



坛紫菜叶状体的抗生素联合除菌效果

顾登辉¹, 朱竹君², 胡代福², 杨锐¹, 骆其君¹,
陈娟娟¹, 吴玮¹, 陈海敏^{1*}

(1. 宁波大学海洋学院, 浙江省海洋生物工程重点实验室, 浙江 宁波 315211;

2. 宁波海洋研究院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 为研究坛紫菜及其外生菌群对氯霉素、竹桃霉素和头孢噻肟3种抗生素的敏感性, 通过将其与氨苄青霉素、卡那霉素和庆大霉素的组合, 优化坛紫菜叶状体的除菌方法, 并利用涂布平板、qRT-PCR及16S *rRNA*测序分析其除菌效果。结果显示, 当坛紫菜先以氨苄青霉素(300 mg/L)、卡那霉素(100 mg/L)和庆大霉素(100 mg/L)混合处理18 h, 再以氯霉素(50 mg/L)、头孢噻肟(200 mg/L)和竹桃霉素(50 mg/L)混合处理4 d, 叶状体的健康率保持在96.3%以上, 而对可培养细菌的抑制率达到99.9%。根据qRT-PCR和16S *rRNA*的结果可知, 该种组合方法较前3种抗生素的组合, 其菌总数下降41.5%, 微生物的丰度和多样性指数明显下降。其中, 假单胞菌、交替赤杆菌、交替单胞菌以及海杆菌等得到针对性的抑制。研究表明, 多种抗生素的优化组合能够对坛紫菜叶片的菌群结构产生显著影响, 使其受到抑制, 但仍无法达到绝对除菌的效果。

关键词: 坛紫菜; 抗生素; 除菌效果; 16S *rRNA*

中图分类号: S 946.2

文献标志码: A

长期生活在海水中的藻类表面附着着大量微生物, 一起形成了复杂的藻菌关系^[1]。但是藻类的生理生化、藻菌互作关系、营养学以及遗传等研究通常需要建立无菌的纯藻培养体系, 以达到在实验室可控条件下开展工作的目的。由于与藻类共存的细菌往往附着在藻体表面胶质鞘等部位, 往往需要物理和化学等不同除菌手段结合使用, 这也使得藻类的除菌工作相对繁琐。而抗生素除菌一直是较常用且方便有效的方法。可以利用真核藻类比细菌具有更强的抗生素耐受性的特点, 根据抑菌机理, 通过组合使用不同抗生素达到较理想的除菌效果^[2-5]。

过去对除菌效果的评判方法主要是利用涂布平板统计菌落数、叶片荧光染色或扫描电镜

等方法, 在无菌落出现或显微镜和电镜观测不到细菌时, 即认为达到无菌化效果^[6-10]。但是生物体表面有非常多的不可培养微生物, 或者某些微生物嵌在表面胶质鞘中难于观察^[11-12], 因此, 上述这些方法通常不能准确判断除菌效果。

紫菜是已知藻际微生物种类非常丰富的类群, 是常用的藻菌关系研究体系^[13]。坛紫菜(*Pyropia haitanensis*)是由单层细胞构成的膜状体结构, 便于培养和观察, 是良好的大型海藻实验载体。由于细菌与紫菜有较近的遗传距离, 很多分子水平的研究, 如基因组的组装, 及藻与特定微生物关系的研究, 都需要尽量避免微生物的干扰。因此, 本实验在前期针对坛紫菜的几种抗生素无菌化处理的基础上^[14], 进一步开

收稿日期: 2019-04-30 修回日期: 2019-10-15

资助项目: 国家自然科学基金(31872540); 浙江省自然科学基金(LY 18C190004); 国家产业技术体系(CARS-50); 浙江省重大科技专项(2016C02055-6B)

通信作者: 陈海敏, E-mail: chenhaiamin@nbu.edu.cn

展抗生素的组合,通过涂布平板法,结合16S *rRNA*测序分析,判断坛紫菜的无菌化程度及抑菌情况,以期为海藻的无菌化处理提供方法。

1 材料与方 法

1.1 材料与处理

坛紫菜于2017年10月采自宁波鄞州,阴干后-20℃冷藏备用。

实验前,将材料于23℃灭菌海水中暗培养24 h复苏。挑选长度5 cm左右的健康小叶片,清洗去杂后于0.7% KI的海水中处理10 min,灭菌海水漂洗3次。

1.2 坛紫菜叶状体对单种抗生素的敏感性检测

在24孔板每孔中添加2 mL含单种抗生素的灭菌海水,抗生素分别为氯霉素(5、25和50 mg/L)、竹桃霉素(5、25和50 mg/L)和头孢噻肟(100、200和300 mg/L)。其中,氯霉素和竹桃霉素采用二甲基亚砜(DMSO)配制成10 mg/mL母液后进行稀释。以纯海水作为对照组1,以加DMSO的海水作为对照组2。所有实验组均设置3个平行。每孔培养25 mg坛紫菜叶片,23℃连续培养6 d,光照周期12L:12D,光照强度为36 μmol/(m²·s)。每隔1天换1次培养液,并统计叶片健康率(健康叶片是指整个叶片无腐烂且色泽正常)。

叶片健康率(%)=(健康叶片数/总叶片数)×100%

1.3 单种抗生素对坛紫菜叶状体附生菌的杀菌效果检测

组别设置同“坛紫菜叶状体对单种抗生素的敏感性检测”部分(n=9)。每2天取3个平行组的叶片,灭菌海水漂洗数次后,加1 mL灭菌海水研磨并稀释后涂布于2216E固体培养基。23℃培养24 h后,统计菌落数。

1.4 组合抗生素对坛紫菜叶状体外生菌的杀菌效果检测

依据上述单种抗生素的敏感性筛选结果,设置组合抗生素处理:组合A[氯霉素(50 mg/L)、头孢噻肟(200 mg/L)和竹桃霉素(50 mg/L)混合]处理4 d;组合B[氨基青霉素(300 mg/L)、卡那霉素(100 mg/L)和庆大霉素(100 mg/L)混合]处理18 h;组合C先以组合B培养18 h,再以组合A培养4 d。以纯海水培养作为对照组1,以加DMSO的海水培养作为对照组2,培养条件同“坛紫菜叶状体对单种抗生素的敏感性检测”。实验周期结束后进

行细菌培养和计数(n=3)。

1.5 荧光定量PCR(qRT-PCR)检测坛紫菜叶状体附生菌情况

每组抗生素处理后,收集叶片,灭菌海水漂洗数次后用无菌滤纸吸干,液氮中速冻90 s后-80℃保存。叶片DNA提取参照 Plant Genomic DNA Kit (TianGen Biotech)。对DNA样本分别进行18S *rRNA*和附生细菌16S *rRNA*的定量检测,定量引物序列分别为18S-rtF: 5'-AGTTAGGGGA TCGAAGACGA-3'; 18S-rtR: 5'-CAGCCTTG CGACCATACTC-3'; 16S-341F: 5'-ACGGG GGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3'; 16S-518R: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'。qRT-PCR扩增程序:95℃10 s,55℃10 s,72℃15 s,40个循环。采用2^{-ΔΔC_T}法进行结果分析:

$$F = 2^{\Delta C_T(16S rRNA_{CK} - 18S rRNA_{CK}) - \Delta C_T(16S rRNA_{sample} - 18S rRNA_{sample})}$$

式中,CK指的是海水处理对照组即CK组,sample分别指的是A、B和C组。F值是F value,是qRT-PCR的结果。

1.6 16S *rRNA*测序分析坛紫菜叶状体附生菌的菌群多样性

将各处理组的坛紫菜叶片以无菌纸吸干表面水分,液氮速冻后,提取总DNA。以微生物核糖体RNA的目标序列为靶点,添加样本特异性Barcode序列,对特定基因片段进行PCR扩增。扩增产物回收纯化,并制备测序文库。样品经Illumina MiSeq测序仪进行2×300 bp的双端测序,选取长度大于150 bp,平均质量分值>20,拼接序列重叠区域错配率小于20%的序列作为有效序列,进行下游分析。

使用QIIME软件,调用UCLUST序列比对工具,按97%的序列相似度进行归并成操作分类单元(OTU)。并选取每个OTU中丰度最高的序列作为该OTU的代表序列,并进行α多样性分析,包括Chao1指数、ACE指数等。通过R软件,计算各组共有OTU的数量,并通过Venn图呈现各组所共有和独有OTU所占的比例;对属水平的群落组成结构进行PCA分析。使用QIIME软件,获取各样本在门、纲、目、科、属5个分类水平上的组成和丰度分布表。

1.7 数据分析

t检验比较样品组与对照组均数间的差别。数据以mean±SD表示。P<0.05表示差异显著。

2 结果

2.1 坛紫菜叶状体及其附生菌对3种抗生素的敏感性

无论是实验组还是对照组, 随培养时间延长, 叶片均出现少量腐烂状态, 而且抗生素浓度增高也对叶片产生胁迫, 如在6 d时, 50 mg/L 氯霉素组中有近8%的叶片生长异常, 其中有个别叶片出现严重腐烂(表1)。

不同抗生素处理对坛紫菜叶状体的杀菌效果显示, 3种抗生素对照组都具有极明显的杀菌作用, 且与处理浓度和时间呈正相关。竹桃霉素处理时, 菌落数的下降较其他2种抗生素少, 如在50 mg/L连续处理4 d后, 叶片附生菌数量仅下降81%, 可能因为抗菌对象主要为赤杆菌(*Erythrobacter*)和海杆菌(*Marinobacter*)等, 因此效果略差(表2)。

2.2 组合抗生素对坛紫菜叶状体外生菌的杀菌效果

连续培养数天后, 坛紫菜叶状体对不同抗生素组合的敏感性结果显示, 以海水处理作为对照组(CK)。组合A, B和C分别持续培养数天, 坛紫菜叶片均保持良好的状态, 叶片的健康率在95%以上(图1-a), 3个组均有良好的杀菌效果, 叶片上的附生菌均下降99%以上(图1-b),

表1 不同抗生素处理下坛紫菜叶状体的健康率

Tab. 1 Health of *P. haitanensis* thalli treated with different antibiotics %

组别 groups	浓度/(mg/L) concentration	处理时间/d operation time		
		2	4	6
对照组1 control 1	\	100	98.14±3.21	94.45±0.52
对照组2 control 2	\	100	100	96.32±3.21
氯霉素 chloramphenico	5	100	100	96.32±3.21
	25	100	100	98.14±3.21
	50	100	96.32±3.21	92.58±3.21
竹桃霉素 oleandomycin	5	100	100	94.45±0.52
	25	100	100	96.32±3.21
	50	100	96.32±3.21	92.58±3.21
头孢噻肟 cefotaxime	100	100	98.14±3.21	96.32±5.56
	200	100	98.14±3.21	92.58±3.21
	300	100	98.14±3.21	94.45±0.52

qRT-PCR技术检测同样显示叶片中的16S *rRNA*细菌表达明显下降, 其中组合C处理的下降最为显著(图1-c, $P<0.01$), F 值仅0.22。说明组合C对叶片附生菌的抑制效果明显优于其他2种。但由于组合C的处理时间长于其他2组, 所以健康率有所下降。

表2 不同抗生素处理对坛紫菜叶状体附生菌的除菌效果

Tab. 2 Effect of different antibiotics on the amount of bacteria of *P. haitanensis* thalli

CFU/g ($\times 10^4$)

组别 groups	浓度/(mg/L) concentration	处理时间/d treatment time		
		2	4	6
对照组1 control 1	\	159.41±15.33	175.10±14.99	184.37±10.08
对照组2 control 2	\	167.10±26.11	166.43±10.43	180.03±20.79
氯霉素 chloramphenico	5	23.24±0.72**	23.62±0.12**	19.61±3.24**
	25	12.39±4.84**	6.41±0.44**	8.77±0.87**
	50	9.60±0.88**	5.63±0.12**	5.62±1.64**
竹桃霉素 oleandomycin	5	48.14±2.72**	44.42±0.84**	40.75±3.83**
	25	38.75±1.21**	40.81±3.52**	39.20±0.88**
	50	36.72±1.88**	33.20±1.64**	35.19±3.48**
头孢噻肟 cefotaxime	100	40.75±4.92 ^{##}	35.18±3.52 ^{##}	48.41±4.83 ^{##}
	200	16.81±1.24 ^{##}	12.44±1.87 ^{##}	15.60±0.82 ^{##}
	300	13.24±0.88 ^{##}	17.64±1.24 ^{##}	16.05±2.44 ^{##}

注: ^{##}. $P<0.01$, 与对照组1比较, 溶剂都为海水; ** $P<0.01$, 与对照组2比较, 溶剂均为DMSO

Notes: ^{##}. $P<0.01$, compared to control 1; ** $P<0.01$, compared to control 2

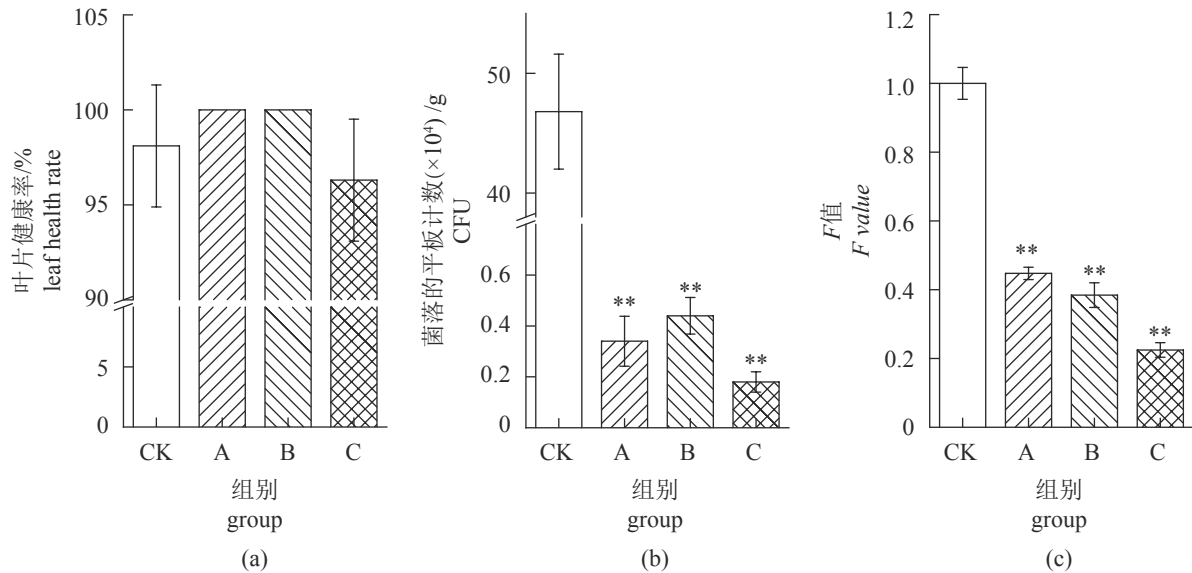


图1 不同抗生素组合处理下坛紫菜叶状体的健康率及杀菌效果

CK. 海水处理对照组, A. 组合A, B. 组合B, C. 组合C

Fig. 1 Effect of different combination of antibiotics on the health and the amount of bacteria on *P. haitanensis* thallus

CK. control group of seawater treatment, A. combinatorial A, B. combinatorial B, C. combinatorial C

2.3 不同抗生素组合处理下坛紫菜附生菌群落结构的改变

为更好的阐明不同抗生素组合处理下坛紫菜叶片附生菌的种属变化差异,应用了覆盖16S *rRNA*的高度V3-V4区域的高通量测序(表3)。为比较细菌丰度和群落多样性,统计了Chao1、Ace、Shannon和Simpson指数,结果发现,3种组合抗生素处理后细菌的丰度均明显下降,尤其是组合C显著降低($P < 0.01$)。而从微生物多样性指标看,相较于对照组,组合C的Shannon指数也显著低于对照组($P < 0.05$)。

基于已识别的OTU构建了Venn图和主成分分析(PCA)(图2)。Venn图显示,不同抗生素处理组拥有其自身不同的OTU,并且与对照组有明显

的差异。从PCA图中则可以看出3个处理组和对照组有显著分布距离,表明与对照组的菌群落差异较大。

2.4 不同抗生素组合处理下坛紫菜附生菌群落在分类水平上的变化

将叶片微生物丰度大于1%的菌门作为主要微生物群进行统计,结果显示,门的水平上,对照组中变形菌门(Proteobacteria)占坛紫菜附生菌的比例高达96.5%,而厚壁菌门(Firmicutes)和拟杆菌门(Bacteroides)只占了1.6%和1.5%,剩下的0.4%则是其他一些菌,如放线菌门(Acrinobacteria)、浮霉菌门(Planctomycetes)等。组合A中,变形菌门,厚壁菌门和拟杆菌门分别占了67%、22.3%和9.4%;在组合B和组合C中,变形菌门和

表3 不同抗生素组合处理下坛紫菜的菌群多样性

Tab. 3 Community diversities of bacteria on *P. haitanensis* thalli treated with different antibiotics combinations

组别 groups	高质量读数 reads	操作分类单元 OTUs	丰度指数 enrichment index		多样性指数 diversity index	
			Chao 1	ACE	Simpson	Shannon
CK	42 811±819	310.13±44.24	318.50±28.99	318.50±28.99	0.86±0.07	4.90±0.15
A	45 252±1 361	177.51±10.61*	177.57±10.66*	179.46±11.01*	0.92±0.02*	5.27±0.39
B	40 855±2 169	127.72±11.02*	134.22±11.38*	135.62±8.06*	0.96±0.09*	5.57±0.18*
C	45 100±2 164	82.11±9.29**	88.64±11.90**	89.84±8.77**	0.86±0.07	4.61±0.07*

注: * $P < 0.05$, 与CK比较; ** $P < 0.01$, 与CK比较

Notes: * $P < 0.05$, compared to CK; ** $P < 0.01$, compared to CK

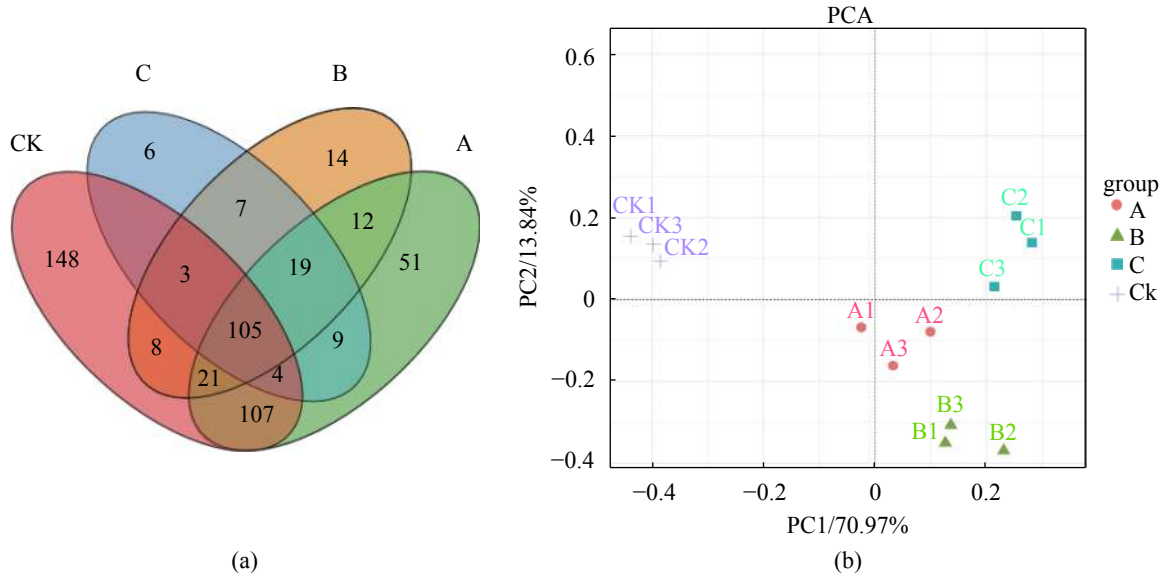


图 2 不同抗生素组合处理对坛紫菜菌群结构的影响

(a) Venn 图, (b) 主成分分析图

Fig. 2 Effects of different antibiotic combinations on the bacteria structure of *P. haitanensis* thalli

(a) Venn, (b) PCA

厚壁菌门所占比例高达95%，且在组合C中未检测到浮霉菌门。因此，虽然抗生素处理使菌群分布发生了显著的变化，但变形菌门还是所占比例最高的细菌，没有完全除去(图3-a)。在属的水平上，各组之间也有明显的菌群分布差异，在对照组中占比高达40%的假单胞菌(*Pseudoalteromonas*)，经抗生素处理后，在组合A、B和C中比例显著下降，尤其在组合C中占比小于0.5%。单胞菌(*Alteromonas*)在对照组和组合A中占14.1%和24.5%，但在组合B与C中则未检测

到。交替赤杆菌(*Altererythrobacter*)和海杆菌(*Marinobacter*)在组合B中分别占6.9%和5.3%，而组合C中未检测到。黄杆菌(*Mesoflavibacter*)等也是如此。因此，在属水平上组合C的菌群种数整体明显减少(图3-b)。

3 讨论

藻类无菌培养体系对藻类生理和组学研究非常重要，目前，无菌方法主要是通过抗生素

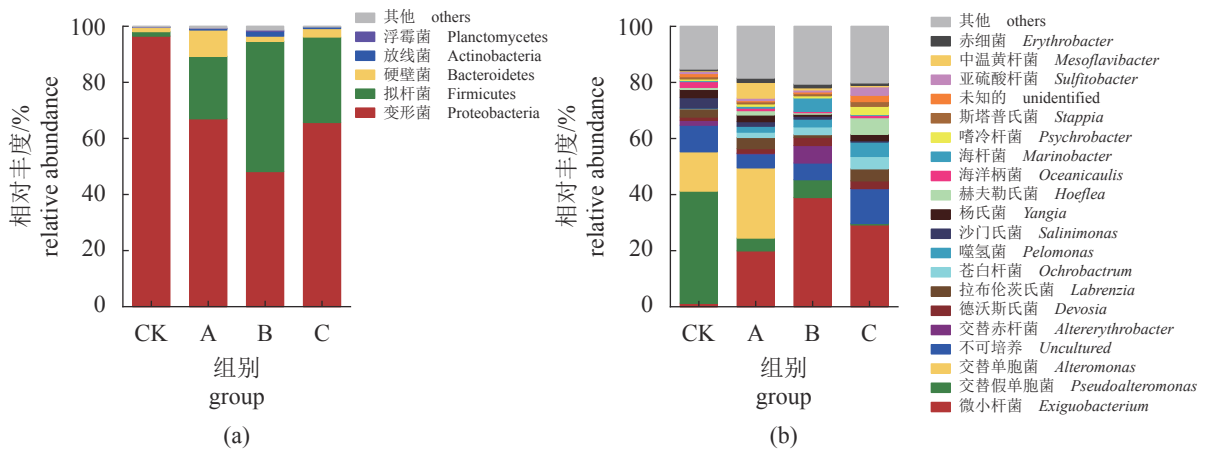


图 3 坛紫菜菌群分布图

(a) 门水平菌群分布, (b) 属水平菌群分布

Fig. 3 Distribution of bacteria on *P. haitanensis* thalli

(a) distribution of bacteria at the level of phylum, (b) distribution of bacteria at the level of genus

处理来达到^[8-10]。有研究显示,赤杆菌、微小杆菌以及多种交替菌等在坛紫菜叶片中所占比例较高^[15],而2种以上的抗生素联合使用效果更好。周金梅等^[14]曾报道,氨苄青霉素、卡那霉素及庆大霉素联合使用能达到对紫菜的完全除菌效果,但本实验经qRT-PCR技术和16S *rRNA*的分析显示,该方法处理后仍会有部分细菌存在,主要是因为这3种抗生素均是对革兰氏阴性菌具有一定的杀菌效果,而对其他菌的抑制效果一般。首先,大量的革兰氏阳性、阴性细菌依然存在,因此,本实验选用了氯霉素和头孢噻肟,其中氯霉素对革兰阳性、阴性细菌均有抑制作用;头孢噻肟则对革兰阴性需氧菌和革兰阳性需氧菌和厌氧菌有广谱抗菌活性,并且二者间无干扰作用^[16-17]。另外,赤杆菌和海杆菌也仍然残留较多,超过10%,因此实验针对性的选择了竹桃霉素,竹桃霉素对大多数革兰氏阴性菌也能起到一定抑制作用^[17]。本实验在此基础上进行新的抗生素组合,并根据前期筛选到的能有效抑制细菌生长且对坛紫菜没有毒害作用的抗生素浓度,对除菌方法进行优化,以期达到更好的除菌效果。

对16S *rRNA*的研究发现,经新的抗生素组合(组合C)处理后,叶片的总体健康率在96%以上,与CK组相比无差异,但相较于原先的抗生素组合不仅在细菌总数上降低了近一倍,且在丰度和多样性上也呈现明显的下降趋势。而某些菌属,如假单胞菌和交替单胞菌在上述组合处理后比例都小于0.5%,说明几种抗生素联合对革兰氏阴性菌的抑制效果进一步加强。此外,交替赤杆菌、海杆菌和黄杆菌均未被检测到,说明新添加的竹桃霉素对这3种菌具有显著的抑制效果,但可以看到变形菌门细菌作为数量最多的细菌,在抗生素组合处理后仍无法完全除去。

结果可知,叶片的健康率和除菌率并没有呈现一致性,如组合C处理后,虽然除菌效果明显增强,但健康率却有所下降,说明藻际微生物群落中既包含了相对于坛紫菜的有害菌,也包括有益菌。这些有益菌可能参与藻类生长发育所需营养的合成,或帮助抵御病害^[18]。而抗生素并不能对此进行区分,即造成了有益菌同时被抑制,从而影响到坛紫菜的健康情况。

综上所述,本实验选择先以氨苄青霉素、卡那霉素和庆大霉素混合处理18 h,再以氯霉

素、头孢噻肟和竹桃霉素处理坛紫菜叶状体4 d后,在不影响叶片正常生长的情况下对坛紫菜叶片的附生菌的群落结构产生显著影响,附生菌的数量达到最低,从而为藻类生理及分子水平的研究提供一定借鉴。

参考文献:

- [1] 张增虎,唐丽丽,张永雨.海洋中藻菌相互关系及其生态功能[J].微生物学通报,2018,45(9):2043-2053.
Zhang Z H, Tang L L, Zhang Y Y. Algae-bacteria interactions and their ecological functions in the ocean[J]. Microbiology China, 2018, 45(9): 2043-2053(in Chinese).
- [2] 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.
- [3] 李福后,王伟霞,王萍,等.坛紫菜雌性叶状体的抗生素敏感性测定[J].海洋学研究,2008,26(4):111-115.
Li F H, Wang W X, Wang P, et al. The determination of sensitivities of *Porphyra haitanensis* female thalloid to antibiotics[J]. Journal of Marine Sciences, 2008, 26(4): 111-115(in Chinese).
- [4] 赵扬,李秀,左正宏,等.坛紫菜叶状体体细胞对抗生素敏感性的研究[J].台湾海峡,2004,23(4):496-499.
Zhao Y, Li X, Zuo Z H, et al. Antibiotics sensitivities of somatic cells of *Porphyra haitanensis* thallus[J]. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 2004, 23(4): 496-499(in Chinese).
- [5] 林伟,陈騫,刘秀云.海洋微藻除菌及除菌与自然带菌微藻生长特点比较[J].海洋与湖沼,2000,31(6):647-652.
Lin W, Chen D, Liu X Y, et al. Marine microalgalaxenation and comparison of growth characteristics between natural and axenic marine microalgae[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2000, 31(6): 647-652(in Chinese).
- [6] 屈建航.5种绿藻对几种常用抗生素的敏感性[J].大连轻工业学院学报,2004,23(2):111-113.
Qu J H. Sensitivity of five kinds of algae to commonly used antibiotics[J]. Journal of Dalian Institute of Light Industry, 2004, 23(2): 111-113(in Chinese).
- [7] 朱方超,李崇丰,王秀娟,等.琼胶寡糖激发坛紫菜对附生细菌的减少作用[J].中国生物防治学报,2012,中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- 28(3): 394-399.
- Zhu F C, Li C F, Wang X J, *et al.* Oligoagars induce defense response of *Porphyrahaitanensis* to epiphytic bacteria[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2012, 28(3): 394-399(in Chinese).
- [8] 雷杰, 丁洪昌, 严兴洪. 抗生素处理对坛紫菜叶状体生长和藻际微生物的影响[J]. *水产学报*, 2017, 41(4): 512-524.
- Lei J, Ding H C, Yan X H. The effects of antibiotics on growth and phycosphere microorganisms of *Pyropia haitanensis* thallus[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(4): 512-524(in Chinese).
- [9] 宋程飞, 郝敬云, 程蔚兰, 等. 杜氏盐藻无菌体系的建立[J]. *山西农业科学*, 2018, 46(1): 25-28, 97.
- Song C F, Hao J Y, Cheng W L, *et al.* Establishment of aseptic system of *Dunaliella salina*[J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2018, 46(1): 25-28, 97(in Chinese).
- [10] 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.
- [11] 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).
- [12] Lange W. Speculations on a possible essential function of the gelatinous sheath of blue-green algae[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1976, 22(8): 1181-1185.
- [13] 方文雅. 紫菜与藻际微生物互作研究平台的初步研究[D]. 宁波: 宁波大学, 2010.
- Fang W Y. Preliminary study of the platform to study the interaction of *Porphyra* spp. and their phycospheres[D]. Ningbo: Ningbo University, 2010 (in Chinese).
- [14] 周金梅, 杨锐, 方文雅, 等. 坛紫菜叶状体的无菌化培养及其应用[J]. *生物学杂志*, 2012, 29(3): 83-87.
- Zhou J M, Yang R, Fang W Y, *et al.* Study on the axenic culture and application of *Porphyra haitanensis* thallus[J]. *Journal of Biology*, 2012, 29(3): 83-87(in Chinese).
- [15] Wu H Q, Liu M, Zhang W C, *et al.* Phylogenetic analysis of epibacterial communities on the surfaces of four red macroalgae[J]. *Journal of Ocean University of China*, 2014, 13(6): 1025-1032.
- [16] Lai H T, Hou J H, Su C I, *et al.* Effects of chloramphenicol, florfenicol, and thiamphenicol on growth of algae *Chlorella pyrenoidosa*, *Isochrysis galbana*, and *Tetraselmis chui*[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2009, 72(2): 329-334.
- [17] Wang L, Yang F Y, Chen H Y, *et al.* Antimicrobial cocktails to control bacterial and fungal contamination in *Chlamydomonas reinhardtii* cultures[J]. *BioTechniques*, 2016, 60(3): 145-149.
- [18] Xiong Y Q, Yang R, Sun X X, *et al.* Effect of the epiphytic bacterium *Bacillus* sp. WPySW2 on the metabolism of *Pyropia haitanensis*[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2018, 30(2): 1225-1237.

Antibacterial effect of antibiotics combination in *Pyropia haitanensis*

GU Denghui¹, ZHU Zhujun², HU Daifu², YANG Rui¹, LUO Qijun¹,
CHEN Juanjuan¹, WU Wei¹, CHEN Haimin^{1*}

(1. Key Laboratory of Marine Biotechnology in Zhejiang Province,
School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo 315211, China;
2. Ningbo Institute of Oceanography, Ningbo 315211, China)

Abstract: The susceptibility of *Pyropia haitanensis* and its bacteria to chloramphenicol, oleandomycin and cefotaxime was studied. They were combined with ampicillin, kanamycin and gentamicin to optimize the sterilization effect of *P. haitanensis* thalli. The effects were evaluated by plate count, qRT-PCR and 16S *rRNA* sequencing analysis. The results show that when *P. haitanensis* thalli was treated with ampicillin (300 mg/L), kanamycin (100 mg/L) and gentamicin (100 mg/L) mixture for 18 h, and then treated with chloramphenicol (50 mg/L), cefotaxime (200 mg/L) and oleandomycin (50 mg/L) mixture for 4 days, the health rate of the thalli is above 96.3%, and the inhibition rate of bacteria reached 99.9%. According to the results of qRT-PCR and 16S *rRNA*, the number of bacteria in this antibiotic combination was nearly reduced by half as compared with the first three antibiotic combination, and the bacteria abundance and diversity index were also significantly decreased. Among them, *Pseudoalteromonas*, *Altererythrobacter*, *Salinimonas* and *Marinobacter* were specifically inhibited. These results indicated that the optimal combination of multiple antibiotics could significantly affect the community structure of epiphytes on the thalli, which could be inhibited to the minimum, but still could not achieve the absolute sterilization.

Key words: *Pyropia haitanensis*; antibiotics; sterilization effect; 16S *rRNA*

Corresponding author: CHEN Haimin. E-mail: chenhaimin@nbu.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31872540); Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LY 18C190004); National Industrial Technology System (CARS-50); Major Scientific and Technological Special Projects of Zhejiang Province (2016C02055-6B)