

软脂酸和硬脂酸对铜绿微囊藻生长的抑制作用

姜闻新, 贾永, 王从彦, 王倩, 田兴军*

南京大学生命科学院, 江苏 南京 210093

摘要: 研究了软脂酸和硬脂酸对产毒铜绿微囊藻 *Microcystis aeruginosa* 生长的抑制效应, 比较了长链饱和脂肪酸抑藻的构效关系。选用的藻种是购于中国科学院水生生物研究所的产毒铜绿微囊藻 *Microcystis aeruginosa* FACHB-912, 且实验藻种处于对数生长期。软脂酸和硬脂酸在藻液中的 4 种最终质量浓度为: 30、60、90 和 120 mg·L⁻¹。实验周期为 6 d, 每天定时定量取藻液, 测量 *A* (650 nm), 叶绿素 a 含量, 藻蓝蛋白含量。实验结束后, 采用 SPSS (13.0 版本) 软件和 DPS (7.05 版本) 分析加入这 2 种脂肪酸的藻液的 3 个指标与空白对照之间的差异显著性。结果表明, 2 种饱和脂肪酸的 4 种质量浓度对产毒铜绿微囊藻均有显著的抑制作用, 浓度越大, 抑藻效果越明显。其中, 2 种饱和脂肪酸在相同浓度的条件下, 软脂酸比硬脂酸的抑制作用要明显。实验技术方面有 2 个创新点: ①因为长链饱和脂肪酸无法溶于蒸馏水, 实验采用乙醇来溶解脂肪酸。②因为溶于乙醇的长链饱和脂肪酸溶液无法用高压灭菌锅灭菌, 实验采用微孔滤膜对脂肪酸溶液进行灭菌。

关键词: 产毒铜绿微囊藻; 脂肪酸; 抑藻效应

中图分类号: X171.5

文献标识码: A

文章编号: 1674-5906 (2010) 02-0291-05

微囊藻 *Microcystis* spp. 是富营养化湖泊中形成“水华” (Water bloom) 的主要藻类。太湖自 20 世纪 80 年代起就经常出现以微囊藻为优势种的蓝藻水华, 其中主要有铜绿微囊藻 *Microcystis aeruginosa*、大型铜绿微囊藻 *Microcystis aeruginosa* var. *major*、水华微囊藻 *Microcystis flos-aquae*、惠氏微囊藻 *Microcystis wesenbergii* 等^[1-2]。

近十几年来由于工业迅速发展, 大量工业废水和生活废水排入湖泊等水体, 导致湖泊等水体的富营养化程度急剧上升。每到温暖季节, 水华频频暴发, 影响景观, 且水华在气温上升后会很快腐败, 引起水中氧气含量迅速下降, 威胁水生动物的生存^[3]。

脂肪酸是重要的化感物质, 存在于许多植物的根叶中, 在利用植物秸秆根茎抑制水华蓝藻生长过程中发挥着重要作用。Ikawa et al.^[4]报道 C14-C18 脂肪酸对绿藻 *Chlorella pyrenoidosa* 有毒性; 高洁等和刘洁生等^[5-6]发现羟基羧酸、亚油酸、脂肪酸等物质在秸秆抑制藻类生长中具有重要作用; Kamaya, et al.^[7]发现长链脂肪酸对淡水藻羊甲绿芽藻 *Selenastrum Capricornutum* 存在很强的抑制作用。虽然脂肪酸对藻生长影响方面的研究不少, 但是长链饱和脂肪酸对铜绿微囊藻 *Microcystis aeruginosa* 生长的影响及其相关研究却少有报道。

本文采用水华常见微囊藻——产毒铜绿微囊藻 *Microcystis aeruginosa* FACHB-912 作为研究对象, 拟通过 2 种不同长链脂肪酸对其生长影响进行

比较研究, 分析脂肪酸质量浓度, 碳链长度与脂肪酸抑藻作用间的关系, 一方面, 可以揭示其化感作用机制, 另一方面, 可以为利用脂肪酸作为除藻剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

产毒铜绿微囊藻 *Microcystis aeruginosa* FACHB-912, 购自中国科学院水生生物研究所。藻种培养采用 BG-11 培养基。BG-11 培养基组分如下 (pH 7.1, ρ /(mg·L⁻¹)): NaNO₃ 1 500, K₂HPO₄ 40, MgSO₄·7H₂O 75, CaCl₂·2H₂O 36, C₆H₈O₇·H₂O 6, C₁₂H₂₂FN₃O₁₄ 6, Na₂-EDTA 1, Na₂CO₃ 20, H₃BO₃ 2.86, MnCl₂·4H₂O 1.81, ZnSO₄·7H₂O 0.22, Na₂MoO₄·2H₂O 0.39, CuSO₄·5H₂O 0.08, Co(NO₃)₂·6H₂O 0.05。

软脂酸(十六酸 16:0), 硬脂酸(十八酸 18:0), 乙醇均为国药集团化学试剂有限公司产品, 所有试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 藻种的培养

在无菌条件下, 向 3 个 3 000 mL 锥形瓶中各加入 1 000 mL 培养基。接入藻种, 摇匀, 培养。培养条件: 光照度 4 000 lx, 光暗周期 12 h : 12 h, 温度 (30±2) °C, pH 值为 7.0。振摇频率 4 次/d, 使铜绿微囊藻处于对数生长期, 作为原始藻液。

配制脂肪酸溶液: 分别取 0, 0.3, 0.6, 0.9,

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目 (2008CB418004); 国家自然科学基金项目 (30870419, 40971151)

作者简介: 姜闻新 (1983 年生), 女, 硕士研究生, 主要从事藻类水华的研究。E-mail: leowenwen@163.com

*通讯作者: 田兴军, E-mail: tianxj@nju.edu.cn

收稿日期: 2009-12-21

1.2 g 的 2 种脂肪酸分别溶于 20 mL 乙醇中,然后用 0.22 μm 的灭菌滤膜过滤,除去其他微生物,过滤后分别放在 9 个灭菌后的三角瓶中,备用。

1.2.2 抑藻实验

将处于对数生长期的原始铜绿微囊藻液混匀,然后用 BG-11 培养基稀释至 OD (650 nm) 值为 0.33~0.34 之间,再各取 100 mL 藻液于 250 mL 锥形瓶内,分别添加 0.2 mL 的 4 个浓度梯度的 2 种脂肪酸,这样脂肪酸的最终质量浓度即为: 30, 60, 90, 120 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。空白对照加入 0.2 mL 的乙醇。每组 3 个重复,置培养箱培养,每 d 摇动 4~6 次,且定时取样测 $A_{650\text{nm}}$,按照 Wintermans and de Mots^[8]的方法测叶绿素 a 含量,按照 Bennet and Bogorad^[9]的方法测藻蓝蛋白含量。

1.3 数据处理

采用 SPSS (13.0 版本) 软件和 DPS (7.05 版本) 分析这 2 种脂肪酸与空白对照之间对影响蓝藻生长的差异显著性。

2 结果

从图 1 的 A 和 B 可以看出,这 2 种脂肪酸的每

个质量浓度梯度对藻生长均有抑制作用,且存在剂量依赖关系。质量浓度越大,饱和脂肪酸对铜绿微囊藻生长的抑制越显著;碳链长度越长,饱和脂肪酸对铜绿微囊藻生长的抑制越差。

差异显著性分析结果(表 1)表明,随着时间的增加,脂肪酸对铜绿微囊藻生长的抑制效果逐渐增强。在第 6 天,60 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的软脂酸,60, 90 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硬脂酸与空白对照出现显著差异 ($P<0.05$), 90, 120 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的软脂酸,120 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硬脂酸与空白对照出现极显著差异 ($P<0.01$)。

直观观察藻液,加入脂肪酸的明显逐渐变黄,出现浑浊现象,显微镜下观察,发现大量藻细胞出现裂解现象,形成藻碎片。

从图 2 的 A 和 B 可以看出,叶绿素 a 含量随着这 2 种脂肪酸质量浓度的增加而表现出下降率逐渐增大的趋势。且脂肪酸碳链越短,抑制效果越明显。

差异显著性分析结果(表 1)表明,随时间增加,脂肪酸对叶绿素 a 含量的抑制效果逐渐增强。在第 6 天,这 2 种脂肪酸的所有质量浓度梯度和空白对照相比均为极显著差异 ($P<0.01$)。

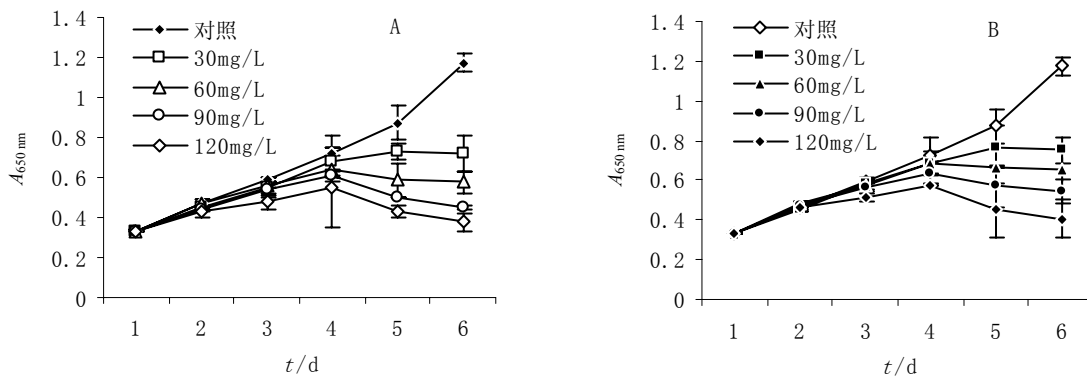


图 1 加入 4 种不同质量浓度的脂肪酸后铜绿微囊藻的生长曲线 ($n=3$, A 为软脂酸, B 为硬脂酸)

Fig.1 The growth curve of *Microcystis aeruginosa* after adding four different contents of palmitic acid and stearic acid ($n=3$). A: palmitic acid, B: stearic acid

表 1 4 个质量浓度梯度的 2 种脂肪酸对铜绿微囊藻的生物量 ($A_{650\text{nm}}$)、叶绿素 a 含量、藻蓝蛋白含量的影响 (培养时间 6 d, $n=3$)。

Table 1 The effects of the four different concentrations of the two fatty acids on the biomass ($A_{650\text{nm}}$), the contents of Chlorophyll a and Phycocyanin (the incubation time is 6 days, $n=3$)

处理	生物量($A_{650\text{nm}}$)	ρ (叶绿素 a)/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	ρ (藻蓝蛋白)/($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
对照	1.223±0.047 ^a	4.054±0.243 ^a	0.125±0.035 ^a
ρ (软脂酸)=30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0.717±0.090 ^{bc}	2.140±0.259 ^{bc}	0.068±0.006 ^{bc}
ρ (软脂酸)=60 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0.577±0.052 ^{cd}	1.610±0.236 ^{cde}	0.052±0.014 ^{bc}
ρ (软脂酸)=90 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0.455±0.010 ^{de}	1.392±0.139 ^{ef}	0.050±0.015 ^{bc}
ρ (软脂酸)=120 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	1.027±0.195 ^f	1.027±0.195 ^f	0.038±0.005 ^c
ρ (硬脂酸)=30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0.754±0.042 ^b	2.170±0.075 ^b	0.087±0.019 ^{ab}
ρ (硬脂酸)=60 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0.652±0.061 ^{bc}	1.974±0.104 ^{bcd}	0.058±0.006 ^{bc}
ρ (硬脂酸)=90 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0.544±0.065 ^{cde}	1.514±0.096 ^{def}	0.052±0.015 ^{bc}
ρ (硬脂酸)=120 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0.406±0.097 ^{dc}	1.577±0.250 ^d	0.042±0.013 ^{bc}

数据右上方不同的字母显示显著差异 ($P<0.05$)

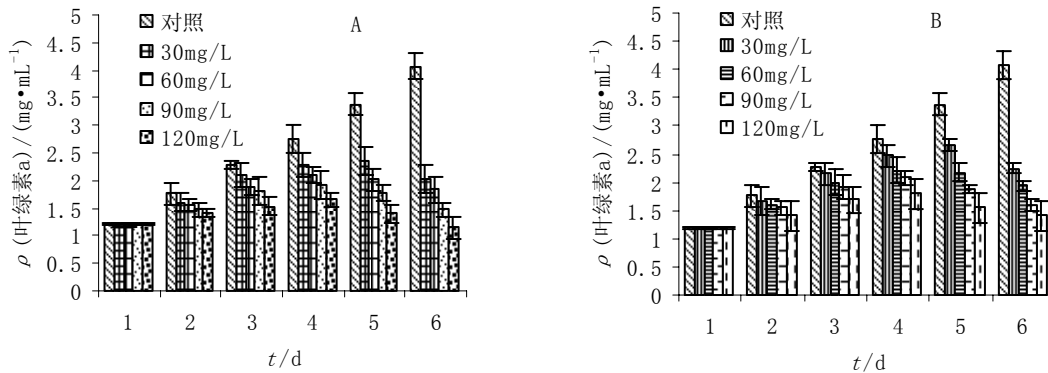


图2 加入4种不同质量浓度的脂肪酸后铜绿微囊藻的叶绿素a含量变化曲线 ($n=3$, A为软脂酸, B为硬脂酸)

Fig.2 The content of Chlorophyll a of *Microcystis aeruginosa* after adding four different contents of palmitic acid and stearic acid ($n=3$, A: palmitic acid, B: stearic acid)

从图3的A和B可以看出,藻蓝蛋白受到这2种脂肪酸的抑制作用也很明显。且规律与生物量和叶绿素a相同。

差异显著性分析结果(表1)表明,随着实验天数的增加,脂肪酸对藻蓝蛋白含量的抑制效果逐渐增强。在第6天,30 mg·L⁻¹的软脂酸,60 mg·L⁻¹的硬脂酸与空白对照相比出现显著差异 ($P<0.05$),60, 90, 120 mg·L⁻¹的软脂酸,90, 120 mg·L⁻¹的硬脂酸则为极显著差异 ($P<0.01$)。

3 讨论与结论

Sjostrom指出脂肪酸是植物体中重要的组成部分^[10]。其碳骨架长度一般为4~36个碳原子,主要为偶数碳的饱和及不饱和脂肪酸,其中软脂酸(十六酸)和硬脂酸(十八酸)较为常见^[11-13]。

本文采用这2种最为常见的饱和脂肪酸来研究其对铜绿微囊藻生长的影响。结果发现抑藻效果十

分明显。质量浓度越大,饱和脂肪酸对铜绿微囊藻生长的抑制越显著;碳链长度越长,饱和脂肪酸对铜绿微囊藻生长的抑制越差。

脂肪酸对藻细胞生长的抑制机理比较复杂,目前的研究认为此类化合物主要通过细胞膜上离子通道的途径产生抑制作用^[14-15]。Wu et al.^[16]研究发现,脂肪酸能对细胞膜产生影响,引起膜通透性改变,造成K⁺外泄进而引起膜结构的破坏从而产生抑藻作用。Agafonov et al.^[14]研究指出,长链C16-C22之间的饱和脂肪酸通过与Ca²⁺的亲合性可引起细胞凋亡。Igarashi et al.^[15]推测脂肪酸可通过Ca²⁺通道影响CaM的活性,引起胞内磷酸酶活性的变化,进一步导致细胞死亡。脂肪酸刺激位于细胞膜上的Ca²⁺通道,引起细胞内的Ca²⁺向外流出,致使细胞质中游离的Ca²⁺浓度降低,当细胞质中游离的Ca²⁺浓度降低到一定的程度,CaM不能被活化,造成依

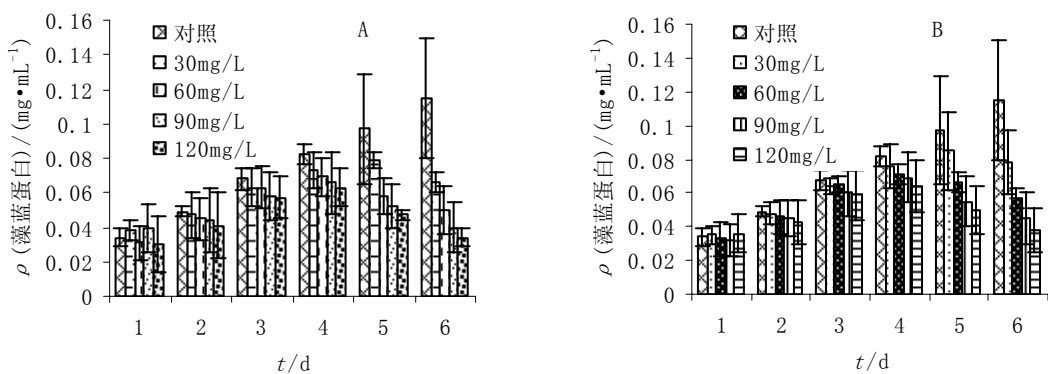


图3 加入4种不同浓度的脂肪酸后铜绿微囊藻的藻蓝蛋白含量变化曲线 ($n=3$, A为软脂酸, B为硬脂酸)

Fig.3 The content of Phycocyanin of *Microcystis aeruginosa* after adding four different contents of palmitic acid and stearic acid ($n=3$, A: palmitic acid, B: stearic acid)

赖于 Ca^{2+} -CaM 的酶如 NAD 激酶、 Ca^{2+} -ATP 酶和蛋白质激酶等不能被激活,使细胞内的某些酶促反应不能进行,胞内受 Ca^{2+} -CaM 的调控的生理活动受到影响,引致细胞死亡^[17-18]。

脂肪酸对藻细胞的抑制还和藻细胞膜自身脂肪酸的含量有关, Sokolov et al.^[19]报道脂肪酸可引起藻细胞膜超微结构或膜内磷脂双层中的离子通道结构的变化,导致细胞膜通透性的改变。藻细胞质膜中软脂酸、亚油酸、亚麻酸的含量较高,因此,这些脂肪酸更容易与质膜结合导致质膜构像的变化,进而引起细胞的死亡。

2005年9月17-21日在南京玄武湖曾开展了以乙酸为主要成分的化学除藻剂治理蓝藻水华的实验研究,治理后实验区藻类总量下降了82.8%^[20]。但是药剂显效时间较短,受风力,水力条件影响较大,不能从根本上解决富营养化问题。而脂肪酸是植物天然分泌物质,如能考虑用脂肪酸来治藻,则效果好,取材方便且不易造成污染。

脂肪酸良好的抑藻效果,提示该物质可作为蓝藻水华的抑制剂。

参考文献:

- [1] 朱浩然. 中国淡水藻志—色球藻纲[M]. 北京: 科学出版社, 1991.
ZHU Haoran. Chinese Freshwater Algae—Chroococcaceae [M]. Beijing: Academic Press, 1991.
- [2] 陈宇炜, 高锡云. 西太湖北部微囊藻时空分布及其光温等环境因子关系的研究[C]//蔡启铭. 太湖环境生态研究(一). 北京: 气象出版社, 1998.
CHEN Yuwei, GAO Xiyun. The study of the spatial and temporal distribution of Microcystis in northern west Lake Taihu and the relationship of the environmental factors such as light and temperature [C]//CAI Qimin. Environmental and Ecological Studies in Lake Taihu (1). Beijing: China Meteorological Press, 1998.
- [3] 俞家禄, 陈明惠, 林坤. 武汉东湖蓝藻水华毒性研究(I): 淡水蓝藻水华毒性的检测[J]. 水生生物学报, 1987, 11(3): 212-217.
YU Jialu, CHEN Minghui, LIN Kun. Research of toxic algal blooms in Lake Donghu, Wuhan (I): The detection of toxic freshwater algal blooms [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1987, 11(3):212-217.
- [4] IKAWA M, HARTSHORNE T, CARON L A, et al. Inhibition of growth of the green alga *Chlorella pyrenoidosa* by unsaturated fatty acids[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1984, 61: 1877-1878.
- [5] 高洁, 杨维东, 刘洁生, 等. 利用小麦秸控制赤潮生物生长的研究[J]. 海洋环境科学, 2005, 24(1): 5-8.
GAO Jie, YANG Weidong, LIU Jiasheng, et al. Studies on wheat straw to inhibit the growth of *Phaeocystis globosa* [J]. Marine Environmental Science, 2005, 24(1):5-8.
- [6] 刘洁生, 陈芝兰, 杨维东, 等. 凤眼莲根系丙酮提取物抑制赤潮类生长的机制研究[J]. 环境科学学报, 2006, 26(5): 1-6.
LIU Jiasheng, CHEN Zhilan, YANG Weidong, et al. Inhibitory mechanism of acetone extract from *Eichhornia crassipes* root on *Alexandrium tamarense*[J]. Acta Science Circumstantiae, 2006, 26(5):1-6.
- [7] KAMAYA Y, KUROI Y, SUZUKI K. Acute Toxicity of Fatty Acids to the freshwater green alga *Selenastrum capricornutum* [J]. Environmental Toxicology, 2003, 298-294.
- [8] WINTERMANS J F, DE MOTTS A. Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b and their pheophytins in ethanol [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1965, 109:448-453.
- [9] BENNETT A., BOGORAD L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga [J]. The Journal of Cell Biology, 1973, 58:419-435.
- [10] SJOSTROM E. Wood Chemistry: Fundamentals and Application [M]. New York: Academic Press, 1981.
- [11] MARSHALL J A, SALAS M D, ODA T, et al. Superoxide production by marine microalgae [J]. Marine Biology, 2005, 147:541-549.
- [12] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学(上册)[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 82-86.
WANG Jingyan, ZHU Shengeng, XU Changfa. Biochemistry (1st Volume) [M]. Beijing: Higher Education Press, 2002:82-86.
- [13] ALAMSJAH M A, HIRAO S, ISHIBASHI F, et al. Isolation and structure determination of algicidal compounds from *Ulva fasciata* [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2005, 69:2186-2192.
- [14] AGAFONOV A, GRITSENKO E, BELOSLUDTSEV K, et al. A permeability transition in liposomes induced by the formation of Ca^{2+} /palmitic acid complexes [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2003, 1609 (2): 153-160.
- [15] IGARASHI T, ARITAKE S, YASUMOTO T. Mechanisms underlying the hemolytic and ichthyotoxic activities of maitotoxin [J]. Natural Toxins, 1999, 7: 71-79.
- [16] WU Jiunntzong, CHIANG Yinru, HUANG Wenya, et al. Cytotoxic effects of free fatty acids on phytoplankton algae and cyanobacteria [J]. Aquatic Toxicology, 2006, 80: 338-345.
- [17] 尚忠林, 孙大业. 植物细胞内的钙通道[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38 (6): 625-630.
SHANG Zhonglin, SUN Daye. Calcium channels in plant cells [J]. Plant Physiology Communications, 2002, 38 (6):625-630.
- [18] PINEROS M, TESTER M. Calcium channels in higher plant cells: electivity, regulation and pharmacology [J]. Journal of Experimental Botany, 1997, 48: 551-577.
- [19] SOKOLOV Y, MARTIN D W, LEHRER R I, et al. Membrane channel formation by antimicrobial protegrins [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1999, 1420:23-29.
- [20] 李静会, 高伟, 张衡, 等. 除藻剂应急治理玄武湖蓝藻水华实验研究[J]. 环境污染与防治, 2007, 29(1): 60-62.
LI Jinghui, GAO Wei, ZHANG Heng, et al. Emergency control of blue algal bloom by algaecide: experimental study in Xuanwu Lake [J]. Environmental Pollution and Control, 2007, 29(1):60-62.

The inhibitory effects of palmitic acid and stearic acid on *Microcystis aeruginosa*

JIANG Wenxin, JIA Yong, WANG Congyan, WANG Qian, TIAN Xingjun*

School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210093, China

Abstract: The inhibitory effects of palmitic acid and stearic acid on toxic *Microcystis aeruginosa* were studied, and the relationship between the structures of the long-chain saturated fatty acids and the inhibitory effects was compared. Our experiment selected toxic *Microcystis aeruginosa* FACHB-912, which was bought from Institute Hydrobiology of Chinese Academy of Sciences, and made it in the logarithmic phase. The four concentrations of palmitic acid and stearic acid in the algal solutions were: 30 mg·L⁻¹, 60 mg·L⁻¹, 90 mg·L⁻¹ and 120 mg·L⁻¹. The experimental time was six days, and we measured $A_{650\text{nm}}$, chlorophyll a and phycocyanin of the alga every day. When the experiment was finished, we used SPSS (13.0 Version) and DPS (7.05 Version) to analyze the significant differences between the alga treated by the fatty acids and the control. The result showed that the four concentrations of the two saturated fatty acids could all inhibit the growth of the alga obviously. The higher the concentration, the obvious the inhibitory effect was found. Also, under the same concentration, the inhibitory effect of palmitic acid on the alga was more obvious than that of stearic acid. Our experiment also had two innovations: ①Because long-chain saturated fatty acids cannot be dissolved in water, we used ethanol to dissolve them. ②Because ethanol solution of long-chain saturated fatty acids cannot be sterilized by autoclaves, we used microfiltration membranes to sterilize the fatty acid solutions.

Key words: toxic *Microcystis aeruginosa*; fatty acids; inhibitory effect on alga