

亚心形扁藻培养基的筛选与优化^{*}

张华军¹ 李元广^{1**} 魏晓东¹ 费志清² 裴鲁青²

(¹ 华东理工大学海洋生化工程研究所、生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237)

(² 宁波大学海洋生物工程重点实验室、全国科技兴海技术转移宁波中心 宁波 312511)

提要 在 500 mL 三角瓶中对亚心形扁藻培养基的筛选与优化结果表明,原“海洋三号”培养基中需添加 0.8 g/L 的 NaHCO₃,且 K₂HPO₄ 的浓度需由原来的 0.01 g/L 调整为 0.06 g/L。10 L 全自动封闭式光生物反应器分批培养结果表明,优化后的“海洋三号”培养基不仅可加快亚心形扁藻的生长速率而且可延长生长时间,培养 4 d 时最高藻细胞密度可达 426 × 10⁴ 细胞/mL,比原“海洋三号”培养基的最高培养密度提高 42%。优化后的“海洋三号”培养基为亚心形扁藻的最适培养基。

关键词 亚心形扁藻,培养基,优化,培养

中图分类号 S968.41 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003)05-0037-05

亚心形扁藻 (*Platymonas subcordiformis*) 是一种海洋微藻,属绿藻门 (Chlorophyta)、绿藻纲 (Chlorophyceae)、塔形藻亚目 (Pyramimonadineae)、扁藻科 (Platymonadaceae)、扁藻属 (*Platymonas*)。由于它含有丰富的蛋白质、脂肪等营养物质,且易被鱼、虾、贝(如泥蚶)等海珍品幼体摄食,在国内外被广泛培养以用作海珍品育苗的开口饵料^[1]。

亚心形扁藻光自养大规模培养过程中存在的主要问题是培养密度低、生长速率慢。合适的培养基是实现亚心形扁藻高密度培养的一个重要因素。目前,国内扁藻培养基^[1]主要有海产绿藻培养基、“海洋三号”培养基、Buchter 培养基以及水产育苗单位自行配制的一些培养基。海产绿藻培养基是一种通用的绿藻培养基,可以用来培养扁藻;“海洋三号”是一种专一的扁藻培养基;Bucher 培养基由于其中的土壤浸出液制备麻烦而较少有人采用;水产育苗中大规模培养亚心形扁藻所用的培养基大多是由各单位根据情况自行配制(如宁波大学海洋生物工程实验室自行研制的培养基,以下称“宁大海生”培养基)。这些培养基的共同特点是:(1)藻细胞培养密度不高。亚心形扁藻在吊袋和大池中培养的最高密度仅为 134 × 10⁴ 细胞/mL^[2]。(2)培养基中的主要成分为硝酸钠(或硝酸钾),磷酸二氢钾以及柠檬酸铁,但各培养基中的含量有差异。(3)培养基中无碳源。国外 Fabregas 等^[3]用于培养扁藻的培养基虽然可使扁藻的最高密度达到 783 × 10⁴ 细胞/mL,但培养基成分中仅微量元素就达 10 种之

多,实际应用时不方便。

由上可见,亚心形扁藻培养基未经系统筛选和优化。此外,由于培养装置和技术落后,亚心形扁藻的培养密度均不高;若采用高效培养装置和培养技术实现亚心形扁藻的高密度培养,则原有培养基更须优化,否则难以实现高密度培养。鉴于此,本文对亚心形扁藻培养基的筛选与优化进行研究,以期确定亚心形扁藻的合适培养基,从而为亚心形扁藻的高密度培养奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

亚心形扁藻:由宁波大学海洋生物工程重点实验室惠赠。

海水:取自宁波象山,并经过滤煮沸处理。

体积为 10 L 的全自动封闭式光生物反应器:由华东理工大学研制,配有溶氧、pH 和温度的计算机在线检测和控制系统。

* 上海市青年科技启明星计划资助。

第一作者:张华军,出生于 1976 年,硕士,研究方向:海洋生化工程,现工作于浙江省嵊州市人民政府。

** 联系人, Email: ygli@ecust.edu.cn, 电话: 021-64250964

收稿日期: 2002-03-28; 修回日期: 2002-05-20

显微镜:OLIMPUS CH0, 日本。

1.2 培养基^[1]

海产绿藻培养基: NH_4NO_3 50~100 mg, K_2HPO_4 5 mg, $\text{FeC}_6\text{H}_6\text{O}_7$ 0.1~0.5 mg, 海水 1 L。

“海洋三号”扁藻培养基: NaNO_3 0.1 g, K_2HPO_4 0.01 g, $2\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 11\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g, 1%的 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 溶液 10 滴, 海水 1 L。

Butcher 扁藻培养基: NaNO_3 0.1 g, K_2HPO_4 0.05 g, 土壤浸出液 50 mL, 海水 1 L;

“宁大海生”培养基: KNO_3 0.1 g, K_2HPO_4 0.01 g, MnSO_4 0.5 mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4.57 mg, EDTA 20 mg, 海水 1 L。

1.3 培养方法

1.3.1 培养基的筛选 选用上述 4 种培养基, 用 500 mL 三角烧瓶在光照培养箱中鼓泡培养, 光照周期为 12:12, 温度 26 °C, 光强 6 000 lx, 接种密度为 23×10^4 细胞/mL。每天 8:00 取样, 用血球计数法在显微镜下计数以观察亚心形扁藻的生长情况。

1.3.2 不同氮源的影响 “海洋三号”培养基中氮源用 NH_4Cl 、尿素、 NaNO_3 的代替, 其浓度(N 浓度均为 1.18 mmol/L)分别为 1.18, 0.59, 1.18 mmol/L, 接种密度为 30×10^4 细胞/mL, 按 1.3.1 法培养。

1.3.3 不同初始 NaNO_3 浓度的影响 NaNO_3 初始浓度分别为 0.0, 0.1, 0.3, 0.6, 0.9 g/L, 除氮源外, 培养基中其它成分同“海洋三号”培养基, 接种密度为 20×10^4 细胞/mL, 按 1.3.1 法培养。

1.3.4 不同初始 K_2HPO_4 浓度的影响 K_2HPO_4 初始浓度分别为 0.00, 0.01, 0.03, 0.06, 0.09, 0.12 g/L, 培养基中其它成分同“海洋三号”培养基, 接种密度为 10×10^4 细胞/mL, 按 1.3.1 法培养。

1.3.5 不同初始 NaHCO_3 浓度的影响 在 K_2HPO_4 浓度为 0.06 g/L 的“海洋三号”培养基中分别添加 0.0, 0.1, 0.4, 0.8, 1.2 g/L 的 NaHCO_3 , 在 28 °C、转速 140 r/min、光照周期 24:0、光强 6 000 lx 条件下, 250 mL 摇瓶上培养, 接种密度为 23×10^4 细胞/mL。

1.3.6 10 L 全自动封闭式光生物反应器培养 在 10 L 全自动封闭式光生物反应器中分别用“海洋三号”培养基和优化后的“海洋三号”培养基进行亚心形扁藻分批培养试验, 光生物反应器中的其它培养条件为: 温度 26 °C、光强 6 000 lx、光暗比 24:0、初始 pH8.6, 接种密度为 28×10^4 细胞/mL。

2 实验结果

2.1 培养基的筛选

图 1 为亚心形扁藻在不同培养基中的生长曲线。由图 1 可知, 亚心形扁藻在“海产绿藻”培养基和

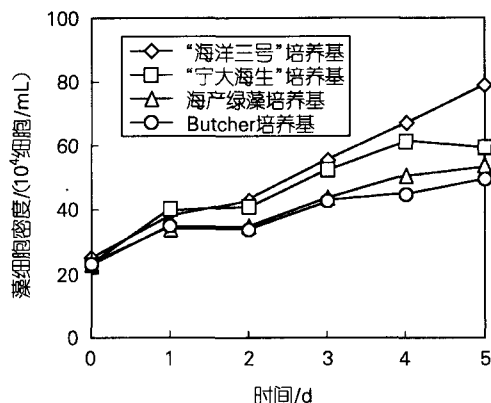


图 1 不同培养基中亚心形扁藻的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of *Platymonas subcordiformis* in different media

Butcher 培养基中培养 5 d, 密度才分别达到 54×10^4 细胞/mL 和 51×10^4 细胞/mL; 在“宁大海生”培养基与“海洋三号”培养基中培养 4 d, 其密度就分别达到 62×10^4 细胞/mL 和 68×10^4 细胞/mL; 培养至第 5 天, 用“宁大海生”为培养基时, 藻细胞密度没有明显升高, 而选用“海洋三号”培养基时, 藻细胞仍然继续生长, 其藻细胞密度达到 80×10^4 细胞/mL。由此可见, 亚心形扁藻在“海洋三号”培养基中的生长明显优于其它培养基, 故选用“海洋三号”作为亚心形扁藻的培养基。

2.2 “海洋三号”培养基优化

培养基筛选结果表明, “海洋三号”培养基是亚心形扁藻培养的较适培养基。下面对“海洋三号”培养基中氮源的种类和含量、磷含量以及碳含量做进一步优化, 最后在 10 L 全自动封闭式光生物反应器中对培养基优化前后的效果进行验证。

2.2.1 不同氮源对亚心形扁藻生长的影响 图 2 为不同氮源对亚心形扁藻生长的影响。由图 2 可知, 用 NaNO_3 作为氮源时, 藻细胞生长最快, 尿素次之, 用氯化铵时生长最慢。培养 1 周时, 以 NaNO_3 为氮源的藻细胞密度由接种时的 30×10^4 细胞/mL 上升到 156×10^4 细胞/mL; 在相同接种密度下, 用尿素与氯化铵为氮源培养 1 周时, 藻细胞密度仅分别为 132×10^4 细胞/mL、 114×10^4 细胞/mL。因此, NaNO_3 是亚心形扁藻培养的较适氮源。

2.2.2 NaNO_3 初始浓度对亚心形扁藻生长的影响 图 3 为 NaNO_3 浓度对亚心形扁藻生长的影响。由图 3 可知, 亚心形扁藻在初始 NaNO_3 浓度为 0.1 g/L 时的生长明显好于其它初始浓度下的生长, 培养

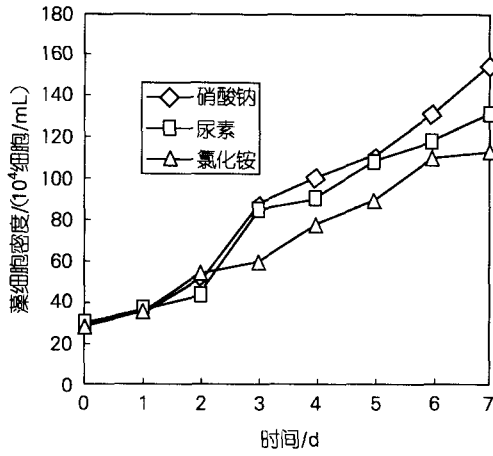


图2 不同氮源对亚心形扁藻生长的影响
Fig. 2 Effects of different nitrogen sources on growth of *Platymonas subcordiformis*

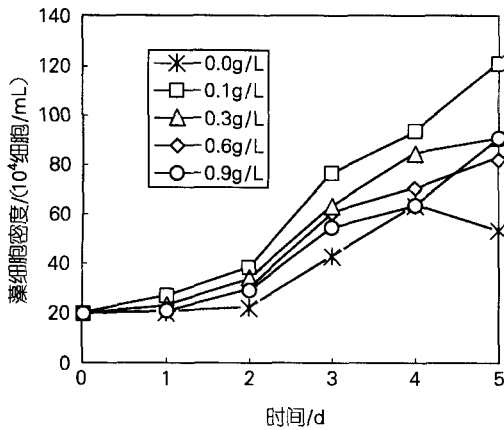


图3 NaNO₃ 初始浓度对亚心形扁藻生长的影响
Fig. 3 Effects of NaNO₃ initial concentration on growth of *Platymonas subcordiformis*

至第5天, 其藻细胞密度达到 120×10^4 细胞/mL; NaNO₃ 初始浓度为 0.0, 0.3, 0.6, 0.9 时培养至第5天, 藻细胞密度才分别为 53×10^4 细胞/mL, 90×10^4 细胞/mL, 82×10^4 细胞/mL, 90×10^4 细胞/mL。由此可见, NaNO₃ 初始浓度过低或过高都不利于亚心形扁藻的生长, 初始 NaNO₃ 浓度为 0.1 g/L 时最适合亚心形扁藻的生长。

2.2.3 K₂HPO₄ 初始浓度对亚心形扁藻生长的影响 亚心形扁藻在 K₂HPO₄ 初始浓度 0.00~0.12 g/L 范围内培养 7 d 的结果如图 4 所示。由该图可知, 培

养 7 d 时, 亚心形扁藻用 0.06 g/L K₂HPO₄ 的初始浓度培养时密度最大, 其值为 141×10^4 细胞/mL; 用 0.00 g/L K₂HPO₄ 的初始浓度培养时的密度最低, 其值为 107×10^4 细胞/mL。前者的最高培养密度比后者提高了 31.8%。K₂HPO₄ 初始浓度为 0.06 g/L 时生长最好, 初始浓度为 0.01 g/L 次之。由此可见, “海洋三号” 培养基中 K₂HPO₄ 的浓度应由 0.01 g/L 调整为 0.06 g/L。

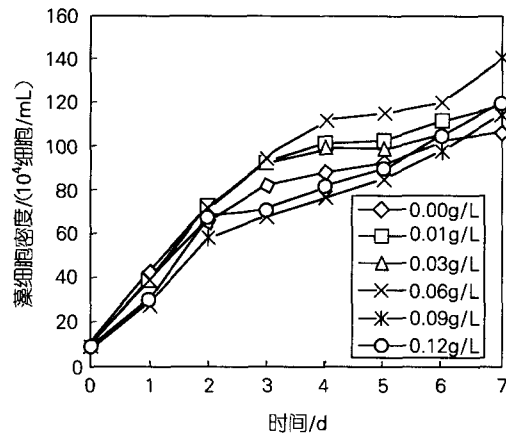


图4 K₂HPO₄ 初始浓度对亚心形扁藻生长的影响
Fig. 4 Effects of K₂HPO₄ initial concentration on growth of *Platymonas subcordiformis*

2.2.4 NaHCO₃ 初始浓度对亚心形扁藻生长的影响 添加 NaHCO₃ 有利于藻类生长^[4-8], 一般藻类生长所用碳氮比^[9]为 7~8:1。图 5 为添加不同初始 NaHCO₃ 浓度对亚心形扁藻生长的影响。由该图可知, 添加 NaHCO₃ 有利于亚心形扁藻的生长, 添加 0.8 g/L 的 NaHCO₃ 培养 4 d, 其藻细胞密度达到 170×10^4 细胞/mL, 不添加 NaHCO₃ 时的藻细胞密度仅为 123×10^4 细胞/mL, 前者是后者的 1.38 倍; 在初始 NaHCO₃ 浓度较低的范围, 藻细胞生长速率随初始 NaHCO₃ 浓度增大而加快, 但当浓度超过 0.8 g/L 时, 其生长速率反而有所下降。由此可见, 原“海洋三号”培养基中不加碳源, 亚心形扁藻在生长时仅靠空气中的碳源是不能满足藻细胞生长需要, 在“海洋三号”培养基中添加 0.8 g/L NaHCO₃ 将更有利于亚心形扁藻的生长。

2.2.5 10 L 全自动封闭式光生物反应器中培养基优化效果的验证 通过以上对培养基的筛选和优化, 最终确定了亚心形扁藻的最适培养基配方 (以下称优化后的“海洋三号”培养基) 为: NaHCO₃ 0.8

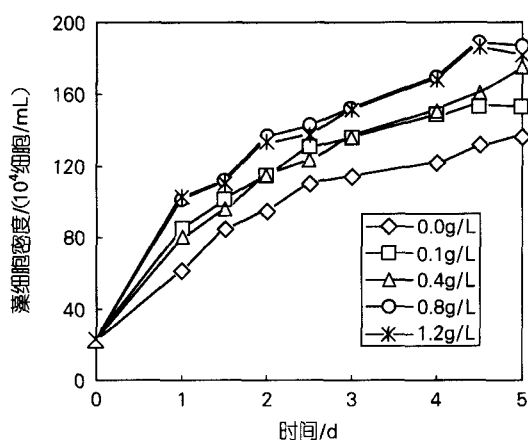


图5 NaHCO₃ 初始浓度对亚心形扁藻生长的影响
Fig.5 Effects of NaHCO₃ initial concentration on growth of *Platymonas subcordiformis*

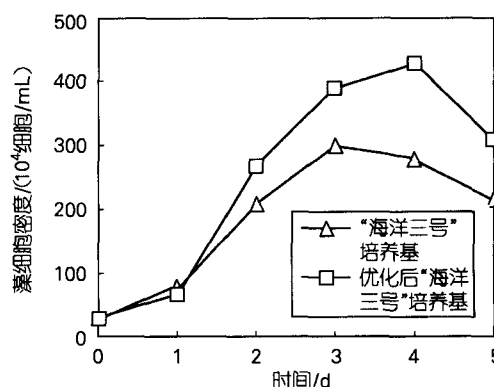


图6 10 L全自动封闭式光生物反应器中亚心形扁藻在两种培养基中的生长曲线
Fig.6 Growth curves of *Platymonas subcordiformis* with two varieties of media in 10 L automatic enclosed photo-bioreactor

g/L, NaNO₃ 0.1 g/L, K₂HPO₄ 0.06 g/L, 2Na₃C₆H₅O₇ · 11H₂O 0.02 g/L, 1%的 Fe₂(SO₄)₃ 溶液 10滴/L, 海水配制。对于“海洋三号”培养基中其它成分, 本文没有进行研究, 这是因为培养基中 Fe₂(SO₄)₃ 的含量很少, 而培养基中 2Na₃C₆H₅O₇ · 11H₂O 的主要作用是为了防止铁离子的沉淀。

对“海洋三号”培养基优化均为单因子实验, 为考察其综合效果, 笔者在 10 L 全自动光生物反应器中对

培养基的优化效果进行了验证, 结果如图 6 所示。由该图可知, 亚心形扁藻在优化后的“海洋三号”培养基中培养 4 d, 密度达最大, 其值为 426 × 10⁴ 细胞/mL; 在“海洋三号”培养基中培养 3 d, 密度达到最大, 其值为 300 × 10⁴ 细胞/mL, 而此时亚心形扁藻在优化后的“海洋三号”培养基中培养的密度为 388 × 10⁴ 细胞/mL, 比前者高出 29%。表 1 对两种培养基下的生长情况进行了比较。

表 1 10 L 光生物反应器中亚心形扁藻在两种培养基中生长结果的比较

Tab.1 Comparison between the growth of *Platymonas subcordiformis* in two varieties of media

培养基	前 3 d 平均生长速率 [10 ⁴ 细胞/(mL·d)]	生长维持时间 (d)	最高密度 (10 ⁴ 细胞/mL)
“海洋三号”培养基	90.7	3	300
优化后的“海洋三号”培养基	120	4	426

由表 1 可知, 在 10 L 全自动封闭式光生物反应器中, 亚心形扁藻在优化后的“海洋三号”培养基中培养, 前 3 d 平均的生长速率为 120 × 10⁴ 细胞/(mL·d), 而在“海洋三号”培养基下前 3 d 平均的生长速率仅为 90.7 × 10⁴ 细胞/(mL·d); 亚心形扁藻在优化后的“海洋三号”培养基中可培养 4 d, 而在“海洋三号”培养基中仅可培养 3 d。优化后的“海洋三号”培养基, 不仅加快了亚心形扁藻的生长速率, 而且延长了亚心形扁藻的生长时间, 其生长的最高密度为 426 × 10⁴ 细胞/mL, 是原“海洋三号”培养基的 1.42 倍。由此可见,

优化后的“海洋三号”培养基可显著提高亚心形扁藻的培养密度。

3 结论

对亚心形扁藻的培养基进行了筛选, 确立了“海洋三号”培养基是亚心形扁藻的较好培养基。在此基础上, 通过对培养基中碳、氮、磷的单因子研究, 优化了亚心形扁藻的培养基, 结果表明原“海洋三号”培养基中应添加 0.8 g/L 的 NaHCO₃, 且其中的 K₂HPO₄ 浓度应由原来的 0.01 g/L 调整为 0.06 g/L。10 L 全自

动封闭式光生物反应器分批培养结果表明,亚心形扁藻在优化后的“海洋三号”培养基中培养4 d时藻细胞密度达最大,其值为 426×10^4 细胞/mL,而在原“海洋三号”培养基中培养3 d时密度达到最大值,其值为 300×10^4 细胞/mL。与原“海洋三号”培养基相比,优化后的“海洋三号”培养基不仅可加快亚心形扁藻的生长速率而且可延长藻细胞生长时间,最终可使亚心形扁藻的最高密度提高42%。

参考文献

- 1 李庆彪, 宋全山编著. 生物饵料培养技术. 北京: 中国农业出版社, 1999. 50-72
- 2 缪国荣, 官庆礼, 王进和. 单胞藻薄膜袋封闭式培养技术的研究. 青岛海洋大学学报, 1989, 19(3): 119-124
- 3 Fabregus J, et al. Mass culture and biochemical variability of the marine microalga *Tetraselmis suecica kytin* (butch) with high nutrient concentrations. *Aquaculture*, 1985, 22(1, 2): 137-148
- 4 湛江水产专科学校主编. 海洋饵料生物培养. 北京: 农业出版社, 1979. 37-116
- 5 陈淑芬, 潘永桢. 等鞭金藻的生长及其主要营养成分的研究. 海洋与湖沼, 1987, 18(1): 55-63
- 6 Helal H M, Mengel K. Interaction between light intensity and sodium chloride salinity and their effects on growth, carbon dioxide assimilation, and photosynthate conversion in young broad beans. *Plant Physiology*, 1981, 67(5): 999-1 002
- 7 曹善茂. 碳酸氢钠在单胞藻生产性培养中的应用. 大连水产学院学报, 1997, 12(3): 52-58
- 8 戴玉蓉, 卢敬让. NaHCO_3 在单胞藻藻种培养中的作用. 齐鲁渔业, 1997, 14(5): 20-21
- 9 陈峰, 姜悦. 微藻生物技术. 北京: 中国轻工业出版社, 1999. 185-186

SCREENING AND OPTIMIZING ON THE CULTURE MEDIUM OF *Platymonas subcordiformis*

ZHANG Hua-Jun¹ LI Yuan-Guang¹ WEI Xiao-Dong¹ FEI Zhi-Qing² PEI Lu-Qing²

(¹Institute of Marine Bioprocess Engineering, State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science & Technology, Shanghai, 200237)

(²Key Laboratory of Marine Biotechnology, Ningbo University, Ningbo Center of National Technology Transferring Center for Promoting Marine Technology, Ningbo, 312511)

Received: Mar., 20, 2002

Key Words: *Platymonas subcordiformis*, Culture medium, Optimization, Culture

Abstract

Compared with other culture mediums, the medium named “marine No. 3” was more suitable for growth of *Platymonas subcordiformis*. Further studies indicated that 0.8 g/L NaHCO_3 should be added to “marine No. 3” medium, and the concentration of K_2HPO_4 should be changed from 0.01 g/L to 0.06 g/L. Results of the batch culture of *Platymonas subcordiformis* in 10 L automatically enclosed photobioreactor showed that the optimized “marine No. 3” medium could not only increase growth rate but also extend growth time of the cell, and the highest cell density reached 426×10^4 / mL after four days, which was 1.42 times that with the original “marine No. 3” medium.

(本文编辑:张培新)