

## 研究报告

## 西沙石珊瑚共附生放线菌的分离培养及抗菌活性评价

李依霖<sup>1,2,3</sup>, 熊子君<sup>3</sup>, 张世清<sup>3</sup>, 王蓉<sup>\*1,2</sup>, 郭志凯<sup>\*3</sup>

1 海南热带海洋学院生态环境学院, 海南 三亚 572000

2 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

3 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

李依霖, 熊子君, 张世清, 王蓉, 郭志凯. 西沙石珊瑚共附生放线菌的分离培养及抗菌活性评价[J]. 微生物学通报, 2023, 50(5): 1756-1771.

LI Yilin, XIONG Zijun, ZHANG Shiqing, WANG Rong, GUO Zhikai. Isolation and antibacterial activity of Xisha stone coral-associated actinomycetes[J]. Microbiology China, 2023, 50(5): 1756-1771.

**摘要:**【背景】珊瑚礁生态系统是海洋中一类极其重要的生态系统, 健康珊瑚礁中丰富的共附生放线菌群体是珊瑚抵御各种致病菌的重要防线, 因此, 这类放线菌是寻找抗菌活性分子的重要资源, 其药用潜力巨大。【目的】从西沙石珊瑚样品中分离共附生放线菌, 并从中筛选具有良好抗菌活性的菌株。【方法】通过稀释涂布法分离珊瑚共附生放线菌, 并根据 16S rRNA 基因序列构建系统发育树进行菌种鉴定; 通过平板对峙法对放线菌进行抗菌活性筛选并确定目标菌株; 将目标菌株涂布于不同氯化钠浓度的 ISP2 固体培养基上培养, 测试其盐度耐受能力; 通过平板对峙法对该菌株发酵产物的热稳定性和光稳定性进行测试; 采用 NanoPore 和 Illumina 方法完成目标活性放线菌全基因组测序, 并通过 antiSMASH 在线分析预测其次级代谢产物生物合成基因簇及其结构类型。

【结果】从 6 份西沙石珊瑚样品中分离得到 104 株可培养放线菌, 根据菌落形态和分离来源去重后对其中 27 株放线菌进行 16S rRNA 基因序列测序, 通过序列比对和系统发育树分析将菌株初步鉴定为盐孢菌属(*Salinispora*) (25 株)、链霉菌属(*Streptomyces*) (1 株)和戈登菌属(*Gordonia*) (1 株)。活性筛选结果表明, 盐孢菌株 SH098 抑菌活性最好, 该菌株在无盐的培养基中不生长, 盐耐受范围为 2%–5%, 其发酵产物的抗菌活性具有良好的热稳定性和光稳定性。全基因组序列分析显示,

资助项目: 海南省基础与应用基础研究计划(自然科学领域)高层次人才项目(2019RC352); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(1630052022016, 1630052019011); 南峰专项(NFZX2021); 海南省普通高等学校研究生创新科研课题(Qhys2021-395)

This work was supported by the Hainan Provincial Basic and Applied Basic Research Fund for High-level Talents in Natural Science (2019RC352), the Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund for CATAS-ITBB (1630052022016, 1630052019011), the Financial Fund of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs (NFZX2021), and the Innovative Research Project of Graduate Students in Hainan Province (Qhys2021-395).

\*Corresponding authors. E-mail: WANG Rong, wangrong1982@gmail.com; GUO Zhikai, guozhikai@itbb.org.cn

Received: 2022-08-02; Accepted: 2022-09-21; Published online: 2022-11-11

盐孢菌株 SH098 基因组中 21.93% 的基因序列与次级代谢产物合成相关, 预测的次级代谢产物结构类型多样, 有待深入发掘。【结论】首次从我国西沙石珊瑚中分离得到具有嗜盐特性和抗农业病原细菌活性的盐孢菌, 丰富了我国西沙海域来源的专性海洋放线菌资源, 为海水养殖业的新型微生物制剂的研发提供新菌种资源, 也为后期挖掘新型抗菌活性物质奠定了研究基础。

关键词: 石珊瑚; 共附生放线菌; 分离培养; 沙栖盐孢菌; 抗菌活性

## Isolation and antibacterial activity of Xisha stone coral-associated actinomycetes

LI Yilin<sup>1,2,3</sup>, XIONG Zijun<sup>3</sup>, ZHANG Shiqing<sup>3</sup>, WANG Rong<sup>\*1,2</sup>, GUO Zhikai<sup>\*3</sup>

1 School of Ecology and Environment, Hainan Tropical Ocean University, Sanya 572000, Hainan, China

2 Hainan Provincial Key Laboratory of Tropical Maricultural Technologies, Hainan Academy of Ocean and Fisheries Sciences, Haikou 571126, Hainan, China

3 Hainan Key Laboratory of Tropical Microbe Resources, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/Key Laboratory for Biology and Genetic Resources of Tropical Crops of Hainan Province, Hainan Institute for Tropical Agricultural Resources, Haikou 571101, Hainan, China

**Abstract:** [Background] Coral reef ecosystem is extremely important in the marine ecosystem, in which the actinomycetes are the important line of defense against various pathogens. Therefore, coral-associated actinomycetes are important resources for molecules with antibacterial activity, indicating tremendous medicinal potential. [Objective] To isolate the culturable actinomycetes from samples of Xisha stone corals and screen out the strains with good antibacterial activity. [Methods] Coral-associated actinomycetes were isolated by dilution separation method and identified by phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequence. The antibacterial activity test was conducted by the plate confrontation method, and the target strain was identified. The salinity tolerance test was carried out by plating the strain on ISP2 solid medium with different concentrations of NaCl, and the thermostability and photostability of the fermentation products were tested by the plate confrontation method. The genome of the target active actinomycete was sequenced by Nanopore and Illumina sequencing, and the types of biosynthetic gene clusters of secondary metabolites were analyzed online by antiSMASH. [Results] A total of 104 culturable actinomycetes were isolated from 6 samples of Xisha stone corals, and 27 actinomycetes were obtained after removing duplicates according to colony morphology and sample source. The 16S rRNA gene sequencing of the 27 strains was performed, and they were identified as *Salinispora* (25 strains), *Streptomyces* (1 strain), and *Gordonia* (1 strain) according to sequence alignment and phylogenetic tree analysis. The results of activity screening showed that *Salinispora* sp. SH098 had the optimal antibacterial activity during the antibacterial activity test. *Salinispora* sp. SH098 did not grow in the salt-free medium and its salt-tolerant range was 2%–5%. Its fermentation products showed good thermostability and photostability. The whole genome sequence analysis showed that 21.93% of the gene

sequences of strain SH098 were related to the biosynthesis of secondary metabolites. The structure types of predicted metabolites were diverse, which needed to be further explored. **[Conclusion]** This is the first report on *Salinispora* spp. with anti-agricultural pathogenic bacteria activity from Xisha stone corals in China, which enriches the obligate marine actinomycetes resources from the Xisha islands of China. It provides new resources for the development of new microecological agents applied to mariculture and also lays a foundation for mining antibacterial active substances.

**Keywords:** stone coral; associated actinomycetes; isolation culture; *Salinispora arenicola*; antibacterial activity

放线菌是一种菌落呈放射状的革兰氏阳性菌,在自然界中分布广泛,自1942年Waksman从链霉菌中发现链霉素并于1952年获得诺贝尔奖以来<sup>[1]</sup>,其便成为研究热点。放线菌可产生具有抗细菌、抗真菌、抗病毒等生物活性的天然产物<sup>[2]</sup>,这些天然药物及其衍生物约占临床药物的50%<sup>[3]</sup>,在微生物学及生物化学等领域都起着至关重要的作用<sup>[4]</sup>。

广泛存在于自然界中的病原细菌不仅影响人的身体健康<sup>[5]</sup>,还对动植物造成威胁。例如:溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)对珊瑚和贝类等水产养殖业均造成极大的威胁<sup>[6]</sup>;无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)会感染多种鱼类,造成高额的经济损失<sup>[7]</sup>。为了防治这些病害,抗菌药物被过度使用,使某些病原细菌高度耐药并产生多重耐药菌株<sup>[8]</sup>。因此,寻找替抗物质或新的防治方法迫在眉睫。近年来,科研人员为寻找结构新颖且活性良好的天然产物,将研究目标转移到海洋及热泉等特殊生境的放线菌。被誉为水下“热带雨林”的珊瑚礁生态系统是世界上具有较强生产力的生态系统之一,孕育了大量不同的微生物群落<sup>[9]</sup>,这些微生物次级代谢物是目前可用于对抗病原体的抗生素重要来源,因此珊瑚共附生微生物的挖掘已成为当前的热点目标。

本研究将对西沙群岛采集的健康珊瑚进行

共附生放线菌的分离培养,通过基因序列分析并构建系统发育树比对鉴定菌株与已知菌种的亲缘关系,并经活性测试筛选出抗菌活性较强的放线菌,进一步对该拮抗菌株进行初步的全基因组序列分析及次级代谢产物预测,以期为深入发掘活性物质及其作用机制奠定基础,也为珊瑚白化病防治及水产生物疾病防治提供重要资源。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 样 品

石珊瑚样品采自海南省三沙市西沙宣德群岛(永兴岛 W1:东经 112°19'49",北纬 16°50'36";七连屿 W2:东经 112°12'34",北纬 16°59'09";七连屿 W3:东经 112°15'30",北纬 16°58'06")和永乐群岛(蓝洞 W4:东经 111°76'81",北纬 16°52'48")海域,将样品装入无菌密封袋中放于-20℃保存。

#### 1.1.2 供试病原菌菌株

哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、欧文斯氏弧菌(*Vibrio owensii*)、美人鱼发光杆菌(*Photobacterium damsela*)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)、海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)、藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)、茄青枯劳尔氏菌

(*Ralstonia solanacearum*)、水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)和芒果角斑病菌(*Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*), 保存于中国热带农业科学院热带生物技术研究所。

### 1.1.3 培养基

1/2 ATCC 172 培养基参照文献[10]配制, 将其中培养基成分含量增至 5 倍, 用 17.5 g/L 海盐替代陈海水; 高氏一号培养基参照文献[11]配制, 添加 17.5 g/L 海盐; TSB 液体培养基参照文献[11]配制, 添加 17.5 g/L 海盐; ISP2 液体培养基参照文献[12]配制, 用 17.5 g/L 海盐替代陈海水, 添加 20.0 g/L 琼脂粉即为 ISP2 固体培养基; LB 培养基参照文献[11]配制, 氯化钠含量减至 5.0 g/L, 添加 20.0 g/L 琼脂粉即为 LB 固体培养基; LB 海盐液体培养基参照文献[11]配制, 氯化钠含量减至 5.0 g/L, 添加 35.0 g/L 海盐, 添加 20.0 g/L 琼脂粉即为 LB 海盐固体培养基; LM3 液体培养基(g/L): 麦芽浸粉 20.0, 葡萄糖 15.0, 蛋白胨 1.0, 海盐 35.0, pH 7.2±0.2。

### 1.1.4 主要试剂和仪器

分析纯级乙酸乙酯, 广东光华科技股份有限公司; DMSO, 上海麦克林生化科技有限公司。电热鼓风干燥箱, 上海一恒科学仪器有限公司; 生化培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; 立式旋转蒸发仪, 上海爱朗仪器有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 西沙石珊瑚共附生放线菌的分离纯化及鉴定

取 10 g 解冻后的珊瑚样品, 先用无菌盐水(17.5 g/L 海盐)清洗 3 次, 再用 75%酒精表面消毒 30 s, 最后用无菌盐水漂洗 3 次。将样品敲为粉末状后, 置于无菌研钵中加入无菌盐水(约 2 mL)进行研磨, 并用无菌盐水进行梯度稀释( $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$  和  $10^{-3}$ )。分别取 150  $\mu$ L 不同梯度的稀释液均匀涂布于 1/2 ATCC 172 和高氏一号固

体培养基(均含 50  $\mu$ g/mL 重铬酸钾)上, 于 28  $^{\circ}$ C 培养 2 个月, 期间挑取单菌落划线接种于 ISP2 平板上, 并多次划线培养得到纯培养物。

根据分离来源和菌落形态对分离到的纯培养物进行去重后获得 27 株放线菌, 编号依次为 SH001–SH006、SH012、SH014–SH016、SH018、SH022、SH029、SH033、SH041、SH051、SH056、SH057、SH065、SH077、SH080、SH082、SH090、SH092、SH093、SH098 和 SH099。将以上菌株送往北京擎科生物科技有限公司昆明分公司, 使用 TSINGKE 植物 DNA 提取试剂盒(通用型)提取总 DNA, 采用通用引物 27F (5'-AGAGTTT GATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACC TTGTTACGACTT-3')扩增 16S rRNA 基因并进行测序。PCR 反应体系(50  $\mu$ L): 1 $\times$ TSE101 Mix 45  $\mu$ L, 27F 2  $\mu$ L (终浓度 0.5  $\mu$ mol/L), 1492R 2  $\mu$ L (终浓度 0.5  $\mu$ mol/L), DNA 模板 1  $\mu$ L。PCR 反应条件: 98  $^{\circ}$ C 2 min; 98  $^{\circ}$ C 10 s, 56  $^{\circ}$ C 10 s, 72  $^{\circ}$ C 10 s, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 5 min。将获得的序列在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)数据库中做同源序列比对搜索, 然后选择相似度大于 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)构建系统发育树。同时将获得的菌株 16S rRNA 基因序列上传 NCBI 数据库。

### 1.2.2 菌株的抗菌活性筛选

#### 1) 病原菌菌悬液的制备

以哈维氏弧菌、溶藻弧菌、欧文斯氏弧菌、美人鱼发光杆菌、无乳链球菌、海豚链球菌、藤黄微球菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、茄青枯劳尔氏菌、水稻白叶枯病菌和芒果角斑病菌为指示菌。将前 4 个病原菌接种于 LB 海盐液体培养基, 后 7 个病原菌接种于 LB 液体培养基, 28  $^{\circ}$ C、160 r/min 培养 1 d 后调整液体吸光

度至  $OD_{600}$  为 0.50–0.65<sup>[13]</sup>, 制成菌悬液, 备用。

### 2) 活性初筛

通过琼脂块法测定放线菌的抑菌活性: 取 1 mL 指示菌菌悬液与 10 mL 冷却至 55 °C 的 LB 培养基倾注于培养皿中充分混合, 制备含菌平板。待平板凝固后, 制备直径 5 mm 的放线菌菌饼接种在含菌平板(直径 90 mm)上, 28 °C 恒温培养 12 h。采用十字交叉法测量抑菌圈平均大小。

### 3) 活性复筛

根据初筛结果选择出抑菌谱较广且活性较强的菌株进行复筛。

将菌株 SH001 接种于 TSB 液体培养基中, 28 °C、160 r/min 振荡培养 3 d 后接种于 ISP2 液体培养基, 同条件培养 10 d; 菌株 SH098 及菌株 SH099 分别接种于 TSB 液体培养基中同条件培养 10 d。用等体积的乙酸乙酯萃取, 减压浓缩后得到菌株发酵提取物。用 DMSO 将其配制为 20 mg/mL 的待测溶液。通过打孔法测定放线菌的抑菌活性: 同 1.2.2 (2) 方法制备含菌平板, 凝固后打孔(直径 5 mm), 每孔滴加 20  $\mu$ L 的待测溶液、阳性对照卡那霉素(10 mg/mL)以及阴性对照 DMSO, 每组处理 3 个重复, 28 °C 恒温培养 12 h, 测量抑菌圈的平均大小, 选出抑菌谱最广且活性最强的菌株。

### 1.2.3 拮抗菌株发酵提取物的热稳定性、光稳定性研究

将菌株 SH098 接种于 TSB 液体培养基中, 于 28 °C、160 r/min 振荡培养 5 d 制成种子液, 按 10% 接种量接种于 LM3 液体培养基中, 于相同条件下振荡培养 10 d, 用等体积的乙酸乙酯萃取, 减压浓缩后得到菌株发酵提取物。

将发酵提取物及阳性对照卡那霉素均配制成 10 mg/mL 溶液(溶剂为 DMSO), 均分为 4 组。分别放置于 28、40、50、60 °C 的水浴锅中 1 h,

处理完后于 4 °C 保存。以哈维氏弧菌为指示菌, 采用打孔法进行活性检测。

将发酵提取物及阳性对照卡那霉素均配制成 10 mg/mL 溶液(溶剂为 DMSO), 均分为 7 组。将它们分别放置于紫外灯下照射 0、1、3、5、10、24、48 h, 处理完后于 4 °C 保存。直至 7 组均处理结束后, 以无乳链球菌为指示菌, 采用打孔法进行活性检测。

### 1.2.4 菌株的耐盐性测定

将 NaCl 加入 ISP2 固体培养基中分别配制浓度为 0、2%、3%、5%、7.5%、10% 和 12%。将菌株 SH098 接种于 TSB 液体培养基中, 于 28 °C、160 r/min 振荡培养 5 d, 涂布于不同盐度的 ISP2 平板上, 分别于 7、14、21 和 30 d 观察菌株生长情况。

### 1.2.5 活性菌株 *Salinispora* sp. SH098 的全基因组测序与初步分析

基于 NanoPore 和 Illumina 测序技术平台对目标海洋放线菌菌株 *Salinispora* sp. SH098 的全基因组进行测序, 使用 Flye<sup>[14]</sup> 软件将 NanoPore 测序数据组装成高质量的细菌基因组骨架(contig), 接着使用 Pilon<sup>[15]</sup> 软件对 Flye 组装结果运用 Illumina 二代数据纠错, 得到高质量的基因组完成图。后续通过基因预测、功能元件分析、基因组功能注释[包括 COG (cluster of orthologous groups of proteins) 和 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 数据库]以及专有数据库注释了解该菌株基因组的基本特征。

## 2 结果与分析

### 2.1 西沙石珊瑚共附生放线菌的分离纯化

从中国西沙永乐群岛和宣德群岛的 4 个海域位点(永兴岛 W1、七连屿 W2 和 W3、蓝洞 W4)采集的 6 份石珊瑚样品中共分离得到 104 株

放线菌。其中, 1/2 ATCC 172 和高氏一号培养基平板上分别获得 102 株和 2 株; 在 4 个位点采集的石珊瑚样品中, 从 W2 中分离得到的菌株最多, 共 62 株; 其次是从 W1 分离得到 40 株; 从 W3 和 W4 分离的菌株数最少, 均仅有 1 株(图 1)。由此可见, 七连屿与永兴岛的石珊瑚放线菌丰富度相对较高。

## 2.2 菌株系统发育树构建与菌种鉴定

结合菌株的培养形态特征去重后, 选择了 27 株放线菌进行 16S rRNA 基因测序鉴定。将获得的序列在 NCBI GenBank 数据库中进行比对发现, 菌株 SH001 (GenBank 登录号 OP028081) 与 *Streptomyces spongiicola* HNM0071 相似度是 99.93%; 菌株 SH003 (GenBank 登录号 OP028083) 与 *Gordonia terrae* IFM0412 相似度是 100%; 其他菌株均与沙栖盐孢菌(*Salinispora arenicola*)相似性高, 菌株 SH002 (GenBank 登录号 OP028082)、SH022 (GenBank 登录号 OP028092)、SH033 (GenBank 登录号 OP028094)及 SH080 (GenBank 登录号 OP028101)与 *S. arenicola* G654 相似度均为 100%。菌株 SH098 (GenBank 登录号 OP028106)

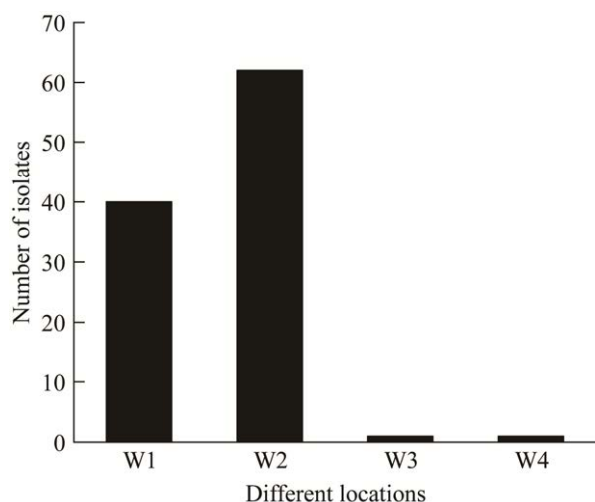


图 1 不同地点分离得到石珊瑚共生放线菌的菌株数

Figure 1 The numbers of strains from different sites.

和 SH099 (GenBank 登录号 OP028107)分别与 *S. arenicola* SCSIOZ-SH11 和 *S. arenicola* NPS-11684 相似度为 99.93%。菌株 SH012 (GenBank 登录号 OP028087) 和 SH029 (GenBank 登录号 OP028093)与 *S. arenicola* MBRM5 相似度分别为 99.93%和 99.71%, 其余菌株与 *S. arenicola* MBRM5 相似度均为 100%。

从基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树(图 2)来看, 分离到的盐孢菌株与沙栖盐孢菌(*S. arenicola*)进化距离近, 聚为一支; 盐孢菌属与小单孢菌属(*Micromonospora*)均属于小单孢科, 亲缘关系较近; 菌株 SH003 和 SH001 分别与戈登菌属和链霉菌属的菌种聚为小支。根据 16S rRNA 基因序列在 GenBank 数据库中比对结果和构建的系统发育树综合分析, 菌株 SH001 属于链霉菌属(*Streptomyces*); 菌株 SH003 属于戈登菌属(*Gordonia*); 其他菌株属于盐孢菌属(*Salinispora*)。本次通过纯培养获得的西沙石珊瑚共附生放线菌属于放线菌门放线菌纲的 1 个目 3 个科 3 个属, 其中大部分菌株为盐孢菌属菌株, 并且均来源于 W1 和 W2 位点, 表明盐孢菌在七连屿与永兴岛石珊瑚中分布较为丰富。

## 2.3 抗菌活性菌株的筛选结果

采用琼脂块法对 27 株放线菌进行了抗菌活性初筛, 结果显示, 26 株放线菌对 11 种指示菌中至少 1 种具有抑菌活性。链霉菌及多数盐孢菌株对 11 种指示菌均表现出或强或弱的抑菌活性, 但菌株 SH003 对所有病原菌均无抑菌活性。最终从中筛选出链霉菌 SH001、盐孢菌 SH098、SH099 共 3 株活性较好的菌株进行复筛。采用打孔法筛选以上拮抗放线菌发酵提取物的抑菌活性, 结果如表 1 所示, 3 株菌均对无乳链球菌、茄青枯劳尔氏菌、水稻白叶枯病菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、藤黄微

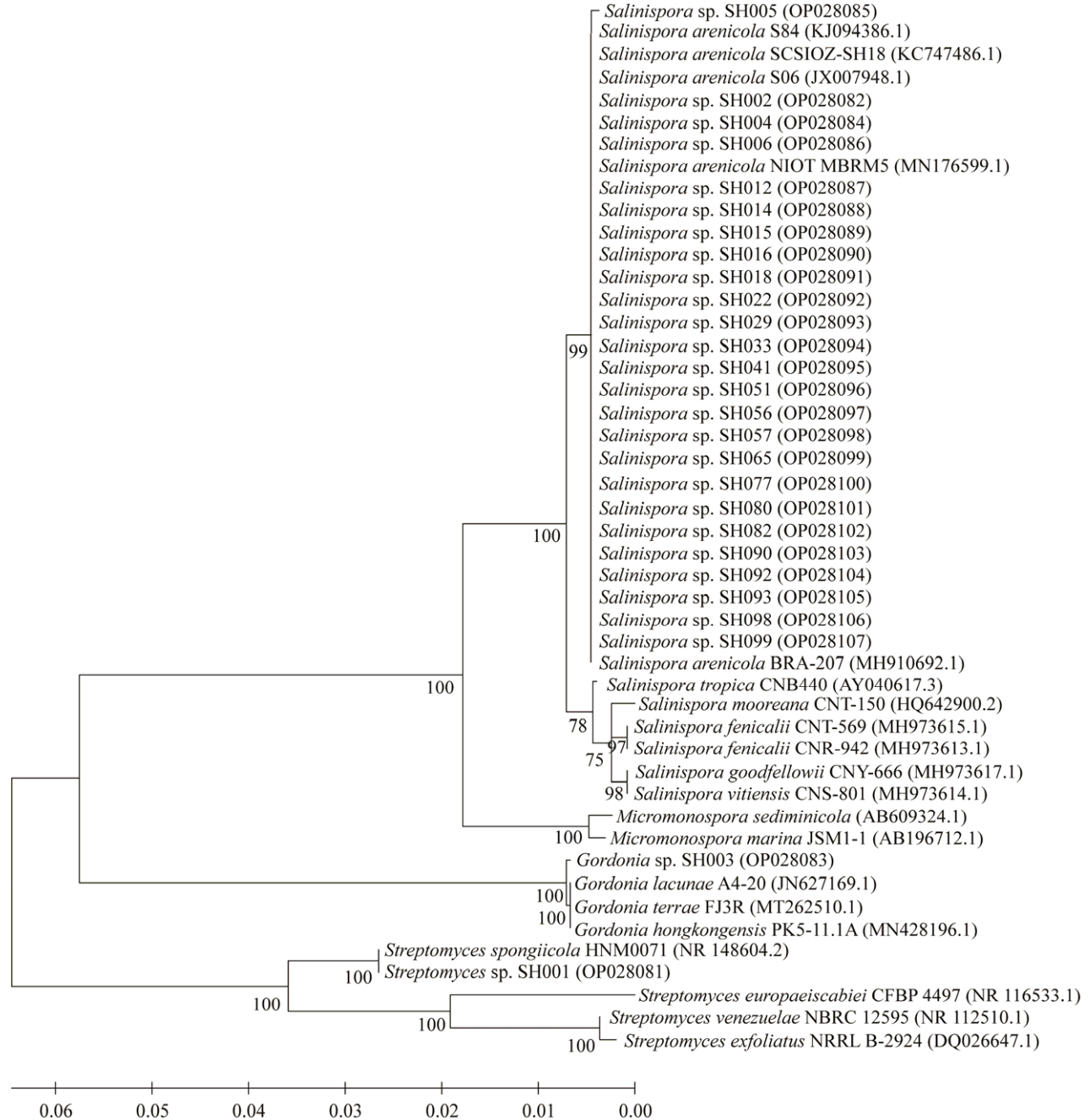


图2 珊瑚可培养共生放线菌基于16S rRNA基因序列构建的系统发育树 采用邻接法构建系统发育树并采用自展法(1 000次重复)进行检验; Bootstrap值显示在相关类群聚集在一起的分支下;括号为中相应菌株的序列登录号;标尺表示进化距离

Figure 2 The phylogenetic tree of culturable actinobacteria isolated from corals based on the 16S rRNA gene sequence. The evolutionary history was inferred using the neighbor-joining method; The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1 000 replicates) are shown below the branches; Accession numbers are shown in brackets; Bar (0.01) represents sequence divergence.

表 1 拮抗菌株发酵提取物活性复筛结果(抑菌圈直径, mm)

Table 1 Bioactivity screening of fermentation extracts from antagonistic strains (inhibitory zone diameter, mm)

Pathogenic bacteria	SH001	SH098	SH099	Kanamycin
<i>Photobacterium damsela</i>	18.33±0.23	10.00±0.40	—	18.16±0.47
<i>Vibrio alginolyticus</i>	17.33±0.23	14.33±0.62	—	20.50±0.40
<i>Vibrio harveyi</i>	—	9.50±0.40	—	18.83±0.23
<i>Vibrio owensii</i>	10.33±0.23	16.66±0.23	—	19.50±0.40
<i>Streptococcus iniae</i>	13.50±0.47	13.50±0.47	—	18.00±0.47
<i>Streptococcus agalactiae</i>	23.33±0.47	26.16±1.02	18.66±0.23	18.75±0.23
<i>Ralstonia solanacearum</i>	7.50±1.41	17.50±0.47	9.00±0.47	23.75±0.84
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>Oryzae</i>	7.50±0.47	18.50±0.00	11.50±0.40	28.00±0.81
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	14.50±0.47	21.25±0.23	12.75±0.40	25.00±0.00
<i>Micrococcus luteus</i>	11.00±1.24	27.25±0.23	19.25±0.70	12.00±1.17
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i>	14.50±0.81	20.50±0.47	9.00±0.47	23.75±0.84

—: 无活性

-: Inactivity.

球菌和芒果角斑病菌有不同程度的抑制活性; 链霉菌 SH001 与盐孢菌 SH098 的活性相当, 但盐孢菌 SH098 对哈维氏弧菌有抑菌活性, 并且菌株 SH098 对无乳链球菌及藤黄微球菌的抑菌活性均高于卡那霉素。由于弧菌、链球菌皆可导致多种海洋鱼类创伤感染, 对它们的人工养殖构成了严重威胁, 因此, 探索该菌株的内在抗菌机制可为水产病害防治的新途径提供可能, 所以选择抑菌谱较广且抑菌活性强的菌株 SH098 为目标菌株进行更深入的研究。

#### 2.4 拮抗菌株发酵提取物的热稳定性和光稳定性

不同温度水浴处理 1 h 后菌株 SH098 的发酵提取物对哈维氏弧菌的活性随着温度的升高而下降, 但是下降趋势并不明显。50 °C 和 60 °C 处理后 SH098 发酵提取物抑菌直径与室温 (28 °C) 下的活性相当(表 2)。因此该发酵提取物对哈维氏弧菌的活性具有较好的热稳定性, 针对耐热病原菌的防治以及室外水产治理等方面可能发挥其稳定的功效。

不同紫外处理时间后菌株 SH098 发酵提取

物对无乳链球菌的抑菌活性整体趋势随着紫外照射时间的增加而降低, 紫外照射 24 h 内的影响不明显, 说明 SH098 发酵提取物的抗菌活性比较稳定; 连续照射 48 h 后, 发酵提取物的抗菌活性明显下降, 但仍强于阳性对照药物的活性(表 3)。因此该发酵提取物对无乳链球菌病菌的活性具有较好的光稳定性, 在室外用于微生物制剂治理水产养殖水体和防治水产养殖动物病原细菌病害中可发挥稳定防效。

表 2 不同水浴温度作用下菌株 SH098 提取物对哈维氏弧菌的抑菌圈直径(mm)

Table 2 Inhibition diameters (mm) of strain SH098 at different water bath temperatures for *Vibrio harveyi*

Temperature (°C)	SH098	Kanamycin
28	9.16±0.23a	12.83±0.23a
40	8.66±0.23ab	15.16±0.23c
50	8.16±0.23b	15.33±0.47c
60	8.16±0.23b	13.83±0.23b

同行数据后不同小写字母表示在  $P<0.05$  水平差异显著  
To compare the data on the same row in the table, different lowercase letters behind the data show significant difference at  $P<0.05$  level.



表3 不同光照时长作用下菌株 SH098 提取物对无乳链球菌的抑菌圈直径(mm)

Table 3 Inhibition diameters (mm) of strain SH098 at different irradiation time for *Streptococcus agalactiae*

Illumination time (h)	SH098	Kanamycin
0	33.50±0.40a	22.66±0.94a
1	32.50±0.70ab	22.83±0.47a
3	31.66±0.23b	21.33±0.47a
5	32.00±0.40b	22.00±0.81a
10	32.33±0.62ab	23.00±0.81a
24	31.50±0.00b	23.33±0.47a
48	25.75±0.25c	22.33±0.47a

同行数据后不同小写字母表示在  $P<0.05$  水平差异显著

To compare the data on the same row in the table, different lowercase letters behind the data show significant difference at  $P<0.05$  level.

## 2.5 拮抗菌株的盐度性测试

经盐度耐受培养实验发现,盐孢菌属菌株 SH098 在盐度分别为 0、7.5%、10%、12% 的培养基中不能生长,在盐度分别为 2%、3%、5% 的培养基中长势良好,表明该菌株具有嗜盐性,但不能耐受 7.5% 以上的盐浓度。

## 2.6 菌株 *Salinispora* sp. SH098 的全基因组测序与初步分析

### 2.6.1 分析概况

本研究通过高通量测序对菌株 SH098 进行全基因组测序,二代测序平均测序深度为 353.3 X,三代测序平均测序深度约为 173.4 X。先后使用 Flye 软件和 Pilon 软件拼装后得到 1 个 contig,整个基因组大小为 5.691 Mb,GC 含量为 69.48%,所有编码基因的总长度 4.997 Mb。经预测,该菌的基因组含有 5 066 个编码基因,4 955 个完整的编码区(coding sequence, CDS),60 个 tRNA,3 个 16S rRNA,1 个 tmRNA。图 3 展示其核基因圈图。各圈由外至内依次为基因组序列信息(青色)、GC 含量曲线(青色)、GC skew 曲线(紫色)、二代测序深度及覆盖度信息

(蓝色)、三代测序深度及覆盖度信息(红色)、参考基因组中的基因编码区(CDS)及非编码 RNA 区(rRNA、tRNA),以内外两层表示,外层代表正链,内层代表负链。

### 2.6.2 COG 和 KEGG 聚类分析

在八大数据库中对 CDS (大小约为 4.972 Mb,占基因组 87.37%)进行功能注释,96.55% 的 CDS 至少有一种注释。将菌株 SH098 基因产物与蛋白质直系同源分类的数据库(COG)进行比对,COG 分为 26 个区(A-Z),将注释的基因按此分类(图 4A),有 1 614 个编码基因获得注释,其中,有关氨基酸转运与代谢的基因最多,共 194 个,占注释基因总数的 12.01%;有关基因翻译、核糖体结构和生物合成的基因数量次之,共 174 个,占注释基因总数的 10.78%;有关能量生产与转化(146 个基因,占 9.04%)、有关辅酶的转运与代谢(132 个基因,占 8.17%)和有关脂类化合物的转运与代谢(116 个基因,占 7.18%)等基因也获得了较多注释。

KEGG 是系统分析基因产物在细胞中的代谢途径以及这些基因产物功能的主要公共数据库,将菌株 SH098 的编码基因与该数据库进行比对,从而进一步研究基因在生物学上的复杂行为。在 KEGG 数据库中(图 4B),仅有 25.37% 的编码基因获得注释,可分为 28 个类型,包括细胞过程、环境信息处理、遗传信息处理、新陈代谢和有机系统五大类。其中与代谢相关的基因最多,有 2 191 个,包括与萜类和聚酮类化合物相关的基因有 123 个;与其他抗生素等次级代谢相关的基因有 68 个。

由 antiSMASH (<https://antismash.secondarymetabolites.org>)在线网站对 *Salinispora* sp. SH098 基因组的次级代谢产物生物合成基因簇进行预测和分析,预测到 25 个潜在的次级代谢生物合成基因簇(表 4),其次级代谢产物主要类型有:

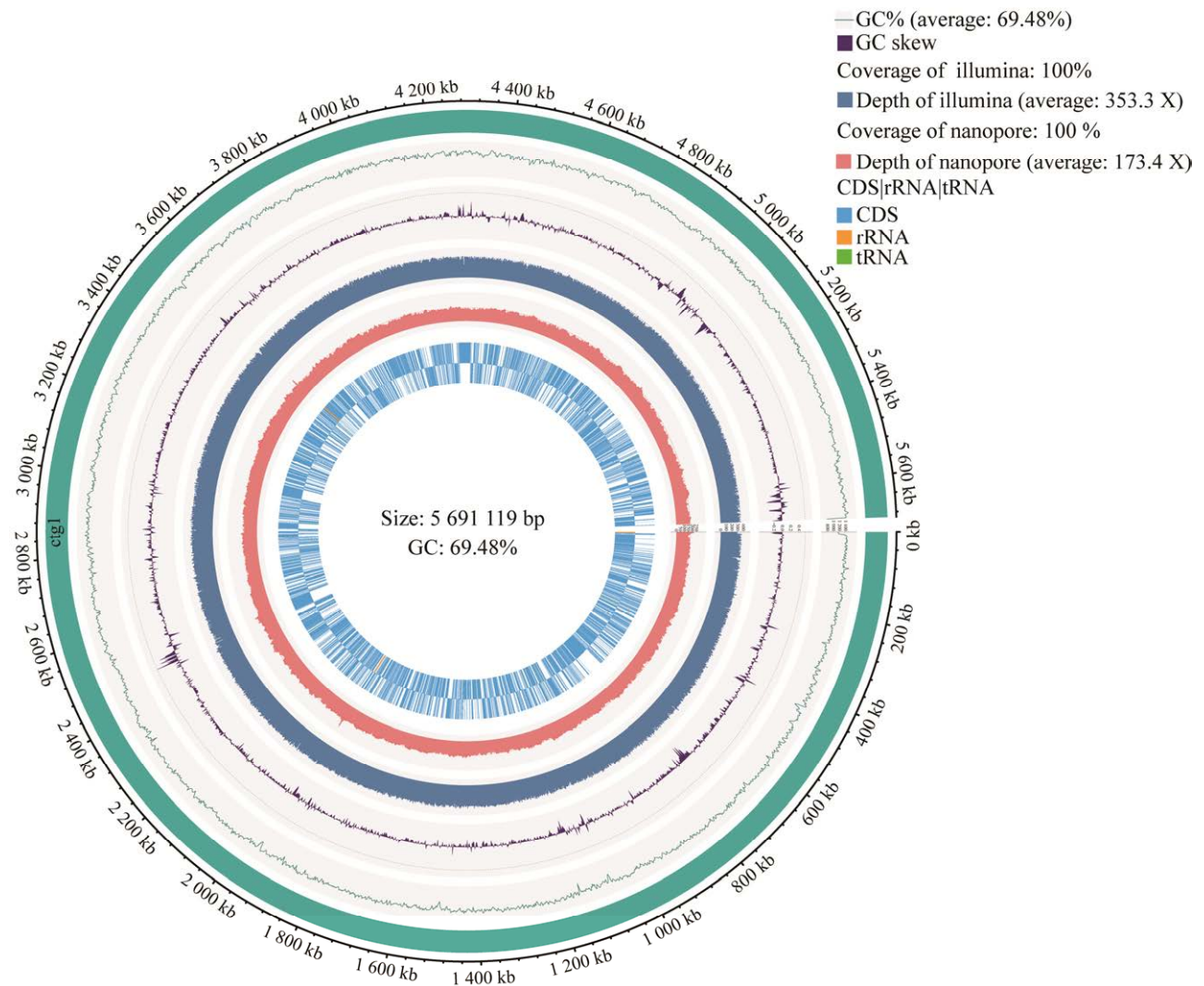


图 3 菌株 SH098 核基因组圈层

Figure 3 Nuclear genome of strain SH098.

非核糖体多肽(NRPS)、聚酮类(PKS)、萜类(terpene)和 PKS-NRPS 杂合型。其中 NRPS 类基因簇有 3 个, 并且 cluster 7 与具有抗肿瘤活性的抗生素 tallysomicin A 合成基因簇相似度为 5%; Cluster 9 与具有抗细菌活性的脂肽抗生素 friulimicin A 合成基因簇相似度为 12%。PKS 类基因簇有 4 个, 其中 I 型 PKS 中, cluster 14 与具有抗细菌活性的抗生素阿米霉素(amycomycin)合成基因簇相似度为 25%; Cluster 23 与具有抗

肿瘤活性的抗生素 calicheamicin 合成基因簇相似度为 40%; II 型 PKS 的 cluster 17 与具有抗细菌活性的顺醌类化合物 paramagnetoquinone 合成基因簇相似度为 25%。Terpene 类基因簇有 3 个, 其中 cluster 2 与具有抗细菌活性的抗生素利福霉素(rifamycin)合成基因簇相似度为 20%; Cluster 8 与具有抗氧化作用的 isorenieratene 合成基因簇相似度为 25%。PKS-NRPS 杂合型基因簇有 7 个, 其中 cluster 3 与具有抗细菌活性

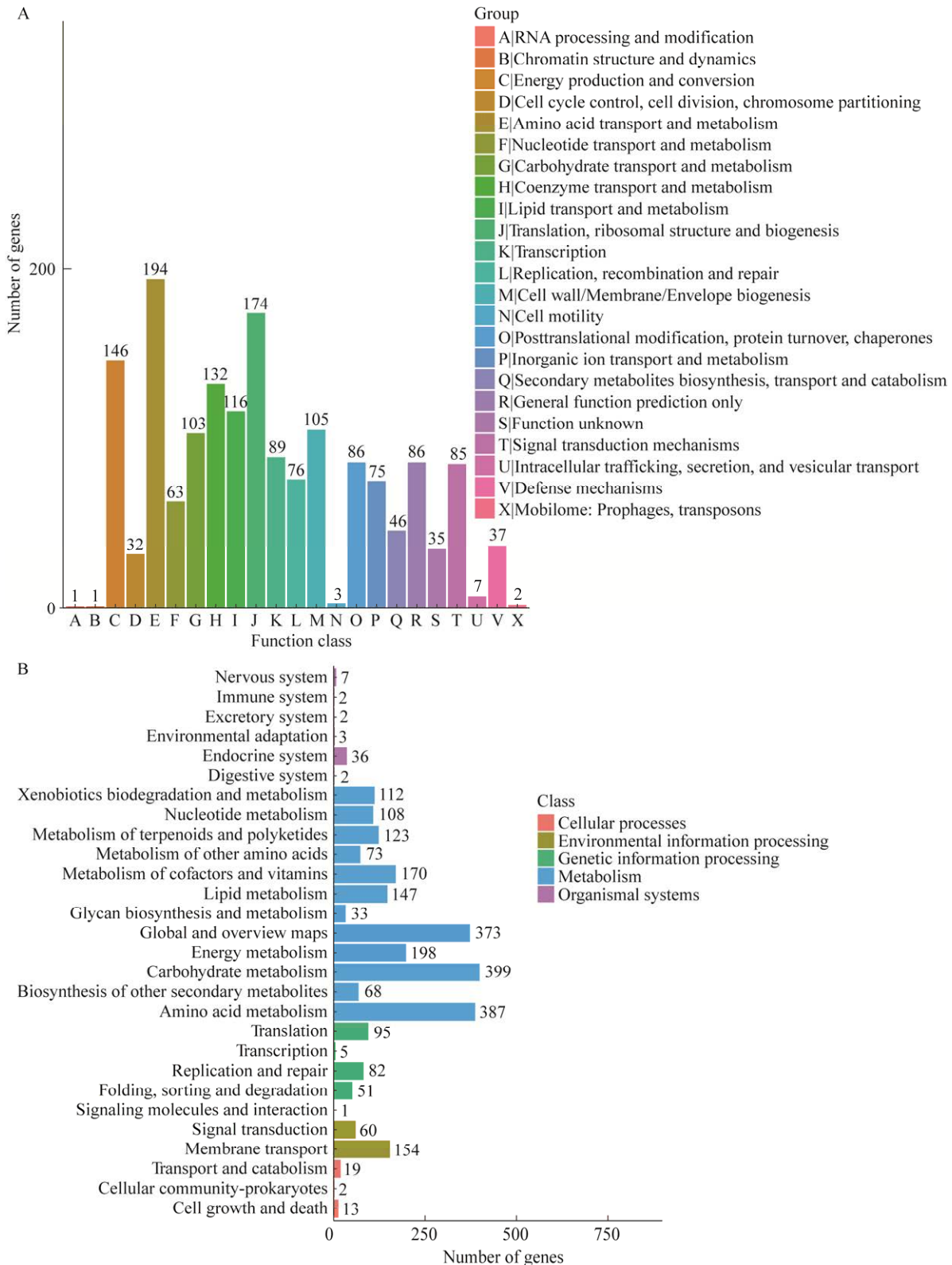


图 4 菌株 SH098 的 COG (A)和 KEGG (B)基因组功能注释

Figure 4 COG (A) and KEGG (B) functional notes on the genome of strain SH098.

表 4 菌株 SH098 基因组中次级代谢产物生物合成基因簇类型

Table 4 Biosynthetic gene clusters of strain SH098

Region	From (nt)	To (nt)	Type	Most similar known cluster	Similarity (%)
1	5 910	33 922	NRPS	Stenothricin	31
2	668 928	689 378	Terpene	Rifamycin	20
3	693 918	785 218	T1PKS, NRPS-like	Rifamycin	71
4	936 001	976 237	Ladderane	Triacsins	65
5	1 231 621	1 246 370	NAGGN	—	—
6	1 501 568	1 588 876	NRPS, T1PKS	Sporolide A/Sporolide B	29
7	1 730 199	1 795 573	NRPS, lanthipeptide	Tallysomycin A	5
8	2 328 989	2 347 958	Terpene	Isorenieratene	25
9	2 348 558	2 404 027	NRPS	Friulimicin A/Friulimicin B/Friulimicin C/Friulimicin D	12
10	2 655 992	2 697 041	T3PKS	Alkyl-O-dihydrogeranyl-methoxyhydroquinones	71
11	3 591 251	3 654 742	NRPS, T1PKS	Caerulomycin A	8
12	4 057 030	4 105 959	Bacteriocin, T1PKS, NRPS-like	Lymphostin/Neolymphostinol B/lymphostinol/Neolymphostin b	100
13	4 205 434	4 332 102	NRPS, T1PKS, NRPS-like	Salinichelins	76
14	4 351 618	4 405 441	T1PKS, other	Amycomycin	25
15	4 454 050	4 465 009	Butyrolactone	Salinipostin G	66
16	4 527 763	4 550 917	Fused	Ketomemycin B3/Ketomemycin B4	100
17	4 729 755	4 802 270	T2PKS	Paramagnetoquinone 1/Paramagnetoquinone 2	25
18	4 877 587	4 914 955	Siderophore, LAP, thiopeptide	—	—
19	4 915 160	4 936 410	Terpene	—	—
20	4 981 292	5 002 458	Amglycycyl	—	—
21	5 009 447	5 032 398	Lanthipeptide	Azalomycin F3a	8
22	5 122 903	5 146 112	Indole	Staurosporine	76
23	5 288 065	5 360 051	T1PKS, PKS-like	Calicheamicin	40
24	5 384 815	5 489 107	NRPS, T1PKS, arylpolyene, ladderane	Kedarcidin	26
25	5 510 504	5 594 132	Oligosaccharide, PKS-like, T1PKS, NRPS	Calicheamicin	41

—: 未预测到最相似已知基因簇

—: The most similar known cluster is not predicted.

的抗生素 rifamycin 合成基因簇相似度为 71%; Cluster 11 与具有抗真菌活性的化合物 caerulomycin A 合成基因簇相似度为 8%; Cluster 12 与作为免疫抑制剂的淋巴斯汀 (lymphostin)合成基因簇相似度为 100%; Cluster

24 与具有抗肿瘤活性的抗生素 kedarcidin 合成基因簇相似度为 26%; Cluster 25 与具有抗肿瘤活性的抗生素 calicheamicin 合成基因簇相似度分别为 41%。据文献[16]报道, 已从盐孢菌属中分离鉴定了利福霉素、淋巴斯汀、阿米霉素

以及星孢霉素等抗生素,这进一步证实了菌株 SH098 具有产生新型抗菌活性物质的能力。

### 3 讨论与结论

海洋放线菌次级代谢产物相对陆生来源的结构与活性均更加多样,为药物开发提供了丰富的先导化合物资源<sup>[17]</sup>。本研究从中国海南省西沙永乐群岛和宣德群岛的 4 个海域位点采集的石珊瑚样品中分离筛选出一株活性良好的菌株 SH098,通过对其进行活性评价,发现该菌株的发酵提取物对多种病原细菌均具有抑制作用,对无乳链球菌和藤黄微球菌的抑菌活性高于卡那霉素,并且该菌株产生的抑菌物质具有良好的热稳定性和光稳定性。因此,盐孢菌 SH098 在制备海水水产养殖动物健康饲料、抗菌药剂以及水产养殖水体改良用微生态制剂这些方面为水产养殖产业的绿色健康发展提供了新机遇,具有重要潜力和应用前景。

#### 3.1 石珊瑚的共附生放线菌多样性

自 2006–2022 年,国内外研究人员已从石珊瑚中分离得到诺卡氏菌属(*Nocardia*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、迪茨氏菌属(*Dietzia*)、盐孢菌属(*Salinispora*)、戈登菌属(*Gordonia*)、链霉菌属(*Streptomyces*)和涅斯捷连科氏菌属(*Nesterenkonia*)等 62 种放线菌属<sup>[18]</sup>,另外,陈洪等<sup>[19]</sup>、李芬发等<sup>[20]</sup>通过免培养技术对南海海域的珊瑚样品中的放线菌物种多样性进行调查分析,均发现了许多未知名的类群,这表明珊瑚中蕴藏着丰富的放线菌资源。本研究也从西沙石珊瑚中分离培养出许多放线菌,其中主要为盐孢菌属放线菌,在永兴岛(W1)和七连屿(W2)来源的样品中均有发现。马亮等<sup>[21]</sup>曾从我国西沙永兴岛白穗软珊瑚中分离得到沙栖盐孢菌,可见盐孢菌属放线菌在永兴岛珊瑚中分布较广。本研究首次报道从我国西沙石珊瑚共附

生环境中分离得到了该属菌株,为今后该类菌株的深入挖掘研究提供了借鉴。

#### 3.2 盐孢菌属的特征

盐孢菌属是第 1 个被报道的专性海洋放线菌<sup>[22]</sup>,多分布于热带及亚热带地区的沉积物中,但海绵、海鞘、海藻以及珊瑚中也均有发现<sup>[23–27]</sup>。截至目前,该菌属共鉴定了 9 个种,分别是 *S. arenicola*、*S. tropica*、*S. pacifica*、*S. cortesian*、*S. fenicalii*、*S. goodfellowii*、*S. mooreana*、*S. oceanensis* 和 *S. vitiensis*<sup>[28–30]</sup>;其中 *S. arenicola* 分布最广,*S. tropica* 目前只在巴哈马群岛被发现<sup>[31]</sup>。1991 年, Jensen 等<sup>[32]</sup>发现 *Salinispora* 菌株在去离子水替换海水时无法生长;2008 年, Tsueng 等<sup>[33]</sup>发现 *Salinispora* 菌株在含有 5.0 mmol/L 钠离子的氯化钾盐培养基中可以生长。因此,培养基中足够高的离子强度而非海水是维持其生长的关键。本研究也得到类似的结果,菌株 SH098 在无 NaCl 的 ISP2 培养基上不生长,在含 2%–5% NaCl 的 ISP2 培养基可以生长,其中含 2%–3% NaCl 的 ISP2 培养基生长效果最好。

#### 3.3 盐孢菌属放线菌的次级代谢产物

盐孢菌属放线菌可以产生丰富的次级代谢产物,目前已从中分离得到的化合物包括 salinosporamides、rifamycins、saliniketals、cyclomarazines、salinisporamycin 等<sup>[29]</sup>,多数具有抗菌、抗病毒活性<sup>[16]</sup>,其中 salinosporamides A 也因具有较强的抗肿瘤特性而被应用于临床研究中。目前基于三代测序技术获得菌株 SH098 的全基因序列,在预测的 25 个次级代谢产物生物合成基因簇中,21 个与已知基因簇相似,其中预测基因簇 2、基因簇 3 (分别与 rifamycin 合成基因簇相似度为 20%和 71%)、基因簇 6 (与 sporolide A 合成基因簇相似度为 29%)、基因簇 12 (与 lymphostin 合成基因簇相似度为 100%)、基因簇 14 (与 amycomycin 合成

基因簇相似度为 25%)和基因簇 22 (与 staurosporine 合成基因簇相似度为 76%)编码的产物与盐孢菌属中已报道的产物相似度较高, 其他生物合成基因簇相似性低, 预示着该菌具有产生结构新颖的次级代谢产物的潜力, 具有深入挖掘价值。当前我国对于盐孢菌属放线菌多样性、次级代谢产物及其生物合成基因挖掘等方面的研究较少。因此, 研究这类放线菌资源将对我国热带海洋生物资源挖掘利用具有重要的指导意义。后续将继续通过现代分离技术对可能的新型活性物质进行分离鉴定及对其生物合成基因簇进行研究, 并探索该类菌在鱼类病原弧菌病害防治以及珊瑚白化病防治、珊瑚礁修复等方面的应用, 为专性海洋放线菌资源开发利用提供基础信息。

## REFERENCES

- [1] 关统伟, 张小平. 放线菌系统分类技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2016.  
GUAN TW, ZHANG XP. Classification Technology of Actinomycetes[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2016 (in Chinese).
- [2] CARROLL AR, COPP BR, DAVIS RA, KEYZERS RA, PRINSEP MR. Marine natural products[J]. Natural Product Reports, 2020, 37(2): 175-223.
- [3] NEWMAN DJ, CRAGG GM. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019[J]. Journal of Natural Products, 2020, 83(3): 770-803.
- [4] KUMAR RR, JADEJA VJ. Isolation of actinomycetes: a complete approach[J]. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 2016, 5(5): 606-618.
- [5] MIR MA, RASOOL U, AISHA S, ALSHEHRI B, HAMADANI SS. Human Pathogenic Microbes (Bacterial and Fungal) and Associated Diseases[M]// Human Pathogenic Microbes. Amsterdam: Elsevier, 2022: 1-30.
- [6] 杨思悦, 龙昊, 章翔, 蔡晓霓, 谢珍玉. 珊瑚病原微生物鉴定及其分子诊断技术进展[J]. 微生物学通报, 2020, 47(2): 623-633.  
YANG SY, LONG H, ZHANG X, CAI XN, XIE ZY. Progress in characterization of microbial pathogens of coral diseases and their molecular diagnosis techniques[J]. Microbiology China, 2020, 47(2): 623-633 (in Chinese).
- [7] 黄木珍, 黎炯, 潘忠超, 石和荣. 宝石鲈无乳链球菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(10): 247-251.  
HUANG MZ, LI J, PAN ZC, SHI HR. Isolation, identification and drug susceptibility analysis of *Streptococcus agalactiae* in *Scortum barcoo*[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2014, 41(10): 247-251 (in Chinese).
- [8] 刘成程, 胡小芳, 冯友军. 细菌耐药: 生化机制与应对策略[J]. 生物技术通报, 2022, 38(9): 4-16.  
LIU CC, HU XF, FENG YJ. Antimicrobial resistance: biochemical mechanisms and countermeasures[J]. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(9): 4-16 (in Chinese).
- [9] BERNASCONI R, STAT M, KOENDERS A, HUGGETT MJ. Global networks of *Symbiodinium*-bacteria within the coral holobiont[J]. Microbial Ecology, 2019, 77(3): 794-807.
- [10] 唐依莉, 谢修超, 洪葵. 红树植物根内生放线菌的分离鉴定及其生理活性的评价[J]. 热带生物学报, 2012, 3(1): 32-37, 41.  
TANG YL, XIE XC, HONG K. Identification and evaluation of physiologically active root endophytic actinomycetes from mangrove plants in Hainan Province[J]. Journal of Tropical Organisms, 2012, 3(1): 32-37, 41 (in Chinese).
- [11] 向晨晨, 周珊珊, 柴树茂, 曹明明, 王立岩, 冯治洋. 红树林链霉菌 ZFSM1-146 中抗菌活性物质的发现[J]. 微生物学通报, 2021, 48(7): 2329-2340.  
XIANG CC, ZHOU SS, CHAI SM, CAO MM, WANG LY, FENG ZY. Discovery of antibacterial compounds from a mangrove *Streptomyces* strain ZFSM1-146[J]. Microbiology China, 2021, 48(7): 2329-2340 (in Chinese).
- [12] 杜英侠, 李晶莹, 傅敏, 张鑫, 曲春强, 李小艺, 张菊林, 顾颖, 王选骏, 付晚涛. 一株海绵放线菌的分离培养、发酵条件优化及其抑制弧菌效果[J]. 大连海洋大学学报, 2017, 32(4): 457-464.  
DU YX, LI JY, FU M, ZHANG X, QU CQ, LI XY, ZHANG JL, GU Y, WANG XJ, FU WT. Isolation, optimization of fermentation conditions and inhibition of *Vibrio* in a sponge-associated actinobacterium FH[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2017, 32(4): 457-464 (in Chinese).
- [13] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 微

- 生物源抗生素类次生代谢产物抗菌活性测定 抑菌圈法: GB/T 38483—2020[S]. 北京: 中国标准出版社, 2020.
- State Administration for Market Regulation, Standardization Administration of the People's Republic of China. Determination of antibacterial activity for microbial secondary metabolites—Inhibition zone method: GB/T 38483—2020[S]. Beijing: Standards Press of China, 2020 (in Chinese).
- [14] WICK RR, JUDD LM, GORRIE CL, HOLT KE. Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads[J]. *PLoS Computational Biology*, 2017, 13(6): e1005595.
- [15] LI H. Minimap and miniiasm: fast mapping and *de novo* assembly for noisy long sequences[J]. *Bioinformatics*, 2016, 32(14): 2103-2110.
- [16] 王可欣, 陈柔雯, 田新朋. 专性海洋放线菌盐孢菌的研究进展[J]. *生物资源*, 2018, 40(5): 430-442.
- WANG KX, CHEN RW, TIAN XP. Advances in the marine obligate actinomycete genus *Salinispora*[J]. *Biotic Resources*, 2018, 40(5): 430-442 (in Chinese).
- [17] 杨小梅, 李菲, 胡丽琴, 周文红, 覃媚, 高程海. 柳珊瑚 *Anthogorgia caerulea* 相关可培养共生放线菌多样性及其生物毒活性研究[J]. *广西科学院学报*, 2014, 30(4): 248-252.
- YANG XM, LI F, HU LQ, ZHOU WH, QIN M, GAO CH. Diversity and biotoxicity of culturable actinomycetes associated with the Gorgonian *Anthogorgia caerulea*[J]. *Journal of Guangxi Academy of Sciences*, 2014, 30(4): 248-252 (in Chinese).
- [18] SIRO G, PIPITE A, CHRISTI K, SRINIVASAN S, SUBRAMANI R. Marine actinomycetes associated with stony corals: a potential hotspot for specialized metabolites[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(7): 1349.
- [19] 陈洪, 龙丽娟, 张偲, 董俊德, 李洁. 澄黄滨珊瑚和丛生盔型珊瑚非培养放线菌多样性[J]. *微生物学通报*, 2014, 41(4): 691-698.
- CHEN Q, LONG LJ, ZHANG S, DONG JD, LI J. Diversity of actinobacteria associated with coral *Porites lutea* and *Galaxea fascicularis*[J]. *Microbiology China*, 2014, 41(4): 691-698 (in Chinese).
- [20] 李芬发, 周双清, 许云, 吴文婧, 夏薇, 张荣萍, 黄东益, 黄小龙. 海南文昌海域珊瑚非培养共附生放线菌的多样性[J]. *基因组学与应用生物学*, 2021, 40(S4): 3528-3537.
- LI FF, ZHOU SQ, XU Y, WU WQ, XIA W, ZHANG RP, HUANG DY, HUANG XL. Diversity of uncultured actinobacteria associated with corals from Wenchang Sea area of Hainan[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2021, 40(S4): 3528-3537 (in Chinese).
- [21] 马亮, 张文军, 朱义广, 吴正超, Saurav K, 黄晖, 张长生. 永兴岛白穗软珊瑚共附生放线菌筛选及部分活性次级代谢产物的鉴定[J]. *微生物学报*, 2013, 53(10): 1063-1071.
- MA L, ZHANG WJ, ZHU YG, WU ZC, SAURAV K, HUANG H, ZHANG CS. Isolation of actinobacteria with antibiotic activity associated with Soft Coral *Nephthea* sp.[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(10): 1063-1071 (in Chinese).
- [22] MINCER TJ, JENSEN PR, KAUFFMAN CA, FENICAL W. Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(10): 5005-5011.
- [23] KIM TK, GARSON MJ, FUERST JA. Marine actinomycetes related to the 'Salinospora' group from the Great Barrier Reef sponge *Pseudoceratina clavata*[J]. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(4): 509-518.
- [24] HE H, DING WD, BERNAN VS, RICHARDSON AD, IRELAND CM, GREENSTEIN M, ELLESTAD GA, CARTER GT. Lomaiviticins A and B, potent antitumor antibiotics from *Micromonospora lomaivitiensis*[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2001, 123(22): 5362-5363.
- [25] FREEL KC, EDLUND A, JENSEN PR. Microdiversity and evidence for high dispersal rates in the marine actinomycete '*Salinispora pacifica*'[J]. *Environmental Microbiology*, 2012, 14(2): 480-493.
- [26] JENSEN PR, GONTANG E, MAFNAS C, MINCER TJ, FENICAL W. Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments[J]. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(7): 1039-1048.
- [27] OCAMPO-ALVAREZ H, MEZA-CANALES ID, MATEOS-SALMÓN C, RIOS-JARA E, RODRÍGUEZ-ZARAGOZA FA, ROBLES-MURGUÍA C, MUÑOZ-URIAS A, HERNÁNDEZ-HERRERA RM, CHOIX-LEY FJ, BECERRIL-ESPINOSA A. Diving into reef ecosystems for land-agriculture solutions: coral microbiota can alleviate salt stress during germination and photosynthesis in terrestrial plants[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 648.
- [28] MALDONADO LA, FENICAL W, JENSEN PR, KAUFFMAN CA, MINCER TJ, WARD AC, BULL AT, GOODFELLOW M. *Salinispora arenicola* Gen. nov., sp. nov. and *Salinispora tropica* sp. nov., obligate

- marine actinomycetes belonging to the family Micromonosporaceae[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(Pt 5): 1759-1766.
- [29] AHMED L, JENSEN PR, FREEL KC, BROWN R, JONES AL, KIM BY, GOODFELLOW M. *Salinispora pacifica* sp. nov., an actinomycete from marine sediments[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2013, 103(5): 1069-1078.
- [30] ROMÁN-PONCE B, MILLÁN-AGUIÑAGA N, GUILLEN-MATUS D, CHASE AB, GINIGINI JGM, SOAPI K, FEUSSNER KD, JENSEN PR, TRUJILLO ME. Six novel species of the obligate marine actinobacterium *Salinispora*, *Salinispora cortesiana* sp. nov., *Salinispora fenicalii* sp. nov., *Salinispora goodfellowii* sp. nov., *Salinispora mooreana* sp. nov., *Salinispora oceanensis* sp. nov. and *Salinispora vitiensis* sp. nov., and emended description of the genus *Salinispora*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2020, 70(8): 4668-4682.
- [31] JENSEN PR, MAFNAS C. Biogeography of the marine actinomycete *Salinispora*[J]. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(11): 1881-1888.
- [32] JENSEN PR, DWIGHT R, FENICAL W. Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57(4): 1102-1108.
- [33] TSUENG G, LAM KS. A low-sodium-salt formulation for the fermentation of salinosporamides by *Salinispora tropica* strain NPS21184[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 78(5): 821-826.