

鱼腥藻 HB1017 株化能异养 生长的研究

金传荫 宋立荣 黎尚豪

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

提 要

以葡萄糖和蔗糖为碳源, 检测了六株(种)鱼腥藻的化能异养生产能力。其中鱼腥藻 HB1017 株化能异养生长较快, 鱼腥藻 HB0 株化能异养生长缓慢, 其余四种鱼腥藻不能进行化能异养生长。鱼腥藻 HB1017 株能利用果糖、葡萄糖、蔗糖为底物进行化能异养生长, 但生长速率依次递减, 差别显著。8 磅湿热灭菌的果糖和蔗糖, 与过滤灭菌的相比, 只能维持低得多的化能异养生长速率。然而, 8 磅湿热灭菌的葡萄糖能维持比过滤法灭菌的高得多的化能异养生长速率, 与过滤灭菌的果糖效果类似。添加外源精氨酸使异养生长速率明显提高。氮源以硝酸钠较好。25°C、30°C、35°C 三组温度中, 以 35°C 最好。适当的搅拌下生长速率比静置时高。光照生长的自养培养物转入黑暗中即可利用适当的碳源进行化能异养生长, 无须经过“适应”过程。本实验中, 3d 最高平均生长速率为 0.74, 增代时间为 0.9d。

关键词 化能异养生长, 碳源, 氮源, 鱼腥藻

蓝藻(藻细菌)是光合自养生物, 利用光能与无机物进行生长增殖。有些种类也可以在黑暗中利用有机碳源进行化能异养生长增殖, 文献中已报道能进行化能异养生长的蓝藻约 50 株。以 Smith 为代表的学者认为令人信服的工作不多, 研究的种类也有限, 应更深入广泛地开展这方面的研究。在生产小球藻(绿藻)作健康食品的行业中, 那些用发酵罐异养培养小球藻的工厂, 与光能自养培养小球藻的厂家一样, 在商业上获得成功¹¹。这一事实更激起我们对蓝藻异养生长研究的兴趣。本研究检测了从稻田分离的六株鱼腥藻 (*Anabaena*) 的异养生长能力, 对其中异养生长较快的 *A.* 1017 株的异养生理作了较详细的研究。

1. 材料和方法

1.1 材料 本实验使用的六株鱼腥藻 (*Anabaena*) 均是从稻田中分离的, 是用作水稻生物肥源的主要种。藻种由我所淡水藻种库提供, 经纯化为无菌株, 然后用于异养研究。它们是: *A.* sp. HB0, *A.* sp. HB686, *A.* sp. HB1017, *A.* sp. HB1042, *A.* sp. HB1058 和 *A.* sp. HB1105 (以下分别以代号 HB0, HB686, HB1017, HB1042, HB1058 和 HB1105

1993年6月2日收到。

表示)。

1.2 培养 使用 Hughes 等^[2] II 号培养基。在研究鱼腥藻异养生长对碳源的要求时使用葡萄糖为碳源, 葡萄糖以 8 磅 15min 湿热灭菌, 然后以无菌操作适量添加到经高压灭菌的无机培养基中。异养培养条件和无菌检查基本上同前法^[3]。实验中发现, HB1017 的光能自养培养物的异养生长特性与长期在黑暗中生长的异养培养物相似, 所以大部分异养生长的实验, 均以处于对数生长期的光能自养培养物接种。一般培养 3d 后收获。

1.3 异养生长速率测定 取样同前法。本实验依 Sorokin^[4]以培养物细胞悬液的光吸收值 A_{730} 和 A_{665} 为生物量指标。为提高测量精度, 将收获物用玻璃匀浆器匀浆, 并加入适量丙三醇, 使细胞悬液良好。用上海分析仪器三厂 721 分光光度计测定, 光径 10mm, 读数换算成原培养物的光吸收值。实验证实 A_{730} 与干重正相关, A_{665} 与叶绿素含量正相关, 而本实验条件下, A_{730} 与 A_{665} 是同步变化的, 故大部分实验便只测定 A_{730} 。

2. 结果与讨论

2.1 六种鱼腥藻化能异养生长能力的检测

分别以葡萄糖和蔗糖为碳源, 检测了 6 种鱼腥藻的化能异养生长能力(表 1)。其中 HB1017 能利用这两种碳源进行异养生长, HB0 只能利用葡萄糖进行很缓慢的异养生长, 其余 4 种均不能利用这两种碳源进行异养生长。

表 1 六株鱼腥藻利用葡萄糖和蔗糖为碳源的异养生长能力

Tab. 1 The heterotrophic growth of 6 strains of *Anabaena* in substrate with glucose or sucrose

Strain 株 底物 Substrate	HB 1017	HB 0	HB 686	HB 1042	HB 1058	HB 1105
葡萄糖 Glucose (2g/L)	生长 Growth	缓慢生长 Slow growth	不生长 No	不生长 No	不生长 No	不生长 No
蔗 糖 Sucrose (2g/L)	生长 Growth	不生长 No	不生长 No	不生长 No	不生长 No	不生长 No

注: 30℃培养一周 Incubated at 30℃ for 1 week

前文已报道 *A. azollae* 的异养生长。在受试的 7 种鱼腥藻中, 有 3 种能进行化能异养生长, 它们在受试藻中占有相当的比例。这一结果与 Khoja 等^[5]的结果相符。然而, Allen 等的结果则表明, 能进行异养生长的蓝藻是罕见的^[6-9]。HB1017 的异养生长速率较快, 我们对其异养生长的条件进行了较详细的研究。

2.2 鱼腥藻 HB1017 异养生长对碳源的要求

2.2.1 对碳源种类的要求 在受试的 8 种碳源中, 只有果糖、葡萄糖、蔗糖 3 种能维持鱼腥藻 HB1017 的化能异养生长(表 2)。

果糖、葡萄糖和蔗糖被藻利用的情况差异甚大, 表现为它们维持的异养生长速率相差甚远。异养生长的研究要求有机底物用过滤灭菌法灭菌, 以避免高温高压引起有机物化学结构变化的复杂情况。因此, 先对比过滤灭菌的 3 种糖维持异养生长的速率。从表 3 可见, 使用过滤灭菌的果糖、葡萄糖、蔗糖时的异养生长速率分别为 0.383、0.197、0.169。显

然对于 HB1017 而言, 果糖是最佳碳源, 葡萄糖次之, 蔗糖最差。

表 2 能维持鱼腥藻 HB1017 的化能异养生长的碳源 (10mmol/L)
Tab. 2 The carbon sources supporting the heterotrophic growth of HB1017

果糖 Fructose	葡萄糖 Glucose	蔗糖 Sucrose	麦牙糖 Maltose	乳糖 Lactose	核糖 Ribose	甘露糖 Mannose	乙酸钠 Na acetate
生长 Growth	生长 Growth	生长 Growth	不生长 No	不生长 No	不生长 No	不生长 No	不生长 No

2.2.2 碳源的灭菌方式对鱼腥藻 HB1017 异养生长的影响 实验发现, 过滤法灭菌的某些糖不仅不支持受试藻的化能异养生长, 还导致“溶藻”现象的发生。是这些糖对藻有毒害作用还是灭菌不彻底? 尚待进一步研究。这一事实促进我们探索在某些实验中采用 8 磅 15min 对糖类灭菌。

表 3 展示了不同灭菌方法灭菌的糖对异养生长速率的影响。果糖与蔗糖经 8 磅湿热灭菌只能维持比过滤法灭菌的低得多的异养生长速率。葡萄糖则相反, 经 8 磅湿热灭菌后维持的异养生长速率比过滤法灭菌的高得多, 而与过滤法灭菌的果糖相近。表 3 列举的葡萄糖的实验中接种量较果糖高, 所以两者的生长速率不便比较。作者专门重复了这一试验, 对比 8 磅湿热灭菌的葡萄糖与过滤灭菌的果糖的效果, 使接种量相同。结果表明, 它们维持的异养生长速度是一样的, 没有差别(表 4)。此后的试验便采用 8 磅湿热灭菌的葡萄糖作碳源。

表 3 鱼腥藻 HB1017 利用经不同方法灭菌的三种碳源时的异养生长速率(10mmol/L)
Tab. 3 The heterotrophic growth rates of HB 1017 using different carbon sources

灭菌方法 Sterilization methods	果 糖 Fructos		蔗 糖 Sucrose		葡 萄 糖 Glucose	
	8 磅湿热灭菌 Heat	过滤灭菌 Filtration	8 磅湿热灭菌 Heat	过滤灭菌 Filtration	8 磅湿热灭菌 Heat	过滤灭菌 Filtration
A_{730} 起始值 Initial A_{730}	0.038	0.038	0.038	0.038	0.067	0.067
A_{730} 收获时值 Final A_{730}	0.061	0.12	0.052	0.063	0.174	0.121
平均生长速率 Specific growth rate	0.158	0.363	0.105	0.169	0.318	0.197
平均增代时间 Mean generation time(d)	4.4	1.8	6.6	4.1	2.2	3.5

注: 30±1°C 静置培养 3d Incubated at 30±1°C as batch culture for 3 days

2.2.3 葡萄糖的浓度对鱼腥藻 HB1017 异养生长速率的影响 在受试条件下, 葡萄糖 3 种不同的浓度并不引起异养生长速率的差异(表 5)。看来, 2g/L 已接近饱和浓度。以下试验中便多采用这一浓度。

2.3 鱼腥藻 HB1017 异养生长对氮源的要求

2.3.1 对无机氮源的要求 使用 3 种无机氮化合物: NaNO_3 、 KNO_3 与 NH_4Cl 。浓度是

表 4 鱼腥藻 HB1017 利用 8 磅湿热灭菌的葡萄糖和过滤灭菌的果糖为碳源的异养生长速率的比较

Tab. 4 Comparison between the heterotrophic growth rates of HB1017 using autoclaved glucose and filtered fructose as carbon sources

碳源 Carbon source (10mmol/L)	灭菌方法 Sterilization methods	起始 A_{730} Initial A_{730}	收获时 A_{730} Final A_{730}	平均生长速率 Specific growth rate	平均增代时间 Mean generation time (d)
果糖 Fructose	过滤法 Filtration	0.038	0.12	0.383	1.8
葡萄糖 Glucose	高压灭菌 Heat	0.038	0.127	0.402	1.7

注: 静置培养时间、温度同表 3 注。

表 5 葡萄糖浓度对异养生长速率的影响

Tab. 5 The effect of the glucose concentration on heterotrophic growth rate of HB1017

葡萄糖浓度 Concentration of glucose(g/L)	2	4	6
起始 A_{730} Initial A_{730}	0.047	0.047	0.047
收获时 A_{730} Final A_{730}	0.120	0.124	0.127
平均生长速率 Specific growth rate	0.234	0.243	0.249
平均增代时间 Mean generation time(d)	3.0	2.9	2.8

注: 30℃静置培养 4d Batch culture at 30℃ for 4 days

这样选定的: NaNO_3 使用 1.0g/L, 其含氮量为 0.165g/L, 将其余两种的含氮量也定为 0.165g/L, 则 KNO_3 为 1.19g/L, NH_4Cl 为 0.63g/L。这一浓度的 NH_4Cl 完全抑制 1017 的异养生长。 KNO_3 的效果稍逊于 NaNO_3 (表 6)。 NaNO_3 是较适合的无机氮源。

表 6 鱼腥藻 HB1017 异养生长对氮源的要求

Tab. 6 Suitable nitrogen sources for heterotrophic growth of HB1017

氮源种类 N source	浓度 Concentration (g/L)	起始 A_{730} Initial A_{730}	收获时 A_{730} Final A_{730}	平均生长速率 Specific growth rate	平均增代时间 Mean generation time (d)
KNO_3	1.19	0.020±0.002	0.123±0.016	0.605	1.2
NaNO_3	1.0	0.020±0.002	0.155±0.015	0.689	1.0
NH_4Cl	0.63	0.020±0.002	0.022±0.001	0	∞

注: 培养时间、温度同表 4 注。

2.3.2 对 NaNO_3 浓度的要求 人工培养基中, NaNO_3 的浓度一般是 1.5g/L。使用 0.5、1.0 和 1.5 3 种浓度的 NaNO_3 为氮源, HB1017 的异养生长速率没有明显差别, 前两种浓度还显得稍好一点(表 7)。

2.3.3 鱼腥藻 HB1017 异养生长对有机氮源精氨酸的要求 蓝藻异养生长是否需要外源氨基酸作补充氮源, 文献中有不同的报道。Rippka^[10]的结果表明, 外源氨基酸对 *Syne-*

表 7 鱼腥藻 HB1017 异养生长对 NaNO_3 浓度的要求Tab. 7 Suitable concentration of NaNO_3 for heterotrophic growth of HB1017

NaNO_3 浓度 Concentration of NaNO_3 (g/L)	起始 A_{730} Initial A_{730}	收获时 A_{730} Final A_{730}	平均生长速率 Specific growth rate	平均增代时间 Mean generation time (d)
0.5	0.020±0.002	0.154±0.014	0.687	1.0
1.0	0.020±0.002	0.155±0.015	0.689	1.0
1.5	0.020±0.002	0.134±0.021	0.634	1.1

注: 培养时间、温度同表 4 注。

表 8 外源精氨酸对鱼腥藻 HB1017 异养生长的促进作用

Tab. 8 The stimulating effect of exogenous arginine on the heterotrophic growth of HB1017

接种物预培养 Preculture	精氨酸浓度 Concentration of arginine (g/L)	起始 A_{730} Initial A_{730}	收获时 A_{730} Final A_{730}	平均生长速率 Specific growth rate	平均增代时间 Mean generation time (d)
光能自养生长 Photoautotrophy	0	0.012	0.070±0.006	0.588	1.2
	0.5	0.012	0.116±0.006	0.756	0.9
化能异养生长 Chemoheterotrophy	0	0.008	0.023±0.002	0.352	2.0
	0.5	0.008	0.066±0.007	0.703	1.0

注: 培养时间、温度同表 4 注。

表 9 适于鱼腥藻 HB1017 异养生长的精氨酸浓度

Tab. 9 Suitable concentration of arginine for heterotrophic growth of HB1017

精氨酸浓度 Concentration of arginine (g/L)	0	0.2	1.0	0
NaHCO ₃ 浓度 Concentration of NaHCO ₃ (g/L)	0	0	0	1.0
以 A_{730} 值 表示生物量 A_{730} as biomass	起始值 Initial	0.022	0.022	0.022
	收获值 Final	0.096±0.006	0.114±0.003	0.139±0.011
	生长速率 Specific growth rate	0.468	0.552	0.585
	平均增代时间 (d) Mean generation time	1.5	1.3	1.2
以 A_{665} 值 表示生物量 A_{665} as biomass	起始值 Initial	0.026	0.026	0.026
	收获值 Final	0.095±0.006	0.113±0.012	0.134±0.014
	生长速率 Specific growth rate	0.411	0.466	0.521
	平均增代时间 (d) Mean generation time	1.7	1.5	1.3

注: 32°C 静置培养 3.15d 后收获 Stand batch culture at 32°C for 3.15 days

chocystis 6714 的异养生长没有影响。Hoare 等^[11]以及 White 和 Shilo^[12]分别报道氨基酸混合物促进 *Nostoc* MAC 株和 *Plectonema* 73110 的异养生长。

试验表明,无论接种物预先是光能自养生长还是在黑暗中连续转接半年以上进行化能异养生长,添加外源精氨酸对 HB1017 的异养生长有明显的促进作用。连续异养生长的对外源精氨酸的需求更为强烈(表 8)。

精氨酸以什么浓度为佳?设置了 3 种浓度:0、0.2、1.0g/L,它们支持的异养生长速率有显著的差别,以 1.0g/L 浓度为最佳(表 9)。没有设置更高浓度,更高的浓度没有实际应用价值,精氨酸成本甚高。考虑到精氨酸是碱性氨基酸,是否由于其碱性而起到促进作用呢?添加 NaHCO_3 ,1.0g/L,其支持的异养生长速率高于对照,而与加 0.2g/L 精氨酸的作用相似(表 9)。说明简单地提高培养基的碱性可以使异养生长速率增加。精氨酸的促进异养生长的机制有待进一步研究。

2.4 鱼腥藻 HB1017 异养生长适宜温度范围

表 10 列举了两次分别的试验结果。可见 $30 \pm 3^\circ\text{C}$ 优于 $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$; $35 \pm 1.5^\circ\text{C}$ 优于 $30 \pm 1.5^\circ\text{C}$ 。可以认为 $30\text{--}35 \pm 1.5^\circ\text{C}$ 是比较适宜的温度范围。

表 10 温度对 HB1017 异养生长的影响

Tab. 10 The effect of temperature on heterotrophic growth of HB1017

培养温度 Temperature (°C)	25±0.5	30±3.0	30±1.5	35±1.5
起始 A_{730} Initial A_{730}	0.016	0.016	0.046	0.046
收获时 A_{730} Final A_{730}	0.046	0.091	0.124	0.138
平均生长速率 Specific growth rate	0.264	0.435	0.248	0.275
平均增代时间 Mean generation time (d)	2.6	1.6	2.8	2.5

注: 静置培养 4d 后收获 Stand batch culture for 4 days

2.5 搅拌对鱼腥藻 HB1017 异养生长的影响

表 11 所示的结果表明,一定速度的振摇有利于鱼腥藻 HB1017 的异养生长。

表 11 搅拌对鱼腥藻 HB1017 异养生长的影响

Tab. 11 The effect of turbulence on heterotrophic growth of HB1017

	起始 A_{730} Initial A_{730}	收获时 A_{730} Final A_{730}	平均生长速率 Specific growth rate	平均增代时间 Mean generation time (d)
静置培养 Stand batch culture	0.067	0.174±0.017	0.318	2.2
摇床培养 Batch culture in a shaker (120r/mn)	0.067	0.206±0.026	0.374	1.9

注: 培养时间、温度同表 4 注。

3 结论

3.1 本文及前文^[3]工作中,共检测了 7 种鱼腥藻,其中 3 种能进行化能异养生长,占有相

当的比例。作者倾向 Khoja 的意见, 即能进行化能异养的蓝藻在蓝藻中占有一定比例, 并非罕见。

3.2 这 3 种能进行化能异养生长的蓝藻, 表现出不同的异养生理特点。*Anabaena* sp. HB0 异生长非常缓慢; *Anabaena azollae* 需要一定“适应”过程, 其异生长速率才提高; 然而, *Anabaena* sp. HB 1017 却不存在“适应”过程。

3.3 鱼腥藻 HB1017 异生长时, 对精氨酸的需求, 以前未见报道, 其机制尚待深入研究。

3.4 葡萄糖经 8 磅湿热灭菌后, 维持鱼腥藻 HB1017 的异生长速率与过滤灭菌的果糖作碳源时类似, 这在生产实践中很有意义, 既可降低碳源的成本, 又可使灭菌彻底。其中的化学机制, 尚待进一步研究。

3.5 虽然在提供的最佳条件下, 鱼腥藻 HB1017 的异生长速度可达 0.74, 增代时间为 0.9d。只有 Wolk^[13] 达到过这样类似的异生长速率, 然而从工业生产的角度考虑, 这一生长速率显然太低了。今后生产上可能采用的方式以混合营养生长更佳(待发表)。

参 考 文 献

- [1] Pinnan Soong. Production and development of Chlorella and Spirulina in Taiwan. In: G. Shelef and C. J. Soeder (Eds) *Algae Biomass*, Elsevier/North-Holland Biomedical Press. 1980: 97—113.
- [2] Hughes E O, Gorham P R, Zehnder A. Toxicity of a unicellular culture of *Microcystis aeruginosa*. *Can. J. Microbiol.* 1958, **4**:225—236.
- [3] 金传荫. 满江红鱼腥藻的异养生理, 水生生物学集刊, 1984, **8**(4): 443—448。
- [4] Sorokin C. Dry weight, packed cell volume and optical density. In: J.R. Stein (Eds.) *Handbook of phycological methods: Culture methods and growth measurements*. London: Cambridge University Press. 1973: 321—344.
- [5] Khoja T M, Whitton B A. Heterotrophic growth of blue-green algae. *Arch. Mikrobiol.*, 1971, **79**: 280—282.
- [6] Allen M B. The cultivation of Myxophyceae. *Arch. Mikrobiol.*, 1952, **17**: 34—53.
- [7] Allen M M. Studies on the properties of some blue-green algae. Ph. D. thesis. Berkeley: University of California, 1966.
- [8] Baker A F, Bold H C. Taxonomic studies in the Oscillatoriaceae. Austin, Texas: University of Texas Publication No. 7004., 1970.
- [9] Stanier R Y, et al. Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order Chroococcales). *Bact. Rev.*, 1971, **35**:171—205.
- [10] Rippka R. Photoheterotrophy and chemoheterotrophy among unicellular blue-green algae. *Arch. Mikrobiol.*, 1972, **87**:93—98.
- [11] Hoare D S, Ingram L O, Thurston E L, Walkup R. Dark heterotrophic growth of an endophytic blue-green algae. *Arch. Mikrobiol.*, 1971, **78**:310—321.
- [12] White A W, Shilo M. Heterotrophic growth of the filamentous blue-green alga *Plectonema boryanum*. *Arch. Mikrobiol.*, 1975, **102**:123—127.
- [13] Wolk C P, Shaffer P W. Heterotrophic micro- and macroculture of a nitrogen-fixing cyanobacterium. *Arch. Microbiol.*, 1976, **110**(2—3):145—147.

STUDY ON CHEMOHETEROTROPHIC GROWTH OF *ANABAENA* HB1017

Jin Chuanyin, Song Lirong and Li Shanghao

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

Abstract

Six species of *Anabaena* were initially examined for their ability to grow on glucose and sucrose chemoheterotrophically. Among these species, HB1017 grew fast and HB 0 very slow, while the other four species did not survive at all. The effects of fructose, glucose and sucrose, though all supported growth of HB1017, on growth were apparently different. The positive effect of the sugar substrates was in the order of fructose, glucose and sucrose. It was found that autoclaved fructose and sucrose only supported a much lower heterotrophic growth rate than the filtrated ones, while autoclaved glucose sustained a higher growth rate as did the filtrated fructose. The addition of exogenous arginine increased heterotrophic growth rate, and NaNO_3 was suitable nitrogen source for growth. It appears that optimal growth was obtained if the culture was provided with appropriate stirring and temperature at 35°C. The photoautotrophic growth culture of HB1017, when transferred to chemoheterotrophic condition, could quickly start to grow in it, without the "adaptation phase". The average heterotrophic growth rate for 3 days was 0.74, and the generation time was 0.9 day.

Key words Chemoheterotrophic growth, Carbon source, Nitrogen source, Cyanobacteria, *Anabaena*