



胶州湾沉积物可培养细菌的多样性及其抑菌活性

王怡婷, 张传波, 齐麟, 贾晓强, 卢文玉*

天津大学化工学院生物工程系, 系统生物工程教育部重点实验室, 天津 300072

摘要: 【目的】海洋微生物在活性物质开发方面具有巨大的应用前景。为了研究胶州湾微生物的多样性和抑菌活性, 选取胶州湾9个观测站点的沉积物进行了细菌多样性及抑菌活性分析。【方法】采用YPD和Z2216E培养基分离细菌, 通过16S rRNA基因测序对分离菌株进行分类鉴定, 继而采用牛津杯法考察分离菌株对7株指示菌的抑菌活性, 最后用PCR方法筛选16株代表菌的PKSI、NRPS、CYP、PhzE和dTGD基因。【结果】从胶州湾沉积物中共分离出76株细菌, 通过对16S rRNA序列分析, 将其归为8个科11个属: 节杆菌属、考克氏菌属、微球菌属、微杆菌属、假交替单胞菌属、*Oceanisphaera*、海单胞菌属、葡萄球菌属、芽孢杆菌属、硫胺素芽孢杆菌属和短芽孢杆菌属, 其中分离细菌中有34株至少对1种指示菌有抑菌活性。所选取的16株菌均能检测到一种功能基因, 且其中5株菌能同时检测到3种以上的功能基因。【结论】以上研究表明胶州湾海域有丰富的微生物资源, 在生物活性次级代谢产物合成上有较大潜力。

关键词: 细菌, 抑菌活性, 功能基因, 胶州湾

近年来, 细菌对抗生素的耐药性不断增强, 导致了全球健康危机^[1]。虽然人类在不断研发新药物, 但大多数新药都是已知药物的衍生物, 很容易产生细菌耐药性^[2]。在这样的环境下, 发现或合成新的抗生素迫在眉睫。海洋环境具有与陆地不同的环境因子, 如高盐度、高压、低温和低营养等。与陆地微生物相比, 海洋微生物的次级代谢产物结构特异性高、种类繁多、生物活性强。在过去几十年里, 已经从海洋微生物中分离

出大量的生物活性化合物^[3]。Song等^[4]从1株南海链霉菌中分离出2个抑制癌细胞和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的angucycline类化合物。Phelan等^[5]从海绵枯草芽孢杆菌中分离出一种具有广谱抑菌活性的新型抗生素。海洋微生物蕴藏着极其丰富的天然产物, 具有重大的研究价值。

海洋活性天然产物复杂多样, 其中聚酮化合物由聚酮合酶(PKS)催化合成, 有广泛的生物活性, 如红霉素、阿维菌素和放线紫红素等。多烯

基金项目: 天津市海洋局蓬莱19-3油田溢油事故生态修复项目(19-3BC2014-03)

*通信作者。E-mail: wenyulu@tju.edu.cn

收稿日期: 2016-04-03; 修回日期: 2016-05-24; 网络出版日期: 2016-06-17

类聚酮化合物广泛用于治疗真菌感染性疾病, 如制霉菌素、匹马霉素^[6]等, 其聚酮骨架的羟基化是由细胞色素P450氧化酶(CYP)催化完成的。非核糖体肽合成酶(NRPS)催化合成的非核糖体肽类同样具有重要的药物价值, 如达托霉素、博来霉素等^[7]。吩嗪类化合物合成的基因簇为PhzABCDEFG, 目前已发现100多种具有生物活性的吩嗪类化合物^[8]。另外, 许多重要化合物如肽类、聚酮类、核苷、萜类化合物等都曾发现6-脱氧己糖(6DOH)糖基化修饰途径, 而在6DOH合成过程中dTDP-葡萄糖-4,6-脱水酶(dTGD)表现出高度保守性^[9-10]。

胶州湾位于我国山东半岛东南侧, 受人类活动影响较大, 而水体环境的改变会引起胶州湾生物多样性及其代谢产物的变化, 从而产生新的生物活性化合物。基于此, 本文研究了胶州湾沉积物中可培养细菌的多样性及其次级代谢产物的抗菌真菌活性, 并通过基因筛选次级代谢产物合成酶基因PKSI、NRPS、CYP、PhzE和dTGD, 快速分析了胶州湾微生物生物活性次级代谢产物的类型和潜力, 对于开发海洋功能性微生物资源具有一定的借鉴作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品: 2015年2月在胶州湾海域9个不同观测站位采集的表层沉积物, 由中国海洋大学海洋化学理论与工程技术教育部重点实验室提供, 采样位置见表1。

1.1.2 培养基: (1) 1/4格里斯溶液: 氯化钠9 g, 氯化钾0.4 g, 氯化钙0.48 g, 碳酸氢钠0.2 g, 蒸馏水定容至1 L, 用于分离胶州湾微生物培养基的配制; (2) YPD培养基: 酵母提取物5 g, 蛋白胨10 g, 葡萄糖20 g, 琼脂20 g, 1/4格里斯溶液定容至1 L; (3) Zobell 2216E: 蛋白胨5 g, 酵母粉1 g, 磷酸高铁0.01 g, 1/4格里斯溶液定容至1 L; (4) 牛

表1. 取样地点的胶州湾观测站位

Table 1. The observation station of Jiaozhou bay for sampling

Position No.	Longitude	Latitude	Sample
jw1	120°18'	36°05.31'	surface
jw2	120°18.75'	36°06.9948'	surface
jw4	120°19.5'	36°09.5'	surface
jw5	120°18'	36°09.5'	surface
jw7	120°12.914'	36°09.57'	surface
jw10	120°09.963'	36°06.243'	surface
jw13	120°16.292'	36°07.399'	surface
jw18	120°19.5'	36°12.168'	surface
jw19	120°20.268'	36°12.066'	surface

肉膏蛋白胨培养基: 牛肉膏3 g, 蛋白胨10 g, 氯化钠5 g, 蒸馏水定容至1 L, pH 7.0-7.2; (5) 素琼脂培养基: 琼脂15 g, 蒸馏水定容至1 L; (6) LB培养基: 胰蛋白胨10 g, 酵母浸粉5 g, 氯化钠10 g, 蒸馏水定容至1 L, pH 7.0。

1.1.3 指示菌株: 大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)、白色假丝酵母(*Candida albicans*)、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)、产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*), 由本实验室保藏。

1.1.4 主要试剂和仪器: *E. coli* Trans1-T1感受态, Fast pfu 酶, DNA marker, pEASY-blunt cloning vector购自全式金生物技术有限公司, 细菌基因组DNA提取试剂盒、胶回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司, 引物由深圳华大基因科技服务有限公司合成。PCR仪、凝胶成像系统、电泳仪购自Bio-Rad公司。

1.2 细菌的分离

在超净工作台内称取10 g泥样加入含玻璃珠的30 mL Z2216E液体培养基中, 置于30 °C、220 r/min

摇床中培养1 h, 静置30 min, 将预处理后的样品悬液按 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 梯度稀释, 取100 μL 稀释液涂布于YPD、Z2216E固体培养基平板上, 置于30 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养3–15 d。根据菌落形态、色泽、湿润度等特征, 采用平板划线法挑取不同形态的细菌分离纯化, 经3次以上纯化并镜检后以甘油管保藏法保存于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

1.3 抑菌活性检测

将菌株接种至装有30 mL Z2216E液体培养基的三角瓶中, 培养24 h后将种子液转接到新鲜的50 mL Z2216E液体培养基内, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min培养7 d, 将发酵液12000 r/min离心, 取上清液用0.22 μm 滤膜过滤后备用。指示细菌、真菌分别接种到LB、YPD液体培养基, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养1 d待用。采用牛津杯法检测发酵上清液抗菌活性, 配制双层培养基, 下层素琼脂培养基, 上层牛肉膏蛋白胨(细菌)、YPD培养基(真菌), 其中上层培养基内均匀混合备用指示菌。指示菌终浓度为 10^7 个细胞/mL, 利用分光光度计法测定 OD_{600} 估算菌液浓度。牛津杯内加待测上清液150 μL , 无菌蒸馏水150 μL 为阴性对照, 安普霉素(Apramycin) (50 mg/mL)20 μL 为阳性对照。分别将培养皿置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养1 d, 观察并通过交叉法记录抑菌圈大小。

1.4 提取细菌基因组DNA

将纯化的菌株接种于Z2216E液体培养基, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min培养1 d, 采用细菌基因组DNA提取试剂盒提取细菌基因组。

1.5 细菌16SrRNA序列分析

以提取的基因组DNA为模板, 利用细菌通用引物对27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1492R: 5'-TACGGCTACCTGTTACGACTT-3'扩增16S rRNA基因序列, 经1%琼脂糖凝胶电泳检测后, 利用胶回收试剂盒纯化回收16S rDNA。纯化产物与pEASY-blunt cloning vector于37 $^{\circ}\text{C}$ 连

接10 min, 连接产物转化到大肠杆菌感受态细胞Trans1-T1, 氨苄抗性筛选阳性克隆。培养12 h后挑取转化子, 菌落PCR验证条带是否正确。选择正确的转化子提取质粒, 送至华大基因测序, 测序引物为pEASY-blunt cloning vector的通用引物对M13F/R。测序结果在EzBioCloud数据库比较分析, 找出同源性最高的序列, 并选择15株代表菌用MEGA 5.05软件中Neighbor-Joining法构建系统发育树, 选用Kimura-2参数模型, bootstrap重复次数1000次, bar=0.02, 即单位长度线段的序列差异度为0.02。

1.6 功能基因检测

合成I型聚酮合酶基因(PKSI)、非核糖体多肽合成酶基因(NRPS)、氨基脱氧异分支酸合酶(PhzE)、细胞色素P450氧化酶(CYP)、dTDP-葡萄糖-4,6-脱氢酶(dTGD)等次级代谢产物合成酶基因引物, 引物序列见表2。以提取的16株生物活性较好的细菌基因组DNA为模板, 扩增功能基因保守区域, 1%琼脂糖凝胶电泳检测。PKSI扩增程

表2. 扩增功能基因的PCR引物序列

Table 2. The PCR primer sequences of amplifying functional genes

Genes	Primer sequences (5'→3')	Fragment length/bp
<i>PKSI</i> (<i>KSF</i> , <i>KSR</i>)	GCGATGGATCCNCAGC AGCG	700 ^[11]
	GTGCCGGTNCCTGNG YYTC	
<i>NRPS</i> (<i>NRPSF</i> , <i>NRPSR</i>)	GCNGGYGGYGCNTAYG TNCC	1000 ^[11]
	CCNCGDATYTTNACYT G	
<i>PhzE</i> (<i>PhzEf</i> , <i>PhzEr</i>)	GAAGGCGCCAACTTCG TYATCAA	450 ^[12]
	GCCYTCGATGAAGTAC TCGGTGTG	
<i>CYP</i> (<i>PEH-1</i> , <i>PEH-2</i>)	TGGATCGGCGACGACC GSVYCGT	350 ^[13]
	CCGWASAGSAYSCCGT CGTACTT	
<i>dTGD</i> (<i>dTGD-1</i> , <i>dTGD-2</i>)	GSGGSGSSGCSGGSTTC ATSGG	530 ^[14]
	GGGWRCTGGYRSGGSC CGTAGTTG	

序: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 59 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共35个循环; 72 °C 10 min。NRPS扩增程序: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 1.5 min, 共35个循环; 72 °C 10 min。PhzE扩增程序: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 54.7 °C 1 min, 72 °C 1.5 min, 共35个循环; 72 °C 10 min。CYP扩增程序: 96 °C 5 min; 96 °C 1 min, 60 °C 30 s, 72 °C 45 s, 共40个循环; 72 °C 10 min。dTGD扩增程序: 96 °C 5 min; 96 °C 1 min, 65 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共30个循环; 72 °C 10 min。

2 结果和分析

2.1 胶州湾细菌的分离及多样性分析

从胶州湾9个站点采集的泥样中共分离208株菌, 通过观察细菌菌落形态、细胞形态等方法去重后得到76株菌, 图1显示了各个站点分离的菌株数。将16S rRNA基因序列测序结果与Ezbiocloud数据库内序列比对, 结果表明: 筛选菌株与数据库中的模式菌株都具有一定的同源性, 相似度在98%–100%, 分属于8个科11个属: 节杆菌属(*Arthrobacter*)、考克氏菌属(*Kocuria*)、微球菌属

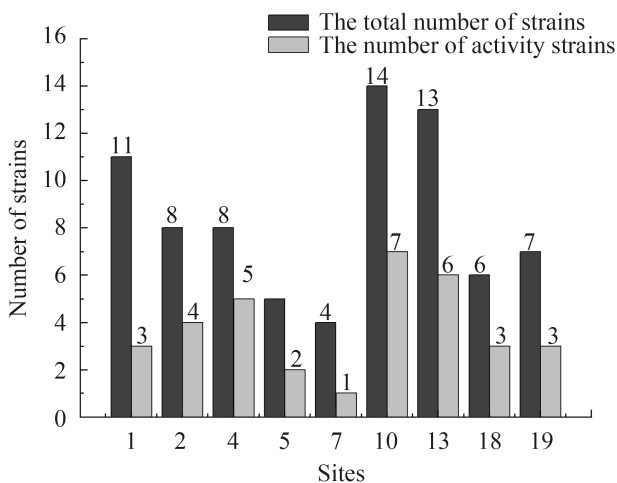


图1. 各站点点菌株分离数

Figure 1. The number of strains isolated from different sites.

(*Micrococcus*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)、*Oceanisphaera*、海单胞菌属(*Marinomonas*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、硫胺素芽孢杆菌属(*Aneurinibacillus*)、短芽孢杆菌属(*Brevibacillus*), 表明胶州湾沉积物有丰富的微生物资源。各属细菌所占比例详见图2, 其中芽孢杆菌属为优势属, 占分离细菌总数的40.0%。选择有代表性的15株菌, 利用MEGA5.05软件中Neighbor-Joining法构建的系统发育进化树见图3。

2.2 胶州湾细菌抑菌活性

采用牛津杯法检测所有分离细菌及阳性对照的抑菌活性, 检测结果见表3。由表3可知, 有34株菌至少对一种指示菌表现出抑菌活性, 约占总分离菌株数的44.7%, 且对*E. coli*、*P. aeruginosa*、*E. aerogenes*、*K. pneumoniae*、*B. subtilis*、*M. luteus*、*C. albicans*有抑菌作用的菌株数分别为16株、11株、2株、17株、13株、16株、8株, 且有15株菌对3种以上指示菌有抑菌活性。

2.3 功能基因检测

根据抑菌能力及广谱性, 选用抑菌活性效果显著的16株菌, 通过PCR扩增的方法筛查功能基因: *PKSI*、*NRPS*、*PhzE*、*CYP*、*dTGD*, 实验结

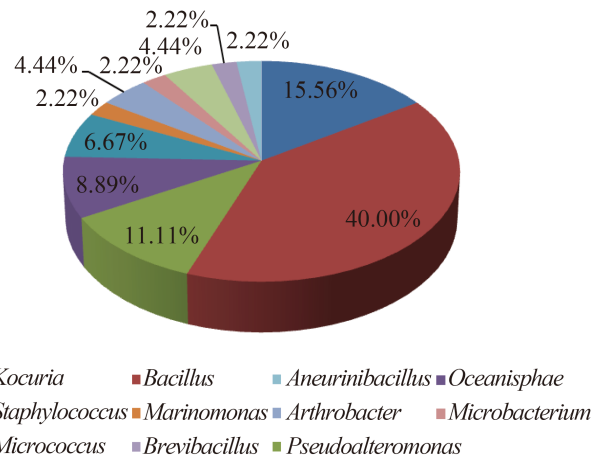


图2. 胶州湾细菌种类

Figure 2. Bacterial species in Jiaozhou Bay.

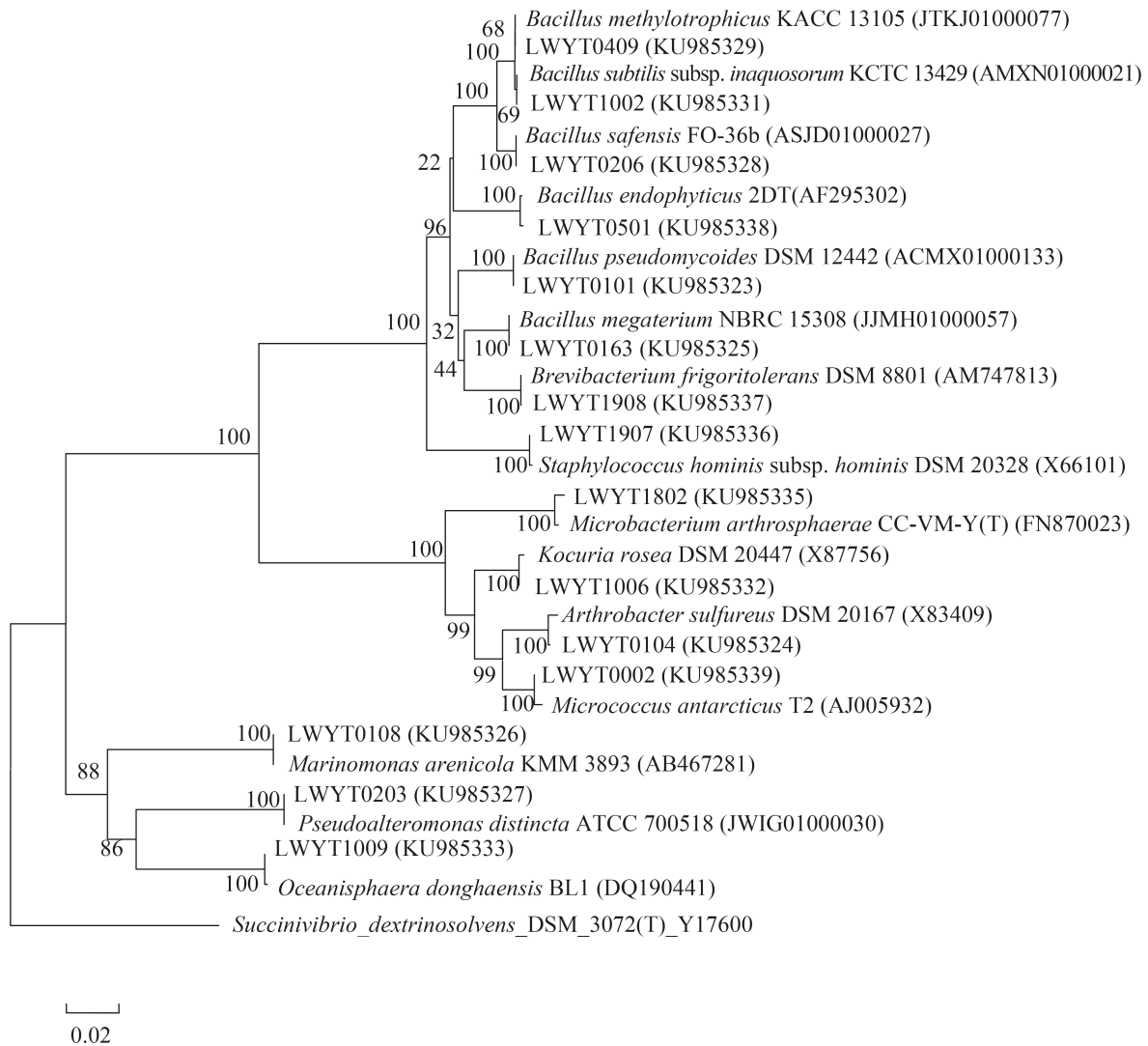


图 3. 胶州湾细菌16S rRNA序列系统发育进化树

Figure 3. The phylogenetic relationship of the bacterial isolates based on 16S rRNA gene homology. The numbers at nodes represent the percentage levels of bootstrap support (%) (expressed as percentages of 1000 replications). The GenBank accession numbers of 16S rRNA sequences are given in the parentheses. Bar=0.02 substitutions per nucleotide position.

果见表 4。根据结果可知，16株菌均可以检测到至少一种功能基因，且5株菌能检测到3种以上的功能基因，证明了胶州湾细菌次级代谢产物的多样性。

3 讨论

微生物多样性的研究是微生物生态学的重要内容，有利于人类更好地挖掘和利用微生物资

源。本文从胶州湾9个站点的泥样中共分离76株细菌，根据16S rRNA基因序列与Ezbiocloud数据库内序列比对结果，将76株菌归类为8个科11个属，研究了胶州湾可培养细菌的多样性。Zhang等^[15]对胶州湾6个站点沉积物中产蛋白酶的可培养细菌的多样性进行了研究，发现*Photobacterium*、*Bacillus*和*Vibrio*为主要菌种，且通过比较不同取样点细菌

表3. 胶州湾细菌抑菌活性
Table 3. The antimicrobial activity of bacteria isolated from Jiaozhou Bay

Isolates No.	Indicator bacteria						
	<i>E. coli.</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>C. albicans</i>
LWYT0101	-	++	-	-	++	-	-
LWYT0108	+	-	-	+++	-	+++	+
LWYT0111	+	-	-	++	-	-	-
LWYT0201	-	++	-	-	+++	+++	-
LWYT0202	-	-	+	+	-	+	-
LWYT0205	++	-	-	-	++	-	-
LWYT0208	-	-	-	++	+	-	++
LWYT0401	+	-	-	+	++	-	+
LWYT0402	+	++	-	-	-	+	+
LWYT0407	+	-	-	+	-	-	-
LWYT0408	-	+	-	-	++	-	-
LWYT0409	-	-	-	-	+	-	+++
LWYT0501	-	-	-	+	-	-	-
LWYT0506	++	-	-	-	-	+	-
LWYT0704	+	-	-	-	-	-	-
LWYT0722	++	-	-	++	-	+	-
LWYT1003	-	-	-	+	-	-	-
LWYT1004	-	-	+	-	-	+	-
LWYT1006	++	-	-	++	+	++	-
LWYT1009	-	-	-	+	-	-	++
LWYT1011	-	-	-	-	-	++	-
LWYT1012	-	-	-	-	+	-	-
LWYT1014	-	++	-	+	-	-	++
LWYT1305	-	-	-	+	-	-	-
LWYT1307	++	-	-	++	-	++	-
LWYT1310	-	+	-	+	-	+	+
LWYT1312	-	++	-	-	-	++	-
LWYT1313	-	++	-	-	+++	-	-
LWYT1803	+	-	-	-	+	+	-
LWYT1904	+	-	-	+	-	+	-
LWYT1906	+	-	-	+	-	-	-
LWYT1907	-	+	-	-	-	-	-
LWYT0002	++	++	-	-	+	++	-
LWYT0003	++	+	-	-	++	++	-
Apramycin	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Only strains having bacteriostatic effect are listed in the table, -: no antimicrobial activity, +: weak antimicrobial activity (inhibitory zone ≥ 8 mm); ++: general antimicrobial activity (inhibitory zone ≥ 12 mm); +++: strong antimicrobial activity (inhibitory zone ≥ 16 mm).

表4. 胶州湾细菌功能基因检测结果
Table 4. The results of functional genes in bacteria isolated from Jiaozhou Bay

Isolates No.	Genus	Functional genes				
		<i>PKSI</i>	<i>NRPS</i>	<i>CYP</i>	<i>PhzE</i>	<i>dTGD</i>
LWYT0101	<i>Bacillus</i>	+	-	-	-	-
LWYT0108	<i>Marinomonas</i>	+	-	-	-	+
LWYT0201	<i>Staphylococcus</i>	-	-	-	+	-
LWYT0205	<i>Kocuria</i>	-	-	-	-	+
LWYT0208	<i>Bacillus</i>	+	+	+	+	-
LWYT0409	<i>Bacillus</i>	+	+	-	-	+
LWYT0506	<i>Bacillus</i>	+	+	+	-	+
LWYT0722	<i>Bacillus</i>	+	-	-	-	-
LWYT1006	<i>Kocuria</i>	-	-	+	+	+
LWYT1014	<i>Bacillus</i>	+	-	+	+	+
LWYT1307	<i>Micrococcus</i>	-	-	-	+	+
LWYT1312	<i>Bacillus</i>	+	-	-	-	-
LWYT1313	<i>Bacillus</i>	+	-	-	-	-
LWYT1904	<i>Pseudoalteromonas</i>	-	+	-	+	-
LWYT0002	<i>Micrococcus</i>	-	-	-	+	+
LWYT0003	<i>Bacillus</i>	+	+	-	-	-

-: no PCR product; +: correct PCR product.

的多样性,证明了海域污染对产蛋白酶细菌的多样性有很大影响。本文筛选到的细菌中*Bacillus*种类最多,可见*Bacillus*在胶州湾沉积物中占相当大的比例,且产生物活性代谢物的潜能较高。

本文采用抑菌活性筛选与活性次级代谢产物合成酶基因筛选相结合的方法研究了胶州湾可培养细菌的应用潜力。实验分离到的76株菌中34菌株至少有1种抑菌活性,表明胶州湾海域微生物有较大的研究价值,为研究新的抗生素提供了大量微生物资源。16株代表菌株中*PKSI*、*NRPS*、*CYP*、*PhzE*、*dTGD*基因阳性检出率分别为62.5%、31.3%、43.8%、25.0%、50.0%,每株菌均能检测到1种功能基因,再次证明了胶州湾微生物的研究价值。生物活性筛选和基因筛选是挖掘

天然产物的传统筛选方法^[16]。生物活性筛选可以直接检测菌株的生物活性,而基因筛选是通过PCR扩增生物合成关键酶的保守序列以获得基因序列进而找到化合物生物合成基因簇的方法,可以用来筛选新来源的生物活性次级代谢产物。基因筛选方法能够快速预测产新颖次级代谢产物或基因序列的菌株,从而加快新天然产物的研究。Hornung等^[17]通过基因筛选与质谱分析相结合的方法,证明了卤代酶基因与天然卤化产物的相关性。Chen等^[18]发现检测*dTGD*基因可以预测糖基化合物的结构。然而,由于生物活性筛选和基因筛选方法本身的局限性,若将两种方法结合则能更有效的获得合成新生物活性化合物的潜力菌株。基因筛选的方法多用于放线菌,本实验对除

放线菌外的其他细菌进行了研究, 发现了其他种属次级代谢产物合成关键酶基因的存在, 证明了此方法对其他类细菌同样有效。

虽然胶州湾细菌功能研究尚在初级阶段, 但已经展现出极大的研究价值, 我们正在对分离到的菌株所产生物活性次生代谢产物进行分离纯化、结构解析。将来拟重点发掘功能基因与生物活性次级代谢产物的关系, 以具有重要应用前景的海洋微生物为切入点, 解析、强化功能化合物的合成途径与合成机理。并扩大不同海域的沉积物取样点, 丰富海洋微生物产海洋天然产物资源库。

参考文献

- [1] Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(1): 42–51.
- [2] Chopra I. The 2012 garrod lecture: discovery of antibacterial drugs in the 21st century. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2013, 68(3): 496–505.
- [3] Bose U, Hewavitharana AK, Ng YK, Shaw PN, Fuerst JA, Hodson MP. LC-MS-based metabolomics study of marine bacterial secondary metabolite and antibiotic production in *Salinispora arenicola*. *Marine Drugs*, 2015, 13(1): 249–266.
- [4] Song YX, Liu GF, Li J, Huang HB, Zhang X, Zhang H, Ju JH. Cytotoxic and antibacterial angucycline- and prodigiosin-analogues from the deep-sea derived *Streptomyces* sp. SCSIO 11594. *Marine Drugs*, 2015, 13(3): 1304–1316.
- [5] Phelan RW, Barret M, Cotter PD, O'Connor PM, Chen R, Morrissey JP, Dobson ADW, O'Gara F, Barbosa TM. Subtilomycin: a new lantibiotic from *Bacillus subtilis* strain MMA7 isolated from the marine sponge *haliclona simulans*. *Marine Drugs*, 2013, 11(6): 1878–1898.
- [6] Mathew BP, Nath M. Recent approaches to antifungal therapy for invasive mycoses. *ChemMedChem*, 2009, 4(3): 310–323.
- [7] Du LC, Lou LL. PKS and NRPS release mechanisms. *Natural Product Reports*, 2010, 27(2): 255–278.
- [8] McDonald M, Mavrodi DV, Thomashow LS, Floss H. Phenazine biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*: branchpoint from the primary shikimate biosynthetic pathway and role of phenazine-1, 6-dicarboxylic acid. *Journal of the American Chemical Society*, 2001, 123(38): 9459–9460.
- [9] Oh TJ, Mo SJ, Yoon YJ, Sohng JK. Discovery and molecular engineering of sugar-containing natural product biosynthetic pathways in actinomycetes. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2007, 17(12): 1909–1921.
- [10] Stockmann M, Piepersberg W. Gene probes for the detection of 6-deoxyhexose metabolism in secondary metabolite-producing streptomycetes. *FEMS Microbiology Letters*, 1992, 90(2): 185–190.
- [11] Zhu P, Zheng L, Lin J, Shao JZ, Yan XJ. Screening and characterization of marine bacteria with antibacterial and cytotoxic activities, and existence of *PKSI* and *NRPS* genes in bioactive strains. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 47(2): 228–234. (in Chinese)
朱鹏, 郑立, 林晶, 邵健忠, 严小军. 抗菌和细胞毒活性海洋细菌的筛选及其次生代谢基因证据. *微生物学报*, 2007, 47(2): 228–234.
- [12] Schneemann I, Wiese J, Kunz AL, Imhoff JF. Genetic approach for the fast discovery of phenazine producing bacteria. *Marine Drugs*, 2011, 9(5): 772–789.
- [13] Lee MY, Myeong JS, Park H J, Han K, Kim ES. Isolation and partial characterization of a cryptic polyene gene cluster in *Pseudonocardia autotrophica*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2006, 33(2): 84–87.
- [14] Du Y, Li TB, Wang YG, Xia HZ. Identification and functional analysis of dTDP-glucose-4,6-dehydratase gene and its linked gene cluster in an aminoglycoside antibiotics producer of *Streptomyces tenebrarius* H6. *Current Microbiology*, 2004, 49(2): 99–107.
- [15] Zhang XY, Han XX, Chen XL, Dang HY, Xie BB, Qin QL, Shi M, Zhou BC, Zhang YZ. Diversity of cultivable protease-producing bacteria in sediments of Jiaozhou bay, China. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 1021.
- [16] Xiong ZQ, Wang JF, Hao YY, Wang Y. Recent advances in the discovery and development of marine microbial natural products. *Marine Drugs*, 2013, 11(3): 700–717.
- [17] Hornung A, Bertazzo M, Dziarnowski A, Schneider K, WelzelK, Wohlert SE, Holzenkmpfer M, Nicholson GJ, Bechthold A, Süssmuth RD, Vente A, Pelzer S. A genomic screening approach to the structure-guided identification of drug candidates from natural sources. *ChemBioChem*, 2007, 8(7): 757–766.
- [18] Chen FF, Lin L, Wang L, Tan Y, Zhou HX, Wang YG, Wang Y, He WQ. Distribution of dTDP-glucose-4,6-dehydratase gene and diversity of potential glycosylated natural products in marine sediment-derived bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 90(4): 1347–1359.

Diversity and antimicrobial activities of cultivable bacteria isolated from Jiaozhou Bay

Yiting Wang, Chuanbo Zhang, Lin Qi, Xiaoqiang Jia, Wenyu Lu *

Department of Biological Engineering and Key Laboratory of Systems Bioengineering of the Ministry of Education, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China

Abstract: [Objective] Marine microorganisms have a great potential in producing biologically active secondary metabolites. In order to study the diversity and antimicrobial activity, we explored 9 sediment samples in different observation sites of Jiaozhou bay. [Methods] We used YPD and Z2216E culture medium to isolate bacteria from the sediments; 16S rRNA was sequenced for classification and identification of the isolates. Then, we used Oxford cup method to detect antimicrobial activities of the isolated bacteria against 7 test strains. Lastly, we selected 16 representatives to detect secondary-metabolite biosynthesis genes: *PKSI*, *NRPS*, *CYP*, *PhzE*, *dTGD* by PCR specific amplification. [Results] A total of 76 bacterial strains were isolated from Jiaozhou bay; according to the 16S rRNA gene sequence analysis. These strains could be sorted into 11 genera belonging to 8 different families: *Aneurinibacillus*, *Brevibacillus*, *Microbacterium*, *Oceanisphae*, *Bacillus*, *Marinomonas*, *Staphylococcus*, *Kocuria*, *Arthrobacters*, *Micrococcus* and *Pseudoalteromonas*. Of them 34 strains showed antimicrobial activity against at least one of the tested strains. All 16 strains had at least one function genes, 5 strains possessed more than three function genes. [Conclusion] Jiaozhou bay area is rich in microbial resources with potential in providing useful secondary metabolites.

Keywords: bacteria, antimicrobial activity, functional genes, Jiaozhou Bay

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Penglai 19-3 Program in Tianjin (19-3BC2014-03)

*Corresponding author. E-mail: wenyulu@tju.edu.cn

Received: 3 April 2016; Revised: 24 May 2016; Published online: 17 June 2016