

# 硫酸铜强化固氮蓝藻生长的研究\*

王少梅 王乾麟 黎尚豪

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

## 提 要

培养基中添加 0.005—0.03ppm 铜能强化固氮蓝藻生长。混合藻种(鱼腥藻属混合藻种)、固氮鱼腥藻 *Anabaena azotica* (水生 686) 和多变鱼腥藻 *Anabaena variabilis* (水生 1058) 最佳铜浓度分别为 0.01ppm 和 0.03ppm。池底铺土进行培养固氮蓝藻, 铜浓度的范围略宽。

**关键词** 铜离子, 强化, 固氮蓝藻

固氮蓝藻是一类能进行光合作用放氧又能固定大气中的分子态氮合成氮素化合物的生物。采用薄膜土池培养种源和茬口田生产藻种的方法, 初步解决了大面积生产固氮蓝藻藻种问题。固氮蓝藻作为晚稻新肥源已获得良好的增产效果<sup>[1]</sup>。加速固氮蓝藻生长, 提高固氮蓝藻产量是推广固氮蓝藻急需解决的问题。在固氮蓝藻的生长过程中, 除了需要大量的碳、氮和磷营养元素外, 还需要微量元素。在培养基中钴含量为 0.4—1.2  $\mu\text{g}/\text{l}$ , 锰含量为 0.01—0.1  $\mu\text{g}/\text{l}$ , 硼含量为 0.05mg/l, 对固氮蓝藻的快速铺展具有促进作用<sup>[2]</sup>。我们采用铜 ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )、钴 ( $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )、锰 ( $\text{MnO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ )、硼 ( $\text{NaB}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ )、钼 ( $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) 和铁 [ $\text{Fe}(\text{SO}_4)_3$ ] 等微量元素进行强化固氮蓝藻生长试验, 以硫酸铜的效果最佳, 取得了加速室内单种培养和大田混合藻种培养的适宜浓度。

## 材 料 和 方 法

按铜离子计算, 硫酸铜的试验浓度为 0.005ppm、0.01ppm、0.03ppm、0.06ppm、0.1ppm、0.2ppm、0.3ppm, 以不加硫酸铜为对照。以混合藻种和多变鱼腥藻(水生 1058)为材料的试验在 0.25m<sup>2</sup> 和 0.5m<sup>2</sup> 塑料薄膜土池内进行, 一部分试验在池底铺土, 另一部试验不铺土; 以固氮鱼腥(水生 686)为材料的试验采用 250ml 三角锥瓶盛 100ml 培养基, 在恒温室内进行。培养基有两种: (1) 水生“111”无氮培养基; (2) 钙镁磷肥 3g, 氯化钾 0.5g, 自来水 1 000ml, 煮沸冷却后过滤。接藻种后, 光照为 5 900Lx 照射 1h, 然后在光照为 1 000Lx

\* 郑英同志为本文插图复墨, 谨此致谢。

1) 固氮蓝藻工作通讯, 第一期(湖北省水生生物研究所, 咸宁地区革委会科学技术委员会合编)。

1989年1月24日收到。

下每天照射 12h, 培养温度为 28℃—35℃, 培养 3—5 天测定藻种的鲜重、干重, 用开氏法测定干物质含氮量, 用乙炔还原法测定固氮量。测量藻体营养细胞和异形胞的大小, 对孢子、异形胞、营养细胞和处于分裂的营养细胞进行计数。

## 结 果

### (一) 铜浓度对固氮蓝藻生长现象的观察

土池接种混合藻种和多变鱼腥藻(水生 1058), 添加不同浓度硫酸铜进行观察, 发现铜浓度在 0.03ppm 以下时, 土池中固氮蓝藻藻体颜色蓝绿带黄, 胶质少, 藻体迅速铺展增厚, 铺展连片后, 厚薄均匀; 铜浓度在 0.03ppm 以上时, 土池中固氮蓝藻藻体颜色蓝绿, 胶质多, 藻体呈块状增厚, 藻体铺展连片后, 厚薄不匀, 厚处有起皱现象。随着铜浓度的增加, 这种现象愈来愈显著。观察结果表明, 低浓度的铜具有强化固氮蓝藻藻体迅速铺展生长的作用。

表 1 铜浓度对固氮蓝藻鲜、干重, 总氮量及固氮量的影响

Tab. 1 Wet weight, dry weight, Total nitrogen quantity and nitrogen-fixing quantity of the nitrogen-fixing blue-green algae in relation to  $\text{Cu}^{++}$  concentration

种类 <sup>①</sup>	处理 <sup>②</sup>	铜离子 浓度ppm <sup>④</sup> 项目 <sup>③</sup>	比 对 照 增 减 % <sup>⑤</sup>						
			0.005	0.01	0.03	0.06	0.1	0.2	0.3
混合藻种 <sup>⑥</sup>	钙镁磷 + 草灰 <sup>⑧</sup> + 土 <sup>⑨</sup>	鲜重 <sup>⑪</sup>	+7.1	+7.1	+3.9	+2.3	-6.4	-16.9	-18.4
		干重 <sup>⑫</sup>	+10.5	+24.1	+6.8	+6.8	-2.3	-16.8	-25.9
		总氮量 <sup>⑬</sup>	+12.2	+34.4	+13.1	+11.5	-2.2	-3.7	-11.4
		固氮量 <sup>⑭</sup>	+16.1	+52.7	+45.3	+30.5	-1.5	-32.1	-46.6
	钙镁磷 + 草灰 <sup>⑨</sup>	鲜重 <sup>⑪</sup>	+11.8	+15.7	+11.4	-11.4	-8.4	-32.2	-42.3
		干重 <sup>⑫</sup>	+15.7	+21.8	+21.1	-8.5	-8.0	-24.9	-38.3
		总氮量 <sup>⑬</sup>	+19.7	+27.5	+9.8	-12.3	-17.9	-33.2	-43.5
		固氮量 <sup>⑭</sup>	+6.3	+8.6	+5.6	-17.7	-51.5	-60.8	-65.1
固氮鱼腥藻 <sup>⑦</sup> (水生 686)	钙镁磷 + 氯化钾 <sup>⑩</sup>	鲜重 <sup>⑪</sup>	+2.3	+21.7	+5.8	-8.7	-62.9	-79.6	-52.1
		干重 <sup>⑫</sup>	+3.0	+23.3	+19.5	-8.4	-26.9	-60.2	-68.9
		总氮量 <sup>⑬</sup>	—	+57.5	+57.2	-5.2	-22.6	-53.1	—
		固氮量 <sup>⑭</sup>	—	—	—	—	—	—	—
多变鱼腥藻 <sup>⑦</sup> (水生 1058)	钙镁磷 + 草灰 <sup>⑧</sup>	鲜重 <sup>⑪</sup>	+9.6	+11.7	+37.1	-5.0	-7.5	-25.1	-32.1
		干重 <sup>⑫</sup>	+13.9	+22.4	+53.4	-3.2	-4.4	-22.1	-22.2
		总氮量 <sup>⑬</sup>	+17.3	+29.9	+66.6	-4.4	-11.3	-23.5	-17.8
		固氮量 <sup>⑭</sup>	+8.9	+20.3	+42.4	-12.2	-38.3	-53.2	-60.2

① Species; ② Treatment; ③ Item; ④  $\text{Cu}^{++}$  concentration ppm; ⑤ % increased or reduced with control; ⑥ Mixed culture of *Anabaena* species; ⑦ *Anabaena azotica*; ⑧ *Anabaena variabilis*; ⑨ Calcium magnesium phosphate + plant ash + soil; ⑩ Calcium magnesium phosphate + plant ash; ⑪ Calcium magnesium phosphate + KCl; ⑫ Wet weight; ⑬ Dry weight; ⑭ Total nitrogen quantity; ⑮ Nitrogen-fixing quantity; ⑯ % increased or reduced with control

表 2 铜浓度对固氮鱼腥藻(水生 686)细胞类型的影响

Tab. 2 Cell types of *Anabaena azotica* in relation to  $\text{Cu}^{++}$  concentration

铜浓度 <sup>①</sup> ppm;	项目 <sup>②</sup>	异形胞 <sup>④</sup> (长×宽) $\mu\text{m}$ <sup>⑤</sup>	营养细胞 <sup>⑥</sup> (长×宽) $\mu\text{m}$	营养细胞 <sup>**⑧</sup>		异形胞 <sup>**④</sup> %	孢子 <sup>**⑧</sup> %
				%	其中分裂% <sup>⑦</sup>		
对照 <sup>③</sup>		6.63×5.78	4.76×3.4	91.95	17.93	7.22	0.83
0.01		7.31×6.55	5.27×3.4	89.20	31.63	10.40	0.40
0.03		7.14×6.45	5.27×3.4	91.70	27.27	8.06	0.24

\* 为 20 个视野三次重复平均数

\*\* 为 4 个视野三次重复平均数

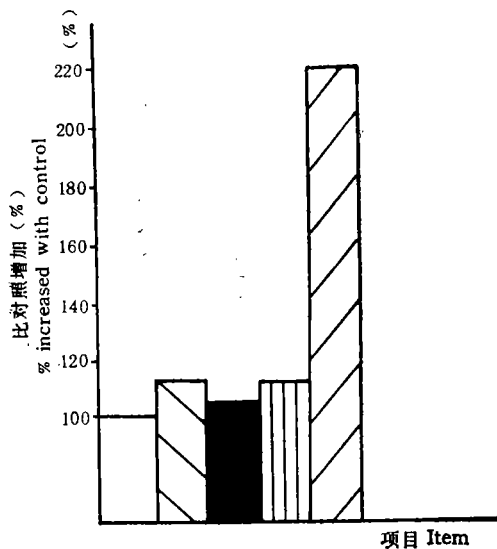
①  $\text{Cu}^{++}$  concentration ppm; ② Item; ③ Control; ④ Heterocysts ⑤ Length×width; ⑥ Vegetative cells; ⑦ Division cells; ⑧ Akinetes.

图 1 在“111”无氮培养基中加铜对固氮鱼腥藻(水生 686)生长的影响

Fig. 1 Effect of addition of  $\text{Cu}^{++}$  on the growth of *Anabaena azotica* in “111” nitrogen-free culture medium

□ 对照 Control; ▨ 鲜重 Wet weight; ■ 干重 Dry weight; ▤ 总氮量 Total nitrogen quantity; ▧ 固氮量 ;Nitrogen-fixing quantity

## (二) 铜浓度对固氮蓝藻鲜重、干重、含氮量及固氮量的影响

铜浓度在不同培养条件下对混合藻种、固氮鱼腥藻(水生 686)和多变鱼腥藻(水生 1058)影响的测定结果如表 1 所示。

1. 铜浓度在 0.005—0.03ppm 范围内, 这些藻种的鲜重、干重、干物质含氮量和固氮量均比对照增加, 具有强化固氮蓝藻生长的作用。混合藻种和固氮鱼腥藻(水生 686)以 0.01ppm 铜强化效果最佳, 而多变鱼腥藻(水生 1058)的最佳铜浓度为 0.03ppm。

2. 用 0.01ppm 铜强化混合藻种时, 池底铺土比池底无土的效果显著。当铜浓度为 0.06ppm 时, 池底铺土对混合藻种仍有强化效果, 而池底无土的则不如对照。这说明了铜对混合藻种的强化作用在有土条件下, 其浓度的范围略宽。

3. 当铜浓度超过 0.03ppm 时, 测出的藻种各项指标均不如对照, 藻种生长均被抑制。这种抑制作用随着铜浓度的增加而加剧。此外与池底有土相比, 池底无土铜浓度对混合藻种的抑制作用更甚。

4. 从混合藻种和固氮鱼腥藻(水生 686)各项指标的测定结果来看, 0.01ppm 铜的强化效果突出表现在藻种的干物质总氮量和固氮量的提高。对混合藻种的固氮量, 池底有土比无土的提高 44.1%; 在“111”无氮培养基中, 固氮鱼腥藻(水生 686)的固氮量比对照提高 1.2 倍(图 1)。对多变鱼腥藻(水生 1058), 0.03ppm 铜的强化效果主要表现在藻种干重和干物质总氮量的提高。

5. 用显微镜观察固氮鱼腥藻(水生 686)的细胞可以看到: 0.01ppm 铜能促使藻细胞分裂。与对照比, 异形胞明显增大并增加 3.18%, 分裂的营养细胞增加 13.7%, 而孢子则减少(表 2)。这充分证明了适宜的铜浓度能促进藻细胞分裂。

## 讨 论

1. 极微量铜对某些藻类的生命过程是不可少的<sup>[2]</sup>。然而铜化合物对若干藻类毒性的影响也是由于二价阳离子引起的<sup>[5-6]</sup>。因此铜化合物对藻类生长的强化或抑制作用取决于铜离子的浓度。本研究指出: 当铜浓度为 0.005—0.03 ppm 时, 铜能明显地强化固氮蓝藻生长; 当铜浓度在 0.03ppm 以上时, 铜却成为固氮蓝藻生长的抑制剂。这一结果与 Laube 等人于 1980 年研究铜对鱼腥藻 7120 生长影响的结果<sup>[7]</sup>是一致的。

铜是多酚氧化酶的必要部分, 还可能是亚硝酸还原酶的一部分, 它可能在固氮作用中起催化作用<sup>[2]</sup>。因此在本研究中, 用微量铜处理固氮蓝藻, 这也许是它的固氮量比对照有明显提高的原因。

在有土条件下, 0.06ppm 铜对混合藻种仍有强化生长的作用, 这是由于土壤条件所致。众所周知, 铜在土壤中有水溶性、交换态、稀酸可溶态、螯合态、有机态和不溶性盐等存在形式, Ellis<sup>[3]</sup>指出, 土壤对各种微量金属离子具有特异的吸附现象。土壤中所含的粘土矿物, 可以吸附铜离子。土壤腐殖质和铜离子能形成稳定的络合体, 使可给态铜向有机态铜转变, 水溶性铜和交换性铜减少, 从而降低了铜的可给性。在有土条件下, 加铜强化固氮蓝藻生长, 降低了培养液中铜离子的浓度, 因此, 适宜固氮蓝藻生长的铜离子的浓度范围略宽, 所以无土培养固氮蓝藻时, 使用硫酸铜必须严格控制浓度。

2. 固氮蓝藻作为作物氮素肥源包括两个方面: 一是生长过程中固氮蓝藻藻体释放出总固氮量的 10—70% (平均 30%) 的氮素化合物, 如氨基酸和短肽<sup>[4]</sup>; 二是利用蓝藻固定空气中氮素合成蛋白质增殖藻体, 藻体死亡形成有机质分解释放出大量的氮化合物。因此, 固氮蓝藻藻体增殖的快慢、干物质含量及含氮量的多少和固氮能力的强弱是固氮蓝藻作为水稻肥效高低的重要指标。在不同培养条件下, 各种固氮蓝藻对硫酸铜浓度的要求是不一样的, 而适宜的硫酸铜浓度对藻类的影响亦有差异。

3. 本研究指出,铜强化固氮蓝藻生长的最佳浓度为 0.01ppm 和 0.03ppm, 所测数据进行了统计分析,其结果是可靠的 ( $p < 0.001$ )。因此,在室内外培养固氮蓝藻藻种,在培养基中添加适宜的硫酸铜,对提高生物肥源有一定意义。

### 参 考 文 献

- [1] 中国科学院水生生物研究所生态组, 1978。双季晚稻大面积放养固氮蓝藻的试验。水生生物学集刊, (6): 299—310。
- [2] 北京大学生物系等译(F.B. 索尔兹伯亚, C. 罗斯著), 1979。植物生理学。科学出版社。
- [3] 唐贤述编译, 1984。近年来日本在微量元素铜方面的一些研究情况。土壤学进展, (4): 19—22。
- [4] 黎尚豪等, 1959。固氮蓝藻对水稻肥效的初步研究。水生生物集刊, (4): 440—444。
- [5] Sunda, W. and Guillard, R. L., 1976. The relationship between cupric ion activity and the toxicity of copper to phytoplankton., *J. Mar. Res.*, 34: 511—529.
- [6] Anderson, D. M. and Morel, F. M., 1978. Copper sensitivity of *gonyaulax tamarensis*. *Limnol. Oceanogr.* 23: 283—295.
- [7] Laube, V. M., 1980. Strategies of response to copper, cadmium, and lead by a blue-green and green alga *Canadian Journal of Microbiology*, 26(11) 1300—1311.

## STUDY ON THE ENHANCEMENT OF GROWTH OF THE NITROGEN-FIXING BLUE-GREEN ALGAE BY ADDITION OF CUPRIC SULPHATE

Wang shaomei, Wang Qianlin and Li Shanghao

(*Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan 430072*)

### Abstract

Additions of 0.005—0.03ppm cupric ion enhanced the growth of the nitrogen-fixing blue-green algae in the culture medium. The optimum  $\text{Cu}^{++}$  concentration for growth is 0.01 ppm for mixed culture of *Anabaena* species and monoculture of *Anabaena azotica*; for monoculture of *Anabaena variabilis*, the optimum concentration is 0.03ppm. The optimum range of  $\text{Cu}^{++}$  concentration is wider for algae in tanks with soil substrates than for algae in tanks without substrates.

**Key words**  $\text{Cu}^{++}$ , Enhancement, Nitrogen-Fixing Blue-Green Algae