

基于分子技术的1株产毒藻藻际细菌多样性分析

杨小茹^{1,2}, 苏建强^{1,2}, 郑小伟¹, 周月霞¹, 田蕴¹, 宁修仁³, 郑天凌^{1,2,3*}

(1. 厦门大学生命科学学院, 滨海湿地生态系统教育部重点实验室, 厦门 361005; 2. 厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室, 厦门 361005; 3. 国家海洋局海洋生态系统与生物地球化学重点实验室, 杭州 310012)

摘要: 采用构建16S rDNA克隆文库的方法, 对实验室保存的1株产毒塔玛亚历山大藻在不同时期的藻际细菌群落多样性进行了分析. 限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)结果表明, 塔玛亚历山大藻藻际微生物的16S rDNA克隆文库中的克隆子总共可分为34种基因型, 选取各谱型的代表克隆子测定其16S rDNA片段核苷酸序列, 将所获得的序列与GenBank数据库进行BLAST比对, 结果表明所有基因型分属于2个细菌类群: 变形细菌门(Proteobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes). 在延滞期的藻培养液中, α -Proteobacteria占36.4%, β -Proteobacteria占9.1%, γ -Proteobacteria占27.3%, 拟杆菌门(Bacteroidetes)占27.3%; 在指数后期的培养液中, α -Proteobacteria占53.3%, β -Proteobacteria占13.3%, γ -Proteobacteria占6.7%, 拟杆菌门(Bacteroidetes)占26.7%; 在稳定期的培养液中, α -Proteobacteria占47.8%, β -Proteobacteria占8.7%, γ -Proteobacteria占21.7%, δ -Proteobacteria占4.3%, 拟杆菌门(Bacteroidetes)占17.4%; 其中有不少克隆子与已知序列同源性低于94%, 表明塔玛亚历山大藻藻际环境中附着有新的未开发的微生物资源, 这些细菌可能在微藻的消长过程中起着重要的调控作用, 所以本研究结果在赤潮微生物调控中具有重要的理论意义和应用价值.

关键词: 塔玛亚历山大藻; 藻际; 16S rDNA克隆文库; 细菌多样性

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)01-0271-09

16S rDNA Clone Library Analysis of Microbial Diversity Associated with the PSP-producing Dinoflagellate *Alexandrium tamarense*

YANG Xiao-ru^{1,2}, SU Jian-qiang^{1,2}, ZHENG Xiao-wei¹, ZHOU Yue-xia¹, TIAN Yun¹, NING Xiu-ren³, ZHENG Tian-ling^{1,2,3}

(1. Ministry of Education of Key Laboratory for Coast and Wetland Ecosystem, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 3. Key Laboratory of Marine Ecosystem and Biogeochemistry of State Oceanic Administration, Hangzhou 310012, China)

Abstract: The composition of bacterial community in the *Alexandrium tamarense* culture was determined by analyzing the 16S rDNA clone libraries. 16S rRNA gene was amplified by using the total DNA extracted from the *A. tamarense* culture at three growth stages as templates. 34 different restriction fragment length polymorphism(RFLP) patterns of the clones were obtained from the three libraries. Clones representing each RFLP patterns were sequenced and phylogenetic analysis revealed that the Proteobacteria and the Bacteroidetes group can be the dominant component in the phycosphere microflora. Results showed that in the lag phase, α -Proteobacteria(36.4%), γ -Proteobacteria(27.3%) and Bacteroidetes(27.3%) were the dominant group; in the late-exponential phase, the clones belonged to α -Proteobacteria(53.3%), β -Proteobacteria(13.3%), γ -Proteobacteria(6.7%), and Bacteroidetes(26.7%); and in the stationary phase, the community was comprised of α -Proteobacteria(47.8%), β -Proteobacteria(8.7%), γ -Proteobacteria(21.7%), δ -Proteobacteria(4.3%) and Bacteroidetes(17.4%). The results also suggest that a part of the bacteria associated with *A. tamarense* are uncultured and novel species. And these bacteria may play a major role in regulating the processes of algal bloom initiation, maintenance and decline. So these results may provide us great academic and practical importance in controlling the algal blooms by microbes.

Key words: *Alexandrium tamarense*; phycosphere; 16S rDNA clone library; microbial diversity

作为海洋生态系统中最为重要的初级生产者, 海洋微藻在生长过程中不断向周围环境释放碳水化合物、氨基酸、酶、肽类、脂类、维生素、有机酸、毒素、挥发性物质以及抑制和促进因子等多种代谢产物, 这些产物统称为胞外产物(extracellular products, ECP), 构成海水中溶解有机物(DOM)的重要来源^[1~3]. 微藻分泌的这些有机物质使微藻细胞的周围聚集了大量以细菌为主的微生物, 形成和微藻相

互作用、具有独特结构和功能的藻际微生物群落.

收稿日期: 2008-05-21; 修订日期: 2008-07-11

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目(2008AA09Z408); 长江学者和创新团队发展计划项目(40521003); 国家重点基础研究发展规划(973)项目(2006CB400605); 国家海洋局海洋生态系统与生物地球化学重点实验室开放基金项目(LMEB200601); 教育部博士点专项基金项目(20050384002); 中国博士后科学基金项目

作者简介: 杨小茹(1980~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为环境微生物学. E-mail: xryang@xmu.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: wshwzh@xmu.edu.cn

1972 年, Bell 等^[4]认为, 微藻胞外产物对细菌食物链有着很重要的作用, 形成了自微藻细胞向外到一定距离的对细菌生长有刺激作用的区域, 类似于陆上的根际环境, 他把这个区域命名为“藻际环境”(Phycosphere)。

实验室保存的藻种, 多数是单种培养, 一般是通过显微挑取后传代培养得到的, 都有一个独特的主要由细菌组成的藻际微生物群落与之共存, 其中有些细菌粘附在藻细胞表面, 有些则自由生活在藻类培养液中^[5-7]。这些细菌能影响到藻种的某些生理特性, 比如毒素的合成, 其中机制尚不明确^[8-9], 甚至这些细菌中的某些种类自己就能产生麻痹性贝毒^[10]。Hold 等^[11]发现, 去除藻类培养液中的细菌后, 塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense* NEPCC 407)和 *A. lusitanicum* NEPCC 253 的生长和毒素的组成并未受到明显的影响, 然而毒素的产量却有所下降。Uribe 等^[9]也发现无菌链状亚历山大藻(*A. catenella*)的生长同有菌状态下相似, 但总毒力减到有菌状态下的五分之一。

藻际环境中生存的细菌和微藻有着独特的生态关系, 微藻在新陈代谢过程中产生并分泌于胞外的有机物质, 被周围细菌摄取利用, 一部分经细菌代谢后以矿物或其他形式释放回海洋中, 又为藻类生长提供营养及必需的生长因子, 藻菌之间的相互作用在微食物环中物质生物地球化学循环过程中起着关键性的作用^[12]。细菌对微藻分泌物的趋化性^[4, 13-15]表明微藻对藻际细菌群落结构的形成可能起决定性的作用, 一些研究也表明藻际细菌和海洋中的自由细菌在系统发育上有着明显的区别^[16, 17]。

塔玛亚历山大藻是一种可产生麻痹性贝毒的海洋甲藻, 该藻适应能力强、生存范围广, 在我国北至胶州湾、南至大鹏湾都有发现。由塔玛亚历山大藻产生的麻痹性贝毒可以通过贝类的累积而达到使人中毒的浓度。因而, 深入开展对塔玛亚历山大藻的研究具有重要理论意义和实用价值。

Jasti 等^[18]在对塔玛亚历山大藻藻际细菌的系统发育多样性的分析中发现, 不同区域来源的塔玛亚历山大藻藻际细菌组成大多是相同的, 群落结构比较稳定, 一些产毒的藻株还有着紧密联系的特殊种属的细菌。藻际细菌对微藻的生长、繁殖、孢囊形成、死亡都具有重要作用^[19-21], 调控着微藻的生长过程, 而一些特殊种属的藻际细菌可能在其中起主要作用。细菌抑(杀)藻作用的研究已有较多相关成果, 而天然藻际细菌群落与微藻相互作用关系因其

复杂性尚鲜见报道。本研究克服了传统微生物培养技术的缺陷, 采用直接提取塔玛亚历山大藻藻际微生物基因组 DNA, 构建 16S rDNA 克隆文库的方法来分析不同生长时期藻培养液中的细菌组成及其多样性, 从而更全面深入地了解藻际微生物群落结构, 以为更深入探讨细菌调控微藻生长提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 藻种

实验主要用的藻种为单细胞塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*), 由暨南大学水生生态研究所提供。藻类所用培养液为 f/2 培养液^[22]。藻类置于室内三角瓶中培养, 温度为 $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 光暗周期为 12 h:12 h。

1.1.2 主要试剂和仪器

DNA 通用纯化试剂盒, 为厦门鹭隆生物公司产品; 质粒 pMD18-T(PCR 产物克隆用载体)、限制性内切酶(*Afa* I 和 *Msp* I)和 PCR 扩增试剂均购自 TaKaRa 公司; 大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 为实验室保存; PCR 扩增仪: 德国 Biometra; GIS-2008 凝胶成像分析系统: Tanon 天能科技有限公司。

1.1.3 引物

引物由上海英骏生物技术有限公司合成。Eubac 27F^[23]: 5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3', Eubac 1492 R^[23]: 5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'; M13-47: 5'-CGCCAGGGTTTCCCACTCACGAC-3', RV-M: 5'-AGCGGATAACAATTTACACAGG-3'。

1.2 藻培养液总 DNA 制备

参照 Mayali 等^[24]的 CTAB 法, 并作适当改进。将塔玛亚历山大藻培养至不同生长时期(延滞期, 培养至第 6 d, 藻细胞浓度为 $3.0 \times 10^3 \sim 3.3 \times 10^3$ cells $\cdot\text{mL}^{-1}$; 指数后期, 培养至 15 d, 藻细胞浓度为 $1.6 \times 10^4 \sim 1.8 \times 10^4$ cells $\cdot\text{mL}^{-1}$; 稳定期, 培养至第 22 d, 藻细胞浓度为 $1.8 \times 10^4 \sim 2.0 \times 10^4$ cells $\cdot\text{mL}^{-1}$), 分别取 5~50 mL 藻类培养液(根据细胞浓度定所需量), 6 000 r/min 离心 10 min; 去上清, 沉淀物加入 2 mL DNA 提取缓冲液(Tris-Cl 100 mmol/L, EDTA 100 mmol/L, CTAB 1%, NaCl 1.5 mol/L, pH 8.0), 使细胞充分悬浮, 加入 2%~5%(终浓度, 下同)的 β -巯基乙醇, 混匀, 加入 2.5 mg $\cdot\text{mL}^{-1}$ 溶菌酶, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 1 h, 每 15 min 颠倒混匀 1 次; 再加入 1% SDS 和 0.2 mg $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的蛋白酶 K, 于 55 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 1 h; 加入 0.7

mol/L NaCl, 充分混匀, 再加入 1% 的 CTAB/NaCl 溶液, 混匀, 于 65℃ 温育 15 min; 随后用等体积的酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)和氯仿/异戊醇(24:1)抽提, 在上清中加入 0.6 倍体积异丙醇, 轻轻混匀, 室温沉淀 0.5 h, 12 000 r/min 离心 10 min 收集沉淀, 沉淀用 70% 的乙醇洗涤 2 次, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 吹干, 重溶于 100 μ L 的 TE 中。

1.3 16S rRNA 基因的 PCR 扩增

PCR 反应采用 50 μ L 体系(27F、1492R 各 0.2 μ mol/L, dNTPs 0.2 mmol/L, 10 $\times$ PCR buffer 5 μ L, *Taq* 酶 1 U, DNA 模板 10 ~ 100 ng, ddH₂O 补至 50 μ L), 反应条件: 94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 2 min, 30 个循环, 最后 72℃ 8 min. PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳后, 切下目的 DNA 条带, 按回收试剂盒的使用说明进行回收纯化。

1.4 16S rDNA 克隆文库的构建

按照 pMD18-T 载体试剂盒说明和文献[25]的方法进行操作. 将回收的 3 个时期 16S rRNA 基因扩增产物分别同 pMD18-T 载体按适当的比例于 16℃ 过夜连接, 连接产物转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中. 挑取白色克隆子于编号的 LB-Amp 平板上, 37℃ 培养 12 h 后于 4℃ 保存, 这样就建好了塔玛亚历山大藻培养液 3 个时期(延滞期、指数后期和稳定期)的 16S rDNA 克隆文库。

1.5 阳性克隆子的 PCR-RFLP 分析

每个文库随机挑取 150 个白色克隆子用于限制性酶切片长度多态性(RFLP)分析. 用牙签挑取少许于 PCR 管内作为模板, 用引物 RV-M 和 M13-47 进行菌落 PCR; 再利用通用引物 27F 和 1492R 为引物, 以 0.5 μ L 10 倍稀释的菌落 PCR 产物为模板进行巢式 PCR; 巢式 PCR 产物即连接到载体上的 16S rDNA 片段, 大小约 1 500 bp. 将巢式 PCR 产物用 *Afa* I 和 *Msp* I 2 种核酸限制性内切酶进行 RFLP 分析, 酶切产物在 4% 琼脂糖凝胶上进行电泳; 分析克隆子的 RFLP 谱型, 计算每个谱型的出现频率。

1.6 DNA 序列测序和分析

挑取每个 RFLP 谱型的代表克隆子送上海英骏生物技术有限公司进行测序; 所测得序列用 DNASTar 去除载体序列后, 将有效序列在 NCBI 上进行比对, 找出相关序列, 找出其所属的微生物种类范畴, 并挑选相关序列, 用 DNAMAN 软件分析, 并用 DNAMAN 采用邻接法(Neighbor-joining method)构建系统发育树, 自举值(Bootstrap)为 1 000. 测序所得的 16S rDNA 序列在 GenBank 数据库中的登录号为 EU647600-

EU647633.

1.7 塔玛亚历山大藻细菌多样性分析

以覆盖率(*C*)来评估所构建的文库对环境微生物多样性的体现, 计算公式为:

$$C = [1 - (n_1/N)] \times 100\%$$

式中, *N* 代表所分析的克隆数, *n*₁ 代表具有不重复序列的克隆数(即 RFLP 谱型个数)。

2 结果与分析

2.1 不同生长时期藻培养液总 DNA 的提取

所提取的 3 个时期塔玛亚历山大藻培养液总 DNA 在 21 kb 处有一条明显的主带, 同时还有不同程度的拖带现象, 由于操作可能出现的机械力对 DNA 有比较强的剪切力, 出现了较多的碎片, 但是从后续实验来看, 对 PCR 是没有影响的。

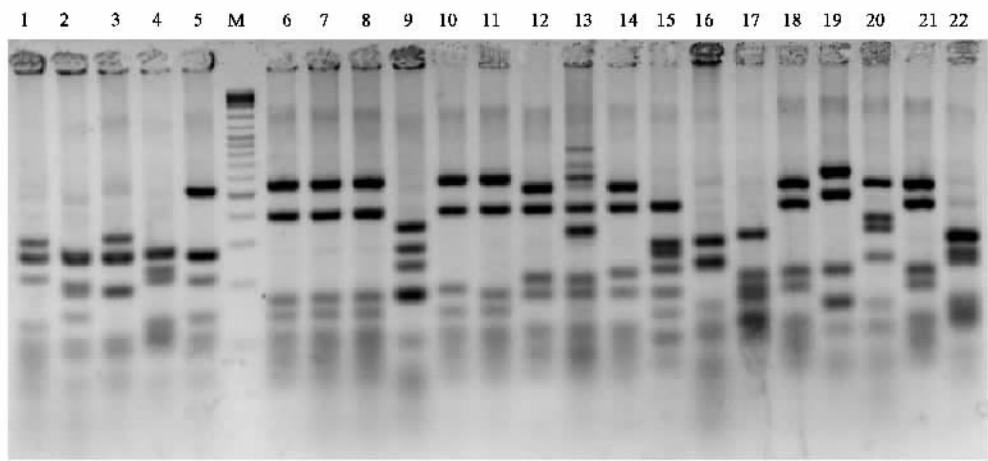
2.2 16S rRNA 基因扩增

将所提取的总 DNA 适当稀释后作为模板, 用细菌通用引物 27F 和 1492R 进行扩增. PCR 产物经电泳检测发现, 用这对引物可以扩增出几乎全长的 16S rRNA 基因, PCR 产物大小约 1.5 kb, PCR 反应特异性较好, 产物单一, 产量较大, 适合下一步 16S rDNA 克隆文库的构建. 这些扩增所获得 16S rRNA 基因的 PCR 产物, 是各个时期各种微生物的 16S rDNA 的混合物, 代表了该生长期的塔玛亚历山大藻培养液中的微生物群体。

2.3 16S rDNA 克隆文库分析

PCR 扩增 16S rDNA 片段经胶回收、同 pMD18-T 载体连接后转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 构建好 16S rDNA 克隆文库, 每个时期的克隆文库均含 300 个以上克隆子. 从每个文库随机挑取 150 个克隆子用载体上的测序引物 RV-M、M13-47 进行菌落 PCR, 电泳结果表明多数克隆子均有插入 16S rDNA 片段. 以菌落 PCR 产物为模板, 用引物 27F、1492R 进行了巢式 PCR, 电泳结果表明多数能扩增出近乎全长的 16S rDNA. 以巢式 PCR 产物作为底物, 分别对塔玛亚历山大藻 3 个时期(延滞期、指数后期和稳定期)的 16S rDNA 克隆文库的 121、84 和 126 个阳性克隆子进行了 RFLP 分析(图 1), 结果表明在塔玛亚历山大藻培养液 16S rDNA 克隆文库中存在多种细菌 RFLP 谱型, 其中延滞期、指数后期和稳定期分别有 23、16 和 23 个 RFLP 谱型。

按 1.7 所述公式计算塔玛亚历山大藻培养液 3 个时期 16S rDNA 克隆文库的覆盖率分别为 83.80%、85.32% 和 83.57%. 所构建的 16S rDNA 克隆文库的



M: GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas, SM0331; 1 ~ 22: 阳性克隆子编号

图 1 文库中部分阳性克隆子 RFLP 结果

Fig.1 Partial results of RFLP analysis of 16S rDNA library

覆盖率至少为 83%，即包含了藻际微生物群落 83% 的细菌多样性.因此,从覆盖率分析可以说明所构建的16S rDNA克隆文库基本能够较完整地反映所属环境中的细菌多样性状况.

2.4 序列比对和系统发育分析

分析的克隆子中与 GenBank 数据库中已知 16S rDNA序列相似性最高为 100%，最低为 89%；其中有不少克隆子与已知序列同源性低于 94%，表明塔玛亚历山大藻藻际环境中存在着新的未开发的微生物资源,有待于进一步研究.

所有分析的克隆子基因型分属于 2 个细菌类群: 变形细菌门 (Proteobacteria) 和拟杆菌门 (Bacteroidetes). 其中在延滞期的藻培养液中, α -Proteobacteria 占 36.4%, β -Proteobacteria 占 9.1%, γ -Proteobacteria占 27.3%, 拟杆菌门(Bacteroidetes)占 27.3%;在指数后期的培养液中, α -Proteobacteria 占 53.3%, β -Proteobacteria 占 13.3%, γ -Proteobacteria 占 6.7%, 拟杆菌门(Bacteroidetes)占 26.7%;在稳定期的培养液中, α -Proteobacteria 占 47.8%, β -Proteobacteria占 8.7%, γ -Proteobacteria 占 21.7%, δ -Proteobacteria占 4.3%, 拟杆菌门(Bacteroidetes)占 17.4%;这些克隆子在 3 个时期文库中的分布情况如表 1 所示,这些细菌的进化关系如图 2 系统发育树所示.

α -Proteobacteria 中的克隆子分别属于红细菌目 (Rhodobacterales)、红杆菌科 (Rhodobacteraceae) 的玫瑰杆菌属 (*Roseobacter*) 和 *Ruegeria* 属, 根瘤菌目 (Rhizobiales) 的生丝微菌科 (Hyphomicrobiaceae) 土微菌属 (*Pedomicrobium*)、根瘤菌科 (Rhizobiaceae) 剑菌

属 (*Ensifer*) 以及红菌科 (Rhodobiaceae) 的 *Parvibaculum* 属, 还有鞘脂单胞菌目 (Sphingomonadales) 赤杆菌科 (Erythrobacteraceae) 的赤杆菌属 (*Erythrobacter*).

γ -Proteobacteria 中的克隆子分别属于交替单胞菌目 (Alteromonadales) 交替单胞菌科 (Alteromonadaceae) 的交替单胞菌属 (*Alteromonas*), 肠杆菌目 (Enterobacteriales) 肠杆菌科 (Enterobacteriaceae) 的沙雷氏菌属 (*Serratia*), 黄色单胞菌目 (Xanthomonadales) 黄色单胞菌科 (Xanthomonadaceae) 的 *Rhodanobacter* 属.

δ -Proteobacteria 中的克隆子全部属于蛭弧菌目 (Bdellovibrionales) Bacteriovoraceae 科的 *Bacteriovorax* 属.

拟杆菌门(Bacteroidetes)中的克隆子分别属于鞘脂杆菌纲 (Sphingobacteria) 鞘脂杆菌目 (Sphingobacteriales) 屈挠杆菌科 (Flexibacteraceae) 的屈挠杆菌属 (*Flexibacter*) 和 *Microscilla* 属, 腐螺旋菌科 (Saprospiraceae) 的 *Haliscomenobacter* 属和 *Lewinella* 属以及黄杆菌纲 (Flavobacteria) 黄杆菌目 (Flavobacteriales) 黄杆菌科 (Flavobacteriaceae) 的 *Winogradskyella* 属.

测序克隆子在塔玛亚历山大藻 3 个时期文库的分布情况(表 1)还表明,有些克隆子所代表的基因型在塔玛亚历山大藻培养液的 3 个时期均有存在,如 ATLC XRY-1、ATLC XRY-2、ATLC XRY-4、ATLC XRY-9、ATLC XRY-12、ATLC XRY-20、ATLC XRY-29、ATLC XRY-37 和 ATLC XRY-40, 其中克隆子 ATLC XRY-2 所代表的基因型玫瑰杆菌属 (*Roseobacter*) 和

表 1 测序克隆子在塔玛亚历山大藻 3 个时期文库中的分布情况

Table 1 Distribution of the representative clones in the three 16S rDNA libraries of *Alexandrium tamarense* cultures

细菌类群	代表克隆子	同源性最高的参照菌, 登录号	同源性 / %	3 个时期克隆子数		
				延滞期	指数期	稳定期
α-Proteobacteria	ATLC XRY-2	<i>Roseobacter</i> sp. CSQ-2 EF512125	99	20(16.53%)	15(17.86%)	18(14.29%)
	ATLC XRY-9	<i>Rhizobiaceae</i> bacterium LA52 AF513446	98	5(4.13%)	12(14.29%)	27(21.43%)
	ATLC XRY-13	<i>Parvibaculum</i> sp. W7-12 DQ659442	93	0	0	3(2.38%)
	ATLC XRY-18	<i>Roseobacter</i> sp. TM1040 AY332662	99	2(1.65%)	0	3(2.38%)
	ATLC XRY-20	<i>Ensifer mexicanum</i> strain IITG-R7 DQ411930	94	2(1.65%)	1(1.20%)	10(7.94%)
	ATLC XRY-25	<i>Ruegeria pelagia</i> HTCC2663 EF134718	100	0	1(1.20%)	4(3.17%)
	ATLC XRY-29	<i>Pedomicrobium fusiformestrain</i> DSM 5304 Y14313	99	2(1.65%)	2(2.38%)	1(0.79%)
	ATLC XRY-37	<i>Roseobacter</i> sp. BS90 DQ659414	99	4(3.31%)	3(3.57%)	1(0.79%)
	ATLC XRY-40	<i>Erythrobacter</i> sp. JL-475 DQ104409	100	5(4.13%)	1(1.20%)	1(0.79%)
	ATLC XRY-48	<i>Erythrobacter</i> sp. JL-475 DQ104409	99	0	1(1.20%)	1(0.79%)
	ATLC XRY-53	Uncultured <i>Roseobacter</i> 253-16 AJ294352	97	0	0	1(0.79%)
	ATLC XRY-63	<i>Erythrobacter</i> sp. JL-378 DQ285076	99	1(0.83%)	0	0
β-Proteobacteria	ATLC XRY-1	Beta proteobacterium BP-5 AY145571	96	34(28.10%)	23(27.38%)	7(5.56%)
	ATLC XRY-4	Bacterium HTCC4037 EF628479	97	21(17.36%)	10(11.90%)	2(1.59%)
γ-Proteobacteria	ATLC XRY-5	Uncultured gamma proteobacterium MERTZ_ 2CM_ 182 AF424097	95	2(1.65%)	0	2(1.59%)
	ATLC XRY-6	<i>Alteromonas</i> sp. 46Xb1 EU440052	99	0	0	18(14.29%)
	ATLC XRY-15	<i>Serratia marcescens</i> strain J2P3 EU221361	99	1(0.83%)	0	0
	ATLC XRY-17	Gamma proteobacterium DG1253 DQ486493	99	2(1.65%)	0	1(0.79%)
	ATLC XRY-23	Marine sponge bacterium liquid OTU6 EU346452	95	3(2.48%)	0	0
	ATLC XRY-55	<i>Rhodanobacter</i> sp. CHNTR45 DQ337598	97	0	0	1(0.79%)
	ATLC XRY-57	<i>Alteromonas macleodii</i> AB238950	99	0	0	1(0.79%)
	ATLC XRY-61	Uncultured bacterium isolate 6i08 AY177779	91	2(1.65%)	1(1.20%)	0
	ATLC XRY-62	<i>Stenotrophomonas</i> sp. ROi7 EF219038	99	1(0.83%)	0	0
δ-Proteobacteria	ATLC XRY-34	<i>Bacteriovorax</i> sp. MER21 DQ631740	97	0	0	3(2.38%)
Bacteroidetes	ATLC XRY-3	<i>Flexibacter aggregans</i> strain: IFO 15974 AB078038	89	2(1.65%)	1(1.20%)	0
	ATLC XRY-7	<i>Elkhidna lutea</i> type strain BiosLi/39T AM746475	98	1(0.83%)	0	8(6.35%)
	ATLC XRY-12	Uncultured bacterium isolate DP-OTU6 DQ831101	89	3(2.48%)	8(9.52%)	10(7.94%)
	ATLC XRY-16	<i>Haliscomenobacter hydrossis</i> strain DSM 1100 AJ784892	91	5(4.13%)	3(3.57%)	0
	ATLC XRY-30	<i>Lewinella cohaerens</i> EU371937	90	0	2(2.38%)	0
	ATLC XRY-36	<i>Flexibacter aggregans</i> strain: IFO 15974 AB078038	89	2(1.65%)	0	0
	ATLC XRY-56	<i>Flexibacter tractuosus</i> strain: IFO 15989 AB078072	95	0	0	2(1.59%)
	ATLC XRY-60	<i>Microscilla furvescens</i> strain: IFO 15994 AB078079	94	1(0.83%)	0	0
	ATLC XRY-64	<i>Winogradskyella</i> sp. 69Xa1-Y1 EU090131	98	0	0	1(0.79%)

ATLC XRY-9 所代表的基因型根瘤菌科 (*Rhizobiaceae*), 这些基因型的克隆子在文库中占有较大的比率; 而有些克隆子所代表的基因型并不是广泛存在于藻生长的各个时期; 有些则仅存在于一个生长时期, 如 ATLC XRY-13、ATLC XRY-53 和 ATLC XRY-34. 这些数据表明, 在藻生长的各个时期, 存在着不同的藻际微生物群落多样性, 每个时期都有其不同的优势菌, 这些细菌可能对藻的生长及生理生化特性有着不同的作用.

3 讨论

多项研究表明, 藻际环境中的细菌对藻类的生理和生化特性起着潜在的调节作用. 一方面, 这些细菌能够影响藻类的毒素产量^[8, 26, 27], 甚至有些细菌本身就能够产生毒素, Gallacher 等^[10]从亚历山大藻培养液中分离出 1 株能产生钠离子通道阻断毒素的细菌, 其产生的毒素被鉴定为麻痹性贝毒的一种; 另一方面这些细菌能够影响到藻类的种群动力学, 可以

系^[32],为后续的杀藻细菌筛选提供了一个相对简单的体系,并利用该体系成功筛选得到具有稳定杀藻效果的细菌 SP48^[33].为了进一步了解细菌对藻类生长的影响,首先需要了解藻培养液中存在的细菌群落组成.

通过对 16S rRNA 基因文库中各种 RFLP 谱型的克隆子测序和比对分析,结果显示塔玛亚历山大藻培养液中细菌组成以 α -变形细菌(α -Proteobacteria)、 γ -变形细菌(γ -Proteobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes)细菌为主,这同链状裸甲藻(*Gymnodinium catenatum*)附属可培养细菌群落组成相似^[7].本研究的结果还显示指数期的细菌多样性低于延滞期和稳定期,这很可能是由于处于指数生长期的塔玛亚历山大藻对一些藻际细菌的活性有某种程度的抑制,所以一些基因型未能检测到,而在微藻进入稳定生长期以后随着这种作用的减弱,细菌又开始逐渐回复生长活性.郑天凌等^[34,35]对藻菌关系的相关研究中也有类似的结果.

α -变形细菌(α -Proteobacteria)的克隆子多数属于红细菌目(Rhodobacterales)、红细菌科(Rhodobacteraceae),其中玫瑰杆菌属(*Roseobacter*)为光合好氧不产氧细菌(aerobic anoxygenic phototrophic bacteria, AAPB),AAPB 有着独特的生理特征和生态功能,它们分布广泛,在海洋特别是贫营养的大洋环境的生物量中占有重要份额,在碳及其他生源要素生物地球化学循环中扮演着独特的角色.本研究中,玫瑰杆菌属在 3 个生长时期中均有检测到,而且占较大比例,这与该属细菌的自身的生理生化特性有关,如硫代谢^[36],具有固着器^[37],营附着生活,很难在与宿主的分离和培养过程中丢失. α -变形细菌(α -Proteobacteria)常见于藻类培养液中,其中以红细菌科(Rhodobacteraceae)细菌最为常见;玫瑰杆菌属(*Roseobacter*)细菌也是亚历山大藻(*Alexandrium* spp.)和锥状斯氏藻(*Scrippsiella trochoidea*)培养液中的优势菌群^[6];4 株费氏杀鱼藻(*Pfiesteria* sp.)的培养液中,有 50% 细菌属于 α -变形细菌(α -Proteobacteria),其中以红杆菌科(Rhodobacteraceae)的 *Ruegeria algicola* 和类似 *Hyphomonas jannaschiana* 细菌最多,其中 *R. algicola* 能促进该藻的生长^[38];红细菌科(Rhodobacteraceae)细菌是腹泻性贝毒产生藻——利马原甲藻(*Prorocentrum lima*)培养液中的主要菌群^[39,40];除甲藻外,在硅藻培养液中也有发现红细菌科(Rhodobacteraceae)细菌的存在^[41].

γ -变形细菌(γ -Proteobacteria)同样也常见于藻培养液中^[6,7], γ -变形细菌(γ -Proteobacteria)是目前所知的细菌中种类最多的一纲,包括医学上和科学研究中很重要的一些类群,该类细菌具有广泛的营养方式,其中有些细菌能促进藻类的生长:从能产生西加鱼毒的 *Gambierdiscus toxicus* 细胞表面分离到的几株细菌,其中 1 株(*Alteromonas* sp.)能促进该藻的生长^[28];Ferrier 等^[29]也发现交替单胞菌(*Alteromonas* spp.)能促进 *Alexandrium fundyense* 的生长,在本研究结果中仅在塔玛亚历山大藻稳定期培养液中检测到该属细菌,这与许多研究发现交替单胞菌属(*Alteromonas*)细菌具有杀藻活性^[42~44]是相符的,这表明在实验用的塔玛亚历山大藻培养液中可能存在有潜在杀藻活性的细菌,在正常培养状态下,该类细菌和藻处于一个平衡状态,到了藻类生长的稳定期,藻类分泌产生的可利用有机物增多,该类细菌活性增强,迅速增殖,通过分泌某些不利于藻类生存的物质甚至直接进攻藻细胞而引起藻死亡.笔者通过多种培养基对塔玛亚历山大藻的藻际细菌进行分离培养鉴定,发现培养液中确实存在着具有潜在杀藻活性的细菌,其中有很多属于交替单胞菌属(*Alteromonas*)(结果未发表).

属于拟杆菌门(Bacteroidetes)的克隆子分属于鞘脂杆菌纲(Sphingobacteria)鞘脂杆菌目(Sphingobacteriales)腐螺旋菌科(Saprospiraceae)的屈挠杆菌属(*Flexibacter*)和鞘细菌属(*Haliscomenobacter*).CFB 菌群在藻培养液中也有报道^[45],也是目前文献报道的杀藻细菌的主要类群^[46].该菌群中的腐螺旋菌属(*Saprospira*)也具有杀藻活性^[47],在实验用的这株塔玛亚历山大藻培养液中发现有屈挠杆菌属(*Flexibacter*)细菌,该属细菌生理生化特征同腐螺旋菌属(*Saprospira*)相似,也可能是潜在的杀藻细菌.

本研究的结果表明塔玛亚历山大藻培养液中的细菌组成同文献报道的甲藻培养液附属细菌群落组成在一定程度上相似,可能其中藻菌双方存在着相互选择的机制:①藻类能为细菌提供可以利用的碳源等,能利用藻类胞外产物的细菌就有可能长存于培养液中,甲藻能产生特定的胞外产物对其周围的细菌群落进行选择,比如藻类产生的 DMSP(dimethylsulfoniopropionate, β -二甲基巯基丙酸内盐)作为 DMS(dimethylsulfide, 二甲基硫)的前体,是一种重要的生源硫化物,可以特定的选择玫瑰杆菌属(*Roseobacter*)细菌,该属细菌可以利用 DMSP 作为碳

源和硫源^[48];②作为微食物环的重要组成部分,细菌通过对藻类胞外产物和细胞碎片的再矿化,能产生可供藻类直接利用的无机氮和无机磷^[49],细菌能产生维生素、细胞分裂素、螯合铁离子来促进藻类的增殖,AAPB在海洋碳循环中起着重要的作用^[50],藻培养液中存在的AAPB细菌则可能为藻类的增殖提供能量;③部分细菌如某些玫瑰杆菌属(*Roseobacter*)细菌^[40]营附着生活,因而难以在藻类分离和培养过程中丢失。

总的来说,实验用的这株塔玛亚历山大藻培养液细菌群落组成有以下特点。

首先,细菌群落主要由红杆菌科(*Rhodobacteraceae*)和交替单胞菌科(*Alteromonadaceae*)组成。这同许多报道的甲藻培养液细菌群落组成相似,同时有报道表明在自然水华暴发过程中,也能检测到这些细菌^[51,52],这表明虽然受到一定程度的人为污染,该藻培养液细菌主要来自其所分离的海域,从而可以依此对该海域的细菌群落做出一定的推断。

其次,在这株塔玛亚历山大藻培养液中检测到潜在杀藻细菌的存在。正常状态下,藻和细菌处于一种互惠互利的平衡下,整个培养液甚至可以看成一个微型食物环,一旦添加外部碳源,细菌的活动加强并打破了平衡,造成藻类死亡。这个结论还需要进行杀藻细菌的分离来证实。

最后,藻培养液中还存在着部分未培养甚至未鉴定的细菌,它们的归属和功能还需要进一步实验深入研究。

综上,该实验鉴定出多种同塔玛亚历山大藻的生长和生理特性紧密联系的细菌,这些细菌在自然水华暴发和消亡过程中也可能起着重要的作用。

4 结论

本研究结果表明该株塔玛亚历山大藻培养液细菌分属于2个细菌类群:变形细菌(*Proteobacteria*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*),其中又以红杆菌科(*Rhodobacteraceae*)和交替单胞菌科(*Alteromonadaceae*)细菌为主,这同许多报道的甲藻培养液细菌群落组成相似;此外该藻培养液中还存在着部分未培养甚至未鉴定的细菌,它们的归属和功能还需要进一步实验深入研究。

参考文献:

- [1] Alexander M. Microbial Ecology [M]. New York: Wiley, 1971. 509.
- [2] Fogg G E. The extracellular products of algae [J]. Oceanogr Mar Biol

Annual Rev, 1966, **4**: 195-212.

- [3] Hellebust J A. Extraction of some organic compounds by marine phytoplankton [J]. Limnol Oceanogr, 1965, **10**: 192-206.
- [4] Bell W, Mitchell R. Chemotactica and growth responses of marine bacteria to algal extracellular products [J]. Biol Bull, 1972, **143**(2): 265-277.
- [5] Kopp M, Doucette G J, Kodama M, et al. Phylogenetic analysis of selected toxic and non-toxic bacterial strains isolated from the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* [J]. FEMS Microbiol Ecol, 1997, **24**(3): 251-257.
- [6] Hold G L, Smith E A, Rappe M S, et al. Characterisation of bacterial communities associated with toxic and non-toxic dinoflagellates: *Alexandrium* spp. and *Scrippsiella trochoidea* [J]. FEMS Microbiol Ecol, 2001, **37**(2): 161-173.
- [7] Green D H, Llewellyn L E, Negri A P, et al. Phylogenetic and functional diversity of the cultivable bacterial community associated with the paralytic shellfish poisoning dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* [J]. FEMS Microbiol Ecol, 2004, **47**(3): 345-357.
- [8] Gallacher S, Smith E A. Bacteria and paralytic shellfish toxins [J]. Protist, 1999, **150**(3): 245-255.
- [9] Uribe P, Espejo R T. Effect of associated bacteria on the growth and toxicity of *Alexandrium catenella* [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, **69**(1): 659-662.
- [10] Gallacher S, Flynn K J, Franco J M, et al. Evidence for production of paralytic shellfish toxins by bacteria associated with *Alexandrium* spp. (Dinophyta) in culture [J]. Appl Environ Microbiol, 1997, **63**(1): 239-245.
- [11] Hold G L, Smith E A, Birkbeck T H, et al. Comparison of paralytic shellfish toxin (PST) production by the dinoflagellates *Alexandrium lusitanicum* NEPCC 253 and *Alexandrium tamarense* NEPCC 407 in the presence and absence of bacteria [J]. FEMS Microbiol Ecol, 2001, **36**(2-3): 223-234.
- [12] Azam F. Microbial control of oceanic carbon flux: the plot thickens [J]. Science, 1998, **280**: 694-696.
- [13] Blackburn N, Fenchel T, Mitchell J. Microscale nutrient patches in planktonic habitats shown by chemotactic bacteria [J]. Science, 1998, **282**: 2254-2256.
- [14] Casamatta D A, Wickstrom C E. Sensitivity of two distinct bacterioplankton communities to exudates from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* kutzing [J]. Microbiol Ecol, 2000, **41**: 64-73.
- [15] Gonzalez J M, Simo R, Massana R, et al. Bacterial community structure associated with a dimethylsulfoniopropionate-producing north atlantic algal bloom [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, **60**(10): 4237-4246.
- [16] Crump B C, Armbrust E V, Baross J A. Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacteria communities in the Columbia River, its estuary, and the adjacent coastal ocean [J]. Appl Environ Microbiol, 1999, **65**: 3192-3204.
- [17] Rooney-Vargz J N, Giewat M W, Savin M C, et al. Links between phytoplankton and bacterial community dynamics in a coastal marine environment [J]. Microbiol Ecol, 2005, **49**: 163-175.
- [18] Jasti S, Sieracki M E, Poulton N J, et al. Phylogenetic diversity and specificity of bacteria closely associated with *Alexandrium* spp. and other phytoplankton [J]. Appl Environ Microbiol, 2005, **71**(7): 3483-3494.

- [19] Doucette G J, Kodama M, Franca S, *et al.* Bacterial interactions with harmful algal bloom species: bloom ecology, toxigenesis and cytology [A]. In: Anderson D M, Cembella A D, Hallegraeff G M, eds. Physiological ecology of harmful algal blooms [M]. Berlin: Springer-Verlag, 1998. 619-647.
- [20] Adachi M, Kanno T, Okamoto R, *et al.* Population structure of *Alexandrium* (Dinophyceae) cyst formation-promoting bacteria in Hiroshima Bay, Japan [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, **69**(11): 6560-6568.
- [21] Zheng T L, Tian Y, Su J Q, *et al.* Study on the Ecological Relationship Between a Red-tide Causative Alga and Three Strains of Bacteria Isolated from Xiamen Harbor [J]. Acta Ecol Sinica, 2002, **22**(12): 2063-2070.
- [22] Guillard R R L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates [A]. In: Smith W L, Canley M H, (eds). Culture of Marine Invertebrate Animals [M]. Plenum Press: New York, 1975. 29-60.
- [23] DeLong E F. Archaea in coastal marine environments [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, **89**(12): 5685-5689.
- [24] Mayali X, Doucette G J. Microbial community interactions and population dynamics of an algicidal bacterium active against *Karenia brevis* (Dinophyceae) [J]. Harmful Algae, 2002, **1**: 277-293.
- [25] Samlunrook J, Fritsch E F, Maniatis T, 著. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 分子克隆实验指南 [M]. (第二版). 北京: 科学出版社, 1996.
- [26] 苏建强, 郑天凌, 俞志明, 等. 海洋细菌对赤潮藻生长及其产毒量的影响 [J]. 海洋与湖泊, 2003, **34**(1): 44-49.
- [27] Doucette G J, Powell C L. Algal-bacterial interactions: can they determine the PSP-related toxicity of dinoflagellates? [A]. In: Reguera B, Blanco J, Fernandez M L, *et al.*, (Eds). Harmful Algae [M]. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Spain, 1998. 406-409.
- [28] Sakami T, Nakahara H, Chinain M, *et al.* Effects of epiphytic bacteria on the growth of the toxic dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* (Dinophyceae) [J]. J Exp Mar Biol Ecol, 1999, **233**(2): 231-246.
- [29] Ferrier M, Martin J L, Rooney-Varga J N. Stimulation of *Alexandrium fundyense* growth by bacterial assemblages from the Bay of Fundy [J]. J Appl Microbiol, 2002, **92**(4): 706-716.
- [30] Amaro A M, Fuentes M S, Ogalde S R, *et al.* Identification and characterization of potentially algal-lytic marine bacteria strongly associated with the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* [J]. J Eukaryot Microbiol, 2005, **52**(3): 191-200.
- [31] 王新, 周立红, 郑天凌, 等. 塔玛亚历山大藻藻际细菌溶藻过程 [J]. 生态学报, 2007, **27**(7): 2864-2871.
- [32] Su J Q, Yang X R, Zheng T L, *et al.* An efficient method to obtain axenic cultures of *Alexandrium tamarense*-a PSP-producing dinoflagellate [J]. J Microbiol Meth, 2007, **69**(3): 425-430.
- [33] Su J Q, Yang X R, Zheng T L, *et al.* Isolation and identification of a marine algicidal bacterium against toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* [J]. Harmful Algae, 2007, **6**(6): 799-810.
- [34] 郑天凌, 徐美珠, 俞志明, 等. 菌藻相互作用下胞外酶活性变化研究 [J]. 海洋科学, 2002, **26**(12): 41-45.
- [35] 郑天凌, 田蕴, 苏建强, 等. 海洋赤潮生物与厦门海域几种细菌的生态关系研究 [J]. 生态学报, 2002, **22**(12): 2063-2070.
- [36] Sorokin D Y. Influence of thiosulfate on the growth of sulfate-producing sulfur-oxidizing heterotrophic bacteria from the Black Sea in continuous culture [J]. Microbiology, 1994, **63**: 255-259.
- [37] Gonzalez J M, Mayer F, Moran M A. *Sagittula stellata* gen. nov. sp. nov., a lignin-transforming bacterium from a coastal environment [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 1997, **47**: 773-780.
- [38] Alavi M, Miller T, Erlandson K, *et al.* Bacterial community associated with *Pfiesteria*-like dinoflagellate cultures [J]. Environ Microbiol, 2001, **3**(6): 380-396.
- [39] Prokic I, Brummer F, Brigge T, *et al.* Bacteria of the genus *Roseobacter* associated with the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* [J]. Protist, 1998, **149**(4): 347-357.
- [40] Lafay B, Ruimy R, de Trautenberg C R, *et al.* *Roseobacter algicola* sp. nov., a new marine bacterium isolated from the phycosphere of the toxin-producing dinoflagellate *Prorocentrum lima* [J]. Int J Syst Bacteriol, 1995, **45**(2): 290-296.
- [41] Schafer H, Abbas B, Witte H, *et al.* Genetic diversity of 'satellite' bacteria present in cultures of marine diatoms [J]. FEMS Microbiol Ecol, 2002, **42**(1): 25-35.
- [42] Imai I. Algicidal Marine-Bacteria Isolated from Northern Hiroshima-Bay, Japan [J]. Fisheries Sci, 1995, **61**(5): 628-636.
- [43] Lovejoy C, Bowman J P, Hallegraeff G M. Algicidal effects of a novel marine *Pseudoalteromonas* isolate (class Proteobacteria, gamma subdivision) on harmful algal bloom species of the genera *Chattonella*, *Gymnodinium*, and *Heterosigma* [J]. Appl Environ Microbiol, 1998, **64**(8): 2806-2813.
- [44] Lee S O, Kato J, Nakashima K, *et al.* Cloning and characterization of extracellular metal protease gene of the algicidal marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain A28 [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2002, **66**(6): 1366-1369.
- [45] Hold G L, Smith E A, Rappe M S, *et al.* Characterisation of bacterial communities associated with toxic and non-toxic dinoflagellates: *Alexandrium* spp. and *Scrippsiella trochoidea* [J]. FEMS Microbiol Ecol, 2001, **37**(2): 161-173.
- [46] Mayali X, Azam F. Algicidal bacteria in the sea and their impact on algal blooms [J]. J Eukaryot Microbiol, 2004, **51**(2): 139-144.
- [47] Furusawa G, Yoshikawa T, Yasuda A, *et al.* Algicidal activity and gliding motility of *Saprospira* sp. SS98-5 [J]. Can J Microbiol, 2003, **49**(2): 92-100.
- [48] Yoch D C. Dimethylsulfoniopropionate: its sources, role in the marine food web, and biological degradation to dimethylsulfide [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, **68**(12): 5804-5815.
- [49] Azam F, Fenchel T, Field J G, *et al.* The ecological role of water-column microbes in the sea [J]. Mar Ecol Prog Ser, 1983, **10**(3): 257-263.
- [50] Kolber Z S, Plumley F G, Lang A S, *et al.* Contribution of aerobic photoheterotrophic bacteria to the carbon cycle in the ocean [J]. Science, 2001, **292**(5526): 2492-2495.
- [51] Tobe K, Ferguson C, Kelly M, *et al.* Seasonal occurrence at a Scottish PSP monitoring site of purportedly toxic bacteria originally isolated from the toxic dinoflagellate genus *Alexandrium* [J]. Eur J Phycol, 2001, **36**(3): 243-256.
- [52] Wichels A, Hummert C, Elbrachter M, *et al.* Bacterial diversity in toxic *Alexandrium tamarense* blooms off the Orkney Isles and the Firth of Forth [J]. Helgoland Mar Res, 2004, **58**(2): 93-103.