



海水来源的 548 株真菌的近海及远海分布模式及其抑菌活性分析

任娜, 朱四东, 陈秀暖, 陈婷, 王景, 徐莹, 杨季芳, 陈吉刚*

浙江万里学院生物与环境学院, 浙江 宁波 315100

任娜, 朱四东, 陈秀暖, 陈婷, 王景, 徐莹, 杨季芳, 陈吉刚. 海水来源的 548 株真菌的近海及远海分布模式及其抑菌活性分析. 微生物学报, 2022, 62(1): 374–387.

Ren Na, Zhu Sidong, Chen Xiunuan, Chen Ting, Wang Jing, Xu Ying, Yang Jifang, Chen Jigang. Distribution pattern and antibacterial activity of 548 fungi from offshore and pelagic seawater. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(1): 374–387.

摘要: 【目的】海洋真菌是新颖天然产物的理想来源。本研究旨在加深对可培养海洋真菌多样性的了解, 以及挖掘具有应用潜力的海洋真菌。【方法】采用膜过滤法分离近海和远海海水样品中的真菌, 通过菌株分离纯化、ITS 基因序列测序, 分析浅海带、半深海带和深海带海水样品中可培养真菌的多样性。在此基础上, 采用固体平板法筛选具有抑菌活性的菌株。【结果】本研究共获得 548 株纯培养真菌, 它们分属于 2 个门 6 个纲 11 个目 19 个科 24 个属 44 个种, 其中包含海洋真菌种 15 个和潜在新分类单元 3 个。在纲水平上, 座囊菌纲(*Dothideomycetes*)包含种的数量最多(13 个), 其次为粪壳菌纲(*Sordariomycetes*)(11 个)和散囊菌纲(*Eurotiomycetes*)(11 个)。在属水平上, 青霉属(*Penicillium*)、枝孢属(*Cladosporium*)、外瓶霉属(*Exophiala*)和拟青霉属(*Simplicillium*)的分离频率较高。44 个真菌种呈现出 5 种不同的地理分布特征, 包括在浅海带、半深海带和深海带均有分布(15 个种), 仅分布于浅海带(5 个种), 不存在于浅海带(12 个种), 不存在于半深海带(5 个种), 以及不存在于深海带(7 个种)。44 个真菌种中, 12 个种具有不同程度的抑菌作用, 其中 *Hortaea werneckii* 所呈现的抑菌谱最广, 而 *Simplicillium cylindrosporum* 对 *Staphylococcus aureus* MCCC1A0646 抑菌活性最强。【结论】本研究初步揭示了近、远海海水中可培养真菌的多样性及

基金项目: 宁波市公益类科技计划(202002N3115); 全球变化与海气相互作用专项(二期)(GASI-04-HYDZ-02); 浙江省生物一流学科创新基金(CX2020019)

Supported by the Ningbo Public Welfare Technology Research Program (202002N3115), by the National Program on Global Change and Air-Sea Interaction (GASI-04-HYDZ-02) and by the First-Class Discipline of Biological Engineering of Zhejiang Province (CX2020019)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-574-88222552, E-mail: genomic@163.com

Received: 6 May 2021; Revised: 4 August 2021; Published online: 5 November 2021

其地理分布模式, 并丰富了海洋真菌菌种资源。

关键词: 海洋真菌; 多样性; 膜过滤法; 天然产物; 抑菌活性

Distribution pattern and antibacterial activity of 548 fungi from offshore and pelagic seawater

REN Na, ZHU Sidong, CHEN Xiunuan, CHEN Ting, WANG Jing, XU Ying, YANG Jifang, CHEN Jigang*

College of Biological & Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, Zhejiang, China

Abstract: [Objective] Marine fungi are ideal producers of novel natural products. This paper aims to deepen the understanding of the diversity of culturable marine fungi and identify potential useful marine fungi. [Methods] Fungi were isolated from offshore and pelagic seawater by membrane filtration. Through the isolation and purification of strains and internal transcribed spacer (ITS) sequencing, the diversity of culturable fungi in neritic water, bathyal water, and abyssal water was analyzed. The solid plate method was used to screen strains with antibacterial activity. [Results] A total of 548 fungi were isolated and they fell into 44 species, 24 genera, 19 families, 11 orders, 6 classes, and 2 phyla, including 15 marine species and 3 novel taxa. At the class level, *Dothideomycetes* dominated (13 species), followed by *Sordariomycetes* (11 species) and *Eurotiomycetes* (11 species). At the genus level, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Exophiala*, and *Simplicillium* were dominant. The 44 species presented 5 geographic distribution pattern: presence in neritic, bathyal, and abyssal areas (15 species), presence only in neritic area (5 species), absence in neritic area (12 species), absence in bathyal area (5 species), and absence in abyssal area (7 species). A total of 12 species had antibacterial activity. Among them, *Hortaea werneckii* showed the broadest antibacterial spectrum, and *Simplicillium cylindrosporium* demonstrated the strongest inhibition on *Staphylococcus aureus* MCCC1A0646. [Conclusion] This study reveals the diversity and distribution pattern of culturable fungi in the offshore and pelagic seawater and enriches the resource of marine fungi.

Keywords: marine fungi; diversity; membrane filtration; natural products; antibacterial activity

海洋独特的环境条件造就了微生物独特的代谢途径, 赋予了微生物产结构新颖、功能独特的生物活性物质的能力, 使海洋微生物来源的天然产物成为海洋新药开发的研究热点^[1]。海洋真菌的次生代谢产物具有结构多样、生物活性丰富、“创新指数”高、产量大等特点, 已经成为化学、生物学和药学等领域关注的焦点^[2]。

“海洋来源”的真菌是新颖天然产物的理想来源。在过去的几十年中, 从海洋来源真菌中发

现了上千种新化合物或已知分子的新衍生物^[3]。丝状海洋真菌, 尤其是子囊菌(*Ascomycetes*)已被证明是新天然产物的重要来源^[3]。例如, 研究人员从海水浸木中分离的 *Aigialus parvus* 中鉴定出 11 种具有多种结构类型的新天然产物^[4]。研究者从红树林潮间带木材来源的 *Hypoxylon oceanicum* 中发现了 3 个新的脂肽, 5 个新的大环聚醚和 5 种新的线性聚酯^[5]。海洋真菌产生的新天然产物已呈现出系列生物活性。如, 来

源于海底泥样的 *Zopfiella marina* 能产生高活性的抗真菌代谢产物 zofimarín (一种粪壳菌素衍生物)^[6]。红树林来源的 *Aigialus parvus* 产生的 aigialomycin D 呈现出抗疟原虫活性和细胞毒性^[7]。海洋浮木来源的 *Corollospora pulchella* 能产生具有 CD45 抑制活性的 pulchellalactam^[8]。一种海藻 (*Ceramium* sp.) 来源的 *Phaeosphaeria spartinae* 能产生 8 种新的天然产物, 其中包括对人白细胞弹性蛋白酶有抑制活性的 spartinoxide 和 spartinol C^[9]。上述实例说明专性海洋真菌可以来源于各种海洋基质, 并可以产生独特的未被发现的天然产物^[10]。

虽然近年来新发现的海洋来源真菌活性次生代谢产物的数目持续增加, 但这些产活性产物的真菌大都属于具有耐渗/耐盐能力的且与腐殖质相关的种属, 如曲霉属 (*Aspergillus*) 和青霉属 (*Penicillium*)^[3,11-13]。导致上述结果的主要原因是用于海洋来源真菌分离的方法大都以平板涂布法为主导^[14]。因此, 建立适合海洋真菌的高效分离策略对新颖海洋天然产物的发现十分必要。2019 年, Overy 等^[10]撰写了海洋来源真菌分离的“最佳实践指南(best-practices

guide)”, 其中涉及海洋真菌的新颖分离培养方法包括膜过滤、极限稀释涂布、潮湿箱式培养、站位诱取和原位培养, 并证明根据不同的样品类型选择相应的海洋真菌分离培养方法, 可以显著提高海洋真菌, 尤其是专性海洋真菌的种群多样性。

本研究依托大洋科考平台, 采用膜过滤法对近海和远海海水样品中的真菌进行了大规模分离培养与鉴定, 并对所获菌株的抑菌活性进行分析, 以期挖掘尚未被发现的海洋真菌, 为海洋天然产物开发提供菌种资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 海水样品来源

海水样品为大洋一号科考船在锚地停靠和航渡期间(大洋 61 航次)用无菌蜀牛瓶采集的 19 个表层水样(SW1-SW19), 以及在科考作业区用 Niskin 瓶采集的 5 个 CTD 站位水样(CTD1-CTD5) (图 1)。采样点横跨浅海带(水深<200 m)、半深海带(水深 200-2 000 m)和深海带(水深>2 000 m)。每个 CTD 站位采集的水样均包含海洋上

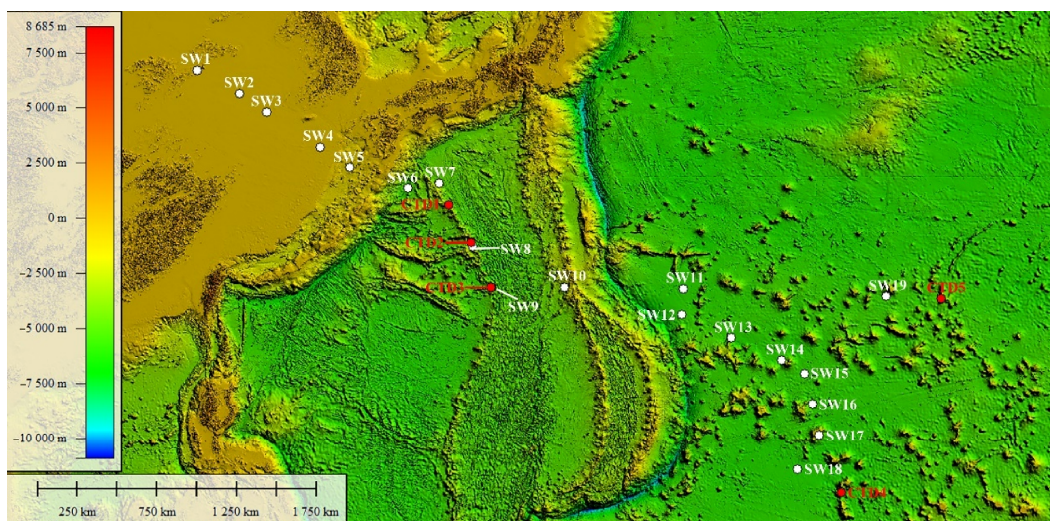


图 1 海水样品站位基本信息

Figure 1 Basic site information of seawater sample.

层/真光层(从海面到水下 200 m)中的 5 个层次(2、50、100、150、200 m), 海洋中层(水深 200–1 000 m)中的 2 个层次(500 m 和 1 000 m)和海洋深层(水深 1 000–4 000 m)中的 1 个层次(1 500 m)。

1.1.2 培养基

(1) PDA 培养基: 200 g 去皮马铃薯, 切成 1 cm³ 小块, 加入 800 mL 蒸馏水煮沸 10 min 至马铃薯块熟而不烂, 过滤收集滤液, 加入 20 g 葡萄糖和 15.0 g 琼脂后, 用陈海水定容至 1 000 mL, 121 °C 灭菌 20 min。补加终浓度为 50 mg/L 氯霉素和 10 mg/L 链霉素。

(2) LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母粉 5, 氯化钠 10, 琼脂 15.0, 蒸馏水定容至 1 000 mL, 121 °C 灭菌 20 min。

(3) 2216 培养基(g/L): 蛋白胨 5, 酵母粉 1, 磷酸铁 0.01, 琼脂 15.0, 陈海水:人工海水:蒸馏水=2:1:1 定容至 1 000 mL, 121 °C 灭菌 20 min。

1.1.3 靶细菌

购自海洋微生物菌种保藏中心(Marine Culture Collection of China, MCCC)的金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) MCCC1A0646; 本实验室保藏的杀香鱼假单胞菌(*Pseudomonas plecoglossicida*) NB2011 和哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*) Zj2008; 浙江万里学院徐洁皓博士惠赠的嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*) T4; 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心(China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC)的副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*) CGMCC1.1997。

1.1.4 主要试剂和仪器

E×Taq 酶、dNTPs Mixture、10×Buffer I 购自 TaKaRa 公司; 蛋白胨、酵母粉购自 OXOID 公司; 葡萄糖、真菌 DNA 提取试剂盒购自上海生工生物工程有限公司; 核酸提取仪为 Tissuelyser LT 公司产品。

1.2 真菌的分离纯化

样品采集后, 于无菌环境将 500 mL 水样抽

滤至聚碳酸酯膜(0.22 μm, Φ47 mm), 待滤膜上仍保留少量海水时立刻关闭抽滤泵, 并用无菌镊子将湿润的滤膜(含菌面朝上)转移至含氯霉素和链霉素的 PDA 培养基表面, 置于 20 °C 恒温培养箱培养至膜表面有菌落形成。挑取膜上不同形态的菌落, 用 PDA 平板进行菌株分离纯化。

1.3 菌株的物种鉴定

根据菌株的菌落特征, 以及菌株的菌丝、孢子及产孢结构特征对分离纯化的菌株进行排重后, 采用试剂盒结合机械破壁法提取菌株的总 DNA, 并使用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') PCR 扩增 ITS 基因序列^[15]。PCR 反应体系(25.0 μL)含上、下游引物各 0.5 μL (10 μmol/L), 10×buffer I 2.5 μL, dNTPs Mixture 2.0 μL (2.5 mmol/L), E×Taq 酶 0.25 μL (5 U/μL), DNA 模板 1.0 μL, ddH₂O 18.25 μL。PCR 扩增反应条件为: 95 °C 5 min; 95 °C 45 s, 47 °C 45 s, 72 °C 2 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后, 送至北京擎科新业生物技术有限公司进行单向测序。采用 Chromas 软件对测序获得的 ITS 基因序列进行分析, 去除质量不佳的测序碱基后, 将获得的有效序列提交至 GenBank 数据库中进行在线 BLAST 比对。下载与对比菌株 ITS 基因序列同源性最高的模式菌株的 ITS 基因序列, 将所有测序菌株及其最相近的模式菌株的 ITS 基因序列整合到一个 Fasta 文件, 将 Fasta 文件导入到 MEGA 7.0 软件中, 由 Clustal W 程序对序列进行人工校正及比对分析, 然后基于 MEGA 7.0 软件中的邻接法(NJ)构建系统发育树。

1.4 抑菌菌株筛选

本实验通过固体平板法测定形态排重后所获真菌菌株的抑菌活性。将保存于甘油管中的靶细菌接种至新鲜的 LB/2216 培养基上活化, 37 °C 培养 18 h。将平板上的单菌落接种到试

管中培养一段时间后, 调整菌悬液的浓度为 10^7 CFU/mL。取 2 mL 菌悬液覆盖 PDA 培养基 30 s 后弃去未被吸收的菌液。将分离的真菌在 PDA 平板上活化至成熟单菌落, 用打孔器制备成 6 mm 直径的菌饼接种于靶细菌平板上, 20 °C 共培养 4–5 d, 观察结果并测量抑菌圈直径。每个样本设置 2 个平行重复, 结果取其平均值。

2 结果与分析

2.1 可培养真菌的多样性分析

本实验从 54 份海水样品中分离纯化获得

548 株真菌, 根据形态学排重结果, 选取其中菌落形态各异的 85 株菌株进行了 ITS 基因序列扩增与测序 (GenBank 登录号为 MW856691–MW856775)。ITS 基因序列一致性比对结果显示, 只有 3 株真菌 ITS 基因序列与数据库中真菌模式菌株 ITS 序列的一致性 < 97% (93.4%–94.9%), 应代表新的分类单元。其余 82 株真菌的 ITS 基因序列与数据库中已有真菌的 ITS 序列的一致性 > 97% (位于 97.7%–100% 之间)。基于 ITS 基因序列同源比对分析结果, 548 株真菌分属于子囊菌门 (*Ascomycota*) 和担子菌门 (*Basidiomycota*) 中的 24 个属 (表 1), 其中隶

表 1 可培养真菌的分布及分离株数

Table 1 The distribution and number of isolates of culturable fungi

Family	Genus	Species*	Isolate
<i>Sporidiobolaceae</i>	<i>Rhodotorula</i>	<i>diobovata</i> (99.57%–100%), <i>mucilaginoso</i> (100%), <i>taiwanensis</i> (100%)	39
	<i>Aspergillus</i>	<i>versicolor</i> (100%), <i>pachycaulis</i> (100%), <i>sydowii</i> (100%)	35
<i>Aspergillaceae</i>	<i>Penicillium</i>	<i>griseofulvum</i> (100%), <i>oxalicum</i> (100%), <i>rubens</i> (100%), <i>chrysogenum</i> (100%)	50
<i>Trichocomaceae</i>	<i>Talaromyces</i>	<i>variabilis</i> (98.29%), <i>juglandicola</i> (98.08%)	16
<i>Herpotrichiellaceae</i>	<i>Exophiala</i>	<i>xenobiotica</i> (98.38%–100%), <i>equina</i> (99.77%)	74
<i>Cystobasidiaceae</i>	<i>Cystobasidium</i>	<i>pinicola</i> (97.82%), <i>calyptogenae</i> (99.8%), <i>benthicum</i> (99.8%–100%), <i>minutum</i> (100%)	45
<i>Ustilaginaceae</i>	<i>Pseudozyma</i>	<i>rugulosus</i> (98.45%), <i>aphidis</i> (99.83%)	17
<i>Nigrogranaceae</i>	<i>Nigrograna</i>	<i>mackinnonii</i> (98.74%)	1
<i>Periconiaceae</i>	<i>Periconia</i>	<i>submersa</i> (94.89%)	4
<i>Pleosporaceae</i>	<i>Alternaria</i>	<i>alstroemeriae</i> (100%)	12
<i>Didymellaceae</i>	<i>Didymella</i>	<i>gardeniae</i> (100%)	14
<i>Cucurbitariaceae</i>	<i>Neocucurbitaria</i>	<i>irregularis</i> (98.18%)	1
<i>Cladosporiaceae</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>phaenocoma</i> (100%), <i>sphaerospermum</i> (100%), <i>puyae</i> (100%), <i>chasmanthicola</i> (99.8%–100%), <i>halotolerans</i> (99.74%–100%), <i>oxysporum</i> (100%)	68
<i>Teratosphaeriaceae</i>	<i>Hortaea</i>	<i>werneckii</i> (97.68%)	20
<i>Mycosphaerellaceae</i>	<i>Phaeophleospora</i>	<i>hymenocallidicola</i> (100%)	4
<i>Sporocadaceae</i>	<i>Pestalotiopsis</i>	<i>rhododendri</i> (99.8%)	14
<i>Cordycipitaceae</i>	<i>Simplicillium</i>	<i>cylindrosporum</i> (98.61%)	68
	<i>Lecanicillium</i>	<i>kalimantanense</i> (93.63%)	8
<i>Chaetomiaceae</i>	<i>Botryotrichum</i>	<i>verrucosum</i> (99.31%)	5
	<i>Chaetomium</i>	<i>globosum</i> (99.5%–100%), <i>nepalense</i> (99.04%), <i>subaffine</i> (100%)	12
<i>Nectriaceae</i>	<i>Dichotomopilus</i>	<i>funicola</i> (100%)	1
	<i>Fusarium</i>	<i>concentricum</i> (99.71%–99.76%)	23
<i>Bionectriaceae</i>	<i>Thyronectria</i>	<i>caudata</i> (93.66%)	3
	<i>Clonostachys</i>	<i>eriocamporesii</i> (99.75%)	14

*: The number in brackets is the highest homology between the ITS gene sequence of the isolated strain and the ITS gene of the type fungus.

属于外瓶霉属(*Exophiala*)的菌株数量最多(74 株), 其次为枝孢属(*Cladosporium*; 68 株)和拟青霉属(*Simplicillium*; 68 株), 而隶属于 *Dichotomopilus* 属(1 株)、*Nigrograna* 属(1 株)和 *Neocucurbitaria* 属(1 株)的菌株数量最少。

2.2 可培养真菌的系统发育分析

基于 ITS 基因序列构建的系统发育树显示,

548 株真菌隶属于 2 门 6 纲 11 目 19 科 24 属 44 种 (图 2-5)。在纲水平上, 座囊菌纲(*Dothideomycetes*)包含的种的数量最多(13 个, 占 29.5%), 其次为粪壳菌纲(*Sordariomycetes*; 11 个, 占 25%)和散囊菌纲(*Eurotiomycetes*; 11 个, 占 25%), 而黑粉菌纲(*Ustilaginomycetes*)包含的种数量最少(2 个, 占 4.5%)。

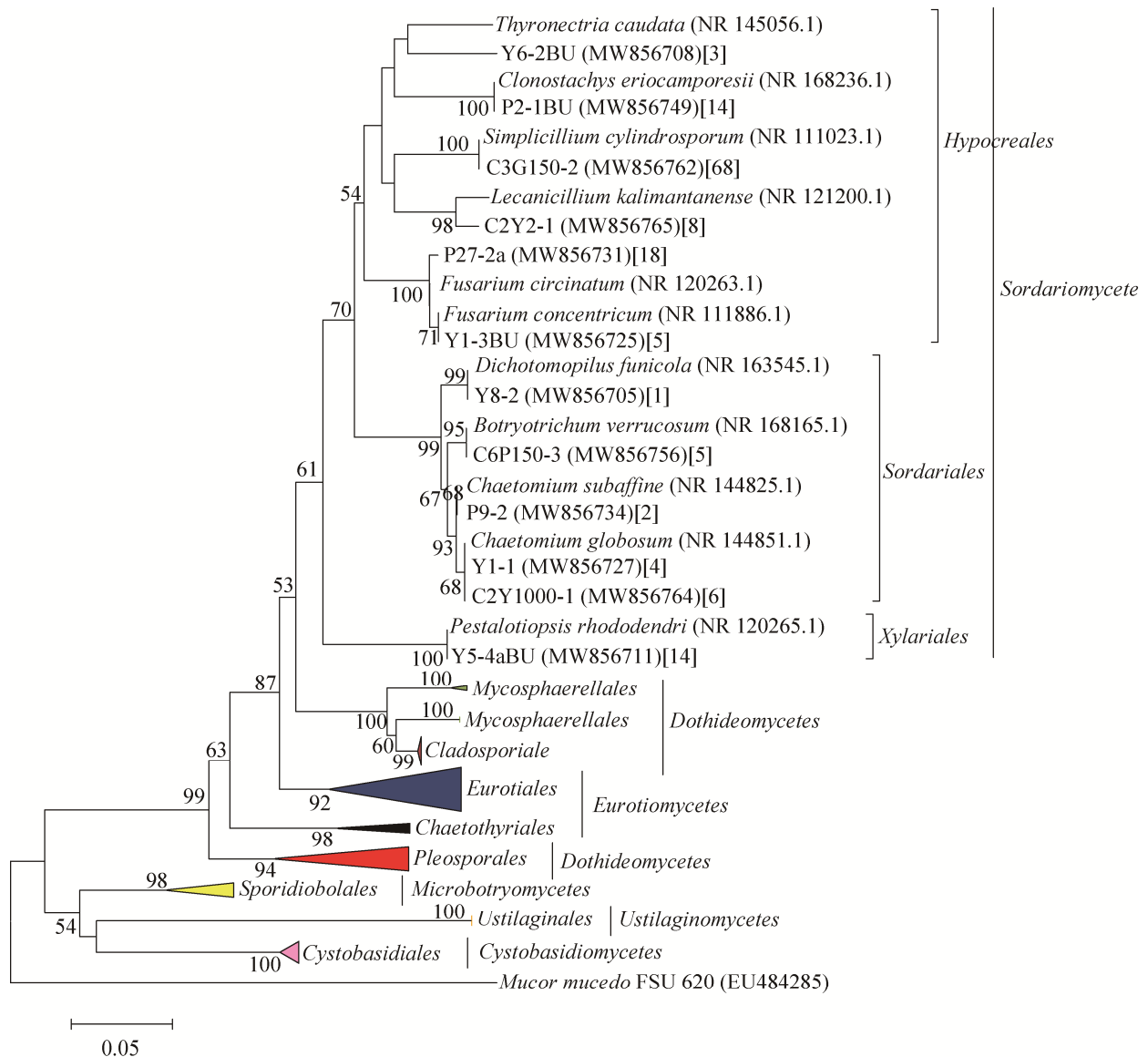


图 2 隶属于粪壳菌纲 11 个种真菌的 ITS rDNA 基因序列系统发育树

Figure 2 Neighbour-joining (NJ) tree for 11 species in *Sordariomycetes* based on ITS rDNA sequences. Numbers in the bracket represent the number of isolated fungal strains.

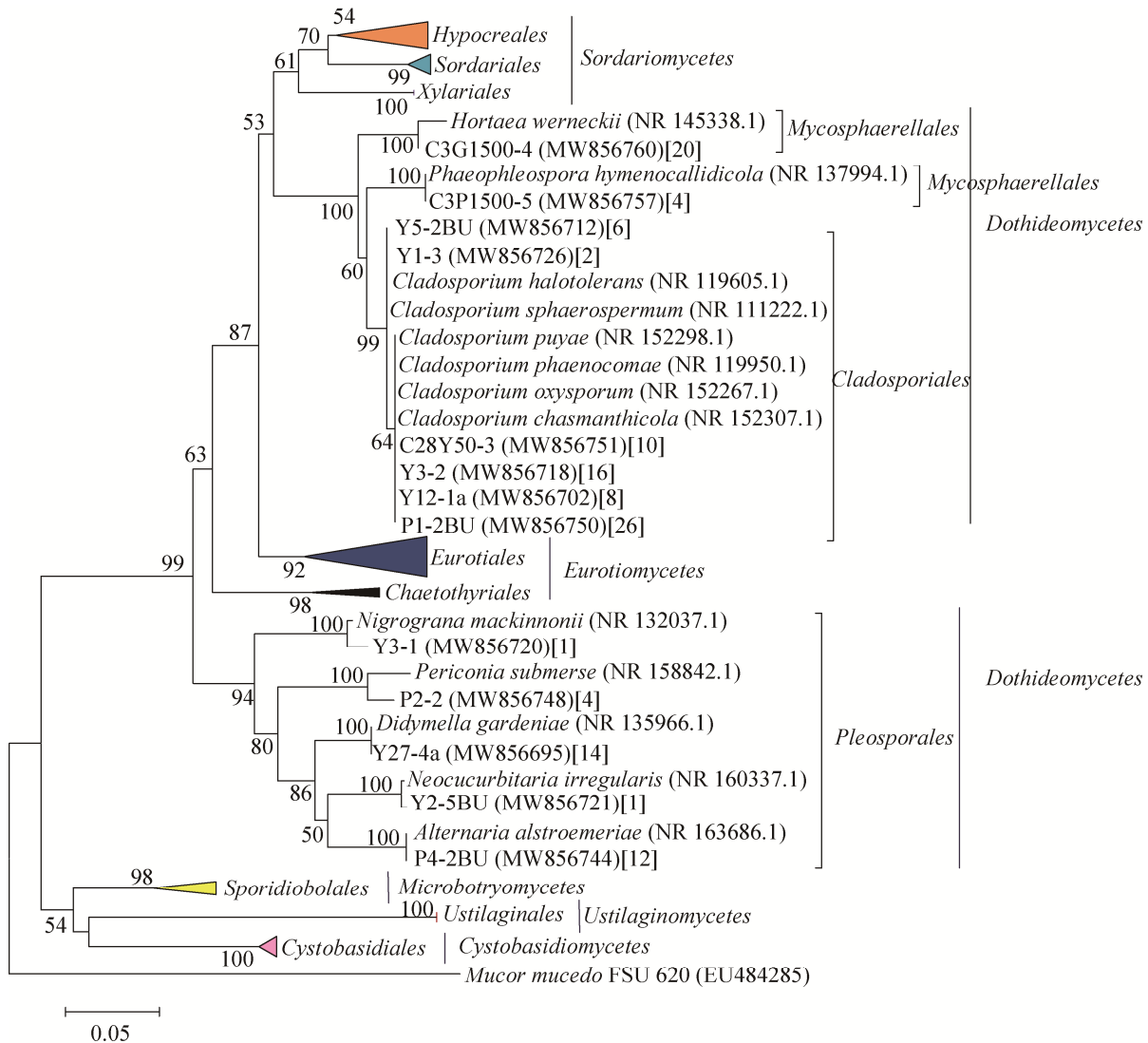


图 3 隶属于座囊菌纲 13 个种真菌的 ITS rDNA 基因序列系统发育树

Figure 3 Neighbour-joining (NJ) tree for 13 species in *Dothideomycetes* based on ITS rDNA sequences. Numbers in the bracket represent the number of isolated fungal strains.

2.3 可培养真菌的地理分布模式

44 个种(含 3 个潜在新分类单元)呈现 5 种地理分布模式(图 6), 包括: (1) 在浅海带、半深海带和深海带均有分布的 15 个种, 包括聚多曲霉 (*Aspergillus sydowii*)、*Cystobasidium benthicum*、*Cladosporium chamanthicola*、*Clonostachys eriocamporesi*、耐盐枝孢 (*Cladosporium halotolerans*)、尖枝孢

(*Cladosporium oxysporum*)、*Cladosporium phaenocoma*、异物外瓶霉 (*Exophiala xenobiotica*)、轮纹镰刀菌 (*Fusarium concentricum*)、产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*)、*Rhodotorula diobovata*、胶红酵母 (*Rhodotorula mucilaginosa*)、*Rhodotorula taiwanensis*、柱孢单梗霉 (*Simplicillium cylindrosporium*)和 *Talaromyces juglandicola*; (2)

未在浅海带发现的 12 个种, 包括 *Aspergillus globosum*、微小囊担菌 (*Cystobasidium pachycaulis*、*Botryotrichum verrucosum*、*minutum*)、*Chaetomium subaffine*、*Cystobasidium calyptogae*、*Chaetomium Dichotomopilus funicola*、*Didymella gardeniae*、

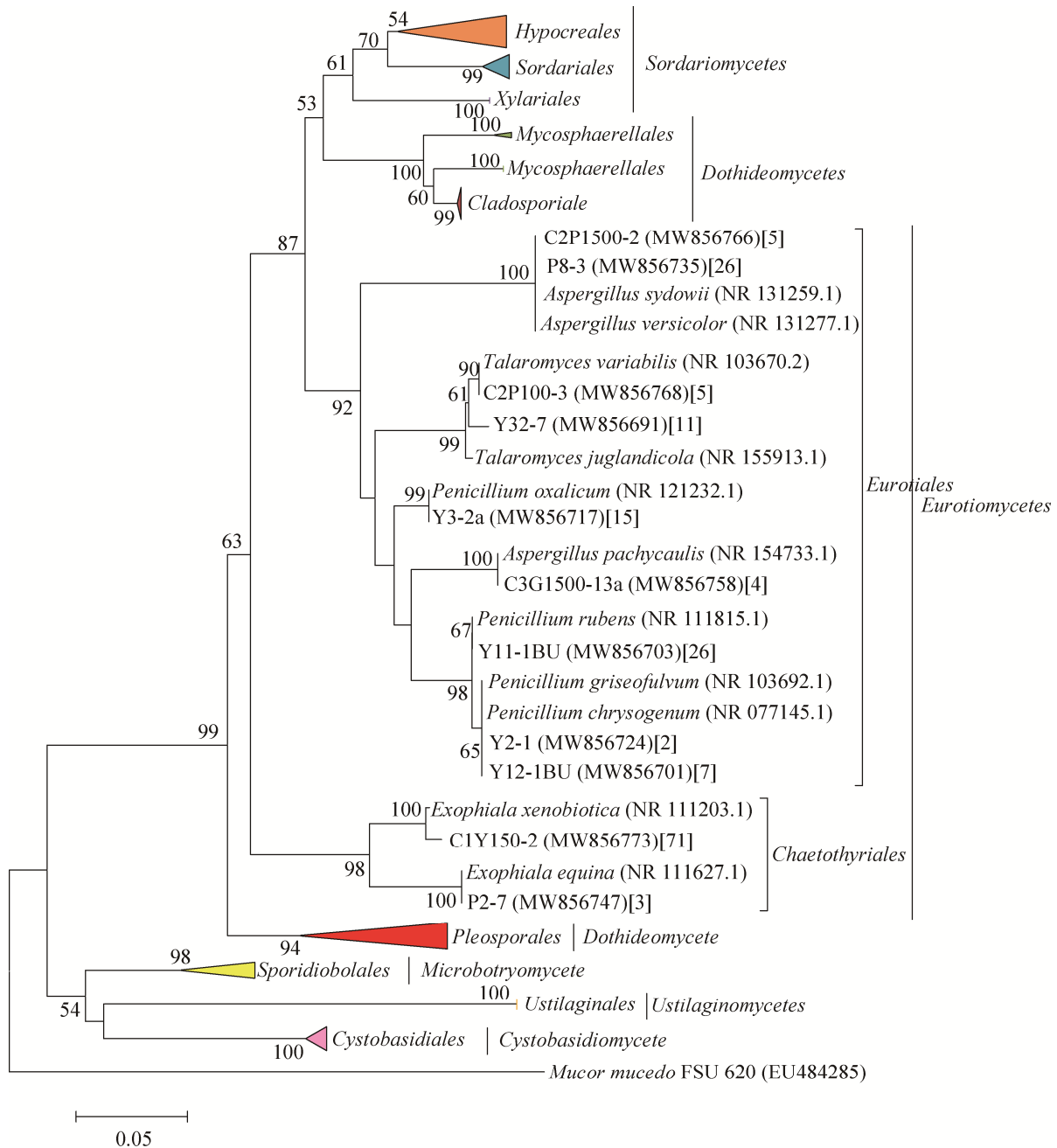


图 4 隶属于散囊菌纲 11 个种真菌的 ITS rDNA 基因序列系统发育树

Figure 4 Neighbour-joining (NJ) tree for 11 species in *Eurotiomycetes* based on ITS rDNA sequences. Numbers in the bracket represent the number of isolated fungal strains.

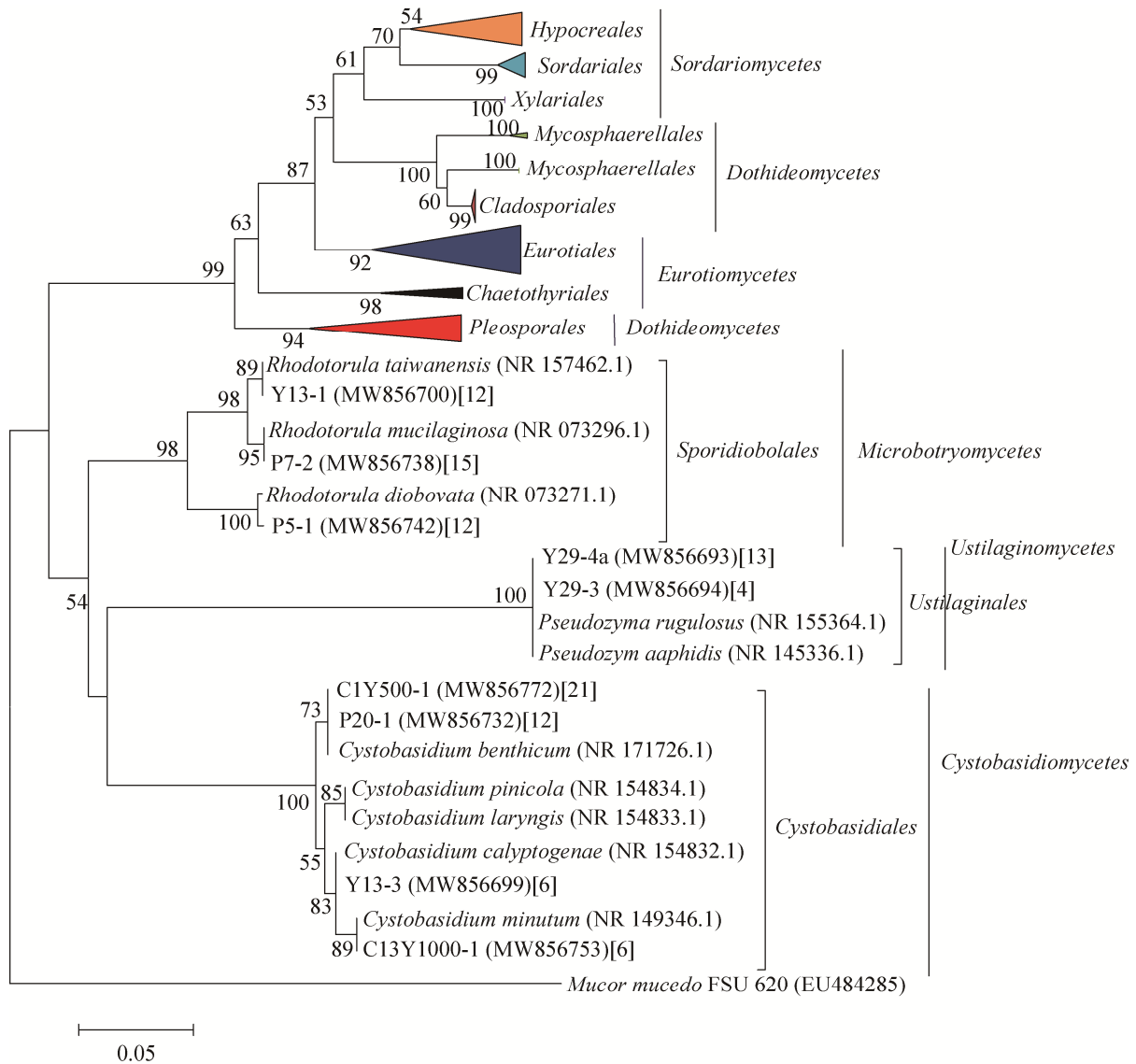


图 5 隶属于微球黑粉菌纲、黑粉菌纲和囊担子菌纲 9 个种真菌的 ITS rDNA 基因序列系统发育树

Figure 5 Neighbour-joining (NJ) tree for 9 species in *Microbotryomycetes*, *Ustilaginomycetes* and *Cystobasidiomycetes* based on ITS rDNA sequences. Numbers in the bracket represent the number of isolated fungal strains.

Hortaea werneckii、产红青霉 (*Penicillium rubens*)、*Pseudozyma rugulosus* 和 *Talaromyces variabilis*，其中 *A. pachycaulis*、*C. subaffine*、*D. funicola* 仅在半深海带水样中发现，而 *B. verrucosum*、*C. minutum*、*P. rugulosus* 仅在深海带水样中发现；(3) 仅在浅海带分布的 4 个种和 1 个潜在新分类单元，包括 *Neocucurbitaria*

irregulari、*Nigrograna mackinnonii*、灰黄青霉 (*Penicillium griseofulvum*)、*Pestalotiopsis rhododendri* 和 *Periconia* sp.；(4) 存在于浅海带和半深海带水样中，但未在深海带分布的 5 个种和 2 个潜在新分类单元，包括杂色曲霉 (*Aspergillus versicolor*)、*Chaetomium nepalense*、球孢枝孢 (*Cladosporium sphaerospermum*)、

Exophiala equina、*Phaeophleospora hymenocallidicola*、*Lecanicillium* sp. 和 *Thyronectria* sp.; (5) 存在于浅海带和深海带水样中, 但未在半深海带分布的 5 个种, 包括

Alternaria alstroemeriae、松树生泡囊担孢酵母 (*Cystobasidium pinicola*)、*Cladosporium puyae*、*Pseudozyma aphidis* 和草酸青霉 (*Penicillium oxalicum*)。

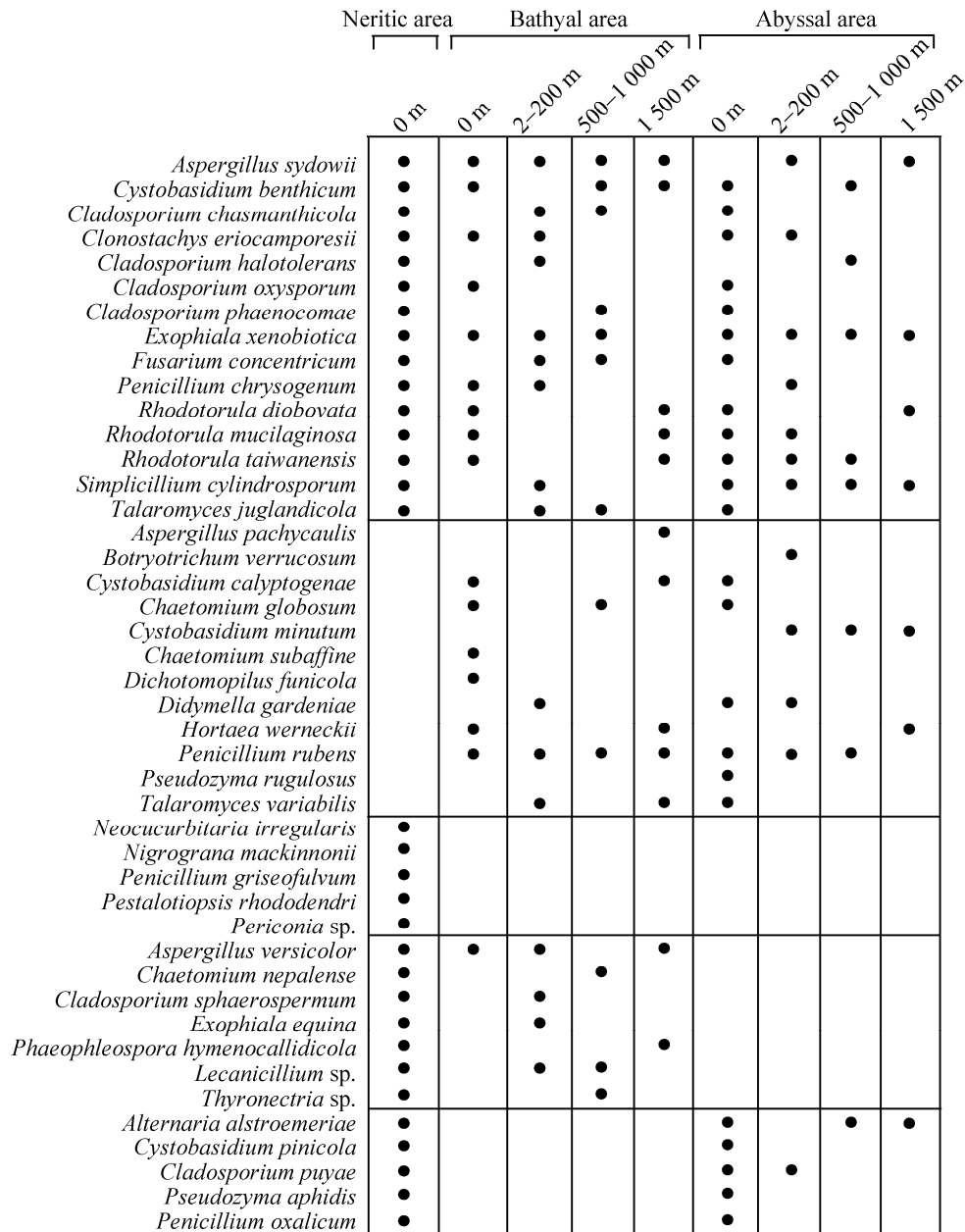


图 6 44 个真菌种的地理分布模式

Figure 6 Geographical distribution patterns of 44 fungal species. Filled circles indicate that the species was isolated from the corresponding seawater samples.

2.4 抑菌菌株筛选

利用固体平板法对隶属于 24 属 44 种的 85 株代表性真菌进行了抑菌活性测试, 发现隶属于 10 属 12 种的真菌对 5 种靶细菌具有不同程度的抑菌作用(表 2)。菌株 *Simplicillium cylindrosporium* C3G150-2 不但对 *S. aureus* MCCC1A0646 具有强抑菌活性, 且对 *P. plecoglossicida* NB2011 和 *A. hydrophila* T4 有不同程度抑菌作用; 菌株 *Hortaea werneckii* C3G1500-4 对 *S. aureus* MCCC1A0646、*P. plecoglossicida* NB2011 和 *A. hydrophila* T4 均有强抑菌活性, 以及对 *V. parahemolyticus* CGMCC 1.1997 和 *V. harveyi* Zj2008 有较弱抑菌活性; 菌株 *Cladosporium halotolerans* Y6-2BU 和 *Didymella gardenia* Y27-4a 对 5 株靶细菌各有不同程度的抑菌活性; 其他真菌至少对 5 种靶细菌中的 1 种有抑菌活性。

3 讨论与结论

本文采用膜过滤法, 对采集自浅海带、半

深海带和深海带的 54 份海水样品中的真菌进行了分离培养, 共获得真菌菌株 548 株, 它们隶属于 24 个属 44 个种(含 3 个潜在新分类单元), 呈现出较高的多样性。基于 ITS 基因序列构建的系统进化树显示, 大部分分离菌株与陆源真菌具有较近的亲缘关系。对本实验所获得的 44 个种的生态分布模式分析发现, 不同种之间的地理分布模式存在较大差异, 主要包括: (1) 15 个种普遍存在于浅海带、半深海带和深海带的海水样品中, 这暗示这些种已具备了强大的海洋环境适应能力, 它们有可能在不同海域均广泛存在; (2) 12 个种不存于浅海带海水样品中, 其原因可能是它们是从其他海域传播至此; (3) 4 个种和 1 个潜在分类单元仅出现于浅海带水样中, 且分离频率较低(表 1), 暗示这些种均为陆地来源, 它们尚没有适应海洋环境, 因此不能在海洋环境中有效扩散; (4) 5 个种和 2 个潜在新分类单元存在于浅海带和半深海带水样, 但不存在于深海带水样中, 这暗示这些种群已经具备了向深海扩散的能力, 但尚不能在

表 2 真菌抑菌菌株筛选实验结果

Table 2 Screening test results of fungal antimicrobial strains

Isolates	Indicator				
	1	2	3	4	5
<i>Pestalotiopsis rhododendri</i> Y5-4aBU	+	-	-	-	-
<i>Penicillium oxalicum</i> P4-2	++	-	-	-	-
<i>Alternaria alstroemeriae</i> Y3-4BU	+	-	-	-	-
<i>Aspergillus pachycaulis</i> C3G1500-13a	-	++	-	-	-
<i>Simplicillium cylindrosporium</i> C3G150-2	+++	++	+	-	-
<i>Hortaea werneckii</i> C3G1500-4	+++	+++	+++	+	+
<i>Cladosporium halotolerans</i> C2M100-1	++	++	-	+	+
<i>Cladosporium phaenocomae</i> C2P1000-2a	++	-	-	-	-
<i>Cladosporium puyae</i> C28Y50-2	-	-	++	+	+
<i>Didymella gardeniae</i> Y27-4a	++	+	-	-	+
<i>Thyronectria</i> sp. Y6-2BU	-	++	+	-	-
<i>Talaromyces variabilis</i> C2P100-3	+	-	-	-	-

-: no transparent circle; +: $6 \leq \Phi < 12$ mm; ++: $12 \text{ mm} \leq \Phi < 18$ mm; +++: $\Phi \geq 18$ mm; Φ : diameter of antimicrobe circle. 1: *Staphylococcus aureus* MCCC1A0646; 2: *Pseudomonas plecoglossicida* NB2011; 3: *Aeromonas hydrophila* T4; 4: *Vibrio parahemolyticus* CGMCC1.1997; 5: *Vibrio harveyi* Zj2008. The results were the average of two replicates.

远海环境中有效生存; (5) 5 个种出现于浅海带和深海带表层海水样品中, 甚至某些种还出现在深海带深海层水样中, 但在半深海带样品中却未能发现它们的踪迹, 其中原因可能与半深海带的采集点和采集的样本数量有关。

真菌的生态可塑性给海洋真菌的定义提出了重大挑战^[16]。Pang 等^[17]提出, 海洋真菌是指那些能够从海洋栖息地中被反复分离的任何真菌, 并且它们能够在海洋环境中生长和/或形成孢子, 或与其他海洋生物存在共生关系, 或在遗传水平上显示出海洋环境适应和进化能力, 或在海洋环境中具有代谢活性。2015 年, Jones 等^[18]对海洋真菌进行了整理, 统计出隶属于 65 个目 19 个科 472 个属中的 1 112 个种的海洋真菌, 包括: 子囊菌门(*Ascomycota*)中的 387 个属 943 个种、担子菌门(*Basidiomycota*)中的 43 个属 96 个种、壶菌门(*Chytridiomycota*)和相关门中的 13 属 26 种、接合菌门(*Zygomycota*)中的 2 属 3 种和芽枝霉门(*Blastocladiomycota*)中的 1 个属 1 个种。在科水平上, 海壳菌科(*Halosphaeriaceae*)是海洋真菌的最大家族, 该科包含 59 个属 141 个种, 而假丝酵母属(*Candida*)、曲霉属和青霉属则是较大的属, 分别含有 64、47 和 39 个种。以 Jones 等的海洋真菌统计数据为参考, 本文分离获得的 41 个真菌种(不包含 3 个潜在新分类单元)中有 13 个种隶属于海洋种, 它们是 *C. oxysporum*、*C. sphaerospermum*、*A. sydowii*、*A. versicolor*、*P. chrysogenum*、*P. griseofulvum*、*P. oxalicum*、*R. mucilaginosa*、*R. cladiensis*、*C. globosum*、*C. benthicum*、*C. minutum* 和 *P. aphidis*。除上述 13 个海洋真菌种外, 本实验室分离获得的 *C. halotolerans* 和 *H. werneckii* 也极有可能是海洋真菌种, 因为近期多个团队在海洋中发现了这些种群, 且这 2 个分离自海洋环境的种均能

产生生物活性物质^[19-20]。

对本实验分离的 41 个种和 3 个潜在新分类单元的抑菌实验表明, 11 个种和 1 个潜在新分类单元(*Thyronectria* sp. Y6-2BU)呈现出抑菌活性(表 2), 其中分离自远海海水样品中的 *S. cylindrosporum* C3G150-2 和 *H. werneckii* C3G1500-4 不但具有较广的抑菌谱, 且均对金黄色葡萄球菌具有较高的抑菌活性, 值得深入研究。此外, 虽然在 13 个海洋种中仅草酸青霉呈现出抑菌活性, 但已有研究表明这些海洋真菌种中的大部分能产生新颖天然产物。如: 分离自红树林的尖枝孢能产生抑菌活性的大环内酯类化合物^[21]; 分离自海洋环境的杂色曲霉能产生生物碱类、蒽醌类、氧杂蒽酮类、二苯醚类、核苷衍生物类、内酯类、多肽类、聚酮化合物类、真菌生物碱类、杂色曲霉素类、萜类、水硫酚类、二酮哌嗪类、aspersiamides 和 indoloditerpene 等 20 余种结构新颖的化合物^[22-25]; 产黄青霉、灰黄青霉和草酸青霉能产生戊烯酮衍生物、羟基苯乙酸衍生物、萜烯类、混源萜类、赤藓糖醇衍生物、聚酮类、二苯甲酮类、sorbicillinoids、二萜类、多氯取代类固醇类、黄酮类、chaetoglobosins、桔霉素类似物、氧杂蒽酮衍生物、二苯醚类、脑苷脂类、苯胺和喹啉衍生物、色酮类、酚醛烯胺类、叠氮基酮类等二十余种结构新颖的化合物, 其中某些化合物具有抗炎活性、抗病毒活性、DNA Topo I 酶抑制活性、抗菌活性、抗真菌活性、抗细菌群体感应活性和抗肿瘤活性^[26-27]; 海洋来源的球毛壳菌能产生白杨素、cytochalasans、嗜氮酮类化合物、chaetomugilins、溶菌酶和链球菌球蛋白等生物活性物质; 深海沉积物来源的胶红酵母能高产类胡萝卜素^[28]。

总之, 本研究首次大尺度开展了近海及远海海域海水样品中真菌的分离培养, 筛选获得

44 个真菌种, 并分析了所获菌种的地理分布模式, 以及筛选出了多株具有抑菌活性的真菌。这些研究结果不但加深了我们对海水可培养真菌多样性的认识, 同时也丰富了海洋真菌菌种资源。

参考文献

- [1] Molinski TF, Dalisay DS, Lievens SL, Saludes JP. Drug development from marine natural products. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2009, 8(1): 69–85.
- [2] 马丽丽, 田新朋, 李桂菊, 赵晏强, 殷建平. 海洋微生物来源天然产物研究现状与态势. *热带海洋学报*, 2021, 40(5): 134–146.
Ma LL, Tian XP, Li GJ, Zhao YQ, Yin JP. Research status and development trends of natural products from marine microorganisms. *Journal of Tropical Oceanography*, 2021, 40(5): 134–146. (in Chinese)
- [3] Overy DP, Bayman P, Kerr RG, Bills GF. An assessment of natural product discovery from marine (*sensu strictu*) and marine-derived fungi. *Mycology*, 2014, 5(3): 145–167.
- [4] Isaka M, Yangchum A, Intamas S, Kocharin K, Jones EBG, Kongsaree P, Prabpai S. Aigialomycins and related polyketide metabolites from the mangrove fungus *Aigialus parvus* BCC 5311. *Tetrahedron*, 2009, 65(22): 4396–4403.
- [5] Abbanat D, Leighton M, Maiese W, Jones EBG, Pearce C, Greenstein M. Cell wall active antifungal compounds produced by the marine fungus *Hypoxylon oceanicum* LL-15G256. I. taxonomy and fermentation. *The Journal of Antibiotics*, 1998, 51(3): 296–302.
- [6] Chokpaiboon S, Unagul P, Nithithanasilp S, Komwijit S, Somyong W, Ratiarpakul T, Isaka M, Bunyapaiboonsri T. Salicylaldehyde and dihydroisobenzofuran derivatives from the marine fungus *Zopfiella marina*. *Natural Product Research*, 2018, 32(2): 149–153.
- [7] Barluenga S, Dakas PY, Ferandin Y, Meijer L, Winssinger N. Modular asymmetric synthesis of aigialomycin D, a kinase-inhibitory scaffold. *Angewandte Chemie International Edition*, 2006, 45(24): 3951–3954.
- [8] Alvi KA, Casey A, Nair BG. Pulchellalactam: a CD45 protein tyrosine phosphatase inhibitor from the marine fungus *Corollospora pulchella*. *The Journal of Antibiotics*, 1998, 51(5): 515–517.
- [9] Elsebai MF, Kehraus S, Gütschow M, König GM. Spartinoxide, a new enantiomer of A82775C with inhibitory activity toward HLE from the marine-derived fungus *Phaeosphaeria spartinae*. *Natural Product Communications*, 2010, 5(7): 1071–1076.
- [10] Overy DP, Rämä T, Oosterhuis R, Walker AK, Pang KL. The neglected marine fungi, *Sensu stricto*, and their isolation for natural products' discovery. *Marine Drugs*, 2019, 17(1): E42.
- [11] Wang C, Lu HY, Lan JZ, Zaman KH, Cao SG. A review: halogenated compounds from marine fungi. *Molecules*, 2021, 26(2): 458.
- [12] Youssef FS, Ashour ML, Singab ANB, Wink M. A comprehensive review of bioactive peptides from marine fungi and their biological significance. *Marine Drugs*, 2019, 17(10): 559.
- [13] Xu JZ, Yi MQ, Ding LJ, He S. A review of anti-inflammatory compounds from marine fungi, 2000–2018. *Marine Drugs*, 2019, 17(11): 636.
- [14] Karwehl S, Stadler M. Exploitation of fungal biodiversity for discovery of novel antibiotics. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2016, 398: 303–338.
- [15] Stielow JB, Lévesque CA, Seifert KA, Meyer W, Irinyi L, Smits D, Renfurm R, Verkley GJM, Groenewald M, Chaduli D, Lomascolo A, Welti S, Lesage-Meessen L, Favel A, Al-Hatmi AMS, Damm U, Yilmaz N, Houbraken J, Lombard L, Quaedvlieg W, Binder M, Vaas LAI, Vu D, Yurkov A, Begerow D, Roehl O, Guerreiro M, Fonseca A, Samerpitak K, van Diepeningen AD, Dolatabadi S, Moreno LF, Casaregola S, Mallet S, Jacques N, Roscini L, Egidi E, Bizet C, Garcia-Hermoso D, Martín MP, Deng S, Groenewald JZ, Boekhout T, De Beer ZW, Barnes I, Duong TA, Wingfield MJ, de Hoog GS, Crous PW, Lewis CT, Hambleton S, Moussa TAA, Al-Zahrani HS, Almaghrabi OA, Louis-Seize G, Assabgui R, McCormick W, Omer G, Dukik K, Cardinali G, Eberhardt U, De Vries M, Robert V. One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 2015, 35(1): 242–263.
- [16] Schoch CL, Crous PW, Groenewald JZ, Boehm EWA, Burgess TI, De Gruyter J, De Hoog GS, Dixon LJ, Grube M, Gueidan C, Harada Y, Hatakeyama S, Hirayama K, Hosoya T, Huhndorf SM, Hyde KD, Jones EBG, Kohlmeyer J, Krays A, Li YM, Lücking R,

- Lumbsch HT, Marvanová L, Mbatchou JS, McVay AH, Miller AN, Mugambi GK, Muggia L, Nelsen MP, Nelson P, Owensby CA, Phillips AJL, Phongpaichit S, Pointing SB, Pujade-Renaud V, Raja HA, Plata ER, Robbertse B, Ruibal C, Sakayaroj J, Sano T, Selbmann L, Shearer CA, Shirouzu T, Slippers B, Suetrong S, Tanaka K, Volkmann-Kohlmeier B, Wingfield MJ, Wood AR, Woudenberg JHC, Yonezawa H, Zhang Y, Spatafora JW. A class-wide phylogenetic assessment of *Dothideomycetes*. *Studies in Mycology*, 2009, 64: 1–15S10.
- [17] Pang KL, Overy DP, Jones EBG, Calado MDL, Burgaud G, Walker AK, Johnson JA, Kerr RG, Cha HJ, Bills GF. ‘Marine fungi’ and ‘marine-derived fungi’ in natural product chemistry research: toward a new consensual definition. *Fungal Biology Reviews*, 2016, 30(4): 163–175.
- [18] Jones EBG, Suetrong S, Sakayaroj J, Bahkali AH, Abdel-Wahab MA, Boekhout T, Pang KL. Classification of marine *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Blastocladiomycota* and *Chytridiomycota*. *Fungal Diversity*, 2015, 73(1): 1–72.
- [19] Wang CN, Lu HM, Gao CH, Guo L, Zhan ZY, Wang JJ, Liu YH, Xiang ST, Wang J, Luo XW. Cytotoxic benzopyranone and xanthone derivatives from a coral symbiotic fungus *Cladosporium halotolerans* GXIMD 02502. *Natural Product Research*, 2020: 1–8.
- [20] Romeo O, Marchetta A, Giosa D, Giuffrè L, Urzi C, De Leo F. Whole genome sequencing and comparative genome analysis of the halotolerant deep sea black yeast *Hortaea werneckii*. *Life*, 2020, 10(10): 229.
- [21] Wang WX, Feng HM, Sun CX, Che Q, Zhang GJ, Zhu TJ, Li DH. Thiocladospolides F-J, antibacterial sulfur containing 12-membered macrolides from the mangrove endophytic fungus *Cladosporium oxysporum* HDN13-314. *Phytochemistry*, 2020, 178: 112462.
- [22] Hu JS, Li Z, Gao JY, He HT, Dai HQ, Xia XK, Liu CH, Zhang LX, Song FH. New diketopiperazines from a marine-derived fungus strain *Aspergillus versicolor* MF180151. *Marine Drugs*, 2019, 17(5): 262.
- [23] Ding Y, Zhu XJ, Hao LL, Zhao MY, Hua Q, An FL. Bioactive indolyl diketopiperazines from the marine derived endophytic *Aspergillus versicolor* DY180635. *Marine Drugs*, 2020, 18(7): 338.
- [24] Zhang JY, Liu C, Lv Y, Wei JH, Li B, Liao GF, Lu RM, Yang XZ. A pair of new isocoumarin enantiomers of *Ludwigia hyssopifolia*. *Natural Product Research*, 2020: 1–8.
- [25] Amin M, Liang X, Ma X, Dong JD, Qi SH. New pyrone and cyclopentenone derivatives from marine-derived fungus *Aspergillus sydowii* SCSIO 00305. *Natural Product Research*, 2021, 35(2): 318–326.
- [26] Liu YP, Fang ST, Shi ZZ, Wang BG, Li XN, Ji NY. Phenylhydrazone and quinazoline derivatives from the cold-seep-derived fungus *Penicillium oxalicum*. *Marine Drugs*, 2020, 19(1): 9.
- [27] Jiang LL, Tang JX, Bo YH, Li YZ, Feng T, Zhu HW, Yu X, Zhang XX, Zhang JL, Wang WY. Cytotoxic secondary metabolites isolated from the marine alga-associated fungus *Penicillium chrysogenum* LD-201810. *Marine Drugs*, 2020, 18(5): 276.
- [28] Buedenbender L, Kumar A, Blümel M, Kempken F, Tasdemir D. Genomics- and metabolomics-based investigation of the deep-sea sediment-derived yeast, *Rhodotorula mucilaginosa* 50-3-19/20B. *Marine Drugs*, 2020, 19(1): 14.

(本文责编 李磊)