

Isochrysis galbana 的培養研究

高炳昀

Studies on the Culture of *Isochrysis galbana*

Ping-Yun Kao

This study deals with the influence of nutrients, salinity and pH value on the growth of *Isochrysis galbana* in the laboratory.

The culture in marine medium without nitrogen caused serious damage to the growth of *Isochrysis galbana*. The growth of *Isochrysis galbana* was retarded in the media lack of phosphorus, vitamin and iron. The marine medium without adding MgSO₄ or EDTA showed a little influence on the growth of *Isochrysis galbana*. Additional trace metals in the marine medium inhibited the growth of *Isochrysis galbana*.

Isochrysis galbana is a euryhaline algae, the optimal salinity and pH is 10-25‰ and 7-8, respectively.

前 言

Isochrysis galbana 是一種黃色鞭毛藻，屬於 Haptophyceae 綱、Isochrysidales 目、Isochrysidaceae 科⁽¹⁾。其形狀為橢圓形，長度約 5~7 μ，前端有兩根鞭毛。

Isochrysis galbana 為飼育 2 枚貝之良好餌料生物⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾，在做貝類繁殖時，經常以 *Isochrysis* 為餌料生物，而如何能適時充分供給良好的餌料生物，為貝類繁殖成敗的關鍵⁽⁵⁾。因此有必要探討此種藻類對環境的適應能力，進而確立其培養的技術。Kain and Fogg (1958) 以及 Laing, I. and Utting, S. D. (1980)⁽⁶⁾ 均曾對 *Isochrysis galbana* 做過有關鹽度對其生長影響的試驗，而對於有關培養方面的報告尚不多見。

本試驗之目的在於探討 *Isochrysis galbana* 對營養鹽之需求及其最適生長之鹽度、pH 值，以便尋找出一種簡單又迅速的培養方法，做為培養此種藻類的參考。

材料與方法

一、材料：

由保存於試管中之 *Isochrysis galbana* 斜面培養，挑取長得較好的 Colony，在合成培養基中作 Stock culture。

在試驗中所用之海水為過濾後經高溫高壓 (120°C、5 分鐘) 滅菌，試驗用的培養瓶均使用 250 ml 的三角燒瓶，在試驗前經徹底洗淨烘乾後使用。

本試驗所有的培養均在溫度 26°C、照度 3500 lx 的生長箱 (Growth Chamber) 內進行，每日光照 16 小時，培養時均予以打氣。

二、試驗方法：

(一) 營養鹽需求試驗：

以 Table 1 所列之營養鹽成份為控制組 (A 組)，以每組少添加或多添加某一種成份為實驗組，詳如 Table 4，總共 8 組，2 重複。每組開始時密度為 2.3×10^4 cells/ml，經數天後以波長 460 nm 測吸光度，以決定其生長情形。

(二) 鹽度試驗：

以蒸餾水及氯化鈉調整海水之鹽度，調成 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50% 之鹽度，共 10 組，2 重複。各組營養鹽成份及添加量如 Table 4 所示。每天定時以 460 nm 之波長測各組之吸光度，以觀察其生長情形。

(三) 酸鹼度試驗：

以 HCl 及 NaOH 調整 pH 值為 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 共 7 組，2 重複，因 PH 值會隨藻類之成長而變化，故每天均再調 pH 值，使各組都維持在試驗 PH 之值，每天以波長 460 nm 測吸光度。各組之營養鹽成份及添加量亦如 Table 1. 所示。

表 1 控制組的營養鹽成份

Table 1 Composition of Control Group (Group A)

NaNO ₃	100mg
K ₂ HPO ₄	20mg
FeCl ₃	1mg
Na ₂ EDTA	4.5mg
MgSO ₄	20mg
V soln.	0.1mg
Sea water	1 l

表 2 M 液的成份

Table 2 Composition of M solution

Zn Cl ₂	20mg
Co Cl ₂ · 6 H ₂ O	20mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O	9mg
Cu SO ₄ · 5 H ₂ O	20mg
Distilled water	1 l

表 3 V 液的成份

Table 3 Composition of V solution

Thiamin HCl	100mg
Cyanocobalamin	10mg
Distilled water	100ml.

表4 實驗組的營養鹽成份
Table 4 Composition of Experiment Group (Group B-H)

Group	Composition
B	A-NaNO ₃
C	A-K ₂ HPO ₄
D	A-FeCl ₃
E	A-MgSO ₄
F	A-V soln.
G	A-Na ₂ EDTA
H	A+M soln. (1 ml)

結 果

一、營養鹽需求：

在不同營養鹽成份的培養下，在第6天及第10天測得各組在波長460 nm的吸光度 (Fig. 1)，結果以控制組 (A組) 成長最好，十天後達到吸光度 1.142 (2.16×10^7 cells/ml)。以A組為標準，各組和A組的差異亦如 Fig. 1 所示。在開始前6天，各組之成長除不加NaNO₃的B組外，各組差距尚不明顯。但至第10天各組成長差距較為顯著，顯示出 *Isochrysis galbana* 對各種營養鹽成份需求之程度。各組中以不添加NaNO₃的影響最大，十天後只達到A組的6.1%，其他不添加K₂HPO₄、FeCl₃、MgSO₄、EDTA、維他命B₁和B₁₂之組，十天後分別達到A組的36.6%、58.3%、75.4%、79.7%、36.8%。而添加微量元素M液反而成長不佳，十天後只達到A組的31.5%。

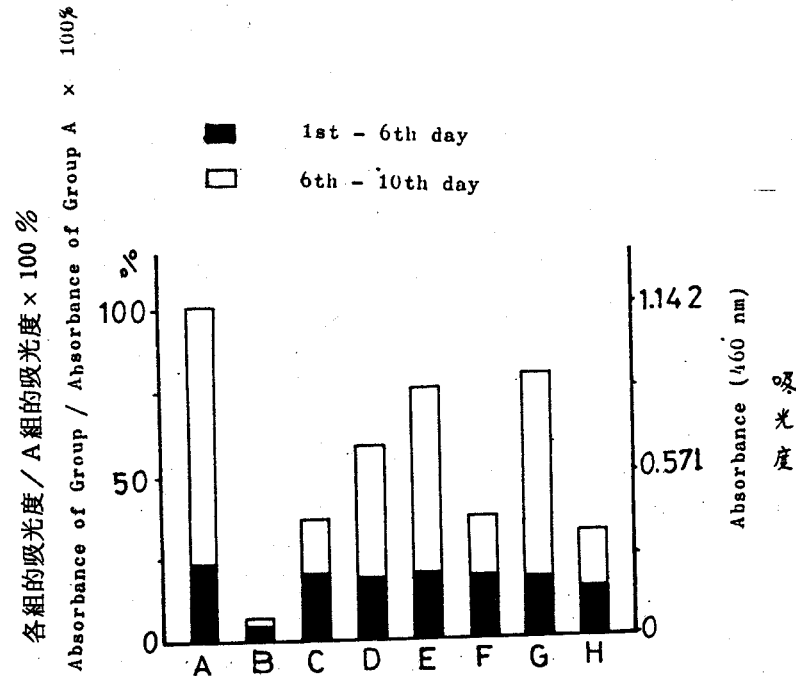


圖1 在不同培養液培養下，十天後的成長情形

Fig.1 Growth of *Isochrysis galbana* after 10-day cultivation in various media

二 鹽度對成長的影響：

Isochrysis galbana 在各種鹽度下培養，各組生長情形如 Fig.2 所示，顯示其為一廣鹽性的藻類，在鹽度 5 ~ 50 ‰ 的範圍均可生長，而其最適鹽度為 10 ~ 25 ‰。

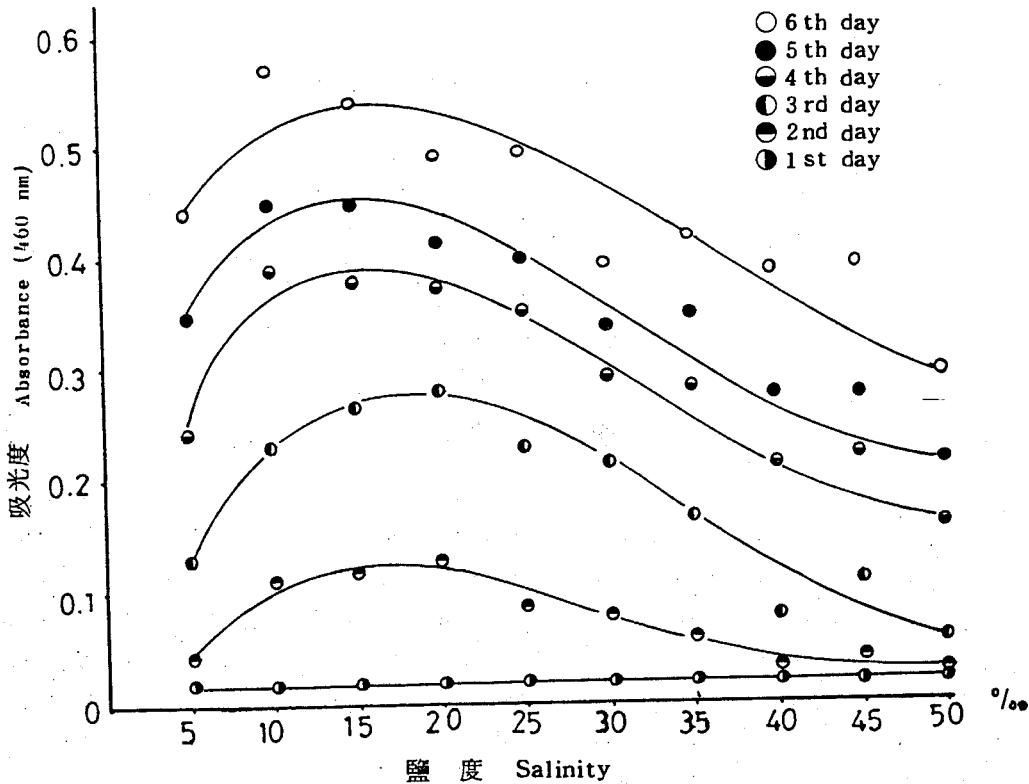


圖 2 在不同鹽度下，*Isochrysis galbana* 的生長情形
Fig.2 Growth of *Isochrysis galbana* in different salinities

三 pH 值對成長的影響：

不同 pH 值培養下各組每天之成長情形如 Fig.3 所示，以 pH 值維持在 7.0 者成長最好，最適 pH 值在 7~8 間，此範圍內成長最快。在 pH 7 以下，pH 值愈低成長愈慢。在 pH 9 時，開始時成長快，但經 2 天後却緩慢下來，顯示在此 pH 值下成長不穩定。而在 pH 10 時，細胞大部份已破裂而死亡，所以成長最差。

討 論

在培養基中未添加 NaNO_3 對 *Isochrysis galbana* 成長有很大的影響。此因氮為構成氨基酸、蛋白質、酶、輔酶、核酸、葉綠素、細胞膜等重要之代謝有機化合物⁽⁷⁾，培養液中若缺乏氮源，則藻類無法合成這些物質，而阻礙其細胞的分裂與增長。另在本試驗中曾將未添加 NaNO_3 之 B 組於實驗完後，加入尿素，其生長隨即恢復正常，顯示此種藻類亦可以利用尿素為氮源。

磷是一般藻類生長所必需的主要元素之一。因在生物體內，含磷的化合物在新陳代謝過程中，扮演重要的角色，尤其是在能量轉換反應中⁽⁸⁾。因此缺磷會限制藻類的生長。但某些藻類在磷充足的情況下，能吸收比藻類本身所需更多的磷，它們可以利用這些磷在缺乏磷的環境下繼續生長一段時間^(8,9)。而在本實驗中，亦有此種情形發生，在前幾天雖然培養液中缺磷，但 *Isochrysis galbana* 仍能生長一段期間，所以在第 6 天時與控制組相差不大，而在 6~10 天時，因嚴重缺磷生

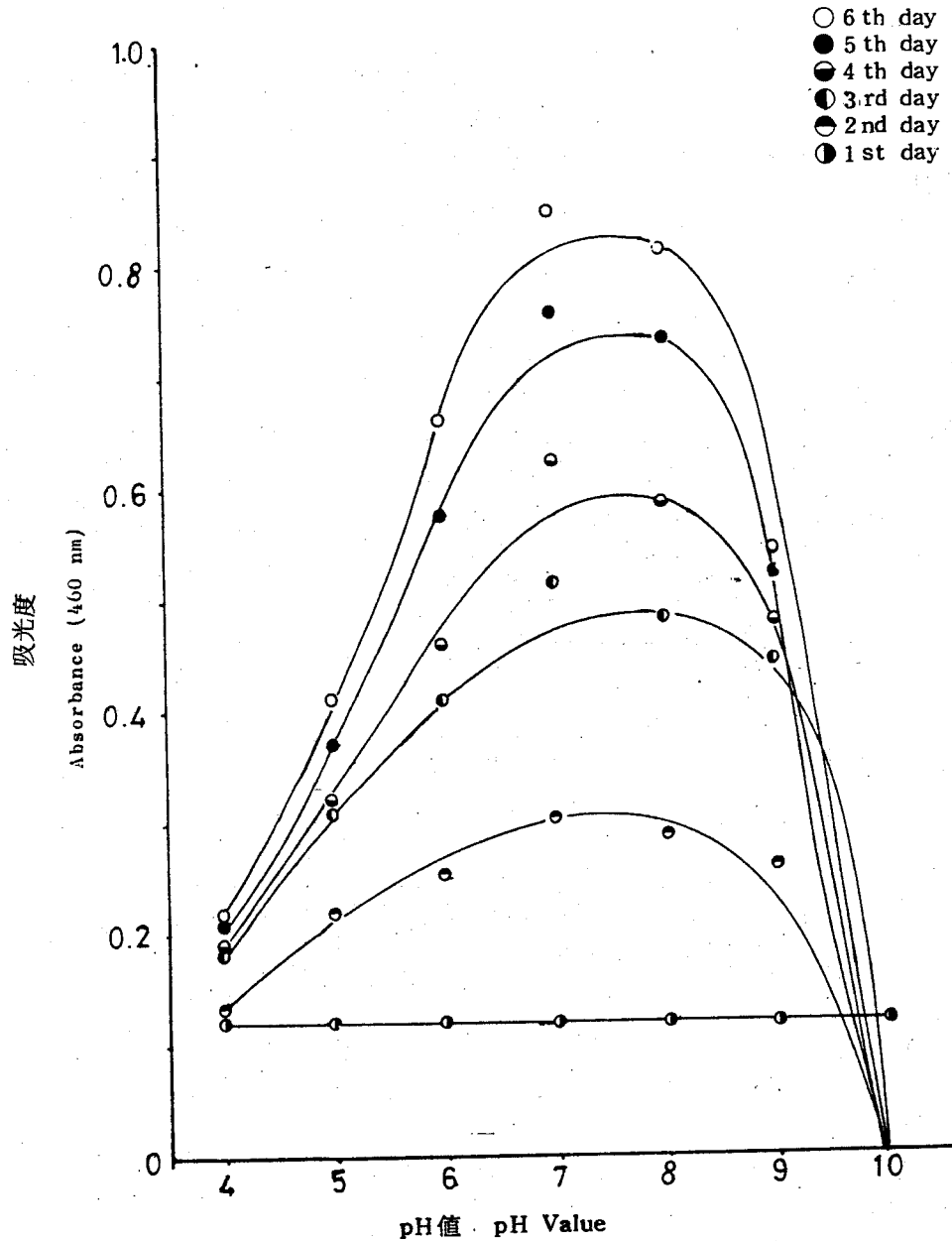


圖3 pH值對 *Isochrysis galbana* 生長的影響
 Fig.3 Effect of pH on the growth of *Isochrysis galbana*

長才緩慢下來。

鐵為多種酵素、細胞色素和某些卟啉 (Porphyrins) 的組成成份，且為合成葉綠素所必需。缺鐵會使葉綠素的含量減少，降低光合作用的速率，因而妨礙藻類的生長⁽⁶⁾。在本實驗中，不添加 FeCl_3 的D組，十天後只達到A組的 58.3%，顯示培養基中缺鐵會阻礙 *Isochrysis galbana* 的成長。

鐵為葉綠素分子中之金屬元素，也是形成接觸酵素 (Catalase) 所必需⁽⁸⁾。硫為某些氨基酸及輔酶A之組成成份，大部份的藻類都能利用 SO_4^{2-} 為硫的來源。然而在本實驗中，不添加 MgSO_4 之E組，十天後為A組的 75.4%，兩者相差並不大，這可能是海水本身含有豐富的鎂 (1.326 g/l)

)及硫(0.928g/l)¹⁰的緣故。

一般藻類生長所需要的維他命只有Cyanocobalamin (B₁₂)、Thiamine (B₁)、Biotin 等三種，其中大部份的藻類需要B₁₂或B₁，少部份的藻類才需要biotin⁽⁶⁾。在本實驗中，不加維他命的F組，十天後僅為控制組的36.8%，兩者相差頗大，顯示*Isochrysis galbana*成長需要吸收維他命B₁或B₁₂。

於本實驗中，不添加EDTA的G組，至第10天達到A組的79.7%，與控制組相差不大。因此在培養液中不添加EDTA對*Isochrysis galbana*成長影響不大，而添加EDTA仍稍具有促進生長的作用，其原因可能是EDTA能與培養液中之金屬離子結合成穩定的螯狀化合物，使一些金屬離子無毒化作用。

微量元素為藻類生長之限制因子之一，且每一種藻類的需求量不同。本試驗中，以四種微量金屬離子Zn²⁺、Co²⁺、Mo⁶⁺、Cu²⁺加入H組，結果加入這些金屬離子反而使*Isochrysis galbana*生長緩慢，十天後僅為A組的31.5%，與A組相差甚大。因此，*Isochrysis galbana*所需之微量元素極微，而海水本身已含有多種微量元素，已足夠供此種藻類利用，若再添加反而容易對其產生抑制作用而阻礙其生長。另於試驗完後，將添加微量元素的H組，再添加多量的EDTA，試消除過量金屬離子的抑制作用，結果顯示其生長有顯著的改善。

鹽度對於*Isochrysis galbana*成長之影響，Kain & Fogg (1985)認為在15~40之範圍長得一樣好。Laing & Utting (1980)認為其最適鹽度為15~25‰⁽⁵⁾。本試驗中，*Isochrysis galbana*最適鹽度為10~25‰，與Laing之結果類似，然在Laing之報告中，並未對15‰以下之鹽度做過試驗。由本試驗中可得知，*Isochrysis galbana*係一廣鹽性之海水藻類，在鹽度5~50‰均可生存，因此以此種藻類為餌料生物時，可隨各種貝類幼生的最適鹽度而變化，而不會死亡。

於本試驗中，在pH 7以下，pH值愈低成長愈慢，可能是由於pH值降低，細胞內酵素的活性相對的降低，致使其成長緩慢。而pH在10以上，細胞大部份破裂而死亡，可能是其細胞內的酵素已失去活性，體內一些生化反應無法進行而死亡，且pH在9.5以上，溶解在水中之CO₂主要形成CO₃²⁻，藻類不能直接利用CO₃²⁻為碳源，因此，在pH 10以上已無法培養。

摘 要

本實驗在探討各種營養鹽對*Isochrysis galbana*成長需求之程度及鹽度和酸鹼度對其生長之影響。其結果如下：

- 一 培養液中缺乏氮源時，嚴重影響*Isochrysis galbana*之成長。缺乏維他命、磷、鐵對其成長亦有顯著之影響。而培養液中不添加微量金屬元素，添加反而生長不良。
- 二 *Isochrysis galbana*係一廣鹽性藻類，在鹽度5~50‰均可生長，其最適鹽度為10~25‰。
- 三 *Isochrysis galbana*的最適pH值在7~8之間。

參考文獻

1. V. J. Chapman & D. J. Chapman (1973). *The Algae* 170 - 176.
2. Loosanoff, V. L. & Davis, H. C. (1963). Rearing of bivalve molluscs *Adv. Mar. Biol.*, **1**, 1-136.
3. Hong-Shii Yang (1985). Studies on the Artificial propagation of the *Sinohoracula Constricta*, 台灣省水產試驗所試驗報告, **38**, 123 - 135.
4. Bardach, J. E., Ryther, J. H. and Mclearney, W. O. (1972). *Aquaculture, the farming and husbandry of fresh water and marine organisms*. New York, Wiley-Interscience 868 P.

5. L. Laing & M. M. Helm (1981). Factors affecting the semi-continuous production of *Terraselmis suecica* (kylin) Butchin. in 200-*l* vessels. *Aquaculture*, **22**, 137-148.
6. Laing, I. and Utting, S. D. (1980). The influence of Salinity on the production of two commercially important unicellular marine algae. *Aquaculture*, **21**, 79-86.
7. Mayer & Anderson (1960). *Plant Physiology*, 247 - 270.
8. F. E. Round (1973) . *The Biology of the Algae*, 147 - 160.
9. Ralph A. Lewin (1962). *Physiology and Biochemistry of Algae*, 141 - 224.
10. J. P. Riley & R. Chester (1971). *Introduction to Marine chemistry*. 60 - 70.