

水芹 (*Oenanthe javaica*) 浸出液对小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 生长及超微结构的影响

袁亚光¹, 李思宇¹, 宰学明^{2①}, 钦佩^{1②} (1. 南京大学盐生植物实验室, 江苏南京 210093; 2. 金陵科技学院园艺学院, 江苏南京 210038)

摘要: 采用在不同浓度水芹 (*Oenanthe javaica*) 浸出液中纯培养小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 的方法, 研究水芹浸出液对小球藻细胞数量、叶绿素含量和藻细胞超微结构的影响。结果显示, 10 g · L⁻¹ 水芹浸出液对小球藻的生长和叶绿素含量具有明显的促进作用; 20 g · L⁻¹ 水芹浸出液处理组藻细胞数量和叶绿素含量增加持续至第 7 天, 但增幅低于对照组, 7 d 后抑制作用增强; 高浓度 (30 ~ 50 g · L⁻¹) 水芹浸出液对小球藻细胞数量和叶绿素含量的抑制作用在第 5 天开始变得显著, 并随时间延长而加剧, 具有浓度效应; 经 40 g · L⁻¹ 水芹浸出液处理后, 小球藻细胞壁断裂甚至消失, 细胞中叶绿体片层肿胀甚至解体, 核膜破裂, 核质外渗。结果表明水芹浸出液对小球藻具有化感效应, 总体呈现低浓度促进、高浓度抑制的规律。

关键词: 水芹; 浸出液; 小球藻; 化感作用; 叶绿素; 超微结构

中图分类号: Q178.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-4831(2012)03-0266-05

Effects of *Oenanthe javaica* Extracts on Growth and Ultrastructure of *Chlorella vulgaris*. YUAN Ya-guang¹, LI Si-yu¹, ZAI Xue-ming², QIN Pei¹ (1. Halophyte Research Laboratory, Nanjing University, Nanjing 210093, China; 2. Department of Horticulture, Jinling Institute of Technology, Nanjing 210038, China)

Abstract: Pure culture of chlorella was done in solutions different in concentration of *Oenanthe javaica* extracts added, to explore effects of *O. javaica* extracts on growth, chlorophyll content and ultrastructure of chlorella. Results show that in the treatment of 10 g · L⁻¹ *O. javaica* extract growth of chlorella was significantly promoted, and in the treatment of 20 g · L⁻¹ *O. javaica* extract the number of cells and chlorophyll content of chlorella increased with a margin narrower than that in the control in the first 7 days, and afterwards, the growth was inhibited. In the treatments of 30-50 g · L⁻¹ *O. javaica* extract, phenomenon of the inhibition became obvious on the fifth day and more obvious with the time going on and with the increasing concentration of the extract added as well. In the treatment of 40 g · L⁻¹ *O. javaica* extract, cell walls of the algae broke up and even vanished, chloroplast lamellas in the cells swelled and even disintegrated, and karyolemmas ripped with karyoplasm extravasating. The findings indicate that *O. javaica* extract had an allelopathic effect on chlorella, and when low in concentration, it promotes growth of the algae, but when high, it acts reversely.

Key words: *Oenanthe javaica*; extract; *Chlorella vulgaris*; allelopathy; chlorophyll; ultrastructure

富营养化导致浮游植物, 尤其是微型藻类过度繁殖而爆发水华, 引起一系列的环境问题, 造成巨大的经济损失, 甚至危及人类健康^[1-3]。而传统的物理、化学抑制藻类生长的方法会不可避免地破坏生态平衡并造成环境污染^[4], 因此寻求一种高效安全的抑藻方法具有重要意义。1949 年 HASLER 等首次发现了水生植物对藻类的化感抑制作用^[5], 此后研究者开始对植物化感作用展开广泛研究, 包括化感抑制作用、化感抑制机理、化感物质的分离纯化和开发利用等。利用植物的化感作用控制水体藻类的繁殖, 因具有安全、不易造成二次污染的优点而备受关注^[6-8]。

植物浸出液抑藻试验是研究植物化感作用的重要方法^[7], 有关浸出液抑藻的研究^[9-15]较多。但是, 关于水芹在富营养化水体中对藻类的抑制作用的研究较少, 其克藻效应及机理仍有待研究。水芹 (*Oenanthe javaica*) 为水生宿根草本植物, 喜水耐寒, 生长适宜温度为 12 ~ 24 °C, 温度超过 25 °C 时, 植株逐渐进入休眠状态。由于水芹具有较高的生物量, 可多次收割, 耐低温, 因此可作为低温季节修复污

收稿日期: 2011-12-12

基金项目: 国家林业公益性行业科研专项 (200904001)

① 共同通信作者 E-mail: zaixueming680825@yahoo.com.cn; ② 通信作者 E-mail: qinpei@nju.edu.cn

染水体的优势种和抑制藻类生长的工具种^[16]。因此,笔者在室内研究水芹浸出液对小球藻的克藻效应及其机制,旨在进一步了解水芹的生态功能,为丰富富营养化水体生态修复的工具种库提供基础材料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

水芹(*Oenanthe javaiica*)购于南京市六合区种植基地。小球藻(*Chlorella vulgaris*)藻种由南京师范大学生命科学学院生物工程实验室提供。小球藻在无菌条件下转移至1/10 Hoagland 营养液中,于光照培养箱中培养1周,至对数生长期进一步扩大培养。培养条件为:温度(25 ± 1) °C, $t(\text{光}):t(\text{暗}) = 12 \text{ h}:12 \text{ h}$, [光]照度为4 500 lx, 静置培养,每天定时摇动3次。

1.2 水芹浸出液的制备

用自来水和蒸馏水将水芹植株反复冲洗干净,在80 °C烘箱中放置48 h后取出,粉碎、研磨、过150 μm 孔径筛,取50 g加入500 mL锥形瓶中,再加250 mL蒸馏水,置于恒温(25 °C)振荡器中提取48 h,减压抽滤,滤液即为浸出母液($200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)。试验前用0.45 μm 孔径滤膜过滤以消除其他微生物的影响。

1.3 化感作用试验

在无菌条件下分别将0、10、20、30、40、50 mL浸出母液加入500 mL透气玻璃瓶内,再加入灭菌1/10 Hoagland 营养液和处于对数生长期的小球藻,使培养液总体积为200 mL。用植物材料的质量与培养液体积比表示化感物质含量($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$),则其浓度梯度为0、10、20、30、40、50 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,以化感物质含量为0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的处理组作为对照,3次重复,初始小球藻密度均值为 $2.45 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 。培养条件为:温度(28 ± 0.5) °C, $t(\text{光}):t(\text{暗}) = 12 \text{ h}:12 \text{ h}$, [光]照度4 000 lx, 静置培养,每天定时摇动3次,培养9 d。每隔24 h取样测定相关指标。

1.4 测定项目与测定方法

1.4.1 小球藻藻细胞计数

每天取定量藻液,用血球计数板在显微镜(16 \times 40倍)下对藻细胞进行计数。

1.4.2 叶绿素含量的测定

取一定量藻液进行抽滤,抽干后将藻及滤膜一起放入具塞离心管中,加入 φ 为95%的丙酮溶液至混合物总体积为10 mL,振荡提取叶绿素,放置暗处过夜。在相对离心力 $F_{r,c}$ 为1 006条件下离心15

min,去上清液测定吸光度^[17]。

1.4.3 藻细胞超微结构的观察

在试验第1、5、7和9天和试验结束时,收集高浓度($40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)水芹浸出液处理组 and 对照组藻细胞,用 φ 为4%的戊二醛及 φ 为1%的锇酸溶液双重固定,采用 φ 为30%、50%、70%、80%、90%、95%和100%的丙酮由低到高梯度脱水,用双氧铀和柠檬酸铅双重染色,切片后于Hitachi600A-2透射电镜下观察。

1.5 数据分析

水芹浸出液对藻类的相对抑制率公式为 $R_i = (1 - N/N_0) \times 100\%$ ^[9],其中, R_i 为相对抑制率, N 为加入浸出液的处理组藻密度, N_0 为未加入浸出液的对照组藻密度。若 $R_i > 0$,表示水芹浸出液对藻类具有抑制作用;若 $R_i < 0$,表示具有促进作用。

采用Excel 2010软件对数据进行统计处理,采用SPSS 18.0软件进行差异显著性检验,采用Origin 7.5软件作图。

2 结果与分析

2.1 水芹浸出液对小球藻生长量的影响

如图1所示,当处于对数生长期的的小球藻受到不同浓度水芹浸出液的影响时,其生长曲线会发生改变。

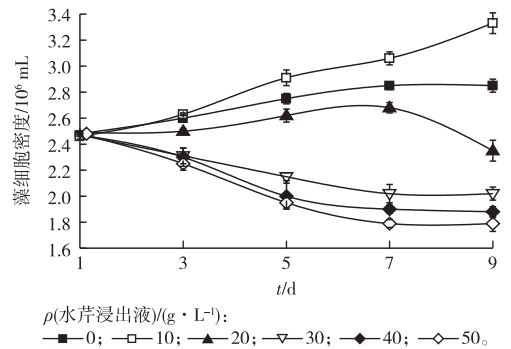


图1 不同浓度水芹浸出液对小球藻生长量的影响

Fig.1 Effect of *Oenanthe javaiica* extracts on growth of *chlorella*

培养5 d后,对照组小球藻数量基本达到稳定状态,即标准logistic模型“S”型曲线的稳定期。10 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 水芹浸出液对小球藻的生长具有显著促进作用($P = 0.00092 < 0.01$),培养第9天小球藻数量已达对照组的1.17倍;20 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 水芹浸出液对小球藻的生长有抑制作用,小球藻数量持续增加到培养第7天,但增幅低于对照组($P = 0.0042 < 0.01$),7

d后藻细胞数量大幅下降,抑制效应明显加强,第9天相对抑制率达17.54% ($P = 0.0078 < 0.01$);高浓度($30 \sim 50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)处理组水芹浸出液对藻类的抑制作用从培养第3天开始出现,藻细胞脱绿黄化沉底现象明显,培养第9天,相对抑制率分别达29.15%、34.04%和37.20%。综上所述,不同浓度水芹浸出液对小球藻生长呈现不同作用,对小球藻生长的相对抑制率随水芹浸出液浓度的增加而明显增加。

2.2 水芹浸出液对小球藻叶绿素含量的影响

藻体中叶绿素含量与小球藻细胞的生长状态密切相关。图2显示,对照组藻细胞中叶绿素含量在整个试验过程中稳定增加,培养第5天,各处理组叶绿素含量与对照组相比差异明显。 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 水芹浸出液处理组叶绿素含量持续增加,培养第9天叶绿素含量为对照组的1.39倍; $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组叶绿素含量的增加趋势持续到第7天,但增幅低于对照组,7d后叶绿素含量迅速下降;高浓度($30 \sim 50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)水芹浸出液处理组叶绿素含量随培养时间的增加而明显下降,培养第9天,叶绿素含量分别比对照组低54.10%、68.85%和73.77%,叶绿素含量降幅随水芹浸出液浓度的升高而增加。同时,藻体叶绿素含量的变幅大于小球藻生长量的变幅。叶绿素含量的变化情况与小球藻细胞的生长在不同浓度浸提液条件下受到促进或抑制的现象相互印证(图1~2)。

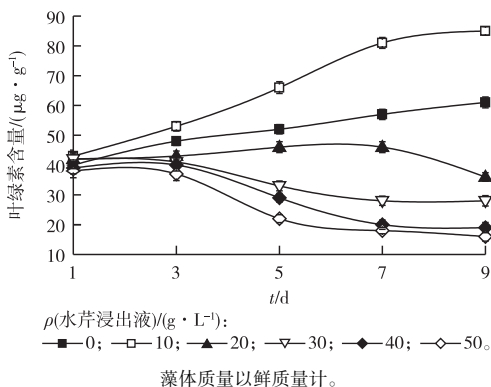


图2 不同浓度水芹浸出液对小球藻叶绿素含量的影响

Fig. 2 Effect of *Oenanthe javanica* extracts on chlorophyll content of *Chlorella*

2.3 水芹浸出液对小球藻超微结构的影响

高浓度水芹浸出液对小球藻细胞超微结构的损伤明显,且随处理时间的延长而加剧。由图3(a)~(b)可知,未受伤害的小球藻细胞具有完整的细胞壁;叶绿体片层清晰,排列整齐有序;细胞膜贴

壁无皱褶,核质均匀。而 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 水芹浸出液处理组小球藻细胞培养至第5天时[图3(c)~(d)],其内部结构已表现出受伤害症状,细胞壁内陷皱褶,核膜破裂,核质外渗。第7天时小球藻细胞受伤害症状加重[图3(e)],叶绿体片层膨胀,排列有序性明显减弱。培养第9天,小球藻细胞的原生质体收缩,叶绿体片层以及外包膜都发生解体,细胞中心几乎变成一个空腔[图3(f)]。

3 讨论

试验结果显示,低浓度($10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)水芹浸出液对小球藻的生长具有显著促进作用,培养第9天小球藻叶绿素含量为对照组的1.39倍,小球藻数量为对照组的1.17倍,叶绿素含量增幅比小球藻数量增幅大,笔者认为 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 水芹浸出液能促进小球藻叶绿素的合成。 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 水芹浸出液条件下培养3、5、7d时的小球藻生长量高于培养第1天,但与同一时间的对照组相比,呈显著受抑制状态,培养第9天藻细胞数量和叶绿素含量与第7天相比均显著下降,低于培养初期,抑制作用加强。高浓度($30 \sim 50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)水芹浸出液处理组小球藻生长受抑制作用明显,随着水芹浸出液浓度的升高,相对抑制率增加,分别达29.15%、34.04%和37.20%,3个处理组藻体叶绿素含量分别比对照组低54.10%、68.85%和73.77%,叶绿素含量降幅大于藻细胞数量降幅,结合超微结构观察认为,高浓度水芹浸出液能抑制小球藻叶绿素的合成。

化感物质对细胞超微结构的影响主要是破坏细胞膜,使膜系统受到损伤,从而进一步作用于膜内的叶绿体、拟核、线粒体及内含物和细胞核等细胞超微结构,达到杀死藻细胞、抑制藻类生长的目的^[5]。李锋民等^[9]在考察芦苇抑藻化感物质对蛋白核小球藻的影响时,发现供试细胞壁脱落,细胞膜破裂,细胞内含物渗出,细胞内片层结构解体,细胞核和线粒体结构损坏;王立新等^[18]发现黑藻分泌物可使铜绿微囊藻细胞质壁脱离、类囊体片层结构松散杂乱,且损伤作用随时间延长而加剧;唐萍等^[19]研究表明,栅藻在受到凤眼莲根系分泌物的抑制作用时,其藻细胞结构产生显著损伤,细胞膜、叶绿体、线粒体、核膜等膜系统受到损伤。

笔者试验中, $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 水芹浸出液培养小球藻仅几天,藻体就出现黄化,细胞壁、叶绿体、细胞核等发生进行性损伤,培养第9天,叶绿体片层以及外包膜都发生解体,藻细胞基本成为空腔。这一系列细胞水平的超微结构变化显示藻细胞生长受到抑

制,甚至被杀死。试验数据和电镜图片表明,高浓度水芹浸出液对叶绿素的破坏非常明显。

叶绿素是植物进行光合作用的物质基础,其含量变化能较好地反映生物各阶段生长发育正常与否^[20]。大多数植物化感物质会对光合系统Ⅱ(PSⅡ)产生影响,低浓度化感物质可能有利于藻类叶绿素生化合成而促进光合作用,从而促进藻类生长;而高浓度化感物质通过破坏藻类的叶绿素,减少其同化产物来抑制藻类生长^[21]。笔者试验中不同水芹浸出液处理组藻细胞生长与叶绿素变化的

趋势也能佐证该结论。

一般来说,植物化感物质主要是植物次生代谢物质^[6],笔者所采用的植物浸出液抑藻试验研究有利于消除光和营养的差异对化感作用测定的影响,便于化感作用的确定、模型的建立及其机理的探究^[22],可信度较高,可为后续化感物质的分离提纯及应用提供参考^[7]。其他一些包括抗氧化酶活性、蛋白质合成、核酸代谢等涉及到化感抑藻机理方面的研究还有待进一步深入,水芹抑制小球藻的化感物质的分离、提纯和鉴定工作还需要进一步开展。

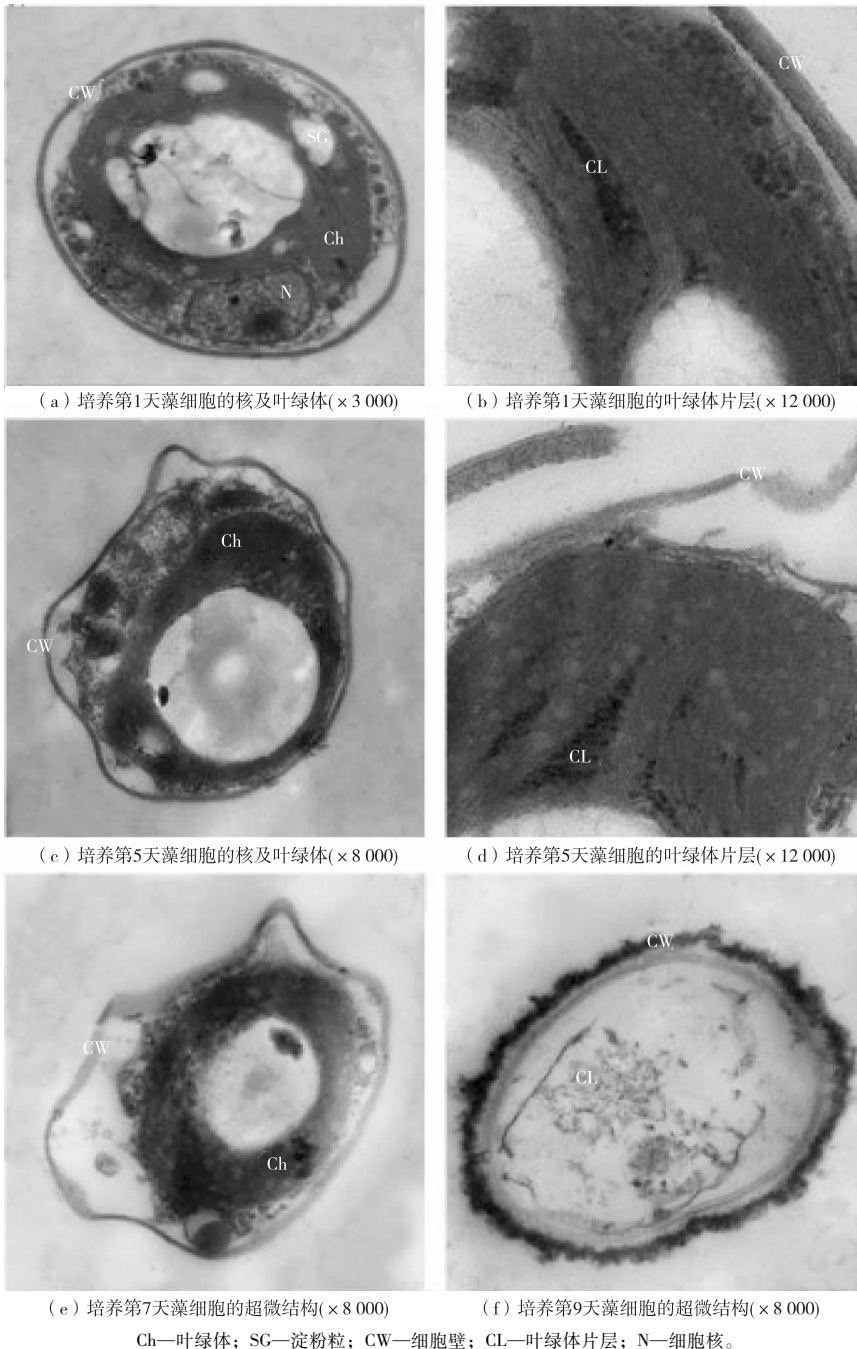


图3 40 g · L⁻¹水芹浸出液对小球藻超微结构的影响

Fig. 3 Effects of 40 g · L⁻¹ *Oenanthe javaica* extract on ultrastructure of chlorella

参考文献:

- [1] SUM X, CHOI J K, KIM E K. A Preliminary Study on the Mechanism of Harmful Algal Bloom Mitigation by Use of Sophorolipid Treatment[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2004, 304(1): 35-49.
- [2] 依成武, 李倩倩, 何聪, 等. 强电离放电对铜绿微囊藻的杀灭效果[J]. *生态与农村环境学报*, 2011, 27(1): 65-68.
- [3] 晁建颖, 颜润润, 张毅敏. 不同温度下铜绿微囊藻和斜生栅藻的最佳生长率及竞争作用[J]. *生态与农村环境学报*, 2011, 27(2): 53-57.
- [4] 王扬才, 陆开宏. 蓝藻水华的危害及治理动态[J]. *水产学杂志*, 2004, 17(1): 90-93.
- [5] 张彬, 郭劲松, 方芳, 等. 植物化感抑藻的作用机理[J]. *生态学杂志*, 2010, 29(9): 1846-1851.
- [6] 胡洪营, 门玉洁, 李锋民. 植物化感作用抑制藻类生长的研究进展[J]. *生态环境*, 2006, 15(1): 153-157.
- [7] 张艳丽, 芦鹏, 吴晓芙. 植物化感作用在抑藻方面的研究进展[J]. *环境科学与管理*, 2006, 31(7): 50-52.
- [8] EVERALL N C, L EES D R. The Use of Barleyst Raw to Control General and Blue-Green Algal Growth in a Derbyshire Reservoir[J]. *Water Research*, 1996, 30(2): 269-276.
- [9] 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[J]. *环境科学*, 2004, 25(5): 89-92.
- [10] HONG Yu, HU Hong-ying, LI Feng-min. Physiological and Biochemical Effects of Allelochemical Ethyl 2-Methyl Acetoacetate (EMA) on Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2008, 71(2): 527-534.
- [11] HONG Yu, HU Hong-ying, LI Feng-min. Growth and Physiological Responses of Freshwater Green Alga *Selenastrum capricornutum* to Allelochemical Ethyl 2-Methyl Acetoacetate (EMA) Under Different Initial Algal Densities[J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2008, 90(3): 203-212.
- [12] 门玉洁, 胡洪营, 李锋民. 芦苇化感组分对斜生栅藻 *Scenedesmus obliquus* 生长特性的影响[J]. *生态环境*, 2006, 15(5): 925-929.
- [13] 李锋民, 胡洪营. 生物化感作用在水处理中的应用[J]. *中国给水排水*, 2003, 19(7): 38-40.
- [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[J]. *中国给水排水*, 2004, 20(11): 18-21.
- [15] 张余霞, 张玲, 张阳阳, 等. 盐京九号水稻秸秆对铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 的抑制作用[J]. *生态与农村环境学报*, 2008, 24(3): 60-63, 80.
- [16] 李欲如, 操家顺. 冬季低温条件下浮床植物对富营养化水体的净化效果[J]. *环境污染与防治*, 2005, 27(7): 505-508.
- [17] 宰学明, 朱士农, 钦佩, 等. 水芹水浸提液对斜生栅藻的化感效应研究[J]. *植物研究*, 2011, 31(6): 735-738.
- [18] 王立新, 吴国荣, 王建安, 等. 黑藻 (*Hydrilla verticillata*) 对铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 抑制作用[J]. *湖泊科学*, 2004, 16(4): 337-342.
- [19] 唐萍, 吴国荣, 周长芳, 等. 凤眼莲根系分泌物对栅藻结构及代谢的影响[J]. *环境科学学报*, 2000, 20(3): 355-359.
- [20] 汪丽, 王国祥, 唐晓燕, 等. 荇菜对铜绿微囊藻生长的抑制效应及其机制[J]. *生态与农村环境学报*, 2010, 26(3): 257-263.
- [21] WU Z B, DENG P, WU X H, et al. Allelopathic Effects of the Submerged Macrophyte *Potamogeton malaianus* on *Scenedesmus obliquus*[J]. *Hydrobiologia*, 2007, 592(1): 465-474.
- [22] 张庭廷, 陈传平, 聂刘旺, 等. 几种高等水生植物的克藻效应研究[J]. *生物学杂志*, 2007, 24(4): 32-36.

作者简介: 袁亚光(1987—), 男, 江苏泰兴人, 硕士生, 主要从事湿地生态方面的研究。E-mail: yuanyaguang0@126.com