

不同类型含磷营养物质对微小亚历山大藻 (*Alexandrium minutum*) 生长 和毒素产生的影响*

张清春 于仁诚¹⁾ 周名江 王云峰 李 钧 颜 天

(中国科学院海洋研究所海洋生态与环境科学重点实验室 青岛 266071;

中国科学院研究生院 北京 100039)

¹⁾(中国科学院海洋研究所海洋生态与环境科学重点实验室 青岛 266071)

提要 采用显微镜细胞计数和麻痹性贝毒的高效液相色谱分析方法,通过对比磷酸二氢钾、磷酸甘油和三磷酸腺苷(ATP)等含磷营养物质对微小亚历山大藻生长和毒素产生的影响,研究了微小亚历山大藻对不同类型含磷营养物质的利用情况。结果表明,在磷限制条件下,加入磷酸二氢钾、磷酸甘油和 ATP 均能促进微小亚历山大藻的生长,所获得的最大藻细胞密度分别为 22700、28400 和 27800 藻细胞/ml,对数期生长速率分别为 0.12/d、0.14/d 和 0.15/d,溶解态有机磷对藻生长的促进作用稍好于溶解态无机磷。三种含磷营养物质对毒素产生的效应没有明显差别,稳定期藻细胞毒素含量分别为 22.87、23.98 和 21.80fmol/cell。磷限制对毒素组成的影响很大,磷限制条件下膝沟藻毒素 GTX1/4 的含量占绝对优势,GTX2/3 含量很少。在添加含磷营养物质后,GTX1/4 所占比例降低,GTX2/3 比例增加,说明磷限制显著改变了微小亚历山大藻的毒素组成。对藻体碱性磷酸酶活性分析的结果显示,磷限制组具有最高的碱性磷酸酶活性,添加有机磷化合物实验组的碱性磷酸酶活性显著高于添加无机磷化合物的实验组。研究表明,微小亚历山大藻可以利用实验中采用的无机磷化合物和有机磷化合物,但其利用溶解态有机磷化合物的机制尚不清楚,可能是通过诱导合成碱性磷酸酶来水解培养基中的溶解态含磷有机物,从而释放无机磷酸盐用于藻细胞的生长。

关键词 微小亚历山大藻,碱性磷酸酶,生长,溶解态有机磷,溶解态无机磷

中图分类号 X55

近年来,有害赤潮的发生频率、规模和危害日趋扩大,已逐渐成为一个全球性的海洋环境问题(周名江等,2003;颜天等,2003;Hallegraeff,1993),其中,有毒甲藻赤潮因其潜在的毒性效应最为引人关注。有毒甲藻的生长和毒性受遗传特征、共生微生物及环境因子等多种因素影响,其中营养盐的影响非常显著。有关氮、磷等营养物质对甲藻生长和毒素产生的影响从上世纪 90 年代初以

来开始受到关注(Anderson *et al.*, 1990)。然而,以往的研究主要集中于溶解态无机氮、磷等对甲藻生长和毒性的影响,对自然海水体系中存在的溶解态有机氮、磷化合物的影响还不够了解。本文中探讨不同类型的无机磷化合物和有机磷化合物对有毒微小亚历山大藻生长和毒素产生的影响。

自然海水中不仅存在无机磷化合物,也存在

* 国家重点基础研究项目(973),2001CB409704 号;国家自然科学基金项目,40076030 号;中国科学院知识创新工程项目,KZCX2-206 号;国家科技攻关计划课题资助,2001BA804A20 号。张清春,硕士研究生,E-mail: qc Zhang1205@sohu.com

1) 通讯作者:于仁诚,博士,研究员,E-mail: rcyu@ms.qdio.ac.cn

收稿日期:2003-10-21,收修改稿日期:2004-04-29

有机磷化合物。当海水中无机磷酸盐限制藻类生长时,有机磷化合物具有促进特定藻类增殖的重要作用。藻类对水体中溶解态有机磷化合物的利用主要依赖藻类合成的碱性磷酸酶,通过将有机磷化合物水解成为溶解态无机磷化合物,使藻类能够吸收利用。然而到目前为止,人们对自然海水中有机磷化合物的了解还不够充分,难以评估有机磷化合物被藻类利用的状况。因此,在针对这些藻类开展的生态学和海洋学研究中,不应当忽视溶解态有机磷化合物的可能影响。

关于溶解态有机磷化合物对藻类生长的影响研究已有很多报道(Aaronson *et al.*, 1976; Van Boekel, 1991; 王海黎等, 1995; Hong *et al.*, 1995),但涉及有毒藻类生长及其毒性的研究很少。微小亚历山大藻(*Alexandrium minutum*)是常见的有毒赤潮藻之一,其产生的麻痹性贝毒是至今为止世界范围内分布最广、危害最严重的一类毒素(于仁诚等, 1998),因此,作者以其作为实验对象,研究不同含磷营养物质对其生长及毒素产生的影响。

1 材料与方法

1.1 实验藻种

实验采用微小亚历山大藻(*Alexandrium minutum*),在中国科学院海洋研究所海洋生态与环境科学重点实验室内保种培养。

1.2 培养条件

培养液选用 *f/2* 营养盐配方,但不添加 Na_2SiO_3 。培养用海水为海洋所水族楼取自青岛汇泉湾附近的自然海水, pH 值为 7.9 ± 0.1 , 盐度为 30 ± 1 。经孔径为 $0.45 \mu\text{m}$ 的混合纤维滤膜过滤, 120°C 高压湿热灭菌 20min, 室温冷却后添加营养盐备用。

实验藻类培养温度为 $(21 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, 光照为 $54 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ (4000 lx), 光暗比(L: D)为 14h: 10h。实验采用 500ml 的锥形瓶, 内装 300ml 灭菌海水进行一次性培养。藻生长培养实验的化学试剂均为分析纯, 包括磷酸二氢钾、磷酸甘油和三磷酸腺苷(ATP)。

1.3 实验方法

1.3.1 有毒藻培养 实验分为 4 组, 其中 3 组分别采用磷酸二氢钾、磷酸甘油和三磷酸腺苷作为含磷营养物质, 一组不添加任何含磷营养物质作为对照, 即磷限制组。每组培养 42 瓶藻, 每瓶含培养液 300ml, 各组培养条件完全相同。每组中有两瓶用于藻细胞密度计数, 其余各瓶用于定期

采样分析毒素含量和碱性磷酸酶活性。每次取样时都设置 2 个重复, 即每次采 4 瓶藻液, 两瓶用于毒素分析, 两瓶用于碱性磷酸酶活性分析。实验开始时各实验组均采用磷酸二氢钾作为含磷营养物质, 但将起始浓度降低为 $1.5 \mu\text{mol/L}$ (即 *f/2* 培养液中原磷浓度的 4.2%), 其他营养物质浓度不变, 作为微小亚历山大藻的初始培养液。接入处于对数生长期的微小亚历山大藻藻种, 接种密度为 400 细胞/ml, 在实验条件下开始培养。至培养液中藻细胞浓度维持稳定, 并即将下降时, 向各实验组中分别加入磷酸二氢钾、磷酸甘油和三磷酸腺苷溶液, 使各实验组海水的磷浓度达到 $10 \mu\text{mol/L}$ (相当于 *f/2* 营养盐的磷浓度的 28%), 对照组不添加任何含磷营养物质。继续培养, 并以一定时间间隔从各实验组中取样进行藻细胞计数, 毒素分析和碱性磷酸酶分析。

1.3.2 藻细胞计数 每天从各实验组用于计数的两瓶藻中分别取 1ml 藻液, 加 1—2 滴鲁哥氏液固定藻细胞, 以浮游植物计数框在显微镜下计数藻细胞, 并计算细胞密度。

1.3.3 藻细胞收集与保存 在加入各种含磷营养物质之后, 每隔 2—3 天取样一次用于毒素含量和碱性磷酸酶活性分析。取样时根据藻细胞密度调整采样量, 使每份细胞总数约为 1×10^6 。以直径为 5cm 的 GF/C 玻璃纤维滤膜于低真空下分别抽滤收集四瓶藻液中的藻细胞。取其中两份立即进行碱性磷酸酶活力分析, 另外两份在 -20°C 下低温冷冻保存, 直至进行毒素提取分析。

1.3.4 培养液的收集与保存 每次在低真空下抽滤藻细胞用于碱性磷酸酶分析时, 将滤液在 -20°C 下冷冻保存, 用于培养液中含磷营养物质的分析。用于抽滤的抽滤瓶和存放滤液的容器均按要求洗涤以满足磷分析的需要。

1.4 毒素分析

1.4.1 毒素提取 将收集了藻细胞的玻璃纤维滤膜剪碎, 装入 7ml 离心管。向每一管中加入 4ml 0.05 mol/L 乙酸溶液, 以超声波超声处理 (100W , 10s , 重复 5 次), 破碎细胞, 至显微镜下镜检无完整藻细胞。 6000 r/min 离心 3min, 收集上清液, 以 $0.22 \mu\text{m}$ 混合纤维滤膜过滤, 收集滤液用于上机分析。

1.4.2 分析方法 实验中提取的麻痹性贝毒毒素采用 Oshima 建立的高效液相色谱方法分析 (Oshima, 1989)。由于该株微小亚历山大藻仅含

有 GTX 毒素, 因此, 只采用该方法中用于 GTX 毒素分析的洗脱和检测方法。Waters Nova-Pak C18 反相柱(3.9×150mm)用于毒素分离, 柱后衍生温度为 80℃; 用 Waters474 荧光检测器进行毒素检测, 激发波长为 330nm, 发射波长为 390nm。

用于毒素分析的化学试剂均达到色谱分析要求, 分析采用的离子对庚基磺酸盐购自 Sigma 公司。分析用水为经 Millipore 纯水系统净化的超纯水。麻痹性贝毒标准毒素购自加拿大国家研究院海洋生物研究所, 包括 GTX1&4 和 GTX2&3。毒素分析用的洗脱液为含有 3mmol/L 庚基磺酸盐离子对的 10mmol/L 磷酸铵缓冲液, pH 值为 7.1。氧化剂为含有 7mmol/L 高碘酸的 50mmol/L 磷酸钾缓冲液, pH 值为 9.0。酸化剂为 0.5mol/L 的乙酸溶液。洗脱液的流速为 0.7ml/min, 氧化剂和酸化剂的流速均为 0.4ml/min。

1.5 碱性磷酸酶活性分析

将收集了藻细胞的玻璃纤维滤膜剪碎, 装入 7ml 离心管, 加入 3ml Tris-HCl 缓冲液(含 40mmol/L Tris, 20mmol/L KCl, 30mmol/L MgCl₂, pH8.5), 以超声波超声处理(100W, 10s, 重复 5 次)破碎细胞, 至显微镜下镜检无完整藻细胞。6000r/min 离心 3min, 收集上清液。取 1ml 上清液, 加入 4mg/ml 的小牛血清白蛋白(BSA) 250μl, 16mmol/L 1,4-二硫代苏糖醇(DTT) 250μl 和 40mmol/L 对硝基苯酚磷酸钠(pNpp) 1.5ml, 反应 60min, 反应温度为 30℃, 以

722 分光光度计测 405nm 处光吸收值(Mondeguer *et al.*, 1998; 秦捷等, 2001)。酶活力单位定义为: 在 30℃下, 每一百万个藻细胞提取的碱性磷酸酶 1h 释放 1μg 对硝基苯酚为一个活力单位(U)。

1.6 培养液中含磷营养物质的分析

培养液中溶解态无机磷(DIP)的分析采用以抗坏血酸为还原剂的磷钼蓝显色法测定; 总溶解态磷(TDP)的分析采用过硫酸钾氧化后的磷钼蓝显色法测定。溶解态有机磷化合物的浓度以 TDP 减去 DIP 的差值表示。具体分析方法参照《海水分析方法》(格拉斯霍夫, 1982)。

2 实验结果

2.1 不同含磷营养物质对微小亚历山大藻生长的影响

各种含磷营养物质对微小亚历山大藻生长的效应概括如图 1 所示。实验发现, 微小亚历山大藻在接种后 11 天达到稳定期, 此时藻密度界于 4500—5000 藻细胞/ml 之间。至接种 20 天后, 藻密度开始下降。这时, 培养液中的磷已耗尽, 藻细胞处于磷限制状态。第 21 天向各实验组加入不同的含磷营养物质, 使培养液中磷浓度达 10μmol/L, 各实验组的藻都迅速进入对数生长期, 至 36—38 天达到最高密度, 进入稳定期。其中, 添加磷酸二氢钾组的藻细胞最大密度为 22700 藻细胞/ml, 对数期生长速率为 0.12/天; 添加磷酸甘油组的

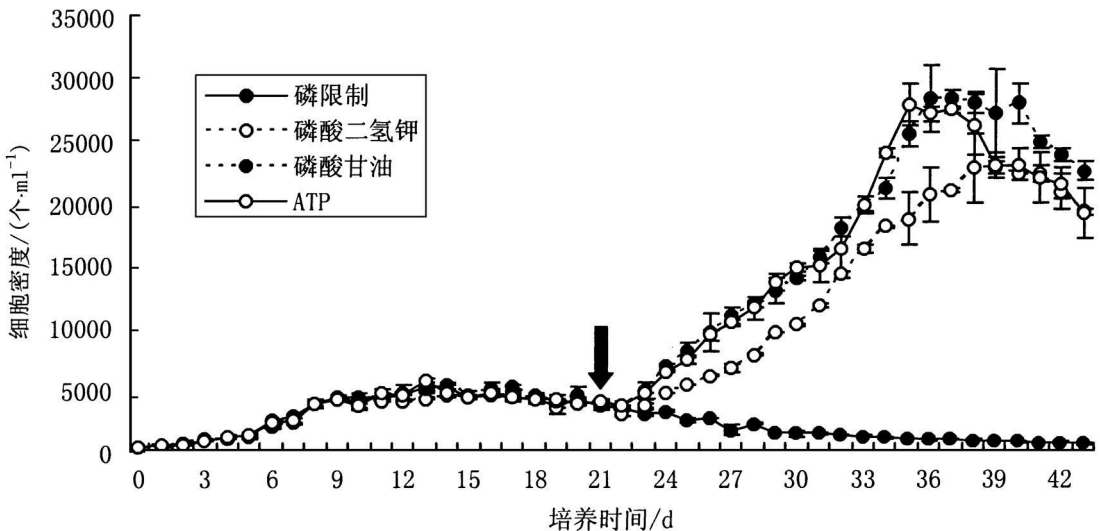


图1 不同含磷营养物质对微小亚历山大藻生长的影响

Fig. 1 The effects of different phosphorus substrates on the growth of *A. minutum*

图中箭头所示为加入各种含磷营养物质的日期

最大藻细胞密度为 28400 cells/ml, 对数期生长速率为 0.14/天; 添加三磷酸腺苷组的藻细胞, 最大密度为 27800 cells/ml, 对数期生长速率为 0.15/天。与之相比, 未添加任何含磷营养物质的磷限制组中藻细胞逐渐死亡。

2.2 不同含磷营养物质对微小亚历山大藻毒素含量的影响

不同实验组中毒素含量的变化如图 2 所示。可以看出, 当微小亚历山大藻开始处于磷限制状态时, 藻细胞毒素含量为 18.92 fmol/cell。在磷限制组中, 随着磷限制程度的加剧, 每细胞毒素含量呈持续上升趋势; 由于受到磷的限制, 藻的生长已处于停滞状态, 单位体积培养液中藻细胞数量下

降, 因此单位体积培养液中毒素含量没有明显变化。各种含磷营养物质, 如磷酸二氢钾、磷酸甘油和 ATP 的加入能够有效缓和藻细胞的磷限制状态, 表现为藻细胞生长的加快和毒素含量的降低。但毒素含量的变化比生长的反应稍慢 2—3 天, 进入对数生长期前, 三者的毒素含量分别降为 12.86、10.55 和 8.90 fmol/cell。随着藻细胞进入对数生长期, 毒素含量又逐渐增加, 在稳定初期达到最大, 添加磷酸二氢钾、磷酸甘油和 ATP 的各实验组中毒素含量分别达到 22.87、23.98 和 21.80 fmol/cell, 随后毒素含量趋于稳定。单位体积培养液中毒素含量的变化趋势在实验过程中呈持续上升态势, 直至藻细胞进入稳定期。

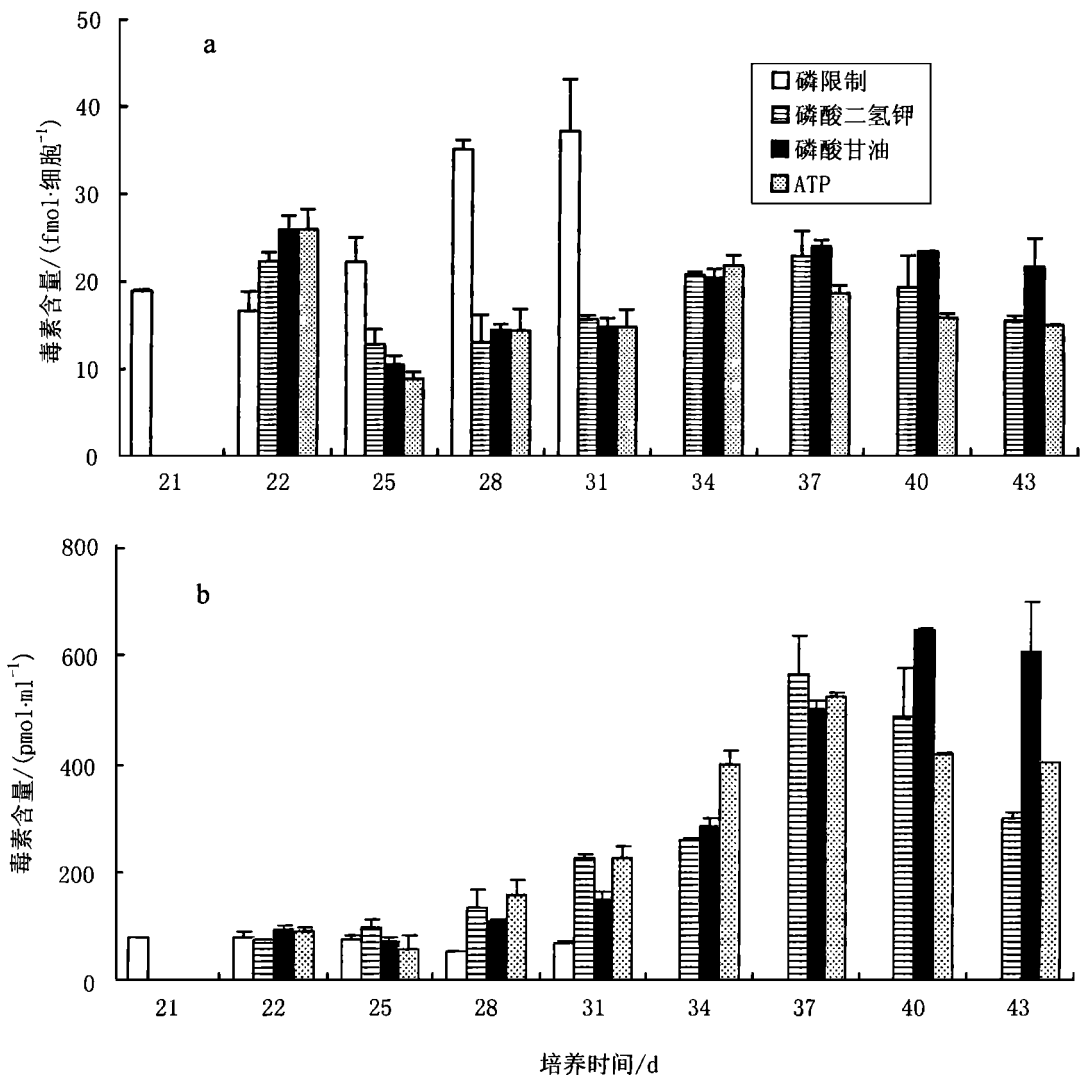


图 2 不同含磷营养物质对微小亚历山大藻毒素含量的影响

Fig. 2 Effects of different phosphorus substrates on toxin content of *A. minutum*

a. 每细胞毒素含量的变化; b. 单位体积培养液中毒素含量的变化

2.3 不同含磷营养物质对微小亚历山大藻毒素组成的影响

不同含磷营养物质对微小亚历山大藻毒素组成的影响如图 3 所示。可以看出, 磷限制组 GTX2 和 GTX3 所占的比例很低, 而 GTX1 和 GTX4 占绝对优势。与之相比, 添加磷酸二氢钾、磷酸甘油和 ATP 的各组, 在加入含磷营养物质 1

天后, 毒素组成还与磷限制组相似, 而在 4 天后, 随着藻细胞毒素含量下降, 毒素组成也明显变化, GTX4 和 GTX1 所占的比例逐渐降低, 而 GTX3 和 GTX2 的比例逐渐升高。与磷限制对微小亚历山大藻毒素组成的影响相比, 不同含磷营养物质对微小亚历山大藻的毒素组成几乎没有影响。

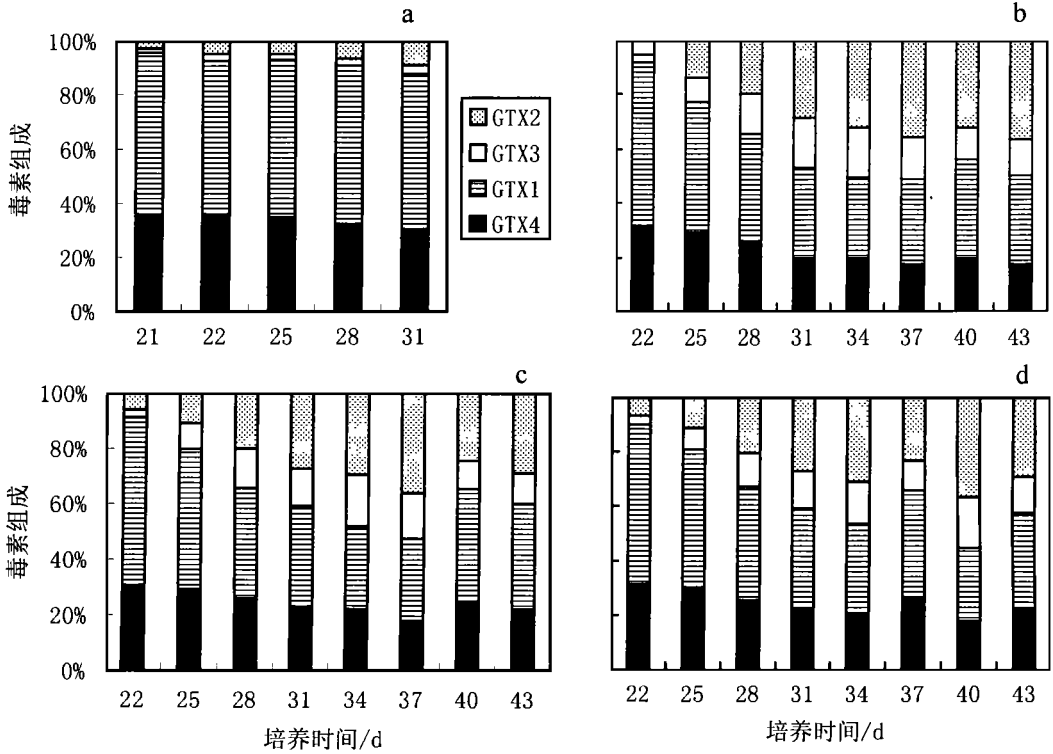


图 3 不同含磷营养物质对微小亚历山大藻毒素组成的影响

Fig. 3 Effects of different phosphorus substrates on toxin composition of *A. minutum*

a. 磷限制; b. 磷酸二氢钾; c. 磷酸甘油; d. ATP

2.4 不同含磷营养物质对微小亚历山大藻碱性磷酸酶活力的影响

实验过程中各实验组藻细胞碱性磷酸酶活力的变化如图 4 所示。可以看出, 实验开始 7 天后, 当微小亚历山大藻处于对数生长期时, 藻细胞碱性磷酸酶活力还很低, 到实验第 21 天出现磷限制现象时, 碱性磷酸酶活力开始上升, 酶活力达到 9.7IU。此后, 对照组的酶活力持续上升, 在第 37 天达到 44.7IU。而添加磷酸二氢钾实验组的碱性磷酸酶活力下降, 并一直维持在 5U 左右, 在实验后期碱性磷酸酶活力又有所上升。添加含磷有机物的两实验组中, 碱性磷酸酶一直维持在较高水平。可以看出, 添加含磷有机物能够使藻细胞碱性磷酸酶保持较高水平, 但不如磷限制条件下

藻细胞的碱性磷酸酶活力高, 说明碱性磷酸酶可以作为指示藻细胞磷限制状态的一种有效指标。

2.5 培养液中磷浓度的分析结果

从实验过程中培养液磷浓度的变化情况可以看出, 磷限制组中的磷浓度接近于零, 一直维持在方法的检出限附近; 而在添加含磷营养物质的其他各实验组中, 培养液中总磷的浓度均呈对数曲线式下降, 即开始时下降很快, 然后趋于缓和。添加磷酸二氢钾组在 1 天后, 磷浓度就从 10 μ mol/L 降低到 5.13 μ mol/L, 此后下降速度减慢, 至实验结束时磷浓度降为 1.40 μ mol/L。添加磷酸甘油和 ATP 实验组也呈相似趋势, 但开始时培养液中总磷浓度下降速率较无机磷酸盐小, 实验结束时总磷浓度分别为 1.35 μ mol/L 和 2.13 μ mol/L。

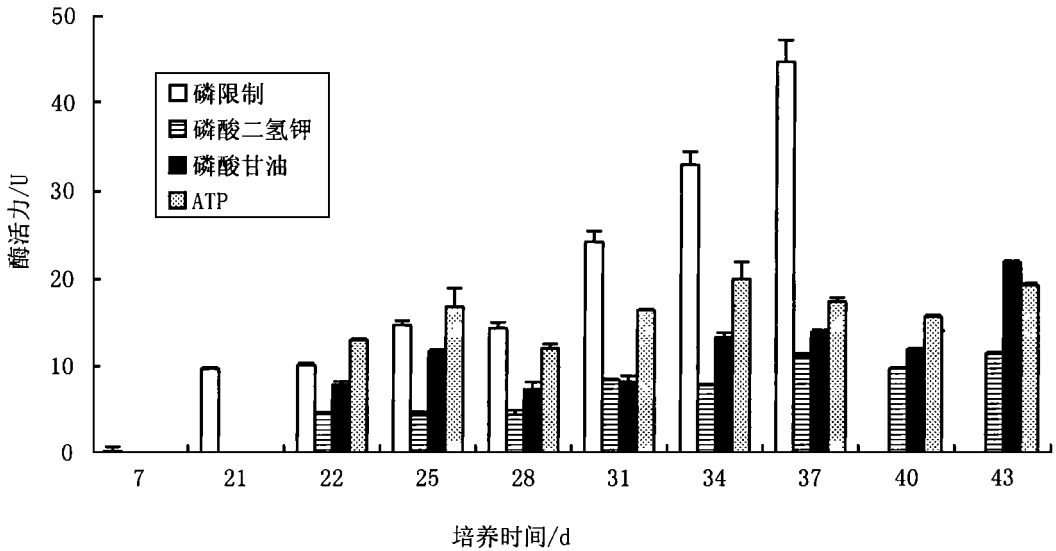


图4 实验过程中微小亚历山大藻碱性磷酸酶活力的变化

Fig. 4 Variation of alkaline phosphatase activity of *A. minutum* during the experiment

在添加含磷有机物的各组中,培养液中的有机磷化合物很快被转化成无机磷化合物。在添加磷酸甘油1天后,培养液中有机磷化合物的浓度降低为 $3.58\mu\text{mol/L}$,而无机磷浓度上升到 $4.39\mu\text{mol/L}$,此后培养液中无机磷浓度一直高于有机磷化合物浓度,约为有机磷浓度的两倍。添加ATP组在1天后培养液中有机磷浓度降低为 $4.72\mu\text{mol/L}$,无机磷浓度上升到 $3.77\mu\text{mol/L}$,此后培养液中无机磷化合物的浓度也一直高于有机磷化合物的浓度。两者变化趋势相近,但ATP转化为无机磷化合物的速率慢于磷酸甘油。

3 讨论

3.1 不同含磷营养物质对微小亚历山大藻生长的影响

实验结果表明,实验中所添加的含磷营养物质都可以被微小亚历山大藻有效利用。Tomas等(1993)曾报道利玛原甲藻(*Prorocentrum lima*)可以利用磷酸甘油作为营养来源。其生长速率比用无机磷化合物的藻生长速率小,但最终细胞密度较大。三角褐指藻(*Phaeodactylum tricorutum*)、湛江叉鞭金藻(*Dicrateria zhanjiangensis*)和小球藻(*Charella* sp.)也可以利用ATP和磷酸甘油作为磷的来源(王海黎等,1995; Hong *et al.*, 1995)。此外,1'-磷酸葡萄糖、6'-磷酸葡萄糖、1',6'-二磷酸

果糖、腺嘌呤,甚至AMP、ADP等,都可以作为含磷营养物质促进棕鞭藻(*Ochromonas danica*)和棕囊藻(*Phaeocystis* sp.)等浮游植物的生长,效果与无机磷相似(Aaronson *et al.*, 1976; Van Boekel, 1991; James *et al.*, 1992),这说明许多浮游植物能够利用有机磷化合物作为营养物质来源。对于微小亚历山大藻而言,实验所用的有机磷化合物和无机磷对其生长表现出了相似的效应,且含磷有机物的作用比活性磷酸盐还要稍好。因此,对微小亚历山大藻生理和生态学研究,有机磷化合物的作用不可忽视。

3.2 不同含磷营养物质对微小亚历山大藻毒素产生的影响

根据实验结果,磷限制能够导致藻细胞毒素含量上升,而且随着磷限制程度的增加,藻细胞毒素含量也逐渐升高。这一现象在有毒亚历山大藻属中很常见,但确切的机理并不清楚(Anderson *et al.*, 1990; Flynn *et al.*, 1995, 1996; Hwang *et al.*, 2000)。最近的研究显示磷对毒素合成的影响有可能是通过一个间接的过程,即通过影响细胞内的氮代谢影响毒素的合成(于仁诚,1998¹⁾)。

从实验中应用的三种含磷营养物质对毒素合成的影响来看,其作用非常相似,藻细胞毒素含量的变化趋势几乎一致,都是在对数生长期后期毒

1) 于仁诚,1998. 塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)产毒生理学研究. 中国科学院海洋研究所博士学位论文

素含量达到最高,进入稳定期后维持稳定并略有下降。这和 Hwang 等(2000)的研究结果相似。因此,无机磷化合物和有机磷化合物对有毒藻毒素产生的影响途径可能是相同的。

毒素组成的分析结果表明,微小亚历山大藻主要含有 GTX1—4 四种毒素,而磷限制条件对毒素组成具有显著影响,在以往的研究报告中也曾得到相似的结果(Flynn *et al.*, 1994)。Hwang 等(2000)也提到微小亚历山大藻在最适环境条件和营养条件下, GTX1 和 GTX4 是毒素优势组分,所占比例可以高达 64%—85%。因此,磷限制能够显著改变藻细胞的毒素组成,进而影响其毒性。

3.3 微小亚历山大藻利用有机磷化合物的机制

实验结果表明,微小亚历山大藻能够有效利用有机磷化合物,用于藻细胞的生长,并影响毒素的合成。已有的研究显示,对有机磷化合物的利用状况与藻细胞或环境中的碱性磷酸酶密切相关(Van Boekel, 1991)。通常认为,藻不能通过细胞膜直接吸收溶解态有机磷化合物(Christ, 1990),但是,藻可以通过细胞表面的酶水解小分子有机磷化合物,从而得到可以直接利用的活性磷酸盐,其中最重要的是碱性磷酸酶。从甲藻中分离得到的碱性磷酸酶分子量大约为 158000 ± 5000 ,最适的 pH 范围是 8.0—8.5(Carpen *et al.*, 1986)。碱性磷酸酶属于可诱导酶,可以结合溶解态磷酸单酯的 O_3P-O 末端和含 8 个磷以上的线性磷酸聚合物(Kobori *et al.*, 1980)。通过酶解作用产生的活性磷酸盐从酶所在位置附近进入细胞(Bentzen *et al.*, 1991)。因此,当水体中无机磷酸盐浓度很低时,碱性磷酸酶可以水解水体中的溶解态有机磷化合物,释放无机磷酸盐供藻利用。曾有报道在荷兰沿海春季发生的一种棕囊藻赤潮时,藻体碱性磷酸酶活性很高,而且发现由溶解态有机磷化合物所释放的活性磷酸盐所占的比例超过了棕囊藻所需磷的 50%,这说明溶解态有机磷化合物在一些赤潮发生的过程中具有重要作用(Veldhuis *et al.*, 1986)。在本文的实验中,微小亚历山大藻在磷限制条件下和利用有机磷化合物作为营养物质时都表现出了较高的碱性磷酸酶活力,而以无机磷酸盐作为磷营养来源时碱性磷酸酶活力明显降低,显示碱性磷酸酶在微小亚历山大藻利用有机磷化合物过程中也可能具有重要的地位。

碱性磷酸酶对有机磷化合物的分解是非常迅速的。实验中发现添加有机磷营养物质 1 天

后,培养液中的无机磷浓度就基本上与有机磷化合物的浓度持平,此后其浓度一直高于有机磷化合物的浓度。而对比两种有机磷化合物可以发现,添加 ATP 组的培养液中,有机磷水解的速率相对较慢,而该组的藻表现出了较高的碱性磷酸酶活性,这可能与 ATP 需要被逐级降解释放出无机磷酸盐有关,因此,就营养物质的可利用性而言,ATP 稍逊于磷酸甘油。

实验中还发现,藻体碱性磷酸酶可以指示藻受磷限制的状况,而与培养液中是否存在有机磷化合物没有明显关系。以往的实验也发现,当培养液中的无机磷浓度低于 $0.5 \mu\text{mol/L}$ 时,会检测到碱性磷酸酶活性(Veldhuis *et al.*, 1987; Bentzen *et al.*, 1991)。在磷限制实验组中,尽管培养液中没有有机磷化合物,藻体依然表现出了很高的碱性磷酸酶活力,而且酶活力随磷限制程度的增加而升高。因此,是藻体内磷代谢状况决定了碱性磷酸酶的合成与否。此外,实验中发现,在给磷饥饿的藻细胞添加无机磷酸盐和有机磷酸盐后,各实验组藻体碱性磷酸酶活力表现出了一定的差别,ATP 组藻的碱性磷酸酶活力最高,磷酸甘油组次之,磷酸二氢钾组最小,但差别并不显著。Tomas 等(1993)曾报道以无机磷酸盐培养的利马原甲藻的碱性磷酸酶活性与磷酸甘油培养的藻相差两个数量级。本文结果可能是由于藻体已先处于磷限制状态,碱性磷酸酶已被诱导产生,尽管随后添加无机磷酸盐作为磷营养来源,但酶活性在短时间内并未消失,只是酶活力有所降低。

许多微藻可以大量吸收外界的含磷营养物质,并在细胞内通过不同形式储存,用以支持磷缺乏时藻的生长和分裂(Van Boekel, 1991)。作者在实验中发现,当微小亚历山大藻藻细胞处于磷饥饿条件时,对于添加的含磷营养物质吸收非常迅速。添加无机磷酸盐的实验组,其培养液中的磷酸盐浓度在添加 1 天后就降低到初始浓度的 50%。此后藻细胞对磷的吸收速率显著降低,尽管培养液中的藻细胞浓度在不断增加,培养液中的无机磷浓度却下降得非常缓慢。因此,微小亚历山大藻也可能存在对磷的奢侈吸收现象,可以大量吸收含磷营养物质并储存,用于藻细胞的生长和分裂。

在海洋生态系统中,微藻藻际聚集着大量细菌。由于藻菌之间的相互作用和选择,形成具有独特结构和功能的藻际细菌群落,并在甲藻的生

长和产毒过程中发挥着重要的作用(林伟等, 2001; 郑天凌等, 2002)。许多实验结果显示细菌在有机磷降解为无机磷的过程中同样具有重要作用。在缺乏无机磷的环境中海洋细菌能够利用低分子量的有机磷化合物(黄邦钦等, 1996; Kuenzler, 1965; Kuenzler *et al.*, 1965; Rhee, 1973), 这与存在于细菌表面或由其释放的具有水解有机磷化合物活力的酶有关(Ammerman *et al.*, 1985; Ammerman, 1991)。因此, 海水中浮游植物、细菌和游离态三种类型的碱性磷酸酶都可以促进有机磷向无机磷的转化(洪华生等, 1992; Veldhuis, 1987), 要澄清藻类利用有机磷化合物的机制非常复杂。本实验所采用的培养条件不能排除培养液中细菌在有机磷转化中的作用, 因此, 要深入了解藻体自身对有机磷的利用情况, 还应当进行无菌藻的实验, 有关工作尚有待于进一步深入。

参 考 文 献

- 于仁诚, 周名江, 1998. 麻痹性贝毒研究进展. 海洋与湖沼, 29(3): 330—338 [Yu R C, Zhou M J, 1998. Advances on research of paralytic shellfish poisoning. Oceanologia et Limnologia Sinica, 29(3): 330—338]
- 王海黎, 洪华生, 黄邦钦, 1995. 海洋环境中溶解有机磷的生物活性初探. 厦门大学学报(自然科学版), 34(3): 416—420 [Wang H L, Hong H S, Huang B Q, 1995. Dissolved organic phosphorus in marine environment. Journal of Xiamen University (Natural Sciences), 34(3): 416—420]
- 林伟, 周名江, 2001. 有毒藻产毒过程中海洋细菌的作用. 海洋科学, 25(3): 34—38 [Lin W, Zhou M J, 2001. Effect of marine bacteria on harmful algal blooms. Marine Sciences, 25(3): 34—38]
- 周名江, 颜天, 邹景忠, 2003. 长江口邻近海域赤潮发生区基本特征初探. 应用生态学报, 14(7): 1031—1038 [Zhou M J, Yan T, Zhou J Z, 2003. Preliminary analysis of the characteristics of red tide areas in Changjiang River estuary and its adjacent sea. Chinese Journal of Applied Ecology, 14(7): 1031—1038]
- 郑天凌, 田蕴, 苏建强等, 2002. 海洋赤潮生物与厦门海域几种细菌的生态关系研究. 生态学报, 22(12): 2063—2070 [Zheng T L, Tian Y, Su J Q *et al.*, 2002. Study on the ecological relationship between a red-tide causative alga and three strains of bacteria isolated from Xiamen Harbor. Acta Ecologica Sinica, 22(12): 2063—2070]
- 洪华生, 戴民汉, 郑效成, 1992. 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. 海洋与湖沼, 23(4): 415—419 [Hong H S, Dai M H, Zheng X C, 1992. Measurement of alkaline phosphatase activity in seawater substrates and investigation on the role of alkaline phosphatase in the cycling of phosphorus. Oceanologia et Limnologia Sinica, 23(4): 415—419]
- 秦捷, 卿人韦, 兰利琼等, 2001. 缺磷胁迫对沙角衣藻碱性磷酸酶的影响. 四川大学学报(自然科学版), 38(6): 892—894 [Qin J, Qing R W, Lan L Q *et al.*, 2001. Influence of phosphorus deficiency on alkaline phosphatase in *Chlamydomonas sp.* Journal of Sichuan University (Natural Science Editions), 38(6): 892—894]
- 黄邦钦, 王海黎, 洪华生等, 1996. 厦门海域浮游植物和细菌对溶解有机磷的利用. 厦门大学学报(自然科学版), 35(4): 625—630 [Huang B Q, Wang H L, Hong H S *et al.*, 1996. Uptake of dissolved organic phosphorus compounds by phytoplankton and bacterioplankton in Xiamen seawaters. Journal of Xiamen University (Natural Sciences), 35(4): 625—630]
- 颜天, 周名江, 傅萌等, 2003. 赤潮异弯藻毒性及毒性来源的初步研究. 海洋与湖沼, 34(1): 50—55 [Yan T, Zhou M J, Fu M *et al.*, 2003. The preliminary study on toxicity of *Heterosigma akashiwo* and the toxicity source. Oceanologia et Limnologia Sinica, 34(1): 50—55]
- 格拉斯霍夫 K, 1982. 海水分析方法. 北京: 海洋出版社, 86—93
- Aaronson S, Patni N J, 1976. The role of surface and extracellular phosphatases in the phosphorus requirement of *Ochromonas*. Limnology and Oceanography, 21(6): 838—845
- Ammerman J W, 1991. Role of Ect ϕ -phosphohydrolases in Phosphorus Regeneration in Estuarine and Coastal Marine Ecosystems. In: Christ R J ed. Microbial Enzymes in Aquatic Environments. Springer-Verlag, NY, 164—185
- Ammerman J W, Azam F, 1985. Bacterial 5'-nucleotidase in aquatic ecosystem: a novel mechanism for phosphorus regeneration. Science, 227: 1338—1340
- Anderson D M, Kulis K M, Sullivan J J *et al.*, 1990. Dynamics and physiology of saxitoxin production by the dinoflagellates *Alexandrium* spp. Marine Biology, 104: 511—524
- Bentzen E, Taylor W D, 1991. Estimating organic utilization by freshwater plankton using [32 P] ATP. Journal of Plankton Research, 13(6): 1223—1238
- Carpen E, Wynne D, 1986. Properties of an alkaline phosphatase from the dinoflagellate *Peridinium cinctum*. Comparative Biochemistry and Physiology, 38B(1): 163—167
- Christ R J, 1990. Microbial Ectoenzymes in Aquatic Environments. In: Overbeck J, Christ R J ed. Aquatic Microbial

- Ecology: Biochemical and Molecular Approaches, 74—78
- Flynn K, Franco J M, 1994. Changes in toxin content, biomass and pigment of the dinoflagellate *Alexandrium minutum* during nitrogen refeeding and growth into nitrogen or phosphorus stress. *Marine Ecology Progress Series*, 111: 99—109
- Flynn K, Franco J, 1995. Nitrogen and Phosphorus Limitation in Cultured *Alexandrium minutum* Hanlim Does Not Promote Toxin Production. In: Lassus P, Erard E ed. *Harmful Marine Algal Blooms*, 439—444
- Flynn K, Jones K, Flynn K J, 1996. Comparisons among species of *Alexandrium* (Dinophyceae) grown in nitrogen- or phosphorus-limiting batch culture. *Marine Biology*, 126: 9—18
- Hallegraeff G M, 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia*, 32(2): 79—99
- Hong H S, Wang H L, Huang B Q, 1995. The availability of dissolved organic phosphorus to marine phytoplankton. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 13(2): 169—176
- Hwang D F, Lu Y H, 2000. Influence of environmental and nutritional factors on growth, toxicity, and toxin profile of dinoflagellate *Alexandrium minutum*. *Toxicon*, 38: 1491—1503
- Kobori H, Taga N, 1980. Extracellular phosphatase from a marine *Pseudomonas* sp. *Canadian Journal of Microbiology*, 26: 833—838
- James B, Cotner J, 1992. Uptake of dissolved inorganic and organic phosphorus by phytoplankton and bacterioplankton. *Limnology and Oceanography*, 37(2): 232—243
- Kuenzler E J, 1965. Glucose-6 phosphate utilization by marine algae. *Journal of Phycology*, 1: 156—164
- Kuenzler E J, Perras J P, 1965. Phosphatases of marine algae. *Biology Bulletin*, 128, 271—284
- Mondegue F, Marcaillou C, Plomb E L *et al.*, 1998. Assay of diarrhetic toxins by inhibition of protein phosphatase extracted from mussel meat. *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO 1998, 545—546
- Oshima Y, 1989. Latest advances in HPLC analysis of paralytic shellfish toxins. *Mycotoxins and Phycotoxins*, 319—326
- Rhee G Y, 1973. A continuous culture study of phosphate uptake, growth and polyphosphate in *Scenedesmus* sp. *Journal of Phycology*, 9: 495—506
- Tomas C R, Banen D G, 1993. The influence of phosphorus source on the growth and cellular toxin content of the benthic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. In: Smayda T J, Shimizu Y ed. *Toxic Phytoplankton Blooms in the sea*. Elsevier Science Publishers B V, 565—570
- Van Boekel W H M, 1991. Ability of *Phaeocystis* sp. to grow on organic phosphates: direct measurement and prediction with the use of an inhibition constant. *Journal of Plankton Research*, 13(5): 959—970
- Veldhuis M J W, Colijn F, Venekamp L A H, 1986. The spring bloom of *Phaeocystis pouchetii* (Haptophyceae) in Dutch coastal waters. *Netherlands Journal Sea Research*, 20: 37—48
- Veldhuis M J W, Venekamp L A H, Tetswaart T, 1987. Availability of phosphorus sources for blooms of *Phaeocystis pouchetii* (Haptophyceae) in the North Sea. *Netherlands Journal Sea Research*, 21: 219—229

EFFECTS OF DIFFERENT PHOSPHORUS SUBSTRATES ON GROWTH AND TOXIN GENERATION OF *ALEXANDRIUM MINUTUM*

ZHANG Qing-Chun, YU Ren-Cheng, ZHOU Ming-Jiang, WANG Yun-Feng

LI Jun, YAN Tian

(Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Science, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071; Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100039)

(Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Science, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

Abstract Effects of three different phosphorus substrates, KH_2PO_4 , glycerophosphate and ATP, on the growth and toxin generation of *Alexandrium minutum* were studied. *A. minutum* cultured in 500ml flasks containing modified *f/2* medium with only $1\mu\text{mol/L}$ dissolve inorganic phosphorus (DIP) and no silicate was used in the experiment. The batch culture of the algae were maintained at $(21 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ in 14L:10D pattern (light intensity 4000 lx). On the 21st day, when original phosphorus in the culture medium was depleted, three additional phosphorus substrates, i. e. KH_2PO_4 , glycerophosphate and ATP, were added to make three separate groups, respectively. And the concentration of phosphorus added was $10\mu\text{mol/L}$. A control group was set with no phosphorus added. The results showed that:

The adding of all the three different phosphorus substrates could promote the growth of *A. minutum* under phosphorus-depleted condition. In stationary phase, the maximum cell concentrations reached 22700, 28400, and 27800 cells/ml, respectively, much higher than the concentration of the control group.

After the addition of phosphorus substrates, the toxin contents per single cell of the three groups first decreased from the same value of 18.92 to 12.86, 10.55 and 8.90 fmol/cell, and then increased gradually to 22.87, 23.98 and 21.80 fmol/cell, respectively. In contrast, the toxin contents in the control group increased gradually to 37.16 fmol/cell till the 31st day.

The toxin composition could be affected by the supply of phosphorus. GTX1 and GTX4 became dominant in the control group when the algae were limited by phosphorus. After phosphorus substrates being added, the ratio of GTX1/4 decreased, while that of GTX2/3 increased. On the contrary, no clear difference was observed in the substrate-added groups in perspectives of affecting toxin level, and toxin composition in *A. minutum*.

Analytical results of alkaline phosphatase (AP) activity showed that the groups added with dissolved organic phosphorus (DOP) had higher activity than that added with DIP. However, the control group had the highest activity among all the groups. Therefore, AP activity can be used as an indicator for phosphorus limitation for *A. minutum*.

One day after adding $10\mu\text{mol/L}$ of those three phosphorus substances, the total concentration of phosphorus in *A. minutum* cultures decreased so quickly that only 51%, 36% and 47% of KH_2PO_4 , glycerophosphate and ATP, respectively, had left in *A. minutum* cultures. It is clear that *A. minutum* can use both DOP and DIP as the phosphorus sources for growth and toxin generation during which AP might play an important role in DOP utilization by the algae.

Key words *A. minutum*, Alkaline phosphatase, Growth, Dissolved organic phosphorus (DOP), Dissolved inorganic phosphorus (DIP)