



## 研究报告

## 2 株小双孢菌新种的全基因组测序分析与抗菌活性测定

刘超兰 黎江华 郭义东\*

成都大学药学院 四川抗菌素工业研究所 抗生素研究与再评价四川省重点实验室 四川 成都 610106

**摘要:**【背景】抗生素的滥用导致了耐药病原菌的不断增多和扩散,成为威胁人们健康的一个重要因素,因此挖掘新型抗生素显得尤其重要。新的物种很有可能会产生新的生物活性物质,特别是那些常规分离方法很少分离到的稀有放线菌。【目的】对 2 株小双孢菌潜在新种进行全基因组测序分析与抗菌活性测定,从多层次分子水平鉴定其新种分类地位,并预测次级代谢基因簇,为发现产生新颖活性物质的药用放线菌资源奠定基础。【方法】通过 16S rRNA 基因序列分析初步确定菌株 H10836 和 H11081 的种属分类;采用 Illumina 平台对 2 个菌株进行全基因组测序和注释,基于此构建全基因组系统发育树、计算 ANI (Average Nucleotide Identity)和 dDDH (Digital DNA-DNA Hybridization)值,最终确定菌株的新种分类地位;基于全基因组注释结果进行 COG (Clusters of Orthologous Genes)聚类、KEGG (Koyto Encyclopedia of Genes and Genomes)代谢通路和 antiSMASH 次级代谢基因簇预测分析;采用琼脂打孔法进行抗菌活性测定。【结果】菌株 H10836 和 H11081 与小双孢菌属 8 个种两两之间的 ANI 值范围分别为 85.3%–92.1%和 85.2%–92.1%,dDDH 值范围分别为 33.0%–44.5%和 31.3%–44.5%。ANI 和 dDDH 值均低于物种判断的临界值,而且 2 株菌在全基因组系统发育树上与小双孢菌属聚成一簇,但独立成一亚支,从分子水平上综合确定菌株 H10836 和 H11081 是小双孢菌属的 2 个潜在新种。antiSMASH 分析发现该 2 株菌基因组中有多种次级代谢产物合成基因簇,而且与已知抗生素合成基因簇相似度较低。抗菌活性测定显示该 2 株菌代谢产物均有抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌活性。【结论】菌株 H10836 和 H11081 是具有抗菌活性的新菌种,因此值得挖掘其新颖活性天然产物,试验结果将为菌株的进一步研究和应用提供参考。

**关键词:** 小双孢菌, 全基因组测序, 新种, 次级代谢基因簇, 抗菌活性

**Foundation items:** Science and Technology Program of Sichuan Province (2020YJ0276, 2019JDPT0012); Talent Introduction Project of Chengdu University (2081915049); Science and Technology Bureau Program of Chengdu Municipal Government (2016-XT00-00023-GX)

\*Corresponding author: Tel: 86-28-84216035; E-mail: guoyidong77@sina.com

Received: 01-06-2020; Accepted: 09-11-2020; Published online: 25-02-2021

基金项目: 四川省科技项目(2020YJ0276, 2019JDPT0012); 成都大学引进人才启动项目(2081915049); 成都市科技局项目(2016-XT00-00023-GX)

\*通信作者: Tel: 028-84216035; E-mail: guoyidong77@sina.com

收稿日期: 2020-06-01; 接受日期: 2020-11-09; 网络首发日期: 2021-02-25

## Whole genome sequencing and antibacterial activity determination of two novel species of *Microbispora*

LIU Chaolan LI Jianghua GUO Yidong\*

Antibiotics Research and Re-Evaluation Key Laboratory of Sichuan Province; Sichuan Industrial Institute of Antibiotics; School of Pharmacy, Chengdu University, Chengdu, Sichuan 610106, China

**Abstract:** [Background] The abuse of antibiotics leads to the increase and spread of drug-resistant pathogens, which has become an important factor threatening people's health. Therefore, it is particularly important to explore new antibiotics. New species are likely to produce new bioactive substances, especially rare actinomycetes which are rarely isolated by conventional methods. [Objective] To confirm classification of two novel species of *Microbispora* and predict the secondary metabolic gene clusters by various molecular biological technologies, which will lay a foundation for the discovery of the medicinal actinobacteria producing novel active substances. [Methods] Taxonomic positions of isolates were preliminarily determined by the 16S rRNA gene sequence analysis. The whole genomes were sequenced and annotated by Illumina genome analyzer. On this basis, a whole-genome-based phylogenomic tree was constructed, and the ANI (average nucleotide identity) and dDDH (digital DNA-DNA hybridization) values were calculated, so as to determine the taxonomic status of novel species. Based on gene annotation, COG (clusters of orthologous genes), KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), and secondary metabolic gene cluster prediction on antiSMASH were analyzed. Antimicrobial activity was tested by cylinder plate method. [Results] The ANI and dDDH values between strain H10836 and 8 species of the genus *Microbispora* were 85.3%–92.1% and 33.0%–44.5%, respectively. Meanwhile, the ANI and dDDH values between strain H11081 and 8 species of the genus *Microbispora* were 85.2%–92.1% and 31.3%–44.5%, respectively. Therefore, all the ANI and dDDH values are well below the cut-off point recommended for delineating species. In addition, a whole-genome-based phylogenomic tree showed that strains H10836 and H11081 formed an independent monophyletic branch within the genus *Microbispora*. Therefore, these results of phylogenetic analysis support the conclusion that strains H10836 and H11081 could be considered to represent two potential novel species of the genus *Microbispora*. Furthermore, there were many kinds of biosynthetic gene clusters in the genomes of both strains H10836 and H11081 by antiSMASH analysis, and the similarities with known antibiotic synthetic gene clusters were low. The metabolites of two strains exhibited antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). [Conclusion] Strains H10836 and H11081 are two novel species with antibacterial activity, so it is worth mining their novel active natural products. The results of this experiment provide reference for further research and application of the strains.

**Keywords:** *Microbispora*, whole genome sequencing, novel species, secondary metabolic gene clusters, antibacterial activity

当代医药领域的重大科技需求之一是研制新药所需且结构多样的药物先导化合物,以实现药物研究由仿制到创新的重大转变。另外,我国是世界上最大的抗生素使用和生产的国家之一,而且也是细菌耐药性的重灾区。抗生素的滥用导致了耐药病原菌的不断增加和扩散,成为威胁人们健康的一个重要因素,因此挖掘新型抗生素显得尤其重要。微

生物次级代谢产物一直是新型药物先导化合物的宝贵资源库。新的物种很有可能会产生新的生物活性物质,特别是那些常规分离方法很少分离到的稀有放线菌。小双孢菌属是由 Nonomura 等在 1957 年根据其气生菌丝的孢子梗上有纵向生长的 2 个孢子建立的<sup>[1]</sup>,属于链孢囊菌科<sup>[2]</sup>。研究者已从不同的自然环境,如温泉<sup>[3]</sup>、植物组织<sup>[4]</sup>、根系土壤<sup>[5]</sup>、海

底沉积物<sup>[6]</sup>等分离得到小双孢菌,可目前有效发表的只有 10 个种。虽然小双孢菌属的菌至今发现较少,但其生物活性物质较为丰富。2005, Berdy 统计小双孢菌产生了 56 种抗生素,之后又发现了  $\gamma$ -glu-MS、Bispolides、Microbiaeratin、Microbiaeratinin 和 Microbisporicin 等一系列具有生物活性的物质<sup>[3-6]</sup>,具有广阔的开发前景。

随着测序技术的发展和测序成本的降低,使得微生物全基因组能够快速被解读,有利于研究者认知微生物基因组信息,通过各种生物信息软件预测次级代谢基因簇,对高效挖掘新型抗生素具有重要的指导意义。

本课题组在筛选具有药用价值的稀有放线菌过程中,从四川红原土壤样本中分离获得 2 株小双孢属的潜在新种。基于此,本文从多层次的分子水平确定菌株 H10836 和 H11081 的分类地位,并利用二代测序技术对 2 株菌进行全基因组测序分析与抗菌活性测定,以期为菌株的进一步研究和应用提供参考,发现可以产生新颖活性物质的药用放线菌资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

菌株 H10836 和 H11081 分离自四川红原土壤样本(经纬度: 31°79'N, 102°55'E; 海拔: 3 504 m),采用腐殖酸培养基(HV)<sup>[7]</sup>平板稀释法分离获得,现保藏于四川抗菌素工业研究所新抗生素菌种保藏管理中心。

检定菌: 大肠杆菌(*Escherichia coli*) ATCC 11775、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) BNCC 212927、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) ATCC 25923、藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*) NCTC 2665、绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*) SIIA 2261、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*) ATCC 10211, 上述菌种均保藏于四川抗菌素工业研究所新抗生素菌种保藏管理中心。

#### 1.1.2 培养基

分类鉴定培养基: ISP 系列培养基<sup>[8]</sup>; 种子培养基: ISP 2 培养基<sup>[8]</sup>; 发酵培养基(g/L): 燕麦片 20.0, 葡萄糖 10.0, 糊精 25.0, 棉籽饼 10.0, 鱼粉 5.0, 糖蜜 5.0, 酵母粉 2.0,  $\text{CaCO}_3$  3.0, pH 7.0。

#### 1.1.3 主要试剂和仪器

MiniBEST Bacteria Genomic DNA Extraction Kit, TaKaRa 公司; 琼脂糖凝胶 DNA 片段纯化回收试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 2×Taq PCR Master Mix, 天根生化科技(北京)有限公司; 其余试剂均为市售分析纯。

PCR 仪, Bio-Rad 公司; 超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; 生化培养箱, 东联电子有限公司; 振荡式摇床, 上海博讯实业有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 培养特征

将菌株 H10836 和 H11081 接种于 ISP 系列培养基, 于 28 °C 培养 10 d, 观察菌落形态、生长状况、颜色、可溶性色素等培养特征。

### 1.2.2 16S rRNA 基因序列测定及系统发育分析

根据 MiniBEST Bacteria Genomic DNA Extraction Kit 说明书提取分离菌株基因组 DNA。采用细菌 16S rRNA 基因的通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGGYTA CCTTGTTAGGACTT-3')<sup>[9]</sup>进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(25  $\mu\text{L}$ ): DNA 模板 2  $\mu\text{L}$ , 2×Taq PCR Master Mix 12.5  $\mu\text{L}$ , 引物 27F (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , 引物 1492R (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 8.5  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 2 min, 30 次循环; 72 °C 10 min。PCR 产物采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 用凝胶回收试剂盒纯化 PCR 产物, 送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。测序结果在 EzBioCloud Server (<https://www.ezbiocloud.net/>)<sup>[10]</sup>进行同源序列比对, 利用 MEGA 7.0<sup>[11]</sup>软件构建基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树和分离菌株的聚类树, 使用 Neighbor-Joining 法进行 1 000 次的 Bootstrap 检验。

菌株 H10836 和 H11081 的 16S rRNA 基因序列和全基因组序列在 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上提交, 获得 GenBank 登录号。

1.2.3 全基因组测序与组装

采用 Illumina NovaSeq 6000 测序平台对菌株 H10836 和 H11081 进行全基因组测序, 使用 SPAdes<sup>[12]</sup>对 DNA 序列进行拼接, 优化参数 Kmer 值, 获得最好的组装结果, 并以 GapFiller<sup>[13]</sup>对拼接得到的 Contig 补 GAP, 最后采用 PrinSeS-G<sup>[14]</sup>进行序列矫正。

1.2.4 基因组注释、比较基因组分析及全基因组系统发育树构建

使用 Prokka 对组装结果进行基因元件预测, 将预测基因的蛋白序列分别与 CDD<sup>[15]</sup>、NR<sup>[16]</sup>、SWISS-PROT<sup>[17]</sup>、GO<sup>[18]</sup>、COG<sup>[19]</sup>、KEGG<sup>[20]</sup>等数据库进行比对分析, 完成基因注释信息预测。

采用 antiSMASH<sup>[21]</sup>数据库进行菌株 H10836 和 H11081 的次级代谢基因簇分析。

菌株 H10836 和 H11081 之间及其分别与相似性较高的模式菌株之间的平均核苷酸一致性值 (Average Nucleotide Identity, ANI) 和理论计算的 DNA-DNA 杂交值 (Digital DNA-DNA Hybridization, dDDH) 分别通过 Jspecies V1.2 和 <http://ggdc.dsmz.de/distcalc2.php> 进行计算<sup>[22]</sup>。

基于菌株 H10836、H11081、小双孢菌属模式菌株以及 *Streptosporangiaceae* 科内不同属模式菌株的全基因组序列, 使用 CVTree3<sup>[23]</sup>网络

服务器构建全基因组系统发育树, 参数 K-value 为 6。

1.2.5 抗菌活性测定

将在 ISP 3 培养基 28 °C 培养 7 d 的分离菌株接种到种子培养基中, 28 °C、200 r/min 培养 4 d, 作为种子培养液。将种子液按比例接种到发酵培养基中 (250 mL 三角瓶装 30 mL 发酵培养基), 28 °C、200 r/min 培养 7 d, 取 5 mL 发酵液, 用 2 倍体积甲醇浸泡过夜, 以 12 000 r/min 离心 10 min 取上清液备用。

分别配制 LB 琼脂培养基 200 mL, 1×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 20 min 后冷却至 40 °C, 在无菌条件下, 分别加入大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、MRSA、藤黄微球菌、绿脓杆菌、肺炎克雷伯菌 6 种致病菌菌悬液 50 μL, 充分混匀后制备琼脂平板, 待平板凝固后, 用直径为 8 mm 的无菌枪头打孔, 分别加入 100 μL 甲醇浸提的发酵液, 于 37 °C 培养 24 h, 观察并测定抑菌圈直径。

2 结果与分析

2.1 培养特征

菌株 H10836 和 H11081 在 ISP 1、ISP 2、ISP 3 和 ISP 6 培养基中生长良好, 在 ISP 4、ISP 5、ISP 7 培养基中不生长或生长弱, 在 ISP 系列培养基菌落颜色各异, 均不产可溶性色素 (表 1)。菌株 H10836 和 H11081 在 ISP 3 培养基上有浅粉色气生菌丝 (图 1), 但在其余培养基上均无气生菌丝。

表 1 菌株培养特征  
Table 1 Cultural characteristics of strains H10836 and H11081

| Agar medium | H10836   |                  |                 | H11081 |                  |                 |
|-------------|----------|------------------|-----------------|--------|------------------|-----------------|
|             | Growth   | Colour of colony | Soluble pigment | Growth | Colour of colony | Soluble pigment |
| ISP 1       | Good     | Orange           | No              | Good   | Beige            | No              |
| ISP 2       | Good     | Dark red         | No              | Good   | Brownish orange  | No              |
| ISP 3       | Good     | Coral            | No              | Good   | Light coral pink | No              |
| ISP 4       | No       | No               | No              | No     | No               | No              |
| ISP 5       | Moderate | Cream            | No              | Poor   | Cream            | No              |
| ISP 6       | Good     | Light yellow     | No              | Good   | Sand             | No              |
| ISP 7       | Poor     | Light brown      | No              | Poor   | Cream            | No              |

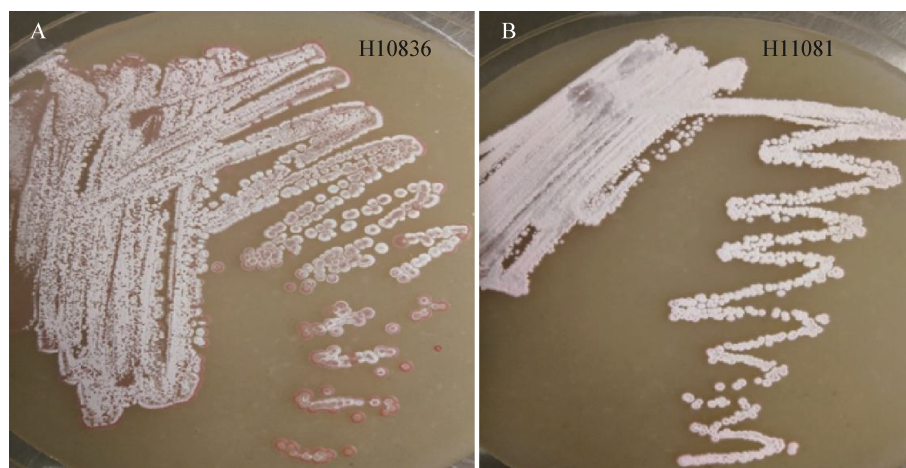


图1 菌株 H10836 (A)和 H11081 (B)在 ISP 3 培养基于 28 °C 培养 10 d 后的菌落形态

Figure 1 Colony morphology of strains H10836 (A) and H11081 (B) grown on oatmeal agar for 10 days at 28 °C

## 2.2 2 株新种的分子鉴定

### 2.2.1 菌株 H10836 和 H11081 的初步归属

16S rRNA 基因序列在 EzTaxon 公用数据库进行同源序列比对结果显示, 菌株 H10836 和 H11081 分别与模式菌株 *Microbispora rosea* subsp. *rosea* ATCC 12950 和 *Microbispora bryophytorum* NEAU-TX2-2 相似度最高, 相似度分别为 99.10% 和 99.33%。2014 年, Kim 等根据更为全面的数据提出了细菌物种分类的 16S rRNA 基因相似度阈值是 98.65%<sup>[24]</sup>, 因此可判断分离菌株归属于小双孢菌属。

### 2.2.2 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树分析

菌株 H10836 和 H11081 的 16S rRNA 基因序列登录号分别为 LC363903 和 LC363911。通过对 16S rRNA 基因序列构建系统发育树, 发现菌株 H10836 和 H11081 与小双孢菌属聚类, 但 2 株菌位于不同分支, 表明菌株 H10836 和 H11081 是小双孢菌属的不同菌种。此外, 虽然菌株 H11081 与模式菌株的 16S rRNA 基因序列最高相似性高于临界值, 但是它在系统发育树上形成一个独立进化分支(图 2), 因此初步判断菌株 H11081 可能是小双孢菌属的潜在新种。

### 2.2.3 基于全基因组的系统发育树分析

菌株 H10836 和 H11081 的全基因组序列上传至

NCBI 获得的 GenBank 登录号分别是 JABBWU000000000 和 JABBWV000000000。结果显示, 菌株 H10836 和 H11081 的全长分别为 8.8 Mb 和 7.4 Mb, Contig 数目为 92 个和 51 个, GC 含量分别为 71.3%和 71.5%; 2 株菌的基因组分别包含了 8 109 个和 6 717 个蛋白编码基因数目。统计信息见表 2。

基于全基因组序列构建菌株 H10836、H11081、小双孢菌属模式菌株以及 *Streptosporangiaceae* 内不同属菌株的系统发育树如图 3 所示。2 株菌在全基因组系统发育树上与小双孢菌属 *Microbispora* 聚成一簇, 但独立成一个亚支, 表明菌株 H10836 和 H11081 可能是小双孢菌属的新菌种。

### 2.2.4 基于 ANI 值和 dDDH 值分析

新菌种判断的标准是 DDH 值低于 70%<sup>[25]</sup>或者 ANI 值低于 95%–96%<sup>[26]</sup>。基于全基因组序列, 2 株菌之间及分别与相似性较高的模式菌株之间的 ANI 值和 dDDH 值见表 3, 结果显示 ANI 和 dDDH 值范围分别为 85.2%–92.1%和 31.3%–44.5%, 均低于物种判断的临界值, 从分子水平上确定菌株 H10836 和 H11081 是小双孢菌属的 2 个新种。

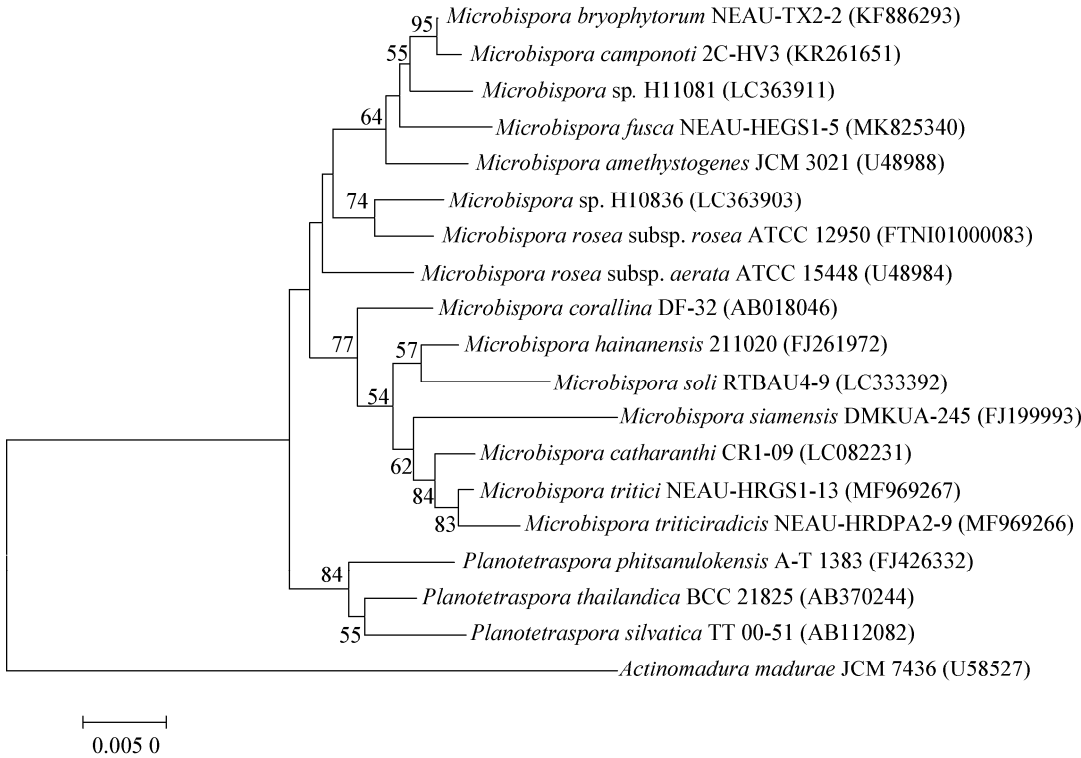


图 2 菌株 H10836 和 H11081 基于 16S rRNA 基因序列构建的 Neighbor-Joining 系统发育树  
Figure 2 Neighbor-Joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of strain H10836 and strain H11081

注：括号中序号：GenBank 登录号；分支点上的数字：Bootstrap 支持率；标尺刻度 0.005 0：序列差异的分支长度  
Note: Numbers in parentheses: GenBank accession No.; Numbers in each branch points: Percentages supported by bootstrap; Bar=0.005 0: Nucleotide divergence

表 2 菌株 H10836 和 H11081 基因组基本特征  
Table 2 General features of the genomes of strains H10836 and H11081

| Attribute                    | H10836 | H11081 |
|------------------------------|--------|--------|
| Genomic size (Mb)            | 8.8    | 7.4    |
| Number of contigs            | 92     | 51     |
| N50 length (Mb)              | 2.9    | 4.7    |
| GC content (%)               | 71.3   | 71.5   |
| Gene number                  | 8 109  | 6 717  |
| rRNA                         | 6      | 6      |
| tRNA                         | 77     | 74     |
| Genes assigned to CDD        | 6 115  | 5 136  |
| Genes assigned to NR         | 7 823  | 6 494  |
| Genes assigned to Swissporot | 5 248  | 4 458  |
| Genes assigned to GO         | 5 231  | 4 398  |
| Genes assigned to COG        | 5 206  | 4 416  |
| Genes assigned to KEGG       | 3 119  | 2 663  |

## 2.3 菌株 H10836 和 H11081 的基因组注释

### 2.3.1 COG 功能注释

Clusters of Orthologous Genes (COG)数据库是微生物基因组注释和比较基因组中常用的工具<sup>[19]</sup>。将基因蛋白序列与 COG 数据库进行比对注释，菌株 H10836 和 H11081 分别有 5 206 个和 4 416 个基因被注释到 21 组 COG 的功能中，其中分别有 4 838 个和 4 105 个蛋白与已知蛋白或已知的假设蛋白同源，功能未知的蛋白分别有 368 个和 311 个，用于通用功能预测的蛋白数量最多，分别有 745 个和 649 个。其次是负责转录和碳水化合物转运与代谢。COG 功能分类见表 4。

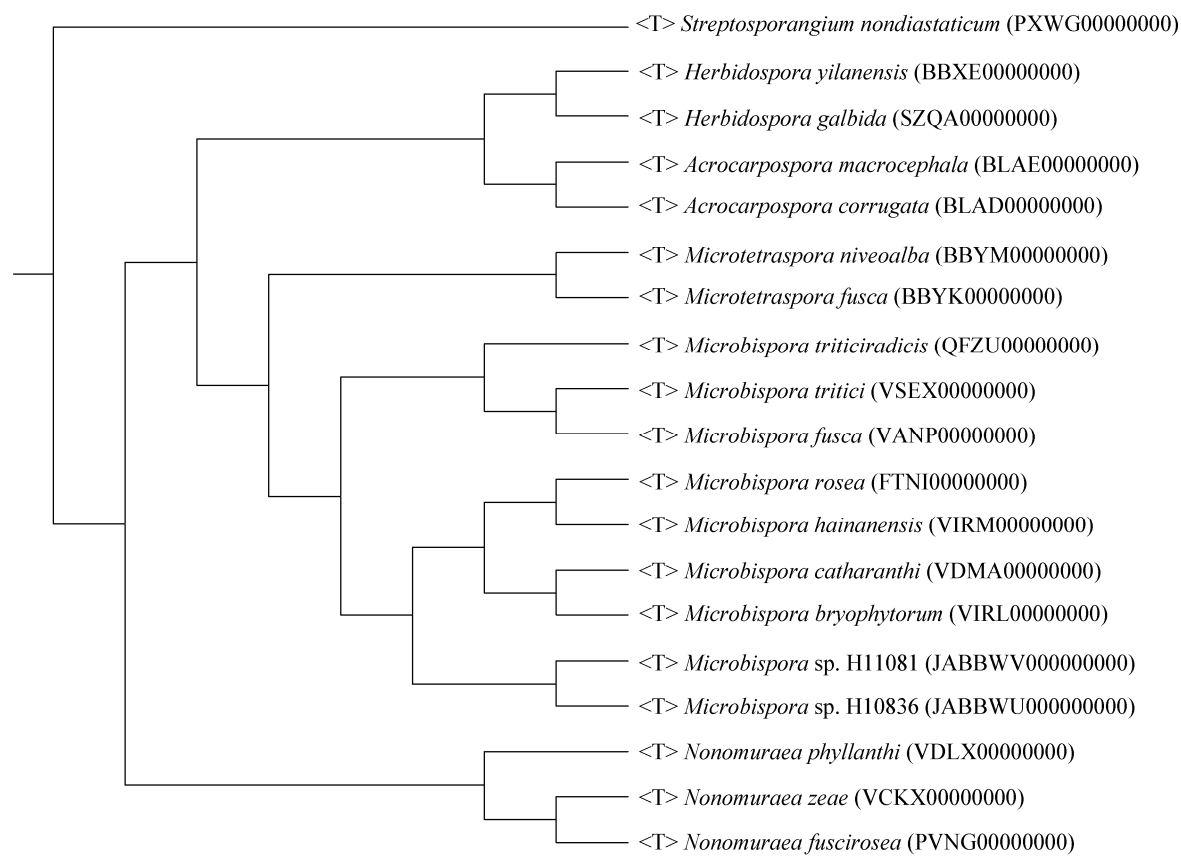


图 3 菌株 H10836、H11081 与 *Streptosporangiaceae* 模式菌株基于全基因组序列构建的系统发育树  
Figure 3 Whole-genome-based phylogenetic tree showing the phylogenetic relationship of strains H10836, H11081 and reference species in the family *Streptosporangiaceae*

注：括号中序号：全基因组序列 GenBank 登录号；<T>：菌株；参数：K-value=6  
Note: Numbers in parentheses: Whole genome sequence GenBank accession No.; <T>: Strain; Parameter: K-value=6

表 3 菌株 H10836、H11081 与相近菌株的 ANI 和 dDDH 值计算结果  
Table 3 ANI and dDDH scores between strains H10836/H11081 and closely related *Microbispora* species

| Related <i>Microbispora</i> species           | H10836   |          |          | H11081   |          |          |
|---|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|   | ANIb (%) | ANIm (%) | dDDH (%) | ANIb (%) | ANIm (%) | dDDH (%) |
| <i>Microbispora bryophytorum</i>              | 89.2     | 91.3     | 41.2     | 88.3     | 90.2     | 37.4     |
| <i>Microbispora rosea</i> subsp. <i>rosea</i> | 89.6     | 91.5     | 41.8     | 88.7     | 90.4     | 38.3     |
| <i>Microbispora tritici</i>                   | 85.3     | 88.9     | 33.0     | 85.3     | 88.3     | 31.3     |
| <i>Microbispora triticiradicis</i>            | 85.4     | 88.9     | 33.1     | 85.2     | 88.3     | 31.4     |
| <i>Microbispora hainanensis</i>               | 89.0     | 91.0     | 40.0     | 88.4     | 90.0     | 36.9     |
| <i>Microbispora catharanthi</i>               | 90.3     | 92.0     | 43.8     | 88.9     | 90.6     | 38.6     |
| <i>Microbispora fusca</i>                     | 85.4     | 88.9     | 33.0     | 85.3     | 88.2     | 31.3     |
| H10836  | *        | *        | *        | 90.9     | 92.1     | 44.5     |
| H11081  | 90.9     | 92.1     | 44.5     | *        | *        | *        |

注：ANIb：基于服务器 BLAST server (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/>)计算的 ANI 值；ANIm：基于服务器 MUMmer server (<http://mummer.sourceforge.net/>)计算的 ANI 值；\*：同一菌株不进行数值计算  
Note: ANIb: ANI scores based on BLAST server (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/>); ANIm: ANI scores based on MUMmer server (<http://mummer.sourceforge.net/>); \*: No numerical computation for the same strain

表 4 菌株 H10836 和 H11081 基因组的 COG 功能分类表  
Table 4 COG functional categories in genomes of strain H10836 and H11081

| COG classification (COG code)                                     | Number of genes |        |
|---|-----------------|--------|
|   | H10836          | H11081 |
| RNA processing and modification (A)                               | 1               | 1      |
| Energy production and conversion (C)                              | 352             | 316    |
| Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning (D)    | 37              | 34     |
| Amino acid transport and metabolism (E)                           | 387             | 361    |
| Nucleotide transport and metabolism (F)                           | 87              | 87     |
| Carbohydrate transport and metabolism (G)                         | 510             | 392    |
| Coenzyme transport and metabolism (H)                             | 197             | 177    |
| Lipid transport and metabolism (I)                                | 202             | 159    |
| Translation, ribosomal structure and biogenesis (J)               | 188             | 181    |
| Transcription (K)   | 724             | 590    |
| Replication, recombination and repair (L)                         | 233             | 181    |
| Cell wall/membrane/envelope biogenesis (M)                        | 206             | 184    |
| Cell motility (N)   | 1               | 1      |
| Posttranslational modification, protein turnover, chaperones (O)  | 121             | 115    |
| Inorganic ion transport and metabolism (P)                        | 221             | 199    |
| Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism (Q)  | 162             | 133    |
| General function prediction only (R)                              | 745             | 649    |
| Function unknown (S)  | 368             | 311    |
| Signal transduction mechanisms (T)                                | 269             | 210    |
| Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport (U) | 32              | 28     |
| Defense mechanisms (V)  | 163             | 107    |

2.3.2 KEGG 功能注释

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)是在分子水平上对基因、基因组、以及代谢进行标注的数据库<sup>[20]</sup>。经 KEGG 数据库注释,菌株 H10836 和 H11081 分别有 3 119 个和 2 663 个编码基因得到注释。从图 4 可以看出,2 株菌参与新陈代谢途径最多,其余则分布在环境信息处理、基因信息处理、细胞过程和生物体系统中。

2.3.3 次级代谢基因簇预测

antiSMASH 是一种常用的生物信息学分析工具,主要用于挖掘微生物次级代谢产物合成基因簇,其可以分析基因簇的类型,预测表达产物的结构<sup>[21]</sup>。利用 antiSMASH 预测菌株 H10836 和 H11081 的次级代谢基因簇,从表 5、表 6 分析发现菌株 H10836 和 H11081 基因组中有多种活性物质的基因簇,包括聚酮类(Polyketides, PKs)、非核糖体多肽

类(Non-Ribosomal Peptides, NRPs)、羊毛硫肽类(Lanthipeptides)、铁载体(Siderophore)、萜烯(Terpene)等,而且部分基因簇与已知抗生素合成基因簇相似度低于 85%。已有的研究表明,85%的序列相似度可作为次级代谢产物预测的起始点<sup>[27-28]</sup>。当序列与已知序列的相似度≥85%时,由该基因编码产生的化合物有可能是已知化合物;相反地,可认为其是独特的序列。因此,值得挖掘菌株 H10836 和 H11081 的新颖活性天然产物。

2.4 分离菌株的抗菌活性初步研究

对 2 株分离菌株进行抗菌活性检测(图 5,表 7)。菌株 H10836 的代谢产物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、藤黄微球菌、绿脓杆菌和肺炎克雷伯菌无抗菌活性,对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 MRSA 有抑菌活性,抑菌圈直径为 1.5 cm,但抑菌圈不够清晰,



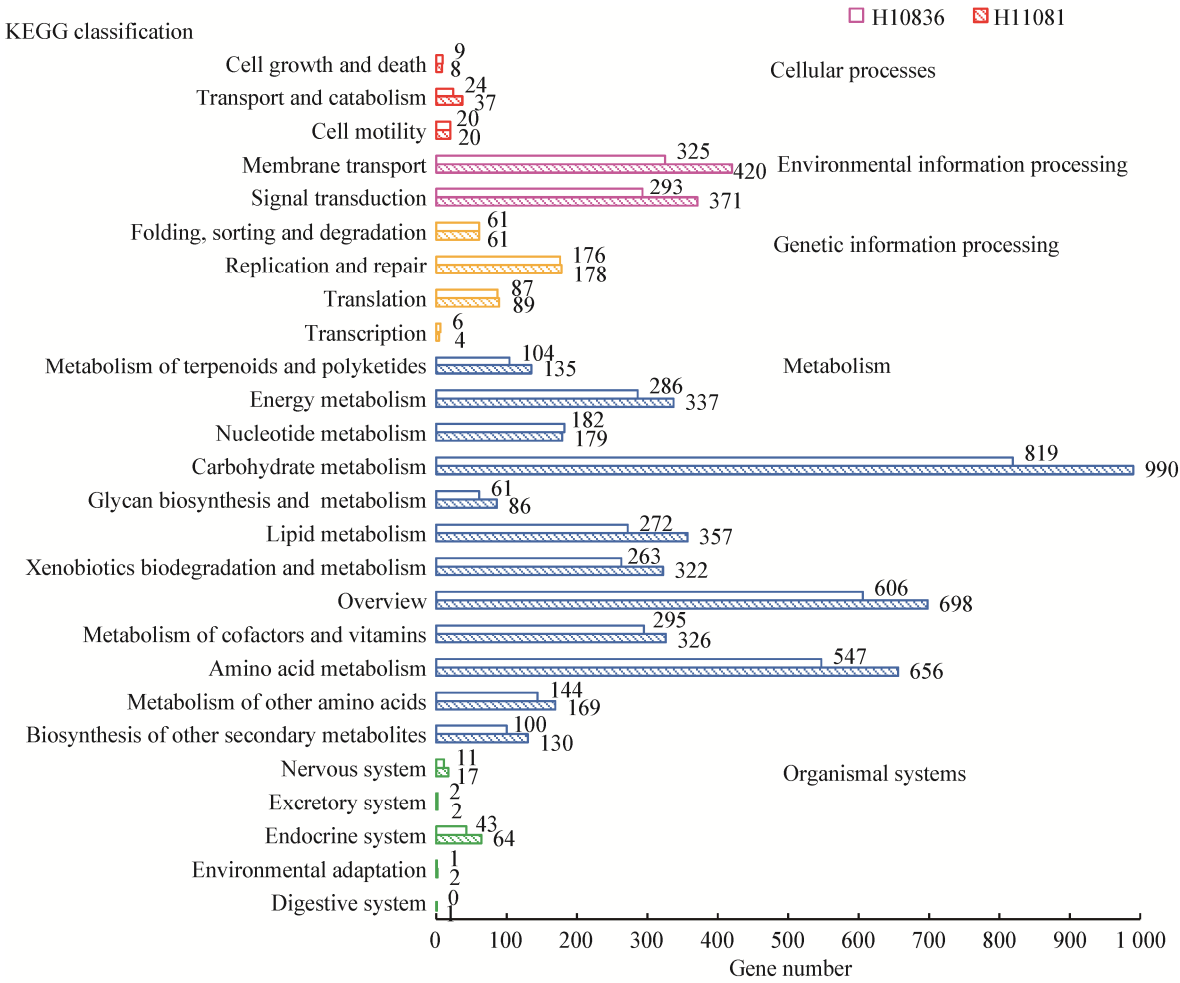


图 4 菌株 H10836 和 H11081 的 KEGG 功能分类图  
Figure 4 KEGG functional classification map of strains H10836 and H11081

表 5 菌株 H10836 基因簇预测结果  
Table 5 Prediction results of gene clusters of strain H10836

| Cluster    | Type          | Most similar known cluster | Similarity (%) |
|------------|---------------|----------------------------|----------------|
| Cluster 1  | Lanthipeptide | Actinokineosin             | 63             |
| Cluster 2  | NRPs+PKs      | Lidamycind                 | 55             |
| Cluster 3  | NRPs-like     | Indigoidine                | 13             |
| Cluster 4  | Terpene       | Hopene                     | 38             |
| Cluster 5  | Terpene       | Isorenieratene             | 28             |
| Cluster 6  | Siderophore   | Desferrioxamine            | 83             |
| Cluster 7  | Lanthipeptide | Mathermycin                | 57             |
| Cluster 8  | Siderophore   | Desferrioxamine            | 83             |
| Cluster 9  | PKs           | Alkylresorcinol            | 100            |
| Cluster 10 | Terpene       | Frankiamicin               | 14             |
| Cluster 11 | Terpene       | Geosmin                    | 100            |

表 6 菌株 H11081 基因簇预测结果  
Table 6 Prediction results of gene clusters of strain H11081

| Cluster    | Type          | Most similar known cluster | Similarity (%) |
|------------|---------------|----------------------------|----------------|
| Cluster 1  | NRPs+PKs      | C-1027                     | 55             |
| Cluster 2  | PKs           | Abyssomicin                | 71             |
| Cluster 3  | PKs           | Alkylresorcinol            | 100            |
| Cluster 4  | NRPs          | Acarviostatin              | 22             |
| Cluster 5  | Terpene       | Hopene                     | 38             |
| Cluster 6  | Terpene       | Geosmin                    | 100            |
| Cluster 7  | Lanthipeptide | Labyrinthopeptin           | 40             |
| Cluster 8  | Siderophore   | Desferrioxamine            | 83             |
| Cluster 9  | Terpene       | Isorenieratene             | 28             |
| Cluster 10 | NRPs-like     | Indigoidine                | 13             |

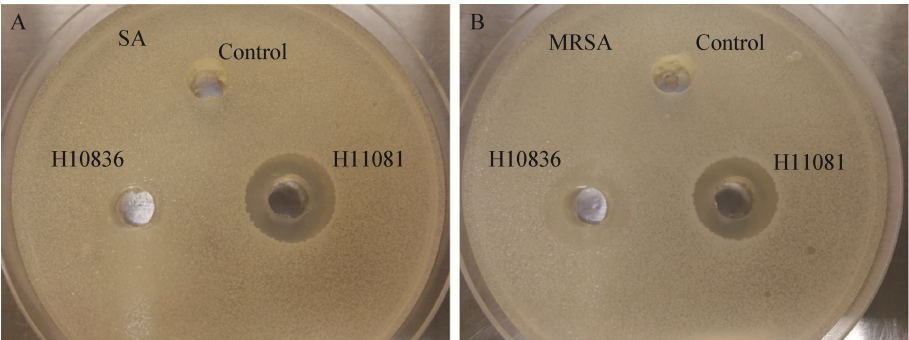


图 5 菌株 H10836 和 H11081 对金黄色葡萄球菌(SA)和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的抗菌活性图  
Figure 5 Antibacterial activity of strains H10836 and H11081 against *Staphylococcus aureus* (SA) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

表明菌株 H10836 代谢产物抑菌活性较弱,可能与本研究发酵处理条件下代谢产物积累量不够有关。菌株 H11081 代谢产物对大肠杆菌、藤黄微球菌、绿脓杆菌和肺炎克雷伯菌无抗菌活性,对金黄色葡萄球菌和 MRSA 均有抗菌活性,抑菌圈清晰且直径均为 1.6 cm,表明菌株 H11081 的代谢产物具有明显杀菌活性。可见,2 株分离菌株都具有产生物活性物质的能力。

3 讨论与结论

新菌种的判断标准是 DDH 值低于 70%<sup>[25]</sup>或者 ANI 值低于 95%–96%<sup>[26]</sup>。在基因组比较分析中,用基于全基因组序列的 ANI 分析进行菌种鉴定和同源性研究结果准确且有效。与传统的 DNA-DNA

杂交试验相比,95% ANI 值与 70% DDH 水平结果类似<sup>[29]</sup>。因此,本研究以 ANI 值和数字化 DDH 值(dDDH)值为物种分类的基本判断依据,结合 16S rRNA 基因序列系统发育树、全基因组序列系统发育树等多层面分子水平分析,确定菌株 H10836 和 H11081 是小双孢菌属的 2 个新种。但新物种的描述需要包括表型(形态、生理生化和化学组分)和基因型的多相分类鉴定<sup>[30]</sup>,因此,后期将补充 2 株菌的表型特征、在国际菌种保藏机构的保藏工作等完善新菌种的描述。

由于新的物种很有可能会产生新的生物活性物质,特别是那些常规方法难以分离到的稀有放线菌。经 antiSMASH 分析发现 2 株小双孢菌新种 H10836 和 H11081 基因组中有多种次级代谢产物合成基因簇,包括聚酮(PKS)、非核糖体肽(NRPs)、羊毛硫肽类(Lanthipeptides)、铁载体(Siderophores)、萜烯(Terpenes)等。其中,聚酮类化合物和非核糖体多肽是具有抗菌、抗肿瘤、抗寄生虫等多种生物活性的次级代谢产物,而羊毛硫肽抗生素属于核糖体合成产物,由于羊毛硫肽的结构多样性、作用机制独特、能有效对抗耐药菌且不易产生耐药性,逐渐成为人们研究的热点,在减缓耐药菌引起的严重人类传染病方面具有应用前景。2 株菌的部分基因簇与已知抗生素合成基因簇相似度低于独特序列(可能产生新化合物)的判断临界值 85%。如菌株 H10836

表 7 抗菌活性测定

| Pathogens                     | Antibacterial diameter (cm) |        |
|-------------------------------|-----------------------------|--------|
|                               | H10836                      | H11081 |
| <i>Escherichia coli</i>       | –                           | –      |
| <i>Staphylococcus aureus</i>  | –                           | 1.6    |
| MRSA                          | 1.5                         | 1.6    |
| <i>Micrococcus luteus</i>     | –                           | –      |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | –                           | –      |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>  | –                           | –      |

注: –: 无抑菌圈  
Note: –: No bacteriostatic zone

的 Cluster 1 基因簇与 Lanthipeptide 类型的 Actinokineosin 相似度为 63%，Cluster 2 与 NRPs、PKs 杂合型的 Lidamycind 相似度为 55%，Cluster 7 与 Lanthipeptide 类型的 Mathermycin 相似度为 57%。菌株 H11081 的 Cluster 1 基因簇与 NRPs、PKs 杂合型的 C-1027 相似度为 55%，Cluster 2 与 PKs 类型的 Abyssomicin 相似度为 71%，Cluster 7 与 Lanthipeptide 类型的 Labyrinthopeptin 相似度为 40%。在这些匹配度较低的已知抗生素中，Actinokineosin 是 2016 年报道的新型抗菌肽，具有抗藤黄微球菌活性<sup>[31]</sup>；力达霉素 Lidamycind (原名为 C-1027) 是属于烯二炔类抗肿瘤抗生素<sup>[32]</sup>，是近年来发现的抗肿瘤活性较强的化合物之一；Mathermycin 是 2017 年报道的羊毛硫肽抗生素，对芽孢杆菌有抑制活性<sup>[33]</sup>；Abyssomicins 是多环聚酮类抗生素，有良好的抑制耐药金黄色葡萄球菌和耐万古霉素金葡菌的活性<sup>[34]</sup>；Labyrinthopeptin 除了具有良好的抗疼痛活性以外，还有明显的抗 HIV 活性<sup>[35]</sup>。因此，本研究基于全基因组测序技术与生物信息学分析，可以推测菌株 H10836 和 H11081 具有产新颖活性天然产物的潜力。同时，抗菌活性检测实验也表明 2 株新种代谢产物具有一定程度的抗菌活性能力，尤其能抑制或杀灭具有多种耐药性和严重影响人类健康的致病菌 MRSA。新的物种很有可能会产生新的生物活性物质，2 株小双孢菌新种的生物活性物质是否新颖值得后续深入研究，本实验结果将为菌株的进一步研究和应用奠定基础。

随着微生物基因组学研究的深入，研究者逐渐发现微生物产生次级代谢产物的能力被大大低估，因为在常规的培养条件下大部分基因簇是沉默的，并不参与转录表达，需要通过有效的技术手段诱导表达<sup>[36]</sup>。除了考虑采用基于基因组信息的基因调控方法，建议后期着重采用逆境胁迫法，包括金属胁迫和微生物共培养技术激活菌株 H10836 和 H11081 的沉默基因簇，深度挖掘其次级代谢产物，以发现新颖的活性物质。

## REFERENCES

- [1] Nonomura H, Ohara Y. Distribution of actinomycetes in soil. II. *Microbispora*, a new genus of *Streptomycetaceae*[J]. Journal of Fermentation Technology, 1957, 35: 307-311
- [2] Nakajima Y, Kitpreechavanich V, Suzuki K, Kudo T. *Microbispora corallina* sp. nov., a new species of the genus *Microbispora* isolated from Thai soil[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1999, 49(Pt4): 1761-1767
- [3] Hoang KC, Tseng M, Shu WJ. Degradation of polyethylene succinate (PES) by a new thermophilic *Microbispora* strain[J]. Biodegradation, 2007, 18(3): 333-342
- [4] Kim TU, Cho SH, Han JH, Shin YM, Lee HB, Kim SB. Diversity and physiological properties of root endophytic actinobacteria in native herbaceous plants of Korea[J]. The Journal of Microbiology, 2012, 50(1): 50-57
- [5] Mingma R, Pathom-Aree W, Trakulnaleamsai S, Thamchaipenet A, Duangmal K. Isolation of rhizospheric and roots endophytic actinomycetes from Leguminosae plant and their activities to inhibit soybean pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. *glycine*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014, 30(1): 271-280
- [6] Pisano MA, Sommer MJ, Lopez MM. Application of pretreatments for the isolation of bioactive actinomycetes from marine sediments[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1986, 25(3): 285-288
- [7] Hayakawa M, Nonomura H. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes[J]. Journal of Fermentation Technology, 1987, 65(5): 501-509
- [8] Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1966, 16(3): 313-340
- [9] Karita S, Nakayama K, Goto M, Sakka K, Kim WJ, Ogawa S. A novel cellulolytic, anaerobic, and thermophilic bacterium, *Moorella* sp. strain F21[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2003, 67(1): 183-185
- [10] Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, Chun J. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2017, 67(5): 1613-1617
- [11] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1870-1874
- [12] Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing[J]. Journal of Computational Biology, 2012, 19(5): 455-477
- [13] Boetzer M, Pirovano W. Toward almost closed genomes

- with GapFiller[J]. *Genome Biology*, 2012, 13(6): R56
- [14] Massouras A, Hens K, Gubelmann C, Uplekar S, Decouttere F, Rougemont J, Cole ST, Deplancke B. Primer-initiated sequence synthesis to detect and assemble structural variants[J]. *Nature Methods*, 2010, 7(7): 485-486
- [15] Marchler-Bauer A, Derbyshire MK, Gonzales NR, Lu SN, Chitsaz F, Geer LY, Geer RC, He J, Gwadz M, Hurwitz DI, et al. CDD: NCBI's conserved domain database[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43: D222-D226
- [16] Pruitt KD, Tatusova T, Maglott DR. NCBI Reference Sequence (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33: D501-D504
- [17] Boeckmann B, Bairoch A, Apweiler R, Blatter MC, Estreicher A, Gasteiger E, Martin MJ, Michoud K, O'Donovan C, Phan I, et al. The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003[J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(1): 365-370
- [18] Consortium GO. The Gene Ontology (GO) database and informatics resource[J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32: D258-D261
- [19] Tatusov RL, Galperin MY, Natale DA, Koonin EV. The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution[J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(1): 33-36
- [20] Kanehisa M, Furumichi M, Tanabe M, Sato Y, Morishima K. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(D1): D353-D361
- [21] Medema MH, Blin K, Cimermancic P, De Jager V, Zakrzewski P, Fischbach MA, Weber T, Takano E, Breitling R. antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39: W339-W346
- [22] Auch AF, Von Jan M, Klenk HP, Göker M. Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison[J]. *Standards in Genomic Sciences*, 2010, 2(1): 117-134
- [23] Zuo GH, Hao BL. CVTree3 web server for whole-genome-based and alignment-free prokaryotic phylogeny and taxonomy[J]. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 2015, 13(5): 321-331
- [24] Kim M, Oh HS, Park SC, Chun J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64: 346-351
- [25] Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O, Krichevsky MI, Moore LH, Moore WEC, Murray RGE, Stackebrandt E, et al. Report of the AD hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1987, 37(4): 463-464
- [26] Richter M, Rosselló-Móra R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(45): 19126-19131
- [27] Gontang EA, Gaudêncio SP, Fenical W, Jensen PR. Sequence-based analysis of secondary-metabolite biosynthesis in marine actinobacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(8): 2487-2499
- [28] Reddy BVB, Kallifidas D, Kim JH, Charlop-Powers Z, Feng ZY, Brady SF. Natural product biosynthetic gene diversity in geographically distinct soil microbiomes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(10): 3744-3752
- [29] Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P, Tiedje JM. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(1): 81-91
- [30] Tindall BJ, Rosselló-Móra R, Busse H, Ludwig W, Kämpfer P. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(1): 249-266
- [31] Takasaka N, Kaweewan I, Ohnishi-Kameyama M, Kodani S. Isolation of a new antibacterial peptide actinokineosin from *Actinokineospora spheciospongiae* based on genome mining[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2017, 64(2): 150-157
- [32] Li M, Liu W, Li Y. Cloning, expression and characterization of gene *sgcD* involved in the biosynthesis of novel antitumor lidamycin[J]. *Science in China Series C: Life Sciences*, 2003, 46(3): 310-319 (in Chinese)  
李敏, 刘文, 李元. 新型抗肿瘤力达霉素合成酶基因 *sgcD* 的克隆、表达和性质研究[J]. *中国科学 C 辑*, 2003, 33(1): 47-55
- [33] Chen EQ, Chen Q, Chen SM, Xu B, Ju JH, Wang H. Mathermycin, a lantibiotic from the marine actinomycete *Marinactinospora thermotolerans* SCSIO 00652[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(15): e00926-17
- [34] Ye H, Gu JF. Advance in the research of abyssomicin C, a polycyclic antibiotic[J]. *Chinese Journal of New Drugs*, 2011, 20(23): 2335-2339 (in Chinese)  
叶卉, 顾觉奋. 多环聚酮类抗生素 Abyssomicin C 的研究进展[J]. *中国新药杂志*, 2011, 20(23): 2335-2339
- [35] Férir G, Petrova MI, Andrei G, Snoeck R, Brønstrup M, Süßmuth RD, Schols D. Dual anti-HSV and anti-HIV activity of the lantibiotic labyrinthopeptin A1[J]. *BMC Infectious Diseases*, 2014, 14(Suppl 2): 79
- [36] Chiang YM, Chang SL, Oakley BR, Wang CC. Recent advances in awakening silent biosynthetic gene clusters and linking orphan clusters to natural products in microorganisms[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2011, 15(1): 137-143