

纤细裸藻对5种抗生素的胁迫响应

张文慧¹, 窦勇¹, 高金伟¹, 姜智飞¹, 贾旭颖¹, 周文礼¹, 王永苓², 高建忠³

(1. 天津市水产生态与养殖重点实验室 天津农学院水产学院, 天津 300384;

2. 天津海友佳音生物科技股份有限公司, 天津 300350;

3. 天津市泥鳅育种与高效利用技术企业重点实验室, 天津 301800)

摘要:裸藻(*Euglena*)是一种重要的资源微藻,含有丰富的氨基酸、不饱和脂肪酸、维生素和裸藻糖等营养物质,并且裸藻没有细胞壁,其营养成分相对于其他藻类更容易被人体、水产动物吸收,开展裸藻集约化培养,对优化养殖环境具有十分重要的意义。为了研究裸藻的无菌化养殖,实验生态条件下,研究了不同浓度的5种抗生素(遗传霉素、氯霉素、青霉素、土霉素和链霉素)胁迫对纤细裸藻(*Euglena gracilis*)细胞密度及叶绿素a水平的影响。结果表明,在遗传霉素、土霉素和链霉素胁迫作用下,裸藻细胞密度显著降低($P < 0.05$),低于25 $\mu\text{g/mL}$ 的遗传霉素即可对裸藻生长与叶绿素a合成产生抑制,200 $\mu\text{g/mL}$ 的土霉素和25 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 的链霉素对裸藻叶绿素a合成有一定的促进作用;氯霉素和青霉素对裸藻生长有一定的促进效应,200 $\mu\text{g/mL}$ 的青霉素可以显著提高纤细裸藻的细胞密度和叶绿素a水平($P < 0.05$)。实验结果说明纤细裸藻对遗传霉素、土霉素和链霉素的敏感性较强,而氯霉素和青霉素可以作为纤细裸藻无菌系建立的备选抗生素,研究结果可为纤细裸藻的基因工程选择标记和无菌培养体系的建立提供参考。

关键词:抗生素;纤细裸藻;胁迫;响应

中图分类号:Q142 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-3075(2017)06-0048-09

裸藻(*Euglena*)又称绿虫藻,为淡水单细胞真核生物,同时具有动物与植物特性,既是一种“原生动物”,又有含叶绿素的叶绿体。裸藻为兼性营养(Ahmadinejad et al, 2007),既可以利用葡萄糖、谷氨酸、苹果酸等有机物生长(Takeyama et al, 1997; Afiukwa et al, 2007; Ogbonna, 2009),又可以进行光合作用制造营养,有效固定环境中的 CO_2 (Pulz et al, 2004)。纤细裸藻(*Euglena gracilis*)属于裸藻门、裸藻属,适宜在阳光充足、有机质丰富、静止的水体中生长(Juraj et al, 2015)。纤细裸藻含有丰富的氨基酸、不饱和脂肪酸、维生素、裸藻糖等营养物质(Mokrosnop et al, 2016),富含59种人体必需的营养元素,氨基酸种类尤其丰富,含有人类所需的全部

氨基酸;此外,纤细裸藻没有细胞壁,其营养物质更容易被人体及水产动物吸收利用。

抗生素是微生物的代谢产物,低浓度下就可以抑制其他微生物的生长,广泛应用于水产养殖业(Xu et al, 2007)。在微藻的培养过程中,抗生素在除菌、抑菌等方面表现出强大功能(Sena et al, 2011; 麻晓霞, 2012);而微藻比细菌具有更强的抗生素耐受性,选择性使用不同种类、不同浓度的抗生素进行无菌处理,更容易获得无菌藻系(林伟, 2000);此外,抗生素为微藻基因工程操作中常用的选择性标记。目前,抗生素可以调节和控制高等植物及微藻的生长发育,其作用效果及作用机理引起了广大学者的关注(Metcalf et al, 1996);纤细裸藻及共生细菌生长对抗生素胁迫的响应,国内外鲜有报道。有学者研究了原油、抗生素、盐度等胁迫下微藻的生长变化规律(于娟, 2004; 周立明, 2006; 周文礼, 2007a; Bi et al, 2012; 马帅, 2015; Aguilar-Machado et al, 2015; Gao et al, 2015)。本文在此基础上,选取5种抗生素,实验室条件下探讨其胁迫对纤细裸藻生长、叶绿素a水平的影响,并分析了可能的作用机理,以期对纤细裸藻无菌体系的建立提供基础资料。

收稿日期:2017-03-14

基金项目:天津市水产产业技术体系创新团队项目(ITTFRS2017005);天津市科技重大专项与工程项目(15ZXBFC00120);卫星海洋环境动力学国家重点实验室开放基金项目(SOEDI419);农业部南海渔业资源开发利用重点实验室开放基金(FREU2015-04);农业部水产品加工重点实验室开放基金(NYGJ201508);天津农学院研究生创新培育项目(2017YYPY031)。

作者简介:张文慧,1991年生,女,硕士研究生,研究方向为渔业资源保护与环境修复。E-mail: 773765349@qq.com

通信作者:周文礼,1969年生,男,研究员,主要从事水域生态学研究。E-mail: saz0908@126.com

1 材料与方法

1.1 微藻及培养

纤细裸藻由中国淡水藻种库提供。培养基使用去离子水配制, AF-6 培养液配方, 1.05 kg/cm^2 压力下, 121.3°C 灭菌 20 min 后使用。培养温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, 光照 $60 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 光暗比 12L : 12D。每天摇动培养瓶数次, 防止微藻附壁或下沉。

1.2 抗生素处理

遗传霉素 (Geneticin G418)、氯霉素 (Chloramphenicol, Cm)、青霉素 (Penicillin)、土霉素 (Oxytetracycline) 和链霉素 (Streptomycin) 购自索莱宝公司。抗生素母液的配制参照萨姆布鲁克等, 经细菌过滤器 ($0.22 \mu\text{m}$) 抽滤灭菌后使用。

在预实验的基础上, 将 G418、Cm、Penicillin、Oxytetracycline 和 Streptomycin 母液分别加入到对数生长期的纤细裸藻培养液中, 抗生素的终浓度为 0、25、50、75、100、200 $\mu\text{g/mL}$ (G418 为 0、25、50、75、100、125 $\mu\text{g/mL}$), 实验过程中保持抗生素终浓度不变。

1.3 实验方法

纤细裸藻的初始接种密度为 5×10^5 个/mL, 实验总体积为 1 500 mL (每瓶 100 mL, 3 个平行, 5 个处理组)。抗生素处理后, 每天取 1 次样, 使用血球计数板测定纤细裸藻的细胞密度; 用丙酮法 (宁修仁, 2005) 测定叶绿素 a 含量。

1.4 数据统计

采用 Excel 2003 整理数据及绘制图形, SPSS 19.0 进行单因素方差分析 (One-way ANOVA), 设定显著性水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 纤细裸藻对遗传霉素胁迫的响应

遗传霉素 (G418) 是一种氨基糖苷类抗生素, 其通过抑制转座子 Tn601 和 Tnn5 的基因, 干扰核糖体功能而阻断蛋白质合成, 对原核和真核细胞产生毒性。在遗传霉素胁迫作用下, 纤细裸藻的细胞密度和叶绿素 a 含量均发生了显著变化。

2.1.1 细胞密度变化 在遗传霉素胁迫下, 纤细裸藻生长受到抑制, 细胞密度急剧减少且显著低于对照组 ($P < 0.05$), 而且细胞形态发生较大变化 (图 1)。从实验第 2 天起, 裸藻细胞几乎全部变为球状, 游动性变差。实验前 3 d, 25、50、100 $\mu\text{g/mL}$ 处理组中, G418 对裸藻产生了一定的生长刺激作用,

细胞密度出现短暂上升, 但随着实验的进行, G418 抑制效应逐渐显现, 裸藻细胞密度逐渐下降, 第 9 天时, 100 $\mu\text{g/mL}$ 和 125 $\mu\text{g/mL}$ 的处理组中, 纤细裸藻密度降为 0, 且呈 G418 浓度越高、抑制作用越强的剂量 - 效应关系。

2.1.2 叶绿素 a 水平变化 在遗传霉素作用下, 裸藻细胞叶绿素 a 含量呈先升高、后降低的变化趋势 (图 2)。实验前 2 d, 遗传霉素对裸藻生长产生刺激效应, 细胞叶绿素 a 含量急剧升高, 达到初始水平的 3.0 ~ 3.5 倍, 然后进入平台期, 叶绿素 a 保持相对稳定, 最高达到 17.36 mg/L, 平台期各抗生素处理组叶绿素 a 含量无显著差异 ($P > 0.05$)。从实验第 5 天起, G418 抑制作用逐渐显现, 叶绿素 a 含量开始下降, 而且抑制效应存在浓度依赖的剂量 - 效应关系。

2.2 纤细裸藻对氯霉素胁迫的响应

2.2.1 细胞密度变化 氯霉素对纤细裸藻生长具有促进作用, 裸藻细胞密度呈不断上升趋势, 群体生物量不断积累 (图 3)。实验前 2 d, 裸藻细胞密度提升迅速, 而从第 2 天起生物量增长速度减缓, 至实验结束, 各氯霉素处理组的裸藻细胞密度达到初始水平的 2 ~ 3 倍。实验前 6 d, 浓度为 25 $\mu\text{g/mL}$ 的氯霉素对裸藻生长的促进效应最强, 而 75 $\mu\text{g/mL}$ 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 组刺激作用最弱; 至实验后期, 低浓度组和高浓度组交替呈现了最强的促进效应。

2.2.2 叶绿素 a 水平变化 在氯霉素作用下, 裸藻叶绿素 a 水平先迅速升高, 然后维持在一个相对稳定的状态 (图 4)。实验开始的前 2 d, 裸藻叶绿素 a 合成迅速, 尤其是 200 $\mu\text{g/mL}$ 组的增加速度最快, 达到 18.08 mg/L; 此后各试验组叶绿素 a 含量进入平台期, 基本维持在相对稳定的水平。总体上高浓度 (100 $\mu\text{g/mL}$ 和 200 $\mu\text{g/mL}$) 氯霉素对裸藻叶绿素 a 合成的促进作用强于低浓度组, 低剂量氯霉素对裸藻叶绿素 a 的生物合成无显著差异 ($P > 0.05$)。

2.3 纤细裸藻对青霉素胁迫的响应

青霉素通过抑制细菌细胞壁四肽侧链和五肽交连桥的结合, 阻碍细菌细胞壁合成从而发挥杀菌作用。在青霉素作用下, 纤细裸藻的细胞密度和叶绿素 a 含量均发生了显著变化。

2.3.1 细胞密度变化 在青霉素胁迫下, 从实验第 5 天起, 有的裸藻细胞开始变为球状, 细胞中的色素体明显减少, 藻体颜色逐渐变浅 (图 5)。实验前 3 d, 裸藻细胞密度大体呈上升趋势, 但青霉素的作用性质有根本不同。第 1 天, 青霉素浓度与细胞密

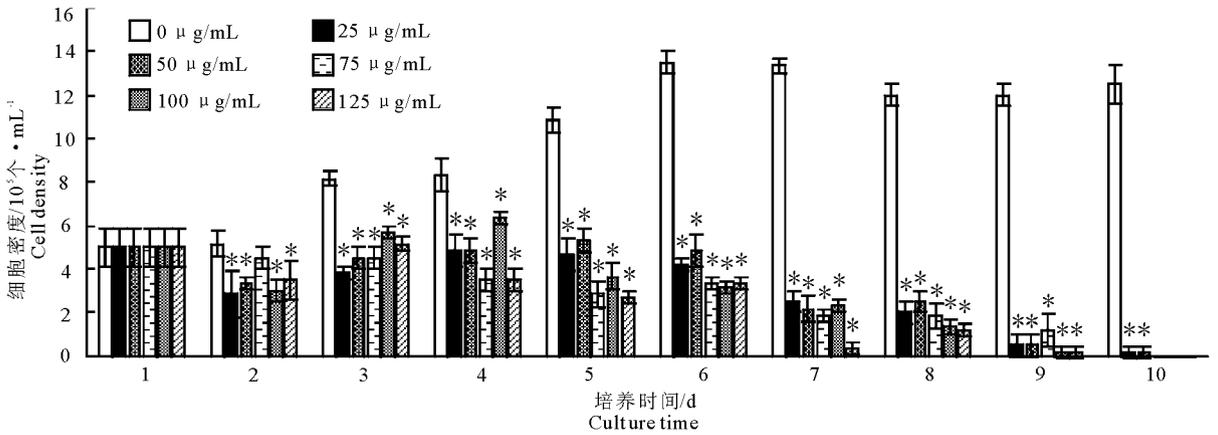


图1 遗传霉素对纤细裸藻生长的影响(*代表差异显著, $P < 0.05$)

Fig. 1 Effect of Geneticin on growth of *E. gracilis* (* significant difference, $P < 0.05$)

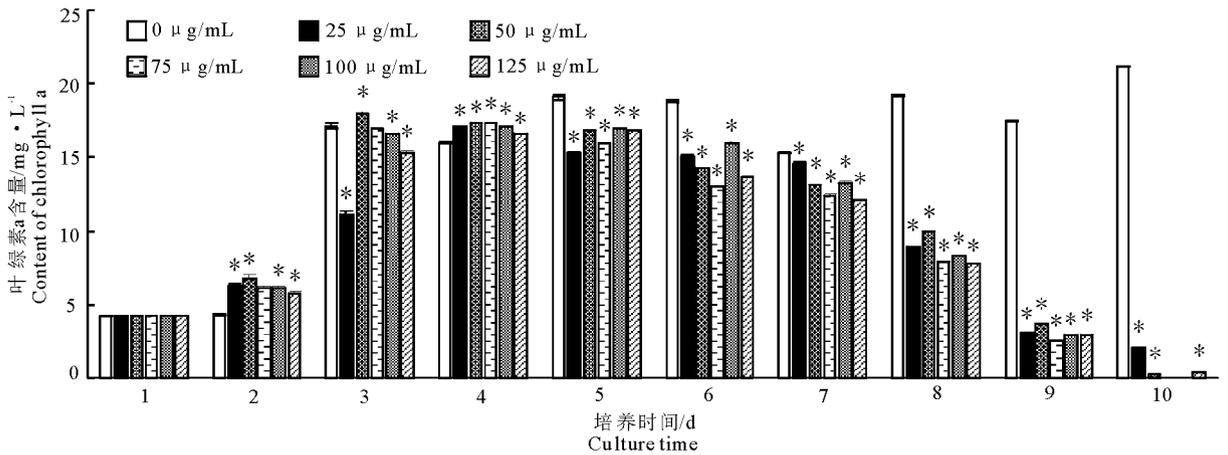


图2 遗传霉素对纤细裸藻叶绿素 a 含量的影响(*代表差异显著, $P < 0.05$)

Fig. 2 Effect of Geneticin on chlorophyll-a levels of *E. gracilis* (* significant difference, $P < 0.05$)

度呈正相关,而第2天则完全相反;实验第5-8天,各试验组裸藻生物量基本维持稳定,只有200 $\mu\text{g/mL}$ 组细胞密度增加迅速,最终达到11.33个/ mL ;实验第9天,低浓度(25 $\mu\text{g/mL}$ 和50 $\mu\text{g/mL}$)青霉素对裸藻生长的刺激作用最强,

200 $\mu\text{g/mL}$ 促进效应最弱。

2.3.2 叶绿素 a 水平变化 在青霉素作用下,裸藻叶绿素 a 迅速上升、然后维持稳态(图6)。实验前3 d,裸藻叶绿素 a 合成迅速;从第4天起,细胞叶绿素 a 水平逐渐趋于稳定。在绝大多数时间点,高浓

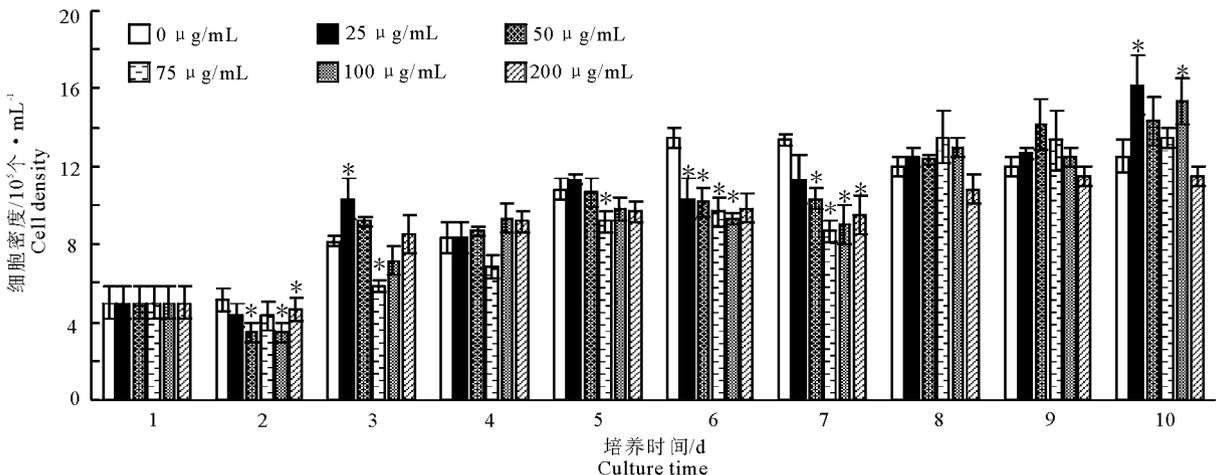


图3 氯霉素对纤细裸藻生长的影响(*代表差异显著, $P < 0.05$)

Fig. 3 Effect of Chloramphenicol on growth of *E. gracilis* (* significant difference, $P < 0.05$)

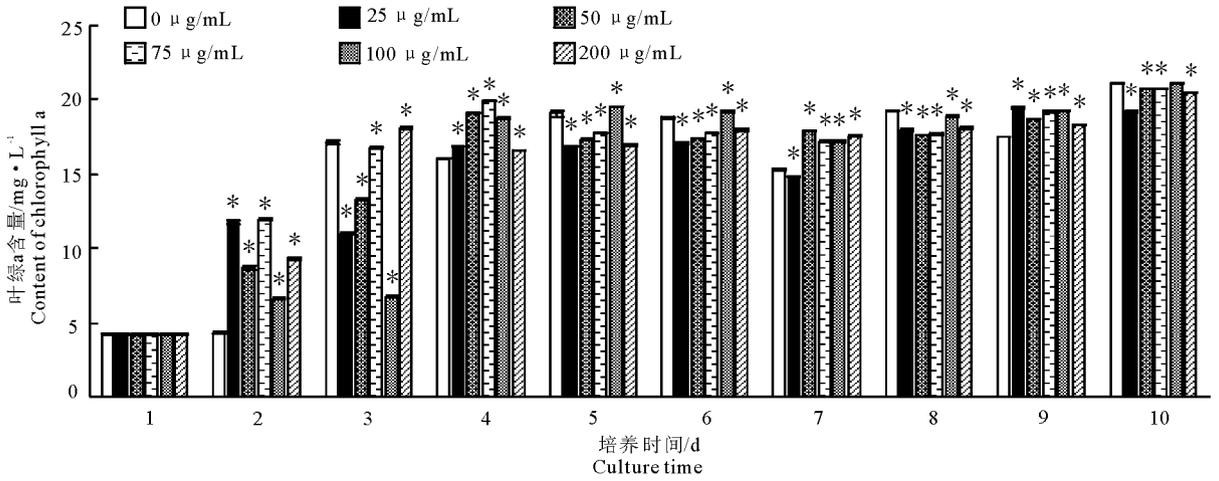


图 4 氯霉素对纤细裸藻叶绿素 a 含量的影响 (* 代表差异显著, $P < 0.05$)

Fig. 4 Effect of Chloramphenicol on chlorophyll-a levels of *E. gracilis* (* significant difference, $P < 0.05$)

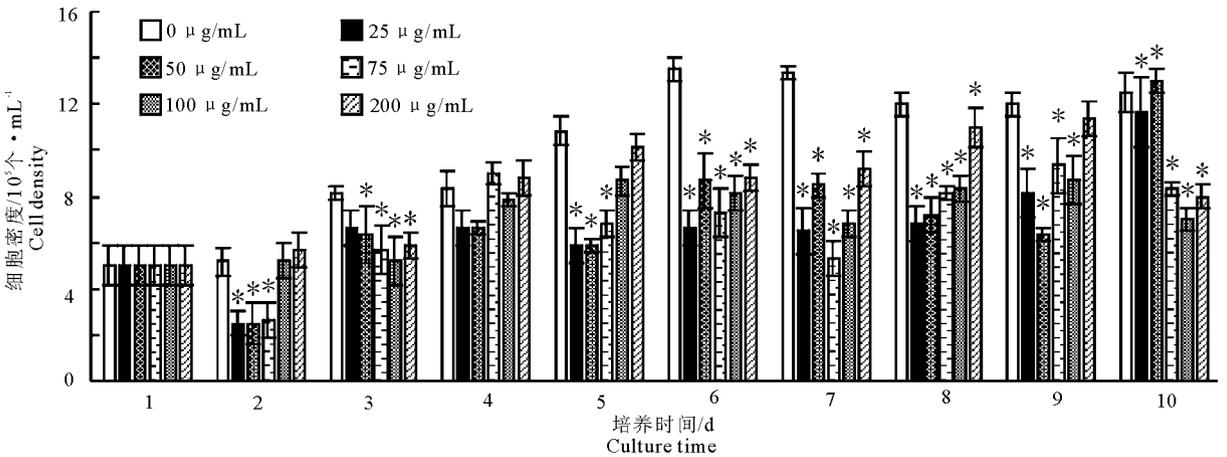


图 5 青霉素对纤细裸藻生长的影响 (* 代表差异显著, $P < 0.05$)

Fig. 5 Effect of Penicillin on growth of *E. gracilis* (* significant difference, $P < 0.05$)

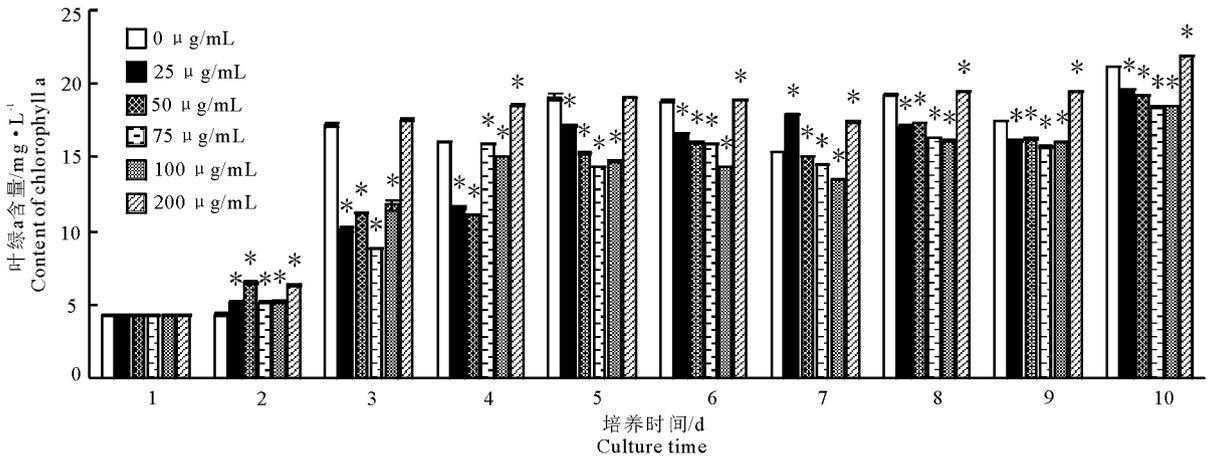


图 6 青霉素对纤细裸藻叶绿素 a 含量的影响 (* 代表差异显著, $P < 0.05$)

Fig. 6 Effect of Penicillin on chlorophyll-a levels of *E. gracilis* (* significant difference, $P < 0.05$)

度(200 μg/mL)青霉素对裸藻叶绿素 a 合成的刺激作用最强, 而低浓度组(25、50、75 μg/mL)裸藻叶绿素 a 含量与青霉素浓度呈负相关关系。

2.4 纤细裸藻对土霉素胁迫的响应

2.4.1 细胞密度变化 在土霉素胁迫作用下, 纤细裸藻生长受到抑制, 各抗生素处理组裸藻细胞密度

均显著低于对照组 ($P < 0.05$), 但抗生素处理组的裸藻细胞密度却大体呈上升的变化趋势 (图 7)。实验前 2d, 土霉素处理组裸藻细胞密度提高, 第 3 天有所回落, 从实验第 4 天起, 细胞密度持续缓慢上升。土霉素浓度对裸藻生长的作用较为复杂, 未呈现规律性变化的剂量-效应关系, 第 2 天时, 剂量越高促进效应越强, 而第 4、6、8 天, 低剂量 ($25 \mu\text{g/mL}$ 、 $50 \mu\text{g/mL}$) 和高剂量 ($100 \mu\text{g/mL}$ 、 $200 \mu\text{g/mL}$) 的土霉素均显示出对纤细裸藻较强的刺激生长作用。

2.4.2 叶绿素 a 水平变化 在土霉素胁迫作用下, 纤细裸藻叶绿素 a 合成受到抑制, 各抗生素处理组裸藻的叶绿素 a 水平均显著低于对照组 ($P < 0.05$), 其叶绿素 a 含量先缓慢上升、然后维持稳态 (图 8)。实验前 2 d, 裸藻叶绿素 a 水平迅速上升, 从此进入平台期, 维持相对稳定; 实验前 3 d, 高浓度抗生素 ($200 \mu\text{g/mL}$) 对叶绿素 a 合成的刺激作用最强, 此后的实验中, 土霉素浓度与叶绿素 a 含量呈负相关关系, 抗生素对裸藻叶绿素 a 的抑制效应表现出很强的剂量依赖特征。

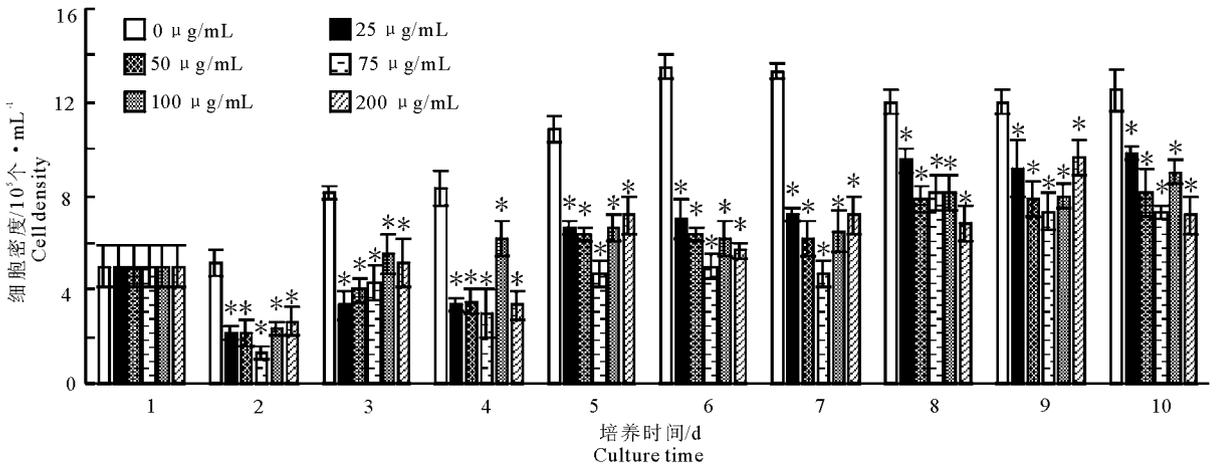


图 7 土霉素对纤细裸藻生长的影响 (*代表差异显著, $P < 0.05$)

Fig. 7 Effect of Oxytetracycline on growth of *E. gracilis* (* significant difference, $P < 0.05$)

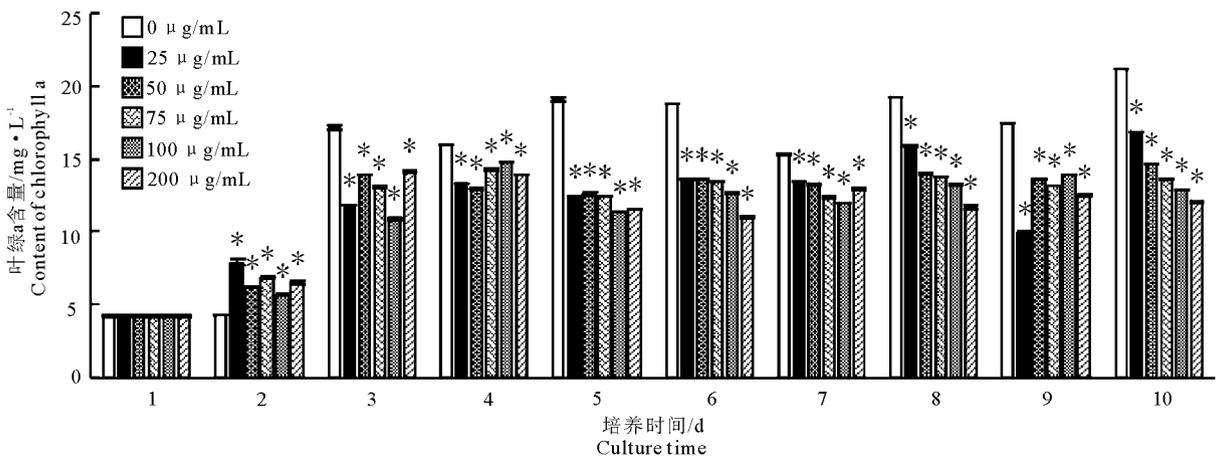


图 8 土霉素对纤细裸藻叶绿素 a 含量的影响 (*代表差异显著, $P < 0.05$)

Fig. 8 Effect of Oxytetracycline on chlorophyll-a levels of *E. gracilis* (* significant difference, $P < 0.05$)

2.5 纤细裸藻对链霉素胁迫的响应

链霉素主要通过与原核细胞 (如细菌) 核糖体 30S 亚单位结合, 抑制细菌蛋白质 (酶) 的合成, 使细菌不能正常生长或者代谢而死亡。在链霉素作用下, 纤细裸藻的细胞密度和叶绿素 a 含量都发生了显著变化。

2.5.1 细胞密度变化 链霉素对纤细裸藻主要起

到抑制作用, 大多数时间链霉素处理组的裸藻细胞密度均显著低于对照组 ($P < 0.05$), 但抗生素处理组的裸藻细胞密度呈现逐渐上升的变化趋势 (图 9)。实验前 5 d, 各处理组裸藻生长速率较快, 细胞密度迅速上升, 从第 6 天起生长速率放缓, 逐渐进入平台期。实验前 4 d, 裸藻生长主要受高剂量 ($100 \mu\text{g/mL}$ 和 $200 \mu\text{g/mL}$) 链霉素的刺激而加快,

此后链霉素对裸藻生长的影响未体现明显的剂量 - 效应关系。

2.5.2 叶绿素 a 水平变化 在链霉素作用下, 裸藻叶绿素 a 水平呈先上升后维持稳定的变化趋势(图 10)。实验前 2 d, 各试验组裸藻细胞叶绿素 a 水平迅速升高; 从第 3 天起, 叶绿素 a 合成速率放缓, 细胞叶绿素 a 含量逐渐进入平台期。实验中链霉素对

裸藻叶绿素 a 的作用差异很大; 第 1 天主要是刺激叶绿素 a 合成, 抗生素处理组叶绿素 a 含量显著高于对照组 ($P < 0.05$); 而第 2 天链霉素的抑制效应显现, 抗生素处理组叶绿素 a 含量显著低于对照组 ($P < 0.05$); 在其他时间点上, 主要是低剂量 (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 链霉素对裸藻叶绿素 a 合成具有一定的促进作用。

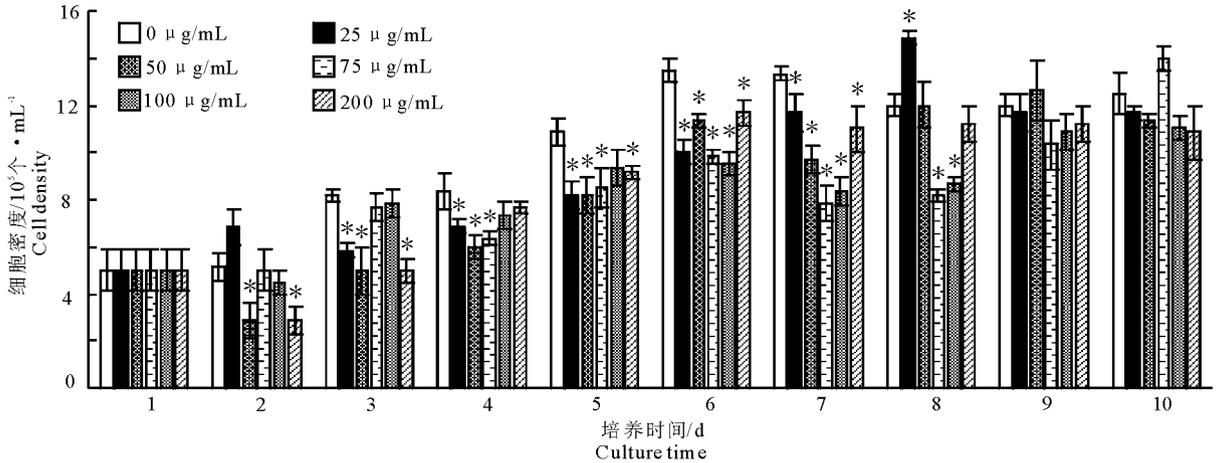


图 9 链霉素对纤细裸藻生长的影响 (* 代表差异显著, $P < 0.05$)

Fig. 9 Effect of Streptomycin on growth of *E. gracilis* (* significant difference, $P < 0.05$)

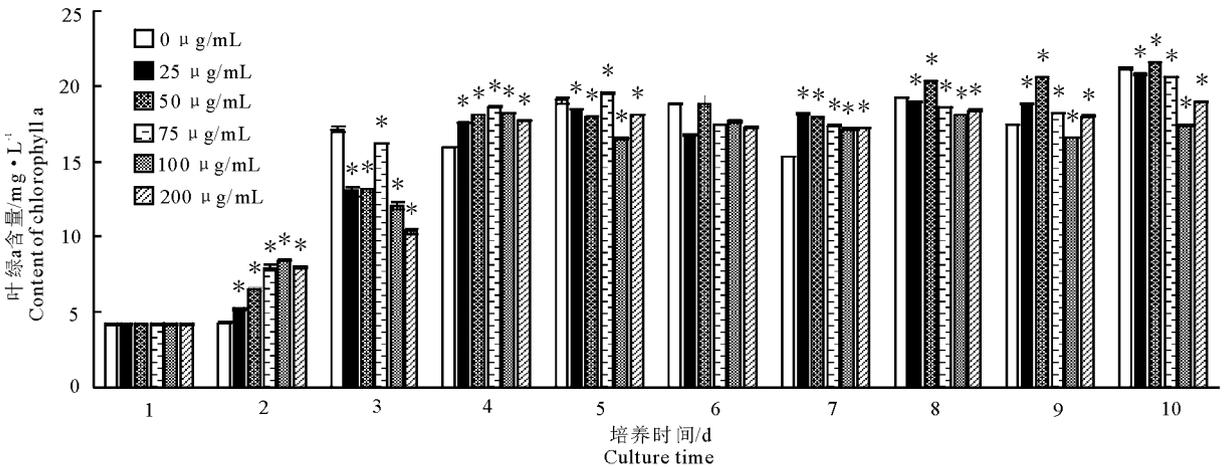


图 10 链霉素对纤细裸藻叶绿素 a 含量的影响 (* 代表差异显著, $P < 0.05$)

Fig. 10 Effect of Streptomycin on chlorophyll-a levels of *E. gracilis* (* significant difference, $P < 0.05$)

3 讨论

3.1 遗传霉素与链霉素对纤细裸藻的影响

G418 是一种氨基糖苷类抗生素, 通过干扰核糖体功能而阻断蛋白质合成, 对原核和真核细胞产生毒性。Vassortbruneau 等 (1996) 认为 Npt II (Neomycin phosphotransferase-II) 基因编码产物能够通过酶促磷酸化使氨基糖苷类抗生素失活而降低毒性, 但一般微藻细胞 Npt II 基因表达产物本底值极少, 因此许多微藻对 G418 胁迫十分敏感; 周文礼等

(2007b) 证实, 较低剂量的 G418 即可显著降低小球藻、金藻、新月菱形藻的叶绿素 a 含量; 而本研究也发现, 在 G418 胁迫下, 纤细裸藻细胞密度和叶绿素 a 水平显著降低 ($P < 0.05$)。链霉素也同属氨基糖苷类抗生素家族, 其作用机理与 G418 十分接近, 受到 G418 胁迫, 纤细裸藻细胞密度显著下降 ($P < 0.05$)。以上结果也进一步印证了 G418 和链霉素不合作为建立微藻无菌系的抗生素。

3.2 氯霉素对纤细裸藻的影响

氯霉素是从委内瑞拉链霉菌中分离提取的广谱

抗生素,对许多需氧革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌、厌氧的菌质体均有抑制作用(麻晓霞,2012)。不同微藻对氯霉素的胁迫敏感性有显著差异,有学者发现亚心形扁藻对 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的氯霉素敏感(屈建航,2004);而 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的剂量才能显著抑制小球藻生长(Zhou et al, 2007)。本研究证实,在不同时间点,25 ~ 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的氯霉素对纤细裸藻生长和叶绿素合成存在促进和抑制交替显现的混合效应,这可能与裸藻特殊的生理构造与代谢特征有关。

3.3 青霉素对裸藻的影响

青霉素通过抑制细菌细胞壁四肽侧链和五肽交连桥的结合,阻碍细菌细胞壁合成,从而发挥杀菌作用。有研究指出,低浓度青霉素一方面可以通过促进细胞内核酸与蛋白合成来提高叶绿素水平,另一方面能借助降低细胞中叶绿素酶活力来抑制叶绿素降解,从而提高细胞叶绿素含量(刘萍,2004)。本研究发现,200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的青霉素可以显著提高纤细裸藻的细胞密度和叶绿素 a 水平($P < 0.05$);造成这一差异的原因可能与裸藻没有细胞壁,从而使青霉素无作用位点有关。

3.4 土霉素对纤细裸藻的影响

本研究证实,在土霉素作用下,裸藻生长和大分子合成受到抑制,细胞密度和叶绿素 a 含量均显著降低($P < 0.05$),实验后期大幅下降;这可能与土霉素可以诱导微藻细胞内活性氧水平升高,对细胞造成不同程度的氧化损伤,从而发挥其生物毒性有关;这也证明了土霉素不适合作为建立微藻无菌系的抗生素。

4 结论

(1)纤细裸藻对遗传霉素 G418、链霉素和土霉素的敏感性较强;G418、土霉素和链霉素不适合作为建立裸藻无菌系所使用的抗生素。

(2)200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的青霉素可以显著提高纤细裸藻的细胞密度和叶绿素 a 水平($P < 0.05$),青霉素可以作为裸藻无菌系建立的备选抗生素。

参考文献

林伟,2000. 几种海洋微藻的无菌化培养[J]. 海洋科学, 24(10):4-6.

刘萍,丁义峰,齐付国,等,2004. 医用抗生素对高等植物的作用研究现状[J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 32(2):66-70.

麻晓霞,马丽萍,石勋祥,等,2012. 微藻对常用抗生素敏感性的研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 40(1):83-

86.

马帅,曲良,李晓红,等,2015. 四种溢油分散剂对青岛大扁藻和小新月菱形藻细胞密度和叶绿素含量的影响[J]. 生态科学, 34(6):9-15.

宁修仁,孙松,2005. 海湾生态系统观测方法[M]. 北京:中国环境科学出版社.

屈建航,2004. 5种绿藻对几种常用抗生素的敏感性[J]. 大连工业大学学报, 23(2):111-113.

于娟,唐学玺,张培玉,等,2004. CO_2 加富对 UV-B 辐射胁迫下亚心形扁藻光合作用和膜脂过氧化以及抗氧化酶活性的影响[J]. 植物学报(英文版), 46(6):682-690.

周立明,孟祥红,肖慧,等,2006. 3种多环芳烃和 UV-B 辐射对 3种赤潮微藻生长的作用[J]. 武汉大学学报(理学版), 52(6):773-777.

周文礼,王悠,肖慧,等,2007a. 不同海洋饵料微藻对抗生素的敏感性差异分析[J]. 武汉大学学报(理学版), 53(2):249-254.

周文礼,王悠,肖慧,等,2007b. 三种海洋微藻叶绿素 a 含量对抗生素胁迫的响应变化[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 37(6):957-960.

Afiukwa C A, Ogbonna J C, 2007. Effects of mixed substrates on growth and vitamin production by *Euglena gracilis*[J]. African Journal of Biotechnology, 6(22):2612-2615.

Aguilar-Machado D E, Benavente-Valdés J R, Montañez J C, et al, 2015. Effect of salt-stress on the production of pigments by *Chlorella sorokiniana* under photoheterotrophic culture [C]// XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.

Ahmadinejad N, Dagan T, Martin W, 2007. Genome history in the symbiotic hybrid *Euglena gracilis* [J]. Gene, 402(1/2):35-39.

Bi X, Xing K, Zhou W, et al, 2012. Detection of acylated homoserine lactone (AHL) in the heterotrophic bacteria Z-TG01 and its ecological action on the algae, *Chlorella vulgaris* [J]. Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh, 64:557-560.

Gao J, Zhou W, Chen R, 2015. Acute Toxicity by Four Kinds of Oil Dispersants in *Cynoglossus semilaevis* [A]// Advances in Applied Biotechnology[C]. Springer Berlin Heidelberg:219-222.

Juraj K, Schwartzbach S D, 2015. *Euglenoid flagellates*: a multifaceted biotechnology platform[J]. Journal of Biotechnology, 202:135-145.

Metcalfe D D, Astwood J D, Townsend R, et al, 1996. Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 36(S1):165-186.

- Mokrosnop V M, Polishchuk A V, Zolotareva E K, 2016. Accumulation of α -tocopherol and β -carotene in *Euglena gracilis*, Cells Under Autotrophic and Mixotrophic Culture Conditions[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 52(2):230–236.
- Ogbonna J C, 2009. Microbiological production of tocopherols: current state and prospects[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 84(2):217–225.
- Pulz O, Gross W, 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 65(6):635–648.
- Sena L, Rojas D, Montiel E, et al, 2011. A strategy to obtain axenic cultures of *Arthrospira* spp. cyanobacteria [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 27(5):1045–1053.
- Takeyama H, Kanamaru A, Yoshino Y, et al, 1997. Production of antioxidant vitamins, β -carotene, vitamin C, and vitamin E, by two-step culture of *Euglena gracilis* Z[J]. Biotechnology & Bioengineering, 53(2):185–190.
- Vassortbruneau C, Lesagedescauses M C, Martel J L, et al, 1996. CAT III chloramphenicol resistance in *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida* isolated from calves [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 38(2):205–213.
- Xu W H, Zhang G, Zou S C, et al, 2007. Determination of selected antibiotics in the Victoria Harbour and the Pearl River, South China using high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Environmental Pollution, 145(3):672–679.
- Zhou W, Wang Y, Xiao H, et al, 2007. Sensitivity of Several Marine Microalga to Antibiotics[J]. Journal of Wuhan University, 53(2):249–254.

(责任编辑 万月华)

Response of *Euglena gracilis* to Five Kinds of Antibiotic Stress

ZHANG Wen-hui¹, DOU Yong¹, GAO Jin-wei¹, JIANG Zhi-fei¹, JIA Xu-ying¹,
ZHOU Wen-li¹, WANG Yong-ling², GAO Jian-zhong³

(1. Tianjin Agricultural University, College of Fisheries, Tianjin Key Laboratory of Aqua-ecology
and Aquaculture, Tianjin 300384, P. R. China;

2. Tianjin Ocean Pal Carol Biotech Co., Ltd, Tianjin 300350, P. R. China;

3. Tianjin Enterprise Key Laboratory of Loach Breeding and High-efficient Utilizing
Technology, Tianjin 301800, P. R. China)

Abstract: As an excellent nutritional resource, the microalgae *Euglena gracilis* is rich in complex nutrients, including amino acids, unsaturated fatty acids and vitamins. Additionally, the nutrients derived from *E. gracilis* are more easily absorbed by humans and aquatic animals than from other algae because it has no cell walls. Therefore, it is important to develop intensive cultivation methods and optimize the breeding environment for *E. gracilis*. In this study, we investigated the variation of cell density and chlorophyll-a (Chl-a) levels of *E. gracilis* cultured exposed to different concentrations of five antibiotics: Geneticin, Chloramphenicol, Penicillin, Oxytetracycline and Streptomycin, to explore sterile culture methods and provide basic data for establishing a sterile system for *E. gracilis*. The experiment was carried out under laboratory conditions. *E. gracilis* was cultured to the logarithmic phase for the test, with a cell density of 5×10^5 cells/mL under the following conditions: temperature of $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, illumination of $60 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ and a light-dark cycle of 12 : 12. Antibiotics were added to culture solutions to give Chloramphenicol, Penicillin, Oxytetracycline and Streptomycin concentrations of 25, 50, 75, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and geneticin concentrations of 25, 50, 75, 100, 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and each treatment was run in triplicate. After treatment, culture solutions were sampled once a day for determination of cell density and Chl-a content. Geneticin, Oxytetracycline, and Streptomycin significantly decreased cell density ($P < 0.05$) and Geneticin, at concentrations under 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, significantly inhibited growth and Chl-a synthesis. Oxytetracycline (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and Streptomycin (25 – 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) increased Chl-a content, while Chloramphenicol and Penicillin promoted growth. Penicillin (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) significantly enhanced cell density and Chl-a levels ($P < 0.05$). Results indicate that *E. gracilis* is sensitive to Geneticin, Oxytetracycline, and Streptomycin and that Chloramphenicol and Penicillin can be used as antibiotics for axenic culture of *E. gracilis*. The results will also serve as reference for identifying a selective marker of *E. gracilis* genetic engineering and the axenic culture of microalgae.

Key words: antibiotic; *Euglena gracilis*; stress; response