

化感物质肉桂酸乙酯对蛋白核小球藻生长及生理特性的影响

高李李 郭沛涌* 苏光明 魏燕芳

(华侨大学化工学院环境科学与工程系 厦门 361021)

摘要: 探讨了肉桂酸乙酯对蛋白核小球藻生长及生理特性的影响,从叶绿素a含量、抗氧化系酶活性、活性氧自由基(ROS)水平、丙二醛(MDA)含量以及光合活性的变化研究了其抑藻的生理生化机制。结果表明,肉桂酸乙酯对蛋白核小球藻具有快速抑制效应,随着浓度的增加抑制效果越明显。其96 h半效应浓度EC₅₀值为5.45 mg·L⁻¹。肉桂酸乙酯引起细胞内叶绿素a含量下降、活性氧(ROS)的过度累积和MDA含量的增加。由此,说明肉桂酸乙酯通过引起活性氧的过度产生,导致膜脂过氧化,引起藻细胞膜系统受损,代谢发生紊乱。为了清除ROS,细胞通过提高抗氧化系酶的活性来保护其免受氧化损伤。肉桂酸乙酯对蛋白核小球藻细胞光合系统Ⅱ的最大光化学量子产量和潜在活性具有一定的急性毒性效应,但随着时间的延长藻细胞可以通过自身调节在一定程度上恢复其光合活性。

关键词: 肉桂酸乙酯; 蛋白核小球藻; 生理特性; 光合活性; 除藻剂

中图分类号: X52 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2013)01-0156-07

Effects of Allelochemicals Ethyl Cinnamate on the Growth and Physiological Characteristics of *Chlorella pyrenoidosa*

GAO Li-li, GUO Pei-yong, SU Guang-ming, WEI Yan-fang

(Department of Environmental Science and Engineering, College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

Abstract: The effects of ethyl cinnamate on the growth and physiological characteristics of *Chlorella pyrenoidosa* were studied. The allelopathic mechanisms were explored, from views of chlorophyll a content, antioxidant enzyme activities, reactive oxygen species (ROS) level, malondialdehyde (MDA) content and photosynthetic activity. The results revealed that ethyl cinnamate had acute inhibitory effects on the growth of *Chlorella pyrenoidosa*, and the inhibited degree tended to increase with increased concentrations. The effective concentration causing a 50% inhibition at 96 h was 5.45 mg·L⁻¹. Ethyl cinnamate induced the decrease of chlorophyll a, the over-accumulation of ROS and the increase of MDA. Therefore, it suggested that ethyl cinnamate could lead to the damage of cell membrane system and metabolic disorder through inducing lipid peroxidation via initiating ROS overproduction. And for scavenging ROS, the algae cells were protected from oxidative damages through increasing the activity of antioxidant enzymes. The results demonstrated ethyl cinnamate had acute inhibition to the maximum quantum yield and the potential activity of photosystem II of *Chlorella pyrenoidosa*, however, the photosynthetic activity could recover to some extent through self-regulation after some time.

Key words: ethyl cinnamate; *Chlorella pyrenoidosa*; physiological characteristics; photosynthetic activity; algaecide

目前,全球由水体富营养化引起的藻类水华频频暴发,造成水生生物大量死亡,给渔业、生态环境及人类健康造成严重危害。如何有效控制富营养化水体中的藻类生长,防止水华发生成为目前水环境领域的研究热点之一^[1-2]。常用的灭藻剂大多为氧化型灭藻剂,如氯气、次氯酸钠等,虽然效率高、价廉,但产生二次污染,且腐蚀性强,因此,寻找高效、安全、经济与环境友好型灭藻剂是当务之急^[3-4]。利用化感作用抑制藻类的生长因可生物降解性和生态安全性而日益受到学者的重视^[5-8]。许多研究者从植物中分离鉴定出脂肪酸类、多酚类等化感物质,它们对一些水华蓝藻有一定的抑制作用。例如,从凤眼莲中分离出N-苯基-2-萘胺和亚油酸甘油

酯^[9],马蹄莲中 α -亚麻酸和亚油酸^[10],芦苇中2-甲基乙酰乙酸乙酯^[11]。国外学者从穗花狐尾藻中分离出多种酚酸类化感物质(如鞣花酸、没食子酸等),并证实其对铜绿微囊藻的生长有不同程度的抑制作用^[12]。从目前的研究结果来看,当前利用水生植物控制藻类,主要集中于沉水植物^[13-15]、挺水植物^[11,16]和浮水植物等^[17,18]。但对陆生植物尤其是大型木本植物化感抑藻的研究相对较少,与水生

收稿日期: 2012-04-03; 修订日期: 2012-06-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(20777021); 教育部科学技术研究重点项目(210253); 福建省自然科学基金项目(2010J01043); 华侨大学科研基金项目(10HZR11)

作者简介: 高李李(1987~),女,硕士,主要研究方向为环境生物修复,E-mail: gllcool2009@163.com

* 通讯联系人,E-mail: guopeiyong@sina.com

植物相比,陆生植物具有材料来源广、数量大、生长稳定,用于萃取抑藻物质的原材料可以得到保障。因此,研究大型木本植物对藻类的化感作用具有很重要的理论与现实意义。笔者前期以大型木本植物柳树为对象,分离鉴定出含量较多的化感抑藻物质肉桂酸乙酯,它属于酚酸类衍生物,一种常见的合成香料,具有水果或花香的特殊香味,是食用香精和日用香精的常用配料。本研究以肉桂酸乙酯为抑藻剂,分析了其对蛋白核小球藻生长、叶绿素a含量、丙二醛(MDA)含量、抗氧化酶活性以及光合活性的影响,揭示其制藻机制,以期为陆生植物化感物质用于藻类控制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

蛋白核小球藻(*Chlorella phrenoidosa*)购自中国科学院武汉水生所淡水藻种库,采用SE培养基培养。肉桂酸乙酯购自上海思域化工科技有限公司,分析纯,纯度98%。

1.2 实验方法

1.2.1 蛋白核小球藻培养

实验前一周,将藻分别接种于装有100 mL SE培养基的250 mL锥形瓶中,进行扩大培养,培养条件为:温度25℃,光照强度3 000~4 000 lx,光暗比14 h:10 h,每天摇动3~4次,同时随机调换三角瓶放置位置,待达到指数生长期时(藻密度约为 $5 \times 10^5 \sim 6 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$)用于进一步实验。采用二甲基亚砜作为助溶剂将肉桂酸乙酯配成母液待用,然后将其加入到SE培养基中,使肉桂酸乙酯的终浓度分别为0、2、4、8、10 mg·L⁻¹,每组设3个平行,所有操作均在无菌条件下进行,以排除微生物的干扰。受试藻液中二甲基亚砜的最终含量低于0.2%,以排除二甲基亚砜的干扰。

1.2.2 藻细胞密度测定

采用血球计数板显微技术法测定藻细胞密度,并于680 nm波长处测定其吸光度,得到蛋白核小球藻细胞密度($Y = 5 \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$)与藻液吸光度 D_{680} (X)的关系: $Y = 357.37X + 0.2904$ ($R^2 = 0.9992$)。两者相关性较好,所以每天定时测定藻液的光密度值(D 值)来反映藻生长情况。

1.2.3 抗氧化酶活性的测定

藻液处理96 h后,离心收集藻细胞,并迅速放入冰浴中,加入50 mmol·L⁻¹磷酸缓冲液(pH 7.8)用超声细胞破碎仪破碎(功率500 W),处理20 min

后4℃12 000 r·min⁻¹离心15 min,上清液即为粗酶提取液,低温保存待用。超氧化物歧化酶(SOD)采用邻苯三酚自氧化法测定。过氧化氢酶(CAT)采用过氧化氢法测定。

1.2.4 活性氧自由基(ROS)水平的测定

藻液处理24 h后,离心收集藻细胞,重悬浮于无血清培养液中,加入荧光探针DCFH-DA,37℃孵育20 min。然后用无血清培养液将藻细胞洗涤至少3次,以除去细胞外残留的荧光染料。最后激光共聚焦显微镜(LSM710,德国Zeiss公司)镜检拍照。

1.2.5 丙二醛(MDA)含量的测定

过氧化脂质降解产物中的丙二醛可与硫代巴比妥酸(TBA)缩合,形成红色产物,在532 nm处有最大吸收峰。采用硫代巴比妥酸法测定藻细胞中MDA含量。

1.2.6 叶绿素荧光参数的测定

叶绿素的含量及其荧光参数采用浮游植物分析仪(Phyto-PAM Phytoplankton Analyzer,德国Walz公司)进行测定。测定方法参考文献[19]并略有改动。

1.3 数据处理

肉桂酸乙酯对藻细胞生长的抑制率计算公式为:

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

式中IR为抑制率;N为处理组藻细胞密度;N₀为对照组藻细胞密度。

半效应浓度EC₅₀的计算用生长面积法计算96 h EC₅₀:

$$A = \frac{(N_1 - N_2)}{2} \times t_1 + \frac{(N_1 + N_2 - 2N_0)}{2}$$

$$\times (t_2 - t_1) + \cdots + \frac{(N_{n-1} + N_n - 2N_0)}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

式中A为生长曲线以下面积;N_n为t_n时刻细胞密度;t_n为实验开始后第n次计数时间;I_A为生长抑制百分率 $I_A = (A_c - A_t) / A_c \times 100\%$;A_c为空白组生长曲线以下面积;A_t为受试浓度生长曲线以下面积。以I_A为纵坐标,以浓度对数为横坐标作图,I_A值为50%所对应的浓度即为EC₅₀值。

数据采用SPSS 18.0软件包进行统计分析,利用Origin 8.0进行作图。对照组与处理组采用单因素方差分析 $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 肉桂酸乙酯对蛋白核小球藻生长的影响

图 1 为不同浓度肉桂酸乙酯对蛋白核小球藻生长曲线和抑制率的变化情况。从中可知,当肉桂酸乙酯浓度 $\leq 2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,蛋白核小球藻的生长都受到一定的抑制作用,且抑制率与投加浓度呈正相关。浓度为 2、4、8 和 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组在处理前 4 d 的平均抑制率分别为 10.7%、30.6%、57.3% 和 74.6%。可

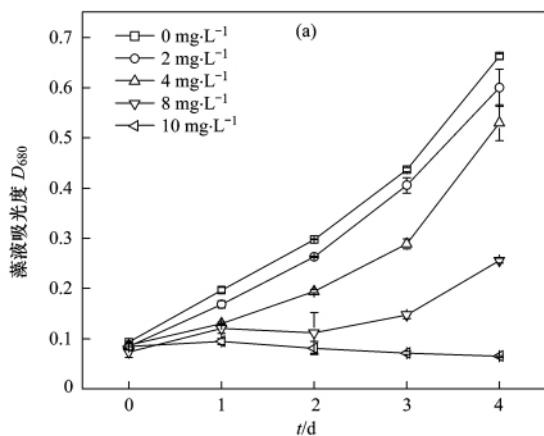


图 1 肉桂酸乙酯对蛋白核小球藻生长的影响

Fig. 1 Effects of ethyl cinnamate on the growth of *Chlorella pyrenoidosa*

2.2 肉桂酸乙酯对蛋白核小球藻叶绿素 a 含量的影响

肉桂酸乙酯对蛋白核小球藻叶绿素 a 含量的影响见图 2。4、8 和 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度处理组的叶绿素 a 含量则呈现先下降后上升的趋势,这与生长抑制率曲线相对应,且与对照组对比,均呈现显著性差异($P < 0.05$)。表现出明显的剂量-效应关系。与藻细胞密度变化趋势相似,浓度为 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时抑制作用最大,在第 3 d 叶绿素 a 含量仅为对照组的 1.4%。

2.3 肉桂酸乙酯对蛋白核小球藻抗氧化酶活性的影响

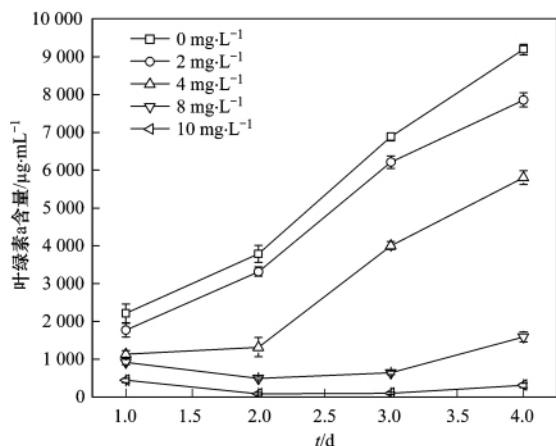


图 2 肉桂酸乙酯对蛋白核小球藻叶绿素 a 含量的影响

Fig. 2 Effects of ethyl cinnamate on the chlorophyll a content of *Chlorella pyrenoidosa*

见,浓度为 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组的抑制作用最大,且随着处理时间的延长抑制率逐渐增大,在第 2 d 时抑制率达到 72.6%,表现出快速抑制效应。此外,在 $2 \sim 8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度范围内,处理第 2 d 后抑制率呈现逐渐下降的趋势。通过计算得出肉桂酸乙酯对蛋白核小球藻 96 h 半致死浓度 EC_{50} 为 $5.45 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

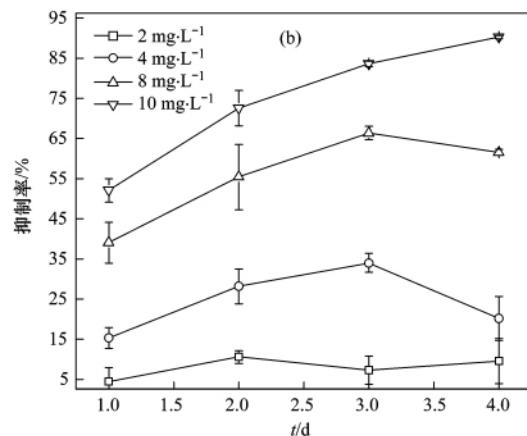


图 1 肉桂酸乙酯对蛋白核小球藻生长的影响

生物体内存在可以清除自由基的抗氧化体系酶类,如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT),在机体受到逆境胁迫时可以维持代谢平衡,保护细胞免受氧化损伤。不同浓度肉桂酸乙酯对四尾栅藻 SOD、CAT 活性的影响如图 3 所示。各浓度处理组藻细胞的 SOD 和 CAT 活性与对照组相比都显著升高($P < 0.05$)。浓度为 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组的 SOD 活性达到最高,是对照组的 54.8 倍,表明蛋白核小球藻细胞内产生了较多的活性氧自由基,为了清除有害的自由基细胞内 SOD 和 CAT 活性显著增加。

2.4 肉桂酸乙酯对蛋白核小球藻 ROS 水平和 MDA 含量的影响

在外界胁迫下,植物体内活性氧自由基的产量会升高,活性氧自由基的毒害会发生膜脂过氧化作用,产生丙二醛(MDA),严重损伤细胞膜系统。图 4 所示,对照组和 $8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 肉桂酸乙酯处理 24 h 后收集藻细胞,装载 ROS 测定荧光探针后拍照的结果。 $8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组细胞内 ROS 水平明显高于对照组,这与 2.3 节结果相对应。可见,肉桂酸乙酯可以引起蛋白核小球藻细胞内 ROS 的积累,导致氧化损伤。不同浓度肉桂酸乙酯处理的蛋白核小球藻细胞内 MDA 含量见图 5。当肉桂酸乙酯浓度高于 $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,各处理组细胞内 MDA 含量都显著升高($P < 0.05$)。MDA 含量的变化与 ROS 的积累相对应。当

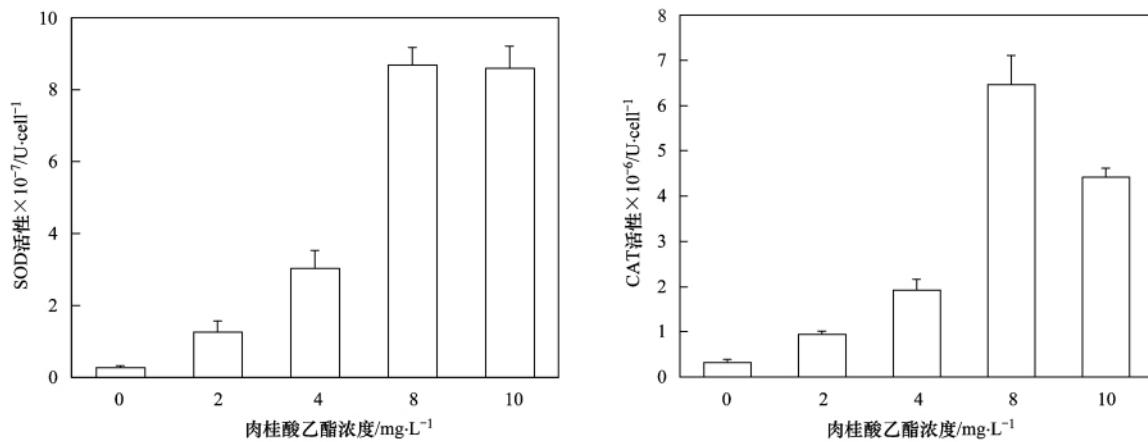


图 3 肉桂酸乙酯对蛋白核小球藻 SOD 和 CAT 酶活性的影响

Fig. 3 Effects of ethyl cinnamate on SOD and CAT activities of *Chlorella pyrenoidosa*

浓度达到 $8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, MDA 含量达到最高, 而 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组 MDA 含量相对较少, 这可能是由于肉桂酸乙酯浓度过高, 藻细胞膜受到严重氧化损伤, 细胞膜破裂, 内含物溢出。

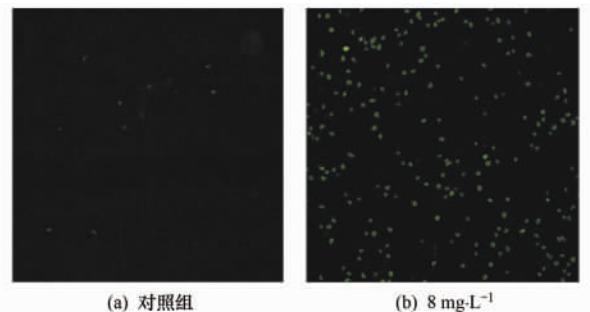


图 4 肉桂酸乙酯对蛋白核小球藻 ROS 水平的影响

Fig. 4 Effects of ethyl cinnamate on ROS level in *Chlorella pyrenoidosa*

2.5 肉桂酸乙酯对蛋白核小球藻光合参数的影响

光合系统 II 的最大光化学量子产率 (F_v/F_m), 反映 PS II 反应中心内禀光能转换效率或称最大 PS II 的光能转换效率。在非胁迫条件下该参数的变化

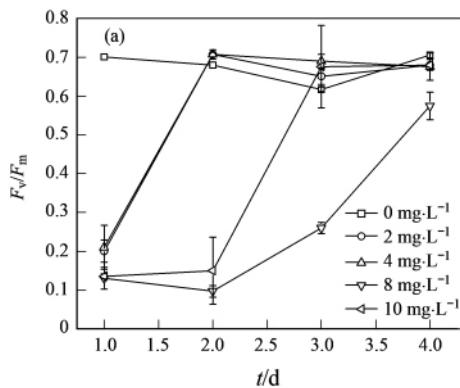
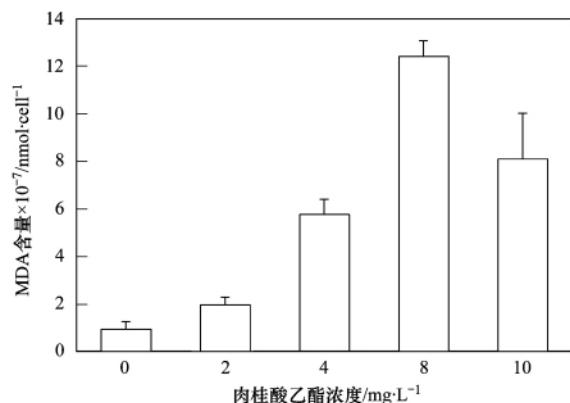
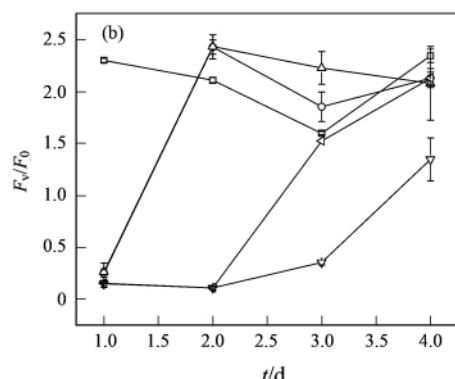
图 6 肉桂酸乙酯对蛋白核小球藻 F_v/F_m 和 F_v/F_0 值的影响Fig. 6 Effects of ethyl cinnamate on F_v/F_m and F_v/F_0 of *Chlorella pyrenoidosa*

图 5 肉桂酸乙酯对蛋白核小球藻 MDA 含量的影响

Fig. 5 Effects of ethyl cinnamate on MDA content of *Chlorella pyrenoidosa*

极小, 不受物种和生长条件的影响, 但在生物和非生物因素胁迫条件下该参数明显下降^[20 21]。 F_v/F_0 表示 PS II 的潜在活性。图 6 分别为不同浓度肉桂酸乙酯对蛋白核小球藻光合系统 II 最大量子产率和潜在活力的变化情况。由图 6(a) 可知, 肉桂酸乙酯各浓度处理组藻细胞 F_v/F_m 值在第 1 d 都显著降低 (P

Fig. 6 Effects of ethyl cinnamate on F_v/F_m and F_v/F_0 of *Chlorella pyrenoidosa*

< 0.05),且下降幅度较大,但在处理第 2 d,2 mg·L⁻¹ 和 4 mg·L⁻¹ 处理组骤升到对照组水平,8 mg·L⁻¹ 和 10 mg·L⁻¹ 浓度组 F_v/F_m 值分别在第 4 d 和第 3 d 恢复到正常水平,与对照组无显著性差异($P > 0.05$)。表明肉桂酸乙酯对蛋白核小球藻细胞光合系统Ⅱ的最大光能转化效率具有一定的急性抑制效应,但随着时间的延长藻细胞可以通过自身调节恢复其光合活性。由图 6(b) 可知,肉桂酸乙酯各浓度处理组 F_v/F_0 值的变化趋势与 F_v/F_m 值相似,在处理第 1 d 均显著减少 2、4、8 和 10 mg·L⁻¹ 处理组在第 4 d 分别恢复到对照组的 90.8%、88.6%、57.5% 和 90.8%。表明藻细胞的潜在光合活性逐渐恢复。

3 讨论

目前,利用植物的化感物质来抑制藻类生长的研究较为活跃,并且分离鉴定出多种化感抑藻物质,如倍半萜烯内酯,有机酸类,酚类等,其中酚酸类物质及其衍生物是一类活性较强的化感物质^[14 22~24]。本实验研究了一种酚酸类物质肉桂酸乙酯对蛋白核小球藻的抑制作用。研究发现,肉桂酸乙酯对蛋白核小球藻具有一定的抑制效应,且随着浓度的增加抑制效果越明显。另外随着时间的延长,肉桂酸乙酯对蛋白核小球藻的抑制率呈现先增大后减小的趋势。类似的现象也有报道,如 Qian 等^[25] 研究发现壬基苯酚在投加初期对普通小球藻具有强抑制作用,24 h 后抑制作用开始下降。以上研究表明,为了应对高浓度肉桂酸乙酯的毒性,藻细胞通过延长迟缓期以适应胁迫环境,这是细胞面对新环境所具有的自我调节能力^[26]。所以肉桂酸乙酯的毒性作用发生在藻细胞的迟缓期,待迟缓期过后,藻细胞又可以恢复一定的生长能力,遂使抑制率出现下降。另外,肉桂酸乙酯加入培养基后,可能被藻细胞产生的抗性物质降解,或作为碳源被藻细胞吸收代谢。而且,肉桂酸乙酯属于酚酸类衍生物又是一种挥发性的香料,既有酚酸类物质不稳定、易降解的性质,又有香料易挥发的特性。随着培养时间的延长,其在培养基中的浓度势必会逐渐下降,当降低到一定浓度时则不能有效抑制藻细胞生长,致使抑制率下降^[27~29]。研究结果表明,与其它酚酸相比,肉桂酸乙酯具有较强抑制作用,且效果快,有一定的挥发性,通过进一步的室外实验和生态安全评价,可望开发成生物除藻剂。

叶绿素是植物进行光合作用的主要色素,在光

合作用的光吸收中心起核心作用,叶绿素含量的减少可能会导致光合作用受阻。由结果可知,随着肉桂酸乙酯浓度的增加各处理组叶绿素 a 含量逐渐下降,且随着时间的延长呈现先下降后增加的趋势,与生长抑制率相对应。叶绿素为镁卟啉化合物,不稳定,酸、碱、氧化剂等都会使其分解。在肉桂酸乙酯胁迫下,藻细胞内的叶绿素 a 发生分解,导致叶绿素 a 含量下降,影响光能的捕获,造成藻细胞的光合活性降低^[30]。

许多研究表明,有机物污染物可以引起生物体内活性氧(ROS)的过度产生,对细胞产生氧化损伤^[31~32]。丙二醛是膜脂过氧化的产物,其含量能反映细胞膜结构损伤程度^[33]。在正常情况下,植物可以通过自身保护机制,使细胞内活性氧的产生和消除处于平衡状态,不易导致氧化损伤。实验结果显示,肉桂酸乙酯可以引起蛋白核小球藻细胞内 ROS 的大量累积,并且引起 MDA 含量显著增加。这可能是由于肉桂酸乙酯胁迫下,藻细胞内 ROS 的产生与清除失去平衡,造成其过度积累,引发膜脂的过氧化作用,造成藻细胞膜系统和功能受到损伤、膜通透性增加,干扰细胞的光合、呼吸及其他代谢过程,严重时导致细胞死亡^[34]。另外,肉桂酸乙酯是具有酚羟基结构的化合物,其羟基能与培养基中的 Cu²⁺ 和 Fe³⁺ 等过渡金属离子发生自氧化,产生 H₂O₂,可能直接对 DNA 产生氧化损伤,诱导细胞程序性死亡^[35~37]。如 Zhang 等^[38] 研究发现农药氟草烟胁迫下,莱茵衣藻 DNA 出现降解。ROS 除了可以对细胞造成氧化损伤外,也可以作为信号分子引发细胞内发生级联效应,最后导致细胞程序性死亡^[39]。植物在外界胁迫下 ROS 水平升高,为了维持平衡细胞内的自由基清除剂含量会随之升高^[40]。抗氧化酶系是机体内防御氧化损伤的重要酶系。实验中较高浓度处理组 SOD、CAT 酶活性都明显升高,浓度为 10 mg·L⁻¹ 时,酶活性有所降低。这是由于肉桂酸乙酯胁迫下藻细胞内活性氧(ROS) 大量积累,为了清除过多的 ROS,藻细胞通过提高抗氧化系酶的活性来保护其免受氧化损伤。然而,当肉桂酸乙酯浓度较高时,细胞内 ROS 浓度超出一定的阈值时,细胞不能及时将其清除,导致细胞损伤不能被及时修复,引起酶活性降低^[41]。

研究结果表明,肉桂酸乙酯胁迫下,蛋白核小球藻光合系统Ⅱ最大光化学量子产量(F_v/F_m) 和潜在活力(F_v/F_0) 在培养初期显著降低,但随着时间的延长两者表现较大幅度的回升,说明肉桂酸乙酯对

蛋白核小球藻细胞光合系统Ⅱ的最大光化学量子产量和潜在活性具有一定的急性抑制效应,但随着时间的延长藻细胞可以通过自身调节在一定程度上恢复其光合活性。因此,肉桂酸乙酯可以使蛋白核小球藻PSⅡ发生可逆性失活^[20]。间接证明了蛋白核小球藻PSⅡ不是肉桂酸乙酯攻击的主要靶位,氧化损伤可能是藻细胞生长受到抑制的主要原因。

4 结论

(1) 肉桂酸乙酯对蛋白核小球藻的生长具有一定的抑制作用,且随着浓度的增加抑制效果越明显。其96 h半效应浓度EC₅₀值为5.45 mg·L⁻¹。与其他酚酸相比,肉桂酸乙酯具有挥发性、强抑制、效果快的优点,具有开发成生物除藻剂的潜能。

(2) 随着肉桂酸乙酯浓度的增加各处理组叶绿素a含量逐渐下降,且随着时间的延长呈现先下降后增加的趋势,与生长抑制率相对应。肉桂酸乙酯引起细胞内叶绿素a含量下降,影响光能的捕获,造成藻细胞的光合活性降低可能是其抑藻机制之一。

(3) 肉桂酸乙酯可以引起蛋白核小球藻细胞内活性氧(ROS)的大量累积和MDA的含量显著增加,造成藻细胞膜系统和功能紊乱,从而导致细胞代谢生长缓慢。为了清除ROS,细胞通过提高抗氧化系酶(SOD、CAT)的活性来保护其免受氧化损伤。

(4) 肉桂酸乙酯对蛋白核小球藻细胞光合系统Ⅱ的最大光化学量子产量和潜在活性具有一定的急性抑制效应,但随着时间的延长藻细胞可以通过自身调节在一定程度上恢复其光合活性。

参考文献:

- [1] Codd G A. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control [J]. *Ecological Engineering*, 2000, **16**(1): 51-60.
- [2] Codd G A, Morrison L F, Metcalf J S. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2005, **203**(3): 264-272.
- [3] 黄加东. 几种氧化性杀菌灭藻剂的应用效果比较[J]. *工业用水与废水*, 2000, **31**(5): 7-9.
- [4] 张景媛, 高惠明, 李爱民, 等. 经济杀菌灭藻剂OACL控制工业循环水中有害微生物的研究[J]. *应用生态学报*, 1993, **4**(3): 308-312.
- [5] Barrett P R F, Littlejohn J W, Curnow J. Long-term algal control in a reservoir using barley straw [J]. *Hydrobiologia*, 1999, **415**: 303-309.
- [6] 孔垂华, 胡飞. 植物化感作用及其应用[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [7] Vyvyan J R. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals [J]. *Tetrahedron*, 2002, **58**(9): 1631-164.
- [8] Fitter A. Making allelopathy respectable [J]. *Science*, 2003, **301**(5): 1337-1338.
- [9] 杨善元, 俞子文, 孙文浩, 等. 凤眼莲根系中抑藻物质分离与鉴定[J]. *植物生理学报*, 1992, **18**(4): 399-402.
- [10] Greca M D, Ferrara M, Fiorentino A, et al. Antialgal compounds from *zantedeschia aethiopica* [J]. *Phytochemistry*, 1998, **49**(5): 1299-1304.
- [11] Li F M, Hu H Y. Isolation and characterization of a novel antialgal allelochemical from *Phragmites communis* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, **71**(11): 6545-6553.
- [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, Hosomi M. Allelopathic inhibitory effects of polyphenols-released by *Myriophyllum spicatum* on algal growth [J]. *Allelopathy*, 2002, **10**(2): 123-131.
- [14] Gross E M, Erhard D, Ivanyi E. Allelopathic activity of *Ceratophyllum demersum* L. and *Najas marina* ssp *intermedia* (Wolfgang) Casper [J]. *Hydrobiologia*, 2003, **506**(1-3): 583-589.
- [15] Mulderij G, Van Donk E, Roelofs J G M. Differential sensitivity of green algae to allelopathic substances from *Chara* [J]. *Hydrobiologia*, 2003, **491**(1-3): 261-271.
- [16] Hong Y, Hu H Y, Sakoda A, et al. Isolation and characterization of antialgal allelochemicals from *Arundo donax* L. [J]. *Allelopathy*, 2010, **25**(2): 357-367.
- [17] 俞子文, 孙文浩, 郭克勤, 等. 几种高等水生植物的克藻效应[J]. *水生生物学报*, 1992, **16**(1): 1-7.
- [18] Sun W H, Yu S W, Yang S Y, et al. Allelochemicals from root exudates of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) [J]. *Acta Phytobiologica Sinica*, 1993, **19**(1): 92-96.
- [19] GmbH H W. Phytoplankton Analyzer PHYTO-PAM [M]. Germany, 2003. 33-107.
- [20] 郭延平, 周慧芬, 曾光辉, 等. 高温胁迫对柑橘光合速率和光合系统活性的影响[J]. *应用生态学报*, 2003, **14**(6): 867-870.
- [21] Macintyre H L, Kana T M, Anning T, et al. Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria [J]. *Journal of Phycology*, 2002, **38**(1): 17-38.
- [22] Rice E L. Allelopathy [M]. New York: Academic Press, 1984.
- [23] Nakai S, Inoue Y, Hosomi M. Algal growth inhibition effects and induction modes by plant-producing phenols [J]. *Water Research*, 2001, **35**(7): 1855-1859.
- [24] Kato-Noguchi H. Allelopathic substances in *Pueraria thunbergiana* [J]. *Phytochemistry*, 2003, **63**(5): 577-580.
- [25] Qian H F, Pan X J, Shi S T, et al. Effect of nonylphenol on response of physiology and photosynthesis-related gene transcription of *Chlorella vulgaris* [J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2011, **182**(1-4): 61-69.
- [26] Wang J X, Xie P, Guo N C. Effects of nonylphenol on the

- growth and microcystin production of *Microcystis* strains [J]. *Environmental Research*, 2007, **103**(1): 70–78.
- [27] Hong Y, Hu H Y, Li F M. Physiological and biochemical effects of allelochemical ethyl 2-methyl acetoacetate (EMA) on cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2008, **71**(2): 527–534.
- [28] Poulsen K L, Sieg R D, Prince E K, et al. Allelopathic compounds of a red tide dinoflagellate have species-specific and context-dependent impacts on phytoplankton [J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2010, **416**: 69–78.
- [29] Jiang D, Huang L F, Lin S Q, et al. Allelopathic effects of euhalophyte *Salicornia bigelovii* on marine alga *Skeletonema costatum* [J]. *Allelopathy*, 2010, **25**(1): 163–172.
- [30] Bornman J F, Vogelmann T C. Effect of UV-B radiation on leaf optical-properties measured with fiber optics [J]. *Experimental Botany*, 1991, **42**(4): 547–554.
- [31] Zhang M, Kong F X, Xing P, et al. Effects of interspecific interactions between *Microcystis aeruginosa* and *Chlorella pyrenoidosa* on their growth and physiology [J]. *International Review of Hydrobiology*, 2007, **92**(3): 281–290.
- [32] Elbaz A, Wei Y Y, Meng Q, et al. Mercury-induced oxidative stress and impact on antioxidant enzymes in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Ecotoxicology*, 2010, **19**(7): 1285–1293.
- [33] Panda S K, Singha L B, Khan M H. Does aluminium phytotoxicity induce oxidative stress in greengram (*Vigna radiata*)? [J]. *Bulgaria Journal Plant Physiology*, 2003, **29**(1–2): 77–86.
- [34] Alaiz M, Hidalgo F J, Zamora R. Effect of pH and temperature on comparative antioxidant activity of nonenzymatically browned proteins produced by reaction with oxidized lipids and carbohydrates [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, **47**(2): 748–752.
- [35] Slater A F G, Stefan C, Nobel I, et al. The role of intracellular oxidants in apoptosis [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Molecular Basis of Disease*, 1995, **1271**(1): 59–62.
- [36] Ross C, Santiago-Vázquez L, Paul V. Toxin release in response to oxidative stress and programmed cell death in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* [J]. *Aquatic Toxicology*, 2006, **78**(1): 66–73.
- [37] Dziga D, Suda M, Bialczyk J, et al. The alteration of *Microcystis aeruginosa* biomass and dissolved microcystin-LR concentration following exposure to plant-producing phenols [J]. *Environmental Toxicology*, 2007, **22**(4): 341–346.
- [38] Zhang S, Qiu C B, Zhou Y, et al. Bioaccumulation and degradation of pesticide fluoroxypr are associated with toxic tolerance in green alga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Ecotoxicology*, 2011, **20**(2): 337–347.
- [39] Van Breusegem F, Dat J F. Reactive oxygen species in plant cell death [J]. *Plant Physiology*, 2006, **141**(2): 384–390.
- [40] Dat J, Vandenebeele S, Vranová E, et al. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2000, **57**(5): 779–795.
- [41] Hejl A M, Koster K L. Juglone disrupts root plasma membrane H⁺-atpase activity and impairs water uptake, root respiration, and growth in soybean (*Glycine max*) and corn (*Zea mays*) [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2004, **30**(2): 453–471.