

# 西沙海绵共附生放线菌 ITBB-ZK-a5 的分离鉴定及抗菌活性研究

齐敏<sup>1,2</sup>, 郭志凯<sup>2,3</sup>, 熊子君<sup>2</sup>, 张世清<sup>2</sup>, 吴炜城<sup>1,2</sup>, 李吉涛<sup>1\*</sup>

1. 生物资源保护与利用重点实验室(湖北民族大学), 湖北恩施 445000; 2. 海南省热带微生物资源重点实验室/中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海南海口 571101; 3. 海南省热带农业生物资源保护与利用重点实验室/中国热带农业科学院海南热带农业资源研究院, 海南海口 571101

**摘要:** 海洋放线菌因其所处环境特殊, 在生理性状和遗传背景方面均具有独特的性质, 因此海洋放线菌具有产生特殊代谢产物的巨大潜力。本研究以西沙海绵为研究对象, 挖掘其具有抑菌活性的共附生放线菌资源。首先, 利用平板分离法从海绵样品中分离纯化出一株活性放线菌菌株 ITBB-ZK-a5, 对其进行 16S rRNA 基因测序, 结合构建的系统发育树和菌落形态特征, 确定该菌株为链霉菌。其次, 采用平板对峙法研究菌株 ITBB-ZK-a5 对植物病原真菌的抑菌广谱性和持效性。结果表明: 该菌株对供试的 16 株病原真菌均有较好的抑菌活性, 抑菌谱较广, 且对峙 14、30 d 仍具有活性, 抑菌持效性较好; 为了进一步验证该菌株平板通过产生活性物质抑制病原菌生长, 对菌落边缘的无菌琼脂块进行抑菌活性研究, 结果表明抑菌率与菌落距离呈负相关, 说明放线菌可能通过向平板中分泌活性物质以抑制病原菌的生长。该菌株连续转接 5 代后, 仍具有较好的世代稳定性。再次, 利用大米固体培养基对菌株 ITBB-ZK-a5 进行发酵, 乙酸乙酯萃取浓缩得到提取物, 通过滤纸片法对发酵粗提物进行光稳定性和热稳定性研究, 结果表明, 随着水浴温度升高和紫外照射时间的增加, 菌株 ITBB-ZK-a5 对香蕉炭疽病原菌的抑制效果呈下降趋势, 但仍具有较强的抑菌活性。最后, 测定菌株 ITBB-ZK-a5 对香蕉炭疽病原菌的半最大效应浓度 ( $EC_{50}$ ) 为 38.88  $\mu\text{g/mL}$ , 对木瓜炭疽病原菌的  $EC_{50}$  值为 11.70  $\mu\text{g/mL}$ 。本研究对南海海绵共附生放线菌进行了分离鉴定, 筛选出具有抑制多种热带作物病原真菌活性的生防菌株 ITBB-ZK-a5, 并对其抑菌活性研究, 为后续生防菌株的开发利用奠定基础。

**关键词:** 海绵; 海洋放线菌; 抗植物病原真菌; 抑菌活性; 生防菌株

中图分类号: S476.1 文献标识码: A

## Isolation, Identification and Anti-phytopathogenic Fungi Activity of Symbiotic Actinomycetes from Xisha Sponge

QI Min<sup>1,2</sup>, GUO Zhikai<sup>2,3</sup>, XIONG Zijun<sup>2</sup>, ZHANG Shiqing<sup>2</sup>, WU Weicheng<sup>1,2</sup>, LI Jitao<sup>1\*</sup>

1. Hubei Key Laboratory of Biological Resources Protection and Utilization (Hubei Minzu University), Enshi, Hubei 445000, China; 2. Hainan Key Laboratory of Tropical Microbe Resources / Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China; 3. Hainan Key Laboratory for Protection and Utilization of Tropical Bioresources / Hainan Institute for Tropical Agricultural Resources, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China

**Abstract:** Marine actinomycetes possess great capacity in producing special metabolites due to their special environment and unique properties in physiological characters and genetic background. In this study, sponge was used as isolation material to explore the resources of symbiotic actinomycetes with antibacterial activity. Firstly, an active actino-

收稿日期 2022-07-01; 修回日期 2022-10-06

基金项目 海南省自然科学基金项目(No. 322QN387); 生物资源保护与利用湖北省重点实验室开放基金项目(No. PKLHB1920); 海南省基础与应用基础研究计划(自然科学领域)高层次人才项目(No. 2019RC306)。

作者简介 齐敏(1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 野生动植物保护与利用。\*通信作者(Corresponding authors): 李吉涛(LI Jitao), E-mail: ljtyouth@foxmail.com。

mycetes strain, ITBB-ZK-a5, was isolated and purified from the sample of Xisha sponge by plate separation method. The strain was identified as *Streptomyces* by analysis of the phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence and colony morphological characteristics. Secondly, the inhibitory spectrum of strain ITBB-ZK-a5 against plant pathogenic fungi was studied by plate confrontation method. The results showed that ITBB-ZK-a5 had a broad antibacterial spectrum, in which the 16 tested pathogenic fungi were inhibited significantly. ITBB-ZK-a5 also showed good antibacterial activity in 14 days and 30 days. In order to explore the reason why strain ITBB-ZK-a5 can inhibit the growth of pathogenic bacteria, the antibacterial activity of asepsis agar from the ITBB-ZK-a5 edge were determined, and the results showed that the antibacterial rate were negatively correlated with colony distance. This result revealed that actinomycetes maybe can secrete active substances to inhibit the growth of pathogenic bacteria. Thirdly, the strain had a good antibacterial stability by detecting the antimicrobial activity of five continuously dynasties. Again, light stability and thermal stability of the ITBB-ZK-a5 crude extracts from the rice solid fermentation were tested through the filter method; the results show that with the increase of bath temperature and UV duration, the antibacterial activity of the strain ITBB-ZK-a5 crude extracts were decreased. Finally, the  $EC_{50}$  value of strain ITBB-ZK-a5 against anthrax diseases of banana and papaya were determined. Plant diseases infected by fungi are the main agricultural diseases, and chemical pesticides are the most commonly used method in diseases control. However, the widespread use of chemical pesticides will not only enhance crop resistance to drugs, but also cause pollution to the ecological environment. More importantly, pesticide residues also have a certain influence on human health. Therefore, the common goal of the world is to find more green, efficient and safe control methods. Actinomycetes are found to have biological control effects. The symbiotic actinomycetes isolated from sponges have an inhibitory effect on pathogenic fungi of tropical crops, which can be applied to efficient diseases control, conforming to the concept of green environmental protection. In this paper, we isolated and identified the strain ITBB-ZK-a5, symbiotic actinomycetes from South China Sea sponge, which has the activity of inhibiting pathogenic fungi of various tropical crops, and studied its antibacterial activity, providing a research basis for the development and utilization of biocontrol strains in the future.

**Keywords:** sponge; marine actinomycetes; anti-phytopathogenic fungi; antibacterial activity; bio-control strain

**DOI:** 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.12.023

放线菌是一种重要的药用微生物资源,其产生的次级代谢产物已被广泛用于抗菌、抗病毒、杀虫和抗肿瘤药物研发<sup>[1]</sup>。因此,人们越来越重视从不同环境条件中分离得到放线菌,并多层次研究发酵培养条件以获取更多感兴趣的次级代谢产物<sup>[2]</sup>。放线菌(Actinomycetes)是一类单细胞革兰氏阳性细菌,(G+C)%含量较高,因其菌落类似真菌的孢子丝而得名<sup>[3]</sup>。迄今已知的可利用的放线菌多数来自土壤,但经过半个多世纪的探索,从陆生放线菌中发现新抗生素的几率已经很低,于是人们将目光转向占地球表面积 70%以上的潜在资源库——海洋<sup>[4-5]</sup>。

海洋特有的高盐、低营养、高压和低温等环境,使生活在其中的包括放线菌在内的微生物具有区别于陆生种群的生理结构和功能,并形成独特的代谢途径,因此造就了丰富的海洋微生物资源,成为巨大的生物资源库和丰富的代谢产物库,同时也是海洋微生物新天然产物挖掘的重要来源之一<sup>[6]</sup>。海绵(marine sponge)是迄今为止海洋天然产物的最大来源<sup>[7]</sup>。海绵属于动物界多孔动物门(Porifera),是一大类低等多细胞海洋动物,

主要生活于海洋中的岩石。海绵是底栖滤食性动物<sup>[8-9]</sup>,其体内和体表富集了大量的微生物,这些微生物与海绵形成了附生、共生或者内生的相互关系<sup>[10]</sup>。海绵虽然是一类非常简单、原始的海洋生物,却能产生比其他海洋生物物种更丰富的次级代谢产物,这些次级代谢产物在海绵的化学防御中起到重要的作用<sup>[11]</sup>,同时还具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗疟疾、抗污染、驱虫和酶抑制剂等活性,具有潜在的药用开发价值<sup>[12-14]</sup>。

真菌侵染引起的植物病害是农业上最主要的病害,化学农药是最常用的防治方法,但不合理使用化学农药不仅会增加有害生物的抗性风险,且易造成环境污染,导致农产品质量安全问题<sup>[15]</sup>。因此,寻找更加绿色、高效、安全的防治方法是全世界的共同目标<sup>[16]</sup>。放线菌是最早发现的具有生物防治作用的一类微生物<sup>[17]</sup>,从海绵中寻找对热带作物病原真菌具有抑制作用的共附生放线菌,具有用于高效防治病害的特色放线菌资源的潜力。海南省西沙群岛地处热带,海绵种类繁多,为海绵共附生放线菌的研究提供了丰富的材料。本研究从西沙群岛采集的茎状管指海绵(*Siphono-*

*chalina truncata*) 样品中分离得到具有抑菌活性的共附生放线菌, 对其进行生物学鉴定, 并分析其对农业病原菌的抑菌谱、抑菌持效性、稳定性以及 EC<sub>50</sub> 值, 研究结果可为寻找特色、高效的生防菌剂奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试样品 供试海绵采自海南省三沙市永兴岛海边, 装入无菌自封袋, 于-0 °C 保存。

1.1.2 供试植物病原真菌 香蕉枯萎病病原菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, FOC 1 和 FOC 4)、香蕉炭疽病病原菌 (*Colletotrichum musae*)、木瓜和芒果炭疽病病原菌 (*C. gloeosporioides*)、木瓜褐色蒂腐病病原菌 (*Phomopsis caricae-papayae* Fetrak & Cif.)、木瓜溃疡病病原菌 (*Lasiodiplodia theobromae*)、辣椒炭疽病病原菌 (*C. capsici*)、辣椒叶斑病病原菌 (*Corynespora* sp.)、豇豆灰斑病病原菌 (*Corynespora* sp.)、豇豆茎基腐烂病病原菌 [*Pythium aphanidermatum* (Eds.) Fitzp.]、椰枣和龙船叶斑病病原菌 (*Pestalotiopsis microspora*)、椰子果腐病病原菌 (*Thielaviopsis paradoxa*)、水稻稻瘟病病原菌 (*Pyricularia oryzae*)、小麦赤霉病病原菌 (*Fusarium graminearum* Schw.)、棉花黄萎病病原菌 (*Verticillium dahliae*)、橡胶炭疽病病原菌 (*C. acutatum*)、黄瓜根腐病病原菌 (*F. solani*)、火龙果果腐病病原菌 (*Gilbertella persicaria*)、荔枝霜疫霉病原菌 (*Peronophythora litchii*)、龙船花炭疽病病原菌 (*C. australianum*)、水稻纹枯病病原菌 [*Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk]。以上病原真菌保存于中国热带农业科学院生物技术研究所。

### 1.2 方法

1.2.1 海绵共附生放线菌的分离与纯化 用无菌半海水 (含海盐 17.5 g/L) 浸洗海绵 3 次, 除去表面附着的杂质, 倒入无菌研钵中, 剪碎, 加入 2~3 mL 无菌半海水研磨成糊状, 无菌半海水稀释至 10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>, 取 100 μL 研磨液和各稀释梯度溶液分别涂布于高氏合成 1 号固体培养基 [可溶性淀粉 20.0 g/L, 氯化钠 6.5 g/L, 硫酸亚铁 0.01 g/L, 硫酸钾 1.0 g/L, 硫酸氢二钾 0.5 g/L, 硫酸镁 0.5 g/L, 琼脂 20.0 g/L, 海盐 17.5 g/L, 重铬酸钾 50 μg/mL, pH 为 (7.3±0.2)] 平板<sup>[18]</sup>, 于 28 °C 倒置

培养 30 d。从培养基中挑取长势良好的放线菌 ITBB-ZK-a5 菌落转接至 ISP 2 固体培养基 [酵母提取物 4.0 g/L, 麦芽提取物 10.0 g/L, 葡萄糖 4.0 g/L, 琼脂 20.0 g/L, 海盐 17.5 g/L, pH 为 (7.2±0.2)] 中进行纯化和培养<sup>[19]</sup>。

1.2.2 16S rRNA 基因序列测定和系统进化树的构建 纯化菌株 ITBB-ZK-a5 由北京擎科生物科技有限公司昆明分公司测定 16S rRNA 基因序列, 将获得的序列在 NCBI 网站进行 BLAST 相似性比对, 在 MEGA 软件中进行多序列分析, 采用邻接法 (neighbor-joining) 构建系统发育树<sup>[20]</sup>。

1.2.3 菌株 ITBB-ZK-a5 对病原真菌的抑菌持效性研究 用划线法研究菌株 ITBB-ZK-a5 的抑菌持效性, 选择放线菌-病原真菌共培养: 将放线菌划线接种 (约 45 mm×10 mm 的条带) 至马铃薯葡萄糖琼脂固体培养基 (PDA) 的两端 (距边缘约 20 mm), 于 28 °C 培养 4 d 后, 将供试病原真菌菌块 (直径 7 mm) 分别接种在 PDA 平板中央 (距离两端的放线菌带约 20 mm), 只接病原真菌的为对照, 于 28 °C 培养 7、14、30 d, 每个处理重复 3 次, 计算抑菌率<sup>[21-22]</sup>。抑菌率=[(对照组病原菌生长直径-病原菌块直径)-(处理组病原菌生长直径-病原菌块直径)]/(对照组病原菌生长直径-病原菌块直径)×100%。

1.2.4 菌株 ITBB-ZK-a5 平板活性物质扩散研究 为了进一步验证菌株 ITBB-ZK-a5 平板通过产生活性物质抑制病原真菌的生长, 在 ISP 2 平板上 1/2 区域进行划线, 于 28 °C 培养至放线菌产孢, 继续培养 7 d 后, 分别在距离产孢区域 5、10、15 mm 位置处取直径为 7 mm 的琼脂块, 5 mm 位置为 1 号位, 10 mm 位置为 2 号位, 15 mm 位置为 3 号位<sup>[23]</sup>。采用平板对峙法: PDA 平板中间接种供试植物病原真菌, 左右两侧距离边缘 20 mm 处分别接 1、2、3 号位琼脂块, 每个处理重复 3 次, 只接病原真菌的为对照, 于 28 °C 培养至对照长满平板, 观察并记录, 计算抑菌率。

1.2.5 菌株 ITBB-ZK-a5 的抑菌稳定性研究 (1) 世代稳定性研究。对菌株 ITBB-ZK-a5 连续转接 5 代, 采用平板对峙法研究不同代 ITBB-ZK-a5 的抗菌稳定性, 选择豇豆灰斑病病原菌为指示菌, PDA 平板中心接指示菌, 距菌块左右 20 mm 处接放线菌, 重复 3 次, 只接病原真菌的为对照, 于 28 °C 培养至对照长满平板, 观察并记录<sup>[20]</sup>。

(2) 菌株发酵提取物的热稳定性和光稳定性

研究。将菌株 ITBB-ZK-a5 用大米固体培养基(每瓶 200 mL 组培瓶中含大米 30 g, 半海水 45 mL, 121 °C 高压灭菌 30 min), 发酵 30 d, 乙酸乙酯萃取过滤, 合并浓缩得到发酵提取物, 将发酵提取物用二甲基亚砷(DMSO)溶解成浓度为 10 mg/mL 的样品液, 分别置于 40、50、60 °C 下水浴 1 h 和紫外灯下照射 1、2、4、6、8、10 h。以香蕉炭疽病病原菌为指示菌, 利用平板滤纸片法测定抑菌活性: 将直径为 7 mm 的香蕉炭疽病病原菌菌块接种至 PDA 平板中央, 在距离中央 20 mm 处左右各放置 1 张直径为 7 mm 的滤纸片, 以多菌灵(有效含量 98%)、百菌清(有效含量 75%)、腈菌唑(有效含量 40%)作阳性对照, 以只接种病原真菌的平板为阴性对照, 每个处理重复 3 次, 于 28 °C 培养至对照长满平板, 观察并记录, 计算抑菌率<sup>[20]</sup>。

1.2.6 测定菌株 ITBB-ZK-a5 发酵提取物对病原真菌的 EC<sub>50</sub> 值 将上述 80 mg/mL 发酵提取物样品液, 以 DMSO 依次 2 倍稀释, 再将各个梯度按 1/1000 的比例加到 PDA 培养基中混匀, 制成含发酵提取物浓度为 80、40、20、10、5、2.5 μg/mL 的固体平板, 分别接种香蕉炭疽病和木瓜炭疽病病原菌菌块(直径 7 mm)至平板中央, 以含等浓度腈菌唑的平板为阳性对照, 含等体积 DMSO 的 PDA 平板为阴性对照, 每组重复 3 次, 置于 28 °C 培养 8~10 d, 十字交叉法测量菌落直径, 计算抑菌率。将抑菌率转化为几率值, 浓度取对数; 采用 Excel 2013 软件求出对应的回归方程( $y=a+bx$ )和相关系数( $R^2$ ), 以抑菌率为 50% 时对应的几率值求出半最大效应浓度(EC<sub>50</sub>)<sup>[24]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的分离与纯化

分离、纯化得到的活性放线菌菌株 ITBB-ZK-a5 在 ISP 2 培养基上生长良好, 于 28 °C 培养 2~4 d 后开始产生孢子, 培养 5 d 后孢子堆颜色接近白色, 呈粉状或绒毛状, 后随着培养天数的增加孢子堆颜色逐渐变成浅灰色、灰色, 最后变成黑色。其菌落形态图(培养 7 d)如图 1。

### 2.2 菌株 ITBB-ZK-a5 的 16S rRNA 基因系统发育树

对菌株 ITBB-ZK-a5 进行 16S rRNA 基因序列分析, 将获得的序列在 NCBI 网站进行 BLAST 相似性对比, 选择相似度大于 98% 的菌株的 16S



图 1 菌株 ITBB-ZK-a5 菌落形态

Fig. 1 Colony morphology of strain ITBB-ZK-a5

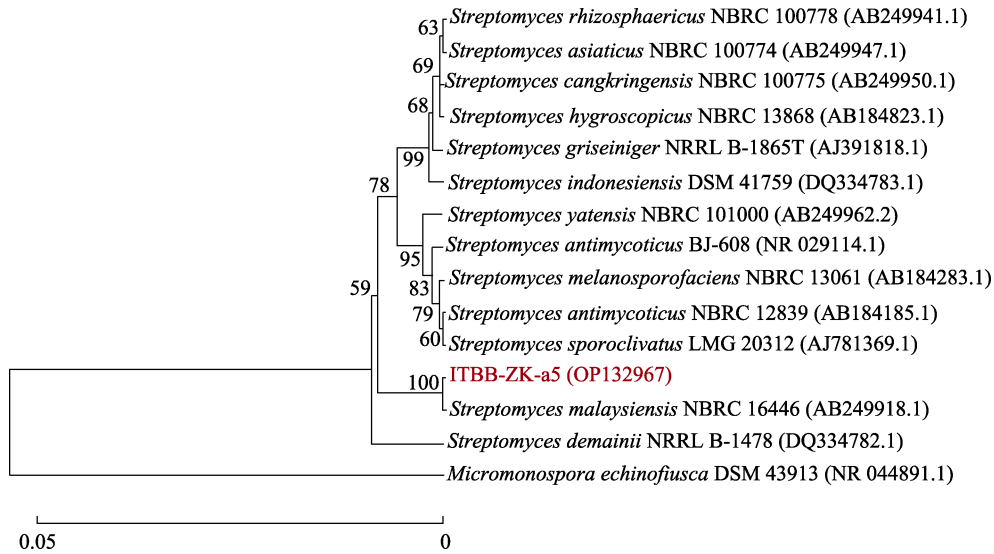
rRNA 基因序列作为参比对象, 在 MEGA 软件中进行多序列比对。通过构建的系统发育树可以看出, 菌株 ITBB-ZK-a5 的 16S rRNA 基因(GenBank 登录号 OP132967)与 *Streptomyces malaysiens* (AB249918.1) 的同源性最高, 结合形态学特征, 初步判断菌株 ITBB-ZK-a5 可能为 *Streptomyces malaysiens* (图 2)。

### 2.3 菌株 ITBB-ZK-a5 对病原真菌的抑菌作用及持效性

通过放线菌-真菌共培养研究菌株 ITBB-ZK-a5 对 16 株病原真菌的抑菌活性, 结果表明, 菌株 ITBB-ZK-a5 对供试的 16 株病原真菌均具有一定程度的抑菌活性, 说明该菌株抑菌谱较广, 其中对香蕉炭疽病和木瓜炭疽病病原菌的抑制效果最好, 抑制率分别为 98.71% 和 98.29%; 其次是对龙船叶斑病、荔枝霜疫霉病、辣椒炭疽病等病原真菌的抑制效果也较好, 抑菌率均在 94% 以上, 而对火龙果果腐病病原菌的抑制效果相对较低, 抑制率为 75.64%, 对其他病原真菌的抑制率均在 80%~90% 之间。菌株 ITBB-ZK-a5 对炭疽类植物病原真菌具有一定的专一性, 且抑菌活性强, 对香蕉炭疽病、木瓜炭疽病、辣椒炭疽病病原菌的抑菌率均达 90% 以上(表 1)。同时也发现, 在对峙培养 14、30 d 后仍具有抑菌活性, 由于培养基直径的局限性以及随着培养时间的延长, 培养基的营养成分逐渐减少, 抑菌率有一定的下降, 但最终趋于稳定, 表明菌株 ITBB-ZK-a5 具有较好的抑菌持效性。

### 2.4 菌株 ITBB-ZK-a5 的平板活性物质扩散研究

利用平板对峙法对菌株 ITBB-ZK-a5 活性物质扩散进行了初步研究, 1 号位、2 号位和 3 号位琼脂块的抑制效果呈较为明显的递减趋势, 距离



括号内为序列 GenBank 登录号；分支处的数字表示 bootstrap 支持率；标尺为 5% 的序列进化差异。  
The numbers in parentheses represent the GenBank accession number; The number at the branch indicates the bootstrap support rate; The scale presents 5% sequence variance.

图 2 基于 16S rRNA 基因序列构建菌株 ITBB-ZK-a5 的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of ITBB-ZK-a5 strain base on the 16S rRNA gene sequences

表 1 菌株 ITBB-ZK-a5 的抑菌持效性  
Tab. 1 Antifungal activity of ITBB-ZK-a5 strain

| 植物病原真菌<br>Plant pathogenic fungi | 抑菌率<br>Inhibition rate/% | 菌落直径<br>Colony diameter/mm |      |      |
|----------------------------------|--------------------------|----------------------------|------|------|
|                                  |                          | 7 d                        | 14 d | 30 d |
| 香蕉枯萎病病原菌(FOC 4)                  | 84.61±2.76               | 20                         | 21   | 26   |
| 香蕉枯萎病病原菌(FOC 1)                  | 87.17±2.09               | 18                         | 22   | 26   |
| 香蕉炭疽病病原菌                         | 98.71±1.04               | 7                          | 8    | 9    |
| 木瓜炭疽病病原菌                         | 98.29±1.59               | 7                          | 8    | 10   |
| 木瓜溃疡病病原菌                         | 85.47±3.36               | 18                         | 22   | 23   |
| 辣椒炭疽病病原菌                         | 94.01±0.60               | 11                         | 11   | 12   |
| 辣椒叶斑病病原菌                         | 93.58±1.04               | 11                         | 12   | 13   |
| 豇豆灰斑病病原菌                         | 92.73±2.17               | 12                         | 13   | 15   |
| 豇豆茎基腐烂病病原菌                       | 94.01±2.63               | 11                         | 12   | 15   |
| 芒果炭疽病病原菌                         | 79.48±1.81               | 23                         | 25   | 25   |
| 椰枣叶斑病病原菌                         | 89.74±1.04               | 14                         | 15   | 17   |
| 火龙果果腐病病原菌                        | 75.64±2.76               | 25                         | 28   | 28   |
| 椰子果腐病病原菌                         | 77.77±1.59               | 23                         | 25   | 28   |
| 荔枝霜疫霉病原菌                         | 95.72±3.36               | 7                          | 9    | 12   |
| 龙船花炭疽病病原菌                        | 81.19±3.36               | 19                         | 24   | 26   |
| 龙船叶斑病病原菌                         | 95.29±1.20               | 11                         | 13   | 21   |

菌落越近的琼脂块，抑制效果越明显（图 3），其中对水稻稻瘟病病原菌的抑菌性最好，1、2、3 号位琼脂块的抑菌率分别为 75.86%、62.64%、59.77%，且 1 号位与 2 号位、3 号位的抑菌率之间具有显著性差异；对椰子果腐病和荔枝霜疫霉病原菌的抑制效果较低；对其他病原真菌的抑菌率也随着菌落距离变远而减弱，抑菌率在

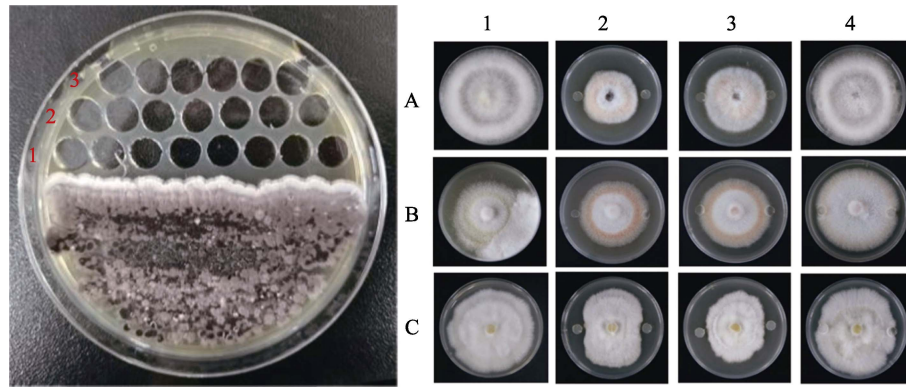
30%~60%之间。1、2、3 号位琼脂块对病原真菌均有抑制活性，1 号位的抑菌性最强，随着菌落距离的变远，其抑菌率下降，其原因可能是菌株 ITBB-ZK-a5 菌落产生的活性物质向平板扩散，距离越远活性物质越少，所以抑菌率呈下降趋势，但仍具有抑菌活性，除了黄瓜根腐病病原菌以外，其余病原真菌的 1、2、3 号位之间均存在显著性差异（表 2）。

### 2.5 菌株 ITBB-ZK-a5 的世代稳定性

以豇豆灰斑病病原菌为供试菌，通过平板对峙法研究了不同世代 ITBB-ZK-a5 菌株的抑菌活性。结果发现，该菌株所有世代均对豇豆灰斑病病原菌有较好的抑菌活性，抑菌率均在 60%以上，其中第四世代的抑菌活性最高（75.21%），并与其他世代的抑菌率之间均呈显著性差异。

### 2.6 菌株 ITBB-ZK-a5 发酵提取物抗植物病原菌的热稳定性

以香蕉炭疽病病原菌为供试菌，通过平板滤纸片法研究了菌株 ITBB-ZK-a5 发酵产物的热稳定性，结果表明，随着温度的升高，3 种药剂和发酵产物对香蕉炭疽病病原菌的抑菌效果均呈下降趋势，抑菌活性最强的多菌灵（94.86%~96.15%）和最弱的百菌清（44.86%~46.15%）在不同温度处理后，其抑菌活性无显著差异（ $P > 0.05$ ），稳定性好；抑菌活性居中的腈菌唑（73.07%~88.03%）在 40、50、60 °C 处理与室温



左图：菌株 ITBB-ZK-a5 平板琼脂块打孔位点。右图：A 是水稻纹枯病病原菌，B 是橡胶炭疽病病原菌，C 是小麦赤霉病病原菌。1 是对照，2 是 1 号位琼脂块，3 是 2 号位琼脂块，4 是 3 号位琼脂块。  
Left: Punching sites of strain ITBB-ZK-a5 plate agar block. Right: A is *T. cucumeris* (Frank) Donk; B is *C. acutatum*; C is *F. graminearum* Schw. 1 is CK, 2 is No. 1 agar block, 3 is No. 2 agar block, 4 is No. 3 agar block.

图 3 菌株 ITBB-ZK-a5 平板活性物质扩散的抑制效果

Fig. 3 Inhibition effect of active substance from ITBB-ZK-a5 agar plate

表 2 菌株 ITBB-ZK-a5 平板活性物质扩散效果

Tab. 2 Inhibition rate of active substances from ITBB-ZK-a5 agar plate

| 植物病原菌<br>Plant pathogenic fungi | 抑菌率 Inhibition rate/%   |                         |                         |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                                 | No. 1                   | No. 2                   | No. 3                   |
| 香蕉枯萎病病原菌 (FOC 1)                | 30.95±0.67 <sup>a</sup> | 20.47±0.67 <sup>b</sup> | 12.85±0.00 <sup>c</sup> |
| 香蕉炭疽病病原菌                        | 44.87±0.00 <sup>a</sup> | 41.45±2.41 <sup>a</sup> | 32.47±0.60 <sup>b</sup> |
| 木瓜炭疽病病原菌                        | 56.52±0.00 <sup>a</sup> | 40.3±2.39 <sup>b</sup>  | 39.05±0.97 <sup>b</sup> |
| 木瓜褐色蒂腐病病原菌                      | 57.69±0.00 <sup>a</sup> | 48.29±1.20 <sup>b</sup> | 47.43±0.00 <sup>b</sup> |
| 辣椒炭疽病病原菌                        | 66.23±0.60 <sup>a</sup> | 63.24±0.60 <sup>b</sup> | 48.29±1.20 <sup>c</sup> |
| 辣椒叶斑病病原菌                        | 42.22±0.00 <sup>a</sup> | 27.40±4.19 <sup>b</sup> | 22.22±3.14 <sup>b</sup> |
| 芒果炭疽病病原菌                        | 53.73±2.11 <sup>a</sup> | 40.79±0.70 <sup>b</sup> | 30.84±0.70 <sup>c</sup> |
| 橡胶炭疽病病原菌                        | 24.01±0.69 <sup>a</sup> | 18.62±0.69 <sup>b</sup> | 6.86±0.69 <sup>c</sup>  |
| 豇豆灰斑病病原菌                        | 46.58±0.60 <sup>a</sup> | 37.60±3.96 <sup>b</sup> | 32.05±1.04 <sup>b</sup> |
| 棉花黄萎病病原菌                        | 62.82±0.00 <sup>a</sup> | 51.70±0.60 <sup>b</sup> | 50.85±0.60 <sup>b</sup> |
| 水稻稻瘟病病原菌                        | 75.86±2.43 <sup>a</sup> | 62.64±0.81 <sup>b</sup> | 59.77±2.15 <sup>b</sup> |
| 小麦赤霉病病原菌                        | 48.71±1.81 <sup>a</sup> | 44.87±1.81 <sup>b</sup> | 31.19±0.60 <sup>c</sup> |
| 黄瓜根腐病病原菌                        | 41.45±0.60 <sup>a</sup> | 39.74±0.00 <sup>a</sup> | 30.34±1.59 <sup>a</sup> |
| 椰枣叶斑病病原菌                        | 40.00±0.00 <sup>a</sup> | 30.76±1.25 <sup>b</sup> | 29.23±0.00 <sup>b</sup> |
| 椰子果腐病病原菌                        | 19.23±0.00 <sup>a</sup> | 14.52±1.20 <sup>b</sup> | 6.41±2.09 <sup>c</sup>  |
| 荔枝霜疫霉病病原菌                       | 17.09±1.59 <sup>a</sup> | 0.00±0.00 <sup>b</sup>  | 0.00±0.00 <sup>b</sup>  |
| 龙船叶斑病病原菌                        | 61.11±0.60 <sup>a</sup> | 53.84±0.00 <sup>b</sup> | 49.57±1.20 <sup>b</sup> |
| 水稻纹枯病病原菌                        | 47.43±0.00 <sup>a</sup> | 40.17±0.60 <sup>a</sup> | 25.21±5.76 <sup>b</sup> |

注：同行不同小写字母表示显著差异 ( $P < 0.05$ )。

Note: Different lowercase letters in the same row indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

处理间具有显著性差异，但是 40、50、60 °C 处理间无显著差异，抑菌活性较稳定；菌株 ITBB-ZK-a5 发酵提取物的抑菌率 (72.21%~79.05%) 与腈菌唑的相当，均保持在 70% 以上，其稳定性也与腈菌唑类似，40、50、60 °C 处理的抑菌活性显

著低于室温处理，在 40~60 °C 具有较好的稳定性 (表 3)。

### 2.7 菌株 ITBB-ZK-a5 发酵提取物抗植物病原菌的光稳定性

以香蕉炭疽病病原菌为供试菌，通过平板对峙法测定了菌株 ITBB-ZK-a5 发酵产物的光稳定性。结果表明，随着紫外光照时间的延长，菌株 ITBB-ZK-a5 发酵产物的抑菌率呈下降趋势，在 0~8 h 光照范围内，抑菌率逐渐下降，1、2 h 处理的抑菌率与 CK 间无显著性差异，4~8 h 处理的抑菌率与 CK 间呈显著性差异；10 h 处理的抑菌率最低，并且与其他处理的抑菌率均呈显著差异，与 CK 相比下降 18.07%。菌株 ITBB-ZK-a5 发酵提取物的抑菌活性在 0~2 h 紫外光照下具有很好的稳定性，然后随着光照时间的延长，其抑菌活性显著降低 (表 4)。

### 2.8 菌株 ITBB-ZK-a5 发酵提取物对病原真菌的 EC<sub>50</sub> 值

以香蕉炭疽病和木瓜炭疽病病原菌为供试菌，通过平板稀释法测定了菌株 ITBB-ZK-a5 发酵提取物的 EC<sub>50</sub> 值，结果表明，菌株 ITBB-ZK-a5 发酵提取物对香蕉炭疽病和木瓜炭疽病病原菌均有较好的抑制效果，EC<sub>50</sub> 值分别为 38.88、11.70 μg/mL，其中对木瓜炭疽病病原菌的抑制效果优于香蕉炭疽病病原菌。但与化学药剂腈菌唑相比，抑制效果稍弱 (表 5)。

## 3 讨论

本研究从西沙群岛采集的海绵中分离得到 1

表 3 菌株 ITBB-ZK-a5 发酵提取物抗香蕉炭疽病原菌的热稳定性

Tab. 3 Thermal stability of fermentation extracts of ITBB-ZK-a5 against banana anthrax

| 处理<br>Treatment | 抑菌率 Inhibition rate/%   |                         |                         |                         |
|-----------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                 | 多菌灵 Carbendazim         | 百菌清 Chlorothalonil      | 腈菌唑 Myclobutanil        | ITBB-ZK-a5              |
| 室温              | 96.15±0.00 <sup>a</sup> | 46.15±1.04 <sup>a</sup> | 88.03±1.60 <sup>a</sup> | 79.05±0.60 <sup>a</sup> |
| 40℃             | 96.15±0.00 <sup>a</sup> | 45.72±1.20 <sup>a</sup> | 73.07±2.09 <sup>b</sup> | 72.21±0.60 <sup>b</sup> |
| 50℃             | 94.86±1.04 <sup>a</sup> | 45.72±1.20 <sup>a</sup> | 74.35±1.04 <sup>b</sup> | 73.07±0.00 <sup>b</sup> |
| 60℃             | 94.86±1.04 <sup>a</sup> | 44.86±1.04 <sup>a</sup> | 73.07±1.04 <sup>b</sup> | 72.21±1.20 <sup>b</sup> |

注: 同列不同小写字母表示显著差异 ( $P<0.05$ )。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference ( $P<0.05$ ).

表 4 菌株 ITBB-ZK-a5 发酵提取物抗香蕉炭疽病原菌的光稳定性

Tab. 4 Photostability of fermentation extracts of ITBB-ZK-a5 against banana anthrax

| 时间<br>Time/h | 抑菌率 Inhibition rate/%    |                         |                          |                          |
|--------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
|              | 多菌灵 Carbendazim          | 百菌清 Chlorothalonil      | 腈菌唑 Myclobutanil         | ITBB-ZK-a5               |
| 0(CK)        | 95.29±0.60 <sup>a</sup>  | 46.57±1.20 <sup>a</sup> | 87.60±1.21 <sup>a</sup>  | 70.93±0.60 <sup>a</sup>  |
| 1            | 93.58±1.04 <sup>ab</sup> | 45.29±0.60 <sup>a</sup> | 85.03±1.20 <sup>ab</sup> | 69.22±1.04 <sup>ab</sup> |
| 2            | 93.15±0.60 <sup>c</sup>  | 45.72±1.20 <sup>a</sup> | 80.33±0.60 <sup>cd</sup> | 69.65±1.21 <sup>a</sup>  |
| 4            | 93.15±1.21 <sup>c</sup>  | 44.44±0.60 <sup>a</sup> | 80.76±1.04 <sup>cd</sup> | 67.08±1.20 <sup>bc</sup> |
| 6            | 94.01±0.60 <sup>ab</sup> | 46.15±1.04 <sup>a</sup> | 79.48±1.81 <sup>d</sup>  | 65.80±0.60 <sup>c</sup>  |
| 8            | 94.43±1.21 <sup>ab</sup> | 45.29±0.60 <sup>a</sup> | 79.48±2.09 <sup>d</sup>  | 65.38±1.04 <sup>c</sup>  |
| 10           | 95.29±0.60 <sup>a</sup>  | 45.72±1.20 <sup>a</sup> | 83.75±2.18 <sup>bc</sup> | 58.11±1.20 <sup>d</sup>  |

注: 同列不同小写字母表示显著差异 ( $P<0.05$ )。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference ( $P<0.05$ ).

表 5 菌株 ITBB-ZK-a5 发酵提取物对病原真菌  $EC_{50}$  值Tab. 5  $EC_{50}$  values of fermentation extract of ITBB-ZK-a5 on pathogenic fungi

| 病原真菌 Pathogenic fungi | 药剂 Drug    | 回归方程 Equation of regression | 相关系数 $R^2$ | $EC_{50}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ |
|-----------------------|------------|-----------------------------|------------|--|
| 香蕉炭疽病原菌               | ITBB-ZK-a5 | $y=0.6939x+3.8969$          | 0.9235     | 38.88                                      |
|                       | 腈菌唑        | $y=2.0660x+2.8601$          | 0.9255     | 10.86                                      |
| 木瓜炭疽病原菌               | ITBB-ZK-a5 | $y=0.9280x+4.0089$          | 0.9197     | 11.70                                      |
|                       | 腈菌唑        | $y=0.6943x+4.6252$          | 0.9553     | 3.47                                       |

株活性放线菌菌株 ITBB-ZK-a5, 通过 16S rRNA 基因序列测定和系统发育树构建, 将其鉴定为 *Streptomyces malaysiens*。进一步的抑菌持效性和广谱性研究结果表明, 菌株 ITBB-ZK-a5 对供试的 16 株植物病原真菌均具有抑制活性, 抑菌谱广, 且对峙培养 14、30 d 后仍有较好的抑菌活性, 其中对炭疽类病原菌的抑制效果尤为显著; 对固体平板中代谢产物的抑菌活性研究结果表明, 抑菌率可能与代谢产物的扩散距离有关, 距离越远, 其抑制率越低; 无论是世代稳定性、光稳定性还是热稳定性研究, 菌株 ITBB-ZK-a5 发酵提取物的抑菌率均有小范围波动, 且稳定性较好; 菌株 ITBB-ZK-a5 发酵提取物对香蕉炭疽病原菌的  $EC_{50}$  值为  $38.88 \mu\text{g}/\text{mL}$ , 对木瓜炭疽病原菌的  $EC_{50}$  值为  $11.70 \mu\text{g}/\text{mL}$ , 均具有较好的抑菌活性,

表明海绵共附生放线菌在开发抑菌活性物质和生防菌剂方面具有较大潜力。

海绵是世界上存在的最早的生命形式之一, 其在海洋中的生物量仅次于珊瑚, 经研究发现, 放线菌在海绵中的数量和种类均十分丰富, 1993 年 IMAMURA 等<sup>[25]</sup>从 1 种未知海绵中分离得到了单一链霉菌菌株, 并分离出新的抗生素。2006 年 ZHANG 等<sup>[26]</sup>利用 8 种不同的培养基, 从海绵 *Hymeniacidon perleve* 中分离得到可培养的放线菌属、链霉菌属、小单孢菌属、红球菌属、诺卡氏菌属等 7 个属的 106 株放线菌, 优势属为链霉菌属。随后的许多研究均表明, 海绵作为代表性的放线菌共附生海洋生物, 其次级代谢产物丰富, 一直是国内外的研究热点。近年来, 对海绵共附生放线菌的研究发现, 来源于链霉菌属的次级代

谢产物,如杂环类、多肽类等,均表现出良好的抗菌、抗肿瘤、抗寄生虫等活性,而抗菌活性尤为突出。EI-GENDY 等<sup>[27]</sup>从海绵中分离出 50 株放线菌,其中 10 株均具有抗真菌活性,并首次从海绵链霉菌中分离到 5,7-二甲氧基-4-对甲氧基苯香豆素和新的抗生素 saadamycin。据已有的文献报道,547 个海洋链霉菌新天然产物中,来源于海绵共附生链霉菌的新天然产物占 64 个,其中 1/5 的化合物表现出抗菌活性,目前已挖掘的药用放线菌大多属于链霉菌属<sup>[28-30]</sup>。

本研究中的放线菌 *Streptomyces malaysiens* ITBB-ZK-a5 的形态特征与 AL-TAI 等<sup>[31]</sup>报道的 *S. malaysiensis* ATB-IIT, 刘为营等<sup>[32]</sup>报道的 *S. malaysiens* 1161 形态特征一致,16S rRNA 基因序列同源性高,并且这类菌均表现出较好的抑菌活性,且均是从非海洋环境中分离得到;本研究发现的活性放线菌 *S. malaysiens* 是从西沙群岛采集的海绵样品中分离得到,尚无该种放线菌从海绵中分离发现的报道。本研究发现,从-20℃保存的海绵样品中分离获得的放线菌数量少于前人<sup>[18]</sup>从新鲜样品中分离获得的菌种数量,因此,分离海洋生物样品中的放线菌时应在采集新鲜生物样品后及时进行菌株分离,以得到多样性的菌株。

在热带作物病害中,有些病害蔓延迅速、危害范围广、防治困难,极易造成作物产量下降,损失严重。放线菌及其次级代谢产物具有高效性、低毒性、无污染等优点,在热带农业病害防治中起到至关重要的作用。吉才娟等<sup>[33]</sup>在海口湾海泥中分离出对芒果炭疽病菌具有较高抑菌活性的放线菌。郭志凯等<sup>[34]</sup>从海南西沙群岛海绵中分离得到对香蕉枯萎病菌 FOC 4 等多种病原真菌均具有抑菌活性的 2 株链霉菌菌株,并从 1 株链霉菌菌株 HMH1 的大米固体发酵产物中分离得到放线菌素 D,研究发现放线菌素 D 对供试的香蕉枯萎病菌和木瓜溃疡病菌等 10 种病原真菌及 2 种病原细菌(水稻白叶枯病菌和茄青枯劳尔氏菌)均具有抑菌活性。本研究以多种热带作物病原真菌作为指示菌,对菌株 ITBB-ZK-a5 进行了抑菌活性筛选,发现该菌不仅具有广谱性,而且对部分同属病原真菌具有普遍的抑菌性。本研究结果将为后续活性物质的分离、鉴定以及大田活性评价等奠定基础,为从海洋放线菌中筛选出对热带农业病害具有抑制效果的生防菌株和活性物质提供基础菌种资源和理论支撑。

## 参考文献

- [1] 郭志凯,盖翠娟,蔡彩虹,陈亮亮,戴好富,梅文莉. 土壤链霉菌 *Streptomyces* sp. 的抑菌成分研究[J]. 深圳大学学报(理工版), 2018, 35(2): 166-171.  
GUO Z K, GAI C J, CAI C H, CHEN L L, DAI H F, MEI W L. Antibacterial metabolites from the soil-derived actinobacteria *Streptomyces* sp.[J]. Journal of Shenzhen University (Science and Engineering), 2018, 35(2): 166-171. (in Chinese)
- [2] BERDY J. Bioactive microbial metabolites[J]. Journal of Antibiotics, 2005, 58(1): 1-26.
- [3] 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.
- [4] GUO Z K, WANG R, CHEN S Q, CHEN F X, LIU T M, YANG M Q. Anthocidins A-D, new 5-hydroxyanthranilic acid related metabolites from the sea urchin-associated actinobacterium, *Streptomyces* sp. HDa1[J]. Molecules, 2018, 23: 1032.
- [5] GUO Z K, WANG R, CHEN F X, LIU T M, YANG M Q. Bioactive aromatic metabolites from the sea urchin-derived actinomycete *Streptomyces spectabilis* strain HDa1[J]. Phytochemistry Letters, 2018, 25: 132-135.
- [6] GUO Z K, MA S Y, KHAN S, ZHU H J, ZHANG B, ZHANG S Q, JIAO R H. Zhaoshumycins A and B, two unprecedented antimycin-type depsipeptides produced by a marine-derived *Streptomyces* sp. ITBB-ZK-a6[J]. Marine Drugs, 2021, 19: 624.
- [7] 伍国梁,李林,陈豪,钱冬萌,李荣贵,王斌. 筛选鉴定一株产生抑菌活性物质的海洋放线菌[J]. 生物技术通讯, 2013, 24(4): 488-492.  
WU G L, LI L, CHEN H, QIAN D M, LI R G, WANG B. Isolation and identification of a marine actinomycete producing antibacterial substances[J]. Letters in Biotechnology, 2013, 24(4): 488-492. (in Chinese)
- [8] ABDELFATTAH M S, ELMALLAH M I Y, EBRAHIM H Y, ALMEER R S, MONEIM A E A. Prodigiosins from a marine sponge-associated actinomycete attenuate HCl/ethanol-induced gastric lesion via antioxidant and anti-inflammatory mechanisms[J]. PLoS One, 2019, 14(6): e216737.
- [9] XIN Z, TING G, FU L, ZHANG P C, ZHOU W Q, LI Y, PING Z. A new analogue of echinomycin and a new cyclic dipeptide from a marine-derived *Streptomyces* sp. LS298[J]. Marine Drugs, 2015, 13(11): 6947-6961.
- [10] SELVIN J, NINAWA A S, KIRAN G S, LIPTON A P. Sponge-microbial interactions: ecological implications and bioprospecting avenues[J]. Critical Reviews in Microbiology,

- 2010, 36(1): 82-90.
- [11] ZHOU S, XIAO K, HUANG D, WU W, HUANG X. Complete genome sequence of *Streptomyces spongiicola* HNM0071T, a marine sponge-associated actinomycete producing staurosporine and echinomycin[J]. *Marine Genomics*, 2019(43): 61-64.
- [12] WILLIAMS D E, ANDERSEN R J. Biologically active marine natural products and their molecular targets discovered using a chemical genetics approach[J]. *Natural Products Reports*, 2019, 37: 617-633.
- [13] LVAREZ-BARDÓN M, PÉREZ-PERTEJO Y, ORDÓEZ C, SEPÚLVEDA-CRESPO D, CARBALLEIRA N M, TEKWNI B L, MURUGESAN S, MARTINEZ-ALLADARES M, GARCÍA-ESTRADA C, REGUERAR R M. Screening marine natural products for new drug leads against trypanosomatids and malaria[J]. *Marine Drugs*, 2020, 18(4): 187.
- [14] JAGANNATHAN S V, MANEMANN E M, ROWE S E, CALLENDER M C, SOTO W. Marine actinomycetes, new sources of biotechnological products[J]. *Marine Drugs*, 2021, 19(7): 365.
- [15] 曲均革, 余诚成, 陈月新. 抗农业病害真菌的海洋细菌筛选、发酵及分离初步研究[J]. *安徽农业科学*, 2019, 47(4): 148-150.
- QU J G, YU C C, CHEN Y X. Screening, fermentation and isolation of marine bacteria against agricultural diseases and fungi[J]. *Anhui Agriculture Science*, 2019, 47(4): 148-150. (in Chinese)
- [16] 辜柳霜, 张月凤, 张凯, 李晓宇, 柳志强. 胶孢炭疽菌生防放线菌 SD-29 的鉴定及抗菌活性评价[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(4): 770-779.
- GU L S, ZHANG Y F, ZHANG K, LI X Y, LIU Z Q. Identification and antifungal activity of a biocontrol actinomycete strain SD-29 against *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(4): 770-779. (in Chinese)
- [17] 邱德文. 生物农药的发展现状与趋势分析[J]. *中国生物防治学报*, 2015, 31(5): 679-684.
- QIU D W. Analysis of the development situation and trends of biological pesticides in China[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2015, 31(5): 679-684. (in Chinese)
- [18] 张海涛. 海绵放线菌的分离和多样性研究[D]. 大连: 中国科学院大连化学物理研究所, 2006.
- ZHANG H T. Isolation and diversity study of culturable actinobacteria from Chinese marine sponges[D]. Dalian: Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, 2006. (in Chinese)
- [19] 信艳娟, 艾江宁, 刘亚男, 吴佩春, 曹旭鹏, 薛松. 一株海洋放线菌的分离鉴定及活性研究[J]. *生物技术进展*, 2012, 2(5): 354-358.
- XIN Y J, AI J N, LIU Y N, WU P C, CAO X P, XUE S. Isolation, identification and bioactivity screening of marine actinobacteria[J]. *Current Biotechnology*, 2012, 2(5): 354-358. (in Chinese)
- [20] 吴炜城, 陈必婷, 张世清, 郭志凯, 李吉涛. 海南白蚁共附生放线菌的分离鉴定及抗热带作物病原真菌活性研究[J]. *热带作物学报*, 2022, 43(6): 1240-1247.
- WU W C, CHEN B T, ZHANG S Q, GUO Z K, LI J T. Isolation and identification of symbiotic actinomycetes from termites in Hainan and their activity against tropical plants pathogenic fungi[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2022, 43(6): 1240-1247. (in Chinese)
- [21] 谢林艳, 狄义宁, 何丽莲, 刘鲁峰, 沈先岳, 李富生. 甘蔗赤腐病内生拮抗菌 YC89 的筛选及鉴定[J]. *微生物学报*, 2020, 60(4): 739-748.
- XIE L Y, DI Y N, HE L L, LIU L F, SHEN X Y, LI F S. Screening and identification of endogenous antagonistic antibacterial YC89 against sugarcane red rot[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(4): 739-748. (in Chinese)
- [22] 郭志凯, 王蓉, 蔡吉苗, 黄贵修. 臂形草内生真菌菌株 HND5 的分离、抗性评价及其初步鉴定[J]. *热带作物学报*, 2007, 28(2): 92-96.
- GUO Z K, WANG R, CAI J M, HUANG G X. Initial identification and resistance analysis of endophytic fungus strain HND5 isolated from *Brachiaria* sp.[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2007, 28(2): 92-96. (in Chinese)
- [23] 高鹏, 薛泉宏, 常显波, 封晔. 拮抗放线菌的筛选培养基与筛选方法研究[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2005, 33(1): 59-63.
- GAO P, XUE Q H, CHANG X B, FENG Y. Study on the media and methods of selecting antimicrobial actinomycetes[J]. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)*, 2005, 33(1): 59-63. (in Chinese)
- [24] 马建英, 张小凤, 王文桥, 韩秀英, 马志强, 丁海波. 灰葡萄孢霉 *Botrytis cinerea* 对啮菌恶唑的敏感性和不同药剂的交互抗性[J]. *植物保护学报*, 2009, 36(1): 61-64.
- MA J Y, ZHANG X F, WANG W Q, HAN X Y, MA Z Q, DING H B. The sensitivity of *Botrytis cinerea* to SYP-Z048 and cross resistance against diverse fungicide[J]. *Acta Phytolacica Sinica*, 2009, 36(1): 61-64. (in Chinese)
- [25] IMAMURA N, NISHIJIMA M, ADACHI K, SANO H. Novel antimycin antibiotics, urauchimycins A and B, produced by marine actinomycete[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1993, 46: 241-246.
- [26] ZHANG H T, LEE Y K, ZHANG W, LEE H K. Culturable actinobacteria from the marine sponge *Hymeniacidon perleve*: isolation and phylogenetic diversity by 16S rRNA gene-RFLP analysis[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2006, 90:

- 159-169.
- [27] EI-GENDY M M A, EL-BONDKLY A M A. Production and genetic improvement of a novel antimycotic agent, saadamycin, against dermatophytes and other clinical fungi from endophytic *Streptomyces* sp. Hedaya48[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2010, 37(8): 831-841.
- [28] JOSEPH F J R S, INIYAN A M, VINCENT S G P. HR-LCMS based analysis of two antibacterial metabolites from a marine sponge symbiont *Streptomyces pharmamarensis* ICN40[J]. Microbial Pathogenesis, 2017(111): 450-457.
- [29] HUANG X L, KONG F D, ZHOU S Q, HUANG D, ZHENG J, ZHU W. *Streptomyces tirandamycinicus* sp. nov., a novel marine sponge-derived actinobacterium with potential against *Streptococcus agalactiae*[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 482.
- [30] 王聪, 梅显贵, 朱伟明. 海洋链霉菌来源的天然产物[J]. 海洋科学集刊, 2016, 51: 86-124.  
WANG C, MEI X G, ZHU W M. Natural products derived from marine *Streptomyces*[J]. Studia Marina Sinica, 2016, 51: 86-124. (in Chinese)
- [31] AI-TAI A, KIM B, KIM S B, MANFIO G P, GOODFELLOW M. *Streptomyces malaysiensis* sp. nov., a new streptomycete species with rugose, ornamented spores[J]. International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology, 1999, 49(4): 1395.
- [32] 刘为营, 殷瑜, 钱秀萍, 戈梅, 阮林高, 许激扬. 放线菌 1161 代谢产物分离纯化及其菌种鉴定[J]. 药物生物技术, 2011, 18(4): 322-327.  
LIU W Y, YIN Y, QIAN X P, GE M, RUAN L G, XU J Y. Metabolite purification and taxonomic identification of actinomycete strain 1161[J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2011, 18(4): 322-327. (in Chinese)
- [33] 吉才娟, 王佩, 梅文莉, 黄小龙, 戴好富. 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.  
JI C J, WANG P, MEI W L, HUANG X L, DAI H F. Second metabolites of a marine *Streptomyces* sp. HNWSW-49[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2018, 39(4): 758-762. (in Chinese)
- [34] 郭志凯, 王蓉, 吴炜城, 黎明, 何汪桂, 周石林. 两株海绵放线菌产生的抗菌活性产物研究[J]. 深圳大学学报(理工版), 2022, 39(5): 550-558.  
GUO Z K, WANG R, WU W C, LI M, HE W G, ZHOU S L. Bioactive secondary metabolites from two sponge-derived actinomycetes[J]. Journal of Shenzhen University (Science and Engineering), 2022, 39(5): 550-558. (in Chinese)