

太湖铜绿微囊藻磷摄取动力学若干重要参数 与其竞争优势相关研究*

韩小波^{1,2} 孔繁翔^{1**} 阎 荣²

(1:中国科学院南京地理与湖泊研究所,南京 210008;2:南京大学环境学院,南京 210093)

提 要 对从太湖分离的铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)进行了不同氮磷比对生长影响的实验,以探索蓝藻生长优势形成的基础. 实验结果虽然在一定程度上符合“氮磷摩尔比低于29蓝藻将会占据优势”的理论,但发现只在较低的营养水平时比较吻合. 同时进行了不同磷营养条件下磷营养摄取与生长的实验,为太湖富营养化研究中应用的水质模型提供所需的参数值. 微囊藻生长的磷半饱和和常数 $K_s = 16.21 \mu\text{M}$ 、磷摄取的半饱和和常数 $K_m = 17.66 \mu\text{M}$ 、藻细胞最小的磷份额 $K = 4.36 \mu\text{g}/\text{mg}(\text{dw})$; 微囊藻在实验条件下的过度储藏系数 $Q_0/Q_{\max} = 0.14$; 测定了磷饥饿和磷丰富时细胞最大的摄磷速率分别为 $1.66 \mu\text{g}/(\text{L} \cdot \text{mg} \cdot \text{h})$ 和 $0.06 \mu\text{g}/(\text{L} \cdot \text{mg} \cdot \text{h})$. 可见初始细胞内磷份额较低的藻细胞对磷的吸收速率要比胞内磷份额较高的藻细胞高.

关键词 太湖 铜绿微囊藻 氮磷比 磷摄取 动力学

分类号 Q949.22

蓝藻水华形成的机理一般认为是由于营养元素,主要是氮和磷的增加所引起的,而磷的作用和人为可控性又在氮之前. 其中一个重要的概念就是对于藻类生长的最优氮磷比. Smith^[1]提出如果湖泊的氮磷摩尔比低于29,那么蓝藻将会占据优势,高于这一比值,蓝藻在整个藻类生物量中的份额就会下降. 但是目前尚没有实验室和野外研究可以确定氮磷比是蓝藻水华优势形成的主导因子^[2]. 本文探讨了在实验室内模拟的贫营养化和超富营养化水平上不同氮磷比对于铜绿微囊藻生长的影响,研究微囊藻比增长率的变化,试图了解实验环境下氮磷比是否对微囊藻生长具有选择作用.

已有研究表明单位质量微囊藻细胞内最大外源性磷含量与光照和扰动等环境因子无关^[3],可能只与水体中初始的磷浓度有关^[4]. 藻可以过度地吸收超过自身目前需要的磷. 藻细胞在过度储存了一定量的外源性磷之后,其对数生长就与外磷浓度无关^[5],而依赖于细胞内的磷含量. Droop^[6]提出了一个普适的方程 $\mu = \mu_{\max}(1 - Q_0/Q)$,式中 Q 表示细胞内磷的含量. 本文检测并讨论了外部磷的浓度、细胞内磷份额与比增长率和摄磷速率之间的关系. 比增长率和半饱和常数是藻类在浮游植物群落中种间竞争能力和演替顺序的指标. 陈德辉^[7,8]测定微囊藻等六种藻的比增长率最大值并计算了磷营养的半饱和常数,探讨了微囊藻成为

* 国家重点基础研究发展计划(2002CB412300)、中国科学院创新项目(KZCX2-311)、中国科学院百人计划项目和南京地理与湖泊研究所所长基金共同资助.

2003-10-28 收稿,2004-04-15 收修改稿. 韩小波,男,1979年生,硕士研究生.

** 通讯联系人. E-mail: kongfx@jlonline.com

水华优势种的条件. 本文所测定的太湖铜绿微囊藻磷摄取的一系列参数, 例如比增长率最大值、半饱和常数、藻细胞最小的磷份额、不同初始磷份额的摄磷速率、过度储磷系数, 目的是为水质模型的构建提供参考值. Q_0/Q_{max} 的比值称为过度储存系数, 是探讨铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 能在野外环境中获得竞争优势从而成为水华优势种群不可或缺的参数, 但是国内目前尚无此类参数测定的报道. 本实验旨在为微囊藻对资源竞争能力的定量研究与预测提供依据.

1 材料与方 法

1.1 藻种与培养

实验用藻种铜绿微囊藻由太湖中分离. 实验藻种用 BG-11 培养基进行液体培养, 置于 $28 \pm 1^\circ\text{C}$ 、光照强度 $100 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的光照培养箱中, 光暗比 12:12 h, 定期摇动. 每一测定设置三个平行并重复两次.

1.2 不同氮磷比的影响

将经过饥饿培养 4d 的藻细胞接到磷的起始浓度分别处于超富营养化水平的 $20 \mu\text{M}$ P 和贫营养化水平的 $0.06 \mu\text{M}$ P 的培养液中, 按照摩尔比设定氮磷比梯度 500:1、100:1、50:1、20:1、10:1. 每个梯度设三个平行样. 氮的浓度为 0-20mM, 培养条件同前. 实验结果经过方差分析, F 值大于临界值 ($p < 0.05$), 即不同培养组之间差异显著.

1.3 微囊藻细胞对磷的摄取和贮积能力

将藻转接到磷浓度梯度为 0、20、40、100、200 μM 的培养液中, 隔一定时间取一定体积藻液, 用平板计数法来检测细胞数量. 藻的日增长率以 2-10d 处于对数生长期的数据进行计算. 用公式 $\mu = \ln(x_n/x_{n-1}) / (t_n - t_{n-1})$ 计算对数生长期内的藻比增长率的极值, 以此作为藻在某一营养浓度下增长率的极值, 单位为 d^{-1} . 半饱和常数的计算用 Lineweaver-Burk 作图法对适用范围内的浓度梯度与比增长率求取. 待测藻液经 4000 转/min 离心 15 min 后, 分别测定无藻的培养液和藻细胞中的总磷含量, 从胞内 P 的上升和培养液中 P 的减少得到微囊藻细胞对 P 的摄取^[9]. 细胞内磷的份额 Q 用 $\mu\text{g}/\text{mg}(\text{dw})$ 来表示. 磷浓度的测定用磷钼蓝分光光度法^[10]. 每次测定均同时制作标准曲线, 所有 $R^2 > 0.99$, 以减少测定误差.

1.4 不同细胞初始磷份额 (Q_0) 对摄磷速率和最大磷份额 (Q_{max}) 的影响

将经过驯化的微囊藻置于确定 P 浓度分别为 0、1.0、10、100 μM 的培养液中进行分批培养 (batch culture). 4 d 后, 收获藻细胞. 测定各组藻细胞内磷份额, 对实验结果进行方差分析, F 值大于临界值 $p < 0.05$, 各驯化组间差异显著. 离心富集后用少量新鲜的无 P 的培养液分别对各组藻细胞进行洗涤重新悬浮, 移到磷浓度皆为 100 μM 的培养液中, 使得藻的初始生物量达到 0.1mg/mL, 在不同的时间间隔测定培养液中 P 浓度和细胞内磷份额. 方法同前. 所得实验结果经单样本 t 检验, t 值大于临界值 ($p < 0.05$), 表明测定样品的显著差异具有统计意义.

2 实验结果

2.1 不同氮磷比对藻类生长的影响

如图 1 所示, 贫营养化水平下培养的藻在 N:P<29 后比增长率较大, 并在 20:1 的地方有

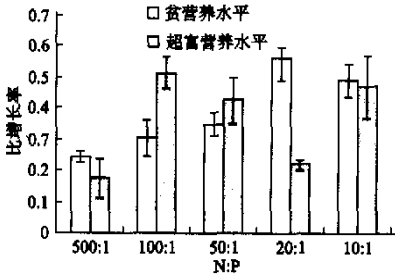


图 1 不同磷浓度时氮磷比对生长的影响
Fig. 1 Specific growth rates of *Microcystis aeruginosa* at various N: P ratios in medium

超过一定的范围后,生长的幅度开始减缓. 在磷营养逐步饱和后,其他的因子可能转为主要限制因子. 以相应的 $1/\mu$ 对 $1/S$ 做回归, 得到方程 $1/\mu = 13.94 \times 1/S + 1.163$, 相关系数为 0.959. 从而得到培养温度下的 $\mu_m = 0.86 \text{ d}^{-1}$, 微囊藻生长的磷半饱和常数为 $K_s = 16.21 \mu\text{M}$. 这一数值表明了微囊藻对磷营养盐的亲性和, 对于利用同一资源的不同物种来说, K_s 小对资源的要求低的物种往往是种间竞争的胜利者, 而 μ_m 是指营养不受限制时可以达到的饱和增殖率, 即内禀增长率.

藻细胞接入培养液后, 培养液中的磷含量迅速减少(图 2). 一段时间内藻细胞内磷含量极大增加(图 3), 藻细胞过量摄取了自身目前所需要的磷, 进入了藻的自身增殖阶段, 其生长速率取决于细胞内部营养库的大小(cell quota). 内磷份额随着生物量的增加不断减少, 可由 Droop 方程 $\mu = \mu_m - \mu_m \times K \times Q^{-1}$ 以增长率 μ 对相应的 Q^{-1} 作图, 得到 $\mu = 0.7632 - 3.326 \times Q^{-1}$ 相关系数为 -0.945 . 从而得到在此模型条件下的 $\mu_m = 0.76$, 微囊藻的最小细胞磷份额 $K = 4.36 \mu\text{g}/\text{mg}(\text{dw})$. 低于该值藻细胞的增殖就将停止.

根据 Michaelis - Menten 方程 $V = V_{max} \times S / (S + K_m)$ 描述的藻对磷的吸收速率与外磷浓度 S 的关系, 由图 2 的值取相应的 $1/V$ 对 $1/S$ 作图, 得到方程 $1/V = 22.44 \times 1/S + 1.27$,

峰值 ($\mu = 0.56$), 而在超富营养化培养下在 N:P 为 100: 1 ($\mu = 0.56$), 20: 1 ($\mu = 0.51$), 10: 1 ($\mu = 0.47$) 都有较大的比增长率, 就是说在 $N: P < 29$ 和 $N: P > 29$ 都可以形成增长率的优势而不仅仅是在 $N: P < 29$ 时. 这说明 Smith 的氮磷比规则可能更符合较低富营养化水平的环境, 而在超富营养化水平时可能有其他影响因素.

2.2 藻类生长与磷摄取

氮浓度为 18mM 时, 不同磷浓度下藻的比增长率 (μ) 见表 1 所示. 经过方差分析表明, F 值大于临界值 $p < 0.01$, 即不同的磷浓度培养组之间差异显著. 从表中可知藻的生长在磷营养

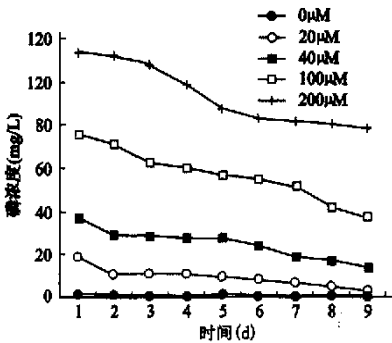


图 2 培养液中外磷浓度随生长的变化
Fig. 2 Changes of P concentration in medium

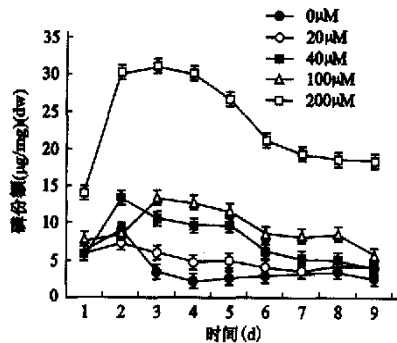


图 3 藻细胞内磷份额 Q 的变化
Fig. 3 Changes of cellular P quota

表 1 不同磷浓度培养下的 μ , Q , B_{max} 值
Tab. 1 μ , Q , B_{max} under different P concentrations

	$S = 0\mu\text{M}$	$S = 20\mu\text{M}$	$S = 40\mu\text{M}$	$S = 100\mu\text{M}$	$S = 200\mu\text{M}$
$\mu \pm SD(d^{-1})$	0	0.519 ± 0.021	0.611 ± 0.017	0.482 ± 0.049	0.405 ± 0.037
$Q(\mu\text{g}/\text{mg}(\text{dw}))$	0	9.04	13.52	11.62	26.6
$B_{max}(10^6 \text{ cells}/\text{mL})$	2.083	13.03	13.41	11.88	11.61

* S 为培养液中的磷浓度; μ 为微囊藻的比增长率; Q 为细胞内磷含量; B_{max} 为最大生物量.

相关系数 0.933. 对应于 $1/V = K_m/V_m \times 1/S + 1/V_m$ 求得磷的最大吸收速率 $V_{max} = 0.787\mu\text{g}/(\text{mg} \cdot \text{d})$ 磷吸收的米氏常数 $K_m = 17.66\mu\text{M}$ 具有一定的模型应用价值.

2.3 藻的磷摄取与藻细胞内的磷容量

微囊藻细胞对磷的摄取速率和最大摄取量在很大程度上受生长之初细胞内含磷量的影响. 在图 4 中, 可以发现初始细胞内磷份额较低的藻细胞对磷的吸收速率要比胞内磷份额较高的藻细胞高. 生长初期, 细胞内磷的含量越低, 培养液中的磷就消耗的越快. 初始时的细胞内磷水平还影响细胞的最大磷份额 Q_{max} . 从表 2 和图 4 可以看出, 初始细胞内缺磷对磷的摄取速率大于富磷的细胞, 但是所达到的最大磷份额 Q_{max} 却只有富磷细胞的 1/5 (低磷细胞的 Q_{max} 为 $6.96\mu\text{g}/\text{mg}(\text{dw})$, 富磷细胞的 Q_{max} 为 $31.09\mu\text{g}/\text{mg}(\text{dw})$). 过度储磷系数 $Q_0/Q_{max} = 0.14$. Q_0 和 Q_{max} 的差距越大藻细胞内磷份额弹性越大, 越容易适应营养限制的环境. 根据细胞初始增长前培养液中磷浓度的变化, 得到了磷饥饿和磷丰富时细胞最大的摄磷速率分别为 $V_{max \downarrow} = 1.66\mu\text{g}/(\text{L} \cdot \text{mg} \cdot \text{h})$ 和 $V_{max \uparrow} = 0.06\mu\text{g}/(\text{L} \cdot \text{mg} \cdot \text{h})$, 差异十分明显.

3 讨论

有关氮磷摩尔比高于 29 时, 蓝藻在整个藻类生物量中的份额就会下降的理论引起了一定的争议. 有些研究结果支持这一结论^[11, 12], 而也有些结果则不符合这一规则^[13]. Xie 等^[14]在武汉东湖进行了围隔实验提出氮磷比规则不适用于超富营养化湖泊, 湖泊中较低氮磷比的出现是蓝藻水华爆发的结果而不是其原因. 本文的实验就不同氮磷比下藻的生

表 2 不同初始磷份额的细胞储磷能力
Tab. 2 The storage capacity of P as affected by the initial cellular P quota

初始磷份额 $Q_0(\mu\text{g}/\text{mg})$	最大磷份额 $Q_{max}(\mu\text{g}/\text{mg})$	贮存磷份额 $Q_{max} - Q_0(\mu\text{g}/\text{mg})$
3.78	6.96	3.19
7.46	9.68	2.22
17.78	18.91	1.09
30.17	31.09	0.92

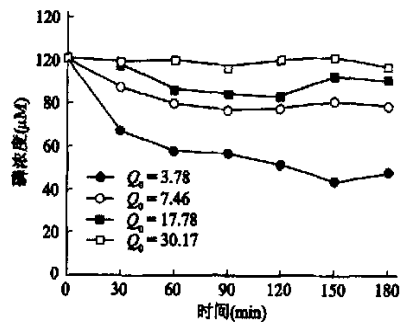


图 4 接入不同初始细胞内磷份额的藻细胞后培养液中磷浓度的变化
Fig. 4 Decline of the external P concentration as affected by the initial cellular P quota

长特征进行了研究,结果一定程度上支持氮磷比规则在超富营养化水平下不适用的结论^[15].并认为在氮磷营养水平较低时氮磷比在 10-20 之间增长率最大;在氮和磷都很丰富的情况下,磷的初始浓度一旦确定下来最大比增长率 μ_m 就很难受到 NO_3^- 供应的影响.藻细胞在氮为 0.2mM 时与磷配比,最大比增长率 μ_m 出现在 P 为 40 μM 的时候,这与营养增长潜力实验的结果一致.

在营养元素稳定的状态下, Droop^[16] 方程可以改写为 $\mu = \mu_{\max}[S]/K_s + [S]$. 营养物的浓度 [S]、细胞磷份额 Q 和比增长率 μ 之间的关系是双曲线型的. 本文使用比增长率为测定半饱和常数的指标同时也用藻对磷的摄取为指标测定计算了半饱和常数,以满足不同模型在描述藻类生长复杂过程应用时的需要. 通过比较不同藻的 μ_{\max} 和 K_s 可以推测磷营养限制条件下藻类竞争的结果. 如果 $\mu_{\max 1} = \mu_{\max 2}$, $K_{s1} < K_{s2}$ 那么两种藻在春季复苏磷营养较丰富的时候,可以共同生长,互不占优,但是在营养短缺时,藻 1 可以迅速占优. 如果 $\mu_{\max 1} > \mu_{\max 2}$, $K_{s1} > K_{s2}$, 那么在营养丰富的时候藻 1 占优势,而营养短缺时藻 2 将占据优势. 这就是确定微囊藻的最大比增长率和磷半饱和常数的实际意义,对于探寻微囊藻成为太湖水华优势种的机理有重要价值. 进一步的实验需要比较微囊藻及其他藻类共存时各自对磷摄取的动力学特点.

Q_0/Q_{\max} 的比值为过度储磷系数,是藻类资源竞争能力的参考值. 在外界磷营养浓度减小的环境中,如果藻细胞的磷营养份额只能保持不变,那么它的生长就会相应的降低. 如果藻细胞能够减低对磷营养的需要,那么它就能弥补在外界磷营养浓度减小时的损失,从而将营养浓度下降对生长的影响降到最小. 而微囊藻过度储磷系数 Q_0/Q_{\max} 为 0.14,表明藻细胞内磷份额可变幅度很大,有较好的磷营养份额弹性,使它可在低营养浓度条件下实现高速增长,就更容易适应营养限制的环境. 从而获得了竞争的潜在优势.

参 考 文 献

- 1 Smith V H. Low nitrogen to phosphorus ratios favor dominance by blue-green algae in Lake phytoplankton. *Science*, 1983, 221:669-671
- 2 Pick F R, Lean D R S. The role of macronutrients (C, N, P) in controlling cyanobacterial dominance in temperate Lakes. *N Z J Mar Freshw Res.* 1987, 21: 425-434
- 3 史小丽,王风平,蒋丽娟等. 扰动对外源性磷在模拟水生态系统中迁移的影响. *中国环境科学*, 2002, 22(6):537-541
- 4 Halmann M, Stiller M. Turnover and uptake of dissolved phosphate in freshwater: a study in Lake Kinneret. *Limnol. Oceanogr.* 1974, 19(5):774-783
- 5 史小丽,王风平,蒋丽娟等. 光照时间对外源性磷在模拟水生态系统中迁移的影响. *环境科学*, 2003, 24(1):40-45
- 6 Droop M R. Vitamin B₁₂ and marine ecology, IV: The kinetics of growth, uptake, and inhibition in *Monochrysis lutheri*. *J Mar Biol Assoc UK*, 1968, 48: 629-636
- 7 陈德辉,章宗涉,陈 坚. 藻类批量培养中的比增长率最大值. *水生生物学报*, 1998, 22(1):26-32
- 8 陈德辉,章宗涉,刘永定等. 微囊藻资源竞争的动力学过程. *环境科学学报*, 2000, 20(3):349-354
- 9 高学庆,任久长,宗志祥等. 铜绿微囊藻营养动力学研究. *北京大学学报(自然科学版)*, 1994, 30(4):461-469
- 10 全国富营养化调查组. 湖泊富营养化调查规范. 北京:中国环境科学出版社,1987:160-163
- 11 Zohary T, Arcaabgela M, Paris-Madeira C M, et al. Interannual phytoplankton dynamics of hypertrophic African Lake. *Arch Hydrobiol.* 1992, 136: 105-126
- 12 Fujimoto N, Sudo R. Nutrient-Limited growth of *Microcystis aeruginosa* and *Phormidium tenue* and competition under

- various N:P supply ratios and temperatures. *Limnol Oceanogr*, 1997, 42: 250 - 256
- 13 Czeslawa Nalewajko, Thomas P Murphy. Effects of temperature, and availability of nitrogen and phosphorus on the abundance of *Anabaena* and *Microcystis* in Lake Biwa, Japan: an experimental approach. *Limnology*, 2001, 2: 45 - 48
- 14 Xie Liqiang, Xie Ping, Li Sixin, et al. The low TN: TP ratio a cause or a result of *Microcystis* bloom. *Water Research*, 2003, 37: 2073 - 2080
- 15 Paerl H W, Fulton R S, Miosander P H, et al. Harmful freshwater algal blooms, with an emphasis on cyanobacterial. *Sci World*, 2001, 1: 76 - 113
- 16 Droop M R. Some thoughts on nutrient limitation in algae. *Journal of Phycology*, 1973, 9: 264 - 272

Several Key Parameters of Dynamics of Phosphorus Uptake Involved with Competition for Resources of *Microcystis aeruginosa* in Lake Taihu

HAN Xiaobo^{1,2}, KONG Fanxiang¹ & YAN Rong²

(1: Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, P. R. China;

2: School of Environment, Nanjing University, Nanjing 210093, P. R. China)

Abstract

The experiment investigated the relationship of growth characters and phosphorus uptake of *Microcystis aeruginosa* from Lake Taihu under laboratory conditions. With phosphate and nitrate in oligotrophic level, the growth rate of the alga supported the "N:P rule" while in hyper-eutrophic level did not. It is concluded from this study that the "N:P rule" does not apply to the conditions which P and N were enough. Growth of algae was strongly affected by phosphorus availability. The half saturation constant of P uptake of algae K_m was 17.66 μM and P half saturation constant for algae growth K_s was 16.21 μM . The P subsistence quota of algae K_d was 4.36 $\mu\text{g} / \text{mg}(\text{dw})$. As affected by the initial cellular P quota, the P uptake rates were different. Maximum uptake rate for algae when P is deficient ($V_{\max, d}$) was 1.66 $\mu\text{g} / (\text{L} \cdot \text{mg} \cdot \text{h})$ and sufficient maximum P uptake rate ($V_{\max, s}$) was 0.06 $\mu\text{g} / (\text{L} \cdot \text{mg} \cdot \text{h})$. P luxury storage coefficient $Q_0 / Q_{\max} = 0.14$.

Keywords: Lake Taihu; *Microcystis aeruginosa*; nitrogen and phosphorus ratios; phosphorus uptake; dynamics