



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102273431 B

(45) 授权公告日 2013. 03. 20

(21) 申请号 201110145766. 5

(22) 申请日 2011. 06. 01

(73) 专利权人 深圳大学

地址 518060 广东省深圳市南山区南海大道
3688 号

(72) 发明人 黎双飞 周连宁 胡章立

(74) 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001

代理人 王敏锋

(51) Int. Cl.

A01K 67/033(2006. 01)

C12N 1/12(2006. 01)

C12R 1/89(2006. 01)

审查员 孟海燕

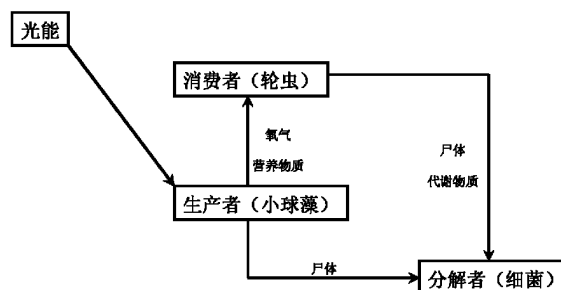
权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种淡水轮虫和小球藻的共培养方法

(57) 摘要

本发明公开了一种 O_3 /BAC 深度处理工艺中优势轮虫的分离与小球藻共培养的方法,其步骤:
a、 O_3 /BAC 深度处理工艺中轮虫的确定:对水厂臭氧活性炭深度水处理中各工艺流程浮游动物种群结构进行调查,取样分别做定量和定性分析;
b、 O_3 /BAC 深度处理工艺中优势轮虫的分离:在室温、黑暗中驯化过夜,用滴管挑选出健康、活泼的成体用于进一步的培养;
c、小球藻的培养:将纯化单种小球藻接种于 Blue-GreenMedium 培养液中;
e、共培养:轮虫的初始接种密度对共培养;
f、传代培养:培养体系中轮虫死亡,转接轮虫进行传代培养。实现 O_3 /BAC 深度处理工艺优势轮虫室内较长时间的共培养,轮虫密度维持在 400-600ind/ml。特别是为生活饮用水中轮虫的安全控制和风险评估研究长期提供实验材料。



1. 一种 O_3 /BAC 深度处理工艺中优势轮虫的分离与小球藻共培养的方法,其步骤是:

a、 O_3 /BAC 深度处理工艺中优势轮虫的确定:对水厂臭氧活性炭深度水处理中各工艺流程浮游动物种群结构进行调查,取样分别做定量和定性分析,按照 O_3 /BAC 深度水工艺流程,采样点设置有出厂水、活性炭池滤后水、活性炭池、砂滤池、沉淀池、絮凝池及原水,分别采集表面水样和 2m 深处的水样;

定性分析:使用 250 目小型浮游生物网分别在 O_3 /BAC 深度处理各工艺中采集,将采集的样品用乙醇固定,将已固定的样品带回实验室后,在解剖镜下挑取出鉴定的轮虫,置于载玻片上,滴加一滴封片剂,加盖盖玻片,Olympus BX51 显微镜下观察,对轮虫进行物种鉴定;
定量分析:使用 5L 有机玻璃采样器,每个采样点采集 10L 水样,250 目小型浮游生物网过滤浓缩至 50mL 离心管中,定量样品用鲁哥氏液固定,最终浓度 1%,将样品带回实验室后,静置沉淀,虹吸浓缩,使用 5mL 浮游生物计数框,显微镜下进行计数;

b、 O_3 /BAC 深度处理工艺中优势轮虫的分离:于水厂 O_3 /BAC 工艺流程中,用 250 目小型浮游生物网采集转轮虫和盘状鞍甲轮虫,样品带回实验室后,暂养于 9cm×1cm 的一次性培养皿,在室温、黑暗中驯化过夜,用滴管挑选出健康、活泼的成体用于进一步的培养;

c、小球藻的培养:将纯化单种小球藻接种于蓝绿藻培养液中,置于恒温光照培养箱中进行 14~18:10~6 小时光照并封闭通气培养,培养过程中每天震荡 2~3 次,震荡时间为 2~5min,培养温度为 23-27℃,光照强度为 6000~8000LX,充气量为 80~90L/h,培养 14-16 天,小球藻密度达到 $10^6 \sim 10^8$ ind/ml;

所述的培养液为:

蓝绿藻培养液的配置:

组成成分	浓度	储存液浓度
(1) NaNO_3	100 mL/L	15.0 g/L dH_2O
(2) K_2HPO_4	10 mL/L	2 g/500 mL dH_2O
(3) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 mL/L	3.75 g/500 mL dH_2O
(4) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10 mL/L	1.8 g/500 mL dH_2O
(5) 柠檬酸	10 mL/L	0.3 g/500 mL dH_2O
(6) 柠檬酸铁铵	10 mL/L	0.3g/500ml dH_2O
(7) EDTANa_2	10 mL/L	0.05g/500ml dH_2O
(8) Na_2CO_3	10 mL/L	1.0g/500ml dH_2O
(9) A5 微量元素溶液	1ml/L	
	H_3BO_3	2.86g/L dH_2O
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.86g/L dH_2O
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.22g/L dH_2O
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.39g/L dH_2O
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.08g/L dH_2O
	$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.05g/L dH_2O

d、转轮虫和盘状鞍甲轮虫的适应性培养：转轮虫和盘状鞍甲轮虫以初始密度为 10 ~ 30 个 / 升直接接种于上述已培养好的小球藻液中,改变培养条件：温度为 25-29℃,光照强度为 3000 ~ 6000LX,光照周期为 12 ~ 16:12 ~ 8,封闭通气培养；

e、共培养：在(d)步骤中的培养条件培养 9-11 天,转轮虫和盘状鞍甲轮虫密度均达到 300-500ind/ml,将培养条件改变为(c)步骤中的培养条件适合小球藻的快速繁殖,同时抑制转轮虫和盘状鞍甲轮虫的快速繁殖,周期性的改变(c)步骤和(d)步骤中的培养条件,实现小球藻与转轮虫和盘状鞍甲轮虫长达 10 ~ 12 个月时间的共培养,并且转轮虫和盘状鞍甲轮虫密度维持在 400-600ind/ml；

f、传代培养：培养体系中转轮虫和盘状鞍甲轮虫开始死亡,转接转轮虫和盘状鞍甲轮虫进行传代培养,重复上述(c)步骤、(d)步骤、(e)步骤一次,获得单系纯种转轮虫和盘状鞍甲轮虫,密度维持在 400-600ind/ml,为以转轮虫和盘状鞍甲轮虫为材料的进一步研究长期持续提供实验材料。

一种淡水轮虫和小球藻的共培养方法

技术领域

[0001] 本发明涉及浮游动物的培养技术领域,更具体涉及一种水厂 O_3 /BAC 深度处理工艺中优势轮虫和小球藻的共培养方法,它适用于淡水轮虫和小球藻的共培养。

背景技术

[0002] 轮虫一般对水体不会造成污染,其本身就是水体有机环境的组成部分。轮虫是多细胞动物中繁殖速率最高和散布能力最强的类群,因此也容易成为水体中浮游生物的优势类群。某些轮虫在室内的种群生态学、分子生物学和生态毒理的研究中作为模式生物,并且某些淡水轮虫作为水体及生活饮用水质量的良好指示生物发挥着重要作用。

[0003] 由于轮虫在水体中大量繁殖及轮虫可以轻易进入沉淀池并穿透滤池,在经过水厂 O_3 /BAC 工艺深度处理后,仍然能保持存活的优势轮虫种群有可能为突变个体,其具备了更强的生存和适应能力,再加上活性炭池中的活性炭为轮虫的大量繁殖提供了营养物质,这样轮虫进入清水池继续繁衍,进而进入官网系统。而轮虫的存在违反了生活饮用水卫生标准中对感官性状指标的规定;一些轮虫是诸如血吸虫,线虫等水中致病生物的中间宿主,从而成为疾病传播的一个重要媒介,给安全用水带来隐患;因此,通过实验室室内培养不同季节的经过水厂 O_3 /BAC 工艺处理后仍存活的优势轮虫,为生活饮用水中轮虫的安全控制和风险评估研究奠定基础。

[0004] 目前对轮虫培养方法的研究甚多,但是主要以臂尾轮虫属(*Brachinorus*)、晶囊轮虫属(*Asplanchna*)、锥轮虫属(*Notommata*)等一些富有生活型轮虫为主。而对 O_3 /BAC 深度处理工艺中轮虫的分离及控制研究比较少见。另外,传统培养方法大多用于实际养殖渔业,不能满足一些实验单系统纯种的要求,对实验结果的影响很大,更加无法适用于 O_3 /BAC 工艺处理中轮虫的安全控制研究。因此对 O_3 /BAC 深度处理工艺中优势轮虫的分离并进行实验室室内的培养就显得尤为重要了。

发明内容

[0005] 本发明的目的是在于提供了一种 O_3 /BAC 深度处理工艺中优势轮虫和小球藻的共培养方法,实现 O_3 /BAC 深度处理工艺优势轮虫室内较长时间的共培养,轮虫密度维持在 400-600ind/ml。为室内的种群生态学、分子生物学和生态毒理的研究特别是为生活饮用水中轮虫的安全控制和风险评估研究长期提供实验材料。

[0006] 为了实现上述的目的,本发明采用以下技术措施:

[0007] 一种 O_3 /BAC 深度处理工艺中优势轮虫的分离与小球藻共培养的方法,其步骤是:

[0008] a、 O_3 /BAC 深度处理工艺中(优势)轮虫的确定:

[0009] 对南方某水厂臭氧活性炭(O_3 /BAC)深度水处理中各工艺流程浮游动物种群结构进行为期一年的调查,每月取样分别做定量和定性分析。按照 O_3 /BAC 深度水工艺流程(预臭氧化—机械混合—高效网格反应—平流沉淀—V 型滤池过滤—主臭氧化—BAC 过滤—氯消毒,现有的普通工艺流程),采样点设置有出厂水、活性炭池滤后水、活性炭池、砂滤池、沉

淀池、絮凝池及原水,分别采集表面水样和 2m 深处的水样。

[0010] 定性分析 :使用 250 目小型浮游生物网分别在 O₃/BAC 深度处理各工艺中采集,将采集的样品用乙醇固定(最终浓度 50%),将已固定的样品带回实验室后,在解剖镜下挑取出需要鉴定的轮虫,置于载玻片上,滴加一滴封片剂,加盖盖玻片,0lympus BX51 显微镜下观察。按《中国动物志轮虫类》、《淡水浮游生物研究生法》对轮虫进行物种鉴定。定量分析 :使用 5L 有机玻璃采样器,每个采样点采集 10L 水样,250 目小型浮游生物网过滤浓缩至 50mL 离心管中,定量样品用鲁哥氏液(请见表 1)固定,最终浓度 1%。将样品带回实验室后,静置沉淀,虹吸浓缩,使用 5mL 浮游生物计数框,显微镜下进行计数。

[0011] 表 1

[0012]

鲁哥氏液的配置 (100ml):	
Component	Amount
I ₂	5g
KI	10g
冰醋酸	10ml
H ₂ O	90ml

[0013] 通过对周期性采样中物种的统计分析,确定 O₃/BAC 深度处理工艺中的典型优势轮虫。

[0014] b、O₃/BAC 深度处理工艺中优势轮虫的分离 :于南方某水厂 O₃/BAC 工艺流程中(预臭氧化—机械混合—高效网格反应—平流沉淀—V 型滤池过滤—主臭氧化—BAC 过滤—氯消毒,现有的普通工艺流程),用 250 目小型浮游生物网采集转轮虫和盘状鞍甲轮虫,样品带回实验室后,暂养于 9cm x 1cm 的一次性培养皿,在室温(20-25℃ 以下相同)、黑暗中驯化过夜,用滴管挑选出健康、活泼的成体用于进一步的培养。

[0015] c、小球藻的培养 :将纯化单种小球藻接种于蓝绿藻培养液(Blue-Green Medium, BG11)培养液中(培养液的配置请见表 2),置于恒温光照培养箱中进行(14 ~ 18):(10 ~ 6)小时光照并封闭通气培养(通入的空气需经空气过滤器过滤),培养过程中每天震荡 2 ~ 3 次,震荡时间为 2 ~ 5min,培养温度为 23-27℃,光照强度为 6000 ~ 8000LX,充气量为 80 ~ 90L/h,培养 14-16 天,小球藻密度达到 10⁶ ~ 10⁸ind/ml。

[0016] 表 2

蓝绿藻培养液的配置:

Component	Amount	Stock Solution
(1) NaNO_3	100 mL/L	15.0 g/L dH_2O
(2) K_2HPO_4	10 mL/L	2 g/500 mL dH_2O
(3) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 mL/L	3.75 g/500 mL dH_2O
(4) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10 mL/L	1.8 g/500 mL dH_2O
(5) Citric acid	10 mL/L	0.3 g/500 mL dH_2O
(6) Ferric ammonium citrate	10 mL/L	0.3g/500ml dH_2O
[0017] (7) EDTANa_2	10 mL/L	0.05g/500ml dH_2O
(8) Na_2CO_3	10 mL/L	1.0g/500ml dH_2O
(9) A5 (Trace mental solution)	1ml/L	
	H_3BO_3	2.86g/L dH_2O
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.86g/L dH_2O
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.22g/L dH_2O
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.39g/L dH_2O
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.08g/L dH_2O
	$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0.05g/L dH_2O

[0018] d、转轮虫和盘状鞍甲轮虫的适应性培养:转轮虫和盘状鞍甲轮虫以初始密度为 10 ~ 30 个 / 升直接接种于上述已培养好的小球藻液中,改变培养条件:温度为 25-29℃,光照强度为 3000 ~ 6000LX,光照周期为 (12 ~ 16): (12 ~ 8),封闭通气培养(通入的空气需经空气过滤器过滤),使用分散器产生微细气泡以增加气泡接触面积,通气气流应稍弱,以适应转轮虫和盘状鞍甲轮虫适宜静水环境中生长繁殖。

[0019] e、共培养:在上述 d 步骤中的培养条件培养 9-11 天,转轮虫和盘状鞍甲轮虫密度均达到 300-500ind/ml,此时摄食量很大,培养体系中的小球藻繁殖速度难以满足转轮虫和盘状鞍甲轮虫的摄食要求。此时将培养条件改变为上述 c 步骤中的培养条件这样更适合小球藻的快速繁殖,同时抑制转轮虫和盘状鞍甲轮虫的快速繁殖。这样,周期性的改变上述 c 步骤和 d 步骤中的培养条件,从而能够实现小球藻与转轮虫和盘状鞍甲轮虫长达 10 ~ 12 个月时间的共培养,并且转轮虫和盘状鞍甲轮虫密度维持在 400-600ind/ml。

[0020] f、传代培养:当培养体系中大量转轮虫和盘状鞍甲轮虫开始死亡,这时需转接转轮虫和盘状鞍甲轮虫进行传代培养,重复上述 c 步骤、d 步骤、e 步骤一次,这样,常年获得单系纯种转轮虫和盘状鞍甲轮虫,密度维持在 400-600ind/ml,为以转轮虫和盘状鞍甲轮虫为材料的进一步相关研究长期持续提供实验材料。

[0021] 本发明的优点和特点是:通过对 O_3 /BAC 深度处理工艺进行为期一年的种群结构调

查,确定优势轮虫并将其分离。通过周期性的改变培养条件,建立一种 O_3 /BAC 深度处理工艺中优势轮虫和小球藻共培养体系,该培养体系,一方面作为饵料的小球藻通过光合作用提供氧气,也为轮虫提供物质和能量,同时还可以清除水体中轮虫的代谢废物(如 NH_4^+ 等);另一方面,轮虫以小球藻为食物的同时,还可以防止细菌滋生以保证小球藻的正常繁殖。通过周期性的改变培养条件,实现 O_3 /BAC 深度处理工艺优势轮虫室内常年的共培养,轮虫密度维持在 400–600 ind/ml。为室内的种群生态学、分子生物学和生态毒理的研究特别是为生活饮用水中轮虫的安全控制和风险评估研究长期提供实验材料。利用本发明的培养方法,可以为环境监测和生态毒理研究特别是生活饮用水中轮虫的控制技术研究提供实验条件。

附图说明

[0022] 图 1 为一种 O_3 /BAC 深度处理工艺中优势轮虫和小球藻共培养体系的物质循环和能量流动示意图。

[0023] 该培养体系,一方面作为饵料的小球藻通过光合作用提供氧气,也为轮虫提供物质和能量,同时还可以清除水体中轮虫的代谢废物(如 NH_4^+ 等);另一方面,轮虫以小球藻为食物的同时,还可以防止细菌滋生以保证小球藻的正常繁殖。

具体实施方式

[0024] 下面结合具体实施例对本发明作进一步详细说明,但本发明并不限于具体实施例。

[0025] 实施例 1:

[0026] 本实施例中的 O_3 /BAC 深度处理工艺中优势轮虫——转轮虫室内常年培养的过程。一种淡水轮虫和小球藻的共培养方法,其步骤是:

[0027] 1、 O_3 /BAC 深度处理工艺中优势轮虫的确定:

[0028] 从 2010 年 3 月至 2011 年 4 月,对深圳对南方某水厂采用 O_3 /BAC 深度水处理工艺水厂各工艺流程浮游动物种群结构进行为期一年的调查,每月中旬取样分别做定量和定性分析。按照该水厂的工艺流程,采样点设置有出厂水、活性炭池滤后水、活性炭池、砂滤池、沉淀池、絮凝池及原水,分别采集表面水样和 2m 深处的水样。

[0029] 定性分析:使用 250 目小型浮游生物网分别在 O_3 /BAC 深度处理各工艺中采集,将采集的样品用乙醇固定(最终浓度 50%),将已固定的样品带回实验室后,在解剖镜下挑出需要鉴定的轮虫,置于载玻片上,滴加一滴封片剂,加盖盖玻片,0lympus BX51 显微镜下观察。按《中国动物志轮虫类》、《淡水浮游生物研究生法》对轮虫进行物种鉴定。定量分析:使用 5L 有机玻璃采样器,每个采样点采集 10L 水样,250 目小型浮游生物网过滤浓缩至 50mL 离心管中,定量样品用鲁哥氏液固定,最终浓度 1%。将样品带回实验室后,静置沉淀,虹吸浓缩,使用 5mL 浮游生物计数框,显微镜下进行计数。通过物种鉴定和定量计数,确定确定盘状鞍甲轮虫(*L. patella*)及转轮虫(*R. totatoria*)为该水厂 O_3 /BAC 深度处理工艺中的典型优势轮虫。

[0030] 2、 O_3 /BAC 深度处理工艺中转轮虫的分离:从该水厂 O_3 /BAC 工艺流程中,用 250 目小型浮游生物网采集转轮虫,样品带回实验室后,暂养于 9cmx1cm 的一次性培养皿,在室温、黑暗中驯化过夜,用滴管挑选出健康、活泼的转轮虫成体用于进一步的培养。

[0031] 3、小球藻的培养：将纯化单种小球藻接种于盛有上述 BG11 培养液中，置于恒温光照培养箱中进行 18:6 小时光照并封闭通气培养（通入的空气需经空气过滤器过滤），培养过程中每天震荡 3 次，震荡时间为 3min，培养温度为 25℃，光照强度为 7000LX，充气量为 80L/h，培养 13 天，小球藻密度达到 6×10^7 ind/ml。

[0032] 4、转轮虫的适应性培养：将转轮虫以初始密度为 15 个 / 升直接接种于上述已培养好的小球藻液中，改变培养条件：温度为 27℃，光照强度为 4000LX，光照周期为 12:12，封闭通气培养（通入的空气需经空气过滤器过滤），使用分散器产生微细气泡以增加气泡接触面积，通气气流应稍弱，以使转轮虫适宜静水环境中生长繁殖。

[0033] 5、转轮虫的扩大和持续培养：上述 4 步骤中的培养条件培养 11 天，转轮虫的平均密度达到 480 ind/ml。此时将培养条件改变为上述 3 步骤中的培养条件继续培养。周期性的改变上述 3 步骤和 4 步骤中的培养条件，常年获得单系纯种转轮虫，平均密度将维持在 550 ind/ml。

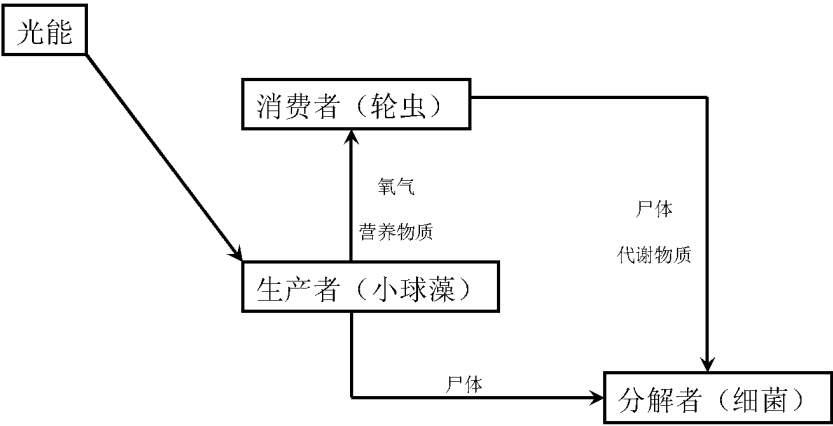


图 1