

黄海两种典型硅藻的磷胁迫生理研究

王丹, 黄春秀, 黄邦钦, 谷体华, 黄秋, 柳欣, 杨听林

(厦门大学 近海海洋环境科学国家重点实验室, 环境科学研究中心, 福建 厦门 361005)

摘要: 在实验室批次培养条件下, 研究黄海两种浮游植物优势种玛氏骨条藻 (*Skeletonema marinoi*) 和旋链角毛藻 (*Chaetoceros curvisetus*) 在低磷条件下的生长特性、环境中不同形态磷浓度的变化以及磷饥饿状态下浮游植物的营养吸收动力学和碱性磷酸酶动力学。结果表明, 玛氏骨条藻在磷胁迫情况下可利用自身较高的吸收速率和较小的细胞体积有效摄取环境中的无机磷快速生长并取得优势, 而旋链角毛藻在无机磷的利用上并无优势, 其比玛氏骨条藻需要更多的细胞颗粒磷去维持细胞活性, 而且更容易诱导碱性磷酸酶分解利用有机磷, 推测在有机磷丰富的环境下旋链角毛藻会在二者竞争中取得优势。这些生理特性有可能是二者在黄海季节性水华发生过程中大量存在的原因。

关键词: 磷胁迫; 碱性磷酸酶; 硅藻; 水华; 黄海

中图分类号: Q945.78

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096 (2008) 05-0022-06

磷 (Phosphorus, P) 是海区中浮游植物生长和繁殖所必需的成分, 参与细胞生长与能量传递等一系列代谢过程, 也是海洋初级生产力和食物链的基础元素^[1]。在海洋中, 通过直接摄取或同化无机和有机形态的含磷复合物等形式, 浮游生物获得生长所需的磷源。无机态的正磷酸盐 (HPO_4^{2-} , Pi) 可能是浮游植物能够直接吸收利用的唯一磷源^[2,3], 然而, 大量的研究表明, 海水中的 Pi 量常常不能满足浮游植物生长繁殖的需要。溶解态非活性磷 (soluble nonreactive phosphorus, SNP) 也称作溶解态有机磷, 作为一种重要的磷源通过浮游植物生物化学作用以及一系列酶作用可以释放出无机态 Pi 为浮游植物生命活动所用^[4]。海洋中的浮游植物是按一定比例从海水中吸收营养盐的, 这一恒定比例称为 Redfield 系数。Redfield 系数过高或过低, 均可导致浮游植物的生长受到某一相对低含量元素的限制, 生物量无法进一步增长, 并显著影响水体中浮游植物的种类组成^[5]。而从生长转变为非生长的过程中, 浮游植物还要经过一系列的适应性响应步骤, 这一过程称为浮游植物的营养盐胁迫过程^[6-8]。随着生理学研究的开展, 人们逐渐认识到营养盐胁迫这个生理过程的重要性, 浮游植物能够在磷缺乏的情况下, 通过一系列适应机制与其他种竞争取得优势地位^[9]。关于磷胁迫的研究目前已有大量报道, 主要是通过模拟现场条件在室内开展若干关键种的研究, 分别从种群、细胞、分子水平研究浮游植物对环境磷胁迫的生理生态响应^[10-13]。Berdalet^[14]认为在一个营养盐受限制的海区, 浮游植物对营养

盐的种间响应机制最终决定了一个海区的浮游植物群落结构。本研究以黄海四季分布的广温沿岸型硅藻角毛藻和骨条藻为研究对象, 通过研究它们在磷胁迫状态下的生理响应机制, 从磷营养盐的角度为黄海季节性硅藻水华的发生机制以及水华过程中浮游植物群落的变动机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 分离与培养

实验用的旋链角毛藻 (*Chaetoceros curvisetus*) 和玛氏骨条藻 (*Skeletonema marinoi*) 是厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室藻菌种质中心从 2007 年 4 月黄海春季水华发生区采集的水样中分离纯化得到, 并由厦门大学生命科学学院高亚辉教授研究组鉴定^[15]。在实验室温度 $20\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$, 光暗周期 14 h : 10 h, 光照强度为 6 500 lx 的白炽光照射条件下, 藻种一般采用 f/2 培养基保种, 在开展磷胁迫研究前, 将藻种接种在以 f/2 培养基为基础的低磷培养基 (磷酸盐浓度 $2\text{ }\mu\text{mol/L}$) 中, 进行 3~4 个世代的低磷驯化培养。实验前两天, 添

收稿日期: 2008-01-20; 修回日期: 2008-03-15

基金项目: 国家 973 计划项目 (2006CB400604); 国家自然科学基金项目 (40576055, 40776081)

作者简介: 王丹 (1982-), 女, 硕士研究生, 山东青岛人, 研究方向海洋生态学, 黄邦钦, 通讯作者, 电话: 0592-2187783, E-mail: bqhuang@xmu.edu.cn

加抗生素（硫酸链霉素与青霉素钠盐的混合液）在预接种的藻液中，进行灭菌处理。正式实验时，将处于指数生长期的细胞接于新的培养基中。实验所用海水均采用经 0.22 μm 孔径的醋酸纤维滤膜过滤并经高温灭菌处理的外海水。

1.2 实验方法与检测方法

1.2.1 营养盐测定

溶解态活性磷（soluble reactive phosphorus, SRP）的测定采取磷钼蓝显色法^[16]，在紫外可见分光光度计（Spectrum, 722E）上进行检测（每个样品保证两组平行样）。细胞颗粒磷（particulate phosphorus, PP）依据 Jeffries^[17]的方法采用酸性过硫酸钾氧化法进行测定。样品在 121 $^{\circ}\text{C}$ 高压消解 60min，然后再依据 SRP 的测定方法进行检测（每个样品保证两个平行样）。

1.2.2 藻类细胞计数

藻类细胞采用酸性 Lugol's 试剂固定，并用光学显微镜和浮游植物计数板进行计数（每个样品保证两组平行样）。

1.2.3 藻细胞体积测定

采用光学显微镜和图像分析系统测量细胞长宽等线性参数并分析细胞体积（每个样品的测定结果保证在测量 100 个细胞体积的基础上取得平均值）。细胞体积根据 Sun 等^[18]方法来计算。

1.2.4 营养盐吸收动力学实验

取适量磷饥饿状态下的藻液分别加入不同浓度的 KH_2PO_4 ，使添加后的 SRP 终浓度在 0~8 $\mu\text{mol/L}$ ，培养一定时间后，测定添加前后培养基中 SRP 的浓度变化，吸收速率（ ρ ）由该浓度变化决定。浮游植物细胞对不同浓度 KH_2PO_4 的吸收速率遵循米氏方程： $\rho = \rho_{\max} S / (K_S + S)$ ， ρ_{\max} 为最大吸收速率（ $\text{fmol}/(\text{个}\cdot\text{h})$ ）， K_S 为半饱和常数（ $\mu\text{mol/L}$ ）， S 为外部磷酸盐浓度（ $\mu\text{mol/L}$ ）。营养吸收动力学参数采用非线性最小平方估算。

1.2.5 碱性磷酸酶动力学实验

取适量磷饥饿状态下的藻液分别加入不同量的底物 MUP（4-Methylumbelliferyl phosphate），使 MUP 的终浓度在 0~250 $\mu\text{mol/L}$ 变化。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴黑暗条件下培养 0.5 h，用 0.2 mol/L 的 HgCl_2 溶液终止酶反应。以未加底物的藻液作为空白对照，待测样品和空白对照各保证三组平行样，采用荧光分光光度计（Varian Cary Eclipse）检测碱性磷酸酶活性（Alkaline phosphatase activity, APA）^[19]， $E_x = 365 \text{ nm}$ ， $E_m = 450 \text{ nm}$ 。两种藻的碱性磷酸酶活性用单位体积浮游植物细胞数修正后，APA 与底物浓度的关系遵循米氏方程 $V = V_{\max} S / (K_S + S)$ ， V 代表在底物浓度为 S （ $\mu\text{mol/L}$ ）时酶降解底物的速率（ $\text{fmol}/(\text{个}\cdot\text{h})$ ）， V_{\max} 为最大降解速率（ $\text{fmol}/(\text{个}\cdot\text{h})$ ），

K_S 为半饱和常数（ $\mu\text{mol/L}$ ）。酶动力学参数采用非线性最小平方估算。

2 结果与讨论

2.1 低磷条件下生长周期中各生理参数的变化

通过对旋链角毛藻和玛氏骨条藻在低磷条件下培养到稳定期的磷饥饿状态（细胞停止分裂大约 3 d，外源 SRP 低于检出限（0.1 $\mu\text{mol/L}$ ）的生长曲线（图 1））可以看出，旋链角毛藻接种后生长比较缓慢，两天后进入指数期，在接种的 4 d 后进入生长的稳定期阶段，细胞数目达到 8×10^7 个/L 左右，玛氏骨条藻在接种后就快速地进入了指数增长期，在培养的第 5 天进入生长的稳定期，指数期长达近 5 d，稳定期细胞数目达到 37×10^7 个/L 左右。培养基中活性磷酸盐浓度表明（图 2），旋链角毛藻接种 4 d 后降到检出限以下，而玛氏骨条藻接种 3 d 后即降到检出限以下。两种浮游植物细胞内部颗粒磷含量（图 3）也是在培养期间有不同变化，旋链角毛藻在接种当天细胞内部颗粒磷浓度 104.15 $\text{fmol}/\text{个}$ ，1 d 后为 105.01 $\text{fmol}/\text{个}$ ，而在稳定期则降到了 20.74 $\text{fmol}/\text{个}$ ，最大和最小颗粒磷含量（ Q_{p0} ）之比达到 5.1 倍，而玛氏骨条藻在接种当天细胞内部颗粒磷浓度为 33.27 $\text{fmol}/\text{个}$ ，在稳定期降到了 9.06 $\text{fmol}/\text{个}$ ，最大和最小颗粒磷含量（ Q_{p0} ）之比仅为 3.7。由此可知，两种浮游植物都可以不同程度地利用外源溶解态活性磷和内源细胞颗粒磷来供给各自不同阶段的生长需要。虽然玛氏骨条藻对于环境中的外源磷吸收比较快，但是旋链角毛藻比玛氏骨条藻更容易利用细胞内源磷，这可能是二者在磷胁迫状态下不同的磷利用策略造成的。玛氏骨条藻可能更容易利用环境中的溶解态活性磷酸盐大规模繁殖，因此其在初始磷浓度较为丰富的条件下，更容易取得竞争优势，而旋链角毛藻在竞争利用无机磷上并无优势，还必须依靠其对细胞颗粒磷的利用来维持比较高的细胞活性。

2.2 磷饥饿情况下无机磷的吸收动力学研究

两种浮游植物细胞对不同浓度 KH_2PO_4 的吸收速率（ ρ ）非线性拟合后吸收动力学曲线如图 4（A, B）。旋链角毛藻对无机磷的最大吸收速率 ρ_{\max} 为 20.59 $\text{fmol}/(\text{个}\cdot\text{h})$ ，半饱和常数 K_S 为 0.90 $\mu\text{mol/L}$ ，而玛氏骨条藻对无机磷的最大吸收速率 ρ_{\max} 为 24.03 $\text{fmol}/(\text{个}\cdot\text{h})$ ，半饱和常数 K_S 为 2.02 $\mu\text{mol/L}$ 。营养盐吸收动力学参数 ρ_{\max} 和 K_S 是目前最常用表达浮游植物对营养盐亲和力的参数， ρ_{\max} 升高或是 K_S 降低均有利于浮游植物竞争营养盐^[20,21]。在环境营养盐丰富时，具有较高 ρ_{\max} 的浮游植物能够迅速摄取环境中的磷储存于细胞内。最大种间吸收速率 $V_{\max} = \rho_{\max}/Q_{p0}$ 能更好反映这一能力，旋链角毛藻的

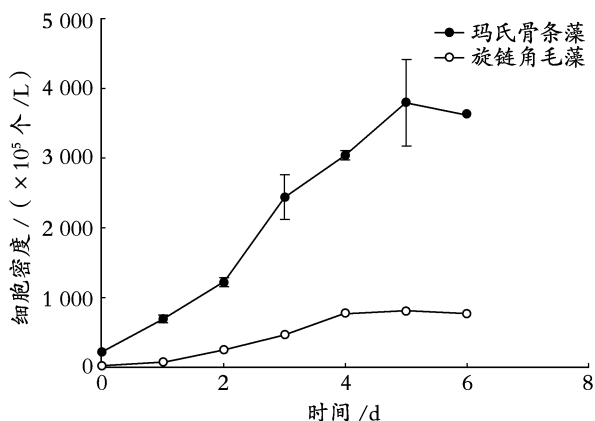


图1 低磷批次培养条件下玛氏骨条藻和旋链角毛藻的生长曲线

Fig.1 Cell growth of *S. marinoi* and *C. curvisetus* in batch culture with low P concentration

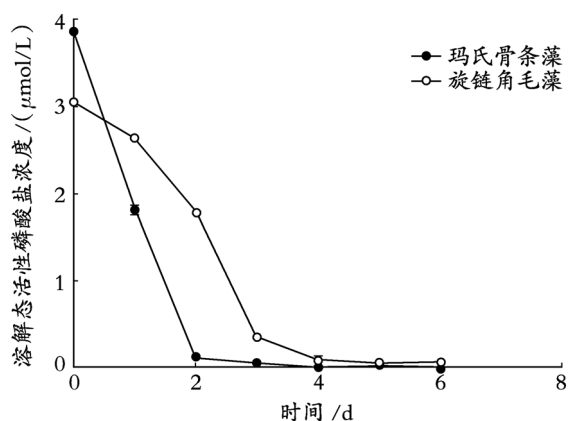


图2 低磷批次培养条件下溶解态活性磷酸盐的变化

Fig.2 Variation of soluble reactive phosphorus (SRP) in batch culture with low P concentration

$V_{\max} = 0.99 \text{ h}^{-1}$, 低于玛氏骨条藻的 $V_{\max} = 2.65 \text{ h}^{-1}$, 说明玛氏骨条藻快速摄取无机磷源并储存于细胞内的能力比较强, 这一特点可以使玛氏骨条藻在环境中 SRP 丰富时快速取得竞争优势。Healay^[22] 提出 V_{\max} / K_S 这个比例更能反映浮游植物在贫营养条件下对营养盐的亲合力, 高比例表明浮游植物在贫营养条件下更具竞争力。旋链角毛藻和玛氏骨条藻的 V_{\max} / K_S 分别为 1.1 和 1.3, 可见两种浮游植物在贫营养条件下对无机磷的亲合力相差不大。另有学者认为, 不同浮游植物对营养盐的亲合力与细胞体积大小也有关。通常, 细胞体积越小, 细胞对营养盐的亲合力越高^[23]。在磷饥饿情况下, 旋链角毛藻细胞体积为 $416.57 \mu\text{m}^3 \pm 251.98 \mu\text{m}^3$, 而玛氏骨条藻为 $92.24 \mu\text{m}^3 \pm 82.57 \mu\text{m}^3$, 可见玛氏骨条藻比旋链角

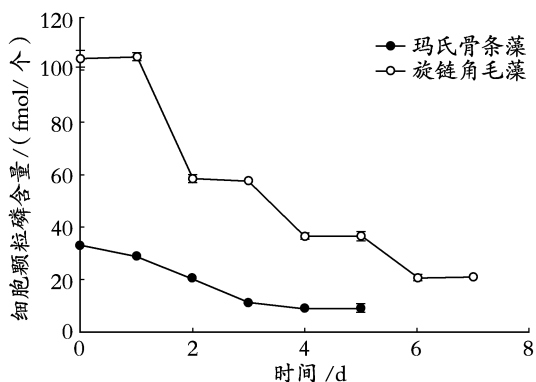


图3 低磷批次培养条件下玛氏骨条藻和旋链角毛藻细胞内颗粒磷的变化

Fig.3 Variation of cellular particular phosphorus (PP) in batch culture with low P concentration

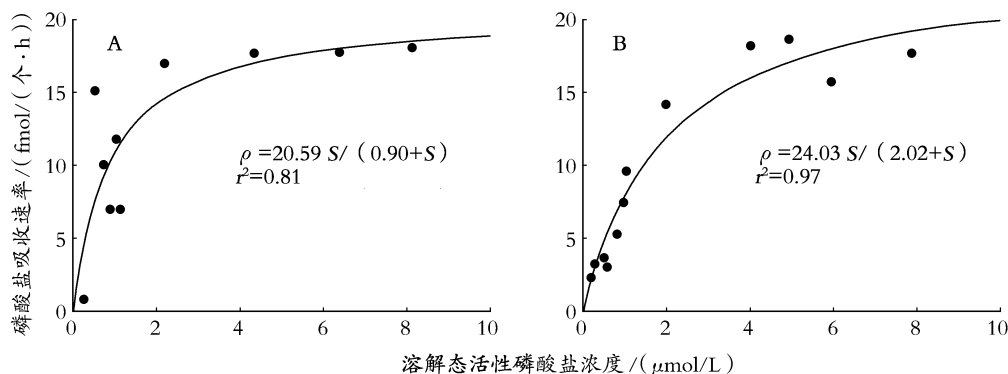


图4 旋链角毛藻和玛氏骨条藻的磷酸盐吸收速率随外界磷酸盐的变化

Fig.4 Phosphatate uptake rates of *C. curvisetus* and *S. marinoi* as a function of the ambient phosphate concentration

A. 旋链角毛藻; B. 玛氏骨条藻

A. *C. curvisetus*; B. *S. marinoi*

毛藻细胞体积小，因此，在贫营养条件下，玛氏骨条藻更可能依靠比较小的细胞体积对营养盐有较高亲和力从而在竞争中取得优势。

2.3 磷饥饿情况下碱性磷酸酶动力学研究

两种浮游植物酶动力学曲线如图 5 (A, B) 所示，旋链角毛藻的最大底物降解速率 V_{max} 和半饱和常数 K_S 分别为 $V_{max} = 659.42 \text{ fmol}/(\text{个}\cdot\text{h})$ 和 $K_S = 13.79 \mu\text{mol}/\text{L}$ ，而玛氏骨条藻分别为 $V_{max} = 219.87 \text{ fmol}/(\text{个}\cdot\text{h})$ 和 $K_S = 47.39 \mu\text{mol}/\text{L}$ 。 $1/K_S$ 可近似地

表示酶对底物亲和力的大小， K_S 越小， $1/K_S$ 愈大，亲和力愈大。因此，旋链角毛藻比玛氏骨条藻有更高的底物降解速率和更高的底物亲和力。这说明在无机磷缺乏的环境中旋链角毛藻比玛氏骨条藻更容易诱导碱性磷酸酶分解细胞内外环境中的 SNP 底物来获得维持生长所需的磷。如果环境中 SRP 匮乏但有丰富的 SNP，旋链角毛藻就有可能在二者的磷营养竞争中取得优势。

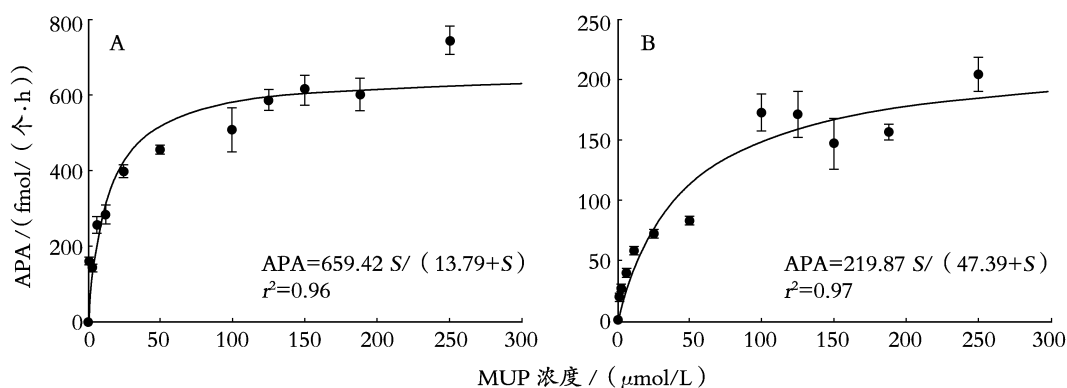


图5 旋链角毛藻和玛氏骨条藻碱性磷酸酶活性随底物浓度的变化

Fig.5 Alkaline phosphatase activity (APA) of *C. curvisetus* and *S. marinoi* as a function of substrate addition

A. 旋链角毛藻; B. 玛氏骨条藻
A. *C. curvisetus*; B. *S. marinoi*

3 结论

通过对黄海两种硅藻旋链角毛藻和玛氏骨条藻在低磷批次培养条件下实验结果可以得知，二者生长过程中细胞密度、环境中的无机磷浓度、细胞内颗粒磷浓度等参数都发生不同程度的变化，二者在磷胁迫情况下对于环境中的磷营养盐有不同的利用策略。通过二者在磷饥饿条件下的溶解态活性磷酸盐吸收动力学和碱性磷酸酶动力学研究，可知玛氏骨条藻在利用环境中的无机磷源方面比旋链角毛藻更有优势，在外源无机磷丰富或者补充的情况下，玛氏骨条藻可以利用其较高的吸收速率摄取无机磷储存在细胞体内，而在外源无机磷贫乏的情况下，其可能利用较小的细胞体积来达到对于无机磷的较高亲和力。另一方面，旋链角毛藻在生长过程中比玛氏骨条藻更多地利用细胞内源磷库以补偿外源磷的降低对细胞生长的影响，从而维持较高的细胞活性，该藻对环境溶解态非活性磷的利用比玛氏骨条藻更具优势，从而推测其在无机磷匮乏

而有机磷丰富的环境内可以通过诱导碱性磷酸酶分解溶解态非活性磷获得生长所需的磷。黄海季节性硅藻水华时有发生，通过开展水华发生区的优势种与非优势种的室内生理实验可以为现场海区水华发生过程中浮游植物的种群消长以及群落的更替提供科学的解释。

参考文献:

- [1] 陈洪涛, 陈淑珠, 张经, 等. 南黄海海水中各种形态磷的分布变化特征[J]. 海洋环境科学, 2002, 21 (1): 9-13.
- [2] Björkman K, Karl D M. Bioavailability of inorganic and organic phosphorus compounds to natural assemblages of microorganisms in Hawaiian coastal waters [J]. *Mar Ecol Prog Ser*, 1994, 111: 265-273.
- [3] Currie D J, Bentzen E, Kalff J. Does algal bacterial phosphorus partitioning vary among lakes? A comparative study of orthophosphate uptake and alkaline

- phosphatase activity in freshwater [J]. *Can J Fish Aquat Sci*, 1986, 43: 311-318.
- [4] Dyhrman S T, Chappell P D, Haley S T, *et al.* Phosphonate utilization by the globally important marine diazotroph *Trichodesmium* [J]. *Nature*, 2006, 439: 25-26.
- [5] 王保栋. 黄海和东海营养盐分布及其对浮游植物的限制[J]. *应用生态学报*, 2003, 14 (7): 1 122-1 126.
- [6] Beardall J, Young E, Roberts S. Approaches for determining phytoplankton nutrient limitation [J]. *Aquat Sci*, 2001, 63: 44-69.
- [7] Dyhrman S T, Palenik B. Phosphate stress in Cultures and field populations of dinoflagellate *Prorocentrum minimum* detected by a single-cell alkaline phosphatase assay [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(7): 205-212.
- [8] Scanlan D J, Silman N J, Donald K M, *et al.* An immunological approach to detect phosphate stress in population and single cells of photosynthetic picoplankton [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(6): 2 411-2 420.
- [9] Dyhrman S D, Palenik B. Phosphate stress in Cultures and field populations of dinoflagellate *Prorocentrum minimum* detected by a single-cell alkaline phosphatase assay [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(7), 3 205-3 212.
- [10] Corstjens P L A M, González E L. Effects of nitrogen and phosphorus availability on the expression of the coccolith-vesicle V-ATPase (subunit C) of *Pleurochrysis* (Haptophyta) [J]. *J Phycol*, 2004, 40: 82-87.
- [11] Dyhrman S T, Palenik B. A single-cell immunoassay for phosphate stress in the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* (dinophyceae) [J]. *J Phycol*, 2001, 37: 400-410.
- [12] Dyhrman S T, Palenik B. Characterization of ectoenzyme activity and phosphate-regulated protein in the coccolithophorid *Emiliana huxleyi*[J]. *J Plankton Res*, 2003, 25(10): 1 215-1 225.
- [13] Fuller N J, West N J, Marie D, *et al.* Dynamics of community structure and phosphate status of picocyanobacterial populations in the Gulf of Aqaba, Red Sea [J]. *Limnol Oceanogr*, 2005, 50(1): 363-375.
- [14] Berdalet E, Marrasé C, Estrada M, *et al.* Microbial community responses to nitrogen- and phosphorus-deficient nutrient inputs: microplankton dynamics and biochemical characterization [J]. *J Plankton Res*, 1996, 18(9): 1 627-1 641.
- [15] 程金凤, 高亚辉, 梁君荣, 等. 骨条藻的种类与基因多样性研究进展[J]. *自然科学进展*, 2007, 5(17): 586-594.
- [16] Murphy J, Riley J P. A modified single solution method for determination of phosphate in natural waters [J]. *Anal Chim Acta*, 1962, 27: 31-36.
- [17] Jeffries D S, Dieken F P, Jones D E. Performance of the autoclave digestion method for total phosphorus analysis [J]. *Water Res*, 1979, 13: 275-279.
- [18] Sun J, Liu D Y. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton [J]. *J Plankton Res*, 2003, 25(11): 1 331-1 346.
- [19] Healey F P, Hendzel L L. Fluorometric measurement of alkaline phosphatase activity in algae [J]. *Freshwat Biol*, 1979, 9: 429-439.
- [20] Button D K. Biochemical basis for whole-cell uptake kinetics: specific affinity, oligotrophic capacity, and the meaning of the Michaelis constant [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1991, 57(7): 2 033-2 038.
- [21] Zou L, Zhang J, Pan W X, *et al.* In situ nutrient enrichment experiment in the Bohai and Yellow Sea [J]. *J Plankton Res*, 2001, 23(10): 1 111-1 119.
- [22] Healey F P. Slope of the Monod equation as an indicator of advantage in nutrient competition [J]. *Microb Ecol*, 1980, 5: 281-286.
- [23] Egge J K. Are diatoms poor competitors at low phosphate concentrations?[J]. *J Mar Syst*, 1998, 16: 191-198.

Physiological responses of two typical species of diatoms to phosphorus stress in Yellow Sea

WANG Dan, HUANG Chun-xiu, HUANG Bang-qin , GU Ti-hua, HUANG Qiu,
LIU Xin, YANG Ting-lin

(State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Environmental Science Research Center, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Received: Jan., 20, 2008

Key words: phosphorus stress; alkaline phosphatase activity; diatom; algal bloom; Yellow Sea

Abstract: Using batch culture experiments, this study was focused on the physiological responses of *Chaetoceros curvisetus* and *Skeletonema marinoi*, two typical diatoms in the Yellow Sea, to phosphorus stress. The results showed that both of the test species could utilize the different phosphorus pools from ambient and cells to dissimilar extent under phosphorus stress. *S. marinoi* preferred utilizing soluble reactive phosphorus (SRP) from ambient while *C. curvisetus* liked to utilize particulate phosphorus in cells. Due to different abilities and strategies of utilizing SRP and soluble nonreactive phosphorus (SNP), *S. marinoi* might be a more advantaged competitor in SRP condition while *C. curvisetus* might be a more advantaged competitor in SNP condition. These results might be helpful to explaining the reason why the two species can out-compete others in frequent diatom bloom in the Yellow Sea.