

光照周期、温度和起始密度对利玛原甲藻(三亚株)生长的影响

曾玲^{1,2}, 龙丽娟¹, 龙超¹

(1. 中国科学院南海海洋研究所, 中国科学院海洋生物资源可持续利用重点实验室, 广东省海洋药物重点实验室, 广东 广州 510301; 2. 湛江师范学院, 广东 湛江 524048)

摘要: 研究了光照周期、温度和起始密度 3 个因素的不同水平组合对利玛原甲藻 *Prorocentrum lima*(三亚株)的生长影响。结果显示, 光照周期、温度和起始密度均是影响利玛原甲藻生长的显著因子($F > F_{0.01}$), 影响程度为: 起始密度 > 光照周期 > 温度, 最佳搭配为温度 30℃, 光照周期 12h : 12h, 起始密度 2000cells·mL⁻¹。

关键词: 利玛原甲藻 *Prorocentrum lima*; 光照周期; 温度; 起始密度; 正交实验

中图分类号: Q178.53 文献标识码: A 文章编号: 1009-5470(2010)06-0137-06

Effect of photoperiod, temperature, and initial cell density on the growth of *Prorocentrum lima* (Sanya strain)

ZENG Ling^{1,2}, LONG Li-juan¹, LONG Chao¹

(1. LMB, LAMB, South China Sea Institute of Oceanology, CAS, Guangzhou 510301, China; 2. Zhanjiang Normal university, Zhanjiang 524048, China)

Abstract: In this study, the effect of temperature, photoperiod, and initial cell density on the growth of *P. lima* was studied using the Orthogonal Design Method. The results showed all three factors had significant effects on the growth of this dinoflagellate ($F > F_{0.01}$), ranking as: initial cell density > photoperiod > temperature. The optimum culture condition was: 30°C, 12h : 12h, and an initial cell density of 2000cells·mL⁻¹.

Key words: *Prorocentrum lima*; temperature; photoperiod; initial cell density; orthogonal design

利玛原甲藻 *Prorocentrum lima*(Dodge)(甲藻门 Pyrrophyta: 双鞭甲藻纲 Dinophyceae)是一种能产生毒素的底栖附生甲藻, 分布于热带和温带沿海水域, 是海洋底栖甲藻中的重要初级生产者^[1-5]。有关研究已经证实食用被有毒甲藻如原甲藻 *Prorocentrum* 或鳍藻 *Dinophysis* 污染的贝类会导致腹泻性中毒^[6-9]。由于鳍藻 *Dinophysis* spp.的实验室培养相对较为困难, 利玛原甲藻通常作为可产生腹泻性贝类毒素的毒藻模型, 被广泛用于研究腹泻性贝毒产生动力学的研究, 并已成为冈田酸(okadaic acid, OA), 鳍藻毒素(dinophysistoxins, DTX-1)的可靠来源^[1]。

影响微藻生长的因素是多方面的, 其中包括理化环境因子和生物因子^[10-12]。光照是影响微藻生长

的关键环境要素, 是其生命活动的主要能量来源, 光影响着光合作用产物的多少, 从而影响藻类的生长繁殖和密度; 温度作为影响藻类生长的最重要环境因素之一, 对海洋微藻的生长和发育有调节作用, 对酶的活性、营养物的吸收利用效率及细胞分裂的周期等诸多方面都存在不同程度的影响^[13]; 微藻在环境中本底生物量的高低影响着其生长和繁殖状况, 因此成为影响微藻生长的关键性因素^[14-15]。至今有不少针对这三个因素对微藻生长影响的研究报道^[14-18]。研究环境因子对利玛原甲藻生长繁殖的影响, 对开展人工培养以获取充足的原材料, 深入研究海洋底栖甲藻的生态属性以及 DSP 的产生和作用机理具有十分重要的意义。但到目前为止, 有

收稿日期: 2010-03-01; 修订日期: 2010-05-28。刘学东编辑

基金项目: 中国科学院重要方向性项目(KSCX2-YW-R-093); 海洋公益性行业科研专项经费项目(200705026)

作者简介: 曾玲(1984—), 女, 广东省茂名市人, 硕士研究生, 研究方向为海洋生物学。E-mail: karine126@126.com

通信作者: 龙丽娟。E-mail: longlj@scsio.ac.cn

关影响利玛原甲藻生长的环境因子评价资料不足^[19-26],以致其最适生长条件及种群动力学机制尚未被阐明。本文选择光照周期、温度和起始密度三因素三水平进行正交实验,探讨了这几种条件组合对利玛原甲藻(三亚株)生长的影响,以期认识和了解利玛原甲藻的生长特性,为利玛原甲藻的进一步研究提供参考。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

利玛原甲藻(三亚株)由本实验室人员从海南省三亚海域分离纯化并鉴定,保藏于中国科学院南海海洋研究所广东省海洋药物重点实验室藻种室。

1.2 正交实验

1.2.1 实验设计

根据相关参考文献及本实验室的研究基础^[22-23],选取光照周期、温度、起始密度为试验因子,每个因子选择 3 个水平进行试验,以生长速率为试验指标。正交表选用 $L_9(3^4)$ 。所选因素水平见表 1。

试验共 9 组,每组设 3 个重复。光照度 4000lx,盐度为 30,培养基采用改良的 K 培养液配方。

表 1 因素水平表

Tab. 1 Levels of the orthogonal design experiment

| 水平 | 因素 | | |
|----|----------|-----------------|-----------------------------------|
| | A: 温度/°C | B: 光照周期/(h : h) | C: 起始密度/(cells·mL ⁻¹) |
| 1 | 20 | 8 : 16 | 2000 |
| 2 | 25 | 12 : 12 | 4000 |
| 3 | 30 | 16 : 8 | 6000 |

1.2.2 藻的培养

选取指数生长期的利玛原甲藻,于无菌超净工作台接种后,置于人工气候箱中培养,每天摇藻 1 次(9:00 am),每隔 2 天取样计数。

1.2.3 生长测定

将培养瓶放在振荡器上充分摇匀后,迅速取样,加入 1%的甲醛固定,然后将藻液充分混匀,准确吸取藻液 10 μ L 于浮游植物计数框上,待细胞沉降至计数板底部后,在显微镜下计数,每个样品计数 3 次,取其平均值。绘制生长曲线。

根据 Guillard 的单细胞藻种群生长公式^[27],求出藻细胞生长率 $K(\text{division}\cdot\text{d}^{-1})$:

$$K=(3.322/t)\times\lg(N_t/N_0)$$

公式中 N_0 为藻细胞初始密度, N_t 为 t 天后藻细胞密

度, t 为培养天数。

2 结果

2.1 不同因素水平组合的生长状况

不同培养条件组合下,利玛原甲藻的生长曲线如图 1。由图 1 可见,利玛原甲藻在实验设定的所有条件下均能生长,但不同的培养条件下生长速率有很大差异(表 2)。当温度为 30、光照周期 12h : 12h、起始密度 2000cells·mL⁻¹(处理 8)时,生长速率最大(0.1712);当温度为 20、光照周期 16h : 8h、起始密度 6000cells·mL⁻¹(处理 3)时, *P. lima* 生长速率最小(0.0941)。方差分析表明组间差异显著($P<0.01$)。

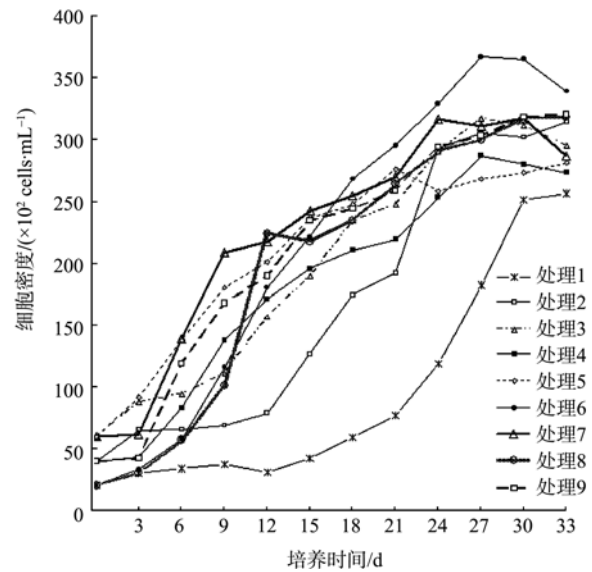


图 1 不同培养条件组合下 *P. lima* 的生长曲线

Fig. 1 Growth curves of *P. lima* under different culturing conditions

处理 1 在接种后经历了长达 15d 左右的延滞期,接着以较大的生长速率进入指数期,在第 30 天前达到稳定期,处理 1 是 9 个处理中延滞期最长、进入稳定期最晚的一组,这可能与其生长条件(低温、低起始密度、短光照)有关,可运用这一生长条件进行保种;处理 2 经历了约 12d 的延滞期才进入指数生长期;其余各组在接种后均在 1—3d 进入指数生长期。最早进入稳定期的是第 5 组,仅用了 20d 左右。第 8 组在整个生长过程中出现了两个稳定期,第 1 个稳定期较短,在第 12—15 天,第 2 个稳定期出现在第 24 天至培养结束;第 7 组和第 9 组,在生长过程中间阶段出现了较慢的生长速率,使得生长曲线在中间有个较缓的坡。总的说来第 7、8、9 组(30°C)在整个生长过程中生长速率呈现了快—慢—快的现象。

不同因素水平组合利玛原甲藻最大细胞密度如图 2 所示,其中处理 6 最大细胞密度最大,达 3.63 \times

$10^4 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$, 比最小的处理 1 和处理 5(约 $2.70 \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$)高了约 $10^4 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$, 处理 2、3、4、7 和 9 最大细胞密度基本维持在 $3.2 \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 左右, 处理 8 稍小, 约 $3.0 \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$, 经方差分析, 各组间最大细胞密度差异不显著($P > 0.05$)。不同环境条件下, 各处理组到达最大密度所需要的时间也不一样(图 3)。到达细胞最大密度需要时间最长的是处理 1, 约 32d, 最短的是处理 5, 约 21d。处理 1 到达细胞最大密度所需时间最长, 最大细胞密度却最小, 进一步体现了低温、短光照时间、低起始密度的培养条件会限制利玛原甲藻生长。对各处理组到达细胞最大密度需要的时间进行单因素方差分析, 结果表明各组间差异显著($P < 0.05$)。

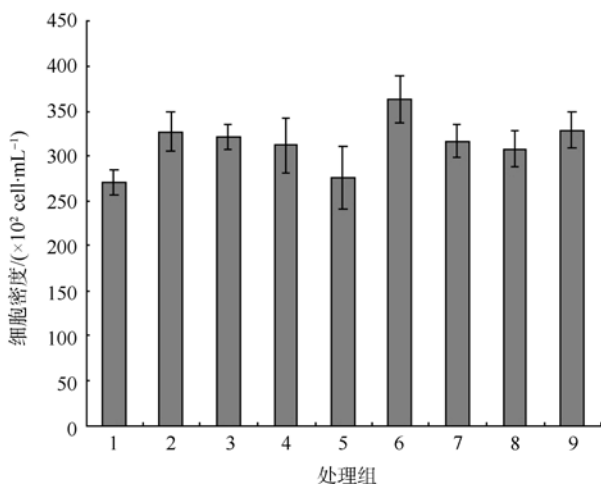


图 2 不同处理组的最大细胞密度
Fig. 2 Maximum cell density of treatment

表 2 不同因素水平组合对利玛原甲藻生长的正交试验结果
Tab. 2 Results of the orthogonal test on the growth of *P. lima*

| 实验号 | 因素 | | | 空列 | 生长速率 k | | | 平均生长速率 K |
|----------|------------------------|--------------|--|--------|----------|--------|--------|------------|
| | 温度/ $^{\circ}\text{C}$ | 光照周期/(h : h) | 起始密度/($\text{cells} \cdot \text{mL}^{-1}$) | | No.1 | No.2 | No.3 | |
| 1 | 1 | 8 : 16 | 1 | 1 | 0.1212 | 0.1301 | 0.1227 | 0.1247 |
| 2 | 1 | 12 : 12 | 2 | 2 | 0.1174 | 0.1240 | 0.1238 | 0.1217 |
| 3 | 1 | 16 : 8 | 3 | 3 | 0.1004 | 0.0886 | 0.0934 | 0.0941 |
| 4 | 2 | 8 : 16 | 2 | 3 | 0.1127 | 0.1135 | 0.1092 | 0.1118 |
| 5 | 2 | 12 : 12 | 3 | 1 | 0.1014 | 0.1098 | 0.0992 | 0.1035 |
| 6 | 2 | 16 : 8 | 1 | 2 | 0.1737 | 0.1797 | 0.1694 | 0.1709 |
| 7 | 3 | 8 : 16 | 3 | 2 | 0.1036 | 0.1001 | 0.1015 | 0.1017 |
| 8 | 3 | 12 : 12 | 1 | 3 | 0.1681 | 0.1796 | 0.1659 | 0.1712 |
| 9 | 3 | 16 : 8 | 2 | 1 | 0.1102 | 0.1202 | 0.1298 | 0.1201 |
| 各因素水平总和 | T_1 | 0.3405 | 0.3382 | 0.4668 | 0.3483 | | | |
| | T_2 | 0.3862 | 0.3964 | 0.3536 | 0.3943 | | | |
| | T_3 | 0.3930 | 0.3851 | 0.3688 | 0.3771 | | | |
| 各因素水平平均值 | x_1 | 0.1135 | 0.1127 | 0.1556 | 0.1161 | | | |
| | x_2 | 0.1287 | 0.1321 | 0.1179 | 0.1314 | | | |
| | x_3 | 0.1310 | 0.1284 | 0.1229 | 0.1257 | | | |
| 极差 | R | 0.0175 | 0.0194 | 0.0377 | 0.0153 | | | |

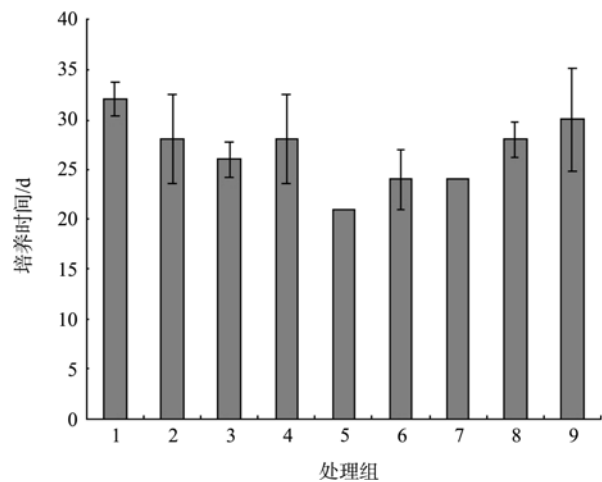


图 3 到达最大细胞密度所需的时间
Fig. 3 Culture time of arriving when the maximum cell density become maximum

2.2 不同因素水平组合对利玛原甲藻生长影响正交实验结果的直观分析

由表 2 可见, 在各因素综合平均值 x_1 、 x_2 、 x_3 中, 温度 x_3 、光照周期 x_2 、起始密度 x_1 最大, 即在本实验范围内利玛原甲藻最佳生长条件为温度 30°C , 光照周期 12h : 12h, 起始密度 $2000 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。实验考察的 3 个因素中, 极差 R 值的大小依次是 $R_{\text{起始密度}} > R_{\text{光照周期}} > R_{\text{温度}}$, 表明影响利玛原甲藻生长最重要的因素是起始密度, 其次是光照周期, 温度对其生长的影响最小。

2.3 不同因素水平组合对利玛原甲藻生长影响正交实验结果的方差分析

运用 SPSS13.0 软件对实验结果进行方差分析^[28]。分析结果表明(表 3), 不同的处理间有极显著

表 3 *P. lima* 生长速率的方差分析Tab. 3 Test of between-subject effects of the growth rate of *P. lima*

| 变异来源 | 离差平方和 | 自由度 | 均方差 | F 值 | F_{α} |
|---------|-----------|-----|-----------|----------|-----------------------|
| 处理 | 1.9E-002 | 6 | 3.16E-003 | 34.787** | $F_{0.01(6,20)}=3.87$ |
| A: 温度 | 1.72E-003 | 2 | 8.61E-004 | 9.484** | $F_{0.01(2,20)}=5.85$ |
| B: 光照周期 | 1.99E-003 | 2 | 9.96E-004 | 10.974** | $F_{0.01(6,20)}=5.85$ |
| C: 起始密度 | 1.5E-002 | 2 | 7.61E-003 | 83.902** | $F_{0.01(6,20)}=5.85$ |
| 误差 | 1.82E-003 | 20 | 9.08E-005 | | |
| 总变异 | 3.95E-002 | 26 | 1.52E-003 | | |

注: **代表有极显著影响($F > F_{0.01}$)。

差异($F > F_{0.01}$); 光照周期、温度和起始密度这 3 个因素的不同水平组合对利玛原甲藻细胞生长速率影响极显著($F > F_{0.01}$), 但影响程度不一样, 起始密度 > 光照周期 > 温度, 与直观分析结果一致。

由表 4 分析得知, 温度的 3 个水平中, A_1 与 A_2 、 A_3 存在显著差异($P < 0.05$); 光照周期的 3 个水平 B_1 与 B_2 、 B_3 也差异显著($P < 0.05$); 起始密度的 C_1 、 C_2 、

C_3 之间都存在显著差异($P < 0.05$), 说明实验设置的水平对实验结果影响显著, 水平设置合理。由单因素统计量表得知(表 5), 温度中 A_3 的平均值最高, 光照周期的是 B_2 , 起始密度的是 C_1 , 表明在本实验条件下, $A_3B_2C_1$ 组合是利玛原甲藻的最佳生长条件, 即温度为 30, 光照周期为 12h : 12h, 起始密度为 2000cells·mL⁻¹, 与直观分析结果相一致。

表 4 因素水平的配对比较

Tab. 4 Pairwise comparisons of average of level

| 因素水平 I | 因素水平 J | A | | B | | C | |
|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|
| | | I-J | 显著性 P | I-J | 显著性 P | I-J | 显著性 P |
| 1 | 2 | -0.16* | 0.02 | -0.19* | 0.00 | 0.39* | 0.00 |
| | 3 | -0.17* | 0.01 | -0.17* | 0.01 | 0.57* | 0.00 |
| 2 | 1 | 0.16* | 0.02 | 0.19* | 0.00 | -0.39* | 0.00 |
| | 3 | -0.01 | 8.00 | 0.03 | 5.63 | 0.18* | 0.01 |
| 3 | 1 | 0.17* | 0.01 | 0.17* | 0.01 | -0.57* | 0.00 |
| | 2 | 0.01 | 8.00 | -0.03 | 5.63 | -0.18* | 0.01 |

注: *表示在 0.05 的显著水平下均值差有显著性差异。

表 5 生长速率的单因素统计量表

Tab. 5 Estimated marginal means of grow rate

| 水平 | 各水平平均值 | | | 标准误差 |
|----|--------|------|------|------|
| | A | B | C | |
| 1 | 1.14 | 1.13 | 1.57 | 0.03 |
| 2 | 1.30 | 1.32 | 1.18 | 0.03 |
| 3 | 1.31 | 1.29 | 1.00 | 0.03 |

3 讨论

产毒的利玛原甲藻在世界范围内广泛分布, 对已分离的藻株进行研究发现, 同种甲藻不同地域藻株、甚至同一地区的不同藻株间的生长特性及毒素成分等都会存在一定差异^[21], 这种差异可能缘自遗传差异, 也可能源于藻生理状态或环境条件上的差异。各种环境因子如温度、光照、盐度、营养盐等对利玛原甲藻生长、细胞分裂速度和毒素的产生有一定影响^[24-26, 29]。吴军等^[23]对利玛原甲藻的生长特

性研究表明盐度对其增长影响明显, 最佳生长盐度在 30‰左右, 此外, K 培养液比 K/2、K/4、K/8 等低营养盐培养液更适于 *P. lima* 的生长繁殖。李丽璇等^[22]对利玛原甲藻(CCMP2579 株)的研究表明, 培养液中 N、P 浓度较低时可促进利玛原甲藻的生长, 而正常的 f/2 培养液, 即高浓度的 N、P 培养条件则对利玛原甲藻的生长构成胁迫。

环境温度的变化导致藻细胞新陈代谢的化学反应速率的变化, 进而影响种群的增殖。Morton 等^[26]研究的加勒比海利玛原甲藻株低于 20 不生长;

Jackson 等^[25]研究的新苏格兰利玛原甲藻株在 5 时几乎不生长, 在 25 条件下的生长速率比 20 的高; 本研究的利玛原甲藻三亚株在 20、25、30 三组温度条件下有着不同的生长状态, 20 时延滞期一般较长, 而在 25 和 30 接种后能迅速进入指数生长期。上述研究表明不同的环境温度严重影响种群的生长情况, 温度过低会抑制种群增殖, 温度适宜会促进种群的生长。

光照时间的长短决定着藻类光合作用的效率, 对藻类的生长速率亦起着至关重要的作用, 在一定的光照时间内, 生长率与光照时间成正比, 超过饱和光期生长率不再增加甚至下降。据在有关铜绿微囊藻的研究中, 发现随光照周期的延长其最大比增长率和最大细胞数也在增加。9h 光照组的最大比增长率和最大细胞数均为最大, 当光照周期继续增加时微囊藻的生长受到抑制^[16]。长光照并不利于藻细胞的正常生长, 这可能是长光照影响了细胞内有机物质的合成和代谢, 破坏了细胞正常的分裂模式, 导致细胞分裂速度加快, 指数生长期缩短。微藻有其最适宜的光照周期, 其原因可能是藻类的生长需要一个适当的光暗交替, 以利于光合过程的光反应和暗反应的匹配以及其光合产物的形成和体内的物质代谢的正常进行^[29-30]。

起始密度也是影响微藻迅速繁殖的关键因素之一。微藻在繁殖过程中遵循着阿利氏规律(Allee's law), 即每个物种都有适合自己生长和繁殖的最佳种群密度, 种群密度过高或过低对种群的发展都是不利的。李锋等^[15]研究表明, 较高接种密度($23 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$)时, 亚心形扁藻 *Platymonas subcordiformis* 密度始终较高且较早进入平稳期; 低密度接种($5 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$)的比生长速率最大; 而中

等接种密度($12 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$)的比生长速率最稳定, 培养时的比生长速率较大, 且比较稳定。蔡恒江等^[14]研究发现, 不同的起始密度对赤潮异弯藻 *Heterosigma akashiwo*、塔玛亚历山大藻 *Alexandrium tamarense* 和中肋骨条藻 *Skeletonema costatum* 生长过程中进入指数生长期和静止期的时间、所达到的种群最大密度均有影响, 随着起始密度的提高, 3 种藻进入指数生长期和静止期的时间缩短。朱艺锋等的^[18]研究结果也体现了不同起始密度对三角褐指藻 *Phaeodactylum tricornutum* 生长率的影响。

本试验证明, 温度、光照周期和起始密度对利玛原甲藻生长影响是极显著的, 但影响程度不一样, 起始密度>光照周期>温度。值得注意的是, 平均生长速率最大的实验组 6($K = 0.1709$, 最大细胞密度 $3.63 \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$)和实验组 8($K = 0.1712$, 最大细胞密度 $3.0 \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$), 起始密度均为本试验最低值 $2000 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$, 与吴军等^[23]有关不同盐度和 K 培养液系列对利玛原甲藻(三亚株)生长影响研究结果一致, 其起始密度为约 $200 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$, 平均生长速率 K 达 0.4073, 表明起始密度对利玛原甲藻生长繁殖的影响极为显著, 在一定范围内起始密度越低, 生长速率越大。本实验获得的最大细胞密度为 $3.57 \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$, 高于李丽璇等^[22]的 $2.1 \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ (美国株, CCMP2579)和吴军等^[23]的 $1 \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ (三亚株), 但低于 Nascimentoa 等^[19]的 $4.83 \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ (英国株, 45d)和已有报道的实验室培养最高密度 $6 \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。因此, 有必要进一步探讨影响其生长及产毒量的环境因子, 开展高密度培养并充分提高单细胞毒素产率, 使高密度高毒素产率培养成为可能。

参考文献

- [1] BRAVO I, FERNANDEZ ML, RAMILO I, MARTINEZ A. Toxin composition of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* isolated from different locations along the Galician coast (NW Spain)[J]. *Toxicon*, 2001, 39: 1537-1545.
- [2] FAUST M A. Morphology of ciguatera-causing *Prorocentrum lima* (Pyrrophyta) from widely differing sites[J]. *Journal of Phycology*, 1991, 27: 642-648.
- [3] CARLSON RD, TINDALL D R. Distribution and periodicity of toxic dinoflagellates in the Virgin Islands[M] //ANDERSON D M, WHITE A W, BADEN D G. *Toxic Dinoflagellates*. New York: Elsevier, 1985, 171-176.
- [4] MARANDA L, CORWIN S, HARGRAVES P E. *Prorocentrum lima* (Dinophyceae) in northeastern USA coastal waters I: Abundance and distribution [J]. *Harmful Algae*, 2007(6): 623-631.
- [5] MARANDA L, CORWIN S, DOVER S. *Prorocentrum lima* (Dinophyceae) in northeastern USA coastal waters II: Toxin load in the epibiota and in shellfish [J]. *Harmful Algae*, 2007(6): 632-641.
- [6] YASUMORO T, OSHIMA M Y, YAMAGUEHI M. Occurrence of a new type of shellfish Poisoning in the Tohoku District [J]. *Bull JaPan Soc Sei Fish*, 1978, 44:1249-1255.
- [7] QUILLIAM M A, HARDSTAFF W R, ISHIDA N, et al. Production of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins by

- Prorocentrum lima* in culture and development of analytical methods[M]//YASUMOTO T, OSHIMA Y, FUKUYO Y. Harmful and Toxic Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 1996, 12–16.
- [8] MURAKAMI Y, OSHIMA Y, YASUMOTO T. Identification of okadaic acid as a toxic component of a marine dinoflagellate *Prorocentrum lima*[J]. Bulletin of the Japanese Society of Fisheries Science, 1982, 48: 69–72.
- [9] ESCOFFIERA N, GAUDINA J, MEZHOUD K. Toxicity to medaka fish embryo development of okadaic acid and crude extracts of *Prorocentrum* dinoflagellates [J]. Toxicon 2007(49): 1182–1192.
- [10] WCLDMAN J C, MAMM R. Temperature influenced variations in speciation and the chemical composition of marine phytoplankton in outdoor mass cultures[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 1980, 46: 29–40.
- [11] LAWRENCE J E, CEMBELLA A D. An immunolabeling technique for the detection of diarrhetic shellfish toxins in individual dinoflagellate cells[J]. Phycologia, 1999, 38(1): 60–65.
- [12] 陈明耀, 生物饵料培养[M].北京:中国农业出版社, 1995, 42–92.
- [13] WCLDMAN J C, MAMM R. Temperature influenced variations in speciation and the chemical composition of marine phytoplankton in outdoor mass cultures[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1980, 46: 29–40.
- [14] 蔡恒江, 唐学玺, 张培玉, 等. 不同起始密度对 3 种赤潮微藻种间竞争的影响[J]. 生态学报, 2005, 25(6): 1331–1336.
- [15] 李锋, 葛长宇, 方建光, 等. 不同温度和接种密度下亚心形扁藻增殖的初步研究[J]. 海洋水产研究. 2007, 28(6): 61–66.
- [16] 沈英嘉, 陈德辉. 不同光照周期对铜绿微囊藻和绿色微囊藻生长的影响[J]. 湖泊科学, 2004, 16(3): 285–288.
- [17] 曾艳芝, 黄翔鹤. 温度、光照对小环藻生长和叶绿素 a 量的影响[J]. 广东海洋大学学报, 2007, 27(6): 36–40.
- [18] 朱艺峰, 郭小强. 不同氮磷硅含量和接种密度对三角褐指藻生长的影响[J]. 中国水产科学. 2001, 7(4): 47–51.
- [19] NASCIMENTO S M, PURDIEA D A, MORRIS S. Morphology, toxin composition and pigment content of *Prorocentrum lima* strains isolated from a coastal lagoon in southern UK [J]. Toxicon, 2005, (45): 633–649.
- [20] SOUTO M L, FERNA'NDEZA J J, NORTE M. Influence of amino acids on okadaic acid production [J]. Toxicon 2001, (39): 659–664.
- [21] Heredia-Tapia, Arredondo-Vega B O, Nunez-Vazquez E J. Isolation of *Prorocentrum lima*(Syn. *Exuviaella lima*) and diarrhetic shellfish poisoning (DSP) risk assessment in the Gulf of California, Mexico [J]. Toxicon, 2002, (40): 1121–1127.
- [22] 李丽璇, 利玛原甲藻产毒特征与化感作用的初步研究[D]. 广州:暨南大学硕士学位论文, 2006.
- [23] 吴军, 林永水, 刘宁宁. *Prorocentrum lima* 的生长特性研究[C]//中国科学院南海海洋研究所南海实验站编. 热带海洋研究(五). 北京:海洋出版社, 1997: 9–16.
- [24] MELACHLAN J L, MAN J C, CONLON K 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.
- [25] JACKSON A E, MARR J C, MCLACHLAN J L. The production of diarrhetic shellfish toxins by an isolate of *Prorocentrum lima* from Nova Scotia, Canada[M]//SMAYDA T J, SHIMIZU Y. Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B V, 1993, 513–518.
- [26] MORTON S L, NORRIS D R. Role of temperature salinity and light on the seasonality of *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge[M]//GRANTLI E, SUNDSTROM B, EDLER L, et al. Toxic Marine Phytoplankton. Amsterdam: Elsevier Scientific Publ Co, 1990, 201–205.
- [27] GUILLARD R R I. Culture methods and growth measurements[M]//STEIN J R. Handbook of phycological methods. London: Cambridge University Press, 1973, 289–312.
- [28] 邓振伟, 于萍, 陈玲. SPSS 软件在正交试验设计、结果分析中的应用[J]. 电脑学习, 2009, (5): 15–17.
- [29] NORTON S L, NORRIS D R, BOMBER J W. Effect of temperature, salinity and light intensity on the growth and seasonality of toxic dinoflagellates associated with ciguatera[J]. J Exp Mar Biol Ecol, 1992, 157(1): 79–90.
- [30] 李乐农, 郭宝江. 光照周期对螺旋藻生长的影响[J]. 海洋科学, 1998, 3: 3–4.