

## Growth Inhibition of the Three Species of Red Tide Microalgae by Extracts from *Potamogeton crispus*

Yingying Sun<sup>1</sup>, Changhai Wang<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Ocean School, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang

<sup>2</sup>Resources and Environment Science Institute, Nanjing Agricultural University, Nanjing

Email: sy-999@163.com, \*chwang2001@sina.com

Received: Oct. 24th, 2011; revised: Nov. 13th, 2011; accepted: Nov. 28th, 2011

**Abstract:** To study effects of solvent-partitioned fractions of methanol extracts from *Potamogeton crispus* on the growth of the three species of microalgae (*Karenia mikimitoi*, *Skeletonema costatum* and *Alexandrium tamarense*), the extracts were extracted with petroleum ether, ethyl acetate, n-butanol and distilled water by liquid-liquid fractionation, respectively. And yields of solvent-partitioned fractions were 38.5% petroleum ether extracts, 21.9% ethyl acetate extracts, 9.37% n-butanol extracts and 26.6% distilled water extracts, respectively. Based on the observation of algal morphology and the measurement of algal number, and the contents of physiological indicators (protein, polysaccharide and chlorophyll), the results showed the petroleum ether extracts and ethyl acetate extracts from methanol extracts of *Potamogeton crispus* had the strongest action. The inhibitory effect of the tested microalgae by these two extracts was above 66% in day 12 at the concentration of 16 mg/L. And the petroleum ether extracts and ethyl acetate extracts caused cavities, pieces and chlorophyll decreased in cells. The further investigation found that these two extracts significantly decreased the contents of protein, polysaccharide and chlorophyll in the cells of those microalgae. But n-butanol extracts and distilled water extracts had not significant affect the growth of the all test microalgae.

**Keywords:** *Potamogeton crispus*; Red Tide Microalgae; Extracts; Growth Inhibition

## 菹草提取物对 3 种赤潮微藻生长的抑制作用

孙颖颖<sup>1</sup>, 王长海<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>淮海工学院海洋学院, 连云港

<sup>2</sup>南京农业大学资源与环境科学学院, 南京

Email: sy-999@163.com, \*chwang2001@sina.com

收稿日期: 2011 年 10 月 24 日; 修回日期: 2011 年 11 月 13 日; 录用日期: 2011 年 11 月 28 日

**摘要:** 以甲醇浸泡菹草干粉 4 d, 过滤、减压蒸干后, 制备到菹草甲醇浸膏。此浸膏用 90% 甲醇水溶液(V/V)溶解后, 依次以石油醚、乙酸乙酯和正丁醇为溶剂, 采用液液萃取法进一步分离。经过滤、减压蒸干, 获得 4 种液液分离提取物 - 石油醚、乙酸乙酯、正丁醇和蒸馏水提取物, 得率分别为 38.5%、21.9%、9.37% 和 26.6%。在此基础上, 通过测定藻细胞数量, 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, 研究了此 4 种液液分离提取物对米氏凯伦藻(*Karenia mikimitoi*)、中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)和塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)生长的影响。结果表明, 石油醚和乙酸乙酯提取物能明显降低 3 种赤潮微藻的细胞数量。当提取物浓度为 16 mg/L 时, 此 2 种提取物对 3 种赤潮微藻的生长抑制率超过 66%(第 12 d)。同时, 此 2 种提取物显著改变了 3 种赤潮微藻的细胞形态, 致使藻细胞出现空洞、破碎和色素明显减退现象。并且, 它们还能显著影响藻细胞内叶绿素、蛋白质和多糖等生理指标的合成。在实验设定浓度范围内, 正丁醇和蒸馏水提取物未对 3 种

\*通讯作者。

赤潮微藻的生长产生明显的影响。

**关键词:** 菹草; 赤潮微藻; 提取物; 抑制作用

## 1. 引言

菹草(*Potamogeton crispus*)是眼子菜科(*Potamogetonaceae*)多年生沉水草本植物,生长快,耐污性较强,分布广泛,常与金鱼藻(*Ceratophyllum demersum*)和穗花狐尾藻(*Myriophyllum spicatum*)等伴生,在冬春季节成为沉水植被的优势种<sup>[1]</sup>。由于菹草耐污能力较强,关于其生态价值的研究较多,主要集中在利用菹草去除富营养化水体中氮、磷营养盐<sup>[2,3]</sup>和控制藻类生长<sup>[4-6]</sup>,及其对铜、锌、镉和汞等重金属的富集和对有毒物质(如硒和苯酚)等吸收转化方面。

近年来,化感作用(化感物质)治理藻类因兼具化学法快捷、生物法相对安全的优点,已广泛应用于淡水藻类控制研究,但用于赤潮治理的研究较少。陈芝兰等发现,凤眼莲根(*Eichhornia crassipes*)粉末及其提取物对塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)有显著的抑制作用<sup>[7]</sup>。刘洁生等发现凤眼莲根粉末及其提取物抑制东海原甲藻(*Prorocentrum donghaiense*)的生长<sup>[8]</sup>。通过前期研究,我们发现菹草粉末的甲醇提取物能明显抑制某些藻类生长<sup>[9]</sup>。鉴于此,本文采用液液萃取法(分别以石油醚、乙酸乙酯和正丁醇为溶剂)对菹草粉末的甲醇提取物进行进一步分离。通过测定藻细胞数量,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,研究了这几种液液分离提取物对米氏凯伦藻(*Karenia mikimotoi*)、中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)和塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)生长的影响,以期利用菹草治理赤潮微藻提供实验基础。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 实验材料

米氏凯伦藻、中肋骨条藻和塔玛亚历山大藻无菌株由中国海洋大学提供,在 f/2 培养基中培养,培养温度(20 ± 0.1)℃,光照强度 40 μmol·(m<sup>2</sup>·s)<sup>-1</sup>,光暗比 12:12。

菹草采自连云港市赣榆县郊区水体,自来水仔细洗去泥沙和其它附着物后,再用蒸馏水漂洗处理材料

3~4 次。40℃ 下烘干 3 d,完全干燥后磨成粉末备用(粉碎至 0.3 mm)。

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)。

石油醚、乙酸乙酯、丙酮、正丁醇和甲醇等有机溶剂以及硫酸、萘酮、考马斯亮蓝、六氰合铁酸钾和琼脂粉为分析纯,购置国药集团化学试剂有限公司;硝酸钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠等无机盐为分析纯,购置南京化学试剂有限公司。

### 2.2. 菹草甲醇浸膏的制备

1.5 kg 菹草粉末,置于 10 L 棕色瓶中,加入 8 L 无水甲醇。室温(10℃~15℃)黑暗浸泡 4 d 后,离心、过滤,40℃ 下浓缩。经 0.45 μm 滤膜过滤后,减压蒸干,获得甲醇浸膏。

### 2.3. 菹草甲醇浸膏的液液萃取分离

在上述实验基础上,用 90%甲醇水溶液(V/V)溶解甲醇浸膏。加入石油醚萃取 3 次,减压蒸干,获得石油醚相提取物。萃余相 40℃ 下除去甲醇后,补充适量蒸馏水,并加入乙酸乙酯萃取 3 次,减压蒸干得到乙酸乙酯相提取物。最后,加入正丁醇萃取 3 次,分别获得正丁醇相提取物和蒸馏水提取物。用适量甲醇或蒸馏水溶解上述提取物,使其浓度为 200 mg/L,经 0.22 μm 滤膜除去微生物,保存于 4℃ 冰箱备用。

通过前期预实验,发现甲醇投加比例 < 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。

### 2.4. 菹草 4 种液液分离提取物的抑藻圈实验

采用培养皿抑藻圈法<sup>[10]</sup>,检测 4 种溶剂提取物对 3 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 3 种微藻藻液),于滤纸中心滴加一定量提取物。同时,以滴加相同体积的甲醇或蒸馏水为对照组,每个培养皿设定 3 个重复,置

于光照培养箱内培养1 d。

## 2.5. 菹草4种液液分离提取物的抑藻作用

分别移取相应体积的提取物到250 mL锥形瓶,4种提取物的终浓度依次为4 mg/L、8 mg/L、12 mg/L和16 mg/L。随后,加入f/2培养基,将体积定容至150 mL。同时,设定添加相同体积甲醇(或蒸馏水)的新鲜海水配制的f/2培养基为对照组。米氏凯伦藻、中肋骨条藻和塔玛亚历山大藻的起始藻细胞数量分别为 $10 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $18 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $7 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ ,培养条件同上,培养12 d。每个锥形瓶设定3个重复,每隔一日,测定藻细胞数量。实验结束后,测定藻细胞叶绿素、蛋白质和多糖含量,并用Motic显微照相系统拍摄藻细胞形态(放大倍数为 $10 \times 40$ )。

## 2.6. 微藻的生理指标测定

### 2.6.1. 叶绿素的测定

藻液5000 g离心15 min,弃去上清液,加入90%丙酮,4°C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[11]计算叶绿素含量(以细胞干重衡量,mg/g)。

## 2.6.2. 蛋白质和多糖的测定

25 mL藻液2000 g转速下离心10 min,弃去上清液。藻泥于-20°C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[12]测定可溶性蛋白质和多糖含量(以细胞干重衡量,mg/g)。

## 2.7. 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: $N$ 为处理组藻细胞数量, $\times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ ;  $N_0$ 为对照组藻细胞数量, $\times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

## 3. 结果和分析

### 3.1. 菹草4种液液分离提取物对3种赤潮微藻生长的影响

菹草甲醇浸膏采用液液萃取分离,制备到4种提取物(见表1)。从图1可以看出,石油醚和乙酸乙酯提

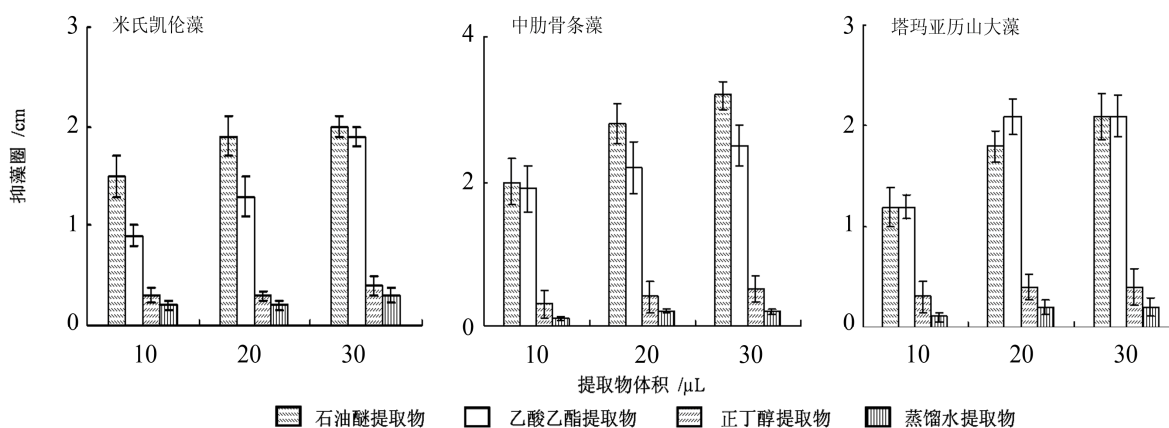


Figure 1. Algal inhibition ring of solvent-partitioned fractions of methanol extracts from *Potamogeton crispus* for the three species of red tide microalgae

图1. 菹草4种液液分离提取物对3种赤潮微藻的抑藻圈

Table 1. Yields of solvent-partitioned fractions as % (w/w) of methanol extracts from *Potamogeton crispus*

表1. 菹草4种液液分离提取物得率

	甲醇浸膏	石油醚提取物	乙酸乙酯提取物	正丁醇提取物	蒸馏水提取物
质量/g	42	16.2	9.22	3.94	11.2
得率/%		38.5	21.9	9.37	26.6

菹草提取物对3种赤潮微藻生长的抑制作用

取物对米氏凯伦藻、中肋骨条藻和塔玛亚历山大藻产生了明显( $p < 0.05$ )的抑制作用。当提取物浓度为 30  $\mu\text{L}$ (6 mg/L)时,对3种微藻的抑藻圈直径超过 1.9 cm。在实验设定浓度范围内,蒸馏水提取物未对3种赤潮微藻产生明显的抑制作用,正丁醇提取物对3种微藻表现出一定的抑制作用(抑藻圈直径  $< 0.4$  cm)。

在上述实验基础上,采用培养液检测方法,进一

步分析4种提取物对3种赤潮微藻生长的影响(图2~图4)。结果表明,石油醚和乙酸乙酯提取物对3种赤潮微藻的生长抑制显著( $P < 0.05$ )且具有浓度效应。在16 mg/L时,它们对米氏凯伦藻、中肋骨条藻和塔玛亚历山大藻的生长抑制率在66%以上(第12 d)。正丁醇和蒸馏水提取物未对3种测试微藻的生长产生抑制作用,这与上述抑藻圈的实验结果一致。

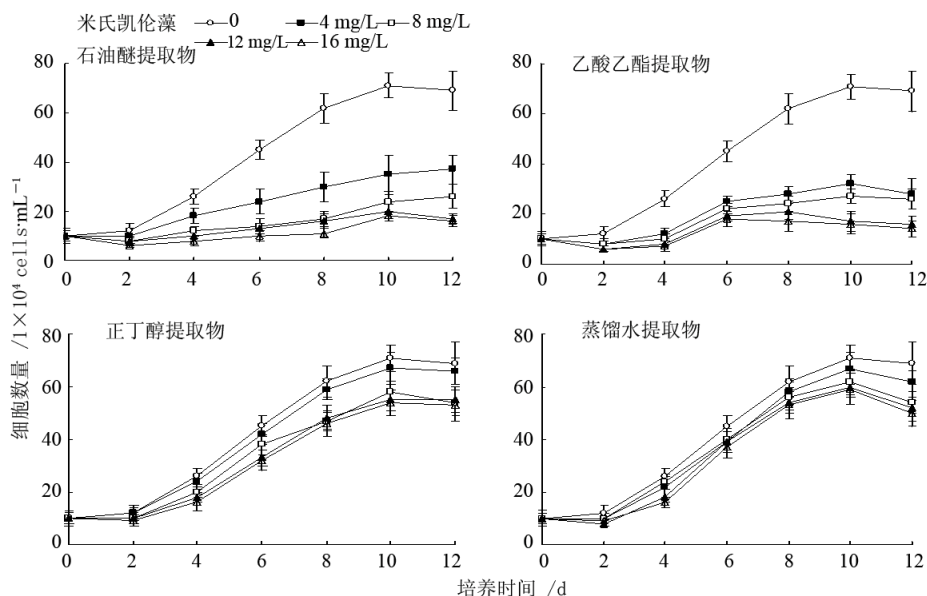


Figure 2. Effects of solvent-partitioned fractions of methanol extracts from *Potamogeton crispus* on the growth of *Karenia mikimotoi*  
图 2. 菹草 4 种液液分离提取物对米氏凯伦藻生长的影响

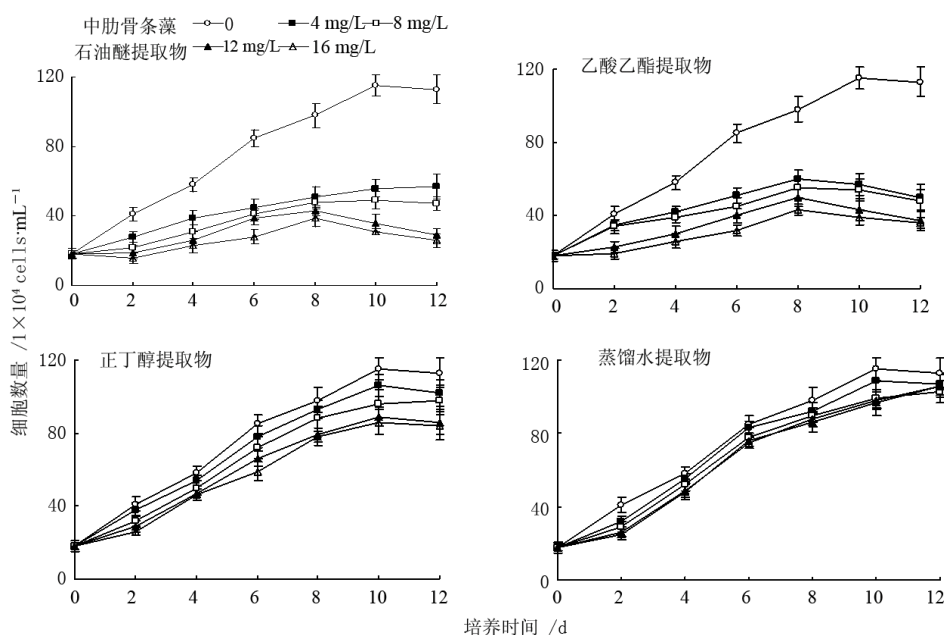


Figure 3. Effects of solvent-partitioned fractions of methanol extracts from *Potamogeton crispus* on the growth of *Skeletonema costatum*  
图 3. 菹草 4 种液液分离提取物对中肋骨条藻生长的影响

### 菹草提取物对 3 种赤潮微藻生长的抑制作用

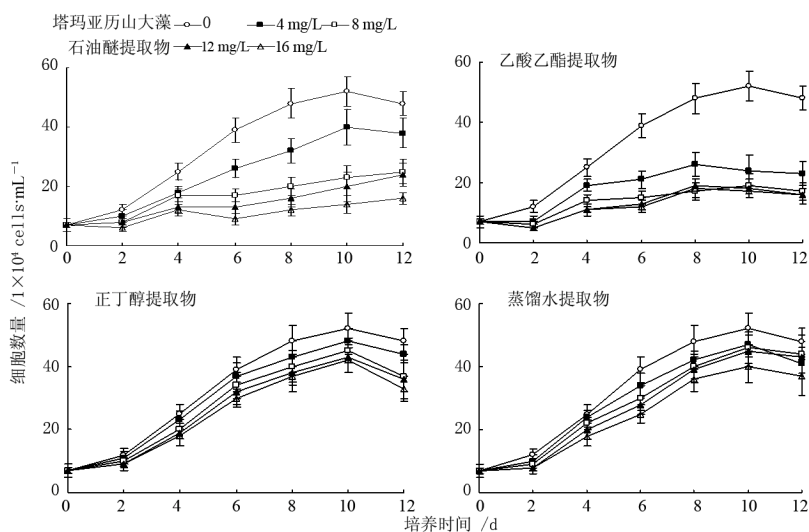


Figure 4. Effects of solvent-partitioned fractions of methanol extracts from *Potamogeton crispus* on the growth of *Alexandrium tamarensis*  
 图 4. 菹草 4 种液液分离提取物对塔玛亚历山大藻生长的影响

### 3.2. 菹草 4 种液液分离提取物对 3 种赤潮微藻细胞形态的影响

在图 5 中, 我们发现在石油醚和乙酸乙酯提取物致使 3 种赤潮微藻细胞出现不同程度的空洞、破碎和细胞色素减退现象; 蒸馏水提取物未对 3 种赤潮微藻的藻细胞形态产生影响。此外, 发现在正丁醇提取物作用下, 米氏凯伦藻、中肋骨条藻和塔玛亚历山大藻的细胞形态也发生一定程度的改变。

### 3.3. 菹草 4 种液液分离提取物对 3 种赤潮微藻蛋白质、多糖和叶绿素含量的影响

从图 6~图 8 可以看出, 石油醚和乙酸乙酯提取物显著 ( $P < 0.05$ ) 降低了 3 种赤潮微藻细胞内叶绿素、蛋白质和多糖的含量。与对照组相比, 当提取物浓度为 16 mg/L 时, 米氏凯伦藻、中肋骨条藻和塔玛亚历山大藻细胞内蛋白质、多糖和叶绿素含量降低为对照组细胞内相应生理指标含量的 50% 左右。正丁醇和蒸馏

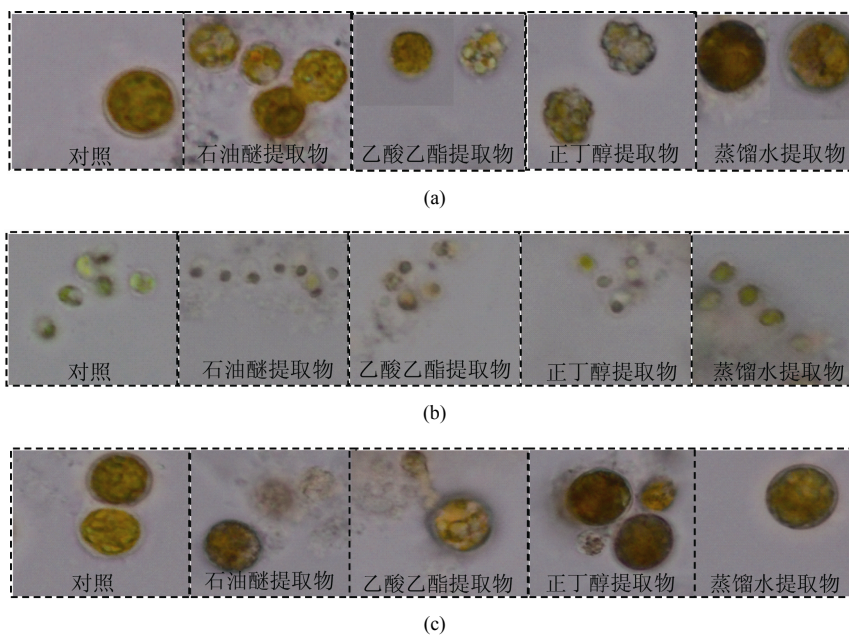


Figure 5. Effects of solvent-partitioned fractions of methanol extracts from *Potamogeton crispus* on morphology of the three species of red tide microalgae; (a) *Karenia mikimotoi*; (b) *Skeletonema costatum*; (c) *Alexandrium tamarensis*  
 图 5. 菹草 4 种液液分离提取物对 3 种赤潮微藻形态的影响; (a) 米氏凯伦藻; (b) 中肋骨条藻; (c) 塔玛亚历山大藻

菹草提取物对 3 种赤潮微藻生长的抑制作用

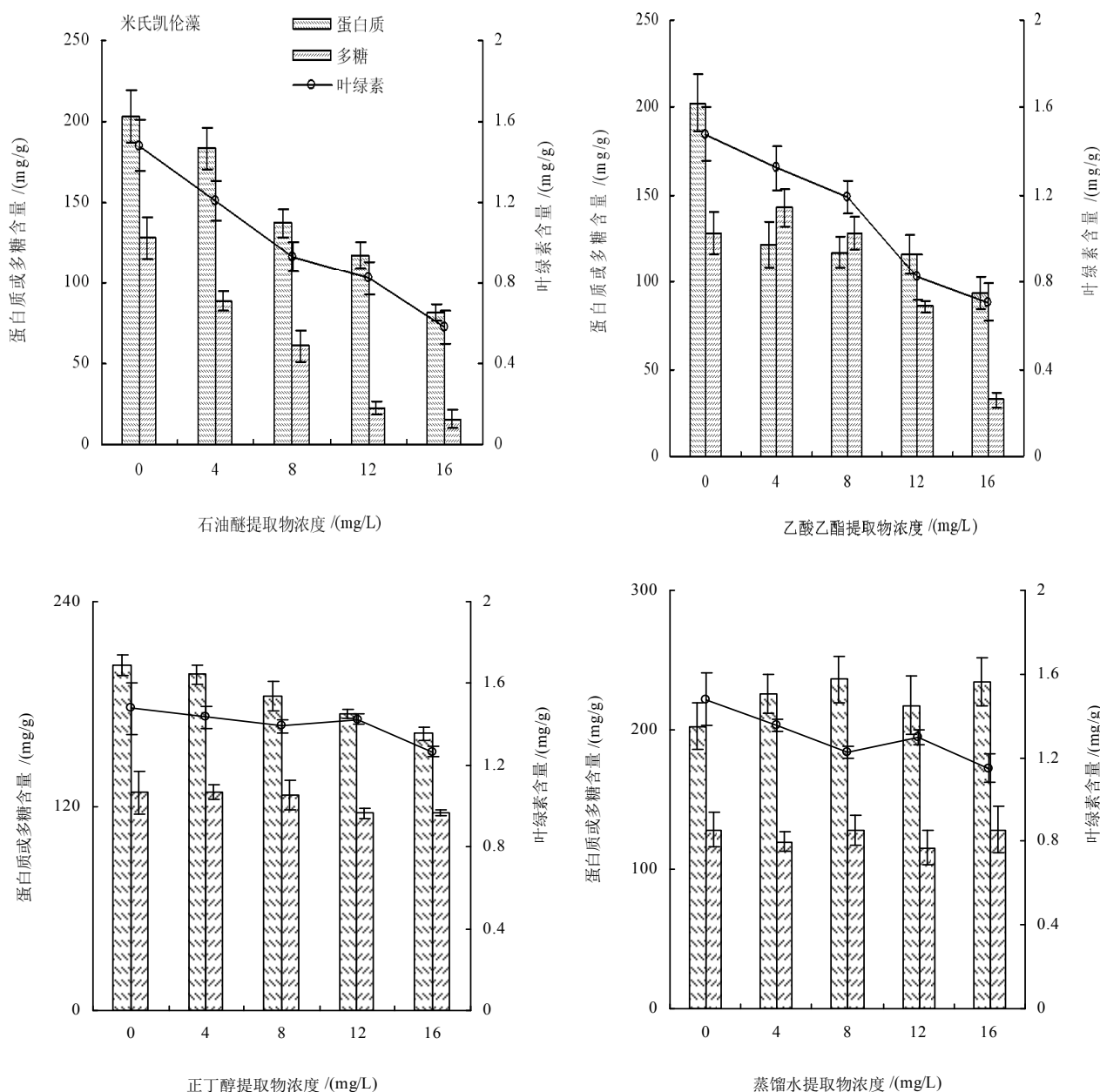


Figure 6. Effects of solvent-partitioned fractions of methanol extracts from *Potamogeton crispus* on the contents of physiological indicators of *Karenia mikimotoi*

图 6. 菹草 4 种液液分离提取物对米氏凯伦藻生理指标的影响

水提取物未对 3 种赤潮微藻细胞内的 3 种生理指标产生明显( $P > 0.05$ )的影响。

#### 4. 讨论

沉水植物是水体中重要的初级生产者，对水体功能具有非常重要的影响。研究者指出，沉水植物释放的化学物质对藻类的抑制作用是浅水湖泊维持清水状态的机制之一<sup>[13]</sup>。目前，已经发现具有抑藻化感活

性的沉水植物超过 40 多种<sup>[13]</sup>。其中，有较强耐寒和耐污能力的菹草被发现能显著抑制铜绿微囊藻、水华鱼腥藻、小席藻以及斜生栅藻的生长<sup>[6,14]</sup>。然而，Sabine 通过实验证实，与金鱼藻和穗花狐尾藻相比，菹草的抑藻能力偏低，前者能抑制大部分的蓝藻、硅藻和绿藻<sup>[15]</sup>。

通过前期研究，制备到了菹草甲醇浸膏。在本文，采用液液萃取法对此浸膏进行进一步分离，获得 4 种

### 菹草提取物对3种赤潮微藻生长的抑制作用

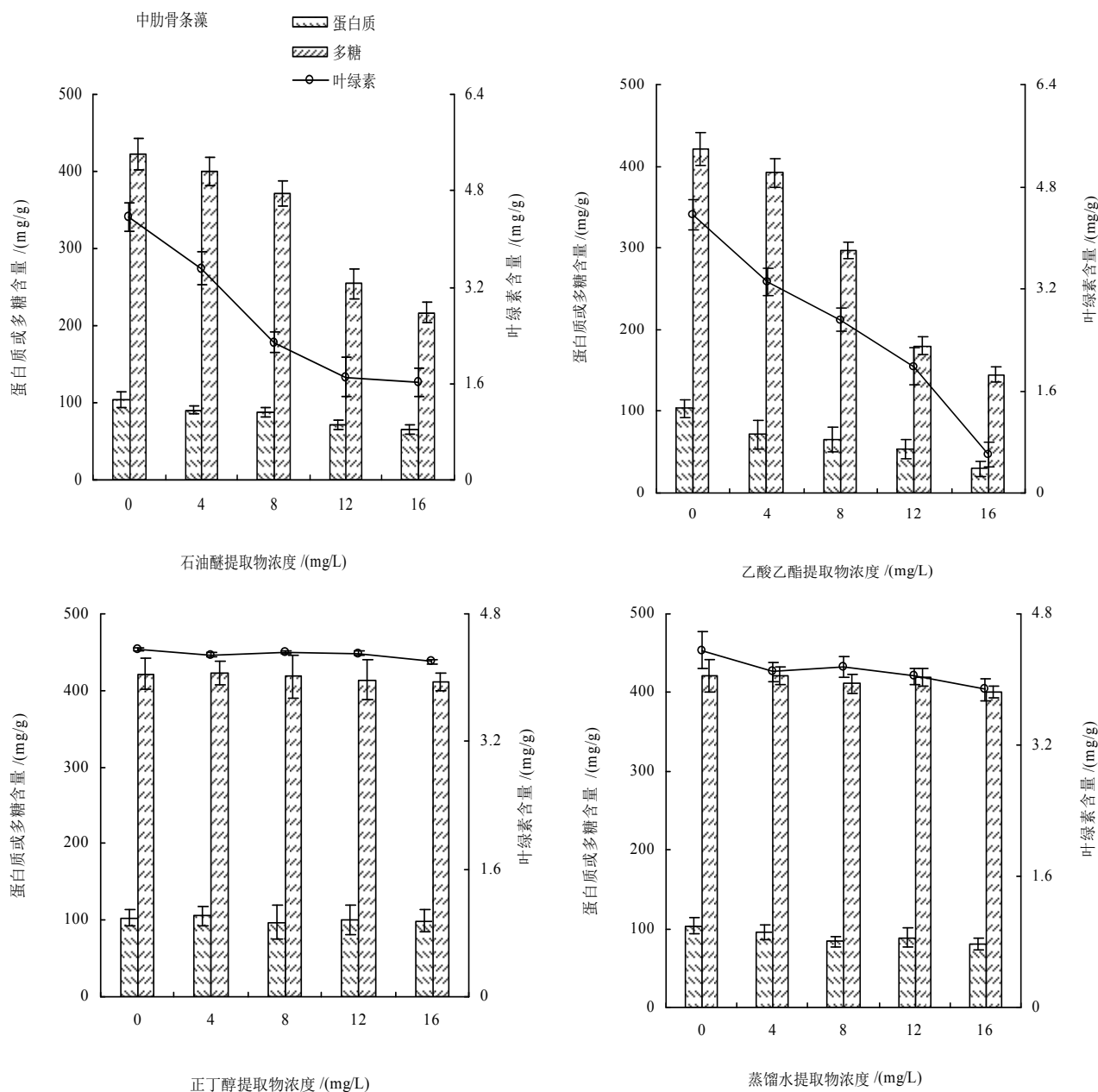


Figure 7. Effects of solvent-partitioned fractions of methanol extracts from *Potamogeton crispus* on the contents of physiological indicators of *Skeletonema costatum*

图 7. 菹草 4 种液液分离提取物对中肋骨条藻生理指标的影响

液液分离提取物——石油醚、乙酸乙酯、正丁醇和蒸馏水提取物。在此基础上,分析此 4 种提取物对米氏凯伦藻、中肋骨条藻和塔玛亚历山大藻生长的影响。由图 1、图 2、图 3 和图 4 可见,石油醚和乙酸乙酯提取物明显降低 3 种赤潮微藻的细胞数量,当提取物浓度为 16 mg/L 时,此 2 种提取物对 3 种赤潮微藻的生长抑制率超过 66%(第 12 d)。结果表明,菹草提取物能显著抑制米氏凯伦藻、中肋骨条藻和塔玛亚历山

大藻的生长。

在石油醚和乙酸乙酯提取物作用下,发现 3 种赤潮微藻的细胞形态发生了变化,藻细胞出现明显的空洞、破碎和细胞色素减退现象(图 5)。在铜绿微囊藻研究中,洪喻等发现,芦竹(*Arundo donax* Linn.)有机溶剂提取物能使藻细胞出现空洞和破碎现象<sup>[10]</sup>。在海带、浒苔和紫菜提取物对多环旋沟藻、前沟藻、米氏凯伦藻、中肋骨条藻和塔玛亚历山大藻等生长的

## 菹草提取物对3种赤潮微藻生长的抑制作用

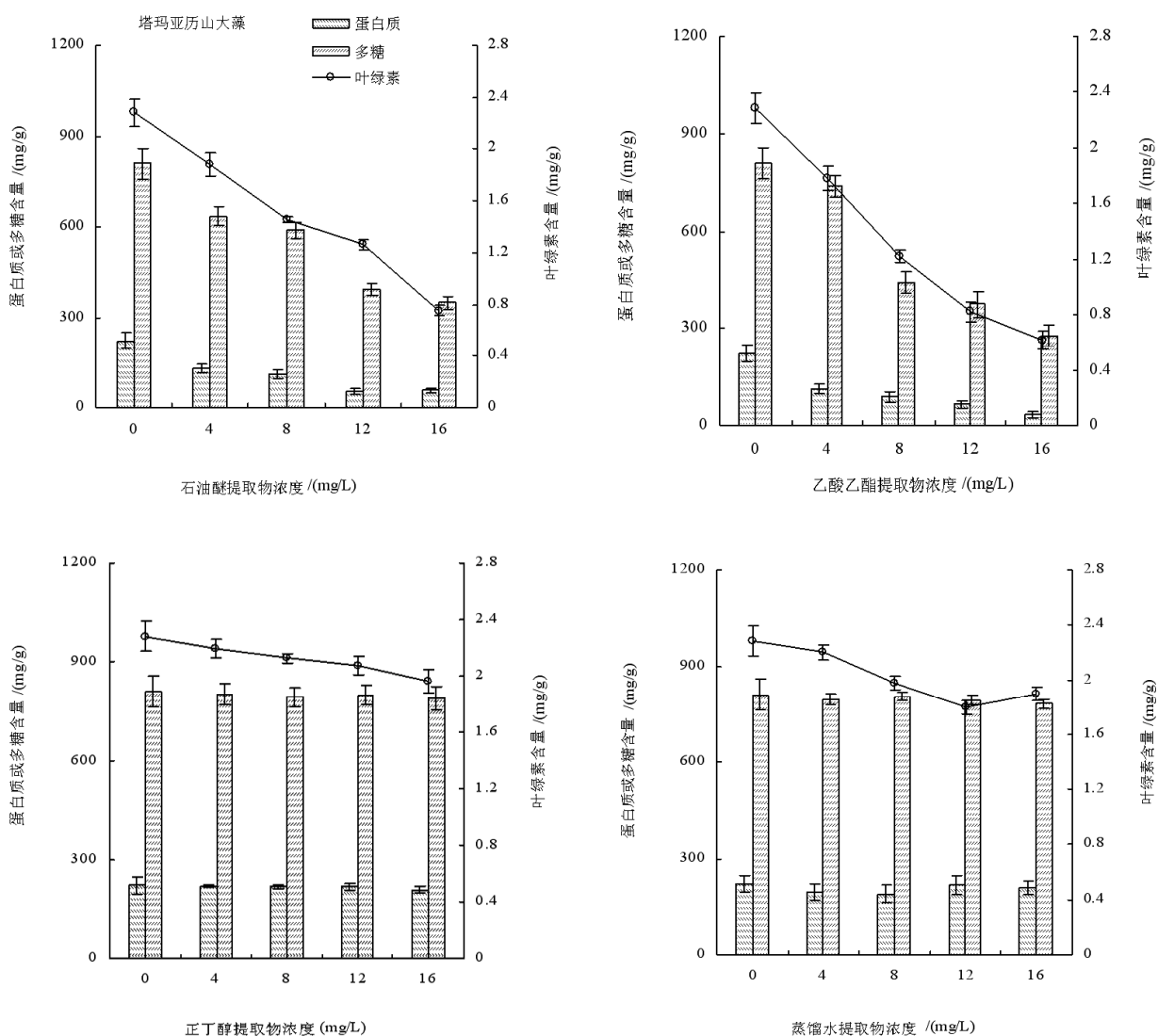


Figure 8. Effects of solvent-partitioned fractions of methanol extracts from *Potamogeton crispus* on the contents of physiological indicators of *Alexandrium tamarense*

图 8. 菹草 4 种液液分离提取物对塔玛亚历山大藻生理指标的影响

研究中也发现藻细胞形态出现类似的变化<sup>[16-19]</sup>。

如图 6、图 7 和图 8 所示，石油醚和乙酸乙酯提取物还致使 3 种受试微藻细胞内蛋白质、多糖和叶绿素的合成发生明显变化。在陆地和淡水生态系统化感作用的机理研究中，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<sup>[19-21]</sup>。根据上述结果，我们推测这种化感作用机理也可能适用于海洋生态系统，但还有待进一步研究。

## 参考文献 (References)

- [1] 金送笛, 李永函, 倪彩虹等. 菹草(*Potamogeton crispus*)对水中氮、磷的吸收及若干影响因素[J]. 生态学报, 1994, 14(2): 168-173.
- [2] 黄蕾, 翟建平, 王传瑜. 4 种水生植物在冬季脱氮除磷效果的试验研究[J]. 农业环境科学学报, 2005, 24(2): 366-370.
- [3] 戴莽, 倪乐意, 谢平. 利用大型围隔研究沉水植被对水体富营养化的影响[J]. 水生生物学报, 1999, 23(2): 97-101.
- [4] 王海珍, 刘永定, 肖邦定. 围隔中鲢和菹草控藻效果及其生态学意义[J]. 水生生物学报, 2002, 28(2): 141-146.
- [5] 俞子文. 几种高等水生植物的克藻效应[J]. 水生生物学报, 1992, 16(1): 1-7.
- [6] 贺锋, 吴振斌, 邱东茹. 东湖围隔中菹草与藻类化他感作用的初步研究[J]. 水生生物学报, 2002, 26(4): 421-424.
- [7] Z. L. Chen, W. D. Yang, J. S. Liu, et al. Allelopathic effects of *Eichhornia crassipes* roots on *Alexandrium tamarense*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, 29(3): 110-114.
- [8] 刘洁生, 杨维东, 陈芝兰. 凤眼莲根对东海原甲藻生长的抑制作用及机制研究[J]. 热带海洋学报, 2007, 26(3): 43-47.
- [9] 浦寅芳, 孙颖颖, 阎斌伦, 朱明. 3 种沉水植物对水华藻类生



### 菹草提取物对3种赤潮微藻生长的抑制作用

- 长的影响[J]. 水生生态学杂志, 2009, 2(6): 46-50.
- [10] 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.
- [11] A. Jensen. Handbook of physiological methods. New York: Cambridge University Press, 1978.
- [12] 张志良, 翟伟管. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002.
- [13] 肖溪, 楼莉萍, 李华等. 沉水植物化感作用控藻能力评述[J]. 应用生态学报, 2009, 20(3): 705-712.
- [14] S. Nakai, Y. Inoue, M. Hosomi, et al. Growth inhibition of blue-green algae by allelopathic effects of marophytes. Water Science and Technology, 1999, 39(8): 47-53.
- [15] H. Sabine, E. M. Gross. Can allelopathically active submerged macrophytes stabilize clear water states in shallow lakes. Basic and Applied Ecology, 2008, 9: 422-432.
- [16] 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.
- [17] K. Nagayama, T. Shibata, K. Fujimoto, et al. Algicidal effect of phlorotannins from the brown alga Ecklonia kurome on red tide microalgae. Aquaculture, 2003, 218: 601-612.
- [18] 孙颖颖, 刘筱潇, 阎斌伦, 王长海. 条斑紫菜提取物对4种赤潮微藻生长的抑制作用[J]. 水产学报, 2010, 34(5): 796-805.
- [19] 孙颖颖, 刘筱潇, 王长海. 浒苔提取物对4种赤潮微藻生长的抑制作用[J]. 环境科学, 2010, 31(6): 1662-1669.
- [20] 胡洪营, 门玉洁, 李锋民. 植物化感作用抑制藻类生长的研究进展[J]. 生态环境, 2006, 15(1): 153-157.
- [21] 李锋民, 胡洪营. 植物化感作用控制天然水体中有害藻类的机理与应用[J]. 给水排水, 2004, 30(2): 1-4.