

DOI:10. 3880/j. issn. 1004-6933. 2019. 05. 017

铜绿微囊藻增殖与产毒过程中的氮磷限制 与主控因子研究

任梦甜,陈 荣,雷 振,薛 涛,王晓江

(西安建筑科技大学环境与市政工程学院,陕西 西安 710055)

摘要:通过正交试验,研究了 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 分别与 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 和 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 两种无机氮形态共存条件下对铜绿微囊藻增殖和产毒素的影响。结果表明:在 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 共存环境下,当 $\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P}) \leq 0.10 \text{ mg/L}$ 时,藻类生长受到限制, $\rho(\text{NO}_3^-\text{-N})$ 升高对藻细胞生长的促进作用不显著;在磷营养适宜后, $\rho(\text{NO}_3^-\text{-N}) \leq 5.0 \text{ mg/L}$ 能有效控制藻类过度增长。在 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 和 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 共存环境下,只有当 $\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P}) \leq 0.05 \text{ mg/L}$ 时, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 对藻细胞生长的促进作用才能得到限制;在磷营养适宜后, $\rho(\text{NH}_4^+\text{-N}) \leq 1.0 \text{ mg/L}$ 才能有效控制藻类过度增长。MC-LR 是铜绿微囊藻产生的主要藻毒素。 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 培养条件下, $\rho(\text{NO}_3^-\text{-N}) \geq 10.0 \text{ mg/L}$ 时, $\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P})$ 对产毒量具有显著促进的影响; $\rho(\text{NO}_3^-\text{-N}) < 10.0 \text{ mg/L}$ 时, $\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P})$ 的影响不明显。 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 培养条件下,所有 $\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P})$ 下的产毒量均在 $\rho(\text{NH}_4^+\text{-N}) = 10.0 \text{ mg/L}$ 达到最大值。 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 是富营养化防治过程中需要优先控制的氮形态,过高的 $\rho(\text{NO}_3^-\text{-N}) (\geq 10.0 \text{ mg/L})$ 和 $\rho(\text{NH}_4^+\text{-N}) (\geq 5.0 \text{ mg/L})$ 会大幅激发藻毒素的合成。

关键词:氮磷限制;铜绿微囊藻;细胞增殖;藻毒素;正交试验

中图分类号:X522 **文献标志码:**A **文章编号:**1004 - 6933 (2019)05 - 0102 - 06

Nitrogen and phosphorus restriction and main controlling factors in proliferation and toxicity production of *Microcystis aeruginosa*//REN Mengtian, CHEN Rong, LEI Zhen, XUE Tao, WANG Xiaojiang (School of Environmental and Municipal Engineering, Xi'an University of Architecture and Technology, Xi'an 710055, China)

Abstract: The effects of $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ coexisting with $\text{NO}_3^-\text{-N}$ and $\text{NH}_4^+\text{-N}$ on the proliferation and toxin production of *Microcystis aeruginosa* were studied by orthogonal experiments. The results showed that under the coexistence of $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ and $\text{NO}_3^-\text{-N}$, when $\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P}) \leq 0.10 \text{ mg/L}$, the growth of algae was restricted, and the growth of algae was not promoted significantly by the increase of $\rho(\text{NO}_3^-\text{-N})$. When the phosphorus nutrition was suitable, the excessive growth of algae could be effectively controlled when $\rho(\text{NO}_3^-\text{-N}) \leq 5.0 \text{ mg/L}$. Under the coexistence of $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ and $\text{NH}_4^+\text{-N}$, only when $\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P}) \leq 0.05 \text{ mg/L}$ could the promotion of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ on algal cell growth be limited. When the phosphorus nutrition was suitable, the excessive growth of algae could be effectively controlled only when $\rho(\text{NH}_4^+\text{-N}) \leq 1.0 \text{ mg/L}$. MC-LR is the main algal toxin produced by *Microcystis aeruginosa*. Under the cultivating condition of $\text{NO}_3^-\text{-N}$, when $\rho(\text{NO}_3^-\text{-N}) > 10.0 \text{ mg/L}$, the effect of $\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P})$ on the toxicity was significantly promoted, the greater the toxicity was. When $\rho(\text{NO}_3^-\text{-N}) < 10.0 \text{ mg/L}$, the effect of $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ was not obvious. Under the cultivating condition of $\text{NH}_4^+\text{-N}$, the toxicity of all concentrations of $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ reached the maximum at $\rho(\text{NH}_4^+\text{-N}) = 10.0 \text{ mg/L}$. $\text{NH}_4^+\text{-N}$ is a priority nitrogen form in the process of eutrophication control. Excessive $\rho(\text{NO}_3^-\text{-N}) (> 10.0 \text{ mg/L})$ and $\rho(\text{NH}_4^+\text{-N}) (> 5.0 \text{ mg/L})$ will greatly stimulate the synthesis of algae toxins.

Key words: nitrogen and phosphorus restriction; *Microcystis aeruginosa*; cell proliferation; algal toxins; orthogonal experiment

蓝藻水华污染不仅导致水生态系统平衡被破坏,且蓝藻细胞破裂后会向水体中释放多种不同类型的藻毒素^[1]。世界上 25% ~ 70% 的蓝藻水华污染可产生藻毒素^[2]。在已发现的各种藻毒素中,微

基金项目:水污染控制与治理科技重大专项(2012ZX07313-001-002);陕西省青年科技新星项目(2013KJXX-55)
作者简介:任梦甜(1990—),女,硕士研究生,研究方向为水体富营养化治理。E-mail:465529905@ qq.com
通信作者:陈荣,教授,博士。E-mail:chenrong @ xauat. edu. cn

囊藻毒素 (Microcystin, MC) 是一种在蓝藻水华污染中出现频率最高、产生量最大和危害最严重的藻毒素种类^[3]。饮水是 MC 进入人体的主要途径,其他途径包括工作、娱乐活动中经口、皮肤接触以及食用蓝藻类保养品等。研究显示,MC 的主要靶器是肝脏,MC 可从血液中转移到肝脏,主要表现为使肝脏充血肿大,严重时可导致肝出血和坏死^[4]。Kotak 等^[5]研究 MC 在单次腹腔注射条件下对肝的急性毒性效果表明,确定不引起有害健康效应的最高剂量为 25 ug/kg,低于 2.5 ug/kg 的暴露剂量产生的有害效应的可能性很小。影响铜绿微囊藻生长和产藻毒素的因素有很多,如有机物、重金属和营养盐等^[6-8]。目前,关于不同形态氮对微囊藻的生长及其产毒影响的报道多集中于 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$,且观点不尽一致。刘洪涛^[9]认为适宜的 $\rho(\text{NH}_4^+ \text{-N})$ 促进微囊藻生长;唐全民等^[10]认为 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 不利于铜绿微囊藻的生长,藻细胞有最大比增长速率的 $\rho(\text{NH}_4^+ \text{-N})$ 较低;张玮等^[11]认为当 $\rho(\text{PO}_4^{3-} \text{-P})$ 不变时, $\rho(\text{NH}_4^+ \text{-N})$ 处于 1.83 ~ 18.3 mg/L 时促进铜绿微囊藻的生长, $\rho(\text{NH}_4^+ \text{-N}) < 1 \text{ mg/L}$ 的条件下,铜绿微囊藻的生长受到限制, $\rho(\text{NH}_4^+ \text{-N}) > 100 \text{ mg/L}$ 抑制铜绿微囊藻的生长。 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 是各种微囊藻培养液中常用的氮源,连民等^[12]认为高浓度的 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 有利于铜绿微囊藻的生长,但超过 245.1 mg/L 后对其生长有轻微抑制作用。张青田等^[13]认为 $\rho(\text{NO}_3^- \text{-N})$ 为 21 ~ 70 mg/L 时适宜铜绿微囊藻生长。磷对微囊藻生长特征有复杂影响,有研究结果表明,在保持 N/P 为 8:1 的条件下,不同总磷浓度对铜绿微囊藻的繁殖作用具有差异性,总磷质量浓度在 0.02 ~ 0.05 mg/L 时,藻的繁殖缓慢,在 0.1 mg/L 以上时,藻的繁殖速度明显加快,当达到 0.5 mg/L 以上时,不同总磷浓度条件下藻的繁殖速度基本相近^[14]。不仅如此,不同研究者关于氮磷与微囊藻毒素合成的关系的研究结果也不尽一致^[15-16]。Kameyama 等^[17]认为磷作用明显,氮影响不大,并且发现对数生长期胞内 MC 与氮浓度没有显著的相关关系;Downing 等^[18]则认为氮在产毒中具有重要作用;Zheng 等^[19]对莲花湖的调查发现微囊藻毒素和 $\rho(\text{NH}_4^+ \text{-N})$ 呈负相关关系;Rapala 等^[20]对加拿大 Albert 的湖泊研究表明 MC-LR 含量与 $\rho(\text{NO}_3^- \text{-N})$ 呈负相关关系。这些不同结论表明目前对氮磷影响藻类增殖和产毒素的机理还有待进一步探究。

以上研究多集中于单一形态的氮在磷充足的情况下对藻细胞增殖和产毒的影响,而对不同形态的氮在不同氮磷浓度下对藻类生长和产毒的影响研究

较少。本研究通过设计正交试验,针对不同形态的氮在不同氮磷浓度下,氮、磷及其形态对微囊藻生长和产毒的影响进行研究,以期揭示氮磷源对微囊藻生长和产毒的影响机理,确定氮磷在藻类增殖和产毒素过程中的主控因子。

1 材料与方法

1.1 试验藻种

试验采用藻种为铜绿微囊藻,购于中国科学院水生生物研究所的淡水藻种库。开始试验之前,将铜绿微囊藻在对数期反复接种进行扩大培养。

1.2 培养条件的设定

试验以 BG-11 培养基为基础,配置成无氮磷培养基,试验中氮分为 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 和 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 两个处理组,每组分别设置 6 个 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 和 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 质量浓度,分别为 0.5、1.0、5.0、10.0、15.0、20.0 mg/L (以 N 计),根据设定浓度添加相应量的 NaNO_3 或 NH_4Cl 。磷元素浓度用 K_2HPO_4 配置,设 4 个梯度,分别为 0.05、0.10、0.50、1.00 mg/L (以 P 计)。培养条件为温度 $T = (25 \pm 0.5)^\circ\text{C}$,光照 2500 ~ 3000 lux,光暗比为 12 h: 12 h。

1.3 预培养、饥饿处理及接种

取适量的藻种,将其接种到新配置的 BG-11 培养基中,培养 7 d 得到对数期藻种。将此对数期的藻种进行去除营养物质处理,6 000 r/min 离心 10 min,倒掉上清液后用 15 mg/L 的 NaHCO_3 洗涤 3 次后保留离心得到的藻细胞,后接种至不含氮、磷培养基中培养 7 d。饥饿处理后按前述方法再次去除营养物质,接入配置的不同氮磷浓度梯度的培养基中,初始接种浓度为 2×10^5 个/mL, $\text{pH} = 7.1$ 。培养周期一般在 12 ~ 18 d。试验过程中每天摇晃培养液 3 次,期间改变各组别培养位置,以尽量减少光照对试验结果的影响。为确保试验结果的准确性,本研究所有样品均设 2 个平行样。

1.4 指标测定

藻密度的测定采用细胞计数分析仪 (Cellometer Auto T4,达科为,中国),该细胞计数仪相比人工计数法能根据细胞的形态辨别细胞是否死亡,可以较准确地计数。每次测定取样量为 1 mL,从接种第 2 天开始测定,每隔 1 d 测定一次。

藻毒素 (细胞内) 的测定采用高效液相色谱 (LC-2000,日立,日本),分离柱尺寸为 250 mm × 4.6 mm (SB-C18,安捷伦,USA)。流动相为甲醇,磷酸盐缓冲溶液体积比为 0.57:0.43,流速为 1 mL/min,进样量为 40 μL 。从培养第 4 天开始每隔 3 d 测定一次 MC-LR 产量。每次取样量控制在 10 ~ 25 mL,前期

取样量多,后期逐渐减少。样品的制备参考 Long^[21] 的制备方法。

比增长率 μ 是衡量藻类增殖的另一重要参数,其计算公式为

$$\mu = \ln(X_t/X_{t-T})/T \quad (1)$$

式中: X_t 为第 t 天的藻密度; X_{t-T} 为第 $t-T$ 天的藻密度; T 为时间间隔。当连续2 d μ 值小于5%时,藻细胞增殖停止,试验结束。

文中所有试验数据均采用 Excel 2007 分析,图均用 Origin 9.0 绘制。数据统计学分析采用 SPSS19.0, P 值表明各组数据之间存在显著性差异, P 值越小表示各组数据之间的显著性差异越大。

2 结果与讨论

2.1 藻细胞密度

图1为不同培养条件下各培养组的最大藻细胞密度值。对比图1(a)(b)可知,当 $\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P}) = 0.05 \text{ mg/L}$ 时,以 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 为氮源, $\rho(\text{NO}_3^- \text{-N}) \leq 5.0 \text{ mg/L}$ 时,对应的最大藻密度值随着氮浓度的增加而增大; $\rho(\text{NO}_3^- \text{-N}) > 5.0 \text{ mg/L}$ 时,对应最大藻密度随 $\rho(\text{NO}_3^- \text{-N})$ 的升高逐渐下降。当 $\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P}) = 0.05 \text{ mg/L}$ 时,以 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 为氮源,低 $\rho(\text{NH}_4^+ \text{-N}) (\leq 5.0 \text{ mg/L})$ 对应的藻密度值整体高于高 $\rho(\text{NH}_4^+ \text{-N})$ 对应值,且在 $\rho(\text{NH}_4^+ \text{-N}) = 1.0 \text{ mg/L}$ 时取得所有试验组中最大值,达到 2.08×10^6 个/mL。当 $\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P}) = 0.10 \text{ mg/L}$, $\rho(\text{NO}_3^- \text{-N}) = 5.0 \text{ mg/L}$ 时,对应藻密度取得所有试验组中最大值;以 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 为氮源,随着 $\rho(\text{NH}_4^+ \text{-N})$ 的升高,藻密度值也依次增大,在 $\rho(\text{NH}_4^+ \text{-N}) = 20.0 \text{ mg/L}$ 时取得所有试验组中最大值,达到 2.79×10^6 个/mL。在 $\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P})$ 充足($\geq 0.50 \text{ mg/L}$)、 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 培养条件下,随着 $\rho(\text{NO}_3^- \text{-N})$ 的增加藻密度最大值整体呈增大趋势, $\rho(\text{NO}_3^- \text{-N}) = 0.5 \text{ mg/L}$ 和 $\rho(\text{NO}_3^- \text{-N}) = 1.0 \text{ mg/L}$ 时,其藻密度显著小于 $\rho(\text{NO}_3^- \text{-N}) = 5.0 \text{ mg/L}$ 时的藻密度($P < 0.001$),而 $\rho(\text{NO}_3^- \text{-N}) = 0.5 \text{ mg/L}$ 和 $\rho(\text{NO}_3^- \text{-N}) = 1.0 \text{ mg/L}$ 时两者的藻密度并无显著性差异($P > 0.05$); $\rho(\text{NO}_3^- \text{-N}) = 10.0 \text{ mg/L}$ 、 $\rho(\text{NO}_3^- \text{-N}) = 15.0 \text{ mg/L}$ 和 $\rho(\text{NO}_3^- \text{-N}) = 20.0 \text{ mg/L}$ 时,其藻密度显著大于 $\rho(\text{NO}_3^- \text{-N}) = 5.0 \text{ mg/L}$ 时的藻密度($P < 0.001$),但三者间藻密度并无显著性差异($P > 0.05$)。这说明在磷充足条件下,氮浓度过低($\leq 1.0 \text{ mg/L}$)或过高($\geq 10.0 \text{ mg/L}$)时改变氮浓度并不会影响藻类增殖,而 $\rho(\text{NO}_3^- \text{-N})$ 从 1.0 mg/L 增加至 5.0 mg/L 再到 10.0 mg/L 可以有效地促进藻类增殖。以 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 为氮源时的结果则不同,当 $\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P}) = 0.50 \text{ mg/L}$

时,藻密度在 $\rho(\text{NH}_4^+ \text{-N}) = 5.0 \text{ mg/L}$ 取得最大值后而呈逐渐降低的趋势,这与 $\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P}) = 1.00 \text{ mg/L}$ 时随着 $\rho(\text{NH}_4^+ \text{-N})$ 的增加,藻密度表现先增加后保持稳定的趋势不同。

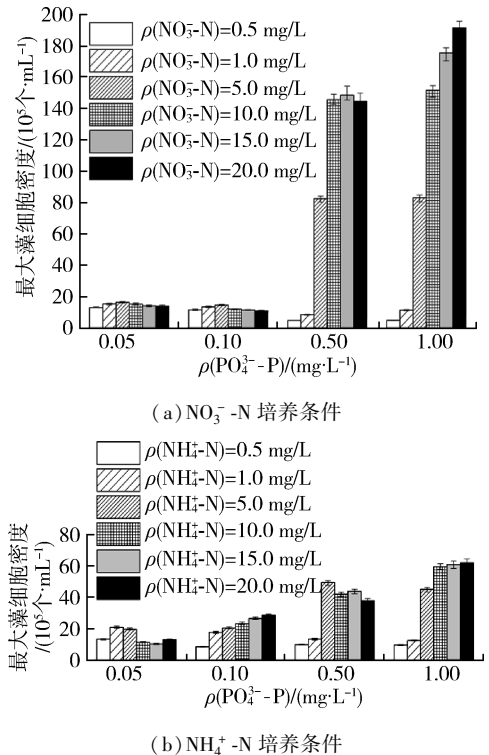


图1 不同氮磷条件下铜绿微囊藻的最大藻细胞密度值

对比图1(a)(b)可知,当 $\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P}) \leq 0.10 \text{ mg/L}$ 时,在相同 $\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P})$ 条件下,以 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 为氮源组藻密度所取得的最大值明显高于以 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 为氮源组,说明在低磷条件下 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 作为氮源更容易促进藻类增殖;当 $\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P}) \geq 0.50 \text{ mg/L}$ 时,在相同 $\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P})$ 条件下,以 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 为氮源组藻密度所取得的最大值明显低于以 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 为氮源组,说明在高磷条件下 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 作为氮源更有利于促进藻类增殖。

从图1(a)可知,当氮源为 $\text{NO}_3^- \text{-N}$, $\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P})$ 控制在 0.10 mg/L 及以下时, $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 对藻类增殖的影响规律体现为:当 $\rho(\text{NO}_3^- \text{-N}) < 5.0 \text{ mg/L}$ 时,藻密度随着氮浓度的增加而增大,当 $\rho(\text{NO}_3^- \text{-N}) = 5.0 \text{ mg/L}$ 对应的藻密度取得最大值,当 $\rho(\text{NO}_3^- \text{-N}) > 5.0 \text{ mg/L}$ 时氮浓度增加会对藻类的增殖产生抑制。 $\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P})$ 充足($\geq 0.50 \text{ mg/L}$)时, $\rho(\text{NO}_3^- \text{-N})$ 在 $1.0 \sim 10.0 \text{ mg/L}$ 范围内藻密度明显增大,超过 10.0 mg/L 时对藻类增殖的促进作用不再增大。从图1(b)可知,当以 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 为氮源时, $\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P}) \leq 0.10 \text{ mg/L}$ 时,藻密度取得最大值时对应的 $\rho(\text{NH}_4^+ \text{-N})$ 从 $\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P}) = 0.05 \text{ mg/L}$ 时的 1 mg/L 增加至 $\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P}) = 0.10 \text{ mg/L}$ 时的 20.0 mg/L 。 $\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P})$ 充足($\geq 0.50 \text{ mg/L}$)

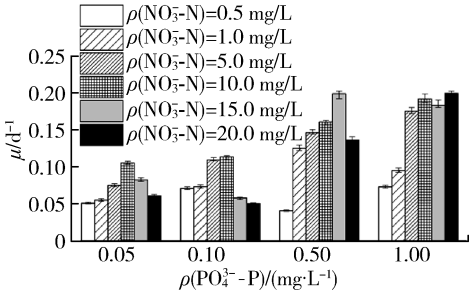
时, $\rho(\text{NH}_4^+-\text{N})$ 在1.0~5.0 mg/L 范围内最大藻密度值随着氮浓度的增加显著增大, $\rho(\text{NH}_4^+-\text{N}) > 5.0$ mg/L 时继续增加 $\rho(\text{NH}_4^+-\text{N})$ 对藻类增殖的影响不大。

磷元素对藻类增殖的影响:在以 NO_3^--N 为氮源时,无论氮源是否充足,在 $\rho(\text{PO}_4^{3-}-\text{P}) \leq 0.10$ mg/L 时,增加 $\rho(\text{PO}_4^{3-}-\text{P})$ 对藻类增殖的影响并不显著 ($P > 0.05$)。而当 $\rho(\text{PO}_4^{3-}-\text{P})$ 从0.10 增加至0.50 mg/L 再至1.00 mg/L 时,所有 NO_3^--N 培养组的藻密度值具有显著增加 ($P < 0.01$),这说明以 NO_3^--N 为氮源时 $\rho(\text{PO}_4^{3-}-\text{P}) > 0.10$ mg/L 时磷属于藻类增殖的重要限制因子;在以 NH_4^+-N 为氮源,当氮浓度较低时 (≤ 1.0 mg/L),增加 $\rho(\text{PO}_4^{3-}-\text{P})$ 并未对各培养组的藻密度产生显著影响 ($P > 0.005$),而当 $\rho(\text{NH}_4^+-\text{N}) > 1.0$ mg/L 时, $\rho(\text{PO}_4^{3-}-\text{P})$ 从0.05 mg/L 增加至0.50 mg/L,各培养组的藻密度值几乎翻了一倍,此条件下 $\rho(\text{PO}_4^{3-}-\text{P})$ 对藻类增殖的影响显著 ($P < 0.01$)。但相比 NO_3^--N 来说, NH_4^+-N 作为氮源时磷元素对藻类增殖的影响作用要比以 NO_3^--N 为氮源时弱很多。这可能是因为当 $\rho(\text{NH}_4^+-\text{N})$ 过高时会对藻类产生毒害作用,在高 $\rho(\text{NH}_4^+-\text{N})$ 条件下 NH_4^+-N 对藻类增殖的抑制作用影响到了磷对藻类的促进作用。

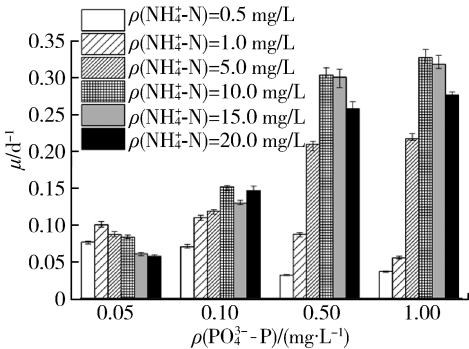
2.2 对数期的比增长率

由于藻类的增殖潜能主要在对数期内得到表现,因而对数期比增长率能够很好地体现在某一培养条件下藻类的增殖潜力。图2 为不同氮磷条件下铜绿微囊藻在对数期的比增长率。从图2(a)可见,在 $\text{PO}_4^{3-}-\text{P}$ 和 NO_3^--N 共存环境下,随着 $\rho(\text{NO}_3^--\text{N})$ 的升高,藻细胞增殖对数期的比增长率呈现先增后降的趋势,这个趋势在不同 $\rho(\text{PO}_4^{3-}-\text{P})$ 条件下基本一致。当 $\rho(\text{PO}_4^{3-}-\text{P}) \leq 0.10$ mg/L 时,比增长率较小且相互差异不大;当 $\rho(\text{PO}_4^{3-}-\text{P}) = 0.50$ mg/L 时,比增长率的值与 $\rho(\text{PO}_4^{3-}-\text{P}) \leq 0.10$ mg/L 时相比明显增大(除 $\rho(\text{NO}_3^--\text{N}) = 0.5$ mg/L 时),当 $\rho(\text{NO}_3^--\text{N})$ 从0.5 mg/L 变化到1.0 mg/L 时,比增长率显著增大,并在 $\rho(\text{NO}_3^--\text{N}) = 15.0$ mg/L 时达到最大值;在 $\rho(\text{PO}_4^{3-}-\text{P}) = 1.0$ mg/L 时,当 $\rho(\text{NO}_3^--\text{N})$ 从1.0 mg/L 变化到5.0 mg/L 时,比增长率有显著性增大,且在 $\rho(\text{NO}_3^--\text{N}) = 20.0$ mg/L 时达到最大值。从图2(b)可知,在 $\text{PO}_4^{3-}-\text{P}$ 和 NH_4^+-N 共存环境下,随着 $\rho(\text{NH}_4^+-\text{N})$ 的升高,藻细胞增殖对数期的比增长率也呈现先增后降的趋势,这个趋势在不同 $\rho(\text{PO}_4^{3-}-\text{P})$ 条件下基本一致。在 $\rho(\text{PO}_4^{3-}-\text{P}) = 0.50$ mg/L 和 $\rho(\text{PO}_4^{3-}-\text{P}) = 1.00$ mg/L 时,对数期的比增长率与 $\rho(\text{PO}_4^{3-}-\text{P}) \leq 0.10$ mg/L 时相比明显增大(除

$\rho(\text{NH}_4^+-\text{N}) \leq 1.0$ mg/L 时),且当 $\rho(\text{NH}_4^+-\text{N})$ 处于1.0~10.0 mg/L 时,比增长速率有显著性增大,并都在 $\rho(\text{NH}_4^+-\text{N}) = 10.0$ mg/L 时达到最大值。这可能是由于随着培养液中磷的不断消耗,低磷组 ($\rho(\text{PO}_4^{3-}-\text{P}) \leq 0.10$ mg/L) 首先出现了磷限制,但在 $\rho(\text{PO}_4^{3-}-\text{P}) = 0.10$ mg/L 时,与 $\rho(\text{NO}_3^--\text{N})$ 相比, $\rho(\text{NH}_4^+-\text{N})$ 的变化对藻细胞增殖对数期的比增长率则有较大促进作用。当 $\rho(\text{PO}_4^{3-}-\text{P})$ 充足时 (≥ 0.50 mg/L),铜绿微囊藻不断吸收超过其生长所需的外源性磷进行大量生长繁殖,对数期比增长率迅速增加。但是,过高 $\rho(\text{NH}_4^+-\text{N})$ 也会抑制藻类的生长,唐全民等^[10]指出 $\rho(\text{NH}_4^+-\text{N}) > 0.5$ mmol/L (7 mg/L) 时,藻细胞比生长速率略降低,达到40mmol/L,铜绿微囊藻的生长则受到严重抑制,与本试验结果一致。



(a) NO_3^--N 培养条件



(b) NH_4^+-N 培养条件

图2 不同氮磷条件下铜绿微囊藻在对数期的比增长率

NH_4^+-N 培养条件下对数期比增长率比 NO_3^--N 培养条件下高的一个主要原因是以 NH_4^+-N 为氮源时藻类增殖的周期大约在12 d,明显比以 NO_3^--N 为氮源时的增殖周期(16~18 d)短,而二者培养周期差异的原因应该是藻细胞吸收利用两种氮源的过程存在差异。Muropastor 等^[22]通过研究发现蓝藻优先利用 NH_4^+-N ,在利用其他氮源之前均须先转化为 NH_4^+-N , NH_4^+-N 再与谷氨酸在谷氨酰胺合成酶(GS)作用下合成谷氨酰胺,进而被藻细胞利用,因此造成了上述差异。

综上,藻类对数期比增长率在 $\rho(\text{NH}_4^+-\text{N})$ 和 $\rho(\text{NO}_3^--\text{N})$ 大于1.0 mg/L, $\rho(\text{PO}_4^{3-}-\text{P})$ 不大于0.5 mg/L

时,随着 $\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P})$ 的增加,且呈现大幅增长趋势,而当 $\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P})$ 超过0.5 mg/L时比增长率不再继续增加;当 $\rho(\text{NH}_4^+\text{-N})$ 和 $\rho(\text{NO}_3^-\text{-N})$ 小于1.0 mg/L时 $\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P})$ 的变化对藻类对数期比增长率的影响并不显著。

2.3 藻毒素合成

根据标准样品检测结果,铜绿微囊藻在生长过程中共产生3种MC异构体:MC-RR、MC-YR、MC-LR。在本试验的氮磷条件下,各试验组在试验过程中合成的MC-RR含量非常少,几乎检测不到,MC-YR在各组中虽能检测到,但只占藻毒素总含量的3%~10%。因此,本试验的氮磷条件下以MC-LR为主导性藻毒素。

氮元素是MC-LR的主要组成元素,氮浓度变化对MC-LR合成具有重要影响。图3为不同培养条件下各培养组的最大MC-LR浓度。当以 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 为氮源时,随着氮质量浓度的增加,MC-LR最大浓度随氮质量浓度变化表现出两种趋势。在所有 $\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P})$ 条件下,当 $\rho(\text{NO}_3^-\text{-N}) \leq 10.0$ mg/L时, $\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P})$ 和 $\rho(\text{NO}_3^-\text{-N})$ 的增加均没有引起MC-LR浓度的增加;当 $10.0 \text{ mg/L} < \rho(\text{NO}_3^-\text{-N}) \leq 15.0$ mg/L时,除 $\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P}) = 0.05$ mg/L时以外,其他所有 $\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P})$ 质量浓度下的MC-LR浓度均呈现了显著的增加,且增加幅度基本一致;当 $\rho(\text{NO}_3^-\text{-N}) > 15.0$ mg/L后, $\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P})$ 的影响出现差异,相同 $\rho(\text{NO}_3^-\text{-N})$ 下, $\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P})$ 越高产毒量越大。当以 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 为氮源时,在所有 $\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P})$ 条件下,当 $\rho(\text{NH}_4^+\text{-N}) \leq 10.0$ mg/L时, $\rho(\text{NH}_4^+\text{-N})$ 的增加促使MC-LR浓度的增加,并在 $\rho(\text{NH}_4^+\text{-N}) = 10.0$ mg/L时取得最大值。

由图3(a)(b)可见,当氮质量浓度为0.5~10.0 mg/L时,利用 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 时细胞内MC-LR浓度比利用 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 时低,其原因可能是微囊藻在 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 条件下生长,毒素合成受到硝酸还原酶(NR)的限制。当氮浓度大于10.0 mg/L时,利用 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 时细胞内MC-LR浓度显著比利用 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 时高,很有可能是由于过高的 $\rho(\text{NH}_4^+\text{-N})$ 会对产毒微囊藻的毒素生产具有抑制作用^[11]。有研究发现,在2 mmol/L的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 条件下,MC-LR的产量只是1 mmol/L时的50%左右,而该两种浓度下细胞比生长速率差别并不明显,这说明高 $\rho(\text{NH}_4^+\text{-N})$ 确实可能对产毒微囊藻的毒素生产具抑制作用^[7]。

与氮元素不同,磷元素不是MC-LR的组成元素,但 $\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P})$ 变化仍能影响MC-LR的合成。Watanabe等^[23]指出,磷限制会降低MC-LR的毒性。

本试验结果表明,以 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 为氮源时,在 $\rho(\text{NO}_3^-\text{-N}) > 10.0$ mg/L条件下, $\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P}) = 0.05$ mg/L时MC-LR最大产量显著小于 $\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P}) = 0.1$ mg/L时MC-LR最大产量;而 $\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P}) > 0.10$ mg/L时继续增加 $\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P})$ 对MC-LR合成并未产生影响。以 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 为氮源时, $\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P}) = 1.00$ mg/L、 $\rho(\text{NH}_4^+\text{-N}) = 10.0$ mg/L时对应的MC-LR产量最大,但总体来说 $\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P})$ 对MC-LR合成的影响并不显著。

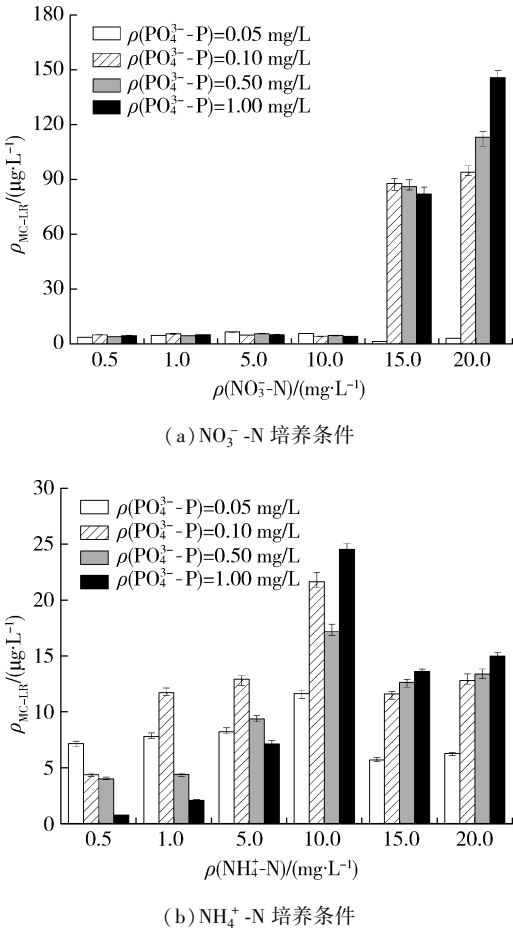


图3 不同培养条件下各培养组的最大MC-LR浓度

2.4 藻细胞密度与MC-LR的相关性分析

表1为藻细胞密度与MC-LR的相关系数,可见铜绿微囊藻MC-LR与藻细胞密度之间存在很好的相关性。在 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 培养条件下, $\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P}) \geq 0.50$ mg/L所对应的各组相关性系数高于 $\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P}) \leq 0.10$ mg/L时所对应的值,在 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 培养条件下反之。当 $\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P}) \leq 0.10$ mg/L时, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 培养条件较 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 培养条件下有更好的相关性,当 $\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P}) \geq 0.50$ mg/L时, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 培养条件下相关系数值明显大于 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 培养条件下的值。据Ressom等^[24]的报道,可以用藻细胞数作为水体微囊藻MC-LR含量的监测预警指标。本试验相关性分析结果进一步验证了以微囊藻细胞数作为MC-LR污染程度的监测预警

表 1 藻细胞密度与 MC-LR 的相关系数

$\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P})$	$\rho(\text{NO}_3^-\text{-N})$						$\rho(\text{NH}_4^+\text{-N})/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$					
	0.5 mg/L	1.0 mg/L	5.0 mg/L	10.0 mg/L	15.0 mg/L	20.0 mg/L	0.5 mg/L	1.0 mg/L	5.0 mg/L	10.0 mg/L	15.0 mg/L	20.0 mg/L
0.05	0.437**	0.476**	0.318*	0.621**	0.487**	0.341*	0.994**	0.899**	0.885**	0.632**	0.638**	0.729**
0.10	0.526**	0.760**	0.494**	0.776**	0.353*	0.356*	0.707**	0.784**	0.806**	0.733**	0.446**	0.597**
0.50	0.685**	0.685**	0.933**	0.954**	0.995**	0.984**	0.348*	0.652**	0.600**	0.670**	0.649**	0.665**
1.00	0.754**	0.726**	0.802**	0.999**	0.904**	0.954**	0.907**	0.922**	0.606**	0.600**	0.516**	0.532**

注：* 表示 $P < 0.05$ ，** 表示 $P < 0.01$ 。

指标的合理性。

3 结 论

a. 磷是藻类生长的限制性因子,但是不同氮形态下的磷限制浓度有差异。在 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 培养条件下,磷的限制质量浓度为 0.10 mg/L,而在 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 培养条件下,磷的限制质量浓度为 0.05 mg/L。因此, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 是富营养化防治过程中需要优先控制的氮形态。

b. 当磷浓度适宜条件下 ($\rho(\text{PO}_4^{3-}\text{-P}) > 0.10$ mg/L),为了控制藻类的过度增长, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 培养条件下的 $\rho(\text{NO}_3^-\text{-N})$ 需要控制在 5.0 mg/L 以下,而 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 培养条件下的 $\rho(\text{NH}_4^+\text{-N})$ 则需要控制在更低的 1.0 mg/L 以下。

c. 在磷营养适宜条件下,当 $\rho(\text{NO}_3^-\text{-N})$ 达到 10.0 mg/L 以上或 $\rho(\text{NH}_4^+\text{-N})$ 达到 5.0 mg/L 以上,藻毒素的合成量显著增加,将对水生态系统产生明显的毒性作用。

参考文献：

[1] KENEFICK S L, HRUDEY S E, PETERSON H G, et al. Toxin release from *Microcystis aeruginosa* after chemical treatment[J]. Water Science and Technology, 1993, 27: 433-440.

[2] DUY T N, LAM P K, SHAW G R, et al. Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water [J]. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 2000, 163: 113-186.

[3] 闫海, 潘纲, 张明明. 微囊藻毒素研究进展[J]. 生态学报, 2002, 22 (11): 1968-1975. (YAN Han, PAN Gang, ZHANG Mingming. Advances in the study of microcystin toxin [J]. Acta Ecologica Sinica, 2002, 22 (11): 1968-1975. (in Chinese))

[4] LIN Y X, LIU X F, YAN H, et al. Toxin of *Microcystis aeruginosa* Kütz in dianchi and its change in water body [J]. Techniques and Equipment for Environmental Pollution Control, 2001, 2 (5): 10-13.

[5] KOTAK B G, KENEFICK S L, FRIZT D L, et al. Occurrence and toxicological evaluation of cyanobacterial toxins in Alberta lakes and farm dugouts [J]. Water Research, 1993, 27 (3): 495-506.

[6] 杜胜蓝, 刘文杰, 臧常娟. 壳聚糖-沸石复合体对铜绿微囊藻的去除效果[J]. 水资源保护, 2013, 29 (4): 87-90.

(DU Shenglan, LIU Wenjie, ZANG Changjuan. Removal of *Microcystis aeruginosa* by chitosan-zeolite composite [J]. Water Resources Protection, 2013, 29 (4): 87-90. (in Chinese))

[7] 谭啸, 戴凯文, 段志鹏, 等. 茶对铜绿微囊藻和聚球藻生长及叶绿素荧光影响的比较[J]. 河海大学学报(自然科学版), 2018, 46 (2): 115-121. (TAN Xiao, DAI Kaiwen, DUAN Zipeng, et al. Comparasion of the effects of naphthalene on the growth and chlorophyll fluorescence of *Microcystis aeruginosa* and *Synechococcus* sp. [J]. Journal of Hohai University (Natural Sciences), 2018, 46 (2): 115-121. (in Chinese))

[8] 倪利晓, 陈春明, 马艳艳. 铜胁迫对铜绿微囊藻的抑制作用及营养盐浓度对其的减缓效应[J]. 水资源保护, 2017, 33 (6): 96-101. (NI Lixiao, CHEN Chunming, MA Yanyan. Inhibitory effects of cadmium stress on *Microcystis aeruginosa* and the alleviation effects of nutrient concentrations [J]. Water Resources Protection, 2017, 33 (6): 96-101. (in Chinese))

[9] 刘红涛. 铜绿微囊藻生长与环境因子的关系及其铜胁迫下的毒理学效应[D]. 武汉: 华中师范大学, 2003.

[10] 唐全民, 陈峰, 向文洲, 等. 铵氮对铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) FACHB905 的生长、生化组成和毒素生产的影响[J]. 暨南大学学报(自然科学), 2008, 29 (3): 290-294. (TANG Quanmin, CHEN Feng, XIANG Wenzhou, et al. Effect of ammonium nitrogen on the growth, biochemical constitutes and toxin production of *Microcystis aeruginosa* FACHB905 [J]. Journal of Jinan University (Natural Science), 2008, 29 (3): 290-294. (in Chinese))

[11] 张玮, 林一群, 郭定芳, 等. 不同氮、磷浓度对铜绿微囊藻生长、光合及产毒的影响[J]. 水生生物学报, 2006, 30 (3): 318-322. (ZHANG Wei, LIN Yiqun, GUO Dingfang, et al. Influence of different nitrogen and phosphorus concentrations on growth, photosynthesis and microcystin production of *Microcystis aeruginosa* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2006, 30 (3): 318-322. (in Chinese))

[12] 连民, 刘颖, 俞顺章. 氮、磷、铁、锌对铜绿微囊藻生长及产毒的影响[J]. 上海环境科学, 2001 (4): 166-170. (LIAN Min, LIU Ying, YU Shunzhang. Effect of Nitrogen, Phosphorus, Iron and Zinc on growth of and microcystin production *Microcystis aeruginosa* strains [J]. Shanghai Environmental Sciences, 2001 (4): 166-170. (in Chinese))

suitable demand amount in lower reaches of Tarim River from 2000 to 2014[J]. Water Resources Protection,2017, 33(4):32-39. (in Chinese))

[8] 薛联青,杨帆,杨昌兵,等. 外界胁迫作用下塔里木河流域径流变化响应的敏感性[J]. 河海大学学报(自然科学版),2018,46(1):1-6. (XUE Lianqing, YANG Fan, YANG Changbing, et al. Sensitivity analysis of the streamflow alteration subjected to climate changes and anthropogenic activities in the Tarim River Basin[J]. Journal of Hohai University (Natural Sciences),2018,46(1):1-6. (in Chinese))

[9] 徐海量,宋郁东,陈亚宁. 塔里木河下游生态输水后地下水变化规律研究[J]. 水科学进展,2004,15(2):223-226. (XU Hailing, SONG Yudong, CHEN Yaning. Study on variation of ground-water after ecological water transport in the lower reaches of Tarim River [J]. Advances in Water Science, 2004, 15(2): 223-226. (in Chinese))

[10] XU H L, YE M, SONG Y D, et al. The natural vegetation responses to the groundwater change resulting from ecological water conveyances to the lower Tarim River [J]. Environ Monit Assess,2007,131(1/2/3):37-48.

[11] 白元,徐海量,张青青,等. 基于地下水恢复的塔里木河下游生态需水量估算[J]. 生态学报,2015,35(3):630-640. (BAI Yuan, XU Hailing, ZHANG Qingqing, et al. Evaluation on ecological water requirement in the lower reaches of Tarim River based on groundwater restoration [J]. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(3): 630-640. (in Chinese))

[12] 王希义,徐海量,凌红波,等. 生态输水对塔里木河下游植被恢复价值的影响[J]. 干旱地区农业研究,2017,35(4):160-166. (WANG Xiyi, XU Hailing, LING Hongbo, et al. Effects of ecological water conveyance on recovery value of vegetation in the lower reaches of Tarim River [J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 2017, 35(4):160-166. (in Chinese))

[13] YE Z X, CHEN Y N, LI W H, et al. Groundwater fluctuations induced by ecological water conveyance in the lower Tarim River, Xinjiang, China [J]. Journal of Arid Environments, 2009, 73(8):726-732.

[14] CHEN Y N, CHEN Y P, XU C C, et al. Effects of ecological water conveyance on groundwater dynamics and riparian vegetation in the lower reaches of Tarim River, China [J]. Hydrological Processes, 2010, 24(2):170-177.

[15] LI W H, HAO X M, CHEN Y J, et al. Response of groundwater chemical characteristics to ecological water conveyance in the lower reaches of the Tarim River, Xinjiang, China [J]. Hydrological Processes, 2010, 24: 187-195.

(收稿日期:2018-07-28 编辑:熊水斌)

(上接第 107 页)

[13] 张青田,王新华,林超,等. 不同氮源对铜绿微囊藻增殖的影响[J]. 水生态学杂志,2011,32(4):115-119. (ZHANG Qingtian, WANG Xinhua, LIN Chao, et al. Effects of different nitrogen on proliferation of *Microcystis aeruginosa* [J]. Journal of Hydroecology, 2011, 32(4): 115-119. (in Chinese))

[14] 罗东,陈荣,程青,等. 不同磷浓度和 N/P 对铜绿微囊藻生长及水环境因子的影响[J]. 环境科学与技术,2015,38(7):6-9. (LUO Dong, CHEN Rong, CHENG Qing, et al. Effects of different phosphorus concentrations and ratios of N/P on the growth of *Microcystis aeruginosa* and the water environmental factors [J]. Environmental Science & Technology, 2015, 38(7):6-9. (in Chinese))

[15] 史红星,曲久辉,刘会娟,等. 微囊藻毒素产生过程中氮素作用的同位素示踪研究[J]. 科学通报,2008,53(4):407-412. (SHI Hongxing, QU Jiuhui, LIU Huijuan, et al. Study on isotope tracer of nitrogen in the process of *Microcystis aeruginosa* production [J]. Chinese Science Bulletin, 2008, 53(4):407-412. (in Chinese))

[16] VÉZIE Č, RAPALA J, VAITOMAA J, et al. Effect of nitrogen and phosphorus on growth of toxic and nontoxic *Microcystis* strains and on intracellular microcystins concentrations[J]. Microbial Ecology, 2002, 43(4):443-454.

[17] KAMEYAMA K, SUGIUTA N, ISODA H, et al. Effect of nitrate and phosphate concentration on production of microcystins by *Microcystis viridis* NIES 102 [J]. Aquatic Ecosystem Health Management, 2002, 5(4):443-449.

[18] DOWNING T G, MEYER C, GEHRINGER M M, et al. Microcystin content of *Microcystis aeruginosa* is modulated by nitrogen uptake rate relative to specific growth rate or carbon fixation rate [J]. Environmental Toxicology, 2005, 20(3):257-262.

[19] ZHENG L, XIE P, LI Y L, et al. Variation of intracellular and extracellular microcystins in a shallow, hypereutrophic subtropical Chinese lake with dense cyanobacterial blooms [J]. Bulletin Environmental Contamination Toxicology, 2004, 73(4):698-706.

[20] RAPALA J, SIVONEN K, LYRA C, et al. Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena* spp. as a function of growth stimuli [J]. Applied Environmental Microbiology, 1997, 63:2206-2212.

[21] LONG B M. Evidence that sulfur metabolism plays a role in microcystin production by *Microcystis aeruginosa* [J]. Harmful Algae, 2010, 9(1):74-81.

[22] MUROPASTOR M I, FLORENCIO F J. Regulation of ammonium assimilation in cyanobacteria [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2003, 41:595-603.

[23] WATANABE M F, OISHI S. Effects of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1985, 49:1342-1344.

[24] RESSOM R, SOONG F S, FITZGERALD J, et al. Health effects of toxic cyanobacteria of Australia [R]. Sydney: National Health and Medical Research Council, Commonwealth of Australia, 1994.

(收稿日期:2018-08-29 编辑:王 芳)