

浒苔抑藻物质的分离及其对赤潮微藻的抑制作用

孙颖颖¹, 董晓柯¹, 李光成¹, 阎斌伦², 王长海^{3*}

(1. 淮海工学院海洋学院, 江苏 连云港 222005;

2. 江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏 连云港 222005;

3. 南京农业大学资源与环境科学学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 采用液液萃取法和硅胶柱层析法对抑藻物质 EPME (methanol extracts of *Enteromorpha prolifera*) 进行分离, 通过监测米氏凯伦藻、中肋骨条藻和塔玛亚历山大藻的细胞数量, 观察藻细胞形态, 分析分离组分的抑藻活性。结果表明, EPME 经液液萃取法分离, 获得 4 个组分 I、II、III 和 IV, 得率分别为 29.0%、19.0%、12.7% 和 5.45%。其中, 仅组分 II 具有明显的抑藻活性。当浓度为 1.0 g/L 时, 组分 II 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分别为 43.4%、44.9% 和 54.3%。组分 II 经硅胶柱层析法分离, 获得 5 种组分, 组分 II-A、II-B、II-C、II-D 和 II-E。其中, 组分 II-B 和组分 II-C 具有明显抑藻活性, 并致使 3 种赤潮微藻的藻细胞出现空洞、细胞破碎和色素减退等。进一步采用波长扫描和化合物检测方法, 分析出此 2 种组分中含有内酯、香豆素类化合物, 并确定了此 2 种组分硅胶 GF₂₅₄ 薄层层析分离的适宜展开剂, 为后续纯化奠定了良好的实验基础。

关键词: 浒苔; 赤潮微藻; 抑藻物质; 抑藻活性; 分离

中图分类号: X 55; S 917.3

文献标志码: A

在中国赤潮发生频率、规模和危害程度愈演愈烈的同时, 海洋沿岸带(如河口、海湾等)水体较浅的透光层内, 以浒苔(*Enteromorpha* sp.) 和石莼(*Ulva* sp.) 等绿藻为主要代表的海藻亦开始泛滥, 形成海藻水华(称之为“绿潮”), 给沿海渔业、养殖业和旅游业造成重大损失。人们注意到在海洋沿岸带和海湾浅水层等泛滥海藻水华的地带浮游微藻的生物量受到明显压制。南春容等^[1]、金秋等^[2]发现孔石莼(*Ulva pertusa*) 能抑制赤潮异弯藻(*Heterosigma akashiwo*) 和塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*) 的生长。孙颖颖等^[3]发现浒苔对前沟藻(*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*) 等赤潮微藻的生长表现出明显的抑制作用, 并利用甲醇从浒苔干粉中提取到抑藻物质 EPME (methanol extracts of *Enteromorpha prolifera*)。

在前期研究基础上, 本研究采用液液萃取和硅胶柱层析等分离方法, 对 EPME 进行进一步分离, 并采用波长扫描、化合物检测试验和硅胶 GF₂₅₄ 薄层层析对上述抑藻组分进行初步分析, 以期对浒苔抑藻物质的纯化研究提供实验基础和理论依据。

1 材料与方法

1.1 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, 经进一步分离纯化后由江苏省海洋生物技术重点实验室保存, f/2 培养基中培养, 培养温度(20 ± 0.1) °C, 光照强度 40 μmol/(m² · s), 光暗比 12:12。

浒苔采集于青岛太平角。将鲜活浒苔去除杂质, 用自来水仔细洗去泥沙和附着物, 用混合抗生素在藻体组织表面作灭菌处理。然后, 蒸馏水漂

收稿日期: 2013-11-26 修回日期: 2014-01-14

资助项目: 江苏省高校自然科学基金项目(13KJB170001); 连云港市科技攻关工业项目(CG1310); 中央财政支持地方高校发展专项资金应用海洋生物学科科研创新团队项目(CXTD27); 江苏省海洋生物技术重点实验室开放课题(2013HS010)

通信作者: 王长海, E-mail: chwang2001@sina.com

洗处理材料 3~4 次,除去表面灭菌剂。随后,将浒苔于 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 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)。

无水甲醇、石油醚、乙酸乙酯和丙酮为分析纯。

1.2 浒苔抑藻物质 EPME 液液萃取分离

以 5 kg 浒苔为原料,参照文献[4]制备得 50 g EPME。将 EPME 重新溶解于 300 mL 氯仿和 100 mL(2%)盐酸水溶液中,转移到 1 000 mL 分液漏斗内。震荡 5 min 后,静置 30 min,获得水相和有机相,分别按如下处理:

水相减压浓缩至 10 mL,加入 200 mL 甲醇和 20 mL 石油醚(沸点 30~60 °C),转移到 500 mL 分液漏斗中,震荡 5 min,静置 5 min。上层弃去,下层减压蒸干,记为组分 I。

有机相加入 10 mL 石油醚,用 500 mL 分液漏斗进行分离,静置分层,上层弃去。下层加入 50 mL 1% KOH,用分液漏斗分离,获得有机相、水相和絮状物。经减压蒸干和低温干燥后,依次记为组分 II、组分 III 和组分 IV。

称量质量后,上述所有组分溶解于甲醇中,浓度为 10 g/L。

1.3 EPME 分离组分的硅胶柱层析分离

在上述实验基础上,将具有明显抑制活性的组分采用硅胶柱层析(2.3 cm × 18 cm)分离,洗脱液依次为石油醚、石油醚:乙酸乙酯(1:1,V/V,下同)、乙酸乙酯、乙酸乙酯:丙酮(1:1)和丙酮,流速为 1 mL/min,依次记为组分 II-A、II-B、II-C、II-D 和 II-E。所有馏分减压蒸干,溶解于甲醇中,保存待用。

1.4 抑藻活性检测

在 f/2 培养基中,分别加入一定体积的待测组分。随后,接种 3 种赤潮微藻,培养混合液总体积为 250 mL。米氏凯伦藻、中肋骨条藻和塔玛亚历山大藻接种密度分别为 $(6 \sim 8) \times 10^4$ /mL、 $(16 \sim 20) \times 10^4$ /mL 和 $(10 \sim 12) \times 10^4$ /mL,分离组分终浓度为 1.0 g/L(除特别标明外,活性检测的待测组分浓度均为此浓度),同时设定添加相同体积甲醇的对照组(甲醇加入体积不超过 1 mL),每个培养瓶设定 3 个平行样。所有培养瓶置于 GXZ-260B 智能型光照培养箱中培养,温度

$(26 \pm 1)^\circ\text{C}$,光照强度 $62 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光暗比 12:12。每天定时摇动培养瓶两次,以防止微藻附着生长。每隔一日从培养瓶中取 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,以避免营养耗尽进而影响微藻的生长。

1.5 藻细胞形态观察

采用显微照相(放大倍数 10×40)获得藻细胞形态照片。

1.6 波长扫描、化合物鉴定试验和硅胶 GF₂₅₄薄层层析

波长扫描 取适量组分 II-B 和组分 II-C 的甲醇溶液,用 Ultrospec 3300 pro 紫外—可见分光光度计进行 200~800 nm 波长扫描。

化合物鉴定试验 参照化合物常用化学鉴定方法,进行生物碱、酚酸、脂肪酸、萜类、内酯、鞣酸、有机酸和糖类等 8 种化合物鉴定试验。

硅胶 GF₂₅₄薄层层析分离 分别以氯仿:甲醇(16:1、8:1 和 1:1)、氯仿:丙酮:甲酸(15:3:2)、石油醚:乙酸乙酯(1:8 和 2:1)为展开剂,进行组分 II-B 和组分 II-C 的硅胶 GF₂₅₄薄层层析分离,紫外 254 nm 观察。紫外 254 nm 观察。

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 为处理组藻细胞数量($\times 10^4$ /mL); N_0 为对照组藻细胞数量($\times 10^4$ /mL)。

2 结果

2.1 浒苔抑藻物质 EPME 溶剂分离组分对 3 种赤潮微藻生长的影响

采用液液萃取法,对抑藻物质 EPME(50 g)进行分离,获得 I、II、III 和 IV 等 4 个组分,质量分别为 8.42、5.52、3.67 和 1.58 g(表 1)。将上述各个组分重新溶解于甲醇,配制浓度为 10 g/L,采用培养液法进行抑藻活性检测。

表 1 浒苔抑藻物质 EPME 溶剂分离组分的得率

Tab. 1 Yield of separation components from EPME of <i>E. Prolifera</i> %				
分离组分 separation components	I	II	III	IV
得率 yield	29.0	19.0	12.7	5.45

抑藻活性检测时,各分离组分终浓度均为 1.0 g/L。组分 II 对米氏凯伦藻、中肋骨条藻和塔玛亚历山大藻表现出明显 ($P < 0.05$) 的抑制作用

(图 1)。第 12 天,对它们的生长抑制率依次为 43.4%、44.9% 和 54.3%;其余组分对 3 种赤潮微藻的生长未表现出抑制作用。

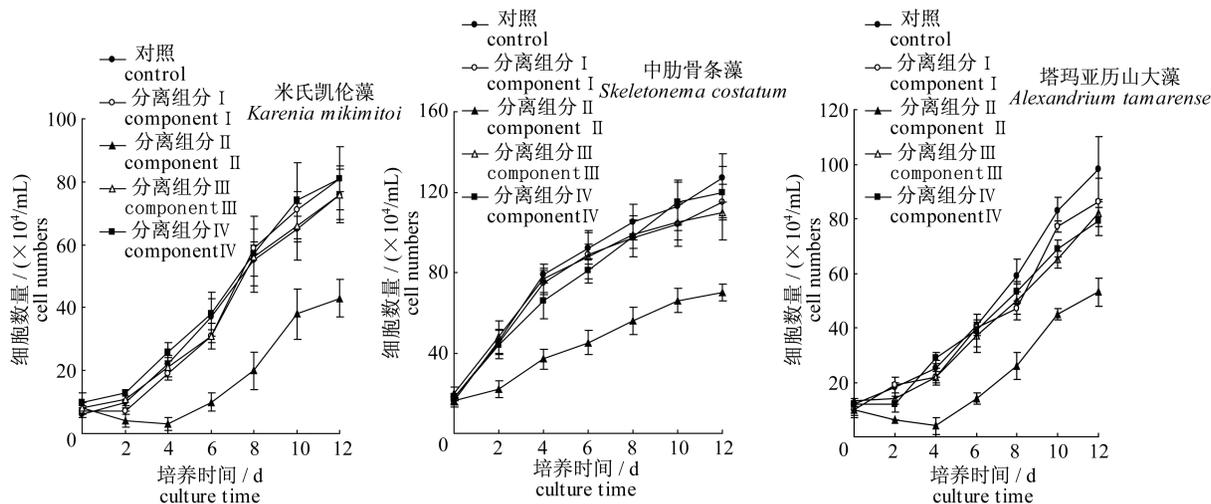


图 1 浒苔抑藻物质 EPME 分离组分对 3 种赤潮微藻生长的影响

Fig. 1 Effects of separation components from EPME of *E. prolifera* on the growth of the three species of red tide microalgae

在上述实验基础上,进行了不同浓度组分 II 对赤潮微藻生长抑制率的影响。从图 2 可以看出,组分 II 对 3 种赤潮微藻的生长抑制率随组分 II 浓度的增加呈现明显 ($P < 0.05$) 的上升趋势,当组分 II 浓度为 3.0 g/L,其对 3 种赤潮微藻的生长抑制率达到 100%。利用概率单位法求出组分 II 对米氏凯伦藻、中肋骨条藻和塔玛亚历山大藻的 12 d EC_{50} 分别为 0.92、0.81 和 1.21 g/L。

2.2 分离组分 II 的硅胶柱层析分离组分对 3 种赤潮微藻生长的影响

采用硅胶柱层析对组分 II 进行分离,依次经石油醚、石油醚:乙酸乙酯(1:1)、乙酸乙酯、乙酸乙酯:丙酮(1:1)和丙酮洗脱,获得 5 种组分,依次为组分 II-A、II-B、II-C、II-D 和 II-E。图 3 表明,组分 II-B 和组分 II-C 对 3 种赤潮微藻的生长表现出非常明显的抑制作用 ($P < 0.01$),添加此 2 种提取物后,3 种微藻细胞数量开始降低,且在整个实验周期内(12 d)无生长恢复现象。第 12 天,3 种微藻细胞数量接近为零。组分 II-D 也对 3 种微藻细胞的生长表现出较为明显的抑制作用 ($P < 0.05$),但后续 3 种赤潮微藻出现明显的生长恢复现象。

组分 II-B 和组分 II-C 致使 3 种微藻的藻细胞出现空洞、细胞破碎和色素减退等现象,且随培养时间的延长,上述现象更加明显(图 4)。洪喻等^[9]发现芦竹(*Arundo donax*)的有机溶剂提取物能使铜绿微囊藻细胞出现空洞和破碎现象。

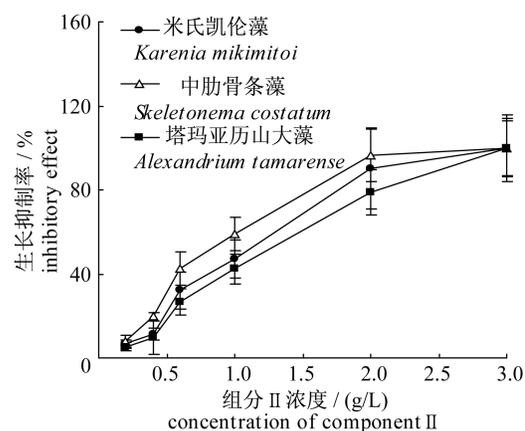


图 2 浒苔抑藻物质 EPME 分离组分 II 对 3 种赤潮微藻生长的影响

Fig. 2 Growth inhibition of separation components (II) from EPME of *E. prolifera* on the three species of red tide microalgae

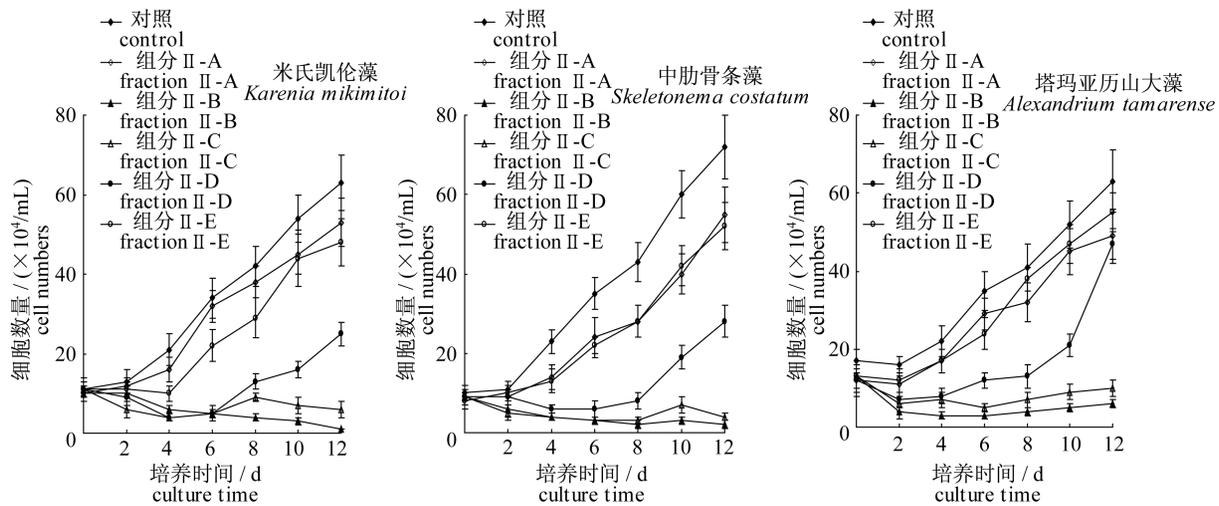


图3 分离组分II的硅胶柱层析分离组分对3种赤潮微藻生长的影响

Fig. 3 Effects of the five kinds of fractions obtained by silica gel column chromatography from separation components (II) on the growth of the three species of red tide microalgae

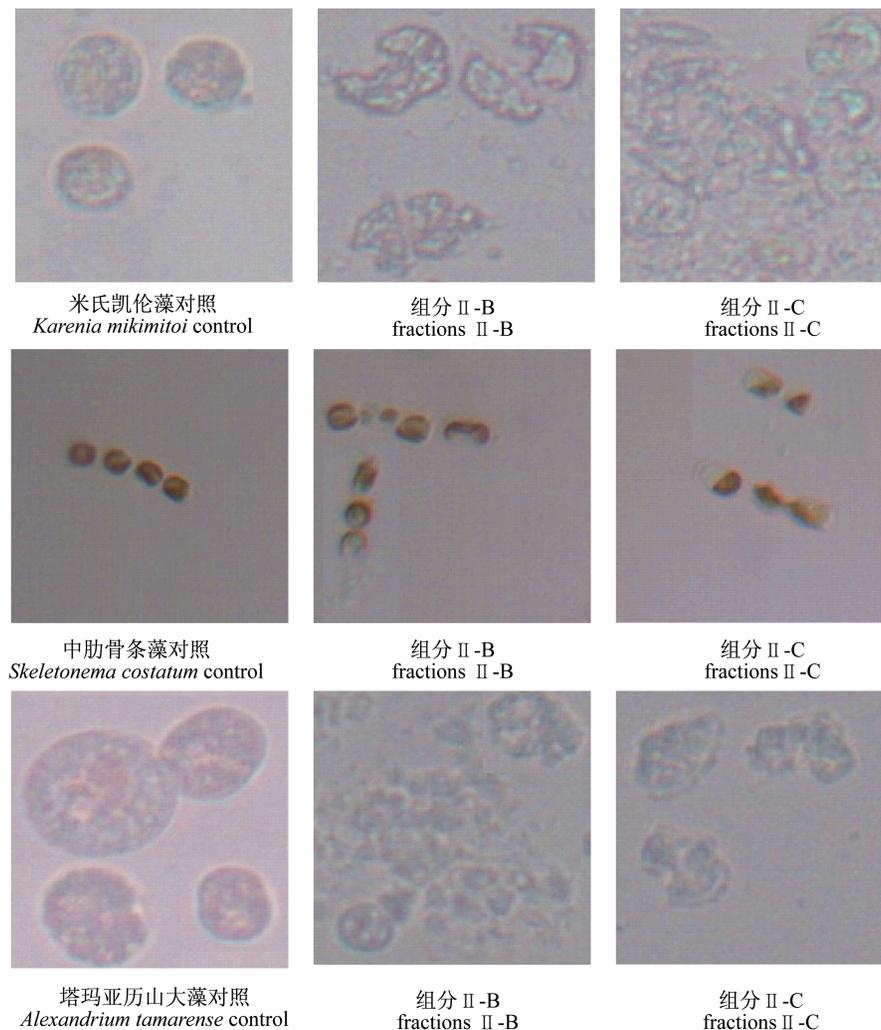


图4 分离组分II的硅胶柱层析分离组分对3种赤潮微藻细胞形态的影响

Fig. 4 Effects of the two kinds of fractions obtained by silica gel column chromatography from separation components (II) on morphology of the three species of red tide microalgae

2.3 硅胶柱层析组分的初步检测

波长扫描 组分 II-B 为黄色粉末, II-C 为白色粉末。将此 2 种组分的甲醇溶液进行 200 ~

800 nm 波长扫描。组分 II-B 在 260 ~ 300 nm 和 400 ~ 440 nm 有明显吸收;组分 II-C 在 400 ~ 440 nm 有明显吸收(图 5)。

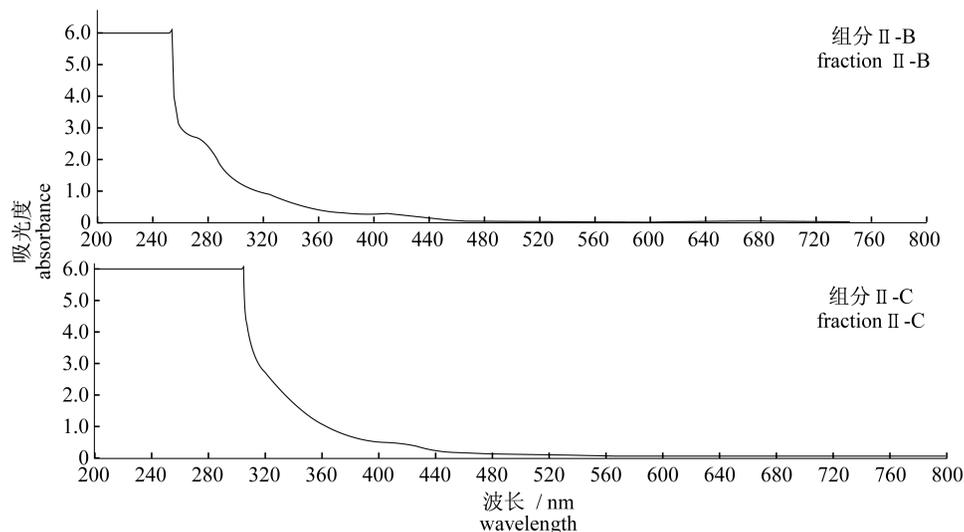


图 5 组分 II-B 和 II-C 的波长扫描图

Fig. 5 Wavelength scanning of the two fractions II-B and II-C

化合物鉴定试验 海藻分泌的化感物质主要包括生物碱、酚酸、脂肪酸、萜类、内酯、鞣酸、有机酸和糖类等^[2,10-14]。本研究进行了此 8 种化合物鉴定试验。组分 II-B 和组分 II-C 不含生物碱、酚酸、脂肪酸、萜类鞣酸、有机酸和糖类或者上述化合物含量极低,进而未呈现阳性反应;此 2 种组分呈现了内酯、香豆素类化合物的阳性反应(表 3)。内酯、香豆素类化合物在 300 nm 范围内有明显吸收,组分 II-B 在 260 ~ 300 nm 有明显吸收,符合上述鉴定结果。

表 3 组分 II-B 和组分 II-C 的化合物鉴定

Tab. 3 identity tests of the two fractions II-B and II-C

化合物种类 compounds	组分 II-B fraction II-B	组分 II-C fraction II-C
生物碱 alkaloid	—	—
酚酸 phenolic acid	—	—
脂肪酸 fatty acid	—	—
萜类 terpene	—	—
内酯、香豆素 lactone, coumarin	+	+
鞣酸 tannic acid	—	—
有机酸 organic acid	—	—
糖类 sugar	—	—

注:“+”表示阳性反应,“—”表示阴性反应或无显示
notes:“+” express positive reaction,“—” express negative reaction or no response

硅胶 GF₂₅₄ 薄层层析分离 更进一步,将组分 II-B 和组分 II-C 甲醇溶液点样于 GF₂₅₄ 上,分别以氯仿:甲醇(16:1、8:1 和 1:1, V/V, 下同)、氯仿:丙酮:甲酸(15:3:2)、石油醚:乙酸乙酯(1:8 和 2:1)为展开剂。展开后,紫外 254 nm 下观察,发现以石油醚:乙酸乙酯(1:8)为展开剂时,组分 II-B 出现 3 个明显斑点, R_f 分别为 0.20、0.788 和 0.975;组分 II-C 出现 2 个明显斑点, R_f 依次为 0.138 和 0.988。遗憾的是,由于制备到的组分 II-B 和组分 II-C 量较少,在进行上述抑藻活性检测、化合物检测和硅胶 GF₂₅₄ 薄层层析等实验后,无法进行后续的分纯化。

3 讨论

采用液液萃取法,对浒苔抑藻物质 EPME 进行分离,得到具有明显抑藻活性的组分 II(图 1 和表 1)。第 12 天,组分 II 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分别为 43.4%、44.9% 和 54.3%。进一步,采用硅胶柱层析法对组分 II 进行分离,制备到 5 种组分。其中,组分 II-B 和组分 II-C 对米氏凯伦藻、中肋骨条藻和塔玛亚历山大藻的生长表现出极其显著的抑制作用(图 3 和图 4)。第 12 天,对 3 种赤潮微藻的生长抑制率超过 85%。分离组分对赤潮微

藻生长抑制作用的明显增强,是由于组分中抑藻物质的纯度明显升高,表明本研究采用的分离方法适合。更进一步,以石油醚:乙酸乙酯(1:8)为展开剂时,组分 II-B 和组分 II-C 经硅胶 GF₂₅₄ 薄层层析展开获得了较好的分离,分别出现 3 个斑点和 2 个斑点,为后续浒苔抑藻物质的纯化奠定了良好的实验基础。

分析抑藻活性检测结果,发现中肋骨条藻和米氏凯伦藻对抑藻分离组分(组分 II、组分 II-B 和组分 II-C)更加敏感(图 2 和图 3)。Qi 等^[5]发现 *Cladosiphon okamuranus* 产生的抑藻物质仅对无细胞壁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。孙颖颖等^[6]发现,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。本研究中,我们认为抑藻分离组分对 3 种赤潮微藻抑制作用的强弱与它们的细胞结构有关。米氏凯伦藻为裸甲藻,无细胞壁,细胞外层是一种赤裸裸的细胞膜^[7],塔玛亚历山大藻细胞外涵盖一层坚硬的外壳^[8]。因此,藻细胞外层结构的差异导致了它们对抑藻分离组分敏感性的差异。

经波长扫描和化合物检测,确定了浒苔抑藻分离组分含有内酯、香豆素类化合物(图 5 和表 3)。然而,内酯、香豆素类化合物是否是抑藻活性物质还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Nan C R, Zhang H Z, Dong S L. Growth inhibition of aqueous extracts of *Ulva pertusa* on three species of microalgae in red tide [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2004, 24(4): 702 - 706. [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. 环境科学学报, 2004, 24(4): 702 - 706.]
- [2] Jin Q. Studies on the allelopathic effects of macroalga *Ulva pertusa* on red tide microalgae and isolation and characterization of its allelochemicals [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2005. [金秋. 大型海藻孔石莼对赤潮微藻克制作用的实验研究及其克生物质的分离与鉴定. 青岛: 中国海洋大学, 2005.]
- [3] Sun Y Y, Li C, Zhang J, et al. Effect of macroalga *Enteromorpha prolifera* on the growth of 4 red tide microalgae under lab condition [J]. *Journal of Huaihai Institute of Technology: Natural Sciences Edition*, 2010, 19(3): 75 - 78. [孙颖颖, 李灿, 张静, 等. 浒苔对 4 种赤潮微藻生长的影响. 淮海工学院学报, 2010, 19(3): 75 - 78.]
- [4] Sun Y Y, Liu X X, Wang C H. Growth inhibition of the four species of red tide microalgae by extracts from *Enteromorpha prolifera* extracted with the five solvents [J]. *Environmental Science*, 2010, 31(6): 1662 - 1669. [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. 环境科学, 2010, 31(6): 1662 - 1669.]
- [5] Qi Y Z, Qian F. Taxonomic studies on red tide causative dinoflagellates in Dapeng Bay, South China Sea [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1994, 25(5): 206 - 211.
- [6] Sun Y Y, Liu X X, Yan B L, et al. The growth inhibition of the four species of red tide microalgae by the extracts from *Porphyra yezoensis* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(5): 796 - 804. [孙颖颖, 刘筱潇, 阎斌伦, 等. 条斑紫菜提取物对 4 种赤潮微藻生长的抑制作用. 水产学报, 2010, 34(5): 796 - 804.]
- [7] Wang L G, Xu S N, He W H, et al. Studies on the antagonistic relationship between seaweed *Enteromorpha clathrata* and marine microalgae *Phaeodactylum tricoratum* [J]. *Marine Fisheries*, 2007, 29(2): 103 - 108. [王兰刚, 徐姗姗, 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. 海洋渔业, 2007, 29(2): 103 - 108.]
- [8] Zhou M J, Zhu M Y. Progress of the project "ecology and oceanography of harmful algal blooms in China" [J]. *Advance in Earth Sciences*, 2006, 21(7): 673 - 679. [周名江, 朱明远. "我国近海有害赤潮发生的生态学、海洋学机制及预测防治"研究进展. 地球科学进展, 2006, 21(7): 673 - 679.]
- [9] Hong Y, Hu H Y, Huang J J, et al. Growth of *Microcystis aeruginosa* affected by allelochemicals of *Arundo donax* Linn. Extracted with different solvents [J]. *Environmental Science*, 2008, 29(11): 3143 - 3147. [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. 环境科学, 2008, 29(11): 3143 - 3147.]
- [10] Jeong J H, Jin H J, Sohn C H, et al. Algicidal activity of the seaweed *Corallina pilulifera* against red tide microalgae [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2000, 12(1): 37 - 43.
- [11] McLachlan J, Craigie J S. Algal inhibition by yellow

- ultraviolet absorbing substances from *Fucus vesiculosus*[J]. *Canadian Journal of Botany*, 1964, 42(3):287-292.
- [12] 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(1):1047-1053.
- [13] DellaGreca M, Monaco P, Previtera L, et al. Allelochemical activity of phenylpropanes from *Acorus gramineus*[J]. *Phytochemistry*, 1989, 28(9):2319-2322.
- [14] 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(1):683-692.

Isolation of antialgal substances from *Enteromorpha prolifera* and its growth inhibition on the red-tide microalgae

SUN Yingying¹, DONG Xiaoke¹, LI Guangcheng¹, YAN Binlun², WANG Changhai^{3*}

(1. Ocean School, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China;

2. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Lianyungang 222005, China;

3. Resources and Environment Science Institute, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Antialgal activity extractions EPME (methanol extracts of *Enteromorpha prolifera*) were separated by liquid-liquid extraction and silica gel column chromatography to isolate and identify antialgal activity compounds in EPME. By liquid-liquid extraction, the four kinds of components (I, II, III and IV) were obtained. Their yield was 29.0%, 19.0%, 12.7% and 5.45%, respectively, but only component II has only obvious inhibiting activity. The inhibitory effect of *Karenia mikimotoi*, *Skeletonema costatum* and *Alexandrium tamarense* by component II (1.0 g/L) was 43.4%, 44.9% and 54.3% on Day 12, respectively. The five kinds of fractions (II-A, II-B, II-C, II-D and II-E) were obtained by silica gel column chromatography, respectively. The fraction B (II-B) and fraction C (II-C) inhibited significantly the growth of all test microalgae, and these two fractions caused cells cavities and pieces. Further, these two fractions (II-B and II-C) were analyzed by wavelength scanning, compound identification test and silica gel GF₂₅₄ thin-layer chromatography. This paper identified containing lactone and coumarins in them and determined the appropriate developing agent by silica gel GF₂₅₄ thin-layer chromatography for subsequent separation and purification. This paper provided solid experiment foundation for further study.

Key words: *Enteromorpha prolifera*; red-tide microalgae; antialgal substances; antialgal activity; isolation

Corresponding author: WANG Changhai. E-mail: chwang2001@sina.com