

眼点拟微绿球藻养殖过程中细菌污染的治理方法

耿金峰, 赵邴鹏, 冯倩, 蔡忠贞, 王慧岭, 张晋阳, 王冰, 刘敏胜*, 白雪梅*

(新奥科技发展有限公司, 煤基低碳能源国家重点实验室, 河北廊坊 065001)

摘要 [目的]以进入中国饲料原料目录的眼点拟微绿球藻为研究对象,研究其在户外自然培养过程受到细菌污染时的污染治理方法及方法的应用。[方法]在硫酸庆大霉素、四环素、青霉素、红霉素和氯霉素为代表的5大类抗生素中筛选最佳的抗生素种类,并对藻液中抗生素残留进行氧化、紫外方法单独使用或结合使用等处理方法的研究。[结果]综合抗生素对藻细胞本身的影响和对细菌的治理效果结果,硫酸庆大霉素治理细菌效果最优,其次为四环素;红霉素对细菌无明显抑制作用;青霉素和氯霉素对藻细胞生长有明显的抑制作用。去除残留庆大霉素的有效方法为:在不含藻细胞的水体中可单独通入2h的臭氧或加入100 mg/L高浓度有效氯溶液的方法可将硫酸庆大霉素去除95%以上,该方法可用作养殖清液或废液中硫酸庆大霉素的处理方法;在藻液中可使用15 mg/L的有效氯+紫外照射0.5 h的组合方法联合处理形式效果佳,藻液中的硫酸庆大霉素去除率在90%以上;藻细胞生长仅在初期受到轻微抑制作用,但细胞性状很快得到恢复,总体藻细胞的性状基本未受到明显的影响。[结论]针对户外眼点拟微绿球藻养殖过程中细菌污染可以使用硫酸庆大霉素进行治理,并可利用15 mg/L有效氯+紫外照射0.5 h将残留在藻液中的庆大霉素较好地去除,上述2种方法的结合使用可以保证户外养殖的持续进行,为眼点拟微绿球藻的规模化稳定养殖提供一种污染治理技术支持,有利于该藻株的产业化进程。

关键词 眼点拟微绿球藻;细菌污染;抗生素;治理方法

中图分类号 S946 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)26-0063-05

Treatment Method of Bacterial Contamination in the Process of *Nannochloropsis oculata* Cultivation

GENG Jin-feng, ZHAO Yan-peng, FENG Qian et al (Xin'ao Technology Development Co., Ltd., State Key Laboratory of Coal-Based Low Carbon Energy, Langfang, Hebei 065001)

Abstract [Objective] Taking the *Nannochloropsis oculata* as the research object in the catalogue of Chinese feed ingredients, the pollution control method when the outdoor natural culture process was contaminated by bacteria and the application of method was studied. [Method] The best antibiotic species among the five major classes of antibiotics represented by gentamicin sulfate, tetracycline, penicillin, erythromycin and chloramphenicol were screened, and the treatment of antibiotic residues in algae liquid was oxidized, and the ultraviolet method was used alone or in combination. [Result] An effective way to remove residual gentamicin was: In the water body without algae cells, the gentamicin sulfate could be removed by more than 95% by adding 2 hours of ozone alone or by adding 100 mg/L of high concentration of available chlorine solution, the method could be used as a treatment method for gentamicin sulfate in a culture supernatant or waste liquid. In the algae solution, 15 mg/L of effective chlorine + UV irradiation for 0.5 h could be combined to form a good effect, and the removal rate of gentamicin sulfate in the algae solution was above 90%. Algae cell growth was only slightly inhibited at the beginning, but the cell traits were quickly restored, and the overall algal cell traits were not significantly affected. [Conclusion] For the bacterial contamination in the process outdoor cultivation of *Nannochloropsis oculata*, it can be treated with gentamicin sulfate, and the gentamicin remaining in the algae solution can be better removed by using 15 mg/L available chlorine + UV irradiation for 0.5 h. The combination of the above two methods can ensure the continuous cultivation of outdoor culture, and provide a pollution control technical support for the large-scale stable culture of *Nannochloropsis oculata*, which is beneficial to the industrialization process of the algae strain.

Key words *Nannochloropsis oculata*; Bacterial contamination; Antibiotics; Treatment method

微藻是一类种类繁多、生长速度快、具有极大应用价值的生物资源。微藻是海洋生物资源的重要来源,是生态系统中最主要的初级生产者。藻类是地球上通过光合作用合成物质质量最多的生物,它合成的物质质量约占全部光合作用合成生物量的1/3。许多海洋微藻富含对人体有重要生理作用与保健功能的长链多不饱和脂肪酸,微藻及其代谢产物可用于天然食品、营养品、保健食品、生物饵料、生物肥料、可持续生物能源生产等方面,具有重要的经济价值和社会价值^[1-5]。其中眼点拟微绿球藻体内含有大量的二十碳五烯酸(EPA),是天然EPA来源^[6-7],其藻粉添加到畜禽饲料和畜牧饲料中,将提高鸡蛋中EPA含量和动物肉质中EPA含量,提升产品营养价值和附加值,可为养殖户增加收入;而且眼点拟微绿

球藻已经进入中国饲料原料目录中,具有巨大的应用潜力。

世界范围内很多科研机构 and 高校都在对微藻进行着系统的、深入的、高水平的研究^[8]。在研究条件稳定的情况下,其微藻的产量较高,如Zhang等^[9]在日本的北方地区,夏季利用1.5 cm板式反应器培养集胞藻,在试验控温的情况下占地面积产量可达39.0 g/(m²·d);Torzillo等^[10]研究发现养殖水平可达到14.8 g/(m²·d);Moheimani等^[11]报道的养殖水平为16.0~33.5 g/(m²·d)。而微藻生产企业实际的户外微藻养殖中产量较低,一般在5~10 g/(m²·d)。究其原因,除了自然的晴天、阴天、多云、高温、低温等多变的条件外,还有一个重要的影响因素就是敌害生物污染问题。微藻养殖过程若遇到严重的敌害生物污染发生,将会导致养殖颗粒无收^[12]。因此,微藻养殖过程中的敌害生物污染严重制约着微藻的规模化过程,限制生物资源的开发,限制眼点拟微绿球藻在饲料产业中应用。目前科学家们对污染的关注度也是越来越高。微藻养殖过程的污染可分为原生动物污染和细菌污染,其中对原生动物污染目前研究成果显著,如吴松^[13]使用表面活性剂、漂白粉对原生动物的灭杀;丛立晶

基金项目 中美清洁能源联合研究中心项目(CERC)“微藻固碳产业化技术与示范”(2016YFE0102500-09)。

作者简介 耿金峰(1982—),男,内蒙古扎赉特旗人,高级工程师,硕士,从事微藻生长机理与规模化养殖工艺研究。*通讯作者,刘敏胜,副研究员,博士,从事微藻生物高附加值开发技术和能源技术研究;白雪梅,副研究员,博士,从事微藻生能高附加值开发技术和能源技术研究。

收稿日期 2018-05-29

等^[14]利用酸化法、碱化法等对藻液中的纤毛虫、游捕虫进行治理;规模化较常用的方法还有碳酸铵盐法等^[12,15]。而细菌和微藻是一个共生体^[16-19],有些细菌对微藻有促进作用,有些细菌对微藻有抑制作用^[20-22],甚至有些细菌具有溶藻的特性^[23-25],可以导致藻细胞较快速死亡,严重的将导致养殖失败。目前针对细菌污染的有效方法是抗生素治理,如刘晓娟等^[26]研究多种抗生素去除藻液中细菌,从而获得无菌藻株;宋程飞等^[27]利用抗生素建立杜氏盐藻的无菌培养体系。但抗生素对环境存在污染,主要残留在水中^[28],将影响人类健康。抗生素残留去除的研究主要集中在畜禽类废水中,研究的去除方法有活性炭吸附、光降解、紫外法、臭氧法等^[28-31],而藻液中关于抗生素残留的去除研究鲜见报道,而且部分抗生素对藻类的毒性很大^[28]。因此,笔者以可应用于饲料领域的眼点拟微绿球藻为研究对象,针对该藻株户外养殖过程的细菌污染进行研究,首先筛选对藻细胞有致死作用细菌的有效抗生素,在此基础上针对抗生素开展深入的去除方法研究,获得的去除方法既要保证抗生素的有效去除同时又要保证不能对微藻生长带来显著的抑制作用。这些研究结果将会为微藻的细菌污染治理提供基础数据积累与支持,为眼点拟微绿球藻的户外稳定养殖提供一种抗细菌污染的技术储备。

1 材料与方法

1.1 材料 试验所用抗生素均购自 Sigma 公司,配制成 1 g/L 母液,根据需要进行稀释(母液经 0.22 μm 滤膜除菌,稀释全过程无菌操作)。金黄色葡萄球菌,购自中国微生物研究所,编号 1.2465。试验过程其他试剂均为常规分析纯试剂。

1.2 仪器 臭氧机,北京山美水美环保高科技有限公司 CF-YG10 型。分光光度计,日本岛津 UV-2550 型。

1.3 藻种与培养 试验所用眼点拟微绿球藻(*Nannochloropsis oculata*),由 ENN 生物质能源技术中心藻种质库提供。所有试验培养基均采用 f/2 海水培养基^[16],盐度为(3.3±0.1)%。试验采用批次培养的方式进行。

细菌污染的藻液,简称污染藻液(下同):来自眼点拟微绿球藻户外培养过程得到,细菌数量在 10⁶/mL 数量级上。其中导致藻细胞死亡的细菌已经得到分离,并得到分子鉴定。

1.4 试验方法

1.4.1 接种密度。各试验组藻细胞接种密度在 0.8~1.0 g/L,主要以各试验组相同体积下具有相同的生物质量为原则。

1.4.2 试验用反应器规格。玻璃板式反应器,10 cm(长)×5 cm(宽)×60 cm(高),其中反应器宽度即反应器光程。玻璃柱式反应器,内径 5 cm、高度 80 cm 玻璃柱式(管式)反应器,一侧封口、一侧开口。

1.4.3 抗生素选择试验。

1.4.3.1 藻种对抗生素耐受性试验。从 5 大类抗生素(β-内酰胺类、氨基糖苷类、四环素类、大环内酯类和氯霉素类)中选择常见的抗生素对藻细胞进行其耐受性试验,依次分别选

取青霉素、庆大霉素、四环素、红霉素和氯霉素,其中各抗生素的使用量均分别为 50、100、200 mg/L 这 3 个浓度梯度。

试验方法:各试验组使用 100 mL 三角瓶,装有 30 mL 无菌培养的藻液,根据表 1 依次加入对应量的抗生素,放置在摇床中、2 000 lx 光强下摇床培养 48 h,测定微藻生物量。根据生物量的增强情况考察藻细胞对不同抗生素的耐受范围。每组试验 3 个平行样。

1.4.3.2 抗生素对细菌治理试验。根据藻细胞耐受性试验结果,选择对藻细胞无明显负作用的抗生素进行细菌治理效果试验,最终选择既具有细菌治理效果又不影响藻细胞自身特性的抗生素种类。

污染藻液分装到各组试验组的玻璃板式反应器中,每组试验 3 个平行样,每组反应器中加入 800 mL 的污染藻液;并按照表 1 所示加入对应种类的抗生素和加量,在 10 000 lx 光强的人工光源下连续培养 7 d,反应器中底部通入含有 5%二氧化碳的空气混合气,将藻液 pH 控制在 7.5~8.5;同时每天监控藻细胞浓度和细菌数量。

表 1 抗生素添加
Table 1 Antibiotics added

组别 Group	种类 Variety	添加量 Added amount//mg/L	备注 Remark
CK 1(阴性对照组 Negative control group)	—		受到污染藻液
试验 1 Test 1	庆大霉素	100	受到污染藻液
试验 2 Test 2	四环素	100	受到污染藻液
试验 3 Test 3	红霉素	100	受到污染藻液
CK 2(空白对照组 Blank control group)	—		无污染藻液

1.4.4 庆大霉素的检测。

1.4.4.1 庆大霉素检测法的制定——比浊法。配制 10 个浓度梯度(2、4、6、8、10 mg/L)的庆大霉素标准液,分别取 3 mL 各标准液于 100 mL 三角瓶;每个样品 3 个平行。将提前活化至对数生长期的金黄色葡萄球菌稀释至 OD₅₈₀ 为 1 的菌悬液,取 3 mL 菌液加入已灭菌的 LB 培养基和生理盐水的培养体系中,并分装至灭过菌的 100 mL 三角瓶中,每瓶 27 mL;将分装好的三角瓶于恒温振荡摇床上培养(摇床,140 r/min,37 ℃,避光);在 3 h 时检测菌液 OD₅₈₀。

1.4.4.2 庆大霉素的去除。取 20 L 经庆大霉素治理后的藻液,经 5 000 r/min 离心 5 min 后,取离心清液开展试验。各组试验方法:①臭氧组。将臭氧发生器产生的稳定臭氧通过软管导入玻璃柱式反应器底部,通过软管连接的曝气石向藻液通入臭氧气体。试验组依次为试验 5、试验 6、试验 7,分别通入臭氧 0.5、1.0、2.0 h。②次氯酸钠组。将含量 10%有效氯的分析纯次氯酸钠溶液按照各组所需有效氯浓度折算取量。试验组依次为试验 8、试验 9、试验 10,分别加入次氯酸 150、500、1 000 μL/L。③臭氧+紫外组。臭氧通入方式同①中所述,紫外处理指同时将 15 W 的紫外灯管直接插入玻璃柱式反应器中直接紫外照射藻液。④有效氯+紫外组。在②的基础上,同时将 15 W 的紫外灯管直接插入玻璃柱式反应器中

直接紫外照射藻液。⑤紫外处理组。单独使用 15 W 的紫外灯管直接插入玻璃柱式反应器中直接紫外照射藻液。

参照表 2,分装到内径 5 cm 的玻璃柱式反应器中,每个反应器中装 800 mL。各试验组处理完毕后均通入空气

20 min,以排除水中残留的臭氧因素等干扰。处理后的样品进行庆大霉素含量的检测,采用比浊法测定,利用标准曲线确定庆大霉素含量。

表 2 庆大霉素去除方法
Table 2 Removal method of gentamicin

组别 Group	试剂添加量 Added reagent amount	备注 Remark
臭氧组 Ozone group	试验组 5	通入 0.5 h
	试验组 6	通入 1.0 h
	试验组 7	通入 2.0 h
阳性对照 Positive control	CK3	通入 2.0 h 臭氧
次氯酸钠 Sodium hypochlorite	试验组 8	150 μL/L
	试验组 9	500 μL/L
	试验组 10	1 000 μL/L
	CK4	加入 1 000 μL/L 次氯酸
阳性对照 Positive control	CK5	—
臭氧+紫外 Ozone + ultraviolet	试验组 11	通入臭氧 0.5 h,同时紫外处理 0.5 h
有效氯+紫外 Available chlorine + ultraviolet	试验组 12	15 mg/L 有效氯处理,同时紫外处理 0.5 h
	试验组 13	50 mg/L 有效氯处理,同时紫外处理 0.5 h
紫外 Ultraviolet	试验组 14	紫外照射 0.5 h
	试验组 15	紫外照射 2.0 h
阳性对照 Positive control	CK6	—

1.4.5 细菌污染治理方法验证试验。取 20 L 经庆大霉素治理后的藻液,混合均匀后直接分装到内径 5 cm 玻璃柱式反应器中,每个反应器中装 800 mL 液体,每组 3 个平行样。试验设计:试验 16 为向藻液中同时加入 150 μL/L 次氯酸溶液和利用紫外灯处理 0.5 h。同时阳性对照(CK7)为无菌状态下的藻液,未经任何处理;阴性对照(CK8)为受到污染的藻液,不经过任何处理。以上试验组均在避光条件下进行操作,试验组通入空气与二氧化碳的混合气 16 h,检测庆大霉素残留量,期间藻液避光。16 h 后,给 10 000 lx 人工光,开始正常养殖 5 d,每 24 h 进行 OD 检测。

1.5 生物量的测定^[32-33] 取一定体积量 V 的藻液先利用 3 500 r/min 进行离心分离藻细胞和培养液,藻液中若有细菌此时由于其自身质量轻、形态小,将在培养液层存在;再加入 5 倍 V 体积量的一次水进行溶解藻泥层,待混匀后进行抽滤,此时将藻细胞截留在滤膜(恒定质量, m₀)上,并用等体积量蒸馏水悬浮藻细胞 3 次,最后将滤膜于 105 °C 的烘箱过夜至恒定质量,冷却后称量 m₁。细胞质量浓度(g/L)=(m₁-m₀) / V。

2 结果与分析

2.1 不同抗生素对藻细胞生长的影响 图 1 为 5 种抗生素在 3 种浓度梯度下对眼点拟微绿球藻生长的影响程度。通过生物量生长数据对比可知,庆大霉素、四环素和红霉素在 200 mg/L 以内对藻细胞无明显的抑制作用;而青霉素在 50 mg/L 时藻细胞就有较小的抑制作用,达到 100 mg/L 以上时对藻细胞抑制作用非常显著;氯霉素在 50 mg/L 对藻细胞无明显的抑制作用,当浓度达到 100 mg/L 以上时对藻细胞的抑制随着浓度的增加而显著提高。

2.2 不同抗生素对藻液细菌污染治理方法的研究 由图 2

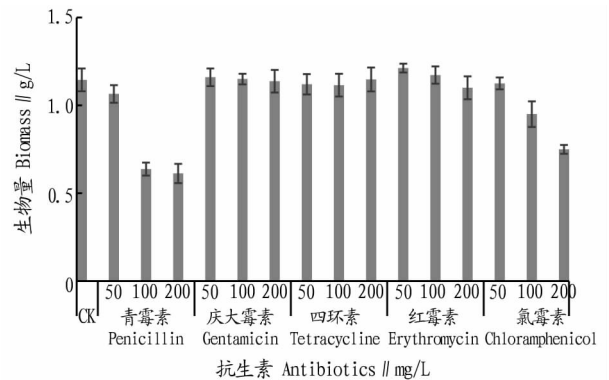


图 1 不同抗生素对眼点拟微绿球藻细胞生长的影响

Fig.1 Effect of different antibiotics on the growth of *Nannochloropsis oculata* cells

可知,污染藻液的阴性对照组(CK1 组)未经任何处理,其藻细胞经过几日的连续培养,藻细胞逐渐大幅死亡,同时藻液中明显短杆状细菌增加。硫酸庆大霉素处理组(试验组 1)和四环素处理组(试验组 2),污染的藻细胞生长状态良好;其中试验组 1 藻细胞生长状态与空白对照组(CK2 组)生长状态相当;试验组 2 前期抑菌效果明显,藻细胞生长状态良好,但后期抑菌效果差,细菌又得到大量繁殖,藻细胞生长受到明显的影响。红霉素处理组(试验组 3)对导致藻细胞死亡的细菌无明显的治理作用,其试验组 3 藻细胞初期就开始死亡,细胞浓度呈现快速下降趋势。在选用的 3 种抗生素中,对导致拟微绿球藻死亡的细菌,有效的抗生素有庆大霉素,四环素短期有效,红霉素对该类细菌无抑制效果。

2.3 庆大霉素去除方法的研究

2.3.1 硫酸庆大霉素检测标准曲线测定结果。图 3 为以 LB

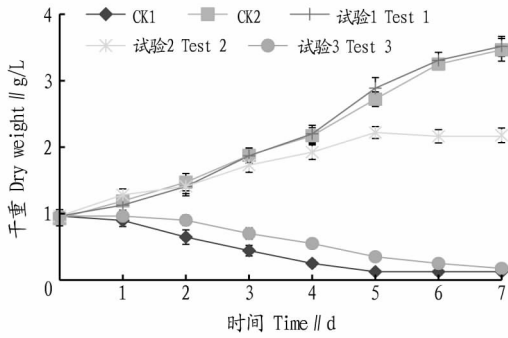


图2 不同抗生素对眼点拟微绿球藻的细菌污染治理情况对比
Fig.2 Comparison of bacterial contamination control of *Nannochloropsis oculata* with different antibiotics

培养基作为金黄色葡萄球菌的培养体系、加入低浓度庆大霉素标准液(2、4、6、8、10 mg/L)培养3 h后检测的OD₅₈₀结果。从图中可以看出,培养3 h后,菌悬液OD均与庆大霉素标准品中的庆大霉素浓度呈线性关系,且庆大霉素浓度越高,菌悬液OD越低,即庆大霉素浓度越高,对金黄色葡萄球菌的灭杀性越好,细菌的增长量越低。根据线性拟合结果 $Y = -6.3557X + 11.3510$ ($R^2 = 0.9917$)可知,3 h时检测结果的线性关系良好。因此,利用比浊法检测水中庆大霉素时,应以LB培养基作为细菌的培养体系,培养3 h时进行检测的效果较好,且只能对低浓度的庆大霉素进行检测(检测范围为2~10 mg/L),对于高浓度的待测样品可进行适当倍数的稀释处理。

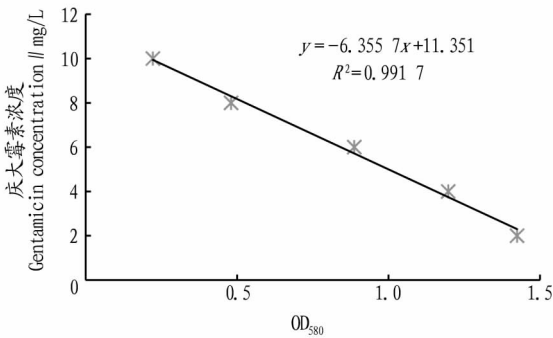


图3 测试样品中庆大霉素浓度变化
Fig.3 Change of gentamicin concentration in the test sample

2.3.2 庆大霉素去除方法的比较。各试验组的出水庆大霉素浓度和庆大霉素去除率见图4。根据检测结果可知,试验5(臭氧处理0.5 h)水样中庆大霉素浓度约为13.40 mg/L,去除率为81.83%;臭氧处理1.0 h组(试验组6)、臭氧处理2.0 h组(试验组7)水样中庆大霉素浓度分别为12.78和3.80 mg/L,折合去除率分别为82.69%和94.84%。臭氧氧化法去除水中庆大霉素具有一定稳定性和可应用性,随着作用时间的增加,庆大霉素的去除率可达到95%左右。而CK3对照组庆大霉素去除率为97.11%,表明藻液中通入臭氧后再经过20 min的曝气将过多的臭氧去除的方法对细菌无明显的致死作用,而且也消除了可能残留的臭氧气体对庆大霉素的干扰。

用一定浓度的有效氯氧化去除水中庆大霉素时,去除效果受有效氯添加量影响严重。15 mg/L有效氯组(试验组8)

水样中庆大霉素浓度为34.23 mg/L,去除率为53.60%;50 mg/L有效氯组(试验组9)水样中庆大霉素浓度为25.73 mg/L,去除率为65.12%;100 mg/L有效氯组(试验组10)水样中庆大霉素浓度为1.98 mg/L,去除率为97.31%,即添加有效氯的量低于50 mg/L时对庆大霉素去除效果较差,当添加的有效氯达到100 mg/L时,水样中庆大霉素含量降至1 mg/L以下时去除效果较好;且通过对CK4对照组结果可知,有效氯的加入对庆大霉素浓度的检测结果基本无影响。

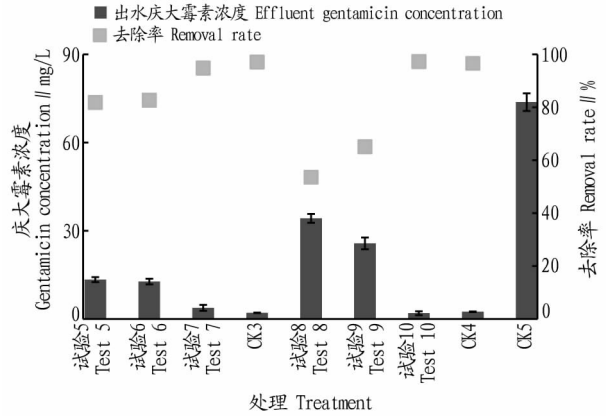


图4 庆大霉素的化学方法去除对比
Fig.4 Comparison of chemical removal of gentamicin

在图4方法的基础上,庆大霉素去除方法的使用过程中又增加了紫外照射的方法,2种方法结合对庆大霉素的去除效果如图5所示。根据检测结果可知,臭氧+紫外处理0.5 h组(试验组11)水样中庆大霉素浓度为2.30 mg/L,去除率达到97.41%;15 mg/L有效氯+紫外处理0.5 h组(试验组12)水样中庆大霉素浓度为8.51 mg/L,去除率达到90.44%;50 mg/L有效氯+紫外处理0.5 h组(试验组13)水样中庆大霉素浓度为6.13 mg/L,去除率达到93.12%。2种方法的组合使用比单独每一种方法的去除效果明显。而单独使用紫外处理其庆大霉素的去除效果较差,紫外处理0.5 h组(试验组14)和紫外处理1.0 h(试验组15)的庆大霉素去除率分别为32.61%和67.99%。

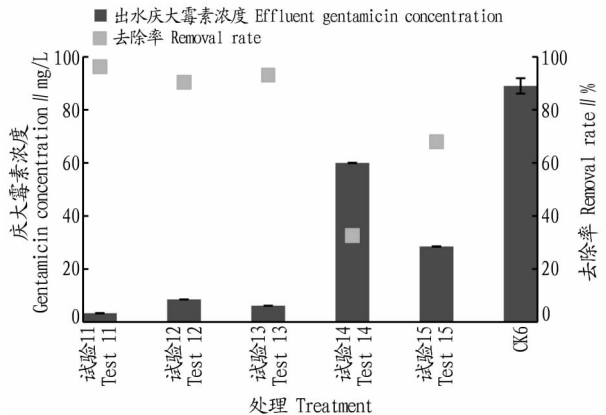


图5 庆大霉素的物理方法去除对比
Fig.5 Comparison of the physical methods of gentamicin removal

2.3.3 细菌污染治理验证试验。庆大霉素的去除方法研究

表明,有效氯和紫外照射这 2 种方法的共同作用对样品中庆大霉素的去除具有很好的作用。但“2.3.2”中研究方法是将对藻液中的藻细胞利用离心方式去除,仅针对离心后的清液水体进行的方法研究。为此,在藻液中的应用也进行了研究,证实该方法在去除庆大霉素的同时,又对藻细胞本身无明显的负作用。

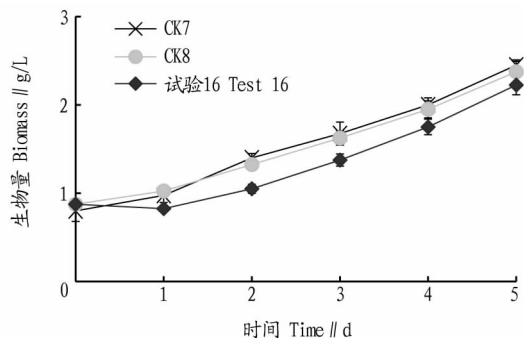


图 6 藻液中庆大霉素去除方法对养殖的影响情况

Fig.6 Effect of gentamicin removal method on culture in algae solution

由藻液中庆大霉素去除方法对养殖影响情况对比(图 6)可知,CK7 对照组与 CK8 对照组藻细胞生长情况相当,说明在庆大霉素治理藻细胞细菌污染时,庆大霉素的治理效果很好,治理后的藻细胞保持与无污染正常状态下藻细胞相同的生长状态;而试验组 16 在庆大霉素去除的试验前期藻细胞生长迟缓,藻细胞第 1 天负增长,从第 2 天开始逐渐恢复,说明庆大霉素去除方法中的 15 mg/L 有效氯对藻细胞具有一定的损伤,随着养殖天数的增加,藻细胞形状逐渐恢复,生长趋于正常。治理后的第 2 天,测定藻液中的庆大霉素含量,CK8 的庆大霉素含量为 80.15 mg/L,通过有效氯和紫外 2 种方法一同处理的试验组 16 中庆大霉素含量为 5.05 mg/L,则庆大霉素的去除率为 93.70%。

3 讨论与结论

该研究过程中,首先通过藻细胞对 5 种抗生素的耐受性选择,选定 3 种抗生素;并对 3 种抗生素对污染藻液进行污染治理效果的筛选,确定出硫酸庆大霉素对眼点拟微绿球藻中致死菌具有很好的灭杀作用,并可将受到细菌污染的藻液治愈成生长速度正常的藻细胞,有利于微藻的持续养殖。该试验选出的最佳试剂为庆大霉素,参考刘晓娟等^[26]给出的庆大霉素对眼点拟微绿球藻细胞的生长抑制率为 8.95%的结论,可以初步确定硫酸庆大霉素对藻细胞负作用较低,而且对细菌具有良好的致死作用。该方法有利于户外连续养殖的稳定性。虽然硫酸庆大霉素对藻液中致死菌具有较好的杀灭作用,但硫酸庆大霉素毕竟是一种抗生素,如果将残留庆大霉素的水体外排将严重污染环境^[24]。因此该研究考察几种方法单独处理庆大霉素的作用效果,以及 2 种方法联合处理庆大霉素的作用效果。

从试验数据可知,单独使用治理方法中,通入臭氧 2 h 和 100 mg/L 高浓度有效氯的方法对庆大霉素的去除效果最好,去除效率可达 97% 以上。虽然庆大霉素的去除率很

高,但由于单独方法中单一方法使用药剂的剂量或作用时长较大,对藻细胞的损伤很大,有些剂量最严重可导致藻细胞死亡,因此这些方法不适宜对庆大霉素处理后的藻液再进行庆大霉素的去除。但是单一的去方法作用简单、操作简便、庆大霉素去除率高,这些优点可将该方法应用于去除藻细胞后的清液的庆大霉素的去除,将清液中的庆大霉素含量尽可能地降到最低,为抗生素的深入去除奠定基础。

在 2 种方法联合处理庆大霉素方面:臭氧 0.5 h+紫外 0.5 h 和 15 mg/L 有效氯+紫外 0.5 h,这 2 种联合作用方法在去除庆大霉素方面效果最好,去除率可达 90% 以上。上述方法均可应用到藻液中,但臭氧较长时间通入到藻液中,会对藻细胞产生较为严重的负影响。该试验中所采用的 15 mg/L 有效氯+紫外 0.5 h 的方法是非常有效的一种去除藻细胞中庆大霉素残留的方法,虽然应用前期也存到一些负影响,其原因是有效氯对藻细胞的作用导致藻细胞受到一定损伤,但藻细胞性状很快就能得到恢复,达到之前的生长速度,因此该方法可作为室内外养殖的藻种环节针对该类细菌污染时的一种有效的治理方法,也为微藻稳定养殖提供细菌污染治理方面的数据积累和技术支持,为眼点拟微绿球藻的稳定养殖提供一种有效的治理细菌污染的方法,促进该藻株的稳定养殖及产业化推广,有助于 EPA 饲料产业及 EPA 产品市场的发展。

参考文献

- [1] 马欣欣,石蕾,杨巧利,等.多重因素对雨生红球藻虾青素积累的影响[J].食品研究与开发,2015,36(17):194-197.
- [2] 凌善锋.天然虾青素产业的发展趋势分析[J].生物学通报,2014,49(1):6-7.
- [3] ZOU N, ZHANG C W, COHEN Z, et al. Production of cell mass and eicosapentaenoic acid (EPA) in ultrahigh cell density cultures of *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae)[J]. European journal of phycology, 2000, 35(2):127-133.
- [4] 赵震宇,刘平怀,王盛林,等.微藻资源综合开发与利用研究进展[J].食品工业,2017,38(11):275-278.
- [5] 常杰,牛化欣.微藻生物分子的营养生理功能应用研究进展[J].饲料研究,2016(1):11-14.
- [6] 卢美贞,沈林杰,陆向红,等.培养条件对眼点拟微绿球藻油脂含量和 EPA 产率的影响[J].中国粮油学报,2014,29(5):80-83.
- [7] 苏怡,高保燕,黄罗冬,等.不同氮源及氮浓度对真眼点藻纲微藻生长及油脂积累的影响[J].水生生物学报,2017,41(3):677-691.
- [8] 周文广,阮榕生.微藻生物固碳技术进展和发展趋势[J].中国科学,2014,44(1):63-78.
- [9] ZHANG K, MIYACHI S, KURANO N. Evaluation of a vertical flat-plate photobioreactor for outdoor biomass production and carbon dioxide bio-fixation: Effects of reactor dimensions, irradiation and cell concentration on the biomass productivity and irradiation utilization efficiency[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, 55(4):428-433.
- [10] TORZILLO G, FARALONI C, SILVA A M, et al. Photoacclimation of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) cultures grown outdoors in photobioreactors and open ponds[J]. European journal of phycology, 2012, 47(2):169-181.
- [11] MOHEIMANI N R, BOROWITZKA M A. The long-term culture of the coccolithophore *Pleurochrysis carterae* (Haptophyta) in outdoor raceway ponds[J]. Journal of applied phycology, 2006, 18(6):703-712.
- [12] 刘建国,徐冉.我国微藻资源开发 30 年蜕变之路[J].生物学杂志,2017,34(2):9-15.
- [13] 吴松.单细胞藻类培养中敌害生物的防治试验[J].齐鲁渔业,2007,24(2):1-3.
- [14] 丛立晶,杨旭,湛江又.鞭藻类大培养中原生动物的防治[J].水产科学,2002,21(3):26-27.

3 结论与讨论

(1) 岷江流域三江汇流区林地面积增加最迅速, 园地面积减少最迅速, 草地变化缓慢。2005—2014年土地利用程度表现为“一衰退四发展”。耕地利用程度最高且处于衰退期, 园地等4种土地类型处于发展期。表明今后的土地利用应该在保护耕地红线的基础上, 积极发展其他类型。

(2) 岷江流域三江汇流区生态系统服务价值缓慢增加, 主要归因于林地的ESV年均增加量最多(2 007.68万元)。表明林地在中区区的生态系统服务中具有不可替代的主导作用, 今后的土地利用需要继续林地的面积。

(3) 岷江流域三江汇流区调节服务功能年均增加最多(398.53万元), 而文化服务年均增加速度最快(1.75%)。揭示了市中区今后需要继续增强调节服务功能和文化服务功能。

(4) 岷江流域三江汇流区气体调节功能的年均增加量最多(173.28万元), 而文化娱乐功能的年均增加率最高(1.75%)。表明气体调节和文化娱乐功能在中区区具有重要的价值, 今后的土地利用应该加强这2种功能的维护。

参考文献

- [1] 傅伯杰, 张立伟. 土地利用变化与生态系统服务: 概念、方法与进展[J]. 地理科学进展, 2014, 33(4): 441-446.
- [2] COSTANZA R, D'ARCE R, DE GROOT R, et al. The value of the world's ecosystem services and natural capital[J]. Nature, 1997, 387(6630): 253-260.
- [3] DAILY G C. Nature's services: Societal dependence on natural ecosystems[M]. Washington, DC: Island Press, 1997.
- [4] Millennium Ecosystem Assessment(MEA). Ecosystems and human well-being: Synthesis[M]. Washington, DC: Island Press, 2005.
- [5] FU B J, WANG S, SU C H, et al. Linking ecosystem processes and ecosystem services[J]. Current opinion in environmental sustainability, 2013, 5(1): 4-10.
- [6] BRAAT L, TEN B P. The cost of policy inaction: The case of not meeting the 2010 biodiversity target. Brussels[C]. Belgium: The COPI Project, 2008.
- [7] 高吉喜. 划定生态保护红线, 推进长江经济带大保护[J]. 环境保护,

2016, 44(15): 21-24.

- [8] 程建, 程久苗, 吴九兴, 等. 2000~2010年长江流域土地利用变化与生态系统服务功能变化[J]. 长江流域资源与环境, 2017, 26(6): 894-901.
- [9] XU C P, XIA B. Land use changes and its influences on ecosystem service value of resources-based city[J]. Ecology and environmental sciences, 2010, 19(12): 2887-2891.
- [10] 杨桂山, 徐昔保, 李平星. 长江经济带绿色生态廊道建设研究[J]. 地理科学进展, 2015, 34(11): 1356-1367.
- [11] 虎陈霞, 郭旭东, 连纲, 等. 长三角快速城市化地区土地利用变化对生态系统服务价值的影响: 以嘉兴市为例[J]. 长江流域资源与环境, 2017, 26(3): 333-340.
- [12] 尹占娥, 田娜, 殷杰, 等. 基于遥感的上海市湿地资源与生态服务价值研究[J]. 长江流域资源与环境, 2015, 24(6): 925-930.
- [13] 许妍, 高俊峰, 黄佳聪. 太湖湿地生态系统服务功能价值评估[J]. 长江流域资源与环境, 2010, 19(6): 646-652.
- [14] 李全, 李腾, 杨明正, 等. 基于梯度分析的武汉市生态系统服务价值时空分异特征[J]. 生态学报, 2017, 37(6): 2118-2125.
- [15] 张萼, 高明, 杨乐, 等. 1988-2013年重庆市主城九区生态用地空间结构及其生态系统服务价值变化[J]. 生态学报, 2017, 37(2): 566-575.
- [16] 王鹏涛, 张立伟, 李英杰, 等. 汉江上游生态系统服务权衡与协同关系时空特征[J]. 地理学报, 2017, 72(11): 2064-2078.
- [17] 彭文甫, 周介铭, 罗怀良, 等. 城市土地利用变化对生态系统服务价值损益估算: 以成都市为例[J]. 水土保持研究, 2011, 18(4): 43-51.
- [18] 武克军, 王海军, 白洁, 等. 西南山地旅游城市土地利用变化对生态系统服务价值的影响[J/OL]. 安徽农业科学, 2018, 46(20): 66-69 [2018-06-26]. <https://doi.org/10.13989/j.cnki.0517-6611.2018.20.019>.
- [19] 中华人民共和国国土资源部. 全国土地利用总体规划纲要(2006—2020年)[A/OL]. (2008-10-24) [2018-06-26]. http://www.mlr.gov.cn/xwdt/jrxw/200810/t20081024_111040.htm.
- [20] 徐绍史. 坚决守住18亿亩耕地红线[J]. 国家行政学院学报, 2008(1): 8-11.
- [21] 朱会义, 李秀彬. 关于区域土地利用变化指数模型方法的讨论[J]. 地理学报, 2003, 58(5): 643-650.
- [22] 王秀兰, 包玉海. 土地利用动态变化研究方法探讨[J]. 地理科学进展, 1999, 18(1): 81-87.
- [23] 高志强, 刘纪远, 庄大方. 中国土地资源生态环境背景与利用程度的关系[J]. 地理学报, 1998, 53(S1): 36-43.
- [24] 谢高地, 鲁春霞, 冷允法, 等. 青藏高原生态资产的价值评估[J]. 自然资源学报, 2003, 18(2): 189-196.
- [25] 谢高地, 张彩霞, 张雷明, 等. 基于单位面积价值当量因子的生态系统服务价值化方法改进[J]. 自然资源学报, 2015, 30(8): 1243-1254.
- [26] 谢高地, 肖玉, 甄霖, 等. 我国粮食生产的生态服务价值研究[J]. 中国生态农业学报, 2005, 13(3): 10-13.

(上接第67页)

- [15] 黄园. 微藻培养过程中轮虫污染防治研究[D]. 北京: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2014.
- [16] 张晶, 侯和胜, 佟少明. 微藻与细菌作用关系的研究进展[J]. 激光生物学报, 2016, 25(5): 385-390.
- [17] 涂仁杰, 金文标, 韩松芳, 等. 细菌对城市污水中小球藻生长和油脂积累的影响[J]. 环境科学, 2017, 38(10): 4279-4285.
- [18] SUYONO E A, RETNANINGRUM E, AJJAH N. Bacterial symbionts isolated from mixed microalgae culture of Glagah strains[J]. International journal of agriculture & biology, 2018, 20(1): 33-36.
- [19] GONZÁLEZ-CAMEJO J, BARAT R, PACHÉS M, et al. Wastewater nutrient removal in a mixed microalgae-bacteria culture: Effect of light and temperature on the microalgae-bacteria competition[J]. Environmental technology, 2017, 39(4): 503-515.
- [20] 王晴晴, 高金伟, 时晓婷, 等. 海洋饵料微藻与共栖细菌相互关系研究进展[J]. 农业与技术, 2016, 36(7): 11-12.
- [21] 迟雯丹. 海洋细菌 *Ponticoccus* sp. PD-2 群体感应系统及对抑藻功能的调控探究[D]. 青岛: 国家海洋局第一海洋研究所, 2017.
- [22] 王善龙, 曹煜成, 徐煜, 等. 蜡芽孢杆菌对对虾养殖水体微藻群落的调控研究[J]. 南方水产科学, 2016, 12(1): 9-16.
- [23] 朱晓漫, 罗玉双, 李娜, 等. 一株溶藻细菌的分离、筛选与分子鉴定[J]. 湖南文理学院学报(自然科学版), 2017, 29(1): 28-34.

- [24] 郝建云, 曹煜成, 徐武杰, 等. 溶藻细菌 A3 的溶藻特性[J]. 渔业科学进展, 2016, 37(6): 151-158.
- [25] MITSUTANI A, YAMASAKI I, KITAGUCHI H, et al. Analysis of algicidal proteins of a diatom-lytic marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain A25 by two-dimensional electrophoresis[J]. Phycologia, 2001, 40(3): 286-291.
- [26] 刘晓娟, 段舜山. 眼点拟微绿球藻对抗生素的敏感性及其无菌藻株的培养[J]. 生态科学, 2006, 25(6): 493-495.
- [27] 宋程飞, 郝敬云, 程蔚兰, 等. 杜氏盐藻无菌体系的建立[J]. 山西农业科学, 2018, 46(1): 25-28, 97.
- [28] 崔晓波, 曲文彦, 高文秀. 水体抗生素污染现状及藻类生态风险评价[J]. 山西农业科学, 2017, 45(12): 2056-2062.
- [29] 李文君, 蓝梅, 彭先佳. UV/H₂O₂ 联合氧化法去除畜禽养殖废水中抗生素[J]. 环境污染与防治, 2011, 33(4): 25-32.
- [30] 王琛, 李梦凯, 阎荣雷, 等. 紫外/真空紫外反应器对磺胺类抗生素的去除研究[J]. 中国给水排水, 2016, 32(9): 53-57.
- [31] 张杏艳, 陈中华, 邓海明, 等. 水环境中四环素类抗生素降解及去除研究进展[J]. 生态毒理学, 2016, 11(6): 44-52.
- [32] RICHMOND A, HU Q. Handbook of microalgal culture[M]. 2nd Edition. Chichester: Wiley-Blackwell, 2013: 40-41.
- [33] 耿金峰, 张惠敏, 石蕾, 等. 反应器培养眼点拟微绿球藻时摆向、光程对产量的影响[J]. 水产科学, 2016, 35(5): 541-546.