

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
49(2):153-160; 4 February 2009
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

紫菜外生细菌抑菌活性及其多聚酮合酶(PKS I)基因筛选

方文雅^{1,2}, 杨锐^{1,2*}, 朱鹏^{1,2}, 单媛媛^{1,2}, 严小军^{1,2*}

(宁波大学¹应用海洋生物技术教育部重点实验室, ²海洋生物工程重点实验室, 宁波 315211)

摘要【目的】基于紫菜外生细菌抑菌活性的研究,本文对具有广谱抑菌活性的菌株进行了多聚酮合酶(Polyketide synthase I, PKS I)基因的筛选,以期获得 PKS I 阳性菌株及探讨紫菜藻际微生物区系细菌的拮抗机制与 PKS I 途径的关系。【方法】利用琼脂柱法筛选出具广谱抑菌活性的菌株 31 株,以其基因组 DNA 为模板,设计引物扩增酮基合成酶(Ketosynthase, KS)片段基因并将其克隆到 pMD19-T Vector,筛选出 PKS I 阳性菌,进行 16S rDNA 测序分析。【结果】紫菜外生细菌表现出广谱抑菌性。从温州病烂紫菜外生菌中筛选出 3 株具强抑菌活性的 PKS I 阳性菌,BLAST 比对结果显示:菌株 WPhG3、WPySw1 和 WPySw2 扩增得到 PKS I 的 KS 结构域核苷酸序列所对应的氨基酸序列与 *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168(NP_389602)、*Bacillus subtilis* (ABR19776)和 *Aspergillus carbonarius* (AAZ99721)的 PKS I 的 KS 结构域的同源性分别达到 98%、99% 和 98%。16S rDNA 系统发生学分析显示它们均与 *Bacillus* 的同源性最高。【结论】紫菜藻际微生物群落组成复杂,通过多条途径调节藻际微生物区系的平衡。PKS I 途径可能是温州病烂紫菜外生菌 *Bacillus* 表现抑菌活性的一种方式。

关键词:紫菜外生细菌;多聚酮合酶(PKS I);16S rDNA;抑菌活性

中图分类号:Q933 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209(2009)02-0153-08

海洋环境特殊而复杂,作为海洋生态系统重要的组成部分,海洋微生物发展出独特的代谢方式并产生特殊的代谢产物^[1,2]。研究人员发现海洋微生物常与海洋动植物共生,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^[3],它们对于维持藻际微环境或栖息微环境具有重要作用。Egan 等^[4]在石莼表面分离到的 5 株细菌,其中 3 株可抑制多种细菌和真菌的生长;Dopazo 等^[5]对潮间带绿、褐藻外生的产色菌株的研究也得到了类似的结果。国内外研究也表明,海藻共附生菌中存在着丰富的抗菌资源^[6],所以从海洋微生物中寻找新特效药物成为开发海洋资源的新一轮热点。

聚酮类化合物是海洋微生物重要的次生代谢产物,抑菌活性强,在至今上市的医药或农用抗生素中,其来源的比例居已知 6 大类天然产物的首位^[7],其生物合成过程是在大型的多酶复合体多聚酮合酶(Polyketide synthase, PKS)的催化下完成的。聚酮合酶分为两类,一类为复合 PKS,即 PKS I,另一类为芳香 PKS,即 PKS II^[8]。目前研究比较多的 PKS I 是以模块形式存在的多功能酶,每一模块含有一套独特的、非重复使用的催化功能域,主要由酮基合成酶(Ketosynthase, KS)、酰基转移酶(Acyltransferase, AT)、脱氢酶(DH)、烯酰还原酶(ER)、酮基还原酶(KR)和酰基载体蛋白(Acylcarrier protein, ACP)等功能域组成^[9]。最小的模块包含 AT、KS、ACP 等 3 个

基金项目:国家自然科学基金(40776077);宁波市科技项目(2006A610082);教育部长江学者与创新团队项目(IRT0734)

* 通信作者。杨锐, Tel: +86-574-87600170, Fax: +86-574-87600590, E-mail: yangrui@nbu.edu.cn; 严小军, Tel: +86-574-87600458, Fax: +86-574-87600590, E-mail: xiaojunyan@hotmail.com

作者简介:方文雅(1984-),女,宁波人,硕士,主要从事藻类生物技术研究。E-mail: fangwenya1984@163.com

收稿日期:2008-09-22;修回日期:2008-11-05

结构域,用于形成 C-C 键来延长聚酮链。KS 结构域催化缩合底物分子到聚酮长链上,AT 结构域负责识别起始物并连接到链上,ACP 结构域接收从 AT 连接上的延伸单位。PKS 中模块的顺序和组成决定了其编码产物的结构,而模块的数量则决定了聚酮链的长度^[10]。

据报道,PKS 合成的聚酮类化合物多于链霉菌和放线菌中发现,如徐平等^[11]对嗜碱放线菌、链霉菌、嗜盐放线菌和稀有放线菌进行 PKS I 基因筛选,阳性率分别为 26.5%、20.4%、15.2% 和 9.35%。近来,已经从海洋中分离到了相当多的聚酮类化合物,如 Kobayashi 等^[12]从海绵 *Callyspongia truncata* 的丙酮浸出物中提取到有细胞毒素的聚酮化合物;Abrell 等^[13]在海绵附生曲霉菌培养液中也发现了新聚酮化合物。在此基础上,人们将目标转移到从海绵及其共附生微生物中克隆聚酮化合物合成基因^[14]。2006 年 Kim 等^[15]人从海绵 *Pseudoceratina clavata* 的宏基因组中成功克隆到了 PKS 基因,孟庆鹏等^[16]在贪婪偃海绵共附生微生物中也成功克隆到 PKS 基因。如今,对 PKS 进行基因克隆已经成为获得聚酮类化合物的重要手段^[17]。

本研究从江苏南通、山东青岛、浙江温州 3 地的紫菜叶状体和江苏东台紫菜贝壳丝状体及其周围的海水分离出紫菜外生细菌,对其进行抑菌活性粗筛,并运用分子生物学技术结合 16S rDNA 序列系统发育分析,对具广谱抑菌活性的细菌进行 PKS I 基因筛选,确定 PKS I 基因产生菌分布规律,以期探讨紫菜藻际微生物区系细菌的拮抗机制与 PKS I 途径的关系,为新药筛选中新菌源的分离及抗性基因的筛选提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 材料来源 2005 年 12 月从江苏南通、山东青岛、浙江温州 3 地采集了紫菜叶状体样品及其周围的海水,2006 年 9 月从江苏东台水产养殖场育苗池采集紫菜贝壳丝状体及育苗水,其中南通、青岛、东台的紫菜为健康样本,温州的紫菜有明显病烂现象。

1.1.2 主要试剂和仪器:Taq 聚合酶、pMD19-T Vector (TaKaRa 公司,日本);UNI-Q-10 柱式细菌基因组抽提试剂盒(Sangon 公司,SK1201/1202);琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(GeneRay 公司,GK2041);Biofuge fresco 高速台式冷冻离心机(SORVALL 公司,美国);吉尔森可调精密移液器 PEPETMAN(GILSON

公司,法国)。

1.2 菌株分离

首先用无菌海水冲洗去掉藻体表面杂质,用漩涡振荡器剧烈振荡 10 min,将去除藻体后的悬液离心 20 min (6000 × g),将沉淀物用少量无菌海水悬浮,制成悬浊液。将振荡后的紫菜放入灭菌的研钵中加少量灭菌石英砂充分磨碎后,用无菌筛绢过滤,收集滤液。将用振荡和研磨方法获得的悬液分别稀释成不同浓度,涂布平板。用振荡方法获得的菌涂布于 Zobell 2216E 海水培养基(酵母粉 1 g,蛋白胨 5 g,柠檬酸铁 0.1 g,陈海水 1000 mL,琼脂 20 g,PH7.6 ~ 7.8)。用研磨方法获得的菌涂布于紫菜添加物培养基。将涂布好的平板 35℃ ~ 37℃ 培养 48 h,纯化 2 ~ 3 次后移于斜面 4℃ 下保存备用。

观察细菌菌体及菌落形态特征并进行革兰氏染色。根据不同采集地区、紫菜品系和处理方式对菌株命名。编号方式如下:首位字母表示采集地区,(N:江苏南通、D:江苏东台、Q:山东青岛、W:浙江温州),第二、三位字母表示样本类型(Py:条斑紫菜 *P. yezoensis*、Ph:坛紫菜 *P. haitanensis*、Pk:半叶紫菜华北变种 *P. katadai* var. *hemiphylla* 或青岛、南通和东台海水对照(Sw),第四位字母表示处理方法(S:振荡法、G:研磨法),东台条斑紫菜贝壳丝状体(C)或温州不同紫菜养殖区海水(Sw),同一地区同样处理方法获得的不同菌株用数字 1、2、3,以此类推。如 NSw2 表江苏南通海水中分离的 2 号细菌,WPYG1 表温州条斑紫菜振荡处理获得的 1 号细菌。

1.3 抑菌实验

指示菌来源有 3 种不同的类型,包括常见敏感菌 6 种:枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),大肠杆菌(*Escherichia coli*),啤酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*),铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*),根瘤菌(*Rhizobia*),典型水产动物致病菌 5 种:嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*),麦氏弧菌(*Vibrio metschnikovii*),副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*),哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*),溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*),典型人体致病菌 8 种:肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*),卡他布兰汉菌(*Branhamella catarrhalis*),肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumonia*),鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*),溶血葡萄球菌(*Staphylococcus haemolyticus*),白色念珠菌(*Candida albicans*),近平滑念珠菌(*Candida parapsilosis*),嗜麦芽芽孢单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*),用琼脂柱法进行初

筛,以氨苄青霉素作为阳性对照,筛选拮抗菌株,根据抑菌圈判别抑菌活性。

1.4 细菌基因组 DNA 的提取

取培养到指数生长期细菌菌液 5 mL,采用 UNIQ-10 柱式细菌基因组抽提试剂盒提取基因组 DNA。

1.5 PKS I 的 KS 结构域扩增引物设计

从 GenBank 中查找已知 PKS I 基因的保守序列,提交 ClustalW 软件对 KS 基因进行序列比对,参照比对结果使用 CODE HOP 简并引物设计,结合 Primer Premier 5 生物学软件,设计出针对 PKS I 基因保守区域 KS 片段的简并引物一套,预计扩增目的片段长度为 700 bp 左右,正向引物 KSF:5'-GCCATGGATCCNCAGCAGCG-3',反向引物 KSR:5'-TGCCGGTNCCTGNGYYTC-3'。

1.6 KS 结构域的 PCR 扩增

以提取的 DNA 为模板,KSF/KSR 为引物,PCR 反应体系 25 μ L。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 40 s;59 $^{\circ}$ C 1 min;72 $^{\circ}$ C 40 s;35 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存;1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.7 阳性克隆筛选

PCR 产物经割胶纯化后,使用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收,16 $^{\circ}$ C 反应过夜,然后将其转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,转化的菌体均匀涂布在含 Amp 的 LB 平板上,37 $^{\circ}$ C 倒置培养 12~16 h,长出白色菌落。挑取白色单菌落,用 15 μ L 无菌水稀释,直接以菌液做模板,PCR 扩增,电泳分析,筛选出阳性克隆。

1.8 序列测定和分析

筛选出可能含有目的片段的菌液,送交上海生物工程技术有限公司测序。通过 GenBank 在线 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 比对,得到同源性最高的序列,利用 MEGA 3.1 软件进行聚类分析。

1.9 16S rDNA 扩增及测序

以提取的 DNA 为模板,以细菌 16S 通用引物进行 PCR 扩增。引物序列如下:正向引物为 P(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'),反向引物为 Pr(5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'),PCR 反应体系 25 μ L:17 μ L PCR 水、2.5 μ L 10 \times Buffer、(5 \times 10 $^{-6}$ mmol) dNTPs、(3.75 \times 10 $^{-5}$ mmol) MgCl $_2$ 、0.8 μ L DNA 模板、(1 \times 10 $^{-5}$ μ mol) 引物、0.04 U/ μ L *Taq* 酶。PCR 反应

条件:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 1 min,58 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1.5 min;35 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min;4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,EB 染色观察,-20 $^{\circ}$ C 保存。扩增 100 μ L 体系的 16S rDNA,送交上海南方基因科技有限公司测序。通过 GenBank 在线 BLAST 搜索,得到同源性最高的序列。

2 结果

2.1 抑菌活性及 PKS I 的 KS 基因筛选

从江苏南通、山东青岛、浙江温州 3 地的紫菜叶状体和江苏东台紫菜贝壳丝状体及其周围的海水共分离紫菜外生细菌 111 株,利用琼脂柱叠法进行抑菌活性筛选,筛选出具有广谱且较强抑菌活性的细菌 31 株,占总菌数的 28%。不同的菌株表现不同的抑菌范围和抑菌活性。按指示菌种类,对这 111 株细菌的抑菌效果进行统计(如图 1),除对麦氏弧菌、副溶血弧菌、哈维氏弧菌、大肠埃希菌、鲍曼不动杆菌、白色念珠球菌、近平滑念珠球菌无抑菌效果外,紫菜外生细菌对铜绿假单胞菌的抑菌效果最差,溶藻弧菌次之,对啤酒酵母菌具抑菌效果的菌株数量最多,达到总菌数的 48.6%。从温州紫菜养殖区海水中分离的细菌具有抑菌活性的菌株比该地区病烂紫菜外生细菌数量多且活性强(表 1)。

对 31 株抑菌活性较强的细菌进行 PKS I 筛选,测序比对结果显示,其中 3 株为 PKS I 阳性菌。成功扩增出 PKS I 的 KS 结构域的细菌都表现出广谱且较强的抑菌活性(如表 2),尤其是 WPySw2 对金黄色葡萄球菌、WPhG3 对枯草芽孢杆菌、WPySw1 对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌都表现出较强的抑制性;此外,还能抑制氨苄青霉素不能抑制的指示菌。从图 1 可见,与其他外生细菌相比,这 3 株 PKS I 阳性菌对水产动物致病菌抑菌效果差,对铜绿假单胞菌、嗜水气单胞菌、溶藻弧菌、卡他布兰汉菌、溶血葡萄球菌均无抑菌效果,而在其它 PKS I 阴性菌中则含有抑制水产动物致病菌的菌株。

2.2 PKS I 的 KS 基因筛选及 16S rDNA 分子鉴定

2.2.1 PKS I 的 KS 基因克隆:以提取的细菌 DNA 为模板,以 KSF/KSR 为引物,利用 PCR 仪具有温度梯度的功能,得到扩增的最佳温度 59 $^{\circ}$ C。对 31 株海洋细菌进行 PKS I 基因筛选,PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖电泳分析,将 700 bp 附近的片段视为目的片段回收,对其进一步连接、转化、检测和测序。

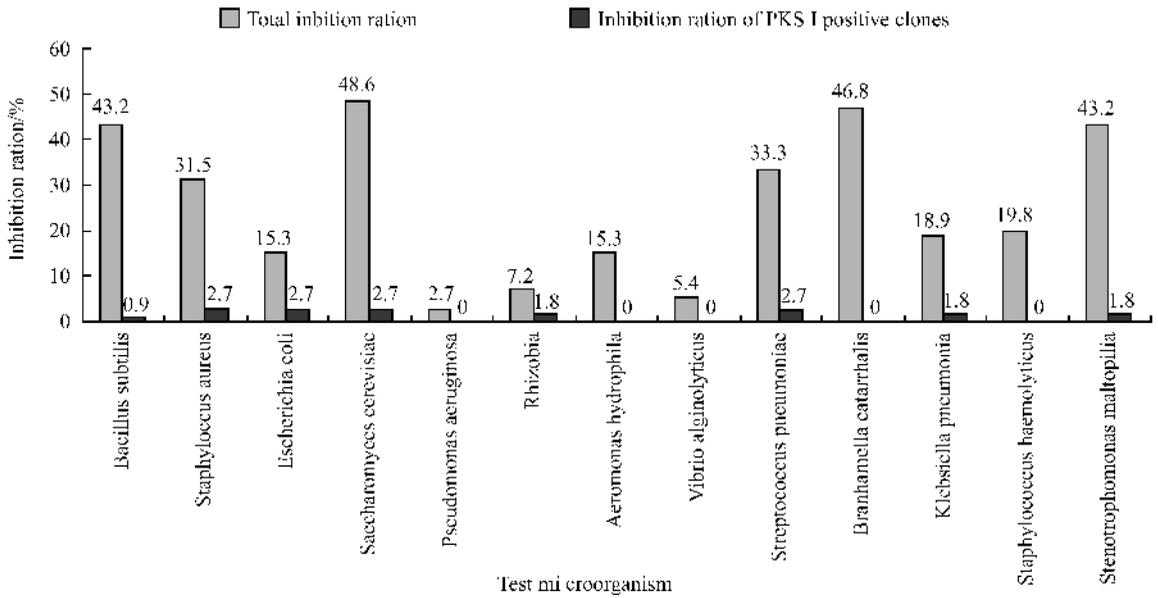


图 1 紫菜外生细菌对指示菌的抑菌率

Fig. 1 Inhibition ratio of the epiphytic bacteria isolated from *Porphyra* spp. on the test microorganisms.

表 1 紫菜外生细菌抑菌活性

Table 1 Antibacterial activity of the epiphytic bacteria isolated from *Porphyra* spp.

Antibacterial activity	Clones of bacteria
Higher	NPyS3, QPkS1, DPyG1, DSw3, WPhS13, WPhS14, WPhG2, WPhG3, WPhG5, WPySw1, WPySw2, WPyS10
Medium	NSw1, NPyS4, NPyG1, NPyG4, DPyG2, DPyS1, DPyS5, DPyC5, QPyS2, QPyG3, QPkG1, WPhSw1, WPhSw2, WPhSw4, WPhSw5, WPhSw7, WPyG4, WPhG11, WPhG12
Lower	NSw3, NPyS2, NPyG7, DSw2, DPyC1, DPyC4, DPyC7, QPyG1, QPkG2, QPkG4, QPkG7, QPkG8, WPhSw6, WPhSw10, WPhS1, WPhS3, WPhS5, WPhS7, WPhS9, WPhS10, WPhS12, WPhG1, WPySw3, WPyS1, WPyG1, WPyG2, WPyG5
No inhibition	DPyG3, DPyG4, DPyS2, DPyC6, WPyG3

表 2 PKS I 阳性菌的抑菌活性

Table 2 Antibacterial activity of PKS I positive bacteria

Test microorganism	Antibacterial activity of testing bacteria			
	WPhG3	WPySw1	WPySw2	Amp
<i>Staphylococcus aureus</i>	++	+++	++++	++++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	++	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i>	+++			++++
<i>Escherichia coli</i>	+	+++	+	++++
<i>Rhizobia</i>		+	+	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	+	+	+	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		+	+	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		+	+	

“+”: inhibition zone between 6 mm and 10 mm; “++”: inhibition zone between 10 mm and 15 mm; “+++”: inhibition zone between 15 mm and 20 mm, “++++”: inhibition zone between 20 mm and 25 mm each additional 5 mm of inhibition zone add “+”.

2.2.2 PKS I 的 KS 基因筛选结果和比对分析、及菌株 16S rDNA 分子鉴定:将测序结果上传 GenBank, 通过 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 在线对比, 在氨基酸库搜索与它们同源性最高的序列。结果显示菌株 WPhG3、WPySw1 和 WPySw2 与 GenBank 中已知序列均有很高的同源性, 相似度达到 98% 以上。成功扩增出 PKS I 的 KS 结构域的细菌, 阳性率占测试菌株的 9.7%。

各菌株扩增得到的核苷酸序列所对应的氨基酸序列与 GenBank 中报道菌株的 PKS I 的 KS 域的同源性最高的分别为: WPySw1 与 *Bacillus subtilis* (ABR19776) 达到 99%, WPhG3 与枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 为 98%。作为革兰氏阳性菌的代表菌株 *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 的全基因组序列于 1997 年测定完毕, 其 PKS 区域大小为 78.5 kb, 占了全部基因组序

列的 2%。因为 WPhG3 与枯草芽孢杆菌 KS 域氨基酸序列相似度达 98% ,推测两者 PKS I 基因的结构可能极为相似。WPySw2 与其余 2 株 PKS I 阳性菌相比 ,与芽孢杆菌相似度只有 87% ,而与曲霉菌 *Aspergillus carbonarius* 和放线菌 *Actinomyces sp.* 同源性较高 ,分别为 98% 和 97%。

对 31 株具广谱抗菌活性的细菌进行 16S rDNA 测序 ,将测序结果上传 NCBI 的 GenBank 数据库 ,通过 BLAST 在线比对发现 ,7 株细菌为 *Bacillus* ,相似度均在 94% 以上 ,其中 3 株为 PKS I 阳性菌 ,且菌株 WPhG3、WPySw1 和 WPySw2 与 *Bacillus sp.*、*Bacillus subtilis* strain DYU1 和 *Bacillus mojavensis* strain KL-070 的同源性分别达到 99%、98% 和 99% ,占受测 *Bacillus* 菌株的 42.8%。

WPhG3、WPySw1、WPySw2 菌株 PKS I 的 KS 基因和 16S rDNA 序列获得的序列号分别为 EU797478、EU863222、EU863221 和 EU710718、EU710721、EU710722。

2.2.3 PKS I 阳性菌的同源性及其系统发育关系分析 根据 3 株 PKS I 阳性菌的核苷酸序列推导其翻译的氨基酸序列 ,并使用 DNAMAN 软件进行多序列比对(如图 2)。比对结果显示 ,其相似度达 84.74% ,可见这 3 株细菌同源性较高 ,亲缘关系较近。

WPhG3	MDPQQRLLLTYAWKAIEDAGYSAKRLSCTKTFGWFITGNT	40
WPySw1	-----mmv-----ia---i-t-lgs	40
WPySw2	-----as-s-----	40
WPhG3	GYSSLLSKANSAIEGSAAMNTSPVGPNRVSYFLNLHGFS	80
WPySw1	--qt-in--glpv-ytmgtiv-----m---di---	80
WPySw2	--g-an-da-----s-----t-----	80
WPhG3	EPIDTACSSSLVAIHHAISSIEEGTCDMALAGGWNTIILP	120
WPySw1	--ve-----rvka-t-d---v-----vt---	120
WPySw2	-----v-----i---v---	120
WPhG3	EYVISFDKAGALSKKCKKTFSNQADGFAHGEAGILFLK	160
WPySw1	-gh-g-q--m-ed-r-----d---yvr-----miv---	160
WPySw2	d-----r-----d-----lf---	160
WPhG3	KLKAAEEAGDHIYGVIKGSAINHGGRASLTIPNPKAQAD	200
WPySw1	--se-hdr-----l-r-te-----s---a---q-t---	200
WPySw2	---ad-----v-----q-e	200
WPhG3	VIQSAYQKAGIDPKTYIYIETHGTC	225
WPySw1	-lk-----h-s-i-----	225
WPySw2	--ka-k-----s---a---	225

图 2 PKS I 阳性菌氨基酸序列比对

Fig.2 Cluster of amino acid sequence alignment from PKS I positive bacteria.

选择 GenBank 上登陆的具有代表性的 KS domain 的氨基酸序列 ,使用软件 Mega 3.1 进行聚类分析 ,采用邻接法(Neighbor-joining)构建系统发育

树。从图 3 得知 :PKS I 阳性菌与 *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 (CAB13604) 和 PedH (AAS47562) PKS 基因 KS 域的氨基酸序列的系统发育关系最近 ;藻类、真菌次之 ,与 *Streptomyces sp.* 系统发育关系较远 ;且其所处的系统发育分支均处于 trans-AT 型 KS 域的氨基酸序列之间 ,推断其 PKS 基因也属于 trans-AT 型 ;WPhG3、WPySw1、WPySw2 三株聚类在一起 ,与 PKS I 阳性菌的同源性比对结果一致。

3 讨论

藻际微生物成分复杂 ,功能多样 ,因此也蕴含了多种代谢途径和具有生物活性的新物质。Canedo 等^[18]曾从深海沉积物中分离出一株芽孢杆菌 ,该菌可产生一种新型抗肿瘤物质(PM94128);Matsuda 等^[19]从 *Pseudomonas sp.* 中分离得到一种具抗癌活性的硫酸盐多聚糖(Polysaccharide B21);曾春民等^[20]从大亚湾分离到一株能产生灵菌红素(Prodigiosin)的细菌 ,该色素可作为天然色素或抗菌素的开发 ;郝志成等^[21]也从厦门地区红树根际海泥中分离到一株链霉菌 ,该菌产生的抗生素 S-111-9 ,对革兰氏阴性菌和真菌具有抑制作用。我们的研究表明 :藻际微生物区系的多样性不仅体现在物种组成的层面 ,还体现在以抑菌活性为代表的功能多样性。不同物种、不同生境的细菌具有不同的抑菌谱 ;温州病烂紫菜养殖区海水中分离的细菌 ,尤其是 *Bacillus* 细菌 ,具有抑菌活性的菌株较该地区病烂紫菜藻体上分离的外生细菌数量多且活性强 ;而其它地区健康紫菜外生细菌的抑菌活性和菌株数量则远远大于其对应的海水细菌。这可能是微生物对藻际微环境的适应及菌-菌互作的结果。

由于藻类和微生物群落间存在双向选择 ,使得藻类对特定微生物存在依赖性。藻际微生物的活性途径相互协调并互为补充 ,在海藻周围形成了具有独特结构和功能并与藻共栖的微生物群落 ,共同实现对藻际微环境平衡的调节。Sakami 等^[22]对具毒冈比甲藻 *Gambierdiscus toxicus* 的研究表明 ,在无菌条件下培养的藻细胞不能增殖 ,而当经抗生素处理的 *G. toxicus* 同与藻共栖的 4 株细菌共同培养时 ,藻细胞恢复增殖 ,存活率显著提高 ;Bell 等^[23]发现分离自中肋骨条藻 *Skeletonema costatum* 培养液的假单胞菌 *Pseudomonas* HNY 在藻培养液中的生长状况明显好于在无机营养加富海水中。本研究的结果也表明 ,除了 PKS I 阳性菌具有较强的抑菌活性 ,大

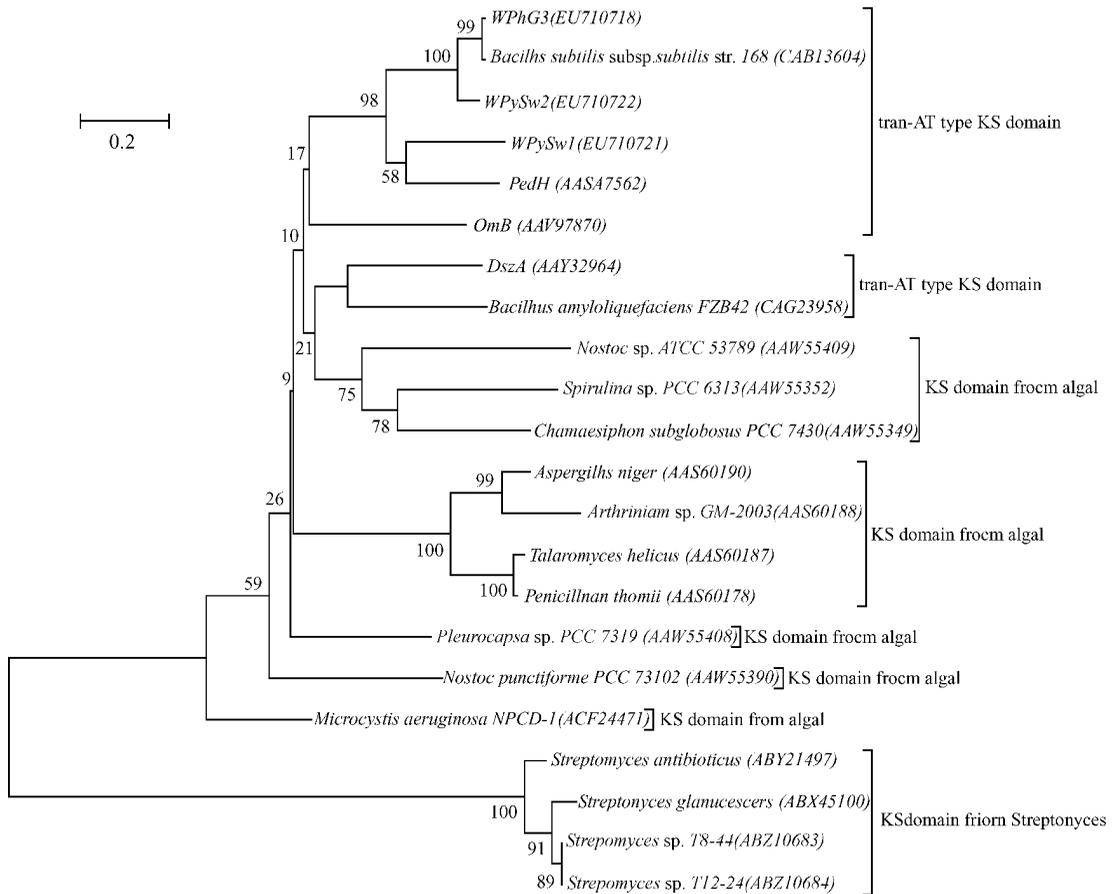


图3 基于氨基酸序列的系统发育树

Fig.3 Neighbor-joining tree based on amino acid sequences. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bootstrap analysis was based on 500 replicates. Scale indicates 20 % sequence divergence.

量未扩增出 PKS I 的 KS 结构域的紫菜外生细菌也表现了广谱抑菌性,尤其是个别菌株对水生动物致病菌(如嗜水气单胞菌和溶藻弧菌)也具有较强的抑菌活性。由此作者推测紫菜藻际微生物群落中细菌的拮抗机制较复杂,除分泌聚酮类化合物外,还可能含多条途径来共同完成对紫菜藻际微生物区系的调节。这一结果充分体现了藻际微环境是藻际微生物与藻体通过选择形成的高度集约、互相制约的体系。

PKS 可以合成包括抗生素、毒素在内的许多具有生物活性的天然产物,对分离到的具有抑菌活性的微生物进行进一步的 PKS 基因克隆,是获得生物资源的有效手段。Chen 等^[24]人曾从 *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42 中筛选到 3 个 PKS 的相关基因簇,Scotti 等^[25]从 *Bacillus subtilis* 的基因组中发现了一个编码 PKS 的开放阅读框(OPF)。我们成功获得了 3 株 PKS I 阳性菌株,16S rDNA 比对结果显示它们均为 *Bacillus*,且 PKS I 阳性菌株均分离自温

州病烂紫菜海区。由此我们推测:*Bacillus* 可能富含聚酮类化合物;从藻际微生物,尤其是病烂藻类,甚至类推到病害生物体中,可能更易获得活性菌株。本研究为我们选择生产聚酮类化合物的菌种提供方向,也为我们获得新的抗生素提供实验方案。

致谢 感谢宁波大学王国良教授和宁波市第二医院许晓敏先生分别提供海水养殖动物常见致病菌和人体致病菌等受试菌株,宁波大学本科毕业生林虹、陆贤艳、曾悦和王晓勤等同学在实验中给与支持。

参考文献

- [1] Carte BK. Biomedical potential of marine natural products. *American Institute of Biological Sciences*, 1996, 46(4): 271-286.
- [2] 林永成,周世宁. 海洋微生物及其代谢产物. 北京: 化学工业出版社, 2003.

- [3] Bewley CA , Holland ND , Faulkner DJ. Two classes of metabolites from *Theonella swinhoei* are localized in distinct populations of bacterial symbionts. *Experientia* , 1996 , 52 (7) : 716 – 722.
- [4] Egan S , Thomas T , Holmstrom C , et al. Phylogenetic relationship and antifouling activity of bacterial epiphytes from marine *Ulva Lactuca*. *Environmental Microbiology* , 2000 , 2(3) : 343 – 347.
- [5] Dopazo CP , Lemos ML , Lodeiros C , et al. Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogen. *Journal of Applied Bacteriology* , 1988 , 65(2) : 97 – 101.
- [6] 郑忠辉,陈连兴,黄耀坚,等. 厦门海区潮间带海洋动植物共附生微生物的抗菌活性. 台湾海峡(*Journal of Oceanography in Taiwan Strait*) , 1998 , 17(4) : 439 – 444.
- [7] McDaniel R , Khosla C , Hopwood DA , et al. Engineered biosynthesis of novel polyketides. *Science* , 1993 , 262 (5139) : 1546 – 1550.
- [8] Shen B. Polyketide biosynthesis beyond the type I , II and III polyketide synthase paradigms. *Current Opinion in Chemical Biology* , 2003 , 7(2) : 285 – 295.
- [9] 刘文,唐功利. 以生物合成为基础的代谢工程和组合生物合成. 中国生物工程杂志(*China Biotechnology*) , 2005 , 25(1) : 1 – 5.
- [10] Katz L , McDaniel R. Novel macrolides through genetic engineering. *Medicinal Research Reviews* , 1999 , 19(6) : 543 – 558.
- [11] 徐平,李文均,张永光,等. 产生大环聚酮类天然产物放线菌的分子筛选研究. 中国抗生素杂志(*Chinese Journal of Antibiotics*) , 2003 , 28(6) : 321 – 324.
- [12] Kobayashi M , Higuchi K , Murakami N , et al. Absolute stereostructure of callistatin A , a potent cytotoxic polyketide from the marine sponge , *Callispongia truncate*. *Tetrahedron Letters* , 1997 , 38(31) : 5533 – 5536.
- [13] Abrell LM , Borgeson B , Crews P , et al. A new polyketide , secocurvarin , from the salt water culture of a sponge derived fungus. *Tetrahedron Letters* , 1996 , 37(50) : 8983 – 8984.
- [14] Kim TK , Fuerst JA. Diversity of polyketide synthase genes from bacteria associated with the marine sponge *Pseudoceratina clavata* : culture-dependent and culture-independent approaches. *Environmental Microbiology* , 2006 , 8(8) : 1460 – 1470.
- [15] Kim TK , Garson MJ , JA Fuerst. Marine actinomycetes related to the 'Salinospora' group from the Great Barrier Reef sponge *Pseudoceratina clavata*. *Environmental Microbiology* , 2005 , 7(4) : 509 – 518.
- [16] 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(*Microbiology*) , 2007 , 34(3) : 464 – 467.
- [17] Rein KS , Borrone J. Polyketides from dinoflagellates : origins , pharmacology and biosynthesis. *Comparative biochemistry and physiology. Part B , Biochemistry & molecular biology* , 1999 , 124(2) : 117 – 131.
- [18] Canedo LM , Fernandez PJJ , Acebal C , et al. PM – 94128 , a new isocoumarin antitumor agent produced by a marine bacterium. *The Journal of Antibiotics* , 1997 , 50 (1) : 175 – 178.
- [19] 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. *Marine Biotechnology* , 2003 , 5(1) : 13 – 19.
- [20] 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(*Chinese Journal of Marine Drugs*) , 1996 , 58(2) : 5 – 7.
- [21] 郑志成,周美英. 海洋链霉菌产生的抗生素 S – 111 – 9 的研究. 厦门大学学报(*Journal of Xiamen University*) , 1993 , 33(5) : 647 – 652.
- [22] Sakami T , Nakahara H , Chinain M , et al. Effects of epiphytic bacteria on the growth of the toxic dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* (Dinophyceae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* , 1999 , 233(2) : 231 – 246.
- [23] Bell WH , Lang JM , Mitchell R. Selective stimulation of marine bacteria by algal extracellular products. *American Society of Limnology and Oceanography* , 1974 , 19(5) : 833 – 839.
- [24] Chen XH , Vater J , Piel J , et al. Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42. *Journal of Bacteriology* , 2006 , 188(11) : 4024 – 4036.
- [25] Scotti C , Piatti M , Cuzzoni A , et al. A *Bacillus subtilis* large ORF coding for a polypeptide highly similar to polyketide synthases. *Gene* , 1993 , 130(1) : 65 – 71.

Antibacterial activity of *Porphyra* spp. epiphytic bacteria and polyketide synthase I gene screening

Wenya Fang^{1,2}, Rui Yang^{1,2*}, Peng Zhu^{1,2}, Yuanyuan Shan^{1,2}, Xiaojun Yan^{1,2*}

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

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

Abstract [Objective] Based on the antibacterial analysis, we screened Polyketide synthase (PKS I) gene from the epiphytic bacteria of *Porphyra* spp., in order to obtain the PKS I positive strains and detect the potential connection between the PKS pathway and the antibacterial mechanisms. **[Methods]** A total of 31 bacteria with broad-spectrum antibacterial activity were screened by agar-screening methods. The 16S rDNA and the Ketosynthase gene were amplified from the genome DNA of these bacteria, which were cloned into pMD19-T vector for sequencing analysis. **[Results]** *Porphyra* spp. epiphytic bacteria showed broad-spectrum antibacterial activity. Three PKS I positive epiphytic bacteria were obtained from Wenzhou rotten *Porphyra* spp. samples which had high antibacterial activity. The BLAST results indicated that the Ketosynthase fragments of PKS I from the strains of WPhG3, WPySw1 and WPySw2 shared highest similarity (98%, 99%, 98%) to the strains of *Bacillus subtilis* subsp. *Subtilis* str. 168 (NP_389602), *Bacillus subtilis* (ABR19776) and *Aspergillus carbonarius* (AAZ99721), respectively. Furthermore, the phylogenetic analysis based on 16S rDNA sequences indicated that they belonged to the genus of *Bacillus*. **[Conclusion]** The flora of *Porphyra* spp. epiphytic bacteria was complex, which regulated the phycosphere in many ways. The PKS I pathway might be a performance of antibacterial function of *Bacillus* from Wenzhou rotten samples.

Keywords : *Porphyra* spp. epiphytic bacteria ; polyketide synthase I ; 16S rDNA ; antibacterial activity

(本文责编 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (40776077), the Technology Projects of Ningbo (2006A610082) and the Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (IRT0734).

* Corresponding author. Rui Yang, Tel : + 86-574-87600170, Fax : + 86-574-87600590, E-mail : yangrui@nbu.edu.cn ; Xiaojun Yan, Tel : + 86-574-87600458, Fax : + 86-574-87600590, E-mail : xiaojunyan@hotmail.com

Received : 11 September 2008/Revised : 5 November 2008

《微生物学报》真诚欢迎刊登广告

《微生物学报》(月刊)创刊于1953年,由中国微生物学会和中国科学院微生物研究所主办,是我国微生物领域唯一的综合性学报级期刊和国家自然科学基金核心期刊,被国内外多家重要的文摘刊物和数据库收录。曾多次被评为优秀科技期刊。

本刊历史悠久,发行量大,内容涵盖面广,主要报道普通微生物学,工业、农业、医学和兽医微生物学,免疫学以及与微生物学有关的生物工程等方面的研究成果和科研进展。一直受到国内外科研工作者、高等院校师生和相关企业界的欢迎。

本刊提供广告服务,分为彩色图版、黑白图版及彩样装订3种形式,刊登与微生物学相关的试剂、仪器、设备及生物技术等方面的产品信息,为您开拓在微生物学领域新的发展空间。本刊态度严谨,信守协议,已与众多生物技术公司建立了长期的合作关系。

需刊登广告的客户,可以能过电话、E-mail 与我们联系获取具体版位及报价,双方经协商确定版位后将签署正式的广告刊登合同。欲了解更多信息,欢迎登录本刊网站 <http://journals.im.ac.cn>, 进入《微生物学报》查看广告服务专区。

联系人 武文、王闵; 电话 010-64807336, 010-64807321; 传真 010-64807327; 编辑信箱 gg@im.ac.cn; <http://journals.im.ac.cn>