



湛江高桥红树林沉积物放线菌多样性及其中一株链霉菌产生的 germicidins 类化合物的鉴定

赵梦冉^{1,2}, 王璐^{1,2}, 叶伟霞³, 张文军^{1,2}, 张庆波^{1,2}, 马亮¹, 张丽萍¹, 张长生^{1,2}, 杨春芳^{1,2*}

- 1 中国科学院南海海洋研究所, 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室, 中国科学院海洋微生物研究中心, 广东省海洋药物重点实验室, 广东 广州 510301
- 2 中国科学院大学, 北京 100049
- 3 暨南大学药学院, 中药与天然药物研究所, 广东 广州 510632

赵梦冉, 王璐, 叶伟霞, 张文军, 张庆波, 马亮, 张丽萍, 张长生, 杨春芳. 湛江高桥红树林沉积物放线菌多样性及其中一株链霉菌产生的 germicidins 类化合物的鉴定. 微生物学报, 2022, 62(5): 1740–1753.

Zhao Mengran, Wang Lu, Ye Weixia, Zhang Wenjun, Zhang Qingbo, Ma Liang, Zhang Liping, Zhang Changsheng, Yang Chunfang. Diversity of actinobacteria from mangrove sediment in Gaoqiao, Zhanjiang and identification of germicidins from one strain of *Streptomyces*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(5): 1740–1753.

摘要: 【目的】从 3 种红树林植物根际沉积物中分离和鉴定放线菌, 进行抑菌活性初筛获得目标菌株并研究其次级代谢产物。【方法】使用 5 种培养基对红树林植物根际沉积物放线菌进行分离, 采用 16S rRNA 基因序列比对的方法研究沉积物中的放线菌多样性, 结合抑菌活性筛选获得目标菌株后进行大规模发酵和分离鉴定次级代谢产物, 根据生物合成基因簇定位和分析对化合物的生物合成途径进行推导。【结果】从 3 种红树林植物根际沉积物中分离得到放线菌 49 株, 包括链霉菌属(*Streptomyces*) 31 株、小单孢菌属(*Micromonospora*) 14 株、小双孢菌属(*Microbispora*)、链孢子囊菌属(*Streptosporangium*)、野野村氏菌属(*Nonomuraea*)和糖单孢菌属(*Saccharomonospora*)各 1 株。获得粗浸膏抑菌活性较好的菌株 *Streptomyces* sp. SCSIO 40067, 从

基金项目: 广州市科技计划(202102020471); 国家自然科学基金(31820103003, 31700042); 国家重点研发计划(2019YFC0312503); 海南省重大科技计划(ZDKJ202018)

Supported by the Science and Technology Planning Project of Guangzhou (202102020471), by the National Natural Science Foundation of China (31820103003, 31700042), by the National Key Research and Development Program of China (2019YFC0312503) and by the Key Science and Technology Project of Hainan Province (ZDKJ202018)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-20-89022736; E-mail: yangchunfang@scsio.ac.cn

Received: 5 September 2021; Revised: 11 November 2021; Published online: 23 February 2022

中分离鉴定了 6 个 α -吡喃酮类化合物: germicidin A–C、germicidin I 和 isogermicidin A–B, 并首次报道了 germicidin A 的晶体结构。从菌株 SCSIO 40067 基因组中定位到了 germicidins 的 III 型聚酮合酶生物合成基因簇, 结合文献对 6 个 germicidins 类化合物的生物合成途径进行了推导。

【结论】湛江高桥红树林根际沉积物中的放线菌具有多样性, 包含潜在的新物种和天然产物资源。菌株 *Streptomyces* sp. SCSIO 40067 具有 α -吡喃酮类化合物的生产潜力。上述研究为后续工作提供了良好的实验材料。

关键词: 红树林; 放线菌; α -吡喃酮; III 型聚酮合酶

Diversity of actinobacteria from mangrove sediment in Gaoqiao, Zhanjiang and identification of germicidins from one strain of *Streptomyces*

ZHAO Mengran^{1,2}, WANG Lu^{1,2}, YE Weixia³, ZHANG Wenjun^{1,2}, ZHANG Qingbo^{1,2}, MA Liang¹, ZHANG Liping¹, ZHANG Changsheng^{1,2}, YANG Chunfang^{1,2*}

1 Guangdong Key Laboratory of Marine Materia Medica, RNAM Center for Marine Microbiology, Key Laboratory of Tropical Marine Bio-Resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, Guangdong, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3 Institute of Traditional Chinese Medicine and Natural Products, College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong, China

Abstract: [Objective] The present work aims to isolate and identify actinobacteria from rhizosphere sediments of 3 mangrove plants and to investigate the target strain for secondary metabolites based on antibacterial activities. **[Methods]** Five media were used to isolate actinobacteria from rhizosphere sediments of mangrove plants in Gaoqiao, Zhanjiang. The isolates were identified based on 16S rRNA genes and then screened for antibacterial activities against 6 indicator strains. The target strain was selected for upscaled fermentation and identification of bioactive compounds. We then analyzed the biosynthetic gene cluster of the isolated compounds to predict the biosynthetic pathways. **[Results]** A total of 49 actinobacterial strains were isolated and categorized into 6 genera including *Streptomyces* (31 strains), *Micromonospora* (14 strains), *Microbispora* (1 strain), *Streptosporangium* (1 strain), *Nonomuraea* (1 strain), and *Saccharomonospora* (1 strain). Six α -pyrones, including germicidins A–C, germicidin I, and isogermicidins A–B, were separated from the crude extract of *Streptomyces* sp. SCSIO 40067 and identified. The crystal structure of germicidin A was reported for the first time. The type III polyketide synthase biosynthetic gene cluster of α -pyrones was localized in the SCSIO 40067 genome by bioinformatics analysis. The biosynthetic pathway of α -pyrones was then proposed. **[Conclusion]** Actinobacteria in the rhizosphere sediment of mangrove plants in Gaoqiao, Zhanjiang had high species diversity, from which new species capable of producing valuable natural products can be mined. *Streptomyces* sp. SCSIO 40067 can produce α -pyrones via the type III polyketide synthase pathway, which can serve as a start strain for the following studies.

Keywords: mangrove; actinobacteria; α -pyrones; type III polyketide synthase

天然产物及其衍生物是新药开发的重要源泉^[1]。微生物次级代谢产物是天然产物的重要组成部分,然而随着陆地微生物资源的过度开发,从中发现新菌和新天然产物的概率大大降低,因此从海洋、沙漠以及红树林等特殊生境中发掘微生物资源以寻找活性天然产物显得尤为重要^[2]。红树林是热带和亚热带沿海地区的海岸潮间带特有的木本植物群落^[3]。目前全球红树林主要分布在亚洲,约占总面积的42%^[4],高温、强光、高盐、低氧、潮汐渐变和富含有机质的特殊生态环境赋予红树林微生物群落的种类多样性及生理代谢途径的独特性^[5]。Chen等的研究表明红树林演替过程中的微生物群落变化取决于营养量和微生境异质性^[6]。经过数十年的研究,从红树林不同生境中所分离鉴定的放线菌被认为是新活性天然产物发现的巨大宝藏^[3,7]。Sangkanu等认为红树林来源的放线菌是生产抗菌、抗肿瘤生物活性代谢产物的优质资源^[5,8-9],例如,Ding等从红树林植物木槿的内生放线菌 *Streptomyces* sp. GT2002/1503 中获得 2 个新的吡啶倍半萜类化合物 xiamycin 及其甲基化酯,生物活性研究发现 xiamycin 具有中等程度的抗 HIV 活性^[10];Fu 等从三亚红树林土壤来源放线菌 *Streptomyces* sp. FMA 中分离鉴定了 2 个具有抗肿瘤细胞毒活性的吡啶唑生物碱 streptocarbazoles A 和 B^[11];Hong K 课题组先后通过 OSMAC 策略、基因组挖掘和代谢流阻断的方法从红树林源链霉菌 *Streptomyces qinglanensis* 172205 中分离鉴定了已知的聚酮类化合物 enterocin 和 5 个新化合物,其中化合物 dehydroxantholipin 对金黄色葡萄球菌和白色念珠菌具有较强的抑制活性,对人乳腺癌细胞(MCF-7)和宫颈癌细胞(Hela)显示中等程度的抗增殖活性^[9,12]。

本研究报道了湛江高桥红树林沉积物中放

线菌的分离鉴定,从沉积物样品来源和分离培养基种类方面初步探讨了红树林沉积物中可培养放线菌的多样性;结合初步的抑菌活性筛选,挑选 *Streptomyces* sp. SCSIO 40067 为目标菌株进行随后的次级代谢产物研究,从中分离鉴定了 6 个 α -吡喃酮类化合物,定位了与该类化合物生物合成相关的 III 型聚酮合酶基因簇并推导其生物合成途径。本研究增加了红树林放线菌资源的多样性,为后续其他活性次级代谢产物的分离鉴定奠定了基础,拓展了 germicidins 类化合物的生产菌株来源,为该类化合物的生物合成研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集

用于分菌的样品采集于广东省湛江高桥红树林自然保护区(109.759 5°E, 21.567 6°N)的 3 种植物根际沉积物,3 种红树林植物分别是:拉关木、海桑和秋茄。样品呈灰棕色淤泥状,将采集的样品装在样品袋中并于-20 °C 保存。

1.1.2 培养基

(1) 分离培养基。G1 (高氏 1 号)培养基(g/L): 可溶性淀粉 20, KNO₃ 1, K₂HPO₄ 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.5, NaCl 0.5, FeSO₄·7H₂O 0.01。G2 (高氏 2 号)改良培养基^[13] (g/L): 葡萄糖 1, 蛋白胨 0.5, 胰蛋白胨 0.3, NaCl 0.5, 复合维生素 500 μ L/L。38[#]培养基(g/L): 酵母提取物 4, 葡萄糖 4, 麦芽浸膏 10, 复合维生素 500 μ L/L。GYEA (葡萄糖-酵母浸膏)培养基^[14] (g/L): 酵母提取物 1, 葡萄糖 10。Proline (脯氨酸)培养基(g/L): 脯氨酸 5。以上培养基分别加入 20 g 的琼脂粉和 15 g 的海盐,加水定容至 1 L,调 pH 7.2-7.4,使用前加入 nystatin 50 μ g/mL。

(2) 发酵培养基。N4 培养基(g/L): 可溶性

淀粉 15, 鱼蛋白胨 8, 蛋白胨 5, 玉米粉 8, 甘油 6, CaCO_3 2。Am6-1 培养基(g/L): 可溶性淀粉 20, 甘油 10, 酵母提取粉 5, CaCO_3 5。ZWJ-1 培养基(g/L): 可溶性淀粉 10, 酵母提取粉 5, 蛋白胨 2。以上培养基分别加入 15 g 的海盐, 加水定容至 1 L, 调 pH 7.0。

(3) 抑菌活性筛选培养基。LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母提取物 5, NaCl 10, 加水定容至 1 L, 调 pH 7.0。

1.2 主要试剂和仪器

Fast *pfu* DNA 聚合酶、dNTPs 和核酸电泳分子量 marker (北京全式基因生物技术有限公司); 菌株基因组提取试剂盒(Zymo Research 公司); 凝胶染色液 goldview (Ruitaibio 公司); PCR 引物(广州天一辉远生物技术有限公司); DNA 测序(广州擎科生物技术有限公司); 色谱乙腈(安徽时联特种溶剂有限公司); 甲醇、氯仿、丙酮、丁酮、无水乙醇等化学试剂(广州化学试剂公司); 核磁氘代试剂(美国 Cambridge Isotope Laboratories 公司)。PCR 仪(德国 Eppendorf 公司); 凝胶电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司); 台式高速离心机(德国 Eppendorf 公司); 微量移液器(德国 Eppendorf 公司); 高压蒸汽灭菌锅 LX-B75 (合肥华泰医疗设备有限公司); 恒温振荡培养箱(上海知楚仪器有限公司); 超净工作台(新加坡 ESCO 公司); 生化培养箱(济南创日新仪器设备有限公司); 正相硅胶(100–200 目, 中国烟台江友硅胶开发有限公司); 反相硅胶(日本 SANYO 公司); 薄层层析硅胶(中国烟台江友硅胶开发有限公司); 凝胶 Sephadex LH-20 (瑞典 Amersham Pharmacia Biotech 公司); 大孔树脂 XAD-16 (美国 Rohm and Haas 公司); 旋转蒸发仪(德国 Heidolph 公司); 中压液相色谱(美国 Agilent 公司); 高效液相色谱仪(日本 Hitachi 公司, 美国 Agilent 公司);

高效液相分析色谱柱(美国 Phenomenex 公司); 高效液相半制备色谱柱(美国 Phenomenex 公司); 核磁共振仪 AV-700 (德国 Burkert 公司); 低分辨质谱仪(德国 Burkert 公司); 高分辨质谱仪(德国 Burkert 公司)。

1.3 放线菌分离、纯化和保藏

分别称取 1.0–2.5 g 拉关木、海桑、秋茄根际沉积物置于无菌平板中, 并于超净台内风干, 加入 10 mL 无菌水, 混匀后于 65 °C 水浴 5 min, 用无菌水稀释 100 倍后涂布于 5 种固体培养基(高氏 1 号、高氏 2 号、38[#]、GYEA、脯氨酸培养基)上, 置于 28 °C 恒温培养箱倒置培养 1–2 周。待长出单克隆后挑取划线培养, 28 °C 培养 1–2 周后用稀释涂布法进行二次纯化。菌株二次纯化方法: 取适量孢子于 1.5 mL EP 管中, 加入 100 μL 无菌水并振荡混匀作为母液, 依次稀释为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 浓度梯度。取不同浓度梯度的孢子稀释液 100 μL 分别涂布于相应的培养基上, 28 °C 培养 1–2 周挑取单克隆划线。用竹签挑取放线菌菌丝体或孢子置于 2 mL 菌种保藏管中, 加入 1.5 mL 40% 甘油混匀后, 于 -80 °C 保存。

1.4 放线菌基因组提取和 16S rRNA 基因序列扩增与鉴定

刮取少量菌体, 用试剂盒提取菌株基因组 DNA, 最终溶于 20 μL 1 \times TE 缓冲液中。使用引物 F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 对每株放线菌的 16S rRNA 基因进行扩增。PCR 反应条件为: 94 °C 5 min; 95 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物送到广州擎科生物技术有限公司进行测序, 将获得的 DNA 序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对分析, 即可获得与其相似度最高的菌株信息, 从而初步确定该放线菌的种属。

1.5 菌株小规模发酵及活性筛选

挑取适量的孢子接种于 50 mL 发酵培养基 (N4、Am6-1、ZWJ-1), 于 28 °C、200 r/min 摇床培养 7 d。取 5 mL 的培养液, 加入等体积的丁酮, 混匀后超声 30 min, 3 900 r/min 离心 10 min, 吸取上清至 2 mL EP 管中, 真空浓缩仪旋干样品, 溶解于 80 μ L DMSO 中, 14 000 r/min 离心 10 min 后, 取 45 μ L 上清进行 HPLC 检测, 检测条件为: 流动相 A 相为 10% 乙腈, 含 0.08% 甲酸, 流动相 B 相为 90% 乙腈, 流速 1 mL/min, 检测波长为 304 nm。HPLC 走样程序为: 0–20 min, 5%–80% B 相; 20–21 min, 80%–100% B 相; 21–24 min, 100% B 相; 24–25 min, 100%–5% B 相; 25–30 min, 5% B 相。

采用滤纸片扩散法进行菌株小发酵粗提物的抑菌活性测试。8 种指示菌株分别为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis* 1064)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 [methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) shhs-A1]、藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*)、肺炎克雷伯杆菌 (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883)、鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii* 19606)、粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212) 和溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus* 13214)。以甲氧苄胺嘧啶 (TMP) 为阳性对照, 二甲基亚砜 (DMSO) 为阴性对照, 如果供试样品具有抑菌活性, 在滤纸片周围会出现清晰的无菌生长抑菌圈。

1.6 菌株 *Streptomyces* sp. SCSIO 40067 大规模发酵与萃取

将菌株 *Streptomyces* sp. SCSIO 40067 的孢子接种至 50 mL 种子培养基 ZWJ-1 中, 28 °C、200 r/min 振荡培养 3 d 后, 按 10% (V/V) 的接种量转接至 20 L 发酵培养基 ZWJ-1 中, 28 °C、200 r/min 培养 7–9 d 后, 离心收集发酵液和菌

丝体, 发酵液用大孔树脂吸附 5–6 次, 然后用丙酮洗脱并收集洗脱液; 菌丝体用丙酮浸提 3 次, 收集浸提液。旋转蒸发回收洗脱液和浸提液中的丙酮, 剩余水相用丁酮萃取 6 次, 旋转蒸发回收丁酮后得到 14 g 粗浸膏。

1.7 化合物的分离和纯化

粗浸膏用氯仿: 甲醇 (1:1, V/V) 溶解后与适量的正相硅胶 (100–200 目) 混合旋干后, 经中压正相层析, 用 CHCl_3 - CH_3OH (1:0; 9:1; 8:2; 7:3; 1:1; 0:1; V/V, 2 L) 梯度洗脱得到 7 个馏分 (Fr. A–F)。将馏分 Fr. B 用 Sephadax LH-20 凝胶柱层析 (120 cm \times 3 cm, 氯仿/甲醇 1:1, V/V) 进行分离, 根据 TLC 检测结果合并得到馏分 Fr. B-L1 到 Fr. B-L7。将馏分 Fr. B-L1 用 Sephadax LH-20 凝胶柱层析 (180 cm \times 1 cm, 氯仿/甲醇 1:1, V/V) 进行分离, 根据 TLC 检测结果合并得到馏分 Fr. B-L1-A 到 Fr. B-L1-D。将馏分 Fr. B-L1-A 采用半制备高效液相色谱 (Phenomenex Luna C_{18} , 250 mm \times 10.0 mm, 5 μ m; A 相为水, B 相为乙腈, 20% 的 B 相等度洗脱; 流速为 2.5 mL/min; 检测波长为 304 nm) 纯化得到化合物 **1** (13.2 mg)、**2** (5.5 mg)、**3** (3.0 mg)、**4** (0.9 mg)、**5** (7.6 mg) 和 **6** (1.2 mg)。化合物 **1–6** 通过高分辨质谱 (HR-ESI-MS)、 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 等波谱及与文献比较确定结构, 同时化合物 **1** 的结构进一步得到 X-ray 单晶衍射确认。

2 结果与分析

2.1 菌株分离鉴定

根据 16S rRNA 基因序列进行 BLAST 排重, 本研究从 3 种红树林植物根际沉积物中共分离得到 49 株放线菌。菌株的 16S rRNA 基因序列分析发现, 这些放线菌共分布于 6 个属 (表 1), 分别是链霉菌属 (*Streptomyces*, 31 株)、

表 1 从红树林根际沉积物所分离放线菌的种属信息

Table 1 Classification of actinobacteria isolated from rhizosphere sediment of mangrove plants

Names	Top-hit taxon	Accession No.	Similarity/%
ZMR1-1	<i>Micromonospora terminaliae</i> (KX394339)	MZ833389	99.63
ZMR1-3	<i>Micromonospora echinofusca</i> (LT607733)	MZ833390	98.91
ZMR1-5	<i>Streptomyces neopeptinius</i> (EU258679)	MZ833391	98.98
ZMR1-7	<i>Micromonospora chalcea</i> (X92594)	MZ833392	99.78
ZMR1-8	<i>Streptosporangium jiaoheense</i> (KM000836)	MZ833393	99.64
ZMR1-9	<i>Streptomyces coeruleofuscus</i> (AB184840)	MZ833394	98.91
ZMR1-11	<i>Micromonospora haikouensis</i> (GU130129)	MZ833395	100.00
ZMR1-12	<i>Micromonospora fluminis</i> (LR130241)	MZ833396	100.00
ZMR1-28	<i>Streptomyces somaliensis</i> (AJ007403)	MZ833397	98.92
ZMR1-30	<i>Streptomyces griseochromogenes</i> (CP016279)	MZ833398	98.70
ZMR1-31	<i>Streptomyces lomondensis</i> (AB184673)	MZ833399	99.27
ZMR1-33	<i>Microbispora rosea</i> subsp. <i>Rosea</i> (FTNI01000083)	MZ833400	99.71
ZMR1-35	<i>Micromonospora oryzae</i> (AB981052)	MZ833401	100.00
ZMR1-37	<i>Streptomyces wuyuanensis</i> (jgi.1085054)	MZ833402	99.85
ZMR1-51	<i>Streptomyces kebangsaanensis</i> (HM449824)	MZ833403	99.78
ZMR1-53	<i>Micromonospora tulbaghiae</i> (jgi.1058868)	MZ833404	99.93
ZMR2-3	<i>Streptomyces corchorusii</i> (KQ948396)	MZ833405	99.49
ZMR2-14	<i>Streptomyces chrestomyceticus</i> (BHZC01000001)	MZ833406	97.97
ZMR2-22	<i>Micromonospora taraxaci</i> (VIWZ01000001)	MZ833407	99.78
ZMR2-24	<i>Streptomyces lucensis</i> (AB184280)	MZ833408	99.13
ZMR2-29	<i>Micromonospora echinospora</i> (LT607413)	MZ833409	99.71
ZMR2-33	<i>Nonomuraea wenchangensis</i> (FJ261959)	MZ833410	99.56
ZMR2-37	<i>Streptomyces gelaticus</i> (DQ026636)	MZ833411	99.35
ZMR2-44	<i>Streptomyces lannensis</i> (AB562508)	MZ833412	100.00
ZMR2-48	<i>Streptomyces ardesiacus</i> (DQ026631)	MZ833413	99.42
ZMR2-66	<i>Streptomyces bingchengensis</i> (CP002047)	MZ833414	99.71
ZMR2-70	<i>Streptomyces griseoaurantiacus</i> (AB184676)	MZ833415	99.13
ZMR2-73	<i>Micromonospora inaquosa</i> (MG725913)	MZ833416	99.49
ZMR2-77	<i>Streptomyces broussonetiae</i> (MT849770)	MZ833417	98.99
ZMR2-80	<i>Streptomyces sparsogenes</i> (MAXF01000077)	MZ833418	99.35
ZMR3-9	<i>Streptomyces thermocarboxydus</i> (U94490)	MZ833419	99.93
ZMR3-17	<i>Micromonospora aurantiaca</i> (CP002162)	MZ833420	100.00
ZMR3-31	<i>Micromonospora narathiwatensis</i> (LT594324)	MZ833421	99.34
ZMR3-35	<i>Micromonospora krabiensis</i> (LT598496)	MZ833422	99.85
ZMR3-36	<i>Micromonospora carbonacea</i> (jgi.1058872)	MZ833423	99.63
ZMR3-39	<i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> (JH636049)	MZ833424	99.64
ZMR3-42	<i>Streptomyces albogriseolus</i> (AJ494865)	MZ833425	100.00
ZMR3-61	<i>Streptomyces aldersoniae</i> (EU170123)	MZ833426	99.71
ZMR3-67	<i>Streptomyces geysiriensis</i> (AB184661)	MZ833427	99.28
ZMR3-70	<i>Streptomyces carpinensis</i> (MUBM01000291)	MZ833428	99.42

(待续)

(续表 1)

ZMR3-72	<i>Streptomyces thermolineatus</i> (Z68097)	MZ833429	99.93
ZMR3-85	<i>Streptomyces cellulosa</i> (AB184265)	MZ833430	99.64
ZMR3-93	<i>Streptomyces reniochaliniae</i> (QOIM01000066)	MZ833431	99.06
ZMR3-95	<i>Streptomyces prasinosporus</i> (DQ026655)	MZ833432	98.33
ZMR3-98	<i>Streptomyces costaricanus</i> (AB249939)	MZ833433	99.71
ZMR3-100	<i>Streptomyces seoulensis</i> (JNXP01000045)	MZ833434	99.42
ZMR3-101	<i>Streptomyces malaysiense</i> (LBDA02000093)	MZ833435	99.85
ZMR3-103	<i>Streptomyces qinglanensis</i> (HQ660227)	MZ833436	99.93
ZMR3-104	<i>Streptomyces sanglieri</i> (AB249945)	MZ833437	99.49

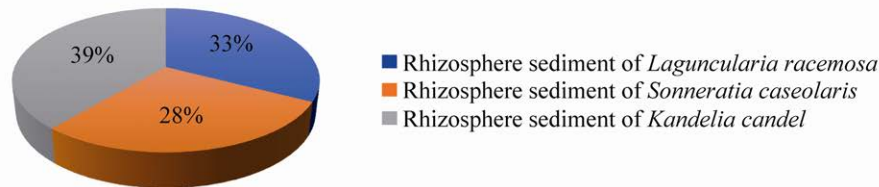
小单孢菌属(*Micromonospora*, 14 株)、小双孢菌属(*Microbispora*, 1 株)、链孢子囊菌属(*Streptosporangium*, 1 株)、野野村氏菌属(*Nonomuraea*, 1 株)和糖单孢菌属(*Saccharomonospora*, 1 株)。其中,在所有分离的可培养放线菌中链霉菌属为主要类群,占总分离菌株的 63.3%,其他稀有放线菌占总分离菌株的 36.7%。

2.2 不同红树林植物根际沉积物中的放线菌多样性

从拉关木、海桑和秋茄的根际沉积物中分

离到的放线菌数目相近,分别为 16 株(占比 33%)、14 株(占比 28%)和 19 株(占比 39%) (图 1A)。拉关木根际沉积物中链霉菌属和小单孢菌属各占 44%,链孢子囊菌属和小双孢菌属各占 6%;海桑根际沉积物中链霉菌属占 72%,小单孢菌属占 21%,野野村氏菌属占 7%;秋茄根际沉积物中链霉菌属占 74%,小单孢菌属占 21%,糖单孢菌属占 5% (图 1B)。由此可见,从 3 种不同红树林植物根际沉积物所分离的放线菌数目相近,但存在种属差异。在拉关木根际沉积物样品中稀有放线菌为优势种群,占比为

(A)



(B)

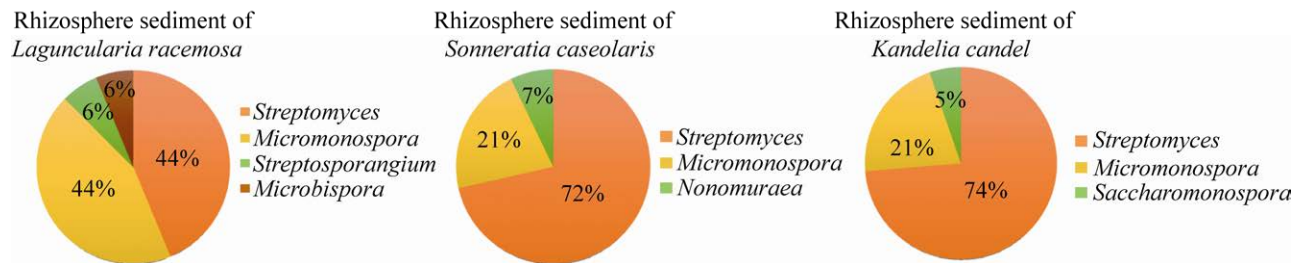


图 1 三种不同红树林植物根际沉积物中可培养的放线菌比例(A)及每份样品中的放线菌分类统计(B)

Figure 1 The proportion and classification of cultivable actinobacteria isolated from rhizosphere sediment of 3 mangrove plants. A: the proportion of cultivable actinobacteria isolated from rhizosphere sediment of 3 mangrove plants; B: classification of actinobacteria isolated from each sample.

56%；而在海桑和秋茄根际沉积物样品中，优势种群为链霉菌，分别占比为 72%和 74%。

2.3 不同分离培养基产出放线菌的多样性

采用高氏 1 号、高氏 2 号、38[#]、GYEA 和脯氨酸这 5 种分离培养基，从 3 种红树林植物根际沉积物中共分离得到 49 株放线菌。以分离到的放线菌数目为依据，高氏 2 号培养基出菌最多(22 株)，脯氨酸培养基出菌最少(1 株)(图 2)。以分离到的放线菌种属为依据，高氏 2 号依然是最佳培养基，从中所分离的放线菌具有多样性，分布于 5 个种属，其中小单孢菌属为优势种群(11 株)。而从高氏 1 号、38[#]和 GYEA 这 3 种培养基中只分到链霉菌属和小单孢菌属或小双孢菌属放线菌(图 2)，且链霉菌属为优势种群。因此，从菌株种类和丰度方面分析，高氏 2 号培养基用于分离红树林根际沉积物放线菌具有明显优势，可作为红树林沉积物放线菌分离的首选培养基。

2.4 菌株 *Streptomyces* sp. SCSIO 40067 (ZMR1-37) 发酵粗提物抑菌活性测试

采用 3 种液体发酵培养基(N4、Am6-1、

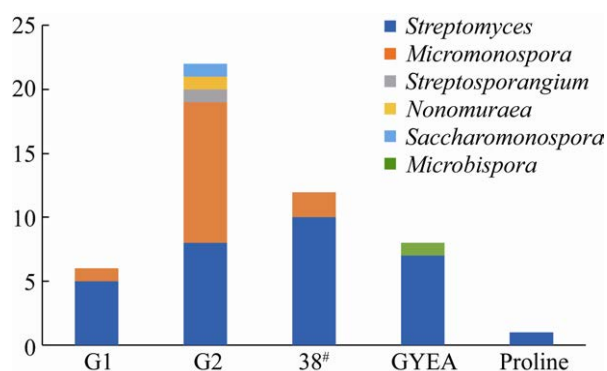


图 2 五种不同分离培养基获得可培养的放线菌分类统计

Figure 2 Classification of cultivable actinobacteria isolated by five separate medium.

ZWJ-1)对分离到的 49 株放线菌进行小规模发酵,经 HPLC 液相检测发现菌株 *Streptomyces* sp. SCSIO 40067 (原菌株编号为 ZMR1-37)在 ZWJ-1 培养基中发酵的次级代谢产物较为丰富(图 3A)。采用滤纸片法对该菌株小发酵粗提物进行抑菌活性测试。以枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* 1064)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC 29213)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) shhs-A1)、藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)、肺炎克雷伯杆菌(*Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883)、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii* 19606)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis* ATCC 29212)和溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus* 13214)等 8 种病原菌为指示菌,发现 *Streptomyces* sp. SCSIO 40067 小发酵粗提物对枯草芽孢杆菌、MRSA、金黄色葡萄球菌和藤黄微球菌具有较好的抑制活性,对肺炎克雷伯杆菌和鲍曼不动杆菌具有微弱抑菌活性(图 3B, 表 2)。鉴于小发酵产物丰度和良好的抑菌活性,本研究选取菌株 *Streptomyces* sp. SCSIO 40067 进行随后的次级代谢产物研究。

2.5 菌株 *Streptomyces* sp. SCSIO 40067 中化合物的分离和结构鉴定

对菌株 *Streptomyces* sp. SCSIO 40067 进行 20 L 放大规模发酵,经有机溶剂萃取获得 14 g 粗浸膏,通过正相色谱、中压反相色谱、Sephadex LH-20 凝胶色谱和 HPLC 半制备等分离手段获得 6 个 α -吡喃酮类化合物(1-6)。利用高分辨质谱 HR-ESI-MS、¹H NMR、¹³C NMR、X-ray 单晶衍射以及与相关文献比较分析,确定它们分别为 germicidin A (1)、germicidin C (2)、isogermicidin A (3)、germicidin I (4)、germicidin B (5)和 isogermicidin B (6)(图 4)。

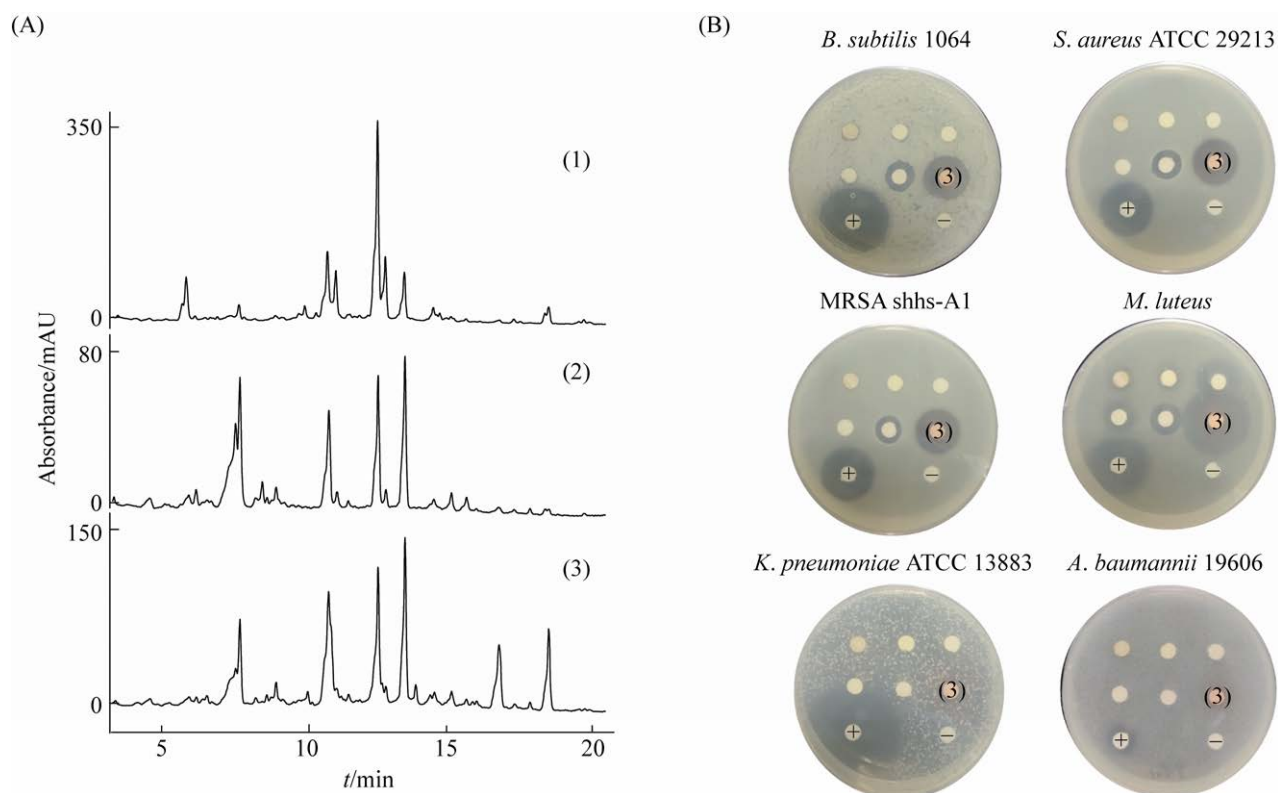


图3 *Streptomyces* sp. SCSIO 40067 在3种不同培养基小发酵产物 HPLC 检测分析(A)及在 ZWJ-1 培养基中发酵产物(3)的抑菌活性初筛(B)

Figure 3 HPLC analysis for the fermentation extracts of *Streptomyces* sp. SCSIO 40067 in three fermentation media (A) and antibacterial activities of crude extracts (3) fermented in ZWJ-1 medium (B). (1): N4 medium; (2): Am6-1 medium; (3): ZWJ-1 medium. +: positive control with TMP; -: negative control with DMSO.

表2 菌株 *Streptomyces* sp. SCSIO 40067 发酵粗提物(3)抑菌活性汇总

Table 2 The total antibacterial activities of crude extract (3) of *Streptomyces* sp. SCSIO 40067 fermented in ZWJ-1 medium

Crude extract	<i>B. subtilis</i> 1064	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	MRSA shhs-A1	<i>M. luteus</i>	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	<i>A. baumannii</i> 19606
(3)	+++	+++	+++	+++	+	+
TMP	++++	++++	+++	+++	+++	+

+: weak antibacterial activity; ++: moderate antibacterial activity; +++: strong antibacterial activity; TMP: trimethoprim.

化合物 1: 白色针状晶体, 正离子 HR-ESI-MS 显示其准分子离子峰为 m/z $[M+H]^+$ 197.117 2 (cal 197.117 8), 推测其分子式为 $C_{11}H_{16}O_3$ 。其核磁数据为: 1H NMR (methanol- d_4 , 700 MHz) δ : 5.98 (1H, s, H-5), 2.47 (1H, m, H-9), 2.40 (2H, q, $J=7.4$, H-7), 1.68 (1H, m, H-11),

1.55 (1H, m, H-11), 1.20 (3H, d, $J=7.0$, H-10), 1.03 (3H, t, $J=7.4$, H-8), 0.89 (3H, t, $J=7.6$, H-12)。 ^{13}C NMR (methanol- d_4 , 175 MHz) δ : 167.3 (C-2), 167.0 (C-4), 103.8 (C-3), 99.0 (C-5), 166.2 (C-6), 15.9 (C-7), 11.4 (C-8), 39.6 (C-9), 16.9 (C-10), 27.1 (C-11), 10.5 (C-12)。

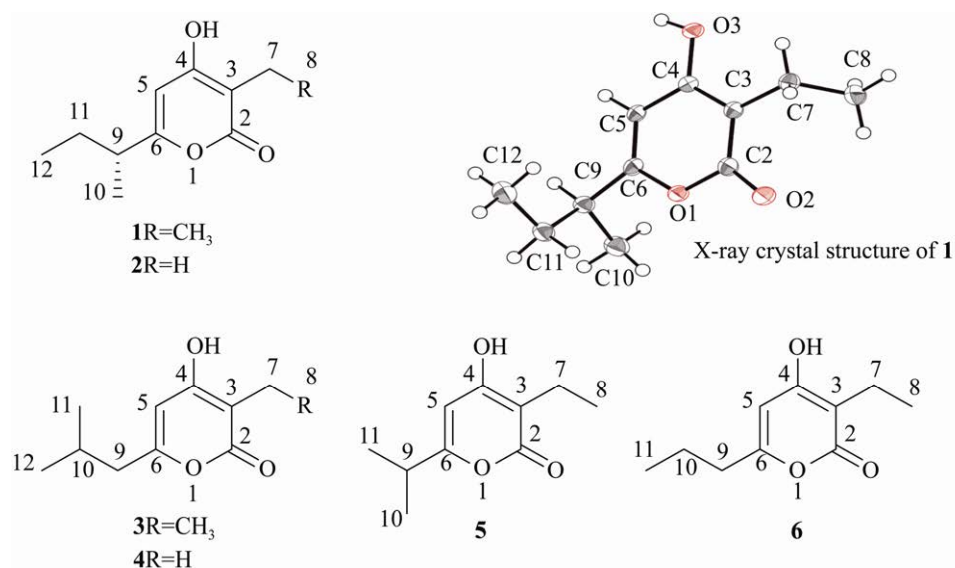


图 4 从 *Streptomyces* sp. SCSIO 40067 中分离鉴定的 germicidins 类化合物 1-6 的结构
Figure 4 The structures of germicidins (1-6) isolated from *Streptomyces* sp. SCSIO 40067.

以上数据与文献报道的波谱数据一致^[15], 确定化合物 1 为 germicidin A, 1 的 X 单晶衍射进一步证实了该结构并确定其绝对构型为 9*S*。

化合物 1: 斜方晶系, $P2_12_12_1$ 空间群, 晶体大小为 0.04 mm×0.01 mm×0.01 mm; 晶胞参数: $a=6.784\ 63(8)\ \text{\AA}$, $b=7.367\ 16(10)\ \text{\AA}$, $c=21.310\ 3(3)\ \text{\AA}$, $\alpha=90.00^\circ$, $\beta=90^\circ$, $\gamma=90.00^\circ$; 晶胞体积 $V=065.16(2)\ \text{\AA}^3$, $Z=4$, 计算密度 1.224 g/cm³, Cu-K α 辐射($\lambda=1.541\ 84\ \text{\AA}$); 收集总衍射点 464 0, 独立衍射点 189 3; $R_1=0.027\ 3$, $wR_2=0.070\ 5$; Flack 常数值为 -0.1(8)。晶体数据保存在剑桥晶体数据中心, CCDC 编号为 2104968。

化合物 2: 白色固体, 正离子 HR-ESI-MS 显示其准分子离子峰为 $m/z\ [M+H]^+$ 183.101 6 (cal 183.102 1), 推测其分子式为 C₁₀H₁₄O₃。其核磁数据为: ¹H NMR (methanol-*d*₄, 700 MHz) δ : 5.99 (1H, s, H-5), 2.48 (1H, m, H-9), 1.85 (3H, s, H-7), 1.67 (1H, m, H-11), 1.55 (1H, m, H-11), 1.20 (3H, d, $J=7.0$, H-10), 0.89 (3H,

t , $J=7.5$, H-12)。¹³C NMR (methanol-*d*₄, 175 MHz) δ : 167.3 (C-2), 166.8 (C-4), 98.9 (C-3), 97.6 (C-5), 166.4 (C-6), 6.8 (C-7), 39.5 (C-9), 16.9 (C-10), 27.1 (C-11), 10.5 (C-12)。以上数据与文献报道的波谱数据一致^[15], 确定化合物 2 为 germicidin C。

化合物 3: 白色固体, 正离子 HR-ESI-MS 显示其准分子离子峰为 $m/z\ [M+H]^+$ 197.117 2 (cal 197.117 8), 推测其分子式为 C₁₁H₁₆O₃。其核磁数据为: ¹H NMR (methanol-*d*₄, 700 MHz) δ : 5.96 (1H, s, H-5), 2.39 (2H, q, $J=7.4$, H-7), 2.32 (2H, d, $J=7.3$, H-9), 2.03 (1H, m, H-10), 1.03 (3H, t, $J=7.4$, H-8), 0.96 (6H, d, $J=6.7$, H-11, H-12)。¹³C NMR (methanol-*d*₄, 175 MHz) δ : 167.4 (C-2), 166.7 (C-4), 103.7 (C-3), 101.1 (C-5), 162.7 (C-6), 15.9 (C-7), 11.5 (C-8), 42.0 (C-9), 26.7 (C-10), 21.1 (C-11, C-12)。以上数据与文献报道的波谱数据一致^[15], 确定化合物 3 为 isogermicidin A。

化合物 4: 白色固体, 正离子 HR-ESI-MS

显示其准分子离子峰为 m/z $[M+H]^+$ 183.101 6 (cal 183.102 1), 推测其分子式为 $C_{10}H_{14}O_3$ 。其核磁数据为: 1H NMR (methanol- d_4 , 700 MHz) δ : 5.96 (1H, s, H-5), 2.33 (2H, d, $J=7.3$, H-9), 2.03 (1H, m, H-10), 1.85 (3H, s, H-7), 0.95 (6H, d, $J=6.7$, H-11, H-12)。 ^{13}C NMR (methanol- d_4 , 175 MHz) δ : 167.6 (C-2), 167.0 (C-4), 101.3 (C-3), 100.3 (C-5), 162.4 (C-6), 6.9 (C-7), 42.0 (C-9), 26.7 (C-10), 21.0 (C-11, C-12)。以上数据与文献报道的波谱数据一致^[16], 确定化合物 **4** 为 germicidin I。

化合物 **5**: 白色固体, 正离子 HR-ESI-MS 显示其准分子离子峰为 m/z $[M+H]^+$ 183.101 6 (cal 183.102 1), 推测其分子式为 $C_{10}H_{14}O_3$ 。其核磁数据为: 1H NMR (methanol- d_4 , 700 MHz) δ : 5.98 (1H, s, H-5), 2.71 (1H, m, H-9), 2.40 (2H, q, $J=7.4$, H-7), 1.22 (6H, d, $J=7.0$, H-10, H-11), 1.03 (3H, t, $J=7.4$, H-8)。 ^{13}C NMR (methanol- d_4 , 175 MHz) δ : 168.2 (C-2), 167.8 (C-4), 103.8 (C-3), 97.6 (C-5), 166.6 (C-6), 15.9 (C-7), 11.4 (C-8), 32.2 (C-9), 19.0 (C-10, C-11)。以上数据与文献报道的波谱数据一致^[15], 确定化合物 **5** 为 germicidin B。

化合物 **6**: 白色固体, 正离子 HR-ESI-MS 显示其准分子离子峰为 m/z $[M+H]^+$ 183.101 6 (cal 183.102 1), 推测其分子式为 $C_{10}H_{14}O_3$ 。其核磁数据为: 1H NMR (methanol- d_4 , 700 MHz) δ : 5.97 (1H, s, H-5), 2.43 (2H, t, $J=7.5$, H-9), 2.39 (2H, q, $J=7.4$, H-7), 1.67 (2H, m, H-10), 1.03 (3H, t, $J=7.4$, H-8), 0.97 (3H, t, H-11)。 ^{13}C NMR (methanol- d_4 , 175 MHz) δ : 167.9 (C-2), 167.5 (C-4), 103.7 (C-3), 100.3 (C-5), 163.4 (C-6), 15.9 (C-7), 11.5 (C-8), 34.8 (C-9), 19.9 (C-10), 12.3 (C-11)。以上数据与

文献报道的波谱数据一致^[15], 确定化合物 **6** 为 isogermicidin B。

2.6 Germicidins 生物合成基因簇定位分析与生物合成途径推导

文献报道显示, germicidins 类化合物主要由 III 型聚酮合酶途径合成^[15,17], 通过 anti-SMASH 在线软件对 *Streptomyces* sp. SCSIO 40067 的全基因组(该基因组已提交至国家基因组科学数据中心(NGDC), 检索编号为: GWHBEIB01000000)分析发现: cluster 4 中包含 α -吡喃酮类 type III PKS 生物合成基因簇中保守的结构基因(编码 III 型聚酮合酶的 *orf57*) 和后修饰基因(编码甲基转移酶的 *orf58* 和编码单加氧酶的 *orf59*), 如图 5A 所示。进一步分析发现 ORF57 与 *Streptomyces griseus* 中的烷基吡喃酮合成酶 SrsA 的相似性为 69%^[17], 与 *Streptomyces coelicolor* A3(2) 中的 III 型聚酮合酶 SCO7221 的相似性为 37%^[15], 由此确定 cluster 4 与化合物 **1-6** 的生物合成相关。Song 等发现新的细菌 III 型聚酮合酶 SCO7221 负责 germicidins 生物合成途径的关键反应, 以 ACP-硫酯中间体为底物, 结合乙基或甲基丙二酰 CoA 进行第二次延伸, 经历随后的环化, 合成三酰产物^[15]。Chemler 等的研究表明, 与酰基 CoA 相比 *Streptomyces coelicolor* 来源的 III 型聚酮合酶 Gcs 更偏好利用底物酰基 ACP^[18]。根据文献报道推测, 类似于 Gcs, III 型聚酮合酶 ORF57 可能以不同的酰基 CoA 为起始单元, 以与脂肪酸合成途径交叉重合的丙二酰 CoA 或丙二酰 ACP 为延伸单元, 催化脱羧缩合反应形成对应的 β -酮酰基硫酯, 后者与乙基丙二酰 CoA 或甲基丙二酰 CoA 在 ORF57 作用下进行二次脱羧缩合反应形成 β, δ -双酮基硫酯中间体并经历随后的环化反应合成 **1-6** (图 5B)。

可作为红树林沉积物样品分菌的优选培养基。

结合抑菌活性筛选和化合物丰度, 确定 *Streptomyces* sp. SCSIO 40067 为目标研究菌株, 从中分离鉴定了 6 个已知的 α -吡喃酮类化合物, 分别为 germicidins A–C, germicidin I 和 isogermicidin A–B。结构上, α -吡喃酮类化合物包含核心的六元内酯环和 C-3、C-6 位不同烷基取代的侧链, 表现出广泛的生物活性, 如海洋拟诺卡氏菌来源的 7-hydroxymucidone 对藤黄微球菌具有中等程度抑制活性^[22]; germicidins A–D 在 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上浓度时可以抑制 *Streptomyces coelicolor* A3(2)的孢子萌发^[23]; germicidin B、germicidin C 和 isogermicidin A 对己糖激酶 II 具有显著的抑制活性, IC_{50} 值分别为 7.11、8.78 和 8.45 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ^[24];此外 1 mg/mL 的 germicidin A 可以完全抑制独行菜根的生长并引起种子膨胀, 显示有植物细胞毒活性, 而 germicidin A 对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和各种真菌均无抑制活性^[25]。我们的研究也发现, germicidins A–C, germicidin I 和 isogermicidin A–B 对 8 种病原指示菌均无抑制活性, 而上文 *Streptomyces* sp. SCSIO 40067 粗提物所展示的优良抑菌活性可能与该菌株所产的其他次级代谢产物相关。目前从不同的链霉菌中共报道 germicidins 类化合物 16 个, 包括 germicidins A–N 和 isogermicidins A–B^[16,26]。本研究从 *Streptomyces* sp. SCSIO 40067 中分离获得 germicidins 类化合物, 进一步拓展了该类化合物的生产菌株来源。

综上所述, 本研究从湛江高桥的 3 种红树林植物根际沉积物中分离鉴定了 49 株放线菌, 并基于沉积物样品来源和分离培养基的种类初步探讨了所分离放线菌的多样性。综合考虑菌株代谢产物的生物活性和丰度, 从 *Streptomyces* sp. SCSIO 40067 中分离鉴定了 6 个 germicidins

化合物并首次报道了 germicidin A 的晶体结构, 定位了 germicidins 类化合物的生物合成基因簇并推导了其生物合成途径。本研究增加了红树林放线菌资源多样性, 为后续其他活性次级代谢产物的分离鉴定奠定了基础, 拓展了 germicidins 类化合物的生产菌株来源, 为该类化合物的生物合成研究提供参考。

致谢: 感谢中国科学院南海海洋研究所热带海洋环境国家重点实验室的程皓博士在红树林根际沉积物取样过程提供的帮助, 感谢中国科学院南海海洋研究所分析测试中心在化合物鉴定方面提供的帮助。

参考文献

- [1] Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, 2020, 83(3): 770–803.
- [2] 宋现芹, 蒋鑫, 孙建彬, 张春燕, 张云, 卢来春, 鞠建华. 红树林放线菌 *Streptomyces costaricanus* SCSIO ZS0073 抗菌活性次级代谢产物的研究. 天然产物研究与开发, 2017, 29(3): 410–414.
Song XQ, Jiang X, Sun JB, Zhang CY, Zhang Y, Lu LC, Ju JH. Antibacterial secondary metabolites produced by mangrove-derived actinomycete *Streptomyces costaricanus* SCSIO ZS0073. *Natural Product Research and Development*, 2017, 29(3): 410–414. (in Chinese)
- [3] Zhang L, Li L, Deng ZX, Hong K. *Micromonospora zhanjiangensis* sp. nov., isolated from mangrove forest soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65(12): 4880–4885.
- [4] Giri C, Ochieng E, Tieszen LL, Zhu Z, Singh A, Loveland T, Masek J, Duke N. Status and distribution of mangrove forests of the world using earth observation satellite data. *Global Ecology and Biogeography*, 2011, 20(1): 154–159.
- [5] Sangkanu S, Rukachaisirikul V, Suriyachadkun C, Phongpaichit S. Evaluation of antibacterial potential of mangrove sediment-derived actinomycetes. *Microbial Pathogenesis*, 2017, 112: 303–312.
- [6] Chen Q, Zhao Q, Li J, Jian S, Ren H. Mangrove succession enriches the sediment microbial community in South China. *Scientific Reports*, 2016, 6: 27468.
- [7] Han Y, Tian EL, Xu DB, Ma M, Deng ZX, Hong K.

- Halichoblelide D, a new elaiophyllin derivative with potent cytotoxic activity from mangrove-derived *Streptomyces* sp. 219807. *Molecules*, 2016, 21(8): 970.
- [8] Hu D, Gao C, Sun C, Jin T, Fan G, Mok KM, Lee SMY. Genome-guided and mass spectrometry investigation of natural products produced by a potential new actinobacterial strain isolated from a mangrove ecosystem in Futian, Shenzhen, China. *Scientific Reports*, 2019, 9: 823.
- [9] Xu DB, Tian EL, Kong FD, Hong K. Bioactive molecules from mangrove *Streptomyces qinglanensis* 172205. *Marine Drugs*, 2020, 18(5): 255.
- [10] Ding L, Münch J, Goerls H, Maier A, Fiebig HH, Lin WH, Hertweck C. Xiamycin, a pentacyclic indolosesquiterpene with selective anti-HIV activity from a bacterial mangrove endophyte. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2010, 20(22): 6685–6687.
- [11] Fu P, Yang CL, Wang Y, Liu PP, Ma YM, Xu L, Su MB, Hong K, Zhu WM. Streptocarbazoles A and B, two novel indolocarbazoles from the marine-derived actinomycete strain *Streptomyces* sp. FMA. *Organic Letters*, 2012, 14(9): 2422–2425.
- [12] Xu DB, Ma M, Deng ZX, Hong K. Genotype-driven isolation of enterocin with novel bioactivities from mangrove-derived *Streptomyces qinglanensis* 172205. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(14): 5825–5832.
- [13] 姜怡, 段淑蓉, 唐蜀昆, 陈华红, 李文均, 徐丽华. 稀有放线菌分离方法. *微生物学通报*, 2006, 33(1): 181–183.
- [14] 刘琳琳. 稀有放线菌的筛选及新种鉴定. 东北农业大学硕士学位论文, 2012.
- [15] Song LJ, Barona-Gomez F, Corre C, Xiang LK, Udvary DW, Austin MB, Noel JP, Moore BS, Challis GL. Type III polyketide synthase beta-ketoacyl-ACP starter unit and ethylmalonyl-CoA extender unit selectivity discovered by *Streptomyces coelicolor* genome mining. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(46): 14754–14755.
- [16] Du YQ, Sun J, Gong QH, Wang Y, Fu P, Zhu WM. New α -pyridones with quorum-sensing inhibitory activity from diversity-enhanced extracts of a *Streptomyces* sp. derived from marine algae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(8): 1807–1812.
- [17] Funabashi M, Funa N, Horinouchi S. Phenolic lipids synthesized by type III polyketide synthase confer penicillin resistance on *Streptomyces griseus*. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(20): 13983–13991.
- [18] Chemler JA, Buchholz TJ, Geders TW, Akey DL, Rath CM, Chlipala GE, Smith JL, Sherman DH. Biochemical and structural characterization of germicidin synthase: analysis of a type III polyketide synthase that employs acyl-ACP as a starter unit donor. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(17): 7359–7366.
- [19] Holguin G, Vazquez P, Bashan Y. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. *Biology and Fertility of Soils*, 2001, 33(4): 265–278.
- [20] Holguin G, Gonzalez-Zamorano P, De-Bashan LE, Mendoza R, Amador E, Bashan Y. Mangrove health in an arid environment encroached by urban development—a case study. *Science of the Total Environment*, 2006, 363(1/2/3): 260–274.
- [21] 何洁, 张道锋, 徐盈, 张晓梅, 唐蜀昆, 徐丽华, 李文均. 印度洋红树林沉积物可培养海洋放线菌多样性及其活性. *微生物学报*, 2012, 52(10): 1195–1202.
- He J, Zhang DF, Xu Y, Zhang XM, Tang SK, Xu LH, Li WJ. Diversity and bioactivities of culturable marine actinobacteria isolated from mangrove sediment in Indian Ocean. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(10): 1195–1202. (in Chinese)
- [22] Zhang HB, Saurav K, Yu ZQ, Mándi A, Kurtán T, Li J, Tian XP, Zhang QB, Zhang WJ, Zhang CS. α -pyrones with diverse hydroxy substitutions from three marine-derived *Nocardiopsis* strains. *Journal of Natural Products*, 2016, 79(6): 1610–1618.
- [23] Aoki Y, Matsumoto D, Kawaide H, Natsume M. Physiological role of germicidins in spore germination and hyphal elongation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *The Journal of Antibiotics*, 2011, 64(9): 607–611.
- [24] Zhang XM, Peng AH, Xie WD, Wang M, Zheng D, Feng MK. Hexokinase II inhibitory effect of secondary metabolites derived from a *Streptomyces* sp. associated with mud dauber wasp. *Chemistry & Biodiversity*, 2020, 17(7): e2000140.
- [25] Petersen F, Záhner H, Metzger JW, Freund S, Hummel RP. Germicidin, an autoregulative germination inhibitor of *Streptomyces viridochromogenes* NRRL B-1551. *The Journal of Antibiotics*, 1993, 46(7): 1126–1138.
- [26] Ma M, Rateb ME, Yang D, Rudolf JD, Zhu XC, Huang Y, Zhao LX, Jiang Y, Duan YW, Shen B. Germicidins H-J from *Streptomyces* sp. CB00361. *The Journal of Antibiotics*, 2017, 70(2): 200–203.

(本文责编 李磊)