

# 石油烃胁迫下 3 种微藻的生长动力学研究

袁萍<sup>1</sup>, 吕振波<sup>2</sup>, 周革非<sup>1</sup>

(1. 烟台大学 生命科学学院, 山东 烟台 264005; 2. 山东省海洋水产研究所, 山东 烟台 264006)

**摘要:** 为探讨石油烃对海洋生物的毒性效应机制, 并对海洋石油污染的预防和治理提供理论依据, 本文研究了 0# 柴油石油烃对 3 种海洋微藻生长的影响。实验结果表明石油烃对微藻有“低促高抑”的现象: 当石油烃质量浓度 >10 mg/L 时, 抑制青岛大扁藻的生长; 当石油烃质量浓度 >30 mg/L 时, 则抑制三角褐指藻的生长; 抑制聚球藻的石油烃质量浓度范围为 >20 mg/L, 且质量浓度越大抑制效果越明显。但低质量浓度石油烃污染物则易促进其生长。在 Logistic 生长模型的基础上, 结合 Lorentz 方程和 Exponential 方程, 引入石油烃污染物质量浓度项, 建立石油烃污染物条件下的海洋浮游植物生长的模型。Lorentz 方程可描述 0# 柴油烃对浮游植物生长速率参数的影响, Exponential 方程可描述 0# 柴油烃对浮游植物生物量的影响, 实验验证该模型是合理的。

**关键词:** 石油烃; 青岛大扁藻(*Platymonas helgolandica* Kylin var. *tsingtaoensis*); 三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornerutum* Bohlin); 聚球藻(*Synechococcus* sp.); 生长动力学

中图分类号: Q819 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2014)10-0046-06  
doi: 10.11759/hyhx20130830004

随着海上石油的开发, 各种石油加工产品的生产、使用及排放, 和海上溢油事故的经常发生, 以及石油类污染物在生物体内高积累、高残留的特性, 使之成为海洋环境的主要污染物。为加强海洋环境污染的预防, 国内外已做了大量的研究和尝试性工作, 但仍处于探索阶段<sup>[1]</sup>。而藻际关系研究对于探索生态系统内物质循环和能量流动、赤潮发生机制及防治途径均有重要意义<sup>[2]</sup>。

石油是饱和烃、芳烃、沥青质和树脂的复杂混合物, 石油的化学毒性主要是由其中的可溶性芳烃造成的, 尤其是多环芳烃, 而低环芳烃更易在生物膜间转移<sup>[3]</sup>。在 20 世纪初期, 微藻就作为受试生物应用到石油烃毒性研究中。石油烃对海洋浮游植物生长的影响不仅可通过降低对二氧化碳吸收、阻止细胞分裂、减小光合作用和呼吸作用速率, 导致生长速率降低, 并可能发生形态的改变<sup>[4]</sup>。对于海洋浮游植物来说, 石油烃可导致其生长速度、粒径效应、光合作用和呼吸作用以及胞外分泌物质的变化。

目前, 关于紫外线辐射、有机物质、光照、温度和氮磷比对浮游植物的毒性及动力学模型研究均已见报道<sup>[5-10]</sup>。但描述石油烃条件下海洋浮游植物生长动力学模型方面, 仅运用一维数学模型来分析预测。生物中存在着 Richards 生长模型<sup>[11]</sup>, 而石油烃动力学的研究也要根据 Richards 生长模型<sup>[12]</sup>。在不同情

况下 Richards 方程可转化为 Mitscherlich、Gompertz、Logistic 方程形式。其中, Logistic 方程又称自然生长方程, 在动物饲养、植物栽培、生态环保等方面的模拟研究中有较广泛的应用<sup>[13]</sup>, 能用来预测生物种群的生长和数量、确定最大持续产量(MSY); Gompertz 模型在石油地质研究、油田开发指标预测等领域有很多应用<sup>[14]</sup>, 能够描述具有反 S 型曲线特征的大量实际数据。本文通过速率曲线回归并在 logistic 函数、Richards 模型的基础上, 结合 Lorentz 方程和 Exponential 方程, 引入石油烃污染物质量浓度项, 建立石油烃污染物条件下的海洋浮游植物生长的模型。模型的提出对研究污染物对浮游植物生长的影响有一定的实际意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

青岛大扁藻(*Platymonas helgolandica* Kylin var.

收稿日期: 2013-12-24; 修回日期: 2014-04-22

基金项目: 山东省自然科学基金项目(ZR2009BL030); 山东省海洋生态修复重点实验室(山东省海洋水产研究所)开放基金资助项目(201212)

作者简介: 袁萍(1988-), 女, 山东淄博人, 硕士研究生, 研究方向为海洋生物工程, 电话: 18364500125, E-mail: yeping1205@126.com; 周革非, 通信作者: zhougf3325@sina.com

*tsingtaoensis*), 三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricor-  
nutum* Bohlin.)和聚球藻 (*Synechococcus* sp.)均由烟台  
大学生命科学学院藻类保种室提供。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 0#柴油石油烃母液的制备

按照 9 : 1 的比例混合过滤海水和 0#柴油, 振荡  
24 h, 转移到分液漏斗里, 静置 3 h 左右, 分层后放  
出下清液, 即得 0#柴油石油烃母液<sup>[15]</sup>。经测定<sup>[16]</sup>此  
方法处理后的 0#柴油石油烃母液质量浓度为 100 mg/L。  
然后用微孔过滤膜进行抽滤除菌, 密封保存待用。

### 1.2.2 石油烃胁迫实验

3 种藻均于 f/2 培养基中培养, 培养温度为  
(20.0±0.1)°C, 光源采用白色日光灯, 光强约为 6 000 lx,  
光暗比为 12 h : 12 h。根据预实验结果确定 3 种藻石  
油烃实验质量浓度分别为: 0、10、20、30、40、50 mg/L。  
实验在 300 mL 三角瓶中进行, 以不加 0#柴油烃作为  
对照组, 每天摇瓶 3 次, 培养周期 144~168 h。

### 1.2.3 藻细胞密度测定

用显微镜计数法测定藻细胞密度, 每隔 24 h 取  
适量藻液, 将其稀释到适当倍数, 用移液枪将其注  
入到血球计数板和盖玻片间, 在适当放大倍数下记  
录细胞个数。

### 1.2.4 数据处理

利用 Origin8.0 进行非线性拟合, 利用 SPSS13.0  
软件进行数据处理, 结果均以平均值±标准差表示。  
对数据进行 ANOVA 分析, 以  $P < 0.05$  表示数据间差  
异显著,  $P < 0.01$  表示差异极其显著。

## 2 结果

### 2.1 石油烃胁迫下微藻生长情况

由图 1、图 2 和图 3 可知, 在生长的过程中, 由  
于对新环境的适应和生长调节, 培养初期藻的细胞  
繁殖很少, 甚至有下降的趋势, 处于生长的迟缓期。  
之后由于环境条件适宜, 繁殖空间足够, 营养充足,  
细胞繁殖较快, 是生物生长的对数生长期。待细胞增  
殖到一定程度, 营养成分开始有限, 繁殖空间变小,  
导致细胞的死亡速率上升, 当生长和死亡速率达到  
平衡时, 细胞数目保持不变达到最大, 即生长稳定  
期。当细胞数目更多、繁殖空间受限、营养物质  
的大量消耗、细胞有害物质排放等因素使细胞的增值  
速率减慢, 死亡速率上升, 整个细胞总数呈下降趋  
势, 便是死亡期。

(1) 如图 1 所示: 青岛大扁藻的空白对照组生长

最好, 在实验所取的质量浓度梯度里, 石油烃质量  
浓度越大对藻的抑制作用越明显 ( $P < 0.05$ )。说明青  
岛大扁藻可能不适宜在石油烃中生长, 也可能由于实  
验中所设的石油烃质量浓度梯度过大, 需要在今后的  
实验中增加  $< 10$  mg/L 低质量浓度的梯度, 从而探  
讨促进青岛大扁藻生长的石油烃质量浓度。

(2) 由图 2 可看出, 三角褐指藻在生长过程中对  
数生长期增长速度从大到小依次为: 20、10、0、30、  
40、50 mg/L。说明在  $< 20$  mg/L 石油烃质量浓度范  
围内, 可促进其生长; 在  $> 30$  mg/L 的石油烃范围  
内, 三角褐指藻的生长受抑制。

(3) 图 3 的趋势表明: 当石油烃质量浓度  $< 10$  mg/L  
时对聚球藻的生长起促进作用; 石油烃质量浓度  $> 20$  mg/L

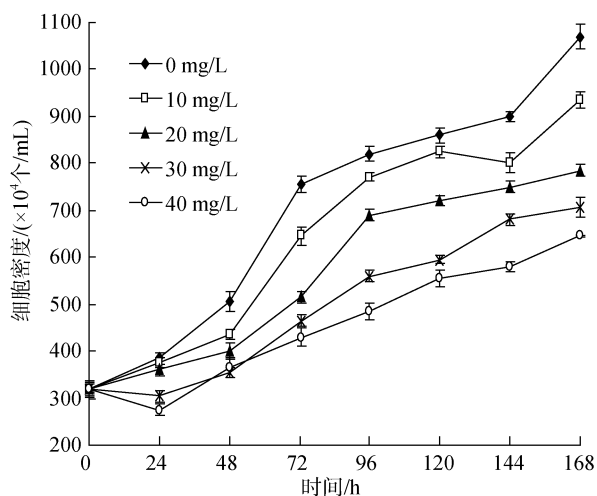


图 1 石油烃对青岛大扁藻生长的影响

Fig.1 Effects of Petroleum on the growth of *Platymonas  
helgolandica*

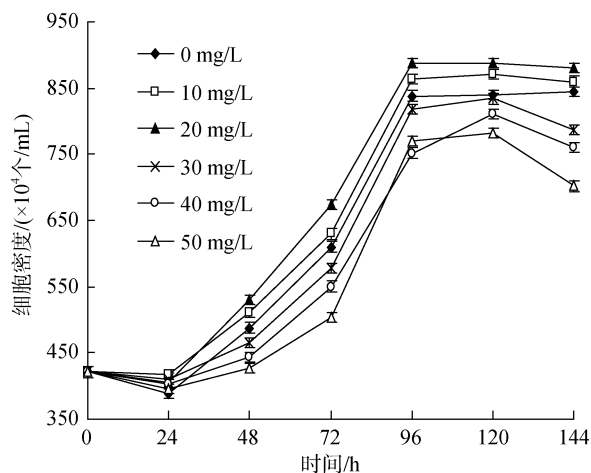


图 2 石油烃对三角褐指藻生长的影响

Fig.2 Effects of Petroleum on the growth of *Phaeodacty-  
lum tricor-  
nutum*

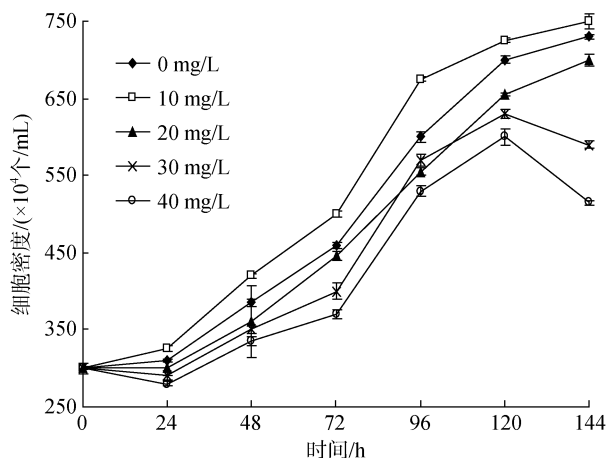


图3 石油烃对聚球藻生长的影响

Fig.3 Effects of Petroleum on the growth of *Synechococcus* sp

时具有抑制作用,且质量浓度越大对藻的抑制作用越明显。

(4) 综上,石油烃质量浓度对微藻的生长有显著影响( $P < 0.05$ )。低质量浓度石油烃能促进微藻的生长,当石油烃质量浓度高于某一值时便会起抑制作用,且质量浓度越大对藻的抑制作用越明显。这与沈南南等<sup>[17]</sup>的研究结果“低促高抑”的趋势非常符合。

## 2.2 石油烃作用下微藻生长动力学方程及实验模型

整个生长过程表现出S形曲线,可采用 Richards 生长模型来描述。根据 Richards 方程:

$$Y = b_0(1 - b_1 e^{-b_2 x}) \frac{1}{1 - b_3} \quad (1)$$

式中,  $b_0$  为初始值参数,  $b_1$  为总生长量的极限值,  $b_2$  为生长速率参数,  $b_3$  为曲线形状参数。当  $b_3$  取值不同 ( $b_3=0, b_3 \rightarrow 1, b_3=2$ ), 可分别转化为 Mitscherlich、

$$B_t = \frac{B_{\max}^0 + f_2 \frac{a_1}{a_1 - a_2} (1 - e^{-a_1 C_{PH}}) - f_1 \frac{a_1}{a_1 - a_2} (1 - e^{-a_2 C_{PH}})}{1 - \frac{B_{\max}^0 + f_2 \frac{a_1}{a_1 - a_2} (1 - e^{-a_1 C_{PH}}) - f_1 \frac{a_1}{a_1 - a_2} (1 - e^{-a_2 C_{PH}}) - B_0}{B_0} e^{-\left(C_{R0} + \frac{2D}{\pi} \frac{\omega}{4(C_{PH} - C_{PH-MAX})^2 + \omega^2}\right)t}} \quad (5)$$

其中, 定义:

$$\Delta GR_{PH} = \frac{2D}{\pi} \frac{\omega_{PH}}{4(C_{PH} - C_{PH-MAX})^2 + \omega_{PH}^2} \quad (6)$$

$$\Delta B_{PH} = f_2 \frac{a_1}{a_1 - a_2} (1 - e^{-a_1 C_{PH}}) - f_1 \frac{a_1}{a_1 - a_2} (1 - e^{-a_2 C_{PH}}) \quad (7)$$

$GR_{PH}$  表示有石油烃影响下, 浮游植物生长速率参数的变化,  $\Delta B_{PH}$  表示有石油烃影响下, 浮游植物生

Gompertz、Logistic 方程形式。其中 Logistic 生长模型适用于描述早期缓慢生长期长的生长过程, 根据 Logistic 方程:

$$B_t = \frac{B_f}{1 + \frac{B_f - B_0}{B_0} e^{-\frac{4\mu_{\max} t}{B_f}}} \quad (2)$$

式中,  $B_t$  为  $t$  时刻生物量(个/cm<sup>3</sup>),  $B_0$  为起始生物量(个/cm<sup>3</sup>),  $B_f$  为终止生物量(个/cm<sup>3</sup>),  $\mu_{\max}$  为最大生长速率(个/(cm<sup>3</sup>·h)),  $t$  为时间(h)。根据方程(2)定义生长速率参数  $G_R$ (h<sup>-1</sup>):  $G_R = 4\mu_{\max}/B_{f0}$

这样根据方程(2)应用 origin 8.0 非线性拟合技术, 得到  $B_f$  与  $\mu_{\max}$  拟合的相关系数  $R^2$  平均为 0.923, 这可以较好的描述青岛大扁藻、三角褐指藻和聚球藻在石油烃质量浓度下的生长过程(图 4)。

$G_R$  与石油烃质量浓度  $C_{PH}$  的关系可用 Lorentz 方程表示:

$$G_R = G_{R0} + \frac{2D}{\pi} \frac{\omega_{PH}}{4(C_{PH} - C_{PH-MAX})^2 + \omega_{PH}^2} \quad (3)$$

式中,  $G_{R0}$  为不加石油烃时的生长速率参数(h<sup>-1</sup>),  $C_{PH-max}$  为生长速率参数为最大值时的石油烃质量浓度(mg/L),  $\omega_{PH}$  为石油烃质量浓度范围值(mg/L),  $D$  为石油烃质量浓度的改变量对生长速率参数的影响总量因子。  $B_f$  与  $C_{PH}$  的关系可用 Exponential 方程表示:

$$B_f = B_{\max0} + f_2 \frac{a_1}{a_1 - a_2} (1 - e^{-a_1 C_{PH}}) - f_1 \frac{a_1}{a_1 - a_2} (1 - e^{-a_2 C_{PH}}) \quad (4)$$

式中,  $B_{\max0}$  为不加石油烃时浮游植物的终止生物量(个/cm<sup>3</sup>);  $a_1, a_2$  为促进作用参数;  $f_1, f_2$  为曲线形状参数。其中,  $a_1 f_2 = a_2 f_1$  时表示对生长无促进作用;  $a_2 > a_1, a_2 f_1 > a_1 f_2$  或  $a_1 > a_2, a_1 f_2 > a_2 f_1$  时对生长有促进作用。这样, 将方程(3), (4)代入方程(2), 得到方程(5):

物量的改变<sup>[18]</sup>。将方程(6), (7)代入方程(5), 则可转化为方程(8):

$$B_t = \frac{B_{\max}^0 + \Delta B_{PH}}{1 - \frac{B_{\max}^0 + \Delta B_{PH} - B_0}{B_0} e^{-(GR_0 + \Delta GR_{PH})t}} \quad (8)$$

方程(5), (8)即为石油烃影响条件下浮游植物的生长模型<sup>[19]</sup>。

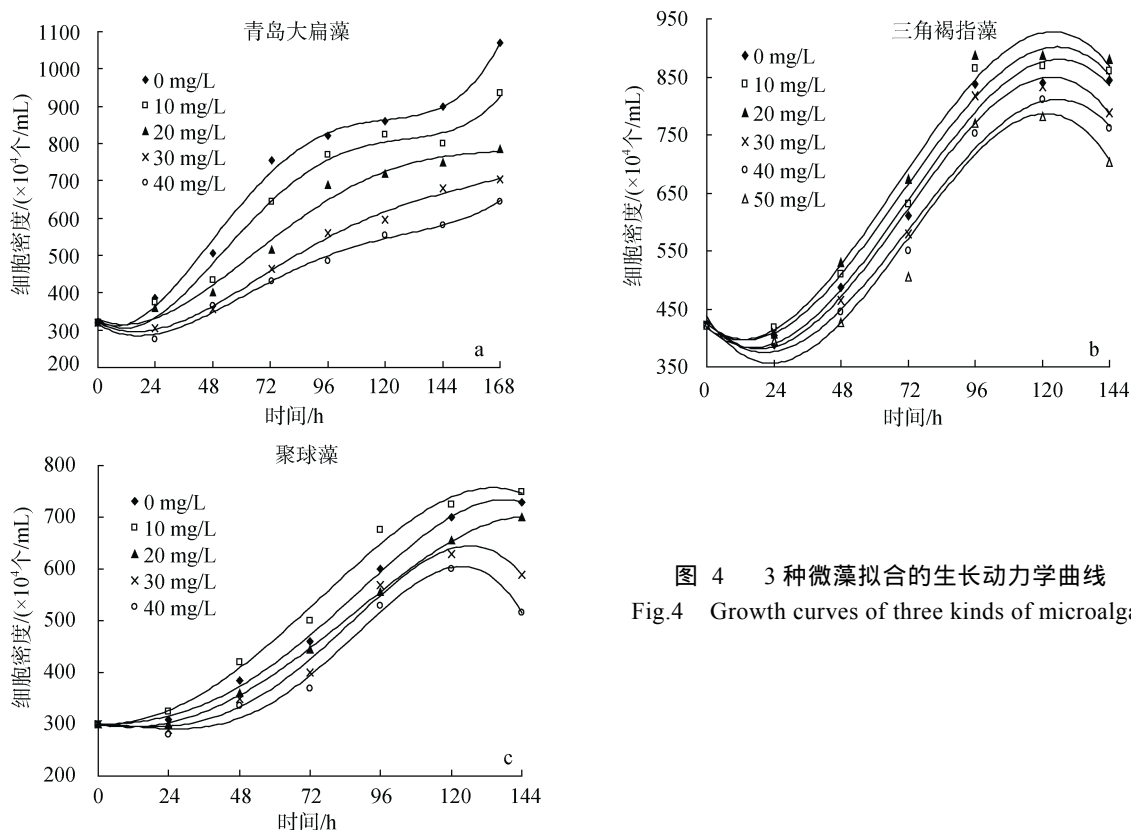


图 4 3 种微藻拟合的生长动力学曲线  
Fig.4 Growth curves of three kinds of microalgae

表 1 3 种微藻的生长曲线方程

Tab.1 Growth equation of three kinds of microalgae

藻类名称	0#柴油烃的质量浓度(mg/L)	生长曲线方程
青岛大扁藻	0	$y = 8.0e^{-8x^4} - 3.1e^{-5x^3} + 0.0035x^2 - 0.0642x + 3.3403$
	10	$y = 7.9e^{-8x^4} - 2.9e^{-5x^3} + 0.0034x^2 - 0.0863x + 3.4097$
	20	$y = 5.0e^{-8x^4} - 1.9e^{-5x^3} + 0.0024x^2 - 0.0601x + 3.3866$
	30	$y = 2.2e^{-8x^4} - 1.0e^{-5x^3} + 0.0013x^2 - 0.0256x + 3.1233$
	40	$y = 1.1e^{-8x^4} - 8.2e^{-6x^3} + 0.0015x^2 - 0.0497x + 3.2275$
三角褐指藻	0	$y = -1.7e^{-8x^4} - 2.3e^{-6x^3} + 0.0011x^2 - 0.0335x + 4.1894$
	10	$y = -2.5e^{-8x^4} - 6.3e^{-7x^3} + 0.0010x^2 - 0.0325x + 4.2551$
	20	$y = -7.5e^{-8x^4} + 1.2e^{-5x^3} + 0.0001x^2 - 0.0095x + 4.1977$
	30	$y = 2.0e^{-8x^4} - 1.4e^{-5x^3} + 0.0022x^2 - 0.0575x + 4.2839$
	40	$y = -1.1e^{-7x^4} + 2.3e^{-5x^3} - 0.0010x^2 + 0.0575x + 4.1842$
50	$y = -5.4e^{-8x^4} + 7.8e^{-6x^3} + 0.0004x^2 - 0.0293x + 4.2465$	
聚球藻	0	$y = -4.4e^{-6x^3} + 0.0009x^2 - 0.0125x + 2.8774$
	10	$y = -4.2e^{-6x^3} + 0.0010x^2 - 0.0310x + 3.1548$
	20	$y = -5.6e^{-6x^3} + 0.0013x^2 - 0.0505x + 3.2107$
	30	$y = -5.9e^{-6x^3} + 0.0013x^2 - 0.0385x + 2.9881$
	40	$y = -7.6e^{-6x^3} + 0.0016x^2 - 0.0578x + 2.9833$

将生长曲线与 Richards 生长模型进行比较,发现曲线形状描述完全一致,曲线方程在指数项有相似。与石油烃作用下浮游植物的生长模型方程(5)和(8)进行对比,发现系数上有差异,而在指数项上有相似性。方程的系数会因生物的种类、环境影响和操作误差引起,不会一成不变。所以实验中的 3 种微藻在石油烃作用下的生长动力学模型进一步验证了 Richards、Exponential、logistic 函数的有效性。之前实验模型是在一次方程的基础上得出的,此试验是在 4 次拟合的情况下得到的,对整个生长趋势具有更准确的描述性。

### 3 结论

本实验通过测定微藻细胞密度的变化情况,探讨了青岛大扁藻、聚球藻、三角褐指藻在不同质量浓度的石油烃胁迫下的生长情况,参照 Richards 生长模型建立了 3 种微藻的生长动力学方程。

实验结果表现出“低促高抑”的现象:当石油烃质量浓度 $>10$  mg/L 时,抑制青岛大扁藻的生长;当石油烃质量浓度 $>30$  mg/L 时,则抑制三角褐指藻的生长;抑制聚球藻的石油烃质量浓度范围为 $>20$  mg/L,且质量浓度越大抑制效果越明显。但低质量浓度石油烃污染物则易促进其生长。这可能由于石油烃中所含的碳氢化合物可作为其生长所需的有机碳源和氮源等营养物质,但是石油烃组分中的烷烃、芳香烃等化合物,能分解破坏藻类的细胞结构,如质膜、线粒体膜和叶绿体膜,从而抑制生长及代谢产物的合成<sup>[20]</sup>。但微藻对石油烃的吸收和代谢作用并不十分明显,因此石油烃对微藻的毒性效应及机理有待进一步探讨研究。

实验在 Logistic 生长模型的基础上,结合 Lorentz 方程和 Exponential 方程,引入石油烃污染物质量浓度项,建立石油烃污染物条件下的海洋浮游植物生长的模型。Lorentz 方程可描述 0<sup>#</sup>柴油烃对浮游植物生长速率参数的影响,Exponential 方程可描述 0<sup>#</sup>柴油烃对浮游植物生物量的影响,实验验证该模型是合理的。模型的提出对研究污染物对浮游植物生长的影响有一定的实际意义。

#### 参考文献:

- [1] 王君丽,刘春光,冯剑丰,等.石油烃对海洋浮游植物生长的影响研究进展[J].环境污染与防治,2011,33(4):81-86.
- [2] 林伟,陈騫.微藻与细菌相互关系研究在海水养殖中

的重要意义[J].海洋科学,1998,4:34-37.

- [3] Pérez P, Fernández E, Beiras R. Fuel toxicity on Isochrysis galbana and a coastal phytoplankton assemblage: Growth rate vs. variable fluorescence[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2010, 73(3): 254-261.
- [4] Gamila H A, Ibrahim B M. Algal bioassay for evaluating the role of algae in bioremediation of crude oil: isolated strains[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2004, 73(5): 883-889.
- [5] 田继远,唐学玺,于娟.海洋微藻对 UV-B 辐射的生理生化响应[J].海洋科学,2006,30(4):54-58+63.
- [6] 张小敏,王蕾,郭丰.4种有机污染物对假微型海链藻的毒性效应[J].厦门大学学报(自然科学版),2011,50(1):138-143.
- [7] 徐明芳,周远志,区德洪.光生物反应器中光衰减特征与螺旋藻生长动力学研究[J].海洋科学,2001,25(11):32-37.
- [8] Giannuzzi L, Pinotti A, Zaritzky N. Mathematical modeling of microbial growth in packaged refrigerated beef stored at different temperatures[J]. Int J Food Microbiol, 1998, (39): 101-110.
- [9] 孙军,刘东艳,陈宗涛,等.不同氮磷比率对青岛大扁藻、新月柱鞘藻和米氏凯伦藻生长影响及其生存策略研究[J].应用生态学报,2004,15(11):2122-2126.
- [10] 唐启升,苏纪兰,孙松,等.中国近海生态系统动力学研究进展[J].地球科学进展,2005,20(12):1288-1299.
- [11] 邢黎峰,孙明高,王元军.生物生长的 Richards 模型[J].生物数学学报,1998,13(3):348-353.
- [12] Echeveste P, Agusti S, Dachs J. Cell size dependent toxicity thresholds of polycyclic aromatic hydrocarbons to natural and cultured phytoplankton populations[J]. Environmental Pollution, 2010, 158(1): 299-307.
- [13] 孙多如.生物种群的数学模型[D].济南:山东大学,2007.
- [14] 朱珉仁. Gompertz 模型和 Logistic 模型的拟合[J].数学的实践与认识,2002,32(5):705-709.
- [15] Siron R, Pelletier E, Delille D, et al. Fate and effects of dispersed crude oil under icy conditions simulated in mesocosms[J]. Mar Environ Res, 1993, 35: 273-302.
- [16] 国家海洋局.海洋监测规范[M].北京:海洋出版社,2007:160-162.

- [17] 沈南南, 李纯厚, 王晓伟. 石油污染对海洋浮游生物的影响[J]. 生物技术通报, 2006, S1: 95-99.
- [18] 王江涛, 赵卫红, 李雪莲, 等. 石油烃和营养盐的复合污染对海洋浮游植物的影响. 石油烃对海洋浮游植物吸收营养盐的影响[J]. 海洋与湖沼, 2013, 44(1): 43-48.
- [19] 张莹莹, 王修林, 杨汝君, 等. 铅离子对海洋浮游植物生长影响的研究[J]. 海洋科学, 2005, 29(6): 28-34+52.
- [20] Elsheekhm M, Elnaggara H, Osmanme H, et al. Comparative studies on the green algae *Chlorel lahomosph-aera* and *Chlorel lavulgaris* with respect to oil pollution the river Nile[ J]. *Water, Air, and Soil Pollution*, 2000, 124(1/2) .

## Growth kinetics of 3 species of microalgae treated with petroleum hydrocarbon

YUAN Ping<sup>1</sup>, LÜ Zhen-bo<sup>2</sup>, ZHOU Ge-fei<sup>1</sup>

(1. College of Life Science, Yantai University, Yantai 264005, China; 2. Shandong Marine Fisheries Research Institute, Yantai 264006, China)

**Received:** Dec., 24, 2013

**Key words:** Petroleum hydrocarbon; *Platymonas helgolandica*; *Phaeodactylum tricornutum*; *Synechococcus*; Growth kinetics

**Abstract:** It is aimed to find out toxic effect of petroleum hydrocarbon on marine organism, and provide theoretical basis for prevention and control. We tested effects of 0<sup>#</sup> petroleum hydrocarbon on growth of three species of microalgae. The results show that the effective concentration, at which petroleum hydrocarbon can inhibit growth of *Platymonas helgolandica*, *Phaeodactylum tricornutum* and *Synechococcus* is higher than 10 mg/L, 30 mg/L, and 20 mg/L, respectively. Moreover the higher the concentration is, the stronger the inhibition is. However, lower doses of petroleum hydrocarbon can promote growth of microalgae. A growth model based on the effects of petroleum hydrocarbon on growth of microalgae, was developed by incorporating Logistic model with Lorentz and Exponential equation. Lorentz equation can describe effects of 0<sup>#</sup> petroleum hydrocarbon on growth rate of phytoplankton, while Exponential equation suggests that on biomass. It is demonstrated that the growth model showed good fitting for experimental data.

(本文编辑: 梁德海)