

## 南极冰藻 *Pyramidomonas* sp. 和 Chlorophyceae L-4 的优化培养

缪锦来<sup>1</sup>, 阙光锋<sup>2</sup>, 张波涛<sup>2</sup>, 姜英辉<sup>1</sup>, 侯旭光<sup>3</sup>, 李光友<sup>1</sup>

(1. 国家海洋局海洋生物活性物质重点实验室, 山东 青岛 266061; 2. 中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003; 3. 山东大学生命学院, 山东 济南 250100)

**摘要:**设计温度、光强、盐度、pH 值、营养盐等培养条件, 测定其对南极冰藻中 2 种绿藻 *Pyramidomonas* sp. 和 Chlorophyceae L-4 生长的影响。研究表明, 1/2 培养基为适合这 2 种南极绿藻生长的适宜培养基。*Pyramidomonas* sp. 最适生长温度为 2~6 °C, pH 为 9.0; Chlorophyceae L-4 的最适生长温度为 -3~6 °C, pH 为 8.0~8.5。2 种南极绿藻生长最适光强为 7.0~60.0  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 最适盐度为 22~33。选择  $\text{NaNO}_3$  为培养基中的氮源, 适合 *Pyramidomonas* sp. 的浓度为 0.88  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 氮源浓度在 0.56~1.47  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 对 Chlorophyceae L-4 生长影响不明显。适宜 2 种南极绿藻生长的磷酸盐浓度为 0.13  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**关键词:** 南极冰藻; 绿藻; 培养条件; 优化培养

**中图分类号:** S968.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2004)03-0244-09

南极是一个严寒、低光照和强辐射为主要特征的特殊地理区域, 南极冰藻在长期的进化中逐渐适应了这样的极端环境而生存。作为南极初级生产力的承担者之一, 南极冰藻具有较高的营养价值, 其中 9 种南极冰藻的蛋白质含量为干重的 30%~50%。磷虾是南大洋中最引人注目的生物资源, 每年有  $1 \times 10^8 \sim 2 \times 10^8$  t 的捕获量, 而南极冰藻正是磷虾的主要食物来源。

影响南极冰藻生长的主要因素包括光(光强、光谱组成和季节变化等)、温度、营养盐和盐度等。极地的藻类适应于低水平的光量子流密度, 在冬季黑暗中的生存策略更成为光适应的有利证据<sup>[1]</sup>。栖息地的温度通常在 -1.8~2 °C, 许多南极冰藻种类属于严格意义上的嗜冷藻。Bunt<sup>[2]</sup>的实验结果表明, 南极冰藻的最适生长温度范围在 4~10 °C。此外, 盐度和营养盐的含量也随着季节的变化而变化, 影响南极冰藻的生长。

国内外对南极冰藻的研究主要集中在生态方面, 且多是在自然环境下的观察。但随着南极冰藻独特的生理和生化方面研究的逐步开展, 基础和应用领域日益显示出广泛的前景。为研究南极冰藻的开发利用, 首先要对其基本生物学特征等方面予以研究。但实验室条件下对南极冰藻的生长和生态学

方面的研究未见相关报道。本研究对南极冰藻中 2 种绿藻, 即 *Pyramidomonas* sp. 和 Chlorophyceae L-4 进行优化培养, 研究它们的生长特征, 为南极冰藻的大规模培养和应用提供科学依据。

### 1 材料和方法

#### 1.1 藻种和培养方法

2 种南极绿藻 *Pyramidomonas* sp. 和 Chlorophyceae L-4, 为第 18 次南极考察采集海冰中分离所得, 本实验室保存。培养采用 1/2 培养基<sup>[3]</sup>, 温度 0~6 °C, 光强 20~30  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 光照周期为 12/12。不充气, 每日摇动 3 次, 接种量 20%。

**1.1.1 培养基成分** 同 1/2 培养基。

**1.1.2 生长曲线的测定** 采用 1/2 培养基, 500 mL 的三角瓶装入培养基 300 mL, 按 20% 的接种量接入种子。每隔 2 d 取样测定吸光值( $\text{OD}_{440}$ )、叶绿素含量和比生长速率( $\mu$ )。

**1.1.3 不同培养基对生长影响的测定** 选择 3 种不同的培养基, 包括 1/2 培养基、普鲁瓦索里(Provasoli)培养基<sup>[4]</sup>和绿藻培养基。

#### 1.1.4 培养条件

(1) 理化条件 温度: 设定温度为 -3、2、6、10 °C。光强: 设定光强梯度为 0.6、3.0、7.0、20.0、

收稿日期: 2003-09-09; 修订日期: 2003-12-16。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(40206022)。

作者简介: 缪锦来(1968-), 男, 博士, 研究员, 从事极端环境微生物学研究。E-mail: miaojinlai@163.com

60.0  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。盐度:通过添加蒸馏水和粗盐调节天然海水的盐度,用盐度计检测,得到盐度分别为11、22、33、66、100和150的海水,配成1/2培养基。pH:用0.1 mol  $\cdot$  L $^{-1}$ 的HCl和NaOH调节培养基的pH分别为6.0、7.0、8.0、9.0、10.0,采用pHS-3C型精密pH计,每天调1次pH值,使藻液的pH值保持一定的梯度。

(2)营养条件 氮源及氮源浓度:以1/2培养基为基础,只改变氮源的种类,不改变氮的浓度,分别选择NaNO<sub>3</sub>(1.5 g)、NH<sub>4</sub>Cl(0.944 g)、尿素(1.06 g)配成20 mL储备液,无氮培养基为对照组。以NaNO<sub>3</sub>为氮源,改变氮的量为0、1.0、1.5、2.0、2.5 g,配成20 mL储备液。因此,氮的浓度为0、0.56、0.88、1.18和1.47 mol  $\cdot$  L $^{-1}$ 。磷的浓度:设定KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>的浓度为0.015、0.033、0.065、0.13 mol  $\cdot$  L $^{-1}$ 。

## 1.2 分析方法

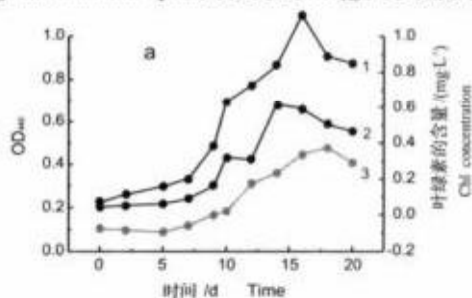
**1.2.1 吸光值的测定** *Pyramidomonas* sp. 和 *Chlorophyceae* L-4 在440 nm波长下吸光值最大,用721型分光光度计在此波长下测定2种南极绿藻的吸光值。每个实验重复3次,结果取平均求值。下同。

**1.2.2 细胞的计数** 取5 mL藻液加入4滴0.5 g  $\cdot$  mL $^{-1}$ 碘化钾固定游动的 *Pyramidomonas* sp. 细胞; *Chlorophyceae* L-4 可不加。血球计数板计数。

**1.2.3 细胞干重的测定** 取50 mL藻液经预先称过重量的滤纸过滤,100  $^{\circ}\text{C}$ 使其完全干燥,冷却至室温称重。

细胞数目、吸光值和细胞干重在一定浓度范围内呈线性关系。

*Pyramidomonas* sp. 的吸光值(OD<sub>440</sub>)与细胞干



重的回归方程为:  $y(\text{g} \cdot \text{L}^{-1}) = 0.66853 \times \text{OD}_{440} - 0.00342$ ,  $r^2 = 0.99932$ 。OD<sub>440</sub>与细胞数目的回归方程为:  $y(10^5 \text{ cell}) = 34.86 \times \text{OD}_{440} - 0.18$ ,  $r^2 = 0.9999$ 。

*Chlorophyceae* L-4 的吸光值(OD<sub>440</sub>)与细胞干重的回归方程为:  $y(\text{g} \cdot \text{L}^{-1}) = 1.20258 \times \text{OD}_{440} + 0.00186$ ,  $r^2 = 0.99524$ 。OD<sub>440</sub>与细胞数目的回归方程为:  $y(10^5 \text{ cell}) = 26.24 \times \text{OD}_{440} - 0.29$ ,  $r^2 = 0.9977$ 。

**1.2.4 比生长速率的测定** 以721型分光光度计测定藻体吸光值,比生长速率( $\mu$ )按  $\mu = (\ln N_t - \ln N_0)/t$  式计算,其中,  $N_t$  表示中止时藻体的吸光值;  $N_0$  表示起始时藻体的吸光值;  $t$  表示藻体生长时间(d)。

**1.2.5 叶绿素含量的测定** 叶绿素含量采用 Jeffrey 等<sup>[5]</sup>方法,单位: mg  $\cdot$  L $^{-1}$ 。方程为:  $C_{\text{Chl a}} = 11.98E_{664} - 1.93E_{647}$ ;  $C_{\text{Chl b}} = 20.36E_{647} - 50E_{664}$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 2种绿藻的生长特征

测定结果表明, *Pyramidomonas* sp. 的生长存在明显的延迟期(如图1a),从第5天进入对数生长期,第18天达到生长稳定期;此后,吸光值下降,细胞进入衰亡期。 *Pyramidomonas* sp. 的 Chl a 和 Chl b 含量的变化趋势同时间( $t$ )曲线和细胞的生长曲线基本一致,但 Chl a 在第16天达到最大值1.123 mg  $\cdot$  L $^{-1}$ ; Chl b 在第14天达到最大值0.62 mg  $\cdot$  L $^{-1}$ ,此后,叶绿素含量开始下降。其最大的比生长速率为0.27 d $^{-1}$ 。

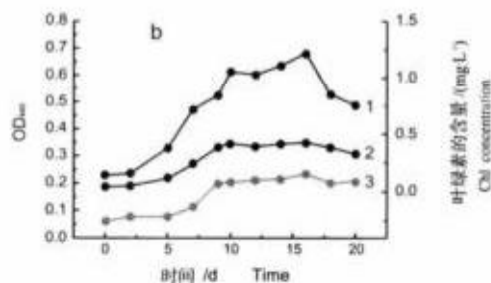


图1 *Pyramidomonas* sp. (a)和 *Chlorophyceae* L-4 (b)的生长曲线

Fig.1 Growth curves of *Pyramidomonas* sp. (a) and *Chlorophyceae* L-4 (b)

1, 叶绿素 a; 2, 叶绿素 b; 3, 吸光度 1, Chl a; 2, Chl b; 3, OD<sub>440</sub>

Chlorophyceae L-4 从第5天进入对数生长期(如图1b),第10天进入稳定期,细胞的吸光值保持不变。Chl b 的变化趋势与细胞生长曲线相似,Chl a 在细胞进入稳定期后,含量还继续上升,但在上升到最大值( $1.360 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )后很快下降。其最大的比生长速率为  $0.28 \text{ d}^{-1}$ 。

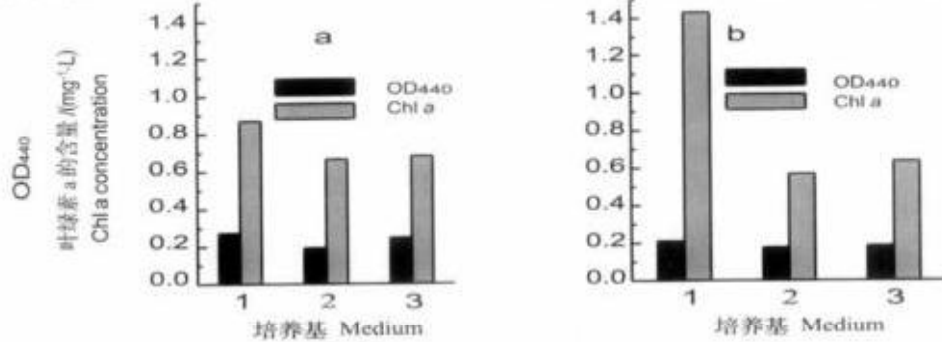


图2 不同培养基对 *Pyramidomonas* sp. (a) 和 Chlorophyceae L-4 (b) 生长的影响

1, 1/2 培养基; 2, 普鲁瓦索里培养基; 3, 绿藻培养基

Fig. 2 Effects of different medium on growth of *Pyramidomonas* sp. (a) and Chlorophyceae L-4 (b)

1, 1/2 medium; 2, Green algae medium; 3, Green algae medium

不同培养基对 Chlorophyceae L-4 的生长的影响不如对 *Pyramidomonas* sp. 的影响显著(图2b),但 Chlorophyceae L-4 在 1/2 培养基中的生长良好,且 Chl a 的含量为 3 种培养基中的最高值( $1.429 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )。培养基的成分组成和含量是影响微藻生长的重要原因之一,为使冰藻生长良好,获得较高的藻体浓度,应选择适合冰藻生长的培养基。因此,选择 1/2 培养基作为培养 2 种绿藻用的培养基。

### 2.3 不同温度对 2 种绿藻生长的影响

温度对 2 种绿藻生长的影响结果见图 3a 和图 3b。从图 3a 可以看出,低温下 ( $-3 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) *Pyramidomonas* sp. 的生长 ( $\text{OD}_{440}$ ) 明显低于较高温度的,但低温对冰藻的生存没有影响,培养时间内能够缓慢的生长。较高温度 ( $6 \text{ }^{\circ}\text{C}$  和  $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) 时, *Pyramidomonas* sp. 在短时间内能够快速生长,第 6 天吸光值可达 0.33;此后,生长进入稳定期,第 14 天吸光值下降。 $2 \text{ }^{\circ}\text{C}$  是适合 *Pyramidomonas* sp. 生长的最适温度,第 14 天达到生长的高峰,吸光值为 0.42。温度  $>6 \text{ }^{\circ}\text{C}$  时,冰藻在短时间内快速生长, $6 \text{ }^{\circ}\text{C}$  时获得最大比生长速率 ( $\mu_{\text{max}} = 0.48 \text{ d}^{-1}$ );但高温最终对冰藻生长不利, $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$  时吸光值开始下降。因此,一定的低温范围有利于 *Pyramidomonas* sp. 的生长和生存,在  $2 \text{ }^{\circ}\text{C}$  时的最大比生长速率为  $0.47 \text{ d}^{-1}$ ,并且可以

### 2.2 不同培养基对 2 种绿藻生长的影响

测定表明,3 种培养基对 *Pyramidomonas* sp. 的生长和 Chl a 含量的影响显著(图 2a),其中 1/2 培养基可以获得最大的吸光值(0.271)和最高的 Chl a 含量( $0.869 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ );绿藻培养基得到的吸光值(0.191)和 Chl a ( $0.666 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的含量最低。

获得最高的吸光值。

温度对 Chlorophyceae L-4 生长的影响(如图 3b)与 *Pyramidomonas* sp. 相似。较高温度下 ( $6 \text{ }^{\circ}\text{C}$  和  $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ),冰藻在短时间内可快速生长,并在第 10 天和 12 天分别达到生长的高峰;此后,吸光值下降,表明部分细胞死亡。 $-3 \text{ }^{\circ}\text{C}$  下 Chlorophyceae L-4 的生长速率明显低于其他温度,但生长期延长,仍然可以在第 16 天达到同  $2 \text{ }^{\circ}\text{C}$  培养温度相似的吸光值。在  $6 \text{ }^{\circ}\text{C}$  的培养条件下,Chlorophyceae L-4 有最大的比生长速率 ( $0.31 \text{ d}^{-1}$ )。从实验结果可以看出,2 种绿藻的最适生长温度均较低, *Pyramidomonas* sp. 为  $2 \sim 6 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , Chlorophyceae L-4 为  $-3 \sim 6 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

对不同培养温度下的 2 种绿藻细胞镜检结果表明, *Pyramidomonas* sp. 能耐受  $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$  的温度; Chlorophyceae L-4 也可耐受  $12 \text{ }^{\circ}\text{C}$  的温度,但此温度下细胞不生长。镜检观察表明,2 种绿藻细胞的平均体积均增大,部分细胞变形。

Bum<sup>[2]</sup> 认为绿藻的最适生长温度范围在  $4 \sim 10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,一般高于栖息地的温度 ( $-2 \sim 0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ )。南极的一些硅藻属于严格的嗜冷藻类,例如 *Corethron*, *Synechra*, *Nitzschia* 和 *Stellarima* 等 4 属中的种类,其最适的生长温度为  $3 \sim 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $6 \sim 8 \text{ }^{\circ}\text{C}$  对其则是致命的<sup>[6]</sup>。

Eppley<sup>[7]</sup> 通过经验值得到冰藻的比生长速率

( $\mu$ ) 和生长温度 ( $T, ^\circ\text{C}$ ) 的函数关系,  $\log \mu = 0.0275T - 0.070$ 。根据 Eppley's<sup>[7]</sup> 的公式,  $2^\circ\text{C}$  的最大比生长速率为  $0.97 \text{ d}^{-1}$ 。*Pyramidomonas* sp. 和 *Chlorophyceae* L-4 在实验室培养条件下的最大比生长速率分别为  $0.47 \text{ d}^{-1}$  和  $0.30 \text{ d}^{-1}$ , 仅为公式值

的  $1/2$  和  $1/3$ 。Eppley's 的公式受到不同培养环境、藻种以及藻种纯度的限制, 因此, 其公式不适合预测所有冰藻的比生长速率同温度的关系, 包括 *Pyramidomonas* sp. 和 *Chlorophyceae* L-4。

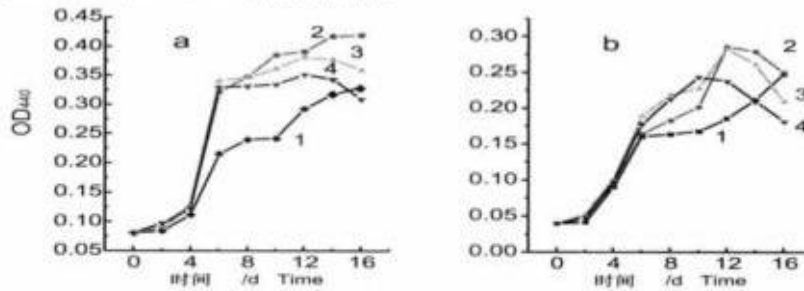


图3 不同温度对 *Pyramidomonas* sp. (a) 和 *Chlorophyceae* L-4 (b) 生长的影响

Fig.3 Effects of temperature on growth of *Pyramidomonas* sp. (a) and *Chlorophyceae* L-4 (b)

1,  $-3^\circ\text{C}$ ; 2,  $2^\circ\text{C}$ ; 3,  $6^\circ\text{C}$ ; 4,  $10^\circ\text{C}$

#### 2.4 不同光强对两种绿藻生长的影响

光强对 *Pyramidomonas* sp. 和 *Chlorophyceae* L-4 生长的影响结果分别见图 4a 和图 4b。其中光强对 *Pyramidomonas* sp. 的生长影响显著, 较高光强 ( $7.0 \sim 60.0 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) 下生长速度快。此时的平均生长速率为  $0.10 \sim 0.11 \text{ d}^{-1}$ , 最大比生长速率为  $0.25 \text{ d}^{-1}$ 。光强为  $60.0 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  时, *Pyramidomonas* sp. 的生长速率和终细胞浓度都没受到抑制, 说明其光饱和点在  $60.0 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  以上。光强低于  $3.0 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  时, 生长速率和终细胞浓度降低,  $0.6 \sim 3.0 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  时 *Pyramidomonas* sp. 的生长速率很小, 平均为  $0.045 \sim$

$0.058 \text{ d}^{-1}$ , 是 *Pyramidomonas* sp. 生长所需的最低光强。

光强同样对 *Chlorophyceae* L-4 生长影响显著。 *Chlorophyceae* L-4 生长适宜的光强为  $7.0 \sim 60.0 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 此时的平均生长速率为  $0.12 \text{ d}^{-1}$ , 最大比生长速率为  $0.28 \text{ d}^{-1}$ 。同样在光强为  $60.0 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  时, *Chlorophyceae* L-4 的生长速率和终细胞浓度都没受到抑制, 说明其光饱和点在  $60.0 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  以上。 *Chlorophyceae* L-4 在光强为  $0.6 \sim 3.0 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  时的生长速率为  $0.056 \sim 0.095 \text{ d}^{-1}$ , 说明它是 *Chlorophyceae* L-4 生长所需的最低光强。

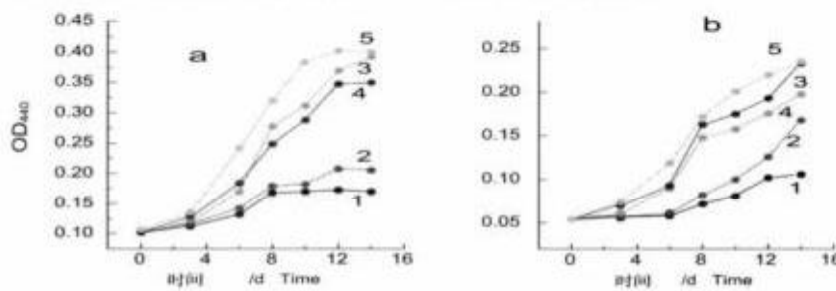


图4 不同光强对 *Pyramidomonas* sp. (a) 和 *Chlorophyceae* L-4 (b) 生长的影响

Fig.4 Effects of irradiance on growth of *Pyramidomonas* sp. (a) and *Chlorophyceae* L-4 (b)

1,  $0.6 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ; 2,  $3.0 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ; 3,  $7.0 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ; 4,  $20.0 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ; 5,  $60.0 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

光合作为微藻的生命活动提供物质基础和能量来源。本研究表明, *Pyramidomonas* sp. 和 *Chlorophyceae* L-4 生长所需的光强的最小值为  $0.6 \sim 3.0$

$\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 与自然环境冰藻群落所需的最低光强 ( $7.6 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ <sup>[8]</sup> 和  $0.3 \sim 1.0 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ <sup>[9]</sup>) 相似, 低于这一水平则不存在光合作用。对

大多数冰藻而言,  $40.0 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  为光合作用的饱和点。 *Pyramidomonas* sp. 和 *Chlorophyceae* L-4 的最大比生长速率均是在  $60.0 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  的光强下获得的。此光强对 2 种绿藻的生长并没有造成抑制, 没有达到这 2 种绿藻光合作用的饱和点。

光强对 *Pyramidomonas* sp. 和 *Chlorophyceae* L-4 的叶绿素 a 含量的影响, 分别见图 5a 和图 5b。从图中可以看出, 在低光照条件下, 虽然培养液中的 Chl a 含量低于强光照条件下的 Chl a 含量, 但每一细胞中的 Chl a 的含量却高于强光下的。光强由高到低, 则细胞内的 Chl a 含量逐渐增加; 对于 *Pyramidomonas* sp., 每细胞中的 Chl a 含量由  $1.42 \times$

$10^{-7} \mu\text{g}$  增加到  $4.67 \times 10^{-7} \mu\text{g}$ ; *Chlorophyceae* L-4 每细胞中的 Chl a 含量由  $2.72 \times 10^{-7} \mu\text{g}$  增加到  $90 \times 10^{-7} \mu\text{g}$ 。

海冰硅藻 *Fragilaria sublinearies* 生长在  $-2 \text{ }^{\circ}\text{C}$  时, 光强从 66 降至  $0.66 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 细胞内的 Chl a 含量以对数的形式增加。 *Nitzschia* 和 *Navicula* 细胞内的 Chl a 是一种主要的捕光色素, 含量占到总色素含量的 50%。本研究对 2 种绿藻的 Chl a 含量与光强关系的结果同文献报道的基本一致。因此, 微藻经历了暗光适应通常是提高细胞内的光捕获色素的含量。

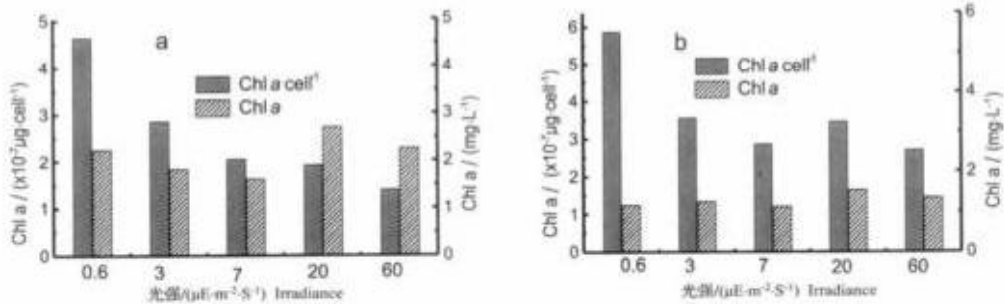


图5 光强对 *Pyramidomonas* sp. (a) 和 *Chlorophyceae* L-4 (b) Chl a 含量的影响  
Fig. 5 Effects of irradiance on Chl a contents of *Pyramidomonas* sp. (a) and *Chlorophyceae* L-4 (b)

## 2.5 不同盐度对 2 种绿藻生长的影响

盐度对冰藻 *Pyramidomonas* sp. 和 *Chlorophyceae* L-4 生长影响分别见图 6a 和图 6b。海水的盐度在 11~66 范围内, 2 种藻均生长良好, 其中 22~33 为生长的最适盐度。对于 *Pyramidomonas* sp., 在较低的盐度(如 10)下, 生长略微受到抑制, 但偏高的盐度对其生长的抑制作用显著。当盐度为 150 时, 细胞的生长完全受到抑制, 镜检结果表明, 此时的细胞结构受到破坏, 许多细胞死亡。偏低的盐度略微抑制 *Chlorophyceae* L-4 的生长, 但当盐度高于 100 时, 抑制作用显著; 盐度为 150 时, 生长几乎完全受到抑制, 但能够保持完整的细胞形态, 能够抵御高盐度的破坏。从图 6a 和图 6b 可以看出, *Pyramidomonas* sp. 和 *Chlorophyceae* L-4 是 1 种广盐度的海洋微藻。尤其是 *Chlorophyceae* L-4 具有很强的盐度耐受性, 这是因为 *Chlorophyceae* L-4 具有较厚的细胞壁<sup>[3]</sup>, 可以抵抗高盐度对细胞造成的膨胀压力。并且 2 种绿藻都对低盐度的适应性要强于高盐度。因此 *Pyramidomonas* sp. 和 *Chlorophyceae* L-

-4 更适宜在低盐度(11~66)下生存。

本研究中, *Pyramidomonas* sp. 的生长速率从盐度为 22 时的  $0.134 \text{ d}^{-1}$ , 降至盐度为 100 时的  $0.098 \text{ d}^{-1}$ 。 *Chlorophyceae* L-4 的生长速率也随着盐度的增加而降低。2 种绿藻的生长速率对盐度改变的反应是相同的。低盐度下有的冰藻的生长显著降低, 例如绿藻 *Dunaliella tertiolecta* 在盐度为 8、2.3 和 1.1 时, 生长依次降至 0.95、0.45 和  $0.0^{[10]}$ 。生存在自然环境海冰中的冰藻群落, 在每年的季节变化过程中, 随着冰层的生长、融化, 冰藻群落不仅经受了光强、温度梯度变化, 而且由于海冰生长时的排盐作用和海冰融化时的稀释作用, 使盐度的变化范围很大, 盐度在一定程度上对冰藻的生长产生很大影响。

## 2.6 不同 pH 对 2 种绿藻生长的影响

pH 值对 *Pyramidomonas* sp. 和 *Chlorophyceae* L-4 生长的影响分别见图 7a 和图 7b。适合 *Pyramidomonas* sp. 生长的 pH 为 9.0, 而适合 *Chlorophyceae* L-4 生长的 pH 为 8.0~8.5。 *Pyramidomonas* sp. 和 *Chlorophyceae* L-4 在生长的过程中,

培养基中的 pH 上升,尽管初始的 pH 为 6.0~10.0, 2 d 以后检测, *Pyramidomonas* sp. 的 pH 在 9.5~10.0, *Chlorophyceae* L-4 的 pH 为 8.5~9.5 之间。由于环境的 pH 直接影响环境的  $\text{CO}_2$  的浓度,而  $\text{CO}_2$  是微藻进行光合作用的重要原料。在光合作用期间,  $\text{CO}_2$  的浓度降低,导致培养基中的 pH 升高。

Horner 等<sup>[11]</sup>曾报道昭和站海冰冰藻层中的 pH 比其它冰层的高,最高值超过 9.0,而且随着冰藻的增殖, pH 有增高的趋势。因此, pH 通过调节生物体内酶的结构和活性以及培养液中碳源的存在形式,对微生物的生长产生影响,同样冰藻的生命活动也可以影响和改变环境的 pH。

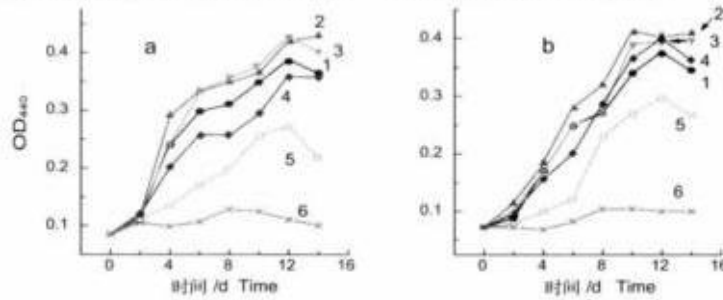


图6 盐度对冰藻 *Pyramidomonas* sp. (a) 和 *Chlorophyceae* L-4 (b) 生长的影响  
Fig. 6 Effects of salinity on growth of *Pyramidomonas* sp. (a) and *Chlorophyceae* L-4 (b)

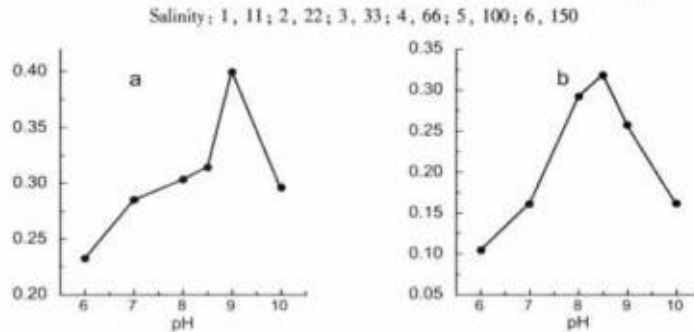


图7 pH 对 *Pyramidomonas* sp. (a) 和 *Chlorophyceae* L-4 (b) 生长的影响  
Fig. 7 Effects of pH on growth of *Pyramidomonas* sp. (a) and *Chlorophyceae* L-4 (b)

## 2.7 不同氮源对 2 种绿藻生长的影响

不同氮源对 *Pyramidomonas* sp. 和 *Chlorophyceae* L-4 的生长有一定的影响,分别见图 8a 和图 8b。  $\text{NH}_4\text{Cl}$  和  $\text{NaNO}_3$  是 *Pyramidomonas* sp. 和 *Chlorophyceae* L-4 生长的良好氮源。  $\text{NH}_4\text{Cl}$  为氮源的最初生长比  $\text{NaNO}_3$  为氮源的生长快,但 2 者的最终吸光值相近。从图 8 中可以看出,以  $\text{NaNO}_3$  为氮源,存在生长的延迟,而以  $\text{NH}_4\text{Cl}$  为氮源的生长延迟期缩短。尿素作为有机氮源,对 2 种绿藻的最初生长有利,但其培养终止时的吸光值比无机氮源的要低,仅为  $\text{NH}_4\text{Cl}$  和  $\text{NaNO}_3$  吸光值的 66%~77%。氮缺乏使冰藻几乎不生长,而且藻体变黄老化,沉底。 Demers 等<sup>[12]</sup>发现,尽管氨氮的最初水平相对较高,由于海冰环境的溶解无机氮源主要是氨氮和硝氮,能够被冰藻同时利用。同样的, Maestrini

等<sup>[13]</sup>也发现,在氨氮的浓度为  $7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,底栖的微藻对硝氮的吸收速率较高。这些结果与经典的结果不同,一般认为,在氨氮的浓度高于  $0.2 \sim 1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,对硝氮的吸收受到抑制<sup>[14-15]</sup>。底栖的藻类以及冰藻能够同时利用环境中的氨氮和硝氮, Demers 等<sup>[12]</sup>认为,这可能是细胞对氮源的一种适应性机制。

不同的氮源对 *Pyramidomonas* sp. 和 *Chlorophyceae* L-4 的 Chl a 含量影响显著,分别见图 9a 和图 9b。可以看出,2 种绿藻均是以  $\text{NH}_4\text{Cl}$  为氮源时可以获得高的吸光值,但其 Chl a 的含量却低于以  $\text{NaNO}_3$  为氮源的 Chl a 含量,尤其 *Chlorophyceae* L-4,以  $\text{NaNO}_3$  为氮源,在培养末期的吸光值为 0.28, Chl a 含量为  $2.32 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,而以  $\text{NH}_4\text{Cl}$  为氮源时的吸光值为 0.285, Chl a 含量仅为  $0.90 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

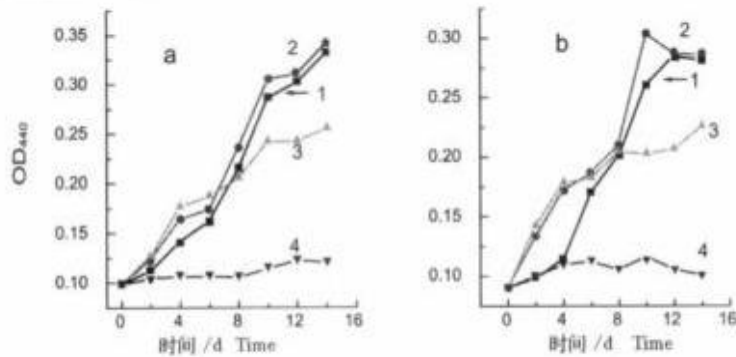


图8 不同氮源对 *Pyramidomonas* sp. (a) 和 *Chlorophyceae* L-4 (b) 生长的影响

氮源: 1.  $\text{NaNO}_3$ ; 2.  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 3. 尿素; 4. 对照

Fig.8 Effects of nitrogen on growth of *Pyramidomonas* sp. (a) and *Chlorophyceae* L-4 (b)

Nitrogen: 1,  $\text{NaNO}_3$ ; 2,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 3, Urea; 4, Control

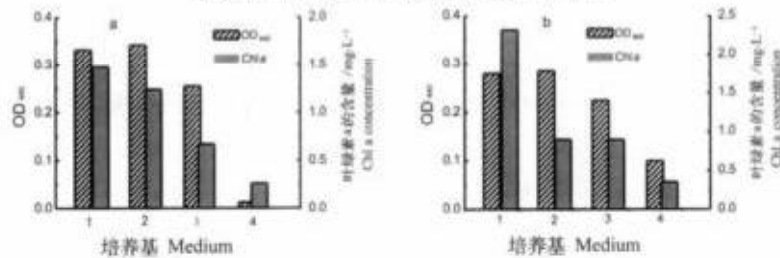


图9 氮源对 *Pyramidomonas* sp. (a) 和 *Chlorophyceae* L-4 (b) Chl a 含量的影响

培养基: 1,  $\text{NaNO}_3$ ; 2,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 3, 尿素; 4, 对照

Fig.9 Effects of nitrogen on Chl a contents of *Pyramidomonas* sp. (a) and *Chlorophyceae* L-4 (b)

Medium: 1,  $\text{NaNO}_3$ ; 2,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 3, Urea; 4, Control

因此,从吸光值和 Chl a 的含量综合考虑,采用  $\text{NaNO}_3$  为培养基氮源。

### 2.8 不同浓度的氮源对 2 种绿藻生长的影响

在所测的氮源浓度中,对 *Pyramidomonas* sp. 的生长有一定的影响,见图 10a。氮浓度在  $0.88 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,可获得最高的细胞浓度,比生长速率为  $0.13 \text{ d}^{-1}$ 。氮浓度低于  $0.88 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,则细胞的生长速度降低,比生长速率为  $0.11 \text{ d}^{-1}$ ;高的氮浓度对冰藻的生长也有抑制作用,但在所测范围内对生长的抑制作用不明显。氮浓度在  $0.56 \sim 1.47 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,对 *Chlorophyceae* L-4 的生长影响不明显,比生长速率维持在  $0.12 \text{ d}^{-1}$ ,因此 *Chlorophyceae* L-4 可适应较宽的氮浓度,见图 10b。

### 2.9 不同浓度的磷源对 2 种绿藻生长的影响

不同浓度磷对 *Pyramidomonas* sp. 和 *Chlorophyceae* L-4 生长的影响分别见图 11a 和 11b。在不添加  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  的培养基中,2 种绿藻细胞仅能利用海水中的磷酸盐缓慢生长。添加一定量的磷酸盐

有利于冰藻的生长。*Pyramidomonas* sp. 在  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  的浓度为  $0.015 \sim 0.033 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,生长速率较快,比生长速率为  $0.10 \text{ d}^{-1}$ ,较高的磷酸盐浓度在短时间内可刺激冰藻的生长,因此,在对数生长初期,磷酸盐的浓度为  $0.130 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,藻细胞的比生长速率可达  $0.28 \text{ d}^{-1}$ 。高浓度的磷酸盐有利于 *Chlorophyceae* L-4 的生长,随着磷酸盐浓度的由  $0.015 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  提高到  $0.130 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,*Chlorophyceae* L-4 的最终藻细胞浓度增加。

### 3 结语

研究表明, $f/2$  培养基为适合 2 种绿藻生长的适宜培养基。*Pyramidomonas* sp. 最适生长温度为  $2 \sim 6 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH 为 9.0; *Chlorophyceae* L-4 的最适生长温度为  $-3 \sim 6 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH 为 8.0 ~ 8.5。2 种绿藻生长最适光强为  $7.0 \sim 60.0 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,最适盐度为 22 ~ 33。选择  $\text{NaNO}_3$  为培养基中的氮源,适合 *Pyramidomonas* sp. 的浓度为  $0.88 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。氮源浓度

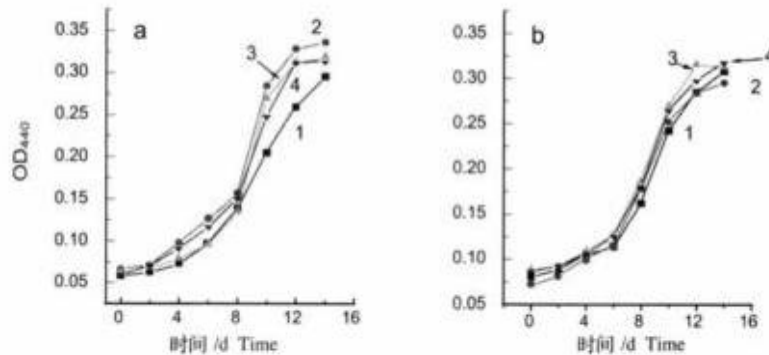


图 10 氮浓度对 *Pyramidomonas* sp. (a) 和 *Chlorophyceae* L-4 (b) 生长的影响

Fig. 10 Effects of nitrogen concentration on growth of *Pyramidomonas* sp. (a) and *Chlorophyceae* L-4 (b)

Nitrogen concentration: 1, 0.56 mol · L<sup>-1</sup>; 2, 0.88 mol · L<sup>-1</sup>; 3, 1.18 mol · L<sup>-1</sup>; 4, 1.47 mol · L<sup>-1</sup>

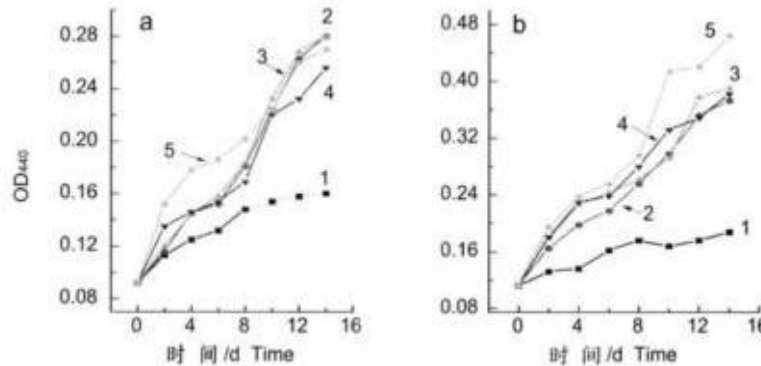


图 11 磷源浓度对 *Pyramidomonas* sp. (a) 和 *Chlorophyceae* (b) 生长的影响

Fig. 11 Effects of phosphate concentration on growth of *Pyramidomonas* sp. (a) and *Chlorophyceae* L-4 (b)

Phosphate concentration: 1, 0 mol · L<sup>-1</sup>; 2, 0.015 mol · L<sup>-1</sup>; 3, 0.033 mol · L<sup>-1</sup>; 4, 0.065 mol · L<sup>-1</sup>; 5, 0.130 mol · L<sup>-1</sup>

在 0.56 ~ 1.47 mmol · L<sup>-1</sup>, 对 *Chlorophyceae* L-4 生长影响不明显。适宜 2 种南极绿藻生长的磷酸盐浓度为 0.13 mmol · L<sup>-1</sup>。

本研究通过对南极冰藻的驯化培养, 可使南极冰藻在 0 ~ 12 °C 的温度范围内生长繁殖, 比生长速率可达到 0.274 d<sup>-1</sup>, 且南极冰藻的蛋白质含量可占南极冰藻干重的 30% 以上。因此, 南极冰藻由于其较高的营养价值和低温生活的习性, 可以在我国北方地区于冬末和早春季节, 在温度比较低的情况下大规模培养, 为养殖经济动物提前人工育苗提供经济饵料, 极有利于水产养殖业的发展。

#### 参考文献:

[1] Buma A G J, Noordeloos A A M, Larsen J. Strategies and kinetics of photoacclimation in three Antarctic nanophytoflagellates[J]. J

Phycol, 1993, 29:407-417.

- [2] Bunt J S. Some characteristics of microalgae isolated from Antarctic sea ice[J]. Antart Res Ser, 1968, 11:1-14.
- [3] 姜英辉. 南极冰藻的分离、培养及低温适应性研究[D]. 青岛: 青岛海洋大学, 2001.
- [4] Provasoli L. Media and prospects of the cultivation of marine algae [A]. Culture a collection of algae[C]. US-Japan Conf Hokone, Jpn Soc Plant Physiol, 1968, 63-75.
- [5] Jeffrey S W, Humphrey F G. New spectrophotometric equations for determining a, b, c1 and c2 in higher plants algal and natural phytoplankton[J]. Biochem Physiol Pfl, 1975, 167:191-194.
- [6] Palmisano A C, Sullivan C W. Physiology of sea ice diatoms. 1. Response of three polar diatoms to a simulated summer-winter transition[J]. J Phycol, 1982, 18: 489-498.
- [7] Eppley R W. Temperature and phytoplankton growth in the sea [R]. NOAA Fish Bull, 1972, 71:1 063.
- [8] Gosselin M, Legendre L, Therriault J C, et al. Physical control of horizontal patchiness of sea-ice microalgae[J]. Mar Ecol Pro



- Ser, 1986, 29:289-298.
- [9] Cota G F, Sullivan C W. Photoadaptation, growth and production of bottom ice algae in the Antarctic[J]. *J Physcol*, 1990, 26:399-411.
- [10] Hellebust J A. Mechanisms of response to salinity in halotolerant microalgae[J]. *Plant Soil*, 1985, 89:69-81.
- [11] Horner R, Schrader G C. Relative contributions of ice algae, phytoplankton and benthic microalgae to primary production in nearshore regions of Beaufort Sea[J]. *Arctic*, 1982, 35:485.
- [12] Dermers S, Legendre L, Maestrini S Y, et al. Nitrogenous nutrition of sea-ice microalgae[J]. *Polar Biol*, 1989, 9:377-383.
- [13] Maestrini S Y, Robert M, Legendre L, et al. Simultaneous uptake of ammonium and nitrate by oyster-pond algae[J]. *Mar Biol Lett*, 1982, 3:143-153.
- [14] Garside C. Nitrate and ammonia uptake in the apex of the New York Bight[J]. *Limnol Oceanogr*, 1981, 26:731-739.
- [15] Blasco D, Conway H L. Effect of ammonium on the regulation of nitrate assimilation in natural phytoplankton populations[J]. *J Exp Mar Biol Ecol*, 1982, 61:157-168.

## Optimum culture of antarctic ice microalgae *Pyramidomonas* sp. and Chlorophyceae L-4

MIAO Jin-lai<sup>1</sup>, KAN Guang-feng<sup>1,2</sup>, ZHANG Bo-tao<sup>1,2</sup>, JIANG Ying-hui<sup>1</sup>, HOU Xu-guang<sup>3</sup>, LI Guang-you<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Marine Bio-active Substances, State Oceanic Administration, Qingdao 266061, China; 2. Marine Life College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 3. Life Science College, Shandong University, Jinan 250100, China)

**Abstract:** Antarctic is an extreme cold area with high salinity and strong UV irradiation. Antarctic ice microalgae, the main producer of primary production, play a very important role in marine ecology system. Ice microalgae develop many mechanisms to adapt these extreme environments after a long time evolution. In order to use completely the value of ice microalgae, the effects of culture conditions (medium, temperature, irradiance, salinity, pH and nutrient sources) on two species of antarctic green microalgae were investigated. *Pyramidomonas* sp. and Chlorophyceae L-4 were cultured in *f*/2 medium. The OD<sub>440</sub>, chlorophyll content and specific growth rate were determined every two days. The results showed that *f*/2 medium was the favorable one for *Pyramidomonas* sp. and Chlorophyceae L-4 among *f*/2, Provasoli and green algae medium. These two species of algae were developed under 4 different temperature of -3, 2, 6 and 10 °C, the range of optimum temperature for the growth of *Pyramidomonas* sp. and Chlorophyceae L-4 is 2-6 °C and -3-6 °C respectively. After the irradiance of 0.6, 3.0, 7.0, 20.0 and 60.0 μE · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup>, the maximal growth quantity of *Pyramidomonas* sp. and Chlorophyceae L-4 were both got under 7.0-60.0 μE · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup>. The salinity of *f*/2 medium were adjusted to 11, 22, 33, 66, 100 and 150 by adding crude salt and sterile water, and the results showed 22-33 was optimum. The pH value of *f*/2 medium to 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 and 10.0 with 0.1 mol · L<sup>-1</sup> HCl and NaOH were regulated, the optimum pH value for the growth of *Pyramidomonas* sp. was 9.0, while Chlorophyceae L-4 was 8.0-8.5. In all nitrogen sources (NaNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl and urea), NaNO<sub>3</sub> was optimum for the two species of algae. *Pyramidomonas* sp. and Chlorophyceae L-4 were cultured in different NaNO<sub>3</sub> level of 0, 0.56, 0.88, 1.18 and 1.47 mol · L<sup>-1</sup>, and our experiments showed that the optimum concentration for *Pyramidomonas* sp. is 0.88 mmol · L<sup>-1</sup>, and 0.56-1.47 mmol · L<sup>-1</sup> has no obvious effect on Chlorophyceae L-4. These two species of green microalgae were cultured in *f*/2 medium consisting of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (phosphate source) of 0.015, 0.033, 0.065 and 0.13 mol · L<sup>-1</sup>, and the optimum KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> concentration for their growth was both 0.13 mmol · L<sup>-1</sup>. Antarctic ice microalgae under the extreme environment have many important substances, such as antioxidant, antifungal, antitumour, etc.. The optimum culture conditions were founded after our experiments, which can provide basic evidences for ice microalgae exploitation and large-scale culture.

**Key words:** antarctic ice microalgae; green algae; culture conditions; culture optimization