

添加碳源對等鞭金藻增殖的影響

蘇惠美^{1*} · 周廷耀² · 陳紫嫻¹

¹行政院農業委員會水產試驗所 東港生技研究中心

²國立中山大學 海洋生物研究所

摘 要

等鞭金藻 (*Isochrysis galbana*) 含有豐富的 DHA, 可作為輪蟲、橈足類及魚蝦貝類幼苗的餌料, 惟其在高密度培養時, 可能會面臨 CO₂ 供應不足的問題。本研究即在探討以小容量 (0.5 L 或 1.0 L) 靜置培養及大容量 (100 L) 打氣培養時, 調整 pH 值或供應 CO₂ 對等鞭金藻增殖之影響。

小容量靜置培養共分為四個試驗。在添加 CO₂ 或鹽酸 (HCl) 調整初始 pH 值之試驗中, 以添加 CO₂ 調整 pH 為 6.5 組者的生長最好, 調整為 5.5 組者, 無論是添加 CO₂ 或 HCl, 其增殖速率均比不添加之對照組為差。每日添加 CO₂ 或 HCl 將 pH 值調整為 6.5 之試驗中, 以 CO₂ 組的增殖情形最佳, 為對照組的 221%; 其次為 HCl 組, 而以對照組居末。添加碳酸氫鈉 (NaHCO₃) 之試驗, 以添加 1 g/L 組的細胞增殖情形最差, 其餘五組 (0.01 g/L、0.05 g/L、0.1 g/L、0.5 g/L 與對照組) 則差異不大。添加 0.5 g/L NaHCO₃, 同時將 pH 值調整為 6.5 組, 其增殖情形較僅添加 NaHCO₃ 者為佳, 為對照組的 212%。

大容量打氣培養中, 利用 pH 控制儀調控 CO₂ 或 HCl, 使 pH 值維持於設定值, 結果添加 CO₂ 調控 pH 值在 7.5、7.0 和 6.5 之三組間的細胞增殖情形無明顯差異, 均較以 HCl 控制為 7.5 組和對照組為佳; 而 HCl 控制組的效果則不比對照組好。CO₂ 控制組在第 7 天細胞數最佳可達 1350 x 10⁴ cells/ml, 約為對照組的 199%。本研究顯示, 等鞭金藻在小容量靜置培養時, 可添加濃度為 0.5g/L 的 NaHCO₃, 將 pH 調整為 6.5; 大容量打氣培養時, 則可利用 CO₂ 控制藻水的 pH 為 7.5, 均可提高收穫時的藻細胞濃度。

關鍵詞：等鞭金藻、碳源、增殖、pH 控制

前 言

等鞭金藻 (*Isochrysis galbana*) 是一種廣鹽性的海水單細胞微藻, 其體型小、繁殖快、胞內營養豐富, 富含 DHA 等高度不飽合脂肪酸, 容易被水生動物幼體消化吸收 (Helm and Laing, 1987; 陳, 1996)。因此, 對貽貝、牡蠣等貝類的養殖, 具有很重要的地位 (Helm and Laing, 1987; 鄭等, 1998)。該藻同時也是極小型輪蟲 (蘇等, 1995)、海參、海水蝦及石斑魚等幼苗 (雷和蘇, 1985; 鄧, 1993; Su *et al.*, 1997) 的良好餌料, 並且經常和角

毛藻 (*Chaetoceros*) 等其他微藻混合, 廣泛的用於蝦類幼苗的培育 (Phatarpekar *et al.*, 2000)。另外, 將餵飼等鞭金藻的輪蟲或豐年蝦做為仔魚的餌料時, 有提升仔魚存活率的效果 (Scott and Middleton, 1979; Su *et al.*, 1997)。

碳是構成生物體內化合物的重要骨架。分析顯示, 微藻細胞的碳含量超過乾重的 50% (Becker, 1994), 其對微藻的重要性可見一斑。微藻從溶於水中之無機碳 (DIC) 獲取碳源, 以進行光合固碳作用。溶於水中之無機碳包含 CO₂、HCO₃⁻ 及 CO₃²⁻ 等型態, 各型所佔之比例主要因 pH 而異。CO₂ 可供微藻直接利用, HCO₃⁻ 則因藻種和環境條件而異, 至於 CO₃²⁻ 則無法被微藻利用。這些水中離子的平衡亦受到 pH 影響, 在 pH 值約 8.2、溫度 20°C 之海水中, 以 HCO₃⁻ 所佔比

*通訊作者 / 屏東縣東港鎮豐漁里 67 號, TEL: (08) 832-4121; FAX: (08) 832-0234; E-mail: hmsu@mail.tfrin.gov.tw

例最高 (>99%)，約 2 mM；CO₂ 比例最低，約 1 μM (Round, 1981)。pH 值愈低時，CO₂ 比例愈高；反之，CO₃²⁻ 比例愈高。在人工培養的情況下，因藻細胞的濃度較高，白天進行旺盛的光合作用時，水中 pH 值上升，在無攪拌或打氣下，CO₂ 的供應往往不足，成為光合作用的限制因子，進而影響藻細胞的生長繁殖 (Merrett, 1990)。雖然有關等鞭金藻繁殖生長的最適條件已有不少的研究 (Kain and Fogg, 1958; Swift and Taylor, 1974; Kaplan *et al.*, 1986; 陳與潘, 1987; Boussiba *et al.*, 1988; Burgess *et al.*, 1993; Zhu *et al.*, 1997; Sevilla *et al.*, 1998; 蘇, 1999; Clark *et al.*, 1999)，然而探討如何解決高密度培養時，CO₂ 供應量不足的研究卻不多。Burns and Beardall (1987) 指出，等鞭金藻細胞內有蓄積 HCO₃⁻ 的情形；Bhatii *et al.* (2002) 進一步發現，等鞭金藻可主動利用 CO₂ 及 HCO₃⁻ 作為光合作用之碳來源。本研究探討在適當的光照、溫度和鹽度下，以 0.5 或 1.0 L 小容量靜置培養及 100 L 大容量打氣培養，調整 pH 或添加 CO₂ 等碳源，對等鞭金藻增殖的影響，並測定大容量打氣培養試驗之藻水的碳、氮、磷含量，以瞭解細胞增殖和該些營養鹽的關係。

材料與方法

一、實驗用藻類

實驗材料取自本研究室保存的等鞭金藻大溪地株 (*Isochrysis aff. galbana* Tahitian clone TISO)。將藻種置於 1L 的透明三角瓶中，在室溫 23 ~ 27 °C，鹽度 25 ~ 32 ppt，表面光照度 280 ~ 400 μE/m²/s 的條件下，靜置培養。

培養液採用修改過的韋音配方 (Laing, 1991; Walne, 1974)，配製方法如 Table 1 所示。培養用的海水皆先經過 1.0、0.45、0.2 μm 濾心過濾及 UV 殺菌處理；1 L 和 20 L 者再經高溫高壓滅菌 (121 °C，30 min)；100 L 者先加入 10 ppm 漂白水處理，靜置隔夜後，再以 10 ppm 的海波 (硫代硫酸鈉) 中和殘氯後接種。

二、實驗方法

實驗的操作分為小容量靜置培養和大容量打

氣培養。小容量靜置培養以 0.5 L 或 1 L 的三角瓶來培養，並於生長箱中進行，培養條件設定為溫度 25±0.5 °C、鹽度 28 ppt、表面光照度 380 ~ 400 μE/m²/s，連續照光。大量打氣培養以 100 L 的圓桶壓克力槽 (直徑為 41 cm) 培養，且以 20 L 的圓桶 (直徑為 32 cm) 來做中繼培養，放置於室內冷氣房進行，溫度為 23 ~ 27 °C，鹽度為 28 ppt，距 8 只並排的日光燈約 15 cm，表面光照度為 280 ~ 400 μE/m²/s，連續照光。

Table 1 Culture medium (modified from Walne, 1974 and Laing, 1991)

Constituents	Quantities
Solution I	
NaNO ₃	100 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	20 g
Na ₂ EDTA	45 g
H ₃ BO ₃	33.6 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.4 g
FeCl ₃ ·6H ₂ O	1.30 g
Solution II	1.0 ml
Make up to 1L with deionized water (heat to dissolve)	
Solution II	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	4.4 g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	2.0 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0.9 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	2.0 g
Concentrated HCl	10.0 ml
Make up to 100 ml with deionized water (heat to dissolve)	
Solution III	
Vitamin B ₁₂	10 mg
Vitamin B ₁	200 mg
Make up to 200 ml with deionized water	
Solution IV	
Na ₂ SiO ₃	6.589 g
Make up to 1L with deionized water (heat to dissolve)	
Usage	
Seawater	1 L
Solution I	1 ml
Solution III	0.1 ml
Solution IV (only for diatom)	1 ml

(一) 小容量靜置培養

又分為四項試驗：

1. 添加 CO₂ 或 HCl，將 pH 值調整為 5.5、6.5 及 7.5

於前一日準備 28 個 0.5 L 的三角瓶，加入海水 400 ml 後，連同 100 ml 的量筒、移液管和 5 L 的容器放入滅菌釜中滅菌，冷卻後使用。將 10 瓶 1 L 三角瓶中培養之藻種的上層藻水部份，倒入已事先滅菌的 5 L 容器，混合後以量筒取 100 ml 的藻液，分別倒入上述 28 個已經消毒的 500 ml 三角瓶內。實驗分成兩組，一為開始時加入 CO₂，將藻水的 pH 值調整為 5.5、6.5 和 7.5 的 CO₂ 組 (CO₂-5.5i、CO₂-6.5i、CO₂-7.5i)。所添加的 CO₂，必需先以 2.4 N 的鹽酸滅菌，再經過 0.22 μ m 孔徑的過濾器，才通入已接藻的滅菌水中。過濾器需保持乾燥以避免阻塞。另一組為加入 HCl，調整至與 CO₂ 組相同的 pH 值 (HCl-5.5i、HCl-6.5i、HCl-7.5i)。pH 值的容許誤差為 \pm 0.05，加上對照組，總共有七種處理。每一處理四重覆，培養五日。

2. 每日添加 CO₂ 或 HCl，將 pH 值調回 6.5

每日在固定時間添加 CO₂ 或 HCl，將 pH 值調回 6.5，共分為三個處理組 (CO₂-6.5e、HCl-6.5e 及對照組)，各四重覆，培養三日。

3. 添加 NaHCO₃ 試驗

材料和步驟同前述 1 項，差別在於以 NaHCO₃ 取代 CO₂ 加入海水中，以及實驗容器是 1 L，其內加入 800 ml 的海水及 200 ml 的藻種。接藻前將試藥級 NaHCO₃ 先以 150 °C 乾熱滅菌 40 分鐘後，加入已滅菌的海水中，搖晃溶解後接入藻種。NaHCO₃ 的添加量為 0.01 g、0.05 g、0.1 g、0.5 g 和 1 g，總共六種處理 (SB-0.01、SB-0.05、SB-0.1、SB-0.5、SB-1 和對照組)。每組四重覆，培養五日。

4. 添加 0.5 g/L 的 NaHCO₃ 並以 HCl 將 pH 值調回 6.5

因為顧慮到添加 NaHCO₃ 會使 pH 值升高，所以同時加入 HCl 來調整 pH 值，使碳酸氫離子轉變成 CO₂。總共有三個處理組，分別為僅添加 0.5 g/L

的 NaHCO₃ (SB)、除 NaHCO₃ 外，再多加 HCl 將 pH 值調整為 6.5 (SBH) 和對照組。每組四重覆，培養五日。

(二) 大容量打氣培養

考量到大量培養之成本，先進行等鞭金藻的打氣量和接種濃度實驗。以成效最佳者進行後續之 pH 控制試驗，培養期間之營養鹽消耗情形亦一併加以分析。

1. 打氣量試驗

將種原於 20 L 圓桶中培養四至五日後，依 1:9 (藻種：海水) 的比例加入培養用水中，空氣進氣量分為 5 LPM (L/min)、15 LPM 和 25 LPM 三組，各三重覆，培養五日。

2. 接種濃度試驗

選取前項最佳打氣量，將起始細胞濃度分為 10 x 10⁴、30 x 10⁴、50 x 10⁴ cells/ml 等三組，利用血球計數板計數細胞濃度，以決定藻種的加入量。各三重覆，培養五日。

3. 利用 pH 控制儀添加 CO₂ 或 HCl，使藻水 pH 值維持在設定值

選取最佳打氣量和最適接種濃度，利用 pH 控制儀添加 CO₂，使 pH 維持在 6.5、7.0 和 7.5，CO₂ 的流量設定在人為控制下的最小進流量。另外一組為利用 pH 控制儀添加 HCl (2.4 N)，使 pH 值維持在 7.5。共分為五種處理 (FBCO₂-6.5、FBCO₂-7.0、FBCO₂-7.5、FBHCl-7.5 和對照組)，二重複，迄實驗組的細胞濃度不再增加即停止培養，第一次試驗培養 9 日，第二次培養 8 日。

(三) 增殖率及細胞濃度相對百分比的計算

所有試驗均每日測量 pH、計算藻細胞濃度 (cells/ml) 與增殖率 (μ) 以及相對於對照組的細胞濃度百分率。藻細胞的增殖率依下列公式計算：

$$\mu = (\ln x_2 - \ln x_1) / (t_2 - t_1)$$

x_1 = 開始培養時之藻細胞濃度； x_2 = 培養終了時之藻細胞濃度； t_1 = 起始日， t_2 = 終了日。

細胞濃度相對百分比以對照組為分母，計算公式如下：

$$\text{相對百分比} = D_n / U_n \times 100\%$$

D_n = 實驗組第 n 日的細胞濃度， U_n = 對照組第 n 日細胞濃度。

(四) 營養鹽分析

pH 控制試驗除求得細胞濃度、pH、 μ 和相對百分率外，每日測量培養液內的硝酸鹽、亞硝酸鹽、銨鹽、磷酸鹽含量和總鹼度。硝酸、亞硝酸、銨-氮和磷酸的測定方法是依據 Parsons *et al.* (1984)，而總鹼度的測定方法則是依據 APHA (1995)。

(五) 統計分析

以上實驗數據先以 SPSS 套裝軟體進行單因子變異分析 (one-way ANOVA)，達到顯著差異水準後，再以 Turkey 多變異分析進行事後比較 (posteriori comparisons) 和多重比較 (multiple posteriori comparisons)，以 $p < 0.05$ 為顯著水準。

結果

一、小容量靜置培養

(一) 添加 CO_2 或 HCl，將 pH 值調整為 5.5、6.5 及 7.5

經過五天之培養，以 ANOVA 分析結果顯示，七組間的細胞數及 pH 值有顯著的差異 (Table 2)。利用 Turkey 測試比較各組結果，以添加 CO_2 將 pH 值調整為 6.5 者 (CO_2 -6.5i) 的藻類生長情形最好，細胞濃度達 237.5×10^4 cells/ml，細胞數與對照組比較之相對百分率達 148%，增殖顯著優於其他各組。將 pH 調整為 5.5 組者，無論是添加 CO_2 或 HCl，均較不添加之對照組增殖差，尤以 HCl-5.5i 最差，細胞濃度為 132.5×10^4 cells/ml，細胞數與對照組比較之相對百分率僅達 82%。在五日常培養期間，以 CO_2 -6.5i 及 HCl-7.5i 組之增殖率最佳，達 0.4，其餘各組均為 0.3。

(二) 每日添加 CO_2 或 HCl，將 pH 值調回 6.5

經過三天的培養，三組間的細胞數及 pH 值有顯著差異 (Table 2)。Turkey 測試比較結果，用 CO_2 每日將 pH 值調整為 6.5 (CO_2 -6.5e) 組的藻類增殖情形最佳，第 3 日的細胞濃度為 241.1×10^4 cells/ml，相對百分率為 221%。其次為添加 HCl 調整者 (HCl-6.5e)，而以對照組最差，第 3 日的細胞濃度只有 109.9×10^4 cells/ml。在三日的培養期間，以 CO_2 -6.5e 有最佳的增殖率，HCl-6.5e 次之，對照組最差，平均增殖率依序為 0.8，0.7 及 0.5。

(三) 添加 NaHCO_3 試驗

經過五天的培養，六組細胞濃度有顯著差異 (Table 2)，但 F 值偏小。Turkey 測試比較各組的結果，以添加 1 g/L (SB-1) 者的藻細胞增殖情形最差，第 5 日的細胞濃度 130.0×10^4 cells/ml，僅達對照組 (156.8×10^4 cells/ml) 的 83%；其餘五組之間則無顯著差異。各組的 pH 值隨著 NaHCO_3 添加量的增加而上升，迄第 5 日達 9.3~9.6 之間，組間有顯著差異 (Table 2)。五日培養期間的平均增殖率，以 SB-1 組為最差，僅有 0.3，其餘五組則均為 0.4。

(四) 添加 0.5 g/L 的 NaHCO_3 並以 HCl 將 pH 值調回 6.5

經過五天之培養，三組間的藻細胞濃度有顯著差異 (Table 2)。Turkey 測試比較結果，以添加 0.5 g/L 的 NaHCO_3 並以 HCl 將 pH 值調回 6.5 (SBH) 組的增殖最佳，第 5 日的細胞濃度達 354.9×10^4 cells/ml，相對百分率 212%；只添加 NaHCO_3 (SB) 次之，而以對照組的增殖情形最差，細胞濃度僅 167.4×10^4 cells/ml。各組間的 pH 值亦有顯著差異 (Table 2)。三組的五日平均增殖率，依序為 SBH 的 0.5、SB 的 0.4 及對照組的 0.3。

二、大容量打氣培養

(一) 打氣量試驗

各組的細胞增殖情形如 Fig. 1 所示。ANOVA

Table 2 Growth of *Isochrysis* aff. *galbana* and pH levels in small-volume algal cultures with the initial pH adjusted with CO₂ or HCl in experiment (Exp.) I-1; daily adjustment in experiment I-2; addition of 0~1 g/L NaHCO₃ in experiment I-3; and the addition of 0.5 g/l NaHCO₃ or/and adjustment of the pH to 6.5 by HCl in experiment I-4.

	Cell density (x 10 ⁴ cells/ml)	Relative cell density (%)	Growth rate (μ)	pH
Exp. I-1 (5 days)				
CO ₂ -5.5i	158.0 ± 5.2 ^{C*}	98	0.3	9.1 ± 0.0 ^B
CO ₂ -6.5i	237.5 ± 4.4 ^A	148	0.4	9.3 ± 0.0 ^A
CO ₂ -7.5i	176.9 ± 2.4 ^B	110	0.3	9.3 ± 0.0 ^A
HCl-5.5i	132.5 ± 5.5 ^D	82	0.3	8.7 ± 0.0 ^C
HCl-6.5i	164.9 ± 4.2 ^C	102	0.3	9.1 ± 0.0 ^B
HCl-7.5i	185.0 ± 4.1 ^B	115	0.4	9.3 ± 0.1 ^A
Control	161.0 ± 2.4 ^C	100	0.3	9.3 ± 0.0 ^A
Exp. I-2 (3 days)				
CO ₂ -6.5e	241.1 ± 4.9 ^A	221	0.8	8.7 ± 0.0 ^B
HCl-6.5e	139.1 ± 2.2 ^B	128	0.7	8.5 ± 0.1 ^C
Control	109.9 ± 7.4 ^C	100	0.5	9.2 ± 0.1 ^A
Exp. I-3 (5 days)				
SB-1	130.0 ± 5.4 ^C	83	0.3	9.5 ± 0.0 ^A
SB-0.5	154.2 ± 6.6 ^{BC}	98	0.4	9.6 ± 0.0 ^A
SB-0.1	166.1 ± 13.6 ^{AB}	106	0.4	9.4 ± 0.0 ^B
SB-0.05	188.7 ± 16.7 ^A	120	0.4	9.4 ± 0.0 ^B
SB-0.01	172.0 ± 16.1 ^{AB}	110	0.4	9.4 ± 0.0 ^C
Control	156.8 ± 5.8 ^{BC}	100	0.4	9.3 ± 0.0 ^C
Exp. I-4 (5 days)				
SB-0.5	193.1 ± 4.6 ^B	115	0.4	9.6 ± 0.0 ^A
SBH-6.5i	354.9 ± 2.5 ^A	212	0.5	9.5 ± 0.0 ^A
Control	167.4 ± 1.6 ^C	100	0.3	9.3 ± 0.0 ^B

*The mean ± SD with different superscript letters in a given column indicates a significant difference, $p < 0.05$.

分析的結果顯示，第 1~3 日各組的細胞濃度相差不大，第 4~5 日開始出現顯著差異。Turkey 測試比較結果，第 5 日的細胞濃度與打氣量成正比，以 25 LPM 組增殖情形最佳，為 343.3×10^4 cells/ml，15 LPM 組的 320.3×10^4 cells/ml 次之，5 LPM 組最差，僅 225.8×10^4 cells/ml。在五日的培養期間，三組均維持增殖狀態，但增殖率隨著日數遞減。五日培養期間的平均增殖率以 5 LPM 組的 0.4 最低，15 和 25 LPM 組均為 0.5。各組的 pH 值，第 1 日時尚無不同，第 2~5 日出現顯著差異 (Fig. 1)。Turkey 測試比較結果，第 2~5 日，5 LPM 組有較高的 pH，15 LPM 和 25 LPM 兩組間則無顯著差異 (Fig. 1)。

(二) 接種濃度試驗

各組之藻細胞增殖情形如 Fig. 1 所示。ANOVA 分析結果顯示，各組之間有顯著差異；Turkey 測試比較結果，在五日的培養期間，開始之接種濃度較高者，增殖情形亦較佳； 10×10^4 、 30×10^4 、 50×10^4 cells/ml 等三組之第 5 日的細胞濃度分別為 326.8×10^4 、 374.6×10^4 和 418.7×10^4 cells/ml；但其細胞的增殖率反而隨著接種濃度的增加而降低，以 10×10^4 cells/ml 組之 0.6 最高，其餘二組分別為 0.5 和 0.4。在 pH 值方面，各組間在第 1~2 日有顯著差異，接種濃度愈高者，pH 值愈高；但第 3 日以後，則趨於一致，在 8.6~8.8 之間變動 (Fig. 1)。

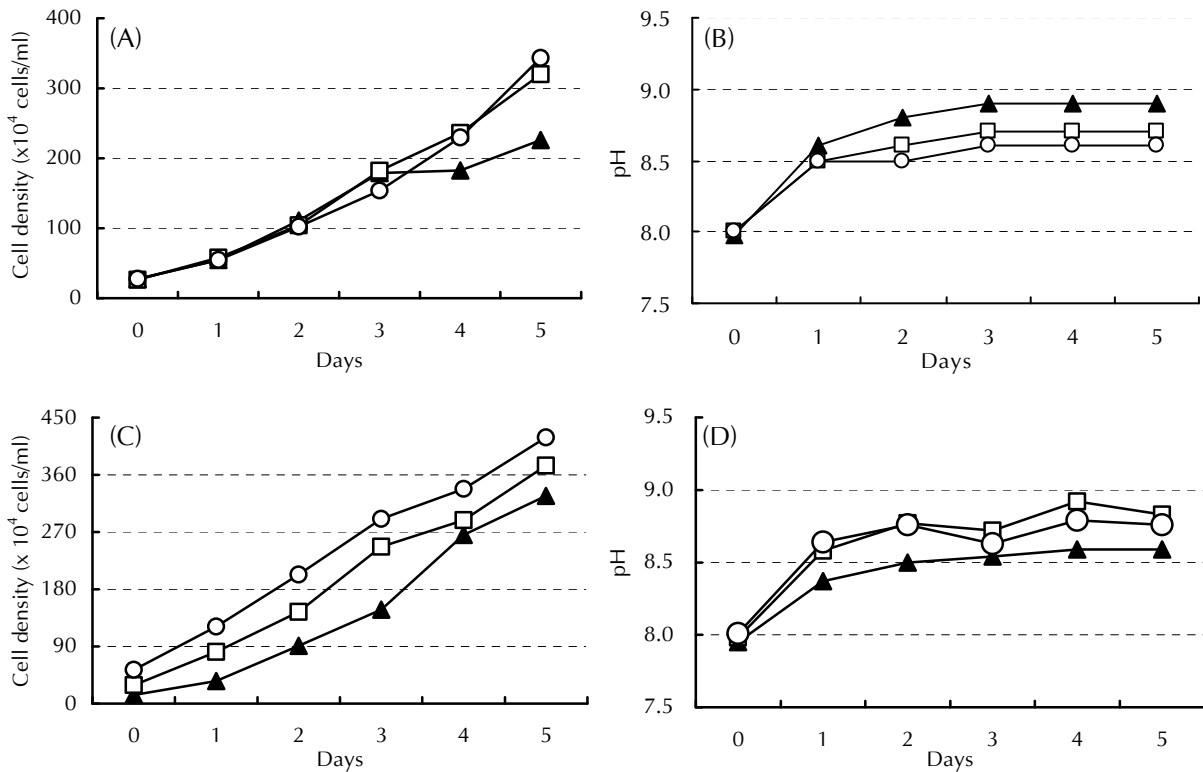


Fig. 1 Growth curve of *Isochrysis aff. galbana* and changes in the pH in 100-L cultures with air flow rates of 5, 15, and 25 L/min (A&B), and initial cell density at (10, 30, and 50) $\times 10^4$ cells/ml (C&D). ▲ 5 LPM; □ 15 LPM; ○ 25 LPM.

(三) 利用 pH 控制儀添加 CO₂ 或 HCl，使藻水 pH 值維持在設定值

第一次實驗，各組在 9 日培養期間，其細胞之增殖情形如 Fig. 2 所示。兩次實驗的結果皆顯示，三個 CO₂ 控制組 (FBCO₂-6.5、FBCO₂-7.0、FBCO₂-7.5) 間無顯著差異，其細胞增殖情形優於 HCl 控制組 (FBHCl-7.5) 和對照組。兩次實驗中，三個 CO₂ 控制組皆約於第 7 日起即不再增殖，最大細胞濃度約 1200 ~ 1350 $\times 10^4$ cells/ml；對照組於第 5 日之後即增殖緩慢，最大細胞數濃度約 700 $\times 10^4$ cells/ml；FBHCl-7.5 組增殖情形與對照組差異不大，最大細胞濃度也僅約 700 $\times 10^4$ cells/ml (Table 3)。二次實驗的結果，CO₂ 控制組相對於對照組的細胞濃度百分率為 176 ~ 199 % (Table 3)。三個 CO₂ 控制組除了有較長的細胞增殖期外，平均增殖率也都優於其他二組，其中以 FBCO₂-7.5 最佳，分別為 0.6 及 0.5 (Table 3)。CO₂ 控制組所控制的 pH 範圍，為設定的 pH 值 ± 0.2 ，

HCl 控制組的 pH 則在 6.9 ~ 7.5 之間，而對照組第 1 日之後的 pH 就保持在 8.5 ~ 8.6 間 (Fig. 2)。

第一次實驗水中硝酸-氮 (NO₃-N) 濃度變化如 Fig. 2 所示。各組的 NO₃-N 皆呈現下降的趨勢，CO₂ 控制組比 HCl 控制組和對照組有較快的消耗速率。兩次實驗中，CO₂ 控制組的硝酸-氮約於第 7 日用盡，而 HCl 控制組於第 7 日的 NO₃-N 剩餘量，第一次為 9.6 ppm (佔初始濃度之 59 %)，第二次為 4.4 ppm (佔初始濃度之 35 %)；對照組則分別剩餘 8.5 ppm 及 3.5 ppm (佔始濃度之 52 % 與 25 %)。各組亞硝酸-氮 (NO₂-N) 含量在 200 ppb 範圍內，銨-氮 (NH₄-N) 濃度在 600 ppb 範圍內，呈現不規則的變化。

第一次實驗磷酸-磷 (PO₄³⁻-P) 濃度變化如 Fig. 2 所示。五組之水中的 PO₄³⁻-P 皆呈現下降的趨勢，CO₂ 控制組的消耗速率較其他二組快速。第一次實驗時，CO₂ 控制組第 9 日的 PO₄³⁻-P 尚餘 37 ~ 54 %，濃度為 1.3-1.9 ppm；FBHCl-7.5 組和對照組尚餘 67 ~ 72 %，濃度為 2.4 ~ 2.6 ppm。第二次實驗時，

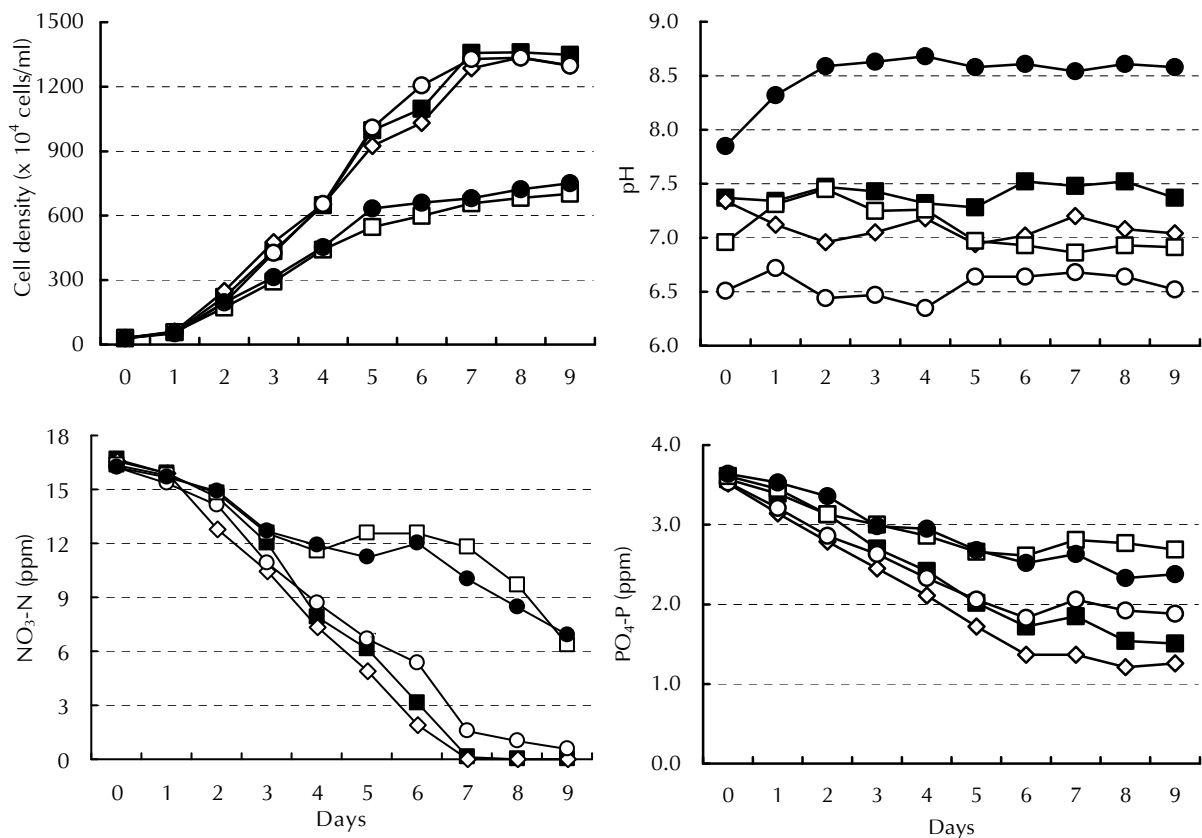


Fig. 2 Growth curve of *Isochrysis aff. galbana* and changes in the pH, $\text{NO}_3\text{-N}$, and $\text{PO}_4\text{-P}$ in 100-L cultures by pH control in experiment II-3-1. ■ FBCO₂-7.5; ◇ FBCO₂-7.0; ○ FBCO₂-6.5; □ FBHCl-7.5; ● control.

CO₂ 控制組第 8 日的 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 尚餘 53 ~ 56 %，濃度為 2.0 ~ 2.2 ppm；FBHCl-7.5 組和對照組尚餘 72 ~ 74 %，濃度為 2.8 ~ 2.9 ppm。

第一次實驗時，FBCO₂-6.5、FBCO₂-7.0、FBCO₂-7.5 與對照組等四組之水中無機碳 (DIC)、CO₂、重碳酸離子 (HCO₃⁻) 及碳酸離子 (CO₃²⁻) 濃度變化如 Fig. 3 所示；第二次變化趨勢與第一次雷同。三個 CO₂ 控制組和對照組之水中 DIC、CO₂、HCO₃⁻ 及 CO₃²⁻ 濃度，均隨培養日數的增加而上升。培養期間，CO₂ 控制組的濃度始終大於對照組，且隨著 pH 的降低而增加，其 DIC 為 9.1 ~ 18.1 mM，對照組為 7.6-13.6 mM；CO₂ 為 0.2 ~ 5.0 mM，對照組小於 0.1 mM；HCO₃⁻ 為 8.3 ~ 5.6 mM，對照組為 7.6 ~ 11.3 mM；CO₃²⁻ 濃度含量均為 0，對照組起始含量為 0，其後則介於 0.6 ~ 2.9 mM 之間。培養 9 日期間，各型態碳佔 DIC 百分比之平均值如 Table 4 所示，CO₂ 控制組之 CO₂ 百分率為 3.3 ~ 19.3 %，隨 pH 下降而上升；對照

組小於 1 %，含量極低；HCO₃⁻ 為 81 ~ 97 %，隨 pH 下降而下降，對照組 85 %；CO₃²⁻ 為 0 %，對照組之含量則高達 15 %。

討 論

本研究證明了碳源的補充，對等鞭金藻細胞濃度的提升，有很大的幫助，在小容量(0.5 或 1 L) 靜置培養可提高 221%，大容量 (100 L) 打氣培養可提高 199%。

光合作用中，Rubisco (雙磷核酮糖羧化氧化酵素, ribulose-1,5- biphosphate carboxylase-oxygenas) 可使用的碳型態是 CO₂，此酵素是羧化酵素也是氧化酵素，但因 CO₂ 和 O₂ 有競爭作用，所以可能會導致碳不足的問題，進而影響到光合作用的效率，尤其在高濃度的人工培養，碳的供應量就愈顯不足。為了解決碳不足的問題，海洋植物除了

Table 3 Growth of *Isochrysis aff. galbana* and pH in the large-volume algal culture on day 7 by pH control in experiment (Exp.) II-3

	Cell density ($\times 10^4$ cells/ml)	Relative cell density (%)	Growth rate (μ)	pH
Exp. II-3-1				
FBCO ₂ -7.5	1357	199	0.6	7.5
FBCO ₂ -7.0	1286	189	0.5	7.2
FBCO ₂ -6.5	1329	195	0.5	6.7
FBHCl-7.5	657	96	0.4	6.9
Control	682	100	0.4	8.5
Exp. II-3-2				
FBCO ₂ -7.5	1099	176	0.5	7.5
FBCO ₂ -7.0	1220	195	0.5	7.2
FBCO ₂ -6.5	1190	190	0.5	6.5
FBHCl-7.5	725	116	0.4	6.9
Control	625	100	0.4	8.5

Table 4 Average dissolved inorganic carbon (DIC; mM) and its constituents in the large-volume algal culture by pH control in experiment II-3-1

	FBCO ₂ -7.5	FBCO ₂ -7.0	FBCO ₂ -6.5	Control
DIC (mM)	13.3	13.9	15.4	11.1
CO ₂	3.3 %	6.6 %	19.3 %	0.3 %
HCO ₃ ⁻¹	96.7 %	93.4 %	80.7 %	84.8 %
CO ₃ ⁻²	0.0 %	0.0 %	0.0 %	15.0 %

有只吸收 CO₂ 無機碳型態的 C3 型光合作用外，還發展出能吸收 CO₂ 和 HCO₃⁻ 型態的 C4 型和 CO₂ 濃縮機制型 (CCM) 光合作用，以提高 Rubisco 附近的 CO₂ 濃度，降低光呼吸反應，增強光合作用效率。CCM 型光合作用會利用 carbonic anhydrase (CA) 酵素，將細胞內外的 HCO₃⁻ 轉變成 CO₂，提高葉綠體內 CO₂ 濃度；而 C4 型光合作用除了吸收 CO₂ 和擁有 CA 酵素外，還可以利用 PEPCase 與 HCO₃⁻ 結合來進行固碳作用，合成有機碳，並藉由有機碳的運送在葉綠體內釋放 CO₂。C4 型和 CCM 型光合作用都是在逆境下被誘導產生，如 CO₂ 濃度的降低或鋅不足等 (Sultemeyer, 1997; Beardall *et al.*, 1998; Nimer *et al.*, 1998; Reinfelder *et al.*, 2000)。等鞭金藻行 CCM 型光合作用，當 CO₂ 濃

度 (300 ppm CO₂) 過低時，其 CA 酵素會主動利用 CO₂ 及 HCO₃⁻ 作為光合作用之碳來源 (Bhatii *et al.*, 2002)。因此水中 DIC、CO₂ 及 HCO₃⁻ 濃度均會影響等鞭金藻的增殖。另一方面，當藻類行光合作用吸收無機碳時，導致水中 pH 上升，進而降低可供利用之碳的含量。因此在本研究之小容量靜置培養試驗中，每天補充 CO₂ 將 pH 值調整為 6.5 組 (CO₂-6.5e)，以及添加 0.5 g/L NaHCO₃ 且以 HCl 調整起始 pH 為 6.5 組 (SBH) 之等鞭金藻均有二倍的增殖；而每天以 HCl 調回 pH 之 HCl-6.5e 組，以及僅添加 0.5 g/L NaHCO₃ 組 (SB)，等鞭金藻僅增殖 1.15-1.28 倍。此結果顯示，在等鞭金藻培養期間，碳源之提供的確十分重要；此種現象在大容量打氣培養試驗中也得到證實。

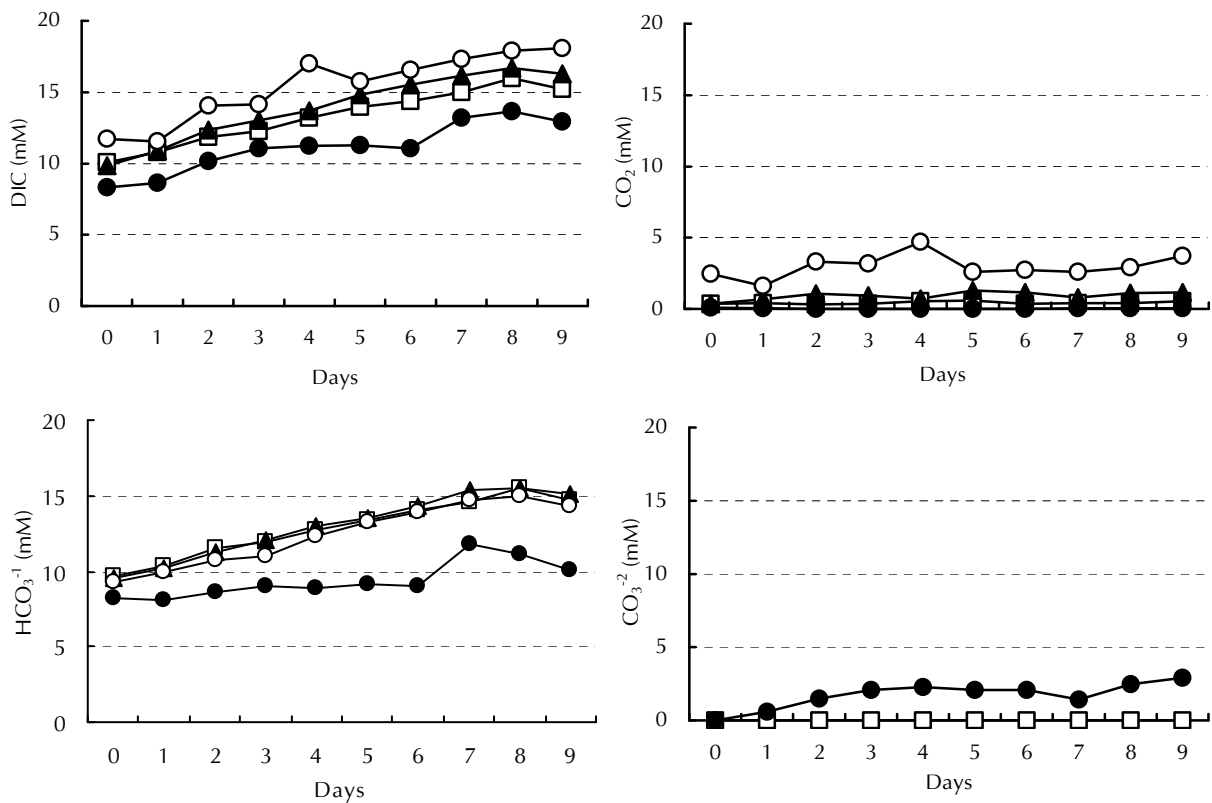


Fig. 3 Daily changes in dissolved inorganic carbon (DIC), CO₂, HCO₃⁻¹ and CO₃⁻² in 100-L cultures by pH control in experiment II-3-1. □ FBCO₂-7.5; ▲ FBCO₂-7.0; ○ FBCO₂-6.5; ● control.

培養微藻的碳源種類，可分為溶解性無機碳及有機碳。前者如本研究以打氣方式增加空氣中 CO₂ 溶入水中速率，添加純 CO₂ 或鹼性化物 (NaHCO₃)；有機碳則有單醣、醋酸鹽以及發酵分解之有機物等。有機碳的醣類對等鞭金藻效果不佳 (Liu and Lin, 2001)，醋酸對靜置培養效果雖佳，但易滋生細菌 (未發表)；發酵產生的物質則因雜質太多，培養結果不穩定。在小容量靜置培養，由於添加 CO₂ 或 HCl 至設定的 pH，控制不易，操作不便；或者氣體可能大部份都散逸掉，形成浪費；或者有污染之虞，因此實務上較不可行。曾經嘗試添加碳酸鈉，但發現不僅生長效果不佳且有大量沉澱物產生。只添加 NaHCO₃，增殖成效不僅不顯著，藻細胞還有變形及凝集的現象，且隨著添加量的增加而有嚴重的趨勢。Clark *et al.* (1999) 添加 0.25 ~ 2.00 mM (0.168 ~ 0.021 g/L) NaHCO₃ 當碳源，亦得到類似的結果。本研究在添加 0.5 g/L NaHCO₃ 時，同時以 HCl 將 pH 值調整

為 6.5，該組之藻細胞濃度，約為未加 HCl 調整組及對照組的二倍，顯示若能增加可利用型態碳的含量，均有利等鞭金藻之增殖，日後可從此方向再開發碳源。

前人研究顯示，打氣式培養比靜置培養有較佳的增殖情形 (Kaplan *et al.*, 1986; 陳與潘, 1987) 和蛋白質含量 (Brown *et al.*, 1997)；而本研究進一步證實打氣量的不足也會影響微藻的增殖。在僅提供空氣所含之碳量時，在 100 L 培養時，打氣量 5 LPM 組於第 3 日起便生長遲緩 (Fig. 1)；而在打氣量為 15 LPM 時，雖然氮源和磷源仍然還有餘量，但對照組於第 5 日之後也有生長遲緩的現象 (Fig. 3)，此說明了隨著細胞數的增多，用打入空氣的方式來增加碳源，還是有量的限制。然而在打氣培養方式時，同時添加 CO₂，15 LPM 之打氣量是否適當仍需再探討。因為試驗結果顯示，FBCO₂-6.5 組之 DIC 及 CO₂ 含量雖然均較 FBCO₂-7.0、FBCO₂-7.5 二組高 (Table 4)，但三組

間的細胞濃度並無顯著差異，此係因為打氣量太大，導致高量之 CO₂ 散逸較多；或者因硝酸鹽已耗盡，細胞無法再增殖所致，需進一步的究明。Kaplan *et al.* (1986) 使用 1% CO₂ 培養等鞭金藻，發現添加 2.0 mM 的氮，生長情況不若添加 10 mM 氮源，且第 5 日已停止生長；Brown *et al.* (1993) 也指出氮的不足會導致藻細胞的成長進入停滯期。本研究所用之 Walne 培養液，其氮源濃度僅 1.18 mM，因此 CO₂ 控制組的限制因子很可能是氮源不足。另外，就像硝酸鹽一樣，水中的磷含量也會隨著細胞的增殖而有減少的趨勢，但兩次實驗結果，各組之磷含量於實驗結束時均還有剩餘。本研究使用的 Walne 培養液之氮磷比例約 9:1，因此等鞭金藻培養液之氮磷比可能需提高，或者是該藻對於磷比對於氮表現了更大的貯藏性，有待後續探討。

Knuckey *et al.* (2000) 指出，利用二氧化碳的 pH 控制法，有助於 *Rhodomonas sp.* 的增殖，但對 *Nannochloropsis oculata* 的生長則無任何助益。因此 pH 控制法是否對所有人工高密度培養的微藻的生長皆有助益，由於相關研究的文獻甚少，尚無定論。另一方面，最有效率的生產系統，除了要培養成功外，也要考慮生產成本。本研究雖然證明了可利用 pH 控制法進行等鞭金藻的大容量培養，但因該設備費用昂貴，恐不敷生產效益。因此尋找價廉且微藻可以吸收的碳源，或改善碳源的添加方式仍有其必要性。例如將小容量靜置培養試驗中，與二氧化碳添加效果接近的碳酸氫鈉作為碳源，並以 HCl 調至 pH 6.5，以增加可利用的 DIC 濃度；或者以氣體流量計，控制二氧化碳流入養殖槽的劑量，使水中酸鹼值不低於 pH 6.5；這些方法有待試驗加以確立。

謝辭

本研究承行政院農業委員會 92 農科-9.2.1-水-A3 經費補助，農委會水產試驗所生物技術組王淑欣小姐、張銀戀小姐與陳亮元先生協助進行試驗工作，得以順利完成，特此致謝。

參考文獻

- 陳椒芬, 潘永堯 (1987) 等鞭金藻的生長及其主要營養成份的研究. 海洋與湖沼, 18: 55-63.
- 陳俊興 (1996) 利用海洋微藻生產 ω -3 族系之多元不飽和脂肪酸. 私立大葉工學院碩士論文, 184 pp.
- 雷淇祥, 蘇惠美 (1985) 草蝦苗以不同餌料餵飼時之生長及生存率. 台灣水產學會刊, 12: 54-67.
- 鄧達祺 (1993) 棘輻肛參 (*Actinopyga echinites*) 初期幼生飼育方法的研究. 國立台灣大學漁業科學研究所碩士論文, 150 pp.
- 鄭金華, 陳紫嫻, 蘇惠美, 陳鏗元, 黃美英, 蘇茂森, 廖一久 (1998) 台灣產巨牡蠣之種苗培育與單體牡蠣之誘發試驗. 水產研究, 6: 25-33.
- 蘇惠美, 蘇茂森, 廖一久 (1995) 極小型輪蟲之篩選及其培養條件. 水產研究, 2: 19-29.
- 蘇惠美 (1999) 餌料生物之培養與利用. 臺灣省水產試驗所, 105 pp.
- APHA (American Public Health Association), American Water Work Association, and Water Environment Federation (1995) Standard Method for the Examination of Water and Wastewater. 19th edition. APHA, Washington, D.C., 1268 pp.
- Beardall, J., A. Johnston and J. Raven (1998) Environmental regulation of CO₂-concentrating mechanisms in microalgae. Canadian Journal of Botany, 76: 1010-1017.
- Becker, E. W. (1994) Microalgae: Biotechnology and Microbiology. University of Cambridge Press, New York, 293 pp.
- Bhatti, S., I. E. Huertas and B. Colman (2002) Acquisition of inorganic carbon by the marine haptophyte *Isochrysis galbana* (Prymnesiophyceae). Journal of Phycology, 38: 914-921.
- Boussiba, S., E. Sandbank, G. Shelef, A. Cohen, A. Vonshak, A. Ben-Amotz, S. Arad and A. Richmond (1988) Outdoor cultivation of marine microalga *Isochrysis galbana* in open reactors. Aquaculture, 72: 247-253.
- Brown, M.R., C.D. Garland, S.W. Jeffrey, I.D. Jameson and J.M. Leroi (1993) The gross and amino acid compositions of batch and semi-continuous culture of *Isochrysis sp.* (clone T.ISO), *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*. Journal of Applied Phycology, 5: 285-296.
- Brown, M.R., S.W. Jeffrey, J.K. Volkman and G.A. Dunstan (1997) Nutritional properties of microalgae for mariculture. Aquaculture, 151: 315-331.
- Burgess, J.G., K. Iwamoto, Y. Miura, H. Takano and T. Matsunaga (1993) An optical fiber photobioreactor for enhanced production of the

- marine unicellular alga *Isochrysis* aff. *galbana* T-Iso (UTEX LB 2307) rich in docosaehaenoic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39: 456-459.
- Burns, B.D. and J. Beardall (1987) Utilization of inorganic carbon by marine microalgae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 107: 75-86.
- Clark, D.R., M.J. Merrett and K.J. Flynn (1999) Utilization of dissolved inorganic carbon (DIC) and the response of the marine flagellate *Isochrysis galbana* to carbon or nitrogen stress. *The New Phytologist*, 144: 463-470.
- Helm, M.M. and I. Laing (1987) Preliminary observations on the nutrient value of "*Tahiti isochrysis*" to bivalve larvae. *Aquaculture*, 62: 281-288.
- Kain, J.M. and G.E. Fogg (1958) Studies on the growth of marine phytoplankton. *Journal of the marine biological Association of the United Kingdom*, 37: 397-413.
- Kaplan, D., Z. Cohen and A. Abeliovich (1986) Optimal growth conditions for *Isochrysis galbana*. *Biomass*, 9: 37-48.
- Knuckey, R., G. Semmens and B. Della-Rodolfa (2000) Research in progress at the live prey. QDPI Northern Fisheries Center, Cairns, 35-41.
- Laing, I. (1991) Cultivation of Marine Unicellular Algae. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food Directorate of Fisheries Research Laboratory, Lowestoft 67, 31 pp.
- Liu, C.P. and L.P. Lin (2001) Ultrastructural study and lipid formation of *Isochrysis* sp. CCMP1324. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 42: 207-214.
- Merrett, M.J. (1990) Inorganic carbon transport in some marine microalgal species. *Canadian Journal of Botany*, 69: 1032-1039.
- Nimer, N.A., M. Warren and M.J. Merrett (1998) The regulation of photosynthetic rate and activation of extracellular carbonic anhydrase under CO₂-limiting conditions in the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Plant, Cell and Environment*, 21: 805-812.
- Parson, S., Y. Maita and C.M. Lalli (1984) A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis. Pergamon Press, Oxford, 173 pp.
- Phatarpekar, P.V., R.A. Sreepada, C. Pednekar and C.T. Achuthankutty (2000) A comparative study on growth performance and biochemical composition of mixed culture of *Isochrysis galbana* and *Chaetoceros calcitrans* with monocultures. *Aquaculture*, 181: 141-155.
- Reinfelder, J.R., A.M.L. Kraepiel and F.M.M. Morel (2000) Unicellular C4 photosynthesis in a marine diatom. *Nature*, 407: 996-999.
- Round, F. E. (1981) The Ecology of Algae. Cambridge University Press, Cambridge, 653 pp.
- Scott, A.P., and L. Middleton (1979) Unicellular algae as a food for turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. The importance of dietary long-chain polyunsaturated fatty acids. *Aquaculture*, 18: 227-241.
- Sevilla, J.M.F., E.M. Grima, F.G. Camacho, J.A. Fernandez and S. Perez (1998) Photolimitation and photoinhibition as factors determining optimal dilution rate to produce eicosapentaenoic acid from cultures of the microalga *Isochrysis galbana*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 50: 199-205.
- Sultemeyer, D. (1997) Changes in the CO₂ concentrating mechanism during the cell cycle in *Dunaliella tertiolecta*. *Botanica Acta*, 110: 55-61.
- Su, H. M., M. S. Su and I. C. Liao (1997) Preliminary results of providing various combinations of live foods to grouper (*Epinephelus coioides*) larvae. *Hydrobiology*, 358: 301-304.
- Swift, D.G. and W.R. Taylor (1974) Growth of vitamin B₁₂-limited cultures: *Thalassiosira pseudonana*, *Monochrysis Lutheri*, and *Isochrysis galbana*. *Journal of Phycology*, 10: 385-391.
- Walne, P. R. (1974) Culture of Bivalve Molluscs. 50 years' Experience at Conway. Fishing News (Books) Ltd. England, Surrey, 173 pp.
- Zhu, C. J., Y. K. Lee and T. M. Chao (1997) Effects of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* TK1. *Journal of Applied Phycology*, 9: 451-457.

Effect of the Addition of the Carbon Source on the Growth of the Microalga, *Isochrysis galbana*

Huei-Meei Su^{1*}, Ting-Yao Chou² and Tzyy-Ing Chen¹

¹Tungkang Biotechnology Research Center, Fisheries Research Institute

²Institute of Marine Biology, National Sun Yat-Sen University

ABSTRACT

Being rich in Docosahexaenoic acid (DHA), the microalga *Isochrysis* aff. *galbana* (TISO) is regarded as a good live food for rotifer, copepod and oyster larvae, and as an indirect food for grouper larviculture. In order to resolve the insufficiency of CO₂ with high-density algal culture, the effects of pH adjustment or CO₂ addition for small volumes (0.5 or 1.0 L) of stagnant culture and large volume (100 L) of aerated culture under continuous illumination were studied. For the small-volume culture, CO₂ or HCl was initially added to adjust the pH value to 5.5, 6.5, and 7.5. The growth was best for the CO₂-6.5i group, while it was worst for the CO₂-5.5i group. In the daily pH adjustment experiment, the CO₂-6.5e group had the best performance with 221% proliferation compared to the control. The lowest cell density was observed in the culture with 1.0 g/L NaHCO₃, and no significant difference was detected among the other groups. The addition of 0.5 g/L NaHCO₃ and the adjustment of the pH to 6.5 with HCl resulted in 212% proliferation in contrast to the control. For the large-volume culture, CO₂ gas or an HCl solution was used to maintain the pH at 6.5, 7.0, or 7.5. The addition of CO₂ was more effective than HCl. However, there were no significant differences among the groups to which CO₂ was added. The cell density reached 1.35 x 10⁶ cells/ml, which was nearly twice that of the control on day 7. This study revealed that the addition of the carbon source can enhance the growth of *I. galbana*.

Key words: microalga *Isochrysis* aff. *galbana*, carbon source, growth, pH control

*Correspondence: Tungkang Biotechnology Research Center, Fisheries Research Institute, Tungkang, Pingtung 928, Taiwan. TEL: (08) 832-4121; FAX: (08) 832-0234; E-mail: hmsu@mail.tfrin.gov.tw