

篇名：

植物性餌料生物扁藻(*Tetraselmis*)的休眠與甦醒培養

作者：

曾奕燕。國立基隆海事高職。養一

指導老師：

趙文榮老師

壹●前言：

扁藻(*Tetraselmis*)又稱為綠色鞭毛藻，在水產養殖上有許多應用，牠們可以直接受投餵貝類幼生及甲殼類幼生如草蝦、蟹類之眼幼蟲期初期餌料，可提高活存率及生長率。

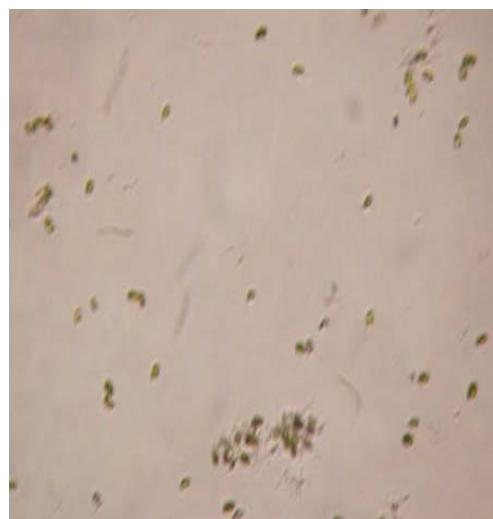
扁藻的乾重更是含有 74% 之蛋白質及 21% 碳水化合物，是可以供做海水輪蟲增殖之基礎餌料(註二)。

牠們的型態可以說是很微小，用肉眼是所看不見的，扁藻(*Tetraselmis*)又稱為綠色鞭毛藻、綠色四鞭藻等名稱，牠們的細胞扁平，橢圓至卵圓體形，有四根頂生等長的鞭毛自上端凹下部份伸出。

以前在分類上將它歸入綠藻門，綠藻綱，團藻目，衣藻科，扁藻屬(*Platymonas*)。後來以其細胞形態、光合色素及光合產物，重新劃分為綠鞭藻門(*Prasinophyta*)，綠叉藻綱，塔形藻目，扁藻科，扁藻屬(*Tetraselmis*)。

實驗當中學習到了如何讓扁藻(*Tetraselmis*)保存於無菌的狀態下和如何讓它甦醒起來，保種的意義在於方便以後隨時要進行水產仔稚苗繁殖時可隨取隨用，以節省採集、分離純化的時間。

在這個實驗當中我發現扁藻(*Tetraselmis*)是一種很可愛很神奇的藻類，像是一隻綠色小精靈一樣相當的活潑，且在水產養殖上也有很多應用，是一種我們值得去研究的藻類。



(註一)

貳●正文：

一、實驗目的

1. 學習使用電子天秤
2. 學習使用高溫高壓殺菌及配製培養基
3. 學習如何在培養皿上接種
4. 認識藻類在培養皿上的數量與休眠成長
5. 鑑定保種純度之成功率
6. 恢復液態少量之甦醒實驗
7. 減少重複採種分離純種之工作的麻煩
8. 預備動物性餌料生物之餌料擴大培養

二、實驗材料與步驟

1. 實驗設備：

	品名	型號
電磁加熱攪拌器	Cimarec	SP-46925
震盪培養器	Wisdom	OS54
高溫高壓滅菌器	Sturdy	SA-300 VF
恆溫培養箱	Hipoint	MT-316
電子天平	Mettler	AJ100
顯微鏡	Olympus	CH20

2. Walne 培養液配方(註三)：

貯備液 I	NaNO ₃	100.00	g
	NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	20.00	g
	Na ₂ EDTA	45.00	g
	H ₃ BO ₃	33.60	g
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.36	g
	FeCl ₃ · 6H ₂ O	1.30	g
	貯備液 II	1	ml
	蒸餾水	1, 000	ml
貯備液 III	維生素 B12	10	mg
	維生素 B1	200	mg
	蒸餾水	100	mg

* 培養液 1 公升添加貯備液 I 1 cc，貯備液 III 0.1 cc

三、本實驗培養的藻類是扁藻(*Tetraselmis*)，在培養之前須先將 Walne 營養鹽之培養液配製出來，將材料準備好之後，依配方取出適當的數量，放電子天秤上稱取。

四、配製好的營養鹽後，再以電子天秤稱取 1.5~2% 之洋菜粉(ager powder)(圖 6.)。

將培養液與洋菜粉混合均勻後(圖 7.)與接種的器具如白金環、滴管、漏斗(圖 8.)，移入高溫高壓滅菌器，設定 1.5kg/cm^2 、 121°C 及 15 分鐘，充分滅菌(圖 3.)。

五、將滅菌後的培養基(培養液+洋菜粉)趁熱在無菌箱內倒入培養皿及試管中，再平放(培養皿)或斜放(試管)，使之冷卻凝固(圖 11.12.)。

六、待洋菜凝固後，進行以下之固態保種接種動作：

1. 先以酒精噴灑雙手，待乾燥後(圖 9.)。
2. 雙手以 75% 酒精消毒，戴上口罩(或雙手使用無菌手套)。
3. 打開 Laminar flow 內之一般燈光及送風機。
4. 將白金環或細玻棒燒紅殺菌，白金環放冷後沾一些藻種。
5. 在平面或斜面培養基上劃 S 型或直線型，接種完後將試管瓶口稍用火烤過殺菌以防污染(圖 13.)。
6. 將接種好的平面或斜面培養基放置在有光照之培養架或培養箱內培養(圖 15.)。
7. 約 1~2 星期後培養基表面即可發現有藻類群落長出(可看出藻種顏色)(圖 14.15.)。
8. 再次分離即可得到純種優良之藻類，固態保種接種完成。

七、液態甦醒培養：

1. 藻種群落長出後，將試管與培養皿放入恆溫培養箱內長期保存，約可保存半年至一年(註二)。
2. 將固態斜面(或平面)培養基在無菌箱內，以殺菌之白金針(環)勾取少許，塗在載玻片上，滴上數滴無菌海水混合均勻(圖 17~20)。
3. 將載玻片移放入顯微鏡載物台，鑑定植物性餌料生物特徵，再與課本或圖鑑比對，是否為純種(圖 22.)。
4. 更進一步將斜面(或平面)培養基之植物性餌料生物，勾取少許接種到無菌三角瓶(250cc)，內含無菌培養液(100cc 無菌海水+Walne 營養鹽)移入震盪培養器，震盪培養 1 星期(震盪速度 125rpm/min)(圖 23.)。

八、1 星期後以微量吸管吸取 0.1cc，在載玻片上以顯微鏡在確認一次，是否為純種(圖 24.)。

九、將甦醒少量培養的純藻種留下，並作中量培養(200 公升)，預備當做動物性餌料生物培養之餌料。



圖 1.將三角瓶用蒸餾水把每個角落清洗乾淨。



圖 2.在將所有會用到的器具用鋁箔包包起來。



圖 3.準備放入高溫高壓滅菌器內。



圖 4.放入器具後等待高溫高壓滅菌器。

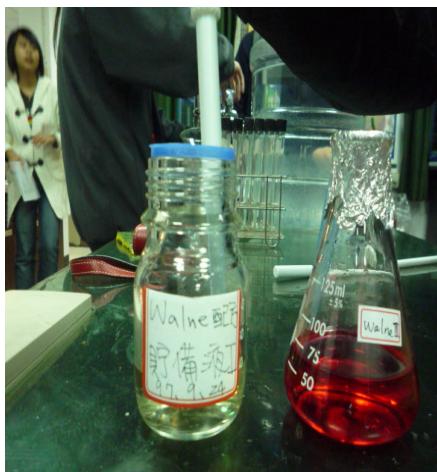


圖 5.在等待的同時我們先配置 Walne 營養液並各取幾cc。



圖 6.用電子天秤稱出 1.5~2% 的洋菜粉(ager powder)。



圖 7. 將培養液與洋菜粉混合後放在電磁攪拌機上準備加熱攪拌。



圖 8. 這個時候消菌完的器具也差不多好了，拿取時務必戴上手套。



圖 9. 用棉花沾取酒精(75%)擦拭無菌箱，且將裡面的器物移出。



圖 10. 加熱的洋菜已好了，將裡面的攪拌石拿出。



圖 11. 雙手以酒精(75%)消毒後，戴上手套以免燙傷，過程中不可以講話。

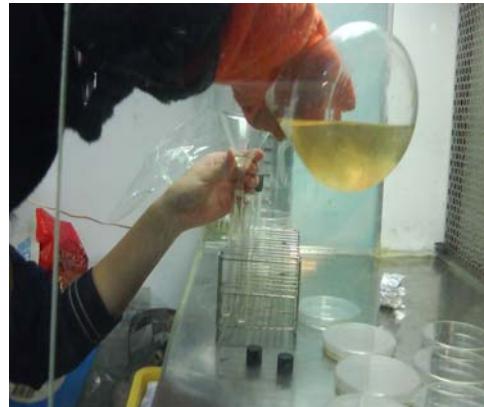


圖 12. 在倒洋菜的時候速度要迅速，以免洋菜凝固。



圖 13. 白金環以酒精燈消毒，之後沾取藻種並在培養皿及試管內劃 S 型曲線接種即告完成。



圖 14. 約兩個禮拜後我的培養皿就長出藻種了，劃上去的字也跑出來了。



圖 15. 斜面培養的藻類扁藻(*Tetraselmis*)也長出來了，這個階段已經完成了一半的實驗。



圖 16. 首先取一些無菌海水，以備下個步驟，扁藻和無菌海水的混合。



圖 17. 拿扁藻專用的滴管吸取一些無菌海水。



圖 18. 將扁藻專用的滴管滴上四滴無菌海水於載玻片上。



圖 19. 將白金環伸入斜面培養內，輕輕括取培養基上的扁藻群落。

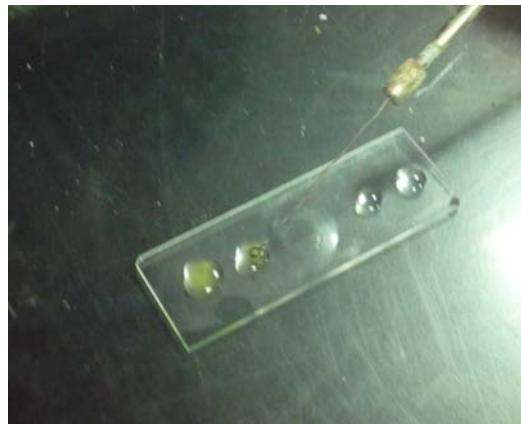


圖 20. 在將勾取到扁藻的白金環跟無菌海水混合，把扁藻洗到無菌海水裡，準備放在顯微鏡上鏡檢。



圖 21. 或者是勾取培養皿上的扁藻也可以。



圖 22. 鏡檢鑑定後的扁藻長得非常純，有些已經開始游動了。



圖 23. 倒入 100cc 的無菌海水加上 Walne 營養液至三角瓶內。

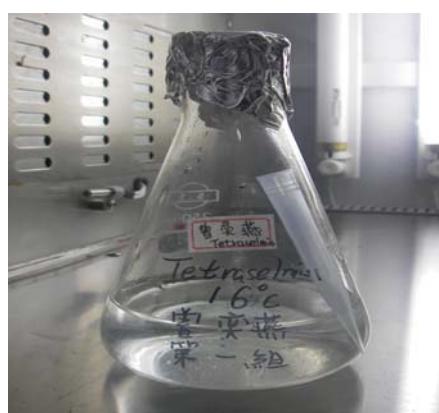


圖 24. 將我所鑑定好的扁藻，用白金環把他摳入三角瓶內，再移入震盪培養器上，5~7 天後水色即可達草綠色。

參●結論：

一、實驗結果的趨勢：

1. 固態休眠藻種生長群落：經過三天後我發現我的培養皿已經有長出明顯的藻類群落，過了 10~14 天後，它長得非常鮮綠且明顯、濃密，發現它的增殖速度很快，培養皿上也沒有其他顏色的藻類群落，表示我的培養皿沒有受到污染。
2. 液態甦醒培養：將白金環刮取到的扁藻放入顯微鏡上鏡檢後，我發現扁藻一碰到海水後就馬上被甦醒起來了，每顆扁藻也幾乎都很活潑，像似綠色小精靈一樣，非常的神奇，扁藻的密度也相當濃，純度很高(圖 22)。

二、實驗過程遭遇的事情與注意事項：

1. 這次的實驗使用到了高溫高壓滅菌器及使用到了酒精燈，這兩種器具是很危險的，所以我們都要很謹慎的操作，甚至要戴上手套，以免從高溫高壓滅菌器拿取消菌的器具時會燙到。
2. 在倒洋菜時，我們發現速度要快，否則洋菜很快就會凝固了，洋菜甚至會卡在漏斗中，無法順利倒出，所以時間的控制上要拿捏好。
3. 在倒洋菜的同時培養皿的蓋子不可以掀太開，以免細菌會跑進去，可能會造成細菌污染或造成發霉的現象。
4. 實驗當中，使用到了酒精燈，當酒精剩不到三分之一時，就要添加酒精，但是一定要注意安全。
5. 勾取扁藻(*Tetraselmis*)的時候要小心且要慢慢刮取，否則會刮到培養皿裡的洋菜，可能會造成鑑定時不好鑑定。
6. 實驗當中，使用到了 Walne 培養液，培養液的量要依配方比利添加，太多太少對藻類都不好。

三、未來展望：

1. 保種的藻種選擇應針對其特性可以更多樣化(註二)例如：
 - A. 螺旋藻(*Spirulina*)它含有高度的蛋白質含量達 63% 又可做為人類蛋白質糧食來源及促進免疫力之健康。
 - B. 單細胞綠藻(*Chlorella*)因體積小、蛋白質培養容易及繁殖快速攜帶方便，可做為未來人類移民太空之糧食及製造氧氣之來源。
 - C. 骨藻(*Skeletonema*)藻體含有高量(約 43%)的高度不飽和脂肪酸(20 : 5n ; EPA)，是牡蠣優良的餌料，可提高其營養價及活存率。
 - D. 裸藻(*Euglena*)可做為必需脂肪酸(EPA 及 DHA)營養強化的良好載體(vector)，又因生長於有機質或腐植質多的靜態水域，所以可做為污染水域之生物指標。
 - E. 擬球藻(*Nannochloropsis*)蛋白質含量達 50% 及脂質佔 22% 尤其是二十碳

五烯酸(20 : 5n ; EPA)，適合種苗培育池培養水色及小型動物性餌料生物之培養與強化營養價。

以上這些藻種都是我們值得去保種、培養及研究的。

2. 如何改善劃破培養皿的機率：假如要改善破培養皿的機率，可以多加些洋菜粉(2%)，當洋菜粉加入太少時，可能會容易劃破洋菜表面，另外一個較簡單的方法就是在括取藻類時我們的動作盡量做輕微些。
3. 保種的方式有很多種，但因學校的設備只能進行洋菜保種，最經濟方便；若能以液態氮氣或真空凍結保存法，或許有更多藻種、更方便及更有效的結果(註二)。

肆●弓|註資料

一、 Patterson, D. and B. Andersen. "Tetraselmis suecica (Kylin) Butcher."

<http://www.eol.org/pages/901592>

二、趙文榮、曾金成、陶申秋(2002) 餌料生物學，台北市， 格致圖書有限公司

三、蘇惠美(1999) 餌料生物之培養與利用，基隆市，臺灣省水產試驗所