

龙须菜的无菌处理及其典型附生菌的分离鉴定

林丽春¹, 江佳瑜¹, 侯赛男¹, 孙 雪¹, 陆开形^{2*}

(1. 宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315211; 2. 宁波大学 科学技术学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 采用不同浓度的氨苄青霉素、卡那霉素、氯霉素以及放线菌酮单独及组合处理龙须菜, 利用 16S rRNA 基因序列和 ITS 序列对分离到的细菌和真菌进行分子鉴定, 比较获得无菌龙须菜的最佳抗生素处理方法。结果表明: $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氯霉素、 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氨苄青霉素及 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 放线菌酮组合使用抑菌效果最好。并从龙须菜的培养液中分离鉴定出 4 株细菌, 分别为鲁杰氏菌属(*Ruegeria*)、单胞菌属(*Alteromonas*)、*Maribacter* 属和 *Fluviimonas* 属, 1 株真菌为 *Urocystales* 或 *Fereydounia* 属, 其中鲁杰氏菌为龙须菜附生细菌的优势菌群。

关键词: 龙须菜; 附生菌; 无菌处理; 分离鉴定

中图分类号: Q93

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2017) 02-0015-07

藻类长期生活在水中, 其表面通常覆盖有一定的细菌, 大型藻类表面的细菌常具有空间分布, 即藻体的某部分会有特异菌群分布^[1]。这些细菌大都附着在藻体表面, 与藻类之间形成了一种复杂的菌藻关系。如有的藻类附生菌可为藻类宿主提供抑制物质对抗附着生物的附着^[2], 而藻类释放的某些有机物质也可被自由生活的细菌所消耗^[3]。但是藻类生物学、生理学及分子生物学以及藻际微生物的研究, 常需获得无菌的纯藻培养体系。在众多藻类除菌方法中, 抗生素除菌是一种较常用且方便有效的方法, 可以使用单一抗生素逐种加入法进行藻类除菌^[4], 也可以根据抑菌机理使用不同组合抗生素, 后者不仅可以达到较好的除菌效果, 且可节约抗生素的用量。

在常用的微生物鉴定方法中, 除形态和生理生化特征外, 16S rRNA 基因、23S rRNA 基因及该两亚基之间的内转录间隔区(Internal Transcribed Spacer, ITS)序列是常用的分子生物学鉴定方法。目前, 16S rRNA 基因序列因其操作简便, 已成为细菌鉴定的首选靶序列。该方法可以单独使用, 也可以与其他方法结合联用。如将扫描电镜和 16S rRNA 基因序列分析相结合^[5], 或者将生化方法如

API 20NE、API ZYM 及抗生素敏感性实验, 以及分子生物学鉴定方法——16S rRNA 基因序列、促旋酶 B 亚单位基因(*gyrB*)、重复序列 PCR (Rep-PCR) 指纹图谱分析法、DNA-DNA 杂交等方法联用^[6]。真菌 ITS 序列包括两部分, 位于 18S 和 5.8S rRNA 基因之间的 ITS1 以及位于 5.8S 和 28S rRNA 基因之间的 ITS2。相较于 28S 和 18S 这 2 种大小亚基的基因序列, ITS 序列进化较快, 具有一定的种间特异性和种内保守性, 且序列长度适中, 已成为真菌分类鉴定研究的重点^[7]。

龙须菜(*Gracilariopsis lemaneiformis*)是一种重要的经济海藻, 主要用来提取琼胶、食用以及饲养鲍鱼等。在我国北方海域有野生型龙须菜存在, 而在南方海域特别是福建省, 龙须菜养殖较为广泛。目前对龙须菜的遗传学研究主要集中在龙须菜的基因组和线粒体的测序等^[8-9], 这些研究都需要无菌的纯藻实验材料。目前, 有关坛紫菜和小球藻等藻类的无菌处理研究较多^[10-11], 而针对龙须菜无菌处理的研究较为鲜见。

本文利用 3 种抗生素探讨了龙须菜无菌处理的方法, 并运用 16S rRNA 基因序列对龙须菜附生菌进行了鉴定, 旨在为龙须菜分子生物学研究等

收稿日期: 2016-12-23.

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

基金项目: 国家自然科学基金(41376151); 宁波大学“水产”浙江省重中之重开放基金(xkzsc1525)。

第一作者: 林丽春(1993-), 女, 湖北黄冈人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 藻类生理和分子生物学. E-mail: 1274908169@qq.com

*通信作者: 陆开形(1972-), 女, 浙江余姚人, 博士/副教授, 主要研究方向: 植物分子生理. E-mail: lukaitong@nbu.edu.cn

提供无菌材料,为藻菌关系研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

采用的研究材料为2009年10月采自福建宁德的龙须菜981品系,在实验室多次洗刷、剪切去除附着杂藻等,保留藻体尖部,然后培养在无菌海水Provasoli培养基^[12]中。培养条件为23℃,光强2000 lx,光周期为12L:12D。细菌培养用Zobell2216E海水培养基^[13]。

1.2 方法

1.2.1 抗生素除菌

将3种抗生素母液——氨苄青霉素、卡那霉素和氯霉素分别加到50 mL培养液中,使每种抗生素的终质量浓度分别为50、100、200、400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。以未加抗生素为空白对照,每瓶培养液中加入4~5根幼嫩的龙须菜,培养3 d后分别取200 μL 培养液涂布在Zobell2216E海水固体培养平板上,于23℃培养,每天观察并记录细菌数量和菌落形态。筛选出抑菌效果较好,且对龙须菜藻体生长无显著抑制作用的抗生素进行抗生素组合除菌。

1.2.2 龙须菜附生细菌的分离

将新鲜龙须菜置于无菌海水中,用灭菌的毛笔在藻体表面刷洗,然后取200 μL 刷洗后的海水涂布于固体培养平板上,在23℃条件下将培养皿倒置培养。记录菌落数量、形态、颜色及出现时间。再从中挑选几株形态特征明显不同的菌落进行多次划线分离,最终纯化到单菌落。

1.2.3 细菌DNA的提取

从分离纯化的固体培养基上挑取单菌落,溶于20 μL 无菌水中混匀,于沸水中加热5 min后立即置冰上冷却,然后8000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心8 min,取上清液,即可作为后续PCR扩增的模板。

1.2.4 细菌16S rRNA基因序列的PCR扩增

细菌16S rRNA基因扩增PCR引物参考文献[3],正向引物27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',反向引物1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。PCR反应体系(20 μL)包括10 $\times$ PCR Buffer 2 μL , MgCl_2 (25 mmol) 1.6 μL , dNTP (25 mmol) 1.6 μL , Taq酶(5 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 0.2 μL , 引物27F和1492R (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 各0.8 μL , ddH₂O 9 μL , DNA模板(5

$\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 4.0 μL 。PCR反应条件: 94℃预变性5 min,然后按照94℃变性1 min、55℃复性1 min、72℃延伸1.5 min的程序进行35个循环,最后72℃延伸10 min。PCR产物在1%琼脂糖凝胶中电泳检测,在紫外灯下拍照。

1.2.5 16S rRNA基因的测序及序列比对

取PCR产物送英潍捷基(上海)贸易有限公司进行测序,通过NCBI数据库进行在线BLAST搜索,根据搜索结果推测细菌的归属。

1.2.6 龙须菜真菌DNA的提取

从培养板中挑选分离良好的真菌单菌落,除了将沸水浴的时间延长到10 min,其余均按照1.2.3节方法进行真菌DNA的提取。

1.2.7 真菌ITS序列的PCR扩增

真菌ITS序列扩增引物参考文献[7],其中正向引物为ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3',反向引物为ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。PCR反应体系与扩增程序同细菌的16S rRNA基因序列。

1.2.8 ITS的测序及序列分析

该真菌ITS序列的测序及序列比对分析方法同1.2.5节。根据BLAST检索的比对结果,选取几株相近菌株用MEGA5.10软件进行序列的对齐和距离值计算,再用最大似然法(Maximum Likelihood, ML)构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 抗生素除菌效果

2.1.1 单一抗生素法

在龙须菜培养液中加入不同抗生素,3 d后取培养液涂布平板,48 h后观察不同菌落生长情况。结果发现,在氨苄青霉素处理组中,50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氨苄青霉素的培养基上菌落相比对照组少,抑菌率为20%,而100、200、400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氨苄青霉素处理后的平板中菌落比对照显著降低,抑菌率约达到80%以上。培养基中菌落大多为表面光滑的米白色菌落,但添加400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氨苄青霉素的固体培养平板上有白色霉菌长出。

在卡那霉素处理组中,对照的培养平板上长满菌落,而不同浓度卡那霉素处理后的平板上同样也长满了菌落,平板上可观察到黄色、米白色和

白色的细菌, 该菌落表面光滑、边缘整齐, 说明卡那霉素溶液对龙须菜中细菌的抑菌效果不显著。

在氯霉素处理组, 对照的培养平板上密布米白色菌落, 而 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氯霉素处理后的平板上细菌数目降低, 成单菌落, 其他浓度氯霉素处理的固体培养平板上仅观察到少量表面光滑的米白色菌落。综上 3 种抗生素的除菌结果, 可见氨苄青霉素和氯霉素对龙须菜的抑菌效果较好, 而卡那霉素的抑菌效果不佳。因此, 选择氨苄青霉素(终浓度 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)和氯霉素(终浓度 100 、 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组合对龙须菜进行无菌处理。

2.1.2 组合抗生素法

根据单一抗生素的除菌结果, 采用抗生素组合 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氨苄青霉素+ $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氯霉素除菌(图 1(b)), $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氨苄青霉素+ $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氯霉素(图 1(c))。观察到对照平板(图 1(a))中长满了细菌, 而加有混合抗生素的平板上细菌被抑制, 但长出了真菌(图 1(b)和(c))。

加入抗真菌剂——放线菌酮($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)后的组合抗生素处理的 3 组实验结果表明(图 1(d)~(f)): 无抗生素和抗真菌剂添加的对照组平板上长满了菌落, 仅加入放线菌酮的对照组的平板上同样也长满了米白色细菌, 但少了白色的真菌菌落, 说明放线菌酮($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的抑制真菌效果比较显著。而同时加有组合抗生素和放线菌酮的实验组平板上无细菌及真菌生长, 说明 2 种抗生素及 1 种抗真菌剂的联合使用对龙须菜的无菌化效果非常显著。

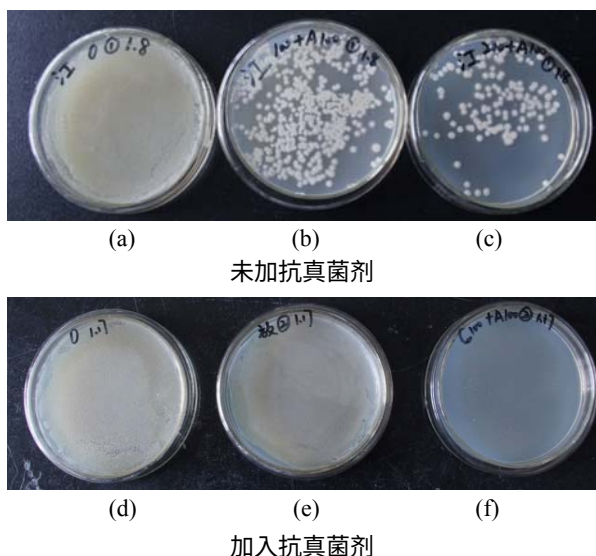


图1 组合抗生素的除菌效果

因此, 综合考虑除菌效果和抗生素节约使用原则, 选用 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氨苄青霉素、 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氯霉素及 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 放线菌酮联合对龙须菜进行除菌, 以培养出无菌龙须菜。

2.2 龙须菜附生菌的分离鉴定结果

2.2.1 细菌和真菌的分离纯化结果

从龙须菜中分离出的单菌落如图 2 所示。1 号菌株米白色、不透明、表面光滑、直径约 1 mm ; 2 号菌株: 白色、不透明、表面光滑、边缘不整齐, 直径约 $2\sim 3 \text{ mm}$, 微凸起; 3 号菌株: 黄色、不透明、表面光滑、直径约 $1\sim 2 \text{ mm}$; 4 号菌株: 米黄色、偏透明、表面光滑、边缘整齐、凸起、直径约 1 mm ; 5 号真菌: 周围白色、中央有黑色小点、表面毛状、边缘不整齐、微凸起, 直径约 3 mm , 记为 Z1 菌株。

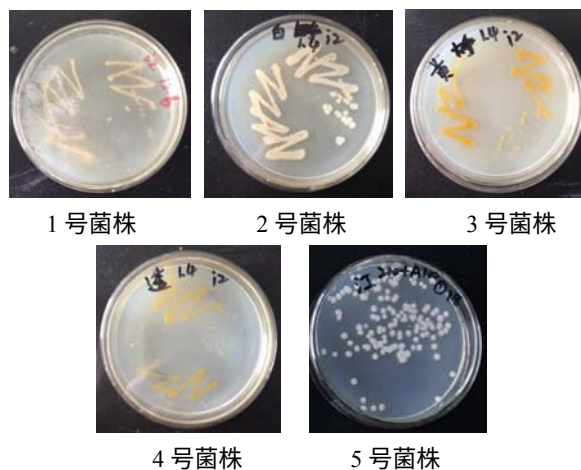


图2 附生菌的分离纯化结果

2.2.2 菌株的鉴定结果

将以上 5 株菌的测序结果经过拼接和修剪, 得到细菌的 16S rRNA 基因序列长度约为 1300 bp , 真菌 ITS 序列长度为 756 bp 。将菌株测序结果通过 NCBI 的核苷酸数据库进行 Blast 比对。结果表明, 与 1 号菌株最相似的物种是鲁杰氏菌属的 *R. mobilis* 和 *R. pelagia* 细菌, 与 *R. mobilis* F2368 株(HQ338132)和 G494 株(HQ338128)的相似性均为 99%, E 值为 0; 与 *R. pelagia* NBRC (NR114024)的相似性也为 99%, E 值为 0。而 *R. mobilis* 和 *R. pelagia* 细菌极其接近, 前者的 NBRC 102038T 株和后者的 NBRC 101030T 株近乎全长 16S rRNA 基因(1425 bp)中只有一个碱基的差别^[6]。因此, 将 1 号菌株定为鲁杰氏菌属的 *R. mobilis* 或 *R. pelagia*。

Ruegeria 属细菌属于变形菌门、 α -变形菌纲鲁

杰氏菌属的某些物种经常在海水或海洋生物表面分离得到,有的物种具有抗菌活性^[14],但 *R. mobilis* 和 *R. pelagia* 仅在藻类培养物中分离得到^[15]。

2 号菌株与 *Alteromonas* sp. S89 (JN654450) 的相似性最高,为 100%;而与 *Alteromonas* sp. KU27F1 株 (AB636144) 和 AKA07-1 株 (AB571941), 及 *Aestuariibacter* sp. PX-1 (JF309276) 等的相似性均为 99%。因此,将 2 号菌株确定为单胞菌属。单胞菌属细菌属于变形菌门、 γ -变形菌纲、交替单胞菌目、交替单胞菌科。该属许多种可降解石莼聚糖、海藻酸盐和其他多糖,还可产生胞外多糖^[16-17]。

3 号菌株与 *Maribacter* sp. (AB526333) 和 MOLA 57 (AM990832) 的相似性均为 99% (1374/1375)。 *Maribacter* 属为拟杆菌门、黄杆菌纲。该属细菌可从海水、海洋底泥、绿藻等中分离,为革兰氏阴性菌,黄色或暗桔黄色^[18-19]。

4 号菌株与 *Fluviimonas* sp. (KF385493) 的相似性为 99%, 1 个 gap, E 值为 0; 而与 2 株 *Bacteroidetes bacterium* SEM4C 和 PAORIC-11 (DQ357760 和 KP030834) 的相似性分别为 99% (1347/1363) 和 98% (1340/1363), 但分别有 16 个和 6 个 gap。因此,把 4 号菌确定为 *Fluviimonas* 属。 *Fluviimonas* 属细菌为拟杆菌门、噬纤维菌纲。该属菌的报道较少,其中有的物种可以从淡水中分离,为革兰氏阴性菌,可形成淡的桔黄色菌落^[20]。

5 号(Z1)菌株与真菌 *Urocystales* sp. TR-2014 (KF176556) 的相似性为 99% (744/754), 1 个 gap, E 值为 0; 与 *Fereydounia khargensis* IBRC-M 30116 株 (KJ490642) 和 IBRC-M 30112 株 (KJ490645) 的相似性分别为 99% (731/741) 和 99% (718/728), 0 个 gap, E 值为 0。与这 3 株菌的覆盖度均在 96% 以上,而与后面比对的相似菌的覆盖度低于 42%。

选取覆盖度在 42% 以上的 10 株菌与 Z1 菌株构建系统进化树(图 3)。从图 3 可发现, Z1 菌株与真菌 *Urocystales* sp. 和 *Fereydounia khargensis* 聚在一起,且其节点的 bootstrap 值达到 100%。 *Urocystales* sp. 和 *Fereydounia khargensis* 均为担子菌门、黑粉菌亚门、黑粉菌纲、条黑粉菌目,但前者属于 unclassified *Urocystidales* 科,而后者属于 *Fereydouniaceae* 科。

因 Z1 菌株的归属地位不明确,又用 MEGA 5.10 软件中的 Kimura 双参数模型计算 11 条序列间的遗传距离(表 1)。结果发现, Z1 菌株与 *Urocystales* sp. (KF176556) 的遗传距离为 0.009, 而与 2 株 *Fereydounia khargensis* (KJ490642 和 KJ490645) 距离均为 0.011。而 *Urocystales* sp. 与 2 株 *Fereydounia khargensis* 的遗传距离均为 0.005, 3 者之间差别很小。所以最终把 Z1 菌定为 *Urocystales* 或 *Fereydounia* 属。

传距离(表 1)。结果发现, Z1 菌株与 *Urocystales* sp. (KF176556) 的遗传距离为 0.009, 而与 2 株 *Fereydounia khargensis* (KJ490642 和 KJ490645) 距离均为 0.011。而 *Urocystales* sp. 与 2 株 *Fereydounia khargensis* 的遗传距离均为 0.005, 3 者之间差别很小。所以最终把 Z1 菌定为 *Urocystales* 或 *Fereydounia* 属。

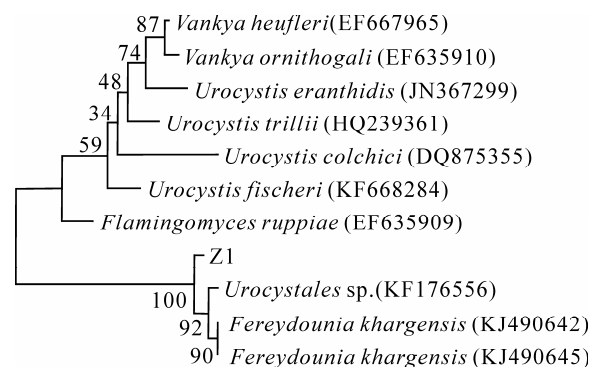


图 3 基于 11 株真菌 ITS 序列构建的系统进化树

表 1 基于 11 株真菌 ITS 序列计算的遗传距离

序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1											
2	0.009										
3	0.011	0.005									
4	0.011	0.005	0.000								
5	0.366	0.378	0.377	0.377							
6	0.360	0.366	0.366	0.366	0.037						
7	0.369	0.381	0.380	0.380	0.026	0.041					
8	0.372	0.384	0.383	0.383	0.005	0.039	0.024				
9	0.370	0.376	0.376	0.376	0.053	0.053	0.060	0.055			
10	0.376	0.388	0.388	0.388	0.026	0.033	0.037	0.028	0.051		
11	0.391	0.403	0.402	0.402	0.055	0.053	0.061	0.059	0.077	0.057	

注: 1~11 代表不同株系和基因库登录号, 其中 1 为 Z1, 本文所测真菌序列; 2 为 *Urocystales* sp. (KF176556); 3 为 *Fereydounia khargensis* (KJ490642); 4 为 *Fereydounia khargensis* (KJ490645); 5 为 *Vankya heufleri* (EF667965); 6 为 *Urocystis fischeri* (KF668284); 7 为 *Urocystis eranthidis* (JN367299); 8 为 *Vankya ornithogali* (EF635910); 9 为 *Flamingomyces ruppieae* (EF635909); 10 为 *Urocystis trillii* (HQ239361); 11 为 *Urocystis colchici* (DQ875355)。

综上鉴定结果, 我们将分离的 5 株菌的比对结果进行了汇总(表 2)。4 株细菌的 Genbank 登录号依次为 KT001465-KT001468。1 号菌株与 *Ruegeria mobilis* (HQ338132.1) 和 *R. pelagia* (NR_114024) 的相似性均为 99%, 为两者中的一种。2 号菌株与 *Alteromonas* sp. (JN654450.1) 的相似性为 100%, 为单胞菌属 (*Alteromonas*)。3 号菌株与 *Maribacter* sp. (AB526333.1) 的相似性为 99%, 为 *Maribacter* 属。

表2 5株菌的鉴定结果

序号	门	纲	可能的属或种	相似性/%	Genbank 登录号
1	变形菌门	α -变形菌纲	<i>Ruegeria mobilis</i> 或 <i>Ruegeria pelagia</i>	99	KT001465
2	变形菌门	γ -变形菌纲	<i>Alteromonas</i> sp.	100	KT001466
3	拟杆菌门	黄杆菌纲	<i>Maribacter</i> sp.	99	KT001467
4	拟杆菌门	噬纤维菌纲	<i>Fluviimonas</i> sp.	99	KT001468
5(Z1)	担子菌门	黑粉菌纲	<i>Urocystales</i> sp.或 <i>Fereydounia khargensis</i>	99	

4号菌株与 *Fluviimonas* sp. (HME9276)的相似性为99%, 为 *Fluviimonas* 属。5号(Z1)真菌, 与 *Urocystales* sp. (KF176556)及 *Fereydounia khargensis* (KJ490642和 KJ490645)的相似性均为99%, 为 *Urocystales* 或 *Fereydounia* 属的一种。各菌的形态特征与各自的分子鉴定结果相一致

3 讨论

3.1 不同抗生素的无菌处理效果

藻类的无菌处理主要有物理方法如稀释涂布法、射线辐照法等和化学方法如抗生素法^[6]。相对于物理除菌方法, 抗生素在除菌方面作用强大。虽然单一抗生素可以用来进行无菌处理^[5], 但众多文献表明^[10-11], 2种以上抗生素联合使用效果更好。因此, 我们筛选了氨苄青霉素、卡那霉素及氯霉素有效抑制细菌生长, 且对龙须菜没有毒害作用的抗生素浓度。结果发现, 卡那霉素对龙须菜的除菌效果较差, 即使用200、400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 高浓度处理, 龙须菜中仍有大量细菌生长。而另外2种抗生素在100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 对细菌的抑菌率就达到80%以上, 因此最终选用100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氨苄青霉素和100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氯霉素组合使用, 效果较好。但在抗生素组合除菌实验后期发现了真菌, 因此又加入了抗真菌剂——放线菌酮(终浓度为50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)用来抑制真菌的生长。结果发现, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 放线菌酮、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氨苄青霉素和100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氯霉素联合使用除菌效果很好, 可在一定时间内抑制龙须菜附生细菌和真菌的生长, 经过连续几次处理就可获得无菌龙须菜。

3.2 藻类附生菌的分离鉴定

大型海藻的表面附着多种微生物, 要研究藻菌之间的关系或鉴定附生菌, 必须通过一定的方法对细菌进行分离。已有的分离龙须菜体表附生细菌的方法主要有超声波粉碎法、涡旋振荡法、超

声波清洗法及研磨匀浆法, 其中以超声波粉碎法处理效果最好^[21]。

16S rRNA 基因序列分析法是常用的细菌鉴定的分子生物学方法, 目前已在藻类附生细菌的鉴定中发挥了重要作用。如徐涤等^[13]运用16S rRNA 基因分析了来自青岛和大连海区海带表面的22株细菌, 将其分别鉴定为假交替单胞菌、嗜冷单胞菌、交替单胞菌、产碱杆菌和海杆菌。杨锐等^[22]利用16S rRNA 基因-V3片段DGGE分析鉴定条斑紫菜外生细菌, 结果表明所获得的63株细菌与假交替单胞菌、嗜冷单胞菌和芽孢杆菌等10属相应菌株具有较高的同源性。而真菌ITS序列分析也在藻类真菌的鉴定中发挥作用。如Dong等^[23]分析一株采自蓝藻门色球藻的共生真菌的ITS序列, 发现其与 *Simplicillium* 具有98%的相似性。

3.3 藻类附生菌的种类

近海水域微生物类群种类繁多。如从东海分离的14种细菌中 α 、 γ -变形菌纲细菌分别占33.3%和57.2%, 厚壁菌门细菌占9.5%; 而南海分离19种细菌中 α 、 γ -变形菌纲细菌分别占41.9%和35.5%, 拟杆菌门和厚壁菌门细菌分别占了17.7%和4.8%^[24]。Salomon等^[25]从波罗的海蓝藻泡沫节球藻中分离了13株菌, 通过16S rRNA 基因分析发现其分属于 α 、 β 、 γ -变形菌和厚壁菌门。Lakaniemi等^[26]利用16S rRNA 基因序列分析发现杜氏藻光生物反应器中占优势的异养细菌主要是 γ -变形菌纲、黄杆菌纲和 α -变形菌纲。我们鉴定的4株细菌中, 1号和2号菌分别为 α 、 γ -变形菌纲, 而3号和4号菌均为拟杆菌门, 分别为其中的黄杆菌纲和噬纤维菌纲。

本研究利用16S rRNA 基因序列方法鉴定了4株菌种, 分别为鲁杰氏菌属(*Ruegeria*)、单胞菌属(*Alteromonas*)、*Fluviimonas* 属、*Maribacter* 属。在细菌分类学中, 通常认为当2株细菌的16S rRNA 基因序列低于97%的相似性时, 即可认为两者不

属于同一种^[27]。我们鉴定的 5 株菌的相似性均在 99% 以上,但也多是与该属中未知的种极其相似;而 1 号菌也无法确定是鲁杰氏菌 *R. mobilis* 和 *R. pelagia* 中的哪一种,因为 2 株鲁杰氏菌的序列很相近。另外,运用 ITS 序列分析法分离鉴定了 1 株真菌,与 *Urocystales* 和 *Fereydounia khargensis* 的相似性都超过 99%,而 *Urocystales* sp. 与 *Fereydounia khargensis* 之间的遗传距离极小(0.005)。

本研究仅鉴定了 4 株细菌和 1 株真菌,这可能与所用样品是实验室多年培养的龙须菜,生长环境相对于海洋环境较简单有关。由于一直使用无菌海水培养,因此这几株菌来自龙须菜起始材料所携带,且经过多次洗刷和长期培养仍然存活下来的。其中鲁杰氏菌最易分离出来,且菌落数目最多,说明该菌是龙须菜附生菌中的优势菌,在一定程度上可以反映海区养殖龙须菜附生菌的种类。

随着基因组学和转录组学的发展,对一些经济海藻进行基因组学等研究已成为一种趋势。但是藻类培养过程中的无菌纯培养相对比较困难,我们所得出的龙须菜无菌处理方法,可用于龙须菜的基因组学等科学研究,检测到的龙须菜附生菌种类,可作为滤除龙须菜中混入细菌序列的参考依据。

参考文献:

- [1] CORRE S, PRIEUR D. Density and morphology of epiphytic bacteria on the kelp *Laminaria digitata*[J]. Botanica Marina, 1990, 33(6):515-524.
- [2] RAO D, WEBB J S, KJELLEBERG S. Microbial colonization and competition on the marine alga *Ulva australis*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(8):5547-5555.
- [3] GROSSART H P, CZUB G, SIMON M. Algae-bacteria interactions and their effects on aggregation and organic matter flux in the sea[J]. Environmental Microbiology, 2006, 8(6):1074-1084.
- [4] COTTRELL M T, SUTTLE C A. Production of axenic cultures of *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae) using antibiotic[J]. Journal of Phycology, 1993, 29(3):385-387.
- [5] NONGKHLAW F M W, JOSHI S R. Distribution pattern analysis of epiphytic bacteria on ethnomedicinal plant surfaces: A micrographical and molecular approach[J]. Journal of Microscopy and Ultrastructure, 2014, 2(1): 34-40.
- [6] LAI Q, YUAN J, LI F, et al. *Ruegeria pelagia* is a later heterotypic synonym of *Ruegeria mobilis*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010, 60(8):1918-1920.
- [7] 郭鹏豪, 刘秀丽, 崔颖鹏, 等. 真菌通用引物 Its1 和 Its4 在丝状真菌鉴定中的价值评价[J]. 中国微生物学杂志, 2013, 25(8):922-924.
- [8] ZHOU W, HU Y, SUI Z, et al. Genome survey sequencing and genetic background characterization of *Gracilariopsis lemaneiformis* (Rhodophyta) based on next-generation sequencing[EB/OL]. [2016-10-20]. <https://www.biomedsearch.com/nih/Genome-Survey-Sequencing-Genetic-Background/23875008.html>.
- [9] ZHANG L, WANG X, QIAN H, et al. Complete sequences of the mitochondrial DNA of the wild *Gracilariopsis lemaneiformis* and two mutagenic cultivated breeds (Gracilariaceae, Rhodophyta)[EB/OL]. [2016-10-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25701844>.
- [10] 林伟, 陈驭, 刘秀云. 海洋微藻除菌及除菌与自然带菌微藻生长特点的比较[J]. 海洋与湖沼, 2000, 31(6):647-652.
- [11] 周金梅, 杨锐, 方文雅, 等. 坛紫菜叶状体的无菌化培养及其应用[J]. 生物学杂志, 2012, 29(3):83-87.
- [12] PROVASOLI L. Media and prospects of the cultivation of marine algae[C]//Watanabe A, Hattori A. Culture and Collections of Algae, Proc US-Japan Conference. Hakone Japan: Japanese Society for Plant Physiology, 1968:63-75.
- [13] 徐涤, 秦松, 庞国兴, 等. 青岛和大连海区海带(*Laminaria japonica*)外生细菌的 16S rRNA 基因序列分析[J]. 高技术通讯, 2003, 14(2):81-86.
- [14] GRAM L, MELCHIORSEN J, BRUHN J B. Antibacterial activity of marine culturable bacteria collected from a global sampling of ocean surface waters and surface swabs of marine organisms[J]. Mar Biotechnol, 2010, 12(4):439-451.
- [15] PORSEBY C H, NIELSEN K F, GRAM L. *Phaeobacter* and *Ruegeria* species of the *Roseobacter* clade colonize separate niches in a Danish Turbot (*Scophthalmus maximus*)-rearing farm and antagonize *Vibrio anguillarum* under different growth conditions[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(23):7356-7364.
- [16] NEUMANN A M, BALMONTE J P, BERGER M, et al. Different utilization of alginate and other algal polysaccharides by marine *Alteromonas macleodii* ecotypes[J]. Environmental Microbiology, 2015, 17(10): 3857-3868.
- [17] MATSUYAMA H, MINAMI H, SAKAKI T, et al.

- Alteromonas gracilis* sp. nov., a marine polysaccharide-producing bacterium[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65(5):1498-1503.
- [18] NEDASHKOVSKAYA O I, KIM S B, HAN S K, et al. *Maribacter* gen. nov., a new member of the family Flavobacteriaceae, isolated from marine habitats, containing the species *Maribacter sedimenticola* sp. nov., *Maribacter aquivivus* sp. nov., *Maribacter orie alis* sp. nov. and *Maribacter ulvicola* nt sp. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54(4):1017-1023.
- [19] ZHANG G, HWANG C, KANG S, et al. *Maribacter antarcticus* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from a culture of the Antarctic green alga *Pyramimonas gelidicola*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59(6):1455-1459.
- [20] SHEU S Y, CHEN Y S, SHIAU Y W, et al. *Fluviimonas pallidilutea* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Cytophagaceae isolated from a freshwater river[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2013, 63(10):3861-3867.
- [21] 徐永健, 乐观宗, 张友平. 龙须菜体表附生细菌的几种分离方法比较[J]. 微生物学通报, 2007, 34(1):123-126.
- [22] 杨锐, 方文雅, 单媛媛, 等. 条斑紫菜外生细菌的遗传多样性[J]. 海洋学报, 2008, 30(4):161-168.
- [23] DONG Q L, LIN T Y, XING X Y, et al. Identification of a symbiotic fungus from blue-green alga and its extracellular polysaccharide[J]. Letters in Applied Microbiology, 2014, 58(4):303-310.
- [24] 卢婧雯, 张心齐, 杜丽丽, 等. 中国东海及南海近海 4 采样点海水可培养细菌的多样性研究[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2012, 39(4):443-449.
- [25] SALOMON P S, JANSON S, GRANÉLI E. Molecular identification of bacteria associated with filaments of *Nodularia spumigena* and their effect on the cyanobacterial growth[J]. Harmful Algae, 2003, 2(4):261-272.
- [26] LAKANIEMI A M, INTIHAR V M, TUOVINEN O H, et al. Growth of *Dunaliella tertiolecta* and associated bacteria in photobioreactors[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2012, 39(9):1357-1365.
- [27] STACKEBRANDT E, GOEBEL B M. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1994, 44(4):846-849.

Aseptic treatment and isolation and identification of epiphytic bacteria from marine red alga *Gracilariopsis lemaneiformis*

LIN Li-chun¹, JIANG Jia-yu¹, HOU Sai-nan¹, SUN Xue¹, LU Kai-xing^{2*}

(1.School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2.College of Science & Technology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: The marine red algae *Gracilariopsis lemaneiformis* were treated by one or two following antibiotics with different concentrations: ampicillin, kanamycin, chloromycetin and cycloheximide. Different bacteria and fungi were identified by using 16S rRNA gene and ITS sequences. The main focus of the current study was the optimal antibiotic treatment method to obtain aseptic red alga *Gp. lemaneiformis*. The results showed that combination of 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ampicillin, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ chloromycetin and 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ cycloheximide was suitable for this algal aseptic treatment. Meanwhile, four strains of bacteria and one strain of fungi were isolated from the algal culture medium. The results showed that the four strains of bacteria belonged to genus of *Ruegeria*, *Alteromonas*, *Fluviimonas*, *Maribacter*, and one fungus was *Urocystales* or *Fereydounia*. The bacteria *Ruegeria* was the dominant bacteria in the epiphytic bacteria of *Gp. lemaneiformis*. The study provided sterile materials for the molecular biology research of *Gp. Lemaneiformis*. Furthermore, the results provide theoretical basis for the study of the relationship between bacteria and algae, which might help algal disease treatment in the future.

Key words: *Gracilariopsis lemaneiformis*; epiphytic bacteria; aseptic treatment; isolation and identification

(责任编辑 史小丽)