

孔石莼的 6 种溶剂提取物对 3 种赤潮微藻生长的影响*

孙颖颖¹ 张 静¹ 王长海^{2*}

(1. 淮海工学院海洋学院, 江苏 连云港 222005; 2. 南京农业大学资源与环境科学学院, 江苏 南京 210095)

摘要 通过测定藻细胞密度, 观察藻细胞形态, 分析藻细胞内叶绿素、蛋白质和多糖等生理指标含量的变化, 研究了孔石莼的 6 种溶剂(石油醚、氯仿、乙酸乙酯、丙酮、甲醇和蒸馏水)提取物对米氏凯伦藻、中肋骨条藻和塔玛亚历山大藻生长的影响。结果表明, 6 种溶剂提取物中, 甲醇提取物对 3 种赤潮微藻的抑制作用最为明显。当甲醇提取物为 15 mg/L, 培养进行到第 12 天时, 其对米氏凯伦藻、中肋骨条藻和塔玛亚历山大藻的抑制率分别为 76.67%、65.65%、56.52%。从对藻细胞形态的影响看, 除蒸馏水提取物外, 其余 5 种有机溶剂提取物均使赤潮微藻细胞出现不同程度的空洞、破碎和细胞色素减退现象。甲醇提取物可明显降低 3 种赤潮微藻细胞内叶绿素、蛋白质和多糖的含量, 乙酸乙酯和丙酮提取物对 3 种生理指标的含量也有一定影响。

关键词 赤潮微藻 孔石莼 抑制作用 提取物

Growth inhibition of 6 kinds extracts of *U. pertusa* to three species of red tide microalgae SUN Yingying¹, ZHANG Jing¹, WANG Changhai². (1. School of Ocean, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang Jiangsu 222005; 2. College of Resources and Environmental Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing Jiangsu 210095)

Abstract: *U. pertusa* was extracted by six solvents (petroleum ether, chloroform, ethyl acetate, acetone, methanol and distilled water) separately. The effect of obtained 6 kinds extracts of *U. pertusa* on the growth of the three species of red tide microalgae (*K. mikimotoi*, *S. costatum* and *A. tamarense*) was investigated through the observation of algal morphology, measurement of algal number, and determination of physiological indicators (chlorophyll, protein and polysaccharide). Results showed that the methanol extracts of *U. pertusa* had the strongest inhibition action. When the methanol extracts of *U. pertusa* in f/2 culture media was 15 mg/L, the suppression rate of *K. mikimotoi*, *S. costatum* and *A. tamarense* was 76.67%, 65.65% and 56.52% after 12 d of cultivation, respectively. All *U. pertusa* extracts could cause the cavities, pieces and chlorophyll decreased in microalgae cells to different degree except the distilled water extract. The further investigation found that the methanol extracts significantly decreased the contents of chlorophyll, protein and polysaccharide in the cells of those microalgae, and the ethyl acetate and acetone extracts had the similar effect on these physiological indicators.

Keywords: red tide microalgae; *U. pertusa*; growth inhibition; extract

近年来,随着近海海域污染的加剧,局部海域富营养化问题日益突出,赤潮现象在世界范围内的沿海水域频繁发生,已成为一种严重的世界性海洋灾害。与此同时,海洋沿岸带(如河口、海湾等)水体较浅的透光层内,以孔石莼和浒苔等绿藻为主要代表的海藻亦开始泛滥,形成海藻水华,给沿海渔业、养殖业和旅游业造成重大损失。因此,如何科学有效地控制和利用藻类资源,以减少藻华现象带来的经济损失,是广大科研人员亟待研究解决的问题。

已有研究表明,孔石莼能够抑制亚心形扁藻、赤潮异弯藻、亚历山大藻和海洋原甲藻的生长^[1-4]。鉴

于此,本研究通过测定藻细胞数量,观察藻细胞形态,分析藻细胞内叶绿素、蛋白质和多糖等生理指标含量的变化,分析了孔石莼的 6 种溶剂(石油醚、氯仿、乙酸乙酯、丙酮、甲醇和蒸馏水)提取物对米氏凯伦藻、中肋骨条藻和塔玛亚历山大藻 3 种赤潮微藻生长的影响,为利用孔石莼治理赤潮微藻提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

米氏凯伦藻、中肋骨条藻和塔玛亚历山大藻无

第一作者:孙颖颖,女,1978 年生,博士,副教授,研究方向为海洋生化工程。* 通讯作者。

* 江苏省海洋生物技术重点实验室开放课题(No. 2008HS017、2009HS09)。

菌株由中国海洋大学提供,经进一步分离纯化后于f/2培养基中培养,培养温度为 $(20.0 \pm 0.1)^\circ\text{C}$,光照强度 $40\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光暗比为12 h:12 h。

孔石莼采购于福建沿海,将采购的干品孔石莼在 40°C 下烘干3 d,待完全干燥后磨成粒径约0.3 mm的粉末,备用。

将天然海水经脱脂棉和300目筛过滤后煮沸、冷却,调节pH和盐度分别为8.5和30,备用。

1.2 孔石莼提取物的制备

分别取5.0 g孔石莼粉末于6个250 mL锥形瓶中,向锥形瓶中分别加入100 mL石油醚、氯仿、乙酸乙酯、丙酮、甲醇和蒸馏水。将6种孔石莼溶液超声波常温提取2 h后,用滤纸过滤除去残渣,并用 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜除去颗粒物。然后置于 60°C 下减压蒸干,获得的浸膏即为孔石莼的6种溶剂提取物。称取提取物质量后,孔石莼的5种有机溶剂提取物采用二甲基亚砜(DMSO)定容,蒸馏水提取物采用蒸馏水定容,制得2 g/L的6种提取物母液,并在无菌条件下过 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜除去微生物,于 4°C 保存备用。

1.3 孔石莼溶剂提取物的抑藻圈实验

采用培养皿抑藻圈法^{[5]3144},检测孔石莼的6种溶剂提取物对3种赤潮微藻(以下简称微藻)生长的影响。向f/2培养基中加入1.5%(质量分数)琼脂制成直径90 mm的平板。用处于对数生长期的微藻藻液浸润直径30 mm的圆形滤纸片,将被浸润的滤纸平铺于平板上,在滤纸中心滴加一定量孔石莼提取物母液。同时,以滴加相同体积的DMSO或蒸馏水为对照,每组实验设定3个重复。将培养皿放置于智能光照培养箱内培养,24 h后观察抑藻圈大小。

1.4 孔石莼提取物的抑藻作用

分别移取一定体积的孔石莼提取物母液于250 mL锥形瓶内,加入f/2培养基,将体积定容至150 mL,使得孔石莼提取物达到设定的浓度。以加入相同体积DMSO(或蒸馏水)的f/2培养基为对照组。调节培养基中米氏凯伦藻、中肋骨条藻和塔玛亚历山大藻的起始藻细胞数量分别为 8×10^4 、 85×10^4 、 4×10^4 个/mL,于 $(20.0 \pm 0.1)^\circ\text{C}$ 、光照强度40

$\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、光暗比12 h:12 h的条件下培养12 d。每个锥形瓶设定3个重复,每隔一天测定藻细胞数量。此外,在第12天测定藻细胞叶绿素、蛋白质和多糖含量,并用显微照相(放大倍数为400倍)拍摄藻细胞形态。

1.5 微藻的生理指标测定

1.5.1 叶绿素的测定

取15 mL藻液于2 000 r/min转速下离心15 min,弃去上清液,加入丙酮溶液至其体积分数90%,在 4°C 下抽提24 h。离心后,测定上清液在630、645、665 nm处的吸光度,参照文献[6]计算叶绿素含量。

1.5.2 蛋白质和多糖的测定

取25 mL藻液于2 000 r/min转速下离心10 min,弃去上清液。将藻泥于 -20°C 冻融破碎3次后,加入3 mL pH为6.5的磷酸盐缓冲溶液(PBS溶液)并充分振荡,离心10 min。参照文献[7]测定上清液中可溶性蛋白质和多糖含量。

1.6 数据处理

实验数据采用SPSS11.5软件包进行独立样本检验统计分析, $p < 0.05$ 为显著性差异, $p < 0.01$ 为极显著性差异。

2 结果和分析

2.1 6种孔石莼提取物的抑藻圈实验结果

表1为6种孔石莼提取物的制备情况。由表1可见,孔石莼的甲醇提取物、蒸馏水提取物得率最高,分别为30.0%与29.4%,石油醚提取物、氯仿提取物的得率最低,仅为13.0%、17.8%。6种孔石莼提取物的抑藻圈实验结果见图1。

由图1可见,孔石莼的5种有机溶剂提取物对米氏凯伦藻、中肋骨条藻和塔玛亚历山大藻均产生了一定的抑制作用。其中,甲醇提取物的抑制作用最强,甲醇提取物母液添加量为 $10\ \mu\text{L}$ 时,其对3种微藻的抑藻圈直径均在2.0 cm左右。而蒸馏水提取物母液添加量达到 $15\ \mu\text{L}$ 时,才会对中肋骨条藻和塔玛亚历山大藻产生微弱的抑制作用。

表1 6种孔石莼提取物的得率
Table 1 Yields of extracts prepared from the dry power of *U. pertusa* using different solvent

提取溶液	石油醚	氯仿	乙酸乙酯	丙酮	甲醇	蒸馏水
孔石莼提取质量/g	0.65	0.89	1.07	1.32	1.50	1.47
得率/%	13.0	17.8	21.4	26.4	30.0	29.4

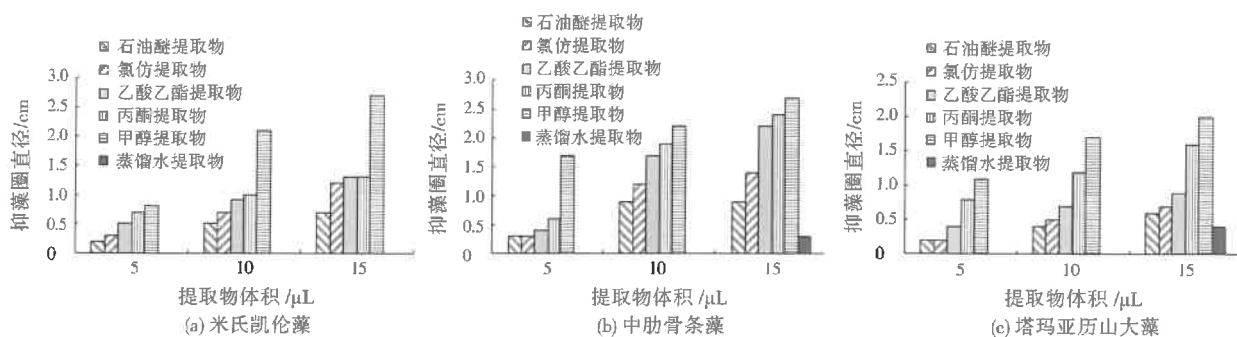


图1 孔石莼提取物的抑藻圈直径

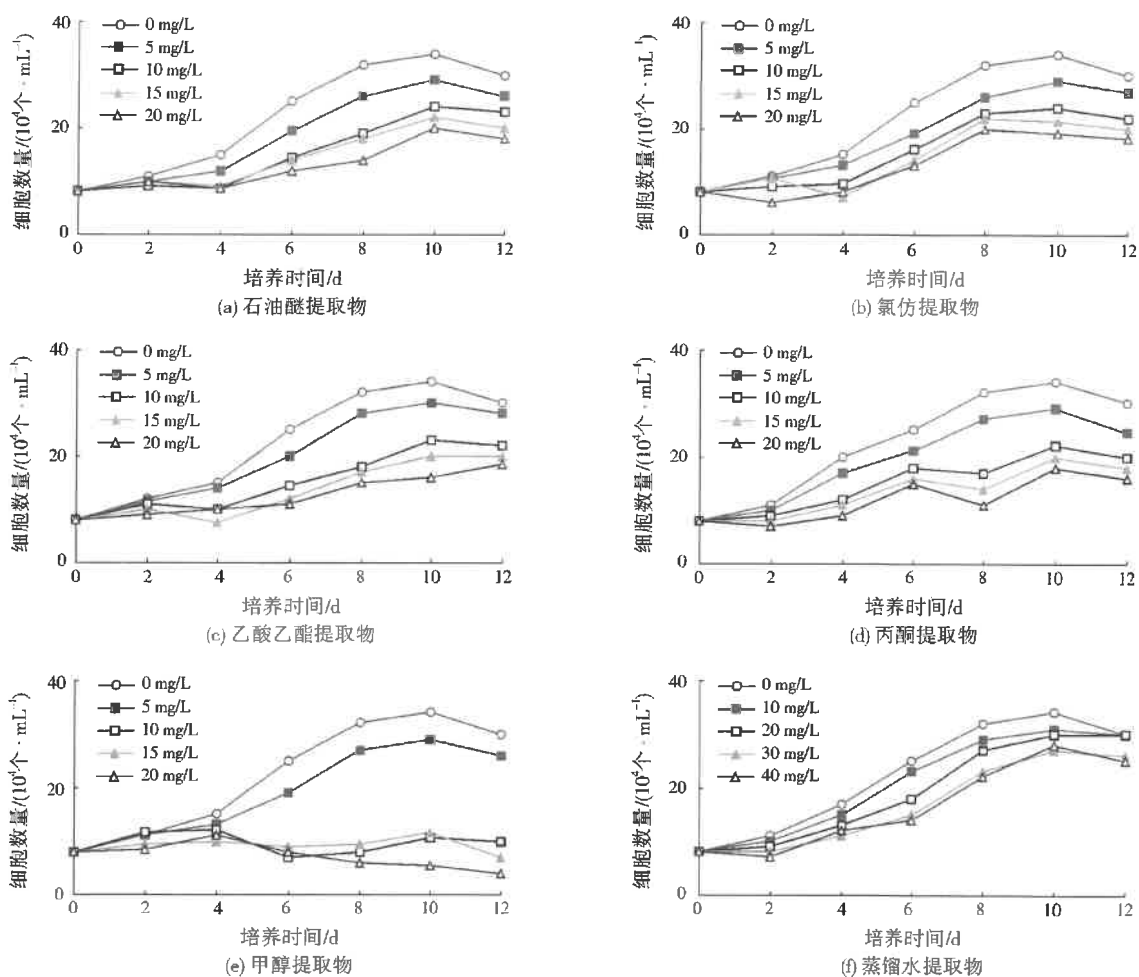
Fig. 1 Diameter of inhibition cycle of microalgae with the addition of the extract of *U. pertusa*

图2 孔石莼提取物对米氏凯伦藻生长的影响

Fig. 2 Effects of extracts from *U. pertusa* on the growth of *K. mikimotoi*

2.2 孔石莼提取物的抑藻实验结果

在抑藻实验中,调节f/2培养基中5种有机溶剂提取物的质量浓度为0、5、10、15、20 mg/L,由于在抑藻圈实验中蒸馏水提取物未对微藻产生明显抑制现象,因此抑藻实验中调节蒸馏水提取物质量浓度分别为0、10、20、30、40 mg/L,6种孔石莼提取物对

米氏凯伦藻、中肋骨条藻和塔玛亚历山大藻生长的影响见图2至图4。

由图2至图4可见,6种孔石莼提取物中甲醇提取物能最显著地抑制3种微藻的生长,其次为丙酮提取物。当f/2培养基中甲醇提取物 ≥ 15 mg/L时,实验组的藻细胞数量明显低于对照组

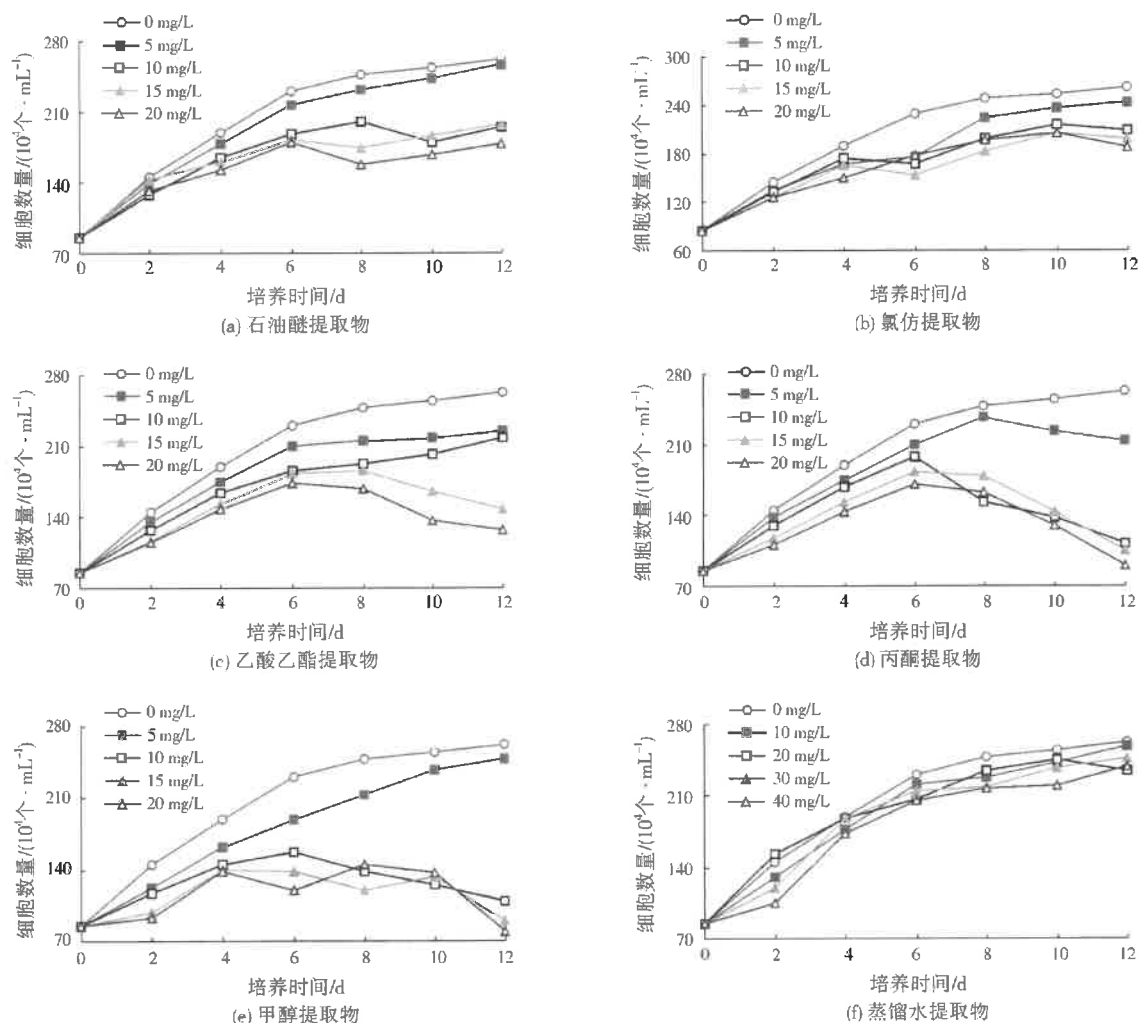


图3 孔石莼提取物对中肋骨条藻生长的影响

 Fig. 3 Effects of extracts from *U. pertusa* on the growth of *S. costatum*

($p < 0.05$)。比较发现甲醇提取物对米氏凯伦藻和中肋骨条藻的抑制作用强于其对塔玛亚历山大藻的抑制作用,当甲醇提取物为 15 mg/L 时,培养进行到第 12 天时其对米氏凯伦藻、中肋骨条藻和塔玛亚历山大藻的抑制率分别为 76.67%、65.65%、56.52%。这与上述抑藻圈实验的结果一致。对于米氏凯伦藻和中肋骨条藻而言,丙酮提取物同样能明显抑制它们的生长($p < 0.05$)。在实验设定的浓度范围内,蒸馏水提取物仍未对 3 种微藻的生长产生明显的抑制作用。这表明,是孔石莼有机溶剂提取物中的某些或某种物质抑制了 3 种微藻的生长。

然而,相关研究中发现,除孔石莼的甲醇提取物对赤潮异弯藻、亚历山大藻和海洋原甲藻具有明显的抑制活性。孔石莼的水溶性抽提液及其干粉末的蒸馏水提取物同样能够抑制某些赤潮微藻的生长。分析原因,很可能是选择的微藻种类不同而导致蒸

馏水提取物对它们产生不同的影响。

2.3 孔石莼提取物对 3 种赤潮微藻细胞形态的影响

孔石莼提取物对米氏凯伦藻、中肋骨条藻以及塔玛亚历山大藻的细胞形态影响分别见图 5 至图 7。由图 5 至图 7 可见,除蒸馏水提取物外,其余 5 种有机溶剂提取物均能使微藻细胞出现不同程度的空洞、破碎和细胞色素减退现象。在丙酮提取物的影响下,米氏凯伦藻和塔玛亚历山大藻的藻细胞出现较为明显的抱团现象;石油醚提取物可使中肋骨条藻细胞出现明显增大现象。尽管石油醚提取物未对塔玛亚历山大藻的藻细胞数量产生明显的影响,但其却使得藻细胞形态发生了一定程度的改变(见图 7(b))。这很可能是石油醚提取物仅使塔玛亚历山大藻的藻细胞膜发生某些改变,细胞轮廓边缘出现虚化现象,但并未使其破碎、死亡,仍保留较为完整的藻细胞形态,从而,在表观上藻细胞数量未见降低。

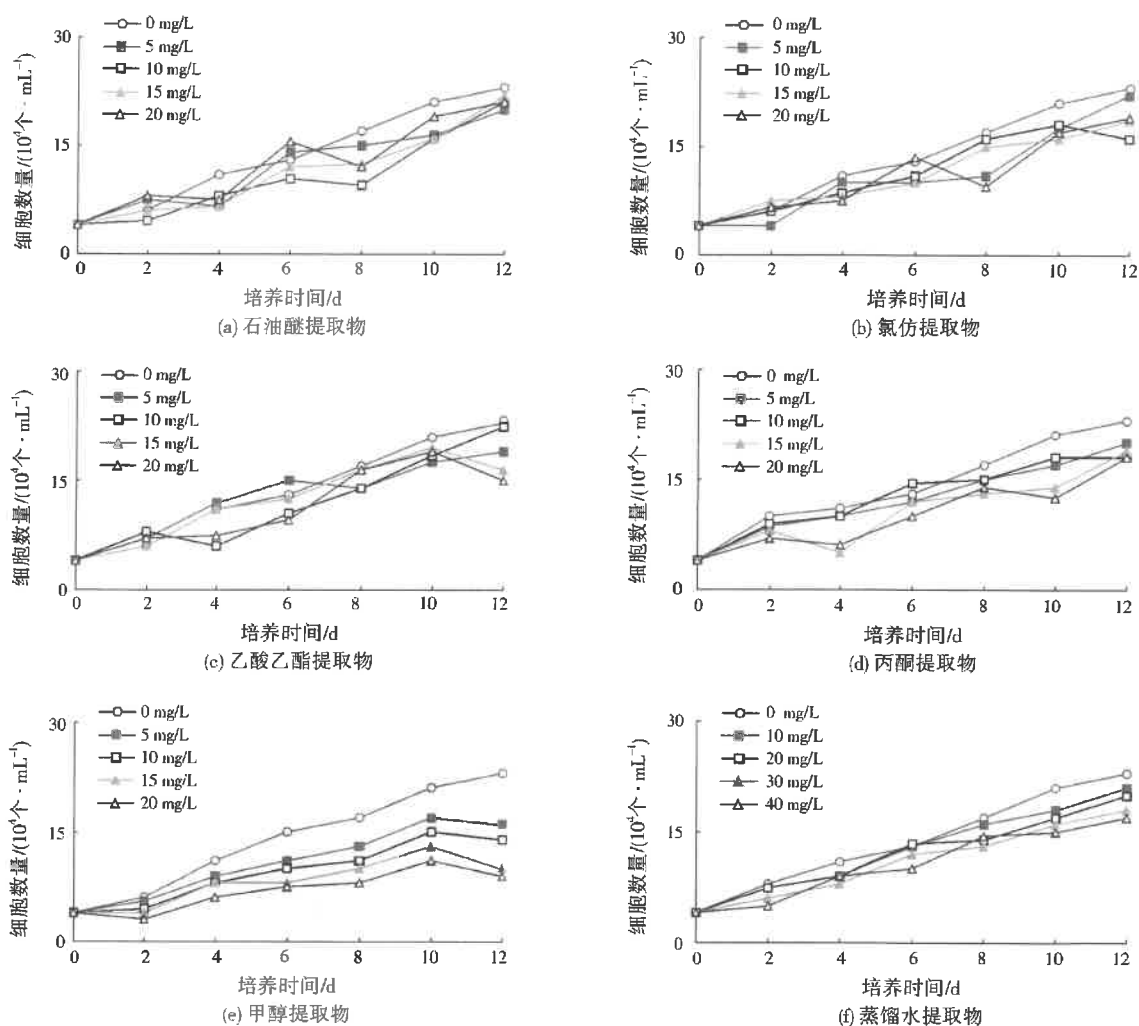


图4 孔石莼提取物对塔玛亚历山大藻生长的影响

Fig. 4 Effects of extracts from *U. pertusa* on the growth of *A. tamarense*

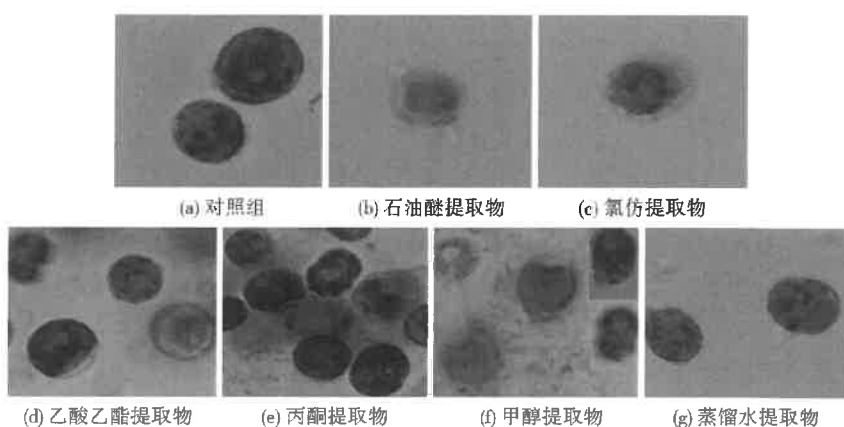


图5 孔石莼提取物对米氏凯伦藻细胞形态的影响

Fig. 5 Effects of extracts from *U. pertusa* on morphology of *K. mikimotoi*

洪喻等^{[5]3146}发现, 芦竹 (*Arundo donax* Linn.) 有机溶剂提取物能使铜绿微囊藻细胞出现空洞、破碎以及细胞聚集抱团现象。海带、浒苔以及紫菜提

取物对多环旋沟藻、前沟藻、米氏凯伦藻、中肋骨条藻和塔玛亚历山大藻等微藻生长影响的研究中也发现了类似现象^[8-12]。

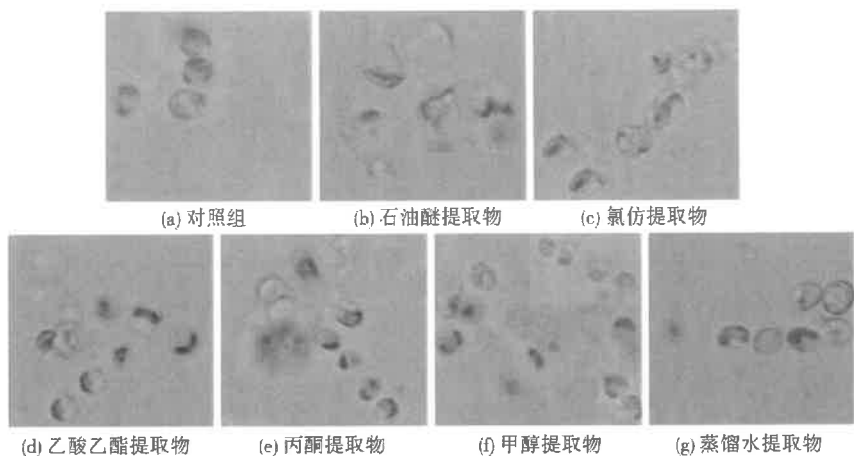


图 6 孔石莼提取物对中肋骨条藻细胞形态的影响
 Fig. 6 Effects of extracts from *U. pertusa* on morphology of *S. costatum*

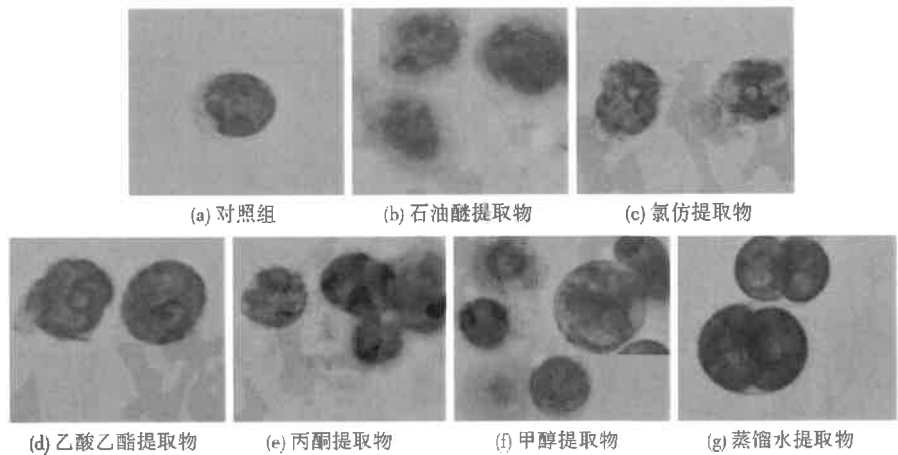


图 7 孔石莼提取物对塔玛亚历山大藻细胞形态的影响
 Fig. 7 Effects of extracts from *U. pertusa* on morphology of *A. tamarense*

表 2 孔石莼提取物对 3 种微藻叶绿素、蛋白质和多糖含量的影响¹⁾
 Table 2 Effects of extracts from *U. pertusa* on the contents of chlorophyll, protein and polysaccharides of the three species of the red-tide microalgae

项目		对照组	提取物浓度						mg/g
			石油醚提取物	氯仿提取物	乙酸乙酯提取物	丙酮提取物	甲醇提取物	蒸馏水提取物	
米氏凯伦藻	叶绿素	1.56	1.42	1.22	1.04	0.64	0.14	1.39	
	蛋白质	48	45	40	34	29	21	42	
	多糖	615	608	583	295	145	94	594	
中肋骨条藻	叶绿素	9.48	9.26	9.15	7.08	5.83	2.18	9.17	
	蛋白质	207	196	152	134	133	98	196	
	多糖	398	382	384	390	245	92	385	
塔玛亚历山大藻	叶绿素	4.05	3.97	3.80	2.48	1.24	1.06	3.35	
	蛋白质	50	47	43	40	32	26	39	
	多糖	811	798	660	369	254	79	798	

注：¹⁾孔石莼提取物为 20 mg/L，蒸馏水提取物为 40 mg/L。

2.4 6 种孔石莼提取物对 3 种微藻叶绿素、蛋白质和多糖含量的影响

6 种孔石莼提取物对 3 种微藻叶绿素、蛋白质和多糖含量的影响见表 2。

由表 2 可见，孔石莼提取物可不同程度地降低

3 种微藻细胞内的叶绿素、蛋白质和多糖的含量。其中，甲醇提取物的影响最为明显。与对照组相比，当甲醇提取物为 20 mg/L 时，米氏凯伦藻内叶绿素、蛋白质、多糖含量仅为对照组的 8.97%、43.75%、15.28%。中肋骨条藻内叶绿素、蛋白质、多糖的含

量仅为对照组的23.00%、47.34%、23.12%。塔玛亚历山大藻内叶绿素、蛋白质、多糖含量仅为对照组的26.17%、52.00%、9.74%。此外,丙酮提取物和乙酸乙酯提取物也对3种微藻细胞内的叶绿素、蛋白质和多糖含量产生了一定程度的影响。蒸馏水提取物未对3种微藻细胞内的3种生理指标产生明显的影响($p>0.05$)。值得注意的是,石油醚提取物对米氏凯伦藻和中肋骨条藻藻细胞数量的抑制作用高于蒸馏水提取物(见图2、图3),然而分析表2发现,石油醚提取物对此2种微藻的叶绿素、蛋白质和多糖的影响与蒸馏水提取物并没有明显差别。这很可能是因为藻细胞数量的增长趋势与藻细胞内生理指标的合成不同步导致,但具体原因还有待进一步研究。

3 结论

孔石莼的6种溶剂提取物中,甲醇提取物对3种微藻的抑制作用最为明显。当甲醇提取物为15 mg/L,培养进行到第12天时,其对米氏凯伦藻、中肋骨条藻和塔玛亚历山大藻的抑制率分别为76.67%、65.65%、56.52%。从对藻细胞形态的影响看,除蒸馏水提取物外,其余5种有机溶剂提取物均使微藻细胞出现不同程度的空洞、破碎和胞色素减退现象。甲醇提取物可明显降低3种微藻细胞内叶绿素、蛋白质和多糖的含量,乙酸乙酯和丙酮提取物对3种生理指标的含量也有一定影响。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 南春容,董双林.大型海藻孔石莼抑制浮游微藻生长的原因初探——种群密度及磷浓度的作用[J].中国海洋大学学报,2004,34(1):48-54.
- [3] 金秋.大型海藻孔石莼对赤潮微藻克生作用的实验研究及其克生物质的分离和鉴定[D].青岛:中国海洋大学,2005.
- [4] 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.
- [5] 洪喻,胡洪营,黄晶晶,等.不同溶剂提取芦竹化感物质对铜绿微囊藻生长的影响[J].环境科学,2008,29(11).
- [6] JENSEN A. Handbook of physiological methods[M]. New York:Cambridge University Press,1978.
- [7] 张志良,翟伟箴.植物生理学实验指导[M].北京:高等教育出版社,2002.
- [8] 杨善元,俞子文,孙文浩,等.凤眼莲根系中抑藻物质分离与鉴定[J].植物生理学报,1992,18(4):399-402.
- [9] NAGAYAMA K,SHIBATA T,FUJIMOTO K,et al. Algicidal effect of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome* on red tide microalgae[J]. Aquaculture, 2003,218(1/2/3/4):601-612.
- [10] 孙颖颖,刘筱潇,阎斌伦,等.条斑紫菜提取物对4种赤潮微藻生长的抑制作用[J].水产学报,2010,34(5):796-805.
- [11] 孙颖颖,刘筱潇,王长海.浒苔提取物对4种赤潮微藻生长的抑制作用[J].环境科学,2010,31(6):1662-1669.
- [12] JIN Qing,DONG Shuanglin. Comparative studies on the allelopathic effects of two different strains of *U. pertusa* on *Heterosigma akashiwo* and *A. tamarense*[J]. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 2003,293(1):41-55.

编辑:丁 怀 (修改稿收到日期:2012-04-20)

(上接第42页)

- [17] CALVET R. Adsorption of organic chemicals in soil[J]. Environ. Health Persp., 1989,83(11):145-177.
- [18] SINGH N. Sorption behavior of triazole fungicides in Indian soils and its correlation with soil properties[J]. J. Agric. Food Chem., 2002,50(22):6434-6439.
- [19] 崔皓,王淑平.环丙沙星在潮土中的吸附特性[J].环境科学,2012,33(8):2895-2900.
- [20] 高鹏,莫测辉,李彦文,等.高岭土对喹诺酮类抗生素吸附特性的初步研究[J].环境科学,2011,32(6):1740-1744.
- [21] 鲍艳宇,周启星,万莹,等.土壤有机质对土霉素在土壤中的吸附-解吸的影响[J].中国环境科学,2009,29(6):651-655.
- [22] WANG C J,LI Z H,JIANG W T. Adsorption of ciprofloxacin on 2:1 dioctahedral clay minerals[J]. Applied Clay Science, 2011,53(4):723-728.
- [23] 莫测辉,黄显东,吴小莲,等.蒙脱石对喹诺酮类抗生素的吸附平衡及动力学特征[J].湖南大学学报:自然科学版,2011,38(6):64-68.
- [24] 章明奎,王丽平,郑顺安.两种外源抗生素在农业土壤中的吸附与迁移特性[J].生态学报,2008,28(2):761-766.
- [25] RAQUELA A F,ALLISON LEONARD A M. Sorption of oxytetracycline to iron oxides and iron oxide-rich soils[J]. Environ. Sci. Technol., 2005,39(17):6664-6671.
- [26] GU Cheng,KARTHIKEYAN K G. Sorption of the antimicrobial ciprofloxacin to aluminum and iron hydrous oxides[J]. Environ. Sci. Technol., 2005,39(23):9166-9173.
- [27] CARTER M C,KILDUFF J E,WEBER J W J. Site energy distribution analysis of preloaded adsorbents[J]. Environ. Sci. Technol., 1995,29(7):1773-1780.
- [28] WEBER J W J,HUANG W. A distributed reactivity model for sorption by soils and sediments. 10. relationship between desorption,hysteresis,and the chemical characteristics of organic domains[J]. Environ. Sci. Technol., 1996,30(3):881-888.
- [29] HUANG Weilin,PENG Ping'an,YU Zhiqiang,et al. Effects of organic matter heterogeneity on the sorption and desorption of organic contaminant by soils and sediments[J]. Applied Geochemistry, 2003,18(7):955-972.
- [30] KONG W D,ZHU Y G,FU B J,et al. The veterinary antibiotic oxytetracycline and Cu influence functional diversity of the soil microbial community[J]. Environmental Pollution, 2006,143(1):129-137.

编辑:卜岩枫 (修改稿收到日期:2012-08-27)