

玉米秸秆对塔玛亚历山大藻生长的影响及化学基础研究

杨维东^{1,2}, 欧阳好婧¹, 刘洁生^{1,2*}

(1. 暨南大学生物工程学系, 广州 510632; 2. 暨南大学赤潮与水环境研究中心, 广州 510632)

摘要:以塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)为材料, 观察了玉米茎秆和玉米叶对塔玛亚历山大藻生长的影响, 比较了灭菌、未灭菌玉米叶的抑藻活性, 并对玉米叶抑制藻类生长的化学基础进行了分析, 以期筛选和发现新的高效除藻剂提供思路. 结果表明, 玉米秸秆能显著抑制塔玛亚历山大藻的生长, 玉米叶的抑藻作用强于玉米茎秆. 0.5 g/L 的玉米叶对密度为 1.69×10^6 个/L 的塔玛亚历山大藻的生长有明显的抑制作用. 灭菌、未灭菌玉米叶对塔玛亚历山大藻生长的抑制作用无明显差别, 表明微生物不是玉米秸秆发挥抑藻作用的主要原因. 玉米叶不同溶剂粗提物对塔玛亚历山大藻生长的抑制作用不同, 石油醚、二氯甲烷粗提物的抑藻活性明显强于乙酸乙酯和正丁醇粗提物. GC-MS 分析结果显示, 石油醚、二氯甲烷粗提物中主要含十八碳二烯酸、十八碳三烯酸、棕榈酸等脂肪酸类物质, 提示长链脂肪酸可能是玉米秸秆抑藻的主要化学成分.

关键词: 赤潮; 玉米秸秆; 脂肪酸; 塔玛亚历山大藻

中图分类号: X524 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)09-2470-05

Inhibitory Effects and Chemical Basis of Cornstalk on the Growth of *Alexandrium tamarense*

YANG Wei-dong^{1,2}, OUYANG Yu-jing¹, LIU Jie-sheng^{1,2}

(1. Department of Biotechnology, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. Research Center of Harmful Algae Blooms and Aquatic Environmental Science, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: To provide more information on new algaecide with high efficiency, ecological safety and selectivity, effects of corn stem and leaves on the growth of *Alexandrium tamarense* were observed. The roles of microorganism in the inhibition were assessed. The inhibitory activities of different solvent extracts from the corn leaves were discussed and the potential antialgal chemicals in corn leaves were analyzed by GC-MS. Cornstalk is shown to have distinctly inhibitory effect on *A. tamarense*, and the inhibition of corn leaves is stronger than that of the corn stem. 0.5 g/L of the corn leaves inhibit *A. tamarense* remarkably in cell density of 1.69×10^6 cells/L. There are little differences in antialgal action between aseptis leaves and rude leaves, suggesting that some antialgal compounds from leaves may be responsible for the inhibition and that microorganisms from leaves have little effect on the inhibition. The petroleum ether and dichloromethane extracts from corn leaves are shown to have stranger inhibition on *A. tamarense* than ethyl acetate and *n*-butanol extracts. GC-MS shows that extracts with high inhibitory activities contain many fatty acids such as linoleic acid, linolenic acid, and palmitic acid, etc. These results suggest that corn leaves have some inhibitory effect on *A. tamarense* and fatty acids may be responsible for the inhibition.

Key words: harmful algal bloom(HAB); cornstalk; fatty acids; *Alexandrium tamarense*

利用植物化感作用和化感物质进行藻类的控制和治理具有良好的应用前景, 已成为筛选和发现新除藻剂的重要途径^[1,2]. 马来眼子菜、石龙尾、满江红、水浮莲、石菖蒲、江蓠、石莼、龙须菜等对淡水藻类生长的抑制作用已见报道^[1]; 大麦秆治理藻类水华更是受到西方国家的广泛关注和青睐^[3]. 英国等欧洲国家已在小型浅水池塘、水库藻类水华的控制上取得成功, 正进一步向大型水域扩展. 美国也加大了对大麦秆控藻的研究力度, 美国环境保护署(EPA)已试图将之发展成大众化、商业化的产品. 研究证实, 大麦秆浸出液中的化感物质是抑藻的主要原因, 这些物质在浓度很低时即可对藻类起到抑制作用, 滞留的化学物质对环境产生的负面影响非常

小^[1]. 大麦秆在控制淡水水华方面的成功引起了学术界的高度关注^[4]. Terlizzi 等^[4]探讨了大麦秆浸泡液在高盐度条件下对数种赤潮藻生长的影响. 结果发现, 高盐情况下, 麦秆浸泡液对藻类生长也有显著的抑制作用, 且具有明显的选择性, 显示出这种方法在赤潮治理方面的潜力和良好前景.

玉米是中国第二大粮食作物, 也是中国分布最广的粮食作物, 各省、自治区和直辖市均有种植. 玉

收稿日期: 2007-08-11; 修订日期: 2007-09-08

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973)项目(2001CB409710); 广东省科技计划项目(2004B20501007)

作者简介: 杨维东(1967~), 男, 博士, 教授, 主要研究方向为环境生物分子与毒理学, E-mail: tywd@jnu.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: tjslu@jnu.edu.cn

米生长期长,获取方便.玉米秸秆作为玉米生产的副产品,产量极其丰富.玉米在收割后,其秸秆在农村一般被当作柴烧,未能充分利用,十分可惜.若能利用这一丰富的农作物资源,变废为宝,用其治理赤潮和水华,不仅可为赤潮的治理、新除藻剂的筛选提供新的思路,同时也为农林废弃资源的有效利用开辟新途径.塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)是一种分布广泛的有害赤潮甲藻,近年来在我国近海水域频繁出现和暴发,给当地水产养殖业造成巨大的经济损失^[5].本研究以塔玛亚历山大藻为目标藻,比较了玉米茎秆和玉米叶对塔玛亚历山大藻生长的影响,进一步考察了玉米叶附着微生物等对玉米叶抑藻作用的影响,并对玉米叶抑制藻类生长的化学基础进行了分析,以期利用玉米秸秆控制水华和赤潮提供参考,为新的除藻剂的筛选提供思路.

1 材料与方法

1.1 实验材料

玉米秸秆(华农 1 号)取自华南农业大学农学院农场.将收割后的玉米秸秆的茎叶分离,洗净后烘干,分别研磨成粉末,160 目过筛后避光保存.塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)由暨南大学理工学院江天久研究员提供.

1.2 藻的培养

塔玛亚历山大藻的培养采用 K 培养基.所用培养液均由人工海水加营养盐配置而成,并经 0.22 μm 微孔滤膜除菌.实验前将保存藻种转移到三角瓶中进行扩大培养,置于温度为(22 ± 1)℃、光照强度为4 000 lx、光暗比为 12 h:12 h 的 Xutemp 智能生物人工气候箱中,细胞生长至指数生长期时用于实验.

1.3 抑藻实验

1.3.1 玉米茎秆和叶对塔玛亚历山大藻抑制作用的比较

分别将 0.05、0.1 和 0.15 g 玉米茎秆或玉米叶粉末加入一系列装有 100 mL 处于指数生长期的塔玛亚历山大藻培养液中,置于人工气候培养箱中培养.对照不加玉米茎秆或玉米叶,3 份平行实验.每天定时在倒置显微镜下观察、计数.

1.3.2 灭菌与未灭菌玉米叶对塔玛亚历山大藻抑制作用的比较

称等量玉米叶 2 份,一份高压蒸汽灭菌 15 ~ 20 min,一份不做处理.分别加入 100 mL 处于指数生长期的塔玛亚历山大藻培养液,置于人工气候培养箱中培养.对照不加玉米叶,3 份平行实验.观察、

计数.

1.4 玉米叶抑藻活性成分分析

1.4.1 玉米叶抑藻活性成分的提取与抑藻作用分析

按图 1 所示步骤进行玉米叶中活性物质的提取和分离,挥去相应溶剂后得石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯和正丁醇粗提物.粗提物溶于无水乙醇,配成 10 g/L 的溶液备用.

分别取上述溶液 500 μL 加至 100 mL 处于指数生长期的塔玛亚历山大藻培养液中,置人工气候箱中培养.对照组加 K 培养基 500 μL,3 份平行实验.观察、计数,计算抑制率.

抑制率(%) = $\frac{\text{对照组藻密度} - \text{实验组藻密度}}{\text{对照组藻密度}} \times 100\%$

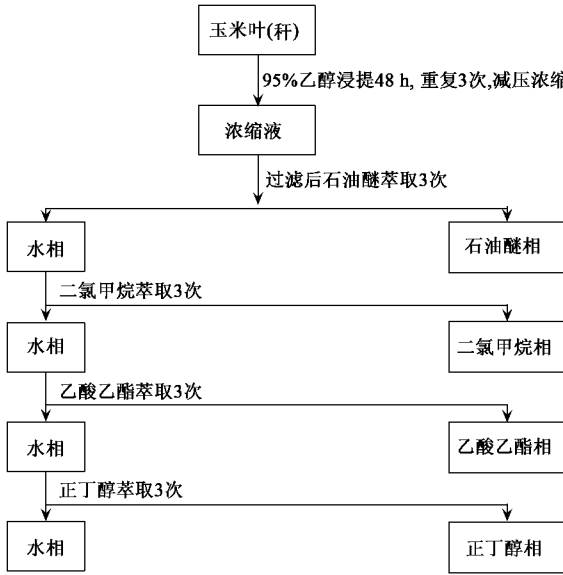


图 1 玉米叶中抑藻活性成分的提取分离流程
Fig. 1 Isolation process of antialgal chemicals in corn leaves

1.4.2 玉米叶抑藻活性成分的 GC-MS 分析

采用 Finnigan 公司 TRANCE 2000 气相色谱/质谱联用仪(GC-MS)对粗提物进行分析,GC-MS 条件如下:色谱柱,Hp-FFAP,30 m × 0.25 mm × 0.25 μm;柱温 80 ~ 220℃,升温速度 10℃/min;柱前压 50 kPa;离子源温度 230℃;连接线温度 280℃;扫描范围 29.0 ~ 550.0.所得质谱经计算机检索,分析出初步的化学成分,用面积归一法计算各成分的相对含量.

2 结果与分析

2.1 玉米茎秆和叶对塔玛亚历山大藻的抑制作用

图 2 为加入不同剂量的玉米茎秆和叶后塔玛亚历山大藻的生长曲线.从中可以看出,1.0 g/L 以上的

玉米茎秆和玉米叶对塔玛亚历山大藻的生长均有明显的抑制作用.相比之下,玉米叶对塔玛亚历山大藻的抑制作用更强.

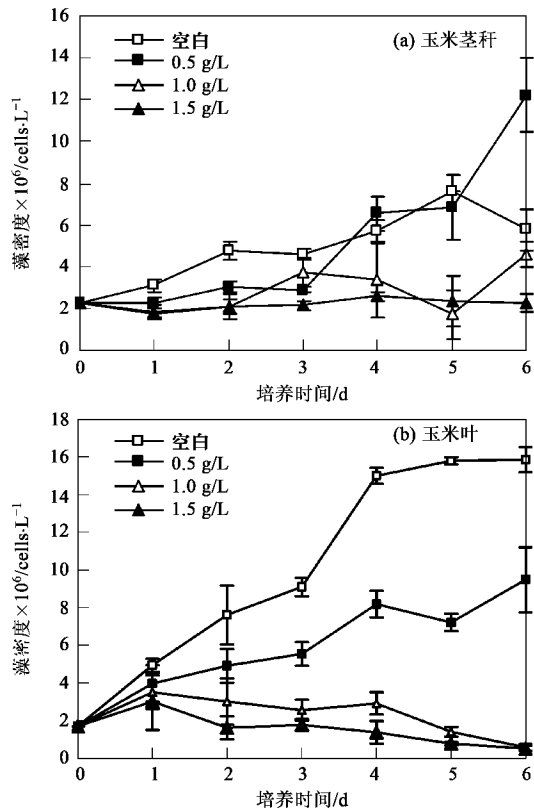


图 2 不同剂量的玉米茎秆和叶对塔玛亚历山大藻生长的影响

Fig.2 Effect of corn stems and leaves on the growth of *Alexandrium tamarense*

2.2 灭菌与未灭菌玉米叶对塔玛亚历山大藻抑制作用的比较

灭菌与非灭菌玉米叶对塔玛亚历山大藻生长的影响如图 3 所示.可以看出,灭菌与未灭菌的玉米叶对塔玛亚历山大藻的生长都有明显的抑制作用,灭菌与未灭菌组的抑制作用并无显著性差别($p > 0.05$).说明玉米叶的抑藻作用主要是由自身引起的,可能与其自身存在的抑藻物质有关,微生物的影响很小.

2.3 玉米叶的不同溶剂粗提物的抑藻作用比较

图 4 为不同溶剂粗提物对塔玛亚历山大藻的抑制率.可以看出,不同溶剂粗提物抑藻活性间有很大差异.相同浓度的石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯和正丁醇粗提物对塔玛亚历山大藻的抑制率分别为 1、1、0.12 和 0.16.加入石油醚或者二氯甲烷的粗提物后,塔玛亚历山大藻的生长被完全抑制.显微镜下观

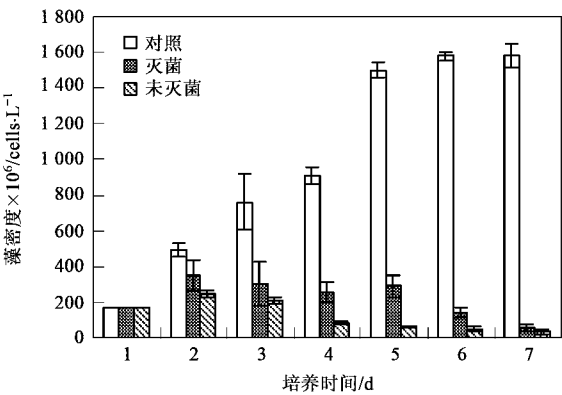


图 3 灭菌与未灭菌玉米叶的抑藻作用比较

Fig.3 Inhibitory effects of autoclaved corn leaves and rude corn leaves on *Alexandrium tamarense*

察发现,12 h 后全部藻细胞停止游动,不少细胞出现脱壳现象;2 d 后已无完整藻细胞,细胞全部裂解死亡.

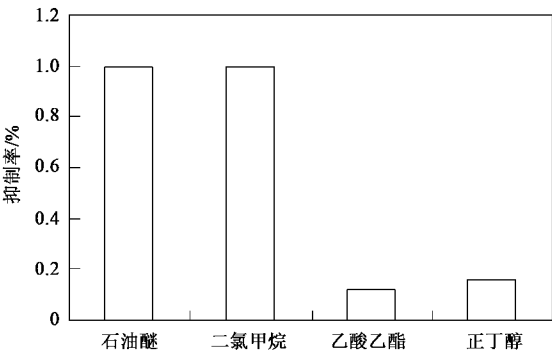


图 4 玉米叶的不同溶剂粗提物的抑藻活性比较

Fig.4 Inhibition of different solvent extracts from corn leaves on *A. tamarense*

2.4 玉米叶的石油醚粗提物 GC-MS 分析结果

玉米叶的石油醚粗提物 GC-MS 分析结果如图 5 和表 1 所示.由表 1 可以看出,石油醚粗提物中主要

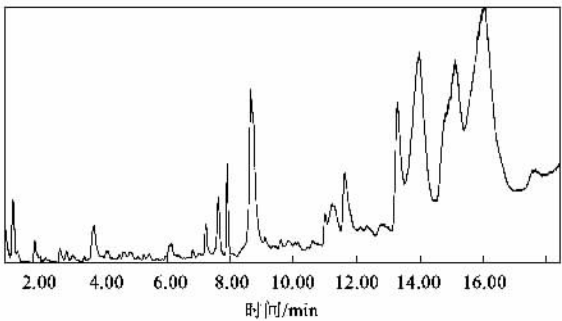


图 5 玉米叶的石油醚粗提物的 GC-MS 总离子流谱图

Fig.5 TIC chromatograph of petroleum ether extracts from corn leaves by GC-MS analysis

含有十八碳三烯酸、十八碳二烯酸等脂肪酸类物质和十六酸乙酯、二氢猕猴桃内酯等酯类物质,还含有少量的酚、醇和酮类.其中含量最高的十八碳三烯酸、十八碳二烯酸 2 个组分占 56.9%.

表 1 玉米叶的石油醚粗提物中化学成分的 GC-MS 分析结果

Table 1 Identified components of petroleum ether extract from corn leaves

成分	滞留时间/min	峰高	含量/%
3-甲基异戊酸	1.13	978 600	1.273
己酸	1.82	342 390	0.434
辛酸	2.61	221 525	0.314
苯乙酸	2.83	183 533	0.255
苯甲酸	3.69	592 294	1.418
苯乙醇	6.15	242 241	0.597
十酸	7.23	509 382	0.611
β-紫兰酮	7.62	959 541	1.460
二氢猕猴桃内酯	8.64	2 906 936	9.920
十二酸	13.30	2 248 085	8.243
十六酸乙酯	13.97	2 793 002	18.593
十八碳三烯酸	15.09	2 450 947	20.650
十八碳二烯酸	16.01	3 301 639	36.234

2.5 玉米叶中二氯甲烷粗提物的 GC-MS 分析结果

玉米叶中二氯甲烷粗提物的 GC-MS 分析结果如图 6 和表 2 所示.由表 2 可以看出,玉米叶二氯甲烷粗提物的成分和石油醚粗提物的成分相似,长链脂肪酸、酯类的含量较高.其中邻苯二甲酸二丁酯、棕榈酸 2 个组分占 56.8%.

综合表 1 和表 2 可知,石油醚和二氯甲烷粗提物中均含有较多的长链脂肪酸,提示长链脂肪酸可能是玉米叶发挥抑藻作用的主要化感物质.而酯类在 2 种溶剂粗提物中含量也比较高,提示酯类也可能在玉米叶抑藻作用中扮演重要角色.

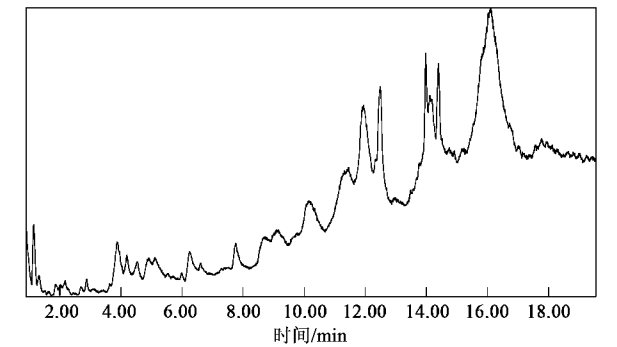


图 6 玉米叶中二氯甲烷粗提物的 GC-MS 总离子流谱图

Fig. 6 TIC chromatograph of CH₂Cl₂ extracts from corn leaves by GC-MS analysis

表 2 玉米叶的二氯甲烷粗提物中化学成分的 GC-MS 分析结果

Table 2 Identified components of CH₂Cl₂ extract of corn leaves

成分	滞留时间/min	峰高	含量/%
3-甲基异戊酸	1.148	463 184	5.403
己酸	1.865	88 385	1.194
苯乙醇	2.173	102 300	1.637
苯甲酸	3.881	394 883	14.239
香兰素	6.257	278 434	10.323
二氢猕猴桃内酯	7.750	192 643	4.874
邻苯二甲酸二丁酯	11.951	706 513	32.735
棕榈酸	12.488	824 692	24.033
油酸	13.976	621 840	5.562

3 讨论

玉米(*Zea mays*)又名玉蜀黍,俗称苞谷、棒子、珍珠米等,是粮食兼饲料作物.玉米籽粒和植株在组成成分方面有许多特点,使得玉米的利用价值非常广泛.世界玉米总产量中直接用作粮食的只占三分之一,大部分用于其他方面.玉米秸秆作为玉米生产的副产品,是一种非常有用的可再生资源.据统计,2000~2005 年间我国的玉米秸秆年产量在 1.2~1.48 亿 t.目前,全国大约有 30% 的秸秆直接用作农村生活燃料;10% 用于牲畜饲料;23% 用作农副业生产;6% 直接还田.大量的玉米秸秆被废弃或被就地燃烧,造成了资源的极大浪费.有研究表明,玉米植株的地上部分和根系分泌物中含有一种广谱性的抗性物质——异羟肟酸[2,4-二羟基-2H-1,4-苯并噁嗪-3(4H)-酮]及其衍生物和酚酸类物质等^[6,7].异羟肟酸是植物抵御病虫害危害的重要物质.丁布作为玉米中主要的苯并噁嗪类物质,具有抗细菌、抗真菌、抗虫、抗线虫和化感作用等活性^[7].不难推测,亦如稻秆和大麦秆,玉米秸秆也能抑制藻类的生长,玉米秸秆也可能存在某些能够显著抑制藻类生长的物质.但截止目前,国内外尚未见有玉米秸秆对藻类生长影响的研究.

本研究表明,玉米茎秆和叶都能显著抑制塔玛亚历山大藻的生长,玉米叶的抑制作用更强,1.0 mg/L 的玉米叶几乎可以完全去除塔玛亚历山大藻.许多研究^[3]指出,秸秆在抑制藻类生长的过程中,附着在秸秆上的微生物可能发挥着重要作用.为明确玉米秸秆上附着微生物可能存在的抑藻效应,本研究对比分析了经高压灭菌和未经高压灭菌的玉米叶对塔玛亚历山大藻生长的影响.结果显示,灭菌和未灭菌的玉米叶对塔玛亚历山大藻的生长都有明显的

抑制作用,两者之间并无显著性差异.提示玉米秸秆的抑藻作用主要是其中抑藻活性物质的作用,微生物对玉米叶抑制藻类生长的影响很小.

从植物体中提取活性成分的方法很多,其中溶剂分步提取法因可使植物体中非极性和极性化合物得到初步分离,因而得到广泛应用,尤其是在需要提供生物试验样品时尤为常见^[8].为弄清玉米秸秆中的抑藻活性成分,笔者选择石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯和正丁醇等4种不同极性大小的溶剂,对玉米叶化学成分进行了初步的分离,并对不同组分的抑藻作用进行了比较,利用GC-MS分析了抑藻作用最强的2个组分的化学成分.结果显示,不同溶剂粗提物的抑藻作用不同,石油醚、二氯甲烷粗提物的抑藻作用较强,而乙酸乙酯和正丁醇粗提物的抑藻作用则比较弱.根据相似相溶原理,可知玉米叶中抑藻成分主要是一些弱极性物质.进一步的分析发现,石油醚、二氯甲烷粗提物的主要成分包括十八碳二烯酸、十八碳三烯酸、棕榈酸等脂肪酸类物质和较多的酯类物质.许多研究指出^[9,10],长链脂肪酸对藻类的生长具有显著的抑制作用.大麦秆、菊花秆、稻草和艾属植物等对单细胞绿藻和蓝藻生长的抑藻作用与二辛酯和己二酸等有关^[10];木粉中常见的C14~C18的脂肪酸对*Selenastrum capricornutum*的生长有显著的抑制作用,其中油酸的抑藻效果最明显^[9].因此,可以推测,玉米叶中存在的长链脂肪酸可能是其抑制藻类生长的原因之一.

值得指出的是,异羟肟酸是玉米中最常见的化感物质,但本实验中未能检出.对此,笔者特地进行了苯甲羟肟酸等对塔玛亚历山大藻生长的影响研究(结果未列出).结果发现,15 mg/L苯甲羟肟酸对塔玛亚历山大藻的生长并无明显影响,表明异羟肟酸并非玉米叶抑藻的主要活性成分,这与本实验中乙酸乙酯和正丁醇粗提物的抑藻作用比较弱的结果是一致的.因为异羟肟酸是强极性物质.

另外,有研究指出,玉米的次生代谢物除了丁布及其衍生物,还含有各种酚酸类化合物,它们都是作物抗虫抗病的物质基础,并且大多具有化感作用^[7].

考虑到酚酸类物质通常极性较强,因此可以推测其并非玉米叶抑藻作用的主要物质.

4 结论

(1)玉米秆和叶对塔玛亚历山大藻的生长均有显著的抑制作用,玉米叶的抑藻作用更强.

(2)灭菌与未灭菌的玉米叶对塔玛亚历山大藻的生长均有明显的抑制作用,两者之间差异不大,提示玉米叶上附着的微生物不是其抑制藻类生长的主要原因.

(3)长链脂肪酸可能是玉米秸秆中主要的抑藻活性物质,异羟肟酸虽然是玉米秸秆中重要的化感物质,但不具有抑藻活性.

参考文献:

- [1] 李锋民, 胡洪营. 芦苇抑藻化感物质的分离及其抑制蛋白核小球藻效果研究[J]. 环境科学, 2004, **25**(5): 89-92.
- [2] 李锋民, 胡洪营, 门玉洁, 等. 化感物质对小球藻抗氧化体系酶活性的影响[J]. 环境科学, 2006, **27**(10): 2091-2094.
- [3] 徐敏, 毕永红, 赵富富, 等. 大麦秆在控制水华藻类中的应用(综述)[J]. 水生生物学报, 2002, **26**(6): 704-711.
- [4] Terlizzi D E, Ferrier M D, Ambrester E A, et al. Inhibition of dinoflagellate growth by extracts of barley straw (*Hordeum vulgare*) [J]. J Appl Phycol, 2002, **14**(4): 275-280.
- [5] Leong S C Y, Murata A, Nagashima Y, et al. Variability in toxicity of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense* in response to different nitrogen sources and concentrations[J]. Toxicon, 2004, **43**(4): 407-415.
- [6] 聂呈荣, 骆世明, 曾任森, 等. 玉米化感物质异羟肟酸的研究进展[J]. 应用生态学报, 2004, **15**(6): 1079-1082.
- [7] 聂呈荣, 骆世明, 王建武, 等. 转 Bt 基因玉米叶片次生代谢物 DIMBOA 和酚酸类物质含量的变化[J]. 生态学报, 2005, **25**(4): 814-823.
- [8] 徐任生主编. 天然产物化学[M]. 北京: 科学出版社, 1993. 5-6.
- [9] Kamaya Y, Kurogi Y, Suzuki K. Acute toxicity of fatty acids to the freshwater green alga *Selenastrum capricornutum* [J]. Environ Toxicol, 2003, **18**(5): 289-294.
- [10] Kakizawa H, Asari F, Kusumi T, et al. An allelopathic fatty acid from the brown alga *Cladosiphon okamuranus* [J]. Phytochemistry, 1988, **27**(3): 731-735.