固氮蓝藻的大量培养方法**

叶清泉 王立美 刘富瑞 黎尚豪 曾繼綿 石鈺鏖 崔希羣 李万洲
（中国科学院水生生物研究所）

固氮蓝藻能够利用空气中的游离氮素，合成氮素化合物，不断的释放出来，死亡分解之后，更可以释放出大量氮素化合物，作为其它植物的氮肥。过去国外的一些試驗証明可以利用固氮蓝藻作为水稻的氮肥肥源[4,9]；我們在 1958 年进行的固氮蓝藻对盆栽水稻的肥效試驗和与湖北省农业科学研究所协作的田間施用固氮蓝藻水生 *686* 号和水生 *678* 号作为水稻追肥試驗的結果，也証明固氮蓝藻可作为水稻田的氮肥新肥源[2]。在我們的試驗中，每亩稻田接入的固氮蓝藻数量是滤去培养液后的湿重 5 市斤，因此，大面积的稻田施用时，需要的固氮蓝藻数量很大，如果以一般实驗室的錐形玻璃瓶来培养是无法滿足需要的，如何大量培养固氮蓝藻便成为急需解决的問題了。

我們自 1959 年春开始进行固氮蓝藻的室內大量培养試驗，气温漸高后，又在室外露天下及温室中大量培养固氮蓝藻。培养的对象是水生 *686* 及水生 *678* 固氮蓝藻，現将培养方法和結果簡单介紹如下。

一、在室內大量培养固氮蓝藻的方法

（一）培养方法

根据固氮蓝藻生长的特点：它喜生长在水面，作平面的鋪开成大片状，或附着在底部，或着生在水边上，很少或沒有漂浮在水层中間。我們便采用面积較大，水不深的浅盆来进行培养，使能适于蓝藻的生长。室內培养用的容器是长方形的白色搪瓷盘，面积为30×40厘米，深度 5 厘米左右，盛入約 1500 毫升培养基，即深度为 2—3 厘米左右，这样，可以用比較少量的培养基而培养較多的固氮蓝藻。如无浅搪瓷盘，也可以用木盆，瓦盆等，只要符合上述的要求，都可以用作培养的容器。

我們所用的培养基是液体的水生 *105* 号无氮培养基，其配制方法如下：

过磷酸鈣	0.3 克	碳酸氫鈉	0.1 克
硫酸鎂	0.2 克	氯化鉄	微量（1％水溶液 1 滴）
氯化鉀	0.1 克	鉬酸	微量（1％水溶液 1 滴）

前面四种盐类，在大量培养时，用量較大，系采用普通农业上用的化学肥料，后二种是化学試剂。

配制培养基所用的水是普通的自来水。为了避免自来水中可能带来的各种低等动物如原生动物、輪虫等，或低等植物如菌类及其它的蓝藻、綠藻等，使培养物污染，因此，用二层紗布，中間垫着半寸左右的葯棉，将自来水过滤后再使用。

---

* 1959 年 10 月 12 日收到。

** 試驗中，陈发貴同志曾参加部分的工作。

培养基配制好后，pH 一般在 8 左右，即可直接使用。

我們采用螢光灯作为培养用的光源。一般是用 30—40 瓦的螢光灯。螢光灯的主要优点是发出的光接近于阳光，同时热量較少，除了酷热的暑天外，不会使水温上升过高而影响固氮蓝藻的生长繁殖。螢光灯可以装在分层的棚或架內，每层距离約 15 厘米，每层按装 2—3 支 38 吋的螢光灯，灯下可放 2—3 个浅盘，灯管与浅盘的距离約 8—10 厘米。若灯管的距离过远，光綫太弱，固氮蓝藻繁殖緩慢。在我們的試驗中，增加螢光灯管至五支的时候，固氮蓝藻的繁殖速度亦随之而增加。光照时間每天为 10—14 小时。

蓝藻是喜温性植物，水温在 25—32℃ 时生长很好。我們采用的是 28—32℃ 的温度。因此，在春秋二季，温度比較合适；冬季可以用各种方法如提高室温、在培养棚架內增加鎢絲灯、在浅盆上加玻璃盖等以提高水温。要注意的是秋末和冬季时，昼夜温度变化較大，夜間气温过低也会影响固氮蓝藻的繁殖，需要尽可能保持一定的温度。

在浅盆培养时，通入适量的二氧化碳能加速固氮蓝藻的生长繁殖，因固氮蓝藻也和其它的綠色植物一样，进行光合作用时需要大量的二氧化碳，而空气中二氧化碳的含量又很少。增加二氧化碳的方法，可以用商品的压縮的二氧化碳，稀释成含 5% 二氧化碳的空气，或用稀盐酸(盐酸：水＝1：1)与碳酸氢鈉作用制成的二氧化碳，用打气机与空气混合后送入培养液中，由于盆浅培养液浅，气体通入后很快成为气泡，从水面逸去，因此，如何增加二氧化碳和水接触的时間，提高其溶解量是很重要的。我們利用一根长約 10 厘米的普通玻璃管，一端拉成細微的口，放入浅盆內，其另一端与通气的橡皮管連接，使放出的气泡很小，来增加二氧化碳和水的接触。同时，为了使二氧化碳不致立即排出水外，我們将这根玻璃管的出口，套在一根长 30 厘米的較粗的玻璃管內，使气泡出来时，先經过大玻璃管內的培养基，增加接触的时間，而后再排出水面（图 1）；否則若速度很快，大部分的二氧化碳将会来不及溶解在培养基中而逸出于空气中了。若是沒有打气机等設备，也可以用水压的方法把二氧化碳送入培养液中。每天适当地在室內燃烧一些带油的紙片或木屑，以增加空气中 CO_2 的含量，也是一个簡单而有效的方法。

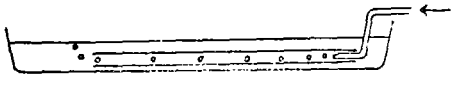

图 1 淺盆培养固氮蓝藻的通气装置。(說明見文中)

浅盆中接种固氮蓝藻的数量要視藻种的多少而定。开始时藻种較少，接入浅盆后最好每天吸出一部分培养基(約 1/2 左右)，換入新的培养基，以加速固氮蓝藻的生长繁殖，当藻种較多的时候，每个浅盆接种的数量以 30—50 克左右为宜，接种时，要把固氮蓝藻弄成 1 平方厘米以下的小块，使每个小块都可向四周鋪开生长，它們很快地就会連成一大片，一般在条件合适的情况下，接入这样数量的固氮蓝藻，在 3—5 天以后，即可长滿一盆顏色鮮蓝綠色的固氮蓝藻，这时候就可以用小的絹网将固氮蓝藻分成几个浅盆扩大培养，或施入水稻田內了。

（二）試驗結果

我們連續进行了几个月的浅盆培养，下面是其中部分的定量培养結果：

1. 水生 *686* 固氮蓝藻培养：在盛水生 *105* 号无氮培养基浅盆中，光源为二支 40 瓦的螢光灯，每天光照 14 小时，水温在 28°—30℃ 間，未通入 CO_2，在培养的第二天补充了蒸发去的培养液，固氮蓝藻增长的結果如表 1。

表 1　室內培养水生 686 固氮藍藻增長情况

实驗盆号	培养的天数	每个淺盆接种数量（克）	收获量（克）	增长量（克）	增长百分率（%）
1	2	50	128	78	156
2	2	50	124	74	148
3	2	50	98.5	48.5	97
4	2	50	94	44	88
5	2	50	93.5	43.5	87

2. 水生 *686* 固氮蓝藻浅盆培养：用水生 *105* 号无氮培养液，光源为 5 支 40 瓦的營光灯，光照 20 小时，水温在 30°—35℃ 間，連續通入含 5%CO_2 的空气，其結果如表 2。

表 2　室內培养水生 686 固氮藍藻增長情况

实驗盆号	培养的天数	每个淺盆接种数量（毫升）*	收获量（毫升）	增长量（毫升）	增长百分率（%）
1	1	50	150	100	200
2	1	50	150	50	100

* 用离心去水后的藻量。

3. 水生 *678* 固氮蓝藻浅盆培养：用水生 *105* 号无氮培养液，光源及光照时間同 1，水温在 28°—30℃ 間，其結果如表 3。

表 3　室內培养水生 678 固氮藍藻的增長情况

实驗盆号	培养的天数	5 个淺盆接种数量（克）	收获量（克）	增长量（克）	增长百分率（%）
1	3	80	160	80	100
2	4	160	288	128	80
3	3	816	1,536	720	88.23
4	3	931.2	1,472	540.8	58.07

从上表 3 可以看出，用浅盆来培养固氮蓝藻，一般在 2—3 天时間內，固氮蓝藻的数量可增长一倍左右，而最高的一天可以增长二倍，即每平方米面积每天最高产量为 834 克（湿重），固氮蓝藻的繁殖速度是与各种环境因素密切有关的，在光綫較弱，温度較低的情况下，固氮蓝藻的生长繁殖就会显著的緩慢了。

二、露天及溫室內大量培养固氮蓝藻

为了在广大的水稻田接种固氮蓝藻，在室內的培养就很难滿足要求，有必要在室外进行大量培养試驗，找出成本較低，不需要特殊設备，到处可以办到的大量培养固氮蓝藻的方法。

在室外培养固氮蓝藻，也同样的要求面积大而較浅的容器，因此，一般的浅木盆，瓦盆或洋灰池等都可以利用。容器的深度一般在 0.3 米左右，盛入深約 15 厘米的培养液。容器的面积，在 10 平方米內为宜，因面积太大不易管理。

我們用直径 93 厘米及 76 厘米的木盆，127 × 300 厘米及 97 × 146 厘米的方木盆及

185 × 245 厘米的椭圓形木盆,直接置于阳光下或在温室內进行培养。培养液用水生 *105* 号无氮培养基,培养液 5—15 厘米深。用打气机加入空气,来增加 CO_2。在初期,固氮蓝藻生长較緩,培养一周后,生长速度加快,最高速度为一天可以增长一倍,但常因环境条件改变后,生长情况亦发生变化,如在雨天,培养藻类常全部沉至盆底,而在阳光照射后,又逐漸浮至水面,連成一大片。

在室外培养时,除培养液条件外,主要的是要注意光照,温度及污染三方面。

1. 光照条件:在室外培养时是利用阳光作为光源,阳光直接照射在培养物上,由于这几种固氮蓝藻原来都是在阳光稍弱处生长較为旺盛的,因此,在露天下用直射阳光培养时,強烈的光照对固氮蓝藻的生长繁殖是有影响的,尤其是夏季的中午,不但光照过強,紫外綫也相对的增加,水温也会上升至 40℃ 以上,使固氮蓝藻受到伤害甚至不能継續生长。因此我們在上午 11 时到下午 2—3 时間,采用竹帘把培养物遮盖起来,这种竹帘的优点是一方面可以遮去一部分的阳光,但又有一些光綫可以从間隙中通过,使藻类得以継續进行光合作用,而且通风情况也良好,水温不会很快的上升。虽然如此,从室內移到室外培养时,最初几天蓝藻的生长常常也是較緩慢的,顏色也由深蓝綠色变成黃綠色,有很多蓝藻都沉在盆底。这些現象,常被訛为蓝藻正在死亡,实际上,經过几天不断更換新鮮的培养液,蓝藻就不断地浮到水面,并开始繁殖,这是固氮蓝藻逐漸对室外強光的一种适应过程。

2. 温度条件:在春秋二季,室外水温在 20℃ 以上,在室外培养固氮蓝藻是很合适的,武汉地区夏季水温在 32℃ 以上,在阳光直射下最高达 42℃,因此,在直射的阳光下培养蓝藻,如在一天中阳光最強时用竹帘遮掩起来,使水温不超过 35℃ 以上,还不致影响固氮蓝藻的生长繁殖。在冬季气温較低的情况下,要使敞开的容器保持一定的水温,困难較大,在室外进行大量培养就較困难。

3. 污染問題:在室外进行大量培养,因为是敞开的,很容易受到其它生物的污染。在我們的試驗中,主要的是受到搖蚊幼虫的污染,这种搖蚊幼虫在夏季繁殖很快,它們不但以固氮蓝藻作为食料,并且将蓝藻做成筒状的窝,藏身其中。因此,当它們大量出現在培养物中时,便大大的影响了固氮蓝藻的产量。我們根据实驗結果,在培养液中加入 1—5ppm 的可湿性 *666*(含丙体 0.5%),可以使搖蚊幼虫的数量大大減少或大量死亡,而对固氮蓝藻的生长繁殖沒有什么抑制作用[1]。也可以經常在培养基中加入 1ppm 的 *666* 来防止搖蚊幼虫的污染。当輪虫大量发生时,也常常吞食蓝藻,影响培养,可在培养液中加入 0.01% 的商品用的福麻林(Formalin),可以杀死輪虫及其他原生动物,有些种类不死时,也将受到抑制不会发展,但如加入福麻林份量过多时(0.05% 以上),蓝藻亦将不能生长或死亡,需要特别留意。此外,为了防止污染,在操作过程中,必需注意清洁問題,使所有使用的东西保持清洁,例如过滤自来水所用的棉花紗布需要經常更換,防止污物积聚;經常換出一部分老培养液,加新培养液,使培养液中的氮素缺少,可以防止其它藻类的污染,因为非固氮植物,在缺氮培养液中是不易生长繁殖的;每次收获后,容器都要仔細的洗滌,收获时所用的各种用具在使用前后都要洗滌干淨,以減少污染的机会。

在温室內进行大量培养固氮蓝藻,主要的优点是在冬季可以利用各种方法加温,継續进行培养。在夏季,由于温室通风較差,水温較高,需用竹帘或淋水等方法来降低室內的温度。

三、討　　論

固氮蓝藻的大量培养是利用固氮蓝藻作为稻田氮肥肥源的关鍵之一，只有在找出簡易、經济的大量培养方法后，固氮蓝藻肥源才能普遍推广使用。

在固氮蓝藻的培养中，培养液是否合适是培养成敗的关鍵之一，我們現在所采用的是水生 *105* 号无氮培养液，蓝藻的生长速度还是很快的。有些作者[9]，在无氮培养液中加入 0.2% 的葡萄糖来加速它的生长，增加产量，亦有用有氮培养液来培养的。用有氮培养液，尤其是用硝酸态氮作为氮源时，其生长繁殖速度是較通过固氮作用利用空气中的游离态氮要高[10]。

我們一直采用无氮培养液进行固氮蓝藻培养是依据下列三个理由：(1)根据固氮細菌的培养情况来看，它的固氮能力是有退化現象的，在固氮蓝藻的培养中，到目前为止，尚未报导过这样的現象，为了保証我們的几种固氮蓝藻，确实是不断地利用空气中的游离氮素，保持它的固氮能力，我們就采用无氮培养；(2)在室內或室外开敞的浅盆或大盆培养时，都容易受到外界生物的污染，尤其是空气中常有相当数量的藻类，随风飘揚，我們不易控制，如采用无氮培养液，因为溶液中缺氮，其它不能利用空气中的游离氮素的藻类，不易繁殖，就可以大大地減少污染；(3)在培养液中增加有机物質如醣类，固然可以促进固氮蓝藻的生长，但是，一方面培养藻类，另一方面对藻类在培养中得到鍛炼，使它能更适于在較差的营养条件下生长，不加入醣是較恰当的。

从我們培养的結果来看，在一般情况下，2 天可以增长一倍以上，最高达到每天增长 200%，也就是說它的生长率为 834 克(湿重)/平方米/20小时光照。日本渡边篤在 1 米寬 6 米长的木槽中培养小单枝藻，利用直接阳光，并通入含 3%CO_2 的空气，每天收获 180 克藻类(湿重)，即 30 克(湿重)/平方米/12 小时光照。到目前为止培养产量最高的为 B. M. Allen 氏，他培养柱孢魚腥藻 (*Anabaena cylindrica*)，产量为 13 克(干重)/平方米/12 小时[8]。可以看出，我們用水生 *105* 无氮培养液进行培养，实际产量是很高的。

光綫的強弱和温度的高低，也是大量培养蓝藻中的一个关鍵性問題。

在人工光源下进行培养，是較容易控制，但耗費較多，将来电力网完成后，利用人工光照培养藻类，是一个重要的方法。直接利用太阳光照是一个既有效而又經济的办法、是大量培养时光照的主要来源。太阳的光照強度和光照时間长短，是因季节，緯度和高度而有不同的，在北緯 30—40° 之間，6 月間可能光照时間最长，可达 14—15 小时，12 月最短为 9:20—10:14 小时。在夏季，由于紫外綫因在大气中被吸收量的減少，阳光中的紫外綫增強，在热带可达 4%[7]；同时由于太阳和地平綫的角度不同，阳光不仅強弱因太阳高低而有差异，就是光譜的构成上也有所不同，在早晚紅光量最多，而在中午則紫光部分相对的增加，这些情况都和我們的培养措施有关。因此在夏季中午时，加上竹帘遮掩，尽量避免直射強光，可以減少对生长不利的条件。

蓝藻植物除含有叶綠素 a 之外，还含有叶黄素、胡蘿卜素和藻色素(包括藻蓝素及藻紅素)，这些色素在量的組成上是因光的強弱和光的波长不同而改变的，一般称为色素的补償作用[5]。Halldal 氏(1958)在研究温度和光綫相互交叉增減时对蓝藻的色素形成的作用中，表明了強光促使魚腥藻 (*Anabaena* sp.) 細胞內黄色素的大量形成，而相对地藻蓝素

則大大地減少，以致光譜分析中亦不出現这种色素的吸收光譜。因此強光造成的結果是使蓝藻的顏色呈黃色較多[6]。我們在阳光下培养时，发現藻类的顏色变成黃綠色，应該是和这种情况一致的。

过強的光綫对蓝藻的生长繁殖上的一些影响，并不会影响到固氮蓝藻在稻田中的施用。在春季早稻插秧前后，阳光还不是很強烈，还不致于影响到固氮蓝藻的生长，到了入夏以后，阳光逐漸增強时，水稻亦逐漸长大而在稻田中形成了蔭影，強烈的光綫通过稻叶的过滤是降低了很多，对蓝藻来說还是很适于生长的。

温度对生物的生命过程——代謝作用起着很重要的作用，它控制了生命活动。在适宜的温度下，固氮蓝藻生长得很好，然而如果驟然超过了它生长的温度最高限，时常由于代謝不能平衡而带来了死亡。

蓝藻是喜温性植物，对温度要求比一般藻类高，在 25—35℃ 以內，生长很旺盛，在武汉地区夏季浅水温度可高至 40℃ 以上，而冬季严寒时，温度又在 0℃ 以下，如在室外常年培养，困难是較多的。在夏季可以通过加竹帘掩盖的方法来降低温度和減少光照，而在冬季只能在温室內进行培养較为合适。

在室內培养时，夏季温度較高，亦不是很合适的，因为室温既高，又用灯光培养，温度更高，可以采用朝北窗口的自然光来培养，既比較通风，又可避免灯光的温度。但一般說来，夏季在室內培养不如在室外竹帘棚下。在冬季則可利用鎢絲灯加热，或直接用鎢絲灯（100—200 瓦的）作为光源，既可解决光源問題，又提高了培养液的温度，使蓝藻生长得更好。在严寒时候，还可以在室內生炉子加温，既提高了温度，又增加了空气中所含的 CO_2，对固氮蓝藻的繁殖是有利的。

四、总　結

1. 固氮蓝藻的大量培养方法的解决，对推广使用固氮蓝藻作为水稻田的氮肥肥源是很重要的。我們以水生 *686* 固氮蓝藻和水生 *678* 固氮蓝藻为材料，以水生 *105* 无氮培养液进行培养。

2. 在室內培养，主要是用浅的长方形搪瓷盆在螢光灯下培养，室外主要是用浅木盆培养，直接利用阳光，夏季在培养盆上加竹帘棚，以降低温度，減少光強。

3. 室內浅盆培养时，如果条件合适，在 2 天內，一般可增长 1 倍，最高可增长 2 倍，达到 834 克/平方米/20 小时。室外培养时，条件适宜也可以达到一天增长一倍。

4. 在室外培养时，除培养液外，温度，光照和污染問題将是决定培养好坏的关鍵問題。

参　考　文　献

[1] 王立美等，1959. 几种常用农葯对固氮蓝藻生长的影响。水生生物学集刊，**1959**: 456—461.

[2] 黎尚豪等，1959. 我国的几种蓝藻的固氮作用。水生生物学集刊，**1959**: 429—439.

[3] Allen, M. B. and D. I. Arnon, 1955. Studeis on nitrogen-fixing blue-green algae. I. Growth and nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica* Lemm. *Plant Physiol.* **30**: 366-372.

[4] De, P. K. 1939. The role of blue-green algae in nitrogen-fixation in rice-fields. *Proc. Roy. Soc. Lond. B.* **127**: 121—139.

[5] Fritsch, F. E. 1952. Structure and reproduction of the algae. Vol. 2, pp. 783-786.

[6] Halldal, P. 1958. Pigment formation and growth in blue-green algae in crossed gradients of light

intensity and temperature. *Plant Physiol.* 11:401—420.
[7] Landsberg, H. 1954. 物理气候学(周恩济譯) pp.1—254. 商务印书館。
[8] Tamiya, H. 1957. Mass culture of algae. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **8**: 309—334.
[9] Watanabe, A. 1956. On the effect of the atmospheric nitrogen-fixing blue-green algae on the yield of rice. (in japanese). *Bot. Mag.* (Tokyo) **69**:530—536.
[10] Wolfe M. 1954. The effect fo molybdenum upon the nitrogen assimilation of *Anabaena cylindrica.* I. A study of the molybdenum requirement for the nitrogen fixation and for nitrate and ammonium assimilation. *Ann. Bot. n.s.* **18**: 299—307.

MASS CULTURE OF NITROGEN-FIXING BLUE-GREEN ALGAE

YEH TSING-CHUAN, WANG LIH-MEI, LIU FU-JUI, LEY SHANG-HAO, TSENG CHI-MIEN, SHIH YU-CHEH, TS'UI SHI-KIUNG AND LI WAN-CHOU

(*Institute of Hydrobiology, Academia Sinica*)

SUMMARY

Studies on the methods of mass culture of nitrogen-fixing blue-green algae, *Anabaena azotica* HB 686), and *A. azotica* forma *alpha* (HB. 678), have been carried out in the laboratory and in the open. The culture medium used (HB 105) is nitrogen-free and specially adapted to the requirements of these algae. In the laboratory experiments, the algae were grown in shallow rectangular ceramic trays under two 40-watt fluorescent lamps and supplied with CO_2—enriched air. Fresh culture medium was added every day to balance loss by evaporation, and the medium was renewed after 2 to 3 days. Under these conditions the algae grew at a rate of over 100% in every 2 days, and the highest production was 834 grams of fresh algae per m^2, per 20 hours illumination, about 13.3 mg. dry weight/m^2/20 hr., under five 40-watt fluorescent lamps.

In outdoor mass culture, these blue-green algae were grown in shallow wooden vessels of about 4 square metres in area, under direct sunlight, or in a greenhouse, without the addition of CO_2. In summer, the strong noon sunlight was shaded by a bamboo screen, to prevent its harmful effects, particularly from the ultra-violet. The optimum temperature for growth was found to be between 28° and 30°C. The production of algae under favourable conditions is about a two-fold increase in 24 hours. But in most cases growth is slow at first, becoming luxuriant after a week. We found that the algae became yellowish under direct sunlight, because of the decrease in phyocyanin content, which agrees with the results of Halldal's experiments.

In our experiments, the contamination of the cultures by other organisms is one of the most serious limiting factors, and we found the most harmful intruders were *Chironomus* larvae and Rotifera. *Chironomus* was controlled by the application of 3 to 5 ppm. of the insecticide "666", while Rotifera and Protozoa were effectively reduced by the addition of 0.01% of formalin to the cultures.