第25卷第6期　　水生生物学报　　Vol.25, No.6
2001年11月　　ACTA HYDROBIOLOGICA SINICA　　Nov., 2001

普通小球藻生长与武汉东湖水体磷形态的相关研究

周培疆[1,2]　郑振华[1]　余振坤[1]　仇银燕[1]　严国安[1]　吴振斌[2]
(1. 武汉大学环境科学系; 2. 中国科学院水生生物研究所,武汉　430072)

摘要: 本文探讨了武汉东湖水体中总溶解磷(TSP)、溶解反应磷(SRP)、总反应磷(TRP)、溶解水解磷(SHP)和颗粒磷(PP)对普通小球藻生长的生物有效利用性。进行了普通小球藻生长量与各磷形态及总磷(TP)被利用浓度的一元相关分析,进一步讨论了这些一元相关方程的不足。并用多元回归分析建立了普通小球藻生长量(N)与所测几种磷形态被利用浓度(C_{TSP}, C_{SRP}, C_{TRP}, C_{SHP}, C_{PP})的相关模型。这些模型可用于评价湖泊水体富营养化的程度及预测藻的生长潜力。

关键词: 普通小球藻; 磷形态; 生物有效性; 多元回归
中图分类号: Q949.2　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 1000-3207(2001)06-0571-06

氮磷在天然水体富营养化中的作用已被广泛认可。由于自然界中存在的含磷化合物的移动性较氮化物低,因此磷对水体中初级生产力的限制作用比氮更为广泛,所以磷是湖泊水体中藻类种群和密度的第一限制性营养元素[1~5]。近年来,武汉东湖受人类生活及生产活动的影响,大量生活污水、工业废水以及农田和地表径流等流入东湖,造成东湖水体磷含量升高,常出现水华及大量死鱼现象,富营养化程度日趋严重。

自然界进入湖泊水体的磷中,溶解态的磷只有一部分属正磷酸盐,此系生物体直接利用的磷形态,其余部分中溶解态和悬浮态的生物可利用磷及有机悬浮态磷可逐渐以正磷酸盐形式释放出磷,故为生物体潜在的可利用磷[4]。因此在探讨磷对生物体生长影响的研究中,仅考虑某种单一磷形态或总磷的影响是不够的,应全面考虑多种磷形态的综合作用。本文初步探讨了武汉东湖水体中总溶解磷(TSP)、溶解反应磷(SRP)、总反应磷(TRP)、溶解水解磷(SHP)和颗粒磷(PP)对普通小球藻生长的生物有效性,并建立了普通小球藻生长与各磷形态之间的相关模型。

1　材料与方法

1.1　藻的接种与培养　选用普通小球藻(*Chlorella vulgaris* Beij),于水生4号培养液中接种,在恒温、光照条件下进行培养,重复2-3次。所得普通小球藻浓度经显微镜计数确定超过10^6cell·mL^{-1}。实验前将处于对数生长期的藻液离心分离,再用无菌水反复冲洗数次以除去藻表面吸附的多余的磷,然后将藻转入无磷的水生4号培养液中培养2-3d,

收稿日期:2000-10-10;**修订日期**:2001-03-11
基金项目:淡水生态与生物技术国家重点实验室开放课题基金资助
作者简介:周培疆(1956—),男,湖南省人;博士;现从事环境生态化学研究

使藻体内蓄积的磷消耗完，从而获得饥饿培养后的藻。该藻液即作为实验用藻种。

1.2 东湖水体中不同磷形态测定 参照已报道的湖水中磷形态分析的方法[4]对东湖水体中不同磷形态进行测定，具体测定方法是用抗坏血酸作还原剂，钼蓝显色后在722型光栅分光光度计（上海申化仪表自控公司产）上于710nm处用3cm比色皿测定东湖水体中的总磷（TP）、总反应磷（TRP）、总溶解磷（TSP）、溶解水解磷（SHP）和溶解反应磷（SRP）等磷形态浓度。所用试剂均为分析纯。具体操作方法如下：分别在各采样点采集东湖表层水样，离心后高压灭菌。

（1）总磷（TP）测定：取25mL离心灭菌水样于大试管中，加入2g过硫酸铵和0.25mL浓硫酸，水浴（90—100℃）消化1.5h，冷却至室温，用酚酞试剂调pH值，转移至50mL容量瓶中，钼蓝显色30min，定容测定。

（2）总反应磷（TRP）测定：取25.00mL离心灭菌水样于50mL容量瓶中，调pH值，钼蓝显色，定容测定。

（3）溶解形态磷制备：将离心灭菌水样通过直径35mm，孔径0.45μm滤膜抽滤，然后进行各溶解形态磷的测定。

（4）总溶解磷（TSP）测定：取上述滤液25mL于大试管中，其余操作同总磷测定。

（5）溶解水解磷（SHP）测定：取上述滤液25mL于大试管中，加入2.5mL 4.5mol·L^{-1}硫酸，水浴（90℃）消化45min，冷却至室温，调pH值，钼蓝显色，定容测定。

（6）溶解反应磷（SRP）测定：取上述滤液25mL于50mL容量瓶中，调pH值，钼蓝显色，定容测定。

（7）颗粒磷（PP）为总磷（TP）与总溶解磷（TSP）之差。

1.3 生长藻量的测定 将所培养的藻液计数后，取一定量配制成一系列不同藻细胞浓度的藻液，于650nm处测定其吸光度，并作藻细胞浓度与其吸光度的标准曲线。在藻类达到较大生长量时，取少量藻液每隔24h测定其吸光度，直至其吸光度值前后变化不超过5%时即可认为藻类已达到最大生长量。

1.4 普通小球藻生长与东湖水体中的磷形态相关实验 采集不同采样点的东湖水样，4500r/min离心分离，高压灭菌后冷却至室温。各取一部分离心灭菌水样测定其总磷及各磷形态浓度。再分别各取300mL离心灭菌水样于500mL锥形瓶中，接种入经无菌水多次洗涤的处于对数生长期，并在无磷水生4号培养液中培养2—3d的普通小球藻，接种量2×10^4cell·mL^{-1}。在恒温、光照条件下培养，每天摇动各培养样品5—6次，并经常更换各锥形瓶位置，以使藻类不致沉积及各样品光照均匀。在藻类达较大生长量时，取少量藻液每隔24h测定其吸光度，直至其前后吸光度值变化不超过5%时为止。最后离心分离，取上部清液测定其终态总磷及各磷形态浓度。

1.5 多元回归分析 采用SPSS（Statistics Package for Social Science）（Windows9.0版本）统计软件对普通小球藻最大生长量与各磷形态被利用浓度分别进行多元回归分析[6]。

2 结果和讨论

2.1 普通小球藻对东湖水体中磷形态的利用率 所测14个东湖水样中，普通小球藻达最大生长量（N）时的总磷（TP）及各磷形态（SRP、TRP、SHP、TSP、PP）浓度与藻培养前的总

磷及各磷形态浓度差值(即藻所摄取利用的磷浓度)列于表 1。其中 $N(\times 10^6)$的标准误差约为 ±0.003；C_{TP}的标准误差约为 ±0.002；C_{SRP}、C_{TRP}、C_{SHP}、C_{TSP}和 C_{PP}的标准误差约为 ±0.002 和 ±0.0003。

表 1　普通小球藻生长量与其所摄总磷及各磷形态浓度的关系

Tab.1　Relationship between algal growth and the concentration of total P and each P fraction

样品编号 Number of sample	$N(\times 10^6)$ (cell/mL)	C_{TP} (mg/L)	C_{SRP} (mg/L)	C_{TRP} (mg/L)	C_{SHP} (mg/L)	C_{TSP} (mg/L)	C_{PP} (mg/L)
1	5.665	0.159	0.053	0.082	0.087	0.1073	0.053
2	4.913	0.141	0.084	0.095	0.107	0.104	0.039
3	1.099	0.114	0.075	0.083	0.075	0.077	0.039
4	5.534	0.159	0.083	0.087	0.134	0.131	0.031
5	5.327	0.133	0.061	0.067	0.136	0.131	0.004
6	2.489	0.075	0.008	0.076	0.060	0.071	0.006
7	1.493	0.111	0.055	0.064	0.113	0.109	0.004
8	5.233	0.133	0.060	0.067	0.134	0.131	0.003
9	6.492	0.160	0.053	0.086	0.096	0.107	0.055
10	2.846	0.133	0.084	0.092	0.104	0.103	0.032
11	2.302	0.126	0.075	0.084	0.085	0.083	0.044
12	6.135	0.163	0.083	0.090	0.138	0.133	0.031
13	2.170	0.074	0.007	0.007	0.060	0.075	0.001
14	1.287	0.109	0.055	0.064	0.111	0.109	0.002

磷形态在藻培养前后的浓度之差与藻培养前该磷形态浓度之比可视为藻类对各磷形态的利用率。将实验所测 14 个水样中普通小球藻达最大生长量时对各磷形态的利用率分别计算，所得平均值列于表 2。

表 2　普通小球藻达最大生长量时对各磷形态的利用率

Tab.2　Utilization factor of each P fraction in process of the algal growth

磷形态 P fraction	溶解反应磷 SRP	总反应磷 TRP	溶解水解磷 SHP	总溶解磷 TSP
利用率(%) Utilization factor	100	94	86	88

从表 2 可知，只有溶解反应磷(SRP)能完全被普通小球藻利用，其余各形态磷均有少部分不能为普通小球藻所利用。其中总反应磷被普通小球藻利用的效率也很高，Bradford 认为，在磷含量较低的湖泊中，TRP 是生物有效磷很好的预测因子[7]。总溶解磷(TSP)和溶解水解磷(SHP)有约 4/5 被利用，还有 1/5 不能被普通小球藻利用，Peters 认为在 TSP 形态中有一部分是生物无效的[8]，即使是在磷非常限制的湖泊水体中，也约有 40% 的 TSP 不能被生物所利用，这部分磷一般既不能被磷酸酶作用，也不参与湖泊中的磷循环[9]。而颗粒磷则通过释放或生物转化亦可被藻所利用[7]。

2.2　普通小球藻生长与磷形态相关

根据以上讨论，将实验所测 14 个样品($n = 14$)的最大藻生长量与其所摄取利用总磷

及各磷形态浓度分别进行线性相关分析(线性方程为 $N_i = A + BC_i$),其结果列于表3。

表3 普通小球藻生长量与总磷及各磷形态浓度线性回归系数(n=14)

Tab.3 Coefficients of the linear regression of the algal growth and total P and each P fraction

磷形态 P fraction	总磷 TP	溶解反应磷 SRP	总反应磷 TRP	溶解水解磷 SHP	总溶解磷 TSP	颗粒磷 PP
A	-3.126	2.461	1.364	-0.2229	-2.711	2.816
B	53.94	22.19	32.45	39.00	61.92	38.95
R	0.7870	0.2830	0.3613	0.5302	0.6783	0.3977

前已述及,一般认为在各磷形态中,溶解反应磷(SRP)是能够完全被藻摄取利用的磷形态(其利用率为100%),但从普通小球藻生长量与SRP的线性回归分析结果来看,SRP并不能充分地用来衡量藻类生长的情况($R = 0.2830$)。Peters发现SRP并不能正确估计湖泊中的生物有效磷[8]。Bradford在对低磷湖泊研究时也发现,SRP与藻类生长的相关性很差。可见SRP并不能单独作为有效预测藻类生长潜力的评价标准。总反应磷(TRP)在低磷湖泊中可作为生物有效磷很好的预测因子[7],但当总磷增高时TRP并不是最好的生物有效磷形态,它也不能充分地用来衡量藻生长($R = 0.3613$)。根据以上分析可知,普通小球藻生长量分别与东湖水体中各磷形态间的相关性均较差,即使对于总磷(TP)其线性相关系数 R 也仅为0.7870,显然此相关系数很难满足作为藻类生长量预测因子的标准。实际上藻类的生长应是各磷形态与藻类综合作用的结果,并非单一磷形态的作用结果。因此要对普通小球藻生长潜力进行较准确的预测,必须将各磷形态综合考虑,即对普通小球藻生长量与各磷形态进行多元回归分析。根据表1结果作多元回归分析,其结果如表4所示。

表4 普通小球藻生长量与五种磷形态的多元回归分析(n=14)

Tab.4 Multiple regression analysis of the algal growth and the five P fractions

磷形态 P fraction	常数 Constant	溶解反应磷 SRP	总反应磷 TRP	溶解水解磷 SHP	总溶解磷 TSP	颗粒磷 PP
回归系数 Regression coefficient	-4.549	-77.971	2.931	68.960	31.102	97.008
t-检验值 Value of t-text	-2.221	-2.050	0.136	0.701	0.329	2.376
显著水平 Significance level	0.057	0.075	0.895	0.503	0.751	0.045

将普通小球藻生长量与湖水中五种磷形态进行多元回归分析,逐步筛选与普通小球藻生长最为相关的磷形态,获得相对较好的多元回归方程,这更能说明各磷形态对藻类生长的共同作用。然而表4的结果显示,并不能将五种磷形态全部纳入回归方程中。从表4可以看出,五种磷形态多元回归系数的t-检验显著水平除颗粒磷外均大于0.05,这表明其相关性不很显著。从统计学角度考虑,普通小球藻生长量与这五种磷形态相关的回归方程的可信度均小于95%。因此将五种磷形态全部纳入回归方程从统计学来讲是不可靠的,此方程也不可作为评判湖泊中藻类生长量的依据。

利用逐步选择回归分析,剔除相关性不显著的磷形态,并选择其回归系数t-检验显

著水平最好的相关式,从而获得符合统计检验的回归方程为:

$$N(\times 10^6) = -88.267C_{SRP} + 0.649C_{TRP} + 100.825C_{SHP} + 108.311C_{PP} - 4.061 \quad (1)$$

$$R = 0.922; \quad F = 12.761; \quad P = 0.001; \quad n = 14$$

式中 R 为线性相关系数;F 为 F-检验值;P 则为其显著水平。该式中各磷形态的显著水平为:SRP 为 0.002;TRP 为 0.974;SHP 为 0.000;PP 为 0.001,常数为 0.014。该方程除了 TRP 的显著水平高于 0.05 外,其余三种磷形态均达到统计检验要求(即其显著水平小于 0.05),且其多元回归方程的线性相关系数($R = 0.922$)也较高。因而在评价含磷较高的湖泊水体藻生长潜能时,该方程值得考虑。

进一步剔除相关性不显著的磷形态,并将方程(1)中所含四种磷形态的每三种磷形态进行多元线性回归,取 t-检验显著水平最好的方程为:

$$N(\times 10^6) = -88.020C_{SRP} + 100.883C_{SHP} + 108.627C_{PP} - 4.041 \quad (2)$$

$$R = 0.922; \quad F = 18.902; \quad P = 0.000; \quad n = 14$$

该式中各磷形态的显著水平为:SRP 为 0.001;SHP 为 0.000;PP 为 0.000,常数为 0.005。均小于 0.05,符合统计检验要求。方程(2)的线性相关系数与方程(1)的线性相关系数相同,且其 F-检验值较方程(1)的高,显著性更好,且测定简便。因而在评价含磷较高的湖泊水体藻生长潜能时,该方程更值得考虑。

进一步简化预测方程,将五种磷形态的每两种磷形态进行多元线性回归,取 t-检验显著水平最好的方程为:

$$N(\times 10^6) = 211.313C_{TSP} - 124.984C_{SHP} - 5.527 \quad (3)$$

$$R = 0.818; \quad F = 11.158; \quad P = 0.002; \quad n = 14$$

该式中各磷形态的显著水平为:TSP 为 0.004;SHP 为 0.023,常数为 0.018。均小于 0.05,符合统计检验要求。方程(3)的线性相关系数较方程(1)和方程(2)的线性相关系数小,其显著性也较差。在较简单的评价湖泊水体富营养化时,可使用该方程预测藻生长潜力。

参考文献:

[1] Smith V H. The nitrogen and phosphorus dependence of algal biomass in lakes: An empirical and theoretical analysis [J]. *Limnol Oceanogr*, 1982, 27:1101—1111

[2] 高玉荣,黄玉瑶,曹宏,等. 磷对藻类生长及污水净化的影响[J]. 应用生态学报,1991, **2**(4):355—360

[3] 高玉荣,黄玉瑶,曹宏,等. 氮磷对污水净化中藻类叶绿素含量的影响[J]. 水生生物学报,1995, **19**(4):289—298

[4] 吴重华,王晓蓉,孙昊. 羊角月芽藻的生长与湖水中几种磷形态关系的建立[J]. 环境化学,1997, **16**(4): 341—346

[5] 吴重华,王晓蓉,孙昊. 几种物质磷形态的生物有效性模拟研究[J]. 环境科学,1998,**19**(3):58—61

[6] 马斌荣主编. SPSS for Windows 在医学科研统计中的应用[M]. 北京:科学出版社,1998,90—106

[7] Bradford M E, Peters R H. The relationship between chemically analyzed phosphorus fraction and bioavailable phosphorus [J]. *Limnol Oceanogr*, 1987, **32**(5):1124—1137

[8] Peters R H. Phosphorus availability in Lake Memphremagog and its tributaries [J]. *Limnol Oceanogr*, 1981, **26**(6):1150—1161

[9] Levine S W, Schindler D W. Radiochemical analysis of orthophosphate concentrations and seasonal changes in the flux of orthophosphate to seston in two Canadian shield lakes [J]. *Can J Fish Aquat Sci*, 1980, **37**:479—487

STUDIES ON THE RELATIONSHIP BETWEEN THE GROWTH OF *CHLORELLA VULGARIS* AND THE PHOSPHORUS FRACTIONS IN WATER OF LAKE DONGHU, WUHAN

ZHOU Pei-jiang[1,2], ZHENG Zhen-hua[1], YU Zhen-kun[1],
QIU Yin-yan[1], YAN Guo-an[1] and WU Zhen-bin[2]
([1] *Department of Environmental Sciences, Wuhan University*; [2] *State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan* 430072)

Abstract: Phosphorus in water of lake Donghu, Wuhan was fractionated into five sorts of P fractions: total soluble phosphorus (TSP), soluble reaction phosphorus (SRP), total reaction phosphorus (TRP), soluble hydrolysable phosphorus (SHP) and particular phosphorus (PP). Effects of these P fractions on the growth of *Chlorella vulgaris* were investigated. The regression equations between each P fractions as well as total phosphorus (TP) and the growth of *Chlorella vulgaris* were obtained and compared with each other. The models of growth of *Chlorella vulgaris* (N) depending on P fractions were established by multiple regressing, and three models can be helpful for predicting the potential growth of the algal and assessing the eutrophication of the lake.

Key words: *Chlorella vulgaris*; Phosphorus fraction; Bioavailability; Multiple regression

欢迎订阅2002年《水产学报》

《水产学报》是中国水产学会主办的水产科学技术的学术性刊物。于1964年创刊。主要刊载渔业资源、水产养殖和增殖、水产捕捞、水产品保鲜与综合利用、渔业水域环境保护、渔船、渔业机械与仪器以及水产基础研究的论文、简报和综述。并酌登学术动态和重要书刊的评介。

本刊为双月刊，大16开，国内外公开发行。每期单价：15.00元。国内统一刊号：CN31-1283/S；国际标准刊号：ISSN 1000-0615。国外发行代号：Q-387，国内邮发代号：4-297。读者可在当地邮局订阅，也可直接汇款至编辑部订阅。请保存订刊收据，本刊将向订户优惠提供《水产学报》创刊至2001年的全文检索光盘。

编辑部地址：上海市军工路334号，上海水产大学48信箱，**邮编**：200090。

联系电话：(021)65710232，**传真**：(021)65680965。

E-mail：scxuebao@online.sh.cn。