

综述

固氮蓝藻培养和应用的结果与展望

沈银武 黎尚豪

(中国科学院水生生物研究所, 武汉, 430072)

CULTIVIGATION AND APPLICATION OF THE NITROGEN-FIXING BLUE-GREEN ALGAE, RESULTS AND PROSPECTS

Shen Yinwu and Li Shanghao

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan 430072)

关键词 固氮蓝藻, 应用, 展望

Key words The nitrogen-fixing of blue-green algae, Application, Prospects

固氮蓝藻是一类低等原核植物。它能进行固氮作用, 固定空气中分子态氮成为氮素化合物; 又能进行光合作用, 将二氧化碳变为碳素化合物并放出氧气, 为自身的固氮提供能源和还原剂。由于具有以上功能, 它们适应性很强往往是贫瘠土壤的先驱植物, 因此, 很早就引起了人们的重视。早在 1889 年 Frank 首先发现生长着蓝藻的土壤在光照下, 氮化合物的含量有所增加; 1901 年 Beijerinck 发现在仅有一点土壤的缺氮水中的小链鱼腥藻 (*Anabaena catenula*) 生长得非常旺盛。直到 1914 年 Pringsheim 研究出了藻类纯培养方法, 为确定蓝藻能否固氮提供了论据。经过不少人的试验, 终于在 1928 年 Drewes 首次分离出了两种固氮蓝藻, 即点状念珠藻 (*Nostoc punctiforme*) 和多变鱼腥藻 (*A. variabilis*)。其后许多工作相继证实了蓝藻中有很多具有固氮能力的种类, 尤其是具有异形胞的丝状蓝藻^[1]。1939 年 De 报道了固氮蓝藻在印度水稻田中繁殖, 提供氮肥, 在不施肥的情况下, 可使水稻连年保持较高的产量^[2], 引起了许多科学工作者对蓝藻作为肥源的兴趣。随后在美国、日本、印度、英国、苏联、埃及、意大利、菲律宾等十多个国家开展了研究。通过盆栽、小区和大田试验证明, 在水稻田中接种固氮蓝藻可提供氮肥, 培肥土壤, 使稻谷增产 15—30%^[3]。

我国对固氮蓝藻的研究虽在 50 年代才开始, 但在长期农业生产经验积累中, 劳动人民对利用天然的固氮蓝藻也有宝贵经验, 如四川一些地区, 在冬水田休耕时投放竹枝、树根, 使蓝藻繁殖, 从蓝藻繁殖的数量来预测下年的丰收。在湖南西部有些地区的冬水田中由蓝藻生长的颜色和数量来估计田的肥力和应施何种肥料; 又如湖北鹤峰在早春季节的

稻田中生长着葛仙米(一种念珠藻属的固氮蓝藻),当地农民作为食品已有悠久的历史。但是这些宝贵的经验没有很好地总结和加以重视。直到1956年,中国科学院水生生物研究所开始开展蓝藻的培养工作。1958年,黎尚豪带领一批人首先在我国开展了固氮蓝藻作为水稻肥源的研究^[4-6],通过多年实验室和田间研究,突破了两大难关,即如何获得水稻田间接种所需的大量藻种和如何使藻种在稻田中快速繁殖,起到肥效。于1976—1979年在湖北省十多个县30多万亩稻田中成功地放养了固氮蓝藻,使稻谷增产10%以上,高达30%^[7,8]。这一技术在我国南方地区的广东、广西、江苏、湖南、江西和上海等省市进行了推广试验。随后,水生生物研究所又开展了稻田蓝藻种群的生态学研究^[9],从固氮蓝藻中提取促长物质,促进作物增长的研究和利用固氮蓝藻作为家禽和鱼类的饲料研究^[10-12]。这些研究都获得了良好的效益。

固氮蓝藻适合于在18—38℃(最适28—35℃)温度条件下生长,广泛分布在热带和亚热带地区。目前已知有33属153种有固氮作用。主要种类多数属鱼腥藻属(*Anabaena*)、念珠藻属(*Nostoc*)、筒胞藻属(*Cylindrospermum*)、单歧藻属(*Tolyphothrix*)、双歧藻属(*Sytonema*)、眉藻属(*Calothrix*)、管链藻属(*Aulosira*)、胶刺藻属(*Gloeotrichia*)、织线藻属(*Plectonema*)和植生藻属(*Richelia*)等具异形胞种类^[3,13-15]。在我国已测定有固氮能力的蓝藻有20余种,广泛分布稻田中。目前我国人工培养并在稻田中增殖效果好的是鱼腥藻属的种类。固氮蓝藻是一种极好的天然资源,开展研究和应用这一资源是有重要意义的。

培养技术

微型生物利用的关键问题是在于如何通过人工培养的方法以获得大量的生物产量。固氮蓝藻的利用问题也是如此,如何获得优良品种,如何获得足够的藻种和如何大量增殖加以利用,是首先要解决的问题。在国外采用的多种的大量培养的方式是:(1)加搅拌罐式培养(Stirring tang culture);(2)密封式循环系统(Closed circulation culture system);(3)开放式通气培养(Open bubbling culture system);(4)二重目的的开放式循环培养(Dual purpose open circulating culture system)和(5)在潮湿的火山砂砾上培养(Culturing on moist volcanic gravels)^[3]。水生生物研究所通过多年的探索,提出了成套培养技术,现简介如下:

1. 藻种培养

(1)原种培养 用试管培养。常用的固氮蓝藻培养基很多,作者主要采用水生“111”和水生“105”无氮培养基^[7]。为了降低成本,节省能源和便于推广,作者还采用了下列方式扩大培养。

(2)一级藻种培养 采用水生“111”和水生“105”无氮培养液,在室内用三角瓶培养,用30—40W日光灯照光,温度控制在28—35℃,或者在光照培养箱中培养。

(3)二级藻种培养 采用室外小池培养。做成长2—5m,宽1m的小池,用塑料膜垫底,灌水8—10cm深,每平方米施农用磷肥和草木灰各15g,1%钼酸溶液25ml;接种50—100g鲜藻或5g干藻粉。为了保温防雨,池上面用塑料薄膜覆盖。一般3—5d可以长满全池,藻生长好后,收获2/3的鲜藻作为大量培养生产的藻种或者干燥后备用;留下的1/3,

打散后继续培养，并补施肥料，1—2d 后又可采收。同时要注意不断筛选生长优良的藻作为扩大用藻种。

2. 藻种的大量生产

利用大面积小池(水泥浅池，土池或塑料薄膜小池)进行大量生产。也可利用各种有空的或茬口农田进行开放式大规模生产(Large scale production)。这种方法是把地整平，保持水深 10cm，每百平方米施农用磷肥 1.5Kg，钾肥 0.75Kg，或草木灰 1.5Kg；接种鲜藻 7.5kg 或干藻 0.5Kg 左右。如遇上大雨，一般 3—5 天可长满全田，每百平方米可采收鲜藻 75—100Kg。收获的藻可直接接种到稻田进行繁殖，作为水稻生物肥源，也可干燥后备用。

3. 塑料大棚工厂化生产

利用塑料大棚工厂化生产固氮蓝藻具有避免不利环境条件(如低温、降雨等)的影响，延长培养时期，提高藻种纯度和产量等优点。培养方法与藻类大量生产相同。培养鱼腥藻在长江中游地区 5—6 月和 9—10 月一般 2—3d 可收获一次，生物量生产率平均为 6g(干重)/m⁻². d⁻¹；7—8 月光照、气温适宜，一般每天可采收，生物量生产率可高达 22g(干重)/m⁻². d⁻¹。5—10 月份平均生物量生产率为 7—11g(干重)/m⁻². d⁻¹^[16]。生产的固氮蓝藻藻粉可作为商品出售，也可加工成其它产品出售。此外，在冬季低温季节，不适宜蓝藻生长时，可利用闲置设备生产食用菌或蔬菜等，以获得较大的经济效益^[17,18]。

4. 病虫害防治

固氮蓝藻在室外培养过程中有时会出现病虫害危害，影响藻的生长。主要病害为“红圈病”，是由粘细菌和粘球菌引起，出现这种病害时，可用 0.01ppm 硫酸铜防治，也可用代森锌和代森铵等药物防治^[19—21]。主要虫害有摇蚊幼虫(红丝虫)、蝌蚪和田螺等，可用药物防治，减少和避免危害。

5. 干燥保存

大量的作为水稻肥源的固氮蓝藻藻种，既要保存活力，又要便于运输，曾经是一个难于解决的问题。日本渡边笃用长在砂砾上的半干湿方法保存，或用小海绵块附着保存，这种方法体积大，分量重，难于运输^[3]。1958 年，曾继绵等研究了用直接风干或晒干保存，这是一种操作简便，具有较高的萌发力，能保证质量的方法^[22]。干燥好的藻片或藻粉可采用牛皮纸袋或塑料袋包装。放在通风干燥的地方，避免潮湿。

应用结果的回顾

固氮蓝藻能进行光合作用和固氮作用，蛋白质含量高，氨基酸组成较完全，含有丰富的维生素和微量元素以及活性物质。固氮蓝藻的应用基本上也是根据它的特点加以利用的。

1. 利用固氮蓝藻作为水稻肥源

继 1939 年印度 De 对固氮蓝藻为水稻提供肥料的报道后^[2]，美、英等国科学家进行了试验，证明固氮蓝藻具有肥效^[1]；日本渡边笃连续 4 年试验表明，水稻田接种固氮蓝藻可使水稻增产^[23]。随后，利用在稻田放养固氮蓝藻增肥增产的工作在许多国家如日本、印

度、埃及、意大利、美国、菲律宾和以色列都开展起来，他们进行了盆栽、小区或大田试验，一般都获得了培肥土壤，提高产量的效果。

本所在 1956 年开始固氮蓝藻的培养工作。1958 年在湖北开展试验，对早稻、中稻、一季晚稻以及晚稻田间都分别进行了放养固氮蓝藻促进水稻生长的试验^[1,4—6]。在 70 年代，作者根据多年的试验结果，认为在我国亚热带常年气候情况下，根据固氮蓝藻生理、生态特性以及稻田对肥料的需要，集中力量研究了固氮蓝藻作为晚稻肥源的应用问题，进行了 30 万亩晚稻田放养固氮蓝藻示范推广试验，获得增产 10—15% 的结果^[7,8,24,25]。

如何进一步推广应用的问题，首先要解决如何保证大量的作为大田养用的藻种生产和商品化的供应问题。

2. 利用固氮蓝藻作为饲料

微藻有较丰富的营养物质，作为家养动物的饲料试验早就有所报道。如单细胞绿藻中的小球藻和栅藻，蓝藻中的螺旋藻可作为家畜、家禽以及水产品的饲料。但因成本较高，只作为名贵水产品和观赏鱼类的饵料以及人的保健食品。印度亦曾有利用固氮蓝藻作为饲料的报道。

中国科学院水生生物研究所首先提出了以固氮蓝藻中的鱼腥藻作为鸡等的饲料进行试验获得成功^[11]，并在“七·五”攻关项目中进行了 11000 只肉鸡的中试，以鱼腥藻代替配合饲料中的进口鱼粉获得成功。也有报道可代替鱼粉作为鲤鱼、草鱼、罗非鱼的饵料，提高了产量^[12,26]。

3. 利用固氮蓝藻的促长物质

1965 年水生生物研究所在进行水稻秧田施放固氮蓝藻藻种后发现秧苗生长茁壮，叶色翠绿，明显地好于未接种固氮蓝藻的对照小区的秧苗^[24]。根据蓝藻生长状况，固氮能力和秧田底肥中氮肥数量的分析比较，黎尚豪提出了固氮蓝藻含有刺激植物生长的活性物质的假设。通过一系列实验室盆栽试验证实了播种时施放固氮蓝藻或提取液浸种均有明显的效果^[10,24]。80 年代，中国科学院水生生物研究所与中国科学院黑龙江农业现代化研究所合作利用固氮蓝藻提取液浸种和喷雾处理春小麦、玉米、水稻等，通过大面积的田间试验示范成功，获得了提高产量 7—10% 的结果^[10]。水生生物研究所通过一系列工作获得光谱纯的鱼腥藻促长物质，命名为藻促长素(Algaprom)。

印度也报道了坑形席藻(*Phormidium fovelarum*)提取液处理多种作物种子获得增产的试验结果^[27,28]。但未见推广试验。另有报道从筒胞藻(*Cylindrusperum*)中检测到含有吲哚类的植物激素^[29]。

4. 利用固氮蓝藻作为人的食品

天然生长的固氮蓝藻被我国民间长期以来作为副食品的最著名者为发菜，其次为葛仙米和海霉菜等。

(1)发菜 学名为丝状念珠藻(*Nostoc flagelliforme* Born et Flah.)，产于干旱、半干旱地区，在我国产于内蒙、宁夏、甘肃、青海和新疆等地^[30]。它是我国传统食品，尤其是在我国华南因与“发财”谐音，成为人们节日喜庆时乐于购买的商品，在国外华侨华裔亦保留此一传统。迄今发菜还不能进行人工培养，商品来源主要依赖于采收天然生长的发菜。发菜能固氮，营养好，但是价格高、产量低，过量采收使发菜生长的草场受到很大的破坏。开

展发菜的人工养殖研究具有相当大的意义。

(2)葛仙米 学名为拟球形念珠藻(*Nostoc sphaeroids*),产于水田、潮湿土壤、岩石上。关于葛仙米的药用和食用价值及其习性和生态学意义早在我国清代的《本草纲目拾遗》中作了介绍。葛仙米在我国湖北省鹤峰县和房县冬水田间大量繁殖,当地农民捞取漂洗干净晒干后作为副食或商品出售,售价由80s初的每公斤1.0元人民币提高到现在为每公斤160元。葛仙米蛋白质含量较高,氨基酸完全,能固氮,是一种既可作为食品又可做为肥源并有一定经济价值的优良藻类资源,有较大的开发前景。

(3)海霉菜(拉丁文为 *Brachytrichia quoyi* (Ag.) Born. et Flah.)生长在海滨砂石上,沿海群众取作食品,海霉菜分布广,但较分散,是有发展前途的一个藻类资源。

展望应用的前景

根据固氮蓝藻的生物学特点和应用试验的结果,可以看出它是一个很有发展前途的天然资源。当前可从以下几个方面发展。

1. 走工厂化生产的道路,使固氮蓝藻商品化

固氮蓝藻在农、牧、渔业上具有较好的应用效果。但要解决应用上所需要的大量的藻,必须走工厂化生产的道路,使产品商品化,以便推广应用。目前利用塑料大棚工厂化生产固氮蓝藻的方式较为成功,能大规模生产藻,制成干粉,可望成为商品。在长江中游地区,利用塑料大棚在5—10月份藻类生长适宜季节,大规模生产鱼腥藻,平均生物量生产率可达到 $7\text{--}10\text{g(干重)}/\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ ^[16]。如建立塑料大棚面积为10000m²,以五个月生产藻,可年产7—10吨干藻。其余半年时间可生产食用菌或反季节蔬菜供应市场,既有经济效益,又有社会效益^[17,18],适宜在城市郊区或农村乡镇建厂,发展成为一个新型的企业。

2. 作为水稻肥源应用

我国水稻生产肥料供应不足,而且长期施用大量化学肥料,将会影响农田土壤结构,产生不良影响。发展生物肥源,既可培肥土壤,改善土质,达到增产的目的,又不污染环境,对农业生产是有利的。利用固氮蓝藻作为生物肥源不仅可以提高作物产量,而且还可以增加土壤中有机质含量^[7,8],这对农业生产的良性循环和保持生态平衡都有十分重要的意义。近年来,国外对固氮蓝藻作为肥源的工作仍然十分重视,并有所进展。我国通过多年研究试验和在几十万亩水稻田推广示范的结果证明,固氮蓝藻作为水稻肥源是有效果的。但是,近几年由于农业体制的改革,过去那种由一个村(生产队)集中培养藻种放田的方式是难以施行的。如果藻种生产商品化,出售给农户,直接施到田间繁殖,使用方便,固氮蓝藻的应用可望发展起来。目前工厂化生产固氮蓝藻的条件和技术已基本成熟,只要给予重视,这一技术将可很快在我国农村发展起来,并可取得较好的经济效益和社会效益。

3. 藻促长素利用

从固氮蓝藻中提取的藻促长素(Algaporom)处理农作物种子或对幼苗喷雾均可获得壮苗,提高产量的效果^[10]。除了在粮食作物上利用外,还可在蔬菜和经济作物上利用。提取物利用具有用量小,见效快,收益大等优点。目前中国科学院水生生物研究所已将藻促长素提纯,命名为藻促长素,可保存较长时间而不失效,这对应用带来了更大的方便。

4. 高蛋白高营养蓝藻饲料

利用固氮蓝藻代替鱼粉作为家畜家禽饲料和鱼类饵料已被实践证明是可行的^[11,12]。利用固氮蓝藻作为蛋白饲料是我国首创,这不仅可以解决进口鱼粉供应不足的矛盾,而且可以节省外汇。目前国际上利用的高蛋白藻饲料中固氮蓝藻培养方便,生产成本最低。因此,发展固氮蓝藻作为蛋白饲料的前景是可观的。在应用对象方面除了作为一般饲养鱼、鸡等的饲料外,还应向珍贵的名特优水产品饲料方面发展。同时除了利用蛋白质含量较高,营养丰富的鱼腥藻^[16]外,还要开发其它增殖快营养好的种类,扩大藻类资源的利用。

5. 开展蓝藻精细化学品的研究和发展

国内外在开发天然色素方面十分重视。天然色素中的蓝色素来源稀少,但蓝藻中所含的藻蓝蛋白(一种蓝色素)十分丰富,目前已开始从螺旋藻中提取藻蓝蛋白作为食用色素和各种化妆品色素。固氮蓝藻中的蓝色素含量高,有开发价值,而且还可通过筛选、诱变和培养条件(如光质)的改变,进一步提高藻蓝蛋白的含量。

固氮蓝藻中的念珠藻和鱼腥藻等含有大量的脂多糖、磷多糖和蛋白多糖等可以开发利用。双歧藻/中含有双歧藻素(Scytonin)有较强的抑菌作用,可以作为药物开发。总之,固氮蓝藻中含有丰富的值得开发的精细化学品,前景是可观的。

6. 以稻藻为主体的生态农业结构模式

我国人口众多,可耕种面积小,往往想尽一切办法增收粮食,有时甚至造成土地资源利用不合理,生态平衡受到破坏,因此,近年来提出和试验了各种尽量合乎生态学原则的生态农业,提高农业产量和经济收入,改善环境条件,达到较好的效果。通过长期在农村和蓝藻试验基地试验观察,设想可建立一个生态农业模式:以培育固氮蓝藻为主体,利用它在稻田中放养作为肥源,改良土壤,提高水稻产量;以提取的藻促长素处理农作物(如小麦、玉米、棉花、水稻等)促进生长,提高产量;以干或鲜藻和农副产品原料配合成饲料,饲养家畜家禽和鱼类等;畜禽粪便和作物秸秆是沤制沼气的原料,沼气的渣水可作为肥料。气温降低不适宜藻生长时,可利用养藻设备生产食用菌等,菌渣也可作为沼气的原料,沼气产生的CO₂可做作为培养藻类的碳源。蓝藻产品可作为商品直接出售和配成饲料或提取藻促长素和精细化学品出售具有良好的经济效益。因此,以培育固氮蓝藻,促进农、牧、副、鱼发展的生态立体农业结构模式不仅可提高农业产量,增加农业收入,改善环境条件等,还可建成具有一定规模的企业,有相当大的经济和社会效益。

参 考 文 献

- [1] 黎尚豪等。我国的几种固氮蓝藻的固氮作用。水生生物学集刊,1959,(4):427—439。
- [2] De. P. K. the role of blue-green algae in nitrogen fixation in rice-field. Proc. Roy. Soc. London, B. 1939, 127:121—139.
- [3] Venkataraman, G S. Algal biofertilizers and rice cultivation. Today & Tomorrow's Printers & Publishers, New Delhi. 1972.
- [4] 黎尚豪等。固氮蓝藻对水稻肥效的初步研究。水生生物学集刊,1959,(4):440—444。
- [5] 黎尚豪等。固氮蓝藻作为水稻肥源的研究。水生生物学集刊,1962,(1):55—61。
- [6] 叶清泉等。固氮蓝藻的大量培养方法。水生生物学集刊,1959,(4):445—451。
- [7] 黎尚豪等。固氮蓝藻作为晚稻肥源的研究。水生生物学集刊,1981,7(3):417—423。
- [8] 中国科学院水生生物研究所第五研究室藻类实验生态组等。双季晚稻田大面积放养固氮蓝藻试验。水生生物学集刊,1978,6(3):299—310。
- [9] Liu yongding and Li shanghao. Species composition and vertical distribution of blue-green algae in rice field soils, Hubei China. Nova Hedwigia, 1989, 48(1—2):55—67.
- [10] 王少梅等。固氮蓝藻促长物质处理春小麦的研究。水生生物学报,1991,15(2):161—165。
- [11] 中国科学院水生生物研究所等。利用固氮蓝藻作为鸡饲料的研究。科学技术成果研究公报,国家科委出版,1987,75(7):6—7。
- [12] S. H. Li (S. H. Ley) Nitrogen-fixing blue-green algae. In: The Nitrogen Fixation and its Research in China. (eds) Guo-Fan Hong. Springer-Verlag. 1992, 501—524.
- [13] Li S H and Wang Q L. Nitrogen-fixing blue-green algae, a source of biofertilizer. Proc. Joint. China-US Phycology Symp. 1981, 479—496.
- [14] 朱浩然。藻类植物。上海教育出版社,1983,120—1264。
- [15] 沈银武,李尧英。蓝藻植生藻属一新种。植物分类学报,1989,27(2):158—159。
- [16] Qian-lin wang, et al. Studies on mixed mass cultivation of Anabaena spp. (Nitrogen-fixing blue-green algae, Cyanobacteria) on a large scale Bioresource Technology, 1991, 38:221—228.
- [17] 刘永定等。藻类蛋白生产基地的平菇高产轮作研究。中国食用菌,1990,(3):18—19。
- [18] Liu yongding, wang qianlin and Shen yinwu. Biotechnologie in China: Eine neuartige kombinierte proteinproduktion aus Algen und Pilzen. CLB Chemie für Labor und Betrieb, 1989, 40(3):155.
- [19] 李勤生,黎尚豪。溶解固氮蓝藻的细菌。水生生物学集刊,1981,7(3):377—384。
- [20] 王少梅等。硫酸铜强化固氮蓝藻生长的研究。水生生物学报,1991,15(2):161—165。
- [21] 利群等。固氮蓝藻“红圈病”的研究 I,“红圈病”在大面积培养蓝藻中的危害以及防范措施。武汉植物学研究,1991,9(2):101—106。
- [22] 曾继绵等。固氮蓝藻的干燥保存试验。水生生物学集刊,1959,(4):452—455。
- [23] Watanabe, A. Effect of nitrogen-fixing blue-green alga Tolypothrix tenuis on the nitrogenonous fertility of paddy soil and on crop yield of rice plant. J. Gen. Appl. Microbiol. (Tokyo), 1962, 8:85—91.
- [24] 湖北省水生生物研究所藻类室蓝藻应用组。固氮蓝藻对培育水稻壮秧的作用。植物学报,1977,19(2):132—137。
- [25] ——。固氮蓝藻的培养和利用。植物杂志,1977,3:17—18。
- [26] Li shanghao (S. H, Ley). Cultivation and application of microalgae in People's Repubilic of China. In: Algal Biotechnology. (eds) Staler, T. et al. Elesiever Applied Science, Publishers London, 1988, 41—54.
- [27] Kushuaha, A. S and Gupta, A. s. Effect of algal growth promiting substances of *Phormidium foveolarum* on seeding of some varieties of wheat. Hydrobiologia, 1970, 35(2):324—332.

- [28] Gupta, A. B. and Shukla, C. Effect of algal extracts of *Phromidium* species on growth and development of rice seedling. *Hydrobiologia* 1969, **34**(1), 77—84.
- [29] Venkataraman, G. S and Neelantan, S. Effect of the cellular constituents of the nitrogen-fixing blue-green alga *Cylindrospermum nuscicola* on the root growth of rice plants. *J. Gen. appl. Microbiol.*, 1967, **13**:56—61.
- [30] 钱凯先等. 发菜生长条件及其规律分析. *植物生态学与地植物学报*, 1989, **13**(2), 97—105.