

ISSN 1004-7271

CODEN SHXUEJ

上海水产大学学报

JOURNAL OF SHANGHAI FISHERIES UNIVERSITY

第 8 卷
Vol. 8

第 1 期
No. 1

1999



SHANGHAI SHUICHAN DAXUE XUEBAO

ISSN 1004-7271



9 771004 727002

上海水产大学学报

1999年 第8卷 第1期

目 次

- 不同方法培养小球藻的试验····· 张登沥、何培民、周洪琪(1)
- 两不同地域中华鳖的核型····· 吴 萍、楼允东、李思发(6)
- 克氏原螯虾大颚器在卵巢发育周期中的组织结构变化····· 李 胜、赵维信(12)
- 东海区渔业资源变动分析····· 柳卫海、詹秉义(19)
- 彭泽鲫的受精细胞学····· 赵振山、高贵琴、黄 峰、孙小强(25)
- 兴国红鲤和散鳞镜鲤杂种优势的 RAPD 分析
····· 董在杰、夏德全、吴婷婷、杨 弘、徐 跑(31)
- 黄鳝血清褪黑激素水平日周期性与季节性变化的节律 ····· 石 琼、林浩然、邓柏礼(37)
- 复合微生物对养殖水体生态因子的影响 ····· 张 庆、李卓佳、陈康德(43)
- 中华乌塘鳢的育苗技术····· 李 生、肖锦平、余忠明、彭景书(48)
- 青蛤增殖技术研究及开发 ··· 于业绍、周 琳、顾润润、郑国兴、左振德、薛存德、顾永康、
陈国民、叶朝康、陆 平、黄则平、吴介新、张沛花(53)
- 鱼糜漂洗液中水溶性蛋白质的回收与利用 ····· 张宗恩、汪之和、肖安华、邹轶天、张 春(59)
- 理化因素对鱿鱼鱼精蛋白抑菌性的影响 ····· 钟立人、毋瑾超、王南舟(63)

综 述

- 鱼类早期发育阶段甲状腺激素的作用····· 张臻宇、鲍宝龙(68)
- 魔芋开发利用现状及发展对策 ····· 楼文高、柏春祥、殷肇君(76)

研究简报

- 鳗鲡精子的主要生物学特性 ····· 谢 刚、叶 星、苏植莲、余德光、潘德博(81)
- 鱼的体长、游速与耐力的关系及其在拖网作业中的应用····· 郑 奕(85)
- 果蔬复合胶囊饮料的开发研制····· 陶宁萍、张宗恩(89)
- 用多路转换技术减少水质参数传感器 ····· 张慕蓉(93)

不同方法培养小球藻的试验

张登沥 何培民 周洪琪

(上海水产大学渔业学院, 200090)

摘要 试验系采用不同方法培养小球藻观察其生长情况。小球藻在水泥池中培养,最高密度是40.0cm组的 2880.0×10^4 cells/mL,但培养液深度在20.0~60.0cm范围内生长无显著差异;在三角烧瓶中培养指数生长末期的最高密度达 8000.0×10^4 cells/mL;在生物反应器中培养,一次性培养指数生长期末期的最高密度达 13000.0×10^4 cells/mL,半连续培养时适宜的起始密度为 4500.0×10^4 cells/mL,每天可以采收1/3藻液,密度约为 6800.0×10^4 cells/mL,这样每天就有较高的、稳定的收获量。结果表明小球藻在生物反应器中培养其生长最好。

关键词 小球藻,培养,生长,水泥池

中图分类号 S968.41

随着特种水产品养殖业的蓬勃发展,特种水产品的人工育苗愈来愈受到重视,尤其是虾蟹、贝类。在育苗时生物饵料中的单胞藻是关键因素之一,因为它具有营养丰富、适口、成本低、不易污染水质等优点,它培养的成功与否直接影响育苗的成败。为解决这个问题国内外许多藻类工作者做了很多研究。如高效能、封闭式单胞藻培养装置的研制[何白沙等 1991],单胞藻薄膜袋封闭式培养技术的研究[缪国荣等 1989],柱式培养方法[王如才等 1982],亚太地区开放式和半封闭式大量培养微藻的系统[Otto 1994]等。但这些方法都存在一定的局限性,没能在生产上广泛应用。有人用封闭式生物反应器大量培养光合微生物[Lee 1986],但尚未有人把这一方法应用于培养单胞藻,于是我们做了一些尝试,以期获得理想的单胞藻培养方法。

1 材料与方 法

1.1 材 料

实验用小球藻(*Chlorella* spp.)藻种取自上海水产大学渔业学院饵料保种室,生物反应器取自本校藻类研究室,水泥池利用大丰贝类苗种场的饵料池,并备5L三角烧瓶若干只。

1.2 培 养 方 法

1.2.1 小球藻在水泥池中培养

水泥池规格500cm×220cm×90cm,培养液营养成分为F/2配方[陈明耀 1995],氮源改为尿素,微量元素不加。水泥池和培养液都用次氯酸钠消毒,接种比例1:3,水温为20.0~25.0℃,

采用日光灯连续光照,光强72.1~96.2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$,连续充气,充气量使培养液达到沸腾,培养液深度A池为20.0cm、B池为40.0cm、C池为60.0cm三种。

1.2.2 小球藻在三角烧瓶中培养

培养液营养成分在F/2配方的基础上N、P三份,三角烧瓶和培养液都用煮沸消毒,水温为20.0~25.0 $^{\circ}\text{C}$,采用日光灯连续光照,光强75.3~80.1 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$,连续充气,充气量为60.0~100.0L/h。

1.2.3 小球藻在生物反应器中培养

生物反应器材料为有机玻璃,柱状,容量为3.0L,培养液营养成分在F/2配方的基础上N、P三份,反应器和培养液都用次氯酸钠消毒,水温为20.0~25.0 $^{\circ}\text{C}$,采用日光灯连续光照,光强75.3~80.1 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$,连续充气,充气量为60.0~100.0L/h。用反应器分别进行了一次培养和半连续培养。

1.2.4 单胞藻密度计数与数据处理

单胞藻密度用血球计数板计数,每天计数一次,两组平行样品取平均值。K值计算[陈明耀1995],W值计算[李庆彪等1983]。

$$K = \frac{\lg N_t - \lg N_0}{T} \quad W = \frac{N_m K}{\bar{X}^{-1} \ln [1/(1-X)]}$$

式中,K为相对生长常数;T为培养时间; N_0 为起始密度; N_t 为培养T时间后的密度;X为每次收获体积占培养液量($0 < X < 1$) N_m 为收获时的密度;W为平均每单位时间、单位培养体积获得的生物量。

2 结果

2.1 小球藻在水泥池中培养的生长情况

水泥池中培养液采用3种不同深度进行一次培养,小球藻的生长情况B组最好,最高密度达2880.0 $\times 10^4$ cells/mL,但经过分析第6天和最高密度的第12天,结果小球藻的生长都无显著差异($P > 0.05$)。说明培养液深度在20.0~60.0cm范围内对小球藻生长没有显著影响(表1)。

表1 小球藻在水泥池中培养的生长($\times 10^4$ cells/mL)

Tab. 1 Growth of *Chlorella* spp. of culture of limited volume in concrete pools ($\times 10^4$ cells/mL)

池号	培养天数													K	
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		13
A	442.5	527.5	607.5	820.0	1170.0	1365.0	1530.0	1522.5	1512.5	1997.5	2135.0	2412.5	2552.5	2290.0	0.063
B	355.0	475.0	517.5	755.0	1165.5	1280.0	1375.0	1552.5	2087.5	2220.0	2795.0	2805.0	2880.0	2765.0	0.076
C	382.5	465.0	482.5	715.0	1110.0	1230.0	1382.5	1475.0	1610.0	1820.0	2062.5	2275.0	2462.5	2340.0	0.067

2.2 小球藻在三角烧瓶中培养的生长情况

从小球藻在三角烧瓶进行一次培养的生长结果看,小球藻的密度稳步提高,在指数生长期末期最高密度达到8000.0 $\times 10^4$ cells/mL(图1)。

2.3 小球藻在生物反应器中培养的生长情况

2.3.1 一次培养

小球藻在生物反应器中一次培养的生长结果见图2。

由图2可见，小球藻的密度也是稳步提高，在指数生长期末期最高密度达到 $13000.0 \times 10^4 \text{ cells/mL}$ ，结果优于三角烧瓶。

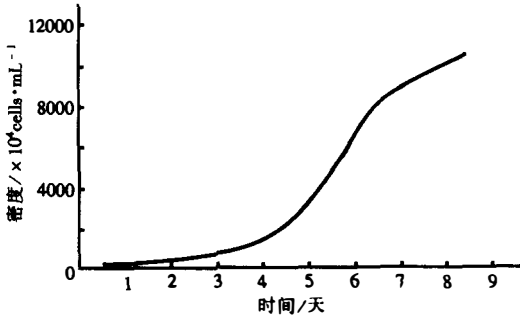


图1 小球藻在三角烧瓶中培养的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of *Chlorella* spp. of culture of limited volume in conical flasks

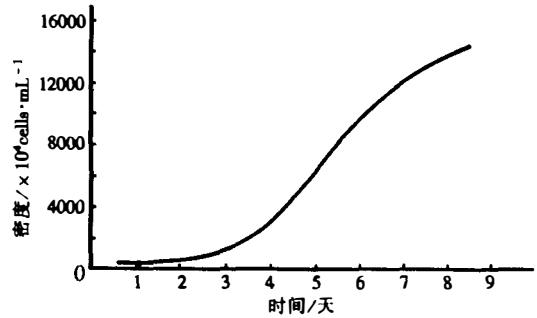


图2 小球藻在生物反应器中培养的生长曲线

Fig. 2 Growth curve of *Chlorella* spp. of culture of limited volume in bio-reactors

2.3.2 半连续培养

为确定小球藻在生物反应器中半连续培养的适当起始密度，现将它在生物反应器一次培养过程中的日净增密度绘成图3。

从图2、图3可以看出，小球藻在 $4500.0 \times 10^4 \text{ cells/mL}$ 左右时，日净增密度最大。为了进一步验证这个结论，设置了几个试验组，在不同起始细胞密度下用反应器进行半连续培养，结果见表2。

由表2可见：I和II调换的藻液体积相同，I密度大于II，净增量小；II和III换取的藻液体积不同，但起始密度相近，净增量也相近；IV虽然K大，但净增量反而小。从四组来看II和III净增量最大，且K又较大，在培养1天后能恢复到原来密度，说明净增量主要决定于起始密度。公式求出 $W = 2456000.0 \times 10^4 \text{ cells}$ 与实际获得生物量 $W = 2450000.0 \times 10^4 \text{ cells}$ 相当。因此认为，用反应器进行小球藻的半连续培养时，当细胞密度达到 $(6500.0 \sim 7000.0) \times 10^4 \text{ cells/mL}$ 时，抽取三分之一藻液，添加新的培养液使细胞密度降到 $4500.0 \times 10^4 \text{ cells/mL}$ 左右，经1天培养细胞密度又恢复到 $(6500.0 \sim 7000.0) \times 10^4 \text{ cells/mL}$ 。经过一周的培养试验小球藻的密度始终处在这个范围之内。

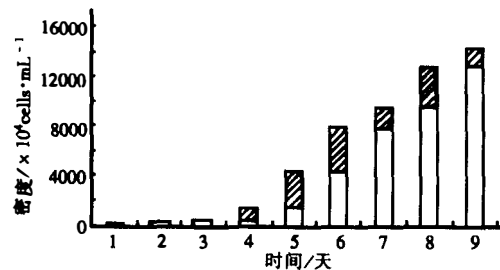


图3 小球藻在生物反应器中培养的日净增密度

Fig. 3 Net increased density per day of *Chlorella* spp. of limited volume in bio-reactors

表2 不同起始密度对小球藻半连续培养的影响

Tab. 2 Effect of different original densities of *Chlorella* spp. on semi-continuous cultures

组别	原藻液细胞密度	调换培养液体积	起始密度	培养1天后密度	净增密度	K
I	8587.5	1/3	5725.0	7587.5	1862.5	0.122
II	6750.0	1/3	4500.0	6950.0	2450.0	0.189
III	9550.0	1/2	4775.0	7212.5	2437.5	0.179
IV	6975.0	2/3	2325.0	4087.5	1762.5	0.245

注:表中有四栏所言的“密度”,其单位为(10^4 cells/mL)

2.4 小球藻在水泥池、三角烧瓶和生物反应器中一次培养的生长结果的比较

从表3及其分析结果可以看出,小球藻在三角烧瓶、生物反应器和水泥池一次培养的生长差异极显著($P < 0.01$),三角烧瓶和生物反应器培养大大地优于水泥池培养,尤其是生物反应器培养最高密度达到 14062.5×10^4 cells/mL,是水泥池培养的4.6倍,K是水泥池的3.4倍。小球藻在生物反应器和三角烧瓶一次培养的生长差异显著($P < 0.05$),生物反应器培养密度高 3700.5×10^4 cells/mL,K值也大0.043。

表3 小球藻在三角烧瓶、水泥池和生物反应器中培养的生长比较(10^4 cells/mL)Tab. 3 Growth of *Chlorella* spp. culture in conical flasks concrete pools and bio-reactors (10^4 cells/mL)

培养天数	0	1	2	3	4	5	6	7	8	k
三角烧瓶	150.0	305.0	437.0	770.0	1742.0	4465.0	7917.0	8612.0	10362.0	0.219
水泥池	355.0	475.0	517.0	755.0	1165.0	1280.0	1375.0	1552.0	2087.5	0.076
生物反应器	113.0	152.0	382.0	1402.0	4257.0	7797.0	9437.0	12787.0	14062.5	0.262

3 讨论

用水泥池培养单胞藻由于池壁四周不透光,藻类光合作用所需要的光照来源于培养液上方,底层藻类能否获得光照取决于培养液的深度。本试验结果表明小球藻在水泥池中培养培养液深度在20.0~60.0cm之间生长没有显著差异。这样,当藻种较少时可少配制培养液,以后根据生长逐步添加,达到高比例接种,确保培养的成功。而且往后培养液深度只要不超过60.0cm可以加深一些,以求获得更多的生物量,满足育苗生产需要。

本试验所选用的营养物质有所差异,主要表现在水泥池中培养没有添加微量元素,其依据是天然海水是海洋生物长期适应于其中生活的优良环境,而且已存在着植物必需吸收的各种物质,在大量生产中只需加入最主要的几种营养元素[陈明耀 1995]。因此,本试验结果出现的差异可以认为主要是方法之间的差异。

目前,生产单位大多使用室内水泥池培养单胞藻。水泥池培养具有耐用性和操作简单的优点,但因为水泥池是敞口的,敌害生物(蚊子、昆虫、原生动物孢子等)容易侵入造成污染,且因外界条件不易控制,单胞藻生长缓慢、密度较低而且不够稳定。所以小球藻在水泥池中培养最高密度只有 2880.0×10^4 cells/mL。三角烧瓶相对来说比较轻巧,操作方便简单,且条件容易控制,培养能达到的藻类密度较高, 10362.0×10^4 cells/mL,但容积太小,培养的藻液数量有限,只够作为生产性大量培养的藻种。而用生物反应器培养小球藻,温度、光照、酸碱度、敌害生物等因子都比三角烧瓶、水泥池容易掌握控制,具有管理方便,生产稳定的优点,小球藻生长快,

密度高,一次培养最高密度达到 14062.5×10^4 cells/mL,是在水泥池培养的4.6倍,1L 生物反应器培养的藻液相当于4.6L 水泥池培养的藻液。如果投喂给育苗对象,使用量只需水泥池的20%左右,不仅数量容易满足,而且较少带进由藻类细胞自己产生的溶解到培养液中的物质和人为添加的没有被藻类利用的物质,对育苗水质的影响较小,提高在育苗中的应用效果。而且生物反应器还可用于单胞藻的半连续培养,当小球藻的密度达到 $(6500.0 \sim 7000.0) \times 10^4$ cells/mL 时,抽取三分之一藻液,添加新的培养液使密度降到 4500.0×10^4 cells/mL 左右,经1天培养密度又恢复到 $(6500.0 \sim 7000.0) \times 10^4$ cells/mL,这样每天都有稳定的收获量,以解决生产之需。

随着科技的进步,水产动物育苗提倡采用生态系育苗,生态系育苗要得以实施就需要大量生物饵料做保证,因此,生物饵料的培养要朝集约化方向发展,生物反应器的应用是一个良好的开端。但本试验所用的生物反应器较高又不便搬动,清洗有一定难度,加上容积还不够大,不能满足大规模生产的需要。若要在生产上推广应用还需要借鉴发酵工业使用的大型发酵罐设计大容积的生物反应器继续试验。

本校渔业学院1996届毕业生倪明玮和张寒野参加了部分工作,在此一并致谢。

参 考 文 献

- 王如才,曲学存,张群乐. 1982. 柱式封闭充气培养小新月菱形藻的方法好. 海洋湖沼通报, (4):51
- 李庆彪,王远隆,张晓燕等. 1983. 关于单胞藻增殖计算的几个问题的讨论. 海洋湖沼通报, (1):58~67
- 何白莎,田景波,陈庆生等. 1991. 高效能、封闭式单细胞藻类培养装置的研制. 中国水产科学研究院学报, (4):62~69
- 陈明耀(主编). 1995. 生物饵料培养. 北京:农业出版社. 49~50, 57~71
- 缪国荣,宫庆礼,王进和等. 1989. 单胞藻薄膜袋封闭式培养技术的研究. 青岛海洋大学学报, 19(3):119~124
- Lee Y K. 1986. Enclosed bio-reactor for the mass cultivation of photosynthetic micro-organism. The future trend TIBTECH, (7):186~189
- Otto P. 1994. Open-air and semi closed cultivation systems for the mass cultivation of Micro-algae in Algae Biotechnology in the Asia-pacific region. Kuala Lumpur: University of Malaya. 113~117

EXPERIMENT ON DIFFERENT CULTURE METHODS OF *CHLORELLA* SPP.

ZHANG Deng-Li, HE Pei-Min, ZHOU Hong-Qi

(Fisheries College, SFU, 200090)

ABSTRACT Growth of *Chlorella* spp. cultured by different methods was investigated. The maximum cell density in concrete ponds was 2880.0×10^4 cells/mL in 40.0 cm group of alga culture medium. But there was no significant difference among the growth in the ponds with depth of alga culture media from 20.0 cm to 60.0 cm. The growth cultured in conical flasks reached 8000.0×10^4 cells/mL at the end of exponential phase. The cell density in bio-reactor was 13000.0×10^4 cells/mL. If original cell density was 4500.0×10^4 cells/mL and 1/3 alga was daily harvested, the growth in bio-reactor might be maintained at 6800.0×10^4 cells/mL. Therefore the culture of *Chlorella* spp. in bio-reactor was the best method.

KEYWORDS *Chlorella* spp., culture, growth, concrete pond