

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(8):1044–1050; 4 August 2010
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

微小卡罗藻 (*Karlodinium micrum*) 共附生微生物抗菌与细胞毒活性

朱鹏^{1,2}, 游玉容^{1,2}, 褚椒江^{1,2}, 金海晓^{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:【目的】本文对微小卡罗藻共附生微生物进行分离并对其抗菌和细胞毒活性进行初步研究,以期获得既具有抗菌又具有细胞毒的高活性菌株,为从共附生微生物的角度去研究微小卡罗藻毒素的合成途径以及真正来源提供研究材料。【方法】利用琼脂扩散法和 MTT 法对细菌培养液的乙酸乙酯提取物进行抗菌和细胞毒活性筛选,并对具有细胞毒活性的细菌菌株进行了 16S rRNA 系统发生学分析。【结果】在分离到的 38 株海洋细菌中,25 株细菌具有抗菌活性,5 株细菌(W-14-2、W-2-2、W-12、E-8-2 和 W-4)具有细胞毒活性。对这 5 株具有细胞毒活性的细菌菌株进行 16S rRNA 系统发生学分析显示它们分别与 *Alteromonas alvinellae*、*Stappia aggregata*、*Pelagibaca bermudensis*、*Marinobacter kribbensis* 和 *Maribacter dokdonensis* 的 16S rRNA 基因序列具有较高的相似性。【结论】在分离到的微小卡罗藻共附生微生物中含有较为丰富的活性菌株,且获得 5 株具有抗菌活性又具有细胞毒的高活性菌株。

关键词: 卡罗藻共附生微生物;抗菌活性;细胞毒活性;16S rRNA

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 08-07-1044

微小卡罗藻 (*Karlodinium micrum*) 是海水养殖水域和自然水体中常见的裸甲藻种类,在自然海区中可形成赤潮,引起生态异常并造成危害。该藻于 20 世纪 50 年代在南非首次被发现后,在南卡罗来纳州的海水澄清池、美国切萨皮克海湾和马里兰州海湾等多处发生过大规模的赤潮,造成鱼类大量死亡^[1-2]。国内,微小卡罗藻曾在我国香港海域发生过赤潮,但并未见到相关鱼类死亡的报道^Δ。

与陆地相比,海洋复杂多变的环境使得海洋微藻与其共附生微生物间存在着更为密切的联系。共附生微生物为藻类的生长提供了无机氮、磷等营养盐和必需的生长因子,与微藻之间存在着互惠互利

的密切关系。共附生微生物在与微藻共同生长过程中不仅可以提供营养物质,还可以影响或参与宿主的次生代谢产物的产生。研究表明,许多赤潮毒素不是由赤潮微藻本身产生的,而是由其共附生的微生物代谢产生的^[3]。

本文研究的微小卡罗藻源自我国东海赤潮水样,该藻已被初[⊙]实能产生较强的鱼毒素,溶血毒素和细胞毒活性^[4-6]。但这些毒素的化学结构、合成途径以及真正来源目前还不清楚。我们对微小卡罗藻共附生微生物进行分离并对其抗菌和细胞毒活性进行初步研究,以期获得既具有抗菌又具有细胞毒的高活性菌株,为从共附生微生物的角度去研

基金项目: 国家“863 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)

* 通信作者。Tel: +86-574-87600458; Fax: +86-574-87600590; E-mail: xiaojunyan@hotmail.com

作者简介: 朱鹏(1979-),男,山西人,讲师,主要从事海洋药用微生物筛选研究。E-mail: zhupeng@nbu.edu.cn

收稿日期: 2010-01-27; **修回日期:** 2010-03-24

^ΔJackie YG, Liu JH. Marine water quality in Hongkong in 2004. In: Environmental Protection Department Report, Hongkong, 2005, 8-16.

究微小卡罗藻毒素的合成途径以及真正来源提供研究材料。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 藻种:微小卡罗藻为宁波大学海洋生物实验室微藻种质库提供的 NMBjah047 品系。

1.1.2 菌株等来源: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) 26001 株、大肠杆菌 (*Escherichia coli*, EC) CMCC (B) 44102 株、根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*, AT) AS1. 1416 株、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisia*, SC) ACCC2. 1882 和铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, PA) AB91095 株购于中国典型培养物保藏中心; *E. coli* DH5 α 购于 TaKaRa 公司; HeLa 细胞购于中国科学院上海典型培养物委员会细胞库。

1.1.3 主要试剂和仪器: T1 Thermal Cycler (Biometra, 德国); Taq 聚合酶、pMD18-T Vector (TaKaRa 公司, 日本); 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (TIANGEN 公司, 中国); Plasmid Miniprep Kit I (Omega Bio-tek 公司)。

1.2 菌株分离

收集处于指数生长期的微小卡罗藻细胞, 用无菌海水漂洗 3 次, 尽可能除去非附生细菌后, 加入 10 mL 无菌海水和经过灭菌处理的石英砂, 25 $^{\circ}$ C 研磨后, 再用无菌海水稀释为 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 三个浓度梯度, 依次涂布于海水细菌分离培养基^[7], 涂布后 25 $^{\circ}$ C 培养 20 d, 挑取不同形态、不同颜色的单菌落转入斜面培养, 经 2 次纯化后 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3 抗菌活性和细胞毒筛选

菌株培养液粗提物制备参考郑立等^[7]报道的方法进行, 以枯草芽孢杆菌 (BS)、金黄色葡萄球菌 (SA)、大肠杆菌 (EC)、根癌土壤杆菌 (AT)、酿酒酵母 (SC)、铜绿假单胞菌 (PA) 作为实验用敏感指示菌, 用琼脂扩散法筛选活性菌株^[8]。

测定细胞毒活性的 MTT 法参考 Mosmann 等^[9]报道的方法略作修改进行, 以 HeLa 细胞作为目标细胞, 培养基为含 10% BCS 的 RPMI1640 培养基。细胞用胰酶消化后, 调节密度为 $2-3 \times 10^4$ 个/mL, 添加于 96 孔板中, 每孔 195 μ L, 置于 37 $^{\circ}$ C、0.5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。将甲醇溶解的粗提取物加入培养物中, 使每孔样品终浓度为 200 mg/L, 以甲醇作为阴性对照, 37 $^{\circ}$ C、0.5% CO₂ 培养箱中培养 48 h。

取出 96 孔板, 每孔加入 20 μ L 的 MTT (5 g/L), 继续培养 4 h。弃培养液, 每孔加入 150 μ L 的 DMSO, 37 $^{\circ}$ C 振荡 6 min, 492 nm 波长测定各孔的光吸收, 抑制率 (IR) $\geq 50\%$ 认为具有细胞毒活性。

1.4 细菌分子鉴定

1.4.1 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。

1.4.2 引物设计:根据文献, 海洋细菌 16S rRNA 基因扩增选用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增^[10]。

1.4.3 PCR 反应体系与条件:PCR 采用 50 μ L 体系, 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 40 s, 59 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。

1.4.4 PCR 产物克隆:PCR 产物进行 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 DH5 α 细胞, 后提取重组质粒进行目的片段的测序。

1.4.5 DNA 序列测定和系统发生学分析:测序由上海生工生物技术有限公司完成。获得的 16S rRNA 基因序列提交 GenBank 用 BLAST 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 与已知序列进行对比, 用 ClustalX1. 8. msw 软件进行排列, 利用 MEGA3. 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 微小卡罗藻共附生细菌的抑菌活性

根据菌落的形态、大小、色泽等表观特征, 从培养的微小卡罗藻中共分离到 38 株海洋细菌。对 6 株敏感性指示菌的抑菌实验表明, 25 株细菌具有至少抑制一种指示菌的活性 (表 1)。其中编号为 W-14-2 的细菌对所有的指示菌均有抑制作用; 4 株细菌对 5 种指示菌有抑制作用, 分别为 E-8-2、E-13、W-4、W-13; 5 株细菌对 4 种指示菌有抑制作用, 分别为 E-3、W-2-2、W-9、W-14、W-15; 5 株细菌对 3 种指示菌有抑制作用, 分别为: E-9、W-2、W-6、W-8、EM-2。

具有抑菌活性的细菌对于病原指示菌表现出不同的抑菌谱 (图 1), 25 株菌中只有 4% 对 PA 具有抑制作用, 20% 对 EC 具有抑制作用, 48% 对 SA 具有抑制作用, 64% 对 SC 具有抑制作用, 88% 对 BS 具

有抑制作用,对 AT 具有抑制作用的菌株最多,占总 数的 92%。

表 1 微小卡罗藻共附生细菌的抑菌活性

Table 1 Antimicrobial activity of bacteria associated with *Karlodinium micrum*

Strains	Target bacteria					
	AT	EC	BS	SA	SC	PA
E-1	+	-	-	-	+	-
E-3	++	-	+	+	+	-
E-7	+	-	+	-	-	-
E-8	+	-	+	-	-	-
E-8-2	++	+	+++	+	++	-
E-9	+++	-	+	+++	-	-
E-10	+	-	+	-	-	-
E-13	+	+	+	+	+	-
W-1	+	-	+	-	-	-
W-2	+	-	++	-	++	-
W-2-2	+	-	+	+	+	-
W-3	-	-	+	-	-	-
W-4	++	+	+++	+	++	-
W-6	+	-	+	-	+	-
W-7	-	-	-	+	-	-
W-8	+	-	+	-	+	-
W-9	+	-	+	+	+	-
W-11	+	-	-	-	+	-
W-12	+	-	+	-	-	-
W-13	+	+	+	+	+	-
W-14	+	-	++	+	+	-
W-14-2	+++	+++	+++	+++	+++	+++
W-15	+++	-	+++	++	++	-
EM-1	+	-	+	-	-	-
EM-2	+	-	+	-	+	-

“-”: No inhibition; “+”: Inhibition zone between 1 and 3 mm; “++”: Inhibition zone between 3 and 5 mm; “+++”: Inhibition zone was ≥ 5 mm

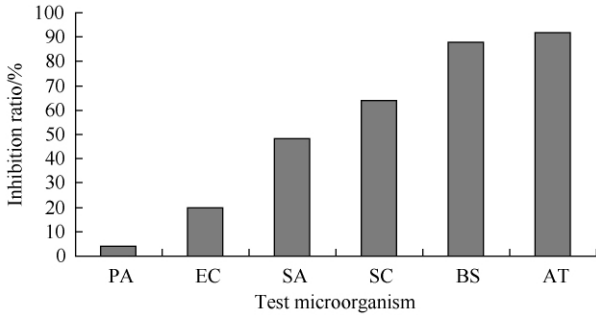


图 1 微小卡罗藻共附生细菌的抑菌谱

Fig. 1 Antimicrobial spectra of bacteria associated with *Karlodinium micrum*.

2.2 微小卡罗藻共附生细菌的细胞毒活性

在分离到的 38 株海洋细菌中,有 5 株细菌的培养液粗提取物具有细胞毒活性(图 2)。其中 W-2-2 和 W-14-2 两株细菌培养液粗提取物对 HeLa 细胞表现出较高的抑制率,并以 W-14-2 为最高。5 株细菌的 ID₅₀值范围从 69.23 mg/L 到 117.86 mg/L(表 2)。与抑制率最高相对应,海洋细菌 W-14-2 的 ID₅₀值(69.23 ± 3.72 mg/L)为 5 株细菌中最低。对照表 1 发现,筛选到的这 5 株具有细胞毒活性的细菌还分别具有大小不等的抑菌活性。其中,细菌 W-14-2 即具有十分广谱的抑菌活性(对 6 株指示菌均

具有抑制作用)同时也具有很高的细胞毒活性。

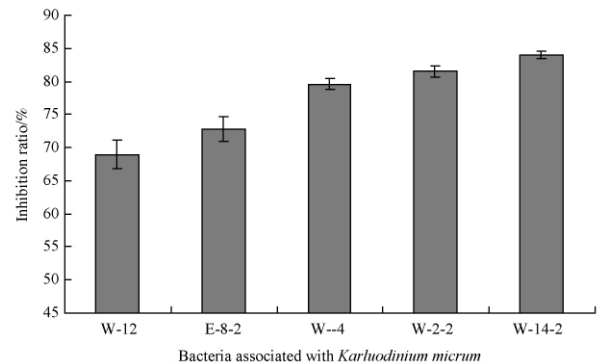


图 2 微小卡罗藻共附生细菌培养液粗提取物对 HeLa 细胞生长抑制率

Fig.2 Inhibitory effect of the extracts from bacteria associated with *Karlodinium micrum* on HeLa cell growth.

表 2 微小卡罗藻共附生细菌粗提取物具有细胞毒活性菌株的 ID₅₀ 值

Table 2 The ID₅₀ of the extracts from bacteria associated with *Karlodinium micrum*

Strains	The most related genus	ID ₅₀ /(mg/L)
W-14-2	<i>Alteromonas</i> sp.	69.23 ± 3.72
W-2-2	<i>Stappia</i> sp.	98.97 ± 2.75
W-4	<i>Maribacter</i> sp.	109.90 ± 2.65
E-8-2	<i>Marinobacter</i> sp.	116.44 ± 2.47
W-12	<i>Pelagibaca</i> sp.	117.86 ± 2.17

2.3 微小卡罗藻共附生细菌的 16S rRNA 分子鉴定

以细菌的 16S rRNA 通用引物 1492R 和 27F 对 5 株既具有抑菌活性同时也具有细胞毒活性的海洋细菌(W-14-2、W-2-2、W-4、W-12、E-8-2)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,并利用 MEGA3.1 软件构建系统发生树(图 3),结果显示所检测的 5 株海洋细菌(W-14-2、W-2-2、W-12、E-8-2 和 W-4)在 GeneBank 中与 *Alteromonas alvinellae*、*Stappia aggregata*、*Pelagibaca bermudensis*、*Marinobacter kribbensis* 和 *Maribacter dokdonensis* 的 16S rRNA 基因序列具有较高的相似性,其相似度分别为:98%、

表 3 微小卡罗藻共附生细菌的 16S rRNA 序列与 GenBank 中已知序列的对比

Table 3 The sequences alignment of 16S rRNA of marine bacteria isolated in this experiment with that submitted to GenBank

Strains	16S rRNA partial size/bp (Accession number)	The most related species (Accession number)	Sequence similarity/%
W-14-2	1495 (GQ495024)	<i>Alteromonas alvinellae</i> (FJ040190)	98
W-2-2	1444 (GQ495021)	<i>Stappia aggregata</i> (AY639889)	99
W-12	1425 (GQ495025)	<i>Pelagibaca bermudensis</i> (DQ178660)	99
E-8-2	1501 (GQ495023)	<i>Marinobacter kribbensis</i> (EF660753)	98
W-4	1492 (GQ495022)	<i>Maribacter dokdonensis</i> (AY960753)	99

3 讨论

海洋共附生微生物由于生存环境复杂多变,并与海洋动植物之间存在高度特异的共栖关系,这种特殊的生态关系也使得其蕴含了多种结构新颖并具有生物活性的新物质。尤其在细胞毒方面,近年来越来越多的研究表明与海洋动植物共附生的海洋微生物能产生许多具有抗肿瘤潜力的化合物。Singh 等从大型海藻 *Pocockiella variegata* 中分离到一株革兰氏阳性海洋细菌 *Pelagiobacter variabilis* 并从其发酵液中提取到 3 个抗肿瘤抗生素 Pelagiomicins A - C,它们都属于吩嗪类化合物同时实验表明抗肿瘤机理主要是造成 DNA 的损伤^[11]。查阅相关文献发现,与海洋真菌和海洋放线菌相比,有关海洋藻类共附生细菌抗肿瘤活性研究的报道较少,且对于微小卡罗藻共附生细菌抗肿瘤活性的研究未见相关报道。本实验中我们从微小卡罗藻中分离到的 38 株海洋细菌,并首次成功的从中筛选到 5 株细菌其培养液粗提取物具有细胞毒活性(图 2)。其中 W-2-2 和 W-14-2 两株细菌培养液粗提取物对 HeLa 细胞表现出较高的抑制率,并以 W-14-2 为最高。

交替单胞菌属(*Alteromonas* sp)中许多菌株的次生代谢产物都具有抗菌、细胞毒等多种生物活性。

99%、99%、98%、99%(表 3)。结合系统发生学分析结果(图 3),我们认为,这 5 株海洋活性细菌(W-14-2、W-2-2、W-4、W-12、E-8-2)分别属于 3 个大纲中的 5 个属,它们分别是:*Alteromonas* sp.,*Stappia* sp.,*Maribacter* sp.,*Pelagibaca* sp.,*Marinobacter* sp.,其中 *Alteromonas* 和 *Marinobacter* 属于 γ -proteobacteria,*Stappia* 和 *Pelagibaca* 属于 α -proteobacteria,*Maribacter* 属于 Flavobacteria。

这次研究中所涉及到的核苷酸序列(16S rRNA)已提交 NCBI/GenBank,并获得序列提交号,分别为:GQ495021、GQ495022、GQ495023、GQ495024、GQ495025。

Gauthier 等早在 1976 年就对 4 株含有紫红色色素的 *Alteromonas luteo-violaceus* 菌的次生代谢产物的抗菌活性筛选,结果从其中的 2 株菌中分离到一个具有抗菌活性的胞外阴离子多聚糖和两个胞内的含溴化合物^[12]。Gil-Turnes 等从虾 *Palaemon macrodactylus* 胚胎体表分离得到一株附生细菌 *Alteromonas* sp 能产生化合物吡啶满二酮,这种化合物可以抑制甲壳类病原菌 *Lagenidium callinectes* 对胚胎的感染^[13]。共附生于管虫中一株细菌 *Alteromonas* sp. strain HYD-1545 能产生一种具有生物活性的胞外多糖(EPS),研究发现这种胞外多糖可以有效的耦合环境中的重金属离子以帮助宿主在重金属含量较高的水体中存活下来^[14]。本实验中我们从微小卡罗藻中分离到的海洋细菌 W-14-2 即属于交替单胞菌属(*Alteromonas* sp),同时具有广谱的抗菌活性(表 1)和较高的细胞毒活性(表 2 和图 2),因此,在以后的研究中,我们将针对该株细菌的次生代谢产物进行分离纯化以希望能得到具有抗菌或细胞毒活性的先导化合物。

大肠杆菌(*Escherichia coli*)和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)是极为常见的感染病原菌,但在以这两种指示菌进行海洋细菌的抗菌筛选时,实验结果往往不甚理想。Lemos 等^[15]实验中发现海洋细菌很难对病原菌 *Escherichia coli* ATCC

25922 产生抑制作用; Ivanova 等^[16] 筛选到的 126 株抗菌菌株中只有 4 株对 *E. coli* 的生长有抑制作用; 方文雅等^[17] 在紫菜外生菌的抗菌活性筛选实验中也发现, 海洋细菌很难对铜绿假单胞菌产生抑制作用。造成这一现象的原因可能是因为这两种病原菌的外膜对抗生素的通透性比其它革兰阴性杆菌差, 且外膜存在着独特的药物主动外排系统, 将抗菌物质主动地排出细胞之外^[18-19]。在本实验中, 25 株抗菌菌株中只有 1 株对铜绿假单胞菌有抑制作用, 5 株对大肠杆菌有抑制作用。这与众多学者的研究结果相似。

α/γ -proteobacteria 是海洋共附生微生物中非常重要的一类, 占整个近岸海水原核生物的 28%^[20]。

很多学者在对甲藻共附生进行研究中发现 α/γ -proteobacteria 细菌在甲藻共附生细菌中占据着很大的比例。Anja 等^[21] 利用 DGGE 的方法对甲藻 *Noctiluca scintillans* 的共附生微生物多样性做了研究, 从甲藻 *Noctiluca scintillans* 中共获得 16 株共附生微生物的序列, 大部分属于 γ -proteobacteria。Prokic 等^[22] 通过微生物分离培养, 对产毒甲藻 *Prorocentrum lima* 相关细菌的多样性进行了研究, 发现 α -proteobacteria 是 *Prorocentrum lima* 的优势群体。在我们的实验中从微小卡罗藻中分离到的活性细菌具有丰富的多样性, 5 株被鉴定的菌株分别属于 5 个不同的属, 其中 3 株属于 α/γ -proteobacteria 这个大类(图 3)。

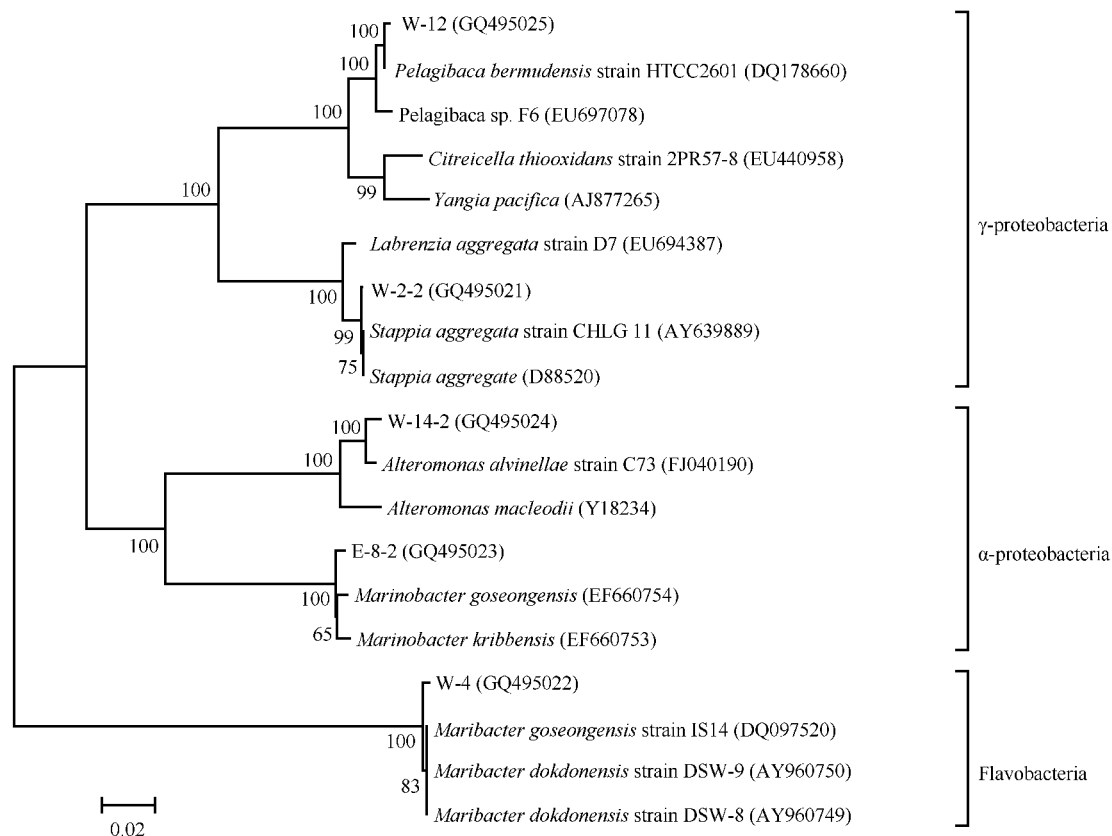


图 3 基于 16S rRNA 序列的分泌生物活性海洋细菌的系统发生学分析

Fig. 3 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.

4 结论

赤潮共附生微生物是否对赤潮毒素的产生有促进或抑制作用, 是否、或间接参与了赤潮毒素的产生一直是有毒赤潮毒素产生机制研究中的一个热点。早在 1982 年, Silva 就提出了甲藻内共生细菌

产毒的假说^[23]。本实验从源自我国东海赤潮水样的微小卡罗藻中共分离到 38 株海洋细菌, 经过抗菌和细胞毒活性筛选, 结果显示其中 25 株细菌具有抗菌活性, 5 株具有细胞毒活性。对 5 株具有细胞毒活性的细菌菌株进行 16S rRNA 系统发生学分析, 它们分别属于 *Alteromonas*, *Stappia*, *Maribacter*,

Pelagibaca, *Marinobacter* 5 个属。为从共附生微生物的角度去研究微小卡罗藻毒素的合成途径以及真正来源提供研究材料, 同时也为药用微生物的开发和利用提供新的研究样本。

参考文献

- [1] Kempton JW, Lewitus AL, Deeds JR, Law JM and Place AR. Toxicity of *Karlodinium micrum* (*Dinophyceae*) associated with a fish kill in a South Carolina brackish retention pond. *Harmful Algae*, 2002, 4: 233-241.
- [2] Glibert PM, Magnien R, Lomas MW, Alexander J, Fan C, Haramoto E, Trice M and Kana TM. Harmful algal blooms in the Chesapeake and coastal bays of Maryland, USA: comparison of 1997, 1998, and 1999 events. *Estuaries*, 2001, 24: 875-883.
- [3] Piel J. Metabolites from symbiotic bacteria. *Natural Product Reports*, 2004, 21: 519-538.
- [4] 周成旭, 傅永静, 严小军. 4 种典型有害赤潮原因种的溶血特征研究. *生态毒理学报* (*Asian Journal of Ecotoxicology*), 2007, 2(1): 65-69.
- [5] 周成旭, 孙雪, 冯婧, 严小军. 源于中国东海的有毒裸甲藻 *Karlodinium micrum* 的显微观察和分子鉴定. *海洋通报* (*Marine Science Bulletin*), 2008, 27(3): 32-37.
- [6] 游玉容, 周成旭, 朱鹏, 陈海敏, 严小军. 非无菌培养的微小卡罗藻次生代谢产物的细胞毒及其宏基因组酮基合成酶基因的筛选. *生物技术通讯* (*Letters in Biotechnology*), 2007, 18(6): 961-963.
- [7] 郑立, 林伟, 严小军, 陈海敏. 海洋细菌抗菌和细胞毒活性的初步研究. *应用生态学报* (*Chinese Journal of Applied Ecology*), 2004, 15(9): 1633-1636.
- [8] Torres RT, Berlinck RG and Nascimento GG. Antibacterial activity against resistant bacterial and cytotoxicity of four alkaloid toxins isolated from marine sponge *Arenosciera brasiliensis*. *Taxicon*, 2002, 40: 885-891.
- [9] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application and cytotoxicity assay. *Immunological Methods*, 1983, 65: 55-63.
- [10] Valinsky L, Vedova GD, Scupham AJ, Alvey S, Figueroa A, Yin B, Hartin RJ, Chrobak M, Crowley DE, Jiang T and Borneman J. Analysis of bacterial community composition by oligonucleotide fingerprinting of rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68: 3243-3250.
- [11] Singh M P, Menendez A T, Petersen P J, Ding W D, Maiese W M, Greenstein M. Biological and mechanistic activities of phenazine antibiotics produced by culture LL-141352. *The Journal of Antibiotics* (Tokyo), 1997, 50: 785-787.
- [12] Gauthier MJ and Flatau GN. Antibacterial activity of marine violet-pigmented *Ateromonas* with special reference to the production of brominated compounds. *Canadian Journal of Microbiology*, 1976, 22: 1612-1619.
- [13] Gil-Turnes MS, Mark EH and Fenical W. Symbiotic marine bacteria chemically defend crustacean embryos from a *Pathogenic Fungus*. *Science*, 1989, 246: 116-117.
- [14] Vincent P, Pignet P, Talmont F, Bozzi L, Fournet B, Guezennec J, Jeanthon C and Prieur D. Production and characterization of an exopolysaccharide excreted by a deep-sea hydrothermal vent bacterium isolated from the polychaeta annelid *Alvinella pompejana*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 4134-4141.
- [15] Lemos ML, Toranzo AE and Barja JL. Antibiotic activity of epiphytic bacteria isolate from intertidal seaweeds. *Microbial Ecology*, 1985, 11: 149-163.
- [16] Ivanova EP, Nicolau DV and Yumoto N. Impact of conditions of cultivation and adsorption on antimicrobial activity of marine bacteria. *Marine Biology*, 1998, 130: 545-551.
- [17] 方文雅, 杨锐, 朱鹏, 单媛媛, 严小军. 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* (*Acta Microbiologica Sinica*), 2009, 49(2): 153-160.
- [18] Wilts MC, Roe F, Bugnicout A, Franklin MJ and Stewart PS. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents and Chemother*, 2003, 47: 317-323.
- [19] Brooun A, Liu SH and Lewis K. A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents and Chemother*, 2000, 44: 640.
- [20] Gonzalez JM and Moran MA. Numerical dominance of a group of marine bacteria in the alpha-subclass of the class Proteobacteria in coastal seawater. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63: 4237-4242.
- [21] Anja S, Antje W and Christian S. Diversity of endocytic bacteria in the dinoflagellate *Noctiluca scintillans*. *Aquatic Microbial Ecology*, 2001, 25: 229-235.
- [22] Prokic I, Brummer F, Brigge T, Görtz DH, Gerdtts G, Schütt C, Elbrächter M and Müller WEG. Bacteria of the genus *Roseobacter* associated with the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Protist*, 1998, 149: 347-357.
- [23] Silva ES. Relationship between dinoflagellates and intercellular bacteria. *Marine Algae in Pharmaceutical Science*, 1982, 2: 269-288.

Screening and characterization of antibacterial and cytotoxic marine bacteria associated with *Karlodinium micrum*

Peng Zhu^{1,2}, Yurong You^{1,2}, Jiaojiang Chu^{1,2}, Haixiao Jin^{1,2}, Xiaojun Yan^{1,2*}

(¹Key Lab of Applied Marine Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

(¹Mairne Biotechnology Laboratory, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: [**Objective**] Antibacterial and cytotoxic activities were screened for marine bacteria which have been isolated from *Karlodinium micrum*, in order to obtain potential strains with antibacterial and cytotoxic activities. [**Methods**] In total 38 bacteria isolated from *Karlodinium micrum* were screened by agar-screening and MTT methods. The 16S rRNA genes were amplified from the genome DNA of those bacteria positive for both antibacterial and cytotoxic activities, which were cloned into pMD18-T vector for sequencing analysis. [**Results**] Twenty-five isolates had antimicrobial activity and 5 isolates (W-14-2, W-2-2, W-12, E-8-2 and W-4) had cytotoxicity. Molecular phylogenetic analysis of marine bacteria with cytotoxicity based on 16S rRNA sequences indicated that they exhibited the highest similarity (98% , 99% , 99% , 98% and 99% , respectively) to the 16S rRNA fragments of *Alteromonas alvinellae*, *Stappia aggregata*, *Pelagibaca bermudensis*, *Marinobacter kribbensis* and *Maribacter dokdonensis*. [**Conclusion**] The bacteria with bioactivity in *Karlodinium micrum* were abundant. We obtained five strains positive for both antibacterial and cytotoxic activities, which provide a clue to understanding the mechanism of toxin biosynthesis in *Karlodinium micrum* based on epiphytic and endophytic bacteria.

Keywords: Epiphytic and endophytic bacteria of *Karlodinium micrum*; antibacterial activity; cytotoxicity; 16S rRNA

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2007AA09Z412) and the National Natural Science Foundation of China (40906080)

* Corresponding author. Tel: +86-574-87600458; Fax: +86-574-87600590; E-mail: xiaojunyan@hotmail.com

Received: 27 January 2010/ Revised: 24 March 2010

系统发育树的构建方法

构建系统树是为了鉴定菌株的分类学地位,应该使用正确的方法构建。具体要求如下:

1. 将鉴定菌的 16S rRNA 序列递交 GenBank,用 Blast 软件搜索相似的 16S rRNA,然后一起构树。
2. 采用能反应分支长度的软件(如 NJ 法),并用 Bootstrap 值分析分支聚类的稳定性。
3. 用国际较为通用的一些建树方法,如 Neighbour - Joining 等,这样结果就更为可靠,更直观。
4. 请严格按照下列具体要求写作[参见:微生物学报,2004,44(2):143.]

① 系统树中:菌名应列出全称,且属和种名应斜体,名称后再加括号,其内含序列号。

② 图注(本刊的图注要求用英文写作):应表明"树"上所有的内容,包括:括号中的序号、分支点上的数字涵义、0.01 代表的意义。

③ 作图要求:要求达到印刷清晰,字体为"Time New Roman",字号为"8p"。可以选用两种方式——(A)文件格式为"*.Tif",分辨率为 600 线;(B)文件格式为"word",画出树,输入文字。