

两种海洋微藻内源醛类对中华哲水蚤繁殖的影响

李捷 梁彦娟 刘泽浩 李永强

(青岛理工大学环境与市政工程学院, 266033)

摘要 通过室内实验研究了中肋骨条藻和海洋原甲藻对中华哲水蚤繁殖的影响, 并采用顶空固相微萃取-气相色谱质谱法对两种微藻内源醛类进行定性定量分析。结果表明, 与海洋原甲藻相比, 中肋骨条藻对中华哲水蚤的存活率、产卵率和孵化率都存在负面影响。在微藻内源醛类分析中, 检测到中肋骨条藻中含有6种醛类, 而在海洋原甲藻中仅检测到两种醛类。不论是从单种醛类的含量上, 还是醛类总含量上, 中肋骨条藻中醛类含量都明显高于海洋原甲藻, 这意味着硅藻释放的醛类物质对中华哲水蚤的繁殖和存活具有潜在的抑制作用。

关键词 硅藻 中华哲水蚤 繁殖 醛类

中图分类号 Q143 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2010)04-0107-06

Effects of aldehydes produced by two algae on *Calanus sinicus* reproduction

LI Jie LIANG Yan-juan LIU Ze-hao LI Yong-qiang

(Institute of Environment and Municipal Engineering, Qingdao Technological University, 266033)

ABSTRACT The effects of aldehydes produced by two algae *Skeletonema costatum* and *Proocentrum micans* on reproduction of *Calanus sinicus* were investigated in laboratory. Aldehydes produced by these two algae were analyzed qualitatively and quantitatively by HS-SPME/GC-MS method. Compared with *P. micans*, *S. costatum* showed negative effects on female survival, egg production and egg hatching of *C. sinicus*. Six kinds of aldehydes were detected in *S. costatum*, while only 2 kinds were detected in *P. micans*. The content of any single aldehyde or total aldehydes in *S. costatum* were significantly higher than those in *P. micans*, indicating that the aldehydes produced by diatom could cause potential negative effects on the reproduction and survival of *C. sinicus*.

KEY WORDS Diatom *Calanus sinicus* Reproduction Aldehydes

胶州湾海域浮游植物群落中, 硅藻在种类和数量上占绝对优势, 是最重要的初级生产者(陈碧鹃等 2000)。但近年来的研究发现, 作为硅藻自我保护的一种机制, 其藻细胞可能产生某些次级代谢产物, 对桡足类的繁殖具有一定的毒害作用(Miralto *et al.* 1999; 李捷等 2004, 2007; Barofsky *et al.* 2007; 梁彦娟等 2009)。最近的研究表明, 这种物质很有可能是某些醛类(Paffenhöfer *et al.* 2005; Li *et al.* 2006; Poulet *et al.* 2007; Wichard *et al.* 2007)。但是目前对于胶州湾海域内硅藻是否也产生内源醛类, 及其对桡足类的

繁殖过程产生负面效应尚缺乏相关的研究。本实验通过比较中肋骨条藻和海洋原甲藻对胶州湾桡足类优势种中华哲水蚤的生物学效应,并通过对这两种单胞藻内源醛类进行定性定量分析来初步分析其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用藻种为中肋骨条藻 *Skeletonema costatum* (SC) 和海洋原甲藻 *Prorocentrum micans* (PM)。藻种均为中国科学院海洋研究所生态实验室所分离自胶州湾海域,藻类培养采用 f/2 培养基(配方:1 000 ml 海水:1 ml 原液 I:1 ml 原液 II:0.5 ml 维生素溶液:1 ml $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 溶液,其中只在硅藻中加 $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 溶液)。培养温度控制在 20 ± 0.5 °C,光周期为 12 h 光照:12 h 黑暗。每日用生物显微镜计数培养藻类浓度,并用新鲜的 f/2 培养基补充藻液,以保持藻类维持在对数期。每日用 GF/F 过滤后的海水将收获的藻液稀释至 $0.5 \mu\text{gC/ml}$ (*S. costatum*: 1.8×10^4 cell/ml; *P. micans*: 296 cell/ml) 用以制备桡足类培养饵料。中肋骨条藻细胞含碳量按 Strathmann(1967)公式计算;海洋原甲藻细胞含碳量按 Menden-Deuer 等(2000)公式计算。

实验用桡足类中华哲水蚤 *C. sinicus* 2009 年 3 月 18 日于胶州湾海域($36^{\circ}06'N, 120^{\circ}19'E$)通过垂直拖网(浅水 I 型浮游生物网,网目为 $500 \mu\text{m}$)采集。取样后,将底管内的浮游动物样品置于盛有 30 L 现场海水的保温桶内,并在 2 h 内迅速转移至实验室内。抵达后采用大口塑料滴管(口径与雌体第一触角伸展开的宽度相当)挑取健康成熟的雌体(具有完整的附肢,无可见损伤,游动活泼),放入经 $0.45 \mu\text{m}$ 的混合纤维滤膜过滤的海水中暂养。挑选工作在捕获后 4 h 内完成。

1.2 实验方法

1.2.1 产卵实验

实验设置中肋骨条藻(SC)和海洋原甲藻(PM)两个处理,每处理实验设 5 个平行样。将挑选后的成熟雌体放入自制的 400 ml 产卵瓶内(底部具有开关的圆锥形塑料瓶,距底部 5 cm 处粘有 1 层 $220 \mu\text{m}$ 的筛绢,可防止雌体摄食已产的卵),每产卵瓶放 6 只雌体,每处理 30 只个体。瓶内盛有 300 ml 藻液,置于生化培养箱中黑暗下培养。根据中华哲水蚤捕获海区的温度将实验的温度控制在 6.5 ± 0.5 °C。正式实验前将中华哲水蚤在过滤海水中驯化 48 h。实验时,每日通过产卵瓶底部开关收集 1/2 的瓶内实验液,并以新鲜的藻悬液进行补充,藻类培养液浓度控制在 $0.5 \mu\text{gC/ml}$ 。收集的实验液在解剖镜下进行产卵计数。每日记录存活雌体和产卵的数量,计算雌体存活率(FS)和产卵率(EPR),实验持续 15 d。

1.2.2 孵化实验

将产卵实验中收集到的卵放在培养皿中,进行孵化实验。培养皿中预先加入 20 ml 过滤海水(经 GF/F 滤膜过滤后获得)。该实验设置中肋骨条藻(SC)和海洋原甲藻(PM)两个处理。每处理实验设 3 个平行组,每培养皿中放 30 只卵。孵化在 6.5 ± 0.5 °C、暗光条件下进行。每 24 h 观察孵化状况直至 72 h,以确保所有卵在该温度下有足够的孵化时间(Uye 1996),实验持续 14 d。

1.2.3 实验藻种醛类的测定

产卵和孵化实验结束后,将用于喂养中华哲水蚤的藻液进行离心处理,取藻类浓缩液 3 ml 装入 20 ml 顶空瓶中。将顶空瓶于 75 °C 恒温条件下进行磁力搅拌(搅拌速率为 170 r/min),平衡 10 min,然后进行顶空固相萃取提取藻液中的醛类物质,15 min 后立即插入气相色谱汽化室,进行 GC-MS 分析。用外标法定量。

2 实验结果

2.1 雌体存活率

在 15 d 的实验期间,中华哲水蚤雌体存活率在两处理中有显著差异,海洋原甲藻处理中华哲水蚤雌体存

活率保持在 90%以上,而中肋骨条藻处理中华哲水蚤雌体存活率则在实验结束时下降至 52%(图 1)。

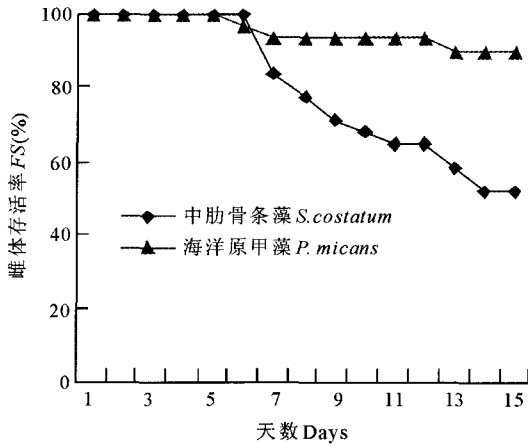


图 1 不同食物处理下中华哲水蚤雌体存活率变化
Fig. 1 Variation of survival rate of female *C. sinicus* fed with 2 uni-algal diets

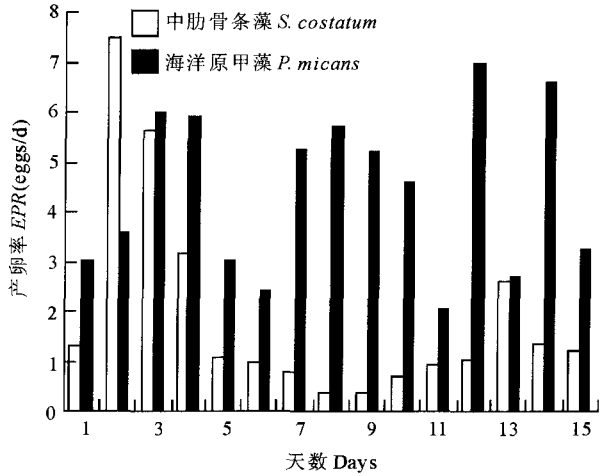
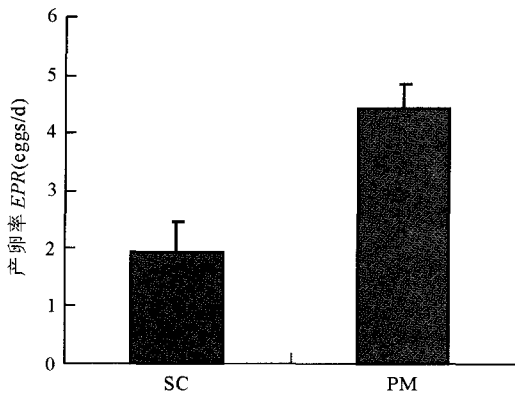


图 2 不同食物处理下中华哲水蚤日平均产卵率变化
Fig. 2 Variation of daily egg production rate of female *C. sinicus* fed with 2 uni-algal diets

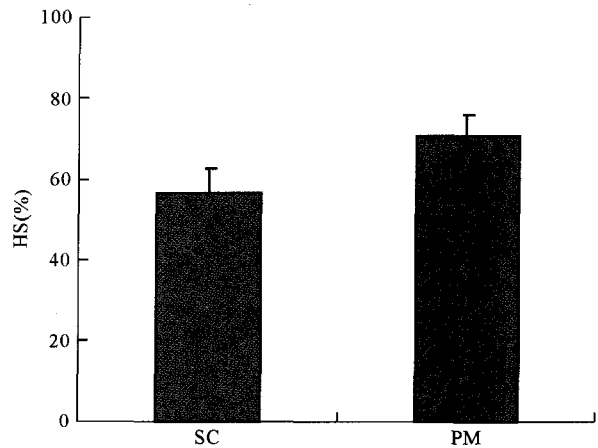
2.2 产卵率

中华哲水蚤的产卵率因食物类型的不同而有显著差异(图 2 和图 3)。在 15 d 的实验期间,与初始产卵率(7.13±2.96)/d 相比,PM 中华哲水蚤平均产卵率为(4.42±0.41)/d,保持在较高的水平,而 SC 中,中华哲水蚤日平均产卵率明显低于初始产卵率,其平均产卵率仅为(1.94±0.51)/d。



注:SC:中肋骨条藻;PM:海洋原甲藻
Note: SC: *S. costatum*; PM: *P. micans*

图 3 不同食物处理下中华哲水蚤 15 d 的平均产卵率
Fig. 3 Average egg production rate of female *C. sinicus* fed with 2 uni-algal diets in 15 days



注:SC:中肋骨条藻;PM:海洋原甲藻
Note: SC: *S. costatum*; PM: *P. micans*

图 4 不同食物处理下中华哲水蚤产的卵在过滤海水中的平均孵化率
Fig. 4 Hatching success of eggs produced by *C. sinicus* fed with 2 uni-algal diets

2.3 孵化率

不同食物处理下中华哲水蚤所产的卵在过滤海水中的平均孵化率如图 4 所示。PM 处理组中华哲水蚤平

均孵化率处于较高水平(70%以上),而 SC 中华哲水蚤实验期间的平均孵化率仅为 56%左右,明显低于初始值(81.11±2.94%)和海洋原甲藻处理组的平均孵化率值(70.93±3.94%)。

2.4 微藻内源醛类物质分析

分别对顶空瓶中的中肋骨条藻、海洋原甲藻浓缩液进行固相微萃取以及 GC-MS 分析,得到微藻内源醛类成分的 GC-MS 色谱图(图 5),各成分及其含量如表 1 所示。

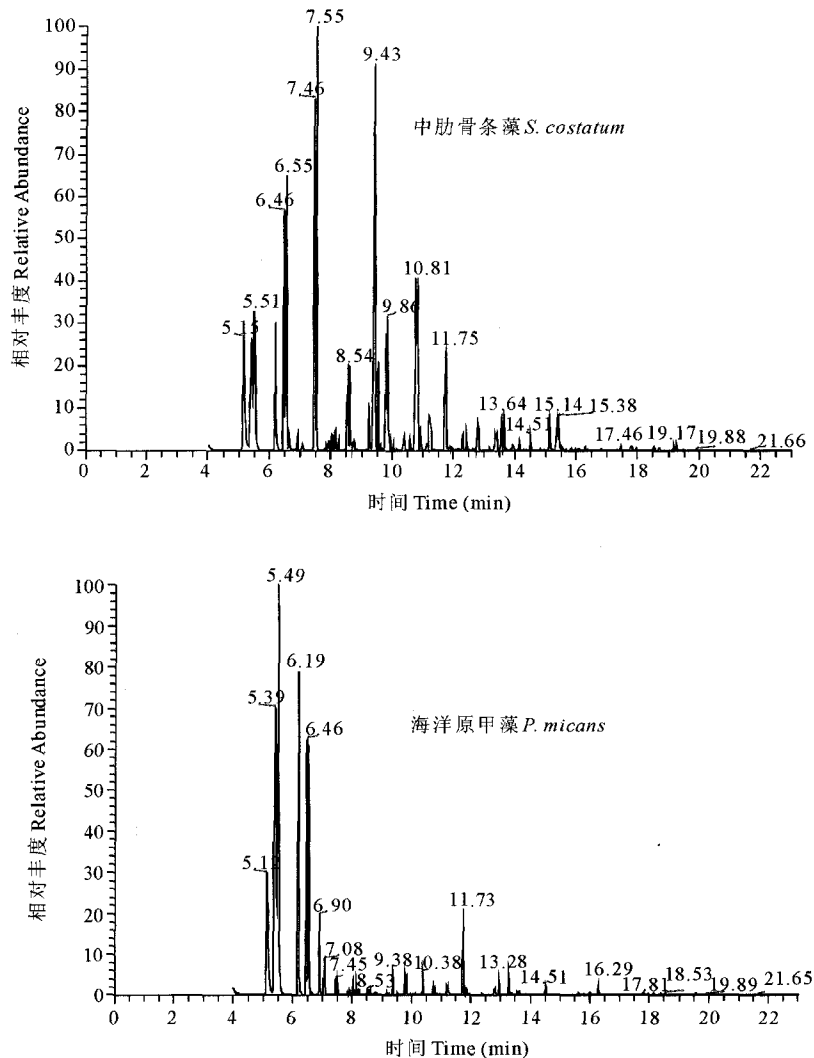


图 5 微藻内源醛类成分总离子流色谱

Fig. 5 Total ion count chromatogram of the aldehyde components produced by 2 algae

藻类内源醛类分析结果表明,中肋骨条藻和海洋原甲藻中醛类物质的种类和含量有显著差异。硅藻中肋骨条藻中检测到 6 种醛类物质,且其含量较高;而甲藻海洋原甲藻中仅检测到了两种醛类,且含量较低(表 1)。

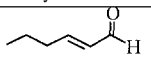
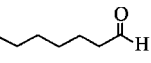
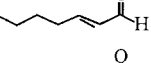
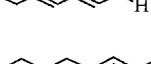
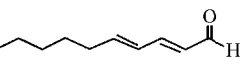
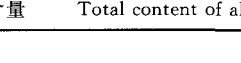
3 讨论

15 d 实验期间,与海洋原甲藻相比,中肋骨条藻处理中华哲水蚤雌体存活率、产卵率和孵化率都处于较低的水平,由此可知,相对于海洋原甲藻,硅藻中肋骨条藻对中华哲水蚤的繁殖产生了负面效应。大量的研究证实,在陆地和海洋高等植物可以通过产生有害次级代谢产物来阻碍摄食者的繁殖和生长(Rosenthal *et al.*, 1991; McClintock *et al.*, 2001)。近年来的研究表明,这一现象在海洋浮游植物中也可能存在,其可能的物质

为不饱和醛类(Pohnert *et al.* 2002,2004)。本次实验中微藻内源醛类定性定量分析中,检测到中肋骨条藻中含有6种醛类物质(*trans*-2-hexenal, heptaldehyde, *trans*-2-heptenal, *trans*-2,4-heptadienal, *trans*-2-decenal, *trans*-2,4-decadienal),而在海洋原甲藻中仅检测到两种醛类(*trans*-2-hexenal, *trans*-2-heptenal),并且不论是从单种醛类的含量上,还是醛类总含量上,中肋骨条藻中醛类含量都明显高于海洋原甲藻。这表明作为胶州湾硅藻优势种的中肋骨条藻,的确产生了大量不饱和醛类并进而阻碍中华哲水蚤的繁殖。这与以往的很多研究(Miralto *et al.* 1999, Ribalet *et al.* 2007)是一致的。

表1 微藻内源醛类成分及其含量

Table 1 Aldehydes components and content of the 2 algae

醛类名称 Aldehyde name	醛结构式 Aldehyde structure	<i>S. costatum</i> (10 ⁻³ g/g Dry weight)	<i>P. micans</i> (10 ⁻³ g/g Dry weight)
<i>trans</i> -2-Hexenal		553.67	6.96
Heptaldehyde		48.59	N. D
<i>trans</i> -2-Heptenal		46.16	21.94
<i>trans</i> -2,4-Heptadienal		273.85	N. D
<i>trans</i> -2-Decenal		11.05	N. D
<i>trans</i> -2,4-Decadienal		48.76	N. D
醛类总含量 Total content of aldehydes		982.08	28.9

注:N. D表示未检出

通过对醛类含量分析结果可知,在中肋骨条藻中,*trans*-2-hexenal、*trans*-2,4-heptadienal 含量很高,占到总含量的80%以上,这表明,次级代谢产物中,起主导作用的往往只有少数几种醛类,这与 Ianora 等(2005)的推测相吻合。但本文实验所检测到的内源醛类与国外研究中相同藻种所发现的醛类并不尽相同(Miralto *et al.* 1999;Ribalet *et al.* 2007),且某些醛类未见诸以往报道,这可能意味着同种藻在不同培养条件下可能产生的醛类也存在差异。

不可否认,桡足类的繁殖受多种因素的共同作用,这些因素既可能来自饵料的营养限制或者毒素作用,也可能来自桡足类摄食器官的机械选择作用或化学感受作用,还有可能是多种因素的综合作用(Paffenhöfer 2005;Li *et al.* 2008)。这些有待于通过进一步实验加以证实。

参 考 文 献

- 李捷,李超伦. 2004. 高浓度硅藻对桡足类繁殖的抑制作用. 生态学报, 24(11): 2664~2670
- 李捷,蒲新明,张展,李超伦,孙松. 2007. 两种藻类饲喂中华哲水蚤的繁殖差异. 海洋水产研究, 28(1): 38~45
- 陈碧鹃,陈聚法,袁有亮,崔毅,曲克明. 2000. 胶州湾北部沿岸浮游植物生态特征的研究. 海洋水产研究, 21(2): 34~40
- 梁彦娟,李捷,张乐,李洛娜. 2009. 高浓度硅藻对桡足类繁殖的影响. 海洋湖沼通报, 4: 83~92
- Barofsky, A., and Pohnert, G. 2007. Biosynthesis of polyunsaturated short chain aldehydes in the diatom *Thalassiosira rotula*. Organic Letters, 9(6): 1017~1020
- Ianora, A. 2005. Birth-control effects of diatoms for copepod reproduction; implications for aquaculture studies In: Lee, C. S., O'Bryen, P. J., and Marcus, N. H. (Eds) Copepods in Aquaculture. Blackwell Publishing, Oxford, U. K.: 31~48
- Li, J., Sun, S., Li, C. L., Zhang, Z., and Tao, Z. C. 2006. Effects of single and mixed diatom diets on the reproduction of copepod *Calanus sinicus*. Acta Hydrochim Hydrobiol. 34 (1): 117~125
- Li, J., Sun, S., Li, C. L., Zhang, Z., and Pu, X. M. 2008. Effects of different diets on the reproduction and naupliar development of the copepod

- Acartia bifilosa. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 355: 95~102
- Mcclintock, J. B., and Baker, B. J. 2001. Mar. Chem. Ecol. New York: CRC Press, Boca Rotan, Florida, 610
- Menden-Deuer, S., and Lessard, E. J. 2000. Carbon to volume relationships for dinoflagellates, diatoms, and other protist plankton. Limnol. Oceanogr. 45: 569~579
- Miralto, A., Barone, G., Romano, G. *et al.* 1999. The insidious effect of diatoms on copepod reproduction. Nature, 402: 173~176
- Paffenhöfer, G. A., Ianora, A., Miralto, A. *et al.* 2005. Colloquium on diatom-copepod interactions. Mar. Ecol. Prog. Ser. 286: 293~305
- Pohnert, G., Adolph, S., and Wichard, T. 2004. Short synthesis of labeled and unlabeled 6Z, 9Z, 12Z, 15-hexadecatetraenoic acid as metabolic probes for biosynthetic studies on diatoms. Chemistry and Physics of lipids, 131: 159~166
- Pohnert, G., Lumineau, O., Cueff, A. *et al.* 2002. Are volatile unsaturated aldehydes from diatoms the main line of chemical defence against copepods? Mar. Ecol. Prog. Ser. 245: 33~45
- Poulet, S. A., Gueff, T., Wichard T., Marchetti, J, Dancie, C., and Pohnert, G. 2007. Influence of diatoms on copepod reproduction. III. Consequences of abnormal oocyte maturation on reproductive factors in *Calanus helgolandicus*. Mar. Biol. 152: 415~428
- Ribalet, F., Wichard, T., Pohnert, G., Ianora, A., Miralto, M., and Casotti, R. 2007. Age and nutrient limitation enhance polyunsaturated aldehyde production in marine diatoms. Phytochem. 68: 2 059~2 067
- Rosenthal, A., and Berenbaum, R. 1991. Herbivores; their interaction with secondary plant metabolites. Vol 1. The chemical participants. San Diego: Academic Press
- Runge, J. A. 1984. Egg production of the marine, planktonic copepod, *Calanus pacificus* Brosky: Laboratory observations. Exp. Mar. Biol. Ecol. 74: 53~66
- Strathmann, R. R. 1967. Estimating the organic carbon content of phytoplankton from cell volume or plasma volume. Limnol. Oceanogr. 12: 411~418
- Uye, S. 1996. Induction of reproductive failure in the planktonic copepod *Calanus pacificus* by diatoms. Mar. Ecol. Prog. Ser. 133: 89~97
- Wichard, T., Gerecht, A., Boersma, M., Poulet, S. A., Wiltshire, K., and Pohnert, G. 2007. Lipid and fatty acid composition of diatoms revisited: rapid wound activated change of food quality parameters influences herbivorous copepod reproductive success. ChemBioChem. 8: 1 146~1 553