

水稻 (*Oryza sativa* L.) 秸秆浸提液对铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 的抑制作用*

张余霞^{1,2}, 张玲¹, 高兴¹, 王立新^{1,3}, 陆长梅¹, 吴国荣^{1**}

(1: 南京师范大学生命科学学院, 南京 210097)

(2: 盐城工学院, 盐城 224003)

(3: 常熟理工大学, 常熟 215500)

摘要: 用刚收割的水稻 (*Oryza sativa* L.) 秸秆浸提液代替水配制培养基培养铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*), 追踪测定微囊藻的生物量、叶绿素 a 含量、光合速率、呼吸速率、膜透性、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性、光合膜自发荧光强度等相关生理生化指标的变化, 研究水稻秸秆浸提液对铜绿微囊藻的抑制作用。结果表明, 质量比 $\geq 1/100$ (水稻秸秆/水) 的水稻秸秆浸提液对微囊藻的生长有明显的抑制作用, 表现如下: 藻细胞生物量在实验过程中逐日降低, 藻细胞叶绿素 a 含量和光合速率急剧下降, 呼吸速率和超氧化物歧化酶 (SOD) 活性呈先升高后下降的趋势, 膜透性迅速升高, 细胞光合膜自发荧光强度显著衰减。用不同的有机溶剂对该浸提液进行萃取, 浓缩后用滤纸片法在固体培养基上做抑藻实验, 乙醚和乙酸乙酯萃取液能明显看到抑藻圈, 证实其中含有抑制物质。

关键词: 水稻秸秆水浸提液; 铜绿微囊藻; 抑制作用; 抑制物质

The inhibition of aqueous extract from *Oryza sativa* straw on growth of *Microcystis aeruginosa*

ZHANG Yuxia^{1,2}, ZHANG Ling¹, GAO Xing¹, WANG Lixing^{1,3}, LU Changmei¹ & WU Guorong¹

(1: College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097 P. R. China)

(2: Yancheng College, Yancheng 224003 P. R. China)

(3: Changshu College, Changshu 215500 P. R. China)

Abstract: *Microcystis aeruginosa* was co-cultivated with aqueous extract from fresh reaped *Oryza sativa* L. straw and the inhibiting effect of this aqueous extract on *M. aeruginosa* was studied in this paper. Results indicated that the growth of *M. aeruginosa* was obviously inhibited when the rate of quality was over 1/100 (rice straw / water). Chlorophyll a content, photosynthetic rate and the intensity of spontaneous fluorescence decreased continuously as the treatment went on; respiratory rate and SOD activity decreased evidently at the first 3 days of treatment and then increased; membrane penetrability increased at the first 5 days of treatment and then decreased slowly. Some substances were extracted from the aqueous extract by different organic solvents (ether, ethyl acetate and petroleum ether 30-60°C), respectively. Inhibiting effect could be observed with filtering paper methods on solid medium when the substances were extracted by ether, ethyl acetate. This suggested that some inhibitive factors might exist in these substances.

Keywords: aqueous extraction from rice straw; *M. aeruginosa*; inhibiting effect; inhibitors

近年来,随着水体富营养化的日趋严重,我国湖泊水华(又称为藻类爆发)发生的频率和程度越来越严重,在有些地方已经成为严重的生态灾难^[1]。探索有效的、经济的、无二次污染的、生态学风险小的控制水

* 国家自然科学基金项目(30370083), 教育部科学技术研究项目(01043)联合资助。2006-07-13 收稿; 2006-10-13 收修改稿。张余霞, 女, 1968 年生, 硕士, 讲师; E-mail: zhangling-0205@163.com.

** 通讯作者

华发生的方法是当前湖泊等水域保护的重要任务^[2].

铜绿微囊藻 (*Microcystic aeruginosa*) 属蓝藻门, 微囊藻属, 原核单细胞藻类, 是形成淡水水华的主要藻类之一, 分泌的藻毒素具致癌效应, 在水华易发水域抑制其繁衍已成为维护人类生存环境的亟待解决的问题^[3]. 有人报道了大麦秸秆可用于水渠或水库内水华的控制^[4,5], 万宏等也发现经一个月暴气降解的稻草浸液对蓝藻生长的抑制作用^[6], 我们则注意到水体富营养化明显的水稻田里, 水体清澈, 水华发生极少, 提示水稻生长对包括微囊藻在内的单细胞藻类生长有抑制效应, 但其系统的研究报道目前尚未见到. 水稻对单细胞藻类的抑制是直接的他感作用 (Allelopathy), 还是水稻秸秆降解物的作用, 还有待探索. 本文以刚收割的水稻 (*Oryza sativa* L.) 秸秆为材料, 在无菌条件下用水短时间 (24 h) 浸提, 研究其浸提液对铜绿微囊藻生长的影响, 并分离其中的抑藻物质, 以期利用我国丰富的水稻秸秆资源, 为构建科学的水体调控模型及开发新型的抑藻物质提供有价值的研究资料.

1 材料与方法

1.1 实验材料

水稻秸秆选用江苏盐城地区种植的盐京九号 (Yanjingjiuhao), 于收割的当天, 处理待用. 铜绿微囊藻 (*Microcystic. aeruginosa*) 由南京师范大学生命科学学院藻类工程研究室提供.

1.2 水稻秸秆浸提液的获取

刚收割的水稻秸秆, 剪成 2 cm 长的小段, 先用 0.1% HgCl 溶液消毒, 再用蒸馏水冲洗干净, 60℃ 烘干至恒重, 以同批水稻秸秆称取 5 g、10 g、20 g, 分别加 1000 ml 蒸馏水浸提 24 h, 得到质量比为 0.5%、1.0%、2.0% 的水浸提液. 该液用 0.45 μm 微孔滤膜抽真空过滤, 再在无菌条件下经除菌漏斗处理, 密封, 放入 4℃ 冰箱待用.

1.3 培养方法

实验设一对照组和三个试验组, 每组 10 瓶 (100 ml 的锥形瓶), 三个试验组以不同质量比的水稻秸秆浸提液代替蒸馏水配制 Detmer 培养基, 对照组和试验组分别接入处于对数生长期的铜绿微囊藻藻种, 使藻液起始藻细胞密度的 OD₆₅₀ 值达到 0.29. 在 LRH-250-G 光照人工气候培养箱中培养, 温度为 26℃, 光照强度 40 μmol/(m²·s), 光暗比为 12 h/12 h. 培养当天进行相关生理生化指标的测定, 以后每隔一天测定一次, 至第 9 d 测定结束. 整个试验经三次重复.

1.4 测定方法

微囊藻生物量的测定参照沃沙克等^[7]的方法, 测定培养液在波长 650 nm 处的光密度值. 呼吸吸氧速率和光合放氧速率的测定采用李德耀等^[8]的薄膜氧电极法. 叶绿素 a 含量的测定参照 Amon^[9]方法. 藻细胞膜透性的测定参照谢田和徐中际^[10]的紫外吸收法测定藻细胞中非电解质的渗出率, 以 OD₂₆₄ (g, FW) 表示. 藻细胞超氧化物歧化酶 (SOD) 活性及其提取液的制备, 参照唐萍、吴国荣等^[11]的方法. 激光共聚焦测定藻细胞光合膜的自发荧光强度, 所用激光扫描共聚焦显微镜型号为 Bio-Rad MRC-1024, 共聚焦系统所用软件 Laser sharp V;312, 采用 488 nm 激发 FITC, 发射波长检测滤镜为 680DF32, 图像经计算机软件处理后计算出平均荧光强度.

实验数据采用 SPSS11.5 软件包进行 Independent Samples Test 统计分析, 以 $P < 0.05$ 为显著性差异, $P < 0.01$ 为极显著性差异.

1.5 水稻秸秆浸提液抑藻物质的提取、分离与初步鉴定

称取 20 g 按 1.2 中的方法处理过的水稻秸秆放入 1000 ml 蒸馏水浸提 24 h, 0.45 μm 微孔滤膜抽提过滤, 再经除菌漏斗处理. 所得浸提液分别用两倍体积分析纯级的石油醚、乙酸乙酯、乙醚进行充分萃取, 无水 CaCl₂ 脱水, 过滤后于真空薄膜旋转蒸发仪上浓缩至 2 ml, Detmer 培养基平板培养铜绿微囊藻, 滤纸片法^[12]测定各有机溶剂提取物的抑藻效应.

2 结果与分析

2.1 水稻秸秆浸提液对铜绿微囊藻生长量的影响

对照组和三个试验组微囊藻生物量跟踪测定的结果见图 1. 实验过程中, 对照组的藻密度呈缓缓升高

的趋势,至第 9 d OD_{650} , 已经增至 0.39, 水体明显变绿; 0.5% 试验组藻细胞增殖趋于停止, 培养液藻细胞密度无明显变化; 1.0% 试验组前期光密度值下降较慢, 7 d 后加快, 藻细胞脱绿黄化沉底现象明显, 第 9 d OD_{650} 下降至 0.14; 2% 试验组在培养一天后就可见明显的下降, 第 3 d 光密度值下降了 25.6%, 至第 9 d 光密度值仅为 0.048, 水体已经变清. 可见不同质量比的水稻秸秆浸提液对铜绿微囊藻生长显现不同的抑制作用, 其抑藻程度随秸秆数量的增加而明显的增加, 提示: 水稻秸秆浸提液的抑藻效应与其中浸提物数量呈正相关. 数据统计结果证实对照组与不同质量比的试验组之间的值分别存在显著性差异 ($P < 0.05$) 和极显著性差异 ($P < 0.01$).

2.2 水稻秸秆浸提液对铜绿微囊藻叶绿素 a 和光合速率的影响

藻体中的叶绿素 a 含量往往与藻细胞的生长状态和光合作用密切相关^[13-16], 在实验过程中跟踪测定对照组和 2% 试验组的藻细胞叶绿素 a 含量和光合速率, 实验结果如图 2 和图 3. 对照组藻细胞中叶绿素 a 含量在实验过程中相对稳定, 而 2% 试验组在第 3 d 就出现了明显的下降 (图 2), 第 9 d 叶绿素 a 含量仅为同期对照组的 8.2% ($P < 0.01$), 提示水稻秸秆浸提液不仅破坏藻细胞现有的叶绿素 a, 也阻碍了藻细胞合成新的叶绿素 a. 对照组在整个实验过程中光合放氧速率没有明显的波动, 而试验组藻细胞的光合速率则迅速下降, 在培养的第 3 d, 仅为第 1 d 的 51.4%, 而后继续下降, 培养至第 9 d 时, 几乎测不到铜绿微囊藻光合放氧速率了 (图 3). 表明该水稻秸秆浸提液明显抑制了铜绿微囊藻的光合作用 ($P < 0.01$). 这个结果与藻细胞生长受到明显抑制的现象相互印证.

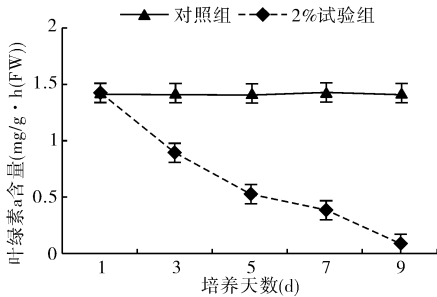


图 2 水稻秸秆浸提液对微囊藻叶绿素 a 的影响 ($n = 10$)

Fig. 2 Effect of aqueous extract from rice straw on the chlorophyll-a content of *M. aeruginosa* ($n = 10$)

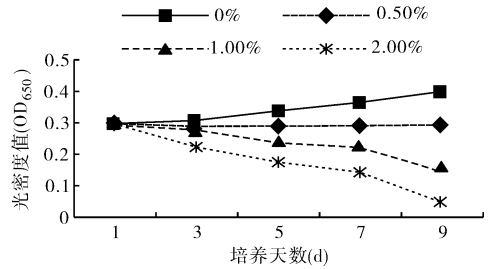


图 1 水稻秸秆浸提液对微囊藻细胞生物量的影响 ($n = 10$)

Fig. 1 Effect of aqueous extract from rice straw on the growth of *M. aeruginosa* ($n = 10$)

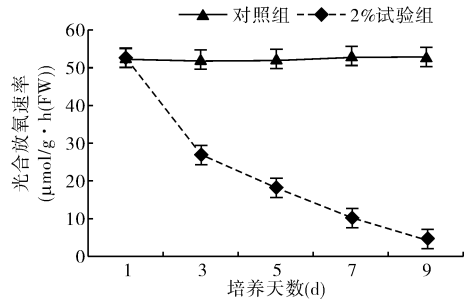


图 3 水稻秸秆浸提液对藻体光合速率影响 ($n = 10$)

Fig. 3 Effect of aqueous extract from rice straw on the photosynthetic rate of *M. aeruginosa* ($n = 10$)

2.3 水稻秸秆浸提液对铜绿微囊藻的呼吸速率的影响

测定实验过程中对照组和 2% 水稻秸秆浸提液试验组的微囊藻的呼吸速率, 结果见图 4. 对照组微囊藻的呼吸速率在整个处理过程中未出现明显的变化. 试验组藻细胞在实验第 3 d 呼吸速率明显提高, 几乎是植入当天的 2 倍. 第 5 d 的呼吸速率有所下降但仍处于高水平, 第 7 d 急剧下降, 已经显著低于对照组, 第 9 d 就几乎测不出其呼吸速率了. 呼吸速率短时间内升高后又急剧下降是藻细胞受到胁迫伤害的一种典型表现^[11], 提示水稻秸秆浸提液在藻细胞植入后就开始对铜绿微囊藻形成伤害.

2.4 水稻秸秆浸提液对铜绿微囊藻细胞膜透性的影响

当藻细胞膜受到破坏时, 其通透性会增大, 细胞内非电解质大量渗出, 藻培养液中的有机物含量短时间内会急剧增高^[10], 本实验以培养液紫外吸收值 (OD_{264}) 的变化表示藻细胞膜透性的改变和膜结构受损伤的情况^[10]. 图 5 是对照组和 2% 水稻秸秆浸液试验组藻细胞膜透性在实验过程中跟踪测定的结果, 可见随着

培养时间的增加,水稻秸秆浸提液培养的藻细胞内非电解质渗出有明显的增加,第3 d OD_{264} 已经接近初始值的2倍,第7 d 已经达到对照组的3倍了($P < 0.01$),以后的升高趋于平缓,提示培养在水稻秸秆浸提液中的微囊藻细胞第3 d 细胞膜已受到严重的损伤,造成胞内有机物的大量流失,至第9 d 细胞已经趋于解体,与此时培养液藻细胞密度大幅度降低,显微镜下已经不易看到完整的藻细胞是一致的。

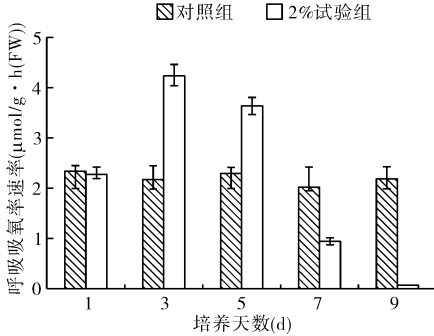


图4 水稻秸秆浸提液对藻体呼吸速率的影响 ($n = 10$)

Fig. 4 Effect of aqueous extract from rice straw on the respiratory rate of *M. aeruginosa* ($n = 10$)

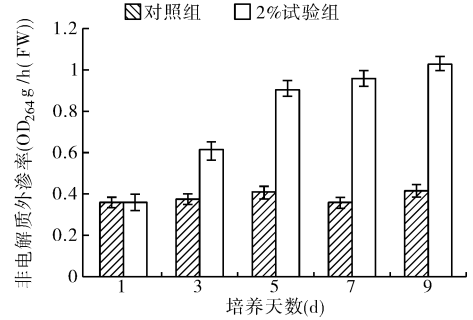


图5 水稻浸提液对藻细胞膜透性的影响 ($n = 10$)

Fig. 5 Effect of aqueous extract from rice straw on the membrane penetrability of *M. aeruginosa* ($n = 10$)

2.5 水稻秸秆浸提液对铜绿微囊藻 SOD 活性的影响

超氧化物歧化酶(SOD)是机体内重要的保护酶,其歧化机体在受胁迫过程中产生过量的超氧阴离子 O_2^- ,处于防止膜脂过氧化连锁反应的前列,在机体受到胁迫和损伤的状态下 SOD 活性往往会发生先升高后降低的变化^[16]. 在实验过程中,追踪测定 2% 试验组藻细胞中 SOD 活性的变化. 对照组微囊藻细胞内 SOD 数值保持相对稳定,而 2% 水稻秸秆浸提液试验组初期铜绿微囊藻 SOD 活性表现出上升趋势,这可能是藻细胞受到胁迫时的应激反应,其后开始下降,第 5 d 几乎与对照组持平,第 7 d SOD 活性出现大幅度下降,此时仅为同期对照组的一半,第 9 d 只有对照组的 38% (图 6),SOD 活性急剧的降低,表明此时铜绿微囊藻细胞已经受到了实质性伤害,藻细胞趋于死亡^[13-16].

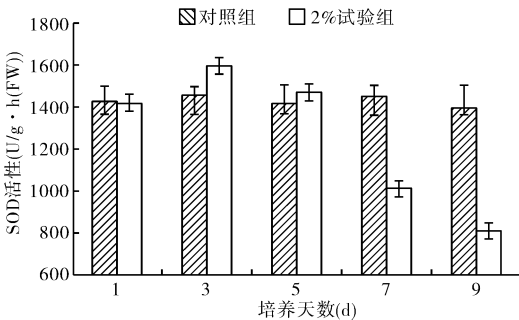


图6 水稻秸秆浸提液对微囊藻细胞 SOD 活性的影响 ($n = 10$)

Fig. 6 Effect of aqueous extract from rice straw on the activity of SOD of *M. aeruginosa* ($n = 10$)

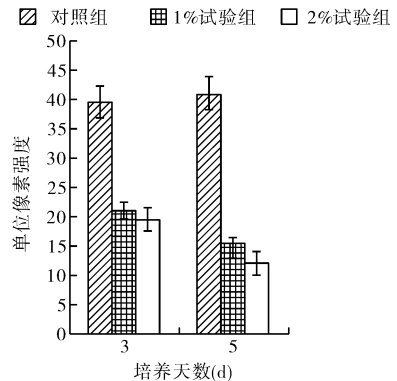


图7 水稻秸秆浸提液对微囊藻光合膜自发荧光强度的影响 ($n = 10$)

Fig. 7 Effect of aqueous extract from rice straw on the spontaneous fluorescence intensity of *M. aeruginosa* ($n = 10$)

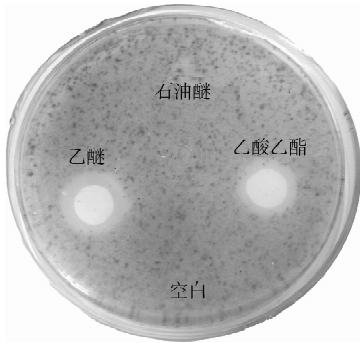


图 8 水稻秸秆浸提液不同有机溶剂萃取液的抑藻效果

Fig. 8 inhibiting effect of different organic solvent extracts from aqueous extraction on solid medium

2.6 水稻秸秆浸提液对铜绿微囊藻光合膜自发荧光的影响

绿色细胞光合膜自发荧光强弱通常是其代谢强度,生命活力的一个重要指标^[17]. 跟踪测定实验过程中微囊藻细胞自发荧光强度变化,可以直接地、定量地描述藻细胞受到胁迫伤害的情况. 在实验培养的第 3 d 和第 5 d,用激光扫描共聚焦显微镜分别测定 1%、2% 水稻秸秆浸提液试验组及对照组藻细胞光合膜自发荧光强度,用软件处理计算其平均强度. 结果表明(图 7),第 3 d 1% 试验组藻细胞光合膜自发荧光强度平均值为 22.95,2% 试验组为 17.36,而对照组自发荧光强度平均值为 55.84. 前两者的光合膜自发荧光平均强度仅为对照组的 41.1% 和 31.1%. 至第 5 d 两个处理组藻细胞光合膜的自发荧光测定值进一步降低,与对照组之间的差异更显著($P < 0.01$). 表明水稻秸秆浸提液在微囊藻植入后很快就对藻细胞光合膜的自发荧光造成明显的抑制,且该现象与此时藻细胞光合作用大幅度下降的情况是平行的.

2.7 水稻秸秆浸提液抑藻物质的分离

先后用石油醚、乙酸乙酯、乙醚三种有机溶剂分别萃取 2% 水稻秸秆水浸提液并浓缩其萃取液. 用滤纸片法分别做抑藻效应的实验. 经过一个月的培养,培养皿平板上出现了不同大小的抑藻圈(图 8),实际测定结果是,乙醚提取物抑藻圈最大,乙酸乙酯提取物次之,石油醚提取物基本无抑制作用. 测量的数据见表 1.

表 1 水稻秸秆浸提液不同有机溶剂萃取液的抑藻效果($n = 10$)

Tab. 1 Allelopathic effect of different organic solvent extracts from aqueous extraction on solid medium($n = 10$)

萃取液	有无抑藻圈	抑藻圈半径(cm)	现象
乙醚	有	0.9 - 1	纸片四周有明显的空白,无藻
乙酸乙酯	有	0.75 - 0.9	纸片上有清晰的空白,有零星的藻长在纸片中
石油醚	无	0	纸片上都长出了藻,无空白的地方

3 讨论

他感作用或异株克生作用(Allelopathy)是植物(包括微生物)通过释放化学物质抑制或促进其他个体生长的现象,又称为生物化感作用^[18]. 这种现象及其机制的研究已广泛深入到农林生产、植物保护、生物防治和环境治理等多个方面,利用水稻等作物秸秆对水体中浮游藻类生长的抑制作用亦已成为水环境保护的研究热点^[1].

本实验采用刚收割的稻草秸秆,经消毒,水浸提 24 h 后经过滤、除菌,配置培养液作铜绿微囊藻培养实验. 实验结果表明新鲜水稻秸秆浸提液对植入的藻细胞生长的抑制作用显著,第 9 d 质量比为 1% 和 2% 的培养液藻细胞密度分别下降至同期对照组的 35.9% 和 5.33%;藻细胞明显脱绿黄化;膜结构破坏性损伤,胞内物质大量渗出;光合放氧速率直线下降,第 9 d 已经测不出其放氧速率了;藻细胞光合膜在激光共聚焦下测定的自发荧光也呈进行性降低,显示藻细胞的光合作用系统受到实质性的伤害;呼吸速率则表现出典型的由于细胞受到明显的胁迫损伤,先升高随后迅速降低的变化趋势;2% 试验组第 9 天水体已经基本变清,其中很少有完整的藻细胞. 藻细胞叶绿素 a 含量、SOD 活性等在实验过程中连续测定的结果则从铜绿微囊藻细胞生理生化的角度印证了微囊藻细胞在水稻秸秆浸提液培养过程中受到显著损伤. 不同水稻秸秆质量比的浸提液对植入的微囊藻细胞的抑制作用明显随秸秆数量的增大而增大,0.5%、1% 和 2% 三个试验组对植入的藻细胞抑制效应有显著的差异($P < 0.05$),提示这种抑制效应与水稻秸秆浸提液中的抑制物质的数量直接相关.

为确定刚收割的新鲜水稻秸秆水浸提中存在抑制物质,我们先后用不同的有机溶剂对经 24h 浸泡的稻草秸秆的无菌水进行萃取、浓缩,并用小滤纸片法对其做平板培养的抑藻试验,结果表明稻草秸秆的水浸提液中有抑藻物质,用乙醚及乙酸乙酯能有效地从中萃取出来. 乙醚和乙酸乙酯所萃取的成分中含有哪些物质尚有待进一步通过 GC-MS 分离并予以鉴定.

有报道称降解稻草对蓝藻的生长有抑制作用,还强调历时一个月伴随微生物的降解作用对于稻草的抑藻因子的产生和释放是必要的^[6]. 我们的试验结果则表明新鲜稻草秸秆中就存在抑藻物质,在严格无菌条件下 24 h 的水浸提就能有效提取. 这与前人的工作应该是互补的. 分离鉴定新鲜稻草中的抑藻物质,在理论上可以进一步明确水稻抑制藻类生长的机制,在实践上则为利用水稻秸秆进一步开发安全,高效的杀藻剂提供有价值的资料.

有效防治水体中的水华,抑制其爆发是保护水安全刻不容缓的工作,是当前生态环境工作者面临的重要任务. 我国水稻播种面积为广阔,水稻秸秆资源极为丰富,有效利用水稻秸秆控制和治理自然水体中的水华必然有着广阔的前景.

4 参考文献

- [1] 刘丽萍. 滇池水华特征及成因分析. 环境科学研究, 1999, **12**(5): 36 - 37.
- [2] 庄源益, 赵凡, 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.
- [3] 朱浩然. 中国淡水藻志. 北京: 科学出版社, 1991: 16.
- [4] Welch I M, Barrett P R F, Gibson M T *et al.* Barley straw as an inhibitor of algal growth *Studies in the Chesterfield Canal Apply Phyco*, 1990, **2**: 231 - 239.
- [5] Barrett P R F, Curnow J C, Littlejohn J W. The control of diatom and cyanobacterial blooms in reservoirs using barley straw. *Hydrobiologia*, 1996, **340**: 307 - 311.
- [6] 万宏, 张昀, 降解稻草对蓝藻生长的抑制作用, 北京大学学报(自然科学版), 2000, **36**(4): 485 - 488.
- [7] 沃沙克, 张大宏等译. 藻类的培养方法和生物量生产力和光合作用测定技术, 北京: 科学出版社, 1985: 196 - 211.
- [8] 李德耀, 叶济宇. 薄膜氧电极的制作与呼吸或光合控制的测定. 植物生理学通讯, 1980, **16**(1): 35 - 40.
- [9] Arnon D L. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physical*, 1949, **24**: 1 - 15.
- [10] 谢田, 徐中际. 紫外吸收方法测定细胞膜的通透性. 植物生理学通讯, 1986, **1**: 45 - 46.
- [11] 唐萍, 吴国荣, 陆长梅等. 凤眼莲根系分泌物对蓝藻结构及代谢的影响. 环境科学学报, 2000, **20**(3): 355 - 359.
- [12] 孙文浩, 俞子文, 郭克勤, 余叔文. 凤眼莲克藻化合物的生物检测. 植物生理学通讯, 1991, **27**(6): 433 - 435.
- [13] 沃沙克(VonshakA)著, 张大宏等译. 生物生产力和光合作用测定技术. 北京: 科学出版社, 1985.
- [14] 袁俊峰, 章宗涉. 金鱼藻(*Ceratophyllum demersum* Kom.)对藻类的生化干预作用. 生态学报, 1993, **13**(1): 45 - 50.
- [15] 何池全, 叶居新. 石菖蒲(*Acorus gramineus*)克藻效应的研究. 生态学报, 1999, **19**(5): 754 - 758.
- [16] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantity of microgram quantities of protein synthesis in tortilla. *Plant Physical*, 1991, **95**: 684.
- [17] 徐旭士, 张超英, 刘清梅. 真菌的自发荧光现象研究. 激光生物学报, 2002, **11**(2): 109 - 113.
- [18] Rice E L. Allelopathy. 2nd ed. Orlando Florida. Academic Press Inc, 1984.