



论文

中国知名大学及研究院所专栏 中国科学院烟台海岸带研究所专刊

土霉素对扇形游仆虫(原生生物)种群生长及遗传多样性的影响

付晓, 龚骏*, 张倩倩

中国科学院烟台海岸带研究所微生物生态与物质循环实验室, 烟台 264003

* 联系人, E-mail: jgong@yic.ac.cn

收稿日期: 2016-02-11; 接受日期: 2016-03-22; 网络版发表日期: 2016-08-26

国家自然科学基金(批准号: 41176143)和山东省杰出青年基金项目(批准号: JQ201210)资助

摘要 抗生素作为一类环境污染物在海岸带生境中广泛存在, 它们对海洋原生生物遗传多样性的影响还不清楚. 本工作以一种海洋纤毛虫原生生物(扇形游仆虫(*Euplotes vannus*))为例, 研究了一种常见四环类抗生素(土霉素)对其生长的影响, 并通过单细胞(个体)分析, 探索了抗生素对其大核基因组中核糖体小亚基 rRNA 基因(SSU rDNA)序列多样性的影响. 结果表明, 与对照组相比, 3个土霉素处理组(1, 10和20 $\mu\text{g/mL}$)中纤毛虫的自然增长率随土霉素浓度升高显著降低, 细胞大小则呈增大趋势. SSU rDNA 序列单倍型多样性、核苷酸多样性和 GC 含量随抗生素浓度升高呈现降低趋势. 序列单核苷酸多态性位点的碱基转换频率远高于颠换, 但随土霉素浓度升高, 颠换频率呈增加趋势. 在20 $\mu\text{g/mL}$ 处理组中, SSU rDNA 序列中胸腺嘧啶(T)突变为胞嘧啶(C)的频率显著升高, 而腺嘌呤(A)突变为鸟嘌呤(G)的频率显著降低. 这表明, 海岸带抗生素污染对纤毛虫表型与生理产生显著影响的同时也导致基因组内 rDNA 遗传结构的变化, 显示纤毛虫原生生物可通过基因组高度的可塑性来快速适应抗生素胁迫.

关键词 扇形游仆虫, 抗生素, 污染物, 种群生长, 单细胞基因组分析, 遗传多样性

在人类活动密集的海岸带环境下, 用于人类和兽类疾病治疗及水产养殖的四环类抗生素在海岸带生境中广泛存在, 它们在环境中的残留所造成的潜在毒性和生态风险受到越来越多的关注^[1,2]. 环境中抗生素的累积造成大量抗生素耐药微生物的形成^[2], 它们在低浓度时就能抑制或干扰它种生物(病原菌、动植物、癌细胞等)的生命活动, 对生态环境造成威

胁^[3]. 根据 Halling-Sorensen^[4]的报道, 四环类抗生素的主要作用就是抑菌, 具有广泛的抗菌活性, 其通过与核蛋白体 30S 亚基结合, 阻止氨基酰 tRNA 向 30S 亚基的 A 位结合, 抑制蛋白质合成, 从而影响细胞生长. 原生生物是单细胞真核生物(如微藻、鞭毛虫、纤毛虫、孢子虫、放射虫、肉足虫等)的总称, 广泛分布于淡水、海洋水体与沉积物及土壤环境中, 在初级生

引用格式: 付晓, 龚骏, 张倩倩. 土霉素对扇形游仆虫(原生生物)种群生长及遗传多样性的影响. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 1113-1120
Fu R, Gong J, Zhang Q Q. Effects of oxytetracycline on population growth and genetic diversity of *Euplotes vannus* (Marine Protist). Sci Sin Vitae, 2016, 46: 1113-1120, doi: 10.1360/N052016-00058

产、微型食物网的物质循环与能量传递中发挥重要作用^[5]。抗生素除抑制细菌生长外,也对真核生物产生影响,例如,Lützhøft 等人^[6]研究发现,四环类抗生素能显著抑制微型藻类的生长,包括铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)、角毛藻(*Rhodomonas salina*)和羊角月牙藻(*Selenastrum capricornutum*)等;另外,Yang 等人^[7]的研究证明,微藻比甲壳类和鱼类对抗菌剂,尤其是四环类抗生素更敏感。Kim 和 Carlson^[8]研究发现,10 mg/L 的四环类抗生素能够诱导雄性日本青鳉(*Oryzias latipes*)体内卵黄蛋白的形成,造成内分泌失调。Gracia 等人^[9]研究发现,抗生素能够调节人肾上腺皮质癌细胞中生产类固醇基因的表达,诱导激素的产生,对人体健康造成威胁。土霉素(oxytetracycline, OTC)是海岸带水产养殖环境中广泛使用的一类四环素类抗生素,用以抑制水产养殖中的致病菌,如假单胞菌(*Pseudomonas*)、气单胞菌(*Aeromonas* sp.)、发光杆菌(*Phytophthora litoralis*)等^[10]。针对土霉素影响纤毛虫生长及生理活动的研究也已有报道,Gomiero 和 Viarengo^[11]研究发现,3.2 μmol/L~32 mmol/L 的土霉素能显著抑制游仆虫(*Euplotes crassus*)的个体生存能力、细胞分裂和内吞效率,降低溶酶体膜的稳定性。尽管如此,抗生素对海洋原生生物遗传多样性的影响至今未有报道。

核糖体 RNA 基因,又被称为核糖体 DNA 或 rDNA,在真核生物中是一段串联重复序列。在当前环境微生物学或微生物生态学研究,SSU rDNA 作为通用的分子标记被广泛应用于环境样品中(可培养、未可培养的)原生生物与真菌的分子鉴定与系统分类^[12,13]。30 年来,对动物、植物 rDNA 进化模式与机制的研究结果已被广泛接受:真核生物的 rDNA 通常遵循协同进化模式(concerted evolution),同一生物体的核基因组中各个 rDNA 重复单元的序列完全相同或变异极小^[14,15]。最近,该观点在某些真核生物类群的研究中受到了质疑。如在几个真菌的基因组中发现了较低程度的 rDNA 序列多样性^[15];在亚历山大藻属(*Alexandrium*)^[16]、齿轮虫(*Elphidium macellum*)^[17]中,基于单个克隆或个体的测序研究发现了一些高频率的 rDNA 序列突变。最近,作者研究组也报道了单个纤毛虫细胞中 rDNA 具有极其高的测序多态性及拷贝数^[18]。目前,维持原生生物基因组内部(或单一细胞内)rDNA 极高多样性的生物学机制还不清楚;

rDNA 序列多样性是否随着环境条件的改变而改变,如何改变等问题还有待解答。

本研究提出抗生素作为一种污染胁迫可能改变纤毛虫基因组内 rDNA 多样性格局的假设。为了验证这个假设,作者以一种海洋纤毛虫(扇形游仆虫(*Euplotes vannus*))为研究对象,在提供种群生长、细胞大小等基础数据的同时,重点探索了抗生素胁迫对 rDNA 为靶标的遗传多样性的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞培养与抗生素处理

扇形游仆虫来源于中国海洋大学原生动物学实验室纤毛虫种质库。虫体置于 60 mm×15 mm 一次性塑料培养皿中纯培养,所需海水取自烟台近海(滤纸过滤,120 °C 灭菌 20 min),添加灭活的大肠杆菌(*E. coli*)作为食物,最后加入灭菌海水溶解的土霉素,设置 3 个浓度(1, 10 和 20 μg/mL)的处理组,不加抗生素的为对照组。对照组和 3 个处理组各设置 3 个重复。起始接种密度均为 3 ind./mL(个体/毫升),培养温度为 21 °C,培养时间为 30 天。

1.2 生长指标及细胞大小的测定

(1) 种群密度的测定。搅动使混合均匀后,对照组和 3 个处理组的 3 个平行培养样品各取 3 份 100 μL 虫液样本,卢戈氏液(Lugo's)固定,显微镜下计数,并换算成种群密度(ind./mL),3 份样本取平均作为每个平行培养基的种群密度,对 3 个平行培养基再取平均作为该组的纤毛虫种群密度^[19]。

(2) 种群自然增长率(r)的测定。种群自然增长率(r)的计算根据公式:

$$\ln N_t = \ln N_0 + rt, \quad (1)$$

式中 N_t 为时间 t 时的种群密度, N_0 是指初始种群密度。增长率以最小二乘法回归分析得出,以时间为横坐标,因变量是纤毛虫密度(ind./mL)的自然对数,只有在指数增长期的数据才用来计算增长率,其斜率即自然增长率 r 值^[20]。

(3) 世代时间(G)的计算。自由生纤毛虫是通过二分裂的方式进行种群增长的,因此其世代时间(G)与种群自然增长率(r)之间的关系为:

$$G = \ln 2 / r, \quad (2)$$

代入上述所得 r 值, 以计算 G ^[20].

(4) 细胞大小测定. 在种群增长指数期的中期, 用微吸管吸取对照组和3个处理组的3个平行培养样品中的扇形游仆虫各10只, 在20倍显微镜(Olympus BX51, 日本)下观察并拍照, 测定其长宽. 由于扇形游仆虫背腹扁平, 其厚度在显微镜下测量误差较大, 以其腹面观椭圆形轮廓面积来指代细胞大小. 并根据公式:

$$S = \pi ab/4, \quad (3)$$

计算细胞大小. 式中 S 为细胞大小, a 为细胞长度, b 为细胞宽度.

1.3 单细胞 DNA 提取及 rDNA 克隆测序

在种群增长指数期的中期, 用微吸管吸取对照组和3个处理组的3个平行培养样品中的扇形游仆虫各3只, 虫体经饥饿、清洗后取单个细胞放入PCR管中, 用 RED Extract N-Amp Tissue PCR Kit(Sigma, 美国)提取基因组DNA^[21].

聚合酶链反应(PCR)对单细胞基因组 SSU rRNA 基因进行扩增, 引物为: EuK82F(5'-GAADTCGYG-AAYGGCTC-3') 和 EuK516R(5'-ACCAGACTTGCC-CTCC-3'). PCR 反应体系含有 2.5 μ L 10 \times PCR 缓冲液, 0.5 μ L 扩增引物, 0.5 μ L dNTP, 0.12 μ L Taq 保真酶, 200 ng DNA 模板, 双蒸水补足至 25 μ L. PCR 程序设定为 95 预变性 3 min; 94 变性 30 s, 56 退火 30 s, 72 延伸 1 min, 30 个循环; 72 延伸 10 min. PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定并切胶回收. 用 TIANGel Midi Purification Kit (TIANGEN, 北京)胶回收试剂盒纯化, 插入克隆载体 pTZ57R/T(Fermentas, 加拿大), 并转入大肠杆菌 DH5 α 菌株. 蓝白斑筛选阳性克隆, 用 M13-F(5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') 和 EuK516R 做 PCR 检测并送测序公司进行测定.

1.4 序列及数据处理

测序所得序列用软件 BioEdit^[22]进行处理, 多重序列比对用 ClustalW^[22], 并运用软件 MEGA5.0^[23]计算序列间遗传距离, 核苷酸和单倍型多样性分析使用软件 DnaSP5.0^[24]. 用软件 SPSS13.0(SPSS, 美国)对最大种群密度和稳定期平均密度进行单因子方差分析, 两组之间细胞大小的差异用 Excel 中的 t 检验

进行显著性检验.

2 结果

2.1 土霉素处理对扇形游仆虫种群密度、种群自然增长率及世代时间的影响

扇形游仆虫生长曲线如图1所示. 对照组及3个土霉素处理组(1, 10 和 20 μ g/mL)中, 种群增长均存在停滞期、指数期、稳定期和衰退期4个时期. 对照组中, 种群经过1天的生长停滞期后进入指数增长期, 经过4天的指数增长后达到密度高峰(780 ind./mL), 之后进入稳定期(平均密度为763 ind./mL). 加入土霉素, 1 μ g/mL 组的生长停滞期及指数增长时间和对照组相比差异不明显, 但10和20 μ g/mL 组的生长停滞期显著延长, 指数增长期显著缩短. 最大种群密度和稳定期平均种群密度单因子方差分析表明, 1 μ g/mL 组的种群密度(742 ind./mL)与对照组相比差异不明显($P > 0.05$); 10和20 μ g/mL 组种群密度则显著性降低, 最大种群密度分别约是对照组的0.74和0.65倍($P < 0.01$), 平均种群密度分别约是对照组的0.74和0.66倍($P < 0.01$)(表1). 对照组中, 扇形游仆虫种群自然增长率(r)为(0.814 \pm 0.016)/天, 世代时间(G)为(0.853 \pm 0.016)天. 3个处理组中, r 随土霉素浓度升高而依次降低, G 则正好相反(表2).

2.2 土霉素处理对扇形游仆虫细胞大小的影响

对照组中, 扇形游仆虫细胞长度(a)平均值为47.21 μ m, 宽度(b)平均值为25.05 μ m, 大小(S)平均值为928.93 μ m²($n=21$)(图2). 加入土霉素后, a 和 b 受到轻微影响, S 在对照组及3个土霉素处理组之间

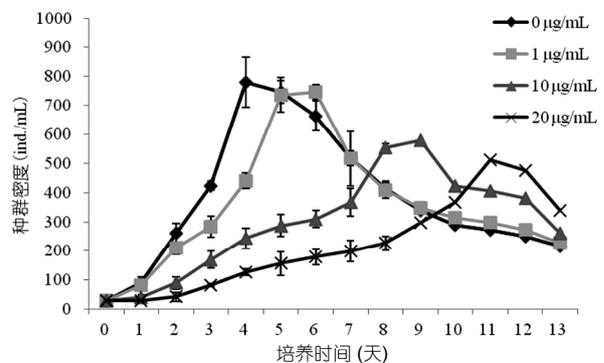


图 1 不同土霉素处理条件下的种群增长曲线

表 1 不同土霉素处理条件下, 最大种群密度和稳定期平均密度的单因子方差分析^{a)}

土霉素浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	最大种群密度				平均种群密度			
	0	1	10	20	0	1	10	20
0	-	0.53	$4.2 \times 10^{-3**}$	$7.4 \times 10^{-6**}$	-	0.53	$9.6 \times 10^{-7**}$	$7.7 \times 10^{-9**}$
1	-	-	0.01*	$1.7 \times 10^{-3**}$	-	-	$4.9 \times 10^{-6**}$	$3.1 \times 10^{-8**}$
10	-	-	-	0.22	-	-	-	0.02*
20	-	-	-	-	-	-	-	-

a) *: 差异显著($P < 0.05$); **: 差异极显著($P < 0.01$)

表 2 不同土霉素处理条件下的种群增长率(r)和世代时间(G)

土霉素浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	种群增长率 r (/天)	世代时间 G (天)
0	0.814 ± 0.016	0.853 ± 0.016
1	0.390 ± 0.004	1.734 ± 0.025
10	0.269 ± 0.007	2.583 ± 0.064
20	0.218 ± 0.003	3.175 ± 0.039

不显著($P > 0.05$). a 随土霉素浓度升高, 呈先降低后升高的趋势, 在高浓度处理(20 $\mu\text{g/mL}$)组, 细胞最长, 平均值为 47.55 μm , 比对照组增加了 0.34 μm ($P = 0.75$); 1 和 10 $\mu\text{g/mL}$ 组中, a 分别比对照组减小了 0.39 和 1.36 μm ($P = 0.74$; 0.20). b 随土霉素浓度的升高, 呈逐渐增加的趋势, 在高浓度处理组, 细胞最宽, 平均值为 26.82 μm , 比对照组增加了 1.77 μm ($P = 0.12$). S 也随土霉素浓度的升高, 呈逐渐增大的趋势, 在高浓度处理组, 细胞最大, 平均值为 1010.96 μm^2 , 比对照组增加了 82.02 μm^2 ($P = 0.16$)(图 2). 总体趋势为, 扇形游仆虫细胞大小随土霉素浓度升高而增大.

2.3 土霉素处理对扇形游仆虫 SSU rDNA 序列多样性的影响

在对照组及 3 个土霉素处理组中分别获得 47,

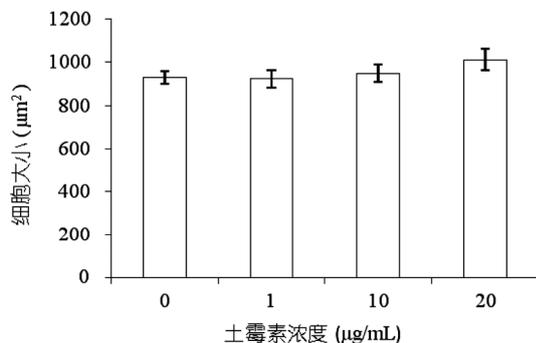


图 2 土霉素处理对扇形游仆虫细胞大小的影响

48, 48 和 49 条 SSU rDNA 序列. 引物 EuK82F/516R 扩增得到的 rDNA 序列片段长度均为 479 bp, 使用运用软件 MEGA5.0 软件得到的序列遗传距离分析结果显示, 对照组中, 序列间遗传距离的变化范围是 0%~1.1%, 平均遗传距离为 0.17%. 加入土霉素后, 序列间遗传距离的变化范围缩小, 最小值出现在 10 $\mu\text{g/mL}$ 组, 为 0%~0.4%(表 3). 随土霉素浓度的升高, 序列间平均遗传距离逐渐降低, 最小值在 20 $\mu\text{g/mL}$ 组为 0.12%, 比对照组减小了 0.05%(表 3).

序列单核苷酸多态性分析结果显示, 随土霉素浓度的升高, 序列多态性位点数减少. 对照组中多态性位点最多(13 个), 高浓度处理组多态性位点最少(10 个)(表 3). 随土霉素浓度的升高, 序列单倍型多样性(Hd)和核苷酸多样性(π)逐渐降低. 对照组中 Hd 值(0.577)和 π 值(0.169)最高, 而高浓度处理组中 Hd 值(0.424)和 π 值(0.124)最低(表 3).

对序列碱基突变的统计发现, 对照组中, SSU rDNA 序列中单核苷酸多态位点(single nucleotide polymorphism, SNP)碱基之间的颠换(A/G C/T)仅有 1 个(占总突变的 5%), 转换频率远高于颠换, 转换频率/颠换频率的比值为 19:1. 在碱基转换中, 腺嘌呤(A) 鸟嘌呤(G)的转换最多, 为 14 个(占总突变的 70%), 其次为胸腺嘧啶(T) 胞嘧啶(C)(4 个, 占总突变的 20%). 加入土霉素后, 碱基突变的类型有明显改变, 其中, 在高浓度处理组, 碱基颠换频率增加(5% 增至 13%), 转换频率/颠换频率的比值降低为 15:2. 另外, 碱基转换中 T C 显著增加(20% 增至 53%), 而 A G 显著减少(70% 减至 27%)(图 3).

对 SSU rDNA 序列 GC 含量的比较发现, 对照组序列的 GC 含量均值最高(43.07%), 其次为高浓度处

理组(43.06%), 1和10 μg/mL处理组GC含量最低, 均为43.05%(图4)。高浓度处理组中, 序列GC含量的

表3 不同土霉素处理条件下, 单细胞SSU rDNA的序列多样性

土霉素浓度 (μg/mL)	长度 (bp)	成对遗传距离($\times 10^{-2}$)				多态性位点(p)	单倍型多样性 (Hd)	核苷酸多样性 ($\pi, \times 10^{-2}$)	序列数(n)
		平均值 (Mean)	最大值(Max)	最小值(Min)	标准差(SD)				
0	479	0.17	1.10	0.00	0.19	13 (2.7)	0.577	0.169	47
1	479	0.14	0.60	0.00	0.15	11 (2.3)	0.553	0.144	48
10	479	0.13	0.40	0.00	0.14	11 (2.3)	0.546	0.133	48
20	479	0.12	0.80	0.00	0.17	10 (2.1)	0.424	0.124	49

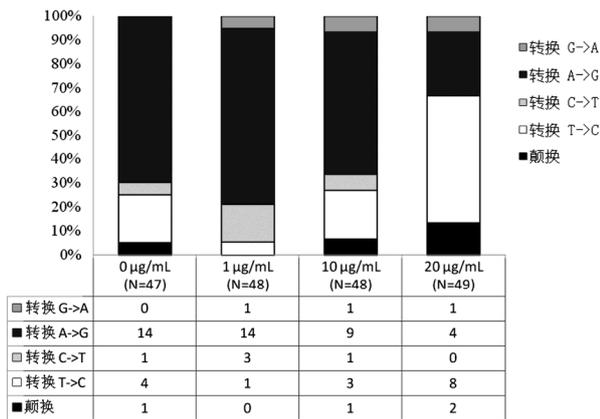


图3 土霉素处理对SSU rDNA序列SNP碱基突变的影响

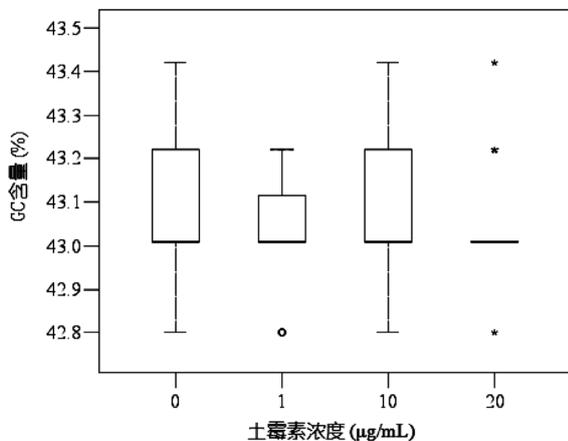


图4 土霉素处理对SSU rDNA序列GC含量的影响

变化最明显, 序列之间的差异性很大, 存在多个偏离中位数较远的极大或极小值(图4)。

3 讨论

种群自然增长率及世代时间是种群生态学中的重要参数, 对于研究水体生态系统中种群对环

境胁迫的适应情况具有重要意义^[20]。本研究发现, 随土霉素浓度的升高, 扇形游仆虫种群自然增长率显著降低, 世代时间显著增加, 该结果与3.2 μmol/L~32 mmol/L的土霉素显著抑制游仆虫的细胞分裂, 降低种群增长率的结果很相似^[11]。表明土霉素的存在会抑制环境中纤毛虫种群的生长。另外, Campa-Córdova等人^[25]研究发现, 3~12 mg/L氯霉素, 0.5~12 mg/L红霉素和呋喃唑酮显著抑制海洋微型藻类(等鞭金藻和角毛藻)的种群增长。因此, 抗生素污染可能会对多种海洋原生生物种群的生长造成显著影响。

细胞在进行分裂前普遍存在一个生长停滞期, 对照组中, 停滞期约为1天的时间, 加入土霉素后, 10和20 μg/mL的处理浓度显著延长了停滞期时间, 该结果与0.025~0.05 mg/mL的氯霉素显著延长褶皱臂尾轮虫(*Brachionus plicatilis*)雌体种群增长停滞期的结果很相似^[26]。可以依据Fyda和Wiackowski^[27]的观点, 将这一现象解释为, 接种于对照组和3个土霉素处理组的扇形游仆虫初始密度较低, 直至个体数目达到一定值后才能迅速进入指数增长期, 土霉素浓度越高对细胞生长的抑制作用越明显, 因此越高土霉素浓度处理组中的细胞, 需花费越多的时间累积到一定的个体数目, 即生长停滞期越长。

对照组中, 扇形游仆虫同一单细胞中SSU rDNA序列之间遗传距离可达到1.1%, Hd值为0.577, π 值为 0.169×10^{-2} 。该结果与作者研究组先前对缘毛类与寡毛类纤毛虫单细胞rDNA测序所得序列的Hd值(0.758~0.998)和 π 值(0.089×10^{-2} ~ 0.297×10^{-2})基本相当^[18]。这显示, 基因组内rDNA的极高的序列多态性在多个纤毛虫类群中均有出现, 因此可能在纤毛虫类群中具有普遍性。

本研究发现, 扇形游仆虫SSU rDNA单倍型多样

性、核苷酸多样性、GC 含量则随抗生素浓度升高而呈现降低趋势, 这一结果支持了本课题组提出的假

设, 即污染胁迫可能改变暴露中的纤毛虫基因组内 rDNA 的多样性格局。这暗示纤毛虫基因组内 rDNA 多样性的维持与变化具有高度的可塑性, 在某种程度上可能由细胞所处的环境条件及污染胁迫来决定。Balaband 等人^[28]研究发现, 加入抗生素, 生长速度缓慢的大肠杆菌细胞比生长迅速的更易存活, 抗生素选择性杀死群体中大部分细胞, 只有那些生长缓慢的细胞通过持续多代的繁殖得以存活, 即抗生素对大肠杆菌细胞类型有选择性作用。本课题组发现, 土霉素处理导致基因组内序列多样性降低, 表明土霉素对大核基因组内的 SSU rDNA 基因也具有一定的选择性。由于核糖体 RNA 与核糖体蛋白共同构成蛋白质合成的工厂, 基因组内 rDNA 多样性的降低可能与胁迫状态下细胞中蛋白合成的需求有关。为了抵抗抗生素胁迫, 细胞可能需要一些特定的核糖体来满足加快合成特定蛋白的需要。

抗生素胁迫下 rDNA 序列的多态性主要来源于单个碱基的改变(单核苷酸多态), 与本课题组之前对采自自然水体纤毛虫 rDNA 多态性报道一致^[18]。DNA 序列中碱基突变分为转换(嘌呤和嘌呤之间的替换, 如 A → G, 或嘧啶和嘧啶之间的替换, 如 C → T)和颠换(嘌呤和嘧啶之间的替换, 如 A/G → C/T), 且通常核苷酸转换频率要高于颠换, Zong 等人^[29]指出, 人体细胞中转换频率/颠换频率的比值为 2.01, 而该比值在几个真菌类群的 SSU rDNA 中为 20.74~28.72^[30]。本文结果显示, 扇形游仆虫 SSU rDNA 的转换频率/颠换频率的比值接近真菌而远大于人类。已有研究

结果显示, 环境胁迫会造成碱基颠换频率的增加, 例

如, Partridge 等人^[31]研究发现, 吸烟人群(长期暴露于核苷酸诱变剂——砷)与非吸烟人群相比, 细胞中线粒体 DNA 碱基的颠换频率明显升高; Takechi 等人^[32]发现, 在大肠杆菌 (*E. coli*) 中, 二氢吡嗪 (dihydropyrazine, DHP) 能够抑制细胞生长和诱导产生突变株, DHP 诱导的突变细胞染色体 *rpoB* 基因序列中 G/C → A/T 的颠换频率显著增加(由 18.8% 增至 52.2%, 或 54.1%)。而本文结果与之相似, 随土霉素浓度的升高, 碱基颠换频率增加, 进一步证实了环境胁迫对碱基颠换的影响, 但产生这一现象的分子机制仍需进一步的研究。另外, 碱基 T → C 转换频率显著增加, A → G 转换频率显著降低, 预示了土霉素可能更倾向于诱导胞嘧啶(C)的产生。

对于“细胞即个体”的原生生物来说, 细胞中 rDNA 的数量及其序列变异程度的了解是正确解释他们物种多样性及相对数量的重要基础^[33,34]。本研究首次从分子水平理解与认识纤毛虫对抗生素胁迫的响应, 发现土霉素处理使纤毛虫基因组内 rDNA 序列多样性及其碱基组成发生改变, 表明基因组内 rDNA 可对环境胁迫作出响应; 由于原生生物基因组中 rDNA 具有多个拷贝, 是维持基因组完整性的重要组成部分, 显示原生生物可通过基因组高度的可塑性以适应抗生素污染胁迫。其他环境因子(如温度、盐度、重金属及有机污染物等)对基因组内 rDNA 多样性的影响以及 rDNA 表达的质与量等还需要进一步研究。搞清这些问题对理解原生生物 rDNA 非协同进化的生物学机制及全球环境变化背景下单细胞生物的生态适应以及微进化等具有重要意义。

参考文献

- 1 Xie X, Zhou Q, He Z, et al. Physiological and potential genetic toxicity of chlortetracycline as an emerging pollutant in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Environ Toxicol Chem*, 2010, 29: 922–928
- 2 Dagherir R, Drogui P. Tetracycline antibiotics in the environment: a review. *Environ Chem Lett*, 2013, 11: 209–227
- 3 Park S, Choi K. Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on aquatic ecosystems. *Ecotoxicology*, 2008, 17: 526–538
- 4 Halling-Sorensen B. Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive farming. *Chemosphere*, 2000, 40: 731–739
- 5 Sherr E B, Sherr B F. Significance of predation by protists in aquatic microbial food webs. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2002, 81: 293–308
- 6 Lützhøft H H, Halling-Sørensen B, Jørgensen S E. Algal toxicity of antibacterial agents applied in Danish fish farming. *Arch Environ Contam Toxicol*, 1999, 36: 1–6
- 7 Yang L H, Ying G G, Su H C, et al. Growth-inhibiting effects of 12 antibacterial agents and their mixtures on the freshwater microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environ Toxicol Chem*, 2008, 27: 1201–1208

- 8 Kim S C, Carlson K. Temporal and spatial trends in the occurrence of human and veterinary antibiotics in aqueous and river sediment matrices. *Environ Sci Technol*, 2007, 41: 50–57
- 9 Gracia T, Hilscherova K, Jones P D, et al. Modulation of steroidogenic gene expression and hormone production of H295R cells by pharmaceuticals and other environmentally active compounds. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2007, 225: 142–153
- 10 孟思妤, 孟长明, 陈昌福. 盐酸土霉素对水产动物致病菌的抗菌作用(2). *渔业致富指南*, 2012, 10: 62–63
- 11 Gomiero A, Viarengo A. Effects of elevated temperature on the toxicity of copper and oxytetracycline in the marine model, *Euplotes crassus*: a climate change perspective. *Environ Pollut*, 2014, 194: 262–271
- 12 Edgcomb V P, Kysela D T, Teske A, et al. Benthic eukaryotic diversity in the Guaymas Basin hydrothermal vent environment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 7658–7662
- 13 Marie D, Zhu F, Balague V, et al. Eukaryotic picoplankton communities of the Mediterranean Sea in summer assessed by molecular approaches (DGGE, TTGE, QPCR). *FEMS Microbiol Ecol*, 2006, 55: 403–415
- 14 Dover G. Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. *Nature*, 1982, 299: 111–117
- 15 Ganley A R D, Kobayashi T. Highly efficient concerted evolution in the ribosomal DNA repeats: total rDNA repeat variation revealed by whole-genome shotgun sequence data. *Genome Res*, 2007, 17: 184–191
- 16 Miranda L N, Zhuang Y, Zhang H, et al. Phylogenetic analysis guided by intragenomic SSU rDNA polymorphism refines classification of “*Alexandrium tamarense*” species complex. *Harmful Algae*, 2012, 16: 35–48
- 17 Pillet L, Fontaine D, Pawlowski J. Intra-genomic ribosomal RNA polymorphism and morphological variation in *Elphidium macellum* suggests inter-specific hybridization in foraminifera. *PLoS One*, 2012, 7: e32373
- 18 Gong J, Dong J, Liu X, et al. Extremely high copy numbers and polymorphisms of the rDNA operon estimated from single cell analysis of oligotrich and peritrich ciliates. *Protist*, 2013, 164: 369–379
- 19 王梅, 许恒龙, 陶振铨, 等. 海洋纤毛虫实验生态学研究 I: 不同浓度葡萄糖对种群增长的影响. *应用与环境生物学报*, 2003, 9: 627–630
- 20 潘莹, 姜勇, 张伟, 等. 不同温度对 3 种海洋纤毛虫种群增长的影响. *应用与环境生物学报*, 2010, 16: 807–811
- 21 Gong J, Kim S J, Kim S Y, et al. Taxonomic redescription of two ciliates, *Protogastrostyla pulchra* n. g., n. comb. and *Hemigastrostyla enigmatica* (ciliophora: spirotrichea, stichotrichia), with phylogenetic analyses based on 18S and 28S rRNA gene sequences. *J Eukaryot Microbiol*, 2007, 54: 468–478
- 22 Tippmann H F. Analysis for free: comparing programs for sequence analysis. *Brief Bioinform*, 2004, 5: 82–87
- 23 Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*, 2011, 28: 2731–2379
- 24 Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 2009, 25: 1451–1452
- 25 Campa-Córdova A I, Luna-González A, Ascencio F, et al. Effects of chloramphenicol, erythromycin, and furazolidone on growth of *Isochrysis galbana* and *Chaetoceros gracilis*. *Aquaculture*, 2006, 260: 145–150
- 26 王金秋, 周叶平, 林隽姬, 等. 两种抗生素对褶皱臂尾轮虫种群增长的影响. *复旦学报(自然科学版)*, 2008, 3: 347–353
- 27 Fyda J, Wiackowski K. Benefits and costs of predator-induced morphological changes in the ciliate *Colpidium kleini* (Protozoa, Ciliophora). *Eur J Protistol*, 1998, 34: 118–123
- 28 Balaban N Q, Merrin J, Chait R, et al. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science*, 2004, 305: 1622–1625
- 29 Zong C H, Lu S J, Chapman A R, et al. Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell. *Science*, 2012, 338: 1622–1626
- 30 Simon U K, Weiss M. Intragenomic variation of fungal ribosomal genes is higher than previously thought. *Mol Biol Evol*, 2008, 25: 2251–2254
- 31 Partridge M A, Huang S X, Kibriya M G, et al. Environmental mutagens induced transversions but not transitions in regulatory region of mitochondrial DNA. *J Toxicol Environ Health A*, 2009, 72: 301–304
- 32 Takechi S, Yamaguchi T, Nomura H, et al. Mutation spectrum induced by dihydropyrazines in *Escherichia coli*. *Biol Pharm Bull*, 2006, 29: 17–20
- 33 Crosby L D, Criddle C S. Understanding bias in microbial community analysis techniques due to rrn operon copy number heterogeneity. *Biotechniques*, 2003, 34: 790–794, 796, 798 passim
- 34 Thornhill D J, Lajeunesse T C, Santos S R. Measuring rDNA diversity in eukaryotic microbial systems: how intragenomic variation, pseudogenes, and PCR artifacts confound biodiversity estimates. *Mol Ecol*, 2007, 16: 5326–5340

Effects of Oxytetracycline on Population Growth and Genetic Diversity of *Euplotes vannus* (Marine Protist)

FU Rao, GONG Jun & ZHANG QianQian

Laboratory of Microbial Ecology and Matter Cycles, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China

In order to understand the potential impact of antibiotic pollutants on marine protists, the marine ciliate *Euplotes vannus* was selected as a model organism to test the effects of oxytetracycline (OTC), a tetracycline antibiotic widely used and distributed in coastal environments. The effects of OTC on growth, cell size, and small subunit ribosomal DNA (SSU rDNA) sequence polymorphisms were documented based on single-cell analysis. For the three OTC treatments used (concentrations of 1, 10, and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), the growth rate decreased significantly with increasing OTC concentrations, whereas cell size showed a tendency of increase, compared with the control. SSU rDNA of single cells generally exhibited lower haplotype and nucleotide diversity, along with slightly lower GC content at higher OTC concentrations. For single nucleotide polymorphisms in SSU rDNA sequences, the frequency of transition was much higher than that of transversion in both control and OTC treatments, although the frequency of transversion increased with increasing dose of OTC. In the treatment with the highest OTC dose, T to C transversion occurred more frequently and A to G reduced substantially, compared with the control. This study indicates that antibiotic pollution has a significant impact on phenotype and physiology of marine ciliates and can lead to changes in the genetic structure of genomic rDNA. It also highlights the high plasticity of protist genomes, which allows these unicellular eukaryotes to rapidly adapt to antibiotic stress.

***Euplotes vannus*, antibiotic, pollutants, population growth, single-cell analysis, genetic diversity**

doi: 10.1360/N052016-00058