

Isolation and characterization of culturable bacteria from tropical coastal waters

Aislamiento y caracterización de bacterias cultivables de aguas costeras tropicales

C-W Lee^{1*}, A Y-F Ng¹, K Narayanan², E U-H Sim³, C-C Ng¹

¹ Institute of Biological Sciences, University of Malaya, 50603 Kuala Lumpur, Malaysia. * E-mail: lee@um.edu.my

² Department of Genetics and Genomic Sciences, Mount Sinai School of Medicine, New York, USA.

Present address: School of Science, Monash University, Sunway Campus, Selangor, Malaysia.

³ Department of Molecular Biology, Faculty of Resource Science and Technology, Universiti Malaysia Sarawak, Malaysia.

Abstract

In this study we isolated and characterized some culturable bacteria from tropical coastal waters of Peninsular Malaysia. We obtained between 0.23 and 1.85×10^3 cfu mL⁻¹ in the Zobell 2216E medium, and cultured 0.04% to 0.12% of total bacterial counts. Different bacterial strains were then selected by 16S rDNA RFLP using four restriction enzymes (*DdeI*, *HhaI*, *RsaI*, and *Sau3AI*), of which *HhaI* gave the most RFLP patterns. A total of 54 unique strains were obtained and these were identified by their 16S rDNA gene sequence. These bacterial strains could be divided into five classes: 38 strains of γ -Proteobacteria (61.1%); 3 strains of α -Proteobacteria (5.5%); 2 strains of the Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides group (3.7%); 3 strains of high GC, Gram-positive bacteria (5.5%); and 13 strains of low GC, Gram-positive bacteria (24.1%). These isolates have good potential for further biotechnological studies since about 56% of the isolates exhibited amylase activity, whereas 36% and 18% of the isolates had protease and lipase, respectively. Most (>70%) of the isolates also produced poly- β -hydroxybutyrate.

Key words: 16S rDNA RFLP, marine bacteria, South China Sea, Straits of Malacca, ZoBell 2216E.

Resumen

En este estudio se aislaron y caracterizaron algunas bacterias cultivables de las aguas costeras tropicales de Malasia Peninsular. Se obtuvieron entre 0.23 y 1.85×10^3 ufc mL⁻¹ en medio de cultivo Zobell 2216E, y se cultivaron 0.04% a 0.12% de los conteos totales de bacterias. Se seleccionaron diferentes cepas bacterianas mediante RFLP del gen 16S rDNA usando cuatro enzimas de restricción (*DdeI*, *HhaI*, *RsaI* y *Sau3AI*), de las cuales *HhaI* produjo más patrones de RFLP. Se obtuvieron un total de 54 cepas singulares, las cuales fueron identificadas por su secuencia 16S rDNA. Estas cepas bacterianas fueron divididas en cinco clases: 38 cepas de γ -proteobacterias (61.1%), 3 cepas de α -proteobacterias (5.5%), 2 cepas del grupo Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides (3.7%), 3 cepas de bacterias Gram positivas con alto contenido de GC (5.5%) y 13 cepas de bacterias Gram positivas con bajo contenido de GC (24.1%). Estos aislados tienen un buen potencial para futuros estudios biotecnológicos ya que 56% de ellos presentaron actividad de la enzima amilasa, mientras que 36% y 18% presentaron actividad de las enzimas proteasa y lipasa, respectivamente. La mayoría (>70%) de los aislados produjeron poli- β -hidroxibutirato.

Palabras clave: 16S rDNA RFLP, bacterias marinas, Estrecho de Malaca, Mar de la China Meridional, ZoBell 2216E.

Introduction

There are 12×10^{28} prokaryotic cells in the open ocean (Whitman *et al.* 1998), representing a large pool of both genetic and physiological diversity. Before the 1990s, the diversity of bacteria was assessed by phenotypic tests and numerical taxonomy of isolates grown on microbiological media (Fry 2000). However, only 0.001% to 0.1% of marine bacteria have been cultured (Oren 2004), and most of the marine microbial community remains unknown. During the last two decades, the analysis of bacteria in the environment has shifted from culture-dependent to culture-independent approaches like 16S rDNA-based molecular techniques (e.g., Yeon *et al.* 2005) and metagenomics (Theron and Cloete 2000). The culture-independent approach has allowed us to understand the physiology of unculturable bacteria, such as

Introducción

En el mar abierto existen 12×10^{28} células procariotas (Whitman *et al.* 1998), lo que representa un gran capital natural de diversidad tanto genética como fisiológica. Antes de la década de los años noventa, la diversidad bacteriana se evaluaba mediante pruebas fenotípicas y la taxonomía numérica de los aislados cultivados en medios microbiológicos (Fry 2000); sin embargo, sólo de 0.001% a 0.1% de las bacterias marinas han sido cultivadas (Oren 2004) y aún se desconoce la mayor parte de la comunidad microbiana. En las últimas dos décadas el análisis de las bacterias en el medio ambiente ha cambiado de técnicas que dependen del cultivo a técnicas que no dependen de éste como la identificación molecular basada en el gen 16S rDNA (e.g., Yeon *et al.* 2005) y la metagenómica (Theron y Cloete 2000). Las técnicas independientes del

Ferroplasma type II and *Leptospirillum* group II from acid mine drainage stream (Tyson *et al.* 2004).

Nevertheless, culture-dependent approaches remain relevant. Culturing bacteria allows phenotypic characterization that is required to fill the gap between function and identity obtained by molecular approaches (Martínez-Murcia *et al.* 2005). Culturable bacteria also provide fixed reference points in molecular taxonomic databases that are useful even for culture-independent approaches (Spiegelman *et al.* 2005). Although a culture-dependent approach does not reflect total bacterial diversity (Oren 2004), many culturable microorganisms are still unknown (Pinhassi *et al.* 1997, Suzuki *et al.* 1997). By varying the media and using novel isolation techniques, new isolates are being obtained (Connon and Giovannoni 2002, Goltekar *et al.* 2006). Moreover, isolation and culture of bacteria from the environment is still a cheaper and easier approach when compared with culture-independent approaches.

Peninsular Malaysia is located on the Sunda Shelf, and is surrounded by the Straits of Malacca and South China Sea. Although these waters are rich in marine life biodiversity (Callum *et al.* 2002), the microbial diversity remains poorly understood. Published reports of marine bacteria in these waters remain limited to microbiological studies of seawater impacted with thermal effluents (Lee 2003), island waters (Bong and Lee 2005), and coral symbionts (Kalimutho *et al.* 2007). However, the identification of these bacterial isolates is based on biochemical tests and the identification of many remains unresolved.

The present study is a pilot research to determine the bacterial diversity in these coastal waters. As a preliminary approach, we isolated and cultured marine bacterial strains from coastal waters of Peninsular Malaysia. Isolates for subsequent analysis were selected by 16S rDNA restriction fragment length polymorphism (RFLP), and identified via their 16S rDNA sequence. In order to determine their potential for biotechnology, selected isolates were characterized according to their production of extracellular enzymes and poly- β -hydroxybutyrate (PHB). All the sequences obtained were deposited in GenBank under the accession numbers EF491975 to EF492033.

Material and methods

Seawater samples were collected from different types of coastal environments along the Straits of Malacca (estuarine waters at Klang [03°00.1' N, 101°23.4' E] and coastal waters at Port Dickson [02°29.5' N, 101°50.3' E]) and the South China Sea (Kuantan: estuarine waters at Ktn Stn 1 [03°48.4' N, 103°20.6' E] and coastal waters at Ktn Stn 2 [03°48.7' N, 103°22.4' E]) (fig. 1). For the physico-chemical analyses, we sampled from six to twelve times over a one-year period (table 1), whereas bacterial isolation was carried out three times at each site.

In situ measurements of temperature and salinity were carried out using a salinometer (YSI-30, USA). About 100 mL

cultivo han permitido entender la fisiología de bacterias no cultivables como *Ferroplasma* tipo II y *Leptospirillum* grupo II en las descargas de aguas ácidas de minas (Tyson *et al.* 2004).

No obstante, los métodos cultivo-dependientes siguen siendo relevantes. El cultivo de bacterias permite la caracterización fenotípica necesaria para llenar la brecha de información entre la función y la identidad obtenida por técnicas moleculares (Martínez-Murcia *et al.* 2005). Las bacterias cultivables también dan puntos de referencia fijos en las bases de datos de taxonomía molecular que son útiles inclusive para las técnicas independientes de los cultivos (Spiegelman *et al.* 2005). A pesar de que un enfoque cultivo-dependiente no refleja la diversidad bacteriana total (Oren 2004), aún faltan por conocer muchos microorganismos cultivables (Pinhassi *et al.* 1997, Suzuki *et al.* 1997). El utilizar diferentes medios y nuevas técnicas de aislamiento ha permitido obtener nuevos aislados (Connon y Giovannoni 2002, Goltekar *et al.* 2006). Además, el aislamiento y el cultivo de bacterias del medio ambiente sigue resultando más económico y fácil que las técnicas independientes de cultivos.

Malasia Peninsular (o Malasia Occidental) se localiza en la Plataforma de Sunda, rodeada por el Estrecho de Malaca y el Mar de la China Meridional. A pesar de ser aguas ricas en biodiversidad marina (Callum *et al.* 2002), existe poco conocimiento de su diversidad microbiana. La literatura sobre las bacterias marinas de estas aguas se limita a estudios microbiológicos de aguas marinas impactadas por descargas termales (Lee 2003), aguas insulares (Bong y Lee 2005) y simbiontes coralinos (Kalimutho *et al.* 2007); sin embargo, la identificación de estos aislados bacterianos se ha basado en pruebas bioquímicas y muchos no han sido identificados aún.

Este trabajo es un estudio piloto para determinar la diversidad bacteriana de estas aguas costeras. De manera preliminar se aislaron y cultivaron cepas de bacterias marinas de las aguas costeras de Malasia Peninsular. Se seleccionaron aislados para su posterior análisis mediante polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés) del gen 16S rDNA y se identificaron por su secuencia 16S rDNA. A fin de determinar su potencial biotecnológico, se caracterizaron los aislados seleccionados según su producción de enzimas extracelulares y de poli- β -hidroxibutirato (PHB). Todas las secuencias obtenidas fueron depositadas en el GenBank con números de acceso EF491975 a EF492033.

Materiales y métodos

Se recolectaron muestras de agua de mar de diferentes tipos de ambientes litorales en el Estrecho de Malaca (aguas estuarinas de Klang [03°00.1' N, 101°23.4' E] y aguas costeras del Puerto Dickson [02°29.5' N, 101°50.3' E]) y el Mar de la China Meridional (Kuantan: aguas estuarinas en la estación 1 [03°48.4' N, 103°20.6' E] y aguas costeras en la estación 2 [03°48.7' N, 103°22.4' E]) (fig. 1). Para los análisis físicoquímicos se realizaron de seis a doce muestreos durante un periodo de un año (tabla 1), mientras que el aislamiento bacteriano se llevó a cabo tres veces en cada sitio.

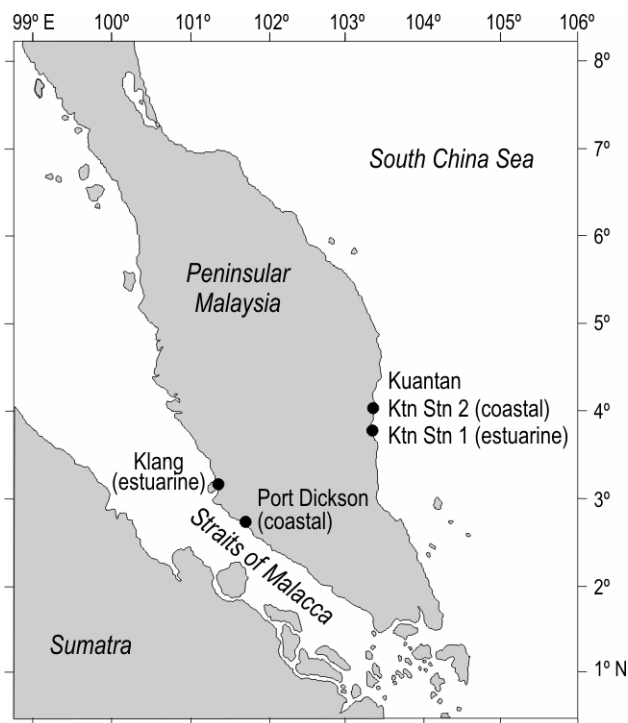


Figure 1. Location of the sampling stations.

Figura 1. Localización de las estaciones de muestreo.

of seawater were collected from 15 to 20 cm below the water surface with sterile bottles for bacterial isolation, while samples for bacterial total counts were preserved with glutaraldehyde (1% final concentration). For the chemical analyses, about 2 L of water were collected. The samples were stored on ice and processed within 3 h of sampling.

For the nutrient analysis, seawater was filtered through pre-combusted (500°C for 3 h) Whatman GF/F filters, and the filtrate was kept frozen (−20°C). Dissolved inorganic nutrients (nitrate [NO₃], ammonium [NH₄], phosphate [PO₄], and silicate [SiO₄]) were measured according to Parsons *et al.* (1984). The coefficient of variation for NH₄, PO₄, and SiO₄ analyses was <5%, and for NO₃ analysis, <10%. Total suspended solids (TSS) were measured as the weight increase in the GF/F filters after drying. Chlorophyll *a* was extracted with 90% ice-cold acetone and determined using a spectrophotometer (Parsons *et al.* 1984).

Bacterial abundance was determined by the direct count method using an epifluorescence microscope (Olympus BX60, Japan) with a U-MWU filter cassette (excitor 330–385 nm, dichroic mirror 400 nm, barrier 420 nm). Samples were filtered onto a black 0.2-μm pore size Isopore filter, and then stained with 4′6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1 μg mL^{−1} final concentration) for 10 min. A minimum of 15 microscope fields or 300 cells were observed. In order to exclude phototrophs from our counts, we also viewed each field under the U-MWG filter cassette (excitor 510–550 nm, dichroic mirror 570 nm, barrier 590 nm) for the autofluorescence of chlorophyll *a*.

Table 1. Sampling stations and periods (*n*, number of samplings), and physico-chemical variables (mean ± standard deviation) measured in this study: surface water temperature, salinity, total suspended solids (TSS), ammonium (NH₄), nitrate (NO₃), phosphorus (PO₄), silicate (SiO₄), chlorophyll *a* (Chla) concentration, and bacterial abundance.

Tabla 1. Estaciones y periodos de muestreo (*n*, número de muestreos), y variables fisicoquímicas (media ± desviación estándar) medidas en este estudio: temperatura del agua superficial, salinidad, sólidos suspendidos totales (TSS), amonio (NH₄), nitrato (NO₃), fósforo (PO₄), silicato (SiO₄), concentración de clorofila *a* (Chla) y abundancia bacteriana.

Station	Sampling period (month/year)	Temp. (°C)	Salinity	TSS (mg L ^{−1})	NH ₄ (μM)	NO ₃ (μM)	PO ₄ (μM)	SiO ₄ (μM)	Chla (μg L ^{−1})	Bacteria (× 10 ⁶ cells mL ^{−1})
Klang (estuary)	09/2004–08/2005 (<i>n</i> = 12)	30.0 ± 0.8	26.4 ± 5.1	280 ± 20	13.50 ± 10.09	3.08 ± 2.83	1.74 ± 1.60	11.01 ± 8.50	5.78 ± 8.62	4.2 ± 2.3
Port Dickson (sandy coast)	07/2004–06/2005 (<i>n</i> = 12)	30.0 ± 1.1	30.7 ± 1.0	284 ± 31	4.74 ± 4.74	0.20 ± 0.10	0.48 ± 0.22	8.72 ± 2.09	2.32 ± 1.00	1.2 ± 0.2
Kuantan Stn 1 (estuary)	07/2005–08/2006 (<i>n</i> = 11)	28.7 ± 1.3	23.8 ± 9.7	50 ± 28	3.53 ± 4.03	0.58 ± 0.23	0.53 ± 0.22	12.25 ± 3.89	5.34 ± 4.05	2.8 ± 0.8
Kuantan Stn 2 (sandy coast)	07/2005–07/2006 (<i>n</i> = 6)	29.6 ± 0.6	30.9 ± 1.4	49 ± 29	1.24 ± 0.71	0.53 ± 0.27	0.57 ± 0.27	8.91 ± 5.64	3.73 ± 2.59	2.3 ± 0.3

Culturable bacteria were isolated by spread plating on Zobell 2216E medium (0.5% peptone, 0.1% yeast extract, 0.01% FePO_4 , prepared in seawater) (ZoBell 1946), and incubated at 25–30°C for several days. Colony forming units (cfu) were counted, and colonies with different morphology were further purified for DNA extraction. For DNA extraction, Gram-negative bacteria were lysed chemically using SDS and lysozyme, whereas Gram-positive bacteria were lysed with an additional freeze and thaw step (Ausubel *et al.* 2002). We used the phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) extraction and ice-cold ethanol precipitation method. DNA was resuspended in Tris-EDTA (TE) buffer (pH 8.0) and stored at –20°C. For all isolated strains, one pair of universal primers was used for the amplification of the 16S rDNA gene: the forward primer, 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'), and the reverse primer, 1525R (5'-AAGGAGGTGWTCCARCC-3'). Polymerase chain reaction (PCR) was performed in a 15- μL reaction mixture containing 10 $\times$ PCR buffer, 1.5 mM of MgCl_2 , 0.4 μM of each primer, 3 μL of DNA template (approximately 200 ng μL^{-1}), 0.2 mM of dNTPs, and 0.5 U of *Taq* polymerase (Finnzymes DyNAzyme™ II, Finland). PCR amplification was carried out according to the following conditions: initial denaturation at 94°C for 2 min; 35 cycles of denaturation for 30 s at 94°C, annealing for 40 s at 55°C, extension for 90 s at 72°C; and a final extension at 72°C for 7 min. PCR products were then purified using the QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN, Germany).

For RFLP, the restriction endonucleases *DdeI*, *HhaI*, *RsaI*, and *Sau3AI* (Roche, Germany) were used to digest the 16S rDNA amplicon separately, and then resolved in a 2.0% agarose gel at 3.8 V cm^{-1} . Restriction patterns were analyzed using the AlphaEaseFC™ software (Alpha Innotech Corp., USA), and strains showing different RFLP patterns were selected for sequencing at Macrogen (South Korea). The nucleotide sequence of the samples was submitted to both the Advanced BLASTn search program (Altschul *et al.* 1990) of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and Ribosomal Database Project II (RDP-II) (Cole *et al.* 2005) for identification of the closest related bacteria.

We also checked the taxonomic position of the bacterial isolates via a phylogenetic tree. The sequences were first aligned via MUSCLE 3.6 (Edgar 2004), and any misalignments were corrected manually. A neighbour-joining tree (Saitou and Nei 1987) was constructed from a matrix of pairwise genetic distances calculated by the Jukes-Cantor algorithm (Jukes and Cantor 1969) using Bosque, a software system for phylogenetic analysis (Ramírez-Flandes and Ulloa 2008). Bootstrap analyses of 1000 replicates were also performed to assess the relative stability of the branches.

To determine the potential of these isolates for biotechnology, isolates were screened for the extracellular enzymes amylase, protease, and lipase (Leifson 1963, Austin 1982). Screening for PHB production was also carried out according to Ostle and Holt (1982).

Se realizaron mediciones *in situ* de temperatura y salinidad con un salinómetro (YSI-30, EUA). Se recolectaron alrededor de 100 mL de agua de mar entre 15 y 20 cm bajo la superficie con botellas estériles para el aislamiento bacteriano. Las muestras para el conteo total de bacterias se preservaron en glutaraldehído (1% de concentración final). Para los análisis químicos se recolectaron alrededor de 2 L de agua. Las muestras se almacenaron en hielo y se procesaron en menos de 3 h después del muestreo.

Para el análisis de nutrientes, el agua de mar se filtró a través de filtros Whatman GF/F prequemados (500°C por 3 h), y el filtrado se mantuvo en congelación (–20°C). Se midieron nutrientes inorgánicos disueltos (nitrato $[\text{NO}_3]$, amonio $[\text{NH}_4]$, fosfato $[\text{PO}_4]$ y silicato $[\text{SiO}_4]$) de acuerdo con Parsons *et al.* (1984). El coeficiente de variación para el análisis de NH_4 , PO_4 y SiO_4 fue <5%, y para el análisis de NO_3 , <10%. Los sólidos suspendidos totales fueron medidos como el incremento en peso en los filtros GF/F después de secarse. La clorofila *a* se extrajo con acetona helada al 90% y se determinó en un espectrofotómetro (Parsons *et al.* 1984).

La abundancia bacteriana se determinó mediante el método de conteo directo bajo un microscopio de epifluorescencia (Olympus BX60, Japón) con un casete de filtro U-MWU (excitación, 330–385 nm; espejo dicróico, 400 nm; barrera, 420 nm). Las muestras se pasaron por un filtro negro de membrana Isopore de 0.2 μm de tamaño de poro, y luego se tiñeron con 4'-diamidino-2-fenilindol (DAPI, concentración final de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) por 10 min. Se observaron un mínimo de 15 campos microscópicos o 300 células. A fin de excluir las bacterias fotótrofas de nuestros conteos, también se observó cada campo bajo un casete de filtro U-MWG (excitación, 510–550 nm; espejo dicróico, 570 nm; barrera, 590 nm) para la autofluorescencia de la clorofila *a*.

Las bacterias cultivables se aislaron mediante la técnica de esparcido en superficie empleando el medio de cultivo Zobell 2216E (peptona 0.5%, extracto de levadura 0.1%, FePO_4 0.01%, preparado en agua de mar) (ZoBell 1946), y se incubaron a 25–30°C durante varios días. Se contaron las unidades formadoras de colonias (ufc), y las colonias con diferente morfología se purificaron aún más para la extracción del ADN. Para tal extracción, las bacterias Gram negativas fueron disueltas químicamente usando dodecilsulfato de sodio y lisozima, mientras que las bacterias Gram positivas fueron disueltas mediante un paso adicional de congelación y descongelación (Ausubel *et al.* 2002). Se utilizó el método de extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y precipitación con etanol frío. El ADN fue resuspendido en amortiguador Tris-EDTA (TE, pH 8.0) y almacenado a –20°C. Para todas las cepas aisladas se utilizó un par de iniciadores universales para la amplificación del gen 16S rDNA: el iniciador delantero, 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'), y el iniciador opuesto, 1525R (5'-AAGGAGGTGWTCCARCC-3'). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) se realizó en una mezcla de reacción de 15 mL que contenía 10 $\times$ de amortiguador para PCR, 1.5 mM de MgCl_2 , 0.4 μM de

Results

Table 1 shows some of the physico-chemical variables measured at the sampling stations. Average surface seawater temperature ranged from 28.7°C to 30.0°C, which is typical of tropical waters, and salinity ranged from 24 to 31. Salinity was generally more variable at the estuaries (Klang and Ktn Stn 1), and this is probably due to the episodic inputs of fresh river water. Both dissolved inorganic nutrients and chlorophyll *a* concentration were also higher in estuaries and highest at Klang. Average TSS level was strikingly higher at the stations along the Straits of Malacca (>280 mg L⁻¹) than at those facing the South China Sea (<50 mg L⁻¹).

The cfu mL⁻¹ measured ranged from 0.23 to 1.85 × 10³, and was lowest at Ktn Stn 2 (fig. 2). The total bacterial counts ranged from 1.04 to 3.29 × 10⁶ cells mL⁻¹ and do not reflect the cfu measurements. The percentage of culturability at different locations was different. An average 0.12% of the total bacteria were cultured at Port Dickson, whereas at Klang, an average 0.06% of total bacteria were cultured. The ratio of culturable to total bacteria was lowest at both Kuantan stations (<0.05%).

In this study, a total of 91 marine bacterial strains with different colony characteristics were selected and purified for DNA extraction. PCR amplification of the 16S rDNA gene produced a single band of approximately 1500 bp. The purified amplicons were then digested for RFLP. Of the four restriction enzymes used, *DdeI* and *Sau3AI* did not cut as frequently and gave only 20 and 19 patterns, whereas *HhaI* and *RsaI* produced 59 and 58 patterns, respectively.

Some bacterial strains showed identical restriction patterns for all four restriction enzymes and only a representative was chosen. A total of 59 strains exhibited different RFLP patterns.

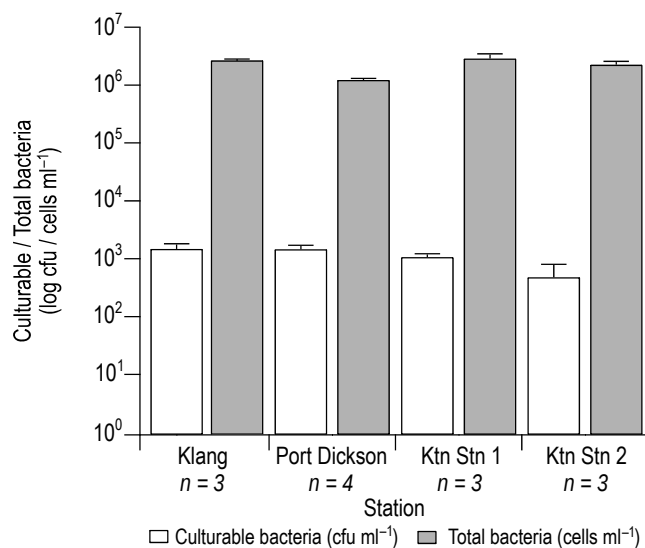


Figure 2. Average (± standard deviation) culturable and total bacteria measured at the different sampling stations in this study.

Figura 2. Promedios (± desviación estándar) de bacterias cultivables y totales medidas en las estaciones de muestreo de este estudio.

cada iniciador, 3 mL de cadena de ADN (aproximadamente 200 ng µL⁻¹), 0.2 mM de dNTPs y 0.5 U de polimerasa *Taq* (Finnzymes DyNAzyme™ II, Finlandia). La amplificación por PCR se realizó en las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C por 2 min; 35 ciclos de desnaturalización por 30 s a 94°C, alineamiento por 40 s a 55°C, extensión por 90 s a 72°C; y una extensión final a 72°C por 7 min. Los productos de PCR se purificaron usando el kit de purificación QIAquick® (QIAGEN, Alemania).

Para RFLP, se emplearon las endonucleasas de restricción *DdeI*, *HhaI*, *RsaI* y *Sau3AI* (Roche, Alemania) para digerir el amplicón 16S rDNA por separado, para posteriormente resolverse en un gel de agarosa al 2.0% a 3.8 V cm⁻¹. Se analizaron los patrones de restricción usando la paquetería AlphaEaseFC™ (Alpha Innotech Corp., EUA), y se seleccionaron las cepas que mostraban diferentes patrones de RFLP para su secuenciación en Macrogen (Corea del Sur). La secuencia de nucleótidos de las muestras se sometió tanto al programa de búsqueda Advanced BLASTn (Altschul *et al.* 1990) del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, EUA) como al Proyecto de Base de Datos Ribosomal II (RDP-II) (Cole *et al.* 2005) para la identificación de las bacterias más cercanamente relacionadas.

Asimismo, se evaluó la posición taxonómica de los aislados bacterianos mediante un árbol filogenético. Primero se alinearon las secuencias usando MUSCLE 3.6 (Edgar 2004), corrigiendo manualmente cualquier desalineación. Se construyó un árbol filogenético (*neighbour-joining tree*; Saitou y Nei 1987) a partir de una matriz de distancias genéticas entre pares calculada con el algoritmo de Jukes-Cantor (Jukes y Cantor 1969) usando la paquetería Bosque para análisis filogenéticos (Ramírez-Flandes y Ulloa 2008). También se realizaron análisis tipo *bootstrap* de 1000 réplicas para evaluar la estabilidad relativa de las ramas.

Para determinar el potencial de los aislados bacterianos para la biotecnología, éstos se examinaron para determinar la presencia de las enzimas extracelulares amilasa, proteasa y lipasa (Leifson 1963, Austin 1982). También se determinó la producción de PHB de acuerdo con Ostle y Holt (1982).

Resultados

En la tabla 1 se muestran las variables físicoquímicas medidas en las estaciones de muestreo. La temperatura del agua de mar osciló entre 28.7°C y 30.0°C, lo cual es típico para aguas tropicales. La salinidad varió de 24 a 31 y, en general, fue más variable en los estuarios (Klang y estación 1 de Kuantan), probablemente debido a las descargas episódicas de agua dulce fluvial. Tanto los nutrientes inorgánicos disueltos como la concentración de clorofila *a* resultaron mayores en los estuarios y más altos en Klang. El nivel medio de sólidos suspendidos totales fue notablemente mayor en las estaciones del Estrecho de Malaca (>280 mg L⁻¹) que en las del Mar de la China Meridional (<50 mg L⁻¹).

Table 2. 16S rDNA RFLP fragments produced using *HhaI* and *RsaI* for the bacterial isolates in this study. Any fragments shorter than 100 bp were not considered in our analysis (* indicates a double band).
Tabla 2. Fragmentos de restricción (RFLP) del gen 16S rDNA producidos usando *HhaI* y *RsaI* para los aislados bacterianos en este estudio. Los fragmentos menores de 100 bp no se consideraron en el análisis (* indica una banda doble).

Strain (Accession number)	Closest relative based on partial sequence homology (Accession number)	Similarity (%)	Fragments produced by <i>HhaI</i> (bp)	Fragments produced by <i>RsaI</i> (bp)
SMN (EF492020)	<i>Acinetobacter junii</i> DSM 6964T (AM184279)	100	650, 427, 253, 189	769, 379, 156
R5 (EF492026)	<i>Alteromonas alvinellae</i> HYD757 (AF288360)	99	435, 371, 310, 266, 241	915, 514
PKM (EF492005)	<i>Alteromonas alvinellae</i> str. MED76 (AY136113)	97	581, 448, 307, 276	811, 438, 204
PD2B (EF492028)	<i>Alteromonas macleodii</i> DSM 6062T (DQ156528)	99	432, 357, 298, 273, 248	882, 512
PKO (EF492032)	<i>Alteromonas marina</i> SW-47T (AY881234)	97	441, 370, 315, 245	893, 482
PD1F (EF491996)	<i>Alteromonas</i> sp. AS30 (AJ391191)	99	437, 361, 297, 275, 254	875, 509
KK9 (EF491997)	<i>Alteromonas</i> sp. AS30 (AJ391191)	99	413, 342, 290, 246, 217	865, 518
KK7 (EF492009)	<i>Alteromonas</i> sp. MED102 (AY136118)	99	534, 413, 252, 244	823, 355, 187
R4 (EF492027)	<i>Alteromonas</i> sp. SSN-6 (AY626838)	99	435, 371, 316, 266, 239	915, 514
SMC (EF491988)	<i>Bacillus algalicola</i> KMM 3737T (AY228462)	99	468, 372, 267, 223	456, 404, 259, 182
SE4 (EF491986)	<i>Bacillus aquimaris</i> JCM 11545T (DQ105971)	99	765, 468, 381	514, 436, 383, 190
SMSTAR (EF491990)	<i>Bacillus baekryungensis</i> (AY505507)	98	500, 438, 346, 249	481, 432, 379, 264
PD1H (EF491981)	<i>Bacillus boroniphilus</i> DSM 17376T (AB198720)	99	437, 353, 276, 238	516, 425, 415, 194
LGM (EF491976)	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580T (AJ586346)	99	529, 432, 344, 273	512, 474, 424
SML (EF491989)	<i>Bacillus marisflavi</i> JCM 11544T (AY647294)	97	538, 346, 259, 210	492, 362, 256, 197, 175
KK10 (EF491982)	<i>Bacillus megaterium</i> DSM 32T (X60629)	100	534, 403, 327, 190	562, 416, 365
SMB (EF491987)	<i>Bacillus neonatensis</i> JCM 13438T (AY904032)	99	570, 438, 355, 259	492, 418, 375, 197
LGV (EF491980)	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> NRRL-NRS 744T (AB271744)	98	882, 432, 274	513, 469, 424
KK3 (EF491983)	<i>Bacillus vietnamensis</i> JCM 11124T (AB099708)	98	543, 359, 264, 207	518, 445, 396
LGO2 (EF491977)	<i>Brevibacterium casei</i> DSM 20657T (AJ251418)	98	442, 398, 277, 264	664, 474, 272
PD2O (EF492014)	<i>Cytophaga</i> sp. NBF7 (AF343928)	98	971, 452	481, 462, 351
PD2L (EF491999)	<i>Erythrobacter flavus</i> JCM 11809 (AF500005)	100	522, 425, 386	523, 450, 427
MT3 (EF492013)	<i>Halomonas</i> sp. B-1083 (DQ270716)	97	741, 423, 225	519, 416, 291, 195
PKU (EF492031)	<i>Marinobacter sedimentalis</i> R65T (AJ609270)	97	441, 375, 311, 278	858, 351, 164
LGN (EF492022)	<i>Microbulbifer maritimus</i> JCM 12187T (AY377986)	99	592, 564, 364	658, 387, 257
PKV (EF492018)	<i>Microbulbifer</i> sp. JAMB-A3 (AB158515)	96	539, 441, 366	638, 484, 361
LGA (EF491975)	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 4698T (AF542073)	100	573, 442, 307, 276	474, 380, 278, 193
SW1 (EF491984)	<i>Micrococcus luteus</i> str. D7 (AJ409095)	99	564, 468, 372	525, 432, 279, 190

(Continued)

Strain (Accession number)	Closest relative based on partial sequence homology (Accession number)	Similarity (%)	Fragments produced by <i>HhaI</i> (bp)	Fragments produced by <i>RsaI</i> (bp)
PKB (EF492002)	<i>Pantoea agglomerans</i> WAB1969 (AM184307)	99	529, 366, 254, 234	530, 502, 469
PKF (EF492033)	<i>Photobacterium ganghwensis</i> FR1311T (AY960847)	98	522, 349, 298, 272	837, 537, 263
PKN (EF492006)	<i>Pseudoalteromonas byunsanensis</i> FR1199T (DQ011289)	99	754, 448, 379	545, 509, 438
PKA (EF492001)	<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i> KMM 162T (DQ537512)	98	845, 461, 184	591, 427, 236
PKR (EF492017)	<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i> NCIMB 2033T (AF297958)	98	686, 489, 388	551, 356, 327, 174
PD2N (EF492012)	<i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i> ATCC 33492T (DQ504310)	99	865, 480	543, 497, 317
PKJ (EF491998)	<i>Pseudoalteromonas piscicida</i> ATCC 15057T (AF297959)	98	734, 357, 258	607, 545, 241
MR2 (EF492025)	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. NJ6-3-1 (AY621063)	99	705, 468, 391	563, 369, 316, 186
LGAA2 (EF491993)	<i>Pseudoalteromonas spongiae</i> JCM 12884T (AY769918)	99	734, 366, 261	579, 518, 209
PD1B (EF491991)	<i>Pseudoalteromonas spongiae</i> JCM 12884T (AY769918)	99	745, 370, 262	575, 516, 220
PD1E (EF491992)	<i>Pseudoalteromonas spongiae</i> JCM 12884T (AY769918)	99	745, 357, 257	575, 509, 223
PKL (EF491994)	<i>Pseudoalteromonas spongiae</i> JCM 12884T (AY769918)	100	754, 371, 260	607, 545, 241
PKP (EF491995)	<i>Pseudoalteromonas spongiae</i> JCM 12884T (AY769918)	99	710, 380, 261	550, 479, 187
PD2M (EF492011)	<i>Pseudoalteromonas viridis</i> MBIC 03135 (AB231330)	100	746, 447, 375	543, 499, 184
PD2Q (EF492015)	<i>Pseudoalteromonas viridis</i> MBIC 03136 (AB231329)	99	804, 464, 394	565, 501, 195
PD2F (EF492000)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 50071T (DQ187386)	99	432, 407, 286, 274	658, 383, 269
B5 (EF492007)	<i>Ruegeria atlantica</i> IAM 14463T (DQ888840)	98	468, 425, 340, 300	722, 500
R2 (EF492023)	<i>Salinimonas chungwhensis</i> BH030046T (AY553295)	99	427, 394, 343, 298, 216	794, 523, 307
SMM (EF492019)	<i>Shewanella algae</i> IAM 14159T (AB205581)	98	585, 534, 355	805, 492, 379
KK5 (EF492008)	<i>Shewanella putrefaciens</i> ATCC 8071T (DQ307731)	100	580, 528, 433	745, 487, 384
PKE (EF492003)	<i>Shewanella waksmanii</i> KMM 3823T (AY170366)	99	997, 427	363*, 249, 209, 195
LGP (EF491978)	<i>Staphylococcus cohnii</i> ATCC 49330T (AB009936)	99	432, 412, 344, 272	507*, 420
PKT (EF491985)	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> ATCC 29970T (D83367)	99	436, 361, 281, 239	468, 406, 383
LGT (EF491979)	<i>Staphylococcus pasteurii</i> ATCC 51129T (AJ717376)	99	432, 410, 344, 273	507*, 424
PK2 (EF492016)	<i>Stappia aggregata</i> IAM 12614T (AY639889)	98	403, 319, 308, 261, 230	601, 527, 365
PKK (EF492004)	<i>Tenacibaculum litoreum</i> JCM 13039T (AY962294)	99	993, 437	537, 444, 220, 161
T1G (EF492029)	<i>Vibrio harveyi</i> ATCC 14126T (AY750578)	99	567, 447, 339, 288	733, 475, 263
TN1Y (EF492021)	<i>Vibrio neptunius</i> LMG 20536 (AJ316171)	97	513, 365, 288, 236	664, 487, 271
KK12 (EF492024)	<i>Vibrio probioticus</i> LMG 20362T (AJ345063)	98	541, 498, 252, 235	760, 541, 281
RS1 (EF492030)	<i>Vibrio</i> sp. LMG 20548 (AJ316170)	97	554, 407, 382, 200	664, 326, 278, 198
MR3 (EF492010)	<i>Vibrio</i> sp. NAP4 (AF064637)	96	746, 611	499, 449, 271, 173

Table 2 shows the size fragments produced after digestion with both *HhaI* and *RsaI*. These two restriction enzymes can differentiate nearly all the 59 strains except for isolates LGP (*Staphylococcus cohnii*) and LGT (*S. pasteurii*), which required a further digest by *DdeI* (data not shown).

All 59 strains were then identified based on the partial sequence analysis (~700 bp) of their 16S rDNA genes to their closest relative (table 2). From the sequence analysis, only 54 distinct strains were found since five strains (LGAA2, PD1B, PD1E, PKL, and PKP) were identical to *Pseudoalteromonas spongiae* and two strains (PD1F and KK9) were identical to *Alteromonas* sp. AS30. All 54 distinct strains were >96% identical to sequences within both the NCBI and RDP-II databases. The strains (*n*, %) isolated in this study belong to the following five classes: **1.** α -Proteobacteria (*Stappia* sp. [1, 1.9%], *Ruegeria* sp. [1, 1.9%], *Erythrobacter* sp. [1, 1.9%]); **2.** γ -Proteobacteria (*Pseudoalteromonas* sp. [9, 16.7%], *Alteromonas* sp. [7, 13.0%], *Shewanella* sp. [3, 5.6%], *Microbulbifer* sp. [2, 3.7%], *Vibrio* sp. [5, 9.3%], *Marinobacter* sp. [1, 1.9%], *Photobacterium* sp. [1, 1.9%], *Pantoea* sp. [1, 1.9%], *Pseudomonas* sp. [1, 1.9%], *Acinetobacter* sp. [1, 1.9%], *Halomonas* sp. [1, 1.9%], *Salinimonas* sp. [1, 1.9%]); **3.** Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides (CFB) group bacteria (*Tenacibaculum* sp. [1, 1.9%], *Cytophaga* sp. [1, 1.9%]); **4.** High GC, Gram-positive bacteria (*Micrococcus* sp. [2, 3.7%], *Brevibacterium* sp. [1, 1.9%]); and **5.** Low GC, Gram-positive bacteria (*Staphylococcus* sp. [3, 5.6%], *Bacillus* sp. [10, 19.0%]).

Table 3 shows the results of the screening for extracellular enzymes (i.e., lipase, amylase, and protease). Amylase was the most prevalent and was found in 56% (*n* = 28) of the isolates screened, whereas only 36% (*n* = 18) and 18% (*n* = 9) of the isolates showed extracellular protease and lipase activity, respectively. The presence of amylase is common in the genera *Bacillus*, *Pseudoalteromonas*, and *Vibrio*. Protease was found in most of the *Micrococcus*, *Pseudoalteromonas*, and *Shewanella*, whereas lipase was observed only in some *Staphylococcus* and *Vibrio*. In contrast, PHB production was found in most of the isolates screened (>70%, *n* = 26) (table 4).

Discussion

All four stations selected had different physico-chemical conditions, and Klang had the highest level of eutrophication. This concurs with Lee and Bong (2008) who reported high rates of primary and bacterial productivity at Klang relative to the other stations. High TSS was also observed at stations along the Straits of Malacca, and this is often attributed to land clearing activities for construction projects, mining, agricultural and forest industries, and dredging operations (Lee and Bong 2006). The cfu and bacterial counts obtained in this study were within the range previously reported for Malaysian waters: 100–2500 cfu mL⁻¹ (Lee 2003) and 0.1–97.5 × 10⁶ cells mL⁻¹ (Lee and Bong 2008). The ratio of culturable bacteria to total bacteria was from 0.04% to 0.12%, which is similar to

Las ufc mL⁻¹ medidas fueron de 0.23 a 1.85 × 10³ y menores en la estación 2 de Kuantan (fig. 2). Los conteos bacterianos totales variaron de 1.04 a 3.29 × 10⁶ cél mL⁻¹ y no reflejan las mediciones de ufc. El porcentaje de cultivabilidad resultó diferente para los diferentes sitios. En Puerto Dickson se cultivó un promedio de 0.12% de las bacterias totales, mientras que en Klang se cultivó un promedio de 0.06%. La razón de bacterias cultivables a bacterias totales fue menor en las dos estaciones de Kuantan (<0.05%).

En este estudio se seleccionó un total de 91 cepas de bacterias marinas con diferentes características coloniales y se purificaron para la extracción de ADN. La amplificación por PCR del gen 16S rDNA produjo una sola banda de aproximadamente 1500 bp, digiriéndose posteriormente los amplicones purificados para RFLP. De las cuatro enzimas de restricción empleadas, *DdeI* y *Sau3AI* se cortaron con menor frecuencia, dando sólo 20 y 19 patrones, mientras que *HhaI* y *RsaI* produjeron 59 y 58 patrones, respectivamente.

Algunas de las cepas bacterianas presentaron patrones de restricción idénticos para las cuatro enzimas, por lo que se seleccionó una muestra representativa. En total, 59 cepas mostraron patrones de RFLP distintos. En la tabla 2 se indican los fragmentos obtenidos después de la digestión con *HhaI* y *RsaI*. Estas dos enzimas de restricción diferenciaron casi todas las 59 cepas con excepción de los aislados LGP (*Staphylococcus cohnii*) y LGT (*S. pasteurii*), los cuales requirieron de una digestión adicional con *DdeI* (datos no mostrados).

Las 59 cepas se identificaron con base en el análisis de la secuencia parcial (~700 bp) de sus genes 16S rDNA a sus parientes más cercanos (tabla 2). Este análisis arrojó sólo 54 cepas singulares, ya que cinco de ellas (LGAA2, PD1B, PD1E, PKL y PKP) fueron idénticas a *Pseudoalteromonas spongiae* y dos (PD1F y KK9) fueron idénticas a *Alteromonas* sp. AS30. Las 54 cepas distintas resultaron >96% idénticas a las secuencias dentro de las dos bases de datos usadas (NCBI y RDP-II). Las cepas (*n*, %) aisladas en el presente estudio pertenecen a las siguientes cinco clases: **1.** α -Proteobacterias (*Stappia* sp. [1, 1.9%], *Ruegeria* sp. [1, 1.9%], *Erythrobacter* sp. [1, 1.9%]); **2.** γ -Proteobacterias (*Pseudoalteromonas* sp. [9, 16.7%], *Alteromonas* sp. [7, 13.0%], *Shewanella* sp. [3, 5.6%], *Microbulbifer* sp. [2, 3.7%], *Vibrio* sp. [5, 9.3%], *Marinobacter* sp. [1, 1.9%], *Photobacterium* sp. [1, 1.9%], *Pantoea* sp. [1, 1.9%], *Pseudomonas* sp. [1, 1.9%], *Acinetobacter* sp. [1, 1.9%], *Halomonas* sp. [1, 1.9%], *Salinimonas* sp. [1, 1.9%]); **3.** Bacterias del grupo Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides (CFB) (*Tenacibaculum* sp. [1, 1.9%], *Cytophaga* sp. [1, 1.9%]); **4.** Bacterias Gram positivas con alto contenido de GC (*Micrococcus* sp. [2, 3.7%], *Brevibacterium* sp. [1, 1.9%]); y **5.** Bacterias Gram positivas con bajo contenido de GC (*Staphylococcus* sp. [3, 5.6%], *Bacillus* sp. [10, 19.0%]).

En la tabla 3 se presentan los resultados de la producción de enzimas extracelulares (i.e., lipasa, amilasa y proteasa). La amilasa resultó la más prevalente, encontrándose en 56% (*n* = 28) de los aislados examinados, mientras que sólo 36% (*n* = 18) y 18% (*n* = 9) de éstos mostraron actividad proteasa y

Table 3. Screening of some extracellular enzymes in selected isolates.**Tabla 3.** Registro de algunas enzimas extracelulares en los aislados seleccionados.

Strain	Closest relative based on partial sequence homology	Lipase	Amylase	Protease
SMN	<i>Acinetobacter junii</i> DSM 6964T	+	–	–
R5	<i>Alteromonas alvinellae</i> HYD757	–	+	–
PKM	<i>Alteromonas alvinellae</i> str. MED76	–	–	–
PD2B	<i>Alteromonas macleodii</i> DSM 6062T	+	+	–
PKO	<i>Alteromonas marina</i> SW-47T	–	–	–
PD1F	<i>Alteromonas</i> sp. AS30	–	+	–
KK7	<i>Alteromonas</i> sp. MED102	–	–	–
R4	<i>Alteromonas</i> sp. SSN-6	–	+	–
SMC	<i>Bacillus algicola</i> KMM 3737T	–	+	–
SE4	<i>Bacillus aquimaris</i> JCM 11545T	–	–	–
SMSTAR	<i>Bacillus baekryungensis</i>	–	+	–
PD1H	<i>Bacillus boroniphilus</i> DSM 17376T	–	+	–
LGM	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580T	–	+	–
SML	<i>Bacillus marisflavi</i> JCM 11544T	–	+	–
KK10	<i>Bacillus megaterium</i> DSM 32T	–	+	+
SMB	<i>Bacillus neonatiensis</i> JCM 13438T	–	+	–
LGV	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> NRRL-NRS 744T	–	+	–
KK3	<i>Bacillus vietnamensis</i> JCM 11124T	+	+	+
LGO2	<i>Brevibacterium casei</i> DSM 20657T	–	–	–
PD2O	<i>Cytophaga</i> sp. NBF7	–	+	+
MT3	<i>Halomonas</i> sp. B-1083	–	–	–
PKU	<i>Marinobacter sedimentalis</i> R65T	–	–	–
LGN	<i>Microbulbifer maritimus</i> JCM 12187T	–	+	–
PKV	<i>Microbulbifer</i> sp. JAMB-A3	–	–	–
LGA	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 4698T	–	–	+
SW1	<i>Micrococcus luteus</i> str. D7	–	–	+
PKB	<i>Pantoea agglomerans</i> WAB1969	–	–	+
PKF	<i>Photobacterium ganghwensis</i> FR1311T	+	+	+
PKN	<i>Pseudoalteromonas byunsanensis</i> FR1199T	–	+	+
PKR	<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i> NCIMB 2033T	–	+	–
PD2N	<i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i> ATCC 33492T	–	+	+
MR2	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. NJ6-3-1	–	+	–
LGAA2	<i>Pseudoalteromonas spongiae</i> JCM 12884T	–	–	+
PD2M	<i>Pseudoalteromonas viridis</i> MBIC 03135	–	+	+
PD2Q	<i>Pseudoalteromonas viridis</i> MBIC 03136	–	+	+
PD2F	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 50071T	–	–	+
B5	<i>Ruegeria atlantica</i> IAM 14463T	–	–	–
R2	<i>Salinimonas chungwhensis</i> BH030046T	–	+	–
SMM	<i>Shewanella algae</i> IAM 14159T	–	+	+
KK5	<i>Shewanella putrefaciens</i> ATCC 8071T	–	–	+
LGP	<i>Staphylococcus cohnii</i> ATCC 49330T	–	–	+
PKT	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> ATCC 29970T	+	–	–
LGT	<i>Staphylococcus pasteurii</i> ATCC 51129T	+	–	–
PK2	<i>Stappia aggregata</i> IAM 12614T	–	–	–
PKK	<i>Tenacibaculum litoreum</i> JCM 13039T	–	–	–
T1G	<i>Vibrio harveyi</i> ATCC 14126T	+	+	–
TN1Y	<i>Vibrio neptunius</i> LMG 20536	–	+	–
KK12	<i>Vibrio probioticus</i> LMG 20362T	–	–	+
RS1	<i>Vibrio</i> sp. LMG 20548	+	+	+
MR3	<i>Vibrio</i> sp. NAP4	+	+	–

Table 4. Detection of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) production in selected isolates.**Tabla 4.** Detección de la producción de poli- β -hidroxibutirato (PHB) en aislados seleccionados.

Label	Gram-negative bacteria	PHB	Label	Gram-positive bacteria	PHB
SMN	<i>Acinetobacter junii</i> DSM 6964T	–	SMC	<i>Bacillus algicola</i> KMM 3737T	+
KK7	<i>Alteromonas</i> sp. MED102	+	SE4	<i>Bacillus aquimaris</i> JCM 11545T	+
PKO	<i>Alteromonas marina</i> SW-47T	+	LGM	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580T	+
R4	<i>Alteromonas</i> sp. SSN-6	+	KK10	<i>Bacillus megaterium</i> DSM 32T	+
MT3	<i>Halomonas</i> sp. B-1083	–	SMB	<i>Bacillus neonatiensis</i> JCM 13438T	+
LGN	<i>Microbulbifer maritimus</i> JCM 12187T	+	SMSTAR	<i>Bacillus baekryungensis</i>	–
PKV	<i>Microbulbifer</i> sp. JAMB-A3	–	PD1H	<i>Bacillus boroniphilus</i> DSM 17376T	+
PKB	<i>Pantoea agglomerans</i> WAB1969	+	KK3	<i>Bacillus vietnamensis</i> JCM 11124T	+
PKF	<i>Photobacterium ganghwensis</i> FR1311T	+	LGV	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> NRRL-NRS 744T	+
PD2F	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 50071T	+	LGO2	<i>Brevibacterium casei</i> DSM 20657T	–
PKP	<i>Pseudoalteromonas spongiae</i> JCM 12884T	+	LGA	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 4698T	+
PD2M	<i>Pseudoalteromonas viridis</i> MBIC 03135	+	LGP	<i>Staphylococcus cohnii</i> ATCC 49330T	+
R2	<i>Salinimonas chungwhensis</i> BH030046T	+	LGT	<i>Staphylococcus pasteurii</i> ATCC 51129T	–
KK5	<i>Shewanella putrefaciens</i> ATCC 8071T	+	PKT	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> ATCC 29970T	–
PKK	<i>Tenacibaculum litoreum</i> JCM 13039T	+	SW1	<i>Micrococcus luteus</i> str. D7	+
RS1	<i>Vibrio</i> sp. LMG 20548	–			
MR3	<i>Vibrio</i> sp. NAP4	+			
T1NY	<i>Vibrio neptunius</i> LMG 20536	+			
KK12	<i>Vibrio probioticus</i> LMG 20362T	–			
T1G	<i>Vibrio harveyi</i> ATCC 14126T	+			

other reports (e.g., Lee *et al.* 1999, Radjasa *et al.* 2001); however, the cfu obtained did not correlate with the bacterial count ($P > 0.50$).

As the primary medium used in this study was the seawater-based ZoBell 2216E that also contains peptone and yeast extract, the isolates obtained are aerobic, heterotrophic, halophilic, or halotolerant bacteria. Of the 54 unique strains isolated in this study, only 13 (or 24%) were obligate halophilic bacteria and did not grow in media without salt (data not shown). The proximity of the sampling stations to the coast could have influenced the occurrence of halotolerant or facultative halophilic bacteria. These terrestrial bacteria, such as *Bacillus subtilis*, are usually carried into the sea by wind, water, animals, etc.

In order to select unique strains, we used the 16S rDNA RFLP. All the four restriction enzymes used produced an average of two to five fragments. *HhaI* produced the clearest patterns, whereas *DdeI*, *RsaI*, and *Sau3AI* gave “double bands” (Urakawa *et al.* 1999). *HhaI* also produced the most varied RFLP, and was alone sufficient for typing almost all the isolated strains. Although the RFLP for strains LGAA2, PD1B, PD1E, PKL, and PKP were different, the partial 16S rDNA gene sequence revealed that they were identical to *Pseudoalteromonas spongiae* with 99–100% of similarity value. A full-length 16S rDNA (~1500 bp) gene sequencing for these strains also confirmed their similarity. The occurrence of intraspecies divergence (Urakawa *et al.* 1999, Jensen *et al.*

lipasa, respectivamente. La presencia de amilasa es común en los géneros *Bacillus*, *Pseudoalteromonas* y *Vibrio*. La proteasa se encontró en la mayoría de las especies de *Micrococcus*, *Pseudoalteromonas* y *Shewanella*, mientras que la lipasa sólo se observó en algunas especies de *Staphylococcus* y *Vibrio*. En contraste, la producción de PHB se observó en la mayoría de los aislados examinados (>70%, $n = 26$) (tabla 4).

Discusión

Las cuatro estaciones de muestreo presentaron condiciones fisicoquímicas diferentes, con un mayor nivel de eutroficación en Klang. Esto concuerda con Lee y Bong (2008), quienes registraron altas tasas de productividad primaria y bacteriana en Klang en comparación con otras estaciones. Los niveles de sólidos suspendidos totales también fueron altos en las estaciones del Estrecho de Malaca, lo cual frecuentemente se atribuye al desmonte de terrenos para la construcción, la minería, la agricultura, la industria forestal y operaciones de dragado (Lee y Bong 2006). Las ufc y los conteos bacterianos obtenidos en este estudio estuvieron dentro del intervalo registrado anteriormente para las aguas de Malasia: 100–2500 ufc mL⁻¹ (Lee 2003) y 0.1–97.5 $\times 10^6$ cél mL⁻¹ (Lee y Bong 2008). La razón de bacterias cultivables a bacterias totales fue de 0.04% a 0.12%, lo que resulta similar a otros reportes (e.g., Lee *et al.* 1999, Radjasa *et al.* 2001); sin embargo, las ufc no se correlacionaron con los conteos bacterianos ($P > 0.50$).

2002) probably caused the inconsistency of one or two restriction patterns. Intraspecies divergence was also observed for strains KK9 and PD1F that had different 16S rDNA RFLP, but were identified with 99% similarity value to *Alteromonas* sp. AS30 from their complete 16S rDNA gene sequences. Although intraspecies divergence has been reported for Vibrionaceae (Urakawa *et al.* 1999), our results showed that it also occurred for *P. spongiae* and *Alteromonas* sp. AS30.

In this study, Gram-negative bacteria were the predominant bacteria isolated. The phylogenetic tree (fig. 3) showed that all but one strain had phylogenetic affiliation. The most prevalent class was γ -Proteobacteria with 61% ($n = 33$) of the isolated strains and nine strains under the family Pseudoalteromonadaceae. Other members fell in the α -Proteobacteria and CFB group. The strain MT3 did not fall within the three classes. Although MT3 was 97% similar to the closest relative (*Halomonas* sp. B-1083), further research is probably needed to ascertain its identity. The phylogenetic tree for Gram-positive bacteria (fig. 4) showed that all strains were well placed within the high GC and low GC classes. *Bacillus* sp. was the most dominant group.

There were two possible novel species, strains PKV and MR3, which had low similarity values (96%) against *Microbulbifer* sp. JAMB-A3 and *Vibrio* sp. NAP4, respectively. We did not obtain any bacteria from the β -Proteobacteria class. Members from this class are rarely cultured by conventional methods (e.g., Pinhassi *et al.* 1997, Lee *et al.* 1999, Yeon *et al.* 2005), and Shigematsu *et al.* (2007) only obtained members of the β -Proteobacteria using specialized techniques (i.e., microplate based liquid cultivation).

The marine bacteria isolated in this study were screened for some extracellular enzymes. Marine bacteria live in a unique environment (i.e., low nutrient concentrations, high salinity [high chlorine and bromine elements], etc.), and their extracellular enzymes have good biotechnological potential. Our results showed that the enzymes amylase and protease were commonly found, concurring with ZoBell and Upham (1944) who reported marine bacteria as a group of microbes that are very actively proteolytic. Among the isolates screened, the genus *Pseudoalteromonas* frequently exhibited amylase and protease activity, whereas *Vibrio* had strains that showed the presence of the three enzymes screened. Reports have already shown that *Pseudoalteromonas* has the potential for producing biologically active extracellular agents including proteases (Holmström and Kjelleberg 1999). Our results also showed that marine bacteria could be a potential source of PHB, as PHB production was a common occurrence. PHB is a strong candidate for degradable or “green” plastics, but the high cost of production is currently limiting its application (Lee 1996).

Our study showed that though we could only culture a small fraction of the bacteria in the sea, we were still able to obtain 54 unique isolates from the Sunda Shelf waters. Culture method is still relevant although future studies will have to employ more variation in media, incubation conditions, and isolation techniques (Connon and Giovannoni 2002, Goltekar

En vista de que el medio de cultivo principal empleado en este estudio fue ZoBell 2216E preparado con agua de mar, el cual también contiene peptona y extracto de levadura, los aislados obtenidos fueron bacterias aeróbicas, heterotróficas, halofílicas o halotolerantes. De las 54 cepas aisladas distintas, solamente 13 (24%) fueron bacterias halofílicas estrictas y no crecieron en medios sin sal (datos no mostrados). La proximidad de las estaciones de muestreo a la costa podría haber influenciado la presencia de bacterias halotolerantes o halofílicas facultativas. Estas bacterias terrestres, tales como *Bacillus subtilis*, son generalmente transportadas al mar por el viento, agua, animales, etc.

La selección de las cepas singulares se realizó mediante RFLP del gen 16S rDNA. Las cuatro enzimas de restricción empleadas produjeron un promedio de dos a cinco fragmentos. Los patrones más claros se obtuvieron con *HhaI*, mientras que *DdeI*, *RsaI* y *Sau3AI* presentaron “bandas dobles” (Urakawa *et al.* 1999). La enzima *HhaI* también presentó mayor variabilidad de RFLP, y permitió tipificar casi todas las cepas aisladas. A pesar de obtener diferentes RFLP para las cepas LGAA2, PD1B, PD1E, PKL y PKP, la secuencia parcial del gen 16S rDNA indicó que eran idénticos a *Pseudoalteromonas spongiae*, con un valor de similitud de 99–100%. La secuenciación completa del gen 16S rDNA (~1500 bp) para estas cepas también confirmó su similitud. La divergencia entre especies (Urakawa *et al.* 1999, Jensen *et al.* 2002) probablemente causó la inconsistencia de uno o dos patrones de restricción. Tal divergencia también se observó para las cepas KK9 y PD1F, las cuales presentaron diferentes RFLP de 16S rDNA pero fueron identificadas con un valor de similitud de 99% con *Alteromonas* sp. AS30 a partir de sus secuencias completas de este gen. Aunque se ha registrado la divergencia entre especies para la familia Vibrionaceae (Urakawa *et al.* 1999), nuestros resultados muestran que también sucedió para *P. spongiae* y *Alteromonas* sp. AS30.

En el presente trabajo predominantemente se aislaron bacterias Gram negativas. El árbol filogenético (fig. 3) indicó que todas las cepas menos una presentaron afiliación filogenética. La clase más prevalente fue las γ -proteobacterias con 61% ($n = 33$) de las cepas aisladas y nueve cepas de la familia Pseudoalteromonadaceae. Los otros miembros pertenecían a las α -proteobacterias y al grupo CFB. La cepa MT3 no cayó dentro de alguna de estas tres clases; a pesar de presentar una similitud de 97% con su pariente más cercano (*Halomonas* sp. B-1083), se requiere de mayor investigación para confirmar su identidad. El árbol filogenético para las bacterias Gram positivas (fig. 4) mostró que todas las cepas se encontraban claramente dentro de la clase con alto contenido de GC o la clase con bajo contenido de GC, siendo *Bacillus* sp. el grupo dominante.

Se encontraron dos posibles especies nuevas, las cepas PKV y MR3, las cuales presentaron valores de similitud bajos (96%) contra *Microbulbifer* sp. JAMB-A3 y *Vibrio* sp. NAP4, respectivamente. No se obtuvieron bacterias pertenecientes a las β -proteobacterias. El cultivo de los miembros de este grupo

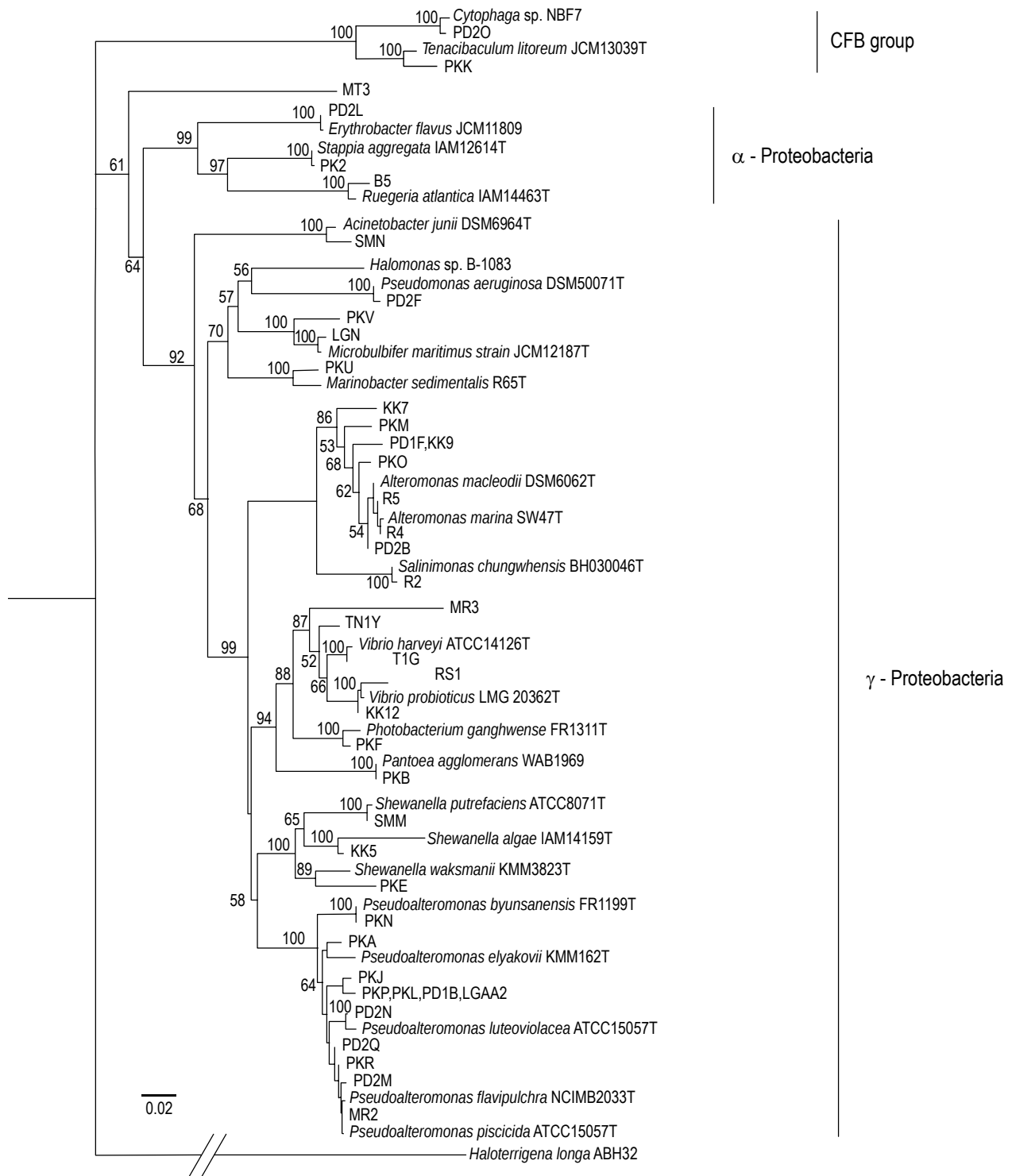


Figure 3. Neighbour-joining tree showing the phylogenetic relationship based on partial sequence of 16S rDNA derived from Gram-negative bacteria isolated in this study. Bootstrap values (1000 replicates) $\geq 50\%$ are shown on each branch. The tree was rooted with an Archaea *Haloterrigena sp. ABH32*. The scale bar represents 0.02 substitutions per base position.

Figura 3. Árbol filogenético con base en la secuencia parcial del gen 16S rDNA derivada de las bacterias Gram negativas aisladas en este estudio. En cada rama se muestran los valores de *bootstrap* (1000 réplicas) $\geq 50\%$. El árbol se construyó con base en *Haloterrigena sp. ABH32*. La barra de escala representa 0.02 sustituciones por posición de base.

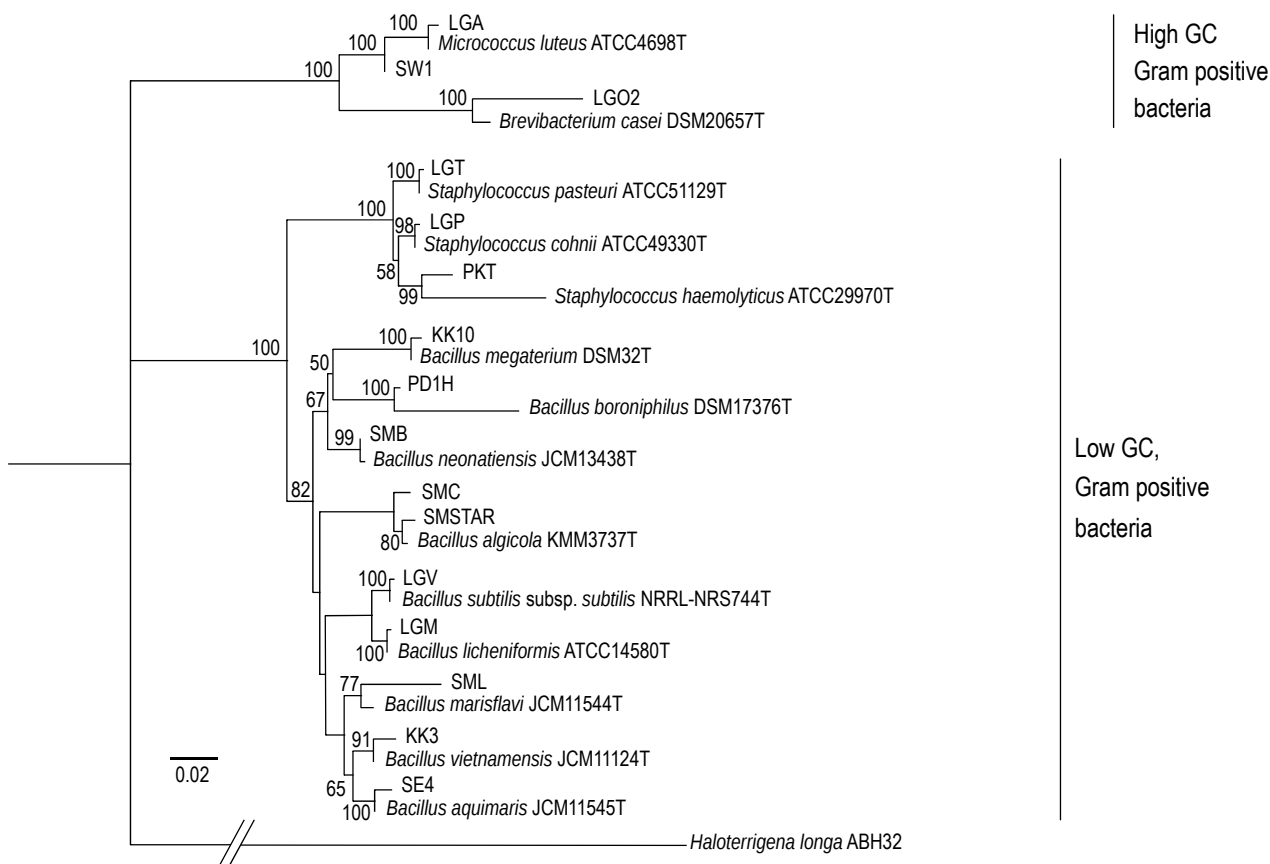


Figure 4. Neighbour-joining tree showing the phylogenetic relationship based on partial sequence of 16S rDNA derived from Gram-positive bacteria isolated in this study. Bootstrap values (1000 replicates) $\geq 50\%$ are shown on each branch. The tree was rooted with an Archaea *Haloterrigena* sp. ABH32. The scale bar represents 0.02 substitutions per base position.

Figura 4. Árbol filogenético con base en la secuencia parcial del gen 16S rDNA derivada de las bacterias Gram positivas aisladas en este estudio. En cada rama se muestran los valores de *bootstrap* (1000 réplicas) $\geq 50\%$. El árbol se construyó con base en *Haloterrigena* sp. ABH32. La barra de escala representa 0.02 sustituciones por posición de base.

et al. 2006, Shigematsu *et al.* 2007). Our study also showed that the restriction enzyme *HhaI* produced the most varied 16S rDNA RFLP, and was sufficient for typing almost all of the isolated marine bacteria. The isolates obtained in this study also showed good potential for further biotechnological research.

Acknowledgements

This research was funded by grants from the Southeast Asia Regional Committee for START (SARCS) (94/01/CW and 95/01/CW), the University of Malaya (FP013/2004B), and the National Oceanography Directorate of Malaysia (eScience 04-01-03-SF0194). We are grateful to PP Ang for technical assistance, and we thank the anonymous referees for constructive comments on previous drafts of this paper.

References

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403–410.
- Austin B. 1982. Taxonomy of bacteria isolated from a coastal, marine fish-rearing unit. *J. Appl. Bacteriol.* 53: 253–268.

mediante métodos convencionales no es común (e.g., Pinhassi *et al.* 1997, Lee *et al.* 1999, Yeon *et al.* 2005), y Shigematsu *et al.* (2007) solamente obtuvieron miembros de las β -proteobacterias con técnicas especializadas (i.e., cultivo en líquido basado en microplacas).

Las bacterias marinas aisladas en este estudio fueron examinadas para detectar enzimas extracelulares. Tales bacterias habitan ambientes particulares (i.e., con bajas concentraciones de nutrientes, alta salinidad [contenidos elevados de cloro y bromo], etc.), y sus enzimas extracelulares tienen un buen potencial biotecnológico. En nuestro estudio fueron comunes la amilasa y la proteasa. Esto concuerda con ZoBell y Upham (1944), quienes registraron a las bacterias marinas como un grupo de microbios con alta actividad proteolítica. Entre los aislados examinados, el género *Pseudoalteromonas* frecuentemente presentó actividad amilasa y proteasa, mientras que las cepas de *Vibrio* mostraron la presencia de las tres enzimas estudiadas. Ya se ha mostrado que *Pseudoalteromonas* tiene el potencial para producir agentes extracelulares biológicamente activos, incluyendo las proteasas (Holmström y Kjelleberg 1999). Nuestros resultados también muestran que las bacterias

- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman RE, Smith JA, Struhl K. 2002. Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology. 5th ed. John Wiley and Sons, UK, 900 pp.
- Bong CW, Lee CW. 2005. Microbial abundance and nutrient concentration in riverine and coastal waters of North-East Langkawi. Malay. J. Sci. 24: 29–35.
- Callum MR, McClean CJ, Veron JEN, Hawkins JP, Allen GR, McAllister DE, Mittermeier CG, Schueler FW, Spalding M, Wells F, Vynne C, Werner TB. 2002. Marine biodiversity hotspots and conservation priorities for tropical reefs. Science 295(5558): 1280.
- Cole JR, Chai B, Farris RJ, Wang Q, Kulam SA, McGarrell DM, Garrity GM, Tiedje JM. 2005. The Ribosomal Database Project (RDP-II): Sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. Nucleic Acids Res. 33: D294–D296.
- Connon SA, Giovannoni SJ. 2002. High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. Appl. Environ. Microbiol. 68: 3878–3885.
- Edgar RC. 2004. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Res. 32(5): 1792–1797.
- Fry JC. 2000. Bacterial diversity and “unculturables”. Microbiol. Today 27: 186–188.
- Goltekar RC, Krishnan KP, De Souza MJBD, Paropkari AL, Loka Bharathi PA. 2006. Effect of carbon source concentration and culture duration on retrievability of bacteria from certain estuarine, coastal and offshore areas around peninsular India. Curr. Sci. 90(1): 103–106.
- Holmström C, Kjelleberg S. 1999. Marine Pseudoalteromonas species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. FEMS Microbiol. Ecol. 30: 285–293.
- Jensen S, Bergh Ø, Enger Ø, Hjeltne B. 2002. Use of PCR-RFLP for genotyping 16S rRNA and characterizing bacteria cultured from halibut fry. Can. J. Microbiol. 48: 379–386.
- Jukes TH, Cantor CR. 1969. Evolution of protein molecules. In: Munro HN (ed.), Mammalian Protein Metabolism. Academic Press, New York, pp. 21–132.
- Kalimutho M, Ahmad A, Kassim Z. 2007. Isolation, characterization and identification of bacteria associated with mucus of *Acropora cervicornis* coral from Bidong island, Terengganu, Malaysia. Malay. J. Sci. 26(2): 27–39.
- Lee CW. 2003. The effects of thermal effluent on marine diatoms and bacteria. Malay. J. Sci. 22: 23–27.
- Lee CW, Bong CW. 2006. Carbon flux through bacteria in a eutrophic tropical environment: Port Klang waters. In: Wolanski E (ed.), The Environment in Asia Pacific Harbours. Springer, Netherlands, pp. 329–345.
- Lee CW, Bong CW. 2008. Bacterial abundance and production and their relation to primary production in tropical coastal waters of Peninsular Malaysia. Mar. Freshwat. Res. 59(1): 10–21.
- Lee JH, Shin HH, Lee DS, Kwon KK, Kim SJ, Lee HK. 1999. Bacterial diversity of culturable isolates from seawater and a marine coral, *Plexauridae* sp., near Mun-Sum, Cheju-Island. J. Microbiol. 37(4): 193–199.
- Lee SY. 1996. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. Trends Biotechnol. 14(11): 431–438.
- Leifson E. 1963. Determination of carbohydrate metabolism of marine bacteria. J. Bacteriol. 85: 1183–1184.
- Martínez-Murcia AJ, Soler L, Saavedra MJ, Chacón MR, Guarro J, Stackebrandt E, Figueras MJ. 2005. Phenotypic, genotypic and phylogenetic discrepancies to differentiate *Aeromonas salmonicida* from *Aeromonas bestiarum*. Int. Microbiol. 8: 259–269.
- marinas podrían ser una fuente potencial de PHB, ya que fue común su producción. El PHB es un fuerte candidato como plástico degradable o “verde”, pero su utilización actual se ve limitada por sus altos costos de producción (Lee 1996).
- Nuestro estudio mostró que a pesar de cultivar sólo una fracción pequeña de las bacterias en el mar, fue posible obtener 54 aislados singulares de las aguas de la Plataforma de Sunda. El método de cultivo sigue siendo relevante aunque en futuras investigaciones se tendrá que incorporar mayor variación en cuanto a los medios de cultivo, condiciones de incubación y técnicas de aislamiento (Connon y Giovannoni 2002, Goltekar *et al.* 2006, Shigematsu *et al.* 2007). Este trabajo mostró que la enzima de restricción *HhaI* produjo más patrones de RFLP del gen 16S rDNA, y fue suficiente para tipificar casi todas las bacterias marinas aisladas. Los aislados bacterianos obtenidos muestran un buen potencial para mayor investigación biotecnológica.

Agradecimientos

Este estudio recibió apoyo financiero del Comité Regional para Asia Sudoriental de START (SARCS) (94/01/CW y 95/01/CW), la Universidad de Malaya (FP013/2004B) y la Dirección Nacional de Oceanografía de Malasia (eScience 04-01-03-SF0194). Agradecemos a PP Ang su asistencia técnica y a los revisores anónimos sus comentarios constructivos.

Traducido al español por Christine Harris.

- Oren A. 2004. Prokaryote diversity and taxonomy: Current status and future challenges. Phil. Trans. R. Soc. Lond. 359: 623–638.
- Ostle AG, Holt JG. 1982. Nile Blue A as a fluorescent stain for poly- β -hydroxybutyrate. Appl. Environ. Microbiol. 44(1): 238–241.
- Parsons TR, Maita Y, Lalli CM. 1984. A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis. Pergamon Press, Oxford, 173 pp.
- Pinhassi J, Zweifel UL, Hagström A. 1997. Dominant marine bacterioplankton species found among colony-forming bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 63(9): 3359–3366.
- Radjasa OK, Urakawa H, Kita-Tsukamoto K, Ohwada K. 2001. Characterization of psychrotrophic bacteria in the surface and deep-sea waters from the northwestern Pacific Ocean based on 16S ribosomal DNA analysis. Mar. Biotechnol. 3: 454–462.
- Ramírez-Flandes S, Ulloa O. 2008. Bosque: Integrated phylogenetic analysis software. Bioinformatics 24(21): 2539–2541.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4: 406–425.
- Shigematsu T, Ueno S, Tsuchida Y, Hayashi M, Okonogi H, Masaki H, Fujii T. 2007. Comparative analyses of viable bacterial counts in foods and seawater under microplate based liquid- and conventional agar plate cultivation: Increased culturability of marine bacteria under liquid cultivation. Biosci. Biotechnol. Biochem. 71(12): 3093–3097.
- Spiegelman D, Whissell G, Greer CW. 2005. A survey of methods for the characterization of microbial consortia and communities. Can. J. Microbiol. 51: 355–386.
- Suzuki MT, Rappé MS, Haimberger ZW, Winfield H, Adair N, Ströbel J, Giovannoni SJ. 1997. Bacterial diversity among small-subunit

- rRNA gene clones and cellular isolates from the same seawater sample. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 983–989.
- Theron J, Cloete TE. 2000. Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. *Crit. Rev. Microbiol.* 26: 37–57.
- Tyson GW, Chapman J, Hugenholtz P, Allen EE, Ram RJ, Richardson PM, Solovyev VV, Rubin EM, Rokhsar DS, Banfield JF. 2004. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature* 428: 37–43.
- Urakawa H, Kita-Tsukamoto K, Ohwada K. 1999. Restriction fragment length polymorphism analysis of psychrophilic and psychrotrophic *Vibrio* and *Photobacterium* from the north-western Pacific Ocean and Otsuchi Bay, Japan. *Can. J. Microbiol.* 45: 67–76.
- Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. 1998. Prokaryotes: The unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 6578–6583.
- Yeon SH, Jeong WJ, Park JS. 2005. The diversity of culturable organotrophic bacteria from local solar salterns. *J. Microbiol* 43(1): 1–10.
- ZoBell CE. 1946. *Marine Microbiology*. Chronica Botanica Company. Waltham, MA, 240 pp.
- ZoBell CE, Upham HC. 1944. A list of marine bacteria including descriptions of sixty new species. *Bull. Scripps Inst. Oceanogr. Univ. Calif.* 5(2): 239–292.

*Recibido en enero de 2009;
aceptado en abril de 2009.*