

◆特邀栏目◆

广西北部湾海域表层海水细菌多样性及其潜在生物合成基因研究^{*}李菲¹, 苏芯莹¹, 李喆², 王巧贞², 黄庶识², 杨慧欢³, 覃仙玲^{1**}

(1. 广西科学院, 广西近海海洋环境科学重点实验室, 广西南宁 530007; 2. 广西科学院, 广西海洋天然产物与组合生物合成化学重点实验室, 广西南宁 530007; 3. 南宁学院机电与质量技术工程学院, 广西南宁 530200)

摘要:本研究选取广西北部湾3处近海海域,以其表层海水作为研究对象进行细菌多样性分析,旨在挖掘潜在抗生素生物合成的菌株。选用传统稀释涂布法和基于16S rRNA基因序列的系统发育树分析海水中可培养细菌多样性,并对其基因组DNA进行抗生素生物合成基因聚酮合酶(PKS)基因、非核糖体肽合成酶(NRPS)基因及卤化酶(Halo)基因的扩增及检测。从海水中共分离到252株细菌,隶属于4门37属52种,变形菌门(Proteobacteria)是绝对优势类群(占总株数的68.25%),其后依次为放线菌门(Actinobacteria, 17.06%)、厚壁菌门(Firmicutes, 8.73%)和拟杆菌门(Bacteroidetes, 5.95%)。在属水平,假单胞菌属(*Pseudomonas*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)是主要的优势类群,共占总株数的38.89%。在4种分离培养基中,2216E培养基中分离细菌的数目与种类最多(83株,37种),其多样性指数均较高。分离获得的细菌新颖性突出,10株细菌与其近缘菌株16S rRNA基因的最高相似度低于98.65%,推测其为潜在的新种。此外,22株细菌的基因组DNA均扩增出至少1种次级代谢产物合成基因。综上所述,广西北部湾海域表层海水中可培养细菌多样性丰富,新颖性突出,可对含有抗生素生物合成基因的菌株进一步开展次级代谢产物的化学研究。

关键词:广西北部湾 表层海水 细菌 多样性 抗生素生物合成基因

中图分类号:Q939.1 文献标识码:A 文章编号:1002-7378(2022)01-0076-12

DOI:10.13657/j.cnki.gxkxyxb.20220421.010

海洋是地球上最大的水生生态系统,约占地球总表面积的71%。海洋中海流、波浪、潮汐和风暴潮等

海水运动,可引起营养物质大规模的水平/垂直运输^[1,2]。在洋流的驱动下,体积小、扩散能力强的微

收稿日期:2022-03-02

* 广西自然科学基金项目(2018GXNSFBA281011),广西科学院基本科研业务费资助项目(2018YJJ902)和国家自然科学基金项目(42066002)资助。

【作者简介】

李菲(1988-),女,助理研究员,主要从事广西北部湾海洋微生物多样性研究,E-mail:finylee@yeah.net。

【**通信作者】

覃仙玲(1989-),女,助理研究员,主要从事海洋生物研究,E-mail:048before@163.com。

【引用本文】

李菲,苏芯莹,李喆,等.广西北部湾海域表层海水细菌多样性及其潜在生物合成基因研究[J].广西科学院学报,2022,38(1):76-87.

LI F, SU X Y, LI Z, et al. Study on Biodiversity and Potential Biosynthetic Genes in Surface Seawater of Guangxi Beibu Gulf [J]. Journal of Guangxi Academy of Sciences, 2022, 38(1): 76-87.

生物遍布海洋的每个角落,承担着海洋生态系统中养分循环和能量流动^[3,4]。庄康等^[5]指出,与陆地微生物相比,海洋微生物在物种类群、生理代谢通路及代谢产物等方面都更具新颖性和多样性。故利用可培养方法来获得海洋微生物资源,开展其生理生化特征与生态功能研究,对物种库与功能基因库的开发和应用有着重要的意义。目前,关于广西北部湾海域中可培养微生物的研究大多集中在海洋沉积物、海洋动植物及红树林生态系统^[6,7],对海水中可培养微生物的研究鲜有报道,究其原因可能是海水中微生物的丰度、潜在新物种数量及其代谢功能均较海洋其他来源的微生物低,未获得广泛关注。本研究选取的3处近岸港湾分别为广西北部湾茅尾海(002 站位)、珍珠港(073 站位)和北仑河口(067 站位)。3处港湾的红树林生态系统生物群落丰富,加上大量的生蚝养殖,丰富了海水中的组成成分,加快了能量和物质循环速度,增强了微生物的生产力和有机质的代谢能力。此外,067 站位位于敞开式海域,002 站位和 073 站位属于半封闭内海,使得3处海域中海水的硅酸盐、铵盐及盐度等理化指标上存在较大差异。

本课题组致力于海洋沉积物、海洋动植物及红树林生态系统中可培养微生物的分离鉴定及功能菌株的挖掘^[8-11],深知开展微生物次级代谢活性物质的分离、纯化、组成和结构解析等工作需要花费大量的精力、时间和费用,且往往会遇到次级代谢产物率低、重现性差和反复挖掘等问题^[12]。此外,从微生物中分离到的化合物种类,远远多于其基因组中次级代谢产物生物合成基因簇的数目,即有为数不少的基因簇在实验室条件下表达量低或不表达,难以在传统研究中被发现^[13,14]。因此,通过次级代谢产物生物合成基因筛选这一种快速发现新型化合物的方法,能高效提升筛选速度。其中,PKS是一种多功能酶复合物,催化如阿维菌素、雷帕霉素、红霉素等聚酮类化合物的合成^[15];NRPS则是一种非核糖体肽合成酶,催化如环孢菌素、博来霉素、达托霉素等多肽类化合物的合成^[16]。Halo是一种具有修饰作用的酶,通过改变化合物的空间和电子效应,赋予微生物次级代谢产物生物活性,如黄素依赖型卤化酶^[17]。本研究选取广西北部湾海域的3个站位,以其表层海水作为研究对象,通过4种分离培养基、分子鉴定和系统发育分析,获取海水中可培养细菌的多样性信息,并利用PKS I型、PKS II型、NRPS和Halo合成基因,对可培养海洋细菌的基因组DNA进行筛选,挖掘潜在合

成活性代谢产物的能力,为深入研究表层海水来源的海洋细菌多样性及其功能提供前期基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

2021年8月中旬,采集广西北部湾海域中3处站位的海水样品,取样点见图1。3个站位分别为茅尾海(002 站位)、珍珠港(073 站位)和北仑河口(067 站位)。对每个站位采集3 L表层海水(0.5 m 深度)样品。随船记录水温、盐度、pH值及溶解氧等环境参数,营养盐、化学需氧量(COD)、悬浮物及细菌总数等各指标均待收集水样后带回实验室测定,研究细菌多样性的水样置于50 mL 无菌离心管中,4℃低温保藏备用。

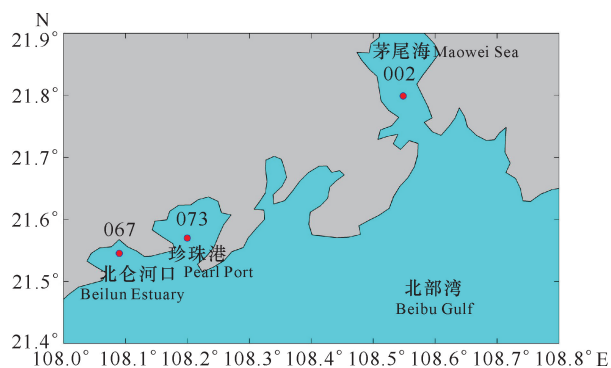


图1 北部湾海域取样点

Fig. 1 Sampling sites in Beibu Gulf

1.1.2 培养基

(1)4种分离培养基:2216E 固体培养基(青岛海博生物技术有限公司);改良高氏一号固体培养基(GN培养基,可溶性淀粉10.0 g,葡萄糖1.0 g,甘油10 mL,复合盐母液10 mL,琼脂14.0 g,去离子水1 000 mL);P7 固体培养基(L-酪氨酸0.5 g,L-天门冬酰胺1.0 g,甘油10 mL,复合盐母液10 mL,琼脂14.0 g,去离子水1 000 mL,pH值7.2-7.4);M5 固体培养基(海藻糖5.0 g,脯氨酸1.0 g,琼脂14.0 g,陈海水1 000 mL,pH值7.2-7.4)。复合盐母液配方为KNO₃ 1.0 g,NaCl 15.0 g,MgSO₄·7H₂O 0.5 g,K₂HPO₄ 0.5 g,NH₄NO₃ 0.1 g,FeSO₄ 0.01 g,去离子水10 mL。

(2)纯化培养基:改良ISP2 固体培养基(麦芽提取粉2.0 g,酵母粉2.0 g,葡萄糖2.0 g,去离子水1 000 mL,海盐25.0 g,琼脂14.0 g)。

(3)含氨苄的LB 固体培养基:酵母粉5.0 g,蛋

白肱 10.0 g, 氯化钠 5.0 g, 氨苄青霉素 100 mg, 琼脂 13.0 g, 超纯水 1 000 mL, pH 值为 7.2–7.4。

1.2 方法

1.2.1 海水参数测定

作业现场采用多参数水质分析仪 (JFE AAQ171, 日本) 测定水温、盐度、pH 值及溶解氧; 参照《海洋监测规范》(GB 17378.1–2007), 对营养盐 (氨氮、硝酸氮、亚硝酸氮、磷酸盐及硅酸盐)、化学需氧量、悬浮物浓度及细菌总数等指标进行测定。

1.2.2 菌株分离纯化

用无菌水将样品稀释成 10^{-1} 、 10^{-2} 和 10^{-3} 浓度的样液, 取 100 μ L 稀释后的样液涂布至 4 种固体培养基中, 每个梯度两个平行, 28 $^{\circ}$ C 培养 5–7 d, 挑取肉眼可见菌落进行纯化培养, 记录其形态特征和菌落数, 以 30% (V:V) 甘油-ISP2 混合液作为保护剂, 将纯化好的菌株保藏于 -80° C。

1.2.3 16S rRNA 基因测序和系统发育分析

用无菌牙签挑取少量培养好的菌苔, 放置于装有无菌 chelex-100 树脂^[18]的管子中进行研磨, 100 $^{\circ}$ C 加热 10 min 后, 5 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 (细菌的 DNA) 为 PCR 模板, 再根据 Walsh 等^[19]的方法对其进行 PCR 扩增。扩增和测序引物均为细菌通用引物 27F 和 1492R, PCR 反应条件参照李菲等^[8]的方法设定。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测合格后, 委托生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测

表 1 抗生素生物合成基因的扩增引物

Table 1 Amplification primer of antibiotic biosynthetic gene

基因 Gene	引物名称 Primers's name	引物序列 (5'→3') Primer's sequence (5'→3')	目的片段长度 (bp) Target fragment length (bp)
NRPS	A3F	GCSTACSYSATSTACACSTCSGG	700–800
	A7R	SASGTCVCCSGTSCGGTAS	
PKS I	K1F	TSAAGTCSAACATCGGBCA	1 200–1 500
	M6R	CGCAGGTTSCSGTACCAGTA	
PKS II	KS α F	TSGCSTGCTTGAYGCSATC	500–750
	KS β R	TGGAANCCGCCGAABCCTCT	
Halo	B4-FW	TTCCSCGSTACCASATCGGSGAG	500–750
	B7-RV	GSGGGATSWMCCAGWACCASCC	

2 结果与分析

2.1 取样站点的海水理化性质

取样站点的的环境特征与海水理化性质如表 2 所

示。其中, 潜在新物种的 PCR 扩增产物用 Easy Pure Quick Gel Extraction Kit 试剂盒进行切胶回收, 将纯化好的 DNA 连接 pEASY-T1 克隆载体上, 转化至 Trans-T1 感受态细胞中, 涂布于含氨苄的 LB 固体培养基, 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后观察菌落情况, 随机挑取 5–6 个菌落, 用 PCR 法验证克隆的片段大小并送生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序。序列经 BioEdit Sequence Alignment Editor 软件整理后, 利用 EzBioCloud 数据库 (<https://www.ezbiocloud.net>) 进行在线比对^[20]; 选取同源性最高的菌株序列作为参比对象, 运用 MEGA7.0 软件, 采用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树, Bootstrap 1 000 次检测各分支的置信值, 对各菌株的系统发育地位进行分析^[21], 并使用 EvolView 对系统发育树进行美化处理^[22]。采用 Excel 软件计算 Simpson、Shannon-Wiener 和 Pielou 生物多样性指数^[23], 并用 SPSS 软件分析可培养细菌多样性与海水理化参数的 Pearson 相关性。

1.2.4 抗生素合成基因的扩增及检测

对 1.2.2 节提取到的细菌 DNA 进行 NRPS、PKS 和 Halo 基因扩增。引物信息见表 1, PCR 扩增参数参照文献^[24, 25]的方法进行设定。取 5 μ L 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 用凝胶成像仪观察结果并拍照。

示。3 处取样站点海水的营养盐含量、盐度、化学需氧量和悬浮物浓度均存在较大差异, 温度、pH 值、溶解氧含量等指标差别不大。

表 2 取样站位的环境特征与海水理化性质

Table 2 Environmental characteristics and seawater physicochemical properties of sampling stations

站点 Station	经纬度 Longitude and latitude	硅酸盐 ($\mu\text{mol/L}$) Silicate ($\mu\text{mol/L}$)	磷酸盐($\mu\text{mol/L}$) Phosphate ($\mu\text{mol/L}$)	铵盐($\mu\text{mol/L}$) Ammonium salt ($\mu\text{mol/L}$)	亚硝酸盐 ($\mu\text{mol/L}$) Nitrite ($\mu\text{mol/L}$)	硝酸盐 ($\mu\text{mol/L}$) Nitrate ($\mu\text{mol/L}$)	温度($^{\circ}\text{C}$) Temperature ($^{\circ}\text{C}$)
002	108°32'53.52" E 21°47'56.40" N	62.19	2.04	4.73	6.76	40.35	31.3
067	108° 05' 26.00" E 21° 32' 43.00" N	74.58	2.12	34.65	3.56	13.02	32.5
073	108° 11' 59.08" E 21° 34' 11.78" N	23.54	0.40	2.93	0.72	2.67	31.4

站点 Station	盐度 Salinity	pH 值 pH value	溶解氧含量 (mg/L) Content of dissolved oxygen (mg/L)	化学需氧量 (mg/L) Chemical oxygen demand (mg/L)	悬浮物浓度 (mg/L) Suspended solids concen- tration (mg/L)	细菌总数 (cfu/mL) Total bacterial count (cfu/mL)
002	15.486	7.415	5.22	2.36	1.67	115 000
067	8.844	7.530	7.10	5.43	7.37	64 000
073	30.352	8.000	5.13	0.95	8.60	460 000

2.2 表层海水中可培养细菌

本研究采集了广西北部湾3处近岸海域的表层海水样品,共获得252株海洋细菌,隶属于4门7纲20目25科37属52种(图2、图3)。变形菌门(Proteobacteria, 172株)、放线菌门(Actinobacteria, 43株)、厚壁菌门(Firmicutes, 22株)和拟杆菌门(Bacteroidetes, 15株)分别占总分离菌株的68.25%、17.06%、8.73%和5.95%[图2(a)]。在纲水平(图3), γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria, 114株)细菌数最多,占总菌数的45.24%;其次为 α -变形菌纲(Alphaproteobacteria, 50株, 19.84%)和放线菌纲(Actinomycetia, 43株, 17.06%)。此外,芽孢杆菌纲(Bacilli)、噬纤维菌纲(Cytophagia)、黄杆菌纲(Flavobacteria)和 β -变形菌纲(Betaproteobacteria)分别包含22株、10株、5株和8株细菌[图2(b)]。在属水平(图3),假单胞菌属(*Pseudomonas*)菌株最多,分离出33株(3种);其次是链霉菌属(*Streptomyces*)、假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*),分别获得25株(4种)、21株(2种)和19株(4种)。此外,袁其鹏属(*Qipengyuania*)、噬冷菌属(*Algoriphagus*)、交替单胞菌属(*Alteromonas*)和盐单胞菌属(*Halomonas*)中的菌种数分别为3个、3个、3个和2个,其余29个菌属中均仅分离到1种细菌。根据细菌16S rRNA基因相似度低于98.65%属于不同物种的归类原则^[26],本研究共分离培养出

10株细菌的潜在新种(表3),分别属黄杆菌纲、噬纤维菌纲、 α -变形菌纲和 γ -变形菌纲,其数目分别为4株、1株、2株和3株。

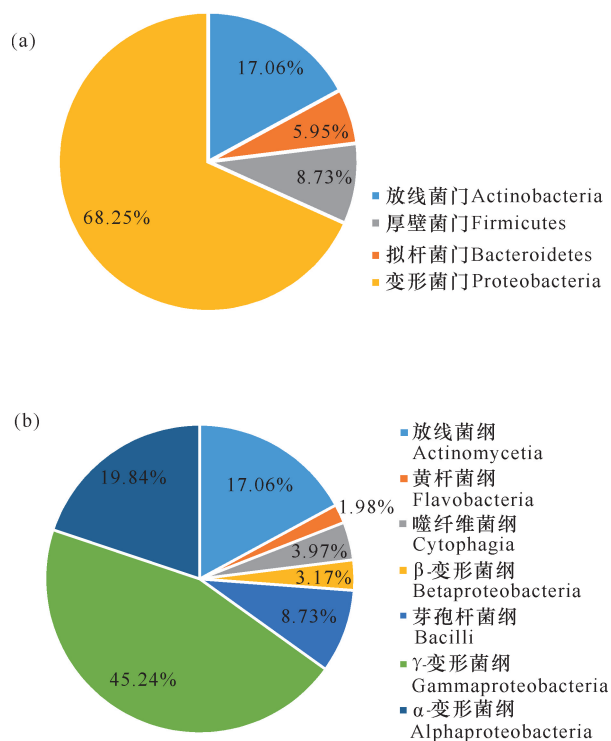
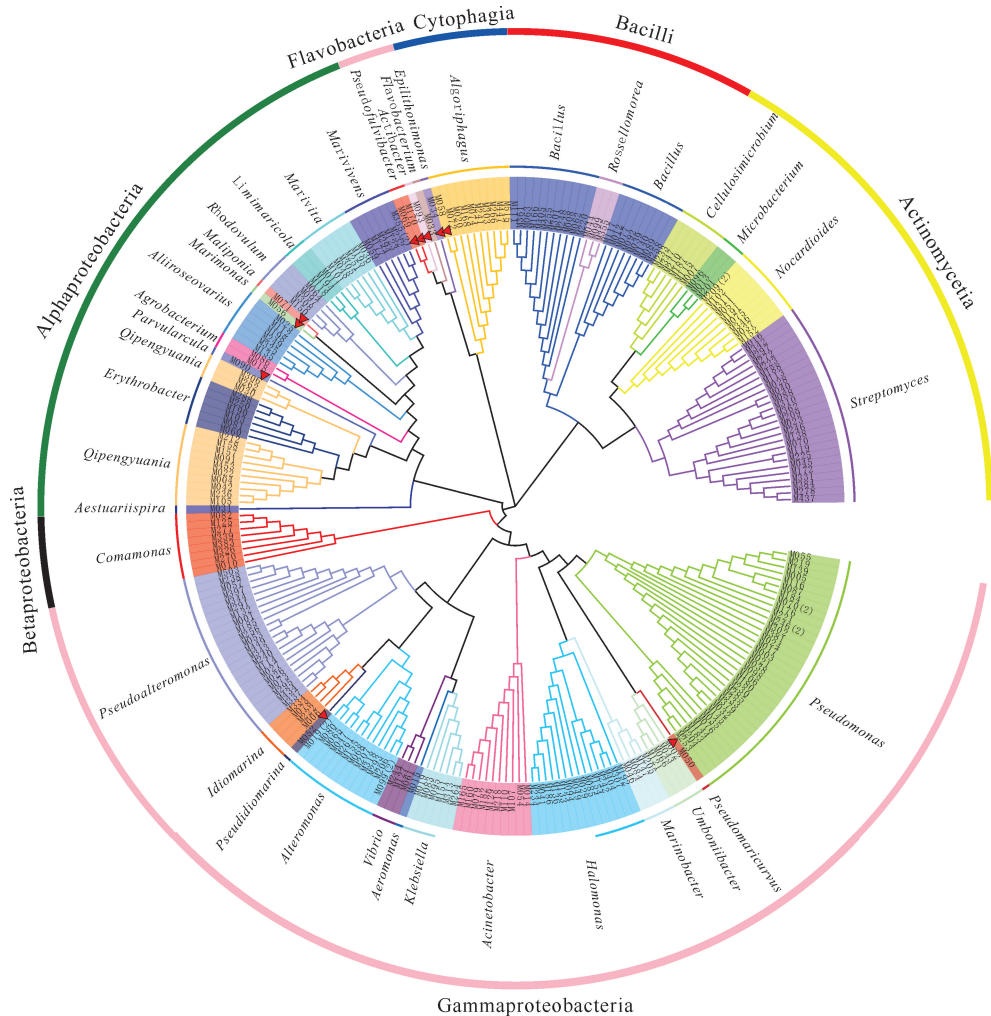


图2 表层海水可培养细菌在门(a)和纲(b)水平的组成分布
Fig. 2 Composition distribution of cultivable bacteria in surface seawater at phylum (a) and class (b) levels

对不同站位分离的细菌类群比较发现,002站位、067站位和073站位分别获得细菌76株(21属

25种)、102株(23属31种)和74株(16属19种)(表4)。其中,有8个属的细菌仅在002站位中分离得到,11个属的细菌仅在067站位中分离得到,4个属的细菌仅在073站位中分离获得,而有9个属的细菌在这3个站位均能分离得到(图4)。对3处站位细菌多样性与环境参数进行 Pearson 相关性分析,结果

显示,铵盐和溶解氧含量与细菌总数呈正相关性,存在显著性差异($P < 0.05$)。细菌种类与硅酸盐、盐度也存在显著性差异,硅酸盐、磷酸盐和盐度在3处海域的细菌多样性上有显著性差异(表5),而海水中的亚硝酸盐、硝酸盐、悬浮物及海水的 pH 值、温度、COD 与3处海域的细菌多样性不相关($P > 0.05$)。



红色三角符号表示该菌为潜在的新分类单元

The red triangle symbol indicates that the bacterium is a potential new taxonomic unit

图3 表层水体中海洋细菌的可培养细菌的系统发育树

Fig. 3 Neighboring phylogenetic tree of cultivable bacteria from surface seawater based on 16S rRNA sequences

表3 表层海水中潜在新型菌株

Table 3 Potential novel taxa of bacteria in surface seawater

菌株编号 Strain No.	相似菌株 Similar strains	相似度(%) Similarity (%)	分离培养基 Isolation medium
M170	<i>Pseudofulvibacter geojedonensis</i> YCS-9 ^T	93.17	2216E
M050	<i>Pseudomarcicurvus alkylphenolicus</i> KU41G ^T	94.77	2216E
M069	<i>Pseudofulvibacter geojedonensis</i> YCS-9 ^T	94.87	GN

续表

Continued table

菌株编号 Strain No.	相似菌株 Similar strains	相似度 (%) Similarity (%)	分离培养基 Isolation medium
M056	<i>Marimonas lutisalis</i> GH1-19 ^T	96.89	GN
M093	<i>Actibacter haliotis</i> W113 ^T	97.24	P7
M052	<i>Pseudidiomarina halophile</i> BH195 ^T	97.32	2216E
M058	<i>Algoriphagus ornithinivorans</i> IMSNU 14014 ^T	97.50	2216E
M071	<i>Maliponia aquimaris</i> CECT 8898 ^T	97.60	GN
M034	<i>Epilithonimonas mollis</i> DSM 18016 ^T	98.13	2216E
M090	<i>Parvularcula lutaonensis</i> CC-MMS-1 ^T	98.50	2216E

表 4 3 处站位及 4 种培养基中细菌属级群类分布

Table 4 Distribution of bacterial genera in three sites and four media

菌属 Genus	002 站位 Station 002	073 站位 Station 073	067 站位 Station 067	2216E	M5	P7	GN
海源杆菌属 <i>Idiomarina</i>	-	4	-	-	3	-	1
假海源菌属 <i>Pseudidiomarina</i>	-	1	-	1	-	-	-
交替单胞菌属 <i>Alteromonas</i>	-	5	7	4	8	-	-
假交替单胞菌属 <i>Pseudoalteromonas</i>	10	2	9	-	9	4	8
气单胞菌属 <i>Aeromonas</i>	1	-	-	-	-	1	-
克雷伯氏菌属 <i>Klebsiella</i>	1	2	3	5	-	-	1
弧菌属 <i>Vibrio</i>	-	-	3	-	-	2	1
<i>Pseudomaricurvus</i>	-	-	1	1	-	-	-
伞形杆菌属 <i>Umboniibacter</i>	-	-	4	2	1	1	-
不动杆菌属 <i>Acinetobacter</i>	6	2	2	5	-	-	5
假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	3	14	16	6	7	6	14
盐单胞菌属 <i>Halomonas</i>	8	4	2	3	6	2	3
海杆菌属 <i>Marinobacter</i>	-	-	4	-	1	3	-
丛毛单胞菌属 <i>Comamonas</i>	-	8	-	6	2	-	-
海滨杆菌属 <i>Actibacter</i>	-	-	1	-	-	1	-
假黄棕杆菌属 <i>Pseudo-fulvibacter</i>	2	-	-	1	1	-	-
黄杆菌属 <i>Flavobacterium</i>	-	-	1	1	-	-	-
<i>Epilithonimonas</i>	-	-	1	1	-	-	-
嗜冷菌属 <i>Algoriphagus</i>	1	-	9	4	6	-	-
芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	5	7	7	6	7	4	2
<i>Rosellomorea</i>	3	-	-	2	1	-	-
类诺卡氏菌属 <i>Nocardioideis</i>	5	4	-	4	-	5	-
链霉菌属 <i>Streptomyces</i>	3	7	15	12	6	-	7
纤维菌属 <i>Cellulosimicrobium</i>	-	6	-	-	4	2	-
微杆菌属 <i>Microbacterium</i>	1	1	1	-	-	-	3
红杆菌属 <i>Erythrobacter</i>	3	-	3	3	-	-	3

续表

Continued table

菌属 Genus	002 站位 Station 002	073 站位 Station 073	067 站位 Station 067	2216E	M5	P7	GN
袁其鹏属 <i>Qipengyuania</i>	3	5	5	4	4	5	-
滩螺菌属 <i>Aestuariuspira</i>	-	-	1	1	-	-	-
短小盒菌属 <i>Parvularcula</i>	-	-	1	1	-	-	-
土壤杆菌属 <i>Agrobacterium</i>	-	-	2	2	-	-	-
小红卵菌属 <i>Rhodovulum</i>	-	-	4	1	-	-	3
玫瑰变色菌属 <i>Aliiroseovarius</i>	6	-	-	2	2	2	-
<i>Marivita</i>	4	2	-	1	5	-	-
<i>Limimaricola</i>	3	-	-	2	-	1	-
<i>Marivivens</i>	6	-	-	2	3	-	1
<i>Maliponia</i>	1	-	-	-	1	-	-
<i>Marimonas</i>	1	-	-	-	1	-	-

注：“-”表示菌种数为 0

Note: “-” indicates that the number of strains is zero

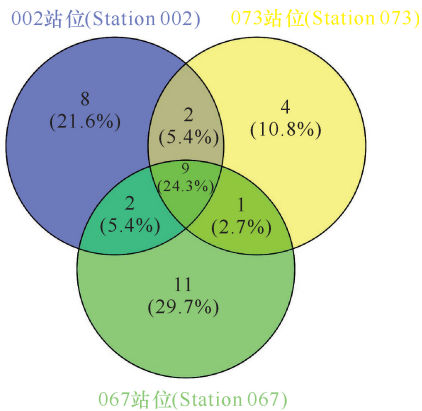


图 4 3 处站位来源海洋细菌属级群类的维恩分析

Fig. 4 Venn analysis of marine bacterial genera from three stations

2.3 培养基的分离效果

采用 4 种分离培养基对表层海水中海洋细菌进行培养, 分离到细菌多样性情况如表 6 所示。就多样性指数可知, 2216E 培养基的 Simpson 指数、Shannon-Wiener 指数和 Pielou 指数均高于 M5、P7

表 5 3 处站位细菌多样性与环境参数的 Pearson 相关性分析

Table 5 Pearson correlation analysis between bacterial diversity and some environmental parameters at three stations

项目 Item	r/P	硅酸盐 Silicate	磷酸盐 Phosphate	铵盐 Ammonium salt	盐度 Salinity	溶解氧含量 Content of dissolved oxygen
菌株数 Bacterial number	r	0.733	0.588	1.000	-0.780	1.000
	P	0.476	0.600	0.009	0.431	0.015
菌属数 Genus's number	r	0.999	0.971	0.755	-1.000	0.748

和 GN 培养基。在纲水平, α -变形菌纲、 γ -变形菌纲、放线菌纲和芽孢杆菌纲的细菌在 4 种培养基均能分离获得; 2216E 和 M5 培养基中均分离到 β -变形菌纲、黄杆菌纲和噬纤维菌纲的细菌, P7 培养基中分离到 1 株黄杆菌纲的细菌, GN 则未分离到 3 个纲的细菌。在属水平(表 4), 2216E、M5、P7 和 GN 培养基均获得盐单胞菌属(*Halomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)的细菌, 其中, 优势类群假单胞菌属在 GN 培养基中菌株数目最多; 作为本次分离培养的第二大优势类群, 链霉菌属(*Streptomyces*)在 2216E 培养基中菌株数目最多, 但在 P7 培养基中未分离到。此外, 分别有 7 个、2 个、2 个与 1 个属的细菌仅在 2216E、M5、P7 及 GN 培养基中被培养。其中, 2216E 培养基中分离出 6 株细菌的潜在新种, GN 和 P7 培养基中各培养出 3 株和 1 株(表 3)。

续表

Continued table

项目 Item	r/P	硅酸盐 Silicate	磷酸盐 Phosphate	铵盐 Ammonium salt	盐度 Salinity	溶解氧含量 Content of dissolved oxygen
	P	0.029	0.153	0.456	0.016	0.462
Shannon-Wiener 指数 Shannon-Wiener index	r	0.994	0.955	0.794	-0.999	0.788
	P	0.049	0.192	0.416	0.023	0.423
Simpon 指数 Simpon index	r	0.995	0.996	0.651	-0.985	0.643
	P	0.044	0.049	0.549	0.109	0.555
Pielou 指数 Pielou index	r	0.855	0.939	0.261	-0.816	0.251
	P	0.347	0.224	0.832	0.392	0.838

注: r 为 Pearson 相关性, P 为显著性(双侧)。加粗表示差异性显著 ($P < 0.05$)Note: r and P represent Pearson correlation and significance (bilateral) respectively. Bold font indicates significant difference ($P < 0.05$)

表 6 不同培养基分离到细菌多样性情况

Table 6 Diversity of bacteria isolated from different media

项目 Item	2216E	M5	P7	GN
菌种数 Species's number	37	27	16	18
菌属数 Genus's number	27	20	14	13
菌株数 Bacterial number	83	78	39	52
Simpon 指数 Simpon index	0.965	0.951	0.917	0.929
Shannon-Wiener 指数 Shannon-Wiener index	3.404	3.114	2.502	2.728
Pielou 指数 Pielou index	0.770	0.715	0.683	0.690

表 7 3 类生物合成基因在 22 种细菌中的分布

Table 7 Distribution of three antibiotic biosynthetic genes in 22 strains

供试菌株 Tested strains	相似菌名 Name of similar bacteria	抗生素生物合成基因 Antibiotic biosynthetic gene			
		PKS I	PKS II	NRPS	Halo
M018	<i>Agrobacterium larrymoorei</i> ATCC 51759 ^T	-	+	-	-
M072	<i>Algoriphagus marincola</i> DSM 16067 ^T	-	+	-	-
M020	<i>Algoriphagus sanaruensis</i> M8-2 ^T	-	+	-	+
M010	<i>Comamonas aquatica</i> NBRC 14918 ^T	-	-	-	+
M073	<i>Erythrobacter tepidarius</i> DSM 10594 ^T	-	+	-	+
M041	<i>Halomonas sulfidaeris</i> ATCC BAA-803 ^T	-	-	-	+
M006	<i>Idiomarina aquatic</i> SN-14 ^T	-	-	+	-
M019	<i>Klebsiella variicola</i> subsp. Tropica SB5531 ^T	+	+	-	-
M071	<i>Maliponia aquimaris</i> CECT 8898 ^T	-	+	-	+
M090	<i>Parvularcula lutaonensis</i> CC-MMS-1 ^T	-	+	-	+
M170	<i>Pseudofulvibacter geojedonensis</i> YCS-9 ^T	-	-	-	+

2.4 抗生素合成基因的检测结果

为了进一步评价 52 种细菌是否存在次级代谢产物生物合成的潜能, 对其进行 *PKS*、*NRPS* 和 *Halo* 基因的扩增。扩增和电泳检测结果(表 7)显示, 22 种细菌均至少扩增出 1 条目的条带, 即其含有 1 种次级代谢产物合成基因。其中, *PKS II* 基因在 15 株细菌中检测到; *Halo* 基因在 13 株细菌中检测到, 3 株细菌含 *PKS I* 基因和 2 株细菌检测到 *NRPS* 基因, 有 10 株细菌含 2 种或 2 种以上的生物合成基因簇。

续表

Continued table

供试菌株 Tested strains	相似菌名 Name of similar bacteria	抗生素生物合成基因 Antibiotic biosynthetic gene			
		PKS I	PKS II	NRPS	Halo
M050	<i>Pseudomarcicurvus alkylphenolicus</i> KU41G ^T	-	-	-	+
M038	<i>Pseudomonas balearica</i> DSM 6083 ^T	-	+	-	+
M008	<i>Pseudomonas oryzae</i> KCTC 32247 ^T	-	+	+	-
M024	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i> NBRC 102199 ^T	-	+	-	+
M030	<i>Qipengyuania citrea</i> RE35F/1 ^T	+	+	-	+
M022	<i>Qipengyuania flava</i> SW-46 ^T	-	+	-	-
M091	<i>Qipengyuania nanhaisediminis</i> CGMCC 1.7715 ^T	-	+	-	+
M045	<i>Streptomyces heilongjiangensis</i> NEAU-W2 ^T	-	-	-	+
M016	<i>Streptomyces koyangensis</i> VK-A60 ^T	+	-	-	-
M023	<i>Streptomyces violaceorectus</i> NBRC 13102 ^T	-	+	-	-
M061	<i>Vibrio astriarenae</i> JCM 19233 ^T	-	+	-	-

注:字体加粗表示潜在新物种;“+”表示菌株中含有抗生素合成基因,“-”表示菌株中未检测到抗生素合成基因

Note: Bold font indicates the potential new taxon; “+” indicates the strains contain antibiotic synthetic genes, “-” indicates antibiotic synthetic genes are not detected

3 讨论

从总体上看,该研究区域中海水可培养优势细菌类群与大多数前人研究报道^[22,27]较为一致,主要由 γ -变形菌、 α -变形菌、拟杆菌和放线菌等优势菌群组成。其中, γ -变形菌类群相对丰度最高(114株,45.24%),同时检测到海水中硝酸盐、磷酸盐、铵盐等无机盐浓度较高,两者是否存在关联,仍需要进一步去考证。此外,3处海域海水中的细菌群落组成存在明显差异。其中,细菌总数排序为珍珠港(073 站位)<茅尾海(002 站位)<北仑河口(067 站位),细菌种类排序为北仑河口(067 站位)>茅尾海(002 站位)>珍珠港(073 站位)。珍珠港(073 站位)内潮流畅通、水质清澈,随着养殖珍珠贝的数量减少,钢铁、火电和纸浆等工业快速发展,环境污染骤增,尤其是重金属类污染^[28]。作为相同半封闭内海,茅尾海(002 站位)是广西沿海最大的养殖区,由于受到周边江水汇集和经济发展的影响,海水中大量的营养物质聚集,重金属污染加剧^[29]。研究指出,重金属污染物可迅速地与悬浮物和沉积物结合而沉入海底,海水中重金属含量大大降低^[30]。此外,海水的重金属含量与细菌数量的分布呈不同程度的相关性,一定浓度的重金属含量可对细菌的生长起到促进作用^[30]。相比之下,敞开式浅水港湾北仑河口具有连片生长红树林,动植物种类组成和群落结构随海岸类型变化而呈

多样化等特征,加速了海水运动,提升了营养物质反复置速率,使得该区域表层海水盐度低,铵盐、硅酸盐和溶解氧含量高,更利于多种微生物生存。此外,海水运动驱使下,表层和底层菌群趋于平衡,进而丰富细菌类群组成。

本研究采用4种营养类型与浓度差异较大的培养基,分别对北部湾3处海域表层海水进行细菌的分离纯化培养。结果表明,2216E培养基分离到的细菌种类和数量最多,其次是M5培养基,P7和GN培养基分离到的最少。其中,GN培养基主要以淀粉、葡萄糖和甘油等碳源为主,常用于分离培养放线菌及观察其形态特征;GN培养基中分离到的两大放线菌类群链霉菌和微杆菌,在广西北部湾已发现的海洋细菌类群中占最高比例,在土壤、水体和植物内都占据绝对优势^[7,9];GN培养基中未筛选到拟杆菌门类群,大多数拟杆菌可产生多种功能的胞外酶^[31],而酶的合成与分泌需要大量的营养物质,尤其是氮源^[32],故推测该类群难以在单一营养源的GN培养基中生长。相比较,2216E培养基更适合分离培养海水中的细菌,获得潜在新分类单元的菌株数高于其他培养基。因此,在分离海水中可培养细菌时,可通过营养类型多元化来培养更多的细菌资源。

在52种细菌中,有22种细菌检测出抗生素生物合成基因,总阳性率为42.31%。相对于红树植物和沉积物来源细菌,本研究海水来源细菌中检测到的抗

生素生物合成基因率偏低,其可能原因是红树林生境中有机质较其他海洋区域的丰富^[33],富含动植物残体的脂素、蛋白和纤维素等营养物质,促使其菌落组成多样化,可加快能量和物质循环速度,增强生产力和有机质的降解活性^[34]。

4 结论

广西北部湾海域表层海水中具有丰富的可培养细菌,具有较高的物种多样性,蕴藏着潜在新物种资源,且具有合成聚酮类、非核糖体肽类化合物及卤化酶的潜能,为后续开展拮抗菌筛选工作及其活性化合物的研究提供理论基础依据。

参考文献

- [1] QU T D, GIRTON J B, WHITEHEAD J A. Deepwater overflow through Luzon Strait [J]. *Journal of Geophysical Research*, 2006, 111: C01002.
- [2] WANG X W, LIU Z Y, PENG S Q. Impact of tidal mixing on water mass transformation and circulation in the South China Sea [J]. *Journal of Physical Oceanography*, 2017, 47: 419-432.
- [3] SALAZAR G, CORNEJO-CASTILLO F M, BENITEZ-BARRIOS V, et al. Global diversity and biogeography of deep-sea pelagic prokaryotes [J]. *The ISME Journal*, 2016, 10: 596-608.
- [4] LIU J W, YANG H M, ZHAO M X, et al. Spatial distribution patterns of benthic microbial communities along the Pearl Estuary, China [J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2014, 37: 578-589.
- [5] 庄康, 胡晓娟, 曹煜成, 等. 不同寡营养培养条件下南海水体细菌群落结构及其对碳源的利用特征[J]. *微生物学报*, 2020, 47(9): 2697-2710.
- [6] 李菲, 李喆, 胡文进, 等. 广西茅尾海红树林土壤放线菌多样性及功能酶活性研究[J]. *海洋学报*, 2021, 43(2): 88-97.
- [7] 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.
- [8] 李菲, 高程海, 余炼, 等. 川蔓藻内生及根际细菌多样性与抑菌活性研究[J]. *广西植物*, 2018, 38(7): 924-933.
- [9] 李菲, 李喆, 黄媛林, 等. 角果木树皮来源放线菌多样性及生物活性初探[J]. *中国抗生素杂志*, 2021, 46(9): 845-853.
- [10] 李菲, 黄庶识, 胡文进, 等. 半红树植物海芒果内生与根际细菌多样性及抗农用真菌活性研究[J]. *中国抗生素杂志*, 2021, 46(5): 396-405.
- [11] 黄媛林, 潘信利, 陆璐, 等. 一株红树林链霉菌所产抑菌活性化合物的分离及其生物合成基因簇的研究[J]. *中国抗生素杂志*, 2021, 46(12): 1090-1101.
- [12] 郑洁, 庾利, 李伟, 等. 江苏盐城沿海滩涂湿地放线菌多样性及功能基因的筛选[J]. *遵义医学院学报*, 2019, 42(3): 282-290.
- [13] ZAZOPOULOS E, HUANG K, STAFFA A, et al. A genomics-guided approach for discovering and expressing cryptic metabolic pathways [J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21: 187-190.
- [14] 侯路宽, 李花月, 李文利. 隐性次级代谢产物生物合成基因簇的激活及天然产物定向发现[J]. *微生物学报*, 2017, 57(11): 1722-1734.
- [15] 马敏, 唐敏, 洪葵. 四种红树植物根际土壤微生物 I 型和 II 型 PKS 基因的检测与多样性分析[J]. *微生物学通报*, 2013, 40(7): 1231-1240.
- [16] 李红玲. 非核糖体肽合成酶结构研究进展[J]. *临床合理用药*, 2013, 6(10 上): 180-181.
- [17] 高鹏, 郗丽君, 朴玉华, 等. 不同生境放线菌的卤化酶基因分析及其对卤代产物筛选的意义[J]. *微生物学报*, 2009, 49(10): 1367-1373.
- [18] 周双清, 黄小龙, 黄东益, 等. Chelex-100 快速提取放线菌 DNA 作为 PCR 扩增模板 [J]. *生物技术通报*, 2010(2): 123-125.
- [19] WALSH P S, METZGER D A, HIGUCHI R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material [J]. *Biotechniques*, 1991, 10(4): 506-513.
- [20] KIM K H, ROH S W, CHANG H W, et al. *Nocardio-ides basaltis* sp. nov. isolated from black beach sand [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59: 42-47.
- [21] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7. 0 for bigger datasets [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [22] 夏呈强, 李毅, 党延茹, 等. 中印度洋与南海西部表层海水细菌多样性[J]. *生物多样性*, 2022, 30(1): 91-100.
- [23] 李菲, 李喆, 覃仙玲, 等. 山口红树林土壤芽孢杆菌多样性及纤维素酶活性筛选研究[J]. *广西科学*, 2021, 28(5): 473-481.
- [24] 王海强, 安向向, 侯淑芬, 等. 39 株内生放线菌次级代谢产物的合成潜能[J]. *河北大学学报(自然科学版)*, 2017, 37(3): 254-261.
- [25] 王玉梅. 海洋链霉菌卤化酶基因筛选阳性菌株的活性物质研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2014.
- [26] KIM M, OH H S, PARK S C, et al. Towards a taxo-

- onomic 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: 346-351.
- [27] POMMIER T, CANBÄCK B, RIEMANN L, et al. Global patterns of diversity and community structure in marine bacterioplankton [J]. *Molecular Ecology*, 2007, 16: 867-880.
- [28] 吴祥庆, 黎小正, 兰柳春, 等. 广西防城珍珠港珍珠养殖区表层沉积物重金属污染评价[J]. *海洋通报*, 2010, 29(5): 584-587.
- [29] 雷富, 陈宪云, 许铭本, 等. 广西茅尾海海水和表层物中重金属污染的调查及评价[J]. *广西科学院学报*, 2013, 29(3): 176-180, 185.
- [30] 杨柳凤, 刘云霞, 李素霞, 等. 茅尾海细菌分布与重金属含量相关性分析[J]. *环境保护科学*, 2018, 44(4): 109-113.
- [31] QIN Q L, ZHANG X Y, WANG X M, et al. The complete genome of *Zunongwangia profunda* SM-A87 reveals its adaptation to the deep-sea environment and ecological role in sedimentary organic nitrogen degradation [J]. *BMC Genomics*, 2010, 11: 247.
- [32] FRANKENA J, VERSEVELD H W V, STOUTHAMER A H. Substrate and energy costs of the production of exocellular enzymes by *Bacillus licheniformis* [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1988, 32: 803-812.
- [33] 孟昊, 薛智权, 唐杰, 等. 深圳福田红树林土壤可培养微生物和土壤酶活性研究[J]. *广东农业科学*, 2013, (1): 53-56.
- [34] 赵雅慧, 张舒琳, 吴家法, 等. 山口红树林根际土壤可培养细菌多样性及其活性筛选[J]. *海洋学报*, 2018, 40(8): 138-151.

Study on Biodiversity and Potential Biosynthetic Genes in Surface Seawater of Guangxi Beibu Gulf

LI Fei¹, SU Xinying¹, LI Zhe², WANG Qiaozhen², HUANG Shushi², YANG Huihuan³, QIN Xianling¹

(1. Guangxi Key Laboratory of Marine Environmental Science, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Marine Natural Products and Combinatorial Biosynthesis Chemistry, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China; 3. College of Electromechanic and Quality Engineering, Nanning University, Nanning, Guangxi, 530200, China)

Abstract: In this study, three characteristic sea areas in Beibu Gulf of Guangxi were selected, and the surface seawater was used as the research object for bacterial diversity analysis, aiming to explore the potential antibiotic biosynthesis gene from these strains. The diversity of culturable bacteria in seawater was analyzed by traditional dilution coating method and phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequence. Polyketide synthase (PKS) gene, nonribosomal peptide synthetase (NRPS) gene and halogenase (Halo) gene were amplified and detected. A total of 252 strains, belonging to 4 phyla, 37 genera and 52 species, were isolated and identified. Proteobacteria was the most dominant group (accounting for 68.25% of the total number of strains), followed by Actinobacteria (17.06%), Firmicutes (8.73%) and Bacteroidetes (5.95%). At the genus level, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Pseudoalteromonas* and *Bacillus* were the main dominant groups, accounting for 38.89% of the total number of strains. Among the four isolation mediums, the number and species of bacteria isolated in 2216E medium were the most (83 strains, 37 species), and the diversity index was higher. The novelty of isolated bacteria was prominent, and the highest similarity of 16S rRNA gene between

10 strains of bacteria and their related strains was less than 98.65%, so they were speculated as potential new species. In addition, at least one secondary metabolite synthesis gene was amplified from genomic DNA of 22 strains of bacteria. In summary, the culturable bacteria in the surface seawater of Guangxi Beibu Gulf are rich in diversity and outstanding in novelty, and the strains containing antibiotic biosynthesis genes deserve further chemical research on secondary metabolites.

Key words: Guangxi Beibu Gulf; surface seawater; bacteria; diversity; antibiotic biosynthetic gene

责任编辑: 陆媛峰

投稿指南

1 来稿要求

1.1 稿件要素

稿件内容必须包括题目、作者姓名、作者所在单位、作者所在省份和城市、邮政编码、中文摘要、关键词、英文题目、作者英文名称、作者英文单位、英文摘要、英文关键词、正文、致谢(非必选)、参考文献等内容。

1.2 题目

应以简明、确切的语言反映稿件的重要思想和内容, 一般不超过 20 字。

1.3 作者与单位

多位作者姓名用逗号隔开。所有作者均须注明所在单位全称、省份城市及邮编。

1.4 汉语姓名译法

姓在前名在后, 姓用大写字母, 名首字母大写(如: 欧阳奋发, OUYANG Fenfa)。

1.5 中、英文摘要

用第三人称撰写, 应完整准确概括论文的实质性内容, 试验研究论文摘要须包含目的、方法、结果、结论 4 个要素。英文摘要与中文摘要内容相对应。

1.6 首页脚注标识要素

资助项目: 项目名称(项目编号)。作者简介包括姓名(出生年-), 性别, 职称或职务, 主要研究方向。如有通信作者, 请注明 ××× 为通信作者, 包括姓名(出生年-), 性别, 职称或职务, 主要研究方向, E-mail。

1.7 稿件正文

试验研究论文应包括引言、材料与方法、结果与分析、讨论、结论等要素。引言须包含研究意义、前人研究进展、本研究切入点、拟解决的关键问题等基本内容, “讨论”与“结论”部分须分开阐述。各层次标题用阿拉伯数字连续编号, 如 0; 1, 1. 1, 1. 1. 1……; 2, 2. 1, 2. 1. 1……层次划分一般不超过 3 级。

1.8 参考文献

参考文献表采用顺序编码制组织, 其编排格式示例如下:

[1] 陈宝玲, 宋希强, 余文刚, 等. 濒危兰科植物再引入技术及其应用[J]. 生态学报, 2010, 30(24): 7055-7063.

[2] CHEN B L, SONG X Q, YU W G, et al. Re-introduction technology and its application in the conservation of endangered orchid [J]. Acta Ecologica Sinica, 2010, 30(24): 7055-7063.

1.9 图和表

稿件可附必要的图和表, 表用三线表形式, 忌与文字表述重复, 表的主题标目要明确。图表名、图表注及图表中所有的中文须有英文对照。图要大小适中, 清晰, 标注完整; 照片尽量选用黑白照片。

1.10 量和单位

量名称及其符号须符合国家标准, 采用法定计量单位(用国际通用符号, 如面积单位“亩”换算成“公顷 hm^2 ”)。书写要规范化, 并注明外文字母的大小写、正斜体及上下角标。容易混淆的字母、符号, 请特别注明。

2 注意事项

2.1 本刊已开通网络投稿系统, 投稿请登录 <http://gxkx.ijournal.cn/gxkxyxb/ch>, 使用网上投稿和查稿系统。我刊审稿周期为 1 个月, 1 个月后未收到审稿结果可另投他刊。

2.2 稿件一经采用, 酌收版面费; 刊登后, 付稿酬含网络发行(《中国学术期刊(光盘版)》、中国期刊网、万方数据网及台湾华艺 CEPS 中文电子期刊服务网等)的稿酬, 同时赠送样刊 2 本。

2.3 本刊入编《中国学术期刊(光盘版)》、中国期刊网、万方数据网及台湾华艺 CEPS 中文电子期刊数据库并已签订 CNKI 优先数字出版合作协议。

2.4 囿于人力、物力, 我刊只通过期刊采编系统发送“稿件处理意见”, 如需纸质意见, 请向编辑部索取。