

海水綠藻(*Tetraselmis* spp)之培養

林琇玲

The Culture of Green Algae—*Tetraselmis* spp

Lin Show—Lin

The purpose of this paper was to understand the optimal environment for *Tetraselmis* spp. growth and the optimal nutrient content of medium.

It was found that optimal salinity for *Tetraselmis* spp. growth was 35‰ and optimal PH was PH9.

The growth was retardation in media deficient in nitrogen, phosphorus and iron. Not only a deficiency of those element but also a concentration in excess of the upper limit can suppress growth. So the optimal nitrogen, phosphorus and iron in medium was 24.4ppm, 61.5ppm, and 0.04ppm. On the other hand, the growth that medium was added EDTA (ethylenediamine-tetraacetate) was better than that was no EDTA.

前 言

多種單細胞藻類為魚蝦幼生及貝類繁殖時，良好的餌料生物（Walne, 1966; Helm et. al., 1973; Walne and Helm, 1974）；其不但可作為這些幼生之營養源，且能控制水質，因此如何適時提供充分的餌料生物，乃成為人工繁殖工作成功的先決條件。

Tetraselmis spp. 這種海水綠藻是屬於 *Prasinophyceae* 綱，於1980年6月，由夏威夷引進，細胞呈橢圓形，長軸長約 15 μ ，短軸長約 10 μ ，行分裂增殖，常有兩細胞聚在一起的特性，其細胞壁較 *Chlorella* 薄，易被消化。現已知這種藻類可用以飼育二枚貝（Laing and Utting, 1980）及作為蝦類幼生之餌料生物（Mock and Neal, 1974），至於其他魚類之利用效果，尚有待進一步的研究。本報告先探討其生長的最適環境，及其營養塩的最適添加量。

材料與方法

(一) 最適成長環境試驗：

1. 塩度試驗：將過濾海水煮沸 5分鐘後備用，以蒸餾水及食塩調節塩度，分別為 20‰，30‰，40‰，50‰，60‰，70‰，6組，2重覆，使用 1升之培養瓶培養，營養塩之成份及添加量如表一，每 2天以波長 415m μ 測吸光度 (OD)，以觀察其成長情形，同時並於培養瓶中添加蒸餾水，以補充水分蒸發的量，維持正常塩度。使用 20燭光之日光燈作為光源，每天照光 20小時。以下之實驗除處理除條件不同外，其他之材料方法均同，不再贅述。

2. 酸鹼度 (PH) 實驗：以 0.1N HCl 及 2N NaOH 調整 pH 為 6，7，8，9，10，11，6組，2重覆，因其 pH 會隨藻類之成長而變化，故需每天調 pH 值。

(二) 各種營養塩對 *Tetraselmis* spp. 成長的影響及其最適添加量的研究：

1. 氮肥：實驗分 6組，2重覆，各組之化肥成份及添加量如表二。經換算得 A，B，C，D，E，F 各組之氮含量分別為：0，14，28，42，56，70ppm。

Table 1. Concentration of stock solutions and fertilization schedule for 1 liter cultures of *Tetraselmis spp.*

Stock solution	Concentration of stock solution (g/l)	ml of stock solution added to 1 liter culture
KNO ₃	102.0	3
K ₂ HPO ₄	17.4	3
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.24	0.6
(EDTA)	1.86	
Burkholders Trace ele.		1.25
H ₃ BO ₃	0.570	
MnCl ₂ · H ₂ O	0.360	
ZnCl ₂	0.625	
CuCl ₂ · 2H ₂ O	0.268	
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.252	

Table 2. Different amount of KNO₃ for *Tetraselmis spp.* growth.

Item	A	B	C	D	E	F(ml)
KNO ₃	0	1	2	3	4	5
K ₂ HPO ₄	3	3	3	3	3	3
FeCl ₃ · 6H ₂ O (EDTA)	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
Burkholders Trace ele.	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
Sea water (1 liter)	1	1	1	1	1	1

2 磷肥：實驗分 6 組，2 重覆，各組之營養鹽成份及添加量如表三。換算後得 A, B, C, D, E, F 各組之磷含量分別為 0, 30, 60, 90, 120, 150ppm。

Table 3 Different amount of K₂HPO₄ for *Tetraselmis spp.* growth

Item	A	B	C	D	E	F(ml)
KNO ₃	3	3	3	3	3	3
K ₂ HPO ₄	0	1	2	3	4	5
FeCl ₃ · 6H ₂ O (EDTA)	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
Burkholders Trace ele.	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
Sea water (1 liter)	1	1	1	1	1	1

3 鐵鹽：實驗分 FeCl₃ · 6H₂O 中添加 EDTA 與不添加 EDTA，共 11 組，2 重覆，各組之化肥成份及添加量如表四，經換算後得 A; B, C; D, E; F, G; H, I; J, K; 各組之鐵含量分別為 0; 0.01; 0.02; 0.03; 0.04; 0.05ppm。

Table 4 Different amount of $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (EDTA) and $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (no EDTA) for *Tetraselmis spp.* growth

Item	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K(ml)
KNO_3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
K_2HPO_4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (EDTA)	0		0.2		0.4		0.6		0.8		1.0
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (no EDTA)		0.2		0.4		0.6		0.8		1.0	
Burkholders Trace ele.	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
Sea water (liter)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

結 果

一、最適成長環境試驗：

1 鹽度試驗：分別以不同鹽度處理的結果，經複迴歸分析後得一迴歸方程式為： $Y = (-0.6982) + 1.0252X + (-0.3321)X^2$ ，見圖 1，Y 軸為每天之成長指數 (Growth index) = (第 t 天之 QD - 開始之 QD) / t 天；由表五，P 值 < 0.01 ，顯示不同鹽度處理對其成長有顯著的影響，而其最適成長鹽度為 35‰。

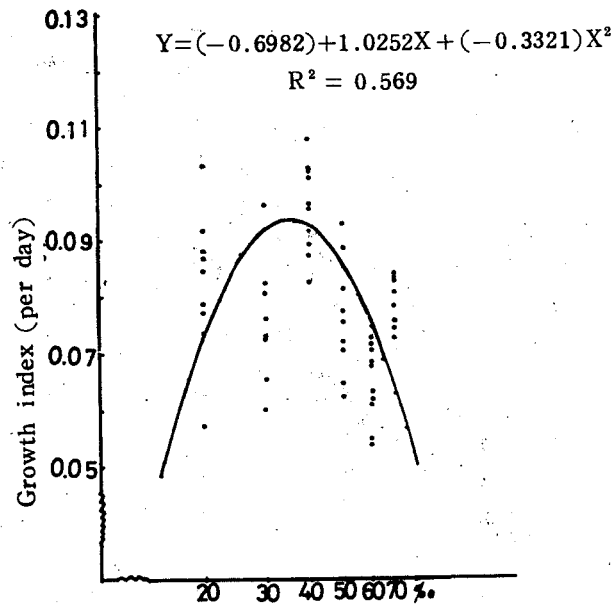


Fig 1. Effect of different salinity on *Tetraselmis spp.* growth.

2 酸鹼度試驗：以 6 種不同 pH 值處理的結果，其成長情形如圖 2，經變異數分析的結果 (見表六)，P 值 < 0.05 ，顯示不同的 pH 值，對其成長有顯著的影響；其中以 pH 9 (D 組) 的成長最好 (t-test, $P < 0.05$)，其次為 pH 10，而以 pH 11 的成長最差。

Table 5 The result of analysis of multiple regression by the treatment of different salinity on *Tetraselmis spp.* growth

Source	Sums of Square	d.f.	Mean Squares	F ratio	p
Regression	6.487×10^{-3}	2	3.244×10^{-3}	37.6378	<0.01
Error	4.913×10^{-3}	57	8.619×10^{-5}		
Total	1.14×10^{-2}	59			

Table 6 The result of analysis of variance by the treatment pH value on *Tetraselmis spp.* growth

Source	Sums of Squares	d.f.	Mean Squares	F ratio	p
Treatment	8.3×10^{-3}	5	1.7×10^{-3}	3.0182	<0.05
Residual	2.31×10^{-2}	42	5.5×10^{-4}		
Total	3.15×10^{-2}	47			

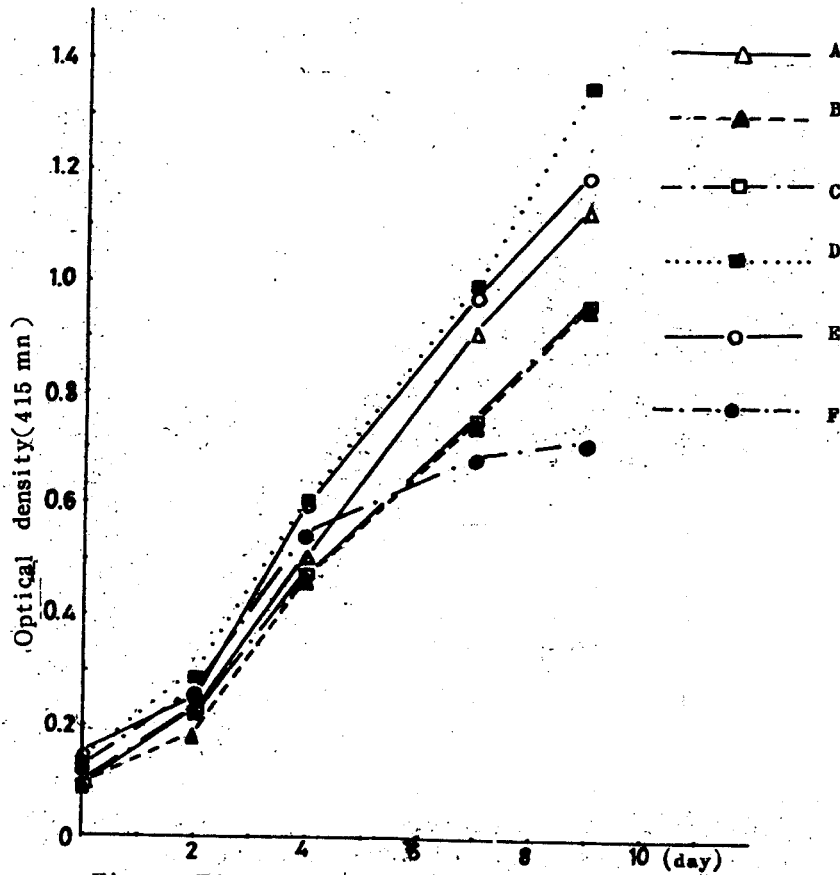


Fig 2. Effect of pH on the growth of *Tetraselmis spp.*

(-)各種營養鹽對*Tetraselmis spp.* 成長的影響及其最適添加量的研究：

1 氮肥：不同濃度氮的添加對*Tetraselmis spp.* 成長的影響，經複迴歸分析後，得一迴歸方程式為 $Y = (-0.1821) + 0.4346X + (-0.1567)X^2$ ，見圖 3，Y 軸代表每天之成長指數，其算法同鹽度試驗；由表七，P 值 < 0.01 ，顯示不同濃度氮肥的添加對其成長有顯著的影響，而其最適添加量為 24.4ppm。培養液中缺乏氮肥之 A 組，成長最差，且藻體有變黃的情形，但於實驗結束後，再補充氮肥，藻體於 2 天內便呈綠色，且恢復正常生長。

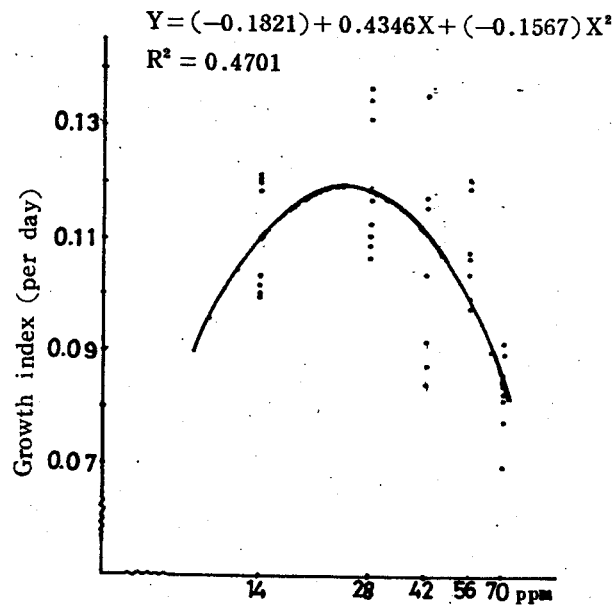


Fig 3. Effect of different amount of nitrogen on *Tetraselmis spp.* growth

2 磷肥：不同濃度磷的添加對*Tetraselmis spp.* 成長的影響，經複迴歸分析後，得一迴歸方程式為 $Y = (-0.6264) + 0.838X + (-0.2342)X^2$ ，見圖 4；由表八，P 值 < 0.01 顯示不同濃度磷肥的添加對其成長有顯著的影響，而其最適添加量為 61.5ppm。培養液中缺乏磷肥之 A 組，成長最差，且藻體有變黃的情形，但於實驗結束後，再補充磷肥，則於 2 天內便呈綠色，並恢復正常生長。

3 鐵離子：培養液中添加 EDTA 者其成長較不添加 EDTA 者好 (t-test, $p < 0.01$)；不同濃度鐵離子的添加 (+EDTA) 對*Tetraselmis spp.* 成長的影響，見圖 5，經變異數分析的結果，見表九 Table 7 The result of analysis of multiple regression the treatment of different amount of KNO_3 on *Tetraselmis spp.* growth.

Source	Sums of Squares	d.f.	Mean Squares	F ratio	P
Regression	4.702×10^{-1}	2	2.351×10^{-1}	16.4401	< 0.01
Error	5.291×10^{-1}	37	1.43×10^{-2}		
Total	9.993×10^{-1}	39			

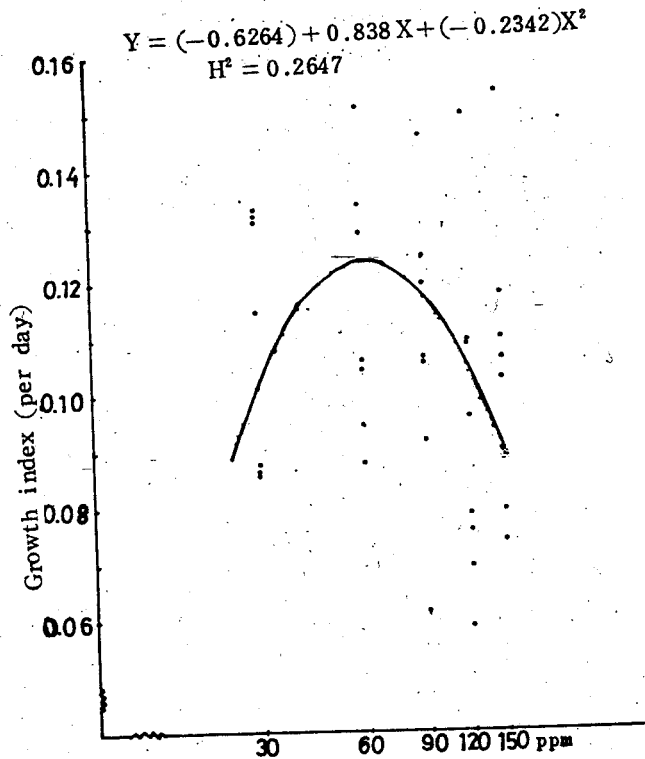


Fig 4. Effect of different amount of phosphorus on *Tetraselmis spp.* growth

Table 8 The result of analysis of multiple regression by the treatment of different amount of K_2HPO_4 on *Tetraselmis spp.* growth.

Source	Sums of Squares	d.f.	Mean Squares	F ratio	P
Regression	6.3×10^{-3}	2	3.2×10^{-3}	6.66**	< 0.01
Error	1.75×10^{-2}	37	4.7×10^{-4}		
Total	2.38×10^{-2}	39			

Table 9 The result of analysis of variance by the treatment of different amount of $FeCl_3 \cdot 6H_2O(EDTA)$ on *Tetraselmis spp.* growth.

Source	Sums of Squares	d.f.	Mean Squares	F ratio	P
Treatment	6.1×10^{-3}	4	1.525×10^{-3}	17.5955**	< 0.01
Residual	3.9×10^{-3}	45	8.667×10^{-5}		
Total	1.0×10^{-2}	49			

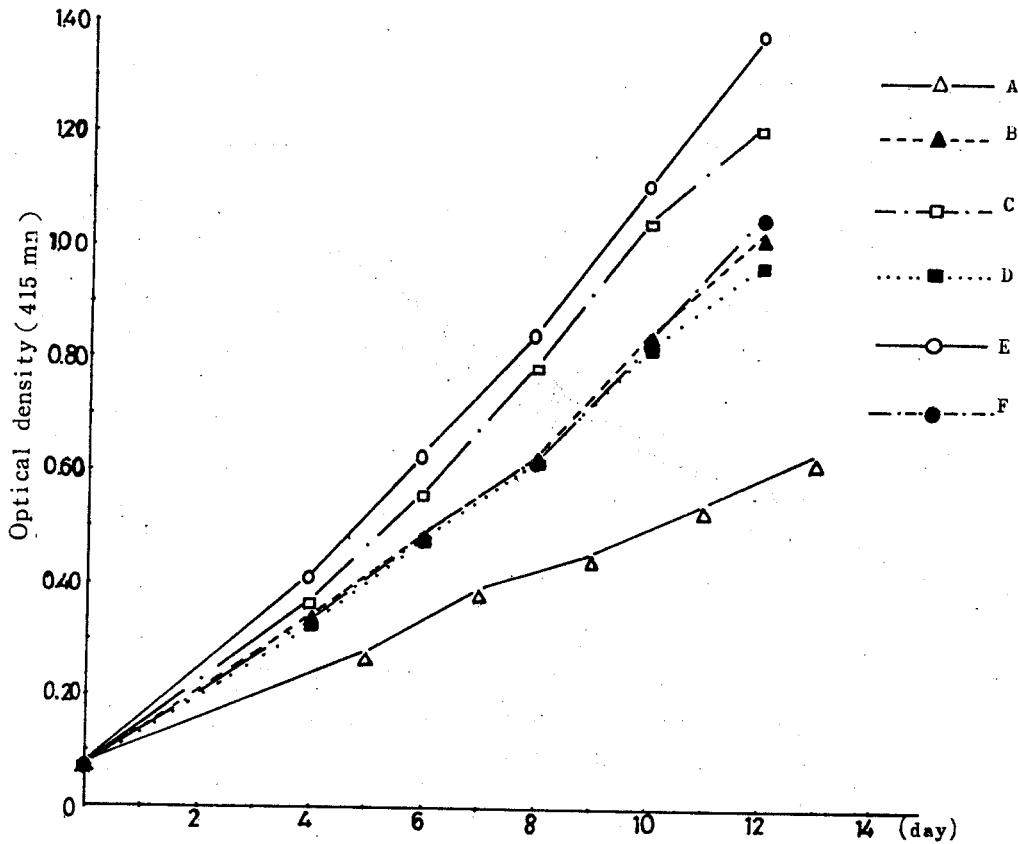


Fig 5. Effect of different amount of $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (EDTA) on *Tetraselmis* spp. growth

，由 $P < 0.01$ 顯示不同濃度鐵鹽（含 EDTA）的添加，對其成長有顯著的影響，其中以 I 組（ Fe^{++} 0.04ppm）的成長最好（ t -test, $P < 0.05$ ）而 A 組完全不添加的成長效果最差，且藻體有變黃的情形；實驗結束後，再補充鐵鹽，則於 2 天內便呈綠色，且恢復正常生長。另外，培養液中不添加 EDTA 時，不同濃度鐵離子對其成長的影響，見圖 6，以變異數分析的結果，見表十， $P < 0.01$ ，顯示不同濃度鐵離子的添加，對其成長有顯著的影響，而以 B 組（0.01 ppm）的成長效果最好（ t -test, $P < 0.05$ ）。

Table 10 The result of analysis of variance by the treatment of different amount of $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (no EDTA) on *Tetraselmis* spp. growth.

Source	Sums of Squares	d.f.	Mean Squares	F ratio P
Treatment	1.2×10^{-3}	4	3.0×10^{-4}	4.8387** < 0.01
Residual	2.8×10^{-3}	45	6.2×10^{-5}	
Total	4.0×10^{-3}	49		

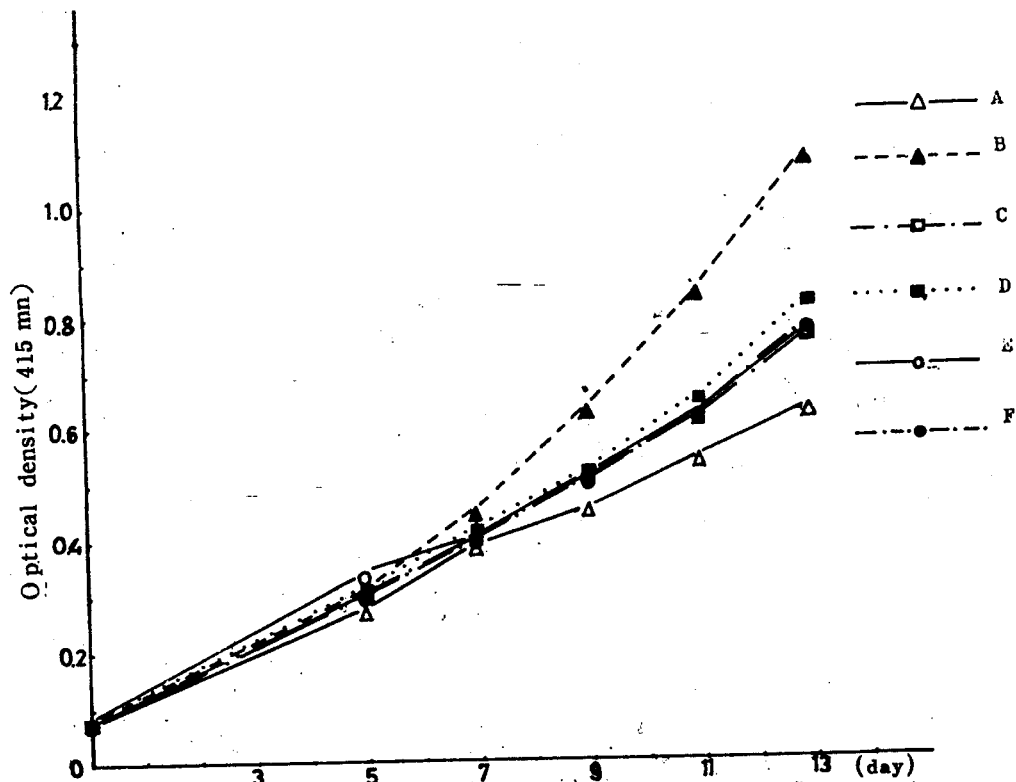


Fig 6 Effect of different amount of $\text{FeCl}_{1.6}\text{H}_2\text{O}(-\text{EDTA})$ on *Tetraselmis* spp. growth.

討 論

本實驗中 *Tetraselmis* spp. 的最適生長鹽度為 35 ‰，這和 Laing and Utting (1980) 的結果 25—30 ‰，稍有不同，可能是因環境之差異所造成。而其最適 pH 為 pH 9，pH 11 時的成長最差，這和藻類對碳源的利用有關，當培養液之 pH 值低於 6 時，大部份之 HCO_3^- 形成 free CO_2 ，在 pH 值 8 以上時，則以 HCO_3^- 形態存在，適於藻體之利用，當 pH 值升至 11 以上時，則形成 CO_3^{2-} ，不能為藻體所利用，且易與鈣離子形成 CaCO_3 之沉澱，而造成鈣質之缺乏。(中村浩，1978, Round, 1973)。

培養基中缺乏氮源時，細胞中氮的含量減少，光合作用主要的產物由蛋白質變為碳水化合物和脂肪，細胞的整個組成在數週內不斷地改變；同時細胞中葉綠素的量也迅速減少，藻體有變黃的情形；此外光合作用的速率也降低，這不僅因葉綠素減少所引起，也可能是酵素平衡發生改變所致，黴菌在氮缺乏時，蛋白分解酵素的活動迅速增加，在藻類可能也有類似的情形。(Lewin, 1962) 故造成氮源缺乏的 A 組成長不良。

磷對於藻類的生長，是一主要的營養元素，因其在代謝過程中扮演重要的角色，尤其是在能量的轉換反應中；另外，磷酸化合物亦參與光合作用反應，而磷缺乏在開始的階段，對於葉綠素的合成有明顯的促進作用，但在後階段，則呈現明顯的萎黃病 (Lewin, 1962)；故在不添加磷肥的 A 組中，成長不良，藻體變黃；但磷酸鹽缺乏或過量，都會抑制藻類的生長，本實驗中，磷的最適添加量為 61.5 ppm。

鐵因為多種酵素、細胞色素和某些卟啉的組成成分，故培養基中缺乏鐵時，細胞中葉綠素的含量

減少，光合作用亦隨之減少，且有萎黃病發生 (Lewin, 1962)，故本實驗中缺乏鐵鹽之 A 組成長最差。此外，EDTA 能與培養液中之金屬離子結合成穩定的螯狀化合物，藻體無法加以利用，故能使金屬離子無毒化作用，因此添加 EDTA 的各組，成長皆較不添加者好。

摘 要

- (一) *Tetraselmis spp.* 的最適成長鹽度為 35‰。
- (二) *Tetraselmis spp.* 的最適酸鹼度為，pH 值 9，而 pH 值 11 的成長最差。
- (三) 培養液中缺乏氮源時，*Tetraselmis spp.* 的成長不良，而其最適添加量為 24.4ppm。
- (四) 培養液中缺乏磷肥時，*Tetraselmis spp.* 的成長不良，其最適添加量為 61.5ppm。
- (五) 培養液中添加 EDTA 的各組，其成長皆較不添加者好。而培養液中含 EDTA 時，鐵離子之最適添加量為 0.04ppm。

謝 辭

本報告承楊維德先生在生統上提供寶貴的意見，及丁分所長雲源先生之惠予校閱，在此特致謝忱。

參 考 文 獻

- (一) Lewin Ralph A. (1962) physiology and Biochemistry of algae p171 - 183, p 211 - 224, p 267 - 279。
- (二) Laing, I. and Vtting, S.D., (1980) The influence of salinity on the production of two commercially important unicellular marine algae. *Aquaculture*, 21:79-86。
- (三) Mock, C.R. and Neal, R.A., (1974) Penaeid shrimp hatchery systems. FAO/CARPAS Symposium on Aquaculture in Latin America, Montevideo, Uruguay. CARPAS / 7 / 74 / SE29, October 1974, 9pp.
- (四) Round F.E. (1973). The Biology of the algae. p.147 - 169.
- (五) Smith W.L. and Chanley M. (1973). Culture of Marine Invertebrate animals. p.29 - 60.
- (六) Simon, C.M., (1978). The culture of the diatom *Chaetoceros gracilis* and its use as a food for penaeid protozoal larvae. *Aquaculture*, 14:105 - 113.
- (七) Walne, P.R., (1966) Experiments in the large - scale culture of the larvae of *Ostrea edulis* L. *Fish. Invest.*, London, Ser. 2, 25(4): 53pp.
- (八) Walne, P.R. and Helm, M.M., 1974. The routine culture of the pacific oyster (*Crassostrea gigas*) at Conwy during 1973. *Shellfish Inf. Leaflet.*, MAFF, Fish. Lab Burnham, No. 32, 10pp.
- (九) 中村浩 (1978) スピルリナ—新シソ食糧: p. 83 - 99.
- (十) 蔡碧心 (1980). 影響螺旋藻生長的因素及螺旋藻的利用試驗。省水產試驗所試驗報告。No. 32 pp. 1 - 19.