

# N, P, Fe-EDTA, Mn 对赤潮生物锥状斯氏藻 增殖影响的初步研究\*

秦晓明 邹景忠

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

**提要** 于1994年7月在胶州湾北岸上马镇小4<sup>#</sup>虾池采集了锥状斯氏藻,采用正交实验的方法研究了N, P, Fe-EDTA, Mn 4个因子对它生长的影响。结果表明, Fe-EDTA和Mn对该藻的生长有显著促进作用, N有一定的促进作用, 其主次因素为 Mn > Fe-EDTA > NO<sub>3</sub>-N > PO<sub>4</sub>-P。

**关键词** 赤潮 锥状斯氏藻 氮 磷 络合铁 锰

许多研究结果表明,丰富的氮、磷营养盐和微量重金属是造成赤潮的物质基础(邹景忠, 1983; 齐雨藻, 1994; Harrison et al., 1986)。因此,国内外的赤潮研究均把营养盐的含量变化对赤潮生物生长影响规律作为其基本研究内容。锥状斯氏藻为近岸性、世界广布的赤潮生物种,由其引发的赤潮在挪威、美国、智利、罗马尼亚都有过报道。1994年7月14日,锥状斯氏藻在上马镇小4<sup>#</sup>虾池中爆发性增殖形成赤潮,密度高达 $9.98 \times 10^4$  cell / ml,次日,池内出现大量死虾。国外对其生理生态特性的研究甚少,国内尚属空白。本文采用正交实验的方法,研究了N, P, Fe-EDTA, Mn 4个因子对锥状斯氏藻增殖的影响,为深入了解其形成赤潮的机制提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 藻种及其保存和制备

锥状斯氏藻 (*Scrippsiella trochoidea*)于1994年7月采自位于胶州湾北岸的上马镇小4<sup>#</sup>虾池,按常规方法分离,纯化,培养于500ml三角烧瓶中,培养介质为f/2(Guillard et al., 1962)培养液。温度 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ,光照为4000lx,光暗比L:D = 14:10。每10d接种一次。实验前,将对数期藻种置于离心管中,以300r/min的速度离心4min,弃掉上清液,加入适量体积人工海水,再离心洗涤,如此3次,将洗涤过的藻种接入含有各个浓度营养盐的100ml三角瓶中,接种密度为100cell/ml,接种体积为60ml。

### 1.2 海水

采用人工海水,根据联合国环境计划(UNEP / FAO / IAEA, 1989)推荐的配方配制。

### 1.3 生长曲线的测定

从接种第2天起,每隔2d于同一时间取样,置于2ml计数框内,于倒置显微镜下计数,

\* 国家自然科学基金资助项目,39790110号;国家攀登计划B资助项目,PDB6号。秦晓明,男,出生于1969年3月,硕士。

收稿日期:1996年3月28日,接受日期:1997年7月20日。

每个样品计数 2 次, 取其平均值, 按下式计算生长率 ( $\mu$ ) 和世代时间 ( $tg$ ):  $\mu = (\ln x_2 - \ln x_1) / (T_2 - T_1)$ 。式中:  $x_1$  为时间  $T_1$  时的细胞密度 (cell / ml),  $x_2$  为时间  $T_2$  时的细胞密度。  $tg(d) = 0.6931 / \mu$ 。实验设平行组。

#### 1.4 影响因子及其水平

以  $\text{NaNO}_3$  为氮源,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  为磷源, Fe-EDTA 为铁源,  $\text{MnCl}_2$  为锰源, 根据已有研究结果<sup>1)</sup> 选取各因子的水平, N, P 和 Fe-EDTA 取四水平, Mn 取二水平, 见表 1。

#### 1.5 正交表

选用  $L_{16}(4^3 \times 2^6)$  正交表, 此表共有 9 列, 将 N, P, Fe-EDTA 放于前 3 列, Mn 放于第 9 列。

#### 1.6 玻璃器皿

本实验中所有玻璃器皿均先于 1N HCl 溶液中浸泡 2d, 用去离子水冲洗干净后于 150℃ 烘箱中消毒备用。

## 2 结果

用正交实验法研究  $\text{NO}_3^-$ -N,  $\text{PO}_4$ -P, Fe-EDTA, Mn 4 个因子对锥状斯氏藻生长的影响, 结果列于表 2。以细胞密度、生长率、世代时间为指标进行方差分析, 结果列于表 3。生物统计学认为, 在作 F 检验时, 如果误差项的自由度太小, 那么其灵敏度

表1 影响因子及其水平 ( $\mu\text{mol/L}$ )

Tab.1 Effecting factors and their levels ( $\mu\text{mol/L}$ )  
on *S.trochoidea*

水平	$\text{NO}_3$ -N	$\text{PO}_4$ -P	Fe-EDTA	Mn
1	1	0.1	0.5	0
2	5	0.5	1	3
3	10	1	5	
4	20	2	10	

表2 正交表  $L_{16}(4^3 \times 2^6)$  及实验结果

Tab.2 Orthogonal designed scheme and the experimental results

实验号	因 子				实 验 结 果		
	$\text{NO}_3$ -N	$\text{PO}_4$ -P	Fe-EDTA	Mn	细胞密度 (cell/ml)	生长率 ( $d^{-1}$ )	世代时间 (d)
1	1	1	1	1	2 400	0.4	1.74
2	1	2	2	2	4 500	0.48	1.46
3	1	3	3	2	8 900	0.56	1.24
4	1	4	4	1	6 700	0.53	1.32
5	2	1	2	2	6 200	0.52	1.34
6	2	2	1	1	3 400	0.44	1.57
7	2	3	4	1	7 200	0.53	1.30
8	2	4	3	2	11 000	0.59	1.18
9	3	1	3	1	6 500	0.52	1.33
10	3	2	4	2	16 700	0.64	1.08
11	3	3	1	2	7 500	0.54	1.28
12	3	4	2	1	7 600	0.54	1.28
13	4	1	4	2	13 200	0.61	1.14
14	4	2	3	1	6 800	0.53	1.31
15	4	3	2	1	7 100	0.53	1.30
16	4	4	1	2	6 400	0.52	1.33

1) Qin, X. M. et al., 1996, *Chin. Limnol. Oceanogr.* (in press)

较低。因而在方差分析中,若误差项的自由度小于6、 $F$ 值小于0.2时,则对被检验因子有一定影响; $F$ 值小于0.05时,影响显著。由表3可知,Mn和Fe-EDTA对细胞密度有显著影响( $p < 0.05$ ), $\text{NO}_3\text{-N}$ 有一定影响( $p < 0.2$ ), $\text{PO}_4\text{-P}$ 基本没影响( $p > 0.9$ ),由此得出主次影响为:Mn > Fe-EDTA >  $\text{NO}_3\text{-N}$  >  $\text{PO}_4\text{-P}$ 。由表3可知,Mn,Fe-EDTA和 $\text{NO}_3\text{-N}$ 对锥状斯氏藻生长率的影响都极为显著( $p < 0.02$ ),而 $\text{PO}_4\text{-P}$ 也有一定影响( $p < 0.2$ ),其主次因素为:Mn > Fe-EDTA >  $\text{NO}_3\text{-N}$  >  $\text{PO}_4\text{-P}$ ;Mn,Fe-EDTA, $\text{NO}_3\text{-N}$ 和 $\text{PO}_4\text{-P}$ 对世代时间的影响都极显著( $p < 0.02$ ),其主次因素为:Mn > Fe-EDTA >  $\text{NO}_3\text{-N}$  >  $\text{PO}_4\text{-P}$ 。

表3 以细胞密度、生长率和世代时间为指标的方差分析

Tab.3 Analysis of variance for cell density, growth rate and generation time of *S. trochoidea*

	方差来源	总平方和	自由度	平均平方和	$F$ 值	$P$ 值
细胞密度 (cell/ml)	Fe-EDTA	81 706 875	3	27 235 625	5.48	0.049
	Mn	44 555 625	3	44 555 625	8.966	0.03
	$\text{NO}_3$	35 281 875	3	11 760 625	2.367	0.187
	$\text{PO}_4$	1 781 875	1	593 958	0.12	0.945
	误差	24 848 125	5	4 969 625		
	总和	188 174 375	15	12 544 958		
生长率 ( $\text{d}^{-1}$ )	Fe-EDTA	0.024	3	0.008	20.411	0.003
	Mn	0.011	3	0.011	29.682	0.003
	$\text{NO}_3$	0.012	3	0.004	10.211	0.014
	$\text{PO}_4$	0.003	1	0.001	2.62	0.163
	误差	0.002	5	0.000		
	总和	0.052	15	0.003		
世代时间 (d)	Fe-EDTA	0.171	3	0.057	39.235	0.001
	Mn	0.076	3	0.076	52.375	0.001
	$\text{NO}_3$	0.092	3	0.031	21.036	0.003
	$\text{PO}_4$	0.037	1	0.012	8.5	0.021
	误差	0.007	5	0.001		
	总和	0.348	15	0.026		

### 3 讨论与结语

长期以来,在营养盐对赤潮藻类生长特性影响的研究中,普遍认为氮和磷是两个重要因子。海洋生物学家一般认为氮是海洋环境中藻类自然种群生长的限制因子(Thomas, 1970a,b),而湖泊生物学家则倾向于磷是湖泊中净有机碳生产的主要限制因子(Riedfield, 1958)。随着研究的深入,微量重金属对赤潮藻类生理生态的影响越来越引起人们的重视并取得一大批研究成果。Susumu Yamachi(1984)提出络合铁在营养水体中是触发赤潮爆发的因子之一,它对海洋原甲藻(*Proocentrum micans*)的增殖有极显著的作用。Ingle等(1971)报道佛罗里达沿岸的短裸甲藻(*Gymnodinium breve* Davis)赤潮与赤潮爆发前三个月中由河流排入海里的铁的含量有明显的正相关。锰在藻类的光合反应中起着重要的作用,由于在外海锰的浓度很低,大约为 $2 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ (Bender et al., 1977),因而常成为浮游植物生长的限制因子。但在某些情况下,水体中锰的含量并非是判断水体中浮游植物的生长是否为锰限制的唯一指标。Jahnke等(1978)发现某些藻类可在光限制条件下吸收锰,而一种栅藻(*Scenedesmus* sp.)可累积过量的锰,并认为如果这两个特性能适用于其它浮游植物,那么生活在适光层底层附近或其它光限制条件下的浮游植物可累积锰供其

所需,直到条件再度适合其生长,这种生长可持续几个世代,直至 Mn 的储备耗尽。本研究表明, Mn 和 Fe-EDTA对锥状斯氏藻的细胞密度和生长率都有极明显的促进作用,这说明该藻并没有累积过量 Mn 的能力。现已有证据表明,微量重金属元素之间表现为协同作用。在藻类生长环境中,如果两种或两种以上的微量重金属元素处于限制状态,其限制作用要比单一重金属元素处于限制状态时强的多(Sunda et al., 1983)。在本研究中,16组实验中细胞密度的两个最低值(第1组和第6组)恰恰出现在 Fe-EDTA和 Mn 都是最低水平(水平1)组中(表2),这也证明了以上的结论。在单因子实验中,磷对处于磷饥饿状态下的锥状斯氏藻的生长有明显的促进作用<sup>1)</sup>,而在本实验中磷的作用不甚明显,可能是因为实验用的藻未经磷饥饿培养,而其累积磷的能力又比较强的缘故,即不论介质中磷的浓度是高或低,细胞都能以体内储存的磷维持生长。由于在水体中铁、锰等重金属的含量很低,往往成为藻类生长的限制因子,一旦这些因子由外界输入水体,很可能引起藻类的爆发性生长而造成危害。因此,加强重金属对藻类生理生态特性影响的研究和重金属在特定水体中分布的研究,对预报和预防赤潮有重要的意义。

### 参 考 文 献

- 齐雨藻, 1994, 海洋与湖沼, 25 (2): 132—138.
- 邹景忠, 1983, 海洋环境科学, 4 (2): 41—54.
- Bender, M. L. et al., 1977, *Deep-Sea Res.*, 24: 799—812.
- Guillard, R. R. L. et al., 1962, *Can. J. Phycol.*, 17: 309—314.
- Harrison, G. I. et al., 1986, *Limnol. Oceanogr.*, 31(5): 989—997.
- Ingle, R. M. et al., 1971, *Environ. Lett.*, 1: 69.
- Jahnke, T. K. et al., 1978, *Z. Pflanzenphysiol.*, 88: 83—93.
- Redfield, A. C., 1958, *Am. Sci.*, 46: 205—222.
- Sunda, W. G. et al., 1983, *Limnol. Oceanogr.*, 28: 924—934.
- Susumu Yamochi, 1984, *Bull. Plank. Soc. Jap.*, 31(2): 97—106.
- Thomas, W. H., 1970a, *Limnol. Oceanogr.*, 15: 386—394.
- Thomas, W. H., 1970b, *Limnol. Oceanogr.*, 15: 395—403.
- UNEP / FAO / IAEA, 1989, *Refer. Meth. Mar. Pollu. Stu.*, 44: 3—5.

1) Qin, X. M. et al., 1996, *Chin. Limnol. Oceanogr.* (in press)

## STUDY ON THE EFFECTS OF N,P,Fe-EDTA,Mn ON THE GROWTH OF A RED TIDE DINOFLAGELLATE *SCRIPPSIELLA TROCHOIDEA*

Qin Xiaoming, Zou Jingzhong

(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071)

**Abstract** Red tide dinoflagellate *Scrippsiella trochoidea* was sampled from a shrimp pond at Shangma located on the north coast of Jiaozhou Bay in July, 1994 and grew within a batch culture system. An orthogonal designing method was used to study the effects of N, P, Fe-EDTA and Mn on the growth of *S. trochoidea*. The experiment consisted of sixteen groups, for which we selected four levels for N, P and Fe-EDTA, and two levels for Mn respectively. We analysed the variance for cell density, growth rate and generation time. The result shows that Mn, Fe-EDTA and  $\text{NO}_3\text{-N}$  remarkably enhance the maximum cell density and growth rate of *S. trochoidea*.  $\text{PO}_4\text{-P}$  does not apparently affect its maximum cell density, but has a positive effect on the growth rate. All the four factors have strong effects on the generation time of *S. trochoidea*. It is concluded that Mn has the most remarkable enhancing effect on the growth of *S. trochoidea*. The effecting order is  $\text{Mn} > \text{Fe-EDTA} > \text{NO}_3\text{-N} > \text{PO}_4\text{-P}$ . Comparing the result obtained in the present study with those from previous studies elsewhere, it appears that *S. trochoidea* has a large storage capacity for P but has no such a capacity for Mn.

**Key words** Red tide      *Scrippsiella trochoidea*      Nitrogen      Phosphorus  
Chelate iron      Manganese