

附植藻类-黑藻体系克藻效应初探

谭海剑¹, 潘伟斌¹, 区晓劲², 曹诗林¹, 曾燕婷¹

(1. 华南理工大学环境科学与工程学院, 广东 广州 510006; 2. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州 510006)

摘要:向鲜重约10 g的扦插黑藻顶枝端表面分别接种1.00、2.00和4.00 g鲜重附植藻类,组成3个附植藻类-黑藻体系处理组,另设置未接种附植藻类的单一黑藻体系处理组,研究了各处理组种植水对水华鱼腥藻的化感作用。研究表明,附植藻类-黑藻体系和单一黑藻体系均对水华鱼腥藻产生了显著的化感抑制作用;附植藻类-黑藻体系抑制作用强于单一的黑藻体系;附植藻类接种量大的处理组,抑制作用较强,其中接种4.00 g鲜重附植藻类的体系对水华鱼腥藻产生了极显著的化感抑制作用,叶绿素a去除率达97.65%。

关键词:附植藻类;黑藻;水华鱼腥藻;化感作用

中图分类号:S949.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-3075(2009)05-0031-05

在富营养化水体中,附植藻类的大量繁殖对沉水植物的生长产生抑制,这种抑制作用会促进沉水植物群落消亡,加速富营养化水体由“草型生态系统”向“藻型生态系统”的转化(Phillips G L et al, 1978; Roberts E et al, 2003),并对沉水植被的恢复起到重要的阻遏作用(Irfanullah H M & Moss B, 2004)。目前,探索附植藻类在富营养化水体“草”和“藻”2种状态转化过程中所起的作用,大多是研究其对沉水植物生长的影响(宋玉芝等, 2007a; 2007b)。化感作用是沉水植物抑制浮游藻类生长的重要手段(马晓燕和陈家长, 2006),是草型水生生态系统维持自身稳定的重要机制(Hilt S & Gross E M, 2007; Gross E et al, 2007)。目前,关于沉水植物或附植藻类化感作用的研究已有不少报道(Irfanullah H M & Moss B, 2005; 杨琳等, 2008; 肖溪等, 2009),而将附植藻类与沉水植物组成联合体系,研究其对浮游藻类的化感作用在国内外研究中尚未见报道。本文研究了附植藻类-黑藻体系对水华鱼腥藻的化感作用,旨在为研究附植藻类-沉水植物体系在水生生态系统中的作用及受损水生生态系统的植物修复方法提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

黑藻(*Hydrilla verticillata*)采自广州市乌涌,种

植在有机玻璃缸内备用。

附植藻类取自华南理工大学环境科学与工程学院用于富营养化水体修复实验的黑藻植株表面。经过鉴定,该附植藻类群落共有藻类16种,其中美丽微孢藻(*Microspora amoena*)为优势种,约占附植藻类个体总数的90%。

水华鱼腥藻(*Anabaena flos-aquae*)购自中国科学院水生生物研究所淡水藻种库,藻种采用BG-11培养基扩大培养,实验开始前2月逐步使用1×Hoagland培养液进行驯化培养。温度25℃、光照度3 000 lx,光暗周期14 h: 10 h,于LRH-250-GS人工气候箱中培养。

1.2 实验方法

选取生长良好,植株状况一致的黑藻,截取20 cm左右顶枝端,称量后扦插在以河沙(经0.1 mol/L HCl浸泡48 h,并用蒸馏水洗净)作为基质的180 mL塑料杯中,每个塑料杯底部具有10个小孔,塑料杯中的黑藻鲜重(1.42 ± 0.12)g。把7只种有黑藻的塑料杯放入经过0.1 mol/L盐酸清洗并用蒸馏水冲洗的直径280 mm、高320 mm的塑料培养容器中,使培养容器中黑藻鲜重约为10 g,加入15 L 0.1×Hoagland营养溶液。

待黑藻加入培养容器3 d后开始接种附植藻类。从用于富营养化水体修复实验的黑藻植株表面刮取附植藻类,称量后将其均匀缠绕在黑藻表面,2~3 d后附植藻类即附着于黑藻表面生长。处理组T1为单一黑藻体系,不接种附植藻类,处理组T2、T3、T4均为附植藻类-黑藻体系,分别接种美丽微孢藻为主的附植藻类1.00、2.00和4.00 g。实验在光照充足的室内进行,实验期间,水体中营养水平控

收稿日期:2008-07-26

基金项目:广州市黄埔区环境保护局资助项目(302D804212)。

通讯作者:潘伟斌。E-mail: ppwbpan@scut.edu.cn

作者简介:谭海剑,1982年生,硕士研究生,研究方向为生态工程与环境修复。E-mail: tan.haijian@mail.scut.edu.cn

制在 $0.1 \times \text{Hoagland}$ 左右,日平均温度 $15 \sim 25^\circ\text{C}$, 采用自然光照。

接种附植藻类 14 d 后,取各处理组的种植水在无菌条件下经过 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜抽真空过滤,取 150 mL 滤液加入已灭菌的 500 mL 玻璃锥形瓶中,而后加入吸光度 ($A_{680\text{nm}}$) 为 1.000 左右的水华鱼腥藻藻液 60 mL、经灭菌的 $1 \times \text{Hoagland}$ 营养液 90 mL,使各处理组实验初始的藻液 $A_{680\text{nm}}$ 约为 0.2000,营养水平为 $0.5 \times \text{Hoagland}$ 左右。以灭菌的蒸馏水代替种植水滤液做对照,每个处理重复 1 次。将各处理组置于 LRH-250-GS 人工气候箱中培养,温度 25°C ,光照度 3 000 lx,光暗周期 14 h:10 h。

1.3 测定方法

1.3.1 取样方法 将装有水华鱼腥藻藻液的锥形瓶置于摇床中,120 r/min 离心 10 min,震荡结束静置 10 min,从锥形瓶中取上清液用于测定。

1.3.2 藻液叶绿素 a 含量的测定 将取得的藻液采用乙醇萃取-分光光度法(李燕等,2008)测定藻液叶绿素 a 含量。实验 0 d 和 7 d 时测定叶绿素 a,叶绿素 a 去除率采用下式计算。

$$q = \frac{\text{Chla}_e - \text{Chla}_0}{\text{Chla}_0} \times 100\%$$

式中: q 为叶绿素 a 去除率; Chla_0 为实验开始时藻液叶绿素 a 浓度 ($\mu\text{g/L}$); Chla_e 为实验结束时藻液叶绿素 a 浓度 ($\mu\text{g/L}$)。

1.3.3 藻细胞密度的测定 将取得的藻液使用血球计数板测定藻细胞密度。由于血球计数板测定藻细胞密度误差较大,本实验仅在实验 0 d 和 7 d 时各测定 1 次,且测定限于对照组、T1 和 T4。

1.3.4 藻液吸光度的测定 本实验开始前,使用 TU-1800SPC 紫外可见分光光度计测定藻细胞的吸光度 $A_{680\text{nm}}$,同时使用血球计数板计数法测量对应的藻细胞密度,并进行 $A_{680\text{nm}}$ 值和使用血球计数板测定的藻细胞密度值的相关性分析,相关系数 $R^2 = 0.9996$,具有很好的线性关系,与胡先文等(2002)的研究相符。为了保证实验数据的稳定性,本研究采用藻液 $A_{680\text{nm}}$ 表征水华鱼腥藻的现存量。实验过程中每隔一定的时间测定藻液的 $A_{680\text{nm}}$ 。

1.4 干扰因素的排除

关于沉水植物抑制藻类生长的机制是资源竞争还是化感作用的争论一直存在(Inderjit & Moral R, 1997),只有排除光照抑制、营养竞争和微生物作用等因素,才可认为藻类生长抑制是由化感作用造成

的(鲜啟鸣等, 2005; 张维昊等, 2006; 吴晓辉, 2005)。本研究参考吴晓辉(2005)的实验方法对光照、营养盐和微生物作用的干扰进行了排除。

本研究实验采用侧面加光,光照度 3 000 lx,为藻类正常培养的照度,不会造成光照抑制。在化感作用和藻类毒理研究中,常采用高浓度方法来排除营养不足对藻类生长的影响(Erhard D & Gross E M, 2006; Mulderij G et al, 2007)。藻类生长实验初始时的营养盐浓度均设置为 $0.5 \times \text{Hoagland}$,使藻类生长的差异不由初始营养盐浓度的差异所造成。在进行沉水植物种植水抑藻实验时须先排除微生物的干扰,通常可以用过滤除菌或高温高压灭菌的方法(林敏等, 2007; 张庭廷等, 2007; 杨维东等, 2008)。考虑到植物的化感物质中可能含有热不稳定物质,本研究采用了 $0.22 \mu\text{m}$ 的微孔滤膜过滤除菌的办法,以使微生物的影响降到较低水平。

1.5 数据分析

数据的统计分析使用 SPSS 13.0 软件,图件使用 EXCEL 软件制作。

2 结果与分析

2.1 吸光度

实验过程中各处理组吸光度变化情况见图 1。实验初始时对照组和各处理组藻液的 $A_{680\text{nm}}$ 值接近,约为 0.2,各处理组间无显著性差异($P > 0.05$)。2 d 时,各处理组水华鱼腥藻皆出现凝聚沉底的现象, $A_{680\text{nm}}$ 值皆降低至 0.11 以下, T4 的 $A_{680\text{nm}}$ 值略低于其他处理组。4 d 时,对照组藻液 $A_{680\text{nm}}$ 值继续升高,达到了 0.25 以上;各处理组间开始表现出一定的差异, T1 和 T2 的 $A_{680\text{nm}}$ 值较 2 d 有一定的回升,接近 0.15, T2 略低于 T1; T3 的 $A_{680\text{nm}}$ 值为 0.0967,与 2 d 的 $A_{680\text{nm}}$ 值接近; T4 的 $A_{680\text{nm}}$ 则继续降低到了 0.0418。7 d 时,对照组藻液 $A_{680\text{nm}}$ 值持续上升,达到 0.3091;各处理组间 $A_{680\text{nm}}$ 值的差异进一步扩大, T1 和 T2 的 $A_{680\text{nm}}$ 值继续回升,达到 0.15 以上, T2 仍略低于 T1; T3 的 $A_{680\text{nm}}$ 值为 0.0945,与 2 d 和 4 d 的吸光度值接近; T4 的 $A_{680\text{nm}}$ 值进一步降低至 0.0173,仅为空白组 $A_{680\text{nm}}$ 值的 5.6%。

经统计分析,到实验 7 d 时对照组水华鱼腥藻的 $A_{680\text{nm}}$ 值显著高于各处理组($P < 0.05$), T2 与 T1 间无显著性差异($P < 0.05$), T3 水华鱼腥藻的 $A_{680\text{nm}}$ 值显著低于 T1($P < 0.05$), T4 水华鱼腥藻的 $A_{680\text{nm}}$ 值则与 T1 间存在极显著差异($P < 0.01$)。

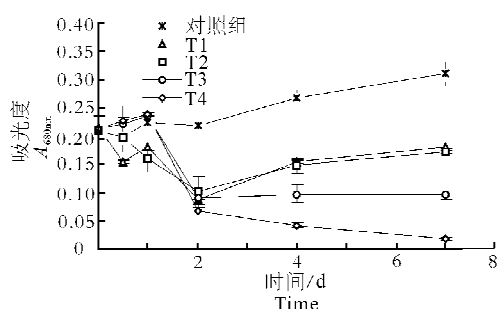


图1 各处理组吸光度变化

Fig.1 The changes in absorbance of each treatment group

2.2 叶绿素 a

藻液叶绿素 a 含量在实验开始和 7 d 时各测定 1 次, 结果如图 2 所示。实验初始时各处理组叶绿素 a 接近, 无显著性差异 ($P > 0.05$)。7 d 时, 各处理组叶绿素 a 与对照组相比均有显著下降 ($P < 0.05$), 但各处理组间也表现出了一定差异。T1 叶绿素 a 含量为 273.42 μg , 去除率为 49.72%; T2 叶绿素 a 含量为 246.92 μg , 去除率为 53.10%, 与 T1 无显著性差异 ($P > 0.05$); T3 叶绿素 a 含量为 172.76 μg , 去除率为 68.81%, 与 T1 有显著性差异 ($P < 0.05$); T4 叶绿素 a 降低程度最大, 由初始的 534.57 μg 降低至 12.56 μg , 与对照组相比有极显著降低 ($P < 0.01$), 去除率 97.65%, 叶绿素 a 含量显著低于 T3、T2 和 T1 ($P < 0.05$), 藻液基本无色。

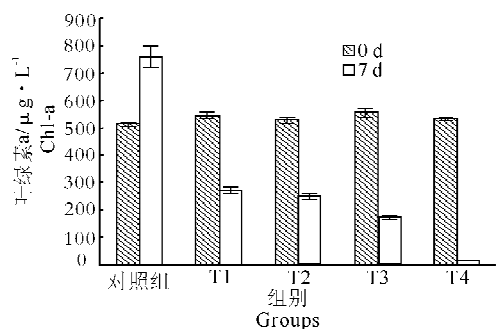


图2 各处理组叶绿素 a 变化

Fig.2 The changes in chlorophyll a of each treatment group

2.3 藻细胞密度

藻细胞密度在实验开始和 7 d 时各测定 1 次, 测定仅限于对照组、T1 和 T4, 结果如图 3 所示。

实验初始时各处理组藻细胞密度接近。实验 7 d 时, 对照组水华鱼腥藻细胞密度有所增加; T1 水华鱼腥藻细胞密度下降, 但高于 T4 藻细胞密度; T4 的藻细胞数量下降程度最大, 经镜检水体中已几乎

看不到藻细胞。藻细胞密度测定结果与前 2 项指标的测定结果相一致。

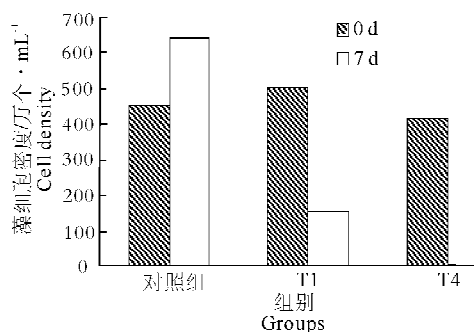


图3 各处理组藻细胞密度变化

Fig.3 The changes in algal cell density of each treatment group

3 讨论

对照组水华鱼腥藻在整个实验过程中保持生长; 单一黑藻体系的 T1 组和接种 1.00 g 附植藻类的附植藻类-黑藻体系 T2 组在实验 2 d 对水华鱼腥藻表现出生长抑制, 其后则恢复生长; 接种 2.00 g 附植藻类的 T3 组在实验 2 d 对水华鱼腥藻表现出生长抑制, 而后的 2~7 d 其现存量基本保持不变; 接种 4.00 g 附植藻类的 T4 组中水华鱼腥藻则现存量不断下降, 其生长受抑制程度最大。可见随着附植藻类接种量的增大, 水华鱼腥藻受抑制的时间和程度增大, 呈现出了明显的量效关系, 且随着实验时间的延长, 这种抑制程度的差别更趋于明显 (图 1)。

长期研究表明, 附植藻类的增加常降低宿主植物的生长速率, 其原因包括附植藻类层遮光、阻碍宿主植物营养吸收、其代谢产物对宿主植物具有毒害作用等 (Phillips G L et al, 1978; Iwan J J et al, 2000; Asaeda T et al, 2004; 陈灿等, 2007; 李强等, 2007)。因此, 有观点认为附植藻类对沉水植物生长的阻碍作用是沉水植被在富营养化水体中退化的关键因子 (Phillips G L et al, 1978)。近年来的研究进一步指出附植藻类不但会促使沉水植被的消亡, 而且对沉水植被的恢复也会起到重要阻遏作用 (Irfanullah H M & Moss B, 2004)。本研究发现在黑藻表面接种附植藻类所组成的附植藻类-黑藻体系对水华鱼腥藻的化感抑制强于单一的黑藻体系, 且附植藻类接种量越大的附植藻类-黑藻体系, 对水华鱼腥藻的抑制程度越大, 这一现象在国内外以往的研究中尚未见报道。

参考文献:

- 陈灿, 张浏, 赵兴青, 等. 2007. 不同营养状态下附生藻类对菹草(*Potamogeton crispus*)叶片光合机能的影响[J]. 湖泊科学, 19(4): 485-491.
- 胡先文, 董元彦, 张新萍, 等. 2002. 可见分光光度法测定水华鱼腥藻[J]. 华中农业大学学报, (3): 295-297.
- 李强, 王国祥, 马婷, 等. 2007. 水网藻附着对亚洲苦草光合特性的影响[J]. 湖泊科学, 19(3): 315-320.
- 李燕, 潘伟斌, 杨丽丽. 2008. 三株溶藻细菌胞外溶藻活性物质若干分离特性的研究[J]. 微生物学通报, 35(2): 171-177.
- 林敏, 潘伟斌, 张太平, 等. 2007. 三株溶藻细菌溶藻活性代谢产物的初步研究[J]. 生态环境, 16(2): 358-362.
- 马晓燕, 陈家长. 2006. 化感作用与养殖池塘中铜绿微囊藻的防治[J]. 水利渔业, 26(6): 75-76.
- 宋玉芝, 秦伯强, 高光, 等. 2007a. 附着生物对沉水植物伊乐藻生长的研究[J]. 生态环境, 16(6): 1 643-1 647.
- 宋玉芝, 秦伯强, 高光. 2007b. 附着生物对太湖沉水植物影响的初步研究[J]. 应用生态学报, 18(4): 928-932.
- 吴晓辉. 2005. 常见眼子菜科沉水植物对浮游藻类的化感作用研究[D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所.
- 鲜敏鸣, 陈海东, 邹惠仙, 等. 2005. 四种沉水植物的克藻效应[J]. 湖泊科学, 17(1): 75-80.
- 肖溪, 楼莉萍, 李华, 等. 2009. 沉水植物化感作用控藻能力评述[J]. 应用生态学报, 20(3): 705-712.
- 杨琳, 吴伟, 胡庚东, 等. 2008. 两种沉水植物浸提液对斜生栅藻的化感效应[J]. 农业环境科学学报, 27(4): 1 530-1 535.
- 杨维东, 李丽璇, 刘洁生, 等. 2008. 海洋底栖甲藻——利玛原甲藻(*Prorocentrum lima*)对三种赤潮藻的化感作用[J]. 环境科学学报, 28(8): 1 631-1 637.
- 张庭廷, 陈传平, 何梅, 等. 2007. 几种高等水生植物的克藻效应研究[J]. 生物学杂志, 24(4): 32-36.
- 张维昊, 周连凤, 吴小刚, 等. 2006. 菖蒲对铜绿微囊藻的化感作用[J]. 中国环境科学, 26(3): 355-358.
- Asaeda T, Sultana M, Manatunge J, et al. 2004. The effect of epiphytic algae on the growth and production of *Potamogeton perfoliatus* L. in two light conditions[J]. Environmental and Experimental Botany, 52(3): 225-238.
- Erhard D, Gross E M. 2006. Allelopathic activity of *Elodea canadensis* and *Elodea nuttallii* against epiphytes and phytoplankton[J]. Aquatic Botany, 85(3): 203-211.
- Gross E, Hilt S, Lombardo P, et al. 2007. Searching for allelopathic effects of submerged macrophytes on phytoplankton - state of the art and open questions[J]. Hydrobiologia, 584: 77-88.
- Hilt S, Gross E M. 2007. Can allelopathically active submerged macrophytes stabilise clear-water states in shallow lakes? [J]. Basic and Applied Ecology, 4(3): 1-11.
- Inderjit, Moral R. 1997. Is separating resource competition from allelopathy realistic? [J]. The Botanical Review, 63(3): 221-230.
- Irfanullah H M, Moss B. 2004. Factors influencing the return of submerged plants to a clear-water, shallow temperate lake [J]. Aquatic Botany, 80(3): 177-191.
- Irfanullah H M, Moss B. 2005. Allelopathy of filamentous green algae[J]. Hydrobiologia, 543(1): 169-179.
- Iwan J J, Eaton J W, Hardwick K. 2000. The influence of periphyton on boundary layer conditions: a pH microelectrode investigation[J]. Aquatic Botany, 67(3): 191-206.
- Mulderij G, Mau B, Van D E, et al. 2007. Allelopathic activity of *Stratiotes aloides* on phytoplankton-towards identification of allelopathic substances [J]. Hydrobiologia, 584(1): 89-100.
- Phillips G L, Eminson D, Moss B. 1978. A mechanism to account for macrophyte decline in progressively eutrophicated freshwaters [J]. Aquatic Botany, 4(3): 103-126.
- Roberts E, Kroker J, Korner S, et al. 2003. The role of periphyton during the re-colonization of a shallow lake with submerged macrophytes[J]. Hydrobiologia, 506(2): 525-530.

(责任编辑 杨春艳)

Allelopathic Inhibition of Epiphyte-*Hydrilla Verticillata* System

TAN Hai-jian¹, PAN Wei-bin¹, OU Xiao-jin², CAO Shi-lin¹, ZENG Yan-ting¹

1. School of Environmental Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China;
2. School of Biological Science and Engineering, South China University of Technology Guangzhou 510006, China;

Abstract: 1.00g, 2.00g and 4.00g fresh weight epiphyte were inoculated with *Hydrilla verticillata* compose *Hydrilla verticillata*-Epiphyte system as treatments T2, T3, T4, a culture filtrates experiment was carried out to study the effect of epiphyte on the allelopathic inhibition of *Hydrilla verticillata*-Epiphyte system and single *Hydrilla verticillata* system T1 without epiphyte. The results showed that *Hydrilla verticillata*-epiphyte system has significant allelopathic activity on *Anabaena flos-aquae*; the allelopathic effect of *Anabaena flos-aquae* by Epiphyte-*Hydrilla verticillata* system was more efficient than single *Hydrilla verticillata* system; the allelopathic effect increased with increasing epiphyte biomass, among them epiphyte-*Hydrilla verticillata* system T4 had significant allelopathic activity on *Anabaena flos-aquae*, the chlorophyll a removal rate reach 97.65%.

Key words: Epiphyte; *Hydrilla verticillata*; *Anabaena flos-aquae*; Allelopathy