单細胞綠藻的大量培养試驗***

黎尚豪　朱　蕙　夏宜琤　俞敏娟
林坤二　刘昆山　樂正亞　陈云霞
（中国科学院水生生物研究所）

在近廿年来，单細胞綠藻的培养和利用，曾引起广泛的兴趣，主要的是由于单細胞綠藻具有下列几个重要的特性：（1）能够充分利用太阳的光能，通过光合作用，制造大量的有机物質，作为动物的直接或簡接的食料；（2）生长繁殖迅速，对自然环境的适应性很強，易于培养；（3）蛋白質的含量很高，达干重的50%，其中有21种氨基酸为动物生长上所需要的，油脂的含量也很高，为干重的10—20%，通过低氮培养，含量可达到80%以上；（4）含有大量的維生素，其中包括B_{12}，以及其他可以作为葯用的有机化合物；（5）在生长过程中放出大量的O_2，可以利用来氧化污水。

单細胞綠藻的培养在上一世紀末年已經开始。当时主要是培养一些柵藻（*Scenedesmus*）和小球藻（*Chlorella*）作为試驗材料。在本世紀的初期，由于植物生理学的发展，单細胞綠藻的培养便成为进行呼吸作用，光合作用和矿質营养試驗中的一个对象；培养方法也得到很大的改进。然而，这些都仅限于实驗室內的培养，也仅作为实驗用的材料。

在第二次世界大战期間，由于粮食的缺少，如何利用水中的浮游生物作为人类食料就成为研究的課題[6]。单細胞綠藻的培养也就逐漸被重視起来，有許多国家先后进行了培养和营养价值的試驗。这些工作，在1953年出版的"从实驗室到中間工厂的藻类培养"[5]一书中，把前人的工作做了一个小結；在1957年田宮的"藻类的大量培养"[7]一文中，又将近年的工作加以小結。苏联学者 Гаевская (1954)[4] 和 Винберг (1957)[2] 也曾分别总結性地介紹了单細胞綠藻培养的历史和发展前途。

大量培养单細胞綠藻主要采用两种方式，即密閉式和开放式的培养方法。密閉式的培养是将培养物与空气全部隔离，密封在透明容器中进行培养，CO_2完全采用人工供給的方式；开放式的培养系将培养物在露天的开敞容器中进行培养。前者設备較繁，但容易控制，产量也較稳定；后者則設备較簡，但自然条件变化的影响較大，也易于污染。因此，在資本主义国家大都是采用密閉式的培养。

日本田宮經过多年的藻类培养工作，采用开放式的培养方法，获得了估計每亩年产6000斤的高額产量[7]。

过去，虽然我們曾进行过一些单細胞綠藻的培养試驗，但仅是在实驗室內进行的，如何大量培养，作为人类利用的对象却还未进行过。在大跃进中，淡水藻类的利用問題被提上日程，如何大量培养单細胞綠藻，得到高額的产量，如何利用这些藻类作为人类的食料和动物的飼料，使淡水藻类能在生产上起直接的作用，便成为重要的問題了。

* 1959年10月12日收到

** 曾参加本研究工作的有赵英华同志，廈門大学陈貞奋同志和南京大学生物系朱丽剑、錢凱先和王楚松同学。

本研究試驗主要目的是找出大量培养单細胞綠藻，得到高額产量的方法，以便进一步的推广利用。因此我們便試驗用設备簡单易于推广的开放式的藻类培养方法，进行单細胞藻类的培养試驗工作，現将培养方法和初步結果，加以总結介紹。

一、藻种培养

我們培养的单細胞綠藻是斜生柵藻（*Scenedesmus obliquus* (Turp.) Kütz.）和蛋白核小球藻（*Chlorella pyrenoidosa* Chick.）。

用微吸管分离法获得单种藻种，接种在 Chu *10* 或 Rice 等固体培养基（琼脂平板）上，待生长旺盛后，再移种到容量 100—2,000 毫升的錐瓶中，用 Chu *10* 或 Rice 培养液进行液体培养。培养量逐漸增加，最后用容量 150 升的玻璃水族箱进行培养，作为大量培养时的藻种。在藻种量增加的同时，藻种培养亦由室內轉到室外进行。150 升的藻种培养是在露天条件下进行，所用的培养基也由 Chu *10*，Rice 等改用水生 *4* 号培养基。改变培养藻种的环境和营养条件主要是依据米丘林生物学的定向培养原理，使培养对象在藻种阶段就逐步地适应于在大量培养中将遇到的环境因素，特别是温度、光照和营养条件。

在整个培养过程中，保持一定数量的藻种，以备随时取用。为了使藻种生长良好，經常将藻种移入新鮮的培养液中，以免在老培养液中培养时間过长，出現衰老現象，增加培养工作上的困难。

二、大量培养方法

1. 水和容器：我們采用內高 30 厘米、直径 150 厘米的木盆作大量培养的容器。用自来水配制培养液。为了防止自来水中可能带入各种生物使培养液污染，在注水管口包扎夾有棉花的两层紗布，进行过滤。培养液深度是 20—25 厘米，培养量为 300—350 升。

2. 培养基：在我們进行大量培养的培养基中，采用了农业化学肥料，如硫酸銨 $(NH_4)_2SO_4$、尿素 NH_2CONH_2、过磷酸鈣 $Ca(H_2PO_4)_2\cdot H_2O + 2(CaSO_4\cdot H_2O)$、氯化鉀 KCl 等；工业用磷酸 H_3PO_4、碳酸氢鈉 $NaHCO_3$；葯用硫酸鎂 $MgSO_4\cdot 7H_2O$ 以及化学試剂三氯化鉄 $FeCl_3$。在培养基的拟訂中，我們有意識地采用了較高的氮浓度。因为根据其他作者如 Гаевская[3] 氏和我們自己的試驗研究，証明了在高氮浓度的培养基中，其他藻类一般不能很快地适应，可以減少污染。

在試驗过程中，对我們自己拟訂的培养基配方作了反复的修改，最后从十个以上的配方中选定了"水生 *4* 号"和"水生 *6* 号"两个配方：

水生 *4* 号培养液

硫酸銨 $(NH_4)_2SO_4$	0.200 克
过磷酸鈣 $Ca(H_2PO_4)_2\cdot H_2O + 2(CaSO_4\cdot H_2O)$	0.030 克
硫酸鎂 $MgSO_4\cdot 7H_2O$	0.080 克
碳酸氢鈉 $NaHCO_3$	0.100 克
氯化鉀 KCl	0.025 克
氯化鉄 $FeCl_3$（1%）	0.150 毫升
土壤浸出液	0.500 毫升

水			1000 毫升

水生 6 号培养液

尿素 NH_2CONH_2	0.133 克	硫酸亚鉄 $FeSO_4$ (1% 水溶液)	0.200 毫升
磷酸 H_2PO_4	0.033 毫升	氯化鈣 $CaCl_2$	0.030 克
硫酸鎂	0.100 克	土壤浸出液	0.500 毫升
碳酸氢鈉	0.100 克	水	1000 毫升
氯化鉀	0.033 克		

以上两种培养液在大量培养中表現出不同的效果。培养在水生 *4* 号培养液中，藻类呈深綠色，生长繁殖速率較低。在水生 *6* 号中，藻类細胞的色素不够正常，培养物呈草綠色，但藻类生长繁殖迅速，在接种后当天內即可看見水色由浅到深的显著变化；3—4 天內，生长浓度陡然上升。*4* 号培养液中的N, P 分别为 40 和 2ppm, P/N 比值是 1/20; *6* 号培养液中，N、P 分别为 60 和 9ppm, P/N 是 3/20。

土壤抽出液是用田园土壤按水和土 2:1 的比例攪匀浸泡后的上层清液，用前，先在显微鏡下检查，若发現污染生物，則需加温消毒后使用。

3. 供給 CO_2：經常供給培养物以足够的 CO_2 和空气以加強光合作用，促进有机物質合成，无疑是保証藻类生长繁殖良好的极为重要的条件之一。我們用通气方法对培养的藻类供給空气与 CO_2 的混合气体，CO_2 的浓度是 5—10%。

我們認为，通气的方法是大面积培养中一个涉及到 CO_2 的利用率和培养产量的重要技术問題。目前各国藻类工作者在不同的培养条件下，已經采用过若干不同的通气措施：有些是将 CO_2 加到輸水系統中，让它溶入水中以后，再曝于阳光下；有些是将 CO_2 通入气体冲淋塔，使它溶解在溶液中；有些是通过攪拌方式以增加空气中 CO_2 在水中的溶解度[5]。

通入 CO_2 的基本原則是要让 CO_2 能大量溶解在水中供藻类同化利用。提高 CO_2 溶解度的方法是：1，尽量延长 CO_2 和水接触的时間；2，尽量使 CO_2 在水中以小气泡沫形式放出，增加接触面积。

我們在自己的研究中，也先后試用了若干通气措施，其中有两种效果良好。一种是将气体气通入培养液循环系統的管导中，使含有較浓的 CO_2 的空气在循环管导內和培养物一起运行。培养盆中的藻类在进入循环管道以后，即可充分地得到CO_2和 O_2 的补充，沒有利用的气体可随循环管道注入培养盆內的自动旋轉器而最后散布到培养池中。

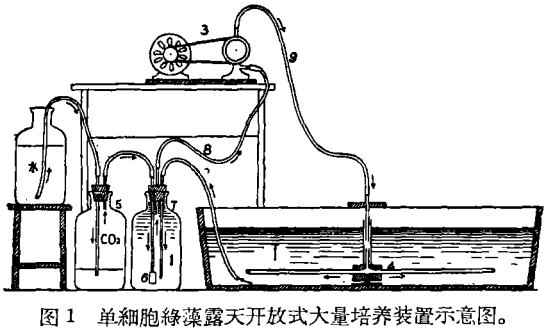


图 1 单細胞綠藻露天开放式大量培养装置示意图。
1—培养物； 2—流出管； 3—抽水机； 4—自动旋轉器；
5—CO_2 瓶； 6—多孔通气石(浮石)； 7—充气瓶； 8、9—回流管

在这个通气方法的基础上，我們又制定了如图 1 所表示的通气方案。这个通气方案即在循环系統的中途設置一个充气瓶，CO_2 通入該瓶中。培养盆中的培养物經管 *2* 注入充气瓶 *7*，带有 CO_2 的气体由管末的多孔通气石(浮石) *6* 逸出，成簇的

气泡連續不断地上升。飽和了 CO_2 的培养液和多余的气沫由抽水机 3 的牽引，經管 8、9 注入旋轉器 4，經旋轉器而散入盆內。在这个通气方案中，充气瓶 2 就相当于一个"气体补給站"，由于抽水机的抽吸和气体的灌注，瓶內培养物和气体經常处于剧烈的翻騰状态，水、气充分混合滲和，使得 CO_2 能得到充分的溶解和利用。

我們曾經采用的另一种簡单的方法，是将排气管的末端，套在一根沉于盆底的玻璃管內，使排出的气体，能够較多的和培养液接触。否則由于培养液仅 25 厘米，CO_2 排出后，通过 25 厘米的水层，馬上就逸入空气中，仅有极少量的 CO_2 能溶于水中，利用效率很低。

4. 攪拌和流轉：为了使单細胞綠藻最大限度地利用照射到培养面积上的太阳光能和經常生长繁殖旺盛，減少沉淀，必須保証培养物經常得到攪拌，最好是經常处于循环流轉之中。我們在培养中采用了图 1 中所表示的流轉和循环的办法。在这个循环系統中，自动旋轉器（图 1 之 4 及图 2）起着很大的作用，培养物由旋轉器的同向出口流出，由于反作用力的推动，旋轉器在盆內自动旋轉，起着攪拌的作用，同时，将飽和了 CO_2 的水均匀分散到培养盆各处。



图 2　自动旋轉器。
⟶ 表示水流的方向。

5. 測定：为了研究藻类接种后的生长繁殖的規律和記录藻类的生长繁殖速率，在培养过程中定期測定藻类的生长浓度，同时記录 pH 和温度变化。

生长浓度的測定是用自制的"单种藻类生长浓度光电比色計"进行。构成此种仪器的主要部分有：(1)光电池，(2)讀数为 2μA 的微安培电流計，(5)聚光透鏡，(3)变压器，(4)光源（12/16 V. 小灯泡）。根据微安培計上的讀数即可以在該比色計的微安-毫克/升的对照表上查到被測定的培养液中的藻类的重量浓度（毫克/升）。

每天定时測定藻类的生长浓度，可以随时掌握藻类在培养液中生长繁殖的速度及其变化。pH 是影响藻类的生长繁殖的一个因素，而培养液 pH 值的变化，又是藻类生命活动的結果的反应。水生 4 号培养基的最初 pH 是 7.5，水生 6 号为 5—6 之間，在接种藻类后，若藻类生长繁殖旺盛，則 pH 值在 3—4 天內剧烈上升到 9 左右，使培养液呈碱性，对藻类生长不利。pH 值的变化又和水中溶解的 CO_2 密切相关，大量通以含有 CO_2 的气体，可以使 pH 值在短期內回复到 7—8 之間，如果在藻类生长繁殖的过程中，就經常連續不断地供給足够的 CO_2，pH 值的上升就不致如此急剧，而变得比較緩慢。由此可見通气的效果又表現在培养液的酸碱度上，根据 pH 值的数值，就可以粗略地了解到培养液中的气体状态和能供藻类利用的 CO_2 的状况。

温度条件无疑地直接影响于藻类的生长繁殖，經常記录温度变化，一方面可以研究藻类生长繁殖与温度的关系；尤其重要的是，可以在温度变化剧烈的情况下，及时作出保持温度的措施。

有了完整的生长浓度，pH 和温度的記录，我們就可以基本上了解藻类生长繁殖的速率和通气的效果。同时，也为定收获期、采取保温措施和追加肥料等方面提供了根据，从

而掌握整个培养物的发展趋势和預先确定在培养过程中随时改变培养条件和提供新的条件。

6. 保温：培养单細胞綠藻，温度是物理条件中首要的因素。在許多作者的工作中都毫不例外地特别強調这一因素，并采取了不同的对付方法。斜生柵藻和蛋白核小球藻，象其他单細胞綠藻一样，对温度条件有較严格的选择，最适生长温度在 25°—28℃ 左右，一般在 10°—30℃ 范围之外的温度条件下，就不能正常生长繁殖。

武汉位于东經 114°—115° 和北緯 30°—31°，是典型的亚热带大陆性气候。冬季严寒，夏季酷热，1 月平均温度 3—4℃，7 月平均温度 29℃，全年最高温度达到 40℃，最低温度达—10℃，所以在武汉地区全年进行单細胞綠藻的露天开放式大量培养，温度条件显然是会带来不少困难。然而，要进行生产性大量培养，就必須設法使培养工作全年得以进行，維持經常性的生产，从而保証单位面积有較高的年产量。我們在自己的培养工作中，一直在以下两个原則的基础上考虑和試图解决温度条件問題：第一，必須使露天培养工作全年順利进行，渡过恶劣的温度条件；第二，为了降低成本，保温措施要簡便易行。基于这种原則，我們对待温度問題，首先是从藻种本身着手，同时輔之以若干簡便的保温措施。在藻种方面，基本的方法是用高温和低温鍛炼藻种，以提高它适应較广的温度范围和抵抗不良温度条件的能力；在鍛炼过程中又不断加以淘汰和选择，保留能在不良温度条件下正常生长和繁殖的藻种个体，并継續給予鍛炼，使其抵抗能力得以累积。1958 年夏天（武汉）气温逐漸上升，每天 12:00—15:00 点时，培养藻种的玻璃水族箱內的水温經常高达 37°—40℃。10 月以后，武汉的气候又日趋寒冷，到 12 月份，白天室外温度經常在 10℃ 以下，1959 年 1 月份出現冰冻現象，白天室外温度有时也低至 0℃，甚至在 0℃ 以下。但是无論是在炎热的夏天或是严寒的冬季，我們的藻种培养工作始終在室外露天条件下进行；在 150 升培养量的藻种玻璃箱中，水温最高达到 40℃，最低降到 0℃，在这种严酷的高低温鍛炼中，曾經有大批藻种个体死亡而被淘汰。然而，最后选择出来的藻种，都在露天条件渡过了武汉的夏天和冬天，获得了抵抗高温和低温的能力，从而对于我們在最不利的温度条件下連續进行室外的露天大量培养，起了很大的保証作用。利用高、低温鍛炼的办法增进藻类适应温度条件的能力的事实，充分地說明了，生物与环境条件統一的米丘林生物学原理，在藻类培养工作中同样也具有指导性的意义。

在提高藻种适应温度的能力的同时，我們还在培养工作中試用了一些保温方法。对于夏天的高温，我們只采取了簡单的遮蔭办法，即在正午最热的 1—2 小时內，用竹棚遮蔭，避免藻类受到強烈的直射阳光的伤害。对于冬天的低温我們采用了两种方法：

（1）塑料玻盖：用透明塑料玻璃布做成鍋形盖，盖在培养盆上，加盖时間是下午气温开始下降时起至次日上午气温高于水温时止。加塑料盖，一方面可以使培养物免受冷气流的侵袭，同时，又可以使阳光不断照射的热量在盖內有所积蘊，因此，可以起一定的保温作用，一般可提高水温 2℃，在最冷的期間，夜間在塑料盖之上还加以草蓆，这样可以使水温不至下降到零度以下，以免藻类遭受冰冻，和完全不加盖的培养盆比較，水温可提高 4—5℃。

（2）向阳玻管組：阳光（太阳輻射）是包含 0.2—2.5 微米的光波，較长的光波具有較大的热能，玻璃具有較短的光波能够通过，較长的光波不能透过的性質，但由于光波透过

玻璃碰到其他物体，使温度增高后，会将較短的光波反射成約为 1 微米的长光波而放出較大的热能，可使温度提高。根据这个原理，我們設計了一种"向阳玻管組"（图 3），用以在冬季晴天提高培养物的温度。向阳玻管組由若干（10—20）支双层玻管串連而成。装置在循环系統的中途，經常調換方向，使阳光直射其上，当循环流轉进行时，培养盆中的藻类即迴迂曲折地通过这一連串夾壁玻管，受到阳光的直射，温度上升。加有这种升温装置的培养盆和对照盆比較，水温經常上升 3—5℃，有时甚至有 10℃ 之差，达到了頗为显著的升温效果。

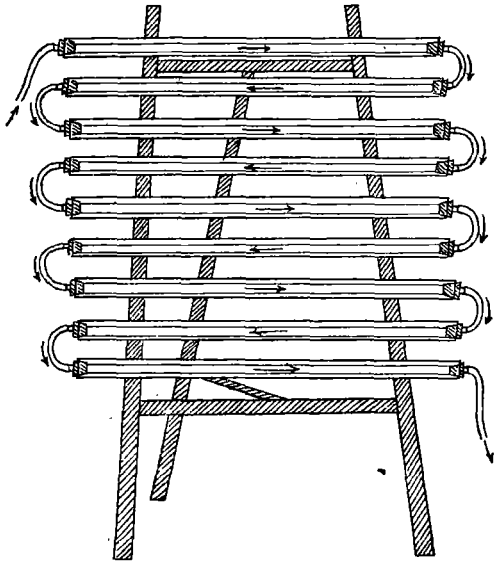


图 3　向阳玻管組（說明見文中）
⟶ 表示流轉方向。

由于向阳玻管組經常正向太阳，而又是透明体，因而在提高温度的同时，还提高了光照強度，使得經充气瓶而来的飽含 CO_2 的培养物，在这里受到強度的光照，能够充分地进行光合作用。在整个玻管組的后面，还装有反光体，这就更增強了光照強度。

7. 防治污染：进行露天开放式培养，污染总难以避免。因而設法防治污染就成为培养工作中一个重要环节。

污染的发生和各种因素密切相关，首先是藻种本身的健康問題，若藻类生长繁殖旺盛，或者藻种有較強的抵抗能力，污染不易发生；反之，則容易污染。在我們的試驗工作中，发現斜生柵藻的抗污能力比蛋白核小球藻为強。其次，污染情况还以外界环境条件为轉移，一般在夏、秋季节污染容易发生；季节不同，污染生物的种类也不相同。在夏季，一般以搖蚊（Chironomidae）幼虫的污染为多；在夏末秋初，則常为輪虫所造成。以下是我們在培养中常遇到的二种污染生物及防治方法：

（1）搖蚊幼虫的污染：搖蚊是夏季最严重的污染生物。它在傍晚时在盆壁产卵，数目众多的虫卵（100—200 个）藏于一长形胶質鞘中，胶鞘一端附着盆壁，另一端飄浮水中。虫卵在 2—3 天內即孵化成紅色幼虫。幼虫出現以后，即向体外分泌粘液，在身体周围胶集大量藻类，构成筒状藻巢，紅虫則隐居其間。因此，本来生长旺盛的藻类逐大量形成这种藻巢，和紅虫一起沉于盆底，这时藻类生长的能力也大減，培养液轉清。紅虫污染造成的結果极端恶劣，倘不及时加以控制，培养工作将被迫中断。

根据实驗結果，我們認为，控制紅虫污染应以早期防治为主，即当虫卵尚未孵化以前加以清除。这时虫卵成羣地聚集在胶鞘中，胶鞘又暴露水面，也容易清除。清除虫卵，除了人工清除以外，在 1959 年我們曾采用了另一种办法，即在培养池水位綫上，环繞全池装置一圈活动的搖蚊产卵板，产卵板在傍晚以前安置一半浸入水中，一半暴露水外，搖蚊即产卵板上，第二天早晨，将板取出，消灭虫卵。装置产卵板的方法对防治紅虫污染有良好效果。

搖蚊虫卵孵化以后，我們采用了含 0.5% 丙体的湿性 666 粉进行杀灭。666 粉的使用

浓度是 3—5 ppm。培养物中出現大批紅虫以后，按培养量加入 3—5 ppm *666* 粉，可以在一天內杀死紅虫，对藻类本身則无显著不利的影响。經 666 粉处理以后，紅虫即丧失运动能力，体色轉白，部分死亡的紅虫从水层上升飄浮水面。

（2）輪虫的汚染：在我們的培养中所遇到的另一种汚染是輪虫汚染。由于輪虫能大量吞食藻类細胞，而本身又繁殖迅速，故輪虫一旦侵入培养物后，可以在 1—2 天內大量繁殖，吞食絕大部分藻类，甚至将藻完全吃掉。輪虫的汚染一般不如搖蚊幼虫那样容易发生，但这种汚染出現以后，其后果却比搖蚊幼虫更为严重，必須及时防治。

对防治輪虫，我們主要是用漂白粉进行杀灭。漂白粉浓度一般应在 2—4 ppm 以下。在小量的培养中遭遇輪虫汚染，我們还采用細絹过滤的办法清除輪虫。

8. 收获：藻类繁殖到一定浓度，即进行收获，我們进行收获的浓度是 0.4—0.5 克(干重)/升以上，每次收获量一般为培养量的 1/3。

收获的方法是将培养物攪匀以后，取出 1/3 水量盛入沉淀缸中，加入沉淀剂，沉淀藻类，我們在沉淀剂方面进行过一系列研究，最后确定了两种沉淀剂在大量培养的收获中使用，即明矾和飽和石灰水。明矾的用量是 2—3/10,000，飽和石灰水的用量是 6%[1]。

藻类加入沉淀剂后，一般在二小时內可以沉淀完毕，然后取出底层藻类沉淀，用离心机浓縮或用棉布过滤成稠密的藻浆，再行干燥。

三、試驗結果

培养的工作从 1958 年 7 月开始以后，一直継續进行，現将部分的結果，报导如下：

（一）夏季培养結果

藻种为室外培养的斜生柵藻，8 月 19 日接种于水生 *4* 号培养基中，培养量为 300 升，接种后最初的浓度是 29 毫克（干重)/升，每日下午 3 时测定生长浓度、pH 和温度(图 4)。从生长繁殖曲綫可以看出：在接种后的最初几天內，斜生柵藻的生长繁殖速度呈直綫上升，第 5 天生长浓度达到 457 毫克/升。第 7 天开始进行第一次收获，收获时的生长浓度是 477 毫克(干重)/升，收获量为 80 升，得藻类 38.16 克(干重)。收获后补回培养液，藻类的浓度被稀释到 346 毫克（干重)/升，第 8 天藻类浓度迅速回升达到 457 毫克（干重)/升，接近第一次收获时的浓度，于是进行第二次收获，收获量仍为 80 升，得藻类 36.56 克(干重)。第 9 天生长浓度是 390 毫克（干重)/升，进行第三次收获得藻类（干重) 31.2 克，第 10、11、12 天未进行收获，第 12 天生长浓度达到 506 毫克(干重)/升，第 13 天收获大批沉淀的藻类，共計 125 克，大量的增加培养液，在第 17、18、22 天又收获了三次，各得藻类(干重) 81、77、75 克。

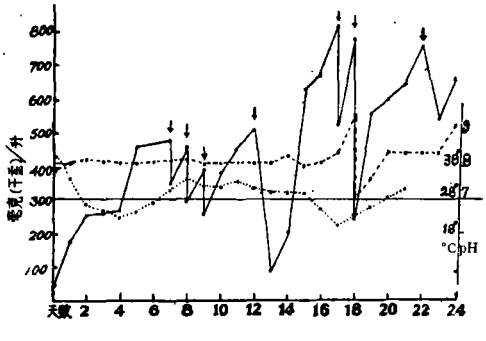


图 4 在夏季露天开放式大量培养中斜生柵藻的生长繁殖曲綫。
图中間的横綫为 pH7，水溫 25℃。
——生长浓度；·－－·pH；·……·溫度；↓收获。

上述試驗說明，在接种后藻类的生长繁殖速度即呈指数上升，到第 5 天即达第一高峯(每升 457 毫克干重)，这时如不进行收获，它将保持一定的时間，并不継續上升。在取出

約 1/3 的培养物后，再加入新的培养液，这对藻类的生长又起了促进的作用，在一天內基本上又增长到原来的浓度，經过三次收获后，停止三天又达到第二次的高峯，在进行了大量收获后、又加入大量新鮮培养液維持原来的水量，經四天达到第三次高峯，达到每升含藻类 0.81 克干重，連續收获两次，再加入新培养液，再經四天后又上升到第四次高峯，每升有 0.75 克。这說明有規律的間歇收获，更换部分培养液，非但不会使藻类生长受到影响，而且促使藻类生长繁殖，一个高峯連接一个高峯，使藻类的培养能达到高产量。

(二)冬季培养的結果

柵藻生长在温暖的季节，繁殖快，气温降低后，时常出現不能繼續繁殖的情况，一般在 10℃以下，除了冬季作物外，植物生长均不佳、仅能保持原来的状态不致死亡而已。因此，如何使培养的藻种能在冬季繼續生长繁殖，对提高全年的产量来說是十分重要的。

我們以斜生柵藻在露天坪台上盛 300 升培养基的大木盆中进行培养。于 10 月 20 日将藻种接到培养液中，并約一周追肥一次。当时水温在前半月为 10℃—15℃ 之間，在半个月以后，則一直未超过 10℃，最低为 2.5℃。夜半以后气温更低，水面有时結有薄冰，我們采用了草蓆包围木盆和加盖等方法及使用向阳玻管組，使水温稍微增高。

由結果(图 5)看出，当水温在 10℃ 以上时，增长曲綫是很正常的，呈 S 形，最初为准备生长时期，因当时温度較低，4—5 天內未見藻类增长，到第 5 天开始指数上升，在水温下降至 10℃ 时，生长繁殖也达到高峯，水温下降到 10℃ 以下，藻类的数量也下降，經 4—5 天的适应后又回升，然后維持在 500 毫克/升的浓度。最高达到 700 毫克(干重)/升。在培养中 pH 的变化不很大，除开始指数上升时 pH 曾达到 9 以上，一般都在 pH8.0—8.5 之間，(图 5)。在同一时間，同一环境条件下的另一試驗中，我們加用了塑料盖和向阳玻管組，水温比前一試驗稍高一些，同时也由于水是通过小型抽水机經常循环，其生长状况就

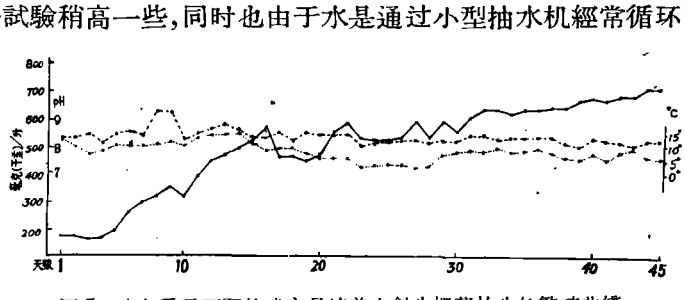


图 5　在冬季露天开放式大量培养中斜生柵藻的生长繁殖曲綫。
—— 生长浓度；　·—·—· pH；　·……· 溫度。

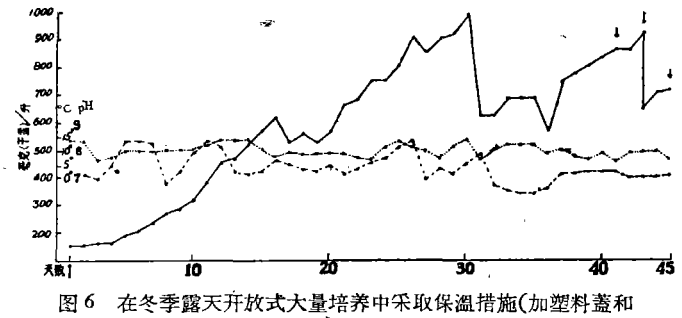


图 6　在冬季露天开放式大量培养中采取保溫措施(加塑料蓋和向阳玻管組)后斜生柵藻的生长繁殖曲綫。
—·— 生长浓度；　·—·—· pH；　·……· 溫度；　↓ 收获；　▲ 增加水量。

有所不同，在10月8日达到每升产干重1000毫克的栅藻量(图6)。这种情况說明了在冬季培养是完全有可能的。

从这个試驗說明水温10℃是一个临界性的温度，在10℃以上，藻类生长繁殖仍然很快，而在10℃以下，則繁殖就显著地下降，虽然数天后卽回升到原来的高峯，繼續維持了将近10天的时間，在水温到8℃时，生长浓度又有較好的提高。因此可肯定地說，在冬季培养中，如何提高温度至10—15℃是个重要的問題。

根据上面的試驗，我們初步得出結論，在露天开放式培养中，我們利用农业上的化学肥料进行培养，只要能适当的控制各种条件，是可以常年进行，而且不論在炎夏或寒冬，同样的可以得到高产。

在我們的实驗中，也发現可以通过人工选择方法，进行定向培育得到适于高温和低温生长的藻种。正如前面所說的，我們所采用的选择方法是将藻种放在露天环境中仔細培养。有一些不适应当时环境条件的逐漸被淘汰，剩下一些对环境适应性較強的种类，可以在夏季35°—40℃的条件下培养，当温度逐漸降低时，它又逐漸适应于低温条件，終于在水温低至0℃尙繼續生长繁殖。

通过这种方法的应用，我們才得到了夏季和冬季高浓度藻类培养物，同时也初步掌握了培养方法，为繼續进行更大面积的培养試驗提供了基础。

(三)藻类生化成分的分析

为了进一步的探索单細胞綠藻的利用价值做好准备，我們也进行了培养得的藻类的生化成分的分析。

我們采用微量凱氏分析法来測定培养物的蛋白質含量，用速氏脂肪抽出器来測定油脂含量，所得結果如表1。同时也測定了斜生栅藻的氨基酸含量，如表2。

表1 斜生栅藻及蛋白核小球藻的蛋白質和油脂含量分析結果(克/100克干藻粉)

	蛋 白 質	油 脂*
斜 生 栅 藻	48.04	13.5
蛋白核小球藻	48.30	11.5

* 由水生所化学組代为分析。

表2 斜生栅藻的氨基酸含量*

氨基酸	克/100克干粉
天門冬硫胺 谷胺酸	5.66
胱氨酸	痕跡
絲氨酸	1.50
苏氨酸†	1.30
甘氨酸	2.10
丙氨酸	4.10
脯氨酸	0.99
纈氨酸†	1.57
苯丙氨酸†	1.37
亮氨酸†	4.10
賴氨酸† 酪氨酸†	2.96
精氨酸†	0.37
組氨酸†	0.64

* 由中国科学院生物化学研究所代为鑑定。色氨酸、白氨酸及异白氨酸未鑑定。
† 为不可替换氨基酸。

从上面的分析結果来看，斜生柵藻及蛋白核小球藻的营养成分异常丰富，作为人类的食料或家畜家禽的精飼料是完全可能而且很有前途。

四、对产量的估計

从上述的夏季和冬季培养結果的例子，可以初步估計出生产性培养时，单細胞綠藻的产量。因为夏季天气炎热，阳光強，水温高，对藻类培养是不利的，冬季則因阳光弱，水温低，藻类生长緩慢。国外一些研究者認为只有春秋两季适宜于藻类的培养[7]。因此，我們通过夏冬两季培养的結果，可以估計出它的年产量。

从夏季的培养来看，約 7 天則可达到每升水含藻类 0.5 克干重的产量。如每天継續取出 1/3，則可以連續取 3—4 天，而不致影响到生长浓度。从图 4 也可以看出，在收获和增加了培养液 3—4 天之后，生长浓度又提高至 0.5—0.8 克/升以上。这說明：收获并不影响藻类的生长繁殖，取出部分培养物以后生长反而提高了。若果生长浓度平均能維持到干重每升为 0.55 克，每周收获三次，每次收获三分之一，就可以达到每亩年产万斤。

我們曾連續取出定量的培养物，来测定其产量。先将取出的藻类浓縮后，在 90°—100℃ 的烘箱內烤干，称取其干重。测定結果，每天每盆可收获 27.17 克，以一年培养 300 天計算，年产可达 10853 斤干重。

在冬季气温在 10℃ 以下的条件下，培养的藻类浓度經常維持在 0.5 克以上，最高可以达到每升 1 克；但連續收获后浓度回升稍慢，需要 10 天左右才能接近原来的浓度。从冬季培养情况来看，产量和夏季也很接近。

依照上述情况，若采用前面所介紹的培养方法，冬季并加以前述加温措施，在大木盆的試驗中，估計年产在 10000 斤干重/亩是完全可以的。当然在大面积生产时，还会遇到不少的困难，需要进行試驗加以解决。

五、提　要

单細胞綠藻生长繁殖迅速，含有丰富的蛋白質，脂肪及維生素，是人类的很有希望的新食料和家畜家禽的精飼料。在过去的 20 年間，已为各方面所重視，也进行了不少的培养試驗工作。

在 1958 年 7 月我們开始进行单細胞綠藻的大量培养工作。培养的对象是斜生柵藻（*Scenedesmus obliquus* (Turp.) Kütz.）和蛋白核小球藻（*Chlorella pyrenoidosa* Chick.），以斜生柵藻为主。我們在四个面积 1.767 平方米的圓木盆中进行培养。培养液用由农业化学肥料配成的水生 *4* 号和水生 *6* 号培养基。在培养过程中，經常攪拌和通入 CO_2，在个别木盆中，并将培养液用小抽水机使水不断流轉，使藻类可充分进行光合作用。每三天增加一次相当于原量 1/3 的肥料，并补入蒸发去的水量。

在夏秋两季遇到搖蚊幼虫的污染时，加入 3—5 ppm 含丙体 0.5% 的可湿性 *666* 进行杀虫。

通过連續的培养試驗，在夏季酷热，冬季严寒生长最不适时，藻类生长浓度可以达到每升水中干重 0.5 克以上。根据采集收获的結果推算，可以达到每亩年产干重 10800 斤。

經过分析，我們培养出的干柵藻含蛋白質达 48%，油脂 13.5%；干小球藻含蛋白質达

48.3% 油脂 11.5%。栅藻含有 15 种氨基酸,在 100 克藻粉中,冬醯酸和谷氨酸含量达到 5.66 克,丙氨酸 4.10 克,亮氨酸 4.1 克,苏氨酸 2.96 克,精氨酸 0.37 克,組氨酸 0.64 克等。

从試驗中栅藻的产量,蛋白質和油脂含量以及氨基酸的丰富和营养价值高,說明发展单細胞綠藻的培养工作是必要的而且很有前途的。

参 考 文 献

[1] 俞敏娟等, 1959。单細胞綠藻的人工沉淀問題的研究。水生生物学集刊, **1959** (4): 482—488。

[2] Винберг, Г. Г. 1957. Массовые культуры одноклеточных водорослей как новый источник пищевого и промышленного сырья. *Успехи Совр. Биол*, **43**: 332—351.

[3] Гаевская, Н. С. 1953. Выращивание массовых культур протококковых водорослей для рыбного хозяйства. *Тр. Всес. гидробиол. об-ва.* **5**: 72—108.

[4] Гаевская, Н. С. 1954. Проблемы одноклеточных водорослей. *Природа*, **1956** (4): 43—51. (譯文見生物学通报, 1958 年 5 月号 王乾麟 譯).

[5] Burlew, J. S. (ed.), 1953. Algal culture from laboratory to pilot plant, *in* Carnegie Institution of Washington Publication 600.

[6] Clarke, G. L. 1939. Plankton as a food source for man. *Science*, **89**: 602.

[7] Tamiya, H. 1957. Mass culture of algae. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **8**: 309—334.

THE MASS CULTURE OF UNICELLULAR GREEN ALGAE

Ley Shang-hao, Chu Wai, Hsia I-tseng, Yu Mien-kuan, Lin Kun-er,

Liu Kun-shan, Lo Cheng-ya and Chen Yun-hsa

(*Institute of Hydrobiology, Academia Sinica*)

Summary

Studies on the mass culture of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* have been going on since July 1958. The algae were isolated from Dung-hu Lake, Wuchang (Hupeh), and first cultivated in the laboratory under artificial illumination. Then, following Michurin's principles, the cultivation of the stock was continued in the open, to induce adaptations to the environmental factors which will be encountered in outdoor mass culture.

The vessels used for the cultivation of *Scenedesmus obliquus* were 4 shallow round wooden trays, 1.5 metres in diameter, and they were kept on the laboratory roof. The algae were grown in HB No. 4 and HB No. 6 culture media, replenished every 3 days. About 4—7 days after inoculation, the dry weight of the algae increased from 50 mg. per litre to 400—500 mg. per litre. When the algae were cultivated in HB No. 6 medium, the concentration potential increased more quickly than that in HB No. 4, but the colour became yellowish green, and the logarithmic phase was maintained for only 4 to 5 days. In this case, it was found better to grow the algae first in HB No. 6, plus the fertilizer at about half-dosage, after 3 days.

Under these conditions, the algal concentration in mass culture could always be maintained above 400—500 mg./litre, irrespective of seasonal changes in the environment. The temperature, for instance, fluctuates between about 40°C. in summer and below 0° in winter. Annual yields are estimated at about 5 tons dry weight per *mou*: 75 tons/hectare, or 30 tons/acre.