

文章编号:1000-0615(2012)04-0562-06

DOI:10.3724/SP.J.1231.2012.27746

## 浒苔对赤潮异湾藻的克生作用

贾睿, 吴敏, 蔡春尔, 霍元子, 何培民\*

(上海海洋大学水产与生命学院, 水域环境生态上海市高校工程研究中心, 上海 201306)

**摘要:** 研究了浒苔对赤潮微藻——赤潮异湾藻生长的克生效应。结果表明, 浒苔新鲜组织对赤潮异湾藻的生长具有强烈的克生效应; 一次性添加浒苔培养过滤液对赤潮异湾藻生长没有显著的抑制作用, 而半连续添加浒苔培养过滤液对赤潮异湾藻生长具有显著的克生作用; 浒苔干粉和甲醇抽提液均对赤潮异湾藻的生长产生显著的抑制作用。试验结果表明, 抑制赤潮异湾藻生长的物质很可能更多地存在于浒苔组织内, 向环境中分泌的克生物质较少。因而, 克生物质的连续分泌是有效克制赤潮异湾藻生长的关键。同时, 克生作用存在着明显的浓度效应, 当抑制物浓度达到一定阈值才表现出明显的克生作用, 在阈值之上浓度越高克生作用越强。

**关键词:** 浒苔; 赤潮异湾藻; 克生; 绿潮

**中图分类号:** Q 143; X 171

**文献标志码:** A

2007—2010年, 我国黄海沿海连续爆发绿潮<sup>[1-4]</sup>。尤其是2008年6月在青岛沿海爆发了世界上最大规模的绿潮, 不但影响到奥帆赛的顺利进行, 并且对我国的海洋经济和生态环境造成了一定的影响<sup>[5]</sup>。但目前对我国绿潮的成因、过程、溯源和其对海洋生态系统的影响等问题仍然没有足够的科学认识。

在我国, 绿潮主要是由浒苔聚集而成, 浒苔(*Ulva prolifera*)属于绿藻门(Chlorophyta)、绿藻纲(Chlorophyceae)、石莼目(Ulvales)、石莼科(Ulvaceae), 是一类广温、广盐、耐干性的大型海藻。赤潮异湾藻(*Heterosigma akashiwo*)是一种典型的赤潮藻, 据报道, 赤潮时, 赤潮异湾藻的细胞数量常在80%以上, 占绝对优势, 能与之共生的仅观测到原甲藻和骨条藻等少数藻种, 在2003年的一次赤潮中, 更是达到了99.9%<sup>[6-8]</sup>。本研究比较系统地研究了浒苔对赤潮微藻——赤潮异湾藻生长的抑制

作用, 为深入研究我国沿海区域大型绿藻与赤潮微藻之间的克生作用, 了解绿潮对我国生态环境的影响提供科学依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 藻种和培养条件

浒苔于2009年5月采自江苏如东海区紫菜栽培伐架, 采集后用经高温高压消毒过的海水仔细清洗, 以除去污泥和附生生物, 无菌培养于VSE培养液中。赤潮异湾藻藻种购自中国科学院水生生物研究所藻种库, 培养于*f/2*培养液中。以上藻种均培养于温度为20℃, 光照强度为60 μmol/(m<sup>2</sup>·s), 光照周期为12L:12D的培养箱内。每天定时晃动微藻培养瓶2次以防其附壁。

#### 1.2 赤潮异湾藻生长曲线绘制

将赤潮异湾藻接种于内含100 mL培养基的250 mL三角瓶中, 初始细胞数量为1×10<sup>2</sup>/mL, 实验设置3个重复。每天定时摇动培养瓶, 防止其附

收稿日期: 2011-09-22 修回日期: 2011-12-13

资助项目: 上海市教委科研创新项目(11YZ149); 上海市科委项目(10391901900); 教育部留学回国人员科研启动基金; 上海高校选拔培养优秀青年教师科研专项基金(ssc09001); 国家海洋局东海分局开放基金(MATHAB20100205, MATHAB20100309); 上海海洋大学博士启动基金(A-2400-09-0139); 上海市教委海洋生物重点学科(J50701)

通讯作者: 何培民, E-mail: pmhe@shou.edu.cn

壁生长。隔天定时从每个培养瓶中采样1 mL,用 Lugol 氏液固定,并用血球计数板在Olympus光学显微镜下计数。然后每个培养瓶中加入1 mL 含有100 mL所有*f/2*成分培养液以避免营养耗尽。试验进行30 d,根据藻类细胞计数结果绘制赤潮异湾藻的生长曲线。

### 1.3 试验设计

**浒苔新鲜组织对赤潮异湾藻生长的影响** 试验采用大藻与微藻共存培养系统。取生长状况良好处于指数生长期的赤潮异湾藻,与不同数量的浒苔新鲜组织同时接种于含有100 mL *f/2*培养液的250 mL锥形瓶内。赤潮异湾藻初始细胞数量为 $2 \times 10^4/\text{mL}$ ,浒苔新鲜组织接种密度(湿重)设定为0、1.0、1.5、3.0和6.0 g/L。每组均设3个重复,试验共进行8 d。营养盐补充和微藻细胞计数方法同赤潮异湾藻的计数。

**浒苔干粉末对赤潮异湾藻的生长的影响** 将浒苔新鲜组织于室温下完全干燥7 d,研磨成粉末。试验在含有100 mL *f/2*培养液的250 mL锥形瓶里进行。赤潮异湾藻初始细胞数量为 $2 \times 10^4/\text{mL}$ 。浒苔干粉末的接种密度为0、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 g/L。本实验研究了微藻与大藻干粉末浓度相关的克生效应。每组设3个重复,共进行8 d。营养盐补充和微藻细胞计数方法同赤潮异湾藻的计数。

**浒苔培养过滤水对赤潮异湾藻生长的影响**

#### (1) 一次性培养

将生物量为每升30 g湿重的大藻在*f/2*培养液中培养3 d后,移去大藻组织,将培养液经高温灭菌过的滤膜过滤。将过滤之后所得的大藻过滤液用40倍*f/2*营养液重新加富,将处于对数生长期的赤潮异湾藻( $2 \times 10^4/\text{mL}$ )立即接种于大藻过滤液中,作为试验组。以相同条件下培养于*f/2*培养液中的赤潮异湾藻作为对照组。试验于盛有40 mL培养液的100 mL三角瓶中进行,每组设3个重复,共进行8 d。

#### (2) 半连续培养

按照“一次性培养”中的方法将赤潮异湾藻接种于浒苔培养水过滤液中。每天从培养瓶中移出10 mL培养液,然后加入10 mL营养重新加富的大藻培养水过滤液以保持培养液体积的恒定。作为对照,以*f/2*培养液代替重新加富的大藻培养水过滤液。试验设置同“一次性培养”中所述。

#### (3) 经高温高压处理的浒苔过滤液

同“一次性培养”中的方法制备出浒苔培养水过滤液,于120 °C 高压灭菌20 min后冷却并加富,接种处于对数生长期的赤潮异湾藻。以相同条件下培养于*f/2*加富消毒海水中的赤潮异湾藻作为对照。试验设置同“一次性培养”中所述。

**浒苔抽提液对赤潮异湾藻生长的影响** 用3种具有不同极性的溶剂(极性从高到低:水>甲醇>氯仿)来检验与浒苔提取物初始浓度相关的对赤潮异湾藻生长的影响。

#### (1) 水溶性提取物母液制备。

取2 g浒苔干粉用100 mL蒸馏水在20 °C的黑暗环境下充分提取3次,合并提取液,并减压蒸干(40 °C, 60 r/min)。提取物再用10 mL的蒸馏水溶解,得到提取物母液,其浓度表示为 $200 \times 10^{-3}$ (即1升溶剂中含有200 g浒苔干粉中所有该溶剂的提取物)。将提取物母液被稀释成不同的浓度。设浓度梯度为(0、0.4、0.8、1.2、1.6和2.0)  $\times 10^{-3}$ 。将100  $\mu\text{L}$ 不同浓度的提取液分别添加到含有20 mL处于对数生长期的赤潮异湾藻( $1 \times 10^5/\text{mL}$ )的40 mL锥形瓶中。添加了相同体积蒸馏水的赤潮异湾藻藻液作为对照组,每组设3个重复,共进行6 d。

#### (2) 有机溶剂提取物母液制备

方法同“水溶性提取物母液制备”,用甲醇和氯仿分别从5 g干粉中提取相应的提取物,提取物母液浓度为 $500 \times 10^{-6}$ 。设甲醇抽提液浓度梯度:0,  $0.01 \times 10^{-6}$ ,  $0.02 \times 10^{-6}$ ,  $0.03 \times 10^{-6}$ ,  $0.04 \times 10^{-6}$ ,  $0.05 \times 10^{-6}$ ;氯仿抽提液浓度梯度:0,  $0.02 \times 10^{-6}$ ,  $0.04 \times 10^{-6}$ ,  $0.08 \times 10^{-6}$ ,  $0.10 \times 10^{-6}$ 。将10  $\mu\text{L}$ 不同浓度的提取液分别添加到含有10 mL处于对数生长期的赤潮异湾藻培养液( $9 \times 10^4/\text{mL}$ )的25 mL三角瓶中。添加了相同体积有机溶剂的赤潮异湾藻藻液作为对照组,试验设置同“水溶性提取物母液制备”。

## 1.4 数据处理

数据经方差分析(One-Way ANOVA)及Duncan氏多重比较进行处理,以 $P < 0.05$ 作为差异显著水平,所得数据均以平均值 $\pm$ 标准差(mean  $\pm$  SD)表示。

## 2 结果

### 2.1 赤潮异湾藻的生长曲线

由图1可知,赤潮异湾藻在第19天达到指数生

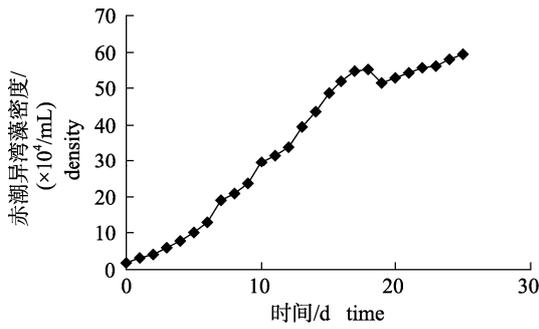


图 1 赤潮异湾藻标准生长曲线  
Fig. 1 Growth curve of *H. akashiwo*

长期, 并且持续 10 多天, 只要有适宜的营养, 光照和温度, 就可以爆发式生长。

2.2 浒苔新鲜组织对赤潮异湾藻生长的作用

与对照组相比, 各试验组浒苔对共培养的赤潮异湾藻生长均有显著抑制作用( $P < 0.05$ ), 尤其是 6 g/L 培养组, 赤潮异湾藻在 7 d 内完全死亡; 1.5 和 3.0 g/L 培养组, 赤潮异湾藻生长受到显著抑制。试验结束后, 赤潮异湾藻种群密度比对照组分别降低了 68.8% 和 76.7%(图 2)。

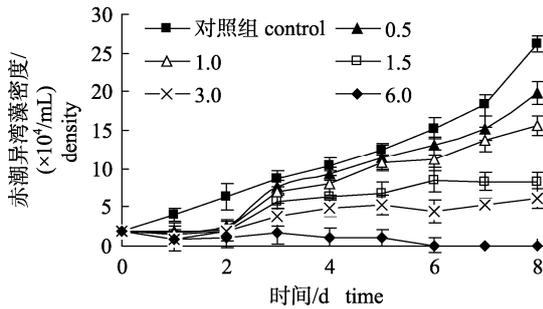


图 2 浒苔新鲜组织对赤潮异湾藻的生长的作用  
Fig. 2 Effects of fresh tissue of *U. prolifera* on growth of *H. akashiwo*

2.3 浒苔干粉末对赤潮异湾藻生长的影响

图 3 表明, 当浒苔干粉末浓度为 1.6 g/L 时, 赤潮异湾藻在 3 d 内全部死亡; 在最高浓度 3.2 g/L 培养组, 抑制效果最为明显, 赤潮异湾藻在 1 d 内完全死亡; 而浓度为 0.2、0.4、0.8 g/L 的干粉末对赤潮异湾藻生长均有极显著的抑制( $P < 0.01$ ), 至试验末, 其抑制率分别为 34.6%、37.7% 和 79.3%。

2.4 浒苔培养过滤水对赤潮异湾藻的生长影响

一次性培养 对照组和试验组微藻种群密度一直呈递增式生长(图 4)。方差分析表明, 将赤潮异湾藻接种至浒苔培养滤液后的第 4~5 天内, 试验组的赤潮异湾藻种群密度均显著低于对照组( $P < 0.01$ ),

此后培养滤液对赤潮异湾藻的生长已无显著抑制作用( $P > 0.05$ )。

半连续培养 在半连续培养方式下, 对照组和试验组赤潮异湾藻种群密度分别呈递增和递减趋势(图 5)。至 8 d 后试验结束时, 试验组赤潮异湾藻种群密度比对照组降低了 80.2%(图 5)。方差分析表明, 从试验开始的第 2 天开始, 试验组赤潮异湾藻的种群密度即显著低于对照组( $P < 0.01$ )。

经高温高压处理的浒苔过滤液 与对照组相比, 5 d 后经高温高压处理过的浒苔培养滤液对赤潮异湾藻生长仍有显著抑制( $P < 0.01$ )。至 8 d 后

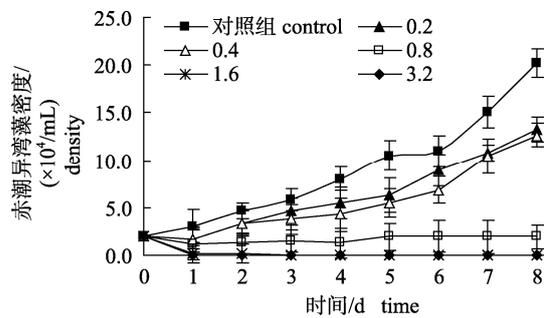


图 3 浒苔干粉末对赤潮异湾藻生长的影响  
Fig. 3 Effects of dry powder of *U. prolifera* on growth of *H. akashiwo*

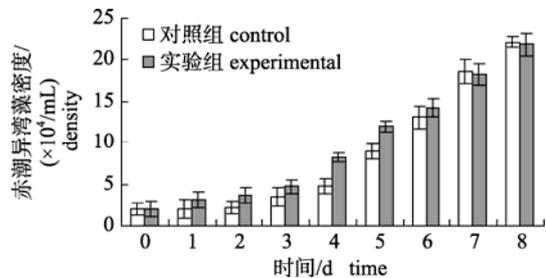


图 4 浒苔培养滤液一次性添加对赤潮异湾藻生长的影响  
Fig. 4 Effects of *U. prolifera* culture medium filtrate under initial filtrate addition on growth of *H. akashiwo*

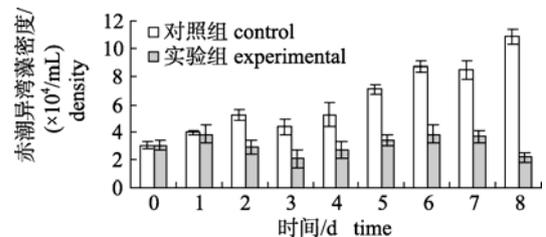


图 5 浒苔培养滤液半连续添加对赤潮异湾藻生长的影响  
Fig. 5 Effects of *U. prolifera* culture medium filtrate under semicontinuous filtrate addition on growth of *H. akashiwo*

试验结束时, 试验组赤潮异湾藻种群密度比对照组降低了 64.7 % (图 6)。

### 2.5 浒苔抽提液对赤潮异湾藻生长的影响

**水溶性抽提液** 不同浓度的浒苔水溶性抽提液对赤潮异湾藻生长均有显著抑制作用( $P < 0.01$ ), 且该抑制作用随着抽提液浓度的增加而加强, 但均不能至赤潮异湾藻死亡(图 7)。(0.4~2.0)  $\times 10^{-3}$  试验组至试验结束时, 其对赤潮异湾藻的抑制率分别为 38.9%, 46.5%, 57.2%, 60.3% 和 62.0%。

**甲醇抽提液** 不同浓度的浒苔甲醇抽提液对赤潮异湾藻生长均有显著抑制作用, 且其抑制作用随着抽提液浓度增加而加强(图 8)。在 0.05  $\times 10^{-3}$

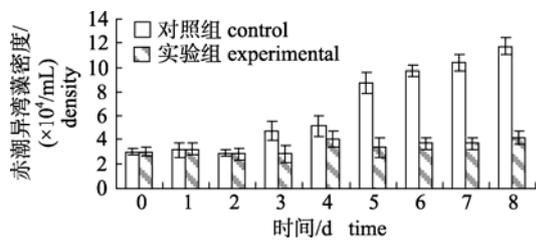


图 6 经高温高压处理过的浒苔培养滤液对赤潮异湾藻生长的影响

Fig. 6 Effects of *U. prolifera* culture medium filtrate under high temperature and high pressure on growth of *H. akashiwo*

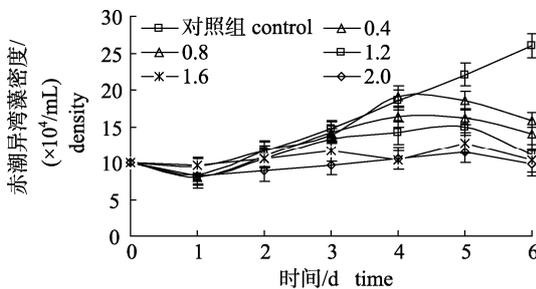


图 7 不同浓度的浒苔水溶性抽提液对赤潮异湾藻生长的影响

Fig. 7 Effects of different concentration of aqueous extracts of *U. prolifera* on growth of *H. akashiwo*

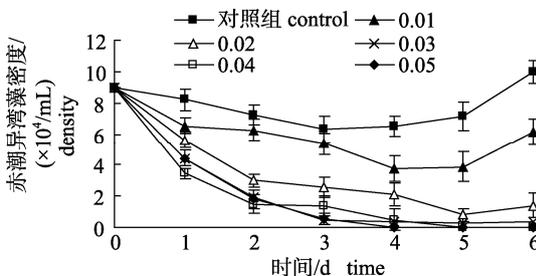


图 8 不同浓度的浒苔甲醇抽提液对赤潮异湾藻生长的影响

Fig. 8 Effects of different concentration of methanol extracts of *U. prolifera* on growth of *H. akashiwo*

抽提液处理下, 赤潮异湾藻第 4 天就完全死亡。抽提液浓度为 0.04  $\times 10^{-3}$  时, 第 5 天可使赤潮异湾藻完全致死。相对较低浓度抽提液组 (0.01  $\times 10^{-3}$ 、0.02  $\times 10^{-3}$  和 0.03  $\times 10^{-3}$ ), 赤潮异湾藻种群密度先降低又逐渐增加, 培养至第 6 天时抑制率分别为 38.3%、85.8% 和 96.2%。

**氯仿抽提液** 由不同浓度的浒苔氯仿抽提液对赤潮异湾藻生长的影响(图 9)结合方差分析可知, 不同浓度的浒苔氯仿抽提液组对赤潮异湾藻生长均有显著抑制作用( $P < 0.01$ )。至试验结束时, 相对较高浓度抽提液组 (0.06  $\times 10^{-3}$ , 0.08  $\times 10^{-3}$  和 0.10  $\times 10^{-3}$ ) 对赤潮异湾藻生长的抑制率分别为 40.2%、40.4% 和 74.8%。

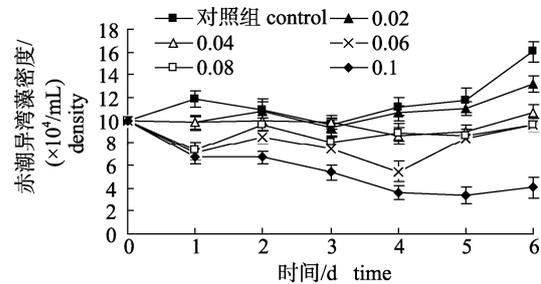


图 9 不同浓度的浒苔氯仿抽提液对赤潮异湾藻生长的影响

Fig. 9 Effects of different concentration of chloroform extracts of *U. prolifera* on growth of *H. akashiwo*

## 3 讨论

克生效应是一种植物(包括微生物)通过向环境释放化学物质而对其附近的另一些植物(包括微生物)产生直接或间接、促进或抑制作用的现象。利用水生生物控制淡水藻类的报道较多, 而对海洋微藻特别是赤潮微藻抑制作用的研究报道相对较少。国外主要有 Jeong 等<sup>[9]</sup>研究了小珊瑚藻对赤潮微藻的影响。国内主要有王悠等<sup>[10]</sup>研究了共培养体系中石莼和江蓠对赤潮异湾藻生长的影响; Jin 等<sup>[11]</sup>报道了两株孔石莼对赤潮异湾藻和塔玛亚历山大藻的植物克生作用; 霍元子等<sup>[3]</sup>发现浒苔组织内存在克生物质, 可有效抑制米氏凯伦藻生长; 王兰刚等<sup>[12]</sup>发现条浒苔与海洋微藻三角褐指藻之间存在相生相克效应。本研究在实验室控制条件下进行, 排除温度、光照、营养盐变化等环境因素可能对试验结果产生的影响。研究结果表明, 浒苔新鲜组织、干粉末、甲醇提取液均对赤潮异湾藻有较

强的克生作用。

浒苔新鲜组织和干粉末试验结果表明,两者对赤潮异湾藻的生长均有显著抑制作用,并且随着密度和浓度的增加,微藻相应受到的抑制作用也随之加强,新鲜组织 6 g/L 培养组,赤潮异湾藻在 7 d 内完全死亡,而干粉 3.2 g/L 培养组,赤潮异湾藻在 1 d 内完全死亡。表明大藻组织内确实存在对赤潮异湾藻生长抑制的克生物质,且对微藻的克生作用存在着浓度效应,当浓度达到一定阈值时才会出现。

浒苔培养水过滤液培养试验结果表明,在以一次性浒苔培养水过滤液添加方式下,第 4~5 天内,实验组的赤潮异湾藻种群密度均显著低于对照组,此后培养滤液对赤潮异湾藻的生长已无显著抑制作用。半连续添加浒苔培养滤液对赤潮异湾藻抑制效果显著,至 8 d 后试验结束时,试验组赤潮异湾藻种群密度比对照组降低了 80.2%。表明克生物质并不是一次性释放的,而是连续分泌的,因此保持环境中克生物质的浓度是抑制赤潮异湾藻增殖的关键。经高温高压处理的浒苔过滤液对赤潮异湾藻的生长仍有显著抑制作用,表明该克生物质对温度并不敏感,仍然有抑藻活性,与以前报道的克生物质高温高压下分解不同<sup>[3]</sup>,可能是由于两种克生物质属不同类型的化合物。

通过浒苔抽提液的试验表明,相同浓度的水、甲醇及氯仿提取液对赤潮异湾藻的抑制效果却不同,0.05×10<sup>-6</sup>的甲醇提取液能使赤潮异湾藻第 4 天死亡,而同浓度的水和氯仿提取液只能抑制赤潮异湾藻的正常生长却不能致死。表明克生物质可能是较易溶于甲醇,根据相似相溶原理,克生物质的极性较高,这也与 Alamsjah 等<sup>[13]</sup>从石莼中分离出具有抑制赤潮异湾藻的克生物质主要为多不饱和脂肪酸类相一致,并为进一步验证该克生物质提供了线索。

本研究表明了浒苔对赤潮异湾藻的生长具有克生作用,且该克生物质具有相对较高的极性。这不仅丰富了大型海藻与微藻间相互作用的认识,也为下一步对这些克生物质进行提取、分离、鉴定奠定了基础,同时进一步解释了绿潮藻爆发的水域赤潮却很少爆发的原因<sup>[14]</sup>:除了营养竞争的关

系,大型海藻与微藻间克生效应也是重要的因素。本文研究结果同时表明:当浒苔密度(湿重)达 1.5 g/L 时,能完全抑制赤潮异湾藻的增殖。基于此,可以利用克生效应进行赤潮生物防治工作。

#### 参考文献:

- [1] Jiang P, Wang J F, Cui Y L, *et al.* Molecular phylogenetic analysis of attached Ulvaceae species and free-floating *Enteromorpha* from Qingdao coasts in 2007[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2008, 26 (3), 276-279.
- [2] Liu D Y, Keesing J K, Dong Z J, *et al.* Recurrence of the world's largest green-tide in 2009 in Yellow Sea, China: *Porphyra yezoensis* aquaculture rafts confirmed as nursery for macroalgal blooms[J]. Marine Pollution Bulletin, 2010, doi:10.1016/j.marpolbul.2010.05.015
- [3] 霍元子,何培民. 浒苔对米氏凯伦藻生长的克生作用[J]. 海洋环境科学, 2010, 29 (4): 496-499.
- [4] 忻丁豪,任松,何培民,等. 黄海海域浒苔属 (*Enteromorpha*)生态特征初探[J]. 海洋环境科学, 2009, 28(2): 190-192.
- [5] Sun S, Wang F, Li C L, *et al.* Emerging challenges Massive green algae blooms in the Yellow Sea[J]. Nature Precedings, 2008, hdl: 10101 / npre. 2008.2266.1
- [6] 郭玉洁. 大连湾赤潮生物—赤潮异湾藻[J]. 海洋与湖沼, 1994, 25(2): 211-215.
- [7] 王惠卿. 大连湾海域赤潮异湾藻赤潮及其生态特征[J]. 环境科学研究, 1991, 4(1): 53-59
- [8] 王年斌,周遵春,马志强,等. 大连湾赤潮异湾藻赤潮的多元分析[J]. 海洋学报, 2006, 28(3): 151-156.
- [9] Jeong J H, Jin H J. Algicidal activity of the seaweed *Corallina pilulifera* against red tide microalgae[J]. Journal of Applied Phycology, 2000, 12(1): 37-43.
- [10] 王悠,俞志明. 共培养体系中石莼和江蓠对赤潮异湾藻生长的影响[J]. 环境科学, 2006, 27(2): 246-252.
- [11] 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, 293 (1): 41-55.
- [12] 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.
- [13] Alamsjah M A, Hirao S. Isolation and structure determination of algicidal compounds from *Ulva fasciata*[J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 2005, 69 (11): 2186-2192.
- [14] Sfrifo A, Pavoni B. Macro algae and phytoplankton competition in the central Venice lagoon[J]. Environmental Technology, 1994 (15): 1-14.

## Allelopathic effects of *Ulva prolifera* on *Heterosigma akashiwo*

JIA Rui, WU Min, CAI Cun-er, HUO Yuan-zi, HE Pei-min\*

(Water Environment & Ecology Engineer Research Center, College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306 China)

**Abstract:** Allelopathic effects of *Ulva prolifera* on the harmful algae (*Heterosigma akashiwo*) were studied in laboratory. The results showed that the growth of *H. akashiwo* was significantly ( $P>0.05$ ) lowered by fresh tissue of *U. prolifera*. The growth of *H. akashiwo* was not significantly ( $P>0.05$ ) lowered by *U. prolifera* culture medium filtrate under initial filtrate addition, but the growth of *H. akashiwo* was strongly inhibited by macroalga culture medium filtrate under semi-continuous filtrate addition. The growth of *H. akashiwo* was strongly inhibited by dry powder and methanol extract of *U. prolifera*. The results showed that allelochemicals existed more in the tissue of *U. prolifera* than excreted to the medium and continuous addition of allelochemicals. It was important to effectively control the growth of *H. akashiwo*. The concentration effect of antagonistic relationship existed between *U. prolifera* and *H. akashiwo*.

**Key words:** *Ulva prolifera*; *Heterosigma akashiwo*; allelopathic; green tide

**Corresponding author:** HE Pei-min. E-mail: pmhe@shou.edu.cn