

黑藻 (*Hydrilla verticillata*) 对铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 抑制作用*

王立新^{1,2} 吴国荣^{1**} 王建安¹ 章浩¹ 陆长梅¹ 徐勤松¹

(1:南京师范大学生命科学学院,南京 210097; 2:常熟高等专科学校,常熟 215500)

提 要 采用黑藻 (*Hydrilla verticillata*) 和铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 共同培养的实验方法, 追踪测定微囊藻的生长量、光合速率等相关生理生化指标以及观察藻细胞超微结构变化, 研究黑藻对铜绿微囊藻的抑制作用及其机制. 结果表明, 黑藻对铜绿微囊藻的生长有明显的抑制作用, 表现为藻细胞生长量显著降低, 细胞超微结构进行性损伤直至细胞解体, 藻体叶绿素 a 含量和光合速率急剧下降, 呼吸速率、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性均呈现先升高后下降的趋势, 膜脂过氧化产物丙二醛 (MDA) 的积累量与膜的损伤程度相一致. 在黑藻养殖水中初步分离得到黑藻分泌的抑藻物质.

关键词 黑藻 铜绿微囊藻 抑制作用 抑藻物质

分类号 Q949.22

近年来, 由于水体富营养化程度的日趋严重, 我国南方水域夏季经常出现大规模水华爆发现象^[1, 2], 直接影响鱼类养殖和人畜饮水的安全. 太湖、滇池等地形成的水华主体是铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa* Kütz), 其属蓝藻门, 微囊藻属, 原核单细胞藻类, 能合成和分泌细胞毒素. 防止水华爆发, 特别是抑制铜绿微囊藻的繁衍已成为一个维护人类生存环境的亟待解决的问题. 黑藻 (*Hydrilla verticillata* (L. f.) Royle) 水鳖科, 一年生沉水草本植物. 在东太湖水域黑藻大量繁殖处, 低等藻类密度很小, 水体清澈, 提示黑藻可能对单细胞藻类生长具有抑制效应. 黑藻生长在河道和湖泊的底部, 不影响航道, 适于水环境的生物治理, 其对水体中包括微囊藻在内的单细胞藻类抑制效应的研究报道目前尚未见到. 本文以黑藻为材料, 研究其对铜绿微囊藻生长的影响, 以期研究黑藻及其分泌物的抑藻机理, 为构建科学的水体生态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

黑藻采自苏州东山太湖水域. 铜绿微囊藻由南京大学生命科学学院曾昭琪教授提供.

1.2 培养方法

用 Detmer 培养基于 LRH-250-G 光照培养箱中对铜绿微囊藻进行扩大培养, 当其进

* 国家自然科学基金项目(30370083)和教育部科学技术研究重要项目(01043)联合资助.
2004-05-14 收稿; 2004-07-02 收到修改稿. 王立新, 女, 1973年生, 讲师.

** 通讯作者.

入生长对数期后于 2000mL 的大烧杯中用 1/10 修改的 Hoagland 培养液培养, 使起始的 OD₆₅₀ 值达到 0.147. 设一对照组, 另四组中放入 20g 生长期相同的黑藻. 黑藻在放入前先用 0.1% HgCl₂ 溶液消毒, 无菌水冲洗, 吸水纸吸干, 称重. 在培养过程中烧杯用两层纱布封口, 26℃, 12/12h 光暗比培养. 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 9d 测定完毕. 实验设三次重复, 均得一致结果.

1.3 测定方法

生长量的测定参照沃沙克等^[3]的方法, 测定培养液在波长 650nm 处的光密度值. 呼吸速率和光合放氧速率的测定采用李德耀等^[4]的薄膜氧电极法. 叶绿素 a 含量的测定参照 Arnon^[5]方法并加以改进. 丙二醛(MDA)含量的测定参照 Heath 的硫代巴比妥酸(TBA)比色法^[6]. 超氧化物歧化酶(SOD)活性测定参照 Stewart 和 Bewley^[7]的方法.

藻细胞提取液的制备: 离心收集藻细胞, 超声波破碎参照唐萍、吴国荣等^[8]的方法.

黑藻养殖水的获取方法: 黑藻养殖 7d 后, 取其养殖水经 0.45μm 微孔滤膜抽真空过滤, 在滤液中添加相当于 1/10N 修改的 Hoagland 培养液的营养元素, 接铜绿微囊藻种使其起始的 OD_{650nm} 达到 0.167. 对照用过滤的蒸馏水代替黑藻养殖水.

铜绿微囊藻超微结构的观察: 分别收集处理组 5d、7d、9d 的藻细胞及对照组藻细胞, 用 4% 戊二醛及 1% 锇酸双重固定, 各级丙酮脱水, Epon815 包埋, LKB 超薄切片机切片, 切片经醋酸双氧铀、柠檬酸铅染色, 于 Hitach I 600 - A - 2 透射电镜下观察并拍照.

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

2 结果与分析

2.1 黑藻对铜绿微囊藻生长量的影响

黑藻和铜绿微囊藻共培养的初期, 处理组藻细胞的生长速度比对照组略快(图 1), 第 3d

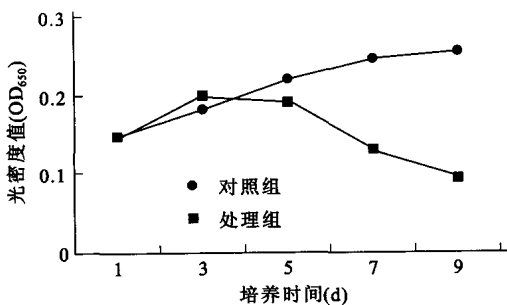


图 1 黑藻对铜绿微囊藻生长量的影响

Fig. 1. Effect of *H. verticillata* on the biomass of *M. aeruginosa* ($n = 3$)

以后处理组藻体开始黄化失绿, 其光密度值呈明显的下降趋势, 至第 7d, 光密度值下降至 0.130, 第 9d 光密度值仅为 0.095, 水体变清, 而此时的对照组水色浓绿、光密度值达到 0.254. 相比而言, 处理组藻细胞密度较实验初始时下降了 35.4%, 仅为同期对照组的 37.5%. 表明黑藻对铜绿微囊藻的生长具显著的抑制作用 ($P < 0.05$).

2.2 黑藻对铜绿微囊藻超微结构的影响

在共培养过程中黑藻及其分泌物对铜绿微囊藻细胞超微结构的损伤随培养天数的增加呈现逐渐加剧的趋势. 对照组细胞可见完整的细胞壁、膜, 排列紧密整齐的一类囊体片层和中央拟核区, 细胞质非常浓厚(图 2a). 而处理组细胞的细胞壁和膜第 5d 出现缺刻(图 2b)直至第 9d 消失(图 2d); 类囊体片层排列由紧密整齐变得疏松杂乱, 拟核区逐渐消失(图 2b、c、d); 第 9d 藻细胞解体, 只剩零星散落的类囊体片层残余(图 2).

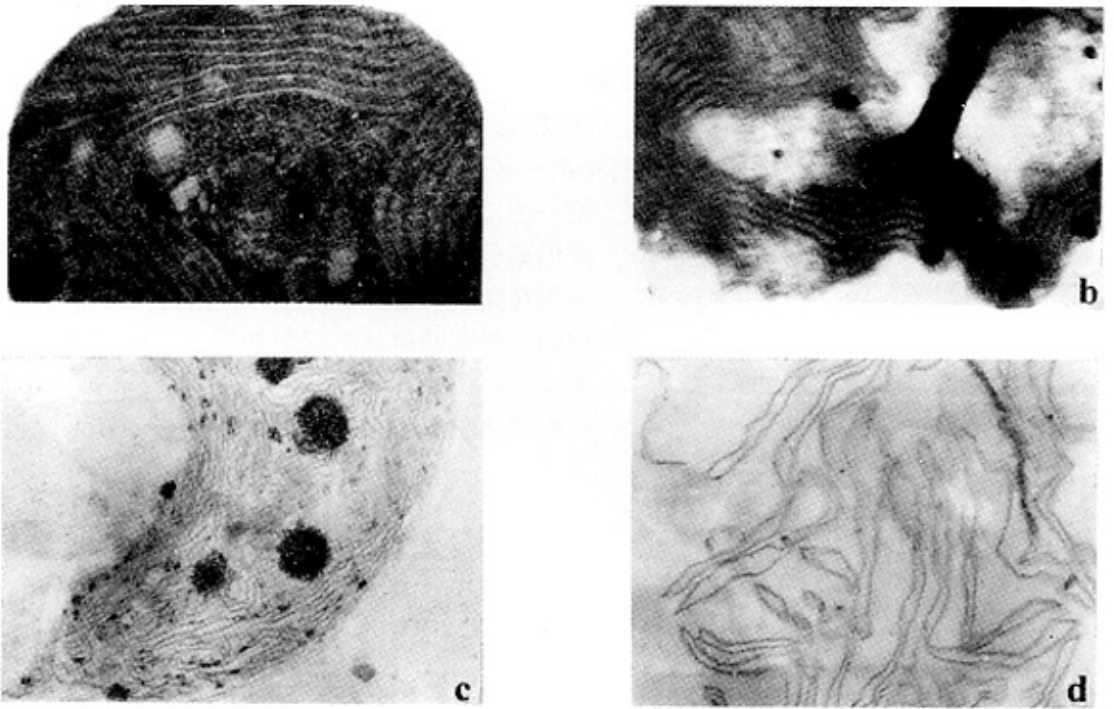


图 2 黑藻对铜绿微囊藻超微结构的影响

Fig. 2 Effect of *H. verticillata* culture on the ultra-structure of *M. aeruginosa* (n = 3)

2.3 黑藻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^[9-11], 由图 3 可见, 对照组叶绿素 a 含量在实验过程中相对稳定, 而处理组在第 3d 就出现了明显的下降, 第 9d 叶绿素 a 含量仅为同期对照组的 12.5%, 这与实验过程中观察到共培养液颜色逐日变黄的现象相一致. 数据处理的结果表明在共培养过程中黑藻对铜绿微囊藻叶绿素 a 含量的影响是非常明显的 ($P < 0.05$). 此结果与处理组铜绿微囊藻光合作用受到明显抑制的现象相吻合(图 4), 在共培养的第 3d, 铜绿微囊藻的光合放氧速率就急剧下降, 仅为第一天测定值的 28.9%, 而后继续下降, 培养至第 7d 时, 已几乎测不到铜绿微囊藻的光合放氧速率了, 表

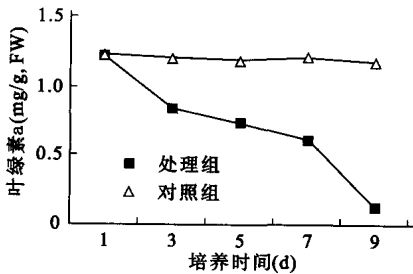


图 3 黑藻对铜绿微囊藻叶绿素 a 含量的影响

Fig. 3 Effect of *H. verticillata* on the chlorophyll a content of *M. aeruginosa* (n = 3)

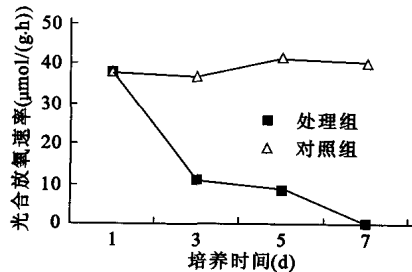


图 4 黑藻对铜绿微囊藻光合速率的影响

Fig. 4 Effect of *H. verticillata* on the photosynthetic rate of *M. aeruginosa* (n = 3)

明黑藻显著抑制了铜绿微囊藻的光合作用 ($P < 0.05$), 这个结果与藻细胞生长受到抑制的结果相互印证.

2.4 黑藻对铜绿微囊藻的呼吸速率的影响

处理组铜绿微囊藻在黑藻植入的第 3d 呼吸速率明显提高, 几乎是植入当天的 2 倍 (图 5), 呼吸速率的急剧增加是藻细胞受到胁迫的一种表现, 与此时藻细胞光合速率急剧下降是统一的, 可见黑藻通过其分泌物开始对铜绿微囊藻形成伤害. 第 5d 处理组铜绿微囊藻的呼吸速率仍在高水平上进行, 第 7d 时明显下降, 此时藻细胞已经开始解体. 对照组铜绿微囊藻的呼吸速率未出现大幅度的波动.

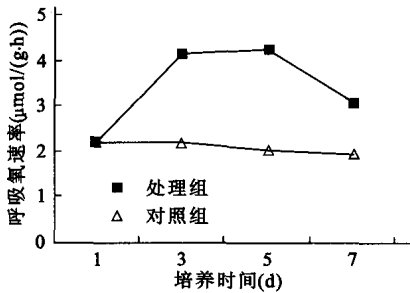


图 5 黑藻对铜绿微囊藻呼吸速率的影响

Fig. 5 Effect of *H. verticillata* on the respiratory rate of *M. aeruginosa* ($n = 3$)

2.5 黑藻对铜绿微囊藻 SOD 活性、MDA 含量的影响

超氧化物歧化酶 (SOD) 是机体内极为重要的保护酶, 其歧化机体在受胁迫过程中产生的超氧阴离子 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 活性会发生相应的变化^[8]. 实验结果表明 (图 6), 在共培养初期铜绿微囊藻 SOD 活性表现出上升趋势, 这可能是铜绿微囊藻在受到黑藻分泌物胁迫时的应激反应, 第 7d SOD 活性出现大幅度下降, 此时仅为同期对照组的一半, 第 9d 仍继续下降, 表明此时铜绿微囊藻细胞已经受到了实质性伤害^[8,12].

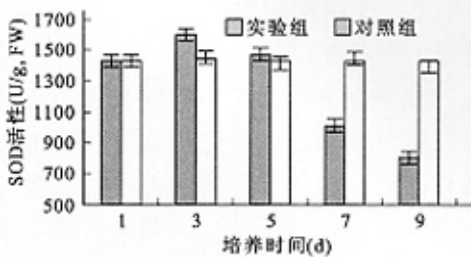


图 6 黑藻对铜绿微囊藻 SOD 活性的影响

Fig. 6 Effect of *H. verticillata* on the activity of SOD of *M. aeruginosa* ($n = 3$)

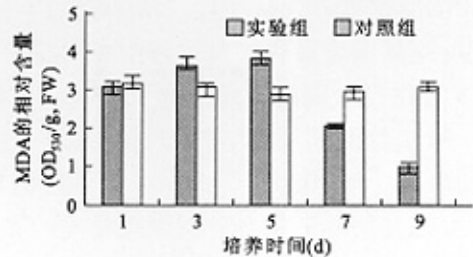


图 7 黑藻对铜绿微囊藻 MDA 含量的影响

Fig. 7 Effect of *H. verticillata* on the MDA content of *M. aeruginosa* ($n = 3$)

丙二醛 (MDA) 是脂质过氧化的产物, 其形成和积累量可作为细胞膜结构损伤, 藻体受胁迫程度的一种标志^[8]. 处理组铜绿微囊藻在实验的第 3d 和第 5d MDA 积累量较第一天分别升高了 19.1% 和 26.6% (图 7). 而第 7d 后 MDA 测定值的显著降低可能与此时藻细胞膜结构受到严重损伤, 藻细胞已经开始解体相关, 与图 2 所显示出的现象是吻合的. 实验过程中对照组 MDA 的测定值未见大幅度波动.

2.6 黑藻养殖水抑藻物质的初步分离

取 200mL 黑藻养殖 7d 的养殖水, 微孔滤膜过滤, 加等量有机溶剂萃取, 分液漏斗分液,

CaCl₂ 脱水,过滤,于旋转蒸发仪上 35℃ 减压浓缩,定容至 400 μ L. Demer 培养基平板培养铜绿微囊藻,以小滤纸片法检测各有机溶剂提取物的抑藻效果,结果发现,乙醚提取物的抑藻圈最大,乙酸乙酯提取物效果次之,石油醚提取物基本无抑制作用。

3 讨论

本实验结果表明:黑藻对铜绿微囊藻生长的抑制作用是明显的,仅几天的共培养,铜绿微囊藻即出现藻体黄化,细胞结构进行性损伤,直至壁和膜结构消失;光合放氧速率直线下降,呼吸速率呈现出相应的藻细胞受到胁迫损伤后的变化趋势,第九天水体变清,培养液中已经几乎找不到完整的藻细胞。叶绿素 a 含量、SOD 活性、MDA 积累量等在实验过程中发生的变化则从铜绿微囊藻生理生化的角度印证了藻细胞在共培养过程中受到了明显的胁迫和伤害,这种胁迫是黑藻和铜绿微囊藻共培养的直接结果。

目前已有报道凤眼莲等抑制单细胞藻类生长繁殖的作用是通过其在水中的根系分泌物兑现的^[8, 13],作者的前期工作也证实了凤眼莲根系分泌的化学物质经过水环境进入藻细胞,其促进藻细胞超氧阴离子等活性氧的形成,造成藻细胞代谢紊乱及膜结构的损伤^[8]。与之相比较,黑藻对铜绿微囊藻的抑制作用似乎更快,更直接,前者共培养 10d 后仍保留同期对照组 59% 的藻细胞数量,后者第 9d 仅为对照组的 37.5%。目前课题组在进行黑藻养殖水乙醚提取物的进一步分离、鉴定及其抑藻机制的研究,都使我们看到利用黑藻等植物分离植物源杀藻剂或模拟这种抑藻物质人工合成杀藻剂,有效抑制水华爆发的应用前景。

利用植物类群之间的异株克生作用进行水环境的生物治理正日益受到关注^[13, 14]。黑藻等水生植物对同一水域内铜绿微囊藻等单细胞藻类生长的抑制作用,对藻类代谢和细胞结构的破坏效应以及对水体中 N、P 等营养成分的吸收等等都是降低水体富营养化,抑制水华爆发,调节水生态环境,促进水质净化等水污染综合治理的生物学基础。我们曾报道和比较过凤眼莲、水花生、菱等几种太湖水域浮水植物的抑藻效应^[12],但在实施治理过程中可能会造成新的生态失控,导致水面拥塞、航道受阻等新的问题。作者在苏州东山等太湖水域看到黑藻在湖底旺盛生长,形成湖底草坪的景象,不仅水体澄清,还为水中的浮游生物形成良好的生长环境,也为草食鱼类提供充足的食物,显示出一个良好的水体生态大环境。相信黑藻的合理种植及其分泌的抑藻物质的开发利用必将使利用水生高等植物治理水环境的工作开展得更加顺利,展现更远大的前景。

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 陈宇炜, 秦伯强, 高锡云. 太湖梅梁湾藻类及相关环境因子逐步回归统计和蓝藻水华的初步预测. 湖泊科学, 2001, 13(1): 63 - 71
- 3 沃沙克, 张大宏等译. 藻类的培养方法和生物量生产物. 生物生产力和光合作用测定技术. 北京: 科学出版社, 1985: 196 - 211
- 4 李跃德, 叶济宁. 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
- 5 Arnon D L. Copper enzymes in isolated chloroplasts Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physical*, 1949, 24: 1 - 15
- 6 Heath R L, Parker L. Photoperititation in isolated choloplasts kinetics and stoichiometry of fatty acidperoxidation. *Arch Bio-phy*, 1968, 75(2): 189 - 198

- 7 Stewert R C, Bewley J D. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiol*, 1980, **65**(3): 245 - 248
- 8 唐 萍, 吴国荣, 陆长梅等. 凤眼莲根系分泌物对栅藻结构及代谢的影响. *环境科学学报*, 2000, **20**(3): 355 - 359
- 9 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
- 10 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
- 11 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
- 12 唐萍, 吴国荣, 陆长梅等. 太湖水域几种高等水生植物的克藻效应. *农村生态环境*, 2001, **17**(3): 42 - 44, 47
- 13 孙文浩, 俞子文, 余叔文. 城市富营养化水域的生物治理和凤眼莲抑制藻类生长的机理. *环境科学学报*, 1989, **9**(2): 188 - 195
- 14 况琪军, 夏宜琤, 吴振斌等. 人工模拟生态系统中水生植物与藻类的相关性研究. *水生生物学报*, 1997, **21**(1): 90 - 93

The Inhibition of *Hydrilla verticillata* on *Microcystis aeruginosa*

WANG Lixin^{1,2}, WU Guorong¹, WANG Jianan¹, ZHANG Hao¹, LU Changmei¹ & XU Qinsong¹

(1: College of life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, P. R. China;

2: Changshu College, Changshu 215500, P. R. China;)

Abstract

In this paper, *Microcystis aeruginosa* co-cultivated with *Hydrilla verticillata* was used to study the inhibitory effect of *Hydrilla verticillata* on *Microcystis aeruginosa* and its mechanism. The results indicated that *Microcystis aeruginosa* growth was obviously inhibited by *Hydrilla verticillata*. Its ultra-structure was destroyed and finally disintegrated; chlorophyll-a content, photosynthetic rate declined evidently from the beginning; whereas respiratory rate and SOD activity increased firstly, but decreased as treatment time went on; MDA accumulation was consistent with the degrees of its cell destruction. *Hydrilla verticillata* culture had the same inhibitory effect on *Microcystis aeruginosa*. The crude excretion from *Hydrilla verticillata* culture which had the inhibitory effect on *Microcystis aeruginosa* was obtained.

Keywords: *Hydrilla verticillata* (L. f.) Royle; *Microcystis aeruginosa* Kütz; inhibition; algae-cide chemical