

固氮蓝藻和单细胞绿藻 的繁殖与培养

郭裕懷 李守祥 張 恒編著



山西人民出版社

前 言

1958年是伟大的一年。在短短的一年里，党领导着全国人民不论工农业战线、教育战线都取得了巨大的胜利。

一年来，我们在党的教育方针的指引下，沿着“三结合”（教学、科学、生产）的道路，为寻求解决教学和生产相结合的正确途径，进行了科学研究；并先后得到中国科学院水生生物研究所、山西师范学院等单位的支持和帮助，获得了不少成绩。

藻类植物的种类和数量很多，分布也很广。它对于发展国民经济，促进社会主义建设，提高人民物质生活水平，都具有极重要的意义。固氮蓝藻的施用效果已经中国科学院水生生物研究所证实，它不仅效果很好，而且施用后发挥的效率逐年上升，因此号称“万年肥”。但由于这些藻类较为微小，研究起来也较麻烦，所以一向不被人们重视。现在则因为祖国大跃进的趋使和要求，藻类的利用和研究，已在中国科学院水生生物研究所开始了，并引起了全国广泛的注意。

近几个月来，我们为了更有效地提高教学质量，支援1959年的农业大跃进，进行了固氮蓝藻和单细胞绿藻的研究，获得了较为满意的成绩。经把这两项成品在山西省教育与劳动生产相结合展览会上展出后，得到各级首长和各地兄弟学校以及其他有关单位的好评，有许多同志还来信索取资

料。为滿足各地的需要，我們在学校党委的鼓舞和领导下，把它整理出来，謹供同志們参考。

我們水平有限，又加手中缺乏充足的参考資料，因此本書不妥之处一定不少，希望讀者批評指正。

郭裕怀于沁县一中

1959年4月10日

目 录

藻类的一般介绍.....	(1)
藻类植物在经济上的意义	(1)
固氮蓝藻	(3)
一 固氮蓝藻的生物学知识.....	(3)
二 固氮蓝藻的分离和培养.....	(9)
三 固氮蓝藻的大量培养.....	(13)
四 固氮量的测定.....	(15)
五 固氮蓝藻的施用.....	(19)
单细胞绿藻	(20)
一 栅藻和小球藻的生物学知识.....	(20)
二 栅藻和小球藻的采集.....	(23)
三 栅藻、小球藻的分离和培养.....	(25)
四 栅藻、小球藻藻种的培养.....	(27)
五 栅藻、小球藻的大量培养.....	(29)
六 培养用的水和肥料.....	(29)
七 接种和培养管理.....	(31)
八 收获.....	(34)
九 栅藻和小球藻的利用.....	(34)

藻类的一般介绍

藻类是很大的一类下等植物。从它的名称就可以知道，大多数的藻类是生活在水中的。可是在它們中間，也有一些生活在陆地上的，它們生活在土壤上、树皮上、峭壁上……因此藻类植物这一概念，与其說是一个分类学的概念，不如說是一个生态学的概念。这一类种类繁多（25,000种？）的藻类植物，除了单細胞的简单类型外，在藻类植物中也有群体、絲状的类型和片状的类型，这些多細胞类型有时候具有复杂的构造，但軀体并不分化为各种器官——根、茎和叶，因而称为叶状体。藻类植物大多是自养的有机体，它們的細胞含有叶綠素。很多門藻类植物除了叶綠素以外，还含有其它的輔助色素——藍的、紅的、褐的。不同藻类植物的顏色决定于叶綠素与其它色素的比例。

藻类植物依其形态、构造、生理、发展等各方面的差异，分为金藻門、黃藻門、甲藻門、矽藻門、裸藻門（眼虫藻門）、綠藻門、藍藻門、褐藻門和紅藻門。这些藻类广泛地分布在我国各地的水域中。

藻类植物在經濟上的意义

在我国漫长的沿海浅水区，以及分布在內地的江河、湖泊、池沼、水庫等水域內，都广泛生长着种类极繁、数量极

大的藻类。它們有些不仅是很珍貴的食品，而且有許多还是很寶貴的工业原料。所以藻类的全面开发和利用，是我們科学工作者迫不及待的任务。現就藻类的經濟意义加以介紹，以引起讀者的重視：

藻类在人类食用上的应用 采用藻类为人类的食品，已經有較长的历史。这不仅因为它含有多量的碳水化合物、蛋白質和矿物质，而且还因为它含有对人类营养生理上有重要作用的維生素和其它元素。这也正是决定它有較高食用价值的原因。

藻类和渔业的关系 在各种水域中的藻类植物，尤其是小型的藻类植物，是水生动物(主要是魚类)的食物来源。所以人們可以根据浮游藻类植物发展的程度，来判断水庫发展渔业的可能性，以及确定漁場的所在地。同时，在进行漁类的人工繁殖时，还可以施用有机肥料的方法，来增加浮游藻类的繁殖率。

藻类在农业上的应用 藻类在农业生产上的实际意义是相当大的，我們平日未予注意或重視，就把它忽略过去，这是非常可惜的。現在扼要叙述几点：

1. 由藻类植物死体所形成的有机質淤泥，已在农业中当作肥料广泛地加以应用。另外一些藻类，被农民打捞起来后作为堆肥，也是常見的事。

2. 現代科学家已經用事实証明，藍藻中有些种类如念珠藻属、項圈藻属中有些种类能起固氮作用。

我国自解放以来，藻类的普查工作和海带、裙带菜、紫菜、小球藻和栅藻等食用藻类的养殖事业，都有很大的发展，海藻的引种和馴化研究，亦日益深入。藻类植物的資源，正在大力开发中。

此外，还有一些必須提及的，就是有不少藻类还可作为家畜、家禽的飼料。

藻类在工业上的应用 藻类植物中含有不少的有机化合物和无机化合物，所以引起了工业化学者的研究兴趣。就已知的：除可以从藻类植物中提取树脂、精油、甲醇、丙酮、藻醣酸、鈉盐、碘和鉀等化合物外，还可提取維生素和抗菌素。同时，在紡織工业中应用极广的藻胶；建筑运输工业中应用頗广的硅藻土；造纸工业中的原料，都可从藻类植物中获得。

藻类在医药卫生上的应用 从藻类中提取的碘質，不仅可以防除疾病，同时还可使人类营养生理維持正常状态。鵝鵝藻的驅虫作用已在我国古籍上有所記載。另外，作为輕泻药或补品的藻胶，也已在我国应用多年。除此之外，某些藻类植物还在无声无息地为人类清洁着池水和河水（当然有些藻类对人类是有害的，如因多数单細胞藻类的孳生，使水质变坏，发生异味，不能飲用，但毕竟还是少数的）。因此，大力发展藻类的养殖事业和充分利用有益的藻类，是发展我国水生生物的一个重要途径。

固 氮 藍 藻

一 固氮藍藻的生物学知識

(一) 固氮藍藻的研究概况 在外国进行藍藻固氮作用研究的有英、美、日本、印度等。但一般限于实验室，其中

• 4 •

日本的渡边篤等自1941年开始研究，先后找到了12种固氮蓝藻，其中固氮量最高的小单枝蓝藻已经进行了大田试验，并且证实了在稻田中施放蓝藻肥料后，产量可以逐年上升，第四年可以增产21.8%。我国的这项研究工作已由中国科学院水生生物研究所藻类组的同志们揭开了序幕，并于1958年下半年找出了四种有固氮作用的蓝藻，如鱼腥藻属、念珠藻属中的某些种，初步试验固氮量超过日本。目前这项工作经水生生物研究所的传授，已在各地推广开了，预计不久还会有新的固氮蓝藻的出现。

(二) 固氮蓝藻的分类 固氮蓝藻属蓝藻门，是最古老有机体中之一类。本门藻类分三目到五目，约有150属，计1,500余种，其中具有固氮能力的有鱼腥藻属、念珠藻属、丝状藻属、项圈藻属中的某些种。目前水生686属鱼腥藻属，固氮能力最大。

(三) 蓝藻的分布和采集 蓝藻广泛地分布于静止的和流动的淡水存贮地方：如道路上的车辙和水洼、排水沟、池沼、含有污水的河沟，以及桥柱和水里的其它物体上。另外在陆地上如稻田边、潮湿的土壤中和土壤表面等处皆有生长。固氮蓝藻对气候条件的适应幅度也较大，它能生长在干旱无雨的沙漠，也能生长在冰天雪地的寒原。因此我们采集时就应当注意这些地方了。但是由于我们的目的是要找到能在稻田或旱田中增加氮肥的蓝藻，因此从稻田旱地中采集蓝藻就特别重要了。

采集的用具：大镊子、大吸管、镊子、广口玻璃瓶、纸袋、标签纸、采集记录簿、铅笔等。

蓝藻是一种喜温性植物，在温暖的季节里它们能大量繁殖，因此，在春末夏初最易找到。在田埂和水面相連的地

方，雨后土表，常有大片胶状蓝藻生长，成深蓝绿色，干了时颜色发黑，也有一片片地浮在水面的。在采集这些蓝藻时，可用镊子或大吸管将这种蓝藻取出放在广口玻璃瓶内，并编上号码投入其中。土壤上的标本可用纸袋包好，但也要编号。同时对采到的标本要在采集簿上记下采集地点、时间、该藻的生活状况及其周围环境，并编上一个号码，但要同于标本上的号码。带回实验室后，可取一部分标本用2—4%的福马林或鲁哥氏液（碘化钾6克、碘4克、水100西西）固定，留为定种名用，其余的均为分离培养的材料。

（四）固氮蓝藻的一般形态

分布在稻田、土表的蓝藻种类很多，它们的颜色一般比绿藻深（因含有藻蓝素），为蓝绿色，或带黄褐色，它们的许多个体常常由胶质连成一片，或为胶质块状、糊状，或成一片膜状，浮在水面上或土壤表面、稻茎上。稻田中常见的蓝藻有鱼腥藻、念珠藻、胶刺藻、颤藻、胶鞘藻、鞘丝藻等。根据国内外报导证明，念珠藻科的一部分种类有固氮能力。下面简单地介绍主要的固氮蓝藻中几个属的特点。

1. 鱼腥藻属 常生在阴湿的草地上、稻田中、田埂的两侧或飘浮在水中，呈深蓝绿色，有许多种类，个体间由胶质连成不定形的胶质块。（图1）

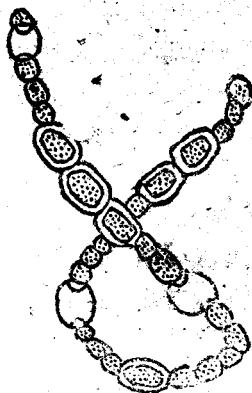


图1 鱼腥藻

魚腥藻的絲狀體是單條的，也可以叢生成群體，另外有一薄層透明的膠質膜，通常看不見，細胞裂的直徑基本上相等，兩端稍尖。一條細胞裂中可以有一個或幾個異形胞。孢子可能緊靠着異形胞，或遠離異形胞，或者在異形胞的兩側。孢子比異形胞子大。

2. 念珠藻屬 干燥時象市面上賣的木耳一樣成膠球形，遇水後膠質吸水膨脹，成為軟軟的不易破碎的東西。有些種類可以食用，通常稱為“葛仙米”或“地木耳”，山坡上很多。

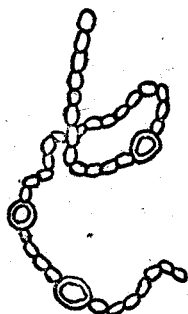


圖 2 念珠藻

細胞和細胞裂的形狀與魚腥藻很相似，兩者的差別是後者有比較硬的膠膜，有一定形狀，不易破碎。（圖 2）

3. 柱胞藻屬 這種藻類的外形與魚腥藻相似，田埂間潮濕的

草上都可以找到，它的特点是：異形胞都在細胞裂的末端，孢子一個或數個位於異形胞與普通細胞之間，細胞裂一般很短，直的或是彎的等粗；細胞圓柱形，長比寬約大二倍。（圖 3）

4. 單枝藻屬 單枝藻是有假分枝的絲狀藍藻，它的假分枝是由與異形胞相連處發生出來，多為單枝或偶爾為成對的假分枝。因此，在假分枝處總有異形胞一

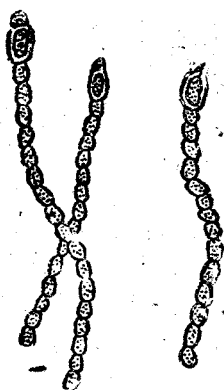


圖 3 柱胞藻

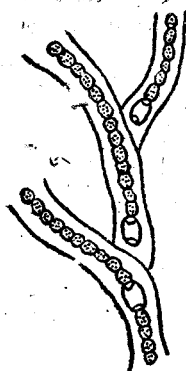


圖4 單枝藻

个或2至6个排成列。(图4)

5. 管鞘藻 这个属植物的絲状体是直的，也有弯的，整个絲状体直径都相等，每个胶鞘內只有一个細胞列，細胞圓柱形，长度与寬度相等，或者长长于寬，鞘很窄，鞘質均匀，而且很坚实。异形胞在中間，圓柱形，孢子通常是数个連在一起排成一列，靠近异形胞或远离异形胞。

管鞘藻与魚腥藻很相似，不同点

在于細胞的形状和坚实的鞘。(图5)

最常見的沒有固氮能力的是颤藻。颤藻分布最广，尤其是在富有有机質的臭水沟、死水坑、下水道出口处常常大量繁殖，形成一片藍綠色光滑的片状物，这种藻类能运动，当它和泥土相混时，能很快的从下面爬到最上层，整齐地排在向光的一面。

颤藻是由一列垂直排列的細胞組成的絲状体，不分枝的有些細的颤藻，細胞长度等于或者大細于

寬度。有些大的颤藻，寬度往往大于长度。有些种类其絲状体末端弯曲，而且围有一层粘液，它的頂端常处于摆动状态。(图6)

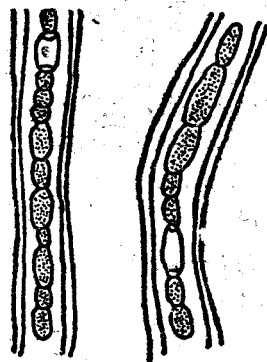


图5 管鞘藻

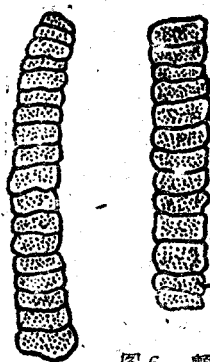


图6 藻类

(五) 固氮蓝藻与稻田常見藻类的区别 在稻田中見到的藻类是很多的，其中有綠藻、藍藻、褐藻、矽藻等。为了采集时的方便，避免采到无用的藻类，影响工作，現将在北方稻田中常見的几种藻类的外形特点介紹如下：

1. 衣藻：是构造最简单的单細胞綠藻，在細胞的前端具两条鞭毛，大多数种类有一杯状色素体和一个淀粉核。这些藻类在春天生活的特別旺盛，故有“春水綠波”之称。当它繁殖多的时候，在水面上形成薄薄的一层，顏色黃綠色的，很易散开，用手輕輕一搓，就碎成小片分散。

2. 水綿：水綿是由长筒形細胞相連而成的不分枝的絲狀綠藻。常在稻田中大量繁殖，生长旺盛时它們是亮綠色，在衰亡及生殖时发黃。水綿的个体較大，肉眼就可以看出，它象一根根的头髮絲，用手触之有滑潤的感觉，这种綠藻不仅消耗田中肥料影响水稻产量，而且也因在池塘大量繁殖，影响养殖。一般用石灰或硫酸銅来杀死它。

二 固氮藍藻的分离和培养

(一) 分离的用具：双筒解剖鏡（15—150倍）、解剖針、表玻璃、載玻片、滴瓶、錐形瓶、培养皿、鑷子、液体培养基、固体培养基等。

(二) 分离的方法：将采回的标本用鑷子取出一些藍藻，放在玻片上，然后在顯微鏡下检查，如果可能具有固氮作用的各属种类，就可进行分离。分离是在双筒解剖鏡下进行的，用解剖針把藍藻中杂有的其它藻类和泥土等杂物，尽量挑去，将比較干净的藍藻放入另一滴干净的水中再行分离。这样連續洗几次，最后可以得到干净的藍藻。然后就将这些干净的藍藻分别接种在水溶液或固体培养基上，放在适宜的条件下进行培养，等它长出以后，再用顯微鏡检查，如果培养基上长出的藍藻里面还杂有其它藻类，就从这个培养基上挑取比較干净的藍藻，用前述方法同样洗净，接种在另一个新的培养基上，这样連續轉移几次，最后便可以获得单种藍藻。这种藍藻就可以移入水溶液中培养。在液体培养时最好7—10天换一次溶液，原来的溶液和藍藻不要倒掉，等新溶液中藍藻长好后，再将老的藍藻放在泥土上保存起来。最初采回的泥土应当保存起来，留作第二次分离培养之用。

(三) 培养条件：藍藻和其它高等植物一样，生长时需要适当的温度、光照、营养、盐分等。

温度 大部分藍藻是喜温植物，在温暖季节藍藻生长較茂盛，一般在20—30°C間生长較快，20°C以下生长較慢。我們培养藍藻时，放在25—30°C之間的环境下，繁殖最快，温度太高（超过40°C）会死亡。

光 蓝藻喜欢生在較阴的地方，如田埂边、草丛中。因此培养蓝藻时可用窗口自然光或电灯，光线不需太强。如用太阳光时，最好用散射光（即隔一张白紙或白布）。直射阳光过强时，也会影响生长。如条件許可，实验时可用日光灯。

二氧化碳 蓝藻和高等綠色植物一样，光合作用时需要二氧化碳，而水中二氧化碳的含量很小，当温度适合光线充足时，在水中不断通入含5%的二氧化碳空气，增加水中二氧化碳含量，可以大大加速蓝藻的生长。

营养盐类 蓝藻正常生长时，需要氮、磷、鉀肥，还有少量鎂、鉄、鈣等，因此在培养液中就要滿足它生长时所需要的营养物質。培养固氮蓝藻时，一般可以不給氮的化合物，因它自己能固定空气中游离的氮素。

酸度 (p^H) 蓝藻生长的 p^H 幅度較寬，从 p^H 6— p^H 9.5 都可以生长，少数种类在强酸强碱中也可以生长。一般在培养中，以 p^H 7.5—8.5 的情况下較佳，但 p^H 会因藻类在生活过程中进行光合作用时，利用了二氧化碳而改变（变为碱性）。 p^H 改变不太大时，一般用不着調节它。

（四）培养液的配制：培养液是人們根据植物的需要而設計出来的，虽然数目很多，但彼此間的區別都很小，只是在各种成分的比例上有所差別而已。我們培养蓝藻的培养基有两种，即：有氮的和无氮的两种，而每种都可以配成液体和固体的培养基。現將它們的配制方法叙述于下：

（1）配方：

有氮培养基

I. 硝酸鈣

0.04克

磷酸氢三钾	0.01克
硫酸镁	0.025克
碳酸钠	0.02克
氯化铁	1%的水溶液 一滴
水	1,000 西西
II 硝酸钙	0.025克
硫酸镁	0.005克
磷酸氢二钾	0.005克
氧化钙	40毫克
硫酸铁	1 毫克
水	1,000 西西
III 硝酸钾	0.2克
硫酸镁	0.2克
磷酸氢二钾	0.2克
氯化钙 (CaCl_2)	0.1克
氯化铁	1%的水溶液 2 滴
水	1,000 西西

无氮培养基

I 过磷酸钙	0.1 克
硫酸镁	0.2 克
氯化钾	0.1 克
重碳酸钠 (小苏打)	0.1克
氯化铁	1%的水溶液 一滴
钼酸	1%的水溶液 一滴
水	1,000 西西

沒有硝酸鈣可用硫酸銨代替，而磷酸氢二鉀亦可用过磷酸鈣代替。总之，只要我們計算出加入盐的某种元素的实际

含量①，然后就可同价的盐类所含某元素实量相等的盐去代替。同时在我们进一步研究盐类对植物的作用时也是必要的。

此外，如果进行大量培养时，还可采用有机肥培养液。取易得的嫩草（NC比含N高）经发酵后过滤，将滤液加热煮沸，调制成5—10%的溶液即可进行培养蓝藻。另外，也可用牛粪一斤、青草一斤、加水4斤放入缸中混和，使发酵后过滤，加热煮沸，然后配成5—10%的溶液，也可培养蓝藻，初步试验效果良好。

（2）配制方法：

我们在配制培养液时，总希望迅速准确，但是在实际工作中由于所用的培养基需要的试剂量的微少，在室内配制培养基时，不容易称得准确，因此，在事先把这些试剂配成原液，使原液和需用量成整数比。当用时只计算出应加多少原液，例如上述有氮培养基中的硝酸钙，我们可以先配成10%的原液，这样的原液，每毫升中含有0.1克的硝酸钙。而每升培养基中需硝酸钙0.04克，因此可以算出每升水中只要加入原液0.4西西就等于加入0.04克的硝酸钙了。这样就比秤0.04克省事多了。当然在大量配制培养液时是不用这样做的。

（五）灭菌：一般使用的培养基可以用蒸馏水、自来水或经过滤的河水配制即成，不必灭菌。若是我们要培养灭菌

①如硝酸钙的分子量为164.01，它含有2个N，N的原子量为14.008，两个N即为28.02，因此硝酸钙中N的含量为 $\frac{28.02}{164.01}=0.17$ ，在培养基中硝酸钙的含量是0.04克，即40毫克。 $40 \times 0.17 = 6.8$ 毫克，即实际上1,000CC培养基中的含N量。

固氮蓝藻或用以保存藻种，这样用的培养基，都必须经过灭菌处理。灭菌方法是采用高压蒸气锅灭菌，将盛好培养基的容器放在锅内，在1.5气压下，处理20—30分钟，取出冷却后即可使用。但必须注意在配培养基时，不要先加入氯化铁，因为铁离子在高温下容易与其它物质结合成为胶状的沉淀，就不能为藻类所利用了。因此，氯化铁必须分开灭菌，待冷却后，再小心加入培养基内。

(六) 固体培养基的配制：

固体培养基的成分完全同于液体的，只是在培养液中加入1.5%的琼脂（即洋菜）加热，待琼脂溶化后，用上述同样方法灭菌。然后将热的培养基在无菌箱内倒入培养皿内，冷却后即成固体平板；或先倒入试管内灭菌后制成斜面亦可。

(七) 培养基的使用：

有氮培养基：从野外采回的标本，一般都放入有氮培养基内培养。因为从自然环境中转到室内的条件来培养变化很大，因此先给它比较有利的营养条件来促使它生长，以免环境突变，招致死亡。

缺氮培养基：分离得的标本，已在有氮培养基内生长良好，就可以用无氮培养基来初步试验它有无固氮能力，灭菌后的蓝藻在测定固氮量时亦要用无氮培养基来培养。

固体培养基：一般在初步分离时采用较多，从野外采回的标本，在分离后，放在固体培养基上培养，容易观察它的生长，同时也容易与其它有机体分开。此外，在保存藻种时，亦可用固体培养基。

液体培养基：一般琼脂难于买到，因此在作室内培养和大量培养时都可采用液体培养基，固氮蓝藻可用无氮的液体培养基来培养。