改性小麦秸秆去除赤潮异弯藻的实验研究

王洪亮[1,2], 俞志明[1*], 宋秀贤[1], 曹西华[1]

(1. 中国科学院海洋研究所海洋生态与环境科学重点实验室, 青岛 266071; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 研究了改性小麦秸秆对赤潮异弯藻的去除作用和机制. 结果表明, 在与未改性秸秆相同用量(0.10 g/L)的情况下, 在 120 min 时, 改性秸秆对赤潮异弯藻的去除率可以从 10% 左右提高到 80% 以上. 为了探讨改性秸秆对赤潮异弯藻的去除机制, 测定了核苷酸在 260 nm 时的吸光度, 结果发现水体内核苷酸物质浓度增大, 说明在此作用过程中, 藻细胞膜结构遭到破坏, 核苷酸物质由胞内释放. 当改性秸秆用量为 0.15 g/L时, 释放核苷酸在 260nm 时吸光度与正常细胞的吸光度比值为 1.17, 此时改性秸秆对赤潮异弯藻造成的损害是不可逆的. 实验发现, 改性秸秆对赤潮异弯藻同时具有吸附作用和灭杀作用. 当浓度较低时, 改性秸秆通过吸附细胞体, 或者与细胞膜结合, 从而导致部分藻细胞的絮凝; 而当浓度进一步增加时, 改性秸秆可以破坏细胞膜的结构, 导致大量膜内物质的释放, 进而导致藻细胞的死亡.

关键词: 改性小麦秸秆; 赤潮异弯藻; 去除机制; 细胞膜损害; 有害赤潮

中图分类号: X55 **文献标识码**: A **文章编号**: 0250-3301(2010)02-0296-05

Removal of *Heterosigma akashiwo* by Modified Wheat Straw

WANG Hong-liang[1,2], YU Zhi-ming[1], SONG Xiu-xian[1], CAO Xi-hua[1]

(1. Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: The modified wheat straw (MWS) was prepared and used to investigate the removal and the mechanism of *Heterosigma akashiwo*. The results showed that under the same loading of 0.10g/L, the algal removal efficiency could reach 80% by MWS in 120 minutes, while 10% by the unmodified wheat straw. To investigate the mechanism, we measured the optical density of the supernatant at 260 nm. The result showed that the nucleotides were released, which meant disruption of the cytoplasmic membrane. More than 15% of the nucleotides were released from the cytoplasm under the effect of 0.15g/L of MWS, indicating the irreversible damage on the cellular membrane, which resulted in the disintegration of the harmful algal cells. It is suggested that the low concentration of MWS might adsorb onto the algal cell surface and bind to the cytoplasmic membrane, which resulted in the flocculation. While the high concentration might cause the penetration into the cellular membrane, which resulted in the leakage of cytoplasm material and hence the death of cell.

Key words: modified wheat straw (MWS); *Heterosigma akashiwo*; removal mechanism; membrane damage; harmful algal blooms (HABs)

随着人类经济的快速发展, 富营养化在全球日益加剧, 成为全球关注的问题. 富营养化引起的有害赤潮, 在全球范围内频繁暴发, 造成巨大的经济损失, 破坏生态系统的平衡, 并造成鱼类、贝类等大范围的死亡, 甚至通过食物链传递威胁人类健康[1~3]. 有害赤潮已成为国际社会共同关注、急需解决的重大海洋环境问题[2]. 探索经济有效的防治方法, 对于保护海洋环境质量, 保障海洋经济可持续发展以及维护人类健康, 具有重要的科学意义.

寻找一种价廉易得、方便使用、对海洋生物无明显副作用的有效控制赤潮的方法非常必要[2,3]. 在我国, 小麦作为一种主要的农作物, 种植面积大, 每年会产生大量的农用秸秆. 但目前秸秆利用技术滞后, 收割后的麦秸主要用于饲料、造纸等, 还有许多的秸秆被遗弃和焚烧. 过剩秸秆正成为农业生态环境中的非点源污染[4]. Barret 等[5] 和 Welch 等[6] 利用大麦秆对蓝藻、硅藻等进行了实验研究, 并证明了其良好的抑藻效果; Gibson 等[7] 推测其作用机制是由于其自身在降解过程中释放的活性化学物质产生抑藻作用; Pillinger 等[8] 进一步研究发现, 降解过程中产生的醌类物质, 是大麦秆抑藻作用的主要活性物质; 高洁等[9] 利用小麦秸秆进行了对球形棕囊藻的研究, 结果发现当小麦秸秆用量浓度 > 2.0 $g \cdot L^{-1}$ 时, 能够持续抑制藻的生长, 并认为活性物质的释放是小麦秸秆抑藻的主要机制. 但直接利用秸

收稿日期: 2009-03-02; 修订日期: 2009-07-16
基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KZCX2-YW-208); 国家自然科学基金委"创新研究群体科学基金"项目(40821004); 中国科学院海洋研究所知识创新领域前沿项目(2007-8)
作者简介: 王洪亮(1979~), 男, 博士研究生, 主要研究方向为环境科学, E-mail: wanghongliang@qdio.ac.cn
* 通讯联系人, E-mail: zyu@qdio.ac.cn

秆抑制藻的生长时,用量较大,作用时间较慢,如在现场试验中,一般需 3 ~6 个月后才可产生明显的抑藻现象[5,6,10].

为此,本实验通过对小麦秸秆进行化学改性,并针对我国沿海常见赤潮藻——赤潮异弯藻,进行了改性秸秆抑制藻华生物的实验,并做了进一步的机制研究,探讨了改性秸秆用于赤潮治理的可能性,以期为赤潮的治理提供了进一步的参考.

1　材料与方法

1.1　实验材料

N,*N*-二甲基甲酰胺、环氧氯丙烷、NaOH、HCl、C_2H_5OH、NaCl、蛋白酶 K(Merck)均为分析纯试剂;33% 二甲胺水溶液为化学纯试剂.

1.2　实验用赤潮生物

实验所用赤潮异弯藻(*Heterosigma akashiwo*)取自胶州湾水域,经分离、纯化,在 20℃ ±1℃、3 000 lx 光照和 12 h 光暗循环条件下,在不加硅酸盐的 f/2 培养液中培养.

1.3　改性小麦秸秆的制备[11,12]

小麦秸秆用蒸馏水清洗,在 60℃ 下烘干 12 h,经物理粉碎后,500 目过筛,分装备用. 称取上述秸秆 2.0 g 放入 500 mL 的三口圆底烧瓶中,加入 100 mL 的环氧氯丙烷、120 mL 的 *N*,*N*-二甲基甲酰胺在 100℃ 下,搅拌加热 60 min;加入 25 mL 吡啶作催化剂,继续在 100℃ 下,搅拌加热 60 min;加入 30 mL 的二甲胺(33%)溶液,在 100℃ 下,搅拌加热 180 min;将产物分别用 NaOH(0.1 mol/L)、HCl(0.1 mol/L)、C_2H_5OH(50%)和 NaCl(0.1 mol/L)在 30℃ 清洗,用旋转蒸发仪干燥,保存在干燥器中,待用.

1.4　改性秸秆对赤潮异弯藻的去除实验

取指数生长期的赤潮异弯藻液(5×10^3 ~ 1×10^4 cells/mL,下同)于 50 mL 的具塞比色管中,加入一定量的改性秸秆和未改性秸秆,使不同秸秆用量均为 0.10 g/L. 同时设空白对照样品(原藻液),迅速摇匀后,静置于微藻培养室中,分别于 15、30、60、120、240、360 min 时取样. 用 Lugol 碘液固定样品,光学显微镜下血球计数板计数. 以未加秸秆的空白藻样为参比,重复实验 3 次,计算改性秸秆和未改性秸秆去除藻细胞的动力学效率.

根据动力学研究结果,改性秸秆去除试验一般在 120 min 时基本达到平衡,因此选择在 180 min 时研究改性秸秆用量(0、0.02、0.05、0.10、0.15、0.20 g/L)对赤潮生物的影响,方法同上.

1.5　改性秸秆对藻细胞中核苷酸释放率的影响实验

由于 DNA、RNA 等核苷酸物质在 260 nm 时,具有较强的吸收峰[13,14],因此通过测定 260 nm 时吸光度的变化,考察藻细胞核苷酸的释放变化.

取指数生长期的赤潮异弯藻藻液于 50 mL 的比色管中,加入一定量的改性秸秆和未改性秸秆,使秸秆用量为 0.10 g/L,以未加秸秆的藻液为空白对照,分别于 15、30、60、120、240、360 min 时,取藻液并于3 000 r/min离心 15 min. 测定上清液 D_{260} 值. 重复实验 3 次. 实验阳性对照组加入 10 μL 20 mg/L蛋白酶 K, 37℃ 水浴 60 min[15],按同样方法处理后测定上清液 D_{260} 值. 并按式(1)计算释放率.

$$\text{释放率} = \frac{D_{\text{实验样品}} - D_{\text{空白对照}}}{D_{\text{阳性对照}} - D_{\text{实验样品}}} \tag{1}$$

与上述方法相同,分别取秸秆浓度 0.02、0.05、0.10、0.15、0.20 g/L,作用 180 min 后,进一步观察秸秆用量对赤潮异弯藻细胞中核苷酸释放的影响.

由于秸秆在水中会释放出如酚类、酯类、蒽醌类等活性物质[7,8],这些物质会影响 260nm 时水溶液的吸光度,因此在计算时,扣除了同样浓度秸秆的水溶液吸光度.

2　结果与讨论

2.1　改性秸秆对赤潮异弯藻去除效率的影响

图 1 为秸秆用量 0.10 g/L时,秸秆改性前后对赤潮异弯藻去除动力学的影响. 结果表明,秸秆改性后对赤潮异弯藻的去除速率有较大的提高. 15 min 时,改性秸秆对赤潮异弯藻的去除率约为 50%,而

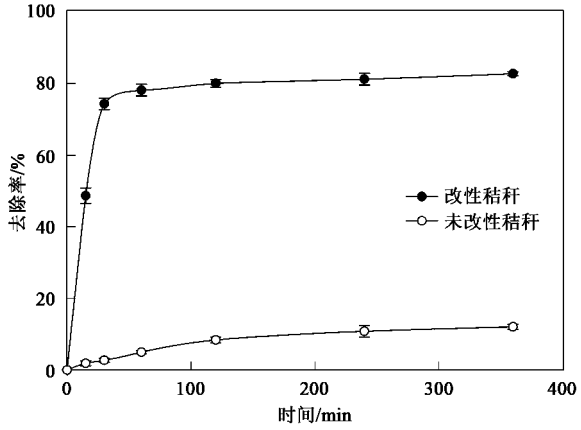

图 1　秸秆去除赤潮异弯藻的动力学

Fig. 1　Kinetics of flocculating *Heterosigma akashiwo* cells with addition of straw

此时未改性秸秆对赤潮异弯藻的去除率不足 1%. 随着时间的增加,改性后的秸秆对赤潮异弯藻的去除率继续升高,在 60 min 时,基本达到平衡,去除率约 80%,此时未改性秸秆对赤潮异弯藻的去除率仅为 10% 左右.

图 2 为作用时间 180 min 时,秸秆不同用量对去除赤潮异弯藻效率的影响. 结果表明,改性秸秆的用量对赤潮异弯藻的去除率有明显的影响. 随着用量的升高,对赤潮异弯藻的去除率显著提高;在 0.02 g/L时,去除率约为 57%;当用量增加至 0.10 g/L时,相同的作用时间,去除率达到 80%;再继续增大用量,去除率并未有很大的变化. 对于未改性秸秆,随着用量的升高,赤潮异弯藻的去除率也有所升高,但较改性秸秆去除率低很多;当用量为 0.10 $g \cdot L^{-1}$时,未改性秸秆对赤潮异弯藻的去除率仅为 10% 左右.

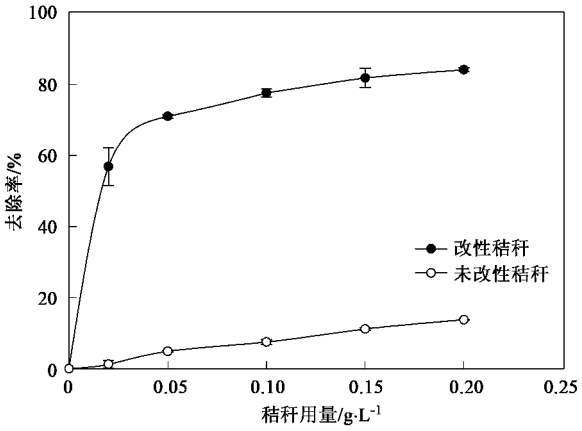

图 2 秸秆用量对去除赤潮异弯藻的影响曲线

Fig. 2 Removal efficiencies of *Heterosigma akashiwo* cells at different straw loadings

2.2 改性秸秆对赤潮异弯藻的去除机制探讨

为了进一步探讨改性秸秆对赤潮异弯藻的去除机制,研究了溶液中 DNA、RNA 等核苷酸物质的浓度变化,通过计算藻细胞中核苷酸的释放率,评估藻细胞的完整性[13,14].

图 3 为秸秆用量 0.10 g/L时,秸秆对赤潮异弯藻中核苷酸释放率的动力学实验. 结果表明,随着时间的增加,对于改性秸秆体系,藻细胞胞内核苷酸的释放率逐渐升高;当时间为 15 min 时,释放率约为 11%;60 min 时,释放率为 15% 左右,达到平衡,随着时间进一步增加,基本保持不变. 改性秸秆作用时,胞内核苷酸的释放率趋势与对赤潮藻的去除动力学曲线接近;而对于未改性秸秆体系,胞内核苷酸的释放率基本保持不变,在 0% 左右浮动,这说明胞内核苷酸基本没有释放.

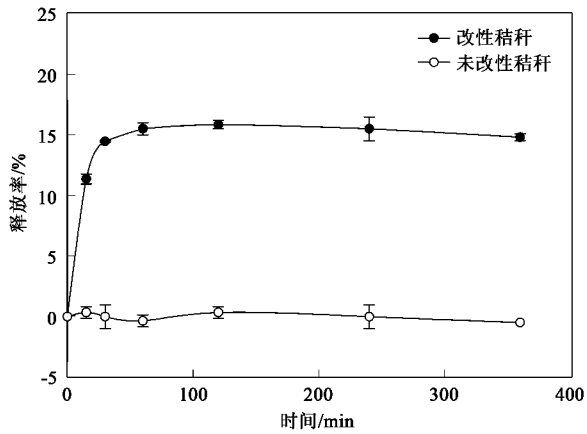

图 3 秸秆对赤潮异弯藻细胞中核苷酸释放率的动力学曲线

Fig. 3 Kinetic curves of the leakage percentage of nucleotide material from *Heterosigma akashiwo* cells with addition of straw

图 4 为作用时间 180 min 时,不同秸秆用量对赤潮异弯藻中核苷酸释放率的影响. 结果表明,改性秸秆的用量对胞内核苷酸的释放率有明显的影响. 随着用量的升高,胞内核苷酸的释放率升高. 当用量为 0.02 $g \cdot L^{-1}$时,胞内核苷酸的释放率约为 6%;当用量增加至 0.10 $g \cdot L^{-1}$时,胞内核苷酸的释放率约为 15%;继续增大用量,胞内核苷酸的释放率继续增加. 对于未改性秸秆体系,随着用量的升高,胞内核苷酸的释放率基本保持不变,在 0% 左右浮动,这说明胞内核苷酸基本没有释放.

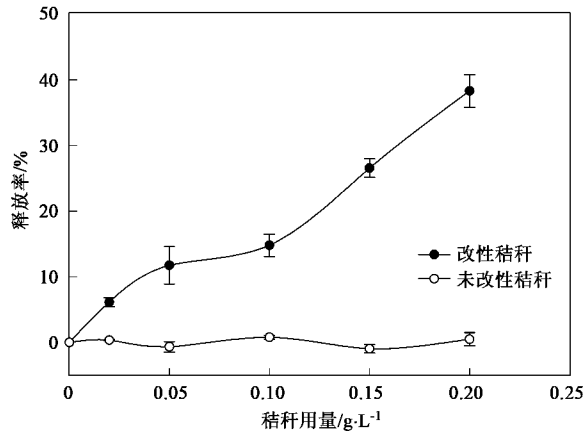

图 4 秸秆用量对赤潮异弯藻细胞中核苷酸释放率的影响曲线

Fig. 4 Leakage percentage of nucleotide material from *Heterosigma akashiwo* cells at different straw loadings

图 5 为作用时间 180 min 时,秸秆用量对赤潮异弯藻中释放核苷酸在 260 nm 时吸光度比值的影

响. 结果表明,该比值和改性秸秆的用量显著相关,随着用量的升高,该比值持续升高. 当用量为 0.02 g/L时,该比值约为 1.03;当用量增加至 0.15 g/L 时,该比值约为 1.17;再继续增大用量,比值继续增加.

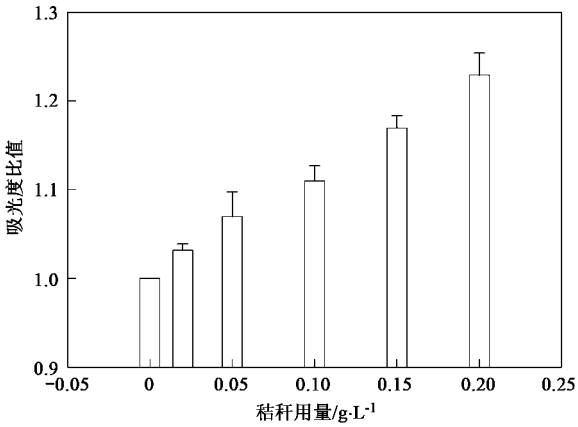

图 5　秸秆用量对赤潮异弯藻细胞中释放核苷酸在 260 nm 时吸光度比值(实验组/对照组)的影响

Fig. 5　Ratio on the leakage of nucleotides from *Heterosigma akashiwo* cells between the O. D. of the experimental group and the control group at different modified straw loadings

秸秆在改性后,化学性质发生变化,秸秆中的纤维素部分含有季铵盐的结构[11]. 在季铵盐作用于藻细胞的过程中,容易造成穿透细胞壁,并破坏细胞膜的完整性,从而导致胞内物质,如 K^+、DNA、RNA 等的释放[13,14]. 对于季铵盐作用于细胞的研究,认为其作用过程可以分为 6 步[16,17]:① 吸附到细胞体表面;② 穿透细胞壁;③ 与细胞膜结合;④ 扰乱细胞膜组成;⑤ 胞内物质如 K^+、DNA、RNA 等的释放;⑥细胞体死亡. 高分子化后的季铵盐,其相对分子量增大,电荷密度提高,就综合效果而言,高分子化的季铵盐比相同结构的小分子体的灭杀性和稳定性均有大幅度提高[17]. 曹西华等[18]研究发现,季铵盐对赤潮异弯藻的作用主要是由于其强表面活性,通过吸附藻细胞的磷脂双分子膜,从而引起膜结构的破坏和功能的丧失,进而导致细胞死亡.

改性秸秆作用于赤潮生物时,季铵盐结构同样起到非常重要的作用. 由图 3、图 4 可以看出,改性秸秆作用赤潮异弯藻的过程中,溶液中核苷酸浓度的增大,说明改性秸秆中季铵盐部分作用于藻细胞,破坏藻细胞膜,导致胞内物质释放. 由图 5 可以看出,当改性秸秆浓度为 0.15 g/L时,释放核苷酸在 260 nm 时吸光度与正常细胞的吸光度比值为 1.17. Chen 等[13]在研究细菌细胞时,认为当释放核苷酸在 260 nm 时吸光度与正常细胞的吸光度比值大于 1.15 时,灭杀剂会对细胞造成不可逆的损害. 这说明在本实验中,当浓度为 0.15 $g \cdot L^{-1}$时,改性秸秆会造成藻细胞不可逆的损害. 从图 2、图 4 可以看出,当改性秸秆用量低时,核苷酸释放率与去除率的趋势一致,而随着用量的进一步增加,核苷酸释放率增加而去除率不变. 这说明,当浓度较低时,改性秸秆通过与藻细胞体的吸附电中和与架桥作用,絮凝藻细胞体,从而造成藻细胞的絮凝沉淀,此时只有少量的细胞膜破坏和少量核内物质的释放;当浓度进一步增加时,改性秸秆通过破坏细胞膜的结构,导致大量膜内物质的释放. 同时可能由于赤潮异弯藻具有运动性,而改性秸秆在水体中沉降,不能充分接触藻细胞,所以随着用量的进一步增加,赤潮异弯藻去除率变化不大.

对于未改性秸秆体系,通常人们认为,在秸秆自身降解过程中可释放活性化学物质,如酚类、酯类、蒽醌类等,这些物质通过化感作用,影响细胞器膜的透性和细胞的分裂、生长及酶的功能和活性,从而影响植物的呼吸作用和光合作用达到抑制藻生长的目的[19]. 这些作用需要较长时间才能见效,约 6 个月[5,6,10]. 所以,在本实验中,未发现对藻细胞膜造成破坏,导致核苷酸等物质的释放,未改性秸秆表现出很低的去除效率.

3　结论

(1)秸秆改性后可极大提高对赤潮异弯藻的去除效率,在用量为 0.10 g/L、120 min 时,去除率可从未改性时的 10% 提高到 80% 以上,并且随着用量的增加,其去除效率进一步增强.

(2)实验发现改性秸秆体系中核苷酸物质浓度增加,说明改性秸秆作用赤潮异弯藻后,造成细胞膜结构的破坏,导致胞内物质的释放、藻细胞的死亡,从而大大提高了该体系的去除效率.

(3)当改性秸秆用量为 0.15 g/L时,释放核苷酸在 260 nm 时吸光度与正常细胞的吸光度比值为 1.17,说明改性秸秆体系对赤潮异弯藻造成的损害是不可逆的.

参考文献:

[1] ECOHAB. The Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms. A National Research Agenda [R]. Woods Hole, MA, USA: Woods Hole Oceanographic Institute, 1995, 66.

[2] Anderson D M. Turning back the harmful red tide [J]. Nature, 1997, **388**: 513-514.

[3] Kim H G. Mitigation and Controls of HABs [A]. In: Ecology of Harmful Algae [M]. Springer Berlin Heidelberg, 2006. 327-338.

[4] 钟华平,岳燕珍,樊江文. 中国作物秸秆资源及其利用[J]. 资源科学,2003,**25**(4): 62-67.

[5] Barrett P R F, Littlejohn J W, Curnow J. Long-term algal control in a reservoir using barley straw [J]. Hydrobiologia, 1999, **415**: 309-313.

[6] Welch I M, Barrett P R F, Gibson M T, *et al*. Barley straw as an inhibitor of algal growth I: Studies in the Chesterfield Canal [J]. Journal of Applied Phycology, 1990, **2**: 231-239.

[7] Gibson M T, Welch I M, Barrett P R F, *et al*. Barley straw as an inhibitor of algal growth II: Laboratory studies [J]. Journal of Applied Phycology, 1990, **2**: 241-248.

[8] Pillinger J M, Cooper J A, Ridge I. Role of phenolic compounds in the antialgal activity of barley straw [J]. Journal of Chemical Ecology, 1994, **20**(7): 1557-1569.

[9] 高洁,杨维东,刘洁生,等. 利用小麦秸控制赤潮生物生长的研究[J]. 海洋环境科学,2005,**24**(1): 5-8.

[10] 吴为中,芮克俭,刘永. 大麦秆控藻研究进展[J]. 生态环境,2005,**14**(6): 972-975.

[11] Orlando U S, Baes A U, Nishijima W, *et al*. Preparation of agricultural residue anion exchangers and its nitrate maximum adsorption [J]. Chemosphere, 2002, **48**: 1041-1046.

[12] Wang Y, Gao B Y, Yue W W. Preparation and utilization of wheat straw anionic sorbent for the removal of nitrate from aqueous solution [J]. Journal of Environmental Sciences, 2007, **19**: 1305-1310.

[13] Chen C Z, Cooper S L. Interactions between dendrimer biocides and bacterial membranes [J]. Biomaterials, 2002, **23**(16): 3359-3368.

[14] Sun X X, Choi J, Kim E K. A preliminary study on the mechanism of harmful algal bloom mitigation by use of sophorolipid treatment [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2004, **304**: 35-49.

[15] 刘洁生,杨维东,张珩,等. 二氧化氯对球形棕囊藻叶绿素 a、蛋白质、DNA 含量的影响[J]. 热带亚热带植物学报,2006,**15**(5): 427-432.

[16] 周轩榕,卢滇楠,邵曼君,等. 表面接枝季铵盐型高分子材料抗菌过程的特性研究[J]. 高等学校化学学报,2003,**24**(6): 1131-1135.

[17] Kanazawa A, Ikeda T, Endo T. Polymeric phosphonium salts as a novel class of cationic biocides. II: Effects of counter anion and molecular weight on antibacterial activity of polymeric phosphonium salts [J]. Journal of Polymer Science. Part A: Polymer Chemistry, 1993, **31**(6): 1441-1447.

[18] 曹西华,俞志明. 季铵盐类化合物灭杀赤潮异弯藻的实验研究[J]. 海洋与湖沼,2003,**34**(2): 201-207.

[19] 杨小茹,苏建强,郑天凌. 化感作用在赤潮调控中的意义及前景[J]. 环境科学学报,2008,**28**(2): 219-226.