

武汉东湖水体磷形态与普通小球藻生长的相关研究

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, 武汉市, 湖北省

2. 中国科学院水生生物研究所, 武汉市

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。获得了普通小球藻生长与各磷形态及总磷(TP)的一元相关方程, 分析和讨论了这些相关方程的不足, 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及预测藻的生长潜力。

关键词: 水体富营养, 普通小球藻 (*Chlorella vulgaris*), 磷形态, 生物有效性, 多元回归

壹、前 言

氮磷在天然水体富营养化中的作用已被广泛认可。磷是藻类生长所必需的营养元素, 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。有关氮磷营养元素对藻类生长的影响已有不少研究^[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是以正磷酸盐的形式进入, 是生物体可以立即利用的磷形态, 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, 是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。

贰、实验材料与方法

一、东湖水体中的磷形态测定

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。实验中所用试剂均为分析纯试剂。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 25.00mL 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 0.45 μm 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 25.00mL 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 25.00mL 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 25.00mL 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。

二、藻的接种与培养

选用普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)作为实验藻种,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 10⁶ cell mL⁻¹ 时便可作为实验藻种。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,使藻体内蓄积的磷被消耗完,从而获得饥饿培养后的藻。该藻液即作为实验用藻种。

三、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。在藻达较大生长量时,取少量藻液每隔 24h 测定其吸光度,直至其吸光度值前后两天的变化不超过 5%时即可认为藻已达最大生长量。

四、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,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。在分别各取 300.00mL 离心灭菌水样于 500mL 锥形瓶中, 接种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 $2 \times 10^4 \text{ cell mL}^{-1}$ 。在恒温、光照条件下培养。在培养过程中每天摇动各培养样品 5~6 次, 并经常更换各锥形瓶位置, 以使藻不致沉积及各样品光照均匀。在藻达较大生长量时, 取少量藻液每隔 24h 测定其吸光度, 直至其前后两天的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。

叁、结果和讨论

一、普通小球藻对东湖水体中磷形态的利用率

实验所测 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。

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

样品 编号	$N (\times 10^6)$ (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	0.1591	0.05282	0.08206	0.08671	0.1073	0.05348
2	4.913	0.1412	0.08405	0.09468	0.1073	0.1040	0.03886
3	1.099	0.1140	0.07475	0.08339	0.07541	0.07674	0.03886
4	5.534	0.1598	0.08272	0.08671	0.1339	0.1306	0.03089
5	5.327	0.1332	0.06146	0.06677	0.1359	0.1306	0.00431
6	2.489	0.07541	0.00763	0.07608	0.06013	0.07076	0.00630
7	1.493	0.1113	0.05481	0.06412	0.1133	0.1086	0.00431
8	5.233	0.1332	0.06079	0.06744	0.1339	0.1312	0.00364
9	6.492	0.1605	0.05282	0.08605	0.09601	0.1067	0.05548
10	2.846	0.1332	0.08405	0.09203	0.1040	0.1027	0.03222
11	2.302	0.1259	0.07475	0.08405	0.08472	0.08339	0.04418
12	6.135	0.1625	0.08272	0.09003	0.1379	0.1326	0.03155
13	2.170	0.07475	0.00696	0.00696	0.06013	0.07475	0.00165
14	1.287	0.1093	0.05481	0.06412	0.1106	0.1086	0.00231

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。

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^[6]。总溶

表 2 普通小球藻达最大生长量时对各磷形态的利用率

磷形态	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(%)	100	94	86	88

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 认为在此磷形态中有一部分是生物无效的^[7],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^[8]。而颗粒磷则通过释放或生物转化亦可被藻所利用^[6]。

二、东湖水体中磷形态与普通小球藻生长的相关

根据以上讨论,我们将实验所测 14 个样品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。

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^[7]。Bradford 在对低磷湖泊研究时也发现,SRP 与藻生长的相关性很差。可见 SRP 并不能单独作为有效预测藻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^[6],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

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

磷形态	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

分析结果可知,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生长量预测因子的标准。实际上藻的生长应是各磷形态与藻综合作用的结果,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

磷形态	常数	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	-4.549	-77.971	2.931	68.960	31.102	97.008
t -检验值	-2.221	-2.050	0.136	0.701	0.329	2.376
显著水平	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5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生长的共同作用。然而表4的结果显示,我们并不能将5种磷形态全部纳入回归方程中。从表4可以看出,5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5种磷形态相关的回归方程的可信度均小于95%。因此将5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:

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

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

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3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。用同样方法还可获得另一种符合统计检验的回归方程为:

$$N(\times 10^6) = -54.536C_{SRP} + 7.989C_{TRP} + 96.466C_{TSP} + 71.655C_{PP} - 5.458 \quad (2)$$

$$R = 0.918; \quad F = 12.083; \quad P = 0.001$$

该式中各磷形态的显著水平为:SRP为0.013;TRP为0.694;TSP为0.000;PP为0.004,常数为0.006。该方程还是TRP的显著水平高于0.05,其余3种磷形态均达到统计检验要求(即其显著水平小于0.05),该多元回归方程的线性相关系数($R = 0.918$)

也较高。因而在评价含磷较高的湖泊水体藻生长潜能时, 此方程也可考虑。

肆、结 论

一、普通小球藻对东湖水体中各磷形态的利用率是不同的, 溶解反应磷 (SRP) 的利用率最高, 其次为总反应磷 (TRP), 其他磷形态只能部分被利用;

二、普通小球藻生长量与各单一磷形态的一元相关模型不能作为普通小球藻生长潜力的预测模型;

三、普通小球藻生长量与 5 种磷形态 (SRP、TRP、SHP、TSP、PP) 的多元相关模型也不宜作为普通小球藻生长潜力的预测模型;

四、普通小球藻生长量与 4 种磷形态 (SRP、TRP、SHP 或 TSP、PP) 的多元相关模型可作为普通小球藻生长潜力的预测模型。

参 考 文 献

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

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

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

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

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

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

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

[8] 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. *Can J Fish Aquat Sci*, 1980, 37: 479~487