

柄杆菌对固氮蓝藻生物量及色素的影响

李勤生 路景舒 利群 黎尚豪

(中国科学院水生生物研究所, 武汉)

摘 要

柄杆菌对固氮蓝藻生物量和色素的影响研究结果表明: 多态柄杆菌 (*Caulobacter polymorphus*) 017-41或新月柄杆菌 (*Caulobacter crescentus*) CB₂的活菌、死菌及破碎细胞悬液分别与鱼腥藻 (*Anabaena*)、念珠藻 (*Nostoc*) 不同藻株混合培养时, 试验组生长量均优于对照组; 对衰老黄化的藻培养物的生长刺激作用尤为显著, 试验组藻培养物的藻蓝素或藻红素含量亦明显高于对照组。其作用机理尚待进一步阐明。

关键词: 柄杆菌, 固氮蓝藻, 生物量, 色素, 刺激作用。

微生物在混合培养状态下相互关系、各种活力以及与单种培养时所表现的差异, 是日益引起科学工作者兴趣的课题。它对环境科学、生物工程和医学等领域有较大的应用价值^[1-3]。

蓝藻是水体初级生产力的主要组成部分, 对水生态系统中的物质循环和能量转换起着重要的作用。它们的丰度受到多种因素的影响。与蓝藻相互作用的多种微生物是影响蓝藻生长繁殖的重要因子之一^[4-8]。

柄杆菌对蓝藻的影响曾有不同的报道^[7-8]。进一步探讨柄杆菌与固氮蓝藻间的相互作用及其生态学意义。本文研究多态柄杆菌 (*Caulobacter polymorphus*) 1017-4 和新月柄杆菌 (*Caulobacter crescentus*) CB₂的活菌、死菌及破碎细胞悬液对鱼腥藻 (*Anabaena*)、念珠藻 (*Nostoc*) 不同藻株的生长和产色素的影响。

材 料 与 方 法

1. 菌株来源及培养基: 多态柄杆菌 (*Caulobacter polymorphus*) 1017-41, 系由我所藻类学研究室呈现黄、蓝绿色相间同心环状异常生长的固氮蓝藻培养物中分离而得^[9]; 新月柄杆菌 (*Caulobacter crescentus*) CB₂系美国纽约公共卫生研究所Poindexter, J.S.博士所赠。培养基: PYE培养基^[10]中添加0.2%葡萄糖, 30℃下培养。

2. 藻株及培养基: 固氮鱼腥藻 (*Anabaena azotica*) 686, 多变鱼腥藻 (*Anabaena variabilis*) 1058, 灰色念珠藻 (*Nostoc muscorum*) 1037及一株未定种名的念珠藻。

水生111培养基^[10]; 固体培养基则加入1%琼脂粉。

3. 细菌悬液的制备: 活菌悬液: 培养3—5日生长良好的菌苔用无菌水洗下, 置冰箱中存放5日以上。灭菌悬液: 无菌水洗下的细菌悬液经15磅20分钟高压蒸汽灭菌。将活菌悬液经反复冻融后, 再以超声波处理破碎细胞。

本文于1989年12月22日收到。

4. 藻细胞悬液制备: 根据不同实验要求, 分别选取生长良好或衰老黄化的藻培养物, 经注射器反复抽吸, 使之分散均匀后备用。在平皿固体培养基中比比藻菌混合培养物与对照组的生长丰度时, 采用混合倾注平皿法; 在液体培养中进行比较时, 于50ml三角瓶中加15ml水生111培养基、5ml藻悬液及2ml细菌悬液。对照则加入2ml水生111培养基, 然后按时取样, 并离心洗涤以除去细菌, 样品105℃烘干至恒重, 再比较各组干重。

5. 色素提取及测定: 叶绿素a, 80%丙酮提取; 藻蓝素或藻红素, 丙酮提取叶绿素a后, 再加蒸馏水提取; 采用SPECORD UV. VIS. 分光光度计测定色素光谱吸收曲线, 比较各组不同色素的含量。

结 果

1. 柄杆菌对生长在水生111固体培养基上的蓝藻的影响: 当用多态柄杆菌1017-41或新月柄杆菌 CB₂ 与固氮鱼腥藻混合培养时, 藻丝生长速度明显高于对照, 当接种柄杆菌量增加时, 效果更为显著(图版 I), 无论用1017-41或CB₂ 接种固氮鱼腥藻686, 多变鱼腥藻1058、灰色念珠藻10.37或念珠藻 (*Nostoc* sp.) 均未发现不利于藻细胞生长的现象。因此, 我们认为: 多态柄杆菌虽然是从异常生长的培养物中分离出来的, 但不是引起此种现象的原因, 亦可排除它是藻类病原的可能性。在藻丝形态上, 试验组与对照组比较, 除试验组藻细胞颜色较深外, 未见其它明显的差别。

2. 1017-41和CB₂ 菌株对固氮蓝藻生物量的影响: 采用液体水生111培养基进行生长对比试验, 以干重为指标, 结果见表1。由此可见, 两种不同柄杆菌对鱼腥藻属、念珠藻属的不同藻种或藻株的生长均有不同程度的促进作用; 生物量的增长最低为对照组的104%, 最高达254%。两种杆菌的效果相近。在同等试验条件下, 藻种接种量与增长幅度明显相关。

表 1 多态柄杆菌1017-41、新月柄杆菌 CB₂ 对固氮蓝藻生长量的影响 (干重, mg)

Table 1 The effects of *Caulobacter polymorphus* 1017-41 and *C. crescentus* CB₂ on the growth of nitrogenfixing blue-green algae (dry weight, mg.)

藻名	组别	对照组 (CK)	试 验 组 (T)					培 养 时 间 (d)
			CB ₂	T/CK	1017-41	T ₂ CK		
固氮鱼腥藻	686	3.07	8.29	2.05	7.79	2.54	7	
固氮鱼腥藻	686	5.84	14.94	2.19			6	
固氮鱼腥藻	686	8.28	11.92	1.44			6	
固氮鱼腥藻	686	9.56	11.47	1.20	11.50	1.20	6	
固氮鱼腥藻	686	10.56	11.53	1.09	10.94	1.04	6	
多变鱼腥藻	1058	4.07	8.03	1.48	6.37	1.32	3	
灰色念珠藻	1037	19.30			37.90	1.96	90	
念珠藻		13.67	24.32	1.78			78	

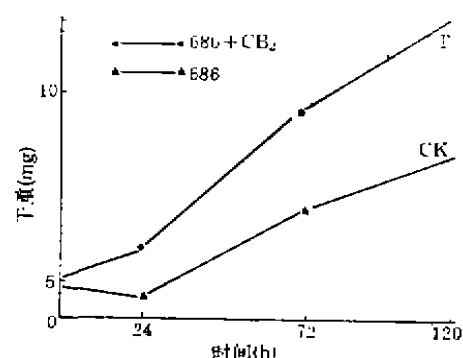


图 1 固氮鱼腥藻686单种培养和柄杆菌 CB₂ 混合培养物生长动态比较

Fig.1 Comparison of the growth dynamics between axenic and mixed algal cultures.

为了解试验组与对照组的生长动态, 我们对 0、24、72、120 小时藻培养物的干重增长量作了测定和比较。结果表明, 在 24 小时至第 120 小时试验结果, 二者的生长丰度有明显的差别 (见图 1)。

鉴于柄杆菌对健康蓝藻的生长有刺激作用,促使我们选择培养时间达35—38日衰老黄化或生长不良的686、1058藻培养物作了进一步观察。结果发现,一旦加入柄杆菌后,衰黄藻培养物迅速转绿,36小时即明显优于对照组,开始长出新的嫩绿藻丝,3—4日形成绿色细胞团,并逐渐长成球状突起(图版A、B),培养7日后测其生长量亦显著高于对照(见表2)。

3. 不同处理的柄杆菌悬液促进生长的比较:采用活菌悬液、高压蒸汽灭菌悬液以及超声波破碎细菌细胞制备液对蓝藻生长刺激作用的实验结果是一致的(表3)。新月柄杆菌CB₂亦表现了与1017-41相似的结果。

4. 柄杆菌对固氮蓝藻色素含量的影响

当藻培养物中加入柄杆菌1017-41或CB₂悬液后,均见藻不仅生长较好,且藻体呈较深的蓝绿色。为证实柄杆菌对蓝藻色素含量的影响,采用不同培养时间的单种或与柄杆菌混合培养物,提取其叶绿素a和藻蓝素(或藻红素),通过分光光度计测定其相对含量,比较每mg干重藻中各种色素的含量(结果见表4—5)。由表4可见,试验组(固氮鱼腥藻686—CB₂)随着藻培养物干重的增加,叶绿素a在每mg干重中的含量接近或略低

表2 多态柄杆菌1017-41、新月柄杆菌CB₂对衰老黄化藻培养物生长的影响(干重,mg)
Table 2 The effect of *Caulobacter polymorphus* 1017-41 and *C. crescentus* CB₂ on the growth of senescent algal cultures (dry weight,mg) (7 days)

藻名	组别 (CK)	试 验 组(T)			
		1017-41	T/CK	CB ₂	T/CK
固氮鱼腥藻 686	6.65	16.80	2.53		
	2.70	3.90	1.44		
	5.73	7.07	1.23	6.97	1.22
多变鱼腥藻1058	2.50	3.40	1.36		

表3 多态柄杆菌1017-41(L)、活菌(L)死菌(D)和超声波破碎制备液(S)
对蓝藻生长的影响(干重,mg)

Table 3 The effects of the living bacterium(L), killed cell(D), and cell-free preparation(S) of *Caulobacter polymorphus* 1017-41 on the growth of blue-green algae (dry weight, mg)

藻名	组别 (CK)	试 验 组 (T)					
		1017-41 (L)	T/CK	1017-41 (D)	T/CK	1017-41 (S)	T/CK
固氮鱼腥藻 686*	3.53	3.94	1.12	4.57	1.29	4.47	1.27
	6.65	16.80	2.53	16.50	2.48		
	2.70	3.90	1.44	4.40	1.63		
	5.73	7.07	1.23	7.93	1.38		
多变鱼腥藻1058	2.50	3.40	1.36	3.90	1.56		
念珠藻	19.30	37.90	1.96	33.90	1.76		

* 试验用藻为衰老黄化培养物 (Senescent cultures)。

于同期对照组,而藻蓝素每mg干重藻中的含量在24小时后持续上升,至第五日为对照组的3.22倍,表明叶绿素a含量的变化较藻蓝素要小得多,而两种色素含量的比值则对照组的变动幅度比试验组大得多!

采用有藻红素的灰色念珠藻(*Nostoc muscorum*) 1037,实验结果与上相似,但叶绿素a与藻红素每毫克藻干重中含量均有所增加。表5所示为观察75天后所测结果。分别比较试验组与对照组的干重、叶绿素a和藻红素增长量表明增长的比例是有差别的,试验组的叶绿

素 a 与藻红素含量的比值高于对照组 (表 5)。

表 4 新月柄杆菌 CB₂ 对固氮鱼腥藻 686 色素量的影响
Table 4 The effects of *Caulobacter crescentus* CB₂ on the pigmentation of *Anabaena azotica* 686

培养时间 (h)	色素含量 (O.D值)	色素 组别	叶绿素 a (665nm)			藻蓝素 (620nm)			藻蓝素/叶绿素a	
			对照组	试验组	试验组/对照组	对照组	试验组	试验组/对照组	对照组	试验组
0—4	测定值	0.1210	0.1270	1.049	0.0720	0.1100	1.528	0.695	0.866	
	色素含量/mg 干重	0.0248	0.0242	0.972	0.0418	0.0210	1.419	0.694	0.868	
24	测定值	0.1260	0.1580	1.254	0.0300	0.1000	3.333	0.238	0.833	
	色素含量/mg 干重	0.0276	0.0271	0.982	0.0066	0.0172	2.606	0.239	0.835	
72	测定值	0.3440	0.4430	1.288	0.1040	0.2320	2.231	0.302	0.524	
	色素含量/mg 干重	0.0490	0.0470	0.959	0.0161	0.0246	1.629	0.308	0.523	
120	测定值	0.6890	0.7390	1.073	0.0960	0.4460	4.646	0.139	0.804	
	色素含量/mg 干重	0.0832	0.0620	0.745	0.0116	0.0374	3.224	0.139	0.603	

表 5 新月柄杆菌对 CB₂ 灰色念珠藻 1037 色素形成量的影响
Table 5 The effect of *Caulobacter crescentus* CB₂ on the pigmentation of *Nostoc muscorum* 1037

项目 组别	干重(mg)		叶绿素a O·D值 (677nm)			藻红素O·D值(656nm)			藻红素 叶绿素a
	测定值	平均值	测定值	平均值	每mg干重含量	测定值	平均值	每mg干重含量	
对照组	13.88		0.38			0.119			0.309
	13.02	13.67	0.39	0.38	0.0278	0.12	0.118	0.0086	
	14.12		0.365			0.115			
试验组	24.58		0.98			0.32			0.334
	24.36	24.32	0.94	0.96	0.0395	0.31	0.32	0.0132	
	24.03		0.97			0.325			
试验组/ 对照组	1.78		2.53		1.42	2.71		1.63	

用 1017-41 或 CB₂ 菌株活菌悬液或高压蒸汽灭菌悬液与灰色念珠藻 1037 混合培养 3 日, 藻培养物的叶绿素 a、藻红素含量测定结果表明试验组与对照组的叶绿素 a 含量逐日上升, 而藻红素含量不同幅度的上下波动。但与对照组比较, 试验组藻红素含量为对照组的 162—216%; 叶绿素 a 则为 108—154%。比较在同一培养物中叶绿素 a 与藻红素的比值, 除对照组外, 其它各试验组均有起落, 但多数均高于对照组。看来柄杆菌对灰色念珠藻色素形成量和色素组成的比例量是有影响的。

讨论与结论

1. 多态柄杆菌 (*Caulobacter polymorphus*) 1017-41 菌株虽系由异常生长的固氮蓝藻培养物中分离而得, 但在与固氮鱼腥藻 686、多变鱼腥藻 1058、灰色念珠藻 1037 以及 *Nostoc* sp. 等不同的固氮蓝藻分别混合培养时, 无论在液体或固体水生 111 培养基中均未发现类似异

常生长现象,亦未记有不利于蓝藻生长的表现;新月柄杆菌 (*Caulobacter crescentus*) CB₂亦然。故此两种柄杆菌均非蓝藻病原菌。

2. 多态柄杆菌1071-41、新月柄杆菌CB₂对上述几种固氮蓝藻生长有明显的促进作用。在固体水生111培养基中,试验组藻丝生长丰度明显高于对照组;在液体培养基中以干重为指标的比较结果表明:不同柄杆菌对不同蓝藻的生长促进作用表现了一致的趋势。对衰老黄化的藻培养物,生长刺激作用显著,试验组藻细胞迅速转绿并恢复生长。

同批试验所表现的增长幅度比较接近,不同批试验结果有些差别。分析其原因除与各批试验用藻的生理状态有明显的差别(如健康藻、黄化藻)和试验培养时间不同外,在同等条件下,接种量与增长量明显相关。如表1中,固氮鱼腥藻686与柄杆菌CB₂或1071-41混合培养5天后,比较干重,即可见在此试验条件下,接种量较小者,增长幅度较高,相反则较低。因此,为取得更为稳定的高产效果,适宜的接种量是一重要因素。

3. 柄杆菌1017-41或CB₂分别与蓝藻混合培养时,蓝藻呈现较深的蓝绿色。提取叶绿素a和藻蓝(红)素比较结果表明试验组均显著高于对照组。进一步比较每毫克干重藻中叶绿素a和藻蓝(红)素含量时,发现无论固氮鱼腥藻686-CB₂、灰色念珠藻1037-CB₂或1017-41,每毫克藻蓝(红)素含量虽在不同培养时间上下波动的现象,但试验组始终明显高于对照组(表4—5);每毫克叶绿素a的含量则有些差别:固氮鱼腥藻686-CB₂混合培养试验组中每毫克叶绿素a含量接近或略低于对照组水平;灰色念珠藻1037-CB₂试验组中每毫克叶绿素a含量仍高于对照组,尽管其增长幅度较藻红素低。在柄杆菌的影响下,因种或培养阶段不同,藻每毫克干重中叶绿素a、藻蓝(红)素的含量与两者之间的比例是有差别的(见表4与表5)。叶绿素a是变化较小的色素,其总量的增长主要是藻的生物量增加所致;而藻蓝(红)素的增长则不仅是生物量增加,而且与此种色素更高的合成和积累有关。

4. 用柄杆菌的活菌液、高压蒸汽灭菌悬液或超声波破碎处理的新细胞制备液加入蓝藻培养物中,均有利于藻的生长和色素的形成。很可能是细菌本身的代谢产物对藻的生长有利,而且,还可能是耐热的促生长物质;此外,此两种柄杆菌对蓝藻乙炔还原活力亦有所提高。看来柄杆菌对蓝藻促长的机理是一个比较复杂的问题,尚待进一步研究阐明。

以上果如不仅进一步证实了澳大利亚学者 Bunt 的某些观察^[8],同时提供了在实验条件下比较详细的资料,揭示了柄杆菌对固氮蓝藻的影响是多方面的。它们之间的相互作用结果直接影响到藻类的生物量、色素产量和代谢活力的强度,对阐明生态系统中生物种群间的相互关系、生态平衡和对环境的影响都是有意义的。

参 考 文 献

- [1] Bull, A.T. & J. H. Slater, 1982, *Microbial Interactions and Communities*, V.L. 1—12, Ed. by Bull, A.T. & J.H. Slater.
- [2] Bull, A.T. & J.H. Slater, 1982, *Ibid.*, 13—44.
- [3] Linton, J. D. & J. W. Drozd, 1982, *Ibid.*, 357—406.
- [4] Jones, A. K. 1982, *Ibid.*, 198—246.
- [5] Paerl, H.W., 1982, *The biology of Cyanobacteria*, 441—482, Ed. by Carr, N. G. & B. A. Whitton.
- [6] 李勤生、黎尚豪, 1984, *生态学报*, 4(4):310—315.
- [7] Poindexter, J.S., 1984, *Bacteriol Rev.*, 28(3):231—259.

[8] Bunt, J. S., 1961, *Nature*, 192(4809):1274—1275.

[9] 李勤生、路景舒、黎尚豪, 1984, 微生物学报, 24(2):111—116.

[10] 中国科学院水生生物研究所第五研究室藻类实验生态组等, 1978, 水生生物学集刊, 6(3):299—310.

CAULOBACTER IN NITROGEN-FIXING BLUE-GREEN ALGAL CULTURE

II. The EFFECTS OF CAULOBACTER ON THE GROWTH AND THE PIGMENTATION OF NITROGEN-FIXING BLUE-GREEN ALGAE

Li Qingsheng, Lu Jingshu, Li Qun, Li Shanghao
(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan)

The study of the title indicated that both *Caulobacter polymorphus* 1017-41 and *Caulobacter crescentus* CB₂ strains stimulated the growth and pigmentation of algae and do not belong to algal pathogens. When cultures of blue-green algae, such as *Anabaena azotica* 686, *Anabaena variabilis* 1058, *Nostoc muscorum* 1037 etc., were mixed with *Caulobacter polymorphus* 1017-41 and *C. crescentus* CB₂, respectively, on solid or in liquid medium, the algal filaments grew much better than the control groups without *Caulobacter*. The dry weight of cell from mixed culture increased to 4—154% of that from an axenic culture. Especially, the effect was more distinct for the senescent algal cultures, and the algal cells turned into green and recovered rather quickly. Compared with the axenic algal cultures, the pigmentation of the mixed showed that the chlorophyll a content was near or lower while the phycocyanin or the phycoerytherin content was much higher (about 2—3 times) based on the dry weight of the cells. The results suggested that total content of chlorophyll a increased with its biomass production and the phycocyanin or the phycoerytherin increased due to their better abilities of synthesis and accumulation. Similar results were obtained from different treatments of algal culture with *Caulobacter* preparations. The sonication of living cell, autoclaved cell as well as cell-free preparation has stimulating effects on the growth and the pigmentation of *Anabaena azotica* 686, *A. variabilis* 1058 or *Nostoc* sp. It is suggested that *Caulobacter* releases some thermo stable materials to benefit the algal cultures.

Key words: *Caulobacter*, blue-green algae, interaction between bacteria and algae.