

薛娇娜,王蕊,谭丽菊,等. 三角褐指藻滤液提取物对东海原甲藻和盐藻生理特性的影响[J]. 海洋学报, 2018, 40(4): 119—126, doi:10.3969/j.issn.0253-4193.2018.04.011

Xue Qiaona, Wang Rui, Tan Liju, et al. Effects of the extracts from the filtrate of *Phaeodactylum triconutum* on *Prorocentrum donghaiense* and *Dunaliella salina* analyzed by different physiological parameters[J]. Haiyang Xuebao, 2018, 40(4): 119—126, doi: 10.3969/j.issn.0253-4193.2018.04.011

三角褐指藻滤液提取物对东海原甲藻和盐藻生理特性的影响

薛娇娜¹, 王蕊², 谭丽菊¹, 王江涛^{1*}

(1. 中国海洋大学 海洋化学理论与技术教育部重点实验室, 山东 青岛 266100; 2. 香港城市大学 深圳研究院 海洋与人类健康研究中心 深圳海洋生物多样性可持续利用重点实验室, 广东 深圳 518057)

摘要: 在实验室培养条件下, 利用流式细胞仪从细胞生长、细胞大小、细胞膜完整性、酯酶活性等方面分别研究了三角褐指藻(*Phaeodactylum triconutum*)滤液提取物对东海原甲藻(*Prorocentrum donghaiense*)和盐藻(*Dunaliella salina*)为期6 d生物培养过程中生理特性的影响。结果表明, 三角褐指藻滤液乙酸乙酯提取物对东海原甲藻表现出强烈的生长抑制作用, 荧光检测显示, 其能刺激细胞体积的增大, 导致部分藻体细胞膜受损, 酯酶活性在短时间内增强, 随后受到显著抑制。而提取物对盐藻的生长抑制并不明显, 盐藻细胞体积没有受到影响, 细胞膜保持了高度完整, 酯酶活性在第6天时才受到抑制作用。以上分析表明, 东海原甲藻对三角褐指藻滤液乙酸乙酯提取物更加敏感, 特殊的细胞内部结构特征有利于化感物质进入东海原甲藻的体内, 直接导致藻细胞的死亡。化感物质引起的不同的生理响应中, 酯酶活性指标具有更好的敏感性, 是在环境压力下生物自我保护的一种应急方式。

关键词: 流式细胞仪; 三角褐指藻滤液提取物; 细胞大小; 细胞膜完整性; 酯酶活性

中图分类号: X173

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2018)04-0119-08

1 引言

海洋有害藻华是一种严重的海洋灾害, 它对沿海地区的人类健康、经济和水生生态系统的威胁不容忽视, 因此, 有效防止藻华暴发成为目前水环境领域的研究热点^[1-3]。研究表明, 浮游植物间存在化感作用, 包括抑制作用和促进作用, 这种相互间的化感作用是赤潮藻较其他竞争者取得生长优势的一个关键因素^[4], 浮游植物通过向环境中释放胞外化感物质进

行种间竞争在赤潮形成中发挥着重要的作用^[5-6]。

目前, 国内外学者对于微藻之间竞争作用进行了大量的研究, Yamasaki 等^[7]发现赤潮异弯藻产生的化感物质能抑制硅藻中肋骨条藻的生长, 韩秀荣等^[8]利用浒苔的乙酸乙酯提取物对东海原甲藻和中肋骨条藻进行了培养实验, 发现东海原甲藻对其提取物更敏感, 张议文等^[9]发现旋链角毛藻滤液的乙酸乙酯提取物抑制中肋骨条藻的生长, Wang 等^[10]发现三角褐指藻滤液的乙酸乙酯提取物抑制赤潮异弯藻的生长。

收稿日期: 2017-04-18; 修订日期: 2018-01-15。

基金项目: 全球变化与海气相互作用专项项目“气候变化对热带大洋上层营养盐供给的影响”(GASI-03-01-02-01); 国家重点研发计划(2016YFC1402101)。

作者简介: 薛娇娜(1994—), 女, 山东省青岛市人, 主要从事海洋污染生态化学研究。E-mail: xueqiaona0727@163.com

* 通信作者: 王江涛(1967—), 男, 河北省承德市人, 教授, 主要从事海洋化学和生态学研究。E-mail: jtawang@ouc.edu.cn

虽然化感物质对微藻生长的抑制作用已经引起人们的广泛关注,但对于抑藻过程中的生理影响研究甚少,对受抑制微藻的生理活性状态的研究方法尚不成熟。

细胞酯酶活性与膜完整性密切相关,能够灵敏反映细胞生理状态或受损程度。应用流式细胞仪(flow cytometry, FCM)能够快速、简便、准确地检测细胞酯酶活性和膜完整性,因其能快速检测单个藻细胞中荧光的强度,样品采集时可得到数万个细胞的样品数据,相对于常规藻类生物测定技术具有明显优势^[1]。本研究以三角褐指藻滤液的乙酸乙酯提取物为实验材料,用于东海原甲藻和盐藻的生长培养,实验进行 6 d,运用流式细胞仪 FCM 对东海原甲藻和盐藻的生长、细胞大小、细胞膜完整性、酯酶活性进行检测,研究了微藻细胞对化感物质的生理反应,分析了三角褐指藻滤液中乙酸乙酯提取物的抑藻机制,以期三角褐指藻化感物质控藻的应用提供理论依据与实际指导。

2 材料与方 法

2.1 藻种及培养

实验采用的三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornerutum*)、东海原甲藻(*Prorocentrum donghaiense*)和盐藻(*Dunaliella salina*)均取自中国海洋大学海洋污染生态化学实验室微藻培养室。微藻培养在光照培养箱中进行,培养三角褐指藻采用有硅 f/2 培养液,培养东海原甲藻和盐藻采用无硅 f/2 培养液,培养温度为(20±1)℃,光照强度 4 000 lx,光暗比为 12 h : 12 h。每天定时摇瓶,以防止藻细胞黏附,每实验组设置 3 个平行样。

2.2 三角褐指藻滤液乙酸乙酯提取物的获得

三角褐指藻扩大培养后,取指数期三角褐指藻(初始藻密度为 3×10^4 个/mL)在实验室条件下培养至稳定期,培养容器为 10 L 透明聚乙烯瓶,共培养体积 8 L。稳定期时藻细胞密度大约为 $(4 \sim 5) \times 10^6$ 个/mL,离心管取样离心,3 000 r/min 条件下离心 15 min,取少量藻体制片,于显微镜下观察,发现三角褐指藻细胞仍然保持完整,说明上清液中没有三角褐指藻胞内物质。收集上清液,经 0.45 μm 滤膜过滤,即为三角褐指藻无藻细胞滤液。

取滤液置于分液漏斗中,用乙酸乙酯分离萃取 3 次,合并萃取液,40℃ 下旋转蒸发至干,经 DMSO(二甲亚砜,Dimethyl sulfoxide)定容至 1 mL,即为三角褐

指藻滤液的乙酸乙酯提取物。DMSO 经验证,对藻类生长并无抑制作用^[8-10]。

2.3 三角褐指藻滤液乙酸乙酯提取物对东海原甲藻和盐藻生长的影响

实验共设置 2 个密度梯度组和 1 个对照组,在 250 mL 锥形瓶加入 100 mL f/2 培养液,高温灭菌后分别接种处于指数生长期的东海原甲藻和盐藻,初始藻密度均为 2.0×10^5 个/mL,加入 2 种体积(12.5 μL、62.5 μL)的上述提取物作为实验组,不加提取物的作为对照组,每个密度梯度设 3 个平行样,分别于实验的第 1、3、5、6 天取不同处理组(0 μL、12.5 μL、62.5 μL)的藻细胞,经 300 目筛绢过滤后移入流式细胞仪样品管,分别加入荧光染料 PI(碘化丙啶,Propidium Iodide)和 FDA(荧光素二乙酸酯,Fluorescein Diacetate),加入各染料的浓度各为 10 μmol/L,25℃ 下暗室染色 15 min,染色后的样品立即使用流式细胞仪测定其形态和生理指标。

2.4 流式细胞仪的分析检测

应用 BD Accuri C6 流式细胞仪进行测定,激发波长为 488 nm,每次检测采集不少于 5 000 个细胞的荧光信号,进样流速为 12 μL/min,数据采集前,需预进样超过 10 s,确保液流稳定。各荧光信号强度为检测到的所有藻细胞(不低于 5 000 个细胞)信号强度的均值。

在 FL3 通道处收集前向角散射(FSC, Forward Angle Light Scatter)荧光信号,它的强度与细胞的大小有关,对同种细胞而言,其光强随着细胞横截面积的增大而增强^[12]。肖溪认为对球状活细胞,在小立体角范围内其前向角散射光的强度和细胞横截面积成线性关系^[13]。实验中使用的东海原甲藻与盐藻细胞,其三维结构近圆球形,因此检测其 FSC 的强度变化可直接反映藻细胞横截面积的变化。利用 CFlow Plus 软件对所有藻细胞 FL3 检测器信号进行分析,对比实验组荧光强度与对照组荧光强度,分析三角褐指藻滤液中的化感物质对两种藻细胞形态变化的影响。

对于 PI 染色的细胞膜完整性的测试,只有在藻细胞细胞膜受损时,PI 才能进入细胞内与核酸物质结合发出橙红色荧光,此时流式细胞仪检测到的荧光信号明显增强,利用 FL2(560~590 nm)检测器可以检测到这种荧光信号^[11],CFlow Plus 软件可对 FL2 检测器信号设门分析,将细胞分为低荧光强度群和高荧光强度群,以此统计健康藻细胞占全部细

胞的百分比。

FDA 可以被细胞吸收同时被内部的酯酶转化,转化产物发出的绿色荧光可被 FL1(530~560 nm)检测器接收^[11],利用 CFlow Plus 软件计算所有藻细胞 FL1 检测器信号进行分析,对比实验组荧光强度与对照组荧光强度,分析三角褐指藻滤液中的化感物质对两种藻细胞酯酶活性的变化。

2.5 统计分析

采用 SPSS 16.0 软件对藻细胞密度和荧光信号进行统计分析,各组间的显著性差异用 one-way ANOVA 分析, $P < 0.05$ 作为显著性差异的标准。

3 结果

3.1 三角褐指藻滤液提取物对东海原甲藻和盐藻生长的抑制作用

预实验中,采用镜检的方法,发现三角褐指藻滤液乙酸乙酯提取物(0 μL 、12.5 μL 、62.5 μL 、125 μL)表现出对东海原甲藻和盐藻不同程度的抑制作用(未列出),东海原甲藻受到的抑藻效果随着暴露浓度的增加而显著加强,125 μL 提取物在第 4 天时抑藻效果

达到 100%,此时藻细胞数目不足,流式细胞仪无法检测分析,因此本实验选取添加 0 μL 、12.5 μL 、62.5 μL 的滤液提取物进行实验,两种微藻的生长曲线如图 1 所示。从图 1 可以看出,添加不同体积细胞滤液提取物的实验组中,两种微藻生长趋势不同,为了解抑制效果,计算添加不同体积的各实验组的细胞密度与对照组的比值(图 2)。采用流式细胞仪(FCM)测得的三角褐指藻对东海原甲藻细胞密度抑制效应明显(图 2A),从第 1 天起,实验组细胞密度与对照组相比具有显著性的差异($P < 0.05$),随着提取物添加浓度的增大,东海原甲藻的生长受到的抑制作用逐渐增强,生长抑制率逐渐增大,第 6 天时,12.5 μL 和 62.5 μL 实验组藻细胞密度与对照组比值下降至 0.3 和 0.07。三角褐指藻滤液提取物对盐藻的生长抑制效应并不明显,如图 2B 所示,第 1 天和第 3 天处理组(12.5 μL 、62.5 μL)对盐藻的藻密度没有影响,与对照组无差异,暴露 5 d 后,12.5 μL 实验组藻细胞密度与对照组的比值为 0.93,差异不明显($P > 0.05$),62.5 μL 实验组则受到了显著的抑制作用($P < 0.05$),高浓度提取物对盐藻的生长抑制作用开始表现出来。

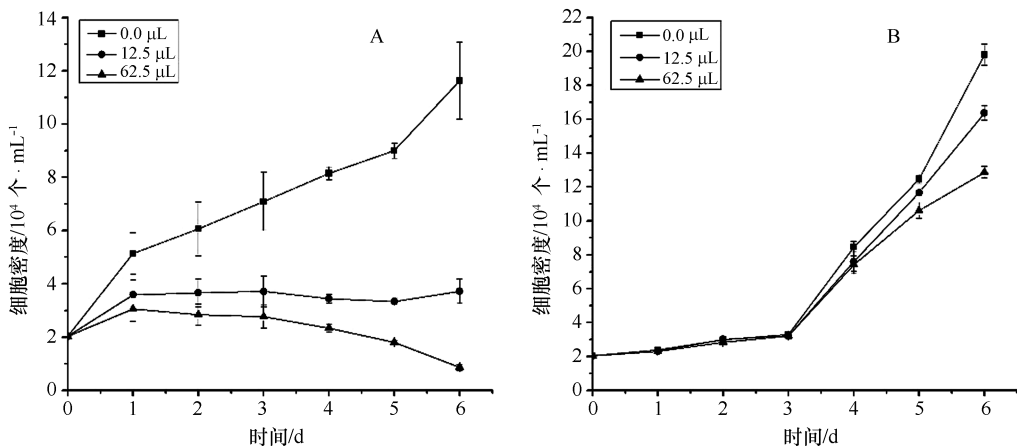


图 1 东海原甲藻(A)和盐藻(B)在三角褐指藻滤液提取物培养下的生长曲线

Fig.1 Growth of *Prorocentrum donghaiense* (A) and *Dunaliella salina* (B) after exposure to the extracts from the filtrate of *Phaeodactylum triconutum*

3.2 三角褐指藻滤液提取物对东海原甲藻和盐藻细胞大小的影响

藻细胞大小的变化由实验组 FSC 平均荧光强度与对照组的比值表示,东海原甲藻细胞大小对三角褐指藻滤液提取物的添加呈现出不同的生理响应(图 3A),与对照组相比,东海原甲藻第 1 天和第 3 天细胞

大小没有明显变化,而随着暴露时间的增加,第 5 天和第 6 天的实验组细胞体积逐渐增大,第 6 天时,62.5 μL 实验组细胞体积大小与对照组的比值为 1.13,与对照组有显著差异($P < 0.05$)。不同浓度的三角褐指藻滤液提取物对盐藻细胞大小的变化如图 3B 所示,盐藻细胞体积与对照组相比无明显差异。

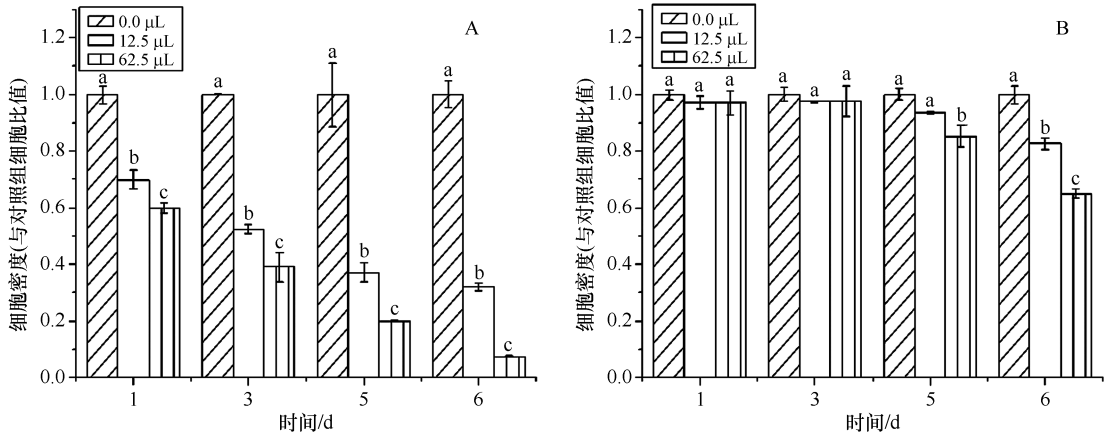


图2 三角褐指藻滤液提取物对东海原甲藻(A)和盐藻(B)细胞密度的影响(a,b,c 分别代表各实验组之间的显著性差异, $P<0.05$)

Fig.2 Cell density of *Prorocentrum donghaiense* (A) and *Dunaliella salina* (B) after 6 days exposure to the extracts from the filtrate of *Phaeodactylum triconutum* (a, b, c represent the significant differences between the experimental groups respectively, $P<0.05$)

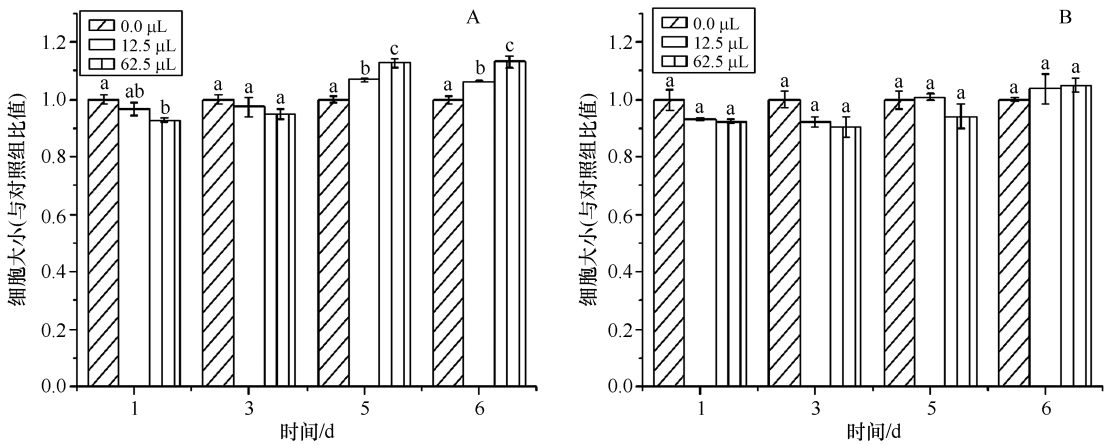


图3 三角褐指藻滤液提取物对东海原甲藻(A)和盐藻(B)细胞大小的影响(a,b,c 分别代表各实验组之间的显著性差异, $P<0.05$)

Fig.3 Cell size of *Prorocentrum donghaiense* (A) and *Dunaliella salina* (B) after 6 days exposure to the extracts from the filtrate of *Phaeodactylum triconutum* (a, b, c represent the significant differences between the experimental groups respectively, $P<0.05$)

3.3 三角褐指藻滤液提取物对东海原甲藻和盐藻细胞膜完整性的影响

经不同浓度三角褐指藻滤液乙酸乙酯提取物处理后,东海原甲藻与盐藻的健康藻细胞数目百分比结果如图4所示。细胞膜完好的藻细胞拒绝PI的进入,只有细胞膜受损或死亡的细胞,PI才能进入其体内并与核酸物质结合发出荧光,所以PI荧光强度可以作为细胞膜完整性的指标^[14-15]。经不同体积(12.5 μL, 62.5 μL)处理的东海原甲藻,随着暴露时间的延长,细胞膜完整性不同程度地受到影响。从实验第1

天起,健康藻细胞数目百分比随提取物浓度增加而降低。第3天后,各实验组健康藻细胞百分比都明显低于对照组($P<0.05$),12.5 μL和62.5 μL处理组健康藻细胞数目百分比分别由第1天的92%和79%下降至第3天的79%和77%,随暴露时间的增加,藻细胞膜受损几率亦逐渐增高,第6天时,12.5 μL和62.5 μL处理组健康藻细胞数目百分比为75%和70%,细胞受损程度明显强于第1天,与对照组相比有显著性差异($P<0.05$),因此,提取物的作用时间对细胞膜完整性的影响不可忽略。盐藻的健康藻细胞数目百分

比结果如图 4 B 所示,在 6 d 的培养过程中,PI 的荧光强度很低,健康细胞百分比与对照组相比并无显著

差异($P>0.05$),表明细胞膜完整性未受到影响,绝大部分细胞(大于 93%)保持完整。

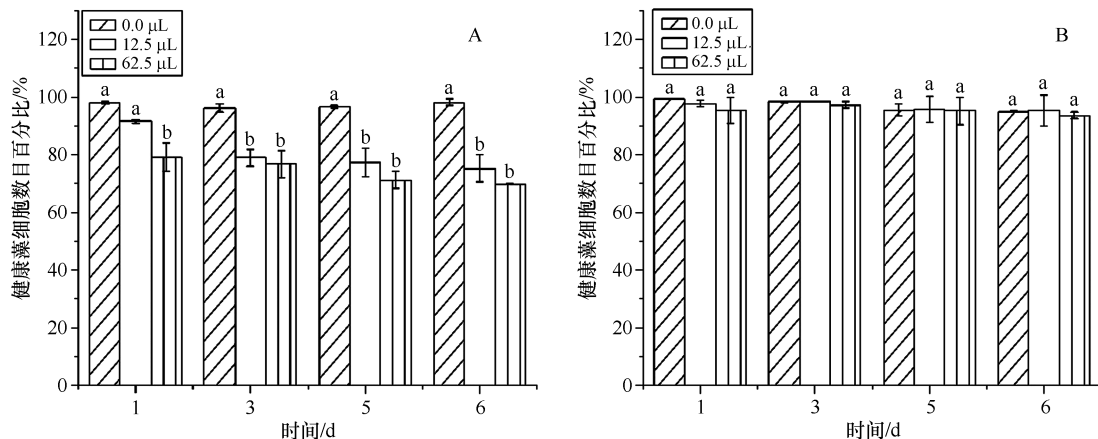


图 4 三角褐指藻滤液提取物对东海原甲藻(A)和盐藻(B)细胞膜完整性的影响(a,b 分别代表各实验组之间的显著性差异, $P<0.05$)

Fig.4 Membrane integrity of *Prorocentrum donghaiense* (A) and *Dunaliella salina* (B) after 6 days exposure to the extracts from the filtrate of *Phaeodactylum triconutum* (a, b, c represent the significant differences between the experimental groups respectively, $P<0.05$)

3.4 三角褐指藻滤液提取物对东海原甲藻和盐藻酯酶活性的影响

FDA(Fluorescein Diacetate)是一种代谢荧光探针,可被细胞吸收,并被胞内的酯酶转化成荧光素,产生荧光信号,从而反映出酯酶的活性,酯酶活性可以用来反映细胞的新陈代谢活性^[16]。由图 5A 可知,与对照组相比,在三角褐指藻滤液提取物处理东海原甲藻的第 3 天,实验组的 FDA 平均荧光强度最高,随着暴露时间的延长,处理组的 FDA 平均荧光强度均减弱,第 5 天和第 6 天酯酶活性受到抑制,随着粗提物浓度的增加,FDA 平均荧光强度逐渐降低,呈现明显的浓度依赖型变化。三角褐指藻滤液提取物处理盐藻时,FDA 荧光变化如图 5B 所示,盐藻的酯酶活性在前 5 天并没有受到影响,和对照组的比值基本接近于 1($P>0.05$),第 6 天时,盐藻的酯酶活性明显受到提取物的抑制,实验组 12.5 μL 和 62.5 μL 与对照组的比值分别为 0.69 和 0.52。另外,FDA 荧光与细胞膜完整性有关,当膜完整性受损时,FDA 分子扩散及细胞裂解产物流失都会造成荧光强度的变化^[17],因此,对酯酶活性的影响应当结合 PI 染色结果分析。

4 讨论

浮游植物释放的化感物质对其他竞争者细胞密度的抑制被广泛认为是化感作用的直接体现^[18],本

实验通过藻细胞密度变化来检测东海原甲藻和盐藻生长受抑制情况,结果显示三角褐指藻滤液提取物对东海原甲藻细胞密度抑制效应明显,与对照组有明显差异,而对盐藻的生长抑制效应并不明显,只有添加的化感物质在高浓度时才开始对盐藻表现出抑制作用。然而细胞密度的减小是不同生理过程共同作用的结果,是藻类生长情况的最终体现。在此前提条件下,对微藻细胞可能发生变化的生理反应进行研究,分析化感物质的抑藻机制正是本文所要研究的问题。

Rioboo 等^[19]发现,除草剂作用于普通小球藻时能增大其细胞体积,荧光强度比对照组细胞显著增强,Franklin 等^[11]发现 Cu^{2+} 作用 48 h 对蛋白核小球藻和三角褐指藻的 FSC 信号有刺激作用,这与本研究中东海原甲藻结果相似,细胞通过改变大小或体积来适应化感物质的抑制作用。第 5 天和第 6 天时,三角褐指藻滤液乙酸乙酯提取物对东海原甲藻细胞大小表现出刺激作用,藻细胞溶胀导致体积增大。许多研究表明,生物特别是单细胞生物通过改变细胞大小或者表面积/体积的比率来适应环境压力。因此,化感物质的抑制作用导致细胞体积的变化可能是抑藻机理之一。盐藻细胞体积则并无显著性变化,且盐藻藻细胞密度与对照组的比值显示,藻密度在长期暴露之后才呈现减小的趋势,这可能和盐藻细胞本身的结构形态有关,盐藻的耐受性较强,提取物的添加造成

的抑制作用并没有影响盐藻细胞的大小。

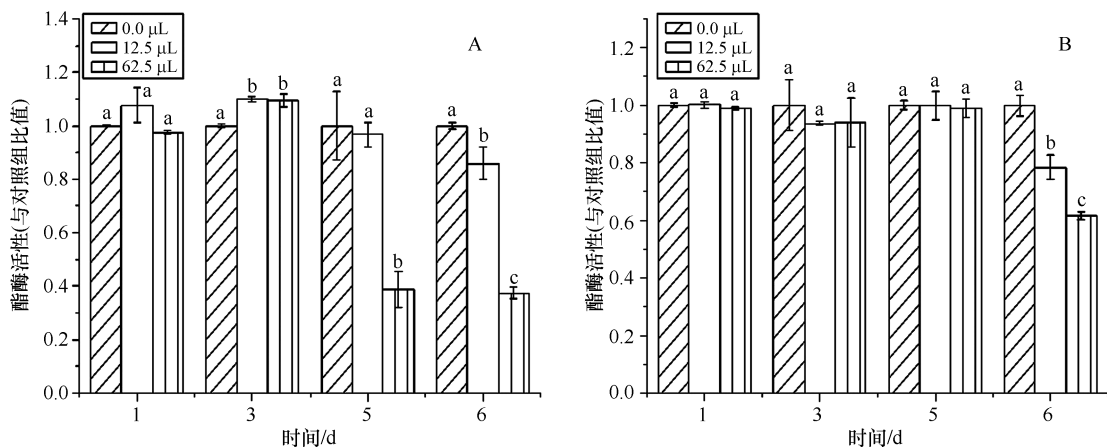


图5 三角褐指藻滤液提取物对东海原甲藻(A)和盐藻(B)酯酶活性的影响(a, b, c 分别代表各实验组之间的显著性差异, $P < 0.05$)

Fig.5 Esterase activity of *Prorocentrum donghaiense* (A) and *Dumaliella salina* (B) after 6 days exposure to the extracts from the filtrate of *Phaeodactylum tricomutum* (a, b, c represent the significant differences between the experimental groups respectively, $P < 0.05$)

化感物质可能干扰藻类的各种生理过程,特别是酯酶活性^[20]。酯酶是一种将酯分解成酸和醇的水解酶,能够快速评估环境污染物对藻类的毒性影响,因此在生物功能中起重要的作用^[21-22]。东海原甲藻酯酶活性在实验初期升高,表明藻细胞的酯酶活性在短时间内受到一定的刺激,可能是短期内提取物的添加使细胞膜上磷脂的代谢加快,从而增强了胞内的酯酶活性^[23]。Lage 等^[24]发现铜绿微囊藻短时间内暴露于 Cu^{2+} 溶液中,酯酶活性增加,这是在环境压力下短时间内生物自我保护的一种应急方式。实验初期酯酶活性便作出应激性生理反应变化,说明酯酶活性指标比其他指标具有更好的敏感性。Berglund 和 Ever-smann 发现^[25],检测酯酶活性时,FDA 会被细胞吸收并在胞内被酯酶转化成荧光沉淀物,当细胞膜受到损伤时,膜的通透性增加,造成胞内荧光沉淀物外流,从而影响 FDA 荧光的准确性,在检测细胞内酯酶活性的变化时,研究者往往没有考虑到细胞膜破损对酯酶活性造成的影响^[26]。本实验中,东海原甲藻暴露于三角褐指藻滤液提取物实验的后期,酯酶活性对浓度依赖性降低,第 5 天时,12.5 μL 和 62.5 μL 处理组 FDA 荧光强度与对照组的比值分别为 0.967 和 0.388,第 6 天后比值下降至 0.859 和 0.375,酯酶活性降低程度显著,PI 荧光检测显示,第 5 天和第 6 天的 12.5 μL 和 62.5 μL 处理组的健康藻细胞数目百分比

分别为 77%、71% 和 75%、70%,均显示此时细胞膜已经受损,因此 FDA 荧光强度的降低不仅是细胞内酯酶活性受到抑制,与细胞膜受损导致荧光物质外流也有很大关系,是它们共同作用的结果。盐藻细胞膜完整性的结果证明,第 6 天 FDA 的降低与细胞膜完整性的破损无关,这种降低是因为提取物抑制盐藻酯酶活性造成的,藻类生长受到抑制会引起酯酶活性的降低。

三角褐指藻滤液乙酸乙酯提取物中确实含有可以抑制这两种微藻生长的化感物质,对于存在抑藻活性的化感物质的抑藻机理,首先要明确它对藻类生长的作用是抑制性(抑制藻类生长)还是致死性的(杀死细胞),肖溪^[13]认为受化感物质作用后若细胞膜破碎,则说明抑藻效应为致死性的,相反地,若藻细胞膜在暴露后仍保持完整,则说明抑藻效应表现为抑制性的。PI 荧光检测显示东海原甲藻细胞膜完整性不同程度的受到损伤,这表明三角褐指藻对东海原甲藻的抑制作用是致死性的,实验结束后藻细胞密度减小也同样说明了这一点,相比之下,盐藻细胞完整性未受到影响,盐藻受到的是一种减缓生长速率的作用。综合各指标考虑,东海原甲藻对三角褐指藻滤液中的化感物质毒性作用更为敏感,而盐藻的耐受性较强,这可能与其细胞内部结构有关。陆斗定等^[27]报道,东海原甲藻的壳面有密集的球形突起分布,壳面还具有

零星的壳面小孔,这种独特的结构可以增大化感物质的接触面积,有利于化感物质进入东海原甲藻的体内。本研究结果表明同种藻类分泌的化感物质对不同微藻抑制作用的机理不同,

5 结论

本文研究了三角褐指藻滤液乙酸乙酯提取物对东海原甲藻和盐藻生长的化感作用。实验结果表明,提取物中确实含有可以影响这两种微藻生长的化感物质。两种微藻对化感物质的敏感程度不同,东海原甲藻对化感物质的敏感性高于盐藻。

FDA 荧光能同时反映酯酶活性和细胞膜完整

性,东海原甲藻后期 FDA 荧光减少不仅是因为细胞内酯酶活性受到抑制,还和细胞膜受损有关。盐藻细胞膜一直保持相对完整,FDA 荧光下降说明藻细胞酯酶活性受到抑制。

东海原甲藻在第 6 天时藻密度小于初始密度,PI 荧光检测显示藻细胞膜受损且受损程度随时间逐渐增加,细胞的新陈代谢活性降低,三角褐指藻对东海原甲藻的化感作用是致死性而非抑制性的。

致谢 衷心感谢中国科学院海洋研究所张清春、赵越在实验过程中提供的帮助。

参考文献:

- [1] Anderson D M. Turning back the harmful red tide[J]. Nature, 1997, 388(6642): 513—514.
- [2] Honjo T. The biology and prediction of representative red tides associated with fish kills in Japan[J]. Reviews in Fisheries Science, 1994, 2(3): 225—253.
- [3] Horner R A, Garrison D L, Plumley F G. Harmful algal blooms and red tide problems on the US west coast[J]. Limnology and Oceanography, 1997, 42(5): 1076—1088.
- [4] Granéli E, Weberg M, Salomon P S. Harmful algal blooms of allelopathic microalgal species: The role of eutrophication[J]. Harmful algae, 2008, 8(1): 94—102.
- [5] Gross E M. Allelopathy of aquatic autotrophs[J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2003, 22(3/4): 313—339.
- [6] 王江涛, 王蕊, 张议文. 海洋微藻释放的他感物质及其研究进展[J]. 海洋环境科学, 2016, 35(3): 460—466.
Wang Jiangtao, Wang Rui, Zhang Yiwen. Allelochemical released by phytoplankton and the recent progress in marine ecosystem[J]. Marine Environmental Science, 2016, 35(3): 460—466.
- [7] Yamasaki Y, Shikata T, Nukata A, et al. Extracellular polysaccharide-protein complexes of a harmful alga mediate the allelopathic control it exerts within the phytoplankton community[J]. The ISME Journal, 2009, 3(7): 808—817.
- [8] 韩秀荣, 高嵩, 侯俊妮, 等. 浒苔干粉末提取物对东海原甲藻和中肋骨条藻的克生作用[J]. 生态学报, 2013, 33(23): 7417—7429.
Han Xiurong, Gao Song, Hou Junni, et al. Allelopathic effects of extracts from *Ulva prolifera* powders on the growth of *Prorocentrum donghaiense* and *Skeletonema costatum*[J]. Acta Ecologica Sinica, 2013, 33(23): 7417—7429.
- [9] 张议文, 王江涛, 谭丽菊. 旋链角毛藻对中肋骨条藻化感作用的影响因素及化感物质性质初探[J]. 海洋学报, 2014, 36(2): 123—129.
Zhang Yiwen, Wang Jiangtao, Tan Liju. The study on the influencing factors of *Chaetoceros curvisetus* allelopathic effect on *Skeletonema costatum* and the primary research on the properties of *Chaetoceros curvisetus* allelochemical[J]. Haiyang Xuebao, 2014, 36(2): 123—129.
- [10] Wang Rui, Wang Jingtiao, Xue Qiaona, et al. Preliminary analysis of allelochemicals produced by the diatom *Phaeodactylum tricorutum*[J]. Chemosphere, 2016, 165: 298—303.
- [11] Franklin N M, Stauber J L, Lim R P. Development of flow cytometry-based algal bioassays for assessing toxicity of copper in natural waters[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2001, 20(1): 160—170.
- [12] Cunningham A, Buonnacorsi G A. Narrow-angle forward light scattering from individual algal cells: implications for size and shape discrimination in flow cytometry[J]. Journal of Plankton Research, 1992, 14(2): 223—234.
- [13] 肖溪. 大麦秸秆对蓝藻化感抑制作用与机理的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2012.
Xiao Xi. Allelopathic inhibition of *Cyanobacteria* by barley straw and its mechanism[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2012.
- [14] Yu Yang, Kong Fanxiang, Wang Meilin, et al. Determination of short-term copper toxicity in a multispecies microalgal population using flow cytometry[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2007, 66(1): 49—56.
- [15] Zhang Min, Kong Fanxiang, Wu Xiaodong, et al. Different photochemical responses of phytoplankters from the large shallow Taihu Lake of subtropical China in relation to light and mixing[J]. Hydrobiologia, 2008, 603(1): 267—278.
- [16] 于洋, 孔繁翔, 王美林, 等. 应用流式细胞技术研究铜对藻细胞膜完整性及脂酶活性的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2006, 12(5): 706—709.
Yu Yang, Kong Fanxiang, Wang Meilin, et al. Effect of copper on membrane integrity and esterase activity of *Microcystis aeruginosa* using flow cytometry[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2006, 12(5): 706—709.
- [17] Persidsky M D, Baillie G S. Fluorometric test of cell membrane integrity[J]. Cryobiology, 1977, 14(3): 322—331.

- [18] Nakai S, Inoue Y, Hosomi M, et al. Growth inhibition of blue-green algae by allelopathic effects of macrophytes[J]. *Water Science and Technology*, 1999, 39(8): 47–53.
- [19] Rioboo C, O'Connor J E, Prado R, et al. Cell proliferation alterations in *Chlorella* cells under stress conditions[J]. *Aquatic Toxicology*, 2009, 94(3): 229–237.
- [20] Körner S, Nicklisch A. Allelopathic growth inhibition of selected phytoplankton species by submerged macrophytes[J]. *Journal of Phycology*, 2002, 38(5): 862–871.
- [21] Hadjoudja S, Vignoles C, Deluchat V, et al. Short term copper toxicity on *Microcystis aeruginosa* and *Chlorella vulgaris* using flow cytometry [J]. *Aquatic Toxicology*, 2009, 94(4): 255–264.
- [22] Regel R H, Ferris J M, Ganf G G, et al. Algal esterase activity as a bioassay of environmental degradation in a freshwater creek[J]. *Aquatic Toxicology*, 2002, 59(3/4): 209–223.
- [23] Girling A E, Pascoe D, Janssen C R, et al. Development of methods for evaluating toxicity to freshwater ecosystems[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2000, 45(2): 148–176.
- [24] Lage O M, Sansonetty F, O'Connor J E, et al. Flow cytometric analysis of chronic and acute toxicity of copper (II) on the marine dinoflagellate *Amphidinium carterae*[J]. *Cytometry*, 2001, 44(3): 226–235.
- [25] Berglund D L, Eversman S. Flow cytometric measurement of pollutant stresses on algal cells[J]. *Cytometry*, 1988, 9(2): 150–155.
- [26] Arsenaault G, Popovic R, Cvetkovic A D. Toxic effects of copper on *Selenastrum capricornutum* measured by a flow cytometry-based method[J]. *Water Quality Research Journal of Canada*, 1993, 28(4): 757–765.
- [27] 陆斗定, 齐雨藻, Goebel J, 等. 东海原甲藻修订及与相关原甲藻的分类学比较[J]. *应用生态学报*, 2003, 14(7): 1060–1064.
Lu Douding, Qi Yuzao, Goebel J, et al. Redescription of *Prorocentrum donghaiense* Lu and comparison with relevant *Prorocentrum* species[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2003, 14(7): 1060–1064.

Effects of the extracts from the filtrate of *Phaeodactylum triconutum* on *Prorocentrum donghaiense* and *Dunaliella salina* analyzed by different physiological parameters

Xue Qiaona¹, Wang Rui², Tan Liju¹, Wang Jiangtao¹

(1. *Key Laboratory of Marine Chemistry Theory and Technology/Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266100, China*; 2. *Shenzhen Key Laboratory for the Sustainable Use of Marine Biodiversity, Research Centre for the Oceans and Human Health, Shenzhen Research Institute, City University of Hong Kong, Shenzhen 518057, China*)

Abstract: To investigate allelopathic effects of extracts from the filtrate of *Phaeodactylum triconutum* on growth and physiology of bloom-forming *Prorocentrum donghaiense* and *Dunaliella salina*, the cell density, cell size, membrane integrity and esterase activity were determined by the flow cytometry during a 6 d exposure test in laboratory. The results suggested that the growth of *P. donghaiense* was significantly inhibited by ethyl acetate extracts from the filtrate of *P. triconutum*. With the ethyl acetate extracts treatments, the cell size increased and the part of the algae membrane integrity was damaged, at the same time esterase activity significantly increased within a short time and was inhibited subsequently. However, the growth of *D. salina* was not inhibited by extracts from the filtrate of *P. triconutum* significantly. Both the cell size and membrane integrity was not inhibited, compared with the control cultures, the extracts induced negative effects on the esterase activity after 6 days exposure. These results confirmed that *P. donghaiense* was more sensitive to the allelochemical contained in the ethyl acetate of *P. triconutum*. Many *P. donghaiense* cells rapidly died and disappeared which be caused by the special internal structure of cells that the allelochemicals could easily enter the *P. donghaiense* cells. Esterase activity was the most sensitive parameter to evaluate the influence of the *P. triconutum* allelochemical on *P. donghaiense*, a kind of emergency mode of biological self-protection under environmental pressure.

Key words: flow cytometry; the extracts from the filtrate of *Phaeodactylum triconutum*; cell size; membrane integrity; esterase activity