

抗生素对共培养的萱藻丝状体和膨胀色球藻生长的影响

马旺楠¹, 宫相忠^{1*}, 张文健¹, 高伟¹, 张必达²

(1. 中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003;

2. 长岛爱华海藻食品有限公司, 山东 烟台 265800)

摘要:为抑制萱藻丝状体扩增过程中出现的膨胀色球藻的生长,采用实验生态学方法,研究了链霉素、氨苄青霉素、卡那霉素、庆大霉素和氯霉素等 5 种常用抗生素对共培养条件下的萱藻丝状体和膨胀色球藻生长的影响。结果显示,(1)链霉素浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时可以显著抑制膨胀色球藻生长,而不影响萱藻丝状体的生长;(2)氨苄青霉素和庆大霉素对膨胀色球藻产生明显抑制作用的浓度均为 100 $\mu\text{g/mL}$,对萱藻丝状体产生抑制作用的浓度分别为 100 和 500 $\mu\text{g/mL}$;(3)10 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素可强烈抑制膨胀色球藻生长,而萱藻丝状体没有出现被抑制的现象;(4)氯霉素对膨胀色球藻和萱藻丝状体均有较强的抑制作用,10 $\mu\text{g/mL}$ 可以对膨胀色球藻的生长产生显著抑制,浓度达到 50 $\mu\text{g/mL}$ 后,萱藻丝状体生长受到抑制。研究表明,链霉素(100 $\mu\text{g/mL}$)、卡那霉素(100 $\mu\text{g/mL}$)和氯霉素(10 $\mu\text{g/mL}$)可以用于降低萱藻种质保存和扩增过程中萱藻丝状体被膨胀色球藻污染的风险。

关键词:萱藻; 膨胀色球藻; 丝状体; 抗生素; 共培养

中图分类号: S 968.4

文献标志码: A

萱藻 (*Scytosiphon lomentaria*) 隶属于褐藻门 (Phaeophyta), 褐子纲 (Phaeosporae), 萱藻科 (Scytosiphonaceae), 广泛分布于中国北起辽东半岛, 南至广东省海陵岛之间的海域。萱藻口感鲜美, 营养价值高, 是优质的海洋蔬菜。除食用价值外, 萱藻所含的活性成分还具有抗氧化^[1-2]、抗肿瘤^[3-5]、抗病毒^[6]等方面的功效, 开发潜力巨大。萱藻具有异形世代交替的生活史^[7], 包括大型的叶状配子体世代和微小的孢子体世代。萱藻孢子体以丝状体、垫状体和类垫状体 3 种形态存在, 3 种存在形态随温度的改变可以相互转化^[8], 其中丝状体因具有生物性状稳定、扩增速度快等优点而成为萱藻种质保存和人工育苗的良好材料。

丝状体扩增、诱导丝状体产生单室孢子囊以及孢子采苗是实施萱藻人工育苗的基本环节, 其中快速扩增以获取足量的萱藻丝状体尤为重要。丝状体扩增过程中常有杂藻出现, 若控制不力, 会对育苗工作造成巨大损失。杂藻污染作为一个十

分棘手的问题, 同样存在于其他大型经济海藻的种质保存和扩增过程中, 其中硅藻和蓝藻污染尤为常见, 且难以处理。二氧化锗作为有效的硅藻生长抑制剂已广泛应用于海带 (*Saccharina japonica*) 配子体^[9]、条斑紫菜 (*Porphyra yezoensis* Ueda)^[10] 以及坛紫菜 (*Porphyra haitanensis*)^[11] 自由丝状体等的扩增过程中, 而在海藻种质扩增过程中, 针对色球藻等蓝藻污染的有效生长抑制剂尚未见报道。

膨胀色球藻 (*Chroococcus turgidus*) 是萱藻丝状体扩增过程中的一种常见杂藻, 该藻是隶属于蓝藻门 (Cyanophyta) 的原核生物, 其细胞结构和代谢过程与细菌具有相似性, 繁殖速度快, 竞争能力强, 进而影响萱藻丝状体的生长发育和扩增速度, 甚至会给萱藻丝状体育苗造成毁灭性损失。抗生素因具有抑菌、除菌的特性而对一些蓝藻的生长也具有抑制作用^[12-13]。目前, 蓝藻^[14-18] 及某些经济藻类^[19-21] 对抗生素敏感性的研究, 多集

收稿日期: 2014-04-11 修回日期: 2014-06-19

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划 (2012AA10A413)

通信作者: 宫相忠, E-mail: gxzhw@163.com

中于基因工程中选择标记的确定,而尚未见以抗生素为选择压力用于抑制共培养条件下膨胀色球藻生长的相关报道。

本实验通过构建萱藻丝状体和膨胀色球藻的共培养体系,研究了链霉素(streptomycin, Str)、氨苄青霉素(ampicillin, Amp)、卡那霉素(kanamycin, Km)、庆大霉素(gentamycin, Gm)和氯霉素(chloramphenicol, Cm)等5种常用抗生素对于混合培养的萱藻丝状体和膨胀色球藻生长的影响,探索一种可以有效抑制、去除共培养体系中膨胀色球藻的方法,以降低萱藻种质的保存和扩增过程中萱藻丝状体被色球藻污染的风险,从而为萱藻的人工育苗提供保障。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用的萱藻丝状体取自本实验室萱藻种质库,首先进行扩增培养,培养条件为温度 20 ℃,光暗周期 L:D = 14:10,光照强度 86.4 ~ 97.2 μmol/(m² · s)。收集成熟丝状体用于实验。

实验用膨胀色球藻分离自本实验室被污染种质,进行纯化培养,培养条件为温度 20 ℃,光暗周期 L:D = 12:12,光照强度 54 ~ 67 μmol/(m² · s)。培养至对数生长期用于实验。

链霉素和氨苄青霉素购于北京索莱宝科技有限公司,卡那霉素、庆大霉素和氯霉素购自上海生工生物技术有限公司,抗生素溶液的配制方法参照《分子克隆实验指南》^[22]。

1.2 实验方法

取生长状况良好的萱藻丝状体,经高速打碎机点切 5 ~ 7 次,得到长度为(200 ± 15) μm 的藻段,用 76 μm 筛绢过滤萱藻丝状体,并用消毒海水反复冲洗除去碎屑,再以吸水纸吸干多余水分。称取经过上述处理的萱藻丝状体,用 F₁ 培养液^[23]配成生物量为 0.60 mg/mL 的藻液。取 300 mL 藻液置于 500 mL 的三角烧瓶中,并接种对数生长期的膨胀色球藻进行共培养,接种密度为 4.0 × 10⁴ 个/mL,按表 1 加入不同浓度的抗生素,每个浓度设 3 个平行样。其他培养条件:温度 22 ℃,光暗周期 14L:10D,光照强度 86.4 ~ 97.2 μmol/(m² · s)。在实验的第 0、1、3、5、10、15、20 天,从平行样中各取 10 mL 藻液,称量萱藻丝状体的鲜重,并用血球计数板统计每毫升藻液中膨

胀色球藻的细胞数。

萱藻丝状体的日均增长率和增重倍比计算公式^[24]:

$$K_s(\%) = [(\text{Ln}N_t - \text{Ln}N_0)/t] \times 100$$

$$P(\%) = [(N_t - N_0)/N_0] \times 100$$

式中, K_s 代表萱藻丝状体的日均增长率; P 代表萱藻丝状体的增重倍比; N_0 代表萱藻的起始鲜重; N_t 代表 t 时的鲜重; t 代表时间间隔(d)。

膨胀色球藻的日均增长率计算公式^[24]:

$$K_c(\%) = [(\text{Ln}C_t - \text{Ln}C_0)/t] \times 100$$

式中, K_c 代表膨胀色球藻的日均增长率; C_0 代表膨胀色球藻的起始细胞密度; C_t 代表 t 时的膨胀色球藻细胞密度; t 代表时间间隔(d)。

表 1 5 种抗生素的实验浓度
Tab.1 Experimental concentrations of antibiotics
μg/mL

抗生素 antibiotic	组别 group					
	1	2	3	4	5	6
链霉素 streptomycin	0	10	20	100	500	
氨苄青霉素 ampicillin	0	0.1	1	10	100	200
卡那霉素 kanamycin	0	0.1	1	10	100	200
庆大霉素 gentamycin	0	10	100	300	500	
氯霉素 chloramphenicol	0	0.01	0.1	1	10	50

2 结果

2.1 链霉素对萱藻丝状体和膨胀色球藻生长的影响

链霉素对膨胀色球藻的生长具有抑制作用,且随着抗生素浓度的升高而增强。100 和 500 μg/mL 2 个实验组中链霉素在实验第 5 天即对膨胀色球藻表现出明显的抑制作用(图 1),其细胞密度分别降至同期对照组的 15.55% 和 5.57%,实验第 20 天,2 个实验组中膨胀色球藻的日均增长率均为负值(表 2),其生长受到完全抑制。显微镜检发现,对照组和较低浓度组(10 和 20 μg/mL)中,膨胀色球藻细胞颜色为深蓝绿色,细胞直径(不含胶质鞘)可达 15 μm,偶有单一细胞存在,多组成胶群体(图版-1),有的群体内细胞数可达 16 个甚至更多,生长繁殖旺盛。较高浓度组(100 和 500 μg/mL)中的膨胀色球藻细胞直径(不含胶质鞘)均小于 10 μm,单生,未见胶群体,细胞呈浅黄色且大量死亡,生长被强烈抑制(图版-2,3)。在 20 d 抗生素实验结束后,更换培养

液恢复至无抗生素条件进行扩增培养 10 d, 镜检发现 100 $\mu\text{g/mL}$ 实验组膨胀色球藻细胞密度未增加, 且未见胶群体, 其他 4 组膨胀色球藻密度均显著增加并出现胶群体。

4 个实验组中只有 500 $\mu\text{g/mL}$ 的链霉素对萱藻丝状体表现出明显的抑制作用, 实验第 10 天萱藻丝状体增重倍比 (6.02%) 远低于对照组 (57.67%), 且第 20 天丝状体日均增长率为负值 (图 2)。而其他浓度组中萱藻丝状体在第 20 天的日均增长率均高于对照组, 表现出一定的促进作用。显微镜检发现, 低于 500 $\mu\text{g/mL}$ 的各浓度组中, 萱藻丝状体多呈深褐色, 细胞质较饱满, 部分细胞呈念珠状, 细胞生长状况良好 (图版-1, 2)。500 $\mu\text{g/mL}$ 浓度组中, 丝状体细胞质萎缩, 细胞多呈长筒状, 色素较浅甚至变绿死亡, 生长受到抑制 (图版-3)。实验 20 d 结束后, 恢复至无抗生素条件扩增培养 10 d, 100 $\mu\text{g/mL}$ 浓度组萱藻丝状体扩增迅速, 细胞呈深褐色, 细胞质饱满且较多念珠状细胞, 而其他各组萱藻丝状体扩增缓慢。

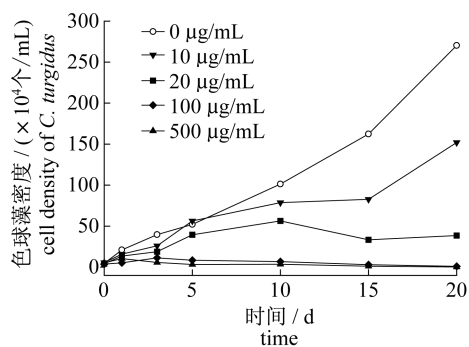


图 1 链霉素对膨胀色球藻细胞密度的影响

Fig. 1 Effects of Str on cell density of *C. turgidus*

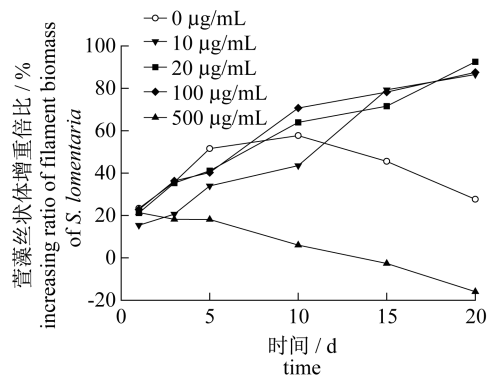


图 2 链霉素对萱藻丝状体增重倍比的影响

Fig. 2 Effects of Str on increasing ratio of filament biomass of *S. lomentaria*

表 2 链霉素对萱藻丝状体和膨胀色球藻的日均增长率的影响 (培养 20 d)

Tab. 2 Effects of Str on daily average growth rates of filaments of *S. lomentaria* and *C. turgidus* (cultured for 20 d)

链霉素浓度/ ($\mu\text{g/mL}$) concentrations of Str	萱藻丝状体鲜重 日均增长率/% daily average growth rates of fresh weight of filaments of <i>S. lomentaria</i>	膨胀色球藻细胞密度 日均增长率/% daily average growth rates of cell density of <i>C. turgidus</i>
0	1.20 $\pm$ 0.62 ^a	20.39 $\pm$ 0.41 ^a
10	3.13 $\pm$ 0.13 ^b	16.68 $\pm$ 0.75 ^a
20	3.26 $\pm$ 0.38 ^b	11.19 $\pm$ 0.19 ^b
100	3.14 $\pm$ 0.34 ^b	-6.65 $\pm$ 0.69 ^c
500	-0.88 $\pm$ 0.46 ^c	-17.16 $\pm$ 4.25 ^d

注: 同一列中的不同字母表示差异显著 ($P \leq 0.05$), 下同

Notes: Different letters in the same column indicate significant difference ($P \leq 0.05$), the same as below

综合比较链霉素各浓度组中膨胀色球藻和萱藻丝状体的生长状况, 适于除去共培养体系中的膨胀色球藻的 Str 浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2 氨苄青霉素对萱藻丝状体和膨胀色球藻生长的影响

氨苄青霉素对膨胀色球藻的抑制作用在恢复培养中表现出可逆性。氨苄青霉素对膨胀色球藻的抑制作用随着抗生素浓度的上升而增加 (图 3)。10 $\mu\text{g/mL}$ 及以下各浓度组膨胀色球藻细胞密度虽然低于对照组, 但始终呈明显的上升趋势, 而 100 和 200 $\mu\text{g/mL}$ 2 浓度组中膨胀色球藻的生长被强烈抑制, 实验第 10 天细胞密度分别降至同期对照组的 14.14% 和 4.14%, 且在实验第 20 天, 200 $\mu\text{g/mL}$ 浓度组的膨胀色球藻日均增长率为负值 (表 3)。显微镜检发现, 100 和 200 $\mu\text{g/mL}$ 2 实验组中膨胀色球藻细胞呈浅黄色, 细胞直径 (不含胶质鞘) 小于 10 μm , 胶群体比对照组明显减少 (图版-4)。20 d 抗生素实验结束后, 更换培养液至无抗生素条件扩增培养 10 d, 6 组膨胀色球藻细胞密度均显著增加, 细胞呈深蓝绿色且有较多胶群体。

5 个浓度组中的萱藻丝状体的增重倍比和第 20 天日均增长率均高于对照组 (图 4)。镜检发现, 实验第 20 天, 100 和 200 $\mu\text{g/mL}$ 2 浓度组的萱藻丝状体细胞质萎缩, 长筒状细胞比例增大, 细胞呈浅褐色甚至变绿死亡, 生长受到抑制 (图版-4)。20 d 实验后恢复无抗生素条件扩增培养 10 d, 6 组萱藻丝状体扩增速度均变缓慢。

综合比较各浓度组中膨胀色球藻和萱藻丝状体的生长状况,氨苄青霉素不适于除去共培养条件下的膨胀色球藻。

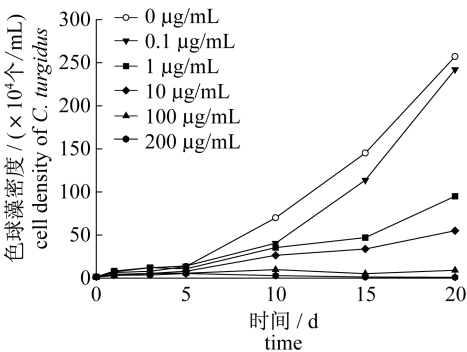


图 3 氨苄青霉素对膨胀色球藻细胞密度的影响
Fig.3 Effects of Amp on cell density of *C. turgidus*

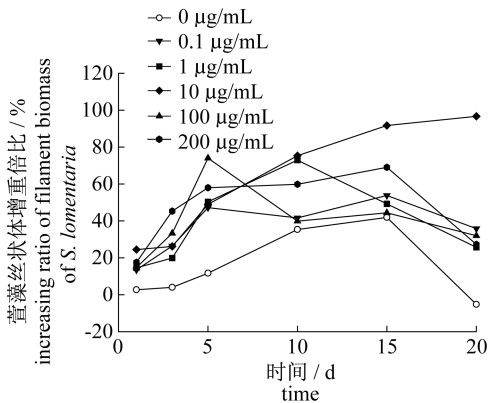


图 4 氨苄青霉素对萱藻丝状体增重倍比的影响
Fig.4 Effects of Amp on increasing ratio of filament biomass of *S. lomentaria*

表 3 氨苄青霉素对萱藻丝状体和膨胀色球藻的日均增长率的影响(培养 20 d)

Tab.3 Effects of Amp on daily average growth rates of filaments of <i>S. lomentaria</i> and <i>C. turgidus</i> (cultured for 20 d)		
氨苄青霉素 浓度/($\mu\text{g/mL}$) concentrations of Amp	萱藻丝状体鲜重 日均增长率/% daily average growth rates of fresh weight of filaments of <i>S. lomentaria</i>	膨胀色球藻细胞 密度日均增长率/% density日均增长率/% rates of cell density of <i>C. turgidus</i>
0	-0.49 ± 0.24^a	25.68 ± 0.27^a
0.1	1.52 ± 0.42^b	25.20 ± 2.15^{ab}
1	1.13 ± 0.50^b	20.86 ± 0.96^{bc}
10	3.38 ± 0.08^c	17.79 ± 1.31^c
100	1.29 ± 0.31^b	11.19 ± 1.45^d
200	1.21 ± 0.48^b	-1.24 ± 2.42^e

2.3 卡那霉素对萱藻丝状体和膨胀色球藻生长状况的影响

卡那霉素对膨胀色球藻的抑制效果较好。100 和 200 $\mu\text{g/mL}$ 2 实验组中膨胀色球藻被显著抑制,第 10 天的细胞密度分别为同期对照组的 11.8% 和 6.64% (图 5),且在实验第 20 天 2 组膨胀色球藻日均增长率均为负值(表 4)。显微镜检发现,100 和 200 $\mu\text{g/mL}$ 2 浓度组中的膨胀色球藻细胞直径(不含胶质鞘)均小于 10 μm ,为单一细胞,呈浅黄色并出现大量死亡现象,生长受到抑制(图版-5)。20 d 抗生素实验结束后,更换培养液至无抗生素条件扩增培养 10 d,100 和 200 $\mu\text{g/mL}$ 2 浓度组的膨胀色球藻细胞密度未见增加,而其他各实验组膨胀色球藻细胞密度均显著上升且出现胶群体。

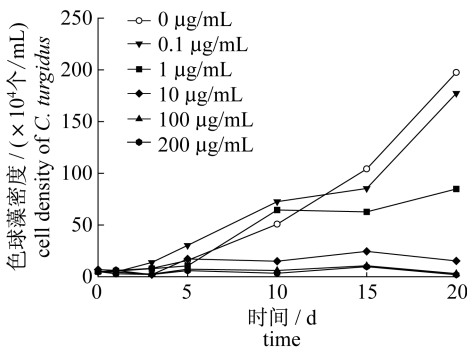


图 5 卡那霉素对膨胀色球藻细胞密度的影响
Fig.5 Effects of Km on cell density of *C. turgidus*

相比于对照组,实验组中萱藻丝状体表现出被促进的现象。随着卡那霉素浓度的升高,各组萱藻丝状体的增重倍比和第 20 天的日均增长率均呈上升趋势(图6)。显微镜检发现,10 $\mu\text{g/mL}$

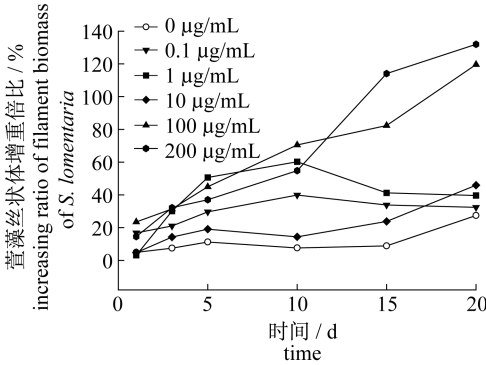


图 6 卡那霉素对萱藻丝状体增重倍比的影响
Fig.6 Effects of Km on increasing ratio of filament biomass of *S. lomentaria*

表 4 卡那霉素对萱藻丝状体和膨胀色球藻日均增长率的影响(培养 20 d)

Tab.4 Effects of Km on daily average growth rates of filaments of *S. lomentaria* and *C. turgidus*(cultured for 20 d)

卡那霉素浓度/ (μg/mL) concentrations of Km	萱藻丝状体鲜重 日均增长率/% daily average growth rates of fresh weight of filaments of <i>S. lomentaria</i>	膨胀色球藻细胞密度 日均增长率/% daily average growth rates of cell density of <i>C. turgidus</i>
0	1.20 ± 0.28 ^a	18.80 ± 0.33 ^a
0.1	1.45 ± 0.07 ^{ab}	18.34 ± 0.47 ^a
1	1.67 ± 0.13 ^{ab}	14.16 ± 0.13 ^b
10	1.89 ± 0.20 ^b	3.97 ± 0.24 ^c
100	3.93 ± 0.14 ^c	-3.16 ± 2.57 ^d
200	4.21 ± 0.18 ^c	-5.08 ± 1.44 ^d

及以上浓度组丝状体呈深褐色,细胞质较对照组更饱满,念珠状细胞比例也较对照组更高,生长受到促进(图版-5)。20 d 实验后恢复无抗生素条件扩增培养 10 d,100 和 200 μg/mL 2 浓度组中萱藻丝状体扩增迅速,而其他 4 组丝状体扩增缓慢。

综合比较卡那霉素各浓度组中膨胀色球藻和萱藻丝状体的生长状况,100 和 200 μg/mL 的卡那霉素均适于除去共培养中的膨胀色球藻。

2.4 庆大霉素对萱藻丝状体和膨胀色球藻生长的影响

庆大霉素强烈抑制膨胀色球藻的生长需要较高的浓度,且其抑制作用在恢复培养中表现出可逆性。300 和 500 μg/mL 2 浓度组在实验第 15 天使膨胀色球藻细胞密度降至同期对照组的 10.92% 和 4.13% (图 7),其中 500 μg/mL 浓度组中,膨胀色球藻在实验第 20 天的日均增长率为负值(表 5)。显微镜检发现,500 μg/mL 浓度组中膨胀色球藻细胞直径(不含胶质鞘)均小于 10 μm,未见胶群体,细胞呈浅黄色并且出现死亡现象,生长受到强烈抑制(图版-6)。在 20 d 抗生素实验结束后,更换培养液恢复至无抗生素条件扩增培养 10 d,各实验组中均观察到膨胀色球藻细胞密度显著增加且形成胶群体。

500 μg/mL 浓度组中庆大霉素表现出对萱藻丝状体的抑制作用,实验第 20 天萱藻丝状体的增重倍比和日均增长率均低于对照组(图 8)。显微镜检发现,500 μg/mL 浓度组中萱藻丝状体细胞质萎缩,长筒状细胞比例增大,细胞呈浅褐色甚至出现变绿死亡现象,生长受到抑制(图版-6)。

20 d 实验后恢复无抗生素条件扩增培养 10 d,各组萱藻丝状体均扩增缓慢。

综合比较各浓度组中膨胀色球藻和萱藻丝状体的生长状况,庆大霉素不适于除去共培养条件下的膨胀色球藻。

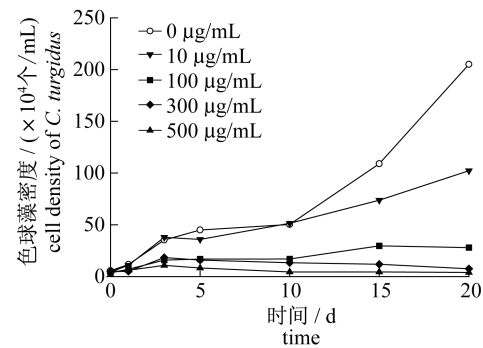


图 7 庆大霉素对膨胀色球藻细胞密度的影响
Fig.7 Effects of Gm on cell density of *C. turgidus*

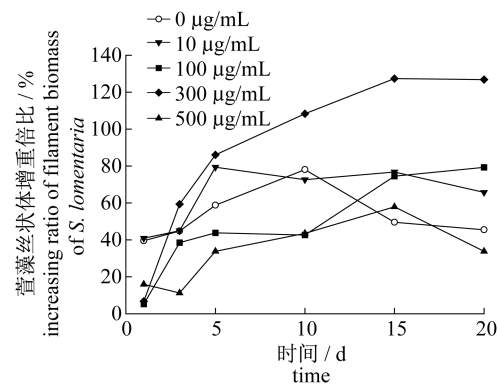


图 8 庆大霉素对萱藻丝状体增重倍比的影响
Fig.8 Effects of Gm on increasing ratio of filament biomass of *S. lomentaria*

表 5 庆大霉素对萱藻丝状体和膨胀色球藻日均增长率的影响(培养 20 d)

Tab.5 Effects of Gm on daily average growth rates of filaments of *S. lomentaria* and *C. turgidus*(cultured for 20 d)

庆大霉素浓度/ (μg/mL) concentrations of Gm	萱藻丝状体鲜重 日均增长率/% daily average growth rates of fresh weight of filaments of <i>S. lomentaria</i>	膨胀色球藻细胞密度 日均增长率/% daily average growth rates of cell density of <i>C. turgidus</i>
0	1.85 ± 0.11 ^a	17.99 ± 0.27 ^a
10	2.52 ± 0.08 ^b	15.62 ± 0.12 ^a
100	3.19 ± 0.05 ^c	10.40 ± 0.04 ^b
300	4.09 ± 0.15 ^d	2.33 ± 0.15 ^c
500	1.45 ± 0.15 ^e	-1.95 ± 3.73 ^c

2.5 氯霉素对萱藻丝状体和膨胀色球藻生长的影响

氯霉素对膨胀色球藻的抑制作用随浓度上升而大幅增强(图9)。10 和 50 $\mu\text{g/mL}$ 2 浓度组中,实验第 15 天,膨胀色球藻细胞密度分别降至同期对照组的 3.01% 和 3.03%,第 20 天膨胀色球藻日均增长率($1.30\% \pm 0.42\%$), ($-2.57\% \pm 0.44\%$) 均远低于对照组($21.12\% \pm 0.27\%$),其中,50 $\mu\text{g/mL}$ 浓度组中膨胀色球藻第 20 天日均增长率为负值(表6)。显微镜检发现,10 和 50 $\mu\text{g/mL}$ 组膨胀色球藻细胞直径(不含胶质鞘)均小于 10 μm ,未见胶群体,细胞呈浅黄色且大量死亡,生长受到抑制(图版-7,8)。在 20 d 抗生素实验结束后,更换培养液恢复至无抗生素条件进行扩增培养 10 d,10 和 50 $\mu\text{g/mL}$ 2 浓度组中膨胀色球藻细胞密度未见增加,其他 4 组膨胀色球藻细胞密度均显著上升。

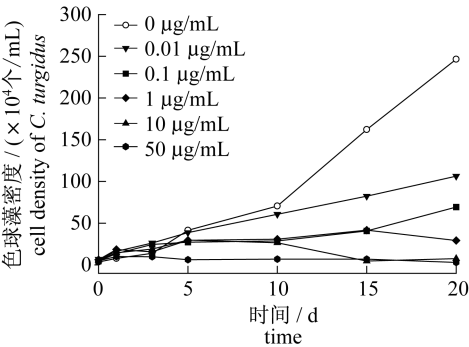


图9 氯霉素对膨胀色球藻细胞密度的影响
Fig.9 Effects of Cm on cell density of *C. turgidus*

50 $\mu\text{g/mL}$ 浓度组中萱藻丝状体表现出被强烈抑制的现象,实验第 10 天丝状体增重倍比为负值(-20.05%),且第 20 天日均增长率也为负值($-2.57\% \pm 0.44\%$)(图10)。镜检发现,50 $\mu\text{g/mL}$ 浓度组中萱藻丝状体细胞质萎缩,长筒状细胞比例增大,细胞呈浅褐色甚至变绿死亡(图版-8)。20 d 实验后恢复无抗生素条件扩增培养 10 d,仅 10 $\mu\text{g/mL}$ 浓度组中萱藻丝状体扩增速度较快,其他 4 组萱藻丝状体扩增速度均缓慢。

综合比较氯霉素各浓度组中膨胀色球藻和萱藻丝状体的生长状况,10 $\mu\text{g/mL}$ 的氯霉素适于除去共培养条件下的膨胀色球藻。

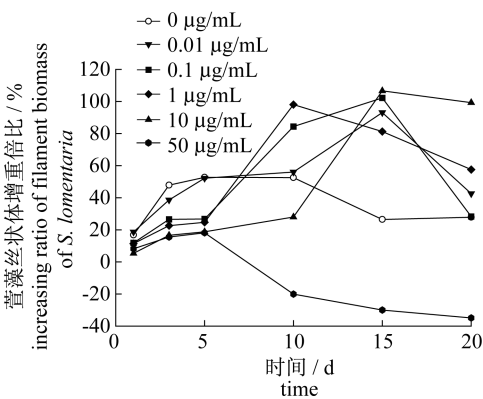


图10 氯霉素对萱藻丝状体增重倍比的影响
Fig.10 Effects of Cm on increasing ratio of filament biomass of *S. lomentaria*

表6 氯霉素对萱藻丝状体和膨胀色球藻日均增长率的影响(培养20 d)

Tab.6 Effects of Cm on daily average growth rates of filaments of *S. lomentaria* and *C. turgidus*(cultured for 20 d)

氯霉素浓度/ ($\mu\text{g/mL}$) concentrations of Cm	萱藻丝状体鲜重	膨胀色球藻细胞密度
	日均增长率/%	日均增长率/%
	daily average growth rates of fresh	daily average growth rates of cell
	weight of filaments of <i>S. lomentaria</i>	density of <i>C. turgidus</i>
0	1.23 ± 0.12^a	21.12 ± 0.27^a
0.01	1.77 ± 0.16^{ab}	13.77 ± 0.23^b
0.1	1.70 ± 0.37^{ab}	13.66 ± 0.69^b
1	2.27 ± 0.33^b	7.79 ± 0.70^c
10	3.43 ± 0.20^c	1.30 ± 0.42^d
50	-2.15 ± 0.26^d	-2.57 ± 0.44^e

3 讨论

链霉素的作用机理是与细菌的 30S 核蛋白体结合以阻止 30S 始动复合物的形成,从而阻止后续启动的发生。有研究表明,链霉素对蓝藻有较强的抑制作用^[13-14]。本实验中膨胀色球藻的生长也受到了链霉素的抑制。其中,100 $\mu\text{g/mL}$ 浓度组中的链霉素不仅强烈抑制了膨胀色球藻的生长,而且促进了萱藻丝状体的生长,这可能是因为链霉素对膨胀色球藻生长的强烈抑制为萱藻丝状体的扩增创造了有利条件。500 $\mu\text{g/mL}$ 浓度组中虽然膨胀色球藻的生长被强烈抑制,但由于过高的浓度使萱藻丝状体也受到损害,使得适应和恢复能力更强的膨胀色球藻在恢复培养中占据

优势,最终抑制了荳藻丝状体的生长和扩增。

氨苄青霉素的作用机理主要是通过抑制原核生物细胞壁中粘肽的合成而抑制其细胞生长。蓝藻的细胞结构与细菌相似,细胞壁中含有粘肽,因此,可以被氨苄青霉素抑制,Murphy 等^[15]曾在研究中利用氨苄青霉素对蓝藻聚球藻(*Synechococcus* sp.)的抑制作用进行实验。但根据 Cao 等^[18]的研究,由于氨苄青霉素具有热不稳定性^[22],在实验条件下作用时间有限,只适合作为高生长速率的单细胞蓝藻选择压力。膨胀色球藻作为以单细胞为主要存在形式的蓝藻,具有较高的生长速率,因此理论上可以区别于细胞壁不含粘肽的荳藻细胞而被氨苄青霉素抑制。然而,本实验中发现,较高浓度的氨苄青霉素(100,200 $\mu\text{g/mL}$)虽然能够强烈抑制膨胀色球藻的生长,但荳藻丝状体细胞也同时受到了损害而处于生长抑制状态,膨胀色球藻在随后的恢复培养中恢复迅速并大量扩增。这可能是因为膨胀色球藻与荳藻丝状体的共培养体系中,2 种藻的相互作用提高了抑制膨胀色球藻生长所需的抗生素浓度而使荳藻丝状体细胞受到损害,作用机理有待进一步研究。

卡那霉素能够抑制细菌核糖体循环中的多个环节。黄小花等^[14]的研究表明,卡那霉素对铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)的生长具有抑制作用,Murphy 等^[15]根据卡那霉素对蓝藻聚球藻的抑制作用将其作为选择压力,本实验中膨胀色球藻也对卡那霉素表现出较高的敏感性。膨胀色球藻的生长在 100 和 200 $\mu\text{g/mL}$ 2 浓度组中受到卡那霉素的强烈抑制,并且在随后的恢复培养中增殖速度缓慢。此外,本实验各浓度组中的卡那霉素对荳藻均未表现出抑制作用,该结果与本实验室曾研究^①的卡那霉素对荳藻丝状体影响的结果不同。对比 2 个实验,分析了可能造成差异的主要原因,首先,在此之前的实验是研究卡那霉素对纯培养的荳藻丝状体的影响,卡那霉素直接作用于丝状体细胞,而本实验构建了荳藻丝状体和膨胀色球藻的共培养体系,卡那霉素可能首先作用于膨胀色球藻或者对膨胀色球藻的抑制作用更强,从而间接为荳藻丝状体创造了有利条件;其次,2 个实验所用的荳藻丝状体在地域和培养时间上的差异也会造成不同结果。因此,不能单纯

由本实验即认为荳藻丝状体像海带^[19]和裙带菜配子体^[20]一样对卡那霉素具有高耐受力。在实际应用中,需要控制卡那霉素的浓度(100 $\mu\text{g/mL}$)和作用时间。

庆大霉素的作用机制是与细菌核糖蛋白体亚单位上的特异性蛋白牢固结合,干扰核糖蛋白体功能,阻止蛋白质合成,并引起 mRNA 上密码的错误而合成无功能蛋白质。关于庆大霉素对蓝藻的抑制作用的报道较少,只有螺旋藻的某些品系表现出对庆大霉素的敏感性^[17]。庆大霉素对膨胀色球藻的抑制效果较差,完全抑制住膨胀色球藻并使其日均增长率降至负值的浓度为 500 $\mu\text{g/mL}$,但过高的浓度也使荳藻丝状体细胞受到了损害,本实验可为庆大霉素在大型藻类中的应用提供基础数据。

氯霉素可干扰核糖体的蛋白质合成,许多海洋微藻都对氯霉素高度敏感,如螺旋藻、小球藻、杜氏盐藻等,因而氯霉素对海洋微藻的抑制作用在许多研究中被广泛应用^[17-18]。本实验中氯霉素对膨胀色球藻的抑制作用最强,强烈抑制膨胀色球藻生长的浓度(10,50 $\mu\text{g/mL}$)相对于其他 4 种抗生素较低,并且在恢复培养中,2 组膨胀色球藻增殖速度都比较缓慢。同时,与裙带菜配子体^[21]对氯霉素的高敏感性一致,荳藻丝状体细胞受氯霉素的影响也较大,较高浓度(50 $\mu\text{g/mL}$)的氯霉素使荳藻丝状体细胞严重受损并且在恢复培养中也难以生长。但较低浓度(10 $\mu\text{g/mL}$)实验组中荳藻丝状体在恢复培养中生长状况良好,扩增迅速,这可能是因为氯霉素对膨胀色球藻的显著抑制为荳藻丝状体的生长创造了有利的条件。因此,在实际应用中,氯霉素的浓度(10 $\mu\text{g/mL}$)和作用时间需加以控制。

综上所述,链霉素(100 $\mu\text{g/mL}$)、卡那霉素(100 $\mu\text{g/mL}$)和氯霉素(10 $\mu\text{g/mL}$)可用于抑制荳藻丝状体扩增过程中出现的膨胀色球藻的生长,但抗生素是否对荳藻丝状体单室孢子囊的形成及孢子的发育造成影响仍有待于进一步研究。因此在种质扩增过程中,要严格控制抗生素的浓度和作用时间,在有效抑制、去除膨胀色球藻后及时停止抗生素的添加。此外,本研究只探讨了单一抗生素的作用效果,2 种或多种抗生素共同作用能否达到更好的种质纯化效果有待进一步研究。

① 高伟,宫相忠. 环境因子对荳藻丝状体扩增及孢子囊发育的影响. 2012.

参考文献:

- [1] Kuda T, Tsunekawa M, Gotoa H, *et al.* Antioxidant properties of four edible algae harvested in the Noto Peninsula [J]. Japan Food Composition and Analysis, 2005, 18(7): 625 – 630.
- [2] Kuda T, Tsunekawa M, Hishi T, *et al.* Antioxidant properties of dried ‘kayamo-nori’, a brown alga *Scytosiphon lomentaria* (Scytosiphonales, Phaeophyceae) [J]. Food Chemistry, 2005, 89 (4): 617 – 622.
- [3] Xu N J, Fan X, Han L J, *et al.* Screening marine algae from Shandong coast for antitumor activity [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2001, 32 (4): 408 – 413. [徐年军, 范晓, 韩丽君, 等. 山东沿海海藻抗肿瘤活性的筛选. 海洋与湖沼, 2001, 32 (4): 408 – 413.]
- [4] Noda H, Amano H, Arashima K, *et al.* Antitumor activity of marine algae [J]. Hydrobiologia, 1990, 204 – 205 (1): 577 – 584.
- [5] Kim S C, Park S Y, Hyoun J H, *et al.* The cytotoxicity of *Scytosiphon lomentaria* against HL-60 promyelocytic leukemia cells [J]. Leukemia Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals, 2004, 19 (5): 641 – 648.
- [6] Hudson J B, Kim J H, Lee M K, *et al.* Antiviral compounds in extracts of Korean seaweeds: Evidence for multiple activities [J]. Journal of Applied Phycology, 1998, 10(5): 427 – 434.
- [7] Clayton M N. The morphology, anatomy and life history of a complanate form of *Scytosiphon lomentaria* (Scytosiphonales, Phaeophyta) from southern Australia [J]. Marine Biology, 1976, 38 (3): 201 – 208.
- [8] Xing Y Z, Gong X Z, Yi B S, *et al.* The morphology and life history of *Scytosiphon lomentaria* [J]. Periodical of Ocean University of China, 2010, 40 (8): 98 – 102. [邢永泽, 宫相忠, 尹宝树, 等. 萱藻不同发育阶段形态学及生活史的研究. 中国海洋大学学报, 2010, 40(8): 98 – 102.]
- [9] Shea R, Chopin T. Effects of germanium dioxide, an inhibitor of diatom growth, on the microscopic laboratory cultivation stage of the kelp, *Laminaria saccharina* [J]. Journal of Applied Phycology, 2007, 19(1): 27 – 32.
- [10] Zhang M R, Lu Q Q, Zhu M X, *et al.* Effect of GeO_2 on diatom pollution in the free filamentous of *Porphyra yezoensis* Ueda [J]. Modern Fisheries Information, 2007, 22 (2): 24 – 26. [张美如, 陆勤勤, 朱庙先, 等. 二氧化锗 (GeO_2) 对条斑紫菜 (*Porphyra yezoensis* Ueda) 自由丝状体 (free filamentous) 中硅藻污染影响的研究. 现代渔业信息, 2007, 22(2): 24 – 26.]
- [11] Ma J H, Liu Q. The effect of germanium dioxide (GeO_2) on the growth of free-living conchocelis of *Porphyra haitanensis* [J]. Journal of Fisheries of China, 1989, 13(1): 36 – 41. [马家海, 刘青. 二氧化锗对坛紫菜自由丝状体生长发育的影响. 水产学报, 1989, 13(1): 36 – 41.]
- [12] Walker T L, Collet C, Purton S. Algal transgenics in the genomic ERA [J]. Journal of Phycology, 2005, 41(6): 1077 – 1093.
- [13] van der Grinten E, Pikkemaat M G, van den Brandhof E J, *et al.* Comparing the sensitivity of algal, cyanobacterial and bacterial bioassays to different groups of antibiotics [J]. Chemosphere, 2010, 80(1): 1 – 6.
- [14] Huang X H, Yang X N, Xu H, *et al.* Study on the sensitivity of *Microcystis aeruginosa* to five antibiotics [J]. Journal of Xiamen University: Natural Sciences, 2006, 45(1): 106 – 109. [黄小花, 杨秀娜, 徐虹, 等. 铜绿微囊藻对 5 种抗生素敏感性的研究. 厦门大学学报: 自然科学版, 2006, 45(1): 106 – 109.]
- [15] Murphy R C, Gasparich G E, Bryant D A, *et al.* Nucleotide sequence and further characterization of the *Synechococcus* sp. strain PCC 7002 recA gene: complementation of a cyanobacterial recA mutation by the *Escherichia coli* recA gene [J]. Journal of Bacteriology, 1990, 172(2): 967 – 76.
- [16] Metz J G, Nixon P J, Rögner M, *et al.* Directed alteration of the D1 polypeptide of photosystem II: evidence that tyrosine-161 is the redox component, Z, connecting the oxygen-evolving complex to the primary electron donor, P680 [J]. Biochemistry, 1989, 28(17): 6960 – 6969.
- [17] Wang G G, Zang X N, Zhang B H, *et al.* Study on sensitivities of *Spirulina* sp. to six antibiotics [J]. Chinese High Technology Letters, 2001, 11(7): 6 – 13. [王高歌, 臧晓南, 张宝红, 等. 螺旋藻对六种抗生素的敏感性研究. 高技术通讯, 2001, 11(7): 6 – 13.]
- [18] Cao J, Xu Z, Qiu G, *et al.* Studies on the sensitivity of *Spirulina platensis* to antibiotics and herbicide: relationship with selectable markers for genetic transformation [J]. Bioresource Technology, 1999, 70

- (1):89-93.
- [19] Wu J Q, Wang X, Qin Q, *et al.* Studies of selective marker for kelp transformation[J]. Marine Sciences, 1995(5):42-45. [武建秋, 王希, 秦秋, 等. 海带基因工程选择标记的研究. 海洋科学, 1995(5):42-45.]
- [20] Li D P, Xiong Y. Sensitivities of gametophytes of brown seaweed *Underia pinnatifida* to four antibiotics [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2005,36(3):255-260. [李大鹏, 熊艳. 裙带菜配子体(*Underia pinnatifida*)对四种抗生素的敏感性研究. 海洋与湖沼, 2005,36(3):255-260.]
- [21] Wang P, Cheng F, Teng Y J, *et al.* The effect of antibiotics inhibiting *Agrobacterium* and the influence on the growth and development in laver *Porphyra yezoensis* [J]. Fisheries Science, 2009,28(7):405-408. [王萍, 成峰, 滕亚娟, 等. 抗生素抑制农杆菌的效果及对条斑紫菜生长发育的影响. 水产科学, 2009,28(7):405-408.]
- [22] Sambrook J, Russell D W. Huang P T, *et al.* Molecular cloning: a laboratory manual [M]. Beijing: Science Press, 2002:1599. [J 萨姆布鲁克, D W 拉塞尔. 黄培堂, 等(译). 分子克隆实验指南. 北京: 科学出版社, 2002:1599.]
- [23] Gao W, Gong X Z, Zhang B D. Effect of environmental factors on spore releasing of filaments of *Scytosiphon lomentaria* [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2012,42(2):244-248. [高伟, 宫相忠, 张必达. 环境因子对萱藻(*Scytosiphon lomentaria*)丝状体孢子放散的影响. 海洋与湖沼, 2012,42(2):244-248.]
- [24] Anderson R A. Algal culturing techniques [M]. Amsterdam: Academic Press, 2005:269-285.

Effects of antibiotics on the growth of filaments of *Scytosiphon lomentaria* and *Chroococcus turgidus* in the co-cultured condition

MA Wangnan¹, GONG Xiangzhong^{1*}, ZHANG Wenjian¹, GAO Wei¹, ZHANG Bida²

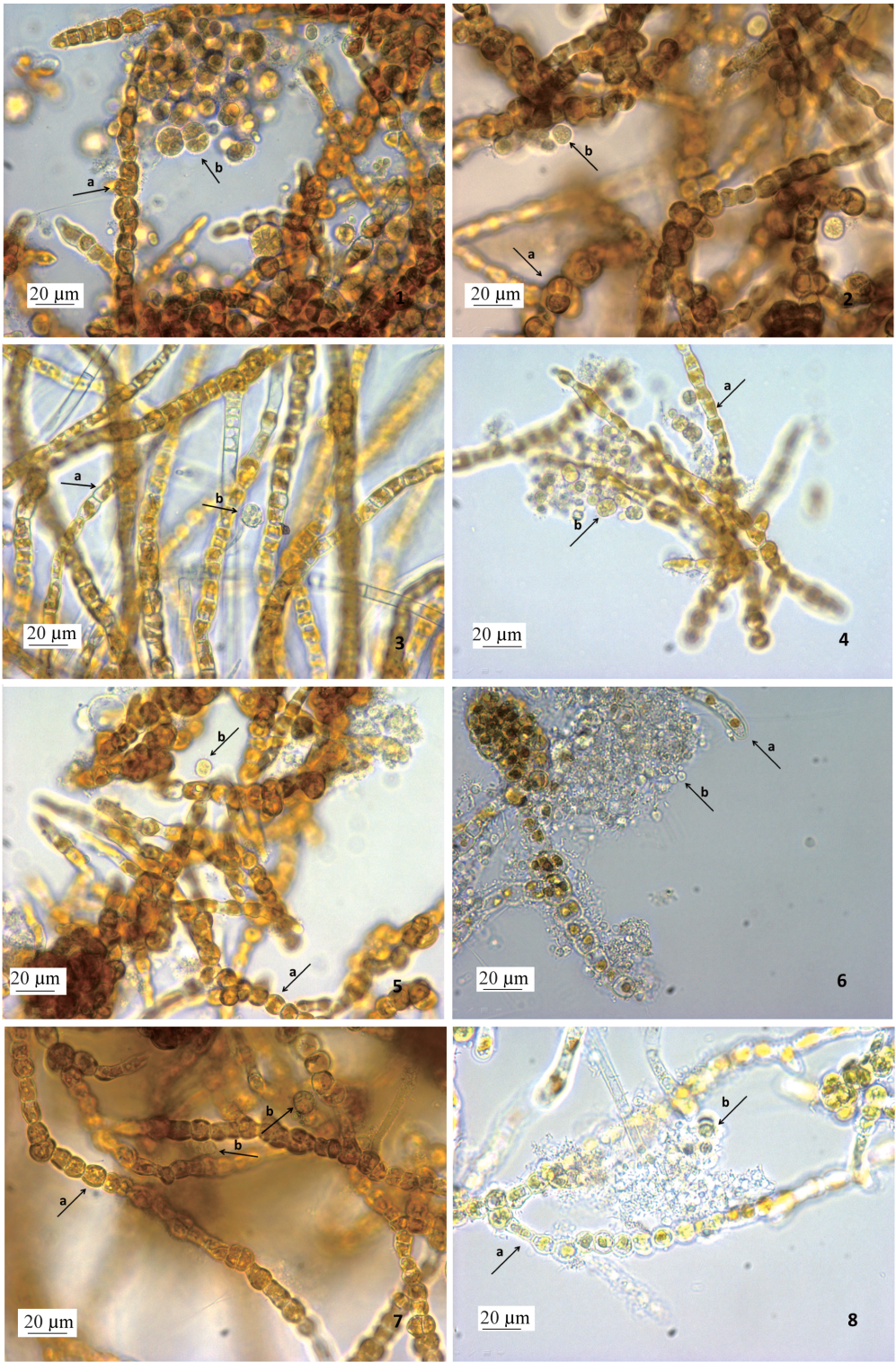
(1. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Changdao Aihua Seaweed Foodstuff Co., Ltd., Yantai 265800, China)

Abstract: In order to suppress *C. turgidus* growth during the amplification process of filaments of *S. lomentaria*, the effects of five commonly used antibiotics: streptomycin (Str), ampicillin (Amp), kanamycin (Km), gentamicin (Gm) and chloramphenicol (Cm) on the growth of filaments of *S. lomentaria* and *C. turgidus*, which were co-cultured in the research were studied by experimental ecology methods in this paper. Results indicated that: (1) Str inhibited the growth of *C. turgidus* significantly at the concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$, while filaments of *S. lomentaria* were not affected; (2) Amp and Gm had obvious inhibitory effects on the growth of *C. turgidus* at the concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$, and filaments of *S. lomentaria* were inhibited at concentrations of 100 $\mu\text{g/mL}$ and 500 $\mu\text{g/mL}$ respectively; (3) The growth of the filaments of *S. lomentaria* was not suppressed by Km within the set range of concentration in this research, while 10 $\mu\text{g/mL}$ Km inhibited *C. turgidus* intensively; (4) Both filaments of *S. lomentaria* and *C. turgidus* were particularly sensitive to Cm, the growth of *C. turgidus* was inhibited by 10 $\mu\text{g/mL}$ Cm distinctly and filaments of *S. lomentaria* were also suppressed when the concentration of Cm reached 10 $\mu\text{g/mL}$. The results mentioned above revealed that Str (100 $\mu\text{g/mL}$), Km (100 $\mu\text{g/mL}$) and Cm (10 $\mu\text{g/mL}$) could be applied to reduce the risk of contamination of *C. turgidus* during the preservation and amplification of filaments of *S. lomentaria*.

Key words: *Scytosiphon lomentaria*; *Chroococcus turgidus*; filaments; antibiotics; co-culture

Corresponding author: GONG Xiangzhong. E-mail: gxzhw@163.com



图版 不同种类及浓度抗生素作用下的萱藻丝状体细胞与膨胀色球藻细胞(培养 20 d)
箭头 a 指示的是萱藻丝状体细胞; 箭头 b 指示的是膨胀色球藻细胞。1. 20 μg/mL 链霉素; 2. 100 μg/mL 链霉素; 3. 500 μg/mL 链霉素; 4. 200 μg/mL 氨苄青霉素; 5. 100 μg/mL 卡那霉素; 6. 500 μg/mL 庆大霉素; 7. 10 μg/mL 氯霉素; 8. 50 μg/mL 氯霉素

Plate Cells of filaments of *S. lomentaria* and *C. turgidus* in different antibiotic conditions(cultured for 20 d)

arrows a indicate filamentous cells of *S. lomentaria*; arrows b indicate cells of *C. turgidus*. 1. 20 μg/mL Str; 2. 100 μg/mL Str; 3. 500 μg/mL Str; 4. 200 μg/mL Amp; 5. 100 μg/mL Km; 6. 500 μg/mL Gm; 7. 10 μg/mL Cm; 8. 50 μg/mL Cm