

# 不同氮源对微藻增殖的影响

张青田<sup>1,2</sup>, 董双林<sup>1</sup>, 胡桂坤<sup>2</sup>, 张兆琪<sup>1</sup>

(1. 中国海洋大学 水产学院, 山东 青岛 266003; 2. 天津科技大学 海洋学院, 天津 塘沽 300450)

**摘要:** 采用室内实验的方式研究了无机氮和有机氮对不同微藻增殖的影响情况。比较了不同氮源(氯化铵和尿素)对纤细角毛藻(*Chaetoceros gracilis*)、赤潮异弯藻(*Heterosigma akashiwo* Hada)、亚历山大藻(*Alexandrium* sp.)、隐藻(*Chroomonas salina* f. *adolenscens*) 4种海洋微藻生长的不同影响。结果表明,有机氮尿素对海洋微藻增殖的影响比无机氮的复杂。由微藻最适生长的氮、磷浓度得到 N:P 值,讨论了该值对微藻增殖的影响,以及影响 N:P 值的可能情形。

**关键词:** 氮;磷;微藻;增殖

中图分类号: Q948.885.3 ; Q178.1  
02-0008-04

文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2005)

许多学者对海洋微藻,尤其是对赤潮藻类的调查和研究表明,富营养化是引发微藻大量增殖的物质基础。微藻在其增殖过程中需要营养物质,其中最重要的是氮、磷类营养盐。目前,对无机氮和磷对海洋微藻的限制和刺激作用进行了大量研究,而有机氮对海洋微藻的作用研究较少。大量生活污水入海,以及池塘养殖中尿素的使用等现象的存在都迫切要求人们加强有机氮源对海洋微藻增殖情况的研究<sup>[1,2]</sup>。作者选取了在中国近海出现过的的 4 种微藻进行了一次性培养实验,研究了尿素对各微藻增殖的影响的同时,比较了氯化铵(无机氮)和尿素(有机氮)对微藻增殖影响的差异,并探讨了氮源等情况不同时对 N:P 值带来的可能影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 藻种

实验选用藻种为:纤细角毛藻(*Chaetoceros gracilis*)、赤潮异弯藻(*Heterosigma akashiwo* Hada)、亚历山大藻(*Alexandrium* sp.)、隐藻(*Chroomonas salina* f. *adolenscens*)。

### 1.2 微藻培养

藻种保存于 f/2 培养液中,硅藻另外添加适量硅酸钠;按照常规微藻培养方法管理。培养及实验用海水通过生物吸收等方法来降低海水中的 N、P 含量<sup>[3]</sup>。实验采用一次性培养方式,培养时间为 12~15 d。光照为 3000~3500 lx;光暗周期比为 14:10; pH 值为 7.8~8.2;水温 21~23℃;盐度值为 29~30。

### 1.3 实验设计及处理

实验分别选用氯化铵和尿素作为氮源,磷酸二氢钠作为磷源进行实验,每个因子各选用 5 个浓度水平,具体浓度数值参见表 1。考虑到分析 N、P 的交互作用,采用 L<sub>25</sub>(5<sup>6</sup>)正交设计表<sup>[4]</sup>。N 因素放在该表第 1 列,P 因素放在第 2 列。后面 4 列用于分析 N、P 的交互作用。

表 1 实验选用的 N、P 初始浓度(μmol/L)

Tab. 1 The initial concentrations of the nutrients of the culture experiments(μmol/L)

元素	因子水平				
	1	2	3	4	5
N	50	100	200	300	400
P	0.5	1	5	10	15

取对数生长期微藻适量扩种,不添加 N、P 营养盐,其余元素按照 f/2 培养液配方添加。培养 4d 后进行实验。按照 f/2 培养液配方添加除 N、P 外的元素,

收稿日期: 2003-05-29; 修回日期: 2003-10-12

基金项目: 国家重大基础研究规划项目(G1999012011)

作者简介: 张青田(1974-)男,硕士,现从事海洋生物方面的教学和研究工作, E-mail: hutiger@tjust.ac.cn

用微量移液枪添加 N、P 达到每个水平的要求浓度。每个实验处理重复 2 次。实验所用仪器按照常规方法消毒。

### 1.4 测试方法

用血球计数板在显微镜下目视计数。测定各微藻在 N、P 实验中的初始浓度见表 2。选取各微藻指数生长期末期的生长速率  $\mu$  进行方差分析,  $\mu$  的计算公式为:  $\mu = (\lg N_t - \lg N_0) / (t \cdot \lg 2)$ , 式中  $t$  为实验进行的天数,  $N_t$  为第  $t$  天的细胞数量(浓度),  $N_0$  为初始时微藻细胞数量( $t = 0$ )。

表 2 N、P 实验中各微藻的初始密度( $10^4$  个/mL)

Tab. 2 The initial densities of microalgae in experiments ( $10^4$  cell/mL)

实验项目	微藻种类			
	角毛藻	赤潮异弯藻	亚历山大藻	隐藻
氯化铵	4	0.95	1.4	4
尿素	7	1.16	1.56	5.5

表 3 指数期末期时各微藻的密度( $\times 10^4$  个/mL)

Tab. 3 The densities of microalgae in experiments near the end of exponential growth( $\times 10^4$  cell/mL)

藻类	氮浓度( $\mu\text{mol/L}$ )									
	氯化铵					尿素				
	50	100	200	300	400	50	100	200	300	400
纤细角毛藻	227.6	339.6	439	418.4	374.8	234.8	236.7	280.1	349.4	309.3
赤潮异弯藻	20.4	21.8	34.7	36.3	27.2	13.8	19.1	17.9	26.2	18.4
亚历山大藻	17.9	25.3	19.8	17.9	10.7	16.6	25.0	28.7	35.3	32.6
隐藻	23.6	34.0	55.6	55.5	42.7	42.1	63.7	107.2	111.2	131.2

注:表中氮浓度以 N 计。

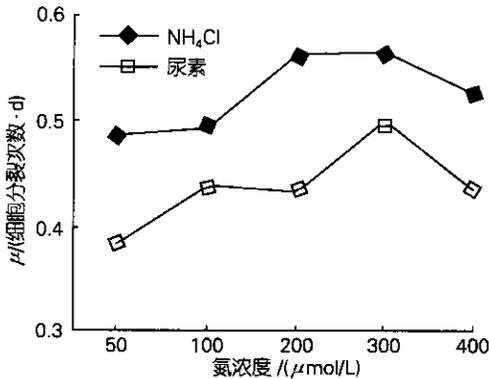


图 1 赤潮异弯藻试验结果比较

Fig. 1 The compare of effects of ammonium chloride and urea in *H. akashiwo* experiments

## 2 实验结果

### 2.1 微藻生长情况比较

各种实验微藻指数生长期末期时的藻细胞浓度见表 3。这时 4 种微藻的浓度值相差较大。并且浓度值和生长速率并非是完全一致的正比关系。如赤潮异弯藻与亚历山大藻的尿素实验,二者初始浓度相近,但生长速率大的赤潮异弯藻指数生长期末期的浓度反而较小。这可能是指数生长期长短有差异等原因造成的。指数生长期内的生长速率比较参见图 1~4。图中数据为各个实验相应处理的平均值。从图 1~4 可以看出,4 种微藻增殖情况随氯化铵浓度变化的趋势一致,开始均随氯化铵浓度的升高而生长速率  $\mu$  增大;增大到一定浓度时(约 200~300  $\mu\text{mol/L}$ ,以 N 计)出现峰值;然后随氯化铵浓度升高出现  $\mu$  减小的现象。其中,赤潮异弯藻在较低水平时  $\mu$  变化不明显。而尿素对  $\mu$  的作用则不一致。尿素对赤潮异弯藻、角毛藻生长速率影响的趋势和氯化铵的一致,只是赤潮异弯藻在稍高的水平 2、3 时的  $\mu$  变化不显著,比氯化铵

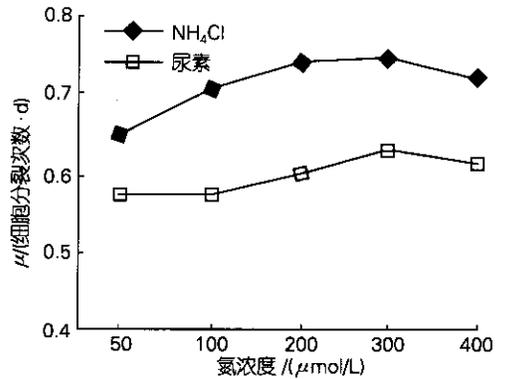


图 2 纤细角毛藻试验结果比较

Fig. 2 The compare of effects of ammonium chloride and urea in *C. gracilis* experiments

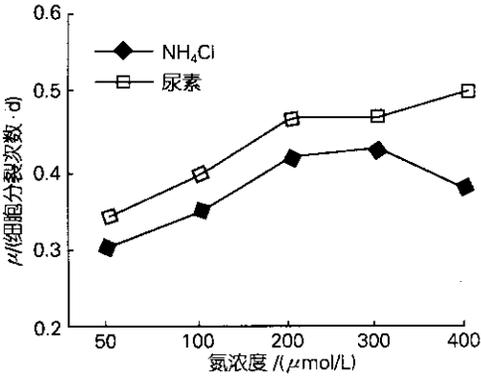


图3 隐藻试验结果比较

Fig. 3 The compare of effects of ammonium chloride and urea in *C. salina* experiments

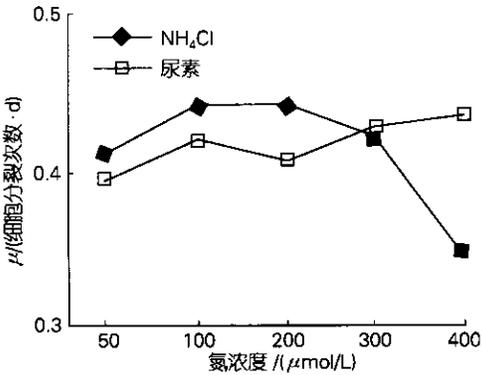


图4 亚历山大藻试验结果比较

Fig. 4 The compare of effects of NH<sub>4</sub>Cl and urea in *Alexandrium* experiments

的有升高。隐藻和亚历山大藻的生长速率  $\mu$  随尿素浓度升高而增大,但达到峰值后,  $\mu$  基本稳定,未出现氯化铵实验中的减小现象。尤其是隐藻实验中,尿素实验的  $\mu$  值比同浓度氯化铵的大,与其他微藻的情况相反。说明尿素对隐藻生长的影响大于同浓度的氯化铵。在对应实验中,磷的作用趋势图与氮实验的基本一致,但是两个实验中的最适磷值并不相同。

## 2.2 方差分析

选取各微藻指数生长期末期的生长速率  $\mu$  进行方差分析,氮、磷及二者的交互作用对微藻生长均表现出极显著的作用。氯化铵实验中,除了亚历山大藻外均表现出磷的限制作用强于氮;尿素实验中,角毛藻和隐藻表现了氮的限制作用强,另两藻表现相反。根据数理统计原理得到微藻生长的最适浓度值见表4。氯化铵和尿素实验中使用的磷在表4中分别简化

表4 几种微藻生长的最适 N、P 浓度

Tab. 4 The optimal concentrations of N and P for micro algae to grow

微藻	最适宜浓度(μmol/L)			
	氯化铵	磷 1	尿素	磷 2
赤潮异弯藻	300	10	300	10
角毛藻	200	5	300	5
亚历山大藻	100	10	300	10
隐藻	200	10	300	10

记录为磷 1 和磷 2。

## 3 讨论

### 3.1 氮、磷对微藻增殖的影响

微藻对不同形态的氮营养盐利用存在差异<sup>[5,6]</sup>。实验结果表明在相应的浓度水平下,3种海洋微藻在氯化铵环境中的增殖速率高于尿素中的,隐藻则例外,利用尿素比利用氯化铵作为氮源更有利于增殖。尿素对不同微藻生长影响的情况较无机氮的复杂。已经证实许多藻含有尿素酶,在它的催化下,尿素分解出氨被微藻利用<sup>[1]</sup>。可能是酶功能的差异造成了各种微藻利用氮(或磷)的能力差异。结果也支持了藻类对氮盐喜好和利用能力存在差异的观点<sup>[6,7]</sup>。本实验中,虽然两类实验中选用的无机磷相同,但是各自的最适浓度水平和产生的增殖效应并不完全相同。在相对应浓度水平下,氯化铵实验中磷的效应基本上是高于尿素实验中的。

### 3.2 氮、磷比值的探讨

实验结果的氮、磷比值差异较大。对同一种海洋微藻来说,氮营养盐的类型不同,氮、磷比值也可能不同。表5中列出了各实验中氮和磷的比值情况。

许多报道<sup>[1,8]</sup>表明 N:P 值与海洋微藻异常增殖密切相关,其比值是水体中植物受氮或磷限制的重要指标。Rhee 认为 N:P 低于 30 时受氮限制, N:P 大于 30 则为磷限制<sup>[9]</sup>;Darly 认为高 N:P 值(如 > 30)意味着磷限制,低 N:P 值(如 < 5),则表示氮限制。浮游

表5 实验中最适 N、P 比值

Tab. 5 The optimal concentration ratio of N to P

微藻	氮氮与磷比值	尿素与磷比值
赤潮异弯藻	30 : 1	30 : 1
隐藻	20 : 1	30 : 1
纤细角毛藻	40 : 1	60 : 1
亚历山大藻	10 : 1	30 : 1

植物同时消耗磷酸盐和硝酸盐。因此这两种营养盐的含量应以同样的方式变化,使海洋中 N:P 比值接近 16:1<sup>[10,11]</sup>。但是,对于表层水中 and 封闭水域等无此特点,比值变化很大<sup>[12]</sup>。方差分析结果显示,当 N:P 值较大(N:P > 20)时,无机磷对微藻增殖的影响强于氮,容易成为限制因素;当 N:P 值较小(N:P < 20)时,氮的影响强于无机磷。尿素和磷实验中 N:P 值均较大,在 20:1 之上,赤潮异弯藻和亚历山大藻表现为磷的作用强于氮,但角毛藻和隐藻的情况则正好反之。

这些变化可能是各种海洋微藻对不同氮的利用倾向和利用能力不同引起的。也就是说,微藻对各种氮的转化率不同,可能会影响到微藻吸收氮、磷时的比值。表 5 中的排列顺序可能就反映了各微藻对氮的利用能力强弱的情况,也表现出不同的比值。所以,讨论 N:P 值时应该考虑氮源的情况,而以往的研究往往忽略了这个问题。

实验表明,氮和磷存在明显的交互作用。在实验水平内选择最适值时不能单一选择,应该根据数理统计分析原理,由二者的组合中选取最适浓度水平。这样也造成了比值的差异,比较不同结果时应该引起注意。

参考文献:

- [1] 徐立,吴瑜端. 有机氮化合物对海洋、浮游植物的影响[J]. 厦门大学学报(自然科学版),1995,34(5): 824-828.
- [2] Christopher F. Ambutong K. Pautong, On the role of urea in the pond fertilization [J]. *Aquaculture*, 1993, 114: 273-283.

- [3] 李秀辰,张国琛,崔引安,等. 孔石莼对养鲍污水的静态净化研究[J]. 农业工程学报,1998,14(1):173-176.
- [4] 中国科学院数学研究所统计组编. 常用数理统计方法[M],第二版. 北京:科学出版社,1979. 附录.
- [5] 张诚,邹景忠. 尖刺拟菱形藻吸收动力学以及氮磷限制下的增殖特征[J]. 海洋与湖沼,1997,28(6):599-603.
- [6] Turner M F. Nutrition of some marine microalgae with special reference to vitamin requirements and utilization of nitrogen and carbon sources[J]. *J Mar Biol Ass UK*, 1979, 59:535-552.
- [7] Moncia B V, Darcy J L. *Aureococcus anophagefference*: Cause and ecological consequences of brown tides in U.S. mid-Atlantic coastal waters[J]. *Limnol Oceanogr*, 1997, 42(5): 1 023-1 038.
- [8] 唐森铭,庄栋法,林昱,等. 围隔生态系内富营养对水体营养盐结构的扰动[J]. 海洋学报,1993,15(2): 135-139.
- [9] Rhee G Y. Effects of N:P atomic ratios and nitrate limitation on algal growth, cell composition and nitrate uptake [J]. *Limnol Oceanogr*, 1978, 23:10-25.
- [10] Darley W M. Algal biology: A physiological approach [M]. Oxford London: Black-well Scientific Publications, 1982. 168.
- [11] Daniel R J. James Johnston Memorial Volume [M]. Liverpool, UK University of Liverpool press, 1934. 176-192.
- [12] 赖利,斯基罗. 化学海洋学(2)[M]. 第2版. 北京:海洋出版社,1982. 283-320.

## Effects of different nitrogen on growth of micro algae

ZHANG Qing-tian<sup>1,2</sup>, DONG Shuang-lin<sup>1</sup>, HU Gui-kun<sup>2</sup>, ZHANG Zhao-qi<sup>1</sup>

(1. Fisheries College of Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Ocean College of Tianjin University of Sci. & Tech., Tianjin 300450, China)

Received: May, 29, 2003

Key words: nitrogen; phosphate; micro algae; growth

**Abstract:** The effects of different nitrogen source, such as ammonium chloride and urea, were studied in this paper. Four micro algae, *Chaetoceros gracilis*, *Heterosigma akashiwo* Hada, *Alexandrium* sp., *Chroomonas salina* f. *adole-scens*, were selected for these experiments. The results showed that the effect of urea on micro algae growth was more complex than that of ammonium chloride. The effect of N:P ratio was also discussed in this paper, and some factors which may affect the ratio were also discussed.

(本文编辑:张培新)