

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 B₁₂、水生 1 号培养基、醋酸钠

Key words *Haematococcus*, media, Vit. B₁₂, 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 β -胡萝卜素,称为虾青素,占细胞干重的0.7—2%^[1]。人工养殖虹鳟一类水产时,饲料中必须添加虾青素作着色剂。红球藻每公斤藻粉可售20—150美元,价值不菲^[2-4]。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^[5]。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。与雨生红球藻相比,具鞭毛的游动细胞个体较大,长接近 20 μ 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 μ Es⁻¹m⁻²。环境气温 26 \pm 1.5 $^{\circ}$ C。接种物预培养在 12:12 光暗周期照明条件,光强在 40—60 μ Es⁻¹m⁻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 4cm²,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 A₆₇₄,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 A₆₇₄ 值与细胞数,细胞内叶绿素含量高度相关。样品 A₆₇₄ 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。

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

μ , 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雨生红球藻。例如: Borowitzka 等^[6]使用 MCM, Boussiba 等^[7]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^[9]使用 A_9 , Kobayashi 等^[8]使用一种类似细菌培养基的培养基。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)

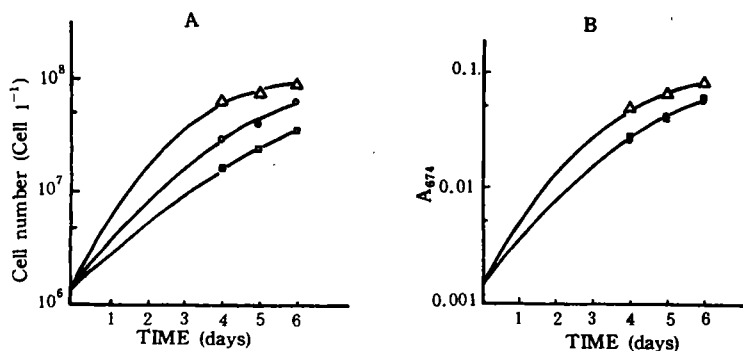


图 1 三种培养基的比较: MCM(Δ), BBM(\circ), BG-11(\square)

Fig. 1 Comparison on growth of *Haematococcus* sp HB 748 in three media: MCM(Δ), BBM(\circ), BG-11(\square)

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 0.97d^{-1} , 在 BBM 中为 0.77d^{-1} , 在 BG-11 中为 0.63d^{-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 5×10^6 细胞升 $^{-1}$ 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_{12} 的需求 考虑到 MCM 中含维生素 B_{12} , 而不少绿藻需要维生素 B_1 或 B_{12} , 或生物素作为生长因子, 因此, 将维生素 B_{12} 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_{12} , 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_{12} 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_{12} , 那么对 BG-11 的重要“修改”就应该是添加维生素 B_{12} 。

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

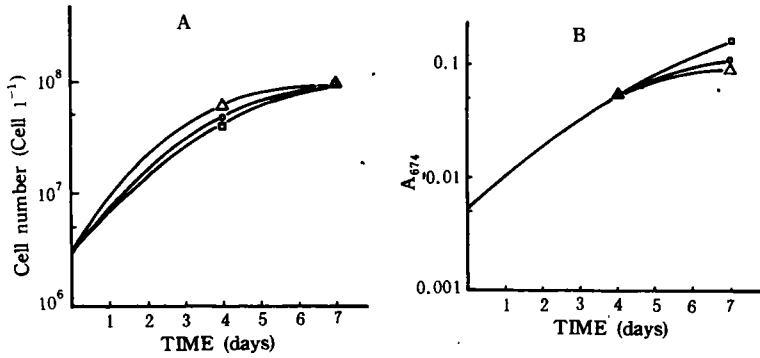


图 2 三种培养基的比较: MCM(Δ), BBM+Vit. B₁₂(○), BG-11(□)

Fig. 2 Comparison on growth of *Haematococcus* sp. HB 748 in three media: MCM(Δ), BBM+Vit. B₁₂(○), BG-11+Vit. B₁₂(□)

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 A₆₇₄ 一定程度上的不一致。正是作者补充 A₆₇₄ 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 A₆₇₄ 值第四天以后类似的差异,只是作者没画出来了。认真分析 Borowitzka 论文^[6]中的生长曲线,可见在 BBM 中雨生红球藻从第四天以后,曲线斜率明显变平,已进入对数生长期后期,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,对数生长期后期生长速度较高,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 B₁₂ 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 B₁₂ 的 BG-11 相比前期生长相同,在对数生长期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)

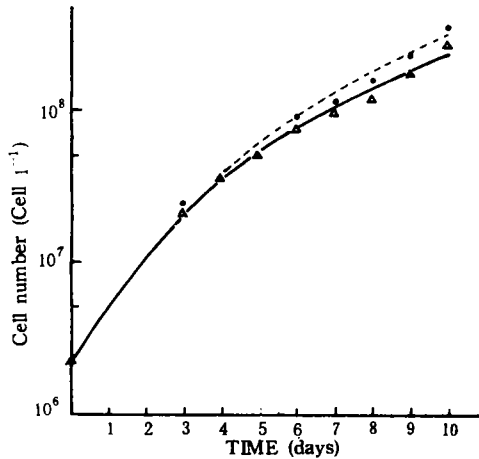


图 3 水生 1 号培养基(○)与添加了 B₁₂ 的 BG-11(Δ)的比较

Fig. 3 Comparison on the growth of *Haematococcus* sp. HB 748 in medium HB 1(○) and BG-11 enriched with B₁₂(Δ)

第四天前二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_{12} 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 0.1g l^{-1} 乙酸钠可保进红球藻生长^[6]。本试验表明,添加 0.025g l^{-1} 、 0.05g l^{-1} 及 0.1g 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 (g l^{-1})	细胞数 Cell number	(Cell. $\cdot\text{l}^{-1} \times 10^6$)			
	起始值 initial	2d	4d	7d	10d
0 (ck)	5.4	36 ± 3	105 ± 6	336 ± 46	903 ± 82
0.25	5.4	37 ± 3	114 ± 4	377 ± 34	1007 ± 54
0.05	5.4	35 ± 4	107 ± 15	360 ± 29	925 ± 70
0.1	5.4	37 ± 5	114 ± 11	391 ± 54	938 ± 89
A_{674}					
	起始值 initial	2d	4d	7d	10d
0	0.007	0.046 ± 0.003	0.129 ± 0.012	0.474 ± 0.041	1.226 ± 0.073
0.025	0.007	0.048 ± 0.002	0.138 ± 0.007	0.484 ± 0.043	1.213 ± 0.085
0.05	0.007	0.048 ± 0.001	0.141 ± 0.005	0.487 ± 0.029	1.267 ± 0.094
0.1	0.007	0.049 ± 0.002	0.151 ± 0.013	0.522 ± 0.078	1.291 ± 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 & Morrissy 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 carctenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga, *Haematococcus pluvialis* *Appl. Environ Microbiol.* Mar 1993 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