

◆ 生物科学 ◆

广西北部湾局部海域海洋沉积物细菌多样性及生物活性评估^{*}杨少娟¹, 陈雪梅¹, 沈锐¹, 安德凤¹, 蔡汉钦², 姜明国², 姜怡^{1**}

(1. 云南大学生命科学学院, 云南昆明 650091; 2. 广西民族大学海洋与生物技术学院, 广西南宁 530008)

摘要:为有效探究海洋新型天然微生物资源,本研究以广西北部湾局部海域海洋沉积物样品为研究对象,采用高通量测序技术和纯培养分离方法分析海洋沉积物样品中细菌群落组成及多样性,利用双层琼脂扩散法检测纯培养菌株的抗菌活性,通过PCR扩增法筛选基因组中含有7种功能基因的阳性菌株。高通量测序结果显示:海洋沉积物中检测到1407个操作分类单元(Operational Taxonomic Units, OTUs);在门水平上,变形菌门(Proteobacteria)的物种丰度最高,其次是厚壁菌门(Firmicutes)和酸杆菌门(Acidobacteria)。纯培养分离纯化鉴定出278株菌,分布在3门5纲16目24科31属,其中YIM 150853为1个潜在新分离单元。生物活性评估实验表明,76.34%的纯培养菌株至少对1种指示菌有抑制作用,其中链霉菌YIM 150601、YIM 150634抑菌谱广、抑菌活性强,放线菌的功能基因检出率高于非放线菌。广西北部湾局部海域海洋沉积物中蕴藏着丰富的细菌资源,纯培养菌株具有抗菌及合成生物活性产物的潜力,是开发新型天然产物的新菌源。

关键词:海洋沉积物 细菌 多样性 抗菌活性 功能基因

中图分类号:Q939 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2021)05-0460-13

DOI:10.13656/j.cnki.gxkx.20211203.004

0 引言

新发传染病(Emerging Infectious Diseases, EIDs)和多重耐药性病原菌(Multidrug-resistant pathogens)对人类健康造成严重威胁^[1,2]。然而,近年来由于陆生微生物的新型抗生素逐渐减少,且分离重复性逐渐升高^[3],从新的、未开发的、极端的环境中分离新菌株成为开发新型天然产物的有效来源^[4-6]。

在海平面以下,压力随深度的增加而增加,温度、氧气、光照强度随深度的增加而减少。因高压、低温、缺乏光照、盐度和氧气浓度可变,海洋成为一个独特的极端环境^[7]。为适应极端环境,海洋生物已进化出独特的生理、生化功能^[8,9]。独特的海洋环境,使海洋微生物具备与陆生微生物不同的特征,可能产生新的生物活性成分和新型抗生素^[10]。目前有关海洋微生物的研究表明:海洋微生物,特别是海洋放线菌能产

收稿日期:2021-05-28

* 国家自然科学基金项目(32010006)和广西自然科学基金项目(桂科AA18242026)资助。

【作者简介】

杨少娟(1997-),女,在读硕士研究生,主要从事微生物资源研究。

【**通信作者】

姜怡(1978-),女,副研究员,主要从事放线菌资源研究,E-mail:jiangyi@ynu.edu.cn。

【引用本文】

杨少娟,陈雪梅,沈锐,等.广西北部湾局部海域海洋沉积物细菌多样性及生物活性评估[J].广西科学,2021,28(5):460-472.

YANG S J, CHEN X M, SHEN R, et al. Bacterial Diversity and Bioactivity Assessment of Marine Sediments in Partial Sea Area of Beibu Gulf of Guangxi [J]. Guangxi Sciences, 2021, 28(5): 460-472.

生新型代谢产物,且部分代谢产物具有新的生物活性,可用于新药的开发^[11,12]。

地处热带和亚热带的广西北部湾海域,蕴含着丰富的海洋细菌资源^[13]。但目前对广西北部湾海域海洋微生物的研究主要集中于北部湾滩涂的红树林保护区,关于该海域海洋沉积物细菌多样性及生物活性潜力的研究鲜见报道。因此,本研究利用高通量测序技术结合纯培养分离技术,对广西北部湾局部海域海洋沉积物的细菌多样性进行研究,同时对纯培养菌株的生物活性潜力进行评估,为该海域海洋细菌资源的开发和利用提供参考依据。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂与仪器

溶菌酶、蛋白酶 K、Taq DNA 聚合酶、dNTPs、PCR Buffer、Marker 购自昆明云科生物技术有限公司,其余试剂为国产分析纯试剂。由昆明擎科生物科技有限公司合成 PCR 所用引物。PCR 扩增仪, Biometra 公司;电泳仪, Bio-Rad 公司;凝胶成像分析系统, Gene Company Limited 公司。

1.2 样品采集

2020 年 11 月,用抓斗取样器从广西北部湾海域采集海洋沉积物。采样的间隔距离为 50 m,停船后在船头用抓斗取样 5-10 次,5-10 个点混为一个样品(共 4 份),并将样品全部装入无菌密封袋中,立即用冰盒运输至实验室,4.0℃ 冰箱保存。样品信息如表 1 所示。

表 1 广西北部湾海洋沉积物样品采集信息

Table 1 Collection information of marine sediment samples in Guangxi Beibu Gulf

样品 Sample	经度 Longitude (E)	纬度 Latitude (N)	深度 Depth (m)	样品特征 Characteristics of samples
A	108°09'	21°00'	22	灰色砂(含贝类遗骸) Grey sand (including shellfish remains)
B	108°56'	20°99'	22	灰色砂质粉砂 Grey sandy silt
C	109°28'	21°19'	22	灰色粉砂 Grey silt
D	109°56'	21°30'	22	灰色粉砂 Grey silt

1.3 高通量测序与分析

1.3.1 高通量测序样品处理

所采集的 4 份样品为混合样品,为确保结果的准

确性,每份样品做 3 个重复。

1.3.2 PCR 扩增与高通量测序

利用试剂盒提取海洋沉积物样品总 DNA。根据编码细菌核糖体 RNA 的核酸序列保守区设计引物 338F (5' - ACTCCTACGGGAGGCAGCA - 3') 和 806R (5' - GGACTACHVGGGTWTCTAAT - 3'),对样品总 DNA 进行 PCR 扩增。30.0 μL PCR 扩增体系: Buffer 15.0 μL、dNTPs 6.0 μL、338F 0.9 μL、806R 0.9 μL、KOD FX Neo 酶 0.6 μL、基因组 DNA 50.0 ng,加 ddH₂O 补至 30.0 μL。PCR 扩增程序: 98℃ 2 min;98℃ 0.5 min,50℃ 0.5 min,72℃ 1.0 min,30 个循环;72℃ 5.0 min。扩增产物经过纯化、定量和均一化后形成测序文库,质检合格后用 Illumina HiSeq 2500 进行测序。

1.3.3 数据处理与分析

高通量测序获得的数据经过预处理后,用 Usearch 软件^[14]对在 97.0% 相似度水平上的序列进行聚类,获得操作分类单元 (Operational Taxonomic Unit, OTUs)。对 OTUs 进行物种注释,在界、门、纲、目、科、属、种水平上分析各样品的细菌群落组成及组间差异。采用 α 多样性分析单个样品的物种丰度及物种多样性,其中用 Chao1 和 Ace 指数衡量物种丰度,其值与物种丰度成正比;用 Shannon 和 Simpson 指数衡量物种多样性,其值与物种多样性成正比。采用 β 多样性分析不同样品间细菌群落组成的相似性及差异。

1.4 纯培养细菌的分离与鉴定

1.4.1 培养基

采用 6 种分离培养基:腐殖酸(HV)^[15]、YIM 91^[16]、YIM 171^[17]、M3^[18]、海藻糖-天冬酰胺^[19]、几丁质。几丁质培养基配方如下:几丁质 2.0 g/L, K₂HPO₄ 0.7 g/L, KH₂PO₄ 0.3 g/L, 微量盐溶液 (FeSO₄ · 7H₂O 0.1 g, MnCl₂ · 4H₂O 0.1 g, ZnSO₄ · 7H₂O 0.1 g, 溶于 100.0 mL 水) 1.0 mL, 海盐 25.0 g/L, 琼脂 10.0 g/L, pH 值为 7.2。

上述 6 个培养基中添加组合抑制剂 (25.0 mg/L 萘啶酸 + 50.0 mg/L 重铬酸钾 + 100.0 mg/L 制霉菌素) 抑制生长较快的细菌和真菌。

纯化培养基 YIM 38 (g/L): 酵母提取物 4.0, 无水葡萄糖 4.0, 麦芽提取物 2.5, 复合维生素 10.0 mg, 琼脂 12.0, pH 值为 7.2。

发酵培养基 YIM 61 (g/L): 大豆粉 20.0, 蛋白胨 2.0, 葡萄糖 20.0, 可溶性淀粉 5.0, 酵母膏 2.0, NaCl

4.0, K_2HPO_4 0.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, $CaCO_3$ 2.0, pH 值为 7.2。

LB 培养基 (g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0, pH 值为 7.2。

PDA 培养基 (g/L): 马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0, pH 值为 7.2。

1.4.2 样品预处理与菌株分离

4 份灰色砂质沉积物样品分别混合均匀后置于无菌培养皿中, 28℃ 自然干燥 7 d。研磨后称取 2.0 g 样品, 置于 80℃ 烘箱中干热处理 1.0 h; 然后加到 18.0 mL 无菌 0.1% $Na_4P_2O_7$ 溶液中, 用摇床 180.0 r/min 震荡 1.0 h; 最后用超声波清洗器处理 40.0 s 得到样品悬浮液, 并用 0.1% $Na_4P_2O_7$ 溶液按 10^{-2} , 10^{-3} 比例稀释。

纯培养采用稀释涂布法, 取 200.0 μ L 充分混合后的 10^{-2} , 10^{-3} 样品稀释液涂布于分离培养基上, 28℃ 倒置培养 30 d。培养期间挑取菌落形态不一样的单菌落接种至 YIM 38 斜面, 28℃ 培养 7 d。培养结束后根据菌株形态特征去除重复菌株及污染菌株, 对剩余菌株进行编号, 然后用 YIM 38 培养基对编号菌株进行扩大培养及纯化, 用 20% 甘油管于 -20℃ 冰箱内保存。

1.4.3 菌株鉴定与系统发育分析

纯化后的菌株用酶法提取 DNA^[20]。采用细菌通用引物 PA (5'-CAGAGTTTGATCCTGGCT-3') 和 PB (5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') 进行 16S rRNA 基因扩增。50 μ L PCR 扩增体系: Buffer 5.0 μ L、dNTPs 4.0 μ L、PA 1.0 μ L、PB 1.0 μ L、Taq DNA 聚合酶 0.3 μ L、ddH₂O 37.7 μ L、模板 DNA 1 μ L。PCR 扩增程序: 94℃ 4 min; 94℃ 1.0 min, 56℃ 1 min, 72℃ 2.0 min, 30 个循环; 72℃ 10.0 min。PCR 扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶进行电泳检测, 将验证结果为阳性的 PCR 产物送至昆明擎科生物科技有限公司进行测序。使用 EZ Biocloud 数据库 (<https://www.ezbiocloud.net/>) 将测序得到的 16S rRNA 基因序列进行比对, 确定菌株与已发表菌株的相似性。采用 MAGE 7.0^[21] 软件以邻接法 (Neighbour-Joining)^[22] 构建菌株的系统发育树, 确定菌株系统发育地位。

1.5 抗菌活性筛选

1.5.1 指示菌

本研究选用 9 种临床和农业生产上常见的病原

菌作为指示菌进行抗菌活性实验。革兰氏阳性菌: 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* CGMCC 1.2386)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis* CGMCC 1.1849)。革兰氏阴性菌: 大肠杆菌 (*Escherichia coli* CGMCC 1.2385)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)。真菌: 黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、白色念珠菌 (*Candida albicans* CGMCC 2.2086)、小麦赤霉病菌 (*Gibberella saubinetii*)、番茄灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*)、马铃薯干腐病菌 (*Fusarium coeruleum*)。其中有保藏号的指示菌由中国普通微生物菌种保藏管理中心提供, 无保藏号的指示菌由云南省微生物研究所提供。

1.5.2 抗菌活性检测

待测菌株和指示菌用 YIM 38 固体培养基进行活化。活化后的待测菌株接种到 YIM 61 液体培养基, 28℃ 少量 (6.0 mL) 发酵 7 d, 取发酵液进行活性测试, 以空白 YIM 61 培养基作为阴性对照。活化后的革兰氏阳性、革兰氏阴性指示菌接种到 LB 培养基, 活化后的真菌指示菌接种到 PDA 培养基, 28℃ 培养 3 d。

抗菌活性检测采用双琼脂扩散法。培养基下层为水琼脂, 琼脂凝固后加入含有指示菌的 YIM 38 培养基, 并将自制的打孔器置于培养基中。待培养基凝固后取出打孔器, 每个孔中加入 100.0 μ L 待测菌株发酵液, 28℃ 培养 24 h, 观察是否产生抑菌圈并记录抑菌圈的大小。

1.6 功能基因筛选

1.6.1 功能基因引物

结合相关文献和本实验室前期研究, 设计并合成 7 种功能基因的简并引物, 引物信息见表 2。

1.6.2 功能基因检测

根据设计的引物, 用 PCR 扩增技术筛选功能基因。50 μ L PCR 扩增体系: Buffer 5.0 μ L, dNTPs 4.0 μ L, 正向、反向引物各 1.0 μ L, Taq DNA 聚合酶 0.3 μ L, ddH₂O 37.7 μ L, 模板 DNA 1 μ L。PCR 扩增程序如下: 94℃ 4.0 min; 94℃ 1.0 min, 退火 (温度见表 2) 1 min, 72℃ 2.0 min, 30 个循环; 72℃ 10.0 min。

用 1.0% 琼脂糖凝胶对扩增产物进行电泳检测, 并将验证后结果为阳性的 PCR 产物送至昆明擎科生物科技有限公司进行测序。

表 2 筛选功能基因的引物信息

Table 2 Primers information for functional gene screening

功能基因 Functional gene	引物 Primer	引物序列 Primer sequence	片段长度 Fragment length (bp)	退火温度 Annealing temperature (°C)	参考文献 References
<i>Diterpenes</i>	GGDPS-F	5'-CTSMTSCACGACGACGTSATGGAC-3'	500	65.0	[23]
	GGDPS-R	5'-SAGSAGGTCGTCSGSAKCTGGAA-3'			
<i>Lugdunin</i>	lug F1	5'-AAACTGTCTGGAGGTATT-3'	758	43.0	[24]
	lug R1	5'-TTTGGCTATCTATTCTGC-3'			
<i>Teixobactin</i>	Tox F2	5'-CACTGGCAGCAGGTGGAAGC-3'	885	64.0	[25]
	Tox R2	5'-GCAGGTGCAAGGACAGGTCG-3'			
<i>Salinomycin</i>	5 F	5'-AACGCACGCCGTCGTTCTC-3'	750	55.0	[26]
	5 R	5'-ACCAGCCACTTGCCGTCCTC-3'			
PKS-II	KS _α	5'-TSGCSTGCTTGGAYGCSATC-3'	600	54.0	[27]
	KS _β	5'-TGGAANCCGCCGAABCCTCT-3'			
<i>Leinamycin</i>	lnmJ-F	5'-GTACCGACCAGGAGATCACCAC-3'	460	57.0	[28]
	lnmJ-R	5'-GCACAGATACAGCGGCAGATT-3'			
<i>Glutarimide</i>	chxBCD-F	5'-GACACCCAGGTCGTCATCGC-3'	820	60.0	[29,30]
	chxBCD-R	5'-CCCGTCATCCAGGTAGTAGCC-3'			

2 结果与分析

2.1 高通量测序细菌多样性分析

2.1.1 细菌群落组成

海洋沉积物测序样品在 97.0% 相似度水平上进行聚类, 共获得 1 407 个 OTUs。就单份样品而言, OTUs 在组内存在较大差异(图 1), 表明组内样品间细菌群落组成不同, 可能是由于测序样品是混合样, 未混合均匀造成的。

对获得的 OTUs 进行物种注释, 门分类水平上部分物种的分布及丰度见图 2。结果显示, 在门水平上, 所有样品中微生物的优势类别相同, 均包括变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、酸杆菌门(Acidobacteria)和绿屈扰菌门(Chloroflexi), 其中变形菌门的丰度最高。另外, 梭杆菌门(Fusobacteria)只在 B 样品(B1、B2、B3)中检测出且有较高的丰度, 在其他 3 个样品中均没有检测出, 表明样品的

特异性对梭杆菌门的菌株具有选择性。在种分类水平上, 注释的 OTUs 大部分为免培养菌株, 表明样品还具有巨大的可培养细菌的潜力。

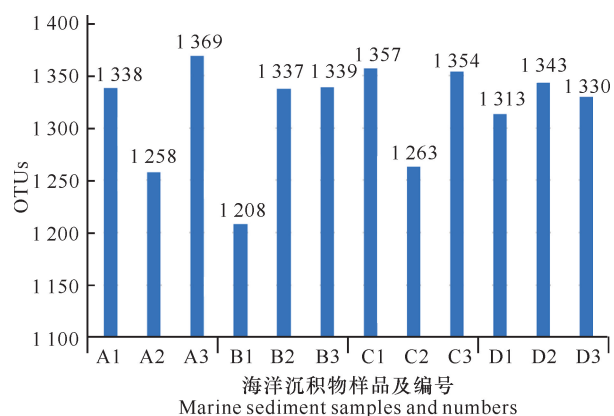
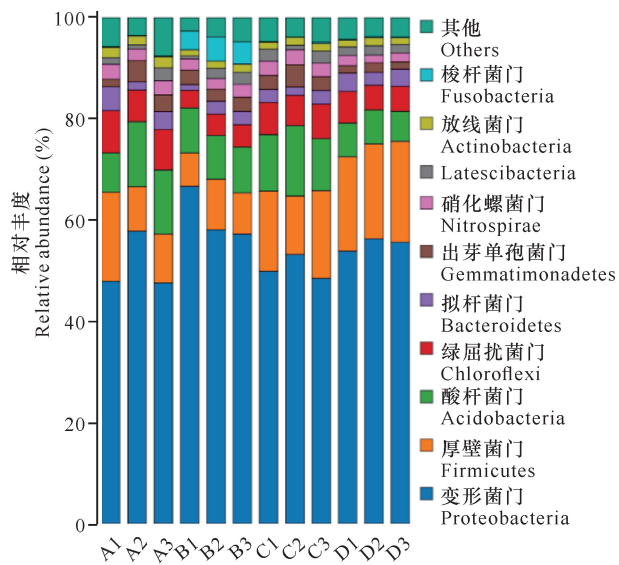


图 1 高通量测序样品 OTUs 数目

Fig. 1 OTUs number of high-throughput sequencing samples



海洋沉积物样品及编号 Marine sediment samples and numbers

图2 门分类水平上高通量测序样品的物种注释相对丰度

Fig. 2 Relative abundance of species annotation of high-throughput sequencing samples at the phylum classification level

2.1.2 α 多样性分析

海洋沉积物样品 α 多样性指数如表 3 所示。样

表 3 高通量测序样品 Alpha 多样性指数

Table 3 Alpha diversity index of high-throughput sequencing samples

样品 Sample	样品编号 Sample number	Ace 指数 Ace index	Chao1 指数 Chao1 index	Simpson 指数 Simpson index	Shannon 指数 Shannon index
A	A1	1 361.533 8	1 371.133 3	0.977 1	7.685 2
	A2	1 298.461 5	1 308.091 7	0.961 9	7.059 2
	A3	1 375.893 8	1 381.097 6	0.988 0	8.221 0
B	B1	1 263.782 7	1 278.069 0	0.880 7	5.828 7
	B2	1 354.218 1	1 358.863 0	0.954 7	7.200 3
	B3	1 357.809 6	1 367.651 5	0.962 7	7.335 6
C	C1	1 370.922 3	1 381.254 2	0.978 7	7.847 7
	C2	1 314.123 1	1 342.780 2	0.970 9	7.418 2
	C3	1 366.915 2	1 370.333 3	0.977 9	7.724 6
D	D1	1 331.570 7	1 334.279 1	0.957 7	7.026 0
	D2	1 363.299 2	1 375.137 0	0.961 3	6.997 2
	D3	1 353.308 3	1 361.662 7	0.952 5	6.909 1

2.2 纯培养多样性分析

2.2.1 细菌多样性

采用 6 种分离培养基对广西北部湾局部海域采集的 4 份海洋沉积物样品进行分离,共分离出 680 株菌。根据菌株形态特征去重复后,对 278 株菌进行 16S rRNA 基因测序。经 EZ Biocloud 数据库比对,

品 Ace 指数为 1 263.782 7 - 1 375.893 8, Chao1 指数为 1 278.069 0 - 1 381.254 2, Simpson 指数为 0.880 7 - 0.988 0, Shannon 指数为 5.828 7 - 8.221 0。A3 样品 4 个指数均较高,表明该样品 α 多样性最高;B1 样品 4 个指数均最低,表明该样品 α 多样性最低。

2.1.3 β 多样性分析

β 多样性分析样品间物种组成相似性的结果如图 3 所示。B 样品与其余 3 种样品聚类关系最远,样品间细菌的组成差异最大;B 样品和 D 样品的 3 个重复均聚类在一起,体现出较近的亲缘关系,说明同一样品内微生物群落的组成及分布较均匀。但是 A 样品和 C 样品的 3 个重复没有完全聚类到一起,存在一定的交叉性,即 A2 和 C2 样品表现出较强的聚类关系,表明这两个样品中微生物的组成更为相似。A 样品和 C 样品 3 个重复样品没有完全聚类的原因可能是:(1)A 样品和 C 样品的 3 个重复组没有充分混合均匀;(2)两个采样地之间物质和能量的流动性较强,所形成的环境相似,所以样品间的微生物组成也比较相似。

278 株菌分布于 3 个门:放线菌门(Actinobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria),5 个纲:放线菌纲(Actinomycetia)、杆菌纲(Bacilli)、 α -变性杆菌纲(Alpha-proteobacteria)、 β -变性杆菌纲(Beta-proteobacteria)、 γ -变性杆菌纲(Gamma-proteobacteria),16 个目:链霉菌目(Streptomycetale-

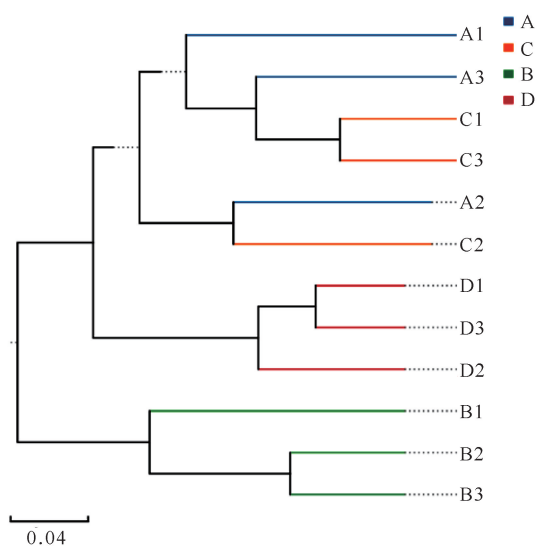


图3 基于 bray curtis 算法构建的 UPGMA 聚类树

Fig. 3 UPGMA clustering tree based on bray curtis algorithm

s)、微球菌目(Micrococcales)、分枝杆菌目(Mycobacteriales)、假诺卡氏菌目(Pseudonocardiales)、丙酸杆菌目(Propionibacteriales)、动孢囊菌目(Kineosporiales)、链孢菌目(Streptosporangiales)、微杆菌目(Microbacteriales)、短杆菌目(Brevibacteriales)、嗜皮菌目(Dermatophilales)、纤维单孢菌目(Cellulomonadales)、芽孢杆菌目(Bacillales)、根瘤菌目(Rhizobiales)、丙杆菌目(Caulobacterales)、伯克霍尔德氏菌目(Burkholderiales)、假单胞菌目(Pseudomonadales), 24 个科: 链霉菌科(Streptomycetaceae)、微球菌科(Micrococcaceae)、戈登氏菌科(Gordoniaceae)、类诺卡氏菌科(Nocardiaceae)、迪茨氏菌科(Dietziaceae)、假诺卡氏菌科(Pseudonocardiaceae)、丙酸杆菌科(Propionibacteriaceae)、类诺卡氏菌科(Nocardiodiaceae)、动孢囊菌科(Kineosporiaceae)、拟诺卡氏菌科(Nocardiopsaceae)、微杆菌科(Microbacteriaceae)、短杆菌科(Brevibacteriaceae)、皮生球菌科(Dermacoccaceae)、原小单孢菌科(Promicromonosporaceae)、微小杆菌科(Exiguobacteriumf)、游动球菌科(Planococcaceae)、芽孢杆菌科(Bacillaceae)、葡萄球菌科(Staphylococcaceae)、类芽孢杆菌科(Paenibacillaceae)、Aurantimonadaceae、丙杆菌科(Caulobacteraceae)、草酸杆菌科(Oxalobacteraceae)、莫拉氏菌科(Moraxellaceae)、假单胞菌科(Pseudomonadaceae), 31 个属: 链霉菌属(*Streptomyces*)、微球菌属(*Micrococcus*)、考克氏菌

属(*Kocuria*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、戈登氏菌属(*Gordonia*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、迪茨氏菌属(*Dietzia*)、假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*)、糖多孢菌属(*Saccharopolyspora*)、*Brevilactibacter*、类诺卡氏菌属(*Nocardioides*)、*Thalasssiella*、拟诺卡氏菌属(*Nocardiopsis*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、农球菌属(*Agrococcus*)、短杆菌属(*Brevibacterium*)、巴里恩托斯单孢菌属(*Barrientosiimonas*)、原小单孢菌属(*Promicromonospora*)、微小杆菌属(*Exiguobacterium*)、游动球菌属(*Planococcus*)、金黄色微菌属(*Chryseomicrobium*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、短芽孢杆菌属(*Brevibacillus*)、橙色单孢菌属(*Aurantimonas*)、*Aureimonas*、短波单孢菌属(*Brevundimonas*)、马赛菌属(*Massilia*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)。不同属水平上的菌选取一株菌为代表菌与该属的典型菌种用邻接法(Neighbour-Joining)构建系统发育树, 如图 4 所示。依据 16S rRNA 序列相似性小于 98.65%用于界定物种界限^[31], 序列比对结果显示, YIM 150853 与 *Nocardioides glacieisoli* HLT3-15T (JQ673418)的相似性最高, 但也只有 98.23%, 表明 YIM 150853 为 1 个潜在新分类单元, 但具体的分类地位需通过多相分类法^[32]确定。

2.2.2 培养基分离效果

通过 6 种培养基从 4 份海洋沉积物样品中分离鉴定出 278 株菌(31 个属 65 个种), 每种培养基均分离出一定数量的细菌。从种水平上来说, HV 培养基分离出 19 种菌, YIM 91 培养基和海藻糖-天冬酰胺培养基各分离出 15 种菌, YIM 171 培养基和几丁质培养基各分离出 7 种菌, 而 M3 培养基仅分离出 3 种菌。从属水平上来说, HV 培养基分离出 14 个属, YIM 91 培养基和海藻糖-天冬酰胺培养基各分离出 11 个属, YIM 171 培养基分离出 6 个属, 几丁质培养基和 M3 培养基各分离出 3 个属(图 5)。上述结果表明, HV 作为分离培养基获得的菌株数量最多, 种属多样性最丰富; 其次是 YIM 91 培养基和海藻糖-天冬酰胺培养基, 但 YIM 91 培养基容易生长真菌, 不利于细菌的分离。另外, 几丁质培养基虽然分离出 4 个属的 7 种菌, 但这些菌株仅从 B 号样品中分离得到, 表明几丁质培养基有较强的分离特异性, 大部分菌株不能利用几丁质作为碳源, 作为分离培养基时普适性较差。

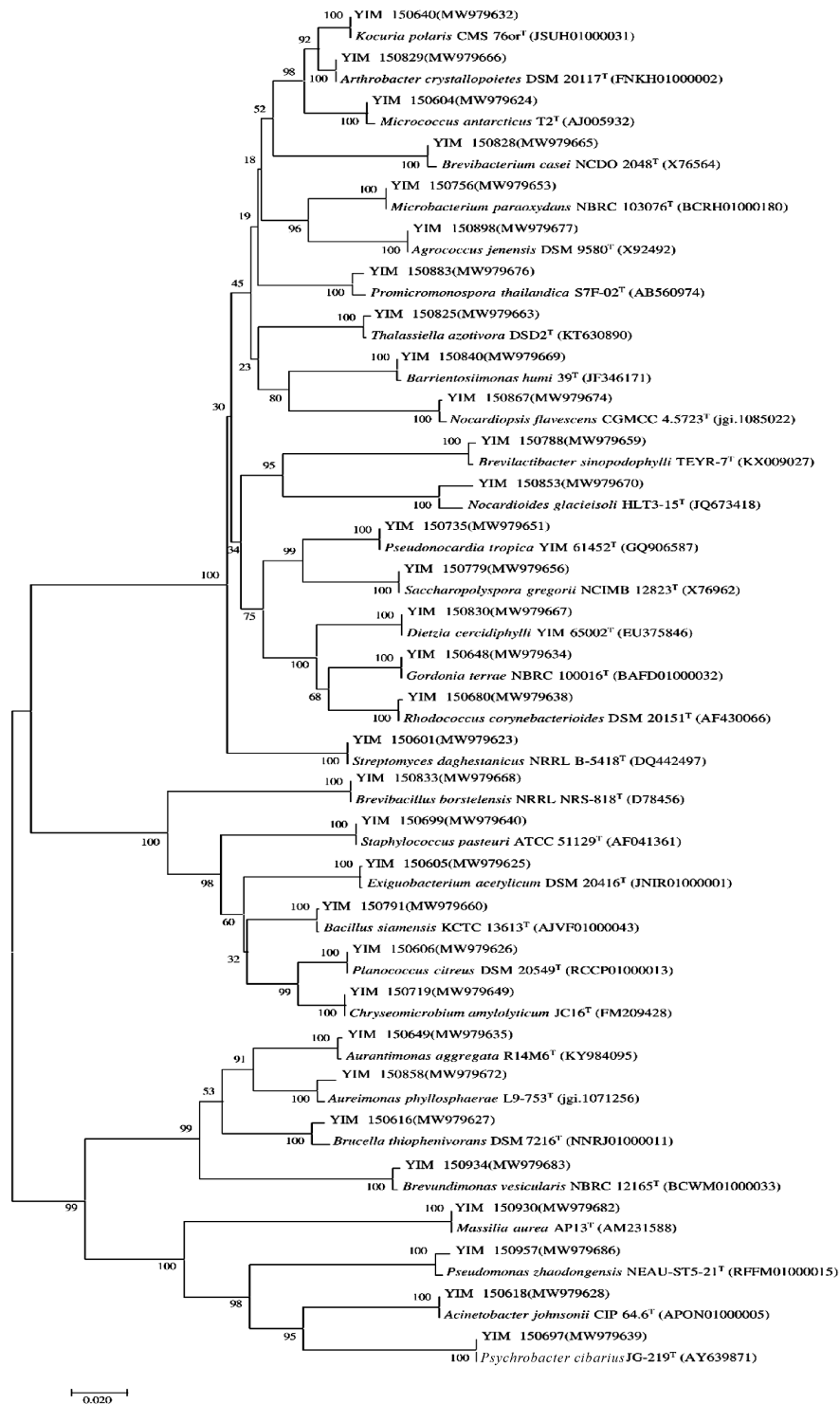


图4 基于16S rRNA基因序列构建广西北部湾海域海洋沉积物部分细菌的系统发育树

Fig. 4 Neighbour-Joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of partial bacteria isolated from marine sediments collected from Guangxi Beibu Gulf

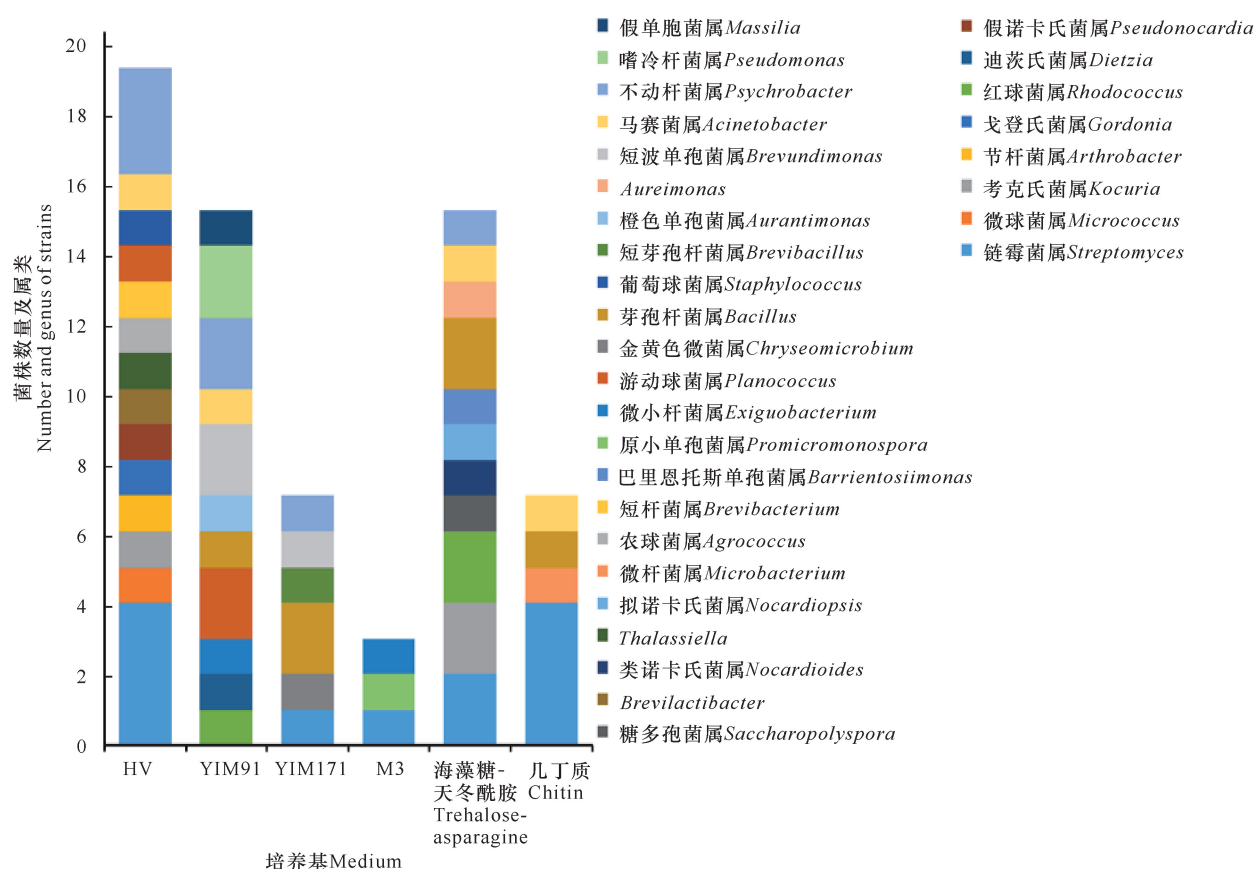


图5 不同培养基分离得到的细菌属

Fig. 5 Bacteria genera isolated from different medium

2.3 抗菌活性及功能基因筛选

2.3.1 抗菌活性

采用双层琼脂扩散法筛选 278 株细菌的抗菌活性,结果表明,有 212 株(76.25%)细菌具有抗 1 种及 1 种以上指示菌的活性,另外有 168 株(60.43%)、159 株(57.19%)、158 株(56.83%)、151 株(54.31%)、139 株(50.00%)、131 株(47.12%)、131 株(47.12%)、22 株(7.91%)、5 株(1.80%)分别对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、马铃薯干腐病菌、白色念珠菌、黑曲霉、小麦赤霉病菌、铜绿假单胞菌、番茄灰霉病菌有抑制作用。以上说明,广西北部湾局部海域海洋沉积物纯培养细菌具有开发抗生素药物的巨大潜力。

本实验中,链霉菌属的菌株表现出广谱的抗菌活性,且抑菌活性更强。链霉菌 YIM 150601 对除铜绿假单胞菌、番茄灰霉病菌以外的 7 种指示菌均有抑菌活性,其中对白色念珠菌的抑菌活性最强,抑菌圈直径达 16 mm;链霉菌 YIM 150634 对大肠杆菌、枯草

芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉、马铃薯干腐病菌、小麦赤霉病菌、番茄灰霉病菌 7 种病原菌均有抗菌活性,其中对黑曲霉、马铃薯干腐病菌、小麦赤霉病菌、番茄灰霉病菌的抑菌活性最强,抑菌圈直径均达 15 mm 以上(表 4)。

2.3.2 功能基因

用 PCR 扩增的方法对可培养菌株的基因组进行功能基因筛选,去重复后的实验结果如表 5 所示。功能基因筛选结果表明:36 株菌(12.90%)至少含有 1 类功能基因,11 株菌(3.94%)含有 2 类功能基因。二萜类功能基因的阳性率最高,达 7.89%,其次依次为雷纳霉素(4.30%)、盐霉素(3.94%)、环缩肽类(1.79%)、PKS-II(1.08%)、路邓素(0.36%),但未能检测到含戊二酰亚胺类功能基因的菌株。所筛选到的 20 株阳性菌株中,15 株为放线菌,表明与非放线菌相比,放线菌含有更为丰富的生物合成基因簇,其合成新型天然产物的潜力更大,开发应用价值更大。

表4 纯培养菌株的抗菌活性

Table 4 Antibacterial activities of culture-dependent bacteria

菌株 Strain	相似菌株 (相似性, %) Closest strain (Similarity, %)	指示菌抑菌圈直径 Diameter of indicator bacteriostatic zone (mm)								
		金黄色 葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	枯草芽 孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	铜绿假 单胞菌 <i>P. aeru- ginosa</i>	黑曲霉 <i>A. niger</i>	白色念 珠菌 <i>C. albi- cans</i>	马铃薯 干腐病菌 <i>F. coe- ruleum</i>	番茄灰 霉病菌 <i>B. cin- erea</i>	小麦赤 霉病菌 <i>G. sau- binetii</i>
YIM 150601	<i>Streptomyces hydroge- nans</i> (100)	11	10	12	-	8	16	10	-	12
YIM 150605	<i>Exiguobacterium acetyl- icum</i> (99.63)	-	-	-	9	-	-	-	-	-
YIM 150618	<i>Acinetobacter johnsonii</i> (99.20)	4	-	-	-	-	-	10	6	-
YIM 150619	<i>Bacillus zhangzhouensis</i> (100)	6	-	-	-	-	6	-	-	-
YIM 150624	<i>Streptomyces glomer- oaurantiacus</i> (99.53)	7	6	6	-	-	-	9	-	-
YIM 150634	<i>Streptomyces youssou- fiensis</i> (99.88)	-	9	8	-	15	10	15	16	17
YIM 150644	<i>Streptomyces globis- porus</i> (99.88)	-	-	-	-	-	-	8	-	-
YIM 150654	<i>Planococcus maritimus</i> (99.63)	-	-	-	-	-	7	-	-	-
YIM 150655	<i>Bacillus altitudinis</i> (100)	-	8	-	-	-	-	-	-	-
YIM 150680	<i>Rhodococcus corynebac- terioides</i> (99.88)	-	-	-	-	-	-	11	-	-
YIM 150699	<i>Staphylococcus pasteuri</i> (100)	-	9	-	-	-	-	-	-	-
YIM150701	<i>Psychrobacter fozii</i> (99.64)	-	-	-	7	-	-	-	-	-
YIM 150709	<i>Streptomyces albogriseo- lus</i> (100)	6	11	12	-	-	-	-	-	-
YIM 150719	<i>Chryseomicrobium</i> <i>amylolyticum</i> (99.88)	-	-	-	7	-	-	-	-	-
YIM 150781	<i>Kocuria rosea</i> (99.76)	-	8	-	-	-	-	-	-	-
YIM 150791	<i>Bacillus siamensis</i> (99.88)	-	-	13	6	-	-	7	-	-
YIM 150806	<i>Streptomyces coelicofla- vus</i> (100)	-	9	8	-	-	-	-	-	-
YIM 150827	<i>Psychrobacter celer</i> (99.76)	-	-	6	-	-	-	-	-	-
YIM 150833	<i>Brevibacillus borstelensis</i> (100)	-	-	10	-	-	-	-	8	-
YIM 150840	<i>Barrientosiimonas humi</i> (99.88)	8	-	-	-	-	-	-	-	-
YIM 150866	<i>Bacillus licheniformis</i> (99.63)	-	4	6	-	-	-	-	-	-
YIM 150867	<i>Nocardopsis flavescens</i> (99.50)	7	-	7	-	-	-	-	-	-
YIM 150875	<i>Streptomyces coelicofla- vus</i> (100)	9	-	7	-	-	-	-	-	-
YIM 150957	<i>Pseudomonas zhaodon- gensis</i> (99.25)	-	10	4	6	-	-	-	-	-
YIM 150963	<i>Pseudomonas oryzihabi- tans</i> (100)	4	-	-	-	-	-	7	6	-
YIM 150993	<i>Brevundimonas terrae</i> (99.40)	4	8	8	-	-	-	-	-	-

注:“-”表示无抑菌圈

Note:“-” means no indicator bacteriostatic zone

表 5 基因组中含有功能基因的阳性菌株

Table 5 Positive strains with functional genes in the genome

菌株 Strain	相似菌株(相似性,%) Closest strain (Similarity, %)	二萜类 Diterpenes	路邓素 Lugdunin	环缩肽类 Teixobactin	盐霉素 Salinomycin	聚酮合酶-II PKS-II	雷纳霉素 Leinamycin	戊二酰亚胺类 Glutarimide
YIM 150606	<i>Planococcus citreus</i> (99.88)	-	-	+	+	-	-	-
YIM 150640	<i>Kocuria polaris</i> (100.00)	-	-	-	+	-	-	-
YIM 150680	<i>Rhodococcus corynebacterioides</i> (99.88)	-	-	-	-	-	+	-
YIM 150711	<i>Streptomyces althiolicus</i> (99.64)	-	-	-	-	-	+	-
YIM 150712	<i>Streptomyces flavovirens</i> (100.00)	-	-	-	-	+	-	-
YIM 150735	<i>Pseudonocardia tropica</i> (100.00)	+	-	-	-	-	-	-
YIM 150756	<i>Microbacterium paraoxydans</i> (100.00)	+	-	-	-	-	-	-
YIM 150757	<i>Streptomyces badius</i> (99.76)	+	-	-	+	-	-	-
YIM 150778	<i>Rhodococcus cerastii</i> (100.00)	-	-	-	-	-	+	-
YIM 150779	<i>Saccharopolyspora gregorii</i> (99.75)	+	-	-	-	-	-	-
YIM 150791	<i>Bacillus siamensis</i> (99.88)	+	-	-	-	-	+	-
YIM 150829	<i>Arthrobacter crystallopietes</i> (99.77)	+	-	-	-	-	-	-
YIM150830	<i>Dietzia cercidiphylli</i> (100.00)	+	-	-	-	-	-	-
YIM 150853	<i>Nocardioides glacieisoli</i> (98.23)	+	-	-	-	-	-	-
YIM 150856	<i>Psychrobacter faecalis</i> (99.75)	-	+	-	-	-	-	-
YIM 150867	<i>Nocardiopsis flavescens</i> (99.50)	+	-	-	-	-	-	-
YIM 150906	<i>Rhodococcus cercidiphylli</i> (100.00)	-	-	-	-	+	+	-
YIM 150909	<i>Streptomyces puniceus</i> (100.00)	+	-	-	+	-	-	-
YIM 150927	<i>Psychrobacter maritimus</i> (99.76)	+	-	-	+	-	-	-
YIM 150963	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i> (100.00)	+	-	-	+	-	-	-

注:“+”阳性;“-”阴性

Note:“+” Positive;“-” Negative

3 讨论

本研究通过高通量测序技术对广西北部湾局部海域海洋沉积物 4 份混合样进行测序,结果显示 3 个平行样品的测序结果均存在一定差异,可能是样品混合不均匀所导致。高通量测序旨在客观、全面地揭示环境样品中细菌多样性和群落组成,由于高通量测序

所需样品量少,若样品混合不均匀,则实验结果不能真实反映样品中微生物群落组成。因此,为确保测序结果的准确性,较为全面地揭示环境样品中微生物群落的组成及多样性,采集的样品应充分混合后再进行测序,尽可能减少取样测序时的人为误差。

纯培养结果揭示,广西北部湾局部海域海洋沉积物蕴藏着丰富的细菌资源。本研究从 4 份海洋沉积

物样品中分离出 278 株细菌,就放线菌而言,链霉菌是优势菌,但稀有放线菌(非链霉菌)有 17 个属,表明海洋生境蕴含着丰富的稀有放线菌资源,与 Subramani 等^[12]报道结果一致。在属分类水平上,除放线菌有 18 个属外,芽孢杆菌有 6 个属,该结果可能与样品预处理有关;放线菌抗逆性强,80.0℃ 热处理 1.0 h 有利于放线菌孢子萌发^[33];而芽孢有很强的热抵抗力,所以分离到的芽孢杆菌也较多^[34]。此外,除几丁质培养基外,本实验所用的 5 种培养基均是由石松标等^[16]、王聪等^[18]、彭云霞等^[19]、姜怡等^[35]、曹艳茹等^[36]研究证实的分离细菌效果较好的培养基,尤其是放线菌。但就本实验而言,HV 培养基分离效果最好,其次是海藻糖-天冬酰胺培养基,而 M3 培养基的分离效果最差。结果表明,培养基的分离效果可能受样品类型、采样位置等因素的影响。

北部湾海洋微生物次级代谢产物多样性丰富。截至 2020 年,多位研究者已从北部湾海洋微生物中分离出 110 个化合物,其中 53 个为新型天然产物^[37]。本研究通过抗菌活性和功能基因筛选实验评估广西北部湾局部海域海洋沉积物纯培养菌株的生物活性潜力。抗菌活性结果表明,76.34% 的菌株至少对 1 种指示菌有抑菌活性,其中链霉菌 YIM 150601、YIM 150634 的抑菌谱最广、抑菌活性最强,YIM 150853 为类诺卡氏菌属(*Nocardioide*s)的 1 个潜在新分类单元。基于“新产地、新菌种、新基因、新产物”的观点^[38],YIM 150853 应该有较好的生物活性,但抗菌活性和功能基因筛选结果却表明,YIM 150853 对 9 种指示菌均无抑菌活性,仅筛选到基因组中含有二萜类化合物的基因簇,该菌株具体的生物活性还有待进一步研究。此外,功能基因筛选和抗菌活性结果显示,与非放线菌相比,放线菌产生生物活性代谢物的潜力更大,更具有开发利用的价值。

近年来,来源于海洋放线菌的新型天然产物逐年增加。1997-2017 年,研究者从 28 个属的海洋放线菌中分离出 108 种新型天然产物,其中从 *Salinispora* 分离的 2 种天然产物和从链霉菌属分离的 1 种天然产物处于临床试验阶段^[12,39,40]。2017-2020 年,研究者从 5 个属的海洋放线菌中分离出 50 种环肽类化合物,这些化合物对枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、白色念珠菌和金黄色葡萄球菌均有抑菌活性,且对鳗弧菌有强烈抑菌活性的环二肽化合物及其衍生物占 68%^[41-46]。因此,加强广西北部湾海域海洋沉积物细菌资源的研究,特别是放线菌的生物活性研究,有望

提高发现先导化合物的概率,可为新型药物的开发提供候选菌株。

4 结论

本研究使用高通量测序和纯培养技术对广西北部湾局部海域海洋沉积物细菌多样性进行研究,结果表明,该海域海洋沉积物中蕴藏着丰富的细菌资源,但由于现阶段纯培养技术的缺陷,仅分离纯化出极少部分菌株。对分离出的可培养菌株进行生物活性评估,结果表明,大量纯培养菌株具有抗菌活性,且部分菌株具有产生活性代谢物的基因簇。综上可知,广西北部湾海域海洋沉积物除了蕴含丰富的细菌资源外,还含有丰富多样的生物合成基因簇及生物活性代谢物。挖掘更多的海洋细菌资源对于今后开发具有新的生物活性化合物具有重大意义。

参考文献

- [1] MORENS D M, FOLKERS G K, FAUCI A S. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases [J]. *Nature*, 2004, 430(6996): 242-249.
- [2] KHAN S N, KHAN A U. Breaking the spell: Combating multidrug resistant superbugs [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 174-184.
- [3] ZOTCHEV S B. Marine actinomycetes as an emerging resource for the drug development pipelines [J]. *Journal of Biotechnology*, 2012, 158(4): 168-175.
- [4] JENSEN P R, DWIGHT R, FENICAL W. Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57(4): 1102-1108.
- [5] GOODFELLOW M, FIEDLER H P. A guide to successful bioprospecting: Informed by actinobacterial systematics [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2010, 98(2): 119-142.
- [6] JENSEN P R. Linking species concepts to natural product discovery in the post-genomic era [J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2010, 37(3): 219-224.
- [7] BULL A T, WARD A C, GOODFELLOW M, et al. Search and discovery strategies for biotechnology: The paradigm shift [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000, 64(3): 573-606.
- [8] FENICAL W. Chemical studies of marine bacteria: Developing a new resource [J]. *Chemical Reviews*, 1993, 93(5): 1673-1683.
- [9] SKROPETA D, WEI L. Recent advances in deep-sea

- natural products [J]. *Natural Product Reports*, 2014, 31(8):999-1025.
- [10] ELLAIAH P, REDDY A P C. Isolation of actinomycetes from marine sediments off Visakhapatnam, east coast of India [J]. *Indian J Mar Sci*, 1987, 16(2):134-135.
- [11] LAM K S. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2006, 9(3):245-251.
- [12] SUBRAMANI R, SIPKEMA D. Marine rare actinomycetes: A promising source of structurally diverse and unique novel natural products [J]. *Marine Drugs*, 2019, 17(5):249-288.
- [13] 于清武. 北部湾(广西海域)海洋微生物多样性研究现状与对策[J]. *南方农业学报*, 2014, 45(12):2293-2296.
- [14] EDGAR R C. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads [J]. *Nature Methods*, 2013, 10(10):996-998.
- [15] HAYAKAWA M, NONOMURA H. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes [J]. *Journal of Fermentation Technology*, 1987, 65(5):501-509.
- [16] 石松标, 杨立芳, 姜明国, 等. 广西北部湾茅尾海红树林生境放线菌分离培养基的比较[J]. *微生物学通报*, 2018, 45(11):2331-2340.
- [17] SHIRLING E B, GOTTLIEB D. Methods for characterization of *Streptomyces* species [J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1966, 16(3):313-340.
- [18] 王聪, 王坤, 姜明国, 等. 广西北部湾放线菌的分离筛选及活性产物的鉴定[J]. *天然产物研究与开发*, 2019, 31(7):1170-1176.
- [19] 彭云霞, 姜怡, 段淑蓉, 等. 稀有放线菌的选择性分离方法[J]. *云南大学学报:自然科学版*, 2007, 29(1):86-89.
- [20] ORSINI M, ROMAN-SPICA V. A microwave-based method for nucleic acid isolation from environmental samples [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2001, 33(1):17-20.
- [21] KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1980, 16(2):111-120.
- [22] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4):406-425.
- [23] LUDLOW E J, VASSILIADIS S, EKANAYAKE P N, et al. Analysis of the indole diterpene gene cluster for biosynthesis of the epoxy-janthitrems in *Epichloë* endophytes [J]. *Microorganisms*, 2019, 7(11):560-581.
- [24] ZIPPERER A, KONNERTH M C, LAUX C, et al. Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization [J]. *Nature*, 2016, 535(7613):511-516.
- [25] LING L L, SCHNEIDER T, PEOPLES A J, et al. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance [J]. *Nature*, 2015, 517(7535):455-459.
- [26] KNIRSCHOVÁ R, NOVÁKOVÁ R, FECKOVÁ L, et al. Multiple regulatory genes in the salinomycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces albus* CCM 4719 [J]. *Folia Micro Biologica*, 2007, 52(4):359-365.
- [27] METSÄ-KETELÄ M, SALO V, HALO L, et al. An efficient approach for screening minimal PKS genes from *Streptomyces* [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, 180(1):1-6.
- [28] PAN G, XU Z, GUO Z, et al. Discovery of the leinamycin family of natural products by mining actinobacterial genomes [J]. *PNAS*, 2017, 114(52):E11131-E11140.
- [29] SANDAL I, BHATTACHARYA A, SAINI U, et al. Chemical modification of L-glutamine to alpha-amino glutarimide on autoclaving facilitates *Agrobacterium* infection of host and non-host plants: A new use of a known compound [J]. *BMC Chemical Biology*, 2011, 11(1):1-13.
- [30] 邓洪斌, 李电东, 蔡年生, 等. 戊二酰亚胺类抗生素 S632 最新研究进展[J]. *中国新药杂志*, 2011, 20(23):2321-2325.
- [31] KIM M, OH H S, PARK S C, et al. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(2):346-351.
- [32] VANDAMME P, POT B, GILLIS M, et al. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics [J]. *Microbiological Reviews*, 1996, 60(2):407-438.
- [33] 原野, 何山. 海洋稀有放线菌的选择性分离方法[J]. *宁波大学学报:理工版*, 2014, 27(3):12-17.
- [34] 黄忠民, 郭鼎, 潘治利, 等. 生孢梭菌芽孢萌发条件的优化[J]. *现代食品科技*, 2021, 37(2):49-55.
- [35] 姜怡, 曹艳茹, 王茜, 等. 波罗的海放线菌的多样性[J]. *微生物学报*, 2011, 51(11):1461-1467.
- [36] 曹艳茹, 姜怡, 王茜, 等. 川滇四区森林土壤纯培养放线菌多样性及生物活性[J]. *微生物学报*, 2010, 50(8):995-1000.

- [37] 徐新亚, 杨宏, 宁小清, 等. 北部湾海洋微生物物种多样性与化学多样性研究进展[J]. 广西科学, 2020, 27(5): 433-450, 461.
- [38] JIANG Y, CAO Y R, ZHAO L X, et al. Large numbers of new bacterial taxa found by Yunnan Institute of Microbiology [J]. Chinese Science Bulletin, 2011, 56(8): 709-712.
- [39] ZOTCHEV S B. Marine actinomycetes as an emerging resource for the drug development pipelines [J]. Journal of Biotechnology, 2012, 158(4): 168-175.
- [40] SUBRAMANI R, AALBERSBERG W. Marine actinomycetes: An ongoing source of novel bioactive metabolites [J]. Microbiological Research, 2012, 167(10): 571-580.
- [41] 姚蓉, 马明, 付晖, 等. 海洋放线菌 *Kocuria* sp. 次级代谢产物的研究[J]. 中国海洋药物, 2017, 36(3): 11-17.
- [42] 林真亭, 叶子坚, 庄玲萍, 等. 一株海洋放线菌抗菌活性物质的分离与结构解析[J]. 江西农业大学学报, 2017, 39(3): 559-566.
- [43] 张岗, 庄玲萍, 许莉, 等. 海洋来源放线菌 HN-E31 次生代谢产物的分离与鉴定[J]. 江西农业大学学报, 2018, 40(5): 1055-1061.
- [44] 吉才娟, 王佩, 梅文莉, 等. 海洋放线菌 *Streptomyces* sp. HNWSW-49 的次生代谢产物研究[J]. 热带作物学报, 2018, 39(4): 758-762.
- [45] 谢春兰, 苏瑞强, 杨全. 海洋放线菌 *Nocardiopsis* sp. SCSIO 11492 的抗肿瘤活性成分研究[J]. 广东药科大学学报, 2017, 33(4): 448-452.
- [46] 于鑫, 韦霞, 冯婵, 等. 海洋放线菌 *Streptomyces novae-caesareae* 次生代谢产物[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2019, 58(3): 63-70.

Bacterial Diversity and Bioactivity Assessment of Marine Sediments in Partial Sea Area of Beibu Gulf of Guangxi

YANG Shaojuan¹, CHEN Xuemei¹, SHEN Rui¹, AN Defeng¹, CAI Hanqin², JIANG Mingguo², JIANG Yi¹

(1. College of Life Science, Yunnan University, Kunming, Yunnan, 650091, China; 2. College of Marine and Biotechnology, Guangxi University for Nationalities, Nanning, Guangxi, 530008, China)

Abstract: In order to effectively explore new marine natural microbial resources, the marine sediment samples from partial sea area of Beibu Gulf of Guangxi were taken as the research objects in this study. The bacterial community composition and diversity in the marine sediment samples were analyzed by high-throughput sequencing technology and pure culture separation method. The antibacterial activity of pure culture strains was detected by double agar diffusion method. The positive strains containing 7 functional genes in the genome were screened by PCR amplification method. High-throughput sequencing results showed that 1 407 OTUs (Operational Taxonomic Units) were detected in marine sediments. At the phylum level, Proteobacteria had the highest species abundance, followed by Firmicutes and Acidobacteria. 278 strains of bacteria were isolated and purified from pure culture, which distributed in 3 phyla, 5 classes, 16 orders, 24 families, 31 genera. Among them, YIM 150853 was a potential new isolation unit. The Bioactivity evaluation experiments showed that 76.34 % of the purely cultured strains had an inhibitory effect on at least one indicator bacterium, of which *Streptomyces* YIM 150601 and YIM 150634 had broad antibacterial spectrum and strong antibacterial activity. The detection rate of functional genes in actinomycetes was higher than that in non-actinomycetes. There are abundant bacterial resources in the marine sediments of the Beibu Gulf in Guangxi. Purely cultured strains have antibacterial and the potential of synthesizing biological active products.

Key words: marine sediment, bacteria, diversity, antibacterial activity, functional genes

责任编辑: 米慧芝, 唐淑芬