

米氏凯伦藻(Km02)共培养细菌群落的研究*

王鹏斌 戴鑫烽 陆斗定

(自然资源部第二海洋研究所 海洋生态系统与生物地球化学重点实验室 杭州 310012)

摘要 米氏凯伦藻作为我国沿岸典型的有毒赤潮甲藻,近年来赤潮频度越来越密,赤潮规模越来越大,持续时间也越来越长,造成了严重的经济损失,并且威胁到海洋生态系统的健康。众多研究表明藻际细菌可能是影响赤潮生消与有毒藻产毒的关键生物影响因子。为揭示米氏凯伦藻共培养菌群的物种多样性信息,本文通过高通量测序技术手段,分析了我国沿岸产米氏凯伦藻(Km02)共培养菌群的种类、丰度、多样性及系统发育信息。结果显示,米氏凯伦藻(Km02)共培养菌群共有 40 个种与已有数据库匹配,隶属于 4 个门(Phylum), 11 个纲(Class), 21 个目(Order), 26 个科(Family), 37 个属(Genus)。其中优势菌属有 8 个(>5%),分别为 *Balneola* (20.28%)、*Marinobacter* (19.25%)、Rhodobacteraceae 科下的未知属(13.15%)、*Alteromonas* (8.88%)、*Methylophaga* (8.17%)、*Thalassospira* (6.24%)、*Reichenbachiella* (5.92%)及 *Mesoflavibacter* (5.41%)。研究结果表明我国沿岸产米氏凯伦藻(Km02)含有生物多样性较高的共培养菌群,且具有探寻未知海洋细菌的潜力,同时该研究结果也为未来更进一步研究细菌群落对米氏凯伦藻赤潮暴发与消亡,以及产毒特性等机制的研究提供了实验方法与奠定了理论基础。

关键词 赤潮藻; 米氏凯伦藻; 共培养菌群

中图分类号 Q948.885.3; X55 **doi:** 10.11693/hyhz20180700179

近年来,在中国及周边国家乃至世界沿海有害赤潮的发生均呈现出频率逐渐增加、规模不断扩大的趋势,危害人类的身体健康和生命安全,同时也造成了巨大的经济损失(Lu *et al.*, 2001; Dai *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2018)。在我国东海,长期以来都是由东海原甲藻(*Prorocentrum donghaiense* Lu)形成赤潮,规模有时达数千平方公里,实属世界罕见,引起了我国政府、公众和科技界的广泛关注。自 2002 年 5 月 4 日在福鼎和霞浦东部海域出现米氏凯伦藻赤潮后,东海海区米氏凯伦藻时有发生,且频度与规模呈现增高增大的趋势,有时米氏凯伦藻与东海原甲藻共同形成赤潮(许翠娅等, 2010; 刘志国等, 2014)。米氏凯伦藻在东海出现与暴发的时间在 5—6 月,赤

潮持续时间多数在 12d 之内,但据许翠娅等(2010)报道,在福建连江近岸海域也有过 1 起米氏凯伦藻的赤潮持续时间最长达 35d。然而,中国首次由米氏凯伦藻引发的赤潮时间可追溯到 1980 年的香港水域(香港渔农自然护理署, 2013)。后来,张水浸等(1988)报道的 1986 年 6 月厦门西港区曾发生的一次裸甲藻赤潮,被怀疑是米氏凯伦藻赤潮(刘志国等, 2014),这可能是我国内地较早的关于米氏凯伦藻赤潮的报道。在广东珠江口的桂山岛、外伶仃岛和香港海域,1998 年从 3 月中旬至 4 月中旬,发生了持续近 30d 的大面积米氏凯伦藻赤潮,造成了大批养殖鱼、贝类死亡,据统计粤港两地因此造成的经济损失达 3.5 亿元,其中广东省近 5000 万元,这同时也是国内明确记录的首次

*国家重点研发计划资助, 2017YFC1404300 号; 国家自然科学基金青年项目, 41706191 号; 国家海洋局第二海洋研究所所长专项团队项目, JT1803 号; 海洋赤潮灾害立体监测技术与应用国家海洋局重点实验室开放研究基金课题, MATHAB201704 号; 国家自然科学基金项目, 41676111 号; 卫星海洋环境动力学国家重点实验室自主项目, SOEDZZ1702 号。王鹏斌, 助理研究员, E-mail: algae@sio.org.cn

通信作者: 戴鑫烽, 副研究员, E-mail: xinfengdai@sio.org.cn

收稿日期: 2018-07-23, 收修改稿日期: 2018-10-16

发生该种引发的赤潮,也是目前我国该种造成经济损失最严重的一次(王朝晖等,2001)。

作为有毒藻,米氏凯伦藻能够产生的溶血毒素,而溶血毒素是造成鱼类大量死亡的主要原因之一,其成分以糖脂类、糖苷类和不饱和多脂肪酸类化合物为主,也有少数蛋白质和肽类物质(刘桂英等,2015)。由于溶血毒素能够造成鱼鳃小叶上皮细胞增生、邻近鳃叶粘连、上皮细胞脱落、鳃血管破裂、血细胞渗出等病理现象,进而导致鱼类呼吸困难,从而死亡(王朝晖等,2001)。然而,影响赤潮发生与毒性的因素多种多样,大部分的研究集中于物理、化学与生理因素(曾江宁等,2004; Heisler *et al.*, 2008; Anderson *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2014),对于生态系统中生物因素(比如细菌等)对赤潮藻群落和产毒的影响与相互作用关注相对较少(Azam *et al.*, 1983)。

近年来,随着分子生物学和生态学技术的发展,高通量测序技术的建立为研究复杂样品中细菌群落的物种的丰富度与多样性提供了强有力的技术支撑(Celikkol-Aydin *et al.*, 2016; Guidi *et al.*, 2018)。尽管目前已经有较多关于米氏凯伦藻的研究,但对其共培养细菌菌群的物种及多样性背景信息尚知之甚少。研究赤潮原因种及其共生或寄生的细菌群落结构,对研究细菌和赤潮藻的相互作用,乃至对了解和预测赤潮的发生、变化趋势以及消亡都具有重要的意义(Croft *et al.*, 2005; Bolch *et al.*, 2011; Sarmiento *et al.*, 2012)。为此,本文对我国沿海分离的一株米氏凯伦藻的共培养菌群进行了高通量测序分析,并获得了该株系的共培养菌群的种类、相对丰度、多样性与进化位置等信息。研究结果可为后续开展藻菌关系、米氏凯伦藻赤潮暴发与终结、产毒特性等生物机理的研究提供必要的研究方法与背景信息。

1 材料与方法

1.1 实验藻种与培养方法

实验所用的藻种米氏凯伦藻(*Karenia mikimotoi*, Km02)分离自赤潮高发区珠海海域,由暨南大学赤潮与水环境研究中心藻种室(吕颂辉教授课题组)提供。培养基采用外海天然海水,按照Guillard等(1962)改良的不含硅酸盐的*f/2*配方配制。将对数期藻种接种于100mL培养液,最终培养起始浓度为约100cells/mL。共进行三个平行培养。培养温度为20°C,光照强度约为100 $\mu\text{mol}(\text{m}^2\cdot\text{s})$,光暗比为12h:12h。

1.2 样品总DNA的提取

培养10d后,米氏凯伦藻处于对数期,对藻进行

回收。取100mL微藻培养液抽滤于0.2 μm GTTP滤膜上(Millipore filter membrane, Millipore Filter Corporation, Ireland)。将滤膜浸泡于盛有0.8mL细胞裂解液的2mL EP管。-20°C保存待DNA提取。

总DNA的提取参考Wang等(2017)提取海洋水体里环境DNA的方法。将EP管置于液氮中直到完全冻凝后放入65°C水浴锅,进行冻融,重复3次。加入8 μL 的10mg/mL蛋白酶K(10mg/mL溶解于TE缓冲液:10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA; pH 8)。37°C水浴30min,期间颠倒EP管3—4次使混匀。加80 μL 20%的SDS溶液后,65°C水浴2h,期间颠倒EP管7—8次使混匀。振荡使混匀。加入等量的chloroform-isoamylalcohol(24:1, *V/V*)后轻轻混匀。10000g离心5min,用移液枪小心将上清液转移至新的2mL EP管,不要扰动下层液体。如上清液不够清澈,可重复加入chloroform-isoamylalcohol(24:1, *V/V*)进行以上操作,直到液体澄清。加入0.1倍等量体积的3mol/L的醋酸钠溶液后,再加入0.6倍等量体积的异丙醇(isopropanol)。14000g离心30min,小心倒去上清液。加入1mL 70%的4°C预冷乙醇洗涤,振荡混匀。14000g离心15min,小心倒去上清液。将EP管打开后倒置在吸水纸上,使乙醇蒸发,室温干燥15min以上。最后加入100 μL 灭菌的1 \times TE缓冲液,振荡使DNA溶解混匀。

1.3 PCR扩增与高通量测序

PCR扩增所使用细菌通用引物为V3—V4区338F—806R,其中上游引物338F:5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3';下游引物806R:5'-GGACTAC HVGGGTWTCTAAT-3',进行PCR扩增。用20 μL 反应体系:5 \times FastPfu Buffer(4 μL)、2.5mmol/L dNTPs(2 μL)、Forward Primer(5 $\mu\text{mol/L}$)(0.4 μL)、Reverse Primer(5 $\mu\text{mol/L}$)(0.4 μL)、FastPfu Polymerase(0.4 μL)、Template DNA(10ng),补ddH₂O至20 μL 。PCR反应参数:95°C预变性2min;95°C变性30s,55°C退火30s,72°C延伸30s,循环30次;72°C终延伸5min,10°C时停止。在进行胶回收,PCR产物定量,Miseq文库构建后,通过Illumina MiSeq(Illumina Inc, San Diego, CA)平台进行高通量测序。

1.4 生物信息分析

根据Miseq测序结果得到的PE reads,根据overlap关系进行拼接,并对序列质量进行质控和过滤。区分样本后,对样本进行操作分类单元(Operational taxonomic units, OTU)聚类分析与物种分类学分析,并通过OTU的多态性进行多样性指数分

析, 以及对测序深度的检测与评估; 基于分类学分析结果, 在不同分类水平上进行细菌群落结构的统计与分析。

1.5 系统发生进化树

在 FastTree 软件中 (version 2.1.3 <http://www.microbesonline.org/fasttree/>) 通过选择属水平上的分类信息对应序列, 根据最大似然法 (approximately-maximum-likelihood phylogenetic trees) 构建进化树, 并利用 R 语言将进化树图形化, 最终结果通过进化树与 reads 丰度组合图的形式呈现。

表 1 米氏凯伦藻(Km02)细菌菌群高通量测序结果信息统计表

Tab.1 The high-throughput sequencing results of bacterial community of *K. mikimotoi* (Km02)

样本名	序列数	碱基数	平均长度(碱基)	最短序列长度(碱基)	最长序列长度(碱基)
Km_1	72826	32179710	442	279	508
Km_3	45426	20096178	442	407	453
Km_2	35395	15667399	443	421	451
总计	153647	67943287	—	—	—

2.2 样品多样性指数

米氏凯伦藻 Km02 株系的共培养菌群样品通过序列随机抽样法进行多样性稀释性曲线分析, 以抽到测序序列数与其代表 OTU 数目构建 rarefaction 曲线(图 1), 结果表明各个样品的高通量测序深度都很充分。样品多样性指数, 包括菌群多样性指数 (Community diversity index) Shannon 指数与 Simpson 指数, 菌群丰度指数 (Community richness index) Ace 指数与 Chao 指数, 及测序深度指数覆盖度 (Coverage), 结果如表 2 所示。通过多样性结果可看出 3 个实验平行效果好。其中, 米氏凯伦藻 Km02 株系共培养菌群有 43 个 OTU。3 个实验平行的平均 Shannon 指数为 2.51, Simpson 指数为 0.12, Ace 指数为 43.98, Chao 指数为 43.50, 为此米氏凯伦藻 Km02 株系共培养细菌菌群的生物多样性较高(表 2)。测序深度指标覆盖度也几乎达到 100%。

表 2 米氏凯伦藻(Km02)细菌菌群生物多样性指数

Tab.2 The biodiversity index of *K. mikimotoi* (Km02)

样本名	分类单元 (OTU)	Shannon 指数	Simpson 指数	Ace 指数	Chao 指数	覆盖度
Km_1	43	2.46	0.12	43.00	43.00	1.0000
Km_2	43	2.56	0.11	44.40	44.00	0.9999
Km_3	43	2.52	0.12	44.54	43.50	0.9999
平均	43	2.51	0.12	43.98	43.50	1.0000

2 结果与分析

2.1 测序数据序列信息统计

在培养 10d 后, 将藻液过膜后提取 DNA 完成后, 利用高通量测序技术分析了米氏凯伦藻(Km02)共培养菌群多样性。本次实验对米氏凯伦藻 Km02 株系的 3 个实验平行样品中的核糖体小亚基(16S)338F—806R 区间进行扩增, 经过质控、拼接、去除 barcode 序列等处理, 本试验最终获得 153647 条有效序列(表 1), 单条序列平均长度样品平均长度 442 个碱基。

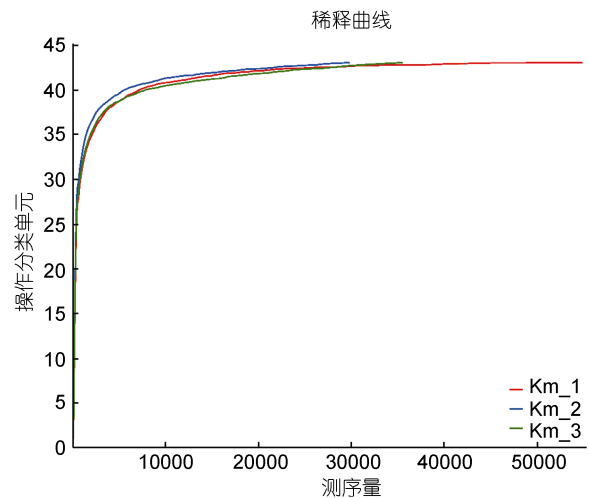


图 1 米氏凯伦藻(Km02)细菌菌群高通量测序结果稀释曲线
Fig.1 Rarefaction curves of *K. mikimotoi* from the analysis of high-throughput sequencing
注: Km_1, Km_2, Km_3 分别为米氏凯伦藻 Km02 株系的 3 个实验平行的样品

表 3 米氏凯伦藻(Km02)细菌菌群生物多样性指数
Tab.3 The biodiversity index of *K. mikimotoi* (Km02)

操作分类单元 OTU	分类学地位	序列数*
OTU31	Bacteria, Bacteroidetes, Bacteroidetes_Incertae_Sedis, Order_III, Unknown_Family_Order_III, <i>Balneola</i>	24234
OTU5	Bacteria, Bacteroidetes, Bacteroidetes_Incertae_Sedis, Order_III, Unknown_Family_Order_III, <i>Gracilimonas</i>	63
OTU28	Bacteria, Bacteroidetes, Cytophagia, Cytophagales, Flammeovirgaceae, <i>Marinoscillum</i>	665
OTU33	Bacteria, Bacteroidetes, Cytophagia, Cytophagales, Flammeovirgaceae, <i>Marinoscillum</i>	372
OTU35	Bacteria, Bacteroidetes, Cytophagia, Cytophagales, Flammeovirgaceae, <i>Reichenbachiella</i>	6833
OTU25	Bacteria, Bacteroidetes, Cytophagia, Cytophagales, Flammeovirgaceae, <i>Reichenbachiella</i>	241
OTU37	Bacteria, Bacteroidetes, Flavobacteriia, Flavobacteriales, Cryomorphaceae, norank_Cryomorphaceae	43
OTU36	Bacteria, Bacteroidetes, Flavobacteriia, Flavobacteriales, Flavobacteriaceae, <i>Mesoflavibacter</i>	6465
OTU38	Bacteria, Fibrobacteres, Chitinivibrionia	1805
OTU43	Bacteria, Proteobacteria, AEGEAN-245	64
OTU16	Bacteria, Proteobacteria, Alphaproteobacteria, Caulobacterales, Hyphomonadaceae, <i>Henriciella</i>	239
OTU12	Bacteria, Proteobacteria, Alphaproteobacteria, Kordiimonadales, Kordiimonadaceae, <i>Kordiimonas</i>	30
OTU22	Bacteria, Proteobacteria, Alphaproteobacteria, Rhizobiales, Phyllobacteriaceae, <i>Mesorhizobium</i>	109
OTU17	Bacteria, Proteobacteria, Alphaproteobacteria, Rhizobiales, Phyllobacteriaceae, <i>Nitratireductor</i>	60
OTU4	Bacteria, Proteobacteria, Alphaproteobacteria, Rhizobiales	115
OTU29	Bacteria, Proteobacteria, Alphaproteobacteria, Rhodobacterales, Rhodobacteraceae, <i>Labrenzia</i>	655
OTU15	Bacteria, Proteobacteria, Alphaproteobacteria, Rhodobacterales, Rhodobacteraceae, <i>Roseovarius</i>	217
OTU26	Bacteria, Proteobacteria, Alphaproteobacteria, Rhodobacterales, Rhodobacteraceae, unclassified_Rhodobacteraceae	15247
OTU32	Bacteria, Proteobacteria, Alphaproteobacteria, Rhodobacterales, Rhodobacteraceae, unclassified_Rhodobacteraceae	468
OTU19	Bacteria, Proteobacteria, Alphaproteobacteria, Rhodospirillales, Rhodospirillaceae, <i>Magnetospira</i>	19
OTU23	Bacteria, Proteobacteria, Alphaproteobacteria, Rhodospirillales, Rhodospirillaceae, <i>Nisaea</i>	2519
OTU6	Bacteria, Proteobacteria, Alphaproteobacteria, Rhodospirillales, Rhodospirillaceae	11
OTU1	Bacteria, Proteobacteria, Alphaproteobacteria, Rhodospirillales, Rhodospirillaceae	6
OTU27	Bacteria, Proteobacteria, Alphaproteobacteria, Rhodospirillales, Rhodospirillaceae, <i>Thalassospira</i>	7454
OTU18	Bacteria, Proteobacteria, Alphaproteobacteria, Sphingomonadales, Erythrobacteraceae, <i>Erythrobacter</i>	240
OTU20	Bacteria, Proteobacteria, Alphaproteobacteria	96
OTU14	Bacteria, Proteobacteria, Betaproteobacteria, Burkholderiales, Burkholderiaceae, <i>Limnobacter</i>	896
OTU13	Bacteria, Proteobacteria, Deltaproteobacteria, Myxococcales, Sandaracinaceae, <i>Sandaracinus</i>	436
OTU41	Bacteria, Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Alteromonadales, Alteromonadaceae, <i>Alteromonas</i>	10613
OTU10	Bacteria, Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Alteromonadales, Alteromonadaceae, <i>Marinobacter</i>	2331
OTU3	Bacteria, Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Alteromonadales, Alteromonadaceae, <i>Marinobacter</i>	20674
OTU40	Bacteria, Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Cellvibrionales, Porticoccaceae, <i>Porticoccus</i>	652
OTU39	Bacteria, Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Cellvibrionales, Porticoccaceae, SAR92_clade	74
OTU42	Bacteria, Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Cellvibrionales, Spongiibacteraceae, <i>Spongiibacter</i>	412
OTU9	Bacteria, Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Oceanospirillales, Alcanivoracaceae, <i>Alcanivorax</i>	2726
OTU7	Bacteria, Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Oceanospirillales, Oceanospirillaceae, <i>Bermanella</i>	4
OTU11	Bacteria, Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Oceanospirillales, Oceanospirillaceae, <i>Pseudohongiella</i>	362
OTU34	Bacteria, Proteobacteria, Gammaproteobacteria, PYR10d3, norank_PYR10d3, norank_PYR10d3	412
OTU8	Bacteria, Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Thiotrichales, Piscirickettsiaceae, <i>Methylophaga</i>	9761
OTU2	Bacteria, Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Thiotrichales, Thiotrichaceae, <i>Thiothrix</i>	17
OTU24	Bacteria, Proteobacteria, Proteobacteria_Incertae_Sedis	1508
OTU21	Bacteria	249
OTU30	Bacteria	113

注: *序列数为三个平行样品的总和

2.3 操作分类单元(OTU)分布与统计

操作分类单元(OTU)是系统发生学或群体遗传学研究中人为设置的分类单元标志,以便进行比对分析(Blaxter *et al.*, 2005; Ramanan *et al.*, 2016)。表 3 表示的是米氏凯伦藻(Km02)共培养菌群样品 OTU 代表性序列相似性在 97% 以上的序列数统计表, OTU 聚类得到样品中各个 OTU 丰度及其在样品中序列数。序列数为米氏凯伦藻 Km02 株系 43 个 OTU 的 3 个平行实验样品结果的总和(表 3)。

2.4 分类学分析

采用 RDP classifier 贝叶斯算法对高通量测序所获得的 Km02 株系共培养菌群结果,以 97%相似水平 OTU 代表序列进行分类学分析,在不同的分类水平

上统计分析样品微生物群落组成。结果表明,米氏凯伦藻 Km02 株系含有的共培养菌群分布在 4 个门(Phylum), 11 个纲(Class), 21 个目(Order), 26 个科(Family), 37 个属(Genus), 40 个种(Species), 此外含有 3 个 OTU 为未知门的种。从属水平比对结果来看(图 2), 其中优势菌属有 8 个(>5%), 分别为 *Balneola* (20.28%)、*Marinobacter* (19.25%)、Rhodobacteraceae 科下的未知种属(13.15%)、*Alteromonas* (8.88%)、*Methylophaga* (8.17%)、*Thalassospira* (6.24%)、*Reichenbachiella* (5.92%)及 *Mesoflavibacter* (5.41%)。结果表明米氏凯伦藻 Km02 株系含有生物多样性较高的共培养菌群,且具有探寻未知海洋细菌的潜力,如 OTU20, OTU21, OTU26, OTU30 等。

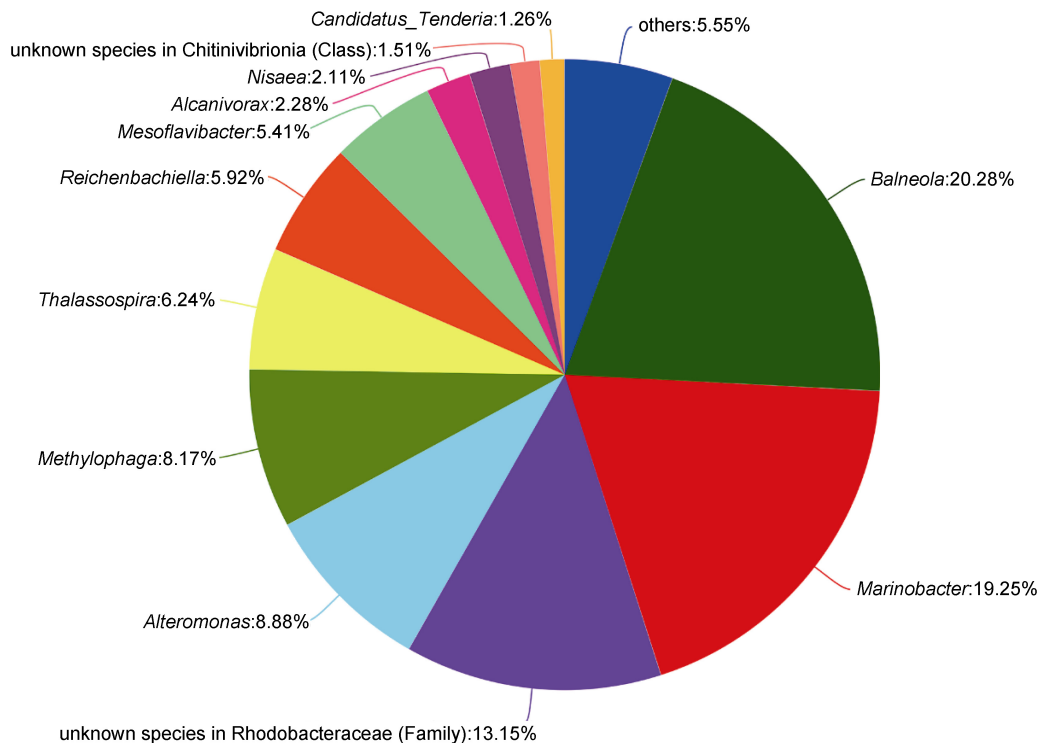


图 2 米氏凯伦藻(Km02)共培养细菌菌群属水平分布图

Fig.2 Co-cultured bacterial community distribution of *K. mikimotoi* (Km02) at the genus level

注: 小于 0.01%的分类群被合并到其他(others)

2.5 系统发生进化树分析

从分子进化的角度,揭示米氏凯伦藻(Km02)共培养细菌菌群属分类在演化过程中的亲缘顺序关系。并对照分析了各优势属的测序 read 数量与标识各个纲下米氏凯伦藻(Km02)共培养细菌的所在位置。通过图 3 我们可以看出, Alphaproteobacteria 和 Gammaproteobacteria 两个纲的细菌不论在多样性还是相对丰度上都占有优势。其中, Gammaproteobacteria 中的未定种属 norank_

PYR10d3 与 *Pseudohongiella* 属较接近, Alphaproteobacteria 中的未定种属 unclassified_Rhodobacteraceae 和 norank_PS1_clade 与 *Roseovarius* 有着较近的亲缘关系。其中, unclassified_Rhodobacteraceae 由于其在共培养群落中有着较大相对丰度与优势,该 OTU 所代表的细菌不论是分类学还是生态意义,都是今后进行米氏凯伦藻(Km02)共培养细菌分类培养实验中重点研究对象之一。

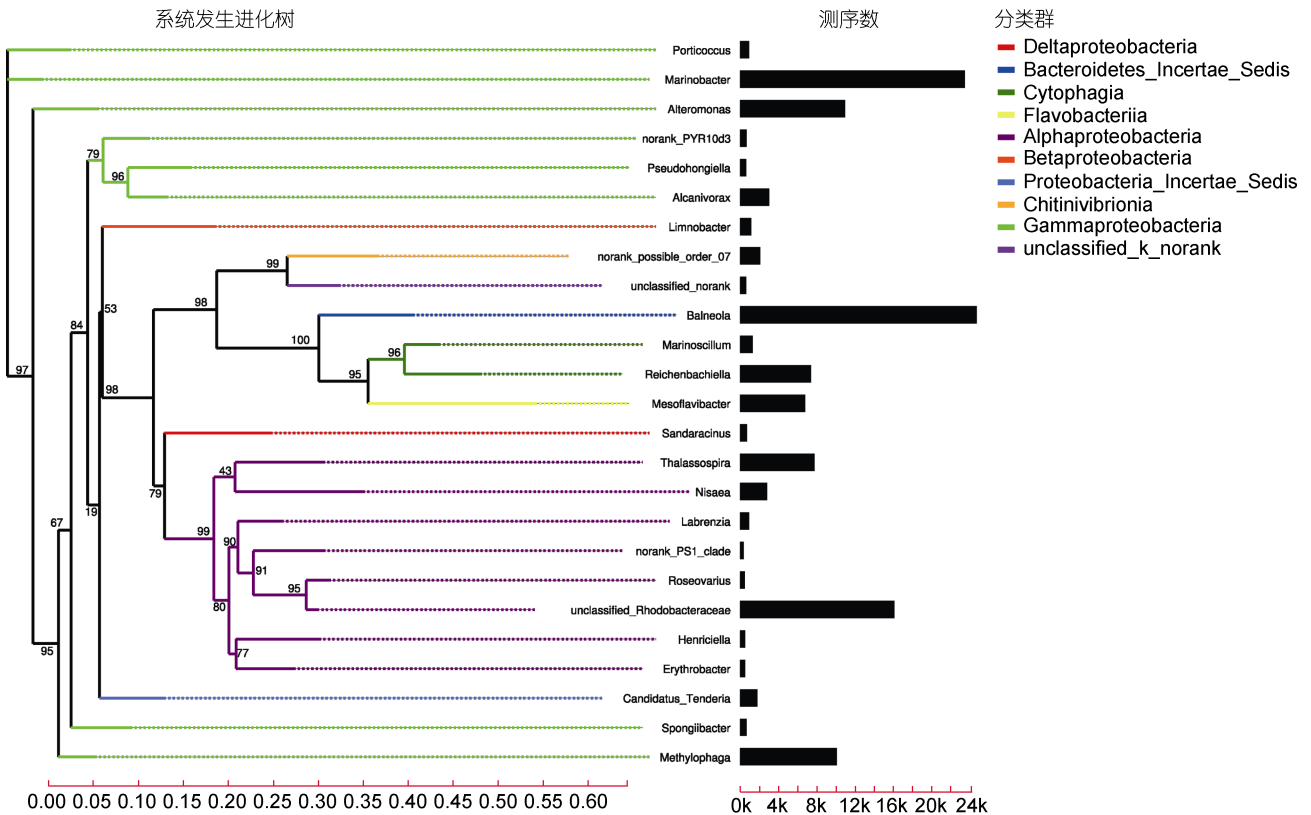


图3 米氏凯伦藻 Km02 共培养细菌优势种的系统进化树及其优势度

Fig.3 Phylogenetic tree of *K. mikimotoi* (Km02) co-cultured bacterial community and their reads number

注: 左边为米氏凯伦藻 Km02 株共培养细菌相对丰度前 25 种的系统发生进化树, 进化树中每条树枝代表米氏凯伦藻 Km02 株中的一种共培养细菌, 树枝长度为两个物种间的进化距离, 即共培养细菌的差异程度; 右边柱状图显示属于不同共培养细菌的 Reads 数量

3 讨论

尽管过去研究赤潮发生的机理主要集中在理化因素的影响, 而越来越多的证据表明仅凭借温度与营养盐等环境因素并不能解释大部分赤潮现象, 因此生物因素受到越来越多的关注, 近来藻际细菌被认为可能在藻类快速生长或赤潮生消过程中发挥着重要作用(Park *et al*, 2015, 2017)。有研究表明海洋藻际细菌群落和海洋中的游离细菌群落在系统发育上有着明显的区别, 说明两种不同生存环境下的细菌种群结构组成由不同的选择性压力所影响(Grossart *et al*, 2005; Rooney-Varga *et al*, 2005)。此外, 海洋微藻与其共生的细菌在长期自然进化的过程中, 形成复杂的共生体系, 藻菌之间不仅有能量与代谢产物的相互利用, 而且有遗传物质在不同物种之间进行基因水平转移(Horizontal gene transfer)甚至是基因融合(Gene fusion) (Hold *et al*, 2001; Green *et al*, 2004; Keeling *et al*, 2008)。高通量测序对微藻培养株共培养菌进行种群分析, 避免了利用传统的培养法所导致

的一些海洋细菌特别是共生菌不可培养性的缺陷与技术瓶颈。为此, 藻际细菌的种群与其共生或寄生藻株有着息息相关的联系, 特别是在目前很多时候通过物理化学因素已经无法判断有毒有害赤潮发生的机制与产毒机制的背景下, 通过高通量测序技术等先进实验方法研究有害赤潮藻的藻际细菌显得尤为重要, 这也会为将来通过生物因子揭示对赤潮的暴发与产毒特性机理的研究提供了研究方向与方法。

4 结论

本研究利用高通量测序技术, 首次阐明了我国米氏凯伦藻内共培养菌群的种类、丰度、多样性与种群进化关系。结果表明米氏凯伦藻 Km02 株含有生物多样性较高的共培养菌群, 且具有探寻未知海洋细菌的潜力, 并且为未来通过与不同米氏凯伦藻株的共培养菌群以及不同生长条件下培养的米氏凯伦藻所分析得到细菌群落奠定了基础, 未来通过深度挖掘细菌种群变动与藻株的生长促进与抑制等变化, 将对米氏凯伦藻赤潮的暴发与产毒的生物机制提供有力的证据。

参 考 文 献

- 王朝晖, 尹伊伟, 齐雨藻等, 2001. 珠海桂山岛米氏裸甲藻赤潮对鱼鳃损伤的病理学组织观察. 海洋学报, 23(1): 133—138
- 刘志国, 王金辉, 蔡 芑等, 2014. 米氏凯伦藻分布及其引发赤潮的发生规律研究. 国土与自然资源研究, (1): 38—41
- 刘桂英, 葛 坤, 宋 伦等, 2015. 米氏凯伦藻的研究进展. 海洋科学, 39(9): 117—122
- 许翠娅, 黄美珍, 杜 琦, 2010. 福建沿岸海域主要赤潮生物的生态学特征. 台湾海峡, 29(3): 434—441
- 张水浸, 许昆灿, 陈其焕等, 1988. 厦门西港区一次赤潮的观测. 海洋学报, 10(5): 602—608
- 香港渔农自然护理署, 2013. 香港有害海洋微生物
- 曾江宁, 曾淦宁, 黄韦良等, 2004. 赤潮影响因素研究进展. 东海海洋, 22(2): 40—47
- Anderson D M, Burkholder J M, Cochlan W P *et al*, 2008. Harmful algal blooms and eutrophication: examining linkages from selected coastal regions of the United States. *Harmful Algae*, 8(1): 39—53
- Azam F, Fenchel T, Field J G *et al*, 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine Ecology Progress Series*, 10(3): 257—263
- Blaxter M, Mann J, Chapman T *et al*, 2005. Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462): 1935—1943
- Bolch C J S, Subramanian T A, Green D H, 2011. The toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (dinophyceae) requires marine bacteria for growth. *Journal of Phycology*, 47(5): 1009—1022
- Celikkol-Aydin S, Gaylarde C C, Lee T *et al*, 2016. 16S rRNA gene profiling of planktonic and biofilm microbial populations in the Gulf of Guinea using Illumina NGS. *Marine Environmental Research*, 122: 105—112
- Croft M T, Lawrence A D, Raux-Deery E *et al*, 2005. Algae acquire vitamin B₁₂ through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature*, 438(7064): 90—93
- Dai X F, Lu D D, Guan W B *et al*, 2014. Newly recorded *Karlodinium veneficum* dinoflagellate blooms in stratified water of the East China Sea. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 101: 237—243
- Green D H, Llewellyn L E, Negri A P *et al*, 2004. Phylogenetic and functional diversity of the cultivable bacterial community associated with the paralytic shellfish poisoning dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *FEMS Microbiology Ecology*, 47(3): 345—357
- Grossart H P, Levold F, Allgaier M *et al*, 2005. Marine diatom species harbour distinct bacterial communities. *Environmental Microbiology*, 7(6): 860—873
- Guidi F, Pezozolesi L, Vanucci S, 2018. Microbial dynamics during harmful dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* growth: bacterial succession and viral abundance pattern. *MicrobiologyOpen*, 7(4): e00584
- Guillard R R L, Ryther J H, 1962. Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology*, 8(2): 229—239
- Heisler J, Glibert P M, Burkholder J M *et al*, 2008. Eutrophication and harmful algal blooms: a scientific consensus. *Harmful Algae*, 8(1): 3—13
- Hold G L, Smith E A, Rappé M S *et al*, 2001. Characterisation of bacterial communities associated with toxic and non-toxic dinoflagellates: *Alexandrium* spp. and *Scrippsiella trochoidea*. *FEMS Microbiology Ecology*, 37(2): 161—173
- Keeling P J, Palmer J D, 2008. Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. *Nature Reviews Genetics*, 9(8): 605—618
- Kim J H, Wang P B, Park B S *et al*, 2018. Revealing the distinct habitat ranges and hybrid zone of genetic sub-populations within *Pseudo-nitzschia pungens* (Bacillariophyceae) in the West Pacific area. *Harmful Algae*, 73: 72—83
- Lu D D, Goebel J, 2001. Five red tide species in genus *Prorocentrum* including the description of *Prorocentrum donghaiense* Lu sp. nov. from the East China Sea. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 19(4): 337—344
- Park B S, Kim J H, Kim J H *et al*, 2015. Dynamics of bacterial community structure during blooms of *Cochlodinium polykrikoides* (Gymnodiniales, Dinophyceae) in Korean coastal waters. *Harmful Algae*, 48: 44—54
- Park B S, Wang P B, Kim J H *et al*, 2014. Resolving the intra-specific succession within *Cochlodinium polykrikoides* populations in southern Korean coastal waters via use of quantitative PCR assays. *Harmful Algae*, 37: 133—141
- Park J, Park B S, Wang P B *et al*, 2017. Phycospheric native bacteria *Pelagibaca bermudensis* and *Stappia* sp. ameliorate biomass productivity of *Tetraselmis striata* (KCTC1432BP) in co-cultivation system through mutualistic interaction. *Frontiers in Plant Science*, 8: 289
- Ramanan R, Kim B H, Cho D H *et al*, 2016. Algae-bacteria interactions: evolution, ecology and emerging applications. *Biotechnology Advances*, 34(1): 14—29
- Rooney-Varga J N, Giewat M W, Savin M C *et al*, 2005. Links between phytoplankton and bacterial community dynamics in a coastal marine environment. *Microbial Ecology*, 49(1): 163—175
- Sarmiento H, Gasol J M, 2012. Use of phytoplankton - derived dissolved organic carbon by different types of bacterioplankton. *Environmental Microbiology*, 14(9): 2348—2360
- Wang P B, Joo J H, Park B S *et al*, 2017. Relationship between dissolved organic carbon and bacterial community in the coastal waters of Incheon, Korea. *Oceanological and Hydrobiological Studies*, 46(1): 50—61

CO-CULTURED BACTERIAL COMMUNITY OF *KARENIA MIKIMOTOI* (KM02)

WANG Peng-Bin, DAI Xin-Feng, LU Dou-Ding

(Key Laboratory of Marine Ecosystem and Biogeochemistry, Second Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources, Hangzhou 310012, China)

Abstract *Karenia mikimotoi* is a typical toxic harmful algal along the coast of China, and its bloom becomes more frequent, bigger in scale, and lasts longer, and has caused heavy economic losses and threats to the health of the residents in recent years. Many studies have shown that bacteria in the phycosphere may play a key biological role that affects a harmful algal bloom and toxin production. To reveal the species diversity and composition of co-cultured bacterial community of *K. mikimotoi*, we analyzed bacterial species, relative abundance, diversity and phylogenetic information of co-culture bacterial communities of *K. mikimotoi* (Km02) via high-throughput sequencing. The OTU (operational taxonomic units) taxonomy analysis showed that 40 species co-cultured bacterial community associated with *K. mikimotoi* (Km02) could match the established database, including 4 phyla, 11 classes, 21 orders, 26 families, and 37 genera. The top eight species (>5%) included *Balneola* (20.28%), *Marinobacter* (19.25%), unknown species in Rhodobacteraceae (13.15%), *Alteromonas* (8.88%), *Methylophaga* (8.17%), *Thalassospira* (6.24%), *Reichenbachiella* (5.92%), and *Mesoflavibacter* (5.41%). This study is the first one reporting the biodiversity of co-cultured bacterial community associated with *K. mikimotoi* (Km02), providing a potential of discovering new marine microbial species from this strain, and a theoretical basis for understanding the mechanism of the bacterial community to the initiation and termination of the harmful algal bloom of *K. mikimotoi*, as well as the toxin production.

Key words harmful algae; *Karenia mikimotoi*; co-cultured bacterial community