

# 微拟球藻优化培养模式及其在光生物 反应器高密度培养中的应用<sup>\*</sup>

刘建国 张京浦 殷明焱 孟昭才

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

微藻是水产养殖动物终生或特定发育阶段的饵料 (或饵料的饵料), 作为重要基础之一, 很大程度上支撑着水产养殖产业。目前, 在水产育苗过程中, 由于生物污染和气候等原因, 时常出现饵料微藻数量不足现象, 人们不得不选用人工饲料代替, 这在很大程度上限制了水产养殖业发展。同时, 微藻饵料质量的优劣也直接影响着水产动物孵化率、成活率及生长率等, 也决定着水产养殖的成败。因此选择生长快、颗粒大小适宜并富含营养物质的饵料微藻是水产养殖的基础。

科学家们研究发现, 水产饲料中多不饱和脂肪酸 [如二十碳五烯酸 (EPA)、二十二碳六烯酸 (DHA) 等] 对海鱼和对虾影响效果明显 (陈晓林等, 2004; 刘镜恪等, 1997, 2002, 2004, 2005, 2001; Liu et al, 2002, 2004; 邱小琮等, 2004)。多数海洋微藻具有增加  $\omega 3$  和  $\omega 6$  系列脂肪酸链长和去饱和能力, 是多不饱和脂肪酸含量最多的生物类群 (樊云真等, 1998; 李文权等, 2003; 刘建国等, 2002)。在水产中, 微藻饵料的缺乏常常成为限制水产动物育苗的关键因素, 因此提供优质海洋微藻饵料是促进水产产业发展的重要措施。微拟球藻是海洋微藻大眼藻纲中的主要种群 (Hibberd, 1981), 能高产不饱和脂肪酸 (特别是 EPA) (Zou et al, 1999; 魏东, 2000; 王秀良, 2002), 并具有生长迅速、细胞颗粒小 (Hu et al, 2003) 的特点。作者利用微拟球藻培养轮虫, 投喂牙鲆幼苗的实验数据显示, 该藻培育的轮虫对牙鲆幼苗生长有明显促进作用, 也有利于提高幼苗的成活率 (刘建国等, 2007)。

本文作者利用微拟球藻在天然海水中的人工优化配方以及光温等重要参数, 总结出优化培养模式, 利用不同光生物反应器对优化模式进行了高密度培养验证, 并研究了比生长速率与生物产量等问题, 为该藻的海水饵料培养和水产应用提供基础。

<sup>\*</sup> 中国科学院方向性创新重要方向项目 KZCX-YW-209 (L48032409D) 和山东省科技项目 (98-18) 资助。

通信作者: 刘建国, 男, 博士, 博士生导师, 中国科学院海洋研究所藻类和藻类生物技术方向责任研究员;  
Tel: 0532 82898709 Email: jliu@ms.qdio.ac.cn

收稿日期: 2006 年 6 月 20 日。

一、材料与方 法

1. 材料来源与培养方法

微拟球藻 (*Nannochloropsis salina*)来自于以色列本古联大学。该藻具有微细胞颗粒小、富含 EPA等不饱和脂肪酸、营养比较全面、生长迅速,不易污染、易形成优势种等特点。

利用天然过滤海水(盐度实验采用淡水)按照 BG-11配方为基础,并逐一改变某种营养物质(包括无机氮、磷、铁、碳源、硼、铜、锌、钴、锰、钼等)浓度后制作培养液,80℃消毒 5min,冷却到室温分别接种处于对数生长期的微拟球藻,分别利用三角烧瓶开展实验,观察实验早期(2~3 d)培养效果,寻求最佳营养物质种类和浓度范围,为连续培养建立优化微拟球藻营养配方。

按照改良后的优化配方配制培养液,依据上述方法分别接种到平板光生物反应器、管道光生物反应器内通气培养,维持模式培养参数,实现高密度体系后,连续采收并补充等量营养物质,观察饵料培养效果。

2. 生长和死亡率测定与计算

微拟球藻细胞测定采用血球计数板法和光密度测定法。由于该藻细胞较小,直径只有 2μm左右,每个样品需要在显微镜下仔细统计,结果中的细胞数量为 64个样本平均值。而在藻液光吸收测定中,为避免叶绿素和类胡萝卜素含量变化对其产生影响,回避叶绿素和类胡萝卜素光吸收峰,测定 750 nm下的光吸收。并对实验测得的光吸收和细胞密度进行了比较,获得二者的关系曲线。

二、结果与讨论

1. 优化培养模式的建立

众所周知,在生物量计算方法中细胞数量比较客观和直接。但是该方法存在明显缺陷:如果统计样本数量少,则数据变化幅度较大;如果样本数量增加后,则统计过程用时较长,且比较繁杂。在微拟球藻生长测定中,同时测定了光吸收和细胞密度数据,结果表明二者之间有较强的线性正相关性,相关方程为:  $Y=0.07215 + 0.0197 X$  相关系数为 94.4%。X为细胞数量  $10^6 mL^{-1}$ , Y为 750 nm的光吸收值。当微拟球藻细胞密度过高时,需要利用净洁海水对藻液先行稀释,间接获得细胞数量或测定光吸收。另外,藻液中藻体碎片和溶解性物质对浊度稍有影响,这也是影响线型相关系数的可能原因。

1) 不同氮、磷及浓度对微拟球藻生长的影响

图 1是在 4种不同氮源培养条件下微拟球藻生长状况。该藻能够利用硝酸氮和铵氮为基本代谢的无机营养物质,在 2 mmol/L以下范围内,增加氮肥有利于该藻生长,其中铵氮培养效果明显好过硝酸氮,硫酸铵和尿素是最好的;该藻达到最快生长所需要的

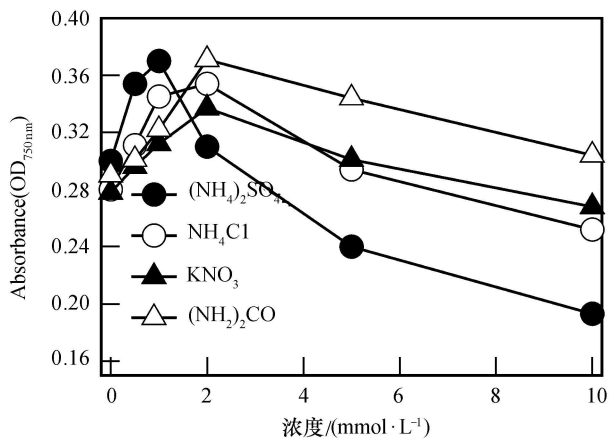


图 1 不同类型的氮源及其浓度对微拟球藻细胞生长的影响

硫酸铵量最少 (只有 1 mmol/L, 而其他氮肥为 2 mmol/L), 但是高浓度的硫酸铵引起细胞生长下降, 这可能与氨中毒现象有关; 在大于 2 mmol/L 氮肥范围内, 尿素培养效果最高也最稳定, 表明尿素是培养微拟球藻的理想氮肥。

在 1.0 mmol/L 硫酸铵、2.0 mmol/L 尿素、0.5 mmol/L 硫酸铵 + 1.0 mmol/L 尿素为氮源情况下, 比较了磷 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 浓度梯度对微拟球藻生长状况 (图 2)。从中可以看出, 无论在何种氮肥情况下, 5 ~ 8 mg/L 的磷浓度时该藻的光吸收最大, 表明 5 ~ 8 mg/L 是微拟球藻生长的适宜磷浓度。

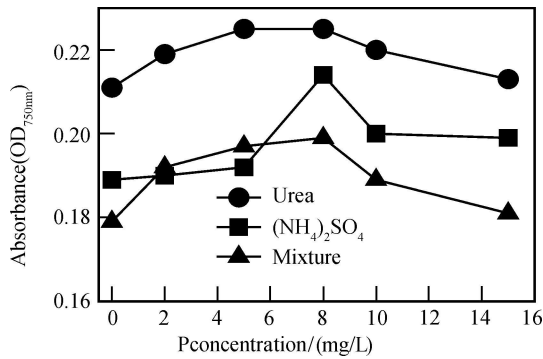


图 2 在不同氮源组合下, 磷浓度梯度对微拟球藻细胞生长的影响

从图 2 结果中还可以看出, 微拟球藻在 2.0 mmol/L 尿素中的光密度曲线明显高于其他曲线, 表明尿素的培养效果明显比硫酸铵以及二种氮肥的复合要好, 与图 1 结果一致。因此, 建议生产中采用 2.0 mmol/L 尿素作为氮肥, 同时配以 5 ~ 8 mg/L 的磷酸二氢钾。

应当指出, 上述氮磷配方与原 BG-11 有很明显的差异, 主要差异表现在: 氮源从硝酸钾改为尿素, 并且氮浓度有大幅度下降, 只有原来的 1/7; 磷酸二氢钾也有很大降幅, 下降到了原来的 1/5。

2) 铁盐、碳和氯化钠在微拟球藻生长中的作用

柠檬酸铁、氯化铁和硫酸亚铁处理情况下，微拟球藻生长数据 (图 3)表明，柠檬酸铁比其他二种铁盐的培养效果好些，在实验范围内，1.5 mg/L 的柠檬酸铁效果最佳。上述铁与原 BG-11 也有很明显的差异，其中铁浓度只是原 BG-11 的 1/4

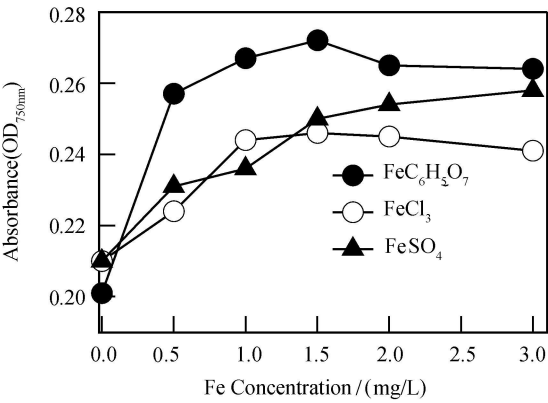


图 3 不同类型的铁源及其浓度对微拟球藻细胞生长的影响

图 4 为用不同浓度的小苏打和氯化钠处理后，微拟球藻的生长数据。从中可以看出，在 100 mg/L 碳酸氢钠和 25~30 g/L 的氯化钠条件下微拟球藻藻液光吸收最大，说明上述浓度比较适宜于微拟球藻生长，分别为建议的优化氮磷模式浓度。培养微拟球藻的盐度在 25%~30%，也比正常海水盐度稍低些，因此采用天然海水或向天然海水中添加 10%~15% 的淡水最有利于微拟球藻生长。

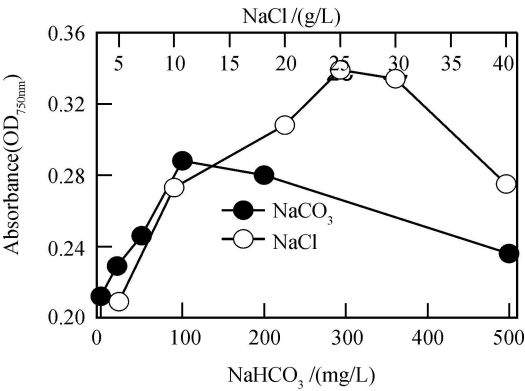


图 4 碳酸氢钠和氯化钠浓度对微拟球藻细胞生长的影响

3) 微量元素及其他对微拟球藻生长的影响效果

钼、钴、铜和锌在微拟球藻生长中的作用如图 5 所示。结果表明微拟球藻对上述微量元素的需求存在差异，其中 0.05 mg/L 的硫酸锌、0.01 mg/L 的硫酸铜、0.08~0.15 mg/L 的钼酸钠以及 0.02 mg/L 的氯化钴比较适宜于该藻生长。这里硫酸锌为 BG-11 量的 2/9

硫酸铜只有原量的 1/80 钼是原来含量的 1/40 氯化钴含量为其 1/25。

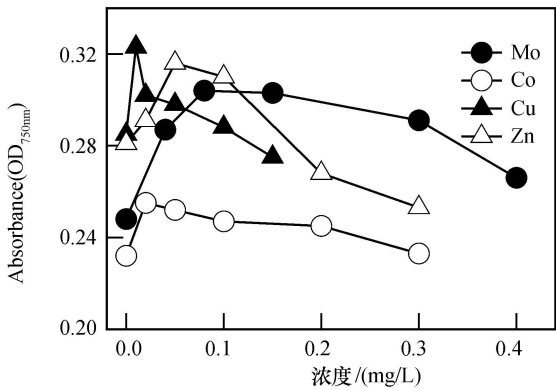


图 5 钼、钴、铜、锌浓度梯度对微拟球藻细胞生长的作用

硼、锰以及阿司匹林对微拟球藻生长的影响结果(图 6)表明, 上述培养因子也对该藻生长产生一定程度的作用, 其中 0.5 mg/L 的硼酸、1.0 mg/L 的硫酸锰和 2.0 mg/L 的阿司匹林都有利微拟球藻生物量的增加。同 BG-11 配方相比硼只有原来量的 1/60 硫酸锰代替了氯化锰, 含量是原量的 1/8。

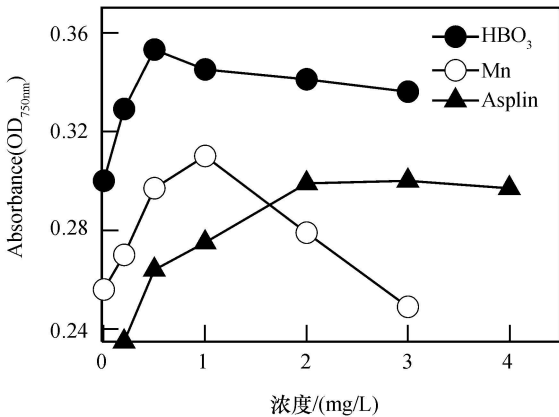


图 6 锰、硼和阿司匹林浓度对微拟球藻细胞生长的影响

另外, 海水中含有大量钙镁离子, 没有必要人为添加就能满足藻类生长需求, 相反也很难从中除掉。

综上所述, 可以总结归纳出利用天然海水配制该藻培养液的适宜营养配方, 内容包括: 120mg/L 尿素、6mg/L 磷酸钾、1.5 mg/L 柠檬酸铁、0.05 mg/L 硫酸锌、0.01 mg/L 硫酸铜、0.1 mg/L 钼酸钠、0.02 mg/L 氯化钴、0.5 mg/L 硼酸、1.0 mg/L 硫酸锰, 盐度控制在 25~30 ‰。

但上述配方同适用于多数微藻培养的 BG-11 差异很大, 除了与具体藻种需要特定营养配方因素有关外, 还与海水中含有丰富的微量元素而降低了其添加量有很大关系。

4) 光照对微拟球藻生长影响

利用上述优化培养配方，进一步观察了微拟球藻光照和温度对该藻生长的影响（表 1）。

表 1 光照时间对微拟球藻生长影响

| 光 暗周期<br>/h | 细胞密度 / ( 10 <sup>6</sup> 细胞 /mL) |               |                |       |              |              |
|-------------|----------------------------------|---------------|----------------|-------|--------------|--------------|
|             | 实验 1                             |               |                | 实验 2  |              |              |
|             | 起始                               | 第 1 周期        | 第 2 周期         | 起始    | 第 1 周期       | 第 2 周期       |
| 4 :20       | 4. 69                            | 5. 69(1. 00)  | 9. 35(4. 66)   | 3. 81 | 4. 81(1. 00) | 4. 93(1. 12) |
| 8 :16       |                                  | 6. 38(1. 69)  | 10. 48(5. 79)  |       | 5. 63(1. 82) | 5. 92(2. 11) |
| 12 :12      |                                  | 6. 78(2. 09)  | 12. 16(7. 47)  |       | 6. 42(2. 61) | 7. 07(3. 26) |
| 16 :8       |                                  | 7. 81(3. 12)  | 12. 31(7. 62)  |       | 6. 68(2. 87) | 8. 02(4. 21) |
| 20 :4       |                                  | 9. 31(4. 62)  | 12. 73(8. 04)  |       | 6. 99(3. 18) | 8. 52(4. 71) |
| 24 :0       |                                  | 11. 35(6. 66) | 15. 51(10. 82) |       | 7. 48(3. 67) | 9. 30(5. 49) |

注：实验 1 和实验 2 的培养温度分别为 (25. 5±0. 5)℃和 (19. 0±0. 5)℃，光照强度为 144μmol/(m<sup>2</sup>·s)。括号内数据为净增加值，表内每个样本细胞密度为统计 64 次数据的平均值。

从表 1 中可以看出无论接种量如何，光照时间越长细胞数量越高，即增加长光照时间明显有利于微拟球藻细胞增加。因此我们可以在生产上采用连续光照的方法培养生产微拟球藻。

从表 1 细胞净增加数量进一步分析还可以看出，细胞生长速率对光照周期的反映还与温度有一定关系。实验范围内温度高更有利于细胞繁殖。在实验 1 中 (25℃) 第 1 个光照周期，光照时间延长 2~6 倍，细胞分别净增加了 1. 7~6. 7 倍；而在较低温度 (19℃) 的实验 2 中的第 1 个光照周期，光照时间延长 2~6 倍，细胞只净增加了 1. 8~3. 7 倍。

从光能角度分析，实验 1 (25℃) 的第 1 个光照周期，细胞净增加与光能增加之间呈不固定的递增关系，分别是其光能增加值的 80%、70%、78%、92% 和 111%；但是第 2 d 为递减趋势，分别是光能增加值的 63%、53%、41%、35% 和 39%。而在较低温度 (19℃) 的实验 2 中，光照延长后细胞净增加与光能增加呈递减关系，第 1 个光照周期内随着光照延长 2~6 倍，细胞净增加只是光能增加量的 91%、87%、72%、64% 和 61%，第 2 个光照周期为其光能增加量的 94%、97%、94%、84% 和 82%。

5) 温度对微拟球藻生长的影响

微拟球藻生长与温度有密切关系。图 7 结果表明从 15~35℃ (恒温温度) 实验范围内，过低的温度明显延缓该藻生长，而过高的温度 (35℃) 则严重抑制藻细胞增殖，其中 25~30℃ 区间最适宜于微拟球藻细胞增长。由于温度提高不仅增加藻类光合作用速率，而且也直接提高了呼吸速率。在恒温状态下最适宜于微拟球藻细胞增长 (图 8)，在光照和更高变温条件下 (黑暗时适当降低温度，达到减少呼吸消耗，实现更高的生物

量累积)，微拟球藻也能维持一定的生长。

图 8是恒温和变温条件下微拟球藻生长对比结果。从中可以明显看出：30℃+20℃变温组合条件下的藻生长速率比相应的 30℃恒温高；即使光下温度为 35℃，只要黑暗时温度有效下降到 25℃，微拟球藻依然维持很高的生长速率。这说明，微拟球藻是一种生长温度范围比较宽、更适宜于高温培养的微藻。图 7、图 8结果表明在实际生产上，控制温度在 25~35℃可以获得比较理想的培养效果。

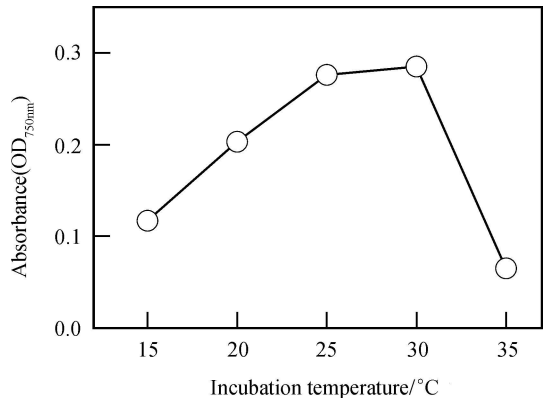


图 7 培养温度对微拟球藻细胞生长的影响

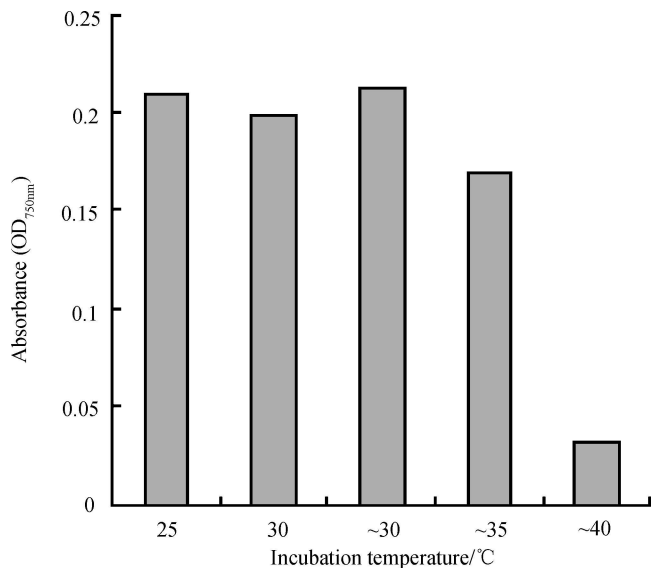


图 8 温度对微拟球藻细胞增长的影响

2. 微拟球藻优化模式的应用效果

1) 优化模式在不同光生物反应器中的应用效果 (表 2)

基于上述基本培养因子的研究结果, 利用优化培养模式配方, 分别在 5 种大小和类型不同生物反应器中进行了效果观察。

(1) 在室外利用夏季自然光, 500 L 平板玻璃光生物反应器 (没有严格消毒, 但加盖封口防止雨水和灰尘), 实现了 2 个多月的微拟球藻连续高密度培养, 细胞密度达到  $7.5 \times 10^{11}$  细胞 / L。

(2) 在室外, 利用 10 m 光径的平板玻璃光生物反应器 (200 L), 在初春季节也实现了高密度培养微拟球藻, 细胞密度提高到近  $7 \times 10^{11}$  细胞 / L。

(3) 在室内, 利用 60 L 平板玻璃光生物反应器培养微拟球藻, 10 d 内提高到  $2.6 \times 10^{11}$  细胞 / L。

(4) 在室内, 在更大的培养缸中 (1600 L) 培养 8 d 后, 微拟球藻密度也提高到  $1.2 \times 10^{11}$  细胞 / L。

(5) 在室内连续人工光照条件下, 利用气升式螺旋管道 (光径 1.2 m) 光生物反应器, 成功建立了微拟球藻超高密度培养体系, 细胞密度更高, 最高可以达到  $3.6 \times 10^{12}$  细胞 / L。

上述不同生物反应器培养效果表明, 在优化培养模式配方中, 可以比较容易地实现高密度和超高密度培养, 其培养密度比目前生产中大小类似的小球藻饵料要高很多。小球藻在生产上能达到  $(0.5 \sim 2) \times 10^{10}$  细胞 / L 就已经非常理想了。

表 2 微拟球藻主要培养参数与生长状况关系

| 培养参数 | 低于适宜范围  | 适宜范围       | 超过适宜范围   | 说 明                                                  |
|------|---------|------------|----------|------------------------------------------------------|
| 氮    | 生长明显受限制 | 2 0 nmol/L | 生长受抑制    | 尿素最适、硫酸铵等铵肥次之、硝酸肥效果相对较差                              |
| 磷    | 生长稍受限制  | 5 ~ 8 mg/L | 生长稍受抑制   | 使用 $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ |
| 镁    | —       | —          | —        | 海水中含量丰富                                              |
| 钙    | —       | —          | —        | 海水中含量丰富                                              |
| 盐度   | 生长受限制   | 25‰ ~ 30‰  | 生长受抑制    | 主要 $\text{NaCl}$                                     |
| 碳    | 生长明显受限制 | 300 mg/L   | 生长受抑制    | 使用 $\text{NaHCO}_3$                                  |
| 铁    | 生长明显受限制 | 1. 5 mg/L  | 浪费       | 柠檬酸铁                                                 |
| 硼    | 生长受限制   | 0. 5 mg/L  | 稍下降、浪费   | 使用 $\text{HBO}_3$                                    |
| 锰    | 生长明显受限  | 1. 0 mg/L  | 明显受抑制    | 使用 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$         |
| 钼    | 明显限制生长  | 0. 1 mg/L  | 稍受抑制, 浪费 | 使用 $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$        |
| 钴    | 生长受限制   | 0. 02 mg/L | 稍受抑制, 浪费 | 使用 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$         |
| 铜    | 明显限制生长  | 0. 01 mg/L | 生长快速下降   | 使用 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$         |

续表

| 培养参数 | 低于适宜范围  | 适宜范围                                                  | 超过适宜范围 | 说 明                                          |
|------|---------|-------------------------------------------------------|--------|----------------------------------------------|
| 锌    | 生长明显受限制 | 0.05 mg/L                                             | 明显受抑制  | 使用 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ |
| 温度   | 生长缓慢    | 25 ~ 30℃                                              | 生长快速下降 | 光暗恒温                                         |
| 日夜温差 | 生长延缓    | 25 ~ 35℃                                              | 生长受抑制  | 暗处温度低于光下                                     |
| 光照   | 生长缓慢    | 140 ~ 800 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ | 光抑制    | 与密度、光径和搅拌方式有关                                |
| 光照时间 | 生长受限制   | > 8 h                                                 | 生长加速   | 人工光源                                         |

2) 比生长速率与细胞密度和生物产量的关系

根据我们对不同光生物反应器数据, 总结出微拟球藻比生长速率与细胞密度和日生物产量的关系(表 3)。从中可以看出: ①比生长速率与体系平衡时细胞密度成明显的负相关性。比生长速率越高, 体系平衡时细胞密度越低; 反之, 比生长速率越小, 体系平衡时的细胞密度就越高。②比生长速率对单位体积的日生物产量影响比较复杂。一般而言, 提高比生长速率首先有利于单位体积日生物产量增加; 当达到最高之后, 继续提高比生长速率则使得其日生物产量下降。比生长速率在 10%~15%时, 可以获得微拟球藻的单位体积最大日生物产量。对室内管道光生物反应器来讲, 日生物产量出现最大时的比生长速率也最高, 其原因估计与该体积的超高密度有关。在超高密度培养体系中, 除常规培养因素影响外, 还有其他新制约因子出现和响应的特殊生理代谢。例如, 研究发现高密度培养体系中, 细胞自由空间的压缩和细胞相互作用加强, 导致产生了反馈调节生长的抑制物质(刘建国等, 2004; 孙艳妮等, 2001; Inada et al., 1991; Liu et al., 2002; Richmond et al., 2003); 细胞相互遮蔽作用的加强, 细胞群体间出现完全不同的光适应机制(张展等, 2003); 另外, 在超高密度培养体系中, 营养代谢物质补偿机制出现了变化。③生物反应器类型和体积大小对其日生物产量并没有起决定性影响(如 10.5 L 的管道反应器比 200 L 的平板反应器还要高很多), 合适的培养参数是决定生物反应器日生物产量的重要因子。相对而言, 增加光照能量(如在夏天获得高光强度)或增加光照时间(表 1)或提高培养温度到适宜范围内等措施, 都明显增加微拟球藻的日生物产量。因此在水产养殖中利用海水培养微拟球藻时, 建议尽可能地采用本研究获得的优化模式, 可获得理想的培养效果。

表 3 不同类型光生物反应器中, 微拟球藻的比生长速率、细胞密度和日生物产量

| 比生长速率<br>/%                                    | 系统平衡时采收藻液的平均密度<br>/(10 <sup>6</sup> 细胞/mL) | 反应器日生物产量<br>/(10 <sup>12</sup> 细胞) | 日生物产量<br>/(10 <sup>10</sup> 细胞/L) |
|------------------------------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| 初春季平板玻璃反应器(反应器体积 200 L, 反应液体积 180 L, 光径 10 cm) |                                            |                                    |                                   |
| 25.0                                           | 0.8                                        | 3.4                                | 1.9                               |
| 20.0                                           | 1.1                                        | 3.8                                | 2.1                               |
| 15.0                                           | 2.2                                        | 5.8                                | 3.2                               |
| 10.0                                           | 3.5                                        | 6.2                                | 3.5                               |

续表

| 比生长速率<br>/%                               | 系统平衡时采收藻液的平均密度<br>/(10 <sup>8</sup> 细胞/mL) | 反应器日生物产量<br>/(10 <sup>12</sup> 细胞) | 日生物产量<br>/(10 <sup>10</sup> 细胞/L) |
|-------------------------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| 5.0                                       | 4.5                                        | 4.1                                | 2.3                               |
| 夏季平板玻璃反应器(反应器体积 500 L 反应液 450 L 光径 20 cm) |                                            |                                    |                                   |
| 15.0                                      | 4.8                                        | 32.4                               | 7.2                               |
| 12.5                                      | 5.8                                        | 32.6                               | 7.3                               |
| 10.0                                      | 6.8                                        | 30.6                               | 6.8                               |
| 5.0                                       | 7.4                                        | 16.7                               | 3.7                               |
| 室内管道反应器(反应器体积 10.5 L 反应液 10 L 光径 1.2 cm)  |                                            |                                    |                                   |
| 30.0                                      | 8.0                                        | 24.0                               | 24.0                              |
| 20.0                                      | 10.0                                       | 20.0                               | 20.0                              |
| 10.0                                      | 16.0                                       | 16.0                               | 16.0                              |
| 5.0                                       | 27.0                                       | 13.5                               | 13.5                              |

注：200 L和 500 L平板反应器实验分别在初春和夏季，利用室外自然变化的光温条件下开展；而 10.5 L管道反应器为室内 24 h连续光照实验，培养藻液温度控制在 (27±1.0)℃。

三、结 论

通过在青岛和新加坡不同气候、温度、光照条件，以及梯度营养因子（包括氮、磷、铁、碳、硼、锌、钴、铜、钼、锰）对微拟球藻细胞生长影响，建立了以天然海水为基础的优化培养模式，主要内容包括：尿素 120mg/L，磷酸二氢钾 6mg/L，柠檬酸铁 1.5mg/L，硫酸锌 0.05mg/L，硫酸铜 0.01mg/L，钼酸钠 0.1mg/L，氯化钴 0.02mg/L，硼酸 0.5mg/L，硫酸锰 1.0mg/L，氯化钠盐度 25‰到 30‰，室内连续光照和适宜的人工强光照，室内温度在 25~30℃(有较大日夜温差时光下可提高到 35℃)、比生长速率控制在 10%~15%之间。

利用不同体积（10L、60L、200L、500L、1600L）和不同类型（平板玻璃和螺旋管道）的光生物反应器，均可以实现位拟球藻的高密度培养，细胞密度可以达到（1.2×10<sup>11</sup>~3.6×10<sup>12</sup>）细胞/L，该密度比目前生产上培养的密度平均提高了数百倍。

比生长速率和培养密度成负相关性，比生长速率增加时培养体系内的密度逐步减少。比生长速率对体系产出量也有直接影响。通常比生长速率在 10%~15%时，可以获得微拟球藻的最大产出。

上述结果可为直接培养微拟球藻或间接培养其他微藻的生产提供指导作用。

参 考 文 献

陈晓琳, 刘镜恪, 徐世宏. 2004 微粒饲料中鱼油 n-3 HUFA 的分子结构对真鲷仔稚鱼生长、存活的影响. 海洋水产研究, 25(6): 13~18

樊云真, 刘发义, 李荷芳等. 1998 海洋微藻高度不饱和脂肪酸的研究 II. 环境因子对等鞭金藻 3011 中高度不饱和

脂肪酸含量的影响. 海洋科学集刊, **40**: 155~160

- 蒋霞敏. 2002 温度、光照、氮含量对微绿球藻生长及脂肪酸组成的影响. 海洋科学, **26**(8): 9~13
- 李文权, 李芊, 廖启斌等. 2003 温度对四种海洋微藻脂肪酸组成的影响. 台湾海峡, **22**(1): 9~13
- 刘建国, 刘伟, Cohen Z et al. 2002 雪藻高密度连续培养中生物量和花生四烯酸的高产出. 海洋与湖沼, **33**(5): 499~508
- 刘建国, 孙艳妮, 殷明焱等. 2004 无机碳与雨生红球藻细胞调节物质. 海洋湖沼, **35**(5): 459~466
- 刘建国, 殷明, 张京浦等. 2007 微拟球藻的水产饵料效果研究. 海洋科学, **31**(5): 4~9
- 刘镜恪, 陈晓琳, 李岩然等. 2005 实验微粒饲料中花生四烯酸含量对牙鲆仔稚鱼生长、存活的影响. 海洋与湖沼, **36**(5): 418~422
- 刘镜恪, 陈晓琳, 周利等. 2004 真鲷仔稚鱼微粒饲料中 DHA 与 EPA 最佳比例的研究. 海洋科学, **28**(2): 18~20
- 刘镜恪, 雷霖霖, 林洪等. 2001 卵磷脂强化饵料对真鲷仔稚鱼生长、存活的影响. 海洋科学集刊, **43**: 152~156
- 刘镜恪, 雷霖霖. 1997 人工调节轮虫  $n-3$  HUFA 对黑鲷仔鱼生长、存活的影响. 科学通报, **42**(12): 1330~1333
- 邱小琼, 周洪琪, 曾庆华等. 2004 营养强化的轮虫、卤虫对牙鲆仔鱼的成活、生长及体脂肪酸组成的影响. 水产科学, **23**(2): 4~8
- 孙艳妮, 殷明焱, 刘建国等. 2001 雨生红球藻的信号物质. 海洋湖沼通报, **89**(3): 22~28
- 王秀良, 刘晨临, 张学成. 2002 pH 对眼点拟微绿球藻的生长、总脂含量以及脂肪酸组成的影响. 海洋科学, **26**(5): 63~67
- 魏东, 张学成, 隋正红等. 2000 氮源和 N/P 对眼点拟微绿球藻生长、总脂和脂肪酸组成影响. 海洋科学, **24**(7): 46~51
- 张继民, 张学成, 魏东. 2002 三种抑制剂对眼点拟微球藻的生长及脂肪酸组成的影响. 海洋大学学报, **32**(2): 266~272
- 张展, 刘建国. 2003 微藻高密度培养中的生长指标和适应机制. 海洋水产研究, **24**(4): 36~43
- Hibberd D J. 1981. Notes on the taxonomy and nomenclature of the algal classes Eustigmatophyceae and Tribophyceae (synonym Xanthophyceae). Bot J Linn Soc, **82**(2): 93~119
- Hu H, Gao K. 2003. Optimization of growth and fatty acid composition of a unicellular marine picoplankton *Nannochloropsis* sp., with enriched carbon sources. Biotechnol Lett **25**(5): 421~425
- Imada N, Kobayashi K, Tahara K et al. 1991. Production of an autoinhibitor by *Skeletonema costatum* and its effect on the growth of other phytoplankton. Nippon Suisan Gakkaishi **57**(12): 2285~2290
- Liu J G, Zhang C W, Cohen Z, Richmond A. 2002. Physiological Inhibitory of OCS in Arachidonic Acid-Rich Parietochloris incisa (Tribouxiphyceae, Chlorophyta). Chinese J Ocean Limnol **20**(3): 248~255
- Liu J K, Li K R, Huang B X et al. 2004. Effects of  $n-3$  HUFA levels in rotifers and Artemia. On growth and survival of larval black sea bream (*Sparus aurata*). Chin J Ocean Limnol **22**(4): 421~424
- Liu J K, Wang W Q, Li K R et al. 2002. Effects of fish oil DHA oil and lecithin in microparticulate diets on stress tolerance of larval gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Chin J Ocean Limnol **20**(4): 338~343
- Richmond A, Zhang C W, Zami Y. 2003. Efficient use of strong light for high photosynthetic productivity: interrelationships between the optical path, the optimal population density and cell growth inhibition. Biomolecular Engineering **20**: 229~236
- Zou N, Richmond A. 1999. Effect of light path length in outdoor flat plate reactors on output rate of cell mass and of EPA in *Nannochloropsis* sp. J Biotechnology **12**(3): 351~355

OPTIMIZED CULTURE MODE AND ITS APPLICATION FOR  
DENSE CULTURE OF NANNOCHLOROPSIS SALINA  
IN DIFFERENT PHOTOBIOREACTORS

LU Jianguo ZHANG Jingpu YIN Mingyan MENG Zhaoai

( Institute of Oceanology Chinese Academy of Sciences Qingdao 266071 )

ABSTRACT

The impacts of different factors ( including light temperature nitrogen phosphorous iron carbon zinc boron cobalt copper molybdenum manganese etc ) on cell growth of Nannochloropsis salina the sole marine genus of the Eustigmaphyceae were carried out in Qingdao and Singapore with nature seawater. Based on the results obtained a optimum model good for culturing this unicellular alga was suggested as follows: 120mg/L urea, 6mg/L  $KH_2PO_4$ , 1.5 mg/L Ferric citrate, 0.05 mg/L  $ZnSO_4$ , 0.01 mg/L  $CuSO_4$ , 0.1 mg/L  $NaMoO_4$ , 0.02 mg/L  $CoCl_2$ , 0.5 mg/L HBCl, 1.0 mg/L  $MnSO_4$ , 25%~30% NaCl continuous illumination indoor or suitable strong light intensity as well as a constant temperature between 25 ~ 30°C, or varied temperature between 25 ~ 35°C, specific growth rate at 10% ~ 15%.

3.  $6 \times 10^{12}$  to  $1.2 \times 10^{11}$  cells /L of dense culture of Nannochloropsis salina were achieved by using 10 L of tubular coiled Photobioreactor, 60 L, 200 L, 500 L and 1600 L of flat glass photoreactors, respectively, which was several hundred fold higher than the cell density of traditional microalgal culture in aquaculture. Specific growth rate negative correlation with cell density affected the biomass output in Nannochloropsis salina culture system. 10%~15% of specific growth rate was suggested in application for maximal production.