

文章编号: 1000- 0615(2002)06- 0510- 09

网箱养殖对东湖沉积物有机质含量以及磷的酶促水解与吸附行为的影响

张 敏, 李建秋, 周易勇

(中国科学院水生生物研究所, 湖北 武汉 430072)

摘要: 东湖养殖罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 的网箱下沉积物中有机质和可酶解磷 (PHP) 含量以及碱性磷酸酶活性 (APA) 均显示增高, 间隙水中的 PHP 较低, 而 APA 与正磷酸盐的浓度均高, 这种现象在垂直与水平两个尺度上均有体现, 故由有机物的富集到正磷酸盐的剧增可能受控于酶学机制。Langmuir 单分子等温度吸附模型的分析结果表明网箱下表层沉积物的最大吸附量明显较高, 而吸附强度明显降低, 此亦为正磷酸盐相应剧增的另一重要原因。不同深度间隙水中 APA 的动力学行为表现出明显的季节性。

关键词: 网箱养殖; 沉积物; 有机质; 可酶解磷; 碱性磷酸酶; 磷吸附

中图分类号: S963.21 文献标识码: A

Influence of cage culture on the contents of organic matter and enzymatic hydrolysis as well as adsorption behavior of phosphorus in sediments of Lake Donghu

ZHANG Min, LI Jian-qiu, ZHOU Yi-yong

(Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

Abstract: The sediments immediately under the cage once rearing *Oreochromis niloticus* showed significantly higher contents of organic matter (OM) and phosphatase hydrolyzable phosphorus (PHP), and alkaline phosphatase activity (APA) as well. In interstitial water, both APA and orthophosphate (O-P) concentrations were significantly higher, while PHP was significantly lower, at vertical and horizontal scales. These results suggested that the enhancement of O-P release from sediment, resulted from the enrichment of OM, might be controlled by an enzymatical mechanism. The Langmuir isotherm approach revealed that, in interstitial water under the cage, sorption capacity was significantly higher, while the corresponding sorption strength was significantly lower in the upper layers, which lends an additional explanation to the enhancement of O-P release in the sediments as affected by the cage culture. A remarkably seasonal variation in vertical patterns of kinetics of APA was observed in interstitial water.

Key words: cage culture; sediment; organic matter; phosphatase hydrolyzable phosphorus; alkaline phosphatase;

收稿日期: 2001-12-20

基金项目: 国家自然科学基金(20177033, 39670149, 39170165)、农业部水产增养殖生态生理重点开放实验基金、淡水生态与生物技术国家重点实验室基金、中国科学院东湖湖泊生态系统试验站基金及中国科学院“青年科学家小组”基金联合资助项目。

作者简介: 张 敏(1978-), 女, 湖北荆州人, 硕士研究生, 主要从事水环境酶学的研究。E-mail: zlm0407@hotmail.com

通讯作者: 周易勇(1956-), 男, 湖南长沙人, 研究员, 主要从事生态酶学的研究。Tel: 027- 87647709, E-mail: zhouyy@ihb.ac.cn

P sorption

水产养殖可产生大量的有机废物^[1],如在相对密集网箱养殖方式中,残饵和鱼类粪便与鱼生产量的比值约为0.6:1,而鱼饵中磷含量则达0.7%~1.6%(以干重为基础)^[2]。直接位于养殖网箱下与接近网箱的沉积物往往处于极端厌氧状态,且为有机性的黑色层面所覆盖^[3]。网箱下沉积物释放的正磷酸盐比对照值高出10倍^[2]。由此可引出下述问题:有机质的输入与正磷酸盐的输出之间是否具有某种内在联系?而问题的焦点当为有机质的可分解性与分解能力。碱性磷酸酶在有机质的分解矿化过程中具有关键作用。接受渔场污水的河流磷酸酶的活性显著增加,这种效应可绵延700m^[4],乃至13km^[5]。更有甚者,升高的幅度足以彻底抵消受影响区域原本具有的酶活性^[5]。再者,鱼类的养殖亦能影响沉积物对磷的吸附行为,Boyd和Munsiri^[6]以来自泰国14个省份且在土壤型和理化形状方面均极具代表性的20种样品为对象,系统研究了鱼塘沉积物吸附磷的能力,结果表明样品的吸附力愈强,可被水提取的磷含量则愈低。上述事实充分说明,网箱养殖引起的有机废物的富集终将导致沉积物中生物可用性磷的剧增,其间应包括有机质的分解与磷酸盐的吸附、释放等诸多关键环节,而对此作集中而有序的探讨无疑将有助于深入揭示贯穿于受养殖废物污染的沉积物磷循环过程的内在机制。为此,本文系统讨论了东湖网箱养殖对沉积物有机质含量、碱性磷酸酶活性及其底物(可酶解磷)浓度以及正磷酸盐吸附行为的影响。

1 材料与方法

1.1 实验场所

富营养化的东湖位于武汉市东郊(30°33'N, 114°23'E),面积27.9km²,平均水深2.21m。近二、三十年来,因湖区周边经济的高速发展,各种污染物质大量排入,东湖水质每况愈下。密集型网箱养殖始于20世纪80年代中期,终止于90年代末期,共设有15个网箱,其上部高出水面0.7m,湖中实际的网箱规格为5m×2.5m×2.5m,箱底接近湖底,每个网箱中间设食物平台(2m×1m)^[7],每年向每个网箱中放养1500尾罗非鱼(*Oreochromis niloticus*),饲养90d左右,网箱养殖区及采样点详见图1。

1.2 样品采集

用彼得森采泥器采集表层沉积物,用内径为3.5cm的不锈钢管状采泥器采集不同深度(0~6cm,

6~12cm,12~18cm,18~24cm,24~30cm,30~36cm)的沉积物。同一采样点取12个沉积物柱芯,随机地分为三组,各组位于相同层面的柱芯充分混匀成为代表各个层面的三组重复样品,并据此对所测数据进行统计分析。

1.3 样品制备

间隙水:循离心法(3000r·min⁻¹)制备^[8]。

沉积物干土样:过2mm筛的沉积物室温风干至恒重,研磨,过80目筛。

1.4 样品分析

沉积物中的有机质:用重铬酸钾容量法测定^[9]。

正磷酸盐(⊕P):用Murphy和Riley^[10]建立的方法测定。



图1 东湖采样点分布图,阴影部分为网箱系统,1、2、3、4点位于网箱之下,位点5、6、7、8作为网箱之外的对照

Fig. 1 Map of Lake Donghu, showing the location of the cage system, illustrated as shadows of picture.

Site 1, 2, 3 and 4 were immediately under the cage while the other sites were outside it as controls

沉积物中的可酶解磷(PHP): 100mg 干样悬浮于 100mL 双蒸水($5\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaN}_3$ 作抑菌剂), 搅拌 24h, 悬浮液过 GF/C 玻璃纤维滤液膜, 所得为第 1 次滤液(I); 将滤膜截获的沉积物以同样的方法再县浮、搅拌, 过滤, 得到第 2 次滤液(II)。滤液 I 和 II 分别于暗处以 1mL 碱性磷酸酶液(AP_{ase} , Sigma, EC 3. 1. 3. 1) 水解(30°C , 24h)。1mL 酶液的组成为: [AP_{ase} ($50\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) + $1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Tris}$ + $0.01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{MgCl}_2$, pH 8. 2]。用水解前后 o- P 的增量表示滤液 I 和 II 中 PHP 的浓度, 并据折算相应沉积物中 PHP 的含量^[11]。

水样的 PHP: 上述酶试剂与过滤(0. 45 μm)湖水以 1: 9 的比例混合, 在 37°C 下保温 24h, 用保温前后水样 o- P 的差值表示 PHP 的浓度^[12]。

碱性磷酸酶活性(APA)及其动力学参数: 用对- 硝基苯磷酸二钠盐(pNPP, Merck 公司出品) 为底物(最终浓度为 $0.3\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 以过 0. 45 μm 孔径滤膜的间隙水为样品^[13], 循分光光度法测定 APA^[14]。另在 0. 01 至 $1.8\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的范围内取 8 种不同的底物浓度按上述方法测定水样的 APA, 据 Michaelis-Menten 方程的 Lineweaver-Burk 转换式测算酶的最大反应速度 V_{max} 和米氏常数 K_{m} 值。

o- P 的吸附: 在 2. 5g 沉积物中加入 50mL 标准 P 溶液($0.02\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{KCl}$ 配制) 和适量(3 滴) 三氯甲烷, 于 $25\pm 1^\circ\text{C}$ 振荡 24h(转速 $200\cdot\text{min}^{-1}$)。标准 P 溶液的初始浓度分别为 0. 78、1. 55、2. 33、3. 10、4. 65、6. 20、12. 4、18. 6、24. 8、31. $0\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。根据 Langmuir 单分子等温吸附方程测定最大吸附容量 X_{m} 和吸附强度 K ^[15]。

所有的测试均设三次重复。

2 结果

2.1 沉积物中有机质的垂直分布

网箱下有机质的含量均明显较高, 其中第 2 层(6~ 12cm)与较深层次(18~ 36cm)的数值与相应对照值之间的差异均达极显著水平($P > 0. 01$) (图 2)。

2.2 沉积物中 PHP 的垂直分布

网箱下 PHP 的含量均明显较高(图 3)。

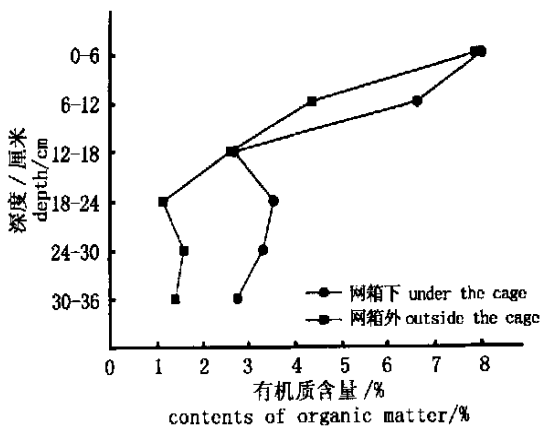


图 2 东湖养殖网箱下与网箱外沉积物有机质含量的垂直分布(采样时间: 2000 年 3 月 7 日)

Fig. 2 Vertical distribution of contents of organic matter in the sediments immediately under the cage and outside it (Samples were taken on March 7, 2000)

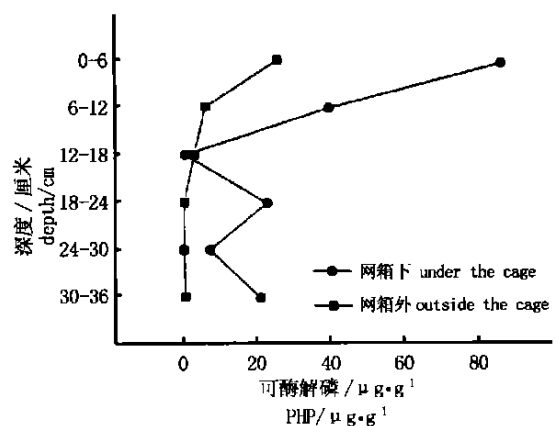


图 3 东湖养殖网箱下与网箱外沉积物可酶解磷含量的垂直分布(采样时间: 2000 年 3 月 7 日)

Fig. 3 Vertical distribution of PHP in the sediments immediately under the cage and outside it (Samples were taken on March 7, 2000)

2.3 沉积物 APA、间隙水 APA 及磷浓度的垂直分布

2000年3月6日的实验结果表明网箱下沉物 APA、间隙水 APA 及 o-P 浓度均明显较高 ($P < 0.01$) (图4)。次日(3月7日)采样测得的相应参数亦有类似的变化趋势, 此外网箱下间隙水中 PHP 浓度亦明显较高 ($P < 0.05$) (图5)。

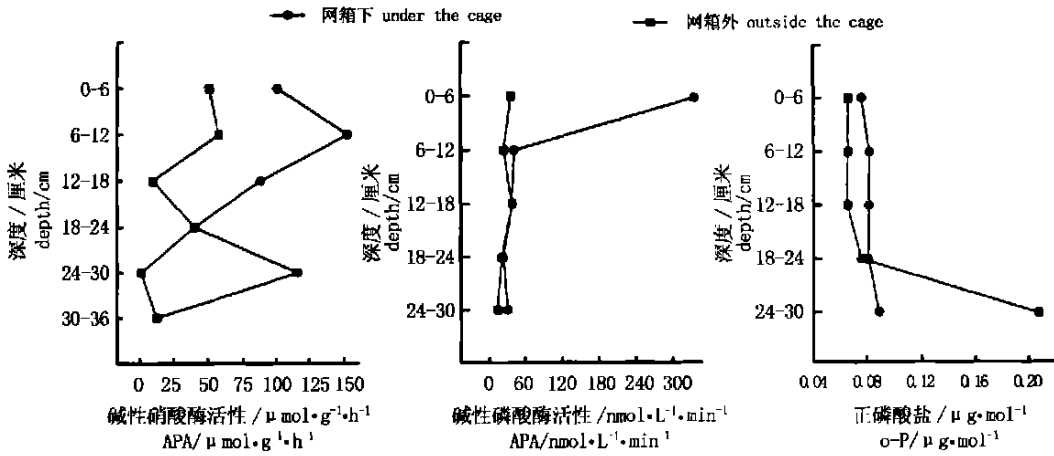


图4 东湖养殖网箱下与网箱外沉积物 APA、间隙水 APA 与 o-P 浓度的垂直分布 (采样时间: 2000年3月6日)

Fig. 4 Vertical distribution of APA in sediments and APA as well as o-P concentrations in interstitial water immediately under the cage and outside it (Samples were taken on March 6, 2000)

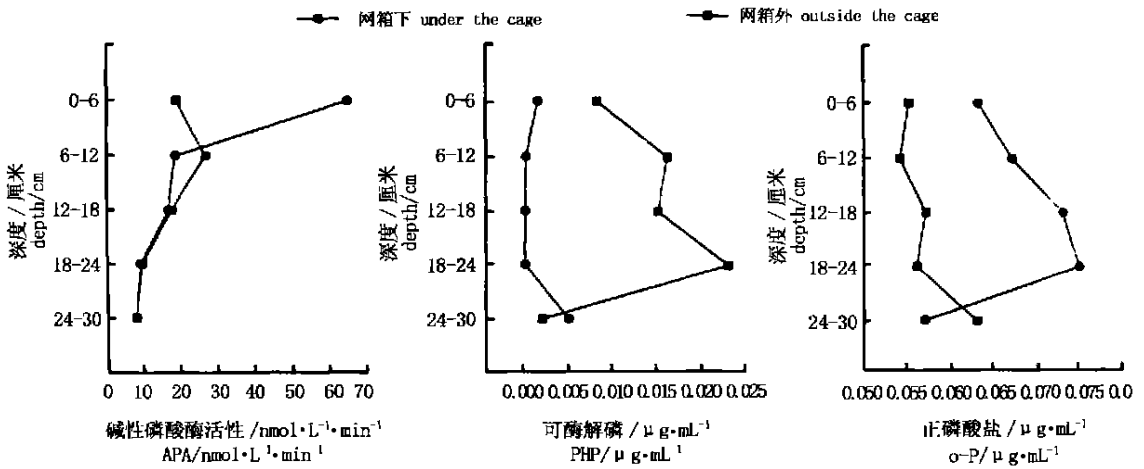


图5 东湖养殖网箱下与网箱外间隙水 APA、PHP 与 o-P 浓度的垂直分布(采样时间: 2000年3月7日)

Fig. 5 Vertical distribution of APA, PHP and o-P concentrations in interstitial water immediately under the cage and outside it (Samples were taken on March 7, 2000)

2.4 表层间隙水 APA 与磷浓度的水平分布

2000年3月22日与3月24日的实验结果表明网箱下各采样点间隙水中 PHP 的浓度均低, o-P 浓度明显较高 ($P < 0.05$) (表1)。而 APA 则显著增大 ($P < 0.01$) (表1)。

表1 东湖网箱下与网箱外表层间隙水的 PHP、o-P 及 APA 的水平分布

(采样日期: 2000年3月22日与3月24日)

Tab. 1 Spatial variations in PHP, o-P concentrations and APA in surficial interstitial water immediately under the cage and outside it in Lake Donghu (Samples were take on March 22 and 24, 2000)

采样点 sampling site	3月22日		3月24日		
	可酶解磷 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) HHP	正磷酸盐 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) o-P	可酶解磷 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) PHP	正磷酸盐 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) o-P	碱性磷酸酶活性 ($\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) APA
1	0	0.039 ± 0.005	0	0.019 ± 0.003	50.58 ± 5.44
2	0	0.015 ± 0.001	0.004 ± 0.001	0.014 ± 0.001	38.31 ± 0.21
3	0	0.013 ± 0.004	0	0.018 ± 0.002	56.59 ± 0.62
4	0	0.005 ± 0.000	0	0.009 ± 0.000	51.17 ± 0.59
5	0.010 ± 0.001	0.002 ± 0.002	0.014 ± 0.001	0.003 ± 0.002	25.29 ± 0.62
6	0	0.006 ± 0.002	0.010 ± 0.002	0.008 ± 0.001	20.41 ± 2.09
7	0.006 ± 0.004	0.006 ± 0.001	0.002 ± 0.001	0.015 ± 0.005	36.53 ± 0.21
8	0.005 ± 0.002	0.004 ± 0.001	0	0.017 ± 0.004	17.60 ± 0.62

2.5 沉积物中最大吸附量 X_m 与吸附强度 K 的垂直分布

在有机物大量堆积的网箱下沉积物中, X_m 值较大, 而从总体上看, 表层沉积物的 K 值明显较小 ($P < 0.01$) (图6)。

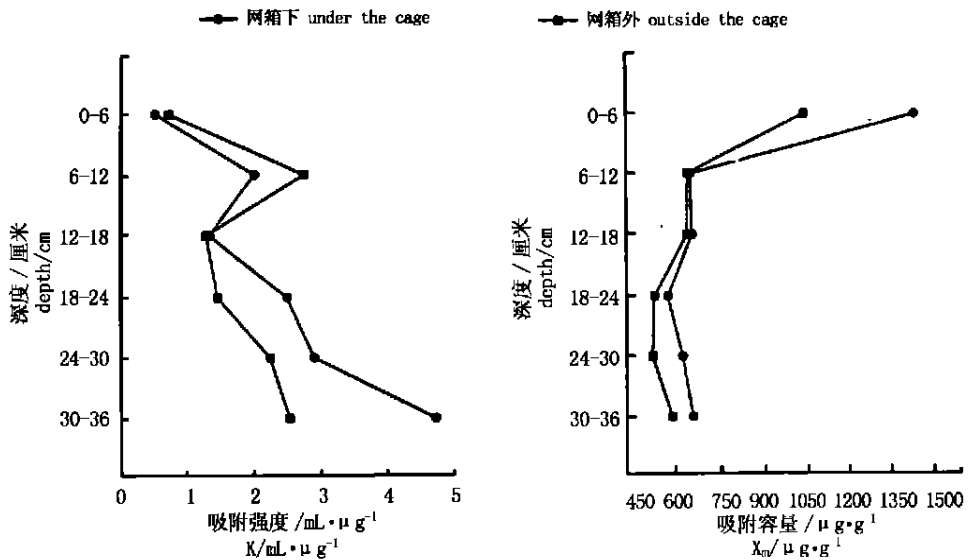


图6 东湖养殖网箱下与网箱外沉积物中磷吸附参数的垂直分布(采样时间: 2000年4月27日)

Fig. 6 Vertical distribution of parameters of P sorption in the sediments immediately under the cage and outside it (Samples were taken on April 27, 2000)

2.6 间隙水 APA 的动力学参数的季节变化

4-6月网箱下间隙水 APA 的 K_m 值或与对照值无明显差异, 或在统计意义上超出(详见表2), 这种升高在不同层次均有表现, 而7-8月网箱下与网箱外表层($< 12\text{cm}$)间隙水的 K_m 无明显差异, 而网箱外第3层的相应值明显较低。

3 讨论

3.1 沉积物中有机质的富集

养殖网箱下沉积物中有机质的含量明显较高(图2),这是鱼类养殖最富特征的环境效应之一。Delgado 等^[17]以芽苗形态、密度、生物量、根茎生长以及营养与溶解糖浓度为指标,系统研究了鱼类养殖对海藻群落的影响,他们提出沉积物有机质的过量是造成植物持续衰减的主要原因。与农业种植土壤相比,鱼塘沉积物往往含有较多的有机质^[18]。本文给出的结果可以从下述方面进一步说明有机质富集的环境效应。

表2 东湖网箱下与网箱外不同深度间隙水中 APA 动力学参数的季节变化

Tab.2 Seasonal variation in kinetic parameters of APA in interstitial water with different depth immediately under the cage and outside it in Lake Donghu

采样时间 (2000) sampling time	深度 (cm) depth	最大反应速度(V_{mzx})			米氏常数(K_m)		
		网箱下 under the cage	网箱外 outside the cage	显著性检验 (P) statistical test	网箱下 under the cage	网箱外 outside the cage	显著性检验 (P) statistical test
4-27	0~6	34.96±1.78	79.68±0.83	<0.01	9.84±0.40	18.13±1.78	<0.01
	6~12	28.67±0.91	58.57±0.84	<0.01	9.25±0.41	14.13±4.71	<0.01
	12~18	38.62±1.09	37.44±1.96		7.56±0.23	7.00±1.12	
5-24	0~6	25.10±1.18	39.66±0.71	<0.01	13.05±3.52	12.39±0.66	
	6~12	32.46±0.34	40.78±1.70	<0.01	8.45±0.54	11.46±1.15	<0.05
	12~18	51.67±0.89	38.09±1.21	<0.01	9.80±0.74	10.79±1.28	
6-20	0~6	27.01±0.72	43.40±0.37	<0.01	7.49±0.23	17.87±0.78	<0.01
	6~12	22.60±0.42	25.31±0.71	<0.01	7.04±1.00	9.29±0.47	<0.05
	12~18	28.86±0.51	30.74±0.62	<0.05	8.41±0.54	8.02±0.48	
7-21	0~6	22.13±1.67	21.96±1.52		9.49±6.04	9.35±0.44	
	6~12	17.82±0.35	24.48±0.26	<0.01	8.07±0.20	9.31±0.53	<0.05
	12~18	27.21±0.18	34.02±0.70	<0.01	8.93±0.72	6.42±0.74	<0.05
8-29	0~6	51.44±4.38	42.39±1.14	<0.05	8.76±1.73	9.17±0.11	
	6~12	36.01±0.81	42.52±0.83	<0.01	8.05±2.15	9.33±1.69	
	12~18	46.81±0.16	51.84±0.96	<0.01	7.34±0.00	6.21±0.40	<0.05

3.1.1 影响深度

泰国东北部以罗非鱼为主的网箱养殖业亦有极为显著的加重有机负荷的作用。颗粒态有机质的净沉积速率可达每年5cm^[19],而图2说明有机质的富集效应至少可深及36cm。因此,养殖有机废物的污染远非局限于表层。

3.1.2 有机态磷的增加

有机物的富集将伴随潜在生物有效态磷(PHP)的增加(图3)。这一结果似有来源、形态与过程等三方面的含义。首先是来源,James 等^[20]发现,向土壤中施入农家肥后,表层有机磷增加,且在停施2~3年后骤减。显然土壤中有机磷的含量与有机肥的多寡直接相关。Carman 等^[21]用核磁共振的分析结果表明,作为 APA 天然底物的磷酸单酯以及磷酸二酯普遍存在于湖泊海洋沉积物中。在湖泊沉积物的总有机磷库中,PHP 的含量可达20%^[22]或4%~23%^[23]。Klotz^[24]发现美国溪流沉积物中的 PHP 因其有机组分的介导而具有迥异于正磷酸盐吸附解离特征的蓄积释放机制。上述事实证实了湖泊沉积物中 PHP 库的存在,而图2和图3给出的结果暗示网箱养殖导入的有机废物可能是沉积物 PHP 的重要来源之一;其次是形态,有机物(农家肥)的施入可使土壤中有机磷的含量升高^[25],或因其含量的改变而使土壤磷库发生再分配^[26]。有机磷可大致分为3种形态,即肌醇磷酸盐(含量最高形式,占50%)、磷脂

(7%)和核酸(小于3%)^[27]。Hannapel等^[28,29]认为有机废物的介入能增加磷在土壤中的运动性。在用于处理食品工业废水的钙质土中,可水解的有机组分为土壤提取液中磷含量的30%~50%,甚至在深抵150cm的层面亦可检出高浓度的可水解有机磷^[30]。根据上述事实可以推论,网箱养殖引起的有机废物能增加有机磷浓度,改变有机磷分布模式,而增加的有机磷中应当包含PHP。作为一种具有特殊生态功能的形态,PHP可与上述例证中的磷脂和可水解有机磷相互比照,且更具直接的可酶解性;再次是过程,网箱下部沉积物APA、间隙水APA以及作为酶解促水解产物的o-P又相应地显著升高($P < 0.01$) (图4)。因此,对碱性磷酸酶及其底物的考察与实证在有机物的富集与正磷酸盐的剧增之间插入了若干可能的关键环节,从而大体勾勒了一条可能的酶促转化途径。这种途径可由分别表现在水平垂直尺度上的间隙水中APA与PHP的负相关关系得到进一步佐证,PHP与o-P的此消彼长意味着APA催化PHP水解,进而产生高浓度的o-P,在湖水中亦表现出类似的负相关关系^[31,32]。对于沉积物APA的刺激可从酶的直接介入与有机碳的间接诱导这两个方面来加以解释。有机废物自身包含碱性磷酸酶,如罗非鱼粪能表现出极高的APA^[33]。Garcia等^[34]亦从牛羊粪肥中分离出具不同分子量的有机物质,并在其中检测出磷酸酶活性。堆置的马与鸡厩肥亦含高活性的碱性磷酸酶^[35]。另一方面,网箱养殖(图2)与其它动物有机废物均能提高环境中有机碳的含量^[34],而碳的激增恰能通过促进微生物活性来提高APA^[36]。

3.2 沉积物中o-P的吸附行为

网箱养殖极大地改变了沉积物中o-P的吸附行为,即 X_m 值明显增大而 K 值明显降低(图6)。网箱下沉积物 X_m 值的增大可能与因有机质含量增高(图2)而引起的粒径变化有关,即微细颗粒增加,故吸附表面增大。事实上沉积物有机质含量高则微细颗粒较多^[37]。Madeyski和Bednarczyk^[38]系统比较了波兰水库和4个鱼塘沉积物的理化性状,结果表明,与水库相比,鱼塘沉积物中有机质含量较高而颗粒较细。位于美国亚拉巴马州具52年养殖史的鱼塘沉积物亦有类似的高有机质含量,且表现出特异性的表面积与离子交换容量^[39]。吸附强度的减弱可从下述3个方面加以分析。首先,有机废物的矿化将产生有机酸。Bolan等^[40]发现,将多发生于枯叶层与禽粪中的典型的有机酸加入土壤之后,磷的吸附能力大为降低;Fox等^[41]的动力学研究结果表明,森林土壤中具代表性的有机酸可通过配基的交换反应将磷从灰土中解吸出来。Hue报道,3种低分子量的有机酸可减弱酸化土壤吸附的能力^[42]。Ohno和Crannell^[43]比较了动物粪肥和植物有机残基中有机酸抑制效应的差异,利用紫外吸收与荧光分析技术,他们发现源于动物粪肥的有机酸分子量较大,故难与土壤中的铝发生反应,而铝正是吸附磷的主要因素,因此磷的吸附行为未受到明显影响;相反,低分子量的植物残体有机酸则明显地抑制磷的吸附。这一结果进一步揭示了有机酸的作用机制。其次,假设有有机物中矿化产生的磷能通过络合作用与土壤中磷的吸附位点发生反应,从而减弱进一步吸附磷的能力^[44,45]。他们向5种不同的酸性土壤中施入农家肥或苜蓿,致使土壤中NaOH提取的无机磷(NaOH-P_i)的量增加,而这一组份恰与磷的吸附位点对应。因此,原有的吸附区域已容纳了大量由施入的有机物产生的磷,从而阻碍了磷的继续吸附^[25]。再次,吸附能力的减少与Fe的含量有关,因为不同土壤中磷的吸附行为对有机物的反应不尽相同,未受影响的土壤中Fe的含量明显较高^[46]。总之,有机废物的介入增加了沉积物的吸附容量却使吸附强度大为降低。因此,吸附能力的减弱应为沉积物o-P的释放量受网箱养殖影响而剧增的另一重要原因。

3.3 APA的季节变化

表2所示,不同层次的较高的 V_{max} 值可能出现在远离网箱的对照沉积物中,这种胞外APA受养鱼污染的影响而降低的现象在河流附石生境中亦体现^[47]。此外,作为酶对底物亲和力的量度,相应的 K_m 值亦表现出明显的季节波动,这一结果可为东湖表层水中APA的 K_m 的季节变化^[48]提供一种可能的解释,同时,产生这种变化的原因可从两个方面加以说明,即网箱下与网箱外沉积物中有机废物的蓄积量与堆置时间的差异以及微生物的活动。马和鸡厩肥中酸性和碱性磷酸酶的 K_m 值不尽相同,这种差异说明其中作为酶底物的磷酸单酯的含量亦不尽相同,因此,酶的发生部位与功能将受制于厩肥的堆置

史^[35]。另一方面,堆置的有机废物分解时表现出的底物亲和力的差异反映了行使分解功能的微生物种群差异^[49],而瑞典埃尔肯(Erken)湖沉积物中,细菌的生物量和磷的形态因季节而异^[50]。纵然如此,在春夏之季(4-6月),网箱下间隙水中的APA持续表现出明显较高的对底物的亲和力(K_m 值明显较小),故仍不乏较强的催化效率,而7-8月网箱下与网箱外表层间隙水APA的 K_m 值又无明显差异,故从整体上看,网箱养殖将以不同的动力学方式促进沉积物有机磷的酶促分解,而相应的季节转换机制尚待深入探讨。

参考文献:

- [1] Beveridge M C M. Cage Aquaculture Fishing News[M]. U. K.: Book Ltd Famham, 1987. 352.
- [2] Kelly L A. Dissolved reactive phosphorus release from sediments beneath a freshwater cage aquaculture development in west Scotland[J]. Hydrobiologia, 1992, 235/236: 569- 572.
- [3] Karakassis I, Hatziyanni E, Tsapakis M, et al. Benthic recovery following cessation of fish farming: a series of successes and catastrophes[J]. Marine Ecology Progress Series, 1999, 184: 205- 218.
- [4] Carr O J, Goulder R. Fish farm effluents in rivers-Effects on bacterial populations and alkaline phosphatase activity [J]. Water Res, 1990, 24: 631- 638.
- [5] Brown S E, Goulder R. Extracellular-enzyme activity in trout- farm effluents and a recipient river [J]. Aquac Res, 1996, 27: 895- 901.
- [6] Boyd C E, Munsiri P. Phosphorus adsorption capacity and availability of added phosphorus in soils from aquaculture areas in Thailand[J]. J World Aquac Soc, 1996, 27(2): 160- 167.
- [7] Shouqi X. Supplementary feeding for cage cultured *Tilapia*: A bioenergetic modelling approach[D]. Wuhan: Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, 1997. 113. [解缓启. 网箱养殖罗非鱼补充营养的能量学模型估算[D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 1997年, 113.]
- [8] Degobis D, Homme-Maslaowska E, Orio A A, et al. The Role of alkaline phosphatase in the sediment of lagoon nutrient regeneration [J]. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 1986, 22: 425- 437.
- [9] Kalembsa S J, Jenkinson D S. A comparative study of titrimetric and gravimetric methods for the determination of organic carbon in soil [J]. J Sci Food Agric, 1973, 24(9): 1085- 1095.
- [10] Murphy J R. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural water [J]. Anal Chim Acta, 1962, 27: 31- 36.
- [11] Feuillade M, Dorioz J. Enzymatic release of phosphate in sediments of various origins [J]. Wat Res, 1992, 26: 1195- 1201.
- [12] Cotner J B, Heath R T. Potential phosphate release from phosphomonoesters by acid phosphatase in a bog lake [J]. Arch Hydrobiol, 1988, 111: 329 - 338.
- [13] Francko D A, Heath R T. Functionally distinct classed of complex phosphorus compounds in lake water [J]. Limnol Oceanogr, 1979, 24: 463- 473.
- [14] Berman T. Alkaline phosphatases and phosphorus availability in Lake Kinneret [J]. Limnol Oceanogr, 1970, 15: 663- 674.
- [15] Holford I C R, Wedderburn R W M, Mattingly G E G. A Langmuir two-surface equation as a model for phosphate adsorption by soils[J]. J Soil Sci, 1974, 25: 242- 255.
- [16] Delgado O, Ruiz J, Perez M, et al. Effects of fish farming on seagrass (*Posidonia oceanica*) in a Mediterranean bay: seagrass decline after organic loading cessation [J]. Oceanologica Acta, 1999, 22(1): 109- 117.
- [17] Das S K, Jana B B. Pond fertilization through inorganic sources: an overview. Indian Journal of Fisheries [J]. Ernakulam, 1996, 43(2): 137- 155.
- [18] Riise J C, Roos N. Benthic metabolism and the effects of bioturbation in a fertilised polyculture fish pond in Northeast Thailand [J]. Aquac, 1997, 150(1- 2): 45- 62.
- [19] James D W, Kotuby-Amacher J, Anderson G L, et al. Phosphorus mobility in calcareous soils under heavy manuring [J]. J Environ Qual, 1996, 25: 770- 775.
- [20] Carman R, Edlund G, Damberg C. Distribution of organic and inorganic phosphorus compounds in marine and lacustrine sediments: a ³¹P NMR study [J]. Chemical Geology, 2000, 163: 101- 114.
- [21] Hino S. Fluctuation of algal alkaline phosphatase activity and possible mechanisms of hydrolysis of dissolved organic phosphorus in Lake Barato [J]. Hydrobiologia, 1988. 157: 77- 84.
- [22] Mauricette F, Dorioz J M. Enzymatic release of phosphate in sediments of various origins [J]. Water Res, 1992, 26: 1195- 1201.
- [23] Klotz R L. Cycling of phosphatase hydrolyzable phosphorus in streams [J]. Fish Aquat Sci, 1991, 48: 1460- 1467.
- [24] Sharply A N, Stewart S A, Mathers A C. Forms of phosphorus in soil receiving cattle feedlot waste [J]. J Environ Qual, 1984, 13: 211- 215.

- [25] Iyamuremye F, Dick R P, Baham J. Organic amendments and phosphorus dynamics II. Distribution of soil phosphorus fractions [J]. *Soil Science*, 1996, 161: 436– 443.
- [26] Dalal R C. Soil organic phosphorus [J]. *Adv Agron*, 1977, 29: 83– 117.
- [27] Hannapel R J, Fuller W H, Bosma S, et al. Phosphorus movement in a calcareous soil I. Predominance of organic forms of phosphorus in phosphorus movement [J]. *Soil Sci*, 1964, 97: 350– 357.
- [28] Hannapel R J, Fuller W H, Fox R H. Phosphorus movement in calcareous soil II. Soil microbial activity and organic phosphorus movement [J]. *Soil Sci*, 1964, 97: 421– 427.
- [29] Robbins C W, Simth J H. Phosphorus movement in calcareous soil irrigated with waste water from potato processing plants [J]. *J Environ Qual*, 1977, 6: 222– 225.
- [30] Heath R T, Cooke G D. The significance of alkaline phosphatase in a eutrophic lake [J]. *Verh Internat Verein Limnol*, 1975, 19: 959– 965.
- [31] Stevens R J, Parr M. The significance of alkaline phosphatase activity in Lough Neagh [J]. *Freshwat Biol*, 1977, 7: 351– 355.
- [32] Zhou Y Y, Li J Q, Zhang M. Vertical variations in kinetics of alkaline phosphatase and P species in sediments of a shallow Chinese eutrophic lake (Lake Donghu) [J]. *Hydrobiologia*, 2001, 450: 91– 98.
- [33] Garcia C, Ceccanti B, Costa F, et al. Phosphatase and glucosidase activities in humic substrates from animal wastes [J]. *Bioresource Technology*, 1995, 53: 79– 87.
- [34] Vuoninen A H. Phosphatases in horse and chicken manure compost [J]. *Compost Science & Utilization*, 1999, 7: 47– 54.
- [35] Kim K Y, Jordan D, McDonald D A. Enterobacter agglomerans, phosphate solubilizing bacteria, and microbial activity in soil: effect of carbon sources [J]. *Soil Biochem*, 1998, 30: 995– 1003.
- [36] Cizkova H, Strand J A, Lukavska J. Factors associated with reed decline in a eutrophic fishpond, Rozmberk (south Bohemia, Czech Republic) [J]. *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica*, 1996, 31(1): 73– 84.
- [37] Madeyski M, Bednarczyk T. Physical, chemical and rheological characteristics of bottom sediments in reservoirs and fish ponds, Poland [J]. *IAHS Publ*, 2000, 263: 237– 241.
- [38] Munsini P, Boyd C E, Hajek B F. Physical and chemical characteristics of bottom soil profiles in ponds at Auburn, Alabama, USA and a proposed system for describing pond soil horizons [J]. *J World Aquacult Soc*, 1995, 26(4): 346– 377.
- [39] Bolan N S, Naidu R, Mahimairaja S, et al. Influence of low- molecular- weight organic acids on the solubilization of phosphates [J]. *Abiol Fertil Soils*, 1994, 18: 311– 319.
- [40] Fox T R, Comerford N B, McFee W W. Phosphorus and aluminum release from a spodic horizon mediated by organic acids [J]. *Soil Soc Am J*, 1990, 54: 1763– 1767.
- [41] Hue N V. Effects of organic acids/ anions on P sorption and phytoavailability in soils with different mineralogies [J]. *Soil Sci*, 1991, 152: 463– 471.
- [42] Ohno T, Grannell B S. Green and animal manure- derived dissolved organic matter effects on phosphorus sorption [J]. *J Environ Qual*, 1996, 25: 1137– 1143.
- [43] Iyamuremye F, Dick P, Baham J. Organic amendments and phosphorus dynamics I. Phosphorus chemistry and sorption [J]. *Soil Sci*, 1996, 161: 436– 443.
- [44] Reddy K R, Overcash M R, Khalet R, et al. Phosphorus sorption desorption of two soils utilized for disposal of animal wastes [J]. *J Environ Qual*, 1980, 9: 86– 92.
- [45] Holford I C R, Hind C, Lawrie R. Effects of animal effluents on the phosphorus sorption characteristics of soils [J]. *Aust J Soil Res*, 1997, 35: 365– 373.
- [46] Brown S E, Goulter R. Change in riverine epilithic extracellular enzyme activity in response to fish farm effluent [J]. *Lett Appl Microbiol*, 1999, 29(4): 385– 388.
- [47] Zhou Y Y. Seasonal variation in kinetic parameters of alkaline phosphatase activity in a shallow Chinese freshwater lake (Donghu Lake) [J]. *Water Res*, 1997, 31: 1322– 1325.
- [48] Tate III L T. *Soil Organic Matter: Biological and Ecological Effects* [M]. New York: John Wiley & Sons, 1987.
- [49] Goedkoop W, Pettersson K. Seasonal changes in sediment phosphorus forms in relation to sedimentation and benthic bacterial biomass in Lake Erken [J]. *Hydrobiologia*, 2000, 431(1): 41– 50.