

四种抗生素对共培养的萱藻丝状体和膨胀色球藻的影响

张红霞, 官相忠*, 高伟, 沈世军, 王吉, 张静

(中国海洋大学海洋生命学院, 山东青岛 266003)

摘要: 为抑制或消除萱藻丝状体扩增阶段出现的膨胀色球藻, 本研究探讨了头孢噻肟钠、阿莫西林、四环素和红霉素4种抗生素对共培养的萱藻丝状体和膨胀色球藻产生的影响。结果显示, 浓度为50和100 mg/L的头孢噻肟钠均显著抑制膨胀色球藻的生长, 进而保证萱藻丝状体正常生长与发育; 浓度为50~1 000 mg/L的阿莫西林对膨胀色球藻和萱藻丝状体均无抑制作用, 阿莫西林不适于去除共培养体系中的膨胀色球藻; 浓度为100和200 mg/L的四环素对膨胀色球藻有显著的抑制作用, 但此浓度下萱藻丝状体细胞质萎缩, 生长状况较差; 浓度为0.10~1.00 mg/L的红霉素对膨胀色球藻的生长均有显著的抑制作用, 但当其浓度超过0.50 mg/L时, 萱藻丝状体的生长亦受到抑制, 甚至死亡。

关键词: 萱藻; 膨胀色球藻; 丝状体; 抗生素; 共培养

中图分类号: Q 949.2; S 968.4

文献标志码: A

萱藻(*Scytosiphon lomentarius*)隶属于褐藻门(Phaeophyta)、萱藻科(Scytosiphonaceae)、萱藻属(*Scytosiphon*), 是一年生广温性海藻, 除我国辽东半岛至广东海陵岛之间的沿海海域外, 还广泛分布于日本、朝鲜半岛、澳大利亚、大西洋和北美太平洋等沿海海域^[1-2]。萱藻是一种具有抗肿瘤^[3-5]、抗病毒^[6]、抗氧化^[7-8]和抗血栓^[9-10]等特性的大型经济海藻, 具有极高的开发价值。萱藻生活史中具有异形世代交替, 即有性的配子体世代和无性孢子体世代, 孢子体包括丝状体、类垫状体和垫状体3种形式, 其间可随着温度的改变而相互转化^[11], 丝状体在一定条件下可产生单室孢子囊并放散游动孢子, 游孢子经附着、萌发即可生长发育为萱藻叶状体。杂藻污染是影响萱藻丝状体生长及发育的重要因素, 其不仅影响了丝状体对营养盐的吸收, 也降低了丝状体的光合作用, 造成丝状体生长缓慢、发育异常等。目前, 二氧化锗(GeO₂)作为硅藻(Bacillariophyta)有效的生长抑制剂已成功应用于实验室种质的培养和保存中, 张美如等^[12]认为

3 mg/L的GeO₂对条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)丝状体培养中硅藻有抑制效果, 马旺楠等^[13]曾报道了链霉素(100 mg/L)、卡那霉素(100 mg/L)和氯霉素(10 mg/L)适于抑制萱藻丝状体扩增过程中出现的膨胀色球藻(*Chroococcus turgidus*)的生长, 但其他抗生素是否能更有效地抑制膨胀色球藻的生长有待进一步研究。

本实验研究了头孢噻肟钠(cefotaxime sodium, CTX)、阿莫西林(amoxicillin, AM)、四环素(tetracycline, TC)和红霉素(erythromycin, EM)4种抗生素对共培养体系中萱藻丝状体和膨胀色球藻的影响, 以解决萱藻丝状体在种质保存和扩繁中被膨胀色球藻污染的问题, 为萱藻繁育提供技术保障。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料及培养方法

实验所用萱藻丝状体由本实验室提供。为获得足够数量的萱藻丝状体, 前期将萱藻丝状

收稿日期: 2017-09-19 修回日期: 2018-01-11

资助项目: 山东省重点研发计划(2016GSF115042); 国家“八六三”高新技术研究发展计划(2012AA10A413)

通信作者: 官相忠, E-mail: gxzhw@163.com

体置于光照培养箱内进行扩繁, 培养条件: 温度(21.00±0.50) °C, 光周期L : D=14 : 10, 光照强度86.40~97.20 μmol/(m²·s)。培养液为F₁培养液。

所用膨胀色球藻取自被污染的萱藻种质, 先对其进行分离, 再进行膨胀色球藻纯化培养。培养条件: 温度(20.00±0.50) °C, 光周期L : D=12 : 12, 光照强度54.00~67.00 μmol/(m²·s)。培养至对数生长期用于实验。

1.2 抗生素来源及配制

头孢噻肟钠、阿莫西林、四环素和红霉素均购于北京索莱宝科技有限公司, 抗生素溶液配制方法参照《分子克隆实验指南》^[14]。

1.3 实验方法

抗生素对共培养体系中萱藻丝状体和膨胀色球藻生长的影响 萱藻丝状体经高速打碎机切成长度为300~400 μm的丝状体藻段。将处于对数生长期的膨胀色球藻和生长状况良好的萱藻丝状体分别按4.00×10⁴ 个/mL和0.60 mg/mL的密度进行接种, 取配好的共培养藻液300 mL于500 mL的锥形瓶中。根据实验要求加入不同浓度的抗生素(表1), 每个浓度设置3个平行样, 置于光照培养箱内, 每天定时摇瓶3次。培养条件: 温度(21.00±0.50)°C, 光周期L : D=14 : 10, 光照强度86.40~97.20 μmol/(m²·s), 每隔5 d全量更换F₁培养液和抗生素。在实验的第0、1、3、5、10、15和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。

表1 四种抗生素的实验浓度

Tab. 1 Experimental concentrations of antibiotics

抗生素 antibiotic	组别 group					
	1	2	3	4	5	6
头孢噻肟钠 cefotaxime sodium	0	25	50	100	200	
阿莫西林 amoxicillin	0	50	100	500	1 000	
四环素 tetracycline	0	25	50	100	200	
红霉素 erythromycin	0	0.01	0.05	0.10	0.50	1.00

萱藻丝状体的日均增长率计算公式:

$$K(\%) = [(\ln N_t - \ln N_0) / t] \times 100$$

式中, K代表萱藻丝状体的日均增长率; N₀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:

$$Kc(\%) = [(\ln C_t - \ln C_0) / t] \times 100$$

式中, Kc代表膨胀色球藻的日均增长率; C₀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)。

抗生素停用后对后期萱藻丝状体孢子囊形成和发育的影响 培养结束后, 将共培养的藻液用250目的消毒筛绢过滤, 全量更换培养液, 恢复至无抗生素培养状态, 将萱藻丝状体配成生物量为0.25~0.30 mg/mL的藻液, 同时重新设置一组未加膨胀色球藻的萱藻丝状体作为空白对照组, 放置光照培养箱内继续培养30 d。培养条件: 温度(17.00±1.00) °C, 光周期L : D=10 : 14, 光照强度14.40~28.80 μmol/(m²·s)。每隔5 d全量更换培养液, 同时计算孢子囊比例并测量孢子囊直径。

$$\text{孢子囊比例}(\%) = \frac{\text{孢子囊细胞数}}{\text{丝状体细胞数}} \times 100$$

1.4 数据分析

用SPSS 19.0和Sigmaplot 10.0软件进行单因素方差分析和制图。

2 结果

2.1 头孢噻肟钠对萱藻丝状体和膨胀色球藻生长的影响

头孢噻肟钠对膨胀色球藻的抑制效果较好, 浓度为50、100和200 mg/L 3个实验组中膨胀色球藻均被抑制(图1), 培养20 d, 其日均增长率分别为3.84%、-0.96%和-3.71%, 均显著低于未加抗生素的对照组(20.26%)(P<0.05)。经显微镜观察发现, 0和25 mg/L浓度组中, 膨胀色球藻细胞颜色为蓝绿色, 细胞以单细胞和藻群共存在, 生长状况良好(图版-1)。50、100和200 mg/L条件下的膨胀色球藻细胞呈浅黄色甚至无色, 多以藻群形式存在, 且藻体所含的细胞数目较多(图版-2), 在抗生素的作用下, 膨胀色球藻多以藻群形式存在。

由于膨胀色球藻生长受到头孢噻肟钠的抑制, 萱藻丝状体日均增长率均高于未加抗生素

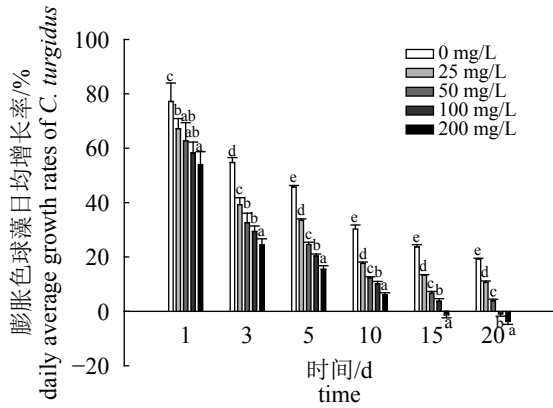


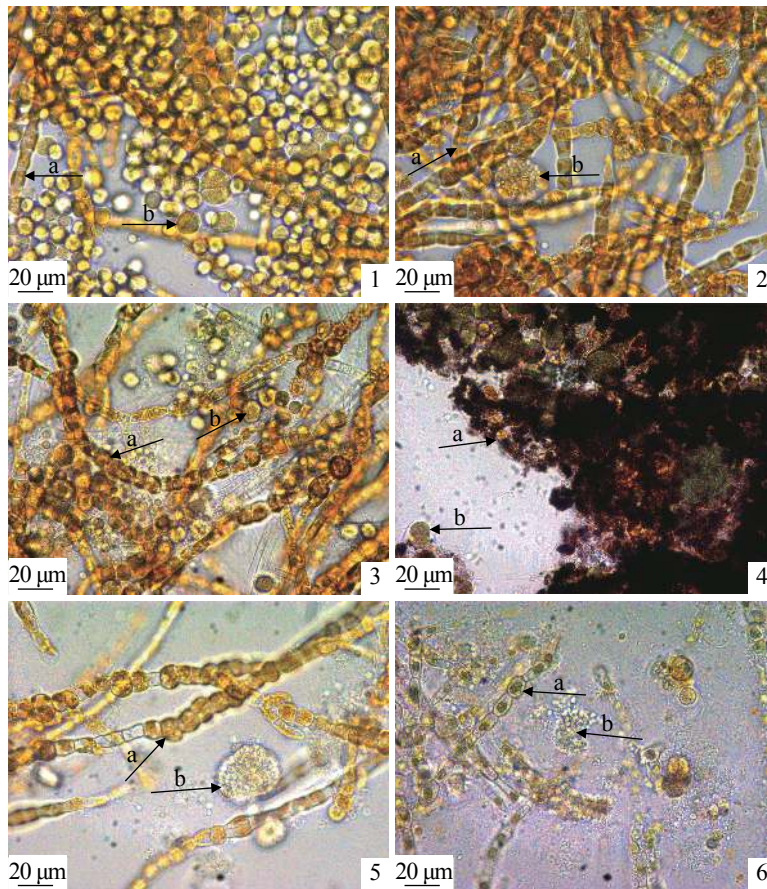
图1 头孢噻肟钠对膨胀色球藻日均增长率的影响
不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$); 下同

Fig. 1 Effects of CTX on daily average growth rates of *C. turgidus*

Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$); the same below

的对照组(图2)。50和100 mg/L实验组的日均增长率较高, 20 d后分别为7.13%和6.12%, 均显著高于未加抗生素的对照组(1.92%)($P < 0.05$)。经显微镜观察发现, 在50和100 mg/L实验组中, 萱藻丝状体生长状况良好, 丝状体细胞呈褐色, 细胞质较饱满, 部分细胞呈念珠状(图版-2)。停用抗生素后, 更换培养液并对实验材料中的萱藻丝状体进行孢子囊诱导, 第30天, 50和100 mg/L实验组的萱藻丝状体的孢子囊比例和孢子囊直径均接近于未加膨胀色球藻的对照组(表2), 孢子囊发育状况良好。

通过比较不同浓度下膨胀色球藻和萱藻丝状体的生长及发育状况, 50和100 mg/L的头孢噻肟钠浓度适于抑制萱藻丝状体扩增过程中出现的膨胀色球藻的生长。



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.未加抗生素的对照组, 2. 50 mg/L 头孢噻肟钠, 3. 1 000 mg/L 阿莫西林, 4. 100 mg/L 四环素, 5. 0.10 mg/L 红霉素, 6. 0.50 mg/L 红霉素

Plate Observation of filaments of *S. lomentaria* and *C. turgidus* treated with single antibiotic solution (cultured for 20 d)

Arrow a indicates filamentous cells of *S. lomentaria*, arrow b indicates cells of *C. turgidus*; 1. control group without antibiotics, 2. 50 mg/L CTX, 3. 1 000 mg/L AM, 4. 100 mg/L TC, 5. 0.10 mg/L EM, 6. 0.50 mg/L EM

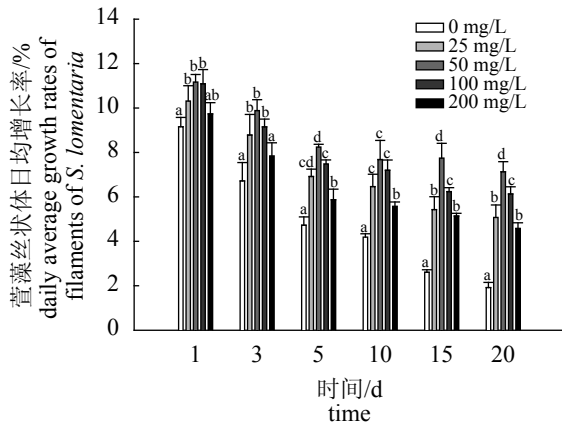


图 2 头孢噻肟钠对萱藻丝状体日均增长率的影响
 Fig. 2 Effects of CTX on daily average growth rates of filaments of *S. lomentaria*

2.2 阿莫西林对共培养萱藻丝状体和膨胀色球藻生长的影响

膨胀色球藻在各浓度条件下均有较高的日均增长率, 实验第20天, 各实验组的日均增长率分别为19.87%、18.21%、16.84%和13.80%, 未加抗生素的对照组为20.26%(图3)。当浓度达到1 000 mg/L时, 阿莫西林对膨胀色球藻有抑制作用, 但抑制作用不明显。显微镜观察发现, 各浓度组中的膨胀色球藻细胞颜色均为蓝绿色, 细胞以单细胞和藻群共存在, 生长状况良好(图版-3)。

各个实验组的日均增长率与同期未加阿莫西林的对照组相比, 增长幅度较低(图4)。显微

表 2 头孢噻肟钠对萱藻丝状体孢子囊形成和发育的影响

Tab. 2 Effects of CTX on the formation and development of filaments of *S. lomentaria*

头孢噻肟钠的浓度/(mg/L) concentrations of CTX	指标 parameter	培养时间/d culture time					
		5	10	15	20	25	30
对照 control	孢子囊比例/% sporangium ratio	10.05±0.27	12.37±0.15	13.62±0.62	15.61±0.27	17.26±0.15	20.74±0.49
	孢子囊直径/ μm sporangial diameter	13.15±0.74	14.72±0.57	16.95±0.95	18.00±0.84	19.63±0.73	22.27±0.73
0	孢子囊比例/% sporangium ratio	1.03±0.56	1.32±0.43	2.10±0.81	2.30±1.11	3.10±0.93	4.52±0.42
	孢子囊直径/ μm sporangial diameter	10.25±0.26	10.58±0.32	11.35±0.49	12.14±0.29	13.40±0.57	14.24±0.59
25	孢子囊比例/% sporangium ratio	9.45±0.84	11.71±1.01	13.24±0.74	15.12±0.82	17.13±0.43	19.16±1.12
	孢子囊直径/ μm sporangial diameter	12.61±0.40	14.06±0.65	16.25±0.52	17.65±0.03	19.25±0.49	21.07±0.71
50	孢子囊比例/% sporangium ratio	10.02±0.44	12.69±0.47	14.66±0.55	16.66±0.63	18.93±0.62	20.12±0.92
	孢子囊直径/ μm sporangial diameter	12.84±0.58	15.67±0.47	16.79±0.93	18.02±0.49	19.45±0.38	21.72±0.59
100	孢子囊比例/% sporangium ratio	10.64±0.46	12.14±0.86	14.83±0.85	16.98±0.32	18.96±0.67	20.71±0.34
	孢子囊直径/ μm sporangial diameter	13.34±0.40	14.65±0.39	16.80±0.80	18.44±0.38	20.84±0.10	22.15±0.24
200	孢子囊比例/% sporangium ratio	9.41±0.32	10.68±0.37	12.83±0.36	14.97±0.62	16.83±0.57	18.73±1.21
	孢子囊直径/ μm sporangial diameter	13.72±0.48	15.38±0.25	16.09±0.99	17.07±0.49	18.85±0.84	20.13±0.35

镜观察发现, 各个浓度组中的萱藻丝状体细胞多呈浅褐色, 部分丝状体的细胞质出现萎缩, 长筒状细胞比例增大(图版-3)。停用抗生素后, 更换培养液并对实验材料中的萱藻丝状体进行孢子囊诱导, 实验第30天, 各个实验组的萱藻丝状体的孢子囊比例和孢子囊直径均低于空白对照组(表3), 孢子囊发育状况较差。

通过比较不同浓度下膨胀色球藻和萱藻丝状体的生长及发育状况, 发现阿莫西林不适于抑制共培养体系中膨胀色球藻的生长。

2.3 四环素对共培养萱藻丝状体和膨胀色球藻生长的影响

在整个实验周期内, 膨胀色球藻的日均增长率随着抗生素浓度的增加而降低(图5)。100和200 mg/L 实验组中的膨胀色球藻被抑制, 其日均增长率在实验第20天分别为8.13%和7.02%, 均显著低于未加抗生素的对照组(20.26%)($P < 0.05$)。显微镜观察发现, 100和200 mg/L条件下的膨胀色球藻多以藻群形式存在, 细胞呈墨绿色(图版-4)。

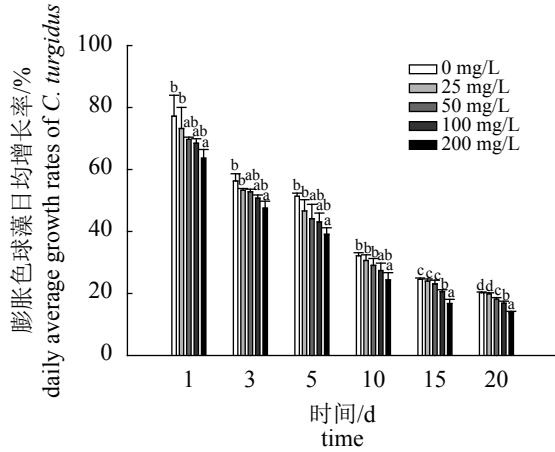


图3 阿莫西林对膨胀色球藻日均增长率的影响

Fig. 3 Effects of AM on daily average growth rates of *C. turgidus*

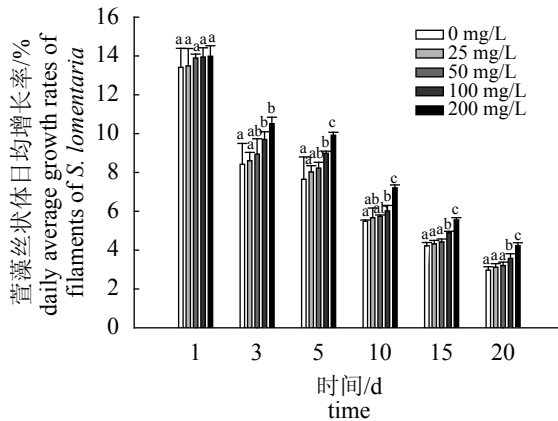


图4 阿莫西林对萱藻丝状体日均增长率的影响

Fig. 4 Effects of AM on daily average growth rates of filaments of *S. lomentaria*

当四环素浓度为25~50 mg/L时，萱藻丝状体的日均增长率随抗生素浓度的增加而升高(图6)，当四环素浓度为100~200 mg/L时，其日均增长率随浓度的增加而降低。显微镜观察发现，100和200 mg/L浓度条件下的萱藻丝状体细胞颜色呈浅褐色，细胞质萎缩，出现死亡(图版-4)。停用抗生素后，更换培养液并对实验材料中的萱藻丝状体进行孢子囊诱导，第30天，25和50 mg/L浓度条件下的萱藻丝状体的孢子囊比例和孢子囊直径均低于未加膨胀色球藻的对照组(表4)，孢子囊发育状况较差。100和200 mg/L浓度条件下的萱藻丝状体细胞死亡，无孢子囊形成。

通过比较不同浓度下膨胀色球藻和萱藻丝状体的生长及发育状况，四环素不适于抑制共

培养体系中的膨胀色球藻的生长。

2.4 红霉素对共培养萱藻丝状体和膨胀色球藻生长的影响

在整个培养过程中，膨胀色球藻的日均增长率随着抗生素浓度的增加而逐渐降低(图7)，实验组的日均增长率均低于未加抗生素的对照组。实验第20天，0.50和1.00 mg/L浓度组的日均增长率均达到负值，分别为-1.63%和-3.95%，膨胀色球藻的生长受到了抑制。显微镜观察发现，0.10和0.50条件下的膨胀色球藻细胞呈浅黄色甚至无色，多以藻群形式存在(图版-5, 6)。

0.50 mg/L和1.00 mg/L 2个实验组的萱藻丝状体受到抑制(图8)，实验第10~20天，2个实验组的日均增长率均低于未加抗生素的对照组。0.10 mg/L实验组的萱藻丝状体日均增长率在整个实验周期内始终最高，在实验第3天其日均增长率达到最高13.06%。经显微镜观察发现，0.10 mg/L实验组的萱藻丝状体细胞呈褐色，细胞质较饱满，部分细胞呈念珠状，细胞生长状况良好(图版-5)。而0.50和1.00 mg/L实验组中萱藻丝状体细胞质萎缩，细胞变绿、解体、死亡(图版-6)。停用抗生素后，更换培养液并对实验材料中的萱藻丝状体进行孢子囊诱导，仅0.10 mg/L浓度组的萱藻丝状体的孢子囊比例在第30天达到20.12%，接近于未加膨胀色球藻的对照组(20.74%)；其孢子囊直径达到21.76 μm，与未加膨胀色球藻的对照组(22.27 μm)接近，其他浓度组的萱藻丝状体孢子囊比例和孢子囊直径均低于未加膨胀色球藻的对照组，孢子囊发育状况较差(表5)。

通过比较不同浓度下膨胀色球藻和萱藻丝状体的生长及发育状况发现，0.10 mg/L的红霉素适于抑制萱藻丝状体扩增过程中出现的膨胀色球藻的生长。

3 讨论

Kooistra等^[15]曾报道了100 mg/L的头孢噻肟钠可用于获得无菌的膜质拟刚毛藻(*Cladophoropsis membranacea*)，同时可有效的抑制蓝藻(Cyanophyta)的生长。本实验中50和100 mg/L的头孢噻肟钠不仅抑制了膨胀色球藻的生长，同时萱藻丝状体因膨胀色球藻生长受到抑制而获得了充足的营养与光照，生长状况良好。马旺楠等^[13]曾报道100 mg/L的卡那霉素培养20 d后萱藻丝

表 3 阿莫西林对萱藻丝状体孢子囊形成和发育的影响

Tab. 3 Effects of AM on the formation and development of filaments of *S. lomentaria*

阿莫西林浓度/(mg/L) concentrations of AM	指标 parameter	培养时间/d culture time					
		5	10	15	20	25	30
对照 control	孢子囊比例/% sporangium ratio	10.05±0.27	12.37±0.15	13.62±0.62	15.61±0.27	17.26±0.15	20.74±0.49
	孢子囊直径/ μm sporangial diameter	13.15±0.74	14.72±0.57	16.95±0.95	18.00±0.84	19.63±0.73	22.27±0.73
0	孢子囊比例/% sporangium ratio	1.03±0.56	1.32±0.43	2.10±0.81	2.30±1.11	3.10±0.93	4.52±0.42
	孢子囊直径/ μm sporangial diameter	10.25±0.26	10.58±0.32	11.35±0.49	12.14±0.29	13.40±0.57	14.24±0.59
50	孢子囊比例/% sporangium ratio	3.03±0.67	4.34±0.63	5.01±0.27	6.89±1.03	8.56±0.34	9.90±0.45
	孢子囊直径/ μm sporangial diameter	10.57±0.63	11.45±0.37	12.69±0.08	13.02±0.73	14.59±0.48	15.26±1.06
100	孢子囊比例/% sporangium ratio	3.60±0.39	5.04±0.40	6.40±1.11	8.02±0.50	9.33±0.93	10.38±1.05
	孢子囊直径/ μm sporangial diameter	10.84±0.73	12.08±0.37	13.73±0.03	15.01±1.29	15.71±0.96	16.49±0.43
500	孢子囊比例/% sporangium ratio	4.45±0.80	6.27±0.17	8.39±0.09	10.59±0.94	12.20±0.05	13.75±0.93
	孢子囊直径/ μm sporangial diameter	11.15±0.37	12.01±0.59	13.68±0.64	15.65±0.48	16.85±0.73	17.77±0.60
1 000	孢子囊比例/% sporangium ratio	7.53±0.16	9.62±0.39	11.07±0.73	13.10±0.03	14.92±0.39	16.13±0.05
	孢子囊直径/ μm sporangial diameter	11.75±0.73	13.22±0.59	14.37±0.06	16.83±0.38	17.27±0.69	18.02±0.36

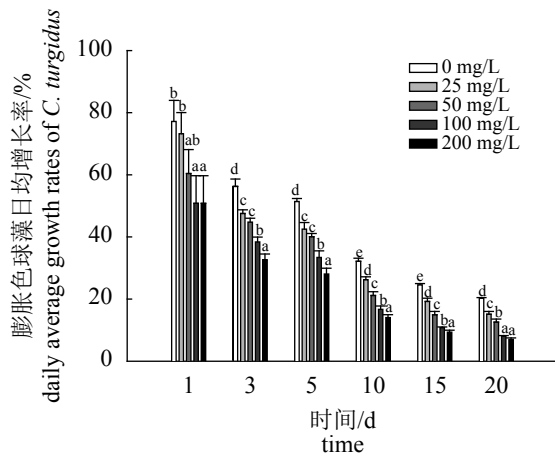


图 5 四环素对膨胀色球藻日均增长率的影响
Fig. 5 Effects of TC on daily average growth rates of *C. turgidus*

状态的日均增长率最高(3.93%), 而本研究100 mg/L 的头孢噻肟钠其日均增长率可达6.12%, 在膨胀色球藻均受到显著抑制时, 萱藻丝状体日均增长率越高, 说明其受到抗生素的影响越小, 因此, 认为头孢噻肟钠(100 mg/L)可以更好地抑制萱藻丝状体中膨胀色球藻的生长。

González-Pleiter等^[16]曾报道0.01~1 500.00 mg/L 浓度范围内的阿莫西林对蓝藻中的项圈藻(*Anabaena* sp.)有抑制作用, 而对绿藻(Chlorophyta)中的月牙藻(*Pseudokirchneriella subcapitata*)没有影

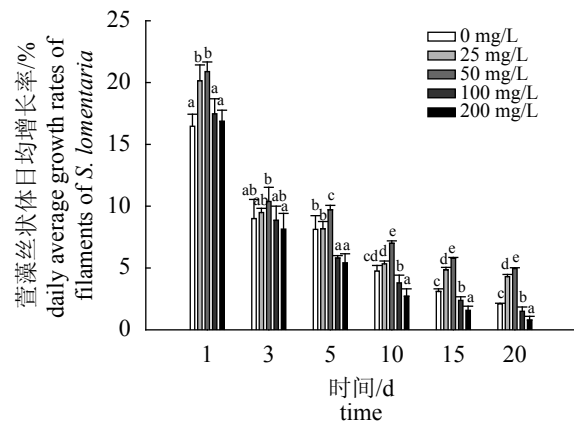


图 6 四环素对萱藻丝状体日均增长率的影响
Fig. 6 Effects of TC on daily average growth rates of filaments of *S. lomentaria*

响。Eguchi等^[17]研究发现阿莫西林对羊角月牙藻(*Selenastrum capricornutum*)和小球藻(*Chlorella vulgaris*)这2种真核藻类的生长均不产生抑制作用。绿藻与褐藻同属真核生物, 细胞壁均不含粘肽, 认为在一定浓度范围内, 阿莫西林可抑制膨胀色球藻的生长而对萱藻丝状体不产生影响。本研究发现, 各种浓度下的阿莫西林均未对膨胀色球藻表现出相应的抑制效果。张丽娟等^[18]曾报道多数革兰氏阴性菌可以产生 β -内酰胺酶, 这些酶能够水解青霉素类和头孢菌素类等抗生素, 使

表 4 四环素对萱藻丝状体孢子囊形成和发育的影响

Tab. 4 Effects of TC on the formation and development of filaments of *S. lomentaria*

四环素浓度/(mg/L) concentrations of TC	指标 parameter	培养时间/d culture time					
		5	10	15	20	25	30
对照 control	孢子囊比例/% sporangium ratio	10.05±0.27	12.37±0.15	13.62±0.62	15.61±0.27	17.26±0.15	20.74±0.49
	孢子囊直径/ μm sporangial diameter	13.15±0.74	14.72±0.57	16.95±0.95	18.00±0.84	19.63±0.73	22.27±0.73
0	孢子囊比例/% sporangium ratio	1.03±0.56	1.32±0.43	2.10±0.81	2.30±1.11	3.10±0.93	4.52±0.42
	孢子囊直径/ μm sporangial diameter	10.25±0.26	10.58±0.32	11.35±0.49	12.14±0.29	13.40±0.57	14.24±0.59
25	孢子囊比例/% sporangium ratio	2.56±0.31	3.11±0.56	4.76±0.71	6.75±0.18	8.91±0.34	10.93±0.25
	孢子囊直径/ μm sporangial diameter	11.48±0.25	12.91±0.73	13.72±0.37	14.23±0.73	15.56±0.96	16.21±0.71
50	孢子囊比例/% sporangium ratio	4.01±0.22	5.01±0.92	6.73±0.20	8.54±0.63	10.65±0.11	12.91±0.38
	孢子囊直径/ μm sporangial diameter	12.3±0.36	13.34±0.25	13.48±0.47	15.34±0.59	16.45±0.63	17.14±0.36
100	孢子囊比例/% sporangium ratio	-	-	-	-	-	-
	孢子囊直径/ μm sporangial diameter	-	-	-	-	-	-
200	孢子囊比例/% sporangium ratio	-	-	-	-	-	-
	孢子囊直径/ μm sporangial diameter	-	-	-	-	-	-

注：“-”表示萱藻丝状体细胞质萎缩，出现死亡，无孢子囊形成；下同
Notes: “-” indicates the cytoplasm of filaments of *S. lomentaria* was constriction, nearly to death and no sporangia were produced; the same below

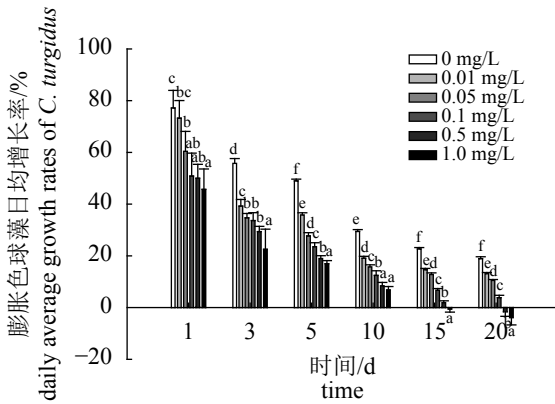


图 7 红霉素对膨胀色球藻日均增长率的影响
Fig. 7 Effects of EM on daily average growth rates of *C. turgidus*

抗生素水解而丧失抑制作用。Liu等^[19]也曾报道铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)能够降解阿莫西林，并且陈诗^[20]研究发现，铜绿微囊藻中含有能够打开 β -内酰胺环的 β -内酰胺酶样蛋白。据此，认为本实验中阿莫西林对膨胀色球藻的生长不产生抑制作用，可能是由于膨胀色球藻产生了 β -内酰胺酶，使阿莫西林丧失抑制作用。

本研究发现，高浓度(100、200 mg/L)的四环素对膨胀色球藻有抑制作用，萱藻丝状体细胞

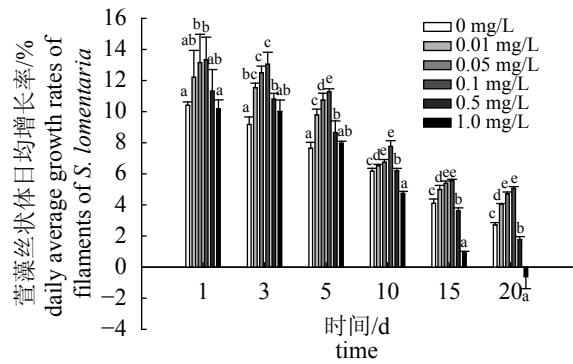


图 8 红霉素对萱藻丝状体日均增长率的影响
Fig. 8 Effects of EM on daily average growth rates of filaments of *S. lomentaria*

亦受到损害，失去活力。四环素遇光颜色逐渐变深，由黄色逐渐变为玫红色，再变为棕褐色，最后变成灰褐色，藻液中的细菌菌团全部被四环素染成黑色，存在于萱藻丝状体细胞周围，影响萱藻丝状体细胞的生长。这可能由于四环素在水体中降解所致，其主要降解产物为其差向异构体和脱水产物，差向四环素(epitetracycline, ETC)可形成差向脱水四环素(epianhydrotetracycline, EATC)，脱水四环素(anhydrotetracycline, ATC)也可以形成差向脱水四环素。在4种抗生素

表 5 红霉素对萱藻丝状体孢子囊形成和发育的影响

Tab. 5 Effects of EM on the formation and development of filaments of *S. lomentaria*

红霉素浓度/(mg/L) concentrations of EM	指标 parameter	培养时间/d culture time					
		5	10	15	20	25	30
对照 control	孢子囊比例/% sporangium ratio	10.05±0.27	12.37±0.15	13.62±0.62	15.61±0.27	17.26±0.15	20.74±0.49
	孢子囊直径/ μm sporangial diameter	13.15±0.74	14.72±0.57	16.95±0.95	18.00±0.84	19.63±0.73	22.27±0.73
0.00	孢子囊比例/% sporangium ratio	1.03±0.56	1.32±0.43	2.10±0.81	2.30±1.11	3.10±0.93	4.52±0.42
	孢子囊直径/ μm sporangial diameter	10.25±0.26	10.58±0.32	11.35±0.49	12.14±0.29	13.40±0.57	14.24±0.59
0.01	孢子囊比例/% sporangium ratio	3.03±0.67	4.34±0.63	6.01±0.27	8.89±1.03	10.54±0.34	11.90±0.45
	孢子囊直径/ μm sporangial diameter	11.94±0.47	12.48±0.65	13.14±0.84	14.9±1.02	15.34±0.36	16.31±0.61
0.05	孢子囊比例/% sporangium ratio	3.76±0.78	5.99±0.45	7.03±0.88	8.84±0.23	10.48±0.66	12.30±0.89
	孢子囊直径/ μm sporangial diameter	12.42±0.94	13.52±0.40	14.05±0.92	15.35±0.24	16.22±0.95	17.00±0.25
0.10	孢子囊比例/% sporangium ratio	9.35±0.74	12.25±0.26	14.25±0.25	16.71±0.46	18.61±0.74	20.12±1.06
	孢子囊直径/ μm sporangial diameter	12.56±0.63	14.70±0.88	16.05±0.97	17.94±0.75	19.06±0.34	21.76±0.19
0.50	孢子囊比例/% sporangium ratio	—	—	—	—	—	—
	孢子囊直径/ μm sporangial diameter	—	—	—	—	—	—
1.00	孢子囊比例/% sporangium ratio	—	—	—	—	—	—
	孢子囊直径/ μm sporangial diameter	—	—	—	—	—	—

中, 四环素对萱藻丝状体细胞损害最大, 因此, 四环素不适于共培养体系中的膨胀色球藻的去除。

Vázquez-Martínez等^[21]曾报道了10 mg/L的红霉素显著抑制席藻(*Phormidium animalis*)的生长。尚迅等^[22]也报道了1 mg/L的红霉素即可完全抑制颤藻(*Oscillatoria* sp.)的生长。本研究发现, 在4种抗生素中, 膨胀色球藻对红霉素的敏感性最高, 0.10 mg/L的红霉素在抑制膨胀色球藻生长的同时, 又保证萱藻丝状体的正常生长和发育, 但与马旺楠等^[13]研究结果相比, 本研究中膨胀色球藻培养20 d后其日均增长率为3.81%, 高于其报道的氯霉素, 因此, 0.10 mg/L红霉素对共培养体系中的膨胀色球藻抑制效果相对较差。

综上所述, 100 mg/L的头孢噻肟钠可更好地抑制萱藻丝状体中膨胀色球藻的生长, 并对萱藻丝状体的生长和发育有良好作用。本研究仅为单种抗生素的使用, 而多种抗生素是否会对萱藻中的膨胀色球藻产生效果, 有待深入探讨。

参考文献:

- [1] Segawa S. Colored Illustrations of the seaweeds of Japan[M]. Osaka: Hoikusha Publishing, 1996: 37.
- [2] 曾呈奎, 张德瑞, 张峻甫. 中国经济海藻志[M]. 北京: 科学出版社, 1962: 59-60.
Tseng C K, Zhang D R, Zhang J F. Chinese Economic Seaweed[M]. Beijing: Science Press, 1962: 59-60(in Chinese).
- [3] 徐年军, 范晓, 韩丽君, 等. 山东沿海海藻抗肿瘤活性的筛选[J]. 海洋与湖沼, 2001, 32(4): 408-413.
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(in Chinese).
- [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]. *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] Kuda T, Tsunekawa M, Goto H, *et al.* Antioxidant properties of four edible algae harvested in the Noto Peninsula, Japan[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2005, 18(7): 625-633.
- [8] 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.
- [9] 滕洪明, 吕东泽, 戴淑芳, 等. 萱藻多糖的制备及抗凝血抗血栓活性研究[J]. *中国海洋药物*, 2012, 31(1): 25-28.
- Teng H M, Lü D Z, Dai S F, *et al.* Preparation of the polysaccharides from seaweed *Scytosiphon lomentarius* and studies on its anticoagulant and antithrombotic activities[J]. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2012, 31(1): 25-28(in Chinese).
- [10] 刘志峰, 宫晓黎, 魏淑贞. 五种海藻多糖体外抗血小板聚集作用的观察[J]. *中国海洋药物*, 2001, 20(2): 36-38.
- Liu Z F, Gong X L, Wei S Z. Observation the effects of five kinds algal polysaccharides on platelets aggregation[J]. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2001, 20(2): 36-38(in Chinese).
- [11] 邢永泽, 宫相忠, 尹宝树. 萱藻不同发育阶段形态学及生活史的研究[J]. *中国海洋大学学报*, 2010, 40(8): 98-102.
- Xing Y Z, Gong X Z, Yin B S. The morphology and life history of *Scytosiphon lomentaria*[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2010, 40(8): 98-102(in Chinese).
- [12] 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[J]. *现代渔业信息*, 2007, 22(2): 24-26.
- 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(in Chinese).
- [13] 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).
- [14] 萨姆布鲁克J, 拉塞尔D W, 曼尼阿蒂斯T. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 译. 第2版. 北京: 科学出版社, 2002: 1599.
- Sambrook J, Russell D W, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*[M]. Huang P T, Trans. 2nd ed. Beijing: Science Press, 2002: 1599(in Chinese).
- [15] Kooistra W H C F, Boele-Bos S A, Stam W T. A method for obtaining axenic algal cultures using the antibiotic cefotaxime with emphasis on *Cladophoropsis membranacea* (Chlorophyta)[J]. *Journal of Phycology*, 1991, 27(5): 656-658.
- [16] González-Pleiter M, Gonzalo S, Rodea-palomares I, *et al.* Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: implications for environmental risk assessment[J]. *Water Research*, 2013, 47(6): 2050-2064.
- [17] Eguchi K, Nagase H, Ozawa M, *et al.* Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae[J]. *Chemosphere*, 2004, 57(11): 1733-1738.
- [18] 张丽娟, 于泉. 青霉素结合蛋白与细菌对 β -内酰胺类抗生素的抗药性机理[J]. *国外药学抗生素分册*, 1987, 8(5): 374-377.
- Zhang L J, Yu Q. Penicillin binding protein and mechanism of drug resistance of bacteria to beta-lactam antibiotics[J]. *World Notes on Antibiotics*, 1987, 8(5): 374-377(in Chinese).
- [19] Liu Y, Guan Y T, Gao B Y, Yue Q Y. Antioxidant responses and degradation of two antibiotic contaminants in *Microcystis aeruginosa*[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2012, 86: 23-30.
- [20] 陈诗. 低浓度阿莫西林对铜绿微囊藻污染的调控效应与机制[D]. 济南: 山东大学, 2017: 51-52.
- Chen S. Regulation effects and mechanisms of low concentration of amoxicillin on the bloom of *Microcystis aeruginosa*[D]. Ji'nan: Shandong University, 2017: 51-52(in Chinese).
- [21] Vázquez-Martínez G, Rodríguez M H, Hernández-Hernández F, *et al.* Strategy to obtain axenic cultures from field-collected samples of the cyanobacterium *Phormidium animalis*[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, 57(1): 115-121.

- [22] 尚迅, 戴继勋, 韩宝芹, 等. 颤藻对6种抗生素敏感性的研究[J]. *海洋学报*, 2000, 22(6): 131-135.
Shang X, Dai J X, Han B Q, *et al.* Study on the sensitivity of *Oscillatoria* sp. (Cyanobacteria) to six antibiotics[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2000, 22(6): 131-135(in Chinese).

Inhibitory effect of four antibiotics on *Chroococcus turgidus* co-cultured to the filaments of *Scytosiphon lomentaria*

ZHANG Hongxia, GONG Xiangzhong*, GAO Wei, SHEN Shijun, WANG Ji, ZHANG Jing
(College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: In order to suppress the growth of *Chroococcus turgidus* and finally eliminate it during the amplification process of filaments of *Scytosiphon lomentaria*, the effects of four antibiotics: cefotaxime sodium (CTX), amoxicillin (AM), tetracycline (TC) and erythromycin (EM) 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 CTX can inhibit the growth of *C. turgidus* significantly at the concentration of 50 and 100 mg/L. On the 20th day, their average daily growth rates were 3.84% and -0.96%, respectively, which were significantly lower than 19.21% in the control group without antibiotics, therefore ensuring the normal growth and development of filaments of *S. lomentaria*. Both *C. turgidus* and the filaments of *S. lomentaria* were not suppressed by AM at the concentrations between 50 and 1 000 mg/L, so AM can not eliminate *C. turgidus* in the co-culture system. TC could inhibit the growth of *C. turgidus* and the filaments of *S. lomentaria* dramatically at the concentration of 100 and 200 mg/L, but the cytoplasm of filaments of *S. lomentaria* presented atrophy. EM inhibited the growth of *C. turgidus* significantly at the concentrations between 0.10 mg/L and 1.00 mg/L, when the concentration was higher than 0.50 mg/L, the growth of filaments of *S. lomentaria* also were inhibited, even to death.

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

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

Funding projects: Key Research and Development Program of Shandong Province (2016GSF115042); National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (2012AA10A413)