

浒苔提取物对 4 种赤潮微藻生长的抑制作用

孙颖颖¹, 刘筱潇¹, 王长海^{2*}

(1. 淮海工学院海洋学院, 连云港 222005; 2. 烟台大学海洋学院, 烟台 264005)

摘要: 通过测定藻细胞密度和细胞体积, 观察藻细胞形态, 分析藻细胞内叶绿素、蛋白质和多糖含量等生理指标的变化, 研究了浒苔 5 种溶剂 (甲醇、丙酮、乙酸乙酯、氯仿和石油醚) 提取物对前沟藻 (*Amphidinium hoeffleri*)、米氏凯伦藻 (*Karenia mikimitoi*)、塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*) 和中肋骨条藻 (*Skeletonema costatum*) 生长的抑制作用。结果表明, 5 种溶剂提取物中, 甲醇提取物的抑藻作用最为显著。第 10 d, 其对前沟藻、米氏凯伦藻、塔玛亚历山大藻和中肋骨条藻的生长抑制率依次为 54.0%、48.1%、44.0% 和 37.5%。同时发现, 各溶剂提取物均能降低藻细胞运动能力。其中, 甲醇、丙酮和乙酸乙酯提取物致使大部分藻细胞出现空洞、破碎和细胞色素明显减褪现象; 而添加丙酮和乙酸乙酯提取物的部分藻细胞出现抱团现象。此外, 乙酸乙酯、氯仿和石油醚提取物明显降低了藻细胞的体积。进一步研究发现, 甲醇提取物明显降低了 4 种微藻细胞内叶绿素、蛋白质和多糖的含量, 致使添加甲醇提取物的前沟藻、米氏凯伦藻、塔玛亚历山大藻和中肋骨条藻的叶绿素、蛋白质和多糖含量比对照组的相应含量低约 51%。其余溶剂提取物同样改变了 4 种微藻细胞内此 3 种生理指标的含量, 但影响并不显著。在此基础上, 采用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇对甲醇提取物进一步分离, 获得 4 种提取物 (石油醚相、乙酸乙酯相、正丁醇相和水相)。其中, 石油醚相和乙酸乙酯相的抑制作用较强, 对 4 种微藻的生长抑制率超过 25%。结果表明, 利用甲醇浸泡浒苔可以获得具有明显抑藻活性的粗提物; 此粗提物通过进一步的液液分离萃取后, 获得 2 个能抑制 4 种测试微藻生长的组分。

关键词: 赤潮微藻; 浒苔; 抑制作用; 抑藻物质; 提取

中图分类号: X55 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2010)06-1662-08

Growth Inhibition of the Four Species of Red Tide Microalgae by Extracts from *Enteromorpha prolifera* Extracted with the Five Solvents

SUN Ying-ying¹, LIU Xiao-xiao¹, WANG Chang-hai²

(1. Ocean School, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China; 2. School of Ocean, Yantai University, Yantai 264005, China)

Abstract: To study the effects of extracts of *Enteromorpha prolifera* on the growth of the four species of red tide microalgae (*Amphidinium hoeffleri*, *Karenia mikimitoi*, *Alexandrium tamarense* and *Skeletonema costatum*), the extracts were extracted with five solvents (methanol, acetone, ethyl acetate, chloroform and petroleum ether), respectively. Based on the observation of algal morphology and the measurement of algal density, cell size and the contents of physiological indicators (chlorophyll, protein and polysaccharide), the results showed methanol extracts of *E. prolifera* had the strongest action. The inhibitory effects of *A. hoeffleri*, *K. mikimitoi*, *A. tamarense* and *S. costatum* by the methanol extracts were 54.0%, 48.1%, 44.0% and 37.5% in day 10, respectively. The extracts of *E. prolifera* extracted with methanol, acetone and ethyl acetate caused cavities, pieces and pigment reduction in cells, and those with chloroform and petroleum ether caused goffers on cells. The extracts of *E. prolifera* extracted with all the five solvents decreased athletic ability of the cells, among which those extracted with ethyl acetate, chloroform and petroleum ether decreased cell size of test microalgae. The further investigation found that the methanol extracts significantly decreased contents of chlorophyll, protein and polysaccharide in the cells of those microalgae. The inhibitory effect of chlorophyll, protein and polysaccharide contents of four species of microalgae by the methanol extracts was about 51%. On the basis of the above experiments, dry powd of *E. prolifera* were extracts with methanol, and extracts were obtained. The methanol extracts were partitioned to petroleum ether phase, ethyl acetate phase, *n*-butanol phase and distilled water phase by liquid-liquid fractionation, and those with petroleum ether and ethyl acetate significantly inhibited the growth of all test microalgae, and the inhibitory effect of four species of microalgae by those two extracts was above 25% in day 10. Our researches expressed that antialgal substances in *E. prolifera* extracted with methanol were obtained. And two fractions (petroleum ether phase and ethyl acetate phase) that inhibited the growth of all test microalgae were obtained when the methanol extracts was fractionated by liquid-liquid fractionation.

Key words: red tide microalgae; *Enteromorpha prolifera*; growth inhibition; antialgal substances; extract

收稿日期: 2009-07-26; 修订日期: 2009-09-17

基金项目: 淮海工学院人才引进科研启动项目 (KQ08001); 江苏省海洋生物技术重点建设实验室开放课题项目 (2008HS017)

作者简介: 孙颖颖 (1978~), 女, 博士, 主要研究方向为海洋生化工程, E-mail: sy-999@163.com

* 通讯联系人, E-mail: chwang2001@sina.com

随着陆源污染物对海洋的污染日趋加重,赤潮已成为世界各地海岸普遍存在的现象,对近海水域生态环境、人类生活和沿海水产业的可持续发展造成了极大的威胁.在赤潮频发背景下,研究者提出了一些治理赤潮的方法,如利用粘土矿物^[1]、季铵盐类化合物^[2],以及病毒^[3]、细菌^[4]等抑制或灭杀赤潮微藻.这些治理方法的研究取得了一系列成果,但鉴于外来添加物质可能对海洋生态系统产生可知或不可预见的影响,利用海洋环境中的生物因子进行赤潮的防控已经越来越引起人们的重视^[5].其中,利用海藻与微藻间的相互作用来预防或控制赤潮是一个新的研究方向^[6,7].

海藻不仅能够净化水质,还能与赤潮微藻进行营养竞争^[8],防止赤潮生物的爆发性繁殖与增长;它们还能向环境中分泌抑藻物质,抑制赤潮微藻的生长^[9~11].海藻抑藻的研究正在逐渐深入,并取得了一定的阶段性成果,已经发现某些海藻对海洋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*)^[11],龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)抑制锥状斯氏藻(*Scrippsiella trochoidea*)^[12],江蓠(*Gracilaria lemaneiformis*)抑制东海原甲藻(*Prorocentrum donghaiense*)和塔玛亚历山大藻^[13],鼠尾藻(*Sargassum thunbergii*)和小珊瑚藻(*Corallina pilulifera*)抑制赤潮异弯藻^[14,15].目前,某些海藻的抑藻物质已被报道.例如,从墨角藻(*Fucus vesiculosus*)中分离出的聚酚能抑制陆兹单鞭金藻(*Monochrysis lutheri*)的生长^[16];从*Ralfsia spongiocarpa*中分离出的鞣酸对*Porphyrodiscus simulans*和*Rhodophysema elegans*有强烈的抑制作用^[17];海头红(*Plocamium hamatum*)产生的单萜^[18]、川蔓(*Ruppia maritima*)产生的二萜^[19]以及从小珊瑚藻中分离出的溴仿^[20]同样能够抑制某些微藻的生长.从孔石莼体内也分离鉴定出能抑制赤潮异弯藻的 9, 12, 15-十八碳三烯酸、6, 9, 12, 15-十八碳四烯酸和 5Z, 8Z, 11Z, 14Z-二十碳四烯酸等不饱和脂肪酸^[21].

2008 年 6 月中旬,我国青岛近海海域及沿岸遭遇了浒苔(*Enteromorpha prolifera*)自然灾害.为了充分利用这些资源,本研究采集了大量的浒苔样品.通过一系列前期工作,笔者发现浒苔活体、水溶性抽提液以及干粉末能明显抑制前沟藻(*Amphidinium hoefleri*)、米氏凯伦藻(*Karenia mikimotoi*)、塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)和中肋骨条藻

(*Skeletonema costatum*)等 4 种赤潮微藻的生长.在此基础上,通过测定藻细胞密度和细胞体积,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的变化,分析浒苔干粉末的 5 种溶剂(甲醇、丙酮、乙酸乙酯、氯仿和石油醚)提取物对前沟藻、米氏凯伦藻、塔玛亚历山大藻和中肋骨条藻等 4 种赤潮微藻的生长影响.进一步,采用液液萃取分离方法,对上述实验中具有明显抑制活性的提取物进行分离,分析所获得的分离物对前沟藻、米氏凯伦藻、塔玛亚历山大藻和中肋骨条藻生长的抑制作用,以期为进一步研究浒苔抑藻物质提供实验基础和理论依据.

1 材料与方 法

1.1 实验材料

前沟藻、米氏凯伦藻、塔玛亚历山大藻和中肋骨条藻五菌株由中国海洋大学提供,经进一步分离纯化后由烟台大学海洋生化工程研究所保存,在 f/2 培养基中培养,培养温度为 $(20 \pm 0.1)^\circ\text{C}$,光照强度 $40 \mu\text{mol} \cdot (\text{m}^2 \cdot \text{s})^{-1}$,光暗比为 12:12.

浒苔采集于青岛太平角.将采集的鲜活浒苔去除杂藻,用自来水仔细洗去泥沙和其它附着物,用混合的抗生素在藻体组织表面作灭菌处理.然后,用蒸馏水漂洗处理材料 3~4 次,除去表面灭菌剂.随后,将处理过的浒苔于 40°C 下烘干 3 d.

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(实验所用海水均做如上处理).

1.2 浒苔 5 种溶剂提取物的制备

称取 250 g 浒苔干粉末(粉碎至 0.3 mm),每份 50 g 置于 500 mL 锥形瓶中,并分别加入 400 mL 石油醚、氯仿、乙酸乙酯、丙酮和甲醇.超声波常温提取 2 h 后,用滤纸过滤除去残渣,并用 0.22 μm 有机系滤膜除去颗粒物干扰. 40°C 下旋转蒸发除去溶剂,获得浸膏,称其质量后,用二甲基亚砜(DMSO)定容至 10 mL.浓缩液在无菌条件下,再次通过 0.22 μm 无菌有机系滤膜除去微生物,于 4°C 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,后续投加比例均控制在此范围内.

1.3 浒苔甲醇提取物的液液分离

按照实验 1.2 的方法制备一定质量甲醇浸膏.此浸膏用 90% 的甲醇水溶液溶解后,加入石油醚萃取 3 次,减压蒸干得到石油醚相浸膏.将剩余的甲醇

水溶液40℃减压条件下蒸发除去甲醇后,加入适量的蒸馏水重新溶解,然后加入乙酸乙酯萃取3次,减压蒸干得到乙酸乙酯相浸膏。最后,加入适量正丁醇萃取3次,减压蒸干分别得到正丁醇相浸膏和水相浸膏。4种分离物分别溶解于适量的DMSO中,保存于4℃冰箱备用。

1.4 抑藻实验

1.4.1 浒苔5种溶剂提取物的抑藻作用

在f/2培养基中,分别添加一定量浒苔的5种溶剂提取物。随后,接种4种赤潮微藻,培养混合液总体积为250 mL。前沟藻、米氏凯伦藻、塔玛亚历山大藻和中肋骨条藻接种密度分别为 $8 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $5 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $5 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $6 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$,溶剂提取物终浓度为8.0 g/L,同时设定添加相同体积DMSO的对照组,每个处理3个重复。所有培养瓶置于GXZ-260B智能型光照培养箱中培养,温度(26 ± 1)℃,光照强度 $62 \mu\text{mol} \cdot (\text{m}^2 \cdot \text{s})^{-1}$,光暗比为12:12。每天定时摇动培养瓶2次,以防止微藻附壁生长。每隔1 d从培养瓶中取1 mL培养液,用Lugol's试剂固定后,计数藻细胞数量的变化。取样后向培养瓶中加入1 mL 250倍f/2培养液,以维持培养液体积恒定。第10 d,测定藻细胞叶绿素、蛋白质和多糖含量。同时,采用测微物尺和测微目镜测定藻细胞大小,并用显微照相(放大倍数为 10×40)获得细胞形态照片。

1.4.2 浒苔甲醇提取物的液液分离物的抑藻作用

培养混合液总体积50 mL,包括f/2培养基、处于对数生长期的藻种液及实验1.3所得的4种分离物,终浓度为8.0 g/L,并设定添加相同体积的DMSO作为对照组,每个处理3个重复。将上述培养瓶置于GXZ-260B智能型光照培养箱中培养,培养条件同上。每天定时摇动培养瓶2次,以防止微藻附壁生长。每隔1 d从培养瓶中取1 mL培养液,用Lugol's试剂固定后,计数藻细胞数量的变化。取样后向培养瓶中加入1 mL 50倍f/2培养液,以维持培养液体积恒定,实验进行10 d。

1.5 微藻的生理指标测定

1.5.1 叶绿素的测定

藻液5 000 g离心15 min,弃去上清液,加入90%丙酮,4℃抽提24 h。离心后,测定上清液630、645和665 nm吸光度,参照文献[22]计算叶绿素含量(以细胞干重衡量,mg/g)。

1.5.2 蛋白质和多糖的测定

15 mL藻液2 000 r/min转速下离心10 min,弃

去上清液。藻泥于-20℃冻融破碎3次后,加入3 mL PBS(磷酸氢二钠和磷酸二氢钠的混合溶液)并充分振荡,离心10 min。上清液用于测定蛋白质和多糖,方法如下:1 mL上清液加入3 mL考马斯亮蓝溶液,测定595 nm处的吸光度。根据标准蛋白质曲线,确定蛋白质的含量(以细胞干重衡量,mg/g);1 mL上清液加入0.1 mL硫酸锌,沸水浴5 min,立即加入亚铁氰化钾0.1 mL,离心10 min,取上清液1 mL加到3 mL蒽酮中,沸水浴10 min,用冷水迅速冷却至室温,稳定后测定620 nm波长处的吸光度。根据标准葡萄糖曲线确定多糖含量(以细胞干重衡量,mg/g)。

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。

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

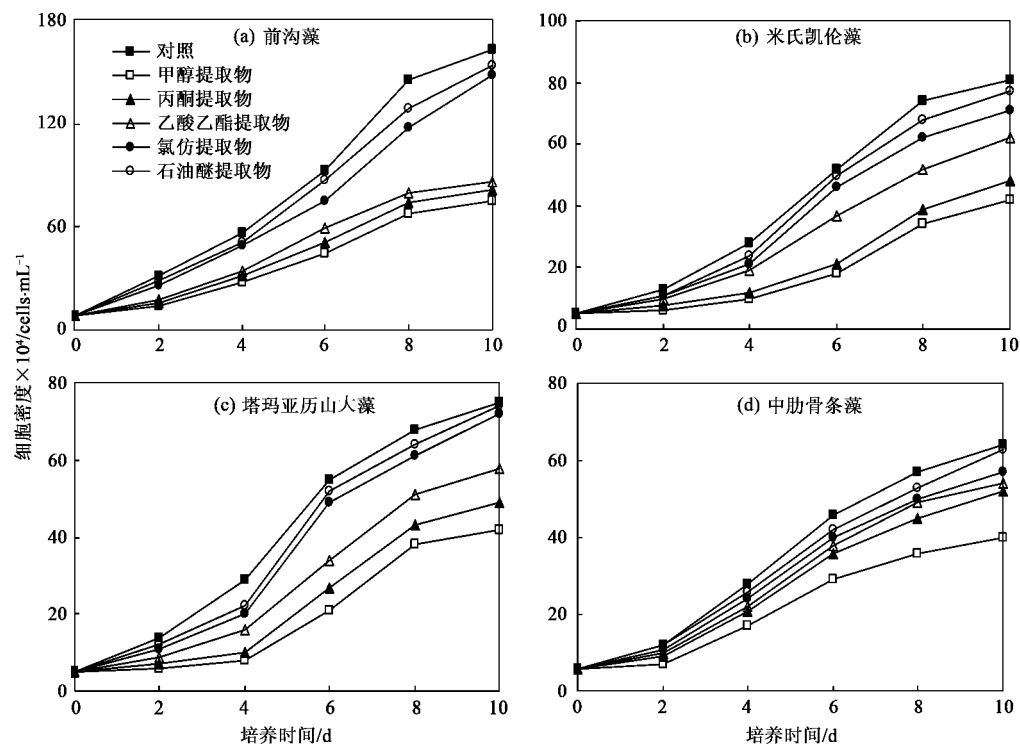
2 结果与分析

2.1 浒苔5种溶剂提取物对4种赤潮微藻生长的影响

从图1可以看出,甲醇、丙酮和乙酸乙酯提取物对前沟藻、米氏凯伦藻和塔玛亚历山大藻3种赤潮微藻的生长表现出较强的抑制作用。其中,甲醇提取物的抑制作用最强;而氯仿和石油醚提取物对此3种赤潮微藻仅表现出微弱的抑制作用。对中肋骨条藻而言,5种溶剂提取物中,仅甲醇提取物具有明显的($p < 0.05$)抑藻作用。第10 d,甲醇提取物对前沟藻、米氏凯伦藻、塔玛亚历山大藻和中肋骨条藻的生长抑制率依次为54.0%、48.1%、44.0%和37.5%。

2.2 浒苔溶剂提取物对4种赤潮微藻细胞形态和大小的影响

浒苔溶剂提取物能影响4种赤潮微藻的细胞形态和大小(图2和表1)。培养4 d后,发现甲醇、丙酮和乙酸乙酯提取物致使藻细胞出现空洞、细胞破碎和色素减褪现象,并且随培养时间的延长,添加此3种提取物的实验组藻细胞空洞、破碎和色素减褪现象更加明显。而氯仿和石油醚提取物致使部分藻细胞出现聚集抱团现象(前沟藻除外)。此外,通过观察,发现各溶剂提取物均明显降低了4种赤潮细胞的运动能力。



图中数据为 3 个重复的平均值,下同

图 1 浒苔 5 种溶剂提取物 (8.0 g/L) 对 4 种赤潮微藻生长的影响

Fig. 1 Effects of extracts (8.0 g/L) with five solvents from *E. prolifera* on the growth of the four species of red tide microalgae

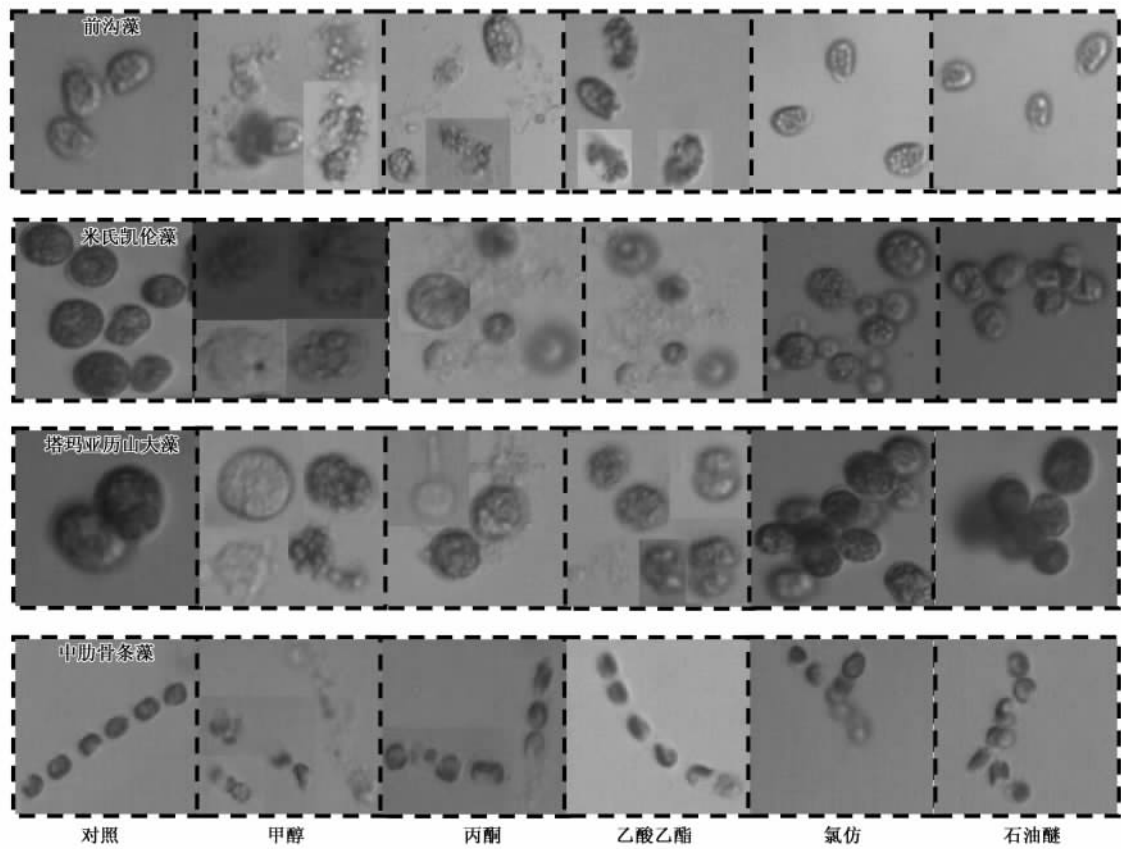


图 2 浒苔溶剂提取物对 4 种赤潮微藻细胞形态的影响

Fig. 2 Effects of extracts of *E. prolifera* extracted with five solvents on morphology of the four species of red tide microalgae

表 1 浒苔溶剂提取物对 4 种赤潮微藻细胞体积的影响

Table 1 Effects of extracts of *E. prolifera* extracted with different solvents on cell volume of the four species of red tide microalgae

实验组	前沟藻	米氏凯伦藻	塔玛亚历山大藻	中肋骨条藻
对照	$(12.75 \pm 1.67) \times (12.75 \pm 1.67)$	$(12.63 \pm 1.20) \times (12.25 \pm 1.18)$	$(11.00 \pm 2.72) \times (14.75 \pm 0.27)$	$(12.25 \pm 2.38) \times (13.13 \pm 3.44)$
甲醇提取物	$(10.75 \pm 1.21) \times (10.75 \pm 1.27)$	$(11.28 \pm 1.30) \times (11.15 \pm 0.87)$	$(10.38 \pm 1.82) \times (10.50 \pm 0.79)$	$(11.05 \pm 1.07) \times (10.65 \pm 1.21)$
丙酮提取物	$(11.13 \pm 1.55) \times (11.25 \pm 1.67)$	$(9.38 \pm 2.82) \times (9.38 \pm 2.82)$	$(11.38 \pm 2.82) \times (10.50 \pm 1.19)$	$(15.12 \pm 2.22) \times (15.13 \pm 2.22)$
乙酸乙酯提取物	$(8.88 \pm 0.99) \times (8.75 \pm 0.99)$	$(8.88 \pm 1.16) \times (9.25 \pm 0.71)$	$(10.25 \pm 0.71) \times (10.75 \pm 0.71)$	$(7.50 \pm 1.20) \times (7.50 \pm 1.19)$
氯仿提取物	$(9.38 \pm 1.77) \times (9.25 \pm 1.75)$	$(9.25 \pm 1.58) \times (8.88 \pm 1.72)$	$(10.75 \pm 1.73) \times (11.63 \pm 2.19)$	$(7.75 \pm 1.48) \times (7.75 \pm 1.48)$
石油醚提取物	$(9.38 \pm 0.52) \times (9.18 \pm 0.52)$	$(9.50 \pm 1.25) \times (9.50 \pm 1.19)$	$(10.88 \pm 1.19) \times (11.63 \pm 0.74)$	$(7.88 \pm 0.99) \times (7.88 \pm 0.99)$

同时发现,乙酸乙酯、氯仿和石油醚提取物组藻细胞体积明显变小($p < 0.05$),且随培养时间的延长,藻细胞体积变小现象更加显著($p < 0.05$).而其余 2 种溶剂提取物藻细胞体积有所减小,但与对照组相比并未有明显($p > 0.05$)变化.

2.3 浒苔溶剂提取物对 4 种赤潮微藻叶绿素、蛋白质和多糖含量的影响

图 3~5 表明,5 种溶剂提取物中,甲醇、丙酮和乙酸乙酯提取物对 4 种赤潮微藻的叶绿素、蛋白质和多糖的合成表现出较强的抑制作用.其中,甲醇提取物的抑制作用最强.第 10 d,添加甲醇提取物的前沟藻、米氏凯伦藻、塔玛亚历山大藻和中肋骨条藻的叶绿素、蛋白质和多糖含量比对照组低约 51%.氯仿和石油醚提取物对此 4 种赤潮微藻叶绿素、蛋白质和多糖的合成没有明显($p > 0.05$)的抑制作用.

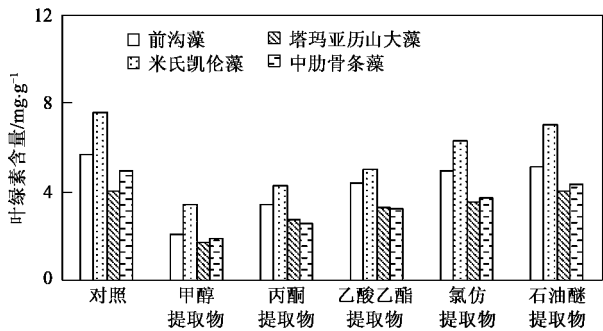


图 3 浒苔溶剂提取物对 4 种赤潮微藻叶绿素含量的影响

Fig.3 Effects of extracts of *E. prolifera* extracted with five solvents on the contents of chlorophyll of the four species of red tide microalgae replicates

2.4 浒苔甲醇提取物的液液分离物对 4 种赤潮微藻生长的影响

在上述实验的基础上,采用甲醇浸泡浒苔干粉末制备 42 g 甲醇提取物.随后,采用液液萃取分离,获得 4 种分离物.4 种分离物(添加浓度均为 8.0 g/L,与上述实验中甲醇提取物的添加浓度相同)的得率及对 4 种赤潮微藻的生长抑制率(第 10 d)见

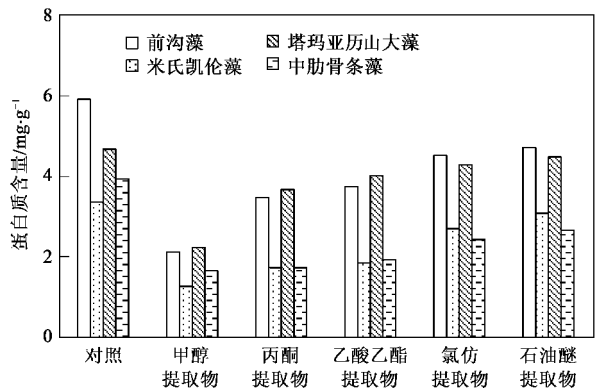


图 4 浒苔溶剂提取物对 4 种赤潮微藻蛋白质含量的影响

Fig.4 Effects of extracts of *E. prolifera* extracted with five solvents on the contents of protein of the four species of red tide microalgae

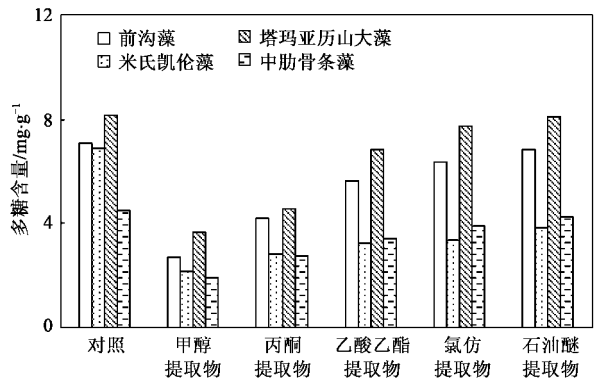


图 5 浒苔溶剂提取物对 4 种赤潮微藻多糖含量的影响

Fig.5 Effects of extracts of *E. prolifera* extracted with five solvents on the contents of polysaccharide of the four species of red tide microalgae

表 2.可以看出,石油醚相和乙酸乙酯相的得率较大,且对 4 种赤潮微藻生长的抑制作用也较为强烈.第 10 d,石油醚相和乙酸乙酯相对前沟藻、米氏凯伦藻、塔玛亚历山大藻和中肋骨条藻的生长抑制率在 25% 以上.正丁醇相和水相对 4 种测试微藻的生长抑制作用则较弱.

图 6 的生长曲线也能看出,石油醚相和乙酸乙

表 2 浒苔甲醇浸膏液分离物的得率及对 4 种赤潮微藻的生长抑制率

Table 2 Yields of extracts prepared from the methanol extracts of the dry power of *E. prolifera* using different organic solvent and its the growth inhibition for the four species of red tide microalgae

分离物	质量 /g	得率 /%	生长抑制率/%			
			前沟藻	米氏凯伦藻	塔玛亚历山大藻	中肋骨条藻
石油醚相	26.46	63.0	41.4 ± 3.29	34.2 ± 3.04	27.9 ± 2.96	34.3 ± 2.42
乙酸乙酯相	10.52	25.0	49.5 ± 3.48	41.8 ± 3.12	38.2 ± 3.75	35.8 ± 3.31
正丁醇相	2.91	6.93	10.8 ± 1.92	3.80 ± 1.48	17.6 ± 1.86	4.47 ± 1.38
水相	1.04	2.47	6.30 ± 1.77	5.06 ± 1.61	14.7 ± 1.58	7.46 ± 1.24

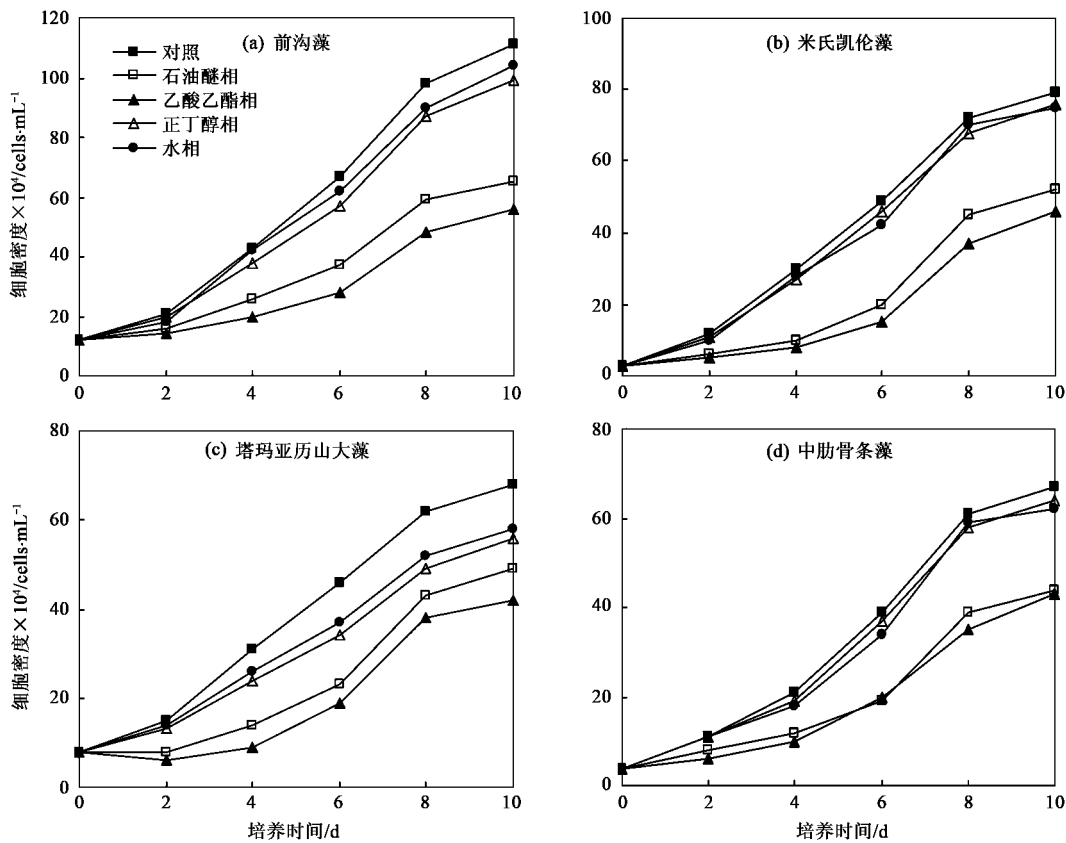


图 6 浒苔甲醇浸膏的液液分离物对 4 种赤潮微藻生长的影响

Fig. 6 Effects of extracts prepared from the methanol extracts of the dry power of *E. prolifera* using different organic solvent on the growth of the four species of the red tide microalgae

酯相对前沟藻、米氏凯伦藻、塔玛亚历山大藻和中肋骨条藻生长的抑制作用较为明显,而正丁醇相和水相对 4 种测试微藻的生长抑制作用较弱.因此,选定石油醚相和乙酸乙酯相为后续分离纯化的目标物.

3 讨论

本研究选定我国沿海赤潮高发区常见的 4 种赤潮微藻(前沟藻、米氏凯伦藻、塔玛亚历山大藻和中肋骨条藻)为实验对象,分析浒苔的甲醇、丙酮、乙酸乙酯、氯仿和石油醚等 5 种溶剂提取物对此 4 种赤潮微藻生长的影响.结果表明,5 种溶剂提取物中

甲醇提取物的抑制作用最强(图 1).第 10 d,其对前沟藻、米氏凯伦藻和塔玛亚历山大藻的生长抑制率超过 44.0%,对中肋骨条藻的生长抑制率稍低,为 37.5%.从上述结果可以看出,浒苔的 5 种溶剂提取物对 4 种赤潮微藻的抑制作用存在差异.笔者推测,这是因为 5 种溶剂极性差异导致浒苔提取物中抑菌物质的组成和含量不同,从而对藻细胞的影响存在差异.经比较发现,5 种溶剂提取物均对 4 种赤潮微藻生长的抑制作用随提取溶剂极性的增大而增强,顺序为石油醚提取物 < 氯仿提取物 < 乙酸乙酯提取物 < 丙酮提取物 < 甲醇提取物.这就表明,在后

续分离纯化中可以利用甲醇进行抑藻物质的初步提取。

通过观察藻细胞形态和测定藻细胞体积,发现甲醇、丙酮和乙酸乙酯提取物致使4种受试微藻细胞出现明显的空洞、细胞破碎和色素减退现象(图2)。在铜绿微囊藻研究中,洪喻等^[23]也发现芦竹(*Arundo donax* Linn.)的有机溶剂提取物能使藻细胞出现空洞、破碎以及细胞聚集抱团现象;而乙酸乙酯、氯仿和石油醚提取物则使4种微藻细胞体积明显变小(表1)。通常认为,外界环境导致藻细胞体积减小有3种可能:①藻细胞进入主动的程序性死亡过程^[24];②藻细胞可能形成孢子耐不利环境的影响,以保证部分个体生存^[25];③细胞体积变化与细胞内外离子浓度差有密切关系,离子通道开放紊乱导致渗透压改变^[26]。根据提取物对藻细胞的抑制作用(图1)以及藻细胞形态的变化(图2),笔者推测,本实验中乙酸乙酯提取物使微藻细胞体积变小的原因,很可能是提取物作用下藻细胞进入主动的程序性死亡和细胞内外出现离子浓度差,从而藻细胞密度偏低、藻细胞体积变小;而氯仿和石油醚提取物则很可能仅仅引起藻细胞内外出现离子浓度差,从而致使藻细胞体积变小。然而,由于未进行相关实验,故还有待进一步实验证实提取物导致赤潮微藻细胞变小的原因。同时,笔者还观察到5种溶剂提取物明显地降低了藻细胞的运动能力。Nagayama和Jin等^[27,28]也发现孔石莼提取物、海带提取物和褐藻昆布提取物能够减低多环旋沟藻和塔玛亚历山大藻等赤潮微藻细胞的运动能力。综合上述结果,笔者推测在胁迫条件下微藻细胞会发生表型可塑性的变化,从而出现区别于正常条件下的不同形态。并且由于浒苔溶剂提取物的组成和含量不同,对藻细胞作用机制可能存在差异,而藻细胞也将启动多种拮抗途径应对外来添加物的胁迫,进而导致藻细胞形态、体积和运动性出现不同的改变,这是胁迫条件下微藻细胞的一种环境诱导抵御机制。

随后,通过测定5种溶剂提取物作用下前沟藻、米氏凯伦藻、塔玛亚历山大藻和中肋骨条藻叶绿素、蛋白质和多糖含量的变化,发现甲醇、丙酮和乙酸乙酯提取物同样能明显抑制此4种赤潮微藻细胞内叶绿素、蛋白质和多糖的合成(图3~5),而氯仿和石油醚提取物对此3种生理指标的含量没有明显的影响。这与上述溶剂提取物对4种赤潮微藻细胞密度的影响结果相一致。在陆地和淡水生态系统化感作用的机制研究中,已经证实化感物质能降低植物的

叶绿素含量、影响蛋白质合成以及酶活等生理指标,并且笔者的其它研究^[29,30]也表明这种作用机制同样适用于海洋生态系统。

上述实验结果表明,浒苔甲醇浸膏具有最强烈的抑制活性,故采用液液分离萃取法进一步分离。在液液分离萃取中,按照有机溶剂极性从小到大的顺序,依次采用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇进行萃取,将甲醇粗提取物按照极性差异进一步分为4种分离物。结果表明,获得的4种分离物中石油醚相和乙酸乙酯相的得率较大,并且对4种赤潮微藻的生长的抑制作用也较为强烈。因此,笔者选定石油醚相和乙酸乙酯相为分离纯化的目标物。目前,石油醚相和乙酸乙酯相的分离纯化和组成鉴定工作正在进行中。

4 结论

利用甲醇浸泡浒苔可以获得具有明显抑藻活性的粗提物。此粗提物能够促使藻细胞出现空洞、破碎和运动性降低的现象,同时还能降低细胞内叶绿素含量,影响蛋白质和多糖的合成。最后,通过液液分离萃取法对甲醇粗提物进一步分离,获得的石油醚相和乙酸乙酯相能抑制前沟藻、米氏凯伦藻、塔玛亚历山大藻和中肋骨条藻的生长。

参考文献:

- [1] Steidinger K A. A re-evaluation of toxic dinoflagellates biology and ecology [J]. Prog Phycol Res, 1983, 2: 147-188.
- [2] 俞志明, 邹景忠, 马锡年, 等. 治理赤潮的化学方法[J]. 海洋与湖沼, 1993, 24(3): 314-318.
- [3] 苏建强, 郑天凌, 俞志明, 等. 海洋细菌对赤潮藻生长及其产毒量的影响[J]. 海洋与湖沼, 2003, 34(1): 44-49.
- [4] Tai V, Lawrence J E, Lang A S, et al. Characterization of HaRNAV, a single-stranded RNA virus causing lysis of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) [J]. J Phycol, 2003, 39(2): 343-352.
- [5] Anderson D M, Anderson P, Brice J V M, et al. Monitoring and management strategies for harmful algal blooms in coastal waters [R]. APEC 201-MR-01.1, Asia Pacific Economic Program, Singapore, and Intergovernmental Oceanographic Commission Technical Series, 2001, 59, Paris.
- [6] Gross E M, Meyer H, Schilling G. Release and ecological impact of algicidal hydrolysable polyphenols in *Myriophyllum spicatum* [J]. Phytochemistry, 1996, 41: 133-138.
- [7] Nakai S, Inoue Y, Hosomi M, et al. Growth inhibition of blue-green algae by allelopathic effects of macroalgae [J]. Water Sci Technol, 1999, 39: 47-53.
- [8] Fitzgerald G P. Some factors in the competition of antagonism among bacteria, algae, and aquatic weeds [J]. J Phycol, 1969, 5: 351-359.
- [9] Anderson D M. Turning back the harmful red tide [J]. Nature,

- 1997, **388**: 513-514.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] McLachlan J, Craigie J S. Algal inhibition by yellow ultraviolet absorbing substances from *Fucus vesiculosus* [J]. Canad J Bot, 1964, **42**: 287-292.
- [17] Fletcher R L. Heteroantagonism observed in mixed algal cultures [J]. Nature, 1975, **253**: 534-535.
- [18] Konig G M, Wright A D, Linden A. *Plocamium hamatum* and its monoterpenes: chemical and biological investigation of the tropical marine red alga [J]. Phytochemistry, 1999, **52**: 1047-1053.
- [19] DellaGreca M, Monaco P, Previtera L, *et al.* Allelochemical activity of phenylpropanes from *Acorus gramineus* [J]. Phytochemistry, 1989, **28**: 2319-2322.
- [20] Ohsawa N, Ogata Y, Okada N, *et al.* Physiological function of bromoperoxidase in the red marine alga, *Corallina pilulifera*: production of bromoform as an allelochemical and the simultaneous elimination of hydrogen peroxide [J]. Phytochemistry, 2001, **58**: 683-692.
- [21] 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.
- [22] Jensen A. Handbook of Physiological Methods [M]. New York: Cambridge University Press, 1978.
- [23] 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): 3143-3147.
- [24] Heimlich G, Bortner C D, Cidlowski J A. Apoptosis and cell volume regulation. The importance of ions and ion channels [J]. Cell Volume and Signaling, 2004, **559**: 189-203.
- [25] Montecchiario F, Giordano M. Effect of prolonged dark incubation on pigments and photosynthesis of the cave-dwelling cyanobacterium *Phormidium autumnale* (Oscillatoriales, Cyanobacteria) [J]. Phycologia, 2006, **45**: 704-710.
- [26] Taylor A R, Manison N F H, Fernandez C, *et al.* Spatial organization of calcium signaling involved in volume control of the *Fucus rhizoid* [J]. Plant Cell, 1996, **8**: 2015-2031.
- [27] 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**: 601-612.
- [28] Jin Q, Dong S L. Comparative studies on the allelopathic effects of two different strains of *U. pertusa* on *Heterosigma akashiwo* and *Alexandrium tamarense* [J]. J Exp Mar Biol Ecol, 2003, **293**: 41-55.
- [29] 孙颖颖, 王长海. 球等鞭金藻生长抑制物的抑藻机理 [J]. 浙江大学学报, 2009, **35** (1): 51-57.
- [30] 阎斌伦, 孙颖颖, 王长海. 球等鞭金藻生长抑制物对自身藻细胞的抑制效应 [J]. 水产学报, 2009, **33** (3): 456-461.