稻、麦秸秆对球形棕囊藻 (Phaeocystis globosa) 生长的抑制作用

刘洁生 杨维东 高 洁 李诗盈

(暨南大学生物工程学系,广州 510632)

摘要:考查了秸秆及其浸出液对球形棕囊藻(Phaeocystis globosa)生长的影响,分析了秸秆附着微生物及秸秆物理吸附作用对秸秆抑藻活性的影响,观察了稻杆浸出液对藻细胞形态的影响。结果显示,一定量的物理破碎稻杆、麦杆及其浸出液均可有效抑制棕囊藻的生长,灭菌与未灭菌秸杆之间抑藻效果相差不大。不同条件处理的秸杆浸出液总酚含量与抑藻作用间均存在很大差异,但两者之间并无明显相关性。原子力显微镜观察发现,秸秆处理组细胞膜破裂、细胞塌陷,结构不完整,细胞粗糙度明显增加。这些结果提示微生物和物理吸附对秸杆抑藻作用的贡献很小,秸秆中存在的或降解产生的抑藻活性成分是秸秆抑藻的主要原因,除了酚酸类物质外,秸秆中可能存在其他可以显著抑制藻类生长的物质,秸秆通过破坏藻细胞的膜结构,导致藻细胞出现空洞,细胞内容物流出,从而抑制或杀灭藻细胞。

关键词 赤潮 球形棕囊藻 秸秆 抑制作用

文章编号:1000-0933 (2007)11-4498-08 中图分类号: X524, Q945.79 文献标识码: A

Inhibitory effects of rice straw and barely straw on the growth on *Phaeocystis globosa*

LIU Jie-Sheng, YANG Wei-Dong, GAO Jie, LI Shi-Ying

Department of Biotechnology, Jinan University, Guangzhou 510632, China

Acta Ecologica Sinica 2007 27 (11) 4498 ~ 4505.

Abstract: The effects of finely-chopped straws and aqueous extracts from barely straw and rice straw on the growth of *Phaeocystis globosa* were observed. The roles of microorganism and possible adsorption of chopped straws in the inhibition were assessed. The morphological changes in algal cells induced by straw extract were observed by AFM. Both finely chopped straws and aqueous extracts of straws were showed to have inhibitory effect on *Phaeocystis globosa*. There were little difference in algistatic action between asepsis straw and rude straw, suggesting that some antialgal compounds from straws might be responsible for the inhibition, and that physical adsorption and microorganisms from straw had little effect on the inhibition. The total phenol levels and antialgal action of the extracts obtained under various conditions were different, but no direct relationship between phenol level and antialgal action were found, which indicated that the antialgal compound or algaecide other than phenol, existed in extracts. Morphological changes such as increase in cellular roughness, shrink of cell structure and rupture of cell membrane, etc. were observed by AFM in the algal cell treated with extracts. From the results, it was suggested that barely straw and rice straw had certain inhibitory effect on *Phaeocystis globosa* and some

基金项目 国家重点基础研究发展规划973 资助项目 (2001 CB409710) 广东省科技计划资助项目 (2004 B20501007)

收稿日期 2006-09-04;修订日期 2007-09-18

作者简介 刘洁生 (1957~) 男 江西九江人 博士 教授 主要从事功能生物分子与毒理学研究. E-mail:tywd@jnu.edu.cn

Foundation item :The project was financially supported by National Basic Research Program of China (No. 2001CB409710) and the Science and Technology Program of Guangdong Province (No. 2004B20501007)

Received date 2006-09-04; Accepted date 2007-09-18

Biography LIU Jie-Sheng , Ph. D. , Professor , mainly engaged in functional molecule and toxicology. E-mail: tywd@jnu.edu.cn

antialgal compounds besides phenol might be responsible for the inhibition. Damages of cell membrane might be cause of the death of the algal cell induced by straw extract.

Key Words: harmful algal blooms (HAB); Phaeocystis globosa; straw; inhibition

秸秆具有抑制藻类生长的作用,已引起人们的高度关注。一般认为,天然水体中加入秸秆,不会产生环境效应^[1],对鱼类、水生高等植物的生长没有影响;不同藻细胞对秸秆的敏感性不同^[2],秸秆抑制藻类具有一定的选择性。目前,秸秆抑制藻类的研究主要集中在淡水藻,并已在池塘、水库获得一定成功。但秸杆用于赤潮藻的控制研究很少^[5]。Terlizzi^[5]等探讨了大麦秆浸出液在高盐度条件下对数种赤潮甲藻生长的影响。结果发现,高盐情况下,麦秆浸出液对藻类生长也有明显的抑制作用,且具有明显的选择性,显示出这种方法在赤潮治理方面的潜力和良好前景。

球形棕囊藻 (*Phaeocystis globosa* Scherffel)是一种广温广盐性的藻类 属定鞭藻纲 (Haptophytes 或 Prymnesiophytes),能在富营养化海域中短期内爆发性增殖形成有害赤潮。我国 1997 年首次在东南沿海爆发 *Phaeocystis* 赤潮 [41],1999 年 7 月、2002 年 12 月、2003 年 7 和 11 月、2004 年 1 月、2005 年 3 月又接连爆发了 *Phaecystis globasa* 赤潮。本文以球形棕囊藻为实验材料,考查了稻杆、大麦杆及其浸出液对球形棕囊藻生长的影响,并就秸秆抑藻的原因进行了分析。

1 材料与方法

1.1 秸杆

稻杆取自华南农业大学农学院农场,大麦杆从宁夏农业科学院获得。将秸秆剪成 2 cm 长的小段,破碎后用不同孔径的不锈钢筛网进行细分,分装备用。

1.2 藻种

实验用球形棕囊藻 (*Phaeocystis globosa*)汕头株由暨南大学吕颂辉博士提供 ,1997 年 7 月采自饶平海域。置于温度为 $(20\pm1)^{\circ}$,光照强度为 $(4000\ lx)$,光暗比为 $(12\ h)$ 的 LRH-250-GS 型光照人工气候培养箱中培养。所用培养液为人工海水加营养盐配成的 $(12\ h)$ 培养液。

1.3 实验方法

1.3.1 物理破碎秸秆的抑藻实验

(1)藻类生长的测定

由于加入秸秆后培养液会发生变色 在 680 nm 处有一定吸收。因此 本实验选择血球计数板计数细胞的方法确定藻细胞密度。每个样品重复计数 3 次 取平均值。

2)秸秆的抑藻作用测定

秸杆的抑藻作用测定按照 Gibson 介绍的方法 ^[5]进行。称取一定量物理破碎的秸秆 ,加入到 100 ml 指数 生长期的棕囊藻培养液中 ,对照组不加秸秆 ,设 3 个平行。置人工气候箱中培养 ,每天进行藻细胞计数。比较实验组与对照组藻细胞的生物量 ,计算藻类抑制率:

抑制率 (%) = (対照组藻密度 - 实验组藻密度)/ 対照组密度× 100%

(3)灭菌、未灭菌秸秆的抑藻作用比较

称取一定量的秸秆两份: 一份高压灭菌; 一份不做处理。分别加入 100 ml 藻细胞悬液, 置于人工气候培养箱中培养。对照组不加秸秆。3份平行实验, 每天进行细胞计数。

(4)不同粒度秸秆抑藻效果的比较

分别将一定剂量不同粒度的物理破碎秸秆 "加入到一系列含有 100 ml 藻细胞液的培养瓶中培养。3 份平行实验 ,每天测定藻细胞密度。

(5) 秸秆沉降过程对藻细胞生长的影响

向 200 ml 藻细胞悬液中加入一定量的秸秆 ,放入人工气候培养箱中培养。3 份平行实验 ,每天吸取对照组和实验组表层、中层、底部的细胞悬液 测定细胞密度 求平均值。

1.3.2 秸秆浸出液的抑藻作用测定

(1) 秸秆浸出液抑藻效果的比较

由于秸杆浸出液有颜色 因此在比较秸秆浸出液抑藻效果时 ,藻密度的测定采用叶绿素荧光强度法 $^{[6]}$ 。 称取一定量的秸秆六份 ,分灭菌、不灭菌两组。加入一定体积无菌过滤的蒸馏水 ,在密闭 (22 ± 1) $^{\circ}$ 条件下分别放置 72~h、1~0 个月。秸秆浸出液先后经滤纸过滤、再经 $0.2~\mu m$ 一次性过滤器除去微生物 ,放入灭菌烘干的棕色试剂瓶中备用。

实验时,分别加入一定体积的浸出液,蒸馏水补足到 20 ml ,再加入 20 ml 2 倍浓度的 f/2 培养基 (含 0.2 mol·l^{-1} HEPES,调 pH 至 7.0)和 60 ml 浓缩藻细胞培养液,得到 100 ml 藻密度为 $2 \times 10^8 \text{ f} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养液,对照组加入 40 ml f/2 培养液。每天取样测定荧光强度 (ex. 468 nm ,em. 680 nm ,灵敏度 2)。同时测定不同浸出液的荧光强度本底值,对处理组藻细胞荧光强度进行校正,以消除由于光散射等造成的实验误差。校正后的结果用标准曲线换算成藻密度。

(2) 用原子力显微镜扫描棕囊藻细胞的外部形貌

将一定量 72 h 稻草浸泡液加入培养液 光照培养 4 d , 收集藻细胞 原子力显微镜 (Atomic force microscope , AFM)下观察藻细胞的外部形态。将棕囊藻细胞悬液滴加到载玻片上 ,用 2.5 % 的戊二醛固定 ,空气中干燥待用。制备好的样品放置于原子力显微镜的样品台上 ,在轻敲模式 (Tapping mode)下观察 ,悬臂 (Park Scientific Instruments ,Microlever)针尖曲率半径 10 nm ,力常数为 2.8 N/m。实验采用 UL20B 氮化硅探针 ,扫描器范围 100 μm ,在空气中进行 AFM 扫描成像。应用仪器配置的 PI 图像处理软件 (Thermomicroscopes Proscan Image Processing Software version 2.1)进行图像数据的采集和分析。

1.3.3 秸秆浸出液总酚含量的测定

总酚含量测定采用改进的普鲁士蓝法[7]。

1.3.4 数据处理

数据用 SPSS 11.5 统计分析软件进行 t 检验 P < 0.05 有显著差异 P < 0.01 有非常显著差异。

- 2 实验结果
- 2.1 不同秸秆的抑藻作用

2.1.1 稻杆对藻细胞生长的抑制作用

不同用量稻杆对球形棕囊藻细胞生长的影响结果见图 1。可以看出 $0.1~{\rm g\cdot L^{-1}}$ 灭菌稻杆能显著促进藻细胞的生长 剂量在 $0.5~{\rm g\cdot L^{-1}}$ 以上的实验组藻细胞的生长受到显著抑制 其中 $1~{\rm g\cdot L^{-1}}$ 组藻密度没有出现反弹,表明 $1~{\rm g\cdot L^{-1}}$ 灭菌稻杆能够持续、高效地抑制藻的生长,可以认为灭菌稻杆抑制球形棕囊藻生长的最低有效浓度为 $1~{\rm g\cdot L^{-1}}$ 。

2.1.2 大麦杆对棕囊藻细胞生长的抑制作用

从图 2 知 ,大麦杆用量在 2 $g \cdot L^{-1}$ 以上的实验各组藻细胞密度持续低于对照 ,藻密度维持在很低的水平。因此 ,可以认为物理破碎大麦杆的最低有效抑藻浓度为 2 $g \cdot L^{-1}$ 。

2.2 秸秆附着微生物对抑藻效果的影响

2.2.1 微生物对稻杆抑藻作用的影响

图 3 为灭菌稻杆与未灭菌稻杆抑藻作用的比较。可以看出 ,48 h 后 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的稻杆均可有效抑制球形棕囊藻的生长 ,24 h 时 $,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 干稻杆对棕囊藻的生长表现出一定的促进作用。

2.2.2 微生物对大麦杆抑藻活性的影响

由图 4 可知 灰菌大麦杆和未灭菌大麦杆均表现出较强的抑藻活性 但抑藻作用差别不大。

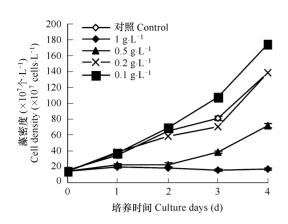


图 1 不同剂量灭菌稻杆对藻细胞生长的影响

Fig. 1 Effects of sterilized rice straw on the growth of *Phaeocystis globosa*

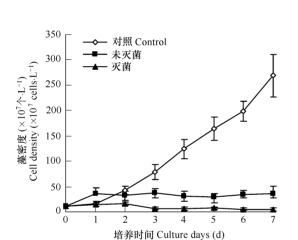


图 3 微生物对稻杆抑藻效果的影响

Fig. 3 Effect of microorganism on the inhibition of rice straw on Phaeocystis globosa

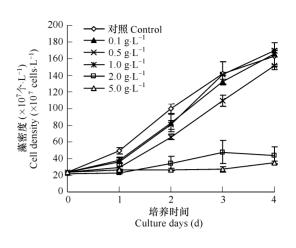


图 2 不同剂量大麦杆对藻细胞生长的影响

Fig. 2 Effect of barley straw on the growth of Phaeocystis globosa

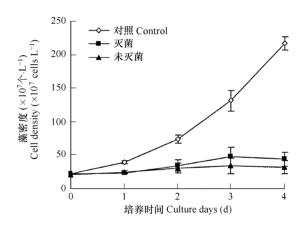


图 4 微生物对大麦杆抑藻效果的影响

Fig. 4 Effect of microorganism on the inhibition of barley straw on Phaeocystis globosa

2.3 不同粒度秸秆抑藻效果的比较

2.3.1 不同粒度稻杆抑藻效果

不同粒度稻杆的抑藻效果见图 5。可以看出,不同粒度大小的稻杆均可显著抑制棕囊藻的生长,抑制率并无显著差别 (P>0.05)。

2.3.2 不同粒度大麦杆抑藻效果比较

不同粒度物理破碎大麦杆的抑藻效果见图 6。可以看出,在实验范围内,不同粒度大小的大麦杆均能显著抑制藻的生长,短时间内,随着大麦杆粒度的减小,抑藻效果有所增强。

2.4 秸秆沉降过程对藻细胞生长的影响

为了确定秸秆沉降过程对藻细胞生长的影响,实验中考查了加入秸秆后培养液不同液面高度 (培养瓶底部、液面与瓶底的中间位置、液面)藻密度的变化情况。结果发现,加入 $1~{\rm g\cdot L^{-1}}$ 的稻杆 $1~{\rm d}$ 后,稻杆完全下沉至瓶底,培养液表面藻细胞去除效果较中间、底层好,但去除率只有 36.26%。 $2~{\rm d}$ 后,不同液面高度藻细胞去除率趋于一致,去除率可达 70% 以上。大麦杆情况与稻杆相似,表明因为秸秆在沉降过程中会吸附少量藻细胞,但并非抑制藻类的主要原因。

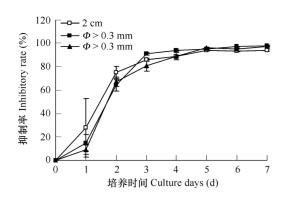


图 5 不同粒度大小的稻杆对棕囊藻生长的抑制作用

Fig. 5 Inhibition of physical disrupted-wheat straw in various sizes on Phaeocystis globosa

图 6 不同粒度物理破碎大麦杆对棕囊藻生长的抑制作用

Fig. 6 Inhibition of physical disrupted-barley straw in various sizes on Phaeocystis globosa

5 不同秸秆浸出液的抑藻效果

2.5.1 不同剂量秸秆浸出液的抑藻效果

不同剂量的秸秆浸出液对藻类的抑制效果见图 7 (a ,b ,c)。图中 ,浸出液的量分别于相当于 $3 g \cdot L^{-1} \cdot 5 g \cdot L^{-1} \cdot 10 g \cdot L^{-1}$ 秸杆的量。随着作用浓度的增大 ,不同秸秆浸出液均表现出较强的抑藻作用。相对而言 ,大 麦秸浸出液的抑藻作用受浸泡时间影响更大。

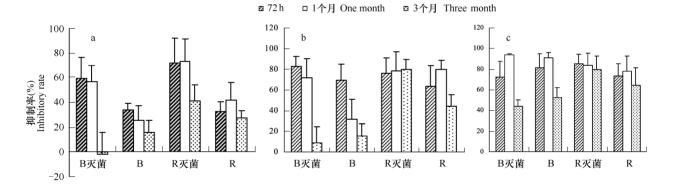


图 7 秸秆浸出液抑藻活性的比较

Table 7 Comparison of inhibitory action of straw extracts obtained under various conditions

B. 大麦杆 Barely straw ; R. 稻杆 Rice straw

2.6 不同处理秸秆浸出液的总酚含量

图 7 为不同秸秆浸出液的总酚含量。可以看出 秸秆浸出液的抑藻作用与总酚含量并无明显关联。

2.7 稻草浸出液对棕囊藻细胞外部形貌的影响

可以看出 正常藻细胞直径约 10 μm ,形态近球形、中间高、沿凹痕均匀分成两个亚结构 ,细胞边缘可见均匀排列的圆形扁平的裂片。稻草浸出液处理的藻细胞外部形态发生了比较明显的变化 ,其中图 C、D 可以看到大量胞内物质流出 ,细胞膜结构不完整 ,而图 E、F 显

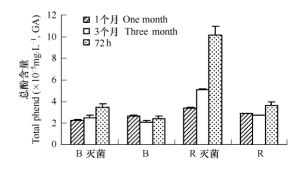


图 8 不同秸秆浸出液总酚含量

Fig. 8 Total phenol levels of straw extracts B. 大麦杆 Barely straw; R. 稻杆 Rice straw

接图9

示藻细胞的细胞骨架破坏 细胞塌陷。

稻杆、大麦杆都能抑制其周围植物的生长^[8]。 研究发现 秸秆中存在植物毒素 (phototoxin) 或称化感物 质 (allelochemical)。当植物受到胁迫时,他感物质的分泌量会增多 [9]。研究表明,这些化感物质除抑制其他 植物的生长外 还具有抑制微生物、藻类的作用。 本研究发现 物理破碎的大麦秸、稻秆均具有抑制棕囊藻细 胞生长的作用。尽管有研究者认为,降解后的大麦杆才具有抑藻活性[10],但有研究得出了与本研究类似的结 果[11,12] 即物理破碎秸杆能够表现出一定的抑藻活性 适度切割有利于秸秆抑藻活性物质的释放。

进一步研究秸秆附着微生物对秸秆抑藻活性的影响发现 灭菌后的秸秆也存在抑藻活性 物理破碎秸秆 与灭菌秸秆的抑藻活性相差不大 说明秸秆的抑藻活性主要是其中抑藻活性物质的作用 微生物作用不是秸 秆表现抑藻活性的主要原因[11,12]。物理破碎稻杆处理藻细胞 1 d,细胞迅速增殖,表现促进藻细胞生长的作 用 2 d 后开始出现显著的抑制效应。造成这种现象的原因可能是:稻杆中附着的微生物可能存在促进藻细 胞生长的作用。随着稻杆的浸润 他感物质开始释放。某些化感物质可能具有抑制微生物生长的作用 从而 使微生物的数量减少 进一步造成 "促进作用"的消失。实验中 我们还比较了低剂量灭菌处理对稻杆抑藻活 性的影响 发现较低剂量的物理破碎稻杆也具有促进藻细胞生长的作用 但作用较弱 表明稻杆附着微生物的 多少与这种促增殖作用间存在一定的相关性 提示秸秆上可能确实存在某些能够促进藻类生长的微生物。

经过物理切割破碎的秸秆颗粒 表面可能变得疏松多孔 ,而很容易产生表面吸附和毛细管凝聚作用-物理吸附作用。存在吸附作用的物体 ,在一定粒度范围内 ,其粒粒径越小 ,比表面积就越大 ,与藻细胞的接触 机会增大 吸附作用越明显。因此不同粒度的秸秆可能因吸附作用的强弱不同而造成抑藻作用上的差异。研 究发现 稻杆的这种物理吸附作用很弱 不同粒度的稻杆抑藻效果非常接近 麦杆的吸附作用相对比较明显 1 d 时不同粒度的大麦杆抑藻效果有些差异,但2 d 后基本趋于一致,说明物理吸附并非大麦杆和稻杆抑藻的主 要原因。

秸秆浸泡的时间长短不同 其浸出液中总酚含量不同 抑藻作用之间也有一定差异 但总酚含量与抑藻作 用间并无明显的相关性 提示除了酚酸类物质以外 浸出液中的其他成分也可能在抑藻过程中发挥重要作用 , 因此有必要对浸出液的化学成分进行进一步的研究 以明确秸秆抑藻的化学基础。

作为生命科学研究中重要工具之一 原子力显微镜可真实还原样品表面二维、三维图像 同时得到样品各 部位精确的高度、粗糙度、截面曲线等重要数据[14]。 由于棕囊藻的藻细胞固定比较困难,采用电镜观察有一 定困难 因此本文用原子力显微镜观察了秸杆处理后藻细胞形态的变化。结果显示 对照组藻细胞表面颗粒 粗糙度大约在 9.4~11.23 nm 范围内 ,平均高度在 51.93~115.6 nm 范围内 ,浸泡液处理组藻细胞粗糙度差 别较大。藻细胞平均粗糙度最大约 300 nm .最小约几十个纳米。稻草浸出液处理藻细胞细胞膜结构不完整 , 藻细胞骨架受到破坏 细胞塌陷。提示稻草浸泡液中某些化感物质可作用于藻细胞的细胞膜 改变膜的表面 结构 进一步引起藻细胞表面的空洞、藻细胞凹陷 甚至细胞破裂、细胞骨架的丧失。

4 结论

- (1)稻杆、大麦杆都具有抑制球形棕囊藻生长的作用;
- (2) 秸秆中存在的化合物或降解过程产生的化合物可能是秸秆抑藻的主要原因:
- ③)稻草及稻草浸出液可通过作用于藻细胞的表面 ,去除或损伤裂片 ,破坏藻细胞的膜结构 ,导致藻细胞 出现空洞 细胞内容物流出 从而杀灭藻细胞。

References:

- [1] Barrett P R F, Littlejohn J W, Curnow J. Long-term algal control in a reservoir using barley straw. Hydrobiologia, 1999, 415:309-313.
- [2] Martin D, Ridge I. The relative sensitivity of algae to decomposing barley straw. J Appl Phycol, 1999, 11:285—291.
- [3] Daniel E Terlizzi, Drew Ferrier M, et al. Inhibition of dinoflagellate growth by extracts of barley straw (Hordeum vulgare). J Appl Phycol, 2002, 14:275-280.

- [4] Chen G F, Xu N, Jiang T J, et al. A report of *Phaeocystis globosa* bloom in coastal water of Southeast China. J Jinan University (Nat Sci & Med Edit), 1999, 20 (3):124-129.
- [5] Gibson M T, Welch I M, Barrett P R F, et al. Barley as an Inhibitor of Algal Growth II: Laboratory Studies. J Appl Phycol, 1990, 2:241—248.
- [6] Zhu Y B, Wu Y Y, Gong W S, et al. Study on fluorescence characteristics of natural chlorophyll. Spectrosc Spect Anal, 1995, 15 (2):5-8.
- [7] Graham H D. Stabilization of the Prussian blue color in the determination of polyphenols. J Agric Food Chem., 1992, 40:801-805.
- [8] Overland L. The role of allelopathic substances in the "smother crop" barley. Amer J Bot , 1966, 53:433-442.
- [9] Christine Kraus, Gerhard Spiteller. Comparison of phenolic compounds from galls and shoots of *picea glauca*. Phytochemistry, 1997, 44 (1):59—67.
- [10] Everall N C , Lees D R. The identification and significance of chemicals released from decomposing barley straw during reservoir algal control .

 Water Res , 1997 , 31 (3):614-620.
- [11] Pillinger J M , Cooper J A , Ridge I. Role of phenolic compounds in the antialgal activity of barley straw . J Chem Ecol , 1994 , 7:1557 1569.
- [12] Ridge I, Pillinger J. M. Towards understanding the nature of algal inhibitors from barley straw. Hydrobiologia, 1996, 340:301-305.
- [13] Shen PP, Wang ZH, Qi YZ, et al. An optical density method for determination of microalgal biomass. J Jinan University (Nat Sci & Med Edit), 2001, 33 (3):115-119.
- [14] Liu M L, Chen Y, Cai J Y, et al. The preliminary study of surface topography and optical properties of lymphocyte with AFM and SNOM. J Mole Sci, 2005, 21 (1):25-30.

参考文献:

- [4] 陈菊芳,徐宁,江天久,等. 中国赤潮新记录种——球形棕囊藻. 暨南大学学报(自然科学版),1999,20 (3):124~129.
- [6] 朱延彬,吴燕燕,龚为穗,等.天然叶绿素荧光特性研究.光谱学与光谱分析,1995,15 @):5~8.
- [13] 沈萍萍,王朝晖,齐雨藻,等.光密度法测定微藻生物量.暨南大学学报(自然科学版),2001,33 (3):115~119.
- [14] 刘美莉,陈勇,蔡继业,等. 利用 AFM 和 SNOM 对淋巴细胞膜表面超微结构及其光学性质的初步研究. 分子科学学报,2005,21 (1): 25~30.

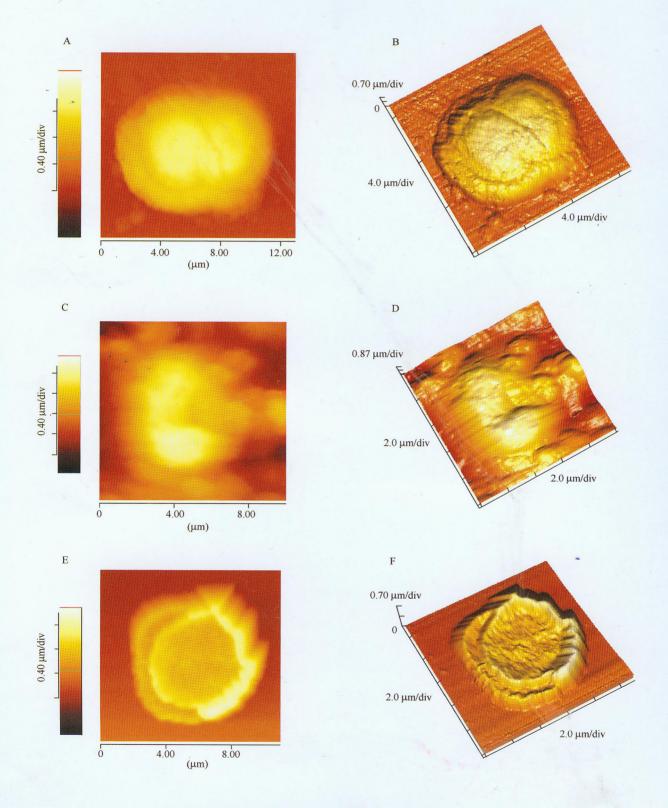


图 9 球形棕囊藻细胞的 AFM 形貌图 Fig. 9 AFM images of Phaeocystis globosa