

磷酸盐对中肋骨条藻生长的影响^{*}

杨登峰^{1,2} 赵卫红¹ 李金涛^{1,2} 王江涛²

(1 中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

(2 中国海洋大学, 青岛 266071)

中肋骨条藻是一种在中国东部沿海广泛存在的广温广盐性的浮游硅藻, 根据对近年来我国长江口和其他海域所发生赤潮的观测, 有相当一部分是以中肋骨条藻为主(王金辉, 2002; 刘玉等, 2002), 其严重的破坏了海洋生态环境并造成了重大的国民经济损失, 因此, 对诱发中骨条藻爆发赤潮各种因子的研究便具有了重要的现实意义。本文应用营养盐加富的实验方法, 在室内进行了中肋骨条藻的培养试验, 研究了不同磷酸盐浓度条件下中肋骨条藻的生长情况, 并对藻细胞内氮磷比的变化情况进行了探讨, 以求对揭示中肋骨条藻赤潮的产生机制有所裨益。

一、材料与方法

1. 藻种和培养液

中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)由中国科学院海洋研究所藻种室提供, 待达到指数生长期后, 进行接种。各培养液中磷(P)浓度分别为 0.02 $\mu\text{mol/L}$ 、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 、2.0 $\mu\text{mol/L}$ 、5.0 $\mu\text{mol/L}$ 、10.0 $\mu\text{mol/L}$, 氮(N)浓度均为 147 $\mu\text{mol/L}$, 其他元素的浓度保持 f/2 的水平, 分别简称为 1 号、2 号、3 号、4 号、5 号, 配好的营养液 pH 在 9.0 左右, 用 0.1mol/L 盐酸(HCl)调节到 pH 约为 8.1~8.2 之间。

2. 藻类培养

将长势良好的中肋骨条藻藻种加入玻璃培养瓶中, 最初接种藻密度为 8 万个/L, 摇匀, 并用滤纸封口。置于光照培养架上培养, 培养时间为 6d。培养液盐度为 32。温度为 25 $^{\circ}\text{C}$, 明暗周期 L:D 为 12:12, 光源为白色日光灯, 光强约为 4 000lx。每天摇瓶 3~4 次, 保持瓶内的溶解氧量。

3. 样品采集及预处理

1) 样品的采集。将灼烧过的 GF/F(Whatman)滤膜放入聚四氟乙烯过滤器中, 取约

^{*} 中国科学院知识创新工程项目: KZCX2-207, KZCX2-206。杨登峰, 男, 在读研究生, 现从事海洋化学方面的研究。E-mail: yangdf@mail.ouc.edu.cn

通信作者: 赵卫红, 研究员。E-mail: Whzhao@ms.qdio.ac.cn

收稿日期: 2003 年 5 月 7 日

60mL 经摇荡混匀后的藻液进行过滤, 弃去先过滤的 10mL 滤液不要, 随后分别滤取 10mL、20mL、20mL, 分别用于测量 pH、营养盐和 DOC。定量过滤 60mL 藻液的滤膜用于测定藻细胞内的 N/P 值。

2) 样品预处理。将营养盐贮液瓶置于 -20°C 速冻; 将 2 滴 HgCl_2 饱和液滴入 DOC 样品瓶以防止生物降解, 将贮液瓶置于 4°C 下保存。过滤后的 GF/F(Whatman)滤膜于 -20°C 速冻保存。

4. 测定方法

藻液营养盐浓度直接用 Skalar San_{plus} System 营养盐自动分析仪测定; 藻细胞内氮磷比则先将过滤后的 GF/F 滤膜用过硫酸钾氧化剂消化后, 再用营养盐自动分析仪测定。藻细胞密度的测定采用 Utermöhl 的方法, 在显微镜下计数。pH 采用 pHs-2C 酸度计测定。DOC 用紫外/过硫酸钾氧化法测定, 仪器精度 $\pm 2\%$ (Wang *et al.*, 1997)。

二、结果与讨论

1. 不同磷酸盐浓度条件下中肋骨条藻的生长状况

由图 1 可见, 接种的前两天, 藻细胞正处于对新环境的适应期, 生长比较缓慢, 不同的培养条件下差别不大, 但从第 3 天藻类开始迅速增长, 藻密度在不同培养液中差别也开始明显起来, 1 号瓶中由于未向其中添加磷酸盐, 磷浓度很低, 故无明显的指数生长期。

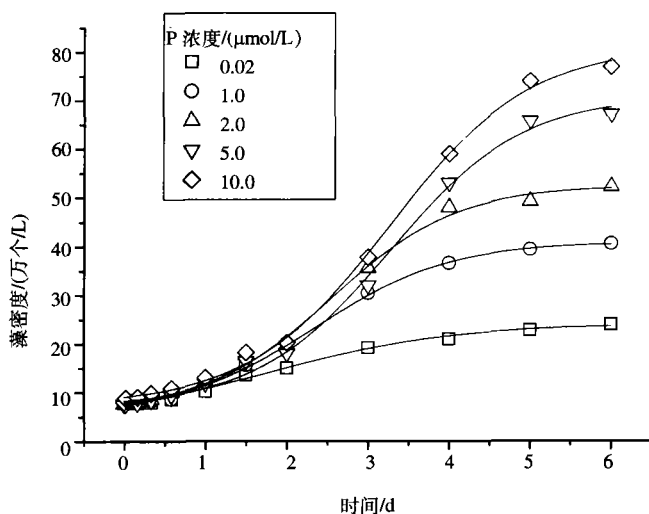


图 1 不同磷浓度下中肋骨条藻生长曲线

当营养盐总水平足以满足浮游植物生长时, 海洋浮游植物的氮磷吸收比例基本上是遵循 Redfield 比值 16:1, 因此常用此比值来判断浮游植物受营养盐的相对限制情况, 刘东艳等(2002)认为中肋骨条藻也是在 $\text{N:P}=16:1$ 的状态下, 生长速度最快。当 N/P

<16 时, 表明氮相对不足; $N/P > 16$ 时, 表明磷相对不足。本实验考察的是在磷相对不足的情况下, 中肋骨条藻的生长情况, 此时, 磷的初始浓度决定其生长速率和所能达到的最高藻细胞密度, 初始浓度越高, 氮磷比越接近 16:1 的培养液中所得到的最高藻细胞密度也就越大。

中肋骨条藻的生长符合一般藻类生长规律, 可用 Boltzmann 方程近似拟和(Wang *et al.*, 1996), $B(t) = B_F - (B_F - B_0) / [1 + \exp((t - t_0) / \delta_t)]$ (图 1)。其中: $B(t)$ 表示 t 时刻浮游植物的生物量; B_F 、 B_0 分别表示浮游植物初始和最终生物量; t_0 为生物量为 $(B_F - B_0) / 2$ 时对应的时间; δ_t 为常数。

2. 不同磷酸盐浓度条件下中肋骨条藻培养液中 pH 的变化

如图 2 所示, 培养液的 pH 从培养的第一天开始逐渐增大, 待第 5 天达到其最大值后即迅速减小, 1 号瓶中的 pH 变化最小。

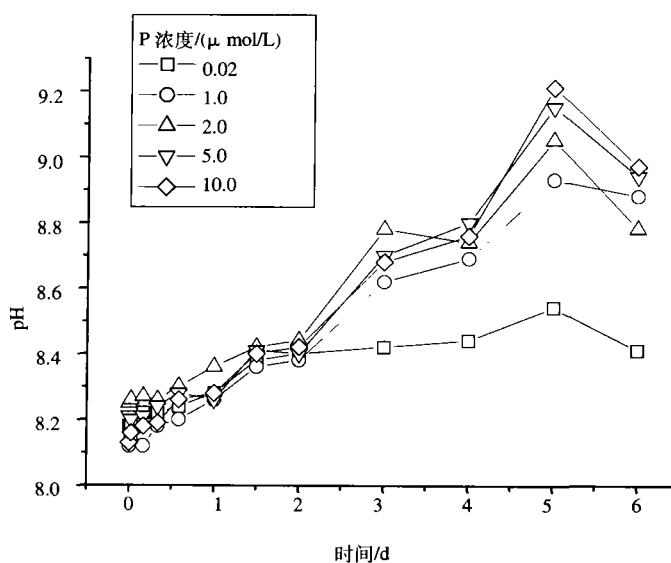


图 2 不同磷浓度下培养液中 pH 变化曲线

溶液的 pH 与中肋骨条藻的生长关系密切, 在藻类生长过程中藻细胞可以吸收利用水体中的无机碳来进行光合作用, 藻细胞在低速生长时可吸收来自 HCO_3^- 中的 CO_2 , 在高速生长时可直接吸收 CO_2 作为无机碳的来源(Law *et al.*, 1996)。如果无机碳的消耗过快, 以至于不能与大气中的 CO_2 平衡, 则 pH 不断升高, 且因营养盐浓度高的瓶中藻类的生物量较大, 吸收的 CO_2 较多, 故所能达到的 pH 也相对较高。藻类生长达到平衡, 即指数生长期结束以后, 藻细胞的光合作用虽然仍在进行但已经开始减慢, 无机碳的利用速率减慢, 相对来说呼吸作用产生的 CO_2 增多而且大气中的 CO_2 可以有充足的时间进行补充, 这几方面共同作用使得 pH 开始下降, 而此时相对应的中肋骨条藻细胞密度却没有明显的衰减, 可见 pH 对藻细胞的生长状况有一定预先指示的作用。

3. 不同磷酸盐浓度条件下中肋骨条藻培养液中 DOC 的变化

由图 3 所示,接种后的前两天,中肋骨条藻处于对新环境的适应期,生长缓慢,DOC 浓度变化不明显,各培养液中其浓度亦无明显差别。当藻细胞进入指数生长期后,2、3、4、5 号瓶中 DOC 浓度开始随之迅速增大,可看出藻细胞进行光合作用合成自身有机质的同时,也在迅速地排出有机物,并以 DOC 的形式迅速释放到水体中(Søndergaard *et al.*, 1995);而 1 号瓶中的 DOC 浓度则变化不大,这与其中藻类生长较为缓和,无明显的指数生长期也是一致的。但当中肋骨条藻指数生长期结束后,2、3、4、5 号瓶中 DOC 浓度仍在继续增长,可以认为虽然各瓶中藻类已结束快速增长,但其光合作用仍在不停地进行着,光合作用产生的有机物仍可通过胞外分泌或扩散等形式释放到水体中(Bjørnsen, 1988);而且随着死亡藻细胞的增多,死藻也可以通过细胞的自溶作用释放相当数量的 DOC,因此当中肋骨条藻指数生长期结束后,DOC 浓度仍可保持相当大的增长幅度。

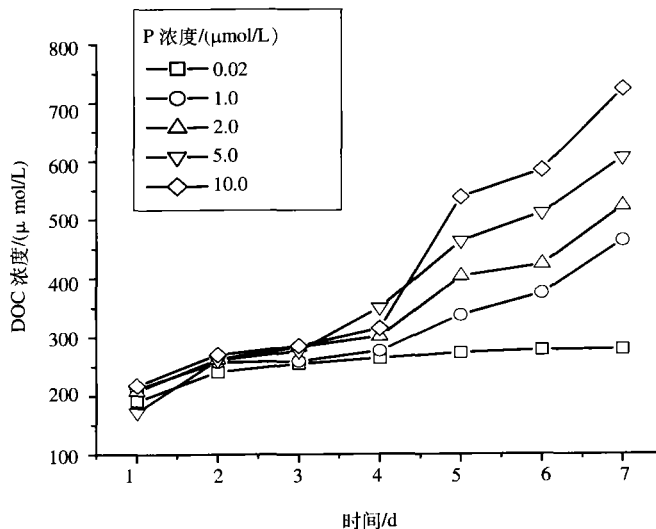


图 3 不同磷浓度下藻液中 DOC 的变化曲线

培养液中的 DOC 浓度与水体中的藻细胞的生长具有很大的相关性,在 N/P 大于 16 的情况下,初始磷浓度较大的培养液中可达到较高的藻细胞密度,所以其中 DOC 浓度也较高。

4. 在中肋骨条藻生长过程中培养液中氮、磷浓度随时间的变化

由图 4、5 可见,在接入中肋骨条藻藻种后的最初两天,各瓶中 N、P 的浓度变化不大,且无明显规律性,与此时藻类正处在对新环境的适应期,生长缓慢相一致。从第 3 天开始,中肋骨条藻进入指数生长期,各瓶中氮、磷浓度开始迅速下降,磷起始浓度较高的瓶中,氮浓度下降的较大。至指数生长期结束,各瓶中磷的浓度基本上消耗殆尽,而氮的浓度则由 1 号瓶至 5 号瓶逐渐降低,5 号瓶中起始 N/P 约为 15:1,在第 6 天,溶液中的氮,磷都接近耗尽,可见中肋骨条藻对氮,磷成比例的吸收,接近于 Redfield

比值 16 : 1(Redfield, 1958)。

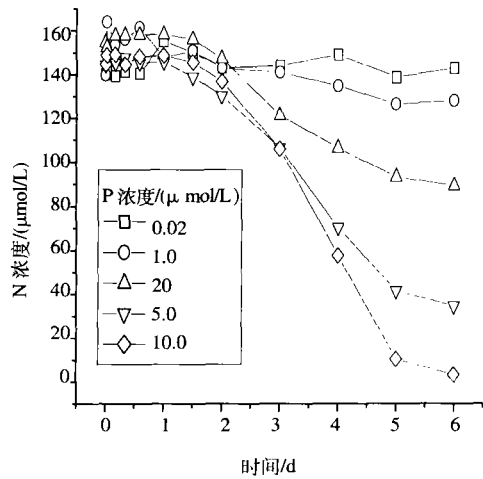


图 4 各培养液中氮浓度的变化曲线

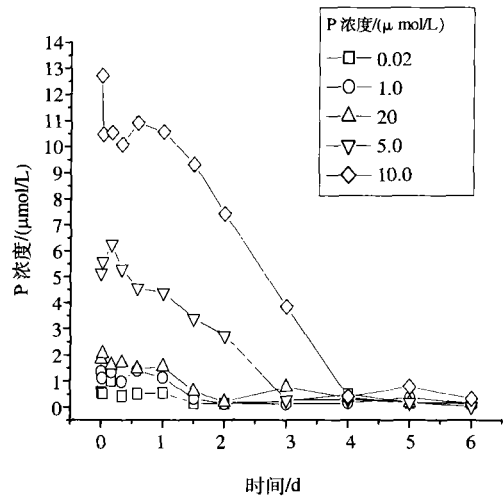


图 5 各培养液中磷浓度的变化曲线

5. 不同磷酸盐浓度下中肋骨条藻细胞内 N/P 的变化

由表 1 可看出，藻细胞加入培养液后，细胞内 N/P 均有所下降，原始值为 30.80，且培养液中起始磷浓度较高的细胞内 N/P 下降的幅度也较大，如 5 号瓶中在 0.5h 时氮磷比迅速下降到 6.83，只有约原来的 1/5，可见刚加入磷酸盐时，藻类对磷酸盐的吸收极为迅速。此后，随着培养实验的进行，各瓶中细胞内 N/P 开始上升，培养液中磷浓度越高，细胞内 N/P 上升的趋势越明显，如 1 号中 N/P 变化不大，基本上围绕着 32 左右波动；2 号瓶中只是略有上升；而 3、4、5 号则有较明显的上升趋势，此时，尽管某些培养液中还有较高的磷酸盐浓度(如 4、5 号瓶)，中肋骨条藻对其的吸收速率已开始

放缓。可见中肋骨条藻进入新环境后,首先在体内富集磷,尔后再逐渐利用,其起始对磷的吸收速度远大于对氮的吸收速度。李铁等(2000)、Kuenzler 等(1962)也得到过类似结论。

表 1 不同磷浓度下中肋骨条藻细胞内氮磷比的变化

时间/h	1 号瓶	2 号瓶	3 号瓶	4 号瓶	5 号瓶
	0.02 $\mu\text{mol/L}$	1.0 $\mu\text{mol/L}$	2.0 $\mu\text{mol/L}$	5.0 $\mu\text{mol/L}$	10.0 $\mu\text{mol/L}$
	N/P				
0	30.80	30.80	30.80	30.80	30.80
0.5	27.57	22.58	15.16	10.30	6.83
4	35.26	26.61	19.20	12.59	5.36
8	32.39	37.91	20.42	12.38	7.89
14	30.08	24.10	19.29	14.86	8.16
24	29.13	18.86	19.74	13.67	10.92
36	31.16	33.56	19.73	15.97	10.85
50	32.78	30.48	18.19	15.56	14.24
74	32.86	34.95	28.68	19.42	16.43
98	29.14	35.58	25.30	19.82	13.10
122	30.45	29.97	33.28	20.47	17.69
146	31.31	23.25	28.47	25.10	17.69

三、结 论

由以上实验结果可看出,当 N/P 大于 16,即磷相对不足时,磷的浓度决定了中肋骨条藻生长速率和所能达到的最高藻细胞密度,中肋骨条藻的生长符合一般藻类生长规律。可用 Boltzmann 方程近似拟和;培养液中 pH 开始逐渐增大,到达其最大值以后即迅速减小,而此时相对应的中肋骨条藻细胞密度却无明显的衰减,即 pH 对藻细胞的生长状况有一定预先指示的作用,且磷浓度较高瓶中所达到的 pH 相对较高;起始磷浓度较高培养液中,DOC 增长的较快,其与培养液中的生物量的大小有一定的正相关性,当中肋骨条藻指数生长期结束后,DOC 浓度仍可保持相当大的增长幅度。培养液中氮、磷浓度在中肋骨条藻的指数生长期快速下降,中肋骨条藻对氮、磷约按 15:1 的比例吸收;中肋骨条藻进入培养液后,细胞内 N/P 先迅速下降,后逐渐上升,培养液中磷浓度越高,此趋势越明显,即先在体内富集磷,后再逐渐利用。

参 考 文 献

王金辉, 2002. 长江口邻近水域的赤潮生物. 海洋环境科学, (21): 37~41
 刘东艳、孙军、魏天迪等, 2002. 不同氮磷比对中肋骨条藻生长特性的影响. 海洋湖沼通报, (2): 39~44
 刘玉、李适宇、董燕红等, 2002. 珠江口浮游藻类生态及与关键水质因子分析. 海洋环境科学, (21): 61~66
 李铁、史致丽、李俊等, 2002. 营养盐对中肋骨条藻和新月菱形藻生长及氮磷组成的影响. 海洋与湖沼, 31(1): 46~52
 Bjørnson P K, 1988. Phytoplankton exudation of organic matter: why do healthy cells do it? *Limnol. Oceanogr.*, 33(1):151~154
 Guillard R L, Ryther J H, 1962. Studies of marine planktonic diatom. 1. *Cyclotella nata* H. And *Detonula confervacea*

- (Cleve). *Gran. Can. J. Phycol.*, **17**: 309~314
- Kuenzler E J, Ketchum B H, 1962. Rate of phosphorus uptake by *Phaeodactylum tricornutum*. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole*, **123**:134~145
- Laws E A, Thompson P A, Popp B N *et al.*, 1996. Sources of inorganic carbon for marine microalgal photo-synthesis: A reassessment of ^{13}C data from batch culture studies of *Thalassiosira pseudonana* and *Emiliania huxleyi*. *Limnol. Oceanogr.*, **43**(1):136~142
- Redfield A C, 1958. The biological control of chemical factors in the environment. *American Scientist*, **46**:204~211
- Søndergaard M *et al.*, 1995. Dynamics of dissolved organic carbon liability in a eutrophic lake. *Limnol. Oceanogr.*, **40**(1):46~54
- Wang J T, Zhang Z B, Liu L S, 1997. Determination of dissolved organic carbon in the sea water using UV/Per-sulfate method and HTO method. *Chin. J. Oceanol. Limnol.*, **15**(1): 25~31
- Wang X L, 1996. Modeling the bioconcentration of hydrophobic organic chemicals in aquatic organism. *Chemosphere.*, **32**:1783~1793

Effect of Different Phosphorous Concentration on the Growth of *Skeletonema costatum*

YANG Dengfeng^{1,2} ZHAO Weihong¹ LI Jintao^{1,2} WANG Jiangtao²

(1 Institute of oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

(2 Ocean University of China, Qingdao, 266071)

Abstract

The growth condition of *Skeletonema costatum* was studied in different phosphorus concentration by the adding-nutrients experimental method and by batch culture experiments were conducted. pH, DOC, nutrients concentration of the culture medium and the N/P ratio of the cell were measured periodically. The results showed that the phosphorous concentration determined the growth rate of *Skeletonema costatum* and the maximum cell density. pH of the culture medium began to decreased drastically as soon as the exponential growth period was over. It seems to be a herald to the *Skeletonema costatum* growth condition. The DOC concentration increased faster in the culture medium with higher cell density as the result of the addition of more phosphate, and could still keep increasing trend for a while after the exponential growth period of *Skeletonema costatum* ended. The N:P ratio in the *Skeletonema costatum* cell was about 15:1, which was close to the Redfield ratio. From the N:P ratio in the cell, we could deduce that when the *Skeletonema costatum* enters a new environment, it first concentrates phosphorous, and then uses it later, the initial absorption rate of phosphorous was faster than that of nitrogen.