

文章编号: 1000-0615(2001)02-0151-05

## 臭氧处理海水对小球藻的生理效应

王成刚<sup>1</sup>, 汤晓华<sup>2</sup>, 郑波<sup>2</sup>, 马生<sup>2</sup>

(1. 山东海洋工程研究院海洋处, 山东 青岛 266071; 2. 青岛海洋大学水产学院, 山东 青岛 266003)

**摘要:** 采用经臭氧处理的海水培养小球藻, 分析了小球藻的相对增长速率、叶绿素 a 含量、DNA 和 RNA 含量及海水中三氮含量的变化, 结果表明: 1. 一定剂量的臭氧处理可提高小球藻的生长速度和叶绿素的含量, 高剂量的处理会抑制小球藻的生长。2. 藻细胞中 DNA 含量对臭氧处理表现的相对稳定, 而 RNA 含量比较敏感, 一定剂量的臭氧处理可引起 RNA 含量增加。3. 经臭氧处理的海水, 硝态氮( $\text{NO}_3^-$ -N)的含量有所提高, 而铵态氮( $\text{NH}_4^+$ -N)和亚硝态氮( $\text{NO}_2^-$ -N)的含量降低。

**关键词:** 臭氧; 小球藻; 生理效应

中图分类号: S949; X52 文献标识码: A

## Physiological effects of seawater treated by ozone on *Chlorella* sp.

WANG Cheng-gang<sup>1</sup>, TANG Xiao-hua<sup>2</sup>, ZHENG Bo<sup>2</sup>, MA Shen<sup>2</sup>

(1. Shandong Marine Scientific and Technical Academy, Qingdao 266071 China;

2. Department of Fisheries, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** Effects of seawater treated by ozone on reproduction, chlorophyll-a content, DNA and RNA content in *Chlorella* sp. were studied. Meanwhile,  $\text{NH}_4^+$ -N,  $\text{NO}_2^-$ -N and  $\text{NO}_3^-$ -N content in the seawater were analyzed. The results showed as follows: 1. A certain concentration of ozone treatment could increase reproduction and chlorophyll-a content, but higher concentration of ozone treatment could inhibit reproduction of *Chlorella* sp. 2. DNA content showed relative stability, RNA content was more sensitive to ozone treatment than DNA content, and ozone treatment could increase RNA content. 3.  $\text{NH}_4^+$ -N and  $\text{NO}_2^-$ -N content in seawater by ozone treated decreased, while  $\text{NO}_3^-$ -N content increased compared with that in control seawater.

**Key words:** ozone; *Chlorella* sp.; physiological effect

臭氧作为氧化剂、消毒剂、催化剂在许多行业中得到广泛的应用。在海水养殖业中, 臭氧主要用于海水的消毒和水质的改良等方面<sup>[1,2]</sup>。在许多国家的海水育苗及养殖生产中, 臭氧处理海水的设施已成为完整生产工艺中不可缺少的部分<sup>[3]</sup>。在海洋微藻的研究方面, 有用臭氧控制或去除微藻的试验报道<sup>[1]</sup>, 也有对微藻生长、耐受力、能量储存和脂肪酸含量与组成等方面的报道<sup>[4-6]</sup>。但臭氧处理海水对微藻的生理效应及其影响机理的研究, 至今未见报道。本文用臭氧处理的海水培养小球藻, 探讨了臭氧处理海水对小球藻生长的影响和作用机理, 以期有效地扩展臭氧在海洋微藻培养中的应用。

收稿日期: 2000-10-23

基金项目: 山东省科学技术发展计划资助项目(981051308) 和国家重大基础研究规划项目(G1999012012) 资助

第一作者: 王成刚(1957-), 男, 山东青岛人, 副研究员, 主要从事海水养殖生态学的研究, Tel: 0532-5824353, E-mail: kykf@ms.qdio.

## 1 材料和方法

### 1.1 实验藻种

选用一种海洋单细胞藻, 小球藻(*Chlorella* sp.) 为实验材料, 藻种取自青岛海洋大学太平角实验场。

### 1.2 培养方法及条件

海水取自青岛鲁迅公园附近海域。对照组海水经孔径 0.45 $\mu$ m 醋酸纤维滤膜抽滤、煮沸消毒, 冷却后备用; 臭氧处理组海水经沙滤、沉淀后, 用青岛洁源机电设备有限公司生产的臭氧发生器(臭氧 10g $\cdot$ h $^{-1}$ ) 和水气反应罐, 通入臭氧分别为 0.5、1.0、2.0min, 放置 2h, 用改进的比色法<sup>[7]</sup> 测定其总氧化剂含量分别为  $0.284 \times 10^{-6}$  mg $\cdot$ L $^{-1}$ 、 $0.378 \times 10^{-6}$  mg $\cdot$ L $^{-1}$ 、 $0.432 \times 10^{-6}$  mg $\cdot$ L $^{-1}$ , 立即配成营养液, 用于小球藻培养。培养液选用 f/2 营养盐配方<sup>[8]</sup>。用于微藻培养的三角瓶, 预先在 1N 的稀盐酸中浸泡数日, 蒸馏水冲洗干净后备用。

培养条件: 光强为 2500~3500Lux; 光: 暗比为 14h: 10h; pH 为  $8.0 \pm 0.1$ ; 盐度为  $30.0 \pm 0.1$ ; 温度为  $25 \pm 1$   $^{\circ}$ C。每个实验组设 3 个重复。

### 1.3 测试指标

#### 1.3.1 细胞密度

用 Lugol 碘液固定样品, 血球计数板计数<sup>[9]</sup>。

#### 1.3.2 相对增长速率(K) 的求算

$K = \frac{\lg N_t - \lg N_0}{T}$ , 其中  $N_t$  代表培养  $t$  时刻的细胞密度,  $N_0$  代表起始细胞密度,  $T$  为培养时间(d)<sup>[10]</sup>。

#### 1.3.3 叶绿素含量(Chl-a) 的测定

参照 Jensen 的方法<sup>[11]</sup>, 用 90% 的丙酮提取, 75F-G 型分光光度计测定。

#### 1.3.4 核酸(DNA、RNA) 含量的测定

参照文献[12] 的方法进行。

#### 1.3.5 三氮含量的测定

用 0.45 $\mu$ m 醋酸纤维滤膜将小球藻滤出, 滤液中三氮( $\text{NH}_4^+$ -N、 $\text{NO}_2^-$ -N、 $\text{NO}_3^-$ -N) 参照靛酚蓝自动法<sup>[13]</sup> 测定。

## 2 实验结果

### 2.1 臭氧处理海水对小球藻生长的影响

一定剂量的臭氧处理能够促进小球藻的生长(图 1)。在实验中, 用初始总氧化剂浓度为  $0.284 \times 10^{-6}$  mg $\cdot$ L $^{-1}$  和  $0.378 \times 10^{-6}$  mg $\cdot$ L $^{-1}$  的实验组, 小球藻自始至终均表现出优于对照组的生长状况; 而初始总氧化剂浓度  $0.432 \times 10^{-6}$  mg $\cdot$ L $^{-1}$  的实验组, 在开始培养的前 2 天, 小球藻生长状况相对较差, 而 2 天后, 生长状况明显好于对照组和  $0.284 \times 10^{-6}$  mg $\cdot$ L $^{-1}$  及  $0.378 \times 10^{-6}$  mg $\cdot$ L $^{-1}$  的处理组。但是高剂量的臭氧处理对小球藻的生长具有明显的抑制作用, 我们在预备实验中发现, 在总氧化剂浓度达  $0.495 \times 10^{-6}$  mg $\cdot$ L $^{-1}$  以上的臭氧处理海水中, 小球藻生长状况明显差于对照组。t 检验表明, 臭氧处理组与对照组的相对增长率差异显著( $P < 0.05$ )。

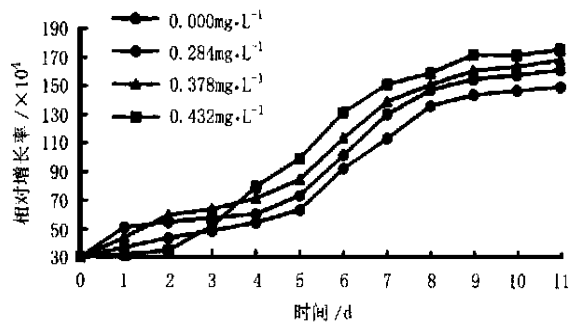


图 1 臭氧处理对小球藻生长影响

Fig. 1 Effects of ozone treatment on growth of *Chlorella* sp.

## 2.2 臭氧处理海水对小球藻叶绿素(Chl a)含量的影响

一定剂量的臭氧处理海水能够明显提高小球藻叶绿素(Chl a)的含量(图2),且在一定时间范围内随着处理时间的延长,提高幅度加大。经t检验,臭氧处理组与对照组的叶绿素含量差异显著( $P < 0.05$ )。

## 2.3 臭氧处理海水对小球藻DNA含量的影响

臭氧处理海水对小球藻DNA含量的影响不明显(图3),处理组的DNA含量和对照组的DNA含量没有差别,且随着培养时间的延长,三者的变化也不明显。t检验得知: $P > 0.05$ ,表明臭氧处理组与对照组DNA含量差异不显著,同时也说明小球藻DNA含量对臭氧的处理表现得比较稳定。

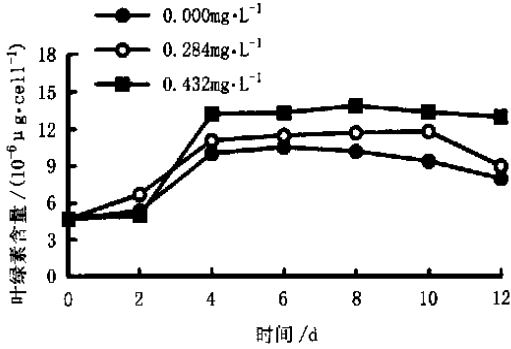


图2 臭氧处理对小球藻Chl-a含量的影响

Fig. 2 Effects of ozone treatment on Chl-a content of *Chlorella* sp.

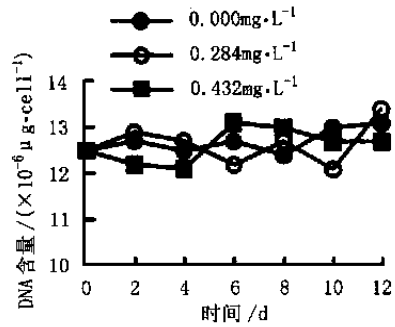


图3 臭氧处理对小球藻DNA含量的影响

Fig. 3 Effects of ozone treatment on DNA content of *Chlorella* sp.

## 2.4 臭氧处理海水对小球藻RNA含量的影响

臭氧处理对小球藻RNA含量的影响类似于相对增长率和叶绿素的变化情况,处理组的RNA含量高于对照组,浓度 $0.432 \times 10^{-6} \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组RNA含量又高于 $0.284 \times 10^{-6} \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组(图4)。t检验表明臭氧处理组和对照组的RNA含量差异显著( $P < 0.05$ ),这说明一定剂量的臭氧处理能明显提高小球藻的RNA含量。

## 2.5 臭氧处理对水中三氮的影响

臭氧处理海水中总氧化剂浓度越高, $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 浓度越高;而处理组 $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_2^-$ 浓度明显低于对照组(表1)。在实验中这种效应一直持续到小球藻培养的开始。

## 3 讨论

### 3.1 臭氧处理海水引起小球藻生理变化的原因

臭氧是一种极不稳定的强氧化剂,在水溶液中的半衰期为 $20 \text{min}^{[1]}$ 。臭氧通入水中,可产生氧化能力极强的单原子氧(O)和羟基自由基(HO)等多种类型的氧化剂,它们能够很快分解水中的有机物质、细菌和微生物,从而起到灭菌消毒作用<sup>[1]</sup>。文献[3]中报道:通入 $0.59 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 臭氧,养殖水中的细菌杀灭率为 $99.12\%^{[3]}$ 。臭氧通入海水,在一定剂量内可以刺激小球藻,使其生理性增加,但过量则对小球藻

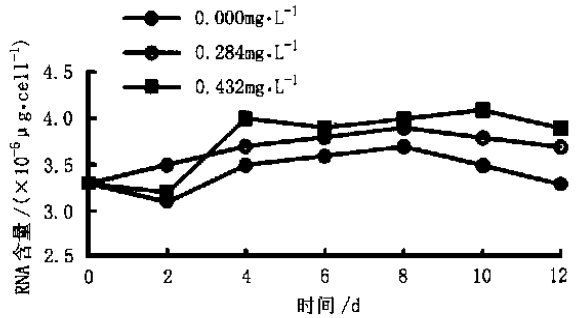


图4 臭氧处理对小球藻RNA含量的影响

Fig. 4 Effects of ozone treatment on RNA content of *Chlorella* sp.

表 1 臭氧处理与高温消毒海水培养液中三氮的含量(单位:  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )Tab. 1  $\text{NH}_4^+-\text{N}$ ,  $\text{NO}_3^--\text{N}$  and  $\text{NO}_2^--\text{N}$  content in ozone-treated and control seawater

培养时间 (d)	处理浓度 ( $10^{-6} \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	$\text{NH}_4^+-\text{N}$	$\text{NO}_2^--\text{N}$	$\text{NO}_3^--\text{N}$	$\text{NO}_3^- - \text{N} / (\text{NO}_2^- - \text{N} + \text{NH}_4^+ - \text{N})$
0	0.432	0.77	1.42	867.1	395.9
0	0.338	0.30	1.62	772.4	402.3
0	0.284	0.44	3.18	687.0	189.8
0	0.000	3.63	7.93	577.1	49.9
6	0.432	0.75	0.74	917.8	616.0
6	0.338	0.33	6.15	725.1	111.9
6	0.284	0.26	12.1	640.7	51.8
6	0.000	3.32	9.41	588.1	46.2
12	0.432	1.61	0.91	889.1	352.8
12	0.338	0.37	5.42	715.1	123.5
12	0.284	3.98	18.1	609.7	27.6
12	0.000	3.74	18.8	535.9	23.8

有毒害甚至杀死作用。另一方面,臭氧通入海水,与海水中多种化学成分发生反应,其反应过程与生成物质较复杂,有些反应生成物也是强氧化剂和消毒剂,如  $\text{O}_3 + \text{Br}^- \rightarrow \text{O}_2 + \text{BrO}^-$  等<sup>[14]</sup>,并可继续与其它物质进行氧化还原反应,总氧化剂逐渐降解。这些反应使被处理海水较对照海水氧化电位提高、氧化力增强、海水中化学组份改变,从而产生与对照海水不同的化学性质,由此引起小球藻生理效应的变化。

### 3.2 臭氧处理海水对小球藻生长的影响

臭氧处理的海水中,不同的氧化剂浓度表现出对小球藻生长的影响不同(图 1)。浓度为  $0.432 \times 10^{-6} \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,起始两天对小球藻生长起胁迫作用,生长速度明显低于对照组,第三天转为促进作用,随后几天基本呈直线增长,第七天开始相对转缓,但仍高于其它各组,从第三天至第十一天,与对照组相比,相对增长率平均高 27%,而浓度为  $0.338 \times 10^{-6} \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $0.284 \times 10^{-6} \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的处理组分别比对照组高 13% 和 12%,两个低浓度处理组自始至终对生长起促进作用。而且对照组显示出比处理组有更早进入衰败期的趋势。

### 3.3 氧处理海水对小球藻生长影响机理的探讨

一般情况下,叶绿素含量高,则微藻光合作用的速率高,生长相对旺盛。试验培养小球藻两天时,  $0.284 \times 10^{-6} \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  处理组叶绿素含量最高 ( $6.6 \times 10^{-6} \mu\text{g} \cdot \text{cell}^{-1}$ ),对照组居中 ( $5.4 \times 10^{-6} \mu\text{g} \cdot \text{cell}^{-1}$ ),  $0.432 \times 10^{-6} \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  处理组最低 ( $5.4 \times 10^{-6} \mu\text{g} \cdot \text{cell}^{-1}$ ),这时各组小球藻的相对增长率与其相对应;四天至十二天,其平均含量分别为  $0.432 \times 10^{-6} \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  处理组  $13.1 \times 10^{-6} \mu\text{g} \cdot \text{cell}^{-1}$ ,  $0.284 \times 10^{-6} \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  处理组  $10.8 \times 10^{-6} \mu\text{g} \cdot \text{cell}^{-1}$ ,对照组  $9.4 \times 10^{-6} \mu\text{g} \cdot \text{cell}^{-1}$ ,仍与各组小球藻的相对增长率相一致。这说明海水中不同的总氧化剂浓度直接或间接引起小球藻的叶绿素含量的变化,影响了小球藻光合作用的速率,这可能是影响小球藻生长的重要原因之一。

RNA 与 DNA 的比值是良好反映生物生长状态的指标之一。细胞 RNA 与 DNA 比值高,藻细胞的生长速度快。试验培养小球藻四至十二天,总氧化剂浓度  $0.432 \times 10^{-6} \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.284 \times 10^{-6} \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的处理组和对照组 RNA 与 DNA 含量比值分别是 0.316、0.302、0.286,两处理组分别比对照组高 3.0% 与 1.6%。三组间 DNA 的含量基本相同, RNA 含量差异显著,处理组中 RNA 与 DNA 比值的提高,无疑是小球藻生长加快的结果。

$\text{NO}_3^-$  有诱导微藻中酶的合成、促进氮的同化等作用,且比  $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NH}_4^+$  易于被微藻吸收和利用。臭氧通入海水,产生氧化反应,将海水中的有机氮氧化成无机氮,铵氮氧化成硝酸氮,另外空气经高频电晕反应产生臭氧过程中也产生部分硝酸氮,使处理海水中硝酸氮明显增多,  $\text{NO}_3^- - \text{N} / (\text{NH}_4^+ - \text{N} + \text{NO}_2^- - \text{N})$  比值增大,小球藻培养期间总氧化剂浓度为  $0.432 \times 10^{-6} \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.338 \times 10^{-6} \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.284 \times 10^{-6}$

$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组的这一比值比对照组分别平均高 10.4、4.3、1.2 倍,从而创造了有利小球藻的生长条件,由此成为处理组小球藻生长优于对照组的一个重要因素。需要指出的是:这种效应持续到培养小球藻 12d 的实验结束,这说明总氧化剂在衰减过程中一直发挥着作用。

另外,可能存在海水活化促进了小球藻的生长。臭氧通入海水,其强氧化能力可能对海水有一定的活化作用,使海水中水的原有链、团结构被破坏,形成较小的链、团,从而提高了海水的生物活性,使小球藻的生理代谢能力增强,各种生理效应相应得到提高,表现出处理组比对照组小球藻生长速度加快的现象。

目前,海水微藻培养的主要用途是做鱼和虾的开口饵料、贝类和饵料动物的饵料。在养殖生产中利用臭氧处理海水培养微藻,有以下几个应注意的问题和建议:(1)目前有的研究报告<sup>[2]</sup>和生产厂家以臭氧处理海水的时间(或注入臭氧量)为应用指标,没有进行使用前总氧化剂浓度的测定,易发生总氧化剂超量和不足的问题。臭氧处理海水用于微藻培养前,应测定其总氧化剂浓度,以此测定指标进行微藻培养,因不同的充气量、臭氧发生器产生臭氧量的稳定性(直接用未经干燥的空气生产臭氧,发生器工作时间长、空气湿度大或气温高,则产生臭氧量降低)和不同的散气石等因素,按机器标注产生的臭氧量,无法准确计算出进入水中的臭氧量有多少,因此,使用中往往易发生通入臭氧量不足或过量等问题,且放置一段时间也无法了解总氧化剂的衰减程度;(2)应用臭氧处理海水培养微藻前,将处理海水静放一段时间,以利充分发挥杀菌、消毒的作用,因各地海水的水质情况不同,应根据其当地情况,确定臭氧处理海水的剂量和静放时间;(3)不同的微藻种类对臭氧处理海水的氧化剂耐受能力和反应不同,需对要培养的各种微藻分别试验,确定其有效剂量指标;(4)鉴于臭氧处理海水大大降低了海水中  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  的浓度,并在微藻培养液中持续保持较长的时间,从而在高浓度藻液作饵料的投喂中降低了  $\text{NH}_3$  对培养动物的毒性危害,且有促进微藻快速生长的作用,建议在生产中选用臭氧处理海水培养微藻。在生态式鱼、虾、贝育苗中,按此方式处理海水,进行微藻在育苗池内的培养,更有利于育苗生产。

#### 参考文献:

- [1] 孙广明,李宝华,杨建军,等.臭氧水处理原理及在水产养殖中的应用[J].内陆水产,1998,(4):5-7.
- [2] 朱福庆,冯守明,孙广明,等.河蟹臭氧水育苗的正交试验[J].海洋科学,1999,26(4):17-18.
- [3] 孙广明,李宝华,杨建军,等.臭氧在水产养殖中的应用研究[J].中国水产,1996,(6):32-33.
- [4] Nasir K, Daws A D, Arnold C R. Effect of ozone treatment on cultures of *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis galbana*, and *Chaetoceros gracilis* [J]. World Aquac Soc, 1999, 30(4): 473-480.
- [5] Robert L H. Decline in energy reserves of *Chlorella sorokiniana* upon exposure to ozone[J]. Plant Physiol, 1984, 76:700-704.
- [6] Paula E F, Robert L H. Ozone-induced fatty acid and viability changes in *Chlorella* [J]. Plant Physiol, 1975, 55:15-19.
- [7] 崔九思,王钦源,王汉平.大气污染监测方法[M].北京:化学工业出版社,1997.896-899.
- [8] 梁英,孙世春,魏建功.海水生物饵料培养技术[M].青岛:青岛海洋大学出版社,1998.47.
- [9] 湛江水产专科学校.海洋饵料生物培养[M].北京:农业出版社,1995.194-196.
- [10] 唐学玺,李永祺.4种海洋微藻对久效磷的抗性与其抗氧化能力的相关性[J].海洋与湖沼,2000,31(40):414-418.
- [11] Jensen A. Handbook of Physiological Methods[M]. New York: Cambridge University Press,1978.59-70.
- [12] 南京大学生物系.生物化学实验[M].北京:人民教育出版社,1979.75-83.
- [13] GB 12763.2—91 海洋调查规范[S].
- [14] Werner R H, Holgxe J. Ozonation of bromide-containing waters, Kinetics of formation of hypobromous acid and bromate[J]. Environ Sci Technol, 1983, 17(5): 261-267.