

# 淡水硅藻的大量培养

湖北省水生生物研究所藻类研究室藻类应用组

## 提 要

淡水硅藻是水生动物的营养丰富的食料。经过一年的筛选培养，我们获得了四种适于大量培养的种类，即：泉生偏缝硅藻 (*Nitzschia fonticola* Grun.)，樁状偏缝硅藻 (*Nitzschia palea* Smith.)，双尖菱板硅藻 (*Hantzschia amphioxys* Grun.) 和梅尼小环硅藻 (*Cyclotella meneghiniana* Kütz.)。我们选择泉生偏缝硅藻进行较为系统的培养试验，对其营养成分进行了分析，并对其所含的 15 种氨基酸进行了定量。同时配制了两个新的适于硅藻生长繁殖的培养基“水生硅 1”和“水生硅 2”。泉生偏缝硅藻最适生长温度为 20—30℃，光强为 2,000—5,000 米烛光。观察了泉生偏缝硅藻在中型培养和大量培养中氮、磷、硅的吸收消耗规律，发现在培养条件下，硅是主要限制因子。在中型培养中，连续培养 15 天，适时补充营养元素，硅藻细胞数可高达  $23 \times 10^6$  个/毫升，产量为 2.7 克干藻/升。在 30 升大量培养中获得每两天收获一次，每次收获 1/6 (相当于硅藻干重 7 克) 的连续生产性培养的结果。根据实验结果推算，若两天半收获一次，每次收获 1/6，可获得持续稳定高产。

淡水硅藻是鱼、虾、蟹、蚌特别是其幼体的良好食料。它广泛分布在池塘、湖泊、水库及河流中。硅藻中的大多数种类在温度 20—30℃ 时生长较佳。在春秋两季往往可观察到硅藻的大量繁殖。

国内外有关硅藻的分类、生理生态方面的工作报道较多，但有关硅藻大量培养研究的报道较少，淡水硅藻大量培养的更少<sup>[7,10,12]</sup>。

近年来由于淡水水产养殖事业中人工繁殖工作的开展，迫切要求解决蟹、虾、蚌幼体的食料问题；同时在血防试验上也要解决钉螺的食料问题。根据生产上的需要，我们在 1973 年开展了硅藻藻种的筛选和大量培养方法的研究。

## 一、藻种的筛选

为了选择适宜于大量培养的种类，我们在采集时注意选择在自然条件下常见的和大量繁殖的硅藻种类进行分离培养。分离方法是采用微吸管法。将野外采集到的标本放在培养皿中或载玻片上，在显微镜下用微吸管将硅藻个体吸出，在蒸馏水滴中洗涤几次后，再接种在盛有修订的朱 10 培养基的培养皿中，每皿中接 20—30 个硅藻个体。待生长旺盛后再移植，逐步扩大到 100—2,500 毫升的锥形瓶中培养，并以此作为大量培养的种源。一般培养的温度为 20—30℃ 左右，光强 2,000—5,000 米烛光。从分离出的少量细胞扩大培养到 200 毫升的培养量，一般需要 20 天以上。为了较长时期保存藻种，我们将分离培

养出来的硅藻用青霉素(1,000—5,000单位)或链霉素(20 ppm)处理后,获得较纯的硅藻藻种,在具有加倍的营养物质的琼脂斜面上保存。

经过近一年的筛选培养,我们获得了四种宜于大量培养的种类,即:泉生偏缝硅藻(*Nitzschia fonticola* Grun.),椿状偏缝硅藻(*Nitzschia palea* Smith.),双尖菱板硅藻(*Hantzschia amphioxys* Grun.)和梅尼小环硅藻(*Cyclotella meneghiniana* Kütz.)。我们选择泉生偏缝硅藻进行较为系统的培养试验,并对其营养成分进行了分析。

## 二、培养基的筛选

为了配制更适于硅藻生长繁殖的培养基,我们进行了硅藻培养基的筛选试验。文献中记载,培养淡水硅藻一般采用朱10(1942),Fogg(1956),Jorgensen(1956)或Lewin(1955)等培养基。我们在中等光强(约4,500米烛光)、18(暗期)—29°C(光照期)、每天光照12小时和摇床振荡的条件下,以泉生偏缝硅藻为材料,多次进行平行比较试验。上述四种培养基的培养效果均不十分理想,其中最好的是Fogg培养基。因此我们又进行了新的培养基筛选试验,以Fogg培养基为对照进行多次对比试验,得到“水生硅1”和“水生硅2”两个新的培养基配方,其组成见表1。这两个硅藻培养基,在培养偏缝硅藻的效果

上,无论是以细胞数或光密度为指标,都超过了Fogg培养基,其中又以“水生硅1”最为显著(图1,图2)。“水生硅2”是用化肥尿素与过磷酸钙为氮、磷来源,适于在大量培养硅藻时采用。

至于光强和温度对偏缝硅藻生长的影响,我们只进行了初步观察,光强为2,000—5,000米烛光时生长较为适宜。如果光强提高到8,000米烛光时生长速度略有提高,但不很显著;当光强低于2,000米烛光时,在细胞浓度低的情况下,硅藻也可以正常繁殖。当细胞浓度过低(光密度 $OD_{420nm} = 0.25 \times 10^{-1}$ )时,硅藻往往不能

忍受高强度的光照。在一万米烛光以上的光强下,即引起培养物整个变白而停止生长。这一点是在作分离培养工作中应予以注意的。

根据初步观察,我们所分离的四种硅藻藻种适应温度的范围较广,在15—35°C之间均可生长,但以20—30°C较为适宜。

温度和光照对硅藻生长的影响,还需要在控制的条件下作进一步探索。

## 三、中型培养试验

### (一) 培养方法

为使硅藻大量繁殖获得较高的产量,我们分析了小型试验的结果,初步认为首先必须有合适的培养装置,为硅藻大量繁殖创造条件;其次在培养中应随着细胞的增长和营养元

表1 “水生硅1”和“水生硅2”培养基配方  
(毫克/升)

“水生硅1”	“水生硅2”
硝酸氮	120
硫酸镁	70
磷酸氢二钾	40
磷酸二氢钾	80
氯化钙	20
氯化钠	10
硅酸钠	100
柠檬酸铁	5
土壤浸出液	20毫升
硫酸锰	2
水	1,000毫升
pH 7.0	
	尿素
	过磷酸钙
	硫酸镁
	氯化钾
	硅酸钠
	碳酸氢钠
	硫酸锰
	EDTA-铁
	土壤浸出液
	水
	150
	50
	50
	30
	100
	100
	3
	1毫升
	4毫升
	1,000毫升

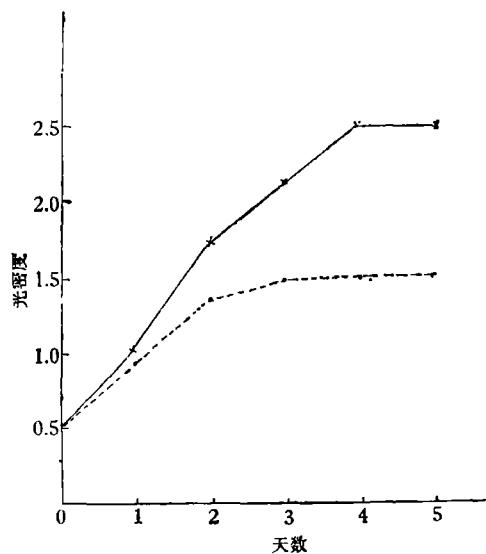


图 1 泉生偏缝硅藻在不同的培养基中生长速度的比较

×—×—“水生硅 1”培养基；  
·—·—·— Fogg 培养基。

素的消耗,适时地补充营养元素。

我们采用容积为 3.6 升的内光照培养装置 (水生 8 号装置) (图 3), 进行深层培养。光源用五只 8 瓦日光灯, 平均光强为 2,000 米烛光, 采用 12:12 (光:暗) 小时的光照。通过调节冷却水的流速来控制水温, 使培养温度维持在 25—28℃。连续通入含 3—5% CO<sub>2</sub> 的空气。采用的培养基为 Fogg 培养基, 用冷开水配制。培养起始浓度为 OD<sub>420nm</sub> = 2.25。

## (二) 硅藻增长和培养基中主要元素的变动

为了探索硅藻的细胞增长与培养基中主要营养元素消耗之间的关系, 我们定时测定培养中的硅藻细胞数和干物重与氮、磷、硅含量的变化。细胞数以普通血球计数器计算。干物重的计算是以光电比色计在波长 420 nm 处测得培养物的光密度值, 与直接将该培养物在 105℃ 烘干至恒重的重量进行对比, 求得其相关数值, 然后在一般测定中以光密度值推算每升中的硅藻干重。根据多次实验的结果, 我们所培养的硅藻干重与光密度值有如下的经验比值关系:

硅藻干重 (克/升) = 0.069 × 光密度 (OD<sub>420nm</sub>), 因此一般情况下只需测光密度就可获得相应的干重值。

氮、磷、硅的分析均采用比色法, 以酚磺酸法测硝态氮, 铬蓝法测磷, 铬黄法测硅。

## (三) 实验结果

我们先后进行了 6 次试验。结果表明, 培养一天后硅藻显著增长, 第二天生长仍良

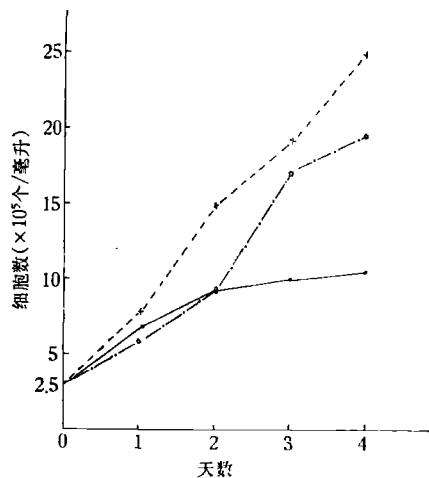


图 2 泉生偏缝硅藻在不同的培养基中细胞数增长的比较

—x—x—“水生硅 1”培养基；  
··o··o··“水生硅 2”培养基；  
—— Fogg 培养基。

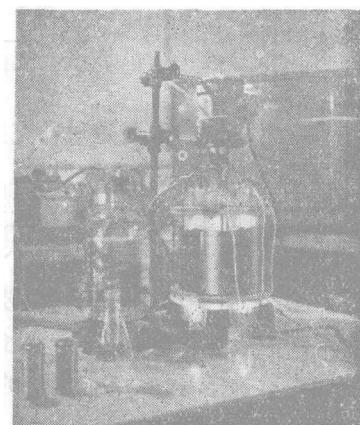


图 3 中型培养装置(水生 8 号装置)

好,至第三天生长速度大大下降,甚至趋于停止。主要营养元素,特别是氮和硅的含量,随硅藻的增长而降低。其中硅含量在培养一天后即大幅度下降,消耗达70%;但培养两天后硅的含量趋于稳定,甚至略有回升。磷的含量虽随培养时间的延长逐步降低,但变化幅度不大(图4)。

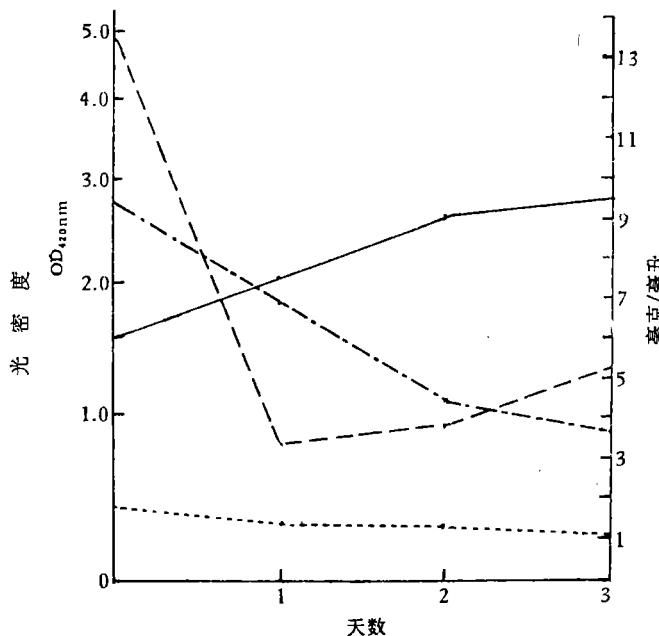


图4 中型培养中硅藻生长和营养元素的变化

———硅藻生长；———氮的消长；  
-----硅的消长；·········磷的消长。

为此,我们采用适时补充主要营养元素——氮、磷、硅的办法,试图使硅藻能持续增长,从而达到较高产量的目的。以培养液中硅的含量下降到最低量时作为指标,补充氮、磷、硅。通过适时补充营养元素,在连续15天的培养中,硅藻的细胞数由接种时 $14 \times 10^5$ 个/毫升增加至 $23 \times 10^6$ 个/毫升,光密度由2.25增至40,即产量为 $40 \times 0.069 = 2.76$ 克干藻/升。硅藻的增长与主要营养元素氮、硅的消长情况见图5和图6。

由此可见,培养前4天生长缓慢,主要是营养元素的限制,自第四天开始,以培养基中硅的含量为指标,按细胞增长的比例补充氮和硅,共补充3次,硅藻生长持续呈指数上升。

## 四、大量培养试验

### (一) 培养方法

采用容量为38升的长方形玻璃缸(40×20×48厘米)进行深层培养,两侧排列20瓦日光灯各4支,表面光强约4,000米烛光,连续光照,搅拌马达功率为0.125千瓦,转速为2,790转/分,连续搅拌(图7)。

培养基采用“水生硅1”,以冷开水配制,容量为30升。藻种采用中型试验培养的泉生偏缝硅藻,接种浓度为 $OD_{420nm} = 3.9$ 。通气、生长测定及元素分析均同中型试验。

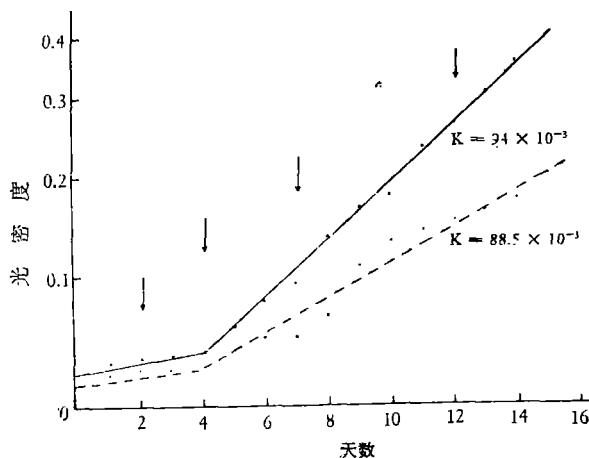


图 5 中型培养中硅藻持续生长的情况

箭头所示为补加营养元素的时间；  
 ——光密度  $[\text{OD}_{420\text{nm}} (\times 10^2)]$ ；  
 - - -细胞数 ( $\times 10^6/\text{毫升}$ )。

营养元素的补充基本上按中型试验，一般是 2—3 天补充一次，补充量根据细胞增长情况而定。由于原培养液中磷是过量的，因此仅在第四天补充过一次。

## (二) 试验结果

按上述方法培养，接种后 10 天内，硅藻生长繁殖速度是指数上升，第十天达到高峰，此时浓度为 1.9 克干藻/升，继续培养一天，藻的浓度不再上升，培养液已呈暗褐色，透光率很低，光强已成为限制因素。因此从第十一天起开始收获，每隔两天 (48 小时) 收获一次。每次取出 1/6 的培养物 (5 升)，加入等量的新鲜培养基，经两天培养后，基本上可增长至接近收获时的浓度，持续培养到第二十天结束试验，共收获 5 次。由于收获时培养浓度为  $\text{OD}_{420\text{nm}} = 20$  左右，所以每次可生产约为 7 克的硅藻 (干重)，即日产量约为 3.5 克 (图 8)。

## 五、硅藻营养成份的分析

为了进一步了解硅藻的营养价值，我们将大量培养所得的硅藻进行了营养成份的分析。我们采用微量凯氏分析法测定硅藻蛋白质含量，用索氏脂肪抽提法测定油脂含量。同时用氨基酸自动分析仪 (柴田 AA 500 型) 测定了硅藻的氨基酸含量。测定结果，泉生偏缝硅藻油脂含量为干重的 6.3%；蛋白质含量占干重的 28.7—30.2%；测定氨基酸共 15 种 (表 2)。可见硅藻营养丰富是一种较好的食料。

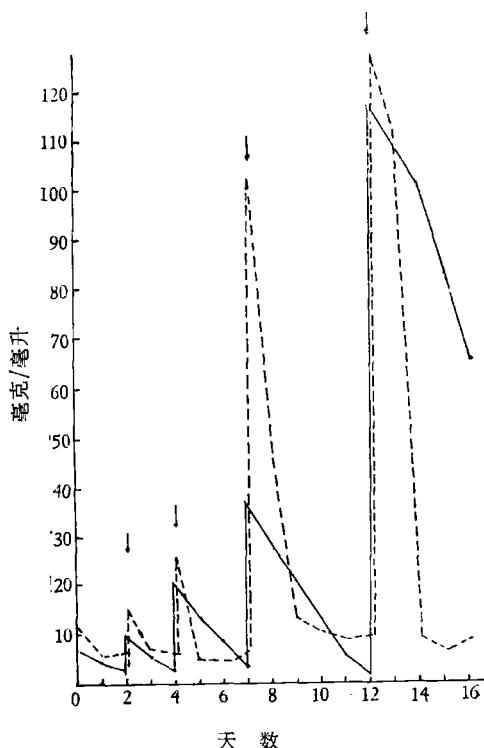


图 6 培养液中氮和硅的变动情况

箭头示补加营养元素时间；  
 ——氮； - - - 硅。

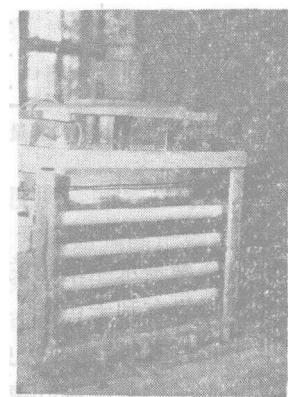


图 7 硅藻大量培养试验装置

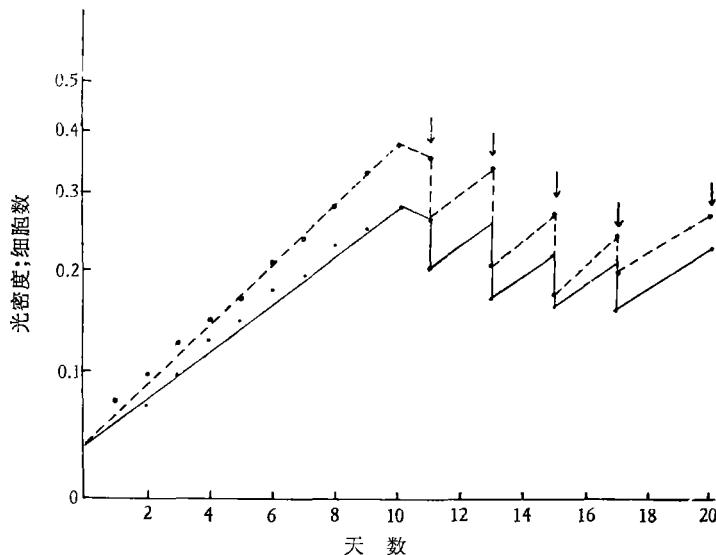


图 8 大量培养和生产试验中硅藻的生长情况  
箭头表示收获时间；——OD<sub>420nm</sub>(×100)；----细胞数(×5.88×10<sup>7</sup>)。

表 2 泉生偏缝硅藻的氨基酸组分

氨基酸名称	1 (毫克/100毫克蛋白)		氨基酸名称	1 (毫克/100毫克蛋白)	
	2 (微克/100毫克藻体)	2 (微克/100毫克藻体)		(毫克/100毫克蛋白)	(微克/100毫克藻体)
天门冬氨酸	16.1	1890	异亮氨酸	1.63	350
苏氨酸	3.5	401	亮氨酸	3.93	754
丝氨酸	3.24	451.5	酪氨酸	0.64	217.5
谷氨酸	11.98	1294	苯丙氨酸	0.64	437
脯氨酸	3.15	301	氨	4.7	214
甘氨酸	6.97	585	甲硫氨酸	—	156.5
丙氨酸	6.26	619	精氨酸	—	177.6
缬氨酸	1.67	249	组氨酸	—	24.6

说明：1. 大量培养，容量 30 升，培养基为“水生硅 1”。2. 中量培养，容量 3.5 升，培养基为 Fogg 培养基。

## 六、讨 论

硅藻是水生动物的一种天然良好的食料，它的营养价值较高，如能大量人工繁殖培养，则将有利于鱼类、甲壳类和软体动物幼体的人工饲养问题的解决。同时在血防工作上，为了彻底消灭血吸虫必须研究如何杀灭血吸虫寄主钉螺；而钉螺的主要食料为硅藻，因此人工培养硅藻问题的解决，也为研究钉螺生活史和杀灭方法提供了基本条件。

硅藻虽然在自然界大量存在，但是对它进行人工大量繁殖的研究还不多。从实验工作的结果看，人工培养硅藻的关键问题在于选择一个优良的藻种和合适的培养基及培养条件。我们选择的泉生偏缝硅藻和椿状偏缝硅藻等四种硅藻是常见的普生性种类，它们适应温度的范围比较广，生长迅速，因此较易于大量培养。我们采用的“水生硅 1”培养基不但适于一般培养，而更有利强化培养，即在短期内给予合适条件使硅藻达到较高的生物

量。“水生硅 2”培养基所选用的肥源多半为化肥,便于推广应用。

从培养试验结果看,硅和氮是限制泉生偏缝硅藻增长的主要因素,因此为了获得稳定性生产,必须适时加入硅和氮。硅是硅藻壳体组成的主要成分,一般硅质占硅藻干重的 4.3—21.6%<sup>[5,6,7]</sup>。天然水体中,往往由于可利用硅的限制而使硅藻繁殖受到限制<sup>[8,9,11]</sup>。从我们的实验结果来看:当硅藻生长持续上升时,培养基中硅的含量大幅度下降;当硅的消耗停止时,往往说明藻类生长也将停顿。如在此时补充硅质则能获得硅藻的持续增长。因此可以将培养液中硅消耗的停滞(或略为回升)之时作为补充营养元素的指标。

大量培养泉生偏缝硅藻的情况也同于中量培养,一般培养 10 天之内可增长 8—10 倍,但 10 天后增长停止,虽补充营养元素后仍不见回升。我们初步认为是由于藻类生长过浓而造成光强不足,因而限制藻类的生长;如改进装置,加强光照,可望继续增长。或者待硅藻增长达到高浓度时,及时收获藻类。收获量视藻类浓度而定,一般为培养量的 1/6—1/8;收获后加入等量的新鲜培养基,继续进行培养。如此循环往复将得到持续的生长。这样一方面可获得一定量的硅藻作为食料之用,另一方面也可避免由于光强不足而带来的不利影响。我们用硅藻数量增长对培养时间作半对数曲线,则

$$K = \frac{\lg OD_1 - \lg OD_0}{T}$$

式中:

$K$  = 生长速率,即曲线的斜率。

$OD_0$  = 收获后立即加入等量新鲜培养基时的光密度读数。

$OD_1$  = 收获前的光密度读数。

$T$  = 培养时间(天数)。

我们每两天收一次( $T = 2$ ),每次收获 5 升(1/6),共收获 4 次,每次硅藻增长  $K$  值很近似,平均  $K = 0.55 \times 10^{-1}$  (变动幅度在  $0.02 \times 10^{-1}$  之内)。但实验结果尚可看出硅藻的浓度有一个逐步下降的趋势。看来,假如要维持稳定的生长速度,应适当延长培养时间或减少收获量才能使硅藻浓度保持稳定。依据下列公式

$$T = \frac{\lg OD_1 - \lg OD_0}{K}$$

其中  $OD_1$  应保持和上一次收获时相等的数值,  $T$  为达到可收获浓度所需的培养时间。通过实验数据的推算得知,本试验应两天半收获一次(即  $T = 2.5$ ),才能达到高产稳产。

从图 7 还显示出硅藻增长中,光密度和细胞数之间的相应关系。前 10 天的培养中,光密度增长速度与细胞数增长比值为 0.89,其后的比值为 0.88。可见:(1)本培养中,细胞数的增长大于光密度的增加,显示出细胞的分裂速度相对地大于色素及内含物合成的速度。(2)收获并稀释后,光密度变化和细胞数变化基本上平行,显出细胞增长及其色素和其他内含物的含量变化基本上趋于稳定。

大量培养中曾出现过杂藻污染问题,主要是浮游的蓝纤维藻及部分栅藻和小球藻。我们利用藻类比重、悬浮习性不同来排除杂藻。发现杂藻时,停止搅拌数小时,使硅藻下沉,蓝纤维藻等悬浮在水中。然后将上清液倾弃,再将沉淀硅藻用蒸馏水反复清洗几次后,加入新鲜培养基,即可获得纯化。一般杂藻去除率可达 90% 以上,而硅藻流失约 10%

左右。说明这一方法还是切实可行的。

此外, 从营养角度看, 硅藻的蛋白质和脂肪含量丰富。一般蛋白质含量为 9.6—37.4%<sup>[1,7]</sup>, 我们测定的泉生偏缝硅藻蛋白质含量为 28—30%。关于硅藻的氨基酸组成方面过去报道不多, 而且多半为定性资料<sup>[9]</sup>。据 Fowden 报道薄壳舟形硅藻 (*Navicula pelliculosa*) 含有 18 种氨基酸, 和其他藻类氨基酸组成很相近<sup>[3]</sup>。我们分析泉生偏缝硅藻共测出 15 种氨基酸, 其中以天门冬氨酸、谷氨酸和精氨酸含量较高, 但其组分比例因培养条件改变而有差异(表 2)。脂肪含量因培养条件, 特别是氮含量的不同而有较大的变化。一般培养时间较长, 培养基中氮含量降低时, 其细胞中贮藏的油脂相对地增加<sup>[2,4]</sup>。我们采用适时补充氮素等的含量的办法促使硅藻持续增长, 因此其脂肪含量是偏低的。依现有资料, 硅藻脂肪含量为无灰分干重的 4.2—44.1%<sup>[7]</sup>。因此硅藻不仅从营养角度来说质量很高, 而且还可通过培养条件的控制, 取得其营养成分更适合于我们所需要的水产养殖好食料。

## 七、结语

1. 硅藻大量培养的关键在于选择优良的藻种和合适的培养基及培养条件。我们选择了 4 种硅藻, 并将其中的泉生偏缝硅藻进行了大量培养。同时也配制了适于硅藻生长的新的培养基“水生硅 1”和“水生硅 2”。
2. 氮和硅是限制泉生偏缝硅藻生长的因素, 为了获得稳定性生产, 必须适时加入氮和硅, 其中硅更为重要。
3. 适于泉生偏缝硅藻生长的温度为 20—30°C; 光强为 2,000—5,000 米烛光。
4. 对泉生偏缝硅藻进行了营养成分的分析。脂肪含量为 6.3%, 蛋白质含量为 28—30%, 并对其中 15 种氨基酸进行了定量分析。
5. 在温度 30°C, 光强 2,000 米烛光条件下, 3.5 升中型培养中, 藻类细胞数可高达  $23 \times 10^6$  个/毫升, 光密度为 40, 相当于干重 2.76 克/升。大量培养试验中, 在光强 4,500 米烛光, 温度 30°C, 细胞数高达  $14 \times 10^6$ , 最高光密度 20; 此时开始每两天收获一次, 每次收总容量的 1/6, 可获得干藻 7 克, 即平均日产量 3.5 克; 但硅藻浓度有一个逐步下降的趋势。
6. 根据实验结果推算, 在硅藻达到高浓度后, 每隔两天半收获一次, 每次收 1/6, 估计将获得持续的稳定性生产。

## 参 考 资 料

- [1] Collyer, D. M. and G. E. Fogg, 1955. Studies on fat accumulation by algae. *J. Exptl. Bot.*, 6: 256—275.
- [2] Fogg, G. E., 1956. Photosynthesis and formation of fats in a diatom. *Ann. Bot.*, (London), 20: 265—285.
- [3] Fowden, L., 1954. A comparison of the compositions of some algal proteins. *Ann. Bot.*, 18: 257—266.
- [4] Harder, R. und H. Witsch, 1942. Über Massenkultur von Diatomeen. *Ber. deut. bot. Ges.*, 60: 146—152.
- [5] Lewin, J. C., 1957. Silicon metabolism in diatoms. IV. Growth and frustule formation in *Navicula pelliculosa*. *Can. J. Microbiol.*, 3: 427—433.

- [ 6 ] Lewin, J. C., 1962. Silicification. *in* Physiology and Biochemistry of Algae (ed. R. A. Lewin), pp. 445—453. Acad. Press, London.
- [ 7 ] Lewin, J. C., 1963. Diatoms. *Ann. Rev. Microbiol.* 17: 373—414.
- [ 8 ] Lund, J. W. G., 1949. Studies on *Asterionella* I. The origin and nature of the cells producing seasonal maxima. *J. Ecol.*, 38: 1—33.
- [ 9 ] Lund, J. W. G., 1950. Studies on *Asterionella* II. Nutrient depletion and the spring maximum. *J. Ecol.* 38: 1—33.
- [10] Patrick, R. 1966. The diatoms of the United States. Vol. I. Acad. of Nat. Sci. Philadelphia, U. S. A.
- [11] Pearsall, W. H., 1932. Phytoplankton in English lakes II. The composition of the Phytoplankton in relation to dissolved substances. *J. Ecol.*, 20: 241—262.
- [12] Witsch, H. von und R. Harder, 1953. Stoffproduktion durch Grunalgen und Diatomeen in Massenkultur. *in* Algal Culture from Laboratory to Pilot Plant (ed. G. S. Burlew), pp. 154—165. Carnegie Institution of Washington, U. S. A.

## MASS CULTURE OF FRESHWATER DIATOMS

Section of Applied Phycology, Laboratory of Phycology,  
Institute of Hydrobiology, Hupei Province

### Abstract

Being rich in nutrition, freshwater diatoms are favored food of many aquatic animals. In 1973, experiments were started to investigate the possibilities of culturing diatoms as a source of food for the larvae of crabs, shellfish and other aquatic animals. Through screening and cultivation for about a year, we have sorted out 4 species of freshwater diatoms suitable for mass culture from the environs of Wuhan, namely, *Nitzschia fonticola*, *N. palea*, *Hantzschia amphioxys*, and *Cyclotella meneghiniana*. *N. fonticola* has been chosen for a series of cultivation experiments. The lipid and protein contents, as well as 15 amino acids, are determined quantitatively. We have also prepared two new culture media, "HB-D 1" and "HB-D 2", which prove satisfactory for the propagation of diatoms.

The optimum temperature for the growth of *N. fonticola* is 20—30°C, optimum light intensity, 2,000—5,000 lux. We have observed the regularity of the absorption and consumption of nitrogen, phosphorus and silicon by *N. fonticola* in both the middle-scale experiment and the mass culture. Under our culturing conditions, it seems that silicon is the principal limiting factor. In the middle-scale experiments, when the nutritional elements were supplied in time throughout a period of 15 days, the cell count increased up to  $23 \times 10^6$ /ml, O. D. <sub>420 nm</sub> = 40, corresponding to a yield of 2.76 grams dry weight per litre. In the 30-litre mass culture experiment, harvested one-sixth the total amount of the culture every 2 days, a yield corresponding to 7 grams dry weight each time has been obtained consecutively. The culture removed was replaced by fresh medium. Judging from our experimental results, we presume that a steady high yield could be obtained should the culture be harvested every 2.5 days at the rate of 1/6 each time.