

研究报告

青藏高原戈壁生境中一株链霉菌新种 *Streptomyces haixigobicum* sp. nov. Qhu-G9 的多相分类学鉴定及其次级代谢产物的基因组挖掘

向信¹, 殷恒霞^{*2}, 樊嘉凯¹, 邓佳文¹, 朱肇宇¹, 邱庆辉¹, 柳宇睿¹, 张本印^{*1,2}

1 青海大学生态环境工程学院, 青海 西宁 810016

2 青海大学三江源生态与高原农业国家重点实验室, 青海 西宁 810016

向信, 殷恒霞, 樊嘉凯, 邓佳文, 朱肇宇, 邱庆辉, 柳宇睿, 张本印. 青藏高原戈壁生境中一株链霉菌新种 *Streptomyces haixigobicum* sp. nov. Qhu-G9 的多相分类学鉴定及其次级代谢产物的基因组挖掘[J]. 微生物学通报, 2023, 50(5): 1872-1886.

XIANG Xin, YIN Hengxia, FAN Jiakai, DENG Jiawen, ZHU Zhaoyu, QIU Qinghui, LIU Yurui, ZHANG Benyin. Polyphasic identification and genome mining of secondary metabolites of a novel species *Streptomyces haixigobicum* sp. nov. Qhu-G9 isolated from the Gobi habitat of the Qinghai-Tibetan Plateau[J]. Microbiology China, 2023, 50(5): 1872-1886.

摘要: 【背景】青藏高原极端生境具有丰富的微生物资源, 同时也是微生物药物的重要来源, 但是大量微生物新资源尚待开发利用。【目的】对从青藏高原戈壁土壤中分离得到的一株链霉菌 Qhu-G9 进行多相分类鉴定及次级代谢产物生物合成潜力分析。【方法】通过 16S rRNA 基因扩增、测序和系统发育分析, 结合形态、生理生化、细胞化学组分及基因组测序等多相分类特征, 确定链霉菌 Qhu-G9 的分类地位。【结果】Qhu-G9 与链霉菌 *Streptomyces dioscori* A217^T 和 *Streptomyces aurantiiacus* NBRC 13017^T 相似度最高, 均为 99.22%, 结合形态观察, 说明该菌是一株链霉菌。基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树显示 Qhu-G9 独立成支, 并且其生理生化和细胞化学成分特征与最相似模式菌存在较大差异。通过基因组测序评估了与最相似模式菌的数字 DNA-DNA 杂交值(digital DNA-DNA hybridization, dDDH)和平均核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI), 发现 Qhu-G9 与最相似菌 *S. aurantiiacus* NBRC 13017^T 的 dDDH 与 ANI 值最高, 分别为 36.65% 和 88.21%, 但是均低于判定新菌的阈值, 进一步表明 Qhu-G9 为一株链霉菌属新种, 并命名为 *Streptomyces haixigobicum* sp. nov. Qhu-G9。此外, 通过 antiSMASH 分析发现 Qhu-G9 基因组中存在大量编码已知和未知次级代谢产物的生物合成基因簇。【结论】从青藏高原戈壁土壤中分

资助项目: 国家自然科学基金(81760633); 生态学世界一流学科科技创新项目(2021-stxy-Y2); 生物技术一流专业科技创新项目(2022-stxy-B8, 2022-stxy-B9, 2022-stxy-B22)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81760633), the Scientific and Technological Innovation Project of World First-class Discipline in Ecology (2021-stxy-Y2), and the Scientific and Technological Innovation Project of First Class Major in Biotechnology (2022-stxy-B8, 2022-stxy-B9, 2022-stxy-B22).

*Corresponding authors. E-mail: YIN Hengxia, hengxiayin@qhu.edu.cn; ZHANG Benyin, benyinzhang@qhu.edu.cn

Received: 2023-01-09; Accepted: 2023-02-24; Published online: 2023-03-09

离得到的 Qhu-G9 是一株链霉菌新种, 并且具有进一步挖掘活性次级代谢产物的潜力。

关键词: 青藏高原; 戈壁; 链霉菌; 多相分类学; 生物合成基因簇

Polyphasic identification and genome mining of secondary metabolites of a novel species *Streptomyces haixigobicum* sp. nov. Qhu-G9 isolated from the Gobi habitat of the Qinghai-Tibetan Plateau

XIANG Xin¹, YIN Hengxia^{*2}, FAN Jiakai¹, DENG Jiawen¹, ZHU Zhaoyu¹, QIU Qinghui¹, LIU Yurui¹, ZHANG Benyin^{*1,2}

1 College of Eco-environmental Engineering, Qinghai University, Xining 810016, Qinghai, China

2 State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture, Qinghai University, Xining 810016, Qinghai, China

Abstract: [Background] The extreme habitats of the Qinghai-Tibet Plateau (QTP) harbor rich microbial resources and are important sources of microbial drugs, with abundant microbial resources remaining to be exploited. [Objective] A *Streptomyces* strain Qhu-G9 isolated from Gobi soil of the QTP was identified by polyphasic taxonomy, and its biosynthesis potential of secondary metabolites was analyzed. [Methods] The taxonomic status of *Streptomyces* Qhu-G9 was determined by 16S rRNA gene amplification, sequencing, and phylogenetic analysis, combined with polyphasic taxonomy based on genome sequencing and morphological, physiochemical, and cytochemical characteristics. [Results] Qhu-G9 had the highest similarity (99.22%) with the type strains *Streptomyces dioscori* A217^T and *S. aurantiiacus* NBRC 13017^T, which, combined with morphological characteristics, indicated that Qhu-G9 belonged to *Streptomyces*. However, the phylogenetic tree constructed based on the 16S rRNA gene sequence displayed that Qhu-G9 branched independently. Moreover, the physiochemical and cytochemical characteristics of this strain were quite different from those of the most similar model bacteria. We then employed genome sequencing to evaluate the digital DNA-DNA hybridization (dDDH) and average nucleotide identity (ANI) between Qhu-G9 and the model bacteria. The dDDH and ANI values were the highest between Qhu-G9 and *S. aurantiiacus* NBRC 13017^T, reaching 36.65% and 88.21%, respectively, both of which were lower than those determining a novel species. The results further confirmed that Qhu-G9 was a novel species of *Streptomyces* and named as *S. haixigobicum* sp. nov. Qhu-G9. In addition, antiSMASH revealed a large number of gene clusters for the biosynthesis of known and unknown secondary metabolites in the Qhu-G9 genome. [Conclusion] Qhu-G9 isolated from Gobi soil of the QTP is a novel *Streptomyces* species and has great potential for the production of active secondary metabolites.

Keywords: Qinghai-Tibet Plateau; Gobi; *Streptomyces*; polyphasic taxonomy; gene clusters for biosynthesis

链霉菌属 (*Streptomyces*) 由 Waksman 和 Henrici 于 1943 年首次报道^[1], 作为放线菌门最大的属, 目前已有约 711 个正式命名的新种 (<https://lpsn.dsmz.de/genus/streptomyces>)。链霉菌广泛分布于土壤中, 并且因其具有产生抗生素、酶抑制剂、抗肿瘤剂和抗真菌化合物等生物活性次级代谢产物的潜力而备受关注^[2-4], 特别是产生抗生素的能力尤为突出, 75% 从放线菌中发现的抗生素(超过微生物来源的一半)是从链霉菌属菌株中发掘的^[5]。然而, 由于抗生素的滥用和抗性基因水平转移等导致多重耐药细菌的出现和耐药现象的加剧, 而新的生物活性化合物的发现速度远远落后于临床需求^[6-7]。此外, 由于从普通土壤生境中重复发现链霉菌及其次级代谢产物的概率极高^[8], 因此, 从独特的环境中寻找新的链霉菌可能有助于发现有价值的新代谢产物。

青藏高原平均海拔 4 000 m, 其独特的地理位置与气候条件形成了多样独特的极端生境, 是当今全球生物研究热点地区之一^[9]。极端环境条件可能导致生存于此的微生物产生结构独特、活性显著的次级代谢产物^[3]。近年来, 从青藏高原发现了大量新的放线菌资源及具有生物活性的次级代谢产物, 如从酸性沙土、沱沱河边土壤、西藏当雄土壤和西藏尼玛县寒甸盐土中发现了新的放线菌 XZ46^{T[10]}、Z1027^{T[11]}、Z022^{T[12]}和 167-2-28^[13], 并且基因组分析发现, 这些新的放线菌中存在大量产生次级代谢产物生物合成的基因簇。另外, He 等^[14]从青藏高原农田土壤中分离出放线菌 A217, 其产生的生物碱类化合物具有较好的抗真菌与抗细菌能力。因此, 青藏高原极端生境是发现微生物新资源及微生物药物的重要来源。本研究对前期从青藏高原戈壁土壤中分离得到的一株链霉菌开展了多相分类学鉴定及基因组信

息分析, 以期挖掘潜在活性次级代谢产物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

菌株 Qhu-G9 是前期从青藏高原戈壁生境 (N37°19.855 1', E96°41.454 5') 土壤样品中分离获得, 于 -80 °C 下 20% 甘油保藏。模式菌株 *Streptomyces aurantiacus* ATCC 19822^{T[15]} 和 *Streptomyces dioscori* JCM 32173^{T[16]} 来自中国普通微生物菌种保藏管理中心。

1.1.2 主要试剂和仪器

2.5% 戊二醛固定液、茚三酮、磷钼酸、核糖、木糖、阿拉伯糖、脯氨酸和丝氨酸等, 生工生物工程(上海)股份有限公司; Premix TaqTM, TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司; PCR 引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成; API ZYM 试剂盒, 生物梅里埃公司; 微晶纤维素层析板, 上海盛亚化工有限公司; GF254 硅胶板, 青岛海洋化工有限公司。

场发式扫描电镜, 电子公司; 液相色谱-质谱联用仪 LC-MS, 赛默飞公司; PCR 仪, Eppendorf 公司; 全自动细菌鉴定系统, MIDI 公司; 核酸蛋白提取仪, MP 生物医疗公司。

1.1.3 培养基

参考文献[17]配制 ISP1-ISP7 和 ISP9 碳源利用培养基; 参考文献[18]配制高氏一号培养基、察式培养基和 NA 培养基; TSB 培养基购自 Oxoid 公司; 参考文献[19]配制氮源利用培养基。

1.2 微生物形态观察与鉴定

将菌株 Qhu-G9 划线接种于 ISP1-ISP7、高氏一号、NA 和察式培养基, 28 °C 培养 14 d 进行菌株形态学观察。利用插片法^[20]在 ISP2 培养基上 28 °C 培养 10 d 后于扫描电镜下观察菌株

超微结构; 使用石炭酸染色后于光学显微镜下观察孢子丝形态。

1.3 生理生化特征测定

为测定菌株最适温度、最适 pH、盐度耐受特征, 将 5% Qhu-G9 菌株种子液接种至 TSB 培养基中, 在相应温度(5–40 °C, 5 °C 为一个梯度)下, 180 r/min 培养 7 d; 相应 pH (3.0–12.0) 和氯化钠浓度(0–10%)条件下, 28 °C、180 r/min 培养 7 d; 为探明菌株碳源、氮源利用情况, 将 5% Qhu-G9 菌株种子液接种至 ISP9 碳源利用培养基和氮源利用培养基, 28 °C、180 r/min 培养 7 d。过氧化氢酶、脲酶、纤维素水解、H₂S 产生、淀粉水解等参照《放线菌快速鉴定与系统分类》^[19]测定。按照 API ZYM 试剂盒使用说明进一步检验其理化性质。

1.4 化学分类分析

通过将 5% Qhu-G9 菌株种子液接种至 TSB 培养基 28 °C、180 r/min 培养 7 d, 4 °C、6 000 r/min 离心 10 min 冷冻干燥后获得化学分类所需的菌丝体。化学分类特征鉴定主要参照《放线菌快速鉴定与系统分类》^[19]。参照 Hasegawa 等^[21]使用薄板层析法分析全细胞水解糖和氨基酸成分, 分别称取 50 mg 冻干菌体加入 100 μL 0.5 mol/L HCl 和 100 μL 6 mol/L HCl, 121 °C 水解, 于微晶纤维素层析板上使用乙酸乙酯:吡啶:冰醋酸:水(8:5:1:1.5, 体积比)和甲醇:吡啶:冰醋酸:水(5:0.5:0.125:2.5, 体积比)的展开体系进行层析; 参照 Kroppenstedt 等^[22]分析磷酸类脂成分, 100 mg 冻干菌体研磨后加入 15 mL 甲醇沸水浴 10 min, 冷却后加入 10 mL 三氯甲烷及适量 2% 氯化钠溶液至分层, 有机相于 37 °C 浓缩, 使用三氯甲烷:甲醇(2:1, 体积比)溶液溶解后, 于 GF254 硅胶板上进行双相薄层层析分析(展开体系: 氯仿:甲醇:水体积比为 65:25:4; 氯仿:乙酸:甲醇:水体积比为 80:15:12:4); 参照阮继生等^[19]提取甲基

萼醌化学组分(全程避光), 100 mg 冻干菌体研磨后, 加入 40 mL 三氯甲烷:甲醇体积比为 2:1 溶液, 180 r/min 振荡过夜, 上清液 40 °C 负压旋干, 0.5 mL 丙酮溶解, GF254 硅胶板上正己烷:乙醚体积比为 85:15 展层, 254 nm 紫外光下刮取相对迁移率 $R_f=0.8$ 的暗褐色条带, 加入 0.5 mL 丙酮后, 使用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤后进行 LC-MS/MS 分析。冻干菌体送至中国海洋微生物菌种保藏管理中心, 使用全自动细菌鉴定系统测定极性脂成分。

1.5 分子生物学分析

将 5% Qhu-G9 菌株种子液接种于 TSB 培养基 28 °C、180 r/min 培养 3 d 后, 4 °C、6 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 无菌水清洗 3 次后重悬于 0.5 mL 无菌水中。使用核酸蛋白提取仪在 6.5 M/s、20 s 破碎、20 s 缓冲的条件下提取 DNA; 重复提取 3 次后, 4 °C、12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液作为 PCR 模板。使用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3') 进行 16S rRNA 基因序列的扩增。PCR 反应体系(25 μL): 上、下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL, Premix Taq (0.05 U/μL) 12.5 μL, 模板(56 ng/μL) 2 μL, ddH₂O 9.5 μL。PCR 反应条件: 95 °C 6 min; 95 °C 45 s, 56 °C 45 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物检测后进行测序。所测序列经拼接后与 EzBioCloud 数据库中模式菌株进行比对, 使用 MEGA 7.0 软件用最大似然法(maximum likelihood, ML)构建系统发育树, bootstrap 自展 1 000 次检验系统发育树拓扑结构置信区间。

菌株 Qhu-G9 的基因组测序由北京百迈客生物科技有限公司在 PacBio 测序平台完成。通过软件 Prodigal V2.6.3^[23]进行基因预测, 应用软件 Circos V0.66^[24]绘制基因组圈图。为进一步

分析菌株基因的差异性,进行了数字 DNA-DNA 杂交和平均核苷酸一致性计算分析。通过 GGDC 网站(<https://ggdc.dsmz.de/>)计算其与最相似菌株(Top4)的 dDDH,使用 JSpecies 获得基于成对 BLAST 的 ANI 值^[25]。为挖掘菌株 Qhu-G9 次级代谢产物生产潜力,使用 antiSMASH 在线工具(<https://antismash.secondarymetabolites.org/>)^[26] 预测次级代谢产物生物合成基因簇。

2 结果与分析

2.1 菌株 Qhu-G9 的鉴定

菌株 Qhu-G9 经 16S rRNA 基因扩增和测序,获得序列长度为 1 405 bp,已上传 GenBank,登录号为 OP984809。然后,16S rRNA 基因序列与 EzBioCloud 数据库中的菌株序列进行比对,发现其与链霉菌 *Streptomyces dioscori*

A217^T、*S. aurantiiacus* NBRC 13017^T 和 *S. glomeroaurantiacus* NBRC 15418 相似度较高,均为 99.22%,而与 *S. tauricus* JCM4837^T 相似度为 98.93%。确定最佳模型 Tamura 3-parameter G+I 后,构建最大似然法系统发育树(图 1),结果发现菌株 Qhu-G9 独立成支,且与 *S. dioscori* A217^T、*S. aurantiiacus* NBRC 13017^T 距离最近。以上结果说明 Qhu-G9 属于链霉菌。

2.2 菌株 Qhu-G9 的形态分析

菌株 Qhu-G9 在 ISP1-ISP7 培养基、高氏一号、察式培养基上长势良好(图 2)。其中菌株 Qhu-G9 在 ISP2 培养基培养 7 d 后,菌落边缘整齐,菌落褶皱,产生白色孢子。在 ISP2、ISP3、ISP4 和高氏一号培养基上产生白色孢子,而在 ISP1、ISP2、ISP3、ISP6、ISP7 和 NA 培养基上有褐色色素累积(表 1)。通过超微

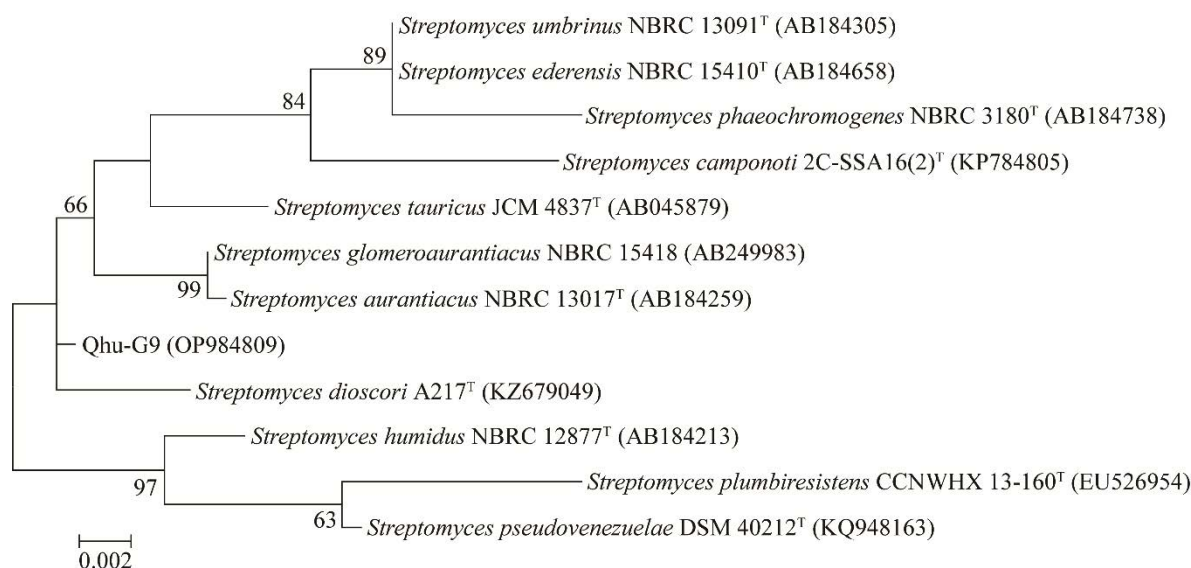


图 1 菌株 Qhu-G9 基于 16S rRNA 基因序列采用 maximum likelihood 方法构建的系统发育树 节点上数字是基于 1 000 次重采样的自展值(仅显示超过 50% 的值);括号中的序列号表示对应菌株的 GenBank 登录号;标尺表示每个核苷酸位点上的 0.002 差异值

Figure 1 The phylogenetic tree constructed using the maximum likelihood method based on the strain Qhu-G9 16S rRNA gene sequence. Numbers at nodes are bootstrap values based on 1 000 re-samplings (only values above 50 % are shown); The sequences number in brackets represent GenBank accession numbers of corresponding strains; Bar, 0.002 changes per nucleotide position.

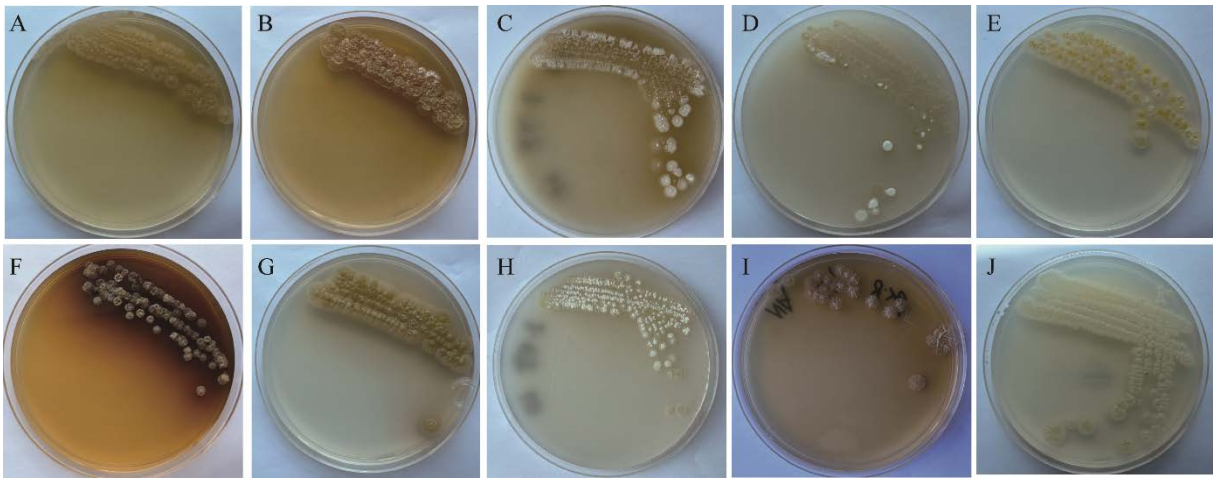


图 2 菌株 Qhu-G9 不同培养基上的形态特征 A-G: ISP1-ISP7 培养基. H: 高氏一号培养基. I: NA 培养基. J: 察氏培养基

Figure 2 Morphological characteristics of strain Qhu-G9 on different media. A-G: ISP1-ISP7 medium. H: Gauze's Medium #1. I: Nutrient agar. J: Czapek's agar.

表 1 菌株 Qhu-G9 的形态特征

Table 1 Morphological characteristics of the strain Qhu-G9

培养基类型 Type of medium	生长情况 Growth	菌落颜色 Colony color	色素累积 Pigment accumulation	孢子产生 Spore production
ISP1	+++	米黄 Beige	褐色 Brownness	—
ISP2	+++	米黄 Beige	褐色 Brownness	白色 White
ISP3	+++	米白 Off-white	褐色 Brownness	白色 White
ISP4	+++	米黄 Beige	—	白色 White
ISP5	+++	米黄 Beige	—	—
ISP6	+++	米黄 Beige	褐色 Brownness	—
ISP7	+++	米黄 Beige	褐色 Brownness	—
高氏一号 Gauze's Medium #1	+++	米白 Beige	—	白色 White
NA Nutrient agar	++	米黄 Beige	褐色 Brownness	—
察式 Czapek's agar	+++	米白 Off-white	—	—

+++：长势良好；++：长势一般；—：未观察到
+++： Grows well; ++: Grows moderate; -: Not observed.

结构观察(图 3A)发现，菌株 Qhu-G9 菌丝体呈丝状圆柱体。经石炭酸染色后(图 3B)，发现菌株孢子丝直链状，孢子呈圆柱形。

2.3 菌株 Qhu-G9 的生理生化特征

耐受性实验表明(表 2)，菌株 Qhu-G9 可以在 10-40 °C 生长，并且最适生长温度为 30 °C；在 0-4% (质量体积分数) NaCl 浓度条件下正常生长,最大 NaCl 耐受浓度 4%;同时菌株 Qhu-G9

能在 pH 5.0-12.0 之间生长，其中 pH 7.0 时状态最好；并且 2 株最相似菌株 *S. aurantiacus* ATCC 19822^T 与 *S. dioscori* JCM 32173^T 也具有相似的生长特性。通过碳源利用实验，发现菌株 Qhu-G9 能够利用 D-甘露醇、鼠李糖、D-半乳糖、肌醇、果糖、山梨醇、乌来糖、甘露糖和葡萄糖，不能利用 D-阿拉伯糖、木糖和核糖；氮源利用方面，该菌可以利用苏氨酸、丙氨酸、脯

氨酸、天冬酰胺、丝氨酸、谷氨酸和甘氨酸维持生长所需,但是不能利用精氨酸和酪氨酸。此外, Qhu-G9 能够产生 H_2S 、水解淀粉,具有脂肪酶活性,但不具有脲酶的活性。API ZYM 检测发现,该菌具有碱性磷酸盐酶、脂酶(C4)、类脂肪酶(C8)、类脂酶(C14)、白氨酸芳胺酶、

缬氨酸芳胺酶、胱氨酸芳胺酶、胰蛋白酶、酸性磷酸酶、萘酚-AS-BI-磷酸水解酶、 α -半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、 α -葡萄糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶、N-乙酰-葡萄糖胺酶和 α -甘露糖苷酶等活性,而胰凝乳蛋白酶、 β -糖醛酸苷酶和 α -岩藻糖苷酶的活性呈阴性。

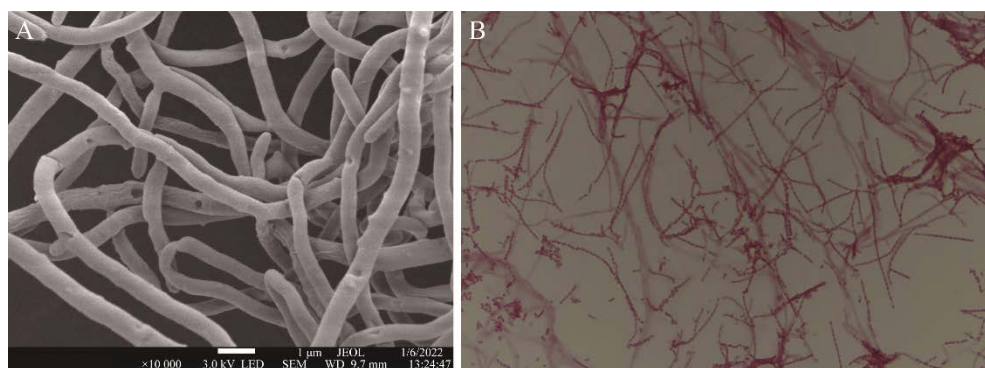


图3 菌株 Qhu-G9 的显微结构 A: 扫描电镜观察. B: 石炭酸染色后的显微镜观察(1 000 \times)

Figure 3 Microstructure of the strain Qhu-G9. A: Scanning electron microscopy. B: Microscopic observation after carbolic acid staining (1 000 \times).

表2 菌株 Qhu-G9 与最相似模式菌株的生理生化特征比较

Table 2 Comparison of the physiological and biochemical characteristics of strain the Qhu-G9 with the most similar model strains

项目 Item	Qhu-G9	<i>S. aurantiacus</i> ATCC 19822 ^T	<i>S. dioscori</i> JCM 32173 ^T
温度 Temperature ($^{\circ}C$)	10–40	10–40	10–40
盐度 Salinity (%)	0–4	0–4	0–6
酸碱度 Pondus hydrogenii	5.0–12.0	5.0–12.0	5.0–12.0
碳源 Carbon sources			
D-甘露醇 D-mannitol	+	+	+
D-阿拉伯糖 D-arabinose	–	–	+
鼠李糖 Rhamnose	+	+	+
D-半乳糖 D-galactose	+	+	+
肌醇 Inositol	+	+	+
果糖 Fructose	+	–	–
山梨醇 Sorbitol	+	+	+
乌来糖 Ulai sugar	+	–	+
甘露糖 Mannose	+	+	+
葡萄糖 Glucose	+	+	+
木糖 Xylose	–	–	+
核糖 Ribose	–	–	+

(待续)

(续表 2)

项目 Item	Qhu-G9	<i>S. aurantiacus</i> ATCC 19822 ^T	<i>S. dioscori</i> JCM 32173 ^T
氮源 Nitrogen source			
苏氨酸 Threonine	+	+	+
丙氨酸 Alanine	+	+	+
脯氨酸 Proline	+	+	+
天冬酰胺 Asparagine	+	+	+
丝氨酸 Serine	+	+	+
精氨酸 Arginine	—	—	+
酪氨酸 Tyrosine	—	—	+
谷氨酸 Glutamic acid	+	+	+
甘氨酸 Glycine	+	+	+
H ₂ S 产生 H ₂ S generation	+	—	—
淀粉水解 Starch hydrolysis	+	+	+
脂肪酶 Lipase			
吐温-20 Tween-20	+	+	+
吐温-60 Tween-60	+	+	+
吐温-80 Tween-80	+	+	+
脲酶 Urease	—	—	+
API ZYM			
碱性磷酸盐酶 Alkaline phosphatase	+	+	+
酯酶 Esterase (C4)	+	+	+
类脂肪酶 Lipase (C8)	+	+	+
类脂酶 Lipase (C14)	+	+	+
白氨酸芳胺酶 Leucine arylaminase	+	+	+
缬氨酸芳胺酶 Valine arylaminase	+	+	+
胱氨酸芳胺酶 Cystine arylaminase	+	+	+
胰蛋白酶 Trypsin	+	+	+
胰凝乳蛋白酶 Chymotrypsin	—	+	+
酸性磷酸酶 Acid phosphatase	+	+	+
萘酚-AS-BI-磷酸水解酶	+	+	+
Naphthophenol-AS-BI-phosphate hydrolase			
α-半乳糖苷酶 α-galactosidase	+	—	+
β-半乳糖苷酶 β-galactosidase	+	+	+
β-糖醛酸苷酶 β-urosidase	—	—	—
α-葡萄糖苷酶 α-glucosidase	+	+	+
β-葡萄糖苷酶 β-glucosidase	+	+	+
N-乙酰-葡萄糖胺酶 N-acetyl-glucosaminease	+	+	+
α-甘露糖苷酶 α-mannosidase	+	+	+
α-岩藻糖苷酶 α-fucosidase	—	—	—

+: 阳性; -: 阴性

+: Positive; -: Negative.

通过与其最相似模式菌株 *S. dioscori* JCM 32173^T 和 *S. aurantiacus* ATCC 19822^T 生理生化特征比较发现, Qhu-G9 菌株在碳源和氮源利用、H₂S 产生、脲酶活性等方面存在一定的差异。在碳源利用方面,除了 *S. dioscori* JCM 32173^T, Qhu-G9 与 *S. aurantiacus* ATCC 19822^T 都不能利用 D-阿拉伯糖、木糖和核糖;3 种链霉菌中,只有 Qhu-G9 能够利用果糖;此外, Qhu-G9 与 *S. dioscori* JCM 32173^T 能够利用乌来糖,而 *S. aurantiacus* ATCC 19822^T 则不能。H₂S 产生方面,在检测 H₂S 产生时,菌株 Qhu-G9 呈阳性,而 *S. dioscori* JCM 32173^T 和 *S. aurantiacus* ATCC 19822^T 呈阴性。脲酶活性方面, Qhu-G9 与 *S. aurantiacus* ATCC 19822^T 脲酶呈阴性,而 *S. dioscori* JCM 32173^T 呈阳性。另外,在其他酶活方面, Qhu-G9 不具有胰凝乳蛋白酶的活性,而相似菌 *S. dioscori* JCM 32173^T 和 *S. aurantiacus* ATCC 19822^T 的检测都显阳性; *S. aurantiacus* ATCC 19822^T 在 α -半乳糖苷酶产生上呈阴性,而 Qhu-G9 与 *S. dioscori* JCM 32173^T 呈阳性。

2.4 菌株 Qhu-G9 的化学分类特征

菌株 Qhu-G9 全细胞水解物 TLC 分析发现,其全细胞水解糖为葡萄糖和半乳糖,氨基酸为 LL-2,6 二氨基庚二酸[(2S,6S)-2,6-diaminoheptanedioic acid, LL-DAP]。基于 LC-MS 测定菌株 Qhu-G9 异戊烯醌种类(图 4),发现分子离子峰[M+H]⁺ 为 793,同时其二级质谱图含有 $m/z=187$ (甲基萘醌)的特征碎片离子峰,因此判定其为 MK-9 (H₈)。使用双相薄层层析分析磷酸类脂(图 5),主要包括茛三酮染色呈红色、茴香醛染色呈蓝色、钼磷酸染色呈蓝色的磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE);茴香醛染色呈绿色的磷脂酰甲基肌醇(phosphatidylinositol mannosides, PIM);茴香醛染色呈蓝色、钼磷酸染色呈蓝色的磷脂酰肌醇(phosphatidyl inositol, PI);钼磷酸染色呈蓝色的磷脂酰甲基乙醇胺(phosphatidylmethyl ethanolamine, PME);茴香醛染色呈蓝色、钼磷酸染色呈蓝色的磷脂酸甘油(phosphatidyl glycerol, DPG)和钼磷酸染色呈蓝色的 3 个未知磷酸(L1、L2 和 L3)。菌株的极性脂成分鉴定(表 3)中含有 C_{16:0}

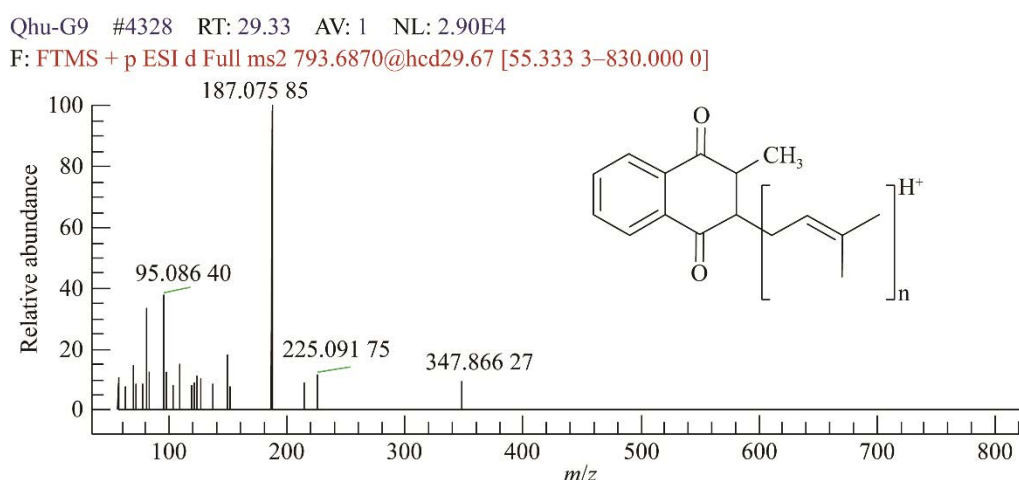


图 4 菌株 Qhu-G9 甲基萘醌二级质谱图

Figure 4 The secondary mass spectra of menaquinone in the strain Qhu-G9.

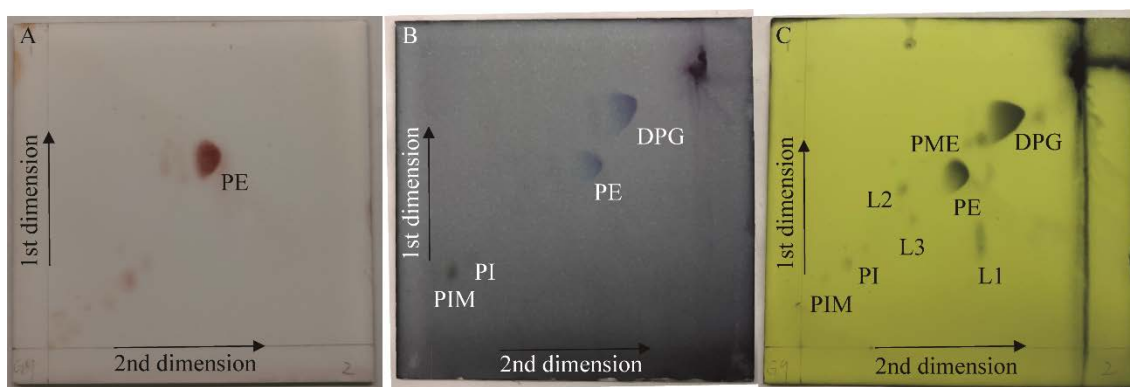


图5 菌株 Qhu-G9 磷酸类脂成分分析 A: 茚三酮染色. B: 茴香醛染色. C: 钼磷酸染色

Figure 5 Analyses of phosphate lipids in the strain Qhu-G9. A: Ninhydrin staining. B: Anisaldehyde staining. C: Molybdenum phosphate staining.

(10.12%)、iso-C_{14:0} (5.65%)、Antieiso-C_{15:0} (19.72%)、Antieiso-C_{17:0} (5.83%)、C_{16:1ω7c} (5.37%)等, 其中 C_{16:0} (10.12%)与 Antieiso-C_{15:0} (19.72%)相对含量均较高, 与相似菌株呈现相似特征。

2.5 菌株 Qhu-G9 的分子生物学特征

为进一步从分子生物学的角度来鉴定菌株

表3 菌株 Qhu-G9 与最相似模式菌株极性脂比较
Table 3 Comparison of polar lipids between the strain Qhu-G9 and the most similar type strains

Fatty acid	Qhu-G9	<i>S. aurantiacus</i> ATCC 19822 ^T	<i>S. dioscori</i> JCM 32173 ^T
C _{13:0}	0.07	0.1	0.2
C _{14:0}	0.92	3.5	0.4
C _{15:0}	—	10.5	15.9
C _{16:0}	10.12	40.5	36.4
C _{17:0}	0.79	3.7	2.6
C _{18:0}	0.34	3.6	1.4
Iso-C _{14:0}	5.65	—	7.9
Iso-C _{18:0}	0.08	0.2	—
Anteiso-C _{13:0}	0.18	0.2	0.1
Antieiso-C _{15:0}	19.72	13.5	20.4
Antieiso-C _{17:0}	5.83	7.5	4.6
C _{16:1ω7c}	5.37	7.0	5.1
C _{18:1ω8c}	0.17	0.9	0.3
C _{17:0} cyclo ω7c	—	8.0	1.5
Iso-C _{17:1ω5c}	—	—	3.1

—: 未检测出

—: Not detected.

Qhu-G9 的分类学地位, 本研究对 Qhu-G9 进行了 PacBio 全基因组测序。通过生物信息学分析, 菌株 Qhu-G9 基因组大小为 9.90 Mb, GC 含量为 70.54%, 由 2 个 Scaffold 组成。其中 Scaffold 1 是染色体基因, 长度为 9 539 225 bp, Scaffold 2 为质粒基因, 其大小为 359 958 bp, 测序数据已上传 GenBank (登录号为 CP114282 和 CP114283)。通过 Prodigal V2.6.3 软件预测到的编码基因共 8 727 个, 总长度为 8 510 325 bp, 占基因组的 85.97% (图 6)。

为进一步分析菌株基因的差异性, 进行了数字 DNA-DNA 杂交(dDDH)和平均核苷酸一致性(ANI)计算分析, 发现菌株 Qhu-G9 与最相似菌株 *S. aurantiacus* NBRC 13017^T 的 dDDH 值与 ANI 值最高, 分别为 36.50%和 88.21% (表 4), 均低于 dDDH 与 ANI 判别新菌的阈值 70%^[27]和 95%^[28], 由此进一步说明菌株 Qhu-G9 为一株链霉菌属新种。

2.6 菌株 Qhu-G9 的次级代谢产物生物合成潜力分析

本研究通过 antiSMASH 在线工具分析了链霉菌 Qhu-G9 的次级代谢产物生物合成能力, 在其基因组中共预测到 31 个次级代谢生物合

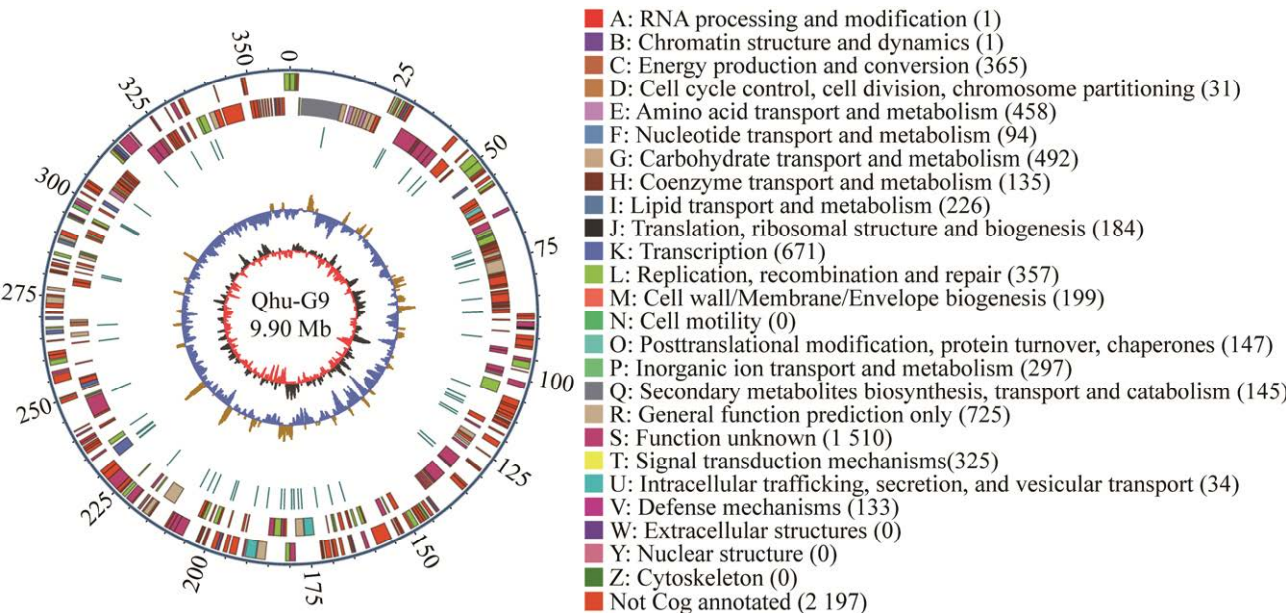


图 6 菌株 Qhu-G9 基因组图谱
Figure 6 The genome map of the strain Qhu-G9.

成基因簇(表 5), 其中 I 型和 III 型聚酮类化合物(T1PKS 和 T3PKS)数量最多, 总共 7 个; 非核糖体多肽及其类似物(NRPS、NRPS-like)和萜类化合物(terpene)生物合成基因簇均为 5 个, 铁载体(siderophore)生物合成基因簇 4 个, 另外还存在 I 型羊毛硫肽类化合物(lanthipeptide-class-I)

表 4 菌株 Qhu-G9 与最相似模式菌株分子生物学特征比较

Table 4 Comparison of the molecular characteristics between the strain Qhu-G9 and the most similar type strains

Most similar strains	16S rRNA gene similarity (%)	dDDH value (%)	ANI value (%)
<i>Streptomyces glomeroaurantiacus</i> NBRC 15418	99.22	36.20	88.12
<i>Streptomyces dioscori</i> A217 ^T	99.22	34.40	87.48
<i>Streptomyces aurantiiacus</i> NBRC 13017 ^T	99.22	36.50	88.21
<i>Streptomyces tauricus</i> JCM4837 ^T	98.93	35.10	87.89

生物合成基因簇 1 个。次级代谢产物生物合成基因簇 4、16、18、21、26 和 29 与已知次级代谢产物编码基因具有 100%的相似度, 说明其具有产生这些已知次级代谢产物如 ectoine、isorenieratene、informatipeptin 等的能力; 而生物合成基因簇 2、10 和 22 与已知次级代谢产物生物合成基因簇具有较高相似性(>50%), 表明菌株 Qhu-G9 可能具有编码铁载体 desferrioxamin、抗生素 teichomycin 及萜类物质 hopene 类似结构的能力。除此之外, 其余生物合成基因簇在现有的数据库中未被注释, 或者与已知天然产物生物合成基因簇的相似度极低, 说明该菌具有合成大量未知天然产物的潜力, 同时也是活性分子的重要来源。

3 讨论与结论

本研究从青藏高原戈壁生境土壤样品中分离出一株链霉菌 Qhu-G9, 并使用多相分类学的方法确定了 Qhu-G9 的分类地位。化学成分显

表 5 菌株 Qhu-G9 基因组中次级代谢物生物合成基因簇的预测

Table 5 Prediction of biosynthetic gene clusters encoding secondary metabolites in the Qhu-G9 genome

Cluster No.	Type	Position/Length	Most similar known cluster	Similarity (%)
Cluster 1	NRPS-like	S1/40 712	/	/
Cluster 2	Siderophore	S1/10 709	Desferrioxamin B/ Desferrioxamin E	83
Cluster 3	Melanin	S1/7 758	Istamycin	5
Cluster 4	Ectoine	S1/10 404	Ectoine	100
Cluster 5	NAPAA	S1/33 452	/	/
Cluster 6	T3PKS	S1/40 698	Polyketide	8
Cluster 7	Siderophore	S1/10 538	/	/
Cluster 8	Melanin	S1/10 356	Melanin	28
Cluster 9	Ladderane	S1/41 343	Colabomycin E	13
Cluster 10	Phosphoglycolipid	S1/28 750	Teichomycin	77
Cluster 11	T3PKS, thiopeptide	S1/81 795	Granaticin	13
Cluster 12	NRPS-like, butyrolactone, NRPS	S1/67 141	Kutznerde 2	20
Cluster 13	T3PKS	S1/41 100	Furaquinocin B	8
Cluster 14	T1PKS	S1/43 693	A54145	3
Cluster 15	T1PKS	S1/45 185	Goadsporin	12
Cluster 16	Terpene	S1/25 204	Isorenieratene	100
Cluster 17	NRPS, T1PKS	S1/51 578	Neocarzinostatin	6
Cluster 18	Lanthipeptide-class-iii, iPP-like	S1/26 376	Informatipeptin	100
Cluster 19	T1PKS, terpene	S1/43 244	Cyphomycin	2
Cluster 20	Terpene	S1/19 055	A54145	5
Cluster 21	NRPS	S1/58 899	Scabichelin	100
Cluster 22	Terpene	S1/59 075	Hopene	92
Cluster 23	T1PKS, NRPS-like	S1/48 540	Kanamycin	46
Cluster 24	Siderophore	S1/11 743	Grincamycin	8
Cluster 25	NAPAA	S1/34 895	Stenothricin	13
Cluster 26	Terpene	S1/20 936	Geosmin	100
Cluster 27	RiPP-like	S1/11 322	/	/
Cluster 28	Siderophore	S1/15 132	/	/
Cluster 29	Terpene	S1/21 085	Albaflavenone	100
Cluster 30	Other, phosphonate, NRPS, T1PKS	S2/37 883	Phosphinothricintripeptide	6
Cluster 31	Lanthipeptide-class-i	S2/21 942	/	/

S: Scaffold; /: 未注释

S: Scaffold; /: Not annotated.

示, 菌株 Qhu-G9 全细胞水解糖为葡萄糖、半乳糖, 氨基酸为 LL-DAP, 极性脂主要含有 C_{16:0}、iso-C_{14:0}、Antieiso-C_{15:0}、Antieiso-C_{17:0}、C_{16:1ω7c} 等, 磷酸类脂主要包括 PE、PIM、PI、PME、DPG 和 3 个未知磷酸(L1、L2 和 L3),

甲基萘醌为 MK9 (H8)。另外, 结合形态观察和生理生化特征来看, 菌株 Qhu-G9 与具有高 GC 含量、LL-DAP 及全细胞水解物中无特征糖的链霉菌属^[29-30]较为一致, 并且 16S rRNA 基因测序分析和系统发育树的构建也进一步证实该菌

株属于链霉菌属。通过 16S rRNA 基因序列分析,发现 Qhu-G9 与链霉菌 *S. glomeroaurantiacus* NBRC 15418、*S. dioscori* A217^T、*S. aurantiiacus* NBRC 13017^T 相似度较高,均为 99.22%,但是 Qhu-G9 在系统发育树上呈现独立一支,可能是由于 16S rRNA 基因多拷贝的异质性或水平基因转移等原因所导致^[31-32],类似现象在很多其他链霉菌新种鉴定如 *S. cyaneochromogenes* MK-45^{T[33]}、*S. septentrionalis* ZLN712^{T[34]} 和 *S. lacrimifluminis* Z1027^{T[11]} 中也存在。当 16S rRNA 基因序列相似度高于 98.65% 时,往往通过全基因组序列分析来进一步判断是否为新种^[35]。在本研究中,Qhu-G9 全基因组与相似菌 *S. aurantiiacus* NBRC 13017^T 的 dDDH 与 ANI 值最高,分别为 36.50% 和 88.21%,均低于判别新种与否的阈值^[27-28],进一步确定 Qhu-G9 为一个链霉菌新种。基于以上多相分类数据,将菌株 Qhu-G9 命名为 *Streptomyces haixigobicum* Qhu-G9 (hai.xi.gobi.cum. Gr. pref. *haixi*, location; Gr. n. *gobi*, habit; L. fem. suff. -cum, adjectival suffix used with the sense of belonging to; N. L. neut. Adj. *haixigobicum*, pertaining to Gobi habitat in Haixi, Qinghai Province, China, where the novel strain was first isolated)。

通过基因组分析,发现链霉菌 Qhu-G9 编码 8 727 个基因,占基因组大小的 85.97%。相对较大的基因组数据与编码基因数量,预示着该菌具有较强的次级代谢产物合成潜力,而且 antiSMASH 分析也预测了该菌具有很强的编码天然产物如 desferrioxamin、ectoine、scabichelin 等的潜力。Desferrioxamin B 作为急性铁中毒的急救药,1968 年被美国食品和药物管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准用于临床^[36]。依克多因(ectooin)最早发现于埃及盐湖嗜盐菌,是一种天然的保护分子,通常来自极端栖息地的细菌。保护蛋白质和生物膜免受极端环境条

件造成的损害,广泛用于酶、医学、化妆工业等领域^[37]。最近的研究表明,ectoine 是过敏性鼻炎、结膜炎和眼表炎症刺激患者的有效替代品^[38-39]。Isorenieratene 具有特殊的芳香结构,是一种天然活性抗氧化剂和紫外线光损伤抑制剂^[40]。从 *Rhodococcus* sp. B7740 中提取的 isorenieratene 对单线态氧和羟基自由基均表现出优异的清除能力^[41]。此外,scabichelin 具有显著的抗菌作用^[42],不仅能被多种链霉菌合成,同时其作为种群信号分子,可以影响孢子疏水包膜的渗透性,从而加速孢子萌发^[43]。这些研究表明,链霉菌 Qhu-G9 具有较大的开发价值和应用前景。综上所述,通过多相分类学鉴定后,菌株 Qhu-G9 基因型和表型数据显示其为链霉菌新种。同时预测到 31 个次级代谢基因簇,其中近 20% 基因簇无已知最相似基因簇,预示着菌株 Qhu-G9 在挖掘新型次级代谢产物方面有较大潜力。

REFERENCES

- [1] WAKSMAN SA, HENRICI AT. The nomenclature and classification of the actinomycetes[J]. Journal of Bacteriology, 1943, 46(4): 337-341.
- [2] KAMENNAYA NA, GRAY J, ITO S, KAINUMA M, NGUYEN MV, KHILYAS IV, BIRARDA G, BERNIE F, HUNT M, VASADIA D, LIN J, HOLMAN HY, TOROK T, COHEN MF. Deconstruction of plant biomass by a *Cellulomonas* strain isolated from an ultra-basic (lignin-stripping) spring[J]. Archives of Microbiology, 2020, 202(5): 1077-1084.
- [3] AMEEN F, ALNADHARI S, AL-HOMIDAN AA. Marine microorganisms as an untapped source of bioactive compounds[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2021, 28(1): 224-231.
- [4] NEWMAN DJ, CRAGG GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010[J]. Journal of Natural Products, 2012, 75(3): 311-335.
- [5] WORTHEN DB. *Streptomyces* in nature and medicine: the antibiotic makers[J]. Journal of the History of Medicine and Allied Sciences, 2008, 63(2): 273-274.

- [6] BÉRDY J. Bioactive microbial metabolites[J]. The Journal of Antibiotics, 2005, 58(1): 1-26.
- [7] JAKUBIEC-KRZESNIAK K, RAJNISZ-MATEUSIAK A, GUSPIEL A, ZIEMSKA J, SOLECKA J. Secondary metabolites of actinomycetes and their antibacterial, antifungal and antiviral properties[J]. Polish Journal of Microbiology, 2018, 67(3): 259-272.
- [8] BUSTI E, MONCIARDINI P, CVALETTI L, BAMONTE R, LAZZARINI A, SOSIO M, DONADIO S. Antibiotic-producing ability by representatives of a newly discovered lineage of actinomycetes[J]. Microbiology (Reading, England), 2006, 152(Pt 3): 675-683.
- [9] MYERS N, MITTERMEIER RA, MITTERMEIER CG, da FONSECA GAB, KENT J. Biodiversity hotspots for conservation priorities[J]. Nature, 2000, 403(6772): 853-858.
- [10] LI JY, WANG LW, YE ZM, LU LC, LI YM. *Streptomyces tibetensis* sp. nov., an actinomycete isolated from the Tibetan Plateau[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2020, 113(1): 33-41.
- [11] ZHANG BL, TANG SK, CHEN XM, ZHANG L, ZHANG GS, ZHANG W, LIU GX, CHEN T, LI SW, DYSON P. *Streptomyces lacrimifluminis* sp. nov., a novel actinobacterium that produces antibacterial compounds, isolated from soil[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, 66(12): 4981-4986.
- [12] ZHANG BL, TANG SK, YANG RQ, CHEN XM, ZHANG DM, ZHANG W, LI SW, CHEN T, LIU GX, DYSON P. *Streptomyces dangxiongensis* sp. nov., isolated from soil of Qinghai-Tibet Plateau[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2019, 69(9): 2729-2734.
- [13] 黄青兰, 袁文婧, 庄原, 罗清, 彭程, 叶波平. 一株青藏高原来源的链霉菌菌株鉴定及其抑菌活性的初步分析[J]. 药物生物技术, 2016, 23(4): 308-312.
HUANG QL, YUAN WJ, ZHUANG Y, LUO Q, PENG C, YE BP. Identification of a *Streptomyces* strain isolated from Qinghai-Tibet Plateau and its antibacterial activity[J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2016, 23(4): 308-312 (in Chinese).
- [14] HE H, HAO X, ZHOU W, SHI N, FENG J, HAN L. Identification of antimicrobial metabolites produced by a potential biocontrol Actinomycete strain A217[J]. Journal of Applied Microbiology, 2020, 128(4): 1143-1152.
- [15] DORIA RT. Su di alcune specie di “Streptothrix” trovate nell’aria studate in rapporto a quelle già note a specialmente all’ “Actinomyces”[J]. Annali dell’Istituto d’Igiene Sperimentale, Università Roma, 1891, 1: 399-438.
- [16] WANG ZK, TIAN JW, LI XG, GAN LZ, HE LL, CHU YW, TIAN YQ. *Streptomyces dioscori* sp. nov., a novel endophytic actinobacterium isolated from bulbil of *Dioscorea bulbifera* L.[J]. Current Microbiology, 2018, 75(10): 1384-1390.
- [17] SHIRLING EB, GOTTLIEB D. Methods for characterization of *Streptomyces* species[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1966, 16(3): 313-340.
- [18] 瞿佳, 门欣, 陈锐, 孙晓宇, 赵玲侠, 宁硕瀛. 核桃黑斑病拮抗放线菌 WMF106 的筛选、鉴定及防效[J]. 微生物学通报, 2021, 48(10): 3621-3631.
QU J, MEN X, CHEN R, SUN XY, ZHAO LX, NING SY. Screening, identification and biocontrol effect of antagonistic actinomycete WMF106 against walnut blight[J]. Microbiology China, 2021, 48(10): 3621-3631 (in Chinese).
- [19] 阮继生, 黄英. 放线菌快速鉴定与系统分类[M]. 北京: 科学出版社, 2011.
RUAN JS, HUANG Y. Rapid Identification and Systematics of *Actinobacteria*[M]. Beijing: Science Press, 2011 (in Chinese).
- [20] 姜朝瑞, 阮继生. 小瓶菌属的两个新种和一个新变种[J]. 微生物学报, 1982, 22(3): 207-211, 294, 300.
JIANG CR, RUAN JS. Two new species and a new variety of *Ampullariella*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 1982, 22(3): 207-211, 294, 300 (in Chinese).
- [21] HASEGAWA T, TAKIZAWA M, TANIDA S. A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes[J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 1983, 29(4): 319-322.
- [22] KROPPESTEDT RM. Separation of bacterial menaquinones by HPLC using reverse phase (RP18) and a silver loaded ion exchanger as stationary phases[J]. Journal of Liquid Chromatography, 1982, 5(12): 2359-2367.
- [23] HYATT D, CHEN GL, LOCASCIO PF, LAND ML, LARIMER FW, HAUSER LJ. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification[J]. BMC Bioinformatics, 2010, 11: 119.
- [24] KRZYWINSKI M, SCHEIN J, BIROL I, CONNORS J, GASCOYNE R, HORSMAN D, JONES SJ, MARRA MA. Circos: an information aesthetic for comparative genomics[J]. Genome Research, 2009, 19(9): 1639-1645.
- [25] RICHTER M, ROSSELLÓ-MÓRA R, OLIVER

- GLÖCKNER F, PEPLIES J. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison[J]. *Bioinformatics*, 2016, 32(6): 929-931.
- [26] BLIN K, SHAW S, KLOOSTERMAN AM, CHARLOP-POWERS Z, van WEZEL GP, MEDEMA MH, WEBER T. antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(W1): W29-W35.
- [27] 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(Pt 1): 81-91.
- [28] JAIN C, RODRIGUEZ-R LM, PHILLIPPY AM, KONSTANTINIDIS KT, ALURU S. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 5114.
- [29] ANDERSON AS, WELLINGTON EM. The taxonomy of *Streptomyces* and related Genera[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, 51(Pt 3): 797-814.
- [30] 阮继生. “伯杰氏系统细菌学手册(第二版)”第5卷与我国的放线菌系统学研究[J]. *微生物学报*, 2013, 53(6): 521-530.
- RUAN JS. Bergey's manual of systematic bacteriology (second edition) volume 5 and the study of actinomycetes systematic in China[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(6): 521-530 (in Chinese).
- [31] CHOI IG, KIM SH. Global extent of horizontal gene transfer[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(11): 4489-4494.
- [32] WANG Y, ZHANG Z, RAMANAN N. The actinomycete *Thermobispora bispora* contains two distinct types of transcriptionally active 16S rRNA genes[J]. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(10): 3270-3276.
- [33] TANG XK, ZHAO JR, LI KQ, CHEN Z, SUN YD, GAO J. *Streptomyces cyaneochromogenes* sp. nov., a blue pigment-producing actinomycete from manganese-contaminated soil[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2019, 69(8): 2202-2207.
- [34] KAMJAM M, NOPNAKORN P, ZHANG L, PENG F, DENG ZX, HONG K. *Streptomyces polaris* sp. nov. and *Streptomyces septentrionalis* sp. nov, isolated from frozen soil[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2019, 112(3): 375-387.
- [35] 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(Pt 2): 346-351.
- [36] HELI H, MIRTORABI S, KARIMIAN K. Advances in iron chelation: an update[J]. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 2011, 21(6): 819-856.
- [37] 周洋, 张学俊, 王红, 钟锐, 贺曾, 韩玓玓, 厉保秋, 刘嘉馨. 四氢嘧啶对人冰冻红细胞质量影响的初步研究[J]. *中国输血杂志*, 2017, 30(3): 271-275.
- ZHOU Y, ZHANG XJ, WANG H, ZHONG R, HE Z, HAN DD, LI BQ, LIU JX. The study of the effects of by adding ectoine into the cryoprotectants of human red cells[J]. *Chinese Journal of Blood Transfusion*, 2017, 30(3): 271-275 (in Chinese).
- [38] BILSTEIN A, HEINRICH A, RYBACHUK A, MÖSGES R. Ectoine in the treatment of irritations and inflammations of the eye surface[J]. *BioMed Research International*, 2021, 2021: 8885032.
- [39] BILSTEIN A, WERKHÄUSER N, RYBACHUK A, MÖSGES R. The effectiveness of the bacteria derived extremolyte ectoine for the treatment of allergic rhinitis[J]. *BioMed Research International*, 2021, 2021: 5562623.
- [40] CHEN YS, ZHOU YF, CHEN M, XIE BJ, YANG JF, CHEN JG, SUN ZD. Isorenieratene interaction with human serum albumin: multi-spectroscopic analyses and docking simulation[J]. *Food Chemistry*, 2018, 258: 393-399.
- [41] CHEN YS, GUO MY, YANG JF, CHEN JG, XIE BJ, SUN ZD. Potential TSPO ligand and photooxidation quencher isorenieratene from Arctic Ocean *Rhodococcus* sp. B7740[J]. *Marine Drugs*, 2019, 17(6): 316.
- [42] GÜRTLER H, PEDERSEN R, ANTHONI U, CHRISTOPHERSEN C, NIELSEN PH, WELLINGTON EM, PEDERSEN C, BOCK K. Albaflavenone, a sesquiterpene ketone with a zizaene skeleton produced by a streptomycete with a new rope morphology[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1994, 47(4): 434-439.
- [43] ČIHÁK M, KAMENÍK Z, ŠMÍDOVÁ K, BERGMAN N, BENADA O, KOFRŇOVÁ O, PETŘÍČKOVÁ K, BOBEK J. Secondary metabolites produced during the germination of *Streptomyces coelicolor*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2495.