

海产底栖硅藻的固定化培养研究

马志珍 张继红

(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266003)

摘 要 本文研究了底栖硅藻双点舟形藻(*Navicula dissipata*)固定在藻酸盐胶珠中的生长情况。研究结果表明,底栖硅藻的固定化培养可以增加藻的生长附着面积,提高藻的生长量。固定化培养后贮存30-360天,藻细胞都能较好地复活生长。因此,固定化培养技术可应用于海产底栖硅藻的扩种生产和保种培养中。

关键词 海产底栖硅藻, 固定化培养, 扩种培养, 保种培养

前 言

海产底栖硅藻是匍匐型贝类鲍、蛸螺和埋栖型贝类缢蛏、泥蚶以及棘皮动物海参、海胆等名贵水产动物苗种生产中的重要饵料^[1,2,4,6,8]。许多育苗场往往因底栖硅藻的供饵不足或是培养失败,使这些水产动物苗种生产受到损失。究其原因,主要是底栖硅藻的培养还是沿用在自然海区挂板附着或刮砂淘洗等方法进行生产培养^[1,4,6],没有达到浮游藻那种人工控制单种培养的程度。目前虽然就技术水平来说,底栖硅藻的单种分离筛选培养技术已经解决^[2,8]。但因底栖硅藻的培养,不象浮游藻那样能立体利用水体,在室内封闭式的扩种培养中遇到了困难,致使底栖硅藻单种培养技术还停留在实验室的试验阶段,未能在育苗生产中推广应用。我们曾试验过在培养瓶中投放剪断的维尼纶绳、聚乙烯薄膜碎片等方法来增加底栖硅藻生长的附着面积,但效果都不太理想。因此,我们进行了固定化培养底栖硅藻的试验。固定化(Immobilization)是构建生物反应器的一项重要生物技术,已涉及到代谢产物生产、污水处理、生物传感器和种质保存等领域^[9,10,12,13]。浮游藻类的固定化培养,国内外都有过较多的报道^[3,5,12,13]。但在底栖硅藻培养中尚未见有报告。现将我们的试验报告如下。

收稿日期: 1995-03-10。

• 农业部重点科研项目(渔85-91-06-01-03)的部分内容。

材 料 与 方 法

(一)试验藻种 分离筛选自青岛鲁迅公园海滨,暂定名为双点舟形藻(*Navicula dissipata* Hastelt),常年保存在微藻实验室内。标本号为MAL-21。

(二)胶珠制备 藻酸盐为市售化学纯褐藻酸钠(温州助剂厂)。称取褐藻酸钠2.5g,慢慢搅动(约4小时)溶入100ml蒸馏水中,配成2.5%(W/V)的凝胶溶液,加入2gNaCl,煮沸消毒备用。以凝胶溶液:藻液为4:1的比例接种藻种,充分搅匀后制成胶-藻混悬液,分别用6号、9号注射针头和普通滴管定量吸取混悬液,以6ml/min的速率滴入2%的CaCl₂溶液中,约30min后形成固化的褐藻酸钙胶珠^[7]。每毫升混悬液分别制成80粒(直径约2.5mm)、50粒(约3.5mm)、20粒(约4.5mm)的胶珠。用消毒海水洗涤2遍后,按各试验的要求接种入250ml的三角烧瓶(内装100ml培养液)中进行培养。

(三)培养液组成和培养条件 每1升消毒海水中添加NaNO₃ 60mg, KH₂PO₄ 4mg, FeC₆H₅O₇ 0.5mg, Na₂SiO₃ 5mg, 维生素B₁ 100μg, 维生素B₁₂ 5μg。在室温(15-20℃)和自然光(800-2000lx)下培养,每组至少双样。常规培养的对照组,用同样的三角烧瓶,将定量的藻种直接接种入100ml的培养液中,在同样的条件下培养。

(四)藻细胞的处理与计数 固定化培养和对照组的接种用的藻细胞,常用200目筛绢网过滤,使藻细胞充分均匀分散。计数用的固定化细胞,一般取5粒或10粒胶珠,放入1ml或2ml 2%的柠檬酸钠溶液中,使胶珠融解,藻细胞解脱分散均匀。用BX-K-25型血球计数板(上海医用仪器厂)计数,以细胞数/粒或换算成细胞数/毫升为藻的生长量单位。由 $K = [3.322 / (t_2 - t_1)] \cdot (\log N_2 / N_1)$ 计算出藻的生长率^[11]。

结 果 与 讨 论

(一)形态观察

本藻固定化后,第2天就观察到胶珠内有气泡产生,说明藻已开始生长,进行光合作用。第3-4天颜色明显变深,呈棕黄色,胶珠开始自动上浮,在培养液中呈立体分布。第9-10天,胶珠呈棕褐色,开始下沉,有少量藻细胞从胶珠中溢出,在三角瓶底部形成少量淡黄色的藻落。镜检并未发现藻细胞形态有大的变化,细胞表面观及大小等均与对照组相似。藻落在胶珠中分布较均匀,基本上沿胶珠的内表面分布,胶珠中空。对照组在第2天开始见在瓶底有明显的藻落散布,第5-6天布满瓶底,呈棕黄色,第9-10天瓶底呈棕褐色。个别瓶中有少量藻落起浮,悬在培养液中。

(二)生长测定

1. 固定化组与对照组的生长曲线 根据3种不同起始接种量的固定化组和对照组,每2天的生长量的测定数据,绘成的生长曲线见图1。

从图1看出,在接种量较低(1.5×10^4 个细胞/毫升)时,固定化组与对照组的生长差异不明显($t=0.817$)。而当提高接种量达 3.0×10^4 个细胞/毫升和 4.5×10^4 个细胞/毫升时,固定化组的生长量分别高于对照组1.5-2.0倍,差异极显著($t=20.829$ 和 $t=46.748$),并且随接种量的增加,藻的最后生长量也增加。对照组的生长量达到一定大小后,再增加接种

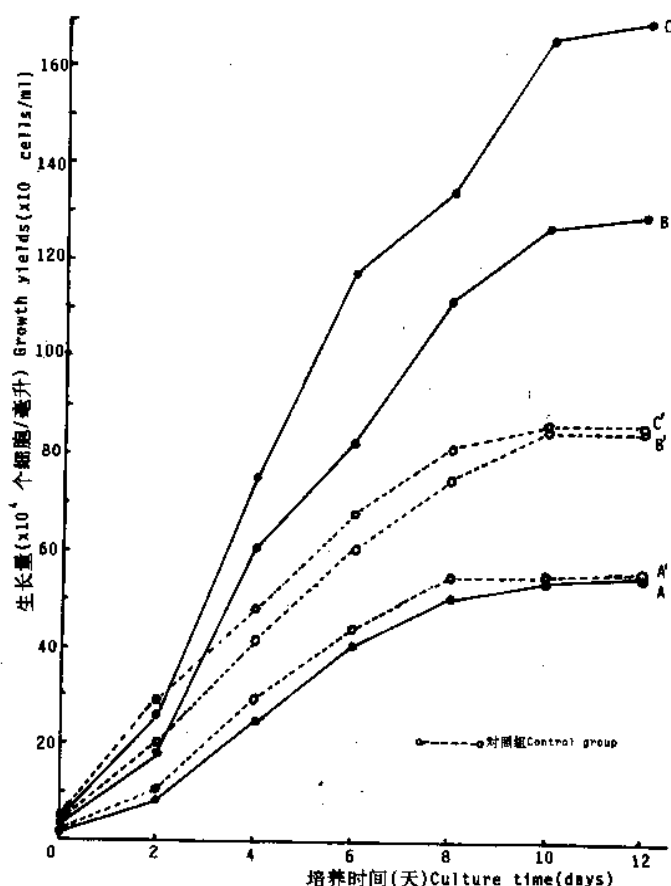


图1 固定化组与对照组的生长曲线的比较

A. A' 接种量为 1.5×10^4 个细胞/毫升

B. B' 接种量为 3.0×10^4 个细胞/毫升

C. C' 接种量为 4.5×10^4 个细胞/毫升

— 固定化组 对照组

Fig.1 Correlation curves between immobilization and control culture

量也不能提高最后的生长量,例如接种量 3.0×10^4 个细胞/毫升组和 4.5×10^4 个细胞/毫升组之间生长量差异不明显($t = 0.633$)。所以,在进行生产性底栖硅藻固定化扩种培养时,应适当增加起始接种量。

一般说来藻细胞被固定化后,其生长率要比对照组低^[3],而底栖硅藻固定化后的生长率和生长量都要高于对照组,我们认为底栖硅藻的生长与附着基质的面积有关。250ml 的三角烧瓶的瓶底直径一般为 70 - 80mm,可供底栖硅藻生长附着的面积约为 3850 - 5000mm²,而直径为 3.5mm 的 200 粒胶珠可供附着的面积约为 8500mm²,是瓶底面积的 1.7 - 2.2 倍。且藻类生长旺盛的胶珠会自动悬浮在培养液中,充分利用了空间。即使在培养

后期胶珠下沉后,也可以进行人工摇动等方法来改善培养物的受光条件。附着于瓶底的对照组的藻落,如经人工摇动或自行漂浮起来后,藻的生长就会受到抑制。

2. 胶珠大小对藻生长的影响 藻酸盐的胶珠直径的大小,会影响胶珠内藻的生长速率,直径越小,藻细胞分裂越快,单位体积的藻密度越大^[3]。在我们的固定化培养中也有类似的趋势(见图2)。其原因可能是胶珠直径越小,物质扩散距离越短,透入胶珠内部的光越强,因此胶珠中固定化藻的营养和光照条件明显优于直径较大胶珠中的藻,有利于藻细胞分裂和生长^[3],尽管2.5mm组与3.5mm组($t=7.254$),2.5mm组与4.5mm组($t=133.675$),3.5mm组与4.5mm组($t=58.149$)等各组间的差异都非常显著,但考虑到胶珠的制备工艺,我们认为,在底栖硅藻的扩种生产中,选用直径约为3.5mm的胶珠是适宜的。既能满足藻的生长量的要求,又能节省制备胶珠的时间。

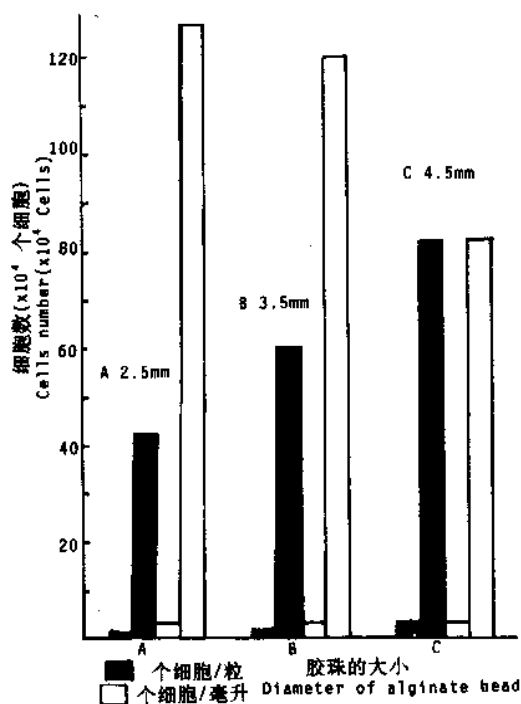


图2 胶珠直径大小与底栖硅藻生长的关系

Fig.2 Relationships between diameter of alginate bead and growth of the benthic diatom

3. 胶珠密度对藻生长的影响 不同胶珠密度对藻生长影响的试验结果见图3。

从图3可看出,在每粒胶珠内接种量相同的条件下,每粒胶珠内的生长率和生长量都与胶珠的密度呈负相关关系。但当换算成每毫升培养液中的藻的生长量时,则最大生长量为300粒组,其次为400粒组,最小为200粒组。我们认为在100毫升培养液中,接种直径为3.5mm的胶珠300粒是适宜的密度,可提高藻的单位体积的产量和节省生产成本。

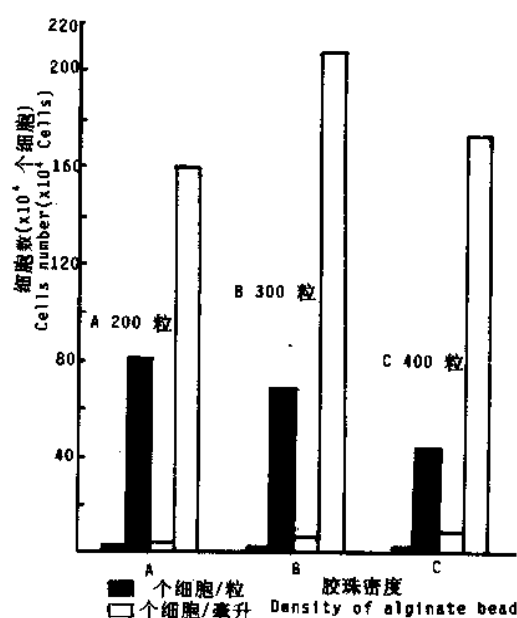


图3 胶珠的密度与底栖硅藻生长的关系

Fig.3 Relationships between density of alginate beads and growth of the benthic diatom

4. 贮存和复活试验 藻类固定化培养后可延长其保存时间^[12,13], 在我们的试验中, 同样发现固定化的底栖硅藻比对照组的存活时间能延长近1倍(表1)。从表1看出, 固定化组在贮存30~360天期间, 除了30天组外, 其他各组的复活生长率都要比对照组高, 贮存360天的生长率还高于对照组180天的生长率。而对照组的藻细胞贮存270天后, 即几乎不能复活生长, 至360天则完全死亡。所以固定化技术也适用于底栖硅藻的种质保存。

表1 固定化培养的底栖硅藻贮存时间对复活生长的影响($\times 10^4$ 个细胞/毫升)Table 1 Relationships between storage time and recovery growth of immobilized benthic diatom ($\times 10^4$ cells/ml)

贮存时间(天) Storage time(days)	固定化组 Immobilization culture			对照组 Contrast culture		
	接种量 Inocula	10天的生长量 Growth yields	生长率 $\bar{K}$	接种量 Inocula	10天的生长量 Growth yields	生长率 $\bar{K}$
30	3.8	81.3	0.442	3.9	88.2	0.450
90	4.0	76.4	0.426	4.0	70.8	0.415
180	3.9	62.3	0.400	4.1	32.5	0.299
270	4.1	56.4	0.378	4.2	6.5	0.079
360	3.9	47.4	0.360	3.8	死亡	—

结 论

1. 固定化底栖硅藻在起始接种量较低(例如 1.5×10^4 个细胞/毫升)时,与对照组的生长曲线相似。当加大接种量(例如 4.5×10^4 个细胞/毫升)时,固定化的生长量为对照组的 2 倍。
2. 褐藻酸钙胶珠的直径和培养密度都对固定化硅藻的生长有明显影响,选择适宜的胶珠大小和培养密度,是提高底栖硅藻生长率和生长量的关键。胶珠直径在 3.5mm 左右,培养密度以 300 粒/100 毫升左右是较为适宜的。
3. 底栖硅藻固定化后能延长存活时间,可达 360 天以上,是对照组的 2 倍多。

参 考 文 献

- [1] 于瑞海等, 1973. 海产贝类的苗种生产, 53, 65-67, 74. 青岛海洋大学出版社。
- [2] 马志珍等, 1985. 一种可作鲍和海参饲料的底栖舟形藻的培养条件的研究. 海洋通报, 4 (4): 36-39.
- [3] 作小南等, 1992. 几种海洋藻类的固定化培养. 海洋学报, 14 (1): 129-133.
- [4] 陈世杰等, 1977. 鲍苗的饵料—底栖硅藻培养试验初报. 动物学报, 23 (1): 47-53.
- [5] 张学成等, 1994. 固定化培养对亚心形扁藻生理功能及超微结构的影响. 海洋学报, 16 (4): 96-101.
- [6] 隋锡林等, 1990. 海参增殖, 185-192. 农业出版社。
- [7] 韩丽君等, 1992. 用于固定化载体的褐藻酸钙凝胶条件的研究. 海洋科学, (3): 56-59.
- [8] 浮永久·菊地省吾, 1979. 附着性微小藻类 6 种的エメ"ろワヒ" 稚贝に対する 饵料效果. 东北水研所研究报告, (40): 47-52.
- [9] Brouers, M. et al., 1987. Immobilized cyanobacteria for sustained ammonia production. In "Algal biotechnology", 265-275. Elsevier Applied Science Publishers LTD. England ammonia.
- [10] de La Noue, J. et al., 1987. Tertiary treatment of urban wastewaters by chitosan-immobilized *Phormidium* sp. In "Algal biotechnology", 159-168. Elsevier Applied Science Publishers LTD. England.
- [11] Guillard, R. R. L., 1973. Division rates. In "Handbook of phycological methods", vol. 1, 289-311. Cambridge University Press. New York.
- [12] Hertzberg, S. et al., 1989. Studies of alginate-immobilized marine microalgae. Botanica Marina, 32 (4): 267-273.
- [13] Tamponnet, C., et al., 1985. Cytological and physiological behaviour of *Euglena gracilis* cells entrapped a calcium alginate. Physiol. Plant., 63 (2): 277-283.

STUDIES ON IMMOBILIZATION CULTURE OF A MARINE BENTHIC DIATOM, *NAVICULA* *DISSIPATA* HASTELT

Ma Zhizhen Zhang Jihong

(Yellow Sea Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266003)

ABSTRACT Growth model of one species of marine benthic diatom, *Navicula dissipata* Hastelt, in alginate beads was studied. The result indicates that by immobilization culture of the benthic diatom attachable area of the alga growth could be increased and alga growth yields

raised. Renew cultures could be obtained from storage cultures after 30 to 360 days of immobilization. Immobilization culture technique may be useful in expansion of population and stock culture management of the marine benthic diatom.

KEYWORDS Marine benthic diatom, Immobilization culture, Expansion population culture, Stock culture

《渔业技术经济学》征订启事

中国水产科学研究院渔业经济研究所所长吴万夫主编的《渔业技术经济学》是一部研究渔业技术经济的学术专著,已由中国科学技术出版社正式出版。该书不仅对渔业技术经济的理论与方法问题进行了研究,而且紧密联系实际,对渔业养、捕、加各方面,产、供、销各个环节的技术经济问题进行了探讨。该书的出版发行,对国家制订技术政策和进行科学决策,对推动渔业技术进步和经济增长,对提高渔业生产经营的经济效益,都有现实意义。

该书的问世,填补了渔业方面的技术经济空白。该书对水产行政部门以及科研和生产单位工作的同仁都有参考价值,并可供大专院校水产专业的师生以及干部培训班的学员作为教材参考。

《渔业技术经济学》的公开发行,得到了许多领导与专家的关心与支持。著名经济学家于光远教授和中国水产科学研究院院长钱志林研究员,分别为此书作序。

该书为大32开本,340页,定价25.00元(含邮资)。凡需购此书的单位和个人,请速联系,并通过邮局汇款。地址:北京永定路南青塔村150号《中国渔业经济研究》编辑部;邮编:100039;联系人:关青;电话:(010)68214442--379。