

满江红鱼腥藻的异养生理*

金 传 荫

(中国科学院水生生物研究所)

提 要

设计了一个经机械处理而获得蓝藻无菌培养物的方法, 利用这一方法获得满江红鱼腥藻(*Anabaena azollae*)的无菌培养物。满江红鱼腥藻的无菌培养物能以果糖、葡萄糖或者蔗糖为底物, 在黑暗中进行化能异养生长。将适应了光能自养生长的培养物转移至黑暗中异养生长时, 以 NaNO_3 为氮源时的生长速率比以空气中的氮气为氮源时高; 然而适应了化能异养生长的培养物以空气中的氮气为氮源时生长更佳。搅拌促进生长。满江红鱼腥藻在黑暗中生长半年后, 叶绿素 a 的含量降至光照下生长时的 $\frac{1}{3} - \frac{1}{4}$ 。满江红鱼腥藻在 5500 勒克斯光照下生长时, 添加外源果糖或葡萄糖仍能促进生长, 提高固氮活性。

已报道能进行化能异养生长的蓝藻有 50 株左右^[4,5,8]。然而, Smith (1973) 认为, 只有 Fay (1965) 与 Hoare (1971) 的工作较为可信^[6]。所以, 对于蓝藻化能异养生长显然还需进一步研究。Wolk 和 Shaffer (1976) 用发酵罐作了多变鱼腥藻(*Anabaena variabilis*) 的大量培养。试验表明: 异养培养时的生长速度与光能自养培养时相当, 而产物浓度可显著提高, 且因不受光照限制, 可在容积很大的容器中培养^[7]。在推广稻田放养固氮蓝藻作为生物肥源时需要大量的藻种, 考虑到能否利用发酵罐工业化生产蓝藻藻种的问题, 作者研究了满江红鱼腥藻(*Anabaena azollae*)的异养生理并且联系鱼腥藻-满江红的共生关系进行了讨论。

材 料 和 方 法

1. 藻种及培养 满江红鱼腥藻由我室藻种组提供, 系白克智等 (1979) 从满江红(*Azolla*) 中分离的共生蓝藻。使用水生 III 培养基培养, 但测生长速率时使用经过修改的 BG-II 培养基。有机底物的溶液用耐酸滤过漏斗(G_5 与 G_6) 过滤灭菌, 然后添加到经高压灭菌的矿质培养基中。

培养温度: 29—35°C; 黑暗条件: 锥瓶外包裹一层包装照相底片用的黑纸, 外加一层锌粉纸。转接时的照明不超过 50 勒克斯。

2. 无菌检查 采用 Hoshaw 和 Rosowski (1973) 介绍的方法^[3]。化能异养生长的材

* 本文系作者在导师黎尚豪教授指导下的硕士研究生毕业论文的一部分。

编辑部收到稿件日期: 1983 年 8 月 9 日。

料,每次转接时均进行检查,污染的材料随即弃去。

3. 生长速率的测定 50 毫升锥瓶内装 30 毫升培养基,定量接种,收获时每瓶作为一个样品,每处理设 5 个样。测干重依 Sorokin (1973) 介绍的方法^[6]。测叶绿素 a 基本上依 Hansmann (1973) 介绍的方法^[2],但改用离心法搜集藻样。

4. 整细胞固氮酶活性的测定 依水生所固氮原理组提供的方法^[1]。

结 果

1. 获得蓝藻无菌培养物 我室藻种组保存的满江红鱼腥藻是带菌的。采用以下方法纯化以获得无菌培养物:

- (1) 取适量藻液,用玻璃匀浆器匀浆,分散藻丝;
- (2) 用细胞破碎器 (The Parr cell disruption bomb) 处理,使藻丝断裂成 1 个、2 个及数个细胞;
- (3) 反复离心,洗涤 5 次;
- (4) 在水生 III 琼脂平板上划线;
- (5) 挑取单个藻落至液体培养基;
- (6) 选取带菌最少的材料。重复以上操作。重复三次后,从中挑选出无菌培养物。

2. 满江红鱼腥藻的化能异养生长能力 选择了 10 种用于藻类异养培养的有机底物,用目测法测生长,表明果糖、葡萄糖和蔗糖均能维持满江红鱼腥藻的化能异养生长,其中果糖最佳,葡萄糖其次,蔗糖只能维持缓慢的化能异养生长。其余 7 种有机物被用作底物

表 1 满江红鱼腥藻在黑暗中对有机底物的利用

Table 1 Utilization of organic substrates by *A. azollae* in the dark

果糖 (5mM)	葡萄糖 (5mM)	蔗糖 (5mM)	麦芽糖 (5mM)	核糖 (5mM)	乳糖 (5mM)	甘露糖 (5mM)	鼠李糖 (5mM)	乙酸钠 (1mM)	丙酮酸 0.1%
+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-

+, 生长; -, 不生长。

表 2 满江红鱼腥藻在黑暗中的化能异养生长速度

Table 2 Dark heterotrophic growth rate of *A. azollae*

重 复		接 种 量	产 量	生 长 系 数 (K _e)	增 代 时 间 g(天)
		干重 (mg)	8.3(3)	0.21	3.2
1	叶绿素 a (μg)	3.46(5)	21.7(3)	0.26	2.6
	干重 (mg)	1.81(5)	7.4(3)	0.20	3.4
2	叶绿素 a (μg)	3.46(5)	18.2	0.24	2.9

注: 培养基 pH 为 7.8。二个重复中使用的锥瓶的瓶口大小不同。共培养 7 天。括号内的数字表示测定的样品数。

1) 水生所固氮原理组,1975 年工作手稿。

时, 满江红鱼腥藻不能在黑暗中生长, 或生长极缓慢而不能被目测(表 1)。

定量测定证实, 满江红鱼腥藻能在黑暗中利用果糖和葡萄糖维持一定的生长速率, 并保持一低水平的固氮活力, 但对果糖与葡萄糖的利用情况却有差异(表 2, 3)。

表 2 说明, 适应了化能异养生长的培养物在利用 10mM 果糖时, 干重和叶绿素 a 以十分相近的速率增长, 表明各细胞组分是按比例增长的。这一实验是用在黑暗中进行了半年以上, 经过多次转接的材料做的。满江红鱼腥藻在光能自养生长时的生长系数为 0.7, 增代时间 1.0 天, 相比之下, 其在黑暗中的化能异养生长速率还是较缓慢的。重复 1 中使用的锥瓶的瓶口较大, 生长较快。表 3 侧重说明满江红鱼腥藻利用果糖与葡萄糖的差别, 列出了黑暗中的固氮活性。

表 3 满江红鱼腥藻对果糖和葡萄糖利用的差别

Table 3 Comparison between the utilizations of fructose and glucose by *A. azollae*

	接种量	产 量	生长系数 (K _e)	增代时间 (日)	整细胞在黑暗中的 固氮活性 (nmC ₂ H ₄ /μg chl.a/ min)
	叶绿素 a (μg)				
果糖 (10mM)	2.36(2)	20.1(2)	0.214	3.2	0.09(4)
葡萄糖 (10mM)	2.36(2)	10.14(2)	0.146	4.7	0.03(4)

3. 满江红鱼腥藻进行化能异养生长时对氮源的要求 满江红鱼腥藻适应了化能异养生长的培养物, 以 NaNO_3 为氮源时, 干重增长稍快, 但以空气中的氮气为氮源时, 叶绿素 a 的增长快得多(表 4), 从而表现出某种更喜固氮生长的倾向。这一现象还未见报道, 值得进一步研究。

表 4 满江红鱼腥藻使用不同氮源时的化能异养生长的比较

Table 4 Comparison of growth in the dark in presence of various nitrogen sources

产 量	空气中的氮气	NaNO_3 (1.5g/l)	NH_4Cl (0.5g/l)
干重 (mg)	6.45	8.25	1.95
叶绿素 a (μg)	20.1	7.1	6.68

接种物为适应了异养生长的培养物。培养 10 天。

表 5 满江红鱼腥藻使用两种不同氮源时化能异养生长的比较

Table 5 Comparison of growth in the dark in presence of two different nitrogen sources.

氮 源	以 干 重 计				以 叶 绿 素 a 计			
	接种量 (mg)	产 量 (mg)	生长系数 K _e	增代时间 (天)	接种量 (μg)	产 量 (μg)	生长系数 K _e	增代时间 (天)
空气中的氮气	0.77	3.3	0.21	3.4	4.9	6.73	0.05	15.7
NaNO_3	0.77	5.65	0.28	2.4	4.9	15.29	0.16	4.3

注: 接种物为适应了光能自养生长的培养物。

然而,适应了光能自养生长的培养物转接至黑暗中进行化能异养生长时,以 NaNO_3 作氮源时的生长速率比以空气中的氮气为氮源时高得多。以叶绿素 a 为指标,以空气中的氮气为氮源时,可以见到生长受到抑制,蓝藻从光能自养条件转移至黑暗中进行化能异养生长时,生长常受到抑制。我们可以看到,以 NaNO_3 为氮源便能在很大程度上消除这一抑制(表 5)。

4. 满江红鱼腥藻在进行化能异养生长时,搅拌对生长的作用 与静置培养相比,用电磁搅拌器缓缓搅拌,能显著促进生长,特别是叶绿素 a 的增长(表 6)。

表 6 搅拌对满江红鱼腥藻化能异养生长的影响

Table 6 The effect of stirring on heterotrophic growth of *A. azollae*

底物	搅拌与否	接种量	产量	生长系数 K_e	增代时间(天)
葡萄糖 (10mM)	搅拌	1.48mg dr. w.	4.3mg dr. w.	0.15	4.5
	不搅拌	1.48mg dr. w.	3.48mg dr. w.	0.12	5.7
果糖 (10mM)	搅拌	4.9 μ g chl. a	24.8 μ g chl. a	0.23	3
	不搅拌	4.9 μ g chl. a	6.7 μ g chl. a	0.05	15.7

注: 接种物为适应了光能自养生长的培养物。

5. 满江红鱼腥藻在进行化能异养生长时叶绿素 a 含量的变化 光能自养生长时,其叶绿素含量因光照强度等条件而变化在 5.92—9.44 μ g 叶绿素 a/mg 干重之间。在黑暗中生长半年后,降至 2.44—2.68 μ g 叶绿素 a/mg 干重之间,约为光能自养生长时的 1/3—1/4。

6. 满江红鱼腥藻在强光下生长时对外源有机物的反应 文献中普遍报道,在较强光照下外源有机物不促进蓝藻生长。但满江红鱼腥藻很特别,当用 5500 勒克斯的连续光照培养时,添加果糖和葡萄糖仍能显著促进生长,提高固氮活性(表 7)。

表 7 满江红鱼腥藻在 5500 勒克斯光照下生长时,外源有机物对生长的作用

Table 7 The effect of exogenous organic substrates on growth of *A. azollae* at 5500 lux.

培养基	以干重计				以叶绿素 a 计				整细胞固氮酶活 ($\text{nM C}_2\text{H}_4/\text{mg dr. w.}/\text{min}$)
	接种量 (mg)	产量 (mg)	生长系数 K_e	增代时间 (天)	接种量 (μ g)	产量 (μ g)	生长系数 K_e	增代时间 (天)	
无机培养基	0.77	4.3	0.57	1.2	4.9	40.6	0.70	1.0	2.69
添加果糖 (10mM)	0.77	16.5	1.02	0.7	4.9	61.3	0.84	0.8	—
添加葡萄糖 (10mM)	0.77	11.5	0.9	0.8	4.9	78.1	0.92	0.8	3.54

注: 荧光灯照明。培养三天。

讨 论

我们设计的获得蓝藻无菌培养物的方法,是一种纯机械处理的方法,不会象 UV 或化

学处理方法导致突变，特别适于遗传分析。此法适于满江红鱼腥藻一类胶质不多的丝状蓝藻，经修改后也可能用于其他蓝藻。

Smith (1973) 提出蓝藻异养的研究必须做到三条：(1) 无菌；(2) 连续分培成功；(3) 测几个细胞组分以测定生长^[5]。是否一定要做到这三条还可以讨论，但我们基本上做到了这三条。我们试验说明，满江红鱼腥藻能在黑暗中进行化能异养生长。并研究了它对碳源、氮源及其它培养条件的要求，这就为今后用发酵罐培养提供了重要信息。

满江红鱼腥藻适应了化能异养生长后，表现出某种喜固氮生长的倾向，文献中还未见报道，这一问题很值得进一步研究。

满江红鱼腥藻在强光下生长时，外源有机物仍能促进生长与固氮，这也是很特别的，只有 Fay (1965) 作过类似报道^[4]。这是对一般认为蓝藻代谢缺乏诱导调控，不能充分利用外源有机物这一传统观念的一个冲击。

Peters 表明满江红给满江红鱼腥藻提供了蔗糖。本试验结果表明满江红鱼腥藻能利用果糖、葡萄糖和蔗糖维持黑暗中的化能异养生长与固氮活性，进一步提高在光照下的生长与固氮。从而使满江红鱼腥藻有可能给满江红提供更多的氮。这一结果有助于阐明满江红-鱼腥藻的共生关系。

参 考 文 献

- [1] Fay, P., 1965. Heterotrophy and nitrogen fixation in *Chlorogloea fritschii* Mitra. *J. Gen. Microbiol.* (39): 11—20.
- [2] Hansmann, E., 1973. Pigment analysis. In: J. R. Stain ed., *Handbook of phycological methods: Culture methods and growth measurements*. pp. 359—368. Cambridge University Press.
- [3] Hoshaw, R. W. and J. R. Rosowski, 1973. Methods for microscopic algae. In: J. R. Stain ed., *Handbook of phycological methods: Culture methods and growth measurements* pp. 53—68. Cambridge University Press.
- [4] Sahu, J. and S. P. Adhikary, 1982. Heterotrophic growth and pigment composition of four filamentous blue-green algae. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 63(2): 189—199.
- [5] Smith, A. J., 1973. Synthesis of metabolic intermediants. In: N. G. Carr and B. A. Whitton ed., *The biology of blue-green algae*. pp. 1—38. Blackwell.
- [6] Sorokin, C., 1973. Dry weight, packed cell volume and optical density. In: J. R. Stain ed., *Handbook of phycological methods: Culture methods and growth measurements*. pp. 321—344. Cambridge University Press.
- [7] Wolk, C. P. and P. W. Shaffer, 1976. Heterotrophic micro- and macrocultures of a nitrogen-fixing cyanobacterium. *Arch. Microbiol.* 110(2-3): 145—147.
- [8] Кузьменко, М. И., 1981, Миксотрофизм синезеленых водорослей и его экологическое значение С. 210. Наукова думка

PHYSIOLOGY OF HETEROTROPHIC GROWTH OF BLUE-GREEN ALGA *ANABAENA AZOLLAEC*

Jin Chuanyin

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica)

Abstract

A method for obtaining axenic culture of blue-green algae was developed. A pure culture of *Anabaena azollae* was obtained with this method. *A. azollae* could grow heterotrophically in the dark. Fructose, glucose and sucrose supported the heterotrophic growth of *A. azollae*. The culture adapted to photoautotrophic growth grew better in the dark when NaNO_3 was used as nitrogen source, but the culture adapted to heterotrophic growth grew better when N_2 in air was used as nitrogen source. Stirring stimulated heterotrophic growth of *A. azollae*. The concentration of chlorophyll a of the culture grown in the dark for half year decreased to $1/3$ — $1/4$ of that in the light. When *A. azollae* grew at 5500 lux, exogenous fructose and glucose still stimulated growth and increased nitrogen fixation.