

条斑紫菜提取物对4种赤潮微藻生长的抑制作用

孙颖颖¹, 刘筱潇¹, 阎斌伦^{1*}, 王长海^{2,3}

(1. 淮海工学院江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏 连云港 222005;

2. 烟台大学海洋学院, 山东 烟台 264005;

3. 大连理工大学环境与生命学院, 辽宁 大连 116024)

摘要:研究条斑紫菜水溶性抽提液对前沟藻、中肋骨条藻、米氏凯伦藻和塔玛亚历山大藻等4种赤潮微藻生长的影响,在此基础上,利用甲醇、丙酮、乙酸乙酯、氯仿和石油醚等有机溶剂浸泡条斑紫菜干粉,经抑藻圈方法检测条斑紫菜水溶性抽提液的抑藻活性。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生化指标的变化,对抑藻活性最大的提取物对前沟藻、米氏凯伦藻、中肋骨条藻和塔玛亚历山大藻赤潮微藻生长的抑制作用进行分析,并依次以石油醚、乙酸乙酯和正丁醇为提取溶剂,采用液液分离法对此提取物做了进一步分离。结果表明,当条斑紫菜水溶性抽提液浓度超过16 g/L时能显著抑制4种赤潮微藻的生长,尤其是对前沟藻和米氏凯伦藻具有很强的抑制作用。在5种有机溶剂提取物中,甲醇提取物的抑制作用最为明显。进一步研究发现此提取物对4种赤潮微藻的生长抑制显著且具有浓度效应,在16 g/L时,此提取物对前沟藻、米氏凯伦藻、中肋骨条藻和塔玛亚历山大藻的生长抑制率分别为70.5%、79.9%、67.1%和65.1%。同时,致使米氏凯伦藻、中肋骨条藻和塔玛亚历山大藻等3种赤潮微藻体积变小,运动能力下降,藻细胞出现空洞、细胞破碎和色素减退等现象;4种赤潮微藻细胞内的叶绿素、可溶性蛋白质和多糖含量显著减低。通过液液分离法甲醇提取物进一步分离为石油醚相、乙酸乙酯相、正丁醇相和水相等4种提取物。其中,石油醚相和乙酸乙酯相具有较强的抑制作用。

关键词:条斑紫菜;赤潮微藻;生长抑制作用

中图分类号:Q 949.2;X 55

文献标识码:A

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增殖。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]。例如,小珊瑚藻(*Corallina pilulifera*)抑制多环旋沟藻(*Cochlodinium polykrikoides*)^[5]、孔石莼(*Ulva pertusa*)抑制赤潮异弯藻(*Heterosigma akashiwo*)和塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)^[6]、鼠尾藻(*Sargassum thunbergii*)、缘管条斑紫菜(*Enteromorpha linza*)和石花菜(*Gelidium amansii*)抑制赤潮异弯藻^[7-8]等。随着海藻抑制微藻研究的逐渐深入,某些海藻的抑藻物质已见诸于相关报道。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^[9];从*Ralfsia spongiocarpa*中分离出的鞣酸对*Porphyrodiscus simulans*和*Rhodophysema elegans*有强烈的抑制作用^[10]; *Plocamium hamatum*产生的单萜^[11]、川蔓(*Ruppia maritima*)产生的二萜^[12]以及从小珊瑚藻中分离出的溴仿^[13]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^[14]。

目前,世界各地海岸普遍存在赤潮现象,对

收稿日期:2009-11-14 修回日期:2010-01-25

资助项目: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(2008HS017);国家“十一五”科技支撑计划(2006BAD09A01)

通讯作者:阎斌伦, E-mail: yanbinlun@yahoo.com.cn

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。针对赤潮的频繁发生,研究者提出了一些治理方法,如利用粘土矿物^[15]、季铵盐类化合物^[16]以及病毒^[17]、细菌^[18]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^[19]。其中,利用海藻与微藻间的抑制作用来预防或控制赤潮是一个新的研究方向^[20-22]。条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)是江苏省近海养殖最普遍的一个经济种,具有较高的商业价值^[23],它适应于高营养盐的环境,是实现生物修复改善海洋环境的理想品种^[24]。然而,目前尚未见有关条斑紫菜对赤潮微藻生长影响的报道。

本文以条斑紫菜为研究对象,首先分析条斑紫菜水溶性抽提液对前沟藻(*Amphidinium hoefleri*)、米氏凯伦藻(*Karenia mikimotoi*)、中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)和塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)等4种赤潮微藻生长的影响;随后,利用甲醇、丙酮、乙酸乙酯、氯仿和石油醚等有机溶剂浸泡条斑紫菜干粉,并采用抑藻圈方法检测这些提取物的抑藻活性。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,进一步分析抑藻活性最大的有机溶剂提取物对4种赤潮微藻生长的影响。最后,依次以石油醚、乙酸乙酯和正丁醇为提取溶剂,采用液液分离法对此有机溶剂提取物进行分离,并分析所获得的提取物对前沟藻、米氏凯伦藻、塔玛亚历山大藻和中肋骨条藻生长的抑制作用,以期为进一步研究条斑紫菜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无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^[25]中培养,培养温度(20±0.1)℃,光照强度40 μmol/(m²·s),光暗比12:12。

条斑紫菜来自于赣榆条斑紫菜养殖基地。

蒸馏水仔细冲洗后,用混合抗生素对藻体组织表面作灭菌处理,再用灭菌海水漂洗3~4次,培养于f/2培养基中,温度(23±1)℃,光照强度3 000 lx,光暗比8:16。

天然海水经过脱脂棉和300目筛绢过滤,煮沸、冷却,用玻璃纤维素膜(Whatman GF/C,0.22 μm孔径)过滤后,将pH和盐度分别调节至8.5和30备用(本文实验所用海水均做如上处理)。

1.2 条斑紫菜水溶性抽提液的制备

新鲜条斑紫菜40 g,加少许蒸馏水研磨成浆,用灭菌海水离心3次,得50 mL水溶性抽提液,浓度为800 g FW/L(湿重)。将此水溶性抽提液用灭菌海水稀释,依次得到浓度梯度分别为2、4、8、16和32 g FW/L的实验用液,每个浓度梯度的实验用液体积为1 000 mL,上述实验用液按照f/2培养基添加营养盐备用。

1.3 条斑紫菜5种溶剂提取物的制备

新鲜条斑紫菜于室温下完全干燥4 d,将其粉碎为0.3 mm干粉。称取250 g干粉,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。40℃下蒸发除去溶剂,获得浸膏,称其质量后,用二甲基亚砜(DMSO)定容至10 mL,获得5种浓度为5 000 g DW/L(干重)的浓缩液。在无菌条件下,将浓缩液经0.22 μm有机系滤膜除去微生物,于4℃冰箱备用。

1.4 条斑紫菜甲醇提取物的液液分离

通过活性检测,确定了甲醇提取物具有最大抑藻活性。分析其对实验微藻的叶绿素、蛋白质和多糖含量等生理生化指标的影响后,进行液液分离。用90%甲醇水溶液将其溶解,加入石油醚萃取3次,减压蒸干得到石油醚相浸膏。萃余相40℃下蒸发除去甲醇后,加入适量蒸馏水重新溶解,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。

1.5 抑藻实验

条斑紫菜水溶性抽提液的抑藻作用 移取150 mL实验用液于250 mL锥形瓶内,同时,

设定新鲜海水配制的 f/2 培养基作为对照,每个锥形瓶设定 3 个重复。将对数生长期微藻以藻泥接种于锥形瓶内,前沟藻、中肋骨条藻、塔玛亚历山大藻和米氏凯伦藻依次为 9×10^4 cells/mL、 13×10^4 cells/mL、 9×10^4 cells/mL 和 8×10^4 cells/mL^[26](4 种赤潮微藻起始密度的确定是根据文献所述赤潮发生时所能达到的最高密度)。锥形瓶放置于 GXZ-260B 智能光照培养箱内培养 12 天,温度 20 ℃,光照强度 3 000 lx,光暗比 8:12。每日定时摇动锥形瓶 3 次,每隔一日采样 1 mL,用 Lugol 氏试剂固定后,计数藻细胞密度;并且,取样后向每一个锥形瓶中加入 1 mL 150 倍 f/2 培养基,以维持培养基体积恒定(如未特别说明,后续实验培养条件相同)。

条斑紫菜 5 种溶剂提取物的抑藻作用
采用培养皿抑藻圈法^[27],检测 5 种有机溶剂提取物对 4 种赤潮微藻生长的影响。f/2 培养基中加入 1.5% 琼脂制成平板(90 mm)。在平板内,铺设 30 mm 的圆形滤纸片(已浸润对数生长期的 4 种实验微藻),于滤纸中心滴加一定量提取物。同时,以滴加相同体积的 DMSO 为对照组,每个培养皿设定 3 个重复。将培养皿放置于智能光照培养箱内培养,24 h 后观察抑藻圈的大小(抑藻圈大小为平均值 ± 方差表示)。

条斑紫菜甲醇提取物的抑藻作用 将甲醇提取物的 DMSO 溶液用灭菌海水稀释,获得浓度分别为 1、2、4、8 和 16 g DW/L 实验用液 1 000 mL,上述实验用液按 f/2 配方添加营养盐后,分别移取 150 mL 至 250 mL 锥形瓶内。同时,设定添加相同体积 DMSO 的新鲜海水配制的 f/2 培养基为对照组,每个锥形瓶设定 3 个重复,4 种赤潮微藻的起始密度和培养条件同上。此外,第 12 天,测定藻细胞叶绿素、蛋白质和多糖含量;并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 10 × 40)获得细胞形态照片。

条斑紫菜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、对数生长期的藻种液及甲醇提取物的 4 种液液分离物,终浓度为 16 g/L,并设定添加相同

体积 DMSO 的新鲜海水配制的 f/2 培养基为对照组,每个锥形瓶设定 3 个重复。将锥形瓶置于智能型光照培养箱中培养 12 d,培养条件同上。

1.6 微藻的生理指标测定

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 nm,645 nm 和 665 nm 吸光度,参照文献[28]计算叶绿素含量(以细胞干重衡量,mg/g)。

蛋白质和多糖的测定 15 mL 藻液 2 000 g 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。上清液参照文献[29]测定可溶性蛋白质和多糖含量(以细胞干重衡量,mg/g)。

1.7 数据处理

实验数据采用 SPSS 11.5 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; N_0 为对照组藻细胞密度。

2 结果

2.1 条斑紫菜水溶性抽提液对 4 种赤潮微藻生长的影响

较高浓度(16 和 32 g/L)的条斑紫菜水溶性抽提液能显著($P < 0.05$)抑制 4 种赤潮微藻的生长(图 1)。第 12 天,32 g/L 条斑紫菜水溶性抽提液对前沟藻、米氏凯伦藻、中肋骨条藻和塔玛亚历山大藻的生长抑制率分别为 79.4%、75.8%、58.1% 和 48.5%。结果表明,条斑紫菜水溶性抽提液含有能抑制 4 种实验微藻生长的抑藻物质。同时,当条斑紫菜水溶性抽提液浓度为 2 g/L 和 4 g/L 时,其对前沟藻和米氏凯伦藻的生长表现出较为明显的促进效应($P < 0.05$);而此浓度范围的条斑紫菜水溶性抽提液对中肋骨条藻和塔玛亚历山大藻的生长并没有明显的影响($P > 0.05$)。

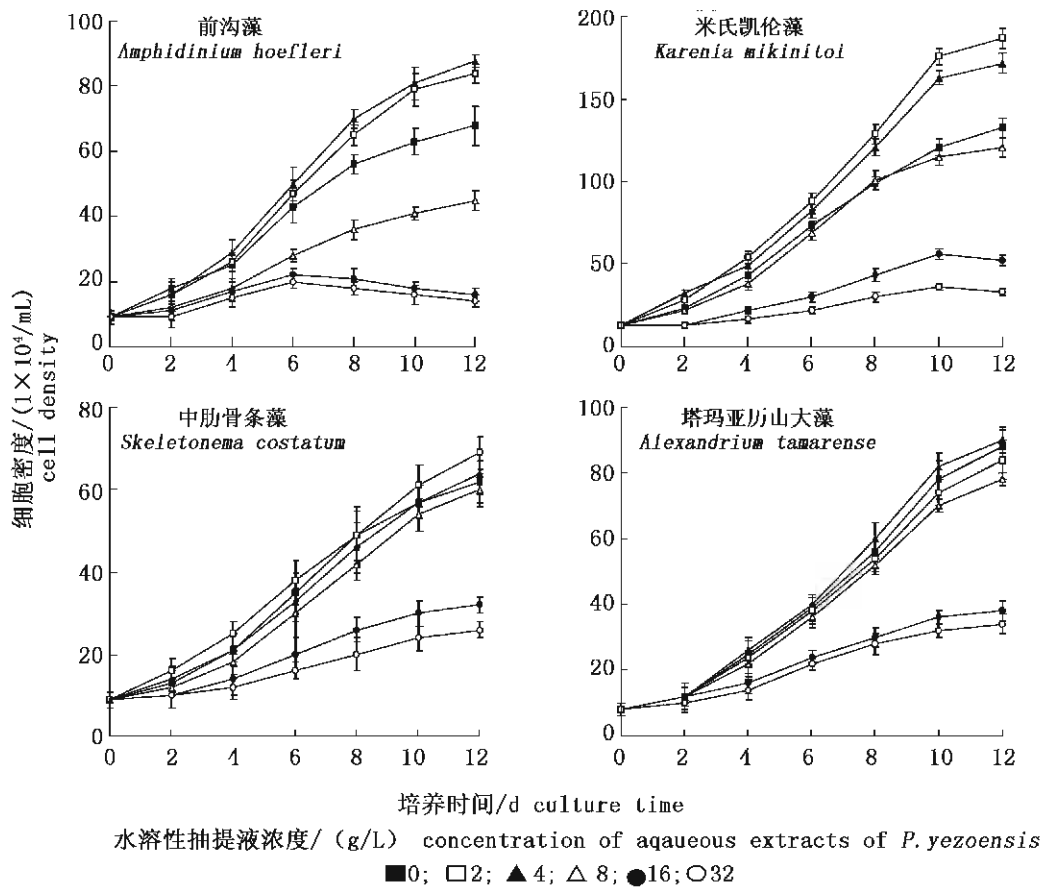


图1 条斑紫菜水溶性抽提液对4种赤潮微藻生长的影响

Fig. 1 Effects of aqueous extracts from *P. yezoensis* on the growth of the four species of red tide microalgae

2.2 条斑紫菜5种溶剂提取物对4种赤潮微藻生长的影响

5种溶剂提取物均有一定的抑藻效果。对于同一种微藻而言,甲醇提取物的抑藻作用最为明显($P < 0.05$),抑藻圈大于3.3 cm;丙酮和乙酸乙酯提取物对前沟藻、米氏凯伦藻和中肋骨条藻等3种赤潮微藻也表现出较强的抑制作用,抑藻圈超过3 cm(图2)。从整体趋势来看,5种溶剂提取物的抑藻强弱顺序为甲醇提取物 > 丙酮提取物 > 乙酸乙酯提取物 > 氯仿提取物 > 石油醚提取物。我们推测,这是因为5种溶剂极性差异导致干粉提取物中抑藻物质的组成和含量不同,从而对藻细胞的影响存在差异。同时,通过比较抑藻圈大小还发现5种溶剂提取物对塔玛亚历山大藻的抑制作用较弱,这与上述条斑紫菜水溶性抽提液的抑藻效果相似。

2.3 条斑紫菜甲醇提取物对4种赤潮微藻生长的影响

条斑紫菜甲醇提取物对4种赤潮微藻的生长抑制显著($P < 0.05$)且具有浓度效应(图3)。在16 g/L时,甲醇提取物对前沟藻、米氏凯伦藻、中肋骨条藻和塔玛亚历山大藻的生长抑制率分别为70.5%、79.9%、67.1%和65.1%。同时,还发现1 g/L甲醇提取物对前沟藻和米氏凯伦藻的生长表现出促进作用,在第12天甲醇提取物处理组的细胞密度略高于对照组的细胞密度($P > 0.05$),这与上述结果类似。

抑藻圈实验(图2)表明,条斑紫菜甲醇提取物具有明显的抑藻活性。通过培养液检测方法,进一步确定了条斑紫菜甲醇提取物对4种实验微藻生长的影响。除了明显降低藻细胞密度外,条斑紫菜甲醇提取物还能影响米氏凯伦藻、中肋

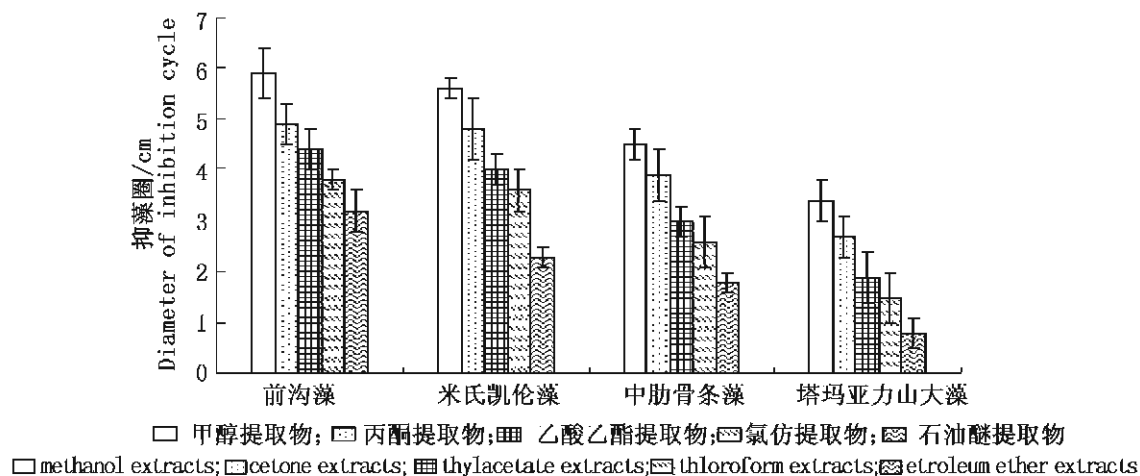


图2 条斑紫菜5种提取物对4种赤潮微藻生长的影响

Fig. 2 Effects of extracts with five solvents from *P. yezoensis* dry powder on the growth of the four species of red tide microalgae

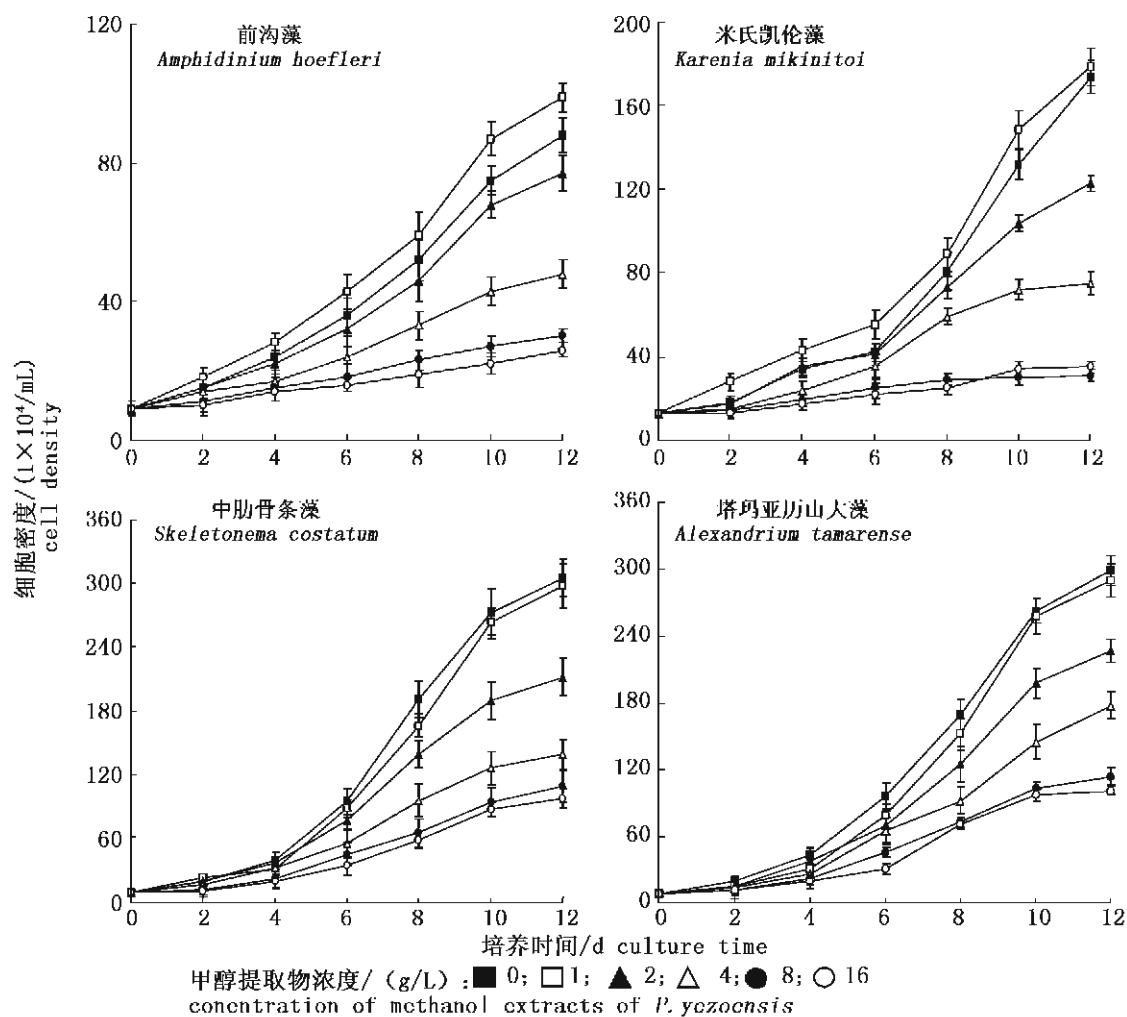


图3 条斑紫菜甲醇提取物对4种赤潮微藻生长的影响

Fig. 3 Effects of methanol extracts of *P. yezoensis* dry powder on the growth of the four species of red tide microalgae

骨条藻和塔玛亚历山大藻等3种赤潮微藻的细胞形态(图4),而对前沟藻细胞形态无明显影响。培养4天后发现,甲醇提取物致使3种微藻的藻细胞出现空洞、细胞破碎和色素减褪等现象,并

且随培养时间的延长,上述现象更加明显。同时,表1表明,4 g/L 甲醇提取物还使此3种微藻(前沟藻除外)细胞体积明显($P < 0.05$)变小。



图4 条斑紫菜甲醇提取物对3种赤潮微藻细胞形态的影响

a. 对照组; b. 加入甲醇提取物处理组; 1. 米氏凯伦藻; 2. 中肋骨条藻; 3. 塔玛亚历山大藻。

Fig. 4 Effects of methanol extracts of *P. yezoensis* dry powder on morphology of the three species of red tide microalgae

a. control; b. tested group added methanol extracts of *P. yezoensis*; 1. *K. mikimitoi*; 2. *S. costatum*; 3. *A. tamarense*.

表1 条斑紫菜甲醇提取物对3种赤潮微藻细胞体积的影响

Tab.1 Effect of methanol extracts of *P. yezoensis* dry powder on cell volume of the three species of red tide microalgae

实验组 test groups	米氏凯伦藻 <i>K. mikimitoi</i>	中肋骨条藻 <i>S. costatum</i>	塔玛亚历山大藻 <i>A. tamarense</i>
对照 control	$(13.13 \pm 1.55) \times (13.00 \pm 1.31)$	$(11.88 \pm 0.99) \times (11.88 \pm 1.41)$	$(11.50 \pm 0.93) \times (11.63 \pm 1.06)$
甲醇提取物 methanol extracts of <i>P. yezoensis</i> dry powder	$(7.63 \pm 2.32) \times (7.63 \pm 2.32)$	$(7.88 \pm 1.80) \times (8.50 \pm 2.31)$	$(9.50 \pm 0.53) \times (8.75 \pm 0.53)$

注:表中数据为平均值±方差。

Notes: The data are presented as means ± SD ($n=3$).

4种实验微藻细胞内的叶绿素、可溶性蛋白质和多糖的含量同样受到条斑紫菜甲醇提取物的影响(图5)。所有实验组微藻细胞内叶绿素含量随甲醇提取物浓度的增加而显著($P < 0.05$)降低。与对照组相比,当甲醇提取物浓度为16 g/L时4种微藻细胞内叶绿素含量降低了47%~

60%;条斑紫菜甲醇提取物对可溶性蛋白质和多糖含量的影响与其对叶绿素含量的影响类似,即随着甲醇提取物浓度的增加,4种微藻细胞内可溶性蛋白质和多糖含量均出现明显($P < 0.05$)的降低。

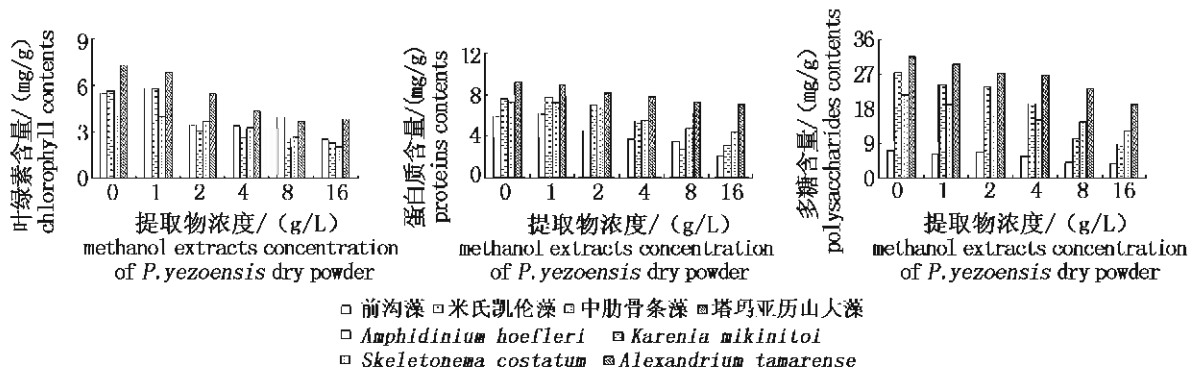


图5 条斑紫菜甲醇提取物对4种赤潮微藻叶绿素、蛋白质和多糖含量的影响

Fig. 5 Effects of methanol extracts of *P. yezoensis* dry powder on the contents of chlorophyll, proteins and polysaccharides of the four species of red tide microalgae

2.4 条斑紫菜甲醇提取物的液液分离物对 4 种赤潮微藻生长的影响

在上述实验基础上,依次以石油醚、乙酸乙酯和正丁醇为溶剂,采用液液分离萃取法进一步分离条斑紫菜的甲醇提取物(图 6 和表 2),结果表明,石油醚相和乙酸乙酯相分离物均能显著($P < 0.05$)抑制前沟藻、米氏凯伦藻、中肋骨条藻和

塔玛亚历山大藻的生长。第 12 天,它们对 4 种赤潮微藻的生长抑制率超过 44%。其中,石油醚相分离物对 4 种赤潮微藻生长的抑制作用更为强烈。鉴于此,选定石油醚相和乙酸乙酯相为后续分离纯化的目标物。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。

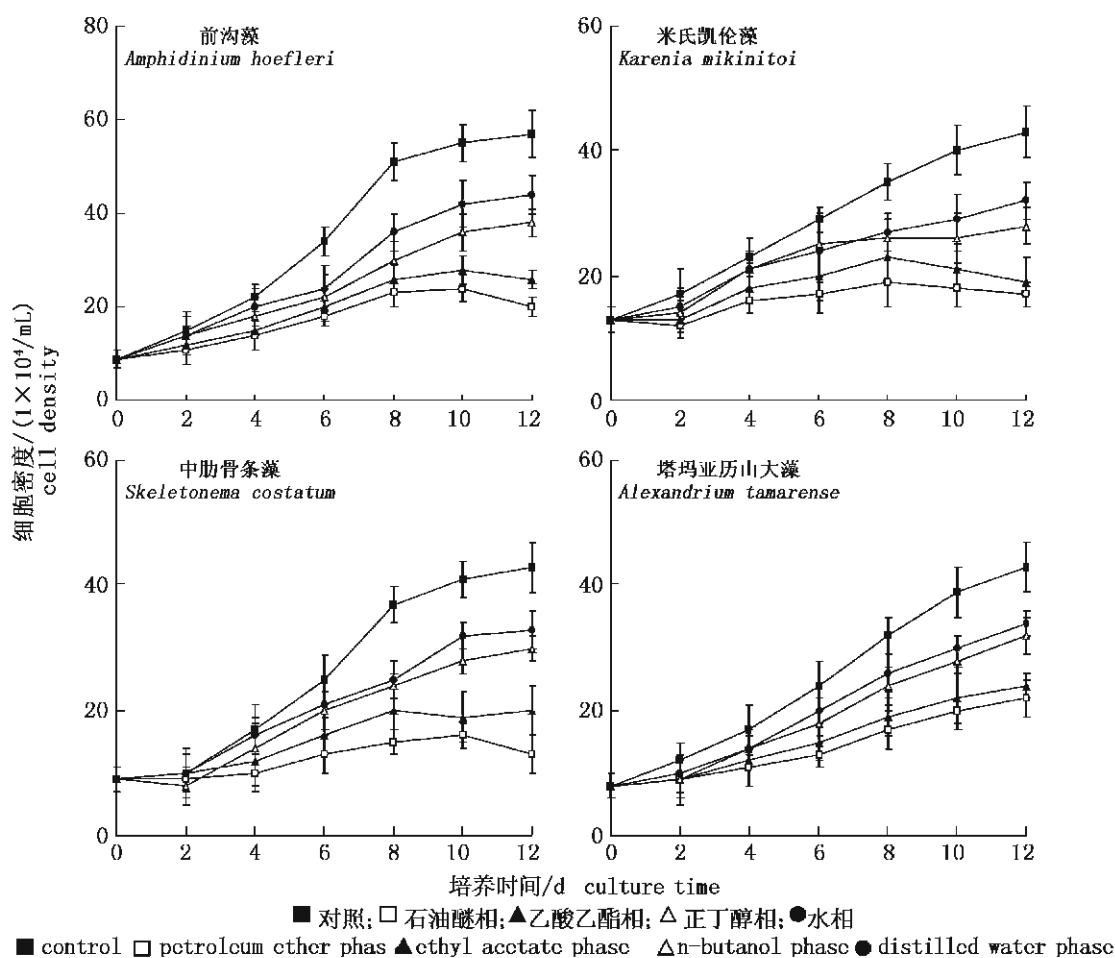


图 6 条斑紫菜甲醇浸膏的液液分离物对 4 种赤潮微藻生长的影响

Fig. 6 Effects of extracts prepared from the methanol extracts of *P. yezoensis* dry powder using different organic solvent on the growth of the four species of red tide microalgae

表 2 条斑紫菜甲醇浸膏液液分离物对 4 种赤潮微藻的生长抑制率

Tab. 2 The growth inhibition of extracts prepared from the methanol extracts of *P. yezoensis* dry powder using different organic solvent for the four species of red tide microalgae

分离物 four kind of fractionation	生长抑制率(%) growth inhibition			
	前沟藻 <i>Amphidinium hoefleri</i>	米氏凯伦藻 <i>Karenia mikinitoi</i>	中肋骨条藻 <i>Skeletonema costatum</i>	塔玛亚历山大藻 <i>Alexandrium tamarense</i>
石油醚相 petroleum ether phase	64.9	60.4	69.7	48.8
乙酸乙酯相 ethyl acetate phase	54.3	55.8	53.4	44.2
正丁醇相 n-butanol phase	33.3	34.8	30.2	25.6
水相 distilled water phase	22.8	25.5	23.2	20.9

注:表中数据为 3 个重复的平均值。

Notes: Each data is the mean of three replicates.

3 讨论

目前,某些海藻水溶性抽提液的抑藻现象已被报道。例如,在龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)对旋链角毛藻(*Chaetoceros curvisetus*)和椎状斯氏藻(*Scrippsiella trochoidea*)的生长抑制实验中,刘婷婷等^[30]发现2.5 g/L水溶性抽提液能明显抑制此2种微藻的生长。王仁君等^[7]指出,当鼠尾藻浓度超过16 g/L时,其水溶性抽提液对赤潮异弯藻和中肋骨条藻的生长有明显的抑制作用。王兰刚等^[31]也发现,0.3~0.7 g/L范围内的条浒苔(*Enteromorpha clathrata*)水溶性抽提液能显著抑制三角褐指藻(*Phaeodactylum tricorutum*)的生长。上述研究表明,不同种属海藻的抑藻能力不同。本文中,条斑紫菜水溶性抽提液浓度超过16 g/L时可表现出明显的抑藻作用。

通过比较,发现不同种属的微藻对条斑紫菜水溶性抽提液的敏感程度不同。条斑紫菜水溶性抽提液对前沟藻和米氏凯伦藻的抑制作用较为强烈,而对中肋骨条藻和塔玛亚历山大藻的抑制作用较弱。我们认为这与它们的细胞结构有关。前沟藻和米氏凯伦藻为裸甲藻,无细胞壁,细胞的外层是一种赤裸裸的细胞膜,而中肋骨条藻细胞连成长链并外有胶质外壳^[32],塔玛亚历山大藻细胞外也涵盖一层坚硬的外壳^[33]。因此,赤潮微藻细胞外层结构的差异导致了它们对条斑紫菜水溶性抽提液有不同的反应。Kakisawa等^[34]也报道褐藻*Cladosiphon okamuranus*能产生一些对有害赤潮藻包括赤潮异弯藻有抑制作用的物质。他们发现这些物质对无细胞覆盖的浮游植物起作用,而对具有坚硬细胞壁的浮游植物不起作用。此外,还发现条斑紫菜水溶性抽提液对前沟藻和米氏凯伦藻生长的“低促高抑”现象,在其它海藻抑藻实验中,研究者也发现了类似现象^[7-8, 35]。

通过条斑紫菜水溶性抽提液的抑藻实验,我们获知条斑紫菜体内含有抑藻物质。在陆生植物的化感作用研究中,为了从植物中更快更多地提取该化感物质,采用有机溶剂浸提的方法是可行的^[36];并且,Jin等^[37]利用有机溶剂浸泡孔石莼获得的提取物具有一定的抑制活性。鉴于此,本文采用甲醇、丙酮、乙酸乙酯、氯仿和石油醚等

5种溶剂浸泡条斑紫菜干粉,以期获得具有抑制活性的提取物。图2表明,5种溶剂提取物中甲醇提取物对4种实验微藻具有强烈的抑制作用。因此,在后续分离纯化中可以利用甲醇进行条斑紫菜抑藻物质的初步提取。

在铜绿微囊藻研究中,洪喻等发现芦竹(*Arundo donax* L.)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^[27]。我们也发现甲醇提取物致使米氏凯伦藻、中肋骨条藻和塔玛亚历山大藻等3种赤潮微藻体积变小,藻细胞出现空洞、细胞破碎和色素减退等现象(表1和图4)。通常认为,外界环境导致藻细胞体积减小是因为,(1)藻细胞进入主动的程序性死亡过程^[38];(2)藻细胞可能形成孢子耐受不利环境的影响,以保证部分个体生存^[39];(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^[40]。由于本文未进行相关实验,故还有待进一步实验来研究甲醇提取物致使藻细胞体积变小的原因。此外,我们还观察到甲醇提取物明显地降低了4种实验微藻的运动能力。Nagayama等^[41]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。

同时,我们发现甲醇提取物不仅能降低藻细胞密度,而且还能够抑制藻细胞内叶绿素、可溶性蛋白质和多糖等生理指标的合成(图5)。目前,在陆地和淡水生态系统化感作用的机理研究中,已经证实植物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。条斑紫菜体内的抑藻物质是否也具有这种作用机制还有待研究。

最后,通过液液分离法对甲醇提取物进一步分离,获得的石油醚相和乙酸乙酯相能显著抑制前沟藻、米氏凯伦藻、塔玛亚历山大藻和中肋骨条藻的生长。综上所述,条斑紫菜抑制赤潮微藻生长的能力还值得进一步研究。

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(4): 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] McLachlan J, Craigie J S. Algal inhibition by yellow ultraviolet absorbing substances from *Fucus vesiculosus* [J]. *Canad J Bot*, 1964, 42(3): 287-292.
- [10] Fletcher R L. Heteroantagonism observed in mixed algal cultures[J]. *Nature*, 1975, 253: 534-535.
- [11] 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(6): 1047-1053.
- [12] DellaGreca M, Monaco P, Previtiera L, *et al.* Allelochemical activity of phenylpropanes from *Acorus gramineus* [J]. *Phytochemistry*, 1989, 28(9): 2319-2322.
- [13] 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(5): 683-692.
- [14] 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.
- [15] Steidinger K A. A re-evaluation of toxic dinoflagellates biology and ecology [J]. *Prog Phycol Res*, 1983, 2: 147-188.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] Anderson D M, Anderson P, Bricelj V M, *et al.* Monitoring and management strategies for harmful algal blooms in coastal waters [R]. Paris: APEC 201 - MR - 01. 1, Asia Pacific Economic Program, Singapore, and Intergovernmental Oceanographic Commission Technical Series, 2001: 59.
- [20] Gross E M, Meyer H, Schilling G. Release and ecological impact of algicidal hydrolysable polyphenols in *Myriophyllum spicatum* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 41(1): 133-138.
- [21] Nakai S, Inoue Y, Hosomi M, *et al.* Growth inhibition of blue-green algae by allelopathic effects of macroalgals [J]. *Water Sci Technol*, 1999, 39(8): 47-53.
- [22] 徐姗姗, 何培民. 我国赤潮频发现象分析与海藻栽培生物修复作用[J]. *水产学报* 2006, 30(4): 554-561.
- [23] 严兴洪, 刘新轶, 张善露. 条斑紫菜叶状体细胞的发育与分化[J]. *水产学报*, 2004, 28(2): 145-154.
- [24] 张寒野, 何培民, 陈婵飞, 等. 条斑紫菜养殖对海区中无机氮浓度影响[J]. *环境科学与技术*, 2005, 28(4): 44-46.
- [25] Guillard R R L, Ryther J H. Studies of marine planktonic diatom. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1962, 8(2): 229-239.
- [26] 周名江, 朱明远, 张经. 中国赤潮的发生趋势和研究进展[J]. *生命科学*, 2001, 13(2): 53-59.
- [27] 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.
- [28] Jensen A. *Handbook of Physiological Methods* [M]. New York: Cambridge University Press, 1978.
- [29] 张志良, 翟伟箐. *植物生理学实验指导* [M]. 北京: 高等教育出版社, 2002.
- [30] 刘婷婷, 杨宇峰, 叶长鹏, 等. 大型海藻龙须菜对两种海洋赤潮藻的生长抑制效应[J]. *暨南大学*

- 学报(自然科学版), 2006, 27(5): 754-759.
- [31] 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.
- [32] 郭皓. 中国近海赤潮生物图谱[M]. 北京: 海洋出版社, 2004.
- [33] Qi Y, Qian F. Taxonomic studies on red tide causative dinoflagellates in Dapeng Bay, South China Sea[J]. Oceanol Limnol Sin, 1994, 25(5): 206-211.
- [34] Kakisawa H, Asari F, Kusumi T, et al. An allelopathic fatty acid from the brown alga *Aladosiphon okaamuranus* [J]. Phytochemistry, 1988, 27: 731-735.
- [35] 曲良, 肖慧, 王仁君, 等. 鼠尾藻和小珊瑚藻对赤潮异弯藻克生效应的初步研究[J]. 中国海洋大学学报, 2007, 37(4): 621-626.
- [36] 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.
- [37] Jin Q, Dong S L. Comparative studies on the allelopathic effects of two different strains of *Ulva pertusa* on *Heterosigma akashiwo* and *Alexandrium tamarense* [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2003, 29(1): 41-55.
- [38] 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(18): 189-203.
- [39] 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(6): 704-710.
- [40] 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(11): 2015-2031.
- [41] 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(1-4): 601-612.

The growth inhibition of the four species of red tide microalgae by the extracts from *Porphyra yezoensis*

SUN Ying-ying¹, LIU Xiao-xiao¹, YAN Bin-lun^{1*}, WANG Chang-hai^{2,3}

(1. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China;

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

3. School of Environmental and Biological Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: A kind of aqueous extracts of *Porphyra yezoensis* was extracted with distilled water, and its inhibitory activity against four species of red tide microalgae, *Amphidinium hoefleri*, *Karenia mikimitoi*, *Skeletonema costatum* and *Alexandrium tamarense* was tested. The extracts were extracted with five solvents (methanol, acetone, ethyl acetate, chloroform and petroleum ether), respectively, to probe their inhibitory effects on the growth of those microalgae. Based on the observation of microalgal morphology and density, cell size and the contents of some key physiological indicators (chlorophyll, proteins and polysaccharides), the inhibitory effect of the solvent extract that had strongest inhibition on all tested microalgae was investigated. Thereafter, the extracts mentioned above were separated again with petroleum ether phase, ethyl acetate phase, n-butanol phase and distilled water phase by the method of liquid-liquid fractionation. The results showed that the growth of the four microalgae was significantly inhibited by the aqueous extracts of *P. yezoensis* at the concentration of 16 g/L. The inhibitory effect of the aqueous extracts of *P. yezoensis* for *A. hoefleri* and *K. mikimitoi* was stronger than that for *A. tamarense* and *S. costatum*. The methanol extracts of *P. yezoensis* dry powder had the strongest effect, and at the concentration of 16 g/L its growth inhibitory effect on *A. hoefleri*, *K. mikimitoi*, *A. tamarense* and *S. costatum* was 70.5%, 79.9%, 67.1% and 65.1% on day 12, respectively. At the same time, the cell size and athletic ability of the cells decreased, and cavities, pieces and pigment faded in cells were caused. The further investigation found that under the effect of the methanol extracts the contents of chlorophyll, proteins and polysaccharides in the cells of those microalgae significantly decreased. The methanol extracts were partitioned to petroleum ether phase, ethyl acetate phase, n-butanol phase and distilled water phase by liquid-liquid fractionation, among which those extracted with petroleum ether and ethyl acetate had the strongest effect.

Key words: *Porphyra yezoensis*; red tide microalgae; growth inhibition

Corresponding author: YAN Bin-lun. E-mail: yanbinlun@yahoo.com.cn