

一株海杆菌的溶藻活性及基于基因组的溶藻机理分析

吴寒华^{1,2}, 李登峰^{1,2*}, 严小军^{1,2}, 徐 然¹, 刘 飞¹, 周成旭¹, 刘联国¹

(1. 宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315211; 2. 宁波大学 浙江海洋高效健康养殖协同创新中心, 浙江 宁波 315211)

摘要: 为了解新型海杆菌(*Marinobacter*)菌株 YWL01 是否具有溶藻活性及其可能的溶藻机理, 将 YWL01 与常见的赤潮藻中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)混合培养, 通过肉眼、光电镜观察及藻叶绿素 a 浓度测定来评估其溶藻活性; 采用 Illumina Miseq 测序技术测定了 YWL01 基因组, 将预测基因的蛋白序列分别进行 BLASTP 比对获得注释信息, 分析其可能的溶藻机理。结果表明, YWL01 可直接溶藻, 感染后藻液颜色由黄褐色逐渐变淡, 藻细胞裂解, 藻叶绿素 a 浓度明显降低。YWL01 基因组中有许多与溶藻相关的基因。研究结果可为海洋生态系统的菌藻关系研究及赤潮防治技术的研发提供参考。

关键词: 海杆菌; 中肋骨条藻; 溶藻; 基因组; 赤潮

中图分类号: Q89

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2017) 01-0023-06

赤潮是我国主要的海洋灾害之一。据国家海洋局中国海洋赤潮灾害公报报道, 从 2009~2014 年累积发生赤潮高达 367 次, 累积面积高达 43 057.7 km², 经济损失惨重。赤潮的高发生率与藻浓度及环境因素(营养浓度、水温、光强度和 pH 值等)存在必然联系^[1-2]。当赤潮发生时, 赤潮生物异常爆发性增加, 破坏海洋生态系统平衡及海洋生物食物链的正常循环, 使鱼虾贝类饵料丧失。此外, 部分赤潮生物能分泌生物毒素, 可直接毒死鱼虾贝等生物, 甚至对人类健康产生危害。

目前, 治理赤潮的手段主要有物理法、化学法和生物法。物理法虽然可直接去除大部分藻类, 但成本高, 且不能从本质上解决富营养化对藻类的影响; 化学法主要是加入除藻剂, 以此快速杀死藻类, 但容易产生二次污染^[3]。近年来, 利用微生物治理赤潮藻类的方法已受到越来越多的关注, 微生物控藻(利用溶藻微生物来防治赤潮藻类)是理想的生态修复技术^[4-6]。溶藻细菌是主要的溶藻微生物, 能以直接或间接方式抑制藻细胞生长甚至杀死藻细胞, 在未来赤潮治理中具有很好的应用

前景^[7-9]。海杆菌属(*Marinobacter*)在海洋中数量丰富, 且分布极广, 是水生生态系统中的重要组成部分^[10-12], 因其功能多样而受到国内外学者的广泛关注。现有的研究证实一些海杆菌与海洋藻类存在密切联系, 有些可与相关藻类共生, 还有些则可以抑藻, 促进其形成海洋雪^[7,13-14]。海杆菌是否可以溶藻, 迄今尚无文献报道。

本文首次研究了 1 株新型海杆菌 YWL01 对我国东海常见赤潮藻中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)的溶藻活性。同时测定了海杆菌 YWL01 的基因组, 初步分析了溶藻的相关功能基因, 以探讨其可能的溶藻机理, 旨在为赤潮的生物防治工程提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

海杆菌 YWL01 由水生微生物课题组分离获得, 保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(保藏编号为 CGMCC No.10857)。用无菌牙签挑取海杆菌 YWL01 单菌落, 转移至装有 5 mL

收稿日期: 2016-03-19。

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journal.g.nbu.edu.cn/>

基金项目: 国家科技部星火计划(2014GA701018); 宁波市科技局农业攻关项目(2011C10004); 浙江省教育厅科研项目(Y201327815);

宁波市海洋蟹类产业科技创新团队项目(2011B81003); 浙江省重点学科开放基金(E02009124200); 宁波大学科研项目(xkzsc1519);

宁波大学王宽诚幸福基金。

第一作者: 吴寒华(1990-), 女, 浙江绍兴人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 水生生物细菌和病毒。E-mail: 497651554@qq.com

*通信作者: 李登峰(1975-), 女, 湖南双峰人, 副教授, 主要研究方向: 水产动物病害防治。E-mail: lidengfeng@nbu.edu.cn

液体海水 LB 培养基的试管中, 37 °C 200 r·min⁻¹ 培养 24 h. 然后取 1 mL 上述菌液于 100 mL 液体海水 LB 培养基中扩大培养, 培养条件如上. 当菌液的 OD_{600} 值达到 0.3~0.6, 用于后续实验.

1.2 培养基

f/2 培养基: 硝酸钠 75 mg·L⁻¹, 磷酸二氢钠 5 mg·L⁻¹, 六水合三氯化铁 3.15×10^{-3} mg·L⁻¹, EDTA-Na₂ 4.36 mg·L⁻¹, 五水硫酸铜 10×10^{-3} mg·L⁻¹, 七水硫酸锌 0.022 mg·L⁻¹, 六水氯化钴 0.001 mg·L⁻¹, 四水氯化锰 0.178 mg·L⁻¹, 二水钼酸钠 6.3×10^{-3} mg·L⁻¹, 维生素 B12 0.5×10^{-3} mg·L⁻¹, 维生素 H 0.5×10^{-3} mg·L⁻¹, 维生素 B1 0.1 mg·L⁻¹, 海水晶 30 g·L⁻¹, 盐度 30‰, 调节 pH 在 7.6~7.8. 1×10^5 Pa 灭菌 30 min. 海水 LB 培养基: 胰化蛋白胨 10 g·L⁻¹, 酵母提取物 5 g·L⁻¹, 海水晶 30 g·L⁻¹, pH 7.0, 盐度 30‰. 1×10^5 Pa 灭菌 30 min.

1.3 方法

1.3.1 海杆菌 YWL01 溶藻活性研究

YWL01 菌液经 800 r·min⁻¹ 离心 20 min, 得到细菌沉淀, 用无菌人工海水清洗 3 次, 最后用等体积的无菌人工海水重悬. 按 1:4 体积比, 将菌细胞悬液添加至指数生长期的中肋骨条藻中, 混匀后共培养 14 d. 培养条件: 20 °C, 3 000 lx, 光暗比(L/D) 为 12 h:12 h. 设置 3 个平行组. 将无菌人工海水代替菌悬液与处于指数生长期的中肋骨条藻藻液同比例混合后作为对照组. 定期用肉眼、光电镜观察和中肋骨条藻叶绿素 a 浓度测定来分析海杆菌 YWL01 的溶藻活性.

藻叶绿素 a 浓度的检测方法参考文献[7,15], 并作了适当修改. 具体为: 20 mL 无污染的藻液经 850 r·min⁻¹ 离心 20 min 后, 弃上清, 藻细胞沉淀中加入 5 mL 90%乙醇, 黑暗下置于-20 °C冰箱内 24 h. 然后样品经 850 r·min⁻¹ 离心 10 min, 上清液用于测量在 665 nm 和 649 nm 处的吸光度, 90%乙醇作为空白. 藻叶绿素 a 浓度计算公式为:

$$C_a = 13.95A_{665} - 6.88A_{649},$$

式中: C_a 表示藻叶绿素 a 浓度, mg·L⁻¹; A_{665} 和 A_{649} 分别表示乙醇提取液在 665 nm 和 649 nm 处吸光度.

1.3.2 海杆菌 YWL01 溶藻模式

为了进一步探索海杆菌 YWL01 是否具有间接溶藻活性, 即胞外分泌物是否具有溶藻活性, 进行

如下实验: 取 YWL01 菌液, 800 r·min⁻¹ 离心 20 min, 上清经 0.22 μm 滤膜重复过滤 3 次; 菌沉淀用无菌人工海水清洗 3 次后, 用等体积的无菌人工海水悬浮. 分别将 10 mL 菌液、滤过液、菌细胞悬液接种 40 mL 指数生长期的中肋骨条藻, 培养条件同 1.3.1 节. 以无菌人工海水配制的 LB 培养基与处于指数生长期的中肋骨条藻藻液同比例混合作为对照组 1, 以无菌人工海水与处于指数生长期的中肋骨条藻藻液同比例混合作为对照组 2. 定期用肉眼、光电镜观察和藻叶绿素 a 浓度测定分析海杆菌 YWL01 的溶藻模式. 藻叶绿素 a 浓度测量方法同上.

1.3.3 海杆菌 YWL01 基因组测序

新鲜培养的海杆菌 YWL01 菌液用全基因组提取试剂盒(Takara, 大连)按说明书提取细菌总 DNA. 采用 Illumina Miseq 测序技术进行海杆菌 YWL01 基因组扫描测序. 主要步骤为: 基因组 DNA (3 μg) 质检、片段化、Illumina PE 文库(400 bp 文库)构建、Illumina Miseq 测序分析. 分别运用 Barnmap 0.7 和 tRNAscan-SE v1.3.1 软件对基因组中包含 tRNA^[16] 和 rRNA^[17] 进行预测. 通过 Glimmer 3.02 软件进行细菌的基因预测^[18]. 将预测基因的蛋白序列分别与 NR(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、KEGG(<http://www.genome.jp/kegg/>)、COG(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/genes>) 和 GO(<http://www.geneontology.org/>) 数据库进行 BLASTP (BLAST 2.2.28+) 比对, 从而获得预测基因的注释信息.

1.3.4 数据处理

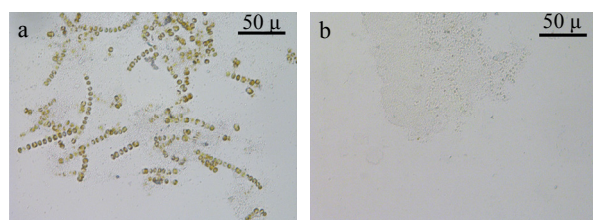
数据统计分析采用 one-way ANOVA (SPSS 19.0 for Windows).

2 结果与分析

2.1 海杆菌 YWL01 溶藻活性分析

被海杆菌 YWL01 感染后的中肋骨条藻藻液颜色由黄褐色逐渐变淡, 同期对照组中肋骨条藻藻液颜色逐渐加深. 从光电镜观察发现, 与对照组相比感染后的藻细胞裂解明显, 无完整的细胞结构, 光合色素变少(图 1 和图 2). 与对照组相比, 裂解液的藻叶绿素 a 浓度在第 10 d 具有显著性影响($P < 0.05$) (图 3). 对照组藻叶绿素 a 浓度从 2.048 mg·L⁻¹ 稳定上升至 4.096 mg·L⁻¹. 而实验组一直处于下降状态, 从 2.035 mg·L⁻¹ 下降至 0.468 mg·L⁻¹, 与对照

组相比下降了 88.57%。由此表明, 海杆菌 YWL01 对中肋骨条藻具有很强的溶藻活性。



a 为未被海杆 YWL01 感染的中肋骨条藻;
b 为被海杆菌 YWL01 感染 10 d 后的中肋骨条藻

图 1 光镜下的中肋骨条藻

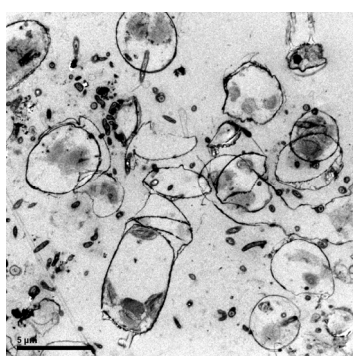


图 2 感染 YWL01 的中肋骨条藻透射电镜图

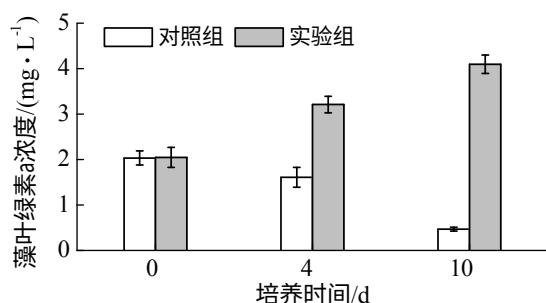
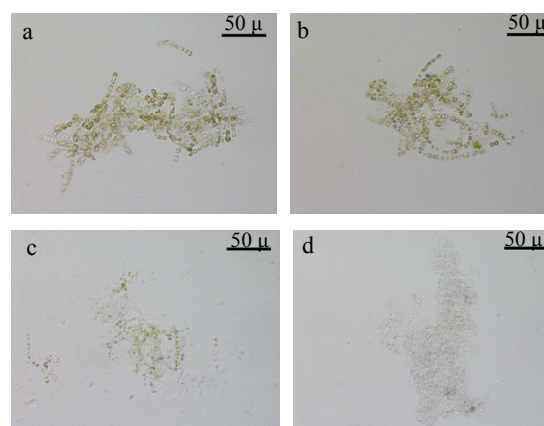


图 3 感染海杆菌 YWL01 对中肋骨条藻叶绿素 a 浓度的影响

2.2 海杆菌 YWL01 溶藻模式研究

分别用新鲜纯培养的 YWL01 菌液、菌细胞悬液、菌液滤过液和无菌海水配制的 LB 培养基、无菌海水接种中肋骨条藻, 结果与对照组相比, 用新鲜纯培养的菌液和菌细胞悬液感染中肋骨条藻后藻液颜色由黄褐色逐渐变淡, 光合色素降解, 无完整藻细胞(图 4)。两个对照组的藻叶绿素 a 浓度一直处于上升状态(图 5), 说明 LB 培养基和人工海水都不会抑制藻细胞生长。菌液和菌细胞悬液感染中肋骨条藻后, 藻叶绿素 a 浓度一直处于下降状态 ($P<0.05$), 叶绿素 a 浓度由原来的 $2.813 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $2.819 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 分别下降至 $0.220 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 0.132

$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (图 5), 与对照组相比, 分别下降了 93.98% 和 96.46%。用菌液的滤过液接种中肋骨条藻后, 藻叶绿素 a 浓度并没有显著下降, 说明 YWL01 的胞外分泌物无抑制效果。因此可知, 海杆菌 YWL01 对中肋骨条藻有直接溶藻活性, 无间接溶藻活性。



a 为无菌 LB 培养基+中肋骨条藻; b 为菌液+中肋骨条藻;
c 为菌滤液+中肋骨条藻; d 为菌细胞悬液+中肋骨条藻

图 4 接种不同组分后培养的中肋骨条藻光镜图

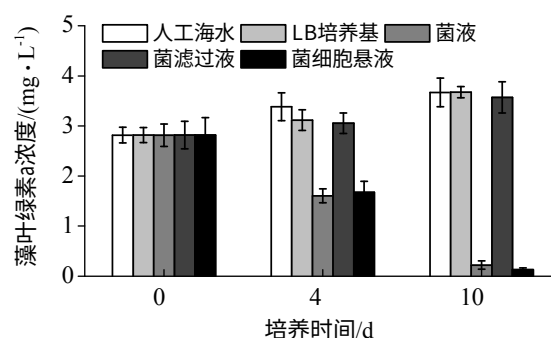


图 5 接种不同组分后中肋骨条藻叶绿素 a 浓度的变化

2.3 海杆菌 YWL01 全基因组测序分析

海杆菌 YWL01 基因组全长为 4 019 418 bp, GC 含量为 57.5%。含有 4 289 个开放阅读框, 这些开放阅读框的平均长度为 937 个碱基(表 1)。KEGG 注释结果表明, 该基因组共包含 180 个代谢途径。根据 COG 注释结果对蛋白功能进行了归类(表 2)。在 23 个 COG 类别中, 氨基酸转运与新陈代谢组[E]所占比例最大(261, 9.77%), 其次是未知功能组[S](230, 8.61%), 一般预测功能组[R](205, 7.67%), 能量产生与转换组[C](200, 7.49%)。所占比例最少的为 RNA 加工与修饰组[A](1, 0.04%), 其次是染色体结构与动力学组[B](4, 0.15%)。E、S、R 和 C 类功能基因数量众多, 可能与其重要生物功能有关。

表1 海杆菌 YWL01 基因组基本特征

属性	数值
基因组大小/bp	4 019 418
GC 含量/%	57.5
开放阅读框数	4 289
框架序列(Scaffold)数	59
重叠群(Contig)数	457

表2 海杆菌 YWL01 基因组 COG 功能基因分类注释

功能范畴	单基因簇数量/个
[A] RNA 加工与修饰	1
[B] 染色质结构与动力学	4
[J] 翻译、核糖体结构与生物起源	163
[K] 转录	147
[L] 复制、重组与修复	115
[D] 细胞周期控制、细胞分裂与染色体分离	30
[M] 细胞壁/膜/核膜的生物起源	139
[N] 细胞机动性	70
[O] 翻译后修饰、蛋白质转翻与分子伴侣	145
[T] 信号传导机制	194
[U] 胞内交换、分泌与膜泡运输	61
[V] 防御机制	32
[C] 能量产生与转换	200
[E] 氨基酸转运与新陈代谢	261
[F] 核酸转运与代谢	59
[G] 碳水化合物转运与代谢	102
[H] 辅酶运输与代谢	92
[I] 脂类转运与代谢	154
[P] 无机离子转运与代谢	185
[Q] 次生代谢产物生物加工、转运和分解代谢	83
[R] 一般预测功能组	205
[S] 未知功能	230

YWL01 的基因组中包含许多与溶藻活动和溶藻机理相关的基因。鞭毛可使细菌吸附于藻细胞表面,参与细菌的溶藻过程^[19]。海杆菌 YWL01 的基因组中含有可编码鞭毛蛋白(FliD, FliC, FlgL, FlgK, FlgE, FlgG, FlgH, FlgI, FlgB, FlgC, FliF, FliM, FliN, FliE, FliG, FliK, FlgD, FlgF, MotB, MotA, FlhA, FlhB, FliH, FliI, FliO, FliQ, FliP, FliR, FlhC, FlhD, FlgM)的相关基因簇。此外,海杆菌 YWL01 序列中存在可编码蛋白质 LuxR 同系物、溶血素同系物、RTX 毒素同系物和外膜蛋白 TolC 的基因。蛋白质 LuxR 同系物在细菌的溶藻活动中可作为关键

信号分子^[20]。溶血素同系物和 RTX 毒素同系物与细菌的强裂解性有关^[21]。外膜蛋白 TolC 可参与信号传导、感染藻细胞和溶解藻细胞膜等重要活动^[22-24]。

3 讨论

过去 20 年人们在对海杆菌研究中发现,海杆菌对控制宿主种群数量具有重要意义^[13-14,25-27]。但迄今尚无有关海杆菌溶藻活性的报道。本研究发现海杆菌 YWL01 对中肋骨条藻有直接的溶藻活性,同时首次测定了该株海杆菌的基因组(GenBank 号: SUB1221360),并对其进行了注释分析,初步探索海杆菌 YWL01 可能的溶藻机理。

溶藻细菌的作用方式主要分为直接溶藻和间接溶藻。直接溶藻是指溶藻细菌直接进攻宿主藻细胞,溶藻细菌与宿主细胞直接接触,有的甚至侵入宿主细胞内部。间接溶藻是指溶藻细菌间接进攻宿主藻细胞,溶藻细菌与宿主细胞竞争营养物质或溶藻细菌通过分泌胞外物质溶解藻细胞。目前,溶藻细菌通过分泌胞外物质溶解藻细胞的文献报道较多,如溶藻细菌 *Joostella* sp. DH77-1^[7]、*Brevibacillus laterosporus*^[9]和 *Pseudoalteromonas* sp. SP48^[13-14]均通过释放胞外物质间接溶解宿主藻细胞。与上述溶藻细菌不同的是,海杆菌 YWL01 的菌细胞悬液和菌液的溶藻效果一致,对中肋骨条藻均有很好的溶解效果。被 YWL01 的菌细胞悬液和菌液感染后,藻液颜色由黄褐色逐渐变淡,光合色素降解,藻细胞被裂解,藻叶绿素 a 含量明显减少,菌培养液的滤过液则无法裂解藻细胞,且在超薄切片中,感染的中肋骨条藻细胞中可见菌细胞(图 2)。因此,该海杆菌 YWL01 可直接接触、入侵中肋骨条藻藻细胞,其溶藻方式为直接溶藻。

海杆菌与海洋藻类存在密切关联^[10-14,25-28],研究其基因组有助于人们深入了解海杆菌与海洋藻类之间的关系。据报道^[13-14,17,25-27],海杆菌 HP15 可附着在海链藻(*Thalassiosira weissflogii*)表面,并使海链藻发生沉降。对 HP15 基因组研究发现,HP15 基因组中含有编码鞭毛的相关基因簇^[27]。鞭毛功能之一是可进行趋向运动且吸附在生物表面^[19],溶藻细菌可通过鞭毛吸附于藻细胞表面。同样,在 YWL01 基因组中,我们也发现了可编码鞭毛蛋白的基因簇。与 HP15 相比,YWL01 不仅能吸附于中

肋骨条藻细胞表面,影响其生长,更可直接裂解中肋骨条藻。让人兴奋的是,经过对 YWL01 序列的注释分析,我们发现 YWL01 的基因组中存在许多与溶藻特性相关的基因。YWL01 序列中存在可编码蛋白质 LuxR 同系物的基因。据 Nakashima 等^[20]研究, LuxR 可作为信号分子来调控细菌的溶藻活动。在 YWL01 基因组中还发现了可编码溶血素同系物和 RTX 毒素同系物的基因。据文献^[21]报道,溶血素和 RTX 毒素在众多致病革兰氏阴性细菌的细胞毒性活动中起到了相当重要的作用。因此我们推测, YWL01 的直接溶藻活性可能与其基因组中含有可编码溶血素同系物和 RTX 毒素同系物的基因有关。此外, YWL01 基因组中还存在可编码外膜蛋白 TolC 的基因。外膜蛋白 TolC 在细菌感染藻细胞过程中扮演着重要的角色,如信号传导、感染藻细胞和溶解藻细胞膜^[22-24],这可能也与 YWL01 具有直接溶藻活性有关。

综上所述,本研究首次报道了海杆菌 YWL01 的溶藻活性,并基于基因组测序和序列分析,探讨了相关功能基因及其可能的溶藻机理,为今后研究溶藻细菌提供了参考。此外,通过研究溶藻海杆菌 YWL01 可以更好地理解溶藻细菌与藻细胞之间的关系,为治理赤潮提供科学依据。

参考文献:

- [1] TOMARU Y, TAKAO Y, SUZUKI H, et al. Isolation and characterization of a single-stranded DNA virus infecting *Chaetoceros lorenzianus* grunow[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(15):5285-5293.
- [2] KIM J J, KIM C H, YOUN S H, et al. Isolation and physiological characterization of a novel algicidal virus infecting the marine diatom *Skeletonema costatum*[J]. The Plant Pathology Journal, 2015, 31(2):186-191.
- [3] YAN C, LI J H, LI J J, et al. A heterotrophic nanoflagellate grazing on the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*[J]. Annales de Limnologie-International Journal of Limnology, 2009, 45(1):23-28.
- [4] SHIRAI Y, TOMARU Y, TAKAO Y, et al. Isolation and characterization of a single-stranded RNA virus infecting the marine planktonic diatom *Chaetoceros tenuissimus* meunier[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(13):4022-4027.
- [5] ROMER W, BERLAND L, CHAMBON V, et al. Shiga toxin induces tubular membrane invaginations for its uptake into cells[J]. Nature, 2007, 450:670-675.
- [6] TOMARU Y, SHIRAI Y, TOYODA K, et al. Isolation and characterisation of a single-stranded DNA virus infecting the marine planktonic diatom *Chaetoceros tenuissimus*[J]. Aquatic Microbial Ecology, 2011, 64(2):175-184.
- [7] YANG X R, LI X Y, ZHENG W, et al. Novel insights into the algicidal bacterium DH77-1 killing the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*[J]. Science of the Total Environment, 2014(482/483):116-124.
- [8] OH J I, KIM M J, LEE J Y, et al. Isolation and characterization of algicidal bacteria from *Cochlodinium polykrikoides* culture[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2011, 16:1124-1133.
- [9] JIA W, HUANG X B, LI C L. A preliminary study of the algicidal mechanism of bioactive metabolites of *Brevibacillus laterosporus* on *Oscillatoria* in Prawn Ponds[J]. The Scientific World Journal, 2004, 9:1-11.
- [10] SINGER E, WEBB E A, NELSON W C, et al. Genomic potential of *Marinobacter aquaeolei*, a biogeochemical 'opportunistic' [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77:2763-2771.
- [11] AMIN S A, GREEN D H, HART M C, et al. Photolysis of iron-siderophore chelates promotes bacterial-algal mutualism[J]. PANS, 2009, 106:17071-17076.
- [12] WORDEN A Z, CUVELIER M L, BARTLETT D H, et al. In-depth analyses of marine microbial community genomics[J]. Trends in Microbiology, 2006, 14:331-336.
- [13] 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]. Journal of Microbiology Methods, 2007, 69(3):425-430.
- [14] SU J Q, YANG X R, ZHENG T L, et al. Isolation and characterization of a marine algicidal bacterium against the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*[J]. Harmful Algae, 2007, 6:799-810.
- [15] GUAN C, GUO X, CAI G, et al. Novel algicidal evidence of a bacterium *Bacillus* sp. LP-10 killing *Phaeocystis globosa*, a harmful algal bloom causing species[J]. Biological Control, 2014, 76:79-86.
- [16] SCHATTNER P, BROOKS A N, LOWE T M. The tRNAscan-SE, snoscan and snoGPS web servers for the detection of tRNA and snoRNAs[J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33:686-689.
- [17] ALTSCHUS S F, GISH W, MILLER W, et al. Basic local alignment search tool[J]. Journal of Molecular Biology, 1990, 215:403-410.
- [18] DELCHER A L, BRATKE K A, POWERS E C, et al.

- Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer[J]. *Bioinformatics*, 2007, 23:673-679.
- [19] PALLÉN M J, MATZKE N J. From the origin of species to the origin of bacterial flagella[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, 4:784-790.
- [20] NAKASHIMA T, MIYAZAKI Y, MATSUYAMA Y, et al. Producing mechanism of an algicidal compound against red tide phytoplankton in a marine bacterium *γ-proteobacterium*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 73:684-690.
- [21] JEONG H, YIM J H, LEE C, et al. Genomic blueprint of *Hahella chejuensis*, a marine microbe producing an algicidal agent[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33: 7066-7073.
- [22] ESWARAN J, HUGHES C, KORONAKIS V, et al. Locking TolC entrance helices to prevent protein translocation by the bacterial type I export apparatus[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2003, 327:309-315.
- [23] GERMAN G J, MISRA R. The tolC protein of *Escherichia coli* serves as a cell-surface receptor for the newly characterized TLS bacteriophage[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2001, 308:579-585.
- [24] LI R, ZHU H, QIAN W, et al. De novo assembly of human genomes with massively parallel short read sequencing[J]. *Genome Research*, 2010, 20:265-272.
- [25] GÄRDES A, IVERSEN M H, GROSSART H, et al. Diatom-associated bacteria are required for aggregation of *Thalassiosira weissflogii*[J]. *International Society for Microbial Ecology*, 2011, 5:436-445.
- [26] SONNENSCHNEIN E C, GÄRDES A, SEEBACH S, et al. Development of a genetic system for *Marinobacter adhaerens* HP15 involved in marine aggregate formation by interacting with diatom cells[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2011, 87:176-183.
- [27] GÄRDES A, KAEPPPEL E, SHEHZAD A, et al. Complete genome sequence of *Marinobacter adhaerens* type strain (HP15), a diatom-interacting marine micro-organism[J]. *Standards in Genomic Sciences*, 2010, 3: 97-107.
- [28] 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]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71:3483-3494.

Algicidal activity of *Marinobacter* sp. YWL01 and algicidal mechanism analysis based on its genome sequence

WU Han-hua^{1,2}, LI Deng-feng^{1,2*}, YAN Xiao-jun^{1,2}, XU Ran¹, LIU Fei¹, ZHOU Cheng-xu¹, LIU Lian-guo¹

(1. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China; 2. Collaborative Innovation Center for Zhejiang Marine High-efficiency and Healthy Aquaculture, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: To explore the algicidal activity and mechanism of a novel *Marinobacter* sp. YWL01, *Skeletonema costatum* cultures are added with YWL01. Cell condition and signs of lysis in each algal culture are monitored with a variety of means including visual inspection, optical microscopy, transmission electron microscopy. Genomic DNA of YWL01 is sequenced with Illumina Miseq. Functional annotations are made in a bid to analyze the algicidal mechanism through a BLASTP search. The results reveal that YWL01 exhibits algicidal activity through a direct attack. After the inoculation of YWL01 cells, the color of the *S. costatum* cultures turn from brown to pale, and the cytoplasmic and photosynthetic pigments are found to be significantly degraded compared to those in healthy cells. The lysate has a statistically significant impact on the chl-a content of *S. costatum*. The genome of YWL01 contains genes about algicidal mechanism. The work presented in this report may facilitate understanding the genetic underpinning of algae-bacterial interactions, and is expected to be useful for further studies of algal blooming.

Key words: *Marinobacter*; *Skeletonema costatum*; algicidal; genome sequence; algal blooming

(责任编辑 史小丽)