

盐京九号水稻种植水对铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 抑制作用的研究

张余霞^{1,2}, 张 玲¹, 张阳阳¹, 李 倩¹, 吴国荣¹

(1. 南京师范大学 生命科学学院, 江苏 南京 210097; 2. 盐城工学院 化工学院, 江苏 盐城 224003)

[摘要] 以培养盐京九号水稻幼苗 20 d 的种植水配置培养液, 培养铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*), 追踪测定微囊藻生长量、藻细胞水溶性蛋白含量、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性、叶绿素含量等相关生理生化指标的变化, 研究水稻种植水对铜绿微囊藻生长的抑制作用及其机制。实验结果显示, 藻细胞生长量和叶绿素含量显著降低; 可溶性蛋白含量和 SOD 酶活性呈先升高后急剧下降的趋势。对水稻种植水抑藻物质作初步分离和鉴定, 表明乙醚萃取液中有有机酸和酚类组分抑藻效果明显。对有机酸组分进一步做 GC/MS 分析鉴定, 可确定其中含有 1, 2-二甲基十三酸、棕榈酸和十八烷酸等组分。

[关键词] 水稻种植水, 铜绿微囊藻, 抑制作用, 抑藻物质

[中图分类号] Q 948.1 [文献标识码] A [文章编号] 1672-1292(2010)04-0099-06

Inhibition of the Culture Water From *Oryza Sativa* on the Growth of *Microcystis Aeruginosa*

Zhang Yuxia^{1, 2}, Zhang Ling¹, Zhang Yangyang¹, Li Qian¹, Wu Guorong¹

(1. School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China

2. Department of Chemistry and Bioengineering, Yancheng Institute of Technology, Yancheng 224003, China)

Abstract The rice culture water (RCW) from 20 day's seedlings of *Oryza sativa* L. Yanning 9 was used to study its inhibitory effect on the growth of *Microcystis aeruginosa* and its inhibitory mechanism. Results showed that the growth of *M. aeruginosa* was obviously inhibited by the RCW. The growth and chlorophyll contents of *M. aeruginosa* decreased and the soluble protein contents and SOD activity increased firstly and decreased as the treatment went on. Further results about the purification and identification of the substances with the algae-inhibiting effects showed that the inhibitory effects of organic acid and phenolic compounds from the ether extracts were prominent and tridecanoic acid-12-methyl hexadecanoic acid and octadecanoic acid were identified from its organic acid components by the GC/MS.

Key words rice culture water, *Microcystis aeruginosa*, inhibitory effect, algae-inhibiting substance

近年来, 国内外学者对水稻的化感现象及其在抑藻方面的作用作了广泛深入的研究。沈荔花等^[1]用不同的根系培养法对水稻化感潜力的测定比较, 得出水稻幼苗具有抗草特性; 万宏等证明降解水稻对铜绿微囊藻、鱼腥藻和颤藻有明显的抑制作用^[2]; 张余霞等曾以盐京九号 (Yanning 9) 水稻秸秆为实验材料, 用水浸法在实验室条件下研究其对铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 的生长及多项生理指标的影响, 实验结果表明, 其秸秆浸提液对铜绿微囊藻的生长具有明显的抑制作用^[3]。在水稻抑藻机理方面的研究目前还处于起步阶段。Choe 等^[4]研究了包括大麦秆、稻草等对单细胞绿藻和蓝藻的作用, 并初步证明酯类和酚类是主要的抑藻物质。本文在以往实验室对水稻抑藻作用研究的基础上, 以盐京九号水稻幼苗的种植水为材料, 研究其对铜绿微囊藻生长的影响, 并对抑藻物质进行初步分离和鉴定, 以期进一步明确水稻的化感作用, 揭示水稻的抑藻机理, 为高效安全抑藻剂的开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*): 由南京师范大学生命科学学院藻类工程研究室李建宏教授提供。

收稿日期: 2010-05-25
通讯联系人: 吴国荣, 教授, 研究方向: 植物生理生化, E-mail: wgwswj@126.com

盐京九号水稻 (*Oryza sativa* L. Yanjing 9) 种子: 购于江苏盐城农业种子公司。

水稻种植水 (RCW): 水稻种子用低浓度双氧水消毒, 经浸种、催芽、萌发, 在多层纱布衬托的培养皿中用蒸馏水 (室温、自然光照) 培养至三叶期, 移植于泡沫板衬托的培养缸内培养 20 d 后 (条件同上), 缸内的种植水经微孔滤膜 ($0.45\ \mu\text{m}$) 过滤, 4°C 保存待用。

1.2 培养方法

用 BG11 培养基对铜绿微囊藻种扩大培养, 待培养至足够数量后, 离心收集藻细胞做接种用。实验组以水稻种植水添加 BG11 的营养元素配制成培养液培养 (记做 RCW 组), 阳性对照组以添加 0.1% CuSO_4 的 BG11 培养液培养 (记做 CuSO_4 组), 阴性对照组以 BG11 培养 (记做 CK 组)。

培养起始时藻培养液的 OD_{650} 值为 0.10 左右, 光照培养箱温度为 28°C , 光照强度为 $125\ \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 光暗比为 12 h/12 h。培养当天对藻细胞密度和相关生理生化指标进行测定, 以后每隔 1 d 测定一次, 至第 9 d 测定结束^[5]。每组均设 10 个平行样 ($n=10$), 实验重复 3 次。

1.3 测定方法

藻细胞生长量的测定按照沃沙克等的方法^[6], 测定 650 nm 波长下的光密度 (OD) 值。叶绿素含量的测定采用比色法^[7]。可溶性蛋白含量的测定参照 Bradford 的考马斯亮蓝 G-250 法^[8]。超氧化物歧化酶 (SOD) 活性的测定采用 Stewart 和 Bewley 的方法^[9]。本实验测定的项目均以单位体积 (mL) 藻液为单位。

藻细胞酶液的制备: 参照唐萍、吴国荣等的方法^[10], 用超声波破碎藻细胞。

水稻种植水中抑藻物质的提取和初步分离: 分别用 3 倍体积的分析纯石油醚、乙醚、乙酸乙酯等有机溶剂对水稻种植水充分萃取, 用小滤纸片法^[11], 确定具有明显抑藻效应的萃取液。用韩庆华等^[12]的方法选出萃取液中具抑藻效应的有机物组群, 并以 GC/MS 鉴定其中的化合物成分。

2 结果与分析

2.1 微囊藻细胞生长量的变化

各组接入铜绿微囊藻后, 跟踪观察培养液颜色变化。培养第 1 d RCW 组和 CK 组的藻液都显示淡绿色; 至第 3 d RCW 组呈黄绿色, 培养瓶的瓶底出现藻细胞沉底现象; 到第 5 d 藻液颜色进一步变黄; 到第 7 d 藻液颜色开始澄清。CK 组藻液颜色由浅绿逐渐成深绿。

实验期间, 藻细胞生长量的情况如图 1 所示。CK 组的藻细胞数量呈持续升高的趋势, 至第 9 d OD_{650} 已经达到 0.42, 是初始值的 4 倍; RCW 组前期 OD_{650} 有小幅上升, 可能是藻细胞刚开始受到胁迫, 具有刺激其裂解的效应; 3 d 后便迅速下降, 到第 9 d 时 OD_{650} 值仅为初始值的 24.1%, 接近 CuSO_4 组。这与肉眼观察藻细胞培养液颜色的变化是一致的, 显示 RCW 对铜绿微囊藻细胞生长具有明显的抑制作用。

2.2 可溶性蛋白含量的变化

跟踪测定藻细胞的可溶性蛋白质含量的结果如图 2 所示。CK 组的蛋白质含量一直持续上升。RCW 组蛋白质在初期有一个小幅度升高, 与此时藻细胞密度有所升高的现象是吻合的。此后藻细胞中的可溶性蛋白质持续下降, 第 9 d 蛋白质含量仅是初始值的 65.0%; 此值较 CuSO_4 组含量高, 原因可能是藻细胞虽死

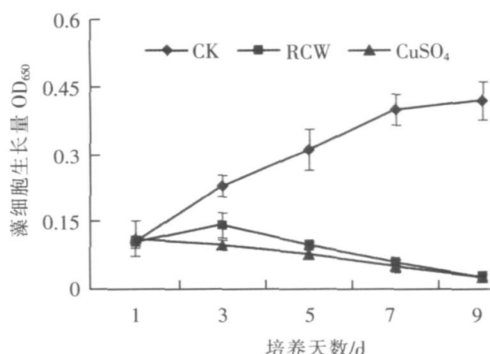


图 1 RCW 对藻细胞生长量的影响 ($n=10$)

Fig.1 Effect of RCW on the growth of *M.aeruginosa* ($n=10$)

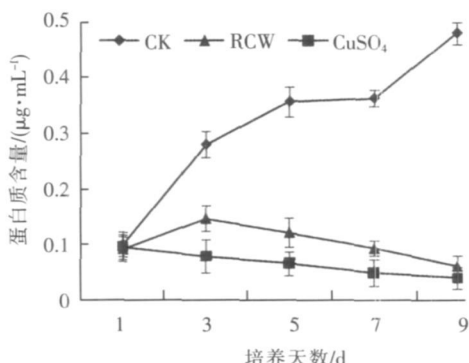


图 2 RCW 对藻细胞可溶性蛋白质的影响 ($n=10$)

Fig.2 Effect of RCW on the soluble protein content of *M.aeruginosa* ($n=10$)

亡,但渗出的可溶性蛋白仍留在培养液中,而 CuSO_4 则不仅杀死藻细胞,还能使渗出的可溶性蛋白变性凝结.

2.3 SOD活性的变化

SOD是机体内极为重要的保护酶,在机体受到胁迫和损伤的状态下,SOD酶活性会发生相应的变化.在实验过程中,追踪测定藻细胞 SOD酶活性的变化,结果如图 3所示.结果显示,RCW 组的藻细胞在前 3 d SOD 活性表现出上升趋势,这是一种对胁迫的应激反应.其后就急剧下降,第 5 d时就只有 CK 组的 68.7%,第 9 d时只有 CK 组的 10.3% ($P < 0.05$). SOD 酶活性急剧降低,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. CuSO_4 组的 SOD 酶活性一开始就持续下降.

2.4 藻细胞中叶绿素含量的变化

跟踪测定培养液中藻细胞叶绿素含量的结果见图 4图 4表明,CK 组藻细胞的叶绿素含量逐渐上升,和藻细胞在营养充分的条件下不断生长,细胞数目迅速增多有关;而 RCW 组的叶绿素含量从第 3 d开始就出现明显下降,第 9 d的含量仅为同期 CK 组的 7.12% ($P < 0.01$),验证了水稻幼苗种植水具有抑制藻细胞的生长,促进其死亡的效应. CuSO_4 组的总叶绿素含量持续减少,至第 9 d只有同期 CK 组的 10.7% .

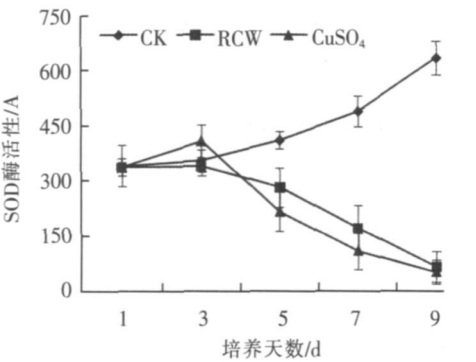


图 3 RCW 对藻细胞 SOD 酶活性的影响(n=10)
Fig.3 Effect of RCW on SOD activity of *M.aeruginosa* (n=10)

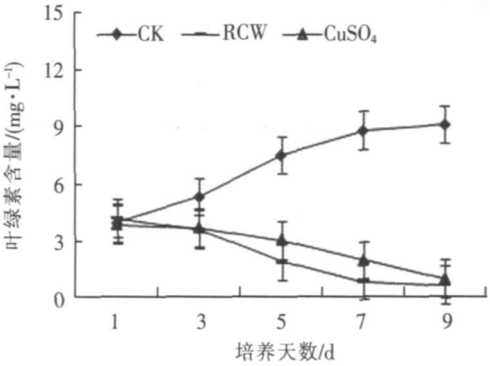


图 4 RCW 对藻液叶绿素含量的影响(n=10)
Fig.4 Effect of RCW on the chlorophyll content of *M.aeruginosa* (n=10)

2.5 水稻种植水抑藻物质的初步分离及平板培养实验

用石油醚、乙醚、乙酸乙酯 3 种有机溶剂依次萃取水稻种植水并浓缩其萃取液,用滤纸片法作抑藻实验,乙醚做空白对照.经过 30 d 培养,培养皿平板上出现了大小不同的抑藻圈(如图 5所示).其中,乙醚萃取物抑藻圈最明显,仅次于 CuSO_4 ,石油醚萃取物的抑藻圈次之,乙酸乙酯萃取物和水残留液基本没有抑制作用.为进一步明确乙醚萃取物中的抑藻物质,再用韩庆华等的方法从乙醚萃取物中分离并鉴定出下列 4 类物质:中性物质、酚类物质、有机酸和生物碱类.经滤纸片法检测抑藻效应的结果如图 6所示,其中有机酸和酚类的抑藻效果明显.

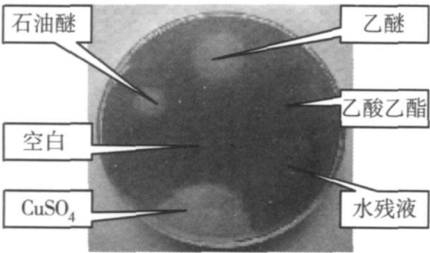


图 5 RCW 的有机溶剂萃取液的抑藻实验(n=10)
Fig.5 Inhibitory effects of different organic solvent extracts from RCW on *M.aeruginosa* (n=10)

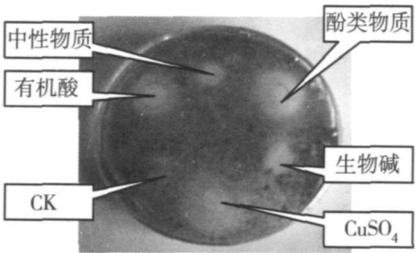


图 6 乙醚萃取物中不同组分的抑藻效果(n=10)
Fig.6 Inhibitory effect of different components in aether extracts on *M.aeruginosa* (n=10)

对有机酸组分进行 GC/MS 分析,用质谱鉴定并在图谱库中检索,根据标准质谱图能初步确定几种物质的名称,其中有 1,2-甲基十三酸、棕榈酸、十八烷酸等(如图 7~图 9所示).

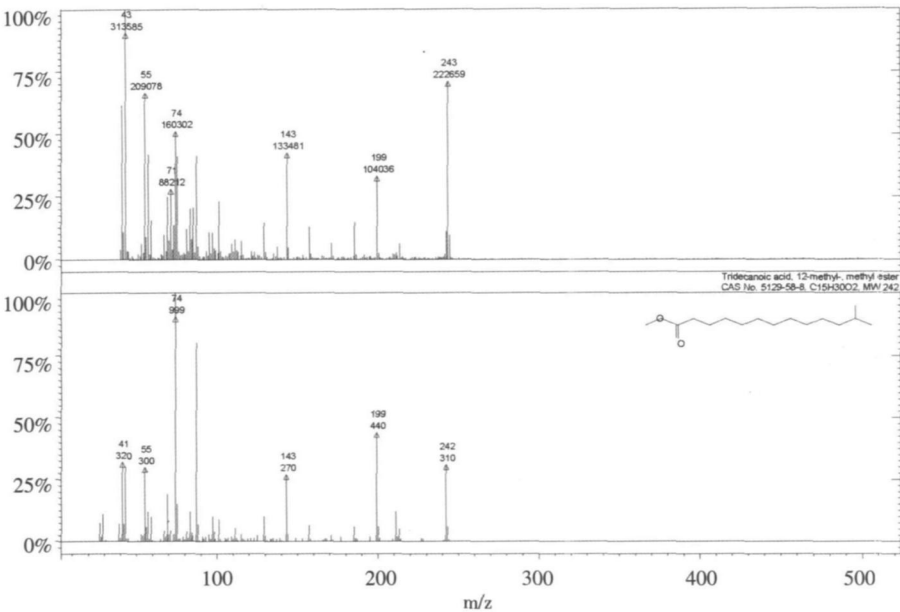


图 7 有机酸组分中某物质的质谱及检索到的 1,2-甲基十三酸质谱图

Fig.7 Mass spectra of one substance in the organic component and tridecanoic acid-1,2-methyl

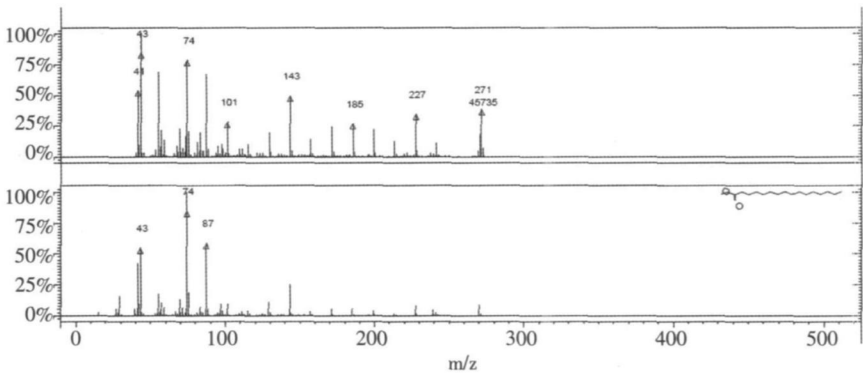


图 8 有机酸组分中某物质的质谱及检索到的棕榈酸质谱图

Fig.8 Mass spectra of one substance in the organic component and hexadecanoic acid

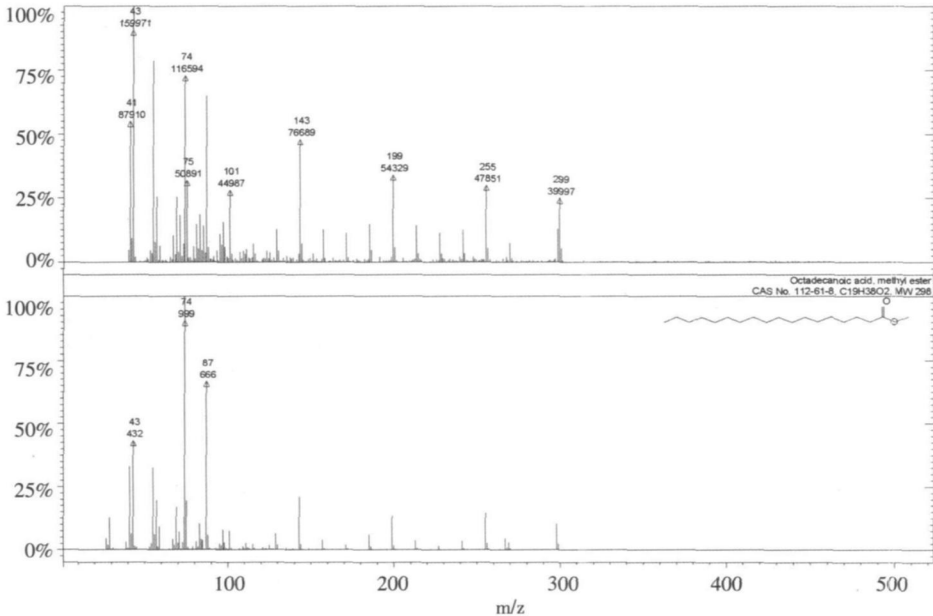


图 9 有机酸组分中某物质的质谱及检索到的十八烷酸质谱图

Fig.9 Mass spectra of one substance in the organic component and Octadecanoic acid

3 结语

Rice在《Allelopathy》中将“克生作用”定义为:植物或微生物在生长过程中的代谢分泌物对环境其他植物或微生物不利的作用^[13]。根据进化的过程来看,水稻是从水生向陆生进化的,它能够抑藻是一种长期进化过程中形成的生长竞争机制^[14]。在目前的生活环境下,水华爆发的现象越来越严重,保护水环境成为一个极其紧迫的任务。如果能确认水稻具抑藻作用或从其秸秆中提取出抑藻物质,一方面给水稻及其秸秆找到了一个再利用或资源充分利用的方法,以减少环境压力;另一方面又能够寻找到一种抑制铜绿微囊藻生长的生物学方法,对于防治富营养化水体中水华的爆发无疑具有特殊的意义。

本实验结果显示,水稻种植水能够有效抑制铜绿微囊藻的生长,促使其黄化和死亡。在实验过程中跟踪测定其生理生化指标所发生的变化,包括:藻细胞叶绿素含量显著降低;可溶性蛋白质含量、SOD酶活性呈先升高后迅速下降趋势等等。这些数据从生理生化的角度支持水稻种植水具有抑藻效应,与作者所做“水稻秸秆水浸液抑藻实验”的结果是一致的^[15],并在其中分离出了抑藻物质,且鉴定出其中的一些化学组分。

水稻秸秆水浸液和水稻种植水的乙醚萃取液均具有明显的抑藻效应,且多为有机酸类和酚类物质,提示它们的来源是一致的,是水稻生理代谢的产物,它可以积累在秸秆中,也可以在生长过程中向环境释放,由水稻根系分泌进入种植水。作者已初步确认,水稻在生长过程中释放入水体的一些有机酸组分是有效的抑藻物质,其他的组分和其间的比例也在研究和破解之中,为开发安全、高效、无公害的天然杀藻剂提供了有价值的研究资料。

[参考文献] (References)

- [1] 沈荔花,梁义元,何华勤,等.水稻化感生物测试方法的比较及应用[J].应用生态学报,2004,15(9):1575-1579.
Shen Lihua, Liang Yiyuan, He Huaqin et al. Evaluation efficiency of different bioassay methods on allelopathic potential of *Oryza sativa* [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2004, 15(9): 1575-1579 (in Chinese)
- [2] 万宏,张昀.降解稻草对蓝藻生长的抑制作用[J].北京大学学报:自然科学版,2000,36(4):485-488.
Wan Hong, Zhang Yun. Growth inhibition of cyanobacteria by decomposed rice straw [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis, 2000, 36(4): 485-488 (in Chinese)
- [3] 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.
Zhang Yuxia, Zhang Ling, Zhang Yangyang et al. Inhibitory effect of rice straw (Yanjing 9) on *Microcystis aeruginosa* [J]. Journal of Ecology and Rural Environment, 2008, 24(3): 60-63 (in Chinese)
- [4] Choe S, Jung I. Growth inhibition of freshwater algae by ester compounds released from rotted plants [J]. Journal of Industrial Engineering Chemistry, 2002, 8(4): 297-304.
- [5] 王立新,张玲,张余霞,等.黑藻(*Hydrilla verticillata*)养殖水对铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)的抑制效应及其机制[J].植物生理与分子生物学报,2006,32(6):672-678.
Wang Lixin, Zhang Ling, Zhang Yuxia et al. The inhibitory effect of *Hydrilla verticillata* culture water on *Microcystis aeruginosa* and its mechanism [J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2006, 32(6): 672-678 (in Chinese)
- [6] Vonshak A. Handbook of Microalgal Mass Culture [M]. Boca Raton: Academic and CRC Press, 1986.
- [7] Arnon D L. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenol oxidase in *Beta vulgaris* [J]. Plant Physiol, 1949, 24: 1-15.
- [8] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein synthesis in tortula [J]. Plant Physiol, 1991, 95: 684.
- [9] Stewart R C, Bewley J D. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes [J]. Plant Physiol, 1980, 65(3): 245-248.
- [10] 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[J].环境科学学报,2000,20(3):355-359.
Tang Ping, Wu Guorong, Lu Changmei et al. Effects of the excretion from root system of *Eichhornia crassipes* on the cell structure and metabolism of *Scenedesmus arcuatus* [J]. ACTA Scientiae Circumstantiae, 2000, 20(3): 355-359 (in Chinese)
- [11] 孙文浩,俞子文,郭克勤,等.凤眼莲克藻化合物的生物检测[J].植物生理学通讯,2000,27(6):433-435.
Sun Wenhao, Yu Ziwen, Guo Keqin et al. Bioassay of allelopathic compounds of *Eichhornia crassipes* on algae [J]. Plant

- Physiology Communications 2000, 27(6): 433-435. (in Chinese)
- [12] 韩庆华, 马永清. 小麦秸秆中生化他感化合物的研究概况 [J]. 生态农业研究, 1994, 8(2): 71-76
Han Qinghua, Ma Yongqing. A brief introduction to the researches on allelochemicals in wheat straw [J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 1994, 8(2): 71-76. (in Chinese)
- [13] Rice E L. Allelopathy[M]. 2nd ed. New York: Academic Press, 1984.
- [14] 庄源益, 赵凡, 戴树桂, 等. 高等水生植物对藻类生长的克制效应 [J]. 环境科学进展, 1995, 3(6): 44-49.
Zhuang Yuanyu, Zhao Fan, Dai Shugui, et al. Algal growth inhibition by phytotoxins [J]. Advances in Environmental Science, 1995, 3(6): 44-49. (in Chinese)
- [15] 张余霞, 张玲, 高兴, 等. 水稻 (*Oryza sativa*) 秸秆浸提液对铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 的抑制效应 [J]. 湖泊科学, 2007, 19(4): 479-484.
Zhang Yuxia, Zhang Ling, Gao Xing, et al. The inhibition of aqueous extract from *Oryza sativa* straw on growth of *Microcystis aeruginosa* [J]. Journal of Lake Sciences, 2007, 19(4): 479-484. (in Chinese)

[责任编辑: 严海琳]

(上接第 92 页)

[参考文献] (References)

- [3] 曾克峰, 刘超, 张志. 论新时期的高校地理野外教学实习改革——以庐山综合地理实习为例 [C] // 湖北省地理学会 2005 年学术年会文集. 武汉: 湖北省地理学会, 2005: 97-100.
Zeng Kefeng, Liu Chao, Zhang Zhi. Exploring the innovation of college geographical field teaching internship in new period—a example on comprehensive geography practice in Lushan [C] // Hubei Geographical Society Annual Conference Proceedings in year 2005. Wuhan: Hubei Geographical Society, 2005: 97-100. (in Chinese)
- [4] 乐德广, 詹荔棚, 吴孙桃, 等. RF8000GPS 接收器的原理及应用 [J]. 电子技术, 2003(11): 33-37.
Le Deguang, Zhan Lixu, Wu Suntao, et al. Principle and application of RF8000GPS receivers [J]. Electronic Technology, 2003(11): 33-37. (in Chinese)
- [5] 吕鑫, 王忠. GPRS 传输模块的设计与实现 [J]. 无线通信, 2008(9): 18-21.
Lixin, Wang Zhong. Design & realization of GPRS data transmission module [J]. Wireless Communication, 2008(9): 18-21. (in Chinese)
- [6] 任升莲, 蔡昊, 杨伟沃, 等. 基于 GIS 的网络电子地图系统开发与研究 [J]. 安徽地质, 2009(12): 272-274.
Ren Shenglian, Cai Hao, Yang Weiwu, et al. GIS-based internet electronic map system development and study [J]. Geology of Anhui, 2009(12): 272-274. (in Chinese)
- [7] 王祖, 汪文婷. GPRS 传输静态图像系统的设计与实现 [J]. 电子技术应用, 2006(4): 37-39.
Wang Zu, Wang Wenting. Design and implementation of GPRS systems for transmitting static images [J]. Electronic Technology Application, 2006(4): 37-39. (in Chinese)
- [8] 霍佳, 王英杰, 王映辉, 等. 基于 Web 的统计电子地图发布系统设计 [J]. 计算机工程, 2009(2): 258-260.
Huo Jia, Wang Yingjie, Wang Yinghui, et al. Design of Web-based statistical electronic map distributing system [J]. Computer Engineering, 2009(2): 258-260. (in Chinese)

[责任编辑: 严海琳]