

桔皮水提液对铜绿微囊藻生长的抑制效果研究

张 薛, 胡洪营*

清华大学 环境科学与工程系, 环境模拟与污染控制国家重点联合实验室, 北京 100084

摘要: 桔皮水提液能显著抑制铜绿微囊藻的生长, 定性滤纸过滤、0.45 μm 滤膜过滤和 0.22 μm 滤膜过滤及高温灭菌水提液的预处理操作对其抑藻效果无明显影响。当桔皮(干质量)水提液投加质量浓度大于 1.0 g/L 时, 培养 10 d 时对铜绿微囊藻生长的抑制率可超过 90%, 抑制率随桔皮水提液投加质量浓度的升高而增大; 当桔皮水提液的投加质量浓度低于 0.1 g/L 时, 抑藻效果不明显。在长期(40 d)培养试验中, 投加低质量浓度(小于 1.0 g/L)桔皮水提液的试验组中, 铜绿微囊藻在培养后期生长迅速, 某些试验组中出现促进铜绿微囊藻生长的现象; 投加高质量浓度(大于 1.0 g/L)桔皮水提液的试验组中, 培养 40 d 内均保持接近于 100% 的抑制率。透析袋分离试验表明, 具有抑藻活性的物质存在于分子量小于 3 500 的组分中。由试验结果可推测, 桔皮水提液中含有某种或某些物质, 可对铜绿微囊藻的生长产生抑制作用, 且这些物质经 121 $^{\circ}\text{C}$ 高温处理 30 min 后仍保持抑藻活性。该抑藻物质易于自然降解, 在长期培养过程中, 其抑藻效果会逐渐消失。

关键词: 桔皮; 铜绿微囊藻; 生长抑制; 化感作用; 富营养化

中图分类号: X705 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-6929(2008)05-0043-06

Inhibitory Effect of Extract from Citrus Peel on Growth of *Microcystis aeruginosa*

ZHANG Xue, HU Hong-ying

Environmental Simulation and Pollution Control Statekey Point Laboratory, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China

Abstract: The inhibitory effects of four kinds of pretreated (filtered by ordinary qualitative paper filter, 0.45 μm filter, 0.22 μm filter, and autoclaved) Citrus peel (dry peel equivalent) extract on *Microcystis aeruginosa* growth were tested. The results showed that all the four pretreated extracts have obvious inhibitory effect on the growth of *M. aeruginosa*, with an inhibitory ratio over 90% in the present of concentrations higher than 1.0 g/L after 10 days of cultivation, and the inhibitory ratios increased with the concentrations of the extract. There was little inhibitory effect when the extract concentration was lower than 0.1 g/L. In the long time (40 days) cultivation experiments, the inhibitory ratios of the low concentration group (less than 1.0 g/L) decreased during the later period, and some even showed stimulative effects. But the inhibitory ratios stayed around 100% through the 40 days with the concentrations of the extract larger than 1.0 g/L. The results of the dialyzer separation showed that the effective material should have a molecular weight less than 3 500. It was deduced that there was some material in the Citrus peel inhibiting the growth of *M. aeruginosa*, and the material can keep its inhibitory effect after being autoclaved (121 $^{\circ}\text{C}$, 30 min). And also the material can be easily degraded in natural conditions, resulting in the inhibitory effects disappearing gradually in the long time period cultivation.

Key words: Citrus peel; *Microcystis aeruginosa*; inhibitory effect; allelopathy; eutrophication

近年来,因 N 和 P 等营养盐的排放、气候变暖、降水减少等原因,我国某些大的湖泊、水库爆发了以铜绿微囊藻为主的蓝藻水华^[1-2]。蓝藻水华爆发时,

影响水体的透明度、浑浊度、颜色,有毒藻类产生的藻毒素、藻体腐败造成水体溶解氧下降、异味等,严重地影响水生生物的生存、人们正常的生产生活用水,破坏景观环境,因此水华被形象地称为水体的“癌症”^[3]。开发安全可靠的技术,控制蓝藻水华的爆发,保障人们正常的生产生活用水,已经成为我国水环境领域亟待解决的问题。目前,随着生物技术的发展以及物化方法暴露出的越来越多的弊端,从生态学原理出发的各种生物控藻技术受到人们越来越多的关注,如溶藻菌^[4-5]、植物化感作用等^[6]。众

收稿日期: 2008-01-22 修订日期: 2008-03-25

基金项目: NSFC-JST 重大国际合作项目(50721140017)

作者简介: 张薛(1983-),女,江苏徐州人,博士研究生,
zhangxue01@tsinghua.org.cn.

* 责任作者,胡洪营(1963-),男,山东菏泽人,教授,博士,博士生导师,主要从事环境微生物学与环境生物技术、污水再生利用水质安全评价与保障技术研究,hyhu@tsinghua.edu.cn

多研究表明,水生植物、陆生植物以及某些大型藻类均具有抑制藻类生长的作用^[7-11]. 笔者在前期研究中发现桔皮对铜绿微囊藻的生长具有较强的抑制作用,在此主要研究桔皮水提液对铜绿微囊藻生长的影响,并初步分析其抑藻机理.

1 材料和方法

1.1 材料

铜绿微囊藻由武汉水生生物研究所淡水藻种库提供,编号为 315.

桔皮由市场购得.

1.2 铜绿微囊藻培养基组分

铜绿微囊藻的培养采用 BG11 培养基,配方见文献[11-12].

1.3 试验方法

桔皮水提液的准备:参考 Hisashi Kato-Noguchi 提取方法^[13],自来水冲洗桔皮表面灰尘,将桔皮切成小块,冷冻干燥机干燥. 按照桔皮(干质量,全文同)/去离子水为 0.05 kg/L 的比例,用去离子水在 4 °C 黑暗中浸提 4 d. 普通定性滤纸过滤除去大块桔皮残渣得粗提液,将其计为 A;依次用孔径为 0.45 和 0.22 μm 的滤膜过滤除去细小残渣和纤维,获得更精细的过滤桔皮水提液,将其分别计为 B 和 C;取部分 0.45 μm 滤膜过滤桔皮水提液 121 °C 下灭菌 30 min,得到高温灭菌桔皮水提液,将其计为 D. 所得水提液经 0.45 μm 滤膜过滤后,可溶性有机碳(DOC)质量浓度 $\rho(\text{DOC})$ 约为 12 500 mg/L;经 121 °C 高温处理 30 min 后, $\rho(\text{DOC})$ 约为 10 500 mg/L, $\rho(\text{DOC})$ 较高.

生长抑制试验:试验前采用 BG11 培养基,将铜绿微囊藻预培养 9~10 d,使之处于对数增长期,作为接种藻种. 在无菌条件下将一定体积的桔皮水提液、藻种(5 mL)置于 500 mL 锥形瓶内,加入培养液使培养体系的总体积为 200 mL,初始藻密度为 $10^5 \sim 10^6 \text{ mL}^{-1}$. 人工气候箱中的培养条件为:光暗比 14 h :10 h,温度 25 °C,相对湿度 75 %,光照强度 40~60 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$. 用血球计数板在显微镜(10 $\times$ 40 倍)下统计藻密度.

1.4 数据处理

桔皮水提液对藻类生长的抑制率(Inhibition Ratio)公式为:

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

式中,IR 为抑制率;N 为加入桔皮水提液组藻密度;N₀ 为对照组藻密度.

2 试验结果

2.1 4 种桔皮水提液对铜绿微囊藻生长的影响

试验研究桔皮粗提液(A),0.45 μm 滤膜过滤水提液(B),0.22 μm 滤膜过滤水提液(C)和 121 °C 高温灭菌水提液(D)对铜绿微囊藻生长的影响,4 种预处理的桔皮水提液的投加质量浓度均为 1.0 g/L,结果如图 1,2 所示. 从图 1 可以看出,对照组中铜绿微囊藻密度迅速上升,18 d 时铜绿微囊藻密度增长了近 30 倍;试验组中,4 种预处理的桔皮水提液(质量浓度为 1.0 g/L)对铜绿微囊藻的生长均表现出较强的抑制作用,各试验组中铜绿微囊藻密度变化幅度很小,呈逐步下降的趋势. 从图 2 可以看出,各试验组中铜绿微囊藻生长的抑制率随培养时间的延长而增大,培养 18 d 时各组中的抑制率均在 95 % 左右. 考虑到试验计数误差等原因,可认为 4 种预处理的桔皮水提液对铜绿微囊藻生长的抑制效果相似. 因此可以推测,桔皮水提液中可能含有某种物质能抑制铜绿微囊藻的生长.

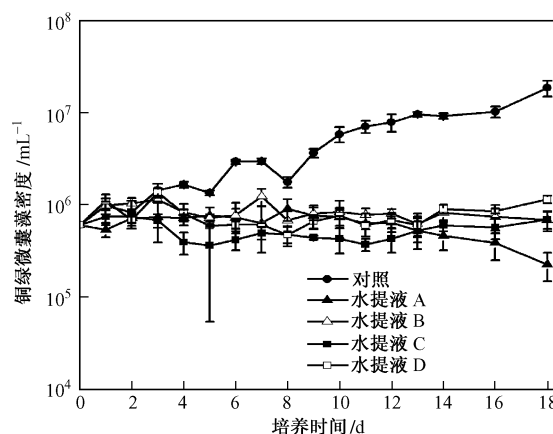


图 1 铜绿微囊藻在 4 种桔皮水提液作用下的生长曲线

Fig. 1 The growth curves of *M. aeruginosa* with four pretreated Citrus peel extracts

2.2 不同质量浓度桔皮水提液对铜绿微囊藻生长的影响

以水提液 B 和 D 为代表,研究了桔皮水提液投加质量浓度对培养 10 d 后的铜绿微囊藻生长抑制的影响,结果如图 3 所示. 图 3 表明,随着桔皮水提液投加质量浓度的增加,水提液 B 和 D 对铜绿微囊藻生长的抑制率均有增大的趋势. 当 2 种预处理的桔皮水提液的投加质量浓度在 1.0 g/L 以上时,培养 10 d 后,对铜绿微囊藻生长的抑制率均在 90 % 以上;而当桔皮水提液的投加质量浓度低于 1.0 g/L 时,0.45 μm 滤膜过滤液(B)对铜绿微囊藻生长的抑

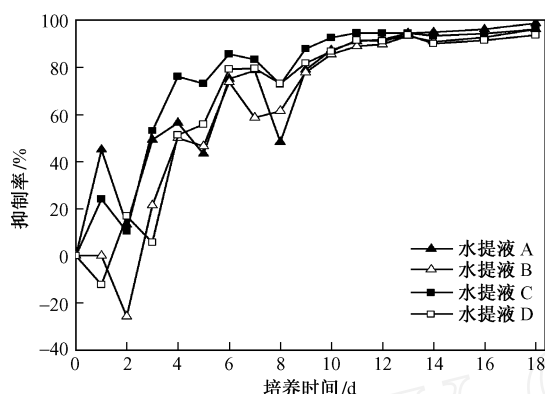


图2 4种桔皮水提液对铜绿微囊藻生长的抑制率

Fig. 2 Inhibit ratios of four pretreated Citrus peel extracts on the algal growth of *M. aeruginosa*

制效果要优于高温灭菌水提液(D);当桔皮水提液的投加质量浓度从0.1 g/L上升到1.0 g/L时,抑藻效果出现显著增加,培养10 d后的抑制率从20%上升到90%以上,培养液的颜色也随着桔皮水提液投加质量浓度的升高而变深,桔黄色更深,培养液更浑浊,抑藻效果更为明显(见图4)。

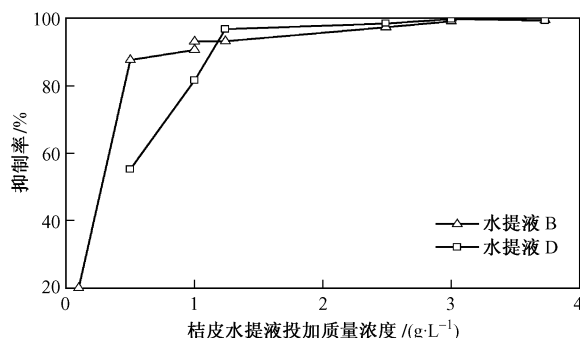
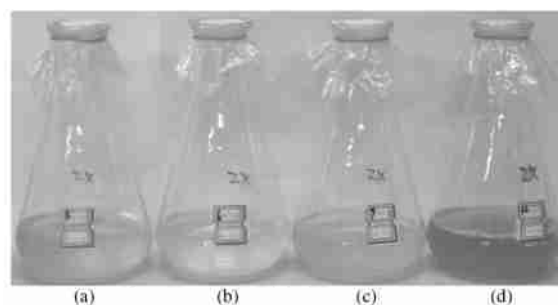


图3 不同质量浓度桔皮水提液B和D对培养10 d后的铜绿微囊藻生长的抑制率

Fig. 3 Inhibit ratios of Citrus peel extracts on the algal growth of *M. aeruginosa* for 10 days

试验中观察到,在投加桔皮水提液的试验组中,培养液均较浑浊,且有絮体形成。在只加入桔皮水提液、未加铜绿微囊藻的对照瓶中也观察到黄色絮体的形成,推测絮体是桔皮水提液中的有机物(如果胶体、糖类等)絮凝形成的。培养初期,投加各质量浓度桔皮水提液的试验组中,铜绿微囊藻的生长均受到抑制,随着培养时间的延长,抑制率出现差异。

在投加低质量浓度桔皮水提液(0.5 g/L)的培养液中,对铜绿微囊藻生长的抑制率下降,絮体上逐渐吸附铜绿微囊藻细胞,使得絮体由白黄色变为绿色



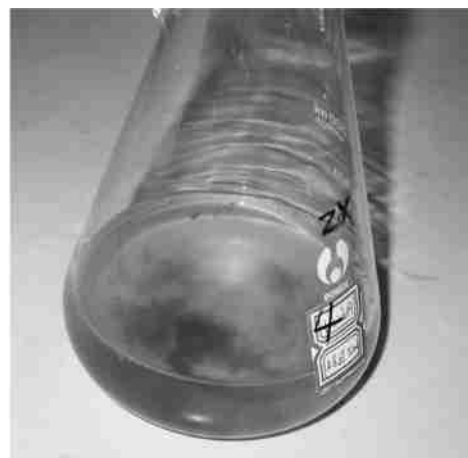
桔皮水提液投加质量浓度/(g·L⁻¹):

a—对照; b—0.5; c—1.0; d—3.0

图4 培养10 d后铜绿微囊藻培养液的表现变化

Fig. 4 Apparent changes of *M. aeruginosa* medium after 10 days culture

(见图5,6);而投加高质量浓度(大于1.0 g/L)桔皮水提液的培养液中,絮体一直保持桔黄色。推测桔皮水提液中的抑制活性组分易于降解,桔皮水提液的投加质量浓度较低时,抑藻活性组分在短时间被降解,使其失去抑藻作用,铜绿微囊藻重新生长,从而被培养液中的有机絮体吸附,出现如图5所示的绿色沉淀;而当桔皮水提液投加质量浓度较高时,经过一段时间的降解后,抑藻活性组分的浓度仍可抑制铜绿微囊藻的生长。以上试验结果进一步验证了桔皮水提液中可能含有某种或某些化学物质,能抑制铜绿微囊藻的生长,且该抑藻活性物质经121 °C高温处理30 min后,仍保持着较强的抑藻活性。



注:培养时间为20 d

图5 低质量浓度桔皮水提液的培养液中形成的绿色絮体

Fig. 5 The green floc formed with the low concentration of Citrus peel extract

2.3 桔皮水提液对长期培养铜绿微囊藻生长状况的影响

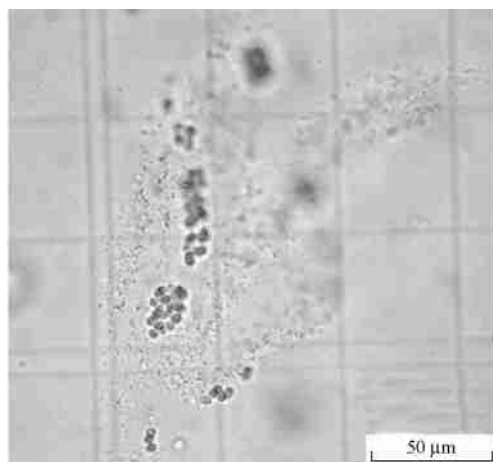
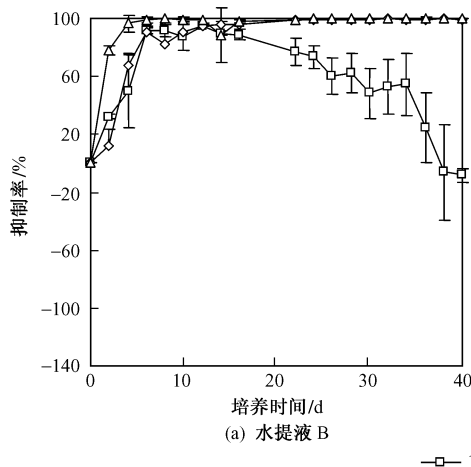


图 6 絮体中的铜绿微囊藻(显微镜照片)

Fig. 6 The algae cells in the floc
(Microscopy picture)

2.2 节的试验结果表明,当桔皮水提液投加质



桔皮水提液投加质量浓度/(g L⁻¹): 1—0.5; 2—1.0; 3—3.0

图 7 不同桔皮水提液 B 和 D 对长期培养的铜绿微囊藻生长的抑制率

Fig. 7 Inhibit ratios of Citrus peel extracts on the algal growth of *M. aeruginosa* for long time cultivation

培养 20 d 后,对铜绿微囊藻生长的抑制率开始下降,40 d 后基本无抑制效果,而 B - 1.0 g/L 和 B - 3.0 g/L 组能在 40 d 的培养过程中保持接近于 100 % 的抑制效果。

综上,桔皮水提液中的抑藻活性物质在培养液中易于降解,长期培养后会逐步丧失对铜绿微囊藻生长的抑制作用。桔皮水提液经 0.45 μm 滤膜过滤处理比高温灭菌处理对铜绿微囊藻的生长具有更强、更持久的抑制效果,推测这种现象可能是由于高温处理使某些抑藻活性物质更易于降解。

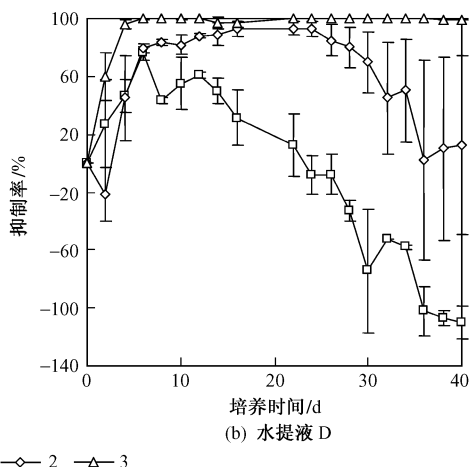
2.4 桔皮水提液中抑藻活性组分初步分离

为鉴定桔皮水提液中的抑藻活性组分,将桔皮水提液用透析袋(MWCO3500)进行初步分离,透析

量浓度在 1.0 g/L 以上,短期(10 d)培养时,能较好地抑制铜绿微囊藻的生长。

图 7 给出了不同质量浓度的桔皮水提液 B 和 D 对长期培养的铜绿微囊藻生长的抑制率。从图 7 可以看出,开始培养的 10 d 内,各试验组中对铜绿微囊藻生长的抑制率均上升到 90 % 以上,且抑制率随桔皮水提液投加质量浓度的升高而增大。投加质量浓度为 0.5 g/L 的桔皮水提液 D 的试验组(即 D - 0.5 g/L 组),10 d 后的抑藻效果明显降低,培养 40 d 时,抑制率为 -100 %,对铜绿微囊藻的生长表现为促进作用;D - 1.0 g/L 组也有类似的现象,培养 25 d 后抑制率开始下降,40 d 后基本无抑制效果;而 D - 3.0 g/L 组却一直保持接近于 100 % 的抑制效果。

对于加入水提液 B 的试验组,低质量浓度组的抑制效果相对于 D 组持续时间长,B - 0.5 g/L 组在



袋外物质的分子量小于 3 500,透析袋内物质分子量大于 3 500。经测定透析袋内外水提液 $\rho(\text{DOC})$ 相当,分别用不同质量浓度的透析袋内、外水提液进行抑藻试验,结果如图 8 所示。由图 8 可见,透析袋外物质质量浓度在 0.62 g/L 以上时,对铜绿微囊藻的生长表现出较强的抑制作用,培养 10 d 后的抑制率可达到 85 % 以上。透析袋内物质和低质量浓度的透析袋外物质均无明显的抑制作用,培养后期均出现不同程度的促进作用。因此,桔皮水提液的抑藻组分应该存在于透析袋外,即抑藻活性物质的分子量应小于 3 500。

2.5 桔皮水提液抑藻机理分析

当桔皮水提液投加质量浓度为 1.0 g/L 时,初始

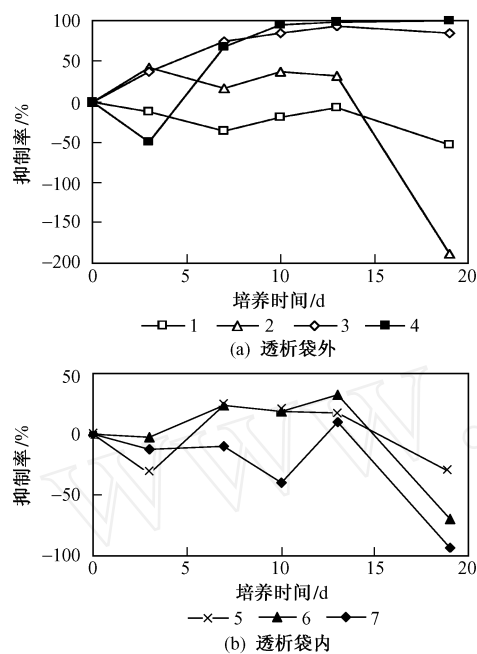


图8 铜绿微囊藻在不同质量浓度透析袋内外桔皮水提液作用下的生长曲线

Fig.8 Growth curves of *M. aeruginosa* with different concentrations of the Citrus peel extracts in and out of the dialyzer

培养液的 $\rho(\text{DOC})$ 可达 200 mg/L. 在培养过程中发现,开始的前 2 天培养液比较清亮,随着培养时间的延长,培养液逐渐变浑浊,且随着桔皮水提液投加质量浓度的增大,溶液的浑浊度和色度均有所增大,染色镜检发现有细菌存在,因试验操作均在超净台中进行,理论上培养液被细菌污染的可能性不大,造成溶液浑浊的可能原因是藻种中的固有细菌,细菌的大量繁殖造成的溶解氧、pH 和营养盐等的变化可能抑制藻类的生长.但实际检测结果表明,因培养液液面较浅,且在培养过程中每日进行摇动, $\rho(\text{DO})$ 一般在 7~9 mg/L,不会影响藻类生长;pH 在 7 左右,也不会明显抑制藻类生长;培养液中 N 和 P 营养盐浓度远远高于藻类生长所需的量,营养盐充足;试验中测定培养液的吸光度均低于对照组,且培养液液面较浅(约 1.3 cm),加入桔皮水提液后,培养液的透光充足,不会影响藻类的生长.将抑制效果良好的培养液离心,上清液高温灭菌冷却后接入铜绿微囊藻藻种,细菌沉淀投入新的 BG11 培养基后接种铜绿微囊藻,培养一段时间后,发现接种细菌沉淀的培养基中铜绿微囊藻生长正常,而原离心上清液中铜绿微囊藻的生长受到明显抑制.以葡萄糖作为碳源,

当培养液的 $\rho(\text{DOC})$ 在 200 mg/L 左右时,也可导致培养液变浑浊,细菌生长,而铜绿微囊藻的生长未受到明显抑制.由此可推测,细菌的存在并没有造成培养液成分等藻类生长条件的改变,并且细菌本身也不是抑制铜绿微囊藻生长的主要原因,而桔皮水提液中的某种或某些小分子有机物可抑制铜绿微囊藻的生长.

随着桔皮水提液投加质量浓度的增大,对铜绿微囊藻生长的抑制效果更为明显,抑藻作用的持续时间也更长,该现象符合浓度-效应响应关系,说明抑藻活性物质较容易降解(光解或者被细菌降解),而活性物质的浓度必须达到一定的阈值才能起到抑制铜绿微囊藻生长的作用.

Fuji-hara 等^[14]研究了柚子皮提取液对 38 种植物种子发芽率的影响,结果表明,柚子皮提取液对多种植物种子的发芽均表现出较强的抑制作用,但不同植物种子发芽所需的半抑制浓度不同.当将柚子皮粉末埋入土中时,也能对某些杂草的生长产生抑制作用;但当用其他柑橘科植物如脐橙、柠檬皮试验时,其抑制效果没有柚子皮明显. Hisashi 等^[13]的研究也发现,柑橘科植物(*Citrus junos*, *C. unshiu* 和 *C. hassaku*)的果皮提取液,对莴苣根和芽的生长有明显抑制作用,并进一步分离得到 abscisic acid- β -D-glucopyranosyl ester (ABA-GE) 是果皮中重要的活性物质之一. 南京大学 CHEN 等^[15]研究了桔皮和矮种香蕉皮对铜绿微囊藻生长的抑制作用,结果表明,桔皮水提液的抑藻效果要显著强于香蕉皮,当桔皮浓度达到 0.1% (相当于 1.0 g/L) 时,能显著抑制藻的生长;当桔皮浓度达到 0.5% (相当于 5.0 g/L) 时,能完全抑制藻生长. 其与该研究所得结果相符,表明柑橘科植物果皮中确实含有某些活性物质,对其他植物、藻类等的生长起到抑制作用,进一步的研究需要对该类活性物质进行分离鉴定.

3 结论

a. 桔皮水提液投加质量浓度大于 1.0 g/L 时,能显著地抑制铜绿微囊藻的生长,且抑制效果随桔皮水提液投加质量浓度的升高而增大.

b. 桔皮水提液经过 4 种预处理(即用普通滤纸过滤的粗提液(A), 0.45 μm 滤膜过滤水提液(B), 0.22 μm 滤膜过滤水提液(C)和 121 $^{\circ}\text{C}$ 高温灭菌水提液(D))后,对其抑藻效果的影响不明显. 推测桔皮水提液中含有某种或某些物质能抑制铜绿微囊藻的生长,这些物质大部分存在于水溶液中,且在 121 $^{\circ}\text{C}$

高温灭菌 30 min 后仍能保持其抑藻活性。

c. 在长期培养试验中,投加低质量浓度桔皮水提液的试验组中,铜绿微囊藻在培养后期生长迅速,有些试验组中的藻密度超过对照组,推测桔皮水提液中的抑藻活性组分易于降解,逐步失去对铜绿微囊藻生长的抑制作用。

d. 透析试验表明,抑藻活性的组分存在于分子量小于 3 500 的组分中。

参考文献(References):

- [1] 金相灿,李兆春,郑朔方,等.铜绿微囊藻生长特性研究[J].环境科学研究,2004,17(增刊):52-54.
- [2] 许海,杨林章,刘兆普.铜绿微囊藻和斜生栅藻生长的氮营养动力学特征[J].环境科学研究,2008,21(1):69-73.
- [3] 周云龙,于明.水华的发生、危害和防治[J].生物学通报,2004,39(6):11-14.
- [4] 赵以军,刘永定.有害藻类及其微生物防治的基础:藻菌关系的研究动态[J].水生生物学报,1996,20(2):173-181.
- [5] 彭超,吴刚,席宇,等.3株溶藻细菌的分离鉴定及其溶藻效应[J].环境科学研究,2003,16(1):37-40.
- [6] 胡洪营,李锋民.植物化感作用控制天然水体中有害藻类的机理与应用[J].给水排水,2004,30(2):1-4.
- [7] Mulderij Gabi, Smolders Alfons J P, Donk Ellen Van. Allelopathic effect of the aquatic macrophyte, *Stratiotes aloides*, on natural phytoplankton[J]. Freshwater Biology, 2006, 51(3):554-561.
- [8] Körner Sabine, Nicklisch Andreas. Allelopathic growth inhibition of selected phytoplankton species by submerged macrophytes [J]. Journal of Phycology, 2002, 38:862-871.
- [9] NAN Chunrong, ZHANG Haizhi, ZHAO Guangqiang. Allelopathic interactions between the macroalga *Ulva pertusa* and eight microalgal species[J]. Journal of Sea Research, 2004, 52:259-268.
- [10] Hisashi Kato-Noguchi. Allelopathic substance in rice root exudates: rediscovery of monilactone B as an allelochemical [J]. Journal of Plant Physiology, 2004, 161:271-276.
- [11] 张薛,胡洪营,门玉洁.大麦秆提取液对铜绿微囊藻生长的影响研究[J].环境科学学报,2007,27(12):1984-1987.
- [12] 胡小贞,马祖友,易文利,等.4种不同培养基下铜绿微囊藻和四尾栅藻生长比较[J].环境科学研究,2004,17(增刊):55-57.
- [13] Hisashi Kato-Noguchi, Tanaka Yukitoshi. Allelopathic potential of *Citrus* fruit peel and abscisic acid-glucose ester [J]. Plant Growth Regulation, 2003, 40(2):117-120.
- [14] Fujihara Shinsuke, Shimizu Tokurou. Growth inhibitory effect of peel extract from *Citrus junos* [J]. Plant Growth Regulation, 2003, 39(3):223-233.
- [15] CHEN Jianzhong, LIU Zhili, REN Guanju, et al. Control of *Microcystis aeruginosa* TH01109 with batangas mandarin skin and dwarf banana peel [J]. Water SA, 2004, 30(2):279-282.

(责任编辑:潘风云)