

## 芦苇化感组分对羊角月牙藻和雷氏衣藻生长特性的影响\*

门玉洁<sup>1</sup>, 李锋民<sup>2</sup>, 胡洪营<sup>1\*\*</sup>

(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: 中国海洋大学, 环境科学与工程学院, 青岛 266003)

**摘要:** 研究了从芦苇(*Phragmites communis* Trin)中分离得到的化感组分对羊角月牙藻(*Selenastrum capricornutum*)和雷氏衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)生长特性的影响。在藻类生长的对数期向培养液中投加不同浓度的化感组分, 分别测定并观察了培养期间受试藻种藻密度和藻细胞形态的变化情况。结果表明, 该化感组分对羊角月牙藻藻密度的增长具有明显的抑制作用, 半效应浓度( $EC_{50, 7d}$ )值为 0.60 mg/L, 同时使羊角月牙藻细胞内部结构改变, 形态变大。投加 6 mg/L 化感组分后, 藻细胞平均宽度是对照组的 1.5 倍。该化感组分对雷氏衣藻藻密度的增长没有明显的抑制作用, 但使其运动性能降低。

**关键词:** 芦苇; 藻类; 生长抑制; 化感作用

## Effects of an allelopathic fraction in *Phragmites communis* Trin on the growth characteristics of *Selenastrum capricornutum* and *Chlamydomonas reinhardtii*

MEN Yujie<sup>1</sup>, LI Fengmin<sup>2</sup> & HU Hongying<sup>1</sup>

(1: State Key Joint Laboratory of Environmental Simulation and Pollution Control, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, P. R. China)

(2: Institute of Environmental Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, P. R. China)

**Abstract:** The effects of an allelopathic fraction extracted from *Phragmites communis* Trin on the growth of *Selenastrum capricornutum* and *Chlamydomonas reinhardtii* were investigated. Different amounts of the allelopathic fraction were added into the culture solutions in which the same amount of algae was inoculated in this study. During the cultivation, the algal density was determined by counting the number of algae under a microscope and the microstructure of the algae was also observed. The results indicated that the allelopathic fraction showed significant inhibitory effects on the growth of *S. capricornutum*, and the value of  $EC_{50, 7d}$  was 0.60 mg/L. The algal cells of *S. capricornutum* in culture solutions with the allelopathic fraction enlarged obviously, and the microstructure was also greatly changed. The average width of cells of *S. capricornutum* in culture solutions with 6mg/L allelopathic fraction was one and a half times larger than that in the control group. No significant inhibition on the growth of *C. reinhardtii* was observed, but the motility of algal cells declined after adding the allelopathic fraction.

**Keywords:** *Phragmites communis* Trin; algae; growth inhibition; allelopathy

目前, 几乎所有的湖泊和城市景观水体都存在着不同程度的富营养化问题<sup>[1]</sup>。富营养化会引发某些藻类的爆发性繁殖, 即水华(water bloom)<sup>[2]</sup>。水华会进一步加重水体污染。不仅导致水产养殖业蒙受经济损失, 同时也破坏水域生态景观。有毒蓝藻水华, 会造成水体中其它生物死亡, 导致生态系统失衡, 并最终危害人体健康。近年来, 水华或赤潮的范围与影响正在不断扩大和恶化<sup>[3]</sup>。一次严重水华或赤潮造成的经济损失超过数百万美元, 世界每年因藻毒素而导致的人体中毒事件有近 2000 例之多<sup>[3]</sup>。因此, 有效控制富营

\* NSFC - JST 重大国际合作项目(20477021), 国家重点基础研究发展规划(973)项目(2003CB415007)联合资助。2006-06-16 收稿; 2006-09-11 收修改稿。门玉洁, 女, 1983 年生, 硕士研究生。

\*\* 通讯作者; E-mail: hyhu@tsinghua.edu.cn.

养化水体中的藻类,防止水华发生成为目前环境领域的研究热点和前沿。

现有的藻类控制技术按其性质可分为三大类:物理技术、化学技术和生物技术。其中短期效果最好,最常用的是化学技术<sup>[4]</sup>。化学技术是通过化学药剂(统称杀藻剂)来控制水中藻类的繁殖。常见的杀藻剂有硫酸铜和有机农药等。化学除藻技术虽能立竿见影,但它将不可避免地破坏生态平衡并造成环境污染<sup>[5]</sup>。物理技术和传统的生物技术则存在着操作时间长、难度高和费用大的缺点。因此,寻找一种高效、经济、安全的新型抑藻技术成为富营养化水体控制领域的重要课题。植物化感作用和化感物质的发现为这种抑藻技术的开发开辟了一条新途径。

化感作用(allelopathy)是一种植物通过向环境中释放化学物质影响其它生物生长的现象<sup>[6,7]</sup>。这类化学物质称为化感物质。国内外已有研究发现,湿生植物马蹄莲(*Zantedeschia aethiopica*)<sup>[8]</sup>、沉水植物中的穗状狐尾藻(*Myriophyllum spicatum*)、水盾草(*Cabomba caroliniana*)<sup>[9]</sup>、金鱼藻(*Ceratophyllum demersum*)、大茨藻(*Najas marina* ssp.)<sup>[10]</sup>、轮藻(*Chara*)<sup>[11]</sup>,以及浮水植物中的凤眼莲(*Eichhornia crassipes*)、水花生(*Alternanthera philoxeroides*)<sup>[12,13]</sup>等对常见的水华蓝藻和绿藻具有一定的化感抑制作用。

本课题组在对大型挺水植物的研究中发现芦苇(*Phragmites communis* Trin)对典型水华藻类铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)和蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)具有强抑制作用<sup>[14,15]</sup>。进一步对芦苇进行提取、分离,得到一种化感组分<sup>[16]</sup>。经生物检测,发现其对铜绿微囊藻和蛋白核小球藻具有很强的抑制作用,半效应浓度( $EC_{50}$ )值分别为0.79 mg/L和0.49 mg/L,但对普通小球藻(*Chlorella*)却没有表现出明显的抑制作用<sup>[16]</sup>。芦苇化感组分对上述三种藻类所产生的不同作用特性表明其对藻类的生长抑制作用具有选择性。Körner, Mulderij, Schrader 和 Sun 等人的研究也表明抑藻物质对不同种属的藻类具有不同程度的生长抑制作用<sup>[3,11,17,18]</sup>。实际水体中往往存在多种藻类,并形成一定的群落结构。由于化感物质对不同藻类具有不同的抑制特性,投入水体后,在抑制一些藻类生长的同时,可能提高其它藻类的生存竞争力,从而改变原有的藻类群落结构。因此,研究化感组分对不同藻类生长特性的影响对植物化感物质在富营养化水体中的实际应用具有重要的指导意义。本论文研究了芦苇化感组分对其它常见淡水藻类,羊角月牙藻(*Selenastrum capricornutum*)和雷氏衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)生长特性的影响。

## 1 实验材料与方法

### 1.1 材料

实验藻种:羊角月牙藻和雷氏衣藻,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 SE 培养基预培养 4-6 d,使之处于对数增长期。SE 培养基配方如表 1 所示。

表 1 SE 培养基成分  
Tab.1 The composition of SE medium

化学成分	浓度(mg/L)	化学成分	浓度(mg/L)
NaNO <sub>3</sub>	250	FeCl <sub>3</sub>	16.2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O	75	Na <sub>2</sub> EDTA	200
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	75	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	25	MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	1.81
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	175	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.22
NaCl	25	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.079
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.5	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.039

化感组分采用乙醇提取、溶剂萃取法从芦苇(*Phragmites communis* Trin)中分离得到(具体提取分离方法请见参考文献[4]),其主要成分为:2-甲基乙酰乙酸乙酯(ethyl-2-methylacetoacetate, EMA),含量78.48%;戊酮酸乙酯(ethyl levulinate),含量16.94%<sup>[16]</sup>。芦苇采自清华大学荷塘。

### 1.2 实验方法

1.2.1 抑藻活性检测方法 采用培养液法,通过摇瓶实验对芦苇化感组分做抑藻活性检测。培养混合液总

体积 200 ml, 其中包括 5 ml 处于对数生长期的藻种液、一定量的培养液 (121℃ 灭菌 20 min) 和化感组分溶液. 化感组分溶液的浓度梯度为 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 mg/L, 每个浓度设三个平行样. 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/(m<sup>2</sup>·s), 光暗时间比 14 h:10 h 的人工气候箱中培养一周左右.

1.2.2 藻类生长测定方法 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.

1.2.3 数据处理方法 根据藻密度计算相对抑制率. 对于具有抑制作用的受试藻类, 求出其半效应浓度 (EC<sub>50</sub>) 值. 化感组分对藻类的相对抑制率计算公式如下<sup>[4]</sup>:

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

其中, IR 为相对抑制率, N 为加入化感组分实验组的藻密度 (cells/ml), N<sub>0</sub> 为对照组藻密度 (cells/ml).

## 2 结果与讨论

### 2.1 对羊角月牙藻生长特性的影响

2.1.1 对藻密度的影响 投加化感组分后羊角月牙藻的生长曲线如图 1 所示. 由图 1 可见, 对照组的生长曲线符合 Logistic 增长模型, 前三天为迟滞期, 之后进入对数生长期, 培养 6 d 后逐渐进入稳定期. 而加入化感组分的实验组中羊角月牙藻生长缓慢, 藻密度一直保持在较低水平, 增殖受到显著抑制 (P < 0.01). 只有 0.5 mg/L 组的藻密度在培养 6 d 后有所增加, 培养 8 d 后与对照组藻密度接近, 这可能是因为化感组分浓度逐渐降低, 抑制作用也随之减弱.

利用相对抑制率公式分别求出培养 5、6、7、8 d 后的相对抑制率 (图 2). 由图 2 可见, 培养的后 4 d, 随培养时间增加, 除 0.5 mg/L 实验组外, 其余各浓度实验组的相对抑制率变化不大. 这表明化感组分对羊角月牙藻产生抑制作用的持续时间较长. 在整个培养期间, 芦苇化感组分对羊角月牙藻产生了明显的抑制作用, EC<sub>50, 7d</sub> 值为 0.60 mg/L.

2.1.2 对藻细胞形态的影响 投加化感组分的实验组中, 羊角月牙藻细胞出现了形态变大、内部结构紊乱的现象. 培养 5 d 后含不同浓度芦苇化感组分的培养液中羊角月牙藻大小分布如图 3 所示, 藻细胞平均宽度见表 2.

由图 3 和表 2 可以看出, 加入化感组分后, 羊角月牙藻细胞显著增大 (P < 0.01). 6 mg/L 实验组中细胞平均宽度约为对照组的 1.5 倍. 其可能的原因是化感组分改变了膜透性, 造成细胞内含物外泄, 由此引发细胞溶胀. 另外, 在对斜生栅藻中毒症状的研究中<sup>[19]</sup>发现, 投加硝基芳烃类化合物后, 斜生栅藻母细胞似亲孢子释放受阻, 藻细胞形态巨大. 羊角月牙藻同样是以似亲孢子方式繁殖, 化感物质的投加很可能阻碍了羊角月牙藻似亲孢子的形成或释放, 使得细胞内营养物质增加并累积, 形态肥大.

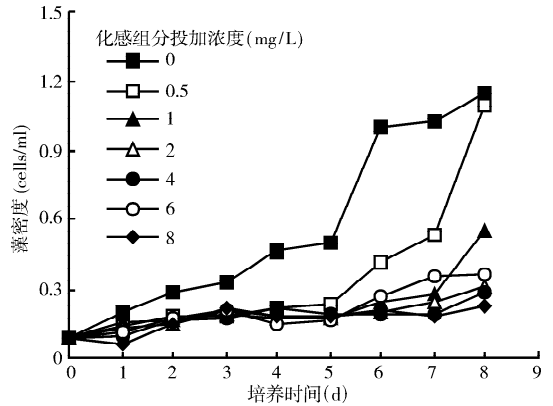


图 1 投加芦苇化感组分后羊角月牙藻的生长曲线

Fig. 1 The growth curves of *S. capricornutum*

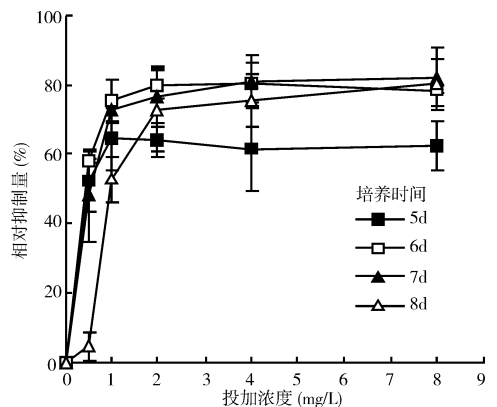


图 2 芦苇化感组分对羊角月牙藻抑制率变化 (误差线表示标准偏差, n = 3)

Fig. 2 The growth inhibition ratio of the allelopathic fraction on *S. capricornutum*

(Error bars represent standard deviation, n = 3)

表 2 含不同浓度化感组分的培养液中羊角月芽藻细胞平均宽度(培养时间: 5d)

Tab. 2 The average width of *S. capricornutum* (5d)

投加浓度 (mg/L)	0	1	6
藻细胞平均宽度 ( $\mu\text{m}$ )	2.4	3.5	3.6

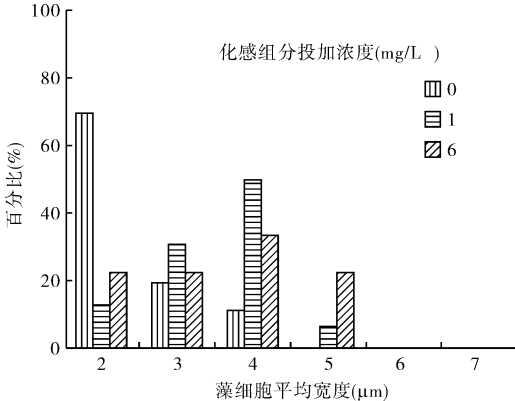


图 3 含不同浓度芦苇化感组分的培养液中羊角月芽藻细胞大小分布(培养时间: 5d)

Fig. 3 The size distribution of *S. capricornutum* in culture solutions with different concentrations of the allelopathic fraction (5d)

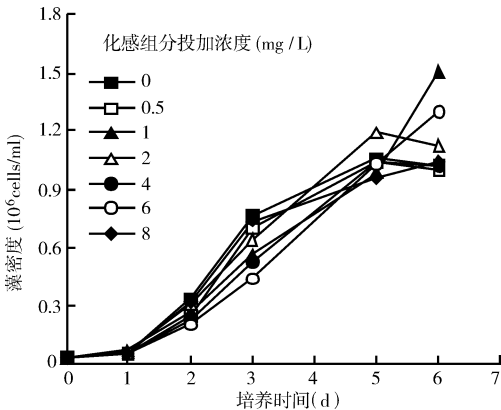


图 4 投加芦苇化感组分后雷氏衣藻的生长曲线

Fig. 4 The growth curve of *C. reinhardtii*

## 2.2 对雷氏衣藻生长的影响

2.2.1 对藻密度的影响 投加不同浓度化感组分后雷氏衣藻的生长曲线如图 4 所示. 培养期间,从藻密度的增长来看,投加芦苇化感组分的实验组中雷氏衣藻藻密度与对照组相近,对雷氏衣藻没有表现出明显的抑制作用. 只在培养第 3 d,表现出弱抑制作用, $EC_{50,3d}$  值为 8.74 mg/L.

2.2.2 对藻细胞运动性的影响 雷氏衣藻具有两条等长的鞭毛,能作主动运动. 加入芦苇化感组分后,雷氏衣藻的数量虽没有显著减少,但从培养第 3 d 开始,雷氏衣藻的运动性减弱. 图 5 给出了培养 3-5 d 时各浓度组中非运动藻细胞所占比例. 由图 5 可见,投加浓度增加,非运动藻细胞数量占细胞总数的比例也随之升高,培养 3 d 后,0.5 mg/L 组中有 36% 的藻细胞失去运动性,是对照组非运动藻细胞所占比例的近两倍. 这表明芦苇化感组分可能对雷氏衣藻的鞭毛产生作用,从而影响了其运动特性.

## 2.3 对几种藻类生长特性影响的比较

芦苇中的化感组分对上述 2 种藻类,以及之前研究过的蛋白核小球藻、普通小球藻和铜绿微囊藻共 5 种受试藻类表现出了不同的作用特性. 将研究结果整理归纳如表 3 所示.

芦苇化感组分对羊角月芽藻和雷氏衣藻的不同作用特性进一步验证了该化感物质对藻类生长抑制作用的选择性.

羊角月芽藻、蛋白核小球藻和普通小球藻均以似亲孢子方式繁殖<sup>[20]</sup>,而在它们含有化感组分的培养液中藻细胞都有不同程度的变大现象,可能的原因就是化感物质会阻止藻类似亲孢子的形成或释放,从而对藻类的增殖产生一定的抑制作用.

5 种藻类中,生长受到抑制的羊角月芽藻和蛋白核小球藻均有蛋白核,而未受到抑制的普通小球藻没有蛋白核,这说明蛋白核可能是藻类的一个敏感部位,化感物质进入细胞后作用于蛋白核,从而抑制藻类生长.

衣藻是绿藻门中比较特殊的一类,它具有与上述三种绿藻不同的形态和生理特点:具鞭毛,能游动;具 1 个大蛋白核,1 个眼点,1-2 个伸缩泡;可通过形成动孢子进行无性繁殖,或通过同配形式进行有性繁殖<sup>[20]</sup>,是介于浮游植物和浮游动物之间的一类. 这些特殊的性状使得化感物质对雷氏衣藻的生长作用特性与其它藻类不同.

衣藻的鞭毛是由“9+2”式的微管结构组成,由许多动力蛋白协作构成的复杂系统实现鞭毛带动藻细胞的运动<sup>[21, 22]</sup>. 研究结果中发现化感组分的加入使雷氏衣藻运动性能降低,而控制藻细胞运动的又是鞭毛和其周围的动力蛋白构成的运动系统,因此,推测化感组分影响了由动力蛋白形成的复杂体系,从而使得雷氏衣藻的运动性受到抑制,而化感组分对衣藻的增殖却没有明显的影响.

表3 芦苇化感组分对5种藻类生长特性影响的比较  
 Tab.3 Comparison of effects of the allelopathic fraction in *Phragmites communis* Trin on the growth characteristics of five different algae species

受试藻类	对藻密度的影响		对藻细胞形态、结构的影响
	有无抑制作用	EC <sub>50</sub> (mg/L)	
羊角月牙藻	有	0.60	部分藻细胞变大,内部结构改变
雷氏衣藻	无	-	运动性减弱
蛋白核小球藻 <sup>[16]</sup>	有	0.49	部分藻细胞变大,内部结构改变
铜绿微囊藻 <sup>[16]</sup>	有	0.79	部分藻细胞变大,内部结构改变
普通小球藻 <sup>[16]</sup>	无	-	少数藻细胞变大

铜绿微囊藻是5种藻类中最特殊的一种,它属蓝藻门,为原核生物,化感物质对其产生抑制的作用部位和机制可能有所不同.

综上,芦苇化感组分抑制藻类的生长可能是由于扰乱了藻细胞的繁殖,阻碍了以似亲孢子繁殖的藻细胞中似亲孢子的形成或释放,从而减少了藻细胞的数量.从具有蛋白核的藻类受到明显抑制的结果可以推断,蛋白核也可能是藻类对化感物质敏感的部位.具有鞭毛能游动的藻类由于化感物质的加入,其由动力蛋白构成的运动体系受到化感物质的干扰,从而引起运动性能降低.化感物质的选择性抑藻机理还需开展进一步的实验研究.

后续实验还需要在更大的受试藻类范围内进行比较研究,并从细胞亚显微结构或分子水平上进一步研究芦苇化感组分中的活性物质在藻细胞内的作用部位和作用机制.

### 3 结论

- (1) 本文研究的芦苇化感组分对羊角月牙藻具有强抑制作用,EC<sub>50,7d</sub>值为0.60(mg/L);对雷氏衣藻没有明显的抑制或促进作用.
- (2) 芦苇化感组分使羊角月牙藻藻细胞变大,细胞内部结构改变.
- (3) 芦苇化感组分使雷氏衣藻运动性减弱或消失.

### 4 参考文献

[1] 李小平. 美国湖泊富营养化的研究和治理. 自然杂志, 2002, 24(2):63-68.  
 [2] 周云龙, 于明. 水华的发生、危害和防治. 生物学通报, 2004, 39(6):11-14.  
 [3] Sun X X, Choi J K, Kim E K. A preliminary study on the mechanism of harmful algal bloom mitigation by use of sophorolipid treatment. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2004, 304(1): 35-49.  
 [4] 李锋民, 胡洪营. 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. 环境科学, 2004, 25(5):89-92.

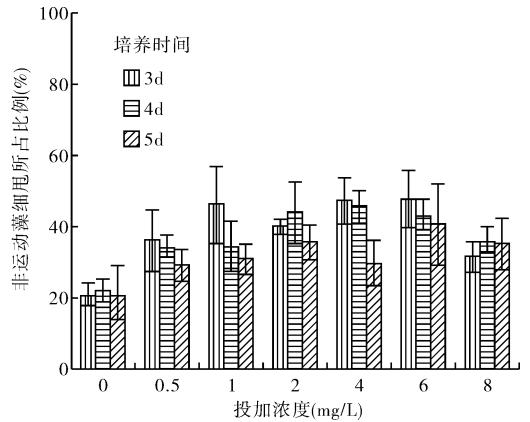


图5 投加芦苇化感组分后雷氏衣藻运动性的变化(误差线表示标准偏差, n = 3)  
 Fig.5 The change of motility of *C. reinhardtii* after adding the allelopathic fraction (Error bars represent standard deviation, n = 3)

- [5] 王扬才, 陆开宏. 蓝藻水华的危害及治理动态. 水产学杂志, 2004, **17**(1):90-93.
- [6] Rice E L. Allelopathy, 2<sup>nd</sup> ed. London: Academic Press, 1984: 1-2.
- [7] 谭仁祥. 植物成分功能. 北京: 科学出版社, 2003: 35-63.
- [8] Greca M D, Ferrara M, Fiorentino A *et al.* Antialgal compounds from *Zantedeschia aethiopica*. *Phytochemistry*, 1998, **49**(5):1299-1304.
- [9] Nakai S, Inoue Y, Hosomi M *et al.* Growth inhibition of blue-green algae by allelopathic effects of macrophytes. *Water Research*, 2000, **34**(11):3026-3032.
- [10] Gross E M, Erhard D, Enik I. Allelopathic activity of *Ceratophyllum demersum* L. and *Najas marina* ssp. *Intermedia* (Wolfgang) Casper. *Hydrobiologia*, 2003, **506**(1-3): 583-589.
- [11] Mulderij G, VanDonk E, Roelofs J G M. Differential sensitivity of green algae to allelopathic substances from *Chara*. *Hydrobiologia*, 2003, **491**(1-3):261-271.
- [12] 孙文浩, 俞子文, 余叔文. 水葫芦对藻类的克制效应. 植物生理学报, 1988, **14**(3):294-300.
- [13] 俞子文, 孙文浩, 郭克勤等. 几种高等水生植物的克藻效应. 水生生物学报, 1992, **16**(1):1-7.
- [14] 李锋民, 胡洪营. 大型水生植物浸出液对藻类的化感抑制作用. 中国给水排水, 2003, **12**(11):18-21.
- [15] Li F M, Hu H Y. Allelopathic effects of different macrophytes on the growth of *Microcystis aeruginosa*. *Allelopathy Journal*, 2005, **15**(1):145-152.
- [16] Li F M, Hu H Y. Isolation and characterization of a novel antialgal allelochemical from *Phragmites communis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, **71**(11):6545-6553.
- [17] Kerner S, Nicklisch A. Allelopathic growth inhibition of selected phytoplankton species by submerged macrophytes. *Journal of Phycology*, 2002, **38**(5):852-871.
- [18] Schrader K K, Nanayakkara N P D, Tucker C S *et al.* Novel derivatives of 9, 10-anthraquinone are selective algicides against the musty-odor cyanobacterium *Oscillatoria perornata*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**:5319-5327.
- [19] 刘静玲, 郎佩珍. 硝基芳烃类对斜生栅列藻的毒性及中毒症状. 环境科学, 1995, **16**(2):7-10.
- [20] 章宗涉, 黄祥飞. 淡水浮游生物研究方法. 北京: 科学出版社, 1991: 179.
- [21] Mitchell D R. *Chlamydomonas* flagella. *Journal of Phycology*, 2000, **36**(2): 261-273.
- [22] Wemmer K A, Marshall W F. Flagellar motility: all pull together. *Current Biology*, 2004, **14**(23): 992-993.