

文章编号: 1000-0615(2019)02-0431-10

DOI: 10.11964/jfc.20171211106

二氧化锗对共培养萱藻丝状体和硅藻生长的影响

杨儒谦, 宫相忠*, 沈世军, 高伟, 张红霞, 庄英瑞

(中国海洋大学海洋生命学院, 山东青岛 266003)

摘要: 为抑制萱藻丝状体保存和扩增过程中出现的小伪菱形藻与碎片菱形藻的生长, 本实验应用实验生态学方法, 分别建立了丝状体与小伪菱形藻、丝状体与碎片菱形藻、丝状体与小伪菱形藻和碎片菱形藻的共培养体系, 研究了1.00~4.00 $\mu\text{g/mL}$ 二氧化锗(GeO_2)对共培养条件下丝状体生长发育及附生硅藻生长的影响。结果显示: ①处理萱藻丝状体和硅藻共培养体系的适宜 GeO_2 浓度为1.00~2.50 $\mu\text{g/mL}$, 各实验组14 d的硅藻抑制率均高于67.33% \pm 5.18%, 且丝状体生长发育良好, 2.00 $\mu\text{g/mL}$ 为最适浓度, 此浓度下丝状体日均增长率最高, 在各培养体系中均大于11.00%, 且诱导后孢子囊枝比例和孢子囊直径分别为57.47% \pm 5.31%和(24.55 \pm 1.01) μm , 与对照组差异不显著; ②3.50和4.00 $\mu\text{g/mL}$ GeO_2 虽对硅藻抑制效果更佳, 但同时也会抑制丝状体生长和后期孢子囊的形成与发育, 其中4.00 $\mu\text{g/mL}$ GeO_2 可导致丝状体死亡; ③碎片菱形藻较小伪菱形藻对 GeO_2 更敏感。实验14 d, 各浓度 GeO_2 对碎片菱形藻的抑制率为(82.10% \pm 2.40%)~(96.35% \pm 0.79%), 均高于同浓度 GeO_2 对小伪菱形藻的抑制率; 同时在丝状体与小伪菱形藻和碎片菱形藻的共培养体系中, 碎片菱形藻占硅藻比例随 GeO_2 浓度升高而相应下降。

关键词: 萱藻; 丝状体; 小伪菱形藻; 碎片菱形藻; 二氧化锗

中图分类号: Q 949.2; S 968.4

文献标志码: A

萱藻(*Scytosiphon lomentaria*)隶属于褐藻门(Phaeophyta)、褐藻纲(Phaeosporae)、萱藻科(Scytosiphonaceae)、萱藻属(*Scytosiphon*), 为泛温带性藻类, 广布于北冰洋至澳大利亚间的沿海海域, 在我国分布于辽东半岛至广东省海陵岛的沿海海域^[1-2]。萱藻在生长过程中会吸收海水中的N、P元素, 防止水体富养化, 具有很高的生态学价值^[3]。萱藻还具有很高的食用及药用价值, 其成熟叶状体富含蛋白质、不溶性膳食纤维、甘露醇和褐藻胶等成分^[4-5], 而且其提取物岩藻糖是一种良好的肿瘤细胞抑制剂, 可显著抑制子宫瘤细胞、肺癌细胞等多种癌细胞的活性^[6-9], 同时萱藻活性物质还具有抗氧化^[10-11]、抗病毒^[12]等功效。另外, 作为一种新型的海藻资源, 萱藻的褐藻酸含量高达23.6%^[2], 所以萱藻也拥有很大的工业应用潜力。因此, 萱藻是一

种具有极大开发潜力的优质海藻资源。

萱藻丝状体保存与扩增过程中常受到小伪菱形藻(*Pseudo-Nitzschia sicula*)与碎片菱形藻(*N. frustulum*)的污染, 上述两种杂藻均属于硅藻门(Bacillariophyta)、羽纹纲(Pennatae), 为附生藻类(epiphytic algae)。附生硅藻繁殖速率快, 竞争能力强, 会抑制丝状体对养分和光能的摄取^[13], 从而导致丝状体生长缓慢、发育迟缓, 甚至死亡。

硅藻在细胞分裂过程中利用培养液中的硅(Si)合成新生细胞壁中的二氧化硅^[14]。锗(Ge)与硅在元素周期表中同属第四主族元素, 二者有理化相似性, 所以锗可以破坏硅藻新生细胞壁^[15], 进而抑制硅藻生长。据此, 二氧化锗(GeO_2)作为特异性硅藻生长抑制剂, 已被应用于海带(*Saccharina japonica*)和紫菜等大型经济海藻的种

收稿日期: 2017-12-26 修回日期: 2018-02-10

资助项目: 山东省重点研发计划(2016GSF115042); 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

质保存与扩增。据报道,不同种类的海藻种质对GeO₂的耐受性差异较大,如3.00 μg/mL GeO₂适宜条斑紫菜(*Pophyra yezoensis*)自由丝状体的长期保存,但当其浓度高于6.00 μg/mL时,条斑紫菜自由丝状体的生长会受到显著抑制^[16];而海带配子体对GeO₂的耐受上限为4.40 μg/mL,若高于此浓度,其产生的孢子体幼苗的生长将受到抑制^[17]。

由于不同大型海藻种质对GeO₂的耐受限度存在差异,将GeO₂应用于萱藻丝状体的保存和扩增前,应先确定其适宜的浓度范围,既能有效抑制硅藻的生长,又保证丝状体的正常生长与发育。目前尚未见利用GeO₂清除萱藻丝状体保存和扩增过程中硅藻污染的报道,因此本实验拟构建丝状体和附生硅藻的共培养体系,研究不同浓度GeO₂对丝状体生长发育及硅藻生长的影响,探索去除萱藻丝状体保存和扩增过程中混入的硅藻的有效方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用萱藻丝状体取自本实验室种质库。首先对丝状体进行充气培养,培养条件为温度(22.0±1.0) °C,光暗周期L:D=14:10,光照强度为66.3~75.3 μmol/(m²·s),培养液为F1培养液^[18]。培养20 d后,收集丝状体用于实验。

所用小伪菱形藻与碎片菱形藻均分离自实验室被污染的丝状体,分离后进行纯化培养,培养条件为温度(20.0±1.0) °C,光暗周期L:D=12:12,光照强度为29.7~32.2 μmol/(m²·s),培养液为三角褐指藻(*Phaeodactylum tricorutum*)、新月菱形藻(*N. closterium*)培养液IV^[19],培养至对数生长期用于实验。

1.2 实验方法

利用组织匀浆机打碎丝状体,随后分别经300目和400目筛绢过滤并收集滤液。将18 mm×18 mm盖玻片加入至直径90 mm的培养皿中,每个培养皿中8片,避免重叠,随后吸取10 mL上述滤液于培养皿中,并接种硅藻,建立丝状体与小伪菱形藻、丝状体与碎片菱形藻、丝状体与小伪菱形藻和碎片菱形藻的共培养体系。最后,利用F1培养液将共培养体系定容至30 mL。其他培养条件为温度(22.0±1.0) °C,光暗周期L:D=14:10,光照强度67.4~73.2 μmol/(m²·s)^[20]。

共培养体系建立24 h后进行第1次镜检,在400×显微镜下随机选取10个视野,统计单列丝状体细胞数和附生硅藻细胞数,记为初始值。随后加入GeO₂溶液,浓度分别设定为1.00、2.00、2.50、3.00、3.50、4.00 μg/mL,并设置对照组,每个浓度梯度设置3个平行样。每2天取盖玻片进行镜检,镜检后全量更换培养液,计数后的盖玻片不再放入培养皿。以日均增长率衡量丝状体扩增速率^[21],计算公式:

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

式中, K 代表萱藻丝状体日均增长率; N_0 代表单列萱藻丝状体起始细胞数; N_t 代表 t 天时单列萱藻丝状体的细胞个数; t 代表实验天数(d)。

上述实验结束后,取共培养体系中经GeO₂处理过的丝状体,用灭菌海水冲洗2遍以去除残留的GeO₂溶液,随后对其进行单室孢子囊诱导,诱导条件及所用培养液参照高伟^[18],并利用未经GeO₂处理的丝状体设置对照组,诱导30 d后统计丝状体的孢子囊枝比例、测量孢子囊直径。

$$\text{孢子囊枝比例} = \frac{\text{具有孢子囊的丝状体数量}}{\text{丝状体总数}} \times 100\%$$

1.3 数据分析

利用SPSS 19.0和Sigmaplot 10.0软件进行单因素方差分析和制图,图片采集及孢子囊直径测量软件为ISCapture。

2 结果

2.1 GeO₂对共培养萱藻丝状体和小伪菱形藻生长的影响

小伪菱形藻初始密度为(19.09±2.64)×10⁴个/cm²。第2天,3.00、3.50和4.00 μg/mL GeO₂实验组中小伪菱形藻的生长已被明显抑制,密度分别降至(15.20±1.27)×10⁴、(15.19±1.52)×10⁴和(12.80±1.16)×10⁴个/cm²,而此时1.00 μg/mL GeO₂实验组和对照组中小伪菱形藻密度较初始密度有所增加,分别为(19.38±1.74)×10⁴和(20.80±1.55)×10⁴个/cm²(图1)。在所设实验条件下,小伪菱形藻的密度均随时间的延长而降低,但不同浓度的GeO₂对其生长的抑制效果不同。第14天,对照组中小伪菱形藻增长率达398.19%±31.42%(表1)。1.00 μg/mL GeO₂浓度下,小伪菱形藻密度

为 $(6.24 \pm 0.99) \times 10^4$ 个/cm², 显著高于其他实验组 ($P < 0.05$), 与初始密度相比仅下降67.33%±5.18%。2.00、2.50和3.00 μg/mL GeO₂实验组中, 小伪菱形藻密度和其抑制率分别为 $(4.29 \pm 0.86) \times 10^4$ 、 $(3.65 \pm 0.75) \times 10^4$ 、 $(3.19 \pm 0.37) \times 10^4$ 个/cm²和77.53%±4.48%、80.87%±3.94%、83.31%±1.93%, 彼此间差异不显著 ($P > 0.05$)。3.50和4.00 μg/mL GeO₂浓度条件下, 小伪菱形藻密度分别降至 $(1.78 \pm 0.60) \times 10^4$ 个/cm²和 $(1.05 \pm 0.34) \times 10^4$ 个/cm², 均显著低于其他实验组 ($P < 0.05$), 且硅藻抑制率达90.69%±3.13%和94.49%±1.78%。

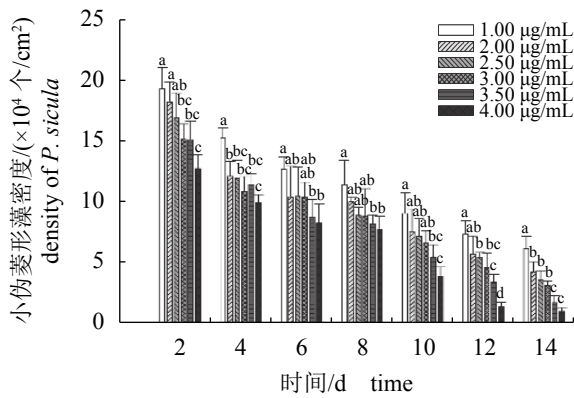


图1 萱藻丝状体与小伪菱形藻共培养条件下 GeO₂对小伪菱形藻生长的影响

同一天中的不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同

Fig. 1 Effects of germanium dioxide on the growth of *P. sicula* co-cultured with filaments of *S. lomentaria*

Different letters in the same day indicate significant difference ($P < 0.05$), the same below

小伪菱形藻对萱藻丝状体的生长具有明显的抑制效果, 对照组中的萱藻丝状体于第10天全部死亡, 其外部附着有大量附生硅藻, 胞质缢缩(图版-1)。4.00 μg/mL GeO₂实验组中丝状体于第12天全部死亡, 表现为细胞畸形, 且胞质由深褐色变为褐绿色(图版-2)。在GeO₂浓度低于4.00 μg/mL的各浓度组中, 丝状体生长状态良好, 但是其日均增长率存在差异。实验第14天, 1.00、2.00和2.50 μg/mL GeO₂浓度下的丝状体日均增长率显著高于3.00和3.50 μg/mL GeO₂浓度下的丝状体日均增长率 ($P < 0.05$)(图2), 其中2.00 μg/mL GeO₂实验组中丝状体日均增长率为11.50%±0.15%, 显著高于同时期其他实验组中的丝状体日均增长率 ($P < 0.05$), 且丝状体细胞质充盈、颜色为深褐色(图版-3)。

2.2 GeO₂对共培养萱藻丝状体和碎片菱形藻生长的影响

碎片菱形藻初始密度为 $(19.08 \pm 2.52) \times 10^4$ 个/cm²。3.00、3.50和4.00 μg/mL GeO₂对碎片菱形藻的抑制效果显著(图3), 第2天, 上述实验组中碎片菱形藻密度分别下降至 $(13.45 \pm 1.33) \times 10^4$ 、 $(14.73 \pm 1.25) \times 10^4$ 和 $(13.36 \pm 1.32) \times 10^4$ 个/cm², 而1.00 μg/mL实验组和对照组中碎片菱形藻密度分别增加至 $(19.80 \pm 1.89) \times 10^4$ 和 $(25.41 \pm 4.61) \times 10^4$ 个/cm²。实验第14天, 对照组中碎片菱形藻增长率达到517.71%±33.84%(表1)。此时各实验组中碎片菱形藻生长均受到抑制, 其中4.00 μg/mL GeO₂效果最佳, 硅藻抑制率为96.35%±0.79%, 显著高于1.00~3.00 μg/mL

表1 共培养14 d后硅藻密度下降百分比

Tab. 1 Percentage decreases of density of diatoms after 14-day co-culturing %

GeO ₂ 浓度/(μg/mL) concentrations of GeO ₂	共培养体系 co-cultured systems		
	萱藻丝状体—小伪菱形藻 filaments of <i>S. lomentaria</i> - <i>P. sicula</i>	萱藻丝状体—碎片菱形藻 filaments of <i>S. lomentaria</i> - <i>N. frustulum</i>	萱藻丝状体—小伪菱形藻与碎片菱形藻 filaments of <i>S. lomentaria</i> with <i>P. sicula</i> and <i>N. frustulum</i>
0	-398.19±31.42	-517.71±33.84	-457.14±23.35
1.00	67.33±5.18 ^c	82.10±2.40 ^c	67.88±3.86 ^c
2.00	77.53±4.48 ^b	88.74±2.15 ^b	80.00±1.16 ^b
2.50	80.87±3.94 ^b	88.74±3.92 ^b	81.57±1.21 ^b
3.00	83.31±1.93 ^b	91.23±2.56 ^b	82.97±4.33 ^b
3.50	90.69±3.13 ^a	92.47±1.58 ^{ab}	84.25±1.85 ^b
4.00	94.49±1.78 ^a	96.35±0.79 ^a	90.51±1.33 ^a

注: 同一列中的不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$); 下同

Notes: in the same column, values with different letters mean significant differences ($P < 0.05$); the same below

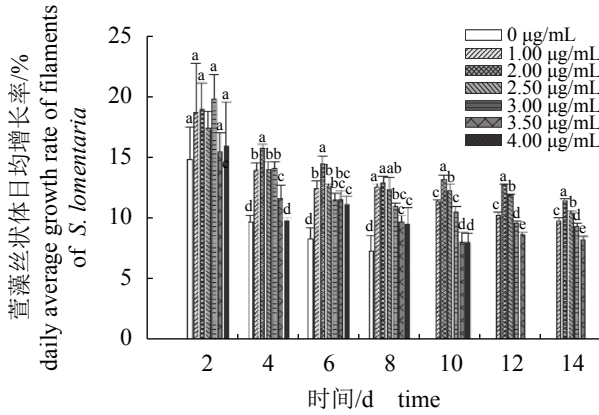


图2 萱藻丝状体与小伪菱形藻共培养条件下二氧化锗对丝状体生长的影响

Fig. 2 Effects of germanium dioxide on the growth of filaments of *S. lomentaria* co-cultured with *P. sicula*

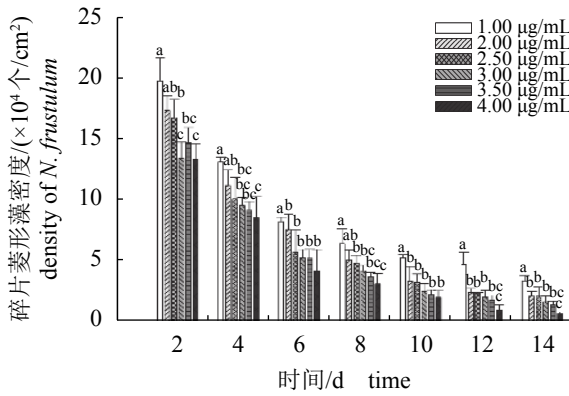


图3 萱藻丝状体与碎片菱形藻共培养条件下二氧化锗对碎片菱形藻生长的影响

Fig. 3 Effects of germanium dioxide on the growth of *N. frustulum* co-cultured with filaments of *S. lomentaria*

GeO₂实验组中的抑制率($P < 0.05$)。2.00~3.50 µg/mL GeO₂范围内的硅藻抑制率差异并不显著($P > 0.05$)。1.00 µg/mL GeO₂对碎片菱形藻的抑制效率最低,第14天硅藻抑制率仅为82.10%±2.40%,显著低于同期其他实验组的硅藻抑制率($P < 0.05$)。

在丝状体与碎片菱形藻的共培养体系中,对照组和4.00 µg/mL GeO₂实验组中的萱藻丝状体均于第12天全部死亡,状态与“二氧化锗对共培养萱藻丝状体和小伪菱形藻生长的影响”中的描述相似。结果显示,第14天,1.00~2.50 µg/mL GeO₂范围内的丝状体日均增长率显著高于3.00和3.50 µg/mL GeO₂浓度下的丝状体日均增长率($P < 0.05$) (图4),其中2.00 µg/mL GeO₂实验组中丝状体日均增长率为11.18%±0.06%,显著高于同时期其他

GeO₂浓度下的日均增长率($P < 0.05$),且丝状体生长状态良好(图版-4)。

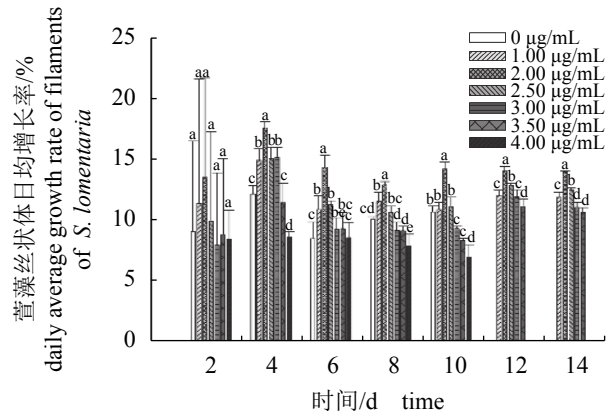


图4 萱藻丝状体与碎片菱形藻共培养条件下二氧化锗对丝状体生长的影响

Fig. 4 Effects of germanium dioxide on the growth of filaments of *S. lomentaria* co-cultured with *N. frustulum*

2.3 二氧化锗对共培养萱藻丝状体与小伪菱形藻和碎片菱形藻生长的影响

该共培养体系硅藻的初始密度为 $(25.44 \pm 1.97) \times 10^4$ 个/cm²,其中碎片菱形藻占硅藻总量的50.12%±0.09%。实验第14天,对照组中硅藻增长率达457.14%±23.35%(表1),4.00 µg/mL GeO₂浓度下硅藻密度降至 $(2.41 \pm 0.34) \times 10^4$ 个/cm²(图5),显著低于其他实验组中的硅藻密度($P < 0.05$),硅藻抑制率为90.51%±1.33%。2.00~3.50 µg/mL范围内,不同浓度GeO₂对硅藻的抑制效果差异并不显著($P > 0.05$)。而此时1.00 µg/mL GeO₂浓度下硅藻密度为 $(8.17 \pm 0.98) \times 10^4$ 个/cm²,显著高于其他实验组($P < 0.05$),硅藻抑制率仅为67.88%±3.86%。

实验第14天,对组中小伪菱形藻及碎片菱形藻分别计数,并计算各自所占硅藻的比例。对照组中,碎片菱形藻所占比例由初始的50.12%±0.09%上升至59.67%±3.29%(图6),且由表1可知,对照组中碎片菱形藻的增长速率比小伪菱形藻快,也许说明其对环境中营养物质及光能的竞争能力比小伪菱形藻强。但是随着GeO₂浓度的增加,碎片菱形藻占比不断下降,实验第14天,在4.00 µg/mL实验组中仅占40.97%±2.19%,所以碎片菱形藻比小伪菱形藻对GeO₂更为敏感。

在丝状体与小伪菱形藻和碎片菱形藻的共培养体系中,GeO₂的最适浓度仍为2.00 µg/mL,14 d时该浓度下丝状体日均增长率为11.69%±

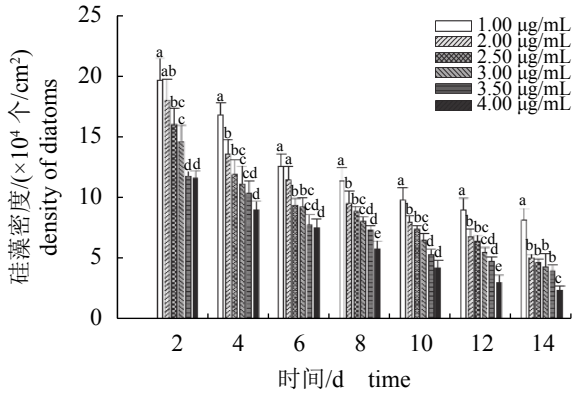


图 5 萱藻丝状体与小伪菱形藻和碎片菱形藻共培养条件下GeO₂对硅藻生长的影响

Fig. 5 Effects of germanium dioxide on the growth of the two species of diatoms co-cultured with filaments of *S. lomentaria*

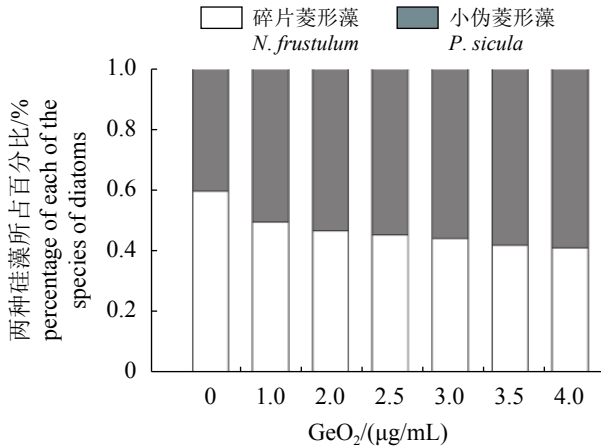


图 6 培养 14 d 后不同 GeO₂ 浓度下两种硅藻所占比例

Fig. 6 Percentages of each species of diatoms at different concentrations of germanium dioxide after 14-day culture

0.28%, 显著高于其他 GeO₂ 浓度条件下的日均增长率 ($P < 0.05$) (图 7)。由于硅藻生长过快, 对照组中萱藻丝状体于实验第 8 天便全部死亡, 将盖玻片冲洗后取样镜检发现丝状体仅剩细胞壁结构 (图版-5)。4.00 μg/mL GeO₂ 浓度下, 实验第 14 天, 仅有少量丝状体死亡, 但是丝状体日均增长率仅为 $8.82\% \pm 0.38\%$, 显著低于其他实验组中丝状体日均增长率 ($P < 0.05$)。

2.4 GeO₂ 处理对萱藻丝状体发育的影响

利用 1.00~3.00 μg/mL GeO₂ 处理丝状体 14 d 并不会抑制其孢子囊的形成与发育。表 2 显示, 诱

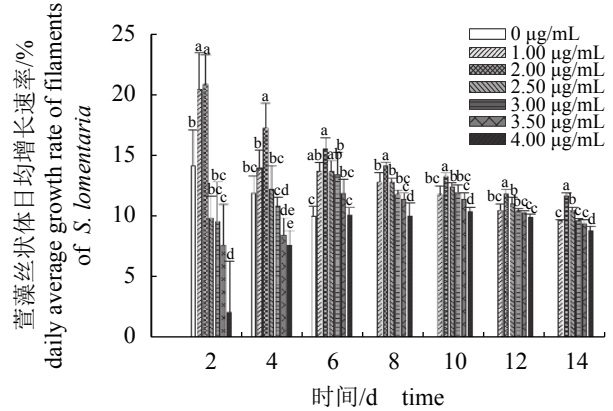


图 7 萱藻丝状体与小伪菱形藻和碎片菱形藻共培养条件下GeO₂对丝状体生长的影响

Fig. 7 Effects of germanium dioxide on the growth of filaments of *S. lomentaria* co-cultured with *P. sicula* and *N. frustulum*

导前各组中丝状体孢子囊枝比例差异不显著 ($P > 0.05$), 经过 30 d 诱导, 1.00~3.00 μg/mL GeO₂ 处理过的丝状体孢子囊枝比例与对照组丝状体的孢子囊枝比例仍无显著差异 ($P > 0.05$), 且均大于 50%。同时, 1.00、2.00、2.50、3.00 μg/mL GeO₂ 实验组及对照组的丝状体孢子囊直径分别为 (24.57 ± 2.39) 、 (24.55 ± 1.01) 、 (24.43 ± 0.50) 、 (24.49 ± 0.33) 和 (24.10 ± 1.34) μm, 彼此差异不显著 ($P > 0.05$)。利用 3.50 μg/mL GeO₂ 处理 14 d 后, 丝状体虽然可经诱导产生成熟的单室孢子囊 (图版-6), 但是丝状体孢子囊枝比例和孢子囊直径分别为 $44.64\% \pm 2.82\%$ 和 (21.85 ± 1.69) μm, 显著低于其他实验组的孢子囊枝比例和孢子囊直径 ($P < 0.05$)。经 30 d 诱导后, 4.00 μg/mL GeO₂ 处理过的萱藻丝状体无单室孢子囊形成。

虽然 GeO₂ 浓度越高对硅藻的抑制效果越显著, 但是 3.00~4.00 μg/mL GeO₂ 会抑制丝状体的生长, 其中 4.00 μg/mL GeO₂ 处理 14 d 会不同程度地导致丝状体死亡, 且 3.50 μg/mL GeO₂ 会抑制后期单室孢子囊的形成和发育。综合 GeO₂ 对萱藻丝状体生长发育和硅藻生长的影响, 1.00~2.50 μg/mL 为 GeO₂ 的适宜浓度范围, 其中 2.00 μg/mL 条件下丝状体日均增长率最高, 所以 2.00 μg/mL 为处理萱藻丝状体的最适浓度。

3 讨论

GeO₂ 作为特异性硅藻抑制剂, 已被应用于

表 2 GeO₂处理过的萱藻丝状体孢子囊形成和发育情况

Tab. 2 Formation and development of unilocular sporangia of filaments of *S. lomentaria* treated by germanium dioxide

GeO ₂ 浓度/(μg/mL) concentrations of GeO ₂	初始孢子囊枝比例/% initial ratio of sporangial branchlets	诱导后孢子囊枝比例/% ratio of sporangial branchlets after inducing	单室孢子囊直径/μm diameters of unilocular sporangia
0	30.44±2.77 ^a	57.19±3.39 ^a	24.10±1.34 ^a
1.00	27.39±6.04 ^a	56.67±3.41 ^a	24.57±2.39 ^a
2.00	30.97±4.38 ^a	57.47±1.20 ^a	24.55±1.01 ^a
2.50	26.11±3.08 ^a	54.72±5.31 ^a	24.43±0.50 ^a
3.00	27.61±2.08 ^a	52.55±5.46 ^a	24.49±0.33 ^a
3.50	32.39±3.93 ^a	44.64±2.82 ^b	21.85±1.69 ^b
4.00	—	—	—

注：“—”表示萱藻丝状体细胞质萎缩，出现死亡，无孢子囊形成

Notes: “—” indicates the cytoplasm of filaments of *S. lomentaria* was constricted, nearly to death and no sporangia were produced

大型海藻育苗及养殖过程中，但GeO₂的过量添加会抑制大型海藻的生长。褐藻门的藻类对GeO₂较为敏感，1.10 μg/mL的GeO₂会显著抑制海带孢子体的生长^[22]。与上述结论相似，萱藻丝状体对GeO₂较为敏感，当GeO₂浓度高于2.50 μg/mL时，其生长便会受到抑制。据报道，过高浓度的GeO₂会导致褐藻新生细胞壁中出现很多孔洞结构，致使细胞壁瓦解、藻体细胞畸形且细胞相互分散^[23]。本实验中萱藻丝状体出现了相似特征，在3种共培养体系中，第8~12天，4.00 μg/mL GeO₂实验组中一些丝状体细胞不再按固有方式排列，而是从原来的藻体脱落，形成小的细胞团。

GeO₂对大型海藻发育的影响因种类而异。据报道，坛紫菜(*P. haitanensis*)壳孢子囊枝形成及发育阶段可耐受的GeO₂浓度高达40 μg/mL^[24]，而海带配子体对GeO₂较为敏感，以4.40 μg/mL GeO₂处理海带配子体，会造成其后续产生的孢子体生长缓慢^[17]，即此浓度的GeO₂对海带配子体生殖结构的发育具有抑制作用。在本研究中，对经过GeO₂处理的丝状体进行孢子囊诱导，经3.50 μg/mL GeO₂处理的丝状体的孢子囊枝比例较低、孢子囊直径较小，经4.00 μg/mL GeO₂处理的丝状体无孢子囊形成。丝状体孢子囊诱导是萱藻人工育苗及养殖过程中非常重要的环节，根据生产经验，丝状体孢子囊枝比例须高于50%才能满足放散需要。但是3.50 μg/mL GeO₂实验组孢子囊枝比例仅为44.64%±2.82%，不能达到实际生产的要求。综合GeO₂对丝状体生长发育的影响，在实际应用时，GeO₂浓度不宜高于2.50 μg/mL。

GeO₂可抑制硅藻对培养液中硅的摄取^[25]，进而影响硅藻壳面(valve)的分化及后续分裂^[26]，从而抑制硅藻生长。GeO₂对硅藻的抑制效率与培养液中锗的浓度成正比^[21]，以菱形藻(*Nitzschia* sp.)为例，利用不同浓度GeO₂处理12 d，1.00和3.00 μg/mL实验组中菱形藻抑制率分别为24.00%和64.00%^[15]。在本实验的3种共培养体系中，1.00 μg/mL GeO₂对硅藻抑制效果最差，而4.00 μg/mL GeO₂抑制效果最佳，实验第14天各共培养体系的硅藻抑制率均高于90.00%。

硅藻对GeO₂的敏感性因种类而异。Markham等^[22]曾报道，0.13 μg/mL GeO₂便可显著抑制圆海链藻(*Thalassiosira rotula*)和柔弱根管藻(*Rhizosolenia delicatula*)的生长，而在1.79 μg/mL的GeO₂溶液中，整齐圆筛藻(*Coscinodiscus concinnus*)仍可正常生长。本实验结果表明，碎片菱形藻较小伪菱形藻对GeO₂更为敏感，表现为相同浓度的GeO₂对碎片菱形藻具有更好的抑制效果，且在丝状体与小伪菱形藻和碎片菱形藻的共培养体系中，碎片菱形藻占比随GeO₂浓度上升不断下降。因此，若丝状体保存与扩增阶段出现硅藻污染，可根据硅藻种类确定GeO₂的适宜用量，既高效解决硅藻污染的问题，又避免成本的提高和资源的浪费。

参考文献:

- [1] 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.

- [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] Demirbaş A. Biomass resource facilities and biomass conversion processing for fuels and chemicals[J]. *Energy Conversion and Management*, 2001, 42(11): 1357-1378.
- [4] 何洁, 崔铁军, 王家骧, 等. 4种药用海藻有效成份的分析与比较[J]. 中国海洋药物, 1996, 15(3): 23-27.
He J, Cui T Y, Wang J X, *et al.* Analysis and comparison on the effective compositions of four kinds of medicinal seaweeds[J]. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 1996, 15(3): 23-27(in Chinese).
- [5] 张宇, 付晓婷, 林洪, 等. 萱藻营养品质的分析和评价[J]. 营养学报, 2011, 33(6): 619-620, 623.
Zhang Y, Fu X T, Lin H, *et al.* Analysis and evaluation of nutritional quality of *Scytosiphon lomentarius*[J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2011, 33(6): 619-620, 623(in Chinese).
- [6] 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).
- [7] 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.
- [8] Noda H, Amano H, Arashima K, *et al.* Antitumor activity of marine algae[J]. *Hydrobiologia*, 1990, 204-205(1): 577-584.
- [9] Moghadamtousi Z S, Karimian H, Khanabdali R, *et al.* Anticancer and antitumor potential of fucoidan and fucoxanthin, two main metabolites isolated from brown algae[J]. *The Scientific World Journal*, 2014, 2014: 768323.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] Drake L A, Dobbs F C, Zimmerman R C. Effects of epiphyte load on optical properties and photosynthetic potential of the seagrasses *Thalassia testudinum* Banks ex König and *Zostera marina* L.[J]. *Limnology and Oceanography*, 2003, 48(1): 456-463.
- [14] Sullivan C W. Diatom mineralization of silicic acid. II. Regulation of Si(OH)₄ transport rates during the cycle of *Navicula pelliculosa*[J]. *Journal of Phycology*, 1977, 13(1): 86-91.
- [15] Lewin J. Silicon metabolism in diatoms. V. Germanium dioxide, a specific inhibitor of diatom growth[J]. *Phycologia*, 1966, 6(1): 1-12.
- [16] 张美如, 陆勤勤, 朱庙先, 等. 二氧化锗(GeO₂)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, Zhou M X, *et al.* Effect of GeO₂ on diatom pollution in the free filamentous of *Porphyra yezoensis* Ueda[J]. *Modern Fisheries Information*, 2007, 22(2): 24-26(in Chinese).
- [17] 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.
- [18] 高伟. 环境因子对萱藻(*Scytosiphon lomentaria*)丝状体扩增及孢子囊发育的影响[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012: 16-20, 38-45.
Gao W. Effect of environmental factors on filaments amplification and sporangia development of *Scytosiphon lomentaria*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012: 16-20, 38-45(in Chinese).
- [19] 陈明耀, 张道南, 许为群, 等. 海洋饵料生物培养[M]. 北京: 农业出版社, 1980: 101.
Chen M Y, Zhang D N, Xu W Q, *et al.* Aquaculture of Marine Live Foods[M]. Beijing: Agriculture Press, 1980: 101(in Chinese).

- [20] 罗伟, 宫相忠, 高伟, 等. 光强对萱藻孢子萌发、幼苗早期发育及附生藻类动态变化的影响[J]. 水产学报, 2014, 38(12): 2018-2028.
- Luo W, Gong X Z, Gao W, *et al.* Effects of light intensity on spore germination, early development of the sporelings of *Scytosiphon lomentaria* and the dynamic change of epiphytic algae[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(12): 2018-2028(in Chinese).
- [21] Andersen R A. Algal Culturing Techniques[M]. Amsterdam: Academic Press, 2005: 269-285.
- [22] Markham J W, Hagmeier E. Observations on the effects of germanium dioxide on the growth of macro-algae and diatoms[J]. *Phycologia*, 1982, 21(2): 125-130.
- [23] Wang X Y. Morphological study on the inhibitory effect of germanium dioxide on growth and development of brown algae[J]. Scientific Papers of the Institute of Algological Research, Faculty of Science, Hokkaido University, 1993, 9(1): 33-91.
- [24] 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[J]. 水产学报, 1989, 13(1): 36-41, 69.
- 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, 69(in Chinese).
- [25] Azam F, Hemmingsen B B, Volcani B E. Germanium incorporation into the silica of diatom cell walls[J]. *Archiv Für Mikrobiologie*, 1973, 92(1): 11-20.
- [26] Chiappino M L, Azam F, Volcani B E. Effect of germanic acid on developing cell walls of diatoms[J]. *Protoplasma*, 1977, 93(2-3): 191-204.

Effects of germanium dioxide on the growth of filaments of *Scytosiphon lomentaria* and diatoms in co-cultured conditions

YANG Ruqian, GONG Xiangzhong*, SHEN Shijun, GAO Wei,
ZHANG Hongxia, ZHUANG Yingrui

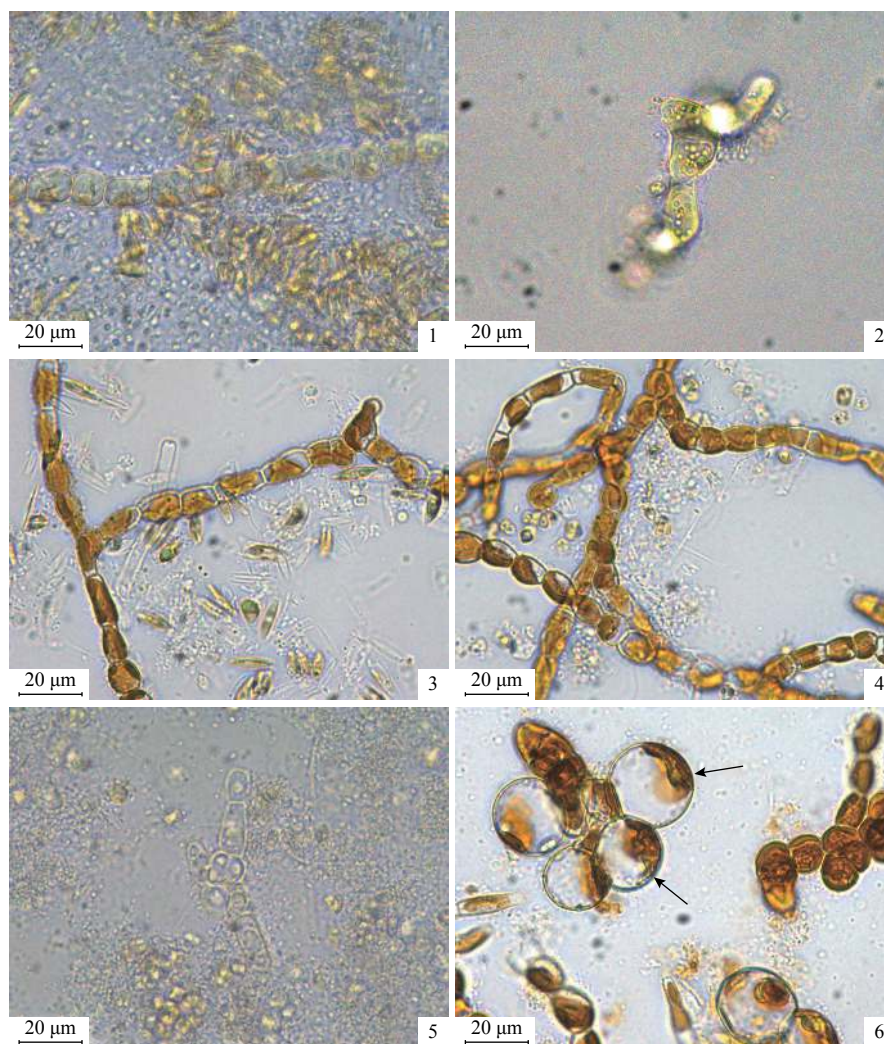
(College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: In order to suppress the growth of *Pseudo-Nitzschia sicula* and *N. frustulum* appearing during the cultivation of filaments of *Scytosiphon lomentaria* in our lab, the effects of germanium dioxide (GeO_2) at 1.00–4.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ on the growth and development of filaments of *S. lomentaria* and the growth of epiphytic diatoms were studied in 3 different kinds of co-cultured systems. Results indicated that: the suitable concentrations of GeO_2 for co-cultured systems of filaments and diatoms were 1.00–2.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, at which the percentage decreases of diatoms were all above $67.33\% \pm 5.18\%$ after 14-day co-culturing, meanwhile the filaments of *S. lomentaria* were in good conditions and good developments. 2.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was the most suitable concentration of GeO_2 since the filaments of *S. lomentaria*, under that condition, had the highest daily average growth rates which were all higher than 11.00% in 3 kinds of co-cultured systems, and ratios of sporangial branchlets as well as average diameter of sporangia were $57.47\% \pm 5.31\%$ and $(24.55 \pm 1.01) \mu\text{m}$, respectively, which were not significantly different from those in control groups. Although diatoms were suppressed more effectively when the concentrations of GeO_2 was up to 3.50 and 4.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the growth of filaments, the ratios of sporangial branchlets and average diameter of sporangia after inducing were also influenced negatively. What is more, filaments were dead when the concentration of GeO_2 reached 4.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$. *N. frustulum* is more sensitive to GeO_2 than *P. sicula*. After 14-day co-culturing, the percentage decreases of *N. frustulum* were between $(82.10\% \pm 2.40\%)$ – $(96.35\% \pm 0.79\%)$ at any concentration of GeO_2 , which were higher than the percentage decreases of *P. sicula* under same conditions. Moreover, on the 14th day in co-cultured systems of filaments of *S. lomentaria*, *P. sicula* and *N. frustulum*, there was negative correlation between percentages of *N. frustulum* in the two species of diatoms and concentrations of GeO_2 .

Key words: *Scytosiphon lomentaria*; filaments; *Pseudo-Nitzschia sicula*; *Nitzschia frustulum*; germanium dioxide

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)



图版 萱藻丝状体的生长发育情况

箭头指示成熟孢子囊。1. 0 $\mu\text{g/mL}$ GeO_2 共培养 10 d; 2. 4.00 $\mu\text{g/mL}$ GeO_2 共培养 12 d; 3. 2.00 $\mu\text{g/mL}$ GeO_2 共培养 14 d; 4. 2.00 $\mu\text{g/mL}$ GeO_2 共培养 14 d; 5. 5.0 $\mu\text{g/mL}$ GeO_2 共培养 8 d; 6. 诱导 30 d 后萱藻丝状体成熟的孢子囊

Plate Developmental and growth situations of filaments of *S. lomentaria*

arrows indicate mature sporangia. 1. 10-day co-culturing at 0 $\mu\text{g/mL}$ GeO_2 ; 2. 12-day co-culturing at 4.00 $\mu\text{g/mL}$ GeO_2 ; 3. 14-day co-culturing at 2.00 $\mu\text{g/mL}$ GeO_2 ; 4. 14-day co-culturing at 2.00 $\mu\text{g/mL}$ GeO_2 ; 5. 8-day co-culturing at 5.0 $\mu\text{g/mL}$ GeO_2 ; 6. mature sporangia of filaments of *S. lomentaria* 30-day after inducing