



# 中华人民共和国水产行业标准

SC/T 2047—2006

---

## 水产养殖用海洋微藻保种 操作技术规范

Technical specification for germplasm grade and preservation  
of marine microalgae using in aquaculture

2006-07-10 发布

2006-10-01 实施

---

中华人民共和国农业部 发布

## 前 言

本标准的附录 A、D、E 是规范性的,其余是资料性的。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国水产养殖标准化技术委员会海水养殖分技术委员会归口。

本标准起草单位:苏州大学、江苏省海洋水产研究所。

本标准主要起草人:陈葵、陈淑吟、吉红九、沈颂东、贺丽红。

# 水产养殖用海洋微藻保种 操作技术规范

## 1 范围

本标准给出了水产养殖中常用海洋微藻保种的术语和定义、设施设备和条件、基本操作与日常管理、藻种来源和分离纯化、藻种保存培养、室内小型扩增培养及藻种种质库的建立与管理方法。

本标准适用于附录 A 所列水产养殖用海洋微藻的保种。其他海洋浮游微藻可参照执行。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB 11607 渔业水质标准

## 3 术语和定义

### 3.1

**水产养殖用海洋微藻** **marine microalgae using in aquaculture**

用于水产养殖动物苗种培育、动物性饵料生物、经济双壳类成体的饵料、净化水质的海洋单细胞藻类,水产养殖常用海洋微藻种类参见附录 A。

### 3.2

**藻种** **microalgae species**

具有良好特征性状,新鲜无污染,细胞密度在  $10^5$  个/mL~ $10^7$  个/mL 之间的微藻单种或纯种。

### 3.3

**接种** **inoculation**

在无污染的条件下,把选中的藻种放入新备好的培养基中的操作。

### 3.4

**单种培养** **xenic culture**

培养过程中,海洋微藻的培养系统内含有细菌(或不含细菌)和要培养的海洋微藻而没有其他生物。

### 3.5

**封闭式培养** **closed culture**

藻类培养在封闭的容器中,只通过充气管、培养液加入管和藻液抽出管与外界接触。

### 3.6

**一次性培养** **batch culture**

指在有限容积的培养容器中,加入定量培养液,接入藻种,藻细胞生长繁殖达到较高密度时,不加入或不更换培养液,一次性全部收获的培养方式。

### 3.7

**半连续培养** **semi-continuous culture**

指在一次性培养的基础上,藻细胞生长繁殖达到较高密度时,收获部分藻液,置换等量的培养液,再

培养再收获的培养方式。

### 3.8

#### 连续培养 continuous culture

指使用封闭式自动培养装置,当培养容器中藻细胞密度超过规定数值,藻液自动流出,新培养液同时流入,自动化仪器不断调整流出率,保持藻液细胞密度相对稳定的培养方式。

### 3.9

#### 继代培养 subculture

保种培养过程中,经过一定时间之后,把藻种接种在新培养基上,先放置在适宜条件下生长一段时间后,再放入低温(5℃~8℃)、弱光(50 lx~200 lx)条件下,一代一代培养下去的方法,接种一次可保藏3个月~12个月。

## 4 设施设备和条件

### 4.1 水质

符合 GB 11607。

### 4.2 设施设备

#### 4.2.1 海水处理设施

室外蓄水池、沉淀池、暗沉淀池或砂滤设备、通入室内的输水管道。

#### 4.2.2 清洗消毒间

用于容器和器材的清洗消毒,可分清洗间与消毒间。配有清洗消毒水槽、不同规格玻璃器皿、玻璃器皿放置架、臭氧紫外线消毒柜、烘箱、紫外线灯、工作台、电炉或煤气灶,高压蒸汽灭菌锅及载物架等。

#### 4.2.3 培养操作间

进行培养液的配制及微藻的保种、培养及检查等操作的房间。配有 pH 计、分光光度计、化学试剂、药品柜、电子天平、光学显微镜、超净工作台、无菌室等。

#### 4.2.4 保种间

用于放置低温培养箱、恒温光照培养箱、冰箱、冰柜,保存藻种、存放浓缩藻液的房间。

#### 4.2.5 小型扩增培养间

进行微藻小型扩增培养的具有控温设施的房间。要求房间采光、通风良好。配置气泵、带人工光源的培养架、遮光帘等。

## 5 消毒灭菌和营养液配制

### 5.1 消毒

5.1.1 微藻分离、保存用的海水在使用前需经灭菌处理。一般煮沸 5 min~10 min,用保鲜膜封口,冷却至室温后备用。

5.1.2 玻璃器皿用洗液或稀盐酸泡洗 5 min~10 min,再用清水冲净,倒置凉干,放入烘箱,120℃~160℃灭菌 1 h~2 h。

5.1.3 有培养基的器皿先去掉培养基再按 5.1.2 的要求洗涤。

5.1.4 其他不易清洗的容器,先刷洗干净,再按 5.1.2 的要求冲洗。

5.1.5 不能用烘箱烘干的器具放于消毒柜消毒或用煮沸的方法处理。

### 5.2 培养液配制

#### 5.2.1 总要求

——用蒸馏水或消毒海水配制;

- 各种营养成分应进行无菌处理；
- 试剂质量应达到或高于化学纯；
- 微量元素、维生素,按比例配成 1 000 倍浓度的母液；
- 大量元素(包括有 N、P、Fe、Si 等)营养盐单独配制成 1 000 倍浓度的母液；
- 母液保存于 4℃ 冰箱中备用；
- 母液使用前必须摇匀,出现沉淀或被污染应弃之另配。

### 5.2.2 常用培养液配方

各种常用微藻培养液的配方见附录 B。

### 5.2.3 培养液配制

- 各成分加入顺序为 N、P、Si、Fe、EDTA-Na<sub>2</sub>、V<sub>B</sub> 等。
- 每加入一种成分应搅均后再加入另一种。
- 微种保存时所用培养液中最后可加入适量抗生素。

## 6 藻种来源和分离纯化

### 6.1 来源

#### 6.1.1 野外采集

在要采集藻类的生长季节、地区,采集有需分离藻种的水样,并记录采集地的理化条件。野外采集的水样须经过分离纯化、鉴定后保种。

#### 6.1.2 引进

从有资质的其他海洋微藻保种单位引进海洋微藻藻种。

### 6.2 分离预备培养

根据要分离的藻类的要求,调节温度、光照度、盐度、酸碱度等,将要分离的藻类富集培养至可进行分离的细胞密度。主要的微藻种类适宜生长条件见附录 D。

### 6.3 分离

#### 6.3.1 微吸管分离

适于分离个体较大的藻种。用玻璃微吸管吸取单个的所要的藻细胞后移入准备好的容器中培养。

#### 6.3.2 水滴分离

适用于在培养液中已占优势的藻种分离。把水体稀释到每一水滴只有一个藻细胞,吸出水滴在显微镜下检查到有需要的藻细胞时,将水滴冲入试管培养。

#### 6.3.3 平板培养分离

适用于所含藻种品种较少的水样。把稀释适当的水样喷洒在固体培养基上,或用接种环蘸取水样后在固体培养基上划线,然后置于适宜条件下培养来分离出藻种。

### 6.4 纯化培养

将分离出的藻种进行单种培养,使其增殖到保种所需要的细胞密度。

### 6.5 鉴定种类

纯化培养后的藻种经藻类分类学鉴定,确定种类。

## 7 藻种保存培养

### 7.1 低温保存

#### 7.1.1 条件

采用低温培养箱。控温为 5℃~8℃,光照度为 50 lx~200 lx,光周期 14 D:10 L,静置。

### 7.1.2 要求

用试管或 150 mL~250 mL 的三角烧瓶保存。每种保存有相继的三代藻种。固液双相和固相保存同一种质材料各 3 管(瓶)以上。

### 7.1.3 培养基配制

- 固体培养基营养成分的浓度为正常培养液配方的 2 倍。
- 在配好的培养液中加入 1%~2% 琼脂,加热溶解后,分装至培养容器中。
- 试管的培养基倒入量为试管长的 1/4,三角烧瓶的培养基分装厚度为 0.8 cm~1 cm。
- 试管口和三角烧瓶口塞好棉塞或牛皮纸包扎好后进行高压蒸汽湿热灭菌。
- 灭菌后取出,试管倾置成斜面,三角烧瓶平放,晾冷备用。

### 7.1.4 固相保存

#### 7.1.4.1 接种

- 用划线法将藻种接种到试管中;
- 用喷雾法把藻种接种于三角烧瓶中培养基表面。

#### 7.1.4.2 保存

先放于适宜的温度、光照条件下培养,至接入藻种生长正常,可见明显的藻细胞群后,移入低温培养箱中保存。不定期观察藻种的保存效果。一般保存半年至一年,再作传代培养。

### 7.1.5 固液双相保存

#### 7.1.5.1 接种

在含有固体培养基的三角烧瓶中,先倒入双倍于固体培养基的培养液,再接入适量的藻种,或把藻种直接加入到含有固体培养基的三角烧瓶中。

#### 7.1.5.2 保存

适当温度、光照,培养 3 d~5 d 后移入或直接置于低温培养箱中。3 个月~6 个月,更换 1/2~1/3 的培养液,或作传代培养。

## 7.2 常温保存

### 7.2.1 条件

采用恒温光照培养箱培养。控温在 18℃~22℃,光照度为 1 000 lx~3 000 lx,光周期 12 D:12 L。

### 7.2.2 要求

- 培养容器为 250 mL~1 000 mL 三角烧瓶。
- 每一种类各保存 3 瓶以上。每天摇瓶 2~3 次。
- 易沉淀藻类用慢速摇床振荡培养保持藻细胞悬浮。
- 封闭式培养。

### 7.2.3 接种

加入藻种与培养液比例为 1:3~1:2。

### 7.2.4 添加培养液

每 15 d~30 d,添加或更换 1/2~1/3 培养液或作传代培养。

## 8 日常管理

### 8.1 观察及处理

藻种生长良好时,藻液颜色逐渐加深,无附壁,无沉淀。如发现有异常,立即取出、去除,并及时接种培养补上空缺的藻种。

### 8.2 显微镜检查

——观察藻细胞的增殖情况、计数。计数方法见附录 C。

——检查被污染情况。

——藻种取样时必须无菌操作。

### 8.3 室内消毒

每 15 d~20 d 消毒一次。在进行无菌操作前,用 30 W 的紫外线灯消毒 1 h。

### 8.4 记录登记

每次检查、接种及营养盐添加,需直接在培养容器上及记录卡上分别登记列存。日常操作及观察结果作书面记录。日常管理记录卡的样式见附录 E 中表 E.2。

## 9 室内小型扩种培养

### 9.1 培养条件与接种措施

#### 9.1.1 培养条件

——温度:按培养藻种要求调控室温。

——光照:自然光照结合人工光源,按藻种培养要求调节光照度、光周期。

——通气:气泵的供气量按培养容积的 1% 提供。供给气体需经 1% 的硫酸铜溶液或空气过滤器过滤后,接入培养容器底部,保持藻液均匀悬浮。

#### 9.1.2 各主要海洋微藻生长的生态条件

各主要海洋微藻最适宜生长的条件见附录 D。

#### 9.1.3 接种时间

在上午 8 时~10 时。

#### 9.1.4 培养方式

为封闭式一次性培养或半连续培养。

#### 9.1.5 营养盐添加

扩增培养时,在充气状态下按顺序将高浓度母液(1:1 000)直接添加于培养容器中,按培养液终浓度 200  $\mu\text{g}/\text{L}$ ~400  $\mu\text{g}/\text{L}$  的量添加青霉素及硫酸庆大霉素。

### 9.2 扩种方法

#### 9.2.1 一级培养

##### 9.2.1.1 培养容器

采用 5 000 mL~10 000 mL 的三角烧瓶或其他容器。

##### 9.2.1.2 藻种与培养液比例

藻种与培养液比例为 1:10~1:5。

#### 9.2.2 二级培养

##### 9.2.2.1 培养容器

用容积为 50 000 mL~100 000 mL 的微藻气升式光生物反应器或透光良好的聚乙烯桶。

##### 9.2.2.2 藻种与培养液比例

藻种与培养液比例为 1:20~1:10。

## 10 藻种种质库的建立和管理

### 10.1 海洋微藻种质库的建立

根据需要,按本标准的要求建立专门的海洋微藻种质库。

### 10.2 海洋微藻种质库管理

### 10.2.1 藻种入库

- 海洋微藻藻种入库前必须确定藻种的学名和中文名。无法定种的,确定其属名。
- 按照学名或中文名拼音字母顺序排列编号。
- 入库时即建立保种档案卡。
- 不同的藻种采用与其保藏培养相适的保种条件和保种技术。
- 每个藻种预留 3~5 个备份。

### 10.2.2 藻种种质标记

所有入库保存的海洋微藻藻种都必须有专一的种质编号。采用海洋微藻藻种种质档案卡及保存卡(附录 E)的形式进行记录。



附 录 A  
(规范性附录)  
水产养殖常用海洋微藻种类

水产养殖常用海洋微藻种类见表 A。

表 A 水产养殖常用海洋微藻种类

中文名称	学 名	所属门
亚心形四扁藻	<i>Tetraselmis subcordiformis</i> (Wille) Hazen	绿藻门
绿色杜氏藻	<i>Dunaliella viridis</i> Teodoresco	
小球藻	<i>Chlorella</i> spp.	
三角褐指藻	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> Bohlin	硅藻门
小新月菱形藻	<i>Nitzschia closterium</i> f. <i>minutissima</i> (W. Smith) Allen & Nelsen	
牟氏角刺藻	<i>Chaetoceros muelleri</i> Lemmermann	
中肋骨条藻	<i>Skeletonema costatum</i> Greville	
球等鞭藻 OA-3011	<i>Isochrysis galbana</i> Parke OA-3011	金藻门
球等鞭藻 OA-3010	<i>Isochrysis galbana</i> Parke OA-3010	
湛江等鞭藻	<i>Isochrysis zhangjiangensis</i> Hu & Liu	
绿色巴夫藻	<i>Pavlova viridis</i> Tseng, Chang & Zhang	
眼点拟球	<i>Nannochloropsis oculata</i> Droop	
异胶藻	<i>Heterogloea</i> sp.	黄藻门

**附录 B**  
(资料性附录)  
**常用海洋微藻培养液配方**

**B.1 硅藻培养液****B.1.1 硅藻培养液配方**

硅藻培养液配方 F/2 见表 B.1.1。

**表 B.1.1 硅藻培养液 F/2 配方**

成 分	用 量
NaNO <sub>3</sub>	74.8 mg
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.4 mg
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	8.4 mg~16.7 mg
微量元素母液	1 mL
维生素母液	1 mL
海水	1 000 mL

**B.1.2 微量元素母液**

硅藻培养液的微量元素 F/2 配方见表 B.1.2。

**表 B.1.2 硅藻培养液微量元素 F/2 配方**

成 分	用 量
ZnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	23 mg
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	178 mg
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	10 mg
FeC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ·5H <sub>2</sub> O	3.9 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	7.3 mg
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	12 mg
Na <sub>2</sub> -EDTA	4.35 mg
蒸馏水	1 000 mL

**B.1.3 维生素母液**

硅藻培养液的维生素 F/2 配方见表 B.1.3。

**表 B.1.3 硅藻培养液的维生素 F/2 配方**

成 分	用 量
维生素 B <sub>12</sub>	0.5 mg
维生素 B <sub>1</sub>	100 mg
维生素 H	0.5 mg
蒸馏水	1 000 mL

**B.2 绿藻培养液配方**

绿藻培养液配方见表 B.2。

**表 B.2 绿藻培养液配方**

成 分	用 量
NaNO <sub>3</sub>	0.5 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5 g
NaCl	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.15 g
CaCl <sub>2</sub>	0.05 g
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.01 g
海水	1 000 mL

**B.3 金藻培养液配方**

金藻培养液配方见表 B.3。

**表 B.3 金藻培养液配方**

成 分	用 量
NaHNO <sub>3</sub>	80 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8 mg
FeC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> (1% 溶液)	0.2 mL
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	500 mg
维生素 B <sub>1</sub>	200 mμg
维生素 B <sub>12</sub>	200 mμg
海水	1 000 mL

**B.4 海洋微藻通用培养液配方**

海洋微藻通用的培养液配方见表 B.4。

**表 B.4 海洋微藻通用培养液配方**

成 分	用 量
NaNO <sub>3</sub>	50 mg~120 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 mg~8 mg
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> (硅藻类用)	3 mg~8 mg
FeC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> (1% 溶液)	0.2 mL~1 mL
Na-EDTA	3 mg~5 mg
维生素 B <sub>1</sub>	100 mμg~200 mμg
维生素 B <sub>12</sub>	200 mμg~500 mμg
Na <sub>2</sub> -EDTA	3 mg~5 mg
海水	1 000 mL

**附 录 C**  
**(规范性附录)**  
**微藻细胞计数方法**

**C.1 器材**

医用血球计数板一个,计数器一个,载玻片、盖玻片若干,微吸管一只,光学显微镜一台。

**C.2 操作**

C.2.1 医用血球计数板及盖玻片清洁、控干,平放桌上,盖好盖玻片。

C.2.2 待测藻液样品摇匀,立即用一支干净的微吸管吸取样品,快速把吸管口放于盖玻片边缘,使藻液流入盖玻片内,并覆盖满划线方格及其周围。

C.2.3 稍停 1 min,显微镜下计数。

**C.3 计数**

医用血球计数板上计数区的划线方格有大格、中格、小格之分,只计数分布于中间的 25 个中格的微藻细胞数,计数 2~3 次,取平均数。藻细胞密度( $10^4$  个/mL) = 25 个中格的藻细胞数的总和。

**附录 D**  
**(资料性附录)**

**水产养殖用海洋微藻常见种类的生态适应性**

水产养殖常用海洋微藻对主要生态因子的适应性见表 D.1。

**表 D.1 水产养殖用海洋微藻常见种类对主要生态因子的适应性**

所属门	藻类名称	光照, lx		温度, ℃		酸碱度, pH		盐 度	
		适宜	最适	适宜	最适	适宜	最适	适宜	最适
绿藻门	亚心形四扁藻	1 000~ 20 000	5 000~ 10 000	7~30	20~28	6~9	7.5~8.5	8~80	30~40
	亚心形四扁藻 青岛生态型	1 000~ 10 000	2 500~ 5 000	17~32	25	8~10	8.9		30~35
	杜氏盐藻	2 000~ 6 000	—	4~40	25~35	7~9	7.0~8.5	—	30~80
	小球藻	—	10 000	10~36	25	6~8	—	—	—
	微绿球藻	—	10 000	10~36	25~30	7.5~8.5		2~54	4~36
硅藻门	三角褐指藻	1 000~ 8 000	3 000~ 5 000	5~25	10~20	7~10	7.5~8.5	9~92	25~32
	小新月菱形藻	—	3 000~ 8 000	5~28	15~20	7~10	7.5~8.5	18~61.5	25~32
	牟氏角毛藻	500~ 25 000	10 000~ 15 000	5~30	25~30	6.4~9.5	8.0~8.9	2.6~35	10~26
	中肋骨条藻	500~ 10 000	5 000	10~34	20~30	—	7.5~8.5	7~50	15~30
金藻门	球等鞭藻 OA-3011	—	7 000~ 9 000	10~35	20~30	—	—	10~30	—
	湛江等鞭藻	1 000~ 31 000	5 000~ 11 000	9~35	25~32	6.0~9.0	7.5~8.5	—	22.7~ 35.8
	绿色巴夫藻	—	4 000~ 10 000	10~35	15~30	—	—	5~80	10~40
黄藻门	异胶藻	1 000~ 8 000	—	8~35	15~33	—	—	17~37	19~34
蓝藻门	钝顶螺旋藻	—	30 000~ 35 000	20~42	30~37	6.5~11	8.6~9.5	35	—

附录 E  
(资料性附录)

海洋微藻种质库藻种保存档案卡样式

E.1 海洋微藻藻种种质档案卡样式见表 E.1。

表 E.1 海洋微藻种质库藻种种质档案卡样式

×××海洋微藻种质库藻种档案卡				
签字(盖章)		建档日期		年 月 日
编号:				
中文名:				
学名:				
采集(购)人签字(盖章):			分离纯化操作人签字(盖章):	
采集(购)集时间		年 月 日		
采集(购)地点(单位)				
采集地点生态环境	盐度%:	温度℃:	pH:	光照,lx:
	其他:			
鉴定机构(盖章):			鉴定人签字(盖章):	
			鉴定时间: 年 月 日	
纯培养 <input type="checkbox"/> 单种培养 <input type="checkbox"/>				
最早报道本种的文献:				
其他种质库保存本种或相近种情况:				

