

菹草对普通小球藻和铜绿微囊藻的化感作用

张欣^{1,2,3}, 卢学强^{1,2,3}, 李玉鑫^{1,2,3}, 周佳莹^{1,2,3}, 李海笑^{1,2,3}, 谢静怡^{1,2,3}

(1.南开大学环境科学与工程学院,天津300350;2.天津市跨介质复合污染环境治理技术重点实验室,天津300350;3.天津市环境生物地球化学循环调控技术国际联合研究中心,天津300350)

摘要: 选取沉水植物菹草与浮游藻类普通小球藻、铜绿微囊藻为研究对象,在菹草共培养胁迫下测定2种藻单独存在和按1:1混合情况下的光密度、叶绿素a(Chl-a)、最大光化学量子产量、相对电子传递速率、可溶性糖、丙二醛以及超氧化物歧化酶活性的变化。结果表明,在菹草存在的条件下,普通小球藻、铜绿微囊藻和二者混合藻的生长被快速、强烈地抑制,抑制率最大值分别为74.38%、80.98%和89.63%。3个处理组的光密度值、叶绿素a、可溶性糖和超氧化物歧化酶均低于对照组,且随时间呈明显的下降趋势,说明其光合能力逐渐减弱;而丙二醛含量在0~6 d却高于对照组,表明可能发生了浮游藻类膜脂过氧化过程。

关键词: 菹草; 普通小球藻; 铜绿微囊藻; 化感作用

中图分类号: TU992 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4602(2020)07-0068-06

Allelopathic Effect of *Potamogeton crispus* on *Chlorella vulgaris* and *Microcystis aeruginosa*

ZHANG Xin^{1,2,3}, LU Xue-qiang^{1,2,3}, LI Yu-xin^{1,2,3}, ZHOU Jia-ying^{1,2,3},
LI Hai-xiao^{1,2,3}, XIE Jing-yi^{1,2,3}

(1. College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300350, China;
2. Tianjin Key Laboratory of Environmental Technology for Complex Trans-Media Pollution, Tianjin 300350, China; 3. Tianjin International Joint Research Center for Environmental Biogeochemical Technology, Tianjin 300350, China)

Abstract: One submerged macrophyte and two algae (*Chlorella vulgaris* and *Microcystis aeruginosa*) were selected to test the allelopathic effect of submerged macrophyte on algae. The changes of optical density, Chl-a, maximum photochemical quantum yield, relative electron transport rate, soluble sugar, malondialdehyde, and superoxide dismutase activity of the two individual algae and their mixture with mixing ratio of 1:1 were measured at co-culture stress of *Potamogeton crispus*. The growth of *Chlorella vulgaris*, *Microcystis aeruginosa* and mixed algae was rapidly and greatly inhibited with the presence of *Potamogeton crispus*, the maximum inhibition rates were 74.38%, 80.98% and 89.63%, respectively. The values of optical density, Chl-a, soluble sugar and superoxide dismutase of three treatment groups were lower than those in the corresponding control groups, and the profile showed a

基金项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项(2018ZX07110-007); 天津市科技计划项目(18PTZWHZ00110、18ZXSZSF00250)

通信作者: 卢学强 E-mail: Luxq@nankai.edu.cn

significantly downward trend with time. The results indicated that the photosynthetic capacity gradually weakened. However, malondialdehyde contents were higher than those in the corresponding control groups during the first six days, indicating the possible occurrence of membrane peroxidation of the algae.

Key words: *Potamogeton crispus*; *Chlorella vulgaris*; *Microcystis aeruginosa*; allelopathic effect

水华暴发严重影响水质安全,会引发严重的饮用水供给危机。夏季水华浮游植物优势种主要为蓝藻和绿藻。铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)是形成水华的一种典型有毒蓝藻,会释放蓝藻毒素和异味物质,不仅会对水生生物包括鱼类、水生无脊椎动物、沉水植物、挺水植物、细菌等造成一定的伤害,还会严重威胁人类健康^[1]。普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)是具有代表性的引起水华的一种绿藻,是北方滨海河流的优势藻种。前期研究表明,一些沉水植物会对浮游藻类产生特异性的化感抑制作用。不同种类的浮游藻类之间也会存在竞争,铜绿微囊藻对小球藻、四尾栅藻等藻类都存在化感抑制作用^[2]。菹草(*Potamogeton crispus*)可明显降低河流中TP含量^[3],同时菹草对铜绿微囊藻还有明显的化感抑制作用^[4],因而菹草往往是环境水生态修复或水生态系统重建的重要物种。水华中一般同时存在蓝藻和绿藻。然而,菹草对小球藻以及蓝藻、绿藻同时存在下的化感抑制作用和可能的机理研究还相对较少。由于影响植物生长的因素较多,本试验在人工气候箱内进行,分别研究了菹草共培养对铜绿微囊藻、普通小球藻和两个藻种共存时的化感作用以及可能的机理。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用普通小球藻(FACHB-8)、铜绿微囊藻(FACHB-524)购自中国科学院水生生物研究所淡水藻种库,试验所用菹草购自江苏省盐城市。试验开始前,菹草用无菌蒸馏水清洗3次,去除附着的沉积物和无脊椎动物,然后用装有BG11培养基的10 L半透明塑料箱悬浮培养7 d,每天换1次水。普通小球藻与铜绿微囊藻置于人工气候箱中,光周期为12 h(L,明):12 h(D,暗),温度为(25±2)℃,相对湿度为70%,光照强度为(6 000±200) lx,采用BG11培养基扩大培养,培养基的盐度为0.2%。每天摇动2次,等待其长到对数生长期且藻类浓度约为 5.5×10^5 cells/mL时进行试验。

1.2 试验方法

试验设为3组,A组:菹草+普通小球藻;B组:菹草+铜绿微囊藻;C组:菹草+普通小球藻和铜绿微囊藻(简称混合藻)。每组试验又分别设置对照组(CK)和处理组(TR),菹草(整株)与浮游藻类共同放于1 L的锥形瓶中。各试验组的组成:A-CK为600 mL含普通小球藻培养基;A-TR为12 g菹草+600 mL含普通小球藻的培养基;B-CK为600 mL含铜绿微囊藻的培养基;B-TR为12 g菹草+600 mL含铜绿微囊藻的培养基;C-CK为300 mL含普通小球藻的培养基+300 mL含铜绿微囊藻的培养基;C-TR为12 g菹草+300 mL含普通小球藻培养基+300 mL含铜绿微囊藻的培养基。连续培养14 d,分别在第0、2、4、6、8、10、12和14天时定时取样30 mL,测定藻液的各项指标。每次取样后向培养瓶中补加30 mL的BG11培养基。

1.3 检测项目及方法

光密度值(OD_{560})代表浮游藻类的生物量,采用分光光度法测定,藻类抑制率的计算方法见式(1)。

$$IR = (1 - N_t/M_t) \times 100\% \quad (1)$$

式中:IR为抑制率; N_t 为处理组第t天藻细胞 OD_{560} 值; M_t 为对照组第t天藻细胞 OD_{560} 值。

根据逻辑斯谛方程 $dN/dt = rN(1 - N/K)$,设定菹草对藻类的效应作用为 E_t ,则藻类在菹草共培养作用下的增长模型见式(2)^[5]。

$$dN/dt = rN(1 - N/K) + E_t N \quad (2)$$

式中: r 为增长率; N 为种群大小(光密度); K 为环境容纳量或负荷量; E_t 为菹草对藻类的化感作用系数, E_t 以试验期间所有 e_t 的平均数表示, e_t 表示每天处理组的比增长率 μ 与对照组的比增长率 μ 的差值, $\mu = (N_t - N_{t-1})/N_{t-1}$ 。

最大光化学量子产量(F_v/F_m)代表浮游藻类光系统II(PS II)对激发光能的转换和耗散效率。每个样品取3.5 mL放入样品池中暗反应15 min后,用水样荧光仪测定 F_v/F_m 值和相对电子传递速率(ETR)。ETR值取光响应曲线中的最大值, F_v/F_m

按式(3)计算。

$$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m \quad (3)$$

式中: F_v 为暗适应后的最大荧光产量与最小荧光产量的差值; F_m 为暗适应后的最大荧光产量; F_0 为暗适应后的最小荧光产量。

可溶性糖(SC),如葡萄糖、蔗糖等,不仅为浮游藻类的生长发育提供能量和代谢中间产物,而且具有信号功能,是浮游藻类生长发育和基因表达的重要调节因子,采用蒽酮试剂分光光度法测定。

丙二醛(MDA)是膜脂氧化的最终产物,可与蛋白质、核酸反应,使纤维素分子间的桥键松弛,或抑制蛋白质的合成,因此可作为细胞及细胞内膜氧化损伤程度的一种重要生物标志物^[6],采用硫代巴比妥酸分光光度法测定。

叶绿素 a(Chl-a)含量采用乙醇法测定。

超氧化物歧化酶(SOD)是一种重要的抗氧化酶,能清除藻类细胞内的超氧自由基,使其转化为 H_2O_2 ,从而减少超氧自由基对藻类产生的毒害作用,采用黄嘌呤氧化酶法测定^[7]。

2 结果与分析

2.1 菹草对浮游藻类生长的抑制效果

图1为菹草共培养对浮游藻类生长的影响。

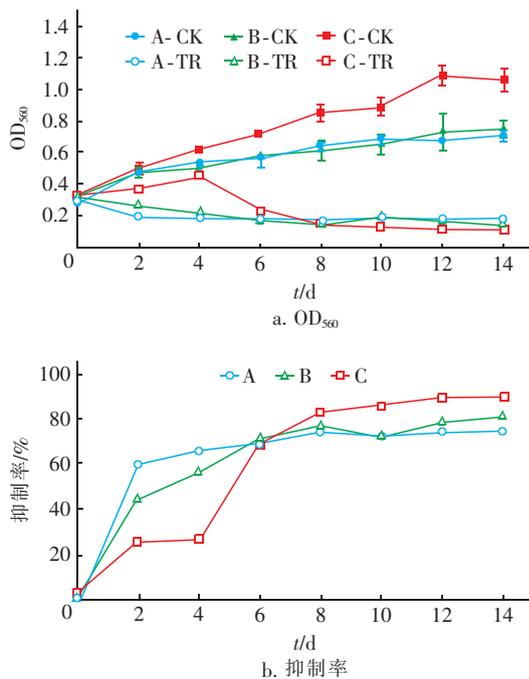


图1 菹草共培养对浮游藻类生长的影响

Fig.1 Effect of co-culture with *Potamogeton crispus* on microalgae growth

由图1可知,A组和B组的生长状况类似,对照组在培养期内呈平稳增长趋势;试验开始后处理组的 OD_{560} 值降低,出现明显抑制,第8天后抑制率逐渐稳定。A组最大抑制率为74.38%,化感系数为-0.221。B组最大抑制率为80.98%,化感系数为-0.235。从抑制率和化感系数可以看出,菹草共培养时迅速抑制了两种浮游藻类的生长,抑制作用显著($P < 0.01$)。菹草共培养对铜绿微囊藻的抑制作用要强于对普通小球藻的抑制作用,这可能是由于浮游藻类的结构不同所造成的,铜绿微囊藻属于单细胞原核生物,没有细胞核存在,而普通小球藻拥有完整的细胞核和叶绿体。这些细胞器和细胞核为普通小球藻增加防御能力,所以铜绿微囊藻抵御化感物质的能力较普通小球藻弱。

C组中对照组的 OD_{560} 值增长迅速,与A、B组不同的是,在0~4 d内处理组 OD_{560} 值并没有降低,而是出现了一定程度的增长,且增长程度较对照组弱。第4天后,处理组 OD_{560} 值陡然下降,最大抑制率达到了89.63%。混合藻在0~4 d内削弱了菹草对纯藻的化感作用。Chang等人^[8]的研究也证明绿藻的存在可以减弱狐尾藻对铜绿微囊藻的化感抑制作用。

巨颖琳等人^[9]的研究表明,当菹草浓度为5 g/L时,共培养对铜绿微囊藻的抑制效果较差,而当菹草浓度为10 g/L时,对含量为 10^5 cells/mL和 10^6 cells/mL的铜绿微囊藻的5 d抑制率分别为75.57%和82.18%。在本试验中,菹草浓度为20 g/L时对铜绿微囊藻的最大抑制率达到80.98%,说明当菹草种植密度达到一定阈值时,增加种植密度对化感抑制作用的提高没有过多帮助。这在实际应用中对菹草种植密度的控制具有重要意义。

2.2 菹草对浮游藻类光合系统的影响

图2为菹草共培养条件下浮游藻类Chl-a含量的变化。可知,在菹草共培养期间,A组中对照组的Chl-a含量在0~6 d内迅速增加,第6天后降低,推测是由于普通小球藻在培养前期合成叶绿素的速度过快导致培养基中营养成分流失过快,从而造成藻体中叶绿素堆积,后期叶绿素合成速度减缓;处理组的Chl-a含量在第2天后迅速降低,抑制作用显著($P < 0.01$)。B组中对照组Chl-a含量稳定增长,其处理组的Chl-a含量在第4天后呈现下降趋势,抑制作用显著($P < 0.01$)。C组中对照组和处理组的

Chl-a 含量在 0~4 d 内的变化没有显著差异,均呈现缓慢增加状态。第 4 天后,其对照组的 Chl-a 含量大幅度增加,而处理组则迅速降低,抑制作用显著 ($P < 0.01$)。对照混合藻的 OD_{560} 值可知,在 0~4 d 内菹草的化感抑制作用较纯藻组要弱,当化感物质累积到一定程度时,才会抑制藻内 Chl-a 的合成,同时造成藻类死亡。

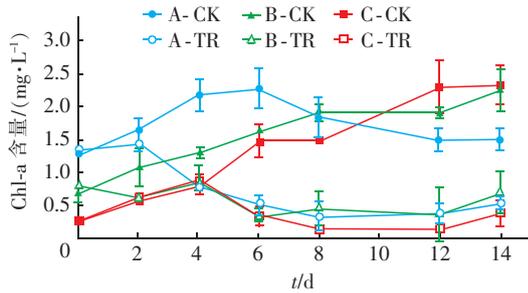


图2 菹草共培养条件下浮游藻类 Chl-a 含量的变化
Fig.2 Change of Chl-a of microalgae under co-culture with *Potamogeton crispus*

Chl-a 含量的变化与光密度值大体一致,说明菹草分泌的化感物质抑制了叶绿素的合成或促进了其分解。在 2 d 内,菹草共培养对普通小球藻 Chl-a 的抑制率为 12.42%,对铜绿微囊藻的 Chl-a 抑制率为 42.44%。从微藻的结构上分析,普通小球藻存在叶绿体,叶绿体膜对抵御化感物质的入侵起到了作用,减缓了 Chl-a 减少的时间。但是从长期来看, OD_{560} 值与 Chl-a 含量都表明菹草对普通小球藻、铜绿微囊藻和混合藻抑制作用强烈。

F_v/F_m 值越高,微藻对光能的吸收利用率越高。3 组试验中对照组和处理组的 F_v/F_m 值在整个培养期内并没有出现明显的上升或下降,对照组和处理组差异不显著。说明在菹草的化感作用下,两种浮游藻类光合系统对光的转化功能并没有遭到严重的损伤。

ETR 值反映了光合电子的传递速度,电子传递时刻发生在光系统 I 与光系统 II 的物质与能量转换之间,影响着碳水化合物和三磷酸腺苷 (ATP) 的合成速率。图 3 为菹草共培养条件下浮游藻类 ETR 值的变化。整体来看,处理组的 ETR 值均高于对照组,在 0~8 d 内,对照组和处理组的 ETR 值基本随着时间的延长而增加,且对照组增长速度相对缓慢。说明随着叶绿素的合成受阻,藻体吸收光能后通过提高 ETR 值来保证光能转化效率不受影响,推测此

为一种藻类抵抗化感物质胁迫的手段。A、B 处理组的 ETR 值在第 8 天达到峰值,分别为 49.23 和 44.66 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。第 8 天后,A、B 处理组的 ETR 值迅速降低,推测是化感物质产生了足够的超氧自由基,对藻体光合系统的伤害达到峰值,阻碍了电子的传递,进一步影响了光合系统的功能。

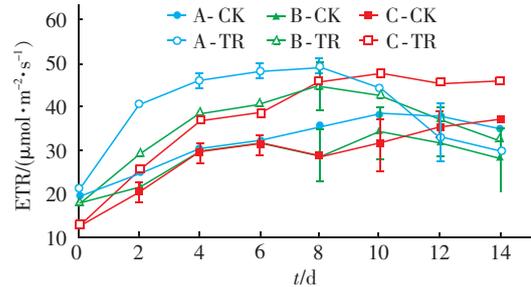


图3 菹草共培养条件下浮游藻类 ETR 的变化
Fig.3 Change of ETR of microalgae under co-culture with *Potamogeton crispus*

2.3 菹草对浮游藻类 SC 含量的影响

SC 不足一方面影响藻类的新陈代谢功能,另一方面为藻类的基因表达设置障碍,使藻类的生长繁殖受到抑制。王丽媛等人^[10]认为,在较低浓度的化感物质作用下,藻类会提高自身的可溶性糖储备量来抵抗面临的逆境,但是在足够高浓度下,藻类的结构受到严重破坏,可溶性糖含量相应降低。

图 4 为菹草共培养条件下浮游藻类 SC 含量的变化。

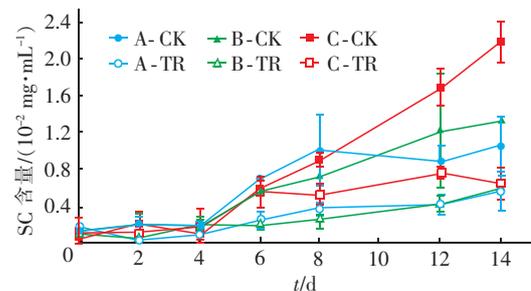


图4 菹草共培养条件下浮游藻类 SC 含量的变化
Fig.4 Change of SC of microalgae under co-culture with *Potamogeton crispus*

从图 4 可知,3 组试验中处理组 SC 含量整体低于对照组。处理组和对照组在 0~4 d 内 SC 含量均无明显变化,第 4 天后,对照组 SC 含量快速增加,而处理组的增长量较少。说明在菹草的化感作用下,叶绿素减少,藻体内 SC 的合成受到抑制,使藻体的能量供给出现危机,进而影响藻类的生长和繁殖。

2.4 菹草对浮游藻类MDA的影响

图5为菹草共培养条件下浮游藻类MDA含量的变化。可知,A组中对照组在0~6d内MDA含量无明显变化,第6天后含量逐渐降低,说明随着对新环境的逐步适应,细胞膜破裂的比例越来越少,藻液环境稳定。其处理组的MDA含量在整个培养期内均高于对照组。第8天后,处理组藻的数量很少,而MDA含量仍缓慢增加,说明普通小球藻内部的细胞器膜和细胞膜受到了氧化损伤,且这种伤害反应迅速,维持时间长。

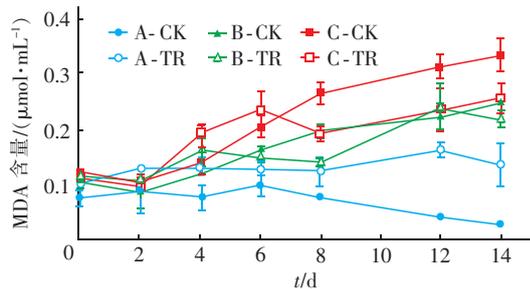


图5 菹草共培养条件下浮游藻类MDA含量的变化
Fig.5 Change of MDA of microalgae under co-culture with *Potamogeton crispus*

B组中,对照组的MDA含量在0~2d内略微下降,第2天后随着藻数量的增加而增大,说明铜绿微囊藻在生长代谢过程中,产生了一定量的MDA。其处理组在0~4d内MDA含量略高于对照组,推测菹草产生的化感物质伤害了铜绿微囊藻的细胞膜,但在第2天后处理组与对照组的MDA含量不相上下,无显著差异,推测菹草对铜绿微囊藻的伤害机理并不是损害铜绿微囊藻的细胞膜。

C组中,对照组的MDA含量持续上升,较其他两种藻单独培养时高,在环境压力和两种浮游藻类的互相竞争生长下,互相施加化感抑制作用,细胞膜氧化破裂。其处理组的MDA含量在0~6d内上升,基本高于对照组,说明菹草在两种藻混合的情况下所施加的化感作用使得混合藻的细胞膜受到更严重的破坏。

2.5 菹草对浮游藻类SOD的影响

SOD作为抗氧化系统中一种重要的酶,其活性变化可以在一定程度上反映外界压力对藻类的胁迫程度。图6为菹草共培养条件下浮游藻类SOD含量的变化。可知,培养开始后3组试验中处理组的SOD活性整体下降,基本低于对照组。推测是菹草

产生的化感物质使浮游藻类的抗氧化系统受到攻击,直接阻碍了SOD的合成或对其结构进行了破坏。进而影响了藻的抗氧化系统的运作,使得藻类无法及时分解逆境条件下所产生的过多的超氧自由基。最后导致超氧自由基在藻体内部大量积累,对细胞器和细胞膜等物质结构造成过氧化伤害。

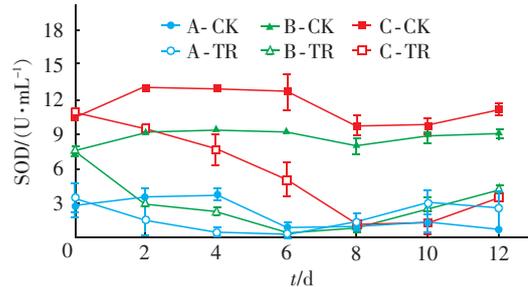


图6 菹草共培养条件下浮游藻类SOD含量的变化
Fig.6 Change of SOD of microalgae under co-culture with *Potamogeton crispus*

邓平^[11]的研究表明,菹草与汉氏菱形藻共培养时,低浓度组强烈刺激了汉氏菱形藻的抗氧化酶系统,提高了SOD的活性,而在高浓度组,SOD活性明显降低,推测是化感作用发挥抑制抗氧化系统的能力需要达到浓度阈值。有学者提出,对有关化感物质酶活性的影响观察期一般在7d以内。本试验中,在菹草浓度为20g/L的共培养条件下,0~8d内明显抑制了铜绿微囊藻和普通小球藻的SOD活性,说明化感物质极大地损害了抗氧化酶系统的功能。Meng等人^[12]在臭椿提取物对铜绿微囊藻的化感试验中得出,5d培养期内,处理组的MDA含量明显升高,而SOD活性则被抑制,这与本试验的研究结果类似。

3 结论

① 菹草共培养对普通小球藻和铜绿微囊藻都有较好的去除效果,14d的最大抑制率分别为74.38%和80.98%,化感系数分别达到-0.221和-0.235。菹草对铜绿微囊藻的抑制作用强于对普通小球藻的抑制作用。

② 菹草对普通小球藻的抑制主要通过干扰其抗氧化系统,产生过多的超氧自由基破坏其细胞膜结构的完整性。菹草对铜绿微囊藻的抑制主要通过抑制其叶绿素的合成,进而影响光合系统功能,减少可溶性糖的合成,影响其生理代谢过程。

③ 普通小球藻和铜绿微囊藻的混合藻在经过

一段竞争生长期后,生长速度大大加快。菹草对混合藻的抑制效果在短期内被减缓,但14 d的抑制率达到89.63%,抑制作用强烈。

参考文献:

- [1] Cirés S, Ballot A. A review of the phylogeny, ecology and toxin production of bloom-forming *Aphanizomenon* spp. and related species within the Nostocales (cyanobacteria) [J]. *Harmful Algae*, 2016, 54: 21–43.
- [2] Wang L C, Zi J M, Xu R B, et al. Allelopathic effects of *Microcystis aeruginosa* on green algae and a diatom: Evidence from exudates addition and co-culturing [J]. *Harmful Algae*, 2017, 61: 56–62.
- [3] 王冠柏, 王怡, 张颖, 等. 菹草生长对西安护城河底泥营养及重金属的影响 [J]. *中国给水排水*, 2018, 34(9): 116–120.
Wang Guanbai, Wang Yi, Zhang Ying, et al. Effect of *Potamogeton crispus* growth on nutrient and heavy metal contents of sediment in Xi'an Moat [J]. *China Water & Wastewater*, 2018, 34(9): 116–120 (in Chinese).
- [4] 张敏, 尹传宝, 张翠英, 等. 沉水植物菹草的生态功能及其应用现状 [J]. *中国水土保持*, 2015(3): 50–53.
Zhang Min, Yin Chuanbao, Zhang Cuiying, et al. Ecological function of submerged plant *Potamogeton crispus* and its application status [J]. *Soil and Water Conservation in China*, 2015(3): 50–53 (in Chinese).
- [5] 陈德辉, 刘永定, 宋立荣. 菹齿眼子菜对栅藻和微囊藻的他感作用及其参数 [J]. *水生生物学报*, 2004, 28(2): 163–168.
Chen Dehui, Liu Yongding, Song Lirong. The allelopathy of macrophyte *Potamogeton pectinatus* L on Chlorophyta (*Scenedesmus obliquus*) and Cyanobacteria (*Microcystis aeruginosa*) and calculation of allelopathic parameter [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, 28(2): 163–168 (in Chinese).
- [6] Shao J H, Xu Y, Wang Z J, et al. Elucidating the toxicity targets of β -ionone on photosynthetic system of *Microcystis aeruginosa* NIES-843 (Cyanobacteria) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2011, 104(1/2): 48–55.
- [7] Qian H F, Xu J H, Lu T, et al. Responses of unicellular alga *Chlorella pyrenoidosa* to allelochemical linoleic acid [J]. *Sci Total Environ*, 2018, 625: 1415–1422.
- [8] Chang X X, Eigemann F, Hilt S. Do macrophytes support harmful cyanobacteria? Interactions with a green alga reverse the inhibiting effects of macrophyte allelochemicals on *Microcystis aeruginosa* [J]. *Harmful Algae*, 2012, 19: 76–84.
- [9] 巨颖琳, 李小明. 南四湖3种沉水植物对铜绿微囊藻化感作用研究 [J]. *山东大学学报: 理学版*, 2011, 46(3): 1–8.
Ju Yinglin, Li Xiaoming. Allelopathic effects of three submerged macrophytes in the Nansi Lake on *Microcystis aeruginosa* [J]. *Journal of Shandong University: Natural Science*, 2011, 46(3): 1–8 (in Chinese).
- [10] 王丽媛, 张莉, 汪东风. 磁性壳聚糖-稀土-粘土复合树脂对赤潮异湾藻的抑制作用 [J]. *海洋环境科学*, 2012, 31(6): 808–812.
Wang Liyuan, Zhang Li, Wang Dongfeng. Inhibitory effect of magnetic chitosan-rare earth-clay composite resin on *Heterosigma akashiwo* [J]. *Marine Environmental Science*, 2012, 31(6): 808–812 (in Chinese).
- [11] 邓平. 三种沉水植物对浮游植物的化感效应研究 [D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 2007.
Deng Ping. Studies on Allelopathic Effects of Three Submerged Macrophytes on Phytoplankton [D]. Wuhan: Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, 2007 (in Chinese).
- [12] Meng P P, Pei H Y, Hu W R, et al. Allelopathic effects of *Ailanthus altissima* extracts on *Microcystis aeruginosa* growth, physiological changes and microcystins release [J]. *Chemosphere*, 2015, 141: 219–226.



作者简介: 张欣 (1995–), 女, 山西长治人, 硕士研究生, 主要研究方向为水生态修复原理与技术。

E-mail: 2120170614@mail.nankai.edu.cn

收稿日期: 2019-09-07