

时也发现大量下沉到水底或聚集在容器的四周,即使加以振盪,一时也不能恢复原来的悬浮状态,以致使培养工作受到很大的阻碍。

因此,揭露产生这种沉淀现象的原因,利用它来控制藻类的沉淀,不但可以用来收获培养的藻类,同时,也可以控制它们沉淀的原因,使它们不致发生自然沉淀,使培养工作能够顺利地進行。

发生藻类沉淀的原因,应该是由于原来使藻类悬浮的因素发生了变化。如象使体重減輕或帮助悬浮物质的减少,大量的个体团聚以相对地增大对于水的等体积的重量,或者水的黏度和密度改变。这都破坏了原来比重的平衡状态,因而藻类必然会下沉到水底。

目前国内外一般所采用的沉淀方法可以分为两类,即:机械方法和化学药品处理的方法^[1]。机械的方法(即力学的方法)主要是利用离心机的离心重力,使原来在一般地心引力的条件下不能下沉的东西都在提高了引力后而下沉;至于化学方法,目前主要是加明矾,或加酸使藻类沉淀。采用前一方法,必需具备大型高速的連續离心机,才能使大量的培养液沉淀,这样在设备上就会有很多困难;采用后一种方法,也是我们在过去所采用的,但由于用量很大,价格也頗貴,增加了生产的成本,而且用明矾沉淀藻类后的上层清液,再利用它来培养藻类并不很适合。因此,就有必要进一步地探索新的好的而又快又省的方法,使培养的藻类能够很好的沉淀以解决收获問題。这是进行本試驗的主要目的。

一、試驗材料和方法

我們的試驗材料是开放式大量(300立升)培养的斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*(Turp.) Kütz.)。試驗时,取生长較佳而又均匀分布的藻类培养液,在实验室中盛入一系列的容量1.5升或5升的长形方玻璃缸中,经过用各种化学药品或原料进行处理后,观察培养的藻类的羣聚变化情况、沉淀的速度、以及沉淀的完全度来比較各种处理方法的效果。

* 1959年10月12日收到。

用来作为沉淀剂的化学藥品或原料有：盐酸、氫氧化鈉、氫氧化鉀、食盐、明矾和生石灰。直接投放或溶成水液后加入藻类培养液中。

藻类羣聚变化情况主要是依靠肉眼观察，沉淀的完全度是依靠肉眼观察和利用自制的藻类生长浓度光电比色計測定其上层清液的浓度来确定。

二、試驗結果

(一) 应用酸和硷作为沉淀剂的結果

最初采用盐酸和氯化鈉处理培养的柵藻，并以明矾处理的作为对照。

用 5、10、20、30 和 40 ppm 的盐酸来处理培养的柵藻，結果是各种浓度的盐酸都可使藻类沉淀，其沉淀的量是随盐酸的浓度而递增。用 20—40 ppm 的盐酸处理的藻类，在 3—4 小时以后变黄，同时，在 24 小时以后，用 40 ppm 盐酸的細胞体积有显著的减小；用 10 ppm 的没有什么变化。用上述浓度要使柵藻沉淀比較良好，但需要的时间較长，約在 24 小时以上。因此，为了进一步了解盐酸的效果，我們用明矾和氯化鈉作为比較，进行观察。所有藥品均配成原液加入培养液中：盐酸用 0.1% 原液，采用 6、8、10 和 15 ppm 四种浓度的处理；氯化鈉用 10% 原液，采用 500、1000、1500、5000 和 10000 ppm 五种处理；明矾用 10% 原液，用 100、200、300 和 500 ppm 四种处理。

用盐酸处理 1 小时 15 分钟以后，除 15 ppm 的稍有沉淀外，其余的没有什么变化；4 小时 15 分钟以后，除 15 ppm 的沉淀稍多外，其他无甚变化，但柵藻顏色均变黄，30 小时以后，除 6 ppm 外，全部沉淀，顏色变黄。用氯化鈉处理的沉淀速度很慢，浓度高的稍好些；有些一直到 30 小时以后用量达到 1000 ppm 以上的才全部沉淀。在用 500 ppm 的明矾处理的，經 1 小时 15 分钟后，已大量沉淀；4 小时 15 分后，用量为 300 ppm 以上的已全部沉淀。从这个結果可以看出，用盐酸作为沉淀剂的效果并不很好，不独沉淀时间长，而且藻类顏色变黄。氯化鈉的效果还不如盐酸、明矾的效果最佳，用量为 300—500 ppm 时即沉淀良好。

我們也采用了硷性藥物来处理。我們用 200、300、400 和 500 ppm 四种浓度的氫氧化鉀和 100—300 ppm 的氫氧化鈉处理，結果并不很好。虽能沉淀，但很慢。

根据以上的情况，用酸和硷处理，虽然也有一些效果，但由于沉淀速度慢，顏色又易变黄，酸硷价格高，成本貴，不适于作为沉淀剂之用。尤其是在大規模培养物的沉淀中，需用很多的硷或酸，大大地增高了成本。

(二) 应用石灰水作为沉淀剂的試驗結果

根据利用明矾作为柵藻的沉淀剂有显著的作用，同时加酸和加硷也有一定的效果，因此，便考虑到是否可以应用容易取得而成本又低的其他沉淀剂来进行試驗。石灰是硷性的，其水溶液中帶有 $\text{Ca}^{++} \cdot 2\text{OH}^-$ 的离子。 Ca^{++} 和 Al^{+++} 同样的可以促使胶状物质发生沉淀作用，而且 Ca^{++} 能使細胞壁质发生硬化，以改变其渗透性，而 OH^- 又可以使細胞外物质发生水解作用。因此便进行了石灰水对柵藻是否具有沉淀作用的試驗。

我們用生石灰或熟石灰泡水，取出上层的饱和清溶液作为原液使用。在試驗时，在培养的藻类液中加入各种不同分量的饱和石灰水，来观察它对藻类沉淀的效果。初步試驗結果証明：应用石灰水作为沉淀剂是可以促使培养的柵藻沉淀(表 1)。

表 1 加入不同分量的饱和石灰水后, pH 的变化和栅藻的沉淀速度
(石灰水用量以 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 量计算, 沉淀速度以单位时间内的沉淀度(%)计算)

饱和石灰水用量 (ppm)	2 小 时		4 小 时		6 小 时		8 小 时		12 小 时		24 小 时	
	pH	沉淀度(%)	pH	沉淀度(%)	pH	沉淀度(%)	pH	沉淀度(%)	pH	沉淀度(%)	pH	沉淀度(%)
36	8.5	6.5	8.4	19.2	8.4	32.6	8.4	34.1	8.5	36.6	8.4	54.1
48	8.5	19.2	8.5	36.5	8.5	36.5	8.5	44.6	8.6	44.6	8.4	58.5
54	8.5	19.2	8.5	39.2	8.5	36.5	8.5	48.8	8.6	52.6	8.5	61.7
60	8.6	32.6	8.5	39.2	8.5	49.6	8.5	52.6	8.6	61.7	8.6	64.6
72	8.7	32.6	8.7	46.9	8.7	52.6	8.6	55.3	8.6	36.0	8.7	68.7
84	8.8	40.7	8.8	51.0	8.8	52.3	8.7	57.4	8.7	66.6	8.7	76.4
96	8.9	40.7	8.8	52.3	8.8	57.4	8.7	59.1	8.7	68.6	8.8	83.3
对照	7.9	—	7.9	7.8	7.9	7.8	7.9	14.3	7.9	23.8	7.9	40.0

由表 1 可以看出, 每升培养液中加入 60 毫升(即 72 ppm)以上饱和石灰水时, 在 6 小时后, 便有一半以上的藻类沉淀。它的沉淀过程是这样的: 在加入石灰水后 4 分钟, 培养的藻类即开始团聚, 出现絮状的藻类团块, 它们逐渐增多后开始下沉, 加入的石灰水的量愈大则团聚愈速, 下沉的数量也愈多。通过多次试验之后, 得到在 1 升培养液中加入 60 毫升饱和石灰水作为沉淀剂的效果最佳, 即在几百升以至 6400 升的培养液中加入 6% 的饱和石灰水, 在 2—4 小时内亦全部沉淀。虽然再增加石灰水的用量, 还可以促使沉淀加速, 但增加了培养液中钙的含量, 这对培养来说是不利的。

为了比较石灰水和明矾对沉淀作用的效果我们也做了对比试验, 结果如表 2。由表 2 可以看出石灰水的效果和明矾是一样的。

表 2 明矾和饱和石灰水对栅藻沉淀的速度比较

剂药及用量	观测时间	沉淀度(%)	沉淀度(%)	沉淀度(%)	沉淀度(%)
0.03% 的明矾	1—5分钟	0	0	开始沉淀	开始沉淀
	2 小 时	80	80	80	100
	3 小 时	100	100	100	100
6% 的饱 和石灰水	1—5分钟	开始沉淀	0	开始沉淀	开始沉淀
	2 小 时	80	80	80	80
	3 小 时	100	100	100	100

(三) 不同条件下, 石灰水所起的促进沉淀作用。

在试验过程中, 我们发现由于藻类生长状况的不同、光线强弱和温度高低的差异以及容器的形状不同, 对沉淀速度都有一定的影响。

1. 培养时间的长短和藻类浓度对沉淀度的关系——健康地繁殖着的新培养的栅藻, 加石灰水后沉淀很快, 一般都在 2 小时以内全部沉淀。在长时间培养的老细胞较多的栅藻培养液, 加入石灰水后, 沉淀速度很慢, 有时在 24 小时以后还是不沉淀。这很可能是由于培养液中胶质增加或其他有机物质的含量增加的原故。因此, 我们选择了不同的培养盆中的栅藻进行处理, 其结果如表 3。

从表 3 中可以看出, 有机物的含量大小和沉淀的完全度是成反比的。

表 3 培养液中有有机物含量和加石灰水后的沉淀速度(以%计)的关系

有机物 O ₂ mg/l.	3 分 钟	15 分 钟	30 分 钟	60 分 钟
10.7	大量絮状沉淀	46.6	71.3	76.1
19.72	没有沉淀	18.1	50.1	63.3
13.7	大量絮状沉淀	69.0	77.7	91.1
13.4	少量絮状沉淀	61.0	83.2	100

2. 光线、温度和沉淀速度的关系——以同样的栅藻培养液, 同样加入 6% 的饱和石灰水液, 在室内分别用 300 瓦钨丝灯的强光照、置于黑暗中和加温至 30—40℃ 三种不同的处理, 并以在室温(20℃)和自然光下的作为对照, 其结果如表 4。

表 4 用饱和石灰水沉淀栅藻时, 光和温度对沉淀速度(以%计)的影响

处理方法	2—3分钟	15 分 钟	120 分钟	备 注
暗	稍 有 沉 淀	48.61 48.61	92.7 93.1	用纸包住, 使不见光
光	有大量沉淀	68.7 69.6	89.7 89.7	300W. 钨丝灯一支, 进行光照
加 温	有大量沉淀	80.7 74.1	100 100	加温至 30—40℃
对 照	稍 有 沉 淀	54.0 60.3	100 100	温度 20℃ 室内自然光

加温的和在自然条件下的, 加石灰水后 2 小时, 其沉淀度为 100%, 而在黑暗中或加光照的都稍差些。

3. 不同容器对沉淀速度的影响——根据沉淀是一种向下聚集过程的想法, 我们用各种不同式样的容器, 盛入等量的同样的藻种来观察加石灰水后藻类的沉淀情况, 结果如表 5。

容器的不同和沉淀速度有一定的关系。盛在大漏斗中的栅藻, 沉淀的速度最快, 加石

表 5 沉淀的容器和栅藻沉淀速度(以%计)的关系

处理容器	2—3分钟	15 分 钟	120 分钟	备 注
方 缸	稍 有 沉 淀	54.3 60.3	100 100	宽 × 长 × 高 7 × 11.5 × 20 厘米
漏 斗	大 量 沉 淀	72.3 72.3	100 100	20 厘米直径
标 本 瓶	少 量 沉 淀	60.5 59.4	66.1 72.3	直径 6 厘米, 高 45 厘米
浅 盆	无 法 目 测	62.1 66.1	100 100	宽 30, 长 45, 高 3.5 厘米
瓦 缸	少 量 沉 淀	71.0 71.0	100 100	直径 30 厘米, 高 20 厘米

灰水后 2—3 分钟即大量沉淀,此后又逐渐减少。在玻璃缸和瓦钵中的都在 2 小时全部沉淀。在高 45 厘米的标本瓶中的栅藻, 2 小时仅沉淀 60—70%。水深和沉淀速度虽有关系,但从仅高 3.5 厘米的浅盆与高 20 厘米的方玻璃缸和瓦缸在 3 分钟之内的沉淀率基本相同的情况来看,似乎也不完全如此。这种情况有必要作进一步的探讨。

4. 加石灰水和直接加石灰对沉淀的效果不同——最初,我们为了简化使用手续,希望

表 6 石灰与饱和石灰水对栅藻沉淀作用的比较

处 理	2 分 钟	60 分 钟
6% 石 灰 水	大 量 沉 淀	100%
6% 熟 石 灰	没 有 沉 淀	10.6%
7.2% 生石灰	没 有 沉 淀	10.6%

能直接在培养液中加入石灰,促使沉淀。但出乎意料之外,效果和加含石灰量相等的石灰水大不相同(表 6)。加饱和石灰水后,藻类沉淀良好,而直接加石灰的,不论是生石灰抑是熟石灰,基本上都不起作用。

三、讨 论

在藻类的生产性培养中,如何收获是一个重大的问题。通过试验,我们可以得出结论:加入相当于培养液量 6% (即一升水中加 60 毫升)的饱和石灰水溶液,可以使藻类沉淀,其效果和加入 0.03% 的明矾的作用相同。

石灰是一种来源广、价格廉的原料,虽然在沉淀作用的效果上和明矾相似,但从经济意义上来说就大得多了。根据我们的试验结果,用石灰处理过的上层清液分离出来后,还可以用来继续培养藻类,其增长率为 130—350% 而对照的为 69—170%。

从前面叙述的实验中,我们可以看出应用石灰水来促使培养的藻类沉淀,是受到许多因素的影响的。

首先,藻类培养时间的长短不同,对石灰水的沉淀作用就有很大的影响。许多单细胞藻类,在细胞壁外面都有一层或薄或厚的胶质,它是一种在细胞代谢过程中不断地由体内分泌或分解出来的物质。这种胶质大半都是果胶质,它可以逐渐地溶解于水中。因此,培养时间越长,也就会使培养液中的有机物质逐渐增加^[2]。在藻类生长过程中,除了细胞外的胶质以外,也还有其他的有机物质,如蛋白质或有机酸一类的东西(有些是具有抗生作用的)^[3],释放出来,这也会使溶液中的有机物增加。因此,培养时间太长、浓度太高的培养物,在沉淀处理时就会碰到一些困难。在这种情况下增加石灰水用量或将培养溶液稀释后再处理,也常可得到良好的效果。

外界环境因素,如温度、光线和沉淀容器等,对沉淀率也有一定的影响。温度和光线应当是和石灰水促使沉淀的反应过程有关。依照 Van't Hoff 的原理,温度提高后要加速反应。光线加强后却常得到相反的效果——这是由于细胞在光或暗中的代谢产物有所改变的原故,而使细胞浮在水面或沉在水底。

从加强酸或硷促使栅藻沉淀的情况来看,酸起的作用主要是细胞内含物受到影响而使藻类的颜色变黄,同时,也使细胞外的物质加以水解,因而促使沉淀。但这些过程一般是进行得较慢的。加硷(NaOH 或 KOH)以后所起的沉淀作用亦不大。这说明 OH⁻ 离子虽有一定影响,但不是主要的促使沉淀的因素。

在栅藻大量培养中,我们采用饱和石灰水作为培养物的沉淀剂,得到了良好的效果,

究竟石灰水对柵藻沉淀的机制是怎样呢? 这一方面还需要繼續深入研究。

石灰 (CaO) 在水中溶解度不高, 只有 0.12%, 它溶在水中以后, 应成为氫氧化鈣 $\text{CaO} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Ca}(\text{OH})_2$, 而且成为离子状态, 即 $\text{Ca}^{++} \cdot 2\text{OH}^-$ 。因此, 我們就可以設想, 在促使柵藻沉淀过程中, 可能是 Ca^{++} 或 OH^- 起了作用, 改变了柵藻原来所具备的浮游的特性; 或者是 Ca^{++} 和 OH^- 同时起作用。

将硷 (KOH 或 NaOH) 加入柵藻培养物中后所起的沉淀作用很慢, 作用也很低。这說明 OH^- 离子虽然是要起一定的作用, 但决不是唯一的或主要的作用。在加入石灰水以后, pH 的变化也不是很大。然而, 如果我們不加入飽和的石灰水而直接加入生石灰或熟石灰, 經過很長的时间还是看不見柵藻发生絮状的团聚, 不起沉淀作用。这說明, 鈣量的增加并不是促使沉淀作用的唯一原因或主要原因。因此, 很可能是 Ca^{++} 和 OH^- 同时起了作用, 才使柵藻培养物发生沉淀。

由于加飽和石灰水所起的促进沉淀作用的效果很好, 而直接加入相当分量的石灰則不起作用或作用很微来看, 可能是把离子状态的 Ca^{++} 和 OH^- 加入溶液中后, 直接就发生了作用。如将石灰 (CaO) 加到溶液中后; 由于培养液中原来含有大量的其他盐类, Ca 或 OH 和其他阴离子或阳离子結合成为不溶性的物質, 如在培养液的組成中有大量的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 MgSO_4 , 也就是說有大量的 SO_4^{--} 存在, CaO 加入后还没有完成促进沉淀的作用, Ca 即和 SO_4 結合而成为不溶性的 CaSO_4 ; 同时, 由于在溶液中也有大量的过磷酸鈣 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O} + 2(\text{CaSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O})$, 直接加入石灰后, 也会成为 $\text{Ca}(\text{PO}_4)_2$ 这不易溶解的化合物。因此 Ca 能起的作用就降低了。加入石灰水, 即以 Ca^{++} 和 2OH^- 离子状态加到培养物中, 遂即时与柵藻外的胶质起作用, 因此在 2—3 分鐘后, 即开始有絮状柵藻羣聚发生, 使藻类的胶质凝結, 体积縮小, 比重增加, 破坏了原来的浮游的平衡状态而发生沉淀。当温度增加时, 其所起的作用也相应的加速。在培养时间較长的老培养物中, 由于老細胞的内含物有所改变, 尤其是在长時間沒有充足的氮肥, 在低氮培养中使細胞內的油脂含量增加^[5], 或部分細胞衰老而瀕于死亡, 会使加石灰水后的沉淀效果降低。同时, 因为柵藻体外的胶质增加, 水中亦存在一定数量的胶质或其他可溶性有机物質, 加入的石灰水不能使胶质完全起作用, 因此沉淀效果就不佳; 适当地增加飽和石灰水, 或先将培养物稀釋, 相对地增加了加入石灰水量, 能够使藻类沉淀, 也正說明了这一点。

假定柵藻的培养物为疏水性胶溶液, 为微硷性的, pH 8—9 之間, 即帶有相当量的 OH^- , 因此应为带負电的。在加入带正电的 Al^{+++} 和 Ca^{++} 及本身的水解物 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 和 $\text{Ca}(\text{OH})_2$, 均可促使带負电的柵藻培养物沉淀。一般來說, 电解质对胶溶液的破坏的效力随离子价而增加 (Schulze-Hardy 法則)^[1]。因此 Al^{+++} 的效果会比 Ca^{++} 佳, 就实际上也表明有时候用 Ca^{++} 不能沉淀的培养物, 用 Al^{+++} 的效果較佳, 而且加入 Al^{+++} 或 Ca^{++} 均呈絮状沉淀的 (这种假設是否正确还有待实验的証明)。

用飽和的石灰水作为大量培养柵藻的沉淀剂虽然目前在沉淀机制方面还是不够了解, 但在实用上是解决了目前大量培养中收获上的一个主要困难。使我們得到既合乎生产性的培养的經濟原則, 又能达到沉淀良好的要求。

容器的不同使沉淀速度有所差异, 主要是由于那一种容器的式样更利于沉淀物和积聚的問題。

四、結 論

在大量培养单細胞綠藻中,收获問題在目前还是一个很重要而尚未能很好解决的問題。我們采用了酸和礆及明矾、石灰、饱和石灰水等作为沉淀剂进行試驗,发现酸与礆在浓度低时不起作用,在浓度高时細胞内含物将受到一定程度的破坏,使顏色变黄,而沉淀速度还是很緩慢的。明矾用量是 0.03—0.05%,效果最好;在培养物中加入 6% 的饱和石灰水后,約 2 小时即可促使藻类全部沉淀。直接加入石灰却得不到同样的效果。沉淀用的容器的不同,对沉淀物的积聚也有一定的影响。

石灰水促使培养的栅藻、小球藻沉淀的原因,我們初步认为是由于石灰水中呈离子状态的 Ca^{++} 对带負电荷的胶态的培养物以及溶解水中的胶质起了沉淀作用。同时鈣对藻类的細胞膜也发生硬化作用而改变了它的渗透,引起細胞内的变化。

我們认为在大量培养单細胞綠藻(栅藻和小球藻)中,采用加 6% 的饱和石灰水来沉淀藻类,进行收获,是既有效而又經濟的办法。

参 考 文 献

- [1] Burlew, J. S. (ed.) 1953. Algal culture from laboratory to pilot plant, in Carnegie institution of Washington Publication 600. pp. 1—357.
- [2] Prat, R. 1942. Studies on *Chlorella vulgaris*. V. Some properties of the growth inhibitor formed by *Chlorella* cells. *Amer. Jour. Bot.*, 29: 142—148.
- [3] Prat, R. et al. 1944. Chlorellin, an antibacterial substance from *Chlorella*. *Science*, 99: 351—352.
- [4] 板村 澈, 1954. 植物生理学, 上卷。
- [5] Witsch, H. von and R. Harder, 1953. Stoffproduktion durch Gruenalgen und Diatomeen in Massenkultur in Carnegie institution of Washington publication 600, pp. 154—165.

THE ARTIFICIAL PRECIPITATION OF UNICELLULAR GREEN ALGAE IN MASS CULTURES

YU MIEN-KUAN, HSIA I-TSENG, LEY SHANG-HAO, LIU KUN-SHAN AND CHU WAI

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica)

SUMMARY

The harvesting of the products in the mass culture of unicellular green algae is one of the most important procedures in their cultivation, but its problems are not yet completely solved.

In the mass culture of *Scenedesmus obliquus* we have tried HCl , KOH , NaOH , $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, CaO , and saturated lime-water ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) as agents for precipitating the algae in cultures. Among these, HCl , KOH and NaOH are not very effective, and after treatment the algae become yellowish and precipitate very slowly. On the other hand, treatment with 0.03—0.05% of alum, or with 6.0% of saturated lime-water, results in the complete precipitation of the algae within 2 hours. It is, however, of considerable interest, that if we add lime directly to the culture medium, no or very little effect is observed. Also, the use of vessels of different shapes for when carrying out these treatments with chemicals, shows some influence on the rate of precipitation of the algae.

Although the mechanisms involved in the precipitation of cultivated algae by saturated lime-water are not completely known, it remains certain that this method is an effective one, and is of practical value in the mass culture of algae and their more efficient harvesting.