

芦竹抑藻物质的初步分离及抑制铜绿微囊藻的效果^{*}

洪 喻^{1,2} 胡洪营^{1*} 黄晶晶¹ 迫田章义³ 下桥雅树³ 李锋民⁴

(1 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; 2 北京林业大学环境科学与工程学院, 北京, 100083; 3 东京大学生产技术研究所, 日本东京, 1068558; 4 中国海洋大学环境科学与工程学院, 青岛, 266003)

摘 要 采用乙酸乙酯提取芦竹 (*Arundo donax* Linn.) 得到高效抑藻粗提物, 其对产毒铜绿微囊藻的半效应抑制浓度 (EC_{50}) 为 $50\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. 粗提物经溶剂萃取分离得到中碱性物质及酸性物质. 活性分析表明, 酸性物质有显著抑制铜绿微囊藻的活性. 通过酸性氧化铝柱层析进一步分离酸性物质, 得到三组弱极性抑藻物质及一组强极性抑藻物质. 培养 3 d 后, 四组抑藻物质在 $10\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时的抑藻率分别为 82%, 83%, 100% 以及 70%.

关键词 芦竹, 铜绿微囊藻, 萃取.

自 20 世纪 90 年代开始, 水生植物化感抑藻的研究备受关注^[1]. 许多水生植物能够产生化感物质抑制藻类的生长, 如芦苇 (*Phragmites communis*)^[2]、穗花狐尾藻 (*Myriophyllum spicatum*)^[3]、凤眼莲 (*Eichhornia crassipes*)^[4]、金鱼藻 (*Ceratophyllum demersum*)^[5] 等. 挺水植物生物量大, 其次生代谢物质更加丰富, 寻找分泌高抑藻活性的挺水植物, 通过投放干植物体或者分离其中的抑藻化感物质, 具有良好的应用前景. 芦竹提取物能够有效的抑制铜绿微囊藻生长^[6].

本文报道了从芦竹 (*Arundo donax* Linn.) 中提取化感物质的方法, 分析了可能的化感物质类型及对藻细胞生长特性的影响.

1 实验部分

1.1 芦竹抑藻的分离

大型挺水植物芦竹采自中国山东省西南部南四湖流域, 采集时间为 3 月中旬, 植株处于发芽生长期, 采集植株地上部分. 采集后于 60°C 干燥 48 h, 备用. 实验所用铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 由中国科学院水生生物研究所淡水藻种库提供. 实验前采用 BG11 培养基^[7]预培养铜绿微囊藻, 使之处于对数增长期.

称取 1.5 kg 干芦竹植株 (粉碎至 50 目), 加入 15 L 乙酸乙酯常温超声波提取 2 h. 提取结束后, 用滤纸滤去提取液中的残渣, 并通过 $0.22\mu\text{m}$ 有机系滤膜除去颗粒物的干扰, 然后通过旋转蒸发 ($100\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 65°C) 除去溶剂, 得到浸膏, 称重, 于一定量二甲基亚砜 (DMSO) 中定容. 浓缩液在无菌条件下, 通过 $0.22\mu\text{m}$ 无菌有机系滤膜除去微生物, 于 4°C 冰箱备用.

取 2 g 乙酸乙酯粗提物溶于 200 mL 乙醚, 用 180mLNaOH ($2\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 萃取. 静置分层得到有机相及水相; 将上层有机相 pH 值调至中性, 用无水硫酸钠脱水, 然后蒸干称重, 于一定量 DMSO 中定容, 得到中碱性组分, 用于抑藻活性测试. 下层水相用 300 mL 乙酸乙酯萃取. 静置分层得到水相和有机相. 有机相 pH 值调至中性, 用无水硫酸钠脱水, 然后蒸干称重, 于一定量 DMSO 中定容, 得到酸性组分, 用于抑藻活性测试^[7].

采用 $\Phi = 16\text{mm}$, $h = 300\text{mm}$ 层析柱, 以 40 g 酸性氧化铝 (100—200 目) 干法装柱. 取 25 mg 上样, 设置一定梯度的洗脱剂洗脱, 洗脱体积 20 mL. 溶剂及比例 (1 L/体积): W1 石油醚-乙酸乙酯 (100: 0), W2 石油醚-乙酸乙酯 (70: 30), W3 石油醚-乙酸乙酯 (50: 50), W4 石油醚-乙酸乙酯 (30: 70), W5 石

2007 年 12 月 26 日收稿.

* NSFC/JST 国际合作项目 (No 50721140017); 科技支撑项目 (No 2006BAC10B03); 杰出青年基金 (No 50825801).

* * 通讯联系人, E-mail: hyhu@tsinghua.edu.cn

油醚-乙酸乙酯 (0: 100), W6 乙酸乙酯-丙酮 (30: 70), W7 乙酸乙酯-丙酮 (0: 100), W8 丙酮-水 (30: 70), W9 丙酮-水 (0: 100), W10 水-甲醇 (30: 70), W11 水-甲醇 (0: 100); 蒸干, 称重, 并定容于 DMSO 中, 用于抑藻活性检测.

1.2 抑藻活性检测

通过摇瓶实验对芦竹化感物质进行抑藻活性检测. 培养混合液总体积 20ml 其中包括处于对数生长期的藻种液、一定量的培养液 (121℃ 灭菌 30min) 及芦竹化感物质. 芦竹化感物质设置一定浓度梯度, 每个浓度设三个平行样. 将上述培养混合液置于温度 25℃, 相对湿度 75%, 光照强度 40–60μmol photons•m⁻²•s⁻¹, 光暗时间比 14h: 10h 的人工气候箱中培养.

采用显微镜计数法, 每天在显微镜下用血球计数板进行计数, 测定藻密度. 采用测微物尺和测微目镜测定藻细胞大小.

根据藻密度计算芦竹化感物质对铜绿微囊藻的相对抑制率:

R (%) = (1 - N / N₀) × 100

式中, R 为相对抑制率, N 为加入化感物质的藻密度 (个•mL⁻¹), N₀ 为对照组藻密度 (个•mL⁻¹).

EC₅₀ 的计算采用概率单位法拟合^[2]. 使用 Origin7.0 软件对数据进行处理. 剂量效应采用 t 检验进行分析评价. 所有实验均至少重复三次. 数据由平均值 ± 方差表示. 显著性分析采用 99% 组间差异置信区间量化的差异表示显著性, 区间包含零表示不显著, 反之显著, 区间距零愈远愈显著.

2 结果与讨论

2.1 芦竹乙酸乙酯提取物对铜绿微囊藻生长特性的影响

Della Greca 等人利用乙酸乙酯常温下提取马蹄莲 (*Zantedeschia aethiopica*)^[8]、灯心草 (*Juncus acutus*)^[9]、浮叶眼子菜 (*Potamogeton natans*)^[10] 的效率分别为 0.22%, 3.3% 和 0.61%, 其中提取灯心草的时间长达 10d. D'Abusca 等人在常温下利用乙酸乙酯提取水葱 (*Schoenoplectus lacustris*)^[11] 的效率为 0.14%, 提取时间为 8d. 由此可见, 乙酸乙酯提取芦竹干植物体的效率较高, 结合超声波辅助提取可在 2h 内获得较多浸出物.

图 1 为投加乙酸乙酯提取物后铜绿微囊藻的生长曲线. 由图 1 可以看出, 乙酸乙酯提取物对铜绿微囊藻生长具有强烈的抑藻效果. 高浓度组在培养 2d 后抑制率达到将近 100%, 其中藻细胞稀少, 后续藻细胞生长无恢复. 乙酸乙酯提取物 EC₅₀ 值为 50mg•L⁻¹.

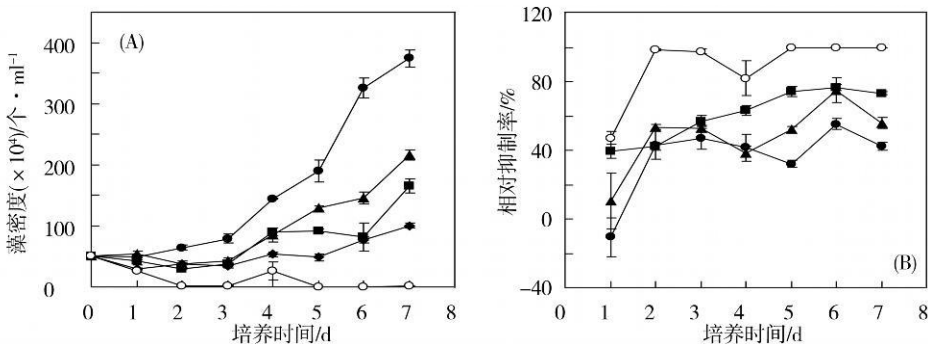


图 1 投加芦竹乙酸乙酯提取物后铜绿微囊藻的生长曲线及抑制率曲线 (n = 3)

(A) 乙酸乙酯提取物浓度(mg•L⁻¹): —●— 0 —▲— 50 —■— 100 —◆— 250 —○— 500

(B) 乙酸乙酯提取物浓度(mg•L⁻¹): —●— 50 —▲— 100 —■— 250 —○— 500

Fig. 1 The growth and inhibition ratio curves of *M. aeruginosa* with the addition of the extract of *A. donax* with ethyl acetate (n = 3)

2.2 芦竹乙酸乙酯提取物的萃取分离组分对铜绿微囊藻生长特性的影响

根据物质酸碱性的差异, 将乙酸乙酯提取物通过溶剂萃取分离得到中 碱性组分及酸性组分. 图

2为分别投加两组分后铜绿微囊藻的生长曲线及抑制率曲线. 由图 2可以看出, 两种组分对藻细胞的生长均有一定抑制作用. 中 碱性组分对藻生长的抑制效果低于酸性组分. 酸性组分仅 $10\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 时对铜绿微囊藻的生长产生显著的抑制作用.

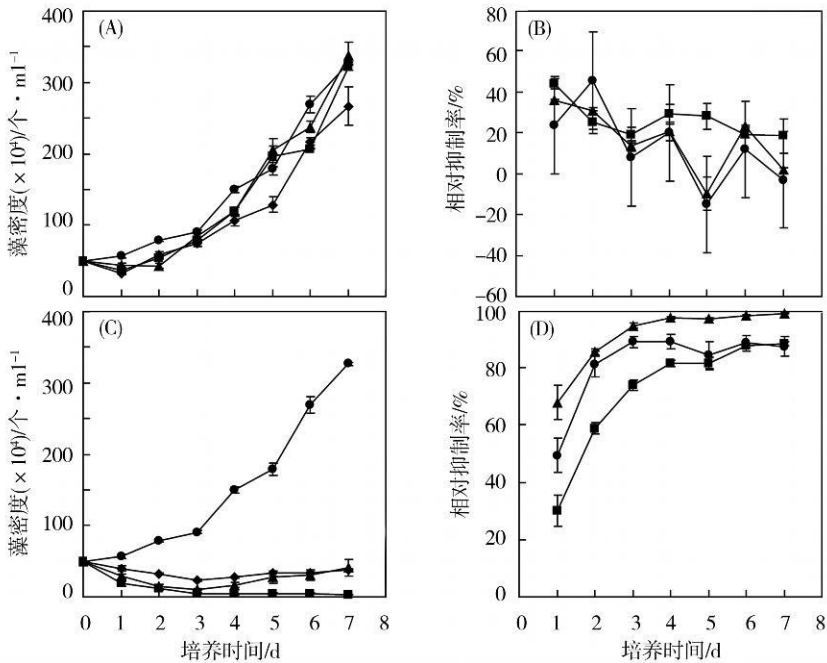


图 2 投加中 /碱性组分及酸性组分后铜绿微囊藻的生长曲线及抑制率曲线 ($n = 3$)
(A) 乙酸乙酯提取物中碱性组分浓度, (C) 乙酸乙酯提取物酸性组分浓度 ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$); $\bullet$ 0 $\blacktriangle$ 10 $\blacksquare$ 50 $\blacklozenge$ 150
(B) 乙酸乙酯提取物中碱性组分浓度, (D) 乙酸乙酯提取物酸性组分浓度 ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$); $\bullet$ 0 $\blacktriangle$ 10 $\blacksquare$ 50

Fig 2 The growth curves and inhibition ratio curves of *M. aeruginosa* with the addition of the neutral fraction and acidic fraction

Nakai等人从穗花狐尾藻 (*M. spicatum*) 浸提液中分离得到了多种酸性抑藻物质, 包括焦枞酸和没食子酸和 (+)-儿茶素在内的酚酸类物质^[12], 以及正壬酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸和油酸在内的脂肪酸类物质^[13]. Della Greca等人分离浮叶眼子菜 (*P. natans*) 乙酸乙酯提取物时发现存在二萜呋喃类抑藻物质^[10]. 戴树桂等人研究宽叶香蒲 (*Typha latifolia*)、窄叶香蒲 (*T. minima*) 和长苞香蒲 (*T. angustata*) 的花粉混合物时发现, 乙酸乙酯、丙酮以及乙醚提取物对斜生栅藻 (*Scenedesmus obliquus*)、小球藻 (*Chlorella* sp.) 有良好的抑制效果, 以乙酸乙酯提取物效果最佳, 其抑藻效果与硫酸铜相当, 化感物质为棕榈酸、胆固醇和油酸酯等^[14]. 因此, 酸性组分中潜在的各种酚酸类、脂肪酸类、酯类和萜类等物质具有抑藻潜力. 本文发现芦竹乙酸乙酯提取物中, 仅酸性组分抑藻效果强烈, 此研究结果与上述报道基本一致.

从酸性组分各浓度梯度抑藻效果的差异可以看出, $10\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 及 $150\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 时, 其抑藻效果均低于 $50\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$, 因此, 推断酸性组分中除存在抑藻物质外, 仍可能存在其它促进藻生长的物质, 其中的抑藻物质仍需进一步分离纯化.

2.3 酸性组分的酸性氧化铝柱层析组分对铜绿微囊藻生长特性的影响

酸性组分经酸性氧化铝柱层析得到 11 个组分, 各组分均以 $10\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 的浓度用于抑藻活性检测. 图 3 为投加酸性氧化铝柱层析分离组分后铜绿微囊藻的生长及抑制率曲线. 由图 3 可以看出, 组分 4 对藻生长基本无影响, 组分 6 8 10 和 11 对藻细胞生长具有一定的促进作用, 仅组分 1—3 5 7 和 9 有一定抑藻活性, 其中组分 1—3 及组分 9 的抑藻率分别为 82%, 83%, 100% 以及 70%. 由酸性氧化铝柱层析结果推断, 芦竹的酸性组分中同时存在极性较弱以及极性较强的抑藻化感物质, 其中组分 2 和组分 3 在 $10\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 的浓度下对藻细胞的抑制即可达到 100%. 上述四个强抑藻组分中的化感物质仍有待进一步的分析鉴定, 以确定物质结构及活性.

对已报道的具有抑藻活性的水生植物的种类和数量进行分析，发现抑藻水生植物中浮水以及沉水植物约占 68%，而挺水植物仅占 32% 左右。虽然挺水植物的研究相对较少，但是已有的研究表明，从挺水植物中发现的 β 细心醚 (石菖蒲 *Acorus gramineus*)^[15]、四氢茈 (灯心草 *J. effusus*)^[16]、新木质素类 (马蹄莲 *Z. aethiopica*)^[8]、EMA (芦苇 *P. communis*)^[4] 等化感物质均具有强烈的抑藻活性，在已发现的抑藻化感物质中属于活性较强的一类。因此，挺水植物具有发现强抑藻化感物质的极大潜力。芦竹与其他挺水植物相比具有更大生物量、更强的环境适应性和更好耐受性，芦竹水浸提液可显著抑制产毒铜绿微囊藻的生长，而对羊角月牙藻、斜生栅藻、蛋白核小球藻无明显的抑制作用^[6]。本文研究发现，芦竹提取物酸性组分中包含多组高效抑藻物质，这些抑藻物质属于芦竹自身合成的化学物质，其性质符合易降解、效应浓度低等特点，因此，它们有成为良好的生物源控藻剂的应用潜力。

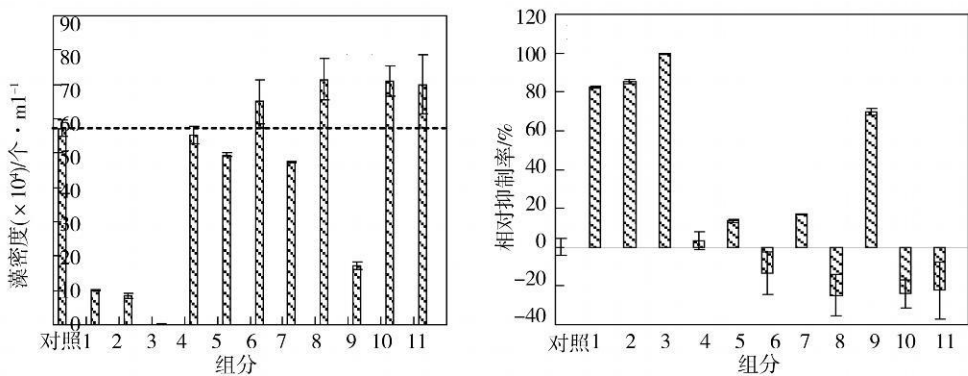


图 3 酸性组分组合酸性氧化铝柱层析的组分对铜绿微囊藻生长的影响 (n = 3)
(投加浓度 10 mg $\cdot$ L⁻¹, 3d)

Fig 3 The growth and inhibition ratio curves of *M. aeruginosa* with the addition of the acidic- alumina chromatography fractions of the acidic fraction (n = 3)

3 结论

- (1) 芦竹乙酸乙酯提取物对铜绿微囊藻有显著的抑制效果，其半效应浓度 (EC_{50 6d}) 值为 50mg $\cdot$ L⁻¹。
- (2) 通过溶剂萃取法将乙酸乙酯提取物分离为中 碱性物质及酸性物质，发现仅酸性物质在 10mg $\cdot$ L⁻¹ 有强烈的抑藻活性。酸性物质经过酸性氧化铝层析柱分离得到四组高效抑藻组分，其抑藻率分别为 82%，83%，100% 以及 70%。另外，芦竹酸性组分中同时含有弱极性及强极性抑藻物质。

参 考 文 献

[1] Vyvyan J R, Allelochemicals as Leads for New Herbicides and Agrochemicals [J] . *Tetrahedron*, 2002 **58** 1631—1646

[2] Li F M, Hu H Y, Isolation and Characterization of a Novel Antialgal Allelochemical from *Phragmites communis* [J] . *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, **71**: 6545—6553

[3] Nakai S, Yamada S, Hosomi M, Anticyanobacterial Fatty Acids Released from *Myriophyllum spicatum* [J] . *Hydrobiologia*, 2005 **543** 71—78

[4] Jin Z H, Zhuang Y Y, Dai S G et al, Isolation and identification of Extracts of *Eidhomia crassipes* and Their Allelopathic Effects on Rlgae [J] . *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2003 **71**: 1048—1052

[5] Gross E M, Erhard D, Ivanyi E, Allelopathic Activity of *Ceratophyllum demersum* L. and *Najas marina* sp. Internodia (Wolfgang) Casper [J] . *Hydrobiologia*, 2003, **506** 583—589

[6] Hong Y, Hu H Y, Effects of the Aquatic Extract of *Aruno donax* L. (Giant Reed) on the Growth of Freshwater Algae [J] . *Allelopathy Journal*, 2007, **20** (2) : 315—325

[7] Della Greca M, Isidori M, Lavarogni M et al, Bioactivity of Phenanthrenes from *Juncus acutus* on *Selenastrum capricornutum* [J] . *Journal of Chemical Ecology*, 2004 **30**: 867—879

[8] Della Greca M, Ferrara M, Fiorentino A et al, Antialgal Compounds from *Zantedeschia aethiopica* [J] . *Phytochemistry*, 1998 **49**

(5) : 1299—1304

[9] Della Greca M, Isidori M, Lavorgna M et al, Bioactivity of Phenanthrenes from *Junas acutus* on *Selenastrum capricornutum* [J] . *Journal of Chemical Ecology*, 2004, **30** (4) : 867—879

[10] Della Greca M, Fiorentino A, Isidori M et al, Antialgal Furan-Diterpenes from *Potamogeton natans* L [J] . *Phytochemistry*, 2001, **58** (2) : 299—304

[11] D'Ambrosia B, Della Greca M, Fiorentino A et al, Chemical Constituents of the Aquatic Plant *Schoenoplectus lacustris*: Evaluation of Phytoxic Effects on the Green Alga *Selenastrum capricornutum* [J] . *Journal of Chemical Ecology*, 2006, **32** (1) : 81—96

[12] Nakai S, Inoue Y, Hosomi M et al, Myriophyllum Spicatum-Released Allelopathic Polyphenols Inhibiting Growth of Blue-Green Algae *Microcystis aeruginosa* [J] . *Water Research*, 2000, **34** (11) : 3026—3032

[13] Nakai S, Yamada S, Hosomi M, Anti-Cyanobacterial Fatty Acids Released from *Myriophyllum spicatum* [J] . *Hydrobiologia*, 2005, **543** : 71—78

[14] 戴树桂, 赵凡, 金朝晖等, 香蒲植物提取物的抑藻作用及其分离鉴定 [J] . 环境化学, 1997, **16** (3) : 268—271

[15] Della Greca M, Monaco P, Previtera L et al, Allelochemical Activity of Phenylpropanes from *Acorus gramineus* [J] . *Phytochemistry*, 1989, **28** (9) : 2319—2321

[16] Della Greca M, Fiorentino A, Monaco P et al, Synthesis and Antialgal Activity of Dihydrophenanthrenes and Phenanthrenes: Biomimetics of Naturally occurring Compounds in *Junas effuses* [J] . *Journal of Chemical Ecology*, 2001, **27** (2) : 257—271

PRELIMINARY ISOLATION OF INHIBITORY ALLELOCHEMICALS
IN THE MACROPHYTES, *ARUNDO DONAX* LINN. AND EFFECTS
ON CYANOBACTERIUM *MICROCYSTIS AERUGINOSA*

HONG Yu^{1,2} HUH ong-yin¹ HUANG Jin-jin¹ SAKODA Akiyoshi³
SAGEHASHI Masaki³ LI Feng-min⁴

(1) Environmental Simulation and Pollution Control State Key Joint Laboratory, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China

2) College of Environmental Science and Engineering, Beijing Forestry University, Beijing 10003, China

3) Institute of Industrial Science, University of Tokyo, Tokyo 1068558, Japan

4) Institute of Environmental Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China

ABSTRACT

The highly effective inhibitory allelochemicals of *Arundo donax* Linn. were extracted by ethyl acetate, of which 50% effective concentration (EC₅₀₋₆₀) on toxic alga *Microcystis aeruginosa* was 50mg•L⁻¹. By solvent extraction, the extract was fractionized into neutral and acidic fractions. Only the acidic fraction had strong inhibitory activity on *M. aeruginosa*. Further purification of the acidic fraction with acidic-alumina column chromatography revealed that the fraction contained three low-polarity and one high-polarity sub-fractions, of which the inhibition ratio was 82%, 83%, 100% and 70%, respectively. *Arundo donax* Linn., *Microcystis aeruginosa*, extraction

Keywords *Arundo donax* Linn., *Microcystis aeruginosa*, extraction