

# 4 株米氏凯伦藻(*Karenia mikimotoi*)藻际 异养细菌的分离鉴定\*

龚诗雁 屠燕萍 谢志浩

(宁波大学海洋学院 宁波 315211; 宁波大学 教育部应用海洋生物技术重点实验室 宁波 315211)

**提要** 采用分子生物学方法,对分离的米氏凯伦藻 4 株藻际异养细菌进行分子鉴定和功能分析。结果表明,经 16S rRNA 序列分析,4 株藻际异养细菌分别隶属于 *Formosa*、*Erythrobacter*、*Shewanella* 和 *Marinobacter* 四个属,P1 菌株与 *Formosa* 的 16S rRNA 核苷酸序列的同源性为 95%,P2、P3 和 P4 菌株与 *Erythrobacter*、*Shewanella* 和 *Marinobacter* 的同源性在 99% 以上。通过 4 株异养细菌及其同源性大的 24 株细菌构建进化树得出,28 株细菌在系统发育树中主要分成 4 个分支,与同源性分析相符。

**关键词** 米氏凯伦藻;藻际异养细菌;16S rRNA;分子鉴定

中图分类号 Q938.8 doi: 10.11693/hyhz20140600174

在长期的生物进化过程中,海洋微藻和细菌之间形成了独特的生态关系,一方面,细菌通过分泌多种胞外酶,把大分子有机物质分解成小分子物质,经菌体细胞吸收利用,并把有机物质矿化成无机盐类,促进单细胞藻类的生长,一些细菌通过消耗藻细胞周围环境中高浓度的溶解氧,为微藻提供一个还原性强的生存环境,使得微藻更好地进行光合作用,藻类通过光合作用为微生物提供溶解氧和有机物(Adachi *et al.*, 1974; Haines *et al.*, 1974; Maruyama *et al.*, 1986; Mouget *et al.*, 1995; 林伟等, 2000; Mayali *et al.*, 2002)。另一方面,有些细菌可以直接通过营养竞争或产生抑藻物质抑制微藻的生长或杀死藻类,也可通过与藻类直接接触导致藻细胞死亡;藻类通过分泌毒素、抗生素或粘液等物质抑制、杀死细菌(李福东等, 1996; 林伟等, 2001; 王新等, 2007; 张俊等, 2010; 赵锐等, 2013)。目前 16S rRNA 已经成为细菌系统分类研究中最常用有效的分子指标,广泛应用于微生物的遗传特性和分子差异的研究,国际上已建立多个微生物 16S rRNA 序列数据库,通过对未知微生物 DNA 序列的测定和比较,可以对其进行快速、有效的鉴定(戴欣

等, 2000)。米氏凯伦藻(*Karenia mikimotoi*)是我国海域一种分布广泛的鱼毒性赤潮藻,本实验对米氏凯伦藻藻际异养细菌进行了分离鉴定,并对其种属关系进行了分析,为藻菌关系的进一步研究提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验藻种和试剂

实验藻种米氏凯伦藻由中国海洋大学微藻培养室提供。培养液为 *f/2* 营养盐配方,培养条件为:温度  $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ ,光照强度 3000 lx,光暗比 12h:12h, pH=  $8.0 \pm 0.1$ ,盐度  $30 \pm 1.0$ 。培养至指数期用于分离异养细菌实验。2216E 固体培养基购自海博生物公司,2216E 液体培养基:蛋白胨 5g,酵母膏 1g,磷酸高铁 0.1g,陈海水 1000mL。正向引物 27F 和反向引物 907R 合成于 Invitrogen,使用前 8000r/min 离心 5min,加超纯水稀释到 10nmol/L,保存于  $-20^\circ\text{C}$  备用。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 异养菌株的分离和保存** 超净工作台中取指数生长期的米氏凯伦藻稀释成不同密度梯度,各移取 100 $\mu\text{L}$  到 2216E 固体培养基上,用三角玻璃棒

\*浙江省科技厅项目, 2014C32074 号; 浙江省自然科学基金项目, LY12C03001 号; 宁波大学学科项目, XKL11D2100 号。龚诗雁, E-mail: gongshiyuan@163.com

通讯作者: 谢志浩, 博士, 副教授, E-mail: xiezhihao@nbu.edu.cn

收稿日期: 2013-10-18, 收修改稿日期: 2014-02-25

均匀涂布开, 倒置培养于 21°C 培养箱中, 长出单菌落后按照形态、颜色大小进行分离纯化, 挑取单菌落至事先高温高压灭菌的 2216E 液体培养基中, 21°C、100r/min 恒温摇床摇 30h, 用于 DNA 提取, 剩余的加入 15% (V/V) 甘油, 保存于 -80°C 超低温冰箱中。

**1.2.2 细菌 DNA 制备** 取摇培后的培养液 100 $\mu$ L 经 10000r/min 离心 5min, 去除上清, 参照曾润颖等 (2002) 的方法制备细菌 DNA。菌体加入 200 $\mu$ L 6mol/L 盐酸胍后混匀裂解, 往裂解液中加入 200 $\mu$ L 酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)混合溶液进行抽提。抽提液经离心后取上层水相, 加入等体积异丙醇沉淀 5min, 离心吸去上清, 沉淀用 70%乙醇洗两次, 放置超净台内吹干。加入 200 $\mu$ L TE 溶液溶解, 同时加入 2 $\mu$ L RNase (浓度为 10 $\mu$ g/ $\mu$ L), 于 37°C 酶解 1h。往溶液中加入等体积异丙醇和 2 $\mu$ L 1mol/L MgCl<sub>2</sub>, 室温放置 10min 后 15000r/min 离心 2min, 除去上清, 沉淀用 70%乙醇洗两次, 放置超净台内吹干, 溶解于 20 $\mu$ L TE 溶液后于 -20°C 保存。

**1.2.3 16S rRNA 基因序列的扩增** 采用细菌的 16S rRNA 基因序列通用引物 27F (5' AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG 3') 和 907R (5' CCGTCAATTCCTTTR AGTTT 3') 对异养细菌的 16S rRNA 基因序列进行扩增。反应体系和程序见表 1 和表 2。

取 3 $\mu$ L PCR 产物跑电泳, 凝胶图像处理系统观察结果并拍照保存, 条带明亮单一的送上海立菲生物技术有限公司进行测序。

表 1 PCR 扩增反应体系  
Tab.1 PCR amplification reactions

名称	体积( $\mu$ L)
10 $\times$ buffer	5
dNTP	4
P1/P2 (引物)	2
DNA	2
rTag	0.25
H <sub>2</sub> O	34.75
Total	50

表 2 反应程序  
Tab.2 PCR reaction conditions

循环次数	温度(°C)	时间
1	94	2min
30	94	30s
	57	45s
	72	1min
1	72	10min
1	4	保存

**1.2.4 序列分析** 把测序所得的序列在 NCBI 上与数据库已有的细菌 16S rRNA 序列进行 blast 比对, 挑选同源性大的细菌和 4 株异养细菌序列比对, Clustal X 先建立 aln 文件, 然后用 MEGA4.1 软件构建系统进化树。

## 2 结果与分析

### 2.1 异养细菌的分离

从米氏凯伦藻中分离到了 4 株主要的藻际细菌, 标为 P1、P2、P3 和 P4(图 1), P1 为淡黄色菌落, P2 为黄绿色菌落, P3 橙红色, P4 为浅黄色菌落, 这些细菌都可以在 2216E 培养基上快速生长。

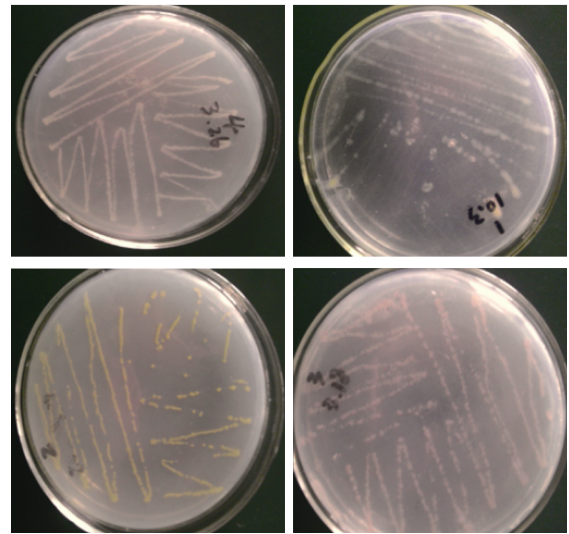


图 1 P1、P2、P3 和 P4 菌落  
Fig.1 P1, P2, P3 and P4 colonies

### 2.2 16S rRNA 基因序列测序结果

PCR 产物跑电泳后, 经凝胶图像观察 4 株细菌的条带都单一且明亮(图 2), 送上海立菲生物技术有限公司进行测序, P1 序列为 883bp, P2 为 836bp, P3 为 886bp, P4 为 814bp, 测序结果如图 3。

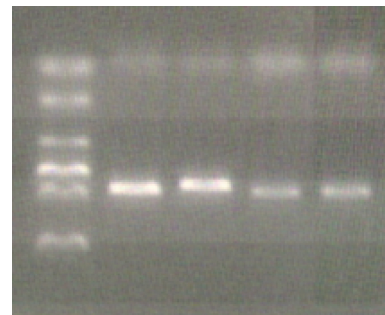


图 2 PCR 产物电泳检测  
Fig.2 Detection of PCR product

```

CTGAGTTTCATTCTTGCGAACGTACTCCCCAGGTGGGATACTTACTACTTTTCGCTTAGCCACTCAGATAAAAT
CCGAACAGCTAGTATCCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTT
CGTCCATCAGTGTCAATGTATTGTTAGTAATCTGCCTTCGCAATCGGTATTCTATGTGATATCTATGCATTT
CACCGCTACACCACATATTCTAACTACTTCACAATAATTCAAGACAACCAGTATCAAAGGCAATTCTACAGT
TGAGCTGCAGGATTTACCTCTGACTTAATCATCCACCTACGGACCCTTTAAACCCAATGATTCCGGATAAC
GCTTGGATCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGATCCTTATTCTTACAGTACCGTCAAG
CTCCCTCACGAGGGAGTGTTCCTTCTGTACAAAAGCAGTTTACAACCCATAGGGCAGTCTTCTGCACGCG
GCATGGCTGGATCAGGCTCCCGCCATTGTCCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGTCCGT
GTCTCAGTACCAGTGTGGGGGATCCCCCTCTCAGGGCCCTATCTATCGTCGCCATGGTAAGCCGTTACCTT
ACCATCCAGCTAATAGAACGCATGCTCATCTTTTACCGATAAAATCTTTAATATGGTCTGATGCCAAGACCA
TATGCTATGAGGTATTAATCCAAATTTCTCTGGGCTATCCCCCTGAAAAGGTAGATTGCATACGCGTTACG
CACCCGTGCGCCGGTCGTACGCGGGCAAGCGCCCTGTTACCCCTCGACTTGATGTGTTAAGCCTGCCG
CTAGCGTTTCATCCTGAGCA
CTGAGTTTTAATCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGATAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACCCAAGCTCCA
TGAGCCCGGACAGCTAGTTATCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCAC
GCTTTCGCACCTCAGCGTCAATAACTGTCCAGTGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCGAATATCTACG
AATTTACCTCTACTCGGAATTCACCTACCTCTCCAGTATCTAGCCATCCAGTTTCAAGGGCAGTTC
GGGGTTGAGCCCCGGGATTTACCCCTGACTTGAAAAGCCGCTACGTGCGCTTACGCCAGTAATTCGGA
ACAACGCTAGCTCCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGAGCTTATTCTCCAGGACTG
TCATTATCATCCCTGGTAAAAGAGCTTTACAACCCTAAGGCCCTCATCACTCACGCGGCAATTGCTGGATCAG
GCTTTCGCCCATTTGTCGAATATTCACCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGCTCAGTCCCAGTG
TGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTATGGATCGTCGACTTGGTAGGCCATTACCCCACTAATCTAATC
CAACGCGGGCCCATCTAAAGGCAATAAAATCTTTGGTCCGAAGACATTATCCGGTATTAGCAGTCAATTTCTAA
CTGTTATTCCGAACCTAAAGGCAGGTTCCACGCGTTACGCACCCGTGCGCCACTAACCCCGAAGGGTTCGT
TCGACTTGATGTGTTAGGCATGCCGCCAGCGTTCGTTCTGAGC
GAGTTTAACTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTACTTAATGCGTTAGCTTGAGAGCCAGTGTTCAGA
CACCAAACCTCCGAGTAGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCT
TTCGTGCATGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCTTCGCCACCGGTATTCTCCAGATCTCTACGCAT
TTCACCGCTACACCTGGAATTTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGTTTCGCCAGTTCGAAATGCTATTCTTAG
GTTGAGCCCAGGGCTTTCACATCTCGCTTAAACAAACCGCCTGCGCACGCTTACGCCAGTAATTCGGATTA
ACGCTCGGACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTCTTCTTCTGTAGGTAACGTCA
CAGATGAGCCGTATTAAGACTCACCTTTCCCTCCCTACTGAAAGTGCTTTACAACCCGAAGGCCCTTCTTAC
ACAGCGGCATGGCTGCATCAGGGTTTCCCCATGTGCAATATTCACCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCT
GGCCGTGCTCAGTCCAGTGTGGCTGATCCTCTCAGAACAGCTAGGGATCGTCGCTTGGTGAGCCA
TTACCTCACCAACTAGCTAATCCACCTAGGTTTCAATCGCGAGAGGCCCGAAGGTCCCCCTCTTTCCC
CCGTAGGGCGTATGCGGTATTAGCAGTCTTTCCAAGTATTACCCCTCGACTGGGCAGATCCCTAGGCAT
TACTACCCGTCGCCGCTCGCCACCTCAGGAGTAACTCCCTGTGCTGCCGCTCGACTTGATGTGTTAG
GCCTGCCGCCAGCGTTCAATCT
TAGTGCGTTAGCTGCGCCACTAAGACTTCAAGAGTCCCAACGGCTAGTTGACATCGTTTACGGCGTGGACTA
CCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTGAGTGTGGTCCAGGTAGCCGCT
TCGCCACTGGTGTTCCTTCTATATCTACGCATTTACCGCTACACAGGAAATCCACTACCCCTTACCACA
CTCTAGTCAGACAGTTCGAAATGCCGTTCCAGGTTAAGCCCGGGCTTTCACATCTCGCTTACCTAACCAC
CTACGCGCGCTTACGCCAGTAATTCGATTAACGCTTGCACCCCTCCGTATTACCGCGGCTGTCGCACGG
AGTTAGCCGTTGCTTCTTCTGCGAGTAACGTCAATCCCTGAAGGTATTAACCTCAGAGCCTTCCCTCGCT
GAAAGTGCTTTACAACCCGAAGCCTTCTTACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGGTTGCCCCATTGTCC
AATATTCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTCGGGCCGTGCTCAGTCCCGATGTGGCTGATCATCTCTC
AGACCAGCTACGGATCGTCGCCTTGGTAGGCCCTTACCCCACTAGCTAATCCGACTTAGGCTCATCCA
GTAGCGCAAGTCCGAAGATCCCTGCTTCTCCCGTAGGACGTATGCGGTATTAATCCGGGTTTCCCGGG
CTATCCCCACTACTGGGCAGATTCTAAGCATTACTACCCGTCGCCGCTCGTACGCGGGTGAAGCAC
CCCTGTTACCGCTCGACTGCA

```

图 3 P1、P2、P3 和 P4 序列

Fig.3 P1, P2, P3 and P4 sequence

### 2.3 同源性分析

同源性是两种核酸分子的核苷酸序列之间, 或两种蛋白质分子的氨基酸序列之间相同的程度。将测得的 4 株米氏凯伦藻异养细菌 16S rRNA 序列在 NCBI 上所存在的序列比对后所得结果见表 3。

根据序列比对结果, 4 株细菌分别隶属于 4 个属,

它们分别是 *Formosa*、*Erythrobacter*、*Shewanella* 和 *Marinobacter*。16S rRNA 序列同源性大于等于 99%, 可以确定为细菌种水平, 同源性小于 99% 可确定为细菌属水平(Hentschel *et al*, 2001)。除了 P1、P2、P3 和 P4 与已知序列相似度都大于等于 99%, 因此都可以确定到种的水平。

表 3 米氏凯伦藻 4 株异养细菌 16S rRNA 基因序列比对  
Tab.3 16S rRNA sequence comparison of four strains of heterotrophic bacteria from *K. mikimotoi*

编号	最接近的属	相似度	最接近的种	相似度
P1	<i>Formosa</i> sp. HE653972.1	100%	<i>Formosa aqariphila</i> HG315671.1	95%
P2	<i>Erythrobacter</i> sp. AM990788.1	100%	<i>Erythrobacter piscidermidis</i> EU127294.1	100%
P3	<i>Shewanella</i> sp. FJ589031.1	99%	<i>Shewanella putrefaciens</i> Hac411 DQ307731.1	99%
P4	<i>Marinobacter</i> sp. AB758589.1	99%	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> JQ799112.1	99%

## 2.4 进化树

对所测定的 4 株米氏凯伦藻异养细菌以及 NCBI 数据库上与它们同源性最大的 28 株细菌 16S rRNA 序列构建系统进化树, 如图 4, 可以看出 28 株细菌在系统发育树中主要分成 *Formosa*、*Erythrobacter*、*Shewanella* 和 *Marinobacter* 四个分支, *Formosa* 属中存在黄杆菌科类的细菌, 与 *Bizionia* 属的细菌亲缘关系相近。从米氏藻异养细菌的系统发育树上还可以看出, 同一种属中的细菌也存在独立的分支, 可能是由

于深海细菌在物种进化中受到了深海环境的影响所致(曾润颖等, 2002; 乔洪金等, 2012)。

## 3 讨论

### 3.1 菌种的鉴定

异养细菌对于微藻的生长繁殖, 代谢都起着非常重要的作用, 所以对海洋细菌的研究已越来越多, 鉴定方法也越来越多, 以前传统的表型和化学鉴定已远远不能满足, 有些传统的菌种鉴定是选用不同的

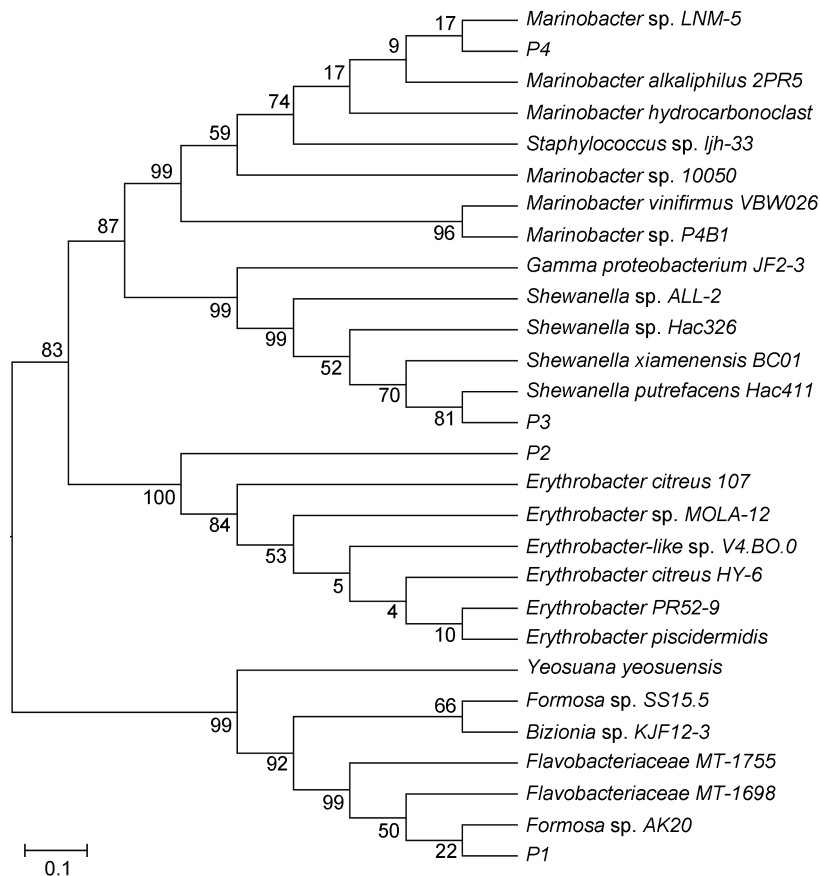


图 4 基于 16S rRNA 的米氏凯伦藻异养细菌系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree of heterotrophic bacteria from *K. mikimotoi* based on 16S rRNA sequence comparison

代谢产物作为碳源,以碳源作为鉴定的指标,但是该方法前提条件是菌株要在 37°C 条件下正常生长,一般来说,海洋细菌最适生长温度为 10—25°C,所以这种方法是不适用的,而且细菌很多种属之间生理生化特征都比较相似,随着分子生物学研究的深入,目前 16S rRNA 已经成为细菌系统分类学研究中最常用也是最有效的分子指标,被广泛地应用于各种微生物的遗传特性和分子差异的研究(曾润颖等,2002)。利用分子方法研究藻类附生细菌群落的组成,是简便、快速又有效的一种方法。相比于陆地微生物,海洋微生物的分离培养会更加困难,目前可以被分离培养的海洋微生物比例不到 0.1%。由于海洋附生细菌和其宿主之间存在着非常特殊的相互依赖的关系,即竞争拮抗和相互促进关系,所以藻际细菌很难分离,或者离开这一藻际微环境,分离的细菌难以培养,而且人工培养的细菌也可能会发生一定的变化。

### 3.2 4 株米氏凯伦藻异养细菌

P1 细菌与 *Formosa* 核苷酸序列同源性达到了 100%,但与其最接近的种相似度只有 95%,所以 P1 只能确定到属的水平,其中与黄杆菌属(*Flavobacterium*)序列相似度达 99%,黄杆菌属是新建的一个菌属,为革兰氏阴性菌,分布于土壤、淡水和海洋中,有研究表明,黄杆菌属能诱导孔石莼形态发生变化(Nakanishi *et al*, 1996),Fukami 等(1992)还发现黄杆菌属具有溶藻活性;P2 细菌与赤细菌属(*Erythrobacter*)序列相似性达到了 100%,同时与其最接近的种 *E. piscidermidis* 序列相似度也达 100%,赤细菌属是一类光合细菌,具有营养、净化水体等作用(李筠等,2006)。张春丹等(2011)在对瓶装泥螺和蟹糊细菌多样性研究中筛选到了一株 *E. piscidermidis* 细菌。芳烃赤细菌(*E. aromatiphilus*)能降解原油,清理海洋中石油的污染(谭田丰,2006);P3 与希瓦氏菌属(*Shewanella*)序列相似性达到 99%,且和 *S. putrefaciens* Hac411 菌株序列相似度也达到 99%,希瓦氏菌属通常可以从海藻、贝类、鱼的表面分离到,有些希瓦氏菌可以引起鱼的腐败,微生物膜中的希瓦氏菌对浒苔属孢子的生殖具有促进作用(Pratixa *et al*, 2003)。刘杰等(2009)从暴发的浒苔上分离到了 2 株希瓦氏菌属。王彪等(2010)从厦门白城海域的潮间带表面沉积物中筛选到一株具有电催化活性的菌株 *Shewanella* sp. S2,具有产电活性;P4 细菌与海杆状菌属(*Marinobacter*)序列相似性达到了 99%,与其最接近的种——除烃海杆菌(*M. hydrocarbonoclasticus*)相似度也达到了 99%,海杆菌,

革兰氏阴性,可以利用多糖类和有机酸类的碳源,且对氨基青霉素、氧哌嗪青霉素等多种抗生素敏感,李倩等(2011)从黄海沉积物中分离到了一株 *Marinobacter* sp. PY97S,它能降解多种多环芳烃和烷烃的海洋石油,具有应用到溢油污染海洋环境生物修复的潜力。由于低蛋白酶具有温度低、热敏感等特点,是一类非常重要的工业用酶,林念炜等(2004)从南极海域沉积物中筛选到的一株 *Marinobacter* sp. R2 就具有产低温蛋白酶的功能。高玉光(2011)在研究油田采油功能菌时,从北海分离到了除烃海杆菌,具有石油烃降解功能。

藻际细菌是在藻际环境里形成的具有一定功能和结构的,并与藻类有相互作用的微生物群落。它们对微藻的繁殖、生长、死亡、孢囊形成都有着极为重要的作用。藻际细菌群落多样性受细菌总体数量、群落结构、种群优势度和均匀度等方面的影响,当群落多样性变化显著时,可伴随水质的变坏与病害的发生(邓刚等,2005;冯胜等,2010),从而影响微藻的生长。目前对于藻菌关系的研究有助于人们在此基础上找到一种调控赤潮藻生长的方法,以期将这种方法运用到赤潮的生物防治过程中。

### 参 考 文 献

- 王 彪,黄杰勋,章晓波等,2010. 一株海洋产电菌 *Shewanella* sp. S2 的筛选和产电分析. 微生物学通报, 37(3): 342—348
- 王 新,周立红,郑天凌等,2007. 塔玛亚历山大藻藻际细菌溶藻过程. 生态学报, 27(7): 2864—2871
- 邓 刚,吕军仪,林 强,2005. 大海马育苗池水华发生期间细菌动态及相关理化参数. 中国水产科学, 12(4): 477—482
- 冯 胜,李定龙,秦伯强,2010. 太湖水华过程中微生物群落的动态变化. 宁波大学学报, 23(1): 7—12
- 乔洪金,刘相全,马晶晶等,2012. 5 株海洋微藻伴生细菌的分离鉴定与功能分析. 安徽农业科学, 40(29): 14421—14424
- 刘 杰,王晓姗,王能飞等,2009. 青岛近海浒苔粘附着细菌 16S rDNA 系统发育学研究. 科学技术与工程, 9(8): 2042—2046
- 李 倩,崔志松,赵爱芬等,2011. 一株石油烃降解菌新种 *Marinobacter* sp. PY97S 的鉴定. 微生物学报, 51(5): 648—655
- 李 筠,周宏霞,刘佳琳等,2006. 青岛近岸特征环境中海洋异养细菌的分布规律及其分子鉴定. 中国海洋大学学报, 36(6): 965—970
- 李福东,张 诚,邹景忠,1996. 细菌在浮游植物生长过程中的作用. 海洋科学, (6): 30—34

- 张俊, 杨宇峰, 龚映雪等, 2010. 中肋骨条藻与链状斯氏藻藻际细菌溶藻效应研究. 环境科学学报, 30(6): 1271—1279
- 张春丹, 陈燕, 全晶晶等, 2011. 瓶装泥螺和蟹糊中细菌多样性研究. 食品科学, 32(1): 185—188
- 林伟, 陈騫, 刘秀云, 2000. 海洋微藻除菌及除菌与自然带菌微藻生长特点比较. 海洋与湖沼, 31(6): 647—652
- 林伟, 陈騫, 刘秀云, 2001. 海洋微藻培育系统抗弧菌作用机理. 海洋与湖沼, 32(1): 7—14
- 林念炜, 张锐, 赵晶等, 2004. 南极产低温蛋白酶菌株 *Marinobacter* sp. R2 的发酵条件及酶学性质研究. 厦门大学学报, 43(6): 865—869
- 赵锐, 王红, 张晓华等, 2013. 青岛海区 4 种大型海藻可培养附生细菌多样性研究. 中国海洋大学学报, 43(3): 44—49
- 高玉光, 2011. 油田采油功能菌的研究. 荆州: 长江大学硕士学位论文, 16—17
- 曾润颖, 赵晶, 2002. 深海细菌的分子鉴定分类. 微生物学通报, 29(6): 12—16
- 谭田丰, 2006. 海洋石油降解菌的分离鉴定及其在海洋石油污染物修复中的应用研究. 厦门: 厦门大学硕士学位论文, 37—47
- 戴欣, 陈月琴, 周惠等, 2000. 海洋细菌的分子鉴定分类. 中山大学学报(自然科学版), 39(1): 68—71
- Adachi M, Kanno T, Matsubara T, 1974. Promotion of cyst formation in the toxic dinoflagellate *Alexandrium* (Dinophyceae) by natural bacterial assemblages from Hiroshima Bay, Japan. Journal of Phycology, 10: 245—252
- Fukami K, Yuzawa A, Nishijima T *et al*, 1992. Isolation and properties of a bacterium inhibiting the growth of *Gymnodinium nagasakiense*. Nippon Suisan Gakkaishi, 58(6): 1073—1077
- Haines K C, Guillard R R L, 1974. Growth of vitamin B12-requiring marine diatoms with vitamin B12-producing marine bacteria. Journal of Phycology, 10: 245—252
- Hentschel U, Schmid M, Wagner M, 2001. Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. FEMS Microbiology Ecology, 35: 305—312
- Maruyama A, Maeda M, Simidu U, 1986. Occurrence of plant hormone (cytokinin)-producing bacteria in the sea. Journal of Applied Bacteriology, 61: 569—574
- Mayali X, Doucette G J, 2002. Microbial community interactions and population dynamics of an algicidal bacterium active *Karenia breas* (Dinophyceae). Harmful Algae, 1: 277—293
- Mouget J, Dakhama A, Lavoie M C, 1995. Algal growth enhancement by bacteria: Is consumption of photosynthetic oxygen involved?. FEMS Microbiology Ecology, 18(1): 35—43
- Nakanishi K, Nishijima M, Masamichi N *et al*, 1996. Bacteria that induce morphogenesis in *Ulva pertusa* (Chlorophyta) grown under axenic conditions. Journal of Phycology, 32(3): 479—482
- Pratixa P, Callow M E, Ian J *et al*, 2003. Specificity in the settlement-modifying response of bacterial biofilms towards zoospores of the marine alga *Enteromorpha*. Environmental Microbiology, 5(5): 338—349

## MOLECULAR IDENTIFICATION OF FOUR STRAINS OF HETEROTROPHIC BACTERIA ISOLATED FROM *KARENIA MIKIMOTOI*

GONG Shi-Yan, TU Yan-Ping, XIE Zhi-Hao

(School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo 315211, China; Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

**Abstract** Molecular identification and functional analysis on heterotrophic bacteria from *Kareoia mikimotoi* were carried out. Four cultivable strains, ie., P1 to P4 that selected from these isolates were identified and classified based on analysis of 16S rRNA sequence. The results show that they belong to four genera including, *Erythrobacter*, *Shewanella*, and *Marinobacter*. Similarity search in 16S rRNA sequence indicated that Strain P1 could be identified *Formosa* to genus level, and other three strains P2 to P4 to species level for sharing more than 99% sequence homology with some strains of *Erythrobacter*, *Shewanella*, and *Marinobacter*, respectively. Phylogenetic tree between the four strains and their 24 homologies could be divided into four branches, which is consistent with homology analysis.

**Key words** *Karenia mikimotoi*; heterotrophic bacteria; 16S rRNA; molecular identification