

药用植物浸提液抑制蛋白核小球藻生长的化感效应

柴民伟, 石福臣*, 马妍, 马俊改

(南开大学生命科学学院, 天津 300071)

摘要:研究了11种药用植物浸提液对水华藻种蛋白核小球藻的影响,结果显示:黄连、重楼、贯众、防己4种药用植物的浸提液均有抑藻效应。当药用植物浸提液的相对浓度为1g/L处理时,其半抑制效应时间 LT_{50} 的排序为:防己<重楼<黄连<贯众。进一步研究防己的相对浓度梯度抑藻效应,结果表明:在相对浓度为2g/L时,实验3d后的藻细胞几乎全部死亡;防己的抑藻效应受贮藏时间和贮藏温度的影响不显著。在所研究的药用植物中,防己的抑藻效果最好,在抑藻方面有较大应用前景,其它3种药用植物对轻度藻类爆发的控制也有潜在应用价值。

关键词:药用植物;蛋白核小球藻;化感作用

The allelopathic and inhibitive effects of extracts from medicinal plants on the growth of *Chlorella pyrenoidosa*

CHAI Minwei, SHI Fuchen*, MA Yan, MA Jungai

(College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: Extracts of 11 medicinal plants were used to test the inhibitive effects on the growth of *Chlorella pyrenoidosa*. The study results show that the extracts of *Coptis chinensis*, *Paris quadrifolia*, *Dryopteris setosa*, and *Stephania tetrandra* had inhibitive effects on the growth of *Chlorella pyrenoidosa*. When the relative concentration of the extracts was at 1g/L, the range of the median lethal times LT_{50} was in the following order: *Stephania tetrandra* < *Paris quadrifolia* < *Coptis chinensis* < *Dryopteris setosa*. In the experiment, the algal response to the relative concentration gradient was tested, all the algae died after 3 days when the relative concentration of *Stephania tetrandra* was at the level of 2g/L. The study results also indicate that the effects of inhibition were not changed markedly by the storage time and storage temperature. *Stephania tetrandra* showed the greatest inhibition on the growth of the algal species among the medical plants studied. Thus, *Stephania tetrandra* has the great potential in inhibiting algal outbreak. The other three medical plants tested in the study also showed moderate inhibitive impact on the algal growth, indicating that they are also valuable in control and management of algal populations.

Key Words: medicinal plant; *Chlorella pyrenoidosa*; allelopathy

近年来,水体富营养化问题已经引起人们的普遍关注。严重的水体富营养化导致某些藻类异常增殖并形成水华。水华的频繁出现,不仅影响水生生态系统的结构和功能,其藻毒素通过食物链还影响到人类的健康^[1]。世界每年因藻毒素而导致的人体中毒事件有近2000例之多^[2]。对湖泊富营养化水治理中最紧迫的任务之一就是对藻类的治理^[3]。植物化感作用是Rice E在20世纪70年代中期提出的,他将化感物质定义为植物通过向环境释放化学物质而对另一种植物(包括微生物)所产生的有害或有益的作用^[4]。水生植物对藻类的化感抑制作用的发现,使化感作用开始应用于富营养化水体藻类控制领域^[5]。利用植物化感作用抑

基金项目:高等学校博士学科点专项科研基金(20050055041)

收稿日期:2009-08-01; 修订日期:2009-10-10

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: fcshi@nankai.edu.cn

制藻类生长具有生态安全和快速高效的优点,对湖泊富营养化的生态控制具有非常重要的意义^[6]。但在水生植物自然分布少或不适合种植大型水生植物的景观水域,应用水生植物抑藻则具有周期长,常不能在短期内见效等缺点^[7]。药用植物含有丰富的具有化感作用的生理活性物质,在水产上多用于水产动物的疾病防治^[8]。近年来,应用水生药用植物的鲜活植株来控制藻类爆发已有一些研究:应用芦苇(*Phragmites communis*)浸提液抑制绿藻^[7,9-11],应用菖蒲(*Acorus calamus*)浸提液可以抑制多种藻类^[12]。本文选用多种药用植物的浸提液,对淡水华藻种蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)的抑制作用进行了实验研究,经过反复筛选获得了对蛋白核小球藻有明显抑藻效果的一组药用植物,并对其抑藻效果进行评估,旨在为中药抑藻生物制剂产品的开发及水体富营养化的生态治理提供科学依据。

1 实验材料和方法

1.1 实验材料

11种药用植物分别选用黄连(*Coptis chinensis*, Cc)、白头翁(*Pulsatilla chinensis*, Pc)、独活(*Angelica pubescens*, Ap)、罗布麻(*Apocynum venetum*, Av)、薄荷(*Mentha haplocalyx*, Mh)、扁蓄(*Polygonum aviculare*, Pa)、常山(*Dichroa febrifuga*, Df)、山豆根(*Menispermum dauricum*, Md)、重楼(*Paris quadrifolia*, Pq)、防己(*Stephania tetrandra*, St)、贯众(*Dryopteris setosa*, Ds)的药用部位的干品,材料来源于中药厂。实验藻种蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)来源于中国科学院水生生物研究所淡水藻种库(FACHB-270)。

1.2 实验方法

1.2.1 藻种的培养

经湿热灭菌过的锥形瓶中加入100mL SE培养基(表1),接入藻种,摇匀,置于光照培养箱(LRH-250GS II)中培养。培养条件为:温度(25±1)℃,光量子PPF:12μmol⁻²s⁻¹,光周期12L/12D,定期更换培养基,使藻处于对数生长期。

表1 SE培养基组成

Table 1 The composition of SE medium

化学成分 Chemical constituents	浓度/(mg/L) Concentration	化学成分 Chemical constituents	浓度/(mg/L) Concentration
NaNO ₃	250	FeCl ₃	16.2
K ₂ HPO ₄ ·H ₂ O	75	Na ₂ EDTA	200
MgSO ₄ ·7H ₂ O	75	H ₃ BO ₃	2.86
CaCl ₂ ·H ₂ O	25	MnCl ₂ ·H ₂ O	1.81
KH ₂ PO ₄	175	ZnSO ₄ ·H ₂ O	0.22
NaCl	25	CuSO ₄ ·H ₂ O	0.079
FeCl ₃ ·H ₂ O	0.5	(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ ·H ₂ O	0.039

1.2.2 药用植物浸提液母液的制备及浸提液相对浓度

分别称取上述11种药用植物干品1g,加入40mL蒸馏水,100℃水浴30min,过滤定容至50mL,作为实验母液,其相对浓度为20 g/L。对照组不添加浸提液,每个处理4次重复。

1.2.3 相关指标测定

藻细胞密度 血球计数板在显微镜(16×10倍)下计数,根据藻细胞密度计算藻细胞抑制率。

藻细胞抑制率 药用植物浸提液对蛋白核小球藻的抑制率计算公式如下^[7]:

$$IR(\%) = (1 - N/N_0) \times 100$$

式中,IR为藻细胞抑制率(%);N为处理组藻细胞密度(个/mL);N₀为对照组藻细胞密度(个/mL)

半效应抑制时间 某浓度下的半效应抑制时间LT₅₀是指处理组藻细胞密度为对照组藻细胞密度的50%时的实验时间^[13]。

2 结果与分析

2.1 不同药用植物浸提液对蛋白核小球藻的抑制效果分析

在无菌条件下,分别将11种药用植物的实验母液(5mL)、藻种(20mL)置于锥形瓶中,用SE培养基定容至100mL,置光照培养箱中培养,此时上述药用植物浸提液的相对浓度均为1g/L。对药用植物黄连、白头翁、独活、罗布麻、薄荷、扁蓄、常山、山豆根、重楼、贯众、防己进行初步的抑藻筛选实验。

药用植物浸提液(1g/L)处理后的蛋白核小球藻的生长曲线见图1。图1A中白头翁、独活处理组的藻细胞密度与对照组之间差异不显著($P > 0.05$)。黄连处理组的藻细胞密度在整个实验中不高于 5×10^5 个/mL,与对照组之间的差异极显著($P = 0.005 < 0.01$),其半效应抑制时间 LT_{50} 为54.67h(表2);图1B中罗布麻、薄荷、扁蓄处理组的藻细胞密度与对照组间差异不显著($P = 0.44 > 0.05$);图1C中对照组的藻细胞密度快速增长,第7天达到 2.3×10^6 个/mL。常山、山豆根处理组与对照组间差异不显著。重楼处理组在整个实验中藻细胞密度维持在 5×10^5 个/mL左右,与对照组间的差异极显著($P = 0.0054 < 0.01$),其半效应抑制时间 LT_{50} 为41.05h(表2);图1D中对照组的藻细胞在实验期间快速生长,第7天达到 2.21×10^6 个/mL。贯众处理组的藻细胞密度在实验第2天降至最低,随后4d稍有恢复($P = 0.0054 < 0.01$);防己处理组的藻细胞密度在第2天降为 1.0×10^5 个/mL,在实验第4天细胞全部被杀死($P = 0.0059 < 0.01$)。贯众、防己处理组的半效应抑制时间 LT_{50} 分别为54.86、29.70h(表2)。

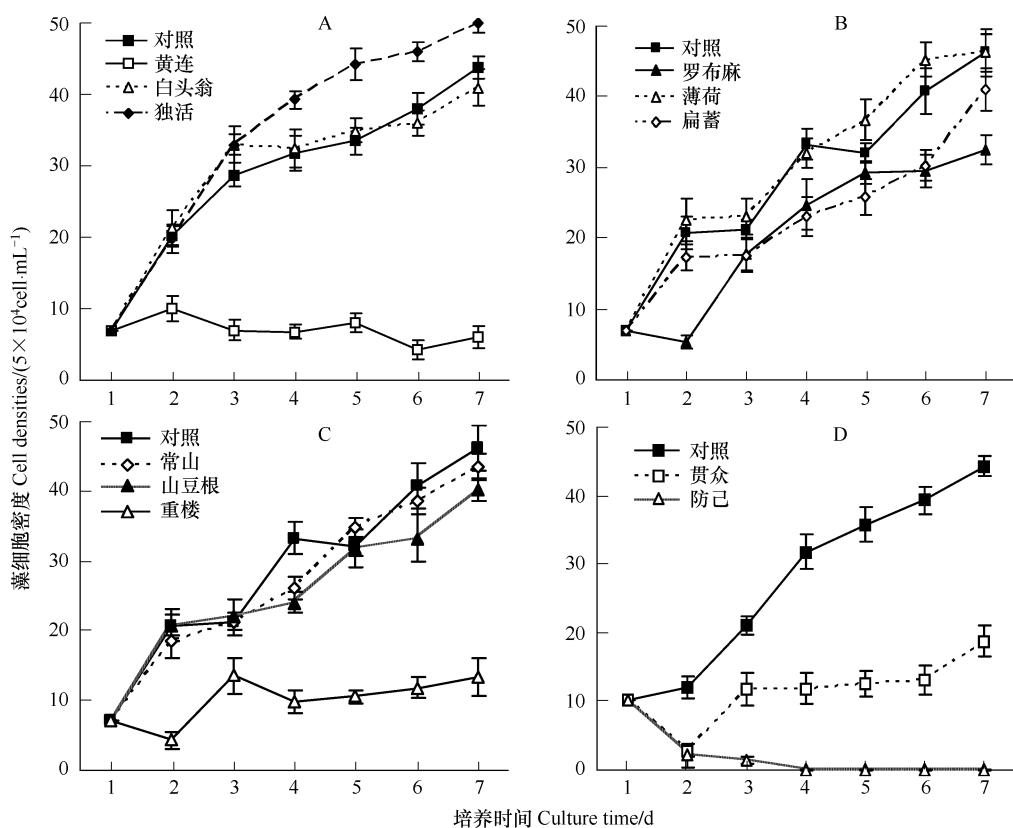


图1 药用植物浸提液(1g/L)对蛋白核小球藻藻细胞密度的影响

Fig. 1 Effects of extracts from several medicinal plants on cell densities of *Chlorella pyrenoidosa*

表2 四种药用植物浸提液(1g/L)处理下的半效应抑制时间

Table 2 The median lethal times treated with extracts (1g/L) of four kinds of medicinal plants

药用植物 Medicinal plant	重楼 Pq	黄连 Cc	防己 St	贯众 Ds
LT_{50}/h	41.05	54.67	29.70	54.86

因此,通过上述实验,初步筛选出对蛋白核小球藻有抑制效应的药用植物4种,分别是:黄连、重楼、贯众、防己。实验用的其它药用植物对蛋白核小球藻的抑制效果不明显。

2.2 抑藻效果明显的4种药用植物的抑藻效应的比较

设计2组实验,分别含有重楼、黄连、防己、贯众的实验母液0.25mL和1mL,每个实验接藻种20mL,与SE培养基一同置于锥形瓶中,使总体积达到100mL,培养条件同上。

重楼、黄连、防己、贯众浸提液在相对浓度为0.05、0.2g/L时对蛋白核小球藻生长的影响见图2。藻细胞初始接种浓度为 4×10^5 个/mL。对照组的藻细胞快速生长,在实验第5天,藻细胞密度达到 1.6×10^6 个/mL。图2E中,重楼、黄连、防己、贯众处理组并不显著抑制藻细胞生长(P 均>0.05)。图2F中,藻细胞处理组表现出较强的抑藻效应,其中防己处理组的藻细胞密度与对照组间差异显著($P=0.0149 < 0.05$),且在整个实验期间不超过 2.75×10^5 个/mL,重楼处理组明显抑制藻细胞生长,与对照组差异显著($P=0.0289 < 0.05$),但实验第5天呈现出恢复增长的趋势,说明重楼的抑藻成分稳定性差。

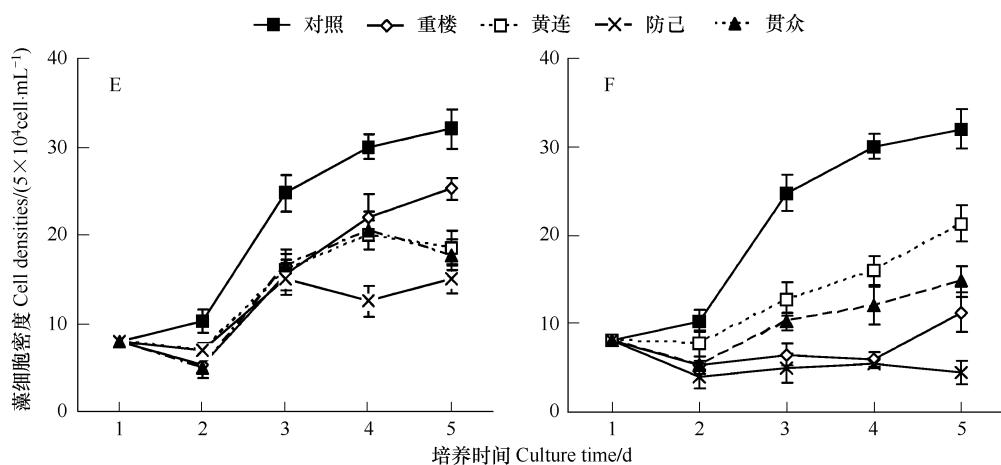


图2 不同药用植物浸提液对蛋白核小球藻的影响

Fig. 2 Effects of extracts from different medicinal plants on cell densities of *Chlorella pyrenoides*

注:浸提液相对浓度 E: 0.05g/L; F: 0.2g/L

表3中的相关系数分析显示:(1)在相对浓度为0.05、0.2g/L处理下,药用植物处理组与对照组相关系数从大到小排序依次为:重楼>黄连>贯众>防己,黄连>贯众>重楼>防己;防己处理组与对照组间的相关系数最小,其抑藻效果最强。(2)在4种药用植物(防己、重楼、黄连、贯众)与对照组相关系数的比较中,0.2g/L处理组普遍小于0.05g/L处理组,说明随着浸提液相对浓度的增加,处理组与对照组间的相关性更趋向于负相关关系,药用植物的抑藻效果逐渐增强。

表3 不同相对浓度下的4种处理组与对照组间的相关系数

Table 3 Correlation Coefficient between four kinds of treat treatment group and the control group in different RC

浓度/(g/L) Concentration	相关系数(r) Correlation coefficient			
	重楼 Pq	黄连 Cc	防己 St	贯众 Ds
E: 0.05g/L	0.9665	0.9563	0.9069	0.9494
F: 0.2g/L	0.3921	0.9354	-0.4197	0.9086

注: $|r| < 0.4$ 为低度线性相关; $0.4 \leq |r| < 0.7$ 为显著性相关; $0.7 \leq |r| < 1$ 为高度线性相关

2.3 防己浸提液抑制蛋白核小球藻的浓度梯度分析

将防己实验母液(1.25、2.5、5、10mL)、藻种(20mL)、SE培养基添加到锥形瓶中,使总体积达到100mL,防己的相对浓度为0.25、0.5、1、2g/L,培养条件与检测手段同上。

不同浓度的防己浸提液处理后,蛋白核小球藻的生长的影响见图3。图3G中,随着实验时间的延长,对

照组(0g/L处理)藻细胞密度前7d变化较缓,第6天达到最高(1.34×10^4 个/mL),随后藻细胞密度急剧上升,最终达到 2.51×10^4 个/mL。各种处理组(0.25、0.5、1、2g/L)随着浓度增加,抑藻效果逐渐增强。0.25g/L处理组的藻细胞密度在实验第4天降为 1.75×10^5 个/mL;2g/L处理组的藻细胞在第4天就完全死亡消失。统计分析结果表明,防己浸提液不同相对浓度处理组之间的差异不显著($P = 0.08 > 0.05$),但与对照组差异极显著(P 分别为0.0030、0.0027、0.0020、0.0018<0.01)。

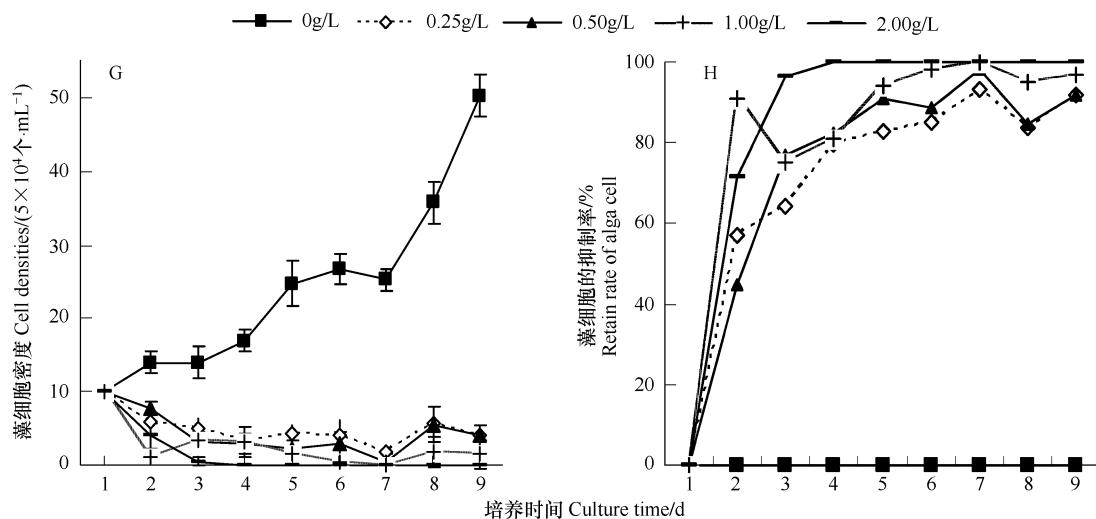


图3 不同相对浓度防己浸提液对蛋白核小球藻生长的影响

Fig. 3 Effects of different concentration extracts from *Stephania tetrandra* on growth of *chlorella pyrenoides*

利用抑制率公式分别求出的4种相对浓度(0.25、0.5、1、2g/L)处理下的抑制率变化曲线(图3H)。实验前3d,防己浸提液对藻细胞的抑制作用并不呈现明显的时间-效应和剂量-效应的关系。在实验后期(第4—9天),处理组对藻类的抑制作用随浓度增长而增强,相对抑制率随时间延长而增强。2g/L处理的相对抑制率在实验4d后稳定在100%。

2.4 防己浸提液抑制蛋白核小球藻的稳定性实验

将配置好的防己浸提液母液分别置于4、25℃下,放置2、4、6d后进行抑藻实验,浸提液相对浓度为1g/L。培养条件与检测手段同上。

蛋白核小球藻的生长曲线见图4。图4I中,对照组在前3d呈现出急剧上升趋势,3d后的藻细胞密度趋于稳定;处理组的藻细胞密度在第2天降到最低,约为 2.5×10^5 个/mL;随着实验时间的延长,放置2、4、6d处理组的藻细胞密度有所上升,且上升幅度依次增加;在实验第7d,放置处理组的藻细胞密度均远低于对照组 1.75×10^6 个/mL。说明防己中存在的化感物质较为稳定,随处理时间的影响不大,抑藻效果明显。统计分析结果表明,在25℃下,放置0、2、4、6d处理组的藻细胞密度与对照组之间的差异极显著(P 分别为0.0018、0.0014、0.0011、0.0013<0.01);而不同处理组之间的差异不显著($P = 0.1786 > 0.05$)。

防己浸提液在温度4℃下放置0、2、4、6d处理后,蛋白核小球藻的生长曲线与温度25℃处理的生长曲线相似,见图4J。统计分析结果表明,在4℃下,放置0、2、4、6d处理组的藻细胞密度与对照组之间的差异极显著(P 分别为0.0018、0.0014、0.0013、0.0015<0.01);不同处理组之间的差异不显著($P = 0.5452 > 0.05$)。

通过上述实验可知:(1)放置时间的延长对防己浸提液的抑藻效应影响不显著。整个实验期中,处理组的藻细胞密度随放置时间延长而有所恢复,这是由于藻细胞吸收并分解了部分有效抑藻成分。(2)温度为25℃时,经放置处理的藻细胞密度在实验第3天就开始有所恢复上升,而在4℃时,相应的藻细胞密度在实验第5天才开始恢复上升,说明低温有助于抑藻物质的长久保藏。因此,防己浸提液的有效成分性状较为稳定,具有强烈的抑藻效果,其抑藻机理有待深入研究。

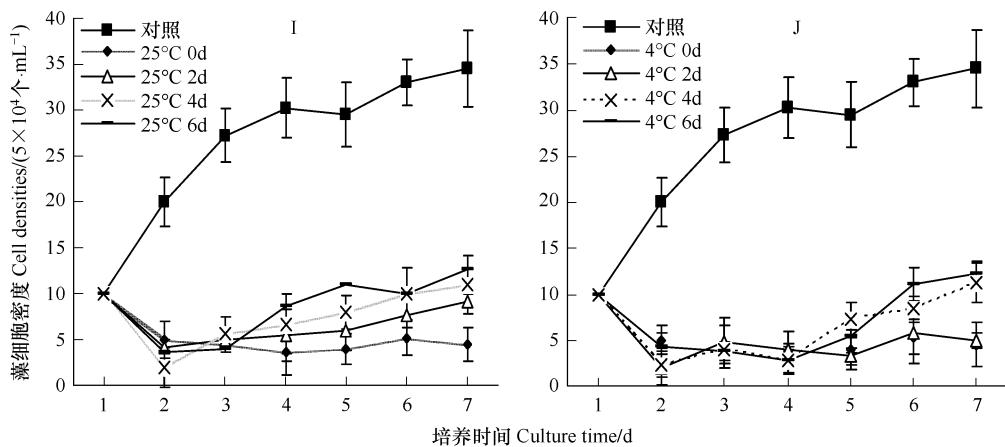


图4 不同时间、温度处理下防己浸提液(1g/L)对蛋白核小球藻的影响

Fig. 4 Effects of extracts (1g/L) from *Stephania tetrandra* (treated by different times and temperature) on cell densities of *Chlorella pyrenoides*

2.5 藻细胞外部形态特征的变化

实验期间,通过显微镜观察了藻细胞在被抑制过程中,外部形态特征发生的变化。结果发现:(1)藻细胞凝聚成团生长,最终死亡、沉底(图5K),可能是细胞凝聚成块导致沉降系数增大,藻细胞沉底后受到的光照减弱,并且凝聚的藻细胞受光面积减少,光合作用受到抑制,生长受到抑制;(2)藻细胞变大,运动性减弱(图5L)。这种现象可能是抑藻成分抑制了藻细胞的分裂生长,且破坏了其鞭毛的结构^[14-15];(3)藻细胞完全破裂死亡(图5M)。这可能是抑藻成分破坏了细胞膜的完整性,使细胞的内容物溢出^[5]。藻细胞形态的变化对今后探讨药用植物浸提液的抑藻机理提供了参考。

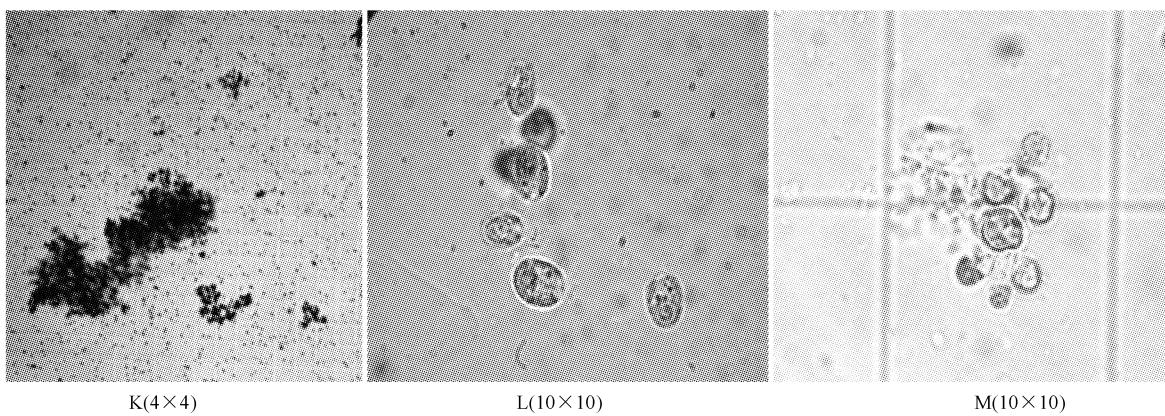


图5 药用植物浸提液处理下的细胞形态

Fig. 5 Cell morphology under treatment with extracts from medicinal plants

3 讨论

中国药用植物资源丰富,利用药用植物抑藻,可以弥补水生植物资源限制的不足。目前应用药用植物进行抑藻的研究主要集中在海洋赤潮藻类,成效显著。黄连、槟榔、板兰根、苦参、鱼腥草浸提液对塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarensense*)的抑藻效应研究表明:应用黄连、槟榔的抑藻效果最好,药用植物的两两联合使用可以增强药物的抑藻能力;以芦荟或海带或沸石粉吸附黄连、海带吸附槟榔的抑藻剂均具有较好的抑藻效果^[16-17]。大蒜粗提液对赤潮藻类塔玛亚历山大藻、锥状斯氏藻(*Scrippsiella trochoidea*)有很好的抑藻效果,且其抑藻成分稳定,不受高温及长期贮藏的影响;大蒜来源广泛、价格便宜、作用效果好,其提取物大蒜素可作为高效的抑藻剂^[18]。但有关药用植物对淡水华藻类的抑藻研究鲜有报道。

本研究对11种药用植物进行筛选,结果表明:防己、重楼、黄连、贯众都有明显的抑藻效果,但抑藻效果有一定差异。4种药用植物对蛋白核小球藻的半效应抑制时间 LT_{50} 排序为防己<重楼<黄连<贯众,见表2。防己处理组的 LT_{50} 为29.70h,明显小于其它3种处理,抑藻效果最好。

在防己抑藻的稳定性实验中,蛋白核小球藻藻密度随着防己处理浓度的增加而减小;当浸提液放置一定时间处理后,所有处理组的藻细胞密度在实验后期有所恢复上升。这是因为浸提液在最初作用几天后,可能由于其中化感物质的水解以及藻细胞对其降解,使得藻细胞密度出现反弹现象,说明应用药用植物抑藻,其化感物质不会长期富集,而是可能存在一个有效持续作用时间问题。

References:

- [1] Zhang T T, Chen C P, H M, Wu A P, Nie L W. Allelopathic effects of several higher aquatic plants on algae. *Journal of Biology* 2007, 24 (4) : 32-36.
- [2] Sun X X, Choi J K, Kim E K. A preliminary study on the mechanism of harmful algal bloom mitigation by use of sophorolipid treatment. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2004, 304 (1) : 35-49.
- [3] Nie F H, Li T, Wu X F, Wang P. Treatment methods of algae eutrophication water body. *China Water & Waste Water*, 2006, 22 (8) : 11-15.
- [4] Rice E L. *Allelopathy*, 2nd ed. London: Academic Press, 1984: 1-2.
- [5] Zhang Y L, Lu P, Wu X F. A review of researches on Phyto-allelopathy in Algal Inhibition. *Environment Science and Management*, 2006, 31 (7) : 50-53.
- [6] Putnam A R, Duke W B. Biological suppression of weeds: Evidence for allelopathy in accessions of cucumber. *Science*, 1974. 185. 370-372.
- [7] Li F M, Hu H Y. Isolation and effects on green alga *Chlorella pyrenoidosa* of algal-inhibiting allelochemicals in the Macrophyte, *Phragmites communis* Tris. *Environment Science*, 2004, 25 (5) : 89-92.
- [8] Li Y. Review of Chinese herbal medicine applied in fishing. *Fisheries Science & Technology Information*, 1991, 18 (2) : 50-53.
- [9] Li F M, Hu H Y. Allelopathy and inhibitory effect of extracts from macrophytes on algae growth. *China Water & Waste Water*, 2004, 20 (11) : 18-21.
- [10] Li F M, Hu H Y. Isolation and characterization of a novel antialgal allelochemical from *Phragmites communis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71 (11) : 6545-6553.
- [11] Men Y J, Hu H Y, Li F M. Effects of the novel allelochemical ethyl 2-methylacetooacetate from the reed (*Phragmitis australis* Trin) on the growth of several common species of green algae. *Journal of Applied Phycology*, 2007, 19: 521-527.
- [12] Ding H J, Zhang W H, Wang C, Huang Z, Kuang J, Song L R. Allelopathic effect of *Acorus calamus* on some species of algae. *Environmental Science & Technology*, 2007, 30 (6) : 20-22.
- [13] Wang Y, Zhou B, Tang X X. Effects of two species of macroalgae-*Ulva pertusa* and *Gracilaria lemaneiformis*-on growth of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *Journal of Applied Phycology*, 2009, 21: 375-385
- [14] Mitchell D R. Chlamydomonas flagella. *Journal of Phycology*, 2000, 36: 261-273.
- [15] Wemmer K A, Marshall W F. Flagellar motility: all pull together. *Current Biology*, 2004, 14: 992-993.
- [16] Zhou L H, Zheng T L, Wang X, Ye J L, Tian Y, Hong H S. Effect of five Chinese traditional medicines on the biological activity of a red-tide causing alga-*Alexandrium tamarense*. *Harmful Algae*, 2007, 6:354-360.
- [17] Yang X R, Su J Q, Zheng T L. The importance and potential application of allelopathy in red-tide control. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2008, 28 (2) : 219-226.
- [18] Zhou L H, Zheng T L, Chen X H, Wang X, Chen S B, Tian Y, Hong H S. The inhibitory effects of garlic (*Allium sativum*) and diallyl trisulfide on *Alexandrium tamarense* and other Harmful Algal Species. *Journal of Applied Phycology*, 2008, 20: 349-358.

参考文献:

- [1] 张庭廷,陈传平,何梅,吴安平,聂刘旺.几种高等水生植物的克藻效应研究. *生物学杂志*, 2007, 24 (4) : 32-36.
- [3] 聂发辉,李田,吴晓英,王平.藻型富营养化水体的治理方法. *中国给水排水*, 2006, 22 (8) : 11-15.
- [5] 张艳丽,芦鹏,吴晓英.植物化感作用在抑藻方面的研究进展. *环境科学与管理*, 2006, 31 (7) : 50-53.
- [7] 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. *环境科学*, 2004, 25 (5) : 89-92.
- [8] 李义.鱼用中草药概述. *水产科技情报*, 1991, 18 (2) : 50-53.
- [9] 李锋民,胡洪营.大型水生植物浸提液对藻类的化感抑制作用. *中国给水排水*, 2004, 20 (11) : 18-21.
- [12] 丁惠君,张维昊,王超,黄振,匡勘,宋立荣.菖蒲对几种常见藻类的化感作用研究. *环境科学与技术*, 2007, 30 (6) : 20-22.
- [17] 杨小茹,苏建强,郑天凌.化感作用在赤潮调控中的意义及前景. *环境科学学报*, 2008, 28 (2) : 219-226.