

抗生素对浒苔形态及共附生细菌多样性的影响

包群靖¹, 毕芳玲¹, 蔡春尔^{1,2}, 李可俊^{1,2}, 何培民^{1,2}

(1. 上海海洋大学海洋生态与环境学院, 上海 201306; 2. 水域环境生态上海高校工程研究中心, 上海 201306)

摘要: 本文研究了3种抗生素联合处理黄海绿潮浒苔(*Ulva prolifera*)形态及共附生细菌多样性的影响。将浒苔放散的配子加入到含有3种广谱抗生素(青霉素 G、硫酸新霉素、多黏菌素 B)的培养液中进行培养, 与对照组相比, 发现浒苔幼苗生长速度缓慢, 且细胞变小, 藻体无法形成正常形态。进一步采用16S rDNA 高通量测序分析抗生素处理藻体前后的共附生细菌多样性, 发现抗生素处理后浒苔共附生细菌丰富度和多样性降低, 其中 *Maribacter* 丰度降低。将藻体与形态发生化合物 thallusin(*Maribacter* spp. 提取物)共培养, 发现 thallusin 可促进藻体形态恢复和生长, 推测抗生素可通过抑制 *Maribacter* 等细菌从而影响浒苔形态和生长, 这将为浒苔共附生细菌功能的深入研究奠定一定基础。

关键词: 浒苔; 抗生素; 细菌多样性; 形态与生长

中图分类号: Q944-33 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2023)4-0108-09

DOI: 10.11759/hyxx20220519002

大型海藻是近海生态系统中非常重要的初级生产者。大型海藻表面有大量共附生细菌, 这是细菌和藻类相互选择的结果^[1-3]。海藻的表面为微生物附着提供了适合的基质, 同时海藻分泌出各种有机物质, 为细菌繁殖和生长提供了营养物质^[4-5]。同样藻类也依赖细菌来获取外源钴胺素、硫胺素和生物素等才能生长^[6]。研究进一步发现细菌对藻类生长、孢子萌发、病原体抗性具有重要作用, 特别是共附生细菌对于藻类诱导形态建成具有促进作用^[7], 实验已证明无菌培养的大型绿藻和褐藻生长缓慢或形态发生异常^[8-13]。Spoerner 等^[14]与 Alsufyani 等^[15]通过无菌培养 *Ulva mutabilis* 配子, 发现再生藻体的形态不正常, 发育为愈伤组织状, 由细胞壁畸形的未分化细胞组成。王瑜^[16]利用5种抗生素联合处理浒苔孢子, 获得的无菌浒苔愈伤组织也缺乏典型浒苔形态。目前大部分的无菌藻类都是利用抗生素联合培养的方式获得, 进一步研究发现抗生素联合培养很难去除与石莼属共生的所有微生物^[17], 大型海藻共附生细菌有外生菌和内生菌之分, 且同一种藻类不同植株之间的共附生细菌种类是存在差异的^[18-19]。为了更好地研究内生菌和外生菌对藻类的作用, 最近研究发现采用石英砂共涡旋振荡方式可以去除外生菌且不影响内生菌, 这将有助于分析藻类外生菌和内生菌的群落组成和宿主特异性^[20-21]。

大型藻类和细菌之间的化学物质交换和物理接触是两者共生的基础^[22], 越来越多的证据表明, 细菌释放一些化学物质对藻类形态发育有影响。*U. mutabilis* 藻体发育需要藻类生长和形态发育促进因子 (AGMPF)^[23]。由 *Maribacter* spp. 释放的细菌半萜烯类化合物——thallusin 是目前唯一已知的 AGMPF^[12, 24]。当无菌 *U. mutabilis* 藻体同时接种2种海洋细菌 *Roseovarius* sp. MS2 和 *Maribacter* sp. MS6 时, 藻体会从愈伤组织样表型发育成由双层细胞和组织组成的表型^[14]。其中 *Roseovarius* sp. MS2 促进细胞分裂和藻叶片细胞生长, 作用类似于陆地植物中的细胞分裂素功能^[25], 而 *Maribacter* sp. MS6 诱导藻类细胞壁和初级根状细胞的形成, 作用类似于陆地植物中的生长素。细菌除了对大型绿藻形态有诱导作用, 还发现丝状单胞菌 *Hyphomonas* (属于 α -变形菌门) 可以诱导红藻 *Neoporphyra yezoensis* 原生质体的正常形态发生^[26]。可见藻类与其相关细菌之间的相互作用对藻类的形态和生长具有不可忽视的影响。

本研究采用抗生素联合处理的方式^[27], 使用3

收稿日期: 2022-05-19; 修回日期: 2022-06-07

基金项目: 国家自然科学基金(41576163)

[Foundation: National Natural Science Foundation of China, No. 41576163]

作者简介: 包群靖(1995—), 女, 山东烟台人, 硕士研究生, 主要从事藻类分子生物学, E-mail: 627956093@qq.com; 何培民(1959—), 通信作者, 男, 江西南昌人, 教授, 主要从事藻类生物技术研究, E-mail: pmhe@shou.edu.cn

种抗生素(青霉素 G、硫酸新霉素和多黏菌素 B)联合处理观察浒苔形态的变化,利用 thallusin 探究其对浒苔生长的影响,并采用 16S rDNA 高通量测序分析浒苔共附生细菌群落变化,为浒苔共附生细菌功能的深入研究提供重要参考。

1 材料与方法

1.1 藻种来源与培养

黄海绿潮漂浮浒苔(*Ulva prolifera*)藻体于 2008 年 7 月在山东省青岛市海边采集,在实验室纯化,利用浒苔配子具有趋光性,判断藻体为配子体浒苔,并在 10℃低温保种。浒苔藻体培养条件为:温度 20±1℃,光照条件 120 μmol·m⁻²·s⁻¹, L:D = 12 h:12 h。采用高浓度海水(金山区,上海)稀释成 25~30 盐度的海水,并进行高压灭菌后,用无菌注射器和 0.22 μm 针头式过滤器加入营养盐配制 VSE 培养基^[28]备用。

1.2 抗生素培养液配制

用无菌注射器和 0.22 μm 针头式过滤器将青霉素 G、硫酸新霉素和多黏菌素 B 液体抗生素加入到灭菌的 VSE 培养基中,摇匀。混匀后的液体抗生素终浓度为:青霉素 G 0.1 g/L;硫酸新霉素 0.1 g/L;多黏菌素 B 0.03 g/L^[29],配制全程均采用无菌操作。

1.3 浒苔配子体培养实验

抗生素处理组(K 组):将浒苔藻体放散的配子加入到含有 3 种抗生素的 VSE 培养基中进行培养,每 5 d 更换 1 次含有抗生素的 VSE 培养基,直到幼苗发育至长度为 3 mm 时转移到圆形培养瓶,继续用抗生素的培养基培养。

对照组(KH 组):即用不添加抗生素的 VSE 培养基培养浒苔配子。

每个组均设立 3 个重复平行组,采用无菌冲气培养,共培养 25 d,每 5 d 测量一次浒苔藻体长度以及更换 1 次培养液,培养过程均采用无菌操作。

1.4 浒苔共生细菌的分离

分别取培养 25 d 后的 KH 组和 K 组浒苔藻体,利用无菌海水和无菌钢珠在冷冻研磨仪(上海沪析)以 70 Hz 频率研磨浒苔植株 120 s,使浒苔藻体完全破碎。离心管直接以 3 000 rpm 的速度离心 30 s,随后在超净工作台中将离心管内的上清液转移到新的灭菌离心管当中,继续 3 000 rpm 离心 2 min,浒苔共附生菌则沉积在离心管壁上^[16]。

1.5 浒苔共附生菌 DNA 的提取与片段扩增

采用 E.Z.N.A.® soil DNA kit 试剂盒提取共附生菌的 DNA。用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测细菌 DNA,在条带清晰、没有拖尾或杂带的情况下,用 NanoDrop 2000 测定细菌 DNA 的浓度和纯度, DNA 稀释到 10 ng/μL。经鉴定质量合格的细菌基因组 DNA 进行细菌 16S rRNA 基因的 V3—V4 可变区巢式 PCR 扩增。引物序列如下表 1,用于后续多样性分析。第一轮 PCR 扩增体系(20 μL)如下:5×TransStart FastPfu 缓冲液 4 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 2 μL, 正反引物(5 μmol/L)0.8 μL, 样本 DNA 1 μL, ddH₂O 11.4 μL。第二轮 PCR 扩增体系与第一次相同,样本 DNA 更换为第一轮 PCR 产物。第一轮 PCR 反应条件为:95℃预变性 3 min;95℃变性 30 s,46℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,30 个循环;72℃延伸 10 min。第二轮 PCR 反应条件为:95℃预变性 3 min;95℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,27 个循环;72℃延伸 10 min。

表 1 巢式 PCR 相关引物

Tab. 1 Constructed primers for nested PCR

引物	序列
799F	5'-AACMGGATTAGATACCKG-3'
1392R	5'-ACGGCGGTGTGTRC-3'
799F	5'-AACMGGATTAGATACCKG-3'
1193R	5'-ACGTCATCCCCACCTTCC-3'

1.6 Illumina Miseq 测序与数据分析

将同一样品的 PCR 产物混合后回收,回收的产物使用 AxyPrep DNA 凝胶提取试剂盒(Axygen Biosciences, Union City, CA, USA)进行纯化,并用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。使用 NEXTFLEX Rapid DNA-SEQ Kit 进行文库构建,最后采用 Illumina Miseq PE300 平台进行测序(上海美吉生物医学科技有限公司)。

下机的原始序列采用 Trimmomatic 软件和 FLASH 软件分别进行质控和拼接。使用 UPARSE 软件(7.1 版)(<http://drive5.com/uparse/>),按照 97% 的相似度对 OTU 序列进行聚类并剔除嵌合体。使用 RDP 分类器(<http://rdp.cme.msu.edu/>)对每个序列进行注释进行物种分类,并将 Silva 数据库(SSU128)与 70% 的阈值进行比较。Alpha 多样性指数(Shannon、Simpson、Chao1、ACE、coverage)分析采用 Mothur 软件对扩增子基因序列基于 OTU 进行。基于 bray_curtis 距离算法对所有样本进行聚类分析,使用 R 软件中的 ggplot2 包来降维进行主成分分析(PCoA),使用函数

anosim 进行相似性分析 (Anosim), 运用 Student's t 双尾检验两组细菌群落分度差异的物种。论文中的数据以平均值±标准差的形式展示。

1.7 thallusin 与浒苔共培养实验

thallusin 获自日本德岛文理大学 Matsuo^[10], 浓度为 1 000 fmol/mL。通过以往研究可知, thallusin 对 *Gayralia oxyspermum* 的有效浓度为 1 fg/mL~1 ag/mL^[10,17], 设置 5 个不同浓度梯度的 thallusin 与抗生素联合处理之后形态发生异常的 3 mm 浒苔培养。浓度从 10 pmol/L 开始, 以 10 倍稀释, 共分为 5 组。经过 20 d 培养, 筛选出促进浒苔藻体长度的最佳浓度。添加该浓度 thallusin 的培养基作为 T 组, 不添加抗生素和 thallusin 的培养基作为 B 组, 继续添加抗生素的培养基作为 K 组。抗生素联合处理之后形态发生异常的 3 mm 浒苔放置在 3 组培养基中培养 25 d, 每组重复 3 个样本, 观察浒苔藻体长度变化情况。

2 结果与分析

2.1 抗生素对浒苔生长抑制作用

KH 组和 K 组浒苔配子经过培养均能形成幼苗, 图 1a 和图 1b 分别为 KH 组和 K 组浒苔配子培养 50 d 后的幼苗生长状态, 可以看出, 抗生素处理显著抑制浒苔配子体幼苗生长, KH 组小苗比 K 组分枝更长、更多。并且抗生素处理显著改变藻体细胞大小, KH 组和 K 组藻体细胞直径分别约为 12 μm 和 8 μm(图 1c、1d), 可见 KH 组细胞明显大于 K 组, K 组浒苔分枝瘦弱, 且大部分分枝只由 1 列细胞组成(图 1d)。

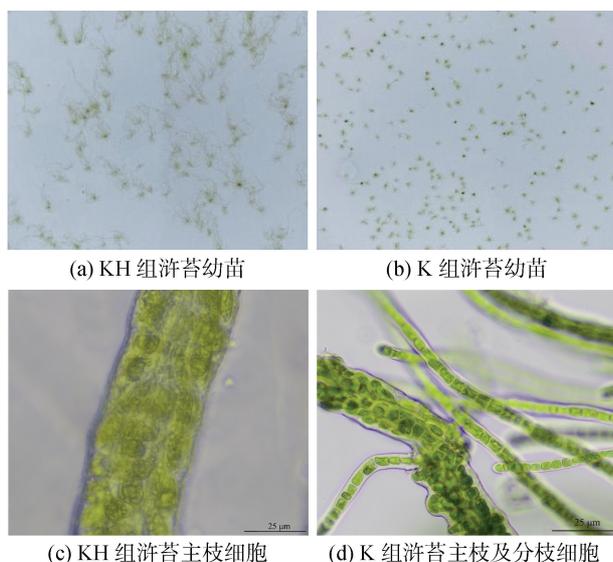


图 1 KH 组和 K 组浒苔配子体幼苗

Fig. 1 *U. prolifera* gametophyte seedlings in the KH and K groups

图 2a 为 KH 组和 K 组浒苔培养 25 d 藻体长度变化, 可见 KH 组藻体在 10 d 后迅速生长, 而 K 组浒苔藻体长度几乎不发生变化, 随着培养时间的增加, 两组浒苔藻体长度差异越来越大。两组培养了 25 d 后, 其藻体形态如图 2b 所示, 显示抗生素显著抑制浒苔生长, 浒苔生长减缓, 没有明显分枝, 整个藻体发育为愈伤组织样的表型。

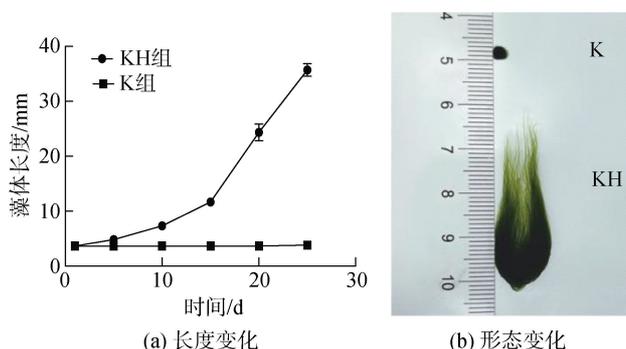


图 2 浒苔培养 25 d 藻体的长度及形态变化

Fig. 2 Changes in the algal body length and morphology of *U. prolifera* cultured for 25 days

2.2 浒苔共附生细菌多样性指数变化

为了降低测序数据量的不同导致的差异, 首先对本次数据进行抽平。测序得到的 reads 平均长度为 375 bp, KH 组 OTU 平均数为 149, K 组 OTU 平均数为 79。对获得的原始数据进行 Alpha 多样性分析(表 2), K 组的 Alpha 多样性指数均低于 KH 组。Shannon 指数和 Simpson 指数表明 KH 组细菌群落多样性略大于 K 组, ACE 指数和 Chao 指数表明 KH 组细菌群落丰富度大于 K 组($P < 0.05$)。Coverage 指数指出样本数据覆盖率为 99%, 测序结果准确率高。所有结果表明, 在抗生素联合处理浒苔共附生细菌的多样性比对照组降低。

2.3 Beta 多样性分析

为了解不同组别样本之间的相似性或差异性, 通过样本群落层级聚类(图 3a)和主坐标分析(图 3b)进行探索。根据本次实验样本层级聚类分析结果, 可以将 K 组和 KH 组浒苔共附生细菌分成两大类, 结果表明添加抗生素之后浒苔的共附生细菌群落组成与对照组相比有明显不同, 主成分分析(PCoA)也证明了这一结论。为了进一步探究分组是否有意义, 基于 Bray-Curtis 相异度进行 ANOSIM 相似性分析(图 3c)。结果表明组间差异大于组内差异, $P < 0.05$, 说明分组有意义, 也说明在 KH 组中和 K 组中存在不同的细菌群落。

表 2 K 组与 KH 组细菌群落 α 多样性指数(平均值 \pm SE)的比较

Tab. 2 Comparison of bacterial community α -diversity indices(mean \pm SE)between K and KH groups

样品名称	香农指数	辛普森指数	ACE 指数	Chao 指数	Coverage 指数
K	1.75 \pm 0.04	0.22 \pm 0.01	61.69 \pm 8.64	59.94 \pm 5.15	0.99 \pm 0
KH	1.97 \pm 0.34	0.25 \pm 0.07	111.77 \pm 20.75	109.72 \pm 25.73	0.99 \pm 0

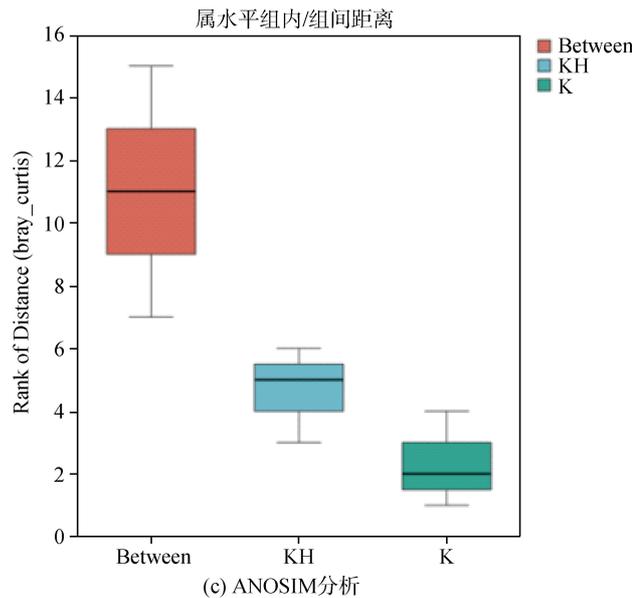
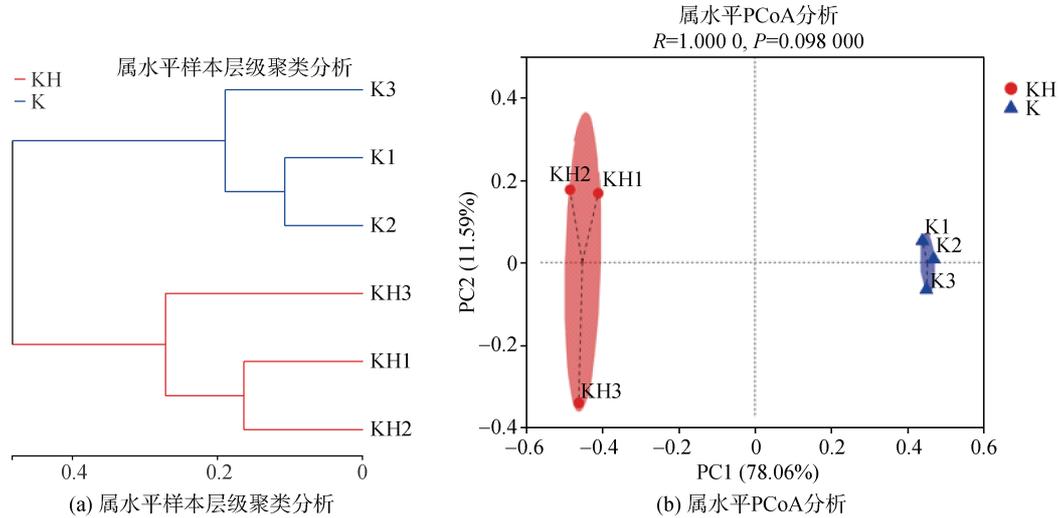


图 3 Beta 多样性分析
Fig. 3 Beta diversity analysis

2.4 浒苔共附生细菌群落物种组成变化

在门分类水平上(图 4a), KH 组细菌占比依次为变形菌门(Proteobacteria)47.2%、拟杆菌门(Bacteroidota)49.8%、放线菌门(Actinobacteriota)2.7%和一些其他细菌。K 组细菌占比依次为变形菌门 90.6%、蓝细菌门(Cyanobacteria)2.5% 和一些其他细菌。KH 组变形菌门和拟杆菌门占比含量高, K 组变形菌门占比高, 表明在

抗生素的作用下对拟杆菌门的杀伤效果明显。

图 4b 显示了属水平 K 组和 KH 组细菌群落中表现出的丰度差异前十的物种。*Maribacter* 在两组中丰度差异最大, 大量存在于 KH 组中。其余有显著差异 ($P < 0.05$)的物种分别是在 K 组有高丰度的根瘤菌属 *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* 以及在 KH 组有高丰度的 *Dinoroseobacter* 和 NS9_marine_group。

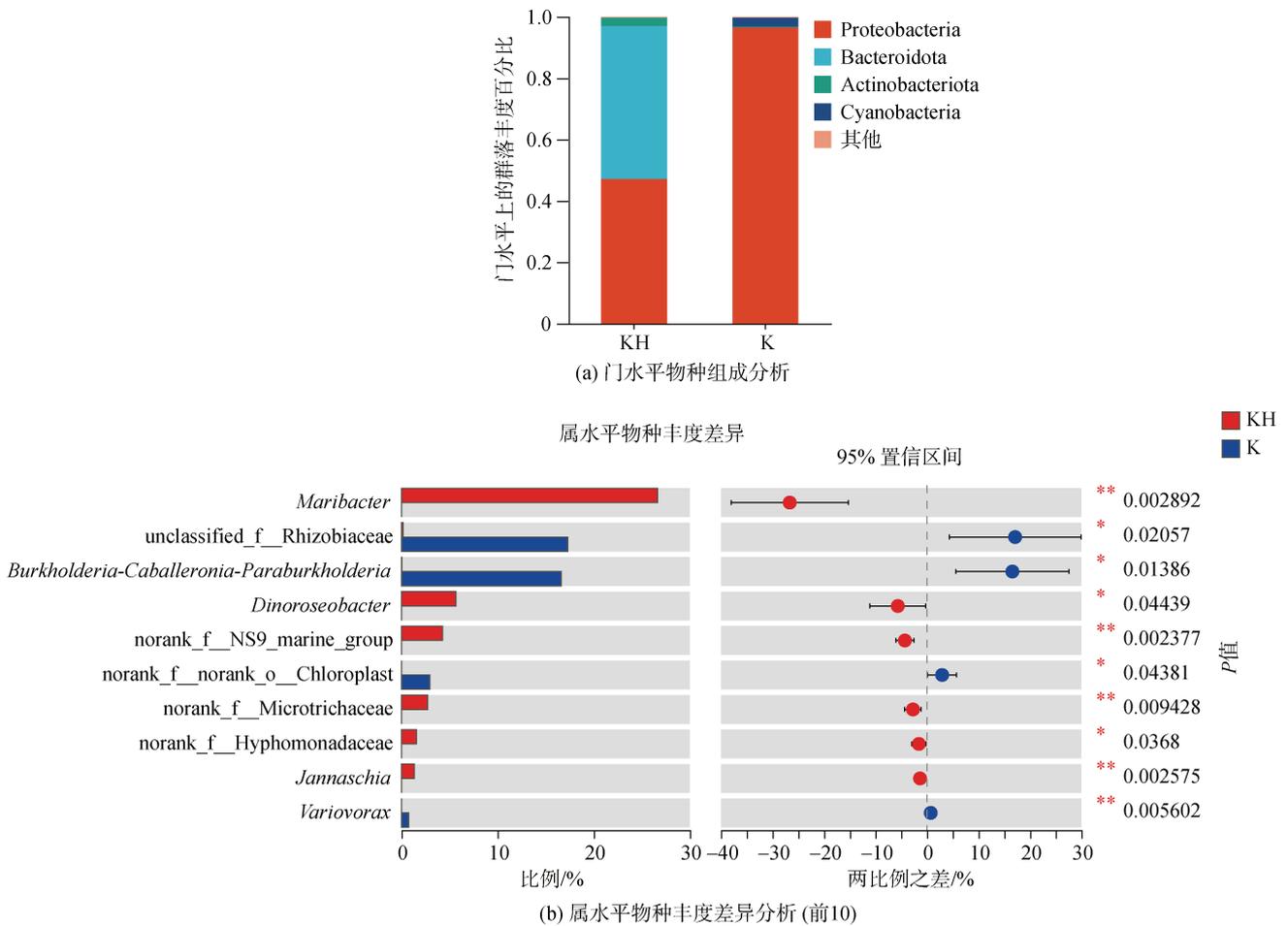


图 4 门水平物种组成和属水平物种丰度差异分析

Fig. 4 Phylum-level community composition analysis and genus-level differences in species abundance

2.5 thalassin 促进浒苔藻体长度增加

为了探究 thalassin 对浒苔促进作用的最佳浓度, 进行浓度梯度实验(图 5)。通过 20 d 的培养发现, 在 1 pmol/L 的浓度下, 浒苔分枝数量最多, 平均藻体长度最长。

使用含 1 pmol/L thalassin 的 VSE 培养基培养愈伤组织样表型的浒苔作为 T 组, 与 B 组、K 组浒苔共同培养 25 d 后的生长变化如图 6a 所示。第 10 d 开始, B 组和 T 组藻体长度大于 K 组, 第 15 d 开始 T 组藻体长度大于 B 组, 随着培养时间的增加, 三组浒苔藻体长度差异更大。25 d 后形态如图 6b 所示, K 组浒苔藻体形态基本不变, B 组、T 组浒苔发育为典型形态, T 组浒苔藻体长度大于 B 组。

3 讨论

微生物在大型藻类的生长发育中发挥着重要作

用。据报道, 细菌可以直接调节 *Ulva* sp. 物种的生长和形态发生^[14, 30]。本研究主要是为了探究浒苔(*U. prolifera*)共附生细菌对浒苔形态发育的影响, 利用青霉素 G、硫酸新霉素和多黏菌素 B 三种抗生素联合处理浒苔配子, 发现浒苔幼苗无法形成典型形态, 浒苔藻体共附生细菌多样性发生改变, 为探索影响浒苔生长发育的关键细菌提供了新的证据。

从实验结果可知, 浒苔配子暴露在抗生素环境中, 可以形成幼苗但无法形成典型藻体形态(图 1), 而 K 组浒苔与典型的浒苔形态不同, 藻体呈现为类似于愈伤组织状的表型, 没有明显的假根细胞, 浒苔分枝短而卷曲, 整体缩为一小团, 且颜色很深, 与王瑜^[16]和 Marshall 等^[31]构建的无菌浒苔和缘管浒苔形态基本一致。抗生素除了会抑制浒苔的生长, Lestonde 等^[32]用不同抗生素对 *U. lactuca* 做了实验, 发现磺胺噻唑对 *U. lactuca* 生长也有抑制作用。同样

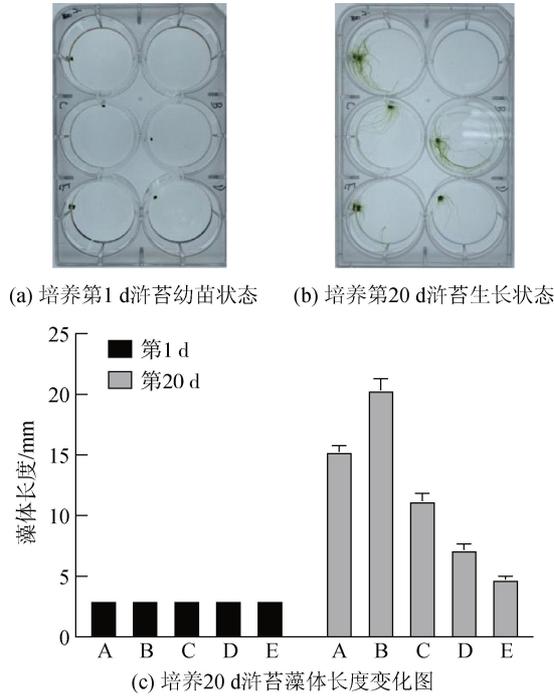


图5 添加 thallusin 浒苔藻体长度变化情况

Fig. 5 Algal body length of *U. prolifera* with thallusin

注: A-E 浓度分别为 10 pmol/L、1 pmol/L、 1×10^{-1} pmol/L、 1×10^{-2} pmol/L、 1×10^{-3} pmol/L

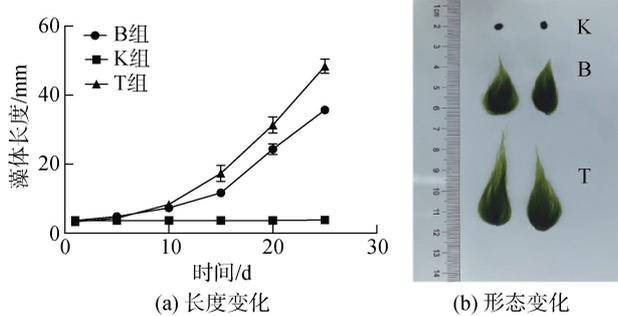


图6 培养 25 d 浒苔藻体长度及形态变化

Fig. 6 Changes in the body length and morphology of algae cultured for 25 days

的, 本次实验结果发现, 利用抗生素培养的浒苔藻体生长速度发生显著改变(图 2), 抗生素可以显著抑制浒苔生长, 推测抗生素抑制某些细菌生长, 导致浒苔无法形成典型的形态, 一旦停止添加抗生素, 细菌生长不受抗生素的抑制, 细菌丰度得到恢复, 故浒苔可恢复正常形态。但当抗生素浓度过高, 也会对浒苔细胞本身造成伤害, 过高浓度的抗生素会对浒苔孢子和小苗产生致死作用^[33], 本实验浒苔配子仍然存活, 并可以发育出幼苗, 但是无法形成典型形态, 所以推测抗生素是通过抑制细菌从而导致形态发生变化。

Burke 等^[34]对与 *U. australis* 共附生细菌群落进行宏基因组测序, 发现其细菌多样性组成为变形菌门(64.0%)、拟杆菌门(27.6%)和浮霉菌门(3.4%), 与本次实验结果趋于一致, 也进一步说明了大型藻类共附生细菌群落在较高的分类等级上(如门、纲)几乎没有区别^[35]。为了筛选影响浒苔形态发育的关键细菌, 从属水平比较分析不同组别的细菌丰度差异。丰度差异最大的细菌属为 *Maribacter*, 在 KH 组含量显著高于 K 组。已知形态异常的无菌 *U. mutabilis* 与 *Roseovarius* sp. (MS2)和 *Maribacte* sp. (MS6)共培养, 两种细菌会产生各种刺激性化学介质完全恢复 *U. mutabilis* 形态^[24], 本实验 K 组浒苔同样缺乏 *Maribacter*, 这或许是浒苔藻体形态异常的主要原因。根据金柘的研究, 将几种细菌单独添加到缺乏典型浒苔形态的藻体中, 有 4 种细菌对浒苔形态恢复有促进作用, 这 4 种细菌在属水平上分类属于 *Roseobacter*、*Marivita*、*Bacillus* sp.、*Maribacter*^[36], 该研究也表明 *Maribacter* 对于浒苔形态发育有影响。本实验未检测到 *Marivita* sp. 和 *Bacillus* sp., 可能是因为所用的浒苔经过多年实验室环境下纯化培养, 部分细菌已经消失。黄杆菌属和噬甲基菌属是本次实验中除了 *Maribacter* 外丰度差异较大的两个细菌属, 一方面说明三种广谱抗生素可能对黄杆菌属和噬甲基菌属的细菌杀伤性强, 另一方面黄杆菌属和噬甲基菌属可能对浒苔的生长和形态发育有着很强的促进作用, 需要进一步从浒苔共附生菌中分离并进行藻菌共培养来研究对浒苔的影响, 所以去除藻体表面外生菌来研究细菌对藻类的影响就显得尤为重要^[20]。

thallusin 是由 *Maribacter* spp. 释放的细菌半萜烯类化合物, 在不同的 *Maribacter* 培养基中均检测到 thallusin 的存在^[24], 是目前唯一已知的藻类形态发育促进因子^[23], 经过测序 *Maribacter* 在抗生素作用下丰度显著降低, 所以推测抗生素可能抑制 *Maribacter* 的丰度, 导致 thallusin 含量过低, 进而影响浒苔形态的发育。通过 thallusin 与浒苔的共培养实验, 发现 thallusin 对于浒苔的生长具有显著促进作用, 佐证了 *Maribacter* 对浒苔形态发育的促进作用。这也表明细菌对藻类形态的影响不仅可以通过直接接触, 还可以通过分泌化合物来介导。

4 结论

利用 3 种抗生素联合处理浒苔配子, 发现浒苔藻体形态在发育过程中发生明显的变化。在抗生素的作

用下,浒苔细胞直径变小,没有明显的假根细胞和主枝,藻体生长速度减慢,由未分化的细胞堆积形成类似于愈伤组织样的表型。为了研究抗生素作用导致浒苔形态发生变化的关键细菌,利用 16S rDNA 高通量测序分析 3 种抗生素联合对浒苔共附生细菌的影响。通过 16S rDNA 测序结果表明,*Maribacter* 是抗生素组中显著减少的一种细菌属,共培养实验证明 *Maribacter* spp.分泌的化合物 thallusin 可以使形态异常的浒苔恢复典型形态,促进浒苔藻体生长更快,推测抗生素诱导浒苔形态变化可能是因为 *Maribacter* 含量低,无法对浒苔的生长起到促进作用。综上所述,浒苔共附生菌对浒苔的生长和形态发育具有促进作用,而在三种抗生素联合处理胁迫条件下会导致相应的共附生菌丰度减少,从而影响浒苔的生长和形态发育。

参考文献:

- [1] CHRISTIE-OLEZA J A, SOUSONI D, LLOYD M, et al. Nutrient recycling facilitates long-term stability of marine microbial phototroph-heterotroph interactions[J]. *Nature Microbiology*, 2017, 2: 17100.
- [2] MURRAY R E, COOKSEY K E, PRISCU J C. Stimulation of bacterial DNA synthesis by algal exudates in attached algal-bacterial consortia[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1986, 52(5): 1177-1182.
- [3] JIANG L J, YANG L Y, XIAO L, et al. Quantitative studies on phosphorus transference occurring between *Microcystis aeruginosa* and its attached bacterium (*Pseudomonas* sp.)[J]. *Hydrobiologia*, 2007, 581: 161-165.
- [4] STEINBERG P D, DE NYS R, KJELLEBERG S. Chemical cues for surface colonization[J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2002, 28(10): 1935-1951.
- [5] STAUFENBERGER T, THIEL V, WIESE J, et al. Phylogenetic analysis of bacteria associated with *Laminaria saccharina*[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 64(1): 65-77.
- [6] CROFT M T, WARREN M J, SMITH A G. Algae need their vitamins[J]. *Eukaryotic Cell*, 2006, 5(8): 1175-1183.
- [7] FUENTES J L, GARBAYO I, CUARESMA M, et al. Impact of microalgae-bacteria interactions on the production of algal biomass and associated compounds[J]. *Marine Drugs*, 2016, 14(5): 100.
- [8] PEDERSEN M. The demand for iodine and bromine of three marine brown algae grown in bacteria - free cultures[J]. *Physiologia Plantarum*, 1969, 22(4): 680-685.
- [9] KINGMAN A R, MOORE J. Isolation, purification and quantitation of several growth regulating substances in *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyta)[J]. *Botanica Marina*, 1982, 25(4): 149-153.
- [10] MATSUO Y, IMAGAWA H, NISHIZAWA M, et al. Isolation of an algal morphogenesis inducer from a marine bacterium[J]. *Science*, 2005, 307(5715): 1598.
- [11] GHADERIARDAKANI F, COATES J C, WICHARD T. Bacteria-induced morphogenesis of *Ulva intestinalis* and *Ulva mutabilis* (Chlorophyta): a contribution to the lottery theory[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2017, 93(8): fix094.
- [12] WEISS A, COSTA R, WICHARD T. Morphogenesis of *Ulva mutabilis* (Chlorophyta) induced by *Maribacter* species(Bacteroidetes, Flavobacteriaceae)[J]. *Botanica Marina*, 2017, 60(2): 197-206.
- [13] PROVASOLI L, PINTNER I J. Bacteria induced polymorphism in an axenic laboratory strain of *Ulva lactuca* (Chlorophyceae)[J]. *Journal of Phycology*, 2010, 16(2): 196-201.
- [14] SPOERNER M, WICHARD T, BACHHUBER T, et al. Growth and thallus morphogenesis of *Ulva mutabilis* (Chlorophyta) depends on a combination of two bacterial species excreting regulatory factors[J]. *Journal of Phycology*, 2012, 48(6): 1433-1447.
- [15] ALSUFYANI T, WEISS A, WICHARD T. Time course exo-metabolomic profiling in the green marine macroalga *Ulva* (Chlorophyta) for identification of growth phase-dependent biomarkers[J]. *Marine Drugs*, 2017, 15(1): 14.
- [16] 王瑜. 黄海绿潮浒苔生长发育的分子机理研究[D]. 青岛: 山东大学(青岛), 2020.
WANG Yu. Molecular mechanism of growth and development of the green tides forming alga *Ulva prolifera* in the Yellow Sea[D]. Qingdao: Shandong University (Qingdao), 2020.
- [17] WICHARD T. Exploring bacteria-induced growth and morphogenesis in the green macroalga order Ulvales (Chlorophyta)[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 00086.
- [18] DELBRIDGE L, COULBURN J, FAGERBERG W, et al. Community profiles of bacterial endosymbionts in four species of *Caulerpa*[J]. *Symbiosis*, 2004, 37(1/3): 335-344.
- [19] FU H H, JIANG P, ZHAO J, et al. Comparative genomics of *Pseudomonas* sp. strain SI-3 associated with macroalga *Ulva prolifera*, the causative species for green tide in the Yellow Sea[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 01458.
- [20] LIU X J, ZHAO J, JIANG P. Easy removal of epiphytic bacteria on *Ulva* (Ulvophyceae, Chlorophyta) by vortex with silica sands[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(2): 476.
- [21] MEI X Y, WU C H, ZHAO J, et al. Community struc-

- ture of bacteria associated with drifting *Sargassum horneri*, the causative species of golden tide in the Yellow Sea[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 01192.
- [22] CROFT M T, LAWRENCE A D, RAUX-DEERY E, et al. Algae acquire vitamin B-12 through a symbiotic relationship with bacteria[J]. *Nature*, 2005, 438(7064): 90-93.
- [23] WICHARD T, CHARRIER B, MINEUR F, et al. The green seaweed *Ulva*: a model system to study morphogenesis[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6(72): 00072.
- [24] TAGHREED A, GIANMARIA C, MICHAEL D, et al. Macroalgal-bacterial interactions: Identification and role of thallusin in morphogenesis of the seaweed *Ulva* (Chlorophyta)[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2020, 71(11): 3340-3349.
- [25] KESSLER R W, WEISS A, KUEGLER S, et al. Macroalgal-bacterial interactions: Role of dimethylsulfoniopropionate in microbial gardening by *Ulva* (Chlorophyta)[J]. *Molecular Ecology*, 2017, 27(8): 1808-1819.
- [26] 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.
- [27] 周玲洁, 何培民, 黄希文, 等. 一种浒苔的无菌化培养方法, CN201310666901.X[P/OL]. [2013-20131210]. ZHOU Lingjie, HE Peimin, HUANG Xiwen, et al. A sterile culture method of *Ulva prolifera*, CN201310666901.X [P/OL]. [2013-20131210].
- [28] OTT F D. Synthetic media and techniques for the xenic cultivation of marine algae and flagellate[J]. *Virginia J Sci*, 1965, 16: 205-218.
- [29] CHEN R, CAI C, JIANG T, et al. Growth and metagenomics analysis of *Ulva prolifera* after antibiotic treatment[J]. *International Journal of Agriculture and Biology*, 2019, 21(5): 1031-1035.
- [30] BRADLEY P M. Plant hormones do have a role in controlling growth and development of algae[J]. *Journal of Phycology*, 2004, 27(3): 317-321.
- [31] MARSHALL K, JOINT I, CALLOW M E, et al. Effect of marine bacterial isolates on the growth and morphology of axenic plantlets of the green alga *Ulva linza*[J]. *Microbial Ecology*, 2006, 52(2): 302-310.
- [32] LESTON S, NUNES M, VIEGAS I, et al. The influence of sulfathiazole on the macroalgae *Ulva lactuca*[J]. *Chemosphere*, 2014, 100: 105-110.
- [33] 叶静, 张喆, 李富超, 等. 大型绿藻浒苔转化表达系统选择标记的筛选[J]. *生物技术通报*, 2006(3): 63-67. YE Jing, ZHANG Zhe, LI Fuchao, et al. Screen of selectable marker for transformation and expression system of green seaweed *Enteromorpha Clathrata*[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2006(3): 63-67.
- [34] BURKE C, THOMAS T, LEWIS M, et al. Composition, uniqueness and variability of the epiphytic bacterial community of the green alga *Ulva australis*[J]. *ISME Journal*, 2011, 5(4): 590-600.
- [35] HOLLANTS J, LELIAERT F, CLERCK O D, et al. What we can learn from sushi: a review on seaweed-bacterial associations[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2012, 83(1): 1-16.
- [36] 金柘. 绿潮浒苔共附生菌的多样性以及重要共附生菌影响其形态发育的研究[D]. 济南: 山东师范大学, 2018. JIN Zhe. Study on the diversity of the *Ulva prolifera* epiphytic bacteria in green tide and the effect of important Co-bacteria on the morphological development[D]. Jinan: Shandong Normal University, 2018.

Effects of antibiotics on the morphology and associated bacterial diversity of *Ulva prolifera*

BAO Qun-jing¹, BI Fang-ling¹, CAI Chun-er^{1, 2}, LI Ke-jun^{1, 2}, HE Pei-min^{1, 2}

(1. College of Marine Ecology and Environment, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Water Environment and Ecology Engineering Center of Higher Education, Shanghai 201306, China)

Received: May 19, 2022

Key words: *Ulva prolifera*; antibiotic; bacterial diversity; morphology and growth

Abstract: This study focuses on the effects of three antibiotics on the morphology and symbiotic bacterial diversity of *Ulva prolifera* in the Yellow Sea. Gametes released from *U. prolifera* were added to the culture medium containing three broad-spectrum antibiotics (penicillin G, neomycin sulfate, and polymyxin B). Compared with the control treatment, *U. prolifera* seedling growth was slow, cells shrank, and algal bodies failed to undergo normal morphogenesis under antibiotic treatment. 16S rDNA sequencing was used to analyze the diversity of symbiotic bacteria before and after antibiotic treatment. It was found that the abundance and diversity of the symbiotic bacteria of *U. prolifera* and the abundance of *Maribacter* decreased after antibiotic treatment. Algae were cocultured with the morphogenic compound thallusin (*Maribacter* spp. extract). Thallusin was found to promote the morphological recovery and growth of the algae. Antibiotics are speculated to be capable of affecting the morphology and growth of *U. prolifera* by inhibiting *Maribacter* and other bacteria. This work will establish a foundation for the in-depth study of the function of the symbiotic bacteria of *U. prolifera*.

(本文编辑: 赵卫红)