

栅藻高温品系的培育及其生长繁殖规律*

夏宜珍 杜代贤 钱凯先** 黎尚豪

(湖北省水生生物研究所)

提 要

单细胞绿藻的最适生长温度,一般都在25℃上下,这给许多试验工作,特别是夏季露天浅层培养和室内高光强强化培养工作造成了大幅度降温的额外负担。而高温品系则可以减轻降温的困难,并且具有高产的特征。本文报道我们培育栅藻高温品系的结果。观察了在长期高温(暗期36℃,光周期42℃)培育后细胞形态上的变化,并着重研究了生长繁殖规律,获得了同步培养。细胞生长在光照下进行,细胞分裂在暗中进行,光照12小时后细胞成熟,光照停止后4小时内,出现孢子形成和子细胞释放的高峰。在2,400lx的弱光照条件下,生长率K值仍可达到2.07(以每日 \log_e 单位计),每个母细胞平均可产生8.7个子细胞,显示了生长繁殖迅速的特点。

一、引 言

从上世纪末叶以来,各国学者在进行单细胞藻类的各种试验研究和大量培养时,大都把培养温度控制在23—28℃之间,尤其是集中在25℃^[10]。通常用作研究材料的小球藻、栅藻,生长最适温度也正是在25℃上下^[7,8,12,14];并且一般把大约35℃当做温度最高极限^[13]。这种温度上的局限性,往往使许多试验工作存在降温的困难,增加了生产性培养的成本。因此,选育一种耐高温的品系,对试验研究工作和生产性培养,均有所裨益。Sorokin和Myers氏(1953)首先在美国南部的得克萨斯州(Texas)培育出一个高温品系,生长最适温度为39°^[10]。Sorokin等氏还证明,藻类的高温品系具有较高的生长率和光能利用率,是一种高效能藻类(high-efficiency algae)^[12]。

高温品系的标准,文献中尚无一致的规定。Трухин氏(1963)曾提出划分高温品系的原则^[15]:将藻类接种在琼脂培养基上,40—41℃,2,500lx,培养10天不褪色,接种到新鲜培养基上,在室温下具有生长能力,即是高温品系。我们认为:所谓高温品系,应该在40—45℃高温条件下能够正常生长,而且繁殖迅速;Трухин氏所定的原则,既不确切,要求又太低,是不可取的。我们以水生58号斜生栅藻[*Scenedesmus obliquus*(Turp.) Kütz.]^[14]为材料进行高温培育时,所采用的温度是42℃(光期);据Davis等氏试验,昼夜保持一定的温差,于藻类生长有利^[6],为了模拟武汉地区昼夜的温差,在暗期我们采用了36℃。用

1974年1月12日收到

* 本文系《栅藻、小球藻培养的研究》之四,摘要曾在中国植物学会三十周年年会宣读。在我们的试验工作全部完成并摘要发表之后, Senger等氏相继发表了栅藻同步培养与生长繁殖方面的研究报告,其中许多结果是和我们在本文中所论及的情况相符合的。有关这方面的材料, Bishop等氏已经作了归纳^[5],本文不再赘述。

** 已调离水生所。

人工控制的高温(光期 42℃, 暗期 36℃)对藻种进行了近两年的诱变、淘汰和分离选择后, 使本来不适应高温的棚藻获得了稳定的生长, 进而对棚藻在高温条件下的形态变化以及生长率、细胞分裂、细胞大小和光强曲线等生长繁殖规律, 进行了详细的研究。

二、高温品系培育方法

在高温品系的培育过程中, 我们采用水生 4 号培养基 (HB 4), 光强 2,000 lx 左右, 光暗比为 12:12, 光照期通以含 5% CO₂ 的空气, 温度控制在 36℃ (暗)—42℃ (光), 并间或以 48—60℃ 的过高温进行短期处理。培养物经常予以移养 (subculture)。

(一) 混合培养阶段

高温诱变和藻种选择: 最初, 我们是以棚藻和小球藻混养的藻种作为起始的培育材料。从一般观察和生长测定结果看来, 在这一阶段, 藻种不能适应 42℃ 的高温, 更不能稳定生长, 以致生长停滞, 颜色变黄, 容易沉淀。而同一藻种, 在室温下却生长迅速, 颜色翠绿, 悬浮性强。两者形成鲜明的对照。坚持一段时间的高温培育后, 它们比较能适应高温, 但仍不能得到稳定的生长速率, 小球藻和棚藻此起彼落, 相互消长, 竞争剧烈, 都难于形成稳定的优势。在此阶段, 藻种还间或受到 50℃ 上下的过高温的处理, 使之受到锻炼和淘汰。

(二) 单种培育阶段

经过第一阶段的 9 个月混合培育以后, 在一号培养物中, 斜生棚藻的生长渐趋稳定, 在混合培养中形成了优势。以此号培养物为材料, 用平板稀释与微吸管法, 分离出棚藻单种, 在固体培养基上得到单种藻后, 即转入液体培养, 继续在 36—42℃ 高温下培育。在此阶段, 藻种又先后经历了 3 次过高温 (48—60℃) 处理, 进行了细胞个体的淘汰与选择。

(三) 单源高温品系¹⁾的分离培养阶段

经过 9 个月的单种培育之后, 斜生棚藻已逐步具备了耐高温的特性, 这时, 我们以在过高温处理后表现最好的一号单种培养物为材料, 进行单个细胞的分离培养, 获得了若干号液体培养的单源培养物, 再从其中选出一号生长较好的培养物水生-6105 (HB-6105) 作为单源高温棚藻品系。

(四) 过高温处理对藻类的影响

上面曾经提到, 在品系培养过程中, 除了采用稳定的高温条件进行诱变和选择外, 藻种还多次受到过高温的处理。藻种经过 48—60℃ 处理后, 大部分个体死亡; 少数细胞, 颜色也由绿变白, 尔后再转绿, 只有极少数细胞, 始终保持绿色而保存下来。这些经过过高温处理尚能保存下来的个体, 就成为我们继续培育的好材料。我们对 60℃ 过高温处理半小时到两小时的试验进行了观察。处理后 1—2 小时内, 无论是目测整个培养物或是显微镜观察, 均无显著变异, 3—5 小时以后, 培养物颜色开始转淡、光密度下降, 细胞由绿而草绿, 进而变黄, 到第二天, 整个培养物全部变白。此时, 用荧光显微镜检查, 细胞大量死亡, 培养物的电导率比对照略有上升, 表明藻类大量死亡后, 体内物质分解、析出, 使培养液中电解质增加。经过一周时间以后, 藻类才渐次恢复, 在一部分原先已经变白而透明的细胞

1) 从一个细胞繁殖起来的单细胞藻类培养物, 我们称之为“单源培养物”, 而从这种单源培养物中培育出来的品系, 我们称之为“单源品系”。

内,开始出现一个小绿点(叶绿体),绿点逐渐扩大,最后整个细胞复绿而成为正常个体。从试验中发现,栅藻比小球藻更能忍受高温,60℃处理后,比较容易恢复正常。

试验结果表明:过高温处理可以起到淘汰锻炼与选择藻种的作用,是培育高温品系的一种辅助方法。

三、斜生栅藻在长期高温培育后的形态变化和生长繁殖规律

为了进一步掌握栅藻在长期高温培育后的形态特征和生长繁殖规律,我们对水生-6105号斜生栅藻在高温条件下的形态变化和细胞生长、分裂等方面,进行了比较深入的观察与研究。

(一) 形态特征 在长期高温培育过程中,细胞形状逐渐由两端比较尖锐变得比较圆钝。集结体(coenobium)只在似亲孢子刚刚释放时较多,一般以单细胞个体为主,而集结体较为罕见。在细胞繁殖过程中,常常出现畸形现象。一类畸形是细胞两端的胞壁增厚突起,细胞体积显著增大;另一类畸形是形成裤状(叉形)个体,整个细胞长成人字形。从染色观察看来,后一类畸形之产生,可能是由于母细胞在进行内分裂形成孢子时,原生质体分割不完全所引起。所以有时可以在人字形个体中发现双核存在。

(二) 生长率K值 进行生长率和生长繁殖规律试验的藻种,事先均经过相同的预备培养,即每隔2天移养一次,至少连续移养3次。最后一次移养后培养了3天的藻种,再用作试验材料。培养基仍用水生4号(NaHCO_3 改为每升培养液中0.3克^[3],铁改用Fe-EDTA^[1],加A₅液),其他条件均与藻种培育时相同。

根据反复测定的结果,在36—42℃和弱光照(2,400 lx)条件下,水生-6105的生长率K值,(以细胞数每日 \log_e 单位计算)已经达到2.07(试验重复的标准误差是±0.04)。

国内以往关于栅藻生长率的报告不多。叶清泉和黎尚豪(1956)曾在700—20,000 lx光强范围内用6种光强研究了斜生栅藻的生长率,最大为0.67(出现在20,000 lx)^[1]。根据夏宜珍等(1962)报告中的资料计算,水生58号斜生栅藻当时的生长率约为1.0^[2]。可见水生-6105的现行生长率已有所提高。国外应用最广的蛋白核小球藻Emerson品系和Tx7-11-05高温品系的生长率,分别为1.96和5.8^[2],这都是在各自的最适生长温度和饱和光强下测得的最大生长率。业已证明:高温品系的光饱点比一般品系要高得多,在最适温度和饱和光强以内,温度越高,要获得较高生长率所需的光强也就越高^[11,12]。由此可以估计,当光照强度提高以后,水生-6105的生长率可望比2.07更高。表1是几种藻种生长率K值的比较。

试验结果表明,不同的生长指标(细胞数、干重、生物量和光密度等)在培养过程中的变化往往不是一致的,但所有这些指标的K值都比较接近,均在2.0左右。2.07是以细胞数为指标的稳定的生长率,若以其他指标计算,有时可以达到2.2。

1) Fe-EDTA配方(R. Staub, 1961):5毫升1N的 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶液(用1N的HCl配制)和5毫升0.1N的 Na-EDTA 溶液相混合,稀释到500毫升,即成Fe-EDTA贮存液;使用时每升培养液中加贮存液1毫升。

2) 关于Tx7-11-05的K值,文献中很不一致:Myers氏(1953)最先称该品系以每日 \log_e 单位计, $K=5.8$ ^[3];在Sorokin氏等(1953)关于该品系的正式报告中,以每日 \log_{10} 计, $K=2.8$ ^[10];而在Sorokin氏和其他作者以后的报告中,以每日细胞物质加倍数(即 \log_2)计, $K=9.2$ ^[11,12]。

表 1 几种藻类的生长率 K 值的比较(均按每日 \log_2 单位计算)

藻类	生长率	培养条件	
		温度 $^{\circ}\text{C}$	光强 lx
蛋白核小球藻 Emerson 品系	1.96	25	5,400(饱和)
高温小球藻 Tx7-11-05	5.8	39	15,000(饱和)
高温棚藻水生-6105	2.07	42	2,400(未饱和)
斜生棚藻	0.67*	25-30	20,000(饱和)
水生 58 棚藻	1.0**	28	2,000(未饱和)

* 见叶清泉和黎尚豪(1956)报告^[1]。

** 根据夏宜珍等(1962)的资料计算得到^[2]。

(三) 光强曲线 用 3 种光强(1,200, 1,800, 2,400 lx)初步进行了光强对水生-6105 生长繁殖影响的试验, 结果见图 1。已经知道, 一个典型的光强曲线分为三个部分, 即: (1) 生长期随光强提高而上升的光相关部分; (2) 光无关部分(顶峰部分); (3) 生长期随光强提高而下降的光相关部分。由于我们试验的 3 种光强均在饱和光强以下, 所以图 1 只显示了光强曲线的一部分。这也证明, 如提高光强, 则 K 值将相应提高。

(四) 同步培养 在高温和 2,400 lx 光照下, 采用 12:12 的光暗制, 可以获得水生-6105 的同步培养。对细胞核染色进行观察统计的结果, 在第一个光暗周期中, 光照停止后, 进行分裂的细胞占培养物细胞总数的 85—90%, 而其中 95% 的细胞是在光照停止后的 4 小时之内同步进行分裂并完成全部分裂过程的。光照后期, 培养物均由成熟的大型母细胞所组成, 而在黑暗后期, 培养物中几乎全部是小型的子细胞。

(五) 生长与细胞分裂 采用定期采样观察测定的方法, 对水生-6105 斜生棚藻的生长和细胞分裂, 进行了反复试验。图 2 是这种棚藻在温度为 36°C(黑暗期)—42°C(光照期), 光、暗比为 12:12, 光强为 2,400 lx 等条件下的一

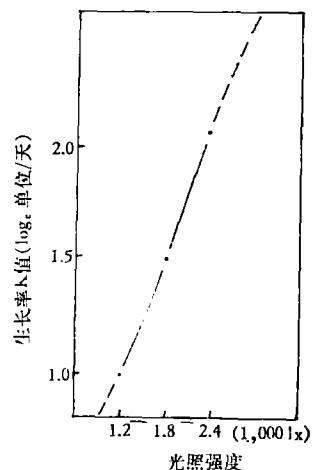


图 1 斜生棚藻在三种光强下的生长率 K 值

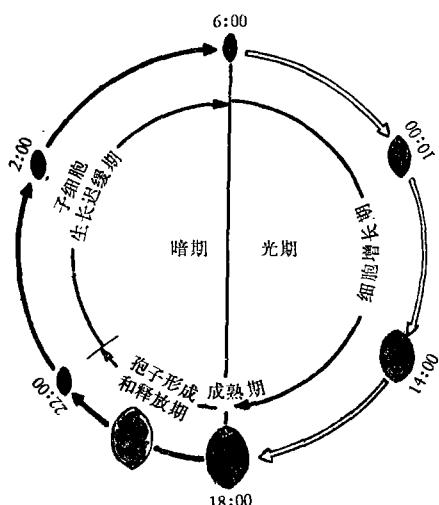


图 2 斜生棚藻的光、暗生活周期(同步培养物)

光、暗生活周期的全过程。图 3 是在相同的培养条件下测得的光密度和细胞数的时间曲线, 表明了水生-6105 斜生棚藻的生长、分裂和光、暗之间的关系。从图 1、2 中可以看出: 水生-6105 斜生棚藻的细胞分裂只在黑暗中进行, 光照停止以后, 细胞分裂即行开始, 核分成 2、4、8 个(部分细胞分至 16 个, 少数细胞可分至 32 个), 然后原生质分割, 形成似亲孢子。光照开始后, 分裂停止, 除了少数在暗中已经开始分裂而尚未完成分裂过程的细胞在光照期仍处于分裂状态外, 在光照条件下

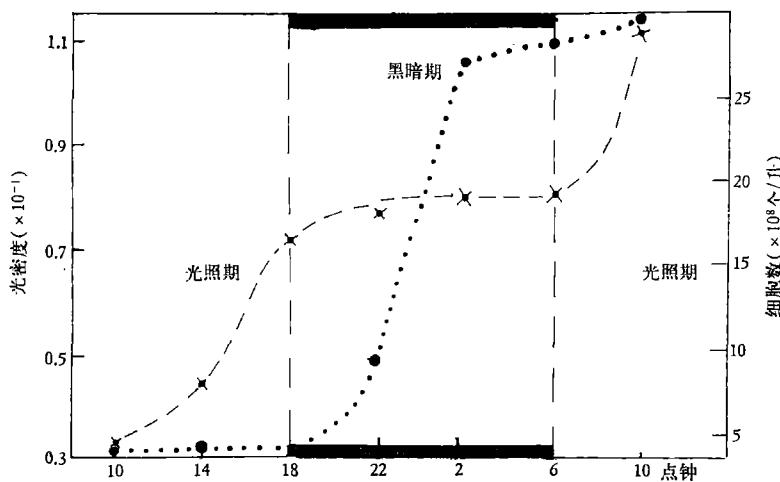


图3 斜生栅藻的生长、分裂和光暗之间的关系
(6:00—18:00 光照期; 18:00—6:00 黑暗期)

一般不产生新的进行分裂的细胞。从细胞核分裂到似亲孢子释放，一般在4小时内即可进行完毕。在同步率差的培养物中，则整个暗期内皆有生殖现象，在光照期间也会有许多细胞仍处于细胞分裂的“停滞”状态，而往往容易误认为在光照条件下也进行细胞分裂。与生殖情况相反，生长过程是在光下进行，光照开始后，生长立即开始（细胞体积增大，光密度上升），光照停止后，生长也随之停滞。根据实际计算统计，水生-6105 栅藻在一个光暗周期（24小时）内，平均每个母细胞产生8.7个子细胞。

在藻类生长繁殖过程中，我们用荧光显微镜对死、活细胞进行了观察计数，发现在培养物中经常有一小部分细胞处于死亡状态，其数量在细胞总数的10%以内。有的是营养细胞死亡，有的是生殖细胞在分裂过程中死亡。死亡的细胞，先是颜色变淡，由绿而黄，嗣后内涵物逐渐减少，成为空壳，最后细胞破碎而瓦解。死细胞在完全变空以前，一般显微镜难于鉴别，在荧光显微镜下，则死、活细胞一目了然，前者呈蓝色，后者呈深红色。

(六) 生活史分期 根据试验结果，我们将栅藻一个光暗周期中的生长、繁殖过程粗分为以下4个时期：(1) 细胞增长期——从光照开始至光照停止，子细胞在光合作用中增长并发育成熟；(2) 成熟期——经12小时光照后，细胞内涵物大量增加，体积增大，转入黑暗即可分裂；(3) 孢子形成和释放期——停止光照后的4小时以内，细胞进行分裂增殖，产生似亲孢子，并纷纷释放出新生个体，使培养物主要由子细胞所组成；(4) 细胞生长迟缓期——光照停止后第5小时一直到光照重新开始的这一阶段内，细胞增长缓慢，培养物光密度保持稳定（参看图2）。

在现行条件下，水生-6105 栅藻一昼夜只行一次分裂，即其整个世代周期为24小时。一种生物的世代周期的长短，可能是由该有机体在长期的生命运动历史过程中形成的一种内在的时间因素所左右的。Pirson等氏曾经提出：小球藻生活史的长度主要受一种在光照开始时即起作用的内在时间因素所控制^[9]。我们认为，这种因素也是可以认识和可以改变的，如何人为地调整世代周期的长短，是值得研究的。

(七) 细胞体积 对栅藻在生长繁殖过程中细胞体积的变化作了大量的测量统

计¹⁾(见表 2)。试验的第一个光
照期间,细胞体积的增长最快,
光照 12 小时,平均长到 290 微
米³。进行生殖的母细胞,其体
积大都分布在 130—600 微米³
的范围之内(占生殖细胞的
90% 以上),其中又以 230—400
微米³ 范围以内者居多。能够

进行生殖的母细胞的体积相差很大,可以小到 73 微米³,也可以大到 840 微米³,大小悬殊

10 倍,但两者在总体中均属少数。一般看来,母细胞体积越大,形成的似亲孢子也越多。

由于试验是采用批量培养 (batch culture) 方式进行,随着藻类的生长,培养的理化条件(光照、营养与分泌物的积累等)日益对藻类生长不利,在试验的第二、三天,光照时间虽仍是 12 小时,但细胞体积平均只能长到 100—120 微米³,光照停止时,许多细胞未能长到足以分裂的大小(130 微米³ 以上),不能进行生殖,从而使培养物的生长速率下降。前一天未能分裂的细胞,积累起来,在以后的光周期再继续长大,进行生殖,往往又会引起培养物产生生长率逆升的现象(见图 4)。在一般培养工作中常常出现的生长速率时上时下的现象,往往就是这样形成的。

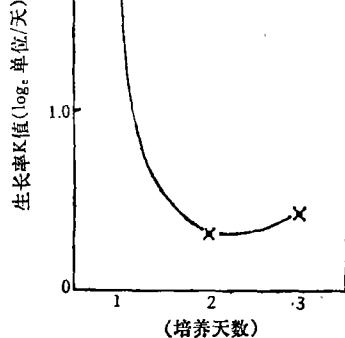


图 4 斜生栅藻在培养过程中生长率的逆升现象

四、结语

通过将近两年的高温培育,终于使斜生栅藻在本来不能适应的 42℃ 高温下能够正常生长繁殖,并已表现出较高的生长速率。这说明,为了获得一个理想的藻类品种,采用某种因素长期对藻种进行诱导锻炼和淘汰选择,是可以比较有把握地达到定向培育的目的。本文所报告的栅藻在高温条件下生长、分裂等方面的研究结果,对栅藻在一个生活周期内的细胞生长和生殖进程,提供了一个明晰的图景,加深了人们对单细胞绿藻的生长繁殖规律的认识,为实现单细胞藻类培养的高产稳产展示了若干可循的途径。

参考文献

- [1] 叶清泉、黎尚豪, 1956。光照强度对于斜生栅藻 *Scenedesmus obliquus* (Turp.) Kütz. 生长的影响。水生生物学集刊, 1956 (1): 107—116。
- [2] 夏宜铮等, 1962。栅藻对氮、磷肥利用问题的研究。水生生物学集刊, 1962 (1): 48—54。
- [3] 张甬元等, 1964。栅藻、小球藻培养的研究(三)水生四号培养液在培养栅藻时 pH 的变化及其控制。中国植物学会三十周年年会论文摘要汇编, 29—30。
- [4] 黎尚豪等, 1959。单细胞绿藻的大量培养试验。水生生物学集刊, 1959 (4): 462—473。

1) 根据细胞形状,以 $V = 2 \times (1/3 \pi r^2)$ 公式计算栅藻细胞体积。

- [5] Bishop, N. I. and H. Senger, 1971. Preparation and Photosynthetic Properties Synchronous Culture of *Scenedesmus*. In «Methods in Enzymology, V. 23, Photosynthesis, Part A, p. 53—66», Academic Press, New York and London, 1971.
- [6] Davis, E. A., Jean Dedrick, C. S., French, H. W. Milner, Jack Myers, J. H. C. Smith and H. A. Spoehr, 1953. Laboratory experiments on Chlorella culture at the Carnegie Institution of Washington Department of Plant Biology. in *Algal Culture: From Laboratory to Pilot Plant*. pp. 105—153.
- [7] Myers, J., 1951. Physiology of the Algae. *Annual Review of Microbiology*, 5:157—180.
- [8] —————, 1953. Growth characteristics of Algae in relation to the Problems of Mass culture. in *Algal Culture: From Laboratory to Pilot Plant*. pp. 37—54.
- [9] Pirson, A., H. Lorenzen and A. Koepper, 1959. A sensitive stage in Synchronized culture of Chlorella. *Plant physiol.*, 34:353—355.
- [10] Sorokin, C. and J. Myers, 1953. A high-temperature strain of Chlorella. *Science*, V. 117, No. 3027—3052.
- [11] Sorokin, C. and R. W. Krauss, 1958. The effects of light intensity on the growth rates of green algae. *Plant Physiol.*, 33:109—113.
- [12] Sorokin, C., 1959. Tabular comparative data for the low-and high temperature strains of Chlorella. *Nature*, V. 184, No. 4683—4687.
- [13] Tamiya, H. (田宮), 1957. Mass culture of algae. *Annual Review of Plant Physiology*. pp. 309—329.
- [14] Винберг, Г., 1959. Массовые культуры одноклеточных водорослей как новый источник пищевого и промышленного сырья. *Успехи современной биологии*, 43(3):332—351.
- [15] Трухин, Н. В., 1963. Сравнительная оценка приуроченности термофильных штаммов хлореилы и сценедесмуса к водемам. *Микробиол.*, 32(3):513.

A HIGH-TEMPERATURE STRAIN OF GREEN ALGA *SCENEDESMUS* AND ITS SYNCHRONOUS CELL DEVELOPMENT

HSIA I-TSENG, DU DAI-SHIEN,
CHIENG CAY-HSIEN AND LEY SHANG-HAO
(*Institute of Hydrobiology, Hupai*)

ABSTRACT

A high-temperature strain of green alga *Scenedesmus obliquus* selected by incubating the cells under the high temperature condition for a long period has been obtained. The morphological and developmental changes of cells after a long period of high temperature cultivation (36°C in the dark period, 42°C in the light period) have been observed, and a synchronous culture has been obtained. The growth of cells occurs under illumination and the cell division takes place in the dark. Twelve hours after the beginning of the light period, cells become ripening, and transform into "mother cells". The production of the autospores and the maximum autospore liberation set in within four hours after the beginning of the dark period. The average number of daughter cell produced is 8.7. The growth rate K is up to 2.07 (log₂ units per day) under unsaturated light intensity. This high-temperature strain is characterized by its rapid growth.