

两种大型海藻提取物对杜氏盐藻生长和代谢活性的促进作用

王婧一 蔡春尔 张颖 董傲 查敏俊 何培民

PROMOTIONAL EFFECTS OF TWO MACROALGAL EXTRACTS ON THE GROWTH AND METABOLIC ACTIVITY OF *DUNALIELLA SALINA*

WANG Jing-Yi, CAI Chun-Er, ZHANG Ying, DONG Ao, CHA Min-Jun, HE Pei-Min

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2024.2024.0030>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

不同品系杜氏藻的多相特征研究

STUDY ON POLYPHASIC CHARACTERISTICS OF DIFFERENT STRAINS OF *DUNALIELLA*

水生生物学报. 2021, 45(4): 925–934 <https://doi.org/10.7541/2021.2020.115>

日粮中添加桑叶提取物和1-脱氧野尻霉素对大鲵生长、消化、免疫能力和肠道菌群的影响

EFFECTS OF DIETARY MULBERRY LEAF EXTRACT AND 1-DEOXYNOJIRIMYCIN ON GROWTH, DIGESTION AND IMMUNITY CAPACITY, AND INTESTINAL MICROORGANISM OF CHINESE GIANT SALAMANDER (*ANDRIAS DAVIDIANUS*)

水生生物学报. 2021, 45(3): 582–592 <https://doi.org/10.7541/2021.2020.116>

溶藻细菌筛选及溶藻活性物质对铜绿微囊藻生理活性的影响

SCREENING OF ALGAE-LYSING BACTERIA AND THE EFFECTS OF ALGAELYSING ACTIVE SUBSTANCES ON THE PHYSIOLOGICAL ACTIVITIES OF *MICROCYSTIS AERUGINOSA*

水生生物学报. 2020, 44(3): 638–646 <https://doi.org/10.7541/2020.078>

棕鞭藻及其培养滤液对铜绿微囊藻生长及生理特性的影响

EFFECTS OF *OCHROMONAS* SP. CULTURE MEDIA FILTRATE ON THE GROWTH AND PHYSIOLOGICAL TRAITS OF *MICROCYSTIS AERUGINOSA*

水生生物学报. 2019, 43(1): 213–218 <https://doi.org/10.7541/2019.026>

蓖麻籽提取液对福寿螺毒杀效果及作用机制

TOXICITY OF *RICINUS COMMUNIS* SEED EXTRACT AND ITS MECHANISM ON *POMACEA CANALICULATA*

水生生物学报. 2021, 45(2): 284–291 <https://doi.org/10.7541/2021.2020.055>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2024.2024.0030

两种大型海藻提取物对杜氏盐藻生长和代谢活性的促进作用

王婧¹ 蔡春尔^{1,2} 张颖¹ 董傲¹ 查敏俊¹ 何培民^{1,2}

(1. 上海海洋大学海洋科学与生态环境学院, 上海 201306; 2. 上海海洋大学水域环境生态
上海高校工程研究中心, 上海 201306)

摘要: 实验选取绿潮藻提取物和铜藻提取物作为一种高经济价值藻——杜氏盐藻生长的营养添加剂, 与传统的f/2培养基相比, 探究两种大型海藻提取物对杜氏盐藻的生长和某些代谢活性(色素、碳水化合物、蛋白质、光合活性)的影响。藻类生理指标和营养成分分析表明, 不同浓度的藻华提取物对杜氏盐藻生长的促进效果显著。添加0.26%、0.31%、0.38%的绿潮藻提取物和添加0.24%的铜藻提取物均能够显著促进杜氏盐藻生物量增长、光合色素和营养物质的积累, 但对杜氏盐藻的最大光化学效率(F_v/F_m)和有效量子产量(Yield)无显著影响。研究表明, 一定浓度的绿潮藻提取物和铜藻提取物能够显著促进杜氏盐藻的生长和营养物质的积累, 该发现为藻华防控及利用大型藻华提取物来优化杜氏盐藻的生产提供了新的思路。

关键词: 绿潮藻提取物; 铜藻提取物; 营养添加剂; 杜氏盐藻; 培养基

中图分类号: Q938.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2024)08-1348-10



随着大型藻华的不断发生和对环境的影响日益严重, 大型藻华问题越来越受到全世界的关注。绿潮和金潮是典型的大型藻华。自2007年以来, 中国黄海海域的绿潮一直持续发生, 浒苔(*Ulva prolifera*)为主要优势种, 在2013年以后也发生了漂浮的金潮。在近期的野外调查中, 在黄海海域发现了越来越多的褐色海藻, 主要由铜藻(*Sargassum horneri*)组成。广泛漂流的铜藻甚至在春季侵入了西南的黄海, 与每年的绿潮共同发生, 并在最近几年形成了不寻常的双支藻华^[1]。两种大型藻华的暴发导致绿潮藻和铜藻的生物量剧增, 使生态系统失衡, 给当地造成巨大经济损失和环境损害。目前的藻华防控技术还不够完善, 但对引起藻华暴发的藻类进行资源化利用, 变藻华灾害为可持续开发资源, 能够减少其对当地所造成的经济损失并实现环境治理。

大量研究表明绿潮藻和铜藻等大型海藻因其资源和营养元素丰富已广泛应用于生物肥料等低

附加值农产品的生产^[2], 通过施用海藻肥减少化肥使用和提高化学肥料利用率的相关研究也越来越多。Shankar等^[3]研究表明, 施用海藻提取物后可显著提高芝麻对N、P、K元素的吸收能力, 使芝麻增产。Singh等^[4]对小麦和水稻喷施海藻提取物, 在化肥施用量减少50%的条件下, 可获得与化肥施用量100%条件下相当的产量。他们认为通过喷施海藻提取物可以弥补因化肥减量而造成作物减产的损失, 因此可实现减少化肥施用量的目标。王明鹏^[5]的实验表明对番茄施用铜藻发酵液后, 在化肥减量25%的条件下, 可维持番茄不减产, 相比化肥施用量100%的处理甚至还有小幅度增产。基于大量研究, 国内外海藻肥产品的发展规模不断扩大, 大多由公牛藻(*Durvillaea antarctica*)、巨藻(*Macrocystis pyrifera*)、泡液藻(*Ascophyllum nodosum*)为原料生产。但与国外海藻肥企业相比, 我国海藻精深加工技术相对落后, 自主创新能力薄弱, 缺乏科技创新

收稿日期: 2024-01-25; 修订日期: 2024-04-08

基金项目: 国家重点研发计划重点专项(2022YFC2601303); 自然资源部海洋生态监测与修复技术重点实验室课题(MATHAB201817)资助 [Supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFC2601303); Key Laboratory of Marine Ecological Monitoring and Restoration Technologies, MNR (MATHAB201817)]

作者简介: 王婧(1998—), 女, 硕士研究生; 主要从事大型海藻资源化利用以及海洋生物学与活性物质的研究。E-mail: 18145664756@163.com

通信作者: 蔡春尔(1980—), 男, 博士, 高级实验师; 主要从事大型海藻资源化利用以及海洋生物学与活性物质的研究。E-mail: cecai@shou.edu.cn

能力和高附加值的产品。因此, 开发高效、节能、环保的海藻肥生产新工艺, 是使我国海藻肥行业健康有序发展的迫切需求。

杜氏盐藻(*Dunaliella salina*)是一种具有高耐盐性和极端环境适应性的微藻, 也是天然 β -胡萝卜素的重要来源, 在日化品、医药、保健品等领域具有重大开发价值^[6]。对杜氏盐藻的培养一般使用化学培养基f/2, 大多由实验室配制, 经济成本相对较高; 或通过调整培养基的碳源、氮源、磷源等促进杜氏盐藻生长和生物质的积累, 不仅效果甚微且造成了一定的环境污染^[7]。对养殖微藻的培养基配方进行改良对微藻培养产业是尤为重要的。而研究表明, 海藻提取物富含生长促进因子, 如微量元素、有机质、维生素和脂肪酸等, 可作为高附加值微藻培养基的营养添加剂^[8]。也有研究使用特定单一海藻萃取液作微藻培养基添加剂, 如Cho等^[9]在球等边金藻(*Isochrysis galbana*)培养基中加入1 mg/mL的礁膜(绿藻门植物)水提液可使球等边金藻的细胞密度提高2倍, 生长率由52%提高到65%。Kaladharan等^[10]发现在纤细四片藻(*Tetraselmis gracilis*)、纤细角毛藻(*Chaetoceros calcitrans*)培养基中添加海莴苣(*Ulva lactuca*)提取物可使藻细胞的生长率增加250%—325%。采用直接打捞的绿海藻和铜藻制备海藻提取物作为杜氏盐藻培养基的营养添加剂, 操作简单且环保, 并可大大降低成本。

因此, 本研究直接使用大型海藻提取物作为天然、低成本的培养基营养添加剂, 与传统的f/2培养基相比, 对杜氏盐藻的生长和某些代谢活性(色素、碳水化合物、蛋白质、光合)的影响, 旨在为藻华防控和微藻养殖提供新思路 and 科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

绿潮藻于2022年7月采自江苏大丰海域, 烘干后阴凉干燥处存放。铜藻于2022年1月采自浙江枸杞岛, 烘干后阴凉干燥处存放。杜氏盐藻藻种购自中国科学院水生生物研究所, 经分子鉴定为杜氏盐藻(*Dunaliella salina*)。

1.2 实验方法

海藻提取物的制备 绿潮藻粉和铜藻粉的制备: 称取干绿潮藻和干铜藻用高速多功能捣碎机(皇代800Y, 永康市铂欧五金制品有限公司)捣碎30s, 过CR不锈钢标准筛(筛号22孔, 边长0.850 mm, 上海宜昌仪器筛厂), 筛粉常温保存备用。

亚临界水提法制备绿潮藻粉水提物和铜藻粉水提物 称取绿潮藻粉和铜藻粉各25 g, 按1:10 (g/

mL)加蒸馏水250 mL, 在立式高压蒸汽灭菌器(LDZM-60L- I, 上海申安)中121℃下103.4 kPa处理15min, 冷却至室温后, 用台式高速冷冻离心机(5810R, Eppendorf Co.) 10000×g, 4℃离心10min得到粗提取液。

杜氏盐藻的培养 取生长至对数期的杜氏盐藻藻液为藻种进行液体培养, 海水与藻种按3:1 (v/v)比例无菌接种于250 mL锥形瓶中, 培养基100 mL, 置于恒温摇床中摇瓶培养。摇床培养条件设置为温度(25±3)℃, 光照强度为(65±2) $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 光暗比为12h:12h培养期为15d。

初始培养基为海水f/2培养基, 实验所用培养基均用90%海水所配制, 间隔7d扩培1次。

实验设计 (1)选用初始的f/2培养基, 设置添加不同量的绿潮藻提取物为杜氏盐藻的培养基营养添加剂, 至其终浓度为0.26%、0.31%、0.38%和0.45%, 对照组仅为f/2培养基, 控制温度和光照等其他条件一致, 每组设定3个重复, 于接种24h后(设为第1天)测定藻液各类指标。

(2)选用初始的f/2培养基, 设置添加不同量的铜藻提取物为杜氏盐藻的培养基营养添加剂, 至其终浓度为0.05%、0.10%、0.18%和0.24%, 对照组仅为f/2培养基, 控制相同温度和光照等其他条件一致, 每组设定3个重复。

杜氏盐藻最佳吸收波长的测定 取3 mL生长于对数期的杜氏盐藻于玻璃比色皿中, 以f/2培养基为对照, 于紫外可见分光光度计下进行全波长扫描, 波长范围为500—750 nm, 确定杜氏盐藻的最佳吸收波长, 以作为杜氏盐藻生物量增长的一种指标。

杜氏盐藻生物量测定方法 利用血细胞计数板计数法对杜氏盐藻细胞进行计数, 作出OD₆₈₄值和细胞个数的关系图。采用吸光度法测定微藻生物量, 根据方程式换算出该吸光度下杜氏盐藻的细胞密度, 因此可以将OD₆₈₄值作为衡量细胞生物量或生长密度的指标。

杜氏盐藻藻液中叶绿素a、b及 β -胡萝卜素含量的测定 取接种24h后的藻液各1.5 mL, 6000 r/min离心, 弃去上清液, 加入1.5 mL 95%乙醇溶液, 震荡破碎后黑暗4℃静置24h, 于分光光度计上读取665、649和450 nm的吸光值, 根据公式计算叶绿素a、叶绿素b、叶绿素总含量及 β -胡萝卜素的含量。公式如下:

$$\beta = \frac{A_{450} \times V \times f \times 10^3}{2500} \quad (1)$$

式中, β 为 β -胡萝卜素的含量(mg/L); V 为提取液的体

积(mL); f 为稀释倍数; 2500为 β -胡萝卜素的换算系数

$$\text{叶绿素}a\text{含量(mg/L)} = 13.95 \times \Delta 665 - 6.88 \times \Delta 649 \quad (2)$$

$$\text{叶绿素}b\text{含量(mg/L)} = 24.96 \times \Delta 649 - 7.32 \times \Delta 665 \quad (3)$$

总糖和总蛋白的含量的测定 总糖的测定采用苯酚硫酸法, 总蛋白含量的测定采用BCA法。具体操作方法: 取5 mL藻液于4000 r/min离心15min, 弃上清, 纯水定容至5 mL, 摇匀。超声破碎10min, 再次离心, 取0.05 mL上清液于试管中, 加入0.25 mL 6%苯酚溶液和1.25 mL浓硫酸, 静置10min后摇匀, 室温放置20min后于490 nm下测定其吸光值, 根据已知浓度的葡聚糖标准溶液测定的糖标准曲线计算各组总糖含量。另取20 μ L藻液于96孔板中, 后加入BCA工作液, 37℃放置30min后于562 nm下测定其吸光值, 根据已知浓度的蛋白质标准溶液测定的蛋白质标准曲线计算各组蛋白质含量。

叶绿素荧光参数的测定 采用PHYTO-PAM荧光分析仪(Walz, 德国)测定叶绿素荧光参数, 3天1次, 每次暗适应15min后测定光合诱导曲线, 记录最大光化学效率(F_v/F_m)和有效量子产量(Yield)。最大光能转换效率(F_v/F_m)表示藻体光系统II(PS II)反应中心处于开放时的最大量子产率即能量捕获效率。有效量子产量(Yield)表示藻体光合量子产额, 两种指标均通过反映光能转化效率来反映杜氏盐藻细胞的生长情况和光合生理活性。

1.3 数据分析

实验数据采用SPSS 26.0进行独立样本 t 检验作显著性分析。使用 Graph-Pad Prism 8软件绘制图表。以 $*P<0.05$ 和 $**P<0.01$ 为差异显著性的标准。

2 结果

2.1 杜氏盐藻最佳吸收波长的确定

对生长至对数期的杜氏盐藻在550—750 nm波长内利用紫外可见分光光度计进行图谱扫描(图1)。杜氏盐藻的细胞内含有大量的类胡萝卜素, 与叶绿素共同起到吸收光能的作用。全波长扫描发现杜氏盐藻的特征吸收峰在684 nm处, 故选择684 nm用于后续藻液吸光度的测定, 反映其生物量大小。

2.2 杜氏盐藻生物量的测定

杜氏盐藻细胞密度和吸光度 A_{684} 之间的关系可以用方程 $Y=5.6044X+0.1026$ 表示, 式中 Y 代表1 mL藻液中的细胞数量, X 代表吸光值大小, R^2 为相关系数。后续可根据此方程计算某吸光度下藻细胞数量从而反映其生物量(图2)。

2.3 添加绿潮藻粉水提液对杜氏盐藻生物量的影响

在不同浓度不同种类海藻提取液的作用下, 杜氏盐藻生物量随时间变化如图3和图4所示。在培养期内, 杜氏盐藻的生物量均呈现先增长后降低的趋势, 且各组杜氏盐藻在6—8d增长速率均最快, 这与单细胞藻的生长模式一致。如图3所示, 施加不同浓度的绿潮藻提取物对杜氏盐藻生物量均有显著促进作用; 在培养中后期, 0.38% 绿潮藻提取物对杜氏盐藻生物量的促进效果最佳。如图4所显示, 施加较低浓度的铜藻提取物均不能显著促进杜氏盐藻生物量提升, 施加0.18%和0.24% 铜藻提取物均可极显著促进杜氏盐藻生物量增加($P<0.01$)。

2.4 添加绿潮藻粉水提液和铜藻粉水提液对杜氏盐藻光合活性的影响

杜氏盐藻光合色素的变化 在不同浓度不同种类海藻提取液的作用下, 杜氏盐藻光合色素含量随时间变化如图5和图6所示。结果显示, 对照组中杜氏盐藻的叶绿素 a 、叶绿素 b 和 β -胡萝卜素的含量均较低。施加不同浓度的绿潮藻提取物, 前3d内杜氏盐藻藻液中叶绿素 a 含量、叶绿素 b 含量和 β -胡萝卜素的含量相比于对照组均无显著性差异(图5; $P>0.05$); 在同一天内与对照组相比, 4—15d内, 0.26%绿潮藻提取物和0.31%绿潮藻提取物浓度分别作用下杜氏盐藻的光合色素均有显著增加(图5; $P<0.05$; $P<0.01$); 而0.38% 绿潮藻提取物和

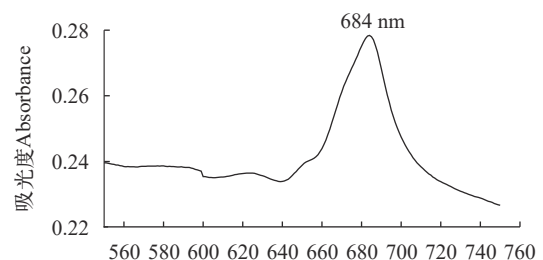


图1 杜氏盐藻全波长扫描

Fig. 1 The full wavelength scanning of *Dunaliella salina*

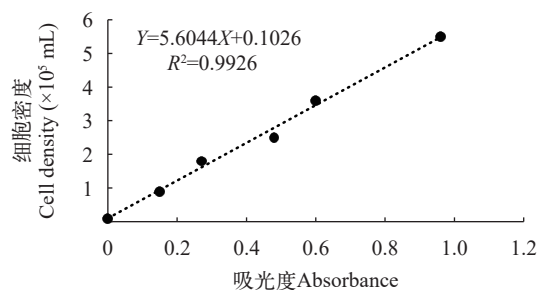


图2 杜氏盐藻细胞密度与吸光度 A_{684} 的关系

Fig. 2 Relationship between cell density and A_{684} of *Dunaliella salina*

0.45%绿潮藻提取物浓度分别作用下杜氏盐藻藻液中光合色素在7d后有显著增加(图5)。此外,在8—10d内,0.26%绿潮藻提取物和0.38%绿潮藻提取物浓度分别作用下杜氏盐藻的 β -胡萝卜素增长量最大,其浓度相比于对照组分别提高了约17.6%和29.8%。因此,添加不同浓度的浒苔水粉提取液均在一定程度上促进了杜氏盐藻光合色素的积累,在0.38%绿潮藻提取物作用下,其促进效果均优于其他3个梯度(图5c)。

施加0.05%浓度的铜藻提取物对杜氏盐藻光合色素的含量均无显著性作用,在同一天内与对照组相比,从第7天开始,施加0.18%和0.24%铜藻提取

物对杜氏盐藻叶绿素 a 含量的促进效果显著;从第4天开始,施加0.18%和0.24%铜藻提取物显著促进杜氏盐藻 β -胡萝卜素的积累(图6)。对叶绿素 b 含量而言,施加0.24%铜藻提取物后,从第4天开始,其含量显著增加,其余浓度对其均无显著促进效果。综上,我们认为添加一定浓度的绿潮藻提取物对杜氏盐藻光合色素的积累效果优于添加铜藻提取物对其作用效果。

杜氏盐藻光合荧光参数的变化 在正常的生理状态下,绝大多数的杜氏盐藻的 F_v/F_m 值在0.6—0.7,在培养后期即藻体生长的衰退期由于遭受胁迫,使藻体的 F_v/F_m 值低于0.6。如图7和图8所

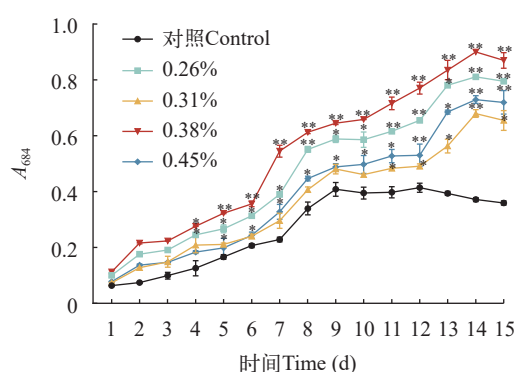


图3 施加绿潮藻粉水提物15d内杜氏盐藻的OD值在684 nm下的变化情况

Fig. 3 Changes in OD of *Dunaliella salina* at 684 nm during 15d of aqueous extract application of green tide algae

标准误差柱顶部的符号表示对照组和实验组数据之间差异的显著性。“*”代表差异显著($P<0.05$),“**”代表差异极显著($P<0.01$);下同

Symbols on the top of standard error bars indicate the significant differences between data for control and experimental group. “*” represent significant difference ($P<0.05$), “**” represent highly significant difference ($P<0.01$). The same applies below

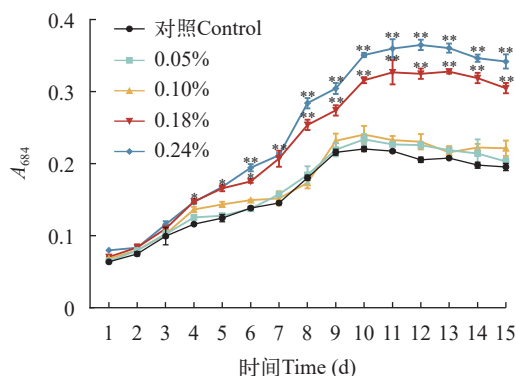


图4 施加铜藻粉水提物15d内杜氏盐藻的OD值在684 nm下的变化情况

Fig. 4 Changes in OD of *Dunaliella salina* at 684 nm during 15d of aqueous extract application of *Sargassum horneri*

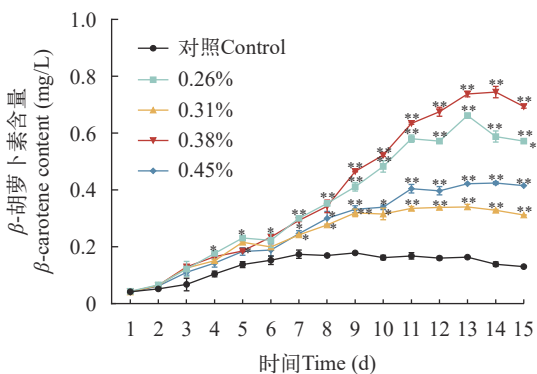
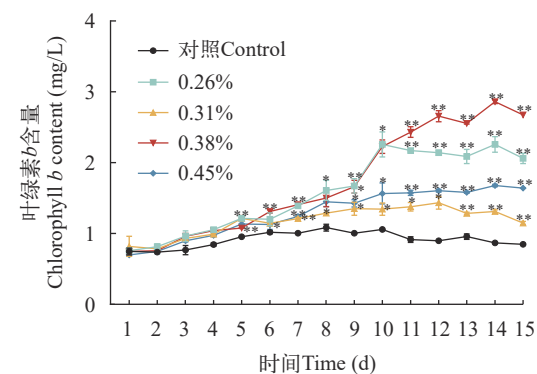
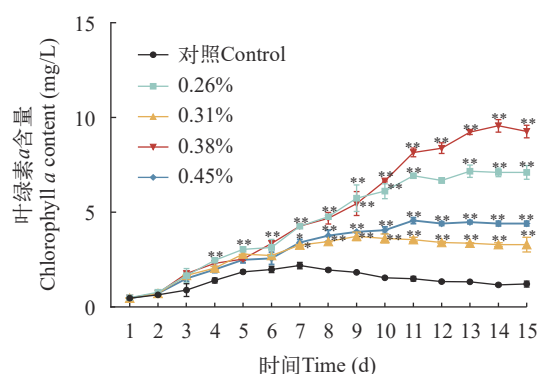


图5 施加绿潮藻粉水提物15d内盐藻藻液中的叶绿素 a 、叶绿素 b 和 β -胡萝卜素含量的变化情况

Fig. 5 Changes in chlorophyll a , chlorophyll b and β -carotene contents of *Dunaliella salina* algal solution within 15d of aqueous extracts application of green tide algae

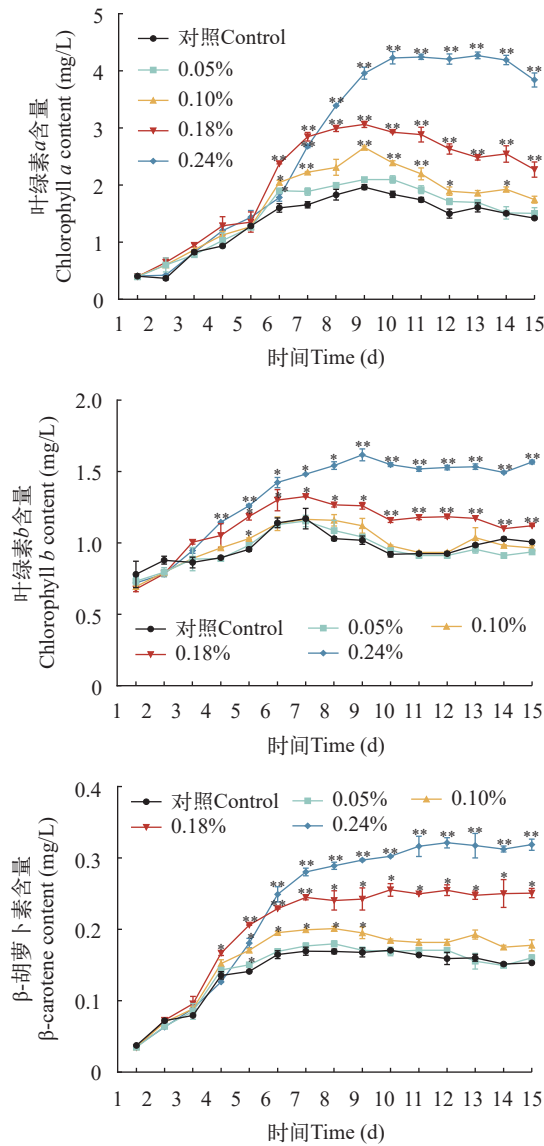


图6 施加铜藻粉水提物15d内盐藻藻液中的叶绿素a、叶绿素b和β-胡萝卜素含量的变化情况

Fig. 6 Changes in chlorophyll a, chlorophyll b, and β-carotene content of *Dunaliella salina* algal solution during 15d of aqueous extracts application of *Sargassum horneri*

示,在整个培养期内,对照组与施加绿潮藻提取物和铜藻提取物后的杜氏盐藻其最大光化学效率均呈现先平稳后缓慢下降的趋势,与正常藻体的生长曲线相符。在同一天内与对照组相比较,在培养13d和15d时,施加0.38%绿潮藻提取物均显著降低了杜氏盐藻的 F_v/F_m 值,在培养11d时,施加0.24%铜藻提取物均显著降低了杜氏盐藻的 F_v/F_m 值。对应图2和图3其各自生物量的变化可推测这3d内杜氏盐藻种群密度增加,藻群内因竞争营养盐或光照等无机环境因素而发生种内斗争,导致藻细胞光合活性降低。

杜氏盐藻营养物质含量的变化 施加不同

浓度不同种类的海藻提取液,杜氏盐藻的可溶性蛋白含量和总糖含量如图9和图10所示。培养3d,不同浓度的海藻提取物作用下可溶性蛋白含量相比于对照组呈上升趋势,其中0.26%和0.38%绿潮藻提取物作用下,与对照组相比杜氏盐藻藻体内可溶性蛋白含量和多糖含量均极显著增加($P<0.01$)。如图10所示,施加铜藻提取物的各组杜氏盐藻的总糖含量和可溶性蛋白含量随施加铜藻提取物浓度的增加而增加,其中0.24%作用下,藻细胞内两种营养物质增加显著($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 大型海藻提取物对杜氏盐藻的促生长分析

本研究分别选取绿潮藻提取物和铜藻提取物作为杜氏盐藻培养基的营养添加剂展开实验。接种4d后,与传统f/2培养基相比,添加不同浓度的两种海藻提取物均能显著促进杜氏盐藻的生长。这也与Mohamed等^[1]的研究结果一致。在绿潮藻提取物和铜藻提取物的作用下,杜氏盐藻的生物量、光合色素含量和营养物质含量出现成倍增加。对比绿潮藻提取物和铜藻提取物对杜氏盐藻的促生

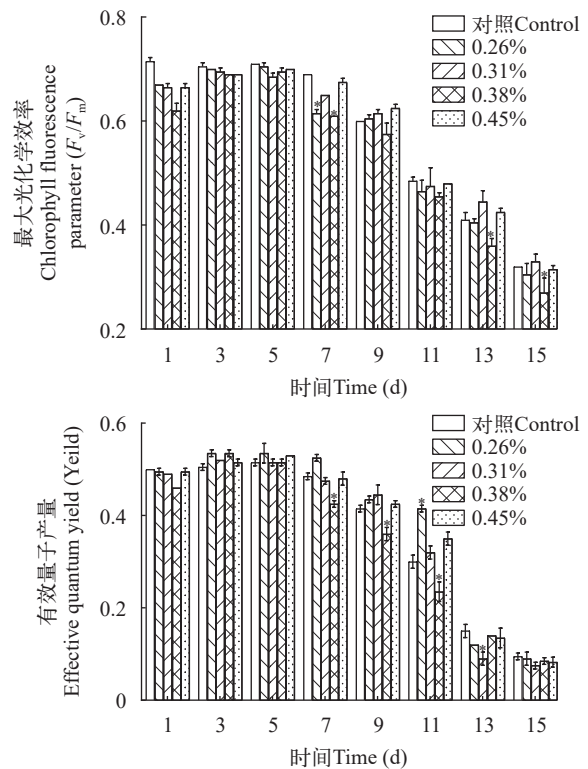


图7 添加绿潮藻粉水提物后15d内杜氏盐藻最大光化学效率(F_v/F_m)和有效量子产量(Yeild)的变化情况

Fig. 7 Changes in Maximum photochemical efficiency (F_v/F_m), and effective quantum yield (Yeild), of *Dunaliella salina* during 15d after aqueous extract addition of green tide algae

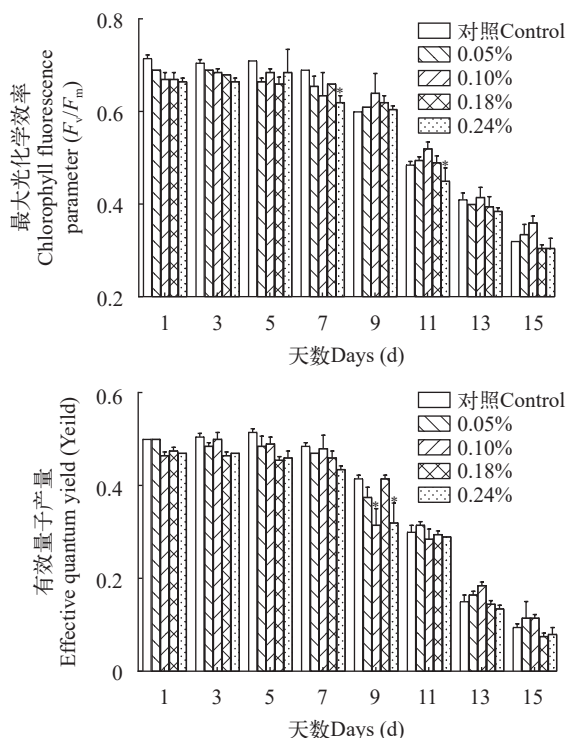


图8 施加铜藻粉水提物后15d内杜氏盐藻最大光化学效率(F_v/F_m)和有效量子产量(Yeild)的变化情况

Fig. 8 Changes in Maximum photochemical efficiency (F_v/F_m), and effective quantum yield (Yeild) of *Dunaliella salina* during 15d after aqueous extract addition of *Sargassum horneri*

长效果, 添加绿潮藻提取物和铜藻提取物后杜氏盐藻的生物量分别最多提高2倍和1.5倍, 叶绿素 a 的含量分别最多提高10倍和4倍, 叶绿素 b 的含量分别最多提高2倍和4倍, β -胡萝卜素的含量分别最多提高4倍和1倍。其中杜氏盐藻生物量的增长可以归因于两种海藻提取物所提供的营养物质或促生长物质的存在, 如细胞分裂素或生长素, 已知它们在各种海藻中均以较高的水平出现^[12]。叶绿素的增加可能与海藻提取物中丰富的矿质离子 Mg^{2+} 和各种植物激素有关。研究表明, Mg^{2+} 可加速叶绿素的合成, 一些植物激素如脱落酸(ABA)、生长素(IAA)等, 可参与藻细胞 β -胡萝卜素的内源调控和合成^[13], 而不同浓度和不同种类的海藻提取物其作用强度均有所差异。在本实验中, 添加绿潮藻提取物对杜氏盐藻生长的促进效果优于添加铜藻提取物对杜氏盐藻的促进效果。Mohamed等^[11]在盐藻培养基中添加5 mg/mL的缘管浒苔提取物(*U.linza*)和马尾藻提取物, 结果显示与传统f/2培养基培养相比, 添加缘管浒苔提取物对杜氏盐藻细胞的促进效果优于添加马尾藻提取物的促进效果, 藻细胞的生物量分别提高了约1.5倍和1倍。才金玲等^[14]改变杜氏盐藻培养基的碳源、氮源、磷源及各种矿质离子, 结

果显示与对照组相比, 杜氏盐藻的细胞密度最高增加1倍。本实验显示的促进效果均优于以上文献报道, 并通过多指标表征显著性结果。

3.2 大型海藻提取物对杜氏盐藻的生理响应分析

据报道, 大型海藻提取物不仅富含多糖、甘油、常量元素(氮、磷、钾、钙、镁和硫), 而且富含微量元素和植物激素, 如细胞分裂素、生长素、脱落酸、赤霉素、水杨酸、乙烯等生物活性化合物^[15]。如Jieun等^[16]在浒苔(*Ulva prolifera*)和昆布(*Ecklonia radialis*)等海藻中检测到赤霉素的存在; Fatemeh^[17]检测到石莼(*Ulva lactuca*)提取物中存在乙烯和细胞分裂素。海藻提取物中有几种化合物被鉴定为促进植物生长的物质, 如氨基酸和维生素具有类激素活性的物质^[18]。

据图9和图10所示, 添加不同浓度的绿潮藻提取物和铜藻提取物均会显著促进杜氏盐藻营养物质的积累。这可能与藻细胞内部的调控机理有关。碳水化合物和蛋白质的增加可能归因于海藻提取物中的生物代谢产物, 它们能够在促进蛋白质生物合成、促进酶活性或膜通透性方面发挥主要作用^[19]。研究表明, 藻类提取物促进生长的潜力也是可溶性糖、氨基酸和矿质元素共同作用的结果,

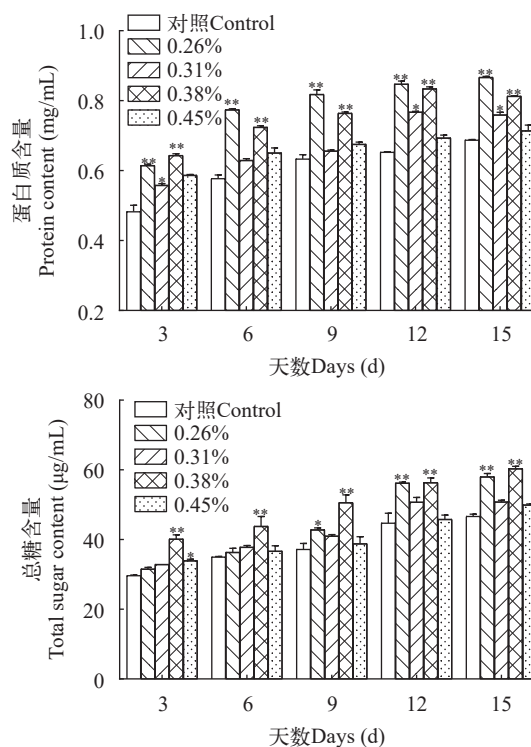


图9 施加绿潮藻粉水提物后15d内盐藻藻液中总糖含量和可溶性蛋白质含量的变化

Fig. 9 Changes in total sugar content and soluble protein content of *Dunaliella salina* algal solution during 15d after aqueous extracts application of green tide algae

主要与多种多糖的存在相关, 已知碳水化合物在渗透调节中发挥重要作用, 并以类似于激素的方式促进植物生长, 也可能通过影响氮同化和基础代谢来控制植物生长^[20]。研究表明, 褐藻寡糖通过褐藻胶裂解酶裂解而来, 而褐藻胶广泛存在于各种褐藻中, 如海带、铜藻的细胞壁中含有大量的褐藻胶^[21], 褐藻中所含的褐藻寡糖可以作为中间代谢和有效信号分子的直接受体参与藻体生长调控的多种信号通路和转导以缓解非生物胁迫对植物造成的损害^[22]。对比绿潮藻提取物和铜藻提取物的作用结果发现, 施加绿潮藻提取物的促进效果优于铜藻提取物, 可能与两种水提液中各种具生物活性的化合物的种类及其参与藻细胞的内源作用机制相关^[23]。

添加不同浓度的绿潮藻提取物均能显著促进杜氏盐藻光合色素的积累, 添加高浓度铜藻提取物显著促进叶绿素 a 和 β -胡萝卜素的积累, 但添加较低浓度的铜藻提取物并未对藻细胞光合色素的含量有显著影响, 可能因为低浓度铜藻提取物中促生长因子的量未能对杜氏盐藻起作用。叶绿素含量的增加可能是叶绿素降解减少的结果, 推测部分原因是由海藻提取物中的甜菜碱引起的^[24]。有研究表明, 甜菜碱广泛存在于各种海藻提取物中, 甜菜

碱在低浓度时可作为氮源, 而在高浓度时可作为渗透剂, 在植物中可引发许多与细胞分裂素相似的反应^[25]。Boukhari等^[26]对浒苔提取物进行组分分离, 生化分析表明, 其粗提物中甜菜碱含量最高, 有效促进番茄的生长; Yakhin等^[27]发现添加海藻提取物后植物叶绿素含量的提高也可能归因于海藻提取物中的甜菜碱。值得注意的是, 添加铜藻提取物并没有显著促进藻细胞叶绿素 b 的积累, 推测可能与光合色素的稳定性相关。光合色素的稳定性由大到小依次为 β -胡萝卜素>叶绿素 a >叶绿素 b 。铜藻提取物中甜菜碱的作用不足以减缓不稳定的叶绿素 b 的降解, 导致叶绿素 b 的降解速率大于其合成速率。此外, 叶绿素含量的增加还可能与丰富的镁等元素有关^[28]。Omar等^[29]的测试结果显示, 曲浒苔(*Ulva flexuosa*)提取物水提液中 Mg^{2+} 含量较高, 镁元素在叶绿素色素的组织中起着重要作用。Ramya等^[30]还认为细胞分裂素是叶绿素生物合成中的一种基本促生长元素, 在植物生长中起着促进作用。El-Sheekh等^[31]在石莼(*Ulva lactuca*)等3种绿藻中均检测出细胞分裂素, 并认为它是促进蚕豆蛋白质含量、可溶性糖含量及叶绿素含量的生长因子。

在生长至7d—13d时, 添加0.38% 绿潮藻提取物和添加0.26%铜藻提取物的杜氏盐藻的 F_v/F_m 值和Yeild值有所降低, 表明藻细胞光合作用强度减弱。可能因为在整个培养期内, 随培养天数的增加, 各组培养基中营养盐含量随藻细胞密度的增加逐渐减少, 藻种内因空间、营养盐等非生物因素竞争生态位, 藻细胞会遵循能量分配原则将更多的能量分配给生存, 导致光合作用强度减弱^[32]。此外, 随藻细胞密度的增加, 上层藻细胞占据有效的捕光位置, 而中下层藻细胞受光不均匀, 导致光系统捕光减弱, 光能转化效率随之降低, 光合作用减弱。与此同时, 藻细胞内 β -胡萝卜素增加以抵抗逆境胁迫。有报道称杜氏盐藻在遭遇非生物环境胁迫时通过上调其 β -胡萝卜素合成相关基因的表达量而增强自身抗逆性^[33]。Christaki等^[34]也报道类胡萝卜素可以通过不同的防御机制, 通过减少活性氧(ROS)诱导的伤害来保护植物细胞免受有害的氧化应激。但是, Ibrahim等^[35]将这种生长模式解释为浒苔提取物中存在的抗坏血酸、脯氨酸和谷胱甘肽, 它们可能在激活抗氧化酶中发挥作用, 在逆境植物中降低ROS水平。 β -胡萝卜素因其特殊的生物活性在食品、日化品、医药和保健品等行业具有极高的应用价值^[36]。利用杜氏盐藻生产 β -胡萝卜素培养简单迅速, 易于操作, 且杜氏盐藻为单细胞藻类, 本身无刚性细胞壁, 易于建立 β -胡萝卜素高效

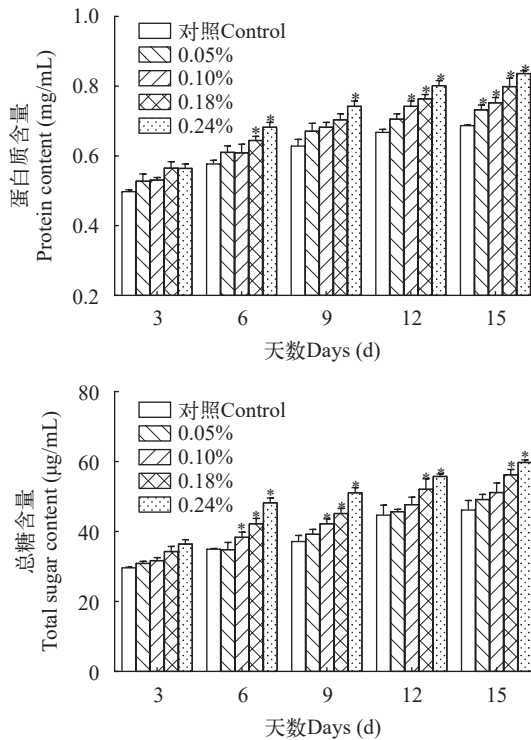


图 10 施加铜藻粉水提取物后15d内盐藻藻液中总糖含量和蛋白质含量的变化

Fig. 10 Changes in total sugar content and protein content of *Dunaliella salina* algal solution within 15d after aqueous extract application of *Sargassum horneri*

提取工艺。利用海藻提取物建立新型杜氏盐藻培养体系有助于 β -胡萝卜素的产出, 为后续应用提供新思路。

3.3 大型海藻提取物对培养杜氏盐藻的优势及其应用潜力分析

随着温度上升及富营养化, 黄海绿潮规模越来越大。据江苏省自然资源和生态环境处统计, 2023年江苏省共计打捞绿藻近4万吨, 是2022年打捞量的4倍。自绿潮暴发以来, 绿潮藻中一直夹杂着漂浮的马尾藻, 且其所占比例逐年上升。富含活性物质的绿潮藻和褐藻的生物资源依然巨大, 通过科学实践变藻华灾害为可持续开发资源具有发展前景。本研究认为, 绿潮藻和铜藻提取物可作为杜氏盐藻培养基的营养添加剂促进杜氏盐藻生长, 也有大量学者对海藻提取物促进其他淡水藻类和陆生植物展开研究, 还有各种海藻生物物质产品已得到推广, 但其处理都需对打捞的海藻进行去盐漂洗, 成本较高。鉴于杜氏盐藻生长的高盐环境, 在制备海藻提取物时无需对打捞的海藻进行去盐漂洗, 极大降低了应用成本。相比于昂贵且有污染性的化学培养基, 采用海量的低成本海藻提取物作为杜氏盐藻培养基的营养添加剂促进杜氏盐藻生长, 在环保的同时既减缓了海洋灾害又为杜氏盐藻的进一步应用提供了新的可能性。

研究表明, 绿藻和铜藻富含生物活性成分, 如多糖、多酚、蛋白质等, 具抗菌、抗氧化、抗过敏等^[37]功效。本研究中得出海藻提取物也有作为杜氏盐藻促生长的营养添加剂的特殊优势。且杜氏盐藻是极具高附加值的微藻之一, 不仅具有极端耐受性, 同时凭借其高碳水化合物含量和高产 β -胡萝卜素可作为日化品和医药的功能性原料, 是目前公认的具有独特经济价值的高附加值微藻^[38]。因此, 寻找一种能够促进杜氏盐藻营养物质积累的有效方式能够为杜氏盐藻的应用市场提供更多可能性。且将处理后的海藻提取物作为杜氏盐藻生长的营养添加剂与杜氏盐藻进行混合培养得到新的具有叠加功效的复合产品极具应用潜力。

4 结论

本研究利用绿潮藻提取物和铜藻提取物作为杜氏盐藻培养基的营养添加剂, 促进了杜氏盐藻细胞密度、光合色素的增加及营养物质的积累。这两种藻华提取物能够为微藻生长提供必要的营养物质, 并可作为一种经济有效的培养基添加剂用于微藻培养。此外, 后续还可以探索多种藻华提取物的复合培养基及利用藻华提取物作替代培养基对

杜氏盐藻的功效, 为微藻养殖业的发展和藻华灾害的防控提供更优解。

(作者声明本文符合出版伦理要求)

参考文献:

- [1] Xiao J, Wang Z, Liu D, *et al.* Harmful macroalgal blooms (HMBs) in China's coastal water: green and golden tides [J]. *Harmful Algae*, 2021(107): 102061.
- [2] Liu J J, Dickson R, Niaz H, *et al.* Production of fuels and chemicals from macroalgal biomass: current status, potentials, challenges, and prospects [J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2022(169): 112954.
- [3] Shankar T, Malik G C, Banerjee M, *et al.* Effect of seaweed extracts on the growth, yield attribute and nutrient uptake of sesame (*Sesamum indicum* L.) [J]. *International Journal of Bio-resource and Stress Management*, 2015, 6(3): 420.
- [4] Singh S K, Thakur R, Singh M K, *et al.* Effect of fertilizer level and seaweed sap on productivity and profitability of rice (*Oryza sativa*) [J]. *Indian Journal of Agronomy*, 2015, 60(3): 420-425.
- [5] Wang M P. Research on fermentation technology of *Sargassum horneri* based on alginate-degrading and agricultural effects of fermentation product [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2017: 34-39. [王明鹏. 基于褐藻酸降解的铜藻发酵提取技术及其产物农用功效研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2017: 34-39.]
- [6] Arun N, Singh, D. P. A review on pharmacological applications of halophilic alga *Dunaliella* [J]. *Indian Journal of Marine Sciences*, 2016, 45(3): 440-447.
- [7] Zhang Z X. Optimization of culture conditions and harvesting of *Dunaliella salina* [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2022: 27-34. [张鑫志. 杜氏盐藻的培养条件优化及采收 [D]. 天津科技大学, 2022: 27-34.]
- [8] Hurtado A Q, Critchley A T. Time for applications of biostimulants in phyconomy: seaweed Extracts for Enhanced Cultivation of Seaweeds (SEECs) [M]. Sustainable Seaweed Technologies. Amsterdam: Elsevier, 2020: 103-127.
- [9] Cho J Y, Jin H J, Lim H J, *et al.* Growth activation of the microalga *Isochrysis galbana* by the aqueous extract of the seaweed *Monostroma nitidum* [J]. *Journal of Applied Phycology*, 1998, 10(6): 561-567.
- [10] Kaladharan P, Gireesh R, Smitha K S. Cost effective medium for the laboratory culture of live feed micro algae [J]. *Seaweed Research & Utilisation*, 2002, 24(1): 35-40.
- [11] Abdel-Kareem M S, Mohy El Din S M, Ibrahim E S M. Optimization of growth conditions and biochemical composition of *Microchloropsis salina*, cultured with three macroalgal aqueous extracts [J]. *Thalassas: An International Journal of Marine Sciences*, 2020, 36(2): 415-429.
- [12] Paulert R, Ascrizzi R, Malatesta S, *et al.* *Ulva intestinalis*

- Extract acts as biostimulant and modulates metabolites and hormone balance in basil (*Ocimum basilicum* L.) and parsley (*Petroselinum crispum* L.) [J]. *Plants*, 2021, **10**(7): 1391.
- [13] Rana V S, Sharma V, Sharma S, *et al.* Seaweed extract as a biostimulant agent to enhance the fruit growth, yield, and quality of kiwifruit [J]. *Horticulturae*, 2023, **9**(4): 432.
- [14] Cai J L, Liu J, Wang Y, *et al.* Culture condition optimization of *Dunaliella salina* utilizing seawater from Bohai Bay [J]. *Journal of Salt Science and Chemical Industry*, 2022, **51**(12): 28-37. [才金玲, 刘洁, 王雨, 等. 渤海湾海水养殖杜氏盐藻培养条件优化 [J]. *盐科学与化工*, 2022, **51**(12): 28-37.]
- [15] Karthik T, Jayasri M A. Systematic study on the effect of seaweed fertilizer on the growth and yield of *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek (Mung bean) [J]. *Journal of Agriculture and Food Research*, 2023(14): 100748.
- [16] Seo J, Lee J G, Kang B C, *et al.* Indole-3-acetic acid, a hormone potentially involved in chilling-induced seed browning of pepper (*Capsicum annuum* L.) fruit during cold storage [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2023(199): 112299.
- [17] Ghaderiardakani F, Collas E, Damiano D K, *et al.* Effects of green seaweed extract on *Arabidopsis* early development suggest roles for hormone signalling in plant responses to algal fertilisers [J]. *Scientific Reports*, 2019, **9**(1): 1983.
- [18] El Khattabi O, El Hasnaoui S, Toura M, *et al.* Seaweed extracts as promising biostimulants for enhancing lead tolerance and accumulation in tomato (*Solanum lycopersicum*) [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2023, **35**(1): 459-469.
- [19] Naskar S, Biswas G, Kumar P, *et al.* The green seaweed, *Enteromorpha intestinalis*: an efficient inorganic extractive species for environmental remediation and improved performances of fed species in brackishwater integrated multi-trophic aquaculture (BIMTA) system [J]. *Aquaculture*, 2023(569): 739359.
- [20] Stirk W A, Arthur G D, Lourens A F, *et al.* Changes in cytokinin and auxin concentrations in seaweed concentrates when stored at an elevated temperature [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2004, **16**(1): 31-39.
- [21] Li L, Ning L M, Yao Z, *et al.* Research progress of alginate polysaccharide molecular modifying enzymes [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2023, **42**(1): 18-39. [李丽, 宁利敏, 姚忠, 等. 褐藻胶多糖分子修饰酶的研究进展 [J]. *食品与生物技术学报*, 2023, **42**(1): 18-39.]
- [22] Bai N R, Banu N R L, Prakash J W, *et al.* Effect of *Sargassum wightii* extract (SLF) on the growth and yield of *Phaseolus aureus* L [J]. *Plant Archives*, 2007, **7**(2): 621-624.
- [23] Ashour M, Mabrouk M M, Ayoub H F, *et al.* Effect of dietary seaweed extract supplementation on growth, feed utilization, hematological indices, and non-specific immunity of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* challenged with *Aeromonas hydrophila* [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2020, **32**(5): 3467-3479.
- [24] Mansori M, Chernane H, Latique S, *et al.* Seaweed extract effect on water deficit and antioxidative mechanisms in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2015, **27**(4): 1689-1698.
- [25] Trivedi K, Vijay Anand K G, Kubavat D, *et al.* Role of *Kappaphycus alvarezii* seaweed extract and its active constituents, glycine betaine, choline chloride, and zeatin in the alleviation of drought stress at critical growth stages of maize crop [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2022, **34**(3): 1791-1804.
- [26] El Mehdi El Boukhari M, Barakate M, Choumani N, *et al.* *Ulva lactuca* extract and fractions as seed priming agents mitigate salinity stress in tomato seedlings [J]. *Plants*, 2021, **10**(6): 1104.
- [27] Yakhin O I, Lubyantsev A A, Yakhin I A, *et al.* Biostimulants in plant science: a global perspective [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017(7): 2049.
- [28] Čmiková N, Galovičová L, Miškeje M, *et al.* Determination of antioxidant, antimicrobial activity, heavy metals and elements content of seaweed extracts [J]. *Plants*, 2022, **11**(11): 1493.
- [29] Omar H H, Abdullatif B M, Al-Kazan M M, *et al.* Various applications of seaweed improves growth and biochemical constituents of *Zea mays* L. and *Helianthus annuus* L. [J]. *Journal of Plant Nutrition*, 2015, **38**(1): 28-40.
- [30] Ramya S S, Vijayanand N, Rathinavel S. Foliar application of liquid biofertilizer of brown alga *Stoechospermum marginatum* on growth, biochemical and yield of *Solanum melongena* [J]. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*, 2015, **4**(3): 167-173.
- [31] el-Sheekh M M, el-D E S A. Effect of crude seaweed extracts on seed germination, seedling growth and some metabolic processes of *Vicia faba* L [J]. *Cytobios*, 2000, **101**(396): 23-35.
- [32] Sui Y, Harvey P J. Effect of light intensity and wavelength on biomass growth and protein and amino acid composition of *Dunaliella salina* [J]. *Foods*, 2021, **10**(5): 1018.
- [33] Kim M, Kim J, Lee S, *et al.* Deciphering the β -carotene hyperaccumulation in *Dunaliella* by the comprehensive analysis of *Dunaliella salina* and *Dunaliella tertiolecta* under high light conditions [J]. *Plant, Cell & Environment*, 2024, **47**(1): 213-229.
- [34] Christaki E, Bonos E, Giannenas I, *et al.* Functional properties of carotenoids originating from algae [J]. *Journal*

- of the Science of Food and Agriculture*, 2013, **93**(1): 5-11.
- [35] Alharbi K, Amin M A, Ismail M A, *et al.* Alleviate the drought stress on *Triticum aestivum* L. using the algal extracts of *Sargassum latifolium* and *Corallina elongate* versus the commercial algal products [J]. *Life-Basel*, 2022, **12**(11).
- [36] Hernández Acevedo H E, Flores Ramos L, Villamón Cifuentes F, *et al.* Characterization and production potential of carotenes in Peruvian strains of *Dunaliella salina* Teodoresco [J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2022, **53**(3): 765-780.
- [37] Gazali M, Husni A, Majid F A A, *et al.* The evaluation of antioxidant action of green seaweed *Boergesenia forbesii* extracts [J]. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2023, **1137**(1): 012044.
- [38] de Souza Félix F C C, Hidalgo V B, de Carvalho A K F, *et al.* Assessing the application of marine microalgae *Dunaliella salina* in a biorefinery context: production of value-added biobased products [J]. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2024, **18**(2): 439-452.

PROMOTIONAL EFFECTS OF TWO MACROALGAL EXTRACTS ON THE GROWTH AND METABOLIC ACTIVITY OF *DUNALIELLA SALINA*

WANG Jing-Yi¹, CAI Chun-Er^{1,2}, ZHANG Ying¹, DONG Ao¹, CHA Min-Jun¹ and HE Pei-Min^{1,2}

(1. College of Oceanography and Ecological Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Water Environment and Ecology Engineering Research Center, Shanghai Institution of Higher Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: In this experiment, Green Tide Algae Extract and Copper Algae Extract were selected as nutrient additives for cultivating *Dunaliella salina*, a high-value alga, aiming to explore the effects on the growth and various metabolic activities (such as pigments, carbohydrates, proteins, and photosynthetic activities) compared to the traditional f/2 medium. The physiological indices and nutrient analysis of the algae showed that different concentrations of macroalgal extracts significantly promoted the growth of *Dunaliella salina*. Specifically, the addition of 0.26%, 0.31%, and 0.38% of *Chlorella vulgaris* extract, as well as 0.24% of Copper Algae extract, notably promoted biomass growth, photosynthetic pigment content, and nutrient accumulation in *Dunaliella salina*. However, these additions did not significantly impact the maximum photochemical efficiency (F_v/F_m) and effective quantum yield (Yield) of Duchenne Saltwater Algae. The present study demonstrated that specific concentrations of Chlorophyceae and Copperophyceae extracts could significantly promote the growth and nutrient accumulation of *Duchenne salina*. This findings provide a novel approach for algal bloom prevention and control, along with optimizing the production of *Dunaliella salina* through the utilization of macroalgal bloom extracts.

Key words: Green tide algae extract; *Sargassum horneri* extract; Nutritional additives; *Dunaliella salina*; Culture media