J. Lake Sci.(湖泊科学), 2007, **19**(3):321 - 325
http://www.jlakes.org. E-mail: jlakes@niglas.ac.cn
© 2007 by *Journal of Lake Sciences*

川蔓藻在再生水体中对普通小球藻的化感作用*

王卫红[1,2],季　民[2], 王苗苗[2],张　楠[2],唐运平[3], 张志杨[3]
(1:天津大学建筑学院,天津 300072)
(2:天津大学环境科学与工程学院,天津 300072)
(3:天津市环境保护科学研究院,天津 300191)

摘　要:采用川蔓藻植株体与普通小球藻在再生水中共培养和使用再生水种植川蔓藻的种植水纯培养普通小球藻的方法,在实验室条件下研究了在滨海再生水河道中生长的沉水植物川蔓藻对小球藻的化感作用. 结果表明,川蔓藻对普通小球藻具有显著的抑制作用. 在共培养实验中,96 h 的抑制率为 88.86%;在种植水纯培养实验中,96 h 的抑制率为 48.91%. 川蔓藻的种植水对普通小球藻的化感作用系数平均为 -0.2448. 川蔓藻的叶和根的种植水对普通小球藻均有抑制效果,96 h 的抑制率为叶 34.71%,根 14.12%;平均的化感作用系数叶为 -0.1317,根为 -0.0901;川蔓藻的根和叶均能释放化感物质,但抑制小球藻的化感物质主要通过叶释放.
关键词:川蔓藻;普通小球藻;化感作用;再生水

Allelopathy of *Ruppia Maritima* on *Chlorella Vulgaris* in reclaimed wastewater

WANG Weihong[1,2], JI Min[2], WANG Miaomiao[2], ZHANG Nan[2], TANG Yunping[3] & ZHANG Zhiyang[3]
(1: *School of Architecture, Tianjin University, Tianjin* 300072, *P. R. China*)
(2: *School of Environmental Science and Engineering, Tianjin University, Tianjin* 300072, *P. R. China*)
(3: *Academy of Environmental Science, Tianjin* 300191, *P. R. China*)

Abstract: It is reported in this paper that the results of allolepathy test of *Ruppia maritima L.* on *Chlorella vulgaris* with co-culture in reclaimed wastewater and pure culture in the filtrate of liquious cultured the macrophyte. *Chlorella vulgaris* co-cultivated with *Ruppia maritima* in reclaimed wastewater indicated that *Ruppia maritima* had remarkable inhibition on *Chlorella vulgaris*. On co-culture experiment, at 96 h inhibition ratio was 88.86%; the competition of the nutrients had contribution to the growth which inhibited the *Chlorella vulgaris*. On pure culture experiment with the filtrate of liquious cultured entire plant, leaves and roots of *Ruppia maritima*, the results of pure culture was inhibition activities on the growth of *Chlorella vulgaris* with the filtrate of entire plant, leaves and roots of *Ruppia maritima*, at 96 h inhibition ratio of leaves and roots were 48.91%, 34.71% and 14.12%, the allelopathic effect of equal coefficient (E_t) of plant, leaves and roots were -0.2448, -0.1317 and -0.0901. The allolepathy parameter E_t of *Ruppia maritime* on *Chlorella vulgaris* was derived from the modified Logistic equation. Leaves and roots of *Ruppia maritima* were capable of releasing allelopathically active compounds, but the inhibitory activity of allelopathically active compounds mainly came from the leaves tissue.
Keywords: *Ruppia maritima*; *Chlorella vulgaris*; allelopathy; reclaimed wastewater

将城市污水再生处理后回用于景观水体是北方滨海缺水城市污水资源化的一个重要方面,但是再生水极易滋生藻类影响景观环境. 大量的研究表明,在自然水域中,很多沉水植物对藻类的生长具有明显的化感作用[1-3]. 因此在景观水体中恢复与重建沉水植被成为控制水体富营养化的一种重要手段[4]. 其中沉水植物川蔓藻(*Ruppia maritima* L.)由于其广泛的盐度容忍性以及在富营养化的水体中迅速生长的能力备

* 国家 863 攻关课题"天津市滨海新区水环境质量改善技术与综合示范"(2003AA601030)资助. 2006 - 05 - 23 收稿;2006 - 08 - 21 收修改稿. 王卫红,女,1968 年生,博士;E-mail:red_wangwei@163.com.

受关注[4,5]. 我们在天津滨海一个高含盐再生水河道中观察到,川蔓藻生长密度大的区域水体清澈,叶绿素 a 含量低,而川蔓藻生长密度小的区域水体透明度低,叶绿素 a 含量较高. 这种现象提示,川蔓藻对再生水河道中的藻类是否有化感抑制作用?

川蔓藻是一个世界广布种,常被称为"水鬼草"或"沟草". 它主要生长在永久或临时被水淹没的中等盐度到高盐海岸湿地中[6]. 大量研究表明,川蔓藻能够显著地改变河口海岸带栖息地的水质质量和沉积物的生物地球化学循环[4-7]. 但目前关于沉水植物川蔓藻对藻类的化感作用研究较少,仅见 Marina DellaGreca[4] 等曾报道使用石油醚从烘干的川蔓藻植株体中分离提取出 7 种 ent-labdane diterpenes 物质,其中有两种物质具有显著的克藻效应. 但在实际的生态工程中,沉水植物与藻类之间的化感作用则以水体为媒介发生相互作用. 在实验室尺度上研究水生植物与藻类之间的化感作用,目前普遍采用适合于水生植物生长的 Hoagland 培养液培养或适合于藻类生长的培养基作为检测化感作用效应的水体介质. 由于化感作用受到多种环境因子的影响[1],因此实验室的研究结果往往不适宜指导实际的生态工程. 本文选择滨海再生水河道中的优势藻类普通小球藻(*Chlorella vulgaris*),在实验室研究了川蔓藻在再生水体中对普通小球藻的化感作用,目的在于进一步揭示川蔓藻的生态学功能,为抑制再生水富营养化提供可选择的沉水植物材料.

1 材料与方法

1.1 材料

川蔓藻采自天津滨海泰达开发区一条再生水河道中,在一只 120 L 高度 60 cm 的塑料水箱底部铺 10 cm 厚河道底泥,用取自河道的再生水室外培养,自然光照. 试验时采适量分别悬浮培养[8]在装有蒸馏水的 2L 烧杯中,置于光照培养箱中,温度 25 ± 2℃,光照强度 4000 ± 100 lux,驯化 2 d 后用于实验. 川蔓藻在放入前先用自来水和蒸馏水反复冲洗,再用 0.1% $HgCl_2$ 溶液消毒,后用无菌水冲洗干净,滤纸吸干,称重.

实验藻种为普通小球藻(*C. vulgaris*)购自中国科学院武汉水生所藻种库. 使用改良的水生 4 号培养液培养,其中营养盐浓度为 $NaNO_3$ 250 mg/L,KH_2PO_4 175 mg/L. 在 HPG-280 B 型光照培养箱中,温度为 24 ± 2℃,250 ml 锥型瓶,培养量为 100 ml. 普通小球藻培养光强为 4000 ± 100 lux,光暗比 12 h/12 h,培养期间每天摇瓶 3 次. 实验前将其转接入灭菌的再生水中,当其进入对数生长期后用于实验.

再生水取自天津泰达新水源一厂 CMF 出水口. 因为 0.22 μm 膜的连续微滤可以提供无其它微生物干扰实验用水. 再生水中含有较高的难降解小分子有机物,其 COD 为 88.6 mg/L,营养盐浓度为 NO_3^--N 3.21 mg/L, NH_4^+-N 为 0.382 mg/L,PO_4^--P 0.289 mg/L.

1.2 实验设计

1.2.1 再生水对于小球藻生长的影响实验 将处于对数生长期的普通小球藻分别接入营养液和灭菌的再生水中,比较其生长曲线.

1.2.2 共培养的抑藻实验 取 2 个 5000 ml 的大烧杯,分别装入 4000 ml 经 0.45 μm 滤膜过滤和高温灭菌的再生水,将处于对数生长期的藻接入,使起始的藻细胞个数为 36×10^4 cells/ml,再放入 20 ± 0.02 g(种植密度 5 g/L)生长期相同的川蔓藻. 培养条件:光暗比为 12 h/12 h,光强 4000 ± 100 lux,温度为 25℃. 每天摇动烧杯 2 次,培养 7 d. 实验设三次重复. 每隔 24 h 用血球计数板在显微镜(16 × 40 倍)下计藻数. 同时测定对照组和处理组水体中营养盐的浓度,使用国家环保局编制的《水和废水监测分析方法》(第四版)中的标准方法. NH_3^+-N 采用纳氏试剂光度法, NO_3^--N 采用紫外分光光度法, PO_4-P 采用钼酸铵分光光度法. 实验结束时,取沉降在杯底的藻细胞置于光学显微镜下观察. 同时取出川蔓藻植株体用自来水反复冲洗 10 min,再用蒸馏水漂洗 5 min,用滤纸吸干植株体表面水分,称重,然后置于 80℃烘箱中 48 h 取出称干重.

1.2.3 种植水的抑藻实验 种植水的制备:取 3 个 2500 ml 的广口瓶,分别装 2000 ml 灭菌的再生水,将川蔓藻植株体 20 g 装入其中一个瓶中. 另取 20 g 川蔓藻植株体,将其茎叶从连接根状茎的节点处切下,茎叶和根(根状茎)分别装入另外 2 个瓶中,将生长川蔓藻根的瓶用锡箔纸包裹阻隔光线. 其余两个瓶口覆盖两层纱布. 在温度 24 ± 2℃,光强 4000 ± 100 lux,12/12 h 光暗比培养. 7 d 后,取该三种处理的种植水,先后用孔径为 0.45 μm 和 0.22 μm 的微孔滤膜进行抽滤,备用.

试验方法:将灭菌的再生水 50 ml 加入到 250 ml 锥形瓶中,再加入 50 ml 的种植水. 总培养体积 100 ml.

无菌操作条件下将处于对数生长期的小球藻(细胞浓度为 10^6 cells/ml)转接到上述培养液中. 培养条件:光暗比为 12/12 h,光强 4000 ± 100 lux,温度为 25℃. 每天摇瓶 3 次,培养 7 d. 设 3 个平行对照,每 24 h 测一次藻的生长量. 藻类生长量用光密度 OD_{650} 值(721 分光光度计).

1.3 实验数据计算与处理

小球藻的生长抑制率(I,Inhibition Ratio)计算公式:

$$I(\%) = (N_0 - N_t)/N_0 \times 100\ \% \quad (1)$$

式中,N_t 是处理组在 t 时刻的藻密度,N_0 是对照组藻密度. 川蔓藻种植水对普通小球藻的他感作用系数 E_t 的计算参见文献[9]. 再生水中营养盐的去除率(R)计算公式:

$$R = C - C_0/C_0 \times 100\ \% \quad (2)$$

式中,C_0 为再生水中营养盐的初始浓度,C 为实验结束时水体中营养盐浓度.

实验数据采用 SPSS 11.5 软件包进行独立样本检验统计分析,以 $P < 0.05$ 显著性差异,$P < 0.01$ 为极显著性差异.

2 结果与讨论

2.1 再生水对于普通小球藻生长的影响

选择回用于景观水体中的再生水作为研究化感作用效应的水体介质,需要首先确定再生水对小球藻是否有影响,结果如图 1 所示,小球藻在再生水中的生长速度略快于在营养液中的生长速度. 144 h 时,再生水中的小球藻生长密度是营养液中小球藻生长密度的 1.39 倍. 小球藻在营养液和再生水中的生长符合一级反应动力学方程:

$$dN/dt = kN$$

式中,N 为藻量(光密值 OD_{650}),t 为时间(d),k 为生长速率常数(d^{-1}). 普通小球藻在营养液和再生水中的生长速率常数线性回归方程是:

营养液 $\ln(N/N_0) = 0.5047t - 5.279$ ($R^2 = 0.9652$),再生水 $\ln(N/N_0) = 0.5508t - 5.240$ ($R^2 = 0.9545$). 营养液的 k(= 0.5047)值为再生水(k = 0.5508)的 91.6%. 但两条曲线差异不显著($P > 0.05$). 说明这种再生水对于普通小球藻的生长没有影响.

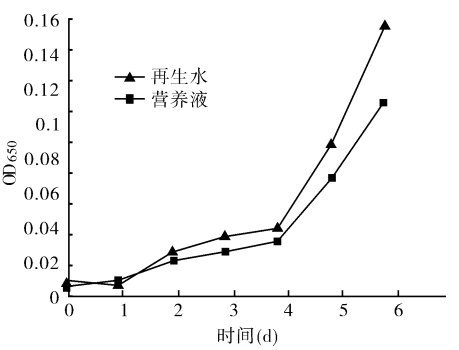


图 1 普通小球藻在营养液和再生水中的生长曲线

Fig. 1 Growth curves of *C. vulgaris* cell in the reclaimed wastewater and a medium

2.2 再生水中共培养时川蔓藻对普通小球藻的抑制作用

川蔓藻的植株体与普通小球藻在再生水中共培养 7 d 后,处理组水体逐渐变清,对照组水体绿色变深;处理组的藻细胞凝聚成团并沉淀在培养缸底;光学显微镜下可以明显看出藻细胞的形态发生了改变,处理组的许多藻细胞由正常生长的圆形变为椭圆形(图 3),有些藻细胞呈淡黄绿色,表明接近或已经死亡. 从图 2 普通小球藻与川蔓藻在再生水中共培养时的生长曲线可以看出,川蔓藻对普通小球藻的生长具有显著的抑制效应,96 h 的抑制率达到 88.86%. 共培养 144 h 时处理组的藻细胞数约为同期对照的 17.57%.

2.3 川蔓藻的植株体与普通小球藻在再生水中共培养时水体营养盐的变化

与共培养生长密度相同的川蔓藻和小球藻单独培养对再生水体中无机氮和磷的吸收速率不同,小球藻明显大于川蔓藻(图 4),共培养 7 d 后,处理组再生水中的营养盐的去除率 PO_4-P 为 80.17%,NO_3-N 为 61.37%,NH_4-N 为 70.93%. 对照组即普通小球藻在再生水中单独培养的营养盐去除率 PO_4-P 为 97.03%,NO_3-N 为 82.76%,NH_4-N 为 99.97%. 川蔓藻在再生水中单独培养的营养盐去除率 PO_4-P 为 92.15%,NO_3-N 为 90.13%,NH_4-N 为 99.97%. 处理组显著低于对照组和川蔓藻在再生水体中单独培养的一组. 理论上讲共培养的处理组生物量远大于对照组的生物量,对水体中的营养盐的吸收率应该高于对照组,但本试验结果则相反. 说明川蔓藻与普通小球藻之间有化感作用,且影响了它们对营养盐的利用率. 实验结束

时处理组的川蔓藻生物量鲜重增加了20.03%,干重增加了23.44%,与川蔓藻在再生水中纯培养时生物量的增加没有显著差异. 而共培养的小球藻的生物量则与纯培养的有显著差异,说明川蔓藻与普通小球藻在再生水中共培养时的化感作用表现为对小球藻的抑制.

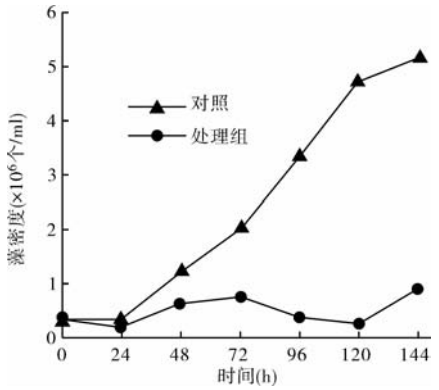


图2 普通小球藻与川蔓藻在再生水中共培养时的生长曲线

Fig. 2 Growth curves of *C. vulgaris* on co-cultivated experiment with *Ruppia maritima*

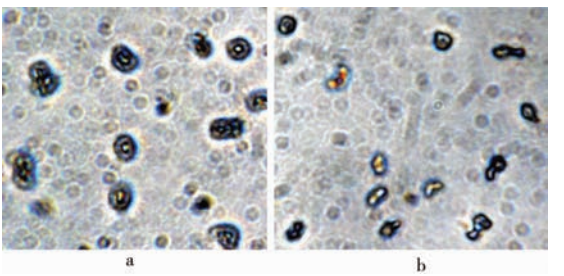


图3 共培养7d后对照组(a)和处理组(b)的普通小球藻在显微镜下的照片(16×100)

Fig. 3 Micrographs of *C. vulgaris* co-cultivated with Ruppia maritima after 7 days treatment

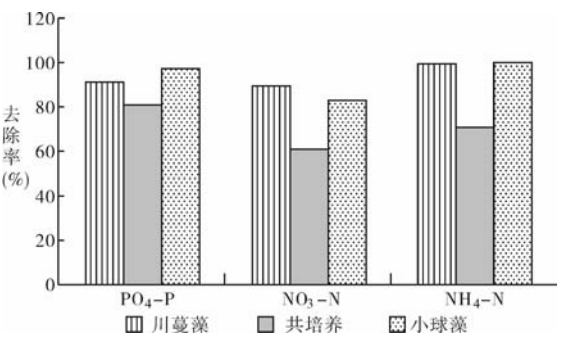


图4 川蔓藻植株体与普通小球藻共培养7 d后再生水中无机营养盐的去除率比较

Fig. 4 Removal rate nutrients of *C. vulgaris* co-cultivated with *Ruppia maritima* in the reclaimed wastewater after 7 days treatment

2.4 川蔓藻的种植水对普通小球藻的抑制作用

再生水体中川蔓藻的种植水对普通小球藻的生长在培养初期具有促进作用(图5),这可能与再生水中可溶性小分子有机物含量较高(COD为88.6 mg/L),成为小球藻的碳源被利用有关. 48 h之后,处理组的光密值比同期对照组有显著下降,96 h的抑制率为48.91%,144 h的抑制率达58.08%,仅为同期对照的41.92%,经计算其化感作用系数(E_t)为-0.2448.

再生水体中川蔓藻的叶和根种植水对普通小球藻均有抑制效果见图6. 根的种植水在培养72 h前促进小球藻的生长,72 h之后则表现为抑制作用. 而叶的种植水在整个培养期间均表现为抑制作用. 96 h的抑制率为叶34.71%,根14.12%. 144 h在叶和根培植水中的藻密度仅为同期对照组的47.52%和68.65%. 化感作用系数(E_t)叶为-0.1317,根为-0.0901.

一般认为,植物之间的化感作用的机理是化感物质通过存在部位释放出来后,利用自身高度的选择性和专一性,对受体产生作用[2]. 植物的化感作用是通过释放化感物质产生相互作用,植物化感物质是植物体分泌到环境中的代谢物或次生代谢物,植物的根、茎、叶、花、果实或种子等均可分泌化感物质[10]. 再生

水体中川蔓藻的叶和根种植水对普通小球藻的抑制试验表明:川蔓藻的根和叶均能释放化感物质,但抑制小球藻的化感物质主要通过叶来释放.

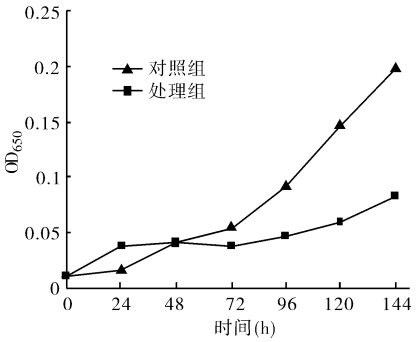


图5 普通小球藻在川蔓藻植株体种植水中的生长曲线

Fig. 5 Growth curves of *Chlorella vulgaris* in the fi1trate of 1iquious cultured by *Ruppia maritima*

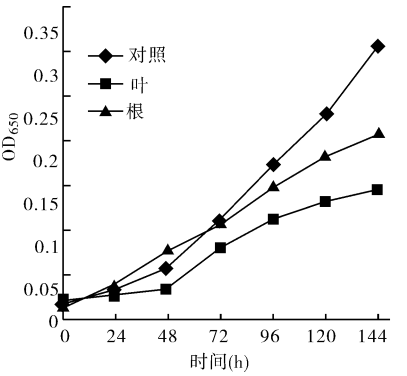


图6 普通小球藻在川蔓藻叶和根种植水中的生长曲线

Fig. 6 Growth curves of Chlorella vulgaris in the fi1trate of 1iquious cultured by leaves and roots of Ruppia maritima

在自然水域中,沉水植物与浮游藻类之间不仅存在光照和营养盐上的竞争,而且它们之间的化感作用也已经被大量的研究所证明[2]. 从本文的实验结果可以看出,在难降解小分子有机物含量较高的再生水体中,沉水植物川蔓藻对普通小球藻具有显著的抑制作用. 虽然川蔓藻在再生水中单独培养的生长密度与小球藻共培养的生长密度一样,但是共培养试验和使用其种植水培养试验结果却有显著差异,共培养在 96 h 的抑制率 88.86% 远大于种植水在 96 h 的抑制率 48.91%. 有些研究认为对资源和生存空间的竞争是发生化感作用的最终原因,多样的生物和非生物因子决定化感作用的强弱[10]. 通常认为使用种植水添加营养盐培养藻类的试验可以排除共培养中对光照和营养竞争的影响,能反映出水生植物和藻类之间的化感作用. 从本文两个试验结果比较也证明了这一观点.

3 参考文献

[1] 庄源益,赵 凡,戴树桂. 高等水生植物对藻类生长的克制效应. 环境科学进展,1995,**3**(6):44 – 49.

[2] Gross E M. Allelopathy of aquatic autotrophs. *Critical Review Plant Science*,2003,**22**(3 – 4):313 – 339.

[3] Elen V D, Wouter J B. Impact of submerged macrophytes including charophytes on phyto-and zooplankton communities :Allelopathy versus other mechanisms. *Aquatic Botany*,2002,**72**:261 – 274.

[4] Marina DellaGreca, Antonio Fiorentino, Marina Isidori, Pietro Monaco, Armando Zarrelli. Antialgal ent-labdane diterpenes from Ruppia maritime. *Phytochemistry*,2002, **55**: 909 – 913.

[5] Burkholder J M, Glasgow H B, Cooke J E. Comparative effects of water-column nitrate enrichment on eelgrass Zostera marina, shoalgrass Halodule wrightii, and widgeongrass Ruppia maritime. *Marine Ecology Progress Series*. 1994,**105**: 121 – 138.

[6] Kantrud H A. Wigeongrass (*Ruppia maritima* L.): A literature Review. US Fish and Wildlife Survey. *Fish and Wildlife Research*. 1991,**10**: 58 – 59.

[7] Howard R J, Mendelssohn I A. Structure and composition of oligohaline marsh plant communities exposed to salinity pulses. *Aquatic Botany*,2000,**68**: 143 – 164.

[8] Thursby G B. Nutritional requirements of the submerged angiosperm *Ruppia maritima* in algae-free culture. *Marine Ecology- Progress Series*,1984,**16**: 45 – 50.

[9] 陈德辉,刘永定,宋立荣. 蓖齿眼子菜对栅藻和微囊藻的他感作用及其参数. 水生生物学报,2004,**28**(2):163 – 168.

[10] 鲜啟鸣,陈海东,邹惠仙等,淡水水生植物化感作用研究进展. 生态学杂志,2005,**24**(6):664 – 669.