

荒漠藻扩繁培养技术规程

Technical regulation for the propagation and cultivation of desert algae

地方标准信息服务平台

2021-11-15 发布

2021-12-15 实施

前 言

本文件按照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。

本文件由内蒙古自治区林业和草原局提出并归口。

本文件起草单位：内蒙古林业科学研究所、中国科学院水生生物研究所、鄂尔多斯市恩格贝生态示范区管理委员会、内蒙古自治区林业和草原局综合保障中心。

本文件主要起草人：刘新前、刘宗奇、段玉玺、兰书斌、王博、胡春香、王伟峰、王志波、莎仁图雅、刘矜杰、崔全友、乔永军、苏毅杰。

地方标准信息服务平台

引 言

本文件的发布机构提请注意，声明符合本文件时，可能涉及到荒漠藻相关专利（专利号：ZL200410012931.X、ZL201510522936.5）的使用。

本文件的发布机构对于该专利的真实性、有效性和范围无任何立场。

该专利持有人已向本文件发布机构承诺，他愿意和任何申请人在合理且无歧视的条款和条件下，就专利授权许可进行谈判。该专利持有人的声明已在本文件的发布机构备案。相关信息可以通过以下联系方式获得：

专利持有人姓名：中国科学院水生生物研究所，李敦海

地址：湖北省武汉市武昌东湖南路7号

请注意除上述专利外，本文件的某些内容仍可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

地方标准信息服务平台

荒漠藻扩繁培养技术规程

1 范围

本文件规定了荒漠藻样品采集，藻种的制备、培养基配制、规模化培养及质量评价等技术要求。本文件适用于荒漠藻的扩繁与规模化培养。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 36197 土壤质量 土壤采样技术指南

DB15/T 2083 人工荒漠藻土壤结皮治沙技术规程

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

荒漠生物土壤结皮 desert biological soil crust (DBSC)

荒漠（包括半荒漠）地区土壤表面由藻类、细菌、地衣、苔藓等生物组分与表层土壤共同形成的一层很薄的复合生物土壤层。

3.2

荒漠藻 desert algae

干旱、半干旱区陆生蓝藻中的具鞘微鞘藻（*Microcoleus vaginatus* Schk）、纤细席藻（*Phormidium tenue* (Menegh.) Gom.）和爪哇伪枝藻（*Scytonema javanicum* (Kutz.) Born et Flah）。

3.3

光生物反应器 photobioreactor

能够用于光合微生物、具有光合作用能力的组织或者细胞培养的装置，分为封闭式光生物反应器和开放式光生物反应器。

4 培养基及配制

4.1 培养基种类

配制具鞘微稍藻和纤细席藻所用的培养基为BG11, 配方如表1所示; 爪哇伪枝藻所用培养基为BG110, 配方如表2所示。

配制培养基时按表中营养盐顺序加入, 且应使一种成分充分溶解和混合均匀之后才能添加下一种成分。

表1 BG11 培养基成分及配比表

单位为毫克每升

营养盐		A ₅ 的成分	
成分	浓度	成分	浓度
NaNO ₃	1500	H ₃ BO ₃	2.86
MgSO ₄ · 7H ₂ O	75	MnCl ₂ · 4H ₂ O	1.81
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	40	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.252
EDTA-Na ₂	1	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.222
CaCl ₂ · 2H ₂ O	36	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.079
柠檬酸	6		
柠檬酸铁铵	6		
A ₅	1 mL/L		
Na ₂ CO ₃	20		

注: 营养盐纯度要求化学纯及以上, 下同。

表2 BG110 培养基的成分及配比表

单位为毫克每升

营养盐		A ₅ 的成分	
成分	浓度	成分	浓度
MgSO ₄ · 7H ₂ O	75	H ₃ BO ₃	2.86
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	40	MnCl ₂ · 4H ₂ O	1.81
EDTA-Na ₂	1	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.252
CaCl ₂ · 2H ₂ O	36	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.222
柠檬酸	6	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.079
柠檬酸铁铵	6		
A ₅	1 mL/L		
Na ₂ CO ₃	20		

4.2 配制

4.2.1 灭菌

对培养基配制时所用设备用高压灭菌锅进行灭菌处理。

4.2.2 配制方法

BG11培养基：每升过滤水加入 NaNO_3 1.5 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.075 g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.04 g、EDTA- Na_2 0.001 g、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.036 g、柠檬酸0.006 g、柠檬酸铁按0.006 g、 A_5 1 mL、 Na_2CO_3 0.02 g。

BG11₀培养基：不加 NaNO_3 ，其他成分和加入顺序与BG11培养基一致。

5 藻种分离纯化及保藏

5.1 生物土壤结皮采集

在荒漠或半荒漠生物土壤结皮生长发育良好的地段，用无菌工具采集有颜色生物土壤结皮层，置于无菌培养皿或试管中，石蜡封口，及时运回实验室保存备用。

5.2 分离和纯化

5.2.1 富集培养

将土样研磨，经过0.1 mm筛，加适量无菌水浸泡2 d后，直接接种于液体培养基进行加富培养，培养条件为光强 $70 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、温度 $28 \text{ }^\circ\text{C} \sim 32 \text{ }^\circ\text{C}$ 。观察记录直至有大量藻体出现。

5.2.2 纯化

将一定体积的富集培养液置于固体培养基上，涂布，同富集培养条件一致进行培养，挑取单菌落进行反复划线、直至无杂菌长出。

5.2.3 鉴定

在显微镜下观察其形态特征并鉴定。

5.3 保藏

将获得的各单一藻种用液体培养基进行扩繁培养后，经离心或过滤，在无菌条件下阴干后置于无菌离心管等容器中密封，低温干燥条件下储存。

6 藻种原液制备及规模化培养

6.1 藻种原液制备

藻种原液制备过程的记录应遵守附录A的规定。生产一、二级藻种原液培养基时，在无菌条件下采用蒸馏水加营养盐配制而成；生产三级藻种原液培养基时，规模化配制可采用深层自然井水和营养盐配制而成：

- a) 一级原液制备：将单一藻种接入150 mL~200 mL三角瓶中，在气流为1.5 L/min~3.5 L/min条件下通气培养，气流经过棉塞或细菌过滤滤膜进行无菌处理；光强控制在 $65 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s}) \sim 85 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ，温度控制在 $28 \text{ }^\circ\text{C} \sim 32 \text{ }^\circ\text{C}$ 。浓度大于0.2 g/L时（一般在5 d~10 d），转入到二级原液制备；
- b) 二级原液制备：将一级原液接入到500 mL~1000 mL培养瓶中，在气流为2.5 L/min~5 L/min条件下通气培养，无菌处理，光强控制在 $75 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s}) \sim 95 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ，温度控制在 $28 \text{ }^\circ\text{C} \sim 32 \text{ }^\circ\text{C}$ ，浓度大于0.2 g/L时（一般在5 d~10 d），转入到三级原液制备；

- c) 三级原液制备：将二级原液接入到 5 L~10 L 培养容器中，在气流为 3 L/min~6 L/min 条件下通气培养，防止污染，光强控制在 $70 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s}) \sim 100 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ，温度控制在 $28 \text{ }^\circ\text{C} \sim 32 \text{ }^\circ\text{C}$ ，浓度大于 0.2 g/L 时（一般在 5 d~10 d），满足规模化培养（50 t 以上）。

6.2 藻类原液质量评价

6.2.1 评价方法

藻液浓度评价采用干质量测定法，取新鲜藻液于 8000 r/min 下离心 6 min，弃上清液，然后用蒸馏水洗涤再离心，重复以上步骤 2 次，将藻泥完全移至表面皿上，涂匀后放入 $-40 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱预冻。采用冷冻真空干燥 12 h~20 h，取出立即称其质量。在冷冻干燥前要将藻泥厚度均匀的摊在干燥器皿上（可打孔成蜂窝状），且不应堆积过厚，保证微藻的干燥时间均匀。

6.2.2 合格标准

规模化培养的合格藻液浓度为 0.2 g/L，野外使用的合格藻液生物量为 $7 \text{ g} \cdot \text{dw}/\text{m}^2 \sim 10 \text{ g} \cdot \text{dw}/\text{m}^2$ 。

6.3 规模化培养条件

规模化培养温室宜建在平坦的场地，建成后关闭门窗，利用福尔马林的挥发性对温室进行熏蒸除菌（24 h），以防止外来污染；同时控制温度为 $22 \text{ }^\circ\text{C} \sim 35 \text{ }^\circ\text{C}$ 、光照为 $120 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s}) \sim 180 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、通气为 3 L/min~6 L/min，抑制某些喜高温和高强光的土著绿藻的生长。培养过程的记录应遵守附录 A 的规定，此外还应注意：

- 1) 用于大规模培养前接种的藻株要尽量纯化，减少接种时带来的污染；
- 2) 三级原液接种到规模化培养时培养液浓度控制在 0.2 g/L~0.5 g/L，以保证培养藻种在培养基中的优势地位以抑制其他杂藻的生长；
- 3) 藻种接入到新鲜的培养基中需要适应 1 d~2 d，在此期间内可能因藻类生长受到抑制，出现藻液发黄现象，属于正常现象，进入对数生长期后，培养液的颜色很快转为蓝绿色。

6.4 储备

将培养好的藻液进行干燥得到藻粉，具体方法为：将藻液用增压泵抽到过滤装置——振动斜面筛上，经过振动斜面筛后，收获得到荒漠藻藻浆，然后将藻浆经过离心机离心，获得荒漠藻藻泥，再将藻泥经过电热干燥箱于 $60 \text{ }^\circ\text{C} \sim 85 \text{ }^\circ\text{C}$ 下干燥 5 h~8 h，收集到藻片后，用粉碎机粉碎获得藻粉，阴干条件保存。

需要接种时，将干藻与沙土一起混匀，直接撒播到地表，也可培养好的藻液可以直接接种到沙地。

7 档案管理

在荒漠藻扩繁培养过程中，档案要及时整理和科学管理，具体内容包括：档案收集、档案整理、档案价值鉴定、档案保管、档案编目和档案检索、档案统计、档案编辑和研究等。相关档案可以分为纸质档案和电子档案，包括藻种培养的基本日程记录信息、人员管理信息、科学研究信息等。

附录 A
(规范性)

荒漠藻扩繁培养日程记录表

荒漠藻扩繁培养日程记录表见表A.1。

表A.1 荒漠藻扩繁培养日程记录表

培养地点:

天气情况:

记录人:

时间	培养 编号	室外 温度 ℃	室内 温度 ℃	室外 光强 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$	室内 光强 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$	通气 时间 min	生长 状况 优、良、差	生物量 $\text{g} \cdot \text{dw}/\text{m}^2$	pH 值

地方标准信息服务平台