

投稿類別:生物類

篇名:

以褐藻膠 (alginat) 將經濟性微細藻類進行包埋及固定保種實驗

作者:

陳郁涵。國立基隆海事職業學校。養殖科二年甲班
孫筠顥。國立基隆海事職業學校。養殖科二年甲班
劉蓁庭。國立基隆海事職業學校。養殖科二年甲班

指導老師:

趙文榮老師

以褐藻膠 (alginate) 將經濟性微細藻類進行包埋及固定保種實驗

壹●前言：

藻種保存的意義是將已純化的藻種長期保存於無菌的狀態下，以便以後隨時要進行水產仔稚苗繁殖時可隨取隨用，不致於有斷種之虞，以節省採集、分離純化的時間。藻種保存的方法：通常是把藻種接種在固態及液體培養基上，在低溫、弱光條件下培養，接種一次可保存半年至一年(隨藻種而異)，再移植到新的培養基繼續保存。(註一)

我們在一年級上過餌料生物實習，利用洋菜培養基來保存藻類，但因易污染和需常替換培養基，導致保種失敗，我們試著去想如何長期或永久去保存藻類，直到我們在上水產生物概要時，看到褐藻膠球的製作方法，得知藻珠十分容易製備且比冷凍保存法來得便宜及方便使用，藻珠可以保存在一般冰箱中，和固定化的藻類可以很快地恢復自由至一般液體培養中(註四)。

藻類固定化已被實際應用於，去除廢水中的營養鹽及重金屬(註三、註五、註六)。固定化的藻類細胞可避免被水流沖走或被草食性生物吃掉(註二)。因此，我們在學校試著用此種技術，將學校現有的經濟性微細藻類固定化，以用於學校的教學，和未來藻類的生理探討。

貳●正文：

一、實驗目的：

1. 學習褐藻膠球的製作方法
2. 學習如何配製及添加 walne 配方
3. 學習如何在淡海水中調配褐藻膠粉之濃度
4. 學習應用經濟性微細藻類製作成褐藻膠球之保種培養
5. 恢復液態少量之甦醒實驗，並檢查藻類是否存活，藻類如果存活再以量化製成固定化藻球加以保存
6. 鑑定保種純度之成功率
7. 將此技術發展在水產魚蝦苗之育種培育上

二、實驗材料：

表一：實驗器材名稱

設備名稱	品名	型號
電磁加熱攪拌器	Cimarec	SP-46925
無塵無菌操作台	HSIANGTAI	4T
光學顯微鏡	Olympus	CH20
解剖顯微鏡	Euromex	雙眼 0.7~45 倍
電子天平	Mettler	AJ100
微量吸管	SOCOREX	ACURA 825(100~1000ul)
烘乾箱	SAMPO	KB-RD85U

以褐藻膠 (alginate) 將經濟性微細藻類進行包埋及固定保種實驗

表二：實驗材料

名稱	數量	品牌	型號
(500/100c.c.)量筒	1/1	FORTUNA	500/100ml
大/小三角錐瓶	8(因骨狀矽藻不需)/9	PYREX	No.4980
錫箔紙	17 片(3*3cm)	MY FOIL	25 SQ.FT.
載玻片	9	KIMBLE	76*26mm
蓋玻片	9	MARIENFELD	100Pcs./Stck
石臘膜	12	PARAFILM™M™	CT.06830
小量杯	18	KIMAX	No.14000
攪拌石	2	鐵氟龍	4cm
培養皿	9	Orange	6cm
針筒	2	TERUMO	60ml
滴管	9	KIMBLE	KIMAX-51
藥杓	2		
無菌淡水	50c.c.*5/100c.c.*6/800c.c.*5		
無菌海水	50c.c.*5/100c.c.*5/800c.c.*3		

表三：Walne 培養液配方

貯備液 I	NaNO ₃	100.00	g
	NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	20.00	g
	Na ₂ EDTA	45.00	g
	H ₃ BO ₃	33.60	g
	MnCl ₂ - 4H ₂ O	0.36	g
	FeCl ₃ - 6H ₂ O	1.30	g
	貯備液 II	1	ml
	蒸餾水	1000	ml
貯備液 II	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	4.4	g
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	2.0	g
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0.9	g
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	2.0	g
	蒸餾水	100	ml
貯備液 III	維生素B ₁₂	10	mg
	維生素B ₁	200	mg
	蒸餾水	100	ml
貯備液 IV	NaSiO ₃	6.589	g
	蒸餾水	1000	ml

* 培養液 1 公升添加貯備液 I 1c.c.，貯備液 III 0.1c.c.，貯備液 IV 1 c.c.

以褐藻膠 (alginate) 將經濟性微細藻類進行包埋及固定保種實驗

三、實驗步驟：

淡水與海水經濟性微細藻類固定化藻珠之製作方法及步驟：

1. 先量取無菌淡水 250c.c. 以及無菌海水 200c.c.，無菌淡水加入 WalneI 0.25c.c. 以及 WalneIII 0.025c.c.，將其分成五杯，無菌海水則是加入 WalneI 0.20c.c. 以及 WalneIII 0.020c.c. (其中骨狀矽藻另外加入 walneIV 0.2c.c)，再將其分成四杯。
2. 秤取 5 碟 1.25g 及 4 碟 2.5g 之褐藻膠粉，並分別加入 5 杯無菌淡水以及 4 杯無菌海水裡加熱攪拌至融溶狀態，融溶後將其放入冰箱冷卻。
3. 使用 300 目浮游生物過濾網分別將淡水經濟性微細藻種：單細胞綠藻 (Chlorella)、葡萄球藻 (Botryococcus)、柵藻 (Scenedesmus)、紅球藻 (Haematococcus)、淡水舟狀矽藻 (Navicula) 以及海水經濟性微細藻種：角毛矽藻 (Chaetoceros)、等鞭金藻 (Isochrysis)、擬球藻 (Nannochloropsis)、骨狀矽藻 (Skeletonema)，加以濾出。
4. 將不同藻種分別加入其融溶褐藻膠中，並搖晃至均勻。
5. 秤取 9 碟 1.47g 之氯化鈣粉末，將其溶入 9 杯 100c.c. 無菌淡水中。
6. 用容量 60c.c. 之針筒將融入淡水以及海水經濟性微細藻種之褐藻膠分別吸取，並分別滴入氯化鈣溶液中，滴入後會瞬間凝成粒狀，分別放置 15 分鐘。
7. 放置 15 分鐘後，分別用蒸餾水沖洗 2~3 次將氯化鈣除去。
8. 製作完成後，將固定化藻珠（褐藻膠球）分別放入 1 公升之三角錐瓶中，加入營養鹽(無菌水 800c.c.+ walneI 0.8c.c. 及 walneIII 0.08 c.c.) 照光培養，並接上新的打氣石以及打氣管，使其得以平均照光促進成長。唯海水經濟性微細藻種之藻珠不需打氣，因為其藻珠容易破裂，會影響固定化的效果。
9. 淡水經濟性微細藻類之褐藻膠球液化步驟：
 - (一) 量取 100c.c. 之無菌淡水，並秤取 5 克之 EDTA 粉末。
 - (二) 再將其加入 100c.c. 之無菌淡水中，並由純白色均勻攪拌至透明無色。
 - (三) 攪拌均勻後，將 100c.c. 之 EDTA 溶液分裝成 5 杯，每杯各 20c.c.。
 - (四) 5 杯 20c.c. 之 EDTA 溶液，分別置入 5 種淡水經濟性微細藻類之褐藻膠球約 10 粒。
 - (五) 最後將其分別充分攪拌至溶解即可。
 - (六) 以顯微鏡檢微細藻類細胞之純度，再做甦醒培養。
10. 海水經濟性微細藻類之褐藻膠球液化步驟：
 - (一) 量取 100c.c. 之無菌海水，並秤 5 克的檸檬酸鈉粉末。
 - (二) 再將其加入 100c.c. 之無菌海水中，並由純白色均勻攪拌至透明無色。
 - (三) 攪拌均勻後，將 100c.c. 之檸檬酸鈉溶液分裝成 4 杯，每杯各 25c.c.。
 - (四) 4 杯 25c.c. 之檸檬酸鈉溶液，分別置入 4 種海水經濟性微細藻類之褐藻膠球約 10 粒。
 - (五) 最後將其分別充分攪拌至溶解即可。
 - (六) 以顯微鏡檢微細藻類細胞之純度，再做甦醒培養。

以褐藻膠 (alginate) 將經濟性微細藻類進行包埋及固定保種實驗
淡水與海水經濟性微藻類固定化藻珠之製作方法及步驟：



(圖一)量取 50c.c. 之無菌淡水五杯及海水四杯



(圖二)每杯加入 0.05c.c. 之 walneI 配方



(圖三)每杯加入 0.005c.c. 之 walneIII 配方



(圖四)秤取 5 碟 1.25 g 及 4 碟 2.5 g 之褐藻膠粉



(圖五)分別將褐藻膠粉加入燒杯中並攪拌至融溶狀態



(圖六)將全部淡海水經濟性微細藻類依此方法用 300 目過濾



(圖七)將不同藻種分別加入其融溶褐藻膠中，並搖晃至均勻



(圖八)秤取 9 碟 1.47g 之氯化鈣粉末，分別將其溶入 100 c.c. 之無菌淡水中



(圖九)將淡海水經濟性微細藻類之褐藻膠分別吸取，並滴入氯化鈣溶液中，使其凝固成藻珠

以褐藻膠 (alginate) 將經濟性微細藻類進行包埋及固定保種實驗



(圖十)待 15 分鐘後，用蒸餾水反覆沖洗，將氯化鈣除去



(圖十一)將 800c.c. 之無菌淡水加入 1 公升之三角錐瓶裡



(圖十二)分別將固定化藻珠接入 1 公升之三角錐瓶裡

淡水與海水經濟性微細藻類之褐藻膠球液化步驟圖：



(圖十三)量取 100c.c. 之無菌淡水



(圖十四)秤取 5 克之 EDTA 粉末



(圖十五)將 5g 之 EDTA 粉末加入 100c.c. 之無菌淡水中



(圖十六)將藻球置入 EDTA 溶液中

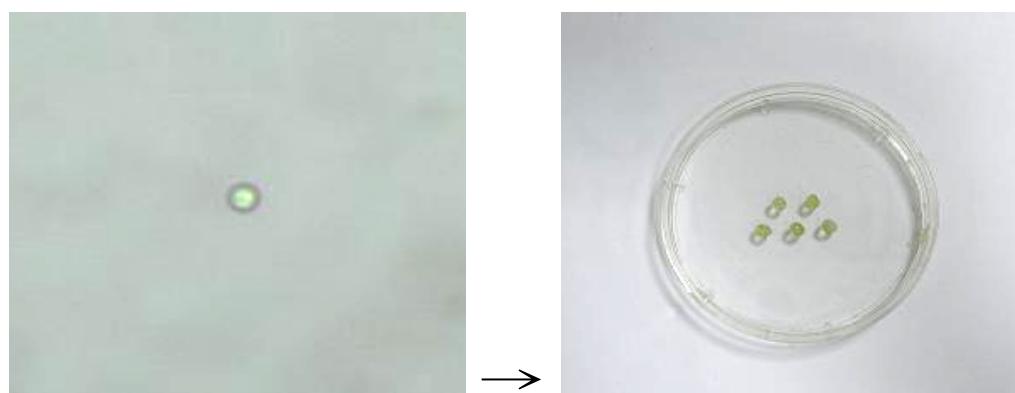


(圖十七)藻球置入後，將其攪拌至溶解

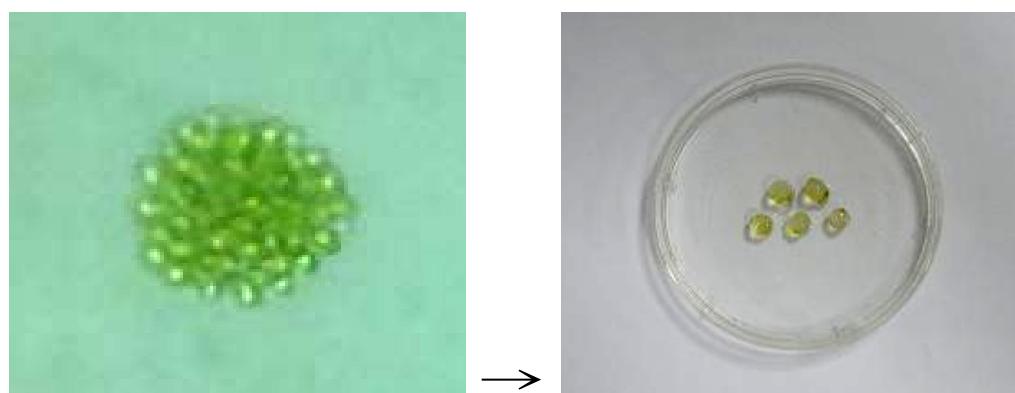
以褐藻膠 (alginate) 將經濟性微細藻類進行包埋及固定保種實驗

實驗結果：

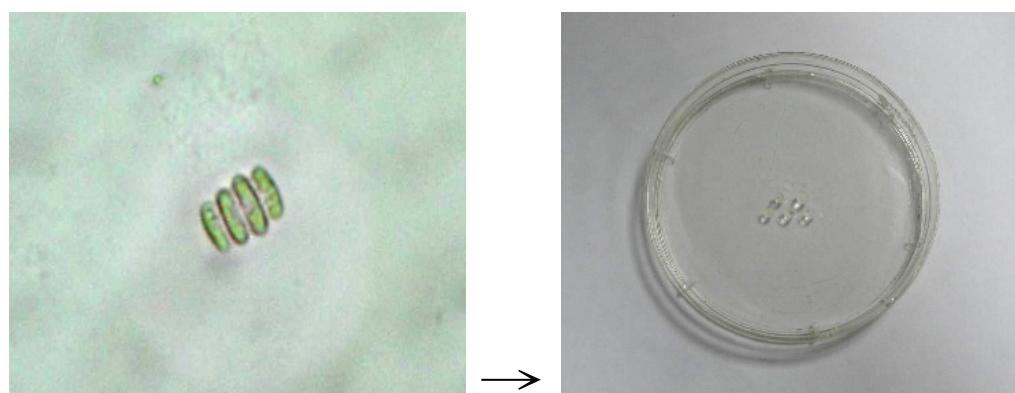
淡水經濟性微細藻球成長結果圖：



(圖十八)圖為由淡水經濟性微細藻類：單細胞綠藻 (Chlorella) 所製成之固定化藻珠

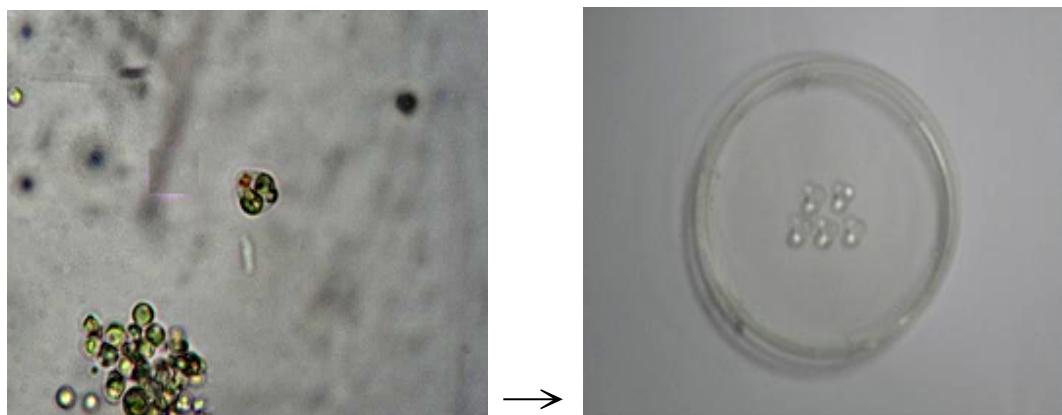


(圖十九)圖為由淡水經濟性微細藻類：葡萄球藻 (Botryococcus) 所製成之固定化藻珠

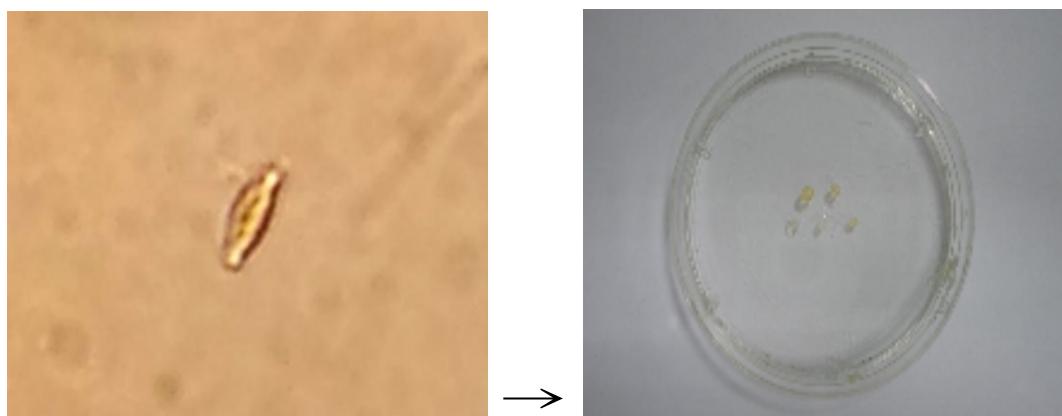


(圖二十)圖為由淡水經濟性微細藻類：柵藻 (Scenedesmus) 所製成之固定化藻珠

以褐藻膠 (alginate) 將經濟性微細藻類進行包埋及固定保種實驗

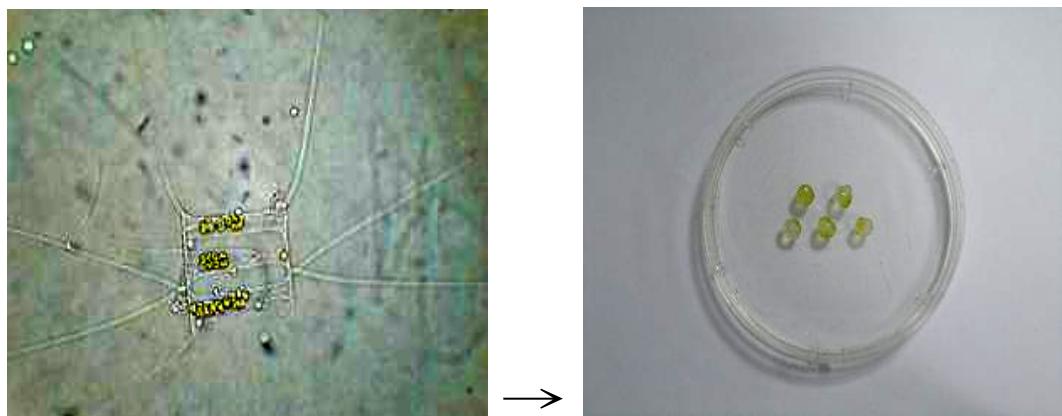


(圖二一)圖為由淡水經濟性微細藻類：紅球藻 (Haematococcus) 所製成之固定化藻珠



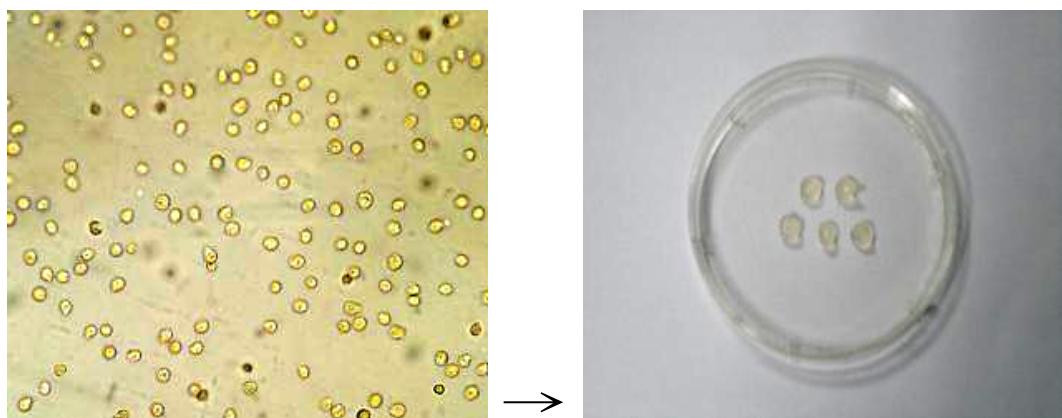
(圖二二)圖為由淡水經濟性微細藻類：淡水舟狀矽藻 (Navicula) 所製成之固定化藻珠

海水經濟性微細藻球成長結果圖：

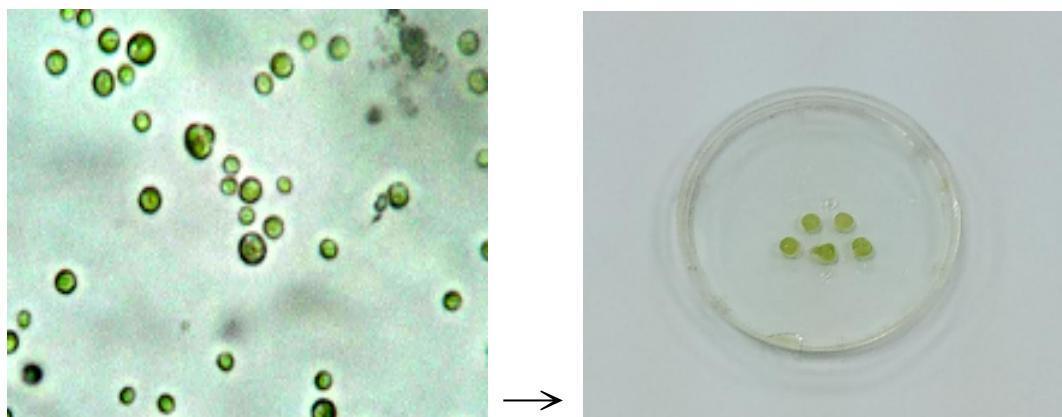


(圖二三)圖為由海水經濟性微細藻類：角毛矽藻 (Chaetoceros) 所製成之固定化藻珠

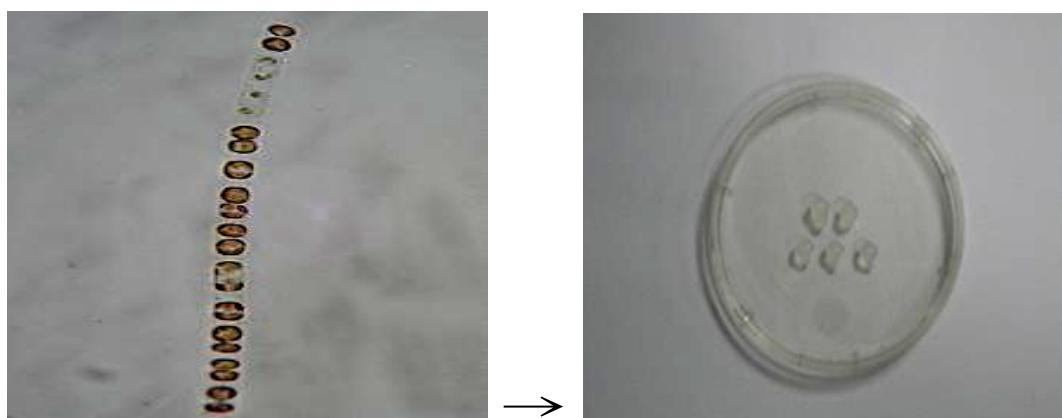
以褐藻膠 (alginate) 將經濟性微細藻類進行包埋及固定保種實驗



(圖二四)圖為由海水經濟性微細藻類：等鞭金藻 (Isochrysis) 所製成之固定化藻珠



(圖二五)圖為由海水經濟性微細藻類：擬球藻 (Nannochloropsis) 所製成之固定化藻珠



(圖二六)圖為由海水經濟性微細藻類：骨狀矽藻 (Skeletonema) 所製成之固定化藻珠

參●結論：

一、討論：

1. 本研究已能成功完成 5 種淡水經濟性微細藻種，包括單細胞綠藻 (Chlorella)、葡萄球藻 (Botryococcus)、柵藻 (Scenedesmus)、紅球藻 (Haematococcus)、淡水舟狀矽藻 (Navicula) 與 4 種海水經濟性微細藻種，包括角毛矽藻 (Chaetoceros)、等鞭金藻 (Isochrysis)、擬球藻 (Nannochloropsis) 及骨狀矽藻 (Skeletonema)。
2. 將褐藻膠溶液攪拌均勻後，需加熱兼攪拌，可使球體要凝結時更好凝結。
3. 接種過程應在無菌培養箱中進行，以免操作過程中有汙染的現象。
4. 製作海水褐藻膠球時，需將鹽度調低，讓球體順利凝結；在保種時，不需打氣，以免球體因打氣而損壞。
5. 在將藻球融解液化，使用 EDTA 時容易造成沉澱無法融解藻球，因此不宜使用在海水來液化，應使用淡水或是其他藥品如檸檬酸鈉來融解藻球。
6. 海水可能含有複雜的鹽類，導致褐藻膠即使由 2.5% 提高至 5% 仍無法完全凝固，在 5% 時靜置培養即可凝結，但在打氣培養，易使藻球破裂。
7. 褐藻膠球保種之經濟性微細藻種經過使用 EDTA 溶解後很快就可以恢復液態培養，其繁殖率及細胞活性並未受到影響。
8. 使用褐藻膠球保種既經濟又方便，是未來經濟性微細藻類保種的一大趨勢，值得推廣。

二、未來展望：

1. 以此技術繼續培育及保種各類經濟價值較高之藻類。
2. 將藻球包覆各類有增色效果的藻種投餵給水晶蝦或其他魚種及蝦種，以增加魚種或蝦種的色澤。
3. 開發以低溫烘乾縮小高經濟價值的藻球並製成人工藻球飼料，使用時再加水膨化即可投餵魚蝦。
4. 褐藻膠球保種之經濟性微細藻種可以衍生至養殖水質改善、蝦類飼料藻類投餵及觀賞藻類培養的應用上。
5. 應用本方法於保種困難高之藻類如 Skeletonema costatum 其結果值得期待。

以褐藻膠 (alginic acid) 將經濟性微細藻類進行包埋及固定保種實驗

肆●引註資料：

1. 趙文榮、曾金成、陶申秋 (2002)。餌料生物學。台北市：格致圖書有限公司。
2. 陳衍昌 (2001)。利用固定化技術作為微細藻種原之保存及利用。
<http://ind.ntou.edu.tw/~b0232/immobil1.htm>
3. Chevalier, P., de la Noüe, J., 1985. Wastewater nutrient removal with microalgae immobilized in carrageenan. Enzyme Microb. Techol. 7:621-624.
4. Garbisu, C., Gil, J.M., Bazin, M. J., Hall, D. O., Serra, J. L., 1991. Removal of nitrate from water by foam-immobilized *Phormidium laminosum* in batch and continuous-flow bioreactors. J. Appl. Phycol. 3:221-234.
5. Romo, S., Pérez-Martínez, C., 1997. The use of immobilization in alginate beads for long-term storage of *Pseudanabaena galeata* (Cyanobacteria) in the laboratory. J. Phycol. 33:1073-1076
6. Wilkinson, C. S., Goulding, K. H., Robinson, P.K., 1990. Mercury removal by immobilized algae in batch culture systems. J. Appl. Phycol. 2:223-230.