

芦苇抑藻化感物质的分离及其抑制蛋白核小球藻效果研究

李锋民, 胡洪营*

(清华大学环境科学与工程系环境模拟与污染控制国家重点联合实验室, 北京 100084)

摘要: 采用乙醇提取-溶剂萃取法从芦苇中分离出 2 组能抑制蛋白核小球藻生长的化感物质。该 2 组化感物质对蛋白核小球藻的半效应浓度 (EC_{50}) 分别为 0.68 mg/L 和 2.65 mg/L。将前者用碱性氧化铝层析柱分离得到一组抑藻活性更强的化感物质和一组能够促进蛋白核小球藻生长的化感物质: 前者对蛋白核小球藻的 EC_{50} 为 0.50 mg/L, 是目前报道的抑藻能力最强的化感物质; 后者在浓度为 0.63 mg/L 时能显著促进蛋白核小球藻的生长。芦苇化感物质可以用来控制淡水有害藻类。

关键词: 芦苇; 蛋白核小球藻; 抑制; 化感作用

中图分类号: X175 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2004)05-0089-04

Isolation and Effects on Green Alga *Chlorella pyrenoidosa* of Algal-Inhibiting Allelochemicals in the Macrophyte, *Phragmites communis* Tris.

LI Feng-min, HU Hong-ying

(ESPC Key Joint Laboratory, Department of Environment Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Two fractions of secondary metabolites which inhibited the growth of green alga *Chlorella pyrenoidosa*, was isolated by several separation techniques from the ethanol extract of the macrophyte, *Phragmites communis* Tris. The EC_{50} of the two fractions on *C. pyrenoidosa* were 0.68 mg/L (the fraction of acidic solvent) and 2.65 mg/L (the fraction of alkaline solvent), respectively. Further purification of the allelochemicals in the acidic solvent by alkaline aluminum oxide column chromatography revealed that this fraction containing inhibiting allelochemicals and stimulating allelochemicals. The inhibiting allelochemicals showed more inhibitory effect and the EC_{50} was 0.50 mg/L. The result suggests that allelochemicals in *P. communis* can be used as an algal-inhibitor.

Key words: *Chlorella pyrenoidosa*; *Phragmites communis* Tris.; inhibition; allelopathy

随着水体富营养化程度的加剧, 水华已经成为农业、渔业和休闲娱乐用水的一大危害。现有抑藻方法中效果最好、最常用的是化学法, 即直接向水体中施入化学物质(如硫酸铜), 达到抑制藻类生长的目的^[1]。然而, 一般的化学抑藻剂在杀灭藻类的同时会杀死其它水生生物, 破坏整个水生生态系统; 同时铜等重金属会在食物链中传递、富集, 最终威胁人类身体健康。因此, 寻找一种安全高效的抑藻方法成为环境保护领域的一个重要课题。

化感物质是植物产生的次生代谢物质, 可以通过不同的途径释放到环境中影响其它生物的生长。许多水生植物产生的化感物质能够抑制藻类的生长^[2, 3]。化感作用和化感物质发现后, 为寻找新型高效安全的抑藻方法提供了一种思路。目前利用化感作用抑制藻类的方式主要有 3 种: 将水生植物栽培至待处理水体, 利用活体植物释放的化感物质抑制藻类^[2~4]; 将死亡干燥的植物体放入待处理水体, 利用其腐败释放的化感物质抑制藻类^[5, 6]; 将从植物中提取的化感物质施入水体抑制藻类^[7~9]。

这 3 种方式中前 2 种需要较长时间, 并且实施较困难。将化感物质从植物中提取出来直接施入水体可以快速抑制藻类的生长, 并且易于操作, 是一种有前景的应用方式^[10]。

前期研究表明, 芦苇产生的化感物质具有较好的抑藻效果。本文报道了从芦苇中提取分离化感物质的方法及化感物质的抑藻效果, 为将芦苇化感物质应用于有害藻类控制提供理论和方法基础。淡水水华的优势种随季节的改变而发生变化: 春季和秋季为绿藻(如小球藻), 夏季为蓝藻(主要是微囊藻属)^[11]。小球藻具有易培养、检测方法成熟等优点而常被应用于科学研究^[12]。因此, 本研究选用蛋白核小球藻为抑制对象。

1 材料与方法

1.1 材料

收稿日期: 2003-12-01; 修订日期: 2004-03-24

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973)项目(G199045711)

作者简介: 李锋民(1975~), 男, 博士研究生, 主要研究方向为环境生物学。

* 通讯联系人

芦苇(*Phragmites communis* Tris.) 采自清华大学荷塘.

蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*) 由中国科学院武汉水生生物研究所淡水藻种库提供. 试验前预培养 4d, 使之处于对数增长期. 培养液组成同文献[11].

1.2 化感物质提取与分离方法

化感物质的粗提: 2.8kg 烘干(80℃, 48h) 芦苇粉碎, 乙醇浸泡提取 48h, 抽滤, 滤液即为化感物质粗提物. 化感物质的分离方法见图 1.

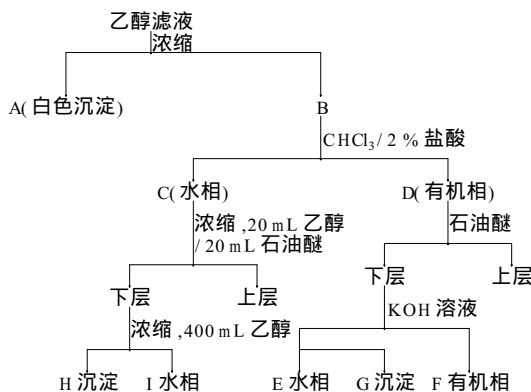


图 1 化感物质的分离方法

Fig.1 Isolation process of allelochemicals in *P. communis* Tris

化感物质的柱层析法分离: 采用 $\Phi=26\text{ mm}$, $h=300\text{ mm}$ 层析柱, 以 30g 碱性氧化铝(100~200目) 湿法装柱. 注入待分离液 10 mL, 用 $\text{H}_2\text{O}/2\%$ NaOH H_2O 阶段洗脱. 洗脱液等体积收集, 每管 5 mL. 得到的流分挥发掉乙醇后用 TOC 测定仪测定总碳含量.

1.3 化感物质的生物检测

采用培养液法对分离组分进行抑藻活性生物检测, 培养混合液共 200 mL, 其中包括 5 mL 处于对数生长期的藻种液、一定量的待测液和培养液, 培养液组成见文献 11. 各沉淀组分用乙醇溶解后再测定. 生物检测体系中待测液浓度梯度设为: 0, 5, 25, 50 mL/L. 于光暗比 16: 8, 温度 25℃, 相对湿度 75% 培养. 第 5 天在显微镜下用血球计数板计数.

1.4 数据处理

化感物质对藻类的抑制率公式为:

$$\text{RI}(\%) = \left| 1 - \frac{N}{N_0} \right| \times 100$$

其中, RI: 抑制率, N : 加入浸出液组藻密度(个/mL), N_0 : 对照组藻密度(个/mL). EC_{50} 的计算采

用概率单位法^[13].

2 结果与讨论

2.1 芦苇化感物质的分离

采用乙醇提取方法得到化感物质粗提物 B 共 48g. 利用图 1 所示分离方法, 进一步将组分 B 分为 E、F、G、H、I 等 5 个组分, 其质量分别为 4.3, 16.5, 1.4, 3.7, 4.8g, 其中 F 和 I 分别溶于乙醇, 浓度为 33g/L 和 9.6g/L. 分离过程中加入石油醚的作用是去除叶绿素和油脂.

2.2 分离组分的抑藻活性生物检测

利用培养液法对上述 5 个组分进行生物检测, 各组分对蛋白核小球藻的抑制率如图 2 所示. 由图 2 可见, 在 5 个组分中, F 和 I 对蛋白核小球藻有明显的抑制作用, 在 5 mL/L 时对蛋白核小球藻的抑制率接近 1, 说明蛋白核小球藻被完全抑制. 其它 3 个组分即使在 50 mL/L 时抑制率仍很低. 可见, 芦苇中抑藻化感物质主要存在于 F 和 I 组分中.

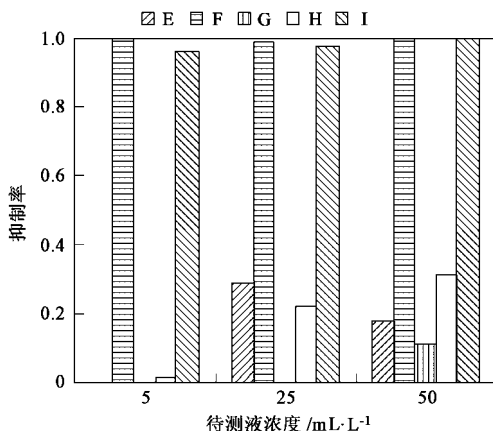


图 2 萃取组分对蛋白核小球藻的抑制率比较

Fig.2 The inhibition ration on *C. pyrenoidosa* of graded dosages of isolates

2.3 F 和 I 组分对蛋白核小球藻的 EC_{50}

在所有组分中 F 和 I 具有明显的抑藻效果, 其不同浓度对蛋白核小球藻的抑制率如图 3 所示. 可见, 在较低浓度(1 mg/L) 时, I 组分对蛋白核小球藻的抑制率达到 0.72, 表现出较好的抑藻活性. 并且 I 组分在各个浓度下的抑制率都高于同浓度的 F 组分的抑制率. 利用概率单位法求出 I 和 F 的半效应浓度 EC_{50} 分别为 0.68 mg/L 和 2.65 mg/L. 这说明 I 组分对蛋白核小球藻的抑制效果好于 F. 在现有文献中, 从水生植物提取的化感物质对藻类的

EC_{50} 都约为 $2 \sim 4 \text{ mg/L}$ 。因此, I 组分的抑藻效果明显好于已经报道的化感物质^[14, 15], 有良好的应用前景。

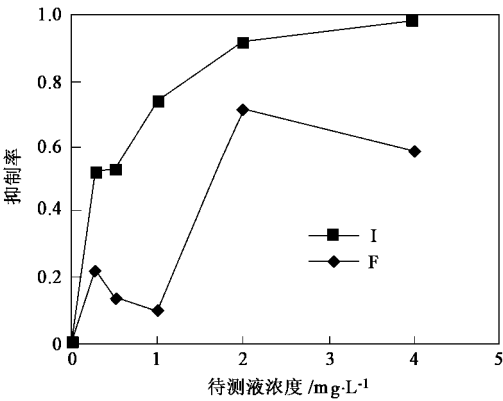


图 3 2 组化感物质对蛋白核小球藻的抑制效果

Fig. 3 Inhibitory effects of 2 allelopathic fractions on *C. pyrenoidosa*

2. 4 I 组分碱性氧化铝层析柱分离流分的抑藻效果

由于 I 组分是从碱性溶剂中分离得到(见图 1), 因此可以用碱性氧化铝对其进行进一步分离, 以明确具有抑藻活性的物质。对每个收集到的流分进行生物监测, 在 200 mL 培养混合液中含有 5 mL 藻种、1 mL 待测流分、194 mL 培养液。图 4 示出了培养 6 d 后不同流分对蛋白核小球藻抑制效果。可见, 1~4 号藻密度接近对照组, 加入 5~13 号流分的培养系统中藻密度显著下降, 抑制率接近 1; 13~

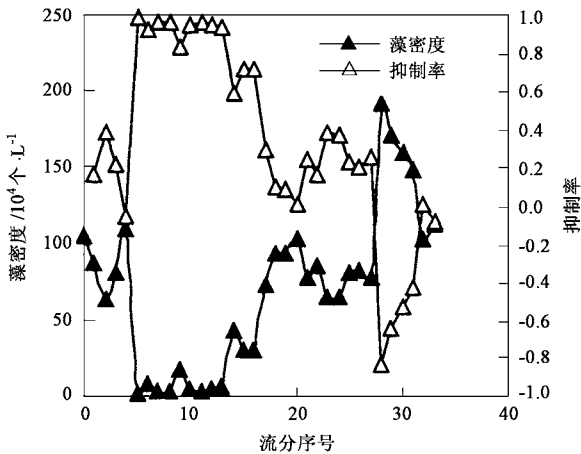


图 4 I 组分层析流分对蛋白核小球藻的化感作用效果

Fig. 4 Growth curve and inhibition rate of *C. pyrenoidosa*

with the allelopathic effects of chromatography fractions of extract I
27 号藻密度与对照相差不大; 而在 28 号之后藻密度突然高于对照组, 该流分显示明显的促进作用。

将具有强抑藻效果的流分 5~13 合并, 称为 I_2 , 28 号之后的流分合并称为 I_1 。图 5 示出不同浓度的 I_1 、 I_2 对蛋白核小球藻的抑制率。 I_1 表现出强的抑制作用, 用概率单位法求出 I_1 的 EC_{50} 为 0.50 mg/L 。可见 I_1 是 I 中抑制藻类生长的主要物质。 I_1 对蛋白核小球藻的化感作用表现为促进作用。在较低浓度(0.05 mL/L , 约 0.63 mg/L)时, I_2 对蛋白核小球藻的促进率为 0.73, 表现为较强的促进作用。但是随着浓度升高, I_2 的促进作用逐渐表现为抑制作用。化感物质的这种“低促高抑”现象已有过报道^[16]。

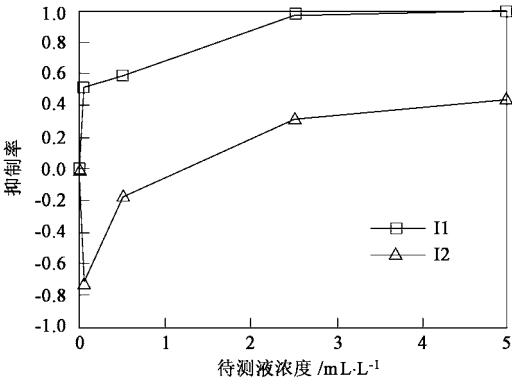


图 5 不同浓度 I_1 和 I_2 对蛋白核小球藻的抑制率

Fig. 5 Inhibitory effects of fraction I_1 and I_2 on *C. pyrenoidosa*

3 结论

(1) 利用乙醇提取溶剂萃取法从芦苇中得到 2 个具有抑藻活性的组分, 对蛋白核小球藻具有强抑制作用, EC_{50} 分别为 0.68 mg/L 和 2.65 mg/L 。

(2) 碱性氧化铝层析法得到抑制和促进蛋白核小球藻生长的流分各 1 个。前者对蛋白核小球藻的 EC_{50} 为 0.50 mg/L ; 后者在 0.65 mL/L 时能强烈促进蛋白核小球藻的生长。

参考文献:

[1] 彭海清, 谭章荣, 高乃云, 等. 给水处理中藻类的去除[J]. 中国给水排水, 2002, 18(2): 29~31.
[2] 俞子文, 孙文浩, 郭克勤, 等. 几种高等水生植物的克藻效应[J]. 水生生物学报, 1992, 16(1): 1~7.
[3] 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.
[4] Aliotta G, Greca N D, Monaco P, et al. In vitro algal growth inhibition by phytotoxins of *Typha latifolia* L. [J]. J. Chem. Ecol., 1990, 16: 2637~2646.
[5] Everall N C, Lees D R. The use of barley-straw to control general and blue-green algal growth in a Derbyshire reservoir[J]. Water Research, 1996, 30(2): 269~276.

- [6] Barrett P R F, Curnow J C, Littlejohn J W. The control of diatom and cyanobacterial blooms in reservoirs using barley straw [J]. *Hydrobiologia*, 1996, **340**: 307 ~ 311 .
- [7] Ball A S, Williams M, Vincent D, *et al.* Algal growth control by a barley straw extract[J]. *Bioresource Technology*, 2001, **77**: 177 ~ 181 .
- [8] Nakai S, Inoue Y, Hosomi M. Algal growth inhibition effects and induce ment modes by plant-producing phenols[J]. *Water Research*, 2001, **35**(7):1855 ~ 1859 .
- [9] Suzuki Y, Takabayashi T, Kawaguchi T, *et al.* Isolation of Allelopathic Substance from the Crustose Coralline Algae, *Lithophyllum* spp. , and Its Effect on the Brown Algae, *Laminaria religida* Miyabe (Phaeophyta) [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1998, **225**:69 ~ 77 .
- [10] Vyvyan J R. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals[J]. *Tetradron*, 2002, **58**: 1631 ~ 1646 .
- [11] Canovas S, Picot B, Casellas C, *et al.* Seasonal development of phytoplankton and zooplankton in a high-rate algal pond[J]. *Water Science and Technology*, 1996, **33**(7):199 ~ 206 .
- [12] Ramos E U, Vaes W H J, Mayer P, *et al.* Algal growth inhibition of *Chlorella pyrenoidosa* by polar narcotic pollutants: toxic cell concentrations and QSAR modeling[J]. *Aquatic Toxicology*, 1999, **46**:1 ~ 10 .
- [13] Hayes A W. Principles & Methods of Toxicology. 2nd Ed[M]. New York: Raven Press, 1989 .
- [14] Nakai S, Inoue Y, Hosomi M, *et al.* *Myrophyllum spicatum* Released Allelopathic Polyphenoles Inhibiting Growth of Blue-green Algae *Chlorella pyrenoidosa*[J]. *Water Research*, 2000, **34**(11): 3026 ~ 3032 .
- [15] 杨善元, 俞子文, 孙文浩, 等. 凤眼莲根系中抑藻物质分离与鉴定[J]. *植物生理学报*, 1992, **18**(4): 399 ~ 402 .
- [16] 叶居新, 何池全, 陈少风. 石菖蒲的克藻效应[J]. *植物生态学报*, 1999, **23**(4):379 ~ 384 .

欢迎订阅 欢迎投稿 欢迎刊登广告

《分析试验室》技术期刊

国内统一刊号:CN11-2017/TF 国际标准刊号:ISSN 1000-0720

国际 CODEN 码:FENSE4 邮发代号:82-431

国外代号:BM848 广告经营许可证:京西工商广字第 0038 号

《分析试验室》是中文核心期刊,月刊,国内外公开发行。1982 年创刊,目前已成为我国著名的分析化学专业刊物。影响遍及冶金、地质、石油化工、环保、药物、食品、农业、商品检验和海关等社会各行业及各学科领域。《分析试验室》以突出创新性和实用性为办刊宗旨,作者来自全国各行业的生产、科研第一线;在国际上常年被“CA”等国内外多家检索数据库、文摘收录,影响因子连续多年列化学类前列。本刊常设“研究报告”、“研究简报”、“仪器装置与设备”等栏目。“定期评述”栏目系统发布特邀知名专家学者撰写的国内外分析化学各领域的综合评述,连续跟踪学术发展前沿。“国际会议”栏目每期介绍影响广泛的分析化学领域国际学术交流会议。2004 年新设“特邀专家评论”,聚焦当前科研重点、难点、热点。

《分析试验室》每期定价 10 元,全年 12 期,120 元。

全国各地邮局征订,邮发代号 82-431。漏订的读者可直接与编辑部联系。

编辑部地址:北京新街口外大街 2 号

邮编:100088。电话:010-82013328

E-mail:analysislab@263.net