

文章编号: 1000-0615(2017)04-0512-13

DOI: 10.11964/jfc.20160510388

抗生素处理对坛紫菜叶状体生长和藻际微生物的影响

雷 杰¹, 丁洪昌¹, 严兴洪^{1,2*}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 上海海洋大学省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

摘要: 设计了氨苄青霉素、硫酸庆大霉素和卡那霉素3种抗生素的不同组合处理坛紫菜叶状体, 旨在筛选出坛紫菜叶状体藻际微生物的最优去除方法; 同时, 探究紫菜叶状体生长与微生物群落变化之间的关系。结果显示, 低浓度(10 $\mu\text{g/mL}$)的硫酸庆大霉素或高浓度(800 $\mu\text{g/mL}$)的卡那霉素处理, 对坛紫菜叶状体生长均具有一定的抑制作用, 而不同浓度的氨苄青霉素处理均促进了叶状体生长。500 $\mu\text{g/mL}$ 的氨苄青霉素、500 $\mu\text{g/mL}$ 的硫酸庆大霉素与300 $\mu\text{g/mL}$ 的卡那霉素3种抗生素混合处理叶状体24 h, 不会抑制叶状体的生长; 同时, 对藻际微生物有较强的抑制性。不同的坛紫菜品系, 不同的叶状体日龄和培养密度, 以及在不同的海水盐度和不同浓度的营养盐中培养, 抗生素处理组圆盘体的生长均比对照组快。通过比较抗生素处理组与对照组分离的菌株后发现, 抗生素处理组有两株菌落形态和菌株形态与对照组显著不同的特有菌株。研究表明, 在坛紫菜叶状体的生长过程中, 某些对叶状体生长起阻碍作用的细菌如果大量繁殖, 会抑制对叶状体生长有益的细菌繁殖, 当用抗生素抑制了阻碍生长的细菌, 就会使益生菌成为优势菌, 促进叶状体的生长, 益生菌对上述抗生素的处理不太敏感, 但由于培养条件的改变, 抗生素对阻碍生长的细菌的抑制作用会减弱, 使得它们大量繁殖, 从而抑制叶状体的生长。

关键词: 坛紫菜; 叶状体; 抗生素; 藻际微生物; 优势群落

中图分类号: S 968.43

文献标志码: A

紫菜是一种具有重要经济价值的大型红藻。坛紫菜(*Pyropia haitanensis*)是我国主要的栽培种之一, 被广泛栽培于福建、浙江和广东沿海, 它的年产量约占我国紫菜年总产量的75%^[1]。

Bell等^[2]在对大型海藻的研究中发现, 藻类在生长过程中向环境释放大量有机物质, 使藻细胞周围形成了具有独特结构与功能的微生物群落, 这种独特的微环境被称为“藻际微环境”。海藻生长与藻际微生物之间存在着密切的关系。Croft等^[3]通过对326种海藻研究后发现, 有171种藻类需要由细菌提供的一种辅酶, 用于合成藻体生长所必需的维生素B₁₂。然而, 并不是所有的藻际微生物都能促进藻类的生长。例如, 当

某种营养盐缺乏时, 藻体上附生的微生物就会成为无机营养盐的竞争者, 从而抑制藻体的生长^[4]。藻际微生物除了影响海藻的生长外, 还会影响海藻的个体发育和形态建成。Fukui等^[5]发现在无菌条件下培养的条斑紫菜(*P. yezoensis*)原生质体, 其再生体的形态畸形率偏高, 而如果接种了生丝单胞菌(*Hyphomonas* sp.)后, 再生体的形态畸形率就明显降低。

大型海藻的藻际微生物数量总是处于一种动态平衡, 这种平衡一旦被打破, 就会暴发病害。人工栽培的海带(*Laminaria japonica*)其藻体表面附生着一定数量的褐藻酸降解菌, 该菌在正常生态环境下不会对海带叶状体有损害作用,

收稿日期: 2016-05-04 修回日期: 2016-10-10

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划(2012AA10A411); 国家自然科学基金(31072208); 国家农业科技成果转化资金(2013GB2C220537); 福建省省长专项基金(2014S1477-10)

通信作者: 严兴洪, E-mail: xhyan@shou.edu.cn

但如果温度过高或栽培密度过大时, 褐藻酸降解菌就会大量繁殖, 使海带发生腐烂^[6-8]。

近年来, 学者对于海藻、藻际微生物以及环境条件三者间的关系进行了大量研究。沈梅丽^[9]采用涡旋振荡与研磨匀浆相结合的方法, 用Zobel 2216E和PDA培养基从养殖坛紫菜的藻际微生物中, 分离出467株细菌和55株真菌。孙进等^[10]利用 γ -变形菌纲(γ -Proteobacteria)特异性探针研究了石莼(*Ulva lactuca*)的藻际微生物, 发现58.3%的石莼表面附生菌属 γ -变形菌纲。

获取无菌的海藻是研究藻际微生物的重要前提, 采用抗生素处理与其他除菌法相结合的方法, 能取得较好的效果。Shibata等^[11]利用孢子冲洗与抗生素处理相结合的方式, 获得了一种红藻的无菌藻体。抗生素主要通过影响微生物的正常代谢, 抑制或杀死微生物, 一定浓度的抗生素也会影响海藻的生长发育。马旺楠等^[12]发现一定浓度的链霉素、氨苄青霉素和硫酸庆大霉素可以明显抑制膨胀色球藻(*Chroococcus turgidus*)的生长, 而不影响萱藻(*Scytosiphon lomentaria*)丝状体的生长。本研究试图采用抗生素处理, 建立培育无菌坛紫菜叶状体的方法, 并在此基础上研究抗生素处理对紫菜叶状体生长和藻际微生物群落的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究所用的2个坛紫菜选育品系(104-01, YZ-8)和1个坛紫菜野生型品系(Ph-WT)均以自由丝状体的形式被保存于实验室内, 保存和培养的方法同文献[13], 品系的来源和代码如表1所示。

表 1 本实验所用坛紫菜品系的来源和代码

Tab. 1 Origins and codes of three *P. haitanensis* strains used in the experiment

序号 no.	代码 codes	来源 sources
1	104-01	由采自浙江舟山的野生型坛紫菜经 ⁶⁰ Co- γ 射线诱变获得 ^[14]
2	YZ-8	由坛紫菜优良品系YZ-7经 ⁶⁰ Co- γ 射线诱变获得 ^[15]
3	Ph-WT	采自福建平潭牛山岛

1.2 材料预处理

坛紫菜壳孢子采苗与叶状体的培养方法同文献[16]。将日龄为35、45、55、65和75 d的104-

01品系叶状体在常温下晾干, 用塑料袋密封后保存于-20 °C的冰箱中。日龄45 d的Ph-WT和YZ-8的叶状体保存方法同上。在使用前, 将冷冻保存的叶状体放入灭菌后的培养液中进行复苏培养, 培养条件: 温度(23±1) °C, 光照密度50 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 光照周期10 L : 14 D, 复苏培养48~72 h后, 用打孔器($\Phi=2.5$ mm)从叶状体的中部分别取出若干圆盘, 用灭菌海水清洗3遍。叶状体的培养液为添加MES培养基^[17]的灭菌海水。

1.3 菌种分离与命名

从不同坛紫菜品系中分离的藻际微生物被依次命名为B1, B2, B3, B4, B5和B6。

1.4 主要试剂

氨苄青霉素, 硫酸庆大霉素和卡那霉素均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.5 抗生素的筛选

104-01品系叶状体对抗生素的耐受性实验
将3种抗生素分别添加到培养液中, 浓度分别为10、100、300、500和800 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 每个浓度组的250 mL培养液中分别加入10个104-01品系(日龄75 d)的圆盘体进行充气培养, 每组设3个平行。培养2 d后仅更换1次新鲜培养液, 并追加抗生素至相应浓度, 充气培养6 d后, 测量圆盘体的长度, 筛选出对坛紫菜圆盘体生长无抑制的抗生素浓度, 以便进行坛紫菜藻际微生物的抗生素敏感性实验。对照组未添加抗生素。

坛紫菜藻际微生物的抗生素敏感性实验
根据上个实验结果配制抗生素储备液, 经0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 取直径为6 mm的若干滤纸圆片, 浸泡于抗生素储备液24~36 h, 40 °C低温烘干, 备用。

取已活化的坛紫菜藻际微生物菌株(B1~B6, 20%甘油保存)菌液0.1 mL, 加入到1.9 mL灭菌海水中, 充分混匀配制成菌悬液。取0.1 mL菌悬液, 均匀涂布于Zobel 2216E培养基上。

将低温烘干的滤纸圆片贴于涂有菌液的培养基上(每个平板贴同种浓度的3种抗生素), 以未浸泡过抗生素的滤纸圆片为对照。培养条件: 温度(30±1) °C, 光照密度40 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 光照周期10 L : 14 D。

抗生素组合处理去除坛紫菜附生菌的实验
根据耐受性和敏感性实验结果选择抗生素最佳

终浓度, 然后进行不同的混合处理实验, 处理24 h后, 在无菌海水中静置培养过夜, 再转入坛紫菜培养液中充气培养2 h后, 更换新的培养液继续培养6 d, 观察圆盘体生长情况。每组设3个平行, 以未经抗生素处理的圆盘体作为对照。

1.6 无菌检测

培养基检测 坛紫菜圆盘体培养6 d后, 取0.1 mL培养液, 涂布于Zobel 2216E和PDA培养基, 分别在36和26 °C下再培养48和120 h, 培养条件: 光照密度40 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 光照周期10 L : 14 D。

叶状体附生菌的革兰氏染色检测 待检测的圆盘体经革兰氏染色(革兰氏染色试剂盒, 海博生物有限公司)后, 置于光学显微镜(Nikon, Eclipse 90i)进行油镜检查。根据染色后的颜色与形态区分菌体与紫菜细胞。

1.7 叶状体的培养密度、日龄和不同培养条件对抗生素处理的坛紫菜圆盘体生长的影响

不同培养密度对经抗生素处理的104-01品系圆盘体生长的影响 根据“抗生素筛选”的第3个实验, 选择最佳抗生素组合处理104-01品系(45 d)的圆盘体24 h后, 用无菌海水充气培养过夜, 随后将圆盘体放入装有250 mL灭菌培养液的充气瓶中, 圆盘体的培养密度梯度为5/250、10/250、15/250、20/250和25/250 [圆盘体个数/培养液体积(mL)], 每个实验组设3个平行, 以抗生素未处理的圆盘体为对照组, 每3 d更换1次新鲜培养液, 培养6 d后测量圆盘体的长轴长度。培养条件同“材料预处理”。

不同日龄对经抗生素处理的104-01品系圆盘体生长的影响 分别取日龄35、45、55、65和75 d的104-01品系叶状体的圆盘体, 先同上进行无菌处理, 每个日龄组各取5个圆盘体, 一同放入装有250 mL灭菌培养液的充气瓶中进行混合培养。圆盘体培养和生长测量方法同上。

不同营养盐浓度对经抗生素处理的104-01品系圆盘体生长的影响 在海水中分别添加2%、4%、6%、8%和10%的MES培养基, 配出5种不同的培养液, 分别标为1倍MES、2倍MES、3倍MES、4倍MES和5倍MES, 高压灭菌后备用。圆盘体无菌处理、培养和生长测量方法同上。

不同海水盐度对经抗生素处理的104-01品系圆盘体生长的影响 圆盘体无菌处理同上, 将

处理后的圆盘体放入装有250 mL灭菌培养液的充气瓶中, 其盐度分别为13.1、19.6、26.1、32.6和39.2。圆盘体培养和生长测量方法同上。

对经抗生素处理的混合培养的坛紫菜野生型品系(Ph-WT)和选育品系(104-01, YZ-8)圆盘体生长的测定 分别标记坛紫菜野生型品系(Ph-WT)和选育品系(104-01, YZ-8)的圆盘体, 先进行无菌处理, 其处理方法同上, 然后, 每个品系各取5个圆盘体, 进行混合培养。圆盘体培养和生长测量方法同上。

1.8 坛紫菜藻际微生物的分离、培养和保存

将培养6 d的坛紫菜叶状体圆盘体放入含10 mL无菌海水的灭菌离心管中, 涡旋振荡10 min, 获得振荡液(P); 将振荡后的圆盘体放入灭菌研钵中, 加入灭菌石英砂和少许无菌海水进行研磨, 用灭菌筛绢过滤, 得到研磨悬液(Q); 坛紫菜圆盘体培养6 d的培养液样品(W)。将W、P、Q 3种液体分别稀释 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 和 10^5 倍, 将每个稀释梯度的液体涂布于Zobel 2216E培养基上, 培养48~72 h。根据菌落形态挑取单菌落, 分区划线2~3次, 对分离菌株进行革兰氏染色(革兰氏染色试剂盒, 海博生物有限公司)、油镜观察并记录菌落形态, 对纯化菌株进行斜面培养, 10%甘油保存菌种。对照组也按以上方法处理。

分离菌株统一编号, B代表细菌, F代表真菌, Ph代表来自于坛紫菜, D代表坛紫菜圆盘体培养密度组, Y代表坛紫菜日龄组, V代表坛紫菜品系组, N代表营养盐浓度组, S代表海水盐度组, 1~4代表菌株, 如BPhQN2表示分离自不同营养盐浓度组中坛紫菜研磨液的第2种细菌。

1.9 高浓度菌液回染抗生素处理过的坛紫菜

将抗生素处理组和对照组分离的特有菌株活化, 并制成 10^9 CFU/mL的菌悬液, 备用。用抗生素混合液处理坛紫菜104-01品系圆盘体24 h后, 用无菌海水清洗3遍。用配制好的菌悬液分别浸泡处理过的圆盘体3 h后, 用无菌海水清洗1遍, 在6孔细胞培养板中培养20 d, 观察坛紫菜叶状体的生长情况。以未浸泡过菌液的紫菜圆盘体为对照组, 在相同条件下进行培养。

2 结果

2.1 抗生素的选择

坛紫菜叶状体对抗生素的耐受性实验表明,

低浓度(10 μg/mL)的硫酸庆大霉素和高浓度(800 μg/mL)的卡那霉素对坛紫菜圆盘体的生长均具有一定的抑制作用，但其他浓度组均有促进生长的作用(图1)；圆盘体对氨苄青霉素具有很好的耐受性，培养6 d，5个浓度组的圆盘体长度均大于对照组，在100~800 μg/mL各处理组之间，圆盘体的长度差异极显著(t -test, $P<0.01$)。坛紫菜藻际微生物菌株对抗生素敏感性实验表明，500 μg/mL的氨苄青霉素对6株菌株均表现出抑制性；500 μg/mL的硫酸庆大霉素对83%的菌株表现出抑制作用；300 μg/mL的卡那霉素对67%的菌株表现出良好的抑制性(表2)。因此，选择氨苄青霉素(500 μg/mL)、硫酸庆大霉素(500 μg/mL)和卡

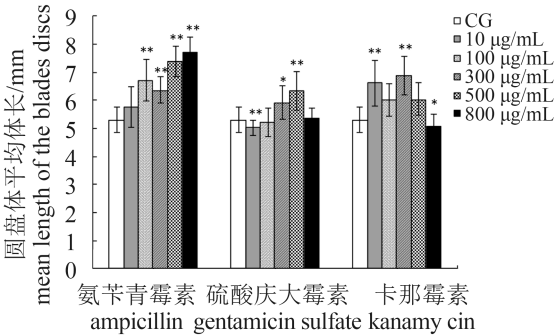


图1 在含不同浓度的抗生素培养液中培养6 d后坛紫菜104-01品系叶状体圆盘体($\Phi=2.5$ mm)的平均长度
*.同种抗生素内差异显著($P<0.05$, t -test); **.同种抗生素内差异极显著($P<0.01$, t -test); 下同; CG.对照组

Fig. 1 Mean length of the blades discs of 104-01 strain in *P. haitanensis* after being cultured with different concentrations of antibiotics for 6 days
*. significant difference in same antibiotics ($P<0.05$, t -test); **. extremely significant difference in same antibiotics ($P<0.01$, t -test); the same below; CG. control group

那霉素(300 μg/mL)3种抗生素混匀液对坛紫菜叶状体进行无菌化处理。

抗生素混合处理的结果显示，与单个抗生素和两两抗生素组合相比，3种抗生素混合使用对坛紫菜的无菌化处理效果更好，不会抑制坛紫菜圆盘体的生长(图2)，而且对6株藻际微生物菌株也有更强的抑制性(表2)。

2.2 无菌检测

经含3种抗生素的混合液处理坛紫菜圆盘体24 h后，革兰氏染色检测发现，对照组(图版 I - 2~4)中有少量杆状菌体存在，而抗生素处理后的

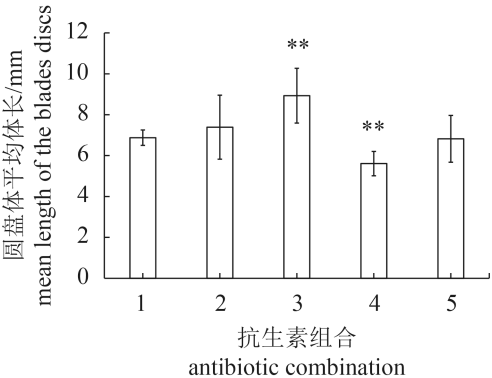


图2 在不同抗生素混合液中培养6 d的坛紫菜104-01品系圆盘体($\Phi=2.5$ mm)的平均长度
1.对照组; 2.氨苄青霉素和卡那霉素; 3.氨苄青霉素和硫酸庆大霉素; 4.硫酸庆大霉素和卡那霉素; 5.氨苄青霉素、硫酸庆大霉素和卡那霉素

Fig. 2 Mean length of the blades discs of 104-01 strain in *P. haitanensis* cultured in antibiotic mixture for 6 days
1. control group; 2. ampicillin and kanamycin; 3. ampicillin and gentamicin sulfate; 4. gentamicin sulfate and kanamycin; 5. ampicillin and gentamicin sulfate and kanamycin

表2 不同抗生素处理对坛紫菜藻际微生物的抑菌效果

Tab. 2 Bacteriostatic effect of different antibiotics processing on phycosheres isolated from <i>P. haitanensis</i>		抑菌圈直径/mm bacteriostatic ring diameter					
抗生素 antibiotic		B1	B2	B3	B4	B5	B6
氨苄青霉素	ampicillin	17.4	7.1	26.5	16.5	28.5	32.5
硫酸庆大霉素	gentamicin sulfate	23.2	7.3	11.1	6.0	29.4	21.1
卡那霉素	kanamycin	20.1	6.0	13.4	6.0	8.9	18.8
氨苄青霉素+卡那霉素	ampicillin+kanamycin	26.2	8.2	37.6	33.7	12.8	31.0
氨苄青霉素+硫酸庆大霉素	ampicillin+gentamicin sulfate	23.3	9.1	37.5	36.5	13.0	24.6
卡那霉素+硫酸庆大霉素	kanamycin+gentamicin sulfate	34.5	8.5	23.0	21.8	6.0	17.7
氨苄青霉素+硫酸庆大霉素+卡那霉素	ampicillin+gentamicin sulfate+kanamycin	30.0	8.5	37.5	39.0	18.3	33.8

圆盘体(图版 I -1)只见紫菜细胞。采用3种抗生素组合处理坛紫菜圆盘体后,取培养6 d后的培养液0.1 mL,分别涂布于Zobel 2216E和PDA培养基,结果发现培养48 h后,在Zobel 2216E培养基上长出少量菌落,120 h后,PDA培养基上没有菌落长出,而对照组两种培养基上均长出大量菌落。取3种抗生素组合处理过的坛紫菜圆盘体,吸干藻体表面海水,放入研钵中加入灭菌石英砂和1 mL灭菌海水研磨,取0.1 mL研磨液涂布于Zobel 2216和PDA培养基,分别在30和26 °C中培养48和96 h,结果发现,抗生素处理组的两种培养基上均没有菌落长出,而对照组的两种培养基上均长出大量菌落(图版 II)。

2.3 不同条件下培养的抗生素处理过的坛紫菜圆盘体生长情况

经抗生素处理过的104-01品系的日龄35 d的叶状体,其圆盘体生长优势最明显,培养6 d的平均长度达4.2 mm,说明年幼叶状体的生长速率较快(图3)。在不同品系的圆盘体混合培养液中,YZ-8品系表现出明显的生长优势,圆盘体平均长度达到4.6 mm(图4)。此外,在坛紫菜不同日龄和不同品系2个实验中,绝大部分抗生素处理组的圆盘体平均长度大于对照组。

当圆盘体培养密度为5个/250 mL培养液时,抗生素处理组和对照组的圆盘体的平均长度最大,其中抗生素处理组的圆盘体平均长度达5.2 mm。各培养密度组中,抗生素处理组的圆盘

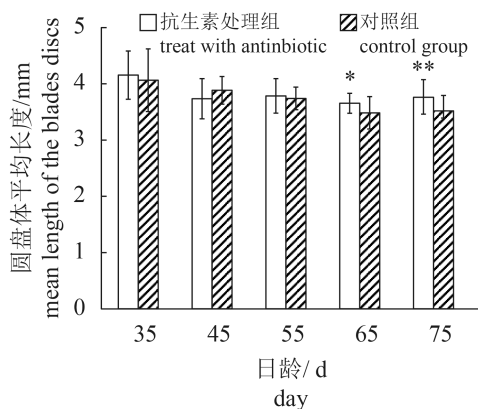


图3 经抗生素处理的不同日龄坛紫菜104-01品系叶状体圆盘体再培养6 d的平均长度

Fig. 3 Mean length of the discs of different-day-old blades of 104-01 strain in *P. haitanensis* treated with antibiotics first and being cultured for another 6 days

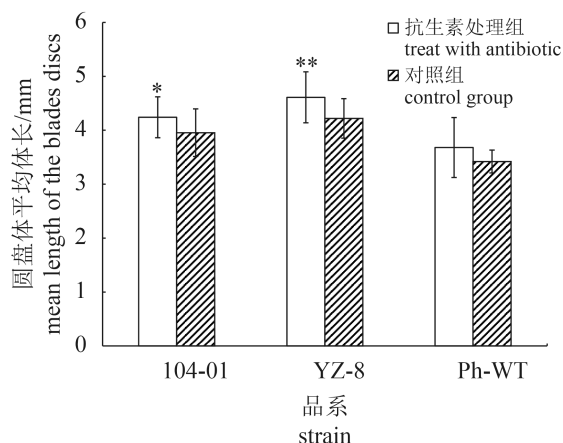


图4 经抗生素处理的坛紫菜野生型品系(Ph-WT)和选育品系(104-01, YZ-8)圆盘体再培养6 d的平均长度

Fig. 4 Mean length of blades discs of the wild-type strain (Ph-WT) and the selected strains (104-01, YZ-8) in *P. haitanensis* treated with antibiotics first and being cultured for another 6 days

体平均长度均大于对照组(图5)。

培养6 d后,5个抗生素处理组的圆盘体平均长度依次为3倍MES组>2倍MES组>4倍MES组>1倍MES组>5倍MES组(图6)。在低营养盐浓度(1倍MES、2倍MES和3倍MES)时,抗生素处理组的圆盘体平均长度分别为6.1、6.3和7.1 mm,分别为对照组的1.6、1.3和1.7倍,二者均具有极显著差异(t -test, $P<0.01$);在高营养盐浓度(4倍MES和5倍MES)时,抗生素处理组与对照组的圆盘体

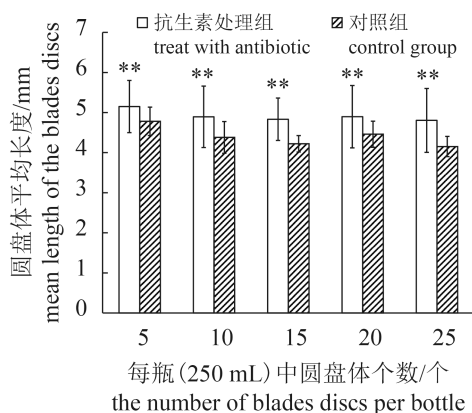


图5 经抗生素处理的坛紫菜104-01品系圆盘体在不同培养密度下再培养6 d的平均长度

Fig. 5 Mean length of blades discs of 104-01 strain in *P. haitanensis* treated with antibiotics first and after being cultured at different culture density for another 6 days

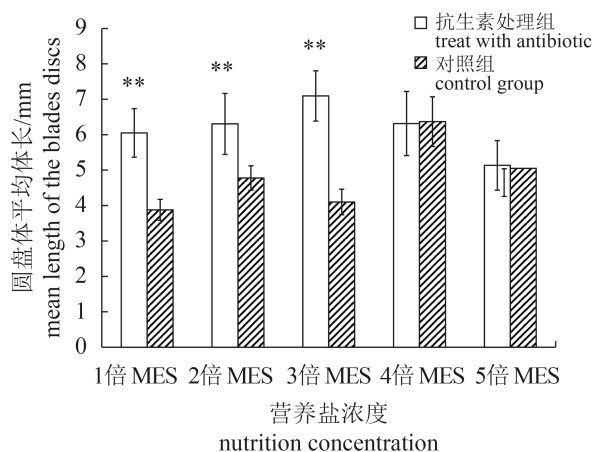


图6 经抗生素处理的坛紫菜104-01品系圆盘体在含不同浓度的营养盐中再培养6 d的平均长度

Fig. 6 Mean length of blades discs of 104-01 strain in *P. haitanensis* treated with antibiotics first and after being cultured at different nutrition concentration for another 6 days

平均长度均较接近。

各盐度组中, 再培养6 d的圆盘体平均长度均为抗生素处理组大于对照组, 其中在13.1和19.6组中, 抗生素处理组与对照组之间的差异极显著, 而在其余盐度组中, 差异不明显(图7)。

2.4 抗生素处理组与对照组的坛紫菜叶状体藻际微生物菌株的比较

从抗生素处理组中分离出的所有藻际微生物菌株均为革兰氏阴性菌(革兰氏染色呈红色至淡红色)(图版Ⅲ), 其中有2株特有细菌菌株, 分

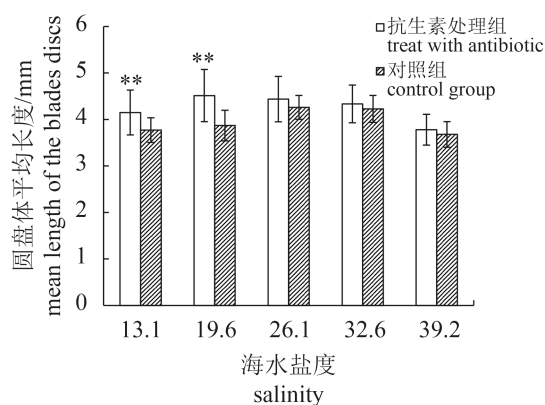


图7 经抗生素处理的坛紫菜104-01品系圆盘体在不同海水盐度中再培养6 d后的平均长度

Fig. 7 Mean length of blades discs of 104-01 strain in *P. haitanensis* treated with antibiotics first and after being cultured at different salinity for another 6 days

别为橙红色菌株BPhVW3和乳黄色菌株BPhVQ1; 从对照组中也分离出2株特有革兰氏阳性菌株(革兰氏染色呈暗紫色至紫色, BPhNW2和BPhDW3)和1株特有短杆状革兰氏阴性菌株BPhDQ1(图版Ⅳ)。以上结果可以看出, 抗生素处理对坛紫菜藻际微生物的构成有影响, 而且某些微生物对抗生素具有一定的耐受性。

2.5 抗生素处理组和对照组分离菌株对无菌坛紫菜的回染观察

坛紫菜圆盘体在6孔细胞培养板中培养20 d, 用抗生素处理组分离出来的菌株回染的圆盘体, 其颜色和大小均明显优于用对照组分离菌株回染的圆盘体, 与未经细菌回染的对照组圆盘体相比较, 也表现出明显的生长优势(图版Ⅴ)。

3 讨论

近年来, 学者们已对红藻、褐藻等大型海洋藻类的藻际微生物进行过广泛研究, 并分离鉴定了多株细菌^[18-19], 但这些研究的材料均来自于自然海区, 由于海水的盐度、温度以及藻体的日龄和密度等均不确定, 都可能会干扰藻际微生物群落结构。本实验以室内培养的坛紫菜野生型品系(Ph-WT)和选育品系(104-01、YZ-8)为材料, 通过改变培养因素、藻体日龄和不同的品系, 系统地研究了抗生素对坛紫菜叶状体的生长和藻际微生物的影响, 并保存了实验中分离出来的坛紫菜藻际优势微生物菌株。

无菌培养体系对研究坛紫菜生长与藻际微生物的相互关系非常重要。多数研究是通过抗生素处理来获得海藻的无菌培养体系^[11], 其中采用具不同作用机制的抗生素组合, 对海藻的无菌处理效果最好, 能够不影响细胞生长的情况下, 保证对一种抗生素产生抗性的微生物能被另一种抗生素抑制^[20]。本研究结果也证实, 单一的抗生素并不能完全抑制坛紫菜的藻际微生物, 而采用氨苄青霉素(500 μg/mL)、硫酸庆大霉素(500 μg/mL)和卡那霉素(300 μg/mL)3种抗生素混合处理坛紫菜叶状体会达到较好的抑菌效果, 同时对叶状体的生长也几乎无影响。

依据本研究的结果, 抗生素处理坛紫菜叶状体, 能有效地抑制其藻际微生物, 并促进坛紫菜叶状体生长。经抗生素处理过的不同日龄和不同品系坛紫菜叶状体再在不同的培养条件

下培养6 d后,其圆盘体生长均普遍快于对照组。但是,当培养液中添加的营养盐浓度大于3倍MES或海水盐度高于19.6时,抗生素处理组与对照组的圆盘体长度差异不显著。而且,对这2组实验的培养液进行无菌检测后发现,当营养盐浓度大于3倍MES时,抗生素处理组和对照组的培养液在Zobel 2216E平板上涂布培养后均出现了大量的菌落;海水盐度高于19.6时,培养液无菌检测也出现了相同的结果。从分离菌株的革兰氏染色结果和平板培养菌落形态观察中发现,从抗生素处理组中分离出的2株菌株在对照组中没有出现,并且抗生素处理组分离的所有菌株的革兰氏染色均呈现淡红色。但是对照组中分离的菌株的革兰氏染色没有呈现统一的颜色,有2株菌株呈现暗紫色,且通过油镜观察发现这2株杆状菌明显大于对照组中分离出的所有菌株。

综上所述,在坛紫菜叶状体的生长过程中,一些对坛紫菜生长有阻碍作用的微生物大量繁殖会抑制对坛紫菜生长有益的微生物生长,当用抗生素抑制了这些阻碍坛紫菜生长的微生物后,就会促使对坛紫菜生长有益菌成为优势菌,促进坛紫菜叶状体的生长。但随着培养环境条件的改变,如营养盐浓度或盐度过高时,抗生素对有害菌的抑制作用就会相应减弱,使它们成为优势菌群,从而抑制坛紫菜叶状体的生长。

参考文献:

- [1] 张学成,秦松,马家海,等.海藻遗传学[M].北京:中国农业出版社,2005:184-225.
Zhang X C, Qin S, Ma J H, *et al.* The genetics of marine algae[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2005: 184-225 (in Chinese).
- [2] Bell W, Mitchell R. Chemotactic and growth responses of marine bacteria to algal extracellular products[J]. The Biological Bulletin, 1972, 143(2): 265-277.
- [3] Croft M T, Lawrence A D, Raux-Deery E, *et al.* Algae acquire vitamin B₁₂ through a symbiotic relationship with bacteria[J]. Nature, 2005, 438(7064): 90-93.
- [4] Rier S T, Stevenson R J. Effects of light, dissolved organic carbon, and inorganic nutrients [2pt] on the relationship between algae and heterotrophic bacteria in stream periphyton[J]. Hydrobiologia, 2002, 489(1): 179-184.
- [5] Fukui Y, Abe M, Kobayashi M, *et al.* Isolation of *Hyphomonas* strains that induce normal morphogenesis in protoplasts of the marine red alga *Pyropia yezoensis*[J]. Microbial Ecology, 2014, 68(3): 556-566.
- [6] 陈騫,林光恒,沈世泽.褐藻酸降解菌的研究 I.褐藻酸降解菌与褐藻酸酶对海带藻体的作用[J].海洋与湖沼,1979,10(4):329-333,402.
Chen D, Lin G H, Shen S Z. Studies on alginic acid decomposing bacteria I. Action of alginic acid decomposing bacteria and alginase on *Laminaria japonica*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1979, 10(4): 329-333, 402 (in Chinese).
- [7] 陈騫,林光恒,沈世泽.褐藻酸降解菌的研究 II.海带夏苗培育中褐藻酸降解菌与烂苗的关系[J].海洋与湖沼,1981,12(2):133-137.
Chen D, Lin G H, Shen S Z. Studies on alginic acid decomposing bacteria II. Rot disease of *Laminaria* summer sporelings caused by alginic acid decomposing bacteria[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1981, 12(2): 133-137 (in Chinese).
- [8] 陈騫,刘秀云,刘秀珍,等.褐藻酸降解菌的研究 III.海带育苗系统中脱苗和烂苗原因分析及其预防措施[J].海洋与湖沼,1984,15(6):581-589.
Chen D, Liu X Y, Liu X Z, *et al.* Studies on alginic acid decomposing bacteria III. The cause of the rot disease and detaching of *Laminaria* sporophytes in sporeling culture stations and their preventive measures[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1984, 15(6): 581-589 (in Chinese).
- [9] 沈梅丽.温州坛紫菜养殖周期中的藻际微生物多样性[D].宁波:宁波大学,2013:1-46.
Shen M L. Microbial diversity of *Pyropia haitanensis* phycosphere during cultivation in Wenzhou[D]. Ningbo: Ningbo University, 2013: 1-46 (in Chinese).
- [10] 孙进,于敏,任晓亮,等.海藻叶面附着细菌群落生理特性与荧光原位杂交分析[J].海洋湖沼通报,2009(4):51-61.
Sun J, Yu M, Ren X L, *et al.* Ecophysiological characteristic and fluorescence in situ hybridization analysis of the epiphytic microbial community[J]. Transactions of Oceanology and Limnology, 2009(4): 51-61 (in Chinese).
- [11] Shibata T, Yamaguchi K, Nagayama K, *et al.* Inhibitory activity of brown algal phlorotannins against glycosidases from the viscera of the turban shell *Turbo*

- cornutus*[J]. *European Journal of Phycology*, 2002, 37(4): 493-500.
- [12] 马旺楠, 宫相忠, 张文健, 等. 抗生素对共培养的萱藻丝状体和膨胀色球藻生长的影响[J]. *水产学报*, 2014, 38(9): 1466-1475.
- Ma W N, Gong X Z, Zhang W J, *et al.* Effects of antibiotics on the growth of filaments of *Scytosiphon lomentaria* and *Chroococcus turgidus* in the co-cultured condition[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(9): 1466-1475 (in Chinese).
- [13] Yan X H, Aruga Y. Induction of pigmentation mutants by treatment of monospore germlings with NNG in *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta)[J]. *Algae*, 1997, 12(1): 39-52.
- [14] 张聪. 印度产紫菜和坛紫菜诱变育种的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2014: 1-10.
- Zhang C. Study on mutation breeding of *Pyropia* from India and *Pyropia haitanensis*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2014: 1-10 (in Chinese).
- [15] 檀应华, 黄林彬, 严兴洪. 坛紫菜耐低盐品系的选育与特性分析[J]. *海洋与湖沼*, 2014, 45(3): 504-512.
- Tan Y H, Huang L B, Yan X H. Selection and characterization of a low-salinity tolerant strain in *Pyropia haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta)[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2014, 45(3): 504-512 (in Chinese).
- [16] 梁志强. 坛紫菜遗传育种的初步研究[D]. 上海: 上海水产大学, 2004: 10-22.
- Liang Z Q. Primary study on genetics and breeding of *Porphyra haitanensis*[D]. Shanghai: Shanghai Fisheries University, 2004: 10-22 (in Chinese).
- [17] 王素娟, 张小平, 徐志东, 等. 坛紫菜营养细胞和原生质体培养的研究I[J]. *海洋与湖沼*, 1986, 17(3): 217-221.
- Wang S J, Zhang X P, Xu Z D, *et al.* A Study on the cultivation of the vegetative cells and protoplasts of *P. haitanensis* I[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1986, 17(3): 217-221 (in Chinese).
- [18] 马家海. 江苏省南部沿海条斑紫菜壶状菌病的调查研究[J]. *上海水产大学学报*, 1992, 1(3-4): 185-188.
- Ma J H. An investigation of chytrid-disease in *Porphyra yezoensis* in the coastal water of south Jiangsu[J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 1992, 1(3-4): 185-188 (in Chinese).
- [19] 褚椒江, 朱鹏, 严小军. 海带藻际微生物抗菌活性及其多样性的初步研究[J]. *水生生物学报*, 2011, 35(6): 972-979.
- Chu J J, Zhu P, Yan X J. Antimicrobial activity and diversity of marine bacteria in phycosphere of *Laminaria japonica*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, 35(6): 972-979 (in Chinese).
- [20] Druehl L D, Hsiao S I C. Axenic culture of Laminariales in defined media[J]. *Phycologia*, 1969, 8(1): 47-49.

The effects of antibiotics on growth and phycosphere microorganisms of *Pyropia haitanensis* thallus

LEI Jie¹, DING Hongchang¹, YAN Xinghong^{1,2*}

(1. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

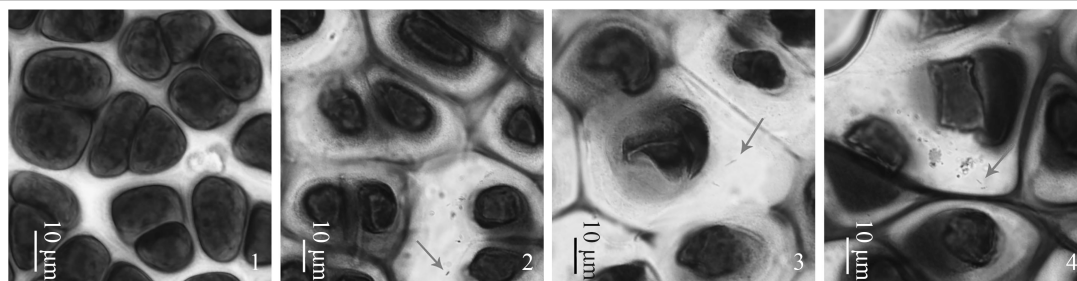
2. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University, Ministry of Education, Shanghai 201306, China)

Abstract: In order to select the best method to remove microorganism of *Pyropia haitanensis*, we treated *P. haitanensis* thallus with different combinations of ampicillin, gentamicin sulfate and kanamycin. Meanwhile, we explored the relationship between the growth of *P. haitanensis* thallus and the change of microflora. The results showed that low concentration of gentamicin sulfate (10 µg/mL) or high concentration of kanamycin (800 µg/mL) could inhibit the growth of *P. haitanensis* thallus. In contrast, ampicillin of each concentration in this paper had a promoting effect on the growth of *P. haitanensis* thallus. We chose the combination of ampicillin (500 µg/mL), gentamicin sulfate (500 µg/mL) and kanamycin (300 µg/mL) treating *P. haitanensis* thallus for 24 hours. The combination of antibiotics could obviously inhibit the microbes and had no side effects on the growth of *Pyropia*. The discs in different strains of *P. haitanensis*, different-day-old and culture density of *P. haitanensis*, different salinity and concentration of medium were all growing faster in antibiotics treated groups than control group. Moreover, two special bacteria strains, whose morphology of colonies and strains were different between antibiotics treated groups and control group, were found after comparing bacteria strains isolated from antibiotic treated groups and control group. Based on the above results, a certain type of microorganism multiply rapidly which inhibit growth of the other microorganism that were benefited for the growth of *P. haitanensis* thallus. When the microorganism that inhibit growth were inhibited with antibiotics, the probiotics became the advantage group and promoted the growth of blades. The probiotics was not sensitive to antibiotics, but with the change of culture condition, the effect of antibiotics on the strains that inhibited the growth of *Pyropia* became weaker, thus they multiplied rapidly, as a result, hindering the growth of *Pyropia* thallus.

Key words: *Pyropia haitanensis*; thallus; antibiotic; phycosphere microorganisms; dominant community

Corresponding author: YAN Xinghong. E-mail: xhyan@shou.edu.cn

Funding projects: National High Technology Research & Development Program of China (“863”Program) (2012AA10A411); National Natural Science Foundation of China (31072208); National Agricultural Science and Technology Achievements Transformation Project (2013GB2C220537); Special Fund of Fujian Provincial Governor (2014S1477-10)

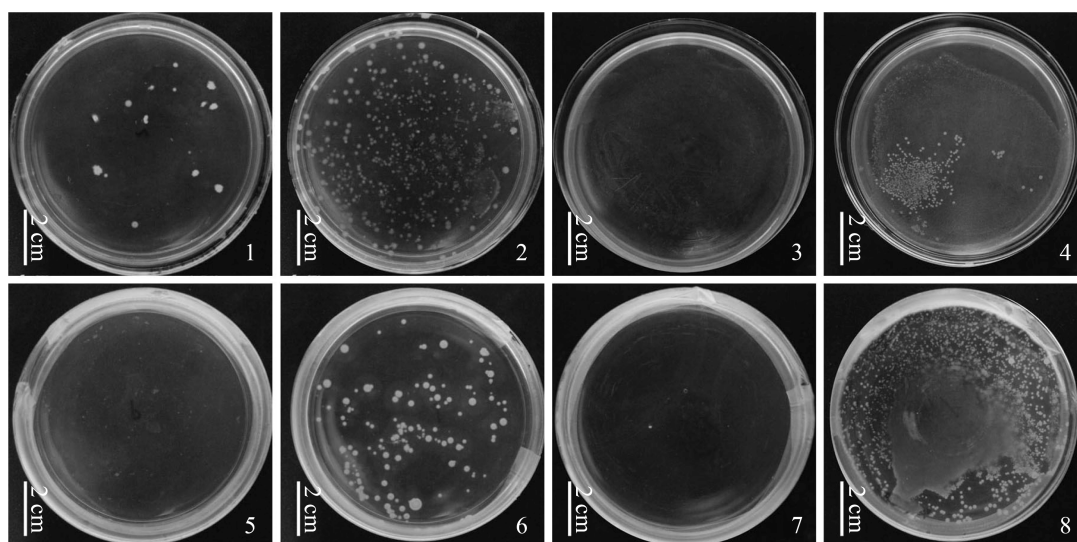


图版 I 抗生素对坛紫菜叶状体表面细菌的杀菌效果显微观察(革兰氏法染色检测)

1. 用抗生素处理24 h后的叶状体表面无细菌; 2~4. 未经抗生素处理的叶状体表面存在细菌(箭头所示)

Plate I Micrographs of bacteria stained by Gram in the blade face treated by antibiotics and untreated in *P. haitanensis*

1. antibiotic-treated blade face showing no bacterium after 24 hours of treatment; 2~4. untreated blade faces showing bacteria (arrows)

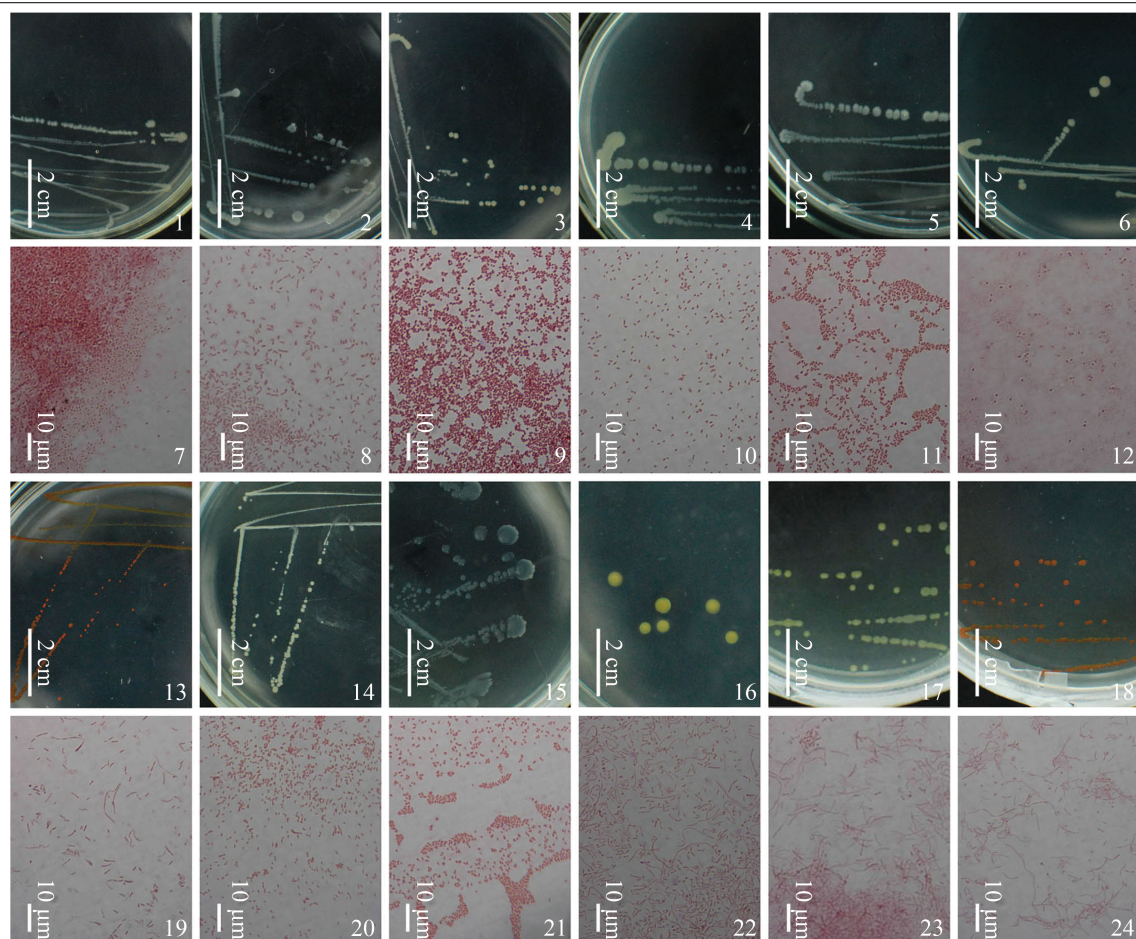


图版 II 坛紫菜培养液和研磨液的微生物检测

1~4. Zobel 2216E培养基; 5~8. PDA培养基。1, 3, 5, 7. 抗生素处理坛紫菜24 h后的实验组; 2, 4, 6, 8. 抗生素未处理坛紫菜24 h后的对照组。1, 2, 5, 6. 坛紫菜圆盘体培养液检测结果; 3, 4, 7, 8. 坛紫菜圆盘体研磨液检测结果

Plate II The microorganism detection of medium and grinding fluid of *P. haitanensis*

1~4. Zobel 2216E medium; 5~8. PDA medium. 1, 3, 5, 7. experiment group after 24 h; 2, 4, 6, 8. control group after 24 h. 1, 2, 5, 6. test result of *P. haitanensis* culture medium; 3, 4, 7, 8. test result of *P. haitanensis* grinding fluid

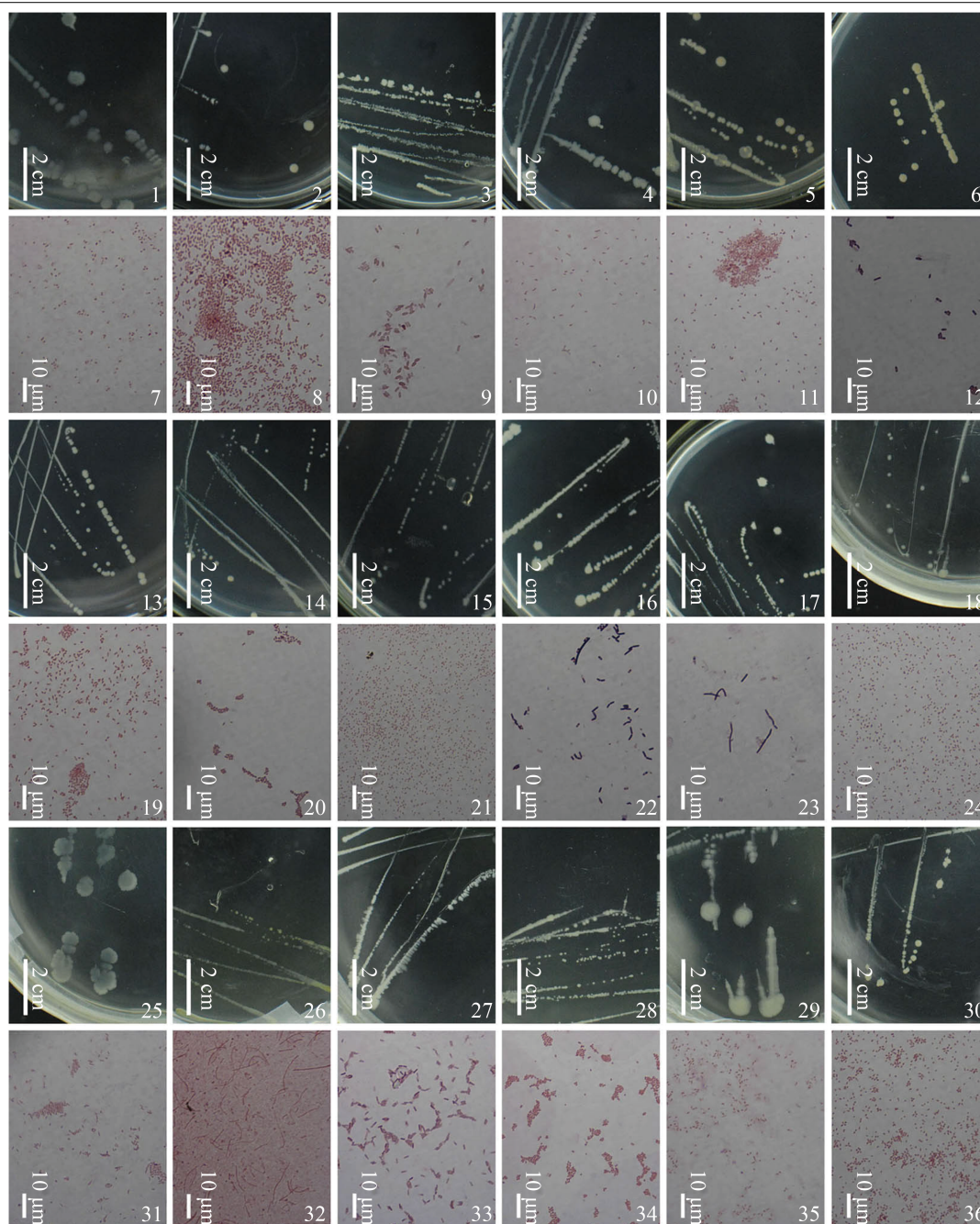


图版 III 从坛紫菜抗生素处理组分离出来的代表性菌株菌落形态图和革兰氏染色图

1~6, 13~18. 菌落形态图; 7~12, 19~24. 革兰氏染色图。1, 7. 菌株BPhDP1; 2, 8. 菌株BPhDP2; 3, 9. 菌株BPhDQ1; 4, 10. 菌株BPhDQ2; 5, 11. 菌株BPhDW2; 6, 12. 菌株BPhDW3; 13, 19. 菌株BPhNQ2; 14, 20. 菌株BPhSQ2; 15, 21. 菌株BPhVP1; 16, 22. 菌株BPhVQ1; 17, 23. 菌株BPhVW1; 18, 24. 菌株BPhVW2

Plate III Representative strains of bacteria colony morphology and Gram stain isolated from antibiotic treatment group of *P. haitanensis*

1~6, 13~18. figure of colony; 7~12, 19~24. figure of Gram staining. 1, 7. BPhDP1 strain; 2, 8. BPhDP2 strain; 3, 9. BPhDQ1 strain; 4, 10. BPhDQ2 strain; 5, 11. BPhDW2 strain; 6, 12. BPhDW3 strain; 13, 19. BPhNQ2 strain; 14, 20. BPhSQ2 strain; 15, 21. BPhVP1 strain; 16, 22. BPhVQ1 strain; 17, 23. BPhVW1 strain; 18, 24. BPhVW2 strain

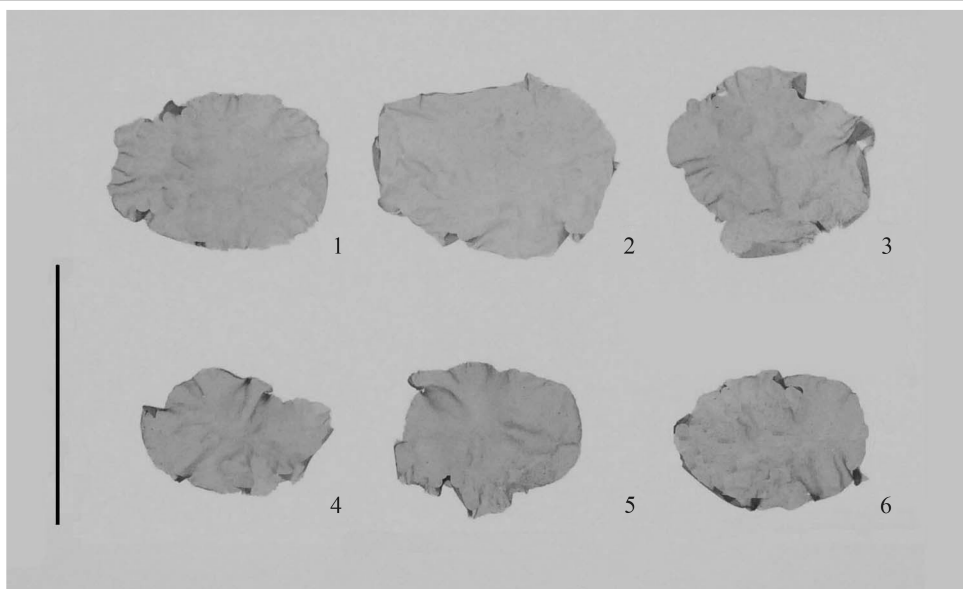


图版 IV 从未经抗生素处理的坛紫菜对照组分离出的代表性菌株菌落形态图和革兰氏染色图

1~6, 13~18, 25~30. 菌落形态图; 7~12, 19~24, 31~36. 革兰氏染色图。1, 7. 菌株BPhDP1; 2, 8. 菌株BPhDP2; 3, 9. 菌株BPhDQ1; 4, 10. 菌株BPhDQ2; 5, 11. 菌株BPhDW2; 6, 12. 菌株BPhDW3; 13, 19. 菌株BPhDW4; 14, 20. 菌株BPhNQ1; 15, 21. 菌株BPhNQ2; 16, 22. 菌株BPhNW1; 17, 23. 菌株BPhNW2; 18, 24. 菌株BPhSP1; 25, 31. 菌株BPhSQ1; 26, 32. 菌株BPhSW1; 27, 33. 菌株BPhSW2; 28, 34. 菌株BPhVQ1; 29, 35. 菌株BPhVW1; 30, 36. 菌株BPhVW2

Plate IV Representative strains of bacteria colony morphology and Gram stain in control group of *P. haitanensis* without using antibiotics

1~6, 13~18, 25~30. figure of colony; 7~12, 19~24, 31~36. figure of Gram staining. 1, 7. BPhDP1 strain; 2, 8. BPhDP2 strain; 3, 9. BPhDQ1 strain; 4, 10. BPhDQ2 strain; 5, 11. BPhDW2 strain; 6, 12. BPhDW3 strain; 13, 19. BPhDW4 strain; 14, 20. BPhNQ1 strain; 15, 21. BPhNQ2 strain; 16, 22. BPhNW1 strain; 17, 23. BPhNW2 strain; 18, 24. BPhSP1 strain; 25, 31. BPhSQ1 strain; 26, 32. BPhSW1 strain; 27, 33. BPhSW2 strain; 28, 34. BPhVQ1 strain; 29, 35. BPhVW1 strain; 30, 36. BPhVW2 strain



图版 V 用从抗生素处理组和对照组中分离的菌株回染后再培养6 d后的坛紫菜叶状体圆盘体

1. 未回感的圆盘体(对照组); 2~3. 分别为用抗生素处理组分离的菌株(BPhVW3和BPhVQ1)回感后的圆盘体; 4~6. 分别为用抗生素未处理组分离的菌株(BPhDW3, BPhDQ1和BPhNW2)回感后的圆盘体。图中标尺代表2 cm

Plate V Blade discs being cultured 6 days after being re-infected by bacteria isolated from the discs with or without antibiotic treatment in *P. haitanensis*

1. discs without re-infection; 2-3. discs re-infected with the bacteria (BPhVW3 and BPhVQ1) respectively isolated from the discs treated with antibiotic; 4-6. discs re-infected with the bacteria (BPhDW3, BPhDQ1, and BPhNW2) respectively isolated from the discs without antibiotic-treatment. The bar=2 cm