

文章编号: 1674-5566(2011)02-0211-06

## 浒苔与球等鞭金藻相互抑制的实验验证

张建恒<sup>1,2</sup>, 霍元子<sup>1,2</sup>, 王阳阳<sup>1,2</sup>, 贾睿<sup>1</sup>, 朱沛<sup>1</sup>, 胡翔<sup>3</sup>, 杨建强<sup>3</sup>,  
房建孟<sup>3</sup>, 何培民<sup>1,2</sup>

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 海洋科学研究院海洋生态环境与修复研究所, 上海 201306; 3. 国家海洋局 北海分局, 山东 青岛 266033)

**摘要:** 研究了实验室条件下漂浮绿潮海藻浒苔 (*Ulva prolifera*) 与微藻球等鞭金藻 (*Isochrysis galbana*) 之间的相互抑制作用, 并对作用机制进行了初步探讨。结果表明, 在浒苔和球等鞭金藻初接种量分别为 1 gFW/L 和  $1 \times 10^4$  cells/mL 的共培养系统中, 实验初始阶段 (前 3 d)  $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{PO}_4^{3-}$  浓度显著高于浒苔和球等鞭金藻各单培养组, 说明共培养系统中浒苔和球等鞭金藻彼此之间产生了显著抑制作用, 其中浒苔对球等鞭金藻抑制率为 96.62%, 球等鞭金藻对浒苔的抑制率为 19.67%, 从而导致对  $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{PO}_4^{3-}$  吸收速率的降低; 从第 4 天到实验结束, 共培养体系中  $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{PO}_4^{3-}$  浓度逐渐升高, 镜检也显示浒苔和球等鞭金藻细胞发生了断裂、肿胀和死亡现象, 而单培养组中  $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{PO}_4^{3-}$  浓度持续下降, 说明共培养系统中由于浒苔和球等鞭金藻的死亡而向培养液中释放了营养盐。本研究表明在营养盐浓度和浒苔生物量相对较低的情况下, 浒苔和球等鞭金藻彼此之间存在化感作用。

**研究亮点:** 比较单、共培养系统藻体生长速率, 发现漂浮绿潮海藻浒苔与球等鞭金藻之间存在相互抑制作用, 其中浒苔对球等鞭金藻抑制率是球等鞭金藻对浒苔抑制率的约 5 倍; 比较单、共培养系统  $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{PO}_4^{3-}$  浓度变化及镜检细胞, 说明浒苔和球等鞭金藻之间存在化感作用。

**关键词:** 绿潮; 浒苔; 赤潮微藻; 克生效应

**中图分类号:** Q 143; Q 178; X 171  
**文献标识码:** A

大型海洋绿藻异常增殖的现象, 被称为“绿潮”<sup>[1]</sup>。自 20 世纪 80 年代以来, 在世界上许多近海、海湾和河口地区, 绿潮已成为一类频发的生态现象<sup>[2-4]</sup>, 且受影响的国家和海区还在不断增加<sup>[1]</sup>, 绿潮已经成为一个严重的世界性生态问题。2008 年, 我国黄海海域爆发的绿潮灾害就已严重影响了青岛奥帆赛的顺利进行。另一方面, 大型绿藻大规模生长可以吸收过量营养盐和一些毒素, 承担着重要“反硝化反应器”作用<sup>[5]</sup>, 并且也可通过化感机制改变海洋生态系统结构和演替顺序<sup>[6]</sup>。

已有研究表明, 在营养盐非限制条件下, 高生物量江蓠属 (*Gracilaria*) 和石莼属 (*Ulva*) 对赤潮藻具有显著的抑制效应<sup>[7-8]</sup>; 而在营养盐限制条件下, 大型海藻可通过营养竞争抑制赤潮藻生长<sup>[9-10]</sup>。但关于漂浮绿藻浒苔对微藻的抑制效应的研究较少, 特别是在营养盐限制条件下, 低生物量浒苔与微藻之间克生效应研究未见报道。

浒苔 (*Ulva prolifera*) 为一种形成绿潮的大型海藻<sup>[11-13]</sup>。已有研究表明, 在温度 25 °C 和光照 140  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  的条件下, 浒苔最大日生长率可以达到 78.9%<sup>[14]</sup>, 并且浒苔也是我国黄海绿

收稿日期: 2010-09-11 修回日期: 2010-10-29

基金项目: 国家海洋局绿潮专项 (LC-03-01); 国家自然科学基金 (30371101); 上海市浦江人才计划项目 (05PJ14086); 上海市水生生物学重点学科建设项目 (S30701); 上海高校选拔培养优秀青年教师科研专项基金 (ssc08002; ssc09001); 上海海洋大学博士启动基金 (B-8201-08-0285)

作者简介: 张建恒 (1987-), 男, 硕士研究生, 专业方向为海洋生物学。E-mail: andyheng@163.com

通讯作者: 何培民, Tel: 021-61900467, E-mail: pmhe@shou.edu.cn

潮重要构成种<sup>[15]</sup>。本文在较低营养盐浓度下,研究了漂浮绿潮藻浒苔与球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)之间相互抑制作用,为探讨我国绿潮爆发对海洋生态系统的影响及绿潮防治方面提供参考资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 藻种和培养条件

浒苔于2009年5月采自江苏如东海域。采集后用消毒海水仔细地清洗,以去除泥污和附生生物,经消毒处理后培养于VSE培养液中。球等鞭金藻购自中国科学院海洋研究所藻种库,培养于f/2培养液中。以上藻种均培养于温度为20℃,盐度30,光照强度为60 μmol/(m<sup>2</sup>·s),光照周期为12L:12D条件下。每天定时摇动微藻培养瓶两次,以防止附壁生长。

### 1.2 球等鞭金藻生长曲线绘制

将球等鞭金藻接种于200 mL经f/2营养盐加富的100 mL培养基中,初始密度为1 × 10<sup>4</sup> cells/mL,实验设置4个重复。每天定时摇动培养瓶两次,以防止微藻附壁生长。每个培养瓶采样1 mL,用Lugol's试剂固定,并用血球计数板在Olympus光学显微镜下计数。然后在每个培养瓶中加入1 mL含有100 mL培养液所有f/2成分的营养液以避免营养耗尽。实验进行了23 d,根据藻类细胞计数结果绘制生长曲线。

球等鞭金藻的生长速度根据冈市友利公式计算: $\mu = K'/\log 2$   
式中: $\mu$ 表示群生长速度, $K' = (\log N_t - \log N_0)/t$ , $N_0$ 和 $N_t$ 分别为单位水体藻类细胞的起始数量和经 $t$ (d)后的细胞数量(cells/mL)。

### 1.3 实验设计

实验采用浒苔和球等鞭金藻共存的培养系统。实验设浒苔单培养组、球等鞭金藻单培养组和共培养组,每组设置3个重复。培养液用KNO<sub>3</sub>和KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>溶液调节N、P浓度分别至4.2 mg/L和1.2 mg/L。实验在盛有800 mL培养液的1 L三角烧瓶中进行。浒苔起始密度设置为1 gFW/L,处于指数生长期的球等鞭金藻的初始密度为1 × 10<sup>4</sup> cells/mL。

每日定时计数微藻细胞密度,同时测定培养液中NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>浓度。实验结束时,用滤纸吸干浒苔藻体表面的水分,用感量为10<sup>-4</sup> g电子天

平称量鲜重。微藻细胞在Olympus光学显微镜下,用血球计数板计数。NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>浓度用SKALAR流动分析仪测定。实验结束后对浒苔和球等鞭金藻进行显微观察,记录藻体形态变化。

### 1.4 数据处理

数据用方差分析(ANOVA)及Duncan多重比较进行处理,以 $P < 0.05$ 作为差异显著水平,所得数据均以平均值 ± 标准差表示。

## 2 结果

### 2.1 球等鞭金藻生长曲线

由图1可知,球等鞭金藻在培养第12~13 d后达到对数生长期,对数生长期持续时间为5~6 d。

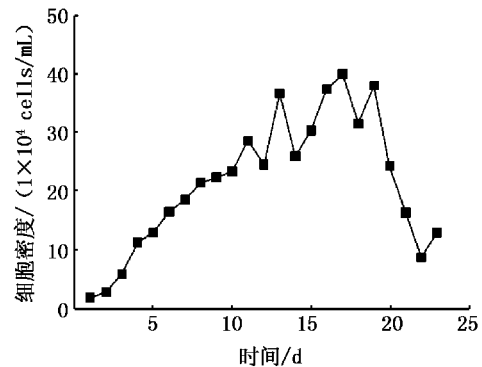


图1 球等鞭金藻生长曲线

Fig. 1 Growth curve of *Isochrysis galbana*

### 2.2 浒苔对球等鞭金藻生长的抑制作用

图2为单培养组和共培养组中球等鞭金藻生长速率。根据冈市友利公式求得单培养组球等鞭金藻生长速率为0.509/d;共培养组球等鞭金藻细胞密度从第2天开始显著低于单培养组,

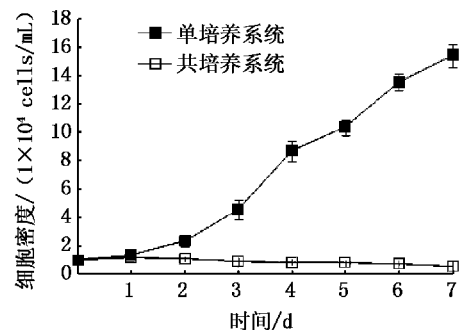


图2 单培养和共培养系统中球等鞭金藻细胞密度变化

Fig. 2 Cell density changes of *Isochrysis galbana* in the mono-cultured and the co-cultured systems

至第7天实验结束时细胞密度比初始时减少了48%,根据冈市友利公式求得其死亡速度为0.154/d。由此可见,共培养组中球等鞭金藻细胞密度持续下降,是因为引入浒苔抑制了球等鞭金藻生长而造成的,其对球等鞭金藻的抑制率为96.62%。

### 2.3 球等鞭金藻对浒苔的抑制作用

单培养组中的浒苔由起始的1.0 g鲜重生长到1.18 g,平均日生长率为2.1%;共培养组中的浒苔至实验结束时的重量为0.986 g,呈现负增长。结合图4发现,共培养组中浒苔发生了断裂和死亡。因此,球等鞭金藻的引入对浒苔的生长也产生抑制作用,其抑制率为19.67%。

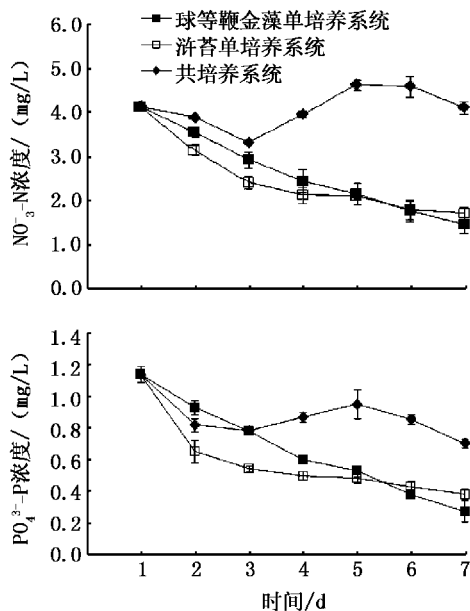


图3 球等鞭金藻与浒苔单培养和共培养系统中NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N和PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P浓度的变化

Fig. 3 Concentration of NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N and PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P in the mono-cultured *Isochrysis galbana*, *Ulva prolifera* and in the co-cultured systems

### 2.4 单培养组和共培养组中营养盐浓度变化

浒苔单培养组、球等鞭金藻单培养组和共培养组NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>浓度随时间的变化曲线如图3所示。实验前3天,所有实验组中的NO<sub>3</sub><sup>-</sup>浓度显著下降,球等鞭金藻和浒苔单培养组中NO<sub>3</sub><sup>-</sup>浓度显著低于共培养组,而浒苔单培养组中NO<sub>3</sub><sup>-</sup>浓度又显著低于球等鞭金藻单培养组( $P < 0.01$ )。从第4天开始至实验结束,共培养组中的NO<sub>3</sub><sup>-</sup>浓度又持续上升。而单培养组中,随着

球等鞭金藻细胞密度的上升,NO<sub>3</sub><sup>-</sup>浓度持续下降而与浒苔单培养组差异不显著( $P > 0.05$ )。

各实验组中,PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>浓度变化与NO<sub>3</sub><sup>-</sup>浓度变化趋势相近。共培养组中PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>浓度从第4d开始缓慢上升。浒苔单培养组中PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>浓度显著低于球等鞭金藻单培养组,从第5天开始,二者浓度无显著差异( $P > 0.05$ )。

### 2.5 藻体形态变化

共培养组中球等鞭金藻部分细胞受到浒苔抑制后,藻体形态发生变化,正常的藻细胞失去活动力,部分破裂,最后死亡。而浒苔也受到球等鞭金藻的抑制,藻体断裂发黄,部分断裂的藻体死亡(图4)。

## 3 讨论

化感作用是水域生态系统中一种普遍的自然现象,包括高等植物之间、高等植物和微生物之间相互促进或相互抑制的作用<sup>[16]</sup>。JIN和DONG<sup>[7]</sup>研究证实孔石莼(*Ulva pertusa*)通过向环境中释放化感物质抑制赤潮异弯藻(*Heterosigma akashiwo*)和亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)的生长。王兰刚等<sup>[17]</sup>研究表明条浒苔(*Ulva clathrata*)对三角褐指藻(*Phaeodactylum tricorutum*)也具有显著的抑制作用。以上研究均是在实验室内排除了营养、光照强度以及细菌微生物作用的研究结果,且引入的大型海藻要有较高的生物量。但在营养限制条件下,对大型海藻与微藻之间的化感作用研究较少,原因是营养竞争产生的影响可能会掩盖化感作用的表征。在本实验研究的条件下,研究结果表明在营养盐限制和引入浒苔生物量为1 gFW/L的条件下,浒苔与球等鞭金藻彼此之间均表现出了显著的抑制效应。本实验单培养组中球等鞭金藻的生长速率低于图1中所示的球等鞭金藻的生长速率,可能是因为球等鞭金藻的诱导期较长,当球等鞭金藻由原来的1/2培养液接种至N、P浓度不同的新培养液中,需要一个适应阶段所致。

植物之间的互相影响是多种作用机制耦合的结果,资源竞争是最重要机制之一<sup>[18]</sup>。龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)与东海原甲藻(*Prorocentrum donghaiensis*)共培养时,龙须菜对营养盐的快速吸收利用,使得共培养体系中营养盐迅速降低,最终导致东海原甲藻消亡<sup>[9]</sup>。张善东

等<sup>[10]</sup>研究还表明,当龙须菜(*G. lemaneiformis*)和锥状斯氏藻(*Scrippsiella trochoidea*)的接种密度分别为0.2 g/L和 $3.0 \times 10^3$  cells/mL时,单独培养组锥状斯氏藻胞内 $\text{NO}_3^-$ 含量是共培养组的1.5倍,说明龙须菜能够通过竞争性吸收环境中的 $\text{NO}_3^-$ 来降低锥状斯氏藻胞内 $\text{NO}_3^-$ 的储存含量,从而有效抑制其生长。在本实验条件下,在前3天,共培养组中 $\text{NO}_3^-$ 含量显著高于浒苔和球等鞭金藻单培养组,是因为共培养系统中彼此之间克生效应降低了浒苔和球等鞭金藻对 $\text{NO}_3^-$ 的吸收,而随着浒苔和球等鞭金藻发生断裂、涨破和死亡,逐渐向培养液中释放营养盐,因而从第4

天开始,介质中的 $\text{NO}_3^-$ 逐渐升高。共培养体系中 $\text{PO}_4^{3-}$ 浓度的变化趋势与 $\text{NO}_3^-$ 的变化趋势相同。而球等鞭金藻单培养组中的 $\text{NO}_3^-$ 和 $\text{PO}_4^{3-}$ 浓度在试验的前4天显著低于浒苔单培养组,而随着细胞密度的升高,对培养液中的营养盐吸收加快,因而营养盐浓度与浒苔单培养组相近,无显著差别。在本实验条件下,并未出现如江蓠属(*Gracilaria*)大型海藻在营养盐限制条件下,可通过营养竞争抑制赤潮微藻的生长<sup>[9-10]</sup>,而是通过化感作用对彼此都产生了抑制效应。

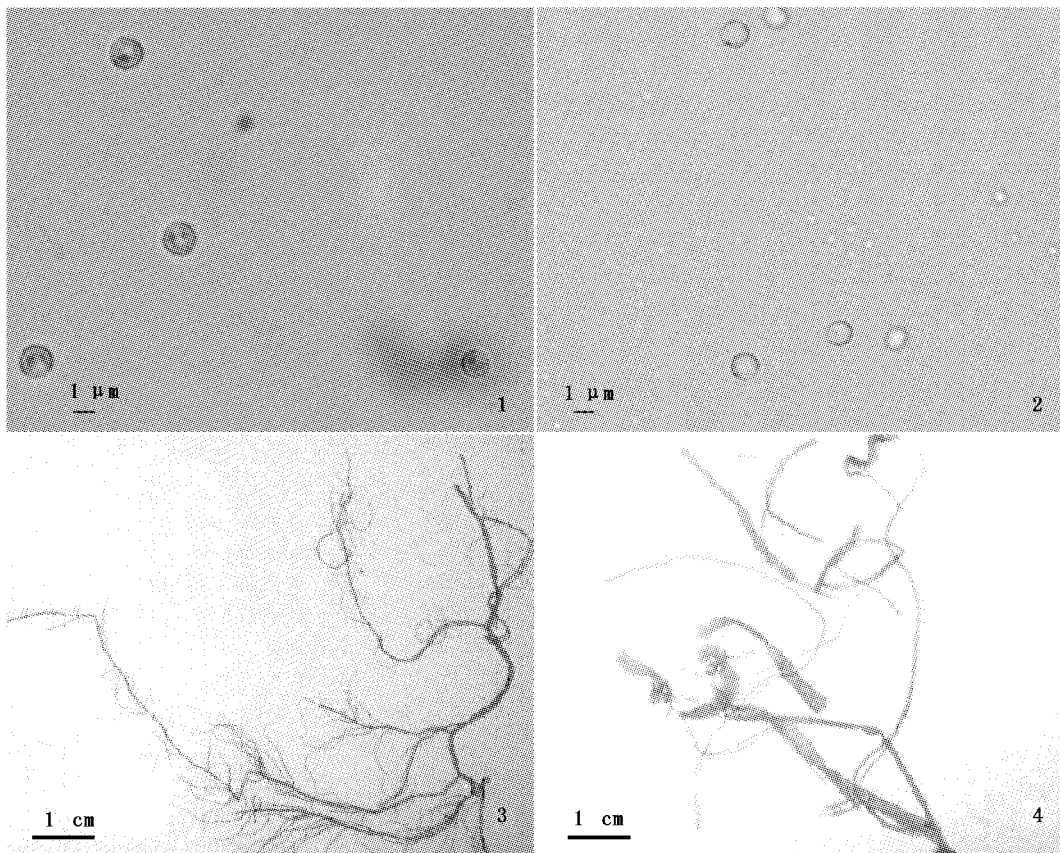


图4 球等鞭金藻单培养(1)、共培养(2)与浒苔单培养(3)、共培养(4)藻体形态变化

Fig.4 Morphology of *Isochrysis galbana* in the mono-cultured (1), co-cultured (2) and *Ulva prolifera* in the mono-cultured (3), co-cultured (4)

因此,本文研究结果证实在较低营养盐浓度下,较低接种量的浒苔和球等鞭金藻彼此之间存在着显著的化感作用,而营养竞争作用不显著。由此可以推断,在自然海域中,只有浒苔在较高的生物量下,才能对浮游植物群落产生显著的抑制作用和营养竞争作用,否则对彼此均有显著的

抑制效应。此外,海水富营养化一直被认为是引起绿潮爆发的最直接因素<sup>[19-20]</sup>,因此,消除海水富营养化不仅可以从减少营养供应上减少或抑制绿潮的发生,而且低营养状况下浮游植物与绿潮存在的彼此抑制效应在绿潮防治中也将会发挥重要作用。

## 参考文献:

- [1] MORAND P, BRIAND X. Excessive growth of macroalgae: A symptom of environmental disturbance [J]. *Botanica Marina*, 1996, 39(6): 491-516.
- [2] HIRAOKA M, OHNO M, KAWAGUCHI S S, *et al.* Crossing test among floating *Ulva* thalli forming 'green tide' in Japan [J]. *Hydrobiologia*, 2004, 512(1-3): 239-245.
- [3] LARGO D B, SEMBRANO J, HIRAOKA M, *et al.* Taxonomic and ecological profile of 'green tide' species of *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta) in central Philippines [J]. *Hydrobiologia*, 2004, 512(1): 247-253.
- [4] WORM B, LOTZE H K. Effects of eutrophication, grazing, and algal blooms on rocky shores [J]. *Limnology and Oceanography*, 2006, 51(1): 569-579.
- [5] SFRISO A, MARCOMINI A. Gross primary production and nutrient behaviour in a shallow coastal environments [J]. *Bioresource Technology*, 1994, 47(1): 59-66.
- [6] KORNER S, NICKIISCH A. Allelopathic growth inhibition of selected phytoplankton species by submerged macrophytes [J]. *Journal of Phycology*, 2002, 38(5): 862-871.
- [7] JIN Q, DONG S L. Comparative studies on the allelopathic effects of two different strains of *Ulva pertusa* on *Heterosigma akashiwo* and *Alexandrium tamarense* [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2003, 293(1): 41-55.
- [8] WANG Y, YU Z M, SONG X X, *et al.* Effects of macroalgae *Ulva pertusa* (Chlorophyta) and *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta) on growth of four species of bloom-forming dinoflagellates [J]. *Aquatic Botany*, 2007, 86(2): 139-147.
- [9] 张善东,俞志明,宋秀贤,等. 大型海藻龙须菜与东海原甲藻间的营养竞争 [J]. *生态学报*, 2005, 25(10): 2676-2680.
- [10] 张善东,宋秀贤,曹西华,等. 龙须菜对锥状斯氏藻抑制作用的机制 [J]. *环境科学*, 2008, 29(8): 2291-2295.
- [11] HERNANDEZ I, PERALTA G, PEREZ-Llorens J L, *et al.* Biomass and dynamics of growth of *Ulva* species in Palmones River estuary [J]. *Journal of Phycology*, 1997, 33(5): 764-772.
- [12] LOTZE H K, SCHRAMM W. Ecophysiological traits explain species dominance patterns in macroalgal blooms [J]. *Journal of Phycology*, 2000, 36(2): 287-295.
- [13] TAYLOR R, FLETCHER R L, RAVEN J A. Preliminary studies on the growth of selected 'green tide' algae in laboratory culture: effects of irradiance, temperature, salinity and nutrients on growth rate [J]. *Botanica Marina*, 2001, 44(4): 327-336.
- [14] 田千桃,霍元子,张寒野,等. 浒苔和条浒苔生长及其氮吸收动力学特征研究 [J]. *上海海洋大学学报*, 2010, 19(2): 252-258.
- [15] 马家海,嵇嘉民,徐韧,等. 长石莼(缘管浒苔)生活史的初步研究 [J]. *水产学报*, 2009, 33(1): 45-52.
- [16] MOLISCH H. Der Einfluss einer Pflanze auf die andere-Allelopathie [M]. Fischer Verlag, Jena, Germany, 1937: 106.
- [17] 王兰刚,徐姗姗,何文辉,等. 海洋大型绿藻条浒苔与微藻三角褐指藻相生相克作用的研究 [J]. *海洋渔业*, 2007, 29(2): 103-108.
- [18] CALLAWAY R M. Positive interactions among plants [J]. *Botanical Review*, 1995, 61(4): 306-349.
- [19] 夏斌,马绍赛,崔毅,等. 黄海绿潮(浒苔)暴发区温盐、溶解氧和营养盐的分布特征及其与绿潮发生的关系 [J]. *渔业科学进展*, 2009, 30(5): 94-101.
- [20] 刘桂梅,李海,王辉,等. 我国海洋绿潮生态动力学研究进展 [J]. *地球科学进展*, 2010, 25(2): 147-153.

## Experimental validation on inhibitory effects between *Ulva prolifera* and *Isochrysis galbana* under controlled laboratory conditions

ZHANG Jian-heng<sup>1,2</sup>, HUO Yuan-zi<sup>1,2</sup>, WANG Yang-yang<sup>1,2</sup>, JIA Rui<sup>1</sup>, ZHU Pei<sup>1</sup>, HU Xiang<sup>3</sup>, YANG Jian-qiang<sup>3</sup>, FANG Jian-meng<sup>3</sup>, HE Pei-min<sup>1,2</sup>

(1. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Institutes of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. North China Sea Branch of the State Oceanic Administration, Qingdao 266033, China)

**Abstract:** In this paper, the experimental validation on inhibitory effects between *Ulva prolifera*, a popular specie of green tides in the Yellow Sea, and *Isochrysis galbana* under controlled laboratory conditions, and the possible mechanism was studied. In the co-culture system with *Ulva prolifera* at  $1 \text{ gFW} \cdot \text{L}^{-1}$  and *Isochrysis galbana* at  $1 \times 10^4$  cells/ml, the concentration of  $\text{NO}_3^- \text{-N}$  and  $\text{PO}_4^{3-} \text{-P}$  were significantly higher in the co-cultured medium than that in the mono-cultured medium of *U. prolifera* and *I. galbana* for initial 3 days. It indicated there was inhibitory effect between *Ulva prolifera* and *Isochrysis galbana*, and the inhibitory rate for *U. prolifera* to *I. Galbana* was 96.62%, while the inhibitory rate for *I. Galbana* to *U. prolifera* was 19.67%. It resulted in decrease of uptake rate of *U. prolifera* and *I. Galbana* for nutrients. From the fourth day to the end, the concentratons of  $\text{NO}_3^- \text{-N}$  and  $\text{PO}_4^{3-} \text{-P}$  were gradually increased, and the cell breakdown, swollen and death of *U. prolifera* and *I. Galbana* were observed under microscope. The concentration of  $\text{NO}_3^- \text{-N}$  and  $\text{PO}_4^{3-} \text{-P}$  in the mono-cultured medium was constantly decreased. It indicated that *U. prolifera* and *I. galbana* released nutrients into the seawater. It demonstrated that there was the allelopathic effect between *U. prolifera* and *I. galbana* when the nutrients in seawater and the biomass of *U. Prolifera* were relatively low.

**Key words:** green tides; *Ulva prolifera*; HABs; allelopathic effect