

# 我国的几种蓝藻的固氮作用\*\*\*

黎尚豪 叶清泉 刘富瑞 王立美 崔希羣

(中国科学院水生生物研究所)

蓝藻植物的分布很广，在热带和寒带，在海水和淡水中，在温泉或冰雪中，在潮湿土地上或直射阳光下的干燥岩石上，到处都有。最引人注意的是在平滑坚固的岩石表面，看来是很难得到营养料的地方，有些蓝藻还可以生长繁殖；在新开辟的土面，和火山爆发后流出的冷却岩浆表面，最先长出来的生物也是蓝藻。因此，人们就不能不考虑到蓝藻是怎样地适应这样的环境条件去生活，它具备有什么特点可以使它获得生命活动中不可或缺的氮素化合物；也很自然地会想到它是否能够利用空气中的游离氮素进行同化——固氮——以取得它所需要的氮素化合物；尤其是生长在平滑岩石上的地衣——一类由菌类和藻类(蓝藻和绿藻)的共生植物，是否依靠蓝藻来供应氮素化合物(氮肥)这一些問題。

在 1889 年，Frank 氏<sup>[1]</sup>首先发现在生长蓝藻的土壤，在光照下，它的氮素化合物含量有所增加；1901 年 Beijerinck 氏<sup>[2]</sup>也发现在仅有的一点土壤的缺氮水液中，鱼腥藻(*Anabaena*)，主要是小链鱼腥藻(*A. catenula*)，生长得非常旺盛。但是，由于当时技术上还没有解决如何除去和藻类同时存在着的固氮细菌(*Azotobacter*)以获得纯蓝藻培养物，因而就很难论断固氮作用是由于固氮细菌存在的结果还是蓝藻本身有固氮能力。要从蓝藻体上将细菌去掉以获得纯培养是比较困难的，因为蓝藻体上有较厚的胶质，细菌可以附着在胶的表面甚至生长在胶质内部，因此，用一般洗涤等机械的方法就很难把它去掉。

直到 1914 年，Pringsheim 氏<sup>[3]</sup>才找出藻类纯培养的方法，给确定蓝藻是否能够固氮带来了极大的便利。经过不少人的试验，终于在 1928 年 Drewes 氏<sup>[4]</sup>分离出了两种固氮蓝藻，即点状念珠藻(*Nostoc punctiforme*) 和多形鱼腥藻(*Anabaena variabilis*)，其后许多工作，相继的证实了蓝藻中有不少种类具固氮能力。此后，1932 年 Allison 和 Morris 氏<sup>[5]</sup>也证实了多形鱼腥藻是能固定游离氮素；1939 年，De 氏<sup>[6]</sup>从印度稻田中分离出了三种固氮蓝藻，即：多形鱼腥藻，胶质鱼腥藻(*Anabaena gelatinosa*)，舟形鱼腥藻(*Anabaena naviculoides*)；1940 年 Bortels 氏<sup>[8]</sup>找出 6 种蓝藻能够固氮，即：柱孢鱼腥藻(*A. cylindrica*)、土生鱼腥藻(*A. humicola*)、多形鱼腥藻、地衣型柱胞藻(*Cylindrospermum licheniforme*)、点状念珠藻、沼地念珠藻(*N. paludosa*)；1942 年，Snigh 氏<sup>[23]</sup>发现了印度稻田中的几种固氮蓝藻，即：美鱼腥藻(*A. ambigus*)、多孢鱼腥藻(*A. fertilissima*)、多孢管鞘藻(*Aulosira fertilissima*)、加拉柱孢藻(*Cylindrospermum gorakporense*)。此外，日本渡边篤氏<sup>[21,22]</sup>也在日本和中国的南海诸岛找到一些固氮蓝藻，并还在婆罗洲分离到一种固氮能力较高的固氮蓝藻——小单枝藻(*Tolyphothrix tenuis*)；Fogg<sup>[11-15]</sup> Gerloff<sup>[17]</sup> Allen<sup>[5]</sup> Wolfe<sup>[15]</sup> 等氏都进行了这方面的研究，探查了它们的固氮作用和环境的关系。

\* 1959 年 10 月 12 日收到。

\*\* 曾参加这项工作的还有夏宜璋、张桂英和刘文郁同志及南京大学生物系方修忠、刘其芳和刘雪娴同学。

通过30多年来的工，已証实了有一些蓝藻确实是有固氮能力，很有可能利用它的固定游离氮素的特点来增加土壤肥力。

从过去的工作中，可以看出大部分能固氮的蓝藻都是属于念珠藻科（Nostocaceae）的植物，少数是属于小溪藻科（Rivulariaceae）、双枝藻科（Scytonemataceae）和鞭枝藻属（*Mastigocladius*）的种类。在蓝球藻目（Chroococcales）各属和颤藻科（Oscillatoriaceae）中尚未发现有具固氮能力的种类<sup>[1,2]</sup>。而且也发现，虽然在分类上属于同一种而在不同环境生长的蓝藻（如多形鱼腥藻）其固氮能力不同，甚至有些能固氮，有些完全不能固氮。

我国的蓝藻种类很丰富，已有记录的有600多种<sup>[2]</sup>。但究竟有那些种类可以固氮是不了解的，也有些学者提出要进行这方面的研究<sup>[1,3]</sup>。因此，就有必要找出我国的固氮蓝藻的种类，以便利用它们来作为农业上的新的氮肥来源。

## 一、标本的采集和分离培养

### （一）采集的对象和范围

我們寻找固氮蓝藻的目的是为了找出可以作为农田生物氮肥肥源的蓝藻加以利用，因此，在采集标本过程中，一方面依据蓝藻的生长特性选择采集地点，另一方面是为了将来更适宜于在稻田中生长，我們集中力量从水稻田中和浅水池塘里采集我們所需要的蓝藻标本。同时，依据国外已有的关于固氮蓝藻的报导，知道蓝藻中念珠藻科的种类有許多是有固氮能力的，因而在采集时也特別着重在念珠藻科的种类的收集，使我們有可能較快地找到所需要的蓝藻种类。

在1958年，我們根据上述的目的和采集范围，在湖北省、湖南省和江西省境内一共采集了200多号标本，其中，以湖北省武昌、汉阳、孝感和武汉市为主要采集地区，并在采集时詳細记录了它们生长的环境条件，作为培养时的参考。标本带回实验室后，在双筒解剖显微镜下进行分离，把所需要的藻类标本和其他藻类或其他生物和土壤、杂质等分开，然后，挑选所需要的蓝藻接入固体培养基中，进行培养。

### （二）分离和培养方法

最初，我們采用典型的分离方法，即：在解剖鏡下将藻絲一根根地挑出来，經過連續洗涤后再进行接种。这样的做法，工作进行速度很慢，而挑出的藻絲又未必能生长良好合乎最后的要求。实际上，用这种方法挑出的藻絲进行培养，因为它带胶质，附带挑出的东西也不少，要得到单种培养也需要經過几次的移种。为了“多、快、好、省”，我們改用先进行“小片分离”，接入液体培养基上，让它生长几天，然后将它们向外扩展生长的比較純淨的新藻絲挑出来，再接种到平板上，让它繁殖。这样，經過几次的移种，不独可以摸出这藻种的生长情况，同时也可以得到較純的藻类培养物。

当藻种在平板上生长較佳时，便挑出一部分接到液体培养基中，让它生长繁殖。所有这些培养物，都在室温条件下，在朝北面的窗口或40瓦荧光灯下进行培养。

在开始培养时，先用有氮培养基进行培养（平板和液体俱全）。培养基的配方如下：

#### 水生104有氮培养基

硝酸鈣 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0.04 克
磷酸氫二鉀 $\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.01 克

硫酸镁 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.025 克
碳酸钠 $Na_2CO_3$	0.02 克
氯化铁 (1% 水溶液)	1 滴
水	1000 毫升

平板用的固体培养基，系照上述配方加上 1.5% 的琼脂制成。

在平板上培养 3—6 天后，即可移植，每隔 3—7 天移植一次。因此，大概 10—20 天便可移入液体培养基中，让它生长。液体培养时的容器系用 250 毫升的锥形烧瓶，盛入 100 毫升的培养液，瓶口用滤纸包扎或棉花塞，以避免污染。光照主要采用 40 瓦的荧光灯作为光源。待它生长繁殖到比较多时，便将一部分的蓝藻种移入无氮的培养液中，进行培养。主要的目的是希望观察蓝藻种在无氮培养液中，是否能继续生长繁殖。如蓝藻种不能生长繁殖，说明它是不可能固定空气中的游离氮素。因为，在无氮培养液中，虽能维持生长一定的时间，但由于得不到氮化物的供应，氮素代谢势必停止，不能继续合成原生质，当然也就无法继续生长繁殖。如蓝藻种在无氮培养基中能继续生长，那么就有三种可能：(一) 蓝藻是能利用空气中的游离氮素，使它成为氮素化合物，也就是说它是固氮蓝藻；(二) 蓝藻不能利用氮素，而是由于蓝藻的胶质鞘膜或被膜上，附生着不少的固氮细菌，它们进行共生，蓝藻胶质上的蛋白类和糖类作为固氮细菌的营养物质，而固氮细菌所固定的空气中氮素，成为氮素化合物，又供给蓝藻生长繁殖的需要，因此虽在无氮培养基中蓝藻得以继续生长和繁殖；(三) 蓝藻种能固氮，同时亦有固氮细菌存在，因此虽在无氮培养液中，氮源还是很充足的。

通过在无氮培养液中培养的阶段，有许多不能继续生长繁殖的蓝藻种便初步地被淘汰，列入不能固氮的种类中。当然，这里面也会有些是可能固氮而因为它所要求的某些条件没有得到满足而不能生长繁殖的，但这些种类，就是能固氮，也会因为它要求生长条件苛刻，不适宜作为生物肥源在田间施用。

我们采用的无氮培养基有三种：

#### 1. 水生 103 无氮培养液：

磷酸氢二钾 $K_2HPO_4$	0.01 克	钼酸 $H_2MoO_4$ (1% 水溶液)	1 滴
硫酸镁 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.025 克	氯化铁 $FeCl_3$ (1% 水溶液)	1 滴
氯化钙 $CaCl_2$	0.02 克	蒸馏水	1000 毫升
碳酸钠 $Na_2CO_3$	0.02 克		

#### 2. 日本渡边篤无氮培养液：

磷酸氢二钾 $K_2HPO_4$	0.3 克	氯化铁 $FeCl_3$	痕跡
硫酸镁 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 克	钼酸 $H_2MoO_4$	痕跡
氯化钙 $CaCl_2$	0.05 克	蒸馏水	1000 毫升

#### 3. 水生 105 无氮培养液：

过磷酸钙 $Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$		碳酸氢钠 $NaHCO_3$	0.1 克
+ 2( $CaSO_4 \cdot H_2O$ )	0.3 克	氯化铁 $FeCl_3$ (1% 水溶液)	1 滴
硫酸镁 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 克	钼酸 $H_2MoO_4$ (1% 水溶液)	1 滴
氯化钾 $KCl$	0.1 克	自来水或蒸馏水	1000 毫升

我們最初培养时是采用水生 103 号培养液；在后来培养数量較大时，采用水生 105 号。在进行测定蓝藻固氮量时，我們采用渡邊篤的无氮培养基，全部試剂均为化学純的，主要是为了便以比較固氮蓝藻的固氮能力。

## 二、蓝藻的无菌培养和固氮量的测定

### (一) 蓝藻培养中的灭菌处理

在通过无氮培养，找出可能固氮而生长得特別好的蓝藻种后，便进一步的进行无菌培养。

首先，进行灭菌处理。灭菌处理的要求是要达到培养的蓝藻上或液体中沒有細菌、特別是固氮細菌的存在。但在灭菌过程中，不能将蓝藻也同时杀害，否則就不能达到蓝藻仍能生长良好而又沒有細菌的目的。因此，我們便采用了各种物理的和药物的方法来进行处理，要求达到杀灭細菌而蓝藻还能繼續生长。

在灭菌处理过程中，物理方法方面，主要是采用紫外線照射灭菌的方法；在药物方法方面，曾經采用杀菌药物如醋酸亚汞、氯化汞、高錳酸鉀等，抗菌素如青霉素、金霉素和鏈霉素单独或混合使用，同时也采用胰蛋白酶，大蒜汁等进行灭菌試驗。

进行灭菌試驗的蓝藻，接种在經過高压蒸汽灭菌的盛有无氮培养液或有氮培养液的培养瓶中，經過培养 2—3 天以后，取出部分溶液或蓝藻接种到細菌和固氮菌培养基中，放在 25℃ 的恆溫箱中，进行細菌培养試驗，如在 3 天以后，尚未有菌落出現的，說明細菌已經杀灭。同时，亦取出部分样品，在相差显微鏡下直接觀察有无細菌的活动。

我們采用的細菌和固氮細菌培养基，均有液体和固体两种，其配方如下：

#### 1. 細菌培养基

蔗糖	50 克	胰	10 克
磷酸二氫鉀	3 克	硫酸鎂	3 克
水	1000 毫升		

#### 2. 固氮菌培养基

甘露醇	2 克	磷酸二氫鉀	0.02 克
水	100 毫升		

固体培养基則增加 1.5% 的琼脂。

培养基在接种前均經過高压蒸汽处理。从細菌檢驗和蓝藻生长情况来看，有一些药品是无效的，有不少藥物可以杀灭細菌和固氮菌，但蓝藻种也同时死亡，不能达到我們預期的要求。結果，只有用紫外線間歇灭菌处理和加入鏈霉素灭菌处理的符合要求（表 1）。

用紫外線間歇灭菌处理是在无菌分离橱內进行的。在操作以前，无菌橱用福爾馬林 20 毫升加高錳酸鉀 5 克，进行灭菌 2—4 小时。紫外線灯是采用“Rontgen S 300”型的 30 瓦石英灯。要进行灭菌处理的蓝藻，盛于直径 9 厘米的培养皿中，分成小块，分散在培养皿的少量培养液中，置于紫外線灯下約 30 厘米处，照射时不断地振盪培养皿，使蓝藻在水液中不断的翻轉位置，以便蓝藻的各方面都能接受照射，否則因蓝藻的遮掩，在藻体下面的細菌便不能受到照射而保存了生命。照射时，每照射 5 分鐘，間歇 5—10 分鐘，一共照射 2—3 次。然后将处理过的蓝藻用无菌手續接入准备好的无菌培养液中，在螢光灯下培

表1 用各种藥物处理和紫外線照射滅菌的結果

处 理	量 剂	处 理 方 法	細菌生 長 情 况	固 氮 菌 生 長 情 况	蓝 藻 生 長 情 况
醋酸亚汞	$1/25 \cdot 10^4$	浸洗 2 次, 每次 5 分钟	-	-	死亡
	$1/50 \cdot 10^4$	加入培养液中	-	-	死亡
	$1/100 \cdot 10^4$	加入培养液中	+	-	死亡
高锰酸鉀	1/500	浸洗 2 次, 每次 1 分钟	+	±	少部分蓝藻呈蓝綠色
	1/500	浸洗 3 次, 每次 2 分钟	-	+	死亡, 少量尚呈蓝綠色
	1/1,000	浸洗 2 次, 每次 1 分钟	+	+	大部分呈蓝綠色
氯化汞	1/1000	浸洗 3 次, 每次 5 分钟	+	+	死亡, 少量尚呈蓝綠色
	1/1000	浸洗 2 次, 每次 5 分钟	+	-	生长良好
胰蛋白酶	1/200	加入培养液中	-	+	生长良好
抗菌素混合液					
1. 青霉素+	500单位				死亡
链霉索	500单位	加入培养液中			
2. 青霉素+	1000单位				死亡
链霉索	500单位	加入培养液中			
链霉索	$20/10^{-6}$	加入培养液中	-	-	大部分呈蓝綠色
大蒜汁	$1/20-1/2$	加入培养液中			死亡
紫外線	300 瓦	連續照射 5 分钟	+	-	大部分呈蓝綠色
		連續照射 10 分钟			死亡
		照射 10 分钟, 2 次, 間歇 5 分钟	-	-	死亡
		照射 5 分钟, 2 次, 間歇 5 分钟	-	-	少量死亡, 大部分呈蓝綠色
		照射 5 分钟, 3 次, 間歇 5 分钟	-	-	少部分呈蓝綠色
流水連續冲洗			+	+	生长良好

养, 观察其生长情况。

鏈霉索灭菌法是将鏈霉索直接加入蓝藻的培养液中。先将培养中生长較好的蓝藻, 用灭菌的培养液或蒸餾水洗涤几次, 取得較为純淨的藻种, 移入經過灭菌的培养液中, 在无菌橱內, 加入 20ppm 的鏈霉索。然后将培养物放在螢光灯下进行培养。

經過紫外線間歇照射或鏈霉索处理的蓝藻种, 虽完全不帶細菌, 但蓝藻也受到一定的伤害, 因此还会有部分蓝藻种死亡, 因此培养过程中便要特別注意, 使各方面的条件都能适于它的生长繁殖。

## (二) 蓝藻固氮能力的测定

通过缺氮培养和灭菌处理后, 我們找出四种极可能有固氮作用的蓝藻种, 即: 508, 670、678 和 686 等号。将这四种蓝藻都在无菌条件下进行培养, 以准备測定其固氮能力。

先将容量 250 毫升的錐形烧瓶盛入 100 毫升的渡边氏无氮培养液, 瓶口用棉花塞塞紧, 并装有两根小玻管以便通入  $\text{CO}_2$  (图 1), 在 15 磅蒸汽压下灭菌 30 分钟, 然后放在灭菌橱內, 分別接入 508 藻种 0.4 毫升, 670、678 和 686 藻种各 1 毫升, 放在恆温槽內培养。

培养槽是用一个  $60 \times 40 \times 40$  厘米的水族箱, 盛  $2/3$  的自来水, 将培养瓶架放在水中, 瓶內培养液的表面略低于槽中的水面, 以便使培养瓶內的温度可以保持稳定 (图 1)。水温的調节是利用电热器加温, 用水銀接觸溫度計自動調節在 33—35°C 之間, 每天用 200 瓦鎢絲灯照明 12 小时, 在光照時間內, 連續通入含有 5% 的二氧化碳的空气。通入的空

气先经过棉花的过滤及 5% 硫酸和碳酸钠溶液的洗涤，以滤去空气中所带有的氨和水汽中所含的氮的氧化物。

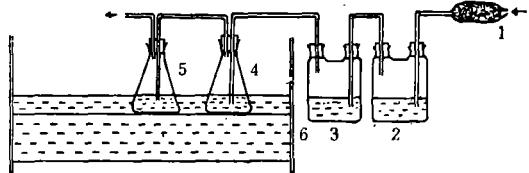


图 1 固氮蓝藻无菌培养时的装置示意图。1, 含 5%  $\text{CO}_2$  的空气通入处；2, 5% 硫酸溶液；3, 5% 碳酸钠溶液；4 和 5, 培养瓶；6, 水槽。

在测定試样时，我們將藍藻先測定分量，再進行測定，培養液則直接進行測定其含 N 量，同時並以蒸餾水及無氮培養液分別進行空白試驗，以確定其中有無 N 素存在。

### (三) 四种固氮蓝藻及其固氮能力

根據我們測定固氮量的結果，發現 686、678、670 和 508 四種藍藻都是固氮藍藻（表 2），從它們的固氮量來看：686 的固氮能力最強，在 100 毫升無氮培養基中，在無菌條件下

表 2 四種固氮藍藻在 100 毫升無氮培養液中培養 4 天的固氮量

藍藻編號	藻體中		培養液中		總固氮量
	氮量(毫克)	總氮量的百分比(%)	氮量(毫克)	總氮量的百分比(%)	
508	0.6790	89.5	0.0802	10.5	0.7592
670	0.2740	31.8	0.5874	68.2	0.8614
678	0.5373	57.3	0.4009	42.7	0.9382
686	0.2270	22.0	0.7876	78.0	1.0146

生長 4 天，其固氮量為 1.0146 毫克；678 號為 0.9382 毫克；670 號為 0.8614 毫克；508 號為 0.7592 毫克。其中值得注意的是在 686 號藍藻的培養液中，含氮量增加了 0.7876 毫克，占總固氮量的 77.6%，也就是說在藍藻生長過程中，將固定的游離氮素同化成為氮素化合物後，大量釋放到水液中。這種性狀，對於利用它作為水稻田或其他作物的生物氮肥源是十分有利的。因為不需要通過藍藻的死亡分解來釋放氮素化合物作為肥料，而在藍藻生長過程中就可以不斷地將同化的氮素供給其他植物的利用。從藍藻的生長過程來說，Fogg (1952 年) 認為分泌出較多的氮素化合物並非由於生長不健康，而是一種旺盛的生長的結果<sup>[14]</sup>，在我們的實驗中也清楚地看到了這一點。

從固氮量來看，這幾種藍藻的固氮能力是高的。在過去的紀錄當中，日人渡邊篤氏找到的小單枝藻的固氮量是較高的，在 100 毫升的渡邊氏無氮培養基中，在無菌條件下培養 60 天，固定氮素量為 5.2 毫克（在溶液中增加 0.2% 葡萄糖時為 9.6 毫克）<sup>[22]</sup>，我們的 686 號固氮藍藻在同樣的培養液和同樣的條件下，4 天的固氮量為 1.0146 毫克，雖然培養時間的長短不同，不能直接比較，但也可以看出 686 的固氮能力是不低的。依照 Fogg 氏（1942）對柱孢魚腥藻在培養的各個時期中的固氮量測定的結果<sup>[11]</sup>，發現它的固氮量不是均等增

在這樣的條件下培養 4 天以後，我們便取出來，測定其固氮量。在取出樣品進行測定前，並做一次細菌檢查，證明在培養過程中並無細菌或固氮菌污染。

我們採用微量凱氏法測定氮量<sup>[4, 18]</sup>。在消化時，加少許化學純的硫酸銅結晶

加而是逐渐提高的，以第 20 天测定的为 100%，第 30 天为 177.2%，第 40 天为 284.98%，第 50 天为 673.79%。这说明，此种蓝藻的培养时间延长后，固氮力并不会衰退而是增进的。我们的 686 号蓝藻可能也是这样。

从分泌到培养液中的氮素化合物的量来看，在 De 氏(1939)的报告中，他所找到的固氮蓝藻分泌到培养液中的氮量是 19—44%<sup>[9]</sup>，Fogg 氏(1942)测定的固氮量在培养液中的为 6.6%<sup>[11]</sup>，我们测定的结果，686 号固氮蓝藻分泌在培养液中的氮量达 77.6%，678 号为 42.7%，670 号为 68.2%，508 号为 10.5%。正如前面所谈到的，分泌在培养液中的氮量多少是和固氮蓝藻能否在田间很快地起肥效有关。从 686 号、678 号和 670 号有一半或一半以上的固定的氮素在生长过程中分泌到培养液中的情况来说，利用它们作为固氮蓝藻肥料是有其优越性的。

### 三、我国几种固氮蓝藻的生物学特征

我们找到的四种固氮蓝藻，其中三种是属于鱼腥藻属，一种属于念珠藻属的，它们的特征分别叙述如下：

(1) 水生 686 固氮蓝藻(图 2)：本种系鱼腥藻属的一种，于 1958 年 7 月采自湖北省武汉市小洪山稻田中。群体呈蓝绿色，通常为胶块状，生长在土壤的表面，连成大达 10 厘米的小片。细胞列紧密而不规则地排列在胶质中，在细胞列中央部分，宽 3.6—4.8 微米，两端的细胞稍小，末端细胞略长，尖端变圆，呈钝圆锥形或截头锥形。细胞为腰鼓形，一般为宽于长的扁腰鼓形，或长宽相等，长 2.5—4.8 微米。细胞内有蓝藻蛋白颗粒。在培养过程中曾发现伪空胞，尤其是气温较低、在 100—200 瓦钨丝灯光下培养时，曾大量出现。在培养中，群体常漂浮在水面或附着在盆的四周，在盆底较少，其颜色因光线的强弱而有所改变，在阳光直照下培养，群体常呈黄绿色。异形胞为球形而至长圆形，长 4.8—7.3 微米，宽 4.8—7 微米。从田间采来标本未发现孢子；大量培养一年多的时间中，虽在生长旺



图 2 固氮鱼腥藻 (*Anabaena azotica* sp. nov.)，即水生 686 固氮蓝藻( $\times 830$ )。

盛时,或因条件不适宜而生长不良,或用农药处理、低温处理时,均未发现形成孢子。在培养过程中,虽群体的形态因条件改变而有显著的变化,如胶质被膜有时很厚,呈黄褐色,有时几全缺如,但细胞列形态的变化极微。

根据上述特点,拟定为一个新种,命名为固氮鱼腥藻 (*Anabaena azotica*, sp. nov.)<sup>1)</sup>。在鱼腥藻属中,有三个种尚未曾发现孢子<sup>[23]</sup>,即:中缩鱼腥藻 *Anabaena constricta* (Szaf.) Geitl., 弯曲鱼腥藻 *A. contorta* Bachm. 和微细鱼腥藻 *A. minima* Tschernov. 中缩鱼腥藻的主要特点是细胞为柱形,在细胞的中部显著地收缩,成为两端较大,中部稍小的细胞。弯曲鱼腥藻是池塘、湖泊常见的浮游植物,细胞列经常呈不规则的弯曲;微细鱼腥藻的细胞列仅有0.7—0.8微米宽。因此,这三种孢子尚未发现的鱼腥藻和固氮鱼腥藻比较,或在形态上相差甚远,或在细胞列的大小上相差很多。若从细胞列和细胞形态来看,固氮鱼腥藻的细胞列和球形鱼腥藻 *Anabaena sphaerica* Born. et Frah. 的很相似,但球形鱼腥藻的孢子是经常可以见到的,它位于异形胞的两旁,因此它和固氮鱼腥藻也是不同的。为此我们应继续观察藻类形态上的变化。

(2) 水生678固氮蓝藻(图3):本种系鱼腥藻属的一种,1958年夏采自孝感城郊稻田中。本种形态上和前面的固氮鱼腥藻颇相似,亦未发现孢子,它和前种不同之处为异形孢为长椭圆或柱形,比前者大,细胞亦为长形、长于宽或方形。因此应为前种的一个生活型。拟定名为固氮鱼腥藻甲型 *A. azotica* f. *α*。

(3) 水生670固氮蓝藻(图4):本种为鱼腥藻属的一种,系采自湖北省汉阳稻田中。

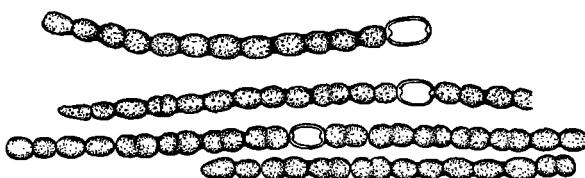


图3 固氮鱼腥藻甲型 (*Anabaena azotica* f. *α*),即水生678固氮蓝藻(×725)。



图4 多形鱼腥藻变型 (*Anabaena variabilis* Kütz. forma),即水生670固氮蓝藻(×725)。

群体呈蓝绿色,稍带黄色,在稻田中浮集水面,形成一大片,几乎全部盖满水面。细胞列直或弯曲,2.5—4微米宽,细胞为鼓形至柱形,长4—6微米,细胞内有蓝藻蛋白颗粒。异形孢为椭圆形至柱形,4—6微米宽,长可达8微米;孢子和异形孢不相邻接,它的形态和营养性细胞相似,体积略大,为柱形,两端变圆,3—4微米宽,5—7微米长,常数个连成一串。我们培养的种类,虽然形成孢子,但多不很成熟,仅在细胞内积聚大量的内含物,颜色变成深蓝绿色。根据它的特点,应该是属于多形鱼腥藻(*Anabaena variabilis* Kütz.)的一个型。从它的细胞形状和大小,以及孢子的形态来看,和Popova氏记载的 *tenuis* 型很相似,但在孢子的形态上也有不同之处,因此定名为多形鱼腥藻变型 (*Anabaena variabilis* Kütz. forma)。

1) *Anabaena azotica* Ley, sp. nov.—Strato crasso, late expenso, mucoso, caeruleo-viridi; trichomatibus dense et irregulariter dispositis, ad apicem leviter attenuatis; cellulis doliformibus, 3.6—4.8μ crassis, 2.5—4.8μ longis; contentu pallide caeruleo-viridi, granuloso et vacuolis gaseosis notato in cultis; cellula terminali attenuato-obtusa vel truncata; heterocystis globosis aut oblongis, 4.8—7 μ crassis, ad 4.8—7.3 μ longis; sporis ignotis.

(4) 水生 508 固氮蓝藻(图 5)：本种系念珠藻属的一种。1958 年春天采自武汉市宝积庵稻田中，采集时所得标本不多，但在实验室培养中，生长颇迅速，同时在环境稍差时，能维持生命或继续生长。群体最初为球形，直径在一厘米以内，但在培养条件不同时，变异很大，在固体培养基(平板)上和在萤光灯下培养时，可形成一个个的球形群体，被膜很软，大的达一厘米以上，颜色为鲜蓝绿至茶褐色。在液体培养基中，则失去其原有形态，成为胶状或片状，浮在水面，有时亦沉于水底，此时群体形态和鱼腥藻极相似。虽长时期未加管理亦可维持鲜艳的颜色。群体内细胞列屈曲相交，3—5 微米宽。细胞为球形至腰鼓形。异形孢多脱落，为扁球形，2—2.5 微米长，3 微米宽；孢子成串，和异形孢相邻接，为球形至腰鼓形，4.8—7.3 微米宽。

根据本种的特点，应该是属于林克氏念珠藻 [*Nostoc Linckia* Roth f. *piscinale* (Kütz.) Elenk.] 中的 *piscinale* 型 (= *Nostoc piscinale* Kütz.)<sup>[23]</sup>，但细胞形态上略有不同，*piscinale* 型的细胞多为腰鼓形，而我们培养中的种类细胞较圆或长圆形或腰鼓形；孢子形态很相似。有些形态上的差异，可能是和培养时间较长有关，原始标本未保留。

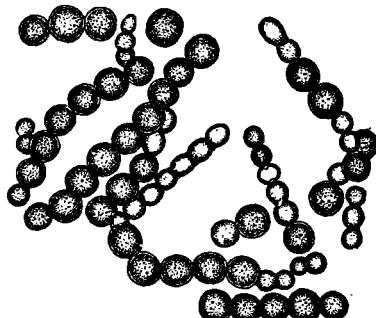


图 5 林克氏念珠藻 [*Nostoc Linckia* Roth f. *piscinale* (Kütz.) Elenk.], 即水生 508 固氮蓝藻 ( $\times 725$ )。

#### 四、摘要

湖北、湖南和江西等地采集的稻田蓝藻经过分离、培养、缺氮培养初步找到可能固氮的蓝藻后，进一步得出了无菌的纯培养的蓝藻藻种，经过试验和用微量凯氏法测定其产生的氮量，确定了四种蓝藻系固氮蓝藻。在 100 毫升无菌无氮培养基中生长四天的结果测定，水生 686 固氮蓝藻 (*Anabaena azotica*)、水生 678 固氮蓝藻 (*A. azotica forma α*)、水生 670 固氮蓝藻 (*Anabaena variabilis forma*) 和水生 508 固氮蓝藻 (*Nostoc Linckia forma*) 的固氮量分别为 1.0146、0.938、0.8614 和 0.759 毫克。

#### 参考文献

- [1] 陈华癸，1950。中国长江流域水稻田中的藻植物和它们对土壤肥沃性的影响。中国植物学杂志，5: 46—49。
- [2] 黎尚豪，中国的蓝藻(手稿)。
- [3] 饶欽止，1956。对藻类学发展规划的意见。科学通报，1956 (4): 57—59。
- [4] 彼坚布尔斯基，阿·符·，1955。农业化学分析(陈家坊等译)。科学出版社。
- [5] Allen, M. B. 1952. The Cultivation of Myxophyceae. *Arch. Mikrobiol.*, 17: 34.
- [6] Allison, F. E. and H. J. Morris, 1932. Nitrogen fixation by soil algae. *Proc. and papers of 2nd Inter. Congr. Soil Sci.*, 3: 24—28.
- [7] Beijerinck, M. W., 1901. Ueber oligonitrophile Mikroben. *Zbl. Bakt.* (2 Abt.), 7: 561—582.
- [8] Bortels, H. 1940. Ueber die Bedeutung des Molybdaens fuer stickstoffbindende Nostocaceen. *Arch. Mikrobiol.*, 11: 155.
- [9] De, P. K. 1939. The role of blue-green algae in nitrogen fixation in rice-fields. *Proc. Roy. Soc. London, B.*, 127: 121—139.
- [10] Drewes, K. 1928. Über die Assimilation der Luftstickstoffs durch Blaualgen. *Zbl. Bakt.* (2 Abt.), 76: 88.
- [11] Fogg, G. E. 1942. Studies on nitrogen fixation by blue-green algae. I. Nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica* Lemm. *Jour. Exp. biol.*, 19: 78—87.
- [12] Fogg, G. E. 1947. Nitrogen fixation by the blue-green algae. *Endeavour*, 6: 172.

- [13] Fogg, G. E. 1951. Studies on nitrogen fixation by blue-green algae II. Nitrogen fixation by *Mastigocladus laminonensis* Cohn. *Jour. Exp. Bot.*, **2**: 117—120.
- [14] Fogg, G. E. 1952. The production of extracellular nitrogenous substances by a blue-green alga. *Proc. Roy. Soc. London B.*, **139**: 372—397.
- [15] Fogg, G. E. and M. Wolfe, 1954. The nitrogen metabolism of the blue-green algae (Myxophyceae). *4th Sym. Soc. gen. Microbiol., London*, 1954. pp. 99—125.
- [16] Frank, B. 1889. Ueber den experimentellen Nachweis der Assimilation freien Stickstoffs durch erdbodenbewohnende Algen. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, **7**: 34.
- [17] Gerloff, G. C., G. P. Fitzgerald and F. Skoog, 1950. The isolation, purification, and culture of blue-green algae. *Amer. Jour. Bot.*, **37**: 216.
- [18] King, E. G. 1951. Micro-analysis in medical biochemistry.
- [19] Pringsheim, E. G. 1914. Kulturversuche mit Chlorophyllfixierenden Mikro-organismen, III Mitteilung. Zur Physiologie der Schizophyceen. *Beitr. Biol. pfl.*, **12**: 49—108.
- [20] Singh, R. N. 1942. The fixation of elementary nitrogen by some of the commonest blue-green algae from the paddy field soils of the United provinces and Bihar. *Indian Jour. Agric. Sci.*, **12**: 743—756.
- [21] Watanabe, A. 1951. Production in cultural solution of some aminoacids by the atmospheric nitrogen-fixing blue-green algae. *Arch. Biochem. Biophys.*, **34**: 50.
- [22] Watanabe, A. 1956. On the effect of the atmospheric nitrogenfixing blue-green algae on the yield of rice (in Japanese) *Bot. Mag. Tokyo*, **69**: 530—536.
- [23] Голлербах, М. М., Е. К. Косинская и В. И. Полянский 1953. Синезеленые водоросли. Москва.

## THE NITROGEN FIXATION OF SOME BLUE-GREEN ALGAE FROM CHINESE RICE-FIELDS

LEY SHANG-HAO, YEH TSING-CHUAN, LIU FU-JUI, WANG LIH-MEI AND Ts'UI SHI-KIUNG

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica)

### SUMMARY

The investigation deals with the nitrogen fixation of some blue-green algae isolated from the soils of rice fields. Samples of algae-bearing soils were collected from rice fields in the provinces of Hupeh, Hunan and Kiangsi. Uni-algal cultures were made first on media enriched with nitrogenous compounds to encourage vigorous growth. The uni-algal cultures were then subcultured onto nitrogen-free media, which effected a preliminary separation of those algae which could thrive in the absence of pre-formed nitrogenous compounds, from those which could not. The algae which showed a prolific growth on the nitrogen-free medium may be considered either to be capable of "fixing" (assimilating) atmospheric nitrogen, or that their nitrogen supply is coming from *Azotobacter* present in the culture. Our next step was to obtain bacteria-free unialgal cultures. Two bacteriostatic methods were used: ultra-violet radiation from 300-watt quartz lamps, and treatment with streptomycin.

Bacteriostatically treated uni-algal cultures were tested by inoculating sterile nitrogen-free media suitable for *Azotobacter* and allied organisms. Examination of these subcultures from the irradiated material showed that an intermittent radiation from our lamps of 5 minutes, repeated two or three times, was an effective bacteriostatic. Also, that *Azotobacter* and other micro-organisms were killed after treatment with 20 ppm. of streptomycin.

The capacity for assimilating free nitrogen from the air was assessed by determining the quantity of nitrogenous compounds produced in the algal cells and in the medium, by means of the micro-Kjeldhal method. The nitrogen-fixing capacity has now been assessed on 4 isolated types of Blue-green Algae: HB 686 (*Anabaena azotica*); HB 678 (*Anabaena azotica* f. *alpha*); HB 670 (*Anabaena variabilis* forma); and HB 508 (*Nostoc Linckia* forma). The highest rate of fixation, amounting to 1.0146 mg. N/100 cc. of nitrogen-free medium in 4 days, was attained by HB 686; the next, of 0.9382 mg. N, by HB 678, 0.8614 mg. N, by HB 670; and 0.7592 mg. N, was produced under the same conditions, by HB 508.