

影响三角褐指藻生长的生态因子间关系及其调节效应^{*}

林霞 朱艺峰 朱振斌 郭小强

(宁波大学生命科学与生物工程学院 宁波 315211)

提要 运用 $3 \times 3 \times 2$ 析因试验,研究 $\text{NO}_3^- \text{N}$ 质量浓度、光照强度和温度间的相互关系及其对三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)生长的调节效应。结果表明: $\text{NO}_3^- \text{N}$ 以抛物线方式控制藻的生长,光照强度主要影响藻的指数生长期,对稳态细胞密度影响减弱,温度升高有助于生长。当温度为 20°C , $\text{NO}_3^- \text{N}$ 质量浓度分别为 14.7 和 14.6 mg/L ,光照强度分别为 5364.0 和 4035.4 lx 时,藻相对生长率和细胞密度达到最大值,分别为 0.6515 d^{-1} 和 $1.0107 \times 10^4 / \text{mL}$ 。光肥效应、温肥效应和光温效应存在于藻类生长过程,并且起协调作用。增产效应随 $\text{NO}_3^- \text{N}$ 含量增加而减少,随光照强度和温度的升高而增加。

关键词 三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*),生长,生态因子,调节效应

中图分类号 Q948 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003)04-0076-06

在陆地植物研究中,定量研究或模拟养分与生态因子间的关系使养分得到充分利用已摆在显要位置^[1];而在海洋微藻有关营养盐研究中,以研究营养盐与其它生态因子间,尤其与光照、温度间的定性关系及其对生化成份的效应^[2~4],或研究微藻营养吸收动力学的模型^[5]为多;真正从提高营养盐利用效率的角度出发,研究这些生态因子间的量间关系及其对微藻生长的调控效应较少^[6,7]。考虑到微藻大面积培养的生产成本,较少技术革新可带来巨大节约^[8]。为此,本文通过三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)一次性培养试验,定量研究了不同 $\text{NO}_3^- \text{N}$ 质量浓度、光照强度和温度对三角褐指藻的生长及其相关效应,以期对藻类培养的节肥技术和自动化提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

非纯化单种培养三角褐指藻 ZS06 品系(三角褐指藻除菌前后的生长特点基本一致^[9])由宁波大学生命科学与生物工程学院水产系中心实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 因素水平设置 $\text{NO}_3^- \text{N}$ (X_1)、光照强度(X_2)、温度(X_3)3个因素采用 $3 \times 3 \times 2$ 析因试验^[4,10]。为检验该藻适宜生长条件下是否存在动态的施肥关系, $\text{NO}_3^- \text{N}$ 水平(称量换算值)分别设置为 $1, 10, 20 \text{ mg/L}$,光照强度分别为 $1500, 4100, 7400 \text{ lx} \pm 100 \text{ lx}$,温度分别为 $10, 20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ ^[2,4,6,11]。 $\text{NO}_3^- \text{N}$ 盐、光照强度、温度各水平分别简记为 $N_1, N_2, N_3, L_1, L_2, L_3, T_1, T_2$ 。

1.2.2 接种藻液预处理 三角褐指藻经预培养($\text{NO}_3^- \text{N} = 13.9 \text{ mg/L}$),处于指数生长期时进行离心。 5000 r/min , 5 min ,去除上清液,经 15 mg/L NaHCO_3 溶液洗涤,离心,并重复1次^[12]。加过滤煮沸的陈化海水(盐度 22.8 , $\text{pH} 8.18$, $\text{NO}_3^- \text{N} 0.037 \text{ mg/L}$)稳定培养3d,取上层藻液接种培养,接种时藻细胞密度为 $356.3 \times 10^4 / \text{mL}$ 。

^{*} 宁波市科委资助项目 01N40100-58 号、浙江省教委资助项目 20010233 号。

第一作者:林霞,出生于1968年,大学本科,讲师。E-mail: yfengz@mail.nbptt.zj.cn

收稿日期:2002-01-31;修回日期:2002-04-26

1.2.3 培养液配制 按实验设计的不同 NO_3^- -N 水平分别配制培养液,培养液其它成份含量按 f/2 培养基(不加生物素),含量相同。

1.2.4 接种培养 在 300 mL 三角烧瓶中,先加入不同处理要求的 NO_3^- -N 培养液,再加入预处理的接种藻液,最终培养体积为 250 mL,每处理设置 3 个重复。日光灯光源,光暗周期 L:D=12h:12 h,光照期间每日随机调换三角瓶并摇动 2~3 次。一次性培养,初始培养密度 $17.1 \times 10^4/\text{mL}$ 。

1.2.5 细胞计数 藻吸光度值(A)测定、藻细胞密度(γ)换算公式的拟合按先前工作^[6]进行。换算公式为: $Y = 1736.4 A^{1.041}$ ($R^2 = 0.998$, $P < 0.01$, $n = 20$)。

1.2.6 考察指标 指数生长期考虑生长率,稳定期考虑藻类最终细胞密度^[3]。相对生长率 K (Y')计算公式为: $K = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{t \ln 2}$,式中 N_t 为第 t 天的细胞密度, N_0 为初始细胞密度;以连续几天日平均生长率 > 0.5 作为判定处于指数生长期的指标值^[3],并以最后一个处理组指数生长期结束的天数(8 d)作为生长率数据处理时的结束日期;当其中一处理组连续 3 d 细胞密度增长 $\leq 5\%$ ^[12]时,认为达到

稳定期,实验结束(15 d),实验共进行 19 d。

1.3 数据处理

统计分析在 SAS 软件包(Ver. 6.12)下进行^[13]。方差分析采用 PROC ANOVA 过程;每处理不同水平均值比较按 SNK(Student-Newman-Kuels)测试。回归分析先按方差分析结果的显著性以确定回归变量^[1],再进行 PROC GLM 趋势面分析^[14];回归方程寻优计算经自编程序运算。

2 结果与讨论

2.1 对生长的影响

方差分析结果显示, NO_3^- -N 质量浓度、光照强度、温度、温度 $\times$ NO_3^- -N、温度 $\times$ 光照强度对生长率和藻细胞密度有极显著或显著影响($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),光照强度 $\times$ 温度 $\times$ NO_3^- -N 无明显差异($P > 0.05$)。光照强度 $\times$ NO_3^- -N 对生长率有极显著影响($P < 0.01$),对最终藻细胞密度无明显差异($P > 0.05$)。在三角褐指藻整个生长过程,除光照强度对稳定期细胞密度的影响以 L_2 水平最佳外,其它不同处理对生长率或细胞密度的影响趋于一致。见表 1。

表 1 各因素不同处理的均值比较

Tab.1 Multiple mean comparisons of different treatments of different factors

生长阶段	N_1 (mg/L)	N_2 (mg/L)	N_3 (mg/L)	L_1 (lx)	L_2 (lx)	L_3 (lx)	T_1 ($^{\circ}\text{C}$)	T_2 ($^{\circ}\text{C}$)
指数生长期	0.3324 ± 0.0086^a	0.5471 ± 0.0164^b	0.5443 ± 0.0158^b	0.4047 ± 0.0207^a	0.5066 ± 0.0276^b	0.5126 ± 0.0274^b	0.4595 ± 0.0208^a	0.4897 ± 0.0242^b
稳定期	166.5 ± 3.8^a	781.4 ± 26.8^b	765.8 ± 25.7^b	552.9 ± 71.9^a	598.5 ± 78.3^b	562.4 ± 67.0^a	515.7 ± 49.7^a	626.8 ± 64.8^b

注:1. 指数生长期的数值(平均值 $\pm$ 标准误差)为相对生长率(d^{-1});稳定期为细胞密度($10^4/\text{mL}$)。2. 同一因素组不同上标 a, b 代表差异显著($P < 0.05$)。

2.2 效应方程

按方差分析结果,选择有显著影响的因素作为回归变量,并考虑因素间高阶交互作用,分别对相对生长率(Y')(8 d)和稳定期细胞密度(Y)(15 d)进行回归,经 GLM 过程 1 至 4 阶趋势面分析,筛选出 3 阶方程为最优回归方程,得方程(1),(2)。

$$Y' = 0.2699 + 1.6443 \times 10^{-2} X_1 - 5.9809 \times 10^{-4} X_1^2 - 3.4530 \times 10^{-7} X_2 + 1.1000 \times 10^{-9} X_2^2 - 5.4941 \times 10^{-3} X_3 + 3.5161 \times 10^{-6} X_2 X_3 + 3.4526$$

$$\times 10^{-6} X_1 X_2 - 2.0000 \times 10^{-10} X_1 X_2^2 - 6.9200 \times 10^{-8} X_1^2 X_2 - 4.0000 \times 10^{-10} X_2^2 X_3 + 6.8454 \times 10^{-4} X_1 X_3 - 2.4633 \times 10^{-5} X_1^2 X_3, R^2 = 0.9725, P < 0.01, n = 54$$

$$Y = 247.0537 + 58.5653 X_1 - 1.8113 X_1^2 - 0.1116 X_2 + 1.3800 \times 10^{-5} X_2^2 - 17.5296 X_3 + 3.3500 X_1 X_3 + 1.0503 \times 10^{-2} X_2 X_3 - 0.1247 X_1^2 X_3 - 1.3000 \times 10^{-6} X_2^2 X_3, R^2 = 0.9749, P < 0.01, n = 54$$

Camacho 等^[7]用 2 mmol NaNO₃ 对扁藻 (*Tetraselmis* sp.) 进行户外的连续培养,证明了生产率 (g/h) 与稀释率 (相当于改变 NO₃-N 质量浓度) 存在抛物线关系。但在微藻一次性培养过程中,很少根据不同的光照强度或温度施用不同质量浓度的 NO₃-N,本方程显示,NO₃-N 质量浓度、光照强度和温度对三角褐指藻生长存在动态调节关系。

寻优结果见表 2。为分析各因素或因素间的相互关系对生长率和细胞密度的影响,以寻优值回代方程(1)和(2),可分别获得单因素或双因素在最佳条件下的调控效应方程。

表 2 方程寻优结果

方程	X ₁ (mg/L)	X ₂ (lx)	X ₃ (°C)	Y' (d ⁻¹)	Y (10 ⁴ /mL)
(1)	14.7	5 364.0	20	0.651 5	-
(2)	14.6	4 035.4	20	-	1 010.7

2.3 因素与调控效应

2.3.1 单因素效应 根据图 1a,1b 及方差分析结果,NO₃-N 质量浓度对生长率和细胞密度影响起主导作用(第 1 主效应, $F = 634.1$ 和 910.3 ,效应差分别为 $0.231 7 \text{ d}^{-1}$ 和 $667.9 \times 10^4/\text{mL}$), NO₃-N

增加,生长率和细胞密度以抛物线方式迅速增加,分别以寻优值时出现拐点,拐点 NO₃-N 质量浓度值几乎相同(表 2)。说明 NO₃-N 质量浓度在 14.7 mg/L 时,三角褐指藻可获得最好生长。这与未去除残余营养下的先前实验结果有所偏差^[6],说明残余营养盐是导致实验结果不同的一个主要因子,残余营养盐含量不同,NO₃-N 施肥量不同。因此,研究培养液中残余营养盐含量与施肥量间的动态关系,对节肥技术有着重要的意义。

光照强度和温度对藻不同生长阶段的效应不同。对生长率,光照强度效应 ($F = 153.9$,效应差 = $0.107 4 \text{ d}^{-1}$) > 温度效应(图 1a, $F = 28.6$,效应差 = $0.066 0 \text{ d}^{-1}$),对细胞密度则相反(F 值分别为 4.29 和 68.6,效应差分别为 $59.5 \times 10^4/\text{mL}$ 和 $260.1 \times 10^4/\text{mL}$,图 1b)。随着温度上升,生长率和细胞密度也提高,这与 Hayward^[4]在 5~35 °C 下对 5 个不同品系三角褐指藻的研究结果较为吻合。光照强度影响藻类的光合作用,李文权等^[2]报道了光照强度与光合作用速率的相关变化,当 < 5 800 lx 时,光合作用速率随着光照强度的增加而增加,尽管最大光合作用速率位于 15 000 lx,但 > 5 800 lx 时,光合作用速率呈波动态势,这与对生长率的影响结果较相近(图 1a)。随着稳定态的出现,光照强度对细胞密度影响

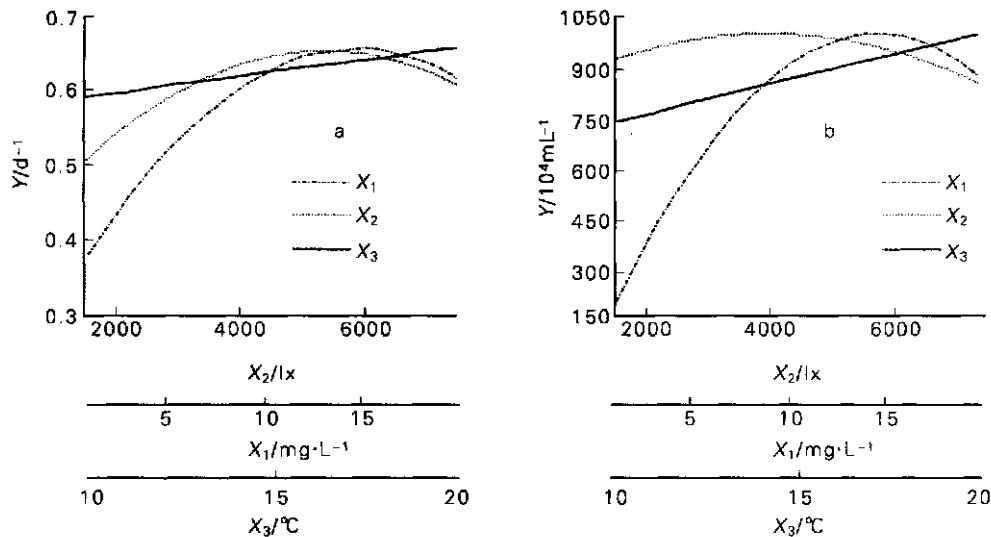


图 1 不同因素对藻生长的效应

Fig.1 Effects of different factors on the alga growth

不大,说明细胞密度达到一定值时,光的穿透力变弱,使光照强度对细胞密度的效应变小(图1b)。

2.3.2 双因素效应 光肥效应:方差分析证实,光肥效应出现于指数生长期。方程的等高线图(表达为等生长率或等细胞密度)显示,除最佳生长率外,获得特定生长率值并不唯一,这说明光照强度和 $\text{NO}_3^- \text{N}$ 质量浓度对藻生长率具有相互调节的作用。当 $\text{NO}_3^- \text{N}$ 质量浓度最低时,即使光照强度最强,其生长率也较低;反之,当光照强度最低时,随

$\text{NO}_3^- \text{N}$ 质量浓度增加生长率虽有明显增加,但仍不能获得最大的生长率;只有当 $\text{NO}_3^- \text{N}$ 含量增加,光照强度也增强时,才可能获得最大值,见图2a。光肥效应说明光照强度与肥料($\text{NO}_3^- \text{N}$)对生长起相互调节作用,但光照不足时,无法用施肥来弥补,反之亦然。即施肥所起的作用,只能是调节在既定的光照条件下的光与肥的平衡状态^[1]。

温肥效应:温肥效应对生长率和细胞密度的影响较一致,在较低的 $\text{NO}_3^- \text{N}$ 质量浓度下,温度效应

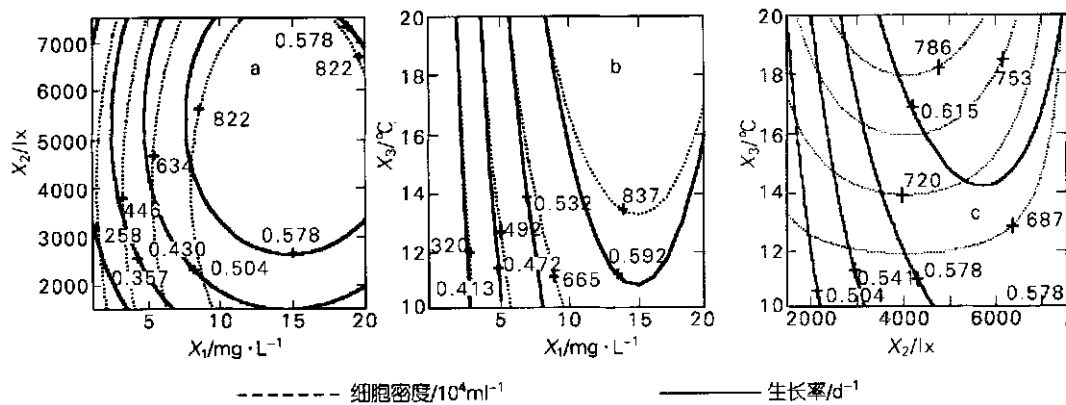


图2 双因素效应等高线

Fig.2 Contours of two factor's effects

较小,随着 $\text{NO}_3^- \text{N}$ 质量浓度的增加,温度影响渐渐加大。当 $\text{NO}_3^- \text{N} < \text{寻优值}$ 时,升高温度可减少 $\text{NO}_3^- \text{N}$ 的使用量;当 $\text{NO}_3^- \text{N} > \text{寻优值}$ 时,要获得特定的生长率或细胞浓度,应升高温度,否则 $\text{NO}_3^- \text{N}$ 效应降低(图2b)。

光温效应:在光温效应中,光照强度主要影响生长率,温度主要影响细胞密度(图2c)。对特定的生长率或细胞浓度,随着温度的升高,光照强度范围变窄。这预示了在藻类培养过程中,存在低温可承受强光,而提高温度应降低光照强度的趋势。有关光温效应研究较少,温度主要影响藻类光合作用的酶促反应,当温度 20.5°C 时可获得最大同化系数^[2,15]。

2.3.3 $\text{NO}_3^- \text{N}$ 的增产效应 以(稳定态细胞浓度 - 初始细胞浓度)/ $\text{NO}_3^- \text{N}$ 质量浓度作为 $\text{NO}_3^- \text{N}$

增产效应指标,探讨 $\text{NO}_3^- \text{N}$ 质量浓度、光照强度和温度变化对 $\text{NO}_3^- \text{N}$ 利用率的影响。显然, $\text{NO}_3^- \text{N}$ 质量浓度增加, $\text{NO}_3^- \text{N}$ 利用率迅速下降(效应差= $156.1 \times 10^4 / \text{mg}$);当光照强度增强、温度升高时, $\text{NO}_3^- \text{N}$ 利用率增加,但温度对 $\text{NO}_3^- \text{N}$ 利用率的影响(效应差= $19.8 \times 10^4 / \text{mg}$)幅度明显低于光照强度的影响(效应差= $66.5 \times 10^4 / \text{mg}$),见图3。

光照强度与温度对 $\text{NO}_3^- \text{N}$ 的增产效应与营养盐的吸收有较大关系,已有研究显示,温度、光照强度降低时对硅藻营养盐(磷酸盐)的吸收速率也变小^[5]。同时值得注意的是,增产效应随 $\text{NO}_3^- \text{N}$ 增加而减少,这预示了增产效应与藻类的最佳生长的 $\text{NO}_3^- \text{N}$ 需要存在消长的关系,对两者间的平衡及优化尚有待于进一步研究。

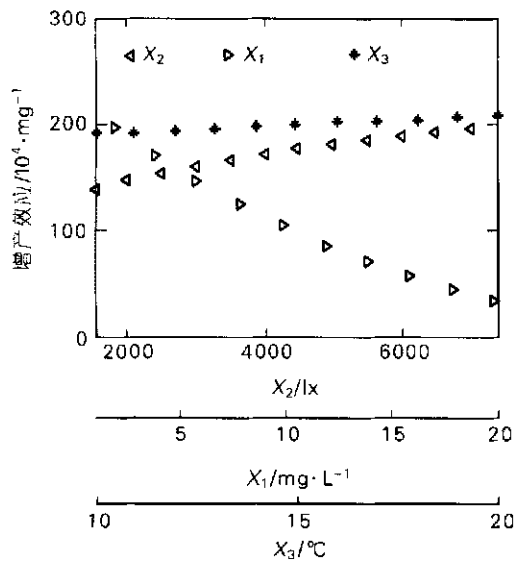


图3 不同因素增产效应

Fig.3 Effect of different factor on increasing production

3 小结

3.1 $\text{NO}_3\text{-N}$ 质量浓度、光照强度和温度对三角褐指藻的生长存在动态的调节效应。 $\text{NO}_3\text{-N}$ 为第1主效应,当质量浓度为 14.7 mg/L 时,三角褐指藻可获得最好生长。光照强度和温度对藻不同生长阶段的效应不同,光照强度主要影响藻的指数生长期,对稳定态细胞密度影响减弱,而温度调节效应相反。

3.2 温度为 20°C , $\text{NO}_3\text{-N}$ 质量浓度分别为 14.7 和 14.6 mg/L ,光照强度分别为 5364.0 和 4035.4 lx 时,藻相对生长率和细胞密度达到最大值,分别为 0.6515 d^{-1} 和 $1010.7 \times 10^4/\text{mL}$ 。

3.3 光肥效应、温肥效应和光温效应在藻类生长中起协调作用。光肥效应出现于指数生长期。温肥效应随 $\text{NO}_3\text{-N}$ 质量浓度增加时,温度影响逐渐加大。在光温效应中,光照强度主要影响生长率,温度主要影响细胞密度。

3.4 增产效应随 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量增加而减少,随光照强度和温度的升高而增加。增产效应与藻类的最佳生长的 $\text{NO}_3\text{-N}$ 质量浓度存在消长的关系。

参考文献

- 1 曾希柏,侯光炯,青长乐,等.土壤-植物系统中光照与氮素的相互关系研究.生态学报,2000,20(1):103-108
- 2 李文权,黄贤芒,陈消化,等.4种海洋单胞藻生化组成的环境因子效应研究.海洋学报,1999,21(3):59-65
- 3 Fabregas J, Herrero C, Cabezas B, et al. Mass culture and biochemical variability of the marine microalga *Tetraselmis suecica* Kylin (Butch) with high nutrient concentrations. Aquaculture, 1985, 49:231-244
- 4 Hayward J. Studies on the growth of *Phaeodactylum tri-cornutum*. IV. Comparison of different isolates. J Mar Biol Assoc UK, 1968, 48:657-666
- 5 李铁,史致丽,仇赤斌,等.中肋骨条藻和新月菱形藻对营养盐的吸收速率及环境因素影响的研究.海洋与湖沼,1999,30(6):640-645
- 6 朱艺峰,郭小强.不同氮磷硅含量和接种密度对三角褐指藻生长的影响.中国水产科学,2000,7(4):47-51
- 7 Camacho F, Molina E, Martinez M E, et al. Continuous culture of the marine microalga *Tetraselmis* sp.——Productivity analysis. Aquaculture, 1990, 90:75-84
- 8 Phatarpekar P V, Sreepada R A, Pednekar C, et al. A comparative study on growth performance and biochemical composition of mixed culture of *Isochrysis galbana* and *Chaetoceros calcitrans* with monocultures. Aquaculture, 2000, 18:141-155
- 9 林伟,陈驷,刘秀云.海洋微藻除菌及除菌与自然带菌微藻生长特点的比较.海洋与湖沼,2000,31(6):647-652
- 10 Snedecor G W, Cochran W G. Statistical Methods. Iowa: Iowa State University Press, 1980. 299-333
- 11 朱明远,牟学延,李瑞香,等.铁对三角褐指藻生长、光合作用及生化组成的影响.海洋学报,2000,22(1):110-116
- 12 陈德辉,刘永定,袁峻峰,等.微囊藻和栅藻共培养实验及其竞争参数的计算.生态学报,1999,19(6):908-913
- 13 彭昭英.世界统计与分析全才 SAS 系统应用开发指南(上,下册).北京:希望电子出版社,2000. 6-12, 464-479
- 14 洪南,侯军. SAS for Windows 统计分析系统教程.北京:电子工业出版社,2001.193-202
- 15 王宪,李文权,林国兴.三角褐指藻对光适应过程的研究.海洋环境科学,1992,11(6):52-55

INTERRELATIONS OF ECOLOGICAL FACTORS AND THEIR REGULATING EFFECTS ON GROWTH OF *Phaeodactylum tricornutum*

LIN Xia ZHU Yi-Feng ZHU Zhen-Bin GUO Xiao-Qiang

(Faculty of Life Science and Biotechnology , Ningbo University , Ningbo , 315211)

Received : Jan . , 31 , 2002

Key Words : *Phaeodactylum tricornutum* , Growth , Ecological factor , Regulation Effect

Abstract

Factorial experiment ($3 \times 3 \times 2$) was performed to examine the interrelations of nitrate , light intensity , temperature , and their regulating effects on growth of *Phaeodactylum tricornutum* . The results indicated that concentration of nitrate predominated by mode of parabola for alga growth , and the influence of light intensity mainly occurred in logarithmic phase and was greater than in stationary phase , meanwhile , raising temperature improved the alga growth . The optimum growth rate of 0.6515 d^{-1} and top maximum density of $1.0107 \times 10^4 / \text{mL}$ were theoretically obtained while in the temperature of 20°C , the concentrations of 14.7 and 14.6 mg/L , the light intensities of 5364.0 and 4035.41 lx were given , respectively . The light intensity , nitrate and temperature kept effect on and cooperated in different growth stages of the alga . But the effects of increasing production demonstrated that the effect decreased corresponding to increasing concentration of nitrate , and increased while light intensity or temperature was promoted .