

韩福光, 王珺, 林秋露, 王茜. 微绿球藻 (*Nannochloropsis oculata*) 培养基的优化 [J]. 广东农业科学, 2019, 46(4): 109-115.

## 微绿球藻 (*Nannochloropsis oculata*) 培养基的优化

韩福光<sup>1</sup>, 王珺<sup>1,2</sup>, 林秋露<sup>1</sup>, 王茜<sup>1,2</sup>

(1. 海南大学海洋学院, 海南 海口 570228; 2. 海南大学海洋生物实验教学中心, 海南 海口 570228)

**摘要:**【目的】微绿球藻 (*Nannochloropsis oculata*) 是一种优良的单细胞饵料微藻, 广泛应用于水产养殖。优化微绿球藻培养基, 以期提高其生长速率, 降低生产成本。【方法】以宁波大学 3# 配方为基础微藻培养液, 以乙酸钠为碳源, 硝酸钾、尿素和氯化铵为氮源, 磷酸二氢钾和磷酸二氢钠为磷源, 硫酸亚铁和柠檬酸铁为铁源, 通过单因子和正交试验, 研究了碳、氮、磷、铁、维生素 B<sub>1</sub> (VB<sub>1</sub>) 和 B<sub>12</sub> (VB<sub>12</sub>) 等主要营养元素对微绿球藻生长、繁殖的影响。【结果】获得了以天然海水为基础的微绿球藻优化培养基: 3 g/L CHCOONa、20 mg/L NH<sub>4</sub>Cl-N、2 mg/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-P、3 mg/L FeSO<sub>4</sub>-Fe、0.05 mg/L VB<sub>1</sub> 和 0.005 mg/L VB<sub>12</sub>; 采用优化培养基与宁波大学 3# 培养基对比培养微绿球藻, 结果表明, 培养 2 ~ 6 d, 优化培养基收获微绿球藻的生物量 (细胞密度) 比宁波大学 3# 培养基的分别提高了 2.21、2.55、2.30、1.97、1.7 倍; 培养 6 d, 优化培养基中微绿球藻收获的生物量 (细胞密度) 达到 1.74 × 10<sup>7</sup> 个/mL, 是宁波大学 3# 培养基的 1.7 倍。【结论】优化培养基极显著地提高了微绿球藻的生物量, 是微绿球藻的良好培养基。

**关键词:** 微绿球藻; 培养基; 优化; 生长; 影响

中图分类号: Q949.270.5

文献标志码: A

文章编号: 1004-874X (2019) 04-0109-07

## Optimization of the Culture Medium of *Nannochloropsis oculata*

HAN Fuguang<sup>1</sup>, WANG Jun<sup>1,2</sup>, LIN Qiulu<sup>1</sup>, WANG Xi<sup>1,2</sup>

(1. Ocean College, Hainan University, Haikou 570228, China ;

2. Experimental Teaching Center of Marine Biology, Hainan University, Haikou 570228, China)

**Abstract:** 【Objective】*Nannochloropsis oculata* is a kind of excellent single-celled diet microalgae, and widely used in aquaculture. The culture medium of *Nannochloropsis oculata* was optimized in order to improve its growth rate and reduce the production costs. 【Method】Taking Ningbo University 3# Formula as the basic microalgae culture medium, with CHCOONa as carbon source, KNO<sub>3</sub>, (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO and NH<sub>4</sub>Cl as nitrogen source, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> as phosphorus source, FeSO<sub>4</sub> and FeC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> as iron source, the effects of different nutrient sources such as carbon, nitrogen, phosphorus, iron, Vitamin B<sub>1</sub> and Vitamin B<sub>12</sub> on the growth and propagation of *N. oculata* were analyzed by one-factor experiment and orthogonal test. 【Result】The optimized culture medium based on nature sea water was formulated as follows: 3 g/L CHCOONa, 20 mg/L NH<sub>4</sub>Cl-N, 2 mg/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-P, 3 mg/L FeSO<sub>4</sub>-Fe, 0.05 mg/L Vitamin B<sub>1</sub> and 0.005 mg/L Vitamin B<sub>12</sub>. The *N. oculata* was cultured on optimized medium and Ningbo University 3# medium and the results showed that the biomass (cell density) of *N. oculata* cultured on optimized medium for 2-6 days was 2.21, 2.55, 2.30, 1.97 and 1.7 times

收稿日期: 2019-02-22

基金项目: 海南省重点研发计划项目 (ZDYF2016087, ZDYF2016085); 海南省自然科学基金 (313039)

作者简介: 韩福光 (1993—), 男, 在读本科生, 研究方向为微藻培养, E-mail: 285113778@qq.com

通信作者: 王珺 (1972—), 女, 硕士, 高级试验师, 研究方向为微藻生物学研究及应用, E-mail: 72206wj@163.com

higher than that of Ningbo University 3# Medium respectively. By the end of the sixth day, the biomass (cell density) of *N. oculata* on the optimized medium was up to  $1.74 \times 10^7$  cell/mL, which was 1.7 times higher than that on Ningbo University 3# medium. 【Conclusion】 The optimized medium extremely enhanced the biomass of *N. oculata* and it was a good medium for *N. oculata*.

**Key words:** *Nannochloropsis oculata*; culture medium; optimization; growth; effects

【研究意义】微绿球藻 (*Nannochloropsis oculata*)，也称眼点拟微球藻，属于绿藻门绿藻纲四孢藻目胶球藻科微绿球藻属，是一种海洋单细胞饵料微藻<sup>[1]</sup>。微绿球藻细胞营养丰富，繁殖迅速，容易培养，常作为水产动物人工育苗的优质饵料。目前微绿球藻已经应用于刺参 (*Stichopus japonicus*)<sup>[2]</sup>、合浦珠母贝 (*Pinctada fucata*)<sup>[3]</sup>、罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*)<sup>[4-5]</sup>、中华绒螯蟹 (*Spirulina platensis*) 等水产动物的育苗<sup>[6]</sup>及轮虫培养<sup>[7-9]</sup>，应用效果均较好。优化微绿球藻的培养基，可以提高其生长速率，降低生产成本。【前人研究进展】已有学者进行了提高微绿球藻生长速率的研究，如陈洁等<sup>[10]</sup>对眼点拟微绿球藻生长的生态因子进行分析；季祥等<sup>[11]</sup>对拟微绿球藻生长条件进行优化；张海琪等<sup>[12]</sup>研究了光照、温度、碳源及接种密度对微绿球藻生长的影响；黄翔鹤等<sup>[13]</sup>研究了微绿球藻对氮和磷营养盐的需求。【本研究切入点】如何提高人工培养微绿球藻的生物物质产量和促进其资源化高效利用是目前急需解决的问题。基于每株微藻所需营养成分及含量各不同，同一种微藻在不同的营养液中生长的效果也不一样，可推知藻类对营养的需求有适宜及最适的种类和浓度，越是符合该藻营养需求的配方，越能获得较理想的培养效果<sup>[14]</sup>。【拟解决的关键问题】目前与微绿球藻生长繁殖密切相关的碳源、氮源、磷源、铁源、维生素 B<sub>1</sub> 及 B<sub>12</sub> 等营养元素最佳种类及浓度的系统研究尚未见报道。鉴于此，本研究分析了不同质量浓度的碳源，不同种类及质量浓度的氮源、磷源、铁源、VB<sub>1</sub> 及 VB<sub>12</sub> 等主要营养元素对微绿球藻的生长效应，选出最适宜的微绿球藻培养基，提高其生长速率，以期微绿球藻的大规模培养提供基础性资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试微绿球藻由海南大学海洋学院微藻保种室提供。微绿球藻藻体形状为细胞球形，直径 2~4 μm，单细胞；眼点圆形，淡橘红色；色素体 1 个，淡绿色，卵圆形或杯状。试验前把微绿球藻藻种接种到 2 000 mL 三角烧瓶中进行活化纯培养，不充气，每天摇动 2~4 次，取指数生长期的微绿球藻用于本试验。

试验使用的培养液为宁波大学 3# 微藻培养液<sup>[1]</sup>。供试海水取自海南省海口市西海岸海区，pH 为 8.07，盐度为 31.5，经过滤、煮沸消毒、封口，备用。

### 1.2 试验方法

微绿球藻培养温度为 26 (±1) °C，光强为 70 (±6) μmol/(m<sup>2</sup>s)，每天随机交换培养瓶的位置并摇瓶 3 次。试验均设 3 次重复。

**1.2.1 有机碳源浓度的筛选** 以宁波大学 3# 培养基为基础培养液，经预备试验，选用乙酸钠作为微绿球藻碳源。设置乙酸钠质量浓度梯度为 0、3、6、9、12、15 g/L。培养 4 d 后计数微绿球藻的细胞密度。

**1.2.2 氮、磷、铁源种类及浓度的筛选** 根据 1.2.1 的试验结果选用最佳的碳源，进行氮、磷、铁的筛选试验。根据宁波大学 3# 配方分别配制出缺氮、缺磷、缺铁培养液，以 KNO<sub>3</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> 作为试验氮源，设置氮浓度梯度为 0、20、35、50、70 mg/L，进行氮源种类及质量浓度的筛选；以 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 作为试验磷源，设置磷质量浓度梯度为 0、1、2、3、4、5、6 mg/L，进行磷源种类及质量浓度的筛选；以 FeSO<sub>4</sub>、C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Fe 作为试验铁源，设置铁质量浓度梯度为 0、0.5、1、2、3、4、5、6 mg/L，进行铁源种类及质量浓度的筛选。培养 4 d 后计数微绿球藻的细胞密度。

**1.2.3 VB<sub>1</sub> 和 VB<sub>12</sub> 的正交试验** 根据 1.2.1 的试验结果选用最佳的碳源, 设计 2 因素 4 水平的 VB<sub>1</sub> 和 VB<sub>12</sub> 正交试验 (表 1)。培养 4 d 后计数微绿球藻的细胞密度。

表 1 VB<sub>1</sub> 和 VB<sub>12</sub> 正交试验因素水平 (mg/L)  
Table 1 Factors and levels of VB<sub>1</sub> and VB<sub>12</sub> orthogonal experiments (mg/L)

| 水平<br>Level | 因素值<br>Factor Value |                  |
|-------------|---------------------|------------------|
|             | VB <sub>1</sub>     | VB <sub>12</sub> |
| 1           | 0                   | 0                |
| 2           | 0.005               | 0.0005           |
| 3           | 0.05                | 0.005            |
| 4           | 0.5                 | 0.05             |

**1.2.4 培养基的比较** 采用上述试验筛选出的微绿球藻优化培养基与宁波大学 3# 培养基进行对比培养试验, 培养时间为 6 d。每天上午 9:00 计数微绿球藻的细胞密度。

### 1.3 指标测定

**1.3.1 微绿球藻细胞密度的测定** 先用血球计数板及分光光度计确定微绿球藻细胞密度与对应藻液 OD<sub>720</sub> 值的线性关系 [15], 然后测定试验藻液的 OD<sub>720</sub> 值, 根据藻细胞密度与藻液 OD<sub>720</sub> 的线性关系换算出微绿球藻的细胞密度。

**1.3.2 微绿球藻生长速率 (K) 的计算** 藻细胞的生长速率 (K) 计算公式为:

$$K = (\ln L_t - \ln L_0) / T$$

式中,  $L_t$  表示培养  $T$  时间后的微绿球藻细胞密度,  $L_0$  表示初始培养时的微绿球藻细胞密度,  $T$  为培养时间 (d)

试验数据采用 Excel 2003 软件进行处理, 并采用 SPSS19.0 及 DPS 14.5 软件进行方差分析及多重比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 乙酸钠浓度对微绿球藻生长的影响

乙酸钠浓度筛选试验中的微绿球藻初始接种密度为  $9.33 \times 10^5$  个 /mL。从图 1 可知, 添加不同质量浓度的乙酸钠进行培养均可快速提高微绿球藻的生长速率 ( $P < 0.01$ ), 其中以 3 g/L 乙酸钠促进微绿球藻生长的效果最优。

### 2.2 氮源种类及浓度对微绿球藻生长的影响

添加 3 g/L 乙酸钠的兼养模式下, 氮源筛选试验初始接种微绿球藻密度为  $2.20 \times 10^5$  个 /mL。

氮源种类及浓度对微绿球藻生长速率的影响见图 2。从图 2 可以看出,  $\text{KNO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  和  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  能极显著促进微绿球藻生长, 适宜作为微绿球藻生长的氮源。3 种氮源中  $\text{NH}_4\text{Cl}$  的促生长效果好于其他两种氮源, 其中以 20 mg/L 的  $\text{NH}_4\text{Cl}$  促生长效果最优。

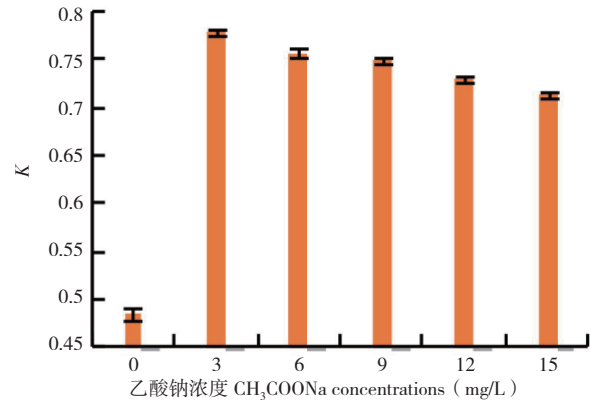


图 1 乙酸钠浓度对微绿球藻生长的影响  
Fig. 1 Effects of  $\text{CH}_3\text{COONa}$  concentrations on the growth of *Nannochloropsis oculata*

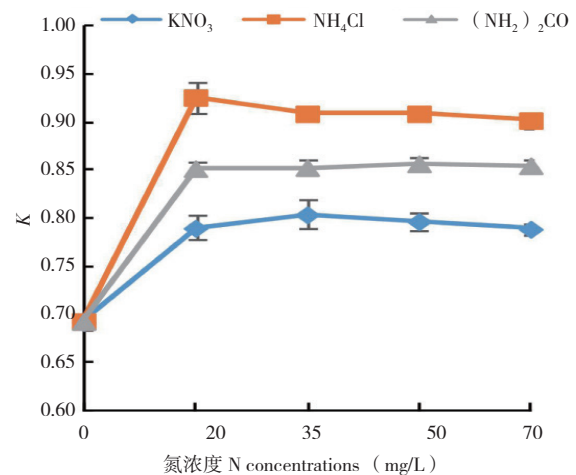


图 2 氮源种类及浓度对微绿球藻生长的影响  
Fig. 2 Effects of nitrogen sources and concentrations on the growth of *Nannochloropsis oculata*

### 2.3 磷源种类及其浓度对微绿球藻生长的影响

添加 3 g/L 乙酸钠的兼养模式下, 磷源筛选试验初始接种微绿球藻密度为  $9.21 \times 10^5$  个 /mL。磷源种类及质量浓度对微绿球藻生长速率的影响见图 3。由图 3 可知,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  和  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  对微绿球藻的生长具有极显著性影响, 均适宜作为微绿球藻生长的磷源, 其中以 2 mg/L 的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  对微绿球藻的促生长效果最优。

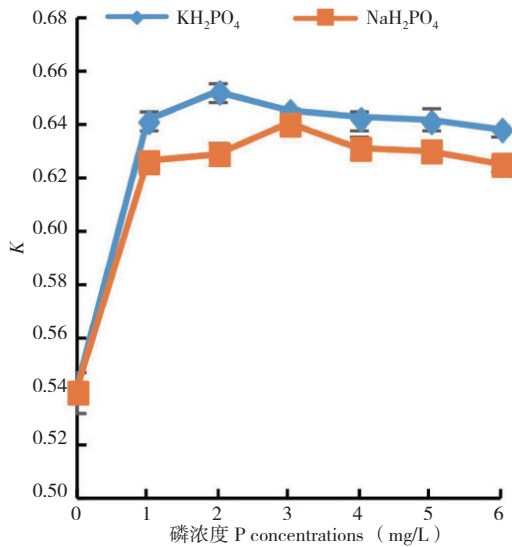


图3 磷源种类及浓度对微绿球藻生长的影响

Fig. 3 Effects of phosphorus sources and concentrations on the growth of *Nannochloropsis oculata*

#### 2.4 铁源种类及浓度对微绿球藻生长的影响

添加 3 g/L 乙酸钠的兼养模式下，铁源筛选试验初始接种微绿球藻密度为  $5.12 \times 10^5$  个/mL。铁源种类及浓度对微绿球藻生长速率的影响见图 4。由图 4 可知，FeSO<sub>4</sub> 和 C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Fe 对微绿球藻的生长具有极显著影响，均适宜作为微绿球藻生长的铁源，其中以 3 mg/L FeSO<sub>4</sub> 对微绿球藻的促生长效果最优，Fe 质量浓度在 3~6 mg/L 范围时，随着 Fe 质量浓度的增加，K 值越来越小。

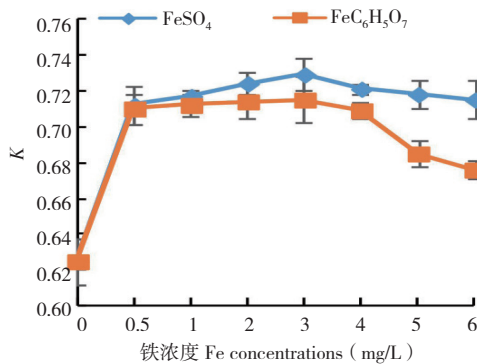


图4 铁源种类及浓度对微绿球藻生长的影响

Fig. 4 Effects of iron sources and concentrations on the growth of *Nannochloropsis oculata*

#### 2.5 VB<sub>1</sub>、VB<sub>12</sub> 的正交试验

添加 3 g/L 乙酸钠的兼养模式下，维生素试验初始接种藻密度为  $5.67 \times 10^5$  个/mL。从 VB<sub>1</sub> 和 VB<sub>12</sub> 的正交试验结果（表 2）可知，VB<sub>1</sub> 和 VB<sub>12</sub>

对微绿球藻的生长具有极显著影响，并且 VB<sub>1</sub> 和 VB<sub>12</sub> 存在交互作用。综合分析，采用试验号 11 混合维生素为微绿球藻的培养基配方，K 值最大，即最适宜微绿球藻生长的维生素为 VB<sub>1</sub> 0.05 mg/L 及 VB<sub>12</sub> 0.005 mg/L。

表 2 VB<sub>1</sub> 和 VB<sub>12</sub> 正交试验结果

Table 2 Results of VB<sub>1</sub> and VB<sub>12</sub> orthogonal experiments

| 试验号<br>Test number | VB <sub>1</sub> | VB <sub>12</sub> | K 值<br>K value  |
|--------------------|-----------------|------------------|-----------------|
| 1                  | 1 (0)           | 1 (0)            | 0.548 ± 0.006c  |
| 2                  | 1               | 2 (0.0005)       | 0.570 ± 0.009ab |
| 3                  | 1               | 3 (0.005)        | 0.570 ± 0.001ab |
| 4                  | 1               | 4 (0.05)         | 0.565 ± 0.003bc |
| 5                  | 2 (0.005)       | 1                | 0.572 ± 0.005ab |
| 6                  | 2               | 2                | 0.563 ± 0.009bc |
| 7                  | 2               | 3                | 0.574 ± 0.002ab |
| 8                  | 2               | 4                | 0.564 ± 0.010bc |
| 9                  | 3 (0.05)        | 1                | 0.570 ± 0.006ab |
| 10                 | 3               | 2                | 0.580 ± 0.004a  |
| 11                 | 3               | 3                | 0.585 ± 0.002a  |
| 12                 | 3               | 4                | 0.564 ± 0.002bc |
| 13                 | 4 (0.5)         | 1                | 0.563 ± 0.009bc |
| 14                 | 4               | 2                | 0.557 ± 0.007bc |
| 15                 | 4               | 3                | 0.572 ± 0.001ab |
| 16                 | 4               | 4                | 0.569 ± 0.004ab |

注：括号内数字代表维生素含量（mg/L）；K 值数据后小写英文字母相同表示差异不显著，小写英文字母相连表示差异显著，小写英文字母相间表示差异极显著。

Note: Numbers in parenthesis represent the contents (mg/L) of vitamins;

The same lowercase letters represent that the differences among K values are not significant, the connected lowercase letters represent significant differences and the interval lowercase letters represent extremely significant differences.

#### 2.6 微绿球藻优化培养基的验证

根据上述试验获得微绿球藻的优化培养基，采用优化培养基与宁波大学 3# 培养基进行对比培养试验，微绿球藻初始接种细胞密度为  $2.84 \times 10^5$  个/mL。从图 5 可知，培养 2 d 后，微绿球藻在优化培养基上的藻细胞密度明显优于宁波大学 3# 培养基；培养 4 d 后，微绿球藻在优化培养基中的藻细胞密度达宁波大学 3# 培养基的 2.55 倍；培养 6 d 后，藻细胞密度达到  $1.74 \times 10^7$  个/mL，但这时藻细胞密度仅为宁波大学 3# 培养基的 1.70 倍。经方差分析可知，优化培养基的培养效果极显著优于宁波大学 3# 培养基。

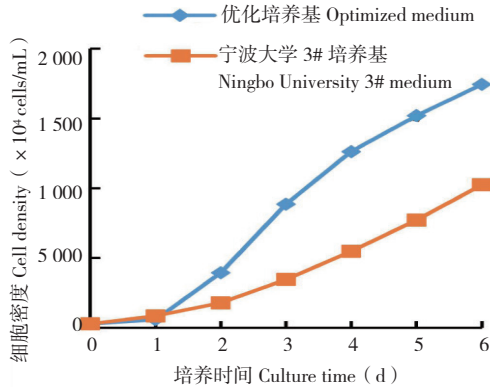


图5 不同培养基中微绿球藻的生长情况  
Fig.5 Growth of *Nannochloropsis oculata* in different culture media

### 3 讨论

微藻光合作用的过程，也是碳的同化过程。本试验结果表明，在有机碳乙酸钠浓度为 3 g/L 的兼养模式下，微绿球藻的生长效果良好，达到自养的 3.2 倍。可见，乙酸钠是微绿球藻的优良碳源。已有研究表明，有些微藻在得到有机质后，生长更适宜，在有机酸中，最重要的是醋酸钠，可以是良好的碳源<sup>[1]</sup>。氮是微藻生长必需的大量元素之一，对微藻的生长、繁殖等生理活动有重要作用<sup>[16]</sup>。黄翔鸽等<sup>[13]</sup>研究表明，微绿球藻在  $\text{NO}_3\text{-N}$  浓度为 28.30 mg/L 和  $\text{PO}_4\text{-P}$  浓度为 2.076 mg/L 时，比生长速率达最大值。潘庭双等<sup>[17]</sup>研究显示，在以硝酸钠或尿素作为氮源时，均以氮质量浓度为 24.64 mg/L 条件下微绿球藻的生长效果最优。本试验结果表明，最适宜微绿球藻生长繁殖的氮源顺序为  $\text{NH}_4\text{Cl-N} > \text{CO}(\text{NH}_2)_2\text{-N} > \text{KNO}_3\text{-N}$ ， $\text{NH}_4\text{Cl-N}$  质量浓度为 20 mg/L 时，微绿球藻的生长速率最大；在  $\text{NH}_4\text{Cl-N}$  质量浓度为 20~70 mg/L 范围时，随着氮质量浓度的升高，微绿球藻的生长速率越来越小，但均大于尿素及硝酸钾处理组。

磷为无机矿物元素，是微藻正常生长繁殖所需要的大量营养元素之一<sup>[1]</sup>。黄翔鸽等<sup>[13]</sup>研究表明，最适合微绿球藻生长的  $\text{PO}_4\text{-P}$  浓度为 2.076 mg/L；王丽卿等<sup>[18]</sup>认为最适合微绿球藻生长的  $\text{PO}_4\text{-P}$  含量为 2.3 mg/L。本试验结果表明，两种磷源之间的微绿球藻生长速率差异不显著，其中  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-P}$  质量浓度为 2 mg/L 时，微绿球藻的  $K$  值最大。

铁源在微藻呼吸作用、光合作用、蛋白质

与核酸合成、固氮作用等生理代谢过程中具有重要的作用<sup>[19]</sup>。铁含量的高低对于微藻的生长有明显影响，适宜的铁浓度会促进其微藻的生长繁殖<sup>[20]</sup>。陈洁等<sup>[10]</sup>研究发现，铁源浓度为 0.2  $\mu\text{mol/L}$  时对微绿球藻生长最有利。季祥等<sup>[11]</sup>研究认为，当  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  浓度为 0.0063 g/L 时，最适合拟微绿球藻生长。本试验结果表明， $\text{FeSO}_4\text{-Fe}$  质量浓度为 3 mg/L 时微绿球藻的生长速率最大。

维生素对微藻生长的影响因种类而不同。季祥等<sup>[11]</sup>研究表明，拟微绿球藻生长繁殖最适的维生素为 0.005 mg/L 维生素  $\text{B}_1$ 、0.00025 mg/L 维生素  $\text{B}_{12}$  和 0.00025 mg/L 生物素。宋邦兴等<sup>[21]</sup>研究表明，0.1 mg/L 维生素  $\text{B}_{12}$  与 0.05 mg/L 生物素混合使用对翼茧形藻的生长有极显著影响。王永强等<sup>[22]</sup>研究表明，1.0 mg/L 维生素  $\text{B}_1$  和 0.05 mg/L 生物素对锤状中鼓藻生长有极显著影响。本试验结果表明，0.05 mg/L 维生素  $\text{B}_1$  和 0.005 mg/L 维生素  $\text{B}_{12}$  对微绿球藻生长有极显著影响。但本试验结果微绿球藻所需的维生素  $\text{B}_1$  和维生素  $\text{B}_{12}$  质量浓度均比季祥等<sup>[11]</sup>的研究结果大，原因是前人的研究在培养基中用了生物素，因此降低了微藻对维生素  $\text{B}_1$  和维生素  $\text{B}_{12}$  需求量。

在相同的生态因子条件下，用优化培养基与宁波大学 3# 培养基对比培养微绿球藻，结果表明，培养 1 d，微绿球藻在两种培养基中的生长速率差异不大；培养 2 d 后，微绿球藻在优化兼养培养基中表现出明显的生长优势；培养 4 d，微绿球藻在优化培养基中的细胞密度达宁波大学 3# 培养基的 2.55 倍；然而培养 4 d 后，宁波大学 3# 培养基的藻细胞密度增加幅度大于优化兼养培养基。主要原因：一是光线受阻，即培养 4 d 后，优化培养基中的藻细胞密度大于宁波大学 3# 培养基，这时平均藻细胞接受的光强相对较小；二是营养盐水平下降，培养前 4 d，由于优化培养基中藻细胞生长速度更快，消耗的营养盐更多，从而造成培养 4 d 后优化培养基中的营养盐含量低于宁波大学 3# 培养基。培养 6 d，优化培养基培养的微绿球藻细胞密度达  $1.74 \times 10^7$  个/mL，生长速率是宁波大学 3# 培养基的 1.70 倍。

### 4 结论

本研究结果表明，微绿球藻对各种营养盐的

需求如下：(1) 乙酸钠适宜作为微绿球藻培养的补充有机碳源, 最佳乙酸钠质量浓度为 3 g/L; (2) 硝酸钾、尿素和氯化铵均可作为氮盐, 最适微绿球藻生长的氮盐为氯化铵, 最佳质量浓度为 20 mg/L  $\text{NH}_4\text{Cl-N}$ ; (3) 磷酸二氢钾和磷酸二氢钠均适宜作为微绿球藻生长的磷源, 以质量浓度为 2 mg/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-P}$  促进微绿球藻生长的效果最优; (4) 硫酸亚铁和柠檬酸铁均适宜作为微绿球藻生长的铁源, 以质量浓度为 3 mg/L  $\text{FeSO}_4\text{-Fe}$  促进微绿球藻生长的效果最优; (5)  $\text{VB}_1$ 、 $\text{VB}_{12}$  混合使用对微绿球藻的生长有极显著影响; (6) 微绿球藻优化培养基配方为: 3 g/L  $\text{CHCOONa}$ 、20 mg/L  $\text{NH}_4\text{Cl-N}$ 、2 mg/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-P}$ 、3 mg/L  $\text{FeSO}_4\text{-Fe}$ 、0.05 mg/L  $\text{VB}_1$  和 0.005 mg/L  $\text{VB}_{12}$ , 优化培养基为微绿球藻的良好培养基。

#### 参考文献 (References):

- [1] 成永旭. 生物饵料培养学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2005.  
CHENG Y X. Culture of Living Feeds [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2005.
- [2] 陈书秀, 刘学迁, 王青岩, 李晓捷, 曲善村. 微绿球藻作为刺参幼体饵料的可行性研究 [J]. 河北渔业, 2014(7): 53-55, 66. doi:10.3969/j.issn.1004-6755.2014.07.020.  
CHEN S X, LIU X Q, WANG Q Y, LI X J, QU S C. Study on the feasibility of *Nannochloris oculata* as a feed for larvae sea cucumber *Stichopus japonicus* [J]. *Hebei Fisheries*, 2014(7): 53-55, 66. doi:10.3969/j.issn.1004-6755.2014.07.020.
- [3] 邓正华, 陈明强, 王雨, 黄桂菊, 于刚, 吴开畅, 李有宁. 合浦珠母贝幼虫培育的饵料优化研究 [J]. 水产科学, 2018, 37(6): 721-727. doi:10.16378/j.cnki.1003-1111.2018.06.001.  
DENG Z H, CHEN M Q, WANG Y, HUANG G J, YU G W, WU K C, LI Y N. Optimization of species, density and combination of microalgae as food for larval pearl oyster *Pinctada fucata* [J]. *Fisheries Science*, 2018, 37(6): 721-727. doi:10.16378/j.cnki.1003-1111.2018.06.001.
- [4] 成文靖, 蔡春芳. 微绿球藻在罗氏沼虾育苗中的应用研究 [J]. 水利渔业, 2002, 22(1): 15-16. doi:10.15928/j.1674-3075.2002.01.010.  
CHENG W J, CAI C F. Application of *Nannochloris oculata* in the seedling of *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Journal of Hydroecology*, 2002, 22(1): 15-16. doi:10.15928/j.1674-3075.2002.01.010.
- [5] 高腾, 陈建酬. 微绿球藻对罗氏沼虾幼体发育的影响 [J]. 江西农业学报, 2017, 29(6): 90-93. doi:10.19386/j.cnki.jxnyxb.2017.06.20.  
GAO T, CHEN J C. Influence of *Nannochloris oculata* on development of *Macrobrachium rosenbergii* larvae [J]. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2017, 29(6): 90-93. doi:10.19386/j.cnki.jxnyxb.2017.06.20.
- [6] 沈和定, 黄旭雄. 三种藻类对中华绒螯蟹 1 期溞状幼体培育效果的比较 [J]. 上海水产大学学报, 1999, 8(3): 202-209.  
SHEN H D, HUANG X X. Study on Metamorphosis and survival rate of zoea I of *Eriocheir sinensis* fed on *Nannochloropsis oculata*, *Phaeodactylum tricornutum* and powder of *Spirulina platensis* [J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 1999, 8(3): 202-209.
- [7] 刘新富, 雷霖霖, 刘忠强, 柳学周. 真鲷饵料生物褶皱臂尾轮虫和眼点拟微绿球藻的大量培养 [J]. 海洋科学, 2002, 24(5): 47-51.  
LIU X F, LEI J L, LIU Z Q, LIU X Z. Mass culture of *Nannochloropsis oculata* and rotifer *Branchionus plicatilis* as living diets for red sea bream [J]. *Marine Sciences*, 2002, 24(5): 47-51.
- [8] LUBZENS E, GIBSON O, ZNIRA O, SUKENIK A. Potential advantages of frozen algae (*Nannochloropsis* sp.) for rotifer (*Branchionus plicatilis*) culture [J]. *Aquaculture*, 1995, 133: 295-309.
- [9] CHBIL L, YAMASAKI S. Improvement of a rotifer ecosystem culture to promote recycling marine microalga, *Nannochloropsis* sp [J]. *Aquacultural Eng*, 1998, 17: 1-10.
- [10] 陈洁, 蒋霞敏, 段舜山. 眼点拟微绿球藻生长的生态因子分析 [J]. 生态科学, 2002(1): 50-52.  
CHEN J, JIANG X M, DUAN S S. Analysis of growth factor of *Nannochloris oculata* [J]. *Ecologic Science*, 2002(1): 50-52.
- [11] 季祥, 乔岩, 成杰, 刘鲜艳, 赵昕宇, 郑添慧, 徐迪华, 蔡禄. 拟微绿球藻生长条件优化 [J]. 江苏农业科学, 2017, 45(2): 154-156. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.02.046.  
JI X, QIAO Y, CHENG J, LIU X Y, ZHAO X Y, ZHENG T H, XU D H, CAI L. Optimization of cultural conditions of *Nannochloris oculata* [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2017, 45(2): 154-156. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.02.046.
- [12] 张海琪, 蒋霞敏, 潘双叶, 赵明忠. 光照、温度、碳源及接种密度对微绿球藻生长的影响 [J]. 河北渔业, 2001(1): 9-13.  
ZHANG H Q, JIANG X M, PAN S Y, ZHAO M Z. Effect of light intensity, temperature, carbon source and vaccination density on the growth of *Nannochloris oculata* [J]. *Hebei Fisheries*, 2001(1): 9-13.
- [13] 黄翔鹄, 李长玲, 刘楚吾, 王中锋, 陈建军. 微绿球藻对氮和磷营养盐需求的研究 [J]. 海洋科学, 2002, 26(8): 13-17.  
HUANG X H, LI C L, LIU C W, WANG Z D, CHEN J J. Studies on the N and P nutrient demand of *Nannochloris oculata* [J]. *Marine Sciences*, 2002, 26(8): 13-17.
- [14] 丁丽欢, 王珺, 严虹羽, 符新欢. 热带小球藻培养模式的筛选及其培养基的优化 [J]. 微生物学通报, 2018, 45(5): 981-989. doi:10.13344/j.microbiol.china.170596.  
DING L H, WANG J, YAN H Y, FU X H. Optimization of tropical *Chlorella vulgaris* culture method and its medium formulation [J]. *Microbiology China tongbao*, 2018, 45(5): 981-989. doi:10.13344/j.microbiol.china.170596.
- [15] 王珺, 王永强, 陈国华, 王军建, 严虹羽, 陈鸿林. 生态和营养条件对日本星杆藻生长的影响 [J]. 海洋渔业, 2014, 36(4): 329-334. doi:10.13233/j.cnki.mar.fish.2014.04.001.  
WANG J, WANG Y Q, CHEN G H, WANG J J, YAN H Y, CHEN H L. Effects of ecological and nutritional factors on growth of *Asterionella japonica* [J]. *Marine Fisheries*, 2014, 36(4): 329-334. doi:10.13233/

- j.cnki.mar.fish.2014.04.001.
- [16] 胡章喜, 安民, 段舜山, 徐宁, 孙凯峰, 刘晓娟, 李爱芬, 张成武. 不同氮源对布朗葡萄藻生长、总脂和总烃含量的影响[J]. 生态学报, 2009, 29(6): 3288–3294.
- HU Z X, AN M, DUAN S S, XU N, SUN K F, LIU X J, LI A F, ZHANG C W. Effects of nitrogen sources on the growth, contents of total lipids and total hydrocarbons of *Botryococcus braunii* [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29(6): 3288–3294.
- [17] 潘庭双, 胡贤江, 侯冠军, 蒋业林, 李海洋. 氮对微绿球藻生长的影响[J]. 安徽农业科学, 2001, 29(4): 548–555. doi:10.13989/j.cnki.0517-6611.2001.04.060.
- PAN T S, HU X J, HOU G J, JIANG Y L, LI H Y. Effect of Nitrogen Application on the growth of *Nannochloropsis oculata* [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2001, 29(4): 548–555. doi:10.13989/j.cnki.0517-6611.2001.04.060.
- [18] 王丽卿, 黄旭雄. 不同营养盐浓度下微绿球藻的生长及水体中氮磷的变化[J]. 上海水产大学学报, 2002, 11(3): 215–218.
- WANG L Q, HUANG X X. The growth of *Nannochloropsis oculata* cultured in different nutrient concentrations and the variations of nitrogen and phosphorus in culture tanks [J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2002, 11(3): 215–218.
- [19] 孔赞, 邹培, 宋黎明, 王子, 戚姣琴, 朱亮, 徐向阳. 铁对藻类生长及藻毒素合成影响研究进展[J]. 应用生态学报, 2014, 25(5): 1533–1540. doi:10.13287/j.1001-9332.2014.0006.
- KONG Y, ZOU P, SONG L M, WANG Z, QI J Q, ZHU L, XU X Y. Effects of iron on the algae growth and microcystin synthesis: A review [J]. *Journal of Applied Ecology*, 2014, 25(5): 1533–1540. doi:10.13287/j.1001-9332.2014.0006.
- [20] Wang Y C. Effects of nitrogen, phosphorus and iron on the growth of *Chaetoceros muelleri* [J]. *Marine Fisheries*, 2006, 28: 173–176.
- [21] 宋邦兴, 王珺, 陈国华, 杨金华, 许炳亮. 翼虫形藻培养基的筛选及优化[J]. 海洋渔业, 2016, 38(3): 297–303. doi:10.13233/j.cnki.mar.fish.2016.03.009.
- SONG B X, WANG J, CHEN G H, YANG J H, XU B L. Screening and optimizing of the culture medium of *Amphiprora alata* [J]. *Marine Fisheries*, 2016, 38(3): 297–303. doi:10.13233/j.cnki.mar.fish.2016.03.009.
- [22] 王永强, 王珺. 锤状中鼓藻培养条件的优化[J]. 广东农业科学, 2018, 45(4): 140–145. doi:10.16768/j.issn.1004-874X.2018.04.020.
- WANG Y Q, WANG J. Optimization of cultural conditions of *Bellerophon malleus* [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2018, 45(4): 140–145. doi:10.16768/j.issn.1004-874X.2018.04.020.

(责任编辑 崔建勋)