

藻类批量培养中的比增长率最大值*

陈德辉 章宗涉 陈 坚

(上海师范大学 200234)

摘要 批量培养谷皮菱形藻、莱茵衣藻、粉核小球藻、斜生栅藻、羊角月牙藻和铜绿微囊藻等六种藻类，在对数生长期，逐日计数而确定比增长率最大值(μ_{mar})，发现(μ_{mar})值出现的时间在各种藻类中不同。同时讨论了每种藻类的(μ_{mar})与营养物质、光强、温度和起始浓度之间的关系。铜绿微囊藻的(μ_{mar})在一定的总磷(TP)浓度范围内随TP浓度呈上升趋势。根据获得增长率最大值的条件，对它们在浮游植物群落中的生态位作了说明。

关键词 藻类，批量培养，比增长率最大值，生态位。

目前国内外都以指数增长模型 $N = N_0 e^r$ 或者它的修正模型，描述批量培养中藻类的增长过程^[1-4]。比增长率尤其是比增长率最大值(μ_{max})既是藻类在浮游植物群落中种类间竞争能力和演替顺序的指标，也是藻类内禀增长率(r_{mar})最好的近似值之一，还是水生态系统中生态模型的重要参数之一。它还可以与藻类的其它指标如世代时间 T_g 和加倍时间 T_d 等相互换算。本文所指的比增长率最大值(μ_{max})即是静态培养中逐日计算获得的比增长率最大值。这里主要报道几种主要的淡水藻类：谷皮菱形藻 [*Nitzschia palea* (Kütz.) W. Smith]，莱茵衣藻 [*Chlamydomonas reinhardtii* Dang]、粉核小球藻 (*Chlorella pyrenoidosa* Chick]、斜生栅藻 [*Scenedesmus obliquus* (Turp.) Kütz.]、羊角月芽藻 [*Selenastrum capricornutum* (Printz)] 和铜绿微囊藻 [*Microcystis aeruginosa* (Kütz)] 在各种生长条件下的 μ_{max} 测定值，并对此进行了探讨。

1 材料和方法

藻种均来自中国科学院水生生物研究所在 17℃、低光强下保种。经 AAM^[5] 液体培养基驯化后用于试验。试验用的培养基分别有 Aenll 培养基、Bristol 培养基、衣藻培养基 (Chlm)、水生四号培养基 (HB4) 和水生硅藻一号培养基 (HB-D1)^[6,7]。取进入对数生长期藻液，经离心 (3000–4000r / min, 5min) 和 15mg / L NaHCO₃ 洗涤两次，作为接种藻液。各种藻类的起始密度 D_0 ，培养温度和光照条件见表 1。各种处理组静置于培养架培养，照光

* 国家自然科学基金资助项目(3880155)。

陈德辉目前地址：湖北武汉中国科学院水生生物研究所96级博士生。张泳、梁臣、马丽华、张锦平、齐备备、张杨东、杨良和童煜等参加部分工作。

培养时每隔 2h 摆动一次。从接种的次日开始, 每天在同一时间取样计数。菱形硅藻以血球计数板, 其余均用 0.1ml 的计数框, 于显微镜下进行计数。从藻种驯化培养到取样计数均是无菌操作。当藻类增长小于 5% 时, 结束培养。每种处理有三个重复。

以公式 $\mu = \ln(x_2 - x_1) / (t_2 - t_1)$ 连续计算处于对数生长期藻种群的比增长率 (μ), 然后求出比增长率最大值 (μ_{\max})。 x 为藻密度 (cells / ml), t 为时间^[8]。然后对取得数据计算平均值, 作方差分析、t 检验和 95% 的置信区间计算^[9]。

表1 各种藻类的培养条件(单位: Cells/ml)

Tab.1 The culture conditions for algae species

	谷皮 菱形藻 <i>N.palea</i>	莱茵 衣藻 <i>C.reinhardii</i>	粉核 小球藻 <i>C.pyrenodinosa</i>	斜生 栅藻 <i>S.obliquus</i>	羊角 月芽藻 <i>S.capricornutum</i>	铜绿 微囊藻 <i>M.aeruginosa</i>
起始浓度(10^4)	6.6	1.0	2.5	1.0	0.1 (or2)	10
Initial density						
温度(℃)	20.5	22.5	30	28	26	28
Temperature						
光照强度(10^3 lx)	3.5	3.7	5.0	5.0	5.0	2.8
Light Intensity						

2 结果

2.1 菱形藻的 μ_{\max} (表 2)

表2 不同培养基中菱形藻的比增长率最大值 (μ_{\max})

Tab.2 The μ_{\max} of *N.palea* in different media

	第一次试验 Experiment I			第二次试验 Experiment II		
	HB-D ₁	Allen	AAM	HB-D ₁	Allen	AAM
μ_{\max}	1.386 (2) 1.282 (2) 1.418 (2)	0.865 (2) 0.996 (2) 0.898 (2)	0.803 (2) 1.051 (2) 0.915 (2)	1.398 (2) 1.185 (2) 1.288 (2)	0.977 (2) 0.895 (2) 0.935 (2)	0.839 (2) 1.138 (2) 0.976 (2)
平均值	1.362	0.916	0.924	1.290	0.935	0.984
互比差数		0.446*	0.438*		0.355*	0.306*
F Test	F>F _{6,2,0.01}			F>F _{6,2,0.01}		

注: 括号内数为 μ_{\max} 出现的日期。*差异显著, ** 差异极显著, 下同 The figures in parenthesis show the days when the μ_{\max} was determined. * Significant, ** Very significant. All the same below

试验结果经 F-检验表明, 每次试验处理间差异都极显著。互比差数结果显示, 由 HB-D₁ 培养基所测得的 μ_{\max} 值两次都明显地高于 AAM 培养基和 Allen 培养基测得的 μ_{\max} 值, 而后两种培养基测得 μ_{\max} 值间差异不显著。

2.2 莱茵衣藻的 μ_{\max} (表 3)

第一次实验结果方差分析表明, 处理间差异极显著。互比差数结果显示, Chlm 培养基和 HB₄ 培养基测得的 μ_{\max} 值间差异不明显, 但它们各自都比 AAM 培养基测得的 μ_{\max} 值明显地高。而对第二次实验结果的 F-检验表明各处理间差异不显著。

2.3 粉核小球藻的 μ_{\max} (表 4)

表3 不同培养基中莱茵衣藻比增长率最大值(μ_{max})Tab.3 The μ_{max} of *C.reinhardii* in different media

Medium	第一次试验		第二次试验		Experiment II	
	ChlmM	HB4	AAM	ChlmM	HB4	AAM
μ_{max}	1.37 (3) 1.36 (3) 1.37 (3)	1.25 (3) 1.31 (3) 1.22 (3)	0.84 (3) 0.62 (3) 0.79 (3)	1.09 (3) 1.08 (3) 1.10 (3)	0.97 (3) 1.05 (3) 0.97 (3)	0.96 (3) 1.02 (3) 0.99 (3)
平均值	1.37	1.26	0.75	1.09	0.99	0.99
互比差数		0.11	0.51 ^{**}		0.62 ^{**}	
Reci.Diff						
F Test	$F^{**} > F_{6,2,0.01}$		$F \approx F_{6,2,0.05}$			

注: 第一次实验藻种由ChlamyM培养基驯化, 第二次由AAM培养基驯化。The inoculum was acclimated with Chlamyomonas media in Experiment I, with AAM media in Experiment. II

表4 不同培养基中粉核小球藻的比增长率最大值 μ_{max} Tab.4 The μ_{max} of *C.pyrenoidosa* in different media

	第一次试验		第二次试验		Experiment II	
	TWNP	TWP	TWP	AAM		
μ_{max}	1.602 (5) 1.116 (6) 1.742 (5)	1.365 (4) 1.257 (4) 1.450 (5)	1.265 (5) 1.222 (3) 1.785 (4)	1.710 (2) 0.799 (2) 1.193 (2)		
平均值	1.487	1.358	1.424	1.181		
F Test	$F << F_{6,2,0.05}$		$t < T_{12,0.05}$			
t Test						

注: 1. TWP为太湖水样加磷, TWNP为太湖水样添加氮为6.75mg/L N-NO₃, 磷为0.450mg/L P-PO₄³⁻ TWP means that the water samples of Lake Taihu were added with 0.450mg/l P-PO₄³⁻, TWNP was with 6.75mg / l N-NO₃ and 0.450mg / l P-PO₄³⁻ combined.

2. 第二次实验培养到第3、4天采用自然光照。The inoculum was incubated with natural light during the 3rd and 4th day in Experiment II.

第一次实验结果经F-检验表明三种处理所得的 μ_{max} 值差异不显著。这些处理所有的均值与第二次实验所得的 μ_{max} 值经t-检验, 两者差异也不显著。这些所有 μ_{max} 值的总平均为 1.30 ± 0.07 。

2.4 斜生栅藻的 μ_{max} (表5)

实验结果经F-检验表明各处理间差异显著。互比差数表明由AAM测得的平均值显著地低于QW和1/2QW测得的平均值; QWP测得的平均值也显著地低于QW的平均值。其余的平均值间差异不明显。

2.5 羊角月芽藻的 μ_{max} (表6)

三个不同起始密度测得的 μ_{max} 值, 经t检验或F-检验; 同一起始密度测得的 μ_{max} 值间差异不显著。而不同起始密度测得的 μ_{max} 的总均值则是起始密度小的都极明显地大于起始密度大的。不同培养基培养测得的 μ_{max} 均值, 各有不同。

表5 不同培养基中斜生栅藻的比增长率最大值 μ_{max} Tab.5 The μ_{max} of *Sobliquus* in different media

Medium	AAM	QWP	1/2 QW	QW
μ_{max}	1.898 (1) 1.660 (1) 1.907 (1)	2.021 (1) 1.924 (1) 1.746 (1)	2.110 (1) 2.073 (1) 2.119 (1)	2.103 (1) 2.067 (1) 2.172 (1)
平均值	1.822	1.894	2.089	2.114
互比差数		0.072	0.267	0.292
Reciprocal			0.195	0.220
Difference				
F-test	$F^{**} > F_{8,3,0.05}$			

注: QW为1989年4月钱塘江水样, QWP为钱塘江水样添加0.0045mg/L P-PO₄³⁻. QW means the water samples of Qiangtangjiang River in Zhejiang Province, China; QWP means the samples were added with 0.0045 mg/l P-PO₄³⁻.

表6 不同基质和不同起始密度下羊角月芽的比增长率最大值 μ_{max} Tab.6 The μ_{max} of *Scapricornutum* in different media

Do ($\times 10^4$)	第一次实验			第二次实验
	Experiment I AAM			Experiment II Bristol's
0.1	2.5			3.5
μ_{max}	2.68 (3) 1.95 (4) 2.18 (2)	1.652 (2) 1.331 (2) 1.523 (1) 1.743 (2) 1.286 (2) 1.339 (1) 1.406 (2) 1.467 (2) 1.242 (1)		1.285 (2) 1.084 (3) 1.116 (3) 1.317 (2) 1.099 (3) 1.222 (3) 1.379 (2) 1.194 (3) 1.299 (3)
平均值	2.27	1.414		1.169
F Test		$F < F_{8,3,0.05}$		
t Test	$t^{**} > t_{19,0.01}$			$t^{**} > t_{16,0.01}$

注: Do组(0.1×10^4 cell/L)的每一 μ_{max} 均为三个重复均值。Each μ_{max} in the column with Do= 0.1×10^4 cells/ml was the arithmetic average of three replicates.

表7 不同氮、磷浓度下铜绿微球藻比增长率最大值 μ_{max} Tab.7 The μ_{max} of *M. aeruginosa* in different N,P concentration

	N ₁ P ₁	N ₂ P ₂	N ₃ P ₃	N ₄ P ₄	N ₅ P ₅
N (mg/L)	0.150	0.450	15.0	4.500	1.500
P (mg/L)	0.015	0.045	1.50	0.450	0.150
μ_{max}	0.643 (6) 0.614 (6) 0.550 (6)	0.757 (6) 0.621 (6) 0.762 (6)	0.926 (6) 0.738 (6) 0.669 (6)	0.891 (6) 0.788 (6) 0.739 (6)	0.944 (6) 0.926 (6) 0.973 (6)
平均值	0.602	0.713	0.778	0.806	0.948
互比差数		0.111	0.176	0.204	0.346 ^{**}
Reciprocal			0.065	0.093	0.235 ^{**}
Difference				0.028	0.170 [*]
F Test	$F^{**} > F_{10,4,0.01}$				

注: NP表示所添加N,P浓度系列, 培养基中其他元素及其含量与AAM相同.NP means the concentration gradient of nitrogen with N-NO₃⁻ and phosphorus with P-PO₄³⁻, the contents of the other elements in the media of this experiment are the same as those in AAM media.

2.6 铜绿微囊藻的 μ_{max} (表 7)

实验结果(表 7)经 F 检验表明处理间差异极显著。互比差数表明 N_3P_3 浓度组测得的 μ_{max} 极显著地高于 N_1P_1 、 N_2P_2 浓度组测得的 μ_{max} 值; 也显著地高于 N_5P_5 浓度组测的 μ_{max} 值; 同时 N_4P_4 、 N_5P_5 浓度组测得的 μ_{max} 都显著地高于 N_1P_1 浓度组测得的 μ_{max} 值。其余浓度组测得的 μ_{max} 值之间则差异不显著。

3 讨论

同一种藻类测得的比增长率的这种差异, Hoogenhout & Amesz^[10]、Fogg^[11] 和 Reynolds 等专门就淡水藻类的 μ_{max} 值作了综述和评价。为了进一步讨论不同因素组合对 μ_{max} 值的影响。现将不同作者测的各种藻的 μ_{max} 值引用于表 8。

表8 不同作者测定的各种藻的 μ_{max} 值

Tab.8 The μ_{max} of algae species determined by several authors

	谷皮菱形藻 <i>N.palea</i>	莱茵衣藻 <i>C.reinhardii</i>	粉核小球藻 <i>C.pyrenodinosa</i>	斜生栅藻 <i>Sobliquus</i>	羊角月牙藻 <i>S.capricornutum</i>	铜绿微囊藻 <i>M.aeruginosa</i>
本文作者	1.33	1.31	1.30	2.11	2.27	0.95
Chen et al	±.09	±.07	±.07	±.04	±.25	±.06
Reynold's	—	—	2.15	1.52	1.32	1.11
Jørgensen ^[12]	—	2.64	3.90	1.52	1.85	—

表9 不同培养基的总氮、总磷量 (mg/L)

Tab.9 The total nitrogen and total phosphorus contents in different media

	AAM	Allen	Bristol's	Chlm	HB4	HB-D1	QW	TW
总氮 TN	4.200	247.20	41.20	133.44	21.20	42.53	1.420	0.074
总磷 TP	0.186	6.668	53.169	419.95	4.381	25.332	0.010	0.040

3.1 培养基的 N、P 含量(表 9)

3.1.1 谷皮菱形藻两次实验结果都表明 HB-D₁ 测得的 μ_{max} 都明显地高于其余两种培养基测得的 μ_{max} 。从表 8 可知, 三种培养基中 P 含量不同, HB-D1 中 TP 为 25.32 mg p / L, 分别约为 Allen 和 AAM 中的 4 倍和 136 倍。

3.1.2 莱因衣藻的情况又有所不同, 第一次实验结果以氨态氮 (NH_4-N) 为氮源的 HB4 和 Chlm 培养基测得的 μ_{max} 显著地高于以硝态氮 (NO_3-N) 为氮源的 AAM 测得 μ_{max} ; 第二次实验中的三种培养基测得的 μ_{max} 差异不显著, 并且都低于第一批由 HB₄ 和 Chlm 培养基测得的 μ_{max} , 这可能与此次实验的接种藻液是由含 NO_3-N 的 AAM 驯化有关。因为多数情况下莱因衣藻只能以 NH_4-N 作为氮源。Hersh 报道由野外分离的两个莱因衣藻的藻株(野生型和抗除草剂型)都只能以 NH_4-N 作为氮源^[13]。

3.1.3 在三种绿藻中: 月芽藻在 AAM 测得的 μ_{max} 值比 Bristol's 培养基测得的 μ_{max} 值显著地高。但 AAM 的含磷量仅为 Bristol 培养基的 1 / 286。斜生栅藻由钱塘江水样测得的 μ_{max} 值明显高于 AAM 测的 μ_{max} , 也明显的高于钱塘江水加磷的水样测得的 μ_{max} 值。即月芽藻、斜生栅藻相对而言以含磷量较低的培养基中测得的 μ_{max} 值反而明显地高。而 Marvan 认为藻类生长曲线的斜率不随 PO_4-P 浓度的增加而明显地增加, 但对最大现存量

是有影响的。而蛋白核小球藻由 AAM 测得的 μ_{max} 与由太湖水样添加磷的水样培养测得的 μ_{max} 值无明显差别。

3.1.4 由表 7 可知, 微囊藻的 μ_{max} 随 PO_4-P 含量由 $0.015mg / L$ 增加至 $0.150mg / L$ 时, 达到最大值。P 含量继续增加时, μ_{max} 值没有明显下降, 而 P 增加至 $1.50mg / L$, μ_{max} 则明显地下降了。

3.2 光强的影响

3.2.1 粉核小球藻的较低 μ_{max} 值 (1.30 ± 0.07), 可能是与培养 3d 后采用自然光照有关。

3.2.2 莱因衣藻测得的 μ_{max} 值较低, 则可能是由于没有在饱和光强下培养的缘故。Matulova D^[14] 用 $4.0 \sim 5.0 \times 10^3$ 光强进行莱因衣藻 AGP 测试获得良好结果。Heksh 等经预试验证明 $305\mu\text{mol} / m^2 / \text{sec}$. 相当于 $4.27 \times 10^3 \text{lx}$ 的光强, 对于所有分离得到的莱因衣藻都是饱和光强^[15], 而我们培养莱因衣藻的光强仅为 $3.7 \times 10^3 \text{lx}$.

3.3 温度的影响

比较不同作者的培养条件发现, 斜生栅藻 μ_{max} 值高主要原因可能是温度。我们采用的温度是 28°C , 上述 Reynold's 和 J. Øpensen 报道的温度是 25°C 。

3.4 起始密度的影响

月芽藻起始浓度 $D_0 = 0.1 \times 10^4$ 细胞 / ml 时, 培养测得的月芽藻的 μ_{max} (2.27 ± 0.5) 明显地高于起始浓度为 2.5×10^4 细胞 / ml 时测得的 μ_{max} ($1.41 \pm .10$)。这可能与试验时藻类的起始密度有关: 因为在其它条件相同时, 低起始密度的优点在于当藻类生长进入指数生长阶段时, 藻细胞间的互相遮光现象可避免, 使光强不至于被衰减到饱和点以下; 同时细胞对于营养物的吸收引起培养基质中的营养浓度的变化也不明显。这与 Pribu 等和 Niels 等强调在以批量培养测定藻类的 μ_{max} 时, 起始密度应尽量地低的观点相一致。

生物种在群落中的生态位, 可由其所处的各种环境因子如空间、温度、盐度、光强度、pH 值、营养条件……等参数来描述。综上所述, 可知在不同的培养基、温度和营养盐浓度下, 每种藻类所获得的比增长率是不同的。Reynolds 认为最大比增长率是在一定条件下藻类潜在增长率的最高表现。以指数增长模型 $N = N_0 e^{\mu t}$, 或者它的修正模型如逻辑斯谛模型、崔启武模型等分析藻类的增长过程: 可知在同等条件下, 增长率越高, 藻类增长所获得的数量也就越多。作者认为获得比增长率最大值 (μ_{max}) 的条件, 就是藻类生长的最适条件, 也就是最佳生态位的条件。各种藻类的生态位有如下特征: 菱形藻适合于高浓度磷和较低温度; 莱因衣藻适合于 NH_4-N 为氮源; 三种绿球藻则适合较高的温度 ($30 \sim 35^\circ\text{C}$), 较高的光强 ($4.0 \sim 5.0 \times 10^3 \text{lx}$) 和较低的磷浓度; 铜绿微囊藻则适合于较低的光强和中等浓度的磷含量。

参 考 文 献

- [1] Marvan P, et al., Algal Assay and Monitoring Eutrophication Stuttgart: E. Schiveizerbart'sche, Verlagsbuchhandlung, 1979, 175—221
- [2] Maestrini S Y, Droop M R, Bonin D J. Test algae as indicators of sea water quality: prospects. In: L. E. Shubert (ed.), Algae as Ecological Indicators. London: Academic Press 1984, 133—188
- [3] Reynolds C S. The Ecology of Freshwater phytoplankton London: Cambridge University Press, 1984, 192.224
- [4] 崔启武, 刘家冈. 生物种群增长的营养动力学. 北京: 科学出版社, 1991, 78—92, 131—150

- [5] Starr R C. Culture Collection of Algae. *J. of Phycol.* 1978, **4** (Suppl) 1: 92—99
- [6] ASTM Standard pratice for algal growth pottential testing with *Selenastrum capricornutum*. Philadelphia: Ann Arbor. MI 1980
- [7] 沈韫芬, 章宗涉等著. 微型生物监测新技术. 北京: 中国建筑出版社, 1990, 275—286
- [8] 金相灿章宗涉等著. 湖泊富营养化调查规范. 北京: 中国环境科学出版社, 1990, 275—286
- [9] 童一中. 生物统计法. 长沙: 湖南科学出版社, 1987
- [10] Hoogenhout H, Amesz J. Growth rates of photosynthetic microorganisms in laboratory cultures. *Arch. für Mikro.*, 1965, **50**:10—25
- [11] Fogg G E. Algal cultures and Phytoplankton Ecology. (2nd ed.) London: University of London. 1975
- [12] J rgensen S Eetc. Handbook of Enviromeotal Data and Ecological Paramters. International society of Ecological Modelling, Copenhagen. 1979
- [13] Hersh C M, Grumpton W G. Atrazine tolerance of algae isolated from two agricultural streams. *Environ. Toxicol. Chem.*, 1989, **8**:327—332
- [14] Nyholm N, Kallqvist T. Methods for growth inhibition toxicity test with freshwater algae. *Environ. Toxicol. & Chem.*, 1989 **8**: 690—730

MAXIMUM SPECIFIC GROWTH RATE (μ_{\max}) OF SIX ALGAL SPECIES DETERMINED IN BATCH CULTURE

Chen Dehui Zhang Zongshe and Chen Jian

(Department of Biology, Shanghai Normal University, Shanghai 200234)

Abstract Six algae species, *Nitzschia palea* (Kütz.) W. Smith, *Chlamydomonas reinhardtii* Dang, *Chlorella pyrenoidosa* Chick, *Scenedesmus obliquus* (Turp.) Kütz, *Selenastrum capricornutum* Printz and *Microcystis aeruginosa* Kütz, were cultured on batch in different conditions. The maximum specific growth rate (μ_{\max}) of these algae were determined by calculating the specific growth rate each day with cell counting until log-phase. the μ_{\max} values were different in each algal species. The effects of nutrient contents, light intensity, temperature and initial inoculum density on μ_{\max} value of these algae were discussed. The μ_{\max} value of *N. palea*, *S. obliquus* and *S. capricornutum* are 1.33 ± 0.09 , 2.11 ± 0.04 and 2.27 ± 0.25 respectively. The μ_{\max} increases gradually with total phosphorus concentration in a certain range. By analysing and comparing the various combination of conditions for μ_{\max} , it was supposed that the maximum specific growth rate could be used as an index of algal niche, and the likely niche of each algal species in the phytoplankton community was illustrated.

Key words Algae, Batch Culture, Maximum Specific Growth Rate, Niche