



临沂大学博士教授文库

LINYIDAXUE BOSHI JIAOSHOU WENKU

海洋微藻研究

HAIYANG WEIZAO YANJIU

王培磊 著

山东人民出版社

全国百佳图书出版单位 国家一级出版社



临沂大学博士教授文库

LINYIDAXUE BOSHI JIAOSHOU WENKU

海洋微藻研究

王培磊 著

山东人民出版社

全国百佳图书出版单位 国家一级出版社

图书在版编目 (C I P) 数据

海洋微藻研究/王培磊著. — 济南: 山东人民出版社, 2015.5

ISBN 978 - 7 - 209 - 08984 - 5

I. ①海… II. ①王… III. ①微藻 - 研究 IV.

①Q949.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2015) 第 115375 号

海洋微藻研究

王培磊 著

主管部门 山东出版传媒股份有限公司
出版发行 山东人民出版社
社 址 济南市经九路胜利大街 39 号
邮 编 250001
电 话 总编室 (0531) 82098914
市场部 (0531) 82098027
网 址 <http://www.sd-book.com.cn>
印 装 莱芜市华立印务有限公司
经 销 新华书店

规 格 16 开 (169mm × 239mm)
印 张 19
字 数 300 千字
版 次 2015 年 5 月第 1 版
印 次 2015 年 5 月第 1 次
ISBN 978 - 7 - 209 - 08984 - 5
定 价 38.00 元

如有质量问题, 请与出版社总编室调换。

前言

藻类是指无胚、具叶绿体、行光合作用的自养型叶状体孢子植物。微藻 (microalgae) 则是指那些单细胞或由数个细胞组成的微小藻类。人们认识和利用微藻已有较长的历史。早在 16 世纪西班牙人入侵墨西哥时, 就在当地市场上见到一种叫 Tecuitlatl 的干饼出售, 它是当地阿兹台克人从 Texcoco 湖中采集螺旋藻 (*Spirulina sp.*) 晒干制成的食品。而微藻的培养则始于 19 世纪末, 荷兰生物学家 Beijerinck 首先在琼脂平板上分离到了一种小球藻 (*Chlorella sp.*) 的纯培养物, 另一位科学家 Warburg 于 1919 年将这一纯培养物在实验室里作为研究植物生理学的材料。微藻光能利用效率很高, 经常被生物学家用来研究自养营养。同期获得纯培养的种类还有栅藻 (*Scenedesmus sp.*) 等藻类。作为水产动物饵料的微藻, 其培养历史可追溯到 20 世纪初。由于小球藻含有高达 50% 的粗蛋白, 第二次世界大战后, 许多国家开展了小球藻培养研究, 目的是想利用小球藻代替粮食和饲料, 以期解决战后的饥荒问题。期间, 还利用小球藻的规模培养筛选抗菌物质。微藻生物技术的发展迅速, 究其原因, 主要是微藻具有以下几点独特的优势: ①微藻的整个生物体均可被利用, 没有被废弃的部分; ②营养丰富, 富含蛋白质、维生素、多不饱和脂肪酸等物质; ③相比农作物, 单位时间和单位面积产量高; ④生长周期短, 繁殖快; ⑤大部分可利用海水培养, 是直接开发利用海洋的有效途径; ⑥可进行自动化、集约化、规模化生产。

生物工程技术在微藻培养上的应用, 使得近 20 年来微藻培养技术发展更快, 取得的成果更大。微藻的异养培养是在 20 世纪 80 年代末提出的, 主要是利用现有工厂的发酵设备进行藻类工业化大规模培养, 生产 EPA、DHA 等有用物质。

微藻产业在我国几经兴衰。20 世纪 50 年代后期, 举国上下大搞小球藻培养, 至今台湾省的小球藻产业仍稳步发展, 产品遍及世界许多国家和地区。螺旋藻自

70年代后期引入我国,经国家组织的七五和八五攻关,而今已形成500多个生产厂家、年产数万吨能力的产业,并带动了食品医药和饲料工业的发展。在我国还发展了盐藻的生产性试验。中国科学院水生生物研究所大量培养多变鱼腥藻(*Anabaena variabilis*)已有近30年的历史,并于1985年用开放式培养方法生产干藻2吨,进行了用藻粉代替鱼粉做鸡饲料的试验,取得良好效果。

在以色列、日本、墨西哥、中国台湾、泰国及美国,微藻(螺旋藻、小球藻和盐藻)的产业化发展很快。20世纪80年代中期,年总产量大约为1500吨,零售总额约为2亿美元。制约微藻产业化发展的主要因子是藻细胞的采收。随着技术的进步,微藻生产成本将下降。

目前,微藻主要用作人类保健食品、水体污染程度指示生物、污水处理、生物能源物质、经济水产动物和家畜家禽的饲料、植物生长调节剂,以及提取DHA、EPA、色素、甘油等生物活性物质。微藻作为水产动物的饵料,主要用于海产动物的人工育苗阶段。国外在鱼类、贝类、甲壳类育苗中应用的微藻已有40多种。我国海洋微藻用作生物饵料的培养工作,始于上个世纪50年代,目前已有20多种,主要有三角褐指藻、小新月菱形藻、牟氏角毛藻、纤细角毛藻、中肋骨条藻、亚心形扁藻、塔胞藻、盐藻、小球藻、微拟球藻、湛江等鞭藻、绿色巴夫藻、异胶藻、钝顶螺旋藻、舟形藻、东方弯杆藻、卵形藻等。由于各种微藻的营养成分不同,每种水产动物所需的营养成分也不同,因此培养不同的水产动物要选用不同的饵料,水产动物的不同发育阶段也要选用不同的饵料。三角褐指藻和小新月菱形藻是贝类幼虫和虾类幼体的良好饵料。牟氏角毛藻是对虾、海参、文蛤、牡蛎、海胆、魁蚶、鲍鱼等的优质饵料。纤细角毛藻是中国海洋大学应用微藻研究所1955年从美国引进的,可以作为双壳贝类、海胆、海参、甲壳类等幼体的饵料。中肋骨条藻在培养对虾幼体时广泛使用,效果良好。盐藻培养刺参效果良好。扁藻和塔胞藻可作为亲贝及贝类后期幼虫的饵料。小球藻和微拟球藻主要用来培养轮虫。球等鞭金藻可以作为贻贝、扇贝等多种双壳类幼虫、刺参幼虫和对虾幼体的饵料,效果良好。湛江等鞭藻是双壳类和海参类幼虫的优质饵料,在我国沿海广泛培养,在双壳类人工育苗中用湛江等鞭藻和亚心形扁藻混合或交替投喂,效果比较理想。绿色巴夫藻适温范围广,对光强要求低,在三四月份温度偏低、光线不强的条件下,比等鞭藻生长快,细胞密度高而且富含蛋白质,适宜我国北方三四月份培养,可作为中国对虾幼体和海湾扇贝幼虫的饵料,效果良好。异胶

藻可作为紫贻贝、泥蚶和杂色蛤幼体饵料。螺旋藻干品和鲜品可饲养对虾幼体和亲贝，以及作为鱼、虾饲料的添加剂。阔舟形藻、舟形藻、东方弯杆藻、卵形藻等底栖硅藻主要用来培育鲍、刺参等底栖水产动物的幼虫。

本书内容是根据作者近年来微藻培养领域的发明专利申报材料整理而成的，主要包括小新月菱形藻、牟氏角毛藻、中肋骨条藻、亚心形扁藻、塔胞藻、盐藻、微拟球藻、湛江等鞭藻、绿色巴夫藻等培养基配方和多级培养方法，介绍了 50 项发明专利的说明书，包括专利名称、领域、背景技术、发明内容、益处、附图说明、具体实施方式。研究和成文过程中，得到了国家知识产权局的朱立岩老师、中国海洋大学张学成教授的热情指导和师弟孟振的大力帮助，内蒙古兰太集团生物公司为本研究提供了卤水、部分藻种和其他便利条件，在此表示真诚感谢。

由于作者水平和研究条件有限，研究方法和结果难免有不当之处，恳请该领域的学者批评指正。

王培磊

2015 年 4 月 25 日

目 录

前 言	1
第一章 亚心形扁藻培养基配方及三级培养方法	1
第二章 微拟球藻培养基配方及三级培养方法	5
第三章 绿色巴夫藻培养基配方及三级培养方法	9
第四章 中肋骨条藻培养基配方、制备方法及养殖方法	14
第五章 盐生杜氏藻培养基配方及四级培养技术	18
第六章 牟氏角毛藻培养基配方及白塑料桶充气培养方法	22
第七章 盐藻半连续培养方式及藻液中原生动物污染的消除方法	26
第八章 紫球藻培养基配方及塑料薄膜袋半连续培养方法	31
第九章 波吉卵囊藻培养基配方及三级培养方法	36
第十章 湛江叉鞭金藻规模化培养技术及固定化保种方法	42
第十一章 塔胞藻简易培养技术和藻细胞收集方法	49
第十二章 小新月菱形硅藻浓缩培养液制备方法和简易培养方式	54
第十三章 小新月菱形藻高效养殖和采收方法	59
第十四章 作物秸秆沤浸液制备方法及在水产养殖业上的应用技术	64
第十五章 牛蒡盐藻酒制作工艺	70
第十六章 一种海藻酒的制作方法	75
第十七章 盐生杜氏藻提纯和驯化方法	80
第十八章 盐生杜氏藻中 β -胡萝卜素和叶绿素 a 含量的测定方法	85
第十九章 利用罐头厂废水培养椭圆双眉藻的培养基及培养方法	90
第二十章 利用抗生素厂废水培养扁圆卵形藻的培养基及培养方法	97
第二十一章 利用味精厂废水养殖丛粒藻的培养基及培养方法	104

第二十二章	利用肉联厂废水养殖蛇目圆筛藻的培养基和培养技术	111
第二十三章	盐生杜氏藻快速培养方法	119
第二十四章	提高紫球藻花生四烯酸含量的方法	123
第二十五章	胁迫盐生杜氏藻快速积累 β -胡萝卜素的方法	127
第二十六章	促进微拟球藻大量积累高不饱和脂肪酸的方法	133
第二十七章	利用沼气池废液培养直舟形藻的方法	138
第二十八章	奶牛场粪便在光棘球海胆育苗中的应用方法	144
第二十九章	一种高密度培养异胶藻的培养基和培养方法	151
第三十章	用人尿培养湛江球等鞭金藻的方法	158
第三十一章	用羊粪浸出液培养蛋白核小球藻的方法	164
第三十二章	螺旋藻酒制作方法	171
第三十三章	极地雪藻固定化保种方法	174
第三十四章	胁迫雨生红球藻快速积累虾青素的方法	179
第三十五章	利用磷肥厂废水养殖半裸舟形藻的培养基及培养方法	184
第三十六章	三角褐指藻和小新月菱形藻混合培养的培养基及培养方法	191
第三十七章	一种利用淀粉厂废水养殖青岛大扁藻技术	197
第三十八章	一种利用尿素厂废水培养莱茵衣藻的方法	204
第三十九章	一种利用屠宰厂废水养殖海洋单胞藻的方法	212
第四十章	一种果状杜氏藻藻膏的制作和保存方法	218
第四十一章	一种海洋微藻的串联培养和快速收集方法	224
第四十二章	一种小型角毛藻浓缩培养液制备方法和高效培养技术	231
第四十三章	一种用混合微藻对角突臂尾轮虫进行营养强化的方法	236
第四十四章	一种栉孔扇贝幼体饵料的制作和投喂方法	243
第四十五章	一种竹蛭生态饵料的制作方法	253
第四十六章	一种羽状江珧环保饵料的制作方法	261
第四十七章	一种用废旧塑料桶培养褶皱臂尾轮虫的方法	269
第四十八章	一种用塑料薄膜袋充气培养双小核草履虫的方法	276
第四十九章	一种用瓷缸培养飞马哲水蚤的方法	281
第五十章	一种用抽滤瓶培养鸟喙尖头蚤的方法	288
主要参考文献		293

第一章 亚心形扁藻培养基配方及三级培养方法

摘 要 本发明提供了一种亚心形扁藻培养基及其三级培养方法，配方如下：硝酸钠 100mg，磷酸二氢钾 45mg，碳酸氢钠 800mg，柠檬酸铁 0.2mg，人尿 2mL，改良 f/2 维生素溶液 1mL，消毒海水 1000mL。所述改良 f/2 维生素溶液配制方法为：维生素 B₁₂ 0.5mg，维生素 B₁ 100mg，维生素 H 0.5mg，纯水定容至 1000mL。实验结果表明，使用优化培养基并采用三级培养亚心形扁藻具有生长速度快、产量高、成本低、易于操作、不易污染的优点。

背景技术

本发明属于海洋微藻养殖域，尤其涉及一种亚心形扁藻培养基配方及三级培养方法。海洋微藻种类繁多、生长速度快、适应性强、易于培养。微藻含有某些特异的高附加值生物活性成分，因此被广泛应用于食品工业、水产养殖、医药美容、废水处理和生物能源等领域，有重要经济价值。亚心形扁藻是研究和应用最广泛的微藻之一。

亚心形扁藻为一种海产单细胞浮游藻类，适应性强，上浮性好，生长繁殖迅速，能够合成高浓度的多不饱和脂肪酸 PuFA，常作为鱼、虾、贝类幼体的开口饵料及饵料动物的饵料。

目前，亚心形扁藻规模化培养存在的主要问题是藻细胞生长缓慢、倍增时间长。合适的培养基是实现亚心形扁藻高密度培养的重要因素之一。以前使用的扁藻培养基没有加入碳酸氢钠，但我的实验表明，亚心形扁藻除了能利用空气中游

离的 CO_2 ，还能有效地利用培养液中的 HCO_3^- 作为碳源。添加碳酸氢钠不仅缩短了亚心形扁藻的倍增时间，而且延长了亚心形扁藻的生长时间。大量实验表明：添加 0.8g/L 的碳酸氢钠能大大提高生长速度。另外，传统的培养基磷酸二氢钾添加量为 5~10mg/L，而我的实验表明，将磷酸二氢钾添加量提高到 45mg/L，亚心形扁藻的产量能提高 47%。

总之，使用优化培养基并采用三级培养亚心形扁藻方法具有生长速度快、产量高、成本低的优势。

发明内容

为了克服目前技术的不足，本发明提供了一种亚心形扁藻培养基配方及三级培养方法，具体技术方案如下：

一种亚心形扁藻培养基，配方如下：硝酸钠 100mg，磷酸二氢钾 45mg，碳酸氢钠 800mg，柠檬酸铁 0.2mg，人尿 2mL，改良 f/2 维生素溶液 1mL，消毒海水 1000mL。所述改良 f/2 维生素溶液配制方法为：维生素 B_{12} 0.5mg，维生素 B_1 100mg，维生素 H 0.5mg，纯水定容至 1000mL。

应用本发明所提供的培养基对亚心形扁藻进行三级培养，包括以下步骤：

1. 一级培养，即用 3000~20000mL 玻璃瓶培养。一般接种密度为 $2 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4 \text{ cell/mL}$ 。消毒瓶中加入上述营养盐，用酒精棉擦拭瓶口，用消毒的滤纸封口，摇匀后，置于光线充足处。最佳光照强度 5000~8000lx，室温 24~26℃，每小时摇动一次。5~6 天细胞密度达到 $4 \times 10^5 \sim 8 \times 10^5 \text{ cell/mL}$ 即可转入二级培养。

2. 二级培养，即用 3m³ 玻璃钢水槽或塑料薄膜袋封闭式充气一次性培养。培养用水为煮过的水或消毒水。接种量 1:10~1:20。接种后，玻璃钢水槽用消毒的塑料布遮盖，24 小时连续充气，日光灯照射。每天视藻液的颜色、浓度、生长情况补充培养用水，经 5~6 天即可转到三级生产性培养。

3. 三级培养，即用 8m³ 玻璃钢水槽或水泥池封闭或开放式充气一次性培养。培养用水经次氯酸钠或漂白粉处理消毒，培养方法与二级培养基本相同，接种量据情掌握，但不宜低于 1:50。充气量达到藻液翻腾，一般经 6 天培养，藻细胞密度达到 $4 \times 10^5 \sim 10 \times 10^5 \text{ cell/mL}$ 时，即可用于投喂青蛤的 D 型幼虫、日本对虾的蚤状幼体等。

实验结果表明，使用优化培养基并采用三级培养亚心形扁藻具有生长速度快、

产量高、成本低、易于操作、不易污染的优点。

具体实施方式

培养基配制方法

1. 柠檬酸铁较难溶解，可加少量自来水在火炉上微热至 $80 \sim 90^{\circ}\text{C}$ ，并不断搅拌至全部融化。
2. 加营养盐的过程中需不断搅水，而且各种营养盐按配方中提供的顺序加入，以免发生化学反应。
3. 各种营养盐可先配成浓度较高的母液，再依次添加。
4. 三级培养各阶段营养盐配方和浓度相同。

一种亚心形扁藻培养基，其特征在于该亚心形扁藻培养基配方如下：硝酸钠 100mg，磷酸二氢钾 45mg，碳酸氢钠 800mg，柠檬酸铁 0.2mg，人尿 2mL，改良 f/2 维生素溶液 1mL，消毒海水 1000mL。所述改良 f/2 维生素溶液配制方法为：维生素 B_{12} 0.5mg，维生素 B_1 100mg，维生素 H 0.5mg，纯水定容至 1000mL。

亚心形扁藻三级培养方法

1. 一级培养：

培养容器为 3000 ~ 20000mL 玻璃瓶。在消毒培养用水中加入上述营养盐。选择生命力旺盛、无污染的藻液进行接种培养。将藻种上清液缓慢倒入玻璃瓶中，一般接种密度为 $2 \times 10^4 \text{ cell/mL}$ 。最后用酒精棉擦拭瓶口，用消毒的滤纸封口，摇匀后，置于光线充足处。最佳光照强度 $5000 \sim 8000 \text{ lx}$ ，室温 $24 \sim 26^{\circ}\text{C}$ ，每小时摇动一次，5 ~ 6 天细胞密度达到 $4 \times 10^5 \sim 8 \times 10^5 \text{ cell/mL}$ 即可转入二级培养。

2. 二级培养：

培养容器为 3m^3 玻璃钢水槽、塑料薄膜袋封闭式充气一次性培养。培养用水为煮过的水或消毒水。扩种时，将藻液倒入容器中，用泵将水打入藻液中，加入相应营养盐。接种量 1:10 ~ 1:20。接种后，玻璃钢水槽用消毒的塑料布遮盖，24 小时连续充气，日光灯照射，最佳光照强度 $5000 \sim 8000 \text{ lx}$ ，每天视藻液的颜色、浓度、生长情况添加营养盐和消毒培养用水。经 5 ~ 6 天即可转入三级生产性培养。

3. 三级培养:

培养容器为 8m^3 玻璃钢水槽、水泥池封闭式或开放式充气一次性培养。培养用水经次氯酸钠或漂白粉处理消毒。培养方法与二级培养基本相同。接种量据情掌握,但不宜低于 1:50。充气量达到藻液翻腾,一般经 6 天培养,藻细胞密度达到 $4 \times 10^5 \sim 10 \times 10^5 \text{ cell/mL}$ 时,即可用于投喂青蛤的 D 型幼虫、锯缘青蟹的 Z 幼体和南美白对虾、日本对虾的蚤状幼体等。

第二章 微拟球藻培养基配方及三级培养方法

摘 要 本发明提供了一种微拟球藻培养基配方及三级培养方法，配方如下：

NaNO_3 $7.5 \times 10^{-2} \text{g}$, KH_2PO_4 $1 \times 10^{-2} \text{g}$, NaHCO_3 $5 \times 10^{-1} \text{g}$, 柠檬酸铁 ($\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) $2 \times 10^{-4} \text{g}$, VB_{12} $5 \times 10^{-7} \text{g}$, VB_1 $1 \times 10^{-4} \text{g}$, VH $5 \times 10^{-7} \text{g}$, 九二〇植物生长刺激素 (即赤霉素) 5 国际单位, 人尿 2mL, 消毒海水 1000mL。实验结果表明, 使用优化培养基并采用三级培养微拟球藻具有生长速度快、产量高、成本低、易于操作、不易污染的优点。

背景技术

本发明属于海洋微藻养殖领域, 尤其涉及一种微拟球藻培养基配方及三级培养方法。微拟球藻 (*Nannochloropsis oculata*) 又称微绿球藻, 是一种广泛分布的海水藻类, 直径为 $2 \sim 4 \mu\text{m}$, 细胞球形, 淡绿色, 富含不饱和脂肪酸及其他营养元素, 其中 EPA 含量占脂肪酸总量的 30%。EPA 能降低胆固醇和甘油三酯的含量, 促进体内饱和脂肪酸代谢, 从而降低血液黏稠度, 增进血液循环, 提高组织供氧而消除疲劳, 并防止脂肪在血管壁的沉积, 预防动脉粥样硬化的形成和发展, 预防脑血栓、脑出血、高血压等心脑血管疾病。EPA 在减轻炎症方面也起着重要的作用。另外, 微拟球藻油脂含量占干重的 68% 以上, 是提炼生物柴油的理想微藻。

目前, 微拟球藻规模化培养存在的主要问题是生长缓慢, 生物量低, 易污染, 特别是梅雨季节不利于大规模培养。以前使用的微拟球藻培养基没有加入碳酸氢

钠, 但我的实验表明, 微拟球藻除了能利用空气中游离的 CO_2 , 还能有效地利用培养液中的 HCO_3^- 作为碳源。大量实验表明: 添加 0.5g/L 的碳酸氢钠能很好地促进微拟球藻的生长。另外, 我还在培养基中补充了柠檬酸铁、维生素 H、赤霉素和人尿, 能将产量提高 54% 。

总之, 使用优化培养基并采用三级培养微拟球藻方法具有生长速度快、产量高、成本低、不易污染的优势。

发明内容

为了克服目前技术的不足, 本发明提供了一种微拟球藻配方及三级培养方法, 具体技术方案如下:

一种微拟球藻培养基, 配方如下: NaNO_3 $7.5 \times 10^{-2}\text{g}$, KH_2PO_4 $1 \times 10^{-2}\text{g}$, NaHCO_3 $5 \times 10^{-1}\text{g}$, 柠檬酸铁 ($\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) $2 \times 10^{-4}\text{g}$, VB_{12} $5 \times 10^{-7}\text{g}$, VB_1 $1 \times 10^{-4}\text{g}$, VH $5 \times 10^{-7}\text{g}$, 九二〇植物生长刺激素 (即赤霉素) 5 国际单位, 人尿 2mL , 消毒海水 1000mL 。

优选地, 还包括微量元素 $0.55 \sim 2.25\text{mL/L}$, 所述微量元素配方为: 磷酸二氢钠 $32 \sim 40\text{g/L}$ 、硫酸铜 $1.2 \sim 3.2\text{g/L}$ 、硫酸锌 $4.2 \sim 6.2\text{g/L}$ 、氯化钴 $4 \sim 6\text{g/L}$ 、氯化锰 $30 \sim 45\text{g/L}$ 加水定容至 1L 。

优选地, 所述微量元素溶液中加入 $120 \sim 140\text{g/L}$ 的磷酸二氢钠溶液。

优选地, 所述微量元素溶液中加入乙二胺四乙酸二钠 $3 \sim 10\text{g/L}$ 。

应用本发明所提供的培养基对微拟球藻进行三级培养, 包括以下步骤:

1. 一级培养:

容器为 5000mL 三角烧瓶, 烧瓶用洗液洗涤、晾干、 120°C 恒温消毒; 培养用的海水比重 $1.015 \sim 1.018$, 盐度 $30 \sim 32$, 经脱脂棉过滤、煮沸、冷却后加入营养盐; 室内培养, 室温 $20 \sim 26^\circ\text{C}$, 室内自然光 + 辅助日光灯管光源照射, 光强 $3000 \sim 10000\text{lx}$, 光暗周期 $14\text{L}:10\text{D}$ 。指数增长期藻种接种, 接种密度 $300 \sim 350 \times 10^4\text{cell/mL}$, 不充气。培养期间每天摇瓶 6 次。密度达 $3000 \times 10^4\text{cell/mL}$, 即可转入二级培养。

2. 二级培养:

容器为 50L 白塑料桶, 白塑料桶刷干净、漂白粉消毒后用消毒水冲干净备用。二级培养用的海水经漂白粉消毒、硫代硫酸钠处理后加入营养盐; 将一级培养的

藻液按 1:10 的比例接种到白桶。室内培养, 室温 20 ~ 26℃, 室内自然光 + 辅助日光灯管光源照射, 光强 3000 ~ 10000lx, 光暗周期 14L:10D, 充气培养, 充气量以能将藻细胞冲起悬浮即可。

3. 三级培养:

容器为水泥池, 面积 20 ~ 30m², 池深 50cm, 水深 20 ~ 30cm, 内贴白色瓷砖。三级培养用海水经漂白粉消毒、硫代硫酸钠处理。将二级培养的藻液做藻种转入水泥池培养, 室外培养, 自然光照射, 充气, 接种密度 $200 \times 10^4 \sim 300 \times 10^4$ cell/mL, 培养至密度达 $2000 \times 10^4 \sim 3000 \times 10^4$ cell/mL 即可收获。

优选地, 包括在步骤 2 中充气培养时同时施加臭氧。

优选地, 臭氧的浓度为 0.5 ~ 0.8 μg/L 空气。

具体实施方式

培养基配制方法

1. 柠檬酸铁较难溶解, 可加少量自来水在火炉上微热至 80 ~ 90℃, 并不断搅拌至全部融化。

2. 赤霉素为白色结晶粉末, 不易溶解于水, 可先用酒精充分溶解 (一般每 g 用 50mL 酒精或 60 度白酒溶解 1 小时以上), 再按所需浓度对水稀释。

3. 加营养盐的过程中需不断搅水, 而且各种营养盐按配方中提供的顺序加入, 以免发生化学反应。

4. 各种营养盐可先配成浓度较高的母液, 再依次添加。

5. 三级培养各阶段营养盐配方和浓度相同。

一种微拟球藻培养基, 其特征在于该微拟球藻培养基配方如下: NaNO_3 7.5×10^{-2} g, KH_2PO_4 1×10^{-2} g, NaHCO_3 5×10^{-1} g, 柠檬酸铁 ($\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 2×10^{-4} g, VB_{12} 5×10^{-7} g, VB_1 1×10^{-4} g, VH 5×10^{-7} g, 九二〇植物生长刺激素 (即赤霉素) 5 国际单位, 人尿 2mL, 消毒海水 1000mL。

优选地, 还包括微量元素 0.55 ~ 2.25mL/L, 所述微量元素配方为: 磷酸二氢钠 32 ~ 40g/L、硫酸铜 1.2 ~ 3.2g/L、硫酸锌 4.2 ~ 6.2g/L、氯化钴 4 ~ 6g/L、氯化锰 30 ~ 45g/L 加水定容至 1L。

优选地, 所述微量元素溶液中加入 120 ~ 140g/L 的磷酸二氢钠溶液。

优选地, 所述微量元素溶液中加入乙二胺四乙酸二钠 3 ~ 10g/L。

微拟球藻三级培养方法

1. 一级培养:

培养容器为 5000mL 三角烧瓶, 烧瓶用洗液洗涤、晾干、120℃ 恒温消毒; 培养用的海水比重 1.015, 盐度 30, 经脱脂棉过滤、煮沸、冷却后加入营养盐; 室内培养, 室温 20 ~ 26℃, 室内自然光 + 辅助日光灯管光源照射, 光强 3000 ~ 10000lx, 光暗周期 14L:10D。指数增长期藻种接种, 接种密度 $300 \times 10^4 \sim 350 \times 10^4 \text{ cell/mL}$, 不充气。培养期间每天摇瓶 6 次。密度达 $3000 \times 10^4 \text{ cell/mL}$, 即可转入二级培养。

2. 二级培养:

培养容器为 50L 白塑料桶, 白塑料桶刷干净、漂白粉消毒后用消毒水冲干净备用。二级培养用的海水经漂白粉消毒、硫代硫酸钠处理后加入营养盐; 将一级培养的藻液按 1:10 的比例接种到白桶。室内培养, 室温 20 ~ 26℃, 室内自然光 + 辅助日光灯管光源照射, 光强 3000 ~ 10000lx, 光暗周期 14L:10D, 充气培养, 充气量以能将藻细胞冲起悬浮即可。

3. 三级培养:

培养容器为水泥池, 面积 20 ~ 30m², 池深 50cm, 水深 20 ~ 30cm, 内贴白色瓷砖。三级培养用水经漂白粉消毒、硫代硫酸钠处理。将二级培养的藻液做藻种转入水泥池培养, 室外培养, 自然光照射, 充气, 接种密度 $200 \times 10^4 \sim 300 \times 10^4 \text{ cell/mL}$, 培养至密度达 $2000 \times 10^4 \sim 3000 \times 10^4 \text{ cell/mL}$ 即可收获。

优选地, 包括在步骤 2 中充气培养时同时施加臭氧。

优选地, 臭氧的浓度为 0.5 ~ 0.8μg/L 空气。

上述所有的区间都可以实现, 不止端点和中点能实现, 在此特别说明。

第三章 绿色巴夫藻培养基配方及三级培养方法

摘 要 本发明公开了一种绿色巴夫藻培养基配方及三级培养方法，涉及海洋微藻养殖领域。绿色巴夫藻的培养，传统上使用 MAV 培养液配方，生长速度慢，产量低。我的实验表明，用 108mg/L 尿素取代硝酸盐，添加 500mg/L 的 NaHCO_3 ，并补充了 5 国际单位/L 九二〇植物生长刺激素（即赤霉素）、f/2 微量元素、f/2 维生素，营养更均衡、全面，大大加快了绿色巴夫藻的生长速度，产量可以提高 86%。绿色巴夫藻的培养方式，现在二级培养我用白塑料桶代替玻璃瓦缸，三级培养我用塑料薄膜悬浮吊带培养代替开放水泥池，好处是易于操作、不易污染，易于掌控、灵活多样，不易划破、更加安全可靠，透光性好，成本低，生长快，产量高。

背景技术

绿色巴夫藻（*Pavlova viridid*）是一种海洋微藻，属金藻门、普林藻纲、巴夫藻目、巴夫藻科、巴夫藻属，无细胞壁、个体微小、繁殖快、营养丰富，适于水产动物幼体摄食和消化，尤其富含水产经济动物幼体生长和发育所必需的二十二碳六烯酸 EPA，是一种优质单胞藻饵料，广泛应用于虾、蟹、贝类幼体及海水仔鱼人工育苗。因 EPA 和 DHA 也是人体必需脂肪酸，可预防和治疗多种疾病，价值越来越受到科研工作者重视。

绿色巴夫藻的培养，传统上使用 MAV 培养液配方（即 KNO_3 100mg， KH_2PO_4 10mg， $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.5mg， MgSO_4 0.25mg，EDTA - Na_2 10mg， VB_{12} 5×10^{-7} mg，