

不同磷源对藻类生长及其生化组成的影响^{*}

黄世玉

(集美大学水产学院水产养殖系, 厦门, 361021)

黄邦钦

(厦门大学环境科学研究中心, 厦门, 361005)

摘要 在实验室培养条件下, 用 KH_2PO_4 及多种溶解有机磷化合物(DOP)对藻类进行一次性培养, 考察藻类对DOP的利用和不同磷源对藻类生长及其生化组成的影响。结果表明: 甘油磷酸钠(G·P)、6-磷酸葡萄糖(G·6·P)、蛋黄卵磷脂(LEC)和酵母核糖核酸(RNA)均可被藻类吸收利用, 并且培养藻类都生长良好; 碱性磷酸酶在大分子DOP(如LEC、RNA)利用过程中起重要作用。不同形态磷对培养藻类的蛋白质、氨基酸含量有一定影响。

关键词 溶解有机磷 藻类 生长 生化组成

中国图书分类号 Q949.206

磷是藻类生长的主要限制因子之一。一般来说, 无机磷(DIP)被认为是藻类最重要的磷源, 但是近来研究表明, 藻类也能利用溶解的有机磷(DOP)^[1~10], 特别是在磷限制的湖泊和某些海域, DOP的生物可利用性显得更为重要^[5, 7]。本文从藻类的实验室单种一次性培养入手, 研究藻类对DOP的吸收利用及利用途径, 同时考察不同磷源对培养藻类生化组成的影响。

1 材料和方法

1.1 藻种及培养条件

实验所用藻类有5种: 奇异拟等鞭金藻(*Pseudoisochrysis paradoxa*)、异胶藻(*Heterogloea* sp.)、小球藻(*Chlorella vulgaris*)、钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)、锥状斯氏藻(*Scrippsiella trochoidea*)。分别隶属于金藻门、黄藻门、绿藻门、蓝藻门和甲藻门。

在高潮时采集厦门港表层海水, 经过滤、消毒后作为储备海水。各藻种在进行批量培养前用f/2培养液进行扩种培养(甲藻的f/2培养液不加硅), 钝顶螺旋藻的培养液采用简化的Zarrouk氏配方^①。

藻类的批量培养以f/2培养液为基础, 调整起始N:P=16:1, 实验分组及各形态磷(DIP和DOP)的浓度见表1, 其中钝顶螺旋藻的磷源为 KH_2PO_4 、甘油磷酸钠(G·P)和蛋黄卵磷脂(LEC), 浓度按简化的Zarrouk氏配方。每天测定藻液的消光值及DIP和DOP浓度。培

* 集美大学水产学院养殖系96届毕业生婷参加部分工作, 特此致谢。黄世玉, 男, 1964年10月出生, 讲师。

① 农牧渔业部螺旋藻协作组, 江西省农科院科技情报研究所。蓝藻——螺旋藻开发利用与生物技术资料汇编, 1985。

本文于1997年1月17日收到。

养条件:光暗周期为 10 : 14, 光强 3 500 lx(用 ST-85 型自动量程照度计测量), 控制水温 20℃ ± 2℃。

表 1 实验分组及各形态磷的浓度

Tab. 1 Experimental groups and concentration of different phosphorus sources

藻 种	KH ₂ PO ₄	甘油磷酸钠	6-磷酸葡萄糖	蛋黄卵磷脂	酵母核糖核酸
	(μmol/dm ³)				
奇异拟等鞭金藻	20	20	20	—	—
异胶藻	10	—	10	10	—
小球藻	10	10	—	—	10
锥状斯氏藻	30	30	—	—	30

1.2 各参数测定

1.2.1 藻类细胞数的测定 用分光光度计测藻液的消光值, 以浮游植物计数框计算藻类细胞数, 制作各藻种细胞数-消光值的工作曲线, 由工作曲线计算出培养过程藻液的细胞数。各藻种细胞数与消光值的工作曲线如下:

$$\text{奇异拟等鞭金藻: } N = 70\,555 + 4.3 \times 10^6 A$$

$$\text{异胶藻: } N = 258\,886 + 2.077\,11 \times 10^8 A$$

$$\text{小球藻: } N = (81.128A - 2.784) \times 10^6$$

式中, N 为藻类细胞数, 个/cm³; A 为藻液的消光值; 锥状斯氏藻以叶绿素 a (Chl-a) 浓度作为生长指标。

1.2.2 DIP、DOP 的测定 DIP 用以抗坏血酸为还原剂的磷钼蓝比色法测定, 总溶解态磷 (TDP) 用过硫酸钾氧化后, 用磷钼蓝比色法测定, DOP 为 TDP 和 DIP 的浓度差。

1.2.3 叶绿素 a (Chl-a) 的测定 采用萃取荧光法。过滤一定体积的藻液, 用 90% 丙酮萃取 (4℃, 12h), 萃取液用日立 820 型荧光分光光度计测定 (激发光 $E_x = 430\text{nm}$, 发射光 $E_m = 670\text{nm}$), 根据酸化前后的荧光值, 按以下公式计算 Chl-a 浓度。

$$\text{Chl-a} = F_D \frac{R}{R-1} (F_b - F_a) \times \frac{V_1}{V_2}$$

式中, F_D 为换算因子, $F_D = 0.087$; R 为酸化因子, $R = 5$; V_1 为萃取液体积, cm³; V_2 为抽滤的藻液体积, cm³; F_b 、 F_a 为酸化前后的荧光值。

1.2.4 碱性磷酸酶活力的测定 以 3-邻甲基荧光素磷酸盐 (Sigma 产品) 为底物, 培养水温为 28℃, 反应时间 2h, 用 0.02mol/dm³ 的 EDTA 溶液来中止反应, 荧光强度在日立 820 型荧光分光光度计上测定 ($E_x = 400\text{nm}$, $E_m = 520\text{nm}$), 酶活力以单位时间内单位体积培养液产生的荧光素量 [$\mu\text{g}/(\text{cm}^3 \cdot \text{h})$] 表示。

1.2.5 蛋白质与氨基酸的定量测定 蛋白质含量测定采用凯氏定氮法, 氨基酸含量测定采用氨基酸自动分析仪法。精确称取经冷冻干燥的一定量样品, 加 6mol/dm³ 盐酸 2cm³, 封管, 在 105℃ 条件下水解 24h, 然后赶酸、定容。稀释液用日立 835-50 型氨基酸自动分析仪测定 (2.6mm × 150mm 离子交换色谱柱, 检测波长为 570nm 和 440nm (脯氨酸专用))。

2 结果与讨论

2.1 藻类对 DOP 的吸收利用

从图 1~4 可以看出: 不论何种 DOP, 藻类都呈生长趋势, 并与 DIP 为磷源的生长曲线基

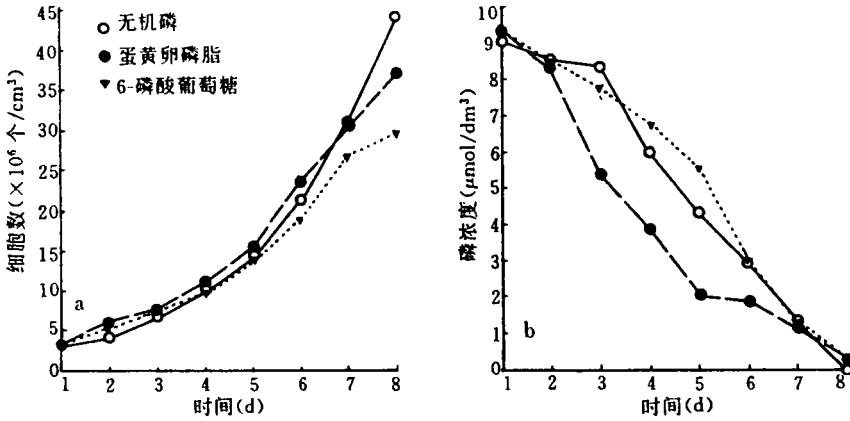


图 1 不同磷源对异胶藻生长的影响(a)及培养介质中磷浓度的变化(b)
 Fig. 1 Effect of different phosphorus on growth of *Heterogloea* sp. (a) and P concentration in culture medium (b)

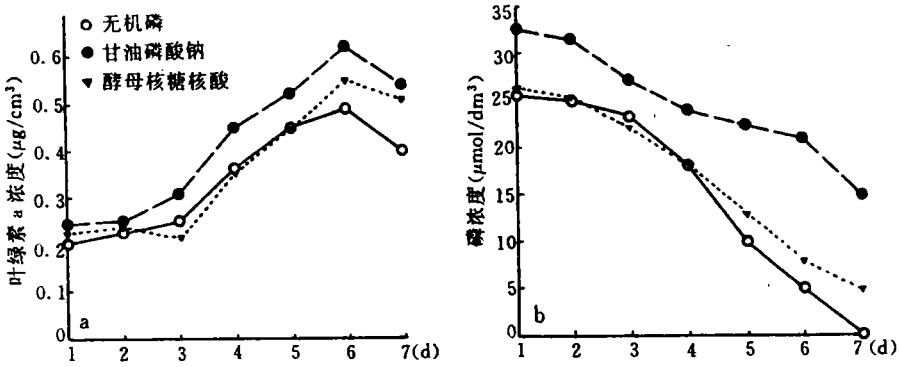


图 2 不同磷源对锥状斯氏藻生长的影响(a)及培养介质中磷浓度的变化(b)
 Fig. 2 Effect of different phosphorus on growth of *Scrippsiella trochoidea* (a) and P concentration in culture medium (b)

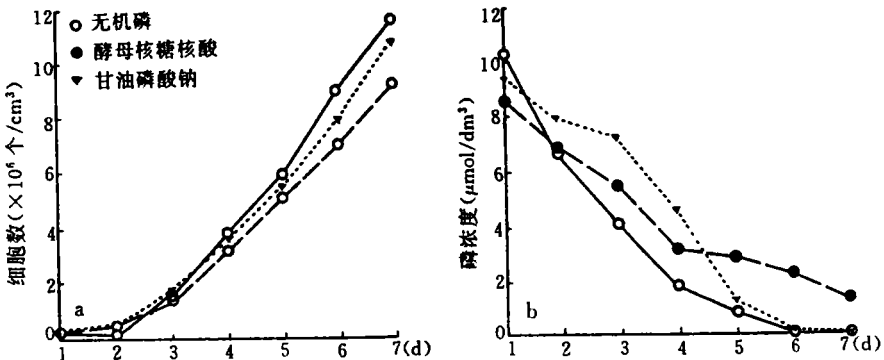


图 3 不同磷源对小球藻生长的影响(a)及培养介质中磷浓度的变化(b)
 Fig. 3 Effect of different phosphorus on growth of *Chlorella vulgaris*. (a) and P concentration in culture medium (b)

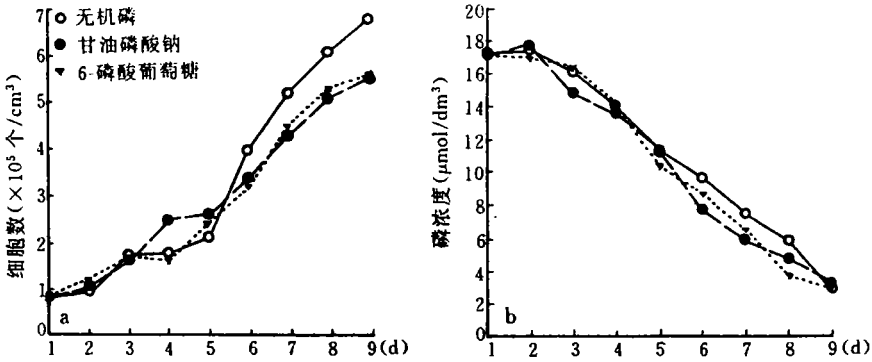


图 4 不同磷源对奇异拟等鞭金藻生长的影响(a)及培养介质中磷浓度的变化(b)

Fig. 4 Effect of different phosphorus on growth of *Pseudoisochrysis paradoxa* (a) and P concentration in culture medium(b)

本吻合,同时 DOP(G·P,G·6·P,LEC,RNA)的浓度都呈下降趋势,可见本试验中使用的 4 种 DOP 均可被藻类吸收利用,并且培养藻类都生长良好.但藻类对不同 DOP 的利用存在着微小的差异,如在不同磷源的异胶藻培养初期(1~3d,图 1b),LEC 浓度的下降速率比 DIP 和 G·6·P 下降速率快,说明异胶藻在培养初期更容易利用大分子的 DOP.本实验所用分属四种不同门类的藻类可以利用 DOP 的结果,进一步证实了 DOP 化合物可作为藻类生长磷源的结论.

2.2 DOP 的利用途径

通过监测藻类培养过程中 DIP、DOP 及藻体内碱性磷酸酶活力(APA)的变化,来指示 APA 在 DOP 利用过程中的作用.结果表明:G·P、LEC 自然降解速率相当慢,但在作为唯一磷源加入藻液中,这些 DOP 下降速率就相当快(图 5,6),并且在小分子 DOP 化合物(如 G·P、

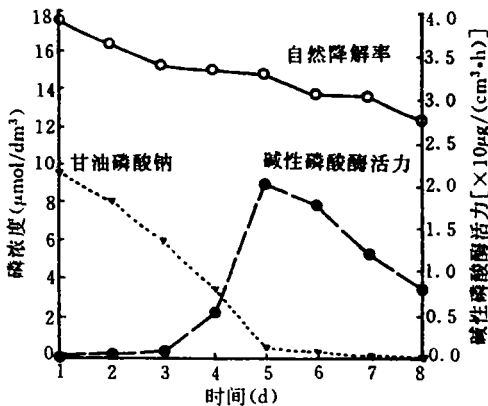


图 5 奇异拟等鞭金藻培养体系中碱性磷酸酶活力与小分子 DOP 利用的关系

Fig. 5 Relationship between APA and utilization of small molecular DOP compound by *Pseudoisochrysis paradoxa*

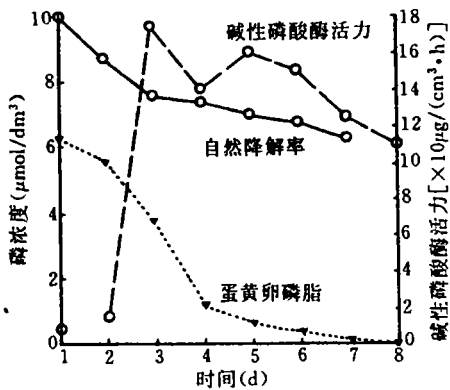


图 6 异胶藻培养体系中碱性磷酸酶活力与大分子 DOP 利用的关系

Fig. 6 Relationship between APA and utilization of large molecular DOP compound by *Heterogloea* sp.

G·6·P)被藻类利用时,APA 值无显著变化(图 5 中 1~4d)。而当藻类利用大分子 DOP 化合物(如 LEC)时,APA 值显著升高(图 6)。此结果暗示:藻类可直接吸收利用小分子 DOP 化合物,亦可通过碱性磷酸酶来利用大分子 DOP。越来越多的实验数据都已证实 DOP 能作为磷源可被藻类利用^[1~10],但却很少有关藻类如何利用 DOP 的报道。洪华生等提出藻类可能存在两条 DOP 利用途径^[11],一条是直接被藻类吸收利用,另一条是被诸如碱性磷酸酶等水解后吸收。本文结果进一步证实藻类利用 DOP 的两条途径,即对于小分子 DOP 化合物,藻类为直接吸收,对较大分子的 DOP,则经碱性磷酸酶降解后再吸收利用。

2.3 不同磷源对培养藻类生化组成的影响

上述结果和文献[1~10]都表明:DOP 可被藻类所利用,但 DOP 对藻类生化组成的影响如何呢?我们测定不同磷源培养的藻类蛋白质及氨基酸含量,结果表明(表 2、3):不同磷源对培养藻类的蛋白质、氨基酸含量有一定影响。

植物体内蛋白质的代谢过程与磷的代谢是密切相关的,蛋白质代谢中的氨基化、脱氨基、氨基移换和脱羧基等作用只有在磷酸吡醛素的参与下才能顺利进行^[12]。由于培养藻类对不同磷源的利用途径不同、利用速率有所差异,从而对蛋白质、氨基酸的含量产生一定的影响。

表 2 不同磷源对培养藻类蛋白质百分含量的影响

Tab. 2 Effect of different phosphorus sources on protein content (%) of algae

磷源	奇异拟等鞭金藻	异胶藻	钝顶螺旋藻
DIP	33.3	25.5	62.46
G·P	26.6	—	44.31
G·6·P	—	28.3	—
LEC	26.8	19	73.22

表 3 不同磷源对培养藻类氨基酸百分含量的影响

Tab. 3 Effect of different phosphorus sources on amino acid content (%) of algae

氨基酸	钝 顶 螺 旋 藻			异 胶 藻		
	DIP	G.P	LEC	DIP	G.6.P	LEC
天冬氨酸	5.89	4.68	5.23	2.52	2.99	1.69
苏氨酸	2.85	2.15	2.63	1.27	1.38	0.85
丝氨酸	2.96	2.24	2.63	1.16	1.26	0.78
谷氨酸	8.73	7.86	8.46	3.48	3.85	2.73
甘氨酸	2.80	2.17	1.57	1.30	1.45	1.05
丙氨酸	4.61	3.40	3.77	1.74	2.01	1.38
胱氨酸	1.92	1.22	2.73	0.54	0.66	0.72
缬氨酸	4.30	3.08	3.65	1.65	1.89	1.34
蛋氨酸	0.36	0.35	0.30	0.04	—	0.04
异亮氨酸	3.25	2.40	3.00	0.88	1.07	1.02
亮氨酸	5.60	4.71	6.01	2.25	2.25	2.40
酪氨酸	3.03	0.91	2.92	0.33	0.36	0.31
苯丙氨酸	2.60	1.89	2.54	1.31	1.48	0.54
赖氨酸	2.85	2.04	2.41	1.23	1.54	1.09
组氨酸	0.88	0.69	0.75	0.46	0.50	0.35
精氨酸	4.01	3.40	3.61	1.43	1.63	1.21
脯氨酸	1.76	1.27	1.26	1.43	1.62	1.30
必需 AA 总量	26.70	20.71	24.91	10.52	11.74	8.84
非必需 AA 总量	31.70	23.75	28.92	12.50	14.20	9.96
氨基酸总量	58.40	44.46	53.83	23.02	25.94	18.8

注: * 表示必需氨基酸。

参考文献

- 1 陈慈美,包建军,吴瑜端. 纳污海域营养物质形态及含量水平与浮游植物增殖竞争关系. 海洋环境科学, 1990,9(1):6~12
- 2 黄邦钦,王海黎,洪华生等. 厦门海域浮游植物和细菌对溶解有机磷的利用. 厦门大学学报(自然科学版),1996,35(4):625~630
- 3 Hong Huasheng, Wang Haili, Huang Bangqin. The availability of dissolved organic phosphorus compounds to marine phytoplankton. *Chin. J. Oceanol. Limnol.*, 1995,13(2):169~176
- 4 Johannes R E. Uptake and release of dissolved organic phosphorus by representatives of a coastal marine ecosystem. *Limnol. Oceanogr.*, 1964,9:224~234
- 5 Conter J B, Wetzel R G. Uptake of dissolved inorganic and organic phosphorus compounds by phytoplankton and bacterioplankton. *Limnol. Oceanogr.*, 1992,37(2):232~243
- 6 Van Boekel W H M. Ability of *Phaeocystis* sp. to grow on organic phosphorus: direct measurement and prediction with the use of an inhibition constant. *J. Plankton Res.*, 1991,13:959~970
- 7 Bonin D J. Role du phosphore organique dissous dans la production primaire. *Oceanis*, 1988,14(2):381~387
- 8 Bentzen E, Taylor W D. Estimating organic phosphorus utilization by freshwater plankton using $^{32}\text{P}_i$ -ATP. *J. Plankton Res.*, 1991,13:1 223~1 233
- 9 Berman T. Differential uptake of orthophosphate and organic phosphorus substrates by bacteria and algae in lake Kinneret. *J. Plankton Res.*, 1988,10:1 239~1 249
- 10 Heath R T. Dissolved organic phosphorus compounds: do they satisfy planktonic phosphate demand in summer? *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 1988, 43:343~350
- 11 洪华生,戴民汉,郑效成. 海水中碱性磷酸酶活力的测定及其在磷的循环中的作用初探. 海洋与湖沼, 1992,23(4):415~420
- 12 曹宗巽,吴相钰编. 植物生理学(上册). 北京:人民教育出版社,1982. 162

Effects of different phosphorus sources on algal growth and biochemical composition

Huang Shiyu

(Department of Aquaculture, Fisheries College, Jimei University, Xiamen, 361021)

Huang Bangqin

(Environmental Science Research Centre, Xiamen University, Xiamen, 361005)

Abstract

Under batch culture condition, the effects of different phosphorus sources (phosphate, glycerophosphate, glucose-6-phosphate, lecithins and yeast RNA) on algal growth and biochemical composition are carried out. Results showed that four algae of this test could up-

take DOP compounds used in this experiment and growth curve cultured in DOP compounds is almost consistent with that in phosphate, alkaline phosphatase plays an important role in the utilization of large molecular DOP compound such as lecithins and RNA. Result also indicates that there is little difference of protein and amino acid between culturing in phosphate and DOP compounds.

KEYWORDS Dissolved organic phosphorus, algae, biochemical composition, protein, amino acid