

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2011.00972

海带藻际微生物抗菌活性及其多样性的初步研究

褚椒江^{1,2} 朱 鹏^{1,2} 严小军^{1,2}

(1. 宁波大学应用海洋生物技术教育部重点实验室, 宁波 315211;

2. 宁波大学海洋生物工程重点实验室, 宁波 315211)

摘要: 从浙江台州海域健康海带、病烂海带(*Laminaria japonica*)及其周围海水中分离纯化海带藻际微生物, 利用双层琼脂扩散法对获得的菌株进行抗菌活性筛选, 比较活性菌株与来源的相关性, 并对具有抗菌活性的菌株进行 16S rRNA 系统发生学分析。结果显示, 在分离的 143 株海带藻际微生物中, 有 42 株细菌具有抗菌活性, 其中来源于健康海带和海水的活性菌株比例(35%和 29%)大于来源于病烂海带的细菌(23%)。对其中 16 株具有广谱抗菌活性的菌株进行的 16S rRNA 系统发生学分析显示, 分别属于 *Pseudoalteromonas*、*Rahnella*、*Donghaeana*、*Bacillus* 和 *Exiguobacterium* 5 个属。为从藻际微环境的微生物多样性入手了解海带病烂机制以及寻找新的抗菌药物提供研究材料。

关键词: 海带; 藻际; 抗菌活性; 多样性

中图分类号: Q938.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2011)06-0972-08

海带 (*Laminaria japonica*) 是我国大规模养殖的重要经济海藻之一, 富含维生素、蛋白质、矿物质、粗纤维以及钙、铁和无机盐等物质, 同时还是生产碘、甘露醇和褐藻胶等物质的重要工业原料。但是随着海带养殖规模的不断扩大, 在养殖过程中发生的病烂性病害经常给海带养殖造成重大的经济损失。海带病烂是一个复杂的问题, 相关研究虽已开展多年, 然而到目前尚未有一个统一的定论, 但发现多数海带病烂与藻际微生物有关^[1]。目前海带病烂的发病机制以及如何对其进行有效的防治仍是许多科研工作者的研究目标。先前主要是从寻找单一致病菌并开发相应的抑制剂入手进行海带发病机制的研究和防治^[2-5]。随着藻际微生物及藻际微环境的提出^[6], 发现藻际微环境的平衡对于维持海藻的正常生长具有至关重要的影响, 某些藻类对藻际微生物还具有特定的依赖性^[7], 使得我们有可能从海带藻际微环境的微生物多样性入手对海带病烂机制以及如何有效防治进行研究。

藻际微环境中微生物的组成复杂多样, 与海藻形成独特的生态关系, 藻际微生物可以产生某些特有的代谢产物(如抗生素、毒素等), 释放于藻际微环境中, 以增强海藻本身的抗病能力^[8]。国内外研究表明, 海藻藻际微生物中存在着丰富的抗菌和抗肿瘤资源^[9]。目前, 从微藻藻际微生物中已经获得了许多具有较强生物活性的物质^[10, 11], 但对巨型海藻的藻际微生物尚无相关研究报道。

本实验从浙江台州海带养殖水域的健康海带体、病烂海带体及其周围海水中分离藻际微生物, 随后对它们的抗菌活性进行初步研究并分析其多样性。有助于从藻际微生物的多样性角度入手了解海带病烂机制, 同时也为从海洋微生物中寻找抗菌先导化合物提供新的研究材料。

1 材料与方法

1.1 材料

样品来源 从浙江台州海带养殖水域(东经

收稿日期: 2010-08-12; 修订日期: 2011-06-14

基金项目: 国家“836计划”(2007AA09Z412); 国家自然科学基金(40906080); 宁波大学科研基金(xkl09110); 宁波大学人才工程项目(RCL2008016)资助

作者简介: 褚椒江(1986—), 男, 浙江温州人; 硕士研究生; 研究方向为海洋生物学。E-mail: iamcjj@gmail.com

通讯作者: 严小军, E-mail: xiaojunyan@hotmail.com

121.3°, 北纬 28.1°)采集健康海带、病烂海带及其周围海水样品。

菌种来源 铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, PA) CMCC(B) 10101 株、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*, BS) CMCC(B) 63003 株、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, SA) CMCC(B) 2600 株、大肠杆菌 (*Escherichia coli*, EC) CMCC(B) 44102 株、根瘤土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*, AT) AS1.1416 株、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*, SC) ACCC2.1882 和溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*, VA) CMCC(B) 17700 株购于中国典型培养物保藏中心; *E. coli* DH5 α 购于 TaKaRa 公司。

培养基 PDA 培养基(土豆 200 g, 蔗糖 20 g, 琼脂 15.2 g, 陈海水 1000 mL); 2216E 培养基(酵母粉 1 g, 蛋白胨 5 g, 柠檬酸铁 0.1 g, 琼脂 20 g, 陈海水 1000 mL, pH: 7.6—7.8); CP 培养基(酵母膏 0.4 g, 牛肉膏 0.2 g, 葡萄糖 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.05 g, K₂HPO₄·3H₂O 0.15 g, KH₂PO₄ 0.1 g, NaCl 0.05 g, FeSO₄·6H₂O 0.001 g, 陈海水 500 mL, 纯水 500 mL, 琼脂 20 g); LB 培养基(葡萄糖 20 g, 蛋白胨 10 g, 牛肉膏 5 g, NaCl 5 g, 纯水 1000 mL, pH: 7.2)。

主要试剂和仪器 T1 Thermal Cycler (Bio-metra, 德国); Taq 聚合酶、pMD18-T Vector、细菌基因组 DNA 提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (TaKaRa 公司, 日本)。

1.2 样品处理

从海水、健康海带体及病烂海带体进行分离。切取约 3 cm×3 cm 健康海带体、病烂海带体, 用无菌海水漂洗 3 遍, 尽可能除去非附生细菌, 然后研磨得到两个原液; 取同样大小健康海带体、病烂海带体, 经无菌海水漂洗 3 遍后置漩涡振荡仪上振荡, 用滤纸过滤, 得到另两个原液, 加上采集的海水共五个原液。将五个原液分别稀释成 10⁰、10⁻¹、10⁻² 三个稀释度。

1.3 分离微生物

分离培养基采用 PDA 固体培养基、2216E 固体培养基和 CP 固体培养基三种培养基。分别取 100 μ L 处理好的样液至三种不同培养基中均匀涂布, 在 27°C 的培养箱中培养 3—5 d, 挑取不同形态、不同颜色的单菌落经多次纯化后, 转入斜面培养备用, 并于 -70°C 保存菌种。

1.4 样品标记

依据样品不同来源和不同处理方法对分离的微生物采用不同的记号标记, 以 P 对应 PDA 培养基, E 对应 2216E 培养基, C 对应 CP 培养基; H 代表来源于健康海带, R 代表来源于病烂海带; S 表示经振荡处理, G 表示经研磨处理; A、B、C 分别表示 10⁰、10⁻¹、10⁻² 三种稀释浓度; D 代表样品取自海带体, S 则表示为海水样。对同种来源及处理方式得到但表现性状不一样的菌株分别以 -1、-2、-3... 的序号加以区分。

1.5 抗菌活性筛选

以铜绿假单胞菌 CMCC(B) 10101 株、枯草芽孢杆菌 CMCC(B) 63003 株、金黄色葡萄球菌 CMCC(B) 26001 株、大肠杆菌 CMCC(B) 44102 株、根瘤土壤杆菌 AS1.1416 株、酿酒酵母 ACCC2.1882 株和溶藻弧菌 CMCC(B) 17700 株作为实验用敏感指示菌, 对所有分离菌株进行抑菌活性筛选。取处于生长对数期的样品菌液 5 μ L 点于其含 1.5% (w/v) 琼脂的 10 mL 固体培养基上, 27°C 静置培养至菌斑直径为 0.5—1 cm (约 2—5 d, 依不同样品有所不同), 覆盖上 5 mL 含 1.5% (w/v) 琼脂的 LB 固体培养基 (已添加指示菌至 A₆₀₀ 值为 0.1), 27°C 培养过夜后测量抑菌圈大小, 以含甲醇的纸片作为阴性对照, 含青霉素、氯霉素纸片 (上海医药化验所产) 作为阳性对照^[12]。

1.6 16S rRNA 分子鉴定

细菌基因组 DNA 的制备 取培养到指数生长期细菌菌液 5 mL, 按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取基因组 DNA。

用于扩增 16S rRNA 的引物 根据文献[13], 选择合成 16S 引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGC-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。

16S rRNA 的 PCR 扩增 50 μ L 扩增体系, 反应条件为: 94°C 5min; 94°C 1min, 56°C 1min, 72°C 1min, 35 个循环; 72°C 5min。

PCR 产物克隆 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, 切下目的条带, 回收 DNA, 将纯化后的 PCR 产物先与 pMD18-T Vector 连接, 然后转化到 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 提取重组质粒。

DNA 序列测定和分析 采用 BigDye terminator v311 和 ABI PRISM 373 自动测序仪 (ABI 公司) 测定克隆片段的核苷酸序列, 测序由上海生

工生物工程技术服务有限公司完成。获得的 16S rRNA 序列提交 GenBank 用 BLAST 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 与已知序列进行对比, 用 ClustalX 2.0.1.1 软件进行排列, 利用 MEGA4.1 软件绘制系统树并确定它们的系统发生学地位。

2 结果

2.1 海带藻际微生物的抗菌活性

根据样品来源及菌落的形态、大小、颜色等外观特征, 从健康海带体及其周边海水以及病烂海带体中共分离到 143 株海洋细菌, 对 7 种敏感指示菌的抑菌实验表明, 有 42 株细菌具有至少抑制一种指示菌的活性(表 1), 其中有 16 株菌具有对 3 株以上指示菌的广谱抗菌性, 特别是 PRGCD、PHSAD-2、PRGBD、PSB-8 等 4 株菌具有对 4 株以上指示菌的抗菌性。从海带及其生长海域水体中分离出的具有抗菌活性的菌株占总菌株数的 29%, 广谱抗菌性菌株占到了 11%。

具有抑菌活性的的藻际微生物对于指示菌表现出不同的抑菌谱, 在 42 株活性菌株中, 对 SA 有抑制作用的最多, 占总数的 83%, 对 BS 有抑制作用的为 40%, 对 PA 有抑制作用的占 26%, 对 EC 有抑制作用的占 24%, 对 VA 有抑制作用的为 17%, 对 SC 有抑制作用的占 14%, 对 AT 有抑制作用的则为 7%(图 1)。

2.2 藻际抗菌活性菌株来源相关性

从具有抗菌活性的藻际微生物数量和比例来看(表 2), 来源于健康海带及其周围海水中的活性菌分别达到 35%和 29%, 高于病烂海带的 23%。

2.3 海带藻际微生物的 16S rRNA 分子鉴定

以细菌的 16S rRNA 通用引物 1492R 和 27F 对 16 株具有广谱抗菌性的海带藻际微生物基因组 DNA 进行扩增, 测得的序列与 GenBank 数据库中的已知序列进行相似性分析(表 3), 并利用 MEGA 4.1 软件进行系统发生学分析(图 2), 结果显示所检测的 16 株活性菌中除 ERGCD 与 *Pseudoalteromonas elyakovii* 具有较低相似性(94%)外, 其余的菌株的 16S rRNA 基因序列与 GenBank 中已知序列均具有较高的相似性, 相似度从 98%—100%不等。结合系统发生学分析结果(图 2), 我们认为, 这 16 株活性细菌分别属于 3 个大纲中的 5 个属, 分别是 *Pseudoalteromonas* sp.、*Rahnella* sp.、*Donghaeana* sp.、*Bacillus*

sp.和 *Exiguobacterium* sp., 其中 *Rahnella* 和 *Pseudoalteromonas* 属于 γ -Proteobacteria, *Exiguobacterium* 和 *Bacillus* 属于 Bacilli, *Donghaeana* 属于 Flavobacterium。这次实验所获得的序列已经提交 NCBI/GenBank, 并获得序列号, 分别为: HM439609-HM439611、HM590611、HM595408-HM595410、HM854012-HM854020。

3 讨论

3.1 海带藻际微生物的抗菌活性

海洋环境特殊而复杂, 作为海洋生态系统重要的组成部分, 海洋微生物演化出独特的代谢方式并产生特殊的代谢产物^[14, 15]。研究发现海洋微生物常与海洋动植物紧密共生, 而且从海洋动植物中分离出很多结构独特并有强生理活性的化合物其真正来源是与之共附生的海洋微生物^[16], 它们对于维持海洋动植物栖息微环境具有重要作用。Egan, *et al.*从石莼表面分离到的 3 株可抑制多种细菌和真菌生长的活性菌^[9]。Burgess, *et al.*从海藻和无脊椎动物表面筛选出 400 株细菌, 其中 35%的细菌有抗陆源病原菌活性^[17]。方文雅等从紫菜 (*Porphyra* spp.) 的藻际微生物中筛选获得 31 株具有抑菌活性的菌株^[18]。国内有关海带 (*Laminaria japonica*) 藻际微生物的抗菌活性的研究未见相关报道。我们首次成功地从海带及其周边海水中分离到 42 株具有抗菌活性的海洋微生物(表 1), 表明海带的藻际微生物中具有极其丰富的抗菌资源。

16S rRNA 分子鉴定发现其中有 7(44%)株属于交替假单胞菌属 (*Pseudoalteromonas* sp.)。该属是主要存在于海洋中的细菌种类, 可产生许多具有生物学活性的次生代谢产物。目前已从该菌属中分离到一些独特有效的具有抗菌、细胞毒活性的次生代谢物。如 Nakayama, *et al.* 从 *Pseudoalteromonas* sp. F-420 中分离到的一种可以通过阻断细菌呼吸链而抑菌的活性物质 Korormicin^[19]。Kanoh, *et al.* 从 *Pseudoalteromonas* sp. KP20-4 中分离到了 Pseudoalterobactin A 和 B^[20]。2003 年, Isnansetyo, *et al.* 报道从 *Pseudoalteromonas* sp. O-BC30(T)中分离到一种新的抗生素物质 MC21-A^[21]。因此, 对本实验中分离到的具有广谱的抗菌活性(表 1)的 7 株属于交替假单胞菌属的藻际微生物 (PSB-8、PRGBD、PRSD-1、ESB-2、PRGCD、ESB-3 和 ERGCD) 的次生代谢产物进行分

离纯化将有望能得到具有抗菌活性的先导化合物。

表 1 海带藻际微生物的抑菌活性
Tab. 1 Antimicrobial activity of marine bacteria

菌种 Strain	指示菌 Test microorganism						
	SC	EC	PA	BS	SA	VA	AT
PSB-8	—	+++	+++	—	+++++	—	++++
PRGAD-2	—	—	—	—	—	++	—
PHSAD-2	++	+++	+++	++	++++	—	+++
PRGBD	—	++	—	+	+++++	—	+++
PHSAD-1	—	—	—	++	—	—	—
PHSBD-4	—	—	—	++	—	—	—
PRSAD	—	—	—	—	++	—	—
PHGAD-4	—	—	++	++	++	—	—
PHSBD	—	—	++	—	—	—	—
PSB-3	—	—	++	—	—	—	—
PSB	++	—	—	—	++	—	—
PHGBD-3	—	—	+++	++	+++++	—	—
PSB-6	—	—	—	—	+++++	—	—
PHSAD-6	—	—	—	++	—	—	—
PHGBD-1	—	—	—	—	++	—	—
PRGAD-3	++++	—	—	+++	+++	—	—
PSB-4	—	++++	—	+	+++++	—	—
PHGBD-4	—	—	—	—	+++	—	—
PRGCD-2	—	—	+++	—	+++	—	—
PHGAD	—	—	—	—	++	—	—
PRSBD	—	—	—	—	+++++	—	—
PSA-2	—	—	—	—	+++++	—	—
PHSAD-7	++	—	—	—	++	—	—
PHGAD-2	++	—	—	++++	+++++	—	—
PHSCD-1	—	++++	+++	—	+++++	—	—
PHSBD-1	—	++++	+++	—	+++++	—	—
PRSCD-2	—	—	+++	+	++++	—	—
PSA-3	—	—	—	—	++++	+++	—
PHGAD-3	—	+++	—	—	+++	—	—
PHSBD-3	—	—	—	++	+++++	—	—
PRSCD	—	++++	—	—	+++++	—	—
PSC	—	+++	—	—	++	—	—
PRGCD	—	++++	++++	++	+++++	—	—
ERGBD-1	—	—	—	+	++++	++	—
ESB-2	—	—	—	+	+++	+++	—
ESB-3	—	—	—	++	++++	+++	—
EHSCD	—	—	—	—	—	—	—
EHGBD	—	—	—	—	++++	+++	—
EHSBD-5	—	—	—	—	+++	—	—
EHSAD	—	—	—	—	++	—	—
EHGCD	—	—	—	—	+++++	++++	—
ERGCD	++	—	—	+	+++	—	—

注：—无抑制作用, No inhibition; +抑菌圈为 1—5 mm, Inhibition zone was 1—5 mm; ++抑菌圈为 5—10 mm, Inhibition zone was

5—10 mm; +++抑菌圈为 10—15 mm, Inhibition zone was 10—15 mm; ++++抑菌圈为 15—20 mm, Inhibition zone was 15—20 mm; +++++抑菌圈≥25 mm, Inhibition zone was greater or equal than 25 mm

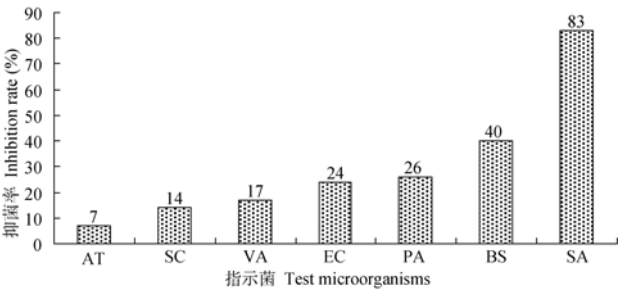


图 1 海带藻际微生物抑菌菌株的抑菌率

Fig. 1 Inhibition ratio of marine bacteria isolated from phycosphere of *Laminaria japonica*

表 2 不同来源的活性细菌数量和比例

Tab. 2 Total number and percentages of bioactive bacteria isolated from different source

来源 Origin	A	B	C
海水 Seaweed	35	10	29
健康海带体 Normal kelp	60	21	35
病烂海带体 Decayed kelp	48	11	23

注: A. 分离细菌数 Number of isolated bacteria (ind.); B. 活性细菌数 Number of bioactive bacteria (ind.); C. 活性细菌比例 Percentages of bioactive bacteria (%)

表 3 海带藻际微生物分类

Tab. 3 Bacterial strains cultured from phycosphere of *Laminaria japonica*

ERI #	Phylum	Genus	Closest neighbor	Antibiotic activity
PSB-8	<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Pseudoalteromonas</i>	<i>P. arctica</i> strain A 37-1-2 (100%)	Y
PRGBD	<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Pseudoalteromonas</i>	<i>P. elyakovii</i> strain BSi20429 (99%)	Y
PHSBD-1	<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Pseudoalteromonas</i>	<i>P. elyakovii</i> strain BSi20539 (99%)	Y
ESB-2	<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Pseudoalteromonas</i>	<i>P. elyakovii</i> strain BSi20429 (99%)	Y
PRGCD	<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Pseudoalteromonas</i>	<i>P. elyakovii</i> strain BSi20429 (99%)	Y
ESB-3	<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Pseudoalteromonas</i>	<i>P. elyakovii</i> strain BSi20539 (99%)	Y
ERGCD	<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Pseudoalteromonas</i>	<i>P. elyakovii</i> strain BSi20539 (94%)	Y
PHGBD-3	<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Rahnella</i>	<i>R. aquatilis</i> strain SPb (98%)	Y
PHGAD-2	<i>Flavobacteria</i>	<i>Donghaeana</i>	<i>D. dokdonensis</i> strain KOPRI_22265 (98%)	Y
PHSCD-1	<i>Flavobacteria</i>	<i>Donghaeana</i>	<i>D. dokdonensis</i> strain KOPRI_22265 (98%)	Y
PHGAD-4	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillus</i>	<i>B. subtilis</i> strain YJ001 (99%)	Y
PRGAD-3	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillus</i>	<i>B. subtilis</i> strain YJ001 (99%)	Y
PSB-4	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillus</i>	<i>B. subtilis</i> strain YJ001 (99%)	Y
PRGCD-2	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillus</i>	<i>B. subtilis</i> strain YJ001 (99%)	Y
ERGBD-1	<i>Bacilli</i>	<i>Exiguobacterium</i>	<i>E. aurantiacum</i> strain DSM 6208 (99%)	Y
PHSAD-2	<i>Bacilli</i>	<i>Exiguobacterium</i>	<i>E. aurantiacum</i> strain M-4 (99%)	Y

此外, 在 42 株活性菌中有 7 株对溶藻弧菌 (VA) 具有抑菌活性, 分别是 PRGAD-2、PSA-3、ERGBD-1、ESB-2、ESB-3、EHGBD 和 EHGCD。溶藻弧菌为专性嗜盐性弧菌, 能引起的三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 的“牙膏病”、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 的“红体病”以及大黄鱼 (*Pseudosciaena croce*)、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 和鳎鲷 (*Anguilla japonica*) 等名贵经济鱼类的弧菌病, 是水产养殖中的常见病源菌, 已经给大规模水产养殖带来严重的影响^[22–26]。目前主要采用人工注射疫苗的方式对其进行防治, 但免疫的效果有限^[27]。

本实验为今后在溶藻弧菌病害防治研究中开发新型、高效、专一的抗溶藻弧菌药物提供了丰富的研究材料。

3.2 海带藻际活性微生物的多样性

42 株具有抗菌活性的微生物分别来自健康海带体、病烂海带体及海水三个不同来源, 对 16 株具有广谱抗菌性海带藻际微生物的 16S rRNA 分子鉴定分别属于 *Pseudoalteromonas* sp.、*Rahnella* sp.、*Donghaeana* sp.、*Bacillus* sp. 和 *Exiguobacterium* sp. 5 个属, 表明海带藻际活性微生物具有数量和种类上的多样性; 对 7 株敏感指示菌的不同抑菌效果则表

明这些藻际微生物还具有功能上的多样性。

从具有抗菌活性的藻际微生物数量和比例来看

(表 2), 来源于健康海带及其周围海水中的活性菌分

别达到 35%和 29%, 远高于病烂海带的 23%, 表明

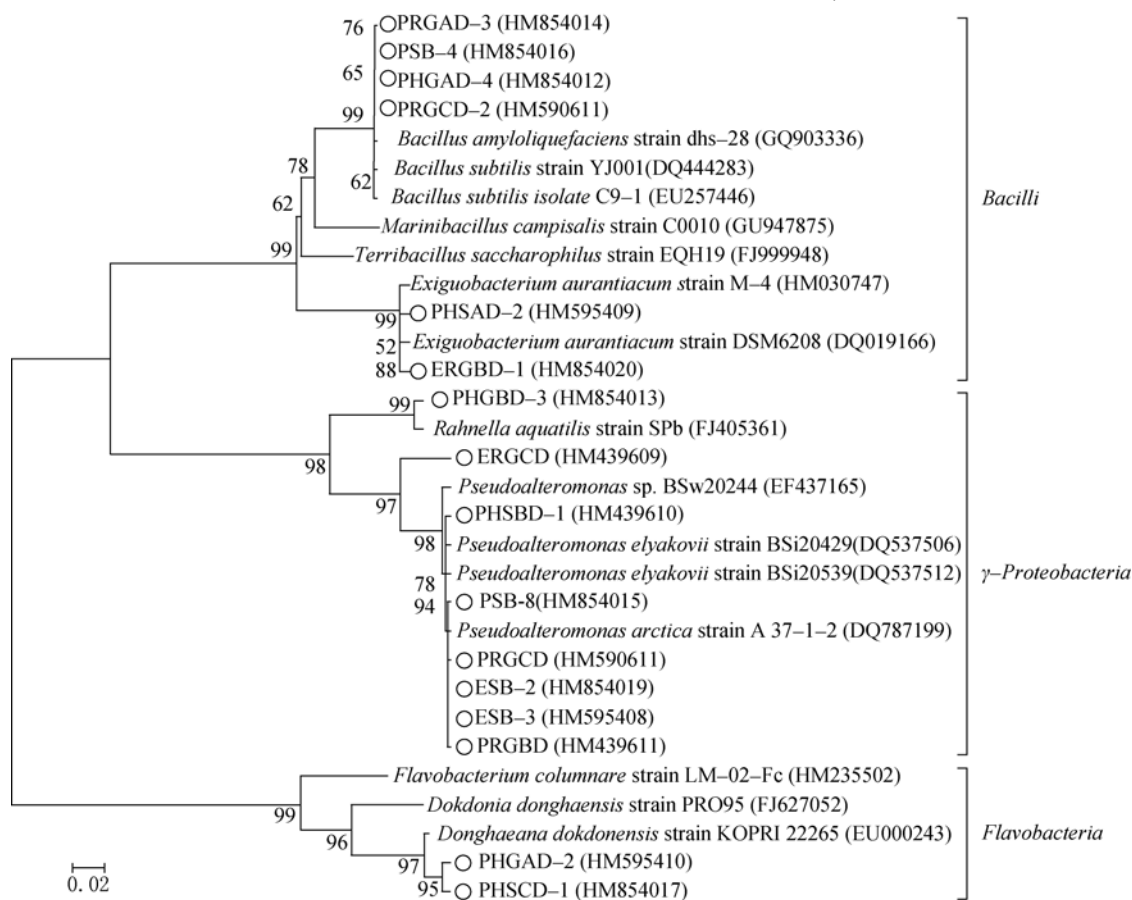


图 2 基于 16S rRNA 序列的活性海带藻际微生物的系统发生学分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of marine bacteria with bioactivities based on 16S rRNA sequences. Phylogenetic trees were constructed by the Bootstrapping and Neighbor-joining rule. Numbers at each branch points indicate bootstrap confidence values as the percentage of 1000 bootstrap replications. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. Bar indicates 0.02 substitutions per nucleotide. Sequences in this experiment are preceded by open circles

海带的生长状况发生改变时, 其生长环境中的微生物也有相应的改变, 共附生的活性菌株种类大大减少。对于这种变化两者之间的因果关系如何, 是否海带生长代谢状况的改变是由其藻际微环境中微生物的种类、数量及功能等方面的多样性的变动所引起, 是否某些养殖病害发生的根本原因是藻际微环境遭到了破坏, 值得更进一步的研究。海带发生病害时的生理生化变化是复杂的^[28], 因而很难直接通过病害前期海带自身的变化来判断其是否发病。本实验表明海带在发生病害时, 其藻际微生物的多样性也发生了变化。因此, 从藻际微生物的多样性入手或可为研究和解决海带病烂问题提供新思路。

参考文献:

- [1] Sun G Y, Yang Z Z, Shen S Z. A modified *Laminaria* summer sporelings cultivation method-more on the rot disease of *Laminaria* summer sporelings [J]. *Marine Sciences*, 1984, **8**: 38—42 [孙国玉, 杨振芝, 沈世泽. 改进的夏苗培育法研究——再论育苗系统中脱苗烂苗的原因及其预防措施. 海洋科学, 1984, **8**: 38—42]
- [2] Tang X X, Yang Z, Huang J, *et al.* Effects of infection by algal acid decomposing bacteria on activity of antioxidant enzymes in *Laminaria japonica* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2001, **25**(5): 424—427 [唐学玺, 杨震, 黄健, 等. 褐藻酸降解菌感染对海带抗氧化酶活性的影响. 水产学报, 2001, **25**(5): 424—427]
- [3] Xiao H, Tang X X, Wang Y L, *et al.* Culture conditions of algal acid decomposing bacteria and their physiological effects on *Laminaria japonica* [J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2006, **32**(2): 261—264 [肖慧, 唐学玺, 王艳玲, 等. 褐藻酸降解菌的生长条件及其对海带的生理效应. 中国海洋大学学报, 2006, **32**(2): 261—264]

- [4] Sawabe T, Makino H. *Pseudoalteromonas bacteriolytica* sp. nov., a marine bacterium that is the causative agent of red spot disease of *Laminaria japonica* [J]. *International Journal of System Bacteriology*, 1998, **48**: 769—774
- [5] Zvereva L V. Mycobiota of the cultivated brown alga *Laminaria japonica* [J]. *Russian Journal of Marine Biology*, 1998, **24**: 19—23
- [6] Lewis J, Kennaway G, Franca S, et al. Bacterium- dinoflagellate interactions investigative microscopy of *Alexandrium* spp. (*Gonyaulacales dinophyceae*) [J]. *Phycologia*, 2001, **40**: 280—285
- [7] Sakami T, Nakahara H, Chinain M, et al. Effects of epiphytic bacteria on the growth of the toxic *Dinoflagellate gambierdiscus toxicus* (*Dinophyceae*) [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1999, **233**: 231—246
- [8] Armstrong E, Yan L, Boyd K G. The symbiotic role of marine microbes on living surfaces [J]. *Hydrobiologia*, 2001, **461**: 37—40
- [9] Egan S, Thomas T, Holmstrom C, et al. Phylogenetic relationship and antifouling activity of bacterial epiphytes from marine *Ulva lactuca* [J]. *Environmental Microbiology*, 2000, **2**: 343—347
- [10] Matsuda M, Yamori T, Naitoh M, et al. Structural revision of sulfated polysaccharide B-1 isolated from a marine *Pseudomonas* species and its cytotoxic activity against human cancer cell lines [J]. *Marine Biotechnology*, 2003, **5**(1): 13—19
- [11] Zeng C M, Lin G Q, Shen H Q, et al. Studies on the chemical constituents of the dayawan bay germ *Pseudomonas* sp. [J]. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 1996, **58**(2): 5—7 [曾春民, 林国强, 沈鹤琴, 等. 大亚湾细菌 *Pseudomonas* sp. 发酵产物化学成分分析. 中国海洋药物, 1996, **58**(2): 5—7]
- [12] Jonathan K, Paul B, Clare P, et al. Isolation and analysis of bacteria with antimicrobial activities from the marine sponge *Haliciona simulans* collected from Irish waters [J]. *Marine Biotechnology*, 2009, **11**: 384—396
- [13] Valinsky L, Vedova G D, Scupham A J, et al. Analysis of bacterial community composition by oligonucleotide fingerprinting of rRNA genes [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68**: 3243—3250
- [14] Schwartzmann G, Rocha A B, Berlinck RGS. Marine organisms as a source of new anticancer agents [J]. *Lancet Oncology*, 2001, **2**: 221—225
- [15] Schupp P, Eder C, Proksch P. Staurosporine derivatives from the ascidian *Eudistoma toaealensis* and its predatory flatworm *Pseudoceros* sp. [J]. *Journal of Natural Products*, 1999, **62**: 959—962
- [16] Piel J. Metabolites from symbiotic bacteria [J]. *Natural Product Reports*, 2004, **21**: 519—538
- [17] Burgess J G, Jordan E M, Bregu M. Microbial antagonism: A neglected avenue of natural products research [J]. *Journal of Biotechnology*, 1999, **70**(1-3): 27—32
- [18] Fang W Y, Yang R, Zhu P, et al. Antibacterial activity of *Porphyra* spp. epiphytic bacteria and polyketide synthase I gene screening [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, **49**(2): 153—160 [方文雅, 杨锐, 朱鹏, 等. 紫菜外生细菌抑菌活性及其多聚酮合酶 (PKS I) 基因筛选. 微生物学报, 2009, **49**(2): 153—160]
- [19] Nakayama Y, Hayashi M, Yoshikawa K, et al. Inhibitor studies of a new antibiotic, korormicin, 2-n-heptyl-4-hydroxy-quinoline-N-oxide and Ag^+ toward the Na^+ -translocating NADH-quinone reductase from the marine *Vibrio alginolyticus* [J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 1999, **22**(10): 1064—1067
- [20] Kanoh K, Kamino K, Leleo G, et al. Pseudoalterobactin A and B, new siderophores excreted by marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. KP20-4 [J]. *Journal of Antibiotics* (Tokyo), 2003, **56**(10): 871—875
- [21] Isnansetyo A, Kamei Y. MC21-A a bactericidal antibiotic produced by a new marine bacterium, *Pseudoalteromonas phenolica* sp. nov. O-BC30 (T), against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob* [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2003, **47**(2): 480—488
- [22] Liu Q, Li H Y, Wang Q, et al. Identification and phylogenetic analysis of a strain of *Vibrio alginolyticus*, a pathogen in *Portunus trituberculatus* with toothpaste disease [J]. *Marine Fisheries Research*, 2007, **28**(4): 9—13 [刘淇, 李海燕, 王群, 等. 梭子蟹牙膏病病原菌—溶藻弧菌的鉴定及其系统发育分析. 海洋水产研究, 2007, **28**(4): 9—13]
- [23] Chen P, Wang Q Y, Li J, et al. Effects on lysozyme and phosphatase activities of *Portunus trituberculatus* infected by *Vibrio alginolyticus* [J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, **30**(2): 78—82 [陈萍, 王清印, 李健, 等. 溶藻弧菌对三疣梭子蟹溶菌酶和磷酸酶活性的影响. 渔业科学进展, 2009, **30**(2): 78—82]
- [24] Cai X H, Lu Y S, Wu Z H, et al. Construction of subtracted cDNA library of *Litopenaeus vannamei* induced by *Vibrio alginolyticus* and analysis of expressed sequence tags [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, **34**(1): 157—163 [蔡小辉, 鲁义善, 吴灶和, 等. 溶藻弧菌诱导凡纳滨对虾消减文库的构建及其表达序列标签分析. 水生生物学报, 2010, **34**(1): 157—163]
- [25] Jin S, Wang G L, Zhao Q S, et al. Epidemiology of *Vibriosis* in large yellow croaker *Pseudosciaena crocea* (Richardson) in marine cage culture [J]. *Fisheries Science*, 2005, **24**(1): 17—19 [金珊, 王国良, 赵青松, 等. 海水网箱养殖大黄鱼弧菌病的流行病学研究. 水产科学, 2005, **24**(1): 17—19]
- [26] Peng X C, Zhang N, Ran Y H, et al. Screening of *Vibrio alginolyticus* in sea foods and their pathogenic factors [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2008, **24**(4): 311—315 [彭喜春, 张宁, 冉艳红, 等. 海产品中溶藻弧菌的筛选及其致病因子的研究. 现代食品科技, 2008, **24**(4): 311—315]
- [27] Wang H F, Sun J J, Zhao D H, et al. Studies on the vaccination against *Vibrio alginolyticus* in farmed marine *Sparus macrocephalus* [J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2008, **29**(1): 97—100 [王海芳, 孙际佳, 赵典惠, 等. 溶藻弧菌疫苗对黑鲷的免疫效果研究. 华南农业大学

- 学报, 2008, 29(1): 97—100]
- [28] Zhou L, Gong Q L, Yu K K, *et al.* Diseases of kelp, *Laminaria japonica* [J]. *Transaction of Oceanology and Limnol-*

ogy, 1996, 4: 38—43 [周丽, 宫庆礼, 俞开康, 等. 海带的病害. 海洋湖沼通报, 1996, 4: 38—43]

ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND DIVERSITY OF MARINE BACTERIA IN PHYCOSPHERE OF *LAMINARIA JAPONICA*

CHU Jiao-Jiang^{1, 2}, ZHU Peng^{1, 2} and YAN Xiao-Jun^{1, 2}

(1. Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. Marine Biotechnology Laboratory, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Kelp (*Laminaria japonica*) is important economic farming seaweed in our country, rich in vitamins, protein, minerals, fiber, inorganic salts and other substances. But with the continuous expansion of seaweed farming, rotten diseases that occurred during the breeding often cause significant economic losses. Rotten diseases are complex problems, relative researches have been carried out for many years, but yet there has not been a unified conclusion. Previously mainly method was to search for a single pathogen and develop corresponding inhibitors. With the theory of phycosphere and phycosphere microbes, the balance of phycosphere micro-environment was found important to the normal growth of algae, making it possible to study rotten diseases from the way of microbial diversity. In this study, marine bacteria were isolated from health kelps (*Laminaria japonica*), rotten diseased kelps and seawater in coastal area of Taizhou, China. Antibacterial activities were screened using agar diffusion method, and the relationship of active bacteria and their origin was studied. The results showed that 42 strains among total 143 isolated marine bacteria had antimicrobial activity, which indicated that marine bacteria in phycosphere were extremely rich in anti-bacterial resources. The proportion of active bacteria associated with health kelps and seawater (35% and 29%, respectively) was higher than that isolated from rotten diseased kelps (23%). Molecular phylogenetic analysis of marine bacteria with broad-spectrum antibacterial activities based on 16S rRNA sequences indicated that they belonged to the genera of *Pseudoalteromonas*, *Rahnella*, *Donghaeana*, *Bacillus* and *Exiguobacterium*, respectively. These results proved that marine bacteria in phycosphere had great diversity in class and quantity, while different inhibitory effect to seven sensitive indicator bacteria meant there was also diversity in function. Diversity condition changed as the growth state of kelp changed. This study provides a clue to understand the mechanism of rotten disease from microbial diversity, and provide some new materials with medical potential.

Key words: *Laminaria japonica*; Phycosphere; Antibacterial activity; Diversity