

## 东海原甲藻和海洋异养细菌对磷酸盐的竞争吸收

连子如 王江涛

(中国海洋大学海洋化学理论与工程技术教育部重点实验室, 青岛 266100)

### COMPETITION BETWEEN *PROROCENTRUM DONGHAIENSE* AND HETEROTROPHIC BACTERIA FOR PHOSPHATE

LIAN Zi-Ru and WANG Jiang-Tao

(Key Laboratory of Marine Chemistry Theory and Technology, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266100, China)

关键词: 异养细菌; 东海原甲藻; 有机碳; 无机磷; 竞争

**Key words:** Heterotrophic bacteria; *Prorocentrum donghaiense*; Organic carbon; Inorganic phosphate; Competition

中图分类号: Q142 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2010)03-0663-06

在水生生态系统的研究中, 微型藻类与海洋细菌的相互关系越来越引起人们的重视。微型藻类是引起赤潮的主要生物, 其与海洋细菌的关系主要表现在藻、菌既可相互促进生长, 又可相互抑制以至于杀灭对方。这种复杂的生态关系因藻种及菌种的不同而异, 并受到环境等因素的影响。因此, 研究这种关系及其对环境的影响, 对于了解水体中的营养结构及能量流动的规律, 进而探讨利用细菌防治赤潮的发生等具有指导意义<sup>[1]</sup>。

东海原甲藻(*Prorocentrum donghaiense*)属于甲藻门, 原甲藻属。该藻从2000年开始, 连续几年春夏之交时, 都在我国东海长江口与浙江沿岸水域形成几千平方公里的赤潮, 东海原甲藻已经成为我国海洋学界密切关注的一个赤潮种, 对该藻的生理生态特征进行深入研究很有必要<sup>[2]</sup>。磷是限制微藻类生长的主要营养因子之一, 其主要来源之一是细菌活动导致的磷酸盐再生<sup>[3]</sup>。不少研究表明, 当细菌依赖浮游植物释放的有机物时, 细菌和浮游植物对营养盐有相似的吸收速率, 细菌的生长率取决于浮游植物所生产的有机物的量; 但是, 当存在非藻类提供的有机碳源时, 细菌就会比微藻对营养盐有更快的吸收速率, 微藻的生长将受到抑制<sup>[4]</sup>, 近海外源有机碳的加入, 有可能使得藻、菌竞争更为剧烈。

为了了解赤潮生物的发育与繁殖规律, 开展藻、菌关系的基础研究, 本实验在不同的有机碳和无机磷浓度下, 对从青岛近海天然海水中采集的异养细菌和实验室培养的东海原甲藻进行混合培养, 观察在不同生长环境中, 异养细菌和原甲藻的生长情况及其对营养物质的吸收, 探讨细菌和浮游植物对无机磷的竞争过程。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验藻种

实验选用的东海原甲藻(*Prorocentrum donghaiense*)由中国海洋大学海洋污染生态化学实验室提供。用 f/2 培养液<sup>[5]</sup>进行培养, 待达到指数生长期时, 3000 r/min 离心 4min 纯化后进行接种。

#### 1.2 菌种获取

采集胶州湾的新鲜海水, 3h 内用预处理过的 GF/F 滤膜(马福炉 450℃, 烧 3h)过滤, 滤液即为所用菌种。

#### 1.3 培养

海水经孔径 0.45 μm 预处理的醋酸纤维滤膜(1:3 HCl 浸泡 1h, 蒸馏水冲洗至中性)过滤到 1 L 三角瓶中(经 1:5 HCl 浸泡洗净), 高压灭菌(120℃, 0.1 MPa, 20min), 待海水自然冷却后, 添加无磷 f/2 营养配方(其他元素浓度

收稿日期: 2009-02-26; 修订日期: 2009-12-30

基金项目: 国际科技合作重点项目计划(2004DFA03600); 国家高技术研究发展计划(2006AA09Z176); 国家重点基础研究发展计划(2010CB428701)资助

作者简介: 连子如(1982—), 女, 汉族, 山东威海人; 硕士研究生; 主要从事海洋生物地球化学方向的研究。E-mail: yoyo-lzr@hotmail.com

通讯作者: 王江涛(1967—), 男, 蒙古族; 教授, 博士生导师; E-mail: jtwang@ouc.edu.cn

不变)培养液,葡萄糖和磷酸盐的加富采用梯度稀释,最终浓度(表 1)。

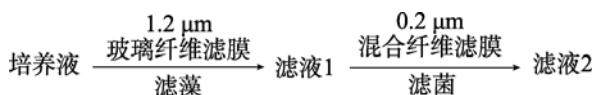
表 1 葡萄糖和无机磷酸盐的加富浓度  
Tab. 1 Concentrations of glucose and phosphate added

系列名称 Treatment	添加 NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 后 最终浓度 Final concentration of NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> added ( $\mu\text{mol P/L}$ )	添加葡萄糖后 最终浓度 Final concentration of glucose added ( $\text{mmol C/L}$ )
P	1	0
PC	1	27.5
PCC	1	275
PP	5	0
PPC	5	27.5
PPCC	5	275
PPP	10	0
PPPC	10	27.5
PPPCC	10	275

接种时, 1 L 海水培养液中分别加入 10 mL 菌种和 5 mL 纯化后的东海原甲藻藻种, 放入光照培养箱中培养。培养温度(20±1)°C, 光照强度为 3000 lx, 明暗比 12h : 12h。藻的起始密度为  $3 \times 10^3$  cells/mL, 菌的起始密度为  $1 \times 10^5$  cells/mL。

#### 1.4 取样及测定

培养过程中每天摇匀培养液。分别在第 0、2、4、6、10、12 天取样, 取样流程如下:



藻细胞生物量测定 取 5mL 培养液, 加入鲁格试剂, 用显微镜直接计数法测定其细胞密度<sup>[6]</sup>。

异养细菌数量的测定 异养细菌的测定采用 DAPI 荧光染色计数法进行<sup>[7]</sup>。向样品中加入 DAPI 染液, 使水样中 DAPI 的浓度最终为 5  $\mu\text{g/mL}$ , 染色时间为 30min。将染好的样品加入装有滤膜的无菌过滤器。滤膜为事先经伊拉克黑染色的孔径为 0.2  $\mu\text{m}$  的 Whatman 核孔滤膜(Millipore), 在 < 0.07 atm 负压下过滤水样。待水样抽干, 取出滤膜, 置于载玻片上, 在 Leica DM4000 型荧光显微镜的紫外波段进行观察及拍照, 每个样品计数不少于 10 个视野, 并按下式计算水样中的细菌丰度:

$$B = AS_1 / (S_2 V) \quad (1)$$

式中,  $B$  为细菌丰度(cells/mL);  $A$  为 10 个视野中的细菌平均数;  $S_1$  为视野面积( $\text{mm}^2$ );  $S_2$  为滤膜的有效过滤面积( $\text{mm}^2$ );  $V$  为过滤水样体积( $\text{mL}$ )<sup>[8]</sup>。

比生长速率( $\mu$ )的计算  $\mu$  的计算按照下式进行, 公式中的  $B_0$  是  $t_0$  时的细胞数,  $B_1$  为经过  $t_1$  时的细胞数<sup>[9]</sup>。

$$\mu = (\ln B_1 - \ln B_0) / (t_1 - t_0) \quad (2)$$

营养盐的测定 第 0、2、4、6、10、12 天定时取样, 分别取滤液 1 和滤液 2 各 10 mL 于贮液瓶, -20°C 速冻保存; 取培养液 10 mL 经过 1.2  $\mu\text{m}$  玻璃纤维滤膜过滤, 滤膜-20°C 冻存; 取滤液 1 20 mL 经过 0.2  $\mu\text{m}$  混合纤维滤膜过滤, 滤膜-20°C 冻存。滤液 1 和滤液 2 中的磷酸盐浓度直接用 AA3 营养盐自动分析仪测定; 膜样经过消化后用 AA3 营养盐自动分析仪测定。

## 2 结果

### 2.1 东海原甲藻的生长

从图 1 可以看出, 在 0—4d 藻密度变化不大, 藻生长处于延滞期, 第 4 天后, 藻密度明显增大, 生长明显加快。第 6 天, 添加 1  $\mu\text{mol/L}$  磷酸盐的系列中(图 1A), 碳源浓度越高, 藻密度越低; 而在磷酸盐 5  $\mu\text{mol/L}$  和 10  $\mu\text{mol/L}$  的系列中(图 1C、E), 磷酸盐浓度相同的系列中, 藻密度随时间变化值很接近。低浓度磷酸盐体系中(1  $\mu\text{mol/L}$ )的微藻相对较高浓度磷酸盐体系(5  $\mu\text{mol/L}$  和 10  $\mu\text{mol/L}$ )进入指数生长期要较早。在相同碳源条件下(图 1B、D、F), 藻密度随着磷酸盐的浓度增加而增加。

### 2.2 异养细菌的生长情况

图 2 是细菌丰度随时间的变化。可以看出, 细菌的生长主要在培养 0—4d, 尤其是前两天丰度值增长较高, 添加葡萄糖的系列比不添加葡萄糖的系列细菌丰度要高, 第 6 天后, 所有系列均变化趋势缓慢。在磷酸盐浓度相同的条件下, 有机碳源浓度越高, 细菌丰度越高; 有机碳源相同的条件下, 随着磷酸盐浓度增加, 细菌丰度也随之增加。

从表 2 可以看出, 添加葡萄糖作碳源的系列中, 前 2 天细菌比生长速率  $\mu$  明显高于不添加葡萄糖系列, 葡萄糖浓度越高, 磷酸盐浓度越高, 细菌  $\mu$  值越大; 对微藻而言, 在磷酸盐浓度 1  $\mu\text{mol/L}$  的三个系列, 可以看出葡萄糖浓度越高, 反而  $\mu$  值越小, 但在 5  $\mu\text{mol/L}$ 、10  $\mu\text{mol/L}$  的系列中, 微藻的比生长速率则相差不大,  $\mu$  值随着磷酸盐浓度增大而增大。

### 2.3 东海原甲藻对磷酸盐的竞争吸收

从图 3 可以看出, 添加 1  $\mu\text{mol/L}$  磷酸盐的系列和磷酸盐浓度 5  $\mu\text{mol/L}$ 、10  $\mu\text{mol/L}$  的系列在藻细胞含磷量上有明显不同。在图 3A 中, 0—2d 三个系列藻细胞含磷量有略微的下降, 第 2 至 6 天又明显上升, 第 6 天后含磷量基本保持不变, 整体上, P 系列的含磷量略高于 PC、PCC 系列。在图 3C、E 中, 藻细胞含磷量一直处于增加状态, 5  $\mu\text{mol/L}$  的系列在第 10 天后浓度不再上升, 而 10  $\mu\text{mol/L}$  的系列依然有增加的趋势, 这与起始磷酸盐浓度较高有关; 添加葡萄糖的系列和未添加葡萄糖的系列, 藻细胞含磷量几乎没有明显不同, 变化趋势也趋于一致。

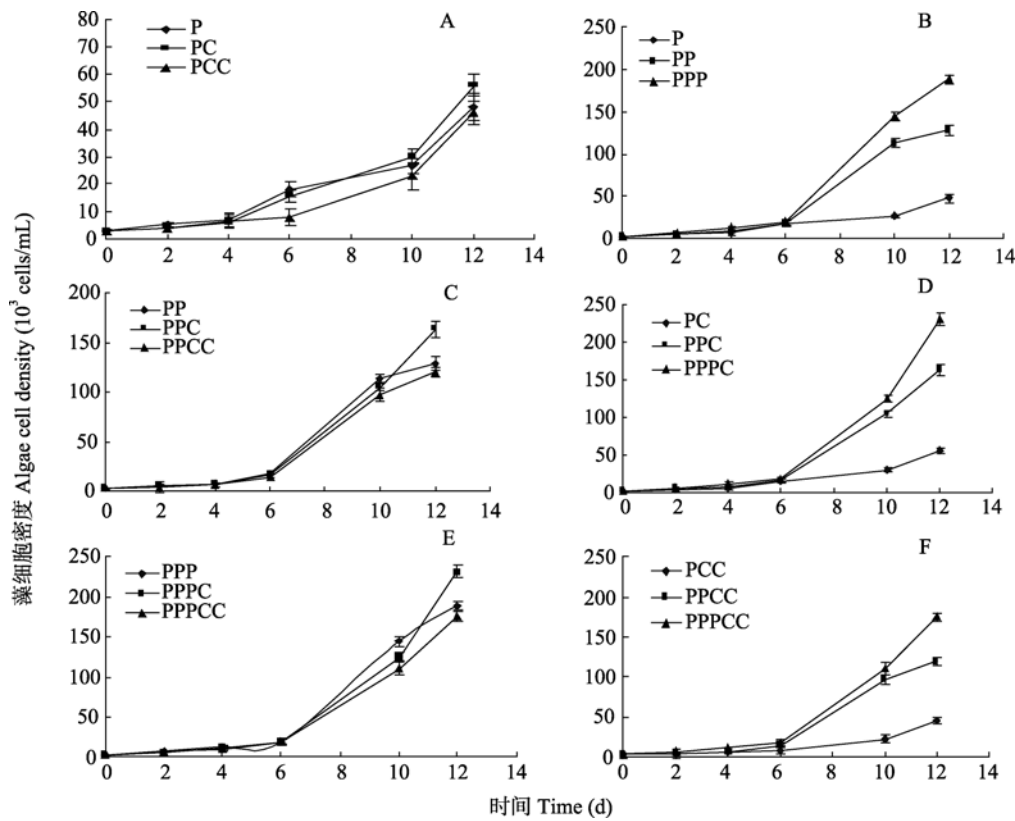


图 1 不同葡萄糖、磷酸盐浓度下的藻密度

Fig. 1 Algae cell density on different glucose and phosphate concentrations

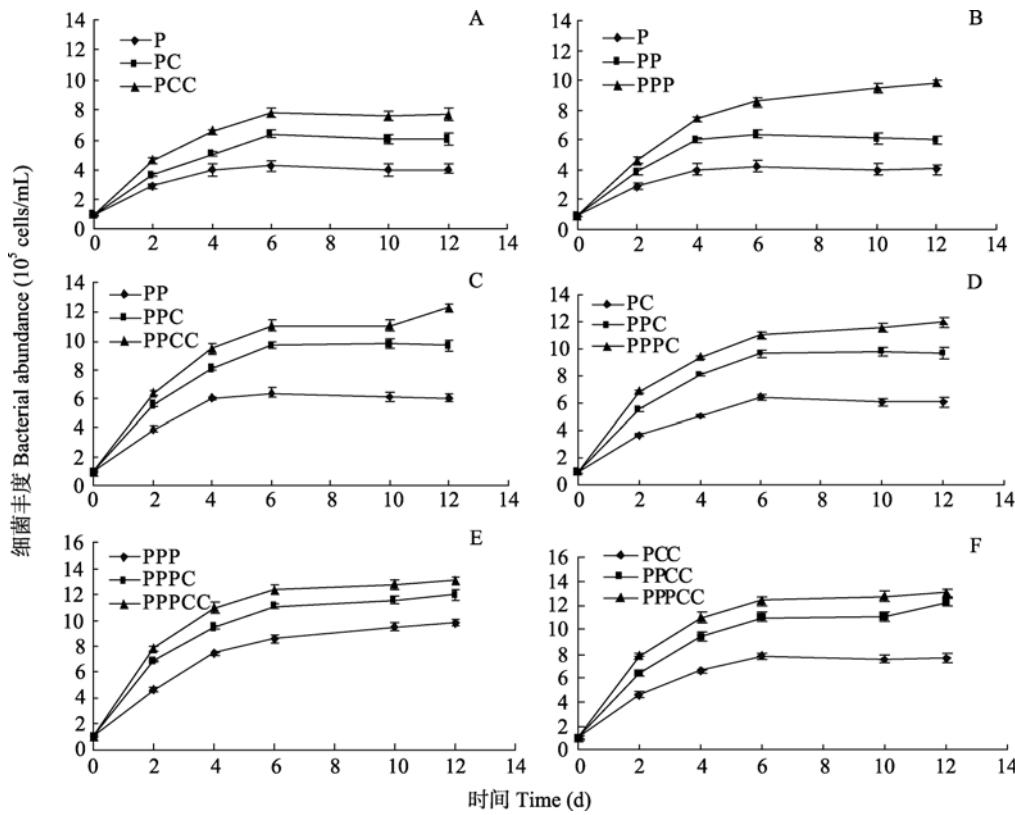


图 2 不同葡萄糖、磷酸盐浓度下的细菌丰度

Fig. 2 Bacterial abundance on different glucose and phosphate concentrations

表 2 细菌和东海原甲藻在 0—2d 的比生长速率  $\mu$  (/d)  
Tab. 2 Growth rates  $\mu$  (/d) of bacteria and algae during 0—2 days

系列名称 Name	异养细菌 Heterotrophic bacteria	东海原甲藻 <i>Prorocentrum donghaiense</i>
P	0.53	0.30
PC	0.65	0.17
PCC	0.76	0.09
PP	0.68	0.35
PPC	0.86	0.32
PPCC	0.93	0.30
PPP	0.77	0.40
PPPC	0.96	0.39
PPPCC	1.03	0.39
不添加碳源 平均值	0.66	0.35
添加 27.5 mmol C/L 碳源 平均值	0.82	0.29
添加 275 mmol C/L 碳源 平均值	0.91	0.26

2.4 异养细菌对磷酸盐的竞争吸收

从图 4 可以看出,添加葡萄糖的系列,0—2d 细菌含磷量迅速增加,基本在第 2 天达到最大值。而未添加葡萄糖的系列(图 4B),随着磷酸盐浓度的降低,细菌含磷量峰值分别出现在第 3、4、6 天。相同磷酸盐浓度下(图 4A、C、E),细菌含磷量随着葡萄糖浓度的增大而增大;相同葡萄糖浓度下(图 4B、D、F),细菌含磷量随着磷酸盐的浓度增大而增大。

3 讨论

Rodrigues<sup>[9]</sup>曾有研究显示,海洋细菌和浮游植物之间存在营养盐的竞争,在营养不充足的情况下,细菌和浮游植物对营养盐的竞争会加剧。从图 1 的藻密度变化可以看出,在低浓度磷酸盐下(1  $\mu\text{mol/L}$ ),细菌对营养盐的竞争作用表现相对明显。我们认为由于细菌较大的比表面积,使其对磷酸盐有更强的亲和力,细菌吸收了相对较多的营养盐,使可用于微藻生长的营养盐减少,从而抑制了微藻的生长。但在高浓度磷酸盐下(5  $\mu\text{mol/L}$ 、

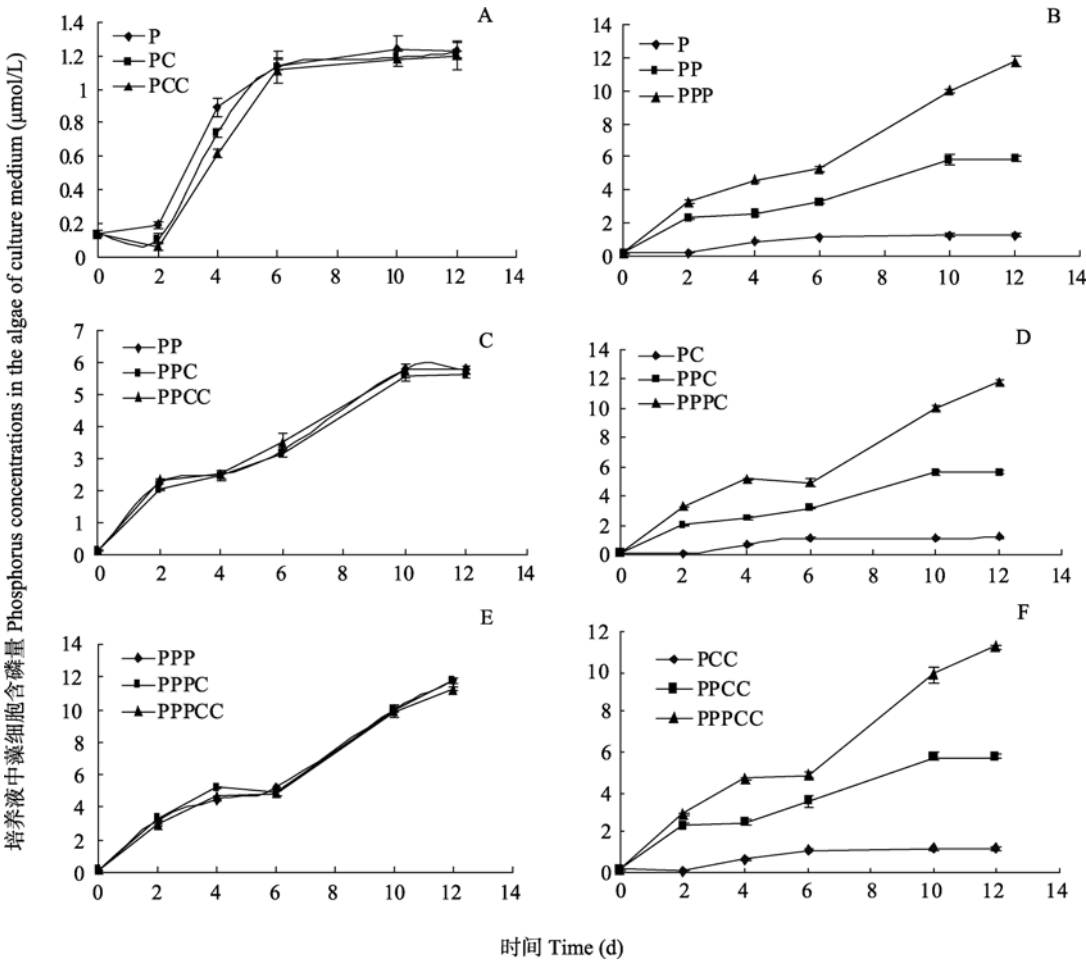


图 3 培养液中藻细胞含磷量时间变化图

Fig. 3 Phosphorus concentrations variation versus time in the algae of culture medium

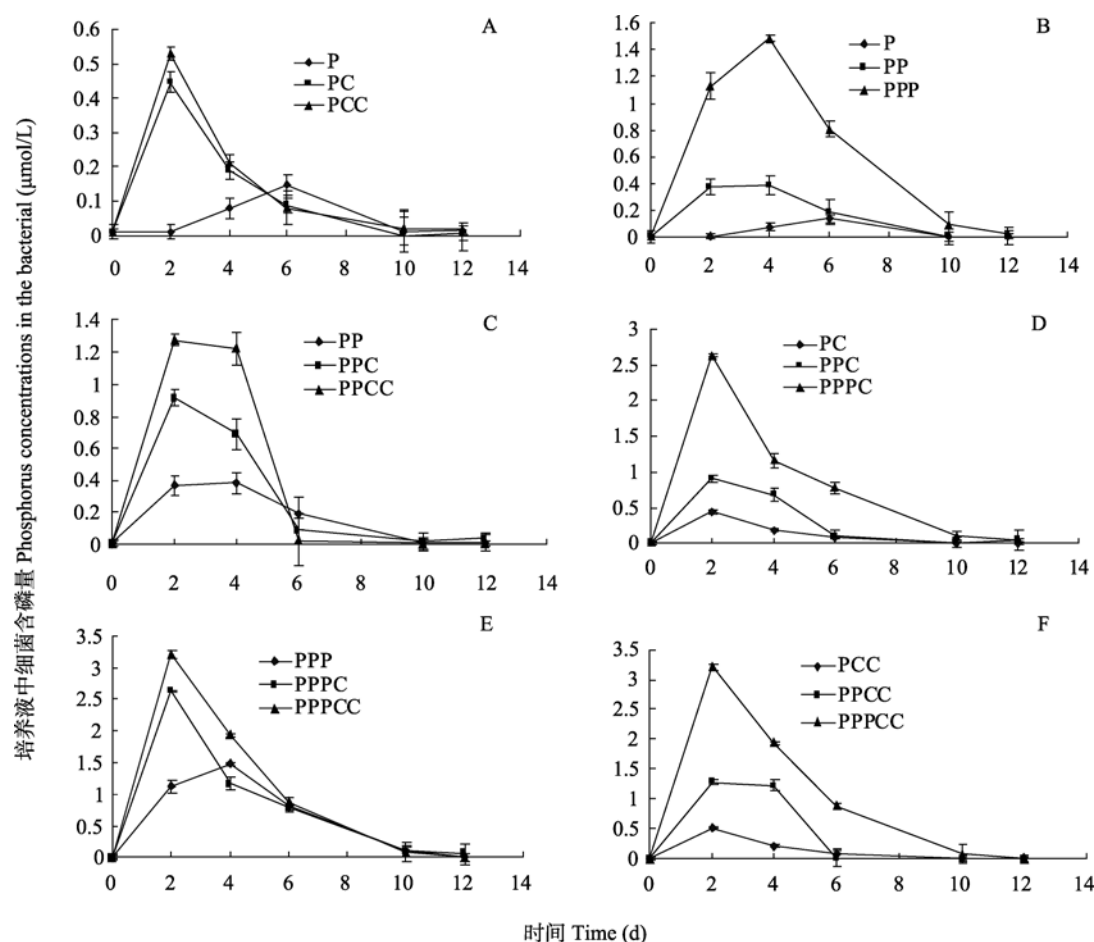


图 4 培养液中细菌含磷量时间变化图

Fig. 4 Phosphorus concentrations variation versus time in the bacterial of culture medium

10  $\mu\text{mol/L}$ ), 由于营养条件相对较好, 这种竞争表现的不明显。

比生长速率  $\mu$  是一个描述生物生长特性的参数, 图 2 的丰度变化与表 2 中细菌  $\mu$  值变化相互吻合。这也可以说明, 有外源有机碳存在时, 细菌的比生长速率会大大提高。当水体磷酸盐浓度偏低时, 营养盐不充足, 微藻的生长速率会受到外源碳的影响。当磷酸盐浓度较高的水体中, 外源碳的存在几乎不会影响微藻的生长。Drakare<sup>[10]</sup>发现细菌指数生长期的  $\mu$  远高于藻类, 细菌指数生长期在培养的 1—2d, 藻类在 2d 后。比生长速率的不同界定了细菌和藻类竞争能力的差别, 而细菌的指数生长期早于藻类, 对营养盐的吸收也会优先于藻类。

Rhee<sup>[11]</sup>在研究异养细菌和浮游植物对无机磷酸盐的竞争吸收时发现, 异养细菌的存在限制了藻类的生长, 在将细菌培养液中的细菌过滤去除后, 向滤液中添加浮游植物, 并未发现藻类的生长受到抑制。我们认为, 在培养液中磷酸盐浓度较低时, 葡萄糖的存在大大刺激了细菌对磷酸盐的吸收, 从而限制了藻类的生长。图 3A 可以说明在低浓度磷酸盐下, 葡萄糖的添加影响了东海原甲

藻对磷酸盐的吸收。

图 4 细菌含磷量呈先增加后下降的变化, 我们认为开始是由于可被细菌利用的有机碳浓度较高, 随着时间推移, 葡萄糖逐渐耗尽, 碳源成为细菌生长的限制因子, 细菌不得不依赖微藻光合作用产生的有机碳, 所以细菌对磷酸盐的竞争能力减弱。这也说明, 外源碳的添加有利于细菌对磷酸盐的吸收, 这和 Jansson, *et al.*<sup>[12]</sup>的研究结论一致。Rodrigues<sup>[10]</sup>认为, 在营养盐限制的条件下, 细菌的生长主要受可利用的氮、磷营养盐的限制, 而在营养限制较弱的水体中, 细菌生长主要受到溶解有机碳的限制。

#### 4 结 论

通过本次研究, 我们可以得到以下三点结论: (1) 异养细菌和东海原甲藻指数生长期出现的时间不同, 细菌在培养开始的第 1—2 天, 微藻在第 3 天后开始, 磷酸盐浓度低, 则进入指数生长期相对早。(2) 培养的前两天, 添加葡萄糖的系列, 异养细菌的比生长速率远高于东海原甲藻。(3) 微藻和细菌关于磷酸盐的竞争和水体中磷酸盐的浓度有关。在低浓度磷(1  $\mu\text{mol/L}$ )下, 细菌存在时, 外

源碳的加入对于藻细胞吸收磷有影响；在高浓度磷(5  $\mu\text{mol/L}$ 、10  $\mu\text{mol/L}$ )下，外源碳的加入对于藻细胞吸收磷几乎没有影响。

#### 参考文献:

- [1] Xu J S, Zheng T L. Influence on the cell biomass of red tide alga *Alexandrium tamarense* (Lebour) cultured with two marine bacteria [J]. *Marine Science*, 2002, **26**(12): 57—60 [徐金森, 郑天凌. 两种海洋细菌对赤潮藻的细胞生物量的影响研究. 海洋科学, 2002, **26**(12): 57—60]
- [2] Li Y. The utilization of *Prorocentrum donghaiense* to four different types of phosphorus [J]. *Ecologic Science*, 2005, **24**(4): 314—317 [李英. 东海原甲藻对不同磷源的利用特征. 生态科学, 2005, **24**(4): 314—317]
- [3] Zheng T L, Su J Q. The role of marine microorganisms in the occurrence and declination of red-tide [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2003, **27**(3): 291—295 [郑天凌, 苏建强. 海洋微生物在赤潮生消过程中的作用. 水生生物学报, 2003, **27**(3): 291—295]
- [4] Kirchman D L. The uptake of inorganic nutrients by heterotrophic bacteria [J]. *Microbial Ecology*, 1994, **28**: 255—271
- [5] Guillard R R, Ryther J H. Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1962, **8**: 229—239
- [6] Xie R, Tang X X. Study on joint toxicity of heavy metal and organophosphorus pesticide to marine microalgae [J]. *Marine Environmental Science*, 1999, **18**(2): 16—20 [谢荣, 唐学玺. 有机磷农药和重金属对海洋微藻的联合毒性研究. 海洋环境科学, 1999, **18**(2): 16—20]
- [7] Porter K G, Y S Feig. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microfloral [J]. *Limnology and Oceanography*, 1980, **25**: 943—948
- [8] Zheng T L, Wang F. Bacterial production, biomass and role in microbial loop in Taiwan strait [J]. *Oceanologica Et limnologia Sinica*, 2002, **33**(4): 415—423 [郑天凌, 王斐. 台湾海峡海域细菌产量、生物量及其在微生物环中的作用. 海洋与湖沼, 2002, **33**(4): 415—423]
- [9] Rodrigues M N, Whilliams P J. Heterotrophic bacteria utilization of nitrogenous and nonnitrogenous substrates, determined from ammonia and oxygen fluxes [J]. *Limnology and Oceanography*, 2001, **46**: 1675—1683
- [10] S Drakare. Competition between picoplanktonic cyanobacteria and heterotrophic bacteria along crossed gradients of glucose and phosphate [J]. *Microbial Ecology*, 2002, **44**: 327—335
- [11] Rhee G Y. Competition between an algae and an aquatic bacterium for phosphate [J]. *Limnology and Oceanography*, 1972, **17**: 505—514
- [12] Jansson M. Uptake, exchange, and excretion of orthophosphate in phosphate-starved *Scenedesmus quadricauda* and *Pseudomonas K7* [J]. *Limnology and Oceanography*, 1993, **38**: 1162—1178