

三种水鳖科沉水植物释放的脂肪酸类化感物质的分离与鉴定

高云霓¹ 刘碧云¹ 葛芳杰^{1,2} 梁 威¹ 徐 栋¹ 张丽萍¹ 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)

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ALLELOPATHIC FATTY ACIDS EXUDED FROM THREE SUBMERGED HYDROCHARITACEAE SPECIES

GAO Yun-Ni¹, LIU Bi-Yun¹, GE Fang-Jie^{1,2}, LIANG Wei¹, XU-Dong¹, ZHANG Li-Ping¹ and WU Zhen-Bin¹

(1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

关键词: 伊乐藻; 轮叶黑藻; 苦草; 脂肪酸; 分离

Key words: *Elodea nuttallii* (Planch) St. John; *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle; *Vallisneria spiralis* Linn; Fatty acids; Isolation

中图分类号: Q948.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2011)01-0170-05

沉水植物是水生态系统的重要组成部分,在维持水生态系统结构和功能方面具有重要作用^[1],其中的一个重要机制就是通过释放化感物质抑制藻类生长,从而保持水体的清水稳态^[2]。自然水体中许多沉水植物如轮叶狐尾藻(*Myriophyllum verticillatum*)、金鱼藻(*Ceratophyllum demersum*)、水卫士(*Stratiotes aloides*)、伊乐藻(*Elodea nuttallii*)和篦齿眼子菜(*Potamogeton pectinatus*)等均表现出明显的化感抑藻现象^[3-7]。研究沉水植物对藻类的化感作用不仅有助于揭示水生态系统中生物间的化学生态学关系,而且可以为水华的控制和沉水植被的重建提供科学指导。

化感作用发生的一个重要条件就是植物必须将其体内产生的化感物质释放到环境中去影响目标生物的生长^[8]。水生植物化感抑藻物质也必须是由植物体释放到水环境中并影响藻类生长的物质。目前已发现一些水生植物可以释放酚酸和脂肪酸类化感物质影响周围藻类的生长,如 Nakai, *et al.*^[9,10]先后从穗花狐尾藻种植水中分离到焦酚等酚酸和壬酸等脂肪酸类化感抑藻物质。其中,脂肪酸是指一端含有一个羧基的脂肪族碳氢链。按饱和度的不同可分为饱和与不饱和脂肪酸两大类,在不饱和脂肪酸分子结构中含有一个或多个双键。除穗花狐尾藻以外的许多水生植物已被报道其体内含有多多种脂肪酸^[11-16]。同

时许多脂肪酸的抑藻活性已被证实,C2到C22的饱和和不饱和脂肪酸对多种蓝藻和绿藻有不同程度的抑制作用^[17-19]。但这些植物体内含有的脂肪酸是否能释放到水环境中去发挥其化感抑藻作用还有待研究。

伊乐藻(*Elodea nuttallii*)、轮叶黑藻(*Hydrilla verticillata*)和苦草(*Vallisneria spiralis*)为长江中下游浅水湖泊中常见的水鳖科沉水植物,三种植物的浸提物和种植水均可以显著抑制多种浮游或附着藻类的生长^[20, 21]。我们的前期研究已发现这些植物能够释放酚酸类化感抑藻物质^[22],但这三种沉水植物是否也释放脂肪酸类物质抑制藻类生长还没有相关报道。

为了全面鉴定伊乐藻、轮叶黑藻和苦草三种水鳖科沉水植物释放的主要化感抑藻物质,本文在建立并初步优化了水生植物分泌物分离鉴定方法的基础上检测了三种植物释放到水环境中的脂肪酸种类及其相对含量,并结合文献资料初步评估了这些脂肪酸的化感作用潜力。

1 材料与方法

1.1 试剂和标准物质

双(三甲基硅烷基)氟乙酰胺(BSTFA)购自 Sigma-Aldrich(美国)公司。所有的溶剂和试剂均为色谱纯。

收稿日期: 2009-12-29; 修订日期: 2010-10-15

基金项目: 国家自然科学基金(30870221, 20877093, 50808172); 中国博士后科学基金(20080431013)资助

作者简介: 高云霓(1982—),女,土家族,湖北长阳人;博士后,主要从事水环境化学生态学研究。E-mail: freebird23231060@163.com

通讯作者: 吴振斌, Tel: 027-68780675; E-mail: wuzb@ihb.ac.cn

1.2 植物采集与培养

伊乐藻、轮叶黑藻和苦草均采自武汉月湖(30°33'N, 114°15'E), 然后用采自同一样点的底泥室外水泥缸培养。实验前一个月左右转入实验室内底泥培养, 培养条件为 3000 lx 光照强度, 12:12 光暗周期, 25℃。实验开始前 15 天, 新鲜植物用自来水反复冲洗去除植物表面的附着物, 然后在相同的培养条件下用改良的 MIII 培养液^[23]适应培养, 发现有新枝长出。培养液每 5 天换一次。为减少微生物在共培养体系中对藻类生长的影响, 用于培养的玻璃方缸和营养盐都经过灭菌处理。

实验开始前, 伊乐藻和轮叶黑藻挑选大小一致的新鲜顶枝(30—50 cm), 苦草挑选新生完整植株(株长不超过 50 cm), 自来水清洗, 双蒸水润洗后, 在无菌 MIII 培养液中培养。3 种水草培养时间均为 3d。培养条件同前。3 种水草均设置了 10 g FW/L 的培植密度, 为了比较不同水草密度对化感物质释放情况的影响, 伊乐藻还设置了一个 50 g FW/L 的培植密度。

1.3 植物分泌物的提取

取出植物后的培养液, Whatman GF/F 玻璃纤维滤纸过滤, 盐酸调 pH 到 2 后, 过 Oasis HLB 固相萃取小柱(500 mg, 6cc, Waters, USA), 每根小柱使用前均用甲醇和超纯水活化平衡。富集完后小柱真空抽干再用甲醇洗脱。根据预实验结果, 为减少烷烃和酞酸酯等杂质的干扰, 合并后的洗脱液旋蒸干, 再用超纯水重新溶解, 然后通过改良的液液萃取方法^[3]进一步分离。主要步骤为: 2mol/L NaOH 将水相调 pH 到 12 后, 正己烷萃取 3 次, 然后将水

相用 2 mol/L HCl 调 pH 到 2, 乙酸乙酯萃取 4 次。收集乙酸乙酯组分, 无水硫酸钠干燥, 旋蒸浓缩后转移到棕色样品瓶, 硅烷化^[24]后进行 GC/MS 分析。未添加植物的培养液也同步提取作为无植物对照, 每组实验重复一次。

1.4 GC/MS 分析

GC/MS 分析在串联的 HP 6890N 色谱仪和 HP 5973Inert 质谱仪上进行。所采用的毛细管柱型号为 HP-5ms(30 m×0.25 mm×0.25 μm)。定性分析采用 SCAN 模式进行。载气为氦气, 流速为 1.0 mL/min。柱升温程序如下: 起始温度 50℃, 保持 1min, 然后以 10℃/min 升温到 280℃, 最后保持 5min。进样温度和接口温度均为 280℃。进样量为 1 μL, 以不分流模式进样。各个峰的鉴定参照 NIST02 标准谱库, 面积归一化法计算样品中各物质的相对含量。

2 结果与讨论

2.1 伊乐藻、轮叶黑藻和苦草种植水中脂肪酸的鉴定

将 10 g FW/L 密度种植的伊乐藻、轮叶黑藻和苦草分泌到水中的物质固相萃取和液液萃取, 硅烷化后 GC/MS 分析得到总离子流图(图 1)。将每个峰的质谱图与标准物质谱图比对, 如停留时间为 7.78min 的峰质谱图如图 2(a), 乳酸的标准物质谱图如图 2(b), 两者匹配度大于 95%, 故将停留时间在 7.78min 的物质鉴定为乳酸。依次类推, 先后从 10 g FW/L 密度种植的伊乐藻、轮叶黑藻和苦草分泌物中鉴定出琥珀酸、己二酸、癸酸、月桂酸、酒石酸、壬二酸、棕榈酸和硬脂酸。图 3 列出了各物质的化

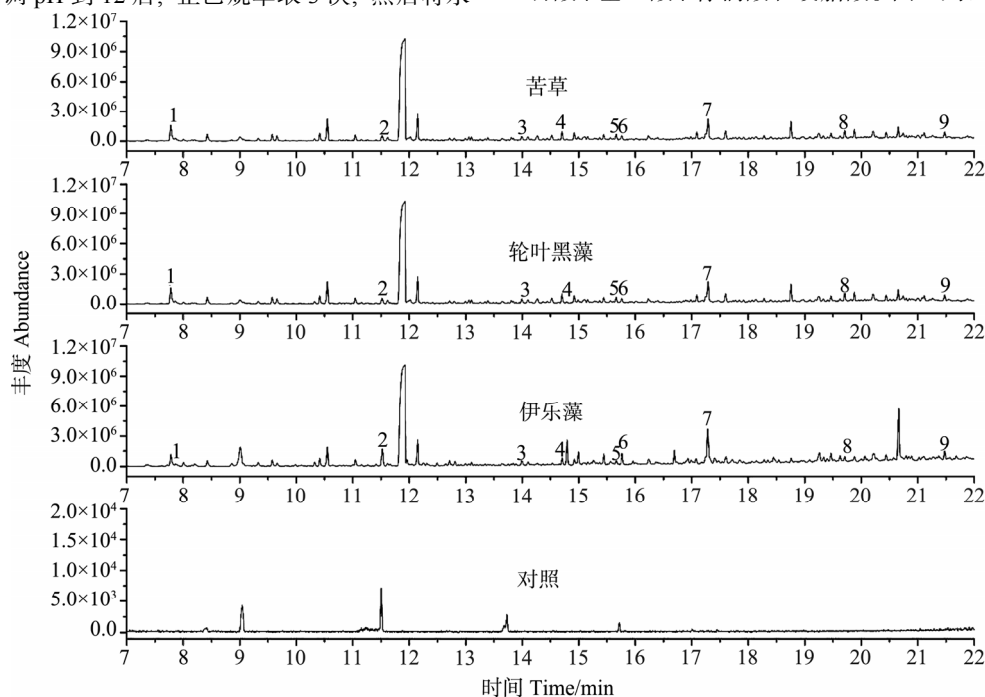


图 1 三种沉水植物分泌物的乙酸乙酯组分总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatogram of ethyl acetate fraction of enriched exudates from three submerged macrophytes

1. 乳酸; 2. 琥珀酸; 3. 己二酸; 4. 癸酸; 5. 月桂酸; 6. 酒石酸; 7. 壬二酸; 8. 棕榈酸; 9. 硬脂酸

1. lactic acid; 2. succinic acid; 3. hexanedioic acid; 4. capric acid; 5. lauric acid; 6. tartaric acid; 7. azelaic acid; 8. palmitic acid; 9. stearic acid

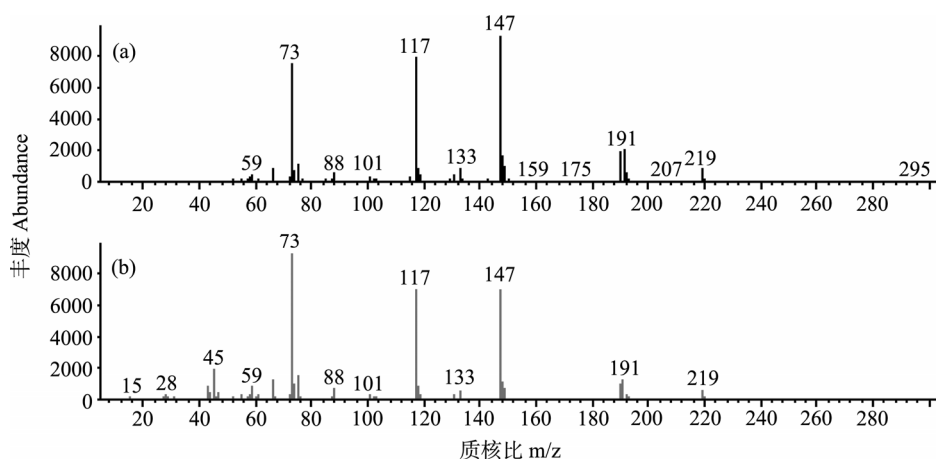


图2 停留时间为7.78min的物质的质谱图(a)与谱库中乳酸BSTFA衍生物的质谱图(b)比较

Fig. 2 Comparison of the GC/MS fragment pattern of the peak at 7.78min (a) with that of the BSTFA derivative of lactic acid from the NIST mass spectral library (b)

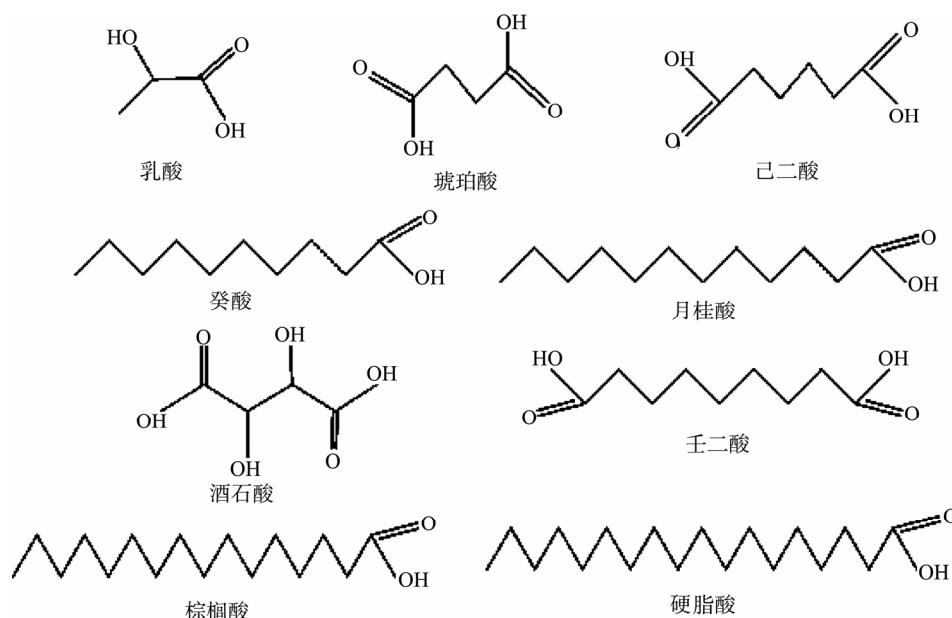


图3 10 g FW/L 密度种植的伊乐藻、轮叶黑藻和苦草分泌的脂肪酸物质结构

Fig. 3 Structures of fatty acids exuded from *E. nuttallii*, *H. verticillata* and *V. spiralis* cultured at 10 g FW/L

学结构。而在同样条件下的无植物对照中则没有检测到这些物质,由此可以推断,伊乐藻、轮叶黑藻和苦草可以释放些物质到水环境中。其中的癸酸、月桂酸、棕榈酸和硬脂酸均具有抑藻活性,且随着脂肪酸碳数的递减,抑藻效果递增,活性最强的癸酸对铜绿微囊藻、蛋白核小球藻和斜生栅藻生长5d的半抑制率分别为0.96、1.38和1.17 mg/L^[19]。

根据总离子流图中各物质的峰面积得到各脂肪酸在不同植物分泌物中的相对含量(表1)。结果显示,尽管三种植物同属于水鳖科,但不同植物释放的脂肪酸相对含量表现出差异。就总量而言,苦草分泌物中脂肪酸相对最高,占分泌物总量的18.87%,轮叶黑藻次之,12.38%,伊乐藻最低,5.89%。琥珀酸是苦草分泌的主要脂肪酸物质,

占到脂肪酸类物质总量的60.15%,其次是壬二酸,乳酸和癸酸也有一定的含量。轮叶黑藻分泌物中壬二酸含量最高,占脂肪酸总量的34.65%,乳酸、棕榈酸和癸酸也有一定的含量。伊乐藻分泌的各脂肪酸含量都不高,只有乳酸和琥珀酸含量超过了1%。这与Xian, *et al.*^[20]从苦草和轮叶黑藻水浸提液中检测到的脂肪酸组成情况相似,苦草体内也含有包括乳酸、琥珀酸、月桂酸、壬二酸、棕榈酸和硬脂酸等在内的多种脂肪酸,且琥珀酸含量最高,乳酸和壬二酸含量也较高。琥珀酸、乳酸、壬二酸在轮叶黑藻中均有较高的含量。

2.2 种植密度对伊乐藻脂肪酸分泌的影响

自然水体中伊乐藻的生物量可以达到500—1693 g DW/m²^[21],若按1 m的水柱计算,1 m³的水域内伊乐藻的

表 1 10 g FW/L 密度种植的伊乐藻、轮叶黑藻和苦草释放的主要脂肪酸
Tab. 1 Main fatty acids exuded from *E. nuttallii*, *H. verticillata* and *V. spiralis* cultured at 10 g FW/L

序号 Number	停留时间 Retention time	物质名称 Compound	伊乐藻/相对含量 <i>E. nuttallii</i> /Content (%)	轮叶黑藻/相对含量 <i>H. verticillata</i> /Content (%)	苦草/相对含量 <i>V. spiralis</i> /Content (%)
1	7.78	乳酸	1.17	2.43	1.81
2	11.52	琥珀酸	1.49	0.94	11.35
3	14.00	己二酸	0.46	0.55	0.80
4	14.71	癸酸	0.47	1.15	1.03
5	15.67	月桂酸	0.33	0.71	0.74
6	15.76	酒石酸	0.76	0.36	—
7	17.29	壬二酸	—	4.29	3.14
8	19.71	棕榈酸	0.45	1.19	√
9	21.48	硬脂酸	0.76	0.76	√

注：—表示未检测到
Note: — indicates it has not been detected

生物量为 500—1693 g DW, 伊乐藻含水率为 94%(未发表数据), 换算成鲜重伊乐藻的生物量为 8—28 g FW/L。本实验选择的 10 g FW/L 的培植密度在一般水体中均可以达到, 能较好地模拟自然情况。然而, 考虑到分离技术和成本, 已有的一些水生植物分泌物分离实验都选择了显著高于实际情况的种植密度, 如 Nakai, *et al.* [10] 在分离穗花狐尾藻分泌的脂肪酸类抑藻物质时植物的培植密度就达到了 100 g FW/L。本实验也采用和前面一致的提取流程分离了 50 g FW/L 密度下种植的伊乐藻的分泌物。如表 2 所示, 共分离出 17 种脂肪酸, 其中包括 8 种从 10 g FW/L 伊乐藻种植水中检测到的脂肪酸。另外 9 种分别为己酸、2-羟基乙酸、2-羟基丙烯酸、辛酸、壬酸、肉豆蔻酸、十五酸、十七酸和花生酸。在两种种植密度下的分离结果显著不同, 高密度的伊乐藻种植水中检测到的脂肪酸种类明显增多, 且大部分新检出的脂肪酸如肉豆蔻酸、十五酸和十七酸都具有较强的抑藻活性[17], 而已酸、辛酸和壬酸活性更强, 对铜绿微囊藻、蛋白核小球藻和斜生栅藻的半抑制率均低于 1 mg/L[19]。同时, 脂肪酸在种植水中的含量也显著不同, 高密度伊乐藻种植水中检测到的 17 种脂肪酸总量占其分泌物总量的 18.18%, 其中棕榈酸含量最高, 为 9.56%, 其次为硬脂酸, 1.5%, 乳酸和肉豆蔻酸的含量也较高, 分别为 1.32% 和 1.12%。沉水植物的化感抑藻作用在其受到较大的营养或光照等竞争压力的情况下会表现得更加明显, 逆境胁迫除直接影响化感物质的产生和分泌外, 还能使植物产生的化感物质含量发生变化[25]。高密度种植下植物分泌物增多很可能就是植物在空间、光照和营养等资源的获得量减少后的一种防御行为。

3 结 论

本实验采用固相萃取、液液萃取和 GC/MS 联用技术

从 10 g FW/L 的伊乐藻、轮叶黑藻和苦草种植水中分离出

表 2 50 g FW/L 密度种植的伊乐藻释放的主要脂肪酸
Tab. 2 Fatty acids exuded from *E. nuttallii* cultured at 50 g FW/L

序号 Number	停留时间 Retention time	物质名称 Compound	相对含量 Content (%)
1	7.78	乳酸	1.32
2	7.91	己酸	0.23
3	8.02	2-羟基乙酸	0.22
4	10.33	2-羟基丙烯酸	0.21
5	10.77	辛酸	0.29
6	11.52	琥珀酸	0.16
7	12.10	壬酸	0.76
8	14.00	己二酸	0.22
9	14.71	癸酸	0.29
10	15.67	月桂酸	0.29
11	17.29	壬二酸	0.98
12	17.78	肉豆蔻酸	1.12
13	18.77	十五酸	0.73
14	19.71	棕榈酸	9.56
15	20.62	十七酸	0.19
16	21.48	硬脂酸	1.5
17	23.02	花生酸	0.11

9 种脂肪酸, 其中的癸酸、月桂酸、棕榈酸和硬脂酸已被证明是对藻类具有抑制作用的化感物质。同时从 50 g FW/L 的伊乐藻种植水中分离出 17 种脂肪酸, 除了 10 g FW/L 的伊乐藻种植水中检测到的脂肪酸外, 还分离到具有强抑藻活性的己酸、辛酸和壬酸等脂肪酸。种植密度的增大导致伊乐藻分泌的脂肪酸种类和含量显著增加, 有关脂肪酸类物质在这些水生植物化感作用中的贡献以及环境因素对植物化感物质分泌的影响还需要进一步研究。

致谢:

在实验和论文写作期间,得到了张甬元、刘保元先生,成水平研究员,贺锋、周巧红副研究员等课题组成员的帮助,谨致谢忱。

参考文献:

- [1] Liu J K. Advanced hydrobiology [M]. Beijing: Science Press. 1999, 230 [刘建康. 高级水生生物学. 北京: 科学出版社. 1999, 230]
- [2] Hilt S, Gross E M. Can allelopathically active submerged macrophytes stabilise clear-water states in shallow lakes [J]. *Basic and Applied Ecology*, 2008, **9**: 422—432
- [3] Hilt S, Ghobrial M G N, Gross E M. *In situ* allelopathic potential of *Myriophyllum verticillatum* (Haloragaceae) against selected phytoplankton species [J]. *Journal of Phycology*, 2006, **42**: 1189—1198
- [4] Van Donk E, Gulati R D. Transition of a lake to turbid state 6 years after biomanipulation: mechanisms and pathways [J]. *Water Sci. Technol.*, 1995, **32**: 197—206
- [5] Mulderij G, Smoldes A J P, Van Donk E. Allelopathic effect of the aquatic macrophyte, *Stratiotes aloides*, on natural phytoplankton [J]. *Freshwater Biology*, 2006, **51**(3): 554—561
- [6] Wang H Q, Cheng S P, Zhang S H, *et al.* GC-MS analysis of alkaloids in *Elodea nuttallii* and their allelopathic effects on *Microcystis aeruginosa* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, **34**(2): 361—366 [王红强, 成水平, 张胜花, 等. 伊乐藻生物碱的 GC-MS 分析及其对铜绿微囊藻的化感作用. 水生生物学报, 2010, **34**(2): 361—366]
- [7] Blindow I. The composition and density of epiphyton on several species of submerged macrophytes-neutral substrate hypothesis tested [J]. *Aquat. Bot.*, 1987, **29**: 157—168
- [8] Willis R J. The historical bases of the concept of allelopathy [J]. *Journal of the History of Biology*, 1985, **18**: 71—102
- [9] Nakai S, Inoue Y, Hosomi M. *Myriophyllum spicatum*-released allelopathic polyphenols inhibiting growth of blue-green algae *Microcystis aeruginosa* [J]. *Water Research*, 2000, **34**(11): 3026—3032
- [10] Nakai S, Yamada S and Hosomi M. Anti-cyanobacterial fatty acids released from *Myriophyllum spicatum* [J]. *Hydrobiologia*, 2005, **543**: 71—78
- [11] Van Aller R T, Pessoney G F, Rogers V A, *et al.* Oxygenated fatty acids: a class of allelochemicals from aquatic plants [A]. In: Thompson A C (Eds.), *The Chemistry of Allelopathy* [C]. Washington D.C.: American Chemical Society. 1985, 337—386
- [12] Aliotta G, Della Greca M, Monaco P, *et al.* In vitro algal growth inhibition by phytotoxins of *Typha latifolia* L [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 1990, **16**: 2637—2646
- [13] Aliotta G, Monaco P, Pinto G, *et al.* Potential allelochemicals from *Pistia stratiotes* L [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 1991, **17**: 2223—2234
- [14] Gallardo-Williams M T, Geiger C L, Pidala J A, *et al.* Essential fatty acids and phenolic acids from extracts and leachates of southern cattail (*Typha domingensis* P.) [J]. *Phytochemistry*, 2002, **59**: 305—308
- [15] Dai S G, Zhao F, Jin Z H, *et al.* Allelopathic effect of plant extracts on algae and the isolation and identification of phototoxins [J]. *Environmental Chemistry*, 1997, **16**: 268—271 [戴树桂, 赵凡, 金朝辉, 等. 香蒲植物提取物的抑藻作用及其分离鉴定. 环境化学, 1997, **16**: 268—271]
- [16] Hu C Y, Ge F J, Zhang S H, *et al.* Isolation of antialgal compounds from *Potamogeton malaianus* and algal inhibitory effects of common fatty acids [J]. *Journal of Lake Science*, 2010, **22**(4): 569—576 [胡陈艳, 葛芳杰, 张胜花, 等. 马来眼子菜体内抑藻物质分离及常见脂肪酸抑藻效应. 湖泊科学, 2010, **22**(4): 569—576]
- [17] Kamaya Y, Kurogi Y, Suzuki K. Acute toxicity of fatty acids to the freshwater green alga *Selenstrum capricornutum* [J]. *Environmental Toxicology*, 2003, **18**: 289—294
- [18] Wu J T, Chiang Y R, Huang W Y, *et al.* Cytotoxic effects of free fatty acids on phytoplankton algae and cyanobacteria [J]. *Aquatic Toxicology*, 2006, **80**: 338—345
- [19] Zhang T T, Zheng C Y, He M, *et al.* Inhibition on algae of fatty acids and the structure-effect relationship [J]. *China Environmental Science*, 2009, **29**: 274—279 [张庭廷, 郑春艳, 何梅, 等. 脂肪酸类物质的抑藻效应及其构效关系. 中国环境科学, 2009, **29**: 274—279]
- [20] Xian Q M, Chen H D, Qu L J, *et al.* Allelopathic potential of aqueous extracts of submerged macrophytes against algal growth [J]. *Allelopathy Journal*, 2005, **15**: 95—104
- [21] Erhard D, Gross E M. Allelopathic activity of *Elodea canadensis* and *Elodea nuttallii* against epiphytes and phytoplankton [J]. *Aquatic Botany*, 2006, **85**: 203—211
- [22] Wu Z B, Gao Y N, Wang J, *et al.* Allelopathic effects of phenolic compounds present in submerged macrophytes on *Microcystis aeruginosa* [J]. *Allelopathy Journal*, 2009, **23**(2): 403—410
- [23] Körner S, Nicklisch A. Allelopathic growth inhibition of selected phytoplankton species by submerged macrophytes [J]. *Journal of Phycology*, 2002, **38**: 862—871
- [24] Zhang Z, Wu Z B, He L. The accumulation of alkylphenols in submersed plants in spring in urban lake, China [J]. *Chemosphere*, 2008, **73**: 859—863
- [25] Gross E M. Allelopathy in benthic and littoral areas: case studies on allelochemicals from benthic cyanobacteria and submerged macrophytes [A]. In: Inderjit K M M, Dakshini M, Foy C L (Eds.), *Principles and Practices in Plant Ecology: Allelochemical Interactions* [C]. Boca Raton: CRC Press. 1999, 179—199