

洱海螺旋鱼腥藻生长生理特性的初步研究

常锋毅^{1,2} 潘晓洁^{1,3} 康丽娟^{1,4} 沈银武¹ 李敦海¹ 刘永定¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039;

3. 水利部中国科学院水工程生态研究所, 武汉 430079; 4. 上海市环境科学研究院, 上海 200233)

摘要:近年来,洱海正处于中营养水平向富营养湖泊的过渡阶段,蓝藻水华也频繁发生。本文作者在洱海大规模水华暴发期间,分离、纯化了水华优势种螺旋鱼腥藻,并对其生长生理特性进行了初步研究,以期为探讨洱海鱼腥藻水华发生的环境影响因素提供基础的参考资料。实验结果表明,氮含量 1.5 mmol/L、磷含量 12 μmol/L、光照强度 30 μE/m·s, pH 8—10 及温度 25℃时,螺旋鱼腥藻生长状况最好,生物量及相对生长速率较高。不同氮、磷浓度下的氮磷代谢活性表明:氮浓度在 0—0.36 mmol/L 时,硝酸还原酶活性随着氮浓度的增加而增强;氮浓度在 0.36—6 mmol/L 时,酶活性由其生长状况决定,生长越好,酶活性越高。碱性磷酸酶受磷影响较大,随着磷浓度的增加其活性逐渐减弱,磷充足时,氮对其活性并无显著影响。此外,洱海螺旋鱼腥藻可在低的氮、磷浓度下生长,这与其氮磷代谢活性的调节作用有关。

关键词:螺旋鱼腥藻;氮;磷;光照强度;温度;pH

中图分类号:Q945.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-3207(2009)03-0385-06

湖泊富营养化是当今水污染领域普遍关注的一个问题,其造成的危害之一就是蓝藻水华的大量暴发。在我国常见的蓝藻水华中,鱼腥藻(*Anabaena*)水华是除微囊藻水华外最常见的水华种类,其频繁发生在许多湖泊、河流、水库中^[1,2],且鱼腥藻的某些种类可产生毒素,对环境和人畜健康造成了很大危害^[3],但有关鱼腥藻水华和形成水华的鱼腥藻生长生理特性的报道并不是很多。

洱海位于云贵高原西部,大理白族自治州境内,湖面积 246 km²,平均水深 10.5 m,容积 27.7 亿 m³,为云南省第二大淡水湖泊,在大理地区担负着生活、工业、农灌、城市用水、航运、旅游、养殖、调节气候等多种功能,是大理州生态、经济、社会发展的基础条件。但近年来随着社会经济的发展,人类对洱海开发活动的不断加剧,洱海现正处于中营养水平向富营养湖泊的过渡阶段^[4],蓝藻水华也频繁发生。鱼腥藻水华是洱海常见的蓝藻水华,其发生面积广,持续时间长,一般洱海全湖在 5—10 月份都会出现鱼腥藻,数量高达 10⁷ 个/L,且水华暴发时会散发出难闻的土腥或土霉气味,

严重影响了洱海多种功能的正常发挥。尽管近两年加大了对洱海的治理,但蓝藻水华依然是困扰洱海可持续发展的重要问题。因此,研究洱海鱼腥藻水华的发生条件和危害以进一步有效地控制水华的发生,成为当前洱海治理中不容忽视的部分。本文作者在云南洱海暴发大规模水华期间,分离、纯化了水华优势种螺旋鱼腥藻,并对其生长生理特性进行了初步研究,以期为探讨鱼腥藻水华发生的环境影响因素提供基础的参考资料。

1 材料与方法

1.1 藻种的分离与纯化 取 2—3 滴水样置于滴板(Spot plates)凹槽内,在解剖镜下用自制毛细管(孔径约 75—150 μm)挑取丝状螺旋鱼腥藻,至盛有无菌水的另一孔内稀释、洗涤。经 3—4 次反复洗涤后,将其转移至 BG11 培养液中,置于低光、25℃条件下培养。待其繁殖到一定生物量时,进行镜检,确定为螺旋鱼腥藻单克隆藻株。在无菌条件下取 1—2 滴藻液涂于琼脂平板表面,培养 12—15 d,选择目的藻种的单克隆体进行进一步的分离。反复进行上

述操作,直至藻落至无菌状态,即可挑取单藻株到BG11中逐级扩大培养,用作实验材料。

1.2 实验设置 选用BG11为基础培养基^[5],分别改变NaNO₃和K₂HPO₄·3H₂O含量,设置氮浓度梯度为0、0.18、0.36、0.72、1.5、3、6mmol/L,磷浓度梯度为0、0.75、1.5、3、6、12、24、48μmol/L;光照强度梯度设置为10、20、30、40、50和60μE/m·s;温度剃度设定为15、20、25、30和35; pH设置为5.0、6.0、7.0、8.0、9.0和10.0。其中氮、磷实验中所采用的藻种在实验前饥饿培养48h后,取一定体积的藻液以5000r/min的速度离心15min,弃掉上清液,重复用15mg/L的碳酸氢钠溶液洗涤、离心3次再用作试验藻种。每个处理设置3个平行样,除温度和光照强度实验外其他各处理均在光照强度30μE/m·s,光暗比12:12和25下静置培养,每天摇动3次。

1.3 生长生理指标的测定和计算 每2天取样一次,测定665nm处藻细胞悬浮液吸光度表示细胞生物量。细胞相对生长速率以下列公式计算:细胞相对生长率 $\mu = (\ln OD_{t_2} - \ln OD_{t_1}) / (t_2 - t_1)$,其中OD_{t1}是开始时的细胞生物量,OD_{t2}是经过t₂时间的细胞生物量。待细胞生长至对数生长期时,分别以磺胺比色法^[6]和p硝基苯磷酸钠法^[7,8]测定氮磷营养盐处理组硝酸还原酶和碱性磷酸酶活性。

2 结果

2.1 氮、磷对螺旋鱼腥藻生长、硝酸盐还原酶和碱性磷酸酶活性的影响

氮对螺旋鱼腥藻生长影响的结果(图1、图2)表明:氮浓度1.5mmol/L时最适合螺旋鱼腥藻生长,高于或低于此浓度,螺旋鱼腥藻生物量及生长速率均有所下降。氮浓度达到6mmol/L时,其生长受到明显的抑制。而在不含氮的培养条件下,其生长虽然相对缓慢,但是并未完全受到抑制。

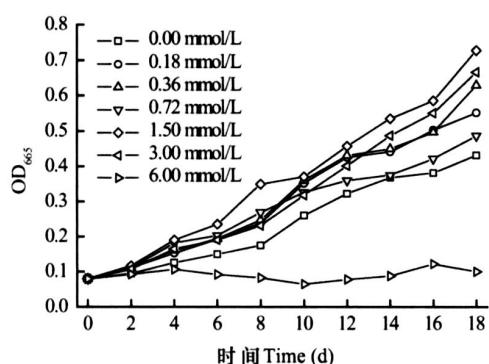


图1 氮对螺旋鱼腥藻生长的影响

Fig. 1 Effect of nitrogen on growth of *Anabaena spiroides*

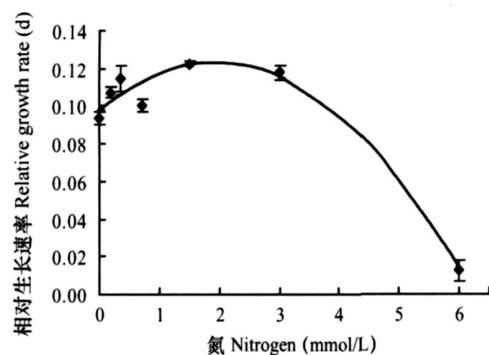


图2 不同氮浓度下的相对生长速率

Fig. 2 The relative growth rate in different nitrogen concentration

由图3、图4中螺旋鱼腥藻的生物量及生长速率可看出,不同磷浓度下,除无磷处理组较其他处理组生长缓慢外,其余各处理组并无明显差别,但磷含量12μmol/L时,细胞生物量和生长速率要稍高于其他处理组。

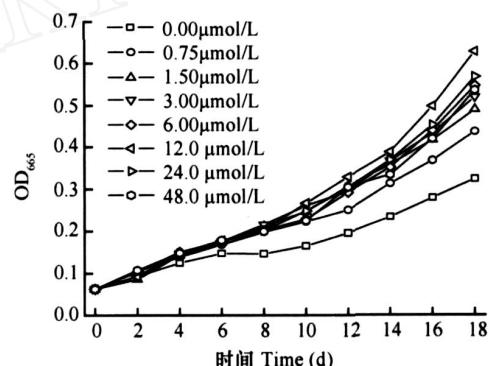


图3 磷对螺旋鱼腥藻生长的影响

Fig. 3 Effect of phosphorus on growth of *Anabaena spiroides*

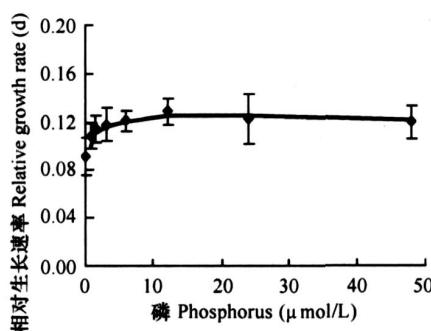


图4 不同磷浓度下的相对生长速率

Fig. 4 The relative growth rate in different phosphorus concentration

不同氮浓度下螺旋鱼腥藻细胞内硝酸还原酶和碱性磷酸酶活性(图5)表明:硝酸还原酶在不含氮处理组中活性很低;在含氮的各处理组中,其活性随

着含氮量的增加而增加,当含氮量为3mmol/L时其活性最高。碱性磷酸酶活性除不含氮处理较低外,在其他各处理组之间并无显著差异,其中1.5mmol/L略高。不同磷浓度对螺旋鱼腥藻硝酸还原酶活性的影响表明,当磷浓度较低时,随着磷浓度的增加,其硝酸还原酶活性逐渐增强;而当磷浓度大于12μmol/L后,其活性基本保持不变(图6)。图6结果还表明碱性磷酸酶随着磷浓度的增加,其活性逐渐降低。

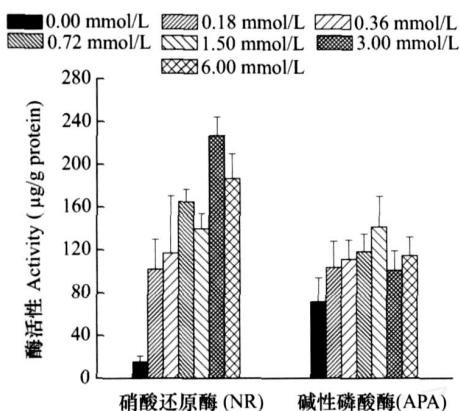


图5 氮对螺旋鱼腥藻硝酸还原酶和碱性磷酸酶的影响

Fig. 5 The NR and APA activity of *Anabaena spiroides* in different nitrogen concentration

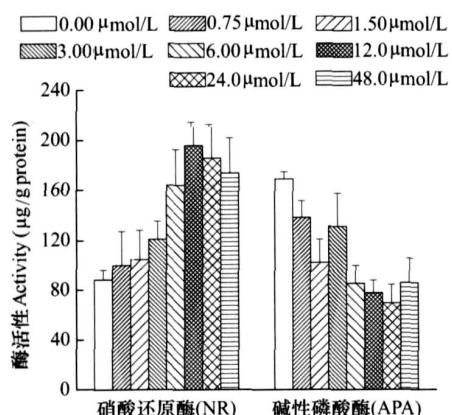


图6 磷对螺旋鱼腥藻硝酸还原酶和碱性磷酸酶的影响

Fig. 6 The NR and APA activity of *Anabaena spiroides* in different phosphorus concentration

2.2 光照强度对螺旋鱼腥藻生长的影响

光照强度对螺旋鱼腥藻生长的影响表明(图7、图8):低光强有利于螺旋鱼腥藻的生长,光照强度为30μE/m·s时螺旋鱼腥藻生长最好;光照强度大于30μE/m·s时,随着光照强度的增加螺旋鱼腥藻的生长明显的降低。

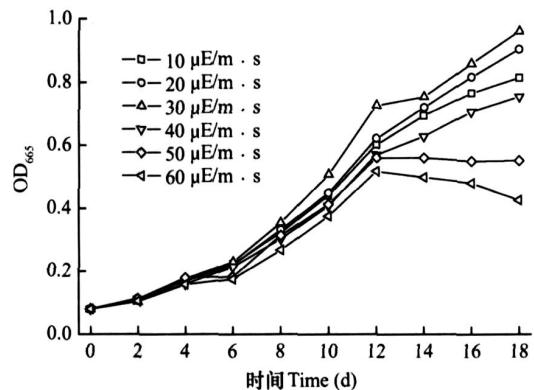


图7 光照强度对螺旋鱼腥藻生长的影响

Fig. 7 Effect of light intensity on growth of *Anabaena spiroides*

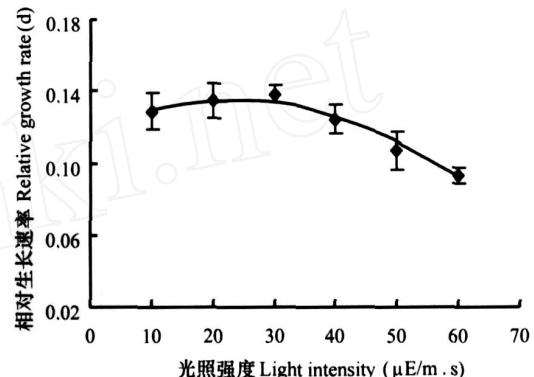


图8 不同光照强度下的相对生长速率

Fig. 8 The relative growth rate in different light intensity

2.3 pH和温度对螺旋鱼腥藻生长的影响

不同pH对螺旋鱼腥藻生长的影响(图9、图10)表明:螺旋鱼腥藻在不同pH条件下都可生长,但碱性环境(pH8—10)较酸性环境有利于螺旋鱼腥藻生长。

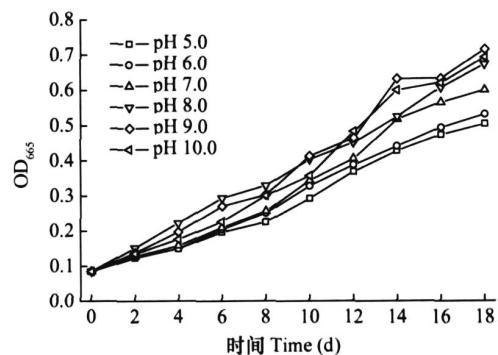


图9 pH对螺旋鱼腥藻生长的影响

Fig. 9 Effect of pH on growth of *Anabaena spiroides*

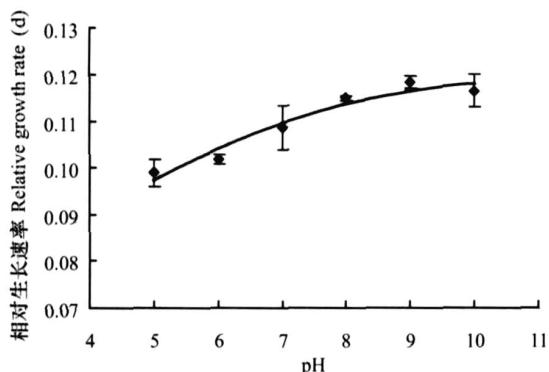


图 10 不同 pH 下的相对生长速率

Fig. 10 The relative growth rate in different pH values

温度对鱼腥藻生长的影响非常显著(图 11、图 12):温度为 25℃ 时鱼腥藻的生长状况最好,生物量及生长速率都最高;20℃ 及 30℃ 时螺旋鱼腥藻生长相比较为缓慢;15℃ 和 35℃ 条件下,鱼腥藻藻体在短期生长后即开始发黄、死亡(图 11)。

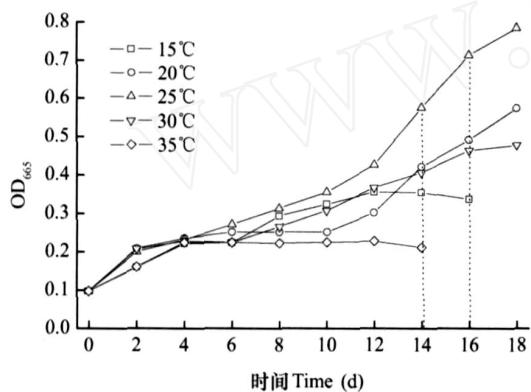


图 11 温度对螺旋鱼腥藻生长的影响

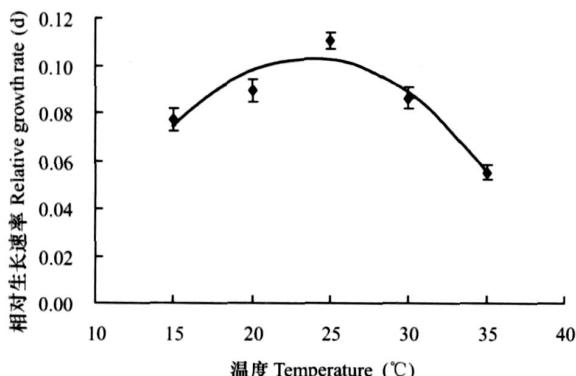
Fig. 11 Effect of temperature on growth of *Anabaena spirooides*

图 12 不同温度下的相对生长速率

Fig. 12 The relative growth rate in different temperature

3 讨 论

3.1 洱海螺旋鱼腥藻的生长特性

大量的研究表明氮磷的不足会限制多数浮游植物的生长,而本研究发现螺旋鱼腥藻在不含氮条件下其生长基本正常,在氮含量较高(6mmol/L)时其生长反而受到限制,当氮含量为 1.5mmol/L 时其生长最好。这可能是由于当底物中无氮或氮含量较低时,螺旋鱼腥藻会通过异形胞,启动细胞内固氮补偿机制满足其生长所需的氮;而当氮浓度较高时,由于 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 所诱导的高硝酸还原酶活性及随后的硝酸根积累作用能导致硝酸还原酶活性与硝酸盐排出之间失去平衡,从而对光合作用产生抑制作用,最终结果导致了生长的抑制^[9]。本研究还发现螺旋鱼腥藻在无磷或低磷条件也可以正常生长,这可能同其在无磷或低磷条件下,可以诱导产生碱性磷酸酶,将细胞质中作为磷元素储存库的多聚磷颗粒分解为可以为藻类直接吸收利用的正磷酸盐,保持磷元素的供应,满足其生长的需求有关^[10]。

本研究发现螺旋鱼腥藻在 $30\mu\text{E} / \text{m} \cdot \text{s}$ 时生长最快,随光强的增加生长逐渐降低,达到 $50\mu\text{E} / \text{m} \cdot \text{s}$ 时,短期内就会出现生长下降的现象。这可能与光强超过螺旋鱼腥藻饱和光合作用所需而引起光损伤,从而使光合能力降低有关^[11]。影响浮游植物生长的另一个重要因素是 pH, pH 可通过改变浮游植物体内酶的结构和活性、培养液中碳源形式以及各种金属复合物的溶解度而对其生长产生影响。研究表明碱性环境更适于蓝藻生长繁殖^[12],大多数蓝藻生长的最适 pH 是 7.5—10,并且大多数蓝藻缺乏在低 pH 中生长的能力,仅有极少数蓝藻可以在 pH 4—5 之间生长。本研究发现,螺旋鱼腥藻在 pH 8—10 时生长最好,这与以往的研究报道是一致的。但是,当初始 pH 为 5 时,尽管其生长速率较 pH 偏碱时较为缓慢,仍可正常生长,表明螺旋鱼腥藻具有较其他蓝藻更为广泛的 pH 适应能力。关于温度对鱼腥藻生长影响的研究,以往的报道指出鱼腥藻最适生长的温度为 28—38^{°C}^[13],但本研究发现:螺旋鱼腥藻生长最适的生长温度为 20—25^{°C},高于 30^{°C} 或低于 15^{°C} 时其生长繁殖均受到很大的影响,这一温度范围与采集样品时洱海的环境温度相当。洱海螺旋鱼腥藻生长的最适温度低于其他鱼腥藻的现象,可能同其对环境的长期适应有关。

3.2 氮磷对洱海螺旋鱼腥藻氮磷代谢活性的影响

氮磷是藻类生长必需的物质,浮游植物细胞中各种有机物的合成及代谢都离不开氮磷的参与,但是氮磷参与浮游植物细胞合成与代谢前必须被藻细胞吸收和转化。自然水体中硝酸盐是浮游植物吸收利用的主要氮源,而硝酸盐并不能为浮游植物直接吸收利用,必须经过一系列酶的还原作用,将硝酸盐最终还原为氨氮后,才能作为合成其他有机物质的原料^[14],这一系列还原反应中硝酸还原酶不但是硝酸盐转化为亚硝酸盐的关键酶,而且是整个氮还原过程中最重要的酶。硝酸还原酶是一种底物诱导酶^[1],当外界环境中存在硝酸盐时会诱导其产生,有研究报道硝酸还原酶的活性受环境中硝酸盐浓度的影响,随硝酸盐浓度增加其活性增强^[15]。本研究表明,无氮条件下螺旋鱼腥藻硝酸还原酶活性显著低于其他浓度处理组,并且随着氮浓度的增加,其活性逐渐增强;当氮达到抑制螺旋鱼腥藻生长的浓度时,由于螺旋鱼腥藻的生长受到了影响而降低了螺旋鱼腥藻对氮的需求,使硝酸还原酶的活性有所降低。无磷条件下螺旋鱼腥藻硝酸还原酶的活性也很高,随着磷浓度的增加,螺旋鱼腥藻硝酸还原酶活性与其生长状况呈现出高度的一致性,这是由于当环境中氮的供应对于螺旋鱼腥藻是过量时,藻细胞硝酸还原酶的活性取决于满足其生长所需还原的硝酸盐的量,此时硝酸还原酶的活性并不决定于环境中硝酸盐的浓度。

可溶性正磷酸盐是能进入浮游植物细胞内,为其直接吸收利用的磷形态,但是自然水体中正磷酸盐的含量一般只占5%,并且由于其可以直接被浮游植物吸收、利用,在自然水体中含量变化很大。浮游植物在正磷酸盐供应不足时,可以通过合成碱性磷酸酶将有机态的磷转化为正磷酸盐以满足其大量生长繁殖的需要,因此在正磷酸盐浓度很低的湖泊中,蓝藻水华仍然可以发生^[16]。很多研究表明,碱性磷酸酶是一种诱导酶,在磷浓度较低时具有较高的活性^[17]。螺旋鱼腥藻在不同磷浓度下的碱性磷酸酶活性表明,无磷条件极大地诱导了螺旋鱼腥藻的碱性磷酸酶活性;随着培养液中的正磷酸盐浓度的增加,螺旋鱼腥藻碱性磷酸酶活性逐渐降低,当达到一定阈值时其活性将不随磷浓度的增加而改变。由于碱性磷酸酶的活性受无磷或低磷的诱导,在磷浓度能满足藻类生长所需时,其他因子对其活性影响不大,所以不同氮浓度对螺旋鱼腥藻碱性磷酸酶的活性无显著影响。

一般来说氮磷往往是浮游植物生长的限制性因子,但是作者发现洱海螺旋鱼腥藻生长的环境中氮、磷的浓度尽管保持在一个较低的水平,但其仍可正常生长繁殖^[2]。本研究也证明较低的氮、磷条件下螺旋鱼腥藻的生长并未受到完全抑制。自然水体中,氮限制下螺旋鱼腥藻的正常生长可能与其具有固氮能力有关,而磷限制下螺旋鱼腥藻的正常生长是同其细胞内丰富的有机磷库密不可分的。本研究发现磷不足时螺旋鱼腥藻碱性磷酸酶活性显著增高,而碱性磷酸酶是藻类利用细胞质中的有机多聚磷酸颗粒的关键性酶之一。这表明洱海螺旋鱼腥藻在低磷条件下具有转化利用藻细胞内储存的有机多聚磷,以满足其生长和繁殖需要的能力。

参考文献:

- [1] Liu L P, Zhang X M, Zhao X H. Approach on comprehensive control countermeasures for algae blooms in Lake Dianchi [J]. *Shanghai Environmental Sciences*, 2002, 21(12): 745—755
[刘丽萍, 张秀敏, 赵祥华. 滇池水华综合控制对策探讨. 上海环境科学, 2002, 21(12): 745—755]
- [2] Dong Y X, Li J J, Zuo Y F, et al. Current situation and treatment countermeasures of water environment in Erhai Lake [J]. *Yunnan Environmental Sciences*, 2004, S1(24): 101—103 [董云仙, 李杰君, 左永福, 等. 洱海水环境现状与治理对策. 云南环境科学, 2004, S1(24): 101—103]
- [3] Qiao M Y, He Z R, Shen Z, et al. The toxicity to sheep and toxin of *Anabaena* bloom in Dalai Lake [J]. *Inner Mongolia Environmental Protection*, 1996, 8(1): 19—20 [乔明彦, 何振荣, 沈智, 等. 达赉湖鱼腥藻水华对羊的毒害作用及毒素分离. 内蒙古环境保护, 1996, 8(1): 19—20]
- [4] Peng W Q, Wang S Y, Liu X B. Assessment on Erhai Lake water quality [J]. *Journal of China Institute of Water Resources and Hydropower Research*, 2005, 3(3): 192—198 [彭文启, 王世岩, 刘晓波. 洱海水水质评价. 中国水利水电科学研究院学报, 2005, 3(3): 192—198]
- [5] Castenholz R W. Culturing Methods for Cyanobacteria In: Packer L, Glazer A N (Eds.), *Methods in Enzymology* [M]. New York: Academic Press 1998, 63—93
- [6] Zou Q. *Experiment of Plant Physiology and Biochemistry* [M]. Beijing: Chinese Agriculture Press 1998, 27—29 [邹琦. 植物生理生化实验指导. 北京: 中国农业出版社, 1998, 27—29]
- [7] Tadano T, Sakai H. Selection of acid phosphatase by the roots of several crop species under phosphorus deficient conditions [J]. *Soil Science and Plant Nutrition*, 1991, 37(1): 129—140
- [8] Xu G H, Chen R Y. *Handbook of Analysis of Soil Microorganism* [M]. Beijing: Higher Education Press 1995, 275—279 [许光辉, 陈瑞阳. 土壤微生物分析手册. 北京: 高等教育出版社, 1995, 275—279]
- [9] Ji C Nill FX F d JA Th photosynthesis of *Du-*

- naliella parva* Lerch as a function of temperature, light and salinity [J]. *Hydrobiologia*, 1990, **197**: 165—172
- [10] Jansson M, Olsson H, Pettersson K. Phosphatases: origin, characteristics and function in lakes [J]. *Hydrobiologia*, 1988, **170**: 157—175
- [11] Kang R J, Cai ZL, Shi D J. Attenuation of light intensity and its effect on cell growth in *Anabaena* sp. PCC 7120 culture [J]. *Engineering Chemistry & Metallurgy*, 2000, **21**(4): 384—388 [康瑞娟, 蔡昭铃, 施定基. 光强在鱼腥藻 7120 培养液中的衰减及其对藻细胞生长的影响. 化工冶金, 2000, **21**(4): 384—388]
- [12] Brock T D. Lower pH limit for the existence of blue-green algae: evolutionary and ecological implications [J]. *Science*, 1973, **179**: 480
- [13] Li S H. Studies on the nitrogen-fixing blue-green algae as biofertilizer in the late rice crop [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1981, **7**(3): 417—423 [黎尚豪. 固氮蓝藻作为晚稻肥源的研究 [J]. 水生生物学集刊, 1981, **7**(3): 417—423]
- [14] Berges J A, Hageman R H. Nitrate reductase activity quantitatively predicts the rate of nitrate incorporation under steady state light limitation: a revised assay and characterization of the enzyme in three species of marine phytoplankton [J]. *Limnology and Oceanography*, 1997, **40**(1): 82—93
- [15] Zou D H, Chen X W. Effects of elevated CO₂ concentration on growth and some physiological and biochemical traits in *Enteromorpha clathrata* (Chlorophyta) [J]. *Marine Science Bulletin*, 2002, **21**(5): 38—45 [邹定辉, 陈雄文. 高浓度 CO₂ 对条浒苔 (*Enteromorpha clathrata*) 生长和一些生理生化特征的影响. 海洋通报, 2002, **21**(5): 38—45]
- [16] Hutchinson G E. A treatise on limnology (): Introduction to lake biology and the limnoplankton [M]. New York: John Wiley and Sons Inc. 1967, 115
- [17] Wynne D, Kaplan B, Berman T. Phosphatase activities in Lake Kinneret phytoplankton. In: Chröst R J (Eds.), *Microbial enzymes in aquatic environments* [M]. New York: Springer-Verlag 1991, 220—226

A STUDY ON THE GROWTH AND SOME PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF ANABAENA SPIROIDES ISOLATED FROM LAKE ERHAI

CHANG Feng-Yi^{1,2}, PAN Xiao-Jie^{1,3}, KANG Li-Juan^{1,4}, SHEN Yin-Wu¹, LI Dun-Hai¹ and LIU Yong-Ding¹

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China;

2 Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China;

3. Institute of Hydroecology, Ministry of Water Resources and Chinese Academy of Sciences Wuhan 430079, China;

4 Shanghai Environmental Sciences Institute, Shanghai, 200233)

Abstract: In recent years, Lake Erhai is experiencing a transition from the mesotrophic to eutrophic condition and cyanobacterial blooms have a rapid increase in the lake. In this study, the dominant species from the bloom of Lake Erhai, *Anabaena spiroides*, was isolated and purified. The growth and physiological characteristics of an *Anabaena spiroides* strain under different environmental conditions were studied to evaluate the influence of environmental factors on *Anabaena* bloom formation, and the growth was determined by cell biomass and relative growth rate. The results showed that the *Anabaena spiroides* strain had the best growth at temperature of 25 °C, light intensity of 30 μE/m · s and pH of 8.0—10.0 and under the contents of nitrogen 1.5 mmol/L and phosphorus 12 μmol/L. The activities of nitrate reductase (NR) and alkaline phosphatase (APA), which indicate metabolism of nitrogen and phosphorus, were measured with different concentrations of nitrogen and phosphorus. NR activity of the *Anabaena spiroides* strain increased with the raising of nitrogen concentration when nitrogen supply level was low (0—0.36 mmol/L). But the activity of NR was related to the growth under the condition of rich nitrogen supply (0.36—6 mmol/L), i.e. the better strain's growth, the higher NR activity. APA activity of the *Anabaena spiroides* strain largely depended on the concentration of phosphorus. APA activity was lower with more phosphorus supply. And Nitrogen did not play an important role in the activity change of APA when phosphorus supply was rich. In addition, it was observed that the *Anabaena spiroides* strain could grow with low concentration of nitrogen or phosphorus. This may be related to special regulatory mechanism of nitrogen fixing and phosphorus utilizing of *Anabaena*.

Key words: *Anabaena spiroides*; Nitrogen; Phosphorus; Light intensity; Temperature; pH