

基于16S rDNA分析的浒苔外生细菌多样性研究

周新倩^{1,2}, 杨锐^{1,2*}, 吴小凯^{1,2}, 黄艳花^{1,2}

(1. 宁波大学海洋学院, 浙江宁波 315211;

2. 宁波大学浙江省海洋生物重点实验室, 浙江宁波 315211)

摘要: 为研究浙江近海浒苔 *Ulva* spp. (*Enteromorpha* spp.) 外生细菌多样性, 采用传统的形态学和16S rDNA测序分析的方法, 从舟山朱家尖、宁海国华电厂和奉化南沙3个地区分离到可培养的浒苔外生细菌及其周围海水细菌65株。根据细菌菌落特征和革兰氏染色结果等将分离到的细菌分为26种表型。16S rDNA序列测序比对发现: 菌株与不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、交替单胞菌属 (*Alteromonas*)、弧菌属 (*Vibrio*)、假交替单胞菌属 (*Pseudoalteromonas*)、微小杆菌属 (*Exiguobacterium*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、赤细菌属 (*Erythrobacter*)、微球菌属 (*Micrococcus*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、深海杆菌属 (*Idiomarina*)、*Phaeobacter*、*Roseivirgaj* 和 *Silicibacter* 等23个属相应菌株具有较高同源性。对不同地区浒苔外生细菌进行了Shannon-Wiener多样性指数分析。研究表明: (1) 宁海国华电厂的浒苔外生细菌多样性最丰富, 多样性指数为93.98%; (2) 浒苔外生细菌与其生活地区密切相关, 其群落组成具有地域差异, 其优势类群也不尽相同, 但均归属于变形菌门。

关键词: 浒苔; 16S rDNA; 外生细菌; 多样性

中图分类号: S 917.1

文献标志码: A

全球气候变化和人类的生产活动导致占地球面积71%的海洋尤其是近海海区或海湾生态系统急剧恶化, 水温升高、富营养化和海洋酸化等深刻地影响着海洋生物的多样性^[1]。大型海藻是海洋生态系统中重要的初级生产者, 而海洋微生物则是重要的次级生产者和分解者, 二者在海洋生物地球化学循环中作用显著^[2-3]。藻类在生长过程中向环境释放大量有机质, 并在特定条件下分泌维生素、酶和毒素, 使藻体周围形成一种独特的微环境, 与土壤中的根系微环境 (rhizosphere) 类似, 被定义为“藻际微环境”, 简称“藻际” (phycosphere)^[4]。藻类为藻际中的细菌、真菌、原生动物和无脊椎动物等提供了良好的蔽护及丰富的食物^[5]; 同时, 藻际微生物也释放不同的活性成分及生长因子甚至毒素对藻

类进行调节^[6]。由于藻类生物机制和生活方式比较原始, 决定其与各生物类群之间不仅存在简单的食物链关系, 同时还存在复杂的伴生、共生和寄生的生活方式, 并以物质代谢和生存环境互补等方式形成了一个密切联系的微型生物群落^[7]。该群落中的各物种协同合作, 共同应对环境变化。

浒苔 *Ulva* spp. (*Enteromorpha* spp.) 是沿海常见的大型藻类, 能够产生多种生物活性物质, 具有抗肿瘤、抗氧化活性^[8-9], 不仅是人们喜爱的食用藻类, 也在近海环境修复中发挥重要作用^[10]。同时, 浒苔等大型绿藻也具有敏感的环境指示作用, 例如在21世纪, 中国沿海多次暴发以浒苔和石莼为主的绿潮, 沿海一线海区环境恶化, 对人类生产生活造成恶劣影响^[11-12]。因此, 研

收稿日期: 2015-03-03 修回日期: 2015-09-30

资助项目: 浙江省公益项目(2015C32004); 宁波市科技富民项目(2015C10062); 宁波大学水产浙江省重中之重一级学科开放基金(xkzsc1509)

通信作者: 杨锐, E-mail: yangrui@nbu.edu.cn

究不同生态条件下, 浒苔藻际外生细菌的多样性特点, 对于揭示其环境适应机制也具有重要意义。

本实验从舟山朱家尖、宁海国华电厂、奉化南沙3个不同生态类型的地区分离到浒苔藻际外生细菌, 通过研究其分布规律及物种构成, 发现不同自然环境下浒苔外生细菌的多样性特点。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2011年6月从舟山朱家尖、宁海国华电厂、奉化南沙3个不同地区采集了浒苔样品及其周围海水样品, 测定海区经纬度、盐度、pH值和温度(表1), 样品处理参照文献[13]的方法。

表1 采样地点、经纬度、环境因子和分离细菌数

Tab. 1 Sampling sites, longitude and latitude, environmental factors and isolates number

采样地点 sampling sites	经纬度 longitude and latitude	环境因子 environmental factors			分离细菌数 isolates number
		酸碱度 pH	盐度 salinity	温度/°C temperature	
宁海国华电厂 Guohua Power Plant	E121°25' N29°17'	7.74	26	25.5	26
奉化南沙 Nansha Fenghua	E121°24' N29°39'	7.75	27	23.5	23
朱家尖 Zhujiajian	E122°50' N29°50'	7.75	30	22.5	16

海水(SW); 最后的数字表示已获得的不同菌株数编码。例如ZEP01表示从舟山朱家尖采集的浒苔样品中分离得到的1号菌株。

1.3 细菌16S rDNA的鉴定

DNA的提取 细菌DNA的提取采用水煮法。具体步骤如下: 在已灭菌的1.5 mL离心管内加入1 mL的Zobell 2216E液体培养基, 挑取单菌落(已活化培养好的细菌)于上述离心管内, 过夜摇床培养。第二天, 从摇床中取出离心管, 12 000 r/min离心10 min, 去上清液后加入200 μ L 无菌蒸馏水, 混匀, 沸水浴10 min后12 000 r/min离心10 min, 吸取上清液作为DNA模板。提取的DNA于-20 °C保存备用或是及时处理。

PCR扩增及检测 提取细菌的DNA作为模板, 并以细菌16S rDNA通用引物对其进行PCR扩增。正向引物: 5'-AGAGTTT GATCCTGG-CTCAG-3', 反向引物: 5'-AAGG AGGTGA-TCCAGCCGCA-3'。PCR反应体系50 μ L(预混液

1.2 细菌的分离、纯化及形态观察

将滤液和海水分别稀释成不同梯度浓度, 涂布于Zobell 2216E海水培养基, 35 °C培养48~72 h, 按形态特征挑取单菌落, 划线分离纯化, 多次分离纯化后保种(在已灭菌的2 mL离心管内加入1 mL的Zobell 2216E液体培养基, 挑取单菌落于上述离心管内, 过夜摇床培养。第二天从摇床中取出在超净工作台内加入500 μ L的50%的甘油后封口膜密封, -20 °C保存备用)。

观察细菌菌体及菌落形态特征, 如菌落的色泽、形状、隆起、边缘等, 并根据不同采集样品地区对菌株命名。编号方式如下: 首字母表示采集地区, 如朱家尖(Z), 电厂(D)和南沙(N); 中间两个字母表示样品为不同地区的浒苔(EP)和

(Premix Taq): 25 μ L, 正向引物(PF): 1 μ L, 反向引物(PR): 1 μ L, 双蒸水(ddH₂O): 21 μ L, 模板DNA: 2 μ L。预混液(Premix Taq)购自TaKaRa宝生物工程(上海)有限公司, 正向引物(PF)和反向引物(PR)购自英潍捷基(上海)贸易有限公司, 双蒸水(ddH₂O)实验室制备。PCR反应条件为94 °C预变性5 min, 94 °C变性1 min, 58 °C复性1 min, 72 °C延伸1.5 min, 35个循环, 72 °C温育10 min, 4 °C保存。EB染色1%的琼脂糖凝胶电泳检测细菌PCR产物。细菌PCR产物于-20 °C保存备用。

16S rDNA基因序列测定 扩增50 μ L体系的16S rDNA样品经1%的琼脂糖凝胶电泳检测出现亮条带, 则将样品送往英潍捷基(上海)贸易有限公司测定16S rDNA的序列。通过GenBank在线BLAST比对, 得到同源性最高的序列, 利用MEGA 3.1软件制作聚类分析树。根据序列比对结果, 用Shannon-Wiener指数对各个不同地区的样品进行种属多样性评估。Shannon-Wiener指数公式如下:

$$H = - \sum (P_i)(\ln P_i)$$

式中, H 为群落的多样性指数, P_i 为样品中属于第 i 种个体的比例。

2 结果

2.1 浒苔外生细菌和海水细菌的分离纯化及形态鉴定

从3个不同地点的浒苔样品及其周围海水样

品中共分离得到可培养细菌65株, 其中朱家尖16株, 奉化南沙24株, 宁海国华电厂25株。根据细菌菌落特征、菌体形态、菌落色泽和革兰氏染色等结果将其归类成26种表型(表2), 其中细菌形状以短杆状居多、球状次之、长弧和短弧状较少; 经细菌革兰氏染色发现: 革兰氏阴性菌占绝大部分, 革兰氏阳性细菌则为少数; 菌落外观形态大多为小而突起, 少数为大而平坦; 菌落色泽丰富, 其中偏白的菌落较多。除

表2 细菌菌落形态特征

Tab. 2 Bacterial morphology

序号 no.	外观形态 colony shape	色泽 colony color	透明度 transparency	边缘 edge	形状 shape	革兰氏 gram staining	菌株编号 strain no.
1	小而突起	米白	不透明	完整	球状	G ⁻	ZEP01、ZEP04、ZSW06、ZSW08
2	小而突起	米白	透明	完整	球状	G ⁻	ZSW02
3	大而平坦	乳白	不透明	完整	球状	G ⁻	ZSW04
4	小而突起	亮黄	不透明	完整	球状	G ⁺	DEP09
5	小而突起	米白	稍透明	完整	长弧	G ⁻	ZEP03、ZEP06
6	大而平坦	米白	稍透明	完整	长弧	G ⁻	NEP02、NEP04、NSW12
7	大而平坦	金黄	透明	完整	长弧	G ⁺	DEP10
8	小而突起	黄褐	稍透明	完整	短弧	G ⁻	ZSW05、ZSW10
9	小而突起	米白	稍透明	完整	短弧	G ⁻	DSW01、DSW07、DSW12
10	小而突起	橘红	不透明	完整	短杆	G ⁻	NSW13、NSW11、NEP10
11	小而突起	橘红	稍透明	完整	短杆	G ⁻	DEP08
12	小而突起	橙黄	不透明	完整	短杆	G ⁻	NSW10、NSW08、DSW14、DEP01
13	小而突起	橙黄	不透明	完整	短杆	G ⁺	NEP06、DEP11
14	小而突起	亮黄	稍透明	完整	短杆	G ⁻	NSW09
15	小而突起	淡黄	不透明	完整	短杆	G ⁺	NSW01、NSW02
16	小而突起	淡黄	不透明	完整	短杆	G ⁻	DSW10、DSW13
17	小而突起	米白	透明	完整	短杆	G ⁻	NSW06、ZSW03
18	小而突起	米白	稍透明	完整	短杆	G ⁻	NSW04、NSW05、ZSW07、ZEP05、ZEP02、NEP01
19	小而突起	米白	不透明	完整	短杆	G ⁻	ZSW01、DSW03、DEP03
20	小而突起	米黄	稍透明	完整	短杆	G ⁻	NSW03、NEP09、DEP02、ZSW09、NSW07
21	小而突起	橘粉	透明	完整	短杆	G ⁻	NEP08、DSW09、DEP07
22	小而突起	乳白	不透明	完整	短杆	G ⁺	NEP03、DSW08、DEP05
23	大而平坦	米黄	不透明	完整	短杆	G ⁻	NEP07、DSW02、DSW04
24	大而平坦	米黄	不透明	完整	短杆	G ⁺	NEP05、DEP04
25	大而平坦	米白	稍透明	完整	短杆	G ⁻	DSW05、DSW06、DSW11
26	小而突起	黄褐	稍透明	完整	短杆	G ⁺	DEP06、DEP12

普遍存在的形态类群外, 各个海区都有各自独特的形态类型, 直接反映了浒苔外生细菌和海水细菌在不同生境中的群落多样性。

2.2 不同地区浒苔外生细菌及海水细菌的分子鉴定和群落特征

不同地区浒苔外生细菌和海水细菌的16S rDNA测序结果通过GenBank在线比对, 结果显示: 分离得到的65株细菌分别属于23个属(表3), 相似度达到96%~100%。将分离得到的细菌序列进行聚类(图1), 发现3个不同地区的细菌种属主要分为两大分支, 其中一个分支以宁海国华电厂的海水细菌为主, 为假交替单胞菌属

(*Pseudoalteromonas*), 而另一分支则分为4个小分支, 其中奉化南沙海水细菌5、6号菌株单独形成小分支, 归属深海杆菌属(*Idiomarina* sp.), 此属细菌在国内的报道相对较少。

对细菌的分布差异进行比较发现, (1)朱家尖和南沙海区的浒苔外生细菌中有大量交替单胞菌属(*Alteromonas*); 奉化南沙和宁海国华电厂都分离到了假交替单胞菌属、微小杆菌属(*Exiguobacterium*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)和*Roseivirga*。(2)浒苔外生菌和对照海水细菌存在明显差异, 朱家尖浒苔外生菌分属于3个属, 少于对照海水细菌分布的4个属; 奉化南沙浒苔外生菌与对照海水的细菌种类数相同, 都属于9个属; 宁海国

表3 采样分离细菌各属的分布情况
Tab. 3 Distribution of bacterial isolates in all sampling sites

细菌属 genus	ZEP	ZSW	DEP	DSW	NEP	NSW	%
<i>Acinetobacter</i> 不动杆菌属	34	40					
<i>Enterobacter</i> 肠杆菌属	33	30					
<i>Brevundimonas</i> 短波单胞菌属		10					
<i>Alteromonas</i> 交替单胞菌属	33				20	8	
<i>Vibrio</i> 弧菌属		20		21			
<i>Pseudoalteromonas</i> 假交替单胞菌属			26	58	10		
<i>Exiguobacterium</i> 微小杆菌属			8		10		
<i>Bacillus</i> 芽孢杆菌属			17		10		
<i>Erythrobacter</i> 赤细菌属			8	7		22	
<i>Micrococcus</i> 微球菌属			8				
<i>Shewanella</i> 希瓦菌属				7			
<i>Pseudomonas</i> 假单胞菌属					10	15	
<i>Idiomarina</i> 深海杆菌属						15	
<i>Algoriphagus</i>					10		
<i>Gaetbulibacter</i>						8	
<i>Labrenzia</i>					10		
<i>Marivirga tractuosa</i>						8	
<i>Phaeobacter</i>						8	
<i>Roseivirga</i>			8		10		
<i>Saccharospirillum</i>					10		
<i>Salinimonas</i>				7		8	
<i>Silicibacter</i>			17			8	
<i>Tenacibaculum</i>			8				

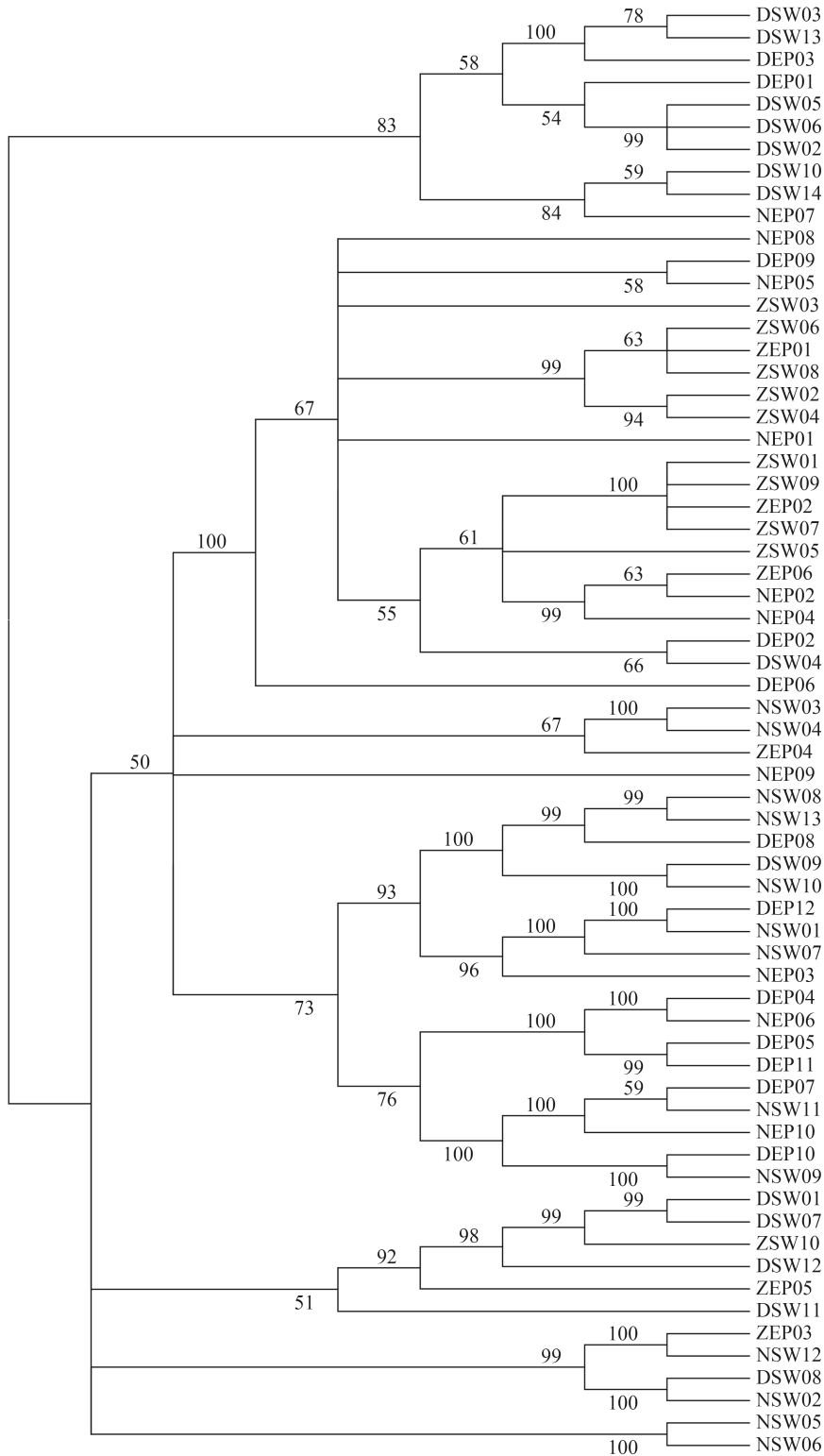


图 1 浒苔外生细菌及海水细菌的16S rDNA 基因序列聚类分析结果

Fig. 1 Phylogenetic tree of epiphytic bacterial isolated from *Ulva* spp. (*Enteromorpha* spp.) and seawater

华电厂浒苔外生菌分属于8个属，多于对照海水细菌分布的5个属，这可能与宁海电厂特殊的地理环境和水温较高等因素有关。(3)不同地区的浒苔外生细菌存在差异，在朱家尖海区分离得

到特有的浒苔外生菌包括不动杆菌属 (*Acinetobacter*)和肠杆菌属(*Enterobacter*); 仅在南沙海区分离到的浒苔外生菌有赤细菌属 (*Erythrobacter*)、微球菌属(*Micrococcus*)、

Silicibacter 和 *Tenacibaculum*, 而假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、*Algoriphagus*、*Labrenzia* 和 *Saccharospirillum* 只出现在宁海国华电厂样本中。(4)不同地区浒苔外生细菌和海水细菌的优势菌群存在差异, 在舟山朱家尖浒苔外生细菌中其各属细菌所占比例相同, 而海水细菌中不动杆菌属细菌占40%, 为优势类群; 宁海国华电厂采集的浒苔外生细菌和海水细菌中假交替单胞菌属细菌均占最高比例, 分别为26%和58%, 是该地区的优势种群; 奉化南沙浒苔外生细菌中交替单胞菌属细菌占20%, 是其优势类群, 而海水细菌中赤细菌属细菌占22%, 是优势类群。结果表明, 3个海区的细菌不仅其群落组成有差异, 其优势类群也不同, 但其优势类群却都属于变形菌门, 其中不动杆菌属和假交替单胞菌属属于 γ -变形菌纲, 则赤细菌属属于 α -变形菌纲。该结果与在近海海域沉积物、海水、海洋动物及藻类共附生细菌多样性研究中变形菌类群占优势的发现一致^[14-17]。

Shannon-Wiener多样指数性评估发现, 朱家尖浒苔共附生细菌多样性指数为47.71%, 海水细菌为55.58%; 宁海国华电厂浒苔共附生细菌为93.98%, 海水细菌为74.37%; 奉化南沙浒苔共附生细菌为85.25%, 海水细菌为52.21%。宁海国华电厂和奉化南沙的浒苔外生细菌的多样性比其周围海水细菌多样性丰富, 而朱家尖的浒苔外生细菌的多样性却略低于其周围海水细菌的多样性, 这可能与3个地区的经纬度及环境因子相关(图2), 从图中也可发现, 宁海国华电厂的浒苔外生细菌的多样性指数最高, 推测可能是受电厂高温影响, 海域环境复杂所致。

3 讨论

根据第二版《伯杰氏系统细菌学手册》, 实验分离得到可培养的65株细菌主要分属于变形菌门(46株)、坚壁菌门(5株)、放线菌门(1株)未归类细菌(13株), 其中变形菌门占较大比例, 为优势类群, 该结果与很多藻类共附生细菌群落研究相一致^[18-19]。未归类的13个属的细菌也可能是目前近海地区存在的潜在未开发的微生物资源, 需做进一步研究。宿主特异性普遍存在于细菌群落与海洋生物之间^[20], 本研究中3个海区的浒苔外生菌多样性也证实了这一点, 共有20个属的细菌是浒苔及其周边海水所特有的, 只有不动

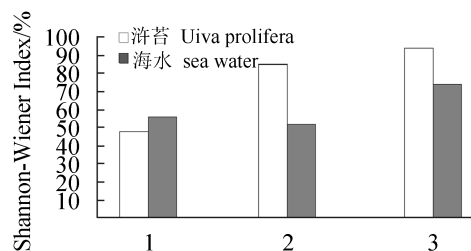


图2 三个不同地区分离到浒苔共附生细菌及海水细菌的香农-威纳多样性指数

1. 朱家尖, 2. 奉化南沙, 3. 宁海国华电厂

Fig. 2 Shannon-Wiener Index of bacterial isolated from *Ulva* spp. (*Enteromorpha* spp.) and seawater in 3 sampling sites

1. Zhujiajian, 2. Nansha Fenghua, 3. Guohua Power Plant

杆菌属、肠杆菌属、交替单胞菌属、假交替单胞菌属、赤细菌属、假单胞菌属在浒苔及海水中都分离得到。

比较微生物群落结构, 实验发现浒苔外生细菌和相应海区的细菌存在明显差异, 该情况也出现在绿藻等大型海藻外生细菌及其海水微生物群落之间^[21-24], 这可能是因为藻类在其生长过程中向周围环境释放大量营养物质, 造成了藻际与周边海水环境差异。随着水温的升高, 朱家尖、南沙和国华电厂浒苔外生细菌及其周边海水细菌的多样性指数呈现逐渐增高的趋势。有研究表明, 电厂温排水会影响收纳海域的热环境、水动力等条件, 影响海洋生物生活和繁殖^[25], 本研究中电厂海区也比另外的海区水温升高。此外, 在藻类表面附着的细菌可以形成生物膜, 结构精密的细菌生物膜可以作为藻类免受其他病原侵染的屏障, 从而影响藻际微生物群落变化^[26-27]。

不同海区的浒苔共附生细菌多样性差异较大, 数据经R软件分析结果表明, 造成3个海区浒苔外生及其海水细菌多样性差异的主要菌种是不动杆菌属、假单胞菌属、弧菌属、假交替单胞菌属和*Saccharospirillum*。不动杆菌属一般存在于较为干净的温带海水水域中, 本实验亦在受养殖活动影响较小的朱家尖海域浒苔上分离到大量该属细菌。假交替单胞菌属细菌广泛分布于海洋环境中, 能分泌多种胞外活性物质, 如胞外酶、胞外毒素等, 这些物质表现出抗菌、溶菌、杀藻、分解半乳糖、降解纤维素和果胶以及软化琼胶等多种生物活性^[28]。本研究

中从宁海国华电厂分离到浒苔共附生细菌和海水细菌中都有假交替单胞菌属细菌,且均为优势群体,该属细菌的功能多样性可能是造成宁海国华电厂较高浒苔细菌多样性的原因^[29-30]。

参考文献:

- [1] Templer P H, Reinmann A B. Multi-factor global change experiments: What have we learned about terrestrial carbon storage and exchange [J]. *New Phytologist*, 2011, 192(4): 797-800.
- [2] Armbrust E V. The life of diatoms in the world's oceans [J]. *Nature*, 2009, 459(7244): 185-192.
- [3] Fuhrman J A. Microbial community structure and its functional implications [J]. *Nature*, 2009, 459(7244): 193-199.
- [4] Bell W, Mitchell R. Chemotactic and growth responses of marine bacteria to algal extracellular products [J]. *Biological Bulletin*, 1972, 143(2): 265-277.
- [5] Rooney-Varga J N, Giewat M W, Savin M C, *et al.* Links between phytoplankton and bacterial community dynamics in a coastal marine environment [J]. *Microbial Ecology*, 2005, 49(1): 163-175.
- [6] Burgess J G, Jordan E M, Bregu M, *et al.* Microbial antagonism: A neglected avenue of natural products research [J]. *Journal of Biotechnology*, 1999, 70(1): 27-32.
- [7] Egan S, Harder T, Burke C, *et al.* The seaweed holobiont: Understanding seaweed-bacteria interactions [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2013, 37(3): 462-476.
- [8] 姚东瑞. 浒苔资源化利用研究进展及其发展战略思考 [J]. *江苏农业科学*, 2011, 39(2): 473-475.
- Yao D R. Research progress and development strategy for resource utilization of *Enteromorpha prolifera* [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2011, 39(2): 473-475 (in Chinese).
- [9] 金浩良, 徐年军, 严小军. 浒苔中生物活性物质的研究进展 [J]. *海洋科学*, 2011, 35(4): 100-106.
- Jin H L, Xu N J, Yan X J. Research progress on the bioactive compounds of seaweed *Enteromorpha* [J]. *Marine Sciences*, 2011, 35(4): 100-106 (in Chinese).
- [10] 杨宇峰, 费修纭. 大型海藻对富营养化海水养殖区生物修复的研究与展望 [J]. *青岛海洋大学学报*, 2003, 33(1): 53-57.
- Yang Y F, Fei X G. Prospects for bioremediation of cultivation of large-sized seaweed in eutrophic mariculture areas [J]. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 2003, 33(1): 53-57 (in Chinese).
- [11] 高姗姗, 段维军, 陈先锋, 等. 2010年-2011年山东近海石莼属绿海藻的种类鉴定 [J]. *生物学杂志*, 2013, 30(4): 24-28.
- Gao S S, Duan W J, Chen X F, *et al.* Distinction of green tide algae *Ulva* sp. in the coastal waters of Shandong province during 2010-2011 [J]. *Journal of Biology*, 2013, 30(4): 24-28 (in Chinese).
- [12] 高嵩, 范士亮, 韩秀荣, 等. 浒苔绿潮与南黄海近岸海域水质的关系 [J]. *中国环境科学*, 2014, 31(1): 213-218.
- Gao S, Fan S L, Han X R, *et al.* Relations of *Enteromorpha prolifera* blooms with temperature, salinity, dissolved oxygen and pH in the Southern Yellow Sea [J]. *China Environmental Science*, 2014, 31(1): 213-218 (in Chinese).
- [13] 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.
- Yang R, Fang W Y, Shan Y Y, *et al.* Genetic diversity of epiphytic bacteria in *Porphyra yezoensis* [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2008, 30(4): 161-168 (in Chinese).
- [14] 刘欣, 肖天, 张文燕, 等. 胶州湾海域表层沉积物细菌多样性 [J]. *海洋科学*, 2010, 34(10): 1-6.
- Liu X, Xiao T, Zhang W Y, *et al.* Diversity of bacterial community in sediments of Jiaozhou Bay [J]. *Marine Sciences*, 2010, 34(10): 1-6 (in Chinese).
- [15] Segawa T, Takeuchi N, Ushida K, *et al.* Altitudinal changes in a bacterial community on Gulkana Glacier in Alaska [J]. *Microbes and Environments*, 2010, 25(3): 171-182.
- [16] 赵锐. 青岛近海两种生态环境可培养细菌多样性研究及3株海洋新菌的分类鉴定 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
- Zhao R. Studies of cultivated marine bacterial diversities in two specific ecological environments in Qingdao coastal area and taxonomic analysis of three novel bacteria [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012 (in Chinese).
- [17] Longford S R, Tujula N A, Crocetti G R, *et al.* Comparisons of diversity of bacterial communities associated with three sessile marine eukaryotes [J].

- Aquatic Microbial Ecology, 2007, 48(3): 217–229.
- [18] Goecke F, Thiel V, Wiese J, *et al.* Algae as an important environment for bacteria-phylogenetic relationships among new bacterial species isolated from algae [J]. *Phycologia*, 2013, 52(1): 14–24.
- [19] Egan S, Thomas T, Holmström C, *et al.* Phylogenetic relationship and antifouling activity of bacterial epiphytes from the marine alga *Ulva lactuca* [J]. *Environmental Microbiology*, 2000, 2(3): 343–347.
- [20] Taylor M W, Schupp P J, Dahllöf I, *et al.* Host specificity in marine sponge-associated bacteria, and potential implications for marine microbial diversity [J]. *Environmental Microbiology*, 2004, 6(2): 121–130.
- [21] Tujula N A, Crocetti G R, Burke C, *et al.* Variability and abundance of the epiphytic bacterial community associated with a green marine *Ulvacean alga* [J]. *The ISME Journal*, 2010, 4(2): 301–311.
- [22] Burke C, Thomas T, Lewis M, *et al.* Composition, uniqueness and variability of the epiphytic bacterial community of the green alga *Ulva australis* [J]. *The ISME Journal*, 2011, 5(4): 590–600.
- [23] 沈梅丽, 杨锐, 骆其君, 等. 坛紫菜养殖周期中的藻际微生物多样性[J]. *微生物学报*, 2013, 53(10): 1087–1102.
- Shen M L, Yang R, Luo Q J, *et al.* Microbial diversity of *Pyropia haitanensis* phycosphere during cultivation [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(10): 1087–1102 (in Chinese).
- [24] Grossi S M G, Kottmeier S T, Sullivan C W. Sea ice microbial communities. III. Seasonal abundance of microalgae and associated bacteria, Mccurdo Sound, Antarctica [J]. *Microbial Ecology*, 1984, 10(3): 231–242.
- [25] 黄晓琛, 陈雪初, 彭欣, 等. 滨海电厂温排水对海洋环境的影响研究进展[J]. *海洋环境科学*, 2014, 33(6): 972–976.
- Huang X C, Chen X C, Peng X, *et al.* The research progress of the impact of thermal discharge from coastal power plants on marine environment [J]. *Marine Environmental Science*, 2014, 33(6): 972–976 (in Chinese).
- [26] Patel P, Callow M E, Joint I, *et al.* Specificity in the settlement-modifying response of bacterial biofilms towards zoospores of the marine alga *Enteromorpha* [J]. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(5): 338–349.
- [27] Mieszkin S, Martin-Tanchereau P, Callow M E, *et al.* Effect of bacterial biofilms formed on fouling-release coatings from natural seawater and *Cobetia marina*, on the adhesion of two marine algae [J]. *Biofouling*, 2012, 28(9): 953–968.
- [28] Holmström C, Kjelleberg S. Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, 30(4): 285–293.
- [29] Rao D, Webb J S, Kjelleberg S. Competitive interactions in mixed-species biofilms containing the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(4): 1729–1736.
- [30] Skovhus T L, Holmström C, Kjelleberg S, *et al.* Molecular investigation of the distribution, abundance and diversity of the genus *Pseudoalteromonas* in marine samples [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 61(2): 348–361.

Diversity of *Ulva* spp.(*Enteromorpha* spp.) epiphytic bacteria based on 16S rDNA sequences

ZHOU Xinqian^{1,2}, YANG Rui^{1,2*}, WU Xiaokai^{1,2}, HUANG Yanhua^{1,2}

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

2. Key Laboratory of Marine Biotechnology of Zhejiang Province, Ningbo University, Ningbo 315211, China;)

Abstract: The diversity of the epiphytic bacteria was studied based on the morphological characteristics and 16S rDNA sequence analysis, which were isolated from *Ulva* spp. (*Enteromorpha* spp.) distributed in Zhujiajian Zhoushan, Guohua power plant of Ninghai and Nansha Fenghua in China. The 65 isolated strains were grouped into 26 morphotypes, which had high similarities with strains of 23 genera such as *Acinetobacter* sp., *Alteromonas* sp., *Vibrio* sp., *Pseudoalteromonas* sp., *Exiguobacterium* sp., *Bacillus* sp., *Erythrobacter* sp., *Micrococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Idiomarina* sp., *Phaeobacter* sp., *Roseivirga* sp., *Silicibacter* sp. and so on. The results suggested that: (1) The diversity of *Ulva* spp. (*Enteromorpha* spp.) epiphytic bacteria was most abundant in Guohua power plant of Ninghai, and the Shannon-Wiener index was shown at 93.98%. (2) The Flora of *Ulva* spp. (*Enteromorpha* spp.) epiphytic bacteria was relevant with its growth and living environment. Although the community structure and dominated bacteria from different origins were various, the main species of bacteria belonged to the phylum of Proteobacteria. There were still some unidentified strains in this study, which need further investigation.

Key words: *Ulva* spp. (*Enteromorpha* spp.); 16S rDNA; epiphytic bacteria; diversity

Corresponding author: YANG Rui. E-mail: yangrui@nbu.edu.cn

Funding projects: Public Project of Zhejiang Province (2015C32004); Science and Technology Project of Ningbo (2015C10062); Fund of Zhejiang Provincial Top Key Discipline of Aquaculture in Ningbo University (xkzsc1509)