

## 等鞭藻的生长及其主要营养成分的研究\*

陈椒芬 潘永尧

(中国科学院海洋研究所, 青岛)

**提要** 本文记述了从我国山东沿岸海水中分离的一种适高温生长的等鞭藻 (*Isochrysis galbana* Parke) 3011, 其最适生长温度为 25—30℃, 用简单的无机盐加少量维生素 B<sub>1</sub> 和 B<sub>12</sub> 就能促其快速生长。其粗蛋白、粗脂肪、碳水化合物和灰分的含量分别占干重约 46.8%, 22.25%, 22.54% 和 8.4%, 氨基酸含量为 33.37%。

等鞭藻 (*Isochrysis galbana* Parke) 是水产界熟知的一种单细胞海藻。由于其个体小(直径为 5μm 左右)、繁殖快、胞内营养丰富, 且缺乏含纤维素的细胞壁, 容易被动物幼虫消化吸收, 国外已广泛用于饲喂贻贝<sup>[4]</sup>、牡蛎<sup>[6]</sup>等, 被认为是海产双壳类动物幼虫的理想饵料。有关这种藻类繁殖生长所需的理化条件, 已有不少报道, 如 Kain & Fogg<sup>[10]</sup> 对其生长和光、温、营养因子的关系进行过系统的研究, Ukeles<sup>[11]</sup> 进一步测定了对温度的适应性, Droop<sup>[6]</sup> 证明了其繁殖除需无机营养外, 还需要维生素补给等。但在实际应用中, 不少作者提到等鞭藻虽是动物幼虫的优质饵料, 但这种藻类对营养要求严格, 且不耐 25℃ 以上的高温, 尤其对外界进入的杂藻竞争能力差, 只适于在密闭的容器内生长, 不宜在开放式池中培养<sup>[16]</sup>。

我国长时期来缺乏这种藻种, 曾多次从国外引进, 都未培养起来, 迄今亦未能在水产养殖中应用。

1982年, 我们从山东省海阳县的海水中分离到一株金藻 OA-3011, 经光学显微镜和电子显微镜观察证明, OA-3011 与 1949年 Parke<sup>[12]</sup> 报道的 *Isochrysis galbana* 为同一类。通过小规模饲养贻贝 *Mytilus edulis* 幼虫, 确证其饵料效果明显地比贝类常用饵料褐指藻 *Pheodactylum tricoratum* 好<sup>[3]</sup>, 为尽快使这种藻类应用于水产养殖业, 亟需建立一套简单易行的培养方法, 为此进行了以下研究。

### 一、材料和方法

#### 1. 实验藻种

等鞭藻 OA-3011 (以下简称等鞭藻 3011) 是作者之一(陈)于 1982年3月分离的, 一直以单藻培养物保存在 12—30℃ 的室温内。

#### 2. 实验方法

\* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 1094 号。

收稿日期: 1984年10月15日。

生态因子实验中的条件和生长率测定方法同文献[1]。营养实验中的培养液1号,其营养组成为1L海水中加  $\text{NaNO}_3$  60mg,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4mg,  $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$  0.5mg 和  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  5mg。维生素实验中所用的  $\text{B}_{12}$  和  $\text{B}_1$  (盐酸硫胺)均为人体用的肌肉注射液;生物素 ( $\text{V}_H$ ) 为进口分装的粉剂。

自然光、温条件下的20L玻璃瓶培养是在本所楼顶的玻璃房内进行的。实验期间昼夜水温波动在  $24-30^\circ\text{C}$ , 光强约为  $700-15,000\text{lx}$ 。半连续培养在朝北的培养架上进行,玻璃瓶一侧由一排4支40W日光灯昼夜照明,射至瓶壁的光强约为  $12,000\text{lx}$ ;另一侧受北窗自然光照射,最高光强为  $5300-6500\text{lx}$ 。温度用控温仪控制,瓶内温度维持在  $25\pm 1^\circ\text{C}$ 。并用无油压缩机日夜通气,实验开始时,培养液内细胞密度为  $10^5$  个/ml。

1吨水体的大池培养则是用两只玻璃纤维制成的白色水池,长2.1m,宽1.2m,水深0.4m。

营养成分分析:粗蛋白用半微量凯氏定氮法测定;粗脂肪在索氏提取器内用乙醚提取;灰分是在  $530^\circ\text{C}$  马福炉内灼烧4小时后测定;碳水化合物为扣去上述三种物质含量的剩余干重百分数。氨基酸测定用  $\text{HCl}$  水解后,在日立835-50型氨基酸自动分析仪上柱分析。

## 二、实验结果

### (一) 生态因子实验

#### 1. 营养

实验用培养液1号加各种不同浓度的维生素进行。在温度  $25\pm 1^\circ\text{C}$ , 光强  $6000\text{lx}$ , 和光照15h、黑暗9h的条件下,培养8天,结果见图1。

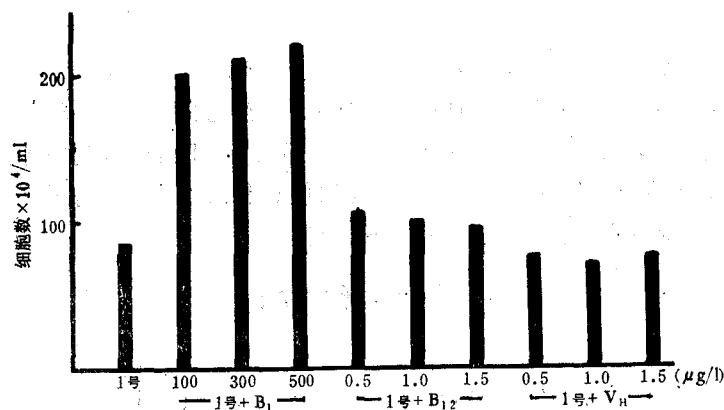


图1 不同浓度单一维生素对等鞭藻 3011 生长的影响

实验结果证明:等鞭藻 3011 在纯无机盐培养液中(1号液),生长极不旺盛,如在1号液中加入维生素  $\text{B}_{12}$  ( $0.5-15\mu\text{g/L}$ ) 细胞密度就有升高;如加入维生素  $\text{B}_1$  ( $100-500\mu\text{g/L}$ ) 则明显地促进藻类生长,但生物素在试验的浓度范围内 ( $0.5-1.5\mu\text{g/L}$ ) 未见有任何

效用,这一结果与 Droop<sup>[6]</sup> 报道是一致的。实验中还看到,单纯提高一种维生素浓度对藻类的生长没有明显的影响。

混合维生素实验是用  $B_1$  100  $\mu\text{g/L}$ ,  $B_{12}$  0.5  $\mu\text{g/L}$  和生物素 0.5  $\mu\text{g/L}$  的 2 种或 3 种混合加入 1 号液,并和 1 号液加 1% 浒苔提取液 (A1) 进行比较,结果见图 2。

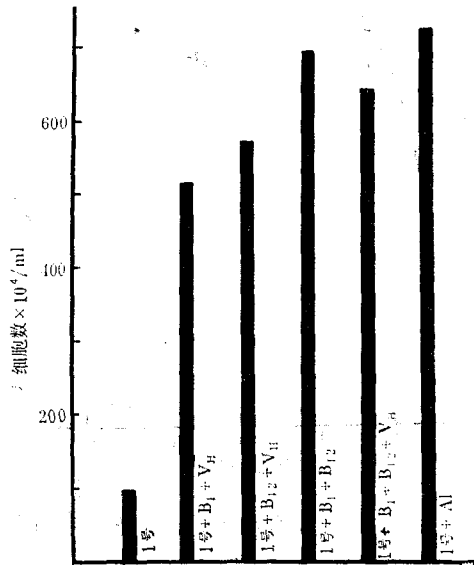


图 2 混合维生素对等鞭藻 3011 生长的影响

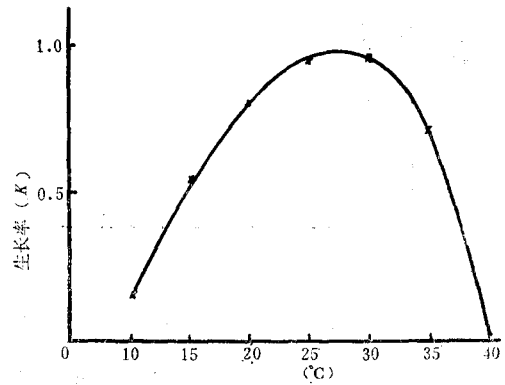


图 3 不同温度对等鞭藻 3011 生长率的影响

在以上几种处理组中,以 1 号液加浒苔提取液组生长最好。这与突起普林藻 *Prymnesium papillatum*<sup>[2]</sup> 的培养结果相同,说明在浒苔等底栖藻类提取液中,具有刺激金藻类生长的活性物质。在混合维生素各组中,以 1 号液加  $B_1$  和  $B_{12}$  组细胞密度最高。为此,我们选用这组的营养成分作为培养等鞭藻 3011 的基本培养液,为以下实验所用。

## 2. 温度

从图 3 中看到,等鞭藻 3011 的适温范围很广,10—35°C 都能正常繁殖。在 10—20°C,随着温度升高,生长率直线上升,20—25°C 还可继续升高,但速度减慢。25—30°C 达最高生长率,30—35°C 开始下降,至 40°C 停止生长。藻体接入后,立即失去游动能力而下沉;不久,色素褪尽随即死亡。

## 3. 盐度

图 4 说明,等鞭藻 3011 在纯淡水中是不能生长的,细胞接入后,色素变为淡绿,立即死亡。从盐度 0—10‰,生长率急剧上升达最高峰,直至 30‰,其生长率几乎无变化,超过 30‰ 生长减慢。这与 Laing<sup>[11]</sup> 等报道结果相一致。

## 4. 光强

如图 5 所示,等鞭藻 3011 当光强为 1000—6000lx 时,生长率随光强增强而递增,6000—10,000lx 虽能继续增高,但速度减慢,10,000lx 已接近该藻的生长饱和光强。

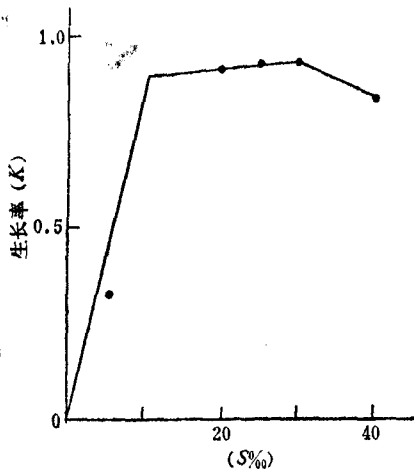


图4 不同盐度对等鞭藻 3011 生长率的影响

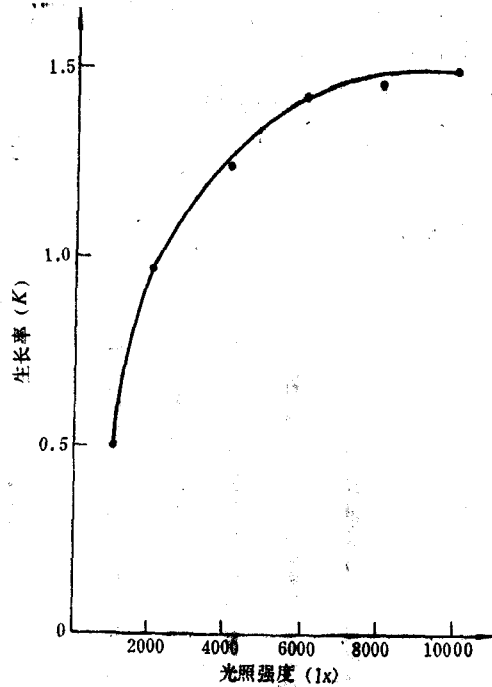


图5 不同光强对等鞭藻 3011 生长率的影响

## (二) 20L 玻瓶培养实验

### 1. 自然光、温条件下一次性培养

实验分静止培养、通气培养和加 0.1%  $\text{NaHCO}_3$  培养三组,每组各两瓶,藻液接种后 8 天内的生长情况见图 6。

结果表明:加 0.1%  $\text{NaHCO}_3$  组获最高细胞密度,培养 8 天后,细胞数增长达  $812 \times 10^4$  个/ml;通气培养次之,为  $450 \times 10^4$  个/ml;静止培养最差,仅  $180 \times 10^4$  个/ml。三者的细胞密度接近 4.5:2.5:1。

在培养液中加入适量的  $\text{NaHCO}_3$ ,为藻类增加光合作用所需的碳源,以促进其繁殖生长,在其他藻类培养中已有成功的报道<sup>[6]</sup>,我们的实验也得到了明显的效果,但在海水培养液中,随着藻类的生长,培养液的 pH 也逐渐升高(最高达 9.3), $\text{NaHCO}_3$  在  $\text{CO}_2$  不断被吸收的同时, $\text{CO}_3^{2-}$  和海水中大量存在的  $\text{Ca}^{2+}$  相结合,形成  $\text{CaCO}_3$ ,沉淀在藻液内和瓶壁四周。因此,必须随时调节 pH,或加缓冲液才能使用。

### 2. 连续光照和控温条件下半连续培养

实验开始时培养液内藻细胞密度为  $10^5$  个/ml,在连续光照条件下,通气培养 7 天后,密度升高至  $10^7$  个/ml 时,开始收获。每日定时从 20L 玻瓶(实际水体为 19L)中吸出浓藻液 4L,并加入新鲜培养液至原来体积,稀释率约为 21%,连续收获 10 天,结果见图 7。

实验表明,培养期间,间歇地吸出部分藻液,并加入等量的培养液,能使瓶内培养的藻类保持在一定的细胞密度,也就是说每日的稀释率接近于藻类的生长率,以获得稳定的产量。在本实验条件下,等鞭藻 3011 连续 10 天的收获得到平均每日每瓶生产密度为

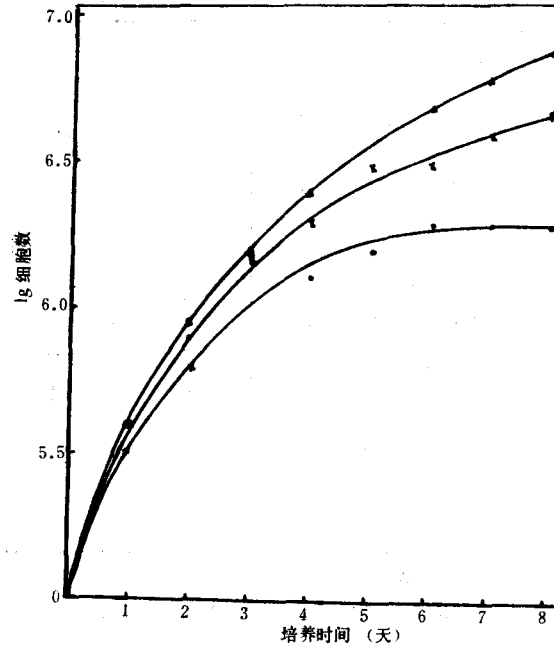


图6 自然光、温条件下, 20L 玻璃瓶内等鞭藻 3011 的生长

·——· 静止 ×——× 通气 ▲——▲ 加0.1% NaHCO<sub>3</sub>

1100 × 10<sup>4</sup> 个/ml 的藻液 4L, 干重约为 450mg。这比 Ukeles<sup>[15]</sup> 获得每日每瓶产 3L 和 Walne<sup>[16]</sup> 报道的每两天收获藻液 5L 的产量还要高。

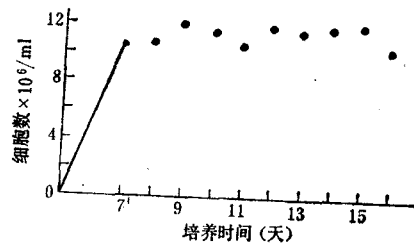


图7 控温条件下半连续培养的等鞭藻 3011 的生长

### 三、大池培养

1983年9月10日至11月5日, 在自然光、温条件下, 进行了一吨水体的大池培养。培养过程中不通风, 仅每日搅动三次, 共培养等鞭藻 3011 6批, 结果见表1。

实验中可看到, 等鞭藻 3011 在敞开的大池中生长很快, 纯度高, 无杂藻滋长。昼夜水温变化在 20—30℃ (9月10日至10月11日), 5—6天藻液的细胞密度即从 10 × 10<sup>4</sup> 个/ml 升至 200 × 10<sup>4</sup> 个/ml, 水色呈深褐色; 水温降至 20℃ 以下时, 生长减慢, 细胞密度达到最高需 9—12天。

表 1 等鞭藻 3011 在 1 吨水体中的生长

培养次数	日期	水温(°C)		光照(lx)		培养池数	实验开始时 细胞密度 ×10 <sup>4</sup> 个/ml	最高细胞 密度 ×10 <sup>4</sup> 个/ml	达到最高 细胞密度 所需天数 (天)	平均 增殖率 (K)
		最高	最低	最高	最低					
1	9月 10—16	30.5	22.0	15,000	700	2	10.6	200	6	0.71
2	17—22	30.0	24.5	18,000	13,000	2	10.0	204	5	0.88
3	24—29	30.0	20.5	15,000	3000	1	8.3	208	5	0.93
4	10月 6—11	24.0	17.0	9800	2100	1	17.1	196	5	0.71
5	13—25	20.0	14.5	3000	2100	1	11.6	221	12	0.35
6	27—11月5	20.5	16.5	—	—	1	10.6	202	9	0.47

#### 四、主要营养成分分析

等鞭藻3011是一种营养丰富的藻类,其干品经分析,氮含量为 7.49—7.96%,粗蛋白(N×6.25)为 41.53—46.81%,粗脂肪 22.25%,碳水化合物 22.54%,灰分 8.4%。氨基酸分析结果见表 2。

表 2 等鞭藻 3011 的氨基酸含量

氨基酸	含总 AA 的%	含干藻的%
赖氨酸 (Lys)	5.01	2.04
组氨酸 (His)	2.05	1.10
精氨酸 (Arg)	4.71	2.28
天门冬氨酸 (Asp)	9.13	3.38
苏氨酸 (Thr)	5.15	1.71
丝氨酸 (Ser)	5.45	1.59
谷氨酸 (Glu)	11.19	4.58
脯氨酸 (Pro)	5.45	1.74
甘氨酸 (Gly)	11.63	2.43
丙氨酸 (Ala)	15.17	3.76
缬氨酸 (Val)	6.19	2.02
异亮氨酸 (Ileu)	4.42	1.61
亮氨酸 (leu)	8.25	3.01
苯丙氨酸 (Phe)	3.83	1.76
甲硫(蛋)氨酸 (Met)	1.77	0.73
总量	100.00	33.74

从表 2 见到,等鞭藻 3011 的总氨基酸含量占干藻重的 33.74%,其中谷氨酸、丙氨酸、天门冬氨酸和亮氨酸含量都在 3% 以上。动物自身不能合成的必需氨基酸(指赖氨酸、苏氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、组氨酸和精氨酸 9 种。色氨酸未测

出来)占干藻的 16.26%，其中赖氨酸含 2.04%、蛋氨酸 0.73%。

## 五、讨 论

等鞭藻 *Isochrysis galbana* 系 1938 年由 Parke<sup>[12]</sup> 在英国海洋生物试验站养鱼池的海水中分离得来,1949 年正式报道。1977 年, Green<sup>[9]</sup> 用电子显微镜对其亚微结构作了进一步的描述。这种藻类的主要特征是:金黄色细胞体顶端具两条光滑而等长或亚等长的鞭毛,鞭毛间,有一条极短的、属于退化了了的定鞭 (haptonema),其细胞体外,还覆盖着多层椭圆形、具放射形脊的鳞片,这些鳞片不易脱落,只能在超薄切片中才能见到。我们从山东海阳县分离的 OA-3011 藻种都具有上述特征。因此,该藻种属于 *Isochrysis galbana* Parke 当是确信无疑的。

Kain & Fogg<sup>[10]</sup> 在原种等鞭藻 *Isochrysis galbana* Parke 的生长研究中,发现该种的生长最适温度为 20—25℃, 30℃ 不能生长。Ukeles<sup>[14]</sup> 进一步对等鞭藻的温度适应性做了仔细的研究,结果证明此种在 18—22℃ 生长最好,24℃ 就很少生长,27℃ 几乎不能繁殖;如在 30℃ 中培养 8 天,即使再转入生长最适温度也不能恢复其活力。这些结果表明,原种等鞭藻在 25℃ 以上的高温中是不能生长的。但我们分离的等鞭藻 3011,不论在温度实验中,抑或在池培养实验中都证实其生长最适温度为 25—30℃,甚至在 35℃ 也能正常繁殖。这充分说明了等鞭藻 3011 虽然与 Parke 分离的等鞭藻 *Isochrysis galbana* 属于同一种类,然而它是一种适合高温生长的品系,比原种在温度适应性上高 5—8℃。

近年来,据有关文献记载,美国有一种称为 *Tahitian Isochrysis aff galbana* (简称 T-Iso)<sup>[13]</sup>,也有的称其为 *Isochrysis Tahiti*<sup>[5]</sup> 能在高温中生长,但这种藻类究竟属于等鞭藻的一种高温品系?或是另一种类?由于未见到原文描述,这里不便加以评述。

等鞭藻 3011 除了温度适应能力比原种强以外,其他特性也有所差异,如等鞭藻 3011 是适应高光强生长的藻类,生长饱和光强在 10,000lx 左右;20L 玻璃瓶培养时,用 12,000lx 的光强照射,生长未受任何抑制,甚至能忍受夏日太阳光的直射。显然比 Kain & Fogg<sup>[10]</sup> 报道的等鞭藻的生长饱和光强只在 1500lx 的结果要高得多。此外,等鞭藻 3011 对营养需求上不如原种那样严格,我们用简单的无机盐加少量人体用维生素就能促其快速生长,不必加任何微量元素。这在大面积生产性培藻上是比较经济适用的。

开放式大池培养藻类是目前国内水产养殖单位普遍采用的养殖方式。但敞开培养易受外界杂藻和原生动物的侵入,尤其在高温季节危害更大。国外学者一直认为等鞭藻竞争能力差,不宜敞开培养。我们从 1983 年 9 月 10 日至 11 月 5 日连续在 1 吨水池中培养 6 批等鞭藻 3011 都获成功。不仅其生长快,而且没有其他生物污染。我们认为所以如此,主要是这种品系能够在高温中快速生长,从而压倒其他生物滋长的缘故。

等鞭藻是没有细胞壁的藻类,整个生物体只有一层极薄的细胞膜包裹,由于缺少纤维素或硅等物质,其灰分含量远比一般绿藻和硅藻低,可供动物幼虫吸收的有效营养成分相对的高。按 Epifanio<sup>[7]</sup> 分析结果,等鞭藻的粗蛋白含量可达 60.1%,灰分仅 7.1%。这与我们对等鞭藻 3011 分析的数据相比,前者略高,后者稍低。其差异除品系不同和培养条件不一致等因素外,可能是 Epifanio 用的是无菌培养物,而我们用的是单藻培养物,分析材料本身的纯度差所致。

综上所述,等鞭藻 3011 既有着原种等鞭藻的种种优良特性,又具有能在 25℃ 以上高温中快速生长的优点,使该藻有着更为广阔的应用前景。最近,我们用这种藻类饲养海湾扇贝 (*Argopecten irradians*)、中国对虾 (*Penaeus orientalis*) 和刺参 (*Stichops japonicus*) 等幼虫,都获得较好的饵料效果,得到生产单位的赞许。这种藻类的推广,必将在我国水产动物养殖事业的发展中发挥更大的作用。

### 参 考 文 献

- [1] 陈椒芬、谭桂英、潘永尧, 1982. 光照时间、强度和温度对角毛藻 (*Chaetoceros* sp.) 繁殖率的影响。海洋科学 2: 38—40。
- [2] 陈椒芬、谭桂英、潘永尧等, 1985. 两株突起普林藻的生长研究。海洋湖沼通报 3: 62—65。
- [3] 陈椒芬、何义潮、谭桂英等, 1985. 两种新分离的海洋金藻及其对贻贝幼虫的饲养效果。海洋湖沼通报 2: 44—46。
- [4] Bayne, B. L., 1965. Growth and the delay of metamorphosis of the larvae of *Mytilus edulis*. *Ophelia* 2(1): 1—47.
- [5] Cost, 1978. Proposal for a coordination of research activities in the field of mariculture. Report from the secretariat to the Cost Senior Officials Committee. European Cooperation in the field of Scientific and technical research. Cost/58/78. 13pp.
- [6] Droop, M. R., 1957. Auxotrophy and organic compounds in the nutrition of marine phytoplankton. *J. Gen. Microbiol.* 16: 286—293.
- [7] Epifanio, C. E., 1979. Growth in bivalve molluscs: nutritional effects of two or more species of algae in diets fed to the American Oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin) and the hard clam *Mercenaria mercenaria* (L.). *Aquaculture* 18: 1—12.
- [8] Ginzburg, M. & B. Z. Ginzburg, 1981. Interrelation-ships of light, temperature, sodium chloride and carbon source in growth of halotolerant and halophilic strains of *Dunaliella*. *Br. Phycol. J.* 16: 313—324.
- [9] Green, J. C. & R. N. Pienaar, 1977. The taxonomy of the order Isochrysidales (Prymnesiophyceae) with special reference to the genera *Isochrysis* Parke, *Dicrateria* Parke and *Imantania* Reynolds. *J. Mar. Bio. Ass. U. K.* 57: 7—17.
- [10] Kain, J. M. & G. E. Fogg, 1958. Studies on the growth of marine phytoplankton. *J. Mar. Bio. Ass. U. K.* 37: 781—788.
- [11] Laing, I. & S. D. Utting, 1980. The influence of salinity on the production of two commercially important unicellular marine algae. *Aquaculture* 21: 79—86.
- [12] Parke, M. W., 1949. Studies on marine flagellates. *J. Mar. Bio. Ass. U. K.* 28: 255—285.
- [13] Thielker, J. L., 1981. Design and Test Operation of an Intensive Controlled-environment Oyster Production System. Sea Grant College Programe, University of Delaware, Del-SG-07-81. pp. 1—28.
- [14] Ukeles, R., 1961. The effect of temperature on the growth and survival of several marine algal species. *Biol. Bull.* 120: 255—263.
- [15] Ukeles, R., 1973. Continuous culture—a method for the production of unicellular algal foods. In: J. R. Stein (Ed.) *Handbook of Phycological Methods: Culture methods and growth measurements*. Cambridge university Press, Great Britain. pp. 233—254.
- [16] Walne, P. R., 1966. Experiments in the large-scale culture of the larvae of *Ostrea edulis* L. *Fish. Invest.* London ser. 2., 25(4): 1—53.



## STUDIES ON THE GROWTH OF *ISOCHRYSIS GALBANA* PARKE AND ITS NUTRIENT COMPONENT\*

Chen Jiaofen and Pan Yongyao

(Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao)

### ABSTRACT

*Isochrysis galbana* Parke 3011, which is newly isolated from the seawater of the coast of Shandong Province, has rapidly grown in inorganic seawater medium with 0.5 µg/L vitamin B<sub>12</sub> and 100 µg/L thiamine HCl. The optimum conditions for growth are temperature 25—30°C, light saturation about 10,000 lx and salinity between 10—30‰. In the 20 L flask semi-continuous culture system, this clone could be maintained by harvesting daily with cell density of  $1100 \times 10^4$  cell/ml at 4L/24h. In 1 t tank, this clone will be cultured for 5—6 days at 20—30°C to reach  $200 \times 10^4$  cell/ml and for 9—12 days at 14—20°C.

This clone contains high nutrition. The contents of protein, lipid, carbohydrate and ash estimated amount to 46.8, 22.25, 22.54 and 8.4 percentage dry weight of cells respectively. The amino-acid content of this clone is 33.37%.

\* Contribution No. 1094 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.