

# 云南程海螺旋藻养殖池中污染菌的研究

张加春<sup>1</sup> 张 灼<sup>2</sup> 阮东义<sup>3</sup> 易 琴<sup>1</sup>

(1 云南师范大学生命科学院, 昆明 650092; 2 云南大学生化学院, 昆明 650091;

3 云南施普瑞有限责任公司, 昆明 650106)

**摘要:** 对程海螺旋藻玻璃温室一半封闭跑道式循环培养池中的细菌、真菌进行研究, 结果发现, 细菌总数通常为  $10^4$ — $10^7$  个/ $\text{mL}$ , 并且随培养时间呈一定规律性波动; 养殖藻的报废与细菌总数有一定关系, 与藻种抗逆性关系更大; 经鉴定, 优势菌为奈瑟氏球菌属 (*Neisseria*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、微球菌属 (*Micrococcus*)、肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*)、拟青霉属 (*Paecilomyces*)、曲霉属 (*Aspergillus*)、束丝菌属 (*Ozonium*) 等; 少数菌株能明显抑制或促进螺旋藻生长, 主要是通过其代谢物对藻体产生影响。

**关键词:** 螺旋藻; 污染; 细菌; 真菌

中图分类号: Q949.2 文献标识码: A 文章编号: 1000- 3207(2001)03- 0257- 04

近二十年来, 国内外螺旋藻产业发展迅速, 为世人瞩目, 因其含有丰富的营养成分及多种活性物质, 已被五十多个国家正式批准用于食品或食品添加剂<sup>[1]</sup>。目前, 其规模化生产主要采用开放式培养系统, 使生产过程不可避免地受到其他生物的影响。我国云南程海地区拥有  $45 \times 10^5 \text{ m}^2$  养殖面积, 培养过程中的污染, 直接影响到产品的质量、产量和成本, 严重污染可导致螺旋藻大批量死亡, 整池养殖藻 1—2d 内即可报废。国内外关于螺旋藻的研究, 主要集中在藻种选育、培养基组成及自然条件的影响等, 而有关培养环境中藻体与其他微生物相互作用的研究甚少。实际生产中, 可观察到大量菌丝缠绕藻体而后整池养殖藻报废的现象, 因此, 对生境中微生物与螺旋藻之间的相互关系进行探讨是十分必要而有意义的。两年来, 对养殖池中菌类污染进行研究, 目的是为今后防治污染提供依据, 减少经济损失。

## 1 材料与方法

**1.1 培养基** 细菌培养采用普通牛肉膏蛋白胨培养基, BPA 培养基<sup>[2]</sup> 及有关生理生化培养基; 真菌培养采用查氏培养基, 马铃薯培养基, 促孢培养基, MYPG 培养基<sup>[3]</sup>。

**1.2 采样方法** 在搅拌机开动搅拌 2h 后(上午 10 点), 于水流湍急处, 用无菌空瓶取水深 10cm 处的藻液, 立即进行培养。

收稿日期: 1999- 10- 08; 修订日期: 2000- 07- 20

基金项目: 云南省省院合作计划项目(978006)

作者简介: 张加春(1969—), 女, 云南省文山县人, 壮族; 硕士, 讲师; 现在云南师范大学从事教学与科研

**1.3 反接种培养方法** 将霉菌接种于马铃薯液体培养基中, 28℃培养 72h 后, 取 3mL 菌液+ 3mL 藻种+ 30mL Zarrouk 培养基, 25℃光照培养, 定时镜检、观察; 细菌接种于牛肉膏蛋白胨或 BPA 培养基中, 37℃培养 48h 后, 处理同前。

**1.4 鉴定** 按文献方法鉴定细菌、真菌<sup>[4—6]</sup>

## 2 结果与分析

### 2.1 细菌总数调查

表 1 可看出, 未接藻种的新配制培养液中, 细菌总数一般为 10<sup>4</sup> 个/mL, 少数池子为 10<sup>5</sup> 个/mL, 细菌总数大, 则养殖藻报废率较高; 污染发生初期即藻体刚解体变白时细菌总数最大, 随后有所下降。

表 1 细菌数量变化(个/mL)  
Tab. 1 The variation of bacterial count

池号 Ponds	培养天数 Days of culture				污染发生时间 Time of pollution
	0	1	*	8	
1#	1. 2×10 <sup>5</sup>	2. 6×10 <sup>6</sup>	2. 5×10 <sup>6</sup>	1. 4×10 <sup>5</sup>	第 4d
2#	2. 3×10 <sup>4</sup>	3. 5×10 <sup>5</sup>		2. 5×10 <sup>5</sup>	未污染
3#	7. 0×10 <sup>4</sup>	5. 1×10 <sup>5</sup>		7. 1×10 <sup>5</sup>	未污染
4#	2. 0×10 <sup>4</sup>	4. 8×10 <sup>5</sup>	2. 4×10 <sup>6</sup>	2. 0×10 <sup>5</sup>	第 5d
5#	4. 3×10 <sup>4</sup>	2. 4×10 <sup>5</sup>	3. 1×10 <sup>6</sup>	3. 9×10 <sup>4</sup>	第 3d
6#	6. 4×10 <sup>5</sup>	6. 3×10 <sup>5</sup>	3. 7×10 <sup>6</sup>	1. 9×10 <sup>6</sup>	第 3d

注:“0”指刚用程海水配制、尚未接入藻种的培养液;“\*”污染发生初期即藻体刚发白解体时的细菌总数

1999 年 1—7 月, 对 5 个养殖池进行跟踪检测, 共采样 86 批次, 细菌含量通常为 10<sup>4</sup>—10<sup>6</sup> 个/mL, 并有规律地上下波动, 细菌总数第一次高峰出现在接种后第 5d 或第 10d, 随后每隔 40—50d 左右达到峰值, 其中 11# 池细菌总数较高, 培养 140d 高达 10<sup>7</sup> 个/mL; 所跟踪养殖池藻体生长正常; 5 个养殖池细菌总数平均值, 细菌总数变化具一定规律性。1997 年所跟踪的 6 个养殖池, 细菌总数最大值为 10<sup>6</sup> 个/mL, 67% 的藻池受污染而报废, 空白培养液中细菌含量高则养殖藻污染率较高; 1999 年的 5 个藻池, 尽管细菌总数最高达 10<sup>7</sup> 个/mL, 藻体生长未受影响。两次结果不同, 与所用藻种关系密切, 1997 年所用藻种为 SF<sub>1</sub>, 1999 年为 SF<sub>3</sub>, SF<sub>3</sub> 较前者含有更高的总类胡萝卜素、叶绿素、藻蓝蛋白和粗蛋白, 比前者更能适应程海的生境条件, 具竞争优势, 抗逆性强。

### 2.2 霉菌分离培养

采用稀释平板法分离正常养殖池中的藻液, 除偶有藻团处生长菌丝外, 平板上不易获得菌体; 直接挑取污染池中较大颗粒藻团点置培养, 则成功率较高。通常, 藻体生长良好时, 呈单个均匀分散于藻液中, 无结团现象; 一旦藻体死亡或生长受到不良影响就易结团, 因而, 大颗粒藻团中多为死亡藻体。可见, 正常养殖池中真菌数量极少, 污染池中真菌数量较多, 且主要附着于死亡藻团上, 从死亡藻体摄取营养生长。

### 2.3 优势菌群分布

共纯化鉴定 86 株细菌, 结果见表 2, 数量较多的有奈瑟氏球菌属(*Neisseria*)、葡萄球

菌属(*Staphylococcus*)及肠杆菌科(Enterobacteriaceae)。

表 2 细菌优势菌群统计表  
Tab. 2 The statistics of dominant bacteria

科属 Familia or genus	奈瑟氏球菌属 <i>Neisseria</i>	葡萄球菌属 <i>Staphylococcus</i>	微球菌属 <i>Micrococcus</i>	动胶菌属 <i>Zoogloea</i>	肠杆菌科 Enterobacteriaceae	总数 Total strain count
菌株数 Strain count	35	16	7	4	24	86

真菌菌群统计结果见表 3, 分离到 11 个属的霉菌共 73 株, 优势菌为: 拟青霉属(*Paecilomyces* Bainier) 17 株, 曲霉属(*Aspergillus* Mich. ex Fr.) 14 株; 无孢菌群(Mycelia Sterilia) 15 株, 其中 11 株为束丝菌属(*Ozonium* Lk. ex Fr.), 包括 7 株云南暗色变种。

表 3 真菌菌群统计表  
Tab. 3 The statistics of dominant fungi

属名 Generic name	菌株数 Strain count	属名 Generic name	菌株数 Strain count
拟青霉属 <i>Paecilomyces</i> Bainier	17	小菌核菌属 <i>Sclerotium</i> Tode ex Fr.	4
曲霉属 <i>Aspergillus</i> Mich. ex Fr.	14	青霉属 <i>Penicillium</i> Lk. ex Fr	3
束丝菌属 <i>Ozonium</i> Lk. ex Fr.	11	弯孢属 <i>Curvularia</i>	3
镰孢霉属 <i>Fusarium</i> Lk. ex Fr.	8	头孢霉属 <i>Cephalosporium</i> Cda.	2
须壳孢属 <i>Pyrenophaeta</i> de Not.	5	痂圆孢属 <i>Sphaceloma</i> de Bary	2
地霉属 <i>Geotrichum</i> Lk.	4	总数 Total strain count	73

## 2.4 抗生素及无菌滤液对藻体生长的影响

青霉素、头孢霉素使藻液变白, 藻体结团解体; 庆大霉素使藻体结团, 但形态正常, 未导致解体; 小诺霉素对藻体基本无影响。1998 年 6 月污染池中的藻液经细菌过滤器除菌, 无菌滤液使螺旋藻解体变白, 说明该样品中含有某些能杀死藻体的次生代谢物或病毒等。

## 2.5 反接种实验

挑取优势菌少许菌体接入螺旋藻培养瓶中, 藻体(SF<sub>1</sub>)生长正常, 菌体未表现生长; 接入菌液(含有菌体及代谢物), 少数菌株能明显抑制或促进藻体生长。可见, 实验菌株于新鲜藻液中不能生长, 不能通过机械损伤或寄生等导致藻体大批量死亡, 主要是通过其代谢产物抑制或杀死藻体, 乃腐生菌或弱寄生菌。

螺旋藻污染发生机制较复杂, 与培养基成分、光照、温度、pH 值及藻种抗逆性等密切相关, 由于培养条件、采藻机械损伤及其他病原生物等原因引起部分藻体死亡后, 培养液中有机质增多, 利于菌类生长繁殖, 结果对螺旋藻产生以下不良影响(1) 菌类代谢物直接对藻体造成损害;(2) 菌丝缠绕藻体使结团, 加速藻体死亡;(3) 死亡藻团被分解, 增加培养液的色度、浊度、BOD<sub>5</sub> 等, 不利于藻体生长;(4) 死亡而尚未完全解体的藻群体和泥沙、不溶性结晶盐结合形成的颗粒物通过采收系统进入藻泥, 极大地增加了藻粉的灰分含量;(5) 污染菌体进入藻泥, 影响藻粉质量。可见, 螺旋藻养殖中的污染问题不容忽视。选育

优良藻种, 控制培养条件, 使藻体处于最佳生长状态, 是预防污染的重要环节; 其次要注意水源、培养池、管道及周围环境的卫生条件。

### 参考文献:

- [1] 陈 峰. 微藻生物技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999. 114
- [2] 任欣正. 植物病原细菌的分类和鉴定[M]. 北京: 中国农业出版社, 1994. 53
- [3] 陈天寿. 微生物培养基的制造与应用[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995. 496
- [4] R. E. 布坎南等. 伯杰细菌鉴定手册(第八版)[M]. 北京: 科学出版社, 1984
- [5] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979
- [6] H. L. 巴尼特. 半知菌属图解[M]. 北京: 科学出版社, 1977

## THE STUDY OF BACTERIA AND FUNGI IN CULTURE PONDS OF SPIRULINA IN CHENGHAI FACTORY

ZHANG Jia-chun<sup>1</sup>, ZHANG Zhuo<sup>2</sup>, RUAN Dong-yi<sup>3</sup> and YI Qin<sup>1</sup>

(1 Institute of Life Science, Yunnan Normal University, Kunming 650092; 2 Institute of Biochemistry, Yunnan University, 650091, Kunming; 3 Yunnan Spirin Co., LTD., Kunming 650106)

**Abstract:** In this paper, we study bacteria and fungi in the *spirulina* culture ponds in Chenghai factory. The results showed that the enumeration of total bacteria is  $10^4$ — $10^7$ /mL, the enumeration curve showed certain regularity with the culture time. The death of *spirulina* had major relation to the resistance of spirulina species and certain relation to the total bacteria enumeration. The dominant bacteria and fungi were *Neisseria*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, Enterobacteriaceae, *Paecilomyces*, *Aspergillus* and *Ozonium*. A few strains obviously inhibited or promoted the growth of *spirulina* chiefly through their metabolite.

**Key words:** *Spirulina*; Pollution; Bacterium; Fungus