

多变鱼腥藻半稳定状态连续 培养的若干特征

刘永定 黎尚豪

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

Ernst, A. Böger, P.

(德意志联邦共和国 Konstanz 大学)

提 要

分别使用恒化装置和全玻璃发酵罐连续培养多变鱼腥藻。在稳定条件下加以周期性的光照 ($L:D = 12:12$), 经 5—6d 得到半稳定状态连续培养物。在光照阶段, 培养物的生物量增长速度约等于稀释速度 D 的两倍, 叶绿素的增长速度略小于 D 的两倍, 糖原的累积速度几乎高出 D^2 的一个数量级。细胞内糖原和蛋白质含量变化的时间过程反映出培养物在光-暗条件下的碳氮物质合成与消耗相互联系的代谢特点。半稳定状态连续培养受培养物内在的生理活性支配, 生长参数的变化符合方程 $X = X_0 e^{(\mu-D)t}$, 但不同于恒浊培养和恒化培养。外界因素的强弱变化只改变生长参数变化的强度。本法适用于研究微藻的生态生理。

关键词 连续培养, 半稳定状态, 多变鱼腥藻, 生态生理, 蓝藻(蓝细菌), 碳氮代谢

在实验室微藻培养技术中, 液体静置培养对于定量地测定藻类对营养的要求来说, 通常是相当方便并且有效的方法。但是, 在研究培养物对能量和营养物质的生理反应方面, 连续培养系统所能提供的恒定状况和稳定的生理状态是静置培养不可能达到的。自 1944 年生物学家 Myers, J. 和物理学家 Clark, L. B. 设计出第一个藻类半连续培养装置以后^[10], 几十年来许多人试制了各种类型, 服务于各种目的的藻类连续培养装置。随着微生物技术的发展和科学技术水平的提高, 藻类连续培养的研究和应用也不断深化。Vonshak, A. (1986)^[14] 等人已就微藻连续培养的理论和应用进展做了述评。运用藻类连续培养技术能准确研究营养浓度与生长速度之间的相互关系, 可以更好地分析藻类对营养和能量变化的适应能力, 可以在严格确定的恒化条件下研究藻类或(与)其它微生物混合培养的各种群的种种关系^[1]。可是, 连续培养系统的恒化或恒浊条件不仅受系统内的生物及其生理状况, 营养物质与 pH、温度等理化因子的影响, 而且由于藻类是光合生物, 在微藻连续培养中, 光能供应和光-暗周期变化也是对培养系统十分重要的条件。本文报道在光-暗周期条件下多变鱼腥藻连续培养物的生长及相应的细胞组分变化规律, 从而说明该种藻半稳定状态连续培养的特征, 并以此提供一种可供选用的研究微藻生态生理的新颖连续培养方法。

材料和方法

多变鱼腥藻 (*Anabaena variabilis* ATCC 29413) 来源于美国模式培养保藏室。本研究全部实验材料都是纯培养。

液体培养基按照 Arnon (1974)^[1] 配方, 或按 Stanier 等 (1971)^[11] 用 BG11 培养基配方。碳源由通气提供; 在 CO₂ 加富时, 通入量占空气的 1% (V/V)。当培养液用于非固氮培养时, 加入氯化铵 (NH₄Cl, 0.01 mol/L, pH 7.0) 使培养基中含氨浓度保持为 0.001—0.002 mol/L。

连续培养使用两种装置。一为美国 New Brunswick 科学器材公司出品的 Microferm, BioFlo model C30 型恒化器, 另一为联邦德国 Konstanz 大学实验工厂与 Kummer (Freiburg) 工厂联合制造的全玻璃发酵罐。前者(图 1)容积 1700ml, 工作容积 1500ml; 以电热棒、触点温度计和冷却水控制温度 30℃ 恒定; 通气流速 82L/h; 旋转式机械搅拌 300r/min; 光源为 Osram 公司出品冷白荧光灯管, 在容器内表面所获光强为 350μE · m⁻² · s⁻¹;

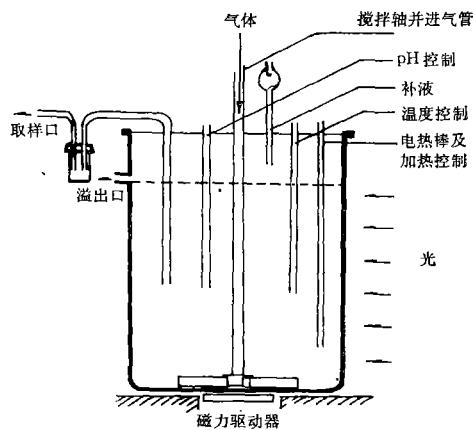


图 1 BioFlo 型连续培养装置简图
Fig. 1 Profile of the device Model BioFlo used for continuous culture

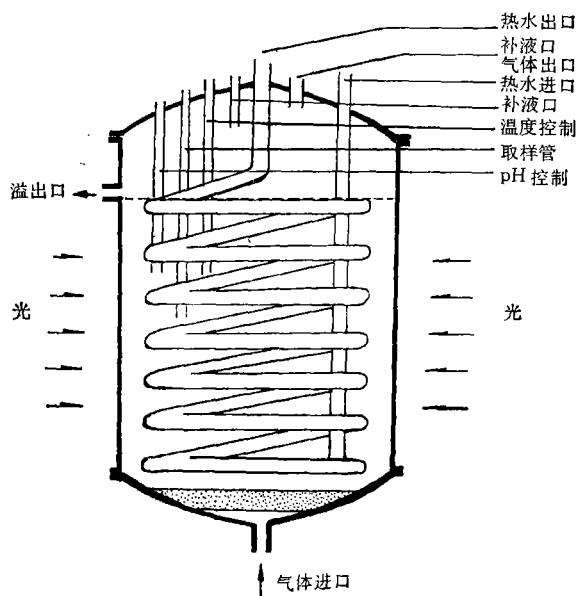


图 2 全玻璃连续培养装置简图
Fig. 2 Profile of whole glass fermentor used for continuous culture

培养基以 47ml/h 的速度 (稀释速度 $D=0.031\text{h}^{-1}$) 经泵连续补给。样品抽取量不超过每 2h 70ml , 其余由溢出口溢出。培养初始时接入指数生长的接种物, 使起始叶绿素含量为 $0.2\mu\text{g/ml}$, 开始连续培养。后者 (图 2) 不仅罐体而且罐盖和罐内的导管都是由玻璃材料制成。容积 1900ml , 工作容积 1700ml ; 以恒温热水流保持培养液的恒定温度 (30°C), 热水流通过罐内螺旋形玻璃热交换管; 通气以 204L/h 的速度通过罐底圆盘形玻璃砂芯进入培养空间, 同时起着搅拌培养液的作用, 不再另加机械搅拌; 光源为 Osram 公司出品的圆圈形 (环式) 冷白荧光灯管两支, 容器内表面所获光强为 $135\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; 新鲜培养液以 48ml/h 的速度 (即稀释速度 $D = 0.028\text{h}^{-1}$) 经泵连续补给。余同前者。光-暗周期为 $12:12\text{h}$ 。

糖原提取和酶法测定^[3]、干重测定^[4]、叶绿素测定^[4]、蛋白质测定^[7, 8]与提取方法^[7]均按已报道的进行。

结 果

1. 指数生长期滞后

连续培养物在控制条件下生长、增殖, 接种后经数天达到稳定的指数生长。在连续光照下, 接种后经 $3\text{--}4\text{d}$ 。而在光暗周期 ($12:12$) 的条件下, 接种后须经 $5\text{--}6\text{d}$ 才能达到指数生长状态。尽管如此, 无论在连续光照还是光暗周期条件下, 藻体在系统内都能最大程度地充分利用所获得的光能和营养, 稳定、连续地保持相同的生长状态和生理活性, 因而, 生长的最终结果是一致的。

2. 理化因子变化只改变生物量周期变化的强度

由于光-暗周期的影响, 培养物的生物量呈现相应的周期变化, 即在周期性的光照时间内生物量增加, 相反, 在周期性的黑暗时间内生物量下降。改变培养基对这样的周期性变化没有决定性的影响, 当改用 BG11 代替 Arnon 培养基时, 这样周期交替的变化是一致的, 培养基的改变只是引起交替变化幅度大小的差异而已。一些单因子的变化, 如光强, CO_2 供应量以及与之相关的通气流量、搅拌速度, 或氮供应条件 (固氮或氨同化) 等变化, 均不改变培养物生物量交替周期, 却不同程度地各自改变变化的强度¹⁾。这说明在连续培养物的指数生长中, 促进或阻抑细胞生长的各种因素达到了相互平衡, 在此基础上, 当平衡的诸种条件中附加以稳定变化的控制作用因素如光-暗周期, 则平衡生长的连续培养物随之呈现相应的稳定变化, 成为半稳定状态连续培养系统。

3. 生物量和若干细胞组分 (叶绿素、糖原、蛋白质等) 在光-暗周期内不同步增减

在半稳定状态下连续培养的多变鱼腥藻, 生物量增长的速度与细胞组分 (其中一些也被用作生长参数) 的增长速度不同 (表 1)。叶绿素在光照时间内以 $\mu_{\text{chl.}} = 0.058\text{h}^{-1}$ 的速度增长, 这一速度略小于稀释速度 D 的两倍; 而在黑暗条件下, 叶绿素合成很少, 但仍为正

1) 刘永定, 1987, 中国科学院水生生物研究所博士学位论文。

值。与此同时,生物量在光照下增长的速度 $\mu_{\text{mass}} = 0.066 \text{ h}^{-1}$, 略等于稀释速度 D 的两倍, 大于叶绿素的增长速度。另外, 光合贮藏产物糖原在光照期间的积累速度是很快的, $\mu_{\text{glyc}} = 0.253 \gg 2D$, 几乎高出稀释速度一个数量级。而培养物一旦转入黑暗, 糖原含量迅速下降, 在 12:12h 光-暗周期条件下, 光照时间内累积的糖原几乎完全在暗中被消耗。进一步的观察说明, 糖原含量的累积(或消耗)并不是匀速的, 开始较快, 而后减慢。培养物细胞的蛋白质含量不仅在光照时间内而且在黑暗时间内也表现正的增长速度, 表明无论在光照下或黑暗中, 细胞内都有蛋白质合成; 不过, 在黑暗时间内蛋白质合成的速度远小于光照时间内的速度。值得注意的是, 在光照时间内蛋白质增长速度 $\mu_{\text{protein}} = 0.042 < \mu_{\text{mass}}$, 也小于 μ_{chl} , 因而, 还观察到在光照期间培养物的蛋白质含量(蛋白质/干重, W/W)下降, 而接着在黑暗时间内, 蛋白质含量上升(图 3)。

由此可见, 半稳定状态连续培养既不同于恒浊培养, 也不同于恒化培养, 后两者细胞及任何细胞组分的增长速度 (μ) 在稳定状态下都等于稀释速度 (D)^[13]。

表 1 半稳定状态连续培养中多变鱼腥藻的生物量和其他生长参数的周期变化速度 (h^{-1} ,¹⁾
 $D = 0.028 \text{ h}^{-1}$, $L:D = 12:12$ 。全玻璃发酵罐)

Tab. 1 The periodic change rates of biomass and other growth parameters in semi-steady state of continuous culture, *A. variabilis*

	生物量 Biomass	叶绿素 Chlorophyll	糖 原 Glycogen	蛋白 质 Protein
光照时间 (L) Light period	0.066	0.058	0.253	0.042
黑暗时间 (D) Dark period	-0.012	0.005	-0.207	0.008

1) h^{-1} 为相对速度, 按下式计算: $\mu = \frac{\ln x - \ln x_0}{t} + D$

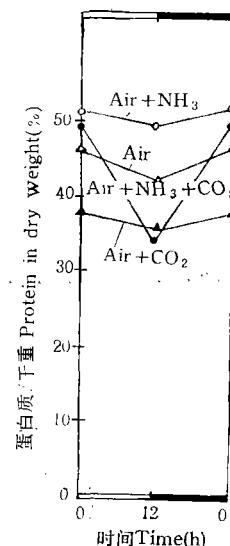


图 3 多变鱼腥藻在半稳定状态连续培养中的蛋白含量的昼夜变化

Fig. 3 Diurnal changes in the protein content of *A. variabilis* in the semi-steady state of continuous culture

●—● ○—○ ▲—▲ △—△ showing different C and/or N supply respectively

4. 半稳定状态培养具有连续运转的实验意义

在培养系统确定的条件下, 多变鱼腥藻的半稳定状态连续培养保持稳定的不间断的运转。连续纯培养可持续一月以上, 作者曾连续维持该系统运转达 50d, 通常为了保证纯培养, 运转的时间以完成试验为度, 不必过长。培养后期可能有污染现象, 须控制细胞数变化在 $\leq 0.5\%$, 生物量 $\ll 0.5\%$, 以不影响半稳定状态生长和进一步的试验研究。

讨 论

半稳定状态是指基于稳定状态生长的连续培养物的周期性变化。就是说，连续培养物达到指数生长时，其生理活性是稳定的，只是随外界某一控制条件(光-暗周期)的周期变化而使培养物的生理过程呈现出相应的周期变化。如表 1 所示，半稳定状态连续培养研究的结果表明，在光-暗周期条件下培养物生物量的增长速度是不同的，各个细胞组分增长速度的大小取决于这些组分在光照或黑暗条件下是否分别连续地合成、积累或消耗。

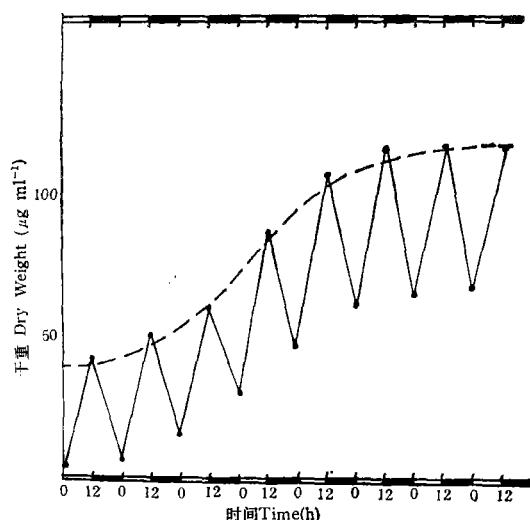


图 4 多变鱼腥藻半稳定状态连续培养的生长曲线
Fig. 4 Growth curve of continuous culture *A. variabilis* in the semi-steady state

但能改变培养物生长参数周期性变化的强度(已如前述)。半稳定状态连续培养能够更确切地了解到培养物的生理活动。作者的实验结果说明培养物的蛋白质含量在光照开始时比在结束时要高，培养物细胞的全氮量与蛋白质含量之比分别为 13% 和 17%，即由全氮计算蛋白质含量的系数分别为 7.69 和 5.88。与此类似，Fontes 等提出了固氮蓝藻培养物在不同生长期的蛋白含量不同：加速生长期 19%，指数生长期 29%，减速生长期 33%^[6]。这些数据可供藻类生物技术特别是藻类蛋白生长中确定和评估培养产物的质量时参考。可以认为，对于藻类生理学和生理生态学的研究来说，半稳定状态连续培养的方法是理想的方法之一。

参 考 文 献

- [1] Arnon, D. I., McSwain, B. D., Tsujimoto, H. and Wada, K., 1974. Photochemical activity and components of membrane preparation from blue-green algae I. *Biochim. Biophys. Acta*, **357**: 231—245.
- [2] Bensadoun, R. A. and Weinstein, D., 1976. Assay of proteins in the presence of interfering material. *Anal. Biochem.* **70**: 241—250.
- [3] Emst, A. and Bochme, H., 1984. Control of Hydrogen-dependent nitrogenase activity by adenylates and

还可看出，一方面培养物从接种开始就按经典的生长曲线增殖，只不过增加了生长参数随能源(光)条件而周期变化的特征，形成两个作用的叠加(图 4)。培养物中无论是生物量的变化，抑或是其他生长参数如细胞叶绿素含量、糖原、全氮、蛋白质的增减变化都符合生长方程的特定表达式 $X = X_{\infty} e^{(\mu - D)t}$ 所表述的关系，说明半稳定状态连续培养中培养物的增殖、生长依然受其内在的生理活性支配，而不由外界因素所左右。在这方面，与其它培养方式所得到的结果是一致的^[1,2]。

另一方面，外界因素的强弱变化虽不改变生长曲线的基本特征，

- electron flow in heterocysts of *Anabaena variabilis*. *Biochim. Biophys. Acta*, **767**: 362—368.
- [4] Fay, P., 1976, Factors influencing dark nitrogen fixation in a blue-green alga. *Appl. Environ. Microbiol.*, **31**: 376—379.
- [5] Fingerhut, U. and Soeder, C. J., 1984. Growth and acetate utilization of *Scenedesmus falcatus* and *Pseudomonas aeruginosa* in axenic and mixed continuous cultures. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.*, **19**: 281—287.
- [6] Fontes, A. C. et al., 1987. Factor affecting the production of biomass by a nitrogen-fixing blue-green alga in outdoor culture. *Biomass*, **13**: 33—43.
- [7] Hinrichs, I., Emst, A. and Böger, P., 1987. Quantitative protein extraction from intact cyanobacteria. *Plant physiol. Biochem.* (in press).
- [8] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J., 1951. Protein measurements with the Folin reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265—275.
- [9] Mackinney, C., 1941. Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.*, **140**: 315—322.
- [10] Myers, J. and Clark, L. B., 1944. Culture conditions and the development of the photosynthetic mechanism II. An apparatus for the continuous culture of *Chlorella*. *J. Gen. Physiol.*, **98**: 103.
- [11] Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M. and Cohen-Bazire, G., 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriol. Rev.*, **35**: 171—205.
- [12] Van Liere, L., De Groot, G. and Mur, L. R., 1979. Pigment variation with irradiance in *Oscillatoria agardhii* Gomont in nitrogen (nitrate)-limited chemostat cultures. *FEMS Microbiol. Lett.*, **6**: 337—340.
- [13] Van Liere, L. and Walsby, A. E., 1982, Interaction of cyanobacteria with light in: The biology of cyanobacteria (eds. Carr, N. and Whitton, B. A.) Blackwell Sci. Publ., Oxford, Lond. pp. 9—45.
- [14] Vonshak, A., 1986. Laboratory techniques for the cultivation of microalgae in: Richmond, A. (ed), CRC handbook of microalgal mass culture. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida. pp. 117—145.

SOME CHARACTERISTICS OF THE CONTINUOUS CULTURE OF *ANABAENA VARIABILIS* (BLUE-GREEN ALGA, CYANOBACTERIUM) IN SEMI-STEADY STATE

Liu Yongding Li Shanghao

(The Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Anneliese Ernst and Peter Böger

(The Constance University, F. R. Germany)

Abstract

A chemostat apparatus and a whole glass fermentor were used in the continuous culture of *Anabaena variabilis*. When diurnal light-dark cycles (12:12 h) were incorporated in the stable conditions of the cultivation, a semi-steady state of the culture was achieved in 5—6 days. The periodic change rates of biomass were different from those of other growth parameters. The metabolic features of the culture under the L:D cycles could be indicated by the comparative data on the synthesis and accumulation of cell components (e.g., glycogen and protein) over the time course. The growth of the culture showed an innate physiological regularity. Changes of the growth parameters can be described by the equation $X = X_0 e^{(\mu-D)t}$. This semi-steady state of continuous culture was different from chemostatic and turbidostatic cultures. The technique is suitable for the research of algal ecophysiology and algal biotechnology.

Key words Continuous culture, Semi-steady state, *Anabaena variabilis*, Ecophysiology Blue-green algae (cyanobacteria)