

文章编号: 1674 - 5566(2012)02 - 0247 - 05

大型海藻羊栖菜对新月筒柱藻生长抑制作用研究

杨承虎, 任俊丽, 路 远, 南春容

(温州医学院生命科学院 海洋科学系, 浙江 温州 325035)

摘要: 研究了羊栖菜藻体、干粉及乙醇提取物对新月筒柱藻生长的影响。结果显示:羊栖菜藻体、干粉和乙醇提取物皆可明显抑制新月筒柱藻的生长,羊栖菜粉末及乙醇提取物对新月筒柱藻的生长的抑制作用表现出较强的浓度-效应关系。72 h时,新月筒柱藻生长抑制率与羊栖菜干粉初始浓度间的关系可表达为 $y = -0.3801x^2 + 1.1636x$,新月筒柱藻生长抑制率与羊栖菜乙醇提取物初始浓度间的关系可表达为 $y = -0.1445x^2 + 1.4279x$ 。羊栖菜粉末浓度达到 1.6 g/L时,新月筒柱藻在 3 d内全部死亡;乙醇提取物浓度达 0.8 g/L时,藻细胞在 2 d内全部死亡。由于乙醇提取物溶液的浓度是以提取前干粉质量表示,因此同等质量的羊栖菜粉未经乙醇提取后其对新月筒柱藻生长的抑制作用明显高于未经提取的羊栖菜粉末。在 1.6 g/L的羊栖菜乙醇提取物作用下数小时,新月筒柱藻细胞核破裂,并逐渐向两端分散,至 24 h时,细胞膜模糊,界限不清,细胞严重萎缩并逐渐碎裂解体。

研究亮点: 本研究发现大型海藻羊栖菜对冷水性赤潮藻——新月筒柱藻的生长具有克生作用,羊栖菜乙醇提取物能明显抑制新月筒柱藻的生长,并对其作用机理进行了初步探讨,为赤潮的生物防治提供理论基础,丰富了海洋化学生态学的研究内容。

关键词: 羊栖菜;新月筒柱藻;生长抑制;短期毒性效应

中图分类号: Q 178.53

文献标志码: A

近几十年来,随着工农业生产的发展和城市化水平的提高,大量工农业废水和生活污水被排入水体,致使水体富营养化,藻类过度繁衍,产生水华或赤潮,从而导致水生态系统结构遭到破坏。在应对水华或赤潮的研究中,人们希望利用生物治理技术来达到预防或治理目的^[1-4]。

新月筒柱藻(*Cylindrotheca closterium*)是一种分布广泛的海洋硅藻^[5],根据记录其曾于2004年1月在香港海域引发赤潮,为冷水性赤潮藻。羊栖菜(*Sargassum fusiforme*)是一种大型褐藻,自然分布于暖温带海区,其生长季节为冬春两季。由于其具有较高的药用和食用价值,近二十多年来在浙江洞头海区常大量栽培。根据作者对当地多年栽培羊栖菜的农民进行调查发现,在羊栖菜生长季节,海区很少有赤潮发生,而在羊栖菜收获后的短时间内,则往往赤潮频发。由此我们推测羊栖菜可能对某些赤潮藻类的生长存在克生

作用。本文以羊栖菜和新月筒柱藻为材料展开系列实验验证此假设。实验于2009年1月至12月进行。

1 材料与方 法

1.1 材 料

新鲜羊栖菜采自浙江温州洞头胜利岙,实验前24 h将新鲜藻体带回实验室,去除表面杂物,以灭菌海水反复冲洗,青霉素链霉素消毒处理,暂养于实验室内,培养过程中无原生动动物及霉菌污染。

新月筒柱藻于2009年2月分离于洞头胜利岙海区,培养于f/2培养液中。培养条件为(20±0.1)℃,光照强度为4 000 lx,光暗比为12 h:12 h,每天定时摇动2次,培养至对数生长期。如无特殊说明,实验条件下同。

收稿日期: 2011-10-08 修回日期: 2011-12-05

基金项目: 浙江省自然科学基金(Y506224);温州市科技计划项目(S20100020)

作者简介: 杨承虎(1987—),男,硕士研究生,研究方向为海洋藻类生态学。E-mail: yangchenghu@126.com

通讯作者: 南春容, E-mail: nanchunrong@163.com

1.2 羊栖菜与新月筒柱藻共培养实验

取处于对数生长期的新月筒柱藻,与羊栖菜的新鲜藻体同时接种于 3 000 mL f/2 培养液中。新月筒柱藻的初始密度为每毫升 1×10^5 个细胞,羊栖菜新鲜组织的初始密度为 10 g/L,同时以新月筒柱藻单独培养作为对照,实验设 3 个重复。实验过程中按照 f/2 配方每 3 天补充一次营养盐,充气培养,通气量为 5 L/min。分别在光照开始前和黑暗开始前测定培养体系的 pH。每日取藻液 0.5 mL, Olympus 光学显微镜下计数。

1.3 羊栖菜干粉对新月筒柱藻生长的影响

选择新鲜健康羊栖菜,蒸馏水洗净,50 °C 下烘干至恒重,粉碎至 40 目备用。

将处于对数生长期的新月筒柱藻稀释至密度为每毫升 1×10^5 个细胞,按 f/2 培养基加富。将羊栖菜干粉接入该藻液中,质量浓度依次为 0、0.1、0.2、0.4、0.8 和 1.6 g/L,实验最终体积为 40 mL,实验设 3 个重复。每日取藻液 0.5 mL, Olympus 光学显微镜下计数。

1.4 羊栖菜乙醇提取物对新月筒柱藻生长的影响

取羊栖菜粉末 20 g 置于 200 mL 无水乙醇中,于 20 °C 黑暗条件下晃动提取 24 h,过滤;重复 3 次,合并滤液减压浓缩,得羊栖菜乙醇提取物。该提取物在使用前溶解于 200 mL 无菌水中,溶液的浓度仍以提取前干粉质量表示,即 100 g/L,作为母液备用。

实验所用的羊栖菜乙醇提取物的浓度系列为 0、0.1、0.2、0.4、0.6 和 0.8 g/L。将上述各液按 f/2 配方加富,取处于对数生长期的新月筒柱藻,接种于 40 mL 培养液中。新月筒柱藻的起始密度为每毫升 1×10^5 个细胞。实验设 3 个重复。

1.5 羊栖菜乙醇提取物对新月筒柱藻的短期毒性效应

将羊栖菜乙醇提取物按 1.6 g/L 溶于灭菌海水中,按 f/2 配方加富,新月筒柱藻初始密度为每毫升 1×10^5 个细胞,不含羊栖菜乙醇提取物的新月筒柱藻作对照。实验设 3 个重复。分别在实验开始后的 6 h、12 h、24 h 观察新月筒柱藻的形态结构变化, Olympus 光学显微镜下拍照。

1.6 数据处理

实验原始数据的处理和差异显著性检验采用 SPSS 13.0。实验数据以藻细胞密度平均值 \pm

标准差表示。单因素方差分析检验处理组与对照组之间的差异显著性, $P < 0.05$ 被认为是在 $\alpha = 0.05$ 水平上差异显著。

新月筒柱藻的生长抑制率按下式计算:

$$G_{IR} = (\rho_c - \rho_e) / \rho_c \times 100\% \quad (1)$$

式中: G_{IR} 为生长抑制率; ρ_c 为对照组藻细胞密度; ρ_e 为处理组藻细胞密度。

根据抑制率和初始浓度进行曲线拟合,根据拟合方程计算出 72 h 时的半数效应浓度 ($EC_{50, 72h}$),即抑制率 50% 所对应的浓度。

2 实验结果

2.1 羊栖菜与新月筒柱藻共培养实验

图 1 显示,在共培养条件下,实验开始后的 2 d 内,羊栖菜藻体对新月筒柱藻的生长无显著抑制作用 ($P > 0.05$);至实验的第 4 天,新月筒柱藻的生长受到显著抑制 ($P < 0.05$),至实验的第 7 天,生长抑制率达 37%。

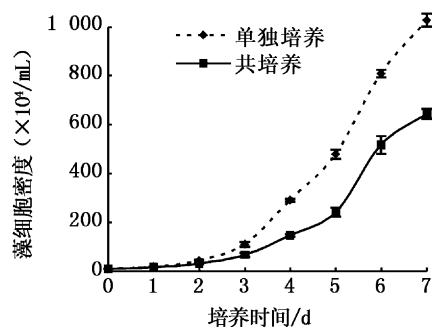


图 1 共培养实验中新月筒柱藻的生长曲线
Fig. 1 The growth curve of *C. closterium* in the co-culture experiment

图 2 显示羊栖菜与新月筒柱藻共培养液中 pH 的周期性变化。经过 12 h 黑暗, pH 下降至当日最低值;12 h 光照, pH 上升至当日最高值。随着实验的进行,藻细胞密度增加, pH 昼夜变化幅度加大,平均值逐渐升高,对照组 pH 最高值明显高于处理组,而最低值接近。

2.2 羊栖菜干粉对新月筒柱藻生长的影响

图 3(a) 显示在羊栖菜干粉的作用下,新月筒柱藻的细胞密度随着羊栖菜粉末浓度的增加而降低。当羊栖菜粉末浓度达 0.4 g/L 以上时,新月筒柱藻的生长在第 2 天即受到显著抑制 ($P < 0.05$);浓度达 1.6 g/L 时,藻细胞在 3 d 内全部死亡。图 3(b) 显示 72 h 时,新月筒柱藻生长抑

制率与羊栖菜干粉初始浓度间的关系可表达为 $y = -0.3801x^2 + 1.1636x$, 羊栖菜干粉对新月筒柱藻 72 h 时的半数效应浓度 ($EC_{50,72h}$) 为 0.52 g/L。

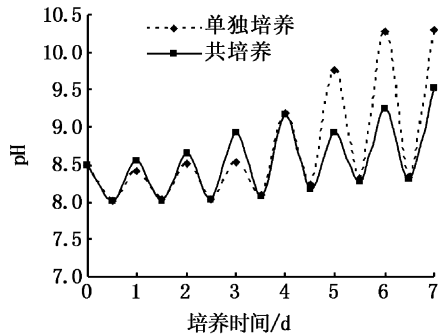
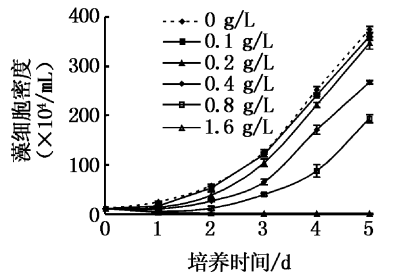
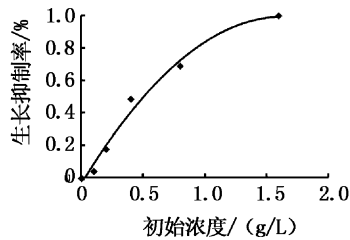


图2 共培养实验中 pH 变化曲线

Fig. 2 The pH curve in the co-culture experiment



(a) 不同浓度下新月筒柱藻的生长曲线



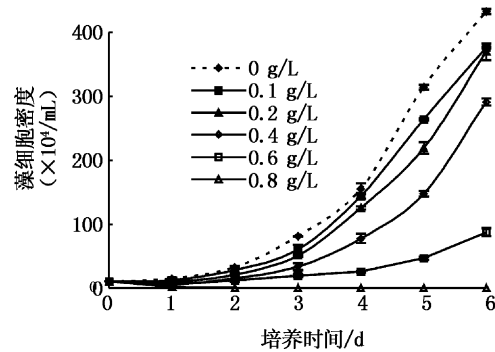
(b) 72 h时新月筒柱藻的生长抑制率与初始浓度间的关系

图3 羊栖菜干粉对新月筒柱藻的抑制作用
Fig. 3 The inhibition effect of dry powder of *S. fusiforme* on the growth of *C. closterium*

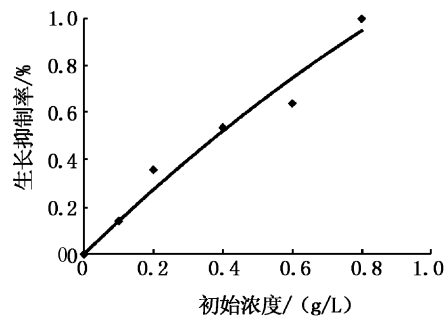
2.3 羊栖菜乙醇提取物对新月筒柱藻生长的影响

图4显示,羊栖菜乙醇提取物对新月筒柱藻的生长抑制作用表现出较强的浓度效应,即随着提取物浓度的增加新月筒柱藻的生长抑制作用增强。在提取物浓度达0.2 g/L以上时,实验第2天新月筒柱藻的生长即受到显著抑制($P < 0.05$);在提取物浓度达0.8 g/L时,新月筒柱藻在2 d内全部死亡。72 h时,新月筒柱藻生长抑制率与羊栖菜乙醇提取物初始浓度间的关系可表达为 $y = -0.1445x^2 + 1.4279x$,见图4(b),

羊栖菜乙醇提取物对新月筒柱藻 72 h 的半数效应浓度 ($EC_{50,72h}$) 为 0.36 g/L。



(a) 不同浓度下新月筒柱藻的生长曲线



(b) 72 h时新月筒柱藻的生长抑制率与初始浓度间的关系

图4 羊栖菜乙醇提取物对新月筒柱藻的抑制作用
Fig. 4 The inhibition effect of ethanol extracts from *S. fusiforme* on the growth of *C. closterium*

2.4 羊栖菜乙醇提取物对新月筒柱藻的短期毒性效应

图5显示在1.6 g/L羊栖菜乙醇提取物的作用下数小时后,新月筒柱藻胞核破裂,核质逐渐分裂为碎块;至24 h时,细胞显著萎缩,细胞膜逐渐溶解模糊,最终导致细胞解体。

3 讨论

在羊栖菜与新月筒柱藻共培养实验中,通过实验设计排除了光照、温度、营养盐等因素的限制和影响,并进行充气处理,旨在降低处理组和对照组间由于藻细胞密度不同而导致的pH差异影响,结果处理组中新月筒柱藻的生长受到显著抑制,提示羊栖菜藻体可能分泌抑制新月筒柱藻生长的化学物质。

羊栖菜粉末及乙醇提取物对新月筒柱藻的生长均显示出有抑制作用,且表现出较强的浓度效应关系。羊栖菜粉末浓度达到1.6 g/L时,新月筒柱藻在3 d内全部死亡;乙醇提取物浓度达

0.8 g/L 时,藻细胞在 2 d 内全部死亡。由于乙醇提取物溶液的浓度是以提取前干粉质量表示,可见同等质量的羊栖菜粉末经过乙醇提取后其对新月筒柱藻生长的抑制作用明显高于未经提取的羊栖菜粉末。

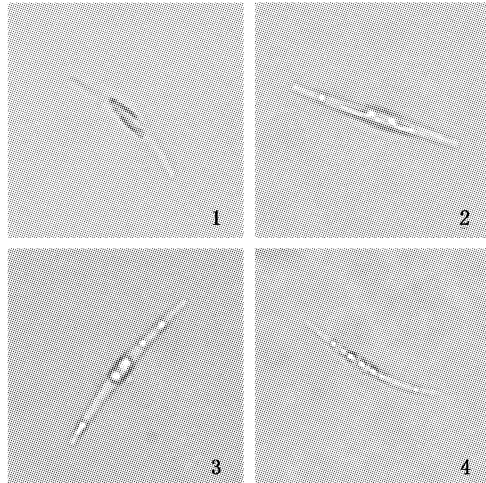


图 5 羊栖菜乙醇提取物对新月筒柱藻的短期毒性效应

Fig. 5 Short-term toxicity effect of the ethanol extract from *S. fusiforme* on *C. closterium*

1. 初始状态; 2. 6 h; 3. 12 h; 4. 24 h.

短期毒性效应实验从细胞形态上显示了羊栖菜提取物对新月筒柱藻细胞作用的机理和过程,这与在铜等重金属离子作用下新月筒柱藻的形态变化类似^[6]:细胞核破裂成细小碎块,细胞内容物外溢。化感物质可以通过影响光合作用、破坏细胞膜的完整性、影响酶活性和影响基因表达等方式发挥作用^[7]。类似的研究表明,化感物质能降低细胞膜的完整性,使细胞内物质大量渗出,渗出液的电导率增加^[8],能够使铜绿微囊藻和

蛋白核小球藻细胞膜中存在的主要脂肪酸在抑藻活性组分作用后被氧化,不饱和度增加,从而使细胞膜流动性增强,对进出细胞物质的选择性降低^[9-10]。

参考文献:

- [1] 吴芳,王晟. 富营养化湖泊原位生物治理技术研究进展[J]. 环境科学导刊,2010, 29 (1): 49-52.
- [2] 南春容,张海智,董双林. 孔石莼水溶性抽提液抑制3种海洋赤潮藻的生长[J]. 环境科学学报,2004, 24(4): 702-706.
- [3] NAN C R, ZHANG H Z, LIN S Z, et al. Allelopathic effects of *Ulva lactuca* on selected species of harmful bloom-forming microalgae in laboratory culture [J]. Aquatic Botany, 2008, 89 (1): 9-15.
- [4] JEONG J H, JIN H J, SOHN C H, et al. Algicidal activity of the seaweed *Corallina pilulifera* against red tide microalgae [J]. Journal of Applied Phycology, 2000, 12: 37-43.
- [5] NESLIHAN B. Seasonal variations of microphytoplankton assemblages and environmental variables in the coastal zone of Bozaada Island in the Aegean Sea (NE Mediterranean Sea) [J]. Aquatic Ecology, 2009, 43: 249-70.
- [6] THOMAS W H, HOLLIBAUGH J T, SEIBERT D L R. Effects of heavy metals on the morphology of some marine phytoplankton [J]. Phycologia, 1980, 19: 202-209.
- [7] 胡洪营,门玉洁,李锋民. 植物化感作用抑制藻类生长的研究进展[J]. 生态环境,2006(15): 153-157.
- [8] 孟丽华,刘义新. 利用植物化感作用抑制铜绿微囊藻的研究进展[J]. 中国给水排水,2008, 24(20): 7-10.
- [9] GROSS E M. Allelopathy of aquatic autotrophs [J]. Critical Review of Plant Science, 2003, 22: 313-339.
- [10] 王伟定. 浙江省马尾藻属和羊栖菜属的调查研究[J]. 上海水产大学学报,2003,12(3):227-232.

Inhibition effect of macro-alga *Sargassum fusiforme* on micro-alga *Cylindrotheca closterium*

YANG Cheng-hu, REN Jun-li, LU Yuan, NAN Chun-rong

(College of Life Science, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, Zhejiang, China)

Abstract: The effect of fresh thalli, dry powder and ethanol extracts from macroalga, *Sargassum fusiforme*, on the growth of a bloom-forming microalga, *Cylindrotheca closterium*, was studied in co-culture under controlled laboratory conditions. The results showed that the fresh thalli, dry powder and ethanol extracts exhibited strong inhibitory effect on the growth of *C. closterium*, and a concentration-effect relationship was observed between the initial concentration of dry powder and the ethanol extracts and the growth inhibition of *C. closterium*. The relationship between the growth inhibition and the initial concentration of dry powder is $y = -0.3801x^2 + 1.1636x$ at 72 h, and it is $y = -0.1445x^2 + 1.4279x$ between the growth inhibition and the initial concentration of ethanol extracts at 72 h. All the cells of *C. closterium* was dead in 3d when the concentration of dry powder reached 1.6 g/L, or in 2 d with the concentration of ethanol extracts reached 0.8 g/L. The latter exhibited stronger inhibition effects on *C. closterium* than the former because the concentration of ethanol extracts was expressed by the quality of dry powder before it was extracted. Under 1.6 g/L of ethanol extracts, the nuclei of *C. closterium* were broken in several hours. Up to 24 h, the cell membrane became obscure and difficult to be recognized, the whole cell shrank seriously and broke into fragments gradually.

Key words: *Sargassum fusiforme*; *Cylindrotheca closterium*; growth inhibition; short-term toxicity effect