

## CO<sub>2</sub> 对牟氏角毛藻高密度培养的影响

# Effects of CO<sub>2</sub> on High Density Culture of *Chaetoceros mulleri*

邹宁\*, 孙东红, 韩亚香

ZOU Ning\*, SUN Dong-Hong and HAN Ya-Xiang

烟台师范学院生命科学学院, 烟台 264025

Life Science College of Yantai Normal College, Yantai 264025, China

**摘要** 以牟氏角毛藻为材料, 通过对比实验研究了 CO<sub>2</sub> 和 CO<sub>2</sub> 通入方式对光合生物反应器中高密度培养的牟氏角毛藻的生长速度和细胞密度的影响, 并以水体 pH 值为指标, 控制 CO<sub>2</sub> 的通入数量, 进而研究了牟氏角毛藻在我们自行研制的卧式光合生物反应器中的生长情况。结果表明细胞悬浮培养达到一定密度之后, CO<sub>2</sub> 的供应, 可以有效地提高生长速度和细胞密度。对 CO<sub>2</sub> 通入方式的实验结果表明, 不同的 CO<sub>2</sub> 通入方式, 产生的效果不同, 其中以空气和纯 CO<sub>2</sub> 混合后通入, 效果最好。

**关键词** 牟氏角毛藻, 光合生物反应器, 生长动力学, CO<sub>2</sub>

中图分类号 TQ92 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)05-0844-04

**Abstract** The effect of CO<sub>2</sub> and the manner of CO<sub>2</sub> offer on the growth rate and maximal cell density of ultra-high density culture of *Chaetoceros mulleri* in the photobioreactor were studied in the work. The amount of CO<sub>2</sub> offered to the culture was controlled by the parameter of pH value in the culture. Furthermore the growth kinetics of *Chaetoceros mulleri* in the photobioreactor was studied. The results showed requirement of CO<sub>2</sub> by the cells and the increase of pH in the culture were the key limiting factors to the growth, when a high cell concentration in the culture was reached. The offer of CO<sub>2</sub> could improve the statute of CO<sub>2</sub>, could control the pH in the culture and increase the growth rate and maximum cell density. The results from the experiments of CO<sub>2</sub> offer manner showed different efficiency to growth was resulted from differences of CO<sub>2</sub> offer manner. The best way is mixing the CO<sub>2</sub> and air before the CO<sub>2</sub> was offered to the culture.

**Key words** *Chaetoceros mulleri*, photobioreactor, growth kinetics, CO<sub>2</sub>

近几年海参养殖发展迅猛, 但是作为海参育苗关键环节的开口饵料——牟氏角毛藻的工程化生产, 却研究甚少。产业界一直采用落后的水泥池开放式培养技术, 风险高、效率低, 细胞密度只能维持在每毫升 100 万 ~ 200 万<sup>[1]</sup>, 科研水平的细胞密度也仅仅达到每毫升 480 万细胞<sup>[2,3]</sup>。今年我们采

用先进的生物反应器技术, 在全自动化控制条件下封闭式培养牟氏角毛藻获得成功, 将细胞密度提高到每毫升 1000 万以上。然而, 光合作用以 CO<sub>2</sub> 作为基质消耗, 并引起了 pH 变化, 采用添加大量的 NaHCO<sub>3</sub> 会导致海水中多种重要离子的沉淀<sup>[4,5,6]</sup>并使生产成本提高, 本研究对 CO<sub>2</sub> 的通入模式

Received: April 14, 2005; Accepted: June 10, 2005.

This work was supported by a grant from Ministry of Education(No.415-000431) and a grant from Yantai Science and Technology Development Plan(No. 2004237).

\* Corresponding author. Tel: 86-535-6681121; E-mail: ningzou76@hotmail.com

教育部留学回国人员基金项目(No.415-000431)和烟台市科技发展计划项目(No.2004237)资助。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

及其对 pH 值、细胞密度、生长速率的影响进行了研究。

CO<sub>2</sub> 的来源广泛,利用 CO<sub>2</sub> 促进微藻细胞的生长,具有良好的经济价值。CO<sub>2</sub> 对微藻的光合作用及固碳效率的影响,已有广泛的研究<sup>[4,7,8]</sup>。但 CO<sub>2</sub> 及 CO<sub>2</sub> 通入方式对微藻生长速度及细胞密度的影响报道不多。本文对 CO<sub>2</sub> 影响条件下牟氏角毛藻的生长繁殖及其与环境条件之间的相互关系进行了研究。

CO<sub>2</sub> 的通入方式,是以单纯 CO<sub>2</sub>,还是将 CO<sub>2</sub> 与空气混合后通入?哪种方式最有效?国内外研究很少。本人在国外工作时,两种方法均采用过<sup>[9,10,11]</sup>,在以色列本-古里安大学采用的是后者,在葡萄牙的实验室里采用的是前一种方法。但在两种方法的效果方面没有做过比较。本文对两种方法进行了对比实验。

此外,CO<sub>2</sub> 通入量在以往的实验中,均没有从经济成本的角度进行过考虑。以自然日光为光源时,由时间自动控制仪,通过电磁阀将 CO<sub>2</sub> 通气管随日出和日落自动开关。而室内由人工光源进行 24h 不间断照光实验时,则每天 24h 不间断提供 CO<sub>2</sub>。这从理论上分析,是没有必要的。CO<sub>2</sub> 不足时要通入,充足时可以停止。以什么为标准来确定何时开通,何时停止?本文采用水体中 pH 值作为 CO<sub>2</sub> 通入与否的指标。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

牟氏角毛藻(*Chaetoceros mulleri*)藻种由烟台师范学院经济藻类种质库提供。

### 1.2 培 养 容 器

采用卧式平板藻类光合生物反应器<sup>[12]</sup>,光径 10cm,体积 40L,反应器底部安装由玻璃条固定的多孔通气管。向培养体系中通入纯 CO<sub>2</sub> 的生物反应器,在反应器底部中央单独安装一个 CO<sub>2</sub> 通气头。

### 1.3 培 养 方 法 与 培 养 条 件

在大小、形状、容积、光径完全相同的光合生物反应器中同时接入相同的藻种,在相同的条件下进行培养。温度为 13~18℃。光照为室内日光散射光。海水取自烟台市北郊海边自然海水,经沉淀、过滤、煮沸后,加入培养基母液制成培养基(培养基母液:NaNO<sub>3</sub> 100g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 g/L, Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> 10 g/L, 柠檬酸铁 1 g/L)。培养基初始 pH 为 8.2。

实验分为三组:第一组通入空气和 CO<sub>2</sub> 混合气,第二组通入空气,并在需要时通入纯的 CO<sub>2</sub> 气,第三组只通入空气。在三个反应器中定期加入营养液,以避免营养源成为细胞生长的限制因子。

### 1.4 生 长 测 定 方 法

用血球计数板计数细胞数,用紫外分光光度计测定光密度值确定藻的生长情况。

### 1.5 生 长 计 算

$$\text{比生长速率 } \mu = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_2 - t_1)^{[13]}$$

## 2 结 果 与 讨 论

### 2.1 光合生物反应器培养牟氏角毛藻的生长动力学

采用上述光合生物反应器,在全封闭和自动监控的适宜条件下,进行牟氏角毛藻生长动力学研究,通过实验得出不同培养条件下牟氏角毛藻细胞的生长随时间变化的动力学关系(图 1)。由结果可见,在自动监控的全封闭高效光合生物反应器中,牟氏角毛藻的培养密度达到了  $2.28 \times 10^7$  /mL。指数生长期生长速率达 0.309。

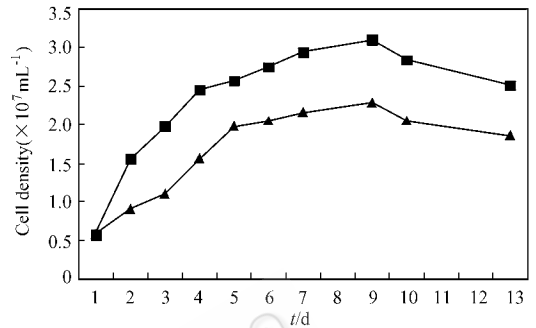


图 1 CO<sub>2</sub> 对牟氏角毛藻细胞密度的影响

Fig. 1 Effects of CO<sub>2</sub> on the cell density of *Chaetoceros mulleri* in the culture (—■—CO<sub>2</sub> offer; —▲—control)

### 2.2 CO<sub>2</sub> 对牟氏角毛藻生长的动力学影响

CO<sub>2</sub> 对微藻生长和生理的影响是多方面的,它不仅通过对培养体系的 pH 的调节作用促进牟氏角毛藻的生长,提高细胞酶的活性,更重要的是为细胞光合作用提供必需的碳源。微藻细胞在进行光合作用时,吸收大量的 CO<sub>2</sub>,导致培养体系 pH 值的升高。因此,CO<sub>2</sub> 的缺乏不仅会影响光合作用的效率,而且通过 pH 的变化影响细胞中酶的活性,进而影响藻类细胞的生长繁殖。CO<sub>2</sub> 的通入引起培养液中 pH 值和溶解性无机碳发生变化,还表现在酶对 CO<sub>2</sub> 的亲合力下降和 CO<sub>2</sub> 的补偿点升高<sup>[14]</sup>。本文通过控制 pH 值的变化来控制 CO<sub>2</sub> 的通入量,可以更有效地提高 CO<sub>2</sub> 的利用效率,降低生产成本。

在低光下,当细胞密度升高到一定程度,光照就成为生长的限制因子。提高光照强度,培养液中碳源的不足就凸现出来,成为新的生长限制因子。CO<sub>2</sub> 的加入能够引起培养液中 CO<sub>2</sub> 分压的增加和无机碳源浓度的提高,使细胞内 CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 的比例提高,有利于催化双向反应的酶——Rubisco 酶主要起羧化酶的作用,抑制光呼吸,引起净光合作用效率的进一步提高<sup>[15]</sup>。图 1、图 2 和表 1 所示的结果显示,CO<sub>2</sub> 的通入明显的提高了牟氏角毛藻细胞的生长速率及其在相同培养体系中所能达到的最高细胞浓度,CO<sub>2</sub> 对藻细胞生长的促进作用主要表现在对数生长期。图 2 中的 OD(光密度值)代表的是细胞干重的变化情况,因为在我们以往的工作中已经证实细胞数量的变化反映细胞的繁殖情况,而细胞干重反映的是细胞生长和细胞内代谢物质积累情况,细胞干重和 OD 值之间的相关性大于 0.95<sup>[9,11]</sup>。

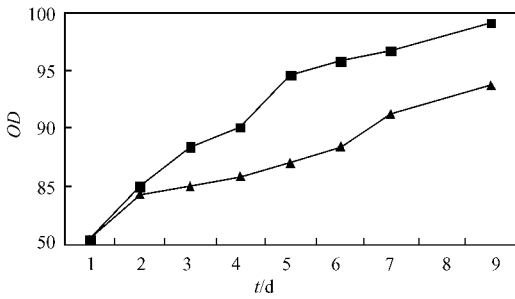


图2 CO<sub>2</sub>影响下 OD 值的变化

Fig. 2 Effects of CO<sub>2</sub> on the optical density of the culture  
(—■—CO<sub>2</sub> offer ; —▲—control)

表 1 CO<sub>2</sub> 对生物反应器中牟氏角毛藻比生长速率  $\mu$  的影响

Table 1 Effects of CO<sub>2</sub> on the specific growth rate  $\mu$  of

*Chaetoceros mulleri* in the photobioreactor

	Control	Pure CO <sub>2</sub> was offered	CO <sub>2</sub> mix with air
$\mu$	0.309	0.408	0.483
Maximal cell density( $10^7$ mL <sup>-1</sup> )	2.28	2.85	3.10
Increase rate of $\mu$ /%		32	56
Increase rate of cell density/%		25	36

2.3 CO<sub>2</sub> 通入方式对牟氏角毛藻生长速度和最高细胞密度的影响

在封闭式光合生物反应器中高效培养微藻时, 通入 CO<sub>2</sub> 的浓度有人进行过研究<sup>[16]</sup>。在生产和实际操作中, 将纯的 CO<sub>2</sub> 单独通入也取得了较好的生产效果<sup>[11]</sup>。究竟哪种通入方式较好, 没有进行过比较。从本文的结果显示, CO<sub>2</sub> 和空气混合后通入, 藻细胞生长速率比通入纯 CO<sub>2</sub> 加快 18.4% (表 1, 图 3); 所能达到的最大细胞密度也明显提高(8.8%) (图 3)。CO<sub>2</sub> 和空气混合通入, 培养液中溶解性无机碳比例会降低, 牟氏角毛藻对游离无机碳的半饱和常数增加<sup>[17]</sup>, 生长加快。

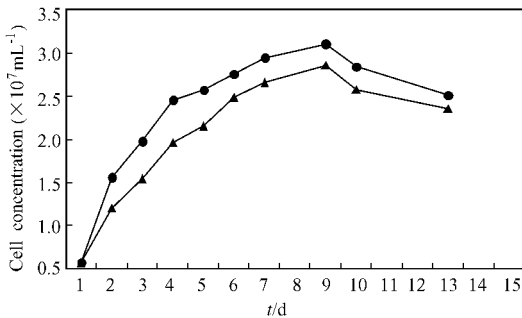


图 3 CO<sub>2</sub> 通入方式对牟氏角毛藻的生长速度及最大生长密度的影响

Fig. 3 Effects of the manner of CO<sub>2</sub> offer on the growth rate and maximum cell density of *Chaetoceros mulleri*  
(—●—CO<sub>2</sub> and air mixed before bubbled into the culture ; —▲—pure CO<sub>2</sub> and air offered separately)

此外, CO<sub>2</sub> 应该通入多少量? 以往的实验中, 均是伴随着日光光照进行的。本文采用水体中 pH 值作为指标, 决定 CO<sub>2</sub>

的通入与否。当培养体系中 pH 高于 8.3 时, 开通 CO<sub>2</sub> 供气系统, pH 会有短时间的继续上升, 然后开始下降, 降至 pH 值为 8.0 时, 关闭 CO<sub>2</sub> 供气系统, 使 pH 始终保持在牟氏角毛藻生长最适范围之内(图 4)。而对照组的 pH 值却在上午 9 点 20 分超过 8.3 之后, 进一步上升, 直至下午 3 点半才停止升高, 然后很长一段时间维持在最高水平, 日落时才开始下降。严重影响光合作用效率和细胞的生长速度。因此, 以能真实、灵敏地反映水体中 CO<sub>2</sub> 变化状况的 pH 值作参数, 控制 CO<sub>2</sub> 的供应量, 可以在提高产量的同时, 有效地降低生产成本。

本文通过对 CO<sub>2</sub> 的供应方式、供应量、监控参数, 以及对 CO<sub>2</sub> 与牟氏角毛藻细胞生长繁殖之间的相互关系的研究, 为海参育苗重要饵料——牟氏角毛藻在生物反应器中工程化高效率、低成本的生产提供了科学的方法和技术依据。

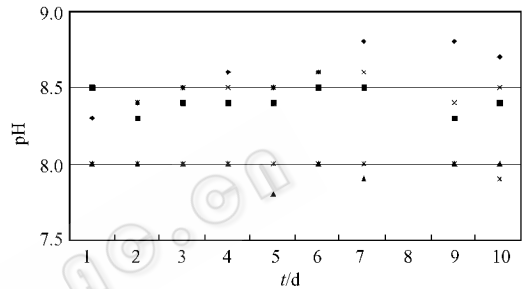


图 4 培养液中 pH 值的变化

Fig. 4 Changes of pH in the culture

(—●—control ; —■—before the pure CO<sub>2</sub> offer ; —▲—after the pure CO<sub>2</sub> offer ; —x—before the offer of the CO<sub>2</sub> and air mixture ; —\*—after the offer of the CO<sub>2</sub> and air mixture)

致谢 在此实验过程中, 得到王玉彬、魏丕伟、郭立等同志的帮助, 在此表示衷心的感谢。

REFERENCES (参考文献)

[ 1 ] Zhu JQ(竺俊全), Zhao QS(赵青松), Shi GD(石钢德). The culture technology of pure unicellular algae in mud clam seed production. *Fisheries Science* (水产科学), 2000, **19**(3) 22-24

[ 2 ] Yuan YX(袁有宪), Qu KM(曲克明), Xin FY(辛福言). Optimum concentration of microelements in seawater culture solution of marine algae culture. *Journal of Fishery Sciences of China* (中国水产科学), 1998, **5**(2) 45-51

[ 3 ] Wang K(王侃). Preliminary test on using plastic white barrels in the commercial culture of microalgae. *Journal of Zhejiang Ocean University* (Natural Science) (浙江海洋学院学报), 2000, **19**(2) : 189-191

[ 4 ] Hu HH(胡晗华), Gao KS(高坤山). Effect of concentrated CO<sub>2</sub> on *Spirulina*. *Journal of Hydrobiology* (水生生物学报), 2002, **25** (6) 374-380

[ 5 ] Lin HM(林惠民). Compare research among *Spirulina salina* and other species of *Spirulina*. *Journal of Hydrobiology* (水生生物学报), 1991, **15**(1) 27-34

[ 6 ] Zou N(邹宁). Development of algal photobioreactor and its

- [ 7 ] Hu HH( 胡晗华 ), Dai LF( 戴铃芬 ), Dai HP( 戴和平 ) *et al.* Components of amino acids and fatty acids in a species of marine yellow alga. *Journal of Applied and Environmental Biology*( 应用与环境生物学报 ), 1999 , **5** :487 - 490
- [ 8 ] Li YQ( 李夜光 ), Hu HJ( 胡鸿钧 ). Studies on the characterizations of CO<sub>2</sub> absorption by *Spirulina* culture. *Wuhan Botany Research*( 武汉植物学研究 ), 1996 , **14** ( 3 ) :253 - 260
- [ 9 ] Zou N , Zhang C , Cohen Z *et al.* Production of cell mass and eicosapentaenoic acid ( EPA ) in ultrahigh cell density cultures of *Nannochloropsis* sp. ( Eustigmatophyceae ). *European Journal of Phycology* , 2000 , **35** ( 2 ) :127 - 133
- [ 10 ] Zou N , Richmond A. Light-path length and population density in photoacclimation of *Nannochloropsis* sp. ( Eustigmatophyceae ). *Journal of Applied Phycology* , 2000 , **12** :349 - 354
- [ 11 ] Navalho J , Cristo C , Valle-Inclan Y , *et al.* " Hytobloom " : microalgae solution for aquaculture. Lavi ' 01-fish & shellfish larviculture symposium. C. I. Hendry , G. Van Stappen , M. Wille and P. Sorgeloos ( Eds ). European Aquaculture Society , Special Publication No. 30. Oostende , 2001 , 412 - 415
- [ 12 ] Zou N , Richmond A. Effect of light path length in flat plate reactors outdoors on output rate of cell mass and EPA in *Nannochloropsis* sp. *Journal of Biotechnology* , 1999 , **70** :351 - 356
- [ 13 ] Pirt SJ. Principles of microbes and cell cultivation. Blackwell Scientific , Oxford , 1975
- [ 14 ] Kitano M , Matsukawa K , Karve I. Enchanted encosapentaenoic acid production by *Navicula saprophils* . *J Appl Phycol* , 1998 , **10** :101 - 105
- [ 15 ] Vonshak A , Richmond A. Mass production of the blue—green alga spirulina :an overview. *Biomass* , 1984 , **4** :105 - 125
- [ 16 ] Richmond A. A prerequisite for industrial microalgaculture : efficient utilization of solar irradiance. In : *Algal Biotechnology* ( Stadler T *et al* eds. ). Elsevier Applied Science Publishers , Essex , 1988 , pp.237 - 244
- [ 17 ] Vonskak A , Boussiba S , Abellovich A *et al.* Production of *Spirulina* biomass : maintenance of monoalgal culture outdoors. *Biotechnology and Bioengineering* , 1983 , **25** :341 - 349