

几种环境因子对叉鞭金藻种群增长的影响

钟 婧¹, 吕小梅², 李 光¹, 方少华², 王义权^{1*}

(1. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005; 2. 福建海洋研究所, 福建 厦门 361012)

摘 要 运用实验生态学方法研究了海产动物重要饵料生物——叉鞭金藻(*Dicrateria* sp.) 在室内大量培养的条件和方法。结果表明, 营养盐浓度对叉鞭金藻的生长没有明显影响, 以 1 倍浓度的 F/2 培养基最佳; 水温 21~27 °C 的范围都适合叉鞭金藻的培养, 27 °C 下的生长速度和种群最终密度都高于其他温度; 在实际应用中, 接种密度以 $10 \times 10^4 \sim 30 \times 10^4$ 个/mL 为最佳; 在收获方式上, 一次性培养与半连续培养的最终收获量没有显著差别, 但半连续培养较一次性培养更有利于操作和减轻工作量。

关键词 叉鞭金藻; 饵料生物; 大量培养

中图分类号: S949.26⁺2

文献标识码: A

文章编号: 1006-9690(2006)06-0044-04

Mass Cultivation of Feed Organism for *Amphioxus* in Laboratory

Zhong Jing¹, L Xiaomei², Li Guang¹, Fang Shaohua², Wang Yiquan¹

(1. School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Fujian Institute of Oceanology, Xiamen 361012, China)

Abstract We have studied the condition and method for indoor mass cultivation of *Dicrateria* sp., which is an important species for marine animal feeding. The results showed that concentration of nutrition salts did not obviously affect its growth, and 1×F/2 medium would be the optimum. A range from 21 to 27 °C was fit for the cultivation, but the growth rate and final population density at 27 °C would be higher than those at other temperatures. Practically, an optimum inoculating density should be set between 10×10^4 and 30×10^4 /mL. Though hardly any difference has been shown between total harvest amounts of batch and semicontinuous cultivation, the latter is still better for simplifying manipulation and reducing workload.

Key words *Dicrateria* sp.; feed organism; mass cultivation

叉鞭金藻(*Dicrateria* sp.) 隶属金藻门(Chrysophyta), 金藻目(Chryomonadales), 等鞭藻科(Isochrysidaceae), 叉鞭金藻属(*Dicrateria*), 为大小仅数微米的浮游单细胞藻类。因其无细胞壁, 富含不饱和脂肪酸^[1], 且生态分布广, 生长速度快, 便于大规模繁殖, 被认为是海产动物人工育苗的理想饵料^[2], 已广泛用于贻贝、牡蛎、泥蚶、对虾等水产品的人工养殖^[3-4]。

目前, 单胞藻类的室内培养多采用摇瓶培养或光生物反应器进行^[3-5]。摇瓶培养产量小, 难以成规模, 多用作保种; 光生物反应器能对环境因子进行较精确的控制, 产量大, 但成本较高。为了满足实验动物养殖过程中对新鲜饵料的需求, 需要一种能在室内进行的低成本、较粗放且能成一定规模的培养方式。在本实验中采用容量为 10 L 的半透明有盖普通塑料方桶作为培养容器, 以叉鞭金藻为材料, 从培养基浓度、接种密度、培养温度等方面出发研究 10L 体系中叉鞭金藻生长情况, 比较了一次性培养和半连续培养条件下其收获量的差异, 以期获知室内大量培养叉鞭金藻的最佳条件。结果表明, 使用普通塑料方桶培养也能达到较高产量, 且投入少, 管理简

收稿日期: 2006-01-18

基金项目: 国家自然科学基金(30470938)、福建省自然科学基金(D0510002)和厦门市科技计划项目(3502Z20042015)资助。

作者简介: 钟 婧(1981-)女, 硕士研究生。

* 通讯作者: 王义权。E-mail: wangyq@xmu.edu.cn

单,方便扩大规模,在普通实验室中有着其它两种培养方式不可比拟的优点。另外方桶培养还可以在微藻饵料的大规模繁殖中作为扩大培养环节应用^[6],在水产养殖方面也具有一定的参考价值。

1 材料与方法

1.1 藻种及维持培养

实验用藻种为叉鞭金藻(*Dicrateria* sp.),取自福建海洋研究所藻种室。实验前接藻种至1 000 mL三角烧瓶中进行活化培养。实验条件为光照(1 200 ± 100) lx,温度(23.5 ± 2.5) °C,不充气培养,每天摇动4次,取指数生长期藻液进行实验。

1.2 培养基的配制

培养基采用不加生物素和硅酸钠的F/2培养基,海水取自厦门近海(盐度2.8‰、pH8.1),经粗砂过滤、煮沸、冷却至室温后备用。

1.3 叉鞭金藻的培养

实验中全部叉鞭金藻均在10 L(25 cm × 17 cm × 30 cm)的半透明聚乙烯方桶中敞开培养,不充气,每天搅动3次,随机变换位置,日光灯24 h连续光照,强度为(1 200 ± 100) lx。设置F/4, F/2, 3F/4和F4个培养基浓度(分别为F/2培养基营养盐浓度的1/2, 1, 3/2, 2倍)确定最佳浓度。每组的初始接种密度均为 10×10^4 个/mL,培养温度(21 ± 1.5) °C。在比较接种密度对金藻培养的影响时,采用F/2培养基,设置6个不同初始接种密度组,分别为 0.1×10^4 /mL, 0.5×10^4 /mL, 3×10^4 /mL, 10×10^4 /mL, 30×10^4 /mL和 50×10^4 /mL,培养温度为(24 ± 1.5) °C。另采用F/2培养基,在初始接种密度为 10×10^4 /mL的条件下,设置3个温度梯度,平均温度分别为20 °C, 24 °C和27 °C,以观察温度对金藻生长的影响。

1.4 一次性培养与半连续培养的比较

为了减少接种次数,提高饵料生物的培养效率,本试验比较了一次性培养(即一次接种,培养至较高的藻密度时全部收获)和半连续培养(即一次接种,培养至一定浓度时开始每天收取一部分藻液,再补充等量体积的培养基,次日再同样的收取藻液并补充培养基,持续多日)的藻收获量。采用F/2培养基,初始接种密度 53×10^4 /mL,培养体积6 L,一次性培养和半连续培养同时进行,每24 h分别计数其藻密度1次。半

连续培养的每日更新率为25%,更新后藻密度和日收获量按更新前藻密度及更新率折算。

1.5 藻密度及细胞分裂速率的测定

在搅动状态下移取藻液1 mL,常规Logol's液固定后^[7],血球计数板显微镜下计数。每组两个平行。细胞分裂速率(K)的按下列公式计算:

$$K = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{\ln 2 \times T}$$

式中: K ——分裂速率; d ; N_0 ——种群初始密度; N_t ——经过时间 T 后的种群密度; T ——时间, d ^[8]。

2 结果

2.1 不同浓度培养基对叉鞭金藻生长的影响

起始接种密度为 10×10^4 /mL,平均培养温度为21 °C时,叉鞭金藻在4种浓度梯度培养基中的增长曲线如图1所示。接种后又鞭金藻很快进入对数生长期,藻细胞数均在第8 d达到最大,约为 $165.6 \times 10^4 \sim 185.4 \times 10^4$ /mL,其中以F/2培养基组最高,F/4培养基组最低。此后细胞数开始降低,至第10 d,F/2, 3F/4和F培养基组中藻密度均降至约 120×10^4 /mL,F/4培养基组中更低至 105.3×10^4 /mL。计算藻细胞分裂速率(表1)可知,4个处理组中,藻细胞分裂速率随时间的变化相似。前4 d都保持着0.7以上的较高分裂速率,尤以第2 d为最高,随后种群逐步进入稳定生长期,细胞分裂速率变缓。前7天的平均分裂速率各组相当,F/2组略高于其他组,为0.60。

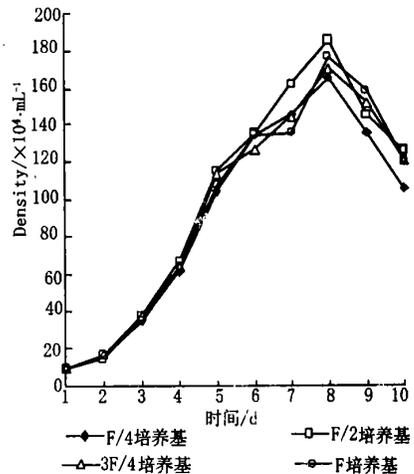


图1 叉鞭金藻在不同浓度培养基中的种群密度变化

表1 叉鞭金藻在不同浓度培养基中细胞分裂速率变化情况

培养基浓度	细胞分裂速率							
	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	平均值
F/4	0.72	1.1	0.79	0.76	0.37	0.11	0.19	0.58
F/2	0.71	1.21	0.82	0.78	0.23	0.26	0.19	0.60
3F/4	0.75	1.18	0.82	0.75	0.16	0.19	0.24	0.58
F	0.77	1.02	0.9	0.74	0.33	0.01	0.39	0.59

2.2 不同接种密度对叉鞭金藻生长的影响

为研究接种初始藻密度对叉鞭金藻生长的影响,本实验按接种量不同设置6个组,在F/2培养基中,平均温度为27℃条件下连续培养,每天记录藻密度变化情况,绘制种群生长曲线,直至各自生长进入衰亡期(图2)。从生长曲线可见,本实验条件下,虽然接种量密度不同,但各组叉鞭金藻的生长均符合种群的logistic增长模型,曲线呈S形,种群密度达到最大后,随时间推移而下降。这是由于培养基中营养盐的消耗,藻密度不能持续保持高位。

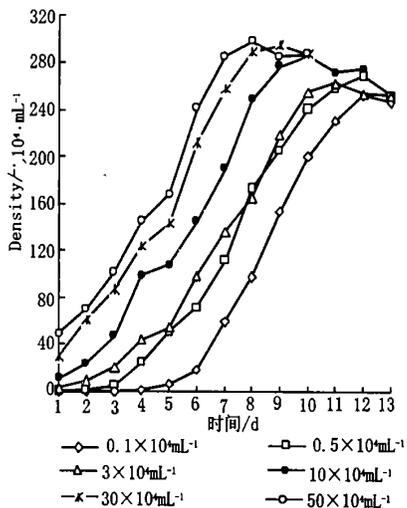


图2 接种量对金藻生长的影响

表2 叉鞭金藻在不同初始密度下种群生长情况

初始接种密度 / ($\times 10^4 \text{ mL}^{-1}$)	最高密度 / ($\times 10^4 \text{ mL}^{-1}$)	至最高密度培养时间/d	细胞平均分裂速率/K
0.1	252.6	12	0.94
0.5	268.9	12	0.76
3	262.4	11	0.59
10	285.3	10	0.48
30	295.1	9	0.37
50	297.4	8	0.32

计算从接种后到藻细胞密度达到最大值时的平均分裂速率,结果显示,叉鞭金藻进入稳定生长期的

时间随接种量的增加而缩短,但细胞分裂速率却并不随接种密度的增大而增长(表2)。

2.3 温度对叉鞭金藻生长的影响

起始接种密度为 $10 \times 10^4/\text{mL}$ 的叉鞭金藻在3种温度梯度下连续培养10 d,根据每天藻密度变化情况绘制种群生长曲线(图3)。结果显示,本研究所用叉鞭金藻在21~27℃范围内都能正常生长繁殖。在21℃下,叉鞭金藻的生长期较短,8 d后种群生长进入衰亡期,最高培养密度仅为 $185.4 \times 10^4/\text{mL}$,远低于另两组。前8 d各组细胞分裂速率(表3)表明,随着温度的升高,藻生长速率提高较快。在27℃下生长速率最快,达到0.61,培养至第10 d,种群密度达到最高为 $331.4 \times 10^4/\text{mL}$ 。

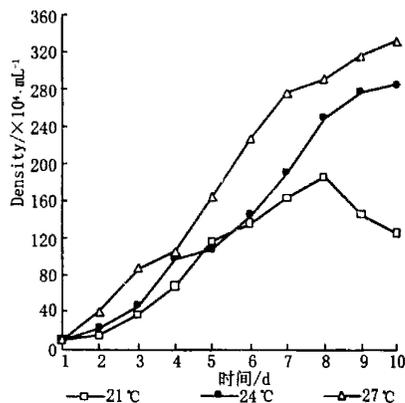


图3 叉鞭金藻在不同温度下的生长曲线

表3 温度对叉鞭金藻生长的影响

温度梯度/℃	前8d平均分裂速率	最高培养密度 / ($\times 10^4 \text{ mL}^{-1}$)
21	0.53	185.4
24	0.58	285.3
27	0.61	331.4

2.4 一次性培养与半连续培养的比较

平均水温27℃时,两种培养方式下叉鞭金藻的生长曲线如图4所示。由图可知,一次性培养10 d,金藻最高密度可达 $355.1 \times 10^4/\text{mL}$,8 d后藻密度呈下降趋势。半连续培养组中,藻密度于6 d后达到一相对稳定值,约 $180 \times 10^4/\text{mL}$ 。若在培养至第8 d时完全收获,一次性培养组最终收获量为 2.13×10^{10} 个细胞,半连续培养组8 d共收获 2.24×10^{10} 个细胞,比前者高出5.3%。图5反映了两种培养方式下藻

细胞日分裂速率的不同变化情况。一次性培养组藻细胞分裂速率在第 2 d 达到最大值(0.73), 半连续培养组细胞分裂速率在第 3 d 达到最大值(0.79), 以后两者都呈下降趋势, 但半连续培养组细胞分裂速率始终高于一次性培养组。6 d 后, 半连续培养组细胞分裂速率基本稳定在 0.45 上下, 而一次性培养组逐渐步入衰亡期, 细胞分裂速率由 0.14 逐降为 0。

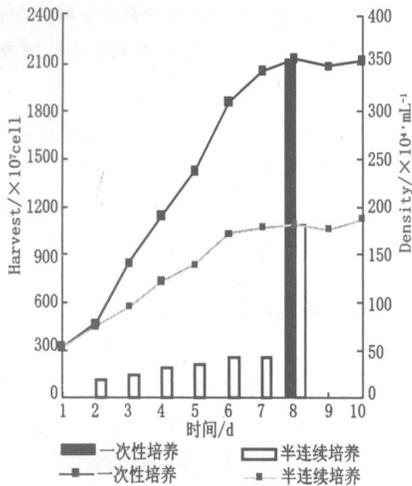


图 4 不同培养方式下叉鞭金藻生长曲线与最终收获量的比较

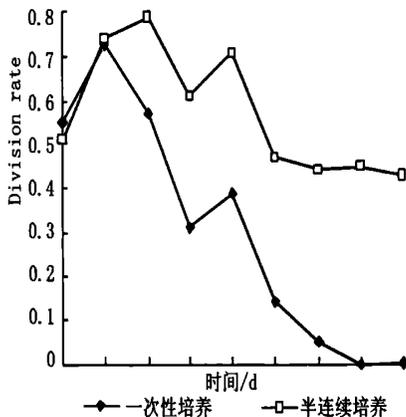


图 5 不同培养方式下叉鞭金藻细胞分裂速率的变化

3 讨论

培养基中的营养盐水平是影响单胞藻生长的重要生态因子, 目前实验室培养多采用 F/2 配方。本次实验设计的浓度梯度中, 仅有 F/4 培养基中叉鞭金藻的生长情况与 F/2 组略有差异, 表现为可达到

的最高藻密度较低和进入衰亡期后细胞数目的迅速减少。这可能是因为 F/4 培养基中营养盐水平偏低, 很易被迅速生长的藻消耗殆尽, 成为金藻生长的限制性因素。F/2, 3F/4 和 F 培养基中金藻生长情况相近, 培养一段时间后都能获得较高的种群密度, 但考虑到生产成本和减少对水体造成的污染等因素, 仍选用 F/2 培养基为宜。

有报道在藻类培养过程中, 接种量过低时, 会导致接种的藻死亡而无法生长, 其原因可能有多种^[9], 我们在金藻的培养过程中也发现, 过低的接种量有时会导致培养失败。但本实验中接种量在 $0.1 \times 10^4 \sim 50 \times 10^4 / \text{mL}$ 的范围内均可成功地生长, 最终均可达到 $252.6 \times 10^4 \sim 297.4 \times 10^4 / \text{mL}$ 的密度, 接种量大小对终浓度的影响不大。但接种量较低时, 从藻密度变化曲线上似乎可见一个明显的“生长延缓期”, 这是由于起始藻细胞数量少, 藻细胞增长的绝对数量少, 但种群仍能正常生长, 最终达到几乎同样高的浓度(图 2), 而细胞的平均分裂速率反倒是低接种密度的为高(表 2), 这是因为低接种密度下, 培养体系中藻细胞达到最大密度的时间长, 种群有较长的时间处在指数增长期; 而接种量大, 体系中藻细胞达到最大密度的时间短, 种群所经历的指数增长的时间也相对较短。由此可见, 此前认为的“生长延缓期”只是由于起始基数过低而造成的表面现象。但在实际应用中, 权衡最高培养密度、细胞分裂速率及培养所需的种子量和时间等方面因素, 应以 $10 \times 10^4 \sim 30 \times 10^4 / \text{mL}$ 的接种密度最为适宜。

各种藻类对温度的要求不同^[10-11]。在本实验条件下, 叉鞭金藻在 $20 \sim 27 \text{ }^\circ\text{C}$ 范围内均能正常生长, 且生长速率随温度的增加而升高。这与王宪等报道叉鞭金藻在 $21 \sim 28 \text{ }^\circ\text{C}$ 范围内, 反应藻生长情况的同化系数随温度升高而递增的结果一致^[12]。在 $27 \text{ }^\circ\text{C}$ 下, 藻很快进入指数生长期, 无论是可达到的最大藻密度还是细胞分裂速率都明显高于其他温度组, 因此在本实验采用的温度范围内为其最适生长温度。我们在夏季室内培养叉鞭金藻时发现, 当温度升高至 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 以上时, 不仅叉鞭金藻生长变缓, 而且培养水体中很易被其它杂藻污染。

在本次实验中, 在 3 种最适因子组合下(初始接种密度 $10 \times 10^4 / \text{mL}$, F/2 培养基, $27 \text{ }^\circ\text{C}$) (下转第 57 页)

甲醇稀释 10 倍, 成 0.2 mg/mL, 即不经萃取直接进 HPLC 分析, 两者相比即为萃取回收率。试验结果见表 4。

表 4 萃取回收率

样品	萃取后峰面积	未经萃取的峰面积	回收率/ %	x	RSD
1	337 727	332 584	101.55	104.247 1	1.68%
2	333 962	320 537	104.19		
3	333 249	320 056	104.12		
4	334 272	322 460	103.66		
5	337 813	321 489	105.08		
6	343 689	321 549	106.89		

5 讨论

(1) 由上述结果可见, 用 50% 甲醇作为溶剂溶解沙苑子总黄酮后再以同样溶剂作为洗脱液过正相氨基小柱, 该小柱可吸附样品中的强极性成分, 使沙苑子苷与其他成分达到基线分离, 此方法回收率良好, 可作为沙苑子总黄酮分析方法。正相氨基小柱

为亲水性填料, 可吸附极性大的成分, 而 C_{18} 小柱的作用只相当于加了一个预柱。

(2) 当用乙醇为溶剂溶解沙苑子总黄酮时, 过正相氨基小柱后直接取洗脱液进样时沙苑子苷峰与前一峰不能分离, 分离度降至 0.7 左右。需挥干溶剂进样, 而用甲醇溶解沙苑子总黄酮时, 则不必挥干溶剂, 可直接进样。

(3) 所得洗脱液需摇匀后进样, 否则偏差大。

参考文献

- [1] 刘春宇, 顾振纶. 沙苑子的化学成分和药理作用[J]. 中国野生植物资源, 2002, 21(2): 1-3.
- [2] 张建军, 闫兴丽, 张玉杰, 等. HPLC 测定沙苑子中沙苑子苷 A 的含量[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(8): 600-602.
- [3] 刘春宇, 孙雄华, 张经硕, 等. RP-HPLC 法测定沙苑子中沙苑子苷[J]. 中草药, 2005, 36(7): 1084-1086.
- [4] 茅向军, 章晨峰, 孙 棣, 等. 不同填料的固相小柱对人参皂苷 Re 血浆样品萃取回收率的研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(19): 1516-1518.
- [5] 刘光田. 固相萃取-反相高效液相色谱法测定地钱中的芹菜素[J]. 化学与生物工程, 2004(6): 51-53.
- [6] 苏海岩, 王海涛, 王同永, 等. 室内大规模培养单细胞藻类实用技术[J]. 中国水产, 2002(1): 72-73.
- [7] Leakey R J G, Burkhill PK, Sleight MA. A comparison of fixatives for the estimation of abundance and biovolume of fixative for the estimation of abundance and biovolume of marine planktonic ciliate populations[J]. Plankton Res, 1994, 16(4): 375-389.
- [8] Fabregas J, Patino M, Arredondo-Vega BO, et al. Renewal rate and nutrient concentration as tools to modify productivity and biochemical composition of cyclostat cultures of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1995, 44: 287-292.
- [9] 张胜利. 新月菱形藻(*Nitzschia dosterium*) 增殖速度与培养密度关系的初步研究[J]. 水产科学, 1994, 4(13): 15-17.
- [10] James C M, Al-Hinty S, Salman A E. Growth and ω fatty acid and amino acid composition of microalgae under different temperature regimes[J]. Aquaculture, 1989, 77: 337-351.
- [11] Thompson P A, Guo M X, Harrison P J, Whyte J N C. Effect of variation of temperature \oplus on the fatty acid composition of eight species of marine phytoplankton[J]. J Phycol, 1992, 28: 488-497.
- [12] 王 宪, 李文权. 光对海洋藻类生长的影响——叉鞭金藻对光响应的动力学过程研究[J]. 海洋学报, 1993, 15(2): 33-39.

(上接第 47 页)

用 10 L 塑料方桶培养叉鞭金藻, 其最高培养密度已与摇瓶实验相当^[3], 初步证明方桶培养也能获得高密度的藻液。作为饵料生物, 除了能快速大量繁殖以外, 还应考虑到其生产的持续性问题。在适当的更新率下, 通过半连续培养, 可延长藻的指数生长期, 使其种群数量增长保持在一个较高的水平, 能够在较长时间内有一比较稳定的、可持续的收获量, 同时也减少了频繁接种的劳动强度。

参考文献

- [1] 林学政, 李光友. 11 种微藻脂类和 EPA/DHA 组成的研究[J]. 黄渤海海洋, 2000, 18(2): 36-40.
- [2] 丛立晶, 杨 旭. 湛江叉鞭金藻扩大培养中原生动物的防治[J]. 水产科学, 2002, 21(3): 26-27.
- [3] 王淑萍. 湛江叉鞭金藻生态条件的研究 I. 营养盐浓度对湛江叉鞭金藻增殖的影响[J]. 水产科学, 1995, 14(1): 18-20.
- [4] 竺俊全, 赵青松, 石钢德. 泥蚶育苗中优质单胞藻培养技术[J]. 水产科学, 2000, 19(3): 22-24.
- [5] 潘双叶, 陈焯, 张华军, 等. 应用光生物反应器高密度培养等鞭