

研究简报

## 红球藻水生 748 株营养需求的研究\*

金传荫 宋立荣 刘永定 甘小妮

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

### THE NUTRIENT REQUIREMENT OF A GREEN ALGA *HAEMATOCOCCUS* SP. HB748

Jin Chuanyin, Song Lirong, Liu Yongding and Gan Xiaoni

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan, 430072)

关键词 红球藻、培养基、维生素 B<sub>12</sub>、水生 1 号培养基、醋酸钠

Key words *Haematococcus*, media, Vit. B<sub>12</sub>, medium HBNo.1, Sodium acetate

红球藻是一种单细胞绿藻, 一般认为在其生活史中不利的环境条件下, 积累红色的色素, 是一种含酮基的  $\beta$ -胡萝卜素, 称为虾青素, 占细胞干重的 0.7—2%<sup>[1]</sup>。人工养殖虹鳟一类水产时, 饲料中必须添加虾青素作为着色剂。红球藻每公斤藻粉可售 20—150 美元, 价值不菲<sup>[2—4]</sup>。然而, 目前只有一家公司, 即美国加州的 Microbio Resources, Inc. 在进行红球藻试生产。主要原因在于尚有一些技术难题尚待解决。其中之一就是培养基。这一公司使用的培养基已申请专利<sup>[5]</sup>。本工作的目的, 就是寻找适于大量培养红球藻水生 748 株的培养基。

#### 1、材料与方法

1.1 材料 红球藻水生 748 株(*Haematococcus* sp. HB 748)由中国科学院典型培养物保藏委员会淡水藻种库提供。原始来源不详。与野生红球藻相比, 具鞭毛的游动细胞个体较大, 长接近 20  $\mu\text{m}$ 。

1.2 培养条件 静置培养。150ml 三角瓶, 内装 100ml 培养基, 接种 1ml。三角瓶——侧光照, 由 40W 日光灯提供照明, 连续光照, 光合活性光强为  $60\mu\text{Es}^{-1}\text{m}^{-2}$ 。环境气温  $26 \pm 1.5^\circ\text{C}$ 。接种物预培养在 12 : 12 光暗周期照明条件下, 光强在  $40—60\mu\text{Es}^{-1}\text{m}^{-2}$  范围内。这样, 保证接种物有较长的对数生长期。

1.3 生物量测量 每一处理设 5—6 个重复。每三角瓶准确灌装 100ml 培养基, 接种 1ml。取样时间固定, 准确取样 10ml 进行测量。生物量测量以细胞计数为主, 以便结果与文献相对照。只是作者改用本研究所自制的“浮游植物计数框”, 计数框面积为  $4\text{cm}^2$ , 体积为 0.1ml, 在细胞数较少时, 计数结果比血球计数框准确; 细胞数目多时, 可稀释后计数。样品经罗戈氏液固定后计数。

测定培养物细胞悬液光吸收  $A_{674}$ , 作为生物量的参考指标。红球藻水生 748 株对数生长培养物, 置岛津 3000 型分光光度计扫描可见光谱光吸收曲线, 仅在 674nm 处存在一明显吸收峰, 这是活体内叶绿素的吸收峰。本试验条件下, 培养物细胞悬液的  $A_{674}$  值与细胞数、细胞内叶绿素含量高度相关。样品  $A_{674}$  值测量, 在上海第三分析仪器厂 752 紫外光栅分光光度计上进行。

\* 中国科学院“八五”重点项目。

1996 年 3 月 18 日收到。

**1.4 光合活性光强测量** 使用 LI-COR 公司 LI-1000Datalogger 配 LI-190SA 光量子传感器, 测定光合活性光强。每次试验前实测, 以消除日光灯管老化导致的误差。标记出  $60\mu\text{Es}^{-1}\text{m}^{-2}$  光强的位置分布曲线, 以确定三角瓶位置。作者选  $60\mu\text{Es}^{-1}\text{m}^{-2}$  光强, 原因是, 这一光强的位置容易标定, 而且在本实验中, 接近最适光强, 实验初稍高, 后期偏低。

**1.5 生长速度计算** 根据普通微生物学通用的公式计算。

$$\mu = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{t - t_0}$$

$\mu$ , 生长速率,  $N_t$ ,  $t$  时间的生物数量, 如细胞数,  $N_0$ , 起始生物量,  $t$  时间, 本实验以天(d)为单位。

## 2 结果与讨论

**2.1 三种不同培养基的比较** 前已述及, 不同的单位使用不同的培养基来培养同一种红球藻。例如: Borowitzka 等<sup>[6]</sup>使用 MCM, Boussiba 等<sup>[7]</sup>使用“修改过”的 BG-11, 美国 Microbio Resources, Inc. 在实验室阶段使用“修改过的”BBM, Lee Yuan-Kun 等<sup>[9]</sup>使用 A<sub>9</sub>, Kobayashi 等<sup>[8]</sup>使用一种类似细菌培养的培养基。于是为作比较, 作者选取了其中三种, MCM, BBM 及 BG-11, 研究红球藻水生 748 株的生长。(图 1)

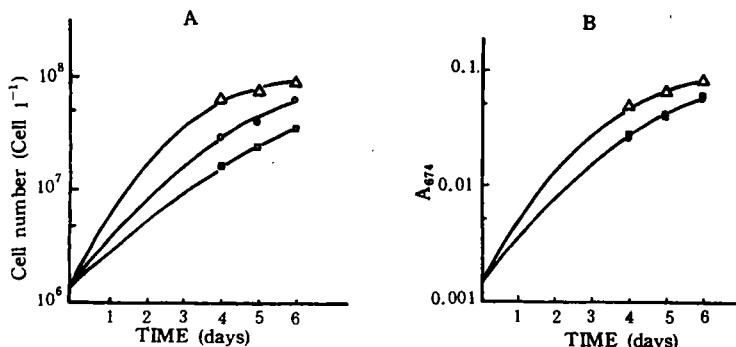


图 1 三种培养基的比较: MCM(△), BBM(○), BG-11(□)

Fig. 1 Comparison on growth of *Haematococcus* sp HB 748 in three media: MCM(△), BBM(○), BG-11(□)

细胞计数的结果简单而明确(图 1, A), MCM 能维持最高的生长速率, BBM 居中, BG-11 最差。对原始数据的统计分析表明, 三者差异非常显著。红球藻水生 748 株在 MCM 中前四天的平均生长速率为  $0.97\text{d}^{-1}$ , 在 BBM 中为  $0.77\text{d}^{-1}$ , 在 BG-11 中为  $0.63\text{d}^{-1}$ 。

$A_{674}$  测定结果同样表明(图 1, B), MCM 明显优于 BBM 和 BG-11。可以认为, 在培养不超过六天, 接种量不超过  $5 \times 10^6$  细胞  $\text{l}^{-1}$  情况下, 在三种培养基中 MCM 是最好的。

**2.2 红球藻水生 748 株对维生素 B<sub>12</sub> 的需求** 考虑到 MCM 中含维生素 B<sub>12</sub>, 而不少绿藻需要维生素 B<sub>1</sub>, 或 B<sub>12</sub>, 或生物素作为生长因子, 因此, 将维生素 B<sub>12</sub> 添加到 BBM 和 BG-11 中, 然后再来比较它们维持生长的状况。(图 2)

在 BBM 和 BG-11 中添加维生素 B<sub>12</sub>, 使生长明显加速, 从而与 MCM 的差异缩小, 以至完全消除了。从细胞计数结果看, (图 2, A)前六天三者的差异很小, 到第七天, 差异完全消除。从  $A_{674}$  测定结果看(图 2, B), 前四天三种培养基不存在差异。这一结果很明确地表明, 红球藻水生 748 株对维生素 B<sub>12</sub> 的需求。虽然不是缺了它绝对不生长, 至少是明显影响了生长速率。

**2.3 BG-11 培养基的修改及修改后的优势** 既然红球藻水生 748 株需要维生素 B<sub>12</sub>, 那么对 BG-11 的重要“修改”就应该是添加维生素 B<sub>12</sub>。

修改后的 BG-11 显示出优势。从图 2, B 的结果看得更清楚, 前四天三种培养基没有差异, 然而

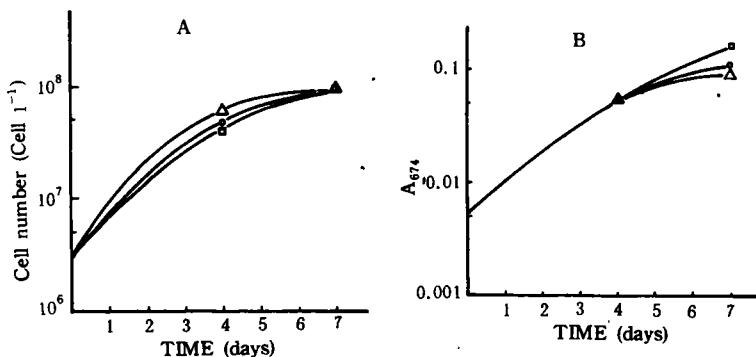
图 2 三种培养基的比较: MCM( $\triangle$ ), BBM+Vit.B<sub>12</sub>( $\circ$ ), BG-11( $\square$ )

Fig. 2 Comparison on growth of *Haematococcus* sp. HB 748 in three media: MCM( $\triangle$ ), BBM+Vit. B<sub>12</sub>( $\circ$ ), BG-11+Vit.B<sub>12</sub>( $\square$ )

从这以后,三种培养基又显出差异来,只是这次 MCM 排在了最差的位置,而修改的 BG-11 能维持最快的生长。细胞计数的结果略有不同,第四天时还是 MCM 最好, BG-11 最差。这是因为 MCM 培养基中细胞数的确比较多,然而小细胞占的比例稍大,细胞叶绿素含量稍低,这一情形并不反映在细胞计数中,而反应在细胞计数与  $A_{674}$  一定程度上的不一致。正是作者补充  $A_{674}$  测量的原因,它反应了一些细胞计数所不能反映的信息。即使是细胞计数,从第七天以后,也出现与  $A_{674}$  值第四天以后类似的变化,只是作者没画出罢了。认真分析 Borowitzka 论文<sup>[6]</sup>中的生长曲线,可见在 BBM 中红球藻从第四天以后,曲线斜率明显变平,已进入对数生长后期,第七天以后,基本进入平稳期。本结果与其结果是一致的。而修改后 BG-11,对数生长期较长,对数生长后期生长速度较高,因而培养物的浓度较高,生物量明显提高。

**2.4 水生 1 号培养基与维生素 B<sub>12</sub> 加富的 BG-11 的比较** 在进一步分析比较了这三种培养基的无机组份后,设计了一用于大量培养的新培养基水生 1 号。它与添加了维生素 B<sub>12</sub> 的 BG-11 相比前期生长相同,在对数生长后期能维持更高的生长速率,从而使培养物浓度提高获得更高的生物量,更适于红球藻大量培养。(图 3)

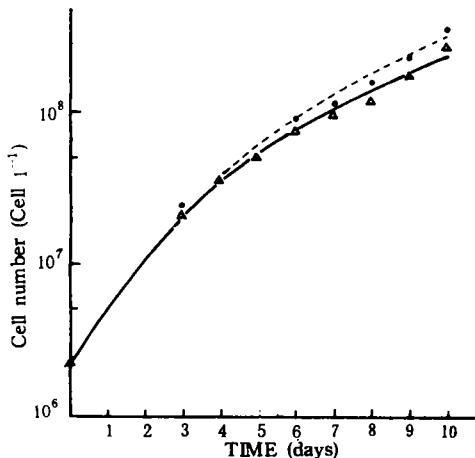
图 3 水生 1 号培养基( $\circ$ )与添加了 B<sub>12</sub> 的 BG-11( $\triangle$ )的比较

Fig. 3 Comparison on the growth of *Haematococcus* sp. HB 748 in medium HB 1( $\circ$ ) and BG-11 enriched with B<sub>12</sub>( $\triangle$ )

第四天前两种培养基不存在差异,第五天出现差异,但不显著,从第六天开始,出现统计学上显著的

差异。水生 1 号表现出明显的优势, 可使红球藻达到每升  $10^9$  个细胞,  $A_{674}$  值超过 1.0, 这是添加了维生素 B<sub>12</sub> 后 BG-11 也难以达到的。

**2.5 添加醋酸钠试验** 文献中广泛报告添加  $0.1\text{ g l}^{-1}$  乙酸钠可促进红球藻生长<sup>[6]</sup>。本试验表明, 添加  $0.025\text{ g l}^{-1}$ ,  $0.05\text{ g l}^{-1}$  及  $0.1\text{ g l}^{-1}$  醋酸钠, 有促进红球藻 HB 748 株生长的趋势, 与对照相比不存在统计学上显著的差异(表 1)。

表 1 醋酸钠对生长的作用

Tab. 1 The effect of acetate on the growth of *Haematococcus* sp. HB 748

醋酸钠 Sodium acetate ( $\text{g l}^{-1}$ )	细胞数 (Cell. $\text{l}^{-1} \times 10^6$ )				
	起始值 initial	2d	4d	7d	10d
0 (ck)	5.4	$36 \pm 3$	$105 \pm 6$	$336 \pm 46$	$903 \pm 82$
0.25	5.4	$37 \pm 3$	$114 \pm 4$	$377 \pm 34$	$1007 \pm 54$
0.05	5.4	$35 \pm 4$	$107 \pm 15$	$360 \pm 29$	$925 \pm 70$
0.1	5.4	$37 \pm 5$	$114 \pm 11$	$391 \pm 54$	$938 \pm 89$
	$A_{674}$				
	起始值 initial	2d	4d	7d	10d
0	0.007	$0.046 \pm 0.003$	$0.129 \pm 0.012$	$0.474 \pm 0.041$	$1.226 \pm 0.073$
0.025	0.007	$0.048 \pm 0.002$	$0.138 \pm 0.007$	$0.484 \pm 0.043$	$1.213 \pm 0.085$
0.05	0.007	$0.048 \pm 0.001$	$0.141 \pm 0.005$	$0.487 \pm 0.029$	$1.267 \pm 0.094$
0.1	0.007	$0.049 \pm 0.002$	$0.151 \pm 0.013$	$0.522 \pm 0.078$	$1.291 \pm 0.154$

## 参 考 文 献

- [1] Grung M D', Souza FML, Borowitzka M et al Algal carotenoids 51. Secondary carotenoids 2 *Haematococcus pluvialis* aplanospores as a source of (3S,3'S)-astaxanthin esters. *J. Appl. Phycol.* 1992 **4**: 165—171
- [2] Foss P, Storebakken T, Schiedt K, et al Carotenoids in diets for salmonids. 1. Pigmentation of rainbow trout with the individual optical isomers of astaxanthin in comparison with canthaxanthin *Aquaculture*, 1994 **41**: 213—226
- [3] Sommer TR, Potts WT & Morrissey NM Utilization of microalgal astaxanthin by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) *Aquaculture*, 1991 **94**: 79—88
- [4] Benemann JR Microalgae aquaculture feeds. *J. Appl. Phycol.* 1992 **4**: 233—245
- [5] Bubrick P Production of astaxanthin from *Haematococcus* *Bioresource Technology* 1991 **38**: 237—239
- [6] Borowitzka MA, Huisman JM, Osborn A Culture of the astaxanthin-producing green alga *Haematococcus Pluvialis*. *J. Appl. Phycol.* 1991 **3**: 295—304
- [7] Boussiba S, Vonshak A Astaxanthin accumulation in green alga *Haematococcus pluvialis* *Plant Cell Physiol.* 1991 **32** (7): 1077—1082
- [8] Kobayashi M, Kakizono T, & Nagai S Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga, *Haematococcus pluvialis* *Appl. Environ Microbiol.* Mar 1993 **59**: 867—873
- [9] Yong YYR & Lee Y-K Do carotenoids play a photoprotective role in the cytoplasm of *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta) *Phycologia* 1991 **30**: 257—261