

Treatment of *Alexandrium Tamarense* by Ultrasound Technology

Yu Liu, Haixia Wang, Ling Liu, Ying Li, Shan Wang

Environmental Information Institute, Dalian Maritime University, Dalian, 116026 China

Email: ylsibo@gmail.com

Abstract: Ballast water is one of the most important mechanisms for the introduction of non-indigenous organisms. The *Alexandrium tamarense* of representative phytoplankton in ship's ballast water, this paper studied its removal by adjusting different parameters, such as the power, irradiation time and duty cycle, so as to obtain the best optimization of ultrasound parameters. The treatment effect was verified by the observation, FDA staining, determination of chlorophyll a and re-training treatment. The results showed that *Alexandrium tamarense* were removed significantly by ultrasonic irradiation with optimal parameters at the input power of 500W and the exposure time of 3.5 min, the death rate of *Alexandrium tamarense* was 95%. The decay rate of chlorophyll is up to 98.6%. Therefore, the ultrasonic technology is an effective way to kill the *Alexandrium tamarense*.

Keywords: Ultrasound; ballast water; *Alexandrium tamarense*

超声波技术处理塔玛亚历山大藻的研究

刘 瑀, 王海霞, 刘 苓, 李 颖, 王 珊

大连海事大学环境信息研究所, 大连, 中国, 116026

Email: ylsibo@gmail.com

摘 要: 船舶压载水是传播地理性隔离有害生物的主要途径。本文针对船舶压载水中代表性浮游植物塔玛亚历山大藻, 研究超声波对其的去除, 通过调节功率、辐射时间和占空比等不同的参数, 得到优化的超声参数组合。并用观察法、FDA 荧光染色、测定叶绿素 a 和再培养的方法验证处理效果。结果表明: 当超声参数组合功率 500W, 辐射时间 3.5 min 时, 具有较好的除藻效果, 死亡率达到 95% 以上, 叶绿素 a 的衰减率高达 98.6%。因此, 超声波技术是去除塔玛亚历山大藻的一种有效途径。

关键词: 超声波; 压载水; 塔玛亚历山大藻

1 引言

船舶压载水是现代远洋船舶航海安全和高效营运的保证。全球贸易中约 90% 的货物经由船舶运输, 每年约有 120 亿吨压载水通过约 9 万艘远洋船舶在世界范围内转移^[1], 每天存在于船舶压载水中随船周游世界的生物多达 7000 至 10000 种^[2], 平均每立方米压载水中有浮游动植物 1.1 亿个^[3]。截止到 2005 年, 全球已确认的由船舶压载水传播的生物约 500 种^[4]。几乎每隔 9 个星期就会在世界各地发现一种新的入侵生物。2004 年国际海事组织 (IMO) 通过了《国际船舶压载水及其沉积物控

制和管理公约》, 提出船舶压载水处理的安全、有效、环保、可操作性及可行五点要求。到目前为止, 已有 8 种压载水处理技术被国际海事组织 (IMO) 最终审批通过。原定于 2009 年开始生效的压载水公约, 由于当时对压载水处理技术发展速度的高估, 到 2010 年 4 月底为止, 也只有 24 个缔约国批准加入, 占世界商船总吨位的 23.29%, 距公约生效条件还有一段路程。这就给新的压载水处理技术的研发带来了机会。

超声波技术有着操作条件温和、降解速率快、适用范围广、可以与其他水处理技术联合使用等优点, 被称为环境友好技术。超声波在水体中由空化效应产生的高压、冲击波、声流和剪切力能够有效地破坏藻类的细胞结构, 使蓝藻细胞内伪空泡破裂^[5], 抑制叶绿素的合成。

资助信息: 国家科技支撑计划重大项目“远洋船舶压载水净化和水上溢油应急处理关键技术研究”第 4 课题“远洋船舶压载水快速检测技术 (2006BAC11B04)”

尽管超声波可以杀死细菌和浮游动物是既知的事实，然而它对压载水的处理的应用至今仍不清楚。Mesbahi^[6]用超声波处理浮游动物和浮游植物的混合液，而结果浮游动物减少量不足 40%，叶绿素 a 减少量为 71%。Eric R.Holm^[7]研究发现浮游动物仅需 3-9 秒的处理时间和 6-19J/mL 的超声波能量就能达到降低 90%存活量的效果。相反，对细菌和浮游植物要达到 90%的减少量则需要 1-22 分钟的处理时间和 31-1240J/mL 的能量密度。

塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense* Balech) 是一种广布性的有毒赤潮甲藻，在大西洋、太平洋、北极、温带及热带都有出现，而以北半球的温带水域出现的频率最高。大多数麻痹性中毒事件与之密切相关^[8-9]，通过对船舶压载舱沉积物的调查发现，塔玛亚历山大藻孢囊为船舶压载水沉积物中的优势孢囊^[10]。因此本文选择塔玛亚历山大藻作为船舶压载舱中的代表浮游植物。利用超声波处理塔玛亚历山大藻，确定杀死塔玛亚历山大藻必要的接触时间和超声波功率，用观察法、FDA 荧光染色、测定叶绿素 a 和再培养的方法验证处理效果，为我国压载水管理方面的船旗国、港口国履约工作提供参考，为我国压载水的处理方法研究提供基础资料，为我国压载水的管理和法案的制定提供技术支撑，具有重要的现实意义。

2 材料和方法

2.1 实验材料

实验藻种塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense* Balech) 由国家海洋环境监测中心提供，图 1，实验用海水由辽宁省水产研究所提供。

取砂滤过的海水，经 0.45μm 醋酸纤维滤膜过滤后，高压消毒灭菌 (0.14 MPa, 30 min)。采用 Conway^[11] 配方用消毒的过滤海水 (pH=8.00) 配制培养液。在恒温光照培养箱中培养，光强为 3000 lx±100 lx，光暗周期为 12 hD: 12 hL，温度为 20℃，每天振摇 3-4 次，并定期扩养 (7d)。

2.2 实验方法

2.2.1 超声波辐照处理

每次取 50 mL 塔玛亚历山大藻液，分别用功率 300 W、400 W 和 500 W，时间为 1 min、1.5min、2 min、2.5 min、3 min、3.5 min、4 min、4.5 min、5 min 辐照，确定功率和时间对处理效果的影响，然后在相同功率的条件下，研究占空比对处理效果的影响。

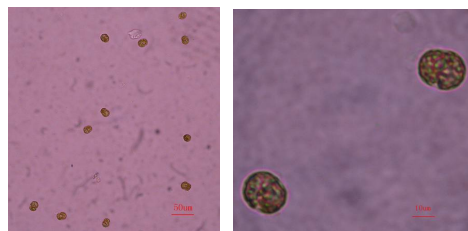


Figure 1. *Alexandrium tamarense* Balech
图 1 塔玛亚历山大藻形态

2.2.2 藻细胞生物活性检测及计数方法

(1) 形态观察法

在显微镜 (Olympus CX21) 下观察藻细胞的物理形态。超声波处理后的细胞发生破碎现象，不能维持原有细胞形状即被认定为死细胞。

(2) FDA 荧光法

取处于对数生长期的藻液，超声波处理后，加入 FDA 溶液，振荡混合均匀，在室温黑暗处放置。在荧光显微镜观测浮游植物计数板上的藻液，活细胞被 FDA 染成亮绿色，死细胞呈暗红色，统计活细胞数。

(3) 叶绿素 a 测定法

根据各种光合色素在有机溶剂中的溶解特性，可将它们从细胞中提取出来，并可根据它们在有机溶剂中的最大吸收波长不同，可以进行分光光度法测定。以丙酮溶液提取浮游植物色素，依次在 664, 647, 630nm 下测定吸光值，按 Jeffrey-Humphrey 的方程式计算，可以得出叶绿素 a 的含量。通过对处理后藻液的叶绿素 a 与原样叶绿素 a 含量的对比，可得出其衰减趋势和衰减率。

(4) 再培养法

为了检验最终的处理效果，加 Conway 培养液于超声波处理后的藻液，并放入恒温培养箱中进行再培养 (温度 20℃，光照强度 3000 lx±100 lx，pH 值为 8.00)，同时选取未经处理的藻液作空白对照实验，经 15d 相同条件的培养后，用显微镜观察其数量。

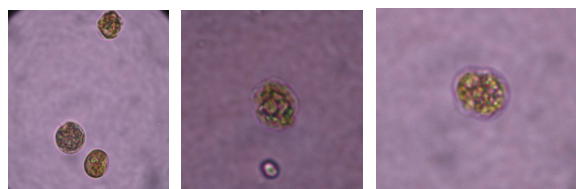
3 结果与讨论

3.1 藻细胞活性分析

3.1.1 形态观察法

在显微镜下观察藻细胞的形态结构在微波-超声波处理前后的变化，如图 2 所示。处理前，观察到藻细胞边缘圆滑完整，细胞形状规则，细胞膜及内部细胞结构清晰可辨；处理后，藻细胞外观形态发生变化，

细胞壁有明显破损,某些细胞器缺失,藻的碎片明显增多,对藻类细胞产生致命的破坏。随着功率的增大和处理时间的加长,完整藻细胞的数量显著下降,藻细胞的碎片呈递增趋势,由此表明超声波对塔玛亚历山大藻有明显的破坏作用。



Ultrasonic pre-irradiation
超声波辐照前

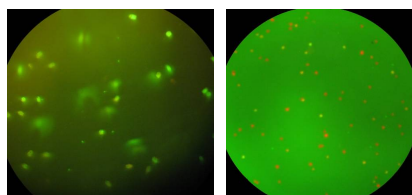
Ultrasonic irradiation
超声波辐照后

Figure 2. *Alexandrium tamaresee* Balech Cell morphology before and after ultrasonic irradiation

图2 超声波辐照前后塔玛亚历山大藻细胞形态

3.1.2 FDA 荧光染色

当活性细胞具有完整细胞膜时, FDA 水解的荧光素不断在细胞内积累,使细胞在蓝色光下发出绿色荧光。当细胞膜受损,荧光素无法在细胞内累积,而使细胞无法发出荧光,呈现出暗红色。活性高的细胞发出强烈的绿色荧光,活性低的细胞发光较弱。根据所发出的荧光,不仅可以计算细胞数量,而且可以非常清楚地辨别细胞形状鉴定细胞活性,如图3。随着功率的增大和辐照时间的延长,显微镜视野下发出绿色荧光的藻细胞越来越少。



Ultrasonic pre-irradiation
超声波辐照前

Ultrasonic irradiation
超声波辐照后

Figure 3. *Alexandrium tamaresee* Balech fluorescence images before and after ultrasonic irradiation

图3.超声波辐照前后塔玛亚历山大藻荧光图片

3.1.3 叶绿素 a 测定

Lorenzen 1968 年指出,来源相同(有相同历史)的浮游生物量可以直接由海水中的碳与叶绿素的比值来确定。在实验室培养的浮游植物样品中,海水中的碳可以作为一个定值,因此经处理后的藻液的叶绿素 a 与原样叶绿素 a 的对比,可得出其衰减趋势和衰减率,确定死亡率。

超声处理完后的塔玛亚历山大藻液,颜色呈棕黄色,在同一功率下,随着辐照时间的延长颜色逐渐加深,如图4所示。其叶绿素的衰减率逐渐增大,如表1所示,500W,全程时间3.5 min后,衰减率高达98.6%。功率为400W 全程时间4.5 min后,衰减率达到90%以上。



2.5min 3 min 3.5 min 4min 4.5 min 5 min

Figure 4. Color of *Alexandrium tamaresee* solution after ultrasonic treatment

图4 超声波处理后塔玛亚历山大藻溶液颜色

Table 1. The decay rate of chlorophyll a
表1. 叶绿素 a 的衰减率

时间 功率	1 min	1.5 min	2 min	2.5 min	3 min	3.5 min	4 min	4.5 min	5 min
300 W	10.1	27.2	56.2	70.3	77.1	80.4	84.3	85.6	91.0
400 W	15.1	28.5	52.6	73.6	86.7	88.6	90.1	94.4	97.1
400 W	48.8	57.4	70.9	87.3	93.6	98.6	98.6	98.6	98.6

3.1.4 再培养

经过超声处理后的藻液,其存活的细胞仍具有生物活性,可继续进行增殖,当给予充足的适宜生长环境时,可观察到藻细胞的再生和繁殖现象,从而可以确定先前的伤害程度。

将经超声波处理后的塔玛亚历山大藻溶液,给予相同的光照与营养盐(同前藻类的培养),经过15d后,观察有无再生情况,以此选择出死亡最彻底的藻组,进而得出超声波最佳处理条件。

经再培养15d后,超声功率为500W,占空比为50%,全程作用时间为3.5min处理后的扁藻回升率几乎为0,如图5所示。



2.5min 3 min 3.5 min 4min 4.5 min 5 min

Figure 5. Re-culture 15day after ultrasonic treatment

图5 超声波处理后再培养

3.2 功率对死亡率的影响

超声波的功率又称为声能强度，也是超声辐射中的一项重要参数。相同的占空比下，塔玛亚历山大藻的死亡率随着功率的增大而升高，如图6所示。功率为500W时，全程时间为3.5min时，死亡率达到95%以上，随着时间的延长，死亡率没有很大的变化，功率为400W时，随着时间的延长死亡率升高，5min时，死亡率达到95%以上，而5min时，功率为300W死亡率较低，在85%以下。

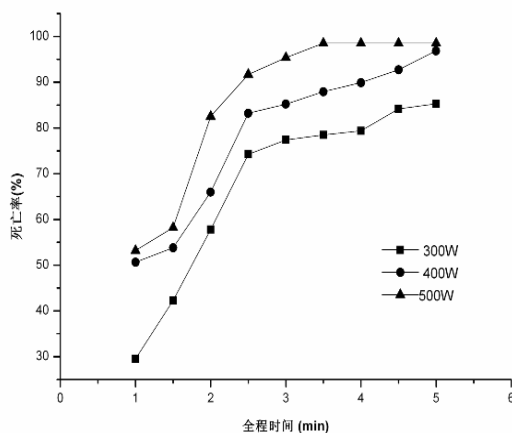


Figure 6. Mortality rate of *Alexandrium tamarense* Balech
图6 塔玛亚历山大藻死亡率

3.3 占空比对死亡率的影响

占空比是超声波仪器频率的一个重要参数，它指的是超声波工作时间与超声波间隙时间的比值，一般来说，超声波的占空比应小于等于1。依据本实验所选择的JY92—II DN型超声波细胞粉碎机的性能，结合产品的说明书，本实验仪器的最佳工作状态为短频率结合长时间工作，即在工作1s间隙2s和工作2s间隙3s条件下选择全程作用时间。实验占空比选择为1/2和2/3，对比塔玛亚历山大藻的死亡率。研究发现：在短时间内，占空比对塔玛亚历山大藻的死亡率有一定的影响，但是，随着处理时间的延长，占空比对塔玛亚历山大藻的处理效果影响不大。

4 结论

超声波处理后的塔玛亚历山大藻形态发生了显著变化。物理形态上，破碎前的藻细胞边缘圆滑，细胞形状规则，细胞膜及内部细胞器清晰可辨。破碎后的藻细胞外观形态发生明显改变：细胞收缩，形状不规

则，细胞膜模糊溶解，某些细胞器丢失，细胞有明显的破裂、缺失、击碎以及细胞内容物外泄的现象，对藻的生物活性有着极大的伤害性。FDA荧光法检测藻细胞活性时发现，破碎前的藻细胞生物活性良好，经染色剂染色后在蓝色光下观察呈现出亮绿色，破碎后细胞膜受损，荧光素无法在细胞内累积，而使细胞无法发出荧光，呈现出暗红色。

实验结果表明：功率为500W，辐照3.5min，塔玛亚历山大藻的死亡率达到95%以上，叶绿素a的衰减率达到98.6%，可以达到压载水的排放要求。虽然占空比是超声波仪器频率的一个重要参数，但对塔玛亚历山大藻的处理效果没有很大的影响，时间和功率是影响处理效果的关键因素。

致谢

感谢国家科技支撑计划重大项目“远洋船舶压载水净化和水上溢油应急处理关键技术研究”第4课题“远洋船舶压载水快速检测技术(2006BAC11B04)”的资助。

References (参考文献)

- [1] Gregory M R. Global spread of microorganisms by ships. *Nature*. 2000, 408: 49-50.
- [2] N. Patrick Lewis, L. Chad Hewitt, Martin Riddle, Andrew McMinn. Marine introductions in the Southern Ocean: an unrecognized hazard to biodiversity. *Marine Pollution Bulletin*. 2003, 46: 213-223.
- [3] Stephan G, Matej D, Matthias V et al. Critical review of the IMO international convention on the management of ships' ballast water and sediments. *Harmful Algae*. 2007, 6:585-600.
- [4] Carlton J T. Biological invasions and biodiversity in the Sea: The ecological and human impacts of non-indigenous marine and estuarine organisms. *Proceedings of the Conference and workshop*. USA, 1994: 5-11.
- [5] Hao H W, Wu M S, Chen W F, et al. Cyanobacterial bloom control by ultrasonic irradiation at 20 kHz and 1.7 MHz. *Journal of Environmental Science and Health (Part A-Toxic /Hazardous Substances & Environmental Engineering)*. 2004a,39(6):1435—1446.
- [6] Mesbahi, E. Latest results from testing seven different technologies under the EU MARTOB project—where do we stand now? In: Matheickal, J.T., Raaymakers, S.(Eds.). *Proceedings of 2nd International Ballast Water Treatment R&D Symposium*, IMO London, 21-23 July 2003. *GloBallast Monograph Series No. 15*. International Maritime Organization London. 2004,210-230.
- [7] Eric R. Holm, David M. Stamper, Robert A. Brizzolara et al. Sonication of bacteria, phytoplankton and zooplankton: Application to treatment of ballast water. *Marine Pollution Bulletin*. 2008,56:1201-1208
- [8] Luckas B. Overview of key phytoplankton toxins and their recent occurrence in the North and Baltic Seas. *Environ Toxicol*, 2005,20(1):1-17
- [9] Yang WD, Zhang XL, Liu J S, et al. Inhibitory effect and sinking behaviour of wood meals from China fir on *Alexandrium tamarense* in cultures. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005,29

- (2):215 —218
- [10] Wang Haixia. Biodiversity and Treatment Technology of Ballast Water Sediments: (Thesis).Dalian:Dalian Maritime University,2009.
王海霞. 船舶压载水沉积物中的生物多样性及处理技术研究:
- (硕士论文). 大连: 大连海事大学, 2009.
- [11] Laing I. Cultivation of Marine Unicellular Algae. MAFF Laboratory Leaflet Number 67, UK: Directorate of Fisheries Research Lowestoft, 1991, 31.