

指导大水域施肥的生氧量生物 测验法的研究

李德尚 张美昭 赵曼华

(青岛海洋大学, 青岛)

许友山

(平度县水利局, 青岛)

提要 1985—1987年, 在平度县大泽山水库, 结合水库的施肥养鱼进行了测验水域的限制性营养元素和最适施肥浓度的生氧量生物测验法的研究。研究表明, 本方法在灵敏性和再现性方面都是令人满意的。与批次培养法进行的对照测验, 证明两种方法的效果基本相同。据此, 作者认为, 本法用于指导大水域的施肥实践是实用的和可靠的。针对本法一些技术环节所进行的研究, 证明在本水库的浮游植物密度(约为200—500万个/L)下, 向测验水样接种藻种并非必要, 而水样在原水域中的培养时间则以两天为宜。

增肥生物测验法是判断水域中的限制性营养元素和据以拟订合理施肥方案而广泛采用的方法。本类方法能直接查明当时水域中营养盐对浮游植物的供应情况, 包括各种营养元素的相对丰度和限制性营养元素的种类, 因而能指示最适的施肥种类和施肥标准。在这类方法中最常用的有 ^{14}C 示踪法、批次培养法和大塑料袋围隔法等几种。其中 ^{14}C 示踪法主要是观测增肥对于浮游植物(或接种藻种)光合作用的短期效应, 而其余诸法则则是观测增肥对于浮游植物(或接种藻类)生物量增长的长期效应。以往学者对几种长期的测验法较为推崇, 而对于短期的 ^{14}C 法则既有人持肯定态度^[5,7,8], 也有人持保留态度^[2,3,10]。

生氧量生物测验法所依据的原理与短期 ^{14}C 法相同, 都是观测增肥对光合作用的短期效应, 其差别仅在于前者以生氧量为标志, 而 ^{14}C 法则以碳同化量为标志。第一种方法以往采用的人很少, 但它在很多方面具有明显的优点, 有潜在的实用价值。为了寻求一种指导大水域施肥的简便而实用的科学方法, 1985—1987年期间, 我们在平度大泽山水库, 作为水库施肥养鱼研究¹⁾的一部分, 对本法进行了较为系统的研究。研究内容包括对本法实用性的验证、对照以及对一些技术环节的探究。

一、材料与方 法

1. 试验水库概况

大泽山水库为一中型丘陵水库, 总库容为1063万立方米, 兴利库容为595万立方米,

收稿日期: 1988年1月6日。

1) 该研究为国家水利电力部的资助项目。

兴利库容时的面积为 2000 亩。养鱼面积为 1125 亩,养鱼水面下的最大水深为 6.6m,平均水深为 2.8m。库形较整齐,无分枝。库区的年降水量约 700mm,近十年的库水平均交换率约为每年 10 次。水库集水区多为果园及农田,因此水质较肥沃。生长季中,硬度为 6.4—7.5 德国度, pH 值为 7.9—8.9,透明度为 40—80cm。

2. 接种的藻种和增肥用的营养盐

藻种为中国科学院水生生物研究所供应的斜生栅列藻 (*Scenedesmus obliquus*) 水生-8。接种前以试验用水洗净原培养液,并在试验用水中暂养 24h。

营养盐皆用分析级的产品: 磷用磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 氮用氯化铵 (NH_4Cl), 钾用硫酸钾 (K_2SO_4)。使用前先用蒸馏水配成浓度较高的母液,使用时再以培养用水稀释为适宜浓度。试验所用浓度 (mg/L) 一般为: $\text{N} = 1.0$, $\text{P} = 0.1$, $\text{K} = 0.1$, 特殊试验者另加注明。

3. 生氧量生物测验法

于水库中心区用采水器采 0.5—1.0m 深水层的水样,用 20 号浮游生物网过滤于一大型容器中。按试验组数(包括对照组)和每组各三个重复,用虹吸法将水样分别装于容量为 500ml 的白色细口瓶中。按设计所规定的成分和浓度,分别加入应加的营养盐母液,有些试验瓶还接种了藻种(一般为 300 万个/L),将瓶盖盖紧固定,而后成单列,各瓶以等距离、等深度悬挂于水库中心区水面下透明度的 1/2 处。在采水、过滤和装瓶、挂瓶中都要避免直射的阳光。

在水库中放置培养的时间一般为 48h,特殊试验例外。取上述的试验瓶立即按碘量测氧法的规定,整瓶加以“固定”,而后带回实验室测定溶氧量。将每组测定结果加以平均(有时将三个重复中差别突出的一个舍去),然后将各试验组分别与对照组加以比较,差别显著者 ($t > t_{0.01}$) 表明所加营养元素(或其配合)有限制作用。

4. 批次培养生物测验法

采样和水样的处理同生氧量法,但水样是带回实验室进行预处理的。另外,当水质显著浑浊时,要先静置沉淀一段时间(最长 12h)再行装瓶。培养容器为 500ml 的锥形瓶,每瓶装水 300ml,一般也设三个重复,装水后各瓶分别加入按试验设计应加的营养盐母液,摇匀,各接种入等量的藻种,浓度为 6000 万个/L。锥形瓶瓶口以单层滤纸覆盖扎紧。

装好的锥形瓶随机排列于培养架上进行培养。培养的光源为日光灯管,照度为 5000—7000lx,培养温度为室内自然温度。培养时间为 8 天。培养期间每天人工摇动各培养瓶 4—6 次。培养中每两天用分光光度计测各瓶培养液的光密度一次,以光密度表示藻细胞的密度。测得数据的处理同生氧量法。

二、结 果

(一) 对本方法实用性的研究

1. 灵敏性

(1) 用于限制性营养盐的测验 配合施肥进行过多次这类测验,结果都很令人满意,举最有代表性的两例说明之。

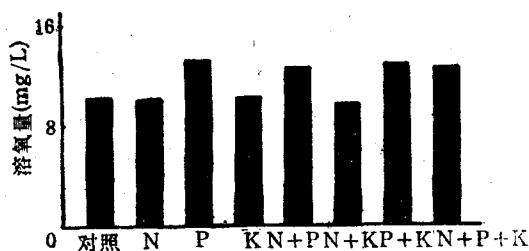


图1 1985年8月31日—9月2日对大泽山水库限制性营养元素的测验

Fig. 1 Limiting nutrients in Dazeshan Reservoir, Aug. 31—Sep. 2, 1985

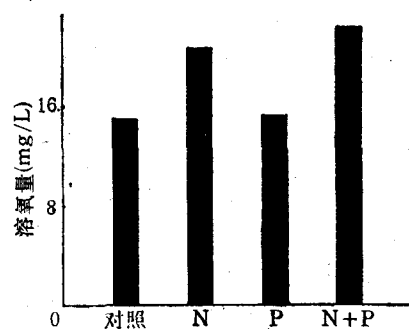


图2 1987年7月2—4日对大泽山水库限制性营养元素的测定

Fig. 2 Limiting nutrients in Dazeshan Reservoir, July 2—4, 1987

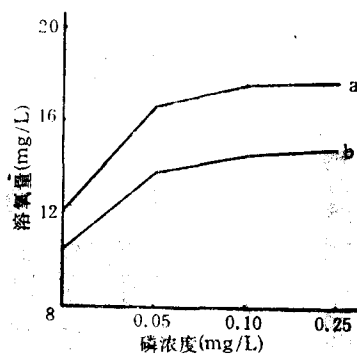


图3 1986年8月25—27日对大泽山水库中磷最适施肥浓度的测验

Fig. 3 Optimum dosage of P for fertilization in Dazeshan Reservoir, Aug. 25—27, 1986

a. 加 N 1.00mg/L; b. 不加 N。

1985年8月31日—9月2日的一次(图1)。当时水库的水温为22—25℃, 溶解无机磷为0.025mg/L, 溶解无机氮为3.01mg/L(台风暴雨后的峰值)。测验结果表明, 加N, K和N+K的三组与对照组差别不显著; 而加P, N+P, P+K和N+P+K的四组与对照组差别极显著。另外, 在与对照组差别极显著的四组之间, 互相差别不显著。这清楚地说明, 当时P是水库的限制因素, 而N和K都不是。

1987年7月2—4日的一次(图2)。当时水库水温为25.5—27.0℃, 溶解无机磷为0.0045mg/L, 溶解无机氮为0.176mg/L。测验结果表明, N和P+N两组与对照组差别极显著; 而P组与对照组差别不显著。另外N组与N+P组之间差别也显著。这明确地指示出当时N是水库的第一限制因素, 而P则是第二限制因素(即在加N=1.00mg/L的情况下, P也起限制作用)。

(2) 用于查明最适施肥浓度 这类测验也进行过多次, 同样得到了满意的结果。以1986年8月25—27日的一次作为实例(图3)。当时水库水温为26.0—26.5℃, 溶解无机磷为0.027mg/L, 溶解无机氮为1.00mg/L。测验结果表明, 两个系列的加P各组与对照组差别都极显著。这说明当时P是限制元素。加P的最适浓度: 加N的系列为

0.10mg/L (该组与 0.05mg/L 组差别显著,而与 0.25mg/L 组差别不显著);不加 N 系列亦为 0.10mg/L,但该组的生氧量与 0.05mg/L 组的差额远小于加 N 系列。结论应是,在加 N(1.0mg/L)的情况下,应加 P 0.10mg/L;而在不加 N 的情况下,则以加 P 0.05mg/L 为宜(就经济效益而论)。

2. 再现性

多次专门试验都证明,本测验法的所得结果,在时间相近的各次测验之间有很强的再现性,以 1987 年 5 月 3—5 日与 5 月 19—21 日的两次测验为实例说明(图 4)。该两次测验的目的都是查明当时的限制性营养元素。两次测验结果都是 N 为第一限制元素, P 为第二限制元素,趋势和比例都十分一致。

3. 与批次培养法的比较

1985 年 8 月 31 日—9 月 13 日,以测验常量限制元素为内容,进行了一次比较(图 5)。两种方法使用大致同时(前后差两天)采得的水样和同一个实施方案,测验结果完全一致:加 P 的几组与对照组差别明显;不加 P 的几组差别不明显;加 P 的各组之间和不加 P 的各组之间差别都不明显。以上均明确表示, P 是唯一的限制性常量元素,证明两种方法同样有效。

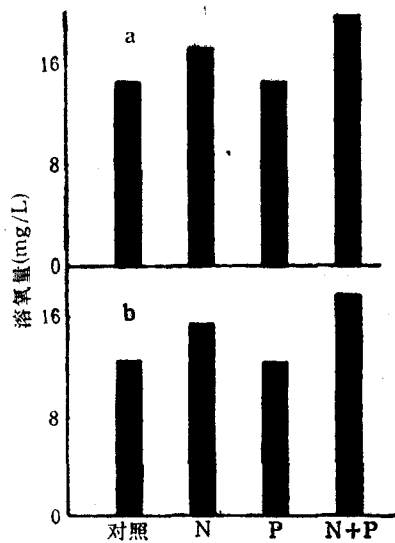


图 4 1987 年 5 月 3—5 日 (a) 与 5 月 19—21 日 (b) 对大泽山水库两次限制性营养盐测定结果的比较

Fig. 4 Comparison of limiting nutrients in Dazeshan Reservoir, conducted in May 3—5 (a) and 19—21 (b), 1987

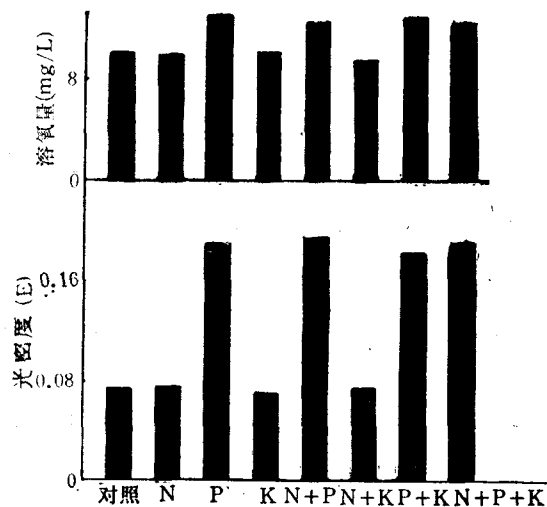


图 5 1985 年 8 月 31 日—9 月 13 日以生氧量法 (a) 和批次培养法 (b) 对大泽山水库限制性营养元素的测验结果

Fig. 5 Limiting nutrients in Dazeshan Reservoir, Aug. 31—Sep. 13, 1985 (a. oxygen evolution method, b. batch culture method)

(二) 对方法的一些技术环节的研究

1. 接种藻种的作用

(1) 接种浓度的影响 1985 年 8 月 31 日—9 月 2 日,用藻种接种浓度不同的两个

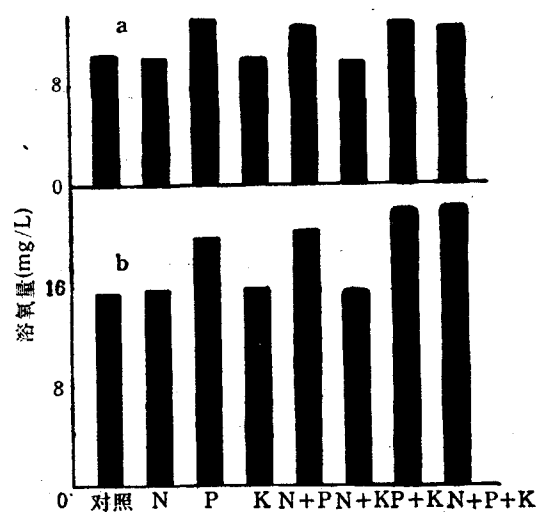


图6 1985年8月31日—9月2日对大泽山水库限制性营养元素的测定——两种藻种接种浓度(a为300万个/L, b为5000万个/L)的比较

Fig. 6 Limiting nutrients in Dazeshan Reservoir, Aug. 31—Sep. 2, 1985 (Inoculation densities: a. 3×10^6 /L, b. 50×10^6 /L)

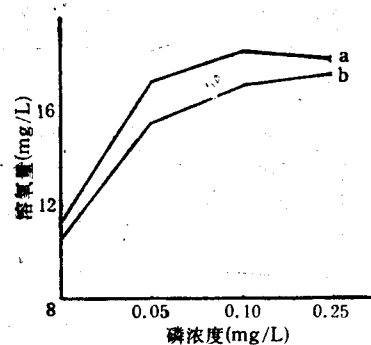


图7 1986年8月4—6日对大泽山水库磷最适施肥浓度的测验——接种(a)和不接种(b)藻种的比较

Fig. 7 Optimum dosage of P for fertilization in Dazeshan Reservoir, Aug. 4—6, 1986 (a. inoculated, b. without inoculation)

系列, 测验了水库当时的限制性常量元素。藻种接种浓度一为常量, 300 万个/L; 一为高量, 5000 万个/L。当时水库中浮游植物的密度为 189 万个/L, 生物量为 1.0mg/L。两种方法测验的结果基本一致(图6): 加P的几组与对照组差别明显; 不加P的几组差别不明显; 加P的各组之间和不加P的各组之间差别都不明显。但是, 高浓度系列中加P诸组与不加P诸组之间的差别比低浓度系列中的要更显著些。

(2) 不接种的试验 1986年8月4—6日, 用接种(300万个/L)和不接种藻种的两个系列测验了施磷肥的适宜浓度。当时水库中浮游植物的密度为 650 万个/L, 生物量为 6.5mg/L。测验结果(图7)表明, 两个系列的生氧量都是 0.1 组 > 0.05 组 > 对照组, 并且差别显著, 但 0.1 组与 0.25 组的差别都不显著。这就是说, 在当时浮游植物的丰度下, 接种藻种与否对测验结果基本无影响。在此后的工作中我们不再接种藻种, 正如前面的实例所证明, 结果在灵敏性和再现性等方面都很理想。

2. 培养时间长短的影响

从应用的需要出发, 我们只比较了培养(挂瓶)一天和两天对测验结果的影响。

1985年8月31日—9月2日, 在测验限制性常量营养元素中进行了比较(图8)。当时水库中的平均水温为 25℃, 培养一天与两天的两个系列使用同一份水样并遵照同一个方案, 结果表明, 培养一天的系列只显示出一个与培养两天的系列大致相同的趋势, 并不能提供与两天系列相同的确切(统计学上有意义的)判断。

1986年8月4—6日, 在测验磷肥最适施肥浓度中又进行了一次比较(图9)。当时水库中的平均水温为 27℃。结果同样表明, 培养一天的系列只显示出与培养两天的系列有大致相同的趋势, 也不能提供与两天系列相同的明确判断, 它只在对照组与 0.05 组之间

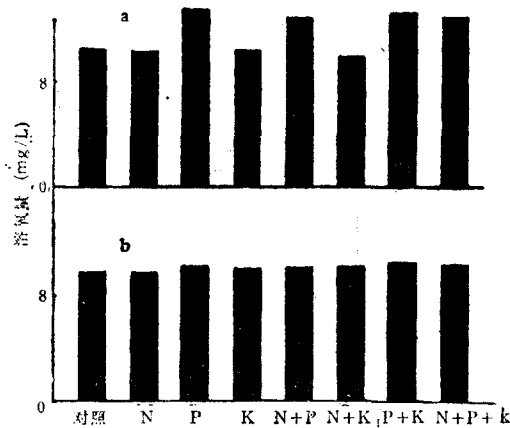


图8 1985年8月31日—9月2日对大泽山水库限制性营养元素的测定——培养一天(b)与培养两天(a)的比较

Fig. 8 Limiting nutrients in Dazeshan Reservoir, Aug. 31—Sep. 2, 1985 (a. inoculation for two days, b. inoculation for one day)

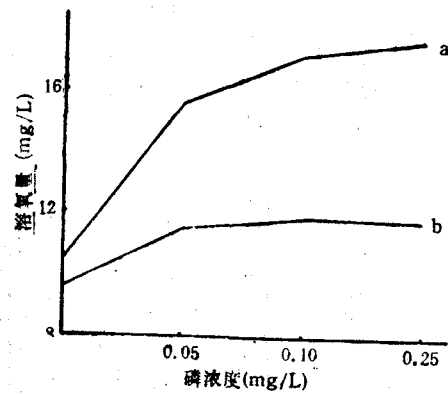


图9 1986年8月4—6日对大泽山水库磷最适施肥浓度的测验——培养一天(b)与培养两天(a)的比较

Fig. 9 Optimum dosage of P for fertilization in Dazeshan Reservoir, Aug. 4—6, 1986 (a. inoculation for two days, b. inoculation for one day)

差别显著,而在0.05组与0.10组之间差别不显著(两天系列这两组之间差别则是显著的)。

三、讨 论

1. 对生氧量生物测验法的比较评价

批次培养法、连续培养法、围隔法等长期测验法的效果是公认的^[2,3,6,9,12,13]。但这些长期(一般一周到数周)法有若干固有的缺陷,使它所提供的结果虽然从形式上看是确切的、有意义的,但实质上都不一定符合水域的实际情况(特别是测验结束时的实际情况)。这些缺陷是:(1)时间太长,水样内浮游植物的组成会发生与水域中的组成不相同的变化^[8,12];(2)时间太长,试验容器内的营养状况会发生与水域不相同的变化(某些因素从非限制性变为限制性,另一些又会从潜在的形式降解为可利用的形式)^[2,12]。此外,对于指导施肥实践来说,测验所需时间过长,也会使结果失掉了时间价值;与此相反,短期测验法则在这些方面具有相对的优越性。在短期测验法中,生氧量法比¹⁴C法更有设备简单和容易掌握等优点。这些优点大大提高了它在生产实践中的应用价值。

研究表明,生氧量法无论在判断水域的限制性营养盐上,还是在确定最适肥分搭配和施肥标准上,都是灵敏的,可靠的。根据这一结果,我们推断以往有些作者在短期测验法(主要是¹⁴C法)上的失败可能归因于培养时间太短^[12]或其他技术细节的不妥。

2. 关于每次测验的持续时间

研究表明,测验的持续时间,或者说水样在原水域中的培养时间,需要两天才能提供明确的判别,一天只能看出大致趋势。关于生物测验法何以需要较长时间,以往已有很多专题研究和解释。有些学者^[12]提出,藻类当遇到较高浓度的营养盐时,从吸收该营养盐

到使该营养盐参与形成终点有机物从而加速光合作用之间,需要一个时滞;有些学者^[3,10]则指出,较高浓度(虽然在最适范围内)的营养盐对藻类的光合作用有短时间(数小时)的抑制作用。Elrifi 等^[1]和 Goldman 等^[4]在海洋浮游植物上证明这种抑制作用的有或无,有种的差别。此外, Kalff^[8]还发现这种抑制与光照强度有关,在最适照度下抑制,而在较低光度下不抑制。从我们进行的培养一天与培养两天的对照测验看,这些作用都是可能的。因为我们使用的主要是水库中的混合浮游植物群落,种类很多,含有受抑制种类的可能性很大;此外,挂瓶的水层是一般浮游植物光合作用的最适光度层。

3. 关于测验水样是否要接种藻种的问题

我们在本水库当时实有的浮游植物密度下进行的对照测验,证明在测验水样中接种藻种的密度甚至接种与否,对测验结果都无影响。在其后的工作中我们一直采用不接种的做法,所得结果都很满意。这证明,在本水库浮游植物的密度下(约为 200—500 万个/L 接种是不必要的。不同种类的藻类对营养盐的配比有不同的要求^[14],所以直接用水域当时的浮游植物群落进行测验,会使结果更符合水库的实际情况。因此,我们主张,除非水域中的浮游植物特别贫乏,一般地都可以不另外接种藻种。

4. 关于测验用营养盐的选择

本方法以溶氧量的变化作为光合作用强度的标志,因此,在选用增肥用的营养盐类时,应避免选用该盐类本身会对溶氧直接、间接产生干扰的种类。例如,在选择铁的化合物时,应选用三氯化铁 (FeCl_3),而不用硫酸亚铁 (FeSO_4)。在本研究中,选用了氯化铵作为氮源,在后来的工作中,发现改用硝酸盐效果更好,因为这样能避免硝化作用对溶氧量的干扰。

参 考 文 献

- [1] Elrifi, I. R., D. H. Turpin, 1985. Transient photosynthetic responses of nitrogen limited microalgae to nitrogen addition. *Mar. Ecol.* 20(3): 253—258.
- [2] Fitzgerald, G. P., 1972. Bioassay analysis of nutrient availability. In: *Nutrient in Natural Waters*, Ed by Allen and Kramer. 147—170.
- [3] Gerhart, D. Z. and G. E. Likers, 1975. Enrichment experiments for determining nutrient limitation: four methods compared. *Limnol. Oceanogr.* 20: 640—653.
- [4] Goldman, J. C., M. R. Dennett, 1985. Photosynthetic responses of 15 phytoplankton species to ammonium pulsing. *Mar. Ecol.* 20(3): 259—264.
- [5] Hamilton, D. H., Jr., 1969. Nutrient limitation of summer phytoplankton growth in Cayuga Lake. *Limnol. Oceanogr.* 14: 579—590.
- [6] Henry, A., J. G. Tundisi, P. R. Curi, 1984. Effects of phosphorus and nitrogen enrichment on the phytoplankton in a tropical reservoir *Hydrobiol.* 118(2): 177—185.
- [7] Henry, R., K. Hino, P. R. Tundisi, J. S. B. Ribeiro, 1985. Responses of phytoplankton in Lake Jacaretinga to enrichment with nitrogen and phosphorus in concentrations similar to those of the River solimoes (Amazon, Brazil) *Arch. Hydrobiol.* 103(4): 453—477.
- [8] Kalff, J., 1971. Nutrient limiting factors in an arctic tundra pond. *Ecology* 52: 655—659.
- [9] Kemmerer, A. J., 1968. A method to determine fertilization requirements of a small sport fishing Lake. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 97: 425—428.
- [10] Lean, D. R. S., T. P. Murphy, and F. R. Pick, 1982. Photosynthetic response of lake plankton to combined nitrogen enrichment. *J. Phycol.* 18(4): 509—521.
- [11] McCoy, G. A., 1983. Nutrient limitation in two arctic lakes, Alaska, *J. Fisher. Res. Board of Canada* 40 (8): 1195—1202.
- [12] O'Brian, W. J., and F. Denoyelles, 1976. Response of three phytoplankton bioassay techniques in experimen-

- tal ponds of known limiting nutrient. *Hydrobiol.* 49(1): 65—76.
- [13] Setaro, F. V. and J. M. Melack, 1984. Responses of phytoplankton to experimental nutrient enrichment in an Amazon floodplain lake. *Limnol. Oceanogr.* 29(5): 972—984.
- [14] Smith, V. H., 1982. The nitrogen and phosphorous dependence of algal biomass in lakes: an empirical and theoretical analysis. *Limnol. Oceanogr.* 27(6): 1101—1112.

STUDIES ON THE OXYGEN EVOLUTION BIOASSAY METHOD FOR GUIDING ARTIFICIAL FERTILIZATION IN LARGE WATER BODIES

Li Deshang, Zhang Meizhao, Zhao Manhua

(*Ocean University of Qingdao*)

Xu Youshan

(*Water Conservancy Bureau of Pingdu County, Qingdao*)

ABSTRACT

The oxygen evolution method, a bioassay technique determining the limiting nutrients and the optimum dosages for artificial fertilization, was studied in Dazeshan Reservoir, Pingdu County, Qingdao, during 1985—1987 to obtain an optimum fish farming with artificial fertilization.

The general procedure of the method was as follows: water samples collected from 0.5—1.0 m depth were filtered through No. 20 bolting cloth, and filled into 500 ml colorless glass bottles; then predetermined concentrations or combinations of nutrients and algae culture were added to each bottle. All treatments and the control were triplicate. These bottles were hung horizontally at the depth half way of the Secchi disk measurements; and the dissolved oxygen (DO) of each bottle was determined after a certain period of incubation. The nutrients added in those treatments which have larger DO increments than the controls were considered limiting, and the combination or level of the nutrients added in that treatment which has the highest DO increment was considered to be the optimum.

This method is satisfactory in both sensitivity and repeatability and as effective as the batch culture method, hence applicable and reliable for guiding artificial fertilization in large water bodies. This method also proves that at the density of 2—5 million phytoplankton per litre as in this reservoir, the inoculation of algae is not indispensable, and the “in situ” incubation time of the samples should be two days.