

文章编号:1005-8737(2000)04-0047-05

不同氮磷硅含量和接种密度对三角褐指藻生长的影响

朱艺峰, 郭小强

(宁波大学水产系, 浙江 宁波 315211)

摘要:通过均匀设计试验研究 N、P、Si 含量与接种密度对三角褐指藻生长的动态关系。结果显示, 8 d 藻生长率和 8 d 密度差不受 N 含量(质量浓度 1.0~89.4 mg/L)影响, 但随 P 含量(质量浓度 0.1~28.6 mg/L)和 Si 含量(质量浓度 0.5~20.1 mg/L)增加而增加。当 P 质量浓度 28.6 mg/L, Si 质量浓度 20.1 mg/L, 接种密度分别为 $8.4 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ 和 $143.1 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ 时, 藻生长率和密度差可达 0.778 d^{-1} 和 $869.7 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ 。11 d 藻生长率主要受接种密度的影响, N 质量浓度起次要作用, P 和 Si 质量浓度对藻生长率无影响。当 N 质量浓度 89.4 mg/L, 接种密度 $8.4 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ 时, 藻生长率可达 0.492 d^{-1} 。

关键词:三角褐指藻; N; P; Si; 接种密度; 藻类生长; 一次性培养

中图分类号: Q949.27

文献标识码: A

在海水人工育苗中, 三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)是习见的优良低温饵料之一, 尽管不同学者在一次性培养中, 曾对其不同 N 源及其浓度、不同品系的生态条件、营养盐浓度作了不同程度的研究^[1-4], 但直接应用这些研究于生产仍无法进行量化控制。因此, 根据不同的培养目的或不同的接种量来利用营养盐浓度对藻类培养进行动态的调控, 便成为藻类生产性培养急待解决的问题。本文从三角褐指藻一次性培养着手, 结合生产角度研究不同 N、P、Si 浓度与接种密度对三角褐指藻的生长及变化趋势, 为今后藻类培养的动态施肥提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料及试剂

1.1.1 三角褐指藻 宁波大学水产系中心实验室/ZS06。

1.1.2 海水 宁波奉化湖头渡, 盐度 23.7, pH 8.1, 含 N 0.032 mg/L ($\text{NO}_3^- - \text{N}$), 含 P 0.007

mg/L(总 P)。海水经脱脂棉过滤、煮沸消毒。

1.1.3 主要试剂 硝酸钠(NaNO_3), 磷酸二氢钾(KH_2PO_4), 硅酸钠($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$), A. R. 级。

1.2 方 法

1.2.1 因素水平设置 N、P、Si 水平设置参考陈明耀^[4]不同营养盐配方和梁英等^[3]实验结果, 并考虑不同藻接种密度的影响, 见表 1。

1.2.2 培养液配制 按实验设计的不同 N(X_1)、P(X_2)、Si(X_3)水平分别配制培养液, 各培养液其它成份含量按 f/2 培养基(不加生物素), 含量相同。

1.2.3 接种与培养 三角褐指藻经预培养(N:P:Si=13.9:2.3:0, 质量浓度比), 处于指数生长期时进行接种, 接种时藻密度 $351.7 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ 。在 300 ml 三角烧瓶中, 按最终培养体积 250 ml, 用相应培养液稀释三角褐指藻, 以达到各处理不同接种密度(X_4)要求, 每处理组设置 3 个重复。室温 $9.5 \sim 15.5^\circ\text{C}$, 平均 $(12.2 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 。日光灯光源, 光强 $(1400 \pm 100)\text{lx}$, 光暗周期 10 h:14 h, 光照期间每日随机调换三角瓶并摇动 2~3 次。

1.2.4 细胞计数 用 721 型分光光度计(上海第三分析仪器厂), 以消毒海水为参比液, 在 656 nm 处, 用 1 cm 比色皿每日定时取样测定藻吸光度(A), 每

收稿日期:2000-02-22

作者简介:朱艺峰(1964-), 男, 浙江玉环人, 宁波大学水产系讲师, 从事水产养殖专业。

样3个重复。藻密度(C)按所测吸光度换算,换算公式经实测藻密度(血球计算板计数6次取平均)与吸光度拟合获得: $C=1\,535.966A^{1.015}$, $R^2=0.999$, $P<0.01$ 。当其中一处理组连续3d藻密度增长 $\leq 5\%$ ^[5]时,实验结束。藻密度差(Y)按 $Y = \text{指数生}$

长期结束密度 - 起始接种密度;相对生长率(Y')按 Fabregas 等^[6]公式计算。

1.2.5 实验设计 采用均匀设计 $U_{10}^*(10^8)$, 按使用表选择1,3,4,5列,偏差 $D=0.223\,6$ ^[7],见表2。

表1 实验因素与水平*

Table 1 Experimental factors and their levels

因素 Factor	水平 Level									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$X_1/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	1.0	5.0	9.9	15.0	24.9	35.3	45.2	59.9	75.2	89.4
$X_2/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	0.1	0.5	1.0	2.0	2.9	5.9	8.9	13.7	18.9	28.6
$X_3/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	0.5	1.0	2.1	2.9	4.1	5.9	8.0	9.9	14.9	20.1
$X_4/(10^4\text{ ml}^{-1})$	8.4	32.4	57.7	82.3	106.9	130.8	156.2	180.1	205.4	230.0

* 指 N、P、Si 浓度分别为 NaNO_3 、 KH_2PO_4 和 $\text{Na}_2\text{SiO}_3\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 称量转换值。Concentrations of N, P and Si were transformed from weights of NaNO_3 , KH_2PO_4 and $\text{Na}_2\text{SiO}_3\cdot 9\text{H}_2\text{O}$, respectively.

表2 实验方案与结果

Table 2 Experimental design and results

实验号 No	$X_1/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$		$X_2/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$		$X_3/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$		$X_4/10^4\text{ ml}^{-1}$		指标 Norm		
	水平 Level	质量浓度 Concentration	水平 Level	质量浓度 Concentration	水平 Level	质量浓度 Concentration	水平 Level	藻密度 Alga density	$Y_{8d}/10^4\text{ ml}^{-1}$	Y'_{8d}/d^{-1}	Y'_{11d}/d^{-1}
n1	1	1.0	3	1.0	4	2.9	5	106.9	360.9	0.304	0.242
n2	2	5.0	6	5.9	8	9.9	10	230.0	402.1	0.208	0.170
n3	3	9.9	9	18.9	1	0.5	4	82.3	339.6	0.337	0.262
n4	4	15.0	1	0.1	5	4.1	9	205.4	396.0	0.221	0.180
n5	5	24.9	4	2.0	9	14.9	3	57.7	255.9	0.349	0.318
n6	6	35.3	7	8.9	2	1.0	8	180.1	370.6	0.230	0.190
n7	7	45.2	10	28.6	6	5.9	2	32.4	401.8	0.535	0.427
n8	8	59.9	2	0.5	10	20.1	7	156.2	422.2	0.270	0.220
n9	9	75.2	5	2.9	3	2.1	1	8.4	81.4	0.487	0.478
n10	10	89.4	8	13.7	7	8.0	6	130.8	456.7	0.310	0.243

1.3 数据处理

统计分析在 SPSS 软件包^[8](Ver. 9.0, 1998)下进行。逐步回归变量筛选按概率设置阈值, $P\leq 0.05$ 引入, $P\geq 0.10$ 排除^[7,9]。回归方程寻优计算按方开泰介绍的网格法编程^[7]。

2 结果与讨论

2.1 不同处理下三角褐指藻的生长

三角褐指藻密度随不同的处理呈不同的变化,指数生长因温度偏低不够明显,但快速生长时间比恒温培养得以延长^[10](图1)。经1d的延缓期后,从第2天至第8天出现快速生长。第9天后,接种密度低于 $100\times 10^4\text{ ml}^{-1}$ 各组仍保持较快生长,而高于 $100\times 10^4\text{ ml}^{-1}$ 各组增速趋缓,第12天开始, n1, n2, n4 组日密度增加 $\leq 5\%$ 。在一次性培养的实验

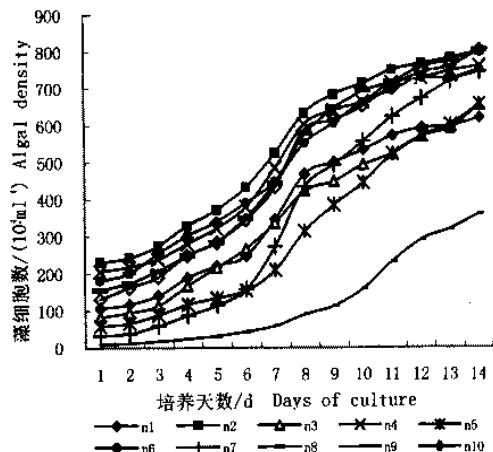


图1 不同处理下三角褐指藻的生长曲线

Fig.1 Growth curves of *P. Tricornutum* in different treatments

中,接种密度常用 $(3.5\sim 30)\times 10^4\text{ ml}^{-1}$ [1,10],而高于 $100\times 10^4\text{ ml}^{-1}$ 未见报道。

2.2 各因素对三角褐指藻生长率的影响

取快速生长结束(第8天)和其中一处理组浓度增长开始达到稳定时(第11天)的生长率作为指标,用以分析不同N、P、Si浓度及接种密度对三角褐指藻生长率的变化过程,各处理组8 d、11 d藻平均生

长率结果见表2。对8 d、11 d藻平均生长率分别进行回归,得下列方程,回归方程寻优结果见表3。

$$Y'_{8d} = 0.496 - 2.350 \times 10^{-3} X_4 + 4.585 \times 10^{-6} X_4^2 + 5.246 \times 10^{-4} X_2 X_3, R^2 = 0.965, P < 0.01 \quad (1)$$

$$Y'_{11d} = 0.469 - 3.050 \times 10^{-3} X_4 + 7.655 \times 10^{-6} X_4^2 + 5.394 \times 10^{-4} X_1, R^2 = 0.987, P < 0.01 \quad (2)$$

表3 方程寻优结果

Table 3 Optimum calculated results of different equations

方程 Equation	因素 Factor				指标 Norm		
	$X_1/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	$X_2/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	$X_3/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	$X_4/10^4\text{ ml}^{-1}$	$Y_{8d}/10^4\text{ ml}^{-1}$	Y'_{8d}/d^{-1}	Y'_{11d}/d^{-1}
(1)	—	28.6	20.1	8.4	—	0.778	—
(2)	89.4	—	—	8.4	—	—	0.492
(3)	—	28.6	20.1	143.1	869.7	—	—

根据方程(1),当 X_2 、 X_3 、 X_4 中2个变量取表3中的寻优值时,就可获得另一个变量对生长率的最佳调控,见图2。结合方程(1)及图2,对8 d藻生长率,N质量浓度在 $1.0\sim 89.4\text{ mg/L}$ 范围内对藻生长率无影响;P和Si质量浓度分别在 $0.1\sim 28.6\text{ mg/L}$ 和 $0.5\sim 20.1\text{ mg/L}$ 时,随P、Si质量浓度增加生长率增加;P与Si质量浓度对生长率贡献相似;而接种密度越高,藻生长率就越低。寻优结果显示,P质量浓度 28.6 mg/L 、Si质量浓度 20.1 mg/L 、接种密度为 $8.4\times 10^4\text{ ml}^{-1}$ 时,藻生长率可达 0.778 d^{-1} ,其生长率最大。

通常认为,海水中N:P为16:1(Redfield 比值)

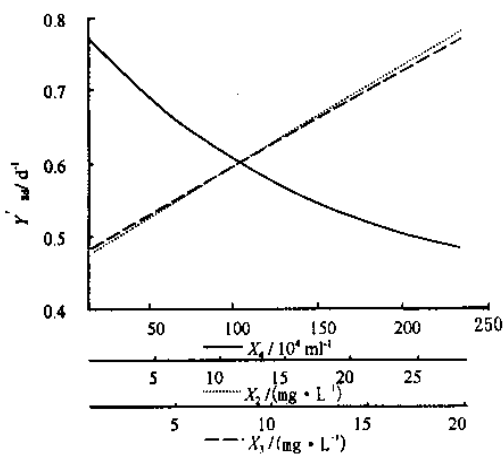


图2 P、Si及接种密度与8 d藻生长率的关系

Fig. 2 Relations of nutrient P, Si and inoculative densities with 8 d growth rate

时,藻类可获得最好的生长。但从本研究结果看,由于N在 $1.0\sim 89.4\text{ mg/L}$ 范围对藻生长率无影响,可认为N:P不是主要的因素。马志珍^[1]在一次性培养中,发现 $10\sim 50\text{ mg/L}$ N对三角褐指藻的生长量影响不显著。Hayward^[2]对不同品系三角褐指藻研究发现,P是三角褐指藻主要的限制性营养素, 2 mg/L 可获得良好生长,但不同N浓度对生长无差异。梁英等^[3]在充气培养条件下,通过正交试验的直观分析显示,N质量浓度在 $24.7\sim 98.8\text{ mg/L}$,P质量浓度在 $9.1\sim 36.4\text{ mg/L}$ 范围对藻生长率影响不显著,但Si的最佳水平是 23.7 mg/L 。这些结论也隐含了N:P不是主要的影响因素。

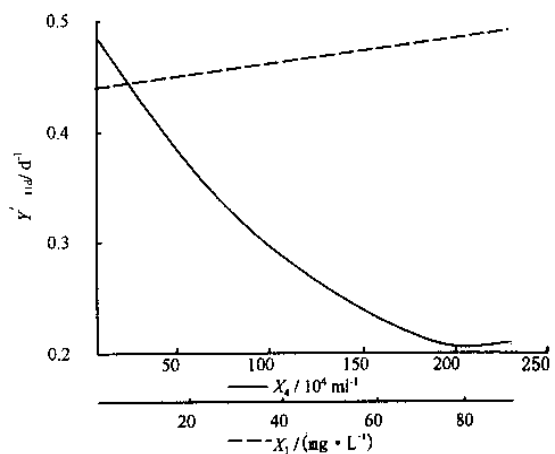


图3 N和接种密度与11 d藻生长率的关系

Fig. 3 Relationships of nutrient N and inoculative densities with 11 d growth rate

11 d的平均生长率回归方程(2)及图3显示,P和Si质量浓度分别在0.1~28.6 mg/L和0.5~20.1 mg/L范围内对藻生长率无影响;随N质量浓度的增加,其生长率呈直线缓慢上升;接种密度越高,生长率越低。寻优结果显示,N质量浓度89.4 mg/L,接种密度 $8.4 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ 时,藻生长率可达 0.492 d^{-1} 。由此可见,接种密度是藻生长率的主要影响因素,N质量浓度起次要作用,P和Si实验设计水平对藻生长率无影响。方程(2)与方程(1)所得结果似乎相悖,但11 d生长率指标考虑的是当其中一处理组藻密度达到稳定时各营养盐浓度与生长率的关系。因此,可解释为除接种密度起主要作用外,N营养盐浓度低,藻细胞生长的持续时间短,生长速度减慢,稳定态提早出现,如n1、n2和n4组;而高N营养盐浓度可获得较长的持续时间^[4]。基于该结论,在三角褐指藻保种培养时,接种低藻密度,添加高N含量可获得较长的培养时间,如n9。

2.3 各因素对三角褐指藻密度差的影响

考虑到培养藻类时取其指数生长期用于接种,用8 d密度差结果(表2)作指标以研究判断各因素对三角褐指藻密度差的影响,回归方程为:

$$Y_{8d} = 39.169 + 4.249X_4 + 0.163X_2^2 - 1.210 \times 10^{-2}X_4^2 + 0.782X_2X_3 - 2.750 \times 10^{-2}X_2X_4, R^2 = 0.993, P < 0.01 \quad (3)$$

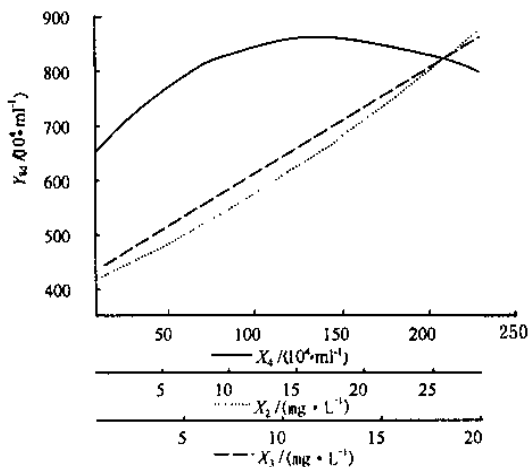


图4 P、Si和接种密度与8 d藻密度差的关系

Fig. 4 Relationships of nutrient P, Si and inoculative densities with 8 d density difference

根据方程(3)及图4,在实验设计水平,N、P、Si含量对8 d密度差的影响与方程(1)的结论相似;但接种密度与密度差呈抛物线关系。当接种密度 $143.1 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ 时,最大密度差可达 $869.7 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ 。

在藻类培养中通常用生长率作为指标,但在生产中只考虑生长率是不够的。如表2所示,尽管n9组8 d时具有较高的平均生长率(0.487 d^{-1}),但最终密度为 $89.8 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$,显然以该密度作为饵料需要较大的培养水体。因此,考虑接种与收获时最大的藻类密度差在生产中具有重要的意义。藻种须达到一定的密度,从开始培养藻类就在培养液中占优势,同时也缩短了培养周期,这已是藻类培养的成功经验^[4]。

致谢:进修生潘传法、徐礼明和陈忠银参加了部分工作,在此表示感谢!

参考文献:

- [1] 马志珍. 氮源及其浓度对三角褐指藻生长的影响[J]. 海洋湖沼通报, 1983, (2):45-50.
- [2] Hayward J. Studies on the growth of *Phaeodactylum tricornutum*. IV. Comparison of different isolates[J]. J Mar Biol Assoc UK, 1968, 48:657-666.
- [3] 梁英, 麦康森, 孙世春, 等. 不同的营养盐浓度对三角褐指藻生长的影响[J]. 海洋湖沼通报, 1999, (4):43-47.
- [4] 陈明耀. 海洋饵料生物培养[M]. 北京: 农业出版社, 1980. 40-106, 208-210.
- [5] 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[J]. 生态学报, 1999, 19(6):908-913.
- [6] Fabregas J, Herrero C, Cabezas B, et al. Mass culture and biochemical variability of the marine microalga *Tetraselmis suecica* Klym (Butch) with high nutrient concentrations[J]. Aquaculture, 1985, 49: 231-244.
- [7] 方开泰. 均匀设计与均匀设计表[M]. 北京: 科学出版社, 1994. 1-52, 71.
- [8] 卢纹岱, 朱一力, 沙捷, 等. SPSS for windows 从入门到精通[M]. 北京: 电子工业出版社, 1997. 318-329.
- [9] 刘魁英. 食品研究与数据分析[M]. 北京: 轻工业出版社, 1999. 182-196.
- [10] 蔡阿根, 李文权, 郑爱榕. 有机磷农药对海洋微藻的若干生物学效应[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1999, 38(4): 589-593.

Effects of different concentrations of N, P, Si and inoculative densities on growth of *Phaeodactylum tricornutum*

ZHU Yi-feng, GUO Xiao-qiang

(Fisheries Department, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: The alga *Phaeodactylum tricornutum* at its exponential growth stage were inoculated into the culture solutions at different mixed concentrations of N, P and Si. The 8 d alga growth rate and alga density difference were not affected by the concentration of N ranging from 1.0 to 89.4 mg/L, but affected by the concentrations of P and Si ranging from 0.1 to 28.6 mg/L and 0.5 to 20.1 mg/L, respectively, and furthermore, these effects were more and more serious as those concentrations increased within the above ranges. The optimum growth rate and alga density difference got to 0.778 d^{-1} and $869.7 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$, respectively, when the concentration of P was 28.6 mg/L, Si 20.1 mg/L and the inoculative density was $8.4 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ and $143.1 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$. The major affecting factor on 11 d growth rate was the inoculative density, and followed the concentration of N, but the concentrations of P and Si had no influences on the growth rate at given levels. If a concentration of N at 89.4 mg/L and an inoculative density of *P. tricornutum* at $8.4 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ are given, a top growth rate can be got theoretically, which is 0.492 d^{-1} .

Key words: *Phaeodactylum tricornutum*; N; P; Si; inoculative density; algae growth; batch culture