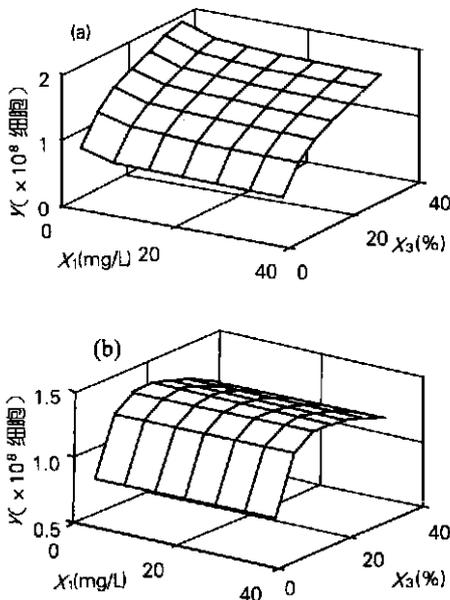


图2 回归方程网线

(a) 8 d 方程; (b) 16 d 方程

Fig.2 Mesh plot for regression equation

a. 8 d equation b. 16 d equation

在一次性培养中, Hayward 1968 年和马志珍 1983 年研究结果表明, N 浓度在不同品系中对生长无差异, 10 ~ 50 mg/L N 对三角褐指藻的生长量影响也不显著。但从 8 d 方程及图 1(a) 看出, 更新率与 N 浓度对采收量均有影响, 更新率变化的影响比 N 含量变化更明显。随着更新率增加, 采收量迅速增加, 以更新率从 5% 增至 10% 时增幅最大, 在相同 N 水平下, 均以 35% 更新率达到最大值; 而在相同更新率下, 除 N 水平在 0.5 mg/L 对采收量有较大贡献外, 随着 N 水平的增加采收量缓慢下降。16 d 方程及图 1(b) 显示, N 水平在 0.5 ~ 35.9 mg/L 范围, 对采收量无影响, 而更新率变化时, 采收量呈抛物线变化, 以 5% 采收量最低; 经寻优计算, 当更新率 18.2% 时, 可使采收量达到最大值 667 000 细胞/ml。

从方程 (1) 得出低浓度 N 对采收量有较大贡献, 而 (2) 得出与实验范围无关, 似乎是矛盾的结论, 但这主要由第一天, 第二天更新后, 新旧培养液变更出现生长缓慢^[1] 有较大关系, 与 0.5 mg/L N 组相比, 其他各组平均增长率分别降低了 28.7% 和 34.2%。据此推断, 更新早期低浓度 N 有改善三角褐指藻生长作用, 从而增加采收量。随着不断更新, 原培养液作用将逐渐减弱, 低浓度 N 对采收量的贡献也逐渐变小。但低浓度 N 能否长时间维持稳定态藻浓度尚有待进一步研究。

Hayward 1968 年研究发现, P 是三角褐指藻主要的限制性营养素, 2 mg/L 可获得良好生长。但本实验在整个更新过程, P 范围 0.3 ~ 12.1 mg/L 对采收量无影响, 每日添加 0.3 mg/L P 已能满足它的生长。

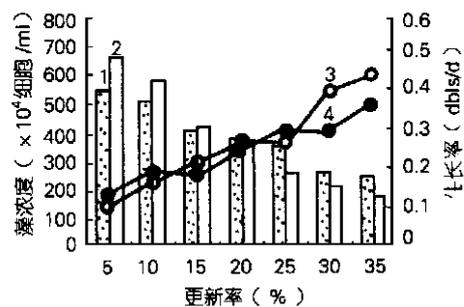


图3 藻浓度、生长率与更新率关系

Fig.3 Relationship of cell density or growth rate to renewal rate 1, 2 分别表示 8 d, 16 d 平均浓度; 3, 4 分别表示 8 d, 16 d 平均生长率

2.3 更新率与藻浓度、生长率关系

藻浓度、生长率与更新率为消长关系, 随着更新

表 3 藻浓度、生长率与更新率的线性分析

Tab.3 Linear analysis for correlation of renewal rate to cell density or growth rate

B(× 10 ⁴ 细胞/ ml)		D(× 10 ⁻² dbls/ d)	
8 d 方程	16 d 方程	8 d 方程	16 d 方程
B = 599.9 - 10.6 X ₃	B = 729.6 - 17.4 X ₃	D = 13.1 + 0.7 X ₃	D = 8.3 + 1.0 X ₃
R ² = 0.972	R ² = 0.962	R ² = 0.974	R ² = 0.945
P < 0.01	P < 0.01	P < 0.01	P < 0.01

率增加,藻浓度下降,但生长率增大,8 d 和 16 d 平均浓度、8 d 和 16 d 平均生长率变化相似,见图 3。直线拟合显示高度相关,见表 3。

更新率增加,藻浓度下降,已得以证实^[6],但生长率随之增大,很可能由于藻浓度降低,光在细胞悬浮液中的穿透增强引起^[1]。

3 小结

3.1 经 16 d 半连续培养, N 浓度、更新率与采收量存在动态关系,根据实际所需采收量,控制 N 浓度或更新率对藻类培养有一定指导意义。

3.2 更新率增加,藻浓度呈下降趋势,但生长率增大。15%更新率藻浓度处于平衡。更新浓度降至 70 × 10⁴ 细胞/ ml ~ 140 × 10⁴ 细胞/ ml 时,藻浓度达到

相对稳定,不同更新率第 13 天后藻浓度达到稳定。

3.3 更新早期,宜用 0.5 mg/ L 低浓度 N,随着更新时间的延续, N 水平在 0.5 ~ 35.9 mg/ L 范围,对采收量无影响。更新率 18.2% 时,可使采收量达到最大值 66.7 × 10⁴ 细胞/ ml。0.3 ~ 12.1 mg/ L P 对采收量无影响。

参考文献

- 1 陈明耀. 生物饵料培养. 北京: 农业出版社, 1995. 25 ~ 71
- 2 方开泰. 均匀设计与均匀设计表. 北京: 科学出版社, 1994. 1 ~ 52; 69
- 3 卢纹岱, 朱一力, 沙捷等. SPSS for windows 从入门到精通. 北京: 电子工业出版社, 1997. 318 ~ 329
- 4 刘魁英. 食品研究与数据分析. 北京: 轻工业出版社, 1999. 182 ~ 196
- 5 张登沂, 何培民, 周洪琪. 上海水产大学学报, 1999, 8(1): 1 ~ 5
- 6 Fabregas J., Patino M., Arredondo Vega B. O. et al. . Appl. Microbiol. Biotechnol., 1995, 44: 287 ~ 292

EFFECTS OF NITROGEN, PHOSPHORUS CONCENTRATION AND RENEWAL RATE ON RECOVERY YIELDS OF *Phaeodactylum tricornutum* IN SEMICONTINUOUS CULTURES

ZHU Yr-feng¹ WU Songjie² GUO Xia-qiang¹

(¹ Department of Fisheries, Ningbo University, 315211)

(² Ningbo Fisheries Research Institute, 315010)

Received: Jan. 25, 2000

Key Words: *Phaeodactylum tricornutum*, Semicontinuous culture, Batch culture, Renewal rate, Uniform design

Abstract

This experiment was conducted to determine the dynamic effects of nitrogen, phosphorus concentration and renewal rate on recovery yields of *Phaeodactylum tricornutum* in semicontinuous cultures at room temperature by uniform design. The results demonstrated that nitrogen concentration ranging from 0.5 mg/ L to 35.9 mg/ L and phosphorus concentration ranging from 0.3 mg/ L to 12.1 mg/ L had no influences upon recovery yields during 16 d dilution, but 0.5 mg/ L of nitrogen concentration was suggested before 8 d. Cell density decreased and growth rate increased while increasing renewal rate. The optimal renewal rate of 18.2% was postulated according to 16 d equation, and recovery yields of 66.7 × 10⁴ cells per ml volume of culture per day were obtained with this renewal rate.

(本文编辑:刘珊珊)