

四种沉水植物的克藻效应*

鲜啟鸣, 陈海东, 邹惠仙, 尹大强, 龚惠娟, 曲丽娟

(南京大学环境学院污染控制与资源化国家重点实验室, 南京 210093)

摘要:设计一系列试验研究了四种沉水植物(金鱼藻、微齿眼子菜、苦草、伊乐藻)对铜绿微囊藻的抑制作用. 单独培养试验结果显示金鱼藻和微齿眼子菜具有较强的抑制藻类生长的作用, 连续滴加种植水试验显示抑藻作用进一步加强, 在植物的生长过程中其化感物质是连续释放的. 并考察 N、P 等营养因素及微生物干扰对抑藻实验的影响.

关键词:化感作用; 沉水植物; 铜绿微囊藻; 生物测试

Allelopathic Effects of Four Submerged Macrophytes on *Microcystis aeruginosa*

XIAN Qiming, CHEN Haidong, ZOU Huixian, YIN Daqiang, GONG Huijuan & QU Lijuan

(State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of Environment Nanjing University, Nanjing 210093, P. R. China)

Abstract: Allelopathic inhibition activities of four submerged macrophytes (*Potamogeton maackianus*, *Vallisneria spiralis*, *Elodea nuttalli* & *Ceratophyllum demersum*) on *Microcystis aeruginosa* are investigated by a series of experiments in a short-term bioassay. Individual algal test reveals culture solution of *P. maackianus* and *C. demersum* have better effects on algal growth inhibition. Furthermore, continuous addition assays show strong growth inhibition by culture solution. Inhibitory activity is different in aquatic extracts from different section of *P. maackianus*. Removing the disturbance of microorganism by autoclaving influences algal assay. These results provide that unstable and excreting continuously allelopathic compounds by submerged macrophytes are the primary cause of algal growth inhibition. Interference with algal growth experiments was investigated in microorganism and nutrient elements of nitrogen and phosphorus.

Keywords: Allelopathy; submerged macrophytes; *Microcystis aeruginosa*; biological assay

植物间的化感作用在农作物生长上的应用研究已取得了非常好的效果^[1,2], 由于水生生态系统相对于陆生态系统的复杂性, 水生植物的化感作用研究进展较为缓慢, 1969年 Fitzgerald 发现水生植物的代谢产物可能控制藻类的生长^[3], 到20世纪90年代, 随着水域污染的日益加剧, 藻类的大量暴发, 严重影响了水体的功能, 水生植物的化感作用研究异常活跃, 人们试图通过对水生植物代谢产物的研究揭示水生植物的抑藻效应, 寻找生态治理的方法来修复水体的功能. 孙文浩从抑藻作用较强的漂浮植物凤眼莲根中分离到两种 N-甲基萘胺的化感物质^[4]; 何池全研究发现挺水植物石菖蒲的抑藻作用主要是由于是石菖蒲根系向水体分泌的化学物质而产生的^[5]; 戴树桂等从香蒲提取物中分离鉴定了克藻化合物, 并对比不同的藻类抑制效果^[6]; 袁峻峰通过对金鱼藻的抑藻研究, 认为生物碱是主要的化感物质^[7], 而 Wium-Andersen 研究认为不稳定的含硫化合物是主要的抑制藻类生长的活性物质^[8], 后来的研究发现^[9] 金鱼藻在高磷浓度下对稳定和维持清水状态具有重要的作用.

沉水植物是水体中重要的初级生产者, 对水体的功能具有非常重要的影响, 它能阻留大量的营养物质^[10] 并对水体的污染作出敏感的反应. 水生植物特别是沉水植物的恢复是解决富营养化的重要举措, 但是选择的种类不同将直接影响生态修复的效果; 研究沉水植物对藻类特别是蓝藻的化感作用有助于进一步了解沉水植物的生态功能, 对沉水植物的恢复具有现实指导意义. 本文选择东太湖中几种常见的沉水植物作

* 国家“973”项目资助(2002CB412307). 2003-12-10 收稿; 2004-04-25 收修改稿. 鲜啟鸣, 男, 1966年生, 副研究员, 在读博士生; E-mail: xianqiming@163.com.

为研究对象研究比较它们对铜绿微囊藻的抑制作用。

1 试验材料和方法

1.1 试验材料

菹草 (*Potamogeton crispus* L.)、微齿眼子菜 (*Potamogeton maackianus* A. Benn)、苦草 (*Vallisneria spiralis* L.)、伊乐藻 (*Elodea nuttalli* (Planch) ST John.)、金鱼藻 (*Ceratophyllum demersum* L.) 采自东太湖带泥, 培养在一只 120L 高度 70 cm 的陶瓷缸中用玄武湖水室外培养, 试验时采适量分别培养在 2 L 的烧杯中, 烧杯底部铺一层 2 cm 厚的细砂(经高温灭菌处理), 培养液采用 Hoagland 营养液 ($0.1 \times$)^[11], 自然光照。

试验藻种采用铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa* Kütz.) 由南京大学环境生物教研室提供, 试验前用 Hoagland ($0.1 \times$) 营养液在 25℃ 下驯化一周。

1.2 方法

1.2.1 植物种植水的抑藻试验 在 5 个 2000 ml 大烧杯中, 放入 600 g 细砂(用蒸馏水浸泡 3 d, 凉干后, 再在 110℃ 烘烤 12 h, 各加入 1400 ml Hoagland ($0.1 \times$) 营养液, 分别种植微齿眼子菜、伊乐藻、金鱼藻 14 g, 以及金鱼藻与微齿眼子菜混生 14 g (各 7 g), 剩下一杯作对照组。培养 3 d 后, 分别取种植水 100 ml, 用 $0.45 \mu\text{m}$ 微滤膜过滤, 接种 5 ml 铜绿微囊藻, 光照培养箱培养, 每隔 24 h 测试藻细胞数, 每组三个平行样。

1.2.2 连续滴加植物种植水克藻试验^[12] 通过 $0.45 \mu\text{m}$ 微滤膜过滤的种植水与藻的培养液 100 ml ($10^5 - 10^6$ cells/ml), 培养 1 d 后, 每天添加新的种植水 20 ml, 连续添加 7 d, 对照组添加营养液。每日测定藻细胞数。

1.2.3 植物水浸提液克藻试验 分别取微齿眼子菜的茎叶、根和金鱼藻各湿重 50 g (用蒸馏水淋洗), 置于 500 ml 烧杯中加 250 ml 蒸馏水使植物完全浸泡在水中, 在 4℃ 下保持 3 d, 用定性滤纸过滤, 并加入体积百分比 1% 的高浓度 Hoagland ($10 \times$) 营养液, 4℃ 冷藏待用。试验前分别取上述处理过的浸提液用 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 100 ml 滤液加 5 ml 浓藻液, 放在光照培养箱培养, 每日测定藻细胞数。

1.2.4 藻类生物测试 用植物种植水 100 ml 通过 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 在滤液中接种铜绿微囊藻 ($10^5 - 10^6$ cells/ml), 在光强度 4000 lux, 25℃ 下培养 5 - 10 d。藻类生长用光密度 OD_{650} 值 (721 分光光度计)、叶绿素 a (三色分光光度法)^[13]、细胞计数 (血球计数法) 来测试; 控制组除不种植物外, 其余处理与试验组相同。

种植水中氮磷营养的消耗通过在接种铜绿微囊藻前补充 Hoagland ($10 \times$) 营养液来消除, 每 100 ml 种植水加 1 ml Hoagland ($10 \times$) 浓营养液, 氨氮测定采用纳氏试剂比色法^[14], 正磷酸盐磷的测定采用磷钼杂多酸孔雀绿分光光度法^[15]。

1.2.5 微生物干扰的消除 在接种铜绿微囊藻进行生物测试前, 采用 $0.45 \mu\text{m}$ 的微滤膜过滤 (上海过滤材料厂) 或采用高温高压灭菌的方法。

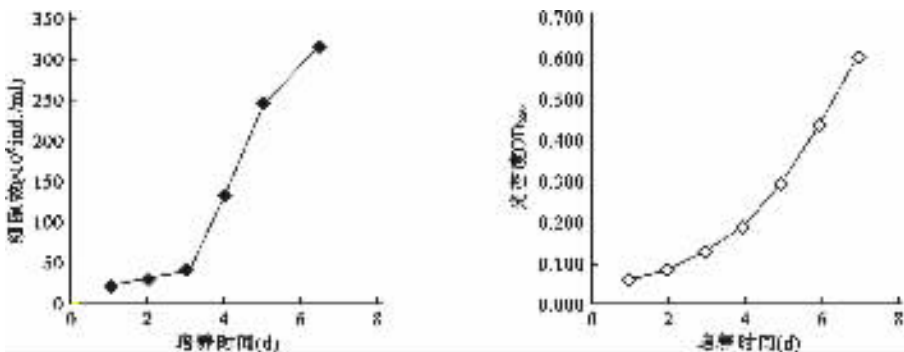


图1 铜绿微囊藻的培养(a: 细胞计数;b: 光密度)

Fig. 1 Culture of *Microcystis aeruginosa* Kütz (a: cell number; b: light density)

2 结果与分析

2.1 铜绿微囊藻的驯化

图1是用Hoagland(0.1×)营养液驯化培养一周藻细胞的个数及OD₆₅₀值的变化曲线.两组数据特别是光密度的平均数据具有很明显的指数关系 $y = 0.04e^{0.3925x}$ (y 为OD₆₅₀值, x 为培养时间), $R^2 = 0.9987$.说明Hoagland(0.1×)营养液对于铜绿微囊藻的生长没有明显干扰.

2.2 营养因素对抑藻试验的影响

表1是不同营养状态下对藻类生长的影响,一直以来,对化感作用与竞争之间的争论一直没有停止^[16],沉水植物由于常年生活在水下,对营养和光的需求导致它们通过分泌化感物质来加强对营养和光的竞争,因此凡沉水植物生长茂盛的地方水体的透明度较高,浮游生物和附生生物都较少.要证明沉水植物的化感作用必须排除光和营养的影响,沉水植物由于在水下对光的竞争不占优势,试验时光的影响可以不考虑,但营养的因素必须考虑,以便在进行化感抑藻试验时排除营养因素的干扰.试验时取经过10 d培养的植物种植水100 ml,用0.45 μm微滤膜过滤,一组不另加营养,另一组滴加1 ml Hoagland(10×)营养液使其营养水平与Hoagland(0.1×)营养液的营养水平相当,分别接种藻液,培养6 d,每天测量藻细胞的数量.实验结果经 t 检验证实,同种水草加营养和不加营养对抑藻试验影响差异不显著,说明营养因素对于短期内的抑藻生物测试的影响很小.可以不予考虑.

表1 营养因素对沉水植物抑藻实验的影响

Tab. 1 The effects of nutrient on algal growth inhibition by submerged macrophytes

培养时间 (d)	<i>Potamogeton Maackianus</i> (10 ⁵ ind./ml)		<i>Ceratophyllum Demersum</i> (10 ⁵ ind./ml)		<i>Vallisneria Spiralis</i> (10 ⁵ ind./ml)	
	不加营养	加营养	不加营养	加营养	不加营养	加营养
1	8.689	8.689	8.689	8.689	8.689	8.690
2	16.605	11.438	14.096	10.542	12.185	11.600
3	15.261	19.203	17.680	17.262	14.903	12.600
4	36.286	49.576	40.766	31.358	33.150	34.600
5	25.236	16.426	0.119	0.806	67.644	75.600
6	1.105	5.644	0.119	0.149	15.082	16.035
t 检验	$t = 0.406 < t_{0.05} = 2.57$ $P > 0.05, N = 5$		$t = 1.334 < t_{0.05} = 2.57$ $P > 0.05, N = 5$		$t = 0.862 < t_{0.05} = 2.57$ $P > 0.05, N = 5$	

2.3 植物种植水的抑藻试验

图2是沉水植物种植水对藻细胞生长的影响,其中图2b,2c是在试验过程中连续滴加种植水所得到的.图2a中除了金鱼藻表现出较强的抑藻作用,其它三种种植水的试验结果与对照组基本一致,似乎它们不表现化感抑藻作用,但化感作用的强弱与植物分泌化感物质的浓度是密切相关的^[12],在很多情况下都表现低促高抑的现象^[17].进行连续滴加后,金鱼藻与微齿眼子菜均有较明显的克藻效应,且金鱼藻的克藻效果比微齿眼子菜更好,这说明植物的化感物质是连续释放到环境中,当其达到一定浓度时才发挥作用;而当两种植物混生培养时抑藻效果又要强于金鱼藻,这可能因为金鱼藻和微齿眼子菜混生培养时产生协同增效作用;试验中伊乐藻基本无克藻效应.

2.4 沉水植物水浸提液克藻试验

图3显示了分别反应微齿眼子菜根、茎叶及金鱼藻的水浸提液在不同浓度(水浸提液与培养基的体积比)时对藻细胞生长的影响,微齿眼子菜根的浸提液几乎没有克藻能力,而茎叶的浸提液在高浓度0.1时具有较好的抑制作用;金鱼藻的抑藻作用则非常明显,在浓度为0.05时抑藻效果就很好.在这三个图中随着浸提液浓度的升高对铜绿微囊藻的抑制作用越强,并表现出明显的低促高抑现象.说明沉水植物对其它水生生物的化感作用是植物初生代谢物和次生代谢物通过溶解进入水体而产生的,研究表明植物的不同部位

对化感作用的贡献是不同的,对植物水浸提液的抑藻试验有助于进一步分析研究产生化感作用的化学物质,对了解沉水植物的化感作用机理具有重要的意义.

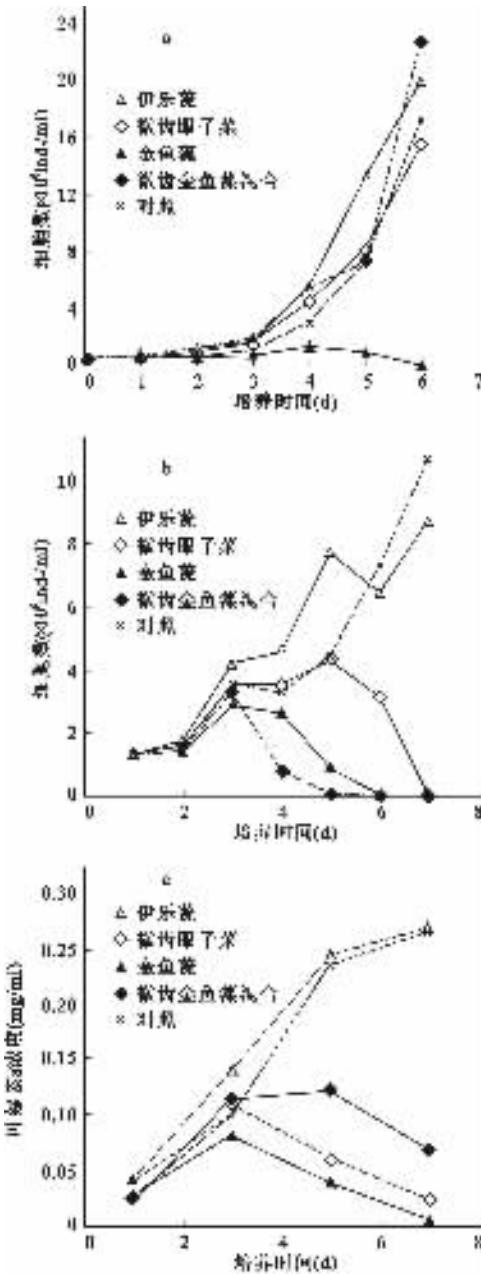


图2 沉水植物种植水抑藻试验(a)、连续滴加种植水抑藻试验(b:细胞计数;c:叶绿素 a)
Fig.2 The algal growth inhibition under culture of submerged macrophytes(a) and antialgal assay of continuous(b: cell number; c: chlorophylla)

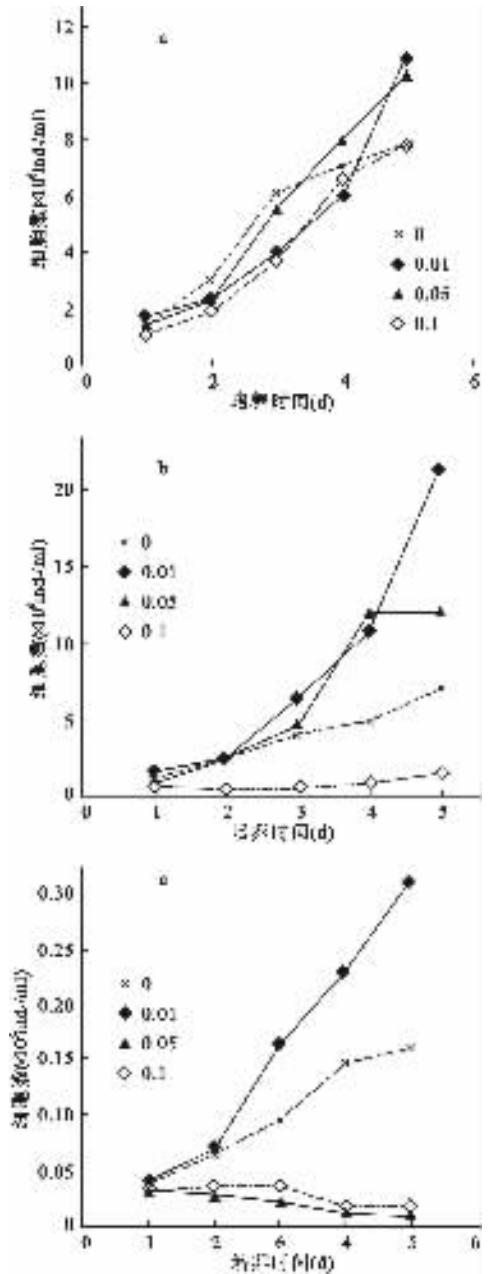


图3 水浸提液抑藻试验(a: 微齿眼子菜根; b: 微齿眼子菜茎叶)和金鱼藻水浸提液抑藻试验
Fig.3 Antialgal assay of aqueous extracts concentration (a: roots of *Potamogeton maackianus*; b: shoots of *Potamogeton maackianus*); c: *Ceratophyllum demersum*

2.5 灭菌方法对抑藻试验的影响

图4分别是采用传统的高温灭菌和0.45 μm微滤膜过滤处理植物种植水,再进行抑藻试验的结果.研究化感作用采用的藻细胞生长抑制试验,微生物的影响是很大的有时甚至会得出相反的结果,在进行沉水植物种植水抑藻试验时须先排除微生物的干扰,通常可以用小于0.65 μm的滤膜过滤或采用高温高压灭菌的方法.采用微滤膜过滤需要在减压的条件下完成且速度较慢,而采用高压灭菌锅灭菌的方法较简便快捷,但由于植物化感物质大多是生物活性物质很多存在热不稳定性,比较研究高温灭菌能否替代微膜过滤.结果显示高温灭菌后种植水的克藻效果明显比微膜过滤的种植水的克藻效果低得多,即沉水植物种植水在高温处理后,克藻能力显著降低,说明这三种沉水植物分泌的化感物质含有热不稳定性的生物活性物质,因此在用种植水进行生物测试时不能采用高温灭菌来代替微膜过滤.

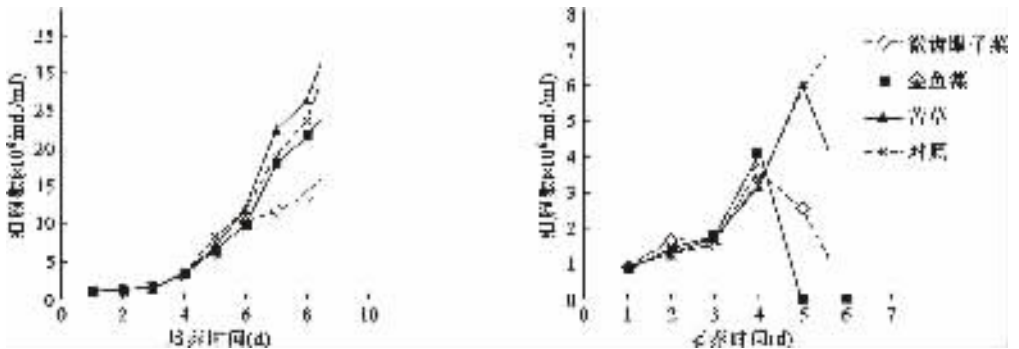


图4 种植水抑藻试验(a:高温灭菌; b:微膜过滤)

Fig. 4 The algal growth inhibition of culture solution after high temperature (a) or after micropore filter membrane (b)

3 结论与讨论

通过设计一系列试验对四种沉水植物抑藻现象的研究发现:金鱼藻、微齿眼子菜及苦草的种植水具有较强的克藻作用,其中以金鱼藻最为显著;伊乐藻生长缓慢,几乎没有克藻能力,微齿眼子菜的克藻效应以前未见报道;在营养不致缺乏的短期培养时,氮磷等营养物质的浓度对于铜绿微囊藻生长可认为无影响,不会影响克藻试验的结果;采用连续滴加种植水方法能显著提高克藻能力,植物种植水的克藻作用是源于沉水植物连续分泌的化感物质.化感物质主要是植物的次生代谢物,其中很多物质容易被微生物所利用,只有当它们达到一定的浓度时才会抑制微生物的生长,酚类、脂肪酸是植物常见的化感物质,它们对藻类生长半抑制浓度的研究表明不同物质对藻类生长的影响差异很大^[18,19],因此在沉水植物对藻类产生化感作用的过程中,植物不同的分泌物对克藻效应的贡献是不同的,植物表现出的化感效应往往是许多物质协同作用的结果,利用联用技术来进行植物化感物质的研究,能大大加快对化感物质的筛选,并能解释化感物质间存在的协同增效作用,近来已取得一定的进展^[20,21].

与挺水植物和浮叶植物不同,沉水植物整株生活在水下,茎、叶直接受到藻类等浮游生物的危害,通过茎、叶直接释放化感物质能有效抑制周围浮游生物的生长;而挺水植物和浮叶植物对藻类的化感作用主要是通过根部释放化感物质来实现的^[4,5].高温灭菌对于种植水中的化感物质有明显的影响,高温下化感物质的生物活性显著降低.植物次生代谢物中很多是热不稳定性的物质,因此在研究植物化感作用和分离化感物质的过程中要考虑温度、酸度等环境因素的影响,避免费了很大力气分离鉴定的化感物质并不是实际发生作用的物质.

沉水植物的克藻效应作为其化感作用的一个重要方面,目前的研究正在向分子水平进发,希望找到有效的稳定的化感物质,从分子水平上阐述植物的化感现象及其机理,为水污染的生态治理提供理论依据,同时植物化感物质的研究对进一步开发高效、环境安全的杀藻剂具有直接的现实意义.采用现代分离富集及

结构表征的方法,如用 XAD 树脂对植物种植水,进行不间断的富集,利用物理性质和化学性质的不同进行分级分离,再采用色谱、红外、质谱和核磁共振等分析表征手段,鉴定分离出化感物质。

致谢:本文水生植物培养得到中国科学院地理湖泊研究所陈为民研究员的指导,铜绿微囊藻的培养和测试得到本院史小丽博士的帮助,在此谨表谢意。

4 参考文献

- [1] Putnam A R, Duke W B. Biological suppression of weeds: Evidence for allelopathy in accessions of cucumber. *Science*, 1974, **185**: 370 - 372.
- [2] 孔垂华,胡 飞,骆世明. 胜红蓟对作物的化感作用. *中国农业科学*, 1997, **30**(5): 95.
- [3] Fitzgerald G P. Some factors in the competition or antagonism among bacteria, algae and aquatic weeds. *J Phycol*, 1969, **5**: 351 - 359.
- [4] 孙文浩,余叔文,杨善元等. 风眼莲根系分泌物中的克藻化合物. *植物生理学报*, 1993, **19**(1): 92 - 96
- [5] 河池全,叶居新. 石菖蒲克藻效应的研究. *生态学报*, 1999, **19**(5): 754 - 758.
- [6] 戴树桂,赵 凡,金朝晖等. 香蒲提取物的抑藻作用及其分离鉴定. *环境化学*, 1997, **16**(3): 268 - 271.
- [7] 袁峻峰,章宗涉. 金鱼藻对藻类的生化干预作用. *生态学报*, 1992, **13**(1): 45 - 50.
- [8] Wium-Andersen S, Anthoni U, Houen G. Elemental sulfur, a possible allelopathic compounds from *Ceratophyllum demersum*. *Phytochemistry*, 1983, **22**: 2613
- [9] Mjelde M, Faafeng B A. *Ceratophyllum demersum* hampers phytoplankton development in some small Norwegian lakes over a wide range of phosphorus concentrations and geographical latitude. *Freshwater Biol*, 1997, **37**(2): 355 - 365.
- [10] 吴振斌,邱东茹,贺 锋等. 水生植物对富营养水体水质净化作用研究. *武汉植物学研究*, 2001, **19**(4): 299 - 303.
- [11] Reddy K R, Tucker J C. Productivity and nutrient uptake of water hyacinth *Eichhornia crassipes* L. Effect of nitrogen Source. *Economic Bot*, 1983, **37**: 237 - 247.
- [12] Satoshi N, Yutaka I, Masaaki H, et al. Growth inhibition of blue-green algae by allelopathic effects of macrophytes. *Wat Sci Tech*, 1999, **39**(8): 47 - 53.
- [13] 叶居新,河池全,陈少风. 石菖蒲的克藻效应. *植物生态学报*, 1999, **23**(4): 379 - 384.
- [14] 魏复盛主编. 水和废水监测分析方法. 第三版. 北京: 中国环境科学出版社, 1989: 252 - 256.
- [15] 刘玉凤. 磷钼杂多酸 - 孔雀绿分光光度法测定水中微量磷. *陕西化工*, 1999, **28**(2): 34 - 37.
- [16] Inderjit D, Moral R. Is separating allelopathy from resource competition realistic? *Bot Rev*, 1997, **63**: 221 - 230.
- [17] 孔垂华,胡 飞. 植物化感(相生相克)作用及其应用. 北京: 中国农业出版社, 2001: 45.
- [18] Satoshi N, Yutaka I, Masaaki H. Algal growth inhibition effects and inducement modes by plant-producing phenols. *Wat Sci Tech*, 2001, **35**(7): 1855 - 1859.
- [19] Yasushi K, Yasunori K, Kyoji S. Acute toxicity of fatty acid to the freshwater green alga *Selenastrum capricornutum*. *Environ Toxicol*, 2003, **18**: 289 - 294.
- [20] Gross E M. Allelopathy of aquatic autotrophs. *Critical Rev Plant Sci*, 2003, **22**(3&4): 313 - 339.
- [21] Haig T. Application of hyphenated chromatography-mass spectrometry technology to plant allelopathy research. *J Chem Ecol*, 2001, **27**(12): 2363 - 2396.