



## 南海东海岛沉积物分离细菌的鉴定及其抑菌活性

邓智敏, 袁红旭, 周家宇, 黄诚欣, 陈任术, 卢冬梅\*

岭南师范学院生命科学与技术学院, 广东 湛江 524048

**摘要:**【背景】海洋微生物在活性物质开发方面具有巨大的应用前景, 而目前有关南海东海岛微生物的研究鲜少。【方法】对从东海岛沉积物中分离纯化的海洋细菌, 采用形态学观察、生理生化以及 16S rRNA 基因序列的系统发育分析方法进行鉴定; 以大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)作为指示菌, 测定其抑菌活性; 对具有抑菌活性的菌株扩增聚酮合酶 (Polyketide synthase I, PKS I) 基因, 并与已知的 PKS I 氨基酸序列比对; 选择具有 PKS I 基因的代表菌株, 检测菌株及其发酵抑菌物的稳定性。【结果】分离纯化到 25 株海洋细菌, 分属于不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、交替单胞菌属 (*Alteromonas*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、嗜冷杆菌属 (*Psychrobacter*)、假交替单胞菌属 (*Pseudo-alteromonas*)、海洋单胞菌属 (*Oceanimonas*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、微球菌属 (*Micrococcus*) 和海杆菌属 (*Marinobacter*)。12 株菌株通过基因筛选检测到 PKS I 编码基因, 其中 6 株菌株具有抑菌活性和 PKS I 编码基因, 并分属于芽孢杆菌属和交替单胞菌属; PKS I 氨基酸序列同源性分析推测菌株 DHD-15 和 DHD-a 可能产生新的 I 型聚酮合酶结构。菌株 DHD-15 和 DHD-L 生长温度范围为 15–40 °C, 可耐受 10% NaCl 高盐以及 pH 3 和 pH 11 的酸碱条件, 但不耐高温; 菌株 DHD-15 产生的抑菌物质可耐受 100 °C 和 pH 11 的高温碱性条件, 在 50 °C、pH 9 条件下制备和室温保藏条件下抑菌活性较高, 其稳定性较好。【结论】南海东海岛沉积物筛选的细菌种具有抑菌活性, 具有产聚酮类活性物质的潜力。

**关键词:** 东海岛细菌, 抑菌活性, 聚酮合酶(PKS I), 稳定性

海洋沉积物中生活着大量种类繁多的微生物, 它们因受海水环境、pH 值、温度等影响而呈现出不同的特征<sup>[1]</sup>。潮间带初级生产力程度高, 矿物质含量丰富, 比外海有更高的沉降率, 潮间带沉积物底泥中微生物的数量会比海水中的数量明显增多<sup>[2]</sup>。2016 年, 王怡婷等进行胶州湾沉积

基金项目: 国家星火计划项目(2013GA780077); 广东省科技厅科技型中小企业技术创新、科技金融结合项目(2017B010136194); 产业链协同创新类公共服务平台项目(湛海创 2017 C8B2); 四川省教育厅项目(CC16Z12)

\*通信作者。E-mail: ludongmei@lingnan.edu.cn

收稿日期: 2019-08-06; 修回日期: 2020-01-20; 网络出版日期: 2020-04-02

物可培养细菌的多样性及其抑菌活性研究<sup>[3]</sup>。中国南海作为世界上第三大陆缘海，也是中国最大和最深的海。东海岛位于其北端，其独特的海洋环境蕴藏着丰富的微生物资源，但目前关于南海东海岛微生物资源的研究和开发程度较低，这有待进一步进行科学研究和开发利用。由于东海岛临港工业发展等因素，潮间带的面积在迅速减少，潮间带微生物的多样性受到不同程度的破坏，因此对潮间带微生物进行调查有一定的研究意义<sup>[4]</sup>。

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，能否快速筛选到具有新结构、新活性的微生物天然产物已成为开发新药研究迫切解决的难题。微生物抑菌活性次生代谢产物主要分为聚酮类和肽类化合物。聚酮类化合物是由一类广泛存在于自然界的聚酮合酶(polyketidesynthetase, PKS)催化产生，广泛分布于真菌、细菌、放线菌和植物中，包括四环素类、内酯类、聚醚类以及萜环类 4 大类<sup>[5]</sup>。PKS 主要分为三类，分别为 I 型、II 型和 III 型<sup>[6]</sup>。PKSI 主要负责大环内酯类、聚醚类和多烯类化合物的催化合成<sup>[7]</sup>，如红霉素(erythromycin)、利福霉素(rifamycin)、西罗莫司(sirolimus)等，其合成的抗生素在抗感染、抗肿瘤及免疫抑制等方面有着巨大的应用价值<sup>[8]</sup>。近年来，枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)作为一种生物安全菌株，其PKS 基因簇代谢产物发掘及其生物活性的研究有所增加，如杨杰<sup>[9]</sup>和 Komaki<sup>[10]</sup>进行 PKS 基因生物合成异香豆素类化合物细菌素和 Amicoumacin 类抗生素研究等<sup>[11]</sup>；从 *Bacillus velezensis* 基因组挖掘分析和体外抗菌活性研究等<sup>[12-14]</sup>；以及丝状真菌产生次级代谢产物 PKSI 研究<sup>[15]</sup>，如叶美金等进行渐绿木霉基因组中 PKS 和 NRPS 基因的多样性分析<sup>[16]</sup>。目前从海洋微生物中筛选 PKS 基因的工作发展迅速<sup>[17]</sup>，

而从东海岛微生物中筛选 PKS 基因的报道鲜少。

本文从南海东海岛沉积物样品中分离纯化细菌，采用抑菌活性筛选与 PKSI 基因筛选相结合的方法，快速评估分离细菌抑菌活性及产聚酮类化合物的潜力。对活性菌株及发酵液进行抑菌活性稳定性研究，有助于后续对抑菌化合物的开发利用。初步探讨东海岛沉积物中细菌抑菌活性及产聚酮类化合物的潜力，以此进一步了解东海岛沉积物细菌的利用价值和发展前景<sup>[18]</sup>。

## 1 材料和方法

### 1.1 样品

2017 年 10 月 22 号早上 6 点半，从我国南海的东海岛海域（沿海岸线 2 km 左右，东经 110°32'22"，北纬 21°0'56"）采集海泥沉积物一份。

### 1.2 培养基

**1.2.1 改良 2216E 培养基:**蛋白胨 5 g、酵母膏 1 g、琼脂 15 g、陈海水 1 L。

**1.2.2 牛肉膏蛋白胨培养基:**牛肉膏 3 g，蛋白胨 10 g，氯化钠 5 g，蒸馏水 1 L，pH 7.0-7.2。

**1.2.3 肉汤培养基:**蛋白胨 20 g，牛肉膏 5 g，氯化钠 5 g，pH 7.5±0.1。

### 1.3 主要仪器和试剂

蛋白酶、Mighty Amp™DNA Polymerase、引物等购于广州瑞真生物技术有限公司；细菌基因组 DNA 提取试剂盒(北京 Solarbio 科技有限公司)；DYY-6C 型电泳仪(北京六一生物科技有限公司)；WFH-201B 紫外透射反射仪(上海精科实业有限公司)；A300 基因扩增仪(杭州朗基科学仪器有限公司)。

### 1.4 细菌菌株的分离和鉴定

**1.4.1 分离纯化:**称取海泥沉积物 1 g，加入 9 mL

无菌海水, 取 0.1 mL 逐级稀释为  $10^{-2}$ – $10^{-6}$  浓度涂布于平板培养基, 在 30 °C 生化培养箱里培养。根据菌落形态、大小等特征挑取单菌落, 划线分离纯化 3 次后, 直至获得纯细菌培养物。

**1.4.2 形态鉴定:** 观察菌体细胞革兰氏染色特性和菌落形态特征。记录菌株的菌落大小、颜色、透明度、边缘特征、湿润度、菌落突起或凹陷等特征。

**1.4.3 生理生化鉴定:** 对所筛选的菌株进行生理生化检验<sup>[19]</sup>: 酶促试验、枸橼酸盐利用试验、吲哚试验、甲基红试验、三糖铁琼脂试验、明胶液化试验、淀粉水解试验、分解酪蛋白试验、产脂肪酶试验、褐藻酸的降解检测。

### 1.5 16S rRNA 基因扩增和序列测定

按照 PCR 扩增试剂盒操作说明提取基因组。以提取的基因组 DNA 为模板, 利用细菌通用引物 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R(5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3')扩增 16S rRNA 序列, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 送英潍捷基(上海)贸易有限公司进行测序。

### 1.6 系统发育学分析

将测序得到的 16S rRNA 序列在 NCBI 进行 BLAST 比对, 选取与分离菌株相似度最高的标准株, 用 MEGA6.0 软件构建系统发育树, 选择 Neighbor-Joining 法, Bootstrap 设为 1000 次, 分析其系统发育地位。

### 1.7 抑菌活性测定

将菌株接种到装有改良 2216E 液体培养基中, 30 °C、220 r/min 培养 24 h 后, 将发酵液 12000 r/min 离心 10 min, 取上清液备用。指示细菌(大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌)接种牛肉膏蛋白胨液体培养基、肉汤液体培养基, 在 37 °C 摇床培养 1 d 待用。利用分光光度计法测定  $OD_{600}$  估算菌

液浓度, 使指示菌终浓度为  $10^7$  个细胞/mL。采用滤纸片法检测待测上清液抑菌活性, 平板配制混合指示菌培养基 15 mL, 在滤纸片上滴加 5  $\mu$ L 待测上清液, 以无菌蒸馏水为阴性对照, 硫酸链霉素(1 mg/mL)为阳性对照。将制好的平板放 4 °C 使其扩散 2 h 后, 再置于 37 °C 恒温培养箱中培养 1 d, 观察并通过十字交叉法记录抑菌圈大小。

### 1.8 *PKSI* 基因筛选

**1.8.1 *PSKI* 基因扩增:** *PSKI* 基因扩增引物为 KSF(5'-GCGATGGATCCNCAGCAGCG-3')和 KSR(5'-GTGCCGGTNCCGTGNGYYTC-3')<sup>[20]</sup>。扩增程序分别为: 98 °C 2 min; 98 °C 10 s, 58 °C 15 s, 68 °C 1.5 min, 共 35 个循环; 68 °C 延伸 10 min。

**1.8.2 *PKSI* 系统发育学分析:** 将测序得到的 *PKSI* 基因序列所对应的氨基酸序列进行 BLAST 比对, 选取相似度最高的标准株序列, 用 MEGA6.0 软件构建系统发育树, 选择 Neighbor-Joining 法, Bootstrap 设为 1000 次, 分析其序列相似性。

### 1.9 菌株耐受性及其抑菌物质的稳定性实验

**1.9.1 生长温度范围实验:** 挑取单菌落划线接种于改良 2216E 斜面培养基上, 分别置于 4、15、30、40 和 50 °C 恒温条件下培养, 培养 1–4 d 后观察并记录菌体生长情况。

**1.9.2 耐盐实验:** 在改良 2216E 培养基的基础上, 分别添加浓度为 0%、1%、3%、5%、7%、9%、10% 的 NaCl; 挑取单菌落于配制好的不同 NaCl 浓度的液体培养基内, 培养 1–3 d, 观察并测量紫外分光光度值  $OD_{600}$ 。

**1.9.3 耐酸碱实验:** 配制不同 pH 值(3.0, 5.0, 7.0, 9.0, 11.0)的改良 2216E 培养基, 挑取单菌落接种于配制好的培养基内培养 1–3 d, 观察并测量紫外分光光度值  $OD_{600}$ 。

### 1.10 抑菌物质热稳定性实验

取等量菌株 DHD-15 发酵液，12000 r/min 离心 10 min 取上清液，分别置于 4、30、50、70 °C 中 2 h、100 °C 煮沸 30 min，然后均冷却到室温，以枯草杆菌作为指示菌检测抑菌活性，以 30 °C 培养未水浴处理的发酵上清液作为对照。

## 2 结果和分析

### 2.1 东海岛细菌的分离纯化

将东海岛沉积物样品处理、稀释后涂布平板

培养 1–15 d，根据菌落形态、湿润度、是否凸起、是否产色素等特征，分离得到共 25 个不同的细菌菌落。

### 2.2 形态鉴定

如表 1 所示，从东海岛沉积物中分离到菌体和菌落的形态特征丰富多样的细菌：菌落多较小；多呈白色，少数为黄色或米黄色，质地均匀，表面多光滑湿润，易挑起；菌体多为短杆状和短棒状，部分为球状和椭圆形；大部分为革兰氏阳性菌，少数为革兰氏阴性菌。

表 1. 细菌分离株的表型特征

Table 1. The phenotypic characteristics of the isolated bacteria

Strains	Gram	Cell morphology	Colony characteristics
DHD-1	+	Spherical or elliptic	Small, white, uniform texture, moist, smooth surface, easy to provoke
DHD-2	-	Rod	Larger, dense, dry, opaque, not easy to provoke, grayish brown, dark middle color, colonies with creases
DHD-4	-	Rod	Larger, milky white, thicker, smooth surface and edge, easy to provoke
DHD-5	+	Short rod-like	Smaller, white, smooth surface and edges, uniform texture, moist, easy to provoke
DHD-6	-	Short rod-like	Small, white, round
DHD-7	+	Spherical or elliptic	Smaller, white, uniform texture, moist, smooth surface and edge, easy to provoke
DHD-8	+	Sphere	Round, white, easy to provoke
DHD-9	+	Elliptic	White, round, moist
DHD-10	+	Elliptic	Larger, beige, thicker, round edge, easy to provoke
DHD-11	+	Elliptic	White, round
DHD-12	-	Rod	Small, transparent, thin, uniform texture, easy to provoke
DHD-13	-	Short rod-like	Small, milky white, rounded edges, uniform texture, smooth surface, sticky, easy to provoke
DHD-15	+	Short rod	Smaller, smooth edges and surfaces, thick, easy to provoke
DHD-20	-	Short rod-like	Smaller, white, thin, uniform texture, moist, easy to provoke
DHD-21	+	Rod	White, slightly transparent, round, not moist
DHD-a	+	Rodlike	Smaller, white, thinner, round edges, wetter
DHD-b	+	Short rod-like	Smaller, translucent, uniform texture, not easy to provoke
DHD-c	+	Short rod-like	Colorless, slightly transparent
DHD-e	+	Short rod-like	White, round
DHD-f	+	Short rod-like	Smaller, yellow, moist, non-sticky, round edges, easy to provoke
DHD-h	+	Elliptic or short rod-like	Larger, milky white, smooth surface, moist, easy to start
DHD-i	+	Elliptic	Smaller, dark pink, thinner, not moist, not viscous, rounded edges, not easy to provoke
DHD-j	-	Short rod-like	Smaller, yellow, moist, non-sticky, round edges, easy to provoke
DHD-L	+	Short rod	Smaller, milky white, thicker, moist, sticky, easy to provoke
DHD-n	+	Circular or elliptic	Smaller, milky white, protruding, smooth surface, easy to provoke

### 2.3 生理生化鉴定

如表 2 所示, 在酶触试验中, 仅有 4 株细菌菌株具有过氧化氢酶活性。大多需氧和兼性厌氧菌均产生过氧化氢酶, 以保护细菌不被伤害, 而其他 21 株不具有过氧化氢酶活性的菌株, 可能是其过氧化氢酶的合成过程被阻断; 在枸橼酸盐试验中, 5 株菌株能以铵盐为唯一氮源, 能利用枸橼酸盐, 分解枸橼酸盐, 因而在枸橼酸盐培养基上生长; 在吲哚试验中, 有 17 株菌株结果呈阳性,

表明这些菌株含有色氨酸酶, 能分解色氨酸为吲哚; 在甲基红试验中, 有 20 株菌株的甲基红试验呈阳性, 表明所筛选的菌株大部分能产生丙酮酸, 并转化生成乳酸、琥珀酸、醋酸和甲酸等大量酸性物质, 使培养基 pH<4.5; 在三糖铁试验中, 11 株菌株发酵葡萄糖, 呈阳性, 14 株菌株能利用乳糖, 呈阴性; 在明胶试验中, 有 18 株菌株结果呈阳性, 表明这 18 株菌株具有明胶酶能将明胶水解为多肽、氨基酸, 使明胶失去凝胶性质而液化;

表 2. 菌株生理生化鉴定结果

Table 2. Physiological and biochemical experiment results

Strains	Catalase test	Citrate test	Indole test	Methyl red test	Trisaccharide iron test	Gelatin test	Starch hydrolysis test	Casein test	Lipase test	Degradation of alginic acid test
DHD-1	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
DHD-2	-	-	-	+	-	+	-	ND	+	-
DHD-4	+	-	-	+	-	+	-	ND	+	-
DHD-5	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-
DHD-6	+	-	+	+	+	ND	-	-	ND	ND
DHD-7	-	-	-	+	-	-	+	ND	-	-
DHD-8	-	-	-	+	-	-	+	ND	-	-
DHD-9	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
DHD-10	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-
DHD-11	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
DHD-12	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
DHD-13	-	-	-	+	-	ND	+	-	+	-
DHD-15	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-
DHD-20	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
DHD-21	-	-	+	+	-	-	-	ND	-	-
DHD-a	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-
DHD-b	-	-	+	-	-	-	-	ND	-	-
DHD-c	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
DHD-e	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-
DHD-f	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
DHD-h	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
DHD-i	-	-	+	+	-	+	-	ND	+	-
DHD-j	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
DHD-L	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
DHD-n	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-

+: positive; -: negative; ND: not determined.

在淀粉水解试验中,9株菌株具有合成淀粉水解酶的能力,能将淀粉水解为麦芽糖或者葡萄糖,从而利用其分解物;在酪蛋白试验中,仅有2株菌株结果呈阳性,表明这2株菌株能分解酪蛋白为小分子进行利用,而所检测的其他16株菌株对酪蛋白的利用能力差;在脂肪酶试验中,有8株菌株结果呈阳性,表明这8株菌株含有脂肪酶,能分解脂肪并进行利用;所检测的24株菌株均没有褐藻酸降解酶,不能降解褐藻酸。所筛选的东海岛细菌大部分能分解利用明胶、葡萄糖或乳糖,部分能分解利用淀粉、脂肪,但不具有分解褐藻酸的能力。

## 2.4 菌株 16S rRNA 序列和系统发育学分析

将菌株 16S rRNA 基因序列测序结果与 NCBI 数据库内序列比对(表 3),结果表明,筛选菌株与数据库中的模式菌株都具有一定的相似性,相似度在 98%–100%,分属于 9 个属 13 种:芽孢杆菌属(*Bacillus*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、交替单胞菌属(*Alteromonas*)、微球菌属(*Micrococcus*)、嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)、假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)、海单胞菌属(*Oceanimonas*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)和海杆菌属(*Marinobacter*),表明东海岛沉积物有较为丰富的微生物资源。

表 3. 东海岛细菌 16S rRNA 的序列分析

Table 3. Sequence analysis of 16S rRNA gene of bacterial strains from Donghai island

Strains	Closest match	GenBank accession No.	Similarity/%
DHD-1	<i>Acinetabacter lactucae</i>	CP020015.1	99.93
DHD-2	<i>Alteromonas macleodii</i>	LT963558.1	99.93
DHD-4	<i>Bacillus subtilis</i>	MN032360.1	100.00
DHD-5	<i>Psychrobacter alimentarius</i>	MH368408.1	100.00
DHD-6	<i>Pseudoalteromonas gelatinilytica</i>	NR_152003.1	100.00
DHD-7	<i>Alteromonas macleodii</i>	MK680205.1	100.00
DHD-8	<i>Alteromonas macleodii</i>	MK680202.1	99.93
DHD-9	<i>Oceanimonas doudoroffii</i>	NR_114185.1	100.00
DHD-10	<i>Bacillus megaterium</i>	MK618596.1	99.11
DHD-11	<i>Acinetabacter pittii</i>	MH144322.1	100.00
DHD-12	<i>Bacillus subtilis</i>	MK263004.1	100.00
DHD-13	<i>Bacillus subtilis</i>	JN707686.1	100.00
DHD-15	<i>Bacillus velezensis</i>	MK859954.1	99.93
DHD-20	<i>Bacillus subtilis</i>	KF017557.1	100.00
DHD-21	<i>Staphylococcus equorum</i>	HQ202869.1	100.00
DHD-a	<i>Bacillus subtilis</i>	MN176503.1	100.00
DHD-b	<i>Alteromonas macleodii</i>	LT963558.1	100.00
DHD-c	<i>Bacillus subtilis</i>	KX713159.1	100.00
DHD-e	<i>Bacillus subtilis</i>	MK450454.1	100.00
DHD-f	<i>Micrococcus endophyticus</i>	MH671518.1	99.77
DHD-h	<i>Acinetobacter pittii</i>	MG462705.1	99.03
DHD-i	<i>Marinobacter sediminum</i>	MH304387.1	98.77
DHD-j	<i>Micrococcus luteus</i>	MH665979.1	99.92
DHD-L	<i>Bacillus subtilis</i>	KX713159.1	99.93
DHD-n	<i>Acinetabacter pittii</i>	MG462705.1	100.00

各属细菌所占比例见图 1, 其中芽孢杆菌属为优势属, 有 10 株, 占分离细菌总数的 40%; 嗜冷杆菌属、假交替单胞菌属、海单胞菌属、葡萄球菌属、海杆菌属种类最少, 仅占分离细菌总数的 4%。可以看出所有细菌共分成 3 个分类单元: 变形菌门(*Proteobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)和放线菌门(*Actinobacteria*)。放线菌门有 1 个属(微球菌属), 1 个种; 厚壁菌门有 2 个属(芽孢杆菌属和葡萄球菌属), 5 个种; 变形菌门共有 6 个属, 7 个种。

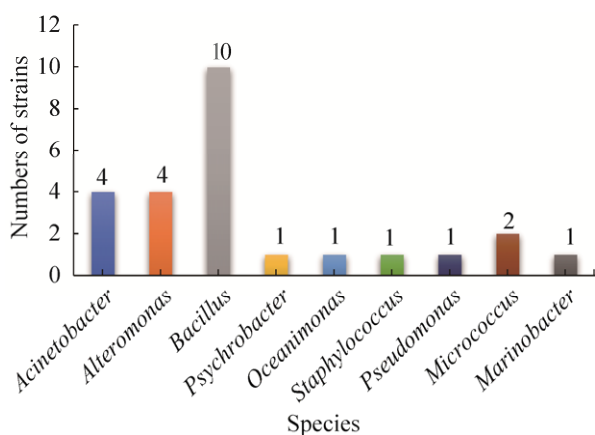


图 1. 东海岛细菌种类

Figure 1. Bacterial species from Donghai island.

## 2.5 抑菌活性分析

由表 4 可知, 有 3 个菌株发酵液至少对一种指示菌表现出抑菌活性(图 2)。3 株菌株(DHD-2、DHD-15、DHD-L)发酵产物具有抗大肠杆菌生长的活性, 6 株菌株(DHD-2、DHD-12、DHD-13、DHD-15、DHD-a、DHD-L)发酵产物具有抗枯草芽孢杆菌生长的活性, 4 株菌株(DHD-12、DHD-13、DHD-15、DHD-L)发酵产物具有抗金黄色葡萄球菌生长的活性。结果表明, 通过抑菌活性测定筛选出 6 株对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌有拮抗作用的菌株, 阳性率为 24%, 均为芽孢杆菌属(*Bacillus*)。

表 4. 东海岛细菌抑菌活性

Table 4. The antimicrobial activity of bacteria isolated from Donghai island

Strains	Indicator bacteria		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
DHD-2	+	+	-
DHD-12	-	+	+
DHD-13	-	+	+
DHD-15	+	+	+
DHD-a	-	+	-
DHD-L	+	+	+

+: inhibitory activity; -: none inhibitory activity.



图 2. 初筛抑菌效果图

Figure 2. The effect of antimicrobial activity on strains.

## 2.6 功能基因 PKSII 检测分析

在 25 株细菌 PKSII 功能基因检测中, 12 株菌株 DHD-2、DHD-8、DHD-10、DHD-12、DHD-13、DHD-15、DHD-20、DHD-a、DHD-e、DHD-i、DHD-L、DHD-n 均可扩增出 PKSII 基因片段(图 3)。其中 DHD-8、DHD-10、DHD-i、DHD-n 的亮带相对较暗。

通过 BLAST 比对, DHD-2、DHD-12、DHD-13、DHD-L 扩增得到 PKSII 核苷酸序列所对应的氨基酸序列与 GenBank 上的 *Bacillus subtilis* 标准菌株 Polyketide synthase 序列的相似性达到 98% 以上(表 5)。而 DHD-15(*Bacillus velezensis*)、DHD-a(*Bacillus tequilensis*)与相似度最高的标准菌聚酮合酶序列对比, 显示其相似性分别仅达 86.44%、92.00%, 推测其有可能含有新颖的 I 型 PKS 结构。

## 2.7 DHD-15、DHD-L 菌株耐受实验

选取对 3 种指示菌都有抑菌活性的菌株 DHD-15 和 DHD-L 进行温度、盐和酸碱的耐受实验。

**2.7.1 生长温度范围:** 由表 6 可知, DHD-15、DHD-L 菌株在 4 °C 均不生长, 在 15 °C、30 °C、40 °C 温度下都可以生长, 但在 50 °C 培养条件下菌株生长非常缓慢且生长量较少, 基本处于不生长状态。

**2.7.2 耐盐范围:** 由图 4 数据可知, DHD-15、DHD-L 菌株在添加 0%–10% NaCl 浓度范围内均可

表 6. 菌株温度耐受实验

Table 6. Temperature tolerance test

T/°C	4	15	30	40	50
DHD-15	-	+	+	+	-
DHD-L	-	+	+	+	-

+: bacterial growth; -: no growth.

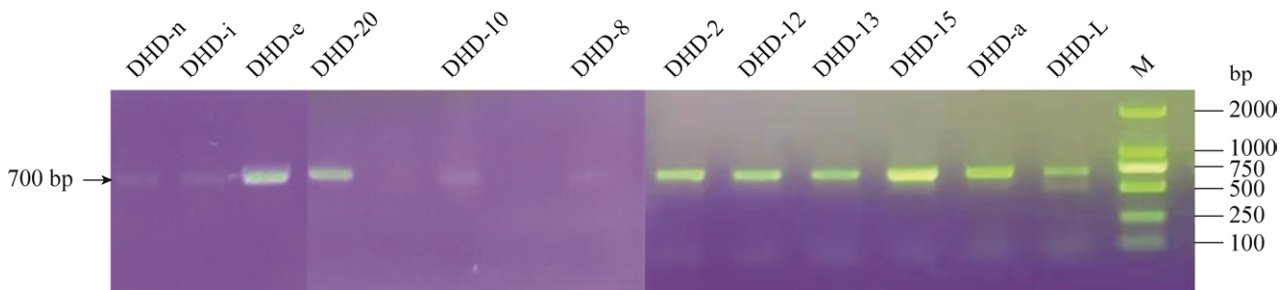


图 3. PKSII 基因 PCR 扩增图

Figure 3. PCR amplification of PKSII gene.

表 5. PKSII 阳性菌氨基酸序列分析

Table 5. Sequence analysis of amino acid of PKSII positive bacteria.

Strains	Closest match	GenBank accession	Similarity/%
DHD-2	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i> (AWW22978.1)	100.00
DHD-12	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i> (SAJ35057.1)	99.07
DHD-13	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i> (WW22978.1)	98.22
DHD-15	<i>Bacillus velezensis</i>	<i>Bacillus subtilis</i> (AWW22986.1)	86.44
DHD-a	<i>Bacillus tequilensis</i>	<i>Bacillus subtilis</i> (SAJ35055.1)	92.00
DHD-L	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i> (AWW22978.1)	98.23



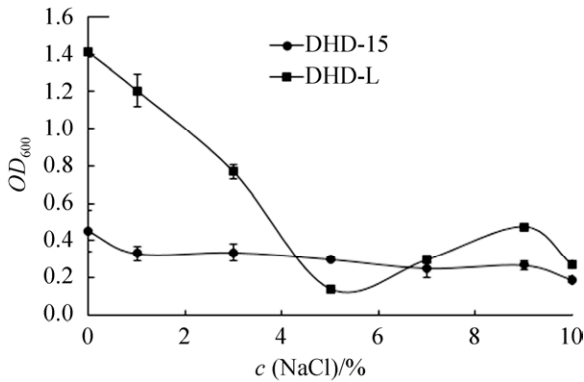


图 4. 菌株耐盐实验

Figure 4. NaCl tolerance test. Assays were performed in triplicate and data were reported as means±standard deviations.

生长。但随着 NaCl 浓度逐渐增大, DHD-15 菌株生长呈现逐渐降低的趋势, DHD-L 菌株生长明显下降;在 NaCl 浓度为 10% 时,两菌株均生长缓慢。

**2.7.3 耐酸碱范围:** 根据图 5 可知,在 pH 5 时, DHD-15、DHD-L 两菌株生长速度较快,其中 DHD-L 菌株生长速度明显高过 DHD-15 菌株。通过比较不同 pH 培养条件下菌株的生长情况,结果表明 DHD-15 和 DHD-L 菌株生长最适 pH 范围为 5–6,且耐 pH 3 和 pH 11 的酸碱条件。

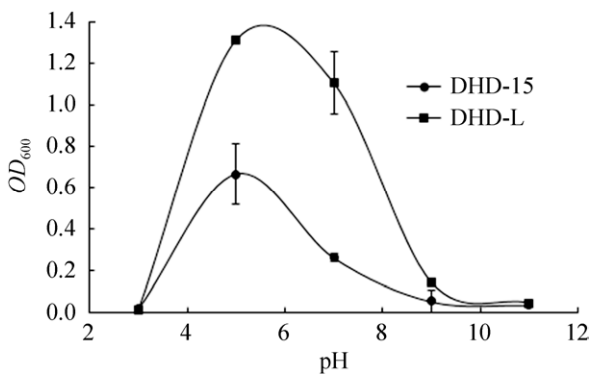


图 5. 菌株 pH 耐受性实验

Figure 5. The result of pH tolerance test. Assays were performed in triplicate and data were reported as means±standard deviations.

## 2.8 抑菌物质的稳定性实验

发酵上清液抑菌活性稳定性的研究有助于对抑菌化合物性质的了解,从而为后期研究提供基础依据。因此,研究抑菌活性稳定性是非常必要的。本实验选取菌株 DHD-15 作为代表菌用于实验研究。

**2.8.1 热稳定性:** 由图 6 可知, DHD-15 菌株抑菌物质具有较高的热稳定性。DHD-15 菌株抑菌物质经过 50 °C 处理 2 h 后,抑菌圈直径高达为 5.0 mm,具有较高的抑菌活性;在 100 °C 处理 30 min 后,抑菌活性明显降低,但依然有抑菌活性。

**2.8.2 酸碱稳定性:** 从图 7 中可以看出, DHD-15

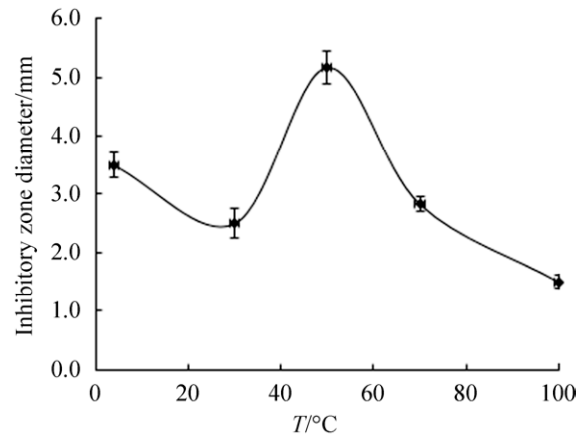


图 6. 发酵上清液的热稳定性

Figure 6. The thermal stability of fermented supernatant. Assays were performed in triplicate and data were reported as means±standard deviations.

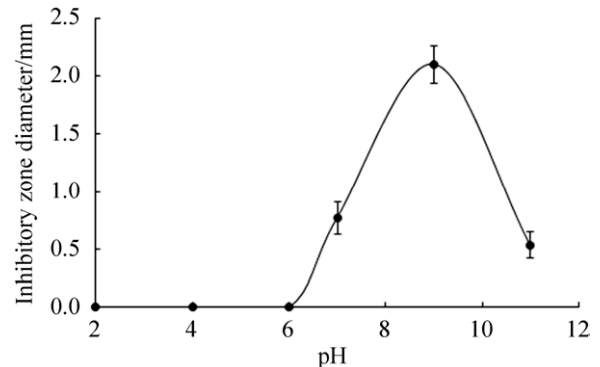


图 7. 发酵上清液的 pH 稳定性

Figure 7. The stability of fermented supernatant pH. Assays were performed in triplicate and data were reported as means±standard deviations.

菌株抑菌物质对酸敏感,耐碱,pH 耐受范围为 7-11。DHD-15 菌株抑菌物质在 pH 9 条件下,抑菌活性效果较好;在 pH 2-6 条件下,无抑菌活性;在 pH 11 时,仍有抑菌活性。

### 3 结论和讨论

(1) 通过形态观察、生理生化及 16S rRNA 分子鉴定得到东海岛沉积物可培养细菌 25 株,其分属于 9 个属:不动杆菌属(*Acinetobacter*)、交替单胞菌属(*Alteromonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)、假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)、海洋单胞菌属(*Oceanimonas*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、微球菌属(*Micrococcus*)、海杆菌属(*Marinobacter*),其中芽孢杆菌属(*Bacillus*)为该环境优势可培养类群,这一结果与其他研究者对南海沉积物可培养细菌的结果一致<sup>[21-24]</sup>。原因可能是由于芽孢杆菌属的细菌为好氧异养型,容易在营养较丰富的表层沉积物中繁殖而占据优势,同时表明该环境中有机质比较丰富。

此外,不同海域环境分离的海洋沉积物中细菌有不同的类群,不同海域生物样品中各优势细菌类群也会有所不相同。如张丽珉等<sup>[25]</sup>从南极罗斯海的海洋沉积物样品分离细菌,嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)为优势类群。王桢<sup>[26]</sup>从北极海洋沉积物中分离纯化细菌,以希瓦氏菌属细菌最多,其次为假交替单胞菌属。姜钊<sup>[27]</sup>从印度洋分离的细菌纯培养物中,除了芽孢杆菌属,还有红球菌属、微杆菌属、节杆菌属、葡萄球菌属等 9 种菌属为优势类群。孙丽<sup>[28]</sup>对从南大西洋沉积物分离可培养细菌,其中 *Marinobacter*、*Halomonas* 两个属是优势菌属。

(2) 在抑菌活性研究中,检测出 6 株芽孢杆菌属菌株对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌 3 种指示菌有不同程度的拮抗作用,均有抗枯草芽孢杆菌活性,其中菌株 DHD-15 和 DHD-L 有抗大肠埃希菌活性的作用。

即使是在同一片海域环境,不同的采样地点所筛选的海洋细菌的抗菌能力有所不同,但芽孢杆菌属(*Bacillus*)具有显著的抑菌活性。芽孢杆菌属在海洋中广泛存在,从近海沉积物到深海沉积物,可能更易获得活性菌株。薛珊珊等<sup>[29]</sup>从硃洲岛和徐闻筛选出抗枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌活性作用的优势菌株均为芽孢杆菌属,但无芽孢杆菌属抗大肠埃希菌活性。田良玉等<sup>[30]</sup>从南海深海沉积物中筛选出具有抗大肠杆菌、金黄色葡萄球菌活性物质的菌株,8 株为芽孢杆菌属(*Bacillus*),其中 7 株芽孢杆菌菌株对大肠杆菌有抑菌作用,4 株芽孢杆菌菌株对金黄色葡萄球菌有抑菌活性。于清武<sup>[22]</sup>从南海深海沉积物培养筛选出对 4 种指示菌(大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和蜡状芽孢杆菌)均有抑制作用的细菌,其中芽孢杆菌属菌株就有 8 株。

(3) 在 *PKSI* 功能基因检测中,12 株菌株检测出有该基因片段。通过 BLAST 比对,推测 DHD-15(*Bacillus velezensis*) 和 DHD-a(*Bacillus tequilensis*)可能含有新颖的 I 型 *PKS* 结构。本文首次证明了东海岛沉积物细菌中存在 *PKSI* 基因,证明了东海岛细菌产生聚酮类化合物的潜力,为南海东海岛产生聚酮类化合物的微生物筛选以及聚酮类化合物的发酵制备奠定了基础。

(4) DHD-15、DHD-L 菌株不仅具有高抑菌活性,在 15-40 °C 均可正常生长,可耐受 10% NaCl 高盐以及 pH 3 和 pH 11 的酸碱条件,但不耐高温;菌株 DHD-15 抑菌物质可耐受 4 °C 低温和 100 °C

高温, 对酸敏感, 但可耐受 pH 11 的碱性条件, 其稳定性较好。

中国南海东海岛独特的海洋环境蕴藏着丰富的微生物资源, 而且目前的研究和开发程度较低, 鲜有研究, 因此对东海岛沿海区沉积物微生物资源的调查对今后具有重要的指导意义, 同时开发微生物资源并挖掘出新型抗菌药或先导物有潜在的巨大价值。

## 参 考 文 献

- [1] 王永霞. 云南高原程海湖沉积物中的细菌多样性研究. 云南大学博士学位论文, 2014.
- [2] Wang JX, Liu XZ, Li P, Chen XL. Microbes isolated from the intertidal zone of Zhoushan sea area and their antimicrobial activity. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2008, 17(4): 507–511. (in Chinese)  
王健鑫, 刘雪珠, 李鹏, 陈小龙. 舟山沿海潮间带底泥微生物分离和抗菌活性的初步研究. 上海水产大学学报, 2008, 17(4): 507–511.
- [3] Wang YT, Zhang CB, Qi L, Jia XQ, Lu WY. Diversity and antimicrobial activities of cultivable bacteria isolated from Jiaozhou bay. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(12): 1892–1900. (in Chinese)  
王怡婷, 张传波, 齐麟, 贾晓强, 卢文玉. 胶州湾沉积物可培养细菌的多样性及其抑菌活性. 微生物学报, 2016, 56(12): 1892–1900.
- [4] Zhang JB, Liu JF, Yao JH, Yang B, Chen CL, Sun XL. Acid-volatile sulfide (AVS), simultaneously extracted metals (SEM) in intertidal sediments of Donghai Island, Zhanjiang and their toxic effect on the organism. *Marine Science Bulletin*, 2014, 33(4): 405–412. (in Chinese)  
张际标, 刘加飞, 姚兼辉, 杨波, 陈春亮, 孙省利. 湛江东海岛潮间带沉积物硫化物(AVS)和重金属(SEM)及其生物毒效性评估. 海洋通报, 2014, 33(4): 405–412.
- [5] 任朝辉. 冬虫夏草微生态区系中真菌及 PKS、NRPS 基因的多样性研究. 贵州师范大学硕士学位论文, 2018.
- [6] Shen B. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II, and III polyketide synthase paradigms. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2003, 7(2): 285–295.
- [7] Meng QP, Li ZY, Miao XL. Polyketide synthases screening from sponge-associated culturable microorganisms. *Microbiology China*, 2007, 34(3): 464–467. (in Chinese)  
孟庆鹏, 李志勇, 缪晓玲. 可培养海绵共附生微生物的 PKS 基因筛选. 微生物学通报, 2007, 34(3): 464–467.
- [8] 张薇. 海绵共附生活性菌 PKS 和 NRPS 基因的筛选及多样性研究. 上海交通大学硕士学位论文, 2008.
- [9] 杨杰. 枯草杆菌 fmb60 的 NRPS 和 I 型 PKS 基因簇代谢产物发掘及其生物活性研究. 南京农业大学博士学位论文, 2017.
- [10] Komaki H, Hosoyama A, Ichikawa N, Igarashi Y. Draft genome sequence of marine-derived *Bacillus subtilis* TP-B0611, a producer of bacilosarcins and amicoumacins. *Genome Announcements*, 2016, 4(5): e01134–16.
- [11] Caulier S, Nannan C, Gillis A, Licciardi F, Bragard C, Mahillon J. Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 302.
- [12] Abdelhamid AG, Hussein WE, Gerst MM, Yousef AE. Draft genome sequence of *Bacillus velezensis* OSY-GA1, which encodes multiple antimicrobial metabolites and expresses antimicrobial activity against foodborne pathogens. *Microbiology Resource Announcements*, 2019, 8(7): e01725–18.
- [13] Gerst MM, Yesil M, Yousef AE. Draft genome sequence of *Bacillus velezensis* OSY-S3, a producer of potent antimicrobial agents active against bacteria and fungi. *Genome Announcements*, 2018, 6(3): e01465–17.
- [14] Liu GQ, Kong YY, Fan YJ, Geng C, Peng DH, Sun M. Whole-genome sequencing of *Bacillus velezensis* LS69, a strain with a broad inhibitory spectrum against pathogenic bacteria. *Journal of Biotechnology*, 2017, 249: 20–24.
- [15] Yang XY, He JN, Niu XM. Research progress on fungal PKS-NRPS hybrid metabolites. *Scientia Sinica (Vita)*, 2019, 49(7): 848–864. (in Chinese)  
杨晓钰, 何佳宁, 牛雪梅. 真菌中 PKS-NRPS 杂合天然产物研究进展. 中国科学: 生命科学, 2019, 49(7): 848–864.
- [16] Ye MJ, Guo HX, Yang CR, Xue FL, Liu HL. Analysis of PKS and NRPS gene diversity in *trichoderma viridescens*. *Molecular Plant Breeding*, 2018, 16(14): 4607–4613. (in Chinese)  
叶美金, 郭海霞, 杨财容, 薛飞龙, 刘红玲. 渐绿木霉基因组中 PKS 和 NRPS 基因的多样性分析. 分子植物育种, 2018, 16(14): 4607–4613.

- [17] 周康. 中国南海海绵可培养共生真菌种群多样性、抑菌活性的研究及 PKS, NRPS 功能基因的筛选. 上海交通大学硕士学位论文, 2011.
- [18] Sun CK, Feng J, Ma GR. The progress of studies on marine microorganisms diversity. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2001, 13(3): 97–99. (in Chinese)  
孙昌魁, 冯静, 马桂荣. 海洋微生物多样性的研究进展. *生命科学*, 2001, 13(3): 97–99.
- [19] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [20] 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.
- [21] Chen RW, Wang KX, He YQ, Tian XP, Long LJ. Diversity of cultured bacteria isolated from a deep sea sediment in South China Sea. *Biotic Resources*, 2018, 40(4): 321–333. (in Chinese)  
陈柔雯, 王可欣, 何媛秋, 田新朋, 龙丽娟. 一份南海深海沉积物样品中可培养细菌的多样性. *生物资源*, 2018, 40(4): 321–333.
- [22] Yu QW, Hu LQ, Li F, Yi XX, Sun YL, Gao CH. Diversity and bacteriostatic activity of cultivable marine bacteria from South China Sea sediment at low temperature. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2015, 28(6): 2803–2808. (in Chinese)  
于清武, 胡丽琴, 李菲, 易湘茜, 孙玉林, 高程海. 低温环境下南海深海沉积物中可培养细菌的多样性及其抑菌活性分析. *西南农业学报*, 2015, 28(6): 2803–2808.
- [23] Yang S, Gao Z, Shao ZZ. Diversity of cultivable bacteria in deep sea sediments from cold seeps in the South China Sea. *Amino Acids & Biotic Resources*, 2016, 38(1): 34–40. (in Chinese)  
杨硕, 高峥, 邵宗泽. 南海冷泉区深海沉积物中细菌的分离培养及多样性分析. *氨基酸和生物资源*, 2016, 38(1): 34–40.
- [24] Sun FQ, Wang BJ, Li GY, Liu XP, Du YP, Lai QL, Shao ZZ. Diversity of bacteria isolated from the South China Sea sediments. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48(12): 1578–1587. (in Chinese)  
孙凤芹, 汪保江, 李光玉, 刘秀芹, 杜雅萍, 赖其良, 邵宗泽. 南海南沙海域沉积物中可培养微生物及其多样性分析. *微生物学报*, 2008, 48(12): 1578–1587.
- [25] Zhang LM, Zhao L, Cong BL. Diversity of culturable bacteria and fungi isolated from Ross Sea region of Antarctica separation, identification and initial screening for the ability to produce low-temperature enzymes. *Acta Oceanologica Sinica*, 2018, 40(8): 152–164. (in Chinese)  
张丽珉, 赵琳, 丛柏林. 南极罗斯海区域可培养微生物分离鉴定及产低温酶能力初步筛选. *海洋学报*, 2018, 40(8): 152–164.
- [26] Wang Z, Li Y, Che S, Lin XZ. Diversity analysis of culturable bacteria isolated from marine sediments of Arctic. *Acta Oceanologica Sinica*, 2014, 36(10): 116–123. (in Chinese)  
王楨, 李阳, 车帅, 林学政. 北极海洋沉积物中可培养细菌及其多样性分析. *海洋学报*, 2014, 36(10): 116–123.
- [27] 姜钊. 印度洋部分深海沉积物细菌多样性研究及链霉菌分离株的多序列位点分析(MLSA). 云南大学硕士学位论文, 2015.
- [28] 孙丽. 南大西洋深海沉积物源可培养细菌的鉴定及抑菌活性. 哈尔滨工业大学硕士学位论文, 2014.
- [29] Xue SS, Liu YW, Wang J, Cui LJ, Jiang LM. Isolation, identification and biodiversity analysis of the marine bacteria producing extracellular antimicrobial activity from the intertidal zone along Zhanjiang coast. *Genomics and Applied Biology*, 2017, 36(5): 2005–2014. (in Chinese)  
薛珊珊, 刘颖文, 王洁, 崔丽娇, 江黎明. 湛江沿海潮间带产胞外抗菌活性海洋细菌的分离鉴定及生物多样性分析. *基因组学与应用生物学*, 2017, 36(5): 2005–2014.
- [30] Tian LY, Peng SY, Gu HH, Jiang C, Zhu DC, Zhou XJ. Isolation and identification of antibacterial bacteria in South China Sea. *Hubei Agricultural Sciences*, 2018, 57(10): 65–68, 72. (in Chinese)  
田良玉, 彭淑娅, 顾卉卉, 蒋超, 朱道辰, 周晓见. 南海具抑菌活性微生物的筛选与鉴定. *湖北农业科学*, 2018, 57(10): 65–68, 72.

# Diversity and antimicrobial activities of cultivable bacteria isolated from Donghai island

Zhimin Deng, Hongxu Yuan, Jiayu Zhou, Chengxin Huang, Renshu Chen, Dongmei Lu\*

Life Science and Technology School, Lingnan Normal University, Zhanjiang 524048, Guangdong Province, China

**Abstract:** [Background] Marine microorganisms have a great application potential in developing bioactive substances, but few researches reported so far on microorganisms in the east island of the south China sea. [Methods] Marine culturable bacteria isolated and purified from sediments from Donghai island were identified by morphological observation, physiological and biochemical analysis, and phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequence. *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* were used as indicators to determine their antibacterial activities. Based on the study on bacteriostasis of sediment bacteria, Polyketide synthase I (PKSI) gene was screened for strains with bacteriostasis activity, and amino acid sequence alignment of PKSI positive bacteria was performed. PKSI positive representative strain was selected to test the stability of the strain and its fermentation bacteriostasis. [Results] In total 25 bacteria were isolated and purified, belonging to 9 genera: *Acinetobacter*, *Alteromonas*, *Bacillus*, *Psychrobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Oceanimonas*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* and *Marinobacter*. Through the screening of bacteriostatic activity and PKSI gene, 6 strains had bacteriostatic activity, and their bacteriostatic substances all contained ketone compounds. It was speculated that DHD-15 and DHD-a might contain novel structure of type I polyketide synthase. DHD-15 and DHD-L can grow normally between 15 and 40 °C, and grow best at 1% salt concentration and pH between 4 and 6 in seawater. [Conclusion] There are relatively rich culture-able bacterial resources in the sediments of Donghai island, south China sea.

**Keywords:** bacteria of Donghai island, antibacterial activity, polyketide synthase (PKSI), stability

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the State Spark Program (2013GA780077), by the Guangdong Science and Technology Department Small and Medium-sized Scientific and Technological Enterprises Technology Innovation, Science and Technology Finance Project (2017B010136194), by the Industrial chain Collaborative Innovation Public Service platform Project (contract number: Zhanhai 2017 C8B2) and by the Sichuan Education Bureau Project (CC16Z12)

\*Corresponding author. E-mail: ludongmei@lingnan.edu.cn

Received: 6 August 2019; Revised: 20 January 2020; Published online: 2 April 2020

卢冬梅, 主要从事微生物发酵与代谢工程、微生物检测、功能性食品与药品等教学与研究。先后参加全国高校生命科学类微课教学比赛和全国师范院校师范生教学技能竞赛等获奖, 并指导学生参加“挑战杯”、全国大学生生命科学竞赛和大学生创新创业训练项目等多项获奖。先后主持和参与国家自然科学基金项目、国家星火计划项目、广东省科技计划项目、四川省教育厅项目和广东省高等教育教学改革项目等课题, 在国内外期刊发表论文 20 多篇。

