

温度与溶解态有机磷源对中肋骨条藻生长的影响

张小华^{1,2,3}, 刘东艳⁴

(1. 中国科学院 烟台海岸带研究所 海岸环境过程重点实验室, 山东 烟台 264003; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 滨州医学院 药学院, 山东 烟台 264003; 4. 华东师范大学 河口与海岸学国家重点实验室, 上海 200241)

摘要: 为探讨温度与溶解态有机磷(Dissolved organic phosphorus, DOP)对浮游植物生长的共同影响, 本文以中肋骨条藻为研究对象, 选取含有 C-O-P 键的三磷酸腺苷(Adenosine triphosphate, ATP)、甘油磷酸钠(Sodium glycerophosphate, SG-P)、6-磷酸葡萄糖(Glucose 6-phosphate, G-6-P)和含有 C-P 键的草甘膦(Glyphosate, G-P)为不同类型的 DOP, 检测了 4 种温度条件下(20、23、26、29℃)藻细胞的生长状况以及培养液中总溶解态磷(Total dissolved phosphorus, TDP)、溶解态无机磷(Dissolved inorganic phosphorus, DIP)浓度与藻细胞内碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, AP)的变化。研究结果表明: 含有 C-O-P 键的 ATP、SG-P 和 G-6-P 均能较好地维持中肋骨条藻的生长, 并且升温可进一步促进各组藻细胞的生长, 最大藻细胞密度分别达到 176.7×10^4 、 218.8×10^4 和 178×10^4 cell/mL; 此外升温还可加速 ATP、SG-P 和 G-6-P 组培养液中 TDP 浓度的下降, 以及 ATP 组培养液中 DIP 浓度的升高; 但各组藻细胞内 AP 活性在不同温度条件下均处于较低水平(< 10 fmol pNP/(cell·h))。与含有 C-O-P 键的 DOP 相比, G-P 组的藻细胞在各温度条件下生长密度均较低, 最大藻细胞密度仅为 40.7×10^4 cell/mL; 但其藻细胞内 AP 活性显著高于 ATP、SG-P 和 G-6-P 组[最高达 83 fmol pNP/(cell·h)]且随温度升高而降低。以上结果表明, 不同类型 DOP 会显著影响中肋骨条藻的生长, 其中 ATP、SG-P 和 G-6-P 能更为有效地被中肋骨条藻生长所利用, 并且温度升高(20~29℃)是促进 3 种 DOP 条件下中肋骨条藻生长的重要环境因素, 但该效应可能并不依赖于 AP 活性。

关键词: 中肋骨条藻; 温度; 生长; 溶解态有机磷; 溶解态无机磷; 碱性磷酸酶

中图分类号: X173 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2020)11-0036-09

DOI: 10.11759/hyhx20200225001

溶解态无机磷(Dissolved inorganic phosphorus, DIP)是海洋浮游植物生长的必需营养元素, 然而, 很多海域存在季节性磷限制的现象^[1-2]。已有研究表明, 在 DIP 限制的条件下, 部分浮游植物可以利用溶解态有机磷(Dissolved organic phosphorus, DOP), 大量繁殖生长, 甚至形成赤潮^[3]。DOP 是近岸海域中广泛存在的一种重要磷源, 在海洋总溶解态磷(Total dissolved phosphorus, TDP)中占有很大比例^[4-6]。例如, 有调查表明, 黄河口及邻近海域 DOP 的含量大约贡献了 TDP 的 85% 左右^[7], 是导致水体富营养化的重要因素之一^[8]。DOP 结构复杂, 由众多复杂混合物组成。根据其所含 C、P 键型不同, 基本可分为两大类有机化合物: 含有 C-O-P 键的磷酸酯和含有 C-P 键的膦酸酯^[9]。大量研究表明 DOP 需要先被转化为 DIP 才能被浮游植物吸收利用^[10-11], 其转换利用能力一方面受到 DOP 的结构影响, 另一方面受到海洋环境因子的

影响。例如, 海洋中痕量金属元素(铝、锌等)的存在可以促进浮游植物对 DOP 的利用^[12-13]; 较高的海水温度也会促进浮游植物对 DOP 的转化吸收速率^[14]。

有研究表明, 海洋变暖会加剧海水的富营养化效应, 促进浮游植物对营养物质的吸收利用, 加剧赤潮的爆发频率和规模^[15-16]。DOP 是富营养化海域的重要磷源, 浮游植物在海水暖化条件下, 对不同结构 DOP 的吸收利用能力可显著影响到生物生产量, 乃至赤潮的发生, 因此, 有必要深入探讨温度与

收稿日期: 2020-02-25; 修回日期: 2020-07-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(41876127); 国家重点研发计划项目(2016YFE0133700, 2016YFA0600904)

[Foundation: National Natural Science Foundation, No. 41876127; Ministry of Science and Technology, Nos. 2016YFE0133700, 2016YFA0600904]

作者简介: 张小华(1980-), 女, 山东荣成人, 博士研究生, 研究方向为藻类生理学, E-mail: 17062997@qq.com; 刘东艳, 通信作者, 研究员, 博士生导师, E-mail: dyliu@sklec.ecnu.edu.cn

DOP 对浮游植物生长的影响效应。本研究选取我国东部沿海的一种常见赤潮藻-中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)^[17-18]为研究对象,在四个不同的温度条件下(20、23、26、29℃),分别添加三磷酸腺苷(Adenosine triphosphate, ATP)、6-磷酸葡萄糖(Glucose 6-phosphate, G-6-P)、甘油磷酸钠(Sodium glycerophosphate, SG-P)和草甘膦(Glyphosate, G-P)四种不同形态的 DOP,通过分析藻细胞生长特征,以及培养液中 TDP、DIP 浓度和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)活性变化,探讨了升温与不同 DOP 对中肋骨条藻生长的影响特征,研究结果将为揭示海水暖化条件下 DOP 丰富海区浮游植物的生长状态提供一定的科学依据。

1 材料与方 法

1.1 藻种培养及实验设计

中肋骨条藻(*S. costatum*)分离自我国黄海海域。实验所用玻璃器皿均使用 10% HCl 浸泡 24 h,纯净水冲洗干净后,放于烘箱烘干备用。培养所用海水为人工海水,参照 Harrison 等^[19]的方法配制, pH 值为 8.0±0.1, 盐度为 30±1, 经 121℃ 高压湿热灭菌 30 min, 室温冷却后备用。实验室中肋骨条藻的培养条件光照为 55 μmol/(m²·s), 光暗周期为 12 h/12 h, 温度为 20℃, 培养液为 f/2 营养盐配方^[20]。

实验选择 4 种不同类型的 DOP, 分别代表海洋中存在的两种 P 键类别: G-6-P、ATP 和 SG-P 代表含有 C-O-P 键的磷酸酯, G-P 代表含有 C-P 键的膦酸酯。参照 f/2 培养基中 NaH₂PO₄ 的浓度(36 μmol/L), 分别添加 36 μmol/L G-6-P、12 μmol/L ATP(约为 36 μmol/L P)、36 μmol/L SG-P 和 36 μmol/L G-P 配制不同类别磷源的培养液, 其他各种元素依旧按 f/2 配方添加; 对照组使用 f/2 培养基。中肋骨条藻生长最适温度在 20~30℃ 之间^[21-22], 因此本次实验在此区间设定 4 个温度条件, 分别为 20、23、26、29℃。接种指数生长期的中肋骨条藻到各含有 600 mL 不同磷源培养液的 1 L 锥形瓶中(表 1), 起始藻细胞密度为 5×10⁴ cell/mL, 然后分别置于预设 4 个温度条件的恒温光照培养箱中, 连续培养 7 d, 每个处理组合均设 3 个重复。每天固定时间从各组中取 50 mL 样品, 用于藻细胞计数、培养液中 TDP、DIP 浓度以及细胞 AP 活性的测定。

1.2 藻细胞计数

取 100 μL 样品用于藻细胞计数, 取样前混匀藻

表 1 实验分组情况列表

Tab. 1 List of experimental groups

DOP 实验分组	添加浓度/(μmol/L)	培养温度/℃
ATP	12	20、23、26、29
SG-P	36	20、23、26、29
G-6-P	36	20、23、26、29
G-P	36	20、23、26、29

液, 将卢戈氏液加入取样样品中固定藻细胞, 使用 0.1 mL 浮游植物计数框(20 mm×20 mm)于显微镜下对每个样品进行计数, 计算每 mL 样品中含有的藻细胞个数。

1.3 生长速率计算

根据每天获得的藻细胞密度, 采用下列公式^[23]计算本实验中肋骨条藻的生长速率:

$$\mu = (\ln N_2 - \ln N_1) / (T_2 - T_1),$$

式中, N_2 和 N_1 分别代表时间 T_2 和 T_1 的细胞密度。

1.4 培养液中 DIP 与 TDP 浓度的测定

50 mL 的培养液离心后, 上清经醋酸纤维膜过滤, 用于测定培养液中 DIP 和 TDP 的浓度。DIP 采用以抗坏血酸为还原剂的磷钼蓝比色法测定(海洋调查规范第 4 部分: 海水化学要素调查 GB17378.4-2007)。TDP 根据 Jeffries 等^[24]的方法进行测定, 过滤培养液加入 50 g/L 的过硫酸钾, 121℃ 消解 30 min, 冷却至室温, 再采用以抗坏血酸为还原剂的磷钼蓝比色法进行测定。

1.5 胞内 AP 活性的测定

离心收集的藻细胞用于胞内 AP 活性的测定。参照 Lin 等^[25]的方法, 以对硝基苯磷酸二钠(4-Nitrophenyl phosphate, pNPP)为底物测定 AP 活性变化。收集到的藻细胞加入 1 mL 0.05 mol/L 的 Tris-HCl (pH=9)的缓冲液, 在冰浴条件下匀浆 1~2 min, 匀浆后离心取上清, 与 50 μL 20 mmol/L 的 pNPP 混匀, 对应培养温度条件下黑暗中放置 2 h, 随后将样品放置冰上终止酶反应, 10 000 g 离心 2 min, 取上清于 405 nm 处测定胞内 AP 活性。酶活计算单位为单个藻细胞含有的 AP 1 h 降解 pNPP 所产生对硝基苯酚(p-nitrophenol, pNP)的 fmol 数。

1.6 数据处理与分析

所有实验测定结果均表示为平均值±标准方差($n=3$)。采用三因子方差分析 DOP(ATP、G-6-P、SG-P 和 G-P)、温度(20、23、26、29℃)和取样时间对藻细

胞密度、TDP、DIP 浓度和 AP 活性的影响, 如果交互作用因子 $P < 0.05$, 则使用单因素重复方差分析来确定差异性。重复测量方差分析时, 如果重复性方差分析的方差-协方差矩阵的球形假设被违反, 则对自由度(df)进行 Greenhouse-Geisser 校正。所有统计分析均采用 SPSS 17.0 软件进行。

2 结果与分析

2.1 中肋骨条藻生长特征比较

中肋骨条藻在不同温度与 DOP 组中表现出不同的生长特征(图 1; 表 2)。在 ATP 组中, 藻细胞在 4 d 后快速生长, 最大藻细胞密度与平均生长率出现在

29°C 条件下 (图 1a; 表 2); SG-P 和 G-6-P 组的藻细胞生长变化趋势相似, 5 d 后快速生长, 最高藻细胞密度与平均生长率均出现在 26°C 条件下(图 1b, c; 表 2)。相比之下, G-P 组的藻细胞密度维持在较低水平, 没有出现显著生长, 生长速率明显低于其它组, 29°C 条件下的生长略高于其他温度条件(图 1d; 表 2)。NaH₂PO₄ 组随着温度的升高细胞密度显著上升, 29°C 生长最好(图 1e)。以上结果可以看出, 含有 C-O-P 键的磷酸酯(ATP, SG-P 和 G-6-P)表现出与 NaH₂PO₄ 组相似的生长趋势, 较高的温度条件可以显著促进中肋骨条藻的生长; 而含有 C-P 键的磷酸酯(G-P)对中肋骨条藻生长的影响不显著。

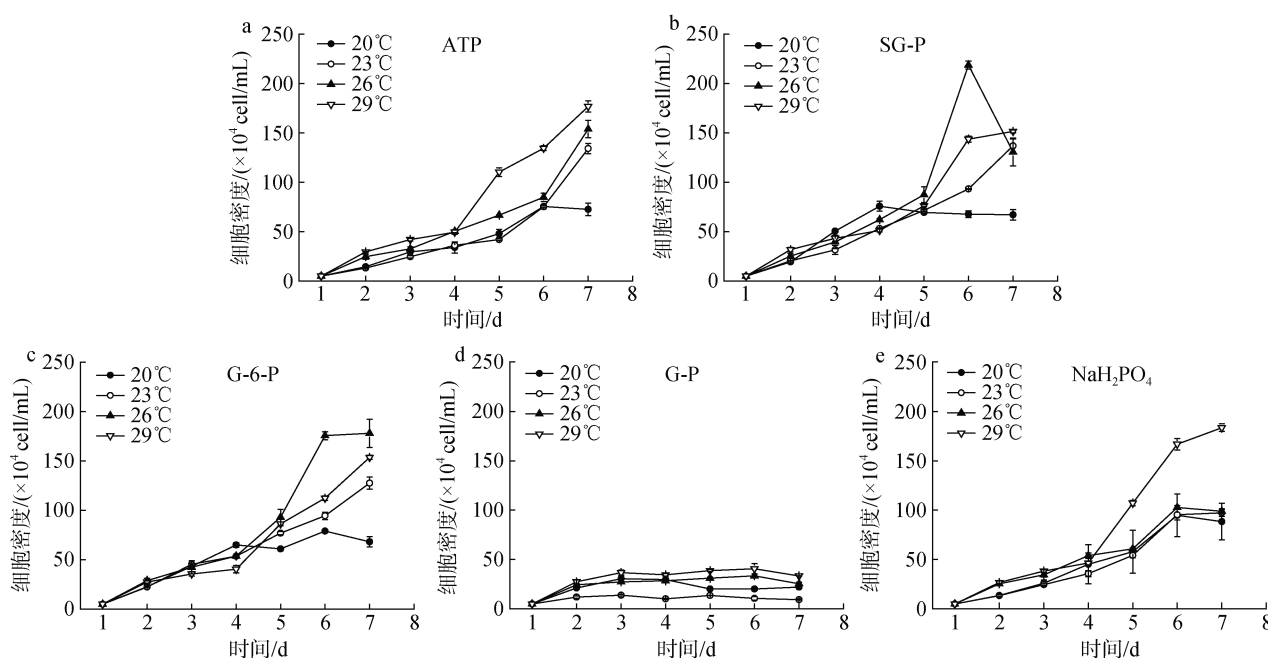


图 1 不同温度和 DOP 条件下中肋骨条藻的生长特征

Fig. 1 Growth characteristics of *Skeletonema costatum* under different temperature and dissolved organic phosphorus (DOP) conditions

表 2 中肋骨条藻在各组中的最高生物量($\times 10^4$ cell/ mL)及平均生长速率(d^{-1})

Tab. 2 Maximal biomass ($\times 10^4$ cells/mL) and growth rate (d^{-1}) of *Skeletonema costatum* in each group

DOP 组别	生物量/生长速率	20°C	23°C	26°C	29°C
ATP	最高生物量	75.5 \pm 5.47 ^d	134.2 \pm 6.41 ^c	153.9 \pm 10.74 ^b	176.7 \pm 6.93 ^a
	平均生长速率	0.45 \pm 0.009 ^d	0.55 \pm 0.008 ^c	0.57 \pm 0.011 ^b	0.59 \pm 0.006 ^a
SG-P	最高生物量	73.2 \pm 5.15 ^d	136.9 \pm 8.51 ^c	218.8 \pm 7.25 ^a	151.5 \pm 1.89 ^b
	平均生长速率	0.44 \pm 0.013 ^c	0.54 \pm 0.010 ^{ab}	0.6 \pm 0.010 ^a	0.57 \pm 0.002 ^b
G-6-P	最高生物量	79.0 \pm 0.86 ^d	127.6 \pm 7.54 ^c	178.0 \pm 17.43 ^a	153.7 \pm 2.51 ^b
	平均生长速率	0.44 \pm 0.012 ^d	0.54 \pm 0.010 ^c	0.6 \pm 0.016 ^a	0.57 \pm 0.003 ^b
G-P	最高生物量	30.6 \pm 1.83 ^b	13.9 \pm 0.93 ^c	33.6 \pm 1.96 ^b	40.7 \pm 6.41 ^a
	平均生长速率	0.25 \pm 0.007 ^c	0.11 \pm 0.014 ^d	0.27 \pm 0.011 ^b	0.32 \pm 0.001 ^a

三因子方差分析表明, 温度与 DOP 类型均对中肋骨条藻生长有显著影响, 并且两者之间存在显著的交互效应(表 3)。单因素重复性方差分析发现, 在相同的 DOP 类型下, 温度对藻细胞生长均有显著影响($P<0.01$); 在相同的温度下, SG-P 和 G-6-P 组之间的生长差异不显著外($P>0.05$), 其余各 DOP 组之间均具有显著差异($P<0.01$)。

2.2 培养液中磷酸盐的变化特征

培养液中 TDP 与 DIP 的浓度变化在不同 DOP

组中显著不同(图 2)。ATP 组的培养液中, TDP 在实验过程中迅速下降, 29℃下降最为显著(图 2a); 培养液中 DIP 浓度在实验前 5 d 显著上升, 随后下降至实验结束(图 2b)。SG-P 和 G-6-P 组培养液中的 TDP 均在 29℃条件下下降最为显著(图 2c, e); 两组培养液中 DIP 浓度变化相似, 均在实验后期有少量 DIP 产生($<10 \mu\text{mol/mL}$)(图 2d, f)。相比之下, G-P 组培养液中 TDP 浓度到实验结束时均呈现上升趋势(图 2g); 整个实验过程均难以检测到 DIP(图 2h)。三因子方差分析发现, 温度和 DOP 类型对 TDP 与 DIP 浓度均有

表 3 三因子方差分析 DOP 类型、温度和取样时间对细胞密度、TDP 和 DIP 浓度以及 AP 活性的影响

Tab. 3 Summary of the RANOVA results of the effects of dissolved organic phosphorus, temperature and sampling time on the cell concentration, total dissolved phosphorus and dissolved inorganic phosphorus concentrations, and alkaline phosphatase activity

参数	细胞密度		TDP 浓度		DIP 浓度		AP 活性	
	F	P	F	P	F	P	F	P
DOP	1 415.71	0.000	288.20	0.001	1 538.11	0.000	29 647.31	0.000
温度	524.83	0.000	32.73	0.021	39.62	0.023	117.73	0.001
DOP×温度	142.99	0.003	33.49	0.000	34.47	0.005	123.03	0.003
时间	4 927.31	0.000	404.58	0.000	1 203.36	0.000	73.48	0.001
DOP×时间	290.00	0.000	148.76	0.000	272.03	0.000	92.34	0.002
温度×时间	204.15	0.000	6.88	0.000	10.08	0.030	26.81	0.006
DOP×温度×时间	54.66	0.002	4.29	0.000	13.78	0.019	19.73	0.009

注: P 表示这些因素或其相互作用的显著性, $P<0.05$ 时表示差异显著。

显著影响(表 3), 且 DOP 类型对 TDP 和 DIP 浓度的影响较温度更为显著。在相同温度条件下, G-P 组的 TDP 浓度与其他各 DOP 组之间差异显著($P<0.01$); ATP 组的 DIP 浓度与其他各 DOP 组之间差异显著($P<0.01$)。

2.3 细胞碱性磷酸酶活性变化特征

不同温度条件与 DOP 组中, 中肋骨条藻胞内 AP 活性表现出显著不同的变化特征(图 3)。AP 活性在 ATP 组中不活跃($<10 \text{ fmol pNP}/(\text{cell}\cdot\text{h})$), 仅在 26℃条件下培养的第 6, 7 d 出现峰值(图 3a); SG-P 和 G-6-P 组中, AP 活性的变化特征相似(图 3b, c), 培养期间变化不显著。各温度条件下 G-P 组的 AP 活性均显著升高, 其中酶活最高值出现在 20℃第 5 d($83 \text{ fmol pNP}/(\text{cell}\cdot\text{h})$)(图 3d)。三因子方差分析结果表明, 温度和 DOP 类型均对 AP 活性有显著影响(表 3)。相同温度条件下, G-P 组 AP 活性与其他各 DOP 组之间均存在显著差异($P<0.01$); 此外 G-P 组 AP 活性在 26℃与 29℃条件下差异不显著($P>0.05$), 其余各温度条件下的 AP 活性均有显著差异($P<0.01$)。

3 讨论

DOP 是富营养海岸水域存在的重要磷源之一, 其中, 磷酸酯类 DOP 可以占到总 DOP 类型的 75%左右^[26-28]。目前已有多种磷酸酯化合物被鉴定出来, 其中, 核酸、游离核苷酸(如 ATP)、甘油磷脂(如 SG-P)、糖类衍生物(如 SG-P)等是其组成成分^[29-30]。ATP、G-6-P、SG-P 都属于小分子磷酸酯, 含有 C-O-P 键, 易于被降解, 因此常被用来作为研究浮游植物对海水 DOP 利用的代表性对象。已有研究表明东海原甲藻(*Prorocentrum donghaiense*)^[31-32]、球形棕囊藻(*Phaeocystis globosa*)^[33]、具槽帕拉藻(*Paralia sulcata*)^[34]、塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)^[35]等可利用 ATP、G-6-P、SG-P 等 DOP 化合物维持生长。磷酸酯约占海洋中 DOP 的 25%^[30], 广泛分布于许多海洋生命形式中。近年来由于 G-P 的广泛应用导致其在沿海海域中积累, 成为水体磷酸盐的重要组成部分^[36]。G-P 属于小分子磷酸盐, 含有化学稳定的 C-P 键, 从能量上讲, 它比水解 C-O-P 键更困难, 因此, 只有少数细菌和海洋浮游植物被报道可以利用 G-P 作

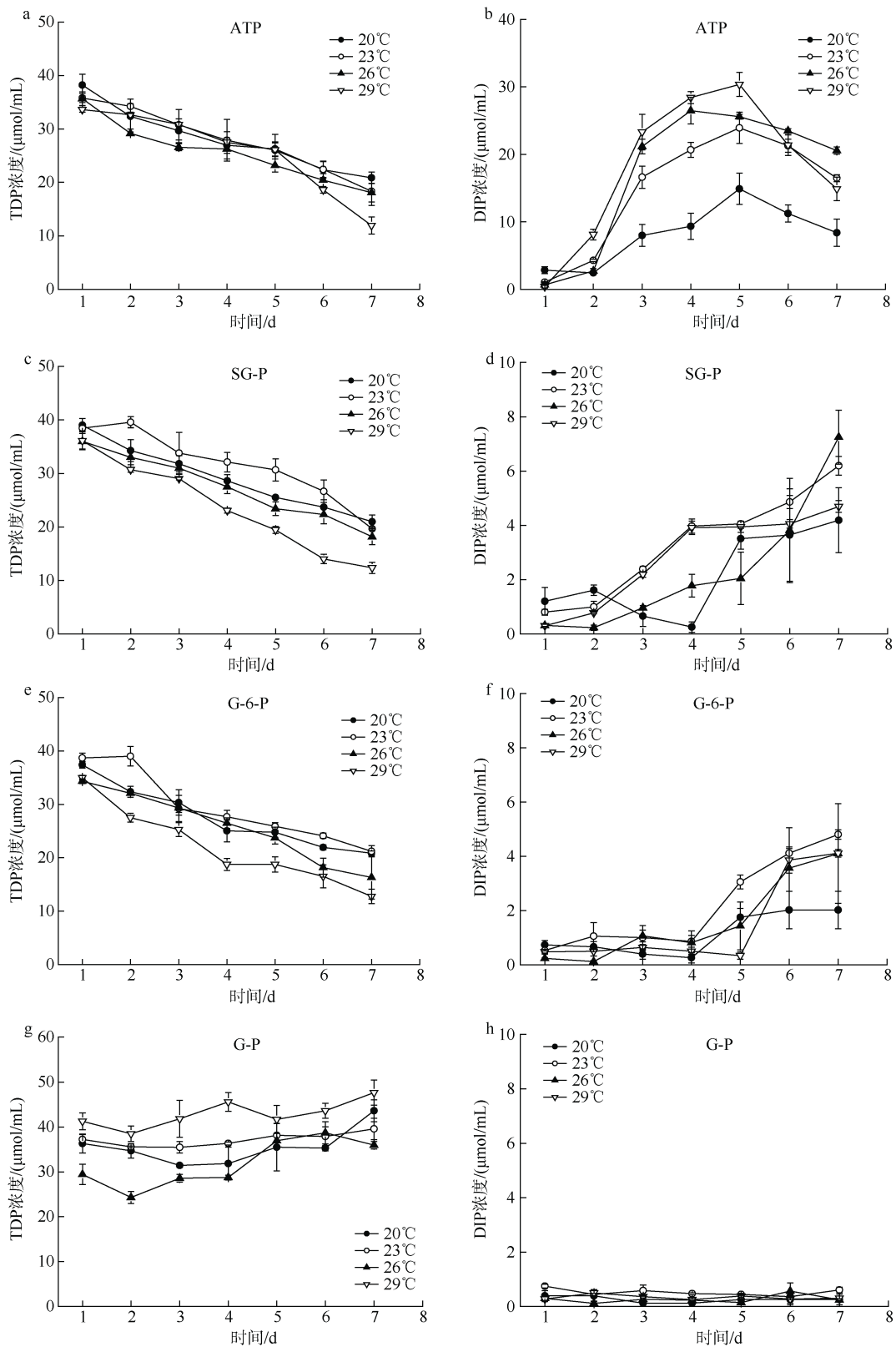


图2 不同温度和 DOP 条件下培养液中 TDP 和 DIP 浓度变化特征

Fig. 2 Dynamic characteristics of total dissolved phosphorus and dissolved inorganic phosphorus concentrations under different temperature and DOP conditions

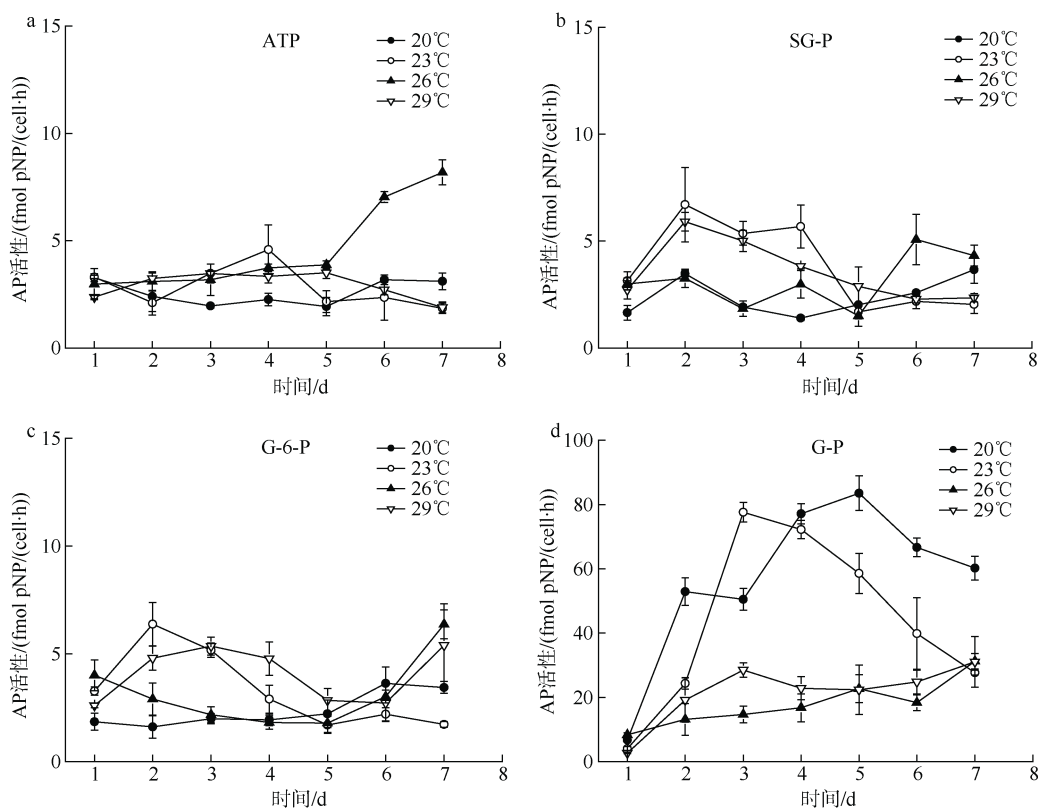


图3 不同温度和 DOP 条件下中肋骨条藻 AP 酶活性变化特征

Fig. 3 Dynamic characteristics of alkaline phosphatase activity in *Skeletonema costatum* under different temperature and DOP conditions

为磷营养源,例如小定鞭藻(*Prymnesium parvum*)^[37]、铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)^[38]以及丝状蓝细菌鱼腥藻(*Anabaena* sp.)^[39]等。不同浮游植物对不同 DOP 的利用能力不同^[35],且易受环境因子影响。

本研究发现中肋骨条藻可以在 ATP、G-6-P 和 SG-P 条件下快速生长,而在 G-P 条件下,中肋骨条藻的生长显著低于其他 DOP 组。这表明中肋骨条藻对不同结构类型 DOP 的利用能力不同,更易利用磷酸酯。在相同 DOP 处理条件下,中肋骨条藻的生长响应了较高的温度条件,这与 Tian 等^[40]报道中肋骨条藻在较高温度下分裂更快,更易引起赤潮的结果一致。通过监测藻细胞生长过程中培养液里 TDP、DIP 的变化,进一步了解中肋骨条藻对不同 DOP 的利用过程。实验发现,在 ATP、G-6-P 和 SG-P 培养液中 TDP 浓度迅速下降,表明中肋骨条藻可以有效利用磷酸酯 ATP、G-6-P 和 SG-P 维持自身生长,在较高温度培养液中的 TDP 消耗更为显著。G-P 组培养液中 TDP 浓度没有下降反而略有升高,表明中肋骨条藻不能直接利用 G-P,培养液中 TDP 浓度升高可能是由于部分细胞死亡后,细胞破裂导致含磷内

容物释放到培养液中。有研究报道表明, DOP 的吸收利用是通过被酶水解成 DIP 的途径来进行的^[11, 41],但也有研究发现一些小分子 DOP 可以被藻类直接吸收利用,例如,米氏凯伦藻(*Karenia mikimotoi*)可以直接吸收利用 G-6-P^[42]。本研究发现 ATP 组培养液中有大量 DIP,而 SG-P 和 G-6-P 组中仅有少量 DIP,表明中肋骨条藻对 ATP 与 SG-P 和 G-6-P 的利用途径可能不同。温度对 ATP 组 DIP 浓度变化有显著影响($P < 0.01$),培养液中 DIP 浓度随温度的升高显著增多,表明温度升高可能加速 ATP 水解产生更多的 DIP,从而促进了中肋骨条藻的生长。

AP 被认为是最重要的 DOP 利用酶,在 DIP 缺失的环境被诱导合成,通过分解水体中的 DOP 为浮游植物提供磷源^[10, 25]。本研究发现,不同类型 DOP 条件下的藻细胞内 AP 活性存在较大差异,其中 ATP、SG-P 和 G-6-P 组的 AP 活性均较低且各组间无显著差异($P > 0.05$),而 G-P 组的 AP 活性显著高于 ATP、SG-P 和 G-6-P 组的 AP 活性($P < 0.01$),表明在含有 C-P 键的 DOP 条件下中肋骨条藻的 AP 活性较高。有研究报道,当环境中可利用磷匮乏时,浮游植物

会通过合成 AP 利用细胞内储存的多聚磷酸盐维持细胞较低水平的生长^[31]。因为 G-P 较难被水解,中肋骨条藻可能会通过合成较高 AP 利用胞内多聚磷酸盐,这可能是本实验在 G-P 营养条件下,中肋骨条藻细胞生长率较低及培养液中 TDP 没有降低现象的一种解释。ATP、SG-P 和 G-6-P 组的 AP 活性均较低,可能是小分子磷酸酯较易被水解,藻细胞保持较低的 AP 水平就能维持较好生长,也可能是藻细胞存在其他酶利用 DOP 维持生长^[41, 43]。Healey 等^[44]研究表明温度会不同程度上影响浮游植物 AP 活性。本研究中,温度变化对 G-P 条件下的细胞 AP 活性有显著影响,AP 活性在 20℃ 和 23℃ 下活性更高。

4 结论

1) 不同类型 DOP 会显著影响中肋骨条藻的生长。与 G-P 相比,ATP、SG-P 和 G-6-P 能更为有效地被中肋骨条藻生长所利用。

2) 本实验温度范围内(20~29℃),温度升高能显著促进中肋骨条藻在 ATP、SG-P 和 G-6-P 三种 DOP 条件下的生长,但该效应可能并不依赖于 AP 活性。

参考文献:

[1] Xu S, Song J, Li X, et al. Changes in nitrogen and phosphorus and their effects on phytoplankton in the Bohai Sea[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2010, 28(4): 945-952.

[2] Turner R E, Rabalais N N. Nitrogen and phosphorus phytoplankton growth limitation in the northern Gulf of Mexico[J]. Aquatic Microbial Ecology, 2013, 68(2): 159-169.

[3] Ou L, Qin X, Shi X, et al. Alkaline phosphatase activities and regulation in three harmful *Prorocentrum* species from the coastal waters of the East China Sea[J]. Microbial Ecology, 2020, 79(2): 459-471.

[4] Benitez-Nelson C R. The biogeochemical cycling of phosphorus in marine systems[J]. Earth-Science Reviews, 2000, 51(1-4): 109-135.

[5] Sebastián M, Aristegui J, Montero M F, et al. Kinetics of alkaline phosphatase activity, and effect of phosphate enrichment: a case study in the NW African upwelling region[J]. Marine Ecology Progress Series, 2004, 270: 1-13.

[6] Karl D M, Yanagi K. Partial characterization of the dissolved organic phosphorus pool in the oligotrophic North Pacific Ocean[J]. Limnology and Oceanography, 1997, 42(6): 1398-1405.

[7] 张欣泉, 邓春梅, 魏伟, 等. 黄河口及邻近海域溶解态无机磷、有机磷、总磷的分布研究[J]. 环境科学学

报, 2007, 27(4): 660-666.

Zhang Xinquan, Deng Chunmei, Wei Wei, et al. The distribution of dissolved inorganic phosphorus, dissolved organic phosphorus, dissolved total phosphorus in the Yellow River estuary and adjacent water[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2007, 27(4): 660-666.

[8] Ni Z, Wang S, Wang Y. Characteristics of bioavailable organic phosphorus in sediment and its contribution to lake eutrophication in China[J]. Environmental Pollution, 2016, 219: 537-544.

[9] Lin S, Litaker R W, Sunda W G. Phosphorus physiological ecology and molecular mechanisms in marine phytoplankton[J]. Journal of Phycology, 2016, 52(1): 10-36.

[10] Labry C, Delmas D, Herbland A. Phytoplankton and bacterial alkaline phosphatase activities in relation to phosphate and DOP availability within the Gironde plume waters (Bay of Biscay)[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2005, 318(2): 213-225.

[11] Nicholson D, Dyhrman S, Chavez F, et al. Alkaline phosphatase activity in the phytoplankton communities of Monterey Bay and San Francisco Bay[J]. Limnology and Oceanography, 2006, 51(2): 874-883.

[12] Zhou L, Tan Y, Huang L, et al. Enhanced utilization of organic phosphorus in a marine diatom *Thalassiosira weissflogii*: A possible mechanism for aluminum effect under P limitation[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2016, 478: 77-85.

[13] Shi Y, Hu H, Ma R, et al. Improved use of organic phosphate by *Skeletonema costatum* through regulation of Zn²⁺ concentrations[J]. Biotechnology Letters, 2004, 26(9): 747-751.

[14] White A E, Watkins-Brandt K, Engle M, et al. Characterization of the rate and temperature sensitivities of bacterial remineralization of dissolved organic phosphorus compounds by natural populations[J]. Frontiers in Microbiology, 2012, 3: 276.

[15] Hessen D O, Hafslund O T, Andersen T, et al. Changes in stoichiometry, cellular RNA, and alkaline phosphatase activity of *Chlamydomonas* in response to temperature and nutrients[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 18.

[16] Lee K H, Jeong H J, Lee K, et al. Effects of warming and eutrophication on coastal phytoplankton production[J]. Harmful Algae, 2019, 81: 106-118.

[17] 赵行行, 刘妍忻, 宋明, 等. 东港赤潮监控区中肋骨条藻生长的主要环境因子影响分析[J]. 环境与发展, 2018, 30(11): 13-15.

Zhao Hanghang, Liu Yanxin, Song Ming, et al. Influence of environmental factors on the growth of *Skeletonema costatum* in the Donggang red-tide-monitoring area of Liaoning[J]. Environment and Development, 2018, 30(11): 13-15.

[18] 朱根海, 许卫忆, 朱德第, 等. 长江口赤潮高发区浮游植物与水动力环境因子的分布特征[J]. 应用生态

- 学报, 2003(7): 1135-1139.
- Zhu Genhai, Xu Weiyi, Zhu Dedi, et al. Distribution of phytoplankton and water dynamical environmental factors in high red tide occurrence area of Changjiang River estuary[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2003(7): 1135-1139.
- [19] Harrison P J, Waters R E, Taylor F J R. A broad spectrum artificial sea water medium for coastal and open ocean phytoplankton[J]. Journal of Phycology, 1980, 16(1): 28-35.
- [20] Guillard R R L, Ryther J H. Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran[J]. Canadian journal of microbiology, 1962, 8(2): 229-239.
- [21] 霍文毅, 俞志明, 邹景忠, 等. 胶州湾中肋骨条藻赤潮与环境因子的关系[J]. 海洋与湖沼, 2001, 32(3): 311-318.
- Huo Wenyi, Yu Zhiming, Zou Jingzhong, et al. Outbreak of *Skeletonema costatum* red tide and its relations to environmental factors in Jiaozhou Bay[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2001, 32(3): 311-318.
- [22] 黄秀清, 蒋晓山, 王桂兰, 等. 长江口中肋骨条藻赤潮发生过程环境要素分析: 水温, 盐度, DO 和 pH 特征[J]. 海洋通报, 1994, 4: 35-40.
- Huang Xiuqing, Jiang Xiaoshan, Wang Guilan, et al. Principal environmental factors during red tide outbreak of *Skeletonema costatum* in Yangtse estuary III. Water temperature, Salinity, DO and pH[J]. Marine Science Bulletin, 1994, 4: 35-40.
- [23] Guillard R R L. Division rates[C]// Stein J R. Handbook of phycological methods: culture methods and growth treatment. Cambridge: Cambridge University Press, 1973: 289-311.
- [24] Jeffries D S, Dieken F P, Jones D E. Performance of the autoclave digestion method for total phosphorus analysis[J]. Water Research, 1979, 13(3): 275-279.
- [25] Lin X, Zhang H, Huang B, et al. Alkaline phosphatase gene sequence characteristics and transcriptional regulation by phosphate limitation in *Karenia brevis* (Dinophyceae)[J]. Harmful Algae, 2012, 17: 14-24.
- [26] Yamaguchi H, Nishijima T, Oda A, et al. Distribution and variation of alkaline phosphatase activity and phosphatase-hydrolyzable phosphorus in coastal seawaters[J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries (Japan), 2005, 70(3): 333-342.
- [27] Suzumura M, Ishikawa K, Ogawa H. Characterization of dissolved organic phosphorus in coastal seawater using ultrafiltration and phosphohydrolytic enzymes[J]. Limnology and Oceanography, 1998, 43(7): 1553-1564.
- [28] Kolowitz L C, Ingall E D, Benner R. Composition and cycling of marine organic phosphorus[J]. Limnology and Oceanography, 2001, 46(2): 309-320.
- [29] Azam F, Hodson R E. Dissolved ATP in the sea and its utilisation by marine bacteria[J]. Nature, 1977, 267(5613): 696-698.
- [30] Young C L, Ingall E D. Marine dissolved organic phosphorus composition: insights from samples recovered using combined electro dialysis/reverse osmosis[J]. Aquatic Geochemistry, 2010, 16(4): 563-574.
- [31] Huang B, Ou L, Hong H, et al. Bioavailability of dissolved organic phosphorus compounds to typical harmful dinoflagellate *Prorocentrum donghaiense* Lu[J]. Marine pollution bulletin, 2005, 51(8-12): 838-844.
- [32] 李英, 吕颂辉, 徐宁, 等. 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.
- Li Ying, Lü Songhui, Xu Ning, et al. The utilization of *Prorocentrum donghaiense* to four different types of phosphorus[J]. Ecologic science, 2005, 24(4): 314-317.
- [33] 覃仙玲, 陈波, 赖俊翔, 等. 球形棕囊藻北部湾株对不同形态磷源的利用及碱性磷酸酶特性研究[J]. 广西科学, 2018, 25(1): 80-86.
- Qin Xianling, Chen Bo, Lai Junxiang, et al. Study on the utilization of different phosphorus and alkaline phosphatase characteristics of *Phaeocystis globosa* cultivated from Beibu Gulf[J]. Guangxi Sciences, 2018, 25(1): 80-86.
- [34] 于倩, 王清, 袁泽轶, 等. 不同形态磷源对具槽帕拉藻 (*Paralia sulcata*) 生长和磷酸酶活性的影响[J]. 海洋与湖沼, 2015, 46(5): 1018-1023.
- Yu Qian, Wang Qing, Yuan Zeyi, et al. Effects of different phosphorus substrates on growth and phosphatase activity of algae *Paralis sulcata*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2015, 46(5): 1018-1023.
- [35] Wang Z, Liang Y, Kang W. Utilization of dissolved organic phosphorus by different groups of phytoplankton taxa[J]. Harmful Algae, 2011, 12: 113-118.
- [36] Annett R, Habibi H R, Hontela A. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment[J]. Journal of Applied Toxicology, 2014, 34(5): 458-479.
- [37] Dabney B L, Patiño R. Low-dose stimulation of growth of the harmful alga, *Prymnesium parvum*, by glyphosate and glyphosate-based herbicides[J]. Harmful Algae, 2018, 80: 130-139.
- [38] Ren L, Wang P, Wang C, et al. Algal growth and utilization of phosphorus studied by combined mono-culture and co-culture experiments[J]. Environmental Pollution, 2017, 220 (part A): 274-285.
- [39] Forlani G, Pavan M, Gramek M, et al. Biochemical bases for a widespread tolerance of cyanobacteria to the phosphonate herbicide glyphosate[J]. Plant and Cell Physiology, 2008, 49(3): 443-456.
- [40] Tian Y, Mingjiang Z, Peiyuan Q. Combined effects of temperature, irradiance and salinity on growth of diatom *Skele-*

- tonema costatum*[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2002, 20(3): 237-243.
- [41] Luo H, Lin X, Li L, et al. Transcriptomic and physiological analyses of the dinoflagellate *Karenia mikimotoi* reveal non-alkaline phosphatase based molecular machinery of ATP utilisation[J]. Environmental Microbiology, 2017, 19(11): 4506-4518.
- [42] Zhang C, Luo H, Huang L, et al. Molecular mechanism of glucose-6-phosphate utilization in the dinoflagellate *Karenia mikimotoi*[J]. Harmful Algae, 2017, 67: 74-84.
- [43] Yamaguchi H, Arisaka H, Otsuka N, et al. Utilization of phosphate diesters by phosphodiesterase-producing marine diatoms[J]. Journal of Plankton Research, 2014, 36(1): 281-285.
- [44] Healey F P, Hendzel L L. Fluorometric measurement of alkaline phosphatase activity in algae[J]. Freshwater Biology, 1979, 9(5): 429-439.

Effects of temperature and dissolved organic phosphorus on the growth characteristics of *Skeletonema costatum*

ZHANG Xiao-hua^{1, 2, 3}, LIU Dong-yan⁴

(1. Key Laboratory of Coastal Zone Environmental Processes and Ecological Remediation, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Department of pharmacy, Binzhou Medical University, Yantai 264003, China; 4. State Key Laboratory of Estuarine and Coastal Research, East China Normal University, Shanghai 200241, China)

Received: Feb. 25, 2020

Key words: *Skeletonema costatum*; temperature; growth; dissolved organic phosphorus; dissolved inorganic phosphorus; alkaline phosphatase

Abstract: The effects of temperature and dissolved organic phosphorus (DOP) on the growth of phytoplankton were investigated in this study. We selected *Skeletonema costatum* as the study species and used adenosine triphosphate (ATP), sodium glycerophosphate (SG-P), glucose 6-phosphate (G-6-P) that contains the C-O-P ester bond, and glyphosate (G-P) that contains the C-P bond as DOP sources to measure cell density, total dissolved phosphorus (TDP), and dissolved inorganic phosphorus (DIP) concentrations in the culture medium and alkaline phosphatase (AP) activity in algal cells under four temperature conditions (i.e., 20°C, 23°C, 26°C, and 29°C). Results showed that ATP, SG-P, and G-6-P with a C-O-P ester bond could maintain the growth of *Skeletonema costatum*, and warming could promote the growth of algal cells in each group. The maximum cell concentrations in the ATP, SG-P, and G-6-P groups reached 176.7×10^4 , 218.8×10^4 , and 178×10^4 cells/mL, respectively. Warming could also accelerate the decrease of TDP concentration in the ATP, SG-P, and G-6-P groups and the increase of DIP concentration in the ATP group. The AP activity in the algal cells of each group was low at different temperatures (<10 fmol pNP/(cell·h)). Compared with that in G-6-P with C-O-P ester bond, the algal cells in G-P with C-O-P bond were lower under the four temperature conditions with maximum cell concentration of 40.7×10^4 cells/mL. However, the AP activity in the algal cells was higher than that in the ATP, SG-P, and G-6-P groups (up to 83 fmol pNP/(cell·h)) and decreased with warming. These results showed that different types of DOPs could significantly affect the growth of *Skeletonema costatum*, among which ATP, SG-P, and G-6-P could be more effectively used by algal cells. Moreover, warming (20~29°C) was an important environmental factor that promoted the growth of algal cells under ATP, SG-P, and G-6-P conditions but did not depend on the AP activity.

(本文编辑: 康亦兼)