

马来眼子菜体内抑藻物质分离及常见脂肪酸抑藻效应*

胡陈艳^{1,2}, 葛芳杰^{1,2}, 张胜花³, 刘碧云¹, 王 静^{1,2}, 高云霓^{1,2}, 吴振斌^{1**}

(1:中国科学院水生生物研究所淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072)

(2:中国科学院研究生院, 北京 100049)

(3:云南大学环境与湖泊研究院, 昆明 650091)

摘要:提取马来眼子菜植物体内的抑藻物质, 分离得到一活性组分, 气质联用(GC-MS)鉴定其主要为脂肪酸类物质, 抑制羊角月牙藻的半效应浓度(EC_{50,3d})为7.90mg/L. 测定组分中含有的8种脂肪酸与油酸单独及联合作用对羊角月牙藻的抑藻效果, 结果证实脂肪酸类物质具有化感抑藻效应, 其抑藻效果与其碳链长度及其不饱和度有关, 碳链越短其抑藻活性越高, 不饱和脂肪酸的抑藻效应大于同碳链饱和脂肪酸, 多种脂肪酸联合作用时具有协同作用. 分离过程中也得到另一甾醇组分, 其对羊角月牙藻没有明显抑制作用, 且对脂肪酸类物质的抑藻效果没有影响.

关键词:马来眼子菜; 羊角月牙藻; 脂肪酸; 化感作用

Isolation of anti-algal compounds from *Potamogeton malaianus* and algal inhibitory effects of common fatty acids

HU Chenyan^{1,2}, GE Fangjie^{1,2}, ZHANG Shenghua³, LIU Biyun¹, WANG Jing^{1,2}, GAO Yunni^{1,2} & WU Zhenbin¹

(1: State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, P. R. China)

(2: Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, P. R. China)

(3: Institute of Environment and Lakes, Yunnan University, Kunming 650091, P. R. China)

Abstract: One active fraction, which mainly contained many kinds of fatty acids, was extracted and isolated from the submerged macrophyte *Potamogeton malaianus*, then was analyzed by the GC-MS. The EC_{50,3d} fraction on *Selenastrum capricornutum* was 7.90mg/L. The inhibition of eight fatty acids in the fraction and oleic acid on *S. capricornutum* confirmed that fatty acids had the allelopathic inhibitory effect and the effect was relevant to the carbon chain and unsaturated linkages, which meant the shorter the carbon chain of the fatty acid, the stronger the algal growth was inhibited, and the more unsaturated linkages in the fatty acid, the stronger the algal growth was inhibited. The combined activity of multi-fatty acids showed synergistic growth inhibition on *S. capricornutum*. Another fraction, which mainly consisted of sterols, was isolated from the extraction of *P. malaianus*, but it did not inhibit the growth of *S. capricornutum* and had no evident influence on the allelopathic inhibition of fatty acids on *S. capricornutum*.

Keywords: *Potamogeton malaianus*; *Selenastrum capricornutum*; fatty acids; allelopathy

沉水植物是水生态系统中主要的初级生产者, 研究发现沉水植物释放化感物质是其保持水体清澈的主要机制之一, 并已从某些沉水植物中分离鉴定出一些化感抑藻物质. 例如 Nakai 等^[1]发现穗花狐尾藻能分泌鞣花酸、焦枞酸、没食子酸、(+)-儿茶素等酚酸类化感物质抑制铜绿微囊藻的生长; 王立新等^[2]发现黑藻养殖水及其乙醚提取物能显著抑制微囊藻生长, 对黑藻养殖水的乙醚提取物进行 GC-MS 分析, 鉴定其含有邻苯二甲酸二异辛酯、邻苯二甲酸二丁酯、邻苯二甲酸丁酯 2-甲基丙酯等. 化感物质是水生植物生长过程中产

* 国家自然科学基金项目(30870221, 50808172, 20877093)、国家“十一五”水专项项目(2009ZX07106-002-004)和中国博士后科学基金项目(20080431013)联合资助. 2009-09-25 收稿; 2009-11-19 收修改稿. 胡陈艳, 女, 1983年生, 硕士研究生; E-mail: huchenyan1984@126.com.

** 通讯作者; E-mail: wuzb@ihb.ac.cn.

生的次生代谢物质,一般能在自然条件下降解,不会在生态系统中长期积累,生态安全性好^[3].因此利用水生植物对浮游藻类的化感作用或分离出来的抑藻物质控制藻类水华将是一种经济、生态安全的方法,近年来该方面的相关研究已成为热点.

马来眼子菜(*Potamogeton malaianus*),是长江中下游浅水湖泊常见沉水植物优势种之一,耐污、适应性强^[4].迄今为止国际上已经从微齿眼子菜(*Potamogeton maackianus*)^[5]、萼齿眼子菜(*Potamogeton pectinatus*)^[6-7]、浮叶眼子菜(*Potamogeton natans*)^[8-9]、光叶眼子菜(*Potamogeton lucens*)、穿叶眼子菜(*Potamogeton pectinatus*)、菹草(*Potamogeton crispus*)^[10-11]等眼子菜科植物体内分离得到生物碱、类黄酮、二萜等有抑藻效应化合物.有关研究显示马来眼子菜也具有化感抑藻效应,其在共培养试验中对不同起始密度的斜生栅藻都有抑制作用^[12];不同处理的马来眼子菜种植水对羊角月牙藻生长具有抑制作用,这种生长抑制与马来眼子菜生物量及种植时间有显著关系^[13].尽管已有的研究结果表明马来眼子菜有化感抑藻作用,但是对其体内主要的抑藻物质类型及作用机制研究很少,因此开展马来眼子菜体内高效抑藻活性物质的提取分离及鉴定,并研究抑藻物质的抑藻效果,对理解马来眼子菜化感作用及利用这种作用开发新型生态型除藻剂具有重要的意义.

1 材料与方法

1.1 实验材料

马来眼子菜(*P. malaianus*)采自湖北黄陂十棵松河,采集时间为2008年6月,室内阴干后粉碎待用.羊角月牙藻(*S. capricornutum*)购自中国科学院水生生物研究所藻种库,采用藻类测试方法推荐的培养基培养.

α -亚麻酸(α -Linolenic acid)、壬酸(Nonanoic acid)、癸酸(Decanoic acid)购自Alfa Asea公司;亚油酸(linoleic acid)、油酸(oleic acid)购自sigma公司;豆蔻酸(Tetradecanoic acid)、月桂酸(Dodecanoic acid)购自BBI公司;硬脂酸(Octadecanoic acid)购自天津科密欧化学试剂公司;棕榈酸(Hexadecanoic acid)购自上海三浦化工;N,O-双(三甲基硅基)三氟乙酰胺(BSTFA)购自sigma公司;二甲亚砜(DMSO)、二氯甲烷为色谱纯,其余试剂为分析纯.

1.2 抑藻物质的提取和分离

粉碎的植物碎末2.4kg加入乙醇浸提,浸提液过滤后,减压蒸干(40℃),得乙醇浸膏约100g.将乙醇浸膏按照Gunatilaka^[14]方法进行适当改动以极性分段,具体步骤见图1.取不同萃取层的浸膏进行抑藻测试,活性最强的萃取层浸膏上硅胶柱层析,石油醚:丙酮(V/V,99:1-0:1)梯度洗脱,收集的馏分薄层层析之后合并,进行抑藻测试,得活性最强馏分.对这一馏分用丙酮进行反复重结晶,得两部分,将其中一部分上凝胶柱Sephadex LH-20分离,溶剂系统为正己烷:氯仿:甲醇=3:1:1,薄层层析合并馏分,得活性最强的组分.

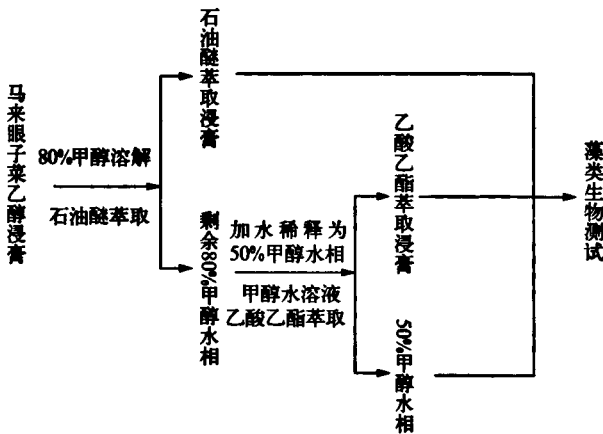


图1 马来眼子菜体内化感组分的初步分离

Fig. 1 The crude isolation of the allelopathic fraction in *P. malaianus*

1.3 衍生化及 GC-MS 分析

取适量样品, N_2 流吹干,加入0.1ml BSTFA, 80℃反应2h, N_2 流吹干,加入二氯甲烷1ml,进GC-MS分析.气质分析采用6890N-5973inert 联用仪(美国安捷伦),色谱柱HP-5, EI离子源,进样口温度250℃,进样量1 μ l,流速1.0ml/min,起始温度60℃,保持2min,以10℃/min升到280℃,保持10min.样品各组分的质谱数据与NIST02标准谱库进行比对,鉴定各组分的物质组成,面积归一法计算各物质相对含量.

1.4 藻类生物测试

本实验采用加拿大环境保护局^[15]推荐的96孔板测定淡水绿藻门羊角月牙藻的生长抑制作为藻类测试的基本方法. 使用加拿大环境保护局推荐的培养基(配方见表1), 取处于对数生长期藻液加入各孔, 使起始藻密度为 10^5 cells/ml, 加入样品, DMSO 助溶(体积分数为 0.3%), 同时设 0.3% DMSO 的对照组, 培养温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 光照强度 3500lux, 连续光照 72h 后, 酶标仪 430nm 检测光密度. 每次加入 0.3mg/L 的硫酸锌作标准参照毒物, 进行方法的校准.

表 1 培养基配方

Tab. 1 The liquid growth medium for algal culture recommended by EPA Canada

| 培养基 | 试剂 | 浓度(mg/L) | 试剂 | 浓度(mg/L) |
|------|---|----------|---|----------|
| 大量元素 | NaNO_3 | 25.5 | $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 14.7 |
| | $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 10.0 | K_2HPO_4 | 1.04 |
| | $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 4.42 | NaHCO_3 | 15.0 |
| 微量元素 | H_3BO_3 | 185.52 | $\text{CuCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0.012 |
| | $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 415.62 | $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 7.26 |
| | ZnCl_2 | 3.28 | $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 160 |
| | $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 1.43 | $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 300 |

根据前期结果, 选取碳链长度分别为 9、10、12、14、16、18 的 6 种饱和脂肪酸, 另外选取了碳链为 18, 不饱和度分别为 1、2、3 的油酸、亚油酸、 α -亚麻酸, 测定这些单一脂肪酸对羊角月牙藻的半抑制效应浓度 (EC_{50}).

在单一脂肪酸抑藻实验的基础上, 设计了 3 组联合实验, 第一组: 9 种脂肪酸的联合; 第二组: 6 种饱和脂肪酸的联合; 第三组: 18 碳的饱和与 3 种不饱和脂肪酸的联合. 这三组联合毒性测试是在测得单一物质 EC_{50} 基础上, 将每组联合中的各种物质按 EC_{50} 比值进行混合, 稀释成系列浓度, 测定各组混合对羊角月牙藻的半抑制效应浓度 (EC_{50}).

联合毒性实验的评价方法使用水生毒理联合效应相加指数法^[16], 根据单一毒性和联合毒性的实验结果, 计算混合物质抑藻活性 (S):

$$S = (A_m/A_1) + (B_m/B_1) + (C_m/C_1) + \dots$$

式中: S 为混合物质抑藻活性, A_1 、 B_1 、 C_1 等为单一物质的 EC_{50} , A_m 、 B_m 、 C_m 等为混合物 EC_{50} 毒性中各毒物的浓度. 当 $S \leq 1$ 时, $AI = 1/S - 1$; $S > 1$ 时, $AI = S(-1) + 1$. $AI > 0$ 时为协同作用, $AI < 0$ 时为拮抗作用, 当 $AI = 0$ 时为相加作用.

1.5 数据处理

根据光密度计算相对抑制率, 公式如下:

$$\text{相对抑制率}(\%) = 100 \times (\text{对照组 OD}_{430\text{nm}} - \text{处理组 OD}_{430\text{nm}}) / \text{对照组 OD}_{430\text{nm}}$$

根据相对抑制率的概率单位与相应的浓度, 用直线回归法得到浓度-效应方程, 计算 EC_{50} , 数据采用 SPSS 13.0 进行分析, 显著性差异采用 One-way ANOVA 分析方法.

2 结果与分析

2.1 提取分离过程中组分的抑藻活性

2.1.1 极性分段所得浸膏活性大小 马来眼子菜乙醇浸膏的甲醇水溶液分别用石油醚和乙酸乙酯萃取后各浸膏的抑藻效果结果表明, 极性最小的石油醚层浸膏抑藻效果最强, 50mg/L 时对羊角月牙藻的生长抑制达到 $59.78\% \pm 5.81\%$; 乙酸乙酯层浸膏的活性次之, 50mg/L 的抑制率为 $38.02\% \pm 4.17\%$; 剩余的 50% 甲醇水

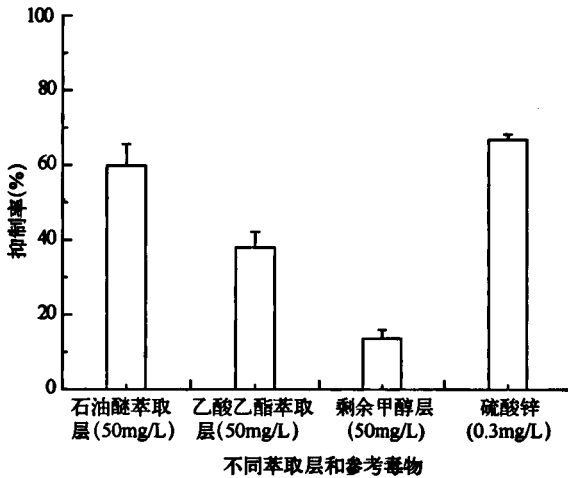


图2 不同萃取层浸膏及参考毒物的抑藻效果

Fig. 2 The antialgal results of different extracts and referent toxicant

层浸膏 50mg/L 的抑藻活性为 $13.64\% \pm 2.25\%$ (图2), 由此可见马来眼子菜提取物中具有强抑藻活性的化合物主要为弱极性物质. 用参考毒物硫酸锌的抑藻结果来衡量每次试验方法及数据的可靠性, 0.3mg/L 的硫酸锌对羊角月牙藻的抑制率为 $66.74\% \pm 1.47\%$, 若每次试验所得 0.3mg/L 硫酸锌的抑制率与此无显著差异 ($P < 0.05$), 则认为此次实验结果可信.

2.1.2 分离过程中各组分活性大小 对活性最高的石油醚层浸膏进行硅胶柱层析所得的 13 个组分中, 石油醚: 乙酸乙酯 = 95:5 洗脱所得的第 5 号组分 (Fr5) 活性最高, 50mg/L 时达到了 $65.76\% \pm 2.64\%$ (其余组分抑藻效果未显示). Fr5 结晶后得两部分, 分别为 Fr5-01 和 Fr5-02, Fr5-01 的抑藻活性明显强于 Fr5-02, 30mg/L Fr5-01 对羊角月牙藻的抑制率为 $67.09\% \pm 1.88\%$, 50mg/L 时达到了 $76.91\% \pm 2.15\%$, 而 Fr5-02 对羊角月牙藻没有明显抑制作用. 分别将 10mg/L 和 30mg/L Fr5-02 加入到 30mg/L 的 Fr5-01 中, 其对羊角月牙藻的抑制率与 30mg/L Fr5-01 单独作用于羊角月牙藻时的抑制率没有显著性差异 ($P > 0.05$), 表明 Fr5-02 不仅自身没有抑藻效应, 对 Fr5-01 的抑藻效应也没有影响. 由凝胶柱色谱层析所得活性最强组分 (PMFA) 50mg/L 时藻类已全部死亡, 达到了 100% 的抑制率, 表现出强烈抑藻效应.

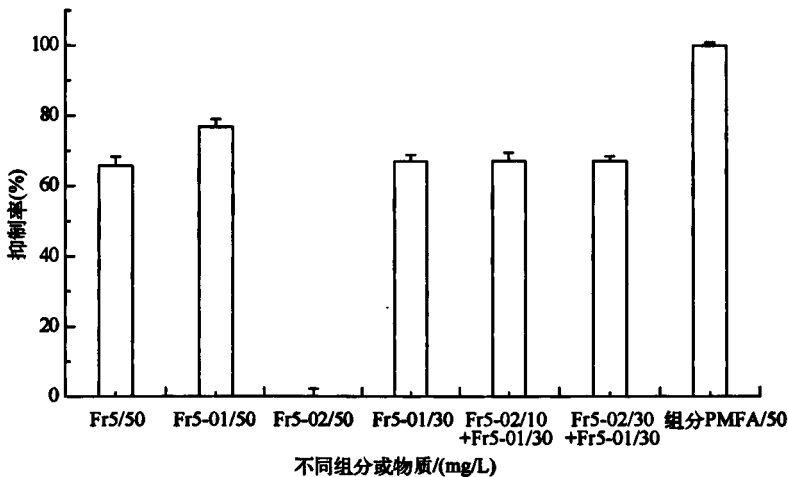


图3 Fr5 及分离的各组分对羊角月牙藻的抑制效果

Fig. 3 The inhibition of Fr5 and isolated fractions on *S. capricornutum*

2.1.3 PMFA 组分对羊角月牙藻的 EC_{50} 50mg/L PMFA 组分作用于羊角月牙藻时, 72h 光照周期结束后藻类全部死亡, 具有明显的抑藻效果. 进一步测定不同浓度 PMFA 组分对羊角月牙藻抑制效应 (图4), 利用一元线性回归, 求得 PMFA 对羊角月牙藻的半效应浓度 $EC_{50,34}$ 为 7.90mg/L ($R^2 = 0.986$).

2.2 分离组分的成分鉴定

Fr5 组分主要由脂肪酸和甾醇两大类物质组成, 其中甾醇占大多数, 达到总量的 71.89%, 脂肪酸含量为 16.78%. 根据甾醇易结晶析出的特性, 采用丙酮进行重结晶, 析出晶体部分为组分 Fr5-02, 甾醇

类物质占其 96.68%, 脂肪酸量极少, 仅为 0.79%; 经过重结晶, Fr5-01 中脂肪酸的量提高, 达到了 66.25%, 为甾醇类物质的 3.6 倍 (表 2)。甾醇类物质的分子量普遍大于脂肪酸类物质, 利用二者分子量的差异选择凝胶柱色谱, 进一步去除 Fr5-01 中甾醇类物质, 收集馏分得组分 PMFA, 其含有 84.16% 的脂肪酸类物质, 甾醇类物质只检测到一种含量为 0.72% 的麦角甾醇。

2.3 单一脂肪酸的抑藻效果

本实验选取了 PMFA 中含量较高的一些常见脂肪酸, 碳链长度分别为 9、10、12、14、16、18 的 6 种饱和脂肪酸, 以及碳链为 18, 不饱和度分别为 1、2、3 的油酸、亚油酸、 α -亚麻酸。其中油酸在 PMFA

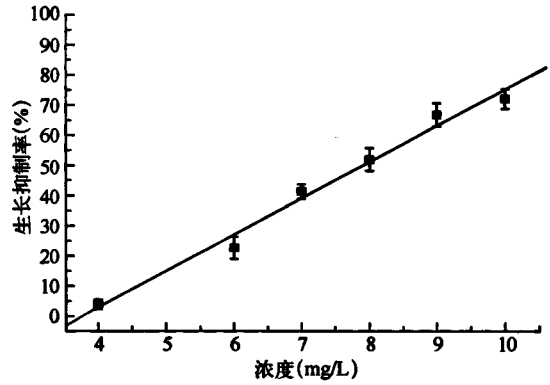


图 4 PMFA 组分对羊角月牙藻的抑制效果

Fig. 4 The inhibition of fraction PMFA on *S. capricornutum*

表 2 GC-MS 鉴定各组分的组成及含量*

Tab. 2 Composition and content of different fractions identified by GC-MS

| 化合物 | 保留时间 (min) | 百分含量 (%) | | | |
|---|------------|----------|--------|--------|--------|
| | | Fr5 | Fr5-01 | Fr5-02 | PMFA |
| 脂肪酸总量 | | 16.78 | 66.25 | 0.79 | 84.16 |
| Octanoic acid(辛酸) | 9.67 | 0.05 | 0.16 | - | 1.77 |
| Nonanoic acid(壬酸) | 10.99 | 0.05 | 0.14 | - | 0.60 |
| Decanoic acid(癸酸) | 12.24 | 0.06 | 0.14 | - | 0.55 |
| Dodecanoic acid(月桂酸) | 14.56 | 0.14 | 0.36 | - | 1.48 |
| n-Tridecanoic acid(十三烷酸) | 15.64 | 0.04 | 0.03 | - | 0.10 |
| Tetradecanoic acid(豆蔻酸) | 16.67 | 0.50 | 1.32 | 0.02 | 3.08 |
| n-Pentadecanoic acid(十五烷酸) | 17.29 | 0.04 | 0.09 | - | 0.21 |
| Palmitelaidic acid(反-9-十六烯酸) | 18.41 | 0.73 | 2.15 | 0.02 | 3.30 |
| Hexadecanoic acid(棕榈酸) | 18.60 | 5.16 | 20.33 | 0.47 | 37.09 |
| Heptadecanoic acid(十七烷酸) | 19.51 | 0.04 | 0.19 | - | 0.21 |
| 9,12-Octadecadienoic acid(亚油酸) | 20.11 | 4.14 | 18.06 | 0.11 | 16.37 |
| α -Linolenic acid(α -亚麻酸) | 20.18 | 5.40 | 21.59 | 0.18 | 23.52 |
| Octadecanoic acid(硬脂酸) | 20.38 | 0.42 | 1.70 | - | 2.44 |
| 甾醇类总量 | | 71.89 | 18.39 | 96.68 | 0.72 |
| Cholesta-6,22,24-triene,4,4-dimethy(胆甾醇类) | 25.78 | 0.16 | 0.03 | 1.17 | - |
| Stigmastan-3,5,22-trien(豆甾醇类) | 27.36 | 0.23 | 0.00 | 0.61 | - |
| Cholesterol(胆甾醇) | 29.00 | 2.07 | 2.15 | 1.13 | - |
| Campesterol(菜油甾醇) | 30.08 | 2.16 | - | - | - |
| Ergost-5-en-3-ol,(3beta,24R)-(麦角甾醇类) | 30.72 | 23.60 | 9.56 | 14.51 | 0.72 |
| Stigmasterol(豆甾醇) | 31.36 | 34.59 | 4.21 | 73.16 | - |
| Stigmasterol,22,23-dihydro(22,23-二氢-豆甾醇) | 31.74 | 1.28 | - | - | - |
| beta-sitosterol(β -古甾醇) | 32.52 | 7.80 | 2.45 | 6.09 | - |
| 脂肪酸/甾醇 | | 0.23 | 3.60 | 0.0082 | 116.89 |

*-表示未检测到。

中可能因为含量太低或者不存在而未检测到,但在文献^[17]中报道过油酸(cis-9-Octadecenoic acid)对铜绿微囊藻具有很强的抑制效应,EC₅₀为 1.6 ± 0.4mg/L,因而也进行了其对羊角月牙藻的抑制作用研究。

各种脂肪酸对羊角月牙藻均有不同程度的抑制效应,碳链最短的壬酸的抑制效应最强,棕榈酸与硬脂

酸等相对碳链较长的饱和脂肪酸抑制效果较差, EC_{50} 大于 35 mg/L, 不饱和脂肪酸的抑制作用要强于同碳链的饱和脂肪酸(表 3). 各脂肪酸对羊角月牙藻的 EC_{50} 分别为: 壬酸 < 油酸 < 癸酸 < 月桂酸 < α -亚麻酸 < 亚油酸 < 豆蔻酸 < 棕榈酸 < 硬脂酸. 6 种饱和脂肪酸的 EC_{50} 与它们所含碳原子的个数呈正相关($r = 0.971$, $P < 0.05$), 碳链越多, EC_{50} 值越大.

表 3 9 种脂肪酸作用于羊角月牙藻的 EC_{50}
Tab. 3 EC_{50} of nine fatty acids on *S. capricornutum*

| 碳链长度 | 脂肪酸 | EC_{50} (mg/L) | 碳链长度 | 脂肪酸 | EC_{50} (mg/L) |
|-------------------|-----|------------------|-------------------|---------------|------------------|
| C _{9,0} | 壬酸 | 3.69 | C _{18,0} | 硬脂酸 | 40.27 |
| C _{10,0} | 癸酸 | 9.07 | C _{18,1} | 油酸 | 8.08 |
| C _{12,0} | 月桂酸 | 10.36 | C _{18,2} | 亚油酸 | 17.27 |
| C _{14,0} | 豆蔻酸 | 18.65 | C _{18,3} | α -亚麻酸 | 10.68 |
| C _{16,0} | 棕榈酸 | 35.46 | | | |

2.4 多种脂肪酸的联合抑藻效果

PMFA 组分由多种脂肪酸组成, 且含量差异较大. 因而在单一脂肪酸抑藻实验的基础上, 按等毒性单位设计了 3 组联合实验. 这三组联合的抑藻结果见表 4, 根据水生毒理联合效应相加指数法计算, 每组联合的效应相加指数 AI 分别为 0.901, 0.852, 1.809, 均大于 0, 表明这三种组合所含的多种脂肪酸间具有明显的协同抑藻作用, 即饱和脂肪酸之间, 不同饱和度的同一碳链的脂肪酸, 以及不同碳链饱和、不饱和脂肪酸联合时, 均存在着协同抑藻作用.

表 4 脂肪酸对羊角月牙藻三组联合的抑藻效果
Tab. 4 The combined inhibitory effects of three fatty acids groups on *S. capricornutum*

| 脂肪酸 | 第一组 | | 第二组 | | 第三组 | |
|---------------|------------------|--------------------------|------------------|--------------------------|------------------|--------------------------|
| | EC_{50} (mg/L) | EC_{50} 中每种物质浓度 (mg/L) | EC_{50} (mg/L) | EC_{50} 中每种物质浓度 (mg/L) | EC_{50} (mg/L) | EC_{50} 中每种物质浓度 (mg/L) |
| 壬酸 | 8.97 | 0.22 | 10.57 | 0.33 | | |
| 癸酸 | | 0.53 | | 0.82 | | |
| 月桂酸 | | 0.61 | | 0.93 | | |
| 豆蔻酸 | | 1.09 | | 1.68 | | |
| 棕榈酸 | | 2.07 | | 3.19 | | |
| 硬脂酸 | | 2.35 | | 3.62 | 6.79 | 3.58 |
| 油酸 | | 0.47 | | | | 0.72 |
| 亚油酸 | | 1.01 | | | | 1.54 |
| α -亚麻酸 | | 0.62 | | | | 0.95 |
| S | 0.526 | | 0.540 | | 0.356 | |
| AI | 0.901 > 0, 协同作用 | | 0.852 > 0, 协同作用 | | 1.809 > 0, 协同作用 | |

3 讨论

通过不同极性有机溶剂的提取, 进一步的分离鉴定及藻类生物毒性试验, 证明了马来眼子菜植物体内抑藻效应组分 PMFA 主要由脂肪酸类物质组成, GC-MS 鉴定其单一脂肪酸组成与文献中报道过的有化感效应的脂肪酸类物质有相同之处. Gallardo-Williams^[18] 等用莴苣萌发作为生物示踪, 从南方香蒲 (*Typha dominicensis* P) 的水浸提液中分离到有活性的亚油酸、 α -亚麻酸等, 在其渗滤液中也检测到这两种脂肪酸; Nakai^[17] 等从穗花狐尾藻的培养液及甲醇提取液中检测到多种脂肪酸, 如壬酸、豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、油酸等, 毒性实验结果显示, 壬酸, 顺-6-烯酸, 顺-9-烯酸明显地抑制铜绿微囊藻的生长; 张庭延^[19] 从大型水生植物普生轮藻 (*Chara vulgaris* L) 中分离得到 3 种脂肪酸类化感物质: 亚油酸、棕榈酸和豆蔻酸, 发现这 3 种脂肪酸具

有不同程度的抑藻作用. 不同的植物体内提取或者组织培养液中分离到的脂肪酸的种类、含量有所不同, 生物测试的方法也存在差异, 各种脂肪酸活性大小也不一致, 但这些实验都显示脂肪酸类物质有化感抑藻效应, 利用这种效应来抑制水华藻类生长具有潜在的可能性.

脂肪酸作为一类物质, 大量存在于植物体内, 其骨架长度为 4-36 个碳原子, 多数为 12-24 个碳, 主要为偶数碳的饱和与不饱和脂肪酸, 16 和 18 个碳原子最常见^[20]. 本实验中选择了存在于马来眼子菜体内且碳链及双键数目有一定分布规律的 9 种脂肪酸, 研究每种脂肪酸对羊角月牙藻的生长抑制规律, 结果显示所选 9 种脂肪酸的抑藻效应大小为: 壬酸 > 油酸 > 癸酸 > 月桂酸 > α -亚麻酸 > 亚油酸 > 豆蔻酸 > 棕榈酸 > 硬脂酸, 6 种饱和脂肪酸碳原子个数与 EC_{50} 具有相关性 ($P < 0.05$), 即饱和脂肪酸碳链越短, 抑藻活性越强. Nakai^[17] 等研究的几种脂肪酸对铜绿微囊藻的抑制结果中壬酸活性最强, 豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸的活性最差, 与此结论一致; 同时不饱和脂肪酸活性强于饱和脂肪酸, 这可能与不饱和脂肪酸含有双键, 易被氧化成羟基化合物而影响抑藻活性的大小有关, Aliotta^[21] 等经过研究也认为 α -亚麻酸的抑藻活性主要来自于它的氧化产物而不是 α -亚麻酸本身. 本实验中含有一个双键的油酸活性强于含有两个双键的亚油酸和三个双键的 α -亚麻酸, α -亚麻酸的活性又强于亚油酸, 这可能是由于不同物质氧化速度不同, 氧化产物的活性大小不同, 具体的作用机理还需进一步研究.

对 PMFA 中检测出来的主要脂肪酸进行单独抑藻试验发现除了壬酸对羊角月牙藻 EC_{50} 为 3.69mg/L, 小于 PMFA 的 EC_{50} 7.90mg/L 外, 其余几种脂肪酸 EC_{50} 都大于 PMFA 的 EC_{50} , 其中硬脂酸 EC_{50} 达到 40.27mg/L, 而且抑制活性高些的物质如壬酸、癸酸等含量要远远小于棕榈酸、硬脂酸等活性差的物质 (表 2), 这也就意味着 PMFA 对羊角月牙藻的抑制效应不是其各组成成分的抑藻效应的简单相加, 可能是多种物质以一定比例联合作用的结果. 以前的研究证明当多种化合物共同作用于生物体时, 在生物体内会彼此影响, 作用方式复杂, 可产生拮抗、相加、无关或者协同等多种效应^[22], 例如硝基苯、苯胺、苯胺、甲苯四种苯的衍生物与 1-硝基萘以等毒性单位两项联合作用于斜生栅藻时, 硝基苯、苯胺与 1-硝基萘显示协同抑制作用而苯酚、甲苯与 1-硝基萘则显示拮抗作用^[23]; 对 PMFA 中主要组成的脂肪酸联合作用的研究发现不管是取其中饱和脂肪酸, 相同碳链的饱和度不同的脂肪酸还是所有脂肪酸的联合, 都显示的是协同抑藻作用, 证明脂肪酸类物质在共存时能联合增效. 这种协同作用使多种物质共存时的毒性要强于单独作用之和, 达到相同抑制效果的抑藻物质的用量相对较少. 不过不同的物质联合, 不同的配比条件, 协同增效的程度会有差别. 例如王桂燕^[24] 等发现不同浓度配比条件下四氯乙烯与镉联合对草鱼毒性的协同作用强度不同. 本试验等毒性单位设计的 3 组联合, 表现出的协同效应大小也有区别, 9 种脂肪酸联合的 EC_{50} 为 8.97mg/L; 6 种饱和脂肪酸联合 EC_{50} 为 10.57mg/L; 18 碳的饱和脂肪酸和 3 种不饱和脂肪酸联合的 EC_{50} 为 6.79mg/L. 三种联合作用中 18 碳的饱和脂肪酸和 3 种不饱和脂肪酸联合协同效应最强, 而 6 种饱和脂肪酸联合协同效应最小.

本实验中还发现对羊角月牙藻没有抑制作用的组分 Fr5-02 主要为甾醇类物质, 包括菜油甾醇、麦角甾醇、豆甾醇、 β -谷甾醇等. 植物甾醇类物质广泛分布于自然界, 主要以游离态、甾醇酯 (脂肪酸酯和酚酸酯)、甾基糖苷和酰化甾基糖苷等形式存在^[25], 与脂肪酸类物质常共存于植物体内, 是油脂中一种功能性成分, 在马来眼子菜体内也大量存在, 但其对脂肪酸类物质的抑制效应没有影响, 这与 Greca^[26] 等从马蹄莲 (*Zantedeschia aethiopica*) 体内提取了 10 种固醇类物质, 以及 Aliotta^[27] 等从水浮莲 (*Pistia stratiotes*) 乙酸乙酯提取物中分离到的两种甾醇类物质的活性结果相似.

4 结论

本文从水生植物马来眼子菜体内分离得到对羊角月牙藻有明显抑制效应的组分 PMFA, 鉴定其组成主要为脂肪酸类物质, 进一步对脂肪酸类物质的化感抑藻效应进行研究发现, 脂肪酸类物质的抑藻活性与其结构有关, 饱和脂肪酸中碳链越短, 活性越好; 不饱和脂肪酸的抑藻效果明显好于含有相同碳链的饱和脂肪酸; 多种脂肪酸联合作用时, 具有协同抑藻作用; 常与脂肪酸类物质共存的甾醇类物质对羊角月牙藻没有明显抑制效果, 且对脂肪酸类物质的抑藻效应没有影响.

致谢: 张甬元教授、刘保元教授、戚水平、贺锋、梁威、周巧红和张丽萍老师对本实验给予的指导, 王红强博士在实验过程中给予的帮助, 在此谨表谢意.

5 参考文献

- [1] Nakai S, Inoue Y, Hosomi M *et al.* *Myriophyllum spicatum*-released allelopathic polyphenols inhibiting growth of blue-green algae *Microcystis aeruginosa*. *Wat Res*, 2000, 34(11):3026-3032.
- [2] 王立新, 张玲, 张余霞等. 黑藻(*Hydrilla verticillata*) 养殖水对铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*) 的抑制效应及其机制. *植物生理与分子生物学学报*, 2006, 32(6):672-678.
- [3] 李峰民, 胡洪营. 植物化感作用控制天然水体中有害藻类的机理与应用. *城市给排水*, 2004, 30(2):1-4.
- [4] 刘伟农, 胡维平, 陈永根等. 西太湖水生植物时空变化. *生态学报*, 2007, 27(1):159-169.
- [5] 鲜啟鸣, 陈海东, 邹惠仙等. 四种沉水植物的克藻效应. *湖泊科学*, 2005, 17(1):75-80.
- [6] Waridel P, Wolfende JL, Lachavanne JB *et al.* *ent*-Labdane diterpenes from the aquatic plant *Potamogeton pectinatus*. *Phytochemistry*, 2003, 64:1309-1317.
- [7] 陈德辉, 刘永定, 宋立荣. 茵齿眼子菜对栅藻和微囊藻的他感作用及其参数. *水生生物学报*, 2004, 28(2):163-168.
- [8] DellaGreca M, Fiorentino A, Isidori M *et al.* Antialgal furano-diterpenes from *Potamogeton natans* L. *Phytochemistry*, 2001, 58:299-304.
- [9] Cangiano T, DeliaGreca M, Fiorentino A. Effect of *ent*-labdane diterpenes from *potamogetonaceae* on *selenastrum capricornutum* and other aquatic organisms. *Journal of Chemical Ecology*, 2002, 28(6):1091-1102.
- [10] Waridel P, Wolfende JL, Lachavanne JB *et al.* *ent*-Labdane glycosides from the aquatic plant *Potamogeton lucens* and analytical evaluation of the lipophilic extract constituents of various *Potamogeton* species. *Phytochemistry*, 2004, 65:945-954.
- [11] 贺峰, 吴振斌, 邱东茹. 东湖围隔中阻草与藻类生化他感作用的初步研究. *水生生物学报*, 2002, 26(4):421-424.
- [12] Wu ZB, Deng P, Wu XH *et al.* Allelopathic effects of the submerged macrophyte *Potamogeton malaianus* on *Scenedesmus obliquus*. *Hydrobiologia*, 2007, 592:465-474.
- [13] 陈坚, 顾林娣, 章宗涉等. 马来眼子菜抑制藻类增长及其抑制系数的计算. *上海师范大学学报(自然科学版)*, 1994, 23(1):69-73.
- [14] Gunatilaka LAA, Bolzani VS, Dagne E *et al.* Limonoids showing selective toxicity to DNA repair-deficient yeast and other constituents of *Trichilia emetica*. *Journal of Natural Products*, 1998, 61(2):179-184.
- [15] Environment Canada. Biological test method: Growth inhibition test using the freshwater alga *Selenastrum capricornutum*. Environmental Protection Series 1/RM/25, Ottawa, 1992.
- [16] 修瑞琴, 许永香, 傅迎春等. 水生毒理联合效应相加指数法. *环境化学*, 1994, 13(3):269-271.
- [17] Nakai S, Yamada S, Hosomi M. Anti-cyanobacterial fatty acids released from *Myriophyllum spicatum*. *Hydrobiologia*, 2005, 543:71-78.
- [18] Gallardo-Williams MT, Geiger CL, Pidala JA *et al.* Essential fatty acids and phenolic acids from extracts and leachates of southern cattail (*Typha domingensis* P). *Phytochemistry*, 2002, 59:305-308.
- [19] 张庭延. 大型沉水植物普生轮藻的抑藻效应及其机理研究[学位论文]. 芜湖:安徽师范大学, 2008.
- [20] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法主编. *生物化学(上册)*. 北京:高等教育出版社, 2002:82-86.
- [21] Aliotta G, Della Greca M, Monaco P *et al.* In vitro algal growth inhibition by phytotoxins of *Typha latifolia* L. *Journal of Chemical Ecology*, 1990, 16(9):2637-2646.
- [22] 孟庆俊, 肖昕. 不同方法对联合毒性作用的评价. *污染防治技术*, 2004, 17(1):33-35.
- [23] 张朝, 竺乃恺, 夏希娟等. 1-硝基茈与苯衍生物共存对斜生栅藻的联合毒性. *环境化学*, 1999, 18(1):87-91.
- [24] 王桂燕, 周启星, 胡筱敏等. 四氟乙烯和镉对草鱼的单一与联合毒性效应. *应用生态学报*, 2007, 18(5):1120-1124.
- [25] 曹莹, 谷克仁, 孟冬等. 植物甾醇提取方法研究进展. *粮食食品科技*, 2006, 14(5):25-28.
- [26] Greca MD, Ferrara M, Fiorentino A *et al.* Antialgal compounds from *Zantedeschia aethiopica*. *Phytochemistry*, 1998, 49(5):1299-1304.
- [27] Aliotta G, Monaco P, Pinto G *et al.* Potential allelochemicals from *Pistia stratiotes* L. *Journal of Chemical Ecology*, 1991, 17(11):2223-2234.