

气升式光生物反应器培养裙带菜配子体的初步研究*

张 栩¹ 李大鹏² 蔡昭铃¹ 丛 威¹ 欧阳藩¹(¹中国科学院过程工程研究所 生化工程国家重点实验室 北京 100080)(²中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

摘要 在气升式光生物反应器中培养裙带菜配子体无性系,比生长速率最高为 0.262 d⁻¹,在快速生长期,日平均增重达到 30%。通过在线测定 DO 和 pH 值变化实时了解配子体光合、呼吸作用的情况。通过测定碱度分析配子体对无机碳的利用情况,表明 HCO₃⁻ 一直处于较高浓度,为配子体所利用的主要碳源。测定培养液的盐度、NO₃⁻ 和 PO₄³⁻ 的浓度,其中 NO₃⁻ 的利用量与配子体的生长相对应,而盐度变化可反映配子体对营养盐的利用。

关键词 裙带菜,配子体,光反应器

裙带菜是我国人工养殖的三大经济海藻(海带、紫菜和裙带菜)之一,是极具保健价值的海洋蔬菜。由于其生活史的特殊性,裙带菜的良好化包括良种培育、良种保存和育苗三个环节。实践证明,采用常规技术难以实现裙带菜的良好化生产。90年代初,中国科学院海洋研究所应用细胞工程方法建立了裙带菜无性繁殖系育苗法^[1]。它的特点是建立和培养裙带菜无性繁殖系,再利用无性繁殖系进行育苗。本文以裙带菜配子体无性系为对象,应用光生物反应器培养技术对其生长特性进行初步的研究,以期对裙带菜无性繁殖系育苗法提供基础数据。

1 材料与amp;方法

1.1 藻种

裙带菜(*Undaria pinnatifida*)配子体无性繁殖系由中国科学院海洋研究所提供,雌、雄配子体以鲜重 1:1 的比例混合培养,培养液为加富消毒海水^[4]。

1.2 设备与方法

1.2.1 气升式光生物反应器 由罐体、气体提升管、气体分布器、pH、DO 在线检测系统等部分组成(见图 1),整体是由耐热耐压的硅硼玻璃制成,可进行蒸汽灭菌。罐体直径 100 mm,高 450 mm,提升管直径 70 mm,高 360 mm,反应器总体积 3 L,工作体积 2.5 L。培养过程中,整个反应器置于 HPG280 B 光照培养箱(哈尔滨东联技术开发有限公司)以控制光强、温度及光照时间,光源为 30 W 荧光灯管(National YZ 30

RR),光强大小用 QRTI 型光量子计(Hansatech Ltd, King's Lynn, Norfolk, U.K.)测定。气源由 WM 无油气体压缩机(天津医疗器械二厂)提供,流量由 LZW12 F 玻璃转子流量计(北京自动化仪表四厂)控制,经孔径为 0.2 μm 空气过滤器(PALL 公司)除菌,进入反应器。培养过程中 pH、溶氧的变化由 SM4300 pH 电极、DOZ280 电极(上海申东传感器厂)测定,以 1999 多参数检测仪(北京金众电子仪器科技公司)显示,由计算机在线记录数据。

1.2.2 反应器培养 利用 JY92-2D 型超声波细胞粉碎仪(宁波新芝科器研究所)将裙带菜配子体无性繁殖系,在功率 100 W 下破碎 1 min(间隔 1 s),培养 1 d 后,在无菌条件下按接种量 1.1 g/L(鲜重)接入反应器。在 25 ± 0.5 °C,光强 40 μmol/(m²·s),光暗周期为 12 h:12 h,通气量 1.0 L/min 条件下培养。

培养过程中,每隔 24 h 取样 25 ml,同时补充新鲜培养液 25 ml。将样品利用 LDS-2 A 离心机(北京医用离心机厂)以 1 000 r/min 离心 10 min,取上清液利用电导法测定盐度^[2],依据 Parsons 方法测定碱度^[5],按 Stumm 等的方法计算无机碳浓度^[6],同时根据 Murphy

* 生化工程国家重点实验室科学基金课题 KT2000-02 号
第一作者:张栩,出生于 1972 年,博士生,研究方向为藻类生物技术。E-mail:qzhangxu@163.com

收稿日期:2001-11-13;修回日期:2002-02-01

和 Riley 的方法测定 PO_4^{3-} [15], Cdlos 等的方法测定 NO_3^- [17]。将离心后的配子体,在烘箱中 80 °C 烘至恒重,FA2 004 电子天平 (上海精密科学仪器公司) 测定配子体干重。

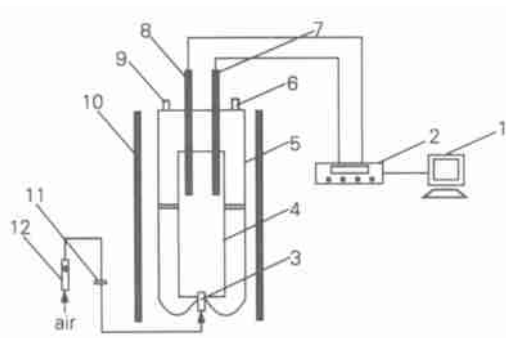


图 1 气升式光生物反应器

1. 计算机; 2. 在线检测仪; 3. 气体分布器; 4. 导流筒; 5. 反应器主体; 6. 取样和接种口; 7. pH 电极; 8. 溶解氧电极; 9. 排气口; 10. 光源; 11. 空气过滤器; 12. 空气流量计

Fig.1 Diagram of the airlift photobioreactor

1. Computer; 2. Online detector; 3. Air distributor; 4. Airlift column; 5. Photobioreactor; 6. Feeding and inoculation port; 7. pH probe; 8. DO probe; 9. Air exhaust; 10. Light source; 11. Air filter; 12. Air flowmeter

2 结果与讨论

2.1 裙带菜配子体的生长曲线

依照上述条件,在 3 L 气升式光生物反应器中培养裙带菜配子体 6 d,其生长情况如图 2 所示。第 1 天,配子体的生长较为缓慢,比生长速率只有 $0.108 d^{-1}$;第 2 天、第 3 天配子体进入快速生长期,比生长速率最高达到 $0.262 d^{-1}$,是第 1 天的 2 倍多,日平均增重达到 30%,而常规培养一般只为 20% [12];第 4 天、第 5 天配子体生长减缓,比生长速率分别为 $0.134 d^{-1}$ 、 $0.169 d^{-1}$,第 6 天进入稳定生长期,比生长速率降为零,配子体基本停止生长。

2.2 裙带菜配子体培养过程中溶解氧的变化

裙带菜作为光合自养生物,在光照下进行光合作用,利用 CO_2 ,释放 O_2 ;在黑暗条件下进行呼吸作用,消耗 O_2 ,放出 CO_2 。所以,在用反应器培养裙带菜配子体过程中,培养液中溶解氧浓度在光照期上升,黑暗期下降(见图 3)。在整个培养过程中,溶解氧随着光暗周期变化而有所升降,但其整体趋势是保持在一个较稳定的水平,略有增加,最高值仅为 $0.280 mmol/L$,相对于培养介质中氧的饱和值只升高

了 11%。这是由于它是一种气升式反应器,在培养过程中持续通入空气,一方面可有效地驱除在光照期配子体光合作用产生的氧,另一方面可充分地补充在黑暗期配子体呼吸作用所消耗的氧,从而使培养过程中溶氧保持在一较稳定的水平,避免了由于氧的积累和消耗,对配子体生长可能产生的抑制和限制。

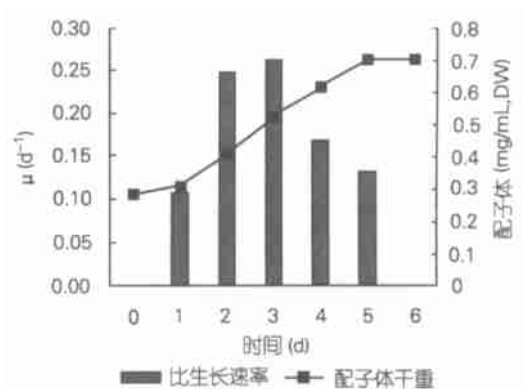


图 2 裙带菜配子体在反应器中培养的生长曲线

Fig.2 Growth of *Undaria pinnatifida* gametophytes cultivated in photobioreactor

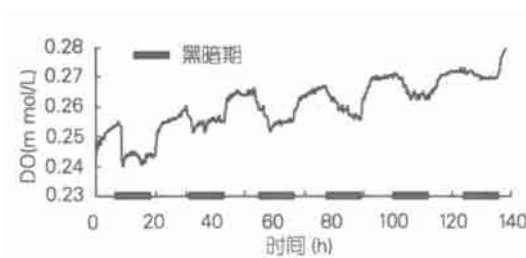


图 3 裙带菜配子体在反应器培养过程中 DO 随时间的变化

Fig.3 The variation of DO with cultivation time in the photobioreactor cultures of *Undaria pinnatifida* gametophytes

2.3 裙带菜配子体培养过程中 pH 的变化

空气中 CO_2 的含量约为 0.03%,将空气通入反应器对培养液的 pH 值几乎没有影响;而海水中溶解的无机碳(DIC)有 4 种存在形式: CO_2 、 H_2CO_3 、 HCO_3^- 和 CO_3^{2-} ,它们存在如下的化学平衡:



当配子体在光照条件下进行光合作用利用无机碳,在黑暗条件下呼吸作用放出 CO_2 补充培养液中的部分无机碳时,导致培养液中 pH 值由于配子体的生长代谢而迅速变化(见图 4)。同图 3 的 DO 变化相似,以一

天 24 h 为一光暗周期,随着光照的开始,pH 值迅速升高达到一最高值后,保持基本稳定;光照关闭后,pH 值迅速下降至最低值,并持续稳定到新的光照期,pH 值又迅速上升,呈现与上周期相同的变化。比较每一光暗周期培养液中最高 pH 值与最低 pH 值随培养时间的变化(见图 5),其中最高 pH 值逐渐缓慢升高,从 pH 8.33 升至 pH 8.61;而 pH 值第 2 天为最低 7.51,此后持续升高至 7.99。前 3 天 pH 值变化幅度最大,后 3 天最高和最低 pH 值之差相对较小,变化趋势与图 2

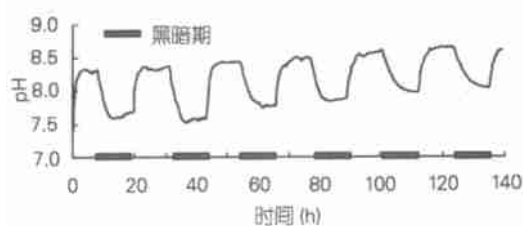


图 4 裙带菜配子体在反应器培养过程中 pH 随时间的变化
Fig. 4 The variation of pH with cultivation time in the photo bioreactor cultures of *Undaria pinnatifida* gametophytes

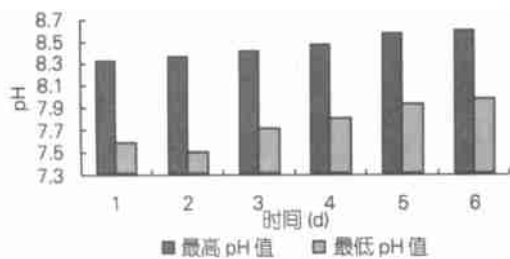


图 5 培养液的最高 pH 值和最低 pH 值随时间的变化
Fig. 5 The variations of the highest pH and the lowest pH of culture solution with cultivation time

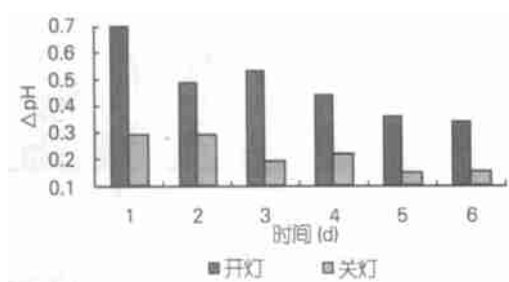


图 6 开灯和关灯后第一小时内 pH 的变化量
Fig. 6 pH changed rate in the first hour after open lamps and close lamps

配子体的生长曲线基本吻合,第 1 天例外,其原因在于新鲜培养液中游离 CO_2 浓度较高,而配子体优先利用游离 CO_2 ,使 pH 值的变化较大。在 100 L 气升式反应器中培养小球藻曾得到相同结果^[3]。每一个光暗周期中光照开始和结束的第 1 小时内 pH 值的升高和降低幅度,可一定程度反映配子体光合作用和呼吸作用的能力(见图 6)。前 4 天 pH 值上升和下降的幅度相对要大于后两天的,这也同配子体的生长情况基本吻合。因此,相对于 DO_2 ,培养液中 pH 值的变化受通入空气的影响小,更能准确反映藻类的生长,是利用光反应器培养藻类的一个重要参数。

2.4 裙带菜配子体培养过程中无机碳的变化

海水中的无机碳是裙带菜配子体光合作用的碳源,是其利用量最大的营养成分。海水中无机总碳(C_t)高达 2.0 mmol/L,其中约 91%是以 HCO_3^- 的形式存在,游离的 CO_2 约为 0.5%,两者可被配子体所利用(具体结果另文发表)。碱度(Alk)是海水中弱酸阴离子总含量的一个量度,在一般海水中含量足以影响碱度的弱酸阴离子有 HCO_3^- 、 CO_3^{2-} 、 H_2BO_3^- ^[3]。裙带菜配子体培养过程中,所测培养液的碱度以及根据体系化学平衡推算的总碳和 HCO_3^- 浓度随时间的变化示于图 7。初始新鲜培养液中总碳浓度较高,为 1.25 mmol/L, HCO_3^- 浓度为培养过程的最高值 1.17 mmol/L;而接种后的第 1 天,总碳和 HCO_3^- 浓度都降为最低点,分别为 0.80 mmol/L 和 0.67 mmol/L,表明配子体生长对无机碳的需求达到最大;随后第 2 天、第 3 天总碳和 HCO_3^- 浓度都较低,说明这段时期配子体生长较为旺盛;第 4、5、6 天总碳浓度回升且接近初始值, HCO_3^- 浓度也相对较高,说明此时配子体的生长已趋缓慢,与图 2 的生长曲线相对应。同时,碱度的变化趋势同总碳和 HCO_3^- 浓度的变化相对应,所以在用光反应器培养藻类时,碱度的测定也是监控藻类生长,特别是了解无机碳利用情况的一个重要手段。

培养液中游离 CO_2 是裙带菜配子体光合作用优先利用的无机碳源,但在培养过程中,一直处于较低的浓度,在 $3.0 \mu\text{mol/L}$ 上下波动(见图 8),培养液的 pH 值在光照期都超过 8.2,依靠配子体在黑暗期进行呼吸作用来补充的无机碳源主要以 HCO_3^- 的形式存在。所以, HCO_3^- 成为配子体生长所需的主要碳源。结合图 7、图 8 可以看出,培养过程中 HCO_3^- 浓度占总碳的比例随着时间缩小,由初始的 94%降为 75%,游离

CO₂ 浓度一直较低, 培养液中配子体所无法利用的 CO₂ 浓度随时间增大, 从而抑制了配子体的生长。在反应器培养过程中, 补加无机碳是一个有效促进藻类生长的手段, 这将是下一步研究工作的重点。

2.5 裙带菜配子体培养过程中 NO₃⁻、PO₄³⁻ 和盐度的变化

无机氮和无机磷是裙带菜配子体的重要生长因子。在反应器培养配子体的过程中, 加入一定浓度的

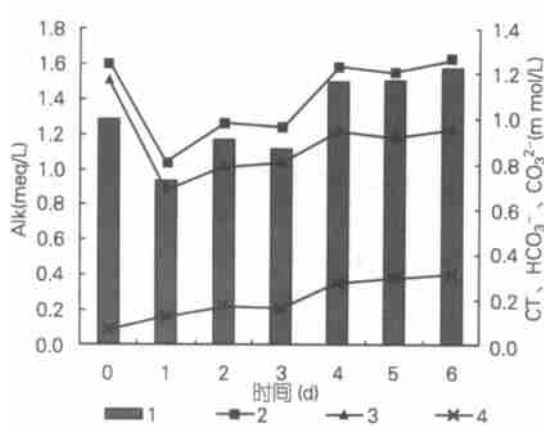


图7 培养液中碱度(1)、总碳(2)、HCO₃⁻(3)和CO₃²⁻(4)随时间的变化

Fig. 7 The variations of alkalinity (1), total inorganic (2), HCO₃⁻ (3) and CO₃²⁻ (4) of culture solution with cultivation time

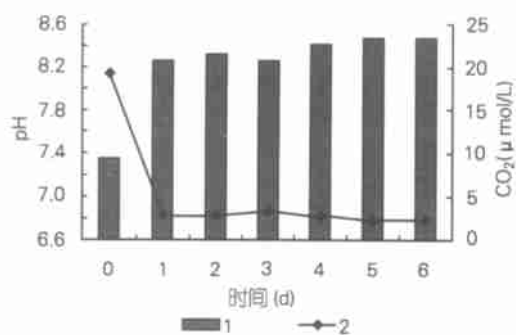


图8 培养液中游离 CO₂(2)与相应的 pH(1)值随时间的变化

Fig. 8 The variation of free CO₂ (2) and corresponding pH (1) of culture solution with cultivation time

NO₃⁻和PO₄³⁻, 它们在培养液中的浓度都随时间而逐渐降低, 每天配子体对NO₃⁻和PO₄³⁻的利用情况如图9所

示。第1天配子体对NO₃⁻和PO₄³⁻的利用量都最低, 此时配子体正处于缓慢生长阶段, 对营养盐的利用较少。第2天NO₃⁻和PO₄³⁻的利用量都迅速增加, 其中NO₃⁻的利用量较大, 并且同第3天的利用量基本持平, 在这两天配子体进入快速生长阶段。第4、第5天配子体对NO₃⁻的利用量达到最高, 这段时期配子体密度最大, 虽然生长减缓, 但对营养物质的利用量加大。进入第6天配子体停止生长, 对NO₃⁻的利用量随之降低。由此可见, NO₃⁻的利用情况同配子体的生长相对应, 说明NO₃⁻是促进配子体生长不可缺少的一个重要营养因子。而与此同时, PO₄³⁻的每天利用量从第2天开始一直处于一个较为稳定的值, 并没有因为配子体的生长而发生明显变化。盐度是衡量海水中溶解物质总量的一个重要参数^[2], 在加入较高浓度和PO₄³⁻的消毒海水中, 其值的大小既受海水中无机碳浓度的影响, 又被NO₃⁻和PO₄³⁻所干扰。将培养液中碱度与相对应的盐度随时间的变化示于图10, 除第4天、第5天以外, 碱度与盐度的变化都基本一一对应, 而这两天正是NO₃⁻利用的高峰, 使得盐度相对碱度要低得多。因此, 测定盐度可在一定程度上反映配子体培养液中营养物质的利用情况, 同时采用电导法测盐度是一个简便、准确的方法, 电导电极可进行在线测量, 成本低, 可在今后利用光反应器技术研究藻类的工作中进行应用。

3 结论

气升式光生物反应器适合裙带菜配子体的培养, 在本实验培养条件下, 配子体处于快速生长时, 比生长速率为0.262 d⁻¹, 日平均增重达到30%, 是常规

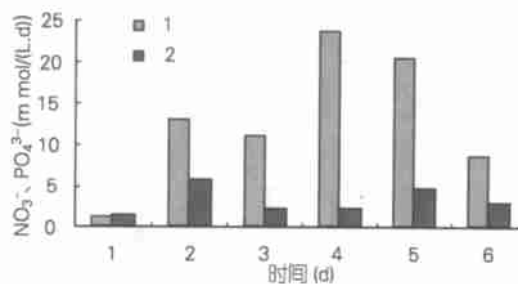


图9 裙带菜配子体对NO₃⁻(1)和PO₄³⁻(2)的利用率随时间的变化

Fig. 9 The variations of consumption rate to NO₃⁻ (1) and PO₄³⁻ (2) of *Undaria pinnatifida* gametophytes with cultivation time

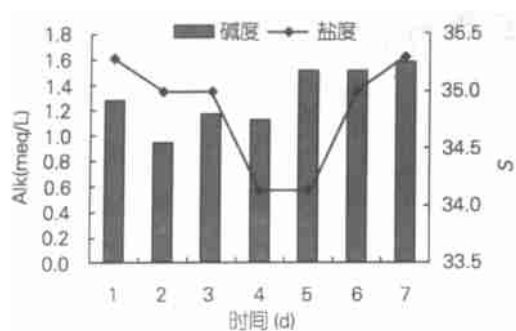


图 10 培养液的碱度和盐度随时间的变化

Fig.10 The variation of alkalinity and salinity of culture solution with cultivation time

培养的 1.5 倍;通过在线实时检测 DO 和 pH 值,可了解配子体的光合、呼吸特性;通过测定培养过程碱度变化,可推知配子体对无机碳的利用情况;测定培养液盐度变化,则能指示配子体对营养物质 NO_3^- 和 PO_4^{3-} 的利用趋势。

参考文献

- 1 李大鹏,刘海航,彭光等.日本品系裙带菜无性繁殖系生产性育苗技术,海洋科学,1998,5:4~5
- 2 郭锦宝主编.化学海洋学.厦门:厦门大学出版社,1997.29~30
- 3 张栩,耿涌,周百成.气升式藻类光生物反应器的应用研究,海洋科学,2000,5:14~17
- 4 Pang Shaojun and Wu Chaoyuan. Study on gametophyte vegetative growth of *Undaria pinnatifida* and its applications, *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1996, 14(3) 205~210
- 5 Parson T., Mita Y. R., Lalli C. M. . A Manual of Chemical and Biological Methods for Sea water Analysis. London: Pergamon Press, 1984. 142~148
- 6 Stumm W., Morgan J. J. . Aquatic Chemistry/ An Introduction Emphasizing Chemical Equilibria in Nature Water. New York: Wiley-Interscience, 1970. 118~160
- 7 Collos Y., Mornet F., Sciandra A. et al. . An optical method for the rapid measurement of micromolar concentrations of nitrate in marine phytoplankton cultures, *J. of Applied Phycology*, 1999,11:179~184

STUDIES ON GROWTH OF GAMETOPHYTES OF *Undaria pinnatifida* IN AIRLIFT PHOTOBIOREACTOR

ZHANG Xu¹ LI Da-peng² CAI Zhao-ling¹ CONG Wei¹ OUYANG Fan¹

(¹ State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, The Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100080)

(² Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

Received: Nov.13,2001

Key Words: *Undaria pinnatifida*, Gametophytes, Photobioreactor

Abstract

The cultures of gametophytes clone of *Undaria pinnatifida* were carried out in an airlift photobioreactor. The highest rate of specific growth was 0.262 d⁻¹ and daily average rate of live weight growth was 30% in fast-growing period. By online monitoring DO and pH in cultivation process, the capability of photosynthesis and respiration of gametophytes were found out in real time. Alkalinity of culture solution was assayed and inorganic carbon consumption of gametophytes was inferred. The results indicated free CO₂ in the cultivation system was first utilized by gametophytes and the concentration was not very high in the cultivation process. Meanwhile, HCO₃⁻ was compensated through respiration of gametophytes in a certain degree and the higher concentration of HCO₃⁻ was maintained in the cultivation. The salinity and concentration of NO₃⁻ and PO₄³⁻ of culture solution were analyzed. The results indicated consumption of NO₃⁻ was corresponding to the growth of gametophytes and the variation of salinity reflected the utilization of nutritive salt of gametophytes. (本文编辑:张培新)