

泉州湾红树林根际土壤放线菌的分离鉴定及链霉菌 W444 次级代谢产物的鉴定

张文州¹, 陈琳琳¹, 林水森¹, 林阳君¹, 庄月娥¹, 谢志新¹, 江红²,
连云阳², 骆祝华³, 彭飞^{1*}

- 1 泉州医学高等专科学校, 福建 泉州
- 2 福建省微生物研究所, 福建 福州
- 3 自然资源部第三海洋研究所, 福建 厦门

张文州, 陈琳琳, 林水森, 林阳君, 庄月娥, 谢志新, 江红, 连云阳, 骆祝华, 彭飞. 泉州湾红树林根际土壤放线菌的分离鉴定及链霉菌 W444 次级代谢产物的鉴定[J]. 微生物学报, 2025, 65(2): 597-613.

ZHANG Wenzhou, CHEN Linlin, LIN Shuisen, LIN Yangjun, ZHUANG Yue'e, XIE Zhixin, JIANG Hong, LIAN Yunyang, LUO Zhuhua, PENG Fei. Isolation and identification of actinomycetes from rhizosphere soil samples of mangrove forests in Quanzhou Bay and secondary metabolites of *Streptomyces* sp. W444[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(2): 597-613.

摘要:【目的】从泉州湾 2 种红树林的根际土壤中分离并鉴定放线菌, 进行抗真菌活性初筛以获取目标菌株, 并对链霉菌属(*Streptomyces*) W444 的次级代谢产物进行分离与鉴定。【方法】从泉州湾洛阳江采集 2 种不同红树林植物的根际土壤样品, 采用稀释涂布法对土样中的放线菌进行分离, 并构建 16S rRNA 基因系统发育树。采用琼脂打孔扩散法进行抗真菌活性筛选, 对获取的目标菌株 *Streptomyces* sp. W444 进行大规模发酵, 并对其次级代谢产物进行了分离与鉴定。根据生物合成基因簇定位和分析, 推导星孢菌素的生物合成途径。【结果】从根际土样中分离得到 56 株放线菌, 分布于 6 目 6 科 8 属, 其中链霉菌属和小单孢菌属为优势菌, 占比分别为 41.0% 和 33.9%。通过抗真菌筛选获得抑菌活性较好的菌株 *Streptomyces* sp. W444, 并从中分离鉴定了 3 个吡啶类化合物: staurosporine、K252c 和 streptochlorin。此外, 还从菌株 *Streptomyces* sp. W444 基因组中定位了星孢菌素生物合成基因簇, 并对其生物合成途径进行了推导。【结论】泉州湾红树林根际土壤中的放线菌具有多样性, 并蕴含着丰富的潜在天然产物资源, 从菌株 *Streptomyces* sp. W444 中分离鉴定了吡啶类生物碱 staurosporine、K252c 和 streptochlorin, 这为研究泉州湾红树林可培养放线菌的多样性和次级代谢产物研究提供了坚实的基础。

资助项目: 泉州市科技计划(2023NS082); 泉州医学高等专科学校校级课题重点科技项目(XJK2210A); 自然资源部第三海洋研究所开放基金(HY202304); 泉州医学高等专科学校研究型教学项目(XJJK2308)

This work was supported by the Science and Technology Project of Quanzhou City (2023NS082), the Key Science and Technology Project of Quanzhou Medical College (XJK2210A), the Scientific Research Foundation of Third Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources (HY202304), and the Research-based Teaching Project of Quanzhou Medical College (XJJK2308).

*Corresponding author. E-mail: fei6451@163.com

Received: 2024-09-23; Accepted: 2024-11-11; Published online: 2024-12-26

关键词：泉州湾红树林；放线菌；吲哚类化合物；生物合成基因簇

Isolation and identification of actinomycetes from rhizosphere soil samples of mangrove forests in Quanzhou Bay and secondary metabolites of *Streptomyces* sp. W444

ZHANG Wenzhou¹, CHEN Linlin¹, LIN Shuisen¹, LIN Yangjun¹, ZHUANG Yue'e¹, XIE Zhixin¹, JIANG Hong², LIAN Yunyang², LUO Zhuhua³, PENG Fei^{1*}

1 Quanzhou Medical College, Quanzhou, Fujian, China

2 Fujian Institute of Microbiology, Fuzhou, Fujian, China

3 Third Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources, Xiamen, Fujian, China

Abstract: [Objective] To isolate and identify actinomycetes from two mangrove soil samples in Quanzhou Bay as well as secondary metabolites from the target strain *Streptomyces* sp. W444 with antifungal activity. [Methods] The rhizosphere soil samples of two different mangrove plants were collected from Luoyang River in Quanzhou Bay. Actinomycetes were isolated from the soil samples by the dilution plating method. The isolates were classified by the phylogenetic tree constructed based on 16S rRNA gene sequences. The antifungal activities of the isolates were examined by the agar diffusion method. The target strain *Streptomyces* sp. W444 was subjected to fermentation scale-up for the isolation of secondary metabolites. Furthermore, the biosynthetic gene clusters were analyzed to deduce the biosynthetic pathway of staurosporine. [Results] A total of 56 strains of actinomycetes were isolated from mangrove soil samples and categorized into 8 genera belonging to 6 families of 6 orders. Among them, *Streptomyces* and *Micromonospora* were dominant, with the relative abundance of 41.0% and 33.9%, respectively. Strain *Streptomyces* sp. W444 exhibited excellent antifungal activity, and three indoles (staurosporine, K252c, and streptochlorin) were isolated and identified from this strain. The biosynthetic gene cluster of staurosporine was localized in the genome of *Streptomyces* sp. W444 by bioinformatics analysis. The biosynthetic pathway of staurosporine was then proposed. [Conclusion] Actinomycetes in the rhizosphere soil of mangrove plants in Quanzhou Bay had high diversity and contained potential natural product resources. Staurosporine, K252c, and streptochlorin were isolated from strain W444. These findings lay a solid foundation for studying the diversity and secondary metabolites of cultivable actinomycetes in mangrove forests in Quanzhou Bay.

Keywords: mangrove in Quanzhou Bay; actinomycetes; indoles; biosynthetic gene cluster

近年来，致病性真菌感染的致病率和死亡率呈上升趋势，严重威胁人类的健康^[1]。目前临床上治疗真菌感染的药物主要包括唑类、棘白菌素类、嘧啶类似物和多烯类等^[2]，但是真菌通

常采用改变药物靶标、过度表达外排泵和细胞应激反应等手段来实现对药物的耐受，从而形成耐药性^[3]。这种持续存在的严重威胁，促使科技工作者努力寻找新的药物以应对真菌感染。

放线菌产生的天然产物及其衍生物是新药先导化合物的重要来源^[4-6]。早期,放线菌主要从陆地生境中筛选获得。然而,随着筛选研究的深入,从普通陆地生境的放线菌中获取新活性产物变得越来越难。因此,更多的研究者将目光聚焦于高原、沙漠、海洋、潮间带、红树林、温泉等特殊生境,以期在这些环境中寻找新的放线菌资源^[7-9],并发现新的活性代谢产物。红树林生长于入海口湿地,具有高盐、高渗透压、低氧等特点,其所处的海水与淡水交汇的特殊生境,使得该地区蕴藏着极为丰富且独特的放线菌资源^[10]。例如,Wang等^[11]从海南西海岸红树林沉积物中分离的广岛链霉菌(*Streptomyces hiroshimensis*) GXIMD 06359的粗提物中,获得4个新的大环多烯内酯类化合物 antifungalmycin B-E。除了 antifungalmycin C 外,其他化合物均对马尔尼菲篮状真菌(*Talaromyces marneffeii*)具有较强的抑制活性,其最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)为2-128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。Wang等^[12]从广东珠海淇澳岛红树林土样中分离的链霉菌属(*Streptomyces*) ZQ4BG 中,得到9个32元环多烯内酯类化合物 flavofungins I-IX,其中 flavofungins III-IX 为新化合物,而 flavofungins I 和 II 均对白色念珠菌(*Candida albicans*)具有较强的抑制活性。Che等^[13]从广东红树林芦苇根际土壤中分离的链霉菌 *Streptomyces* sp. CHQ-64 中,获得6个新的大环多烯内酯化合物 reedsmycins A-F,其中 reedsmycin A 对白色念珠菌(*C. albicans*)具有较强的抑制活性,其 MIC 范围为25-50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。Zeng等^[14]从海南东寨港红树林沉积物分离的白色链霉菌(*Streptomyces albogriseolus*) HA10002 中,得到一类新的抗根结线虫活性化合物 fungichromin B,该化合物对酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)、尖孢镰孢菌

(*Fusarium oxysporum*)和黑曲霉(*Aspergillus niger*)均具有较强的抑菌活性。综上所述,从红树林放线菌资源中寻找抗真菌活性先导化合物,仍然是天然药物化学研究的重要方向。

洛阳江红树林湿地位于泉州湾河口湿地自然保护区核心区,对于该区域微生物的研究主要集中于微生物群落结构变迁、分布和种类鉴定等方面^[15-17],而关于泉州湾红树林放线菌资源的研究则鲜有报道。本研究报道了泉州湾洛阳江红树林根际土壤中放线菌的分离与鉴定,初步分析了红树林植物根际土壤中可培养放线菌的多样性;结合初步的抗真菌活性筛选,选取 *Streptomyces* sp. W444 作为目标菌株进行次级代谢产物研究。从中分离鉴定了3个吡啶类化合物: staurosporine、K252c 和 streptochlorin,定位了这些化合物生物合成相关的基因簇,并推导了其生物合成途径。本研究揭示了泉州湾红树林放线菌资源的多样性,为后续抗真菌次级代谢产物的研究奠定了基础,同时拓宽了星孢菌素类化合物产生菌株的来源,为该类化合物的生物合成研究提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 土壤样品

植物根际土壤样品于2022年6月采自泉州湾洛阳江红树林自然保护区,样品及采集信息如表1所示。采集土样的深度为根系以下10 cm,样品用灭菌采样袋收集,于超净台中自然晾干,4 $^{\circ}\text{C}$ 待用。

1.2 培养基

分离培养基 W1: 可溶性淀粉 20 g, CaCO_3 1 g, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, KNO_3 0.1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, NaCl 0.5 g, L-天冬素 1 g。W2: 酪蛋白 0.4 g, 淀粉 10 g, CaCO_3 0.1 g, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g。W3: 燕麦片 40 g。W4: 淀粉 10 g, 酵母

表1 泉州湾洛阳江红树林自然保护区土壤样品

Table 1 Soil sample from Mangrove Nature Reserve of Luoyang River in Quanzhou Bay

样品编号 Sample number	植物根际 Plant rhizosphere	采样地经纬度 Latitude and longitude of the sampling site
S1	互花米草 <i>Spartina alterniflora</i>	24°55'14"N, 118°39'49"E
S2	秋茄 <i>Kandelia candel</i>	24°54'0"N, 118°40'8"E

提取物 3 g, 蛋白胨 1.5 g。W5: 甘油 6 mL, 精氨酸 1 g, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g。W6: 腐殖酸 1 g, Na_2HPO_4 0.5 g, KCl 1.7 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, CaCO_3 0.02 g, 复合维生素母液 1 mL。W7: 葡萄糖 4 g, 酵母粉 4 g, 麦芽浸粉 10 g, 复合维生素母液 1 mL。其中复合维生素母液的配方参照梁效伟^[18]的研究。以上培养基分别加入 15 g 的琼脂粉和 10 g 的海盐, 加水定容至 1 L, 调 pH 7.2–7.4。杂菌抑制剂选取放线菌酮、制霉菌素、新生霉素和重铬酸钾, 用以抑制细菌和真菌的生长, 终浓度分别为 25、10、25、25 mg/L, 抑制剂待培养基冷却至 50 °C 左右时加入。

发酵培养基(g/L): 可溶性淀粉 40.0, 葡萄糖 5.0, 花生饼粉 20.0, 蛋白胨 5.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, K_2HPO_4 0.5, CaCO_3 1.0, 海盐 10, 调 pH 7.5。

检定菌培养基: 真菌培养采用 PDA 培养基。

1.3 主要试剂和仪器

pEASY-T1 克隆试剂盒及感受态细胞, 北京全式金生物技术股份有限公司; $2 \times \text{Es Taq}$ MasterMix, 北京康为世纪生物科技有限公司; Chelex-100, Bio-Rad 公司; AxyPrep PCR 纯化试剂盒, 爱思进生物技术(杭州)有限公司; PCR 引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成; IPTG、氨苄西林, 北京绿泽森生物技术有限公司; 其他试剂均为分析纯或色谱纯。

超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; 高速台式离心机, 上海安亭科学仪器厂; PCR

仪, 国力天(深圳)科技有限公司; 立式压力蒸汽灭菌器, 厦门柏嘉生物科技有限公司; 恒温振荡培养箱, 上海福玛实验设备有限公司; 恒温培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; Agilent-1260 高效液相色谱仪, 色谱柱为 Agilent Eclipse XDB-C18 柱(5 μm , 250 mm \times 4.6 mm); 核磁共振波谱采用 Bruker DRX2500 核磁共振仪(600 MHz)测定, 以 TMS 为内标, MeOD 为溶剂; ESI-MS 采用 Agilent 6460 液质联用仪, 以 CH_3OH 为溶剂测定; 凝胶为 Sephadex LH-20 (40–70 μm , Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden); 反相硅胶为 YMC* GEL ODS-A (12 nm, S-50 μm)。

1.4 检定菌

真菌白色念珠菌(ATCC 90028)购自广东环凯微生物科技有限公司, 黑曲霉(FJAT-31087)由福建省农业科学院生物资源研究所农业微生物研究中心惠赠, 茄病镰刀菌(QY22)购自中国海洋微生物菌种保藏管理中心。

1.5 土壤样品的处理

将 2 份土壤样品于无菌超净台中自然风干后, 分别置于灭过菌的研钵研碎。称取研碎后的土样 3 g, 悬浮于 30 mL 100% 无菌海水中, 置于 250 mL 三角瓶(内含 10 个小玻璃珠), 充分振荡, 混合均匀后加入蛋白胨和十二烷基硫酸钠母液至终浓度分别为 6% 和 0.05%, 于 50 °C 水浴中 10 min, 之后超声波处理 15 s, 用无菌海水稀释至最终浓度分别为 10^{-3} g/mL 和 10^{-4} g/mL。将各样品稀释液 150 μL 分别涂布于

7种分离培养基上, 每一个稀释度样品重复涂布3个分离平板, 28 °C静置培养7 d。

1.6 菌株的分离纯化与保存

肉眼观察上述已培养的分离平板, 挑取放线菌菌落于相应的琼脂斜面, 28 °C培养5-7 d; 转接于斜面的分离菌株挑出进一步纯化, 采用平板划线法进行单菌落分离, 挑取纯化后的单菌落接种于相应的斜面培养基; 将纯化平板上的菌落刮下, 保存于50%灭菌甘油中, -80 °C保藏。

1.7 基于16S rRNA基因序列的分子鉴定

菌株的基因组DNA提取、PCR反应体系和条件均参照梁效伟^[18]的方法, 采用细菌通用引物27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')进行16S rRNA基因的PCR扩增。PCR产物经0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测验证后, 其测序工作由苏州金唯智生物科技有限公司完成。测序结果于NCBI进行BLAST比对, 选取近缘模式菌的16S rRNA基因序列, 用MEGA 7.0的Neighbor-joining法构建系统发育树。

1.8 发酵粗提物抗真菌活性检测

1.8.1 放线菌发酵液粗提物的制备

将目标菌株接种于相应的培养基, 于28 °C恒温箱培养5 d, 取菌丝体或者孢子接入3瓶装有150 mL发酵培养基的500 mL锥形瓶中, 于28 °C、180 r/min培养3-5 d。发酵液于5 000 r/min离心20 min, 取菌渣浸泡于甲醇中1 d, 再次离心获取甲醇上清液, 之后于旋转蒸发器浓缩成膏状; 取上清液, 等体积乙酸乙酯萃取3次, 有机相同法浓缩至膏状; 将上述2种浸膏合并待用。称取少量粗提物用甲醇溶解, 配成浓度为20 mg/mL的母液, 4 °C冰箱中备用

1.8.2 待测液抗真菌活性的检测

采用琼脂打孔扩散试验, 通过测量抑菌圈的大小直观地考察发酵液的抑菌性能。取制备好的 10^7 CFU/mL菌悬液100 μ L (白色念珠菌、茄病镰刀菌和黑曲霉孢子)均匀涂布到PDA琼脂平板上, 将制备好的30 mg/mL发酵液100 μ L滴加至直径为9 mm圆形孔洞上, 置于培养箱中28 °C (真菌)培养, 分别于24 h (白色念珠菌)和5 d (茄病镰刀菌和黑曲霉)后测量其抑菌圈直径。每个试验平行进行3次, 取平均值。

1.8.3 化合物最小抑菌浓度(MIC)的测定

对化合物F2-1、F4-1和F5-1进行抗真菌活性测试, 阳性对照为多菌灵。指示真菌为白色念珠菌ATCC 90028、茄病镰刀菌QY22和黑曲霉FJAT-31087。化合物和多菌灵DMSO溶解, 采用试管稀释法, 用培养基将化合物稀释为200、100、50、25、12.5、6.25 μ g/mL的质量浓度, 无菌试管为空白对照, 加入100 μ L菌悬液(1×10^6 CFU/mL), 28 °C恒温培养72 h, 每组平行实验3次, 取平均值, 以无菌生长的最低浓度作为化合物对该菌的MIC。

1.9 阳性菌株发酵粗提物的HPLC-DAD分析

取1.8制备的发酵粗提物, 使用0.45 μ m的滤膜过滤, 色谱柱: Eclipse XDB-C18, 4.6 mm \times 250 mm, 进样量10 μ L, 流动相为甲醇-水(10%-100%, 60 min), 流速为1 mL/min, 检测采用二极管阵列检测器(diode array detector, DAD)检测器, 波长扫描范围190-800 nm。

1.10 菌株W444的大规模摇瓶发酵

将菌株W444接种于W7固体培养基上, 28 °C培养4 d, 刮取孢子接种于W7液体培养基中, 28 °C、250 r/min培养2 d获取种子液, 将其按体积分数为5%的接种量接入20 L发酵培养基中, 28 °C、250 r/min培养4 d获取发酵液。

发酵粗提物的制备同方法 1.8.1。

1.11 化合物的分离和纯化

粗提物(8.5 g)经 C18 反相硅胶柱层析粗分, 甲醇水梯度(10%–100%)洗脱, 收集馏分, HPLC 检测合并得馏分 Fr.1–Fr.7。馏分 Fr.2 上样于 Sephadex LH-20, 甲醇洗脱得馏分 Fr.2-11, Fr.2-11 进行高压液相制备, 48% 甲醇水洗脱得到化合物 F2-1 (10.5 mg); 馏分 Fr.4 上样于 Sephadex LH-20, 甲醇洗脱得馏分 Fr.4-3, Fr.4-3 进行高压液相制备, 65% 甲醇水洗脱得到化合物 F4-1 (6.5 mg); 馏分 Fr.5 上样于 Sephadex LH-20, 甲醇洗脱得馏分 Fr.5A–Fr.5C, Fr.5A 进行高压液相制备, 70% 甲醇水洗脱, 制备得到化合物 F5-1 (8 mg)。化合物经质谱(ESI-MS)和 NMR 等波谱分析及与文献比较确定结构。

2 结果与分析

2.1 菌株分离鉴定及不同红树林植物根际沉积物中的放线菌多样性分析

本研究通过 16S rRNA 基因序列的 BLAST 比对去重, 并将结果提交至 EzBioCloud 数据库进行鉴定。表 2 中的“Similarity”列显示了分离菌株与数据库中相似度最高的参考菌株之间的相似性百分比, 该数据通过 16S rRNA 基因序列比对得出。较高的相似度表明分离菌株与已知菌株在基因序列上具有密切的亲缘关系, 为菌株的准确分类和鉴定提供了可靠依据。基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树(图 1)和表 2 的数据表明, 从 2 种土壤样品中分离出 56 株放线菌, 隶属于 6 目 6 科 8 属, 包括链霉菌 23 株、小单孢菌 19 株、拟无枝酸

表2 两种不同红树林植物根际土样品分离的放线菌概况

Table 2 Summary of actinomycete strains isolated from rhizosphere soil samples of two different mangrove plants

Names	Mangrove plants	Top-hit taxon	Accession number	Similarity (%)
W1-3	<i>Kandelia candel</i>	<i>Micromonospora provocatoris</i> (AY894337)	PP204174	98.93
W4-1	<i>Kandelia candel</i>	<i>Micromonospora aurantiaca</i> (CP002162)	PP204175	99.93
W3-1-1	<i>Kandelia candel</i>	<i>Micromonospora taraxaci</i> (VIWZ01000001)	PP204177	99.30
W3-7	<i>Kandelia candel</i>	<i>Micromonospora solifontis</i> (LC383890)	PP204178	99.09
W112	<i>Kandelia candel</i>	<i>Micromonospora humida</i> (MT907442)	PP204181	99.26
W126	<i>Kandelia candel</i>	<i>Micromonospora fluminis</i> (LR130241)	PP204182	99.78
W321	<i>Kandelia candel</i>	<i>Micromonospora globbae</i> (LC177396)	PP204183	99.78
W152	<i>Kandelia candel</i>	<i>Micromonospora fluminis</i> (LR130241)	PP204184	100.00
W153	<i>Kandelia candel</i>	<i>Micromonospora endophytica</i> (EU560726)	PP204185	99.77
W156	<i>Kandelia candel</i>	<i>Micromonospora maritima</i> (HQ704071)	PP204186	100.00
W343	<i>Kandelia candel</i>	<i>Micromonospora aurantiaca</i> (CP002162)	PP204187	99.85
W2-1	<i>Kandelia candel</i>	<i>Micromonospora aurantiaca</i> (CP002162)	PP204191	99.41
W3-4	<i>Kandelia candel</i>	<i>Micromonospora taraxaci</i> (VIWZ01000001)	PP204192	98.69
W3-6	<i>Kandelia candel</i>	<i>Micromonospora terminaliae</i> (KX394339)	PP204193	98.37
W3-8	<i>Kandelia candel</i>	<i>Micromonospora aurantiaca</i> (CP002162)	PP204194	99.49
W136	<i>Kandelia candel</i>	<i>Micromonospora fluminis</i> (LR130241)	PP204196	100.00
W145	<i>Kandelia candel</i>	<i>Micromonospora fluminis</i> (LR130241)	PP204197	99.27

(待续)

(续表2)

Names	Mangrove plants	Top-hit taxon	Accession number	Similarity (%)
W131	<i>Kandelia candel</i>	<i>Streptomyces sundarbansensis</i> (AY550275)	PP211921	99.42
W221	<i>Kandelia candel</i>	<i>Streptomyces niveus</i> (DQ442532)	PP211922	99.50
W141	<i>Kandelia candel</i>	<i>Streptomyces sundarbansensis</i> (AY550275)	PP211923	99.85
W147	<i>Kandelia candel</i>	<i>Streptomyces spirodelae</i> (MW602308)	PP211925	99.48
W162	<i>Kandelia candel</i>	<i>Streptomyces olivaceus</i> (JOFH01000101)	PP211926	99.78
W171	<i>Kandelia candel</i>	<i>Streptomyces badius</i> (AY999783)	PP211927	99.78
W262	<i>Kandelia candel</i>	<i>Streptomyces mayteni</i> (EU200683)	PP211928	99.48
W272	<i>Kandelia candel</i>	<i>Streptomyces badius</i> (AY999783)	PP211929	99.78
W273	<i>Kandelia candel</i>	<i>Streptomyces mayteni</i> (EU200683)	PP211930	99.48
W372	<i>Kandelia candel</i>	<i>Streptomyces badius</i> (AY999783)	PP211932	99.78
W444	<i>Kandelia candel</i>	<i>Streptomyces fradiae</i> (MIFZ01000280)	PP211933	99.93
W462	<i>Kandelia candel</i>	<i>Streptomyces olivaceus</i> (JOFH01000101)	PP211934	99.93
W471	<i>Kandelia candel</i>	<i>Streptomyces sundarbansensis</i> (AY550275)	PP211935	99.85
W442	<i>Kandelia candel</i>	<i>Streptomyces endocoffeicus</i> (MN116545)	PP211940	99.41
W132	<i>Kandelia candel</i>	<i>Amycolatopsis lurida</i> (AJ577997)	PP211970	99.41
W233	<i>Kandelia candel</i>	<i>Amycolatopsis lurida</i> (AJ577997)	PP211971	99.34
W334	<i>Kandelia candel</i>	<i>Amycolatopsis lurida</i> (AJ577997)	PP211973	98.69
W242	<i>Kandelia candel</i>	<i>Saccharopolyspora shandongensis</i> (EF104116)	PP211985	100.00
W251	<i>Kandelia candel</i>	<i>Gordonia terrae</i> (BAFD01000032)	PP211986	100.00
W6-2	<i>Spartina alterniflora</i>	<i>Micromonospora fluminis</i> (LR130241)	PP204179	99.92
W6-4	<i>Spartina alterniflora</i>	<i>Micromonospora aurantiaca</i> (CP002162)	PP204180	100.00
W5-4	<i>Spartina alterniflora</i>	<i>Micromonospora aurantiaca</i> (CP002162)	PP204195	100.00
W5-1	<i>Spartina alterniflora</i>	<i>Micromonospora provocatoris</i> (AY894337)	PP204176	99.35
W743	<i>Spartina alterniflora</i>	<i>Verrucosipora rhizosphaerae</i> (HQ123438)	PP204188	99.55
W751	<i>Spartina alterniflora</i>	<i>Micromonospora globispora</i> (KF818390)	PP204189	99.62
W763	<i>Spartina alterniflora</i>	<i>Micromonospora krabiensis</i> (LT598496)	PP204190	99.85
W671	<i>Spartina alterniflora</i>	<i>Streptomyces badius</i> (AY999783)	PP211936	99.78
W742	<i>Spartina alterniflora</i>	<i>Streptomyces spirodelae</i> (MW602308)	PP211937	99.48
W744	<i>Spartina alterniflora</i>	<i>Streptomyces spirodelae</i> (MW602308)	PP211938	99.26
W761	<i>Spartina alterniflora</i>	<i>Streptomyces olivaceus</i> (JOFH01000101)	PP211939	99.93
W572	<i>Spartina alterniflora</i>	<i>Streptomyces mayteni</i> (EU200683)	PP211941	99.48
W531	<i>Spartina alterniflora</i>	<i>Amycolatopsis lurida</i> (AJ577997)	PP211975	99.40
W723	<i>Spartina alterniflora</i>	<i>Gordonia didemnid</i> (JN615417)	PP211976	100.00
W731	<i>Spartina alterniflora</i>	<i>Nocardia rhizosphaerae</i> (KP972639)	PP211977	99.78
W733	<i>Spartina alterniflora</i>	<i>Amycolatopsis keratiniphila</i> (LQMT01000206)	PP211978	99.48
W735	<i>Spartina alterniflora</i>	<i>Nocardioides luteus</i> (AF005007)	PP211979	99.48
W822	<i>Spartina alterniflora</i>	<i>Gordonia terrae</i> (BAFD01000032)	PP211980	99.93
W831	<i>Spartina alterniflora</i>	<i>Amycolatopsis keratiniphila</i> (LQMT01000206)	PP211981	99.48
W745	<i>Spartina alterniflora</i>	<i>Saccharopolyspora spongiae</i> (KX037095)	PP211988	98.66

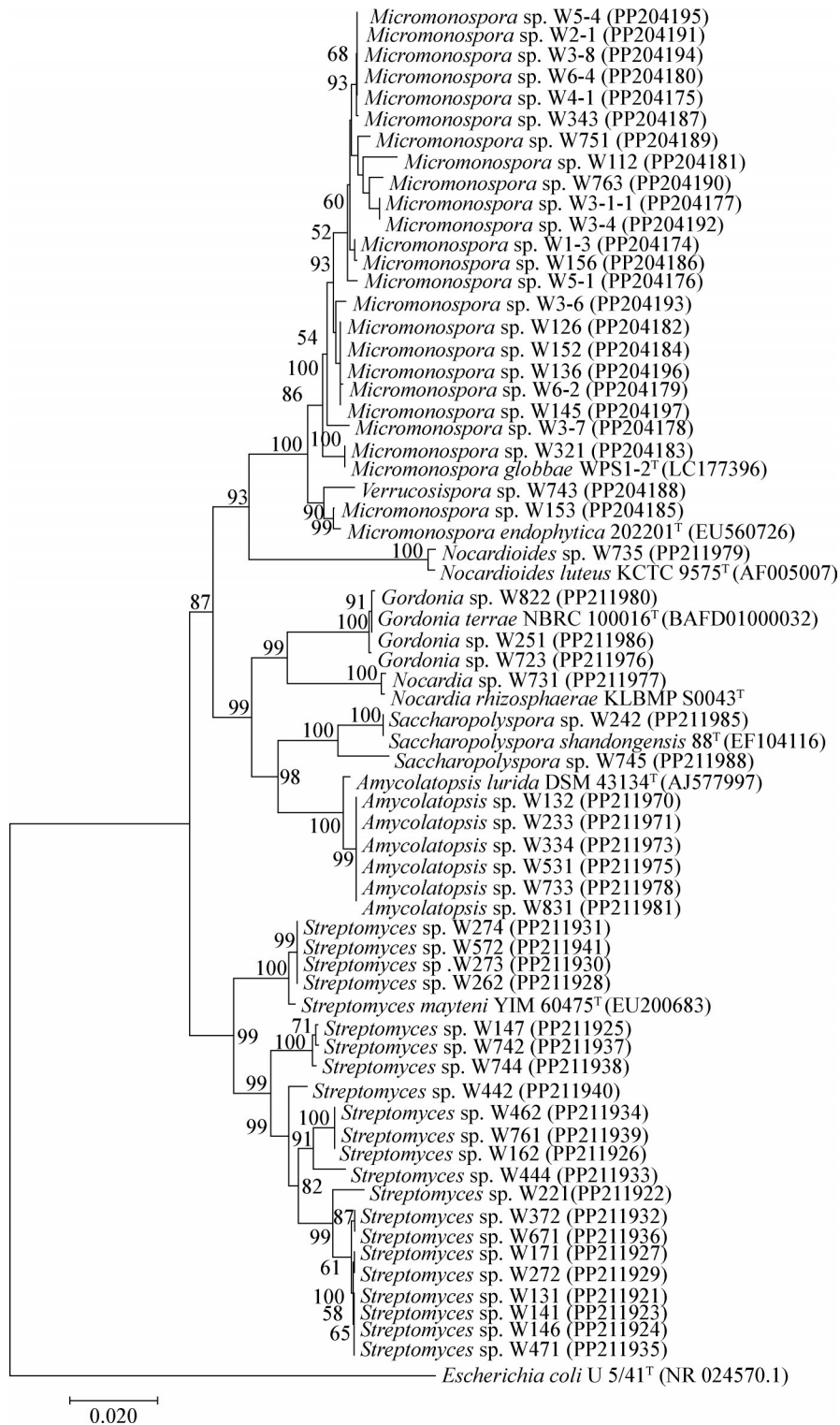


图1 红树林来源部分代表性分离菌株通过16S rRNA基因序列构建的系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree constructed by 16S rRNA gene sequence of representative isolates from mangrove sources.

菌 6 株、糖多孢菌 2 株, 戈登氏菌 3 株、类诺卡氏菌 1 株、诺卡氏菌 1 株和疣孢菌 1 株。在所有分离的放线菌中, 小单孢菌为主要类群, 占总分离菌株的 41.0%, 其次是链霉菌属, 占 33.9%, 其他属放线菌占总分离菌株的 25.0%。

对 2 种红树林植物根际沉积物样品的放线菌进行多样性分析, 发现从秋茄和互花米草的根际土样中获得的放线菌数目有一定差异, 分别为 36 株(占比 64.3%)和 20 株(占比 35.7%)(表 2 和图 2)。秋茄根际土样中小单孢菌属和链霉菌属分别占 47% 和 39%, 拟无枝酸属仅占 8%, 其他放线菌占 6%。互花米草根际土样中放线菌的多样性最丰富, 共分离到 8 个不同属的 20 株放线菌, 链霉菌属占 30%, 小单孢菌属占 25%, 其他放线菌占 45%(表 2 和图 2)。综上所述, 2 种不同红树林植物根际土样中的放线菌数目和种属都有一定的差异。在秋茄根际土样中, 链霉菌属和小单孢菌属为优势种群, 占比为 86%; 而在互花米草根际土样中, 优势种群为稀有放线菌, 占比为 75%。

2.2 菌株 *Streptomyces* sp. W444 发酵粗提物 HPLC 分析和抗真菌活性测试

本研究根据系统发育树的分类特征和菌株

的摇瓶长势, 筛选出 21 株放线菌进行小规模发酵, 经 HPLC 分析发现菌株 *Streptomyces* sp. W444 在发酵培养基中发酵的次级代谢产物较为丰富(图 3)。采用琼脂扩散法对该菌株的发酵粗提物进行抗真菌活性测试, 特别是测试了 *Streptomyces* sp. W444 的发酵粗提物对白色念珠菌 ATCC 90028、茄病镰刀菌 QY22 和黑曲霉 FJAT-31087 的抗真菌活性。测试结果如表 3 和图 4 所示, *Streptomyces* sp. W444 的发酵粗提物对这 3 种指示菌均表现出较强的抑制活性。鉴于 *Streptomyces* sp. W444 发酵产物的高丰度及其良好的抗真菌活性, 本研究决定将其作为后续次级代谢产物研究的候选菌株。

2.3 菌株 *Streptomyces* sp. W444 中化合物的分离和结构鉴定

对菌株 *Streptomyces* sp. W444 进行 20 L 扩大发酵, 经乙酸乙酯萃取得 8.5 g 粗浸膏, 通过中压反相色谱、Sephadex LH-20 凝胶色谱和 HPLC 半制备等分离手段获得 3 个吡啶类化合物(F2-1、F4-1 和 F5-1)。利用质谱 ESI-MS、¹H NMR、¹³C NMR 及与相关文献[19-22]比较分析, 确定它们分别为 streptochlorin、K252c 和 staurosporine (图 5)。

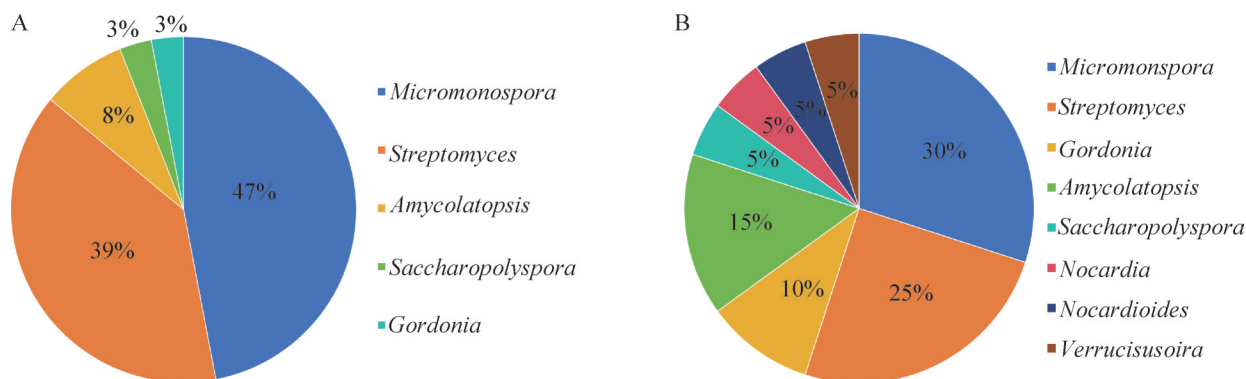


图2 两种红树林植物根际土壤中可培养放线菌的比例和分类统计。A: 秋茄根际土壤; B: 互花米草根际土壤。

Figure 2 The proportion and classification of cultivable actinobacteria isolated from rhizosphere soil samples of two mangrove plants. A: Rhizosphere soil of *Kandelia candel*; B: Rhizosphere soil of *Sporobolus alterniflorus*.

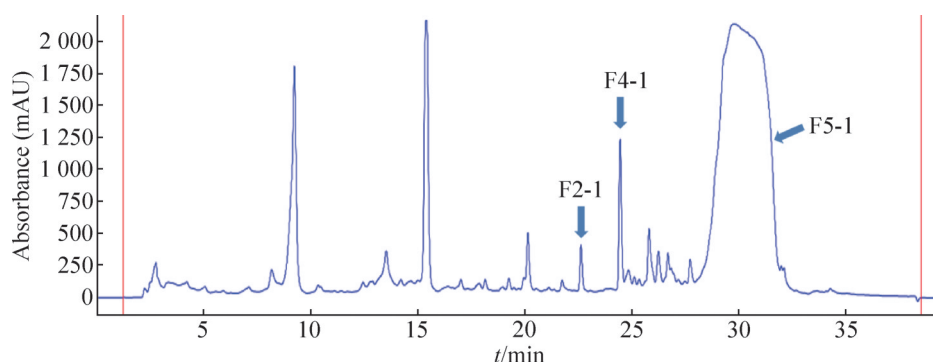


图3 *Streptomyces* sp. W444发酵粗样的HPLC检测分析

Figure 3 HPLC analysis of fermentation extracts of *Streptomyces* sp. W444.

表3 *Streptomyces* sp. W444发酵粗提物的抗真菌活性初筛结果

Table 3 Primary results of the antifungal activities of crude extract of *Streptomyces* sp. W444

样品 Sample	白色念珠菌 ATCC 90028 <i>Candida albicans</i> ATCC 90028	黑曲霉 FJAT-31087 <i>Aspergillus niger</i> FJAT-31087	茄病镰刀菌 QY22 <i>Fusarium solanaceae</i> QY22
W444	20	19	24
多菌灵 Carbendazim	35	37	32

浓度 $c=30$ mg/mL; 抑菌圈直径 d 单位 mm。

Concentration $c=30$ mg/mL; Diameter of antifungal circle d : mm.

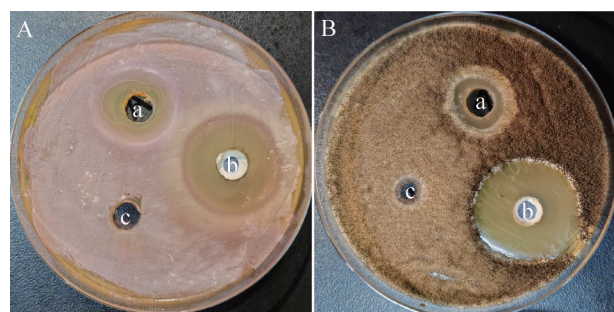


图4 *Streptomyces* sp. W444发酵粗提物的抗真菌活性初筛。A: 茄病镰刀菌 QY22; B: 黑曲霉 FJAT-3108。a: *Streptomyces* sp. W444发酵粗提物 (30 mg/mL); b: 阳性对照多菌灵 (25 mg/mL); c: 阴性对照甲醇。

Figure 4 Antifungal activities of crude extracts from *Streptomyces* sp. W444. A: *Fusarium solani* QY22; B: *Aspergillus niger* FJAT-31087. a: Crude extract of strain W444 (30 mg/mL); b: Positive control with carbendazime (25 mg/mL); c: Negative control with MeOH.

化合物 F2-1 为白色粉末。UV (MeOH) λ_{\max} 221、271 和 286 nm 处有特征吸收峰。ESI-MS m/z 219 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR (MeOD, 600 MHz) δ : 8.20 (1H, s, H-2), 8.02 (1H, d, H-4'), 7.84 (1H, s, H-2'), 7.46 (1H, d, H-7'), 7.22 (1H, t, H-6'), 7.16 (1H, t, H-5')。 ^{13}C -NMR (MeOD, 150 MHz) δ : 149.9 (d, C-2), 145.2 (s, C-5), 137.6 (s, C-7'a), 125.8 (s, C-3'a), 125.2 (d, C-2'), 123.7 (d, C-6'), 121.6 (d, C-5'), 121.4 (s, C-4), 121.2 (d, C-4'), 112.8 (d, C-7'), 103.4 (s, C-3')。综合分析紫外、质谱及核磁等数据, 表明该化合物与文献[19]报道的 streptochlorin 一致, 确定它们同质。结构如图 5A 所示。

化合物 4-1 为淡黄色粉末状。UV (MeOH) λ_{\max} 240、288、333、360 nm 处有特征吸收峰。ESI-MS m/z 310 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR (MeOD, 600 MHz)和 ^{13}C -NMR (MeOD, 150 MHz)数据见

表 4。综合上述数据表明, 该化合物的理化性质、波谱性质与 K252c^[20]数据一致, 结构如图 5B 所示。

化合物 F5-1 为淡黄色固体 (MeOH), 在 240、290 和 336 nm 处有较强的紫外吸收。ESI-MS 给出分子离子峰 m/z 467.1 $[M+H]^+$ 。¹H-NMR (MeOD, 600 MHz) 和 ¹³C-NMR (MeOD, 150 MHz) 数据见表 4。综合上述数据表明, 该化合物的理化性质、波谱性质与化合物星孢菌素^[21-22]数据一致, 结构如图 5C 所示。

2.4 Staurosporine 生物合成基因簇定位分析与生物合成途径推导

利用 antiSMASH 7.1^[23] 对 *Streptomyces* sp. W444 的全基因组 (该基因组已提交至 GenBank, 登录号为 CP169412、CP169413 和 CP169414) 进行比较分析, 结果表明 cluster 3 与吲哚咔唑类化合物星孢菌素 (GenBank 登录号为 AB088119)^[24] 的生物合成基因簇具有 60% 的相似性 (表 5, 图 6A)。生物信息学分析表明, cluster 3 含有 33 个基因, 与星孢菌素合成相关的基因只有 9 个, 其中负责吲哚[2,3- α]-吡咯并[3,4-c]咔唑母核结构合成相关的基因为 orf4-6 和 orf9, 它们分别与 *Streptomyces* sp. TP-A0274 的星孢菌素合成基因簇^[25] 中的 staO (编码 L-氨基酸氧化酶)、staD (编码色吡咯酸合成酶)、staP

(编码细胞色素 P450) 以及 staC (编码单氧化酶) 编码的蛋白具有较高的相似性 (表 5); 基因 orf7 和 orf8 编码的 N-甲基转移酶和 O-甲基转移酶分别负责催化星孢菌素氨基糖苷 (L-ristosamine) 的 4'-NH 和 3-OH 甲基化反应^[26], 分别与星孢菌素合成基因簇中的 staMA 和 staMB 编码的蛋白具有较高的相似性 (表 5); orf2 和 orf3 分别编码细胞色素 P450 和 N-糖基转移酶, 这 2 个蛋白主要负责催化吲哚咔唑母核与糖基的偶联反应, 分别与星孢菌素合成基因簇中的 staN 和 staG 编码的蛋白具有较高的相似性 (表 5); orf1 则负责编码转录激活蛋白, 与星孢菌素合成基因簇中的 staR 编码的蛋白具有较高的相似性 (表 5); 此外, 进一步分析发现该基因簇缺少糖基合成相关的基因, 如 staA (编码 glucose-1-phosphate thymidyltransferase)、staB (编码 dTDP-glucose 4, 6-dehydratase) 等。最后结合文献[25,27]对 2 个吲哚咔唑类化合物的生物合成途径进行了推导, 结果表明星孢菌素母核的合成主要由 L-色氨酸修饰、色吡咯酸的合成以及氧化闭环生成色吡唑 3 个步骤构成 (图 5)。L-色氨酸在 L-氨基酸氧化酶 (StaO) 催化下生成吲哚-3-丙酮酸 (indole-3-propionic acid, IPA) 亚胺衍生物。之后, 色吡咯酸合成酶 (StaD) 催化 2 分子 IPA 亚胺产生色吡咯酸 (chromopyrrolic acid, CPA)。在糖基转移酶

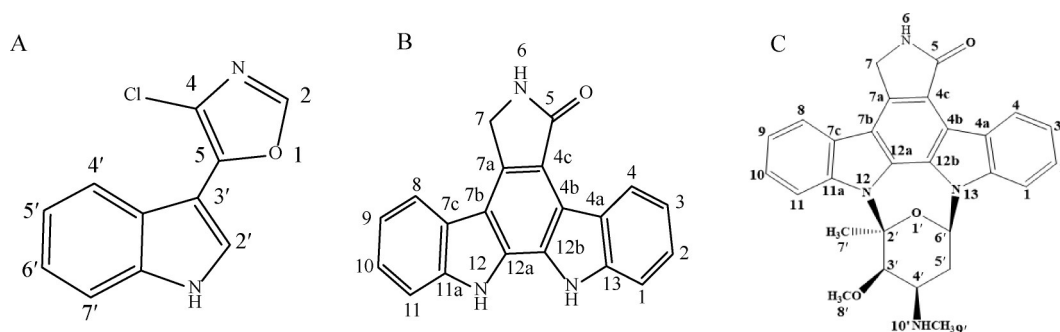


图5 化合物的化学结构。A: 化合物F2-1; B: 化合物F4-1; C: 化合物F5-1。

Figure 5 Chemical structure of the compounds. A: Compound F2-1; B: Compound F4-1; C: Compound F5-1.

表4 化合物F4-1和F5-1的氢谱和碳谱数据

Table 4 ^1H and ^{13}C NMR data of compound F4-1 and F5-1

Position	Compound 4-1		δ H values for compound 5-1	
	δ C, type	δ H	δ C, type	
1	112.5, CH	7.63, 1H, d	108.9, CH	7.56, 1H, d
2	126.3, C	7.44, 1H, t	125.7, CH	7.45, 1H, td
3	119.4, CH	7.24, 1H, t	120.4, C	7.28, 1H, t
4	127.0, CH	9.20, 1H, d	127.0, CH	9.27, 1H, d
4a	124.5, C	-	124.4, C	-
4b	117.7, C	-	115.4, C	-
4c	120.3, C	-	119.5, C	-
5	176.0, C	-	175.6, C	-
6	-	-	-	-
7	47.1, CH ₂	5.03, 2H, s	45.4, CH ₂	4.98, 2H, s
7a	134.7, C	-	133.9, C	-
7b	115.9, C	-	115.8, C	-
7c	124.3, C	-	125.6, C	-
8	122.0, CH	8.04, 1H, d	121.9, CH	7.96, 1H, d
9	121.3, CH	7.33, 1H, t	121.3, CH	7.28, 1H, t
10	126.4, CH	7.48, 1H, t	126.3, CH	7.41, 1H, td
11	111.8, CH	7.69, 1H, t	116.3, CH	8.00, 1H, d
11a	141.1, C	-	140.9, C	-
12a	130.8, C	-	131.9, C	-
12b	126.5, C	-	128.2, C	-
13a	141.2, C	-	138.1, C	-
2'			93.3, C	-
3'			84.5, CH	4.04, 1H, d
4'			52.7, CH	3.25, 1H, m
5'			31.1, CH ₂	2.52, 2.62, 2H, m
6'			82.1, CH	6.62, 1H, dd
7'			30.1, CH ₃	2.39, 3H, s
8'			58.5, CH ₃	3.14, 3H, s
9'			33.4, CH ₃	1.79, 3H, s

(StaG)催化下, K252c (F4-1)的 N-13 位与氨基糖的 C-6' 位发生脱水缩合反应, 产生吡啶唑啉氮昔中间体 holyrineA; 在细胞色素 P450 酶(StaN)催化下 holyrineA 再次发生脱水缩合反应, 使糖基的 C-2' 位和 N-12 位连接形成第二个 C-N 键, 产生 O-去甲基-N-去甲基星孢菌素, 随后在甲基转移酶 StaMA 和 StaMB 的作用下糖基上-OH 和 -NH₃ 分别发生甲基化反应, 最终形成星孢菌素(F5-1), 其生物合成途径如图 6B 所示。综合产物和基因簇分析表明, *Streptomyces* sp. W444 中 cluster3 主要负责星孢菌素类化合物的合成。

2.5 化合物的 MIC 值测定

通过 MIC 的测定发现, 3 个化合物对真菌均具有较好的抑制活性, 结果如表 6 所示。其中, 化合物 F5-1 对黑曲霉 FJAT-31087 的抑制活性最强, MIC 值为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 且对 3 株测试菌均具有一定程度的抑制作用。此外, 化合物 F4-1 对黑曲霉 FJAT-31087 和茄病镰刀菌 QY22 都具有一定的抑制活性, MIC 值均为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。相比之下, 化合物 F2-1 对测试真菌的抑菌活性较弱, 仅表现出对茄病镰刀菌 QY22 的抑制活性, 其 MIC 值为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

3 讨论与结论

红树林生态系统表现为生物群落复杂多样, 其生物量占全球热带和亚热带沿海地区的 60%–75%^[28], 其中孕育着丰富独特的微生物资源。泉州湾洛阳江红树林主要分布于洛阳江、晋江出海口沿岸, 此区域潮流作用强, 东海暖流、南海暖流和黑潮分支等多种水系交汇, 受此影响该区域蕴含着丰富的放线菌资源和潜在的结构新颖的代谢产物^[29]。基于此, 本研究选取了 7 种分离培养基, 从泉州湾洛阳江不同区域采集 2 份红树林根际土壤样品, 并从中分离鉴定了放线菌 56 株, 隶属 6 目 6 科 8 属, 其中

表5 红树林根际土壤来源的*Streptomyces* sp. W444中cluster 3各开放阅读框的功能预测

Table 5 Deduced functions of ORFs in cluster 3 in *Streptomyces* sp. W444 from rhizosphere soil of mangrove plant

Orf	Product size (aa)	Protein homolog	Identity (%)/ Similarity (%)	Proposed function	Accession number
1	957	StaR	68/72	Transcriptional activator	BAC55205
2	408	StaN	85/92	Cytochrome P450	BAC55208
3	436	StaG	79/87	N-glycosyltransferase	BAC55209
4	504	StaO	82/87	L-amino acid oxidase	BAC55210
5	1 154	StaD	73/79	Chromopyrrolic acid synthase	BAC15759
6	418	StaP	73/80	Cytochrome P450	BAC55212
7	274	StaMA	73/83	Methyltransferase	BAC55213
8	288	StaMB	82/89	Methyltransferase	BAC55218
9	545	StaC	80/88	Monooxygenase	BAF47693
10	280		89/92	Recombinase family protein	MET7710960
11	295		96/97	Aminoglycoside phosphotransferase family protein	WP_093549433
12	427		97/98	Helix-turn-helix domain-containing protein	SCD65229
13	157		100/100	ATP-binding protein	WP_283298866
14	150		95/96	DUF6415 family natural product biosynthesis protein	WP_283298867
15	157		96/96	DUF6302 family protein	WP_229870986
16	66		97/96	DUF5999 family protein	WP_229901893
17	221		97/99	Hypothetical protein	WP_337674500
18	411		98/99	Methyltransferase, FxLD system	WP_283298873
19	65		97/98	FxLD family lanthipeptide	WP_093549423
20	1 006		97/97	Lantibiotic dehydratase	WP_337674501
21	407		97/98	Lanthionine synthetase C family protein	WP_189716992
22	329		97/98	Thiopeptide-type bacteriocin biosynthesis protein	WP_308435751
23	241		82/85	Hypothetical protein	MER5525945
24	278		97/97	SGNH/GDSL hydrolase family protein	WP_031128207
25	338		99/99	Hemolysin family protein	WP_359285438
26	516		96/97	Hemolysin family protein	WP_359388163
27	142		94/95	GNAT family N-acetyltransferase	AYA81838
28	83		96/96	Antitoxin	WP_315879421
29	123		99/99	Fic family toxin-antitoxin system, toxin component	WP_317433620
30	126		87/88	Hypothetical protein	OSY52980
31	226		97/98	Class I SAM-dependent methyltransferase	MEV2200025
32	114		98/98	VOC family protein	MEV2200026
33	240		96/96	Dethiobiotin synthase	WP_317433624

链霉菌 21 株、小单孢菌 23 株、拟无枝酸菌 6 株、糖多孢菌 2 株，戈登氏菌 3 株、类诺卡氏菌 1 株和诺卡氏菌 1 株。从多样性分布可以看

出，链霉菌属和小单孢菌属为优势菌群，该优势类群分布与何洁等^[30]报道的印度洋红树林沉积物放线菌，以及何子邦等^[31]报道的广西沿海

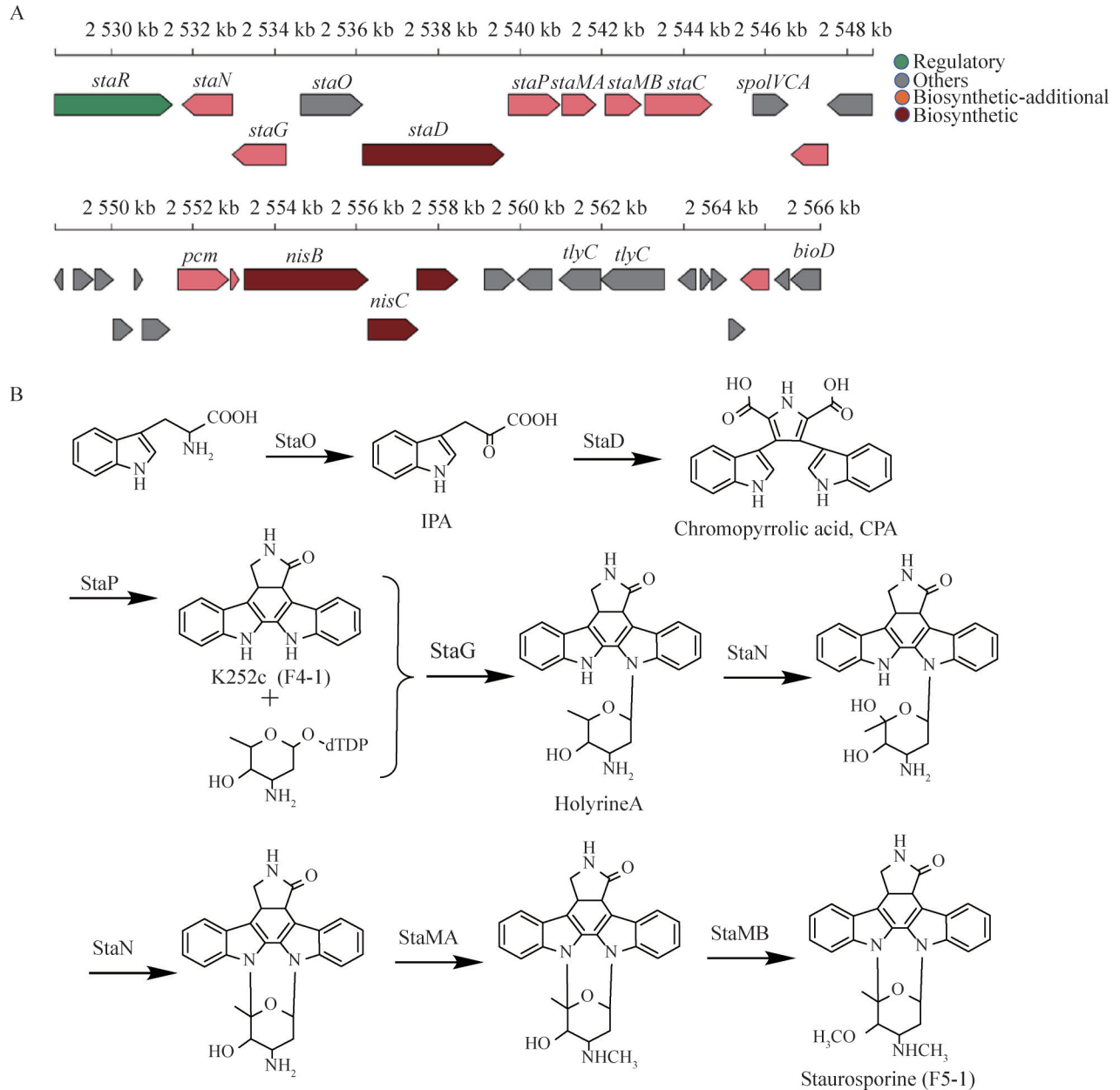


图6 Staurosporine的生物合成基因簇定位(A)和生物合成途径推导(B)

Figure 6 The located biosynthesis gene clusters of staurosporine (A) and its proposed biosynthetic pathway (B).

表6 化合物的最小抑菌浓度(MIC)测定

Table 6 Minimum inhibitory concentration (MIC) test of compounds ($\mu\text{g/mL}$)

样品 Sample	白色念珠菌 ATCC 90028 <i>Candida albicans</i>	黑曲霉 FJAT-31087 <i>Aspergillus niger</i>	茄病镰刀菌 QY22 <i>Fusariums olanaceae</i> QY22
Compound F2-1	>200	>200	200
Compound F4-1	>200	100	100
Compound F5-1	50	25	50
Carbendazim	25	12.5	50

红树林土壤放线菌的优势类群一致。从分菌土样来源不同分析, 2种不同红树林植物根际土样中可培养放线菌的数目和多样性均呈现出一定差异, 其中从互花米草根际土样中分离得到的稀有放线菌种属更为丰富, 约占该样品中可培养放线菌总数的75%, 表明互花米草根际土样中富含稀有放线菌, 可作为稀有放线菌分离的重要资源。

结合抑菌活性筛选, 选取 *Streptomyces* sp. W444 作为目标菌株, 从中分离鉴定了3个吡啶类化合物, 分别为 streptochlorin、K252c 和 staurosporine。结构上, 星孢菌素类化合物(K252c 和 staurosporine)作为吡啶唑啉类生物碱, 表现出广泛的生物活性, 如 *Streptomyces* sp. ZS-A121 产生了5个星孢菌素衍生物, 其中一个新的星孢菌素衍生物 streptomholyrine A 对白色念珠菌(*C. albicans*)具有较强抑制活性, 其 MIC 为 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[32], 此外, 本研究分离得到的 K252c 对大肠杆菌(*Escherichia coli*)以及金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)也具有较显著的抑制活性, 其 MIC 均为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。同时, 研究还表明星孢菌素对蛋白激酶 C 具有极强的抑制活性, 其 IC₅₀ 值达到 2.7 nmol/L^[33], 因此其被作为科研工具化合物, 用于细胞生命活动的追踪, 如细胞信号传导以及细胞凋亡^[34]; 此外, 星孢菌素衍生物也具有较强烈的细胞毒活性。例如 Xiao 等^[35]通过异源表达从基因工程菌 *Streptomyces coelicolor* M1146 分离得到2个新的星孢菌素衍生物(staurosporines M1 和 M2), 生物活性分析表明 staurosporines M1 和 M2 对肿瘤细胞(HCT-116, K562 和 Huh 7.5)的生长具有显著的抑制活性。同时, 研究还发现吡啶类化合物 streptochlorin 对植物病原性真菌 *Pythium dissimile*、*Botrytis cinerea*、*Zymoseptoria tritici*、*Pyriculariaory zae*、*Fusarium culmorum* 和

Rhizoctonia solani 等均具有较强的抑制活性^[36], 显示出良好的生防菌潜能。基于此, 抗真菌分析结果表明, *Streptomyces* sp. W444 粗提物展示的优良抗真菌活性可能与该菌株所产的吡啶类化合物密切相关, 分离得到的3个吡啶类化合物的抗真菌 MIC 值的测定结果进一步验证了上述结论。基因组分析表明, 其合成基因簇 cluster 3 与星孢菌素的生物合成基因簇高度相似, 主要包括负责吡啶[2,3- α]-吡咯并[3,4-c]吡啶母核合成相关的基因, 进一步分析还发现该基因簇缺少糖基合成相关的基因, 这与王冕等^[37]报道的海洋链霉菌 IMB3-202 中的星孢菌素合成基因簇的构成一致, 该发现也预示着 cluster 3 中的 orf2 和 orf3 所编码的细胞色素 P450 和 N-糖基转移酶具有较宽的底物识别能力, 能从初级糖代谢中识别底物, 进而催化吡啶唑啉母核与糖基的偶联反应, 该发现也为研究这2个酶的催化机制和合成新的星孢菌素衍生物奠定了基础, 也预示着泉州湾红树林放线菌中蕴含着丰富的基因资源, 值得进一步开发利用。

综上所述, 本研究从泉州湾的2种红树林植物根际土样中分离鉴定了56株放线菌, 并基于样品来源初步探讨了可培养放线菌的多样性, 结果表明泉州湾红树林的放线菌资源丰富, 发掘潜力巨大, 为今后进一步开发利用泉州湾红树林药用放线菌资源奠定了基础。同时, 综合菌株代谢产物的抗真菌活性, 从 *Streptomyces* sp. W444 中鉴定了3个吡啶类化合物, 定位了 staurosporine 类化合物的生物合成基因簇, 并推导了其生物合成途径, 拓宽了 staurosporine 类化合物的菌株来源, 为其生物合成研究奠定了基础。

作者贡献声明

张文州: 实验设计与执行, 撰写初稿;
陈琳琳: 数据收集与整理, 抗菌实验操作; 林

水森: 数据收集与整理, 协助撰写初稿; 林阳君: 数据收集与整理, 数据分析与解释; 庄月娥: 数据收集与整理, 协助撰写初稿; 谢志新: 技术支持; 江红: 稿件修订; 连云阳: 稿件修订; 骆祝华: 稿件修订; 彭飞: 概念与设计, 数据分析与解释, 稿件修订。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] RODRIGUES ML, NOSANCHUK JD. Fungal diseases as neglected pathogens: a wake-up call to public health officials[J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2020, 14(2): e0007964.
- [2] FISHER MC, ALASTRUUEY-IZQUIERDO A, BERMAN J, BICANIC T, BIGNELL EM, BOWYER P, BROMLEY M, BRÜGGEMANN R, GARBER G, CORNELLY OA, GURR SJ, HARRISON TS, KUIJPER E, RHODES J, SHEPPARD DC, WARRIS A, WHITE PL, XU JP, ZWAAN B, VERWEIJ PE. Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2022, 20(9): 557-571.
- [3] REVIE NM, IYER KR, ROBBINS N, COWEN LE. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2018, 45: 70-76.
- [4] RÜTTEN A, KIRCHNER T, MUSIOL-KROLL EM. Overview on strategies and assays for antibiotic discovery[J]. *Pharmaceuticals*, 2022, 15(10): 1302.
- [5] ALAM K, MAZUMDER A, SIKDAR S, ZHAO YM, HAO JF, SONG CY, WANG YY, SARKAR R, ISLAM S, ZHANG YM, LI AY. *Streptomyces*: the biofactory of secondary metabolites[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 968053.
- [6] OSSAI J, KHATABI B, NYBO SE, KHAREL MK. Renewed interests in the discovery of bioactive actinomycete metabolites driven by emerging technologies[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2022, 132(1): 59-77.
- [7] de LIMA JÚNIOR AA, de SOUSA EC, de OLIVEIRA THB, de SANTANA RCF, da SILVA SKR, COELHO LCBB. Genus *Streptomyces*: recent advances for biotechnological purposes[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2023, 70(4): 1504-1517.
- [8] KIM ES. recent advances of actinomycetes[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(2): 134.
- [9] 徐静, 邹仁健, 陈红军, 温珍昌. 红树林放线菌生物多样性及其抗菌活性代谢产物研究进展[J]. *广东海洋大学学报*, 2022, 42(6): 143-152.
- XU J, ZOU RJ, CHEN HJ, WEN ZC. Research progress on biodiversity and antimicrobial metabolites from mangrove actinomycetes[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2022, 42(6): 143-152 (in Chinese).
- [10] 林鹏, 张瑜斌, 邓爱英, 庄铁诚. 九龙江口红树林土壤微生物的类群及抗菌活性[J]. *海洋学报*, 2005, 27(3): 133-141.
- LIN P, ZHANG YB, DENG AY, ZHUANG TC. Microflora and antimicrobial activities of soil microorganisms in mangrove forests in the Jiulong Estuary[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2005, 27(3): 133-141 (in Chinese).
- [11] WANG Z, YIN JL, BAI M, YANG J, JIANG CP, YI XX, LIU YH, GAO CH. new polyene macrolide compounds from mangrove-derived strain *Streptomyces hirosheimensis* GXIMD 06359: isolation, antifungal activity, and mechanism against *Talaromyces marneffeii*[J]. *Marine Drugs*, 2024, 22(1): 38.
- [12] WANG WL, SONG TF, CHAI WY, CHEN L, CHEN L, LIAN XY, ZHANG ZZ. Rare polyene-polyol macrolides from Mangrove-derived *Streptomyces* sp. ZQ4BG[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 1703.
- [13] CHE Q, LI T, LIU XF, YAO TT, LI J, GU QQ, LI DH, LI WL, ZHU TJ. Genome scanning inspired isolation of reedsmycins A – F, polyene-polyol macrolides from *Streptomyces* sp. CHQ-64[J]. *RSC Advances*, 2015, 5(29): 22777-22782.
- [14] ZENG QF, HUANG HQ, ZHU J, FANG Z, SUN QG, BAO SX. A new nematocidal compound produced by *Streptomyces albogriseolus* HA10002[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2013, 103(5): 1107-1111.
- [15] 许敬华, 李意敏, 丁思龙, 张秋芳, 陈永山. 泉州湾红树林人工种植过程根际微生物群落结构演变特征[J]. *湿地科学与管理*, 2023, 19(1): 9-14.
- XU JH, LI YM, DING SL, ZHANG QF, CHEN YS. Characteristics of rhizosphere microbial community structure evolution during mangrove plantation[J]. *Wetland Science & Management*, 2023, 19(1): 9-14 (in Chinese).
- [16] MIN LL, WANG WZ, OREN A, LAI QL, HUANG ZB. *Coralimargarita parva* sp. nov., isolated from mangrove sediment and genome-based analysis of the class *Opitutae* revealed five novel families: *Coralimargaritaceae* fam. nov., *Pelagicococcaceae* fam. nov., *Cerasicoccaeae* fam. nov., *Oceanipulchritudinaceae* fam. nov., and *Alterococcaeae* fam. nov.[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1202141.
- [17] HU YZ, GUO Y, LAI QL, DONG L, HUANG ZB. *Draconibacterium mangrovi* sp. nov., isolated from mangrove sediment[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2020, 70(8): 4816-4821.
- [18] 梁效伟. 台湾海峡海洋沉积物放线菌的多样性及次级代谢产物生物合成基因筛选[D]. 福州: 福建医科大学硕士学位论文, 2012.
- LIANG XW. Diversity of actinomycetes in marine sediments of Taiwan Province strait and screening of biosynthesis genes of secondary metabolites[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fujian Medical University, 2012 (in Chinese).

- [19] WATANABE H, AMANO S, YOSHIDA J, SASAKI T, HATSU M, TAKEUCHI Y, KAJII K, SHOMURA T, SEZAKI M. A new antibiotic SF2583A, 4-chloro-5-(3'-indolyl)oxazole, produced by *Streptomyces*[J]. Meiji Seika Kenkyu Nenpo, 1988, 27: 55-62.
- [20] YASUZAWA T, IIDA T, YOSHIDA M, HIRAYAMA N, TAKAHASHI M, SHIRAHATA K, SANO H. The structures of the novel protein kinase C inhibitors K-252a, b, c and d[J]. The Journal of Antibiotics, 1986, 39(8): 1072-1078.
- [21] DE FARIA AF, MARTINEZ DST, MEIRA SMM, DE MORAES ACM, BRANDELLI A, FILHO AGS, ALVES OL. Anti-adhesion and antibacterial activity of silver nanoparticles supported on graphene oxide sheets[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2014, 113: 115-124.
- [22] LI XB, TANG JS, GAO H, DING R, LI J, HONG K, YAO XS. A new staurosporine analog from actinomycetes *Streptomyces* sp. (172614)[J]. Journal of Asian Natural Products Research, 2011, 13(8): 765-769.
- [23] BLIN K, SHAW S, AUGUSTIJN HE, REITZ ZL, BIERMANN F, ALANJARY M, FETTER A, TERLOUW BR, METCALF WW, HELFRICH EJM, van WEZEL GP, MEDEMA MH, WEBER T. antiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation[J]. Nucleic Acids Research, 2023, 51(W1): W46-W50.
- [24] ONAKA H, TANIGUCHI SI, IGARASHI Y, FURUMAI T. Cloning of the staurosporine biosynthetic gene cluster from *Streptomyces* sp. TP-A0274 and its heterologous expression in *Streptomyces lividans*[J]. The Journal of Antibiotics, 2002, 55(12): 1063-1071.
- [25] GROOM K, BHATTACHARYA A, ZECHEL DL. Rebecamycin and staurosporine biosynthesis: insight into the mechanisms of the flavin-dependent monooxygenases RebC and StaC[J]. Chembiochem, 2011, 12(3): 396-400.
- [26] SALAS AP, ZHU LL, SÁNCHEZ C, BRAÑA AF, ROHR J, MÉNDEZ C, SALAS JA. Deciphering the late steps in the biosynthesis of the anti-tumour indolocarbazole staurosporine: sugar donor substrate flexibility of the StaG glycosyltransferase[J]. Molecular Microbiology, 2005, 58(1): 17-27.
- [27] HOWARD-JONES AR, WALSH CT. Staurosporine and rebecamycin aglycones are assembled by the oxidative action of StaP, StaC, and RebC on chromopyrrolic acid[J]. Journal of the American Chemical Society, 2006, 128(37): 12289-12298.
- [28] HOLGUIN G, VAZQUEZ P, BASHAN Y. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview[J]. Biology and Fertility of Soils, 2001, 33(4): 265-278.
- [29] 颜利, 王金坑, 蒋金龙, 傅世锋, 戴娟娟, 欧阳玉蓉. 海洋生物多样性保护空间规划分区体系构建及其在泉州湾的应用[J]. 台湾海峡, 2012, 31(2): 238-245.
- [30] 何洁, 张道锋, 徐盈, 张晓梅, 唐蜀昆, 徐丽华, 李文均. 印度洋红树林沉积物可培养海洋放线菌多样性及其活性[J]. 微生物学报, 2012, 52(10): 1195-1202.
- HE J, ZHANG DF, XU Y, ZHANG XM, TANG SK, XU LH, LI WJ. Diversity and bioactivities of culturable marine actinobacteria isolated from mangrove sediment in Indian Ocean[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(10): 1195-1202 (in Chinese).
- [31] 何子邦, 李顺莲, 吴友浪, 陈明胜, 庾利. 广西沿海红树林土壤放线菌多样性、新颖性及抗菌活性研究[J]. 中国抗生素杂志, 2022, 47(5): 463-473.
- HE ZB, LI SL, WU YL, CHEN MS, TUO L. Diversity, novelty, and antibiotic activity of actinobacteria isolated from mangrove soil in Guangxi[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2022, 47(5): 463-473 (in Chinese).
- [32] XU L, LIU RS, FANG JB, ZHANG NJ, PU FQ, LEI Z, DING WJ, JIANG YJ. Cytotoxic and antifungal staurosporine derivatives from marine-derived actinomycete *Streptomyces* sp. ZS-A121[J]. Chemistry & Biodiversity, 2024, 21(2): e202301712.
- [33] MCALPINE JB, KARWOWSKI JP, JACKSON M, MULLALLY MM, HOCHLOWSKI JE, PREMACHANDRAN U, BURRENS NS. MLR-52, (4'-demethylamino-4',5'-dihydroxystaurosporine), a new inhibitor of protein kinase C with immunosuppressive activity[J]. The Journal of Antibiotics, 1994, 47(3): 281-288.
- [34] ZHOU B, HU ZJ, ZHANG HJ, LI JQ, DING WJ, MA ZJ. Bioactive staurosporine derivatives from the *Streptomyces* sp. NB-A13[J]. Bioorganic Chemistry, 2019, 82: 33-40.
- [35] XIAO F, LI HY, XU MY, LI T, WANG J, SUN CM, HONG K, LI WL. staurosporine derivatives generated by pathway engineering in a heterologous host and their cytotoxic selectivity[J]. Journal of Natural Products, 2018, 81(8): 1745-1751.
- [36] ZHANG MZ, CHEN Q, MULHOLLAND N, BEATTIE D, IRWIN D, GU YC, YANG GF, CLOUGH J. Synthesis and fungicidal activity of novel pimprinine analogues[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2012, 53: 283-291.
- [37] 王冕, 郝晓萌, 李娇, 胡媛媛, 关艳, 王以光, 甘茂罗, 肖春玲. 海洋链霉菌 IMB3-202 产生的吡啶咪唑生物碱[J]. 中国医药生物技术, 2018, 13(2): 137-144.
- WANG M, HAO XM, LI J, HU YY, GUAN Y, WANG YG, GAN ML, XIAO CL. Identification of indolocarbazoles from the marine-derived *Streptomyces* sp. IMB3-202[J]. Chinese Medicinal Biotechnology, 2018, 13(2): 137-144(in Chinese).