文章编号：1004－2490(2021)03－0377－08

球等鞭金藻培养条件的响应面法优化

田 镇[1,2]，曹 奕[1]，陈爱华[1]，吴杨平[1]，
张 雨[1]，陈素华[1]，张志东[1,2]，李秋洁[1,2]

(1. 江苏省海洋水产研究所，江苏南通 226007；
2. 上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心，上海 201306)

摘 要：为探究球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)的最优培养条件，采用实验生态学方法和响应面法，以球等鞭金藻的比生长速率为指标，设置不同温度、盐度、接种量单因素实验及 Box-Benhnken(BBD)模型多因素交叉实验。结果表明：1)在一定温度、盐度及接种量范围内，球等鞭金藻的比生长速率随着各因素的增大，呈先升高后下降的趋势；2)通过响应面 BBD 模型优化出球等鞭金藻的最佳培养条件为：温度 26.38℃、盐度 26.61、接种量 1.29×10^6 个·mL^{-1}，此时的球等鞭金藻的比生长速率最大，为 0.44 d^{-1}。

关键词：球等鞭金藻；温度；盐度；接种量；比生长速率；响应面法优化
中图分类号：S 963.21 **文献标志码**：A

球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)隶属于金藻门(Chrysophyta)，是1938年被首次分离出来的单细胞藻类[1]，其可以通过自身光合作用，吸收水体中无机氮(主要是氨氮)，用于自身生长与繁殖，完成氮素的转移；由于其个体小、繁殖快的优势，球等鞭金藻成为新概念引领下极具潜力的绿色污水处理技术的主要微型藻类之一[2]。因其营养价值较高，也常作为饵料被用于文蛤(*Meretrix meretrix*)、大竹蛏(*Solen grandis*)、缢蛏(*Sinonovacula constricta*)等双壳贝类的人工育苗中[3]。

比生长速率是指单位时间内单位质量的单细胞生物所增加的生物量，它是反映微藻、细菌等单细胞生物生长速率的重要参数[4]。比生长速率不仅能够准确反映出单细胞藻类在一定时间的特定生长率，更能综合体现藻类生长与死亡率平衡的动态变化。响应面法是统计学与数学相结合的方法，它不仅有着正交实验中的交互作用，还可以利用数学模型得到响应与各变量之间的函数关系式，从而进一步对全部变量因素组合进行预测得到最优响应面值，并因其具有实验次数少、周期短以及多因素相互作用等诸多优势，近年来被大量应用于食品和医药等多个领域中[5-6]。目前，有关单细胞藻类仅见温度[7-8]、光照[9-10]等单因素对单细胞藻类生长的影响研究，以及藻类生长繁殖对水环境(N、P等)的影响研究[11-12]，而环境因素交互作用对单细胞藻类生长的研究报道较少见，仅见于采用正交法优化小球藻(*Chlorella vulgaris*)[13]、双鞭甲藻(*Crypthecodinium cohni*)[14]等单细胞藻类培养条件，但鲜见球等鞭金藻培养的响应面法优化的报道。因此，本文以球等鞭金藻比生长速率为指标，通过响应面法优化其在适宜温度、盐度及接种量的最佳条件，旨在为球等鞭金藻实验室培

收稿日期：2020－02－25
基金项目：江苏省渔业科技类重大项目(D2018-1)；江苏省科技厅苏北专项(SZ-YC2018064)；水产良种保种及更新-文蛤项目(2019-SJ-006)；南通市基础科学研究项目(JC2018026)；水产良种保种及更新-文蛤项目(2020-SJ-006)
作者简介：田 镇(1996—)，男，山东临沂人，硕士研究生，研究方向为贝类遗传育种与分子生物技术，E-mail：2773688317@qq.com。曹奕为并列第一作者。
通信作者：陈爱华(1966—)，女，研究员。E-mail：chenah540540@aliyun.com

养、规模化繁育等提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用藻类为江苏省文蛤良种场所培养的球等鞭金藻藻液,藻类培养海水取自江苏启东近海,经砂滤池黑暗沉淀处理并经二次煮沸后使用。取 3 500 mL 实验用水于 5 000 mL 三角烧瓶中,并加入 15 mL 的实验营养液。营养液配方为:25 mg · L^{-1} $NaNO_3$、2.5 mg · L^{-1} K_2HPO_4、2.5 mg · L^{-1} $C_6H_5FeO_7$、8 mg · L^{-1} EDTA。所用仪器器皿均采用医用酒精消毒后使用。在实验所设定的特定光照条件下进行培养,光照强度约为 6 000 lx,光照周期为 12 h。为避免藻类沉淀,每天摇晃实验烧瓶 2 ~ 3 次,培养周期为 4 d。

1.2 单因素实验

1.2.1 温度对球等鞭金藻比生长速率影响实验

实验设置 5 个温度梯度:22、24、26、28、30℃,并设置 3 组重复。室温为 22℃,采用加热板水浴调控温度;实验盐度为 30,藻类接种量为 1.30 × 10^6 个 · mL^{-1},pH 为 8.7,培养条件及方法同 1.1。4 d 后利用血球计数板进行计数得到最终藻类浓度,并根据公式计算出球等鞭金藻的比生长速率。

1.2.2 盐度对球等鞭金藻比生长速率影响实验

实验设置 5 个盐度梯度:18、21、24、27、30,并设置 3 组重复。盐度利用淡水进行稀释并通过盐度计进行观测确定实验水体盐度,温度设置为 22 ℃,藻类接种量为1.30 × 10^6 个 · mL^{-1},pH 为 8.7,培养条件及方法同 1.1。4 d 后利用血球计数板进行计数得到最终藻类浓度,并根据公式计算出球等鞭金藻的比生长速率。

1.2.3 接种量对球等鞭金藻比生长速率影响实验

根据球等鞭金藻母液浓度调节实验瓶中藻类接种量,实验设 5 个接种梯度,0.70 × 10^6、1.00 × 10^6、1.30 × 10^6、1.60 × 10^6、1.90 × 10^6 个 · mL^{-1},并设置 3 组重复。温度设置为 22 ℃,盐度为 30,pH 为 8.7,培养条件及方法同 1.1。4 d 后利用血球计数板进行计数得到最终藻类浓度,并根据公式计算出球等鞭金藻的比生长速率。

1.3 多因素实验

在单因素实验的基础上,以球等鞭金藻比生长速率为指标,运用响应面法 Box-Benhnken (BBD)模型,选择 3 因素 3 水平的中心组合方案,以温度(A)、盐度(B)和球等鞭金藻接种量(C)为主要考察因素,进行响应面实验,实验因素水平编码见表 1,实验装置及方法同 1.1。

表 1 因素水平表

Tab. 1 Design table of factors and levels

因素 Factors	水平 Levels		
	-1	0	1
温度(A)/℃ Temperature(A)	24	26	28
盐度(B) Salinity(B)	24	27	30
接种量(C)/($\times 10^6$ 个 · mL^{-1}) Inoculation level(C)	1.00	1.30	1.60

1.4 比生长速率的测定

球等鞭金藻的比生长速率采用如下公式计算[15]:

$$\mu = \frac{\ln C_t - \ln C_0}{t}$$

式中,C_0(10^6 个 · mL^{-1})指藻类的起始浓度,C_t(10^6 个 · mL^{-1})指实验结束时藻类的浓度,t(d)指实验时间,μ(d^{-1})指球等鞭金藻的比生长速率。

1.5 数据统计

单因素实验所得数据均用 Excel 2016 整理,并用 Origin 8.0 作图。通过 SPSS 22.0 进行单因素方差分析(one-way ANOVA),若差异显著($P < 0.05$),再作 LSD 法多重比较。多因素实验采用 Design-expert 8.0 软件 BBD 模型进行实验设计和响应面法分析。实验结果均以平均值 ± 标准差(means ± SD)表示。

2 结果与讨论

2.1 单因素实验

温度和盐度是影响海洋藻类生长的重要环境因素,会一定程度地影响海洋单细胞藻类的细胞分裂周期、酶的活性、吸收利用营养物质的效率,进而影响整个藻类生长繁殖过程[16-18]。单因素研究结果(图 1 ,图 2)显示,当温度在 22 ~ 30 ℃时或盐度在 18 ~ 30 时,球等鞭金藻的比生长速率会呈先升高后降低的趋势。其中在温度 26 ℃、盐度 27 时,球等鞭金藻的比生长速率达到

最大,且温度和盐度的交互作用对球等鞭金藻的比生长速率影响显著($P<0.05$)。这与塔玛亚历山大藻(*Alexandurium tamarense*)[19-20]、小球藻(*Chlorella vulgaris*)[13]生长规律一致。其原因可能是,温盐过高或者过低可能会抑制某些酶的活性,降低藻体内部的 CO_2 溶解度,使得光合作用下降,进而影响藻体物质合成和能量代谢的过程,从而影响其生长繁殖[22-23]。

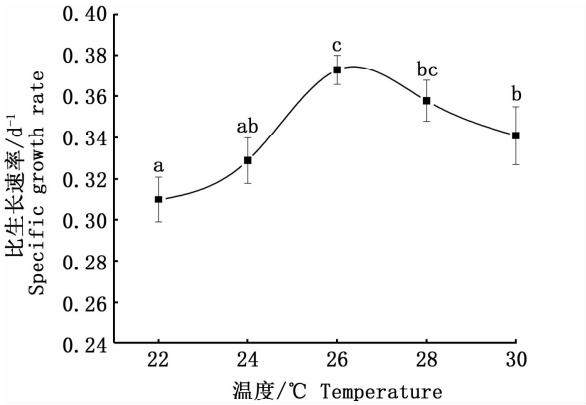

图 1　温度对球等鞭金藻比生长速率的影响

Fig. 1　Effect of temperature on the specific growth rate of *Isochrysis galbana*

注:不同小写字母表示试验组之间差异显著($P<0.05$)

Note: Different small letters indicate significant differences between different groups($P<0.05$)

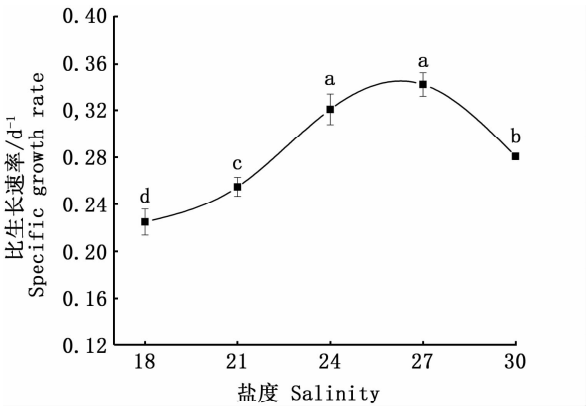

图 2　盐度对球等鞭金藻比生长速率的影响

Fig. 2　Effect of salinity on the specific growth rate of *Isochrysis galbana*

注:不同小写字母表示试验组之间差异显著($P<0.05$)

Note: Different small letters indicate significant differences between different groups($P<0.05$)

接种量的多少是影响藻类生长繁殖的重要因素,在实际生产过程中,接种量多少会直接影响藻类培养效率[24]。研究结果(图 3)显示,球等鞭金藻比生长速率在接种量为$(0.70\sim1.90)\times10^6$ 个·mL^{-1} 时呈先增大后减小的趋势,在 1.30×10^6 个·mL^{-1} 时,比生长速率达到最大。这可能是由于在接种量为$(0.70\sim1.30)\times10^6$ 个·mL^{-1}时,球等鞭金藻营养充分,比生长速率逐渐升高。当超过 1.30×10^6 个·mL^{-1},由于培养基中代谢废物积累量逐渐增多、营养盐含量逐渐减少、藻细胞接触抑制等原因,球等鞭金藻的生长逐渐受到抑制,甚至停止[25]。这与眼点拟微绿球藻(*Nannochloropsis oculata*)、三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)、中肋骨条藻(*Skeletonema* sp.)的生长规律一致[26]。

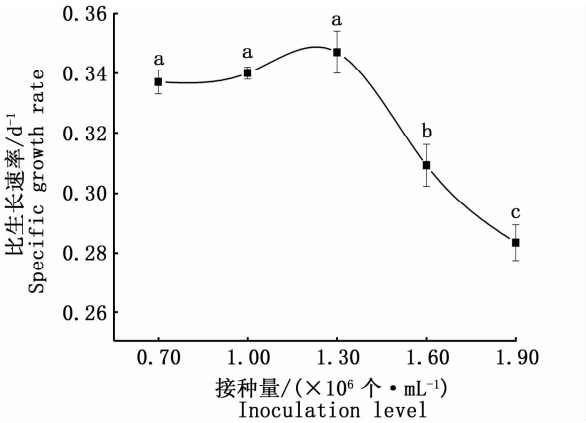

图 3　接种量对球等鞭金藻比生长速率的影响

Fig. 3　Effect of inoculation level on the specific growth rate of *Isochrysis galbana*

注:不同小写字母表示试验组之间差异显著($P<0.05$)

Note: Different small letters indicate significant differences between different groups($P<0.05$)

2.2　响应面多因素交叉试验

为进一步研究温度、盐度、接种量 3 个因素之间的交互作用对球等鞭金藻生长的影响,通过响应面法优化得到球等鞭金藻的最佳比生长速率。本实验球等鞭金藻在多因素交叉条件中培养,实验交叉设计及结果见表 2。回归曲线模型表明(表 3),F 值为 30.68,$P<0.000\ 1$,模型的决定系数(r^2)为 0.975 3,说明该模型具有较好的拟合性,可以用于 3 个因素对球等鞭金藻的比生长速率分析。偏差系数(adeq precision)代表实验的精确度,偏差系数越小,实验的可靠性越高,本次

实验的偏差系数仅为 14.9%，说明本实验可信。经方差分析（表 3），温度的单因素效应对球等鞭金藻比生长速率的影响显著（$P<0.05$），盐度的线性效应对球等鞭金藻比生长速率的影响不显著（$P>0.05$），接种量的线性效应对球等鞭金藻比生长速率影响不显著（$P>0.05$），温度、盐度和接种量 3 因素间的曲面效应都能够对球等鞭金藻比生长速率影响极显著（$P<0.01$）。这和单因素实验中得出的结论基本相同。通过响应面法得出，球等鞭金藻比生长速率预测值 μ 对自变量 A（温度）、B（盐度）和 C（接种量）的编码值二次多项式回归方程为：

$$\mu = 0.44 + 0.01A - 5.68\times10^{-3}B + 3.11\times10^{-4}C - 0.02AB - 0.01AC - 7.17\times10^{-3}BC - 0.04A^2 - 0.04B^2 - 0.04C^2$$

球等鞭金藻比生长速率预测值对实际值自变量 A、B 和 C 的二次多项式回归方程为：

$$\mu = -13.34 + 0.63A + 0.31B + 0.02C - 3.40\times10^{-3}AB - 2.38\times10^{-4}AC - 7.97\times10^{-5}BC - 9.69\times10^{-3}A^2 - 4.03\times10^{-3}B^2 - 4.25\times10^{-5}C^2$$

通过对球等鞭金藻生长条件优化预测建立上述模型并绘制响应面图（图 4），得出温度、盐度和接种量 3 个因素的最优组合条件为：温度26.38 ℃、盐度 26.61 和接种量 1.29×10^6 个 · mL^{-1}。此时球等鞭金藻的比生长速率的预测值可达 0.44 d^{-1}。

2.3 模型验证

通过 BBD 模型得到球等鞭金藻比生长速率的最优条件。选择同一批藻种，设计 3 个平行试验组，实验预测结果和实际验证结果见表 4。验证结果表明，模型预测与实际验证的比生长速率并无显著性差异（$P>0.05$），响应面模型分析方法可靠。在实际生产过程中可以利用设备对各变量进行精准控制，设置培养条件为：温度 26 ℃左右、盐度 27 左右、接种量 1.30×10^6 个 · mL^{-1} 左右，以保证球等鞭金藻的比生长速率为最大值。

表 2 实验设计与结果

Tab. 2 Box-Benhnken design with the observed responses

实验号 No.	A	B	C	比生长速率/ d^{-1} Specific growth rate
1	0	0	0	0.43 ± 0.01
2	0	0	0	0.44 ± 0.01
3	0	0	0	0.36 ± 0.01
4	1	0	1	0.35 ± 0.02
5	0	1	1	0.37 ± 0.01
6	1	−1	0	0.36 ± 0.01
7	−1	0	−1	0.24 ± 0.02
8	0	1	−1	0.36 ± 0.01
9	−1	0	1	0.38 ± 0.02
10	−1	−1	0	0.35 ± 0.01
11	−1	1	0	0.43 ± 0.01
12	1	0	−1	0.38 ± 0.01
13	0	−1	−1	0.35 ± 0.01
14	0	0	0	0.43 ± 0.02
15	0	−1	1	0.37 ± 0.01
16	1	1	0	0.34 ± 0.01
17	0	0	0	0.43 ± 0.01

表 3 回归模型方差分析

Tab. 3 ANOVA for the regression model

变异来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean squares	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
模型 Model	0.022	9	0.13	30.68	< 0.000 1	**
A	7.540×10^{-4}	1	7.540×10^{-4}	9.62	0.017 3	*
B	2.316×10^{-4}	1	2.316×10^{-4}	2.95	0.129 3	
C	5.092×10^{-7}	1	5.092×10^{-7}	6.497×10^{-3}	0.938 0	
AB	1.346×10^{-4}	1	1.346×10^{-4}	17.18	0.004 3	**
AC	4.926×10^{-4}	1	4.926×10^{-4}	6.28	0.040 6	*
BC	2.175×10^{-4}	1	2.175×10^{-4}	2.77	0.139 7	
A^2	5.712×10^{-3}	1	5.712×10^{-3}	72.87	< 0.000 1	**
B^2	4.376×10^{-3}	1	4.376×10^{-3}	55.83	0.000 1	**
C^2	3.626×10^{-3}	1	3.626×10^{-3}	46.25	0.000 3	**
残差 Residual	0.014	1	1.963×10^{-3}			
失拟项 Lack of fit	3.615×10^{-4}	3	1.884×10^{-3}	2.57	0.191 6	
纯误差 Pure error	1.872×10^{-4}	4	1.994×10^{-3}			
总离差 Cor total	0.022	16				

注：拟合系数 = 0.975 3，校正系数 = 0.943 5，偏差系数 = 14.928%；*：$P<0.05$，差异显著，**：$P<0.01$，差异极显著

Note: r^2 = 0.975 3, Adj r^2 = 0.943 5, adeq precision = 14.928%; *: $P<0.05$, indicating significant difference, **: $P<0.01$, indicating extremely significant difference

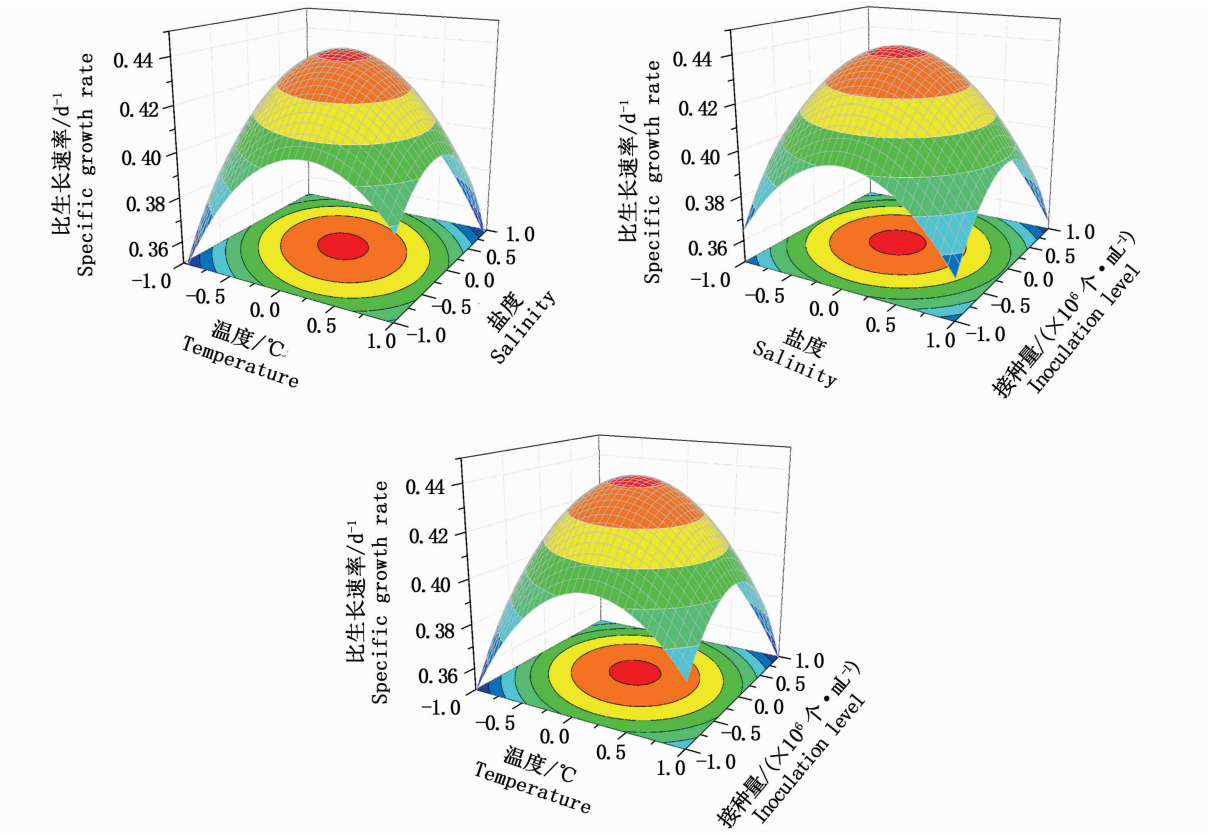

图 4　交互作用对球等鞭金藻比生长速率影响的响应面图

Fig. 4　Response surface showing interactive effects of factors

表 4　实验结果验证

Tab. 4　Experimental results verification

实验条件 Experimental condition	温度/℃ Temperature	盐度 Salinity	接种量/($\times 10^6$ 个 · mL^{-1}) Inoculation level	比生长速率/d^{-1} Specific growth rate
模型预测最适条件 Model prediction of optimum conditions	26.38	26.61	1.29	0.44
实际验证最适条件 Actual verification of optimum conditions	26.00	27.00	1.30	0.44 ± 0.01

参考文献:

[1]　孙颖颖,王长海. 球等鞭金藻的生长速率与培养液中营养盐的关系研究[J]. 海洋科学,2006(1):78 – 83.
SUN Y Y, WANG C H. Study on relation between the growth rates of *Isochrysis galbana* and nutrient salt concentration[J]. Marine Sciences,2006(1):78 – 83.

[2]　贺　锋,吴振斌. 水生植物在污水处理和水质改善中的应用[J]. 植物学通报,2003(6):641 – 647.
HE F, WU Z B. Application of aquatic plants in sewage treatment and water quality improvement [J]. Chinese Bulletin of Botany,2003(6):641 – 647.

[3]　王扬才, 叶显峰. 饵料藻类对贝类育苗的影响[J]. 齐鲁渔业,2003,20(11):6 – 12.
WANG Y C, YE X F. Requirement of the reared prawn to the protein, amino acid and carbohydrate [J]. Shandong Fisheries,2003,20(11):6 – 12.

[4]　王岁楼. 微生物比生长速率 μ 的含义[J]. 郑州轻工业学院学报,1993,8(4):6 – 9.
WANG S L. Meaning on specific growth rate of microorganism[J]. Journal of Zhengzhou Institute of Light Industry,1993,8(4):6 – 9.

[5]　徐　萌,包建强,黄　雯,等. 响应面法优化斑点叉

尾鲫鱼皮明胶-壳聚糖可食膜的制备工艺[J]. 海洋渔业,2017,39(4):463 – 470.
XU M, BAO J Q, HUANG W, *et al*. Optimizing edible fish skin gelatin, chitosan membrane preparation by response surface method[J]. Marine Fisheries, 2017,39(4):463 – 470.

[6] 胡 昂,段 蕊,刘志东,等. 响应面法优化中性蛋白酶酶解海湾扇贝副产物制备抗氧化酶解物研究[J]. 海洋渔业,2020,42(1):98 – 109.
HU A, DUAN R, LIU Z D, *et al*. Optimization of hydrolysis conditions on the antioxidant hydrolysates from *Argopecten irradias* by-product using neutral protease[J]. Marine Fisheries,2020,42(1):98 – 109.

[7] 李飞鹏, 陈蒙蒙, 贾玉宝, 等. 气象因素对封闭浅水湖泊浮游藻类生长和分布影响[J]. 水生态学杂志, 2019,40(5):55 – 62.
LI F P, CHEN M M, JIA Y B, *et al*. Effects of meteorological factors on growth and distribution of phytoplankton in an enclosed shallow lake [J]. Journal of Hydroecology,2019,40(5):55 – 62.

[8] 文世勇, 林雨霏, 王紫竹, 等. 米氏凯伦藻和东海原甲藻生长的光照强度生态幅研究[J]. 海洋与湖沼,2019,50(3):664 – 671.
WEN S Y, LIN Y F, WANG Z Z, *et al*. Ecological amplitude for light intensity of *Karenia mikimotoi* and *Prorocentrum donghaiense* at different temperatures in laboratory cultures [J]. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 2019,50(3):664 – 671.

[9] 叶志林, 曹洁茹, 吴 霓, 等. 温度,光照和盐度对产麻痹性贝类毒素藻类生长及产毒的影响[J]. 海洋环境科学, 2018,37(3):321 – 325, 348.
YE Z L, CAO J R, WU N, *et al*. Effects of temperature, light intensity and salinity on growth and toxin production of paralytic shellfish poisoning toxins-producing dinoflagellates [J]. Marine Environmental Science, 2018, 37(3): 321 – 325, 348.

[10] 刘红涛. 铜绿微囊藻生长与环境因子的关系及其铜胁迫下的毒理学效应[D]. 武汉:华中师范大学,2003.
LIU H T. The relationship between environment factors and the growth of *Microcystis aeruginosa* and its toxicology under cupric ion stress[D]. Wuhan: Central China Normal University,2003.

[11] 魏 静, 林 莉, 潘 雄, 等. 不同环境胁迫因子对藻类分子生物学特性的影响研究进展[J]. 长江科学院院报, 2020,37(4):14 – 24.
WEI J, LIN L, PAN X, *et al*. Research progress about the effects of different environmental stress factors on algae in molecular biology[J]. Journal of Yangtze River Scientific Research Institute, 2020,37(4):14 – 24.

[12] XU D, ZHOU Y, ZHENG J. *et al*. Optimization of ultrasound-assisted extraction of natural antioxidants from the flower of *Jatropha Integerrima* by response surface methodology[J]. Molecules,2016,21(1):1 – 12.

[13] 钟晓璇, 颜菲菲, 曲 奕, 等. 响应面法优化蛋白核小球藻的生长条件[J]. 河北渔业, 2019(3): 35 – 40.
ZHONG X X, YAN F F, QU Y, *et al*. Optimization of growth conditions of *Chlorella* by response surface method [J]. Hebei Fisheries, 2019(3):35 – 40.

[14] 李正鹏,尚 耘. 双鞭甲藻液体菌种培养条件优化[J]. 食品工业科技,2010,31(3):228 – 229,238.
LI Z P, SHANG Y. Optimization of liquid strain fermentation conditions for *Crypthecodinium cohnii* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2010,31(3):228 – 229,238.

[15] 刘 义, 谭安民, 谢昌礼, 等. 细胞动力学研究: Ⅲ. 细菌算术级数式生长过程热动力学[J]. 物理化学学报,1996(5):451 – 455.
LIU Y, TAN A M, XIE C L, *et al*. Thermokinetic study of bacterial arithmetic series growth[J]. Acta Physico Chimica Sinica,1996(5):451 – 455.

[16] 张 曼. 不同生长条件对乌江适生藻类生长、光合作用和叶绿素荧光特性的影响[D]. 重庆: 西南大学,2007.
ZHANG M. Effects of several ecological factors on the growth, photosynthesis and chlorophyll flurescence of algea from Wujiang River [D]. Chongqing: Southwest University,2007.

[17] EPPLEY R W. Temperature and phytoplankton growth in sea[J]. Fishery Bulletin-National Oceanic and Atmospheric Administration,1972, 70(4):1063 – 1085.

[18] GOLDMAN J C, CARPENTER E J. A kinetic approach to the effect of temperature on algal growth [J]. Limnology & Oceanography, 1974,19(4): 756 – 766.

[19] RENAUD J P, ROCHEL N, RUFF M, *et al*. Crystal structure of the rar-γ ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid [J]. Nature, 1995, 378 (6558): 681 – 689.

[20] 江天久, 黄伟建, 王朝晖, 等. 几种环境因子对塔玛亚历山大藻(大鹏湾株)生长及其藻毒力影响[J]. 应用与环境生物学报, 2000, 6(2):151 – 154.
JIANG T J, HUANG W J, WANG Z H, *et al*. Effects of water temperature, salinity and pH on growth and toxicity of *Alexandrium Tamarense* (Lebour) balech (Dapeng strain) [J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2000, 6(2):151 – 154.

[21] 郭　兵, 龚阳敏, 万　霞, 等. 光强和温度对球等鞭金藻(*Isochrysis sphaerica*)生长及其脂肪酸的影响[J]. 中国油料作物学报,2011,33(3):295 – 301.
GUO B, GONG Y M, WAN X, *et al*. Effect of light intensity and temperature on growth and fatty acid composition of *Isochrysis sphaerica* [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences,2011,33(3):295 – 301.

[22] MAURICE L, TREMBLAY J-É. Algal cultures, analogues of blooms and applications by subba rao, D. V. (Ed.)[J]. Journal of Phycology, 2006,42(5):1157 – 1159.

[23] 苏永全,吕迎春. 盐分胁迫对植物的影响研究简述[J]. 甘肃农业科技,2007,9(3):23 – 27.
SUN Y Q, LV Y C. Effects of salt stress on plants [J]. Gansu Agricultural Science and Technology, 2007,9(3):23 – 27.

[24] CLAQUIN P, PROBERT I, LEFEBVRE S, *et al*. Effects of temperature on photosynthetic parameters and tep production in eight species of marine microalgae[J]. Aquatic Microbial Ecology, 2008, 51(1):1 – 11.

[25] 秦业海. 基于 SparkR 的藻类生长模型及预测[D]. 南宁:广西大学,2019.
QIN Y H. Algal growth model and prediction based on SparkR [D]. Nanning: Guangxi University, 2019.

[26] 王　辉. 三种海洋微藻的培养优化及其对铜和锌的吸附研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2017.
WANG H. Cultivation optimization of their absorption for copper and zinc[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology,2017.

Optimization of culture conditions of *Isochrysis galbana* by response surface method

TIAN Zhen[1,2], CAO Yi[1], CHEN Aihua[1], WU Yangping[1],
ZHANG Yu[1], CHEN Suhua[1], ZHANG Zhidong[1,2], LI Qiujie[1,2]
(1. *Jiangsu Institute of Marine Fisheries*, *Nantong Jiangsu* 226007, *China*; 2. *National Demonstration Center for Experinental Fisheries Science Education*, *Shanghai Ocean University*, *Shanghai* 201306, *China*)

Abstract: *Isochrysis galbana* has the advantages of small size and fast reproduction. It has become one of the main micro-algae with great potential for green sewage treatment technology under the new concept. Because of its high nutritional value, it is often used as bait in the artificial breeding of bivalve shellfish such as *Meretrix meretrix*, *Solen grandis*, *Sinonovacula constricta* and so on. Response surface method is a combination of statistics and mathematics. It not only has the interaction in the orthogonal experiment, but also can use the mathematical model to get the functional relationship between the response and each variable, so it is an effective method to further predict the combination of all variable factors and get the optimal response surface value to solve scientific and production problems. Specific growth rate refers to the increased biomass of single-celled organisms per unit mass per unit time, which is an important parameter reflecting the growth rate of single-celled organisms such as microalgae and bacteria. The specific growth rate can not only accurately reflect the specific growth rate of microalgae in a certain time period, but also can comprehensively reflect the dynamic changes of the balance between microalgae growth and mortality. In order to optimize the culture conditions of *Isochrysis galbana*, using the method of experimental ecology and response surface (Box-Behnken mode), different experimental groups with different temperatures, salinities and initial inoculation levels were set up. Single factor experiment and multifactor experiment (Box-Benhnken model) were constructed to obtain the specific growth rate of *Isochrysis galbana*. Results showed that: 1) In a certain range of temperature, salinity and initial inoculation level, the specific growth rate of *Isochrysis galbana* increased first and then decreased with the increase of various factors; 2) The optimization of culture conditions of *Isochrysis galbana* respectively were: temperature 26.38 ℃, salinity 26.61, and initial inoculation level 1.29×10^6 cell · mL^{-1}, and the maximum specific growth rate of *Isochrysis galbana* was 0.44 d^{-1}. The model conclusion data is available and can be applied to the actual production process. Our results could provide scientific basis for laboratory culture and large-scale propagation of *Isochrysis galbana*. In this paper, taking the specific growth rate of *Isochrysis galbana* as an index, the optimum conditions of suitable temperature, salinity and initial inoculation level were optimized by response surface method to provide scientific basis for laboratory culture and large-scale breeding of *Isochrysis galbana*.

Keywords: *Isochrysis galbana*; temperature; salinity; inoculation level; specific growth rate; response surface optimization