

一种生活在污水中的螺旋藻新品系的分离和培养

耿亚红, 李夜光*, 胡鸿钧, 李修岭, 苗凤萍

(中国科学院武汉植物园, 武汉 430074)

摘要: 从污水中分离到一种螺旋藻新品系, 并筛选到适合的培养基。藻体长 1 750 μm , 在适宜的条件下, 藻体活跃地摆动和转动。其生活环境水质呈弱酸性和中性, 盐度低, 温度变化范围 5~34°C, 氮(N)、磷(P)浓度分别为 4.53~4.96 mg/L 和 0.39~0.48 mg/L, 达到超富营养化水平; 培养试验表明, 这种螺旋藻只适应在弱光下生长, 与一般螺旋藻喜高温、高光、耐碱耐盐的特性显著不同。 NH_4^+ 有利于这种螺旋藻的生长, 是一种适合于在污水中生长的螺旋藻, 有可能在水质净化方面得到应用。

关键词: 螺旋藻; 分离培养; 污水

中图分类号: Q949.22

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2004)04-0329-05

Separation and Cultivation of New Strain of *Spirulina* sp. from Sewage

GENG Ya-Hong, LI Ye-Guang*, HU Hong-Jun, LI Xiu-Ling, MIAO Feng-Ping

(Wuhan Botanical Garden, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China)

Abstract: A new strain of *Spirulina* sp. was separated from sewage, and the suitable medium was selected. This *Spirulina* sp. was as long as 1 750 μm , it waves and rotates actively under optimal living conditions. The water in which this *Spirulina* sp. lived was slightly acid or hypereutrophic, the salinity was low, and the temperature was 5~34°C, the concentration of total nitrogen and total phosphate were 4.53~4.96 mg/L and 0.39~0.48 mg/L respectively. Culture experiments revealed it grew only under low light intensity, which is quite different from the *Spirulina*'s common characteristics of adaptation to high light intensity, high temperature, high salinity and high alkaline. NH_4^+ is helpful for this *Spirulina* sp. to grow. The *Spirulina* sp. adapted well to sewage, thus it may be applied in purification of sewage.

Key words: *Spirulina* sp.; Separation and cultivation; Sewage

已报道的螺旋藻有 36 种。尽管螺旋藻在自然界存在于各种各样的生态环境中, 甚至在冰雪中也发现过螺旋藻, 但是大规模生产的螺旋藻只有在光照充足、温暖的高碱性和高盐度水体中才能形成较大的生物量, 喜高温、耐碱耐盐是一些螺旋藻最显著的生理生态特征^[1~3]。

螺旋藻蛋白质含量高达 60%~70%, 具有藻蓝

蛋白和藻多糖等特有的活性物质, 含有丰富的维生素和微量元素, 被广泛应用于人类功能食品、药品、化妆品和各种饲料添加剂^[4]。但是现在工厂生产成本高, 需要大量的 N 和 P, 因此, 有学者试图用含大量有机物污染的废水培养螺旋藻, 既能生产高蛋白的螺旋藻产品, 又可以去除污水的 N 和 P 达到净化水质的目的, 一举两得。早在 20 世纪国外就开始进

收稿日期: 2003-10-20, 修回日期: 2004-02-12。

基金项目: 中国科学院知识创新工程所长基金资助项目(04035116); 湖北省科技攻关资助项目(2002AA306B03)。

作者简介: 耿亚红(1962—), 女, 从事微藻藻种选育和培养研究工作。

* 通讯作者(yeguang@rose.whio.ac.cn)。

行方面的研究。20世纪80年代Oswald就在美国加州建造了一个 $6 \times 10^4 \text{ m}^2$ 的污水处理厂^[5]。马来西亚用生产西米(Sago)淀粉的废水培养螺旋藻取得了好的效果^[1]。国内这方面的研究开展较晚,吴开国等以沼气池发酵废液配制螺旋藻培养基(BGM)培养钝顶螺旋藻获得成功^[5]。刘中仁等利用煮蚕废水培养钝顶螺旋藻也得到较好结果^[1]。上述研究是用钝顶螺旋藻不同的品系或其它藻类为试验材料进行的。Padhi等在印度污水池塘中发现一种螺旋藻(未定种名),对这个种作了初步生态学观察,没有进行培养试验^[6]。

2000年秋季,笔者在中国科学院武汉植物园水沟中发现一种螺旋藻。这是首次在该地观察到螺旋藻。由于相邻单位生活污水的排入,这条水沟实际上也是污水沟。在这种环境条件下,螺旋藻能在水底成片生长,形成较大的生物量。我们认识到这种螺旋藻的生理生态特性与众不同,或许具有特殊的用途。3年来,我们连续观察了螺旋藻在水沟中数量和分布的变化,初步研究了适合的培养条件,筛选出培养基,经过尝试多种方法,成功地分离培养了该种螺旋藻。

1 材料和方法

1.1 藻种

所用螺旋藻品系(*Spirulina* sp.)采自中国科学院武汉植物园内水沟。

1.2 培养基

使用多种培养基进行培养实验:①Zarrouk 培养基;②稀释 10 倍的 Zarrouk 培养基;③经过抽滤灭菌的沟水;④经过抽滤灭菌的沟水+土壤浸提液;⑤BG-11 培养基;⑥改良的 BG-11 培养基:BG-11 + $\text{NH}_4\text{H}_2\text{O}$ 1 mmol/L, VB₁ 0.2 mg/L, 生物素(D-Bioin)0.25 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。

1.3 培养条件

多种温度光照组合进行培养实验:① $80 \sim 100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, (21 ± 1) °C;② $15 \sim 20 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, (21 ± 1) °C;③ $80 \sim 100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, (10 ± 1) °C;④ $15 \sim 20 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, (10 ± 1) °C。

1.4 单藻培养

经过以下3个步骤,获得单种培养的螺旋藻。①初步分离:藻和原生动物分离。具体方法是:在一个50 mL 烧杯中放入 20 mL 藻液,将一块干净的载玻片靠烧杯壁倾斜立放。螺旋藻顺着载玻片向上蠕动,3~4 h 后,载玻片液面以上的部分布满螺旋藻。取

出载玻片,用过滤灭菌的沟水洗涤,将载玻片下部的螺旋藻擦洗干净后倒置于干净的 50 mL 烧杯中,加入过滤灭菌的沟水,使附着螺旋藻的部分浸在水中。3~4 h 后,螺旋藻又布满载玻片液面以上的部分。重复以上过程,载玻片上的螺旋藻中混杂的微藻和原生动物越来越少。②平板涂布:改良的 BG-11 培养基加 1.5% 琼脂制成平板。取经过初步分离的螺旋藻,均匀涂布于平板上培养。1周后,在倒置显微镜下观察,选取没有杂藻和原生动物的区域,用接种环小心地从平板上刮下螺旋藻,放入液体培养基中,准备挑取单藻。③单藻分离:在显微镜下用毛细管挑取单个藻体,放入改良的 BG-11 培养基中,在弱光下培养。经过 2~3 周,可以观察到试管壁上附着了一层螺旋藻。

1.5 藻体形态观察和照相

用配有自动拍照系统的 Olympus BH-2 显微镜观察藻体形态和照相。

1.6 水样 N、P 含量分析

用碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法测定总氮;用纳氏试剂比色法测定 NH_4^+ -N;钼酸铵分光光度法测定总 P。

1.7 电导率的测定

用 ORION1230 多功能水质测定仪测定。

1.8 CODcr 的测定

用重铬酸钾法(容量法)测定。

2 结果和分析

2.1 标本采集地的生态环境和螺旋藻数量分布的变化

武汉植物园水沟位于园区中部,宽约 5 m,长约 500 m,水深 0.5~1.5 m,由南向北贯穿植物园。其水源主要有两种:①周围地区的降雨;②相邻单位排入的生活污水。降雨时,水流较大,不降雨时,水流逐渐减小,水量的大小主要由生活污水排入的多少决定。这条水沟多年没有清理,底部沉积了厚厚的黑色污泥。水中种植了荷花、睡莲等水生植物,自然生长的浮萍覆盖了大部分水面,局部河段凤眼莲旺盛生长。每年从深秋到早春,沟中的水生高等植物死亡,黄丝藻(*Tribonema* sp.)、衣藻(*Chlamydomonas* spp.)、绿球藻(*Chlorococcum*)、硅藻(*Diatom*)等微藻为优势种大量繁殖,在水表面形成藻膜,有时覆盖整个水面。

2000 年 11 月,首次在水沟的最下端发现螺旋藻。螺旋藻在水底呈片生长,藻片呈蓝绿色,长宽从

2~3 cm 到十几厘米,往往附着在水底的枯枝败叶表面。几年的观察表明,冬天最冷时,水底仍可看到成片生长的螺旋藻,颜色蓝绿,但数量较少;春季,随着水温升高,螺旋藻数量增加,遇到连续几个晴天,藻片会浮到水表面;在夏季晴朗天气,大量的藻片上浮。

几年来,螺旋藻在水沟中的数量明显增加,分布范围也快速扩大,2000~2001年,螺旋藻只分布

在水沟最下端很小的范围内,2002年,分布范围扩大,约占水沟长度的1/3;2003年春天,水沟中段出现大量的螺旋藻,到2003年8月,螺旋藻的分布范围已经超过水沟2/3。

2.2 沟水水质情况

沟水呈弱酸性和中性,温度随季节变化很大。2003年不同季节取样测定了水中N、P浓度及一些物理、化学指标,结果见表1。

表1 沟水水质和温度变化
Table 1 Changes of water quality and temperature in sewage

| 深度(m) Depth | 温度(℃) Temperature | pH | 总氮(mg/L) TN | 铵态氮(mg/L) NH ₄ ⁺ -N | 总磷(mg/L) TP | 化学耗氧量(mg/L) CODcr | 电导率(μs/cm) Conductivity |
|----------------|----------------------|---------|----------------|--|----------------|----------------------|----------------------------|
| 0.5~1.5 | 5~34 | 6.5~7.5 | 4.53~4.96 | 1.56~1.74 | 0.39~0.48 | 20.05~22.26 | 358~400 |

水样的电导率与武汉东湖水接近,表明水中盐度低。根据N、P浓度,化学耗氧量,特别是铵态氮的浓度,沟水水质已达到重度富营养化。

2.3 螺旋藻形态和运动特征

螺旋藻由单列细胞构成,卷曲呈螺旋状。藻体的形态特征见图1和表2。

单种培养与野生藻株形态特征基本一致,但是也存在一些差别,最明显的是野生藻株的螺距比单种培养的藻株大,另外,螺旋数也比单种培养的藻株多。单种培养后,由于螺距减小和螺旋数减少,藻体变短。根据作者多年从事螺旋藻藻种选育和培养工作的经验,螺旋藻的形态特征具有多变性,最容易改变的就是螺旋数,其次是螺距。在形态易出现变化这一点上,新分离培养的螺旋藻与其它螺旋藻相似。

用显微镜观察到,螺旋藻运动非常活跃,主要有两种运动形式:①摆动。在适宜的环境条件下,几乎所有的藻体都在摆动,分布在藻团周围的藻体摆动得尤为快速,而且摆动幅度大;②转动。在适宜的环

表2 螺旋藻形态特征

Table 2 Morphological features of strain *Spirulina* sp.

| 形态特征 Morphological character | 野生型 Wide type | 单种培养 Unialgae culture |
|---------------------------------|------------------|--------------------------|
| 藻丝长 Length of trichome | 800~2000 μm | 400~1750 μm |
| 藻丝宽 Width of trichome | 4.5~5.0 μm | 4.5~5.0 μm |
| 螺旋宽 Width of helix | 10~11.25 μm | 10~11.5 μm |
| 螺距 Length of helix | 20~22 μm | 17~19 μm |
| 螺旋数 Number of helix | 38~90 | 23~100 |
| 顶端细胞 Apical cell | 钝圆 Rounded | 钝圆 Rounded |
| 细胞横隔 Cross wall | 明显 Obvious | 明显 Obvious |
| 细胞间收缩 Contracted | 无 No | 无 No |

境条件下,一部分藻体围绕螺旋的轴快速旋转,就像一根沿轴芯旋转的“弹簧”。除了以上两种微观的运动方式外,在宏观上,螺旋藻表现出一种向四周扩散的运动,可以想象,这种运动是微观的摆动和转动的结果。

只有在适宜的条件下,螺旋藻才运动,当环境发生不利的变化,运动就变得不那么活跃,甚至停止运动。运动与否,是这种螺旋藻生长状态好坏的重要指示。

2.4 适合的培养基和培养条件

采集到的螺旋藻经过洗涤接种到各种不同的培养基,在不同的温度和光照条件下培养的结果见表3。

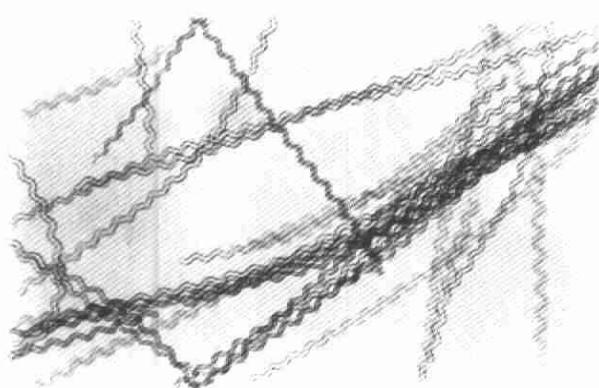


图1 分离的螺旋藻形态(×170)
Fig. 1 Morphology of *Spirulina* sp. (×170)

表3 在几种培养基和不同光温条件下的生长情况
Table 3 Growth in several media and under different temperature and illumination

| 培养基 Media | 光强/温度 Light intensity/temperature | | | |
|---------------------------------|--|---|--|---|
| | 80~100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (21±1)°C | 15~20 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (21±1)°C | 80~100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (10±1)°C | 15~20 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (10±1)°C |
| Zarrouk | 1 d 后变黄死亡 | 1 d 后变黄死亡 | 1 d 后变黄死亡 | 1 d 后变黄死亡 |
| 1/10 Zarrouk | 存活 2~4 d | 存活 2~4 d | 存活 2~4 d | 存活 2~4 d |
| 沟水 Sewage | 3~4 d 后变黄， 杂藻原生动物繁殖， 7~8 d 后消失 | 7~8 d 后变黄， 杂藻原生动物繁殖， 2 周后消失 | 5~6 d 后变黄， 杂藻原生动物繁殖， 12 d 后消失 | 10 d 后变黄， 杂藻原生动物繁殖， 2 周后消失 |
| 沟水+土壤浸提液 Sewage+Soil extract | 同沟水 | 同沟水 | 同沟水 | 同沟水 |
| BG-11 | 5~6 d 后变黄，杂藻 繁殖，10 d 后死亡 | 10 d 后变黄，杂藻 繁殖，2 周后死亡 | 7~8 d 后变黄，杂藻 繁殖，2 周后死亡 | 2 周后变黄，杂藻 繁殖，3 周后死亡 |
| 改良 BG-11 Modified BG-11 | 形态正常，颜色偏黄， 生长缓慢 | 形态正常，颜色蓝绿， 生长快 | 形态正常，颜色稍黄， 生长慢 | 形态正常，颜色蓝绿， 生长缓慢 |

在 Zarrouk 培养基和稀释的 Zarrouk 培养基中很快死亡, 表明这种螺旋藻对盐度和 pH 非常敏感, 高盐高碱不利于其生长繁殖, 与一般螺旋藻的特性相反; 在经过抽滤灭菌的水沟水中开始生长良好, 但后来藻颜色变黄, 杂藻和原生动物大量繁殖起来, 螺旋藻越来越少, 最后消失。表明经过抽滤灭菌的沟水中缺乏螺旋藻生长繁殖需要的某些物质, 或者说抽滤灭菌后的沟水中的营养物质不能满足螺旋藻大量生长繁殖的需要; 融合藻在抽滤灭菌沟水+土壤浸提液中的表现与抽滤灭菌沟水基本一样, 由此可以推断, 添加矿物质和多种有机物, 包括腐质酸类物质也不能满足螺旋藻的生长需要; 融合藻在 BG-11 培养基中不能长期存活, 而在改良的 BG-11 培养基中生长良好, 可能是其中的铵态氮(NH_4^+-N)和维生素(VB_1 和生物素)对螺旋藻的生长起到促进作用。在相同的培养基中, 处于弱光和低温条件下, 融合藻能够存活更长时间。在改良的 BG-11 培养基中, 虽然在各种条件下螺旋藻都能生长, 但是在强光下, 融合藻颜色发黄, 生长非常缓慢, 在弱光下, 颜色蓝绿, 生长快速。表明这种螺旋藻适合于弱光, 这和它的底栖习性相符合。

经过以上研究, 初步掌握了螺旋藻适合的培养条件, 筛选出较为适合的培养基配方——改良的 BG-11, 其为单藻分离培养提供了条件。

3 讨论

螺旋藻生活的水沟, 氮、磷浓度较高, 但盐度低, 水质呈弱酸性到中性, 融合藻在这种环境中能大量生长繁殖, 生理生态特性是比较特殊的。它还能在 5~6°C 的水中自然越冬, 保持颜色蓝绿, 培养实验表

明, 这种螺旋藻适应弱光照, 与已工厂化生产的螺旋藻喜高温高光的特性不同, 目前国内外还未见类似的报道。现在还不清楚螺旋藻附着在水底枯枝败叶表面是否与其生活方式有关, 比如是否有腐生营养方式。比较改良的 BG-11 培养基和抽滤灭菌沟水中的 NH_4^+-N 浓度, 前者为 14 mg/L, 后者为 1.56~1.74 mg/L, 差异很大, 这可能是螺旋藻在改良的 BG-11 培养基中生长良好, 而在沟水和沟水+土壤浸提液中不能长期存活的原因。从螺旋藻在各种培养基中的生长情况来看, 铵态氮(NH_4^+-N)和维生素有利于其生长, 铵态氮是否为这种螺旋藻生长繁殖所必需, 还有待于进一步实验证明。 NH_4^+ 浓度高是水体受污染的重要指标之一, 可见笔者分离培养的螺旋藻适应在污水中生长。

将螺旋藻的用途扩展到环保领域, 国内外已经尝试的工作有两个方面: ①将某种基因转入螺旋藻中, 使螺旋藻获得富积或分解特定物质的能力, 用于工业废水的处理^[7]; ②用工业和生活废水培养螺旋藻, 废物利用的同时降低螺旋藻的生产成本^[8]。由于受螺旋藻遗传特性的限制, 基因工程螺旋藻还没有取得突破; 筛选适合在污水中生长的藻种, 是一条值得探索的途径。我们分离培养成功的螺旋藻有可能成为这样的一个藻种。

将这一藻种用于水质净化方面, 还需要深入了解这个藻种的特性, 做大量的研究工作。目前这种螺旋藻的定种、生理生态学、生物化学、水质与藻体的相互作用等研究工作正在进行之中。

参考文献:

- [1] 胡鸿钧. 融合藻生物学与生物技术原理[M]. 北京:

- 科学出版社,2003.1—181.
- [2] 胡鸿钧.国外螺旋藻生物技术的现状及发展趋势[J].武汉植物学研究,1997,15(4):369—374.
- [3] Richmond A. *Spirulina* [A]. In: Borowitzka A, Borowitzka J eds. *Micro-algal Biotechnology* [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1988. 85—121.
- [4] 吴开国主编.螺旋藻——保健食品新资源和开发利用[M].海口:南海出版社,1999.81—83.
- [5] Oswald W J. *Micro-algae and wast water treatment* [A]. In: Vonshak A ed. *Spirulina Platensis (Arthospira)*: Physiology, Cell-biology and Biotechnology [M]. London: Taylor & Francis Ltd., 1997. 131—156.
- [6] Padhi B, Rautray B, Balliarsingh P. Ecological studys on *Spirulina* sp. in a polluted pond of Besham-pus (orissa)[A]. In: Seshadri C V, Jeeji Bai N eds. *Spirulina*. ETTA National Symposium [M]. India: MCRC,1992. 52—56.
- [7] 陈必健,施巧琴.螺旋藻藻种选育研究进展[J].食品与发酵工业,2000, 26(3):78—81.
- [8] 马金才,李媛,刘中文,陈甫华,陈天乙.2种污水培养的螺旋藻的品质研究[J].食品与发酵工业,2002, 28(1): 13—15.