

不同溶剂提取芦竹化感物质对铜绿微囊藻生长的影响

洪喻¹, 胡洪营^{1*}, 黄晶晶¹, Sakoda Akiyoshi², Sagehashi Masaki², 李锋民³

(1. 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; 2. 东京大学生产技术研究所, 东京 1068558; 3. 中国海洋大学环境科学与工程学院, 青岛 266003)

摘要: 研究并比较了 3 种极性不同的有机溶剂(甲醇、乙酸乙酯、正己烷)提取的芦竹(*Arundo donax* Linn.)化感物质对铜绿微囊藻生长的影响. 通过跟踪观察藻细胞形态, 测定藻细胞密度和细胞大小, 发现 3 种溶剂提取物对铜绿微囊藻均有抑制作用. 抑藻作用出现早晚次序: 甲醇提取物 < 乙酸乙酯提取物 < 正己烷提取物. 随作用时间的延长, 投加低浓度甲醇提取物藻细胞生长恢复明显, 高浓度抑藻效果较乙酸乙酯提取物及正己烷提取物弱. 高浓度乙酸乙酯提取物、正己烷提取物在分别作用 2 d、4 d 后, 抑藻效果均接近 100%. 各溶剂提取物的半效应质量浓度($EC_{50,6d}$)分别为甲醇提取物 $0.17\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 乙酸乙酯提取物 $0.05\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 正己烷提取物 $0.08\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. 研究同时发现, 投加甲醇提取物藻细胞空洞化, 投加乙酸乙酯提取物藻细胞空洞化、破碎以及部分抱团, 投加正己烷提取物藻细胞出现褶皱及聚团现象. 各溶剂提取物均引起铜绿微囊藻细胞体积减小, 其中乙酸乙酯提取物的效果最强.

关键词: 化感物质; 芦竹; 铜绿微囊藻; 物质提取

中图分类号: X52 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)11-3143-05

Growth of *Microcystis aeruginosa* Affected by Allelochemicals of *Arundo donax* Linn. Extracted with Different Solvents

HONG Yu¹, HU Hong-ying¹, HUANG Jing-jing¹, Sakoda Akiyoshi², Sagehashi Masaki², LI Feng-min³

(1. Environmental Simulation and Pollution Control State Key Joint Laboratory, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 2. Institute of Industrial Science, University of Tokyo, Tokyo 1068558, Japan; 3. Institute of Environmental Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: To study the effects of allelochemicals of *Arundo donax* Linn. on the growth of *Microcystis aeruginosa*, the allelochemicals were extracted with three solvents (methanol, ethyl acetate and hexane), respectively. Based on the observation of algal morphology and the measurement of algal density and cell size, the results showed the allelochemicals extracted with all the three solvents had inhibition on *M. aeruginosa*. The appearance time of allelochemical inhibition increased as follows, allelochemicals extracted with methanol < ethyl acetate < hexane. As treatment time extended, *M. aeruginosa* regrew at low doses of allelochemicals extracted with methanol. Their inhibitory effects at high doses were lower than those extracted with ethyl acetate and hexane. After 2 d and 4 d of treatment, the inhibition ratios of allelochemicals extracted with ethyl acetate and hexane reached almost 100%, respectively. The 50% effective concentrations ($EC_{50,6d}$) of allelochemicals extracted with methanol, ethyl acetate and hexane were $0.17\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $0.05\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $0.08\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. The allelochemicals extracted with methanol caused cavities in cells, those with ethyl acetate caused cells into cavities, pieces and conglomeration, and those with hexane caused goffers on cells initially with conglomeration later. The allelochemicals extracted with all the three solvents decreased the cell size of *M. aeruginosa*, among which those extracted with ethyl acetate had the strongest action.

Key words: allelochemical; *Arundo donax* Linn.; *Microcystis aeruginosa*; extraction

伴随水体富营养化的加剧, 藻类暴发性生长即水华或赤潮的影响范围及危害也在逐年扩大^[1]. 目前, 藻类控制技术研究虽取得了一系列成果, 但对水华控制的应用仍未有突破性的进展. 现有最简便、最常用且效果最好的抑藻方法仍是直接向水体中投加化学杀藻剂(如硫酸铜). 这类杀藻剂虽能短时间达到杀灭藻类的效果, 但对生态环境的危害以及对人类健康的威胁也是十分严重的^[2]. 因此, 寻找高效、安全、简便的抑藻方法已成为水环境保护领域一个前沿和热点的课题.

利用水生植物产生的化感物质抑制藻类的生长

为藻类控制技术开辟了新的思路^[3]. 已有研究发现, 许多水生植物能够产生化感物质抑制藻类的生长, 如穗花狐尾藻(*Myriophyllum spicatum*)^[4]、芦苇(*Phragmites communis*)^[5]、凤眼莲(*Eichhornia crassipes*)^[6]、金鱼藻(*Ceratophyllum demersum*)^[7]等. 目前利用水生植物化感作用及化感物质抑制藻类的方

收稿日期: 2007-11-26; 修订日期: 2008-01-22

基金项目: NSFC/JST 国际合作项目(50721140017); 南四湖支撑项目(2006BAC10B03)

作者简介: 洪喻(1982~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为环境生物学, E-mail: y-hong03@mails.tsinghua.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: hyhu@tsinghua.edu.cn

式主要包括 3 类:在待处理水体中种植水生植物,使其主动分泌化感物质抑藻;将收割干燥的植物体施入待处理水体,通过腐败降解作用释放化感物质抑制藻类生长;从植物体中提取化感物质投加到待处理水体中进行藻类控制^[8-10]。其中,最后一类方式操作简便,易工业化,更受人们推崇^[3]。

目前水生植物化感作用抑藻研究中,考察的水生植物多为沉水和漂浮植物,对大型挺水植物的研究鲜见报道。同时,现有的文献中多报道的是鲜活植物体在培植条件下种植水对藻类的化感作用,对干燥植物体的提取物是否具有化感抑藻活性的报道较少,而对不同溶剂提取物抑藻活性的比较研究的报道更为鲜见^[4-8]。

淡水水华种类繁多,其中 50% 以上的水华藻类能够产毒,而我国众多河流湖泊中连年暴发水华的藻种多为铜绿微囊藻^[11,12],因此,本研究选用铜绿微囊藻为对象,比较了不同溶剂芦竹提取物对铜绿微囊藻的生长的影响,以期利用芦竹化感物质控制水华提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

大型挺水植物芦竹采自山东省西南部南四湖流域,采集后于 60℃ 干燥 48 h,备用。实验所用铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)由中国科学院水生生物研究所淡水藻种库提供。实验前采用 BG11 培养基^[5]预培养铜绿微囊藻,使之处于对数增长期。

1.2 实验方法

1.2.1 溶剂提取芦竹植株的方法

称取 60 g 干芦竹植株(粉碎至 0.3 mm),每份 20 g 置于 500 mL 锥形瓶中,并分别加入 400 mL 正己烷、乙酸乙酯、甲醇,超声波常温提取 1 h。提取结束后,用滤纸滤去提取液中的残渣,并通过 0.22 μm 有机系滤膜除去颗粒物干扰,后通过旋转蒸发(100 r/min, 65℃)除去溶剂,得到浸膏,称重,并用二甲基亚砜(DMSO)定容。浓缩液在无菌条件下,通过 0.22 μm 无菌有机系滤膜除去微生物,于 4℃ 冰箱备用。前期实验已发现 DMSO 投加比例 < 1% 对受试铜绿微囊藻的生长无影响,后续投加比例均控制在此范围内。

1.2.2 抑藻圈检测方法

BG11 培养基中加入 2% 琼脂制成平板,铺设 30 mm 的圆形滤纸片(已浸润对数生长期的铜绿微囊藻藻液),于滤纸中心滴加一定量提取物,在温度为 25℃,光照强度 40 ~ 60 μmol·(m²·s)⁻¹,光暗时间比

14 h:10 h 的培养条件下培养,1 d 后观察抑藻圈的大小。处理组及空白对照组试验分别进行 3 次,抑藻圈大小为平均值 ± 方差表示。

1.2.3 培养液检测方法

采用培养液法,通过摇瓶实验对芦竹化感物质进行抑藻活性检测。培养混合液总体积 20 mL,其中包括处于对数生长期的藻种液、一定量的培养液(121℃ 灭菌 30 min)及芦竹化感物质。不同溶剂提取的芦竹化感物质的浓度梯度为 0、0.05、0.1、0.25 和 0.5 g·L⁻¹,每个浓度设 3 个平行样。将上述培养混合液置于温度 25℃,相对湿度 75%,光照强度 40 ~ 60 μmol·(m²·s)⁻¹,光暗时间比 14 h:10 h 的人工气候箱中培养。3 种溶剂提取物的抑藻效果的测定同时进行。

1.2.4 藻类生长、形态及大小测定方法

采用显微镜计数法,每天在显微镜下用血球计数板进行计数,测定藻密度。采用测微物尺和测微目镜测定藻细胞大小。显微照相获得细胞形态照片。

1.2.5 数据处理方法

根据藻密度计算芦竹化感物质对铜绿微囊藻的相对抑制率,计算公式为:

$$IR(\%) = (1 - N/N_0) \times 100$$

式中,IR 为相对抑制率, N 为加入化感物质实验组的藻密度(个·mL⁻¹), N_0 为对照组藻密度(个·mL⁻¹)。EC₅₀ 的计算采用概率单位法拟合^[5]。使用 Origin7.0 软件对数据进行处理。剂量效应采用 t 检验进行分析评价。所有实验均至少重复 3 次。数据由平均值 ± 方差表示。显著性分析:采用 99% 组间差异置信区间量化差异的显著性,区间包含零表示不显著;反之显著;区间距零越远越显著。

2 结果与讨论

2.1 不同溶剂芦竹提取物对铜绿微囊藻生长特性的影响

图 1 为甲醇提取物、乙酸乙酯提取物以及正己烷提取物对铜绿微囊藻生长影响的抑藻圈结果。由图 1 可以看出,各溶剂提取物均有抑藻效果,其中甲醇提取物及乙酸乙酯提取物在培养 1 d 后效果强于正己烷提取物。

图 2 为分别投加各溶剂提取物的铜绿微囊藻生长曲线。从中可见,随培养时间的延长,各溶剂提取物抑藻效果随投加物浓度增加而增强。甲醇提取物对铜绿微囊藻的抑制作用出现最早,在培养 1 d 后即达到 50% 左右。按照各溶剂提取物抑藻效果出

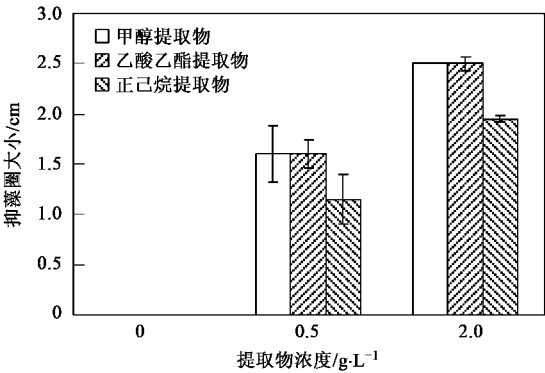


图 1 分别投加芦竹甲醇提取物、乙酸乙酯提取物以及正己烷提取物的抑藻圈大小(1 d)

Fig.1 Diameter of inhibition cycle of *M. aeruginosa* with the addition of the extract of *A. donax* with methanol, ethyl acetate and hexane(1 d)

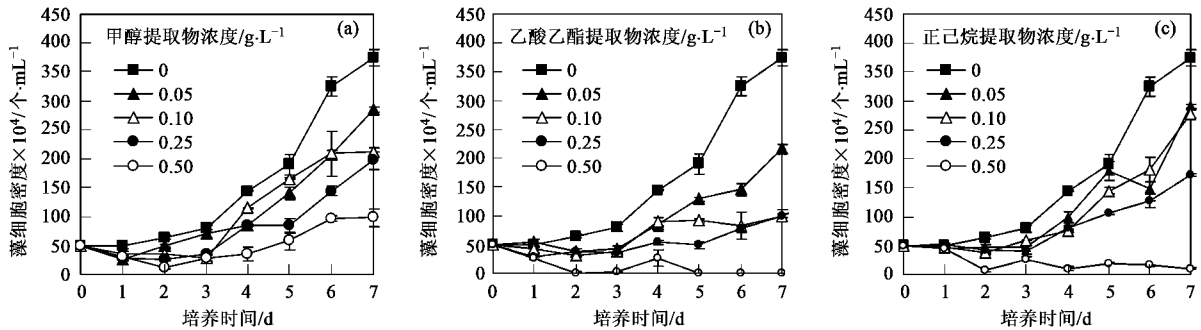


图 2 投加芦竹甲醇提取物、乙酸乙酯提取物以及正己烷提取物后铜绿微囊藻的生长曲线 ($n=3$)

Fig.2 Growth curves of *M. aeruginosa* with the addition of the extract of *A. donax* with methanol, ethyl acetate and hexane($n=3$)

利用概率单位法得到各溶剂提取物 $EC_{50,6d}$ 值: 甲醇提取物 $0.17\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 乙酸乙酯提取物 $0.05\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 正己烷提取物 $0.08\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. 乙酸乙酯提取物 EC_{50} 值最低, 即抑藻效果最佳.

2.2 不同溶剂芦竹提取物对铜绿微囊藻细胞形态和大小的影响

不同溶剂芦竹提取物对铜绿微囊藻细胞形态的影响差异显著(图 3). 培养 2 d 后, 甲醇提取物组藻细胞出现明显的空洞, 细胞色素减退; 乙酸乙酯提取物组藻细胞出现明显的空洞, 细胞色素减退, 部分细胞发生严重的破碎现象; 正己烷提取物组藻细胞形态出现褶皱, 细胞内含物(如色素)或细胞壁膜结构分布不均匀. 随着培养时间的延长, 甲醇提取物组空洞现象更加明显; 乙酸乙酯提取物组细胞除产生空洞、出现破碎现象外, 部分细胞出现聚集抱团现象; 而正己烷提取物组大部分细胞聚集抱团. 培养后期, 所有实验组藻细胞细胞色素均明显减退. 推测 3 种溶剂极性差异较大, 其中芦竹化感物质的组成不尽相同, 不同类型的化感物质对藻细胞影响的机制可能有所

现时间早晚, 发现甲醇提取物 < 乙酸乙酯提取物 < 正己烷提取物. 正己烷提取物在培养第 1 d 时, 对藻细胞的生长未产生影响. 随着培养时间的延长, 各溶剂提取物的抑藻效果出现明显的差异. 其中乙酸乙酯提取物各浓度抑藻效果均显著, 高浓度组在培养 2 d 后抑制率达到将近 100%, 其中藻细胞稀少, 后续藻细胞生长无恢复. 正己烷提取物高浓度抑藻效果强烈, 但较乙酸乙酯高浓度组抑藻效果弱, 在培养 4 d 后抑制率达到将近 100%, 虽然后续藻细胞生长无明显恢复, 但维持一定数量的藻细胞存在. 甲醇提取物各浓度组抑藻效果均弱于乙酸乙酯及正己烷提取物, 藻细胞生长恢复明显, 高浓度组抑制率仅在 80% 左右.

差异, 从而导致抑制藻细胞的形态变化差异. 铜绿微囊藻细胞通常在人工培养条件下主要是以单细胞形式存在; 而在自然条件下则主要是以群体形式存在^[13]. Shirai 等^[14]发现野外采集到的微囊藻经纯化后表型由群体转变为单细胞. Van Donk 等^[15]研究发现浮游植物面临动物摄食时会改变细胞表型形成群体结构. 吴忠兴^[16]在研究硫酸铜对铜绿微囊藻的影响中发现, 单细胞藻在硫酸铜的作用下活性迅速降低或死亡, 而群体铜绿微囊藻可以保持生存活力. 上述研究中, 无论是理化环境的胁迫还是浮游动物的摄食压力, 微囊藻细胞形态的变化情况类似, 由于芦竹化感物质也给藻细胞生长带来压力, 从而使藻细胞受到刺激或诱导从单细胞转变为群体表型以抵御这一胁迫作用. 推测铜绿微囊藻的这种细胞表型可塑性属于一种环境诱导抵御机制. Burkert 等^[17]也认为微囊藻形成群体可能是个体细胞对外界环境的抵御反应. 关于更深层次的群体形成机制仍有待进一步研究.

培养初期, 乙酸乙酯提取物高浓度组中藻细胞

明显变小.随着培养时间的延长,实验各组藻细胞体积均显著减小,如表 1 及图 4 所示.其中乙酸乙酯提

取物对细胞体积的影响最强,正己烷提取物次之,甲醇提取物最弱.

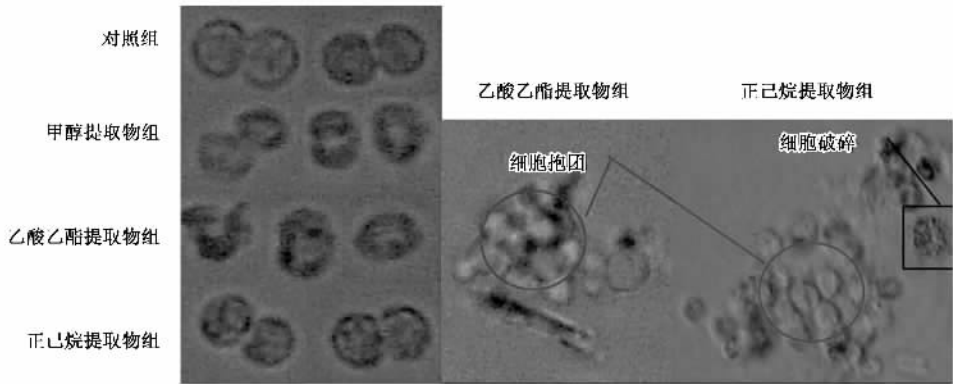


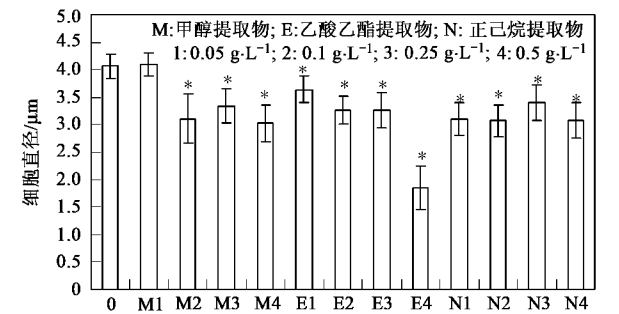
图 3 芦竹甲醇提取物、乙酸乙酯提取物以及正己烷提取物对铜绿微囊藻细胞个体及群体特性的影响

Fig.3 Effects of the extract of *A. donax* with methanol, ethyl acetate and hexane on the morphology of cell unit and cell colony

表 1 不同溶剂提取芦竹化感物质对铜绿微囊藻细胞大小的影响($n = 75, 3\text{ d}$)

Table 1 Allelochemical effect of *A. donax* extracted with different solvents on cell volume of *M. aeruginosa* ($n = 75, 3\text{ d}$)

提取物类型及浓度	细胞大小	99% 组间差异 置信区间
	/μm	
对照	4.07 ± 0.22	—
甲醇提取物 0.5 g•L ⁻¹	3.02 ± 0.34	(0.36·0.60)
乙酸乙酯提取物 0.5 g•L ⁻¹	1.85 ± 0.39	(0.81·1.23)
正己烷提取物 0.5 g•L ⁻¹	3.08 ± 0.32	(0.34·0.57)



* 代表 $p < 0.01$, 与对照相比有显著性差异

图 4 不同浓度芦竹甲醇提取物、乙酸乙酯提取物以及正己烷提取物对铜绿微囊藻细胞大小的影响(3 d)

Fig.4 Effects of the extracts of *A. donax* with methanol, ethyl acetate and hexane on cell size of *M. aeruginosa* at different dose(3 d)

Sedmak 等^[18]研究发现产毒微囊藻在形成水华时为克服藻泥形成过程中光照的减弱,可通过增大藻细胞体积来增大捕光面积.其它光积累相关的研究也指出细胞可通过增大体积争取更多的光照^[19].而本研究中,芦竹化感物质投加后 3 d 即可使大部

分尚存且形态完整的藻细胞体积显著减小.考虑到实验中采用的都是全玻璃培养瓶,光可从各个角度照射到藻细胞,投加的化感物质也未对细胞产生遮光影响,不会导致光遮蔽效应.本研究中首次区分了形态不规则破损细胞与形态完整藻细胞,通过对后者进行大小统计分析发现了芦竹化感物质抑制铜绿微囊藻过程中特殊变化规律.外界环境导致的藻细胞体积的减小一般认为有 3 种可能:一是藻细胞进入主动的程序性死亡过程,根据现有的研究报道细胞体积减小是细胞编程性死亡过程的重要标志^[20];二是藻细胞可能形成孢子耐受不利环境的影响从而保证部分个体的生存^[21];另外,细胞体积的变化与细胞内外离子浓度差也有密切关系,离子通道开放紊乱会导致渗透压改变,这也可作为藻细胞体积减小的一个原因^[22].结合芦竹化感物质投加后藻细胞空洞化、色素减退、细胞聚团、体积减小等现象分析,推测芦竹化感物质对不同表型的微囊藻细胞作用机制可能存在差异,而铜绿微囊藻也将启动多种拮抗途径应对化感物质的胁迫.

3 结论

- (1) 芦竹甲醇、乙酸乙酯、正己烷提取物均有显著的抑藻活性,抑藻时间出现早晚顺序为: 甲醇提取物 < 乙酸乙酯提取物 < 正己烷提取物.
- (2) 芦竹甲醇、乙酸乙酯和正己烷提取物对铜绿微囊藻的 $EC_{50.6\text{ d}}$ 值分别为 0.17、0.05 和 0.08 g•L⁻¹. 乙酸乙酯提取物 EC_{50} 最低,即抑藻效果最佳.
- (3) 不同溶剂芦竹提取物对藻细胞形态均有显

著影响,其中甲醇提取物组藻细胞产生空洞,正己烷提取物组藻细胞出现褶皱、聚集抱团现象,乙酸乙酯提取物组部分细胞发生破碎、有细胞抱团现象,实验各组藻细胞均显著减小,其中乙酸乙酯提取物组减小最显著。

参考文献:

- [1] Falconer I R. An overview of problems caused by toxic blue-green algae (cyanobacteria) in drinking and recreational water [J]. Environmental Toxicology, 1999, **14**: 5-12.
- [2] Veldhuis M J W, Wassmann P. Bloom dynamics and biological control of a high biomass HAB species in European coastal waters: A *Phaeocystis* case study[J]. Harmful Algae, 2005, **4**: 805-809.
- [3] Vyvyan J R. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals[J]. Tetradron, 2002, **58**: 1631-1646.
- [4] Nakai S, Yamada S, Hosomi M. Anti-cyanobacterial fatty acids released from *Myriophyllum spicatum* [J]. Hydrobiologia, 2005, **543**: 71-78.
- [5] Li F M, Hu H Y. Isolation and characterization of a novel antialgal allelochemical from *Phragmites communis* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, **71**: 6545-6553.
- [6] Jin Z H, Zhuang Y Y, Dai S G, *et al.* Isolation and identification of extracts of *Eichhornia crassipes* and their allelopathic effects on algae [J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2003, **71**: 1048-1052.
- [7] Gross E M, Erhard D, Ivanyi E. Allelopathic activity of *Ceratophyllum demersum* L. and *Najas marina* spp. intermedia (Wolfgang) Casper[J]. Hydrobiologia, 2003, **506**: 583-589.
- [8] 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.
- [9] Barrett P R F, Cumow J C, Littlejohn J W. The control of diatom and cyanobacterial blooms in reservoirs using barley straw [J]. Hydrobiologia, 1996, **340**: 307-311.
- [10] Nakai S, Inoue Y, Hosomi M. Algal growth inhibition effects and inducement modes by plant-producing phenols[J]. Water Research, 2001, **35**(7): 1855-1859.
- [11] Chen J Z, Liu Z L, Ren G J, *et al.* Control of *Microcystis aeruginosa* TH01109 with batangas mandarin skin and dwarf banana peel[J]. Water Sa, 2004, **30**: 279-282.
- [12] Pan G, Zhang M M, Chen H, *et al.* Removal of cyanobacterial blooms in Taihu Lake using local soils. I. equilibrium and kinetic screening on the flocculation of *Microcystis aeruginosa* using commercially available clays and minerals [J]. Environmental Pollution, 2006, **141**: 195-200.
- [13] Reynolds C S, Jaworski G H M, Cmiech H A, *et al.* On the annual cycle of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* Kütz. Emend[J]. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 1981, **293**: 419-477.
- [14] Shirai M, Matumaru K, Ohtake A, *et al.* Development of a solid medium for growth and isolation of axenic *Microcystis* Strains (Cyanobacteria) [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1989, **55**(10): 2569-2571.
- [15] Van Donk E, Lüring M, Lampert W. Consumer-induced changes in phytoplankton: inducibility, costs, benefits and the impact on grazers [A]. In: Harvell D, Tollrian R (eds). Ecology and Evolution of Inducible Defenses[M]. Princeton, New Jersey: Princeton University Press, 1999. 87-103.
- [16] 吴忠兴. 我国微囊藻多样性分析及其种群优势的生理学机制研究[D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 2006. 113-114.
- [17] Burkert U, Hyenstrand P, Drakare S, *et al.* Effects of the mixotrophic flagellate *Ochromonas* sp. on colony formation in *Microcystis aeruginosa*[J]. Aquatic Ecology, 2001, **35**: 9-17.
- [18] Sedmak B, Kosi G. The role of microcystins in heavy cyanobacterial bloom formation[J]. Journal of Plankton Research, 1998, **20**: 691-708.
- [19] Post A F, Dubinsky Z, Wyman K, *et al.* Physiological response of a marine planktonic diatom to transition in growth irradiance [J]. Marine Ecology Progress Series, 1985, **25**: 141-149.
- [20] Heimlich G, Bortner C D, Cidlowski J A. Apoptosis and cell volume regulation-The importance of ions and ion channels[J]. Cell Volume and Signaling, 2004, **559**: 189-203.
- [21] Montecchiario F, Giordano M. Effect of prolonged dark incubation on pigments and photosynthesis of the cave-dwelling cyanobacterium *Phormidium autumnale* (Oscillatoriales, Cyanobacteria) [J]. Phycologia, 2006, **45**: 704-710.
- [22] Taylor A R, Manison N F H, Fernandez C, *et al.* Spatial organization of calcium signaling involved in volume control of the *Fucus rhizoid*[J]. Plant Cell, 1996, **8**: 2015-2031.