

水稻秸秆浸泡液对铜绿微囊藻生理特性的影响

苏文^{1,2}, 孔繁翔^{1*}, 于洋¹, 贾育红^{1,2}, 张民¹

(1. 中国科学院南京地理与湖泊研究所湖泊与环境国家重点实验室, 南京 210008; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 室内利用流式细胞仪对暴露于不同浓度水稻秸秆浸泡液下铜绿微囊藻的细胞生长、细胞膜完整性、膜电位、酯酶活性进行了为期 15 d 的检测, 研究了水稻秸秆浸泡液对铜绿微囊藻生理特性的影响。结果发现, 浸泡 5 d 的水稻秸秆液可以抑制藻的生长, 呈明显的浓度抑制型变化; PI 荧光检测显示暴露于浸泡液各组细胞 (>98%) 的细胞膜保持高度完整; FDA 荧光检测显示与对照组相比, 第 1、4 d 处理组酯酶活性增强和减小的细胞都有增加, 但活性下降的细胞数量明显多于活性增强的细胞, 第 7 d 酯酶活性下降的细胞数量明显增加, 而增强的细胞数量基本不变, 第 10、15 d 酯酶活性正常的细胞数量增加显著, 而酯酶活性下降的细胞数量明显减少, 增强的细胞变化幅度较小; DiOC6(3) 荧光检测显示膜电位在前 7 d 变化显著, 第 10、15 d 变化程度减弱, 与酯酶活性变化趋势一致。分析表明, 浸泡液存在促进和抑制藻细胞生长的两种作用, 抑制作用占据优势, 随着暴露时间延长, 促进作用消失, 抑制作用有所下滑, 浸泡液对藻细胞生长具有抑制性而非致死性的作用。

关键词: 秸秆; 流式细胞仪; 铜绿微囊藻; 光合作用; 酯酶活性

中图分类号: X52 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2013)01-0150-06

Effects of the Rice Straw on *Microcystis aeruginosa* Analyzed by Different Physiological Parameters

SU Wen^{1,2}, KONG Fan-xiang¹, YU Yang¹, JIA Yu-hong^{1,2}, ZHANG Min¹

(1. State Key Laboratory of Lake Science and Environment, Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: The growth and physiology of bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* were determined by the flow cytometry when exposed to rice straw extract for 15 d. The cell growth, cell integrity, mitochondrial transmembrane potential, and esterase activity were used to evaluate the physiological response in *Microcystis aeruginosa*. Rice straw extract stored for 5 days significantly inhibited the growth of *Microcystis aeruginosa* in a concentration-dependent way; Most of the algae cells (>98%) remained complete membranes in all the concentration treatments; Compared with the control cultures, the rice straw induced both negative and positive effects on the esterase activity for each test within 4 days, while the inhibition exceeded the stimulation effect. After a 7 d exposure, only the inhibition effect was found. Neither the inhibited nor stimulated effects was observed after algae exposure from 10 d to 15 d. Evident changes was found in the membrane potential during 7 d experiment, whereas inhibition effect became weaker after 10 d and 15 d exposure, in consistent with the result of esterase activity. These results confirmed that the rice straw extract might provide both dominant inhibition and relatively weak stimulation effects. After a long time exposure, inhibition effect became limited while stimulation effect disappeared. The action of rice straw may be algistatic (preventing algal growth) but not algicidal (killing algae).

Key words: rice straw; flow cytometry; *Microcystis aeruginosa*; photosynthesis; esterase activity

近年来大量的营养盐通过各种途径进入水体, 引起藻类的过度生长, 形成藻类水华, 造成水质的恶化, 某些产毒藻类危害水生动物及人体健康^[1]. 因此, 有效控制富营养化水体中的藻类, 防止水华发生成为目前环境领域的研究热点和前沿^[2].

化感作用 (Allelopathy) 是 1937 年 Molisch 首次提出并定义为某种植物 (包含微生物) 生成的化学物质, 对其他植物产生某种作用的现象^[3]. 目前, 植物化感作用被认为是一种新型的生物抑藻技术, 具有高效、经济、生态学风险小等特点, 近年来备受国内外关注^[4,5]. 80 年代以后, 随着对化感作用等相关研究的深入, 利用农作物秸秆 (大麦、水稻等) 进行抑藻的方法逐步得到了应用. 我

国水稻种植面积广、品种多, 以稻秆抑藻机制为基础, 建立科学的水体生态调控体系, 具有潜在的实用价值.

目前, 国内外已有学者开展了水稻对淡水藻个体及其群体生长抑制作用的研究, Park 等^[6] 采用水稻秸秆甲醇提取物抑制铜绿微囊藻生长, 表明甲醇提取物即使很低的浓度下 ($0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 也可以强烈抑制藻类生长. Park 等^[7] 利用稻壳中提取的单体

收稿日期: 2012-03-20; 修订日期: 2012-06-19

基金项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项 (2012ZX07103-002, 2009ZX07106-005-006); 国家重点基础研究发展规划 (973) 项目 (2008CB418000)

作者简介: 苏文 (1985-), 女, 博士研究生, 主要研究方向为湖泊生物生态学, E-mail: soonhai@126.com

* 通讯联系人, E-mail: f.xkong@niglas.ac.cn

抑制铜绿微囊藻个体及群体生长,发现稻壳内存在强烈抑制藻单体及群体生长的物质。同时, Park 等^[8]利用稻壳提取物对蓝藻、绿藻和浮游动物进行实验,发现蓝藻对其提取物最敏感,绿藻次之,提取物对浮游动物的影响很小。国内学者在水稻秸秆抑藻的化学作用和生物作用进行了诸多探究,证实了水稻秸秆可以抑制蓝藻、球形棕囊藻等藻类的生长^[9-11]。万宏等^[12]和吴小平等^[13]的研究表明细菌存在是水稻秸秆抑藻所必需的,但是张余霞等^[9]发现当水稻秸秆(以干重计)浓度不小于 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,无论细菌存在与否,稻秆均可强烈抑制藻生长。近年来,杨维东等^[10]和冯菁等^[14]研究表明水稻秸秆对藻抑制作用受细菌、有氧无氧、降解时间的综合作用影响。虽然水稻对藻生长的抑制作用已经引起人们关注,但国内外学者对水稻秸秆控藻的研究存在 2 个问题: ①大部分实验为短期暴露实验(4~7 d),不能长时间反映稻秆抑藻效果^[6,10,14]; ②水稻稻秆抑藻机制研究甚少。

本研究以江苏水稻主栽品种武育梗为实验材料,将其浸泡液作用于铜绿微囊藻,实验进行 15 d,运用流式细胞仪(flow cytometry, FCM)对铜绿微囊藻的生长、细胞膜完整性、酯酶活性、膜电位进行检测,分析了稻秆的抑藻机制,以为为秸秆控藻的应用提供理论依据与实际指导。

1 材料与方法

1.1 材料

水稻秸秆用去离子水清洗 3~5 次, 33°C 下干燥 5 d,剪成 2 cm 长的小段,粉碎,过 40 目筛。取 20 g 粉碎的稻秆,分别浸泡于装有 400 mL 无菌水的 1 L 锥形瓶中。密封在 25°C 的人工气候箱放置 5 d 后,稻秆浸泡液过 GF/C 膜用于抑藻实验。

1.2 藻种及培养

藻种铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)由中国科学院武汉水生生物研究所提供,用 BG-11 培养基^[15]于光照培养箱中培养。培养条件为:光强 $40 \mu\text{E} \cdot (\text{m}^2 \cdot \text{s})^{-1}$,温度 25°C ,光暗比 12 h:12 h,每天定时摇晃 3 次。

1.3 实验方法

实验共设置 1 个对照组和 5 个质量浓度梯度组(0.5 、 2 、 4 、 8 、 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),在 100 mL 锥形瓶内加入 35 mL BG11 培养基,高温灭菌后接种处于对数生长期的藻。据 OECD 标准,在进行藻类毒性实验时,藻的初始密度多设定为 $10^4 \sim 10^5 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[16],本研

究接种藻浓度为 $1.6 \times 10^5 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$,抑藻实验体系均用灭菌去离子水定容到 50 mL,对照不加浸泡液,每个浓度梯度 3 个平行样,设置 5 个空白对照,培养 3 d 后加入不同浓度的稻秆浸泡液。分别于实验第 1、4、7、10、15 d 取样,过 300 目滤膜后,分别加入表征细胞膜完整性染料 PI(Sigma, P-4170)^[17],表征膜电位染料 DIOC6(3)(Sigma)^[18]和表征细胞膜选择透过性染料 FDA(Sigma, F-7378)^[19,20],加入各染料的浓度为 10 、 25 、 $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,对应的 25°C 暗室温育时间为 15、8、15 min。温育后的样品,立即使用流式细胞仪进行测定。

1.4 仪器分析

应用 FACS Vantage SE 流式细胞仪(Becton Dickinson)进行样品的测定,激光器为 Coherent 水冷氩离子激光器,激发的波长为 488 nm。FL2 通道处收集 PI 荧光,荧光检测波长为 560~590 nm,FL1 通道处收集 FDA 和 DIOC6(3) 荧光,荧光检测波长为 530~560 nm。每个样品检测细胞 10 000 个,检测到的数据用 WinMDI 软件分析^[20]。

1.5 统计分析

采用 SPSS 16.0 软件包进行统计分析,组间差异利用 one-way analysis of variance (ANOVA) 分析, $P < 0.05$ 表示显著性差异, $P < 0.01$ 表示极显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 水稻秸秆对铜绿微囊藻生长的抑制作用

采用不同浓度的水稻秸秆浸泡液处理铜绿微囊藻,对藻的生长进行了 15 d 的监测。用细胞密度相对对照组百分比表征暴露于 0.5 、 2.0 、 4.0 、 8.0 和 $10.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下的水稻秸秆浸泡液对铜绿微囊藻的抑制作用(图 1)。结果发现,处理组的藻从第 1 d 开始,其生长就受明显抑制,第 15 d 时高浓度处理组($8.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $10.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)抑藻效果仍可高达 60% 左右,与对照相比具有极显著差异($P < 0.01$),有别于相关学者的研究结果^[9,11]。Choe 等^[21]研究发现 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的水稻秸秆可促进铜绿微囊藻生长。Xiao 等^[22]观察到,第 1 d 时,低浓度的大麦秆提取液能促进铜绿微囊藻的生长。造成这种差异的原因可能与实验中所用的实验材料、藻起始密度、藻株、浸泡液浓度等不同有关。例如,芦苇化感物质 2-甲基乙酰乙酸乙酯(EMA)抑制起始密度低羊角月牙藻(*Selenastrum capricornutum*)的生长,但是促进起始密度高羊角

月牙藻的生长^[23].

水稻秸秆对铜绿微囊藻生长的抑制效果随着暴露浓度的增加而显著升高,暴露时间不同,其抑藻效果也不同.第1~7 d,随暴露时间的延长抑制效果增强.2、4和8 g·L⁻¹处理组藻细胞密度占对照组百分比分别由第1 d的66%、59%、52%下降至第7 d的42%、42%、41%.第10~15 d时,抑藻效果与前7 d相比有所减弱.2 g·L⁻¹和4 g·L⁻¹处理组占对照组百分比第10 d和第15 d分别为60%、45%和68%、46%.据此推测稻秆抑藻的物质可能不太稳定,导致时间延长抑藻效果有所下滑,这与张玲等^[24]的研究结果类似.他们认为未灭菌稻秆的活性物质可能对氧气或微生物敏感,时间越长,抑藻效果越差.

对有抑藻活性的物质,首先需要解决的问题是确定它对藻类生长的作用是抑制性的(抑制藻类生长)还是致死性的(杀死细胞).本实验利用PI染料大分子,借助流式细胞技术对藻细胞膜完整性进行了检测.细胞膜完整的藻细胞拒绝PI的进入,只有细胞膜受损的细胞,PI才能进入其内并与核酸物质结合,所以PI荧光强度越强说明细胞膜受损害程度越严重^[19,20].实验结果(表1)显示,5个浓度处理组(0.5、2、4、8、10 g·L⁻¹)的铜绿微囊藻在15 d的暴露实验中,PI荧光强度很低,提示藻细胞膜完

表1 铜绿微囊藻暴露1、4、7、10、15 d后细胞膜完整性变化¹⁾

Table 1 Cell membrane integrity of *Microcystis aeruginosa* cells after a 1, 4, 7, 10 and 15 d rice straw exposure

项目	1 d	4 d	7 d	10 d	15 d
对照组	98.86(±0.01)	98.93(±0.02)	98.94(±0.03)	98.96(±0.02)	98.72(±0.01)
0.5 g·L ⁻¹	98.86(±0.02)	98.93(±0.03)	98.94(±0.04)	98.96(±0.05)	98.72(±0.06)
2.0 g·L ⁻¹	98.83(±0.02)	98.96(±0.02)	98.85(±0.03)	98.96(±0.05)	98.61(±0.04)
4.0 g·L ⁻¹	98.85(±0.04)	98.93(±0.05)	98.94(±0.06)	98.91(±0.03)	98.91(±0.05)
8.0 g·L ⁻¹	98.79(±0.01)	98.97(±0.02)	98.97(±0.03)	98.97(±0.02)	98.92(±0.03)
10.0 g·L ⁻¹	98.74(±0.05)	98.96(±0.01)	98.96(±0.02)	98.95(±0.05)	98.89(±0.01)

1) 细胞膜完整性以PI未染色细胞占总细胞数的百分比(%) (±SD)表示

大麦秸秆控藻在野外已取得多个成功的实例^[25,27],但是大麦杆产生抑藻作用前需要进行为期3个月的有氧降解^[28,29].计算水稻秸秆浸泡液抑制铜绿微囊藻生长的15 d半数抑制浓度(EC₅₀,以干重计,下同)为6.003 g·L⁻¹(表2),而大麦杆降解50 d的浸泡液对铜绿微囊藻15 d EC₅₀为4.3 g·L⁻¹^[22],两者相差不大.需要说明的是,稻秆只需要进行5 d降解即可产生与大麦杆相似程度的抑制效果,表明在野外控藻应用时,稻秆的前处理比大麦杆简单易行.

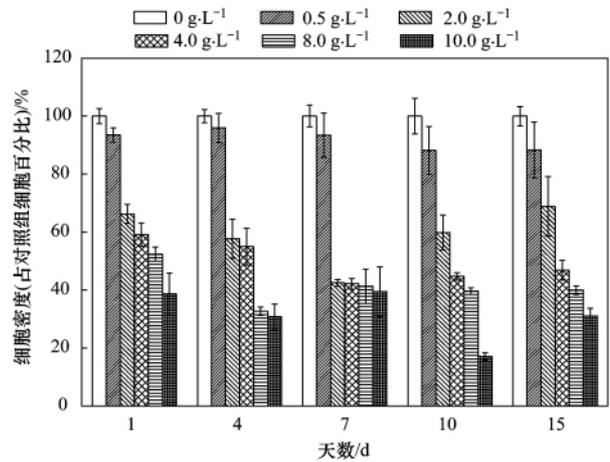


图1 不同浓度水稻秸秆浸泡液对铜绿微囊藻暴露1、4、7、10、15 d后生长的抑制作用

Fig. 1 Inhibition effect on growth of *Microcystis aeruginosa* cells after a 1, 4, 7, 10 and 15 d rice straw exposure

整性未受到影响,大部分细胞保持完整(>98%).这表明水稻秸秆对铜绿微囊藻的抑制作用是抑制性的而非致死性的,这与大麦杆的研究结果相同^[22,25].也有研究表明,利用盐京九号稻秆水提取液作用于铜绿微囊藻,出现了藻细胞黄化沉底现象,表明藻体出现死亡^[9].水稻的水生环境不同,抑制浮游藻类的机制可能不同,同时除了所用实验材料不同外,藻细胞自身的生理状态、藻密度都可能影响除藻效果^[26].

表2 铜绿微囊藻细胞生长、酯酶、膜电位在1、4、7、10、15 d的EC₅₀值

Table 2 Effect of rice straw on cell growth, esterase activity, membrane potential of *Microcystis aeruginosa* cells

项目	EC ₅₀ /g·L ⁻¹				
	1 d	4 d	7 d	10 d	15 d
细胞生长	7.64	5.701	7.532	5.348	6.003
酯酶	8.932	16.983	9.357	—	—
膜电位	4.499	6.394	4.052	4.154	6.409

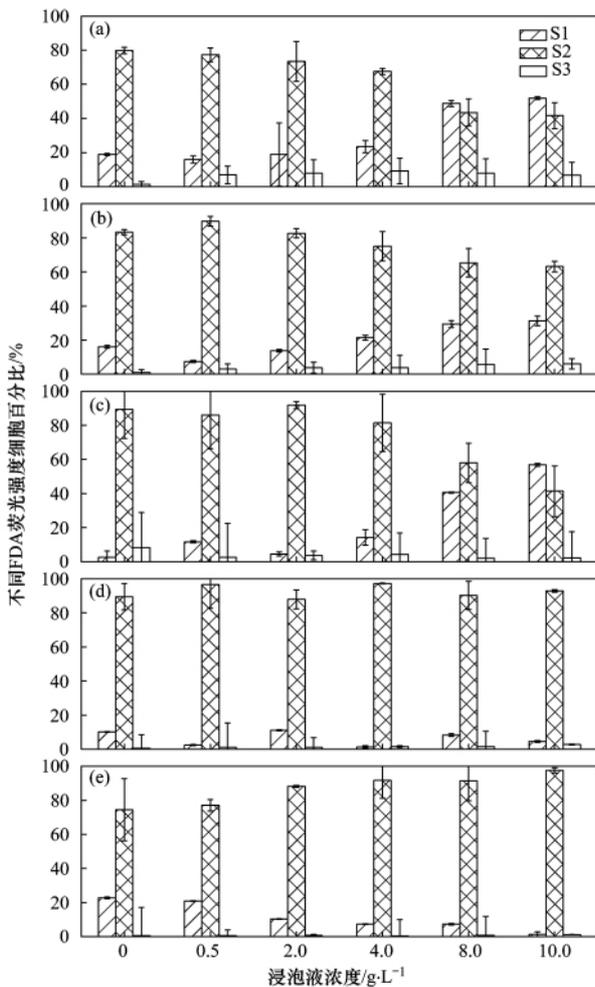
2.2 水稻秸秆抑制铜绿微囊藻生长的生理响应

目前水稻秸秆抑制铜绿微囊生长的机制尚不清

楚,这是限制和影响秸秆野外大范围应用的主要原因^[10].利用荧光染料 FDA 和 DIOC6(3)对暴露于不同浓度水稻秸秆浸泡液的铜绿微囊藻酯酶活性和膜电位进行检测,深入揭示稻秆抑藻的机制,以期填补国内外研究的空白.酯酶活性作为流式细胞仪检测中敏感的毒理学指标,可以用来反映细胞的新陈代谢活性^[30,31].各处理组不同 FDA 荧光强度的细胞百分比分布(图 2)显示,实验第 1 d,所有处理组 S1 区域(酯酶下降)和 S3 区域(酯酶上升)细胞数目明显多于对照组,酯酶下降细胞比例随浸泡液浓度增加而增加.第 4 d 时,各处理组 S1 和 S3 区域细胞百分比虽然大于对照组,但是低于第 1 d 的细胞百分比.第 1 d 8、10 g·L⁻¹处理组 S1 区域和 S3 区域细胞百分比分别为 49%、52%和 8%、7%,都显

著高于对照组(19%,*P* < 0.01; 1%,*P* < 0.01).第 4 d 8、10 g·L⁻¹处理组 S1 区域和 S3 区域细胞百分比分别为 29%、31%和 6%、5%,虽然仍高于对照组(16%、1%),但是只有 10 g·L⁻¹处理组 S1 区域和 S3 区域细胞百分比与对照组有显著差异(*P* < 0.05).酯酶活性下降和上升的细胞数量明显低于实验第 1 d.第 7 d 各处理组只有 S1 区域细胞增加, S3 区域细胞不再增加.第 10~15 d,各处理组藻的酯酶活性不再降低,随着浸泡液处理浓度的升高,正常细胞的数量越来越高.笔者推测水稻秸秆浸泡液存在抑制和促进藻细胞生长的两种作用,因为抑制作用占据优势,所以前 7 d 细胞生长受到抑制.浸泡液中的抑制物质可能随着时间延长不稳定^[24],所以第 10~15 d 藻细胞的酯酶活性不再受到抑制.水稻秸秆中存在促进藻类生长的化学成分在其他研究中也类似发现^[21,22],Park 等^[7]自水稻稻壳中提纯的 10 种单体,有 2 种可促进单体铜绿微囊藻生长.Xiao 等^[22]实验表明大麦秆中也存在对藻的促进作用,不过随着暴露时间延长,这种作用越来越弱.有些学者认为细胞膜渗透性的改变会影响 FDA 的摄入^[32],进而引起 FDA 的改变,但是细胞膜完整性的结果证明实验第 1、4 和 7 d FDA 的降低与膜渗透性改变无关,这种降低是因为水稻秸秆抑制了铜绿微囊藻酯酶活性造成的,酯酶活性的降低也在藻类生长受到抑制的结果上再次得到证实.

DIOC6(3)是一种带阳离子的荧光染料,由于膜电位内负外正,细胞膜可以选择性的对其进行富集.当膜电位发生去极化时(膜电位下降),DIOC6(3)荧光强度下降;当膜电位超级化时(膜电位上升),DIOC6(3)荧光强度增强^[33].所以 DIOC6(3)荧光强度的变化被用来表征藻细胞中膜电位的变化^[34,35].不同暴露时间 DIOC6(3)荧光强度平均值的变化(图 3)显示,第 1 d 低浓度(0.5 g·L⁻¹、2 g·L⁻¹)膜电位分别升至对照组的 1.4 和 1.3 倍,高浓度(4.0、8.0 和 10.0 g·L⁻¹)分别下降至对照组的 40%、18%、16%;第 4 d 膜电位下降,但是高浓度(4.0、8.0 和 10.0 g·L⁻¹)下降至对照组 51%、41%、19%,下降程度弱于第 1 d;第 7 d 2 g·L⁻¹浓度组膜电位升至最高为对照组的 174%,高浓度组(4.0 g·L⁻¹和 8.0 g·L⁻¹)降至最低点,分别为对照组的 22%、17%;说明第 7 d 时膜电位受到水稻秸秆影响发生明显变化,细胞膜的生理功能可能受到严重影响,发生紊乱.第 10~15 d,膜电位随暴露浓度升高仍在降低,但是随着暴露时间延长,降低程度



左侧 S1 为 FDA 荧光强度减少细胞区,中间 S2 为健康对照细胞区,右侧 S3 为 FDA 荧光强度增加区域

图 2 铜绿微囊藻暴露 1、4、7、10、15 d 后不同 FDA 荧光强度细胞百分比

Fig. 2 Cell percentage under different FDA fluorescence(%) of *Microcystis aeruginosa* cultures after a 1, 4, 7, 10 and 15 d rice straw exposure

减弱,高浓度组(4.0、8.0和10.0 g·L⁻¹)在第15 d时膜电位相当于对照组的42%、39%、39%。结合酯酶活性变化的结果(图2),笔者认为第4 d高浓度组膜电位下降程度减弱可能受部分细胞生长被促进影响,第10~15 d膜电位下降程度的减弱推测是抑藻作用下滑引起的。

目前藻类研究中常用的生理指标为酯酶,而对膜电位的研究较少,表2的结果可以看出:除第4 d外,膜电位 EC₅₀ < 生长 EC₅₀ < 酯酶 EC₅₀。第4 d膜电位 EC₅₀ > 生长 EC₅₀,这可能是由于部分细胞受到稻秆促进作用引起的。因此笔者认为膜电位也可以敏感地反应藻的生理变化,在研究藻生长的实验中可能是更优于酯酶的毒理学指标。

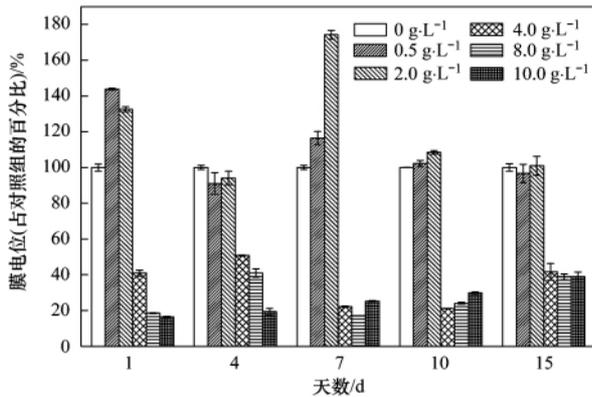


图3 不同暴露时间 DIOC6(3) 荧光强度平均值的变化

Fig. 3 DIOC6(3) mean fluorescence intensity of *M. aeruginosa* exposed to different time

细胞密度变化可直观反映抑藻效果,但不能说明藻类在形态、结构以及生理方面的变化。通过细胞膜完整性、膜电位、酯酶活性的变化分析,可深入理解稻秆浸泡液对铜绿微囊藻的作用机制:显著影响酯酶活性和膜电位(图2、图3),其响应规律与细胞生长状况较为吻合;而对细胞膜完整性基本没有影响(表1)。

3 结论

(1) 不同浓度水稻秸秆浸泡液处理铜绿微囊藻时,随着暴露时间的延长抑制效果呈先增强后下滑的趋势,但是高浓度组在第15 d时的抑制率仍然高达60%以上。

(2) 前7 d内,酯酶活性增强和减弱的细胞数量都有所增加,但随藻细胞暴露时间延长,活性增强的细胞数量不再增加,活性被抑制的细胞数量持续显著增加;藻细胞膜电位在低浓度处理组发生超级化,高浓度组发生去极化。秸秆浸泡液对藻类生长

的影响存在促进和抑制两种作用,抑制作用占据优势,同时浸泡液严重影响了藻细胞的膜功能。第10~15 d,酯酶活性和膜电位受到的影响都减弱,与浸泡液对铜绿微囊藻生长抑制作用下降的规律相吻合。15 d的暴露实验中,藻细胞膜完整性未受到影响。生理指标检测结果表明水稻秸秆对铜绿微囊藻生长的作用是抑制性的而非致死性的,建议野外控藻应用时应考虑持续或反复添加。

(3) 对比藻细胞生长、酯酶和膜电位的半抑制浓度值,发现膜电位的 EC₅₀ 最小,提示膜电位可以作为检测铜绿微囊藻生理状态的灵敏指标。

致谢:在实验过程中得到了龚伊、阳振、卢亚萍、史小丽、刘凌光、吴松涛、段晓尘、钱梦雨、赵旭辉等人的帮助,并且在论文的写作和修改中得到了姜广甲同学的帮助,在此一并感谢!

参考文献:

- [1] 孔繁翔,高光. 大型浅水富营养化湖泊中蓝藻水华形成机理的思考[J]. 生态学报,2005,25(3): 589-595.
- [2] 胡洪营,门玉洁,李锋民. 植物化感作用抑制藻类生长的研究进展[J]. 生态环境,2006,15(1): 153-157.
- [3] Molisch H. Der Einfluss einer Pflanze auf die andere Allelopathie: Fischer[M]. 1937.
- [4] 张彬,王书敏,刘小兵,等. 植物化感抑藻物质研究[J]. 给水排水,2011,37(4): 115-121.
- [5] Vyvyan J R. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals[J]. Tetrahedron,2002,58(9): 1631-1646.
- [6] Park M H, Han M S, Ahn C Y, et al. Growth inhibition of bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* by rice straw extract[J]. Letters in Applied Microbiology, 2006, 43(3): 307-312.
- [7] Park M H, Chung I M, Ahmad A, et al. Growth inhibition of unicellular and colonial *Microcystis* strains (*Cyanophyceae*) by compounds isolated from rice (*Oryza sativa*) hulls[J]. Aquatic Botany, 2009, 90(4): 309-314.
- [8] Park M H, Kim B H, Chung I M, et al. Selective bactericidal potential of rice (*Oryza sativa* L. var. *japonica*) hull extract on microcystis strains in comparison with green algae and zooplankton[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2009, 83(1): 97-101.
- [9] 张余霞,张玲,张阳阳,等. 盐京九号水稻秸秆对铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)的抑制作用[J]. 生态与农村环境学报,2008,24(3): 60-63.
- [10] 杨维东,高洁,刘洁生,等. 稻秆浸泡液化学成分变化对抑制球形棕囊藻(*Phaeocystis globosa*)生长的影响[J]. 生态学报,2007,27(12): 5184-5192.
- [11] 刘洁生,杨维东,高洁,等. 稻、麦秸秆对球形棕囊藻(*Phaeocystis globosa*)生长的抑制作用[J]. 生态学报,2007,27(11): 4498-4505.
- [12] 万宏,张昀. 降解稻草对蓝藻生长的抑制作用[J]. 北京大

- 学学报(自然科学版), 2000, **36**(4): 485-488.
- [13] 吴小平, 张平静. 发酵稻草抑藻机理研究[J]. 生态环境, 2006, **15**(1): 20-22.
- [14] 冯菁, 朱擎, 吴为中, 等. 稻草浸泡液对藻类抑制作用机制[J]. 环境科学, 2008, **29**(12): 3376-3381.
- [15] Rippka R, Deruelles J, Waterbury J B, *et al.* Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria[J]. Journal of General Microbiology, 1979, **111**(1): 1-61.
- [16] 欧阳慧灵, 孔祥臻, 何玘霜, 等. Cu^{2+} 对普通小球藻的光合毒性: 初始藻密度的影响[J]. 生态毒理学报, 2011, **6**(5): 499-506.
- [17] 于洋, 孔繁翔, 王美林, 等. 应用流式细胞技术研究铜对藻细胞膜完整性及脂酶活性的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2006, **12**(5): 706-709.
- [18] Shapiro H M, Natale P J, Kamensky L A. Estimation of membrane-potentials of individual lymphocytes by flow cytometry[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1979, **76**(11): 5728-5730.
- [19] Yu Y, Kong F X, Wang M L, *et al.* Determination of short-term copper toxicity in a multispecies microalgal population using flow cytometry[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2007, **66**(1): 49-56.
- [20] Zhang M, Kong F X, Wu X D, *et al.* Different photochemical responses of phytoplankters from the large shallow Taihu Lake of subtropical China in relation to light and mixing [J]. Hydrobiologia, 2008, **603**(1): 267-278.
- [21] Choe S, Jung I. Growth inhibition of freshwater algae by ester compounds released from rotted plants[J]. Journal of Industrial and Engineering Chemistry-Seoul, 2002, **8**(4): 297-304.
- [22] Xiao X, Chen Y X, Liang X Q, *et al.* Effects of Tibetan hullless barley on bloom-forming cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) measured by different physiological and morphologic parameters [J]. Chemosphere, 2010, **81**(9): 1118-1123.
- [23] Hong Y, Hu H Y, Li F M. Growth and physiological responses of freshwater green alga *Selenastrum capricornutum* to allelochemical ethyl 2-methyl acetoacetate (EMA) under different initial algal densities [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2008, **90**(3): 203-212.
- [24] 张玲. 盐京九号水稻(*Oryza sativa* L. Yanjing 9) 抑制铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*) 生长作用及其机制的研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2008. 38-41.
- [25] Welch I, Barrett P R F, Gibson M T, *et al.* Barley straw as an inhibitor of algal growth I: studies in the Chesterfield Canal [J]. Journal of Applied Phycology, 1990, **2**(3): 231-239.
- [26] 梁耀懋, 赵艳红, 彭懿紫, 等. 水稻化感种质筛选的初步研究[J]. 广西农业生物科学, 2005, **24**(1): 27-29.
- [27] Barrett P R F, Curnow J C, Littlejohn J W. The control of diatom and cyanobacterial blooms in reservoirs using barley straw [J]. Hydrobiologia, 1996, **340**(1-3): 307-311.
- [28] Pillinger J W, Cooper J A, Ridge I. Role of phenolic compounds in the anti-algal activity of barley straw [J]. Journal of Chemical Ecology, 1994, **20**(7): 1557-1569.
- [29] Gibson M T, Welch I M, Barrett P R F, *et al.* Barley straw as an inhibitor of algal growth II: laboratory studies [J]. Journal of Applied Phycology, 1990, **2**(3): 241-248.
- [30] Shi X L, Kong F X, Yu Y, *et al.* Survival of *Microcystis aeruginosa* and *Scenedesmus obliquus* under dark anaerobic conditions [J]. Marine and Freshwater Research, 2007, **58**(7): 634-639.
- [31] Li J, Ou D, Zheng L, *et al.* Applicability of the fluorescein diacetate assay for metabolic activity measurement of *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanobacteria) [J]. Phycological Research, 2011, **59**(3): 200-207.
- [32] Rioboo C, O'Connor J E, Prado R, *et al.* Cell proliferation alterations in *Chlorella* cells under stress conditions [J]. Aquatic Toxicology, 2009, **94**(3): 229-237.
- [33] Shapiro H M. Cell membrane potential analysis [J]. Methods in Cell Biology, 1994, **41**: 121-133.
- [34] Varvarigos V, Galatis B, Katsaros C. Radial endoplasmic reticulum arrays co-localize with radial F-actin in polarizing cells of brown algae [J]. European Journal of Phycology, 2007, **42**(3): 253-262.
- [35] Holzinger A, Lütz C, Karsten U. Desiccation stress causes structural and ultrastructural alterations in the aeroterrestrial green alga *Klebsormidium crenulatum* (Klebsormidiophyceae, stryptophyta) isolated from an alpine soil crust [J]. Journal of Phycology, 2011, **47**(3): 591-602.