

单细胞蓝细菌粘球藻的分离培养及固氮能力研究

周宏斌* 陈廷伟

(中国农业科学院土壤肥料研究所, 北京)

本文报道了单细胞蓝细菌粘球藻 (*Gloeocapsa* spp.) 的分离培养新方法。经改进后的超声波处理方法比前人报道的分离方法更简便有效, 又不会对菌体产生不良影响。应用这一方法, 从国内不同生态环境的土壤样品中, 首次分离到 4 株 *Gloeocapsa* spp. 纯培养体, 同时还证实了它们均有固氮酶活性。

关键词 单细胞蓝细菌; 分离方法; 固氮能力

粘球藻 (*Gloeocapsa*) 是一类分布广泛的单细胞球形蓝细菌(又称为蓝藻类)。有关 *Gloeocapsa* 的生态、分类地位等方面的研究已有许多报道^[1-4]。为了查明此种单细胞蓝细菌有无固氮能力, 许多学者致力于分离纯化方法的研究^[4-8]。但由于粘球藻在自然界中常以几个乃至几十个单细胞聚集成团生活, 外有一层或几层较厚的胶质包被所包裹, 很容易粘附一些其它细菌而难以去除掉, 比丝状体蓝藻更难纯化, 因而长期未能确证它们的固氮活性。直到 1969 年美国 J. T. Wyatt 和 J. K. G. Silvey 才首次明确粘球藻 *Gloeocapsa apicola* UTEX 795 有固氮活性^[9]。随后又陆续发现了三株粘球藻有固氮活性。作者在研究粘球藻 (*Gloeocapsa*) 与真菌原生质体融合过程中^[10], 对它们的分离方法作了较大改进, 由此分离到四株粘球藻纯培养体, 并测定其固氮能力。现将研究结果报告如下:

材 料 和 方 法

(一) 固氮蓝细菌的分离培养

1. 菌种来源: 本实验分离得到的菌株和对照菌株详见表 1。

在分离培养过程中所用的培养基系 Allen 无氮培养基^[11] (g/L): 磷酸氢二钾 0.039, 硫酸镁 0.075, 碳酸钠 0.02, 氯化钙 0.027, 硅酸钠 0.058, EDTA 0.001, 柠檬酸 0.006, 柠檬酸亚铁 0.006, 微量元素 1ml/L (每升含硼酸 2.86g, 氯化锰 1.81g, 硫酸锌 0.222g, 钼酸钠 0.391g, 硫酸铜 0.079g, 硝酸钴 0.0494g), pH 7.8。

2. 培养条件: 将粘球藻接种在 pH7.8 的 Allen 无氮培养基上, 在 25℃、2500—3000 lx 日光灯下光照培养。

3. 分离纯化方法的改进: 由于用传统的划线分离方法很难将粘球藻外围胶被中包裹的杂菌去掉, 作者所采用的是在传统的分离方法^[5,7,12,13]的基础上作了适当修改。修改后的方法为: 将土样用无菌水浸泡后, 用力振摇制成悬液, 取一定量的悬液涂布在 Allen 无氮培养基平板上, 置 25℃, 2500—3000lx 光照下培养约两周, 经检查后挑起粘球藻的菌落用无菌水再制成悬液, 用单细胞分离器在显微镜下分离特定形态的粘球藻(图版 I-1)。将藻类纯的粘

本文于 1990 年 9 月 25 日收到。

* 中国农业科学院土壤肥料研究所 82 级研究生, 现在中国农业科学院油料作物研究所, 武汉。

表1 分离菌株
Table 1 Isolated strains

| 菌株 Strains | 来源 Origin | 生态环境 Ecological enviroment | 采集时间 Time of collection |
|-------------------------------|----------------------------------|---|----------------------------|
| <i>Gloeocapsa</i> sp. BC01 | 中国农科院农场 farm of CAAS, Beijing | 潮湿玉米地表土 on moist surface soil of maize field | 1982,8,26 |
| <i>Gloeocapsa</i> sp. BC02 | 同上 the same | 水稻田水层及泥面 in water and soil of paddy field | 1982,8,26 |
| <i>Gloeocapsa</i> sp. BC03 | 山东, 郯城 Shandong, Tancheng | 红萍培养物液体中 in culture solution of Azolla | 1982,9,4 |
| <i>Gloeocapsa</i> sp. BC04 | 湖南, 祁阳 Hunan, Qiyang | 红萍培养物液体中 in culture solution of Azolla | 1982,9,4 |

球藻接种在 Allen 无氮培养基上加富培养, 经浓缩洗涤后, 用超声波(功率 100W, 频率 2kHz, 220V)处理 2 分钟, 以打碎粘球藻细胞外的胶质包被, 分散其包裹在胶被中的杂菌。然后用浓度为 0.6—0.8mol/L 的无菌蔗糖溶液悬浮, 在 800 型离心机低速(500r/min)离心 2—3 分钟, 然后小心地用无菌滴管将离心管上层液体吸掉。如此洗涤二次后, 再用无菌 Allen 无氮液体培养基洗涤 2—3 次, 全部操作均在无菌条件下进行。最后挑起少许沉淀物, 在 Allen 培养基平板上划线培养, 一周后挑起单菌落进行扩大培养, 即得到无菌纯培养的粘球藻。为了检验其纯度, 将其分别接种在牛肉膏、马铃薯、Ashby 和 Allen 等培养基上, 在 25℃ 下培养, 进行无杂菌检验。与此同时, 将未纯化的藻种也接种在上述四种培养基上作为对照。

4. 形态特征观察: 在光学显微镜下定点、定时观察细胞大小、形态、胶被结构、颜色、群体大小、群体单细胞数以及细胞的分裂过程等。

(二) 固氮酶活性测定

粘球藻的固氮酶活性采用常规的气相色谱仪乙炔还原法测定。气相色谱仪为 Sigma 2B 型, 氢火焰离子检测器 (FID) 载气流量 (N_2) 39ml/min, 柱长 3mm×2m

不锈钢柱, 柱温 80℃, 乙炔出峰时间 22—25 秒, 乙炔出峰时间 33—35 秒, K 值 0.763。测定前, 将藻体制备成较高浓度(约 10^9 个细胞/ml)的菌液, 均匀涂布在装有 10ml Allen 固体培养基的血清瓶中(体积 25ml), 光照培养 3 个星期左右, 分设有氧光照、有氧黑暗、无氧光照和无氧黑暗四种处理。无氧条件是由真空泵抽成真空后充入同体积的氮气进行的。乙炔加量为 5%。为了探讨粘球藻固氮的氧保持机制, 将处理成无包被的单细胞的粘球藻用上述方法测定固氮活性。固氮酶活性用毫微克分子乙烯·g(鲜重) $^{-1}$ ·h $^{-1}$ 表示。

结 果

(一) 形态观察

蓝细菌的分类至今仍沿用林奈 (Linnaeus) 的《植物的属》第五版(1854)中植物学和藻类分类方法, 按个体单细胞大小、形态、粘膜包被、群体单细胞数、群体大小、排列以及颜色等形态学指标为主要依据。作者为了使分离菌株的细胞形态充分体现自然存在状态, 四株粘球藻都是在非纯化培养体时观察的。由于它们同属一物种, 故将其形态观察结果综述如下: 细胞球形或椭圆形, 蓝绿色, 单个或形成具有无色包被的群体, 小群体细胞常为 2—8 个,

有时 16—32 个细胞相联为大群体，整齐排列在包被中。细胞分裂后呈平面或三维立体排列。单细胞直径平均为 $5.26 \pm 0.52 \times 6.85 \pm 1.35 \mu\text{m}$ ，群体连同包被直径一般为 20—40 μm 。

(二) 粘球藻的细胞分裂过程

将粘球藻的培养体用 Allen 培养液稀释到含 2—5 个细胞/ml 后，用滴管吸取 0.5—1ml，放入日本产特制的中间凹陷的培养皿中。25℃、2500lx 光照培养，在倒置显微镜下定时定点观察，记录细胞分裂过程。在一般情况下粘球藻的分裂呈三维立体式，也有少数是一维或二维平面式。在培养液中，单个细胞培养 12 小时后膨大并拉长，大约 48 小时后开始分裂，60 小时后两细胞分开，但此时仍为一层胶质包被所包围，外层仍保留原来的大包被，形成明显的层次。经过大约 12—15 小时，外层包被破裂，两个子细胞彼此分离，直至进行下一次分裂。经过多重分裂面的分裂过程，使细胞团成立体排列，而后当最外层的包被破裂时，则形成四方形的平面细胞排列，每个细胞，或两个细胞外各自产生新的包被。从一个细胞最多可分裂成 16—32 个细胞。图版 I-1 示细胞分裂时的几种群体排列情况。

(三) 藻种纯化

用改进后的分离纯化方法使四株分离物均达到了纯培养体(图版 I-2)。将它们接种到牛肉膏、马铃薯和 Ashby 等培养基上，除粘球藻菌落外，均无杂菌出现，从而证明四株粘球藻均已达到了无菌纯培养。

(四) 固氮酶活性测定结果

用上述的四种处理方法对生长在血清瓶中的四株粘球藻进行固氮活性测定。表 2 结果表明，在光照无氧气(以同体积的氮气替换)的情况下，四株的固氮酶活性均高于相应的光照有氧气处理，不同的菌株之间表现出差异，*Gloeocapsa* sp. BC01 酶活性高达 $865.2 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{g (fr. wt.)}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ，而 *Gloeocapsa* sp. BC03 则只有 $79.8 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{g (fr. wt.)}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。这说明氧气对粘球藻固氮酶有一定的抑制作用。将四个菌株遮光后设有氧和无氧两个处理的结果均比其相应的在光照条件下酶活性低，同时有氧的低于无氧的。这表明粘球藻的固氮作用需要在有光照的条件下进行，无光照时则受到不同程度的抑制。试验结果还表明，在有光照的条件下，无论是有氧或无氧处理，酶活性均高于在无光照下的两种处理(表 2)。

另外，随保温时间增加，酶活性呈下降趋势(图 1)。

为了进一步探索粘球藻的固氮机制，

表 2 *Gloeocapsa* spp. 的固氮酶活性测定
Table 2 The tests of nitrogenase activity on *Gloeocapsa* spp.

| 处 理* Treatments | nmol C ₂ H ₄ · g (fr. wt.) ⁻¹ · h ⁻¹ | | | | | | | |
|--------------------|--|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|
| | BC01 | | BC02 | | BC03 | | BC04 | |
| | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| LO ₂ | 280.2 | 231.8 | 96.0 | 95.9 | 57.9 | 45.3 | 75.8 | 91.5 |
| LHe | 538.6 | 865.2 | 141.7 | 129.5 | 191.1 | 79.8 | 215.1 | 160.0 |
| DO ₂ | 117.0 | 75.7 | 54.7 | 70.7 | 34.0 | 37.1 | 54.1 | 24.1 |
| DHe | 364.8 | 470.9 | 113.1 | 96.5 | 45.3 | 59.8 | 51.6 | 59.3 |

* L: 在光中 in light; D: 在暗中 in dark; O₂: 有氧 in air; He: 抽真空加氦气 in helium.

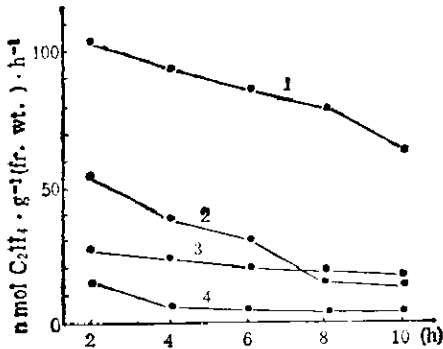


图1 *Gloeocapsa* 的固氮酶活性与培养时间关系
Fig. 1 The relation between nitrogenase activities and cultural time of *Gloeocapsa*

1. 光照无氧 In light without oxygen
2. 光照有氧 In light with oxygen
3. 黑暗无氧 In dark without oxygen
4. 黑暗有氧 In dark with oxygen

作者将经过超声波处理后无粘质包被的粘球藻细胞,置于有氧和无氧的光照条件下测定酶活性,结果均无活性;而将此细胞经一段时间的培养,恢复了包被后则表现出固氮活性。为此,可初步认为,粘质包被是单细胞粘球藻固氮时的避氧屏障。

讨 论

1. 粘球藻的分离培养问题: 对于粘球藻的研究早期多集中在形态观察和分类问题上^[1,13]。关于它们的分离纯化问题,所见报道有紫外线灭菌,并结合划线分离法进行^[5],以后又有学者^[7,8,15]创造了平板划线结合紫外线照射和间歇紫外线处理结合链霉素处理的方法,取得一定效果。由于粘球藻细胞外整齐排列的多层粘包被上所带杂菌很难用洗涤方法或紫外线照射等将其去掉。在上述各方法基础上,本实验所设计的一种用超声波处理结合平板划线的纯化方法较适合于粘球藻的纯化工作。这是由于(1)短时间(2分钟)的超声波处理对于藻体本身没有什么破坏作用,经它处理后的无包被细胞在两天内即可恢复包被;(2)

粘球藻的比重及重量比一般的细菌和破碎的包被要重,故在 0.8mol 浓度的蔗糖溶液中低速离心时,较重的粘球藻细胞先下沉,而一些杂菌等则漂浮在上层,快速用无菌吸管将上层的液体吸走后,共离心两次,然后取沉淀物划线分离就能将杂菌除掉。作者认为这种分离方法比传统的方法要优越: 第一,传统的紫外线法不单杀死了细菌,同时对蓝细菌同样有损伤作用,易使其发生突变^[12],而本方法就不会导致这种结果。第二,由于蓝细菌粘球藻和细菌一样都是原核生物,链霉素对细菌和粘球藻的遗传物质 DNA 和 RNA 同样都有损伤作用。第三,连续平板划线的方法既费时又不易排除,粘液中的杂菌,而且只限于某些生长快的蓝藻,因而广泛采用就受到了限制;本文所报道的分离方法,既省时又较易排除粘液中的杂菌,对于那些生长较慢的单细胞蓝藻如粘球藻较为适用。

2. 粘球藻的固氮效能: 关于粘球藻的固氮问题,自从 1969 年报道 *Gloeocapsa alpicola* UTEX 795^[9] 有乙炔还原能力以后,才明确了没有异形孢的单细胞蓝藻也有固氮作用。到 80 年代,一些学者公认 *Gloeocapsa* 具有固氮能力^[14,17,18]。迄今为止,已证明只有 *Gloeocapsa alpicola* UTEX 795, *Gloeocapsa* sp. PCC 6501, *Gloeocapsa* sp. CCAP 1403/3 等有固氮能力。国内尚无这方面的报道。

经超声波处理去掉包被的单细胞粘球藻没有固氮活性的结果表明: 粘质包被可能是固氮酶的氧保护外层屏障,因为它们恢复了包被的同时也恢复了固氮活性。光照和黑暗对粘球藻固氮酶的影响与报道的材料相似^[18],但本实验结果其活性降低的幅度不太大,因而不是明显下降。尽管如此,粘球藻的有效生长和固氮作用均对光照有依赖性^[19,20]。

参 考 文 献

- [1] 朱浩然: 南京大学学报(生物学), 1: 93—101, 1963.
- [2] 黎尚豪: 水生生物学集刊, 4: 429—439, 1959.
- [3] Голлербах, М. М.: Определитель Пресноводных Водорослей СССР, Выпуск 2, 1953.
- [4] Stanier, R. Y. et al.: *Bac. Rev.*, 35: 177—205, 1971.
- [5] Pringsheim, E. G.: *Beitr. Bid. Pfl.*, 12: 49—108, 1914.
- [6] Drews, G.: *Bak.* (2 Abt.), 75: 88, 1928.
- [7] Allison, F. E. and H. J. Morris: *Science*, 71: 221—223, 1930.
- [8] De, P. K.: *Proc. Roy. Soc., London, B.*, 127: 121—139, 1939.
- [9] Wyatt, J. T. and J. K. G. Silvey: *Science*, 165: 908—909, 1969.
- [10] 周宏斌、陈延伟: 生物工程学报, 4(2): 153—156, 1988.
- [11] Allen, M. M.: *J. Phycol.*, 4: 1—4, 1968.
- [12] Beijerinck, M. W.: *Bak.* (2 Abt.), 7: 761—182, 1901.
- [13] Smith, G. M.: *The Fresh-water Algae of the United States*, New York, McGraw-Hill, 1950.
- [14] 胡鸿均: 中国淡水藻类, 上海科技出版社, 上海, 1981.
- [15] Rippka, R. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 111: 1—16, 1979.
- [16] Fogg, F. E.: *Endearour*, 6: 172, 1941.
- [17] 黄有馨等编: 固氮蓝藻, 农业出版社, 北京, 1984.
- [18] Gallon, J. R.: *Biochem. Soc. Translation*, 7(6): 1295—1297, 1979.
- [19] Kallas, T. et al.: *J. Bact.*, 155 (1): 427—431, 1983.
- [20] Mullineaux, P. M. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 126: 227—232, 1980.

THE ISOLATION, PURIFICATION AND EFFICIENCY OF NITROGEN FIXATION FOR UNICELLULAR CYANOBACTERIA *GLOEOCAPSA* SPP.

Zhou Hongbin Chen Tingwei

(Soils and Fertilizers Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing)

An improved method on isolation and purification for unicellular cyanobacteria *Gloeocapsa* spp. was reported in this paper.

The isolation and purification for these cyanobacteria was as follows: A large number of cyanobacteria cells were got by using the enrichment medium of nitrogen free, then the mucilage sheathes of cells were removed by a sonic oscillator for 2 minutes and centrifugalized (500 r/min) in 0.8 mol/L sucrose solution for 2—3 minutes. Finally, the pure culture of four strains of cyanobacteria was obtained from some places of China after

clearing away the bacteria which always be contaminated in the sheath.

Nitrogenase activity of purified *Gloeocapsa* spp. was determined by acetylene reduction assay and it comes about 40 nmol $C_2H_4 \cdot g(fr. wt.)^{-1} \cdot h^{-1}$ in air and 800 nmol $C_2H_4 \cdot g(fr. wt.)^{-1} \cdot h^{-1}$ in oxygenfree.

Key words

Cyanobacteria *Gloeocapsa*; Isolation; Efficiency of nitrogen fixation