

不同磷源及浓度对利玛原甲藻生长和产毒的影响研究

杨维东, 钟娜, 刘洁生, 张洁玲, 何洋

(暨南大学生物工程学系, 广州 510632)

摘要:探讨了不同磷源条件下利玛原甲藻的生长情况, 分析了碱性磷酸酶在营养盐利用方面的作用, 对不同营养盐条件下腹泻性贝毒(diarrhetic shellfish poison, DSP)的合成情况进行了比较和分析. 结果显示, 以 NaH_2PO_4 、 β -甘油磷酸钠和 ATP 分别作为唯一磷源时, NaH_2PO_4 组和 ATP 组最大生长速率($\mu_{\max}$)差异不大, β -甘油磷酸钠组稍低; ATP 组最大生物量(X)明显高于 NaH_2PO_4 组和 β -甘油磷酸钠组. 实验浓度范围内, β -甘油磷酸钠组碱性磷酸酶活性均比较低, 而 ATP 组活性较高. NaH_2PO_4 组因其浓度的变化而有较大的差异. 浓度 $> 2 \mu\text{mol/L}$ 时, 活性比较低, $< 2 \mu\text{mol/L}$ 时, 活性明显增高. β -甘油磷酸钠组大田软海绵酸(okadaic acid, OA)总含量和单位藻细胞 OA 含量最高, NaH_2PO_4 组次之, ATP 组最低. 这些结果表明, 利玛原甲藻可吸收利用无机磷 NaH_2PO_4 和有机磷 β -甘油磷酸钠及 ATP. 其中, NaH_2PO_4 和 ATP 的营养价值基本等效, 而 β -甘油磷酸钠的营养价值较低. ATP 较 NaH_2PO_4 和 β -甘油磷酸钠更有利于维持利玛原甲藻的生长. 利玛原甲藻可以直接利用 β -甘油磷酸钠; 而 ATP 则需要碱性磷酸酶水解后才能利用. 利玛原甲藻毒素的合成与营养盐的形态有关, 不同营养盐条件下 DSP 的合成不同. β -甘油磷酸钠为磷源时, DSP 合成量最多. 磷盐对 DSP 合成的影响与该磷盐条件下利玛原甲藻的生理状态有关.

关键词: 利玛原甲藻; 磷源; 碱性磷酸酶; 腹泻性贝毒

中图分类号: X55 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)10-2760-06

Effects of Different Phosphorus Sources on the Growth and Toxin Production of *Prorocentrum lima*

YANG Wei-dong, ZHONG Na, LIU Jie-sheng, ZHANG Jie-ling, HE Yang

(Department of Biotechnology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: To explore the nutrient properties of *Prorocentrum lima* and biosynthesis mechanism of diarrhetic shellfish poison (DSP), the growth and activities of alkaline phosphatase of *Prorocentrum lima* were observed under different phosphorus sources. DSP productions were also analyzed. The maximum growth rate ($\mu_{\max}$) was slightly lower under β -sodium glycerophosphate than those under NaH_2PO_4 and ATP as phosphorus sources, respectively. The maximum biomass (X) under ATP was higher than those under NaH_2PO_4 and β -sodium glycerophosphate as the phosphorus sources, respectively. When the concentration of NaH_2PO_4 was below $2 \mu\text{mol/L}$, the activity of alkaline phosphatase increased significantly. However, the activities were much low in the all treatments when β -sodium glycerophosphate used as phosphorus source, whereas the activities increased with the concentration of ATP when ATP used as phosphorus source. The level of okadaic acid (OA) in *Prorocentrum lima* at the stationary phase under β -sodium glycerophosphate was higher than those under NaH_2PO_4 and ATP. These suggested that β -sodium glycerophosphate could be utilized directly by *Prorocentrum lima* with lower efficiency; ATP could induce alkaline phosphatase to produce inorganic phosphate for algae. DSP production in *Prorocentrum lima* were different under various phosphate sources, β -sodium glycerophosphate enhanced production of DSP. The difference in DSP production might be related with the physiological state of *Prorocentrum lima*.

Key words: *Prorocentrum lima*; phosphorus source; alkaline phosphatase; diarrhetic shellfish poison

磷是海洋、湖泊等水生生态系统初级生产力水平的关键限制因素, 对藻类的生长起着至关重要的作用. 无机磷因为能被藻类所直接吸收利用, 被认为是藻类最重要的磷源. 但是当缺乏无机磷时, 浮游藻类可以通过碱性磷酸酶利用有机磷来维持藻类的生长^[1].

利玛原甲藻属甲藻门(Pyrrophyta)原甲藻科(Prorocentraceae Stein)原甲藻属(*Prorocentrum* Ehrenberg), 为海洋底栖甲藻之一, 是最常见的腹泻性贝毒(diarrhetic shellfish poison, DSP)产毒藻, 被认为是 DSP 标准的可靠来源^[2]. DSP 是一类结构独特

的多醚类化合物, 其成分主要为大田软海绵酸(okadaic acid, OA)和鳍藻毒素(dinophysistoxin, DTX). DSP 是蛋白磷酸酶 1、2A 的特异抑制剂, 同时又是促癌剂, 可在贻贝肝、脾中积累, 从而引起食用者腹泻性中毒. 尽管到目前为止, 尚未见有 DSP 中毒引起人类死亡的报道. 但近年来的调查显示, 世界

收稿日期: 2007-10-17; 修订日期: 2007-12-17

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(U0733006); 国家重点基础研究发展规划(973)项目(2001CB409710); 广东省自然科学基金项目(031885)

作者简介: 杨维东(1967~), 男, 博士, 教授, 主要研究方向为环境生物分子与毒理学, E-mail: tywd@jnu.edu.cn

范围内 DSP 污染和中毒事件非常广泛,致病率极高,几乎所有发达国家都在本国海域发现和检出此类毒素.在我国,辽东湾、胶州湾、莱州湾、秦皇岛、福建等海域及天津、烟台、连云港、舟山、深圳、香港等沿海城市均发现 DSP,黄海、渤海和南海水域则发现有 DSP 产毒藻^[3].为揭示和阐明底栖甲藻的磷营养利用机制,明确利玛原甲藻的产毒机制,本研究观察了不同磷源条件下利玛原甲藻的生长情况,探讨了碱性磷酸酶在营养盐利用方面的作用,比较和分析了不同营养盐条件下 DSP 的合成情况.

1 材料与方法

1.1 藻种

利玛原甲藻(*Prorocentrum lima*),由美国 CCMP (Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton)提供,编号 2579.

1.2 主要试剂

Diarrhetic Shellfish Poison (DSP) Quick Test Kit (Panapharm Laboratories Co., Ltd., Japan)购自北京必发分析系统销售有限公司.

1.3 实验方法

1.3.1 利玛原甲藻的培养

藻种培养选用 f/2 培养基改良配方,实验组以 NaH_2PO_4 、 β -甘油磷酸钠或者 ATP 作为唯一磷源,其他元素按照 f/2 培养液配方添加.设置 5 个磷浓度:0.5、1、2、5 和 $10 \mu\text{mol/L}$.取对数生长期利玛原甲藻接种于培养基中,接种密度约为 $1.0 \times 10^6 \text{ cells/L}$.置于温度 $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、光照强度 4000 lx 、光暗循环为 L:D = 12 h:12 h 的人工气候箱中进行培养.实验每组设置 3 个平行,隔天于固定时间取样,在倒置显微镜下观察、计数,绘制藻生长曲线,计算比生长速率(μ)、最大比生长速率(μ_{max})和半饱和常数(K_s).最大比生长速率(μ_{max})和半饱和常数(K_s)的计算采用 Monod 方程.

1.3.2 碱性磷酸酶活性的测定

取藻液 30 mL,以 10000 r/min 离心 15 min,弃去上清液,加入 1 mL Tris-盐酸缓冲液($\text{pH} = 8.8$),摇匀,放入含冰水混合物的烧杯中.细胞经超声破碎后,置于 4°C 冰箱中过夜.然后 12000 r/min 离心 10 min,保留上清液,即为碱性磷酸酶的粗提液.碱性磷酸酶活性的测定参照文献[4]进行.取 0.1 mL 酶粗提液加入 3.0 mL 复合基质液,在 37°C 水浴中保温 30 min 后,立即加入 0.5% 铁氰化钾 2.1 mL,迅速混匀,静置 10 min,在 510 nm 波长下测 D 值,用 Tris-盐

酸缓冲液($\text{pH} = 8.8$)作为空白对照.活力单位定义为:1 mL 待测酶液 1 h 释放 $1 \mu\text{g}$ 对硝基苯酚为一个活力单位(U).

1.3.3 毒素分析

取处于平台期的利玛原甲藻培养物 10 mL, 3500 r/min 离心 5 min 收集藻细胞.弃上清,藻细胞沉淀煮沸 5 min.在收集有藻细胞的离心管中加入 $500 \mu\text{L}$ 90% 的甲醇和少量二氧化硅,在旋涡混合器上振荡,利用二氧化硅使细胞破壁, 7500 r/min 离心 5 min,取上清液,加入 $500 \mu\text{L}$ 双蒸水,混合均匀后进行毒素测定. DSP 的检测使用 Diarrhetic Shellfish Poison Quick Test Kit,该试剂盒采用抗 OA 的单克隆抗体,通过酶联免疫分析方法对 OA 进行特异性检测.测定按照试剂盒说明进行.

2 结果与分析

2.1 不同磷源条件下利玛原甲藻的生长状况

在相同的起始密度下($1.0 \times 10^6 \text{ cells/L}$),以 3 种不同形态的磷盐分别作为磷源时利玛原甲藻的生长状况如图 1 所示.

NaH_2PO_4 作为唯一磷源时,各浓度条件下的利玛原甲藻在接种后 10d 均开始快速分裂,进入对数生长期,藻细胞密度明显增大,第 46 ~ 49 d 陆续进入生长稳定期,比生长速率和最大生物量随着 NaH_2PO_4 浓度的增加逐渐升高. $0.5 \mu\text{mol/L}$ 时比生长速率最小,为 0.051 d^{-1} ; 最大生物量也最低,为 $1.2 \times 10^7 \text{ cells/L}$. $10 \mu\text{mol/L}$ 时比生长速率最大,达 0.061 d^{-1} ; 最大生物量也最大,为 $1.6 \times 10^7 \text{ cells/L}$.

以 β -甘油磷酸钠为磷源时,各浓度组在接种 7 d 后进入对数生长期,细胞数目明显增多,第 46 ~ 52 d 陆续进入生长稳定期.随着 β -甘油磷酸钠浓度的增加,利玛原甲藻比生长速率有所降低,但最大藻细胞密度逐渐升高. $0.5 \mu\text{mol/L}$ 时比生长速率最大,为 0.067 d^{-1} ; 最大生物量最低,为 $1.1 \times 10^7 \text{ cells/L}$. $10 \mu\text{mol/L}$ 时比生长速率最小,为 0.051 d^{-1} ; 最大生物量最大,为 $1.6 \times 10^7 \text{ cells/L}$.

以 ATP 为磷源时,接种 10 ~ 13 d 后各浓度下利玛原甲藻藻密度开始增高,第 49d 左右各浓度组进入平台期,比生长速率和最大生物量随着 ATP 浓度的增加逐渐升高. $0.5 \mu\text{mol/L}$ 时比生长速率最小,为 0.047 d^{-1} ; 最大生物量也最低,为 $1.3 \times 10^7 \text{ cells/L}$. $10 \mu\text{mol/L}$ 时比生长速率最大,达 0.054 d^{-1} ; 最大生物量最大,为 $1.9 \times 10^7 \text{ cells/L}$.

综合分析, NaH_2PO_4 最大比生长速率最大,为

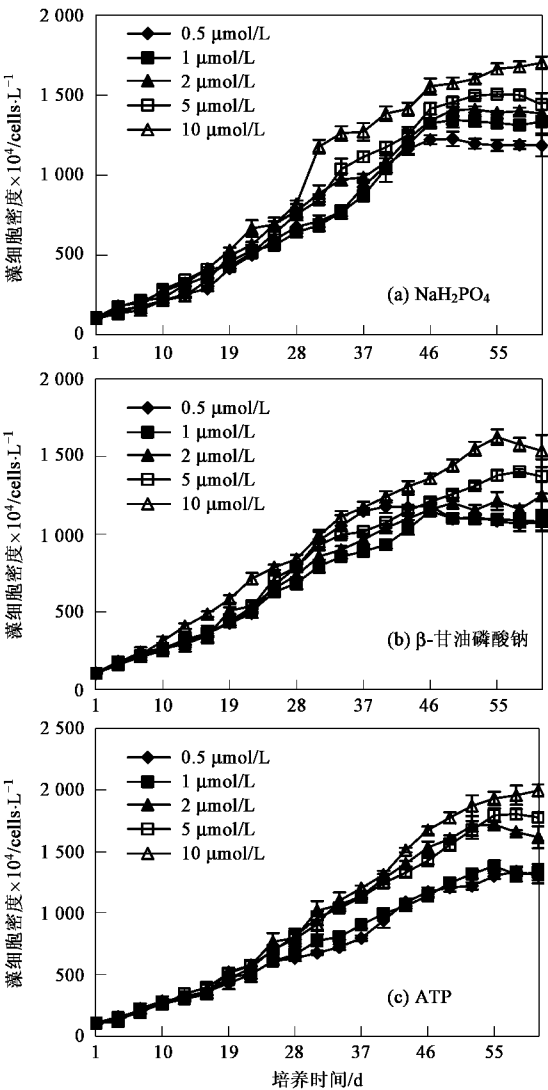


图 1 不同磷源条件下利玛原甲藻的生长曲线
Fig.1 Growth curve of *Prorocentrum lima* under different phosphorus sources

表 1 不同磷源条件下利玛原甲藻的最大比生长速率(μ_{max})和半饱和常数(K_S)

Table 1 Maximum growth rate(μ_{max})and half-saturation constant (K_S)of *Prorocentrum lima* under different phosphorus sources

磷源	回归方程	显著性差异	μ _{max} /d ⁻¹	K _S /μmol·L ⁻¹
NaH ₂ PO ₄	y = 1.420 1x + 16.833	23.362 04 > F ₃ ¹ _{0.05} (10.13)	0.059	0.084
β-甘油磷酸钠	y = - 2.810 2x + 20.905	34.735 85 > F ₃ ¹ _{0.05} (10.13)	0.048	0.135
ATP	y = 1.485 7x + 18.692	19.692 89 > F ₃ ¹ _{0.05} (10.13)	0.053	0.079

表 2 Student-Newman-Keuls 法进行均数间的相互比较¹⁾

Table 2 Intercomparson among the equal counts of maximum biomass using SNK-q

磷源	最大生物量均数(̄X)	̄X-1618	̄X-1301
NaH ₂ PO ₄	1 376	242 *	75
β-甘油磷酸钠	1 301	317 *	
ATP	1 618		

1) * 表示 p < 0.05

0.059 d⁻¹; β-甘油磷酸钠最大比生长速率最小,为 0.048 d⁻¹. 最大生物量均值 ATP 组明显高于 NaH₂PO₄ 和 β-甘油磷酸钠组(见表 1 和表 2),为 1.6 × 10⁷ cells/L (p < 0.05).

2.2 不同磷源条件下利玛原甲藻的碱性磷酸酶活性

图 2 为不同磷源条件下利玛原甲藻碱性磷酸酶活力的变化情况.可以看出,以 NaH₂PO₄ 作为唯一磷源时,碱性磷酸酶活性随着利玛原甲藻的生长呈逐渐增高后降低的趋势. NaH₂PO₄ 浓度 < 2 μmol/L 时,碱性磷酸酶活性最大值随着 NaH₂PO₄ 浓度的增高而降低,而当 > 2 μmol/L 时,碱性磷酸酶活性变化不大,但均比较低.以 β-甘油磷酸钠为磷源时,在实验浓度范围内碱性磷酸酶的活性都比较低. ATP 为唯一磷源时,碱性磷酸酶活性整体上呈先升高后降低的趋势,随着 ATP 浓度的增高逐渐增强.

2.3 不同磷盐条件下平台期利玛原甲藻细胞 OA 的含量

从图 3 和图 4 中可以看出,无论是 OA 总含量还是单位藻细胞 OA 含量,3 组之间均存在显著性差异,β-甘油磷酸钠组最高,NaH₂PO₄ 次之,ATP 组最低 (p < 0.05). NaH₂PO₄ 和 β-甘油磷酸钠组单位藻细胞毒素含量随磷盐浓度的增加有所下降,ATP 组单位藻细胞毒素含量则差别不大.

3 讨论

磷是藻类生长的主要限制因子之一,在海洋环境中对初级生产力有着重要的调控作用.在自然海水中除了存在无机的磷酸盐外,还有大量的溶解有

机磷.不少研究表明,大部分藻类既可以直接吸收利用无机磷酸盐,又可以直接或间接地利用多种溶解有机磷^[5].而且,藻类对不同形态磷的利用特性又随着藻种类的不同而有着明显的区别.本研究选取产毒海洋底栖甲藻——利玛原甲藻为对象,探讨了不同形态和浓度的磷盐对利玛原甲藻产毒和生长的影响,并分析了藻体中碱性磷酸酶的活性,以期为进一步明确利玛原甲藻的营养盐利用特征和产毒规律提

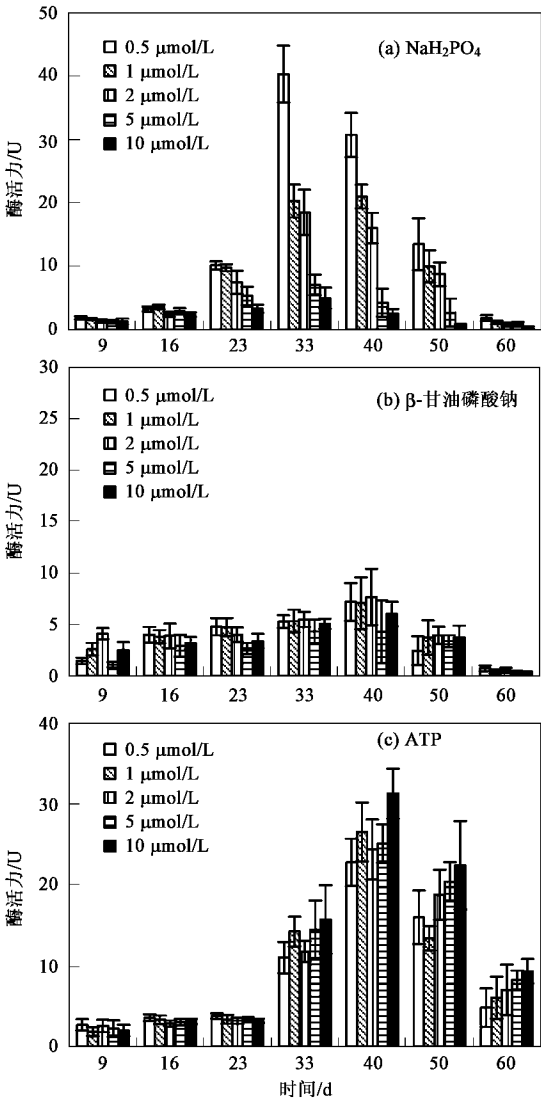


图2 不同磷源条件下利玛原甲藻碱性磷酸酶活性的变化
Fig.2 Alkaline phsphatase activity of *Prorocentrum lima* under different phosphorus sources

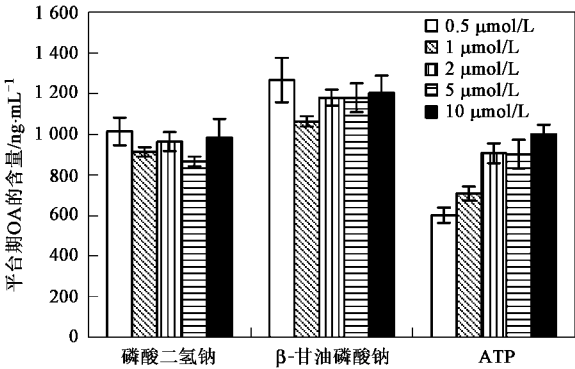


图3 不同磷盐条件下利玛原甲藻生长稳定期 OA 的含量
Fig.3 OA content in *Prorocentrum lima* at stationary phase under different phosphorus sources

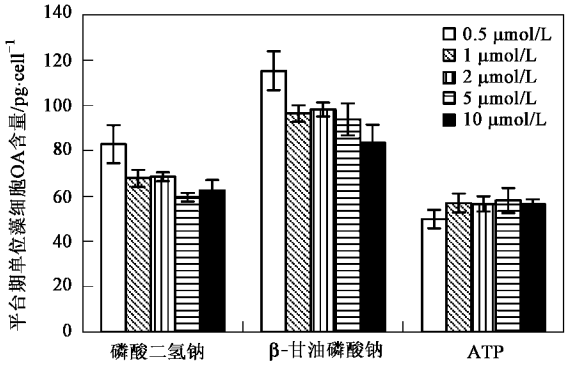


图4 不同磷盐条件下利玛原甲藻平台期单位藻细胞中 OA 的含量
Fig.4 OA content per cell in stationary phase under different phosphorus sources

供参考.

研究发现,不同磷源都能促进利玛原甲藻的生长.在经历较短的潜伏期后,进入对数生长期,藻细胞密度都有显著增加,并保持了较长时间的生长稳定期.说明利玛原甲藻可以利用 NaH_2PO_4 、 β -甘油磷酸钠和 ATP 维持生长,这与浮游藻类的情况类似^[6, 7].实验还发现,在磷浓度比较低的条件下,利玛原甲藻仍能保持良好的生长,表明利玛原甲藻对磷的适应浓度范围较宽.

最大比生长速率表示细胞最大分裂速度的大小,可考察细胞的生长分裂能力. K_s 反应则可反映藻类对某种营养盐的适应程度. $\mu_{\max}$ 越大, K_s 越小,说明该营养盐越适合藻类的生长.本研究发现,实验组最大比生长速率 ($\mu_{\max}$) 从大到小的顺序为: NaH_2PO_4 组 > ATP 组 > β -甘油磷酸钠组, NaH_2PO_4 组和 ATP 组相差不大, β -甘油磷酸钠组较低.半饱和常数 (K_s) 从小到大排序为: ATP 组 < NaH_2PO_4 组 < β -甘油磷酸钠组.表明利玛原甲藻对 3 种磷源的利用情况不同. NaH_2PO_4 和 ATP 对利玛原甲藻的营养价值基本相等, β -甘油磷酸钠的营养价值则比较低.这与李英等^[8]对东海原甲藻的研究结果基本相似.对东海原甲藻而言, NaH_2PO_4 、ATP、D-葡萄糖-6-磷酸钠和甘油磷酸钠中,甘油磷酸钠的营养价值最低,对最大生物量的贡献也最小.但张民等^[9]研究发现,甘油磷酸钠比 KH_2PO_4 更有利于对数期铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 的生长.这可能是不同藻种对磷的利用方式不同所致.研究同时发现,不同磷盐条件下藻类生长所能达到的最大藻密度不同. ATP 组明显大于 NaH_2PO_4 组和 β -甘油磷酸钠组 ($p < 0.05$), NaH_2PO_4 组和 β -甘油磷酸钠组之间差别不明显;实

验组中最大生物量均随磷盐浓度的升高而升高, ATP 比 NaH_2PO_4 和 β -甘油磷酸钠更有利于维持利玛原甲藻的生长。

藻类必须从外界摄取磷酸盐来满足生长的需要, 所以藻体内通常具有一套应急的磷供应体系以及相应的调节过程, 以适应环境的变化^[10]。当可利用的磷酸盐数量受到限制时, 有机体为了存活, 就必须有一种水解酶, 能够水解磷酸酯提供的磷酸基团, 而碱性磷酸酶就是其中的关键酶。在缺磷胁迫下, 一般来说, 最直接的方法就是分解体内的有机磷, 释放磷酸根来满足藻生长的需要, 在分解有机磷的过程中碱性磷酸酶起着关键性的作用^[11]。碱性磷酸酶是一种最佳活性出现在碱性条件下的正磷酸单酯水解酶。已有的研究表明, 碱性磷酸酶在浮游植物吸收利用有机溶解磷(dissolved organic phosphorus, DOP)的过程中起重要作用^[12], 水体中碱性磷酸酶活性作为磷限制参数正逐步得到应用^[13]。本研究发现, NaH_2PO_4 浓度 $< 2 \mu\text{mol/L}$ 时, 利玛原甲藻的碱性磷酸酶活性比较高, 随 NaH_2PO_4 浓度的增高而降低; $> 2 \mu\text{mol/L}$ 时, 碱性磷酸酶活性变化不大, 都处于较低的水平。这与报道中浮游藻类的情况相似^[14, 15]。Yamaguchi 等^[14]指出, 正磷酸盐的浓度低于 $0.2 \sim 0.25 \mu\text{mol/L}$ 时, *Karenia mikimotoi*、*Skeletonema costatum* 和 *Helerosigma akashiwo* 均会激活碱性磷酸酶的活性。王艳等^[15]研究发现, 缺磷胁迫会导致球形棕囊藻碱性磷酸酶活性增强, 且酶活力随磷限制程度的增加而增高。

与之比较, 以 β -甘油磷酸钠为磷源时, 在实验浓度范围内碱性磷酸酶的活性均比较低, 各浓度组之间并无明显差异。ATP 作为唯一磷源时, 碱性磷酸酶的活性随 ATP 浓度的增高而增高。洪华生等^[16]提出藻类可能存在 2 条 DOP 利用途径, 一条是直接被藻类吸收利用, 另一条是被诸如碱性磷酸酶等水解后吸收。实验中 ATP 组利玛原甲藻表现出较高的碱性磷酸酶活性, 并随 ATP 浓度的增高而显著升高, 提示对于分子量相对较大的 ATP 不能被藻细胞直接利用, 需要经碱性磷酸酶水解转化成无机磷后才能被吸收利用。有机磷可通过诱导作用提高碱性磷酸酶的活性^[17], 因此造成其活性随 ATP 浓度的增加而增加。由于 β -甘油磷酸钠组碱性磷酸酶活性始终保持较低的水平, 因此推测, 与浮游藻类 *Amphidinium* sp. 和 *Isochrysis galbana* 类似^[18], 利玛原甲藻可以不通过酶解作用直接吸收利用 β -甘油磷酸钠。有研究证实, 某些底栖甲藻能直接吸收水生生物分泌的

DOP, 或者重新利用其自身新陈代谢的 DOP 作为营养源^[7]。但是唐洪杰等^[19]对中肋骨条藻等 5 种藻的研究中证实, 碱性磷酸酶活性随底物浓度的增加而升高, 并在一定的浓度范围内表现出线性关系, 但当底物浓度增加到一定程度时, 碱性磷酸酶活性不再随底物浓度的增加而升高, 趋于一个极值, 此时浓度为酶的底物饱和浓度。本实验中 ATP 浓度可能并未达到碱性磷酸酶的最大饱和浓度, 因此酶活性随着 ATP 的浓度的增高而升高。

由于 OA 的合成主要在 S 期和 G2 期, 毒素水平在生长稳定期达到最大^[20]。因此, 本研究测定了不同磷盐条件下生长稳定期毒素的水平, 以了解利玛原甲藻在不同磷盐条件下毒素的合成情况。结果显示, 不同磷盐条件下毒素的生成有明显差异, 其中以 β -甘油磷酸钠组最高, NaH_2PO_4 组次之, ATP 组毒素水平最低 ($p < 0.05$)。与不同磷盐条件下利玛原甲藻的生长状况相对照, 可以发现, 以 NaH_2PO_4 和 ATP 作为磷源时, 利玛原甲藻的生长情况较好, 产毒较少; 以 β -甘油磷酸钠作为磷源时, 藻的生长相对较差, 毒素含量显著增加。这与 McLachlan 等^[20]的研究结果相似。他们认为, 利玛原甲藻的生长、细胞分裂速度和毒素的产生受温度、光照和盐度的影响, 藻生长受到抑制时, 毒素水平显著增加。DSP 是一类聚醚类或大环内酯类化合物, 其结构中不含磷, 磷盐直接参与 DSP 生物合成的可能性很小。磷盐对 DSP 合成的影响可能与藻类在该磷盐条件下的生长状况有关。当利玛原甲藻的生长受到某种程度的限制时, 毒素的合成会增多。

4 结论

(1) 利玛原甲藻对不同来源的磷利用情况不同, 可直接利用 β -甘油磷酸钠, ATP 则需要碱性磷酸酶水解后才能利用。

(2) 利玛原甲藻毒素的合成与营养盐的形态有关, 不同营养盐条件下 DSP 的合成不同。 β -甘油磷酸钠为磷源时, DSP 合成量最多。磷盐对 DSP 合成的影响可能与该磷盐条件下利玛原甲藻的生理状态有关。

参考文献:

- [1] 黄邦钦, 黄世玉, 翁妍, 等. 溶解态磷在海洋微藻碱性磷酸酶活力变化中的调控作用[J]. 海洋学报, 1999, 21(1): 55-60.
- [2] Bravo I, Fernandez M L, Ramilao I, et al. Toxin composition of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* Dodge isolated from

different locations along the Galician coast (NW Spain) [J]. *Toxicon*, 2001, **39**(10): 1537-1545.

[3] 杨维东, 彭喜春, 刘洁生. 腹泻性贝毒研究现状[J]. 海洋科学, 2005, **29**(5): 66-72.

[4] 许光辉, 陈瑞阳. 土壤微生物分析手册[M]. 北京: 高等教育出版社, 1995. 275-279.

[5] Huang B Q, Ou L J, Hong H S, *et al.* Bioavailability of dissolved organic phosphorus compounds to typical harmful dinoflagellate *Prorocentrum donghaiense* Lu [J]. *Mar Pollut Bull*, 2005, **51**: 838-844.

[6] Huang B Q, Hong H S. Alkaline phosphatase activity and utilization of dissolved organic phosphorus by algae in subtropical coastal waters [J]. *Mar Pollut Bull*, 1999, **39**: 205-211.

[7] 王海黎, 洪华生, 黄邦钦. 海洋环境中溶解有机磷的生物活性初探[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1995, **34**(3): 416-420.

[8] 李英, 吕颂辉, 徐宁. 东海原甲藻对不同磷源的利用特征[J]. 生态科学, 2005, **24**(4): 314-317.

[9] 张民, 史小丽, 蒋丽娟, 等. 两种外源性磷及振荡对铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)生长的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2002, **8**(5): 507-510.

[10] Chae-Hong L, Ozkanca R, Flint K P. The effects of osmotic stress on survival and alkaline phosphatase activity of *Aeromonas hydrophila* [J]. *FEMS Microbiol Let*, 1996, **137**(1): 19-24.

[11] Feuillade J, Feuillade M, Blanc P. Alkaline phosphatase activity fluctuation and associated factors in a eutrophic lake dominated by *Oscillatoria rubescens* [J]. *Hydrobiologia*, 1990, **207**(1): 233-240.

[12] Dyhrman S. Ectoenzymes in *Prorocentrum minimum* [J]. *Harmful Algae*, 2005, **4**(3): 619-627.

[13] Waiser M J, Roberts R D. Microbial nutrient limitation in prairie saline lakes with high sulfate concentration [J]. *Limnol Oceanogr*, 1995, **40**(3): 566-574.

[14] Yamaguchi H, Nishijima T, Nishitani H, *et al.* Organic phosphorus utilization and alkaline phosphatase production of 3 red tide phytoplankton [J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 2004, **70**(2): 123-130.

[15] 王艳, 唐海溶. 不同形态的磷源对球形棕囊藻生长及碱性磷酸酶的影响[J]. 生态科学, 2006, **25**(1): 38-40.

[16] 洪华生, 戴民汉, 郑效成. 海水中碱性磷酸酶活力的测定及其在磷的循环中的作用初探[J]. 海洋与湖沼, 1992, **23**(4): 415-420.

[17] Bentzen E, Taylor W D. Estimating organic utilization by freshwater plankton using [³²P] ATP [J]. *J Plankton Res*, 1991, **13**(6): 1223-1238.

[18] Gonzalez-Gil S, Keafer B A, Jovine R V M, *et al.* Detection and quantification of alkaline phosphatase in single cells of phosphorus-starved marine phytoplankton [J]. *Mar Ecol Prog Ser*, 1998, **164**: 21-35.

[19] 唐洪杰, 杨茹君, 张传松, 等. 几种海洋微藻的碱性磷酸酶性质初步研究[J]. 海洋科学, 2006, **30**(10): 61-64.

[20] McLachlan J L, Marr J C, Conlon-Kelly A. Effects of nitrogen concentration and cold temperature on DSP-toxin concentrations in the dinoflagellate *Prorocentrum lima* (Prorocentrales, Dinophyceae)[J]. *Nat Toxins*, 1994, **2**(5): 263-270.