

含藻水体中总糖、总氮和总磷相关性研究

谢寄清,白同春,刘德启,张 芸

(苏州大学化学化工学院,江苏 苏州 215123)

摘要 :分别研究了水网藻在人工培养液培养下,微藻在以湖底泥为营养源培养下,藻代谢总糖浓度与溶液中总氮浓度、总糖与总磷浓度随培养时间的变化情况。结果表明两两均呈现一种反向变化关系。氮、磷是藻的重要营养组分,其浓度增高,有利于促进藻生长,伴随着溶液较低的糖浓度。在严重氮、磷限制条件下,藻的蛋白质合成可能停止,但细胞外多糖的生产仍以较高的速度进行,从而导致溶液总糖浓度的增加。

关键词 :水网藻;微藻;总糖;总氮;总磷

中图分类号 :X172 文献标识码 :A 文章编号 :1004-693X(2008)01-0023-04

Relationships among the concentration of total saccharides , total nitrogen and total phosphorus in the water with algae

XIE Ji-qing , BAI Tong-chun , LIU De-qi , ZHANG Yun

(School of Chemistry and Chemical Engineering , Suzhou University , Suzhou 215123 , China)

Abstract :The changes of total nitrogen and total phosphorus concentration in solutions with total saccharides released by two kinds of algae , the *Hydrodictyon reticulatum* in artificial culture medium and the microalgae in a medium whose nutrient is supplied by bed mud from lakes , were studied respectively. It shows that both of the concentration have opposite changing directions. Nitrogen and phosphorus are important nutrient substances for the growth of algae. The higher concentration of P and N is favorable for algae growth , followed by the decrease of total saccharides concentration. Severe P and N limitation would probably lead to a suppressed synthesis of proteins and a higher production of extracellular polysaccharide , which would promote the increasing of total saccharides concentration.

Key words :*Hydrodictyon reticulatum* ; microalgae ; total saccharides ; total nitrogen ; total phosphorus

水体中藻类的过度生长引起水体的富营养化。评价水体富营养化的常用指标有:生物量、叶绿素 a、氮(N)和磷(P)等营养元素含量、水体透光度等^[1-2]。影响藻类生长的因素多且复杂,其中包括介质营养组分和藻排泄化学组分的影响^[3]。藻通过光合作用产生细胞内组分的效率并非 100%。总有一小部分有机分子(大分子或小分子)从细胞内释放到水中^[4]。一种藻旺盛生长产生的代谢物,可能有利于或制约另一种藻的生长^[5]。文献[3,6]表明,藻类 77%的排泄物由多糖组成,23%的小分子主要是单糖、氨基酸和一些有机酸,还有其他许多尚未充分认识的化合物。由于有机化合物的多样性和复杂性,

对这些物质与藻生长之间的关系研究相对较少。

藻多糖既可存在于细胞壁内,也可游离于细胞之外^[7]。文献[3,8-9]表明,影响可溶性多糖的组成和浓度的因素有藻种、藻的生长阶段、环境的营养状况、光照状况等。为了探讨以糖作为评价水体富营养化指标的可行性,有必要了解藻的生长状况与溶液中糖浓度的关系,了解糖浓度与一些化学因素如 N、P 含量的关系。

水网藻(*Hydrodictyon reticulatum*)和微藻(*Microalgae*)是两种常见的与淡水水域富营养化相关的藻,其生长过程中吸收大量的 N、P 等^[10-11]。本文分别以水网藻和微藻为研究对象,用不同 N、P 浓度比的

营养液培养水网藻,用湖底泥为营养源,模拟自然水体条件培养微藻,实验监测含藻水溶液中 N、P 含量与平衡总糖浓度,以考察含藻水体 TN、TP 与溶液中总糖浓度的相关联系。

1 材料与方法

1.1 实验器材与药品

a. 配制分析试剂: 5% 苯酚溶液, 过硫酸钾 + 氢氧化钠氧化剂溶液, 3.5 mol/L 硫酸的钼酸铵锡贮备液 + 抗坏血酸显色剂。

b. 仪器: 紫外-可见分光光度计 (U-1800 spc), 日本岛津公司; 高速离心机, 上海仪器公司; 水相针头式滤器, 孔径 0.45 μm , 直径 13 mm, 安谱科仪公司。

1.2 总糖、总氮和总磷测定方法

由于水体中总糖浓度很低,天然产物的分离技术复杂,目前还难以得到各种含藻水体中糖的具体组成,相关文献报导也很少^[5,14]。为简化问题,本文用总糖浓度来表征糖的含量,将总糖酸解为单糖,折合成葡萄糖计算。而溶液中的单糖总浓度则以不通过酸解、直接测定、折合成葡萄糖的方法来计算。

取含藻水液,离心取上部清液,用孔径 0.45 μm 的水相针头式滤器过滤,滤液酸解。用 10% NaOH 溶液调 pH 值在 7.5 ~ 8.5。用硫酸-苯酚法和紫外-可见分光光度计测单糖浓度^[12]。

吸取离心后藻上清液,加氧化剂溶液(过硫酸钾 + 氢氧化钠),沸水浴中氧化,冷至室温后用钼蓝比色法测定总氮浓度^[13]。

将氧化处理后的藻上清液,加入二硝基酚指示剂,用饱和碳酸钠溶液和 0.5 mol/L 硫酸调至浅黄色,加入显色剂,加水定量,置于 20 ~ 40 $^{\circ}\text{C}$ 温度下还原显示 30 min 后,用分光光度计钼蓝比色法测定总磷浓度^[13]。

所有藻液样品平行取样 3 次,实验相对误差小于 2%。

1.3 藻培养条件

按比例配制营养液组成为: NaHCO_3 , 168; NaNO_3 , 25; K_2SO_4 , 10; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.0; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.4; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 5.0; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1; Na-EDTA, 0.8。再按 N/P 质量比分别为 5:1、10:1 和 45:1 加入硝酸钠及磷酸氢二钾。

水网藻经挑选、分离、纯化后进行扩大培养。5 d 后分别用上述 3 种营养液在玻璃缸中自然光照下培养。选择不同 N、P 比营养液的目的是观察在温度与光照条件相同、营养液组成存在差异的条件下藻生长的差异,以及溶液中糖、N、P 浓度的差异。实验跟踪监测溶液中的总糖(TS)、TN、TP 浓度,在规

定时间定量取样。取样前加入去离子水以补充蒸发掉的水分,取样后加入营养液以补充液体量的损失。

微藻取自一富营养化水体,在显微镜下挑选藻种,优势藻种为小球藻(*Chlorella*)和微囊藻(*Mirocrocystis*),将其转移到玻璃缸中进行扩大和驯化培养。量取藻种液,离心。沉淀的藻细胞用 15 mg/L 的 NaHCO_3 溶液洗涤 2 ~ 3 次,以除去吸附性营养物质及其他物质,用湖底泥做营养源,在自然光照下培养。实验跟踪监测溶液中的 TS、TN、TP,取样分析前加入去离子水以补充蒸发掉的水分,取样后再加不含藻的湖底泥浸泡的水以补充液体量的损失。分析结果扣除了无藻培养液的影响。

由于含藻水体为活生物体体系,为了考察结果的可靠性,分别考察两种藻在不同培养条件下,氮-糖、磷-糖之间关系是否具有相似的规律性。本文的讨论将在实验结果具有相似规律性的基础上展开。

2 结果及讨论

2.1 藻胞外糖浓度随培养时间的变化

水网藻在人工培养液中经 1 周培养后,实验监测溶液 TS 浓度随培养时间的变化。以第 1 次分析检测糖浓度为时间起点,前 20 天仅测 TS 浓度,随后同时检测 TS 和单糖浓度。

图 1 为 TS 质量浓度随培养时间的变化曲线。初始阶段(0 ~ 17 d),由于营养液组成的差异,藻生长环境不同,总糖浓度也存在差异。该阶段变化总趋势为 3 个样品的糖浓度都在减少。此时,藻在生物量增加期,糖浓度减少是由于糖被消耗或利用。文献 14 指出,糖浓度的下降,是由于单糖很容易被吸收所致。在 t 为 17 d 时,3 个样品的糖浓度均达到各自的一个最低点。

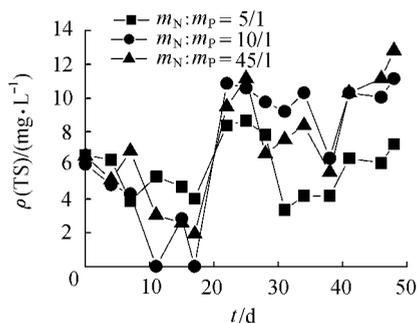


图 1 $\rho(\text{TS})$ 随水网藻培养时间 t 的变化曲线

在 17 ~ 25 d 阶段,糖浓度随培养时间增加而显著增加,在 25 d 左右达到一个小高峰。在糖浓度很低时(15 d),藻生长受到抑制,随后出现藻含量降低。这反而导致糖浓度开始升高。在后观察期(大于 30 d)除个别点外,糖浓度在相对稳定的浓度区间波动,表示藻生长维持在一个相对平稳的阶段。

表 1 为单糖在总糖中所占的质量分数。在后培养期 ($t > 34$ d) 水中主要以单糖为主,个别情况 ($t = 41$ d) 例外。

表 1 单糖在总糖中所占的分数

t/d	m_N/m_P			t/d	m_N/m_P		
	5/1	10/1	45/1		5/1	10/1	45/1
22	0.634	0.898	0.765	38	0.999	0.957	0.950
25	0.774	1.000	0.725	41	0.912	0.487	0.406
28	0.501	0.772	0.667	46	0.999	0.972	0.850
31	0.833	0.698	0.704	48	0.922	0.975	0.935
34	0.932	0.919	0.800				

2.2 氮浓度对总糖浓度的影响

图 2 是水网藻在人工培养液中 TS 和 TN 质量浓度随培养时间变化的情况。由图 2 可见:在多数情况下,溶液中 $\rho(TS)$ 与 $\rho(TN)$ 呈现一种反向变化关系。当 TN 处于低点时,TS 则处于高点;而当 TN 处于高峰期时,TS 则处于低谷。

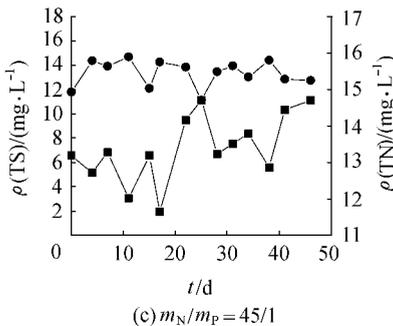
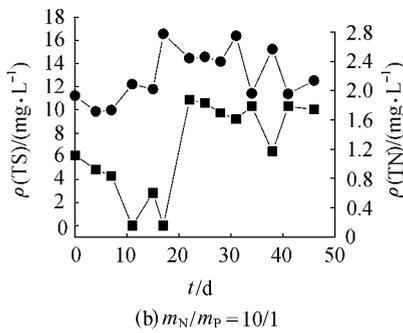
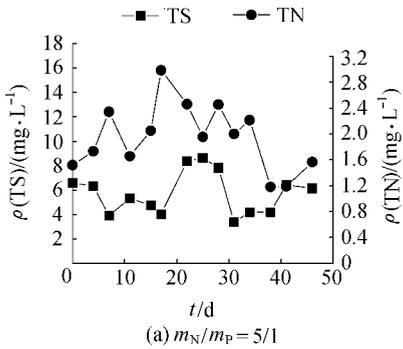


图 2 水网藻在人工培养液中 $\rho(TS)$ 、 $\rho(TN)$ 随培养时间 t 的变化关系

图 3 是以湖底泥作为营养源,模拟自然培养条件下,微藻体系溶液 $\rho(TS)$ 和 $\rho(TN)$ 随培养时间的变化情况。TN 和 TS 也呈反向变化关系。 $\rho(TN)$ 在 0.70~2.00 mg/L 间,相应的 $\rho(TS)$ 在 1.1~8.44 mg/L 间。这些现象表示: $\rho(TN)$ 较高时,溶液中 $\rho(TS)$ 较低, $\rho(TN)$ 达某一上限(2.0 mg/L)时, $\rho(TS)$ 也处于低极值点。当 $\rho(TN)$ 较低时,刺激藻类,使得代谢糖浓度增高。

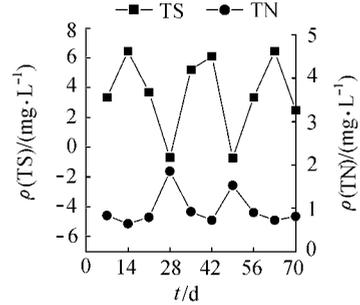


图 3 微藻在湖底泥培养条件下 $\rho(TS)$ 、 $\rho(TN)$ 随培养时间 t 的变化关系

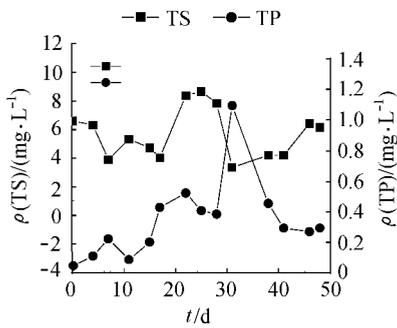
两项实验结果表明,氮盐不仅影响藻的生长,而且还影响溶液中总糖浓度。N 是藻生长必需的营养元素,它构成浮游植物细胞的蛋白质分子,参与生物的新陈代谢,直接决定了藻生物量的累积,是初级生产力的限制因子。当 $\rho(TN)$ 较高时,糖没有积累,这可能和糖被吸收有关。TN 增大,不仅有利于藻的生长,同时也加速细菌和异养生物的生长。此时藻分泌糖的速度并不高,而藻和异养生物的糖消耗量却在增大。另一方面,氮盐还是多糖合成的限制因素^[14]。藻对氮素缺乏的反应是合成含氮分子和蛋白质的速度降低甚至停止,但光合作用合成碳水化合物的反应仍在进行。据文献^[3]氮限制条件下藻的主要活性反应是合成胞外多糖。

2.3 磷元素与总糖浓度的关系

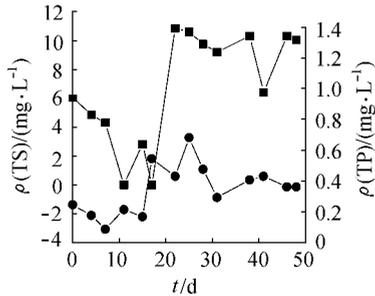
磷是植物生长发育的营养元素之一,许多藻类都可以利用不同形式的磷作为生长发育的磷的来源。因此,磷源也是藻类生长的影响因子^[3,14]。图 4 是水网藻体系在人工培养液条件下 $\rho(TP)$ 与 $\rho(TS)$ 的关系。图 5 是以湖底泥作为营养源,模拟自然培养条件下,微藻体系水溶液中 $\rho(TP)$ 与 $\rho(TS)$ 的关系。它们都显示:水体中 $\rho(TP)$ 与 $\rho(TS)$ 也呈反向变化关系。 $\rho(TP)$ 与 $\rho(TS)$ 的关系类似于 $\rho(TN)$ 与 $\rho(TS)$ 的关系,对这一关系的解释也有相似的机理。

3 结论

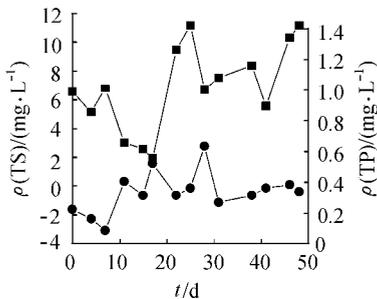
水体富营养化与水藻代谢糖有关,和环境的营养状况有关。在水网藻和微藻的培养过程中,总糖



(a) $m_N/m_P = 5/1$



(b) $m_N/m_P = 10/1$



(c) $m_N/m_P = 45/1$

图4 人工培养液条件下 $\rho(TS)$ 、 $\rho(TP)$ 随培养时间 t 的变化关系

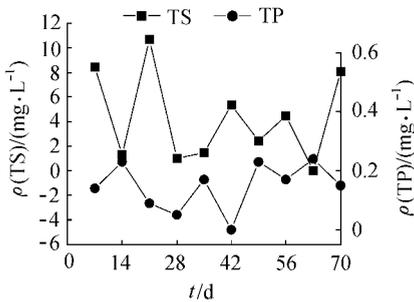


图5 微藻在湖底泥培养条件下 $\rho(TS)$ 、 $\rho(TP)$ 随培养时间 t 的变化关系

浓度并不是连续积累的,而是随藻的生长状况发生变化,受水体中N、P营养盐浓度的影响。水体中总氮-总糖、总磷-总糖浓度均呈反向变化关系。一方面,N、P浓度增高,有利于促进藻生长,它同时也促进细菌和异养生物等对糖的吸收,结果是总糖的浓度在降低;另一方面,当溶液中N、P缺乏时,藻的反应是停止合成蛋白等含N、P分子的反应,而合成碳水化合物以及糖的反应仍在继续,从而导致糖浓度的增加。

参考文献:

- [1] 王明翠,刘雪芹,张建辉. 湖泊富营养化评价方法及分级标准[J]. 中国环境监测, 2002, 18(5): 47-49.
- [2] 蔡庆华. 湖泊富营养化综合评价方法[J]. 湖泊科学, 1997, 9(1): 89-94.
- [3] MYKLESTAD S M. Release of extracellular products by phytoplankton with special emphasis on polysaccharides[J]. The Science of the Total Environment, 1995, 165: 155-164.
- [4] MYKLESTAD S M, HOLM-HANSEN O, VÅRUM K M, et al. Rate of release of extracellular amino acids and carbohydrates from the marine diatom *Chaetoceros affinis*[J]. J. Plankton Res, 1989, 11: 763-773.
- [5] VASCONCELOS M T S D, LEAL M F C, VAN DEN BERG C M G. Influence of the nature of the exudates released by different marine algae on the growth, trace metal uptake and exudation of *Emiliania huxleyi* in natural seawater[J]. Marine Chemistry, 2002, 77: 187-210.
- [6] MYKLESTAD S M, Skånøy E, HESTMANN S. A sensitive and rapid method for analysis of dissolved mono- and polysaccharides in seawater[J]. Marine Chemistry, 1997, 56: 279-286.
- [7] DAVIS T A, VOLESKY B, MUCCI A. A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae[J]. Water Research, 2003, 37: 4311-4330.
- [8] YOU T, BARNETT S M. Effect of light quality on production of extracellular polysaccharides and growth rate of *Porphyridium cruentum*[J]. Biochemical Engineering Journal, 2004, 19: 251-258.
- [9] BIERSMITH A, BENNER R. Carbohydrates in phytoplankton and freshly produced dissolved organic matter[J]. Marine Chemistry, 1998, 63: 131-144.
- [10] STARY J, KRATZER K, ZEMAN A. The uptake of phosphate ions by the algae *Hydrodictyon reticulatum*[J]. Acta Hydrochimica Hydrobiologica, 1987, 15(3): 275-280.
- [11] 王朝晖,江天久. 水网藻(*Hydrodictyon reticulatum*)对富营养化水样中氮磷去除能力的研究[J]. 环境科学学报, 1999, 19(4): 257-261.
- [12] 朱成文,白同春,刘德启,等. 硫酸苯酚法和焦糖化分光光度法相结合测定藻类水溶液中总糖浓度[J]. 苏州大学学报:自然科学版, 2005, 21(2): 63-67.
- [13] 钱君龙,府灵敏. 用过硫酸钾氧化法测定水样中的总氮总磷[J]. 环境科学, 1991, 12(1): 61-64.
- [14] BØRSHEIM K Y, MYKLESTAD S M, SNELI J-A. Monthly profiles of DOC, mono- and polysaccharides at two locations in the Trondheimsfjord (Norway) during two years[J]. Marine Chemistry, 1999, 63: 255-272.

(收稿日期: 2006-10-18 编辑: 徐娟)