

微绿球藻固定化培养及其对对虾养殖水质调控

郑 莲, 黄翔鹄, 刘楚吾, 陈艳娟

(湛江海洋大学 水产学院, 广东 湛江 524025)

摘要: 用褐藻酸钙作固定化载体, 初步探讨了胶球直径、不同接种量、CaCl₂ 溶液浓度、褐藻酸钠浓度等固定化条件对微绿球藻 (*Nannochloris oculata*) 生长及其对养殖水质的影响。结果表明, 微绿球藻固定化培养的最好条件是胶球的直径为 2.5 mm、微藻接种量为 1×10^6 Cell/mL, CaCl₂ 溶液的质量分数为 3%, 褐藻酸钠溶液质量分数为 2%。在此条件下制备的固定化藻珠, 微绿球藻生长率较高, 生长周期较长。实验期间固定化微绿球藻的生物量增加了约 17 倍, 证明了它的生理活性不会因固定化而受干扰。引入固定化的微绿球藻不但可以降低养殖水体中氨氮、亚硝酸氮等有害因子的浓度, 还能提高水中溶解氧含量, 使水体环境长时间处于良好的动态平衡状态。

关键词: 固定化培养; 微绿球藻; 养殖水质; 调控

中图分类号: Q178.112 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2005)06-0004-05

藻类固定化技术起始于 20 世纪 80 年代, 早期主要应用于生化生产和能源提供^[1]。在环境领域中固定化藻类主要应用于生物监测和废水处理, 它具有藻细胞密度高、反应速度快、运行稳定可靠、微生物流失少、不需分离、能提纯和保存高效菌株等优势。固定化微藻细胞净化污水的研究刚刚起步, 其研究包括对 N、P 的去除^[2-4], 对重金属的吸收, 如 Wilkinson 等^[5] 人研究表明, 用海藻酸钙固定小球藻可去除污水中 99% 的汞, 固定化技术大大提高了藻类对重金属的富集。孙红文等^[6] 指出, 藻类能为降解有机物的好氧细菌提供氧气, 因而提高抗击高浓度废水的能力, 并指出藻类固定化技术用于废水治理是非常有前景的, 尤其是采用藻菌共生系统。陈衍昌^[7] 初步研究了固定化栅藻改善养殖水质。微绿球藻 (*Nannochloris oculata*) 是虾池中广泛存在的优势藻种, 隶属于绿藻门 (Chlorophyta) 的四胞藻目 (Tetrasporales)^[8]。作者以微绿球藻为材料, 以褐藻酸钙包埋固定在不同条件下培养以选择固定化培养的最佳条件。以期为固定化培养海洋微藻技术的应用及发展提供必要的实验依据和理论基础, 同时也为今后微藻生态调控防病理论的研究提供依据。

1 材料与方 法

1.1 藻种来源

实验所用的微绿球藻 (*Nannochloris oculata*) 于 2000 年 3 月从海南三亚湛泰对虾养殖场分离所得, 经驯化培养在实验室备用。

1.2 培养条件

微藻培养用海水取自湛江市东风码头海区, 经过沉淀、沙滤和煮沸后冷却的海水。质量密度为 1.010 ± 0.001 。培养液成分采用湛水 107-18 培养液配方, 培养容器为 1 000 mL 三角烧瓶, 培养光源为自然光照, 光照强度为 600~10 000 lx, 培养温度为 $29^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 。培养过程中每日振摇数次, 保证微藻正常生长。

1.3 固定化胶球制备

藻酸盐为化学纯褐藻酸钠, 称取不同质量的褐藻酸钠, 慢慢搅动 (约 4h) 分别溶入 1 000 mL 蒸馏水, 并

收稿日期: 2003-12-23; 修回日期: 2004-05-10

基金项目: 广东省科技攻关项目 (C20328)

作者简介: 郑 莲 (1967-), 女, 广东湛江人, 硕士, 实验师, 电话: 0759-2382180, E-mail: Li2382180@163.net

分别加入 NaCl 20 g, 配制成一定体积不同质量浓度的凝胶溶液, 高温灭菌冷却备用。按凝胶溶液体积: 藻液为 1: 4 接种藻种, 充分搅匀, 然后用注射器吸取混合液, 通过不同的针头, 以 5 mL/min 的速度滴入不同质量分数的 CaCl₂ 溶液中, 边滴边摇, 此时褐藻酸钠中的 Na⁺ 与 CaCl₂ 中的 Ca²⁺ 发生置换, 形成褐藻酸钙凝胶网状结构, 从而使细胞得以固定, 约 30 min 后形成固定化的胶球。用消毒海水洗涤 3 次, 移入 1 000 mL 的三角烧瓶内, 每瓶装 150 mL 的培养液, 接种 300 粒胶球。

1.4 固定化条件的选择

1.4.1 藻珠大小的对比试验

用不同大小的针头滴成不同大小的藻珠, 设 2 个平行组。

1.4.2 接种量试验

用 10⁴、10⁵、10⁶ 级 Cell/mL 藻种密度, 设 2 个平行组。

1.4.3 褐藻酸钠浓度与氯化钙浓度正交试验

褐藻酸钠溶液的质量分数为 1%、2%、3.5% 分别与质量分数为 1%、2%、3% 的 CaCl₂ 正交试验, 即 9 种褐藻酸钠与氯化钙浓度组合进行试验。

1.5 水质调控试验方法

采用优化的固定化条件制作藻珠备用。将藻珠用筛绢网袋包装好, 以吊挂的形式把藻珠引入在水体为 0.5 m³ 的实验室水族箱中进行。实验 1 组为对照组, 实验 2 组引入微绿球藻藻珠 40 000 粒。实验室的光照

强度为 600~2 000 lx, 水温度为 29℃ ± 1℃, 并加入微藻生长所需的营养盐。每组放养对虾 25 尾, 各组通气量、温度、盐度、投饵量和投饵次数等实验条件保持一致。

1.6 测定的方法

1.6.1 藻细胞数量的测定

每 4 d 取相同个数的胶球加入一定体积的 5% 的柠檬酸钠溶液溶解胶球并用血球记数板在显微镜下计算藻细胞数量。

1.6.2 生长率的测定

根据公式 $K = (\ln N_t - \ln N_0) / T$ 其中: N_0 是开始的细胞数, N_t 是经过 T 时间后的细胞数, T 代表一段生长的时间, K 为相对生长常数, 表示生长效率。

1.6.3 水质因子的测定

试验结束后, 分别从试验组和对照组取水样来测定各项水质因子, 氨氮 (NH₃-N) 用奈氏试剂法测定; 亚硝酸氮 (NO₂-N) 用 GR 试剂法测定; 溶解氧 (DO) 用碘量法; pH 值用 600 型 pH 计测定。

2 结果

2.1 胶球直径对固定化微绿球藻细胞生长的影响

结果表明直径 2.5 mm 胶球的藻生长速率最快, 生长率最高, 3.5 mm 胶球较差, 4.5 mm 胶球生长最慢 (表 1)。同时, 对微绿球藻不同球粒试验结果进行单因子方差分析, $F = 40.77 > F_{0.01}(2, 3) = 30.82$, 也表明了 2.5 mm 胶球对固定化微绿球藻细胞的生长影响极显著。

表 1 3 种不同球径的胶粒对固定化微绿球藻细胞生长的影响

Tab.1 The effect of different diameter of beads on the growth of Immobilized cells of *Nannochloris oculata*

组别	胶球直径 (mm)	接种量 (× 10 ⁴ cell/mL)	20d 后的细胞数 (× 10 ⁴ cell/mL)	生长量 (× 10 ⁴ cell/mL)	K
1	2.5	250	3 365	3 115	0.129
2	3.5	250	480	230	0.031 5
3	4.5	250	380	130	0.020 5

2.2 接种量对固定化细胞生长的影响

从表 2 中可看出接种量小于 10⁴ cell/mL 时藻几乎停止生长, 到后期, 细胞数目减少了 39%, 因此, 10⁶

cell/mL 接种量对固定化微绿球藻生长比较适合, 单因子方差分析结果 $F = 22.7 > F_{0.05}(1, 2) = 18.51$ 差异显著。

表2 不同接种量对固定化微绿球藻细胞生长的影响

Tab.2 The effect of different initial inoculation on the growth of immobilized cells of *Nannochloris oculata*

组别	接种量 ($\times 10^4$ cell/mL)	20d后的细胞数 ($\times 10^4$ cell/mL)	生长量 ($\times 10^4$ cell/mL)	K
1	116	1 970	1 854	0.142
2	11.6	163	151.4	0.132
3	1.16	0.86	-	-

2.3 CaCl_2 浓度与褐藻酸钠浓度正交试验对固定化微绿球藻细胞的影响

试验结果表明,用3%的 CaCl_2 溶液与2%的褐藻酸钠形成的凝胶珠,微绿球藻的生长量和生长率最大。实验过程中发现 CaCl_2 浓度高,形成藻珠时间就

短。用2%褐藻酸钠制成藻球,微绿球藻细胞生长率比1%和3.5%时的生长率明显增大,而单因子方差分析结果 $F = 33.87 > F_{0.01}(8, 9) = 5.47$,表明 CaCl_2 浓度和褐藻酸钠浓度的不同组合对固定化微绿球藻细胞生长的影响极显著。

表3 CaCl_2 浓度与褐藻酸钠浓度在微绿球藻固定化培养中的正交试验结果

Tab.3 Results of orthogonal test of density of CaCl_2 and density of alginate on the growth of immobilized the *Nannochloris oculata*

组别	CaCl_2 质量分数 (%)	褐藻酸钠质 量分数(%)	细胞数($\times 10^4$ cell/mL)		K
			初始细胞数	20d 细胞数	
1	1	1	210	315	0.020
2	1	2	210	280	0.014
3	1	3.5	210	330	0.020
4	2	1	210	2 510	0.124
5	2	2	210	2 900	0.131
6	2	3.5	210	2 940	0.132
7	3	1	210	1 585	0.056
8	3	2	210	1 470	0.095
9	3	3.5	210	1 165	0.086

2.4 藻珠中微藻生物量变化

将藻珠用筛绢袋装好放入养殖桶,第2天就观察到袋内有气泡,说明藻细胞已开始生长。第3~4天颜色明显加深,呈鲜绿色,筛绢袋在藻珠的影响下浮于水面,袋内气泡增多,接近培养后期时,藻珠颜色呈深绿色。镜检结果显示,微绿球藻藻珠中细胞数从 1.50×10^7 个/粒增加到 25.47×10^7 个/粒,生物量从 0.51×10^{-2} mg/粒增加到 8.66×10^{-2} mg/粒,约增加

了17倍。

2.5 主要水质因子的检测

2.5.1 DO 和 pH 值的变化

试验过程中,实验组 DO 比对照组提高了11.9%;实验组 pH 为7.92,对照组为7.61。因此,固定化微藻对 pH 的上升具有促进作用。实验过程处于充氧状态,因此,DO 和 pH 无明显的相关性(图1,2)。

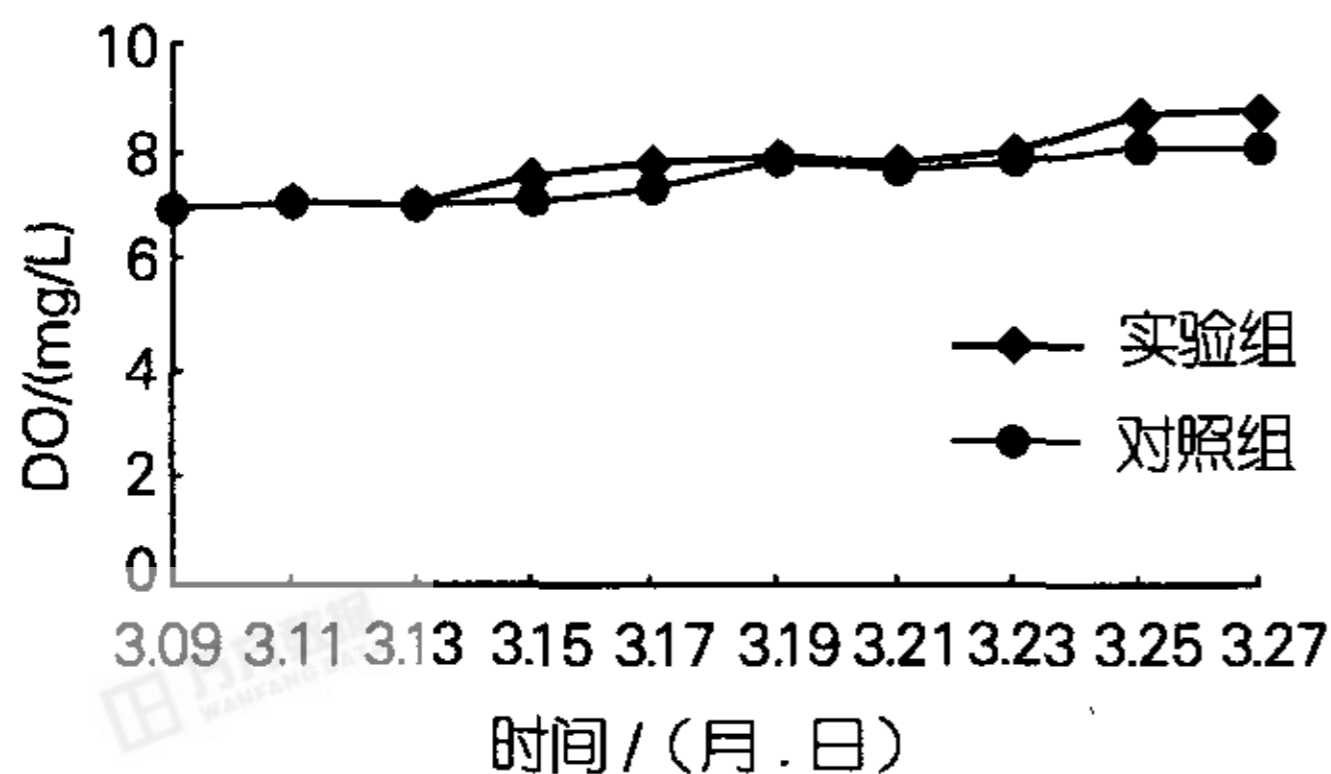


图1 实验过程中 DO 值的变化

Fig.1 The variation of DO during the experiment

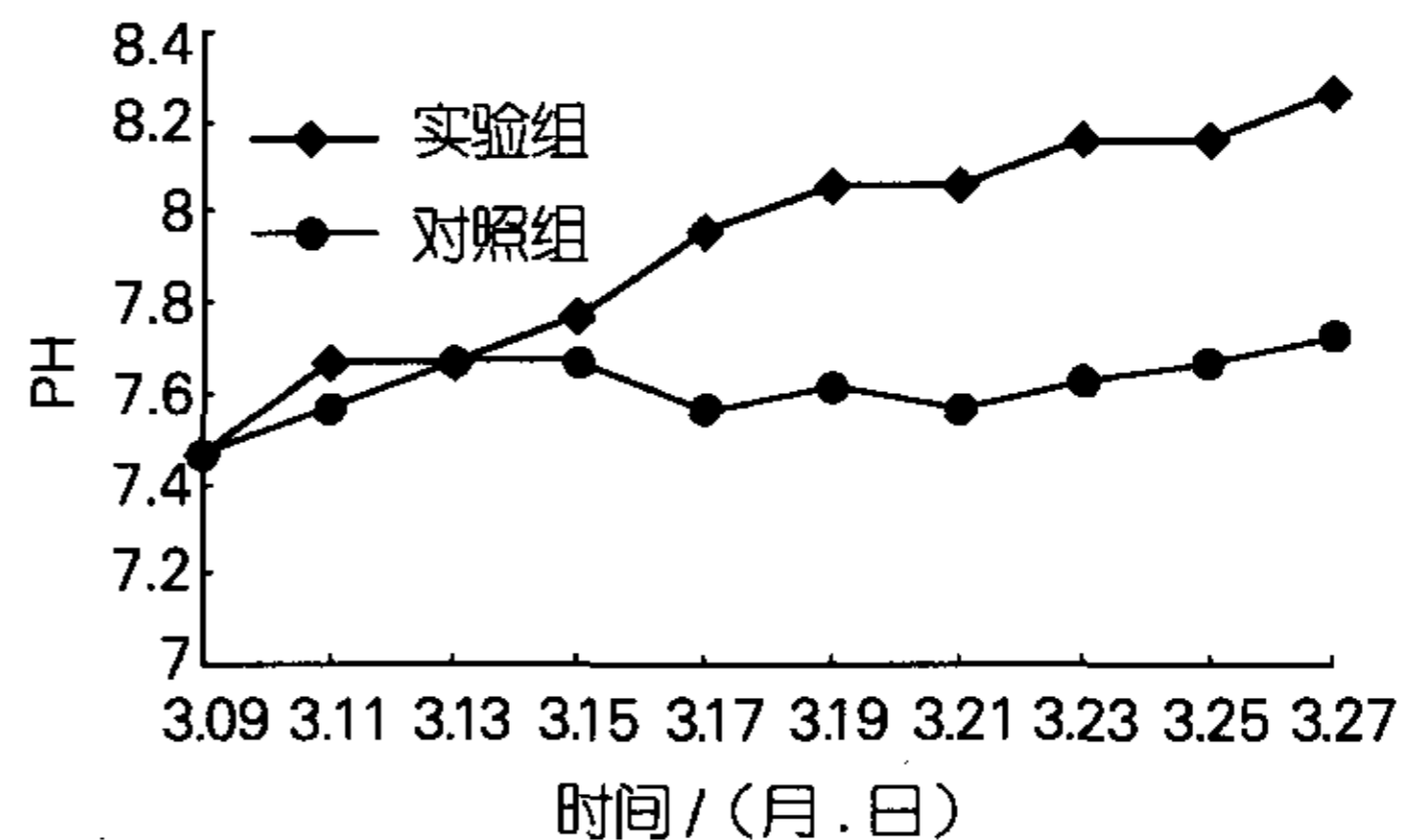


图2 实验过程中 pH 值的变化

Fig.2 The variation of pH during the experiment

2.5.2 氨氮和亚硝酸氮的变化

引入固定化微藻可降低养殖环境中氨氮与亚硝酸氮含量，实验组的氨氮含量比对照组降低了38.5%；亚硝酸氮含量比对照组降低了47%（图3,4）。

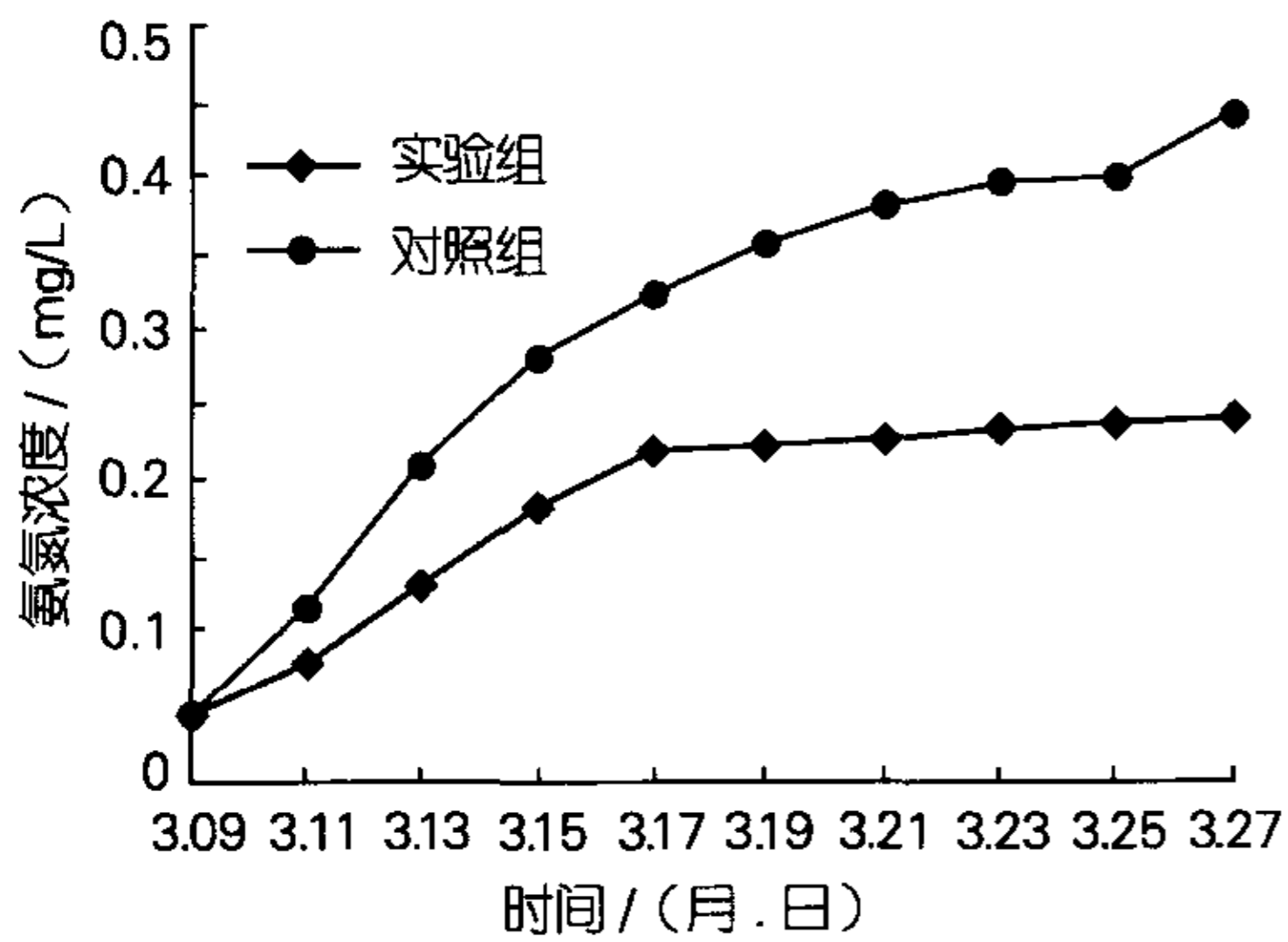


图3 亚硝酸氮的变化
Fig. 3 The variation of NO₂⁻-N

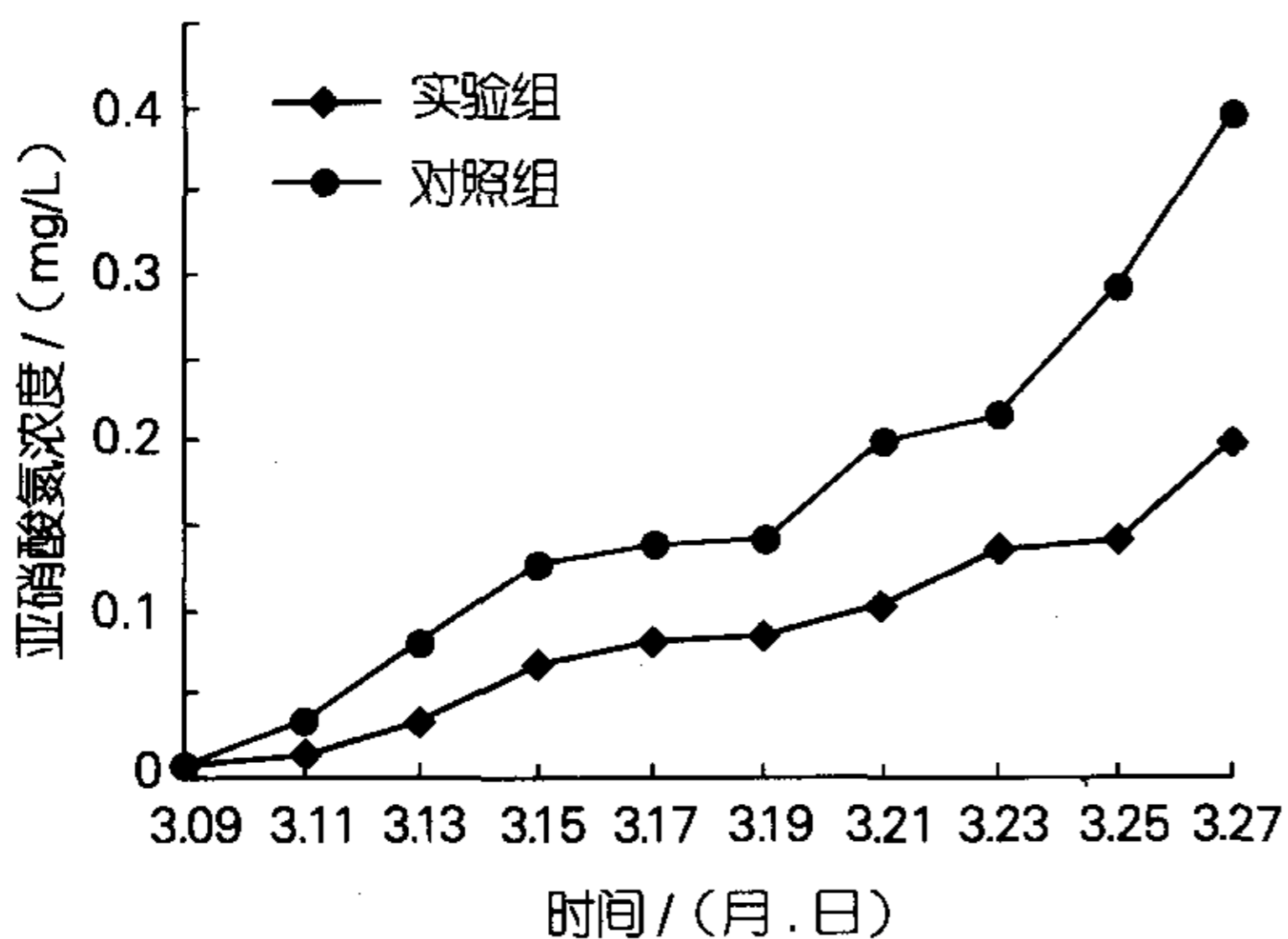


图4 氨氮的变化
Fig. 4 The variation of NH₄⁺-N

3 讨论

3.1 不同固定化条件对固定化藻类的影响

3.1.1 胶球的直径对固定化藻类的影响

不同型号的针头，其内径不同，由其所形成的凝胶球的直径也不同，型号越大，胶球直径越大。从表1生长率结果和方差分析可以看出胶粒的大小对固定化微绿球藻细胞的生长影响是显著的。杨海波^[9]等认为胶球直径越大，所产生的扩散传质阻力越大，胶球内所需营养不足，积累的代谢物过多，细胞生长环境恶化，同时由于直径过大，使得胶球内光照不足，这些不利条件使得大直径不利于小球藻生长。试验结果表

明大直径也不利于微绿球藻生长，所以用直径2.5 mm 胶球较好。

3.1.2 接种量对固定化藻类的生长影响

试验结果表明接种量小于10⁴级时藻几乎停止生长，接种量大，生长量大，生长率也高，从单因子方差分析差异显著，10⁶级接种量对固定化微绿球藻生长比较适合。李英敏^[10]等也认为接种量大的细胞生长较快，且胶球的稳定性较好。但为了避免离心的麻烦，又可以获得较好的结果，因此，选用10⁶级的细胞密度进行固定化为宜。

3.1.3 不同浓度的CaCl₂溶液与不同来源的褐藻酸钠对固定化藻类的生长影响

韩丽君^[11]等人考察了不同浓度的CaCl₂溶液与不同来源的褐藻酸钠形成凝胶珠后，其强度的变化规律。发现褐藻酸钠中的甘露糖醛酸(M)越高，所形成胶球的强度越差；古罗糖醛酸(G)越高，所形成胶球的强度越高。同时，实验表明，褐藻酸钠的浓度明显对藻细胞的生长有影响，当用1%的褐藻酸钠时，培养液随时间的延长逐渐变成绿色，说明胶珠散落，包埋于珠内的细胞游离至培养液中，使测得的细胞密度低。随着褐藻酸钠浓度增大，其与形成的网格变密，凝胶珠的机械强度增高，藻细胞能够较好地包埋于其中，并通过凝胶网格的孔隙获得培养液中的营养，排除代谢物，当褐藻酸钠浓度增加到3.5%时所形成的凝胶网格过于致密，从而加大了培养液中的底物和造细胞产生的代谢物进出凝胶珠的阻力，使细胞生长环境恶化，随着培养时间的延长，珠内营养不断消耗，代谢物不断增多，细胞开始衰老，并逐渐死亡。本实验结果(表3)表明，用3%的CaCl₂溶液与2%的褐藻酸钠形成的凝胶珠，微藻的生长量大，生长率最高；实验过程中发现CaCl₂浓度高，形成藻珠时间就短，所以选用3%的CaCl₂浓度为佳。

3.2 固定化技术在水产养殖中的应用

微藻固定化技术在环境领域中的应用逐渐受到重视，尤其在污水处理和养殖水质调控、养殖废水处理等方面。藻类最初应用于废水处理是在1957年就提出的，至现在已有一定的研究基础。Baillies等^[12]研究固定化丛粒藻细胞的生理生特性时发现，固定化丛粒藻光合放氧量高于悬浮藻的3倍；载体凝胶可保护藻细胞免受汞等有毒物质的伤害，保证微藻的生理活性；严国安等^[13]报道，小球藻的固定化增加了其生理代谢活性，对水质的净化效率要比悬浮态相对要高。本实验的结果可以看出，固定化微绿球藻的数量增加了约17倍，由此证明了微绿球藻的生理活性不会因固定化而受干扰。同时，固定化的微绿球藻能把对虾

养殖环境中的氨氮和亚硝酸氮当成营养盐而吸收,使水质中氨氮和亚硝酸氮浓度明显低于对照组。因此,引入固定化的微绿藻不但可以降低水体中氨氮、亚硝酸氮等有害因子的浓度,消除胁迫,还能提高水中的溶解氧含量,使水体环境长时间处于良好的动态平衡状态。

参考文献:

- [1] Robinson P K. Immobilized algae: a review[J]. *Process Biochem*, 1986, 8: 12 - 127.
- [2] Chevalier P K, de la Noüe J. Wastewater nutrient removal with microalgae immobilized in carrageenan[J]. *Enzyme Microb Technol*, 1985, 7: 621 - 624.
- [3] Robinson P K. Phosphorus uptake Kinetics of immobilized *Chlorella* in batch and continuous - flow culture[J]. *Enzyme Microb Technol*, 1989, 11(9): 590 - 595.
- [4] Robinson P K. Immobilized algae: a review[J]. *Process Biochem*, 1986, 8: 122 - 127.
- [5] 张蕾. 石油烃污染物对海洋浮游植物生长的影响——实验与模型[J]. 青岛海洋大学学报, 2002, 32(5): 804 - 810.
- [6] 孙红文. 固定化技术在环境领域中的应用[J]. 上海环境科学, 2001, 18(8): 356 - 359.
- [7] 陈衍昌. 利用固定化技术作为微细藻种原之保存及利用. 水产养殖, 2001, 195(1-2): 71 - 80.
- [8] 陈明耀. 生物饵料培养[M]. 北京: 农业出版社, 1995. 69 - 75.
- [9] 杨海波, 于媛, 张欣华, 等. 小球藻固定化培养的初步研究[J]. 水产科学, 2001, 20(5): 5 - 6.
- [10] 李英敏, 杨海波, 张欣华, 等. 盐藻固定化培养初步研究[J]. 生物技术, 2001, 11(1): 48 - 51.
- [11] 韩丽君. 用于固定化载体的褐藻酸钙凝胶条件的研究[J]. 海洋科学, 1992, 3: 56 - 59.
- [12] Baillies C, Largeau C, Berkaloff C, et al. Immobilization of *boreyococcus braunii* in alginate: influence of chlorophyll content, photosynthetic activity[J]. *Appl Microbiol*, 1986, 361 - 366.
- [13] 严国安, 李益健. 固定化小球藻净化污水的初步研究[J]. 环境科学研究, 1994, 7(1): 39 - 42.

Immobilization of *Nannochloris oculata* in water quality control in shrimp mariculture

ZHENG Lian, HUANG Xiang - hu, LIU Chu - wu, CHEN Yan - juan
(Fisheries College, Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Received: Dec. , 23, 2003

Key words: immobilization culture ; *Nannochloris oculata* ; control ; cultural water quality

Abstract: By using alginate - Ca as immobilized matrix, the effects of some immobilized conditions on the growth of *Nannochloris oculata* and cultural water quality are discussed. The optimal immobilized conditions are 2.5 mm syringe, initial inoculation 10^6 cell/ mL, 3% CaCl_2 , and 2% alginate. Immobilized microalgae produced in these optimal conditions had high growth rates and a long growth cycle; The biomass of *N. oculata* increased about 17 times during the experiment. It proves that the physiological conditions of the immobilized microalgae were not interrupted by the immobilization. At the same time, immobilized microalgae did not only reduce the concentration of the harmful factors such as $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ and $\text{NO}_2^- - \text{N}$, but also added DO in to water which can hold better balance of water environment for a long time.

(本文编辑:张培新)