

尖刺拟菱形藻氮磷吸收动力学以及 氮磷限制下的增殖特征*

张 诚 邹景忠

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

提要 于 1991 年 11 月在胶州湾采集尖刺拟菱形藻, 以毛细管法分离纯化, 建立克隆藻株, 以此为实验材料, 研究其在营养盐饥饿状态下对 $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NH}_4\text{-N}$ 和 $\text{PO}_4\text{-P}$ 的吸收动力学及在营养盐限制下的增殖特征。结果表明, 在营养盐饥饿状态下, 该藻对 $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NH}_4\text{-N}$ 和 $\text{PO}_4\text{-P}$ 的吸收过程符合米氏方程, 半饱和常数 (K_s) 分别为 2.29, 2.18 和 $1.40\mu\text{mol/L}$; 最大吸收速率 (V_m) 分别为 7.28, 18.90, $1.48 \times 10^{-13}\text{mol}/(\text{cell} \cdot \text{h})$ 。在营养盐限制下, 该藻的比生长率与限制性营养元素细胞含量之间的关系符合 Droop 方程; 求得该藻氮限制下的最大比生长率为 1.45d^{-1} , 最小细胞氮含量为 $6.30 \times 10^{-13}\text{mol}/\text{cell}$; 磷限制下的最大比生长率为 1.37d^{-1} , 最小细胞磷含量为 $0.69 \times 10^{-13}\text{mol}/\text{cell}$ 。根据以上结果, 计算出该藻对 $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NH}_4\text{-N}$ 和 $\text{PO}_4\text{-P}$ 的比最大吸收速率分别为 28, 72 和 51d^{-1} 。研究说明, 该藻具有较强的吸收氮的能力, 而吸收磷的能力较弱, 推测磷可能是自然环境中限制其生长的营养因子。

关键词 尖刺拟菱形藻 营养盐吸收 动力学 营养盐限制 增殖

尖刺拟菱形藻是一种在全球近岸海域分布极广的广温广盐性的浮游硅藻 (Hasle, 1972), 并且曾于 1987 年 11 月在加拿大形成有毒赤潮, 造成 3 人死亡, 105 人中毒 (Perl et al., 1990), 因此引起国内外赤潮研究者的广泛关注。本文作者曾对该藻在中国近海的自然生态特征和种下分类地位进行过初步的探讨 (Zou et al., 1993; 张诚等, 1994)。而对该藻的生理生态特征国内外研究甚少, 国内尚未见报道。本文报告该藻吸收氮、磷的动力学特征, 以及其在营养盐限制下的增殖特征, 并据此探讨自然环境中限制其增殖的营养盐因子, 以期阐明该藻形成赤潮的机理提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 藻株及保存

尖刺拟菱形藻 (*Pseudonitzschia pungens*) 于 1991 年 11 月用浅水 III 型浮游生物网采自青岛胶州湾, 采用毛细管法进行分离、纯化, 最后达到克隆培养。保存培养基为 f/2 培养液 (Guillard et al., 1962), 盐度为 32, 培养温度为 $20 \pm 1^\circ\text{C}$, 光照度为 5 000lx, 光暗比为 L:D = 14:10。

* 国家攀登计划 B 资助项目, B6-07-02 号。张诚, 男, 出生于 1967 年 1 月, 博士, 助研。

收稿日期: 1996 年 4 月 15 日, 接受日期: 1997 年 6 月 10 日。

1.2 吸收实验用藻种的准备

将处于指数生长期的藻细胞接种至未外加氮源或磷源的 $f/2$ 培养液中, 培养至介质中的无机氮或磷被耗尽后 3d, 此时藻细胞处于氮或磷饥饿状态。

1.3 实验用海水

保种和准备饥饿细胞所用培养液, 均采用中国科学院海洋研究所生物培养楼管道中的海水配制; 吸收实验所用海水采自东海外海, 采集后保存于黑暗中。

1.4 吸收动力学实验

氮吸收实验, 将处于氮饥饿状态的藻细胞接种到 $\text{NO}_3\text{-N}$ 或 $\text{NH}_4\text{-N}$ 浓度分别为 1, 2, 4, 6, 8 和 $10\mu\text{mol/L}$ 的 $f/2$ 培养液中, 接种后于第 10, 20, 30, 40 和 60min 测定各浓度组介质中 $\text{NO}_3\text{-N}$ 或 $\text{NH}_4\text{-N}$ 的浓度。磷吸收实验, 步骤同氮吸收实验, 介质中 $\text{PO}_4\text{-P}$ 浓度分别为 0.5, 1, 2, 4, 6 和 $8\mu\text{mol/L}$ 。实验温度、盐度和光照条件同 1.1。

1.5 营养盐限制下的增殖实验

在氮限制的半连续培养实验中, $\text{NH}_4\text{-N}$ 为唯一外加氮源, 浓度约为 $5\mu\text{mol/L}$; 磷限制的培养实验中, $\text{PO}_4\text{-P}$ 为唯一外加磷源, 浓度约为 $2\mu\text{mol/L}$ 。实验步骤为: 在实验期间每天同一时刻, 从每个实验用的三角烧瓶中移出部分藻液, 并加入相同体积的新鲜培养液, 测定取出藻液中的藻细胞密度和限制性营养盐的浓度。在两次实验中, 均采用 5 个稀释度 (0.05, 0.10, 0.20, 0.30 和 0.40), 稀释度为每次取出藻液体积与总培养体积之比。当细胞密度稳定不变时, 藻细胞即处于稳定状态, 这时加测细胞的氮或磷含量。

1.6 测定方法

藻细胞密度的测定采用 2ml 浮游植物计数框, 在倒置显微镜下计数。无机氮、磷的测定基本按 Parsons 等 (1984) 的方法。细胞氮含量和磷含量的测定采用 Strickland 等 (1972) 的方法。

1.7 计算方法

吸收速率 $v = -ds / (dt \cdot N)$, 式中, s 为营养盐浓度 (下同); t 为时间; N 为细胞密度。

营养盐浓度与吸收速率的关系采用米氏方程 $v = V_m \cdot s / (K_s + s)$ 进行非线性回归分析, 式中, V_m 为最大吸收速率; K_s 为半饱和常数; 这两个常数是经非线性回归求得的。

稳定状态下的比生长率 μ 用公式 $\mu = \ln[1 / (1 - D)]$ 计算, 式中, D 为稀释度。

稳定状态下的比生长率 μ 与限制性营养元素的细胞含量 q 的关系用公式 $\mu = \mu_m(1 - q / q_0)$ (Droop, 1968) 进行非线性回归, 式中 μ_m 为最大比生长率; q_0 为最小细胞含量, 经非线性回归求得。

2 结果

2.1 吸收动力学实验结果

2.1.1 吸收速率 实验期间 (0—60min), 各实验组培养液中的目标营养盐浓度均随时间呈线性减小, 表明在实验时间范围内, 尖刺拟菱形藻对目标营养盐的吸收速率不随时间变化。

2.1.2 吸收速率与米氏方程 各实验组中, 尖刺拟菱形藻对目标营养盐的吸收速率与其初始浓度之间的关系均符合米氏方程, 经非线性回归求得的最大吸收速率和半饱和常数列于表 1。可见, 尖刺拟菱形藻吸收 $\text{NO}_3\text{-N}$ 和 $\text{NH}_4\text{-N}$ 的半饱和常数相差不大, 但最大吸

收速率则相差甚大;而该藻吸收 $\text{PO}_4\text{-P}$ 的半饱和和常数值较高。

表1 尖刺拟菱形藻对无机氮、无机磷的半饱和常数和最大吸收速率

Tab.1 Half-saturation constants and maximal uptake rates of *P. pungens* on inorganic nitrogen and phosphorous

营养盐	$K_s(\mu\text{mol/L})$	$V_m[\times 10^{-13}\text{mol}/(\text{cell}\cdot\text{h})]$
$\text{NO}_3\text{-N}$	2.29 ± 0.73	7.28 ± 1.25
$\text{NH}_4\text{-N}$	2.18 ± 0.62	18.90 ± 2.46
$\text{PO}_4\text{-P}$	1.40 ± 0.48	1.48 ± 0.39

表2 氮限制和磷限制下尖刺拟菱形藻的 μ_m 和 q_0 值

Tab.2 μ_m and q_0 values of *P. pungens* under nitrogen or phosphorous limitation

限制因素	$\mu_m(\text{d}^{-1})$	$q_0(\times 10^{-13}\text{mol}/\text{cell})$
氮	1.45 ± 0.36	6.30 ± 0.88
磷	1.37 ± 0.27	0.69 ± 0.23

2.2 营养盐限制下尖刺拟菱形藻的增殖

稳定状态下的尖刺拟菱形藻的比生长率与细胞内限制性营养元素含量之间的关系符合 Droop 方程。经非线性回归求得的 μ_m 和 q_0 值列于表 2。

2.3 尖刺拟菱形藻对 $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NH}_4\text{-N}$ 和 $\text{PO}_4\text{-P}$ 的比最大吸收速率 V_m^{sp}

根据公式 $V_m^{\text{sp}} = V_m / q_0$ 计算得出该藻对 $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NH}_4\text{-N}$ 和 $\text{PO}_4\text{-P}$ 的比最大吸收速率分别为 28, 72 和 51d^{-1} 。

3 讨论与结语

Perry(1976)和 Suttle 等(1988)的研究表明,浮游植物对无机氮、磷的吸收过程可用米氏方程来描述,在本研究中,尖刺拟菱形藻对无机氮、磷的吸收动力学也符合米氏方程。

藻细胞所处的营养条件对其吸收营养盐的速率有一定的影响,一般地,处于某种营养盐限制下的藻类被移入该营养盐丰富的环境中,其吸收速率有明显的增加,限制的程度越大, V_m 的增加就越明显。由于藻类营养状况的差异,用处于不同营养状态的藻类进行的吸收动力学实验所测得的 V_m 值就可能不同,这不利于不同藻类吸收速率的比较。本研究所用的藻细胞均处于某种营养盐饥饿的状态,所得结果能较客观地反映尖刺拟菱形藻吸收营养盐的能力。

从生理学的角度看,氧化态的氮被藻类吸收后,要在还原酶的作用下被还原成氨态氮才能被利用,而这个过程要消耗能量,因此,利用还原态的氮对藻类来说更经济。本研究表明,虽然尖刺拟菱形藻对 $\text{NO}_3\text{-N}$ 和 $\text{NH}_4\text{-N}$ 的 K_s 值相差不大,但 V_m 值却相差较大,说明在介质中二者浓度相同的条件下,该藻有优先利用还原态 $\text{NH}_4\text{-N}$ 的趋势,这与 Eppley 等(1974)和 Cochlan 等(1991)的研究结果是一致的。

Droop(1968)在研究单鞭金藻(*Isochrysis lutheri*)在 VB_{12} 限制下的生长时发现,其比生长率与介质中 VB_{12} 的浓度无直接关系,而与藻细胞内 VB_{12} 含量有关,二者之间的关系可用一种双曲线函数来描述。Rhee(1972)发现栅藻(*Scenedesmus* sp.)在介质中的磷被耗尽后,其比生长率仍可维持在 1d^{-1} 以上,表明浮游藻类的比生长率与介质中的营养盐浓度并无直接关系,而可能与藻细胞内营养元素的含量有关。本研究的结果表明,尖刺拟菱形藻的比生长率与其细胞内限制性营养元素含量之间的关系也符合 Droop 方程。

由于不同的浮游藻类细胞大小相差很大,细胞内营养元素含量也有所不同,因此其对某种营养盐的最大吸收速率应在其细胞内该种营养元素含量的基础上加以比较。Eppley

等(1969)为此提出了比最大吸收速率(specific maximal uptake rate, 以 V_m^{sp} 表示)的概念: $V_m^{sp} = V_m / q_0$ 。已有的研究表明,浮游植物吸收 NO_3-N 的值在 $5-30d^{-1}$ 之间,吸收 PO_4-P 的值在 $50-200d^{-1}$ 之间 (Eppley et al., 1969; Eppley et al., 1974; DiToro, 1980; Gotham et al., 1981; Rhee, 1980; Rivkin et al., 1982)。本研究的结果,尖刺拟菱形藻对 NO_3-N , NH_4-N 和 PO_4-P 的比最大吸收速率分别为 28, 72 和 $51d^{-1}$ 。可见,该藻吸收无机氮的能力在浮游植物中是较强的,这可能使其在与其他种类竞争氮时处于有利的位置而成为优势种,乃至形成赤潮。而其吸收磷的能力则较弱,故磷有可能是自然环境中限制其增殖的营养因子。

参 考 文 献

- 张诚等, 1994, 海洋与湖沼, **25**(2): 216—218.
- Cochlan, W. P. et al., 1991, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **153**: 129—141.
- DiToro, D. M., 1980, *Ecol. Modelling*, **8**: 201—218.
- Droop, M. R., 1968, *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, **48**: 689—733.
- Eppley, R. W. et al., 1969, *J. Phycol.*, **5**: 375—379.
- Eppley, R. W. et al., 1974, *Limnol. Oceanogr.*, **14**: 912—920.
- Gotham, I. J., 1981, *J. Phycol.*, **17**: 309—314.
- Guillard, R. R. L. et al., 1962, *Can. J. Microbiol.*, **8**: 229—239.
- Hasle, G. R., 1972, *Nova Hedwigia (Beih.)*, **39**: 171—190.
- Parsons, T. R. et al., 1984, *A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis*, Pergamon Press (Oxford), pp.139—152.
- Perl, T. M. et al., 1990, *N. Engl. J. Med.*, **322**: 1775—1780.
- Perry, M. J., 1976, *Limnol. Oceanogr.*, **21**: 88—107.
- Rhee, G-Y., 1972, *Limnol. Oceanogr.*, **17**: 505—514.
- Rhee, G-Y., 1980, *Adv. Aquat. Microbiol.*, **2**: 155—204.
- Rivkin, R. B. et al., 1982, *J. Phycol.*, **18**: 113—120.
- Strickland, J. D. H. et al., 1972, *Bull. Fish. Aquat. Res. Board Can.*, **167**: 101—203.
- Suttle, C. A. et al., 1988, *J. Plankton Res.*, **10**: 133—149.
- Zou, J. Zh. et al., 1993, *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*, ed. by Smayda, T. et al., Elsevier (New York), pp. 651—656.

NUTRIENT UPTAKE KINETICS AND GROWTH UNDER NUTRIENT LIMITATION OF *PSEUDONITZSCHIA*

Zhang Cheng, Zou Jingzhong

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

Abstract *Pseudonitzschia pungens* was collected from the Jiaozhou Bay using a Shallow Water Type III plankton net (with mesh size of ca. $65\mu m$) in November

1991. A clonal culture was established using micro-pipette method, subsequently; this was applied in this study. This culture was grown in $f/2$ media at ca. 20°C with salinity of 32, light intensity of ca. 5000lx, and lightdark cycle of 14:10. Nitrogen-or phosphorous-starved cells of the species were obtained by growing the cells in $f/2$ media without addition of nitrogen or phosphorous until the ambient nitrogen or phosphorous had been depleted for 3 days. Such cells were used to study its uptake kinetics of $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NH}_4\text{-N}$ and $\text{PO}_4\text{-P}$. In the $\text{NO}_3\text{-N}$ uptake experiments, the concentrations of 1, 2, 4, 6, 8, and 10 $\mu\text{mol/L}$ were used. The same concentrations were adopted in the $\text{NH}_4\text{-N}$ uptake experiments. The concentrations used for the $\text{PO}_4\text{-P}$ uptake experiments were 0.5, 1, 2, 4, 6, and 8 $\mu\text{mol/L}$. The uptake rates were represented by the disappearing rates of the targeting nutrients. Semi-continuous culture mode was employed to examine the growth characteristics under the controlled nitrogen or phosphorous conditions. Five dilution rates were employed, ranging between 0.05, 0.10, 0.20, 0.30, and 0.40. The concentrations of the limiting nitrogen and phosphorous in these experiments were 5 and 2 $\mu\text{mol/L}$, respectively. The results show that in nutrient uptake experiments, the nutrient uptake rates (v) are constant within the experiment periods (0 to 60 min) and the nutrient uptake kinetics can be described by the Michaelis-Menton equation: $v = V_m \cdot s / (K_s + s)$. The half-saturation constants (K_s) for $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NH}_4\text{-N}$ and $\text{PO}_4\text{-P}$ are 2.29, 2.18, and 1.40 $\mu\text{mol/L}$, respectively. Under the experimental conditions, maximal uptake rates (V_m) for $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NH}_4\text{-N}$ and $\text{PO}_4\text{-P}$ are 7.28, 18.90, and 1.48×10^{-13} mol / (cell · h), respectively. In the semi-continuous culture experiments, the relationship between steady state specific growth rates (μ) and cell quotas of the limited nutrient elements (q) follows the Droop equation: $\mu = \mu_m(1 - q / q_0)$. Maximal growth rates μ_m and minimum cell quota q_0 associated with the limited nitrogen concentrations are 1.45d^{-1} and 6.30×10^{-13} mol / cell respectively; those associated with the limited phosphorous concentrations were 1.37d^{-1} and 0.69×10^{-13} mol / cell, respectively. On the basis of the results obtained from the nutrient uptake experiments and the nutrient limited growth experiments of *P. pungens*, the specific maximal uptake rates for $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NH}_4\text{-N}$ and $\text{PO}_4\text{-P}$ of this species are 28, 72, and 51d^{-1} respectively. Compared with the data of other phytoplanktonic species, *P. pungens* shows a high ability to uptake inorganic nitrogen, and a relatively low ability to uptake inorganic phosphorous. Therefore, phosphorous might be the controlling nutrient of this species in the natural environment.

Key words *Pseudonitzschia pungens* Nutrient uptake Kinetics Nutrient limitation growth