

ICS 65.150
CCS B 51

DB33

浙 江 省 地 方 标 准

DB33/T 2300—2020

单胞藻规模化培养技术规范

Technical specification for large-scale cultivation of microalgae

2020 - 12 - 30 发布

2021 - 01 - 30 实施

浙江省市场监督管理局

发布

前 言

本标准按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本标准由浙江省农业农村厅提出。

本标准由浙江省水产标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：浙江省海洋水产养殖研究所，浙江永兴水产种业有限公司，宁波大学。

本标准主要起草人：柯爱英、徐继林、周朝生、肖国强、蔡景波、黄振华、曾国权、胡园、朱洁、吴越、王瑶华。

单胞藻规模化培养技术规范

1 范围

本标准规定了单胞藻规模化培养的培养条件和设施、培养方法、日常管理、收获和保存等内容。本标准适用于水产苗种培育和养殖生产中的单胞藻培养。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过规范性文件的引用而构成本标准必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期的对应版本适用于本标准；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

GB 11607 渔业水质标准

NY 5051 无公害食品 淡水养殖用水水质

NY 5052 无公害食品 海水养殖用水水质

3 术语与定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

指数生长期

细胞迅速生长繁殖，藻细胞数量随着培养时间的延长呈几何级数递增的时期。

3.2

一级培养

以0.3 L~5.0 L广口瓶或三角烧瓶作培养容器，严格消毒，用滤纸封口的培养方式。

3.3

二级培养

用容积为50 L~100 L白塑料桶、尼龙袋、光生物反应器等作为培养容器，严格消毒，连续充气的培养方式。

3.4

三级培养

采用育苗场现有的水泥培养池、帆布池等作为培养容器，消毒，连续充气的培养方式。

4 培养条件和设施

4.1 培养用水

海水应符合GB 11607、NY 5052规定。

淡水应符合GB 11607、NY 5051规定。

4.2 设施设备

主要有蓄水池、沉淀池、过滤池、输水管、保种室、培养池、光生物反应器等设施。场地要求光线明亮，通风条件好，配备显微镜、生物培养箱、空调、冰箱等设备。配套供水、供气、供电设施。

4.3 培养容器

一级培养的容器主要有0.3 L~5.0 L的三角烧瓶，二级培养主要采用10 L~20 L玻璃广口瓶、50 L~100 L白色塑料桶、光生物反应器等；三级大面积培养主要采用水泥池、帆布池等。

5 培养方法

5.1 器具消毒

5.1.1 高温消毒法

5.1.1.1 培养用的玻璃器皿和金属工具适用于煮沸消毒、烘箱干燥消毒、高压灭菌等高温消毒；

5.1.1.2 培养用的充气管、散气石适用于煮沸消毒。消毒的方法见附录A。

5.1.2 化学药品消毒法

5.1.2.1 酒精消毒适用于手、镊子、瓶口的消毒。

5.1.2.2 将高锰酸钾、漂白粉或漂白片、盐酸配成溶液适用于玻璃器具、塑料容器、充气管、散气石、玻璃缸、水泥池、管道等消毒。消毒方法见附录A。

5.2 培养用水消毒

5.2.1 加热消毒法

5.2.1.1 一级培养用的水经砂滤、脱脂棉过滤，煮沸5分钟~10分钟，冷却后使用。

5.2.1.2 二级培养用水经砂滤、250目筛绢袋过滤煮沸5分钟~10分钟，冷却后使用。

5.2.2 漂白粉或漂白片消毒

5.2.2.1 容积50 L~100 L塑料桶，加水后用漂白片消毒，有效氯浓度为20 mg/L~50 mg/L，中和去除余氯后使用。

5.2.2.2 水泥池加水后泼洒80目过滤过的漂白水，有效氯浓度为15 mg/L~30 mg/L，中和去除余氯后使用。

5.2.2.3 光生物反应器直接注入有效氯浓度为50 mg/L~100 mg/L漂白水消毒，中和去除余氯后使用。光生物反应器长期培养藻类后消毒采用盐酸1000 mg/L+250 mg/L次氯酸钠混合消毒液在缓冲罐里，用水泵循环到管道里，消毒混合液可以重复使用。

5.3 接种

5.3.1 藻种质量

藻种应无污染，无杂藻、藻细胞无附壁。

5.3.2 接种浓度

接种时间宜在早上6:00~10:00进行，藻种在指数生长后期，一级培养接种浓度为1:5~1:10；二级培养接种浓度1:10~1:50；三级培养根据天气、生产需要来接种，接种浓度1:15~1:30。

5.4 培养条件

水产养殖常用微藻种类生态条件参数见附录B。

5.5 培养液

常用培养液配方见附录C、附录D。

6 日常管理

6.1 观察与处理

6.1.1 观察

定期显微镜检查，从藻细胞的形态、悬浮、污染情况等了解细胞生长是否正常。注意观察藻液颜色，有无附壁、沉淀、菌膜和敌害生物，如发现异常应立即舍弃，并及时重新接种培养。

6.1.2 一级培养

空调控温，光照用日光灯调节，每天摇晃藻种瓶4次~6次，培养用的消毒水应在5天~7天用完。

6.1.3 二级培养

二级培养室保持采光良好，自然光照或人工光源，用遮光帘或遮阳布等设施，避免太阳光直射，充气量微沸、封口，定期用漂白水培养场所进行消毒。

6.1.4 三级培养

控温，用遮光帘或遮阳布等设施，调节光照，充气微沸。

6.2 记录和补充培养液

根据藻类的生长状态和对藻类的需求量收获一部分浓藻液，并补充等量的新培养液继续培养。对每次接种、培养液添加进行记录。

7 收获和保存

7.1 收获

单胞藻经各培养阶段，最终达到苗种及养殖生产单位所要求的藻种浓度和质量，投喂的单胞藻以处于指数生长期收获。

7.2 保存

培养的单胞藻利用500目尼龙筛网富集、暗沉淀、加0.5 g/L~1.0 g/L明矾或氢氧化钙收集藻类，冷藏或冷冻保存，以备随时投喂使用。

8 技术模式图

单胞藻规模化培养技术模式图见附录E。

附 录 A
(资料性)
单胞藻培养常用消毒方法

单胞藻培养常用消毒方法见表A.1

表A.1 单胞藻培养常用消毒方法

项目名称	煮沸	烘箱干燥	高压灭菌	高锰酸钾	漂白粉或漂白片	盐酸
玻璃容器	5分钟~10分钟	120℃ 恒温2小时	121℃, 维持20分钟	浓度10 mg/L~20 mg/L 浸泡5分钟~10分钟	浓度10 mg/L~100 mg/L 浸泡12小时	盐酸:水 1:1~1:5
金属工具	5分钟~10分钟	120℃ 恒温2小时	121℃, 维持20分钟	/	/	/
塑料容器	/	/	/	浓度10 mg/L~20 mg/L 浸泡5分钟~10分钟	浓度10 mg/L~100 mg/L 浸泡12小时	盐酸:水 1:1~1:5
充气管 散气石	5分钟~10分钟	/	/	浓度10 mg/L~20 mg/L 浸泡5分钟~10分钟	浓度10 mg/L~100 mg/L 浸泡12小时	/
水泥池 玻璃缸	/	/	/	浓度10 mg/L~20 mg/L 浸泡5分钟~10分钟	浓度10 mg/L~100 mg/L 浸泡12小时	盐酸:水 1:1~1:5
光生物反 应器、管 道	/	/	/	浓度10 mg/L~20 mg/L 浸泡5分钟~10分钟	浓度10 mg/L~100 mg/L 浸泡12小时	盐酸:水 1:1~1:5

附录 B

(资料性)

水产养殖常用微藻种类生态条件参数

水产养殖常用微藻种类生态条件参数见表B.1。

表B.1 水产养殖常用微藻种类生态条件参数

品种	隶属	PH	适温范围 (°C)	盐度范围 (‰)	光照强度 (lx)
三角褐指藻	硅藻门	7.0~10.0	5~25	15~35	1000~8000
小新月菱形藻		7.0~10.0	5~28	20~35	1000~8000
纤细角毛藻		6.5~9.5	10~40	10~30	5000~15000
牟氏角毛藻		6.5~9.5	10~40	10~30	5000~15000
假微型海连藻		7.0~10.0	20~30	15~35	1000~10000
威氏海连藻		7.0~10.0	20~30	15~35	3000~10000
中肋骨条藻		7.0~10.0	10~25	10~40	3000~7000
等鞭金藻	金藻门	7.0~9.5	15~35	10~50	3000~9000
球等鞭金藻		7.0~10.0	10~35	10~50	3000~10000
叉鞭金藻		7.0~9.5	9~35	10~50	3000~15000
绿色巴夫藻		7.0~9.5	10~35	5~80	3000~15000
亚心形扁藻	绿藻门	7.0~10.0	7~30	10~40	1000~20000
青岛大扁藻		7.0~10.0	10~35	10~40	1000~10000
塔胞藻		7.0~10.0	7~30	10~40	1000~20000
小球藻		6.0~8.5	10~36	0~45	1000~20000
微绿球藻		7.0~9.5	10~36	4~36	3000~20000
栅藻		5.0~7.5	10~35	0	1000~10000

附 录 C
(资料性)
常用海洋微藻培养液配方

常用海洋微藻培养液配方见表C.1。

表C.1 常用海洋微藻培养液配方

隶属	培养液配方			
	成分	一级培养 mg	二级培养 mg	三级培养 mg
金藻门	硝酸钠或硝酸钾	100.00	50.00	20.00
	磷酸二氢钾	15.00	10.00	3.00
	硫酸亚铁或柠檬酸铁	2.50	2.50	1.5
	硫酸锰	0.25	0.25	/
	EDTA	20.00	10.00	/
	尿素	/	10.00	10.00
	维生素 B1	0.1	0.05	/
	维生素 B2	0.0005	0.0005	/
	碳酸氢钠	1.00	/	/
	消毒水	1 L	1 L	1 L
	硅藻门	硝酸钠或硝酸钾	90.00	50.00
磷酸二氢钾		20.00	4.00	3.00
硫酸亚铁或柠檬酸铁		2.50	2.50	1.5
硫酸锰		0.25	0.25	/
EDTA		20.00	10.00	/
尿素		/	10.00	10.00
维生素 B1		0.1	0.001	/
维生素 B2		0.0005	0.000008	/
碳酸氢钠		1.00	/	/
硅酸钠		10.00	10.00	10.00
消毒水		1 L	1 L	1 L
绿藻门	硝酸钠或硝酸钾	100.00	20.00	20.00
	磷酸二氢钾	20.00	4.00	3.00
	硫酸亚铁或柠檬酸铁	2.50	2.50	1.0
	硫酸锰	0.25	0.25	/
	EDTA	20.00	10.00	/
	尿素	/	20.00	20.00
	维生素 B1	0.1	0.001	/
	维生素 B2	0.0005	0.000008	/
	碳酸氢钠	1.00	/	/
	消毒水	1 L	1 L	1 L

附 录 D
(资料性)
常用淡水藻类水生4号培养液配方

常用淡水藻类水生4号培养液配方见表D.1。

表D.1 常用淡水藻类水生4号培养液配方

成分	硫酸铵 mg/L	磷酸氢二钾 mg/L	过磷酸钙 mg/L	硫酸镁 mg/L	氯化钾 mg/L	碳酸氢钠 mg/L	三氯化铁 1%水溶液	土壤浸出液 ml
用量	200	10	30	80	25	100	1滴	0.5
注：土壤浸出液配制：（菜园土1份+2份水）混合摇匀，静止，取上清液。								

附录 E
(资料性)
单胞藻规模化培养技术模式图

单胞藻规模化培养技术模式见图E.1。






一级培养	二级培养			三级培养
				
将保种室中培养的藻种扩种到 0.3 L~5 L 的玻璃瓶, 用水需经过脱脂棉过滤煮沸, 培养液高压灭菌或煮沸。	将经过滤培养水烧开注入桶内密封, 冷却后加培养液, 接种培养。充气管、气石煮沸消毒, 培养液煮沸。	将经过滤培养水注入桶内, 加漂白片有效氯浓度 20 mg/L~50 mg/L, 充气-停气-密封, 12 小时~24 小时后充气加硫代硫酸钠中和, 加培养液, 接种培养。充气管、气石煮沸消毒或漂白精消毒, 培养液煮沸。	将经过滤水加有效氯浓度 50 mg/L~100 mg/L, 用水泵注入管道, 12 小时~24 小时后充气加硫代硫酸钠中和, 加培养液和 30 mg/L 碳酸氢钠接种培养。	将池子冲洗干净, 加经过滤的水到水位 80 cm~120 cm, 充气泼洒经 80 目过滤的漂白粉使水体有效氯浓度达 15 mg/L~30 mg/L, 用漂白水将池壁和过道淋洗, 充气 30 小时~60 小时后停气, 12 小时~24 小时后泼洒硫代硫酸钠, 充气 1 小时左右施肥接种。

图 E.1 单胞藻规模化培养技术模式图