

龙须菜对3种赤潮微藻生长的影响

孙颖颖¹, 张静¹, 刘泓君¹, 李灿¹, 王长海²

(1. 淮海工学院 江苏省海洋生物技术重点建设实验室, 江苏 连云港 222005; 2. 烟台大学 海洋学院, 山东 烟台 264005)

摘要: 在共生条件下, 研究了鲜龙须菜对前沟藻、米氏凯伦藻和塔玛亚历山大藻等3种赤潮微藻生长的影响。在此基础上, 以龙须菜培养水过滤液和龙须菜水溶性抽提液为实验用液, 分析它们对上述3种赤潮微藻的抑制作用。最后, 采用甲醇浸泡龙须菜干粉末, 研究了其甲醇提取物对3种赤潮微藻生长的影响。结果表明, 当鲜龙须菜浓度 $\geq 32 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 其能显著抑制3种赤潮微藻的生长, 对它们的生长抑制率在42%以上。在龙须菜(浓度为 $32 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)培养水过滤液的实验中, 发现无论一次性还是在半连续添加方式, 培养水过滤液都对3种赤潮微藻表现出较为明显的抑制作用; 同时发现, $40\sim 80^\circ\text{C}$ 下处理此培养水过滤液, 其抑藻作用并未显著减弱, 可见龙须菜抑藻物质具有较高的热稳定性。当龙须菜水溶性抽提液浓度为 $16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 其显著抑制了3种赤潮微藻的生长。龙须菜干粉末的甲醇提取物同样能显著抑制3种赤潮微藻的生长, 在甲醇提取物浓度为 $2.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 对3种赤潮微藻的生长抑制率超过40%。上述结果表明, 抑藻物质不仅存在于鲜龙须菜中, 还存在于其干粉末中。

关键词: 龙须菜; 抑藻物质; 赤潮微藻

中图分类号: Q949.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-6932(2011)03-0328-06

Effects of macroalga *Gracilaria lemaneiformis* on the growth of three species of red tide microalgae under laboratory conditions

SUN Ying-ying¹, ZHANG Jing¹, LIU Hong-jun¹, LI Can¹, WANG Chang-hai²

(1. Jiangsu key laboratory of marine biotechnology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China;

2. School of Ocean, Yantai University, Yantai 264005, China)

Abstract: To study the effects of fresh *Gracilaria lemaneiformis* on the growth of the three species of red tide microalgae (*Amphidinium hoefleri*, *Karenia mikimotoi* and *Alexandrium tamarense*), those microalgae coexist with different initial inoculation concentrations of fresh tissue of *G. lemaneiformis*, respectively. Furthermore, the inhibitory activities against three species of red tide microalgae of fresh *G. lemaneiformis*'s culture filtrate and aqueous extracts of *G. lemaneiformis* were tested. The extracts were extracted from the dry powder of *G. lemaneiformis* with methanol, and to probe their inhibitory effects on the growth of those microalgae. The results showed that the fresh tissue of *G. lemaneiformis* had strong growth inhibitory effect on *A. hoefleri*, *K. mikimotoi* and *A. tamarense* at the concentration of $32 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ and the growth inhibitory for three species of red tide microalgae was above 42%. The culture medium filtrate of *G. lemaneiformis* (the concentration of $32 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) could significantly inhibit the growth of the three species of the red tide microalgae under initial or semi-continuous filtrate addition. The further investigation found that the culture medium filtrate of *G. lemaneiformis* that had gentle heat for 60 minutes under different lengths of temperature (40°C , 60°C and 80°C) also had significant inhibitory effect on the growth of all test microalgae; this suggested that the inhibitory substances had higher thermal stability. The growth of all test microalgae was restrained by fresh *G. lemaneiformis*'s aqueous extracts when concentration was $16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. The methanol extracts of *G. lemaneiformis* dry powder also inhibited significantly those three species of red tide microalgae at the concentration of $2.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, and the growth inhibitory for three species of red tide microalgae was above 40%. It indicated fresh *G. lemaneiformis* had the inhibitory substances and inhibitory substances existed also in *G. lemaneiformis*'s dry powder.

Keywords: *Gracilaria lemaneiformis*; inhibitory substances; red tide microalgae

收稿日期: 2010-03-06; 收修改稿日期: 2010-10-07

基金项目: 江苏省海洋生物技术重点建设实验室开放课题(2009HS09)。

作者简介: 孙颖颖(1978-), 女, 黑龙江桦南人, 博士, 讲师, 主要从事海洋生化工程研究。电子邮箱: syy-999@163.com。

研究表明, 海藻不仅能够净化水质, 还能与赤潮微藻进行营养竞争^[1], 防止赤潮生物的爆发性繁殖与增长; 同时, 它们还能向环境中分泌抑藻物质, 抑制赤潮微藻的生长^[2-4]。目前, 海藻抑制微藻的研究正在逐渐深入, 已经发现某些海藻对微藻生长的抑制作用。例如, 孔石莼 (*Ulva pertusa*) 抑制赤潮异弯藻 (*Heterosigma akashiwo*) 和塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*)^[4], 龙须菜 (*Gracilaria lemaneiformis*) 抑制锥状斯氏藻 (*Scrippsiella trochoidea*)^[5]、东海原甲藻 (*Prorocentrum donghaiense*) 和塔玛亚历山大藻^[6]、鼠尾藻 (*Sargassum thunbergii*) 和小珊瑚藻 (*Corallina pilulifera*) 抑制赤潮异弯藻^[7,8]。鉴于此, 本文选定龙须菜 (*Gracilaria lemaneiformis*) 为材料, 采用共培养方法, 研究了鲜龙须菜、龙须菜培养水过滤液和其水溶性抽提液对前沟藻 (*Amphidinium hoefleri*)、米氏凯伦藻 (*Karenia mikimitoi*) 和塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*) 等 3 种赤潮微藻生长的影响。在此基础上, 采用甲醇浸泡龙须菜干粉末, 分析龙须菜甲醇提取物对上述 3 种微藻生长的抑制作用, 以期利用海藻防控赤潮提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

前沟藻、米氏凯伦藻和塔玛亚历山大藻无菌株由中国海洋大学提供。

龙须菜取自福建沿海, 蒸馏水冲洗后, 用混合抗生素对藻体作灭菌处理, 再用灭菌海水漂洗 3~4 次, 无菌培养于 f/2 培养液中, 温度 23±1℃, 光强 3 000 lx, 光暗比 16:8。

天然海水经过脱脂棉和 300 目筛绢过滤, 煮沸、冷却, pH 值和盐度分别调节至 8.5 和 30 备用 (本文所用海水均做此处理)。

1.2 鲜龙须菜的抑藻实验

将指数生长期的微藻与鲜龙须菜同时接种于 500 mL 锥形瓶, 内装 200 mL f/2 培养液。龙须菜浓度分别为 0 g·L⁻¹、4 g·L⁻¹、8 g·L⁻¹、16 g·L⁻¹、32 g·L⁻¹ 和 64 g·L⁻¹, 前沟藻、米氏凯伦藻和塔玛亚历山大藻的接种密度依次为 9×10⁴ mL⁻¹、9×10⁴ mL⁻¹ 和 8×10⁴ mL⁻¹, 每个锥形瓶设 3 个重复。在光照培养箱内培养 12 d, 温度 23±1℃, 光强 3 000 lx, 光暗比 16:8 (如未特别说明, 后续实验培养条件相

同)。每隔 1 日取样 1 mL, 用 Lugol's 试剂固定后, 测定藻细胞密度。同时, 取样后向培养瓶中加入 1 mL 200 倍 f/2 培养液, 以维持培养液体积恒定。

1.3 龙须菜培养水过滤液的抑藻实验

1.3.1 一次性培养 32 g·L⁻¹ 鲜龙须菜培养在 f/2 培养液内, 同时设定未培养龙须菜的空白锥形瓶 (仅 f/2 培养液), 每个锥形瓶设定 3 个重复。4d 后移去龙须菜, 培养液经高温灭菌的 0.22 μm 滤膜过滤。过滤液重新配制为 f/2 培养液, 接种 3 种微藻。未培养龙须菜 f/2 培养液按照同样方法处理后, 接种微藻, 作为对照。

1.3.2 半连续培养 在数个培养缸内 (内装 f/2 培养液) 接种 32 g·L⁻¹ 鲜龙须菜, 培养缸分为 A 和 B 2 组。4d 后, 移出 A 组培养缸内龙须菜, 按照上述方法制备龙须菜培养水的过滤液, 配制为 f/2 培养液后, 用于 3 种微藻的培养。同时, 将 3 种微藻分别接种于新鲜海水配制的 f/2 培养液中作为对照, 每个锥形瓶内培养液总体积为 200 mL。B 组培养缸内的龙须菜继续培养, 并为半连续培养供给龙须菜培养水过滤液。

每日从每个锥形瓶移取 50 mL 藻液, 同时加入 50 mL 龙须菜培养水过滤液 (来自于 B 组, 并按照上述方法处理后, 重新配制为 f/2 培养液)。对照组按照同样方法移取 50 mL 藻液, 并加入 50 mL 新配制的 f/2 培养液。

1.3.3 温度对龙须菜培养水抑制作用的影响 将数个装有 100 mL 龙须菜培养水的过滤液 (按照上述实验方法制备) 的锥形瓶分别置于 40、60 和 80℃ 的水浴中加热, 水浴时间 60 min。待锥形瓶冷却至室温后, 补充蒸馏水至 100 mL, 并将过滤液 pH 调为 8.5, 添加营养盐配制为 f/2 培养液, 同时设定新鲜海水和龙须菜培养水过滤液配制的 f/2 培养液分别为对照 1 和对照 2, 接种 3 种微藻。

1.4 龙须菜水溶性抽提液的抑藻实验

48 g 新鲜龙须菜研磨成浆后, 加入灭菌海水, 4 000 g 离心 10 min, 获得 300 mL 水溶性抽提液, 并配制为 f/2 培养液。然后, 用新鲜海水配制的 f/2 培养液将其依次稀释为 2、4、8、16 和 32 g·L⁻¹, 用于前沟藻、米氏凯伦藻和塔玛亚历山大藻等 3 种微藻的培养。同时, 将 3 种微藻接种于新鲜海水配制的 f/2 培养液中, 作为对照。

在上述实验基础上, 选定产生抑制作用浓度的水溶性抽提液。将此水溶性抽提液经高温 121℃ 高

温处理 30 min。冷却后,按照 f/2 培养液添加营养盐后用于上述 3 种微藻的培养,同时以新鲜海水配制的 f/2 培养液培养微藻作为对照。

1.5 龙须菜甲醇萃取物的抑藻实验

新鲜龙须菜 40℃干燥,研磨成粉末(粉碎至 0.3 mm),甲醇浸泡 4d,用滤纸过滤除去残渣。40℃减压蒸干,获得浸膏,称其质量后,用二甲亚砜(DMSO)定容至 10 mL。在无菌条件下,浓缩液通过 0.22 μm 无菌有机系滤膜过滤,于 4℃冰箱备用。

通过前期预实验已发现 DMSO 投加比例 < 1% 对受试微藻的生长无影响,实验投加比例均控制在此范围内。移取一定体积此溶液添加到 f/2 培养液中,随后接种微藻。最终,甲醇萃取物浓度分别为 0.25、0.5、1.0、2.0 和 4.0 g·L⁻¹,同时,添加相应体积的 DMSO 作为对照。

1.6 数据处理

数据采用 SPSS11.5 软件包进行独立样本检验

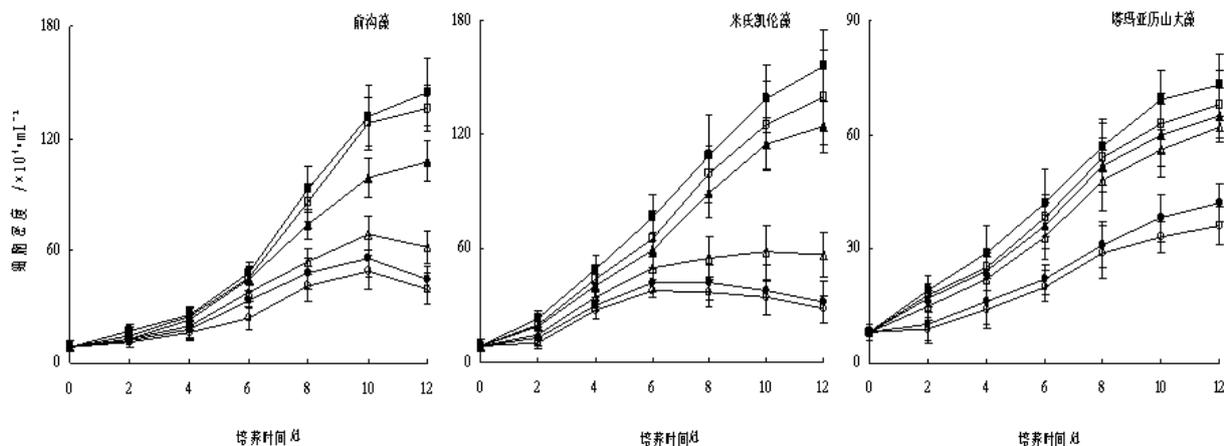


图 1 鲜龙须菜(■ 0, □ 4 g·L⁻¹, ▲ 8 g·L⁻¹, △ 16 g·L⁻¹, ● 32 g·L⁻¹, ○ 64 g·L⁻¹)对 3 种赤潮微藻生长的影响

Fig. 1 Effects of the fresh tissue (■ 0, □ 4 g·L⁻¹, ▲ 8 g·L⁻¹, △ 16 g·L⁻¹, ● 32 g·L⁻¹, ○ 64 g·L⁻¹) of *G. lemaneiformis* on the growth of three species of red tide microalgae

2.2 龙须菜培养水过滤液对 3 种赤潮微藻生长的影响

上述实验结果表明,32 g·L⁻¹新鲜龙须菜能显著抑制 3 种赤潮微藻的生长。因此,在培养水过滤液实验中将龙须菜接种密度设定为 32 g·L⁻¹。从图 2 可以看出,无论在一次性还是在半连续添加方式下,龙须菜培养水过滤液对 3 种赤潮微藻的生长均有显著 ($P < 0.05$) 抑制作用,第 12d 龙须菜培养水

统计分析, $P < 0.05$ 为显著性差异。

微藻的生长抑制率为: $I = (1 - N/N_0) \times 100\%$, 式中: N 为处理组藻细胞数量 ($/\times 10^4 \text{ mL}^{-1}$); N_0 为对照组藻细胞数量 ($/\times 10^4 \text{ mL}^{-1}$)。

2 结果

2.1 共生条件下,鲜龙须菜对 3 种赤潮微藻生长的影响

图 1 表明,在共生条件下,鲜龙须菜对前沟藻、米氏凯伦藻和塔玛亚历山大藻的生长抑制显著 ($P < 0.05$) 并具有浓度效应。当鲜龙须菜浓度为 16 g·L⁻¹ 时,第 12d 其对前沟藻和米氏凯伦藻的生长抑制率在 55% 以上。对塔玛亚历山大藻而言,鲜龙须菜浓度 $\geq 32 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,塔玛亚历山大藻生长被显著 ($P < 0.05$) 抑制,生长抑制率超过 42% (第 12 d)。在实验设定浓度范围内,未见鲜龙须菜对 3 种赤潮微藻的致死现象。

过滤液对 3 种赤潮微藻的生长抑制率均超过 41%。比较还发现,半连续添加方式下龙须菜培养水过滤液对 3 种赤潮微藻生长的抑制作用比一次性添加要更为强烈。

在 40~80℃ 范围内处理龙须菜培养水过滤液,发现温度对龙须菜培养水过滤液作用于 3 种赤潮微藻的生长的抑制作用并无明显 ($P > 0.05$) 影响 (图 3)。

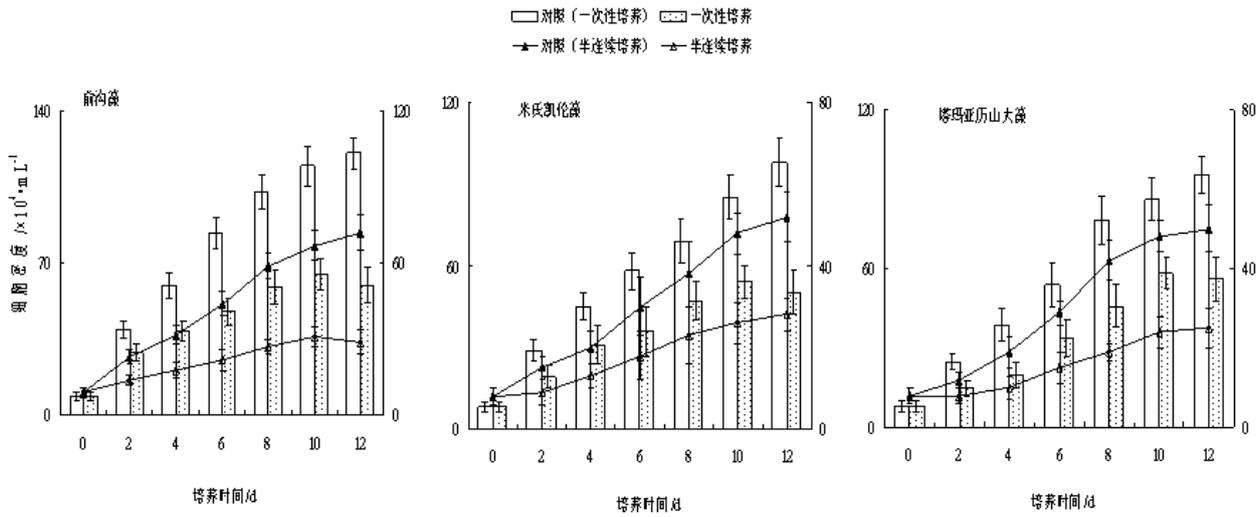


图 2 在一次性 and 半连续龙须菜培养水过滤液添加方式下 3 种赤潮微藻的生长曲线

Fig. 2 Growth curves of three species of red tide microalgae under initial or semi-continuous culture medium filtrate addition of *G. lemaneiformis*

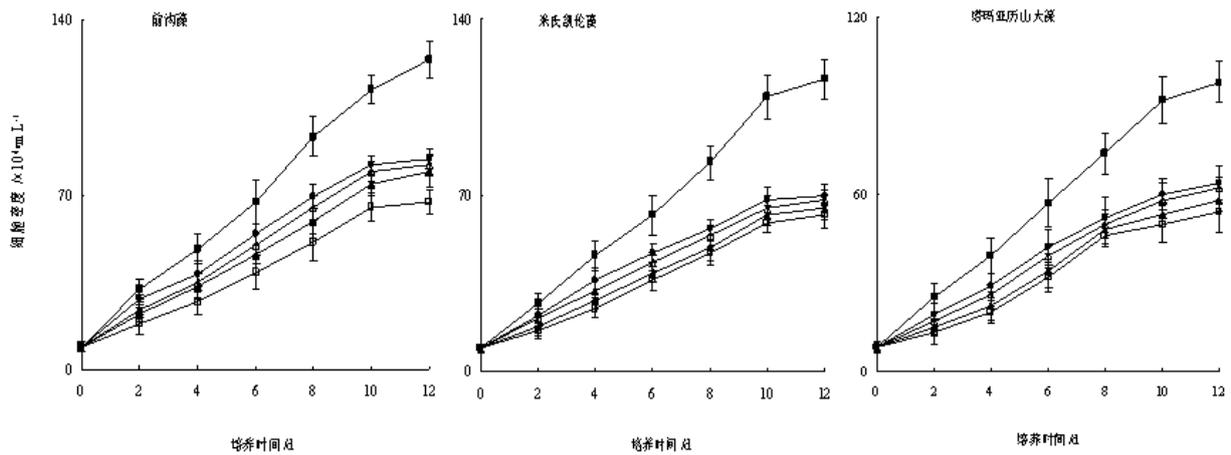


图 3 温度 (■ 对照 1, □ 对照 2, ▲ 40°C, △ 60°C, ● 80°C) 对龙须菜培养水过滤液作用于 3 种赤潮微藻生长的抑制作用的影响

Fig. 3 Effect of temperature (■ control 1, □ control 2, ▲ 40°C, △ 60°C, ● 80°C) on the inhibitory activity of culture medium filtrate from *G. lemaneiformis* for the growth of three species of red tide microalgae

2.3 龙须菜水溶性抽提液对 3 种赤潮微藻生长的影响

较高浓度 (16 g·L⁻¹ 和 32 g·L⁻¹) 的龙须菜水溶性抽提液能显著 ($P < 0.05$) 抑制 3 种赤潮微藻的生长 (图 4)。第 12d, 32 g·L⁻¹ 龙须菜水溶性抽提液对 3 种的生长抑制率在 62% 以上。同时, 当其浓度范围在 2~8 g·L⁻¹ 时, 龙须菜水溶性抽提液对前沟藻、米氏凯伦藻和塔玛亚历山大藻的生长并没有明显 ($P > 0.05$) 的影响。

2.4 龙须菜甲醇提取物对 3 种赤潮微藻生长的影响

在图 5 中, 当浓度超过 1.0 g·L⁻¹ 时, 龙须菜甲醇提取物显著 ($P < 0.05$) 抑制了米氏凯伦藻的生长, 第 12d, 甲醇提取物对米氏凯伦藻的生长抑制率在 60% 以上。对前沟藻和塔玛亚历山大藻而言, 当龙须菜甲醇提取物浓度 ≥ 2.0 g·L⁻¹ 时, 同样显著 ($P < 0.05$) 抑制了此 2 种微藻的生长。

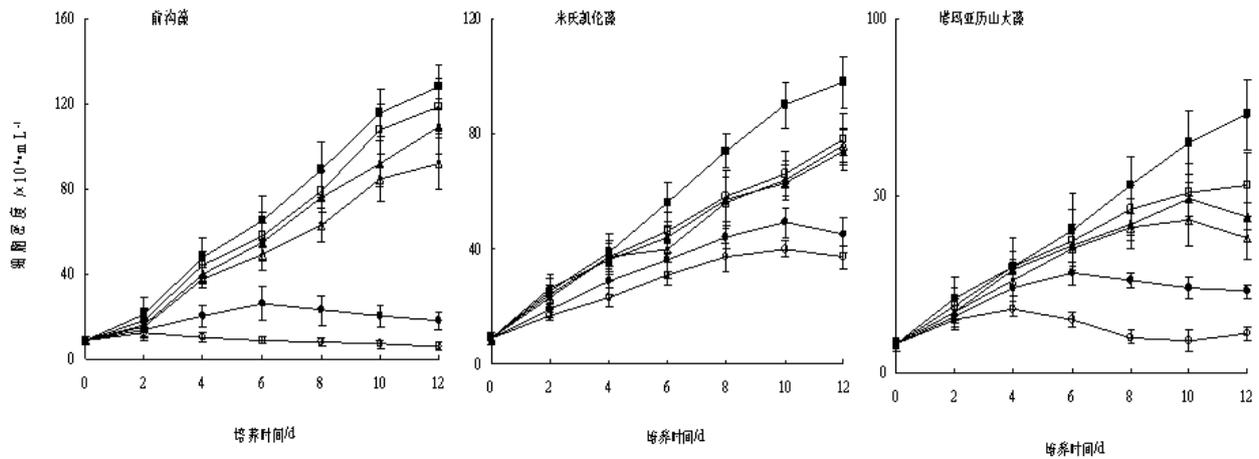


图 4 龙须菜水性抽提液(■ 0, □ 2 g·L⁻¹, ▲ 4 g·L⁻¹, △ 8 g·L⁻¹, ● 16 g·L⁻¹, ○ 32 g·L⁻¹)对 3 种赤潮微藻生长的影响

Fig. 4 Effects of aqueous extracts (■ 0, □ 2 g·L⁻¹, ▲ 4 g·L⁻¹, △ 8 g·L⁻¹, ● 16 g·L⁻¹, ○ 32 g·L⁻¹) of *G. lemaneiformis* on the growth of three species of red tide microalgae

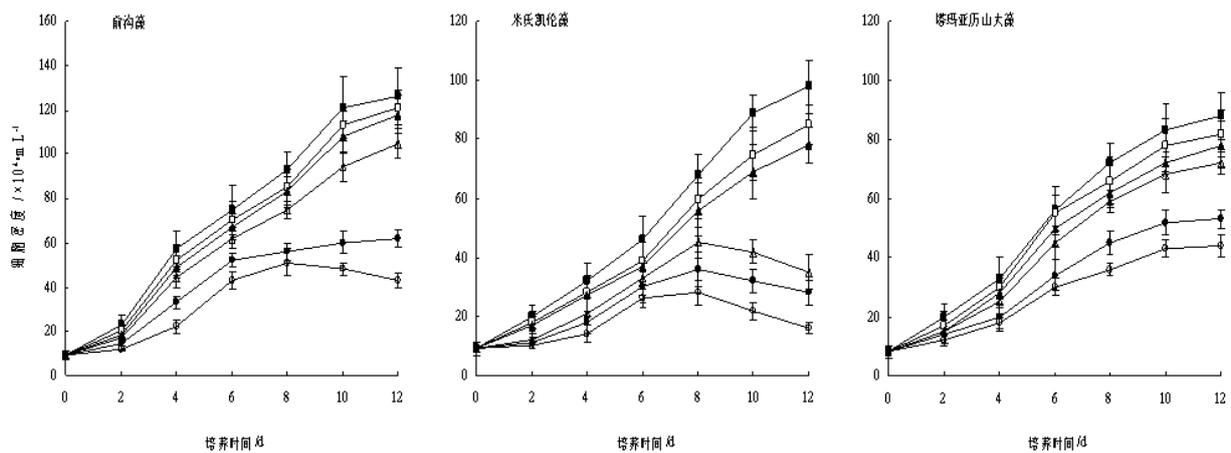


图 5 龙须菜甲醇提取物(■ 0, □ 0.25 g·L⁻¹, ▲ 0.5 g·L⁻¹, △ 1.0 g·L⁻¹, ● 2.0 g·L⁻¹, ○ 4.0 g·L⁻¹)对 3 种赤潮微藻生长的影响

Fig. 5 Effects of methanol extracts (■ 0, □ 0.25 g·L⁻¹, ▲ 0.5 g·L⁻¹, △ 1.0 g·L⁻¹, ● 2.0 g·L⁻¹, ○ 4.0 g·L⁻¹) of *G. lemaneiformis* on the growth of three species of red tide microalgae

3 讨论

本文选定我国沿海赤潮高发区常见赤潮微藻—前沟藻、米氏凯伦藻和塔玛亚历山大藻为实验对象,分析龙须菜对它们生长的影响。共生条件下,鲜龙须菜(浓度为 32 g·L⁻¹)显著抑制了前沟藻、米氏凯伦藻和塔玛亚历山大藻的生长(图 1)。研究表明,种群间的相互作用和相互竞争一般通过 2 种途径进行:第一,细胞直接接触抑制;第二,分泌某些物质。Uchida 等指出,圆藻异囊藻(*Heterocapsa circularisquama*)对米氏裸甲藻(*Gymnodinium mikimotoi*)的抑制作用主要是通过细胞直接接触^[9]。

颜天等认为,赤潮异弯藻对其它种群的抑制作用采取的是细胞直接接触抑制^[10]。因此,为了确定共生条件下,鲜龙须菜对前沟藻、米氏凯伦藻和塔玛亚历山大藻的抑制作用途径,进行了龙须菜培养水过滤液的抑藻实验。

图 2 表明,龙须菜培养水过滤液一次性添加或半连续添加方式都对 3 种赤潮微藻的生长表现出一定的抑制作用,并且比较发现后者对 3 种赤潮微藻的抑制作用比前者更为强烈,这表明龙须菜释放到培养基中的抑藻物质的数量相对较多(足以产生抑制作用),释放方式是可连续性的,并且此抑藻物质可以在培养基中积累(应不属于快速降解物质)。

Nakai 等也发现穗状狐尾藻 (*Myriophyllum spicatum*) 通过连续分泌抑藻物质来抑制蓝藻生长^[11, 12]。在条浒苔 (*Enteromorpha clathrata*) 与三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricorutum*) 研究中, 王兰刚等也认为鲜条浒苔持续向周围环境中分泌抑藻物质, 当此物质累计到一定浓度时会对共培养的微藻产生强烈抑制作用^[13]。随后, 本文通过温度处理实验进一步证实, 龙须菜释放的抑藻物质具有较高的热稳定性 (图 3), 这为后续龙须菜抑藻物质的分离纯化工作提供了很好的实验基础。

从图 4 和图 5 可知, 不仅鲜龙须菜中含有抑藻物质, 在其干粉末中同样存在着抑藻物质。采用甲醇浸泡龙须菜干粉末后, 其甲醇提取物 ($2.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 强烈地抑制了前沟藻、米氏凯伦藻和塔玛亚历山大藻等 3 种赤潮微藻的生长。这表明, 后续工作中可利用甲醇进行龙须菜抑藻物质的初步分离。

参考文献:

- [1] Fitzgerald G P. Some factors in the competition of antagonism among bacteria, algae, and aquatic weeds [J]. *J Phycol*, 1969, 5: 351-359.
- [2] Anderson D M. Turning back the harmful red tide [J]. *Nature*, 1997, 388: 513-514.
- [3] Jeong J H, Jin H J, Sohn C H, et al. Algicidal activity of the seaweed *Corallina pilulifera* against red tide microalgae [J]. *J Appl Phycol*, 2000, 12: 37-43.
- [4] 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.
- [5] 张善东, 宋秀贤, 王悠, 等. 大型海藻龙须菜与锥状斯氏藻间的营养竞争研究 [J]. *海洋与湖沼*, 2005, 36(6): 556-560.
- [6] 王悠, 俞志明, 宋秀贤, 等. 大型海藻与赤潮微藻以及赤潮微藻之间的相互作用研究 [J]. *环境科学*, 2006, 27(2): 274-280.
- [7] 王仁君, 唐学玺, 冯蕾, 等. 鼠尾藻对赤潮异弯藻和中肋骨条藻的抑制作用 [J]. *应用生态学报*, 2006, 17(12): 2421-2425.
- [8] 王仁君, 唐学玺, 孙俊华. 小珊瑚藻对赤潮异弯藻的化感效应 [J]. *应用生态学报*, 2008, 19(10): 2322-2326.
- [9] Uchida T, Satorutoda Y, Matsuyama M, et al. Interactions between the red tide dinoflagellates *Heterocapsa circularisquama* and *Gymnodinium mikimotoi* in laboratory [J]. *J Exp Mar Biol Ecol*, 1999, 241: 285-299.
- [10] 颜天, 周名江, 傅萌, 等. 赤潮异弯藻毒性及毒性来源的初步研究 [J]. *海洋与湖沼*, 2003, 34(1): 50-55.
- [11] Nakai S, Inoue Y, Hosomi M, et al. Growth inhibition of blue-green algae by allelopathic effects of macrophytes [J]. *Water Sci Technol*, 1999, 39: 47-53.
- [12] Nakai S, Inoue Y, Hosomi M, et al. *Myriophyllum spicatum* released allelopathic polyphenoles inhibiting growth of blue-green algae *Chlorella pyrenoidosa* [J]. *Water Research*, 2000, 34(11): 3026-3032.
- [13] 王兰刚, 徐姗楠, 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.