

文章编号:1674-7054(2010)03-0220-04

不同生态因子对直链藻生长的影响

王 珺,邢诒炫,陈国华,刘志媛,李洪武,王爱雯

(海南大学 海洋学院,海南省热带水生生物技术重点实验室,海南 海口 570228)

摘 要: 在实验室模拟条件下,研究了温度、光照、盐度和 pH 值对直链藻生长的影响。结果表明:直链藻生长的适宜温度为 10~30℃,最适温度为 25℃;适宜光照为 500~9 000 lx,最适光照为 3 000~7 000 lx;适宜盐度 5~85,最适盐度为 20;适宜 pH 值为 4~10,最适 pH 值为 8.5。

关键词: 直链藻;温度;光强;盐度;pH

中图分类号: Q 949.27 **文献标志码:** A

直链藻 (*Melosira sp.*) 是一种褐色的微小硅藻,属硅藻门、中心纲、圆筛藻目、圆筛藻科、直链藻属。该硅藻取自海南省文昌市翁田镇海区,经分离纯化得到的微藻,其藻体为单细胞,呈圆柱形,细胞大小通常为长 9.8~21.6 μm,宽 8.1~11.4 μm,常以壳面上的粘液或齿连成链状,每个细胞的侧面观为矩形,壳面观为圆形,无壳环,显微摄像见图 1。水温超过 18℃时,直链藻藻体以单细胞形式生存^[1],是水产养殖中的一种重要的饵料生物^[1-2]。目前,在水产动物人工育苗上,直链藻已经得到很好的应用,吴学军等研究了 6 株海洋微藻强化的酵母轮虫对中华绒螯蟹溞状幼体的影响,结果表明:经过直链藻强化的轮虫投喂的中华绒螯蟹溞状幼体的成活率及变态时间均优于其他海洋微藻强化的褶皱臂尾轮虫^[2];王庆等研究了直链藻强化的轮虫对中华绒螯蟹溞状幼体Ⅱ期与Ⅲ期生长及脂肪酸组成的影响^[3];吴学军等研究了直链藻密度对中华绒螯蟹溞状幼体 Z1 到 Z2 的影响^[4];在水产养殖的饵料生产上,人工培养直链藻的技术也受到广泛重视,唐兴本等研究了海水育苗优质饵料—直链藻的培养技术^[1], Toledo 等研究了腐殖酸对意大利直链藻的生长和忍受力的影响^[5], Nobutada 等研究了自然条件下意大利直链藻的同步生长^[6]。到目前为止,国内、外尚未见研究直链藻生态条件的报道。该直链藻为新分离藻种,笔者研究了影响直链藻生长的主要生态因子,以期今后培养该藻提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料 试验用的直链藻由海南大学海洋学院水产系藻种室提供,2009 年取自文昌市翁田镇海区水样分离培养。试验前将直链藻接种到 1 000 mL 三角烧瓶中进行活化纯培养,不充气,每天摇动 3~5 次,取指数生长期的藻液进行试验。

1.2 方法

1.2.1 藻体培养条件 培养用的海水取自海口白沙门海区,经黑暗沉淀,再经脱脂棉过滤、煮沸、自然冷却后使用。海水 pH 7.96,盐度 31。试验用培养瓶选用 250 mL 同型号的三角瓶,经洗液洗涤、晾干,130℃恒温消毒 2 h。除温度试验外,其余试验组温度控制在 24~26℃,光照强度 3 000~3 500 lx,光周期 $L_h:D_h=10:14$,培养时间为 4~5 d。实验期间每天摇瓶 4 次,并随机交换位置,以减少光照度差异。

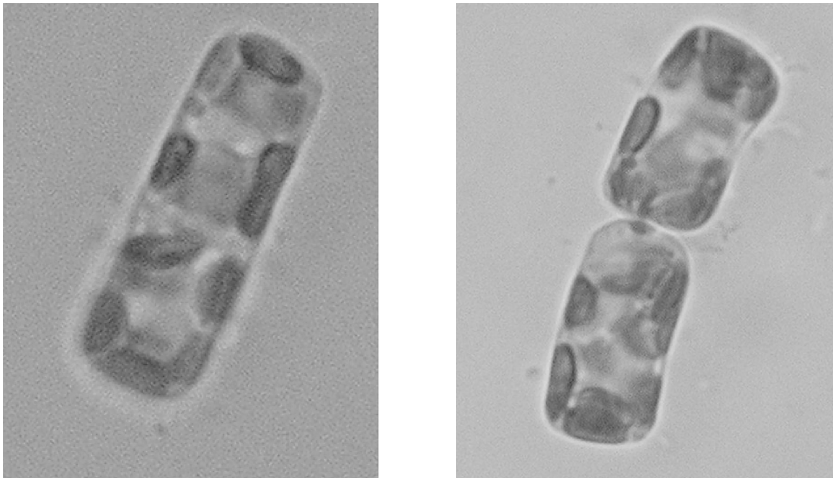
1.2.2 试验设计 温度试验设置的梯度为 5,10,15,20,25,30,35℃。用光照恒温培养箱控温培养;光照强度试验设置的梯度为 500,1 000,2 000,3 000,4 000,5 000,6 000,7 000,8 000,9 000 lx,培养架置于

收稿日期: 2010-07-03
基金项目: 海南省教育厅高校科研资助项目(Hjkj2009-23); 国家科技支撑计划项目(2007BAD29B01, 2007BAD29B02); 海南大学科研资助项目(hd09xm56)
作者简介: 王珺(1972-),女,海南文昌人,海南大学海洋学院高级实验师。

暗室中,通过调整试验瓶与光源距离以达到所需要的光照强度;盐度试验设置梯度为 5,10,15,20,25,30,40,50,60,70,80,85,盐度低于 30 的各组用自然海水加入去离子水的办法调配,盐度高于 30 的各组用自然海水加入 NaCl 的办法调配;pH 试验设置梯度为 4,5,6,7,7.5,8,8.5,9,10,用自然海水加入 HCl 或 NaOH 的办法调配。

1.2.3 藻细胞计数 用 722S 可见分光光度计测定吸光度,同时用 XB-K-25 血球计数板计数。计数用的藻液以少许福尔马林固定,1 d 内计数完成,每瓶重复 2 次,取平均值,确定吸光值与藻细胞密度的关系。测定藻液的吸光值,可根据吸光值与藻细胞密度的关系换算成藻细胞密度。

1.2.4 藻细胞的分裂频率 藻细胞分裂频率(K)用下列公式计算: $K = (\ln N_t - \ln N_0) / T$,式中: N_0 为起始藻细胞浓度 (cells/mL); N_t 为经过 T 时间培养的藻细胞浓度 (cells/mL); T 为培养时间(d)。



(a) 单细胞 (b) 多细胞

图1 直链藻环面观显微摄像照片

2 结果与分析

2.1 生长曲线 选用“宁波大学 3 号”培养液配方,加入 $5\text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$ 硅酸钠培养直链藻,接种质量浓度为 1.866×10^4 cells/mL,在光照 2 000 lx、温度 25 ℃ 的条件下培养,设置 2 个平行组,每天定时计数,取平均值,结果见表 1,并用细胞浓度的对数和时间制作图 2。

表1 直链藻的生长曲线测定

培养天数/d	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
细胞数目的对数	—	1.51	2.02	2.24	2.35	2.51	2.70	2.86	2.95	3.08
K 值	—	0.48	0.50	0.40	0.33	0.30	0.28	0.26	0.24	0.23

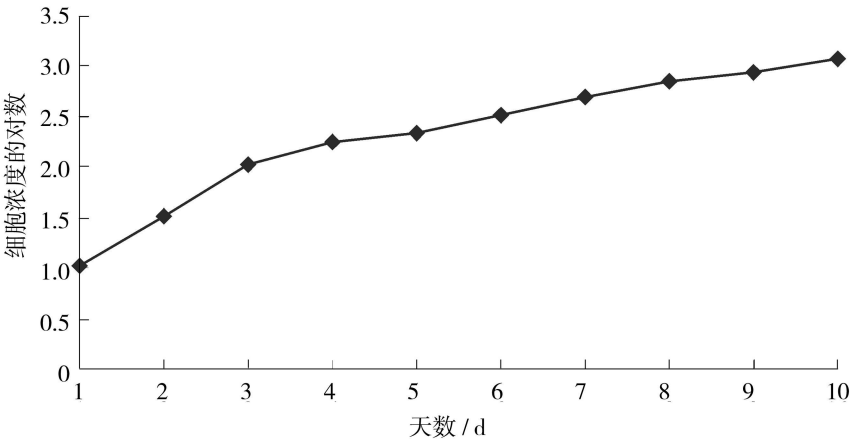


图2 直链藻的生长曲线

2.2 温度 利用 SPSS12.0 软件对温度进行单因素方差分析,温度对直链藻生长的影响极显著($P < 0.01$),试验结果见图 3。从图 3 可知,直链藻在 10~30 ℃ 下均能生长,最适生长温度为 25 ℃。

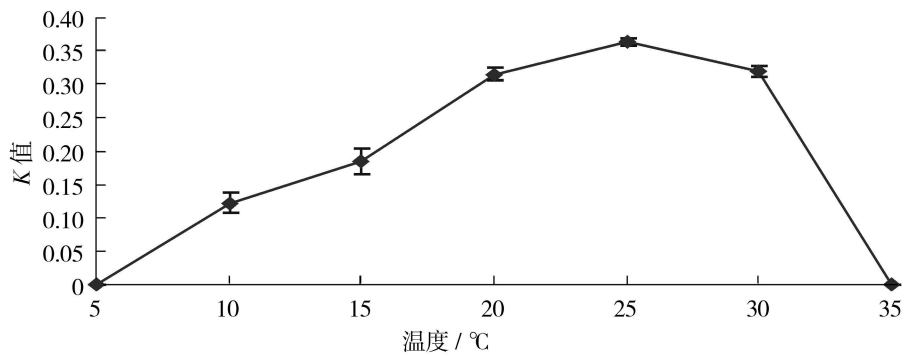


图 3 温度对直链藻生长的影响

2.3 光照 利用 SPSS12.0 软件对光照进行单因素方差分析,光照强度对直链藻生长的影响极显著 ($P < 0.01$),试验结果见图 4。从试验结果可知,直链藻在 500 ~ 9 000 lx 光照强度下均能生长,光强在 3 000 ~ 7 000 lx 的范围内, K 值均较高,藻液颜色鲜艳,为最适光照强度;同时在该范围内,随着光强的增加,其 K 值变化极小。可见,3 000 lx 的光照强度已能满足直链藻的生长。

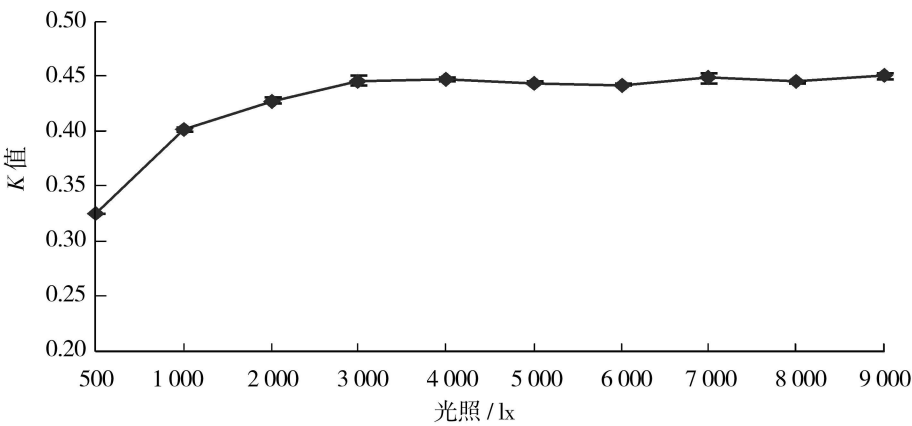


图 4 光照对直链藻生长的影响

2.4 盐度 利用 SPSS12.0 软件对盐度进行单因素方差分析,盐度对直链藻生长的影响极显著 ($P < 0.01$),试验结果见图 5。从图 5 可知,直链藻在 5 ~ 85 盐度下均能生长,最适生长的盐度为 20。

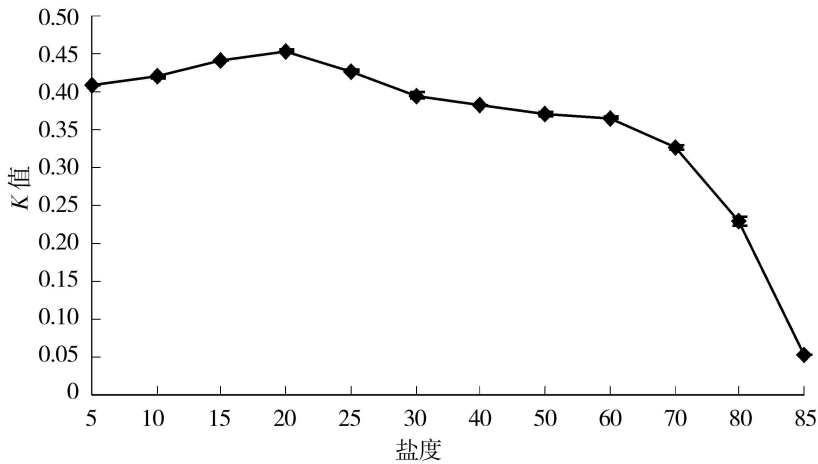


图 5 盐度对直链藻生长的影响

2.5 pH 值 利用 SPSS12.0 软件对 pH 值进行单因素方差分析,pH 值对直链藻生长的影响极显著 ($P < 0.01$),试验结果见图 6。从图 6 可知,直链藻在 4 ~ 10 pH 值条件下均能生长,最适生长的 pH 值为 8.5。

3 讨 论

直链藻生长的延缓期时间较短,第2天就出现了指数生长期,接种后第3天 K 值达最大(见表1),因此,可以利用这个特性,在生产上采用每天或隔天追培的方式培养直链藻。

直链藻在 10 ~ 30 ℃ 范围内均能生长,最适生长温度为 25 ℃ (见图3)。温度在 5 ~ 25 ℃ 范围内,随着温度的增加细胞分裂频率(K 值)呈直线上升,而在 25 ~ 30 ℃ 范围内,随着温度的增加,该藻的 K 值越来越小。

而四片藻生长繁殖的适宜温度为 5 ~ 30 ℃ ,最适温度为 20 ℃^[7]。可见,直链藻比四片藻更能适应高温。

直链藻在 500 ~ 9 000 lx 光强度下均能生长(见图4),是一种适应光照范围广的藻类。光强在 3 000 ~ 7 000 lx 的范围内, K 值均较高,藻液颜色鲜艳,为最适光照强度;同时在该范围内,随着光强的增加, K 值变化极小,可见,3 000 lx 的光照已能满足直链藻的生长。

从实验结果可以看出,直链藻是河口性种,同时也是一种广盐种,适宜盐度为 5 ~ 85,最适盐度为 20 (见图5)。盐度在 5 ~ 20 范围内,藻类生长较好,盐度升到 20 时为最佳;盐度在 20 ~ 60 范围内,生长速率变化不大,盐度大于 60 时,生长速率随盐度增加而急剧降低。朱明等研究表明,具槽直链藻获得最大生长速率的盐度是 24,盐度在 16 ~ 32 范围生长差异不大,低于 16 或高于 32 时,生长明显受到抑制^[8]。本试验中的直链藻在盐度为 5 和 30 时,其生长速率差异不显著,在盐度高于 70 时,其生长才受到抑制。这两种直链藻的适宜盐度差异较大,一是基因型不同,二是来自不同海区。

直链藻生长的适宜 pH 值范围为 4 ~ 10,最适生长的 pH 值为 8.5。这与文献[7]报道的四片藻生长的适宜 pH 值范围为 4 ~ 9,最适生长的 pH 值为 7 相近。

综上所述,温度、光照、盐度和 pH 值是影响直链藻生长的重要生态因子,在培养海洋微藻时,只有合理地选择各种环境条件及营养盐,才能保证提供充足、优质的微藻。

参考文献:

[1] 唐兴本,陆波,刘杰. 海水育苗优质饵料——直链藻的培养技术[J]. 水产科技情报,2005,32(2):53-56.

[2] 吴学军,杨家新,姜爱兰. 六株海洋微藻强化的酵母轮虫对中华绒螯蟹溞状幼体的影响[J]. 水产养殖,2009,30(10):55-58.

[3] 王庆,唐晟凯,杨家新. 直链藻强化的轮虫对中华绒螯蟹溞状幼体Ⅱ期与Ⅲ期生长及脂肪酸组成的影响[J]. 南京师大学报:自然科学版,2006,29(1):102-105.

[4] 吴学军,杨家新,陆建明,等. 直链藻密度对中华绒螯蟹溞状幼体 Z1 到 Z2 的影响[J]. 淡水渔业,2004,34(1):32-33.

[5] TOLEDO A P P, D'AQUINO V A, TUNDISI J G. Influence of humic acid on growth and tolerance to cupric ions in *Melosira italica* (subsp. subartica) [J]. Hydrobiologia, 1982, 87: 247-254.

[6] NOBUTADA Nakamoto, MARCOS A Marins, JOSE G Tundisi. Synchronous Growth of a Freshwater Diatom *Melosira italica* under Natural Environment[J]. Oecologia (Berl.), 1976, 23:179-184.

[7] 王珺,王永波,陈国华,等. 四片藻培养条件的研究[J]. 海洋渔业,2008,30(2):189-194.

[8] 朱明,阎斌伦. 具槽直链藻生长条件和生活史的研究[C]//中国海洋湖沼学会藻类学分会第七届会员大会暨第十四次学术讨论会论文摘要集.(出版者不详),2007:146.

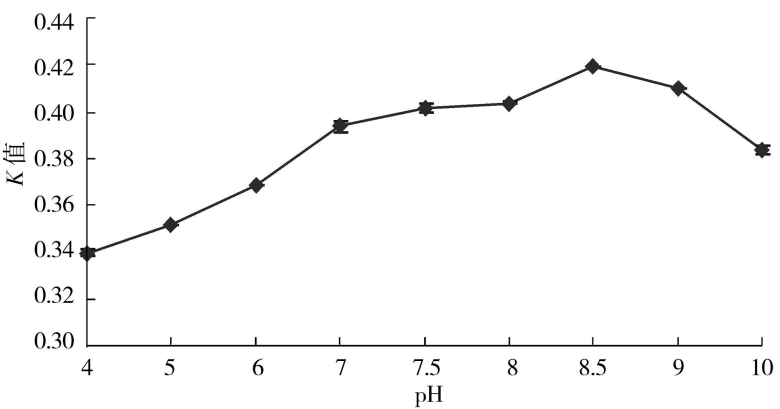


图6 pH对直链藻生长的影响

参考文献:

[1] 杨安钢,毛积芳,药立波.生物化学与分子生物学实验技术[M].北京:高等教育出版社,2001.

[2] 冯建成,崔贞华,罗素兰.大肠杆菌 JM109 菌株高效电转化条件的研究[J].湖北大学学报:自然科学版,2008,30(1):79-81.

[3] CHEN X D, GUO P Y, XIE Z X, et al. A convenient and rapid method for genetic transformation of *E. coli* with plasmids[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2001,80:297-300.

[4] 李代宗,赵晓瑜,倪志华,等.少量制备大肠杆菌感受态细胞条件探索[J].生物技术,2006,16(6):55-57.

[5] 游雷鸣,翁海波,韩绍印,等.大肠杆菌 JM109 感受态形成因素分析[J].生物技术,2007,17(2):37-40.

[6] 温建新,李志辉,宋明慧,等.影响大肠埃希菌感受态细胞因素的探讨[J].动物医学进展,2007,28(5):9-12.

[7] 萨姆布鲁克 J,弗里奇 E F,曼尼阿蒂斯 T,等.分子克隆实验指南[M].第2版.北京:科学出版社,2002.

[8] 涂知明,陈明洁,何光源,等.三种大肠杆菌高效感受态的制备及转化[J].华中科技大学学报:自然科学版,2006,34(4):112-115.

Optimization on the Preparation of the Competent Cells
of *Escherichia coli* HB101

FENG Jian-cheng, NIU Cheng, XING Xu, WANG Chao

(College of Materials and Chemical Engineering, Hainan University Haikou 570228, China;
Key Laboratory of Hainan Natural Resources Chemical Materials Application Technology, MOE, Haikou 570228, China;
Tropical Bio-engineering Center for Polysaccharide Utilization, MOE, Haikou 570228, China)

Abstract: The strain source, the growth phrase of the cell and the storage condition were optimized for preparing the competent cells of *Escherichia coli* HB101. The results revealed that the highest transformation ability could be obtained when the source of the strain was streaked from strains stored under -70 ℃, cells were harvested when *OD*₆₀₀ were 0.3—0.4, the storage condition of competent cells was under 4 ℃ for 1 d and -70 ℃ for 1 month, and the highest transformation efficiency attained 1.18×10^7 cfu · g⁻¹ DNA.

Key words: *Escherichia coli* HB101; competent cells; preparation; optimization

(上接第 223 页)

Effects of Different Ecological Factors on the Growth of *Melosira* sp.

WANG Jun, XING Yu-xuan, CHEN Guo-hua, LIU Zhi-yuan, LI Hong-wu, Wang Ai-wen
(Ocean College, Hainan University, Hainan Key Laboratory of Tropical Hydrobiology Technology, Haikou 570228, China)

Abstract: The effects of temperature, illumination intensity, salinity and pH on the growth and reproduction of *Melosira* sp. were analyzed under the experimental conditions. The results indicated that the adaptive water temperature ranged from 5 ℃ to 30 ℃ with the optimal temperature at 25 ℃; the adaptive illumination intensity was 500—9 000 lx with optimal value at 3 000—7 000 lx; the range of adaptive salinity was 5—85 with the optimal salinity at 20; the range of adaptive pH was 4—10 with the optimal pH at 8.5.

Key words: *Melosira* sp.; temperature; illumination intensity; salinity; pH