

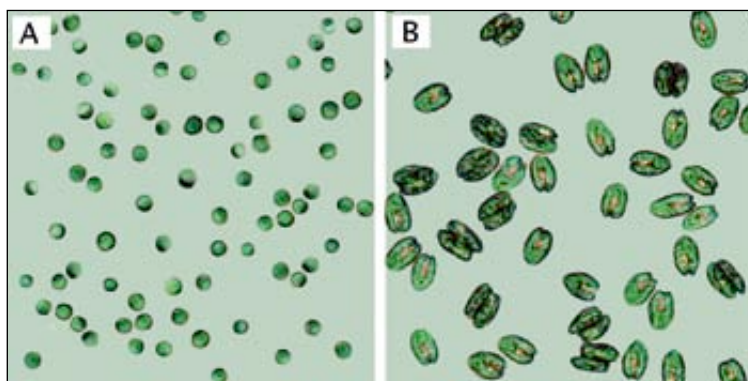
## 第三部分

# 育苗场的运作：单细胞藻类的培养

3.1 概述 .....	29
3.2 藻种和一级培养的维护和管理 .....	31
3.2.1 藻种的管理程序 .....	32
3.2.2 一级培养程序 .....	36
3.3 二级培养 .....	37
3.3.1 培养过程的生长时相 .....	37
3.3.2 二级培养的操作细节 .....	38
3.3.3 藻类密度的计算 .....	40
3.4 三级培养 .....	42
3.4.1 袋式培养或圆柱式培养 .....	44
3.4.2 内部照明培养 .....	45
3.4.3 三级培养的管理原则 .....	46
3.4.4 自动化三级培养 .....	49
3.4.5 存在问题和解决方案 .....	50
3.4.6 室外粗放培养 .....	50
3.5 参考文献 .....	52

### 3.1 概述

进行海产经济贝类苗种商业性生产中,海洋单细胞类藻一直被用于不同发育阶段贝类幼体的饵料(图12)。到目前为止,活的海洋单细胞藻类始终被认为是双壳类幼虫和稚贝的最佳饵料。为了改变这一局面,人们正在研发适合于这一目的的非活性饵料和人工配合饲料。尽管如此,在可预见的将来活的单细胞藻类的培养对于贝类育苗的成功依然起到举足轻重的作用;非活性饵料和配合饲料仅仅用于活饵料的补充成分。



**图12:** 贝类育苗中常用的两种单细胞微藻(A)等鞭金藻和(B)四片藻的光学显微镜图片,及其它们的相对个体大小。

鞭毛藻和硅藻是海洋微藻的主要组成部分,是构成海洋食物链的基础生产者。它们从海水中吸收营养物质,利用光能进行光合作用,制造组成细胞的有机物。在育苗场中,微藻被养殖在添加有硝酸盐、磷酸盐、必需微量元素、维生素和用作碳源的二氧化碳的海水中。人造海水也可以用来培养微藻,由于费用过高,仅限于实验室的小规模培养中使用。

微藻的培养之所以重要是因为育苗场中所用的微藻在天然海水中数量太少,满足不了高密度培养的贝类幼虫和稚贝最佳生长的需要。在贝类幼虫的培养过程中,海水中所包含的天然浮游藻类基本上都被过滤殆尽,这就必须提供足够量的人工培养的、经过优选的、具有高营养价值的微藻,并非任何未经选择的藻类都可用作饵料。双壳类苗种生产中常用的单细胞藻类列于表1,并包含这些藻类的个体大小和成分的参数。

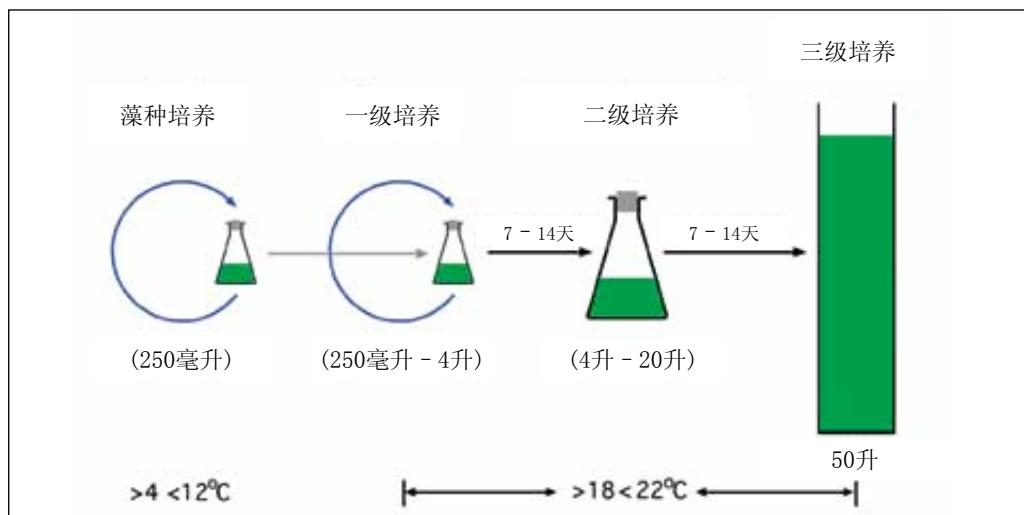
**表1:** 双壳类幼虫和稚贝培育中常用的微藻,及其细胞体积、有机物质质量和粗脂肪含量

种类	细胞平均体积 (微米 <sup>3</sup> )	有机质质量 (微克/100万细胞)	粗脂肪 (%)
<b>鞭毛藻:</b>			
<i>Tetraselmis suecica</i>	300	200	6
<i>Dunaliella tertiolecta</i> *	170	85	21
<i>Isochrysis galbana</i>	40-50	19-24	20-24
<i>Isochrysis</i> (T-ISO)			
<i>Pavlova lutherii</i>			
<b>硅藻:</b>			
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	35	7	17
<i>Chaetoceros gracilis</i>	80	30	19
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	45	22	24
<i>Skeletonema costatum</i>	85	29	13
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> *	40	23	12

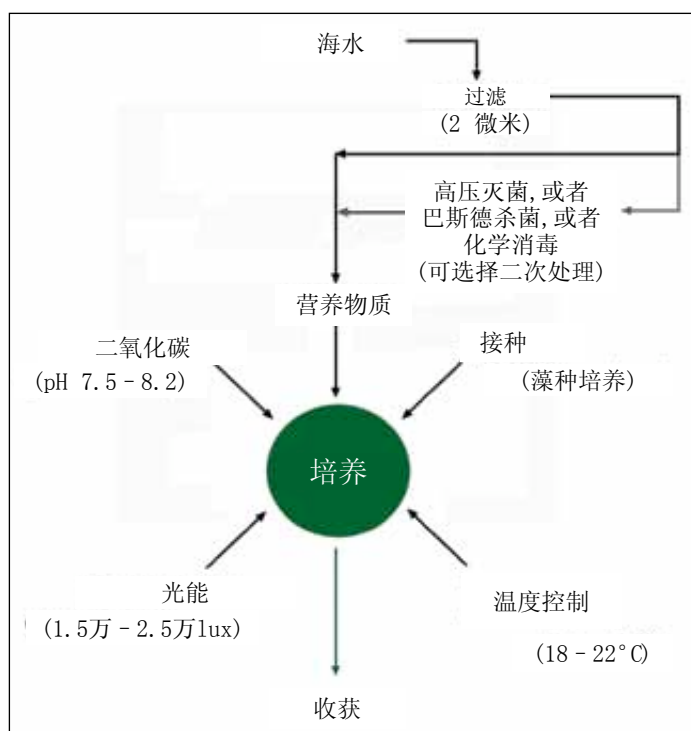
\*标有“\*”的种类营养价值相对较低

双壳类幼体培养到5毫米的商品规格,藻类饵料成本占到种苗生产总成本的40%。例如:培育100个万个菲律宾蛤子或100万个太平洋牡蛎每天要消耗1400升,在24°C最佳温度条件下人工培育的高密度藻类饵料,而亲贝和幼虫所消耗的饵料相对要少些。

培养单细胞藻类的基本方法多年来几乎没有多少变化,图13表示生产过程中的不同步骤。在育苗生产中既可以选择使用人工光源的室内集约化方法来生产单细胞藻类,也可以利用自然光能在户外的小池塘或水池中进行粗放式的生产。采用何种培养方法由基础设施和培养方法来确定。集约化培养方法无论是可靠性,还是生产力都是令人满意的,但是成本和劳力费用高;粗放式生产可靠性较差,有时产量较低。在采用一种方法时必须考虑基本设施和条件。图14表示藻类的培养过程。藻类培养车间在育苗场中所处的平面位置已经在前一部分的图5中做过介绍(见1.2节)。



**图13:** 单细胞藻类生产程序。藻种培养（250 ml或以下）保持在控光、控温(低温)等条件下,用于一级培养接种用。藻种的培养无须充气和补充二氧化碳。一级培养是在250毫升到4升的容器中进行的。在适宜的光照和温度条件下,供给补充了二氧化碳的空气,7-14天就可达到较高细胞密度。取其中一小部分继续用于一级培养,大部分用来接种,开始二级培养(容器体积:4升-20升)。二级培养的藻液既可用于作幼虫饵料,也可用来接种并开始三级培养。三级培养的容器最小是50升,通常要大得多。



**图14:** 藻类生产过程中的各种必要条件。是否需要进行海水的二级处理取决于海水最初的过滤程度。

### 3.2 藻种和一级培养的维护和管理

对选定的藻种进行培养是单细胞藻类养殖中的基础。一些知名的国家级研究机构或者是专门从事于藻类采集的实验室通常供应纯种(单一种类的藻种)。因为它们具有较高的价值,通常是保存在专门的培养基上,如Erdschreiber培养基和 F/2培养基,或者是保存在加有营养盐的琼脂平面或斜面培养基上,严格控制温度和光照条件。在藻类培养室中,要专门规划一定的区域或者是房间用于藻种的保存和培养。

通常在需要的时候将藻种用于一级培养,也称之为接种。在藻种的保存中所做的每一项工作就是要将污染的风险,以及在一级培养时会与藻类培养产生竞争的微生物降低到最低的程度。下面将要介绍的消毒程序必须遵循,以确保污染不会发生。

藻种是保存在较小的透明的、能经受得住高温高压消毒的容器内。如500毫升硼硅酸盐平底玻璃烧瓶,或者是锥形的三角烧瓶。瓶口能用棉花塞塞住,瓶内可盛250毫升经过高压消毒的培养液是最理想的。Erdschreiber培养液的成分和制备示于表2。另外两种适合于该目的的培养液是Guillard的F/2培养液(表3)和HESAW培养液(表4)。所有的用于单细胞藻类培养用的适合于强化海水营养的产品均可按照生产商的使用说明来使用。藻种也时常保存在海水的琼脂培养基上,可以在培养皿内做成平面培养基,或是在试管内做成斜面培养基。

藻种培养最好是在低温培养箱内进行,温度是根据需要控制在4-12°C的范围内,光照由两支以上的8瓦荧光灯提供,光照强度控制在450lux(图15)。有时也可将培养皿放在太阳晒不到的北窗旁,或是放在具有荧光等照明的低温房内。目的是不让藻种进入快速生长期,但是要保存在较好的培养条件下。藻种的培养无须充气,也不需要补充二氧化碳。



图15: 用于保存少量单细胞藻类的控光控温培养箱。

### 3.2.1 藻种培育的管理程序

为保持藻种的旺盛和健康生长,每月对藻种进行继代培养实为必要。其操作如下:打开棉塞,用本生灯或丁烷灯灼烧三角烧瓶瓶颈,随后向另一瓶已经装有灭菌培养液的三角烧瓶里注入20至50毫升的藻种。瓶颈灼烧后塞上棉塞,用防水标记笔标注藻种种名和接种时间,放回培养架。原有的藻种可保留数周以防接种失败。接种工作最好在由紫外线消过毒的无菌室进行,以减少污染的风险(图16)。转接程序细节附在本节的文本框内。

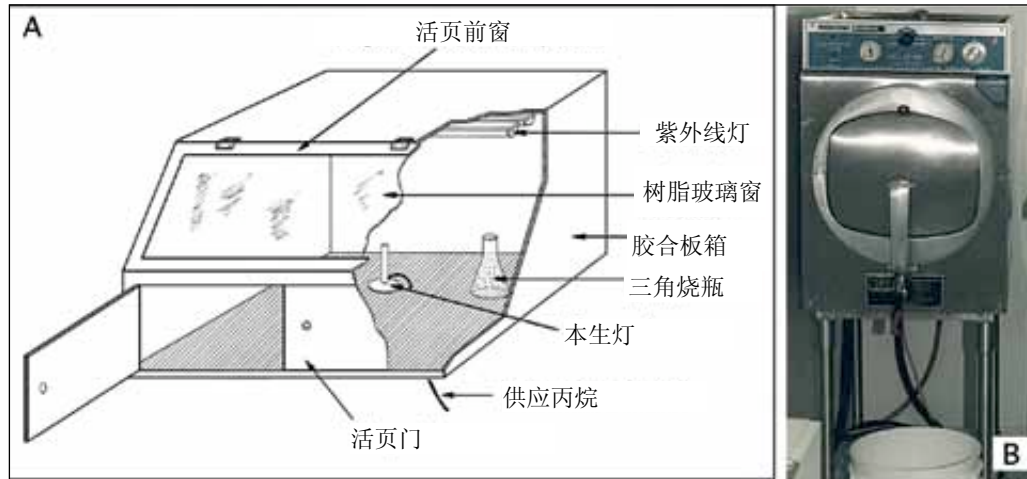


图16: (A) 接种箱示意图. (B) 小型高温高压消毒器。

表2: Erdschreiber 培养液的成分和制备

**要素:**

1. 海水: 在3升平底三角烧瓶内盛2升培养液, 塞上棉塞, 在1.06千克/厘米<sup>2</sup>压力下消毒20分钟, 并静置2天。
2. 按照下列程序制备土壤提取液。
  - 1) 在未使用过化肥和农药的林地或草地中取1千克土, 加入1升蒸馏水。
  - 2) 在1.06千克/厘米<sup>2</sup>压力下消毒60分钟
  - 3) 倾出上清液
  - 4) 用1号滤纸和玻璃纤维纸 (GF/C) 过滤上清液
  - 5) 滤液盛于聚丙烯瓶内, 在1.06千克/厘米<sup>2</sup>压力下消毒20分钟。
  - 6) 贮存在深冷条件下备用。
  - 7) 在500毫升的平底三角烧瓶内盛100毫升滤液, 塞上棉塞, 在1.06千克/厘米<sup>2</sup>压力下消毒20分钟。
3. 硝酸盐/磷酸盐母液: 在500毫升的烧瓶内将40克NaNO<sub>3</sub>和4克Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>溶解于200毫升蒸馏水内, 在1.06千克/厘米<sup>2</sup>压力下消毒20分钟。
4. 硅酸盐母液: 在500毫升的烧瓶内将8克Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O溶解于200毫升蒸馏水内, 在1.06千克/厘米<sup>2</sup>压力下消毒20分钟。

**程序:**

在2升消毒海水(1)中加入100毫升土壤提取液。用消毒的移液管吸取2毫升硝酸盐/磷酸盐母液和2毫升硅酸盐母液加入其中。将上述营养液分别均分到8个500毫升的三角烧瓶中, 塞上棉塞。在倒入培养液前后立即用本生灯或丁烷灯灼烧瓶颈。至此, 保种液制备完成。

### 藻种从一个三角烧瓶转入另一三角烧瓶的操作程序

- a) 用85%酒精擦接种箱的所有内表面。
- b) 将所有要用的三角烧瓶放入接种箱;即将藻种瓶和盛有消毒培养液的三角烧瓶都放入箱内。
- c) 合上接种箱, 打开紫外线灯, 保持20分钟。(不要用肉眼直接看紫外线灯, 当灯打开时应该在透明的丙烯酸玻璃观察板上蒙上黑布)。
- d) 关闭紫外线灯, 点燃本生灯。
- e) 去除三角烧瓶瓶口的铝箔, 用火焰灼烧瓶颈, 并缓慢转动瓶颈。
- f) 将原藻种瓶与接种瓶的瓶口相对, 同时, 打开瓶塞, 将藻种从原种瓶内倒入接种瓶。硅藻的接种量大约是50毫升, 鞭毛藻是100毫升。在接种过程中不要使两个瓶口接触, 也不要接触瓶塞。藻种一旦接入后, 盖上原藻种瓶的瓶塞。接种瓶的瓶颈灼烧后也盖上瓶塞。
- g) 将接种瓶的铝箔盖盖上。用防水的标记笔在接种瓶上写上接种的藻种种名和接种日期
- h) 做完所有的接种后, 关闭本生灯, 打开接种箱
- i) 将所有的刚接完种的接种瓶放入培养器或是其他用于藻类培养的设备内。
- j) 在原藻种瓶内剩余的藻液可以接种到更大的容器内, 如4升的三角烧瓶或是细口大玻璃瓶内。

本资料引用自Bourne, Hodgson 和 Whyte, 1989

**表3:** 用于双壳类育苗用的F/2藻类培养基(引用自 Guillard, 1975)

	成分	化学名	重量(克)	蒸馏水量(毫升)
1.	硝酸盐	$\text{NaNO}_3$	75.0	1000
2.	磷酸盐	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5.0	1000
3.	硅酸盐	$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	30.0	1000
4.	微量元素	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3.5	900毫升蒸馏水
		$\text{Na}_2\text{EDTA}$	4.36	900毫升蒸馏水

将下列微量元素溶液分别吸取1毫升加入到上述的微量元素溶液中, 并用蒸馏水将容量调至1升

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.98	100 毫升
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.20	100 毫升
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.00	100 毫升
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	18.00	100 毫升
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.63	100 毫升

## 5. 维生素

生物素	1.0毫克
B <sub>12</sub>	1.0毫克
B <sub>1</sub>	20毫克

将上述三种维生素溶解于1升蒸馏水中, 冷藏

在每升过滤海水中分别加入1毫升1-4的成分和1/2毫升维生素

**表4:** 用于双壳类育苗用的HESAW培养基(引自Harrison 等, 1980)。

组别	成分	重量(克)
1.	NaNO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> glycero.P0 <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	466.7 66.7
溶解于2升蒸馏水中		
2.	Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	55.3 38.0
溶解于1升热蒸馏水中		
3.	FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	1.6
溶解于100毫升蒸馏水中。加50毫升到溶液#1, 另外的50毫升加到溶液#2; 最后将溶液#1和#2混合到一起。		
4.	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O 或者MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	4.1 5.4
溶解于50毫升蒸馏水中, 加到上述溶液中		
5.	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1.26
溶解于50毫升蒸馏水中, 加到上述溶液中		
6.	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O CuSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	7.3 1.6
溶解于100毫升蒸馏水中, 加10毫升到上述溶液中		
7.	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0.173
溶解在1升蒸馏水中, 取1毫升加到100毫升蒸馏水中配制成母液; 加10毫升该母液到上述溶液中。		
上述溶液加入到10升蒸馏水中, 使用前经过高温高压灭菌, 取1毫升加入到1升过滤海水中		
8.	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> .5H <sub>2</sub> O或者 Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O	224.0 300.0
溶解于1升蒸馏水中, 缓慢地加入1.5升1克分子盐酸(133.5毫升浓盐酸加入到1.5升蒸馏水中)。将上述溶液加入到10升蒸馏水中。使用前经灭菌处理。取1毫升加到1升过滤海水中。		
9.	维生素: 与上表同	

### 3.2.2 一级培养的管理

一级培养的程序基本上与上述的藻种培养程序相同。这些培养液也是用于下一级的接种, 开始进行大量培养供培养幼虫和稚贝所用

一级培养是从上述选定的藻种培养开始。一级培养是将所需要的藻种培养在装有250毫升培养液的500毫升烧瓶中。为了使得它们进入快速生长, 所以需要在18-22°C的温度条件下, 同时提供65瓦 - 80瓦的荧光灯照明, 与烧瓶保持15-20 厘米的距离, 光照强度大约在4750-5250Lux(图17)。一级培养就需要充入经二氧化碳强化的混合空气。



图17: 一级培养所用的典型设施和日常操作。

一级培养的时间随种类而异, 例如, 硅藻的世代周期较短, 一般培养3-5天即可。对于大多数鞭毛藻类而言, 培养时间约7 - 14天。当一级培养藻液达到可供使用浓度时, 先作继代培养, 操作程序如前所述。接种20-50毫升藻种(接种量的多少取决于种类和细胞密度)到新鲜的培养液里, 以持续保持一级培养。剩余的一级培养藻液可接种到大容器(25升)内进行扩大培养, 可直接用于饲养贝苗或是用做二级培养的母液。这样的接种和扩大培养可以依次的进行下去。

如果需要进行较大量的三级培养, 就需要用较大容积的容器进行一级培养。说得更清楚一点, 用2升-25升的容器进行的培养常被称之为二级培养。例如, 进行一个200升



的三级培养,从250毫升的一级藻种开始,随后扩展到2升-4升的大容器内开始二级培养。从二级培养液中取出200-400毫升用做继代培养,余者接种到200升的三级培养罐。

用较大的容器进行一级培养的好处是增加了光照,以及可以补充空气和二氧化碳的混合气体。为了获得较快的生长速度,在培养硅藻时将盐度稀释到20-25PSU(实际盐度单位,相等于PPT),将大部分鞭毛藻培养液的盐度调整到30PSU的盐度是可取的。

### 3.3 二级培养

大多数实验室不需要大量的微藻作为饵料,常常使用球形的烧瓶或是25升的透明塑料桶作为培养容器(图18)。这类设施一般用于批培养或者用于半连续培养。所谓的批培养就是从接种开始,随后进入快速生长时期。随着细胞密度的增加,光线的穿透率受到限制,而抑制其生长,此时就可开始收获。并将所有容器进行清洗、消毒再开始下一批的培养。

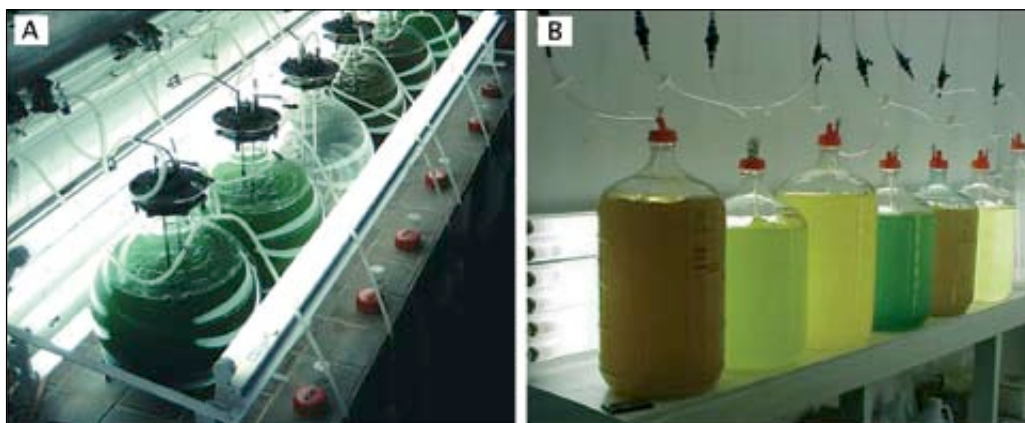


图18: 两种不同的二级培养容器: (A) 20升的圆底烧瓶 (B) 15-20 升的细口玻璃瓶。

半连续培养基本与批培养相同,不同之处是不完全收获藻液,即在藻液的密度影响到光照时收获一部分,余下的藻液中再添加新鲜培养液。这样的操作每2-3天重复一次。单细胞藻的生命就这样得到延续。对于一些容易培养的藻类,如四片藻,可以连续培养3个月,每周收获3次,每次收获总量的25%-50%。批培养主要用于难以培养的脆弱的藻类和快速生长的硅藻,半连续培养主要是用来培养易培养的鞭毛藻类。

#### 3.3.1 单细胞藻类的生长阶段

半连续培养是在指数生长期收获,而批培养是在指数生长最高点,即将进入停滞期前开始收获。这些专用术语的含义见图19。在该图例中所培养的是个体较大的绿色鞭毛藻——四片藻。

一级培养的藻种接种后,细胞的起始密度是25个-50个细胞/微升。当它们适应了培养条件后开始快速的细胞分裂。这一适应期大约需要2-3天,叫做适应期(缓慢生长期)。一旦适应了这一环境,细胞分裂加速,细胞数量呈指数增长,可持续4-6天,此时谓之指数生长期。随着细胞密度的增加,光线的穿透率下降和培养液中的营养盐浓度

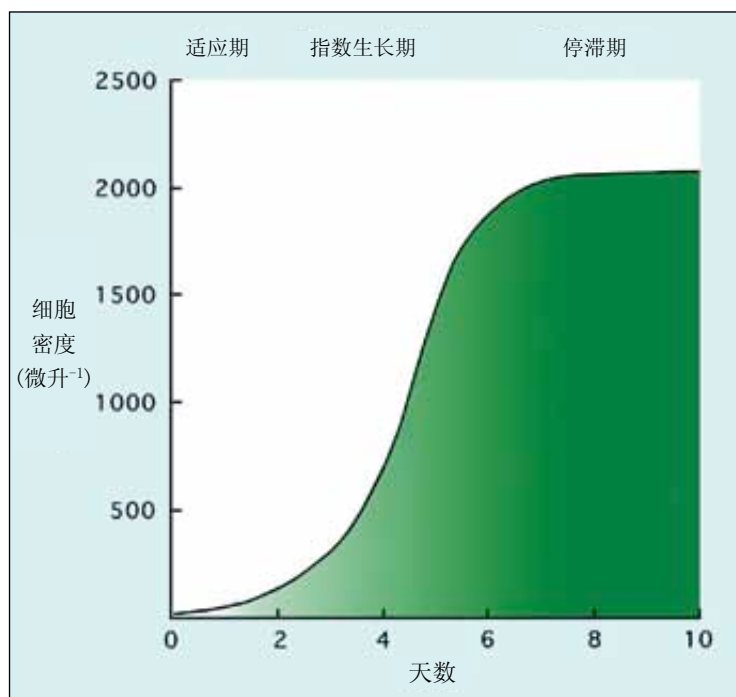


图19: 大形绿色鞭毛藻的典型生长曲线, 说明单细胞藻类的生长时相。

逐渐降低, 细胞分裂速度也随着降低。此时的培养进入停滞期(休止期)。鞭毛藻的这一时期可持续多日, 而硅藻的休止期较短。在这一时相的鞭毛藻死亡、腐烂后的藻体释放出的营养物质又可进入被活藻体再利用的循环, 而硅藻类产生的自身抑制物会诱导细菌的繁殖, 而导致培养的失败。

如图19所示, 批培养的四片藻的密度可以达到2000细胞/微升, 半连续培养达到1500细胞/微升。如果在一定的范围内增加光照强度和通过控制二氧化碳浓度将pH值限定在7.5-8.2这一范围内, 以及及时地添加营养盐, 细胞密度还可以增加, 但是是有限度的。

### 3.3.2 二级培养操作细节

藻类培养的复杂程度取决于藻类的要求和系统操作的成本限制。最简单的培养系统只要按照一级培养(2升-25升的平底的烧瓶或细口大玻璃瓶)核算的成本按比例增加即可。

按种类的要求注入培养基, 然后接入所需要的藻种。充气时压缩空气内混入2%的二氧化碳。二氧化碳是贮藏在气体压缩钢瓶内, 按压缩气体的使用说明使用。提供碳源是提高光合作用的效率, 并将pH值控制在7.5-8.2的范围内。空气和二氧化碳混合气体的注入是通过0.2微米的气石或者是通过微孔滤膜进入培养液, 目的是过滤掉由空气携带的污染物和竞争微生物。图18对该系统作了说明。培养基是由过滤消毒海水配制。

有下列几种对海水进行处理的方法:

- 采用孔径为0.22-0.45微米的细菌过滤器
- 采用巴斯德灭菌法, 温度控制在65-75°C的范围内
- 也可以用高温高压灭菌, 即在1.06千克/厘米<sup>2</sup>压力下保持20分钟 (高压灭菌后, 培养液可以在密闭的容器内放置2天)

d) 也可以用化学方法灭菌,即在1升海水中加入25毫克次氯酸钠,使用前,残留的游离氯用过量的、蒸馏水配制的硫代硫酸钠溶液还原,即在每升灭菌海水中加入50毫克。

**注释:** 上述方法(a)和(c)通常用在小规模的培养中,而(b)和(d)处理过的培养液,经孔径1-2微米的过滤器处理后,常在大规模培养中应用。

经过灭菌处理后,加入营养盐。所使用的营养盐组成由美国农业、渔业、食品部和英国的Conwy水产研究所发布,它们符合大多数所培养的种类,现列于表5。但要注意,在培养硅藻时必需在基本培养液中加入硅。此时,可在无菌条件下,将配制好的培养液分到三角烧瓶中,预备接种。近年来,有多个品牌的配制好的培养液问世。这些产品基本上是根据Guillard的F/2配方配制的,提供了极好的生长效果(见表3和表4的基本配方)。

**表5: 培养硅藻的营养盐配方(如果用于培养鞭毛藻不加母液C)**

营养盐成分	重量(克)
<b>母液A:</b>	
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1.30*
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.36
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	33.60
EDTA	45.00
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	20.00
NaNO <sub>3</sub>	100.00
微量元素母液*	1.0毫升
上述成分用蒸馏水稀释到	1000毫升
每升过滤海水中加2毫升母液A	
*微量元素母液	
ZnCl <sub>2</sub>	2.10
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	2.00
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.90
CuSO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O	2.00
上述成分加蒸馏水	100毫升
用较高浓度的盐酸酸化到溶液澄清	
<b>母液B:</b>	
维生素B <sub>12</sub>	10毫克
维生素B <sub>1</sub>	200毫克
蒸馏水	200毫升
每升过滤海水中加0.2毫升母液B	
<b>母液C:</b>	
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O	4.0
蒸馏水	100毫升
每升过滤海水中加2毫升母液C	

对于大多数微藻而言,为了使生产力达到最高水平,用无污染的淡水经过过滤和高压灭菌,对海水培养基进行稀释是必要的。*Chaetoceros calcitrans*, *Thalassiosira pseudonana* 和 *Skeletonema costatum* 生长和细胞分裂的最佳盐度是20-25 PSU。大部分鞭毛藻类的最佳盐度是25-30 PSU。大多数藻类培养采用荧光灯作为外光照光源(图18)。所用的荧光灯的数量取决于灯离开培养皿的高度和培养器具的直径大小,一般要求在培养容器中心部位的光照强度达到15000-25000 Lux(指空容器,尚未开始注入培养液时的照度)。两支 65 W或 80 W的荧光灯可以满足3升的三角烧瓶(底部直径约18厘米)的照明要求。5支同样的荧光灯可以达到25升培养瓶(直径约35cm)的光照要求。大多数藻类最适的培养温度在18-22°C范围内。

表6给出了常用的单细胞藻类在小规模培养时所要求的细胞密度。这些数据是由英国农业食品渔业部下属的Conwy水产研究所提供的,以及由商业性企业生产中所得到的数据。很有意思的是在2升培养瓶内的*Chaetoceros calcitrans*的细胞浓度要比在20升容器内的高得多。但是,小容器的生产量比大容器的低得多。所有的培养种类,其细胞的大小与培养条件和生长时相有关。例如,在2升培养瓶内培养的*Chaetoceros*达到了密度较高,但是细胞个体却变小了,在2升容器中是35微米<sup>3</sup>,而在20升容器中达到50微米<sup>3</sup>。干重也是如此,前者是10微克/100万细胞;后者达到18微克/100万细胞。其它种类表现出类似的情况。但与每一种藻固有的遗传特性有关,表现出种间的差异。对于一些个体较大的种类,如*Tetraselmis*,可以通过培养条件的调节来改变它的个体大小,以满足个体较小幼虫摄食的要求。如果是小规模培养,可以按照生物反应器的要求来操作,假如生产的目的仅仅是用于饵料,那么最好的解决方案还是按大规模培养程序来做。

表6: 小规模批量培养(B)和半连续培养(SC)方法下,不同藻类的细胞密度

种类	培养方法			收获时细胞密度 (细胞/微升)
	体积 (升)	培养方法	盐度	
<i>Isochrysis</i> (T-ISO)	20	SC	25	15 000
<i>Tetraselmis suecica</i>	20	SC	30	2 000
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	2	B	20	60 000
	20	B	20	22 000
<i>Thalassiosira pseudonana</i> (3H)	2	B	20	40 000

### 3.3.3 藻液密度的估计

在介绍大规模藻类培养前,有必要谈谈如何估计任何一级培养中的藻类细胞密度。估算藻类密度的方法有若干种,如分光光度法、荧光法、血球计数法和Coulter计数器法。分光光度计法和荧光法是测定培养液中叶绿素A的含量来估计细胞数,这一方法是迅速、方便。事先绘制出细胞密度与叶绿素A的关系曲线,然后通过仪表的读数就可知道细胞数。需要指出的是,这种关系曲线只是针对每一种藻的,不同的藻就要绘制不同的曲线。另一方面是藻液中的叶绿素含量与培养期间的营养条件有关,所以,它的精确度受到一定的限制。

更为精确的方法是使用血球计数器,或者是用Coulter计数器。

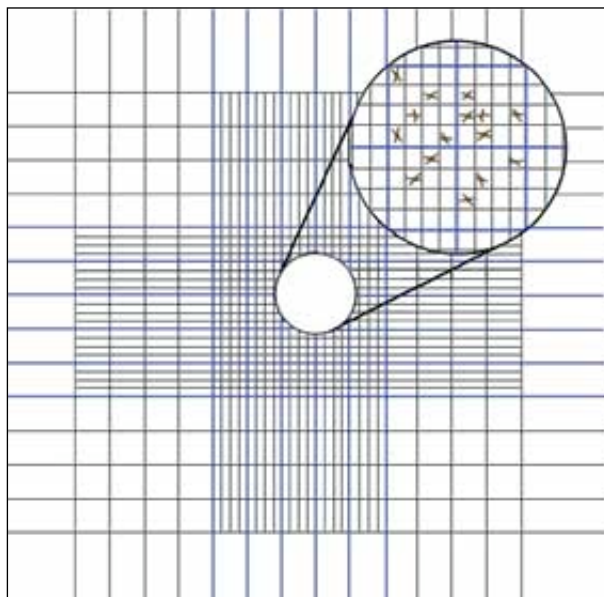


图20: 血球记数板上小格的划分。

血球记数板是一块厚玻璃片,在其上部有两个小室,每一个是 $1.0\text{mm} \times 1.0\text{mm}$ ,当一片专用的盖玻片(血盖片)盖在上面后,形成一个 $0.1\text{mm}^3$ 的空间,所以小室内的体积是 $0.1\text{mm}^3$ 。为了方便记数,将这一大格分为若干小格(图20)。对于鞭毛藻的记数,需要在记数前,在10-20毫升样品中加1-2滴10%福尔马林。将血盖片盖好,用移液管向记数板上加1-2滴需要记数的藻液样本。

细胞密度按如下方法进行记数:每一大格分成25个中格,每一中格的面积是 $0.2\text{mm} \times 0.2\text{mm}$ ;每一中格又分成16个小格,其面积是

$0.05\text{mm} \times 0.05\text{mm}$ 。记数时随机地选10个中格,然后取其平均数。所得到的平均数即是在 $0.2\text{mm} \times 0.2\text{mm} \times 0.1\text{mm}$ ,也就是在 $0.004\text{mm}^3$ 内的细胞数。

#### 例1:

1) 10个样本的记数是: $40 + 30 + 50 + 60 + 55 + 65 + 70 + 45 + 40 + 70 = 525$ 。

平均数:  $52.5$ 个细胞/ $0.004\text{mm}^3$ 。

2) 将平均数乘以250,得到每微升的细胞数

3) 因为1000微升等于1毫升,这样将B项的数乘以1000,即得到每毫升的细胞数。

在本例中,所测得的细胞密度是: $52.5 \times 250 \times 1000 = 131$ 万细胞/毫升

注: 1个细胞/微升 = 1000细胞/毫升

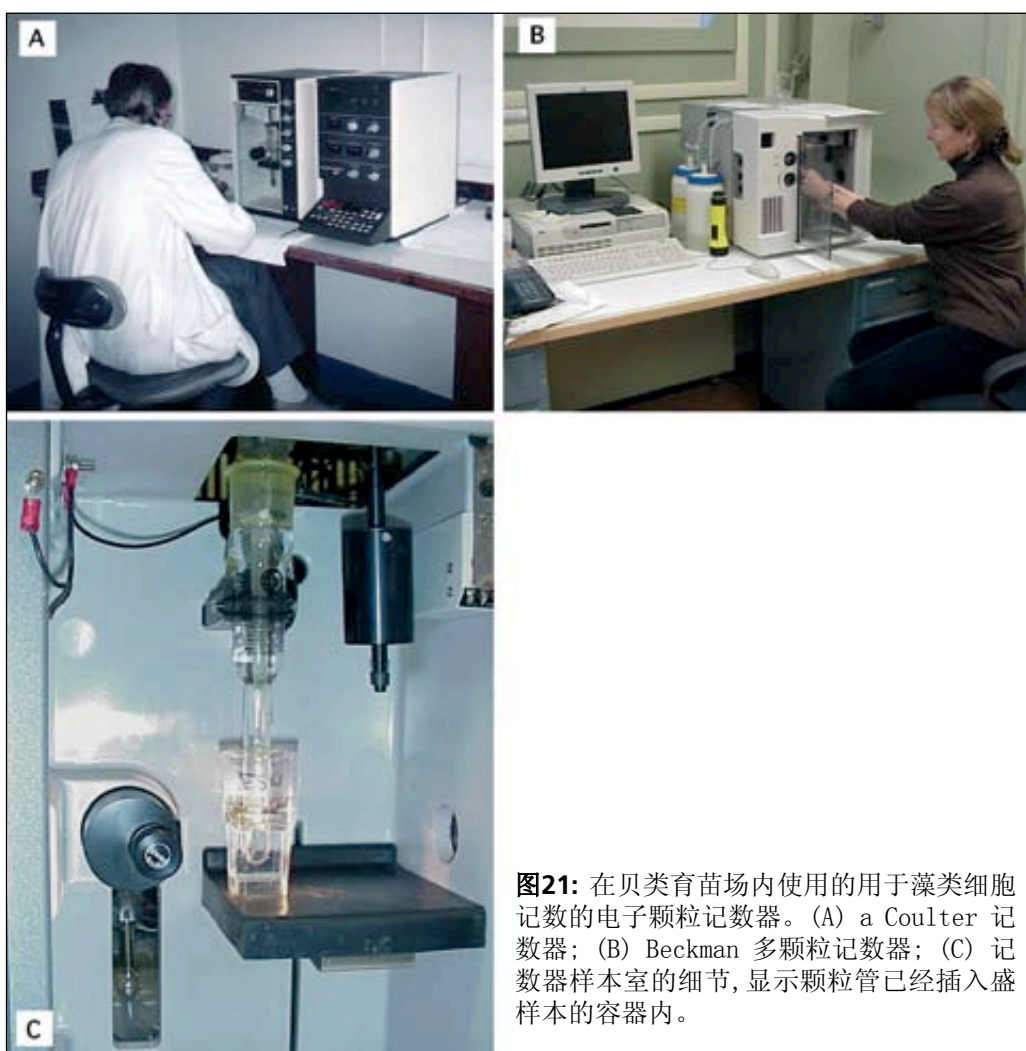
另一种更为方便、精确的方法是采用Coulter计数器(现在叫“multisizer”,图21)。这种仪器是为血球记数发明的。它有不同的型号,但是操作原理是基本相同的。一个很小的电流在两个电极之间通过,每当一个细胞处于这两个电极之间时,电流被阻断,仪器记下一个细胞数。细胞通道孔径的大小是很重要的,例如要统计个体大小在2微米到10微米之间的细胞时,孔径必须在50微米-100微米之间。当一定量的水通过该开口时,细胞数也就被记录下来。Coulter计数器的操作细节可参考本节的参考文献。由于培养液中的藻类密度很高,在记数操作时必须将其稀释,才能得到较为精确的值。大约的密度在50000细胞/毫升(50细胞/微升)左右较为适宜。稀释藻液时,可用3%的氯化钠溶液或者用孔径为0.45微米的滤膜过滤的海水。

电子计数器和颗粒计数器是很昂贵的,旧仪器会便宜得多。测定过程中节约的时间和记数的精确性将会抵消购买时所花费的昂贵代价。

**例2:**

- 1) 加0.2毫升藻液到20毫升3%的NaCl溶液中, 混合均匀。
- 2) 统计3次, 得到3个数: 5280;5336;5120。Coulter计数器中溶液量是0.1毫升, 所以稀释后的细胞密度的平均值是: 5245细胞/0.1毫升。
- 3) 将上述数值乘以10得到1毫升中的细胞数, 再乘以100得到稀释前藻液的实际密度。

在本例中的细胞密度是:  $5245 \times 10 \times 100 = 520$ 万细胞/毫升



**图21:** 在贝类育苗场内使用的用于藻类细胞计数的电子颗粒计数器。(A) a Coulter 计数器; (B) Beckman 多颗粒计数器; (C) 计数器样本室的细节, 显示颗粒管已经插入盛样本的容器内。

### 3.4 三级培养

商业性的贝类苗种生产, 每天需要供应大量的、高质量的单细胞藻类做饵料。本节将介绍欧洲和北美所使用的培养系统。这些系统包括从简单的悬挂式的聚乙烯袋, 以及由圆柱形的镀塑或镀锌网框支撑的聚乙烯袋, 到配备有复杂的电子恒浊器。尽管它们的形式不同, 但是共同的特点是所培养的藻类是在一个高而窄的, 直立的圆桶状的容器内进行的。这种形式的结构最为合理。配备有灯光的方形(图22)或圆形的水池基

本上已被废弃。但是在北美西海岸的一些育苗场仍在继续使用大型的圆池作为培养池,配置有高功率的碘钨灯。要取得高的生产量必须使用内照明的灯具(图23),而不是外照明的荧光灯。



图22: 藻类的大规模培育一般在大的圆桶或方形池内进行,在其上方配备有照明灯。本图中所显示的方形培育槽已为高的圆桶形的培养槽所取代。

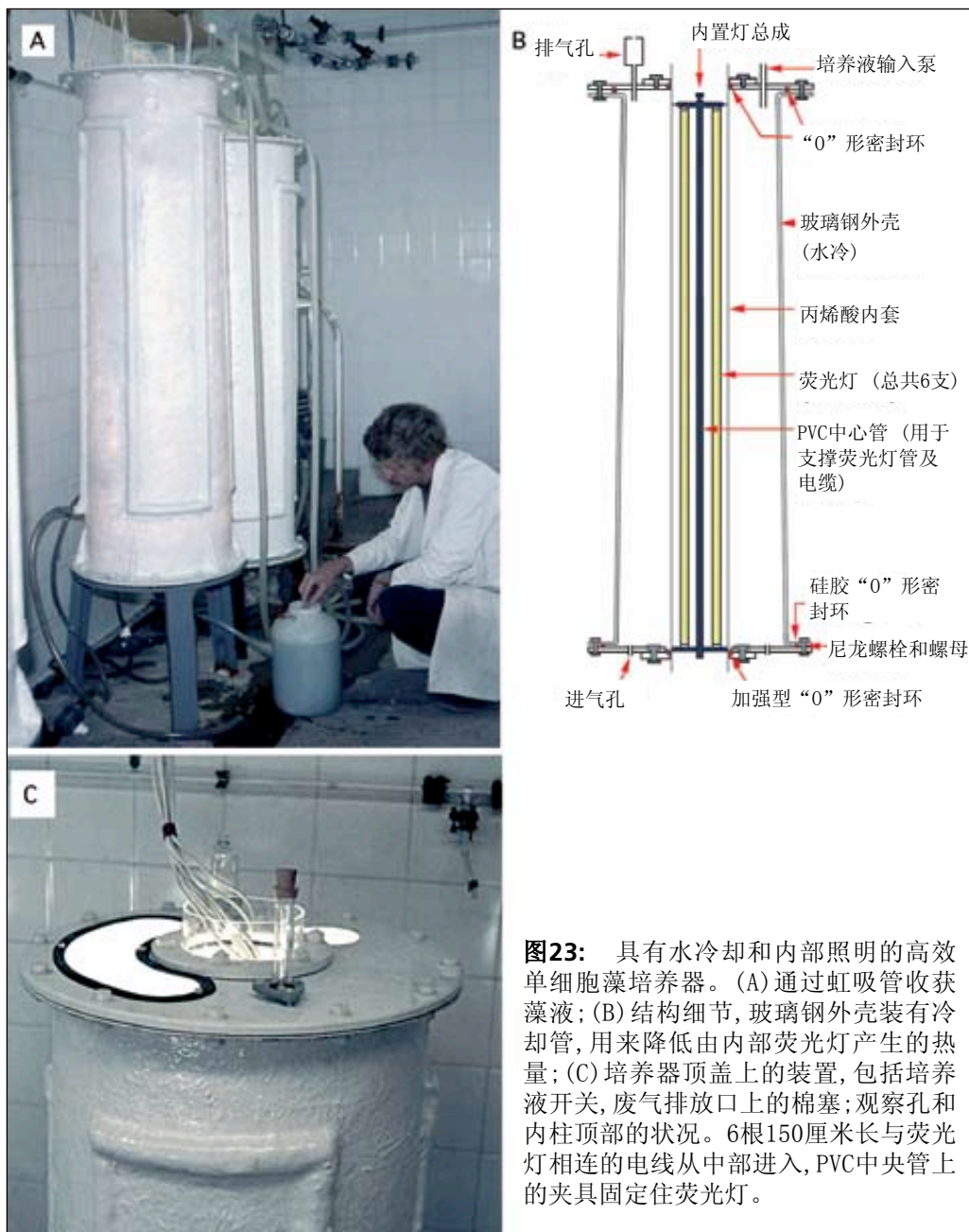
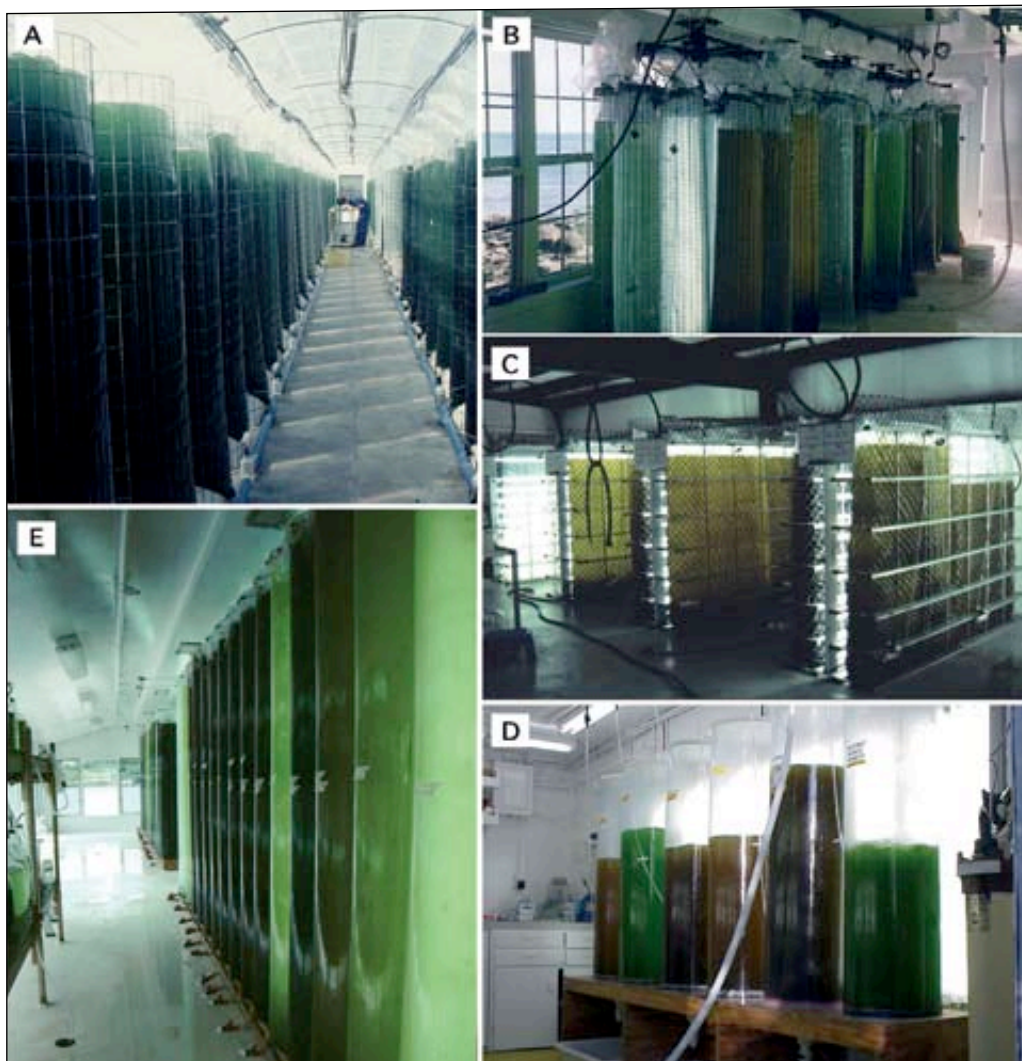


图23: 具有水冷却和内部照明的高效单细胞藻培养器。(A)通过虹吸管收获藻液;(B)结构细节,玻璃钢外壳装有冷却管,用来降低由内部荧光灯产生的热量;(C)培养器顶盖上的装置,包括培养液开关,废气排放口上的棉塞;观察孔和内柱顶部的状况。6根150厘米长与荧光灯相连的电线从中部进入,PVC中央管上的夹具固定住荧光灯。

### 3.4.1 袋式培养器和圆柱桶培养器

聚乙烯袋可以选用厚的,具有不同直径的塑料卷即可。截取合适的长度,将一头严密热封,即成为一个可灭菌处理的柔软的培养袋,圆柱形或椭圆形皆可。以这种方法制成的容器外面用镀塑或镀锌的铁丝网框支撑住;圆形的培养袋也可以悬挂在支柱上,可用支撑网维护住袋的重量,如果袋的直径小于30厘米,高度不足200厘米也可不用。如图24所示。



**图24:** 聚乙烯袋和太阳能级的玻璃钢圆柱形培养系统示例。

- A - 480升聚乙烯袋和外支撑的钢丝网框,安装在温室内,自然采光;
- B - 80升的培养袋由圆形中央框架支撑着,固定于天花板上可旋转的装置悬吊着培养袋;
- C - 塑料框架支撑着的椭圆形的培养袋,荧光灯安装在培养袋相邻的两侧;
- D - 100升太阳能级的玻璃钢培养器,一侧垂直安装着荧光灯;
- E - 2.4米高,直径0.3米的玻璃钢圆柱形培养器,照明由垂直安装的荧光灯提供。

袋式培养器是最廉价的大规模培养装置。这样的装置既可安装在室内,也可安装在室外,具有采用自然光的优点。在图24A中所用的培养袋是从长10000尺、宽90厘米的超厚聚乙烯吹膜制成。它们由焊接的钢丝网框架支撑着,容积480升,具有3.2米<sup>2</sup>的面积允许光线通过。这种大型培养器,可以垂直安装长1.8米的80瓦的荧光灯,也可安装在室外,但是不要暴露在直射的阳光下。图24B和C所示的培养器用的是相同的材料,但是支撑架是由结实的塑料网制作的。



总之,培养器的直径愈大,光照强度在同一水平上时,可以达到的细胞密度愈小。尽管如此,袋式培养器是优于相同容量的槽式培养器、玻璃钢培养器和塑料槽等,尽管这些设备还在藻类大规模生产中使用。但是,它们与内部照明的培养器相比,有其不足之处,如表7所示。聚乙烯袋的使用寿命较短,因为它的内壁上会吸附许多有机碎屑和细菌,它们聚集在一起阻碍光线的穿透,并且会成为污染的源头。在一批培养结束后,需要重新更换培养袋。袋子直径过大效率较低,小于30厘米时效率较高,因为其体积与表面积之间的关系,使得光照效率得到提高。

更为长远的解决方法是采用太阳能级的透明的玻璃钢材料。它们可以做成圆柱形,或是用溶剂焊接。这类材料对于光线的穿透性能非常之好,而且非常耐用。在北美的贝类育苗场中,通常用的圆柱形的培养器高约150–240厘米,直径30–50厘米(图24D和E)。

**表7:** 四片藻和褐指藻在不同类型的大型培养器中培养结果的比较。产量是以每升培养液中的标准细胞密度为基准,计算每天产出的升数。(\* 内部照明系统)。参考资料的全文列于本章的参考文献

种类/系统	参考文献	产量
四片藻		
80升恒浊器*	Laing & Jones, 1988	1.25
200升容器*	Laing & Helm, 1981	0.40
340升水槽	Griffith <i>et al.</i> , 1973	0.12
褐指藻		
200升容器*	Helm & Laing, 1981	0.35
20升烧瓶	Ukeles, 1973	0.33
480升聚乙烯袋	Baynes <i>et al.</i> , 1979	0.15
195升聚乙烯圆柱形培养器	Wisley & Purday, 1961	0.06

\* 1.25的产量值是将80升的培养器中的细胞密度作为一天生产量的标准值而得到的相对值。

### 3.4.2 内部照明的培养器

建造内部照明的培养器花费较大,但是在运转时,费用较低。将灯具安装在玻璃或透明的塑料管内,如图23所示。光源到培养液之间的距离大大地缩短了。如例所示,培养器高150厘米,直径40厘米。内部灯具的圆管直径是15厘米,因此,由6支80瓦,150厘米长的荧光灯所提供的光线,只要穿透14厘米的距离就可到达培养器的外周。在近期开发的这类培养器,其容积降低到80升,但是其生产能力相当于200升的外光源的培养器。

生产力(产量)是指每日生产的、可供收获的细胞数。内部照明有较长的使用寿命,在培养一些难以培养的藻类时,可长达100天。每当一批培养结束时,培养袋可以用每升20–50毫克(游离氯)的次氯酸盐溶液来消毒,允许溶液在袋内停留1小时。在下一轮培养前,用符合培养用水质量的过滤海水彻底的冲洗,排尽后,注入培养液重新开始。

基本培养条件相同,如同前述。主要差别是在用做培养液的海水的处理不同。高压灭菌和亚微米级过滤对于单细胞藻类的大规模培养来说,成本过高。用1–2微米级的桶式过滤器过滤海水培养一些大形微藻,如四片藻和骨条藻是适合的。巴斯德灭菌法和

化学灭菌也是可以的。盐度和pH值需要控制,为了获得最大的生产量,光照强度一定要根据培养器的直径精确地计算。

### 3.4.3 三级培养的管理原则

培养管理的目标是每天可能达到的最高的藻类生产量,所以培养系统就要求在有效的生产成本下运转。为了满足贝类苗种生产的要求,就要求藻类生产系统长时间地保持稳定生产。藻类培养管理不善,最终就影响到贝类种苗的生产潜力和销售价格。

在本节中将要介绍半连续培养和内部照明的操作系统。一般原理可以运用到不同类型的培养系统和不同的培养规模中。基本产量与光能的关系如图25所示。产量是以每天所收获的每微升的标准细胞浓度的升数来计算。

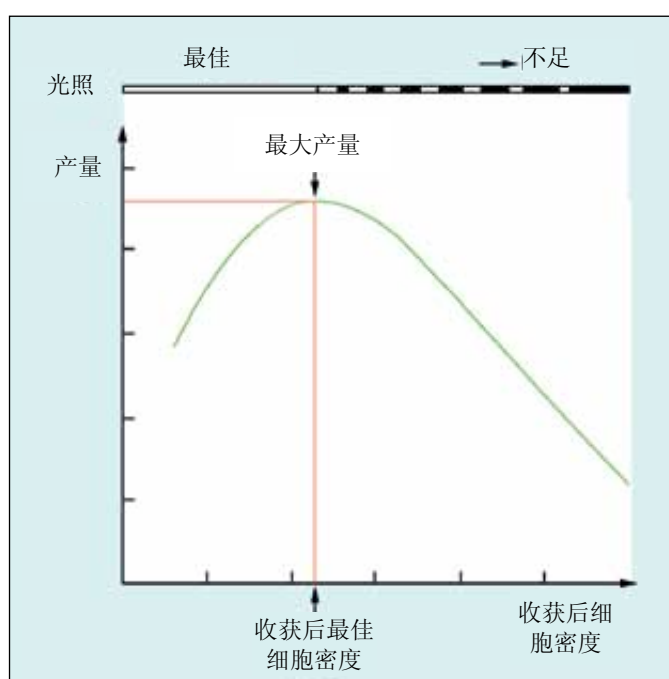


图25: 培养系统的产量与输入的光能之间的关系。(解释见手册正文)。

这里解释一下标准细胞浓度。为了比较在一个培养器中的不同种类藻类的产量,根据所收获的藻类的干物质量作为共同的基准。不同的藻类每个细胞的大小和重量变化很大,如表1所表示。知道了每一个细胞的重量,对于每一种藻类的生物量,就可以计算出它的细胞数量。以下是一些重要种类的干物质的近似值:

250个钙质角毛藻细胞

- = 100个球等鞭金藻细胞
- = 60个骨条藻细胞
- = 10个四片藻细胞。

因此,以骨条藻和四片藻为例,在计算产量时,每微升中的细胞数分别是6000个和1000个(相当于每毫升600万细胞和100万个细胞)。

另一个需要解释的术语是收获后的细胞密度(PHCD)。

PHCD = 每天收获后, 再添加新的培养液到原有的体积, 立即统计的单位体积内的细胞密度(细胞数/微升)。

这一细胞密度关系到随后的24小时内光照强度对生长的影响。图25的数据表明, 最佳的PHCD, 输入的光能不受到限制, 产量也达到最大值。当PHCD低于最佳值时, 细胞分裂速度(K)则开始下降, 如公式所示,

$$K = \frac{1.443}{t(\text{天数})} \times \frac{\log_n N_t}{\log_n N_0} \quad \begin{array}{l} (N_t = \text{收获时每微升的细胞密度}) \\ (N_0 = \text{PHCD}) \end{array}$$

$\log_n N_0$  虽是它的最高分裂速度时的细胞密度, 但是PHCD对于单位水体中的最大产量而言实在是太低。当高于PHCD时, 由于细胞之间的互相遮蔽作用, 光照强度对高密度条件下的细胞而言就受到了限制。光合成能力开始下降, 细胞分裂速率也随之降低, 日产量也相应地下降。产量也只有在特殊的条件下才能达到最大, 当输入的光能变化时, 产量也随之发生变化, 增加或减少。

图26说明四片藻在200升的培养器中, 80瓦的荧光灯的数量从4支到8支对产量的作用。4支灯提供的光照强度是7.6毫瓦/厘米<sup>2</sup>(28000lux), 8支灯管达到14.0毫瓦/厘米<sup>2</sup>(52000lux)。每天的最大生产量, 从4支灯时的67升(1000细胞/微升)增加到96升(细胞密度相同)。产量的增加源于细胞分裂速率的加快, 因为输入的光能较多, 就可在较高的PHCD条件下运行。从6支灯增加到8支灯, 产量相差无几, 这是因为在最大的光照条件下, 达到了光饱和度, 因此, 过多的能量输入将会增加生产成本。

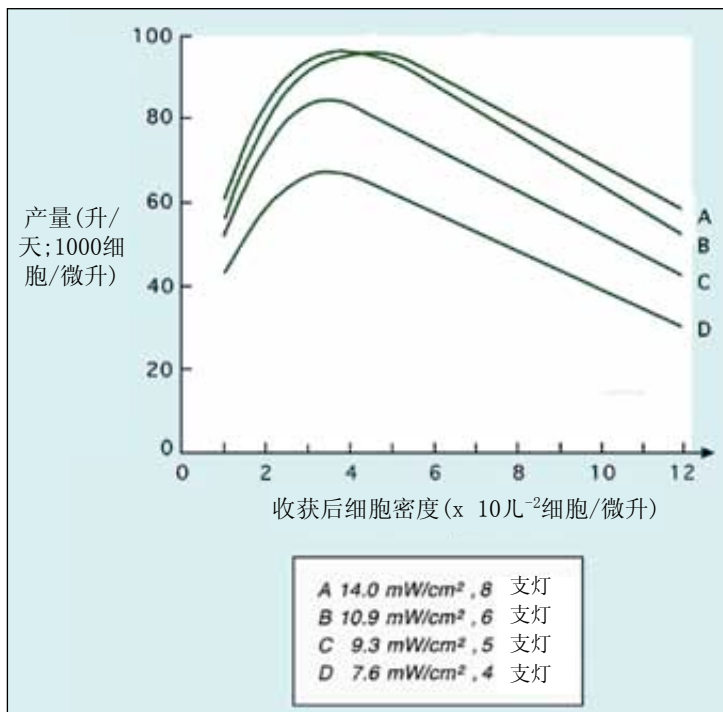


图26: 200升内照明培养系统中光照强度对四片藻产量的影响。

在200升的培养系统中, PHCD对四片藻细胞分裂速率(K)的影响示于图27A。随着PHCD值的不断增加, K值呈指数下降, 因为光照强度愈来愈受到限制。图27B和C的资料表明, K值降低, 产量也随着pH和盐度的增加而降低。这一点强调指出, 必须控制这些参数; (a) 当pH值上升时, 增加二氧化碳的输入; (b) 盐度升高时可用淡水来稀释, 调节

到正常水平。通过增加二氧化碳来控制 and 调节pH值的设备可以从水产养殖仪表供应商处购买。

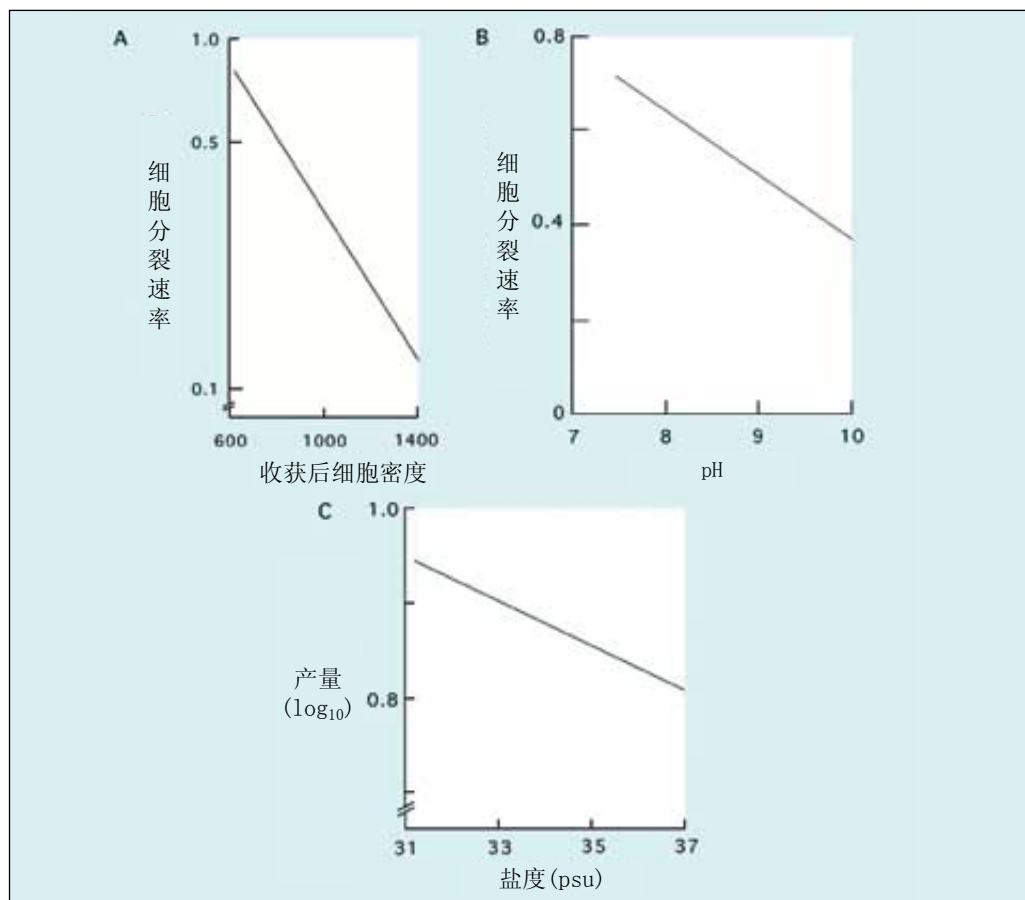


图27: PHCD(A) 和pH值(B) 对细胞分裂速率的影响, 以及盐度(C) 对四片藻生产量的作用。

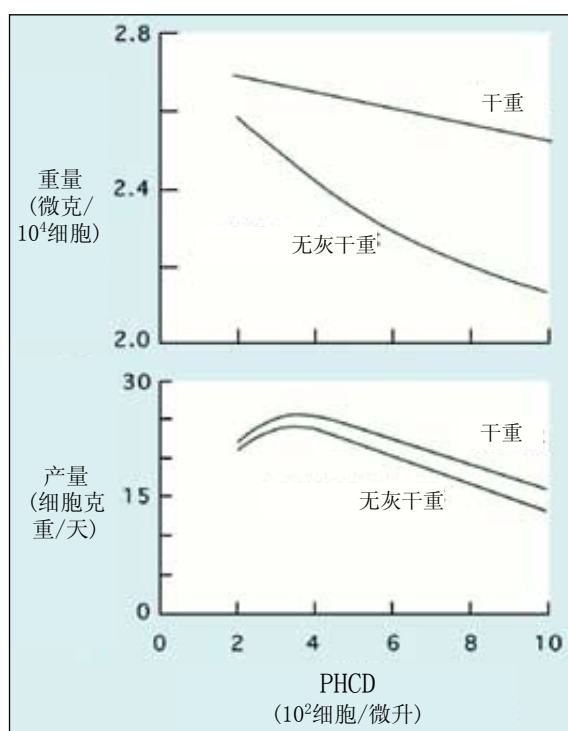


图28: 四片藻在半连续培养条件下, 其产后密度与细胞产量、重量之间的关系。

改善获得最大生产量的培养技术有可能会改变所收获的细胞的个体大小(图28)。随着PHCD值的增加, 光照强度受到明显的影响, 细胞个体大小, 无论是干重还是有机物重都随之下落。然而在正常的PHCD运行范围内, 对最大生产量, 以及对生物量的作用都不是很大。

在单胞藻大规模培养中, 培养液的营养成分对大规模生产的产量也起着重要的作用。图29是培养基对硅藻的作用。硅藻需要硅, 它是以硅酸盐的形式供给硅藻生长的需要, 硅质细胞外壳起到保护细胞质的作用。如果硅元素供应不足, 细胞的生长和分裂的速率下降, 产量也随之下落。在6支80瓦的荧

光灯提供照明的条件下, 比较了每升含30毫克硅(图29A)和每升含5毫克硅(图29C)的培养结果。结果表明, 30毫克硅/升的培养基日最高产量达到了160升(200升的培养器中的细胞密度是6 000个细胞/微升); 而硅含量在5毫克/升的培养基的产量仅仅是74升, 这一产量低于4支荧光灯光照强度和最高硅水平条件下所得到的产量(图29B)。最高产量(图29)要比四片藻在相同培养条件下的高得多。

### 3.4.4 自动化的三级培养

直到目前为止, 所讨论的只是半连续培养系统。虽然劳动强度比批量培养要小些, 但是, 如果每天都要收获培养系统中的藻液, 人力消耗依然是相当大的。结果只得将每日收获改为48小时采收一次, 并且得在低PHCD条件下操作。最高产量目标可以在48小时内达到, 但是光照的限制影响到了总的生产力。为了解决这一问题, 提出了连续培养的方案, 也就是连续采收。当利用光电子控制元件来监测细胞密度后, 这一方案是可行的。图30是由英国Conwy水产研究所研发和使用的这一自动系统的示意图。

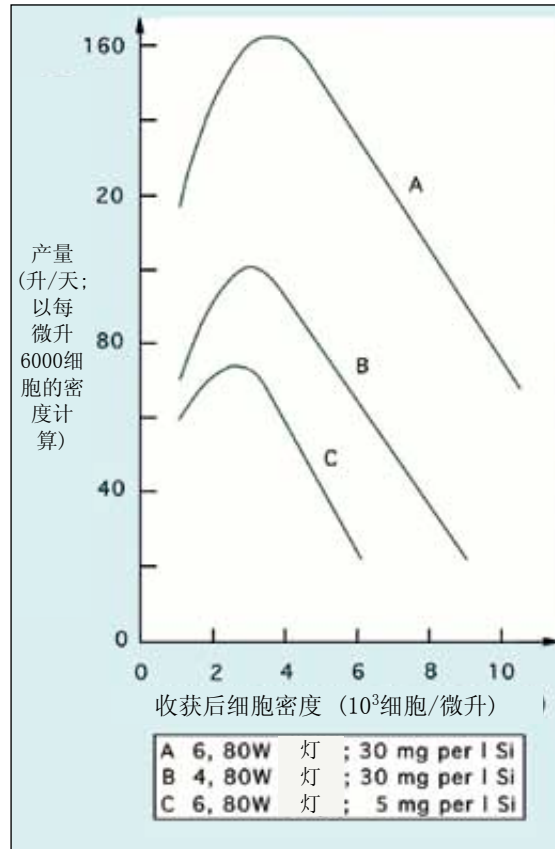


图29: 骨条藻在两个不同光照强度和硅浓度培养条件下, 产后细胞密度(PHCD)和产量的关系。

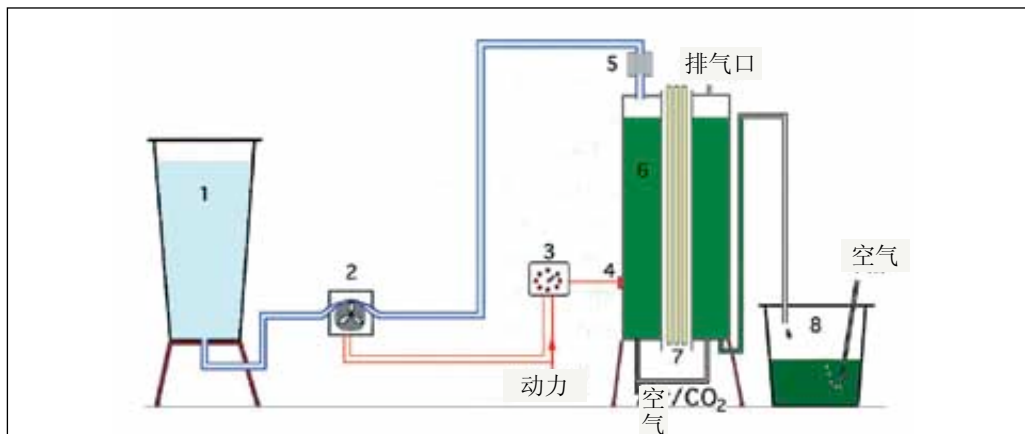


图30: 恒浊器式的藻类连续培养系统。

1. 200升的海水培养基贮槽, 2. 蠕动泵, 3. 电阻传感器(50-5000欧姆), 4. 光敏电阻(ORP12), 5. 桶式过滤器(0.45微米), 6. 80升培养水槽, 7. 6支80瓦荧光灯, 8. 125升藻液收集桶。

该系统的关键部件是一个安装在透明的培养器外面的光控电阻元件(LDR)。当光线穿透培养液到达LDR时, 光照强度随细胞密度的变化而变化。照明用的灯具与三级培养系统中所介绍的一样, 为内置式照明。随着细胞密度的增加, 光线穿透培养液的量下

降,导致LDR值的阻力增加。这一增加值被传输到电阻传感器(RSR),当一个预先设定的电阻值达到时,RSR启动了蠕动泵,向外输送可收获的藻液同时添加相同量的新鲜培养液。RSR可以被调节到细胞最高分裂速率的水平,始终使得收获的藻液浓度达到最大值。一旦培养器内的藻液浓度被稀释,LDR的阻力减少,RSR关闭蠕动泵。

这套设备并不很贵,但很有效,可始终将产量维持在一个高水平上。一个80升的自动化培养器,用来培养等鞭金藻(克隆T-Iso)和四片藻所得到的生产量相当于一台200升的半连续培养器的产量。在培养四片藻时达到了日产100升,每微升的细胞密度是1 000个,在自动化系统内的细胞密度是2 000细胞/微升。等鞭金藻的日产90升(按细胞密度10 000个/微升计算),在培养器内的实际密度是16 000个/微升。

自动化运作的原理并不是什么新发明。利用带有外光源的恒化器和恒浊器来培养微藻早有介绍。这里介绍的Conwy培养器只是在原有的概念上更新和更有效而已。连续培养系统可以垂直安装,也可水平安装,聚乙烯袋式培养器已经实行商业化生产。

### 3.4.5 存在问题 and 解决方案

单细胞藻类培养时常会出现问题,如生长不好,污染生物大量繁殖,即使在管理良好的育苗场里,也会出现“倒池”的事例。下面将来探讨问题出现的原因和解决方案。

1. **充气:**是否有足够量的空气供给培养液? 藻类细胞是否沉淀到培养容器的底部?这类情况时常出现在硅藻的培养中,应该加大充气量。在鞭毛藻的培养中,通常不应该出现这类问题。假如出现了,还得从其他方面去找原因。
2. **温度:**检查一下最高/最低温度。在过去的24小时内,培养设备是否出现过温度上升或下降的现象?大部分培养的微藻不能长时间忍受高于26°C或低于12°C的温度。适宜的温度范围是在18-22°C之间。
3. **PH:** 检查二氧化碳的供应量。二氧化碳气瓶是否用完了?用pH计测定培养液的pH值。大于8.5太高,小于7.5太低。适当调节二氧化碳的供应量。
4. **营养:**检查上一次补充营养盐的记录。这一点对于半连续培养特别重要。
5. **污染:**看看培养容器的壁,特别是气/液交界面上是否有有机碎屑的泡沫或脏物?如果有,这批培养液不可再用了,必须重新更换。如果这类问题出现在某一种藻的培养初期,说明,问题出现在一级培养上,更换上一级培养液是必要的。

并非所有藻类能够全年成功地培养。有时候碰到点子上了,它们可以生长得很稳定,然而,在不同的育苗场之间并不一致,有时候某一种长得好,有时候长得不好。这就需要现场积累经验,强调做好记录的重要性。

### 3.4.6 室外粗放培养

以上介绍的是在人为严格控制下,高生产效率的集约化藻类培养系统,它可以为幼虫、稚贝,乃至暂养的亲贝提供饵料。为了给幼贝等提供大量的单细胞藻,通常是采用室外的大型培养池,利用自然光(图31)。在这类系统中,营养盐只是用氮、磷、硅等最基本的肥料给海水施肥,而目的也不是培养单一的藻种,而是鞭毛藻和硅藻混合群体,犹如

在正常的海水里所包含的藻类一样,但密度却要大的多。如果要生产单一的藻类,海水必须经过小于2微米的筛网过滤,接种所需要的藻种,只要这些藻种活力好,对环境的适应性强即可。只要盐度适合,从井里取水也是可以的。但是生产单一的藻类难以维持较长的时间,因为它很快就会被其它微生物所污染。如同人工接种一样,利用海水中的天然藻类进行多种藻类混合养殖是比较方便的。随着季节和环境条件的变化,海水中的藻类种类也是变化的,这种方式培养的藻类对培育幼体及培养亲体都是有利的。



图31: 微藻室外的大规模培养。

- A - 位于加拿大BC省的育苗场里的圆形-加盖、半透明玻璃钢微藻培养池;
- B - 英国Conwy水产研究所采用的450米<sup>3</sup>的培养天然浮游植物, 喂养稚贝的水泥池;
- C - 委内瑞拉Turpiolito 育苗场培养单一种微藻的水泥池, 池底带有一定的坡度;
- D - 加拿大Nova Scotia育苗场采用 2500 升的玻璃钢“鱼箱”来培养微藻。

在英国Conwy水产研究所, 室外水泥培养池的容积从60米<sup>3</sup> - 450米<sup>3</sup>大小不等。收获的藻类被用来培育稚贝。池内的海水盐度在28-32PSU之间, 来自附近的河口地区。两周为一个生产周期。肥料是在计划生产藻类的前三天添加。

在室外培养中每米<sup>3</sup>海水添加的营养盐是:

尿素(NH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>; 46% N) 1.5克;  
 过磷酸盐(P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; 20% P) 1.56克;  
 硅酸钠(Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O; 13% Si) 10.6克。

NH<sub>2</sub>-N、PO<sub>4</sub>-P和SiO<sub>3</sub>-Si的浓度分别是50微克原子/升、10微克原子/升和50微克原子/升。更为粗放的方法是施用有机肥, 如禽畜粪便。水池中的水深1米时, 每公顷用500千克。这种方法很有效, 成本也低。

藻类繁殖生长的快慢与海水中天然藻类的组成、密度有关, 也还与日光的照时间和光强, 以及营养成分的含量、温度有关。水池或池塘的面积和容积的关系也很重要。水

深1米的水池要比更深的效率高,因为光线可穿透到达池底。如给水池充气也可提高生产率。

生产周期与很多因素有关,如藻类的优势种群和贝类滤食的速率。一般说,7-10天一个周期可以满足要求,收获后,排尽池水,对水池进行清洗,再注满新水。

在繁殖天然微藻的过程中,如果想控制住所需要的种类,可以在添加的营养盐上做些调整。例如,不加硅藻所必需的硅,鞭毛藻就会占优势,因为硅对于硅藻的繁殖是必不可少的。在较小的户外培养水槽中培养微藻,也可以人为地接入在集约化条件下培养的微藻作为藻种。所接入的藻种是否会成为优势种群要看外界的环境条件和其它的竞争对手的存在与否。一般说,在有限的水体内,通过施肥来繁殖微藻供给双壳类育苗和养殖,从技术上考虑是值得的,尤其是在稚贝暂养阶段。通过与海洋环境多个因素作比较,改进微藻的生产是可能的。在海水中通过施肥来繁殖微藻所花费的成本与可观的收入相比是微不足道的,随着贝苗价格的不断上涨更是如此。

### 3.5 参考文献

**Baynes, S.M., Emerson, L. & Scott, A.P.** 1979. Production of algae for use in the rearing of larvae fish. Fish. Res. Tech. Rep., MAFF Direct. Fish. Res., Lowestoft, **53** (3): 13-18

**Bourne, N., Hodgson, C.A. & Whyte, J.N.C.** 1989. A Manual for Scallop Culture in British Columbia. Canadian Tech. Rep. Fish and Aquatic Sciences, No. **1694**: 215 pp.

**Droop, M.R.**, 1975. The chemostat in mariculture. In: G. Persoone and E. Jaspers (eds) Proceedings of the 10th European Symposium on Marine Biology, Ostend, Belgium, 17-23 September 1975. Universa Press, Wetteren, 1: 381-390

**Dunstan, W.M. & Menzel, D.W.** 1971. Continuous culture of natural populations of phytoplankton in dilute treated sewage effluent. Limnol. Oceanogr. **16**: 623-632

**Griffith, G.W., Murphy Kenslow, M.A. & Rose, L.A.** 1973. A mass culture method for *Tetraselmis* sp. - a promising food for larval crustaceans. In: J. W. Avault, Jr. (ed) Proceedings of the 4th Annual Workshop of the World Mariculture Society. Louisiana State University, Baton Rouge: 289-294

**Guillard, R.L.** 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates, p. 29-60. In: P.B. Smith (ed) Culture of Marine Invertebrates. Plenum Press, New York.

**Harrison, P.J., Waters, R.E. & Taylor, F.J.R.** 1980. A broad spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton. J. Phycol. **16**: 28-35

**Helm, M.M., Laing, I. & Jones, E.** 1979. The development of a 200 l algal culture vessel at Conwy. Fish. Res. Tech. Rep., MAFF Direct. Fish. Res., Lowestoft, **53** (1): 1-7

**Kranck, K. & Milligan, T.** 1979. The Use of the Coulter Counter in Studies of Particle Size Distributions in Aquatic Environments. Bedford Inst. Oceanography. Dartmouth, Nova Scotia. Rep. Ser. BI-R-79-7: 48 pp.



- Laing, I.** 1979. Recommended procedures for the culture of *Chaetoceros calcitrans*. Fish. Res. Tech. Rep., MAFF Direct. Fish. Res., Lowestoft, **53** (2): 8–12
- Laing, I.** 1985. Growth response of *Chaetoceros calcitrans* (Bacillariophyceae) in batch culture to a range of initial silica concentrations. Mar. Biol., **85**: 37–41
- Laing, I.** 1987. The use of artificial diets in rearing bivalve spat. Aquaculture, **65**: 243–249
- Laing, I.** 1990. Nutritional value of dried algae diets for larvae of Manila clam, *Tapes philippinarum*. J. Mar. Biol. Assoc., UK, **70**: 1–12
- Laing, I. & Ayala, F.** 1987. Commercial mass culture techniques for producing microalgae. p 447–477. In: Akatsuka (ed) Introduction to Applied Phycology. Academic Publishing, The Hague, The Netherlands
- Laing, I. & Helm, M.M.** 1981. Cost effective culture of marine unicellular algae. In: F. Vogt (Ed) Energy Conservation and Use of Renewable Energies in the Bio-Industries. Pergamon Press, Oxford: 247–259
- Laing, I. & Helm, M.M.** 1981. Factors affecting the semi-continuous production of *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch. in 200 l vessels. Aquaculture, **22**: 137–148
- Laing, I. & Jones, E.** 1983. Large scale turbidostat culture of marine microalgae. Aquacultural Engineering, **2**: 203–212
- Laing, I. & Jones, E.** 1988. A turbidostat vessel for the continuous culture of marine microalgae. Aquacultural Engineering, **7**: 89–96
- Langdon, C.J. & Waldock, M.J.** 1981. The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat. J. Mar. Biol. Assoc. UK, **61**: 431–448
- Mann, R. & Ryther, J.H.** 1977. Growth of six species of bivalve molluscs in a waste recycling aquaculture system. Aquaculture, **11**: 231–245
- Roels, O.A., Haines, K.C. & Sunderlin, J.B.** 1975. The potential yield of artificial upwelling mariculture. In: G. Persoone and E. Jaspers (eds) Proceedings of the 10th European Symposium on Marine Biology, Ostend, Belgium, 17–23 September 1975. Universa Press, Wetteren, **1**: 381–390
- Sheldon, R.W. & Parsons, T.R.** 1967. A Practical Manual for the Use of the Coulter Counter in Marine Science. Coulter Electronics, Toronto, Ontario: 66 pp.
- Spencer, B.E.** 1988. Growth and filtration of juvenile oysters in experimental outdoor pumped upwelling systems. Aquaculture, **75**: 139–158
- Stein, J.R.** 1973. Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge University Press, Cambridge, England: 448 pp.
- Trotta, P.** 1981. A simple and inexpensive system for continuous monoxenic mass culture of marine microalgae. Aquaculture, **22**: 383–387

- Ukeles, R.** 1973. Continuous culture – a method for the production of unicellular algal foods. In: J.R. Stein (ed), *Handbook of Phycological Methods, Culture Methods and Growth Measurements*. Cambridge University Press, Cambridge: 233–254
- Ukeles, R.** 1973. Cultivation of plants. In: O. Kinne (ed.), *Marine Ecology*, John Wiley and Sons, New York, NY, *Cultivation*, 3 (1): 367–466
- Walne, P.R.** 1970. Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria*, and *Mytilus*. *Fishery Invest.*, Lond., Ser. 2, 26 (5): 1–62
- Webb, K.L. & Chu, F.-L.E.** 1983. Phytoplankton as a source of food for bivalve larvae. In: (eds: Pruder, G.D., Langdon, C. & Conklin, D.) *Proceedings of the 2nd International Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition*, October 1981, Rehoboth Beach, Delaware. Louisiana State University Press, Baton Rouge: 272–291
- Whyte, J.N.C.** 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture*, 60: 231–241
- Wisley, B. & Purday, C.** 1961. An algal mass culture unit for feeding marine invertebrate larvae. *Tech. Pap. Div. Fish. Oceanogr. CSIRO, Australia*, 12: 2–12