

南海羽毛藻共附生放线菌分离鉴定及其活性测定

刘哲良^{1,2,3}, 郭志凯², 艾丽曼·阿布来孜², 张世清², 马 帅², 王 蓉^{3*},
熊子君^{2*}

1. 海南热带海洋学院, 海南三亚 572000; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所/海南省热带微生物资源重点实验室/海南热带农业资源研究院/海南省热带农业生物资源保护与利用重点实验室, 海南海口 571101; 3. 海南省海洋与渔业科学院/海南省热带海水养殖技术重点实验室, 海南海口 571126

摘 要: 病原细菌是造成水产养殖业损失的主要因素, 目前生物防治被认为是一种很有前途的防治策略。海藻是海洋生态系统的重要组成部分, 海藻藻际有丰富多样的微生物群落。为探究南海海藻共附生放线菌资源的多样性及潜在的应用价值, 对海南陵水羽毛藻共附生放线菌进行分离、鉴定与抗菌活性测试。采用稀释涂布法对采集的羽毛藻进行放线菌分离, 并进行 16S rRNA 基因测序、序列比对及系统发育树构建。结果表明: 分离获得链霉菌属 (*Streptomyces*) 20 株、拟诺卡氏菌属 (*Nocardiopsis*) 1 株以及微杆菌属 (*Microbacterium*) 1 株; 采用滤纸片法以欧文氏氏弧菌 (*Vibrio owensii*) 等 9 种病原细菌为靶标对菌株发酵粗提物进行抗菌活性测试, 结果显示, 所有菌株至少对 1 种细菌表现出抑制作用; 通过高效液相色谱分析菌株粗提物的化学多样性, 结果显示, 菌株 HZ057 具有更丰度的次级代谢产物; 为了进一步研究菌株盐胁迫耐性, 进行了耐盐性测试, 结果显示, 所有菌株在 0%~4% NaCl 条件下生长良好, 菌株 HZ054 和 HZ057 在 12% NaCl 浓度下仍有孢子生长; 对菌株 HZ057 进行全基因组测序并通过 antiSMASH 预测各基因簇功能, 结果显示, 其基因组含有 29 个次级代谢产物基因簇且结构类型多样, 有待进一步深入发掘。本研究从南海羽毛藻中分离获得链霉菌属、拟诺卡氏菌属以及微杆菌属菌株, 并且发现它们具有一定程度的抗菌活性和较丰富的次级代谢产物产生能力, 具有潜在的研究价值。本研究结果为推进羽毛藻共附生微生物的开发利用, 以及为南海海藻共附生放线菌资源的研究奠定基础。

关键词: 羽毛藻; 共附生放线菌; 分离鉴定; 抗菌活性; 次级代谢产物

中图分类号: R915; Q939.92 文献标志码: A

Isolation, Identification and Antibacterial Activity of Symbiotic or Epiphytic Actinomycetes Associated with *Caulerpa sertularoides* f. *Longipes* in South China Sea

LIU Zheliang^{1,2,3}, GUO Zhikai², A BU LAI ZI Ailiman², ZHANG Shiqing², MA Shuai², WANG Rong^{3*},
XIONG Zijun^{2*}

1. Hainan Tropical Ocean University, Sanya, Hainan 572000, China; 2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Hainan Key Laboratory of Tropical Microbe Resources / Hainan Institute for Tropical Agricultural Resources / Key Laboratory for Biology and Genetic Resources of Tropical Crops of Hainan Province, Haikou, Hainan 571101, China; 3. Hainan Academy of Ocean and Fisheries Sciences / Hainan Provincial Key Laboratory of Tropical Maricultural Technologies, Haikou, Hainan 571126, China

Abstract: Pathogenic bacteria are the primary causative agents of economic losses in the aquaculture industry, and bio-

收稿日期 2025-01-08; 接受日期 2025-02-21

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 82404490); 海南省重点研发专项 (No. ZDYF2024XDNY229); 研究生创新课题 (No. RHDYC-202415)。

作者简介 刘哲良 (1998—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 资源与环境。*通信作者 (Corresponding author): 王 蓉 (WANG Rong), E-mail: wangrong1982@gmail.com; 熊子君 (XIONG Zijun), E-mail: xiongzijun@itbb.org.cn。

logical control is currently regarded as a promising strategy for prevention and management. Algae, as crucial components of marine ecosystems, host diverse and abundant microbial communities within their phycospheres. In order to explore the diversity and potential application value of algae-associated symbiotic or epiphytic actinomycetes resources in South China Sea, the isolation identification and antibacterial activity screening of symbiotic or epiphytic actinomycetes from *Caulerpa sertularoides* f. *Longipes*, collected from Lingshui, Hainan, were carried out. Actinomycetes were isolated through dilution coating method and identified according to the 16S rRNA gene sequences alignment and by phylogenetic tree construction. The results revealed that 20 strains were identified as *Streptomyces*, one as *Nocardiopsis*, and one as *Microbacterium*. The antibacterial activity of the fermented crude extracts of the obtained strains was evaluated against nine pathogenic bacteria, including *Vibrio owensii* using the filter paper method. Results showed that all strains exhibited inhibitory effects on at least one type of bacteria. High-performance liquid chromatography (HPLC) was employed to assess the chemical diversity of the crude extracts. Results showed that strain HZ057 had a higher abundance of secondary metabolites than other strains. To further investigate the salt stress tolerance of the strains, salt tolerance tests were conducted. The results showed that all the strains could grow well on 0%–4% NaCl, HZ054 and HZ057 could still grow at a salt concentration of 12%. The whole genome of HZ057 was sequenced and the functions of each gene cluster were predicted using antiSMASH. The analysis revealed that the genome contained 29 secondary metabolite genes clusters with diverse structural types, indicating that this strain is associated with a rich diversity of secondary metabolites. In this study, strains of *Streptomyces*, *Nocardiopsis* and *Micrococcus* were isolated firstly from the algae *Caulerpa sertularoides* f. *Longipes* in the South China Sea, indicating that the algae contained abundant actinomycete resources. Moreover, it was found that the identified strains exhibited significant antibacterial activity and the ability to produce a variety of secondary metabolites, suggesting the potentials for future research and applications.

Keywords: *Caulerpa sertularoides* f. *Longipes*; symbiotic or epiphytic actinomycetes; isolation and identification; antibacterial activity; secondary metabolites

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.06.024

在过去几十年，自然渔业资源的枯竭促进了水产养殖的蓬勃发展，目前亚洲水产 60%以上来源于中国，并且产量还在逐年增加。大规模及高密度养殖使海洋病原细菌引起的病害严重影响水产养殖业^[1-2]。据不完全统计，水产病害导致我国每年水产养殖损失高达上百亿元。为快速有效地控制各种疾病，人们常使用杀菌剂及抗生素等化学药物，但滥用化学药剂导致耐药性等问题日益突出，促使对生物防治的需求不断提高。目前放线菌来源的天然产物已成为微生物源农药的主体之一^[3]。如土霉素和克林霉素已广泛应用于渔业病害防治，以减缓或替代部分化学农药的使用。由于陆生环境中新生物活性物质的发现数量逐年减少，导致人类对新型生物活性物质的探索进程受到严重阻碍^[4]，人类将目光转向目前开发不足 10% 的海洋。海洋放线菌在高压、高盐、缺氧、低（无）光照等特殊的海洋生态系统中可能产生结构新颖和活性显著的次级代谢产物^[5-8]。

海藻藻际存在大量微生物，海藻为微生物提供营养，反之微生物通过产生生物活性物质或结构新颖的次级代谢产物保护其宿主^[9-10]。例如，石莼来源放线菌产生具有抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*,

MRSA）活性的苯丙霉素类化合物^[11]，从褐藻中分离得到的链霉菌产生活性代谢物去铁胺 B 及其新衍生物去铁胺 B2 对 MRSA、耐亚胺培南鲍氏不动杆菌（imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, IRAB）和耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌（carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, CRPA）具有抗菌活性^[12]。由此可见，海藻共附生放线菌具有产生新的活性次级代谢产物的能力，但是目前对藻类共附生微生物的研究主要集中在真菌上，而对放线菌培养利用的研究较少^[13]。

羽毛藻，学名棒叶蕨藻变种（*Caulerpa sertularoides* f. *Longipes*），隶属于绿藻门（Chlorophyta）绿藻纲（Chlorophyceae）蕨藻目（Caulerpales）蕨藻科（Caulerpaceae）蕨藻属（*Caulerpa*），是一种羽毛状的海藻，具有繁殖快、生长快和环境适应性强、吸收污染物以及生产有机物和氧气等特点。近年来 LIMA 等^[14]研究发现，将羽毛藻与虾共生能使虾的存活率与生长率显著提高，这可能与羽毛藻表面的微生物有关，但尚未进行验证。本研究对羽毛藻样品的共附生放线菌进行分离、鉴定，并对其抗菌活性和次级代谢产物多样性进行评价，以推进羽毛藻共附生微生物的开发利用，为南海海藻共附生放线菌资源研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试样品 羽毛藻样品采自海南省陵水黎族自治县黎安镇黎安港泻湖 (110°03'3.00"E, 18°25'46.66"N), 采后将样品装入无菌密封袋中置于冰盒中保存。

1.1.2 培养基 (1) 分离培养基。改良高氏 1 号培养基^[10]: 可溶性淀粉 20.0 g/L、氯化钠 0.5 g/L、硫酸亚铁 0.01 g/L、硝酸钾 1.0 g/L、磷酸氢二钾 0.5 g/L、硫酸镁 0.5 g/L、琼脂 15.0 g/L、海盐 17.5 g/L, pH 为 7.3±0.2。

TWYE 培养基^[15]: 酵母提取物 0.25 g/L、磷酸氢二钾 0.5 g/L、琼脂 20 g/L、海盐 17.5 g/L, pH 为 7.3±0.2。

1/2 ATCC 培养基^[10]: 葡萄糖 10.0 g/L、可溶性淀粉 20.0 g/L、酵母提取物 5.0 g/L、酸水解酪蛋白 5.0 g/L、碳酸钙 1.0 g/L、琼脂 15.0 g/L、海盐 17.5 g/L, pH 为 7.3±0.2。

(2) 放线菌纯化培养基。ISP2 培养基^[10]: 麦芽提取物 10.0 g/L、酵母提取物 4.0 g/L、葡萄糖 4.0 g/L、琼脂 20.0 g/L、海盐 17.5 g/L, pH 为 7.3±0.2。

(3) 放线菌液体发酵培养基。LM1 培养基: 蔗糖 20.0 g/L、麦芽提取物 10.0 g/L、葡萄糖 10.0 g/L、蛋白胨 1.0 g/L、碳酸钙 1.0 g/L、海盐 17.5 g/L, pH 为 7.3±0.2。

LM3 培养基: 葡萄糖 20.0 g/L、麦芽提取物 10.0 g/L、蛋白胨 1.0 g/L、碳酸钙 1.0 g/L、海盐 17.5 g/L, pH 为 7.3±0.2。

(4) 抗菌活性筛选培养基。LB 液体培养基^[15]: 胰蛋白胨 10.0 g/L、酵母粉 5.0 g/L、氯化钠 5.0 g/L、琼脂 20.0 g/L, pH 为 7.3±0.2。

胰酪大豆胨液体培养基 (TSB)^[10]: 胰酪胨 17.0 g/L、大豆木瓜蛋白酶水解物 3.0 g/L、氯化钠 5.0 g/L、磷酸氢二钾 2.5 g/L、葡萄糖 2.5 g/L、海盐 17.5 g/L, pH 为 7.3±0.2。

1.1.3 供试病原菌菌株 水稻白叶枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*, A)、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*, B)、哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*, C)、溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*, D)、藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*, E)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA, F)、欧文斯氏弧菌 (*V. owensii*, G)、海豚链球菌 (*S. iniae*, H)、美人鱼发光杆菌 (*Photobacterium damsela*, I) 保存

于中国热带农业科学院热带生物技术研究所。

1.1.4 主要试剂和仪器 电子分析天平 ME104T 购自瑞士 Mettler Toledo 集团; 恒温摇床 (ZQZY-CS8V) 购自上海知楚仪器有限公司; 色谱甲醇购自天津康科德科技有限公司; 分析纯级乙酸乙酯购自广东光华科技股份有限公司; 二甲基亚砜 (DMSO) 购自上海麦克林生化科技有限公司; 电热鼓风干燥箱购自上海一恒科学仪器有限公司; 生化培养箱购自上海一恒科学仪器有限公司; 立式旋转蒸发仪购自上海爱朗仪器有限公司; 高效液相色谱仪 (1260 型) 购自美国 Agilent 公司; 数控超声波清洁剂 KQ-500DE 购自东莞市科桥超声波设备有限公司。

1.2 方法

1.2.1 样品处理及其共生微生物分离纯化 使用无菌半海水 (海盐浓度为 1.75%) 清洗羽毛藻样品 2~3 次, 将沙泥冲洗干净, 用 75% 酒精浸泡 30 s 杀灭表面细菌, 然后用无菌半海水冲洗 2 遍, 置于超净台晾干。使用无菌镊子、剪刀将样品剪成小块, 置于无菌研钵中, 加入 5~10 mL 无菌半海水研磨成浆, 移入无菌试管进行梯度稀释, 吸取原液、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 稀释液各 200 μ L 涂布于高氏 1 号、TWYE 以及 1/2 ATCC 培养基 (分离培养基均含 50 μ g/mL 重铬酸钾) 上, 重复 2 个平板。倒置于 28 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养, 每周观察, 培养至 8 周。根据菌落形态用牙签挑取分离板上的单菌落, 接种至 ISP2 固体平板培养基进行纯化培养, 多次纯化后得到纯培养物, 对菌株进行编号, 将菌株保存于无菌甘油 (20%) 中, 置于 -80 $^{\circ}$ C 保存, 备用。

1.2.2 放线菌 16S rRNA 基因序列分析 将分离得到的菌株进行 16S rRNA 基因测序。将获得的序列在 EZ BioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/login>) 数据库中进行同源序列比对搜索, 选择相似度大于 98% 的菌株的 16S rRNA 基因序列作为参比对象, 使用 MEGA 11 软件进行多序列对比, 采用邻接法 (neighbor-joining method) 进行系统发育树的构建和分析。

1.2.3 菌株的抗菌活性筛选 以供试病原菌菌株为指示菌进行活性筛选。在 50 mL 锥形瓶中配制 20 mL 液体 LB 培养基, 于 121 $^{\circ}$ C 高压灭菌 20 min, 冷却后加入活化的病原菌菌液 20 μ L, 在 37 $^{\circ}$ C、160 r/min 条件下振荡培养 12~24 h, 使 OD₆₀₀ 为

0.50~0.65,用于活性筛选试验,并与40%甘油1:1混合后保存于-80℃。

(1) 菌株发酵。根据形态和16S rRNA 序列分析结果将分离获得的放线菌去重后选取 LM1 和 LM3 液体培养基进行小规模发酵。在纯化的待测放线菌中挑取适量孢子接种于 100 mL 种子培养基 TSB 中,在 28℃、160 r/min 条件下振荡培养 3 d,然后按体积分数为 10%的接种量转接至 2 L 发酵培养基 LM1 和 LM3 中,在 28℃、160 r/min 条件下振荡培养 14 d。发酵结束后,在发酵液中加入等体积乙酸乙酯萃取 3 次,将有机相合并后在旋转蒸发器中浓缩得到粗提物,粗提物用二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)配制成浓度为 20 mg/mL 的溶液,置于 4℃保存,用于抗菌活性检测。

(2) 活性筛选。采用滤纸片法观察测定发酵粗提物对 9 种供试病原菌的抑菌活性。吸取 200 μ L 病原菌菌液和 20 mL 冷却至 50℃的 LB 固体培养基于 50 mL 锥形瓶中,混匀后倾注于培养皿。待平板凝固后,用无菌镊子放入灭菌滤纸片(直径 10 mm),以 DMSO 为阴性对照,卡那霉素(10 mg/mL)为阳性对照,每个滤纸片上滴加 10 μ L 菌株发酵粗提物(20 mg/mL),设置 3 次重复,置于 28℃恒温培养 12~24 h 后观察。如果供试样品具有抑菌活性,在滤纸片周围会出现清晰的无菌生长抑菌圈。采用十字交叉法测定抑菌圈直径,重复 3 次。

(3) HPLC 分析检测。将菌株 HZ037、HZ041、HZ046、HZ051、HZ054、HZ055、HZ056、HZ057、HZ063 发酵提取物经色谱甲醇溶解后,使用 0.22 μ m 过滤器过滤,滤液置于质谱小瓶进行 HPLC 检测(Agilent Zorbax SB C18 色谱柱,250 mm $\times$ 4.6 mm,5 μ m)。检测条件:以超纯水(A)、甲醇(B)为流动相;梯度洗脱:0~15 min,10%~100% B;15~20 min,100% B;20~25 min,10% B,流量为 1.0 mL/min,柱温为 25℃,进样量为 10 μ L。

1.2.4 菌株的耐盐度试验 刮取分离纯化的 9 株放线菌孢子接种于 TSB 液体培养基中,置于摇床于 28℃、160 r/min 振荡培养 3 d,吸取 200 μ L 定量涂板。在分离菌株能够生长良好的 ISP 2 培养基中分别添加 0%、2%、4%、6%、8%、10%、12%、14% NaCl 灭菌后倒平板,定量涂布,每组设 2 个重复,倒置于 28℃培养箱恒温培养 14 d,观察并记录生长情况。

1.2.5 目标菌株的全基因组测序与分析 将菌株纯化后送至测序公司,基于 Nanopore promethION 48 三代技术平台以及 illumina Novaseq 6000 二代测序技术平台进行测序,使用 Flye 软件进行组装得到高质量的组装基因组,通过基因预测、功能元件分析,以及专有数据库注释了解全基因组的信息,通过 antiSMASH(<https://antismash.secondarymetabolites.org>)在线网站对次级代谢基因簇进行分析。

2 结果与分析

2.1 海藻共附生放线菌菌种分离、鉴定

利用 3 种分离培养基从海南陵水采集的羽毛藻中共分离得到 22 株放线菌。其中,改良高氏 1 号培养基分离得到 10 株,1/2 ATCC 培养基分离得到 5 株,TWYE 培养基分离得到 7 株。由此可见,改良高氏 1 号培养基用于分离羽毛藻放线菌具有明显优势,可作为首选培养基。为确定菌株分类地位,对 22 株放线菌进行 16S rRNA 基因序列鉴定,通过 EZ BioCloud 序列比对、相似性分析,其中链霉菌属(*Streptomyces*)最多(20 株),拟诺卡氏菌属(*Nocardopsis*)和微杆菌属(*Microbacterium*)各 1 株,这些菌株为首次从羽毛藻中分离获得的纯培养物。根据 16S rRNA 基因序列构建 22 株海藻共附生放线菌相近种之间的系统发育树(图 1)。菌株 HZ037、HZ039、HZ047、HZ052、HZ053、HZ061 和 HZ064 与 *S. rochei* NRRLB 2410^T 的相似度达 100%; HZ041、HZ042、HZ043、HZ044、HZ060 和 HZ062 与 *S. daghestanicus* NRRLB 5418^T 的相似度为 99.93%; HZ046、HZ048 和 HZ059 与 *S. griseoincarnatus* LMG 19316^T 的相似度为 100%; HZ051 与 *S. abyssomicinicus* CHI39^T 的相似度为 99.85%; HZ054 与 *S. griseoflavus* LMG 19344^T 的相似度为 100%; HZ055 与 *N. changdeensis* Mg02^T 的相似度为 99.71%; HZ056 与 *S. luozhongensis* TRM 49605^T 的相似度为 99.78%; HZ057 与 *S. levis* NBRC 15423^T 的相似度为 99.93%; HZ063 与 *M. resistens* NBRC 103078^T 的相似度为 98.31%。

2.2 菌株发酵粗提物抑菌活性及化学多样性分析

以欧文斯氏弧菌等 9 种病原细菌为指示菌,采用滤纸片法对 9 株放线菌发酵粗提物进行抗菌活性测定。抗菌试验结果如表 1 所示,9 株放线

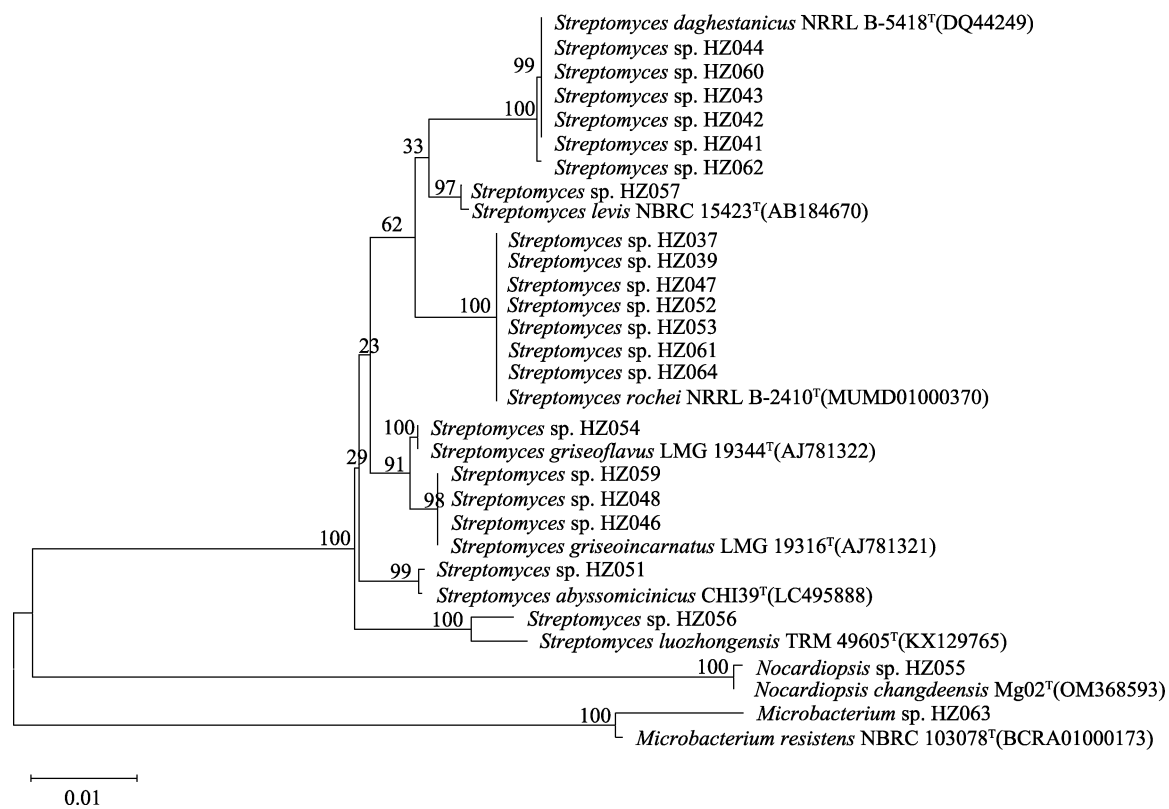


图 1 羽毛藻共附生放线菌菌株基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of *Caulerpa sertularioides* f. *Longipes*-associated actinomycetes based on 16S rRNA gene sequences

表 1 羽毛藻共附生放线菌的抗菌活性

Tab. 1 Antibacterial activity of *Caulerpa sertularioides* f. *Longipes*-associated actinomycetes

菌株 Strain	培养基 Medium	抑菌圈直径 Antibacterial circle diameter/mm								
		A	B	C	D	E	F	G	H	I
HZ037	LM1	—	—	—	—	—	12	—	10	—
	LM3	—	—	—	—	—	11	—	10	—
HZ041	LM1	—	15	—	—	—	—	—	—	13
	LM3	—	14	—	—	—	—	—	—	14
HZ046	LM1	—	—	—	—	—	—	—	12	14
	LM3	—	—	—	—	—	—	—	12	13
HZ051	LM1	14	16	—	—	—	—	—	—	—
	LM3	15	16	—	—	—	—	—	—	—
HZ054	LM1	—	—	—	—	9	—	13	—	—
	LM3	—	—	—	—	9	—	13	—	—
HZ055	LM1	—	—	—	13	—	—	—	14	—
	LM3	—	—	—	12	—	—	—	14	—
HZ056	LM1	—	—	—	—	—	—	15	—	—
	LM3	—	—	—	—	—	—	15	—	—
HZ057	LM1	—	—	—	—	13	—	11	—	—
	LM3	—	—	—	—	12	—	10	—	—
HZ063	LM1	—	—	—	—	—	—	—	12	—
	LM3	—	—	—	—	—	—	—	12	—

注：—表示无活性。

Note: — indicates inactive

菌均对至少 1 种指示菌表现出抑菌活性，但均对哈维氏弧菌（C）无抑制活性。将菌株 HZ037、HZ041、HZ046、HZ051、HZ054、HZ055、HZ056、HZ057 以及 HZ063 的发酵粗提物进行 HPLC 分析，结果发现菌株 HZ057 的次级代谢产物相较于其他菌株的次级代谢产物丰富度高，以菌株 HZ057 为研究对象进行后续试验。由于选用的 2 种液体培养基成分高度相似，使同种菌株在 2 种不同发酵培养基中获得的粗提物活性和代谢产物丰富度较一致。

2.3 菌株 HZ057 的全基因组测序与分析

通过高通量测序对菌株 HZ057 进行全基因组测序获得基因组数据，在 NCBI 中下载与菌株 HZ057 邻近的相关菌株基因组序列，利用 Type Strain Genome Server (<https://tygs.dsmz.de/>) 构建菌株 HZ057 与邻近菌株在全基因组水平上的系统发育树（图 2）。在基因组系统发育树中，菌株 HZ057 与 *S. djakartensis* JCM4957^T 聚为一支，进化关系最近，通过计算二者的平均核苷酸同一性（average nucleotide identity, ANI）和数字 DNA-DNA 杂交（digital DNA-DNA hybridization, dDDH），分别为 94.27%和 56.00%，不支持二者

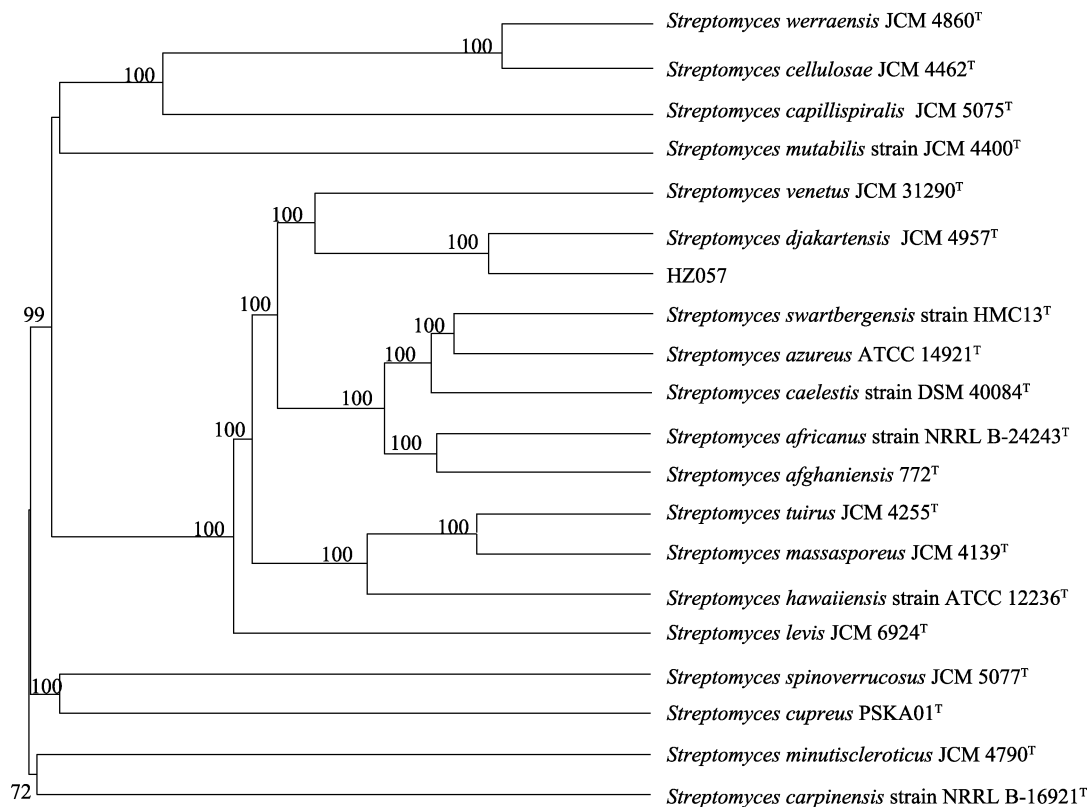


图 2 HZ057 全基因组系统发育树

Fig. 2 Genome-wide phylogenetic tree of HZ057

为同一物种；选取与这 2 株菌聚类为同一大支的另外 11 株典型菌株，分别计算这些菌株与 HZ057 的 ANI 和 dDDH（表 2），结果显示，ANI 均小于目前原核生物分类体系中种分类的 ANI 临界值（95%）和 dDDH 临界值（70%）。由此推测，菌株 HZ057 可能是链霉菌属的一个新物种，但仍需进一步结合其形态学特征、生理生化特征、培养特征和化学特征进行判断。

通过 antiSMASH 在线网站 (<https://antismash.secondarymetabolites.org>) 对菌株 HZ057 的次级代谢产物生物合成基因簇类型进行分析，结果如表 3 所示。菌株 HZ057 存在 29 个潜在的次级代谢产物合成基因簇，负责合成的次级代谢产物主要类型有：萜类（terpene）、聚酮类（PKS）、类似核糖体肽（RiPP-like）以及铁载体（NI-siderophore）等。从基因簇相似度来看，HZ057 有 7 个基因簇与已知基因簇的相似度为 100%；有 3 个基因簇与已知基因簇的相似度大于 60%，有 12 个基因簇与已知基因簇的相似度小于 60%，有 7 个未知基因簇可能产生新的次级代谢产物。其中，基因簇 9 位于基因组的 4553~76 325 nt，与去铁胺 B/E（desferrioxamin B/E）生物合成基因簇相似度达

表 2 菌株 HZ057 与模式菌之间的 ANI 和 dDDH

Tab. 2 ANI and dDDH between strain HZ057 and model bacteria

模式菌 Model bacteria	ANI/%	dDDH/%
<i>S. djakartensis</i> JCM 4957 ^T	94.27	56.00
<i>S. swartbergensis</i> HMC13 ^T	89.81	39.10
<i>S. venetus</i> JCM 31290 ^T	90.29	40.30
<i>S. afghaniensis</i> 772 ^T	89.81	39.10
<i>S. africanus</i> NRRLB-24243 ^T	89.59	38.60
<i>S. azureus</i> ATCC 14921 ^T	89.68	38.40
<i>S. caelestis</i> DSM 40084 ^T	89.45	38.10
<i>S. tuius</i> JCM 4255 ^T	88.87	36.00
<i>S. massasporeus</i> JCM 4139 ^T	88.73	36.20
<i>S. hawaiiensis</i> ATCC 12236 ^T	89.81	39.10
<i>S. levis</i> JCM 6924 ^T =NBRC 15423 ^T	88.38	35.50

到 100%。去铁胺是一种天然的螯合剂，主要用于治疗铁中毒以及与铁相关的疾病治疗^[21]。基因簇 24 位于基因组 46 157~71 976 nt，与萜类化合物 isorenierantene 生物合成基因簇的相似度为 100%。isorenierantene 是一种芳香类胡萝卜素，已成为涂抹奶酪的成分之一，具有特殊的抗氧化能力和显著的光保护作用^[29]。基因簇 29 位于基因组 5070~46 254 nt，与Ⅲ型 PKS germicidin 生物合成

表 3 菌株 HZ057 次级代谢物生物合成基因簇类型
Tab. 3 Secondary metabolite biosynthesis gene cluster types of strain HZ057

序号 No.	类型 Type	已知最相似的集群 The most similar cluster	相似度 Similarity/%	参考文献 Reference
1	NRPS-like			
2	terpene	hopene	92	[16]
3	hydrogen-cyanide	aborycin	21	[17]
4	NI-siderophore	kinamycin	19	[18]
5	ectoine	ectoine	100	[19]
6	RiPP-like			
7	terpene	geosmin	100	[20]
8	T1PKS, butyrolactone	4-hexadecanoyl-3-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-2H-furan-5-one	45	
9	NI-siderophore	desferrioxamin B/desferrioxamine E	100	[21]
10	T1PKS, melanin	melanin	80	[22]
11	terpene	SCO-2138	14	
12	T1PKS, butyrolactone	Thaxtomin D/thaxtomin A/thaxto-min C/thaxtomin B	16	[23]
13	NI-siderophore	paulomycin	11	[24]
14	RiPP-like, lanthipeptide-class-iii	informatipeptin	100	
15	amglyccycl	spectinomycin	54	[25]
16	oligosaccharide, LAP, RRE-containing			
17	terpene	albaflavenone		[25]
18	NRP-metallophore, NRPS	coelichelin	100	[25]
19	other	colibrimycin		
20	butyrolactone, NRPS	cyclofaulknamycin		[26]
21	phenazine	phenazineSA/phenazine SB/phenazi-ne SC	37	[27]
22	tripeptide			
23	RiPP-like	granaticin	5	[28]
24	terpene	isorenieratene	100	[29]
25	butyrolactone	cyphomycin	5	[30]
26	melanin	melanin	42	[21]
27	T1PKS, NRPS			
28	T2PKS	spore pigment	75	[31]
29	T3PKS	germicidein	100	[32]

基因簇的相似度为 100%，germicidein 属于 α -吡喃酮家族的一员，具有烯烴和芳香化合物的性质，可作为关键的生物合成中间体并参与如生物防御等许多不同类型的生物反应过程，具有广泛的生物活性^[32]。

2.4 菌株耐盐性试验

选择去重后的 9 株放线菌分别定量涂布于含不同浓度 NaCl 的 ISP2 固体培养基（不含海盐）上，培养 14 d 后观察菌株生长状态。结果表明，所有菌株在含 0%~4% NaCl 的固体培养基上生长良好，在含 6% NaCl 的固体培养基上生长一般，在含 8% NaCl 的固体培养基上有零星孢子生长；菌株 HZ054 和 HZ057 在含 10%、12% NaCl 的固

体培养基上仍有孢子生长（表 4）。由此可见，菌株 HZ054 和 HZ057 具有高度的盐环境适应性。

3 讨论

3.1 海藻的生态与资源价值

海藻不仅对海洋生态系统的健康和平衡发挥着重要作用，而且含有丰富的活性物质。近年来，随着对海洋动植物共附生放线菌的研究不断深入，海藻共附生放线菌被不断发现并受到关注。例如，于伟伟等^[10]采用稀释涂布平板法对 6 种海藻进行放线菌分离，从西沙海藻共附生环境中分离出盐孢菌属；PALMER 等^[32]分离鉴定了褐藻和马尾藻来源的 4 个放线菌以及绿藻来源的 3 个放

表 4 菌株耐盐性测试
Tab. 4 Salinity tolerance test of strains

菌株 Strain	菌株生长情况 Growth status of strains							
	0	2%	4%	6%	8%	10%	12%	14%
HZ037	+++	+++	+++	++	+	-	-	-
HZ041	+++	+++	+++	++	+	-	-	-
HZ046	+++	+++	+++	++	+	-	-	-
HZ051	+++	+++	+++	++	+	-	-	-
HZ053	+++	+++	+++	++	+	-	-	-
HZ054	+++	+++	+++	++	+	+	+	-
HZ057	+++	+++	+++	++	+	+	+	-
HZ055	+++	+++	+++	++	+	-	-	-
HZ063	+++	+++	+++	++	+	-	-	-

注：+++表示生长良好；++表示生长较好；+表示生长弱；-表示不生长。

Note: +++ indicates good growth; ++ indicates better growth; + indicates weak growth; - indicates no growth.

线菌；孙晓梦^[33]利用稀释平板法从采自北极新奥尔松地区的海洋红藻多管藻样品中分离纯化得到 60 株可培养的藻类附生细菌，其中 10 株隶属于放线菌门的盐地杆菌属（*Salinibacterium*）。目前海洋大型藻类已成为获得新型藻类附生菌资源以及新型微生物活性物质的理想研究对象及分离源。

本研究通过采用 3 种分离培养基对羽毛藻的共附生放线菌进行分离，得到 22 株放线菌，其中链霉菌属为优势菌属，拟诺卡菌属以及微杆菌属为海洋稀有放线菌属，这表明羽毛藻中的放线菌种类较丰富。在耐盐性测试中所有菌株在含 0%~4% NaCl 的培养基中均生长良好，而菌株 HZ057 和 HZ054 在含 12% NaCl 的培养基中仍有孢子生长，说明羽毛藻共附生放线菌具有对盐环境的适应性。

3.2 海藻放线菌在水产养殖病害防治中的潜力

由弧菌和链球菌等引起的病害是水产养殖业中影响严重的细菌型病害，发生如体色变黑、鳃丝呈灰白色、腹部肿胀、鳍基部充血、口部充血发红等症状的弧菌病在我国沿海养殖区扩散^[34]；能感染多种经济鱼的无乳链球菌造成鱼的死亡率达 30%~80%，经济损失高达数亿元^[35]。海洋病原细菌的抗生素耐药性问题已成为从海洋环境中寻找新型抗菌化合物的重要驱动力。例如，ULFAH 等^[36]从红海藻中分离出 10 种海洋放线菌并进行抗弧菌试验，结果表明，5 株放线菌对溶藻弧菌和副溶血性弧菌的最小抑菌浓度（MIC）在 0.625~5.000 μg/μL 之间；于伟伟等^[10]从南海仙掌

藻、蕨藻以及伴绵藻中分离出 36 株海洋放线菌，对欧文斯氏弧菌等 10 种海洋病原性细菌进行抑菌试验，结果表明，36 株放线菌均至少对 1 种病原细菌有抗菌活性，且部分放线菌的抗菌活性优于阳性对照卡那霉素。由此可见，海洋放线菌在弧菌等水产养殖病原细菌的防治中具有一定的应用潜力。

本研究分离获得的海藻共附生放线菌对水产养殖病原细菌，包括无乳链球菌、溶藻弧菌、欧文氏弧菌、海豚链球菌和美人鱼发光杆菌等均表现出抗菌活性，为防治这些致病菌提供了新的选择，具有潜在的应用价值。

3.3 海藻共附生微生物次级代谢产物的研究进展与前景

自 20 世纪以来，很多学者开始关注海藻相关真菌的次级代谢产物，这些真菌能够产生多种新颖且具有生物活性的次级代谢产物。近年来，海藻相关放线菌的次级代谢产物也逐渐受到关注，如分离自褐藻的链霉菌 *S. cyaneofuscatus* M-27 能够产生抗肿瘤的化合物 daunomycin 和 cosmomycin B，抗真菌的大环内酯类化合物 maltophilin 和聚酮类化合物 germicidins A、B^[37]；*S. carnosus* M-40 能产生具有抗炎、抗癆作用的 lobophorine B 和聚酮类化合物 galtamycin B^[37]；*S. sundarban-sensis* WR1L1S8 能够产生抗细菌活性的 phaechromycins B、C、E 和 1 个新的聚酮化合物，其中新化合物对 MRSA 的 MIC 为 6 μmol/L^[38]；马尾藻共附生放线菌 *Nocardiopsis* sp. AS23C 能够产生一个新的酚酸衍生物 4-amino-6-methylsalicylic acid，该物质具有较强的抗细菌活性^[39]；小单孢菌（*Micromonospora* sp.）CNY-010 能够产生大环内脂新霉素 B^[39]。这些研究表明，海藻共附生微生物及其代谢产物在医药和农业等领域具有较好的应用前景。

本研究在抑菌活性试验中发现羽毛藻中分离获得的放线菌至少对 1 种供试病原细菌表现出抑制作用，并且对水产病原细菌欧文斯氏弧菌和无乳链球菌表现出较好的抑菌活性。对其中次级代谢产物丰富的菌株 HZ057 进行全基因组测序和次级代谢产物生物合成基因簇分析，发现该菌株的次级代谢产物生物合成基因簇中与已报道的去铁胺、germicidin 以及保罗霉素等具有抗菌、抗肿瘤、抗癌、免疫抑制活性分子的生物合成基

因簇类似, 菌株 HZ057 可能产生类似结构的次级代谢产物从而发挥抗菌活性; 此外, HZ075 基因组中也有与已知代谢物生物合成基因簇相似性低或未预测到的基因簇, 存在产生新颖结构次级代谢产物的可能。因此, 进一步深入研究该菌株的次级代谢产物, 有望发现具有重要生物活性的新型次级代谢产物, 在水产病害防治上具有应用前景, 为海洋药物或生物防治菌剂的研发提供新资源。

参考文献

- [1] WANG J J, BEUSEN A H W, LIU X C, BOUWMAN A F. Aquaculture production is a large, spatially concentrated source of nutrients in Chinese freshwater and coastal seas[J]. *Environmental Science Technology*, 2020, 54(3): 1464-1474.
- [2] FLORES KOSSACK C, MONTERO R, KOLLNER B, MAISEY K. Chilean aquaculture and the new challenges: pathogens, immune response, vaccination and fish diversification[J]. *Fish Shellfish Immunology*, 2019, 98: 58-27.
- [3] 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)
- [4] KATZ L, BALTZ R H. Natural product discovery: past, present, and future[J]. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, 2016, 43(2/3): 155-176.
- [5] 王成, 张国建, 刘文典, 杨新雨, 朱妮, 申静敏, 王志成, 刘杨, 程珊, 于广利, 管华诗. 海洋药物研究开发进展[J]. *中国海洋药物*, 2019, 38(6): 35-69.
WANG C, ZHANG G J, LIU W D, YANG X Y, ZHU N, SHEN J M, WANG Z C, LIU Y, CHENG S, YU G L, GUAN H S. Recent progress in research and development of marine drugs[J]. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2019, 38(6): 35-69. (in Chinese)
- [6] SHARMA S, RANI V, SAINI R, VERMA M L. Bioprospecting and biotechnological applications of microbial endophytes[J]. *Microorganisms for Sustainability*, 2020, 54: 191-228.
- [7] XIONG Z J, WANG R, XIA T F, MA S, GUO Z K. Natural products and activity from actinomycetes associated with marine algae[J]. *Molecules*, 2023, 28(13): 5138.
- [8] SELVIN J, NINAWA A S, SEGHAL KIRAN G, LIPTON A P. Sponge microbial interactions: ecological implications and bioprospecting avenues[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2010, 36(1): 82-90.
- [9] RENGASAMY K R, MAHOMOODALLY M F, AUMEER-UDDY M Z, ZENGIN G, XIAO J, KIM D H. Bioactive compounds in seaweeds: an overview of their biological properties and safety[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2020, 135: 111013.
- [10] 于伟伟, 唐贤明, 熊子君, 张世清, 王蓉, 曾晓起, 郭志凯. 西沙海藻共附生放线菌的分离鉴定及其抗菌活性评价[J]. *微生物学报*, 2023, 63(4): 1472-1489.
YU W W, TANG X M, XIONG Z J, ZHANG S Q, WANG R, ZENG X Q, GUO Z K. Isolation and antimicrobial bioactivity of algae-associated actinomycetes from Xisha islands[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(4): 1472-1489. (in Chinese)
- [11] 颜祯阳, 李晓, 王远强, 罗明和. 海洋放线菌 *Streptomyces* sp.11695 次生代谢产物的研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2024, 12(5): 1-9.
YAN Z Y, LI X, WANG Y Q, LUO M H. Secondary metabolites of marine-derived *Streptomyces* sp. 11695[J]. *Natural Products Research and Development*, 2024, 12(5): 1-9. (in Chinese)
- [12] BLUNT J W, COPP B R, HU W P, MUNRO M H G, NORTHCOTE P T, PRINSEP M R. Marine natural products[J]. *Natural Product Reports*, 2008, 25(1): 35-94.
- [13] PORTILL CLARK G, CASILLAS HERNANDEZ R, SERVIL VILLEGAS R, MAGALLON BARAJAS F G. Growth and survival of the juvenile yellowleg shrimp *Farfantepenaeus californiensis* cohabiting with the green feather alga *Caulerpa sertularioides* at different temperatures[J]. *Aquaculture Research*, 2012, 44(1): 22-30.
- [14] LIMA P C W D C, TORRES V M, RODRIGUES J A G, LOBO W R. Effect of sulfated polysaccharides from the marine brown alga *Spatoglossum schroederi* in *Litopenaeus vannamei* juveniles[J]. *Revista Ciencia Agronomica*, 2009, 40(1): 79-85.
- [15] 陈健鑫, 魏玉倩, 刘丽, 张东华, 马焕成, 伍建榕. 云南油茶炭疽病菌的鉴定及生防菌筛选[J]. *华南农业大学学报*, 2022, 43(5): 43-53.
CHEN J X, WEI Y Q, LIU L, ZHANG D H, MA H C, WU J R. Identification of *Colletotrichum gloeosporioides* and screening of biocontrol bacteria in Yunnan[J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2022, 43(5): 43-53. (in Chinese)
- [16] LIU Z, ZHANG Y, SUN J, HUANG W C, XUE C H, MAO X Z. A novel soluble squalene-hopene cyclase and its application in efficient synthesis of hopene[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 426.
- [17] SHAO M, MA J, LI Q, JU J. Identification of the anti-infe-

- ctive aborycin biosynthetic gene cluster from deep-sea-derived *Streptomyces* sp. SCSIO ZS0098 enables production in a heterologous host[J]. *Marine Drugs*, 2019, 17(2): 127-127.
- [18] 刘东旭, 刘向阳, 邓子新, 蒋明. 靛那霉素生物合成基因簇中 *alp2F* 和 *alp2G* 基因的功能表征[J]. *基因组学与应用生物学*, 2019, 38(11): 5037-5044.
- LIU D X, LIU X Y, DENG Z X, JIANG M. Functional characterization of *alp2F* and *alp2G* genes in the kinamycin biosynthetic gene cluster[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2019, 38(11): 5037-5044. (in Chinese)
- [19] FENG Y, QIU M, SHAO L, JIANG Y, ZHANG W, XIN F, JIANG M. Strategies for the biological production of ectoine by using different chassis strains[J]. *Biotechnol Advances*, 2024, 70: 108306.
- [20] ZHENG D, WILEN B R, OBERG O, WIK T, MODIN O. Metagenomics reveal the potential for geosmin and 2-methylisoborneol production across multiple bacterial phyla in recirculating aquaculture systems[J]. *Environmental Microbiology*, 2024, 26(10): 16696-16714.
- [21] CODD R, RICHARDSON SANCHEZ T, TELFER T J, GOTSCHACHER M P. Advances in the chemical biology of desferrioxamine B[J]. *ACS Chemical Biology*, 2018, 13(1): 11-25.
- [22] GUO L, LI W, GU Z, WANG L, GUO L, MA S, LI C, SUN J, HAN B, CHANG J. Recent advances and progress on melanin: from source to application[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(5): 4360-4386.
- [23] ZHANG H, WANG Q, NING X, HUANG H, MA J, YANG X, LU X, ZHANG J, LI Y, NIU C. Synthesis and biological evaluations of a series of thaxtomin analogues[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(14): 3734-3741.
- [24] 唐越, 王敏, 丁勇, 李金娥, 陈义华. 通过保罗酸的加成提高保罗霉素的稳定性[J]. *有机化学*, 2018, 38(9): 2420-2445.
- TANG Y, WANG M, DING Y, LI J E, CHEN Y H. Improvement of paulomycin stability by addition of paulic acid[J]. *Chinese Journal of Organic Chemistry*, 2018, 38(9): 2420-2445. (in Chinese)
- [25] ARKADEEP S, SILVIA P S, TANU ADHIKARI N, SHORT K A, NIRAULA N P. The complete genomic sequence of *Streptomyces spectabilis* NRRL-2792 and identification of secondary metabolite biosynthetic gene clusters[J]. *Journal of Industrial and Biotechnology*, 2019, 46(8): 1217-1223.
- [26] HORBAL L, STIERHOF M, PALUSZAK A, ECKERT N, ZAPP J, LUZHETSKYY A. Cyclofaulknamycin with the rare amino acid D-capreomycinidine isolated from a well-characterized *Streptomyces albus* strain[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(8): 1609-1623.
- [27] 刘静, 徐幼桥, 张春花, 夏卓璐, 王志祥, 黄德春, 江峰. 吩嗪及其类似物抗肿瘤活性研究进展[J]. *药学进展*, 2022, 46(9): 710-722.
- LIU J, XU Y Q, ZHANG C H, XIA Z L, WANG Z X, HUANG D C, JIANG F. Progress of research on anti-tumor activity of phenazine and its analogues[J]. *Progress in Pharmaceutical Science*, 2022, 46(9): 710-722. (in Chinese)
- [28] 郑胜蓝, 李宗显, 朱运平. 蓝色化合物榴菌素及其类似物的研究现状[J]. *中国食品学报*, 2022, 22(5): 399-411.
- ZHENG S L, LI Z X, ZHU Y P. Research status of blue pigment granaticin and its analogues[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2022, 22(5): 399-411. (in Chinese)
- [29] CHEN Y, ZHOU Y, CHEN M, XIE B, YANG J, CHEN J, SUN Z. Isorenieratene interaction with human serum albumin: multi-spectroscopic analyses and docking simulation[J]. *Food Chemistry*, 2018, 258: 393-399.
- [30] MOLL L V, SMET J D, COS P, CAMPENHOUT L V. Microbial symbionts of insects as a source of new antimicrobials: a review[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2021, 47(5): 562-579.
- [31] HEERDEN A V, PHAM N Q, WINGFIELD B D, WINGFIELD M J, WIKEN P M. Six type-I PKS classes and highly conserved melanin and elsinochrome gene clusters found in diverse *Elsinoe* species[J]. *BMC Genomics*, 2024, 25(1): 990-1001.
- [32] PALMER J M, WIEMANN P, GRECO C, CHIANG Y M, WANG C C C, LINDNER D L, KELLER N P. The sexual spore pigment asperthecin is required for normal ascospore production and protection from UV light in *Aspergillus nidulans*[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2021, 48(9/10): 55-64.
- [33] 孙晓梦. 海藻可培养附生细菌多样性分析及多相分类学研究[D]. 济南: 山东师范大学, 2021.
- SUN X M. Diversity and polyphasic taxonomy of epiphytic bacteria isolated from macroalgae[D]. Jinan: Shandong Normal University, 2021. (in Chinese)
- [34] 秦蕾, 王印庚, 阎斌伦. 大菱鲆微生物性疾病研究进展[J]. *水产科学*, 2008, 27(11): 598-602.
- QIN L, WANG Y G, YAN B L. Advances in research on diseases of turbot *Scophthalmus maximus* affected by microorganisms[J]. *Fisheries Science*, 2008, 27(11): 598-602. (in Chinese)
- [35] 张德锋, 袁伟, 可小丽, 刘志刚, 曹建萌, 卢迈新, 王淼, 衣萌萌. 中国罗非鱼主养区无乳链球菌的分子流行特征及其传播方式[J]. *中国水产科学*, 2017, 24(3): 606-614.
- ZHANG D F, YUAN W, KE X L, LIU Z G, CAO J M, LU

- M X, WANG M, YI M M. Molecular characteristics and transmission of *Streptococcus agalactiae* in a major tilapia culturing area of China[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(3): 606-614. (in Chinese)
- [36] ULFAH M, KASANA N, WIJAYANTI N. Antivibriosis and cytotoxicity of Actinobacteria associated with red seaweed *Gelidiella acerosa*[J]. Aquaculture Research, 2021, 52(12): 6786-6794
- [37] DJINNN I, DEFANT A, KECHA M, MANCINI I. Antibacterial polyketides from the marine alga-derived endophytic *Streptomyces sundarbansensis*: a study on hydroxypyron tautomerism[J]. Marine Drugs, 2013, 11(1): 124-135.
- [38] ELIWA E M, ABDEL RAZEK A S, FRESE M, HALAWA A H, EI AGRODY A M, BEDAIR A H, SEWALD N, SHAABAN M. New naturally occurring phenolic derivatives from marine *Nocardiopsis* sp. AS23C: structural elucidation and in silico computational studies[J]. Vietnam Journal of Chemistry, 2019, 57(2): 164-174.
- [39] KIM M C, MACHADO H, JANG K H, TRZOSS L, JENSEN P R, FENICAL W. Integration of genomic data with NMR analysis enables assignment of the full stereostructure of neaumycin B, a potent inhibitor of glioblastoma from a marine-derived *Micromonospora*[J]. Journal of the American Chemical Society, 2018, 140(34): 10775-10784.