

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.16206

## pH 和氮磷比对微小原甲藻和青岛大扁藻生长竞争的影响

葛红星<sup>1,2</sup>, 陈钊<sup>1</sup>, 李健<sup>2,3</sup>, 冯艳艳<sup>2</sup>, 刘思涛<sup>4</sup>, 赵法箴<sup>2</sup>

1. 中国海洋大学 水产学院, 山东 青岛 266003;
2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071;
3. 青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266071;
4. 潍坊新大地水产养殖有限公司, 山东 潍坊 261108

**摘要:** 为探讨 pH 和氮磷比对青岛大扁藻(*Tetraselmis helgolandica*)和微小原甲藻(*Prorocentrum minimum*)生长竞争的影响, 本研究首先根据对虾养殖水体 pH 值的范围设置了 7.5, 8.0, 8.5 和 9.0 共 4 个 pH 梯度, 获得了青岛大扁藻抑制微小原甲藻的最佳 pH; 在该 pH 条件下, 设置了氮磷比分别为 3 : 2(高富磷组), 6 : 1(富磷组), 24 : 1(对照组)和 96 : 1(富氮组)等 4 个梯度, 其中, 单种培养体系中只接种青岛大扁藻或者微小原甲藻, 混合培养体系中同时按照 1 : 1 的比例接种青岛大扁藻和微小原甲藻。结果表明, 混合培养体系中, 青岛大扁藻在 pH 8.5 和 pH 9.0 时, 出现拐点时间最晚, 均为 7 d; 而微小原甲藻在 pH 8.5 和 pH 9.0 时, 出现拐点时间最早, 均为 3 d。pH 8.5 时青岛大扁藻对微小原甲藻的竞争抑制参数最大, 青岛大扁藻抑制微小原甲藻的最佳 pH 为 8.5。单种培养体系中, 微小原甲藻拐点出现的时间在高富磷组、对照组和富氮组中均晚于青岛大扁藻; 混合培养体系中, 对照组中微小原甲藻和青岛大扁藻拐点出现时间分别为 4 d 和 3 d, 而其他处理组 2 种微藻拐点出现的时间分别相同。氮磷比影响混合培养中 2 种微藻的竞争抑制参数, 其中, 96 : 1(富氮组)中拐点之后青岛大扁藻对微小原甲藻的竞争抑制参数( $\alpha$ )的平均值为 9.2063, 微小原甲藻对青岛大扁藻的竞争抑制参数( $\beta$ )为 3.4886。以上研究表明, 对虾养殖水体中, 青岛大扁藻抑制微小原甲藻的最佳条件是: pH 为 8.5, 氮磷比为 96 : 1。

**关键词:** pH; 氮磷比; 青岛大扁藻; 微小原甲藻; 种间竞争

中图分类号: S963

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)03-0587-09

浮游微藻是虾池生态系统的生产者, 但是, 张瑜斌等<sup>[1]</sup>研究表明, 浮游微藻的优势藻种在养殖过程中不断演替。研究者们普遍认为, 对虾养殖前期主要微藻是某些能较好适应低营养盐的硅藻和绿藻, 随着养殖的进行, 残饵和排泄物不断积累与分解使水体富营养化程度不断提高, 喜肥耐污的蓝藻、甲藻开始大量繁殖并成为优势种, 最终引起水华或赤潮<sup>[2-3]</sup>。李雪松等<sup>[4]</sup>研究表明, 某些赤潮性的甲藻能分泌毒素, 严重威胁对虾的健康养殖。浮游微藻群落的演替通常被认为与氮、

磷浓度, 温度, pH 等水质因子的变化有关<sup>[5-6]</sup>。陈家长等<sup>[7]</sup>研究了 pH 对鱼腥藻和普通小球藻两种微藻间生长竞争的影响, 表明 pH 对竞争结果有重要影响; Wang 等<sup>[8]</sup>研究了氮磷比对鱼腥藻和普通小球藻两种微藻间生长竞争的影响, 发现氮磷比对竞争结果也有重要影响。目前关于影响对虾养殖水体中微藻演替因子的研究较多<sup>[1-3]</sup>, 但是关于微藻演替的调控鲜有报道。

周名江等<sup>[9]</sup>研究表明, 微小原甲藻是引起赤潮的常见藻种之一。梁伟峰等<sup>[2]</sup>研究发现, 微小原

收稿日期: 2016-07-12; 修订日期: 2016-08-22.

基金项目: 国家虾产业技术体系-北方养殖岗位(CARS-47); 山东省泰山产业领军人才工程项目(LNJV2015002); 青岛海洋科学与技术国家实验室鳌山科技创新计划项目(2015ASKJ02).

作者简介: 葛红星(1986-), 男, 博士研究生, 主要从事对虾健康养殖. E-mail: hongxinggelu@163.com

通信作者: 李健, 研究员, 主要从事海水健康养殖技术研究. E-mail: lijian@ysfri.ac.cn

甲藻也是对虾养殖中后期水体中常见的浮游微藻。Shimizu<sup>[10]</sup>认为,微小原甲藻可能释放一些毒性物质,不仅毒害水产动物,甚至对人类健康也有潜在危害。青岛大扁藻是对虾养殖水体中常见微藻,也是对虾育苗、贝类养殖中常用的优良饵料,青岛大扁藻对水体中的氨氮等养殖废物有一定的去除作用,而且,郝雯瑾等<sup>[11]</sup>研究发现,青岛大扁藻能够通过释放克生物质而抑制其他种类微藻。尽管目前有关微小原甲藻和青岛大扁藻的研究较多<sup>[11-12]</sup>,但这些研究多是探讨环境因素对单一藻种生长特性的影响,而有关青岛大扁藻和微小原甲藻间生长竞争的报道较少。因此,本研究选用对虾养殖水体中常见的青岛大扁藻和微小原甲藻为实验对象,探讨不同 pH 及氮磷比条件下,青岛大扁藻和微小原甲藻的生长竞争,探讨微藻藻相演替的相关调控因子,为对虾养殖优良藻相的构建提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 藻种和培养

实验用微小原甲藻和青岛大扁藻由黄海水产研究所育种室提供。藻种培养基采用 f2 培养基<sup>[13]</sup>。单种培养过程中,以上两种微藻藻细胞生长稳定后均能有效监测<sup>[14]</sup>。微藻于 500 mL 锥形瓶中培养,锥形瓶均经清水冲洗干净后,120℃ 高温灭菌,烘干备用。

实验开始前,两种微藻分别在相应的实验条件下适应 5 个世代。实验时,将达到接种浓度的青岛大扁藻、微小原甲藻常温下 4000 r/min 离心 10 min 后,弃上清液,分别接种到一定体积(300 mL)的 f2 培养基稀释到实验所需浓度。将锥形瓶置于光照培养箱(武汉,瑞华)中进行一次性培养,直到微藻均达到最大生物量。培养箱内 CO<sub>2</sub> 浓度为 700 mg/L,光强为 3000 lx,光暗周期 12 h : 12 h,温度(20±1)℃。光照期间,每隔 3 h 摇动锥形瓶 1 次并随机更换锥形瓶的位置。实验过程的所有操作均是无菌条件下进行。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 不同 pH 条件对两种微藻生长竞争的影响** 根据对虾养殖水体中常见 pH,实验设置 4 个 pH

梯度(pH 7.5, 8.0, 8.5 和 9.0)。每个 pH 均设置 3 个实验组,分别为青岛大扁藻单种培养组,微小原甲藻单种培养组和青岛大扁藻和微小原甲藻混合培养组,其中,单种培养体系中只接种青岛大扁藻或者微小原甲藻,混合培养体系中按照 1 : 1 的比例同时接种青岛大扁藻和微小原甲藻。各实验组均设 3 个平行。实验期间,pH 由 0.1 mol/L 的 HCl 和 0.1 mol/L 的 NaOH 对 pH 进行调节。同时,每 24 h 对 pH 监测并调节。分别以 24 h 内 pH 变化的平均值作为实际梯度。实测 pH 分别为 7.42, 8.02, 8.56 和 9.11。

**1.2.2 不同 N/P 条件对两种微藻生长竞争的影响** 获得最佳 pH 条件后,参照 f2 培养基中 N、P 浓度,在该 pH 条件下,设置 3 个不同 N/P 浓度梯度,以 f2 培养基中 N/P 浓度为对照组(表 1),每个 N/P 比浓度均设置 3 个实验组,分别为青岛大扁藻单种培养组,微小原甲藻单种培养组和青岛大扁藻和微小原甲藻混合培养组,接种量同 1.2.1,各实验组均 3 个平行。N/P 比浓度分别通过添加的 NaNO<sub>3</sub> 和 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 调节,pH 调节同上。

表 1 N、P 初始添加浓度值

Tab. 1 The initial concentration of N, P and N/P ratio

组别 group	总氮含量/ (mol·L <sup>-1</sup> ) TN	总磷含量/ (mol·L <sup>-1</sup> ) TP	氮磷比/ (N/P)
高富磷组	8.83×10 <sup>-4</sup>	5.81×10 <sup>-4</sup>	3 : 2
富磷组	8.83×10 <sup>-4</sup>	1.45×10 <sup>-4</sup>	6 : 1
对照组	8.83×10 <sup>-4</sup>	3.63×10 <sup>-5</sup>	24 : 1
富氮组	2.65×10 <sup>-3</sup>	3.63×10 <sup>-5</sup>	96 : 1

### 1.3 细胞计数

自接种当日起,每天 08:00 充分摇匀后,分别取样并统计微藻数量<sup>[6]</sup>。微藻生物量均出现负增长时实验结束,微藻出现负增长前 1 d 的生物量即为该种微藻的最大现存量。

### 1.4 数据处理

**1.4.1 比生长速率** 根据微藻生物量计算比生长数量<sup>[6]</sup>:

$$\ln[N_n/N_{n-1}] = \mu_n \cdot (t_n - t_{n-1}) \quad (n=1, 2, 3, \dots)$$

式中, $\mu_n$  为第  $n$  天的比生长速率(/d);  $N_n$  为第  $n$  天的细胞密度(cells·L<sup>-1</sup>);  $N_{n-1}$  为第  $n-1$  天的细胞密度(cells/L);  $t_n$  为对应于  $N_n$  的培养天数;  $t_{n-1}$  为对应于  $N_{n-1}$  的培养天数。同时,将藻类从实验开始

至生物量达最大现存量这一时间段内的比生长速率的平均值定义为藻类的平均比生长速率( $\mu$ ), 用于比较藻类生长速率的大小。

**1.4.2 生长曲线拟合** 单种培养下微藻的生长以逻辑斯蒂方程  $N=K/(1+e^{-r \times t})$  拟合, 其中  $N$  为微藻生物量,  $K$  为最大生物量,  $r$  为内禀增长率。

应用逻辑斯蒂方程的对数形式  $\ln[(K-N)/N]=a-r \times t$ , 以最小二乘法进行回归分析, 获得该方程的斜率和截距作为  $a$  和  $r$  的估计值。

**1.4.3 竞争抑制参数的计算** 利用 Lotka-Volterra 竞争模型的差分形式(式 1、式 2)计算竞争抑制参数<sup>[2]</sup>。

$$(N_s - N_{s-1}) / (t_n - t_{n-1}) = r_s \times N_{s-1} (K_s - N_{s-1} - \alpha \times N_{m-1}) / K_s \quad (1)$$

$$(N_m - N_{m-1}) / (t_n - t_{n-1}) =$$

$$r_m \times N_{m-1} (K_m - N_{m-1} - \beta \times N_{s-1}) / K_m \quad (2)$$

式中,  $N_s$  和  $N_m$  分别为混合培养中的微小原甲藻和青岛大扁藻在时间  $t_n$  时的数量( $\times 10^4$  cells/mL);  $N_{s-1}$  和  $N_{m-1}$  分别为混合培养中微小原甲藻和青岛大扁藻在时间  $t_{n-1}$  时的数量( $\times 10^4$  cells/mL),  $r_s$  和  $r_m$  分别为微小原甲藻和青岛大扁藻的增长率(由单种培养经回归计算获得);  $K_s$  和  $K_m$  分别为微小原甲藻和青岛大扁藻的最大环境容纳量(由单种培

养获得);  $\alpha$  和  $\beta$  分别为混合培养中青岛大扁藻对微小原甲藻和微小原甲藻对青岛大扁藻竞争抑制参数。

应用式(1)和(2)分别计算混合培养藻类的增长曲线在拐点至达到最大环境容纳量期间每一单位时间的所有竞争抑制参数, 其平均值作为这种藻类对另一种藻类的竞争抑制参数估计值<sup>[15]</sup>。

抑制起始点为微藻生长曲线的拐点, 即逻辑斯蒂方程二阶导数等于 0 的时间  $t_n$  值, 这时  $N=K/2$ ,  $t_n=\alpha/r$ ,  $t_n$  对  $\alpha/r$  取整数<sup>[16-17]</sup>。

**1.5 统计分析**

采用单因素方差分析法处理数据, 并用  $t$  检验方法对回归方程进行回归显著性检验。

**2 结果与分析**

**2.1 pH 对微小原甲藻和青岛大扁藻生长竞争的影响**

单种培养体系中, 微小原甲藻和青岛大扁藻的生长曲线在不同 pH 条件下符合“S”形, 故均可用 Logistic 模型拟合, 进而得到微小原甲藻、青岛大扁藻各生长曲线的拐点出现时间(表 2)。单种培

表 2 不同 pH 下青岛大扁藻和微小原甲藻逻辑斯蒂方程模型拟合参数和增长曲线出现拐点的时间  
Tab. 2 Parameters of *Prorocentrum minimum* and *Tetraselmis helgolandica* regression coefficients of Logistic model and the growth curve inflection points at different pH

培养模式 culture system	pH	藻种 microalgae	最大生物量/ ( $10^6$ cells·mL <sup>-1</sup> ) $K$	常数 $a$	内禀增 长率 $r$	拟合度 $R^2$	拐点时间/d inflection point of time
单种培养 monoculture system	7.5	微小原甲藻 <i>Prorocentrum minimum</i>	4.66	2.798	0.406	0.968	6.89(7)
		青岛大扁藻 <i>Tetraselmis helgolandica</i>	6.27	2.811	0.499	0.961	5.61(6)
	8.0	微小原甲藻 <i>Prorocentrum minimum</i>	10.45	3.363	0.544	0.936	6.18(6)
		青岛大扁藻 <i>Tetraselmis helgolandica</i>	8.16	3.289	0.548	0.942	6.00(6)
	8.5	微小原甲藻 <i>Prorocentrum minimum</i>	11.00	4.105	0.802	0.989	5.12(5)
		青岛大扁藻 <i>Tetraselmis helgolandica</i>	6.24	3.334	0.538	0.989	6.20(6)
混合培养 mixed culture system	7.5	微小原甲藻 <i>Prorocentrum minimum</i>	9.87	3.918	0.560	0.997	7.00(7)
		青岛大扁藻 <i>Tetraselmis helgolandica</i>	6.38	2.938	0.460	0.953	6.39(6)
	8.0	微小原甲藻 <i>Prorocentrum minimum</i>	1.35	1.625	0.436	0.848	3.73(4)
		青岛大扁藻 <i>Tetraselmis helgolandica</i>	2.88	2.574	0.595	0.970	4.33(4)
	8.5	微小原甲藻 <i>Prorocentrum minimum</i>	1.45	1.577	0.484	0.950	3.26(3)
		青岛大扁藻 <i>Tetraselmis helgolandica</i>	5.23	3.081	0.533	0.978	5.78(6)
9.0	微小原甲藻 <i>Prorocentrum minimum</i>	1.59	1.858	0.597	0.969	3.11(3)	
	青岛大扁藻 <i>Tetraselmis helgolandica</i>	5.98	3.233	0.462	0.979	7.00(7)	
9.0	微小原甲藻 <i>Prorocentrum minimum</i>	1.38	1.743	0.666	0.921	2.62(3)	
	青岛大扁藻 <i>Tetraselmis helgolandica</i>	5.13	3.068	0.463	0.962	6.63(7)	

注: 括号内数字表示拐点出现的时间(d)四舍五入取整数。

Note: Numbers in brackets indicate the inflection point of time which was rounded to the nearest whole day.

养体系中,微小原甲藻在 pH 7.5, pH 8.0 和 pH 9.0 条件下拐点出现的时间均晚于青岛大扁藻;混合培养体系中,微小原甲藻在 pH 7.5, pH 8.0, pH 8.0 和 pH 9.0 各种 pH 条件下拐点出现的时间均早于青岛大扁藻。混合培养体系中,青岛大扁藻在 pH 8.5 和 pH 9.0 时,出现拐点时间最晚,均为 7 d;而微小原甲藻在 pH 8.5 和 pH 9.0 时出现拐点时间最早,均为 3 d。

如表 3 所示,  $\alpha$  和  $\beta$  在 pH 7.5 条件下分别为: 1.2477 和 2.5002; pH 8.0 条件下为: 4.8065 和 2.5519; pH 8.5 条件下分别为: 5.7447 和 0.9494; pH 9.0 条件下为: 5.0477 和 1.3829。 $\alpha$  在 pH 8.5 条件下最大,而  $\beta$  在 pH 7.5 条件下最大。考虑到 pH 8.5 时,共培养体系中,青岛大扁藻出现拐点时间最晚,微小原甲藻出现拐点时间最早以及青岛大扁藻对微小原甲藻的竞争抑制参数最大,同

时考虑到弱碱性水体有利于对虾生长和抗病力的提高,故不同 N/P 条件对微小原甲藻和青岛大扁藻生长竞争影响实验中,青岛大扁藻抑制微小原甲藻的最佳 pH 为 8.5。

## 2.2 氮磷比对青岛大扁藻和微小原甲藻生长竞争的影响

由表 4 可知,无论是单种培养还是混合培养,氮磷比均影响 2 种微藻的比生长速率。随着氮磷比的增大,单种培养体系中,微小原甲藻的平均比生长速率呈现降低的趋势:富磷组>高富磷组>对照组>富氮组;青岛大扁藻的平均比生长速率表现为:富磷组>高富磷组>富氮组>对照组。混合培养体系中,微小原甲藻呈现先升高后降低的趋势:对照组>富磷组>高富磷组>富氮组;青岛大扁藻的平均比生长速率大小表现为:高富磷组>对照组>富磷组>富氮组。

表 3 不同 pH 下拐点出现后微小原甲藻和青岛大扁藻的竞争抑制参数  
Tab. 3 Competitive parameters of *Prorocentrum minimum* and *Tetraselmis helgolandica* after inflection point at different pH

培养时间/d culture time	pH=7.5		pH=8.0		pH=8.5		pH=9.0	
	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$	$\beta$
3			7.2915		7.4870		5.6936	
4	2.2794	5.5734	5.1821		5.4527		4.4017	
5	2.1688	-0.5729	4.7184		7.2132			
6	0.9996		2.0341	3.9613	2.8258			
7	1.4367			1.8822		1.6515		1.8209
8	0.9341			3.1348		1.4528		1.7704
9	0.8208			2.6971		1.2272		1.1360
10	0.7068			1.0842		0.3373		0.8043
11	0.6356					0.0784		
平均 mean	1.2477	2.5002	4.8065	2.5519	5.7447	0.9494	5.0477	1.3829

表 4 不同 N/P 下微小原甲藻和青岛大扁藻的平均比生长速率  
Tab. 4 Mean specific growth rate ( $\mu$ ) of *Prorocentrum minimum* and *Tetraselmis helgolandica* at different N/P ratio

藻种 microalgae	氮磷比 N/P ratio	比生长速率 mean $\mu$	
		单种培养 sole culture	混合培养 mixed culture
微小原甲藻 <i>Prorocentrum minimum</i>	3 : 2	0.414215	0.245987
	6 : 1	0.417255	0.395603
	24 : 1	0.365658	0.405359
	96 : 1	0.333853	0.336662
青岛大扁藻 <i>Tetraselmis helgolandica</i>	3 : 2	0.362018	0.361239
	6 : 1	0.498091	0.308089
	24 : 1	0.299351	0.316187
	96 : 1	0.331061	0.253131

由表 5 可知, 无论是单培养体系中还是混合培养体系中, 微小原甲藻和青岛大扁藻拐点出现时间均在对照组最晚。单种培养体系中, 微小原甲藻拐点出现的时间在高富磷组, 对照组和富氮组中均晚于青岛大扁藻; 混合培养体系中, 对照组中微小原甲藻和青岛大扁藻拐点出现时间分别为 4 d 和 3 d, 而其他处理组 2 种微藻拐点出现的时间分别相同。各处理组中, 2 种微藻在混合培养体系中拐点出现的时间均早于单种培养。

如表 6 所示, 氮磷比影响混合培养中 2 种微藻的竞争抑制参数。随着氮磷比的增大,  $\alpha$  和  $\beta$  均

呈现增大的趋势。其中, 高富磷组  $\alpha$  和  $\beta$  分别为 0.7329 和 0.4842; 富磷组  $\alpha$  和  $\beta$  分别为 1.8481 和 1.1094; 对照组  $\alpha$  和  $\beta$  分别为 3.3874 和 3.2665; 富氮组  $\alpha$  和  $\beta$  分别为 9.2063 和 3.4886。

### 3 讨论

#### 3.1 pH 对青岛大扁藻和微小原甲藻生长竞争的影响

陈家长等<sup>[7]</sup>研究表明, pH 值是影响微藻生长的重要因素。本实验中, 无论是单种培养体系还是混合培养体系中, 微小原甲藻和青岛大扁藻在

表 5 不同 N/P 下青岛大扁藻和微小原甲藻的逻辑斯谛方程模型拟合参数和增长曲线出现拐点的时间  
Tab. 5 The parameters of *Prorocentrum minimum* and *Tetraselmis helgolandica* regression coefficients of Logistic equation model and growth curve inflection points at different N/P

培养模式 culture system	pH	藻种 microalgae	最大生物量/ (10 <sup>6</sup> cells/mL) K	常数 a	内禀增 长率 r	拟合度 R <sup>2</sup>	拐点时间/d inflection point of time
单种培养 monoculture system	3 : 2	微小原甲藻 <i>Prorocentrum minimum</i>	2.38	3.593	0.946	0.895	3.80(4)
		青岛大扁藻 <i>Tetraselmis helgolandica</i>	1.83	2.949	0.958	0.917	3.07(3)
	6 : 1	微小原甲藻 <i>Prorocentrum minimum</i>	5.57	3.616	0.983	0.966	3.67(4)
		青岛大扁藻 <i>Tetraselmis helgolandica</i>	3.62	3.630	0.954	0.909	3.80(4)
	24 : 1	微小原甲藻 <i>Prorocentrum minimum</i>	11.85	4.361	0.991	0.981	4.40(5)
		青岛大扁藻 <i>Tetraselmis helgolandica</i>	6.34	3.594	0.986	0.973	3.65(4)
	96 : 1	微小原甲藻 <i>Prorocentrum minimum</i>	10.22	4.446	0.985	0.970	4.51(5)
		青岛大扁藻 <i>Tetraselmis helgolandica</i>	2.19	2.509	0.986	0.971	2.54(3)
混合培养 mixed culture system	3 : 2	微小原甲藻 <i>Prorocentrum minimum</i>	0.80	1.591	0.928	0.860	1.71(2)
		青岛大扁藻 <i>Tetraselmis helgolandica</i>	1.27	2.183	0.978	0.957	2.23(2)
	6 : 1	微小原甲藻 <i>Prorocentrum minimum</i>	1.46	2.629	0.946	0.895	2.78(3)
		青岛大扁藻 <i>Tetraselmis helgolandica</i>	1.40	2.738	0.976	0.952	2.81(3)
	24 : 1	微小原甲藻 <i>Prorocentrum minimum</i>	3.42	3.479	0.958	0.918	3.63(4)
		青岛大扁藻 <i>Tetraselmis helgolandica</i>	2.00	2.416	0.986	0.972	2.55(3)
	96 : 1	微小原甲藻 <i>Prorocentrum minimum</i>	1.62	1.882	0.991	0.981	1.90(2)
		青岛大扁藻 <i>Tetraselmis helgolandica</i>	1.37	1.779	0.994	0.988	1.79(2)

注: 括号内数字表示拐点出现的时间(d)四舍五入取整数。

Note: Numbers in brackets indicate the inflection point of time which was rounded to the nearest whole day.

表 6 不同 N/P 下拐点出现后微小原甲藻和青岛大扁藻的竞争抑制参数

Tab. 6 Competitive parameters of *Prorocentrum minimum* and *Tetraselmis helgolandica* after inflection point at different N/P

培养时间/d time	氮磷比 N/P ratio							
	3 : 2		6 : 1		24 : 1		96 : 1	
	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$	$\beta$
2	-1.5180	0.6902				-0.8885	10.2528	5.6184
3	2.4542	0.3312	1.1157	0.2851		8.5015	14.6671	4.9506
4	1.2625	0.4313	2.5805	1.6469	5.7310	4.4632	12.0034	2.8164
5				1.3963	0.0787	3.1695	-0.0981	3.1502
6					4.3523	1.0869		0.9072
平均 mean	0.7329	0.4842	1.8481	1.1094	3.3874	3.2665	9.2063	3.4886

不同 pH 条件下出现的拐点时间不同, 表明 pH 影响微藻生长。邓光等<sup>[18]</sup>研究也表明, 微藻对中性或者偏碱性环境较为适宜, 而 pH<6.0 或者 pH>9.0, 微藻的生长就会受到抑制。单种培养体系中, 微小原甲藻在 pH 7.5、pH 8.0 和 pH 9.0 时拐点出现的时间均晚于青岛大扁藻; 混合培养中, 微小原甲藻拐点出现的时间均早于青岛大扁藻, 表明混合培养体系中, 微小原甲藻从自由的快速增长阶段转入互相抑制的生长阶段的时间早于青岛大扁藻。pH 7.5 条件下, 微小原甲藻和青岛大扁藻几乎同时对对方产生抑制, 而 pH 8.0, pH 8.5 和 pH 9.0 条件下, 微小原甲藻开始受到青岛大扁藻抑制的时间比青岛大扁藻开始收到微小原甲藻抑制的时间分别早 3 d、4 d 和 4 d, 表明青岛大扁藻对微小原甲藻的抑制作用随着 pH 的升高而增强。

郑忠明等<sup>[16]</sup>研究发现, 混合培养体系中微藻的抑制参数( $\alpha$  和  $\beta$ )可反映不同微藻种类的抑制作用。本实验结果显示, pH 7.5 条件下拐点之后  $\alpha$  小于  $\beta$ ; pH 8.0, pH 8.5 和 pH 9.0 条件下拐点之后  $\alpha$  大于  $\beta$ , 这可能是因为不同微藻具有不同的最佳生长 pH 范围。有研究表明, 旋链角毛藻的最适 pH 为 8.3<sup>[19]</sup>, 颤藻的最适 pH 范围为 7.3~8.6<sup>[20]</sup>, 这与戴芳芳等<sup>[21]</sup>关于东海原甲藻的最适 pH 为 7.5 的结果也是一致的。混合培养体系中, pH 8.0~9.0 时,  $\alpha$  大于  $\beta$ , 表明碱性环境中青岛大扁藻的竞争优势强于微小原甲藻。

### 3.2 氮磷比对青岛大扁藻和微小原甲藻生长竞争影响

研究者们普遍认为, 氮、磷是影响水体中微藻生长的主要因子<sup>[6, 8, 22]</sup>。孙耀等<sup>[23]</sup>研究表明, 水体中无机氮、磷二者之一低于其生长所需最低值, 就可能影响浮游微藻的正常生长。本实验氮磷的最低值分别为  $8.83 \times 10^{-4}$  mol/L 和  $3.63 \times 10^{-5}$  mol/L, 均高于微藻生长所需最低值, 故两种微藻在各处理组均表现出一定的生长性。本实验中, 无论是单培养体系还是混合培养体系条件下, 随着氮磷比的增大, 微小原甲藻的平均比生长速率呈现降低的趋势, 微小原甲藻的生长受到抑制, 表明高氮处理下, 影响微小原甲藻生长繁殖最直接因素可能是磷的缺乏。这与 Khozin-Goldberg 等<sup>[24]</sup>得

出的磷缺乏影响藻类细胞的生长以及胞内物质积累结论一致。无论是单培养体系还是混合培养体系, 微小原甲藻和青岛大扁藻拐点出现时间在对照组均最晚, 表明对照组可能提供了 2 种微藻适宜的氮磷比或氮、磷浓度。各处理组中, 2 种微藻在混合培养体系中拐点出现的时间均早于单种培养, 表明混合培养体系中 2 种微藻彼此抑制。

本实验中, 混合培养条件下, 青岛大扁藻对微小原甲藻的抑制参数( $\alpha$ )的平均值在高富磷组、富磷组、对照组和富氮组分别为 0.7329、1.8481、3.3874 和 9.2063, 而微小原甲藻对青岛大扁藻的抑制参数( $\beta$ )的平均值在高富磷组、富磷组、对照组和富氮组分别为 0.4842、1.1094、3.2665 和 3.4886, 在所有营养条件下,  $\alpha$  均大于对应的  $\beta$ 。陈德辉等<sup>[15]</sup>研究得到微囊藻对栅藻的抑制能力是栅藻对微囊藻抑制能力的 7 倍的结论, 明显高于本实验室中青岛大扁藻对微小原甲藻的抑制能力。这可能是因为, 微小原甲藻作为一种赤潮种对营养盐的吸收能力也较强, 故生长速度也较快。万蕾等<sup>[25]</sup>也研究发现, 在大多数不同 N/P 营养条件下, 铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)和四尾栅藻(*Scenedesmus quadricauda*)表现出相互竞争、相互抑制的作用。本实验中, 混合培养体系条件下, 青岛大扁藻可以抑制微小原甲藻。这可能是因为相对于微小原甲藻, 青岛大扁藻可以自由游动, 能避免局部营养不足及其种内竞争, 获得足够生长所需要的营养盐和光照等, 所以在竞争中占优势。这与 Pang 等<sup>[26]</sup>, 王珂等<sup>[27]</sup>的结论也是一致的。另外, 郝雯瑾等<sup>[11]</sup>研究表明, 青岛大扁藻能分泌克生物质而直接抑制其他种类微藻, 故本实验中, 青岛大扁藻在混合培养体系中更能表现出竞争优势性。另外, 有研究表明甲藻最适 pH 为 7.5<sup>[21]</sup>, 而本实验中 pH 为 8.5, 低于甲藻生长所需最适 pH, 非最适合 pH 可能抑制了甲藻的生长。随着营养盐中氮磷比的降低, 青岛大扁藻和微小原甲藻对对方的抑制参数均增大, 这与 Tilman 等<sup>[28]</sup>关于绿藻对磷的要求比氮高的结论相似。

## 4 结论

pH 为 8.5 时, 混合培养体系中, 青岛大扁藻出

现拐点时间最晚(7 d), 微小原甲藻出现拐点时间最早(3 d), 青岛大扁藻对微小原甲藻的竞争抑制参数最大(5.7447), 表明青岛对微小原甲藻抑制能力最佳的 pH 为 8.5。pH 为 8.5 条件下, 氮磷比对 2 种微藻的平均比生长速率均有影响。各处理组中, 2 种微藻在混合培养体系中拐点出现的时间均早于单种培养。氮磷比 96 : 1(富氮组)组的  $\alpha$  和  $\beta$  分别为 9.2063 和 3.4886。以上研究表明, 对虾养殖水体中, 青岛大扁藻抑制微小原甲藻的最佳条件是: pH 为 8.5, 氮磷比为 96 : 1。

### 参考文献:

- [1] Zhang Y B, Gong Y Y, Chen C P, et al. Succession of phytoplankton community in exalted shrimp ponds during culture process[J]. Chinese Journal of Ecology, 2009, 28(12): 2532-2540. [张瑜斌, 龚玉艳, 陈长平, 等. 高位虾池养殖过程浮游植物群落的演替[J]. 生态学杂志, 2009, 28(12): 2532-2540.]
- [2] Liang W F, Li Z J, Chen S W, et al. Investigation and analysis on characteristics of microalgae community in prawn ponds[J]. South China Fisheries Science, 2007, 3(5): 33-37. [梁伟峰, 李卓佳, 陈素文, 等. 对虾养殖池塘微藻群落结构的调查与分析[J]. 南方水产, 2007, 3(5): 33-37.]
- [3] Li Z J, Zhang H H, Guo Z X, et al. Species composition, quantity variation and bio-diversities of phytoplankton in shrimp culture ponds[J]. Journal of Zhanjiang Ocean University, 2005, 25(3): 29-34. [李卓佳, 张汉华, 郭志勋, 等. 虾池浮游微藻的种类组成、数量和多样性变动[J]. 湛江海洋大学学报, 2005, 25(3): 29-34.]
- [4] Li X S, Liang J R, Chen C P, et al. Species diversity of phytoplankton in shrimp aquaculture areas in the Quanzhou Bay, Fujian Province[J]. Journal of Xiamen University: Natural Science, 2006, 45(S1): 234-239. [李雪松, 梁君容, 陈长平, 等. 泉州湾虾池浮游植物种类多样性研究[J]. 厦门大学报: 自然科学版, 2006, 45(S1): 234-239.]
- [5] Wang J, Chen J C, Meng S L. The effects of environmental factors on the growth and competition of algae[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2013, 29(17): 52-56. [王菁, 陈家长, 孟顺龙. 环境因素对藻类生长竞争的影响[J]. 中国农学通报, 2013, 29(17): 52-56.]
- [6] Meng S L, Qiu L P, Hu G D, et al. Effect of nitrogen and phosphorus ratios on growth and competition of two blue-green algae[J]. 2012, 31(7): 1438-1444. [孟顺龙, 裘丽萍, 胡庚东, 等. 氮磷比对两种蓝藻生长及竞争的影响[J]. 农业环境科学学报, 2012, 31(7): 1438-1444.]
- [7] Chen J Z, Wang J, Qiu L P, et al. Effect of pH on growth and competition of *Chlorella vulgaris* and *Anabaena* sp. strain PCC[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2014, 23(2): 289-294. [陈家长, 王菁, 裘丽萍, 等. pH 对鱼腥藻和普通小球藻生长竞争的影响[J]. 生态环境学报, 2014, 23(2): 289-294.]
- [8] Wang J, Qiu L P, Meng S L, et al. Influences of nitrogen-phosphorus ratio on the growth and competition of *Chlorella vulgaris* and *Anabaena* sp. strain PCC[J]. Agric Sci Technol, 2015, 16(8): 1757-1762.
- [9] Zhou M J, Zhu M Y, Zhang J. Status of harmful algal blooms and related research activities in China[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2001, 13(2): 54-59. [周名江, 朱明远, 张经. 中国赤潮的发生趋势和研究进展[J]. 生命科学, 2001, 13(2): 54-59.]
- [10] Shimizu Y. Dinoflagellate toxins[C]/Taylor F J R. The Biology of Dinoflagellates: Botanical Monographs Vol. 21. Boston: Blackwell Scientific Publications, 1987: 282-315.
- [11] Hao W J, Wang Y, Tang X X. Interactions between two marine microalgae: *Amphidinium carterae* hultbert and *Platymonas helgolandica* var. tsingtaoensis in under controlled Laboratory co-culture[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2008, 47(S1): 98-105. [郝雯瑾, 王悠, 唐学玺. 两种海洋微藻——强壮前沟藻与青岛大扁藻之间的相互作用研究[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2008, 47(S1): 98-105.]
- [12] Shi Y J, Hu H H, Ma R Y, et al. Photosynthetic characteristics of *Prorocentrum minimum* and its nutrient uptake at different nitrogen and phosphorus levels[J]. The Chinese Journal of Process Engineering, 2004, 4(6): 554-560. [石岩峻, 胡晗华, 马润宇, 等. 不同氮磷水平下微小原甲藻对营养盐的吸收及光合特性[J]. 过程工程学报, 2004, 4(6): 554-560.]
- [13] Guillard R R L, Ryther J H. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve [J]. Can J Microbiol, 1962, 8: 229-239.
- [14] Hecky R E, Kilham P. Nutrient limitation of phytoplankton in freshwater and marine environments: a review of recent evidence on the effects of enrichment[J]. Limnol Oceanogr, 1988, 33: 196-822.
- [15] Chen D H, Liu Y D, Yuan J F, et al. Experiments of mixed culture and calculation of competitive parameters between *Microcystis* (Cyanobacteria) and *Scenedesmus* (Green algae)[J]. Acta Ecologica Sinica, 1999, 19(6): 908-913. [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.]
- [16] Zheng Z M, Bai P F, Lu K H, et al. Growth characteristics

- and competitive parameters of *Microcystis aeruginosa* and *Scenedesmus quadricauda* at different temperatures[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, 32(5): 720–727. [郑忠明, 白培峰, 陆开宏, 等. 铜绿微囊藻和四尾栅藻在不同温度下的生长特性及竞争参数计算[J]. 水生生物学报, 2008, 32(5): 720–727.]
- [17] Mao H, Xu H, Liu Z P, et al. Effect of initial cell density on population competition between *Skeletonema costatum* and *Chaetoceros curvisetus*[J]. *Marine Environmental Science*, 2008, 27(5): 458–461. [茅华, 许海, 刘兆普, 等. 不同起始细胞数量对旋链角毛藻和中肋骨条藻种群竞争的影响[J]. 海洋环境科学, 2008, 27(5): 458–461.]
- [18] Deng G, Geng Y H, Hu H J, et al. Effects of environmental factors on photosynthesis of a high biomass bloom forming species *Prorocentrum donghaiense*[J]. *Marine Science*, 2009, 33(12): 34–39. [邓光, 耿亚洪, 胡鸿钧, 等. 几种环境因子对高生物量赤潮甲藻-东海原甲藻光合作用的影响[J]. 海洋科学, 2009, 33(12): 34–39.]
- [19] Mao H, Xu H, Liu Z P. Effects of water temperature, illumination, salinity and pH on the growth of *Chaetoceros curvisetus*[J]. *Ecological Science*, 2007, 26(5): 432–436. [茅华, 许海, 刘兆普. 温度、光照、盐度及 pH 对旋链角毛藻生长的影响[J]. 生态科学, 2007, 26(5): 432–436.]
- [20] He C H, Huang X H, Li C L, et al. Limiting conditions of temperature, illumination intensity, salinity and pH on growth of *Oscillatoria* sp.[J]. *Fishery Modernization*, 2011, 38(6): 20–25. [贺春花, 黄翔鸽, 李长玲, 等. 温度、光照度、盐度和 pH 对颤藻生长的限制条件研究[J]. 渔业现代化, 2011, 38(6): 20–25.]
- [21] Dai F F, Zhou C X, Yan X J. Effect of pH and light on population growth and activity of extracellular carbonic anhydrase in two species of dinoflagellates[J]. *Marine Environmental Science*, 2011, 30(5): 694–698. [戴芳芳, 周成旭, 严小军. pH 及光照对两种赤潮甲藻种群生长和胞外碳酸酐酶活性的影响[J]. 海洋环境科学, 2011, 30(5): 694–698.]
- [22] Zheng S F, Yang S W, Jin X C. Dynamic studies on the effect of nutrients on the growth of *Microcystis aeruginosa*[J]. *Environmental Science*, 2005, 26(2): 152–156. [郑朔方, 杨苏文, 金相灿. 铜绿微囊藻生长的营养动力学[J]. 环境科学, 2005, 26(2): 152–156.]
- [23] Sun Y, Li F, Li J, et al. Phytoplankton community characteristics and their relationship with nutrient salts in shrimp ponds[J]. *Marine Fisheries Research*, 1998, 19(2): 45–51. [孙耀, 李峰, 李健, 等. 虾塘水体中浮游植物群落特征及其与营养状况的关系[J]. 海洋水产研究, 1998, 19(2): 45–51.]
- [24] Khozin-Goldberg I, Cohen Z. The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water euglenoid *Monodus subterraneus*[J]. *Phytochemistry*, 2006, 67(7): 696–701.
- [25] Wan L, Zhu W, Zhao L F. Effect of nitrogen and phosphorus on growth and competition of *M. aeruginosa* and *S. quadricauda*[J]. *Environmental Science*, 2007, 26(6): 1230–1235. [万蕾, 朱伟, 赵联芳. 氮磷对微囊藻和栅藻生长及竞争的影响[J]. 环境科学, 2007, 26(6): 1230–1235.]
- [26] Pang S J, Zhang Z H, Bao Y, et al. Settling abalone veliger larvae in a free-swimming microalgal culture[J]. *Aquaculture*, 2006, 258: 327–336.
- [27] Wang K, Pang Y, Gao G. Comparison of Competition between *Microcystis aeruginosa* and *Scenedesmus obliquus* under different disturbance[J]. *Jiangsu Environmental Science and Technology*, 2006, 4(19): 40–42. [王珂, 逢勇, 高光. 不同扰动条件下微囊藻和栅藻竞争能力的比较[J]. 江苏环境科技, 2006, 4(19): 40–42.]
- [28] Tilman D, Sterner R W. Invasions of equilibria: Tests of resource competition using two species of algae[J]. *Oecologia*, 1984, 61: 197–200.



## Effect of pH level and N/P ratio on growth and competition of the microalgae *Tetraselmis helgolandica* and *Prorocentrum minimum*

GE Hongxing<sup>1,2</sup>, CHEN Zhao<sup>1</sup>, LI Jian<sup>2,3</sup>, FENG Yanyan<sup>2</sup>, LIU Sitao<sup>4</sup>, ZHAO Fazhen<sup>2</sup>

1. Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;
2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Qingdao 266071, China;
3. Functional Laboratory of Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China;
4. Weifang Xindadi Aquiculture Co., Ltd., Weifang 261108, China

**Abstract:** *Tetraselmis helgolandica*, with several varieties, is one of numerous species of unicellular free-swimming marine green algae that are widely used for intensive rearing of a variety of marine animal larvae. *Prorocentrum minimum* is a dinoflagellate capable of producing powerful biotoxins and it is commonly found in shrimp ponds. Chief physical and chemical concerns of the commercial growing environment of microalgae are pH and the nitrogen–phosphorus (N/P) ratio. To identify the optimum growth conditions of *Tetraselmis helgolandica* to inhibit the growth of *Prorocentrum minimum* in shrimp ponds, we tested for interspecies competition at various nutrient concentrations after determining the optimum pH for each species. Prior to the start of each test, *in vitro* cultures were maintained for an adaption period of approximately 5 generations. Thereafter, the experiments were conducted in batch cultures and continued up to 10 days, and the microorganisms were grown until either late exponential phase or early stationary phase. The pH levels and N/P ratios chosen took into account the common environmental conditions found in shrimp ponds. With this in mind, a culture experiment was first carried out using four different pH levels (7.5, 8.0, 8.5 and 9.0) and a constant N/P ratio of 24, so as to determine the optimum growth rate for *Tetraselmis helgolandica*. After deciding the best pH conditions, the N/P ratio was selected considering the concentrations of DIN and DIP found in shrimp ponds. The next test thus used four different N/P ratios: 3 : 2, 6 : 1, 24 : 1 and 96 : 1. The results showed that the maximum carrying capacity ( $K$ ) of both *Tetraselmis helgolandica* and *Prorocentrum minimum* was lower than that in the environments of individual cultivation. This finding indicated that the inhibition parameter of interspecies competition between these two algae could be significantly influenced by pH conditions. The maximum rate of competition inhibition of *Tetraselmis helgolandica* against *Prorocentrum minimum* occurred at pH 8.5, with an inhibition parameter value of 5.7447, and the value of inhibition of *Prorocentrum minimum* against *Tetraselmis helgolandica* was 3.4886, also at pH 8.5. Therefore, the nutrient limitation study was set at a constant pH of 8.5 against the four N/P ratios. The results of that experiment showed that the inhibition parameter of interspecies competition could also be significantly influenced by N/P ratio. Maximum inhibition of *Tetraselmis helgolandica* against *Prorocentrum minimum* occurred at the N/P ratio 96 : 1, with an inhibition value of 9.2063, whereas the inhibition value for *Prorocentrum minimum* against *Tetraselmis helgolandica* was 3.4886; hence, the inhibition effect of *Tetraselmis helgolandica* on *Prorocentrum minimum* was stronger than that of *Prorocentrum minimum* on *Tetraselmis helgolandica*. Thus, we propose that the optimum growth conditions of *Tetraselmis helgolandica* to inhibit growth of *Prorocentrum minimum* can be achieved at pH 8.5 and N/P ratio 96 : 1. In shrimp culture, the pH level and N/P ratio of the culture water can be accordingly adjusted to control algal growth; this approach can be applied for the purposes of controlling the production process, to assist with accurate water technology research, or to control eutrophication the culture water.

**Key words:** pH; N/P ratio; *Prorocentrum minimum*; *Tetraselmis helgolandica*; interspecies competition

**Corresponding author:** LI Jian. E-mail: lijian@ysfri.ac.cn