

学校编码：10384
学号：22420081151508

密级_____

厦门大学

硕士 学位 论文

海马齿对三种赤潮微藻生长的
克生作用研究

**Allelopathic effect of *Sesuvium portulacastrum* on
the growth of three red tide microalgae**

张 可

指导教师姓名：黄凌风 教授
专业名称：海洋生物学
论文提交日期：2011 年 11 月
论文答辩时间：2011 年 11 月

2011年11月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（863项目：高污染海洋浅水湿地生物修复的关键技术研究与示范）课题（组）的研究成果，获得（黄凌风教授）课题（组）经费或实验室的资助，在（海洋生态）实验室完成。

声明人（签名）： 张可

2011 年 12 月 31 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其他方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

- () 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。
(√) 2. 不保密，适用上述授权。

声明人（签名）： 张可

2011 年 12 月 31 日

目 录

摘要	VI
ABSTRACT	VIII
第一章 前言	1
1.1 赤潮简介	1
1.2 赤潮成因	1
1.2.1 生物因素	1
1.2.2 化学因素	2
1.2.3 物理因素	3
1.3 赤潮的危害	3
1.4 赤潮的治理	3
1.4.1 物理法	4
1.4.2 化学法	4
1.4.3 生物法	4
1.5 利用植物的克生作用抑制赤潮	4
1.5.1 克生作用	4
1.5.2 克生物质	5
1.5.3 利用植物克生作用抑制微藻的生长	5
1.6 本论文的研究目的与意义	8
第二章 海马齿植株对赤潮发生的抑制作用及其根提取物对三种赤潮微藻的克生作用	10
2.1 实验材料	10
2.2 实验方法	11
2.2.1 海马齿植株对不同生长期的中肋骨条藻生长影响的实验	11
2.2.2 海马齿根提取物对三种赤潮微藻生长影响的实验	13
2.3 数据处理	16
2.3.1 半抑制浓度(IC_{50})	16

2.3.2 藻细胞体积.....	17
2.3.3 Chl <i>a</i> 浓度.....	17
2.4 实验结果.....	17
2.4.1 海马齿植株对不同生长期的中肋骨条藻生长的影响.....	17
2.4.2 海马齿根提取物对三种赤潮微藻生长的影响.....	18
2.5 讨论.....	37
2.6 小结.....	41
第三章 克生物质的分析及其抑藻作用研究	42
3.1 实验材料.....	42
3.1.1 海马齿根石油醚提取物GC-MS分析	42
3.1.2 油酸酰胺对三种赤潮微藻的生长抑制实验.....	42
3.1.3 棕榈酸对三种赤潮微藻的生长抑制实验.....	42
3.2 实验方法.....	43
3.2.1 海马齿根石油醚提取物GC-MS分析	43
3.2.2 油酸酰胺对三种赤潮微藻的生长抑制实验.....	43
3.2.3 棕榈酸对三种赤潮微藻的生长抑制实验.....	44
3.3 实验结果.....	44
3.3.1 海马齿根石油醚提取物GC-MS分析结果	44
3.3.2 油酸酰胺对三种赤潮微藻的影响.....	46
3.3.3 棕榈酸对三种赤潮微藻的影响.....	47
3.4 讨论.....	54
3.5 小结.....	57
第四章 总结与展望	58
参考文献	60
致谢	72

CONTENTS

ABSTRACT	VI
ABSTRACT (English).....	VIII
Chapter One Introduction.....	1
1.7 Introduction of red tide	1
1.8 Cause of red tide.....	1
1.8.1 Biological factors.....	1
1.8.2 Chemical factors.....	2
1.8.3 Physical factors.....	3
1.9 Harm of red tide	3
1.10 Control of red tide.....	3
1.10.1 Biological methods	4
1.10.2 Chemical methods	4
1.10.3 Physical methods	4
1.11 Using allelopathy to control red tide	4
1.11.1 Allelopathy	4
1.11.2 Allelochemical.....	5
1.11.3 Using allelopathy to inhibit the growth of microalgae	5
1.12 Study purpose and significance of this thesis	8
Chapter Two Inhibition effect of <i>Sesuvium portulacastrum</i> on red tide and allelopathic effect of its root extracts on the growth of three red tide microalgae.....	10
2.1 Materials	10
2.2 Methods.....	11
2.2.1 Inhibition effect of <i>Sesuvium portulacastrum</i> on growth of <i>Skeletonema costatum</i>	11
2.2.2 Inhibition effect of extracts from <i>Sesuvium portulacastrum</i> root	

on growth of three red tide microalgae	13
2.3 Statistical analysis	16
2.3.1 IC ₅₀	16
2.3.2 Cell volume of microalgae	17
2.3.3 Concentration of Chl <i>a</i>	17
2.4 Results	17
2.4.1 Inhibition effect of <i>Sesuvium portulacastrum</i> on growth of <i>Skeletonema costatum</i>	17
2.4.2 Inhibition effect of extracts from <i>Sesuvium portulacastrum</i> root on growth of three red tide microalgae	18
2.5 Discussion.....	37
2.6 Conclusion	41

Chapter Three Allelochemical analysis and the study of its inhibition effect of microalgae 42

3.1 Materials	42
3.1.1 GC-MS analysis of petroleum ether extract from <i>Sesuvium portulacastrum</i> root.....	42
3.1.2 Inhibition effect of oleamide on growth of three red tide microalgae	42
3.1.3 Inhibition effect of palmitic acid on growth of three red tide microalgae	42
3.2 Methods	43
3.2.1 GC-MS analysis of petroleum ether extract from <i>Sesuvium portulacastrum</i> root.....	43
3.2.2 Inhibition effect of oleamide on growth of three red tide microalgae	43
3.2.3 Inhibition effect of palmitic acid on growth of three red tide microalgae	44
3.3 Results	44

3.3.1 Results of GC-MS analysis of petroleum ether extract from <i>Sesuvium portulacastrum</i> root	44
3.3.2 Inhibition effect of oleamide on growth of three red tide microalgae	46
3.3.3 Inhibition effect of palmitic acid on growth of three red tide microalgae	47
3.4 Discussion.....	54
3.5 Conclusion	57
Chapter Four Summarization and expectation.....	58
References.....	60
Acknowledgement.....	72

摘要

近年来，随着海水富营养化程度的加剧，有害赤潮在世界各海域频繁爆发，给海洋生态环境、人类健康和世界经济造成了巨大危害。如何有效地防治赤潮，引起了人们的广泛关注。探索新的、经济有效的赤潮防治方法具有重要的科学意义和应用前景。

本文研究了海马齿(*Sesuvium portulacastrum*)对三种赤潮微藻——中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)、东海原甲藻(*Prorocentrum donghaiense*)和微小原甲藻(*Prorocentrum minimum*)生长的克生作用，初步提取、分离和鉴定了海马齿根石油醚提取物内的克生物质，并探讨了其中的油酸酰胺和棕榈酸的克生作用，为利用其防治赤潮发生提供了理论依据。主要实验结果如下：

(1) 在共培养实验中，停滞期和指数期的中肋骨条藻均受到了海马齿的抑制，其对停滞期的藻细胞密度和 Chl *a* 浓度的抑制率分别为 98.6 % 和 98.5 %，对指数期为 22.2 % 和 15.4 %。说明海马齿不仅能预防中肋骨条藻赤潮暴发，还能降低赤潮程度和加速赤潮衰败。

(2) 在提取物实验中，海马齿根石油醚、氯仿、正丁醇、甲醇和水提取物均可明显抑制中肋骨条藻、东海原甲藻和微小原甲藻的生长，且效果随着提取物浓度的升高而增强。不同种类的赤潮微藻对提取物的敏感性强弱有所差异，对中肋骨条藻而言，石油醚和甲醇提取物的抑制作用最强，其 IC₅₀ 分别为 9.25 mg·L⁻¹ 和 9.26 mg·L⁻¹。对于东海原甲藻抑制作用最强的是正丁醇提取物，其 IC₅₀ 为 1.77 mg·L⁻¹，其次为甲醇提取物，其 IC₅₀ 为 3.72 mg·L⁻¹。而对微小原甲藻抑制作用最强的也是甲醇提取物和正丁醇提取物，IC₅₀ 分别为 3.56 mg·L⁻¹ 和 4.33 mg·L⁻¹。提取物可影响藻细胞的大小与形态，中肋骨条藻细胞体积基本随提取物浓度的升高而增大，其中石油醚提取物的作用最强，30 mg·L⁻¹ 提取物作用下的藻细胞体积与对照组藻细胞体积的比值达到了 2.1。高提取物浓度下的中肋骨条藻细胞明显加长，甚至显示细胞内含物缺失。两种甲藻细胞体积则基本随提取物浓度的升高而减小，其中作用最强的均为甲醇提取物，东海原甲藻对提取物的敏感性较微小原甲藻更强，30 mg·L⁻¹ 提取物作用下的东海原甲藻和微小原甲藻细胞体积与对照组藻细胞体积的比值分别为 0.5 和 0.8。另外，在提取物的作用下，三种藻的培养体系总 Chl *a* 浓度和单位体积 Chl *a* 含量均随提取物浓度的增大而明显降低。

(3) 通过 GC-MS 分析, 由海马齿根石油醚提取物中鉴定出多种非极性化合物, 脂肪酸类物质是其主要组成成分, 油酸酰胺和棕榈酸在其中均占有较大比例, 分别达到 21.17% 和 10.74%。实验显示, 油酸酰胺和棕榈酸对中肋骨条藻、东海原甲藻和微小原甲藻均具有明显的抑制作用, 且随着浓度的升高抑制作用增强。不同种类的微藻对它们的敏感性不同, 其中油酸酰胺对三种微藻的 IC_{50} 分别为 $6.55 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $7.75 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $5.62 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 棕榈酸对三种微藻的 IC_{50} 分别为 $5.87 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $6.47 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $6.06 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。油酸酰胺和棕榈酸还可影响藻细胞大小与形态。中肋骨条藻细胞体积基本随它们的浓度升高而增大, $3.80 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 油酸酰胺和棕榈酸作用下的藻细胞体积与对照组藻细胞体积比值分别达到了 2.4 和 2。高浓度下的中肋骨条藻细胞细胞明显加长, 甚至显示细胞内含物缺失。两种甲藻的细胞体积变化则不明显。另外, 它们也能降低藻的培养体系总 Chl a 浓度和单位体积 Chl a 含量, 影响藻的光合作用。

本研究结果表明, 海马齿对赤潮微藻具有一定的克生作用, 并能有效控制和减轻水体赤潮发生。利用其防治赤潮发生和修复近海水域富营养化具有一定的经济和生态效益。

关键词: 海马齿; 赤潮微藻; 克生作用; 油酸酰胺; 棕榈酸

Abstract

These years, harmful algal blooms (HABs), in response to the coastal eutrophication, occurred much frequently all over the world. It has a great impact on marine ecosystem, human health and economy development. HABs have caused wide attention, especially in its management and control. It is important to develop a new, economical and effective way to control HABs.

In this thesis, the allelopathic effect of *Sesuvium portulacastrum* on growth of *Skeletonema costatum*, *Prorocentrum donghaiense* and *Prorocentrum minimum* were studied. Then isolated and characterized allelochemicals in petroleum ether (PE) extract of *S. portulacastrum*. Among them, the allelopathic effect of the oleamide and palmitic acid on the growth of marine algae were discussed. these provided a theoretical basis for controlling HABs.

(1) In co-culture experiments, time-course growth curve of *S. costatum* showed that algal growth in both the lag and exponential phase was inhibited by *S. portulacastrum*, IR of cell densities and Chl *a* in lag phase were 98.6 % and 98.5 %, in exponential phase were 22.2% and 15.4%. The inhibitory activity of *S. portulacastrum* was biomass-dependent, suggesting that *S. portulacastrum* can prevent or reduce the magnitude of algal blooms.

(2) In extracts experiments, growth of *S. costatum*, *P. donghaiense* and *P. minimum* were obviously inhibited by petroleum ether, chloroform, butanol, methanol and water extracts, this effect was dose-dependent and species-specific on the growth of three microalgae. On *S. costatum*, inhibitional effects of petroleum ether and methanol extracts were strongest, the IC₅₀ of these two extracts against *S. costatum* were 9.25 mg·L⁻¹ and 9.26 mg·L⁻¹. On *P. donghaiense*, inhibitional effects of butanol and methanol extracts were strongest, the IC₅₀ of them against *P. donghaiense* were 1.77 mg·L⁻¹ and 3.72 mg·L⁻¹. On *P. minimum*, inhibitional effects of methanol and butanol extracts were strongest, the IC₅₀ of them against *P. minimum* were 3.56 mg·L⁻¹ and 4.33 mg·L⁻¹. It also showed that cell volume of *S. costatum* increased with the increasing concentrations of extracts, petroleum ether extract had a strongest

effect on it, and ratio of cell volume of experimental group with $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ extracts to cell volume of control group could reach 2.1. Some *S. costatum* cells were lengthened by extracts under high concentrations, and some were lack of cell inclusions. Cell volume of two dinoflagellates mainly decreased with the increasing concentrations of extracts, methanol extract had a strongest effect on them, ratio of cell volume of experimental group with $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ extracts to cell volume of control group were 0.5 and 0.8. Extracts could also reduced the total Chl *a* and Chl *a* content per unit biovolume of three microalgae.

(3) GC-MS analysis was used to identify the lipophilic compounds in the petroleum ether extract of *S. portulacastrum*, among which, fatty acids were the major components. Here it showed that oleamide and palmitic acid had an obvious dose-dependent and species-specific allelopathic effect on the growth of three microalgae, and the proportions of them in extract were 21.17% and 10.74%. Growth of *S. costatum*, *P. donghaiense* and *P. minimum* were obviously inhibited by both oleamide and palmitic acid, the IC₅₀ of oleamide against three microalgae were $6.55\times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $7.75\times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and $5.62\times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, and the IC₅₀ of palmitic acid against three microalgae were $5.87\times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $6.47\times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and $6.06\times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. They could also affect cell volume and cell shape of microalgae, cell volume of *S. costatum* increased with the increasing concentrations of oleamide and palmitic acid, ratio of cell volume of experimental group with $3.8\times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ oleamide or palmitic acid to cell volume of control group were 2.4 and 2. Some *S. costatum* cells were lengthened by oleamide and palmitic acid under high concentrations, and some were lack of cell inclusions. The change of cell volume of *P. donghaiense* and *P. minimum* were not obviously. They could also reduced the total Chl *a* and Chl *a* content per unit biovolume of three microalgae, and effected photosynthesis of three microalgae.

Our results indicated that *S. portulacastrum* have allelopathic activities on the microalgal growths. It might provide an efficient and ecological alternative for HABs prevention and phytoremediation of coastal eutrophication.

Key words: *Sesuvium portulacastrum*; red tide microalgae; allelopathy; oleamide; palmitic acid

厦门大学博硕士论文摘要库

第一章 前 言

1.1 赤潮简介

赤潮(red tide)又称有害藻华(harmful algal blooms, HABs)，是指海洋中某些微小的浮游生物在一定条件下暴发性增殖或聚集而引起海水变色的一种有害的生态异常现象^[1]。在我国，从20世纪70年代开始，赤潮的发生以每10年增加3倍的速度不断上升^[2]。据国家海洋局2001-2010年《中国海洋环境质量公报》统计(表1-1)显示，近10年来，我国赤潮每年的发生频率均大于60次，发生面积均大于1万平方公里。赤潮的高发区为渤海、长江口、福建沿海和南海海域。形成赤潮的浮游生物种类繁多，主要有甲藻类、硅藻类和蓝藻类，还有绿藻、金藻、隐藻、裸藻、定鞭藻等其他藻类，以及能进行光合作用的浮游动物红色中缢虫(*Mesodinium rubrum*)，如2010年7月发生在北戴河至抚宁沿海海域的赤潮即由后者所引起。

1.2 赤潮成因

赤潮的发生是一个复杂的生态变化过程，不是单一因素的产物^[3]，但必须具备两个方面的基本条件，一是要有赤潮生物的存在；二是要有适宜赤潮生物快速繁殖的环境条件，如氮、磷等营养盐，水温、盐度、微量元素以及维生素类等。此外，赤潮的形成还受海况、潮流和气象条件等因素的影响^[4]。

1.2.1 生物因素

有害赤潮生物的存在，其生理生态特点及物种和遗传多样性的变化，是引发有害赤潮的内因^[5]。目前，在全球海域中发现能引起赤潮的浮游生物约有300余种，并有不断增加的趋势。潮流、航运(压舱水)等已成为赤潮生物或孢囊传播的重要途径^[6-11]。

赤潮生物的生理生态特征决定了其生长过程，单细胞藻类有机体快速新陈代谢和生殖是形成暴发性增殖赤潮的最重要因素^[6]。赤潮生物在正常海域中所占比重可能并不大，但在发生赤潮时，某种或少数几种藻类可急剧增殖并成为优势种^[12]，形成单一^[12]或混合性赤潮^[13,14]。赤潮生物的物种多样性可导致同一海区不

同时期或局部水域的旺发藻种类不同，代谢多样性则能导致不同海区引发赤潮的生物种类相同。有些赤潮生物如甲藻，在环境条件不适合其细胞生长的情况下，能形成孢囊并沉降到海底，一旦环境条件适宜，孢囊即大量萌发形成占优势的营养细胞群，从而引发赤潮。因此，普遍认为孢囊是引发赤潮的种源(Seed bed)。此外，浮游动物对藻类的摄食压力和细菌、病毒等生物的裂解压力也是影响藻类赤潮发生的生物因素^[15]。

表 1-1 2001-2010 年我国海域赤潮发生情况^{*}
Table 1-1 The occurrence of red tide in China Sea from 2001 to 2010^{*}

年份	发生次数	发生面积 (km ²)	主要赤潮生物种类
2001	77	15000	夜光藻、浮动弯角藻、聚生角毛藻和丹麦细柱藻等
2002	79	10150	中肋骨条藻、具齿原甲藻、夜光藻、无纹环沟藻和红色中缢虫等
2003	119	14550	中肋骨条藻、具齿原甲藻、夜光藻、裸甲藻、海洋卡盾藻和锥状斯氏藻等
2004	96	26630	中肋骨条藻、东海原甲藻、具齿原甲藻、夜光藻、棕囊藻和米氏凯伦藻等
2005	82	27070	中肋骨条藻、具齿原甲藻、米氏凯伦藻、棕囊藻和夜光藻等
2006	93	19840	具齿原甲藻、中肋骨条藻、米氏凯伦藻、旋链角毛藻、棕囊藻和红色中缢虫等
2007	82	11610	中肋骨条藻、角毛藻、裸甲藻、卡盾藻、柔弱菱形藻和海链藻等
2008	68	13738	中肋骨条藻、东海原甲藻、具齿原甲藻、夜光藻、米氏凯伦藻和卡盾藻等
2009	68	14102	中肋骨条藻、具齿原甲藻、夜光藻、赤潮异弯藻和米氏凯伦藻等
2010	69	10892	中肋骨条藻、东海原甲藻、夜光藻和米氏凯伦藻等

* 数据来源：国家海洋局 2001-2010 年《中国海洋环境质量公报》

* Source: State Oceanic Administration People's Republic of China, "Marine Environment Quality Bulletin of China in 2001-2010"

1.2.2 化学因素

赤潮现象是由大量的浮游生物增殖或聚集造成的，充分的营养基础往往是促

使这些生物形成巨大生物量的前提条件。水体中的营养盐(如氮、磷、硅等)、有机物、微量元素(如铁)和维生素等都与藻类的生长繁殖密切相关。随着我国沿海工业、农业、海水养殖业以及旅游业的迅速发展，工业废水、含化肥和农药的江河入海水，生活污水以及海水养殖污水的过度排放，使得近海海水中氮、磷等营养元素大量增加，造成近岸水体富营养化^[16]。赤潮的发生与水体的富营养化有着密切联系^[6]，近海富营养化通常会导致赤潮的形成^[17]。

1.2.3 物理因素

首先，在营养盐充足的情况下，适宜的水温及盐度是赤潮形成的必要因子，温度、盐度的骤变常常容易诱发赤潮。其次，地理环境是赤潮形成的一个重要因素，在一个特定的海域，如封闭性内湾，由于水体交换能力差，若存在富营养化，一旦稀释和扩散不利即会造成营养物质大量积累，为赤潮生物大量繁殖创造充分物质条件。水文状况与赤潮的形成密切相关，包括浪、潮、流、锋面及水体稳定性等物理海洋因子，其对赤潮的影响在一定程度上受地理环境限制^[6]。第三，赤潮的发生与很多气象条件关系密切，低气压、微风、大雨和持续高温都能促使赤潮发生^[18]。

1.3 赤潮的危害

有些赤潮生物的体内或代谢产物中含有生物毒素，能直接毒死鱼、虾和贝类等生物^[19]；有些赤潮生物产生的毒素虽不能毒死海洋生物，但却可在其体内积累，人食用时可导致中毒甚至死亡；有些赤潮生物虽无毒，但能对鱼鳃造成堵塞或机械损伤，或粘附于鱼类等海洋动物的鳃上，导致其窒息而死。另外，赤潮生物死亡时大量耗氧或产生硫化氢等有害物质，还可能使海洋生物窒息或中毒死亡。这些危害往往是同时发生的。赤潮发生和消亡过程中，水体中溶氧、pH值和水质(如营养盐)显著变化，各种海洋生物的生存环境遭到破坏，海洋生态系统失衡，渔业资源和海产养殖业受损，同时赤潮藻毒素可严重威胁海洋生物和人类的生命安全。

1.4 赤潮的治理

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库