

基于高通量测序和纯培养技术解析海南东寨港红树植物老鼠簕根际放线菌多样性及其潜在的功能

刘顺卿^{1,2}, 何小稳¹, 吴金燕¹, 易国辉¹, 陈芊芊^{1,2}, 谢欣宜^{1,2}, 隋金蕾^{1*}

1. 海南医学院科学实验中心, 海南海口 571199; 2. 海南医学院基础医学与生命科学学院, 海南海口 571199

摘要: 根际是土壤-植物根系-微生物进行物质交换的活跃地带。根际放线菌是根系放线菌的重要组成部分, 是生物活性物质的主要来源之一。本研究从海南东寨港红树林自然保护区采集了 5 份红树植物老鼠簕根际土壤样品, 采用高通量测序和传统纯培养相结合的策略探究样品中根际放线菌的多样性和产生生物活性物质的潜力。利用 Illumina NovaSeq 6000 测序平台对老鼠簕根际样品细菌的 16S rRNA 基因的 V3~V4 区域进行测序与分析, 结果显示: (1) 老鼠簕根际细菌共注释到 32 个门 (包括 25 个有效鉴定的门), 其中优势门是变形菌门; α 多样性分析表明老鼠簕根际细菌群落多样性非常丰富; (2) 对放线菌门的微生物群落进行分析, 注释到 33 个有效鉴定的属、4 个暂定的属和 28 个未培养的新放线菌属, KEGG 功能预测分析显示老鼠簕根际放线菌主要参与次级代谢产物的生物合成。同时, 利用传统纯培养方法分离放线菌, 经形态特征分群和排重, 通过 PCR 扩增、测序并比对 16S rRNA 基因序列后进行放线菌多样性分析, 利用琼脂扩散法筛选抑菌活性, 通过基于 PCR 的基因筛选技术检测代表菌株可能存在的 PKS-I、PKS-II 和 NRPS 抗生素生物合成基因, 结果显示: (1) 共得到 4 个属的 33 株放线菌代表菌株, 其中链霉菌属为优势菌属, 有 2 个属未被高通量测序分析结果注释到; (2) 代表菌株的 NRPS 和 PKS-II 基因阳性率很高 (90%以上), 24.24% 根际放线菌具有抗 1 种及以上指示菌的活性。本研究利用高通量测序和纯培养方法得出东寨港红树植物老鼠簕的根际放线菌多样性非常丰富, 并具有较好的合成次生代谢产物的潜力, 因此, 该研究结果可为具有生物活性化合物的筛选提供丰富的菌种资源, 同时也为后续新药的开发提供重要参考依据。

关键词: 老鼠簕; 根际; 放线菌多样性; 高通量测序; 纯培养

中图分类号: Q939.9 文献标志码: A

Analysis of Rhizospheric Actinomycetes Diversity and Potential Functions of Mangrove *Acanthus ilicifolius* in Dongzhaigang of Hainan Province Based on High-throughput Sequencing and Pure Culture

LIU Shunqing^{1,2}, HE Xiaowen¹, WU Jinyan¹, YI Guohui¹, CHEN Qianqian^{1,2}, XIE Xinyi^{1,2}, SUI Jinlei^{1*}

1. Public Research Center, Hainan Medical University, Haikou, Hainan 571199, China; 2. School of Basic Medicine and Life Science, Hainan Medical University, Haikou, Hainan 571199, China

Abstract: Rhizosphere is a dynamic interface where soil, plant roots and microorganisms exchange substances. Rhizospheric actinomycetes are an important component of root actinomycetes and one of the main sources of bioactive substances. In this study, five different rhizospheric soil samples of a mangrove plant, *Acanthus ilicifolius*, were collected from the Dongzhaigang Mangrove Nature Reserve of Hainan province. A combination of high-throughput sequencing and traditional pure culture strategies were used to explore the diversity of the rhizospheric actinomycetes of *A. ilicifolius* and the potential to produce bioactive substances in the samples. The V3 to V4 regions of 16S rRNA gene in

收稿日期 2023-09-28; 修回日期 2023-10-25

基金项目 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 (No. 2019RC216); 海南医学院引进人才科研启动基金项目 (No. XRC190006); 海南医学院 (国家级) 大学生创新创业训练计划项目 (No. 202311810008)。

作者简介 刘顺卿 (2003—), 男, 本科生, 研究方向: 微生物学。*通信作者 (Corresponding author): 隋金蕾 (SUI Jinlei), E-mail: hy0303010@hainmc.edu.cn。

the rhizospheric samples of *A. ilicifolius* were sequenced and analyzed by Illumina Novaseq 6000 sequencing platform. A total of 32 phyla (including 25 effectively identified phyla) were annotated, of which Proteobacteria is the dominant phyla. α -diversity analysis showed that the rhizospheric bacterial community of *A. ilicifolius* was very abundant. The microbial communities of actinomycetes were analyzed, and 33 validated genera, four tentative genera and 28 uncultured new genera were noted. KEGG functional prediction analysis in different levels showed that rhizospheric actinomycetes were mainly involved in the biosynthesis of secondary metabolites including various antibiotics. Meanwhile, actinomycetes were isolated by the traditional pure culture method. After isolation, purification, morphological characteristics grouping and rearrangement, the diversity of actinomycetes of mangrove *A. ilicifolius* was analyzed by PCR amplification, sequencing and comparison of 16S rRNA gene sequences. The antimicrobial activity was screened by the agar diffusion method. PCR-based gene screening technology was used to detect the possible antibiotic biosynthesis genes of the representative strains of PKS-I, PKS-II and NRPS. A total of 33 representative strains of rhizospheric actinomycetes were obtained from four genera, of which *Streptomyces* was the dominant genus, and 2 genera could not be detected by high-throughput sequencing method. The positive rates of NRPS and PKS-II genes of the representative strains were very high (more than 90%). 24.24% of rhizospheric actinomycetes had the activity against at least one or more indicator microorganisms. In this study, high-throughput sequencing and traditional pure culture methods were used to show that rhizospheric actinomycetes of a mangrove plant *A. ilicifolius* from Dongzhaigang had a very rich actinomycetic diversity. The rhizospheric actinomycetes of *A. ilicifolius* has good potential to synthesize secondary metabolites, which could provide rich microbial resources for the screening of bioactive compounds, and also provide an important basis for the development of subsequent new drugs.

Keywords: *Acanthus ilicifolius*; rhizosphere; actinomycetic diversity; high-throughput sequencing; pure culture

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.07.022

红树林 (Mangrove) 是生长在热带和亚热带海岸潮间带, 由红树植物为主体的常绿乔木或灌木组成的湿地木本植物群落, 在净化海水、防风消浪、固碳储碳、维护生物多样性等方面发挥着重要作用^[1]。红树植物是红树林生态系统中唯一的木本植物。红树林生境的强还原性和酸度、高盐度和丰富的营养含量^[1-2], 造就了丰富而独特的微生物资源。

根际是直接靠近根系的一个狭窄的土壤区, 是受植物根系影响最强烈的土壤区域, 微生物活动最活跃, 微生物多样性最丰富^[3]。根际最初通过被根系分泌物吸引而富集特定微生物, 然而, 这些分泌物对非根际土壤微生物的影响很小, 这使得根际微生物的丰度和种类与非根际土壤有一定的差异^[4]。根际微生物感知和解释自身、其他微生物、植物而产生信号, 并能够通过释放信号分子影响其植物宿主^[5]。红树林植物根际微生物通过参与与宿主生命活动有关的过程, 影响红树植物的生长与代谢, 在红树林生态系统中发挥着重要作用。根际微生物, 特别是放线菌是新抗生素的最有希望的来源, 对制药工业和生物技术的发展都有重要的意义^[3, 6]。放线菌是通常从根际分离出来的重要细菌群, 是新型生物活性物质的主要来源之一。已知由它们产生的抗生素在工业、

农业、医学和兽医科学中具有广泛应用^[7]。

海南东寨港红树林是我国成片面积最大、种类最齐全、保存最完整的红树林湿地生态系统^[8]。红树植物老鼠簕 (*Acanthus ilicifolius* Linn.) 是一种灌木, 生长在热带和亚热带地区的红树林和潮汐区^[9]。其独特的生长环境造就了多种结构特异的次生代谢物, 表现出多种生物活性, 具有潜在的药用价值。在印度和中国, 这种植物的叶子、根和整株植物都被用于传统医学, 是红树林中一种重要的药用植物^[9-10]。目前, 系统全面地探究东寨港红树林红树植物老鼠簕的生物多样性的研究还较少, 本研究选取老鼠簕 (*A. ilicifolius*) 的根际土壤为材料, 利用免培养测序和纯培养分离探究老鼠簕根际放线菌的多样性, 检测放线菌的抗菌活性和 3 类活性物质化合物合成基因簇, 为开发新药提供重要的菌种资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土壤样品 供试土壤样品为老鼠簕的根际土壤样品, 于 2021 年 5 月 3 日采自海南省海口市东寨港红树林自然保护区 (19°95'N, 110°55'E)。根际土的采样方法为 5 点法 (即将同一地点 5 株老鼠簕的根际土的混样作为一个样品, 设置 5 个

生物学重复)。将植株直接连根拔起,连带周围松散的土一起装入无菌自封袋,放入装有冰和冰袋的泡沫箱中低温保存,4 h 内带回实验室。抖掉周围松散的土,用无菌磷酸缓冲液(PBS)冲洗剩下的附着在根周围的土壤(约 1 mm 厚),离心,收集根际土(rhizosphere soil)。将得到的根际土分成 2 份,1 份直接于-80℃保存,1 份置于无菌平皿中室温风干,用于放线菌的分离。

1.1.2 菌株 供试菌株为从老鼠筋根际土分离和鉴定的根际放线菌。指示菌有金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, SA)、大肠杆菌(*Escherichia coli* ATCC 25922, EC)和白色念珠菌(*Candida albicans* ATCC 10231, CA),均购自广东环凯微生物科技有限公司。

1.1.3 主要试剂 PowerSoil® DNA 分离试剂盒(美国 MoBio 公司);放线菌分离琼脂(AI,美国 Difco 公司);改良的高氏 I 号培养基(MG,青岛海博生物科技有限公司);酵母麦芽浸汁培养基(ISP2,青岛海博生物科技有限公司);葡萄糖天门冬素培养基(GA,青岛海博生物科技有限公司);腐殖酸培养基(HV,青岛海博生物科技有限公司);燕麦培养基(ISP3,青岛海博生物科技有限公司);制霉菌素(阿拉丁生化科技股份有限公司,货号:N141226-5MU;≥4400 USP units/mg);羧苄酮酸钠(上海源叶生物科技有限公司,货号:S25789-5 g,含量≥98%);PCR 所用的 10×Buffer、Taq DNA 聚合酶、dNTPs 等(TaKaRa 公司)。

1.1.4 仪器与设备 PCR 扩增仪(德国 Biometra 公司,型号:analytikjena);生化培养箱(上海申贤恒温设备厂,型号:DHP-240);光学显微镜(奥林巴斯光学技术公司,型号:CX41);组织研磨仪(上海净信实业发展有限公司,型号:JXFSTPRP-24);Centrifuge 5430 台式离心机(德国艾本德,型号:Centrifuge 5430);多功能酶标仪(美国伯腾仪器有限公司,型号:Synergy HTX);生物安全柜(青岛海尔生物医疗股份有限公司,型号:HR30-IIA2)。

1.2 方法

1.2.1 高通量测序分析 (1)样品 DNA 提取和高通量测序。采用 MoBio PowerSoil® DNA 分离试剂盒提取根际土基因组总 DNA,具体方法参照 MoBio PowerSoil® DNA 分离试剂盒说明书。扩增 16S rRNA 基因 V3~V4 区的引物是 338F(5'-ACT

CCTACGGGAGGCAGCA-3')和 806R(5'-GGACT ACHVGGGTWTCTAAT-3')[11],扩增后的 PCR 产物用 2%的琼脂糖凝胶电泳检测。

(2)数据分析。样品纯化检测后由北京百迈客生物科技有限公司采用 Illumina Novaseq 6000 测序平台的双末端测序(Paired-End)法进行高通量测序。为方便测序及数据分析,AIS1~AIS5 代表老鼠筋根际样品的第 1 到第 5 个生物学重复。测序数据下机后,首先对数据进行处理,主要流程为:使用 Illumina Novaseq 6000 系统从经过验证的文库中获得有效的扩增子序列。使用 FLASH (Version 1.2.11)软件拼接得到原始 Tags 数据。生成高质量的扩增子序列方法如下:首先,使用 Trimmomatic (version 0.33)软件对原始数据进行质量过滤(参数设置:50 bp 的窗口,如果窗口内的平均质量值低于 20,从窗口开始截去后端碱基),然后使用 Cutadapt (version 1.9.1)软件进行引物序列的识别与去除(参数设置:允许最大错配率 20%,最小覆盖度 80%),接着用 USEARCH (version 10.0)软件对双末端 reads 进行拼接(参数设置:最小 overlap 长度为 10 bp,overlap 区允许的最小相似性 90%,最大错配碱基数为 5 bp)并用 UCHIME (version 8.1)软件去除嵌合体(参数设置:2 条 parents 分别有一段序列与 query 序列相似度在 80%以上,则判断该 query 为嵌合体),最终得到高质量的序列用于后续分析。使用 USEARCH (version 10.0)软件将相似性高于 97%的序列聚类为一个分类单元,即 OTU (operational taxonomic unit)。与 SILVA 参考序列 (Release 132, <http://www.arb-silva.de>)[12]比较,采用朴素贝叶斯分类器对特征序列进行注释分析。另外,与将叶绿体和线粒体标记的参考序列匹配的序列从数据集中删除。

生物信息学分析使用百迈客云平台 BMKCloud(www.biocloud.net)进行。利用 QIIME2 (<https://qiime2.org/>)对样品中不同物种的丰度进行评估,利用 R 程序包绘制基于不同分类水平频率分布的直方图。随后,通过 QIIME 软件获得样品的 α 多样性指数,采用 Student's *t* 检验对各红树林物种的细菌多样性和丰度进行分析。采用 ACE 和 Chao1 指数估算细菌丰度,采用 Simpson 和 Shannon 指数估算细菌多样性。利用云平台 BMKCloud 过滤(保留)放线菌门(Actinobacteria)进行放线菌多样性分析,分析放线菌门、属水平的

多样性情况。为了分析不同样本中放线菌类群在功能上的差异,使用 PICRUSt2 软件预测它们在系统发育中的功能潜力^[13]。PICRUSt2 软件将待预测的特征序列与 IMG (integrated microbial genomes)微生物基因组数据库已有的数据进行对比,推测样本中的功能基因组成。首先需要对生成的特征丰度表进行标准化处理(不同的种属菌包含的 16S 拷贝数不相同);然后,通过每个特征 (Feature) 对应的 ID,即可获得特征 (Feature) 对应的 KEGG 家族信息,从而计算该 KEGG 的丰度并从 KEGG 数据库的信息中获得通路、特征 (Feature) 丰度来计算各功能类别的丰度情况。

1.2.2 纯培养分析 (1) 根际放线菌的分离、纯化和保藏。采用 5 种选择性分离培养基[放线菌分离琼脂 (AI)、改良的高氏 I 号培养基 (MG)、酵母麦芽浸汁培养基 (ISP2)、葡萄糖天门冬素培养基 (GA) 和腐殖酸培养基 (HV)]进行老鼠簕根际放线菌的分离。在分离培养基中加入抑制剂(制霉菌素 50 mg/L, 萘啶酸钠 25 mg/L 和重铬酸钾 25 mg/L)抑制生长较快的杂菌(细菌和真菌)的生长。选用 ISP2 和燕麦培养基 (ISP3) 作为菌株纯化培养基,选用 ISP2 作为活化和保藏培养基。另外,选用课题组前期优化的葡萄糖淀粉酵母培养基 (GSP) (配方:葡萄糖 10 g、可溶性淀粉 20 g、蛋白胨 10 g、酵母粉 10 g、KH₂PO₄ 1 g、MgSO₄·7H₂O 0.5 g、CaCO₃ 1 g, pH 7.0~7.5) 作为菌株发酵培养基。

放线菌的分离采用 2 种分离方法:(a) 涂布稀释法:称取风干的土壤样品 5 g 溶于 1/4 浓度的林格溶液,旋涡振荡混匀,55 °C 水浴加热 20 min,再进行梯度稀释,吸取 100 μL 的 10⁻² 和 10⁻³ 悬浮液涂布在分离平板上。在 28 °C 生化培养箱倒置培养 3 周至 3 个月;(b) 印章法:称取 1 g 土壤,用无菌研钵研磨均匀后,置于无菌培养皿中(湿土先在超净工作台干燥 2 h),用无菌的橡胶塞均匀蘸取土样后,反复压在分离琼脂表面,产生一系列稀释效果。在 28 °C 生化培养箱倒置培养 3 周至 3 个月。

待分离平板长出疑似放线菌菌落后,挑选单菌落转接入 ISP2 和 ISP3 平板中,采取四区划线法纯化菌株,28 °C 培养 7 d。根据菌落在 ISP2 和 ISP3 的形态特征以及显微镜下观察基内菌丝与气生菌丝的形态特征等,进行分群、形态鉴定和去重

复后挑选代表菌株并进行保藏。

(2) DNA 的提取、扩增和测序。将得到的代表菌株接种在 ISP2 液体培养基中,在 28 °C 摇床中 180 r/min 培养 36~48 h。取 1 mL 的培养物加入至 1.5 mL 离心管中,以 13 000 r/min 离心 1 min,然后弃上清。将沉淀重悬于 500 μL 的无菌水中,加入 4 颗无菌小钢珠,在组织研磨仪中以 50 Hz 研磨 1 min。10 000 r/min 离心 2 min 后,取上清用作模板 DNA。

16S rRNA 基因的扩增使用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。反应体系:2.5 μmol/L dNTPs 4 μL, 10×Buffer 2.5 μL, 10 μmol/L 正、反向引物各 0.5 μL, 5 U/μL Taq DNA 聚合酶 1.5 μL, 模板 DNA 2 μL, 加入 ddH₂O 补足至 25 μL。反应程序:95 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物用 E.Z.N.A.凝胶纯化试剂盒 (Omega Bio-tek, USA) 纯化后连接到 pMD-19T 载体上,送往武汉天一辉远生物科技有限公司测序。

将测序结果在 EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/identify>) 网站上进行相似性比对,下载相似性最高的模式菌株。利用 MEGA 11 软件采用邻接法(自展值 1000)进行系统进化发育树的构建^[14-16]。

(3) 化合物合成基因的检测。聚酮合酶 (PKS) 基因和非核糖体肽合成酶 (NRPS) 基因是常用来筛选微生物合成次级代谢产物的基因,广泛用于评价细菌、真菌、蓝细菌等合成相应次级代谢产物的潜在能力^[17]。本研究拟对 PKS-I、PKS-II 和 NRPS3 类抗生素合成基因进行扩增,引物序列及目的条带大小见表 1。PCR 扩增条件参照文献^[18]进行。用琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物,根据条带大小判断代表菌株是否携带相应基因。

(4) 代表菌株的发酵和抑菌活性初筛。将 33 株新活化的老鼠簕根际放线菌菌株,转接到 GSP 液体培养基中进行小量发酵,28 °C,220 r/min 振荡培养 7 d,将发酵液 6000 r/min 离心 15 min,离心后的上清用于抗菌活性初筛,以未接种菌株的培养基作为阴性对照。采用琼脂扩散法筛选抗菌活性。吸取 0.2 mL 病原指示菌悬液涂布固体培养基表面,待液体吸收后,用打孔器打出直径 8 mm

表 1 化合物合成基因引物序列及目的条带大小
Tab. 1 Primers used in screening of genes associated with compound synthesis

基因名称 Gene name	基因长度 Gene length/bp	引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
PKS-I	1200~1400	K1F	TSAAGTCSAACATCGGBCA
		M6R	CGCAGGTTSCSGTACCAG
PKS-II	600	KSa	TSGCSTGCTTGGAYGCSATC
		KSβ	TGGAANCCGCCGAABCCTCT
NRPS	900	A3F	GCSTACSYSATSTACACSTCSGG
		A7R	SASGTCVCCSGTSCGGTAS

的小孔加入发酵液上清，每株菌设置 3 次重复，并观测阴性对照组有无抑菌圈形成。将细菌指示菌（SA 和 EC）于 37 ℃培养 16~18 h，真菌指示菌（CA）于 37 ℃培养 20~24 h，分别测量抑菌圈直径。

2 结果与分析

2.1 高通量测序分析内生细菌和放线菌多样性

2.1.1 测序数据基本情况分析 对红树林物种老鼠簕根际土壤进行 16S rRNA 扩增子测序。如图 1 所示，老鼠簕根际土壤样品 5 个生物学重复的稀释曲线最终都归于平缓，说明测序趋于饱和，能够比较真实地反映老鼠簕根际土壤样品的微生物群落。

本研究共从 5 个样本中获得 400 615 个 PE reads。如表 2 所示，经过质量过滤和数据合并，共获得 263 704 条高质量序列，以 97% 的序列一致性阈值并删除低丰度 OTU，共检测到 2273 个 OTUs。同时，老鼠簕根际土壤样品的 5 个样品（生物学重复）测序覆盖率均超过 99%，理论上测序数据已能覆盖样品中的全部序列。

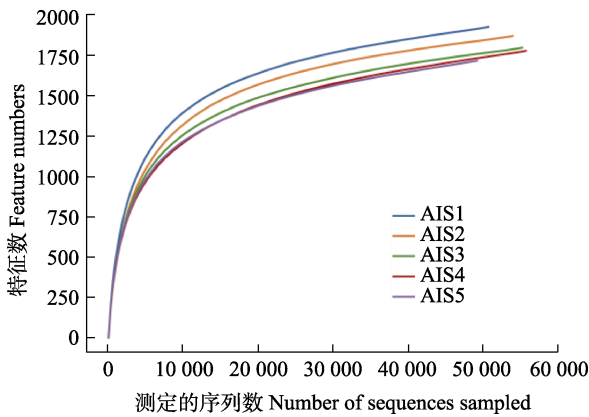


图 1 老鼠簕根际土壤样品的稀释曲线
Fig. 1 Multi-samples shannon curves of 16S rRNA sequences in the rhizosphere compartments of mangrove plant *A. ilicifolius*

α 多样性用 ACE 指数和 Chao1 指数来评估样品内微生物群落丰富度（community richness），反映的是一个群落中物种数目的多少。ACE 指数和 Chao1 指数用来估计物种总量，Chao1 指数越大，代表物种总量越多。从表 2 可以看出，老鼠簕根际土壤样品的 5 个生物学重复 ACE 指数和 Chao1 指数比较大，且不同样品间差别不大，可知不同生物学重复的微生物群落丰富，总量比较相近。Simpson 指数和 Shannon 指数被用来反映样品中微生物群落多样性（community diversity），是物种丰富度和物种均匀度的综合指标，其值越大，说明群落物种丰富度越大或均匀度越高^[18]。老鼠簕根际土壤样品的 5 个生物学重复的 Simpson 和 Shannon 指数较大，且相近，说明 5 个样品中物种的丰富较大和均匀性较高，因此总的生物多样性较大。综上分析可知，老鼠簕根际土壤样品中的微生物群落结构多样性非常丰富。

表 2 16S rRNA 扩增子测序数据质量统计和细菌群落 α 多样性分析
Tab. 2 Quality statistics of 16S rRNA gene amplicon sequencing and bacterial community α-diversity characteristics

编号 No.	原始 reads Raw reads	待处理 reads Clean reads	有效 reads Effective reads	有效 tags Taxon tags	分类单元 OTUs	ACE 指数 ACE index	Chao1 指数 Chao1 index	Simpson 指数 Simpson index	Shannon 指数 Shannon index	覆盖率 Coverage %
AIS1	79 993	79 707	78 529	50 508	1926	2078.273	2125.8408	0.9966	9.5183	109.0890
AIS2	79 768	79 471	77 898	53 761	1870	2016.6766	2064.4194	0.9916	9.0440	107.1289
AIS3	80 202	79 893	78 849	55 082	1798	1973.9867	2008.4375	0.9961	9.2470	103.7873
AIS4	80 648	80 360	78 717	55 643	1780	1991.7253	2021.4176	0.9969	9.2783	102.0523
AIS5	80 004	79 724	78 134	49 216	1719	1919.9009	1938.7927	0.9963	9.2555	100.2765
Total	400 615	399 155	392 127	263 704	2273					

2.1.2 微生物细菌群落结构分析 在门分类水平上的群落共包括细菌域的 32 个门,其中包括有效鉴定的 25 个门:酸杆菌门 (Acidobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、Calditrichaeota、Chlamydiae、绿屈挠菌门 (Chloroflexi)、蓝细菌门 (Cyanobacteria)、达达菌门 (Dadabacteria)、异常球菌-栖热菌门 (Deinococcus-Thermus)、肠杆菌门 (Entothaeonellaeota)、Epsilonbacteraeota、厚壁菌门 (Firmicutes)、梭杆菌门 (Fusobacteria)、芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes)、Kiritimatiellaeota、匿杆菌门 (Latescibacteria)、硝化刺菌门 (Nitrospirae)、硝化螺旋菌门 (Nitrospirae)、Patescibacteria、浮霉菌门 (Planctomycetes)、变形杆菌门 (Proteobacteria)、己科河菌门 (Rokubacteria)、螺旋体门 (Spirochaetes)、疣微菌门 (Verrucomicrobia)、河床菌门 (Zixibacteria), 暂定的 6 个门 (BRC1、FCPU426、GAL15、TA06、WPS-2、WS2) 和 1 个未培养的门 (uncultured_bacterium_k_Bacteria)。

老鼠簕根际土壤 5 个样品中, 细菌群落均以变形菌门 (Proteobacteria) 为主, 这个门的相对丰度在不同样本中均超过 50%。另外, 绿屈挠菌门、酸杆菌门、拟杆菌门、芽单胞菌门和放线菌门也占有较大比例, 均是优势菌群。这些优势菌群在不同样品中的占比存在些许差异, 但群落结构组成一致。

将放线菌门的细菌群落进行分析, 在属分类水平上共获得 33 个已注释的放线菌属 (热酸菌属 *Acidothermus*、马杜拉放线菌属 *Actinomadura*、*Actinophytocola*、*Aeromicrobium*、*Agromyces*、拟无枝酸菌属 *Amycolatopsis*、*Angustibacter*、双栖杆菌属 *Bifidobacterium*、*Blastococcus*、*Brevibacterium*、扣林氏菌属 *Collinsella*、*Conexibacter*、克洛斯氏菌属 *Crossiella*、*Dactylosporangium*、*Demequina*、*Frankia*、*Gaiella*、*Iamia*、*Ilumatobacter*、*Isopterocola*、*Jatrophihabitans*、*Luedemannella*、*Lysinimicrobium*、大理石雕菌属 *Marmoricola*、微杆菌属 *Microbacterium*、*Micromonospora*、*Mycobacterium*、类诺卡氏属 *Nocardioideis*、假诺卡氏菌属 *Pseudonocardia*、罗氏菌属 *Rothia*、中华单胞菌属 *Sinomonas*、*Solirubrobacter*、*Streptomyces*), 4

个暂定的放线菌属 (*Coriobacteriaceae*_UCG-002、*Corynebacterium*_1、*Sva0996_marine_group* 和 *bacterium*_YC-ZSS-LKJ159) 和 28 个未培养的放线菌属。其中放线菌属 *Ilumatobacter* 是第一优势属。

在排前 20 的优势放线菌属的分布如图 2 所示, 已注释的放线菌属只有 7 个, 分别是 *Ilumatobacter*、*Gaiella*、大理石雕菌属、*Demequina*、*Mycobacterium*、*Microbacterium* 和热酸菌属, 未培养的放线菌属占比较大。

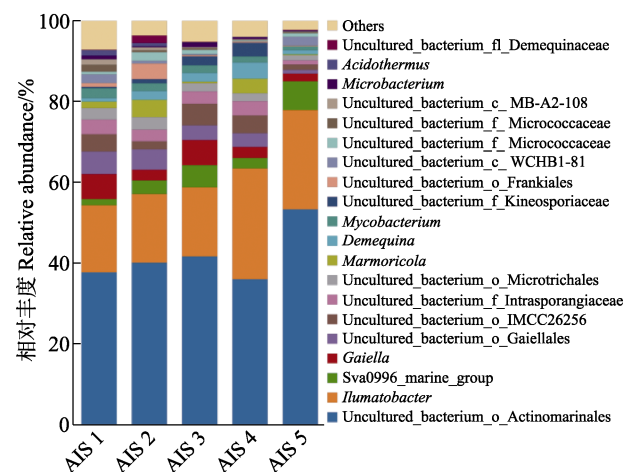


图 2 红树林根际放线菌属水平的物种组成
Fig. 2 Relative abundances of the actinobacteria in the rhizosphere of mangrove *A. ilicifolius* at the level of genus

2.1.3 老鼠簕根际放线菌群落的功能预测分析 利用 PICRUST2 软件对放线菌菌群进行了基因功能预测。通过对 KEGG 数据库进行比对, 共获得 6 类一级生物代谢通路功能, 其中代谢功能的相对丰度最高, 占 80% 以上 (图 3)。在分布于 6 个代谢途径的细菌群落中, 注释到的二级代谢功能中, 氨基酸代谢、能量代谢、脂类代谢、异生素生物降解和代谢、萜类化合物和聚酮化合物的代谢等与次生代谢产物的生物合成相关的功能均占较高的比重 (图 3)。对 KEGG 三级功能层丰度进行分析, 发现次级代谢产物的生物合成和抗生素的生物合成功能是仅次于代谢通路的丰度最高的功能活动 (图 3)。以上结果可以得出, 老鼠簕根际放线菌中与化合物合成相关的功能基因的丰度最高, 意味着参与化合物的生物合成的菌群占比最高, 这为充分挖掘老鼠簕根际放线菌资源进而发现微生物来源的先导化合物提供了实验依据。

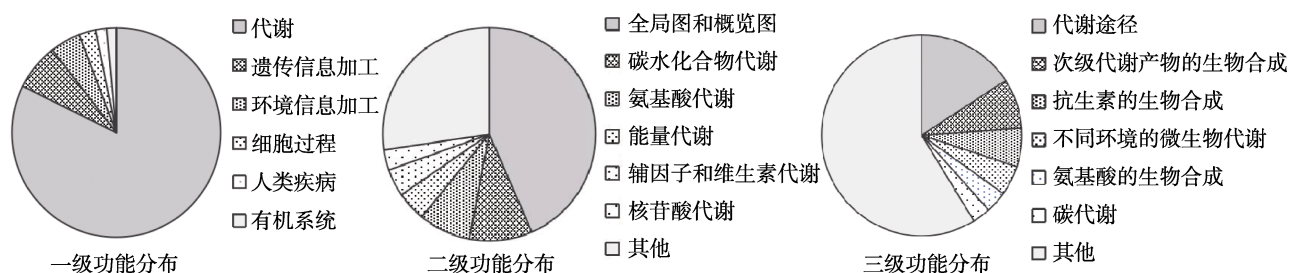


图 3 根际放线菌群落的一、二、三级功能分布

Fig. 3 The functional distribution of rhizospheric actinomycetes community of in level 1, level 2 and level 3

2.2 纯培养放线菌多样性分析

2.2.1 纯培养分离的根际放线菌多样性 采用 5 种选择性分离培养基从老鼠筋根际土壤中分离、鉴定出 3 个目 4 个属的 33 株根际放线菌代表菌株（原始菌株 41 株）。如表 3 所示，它们分别属于链霉菌目（Streptomycetales）、分支杆菌目（Mycobacteriales）、链孢囊菌目（Streptosporangiales）3 个目和链霉菌属、红球菌属、马杜拉放线菌属和北里孢菌属 4 个属，其中链霉菌属是丰度最高的属，有 29 株。

纯培养分离到的根际放线菌的情况如表 3 所示，不同预处理方法得到的放线菌数量不同，干土湿热稀释涂布法得到的放线菌数量大于湿土湿热稀释涂布法，干土印章法得到的放线菌数量大于湿土印章法，因此，干土分离得到的放线菌数量明显大于湿土得到的放线菌数量。5 种分离培养基中，ISP2 和 GA 培养基得到的放线菌较多，而 MG 和 HV 培养基得到的放线菌较少。不同分离培养基得到的放线菌的种类和数量的差异与不同放线菌对培养基的营养成分和比例有一定的偏好性有关。AI 分离培养基得到的放线菌的多样性最为丰富，这可能与 AI 中含有较多稀有放线菌偏好的氮源（酪蛋白酸钠和天门冬氨酸）、碳源及良好的缓冲体系有关。ISP2 和 GA 培养基营养丰富，尽管分离得到的放线菌较多，但主要是土壤放线菌的优势菌群链霉菌。相对寡营养的 MG 和 HV 培养基适用于分离部分放线菌，最终得到的放线菌数量较少，当然，这也与预处理后土壤中的放线菌的种类有一定关系。

2.2.2 代表菌株的系统发育分析 将 33 株代表菌株在 EzBioCloud 网站上进行相似性比对，下载最相近的模式菌株，然后进行系统发育分析。有 4 株菌与已知的相似性最高的模式菌株有 100% 的相似性，有 25 株介于 99.0%~99.9% 之间，还

有 4 株在 99.0% 以下，并且在系统发育树上这些菌株均与最相近的模式菌株聚在一起（图 4）。

目前国际上的通用规则是 16S rRNA 基因序列相似性小于 98.7% 的菌株即为新种^[19]。从老鼠筋根际土壤分离的代表菌株中，062120 与 *Streptomyces rameus* LMG 20326^T (AJ781379) 的相似性为 98.55%，可初步判断为新种。同时，064303 与 *Streptomyces prasinosporus* NRRL B-12431^T (DQ026655) 的相似性为 98.77%，062409 与 *Streptomyces jiujiangensis* JXJ 0074^T (KF938657) 的相似性为 98.92%，063201 与 *Streptomyces sasae* JR-39^T (HQ267987) 的相似性为 98.91%，这些菌株与最相近模式菌株的相似性均比较低，都可能是潜在的新种，说明老鼠筋根际土壤中的放线菌不仅多样性丰富，而且可能还含有较多新的放线菌资源。

2.2.3 免培养测序与纯培养分离获得放线菌多样性比较 通过高通量扩增子测序与纯培养分离方法从老鼠筋根际土壤样品中共获得 35 个有效鉴定的放线菌属，说明老鼠筋根际放线菌多样性非常丰富，同时发现 2 种方法获得的菌属存在较大差别。

高通量测序从老鼠筋根际土壤样品中共检测出 33 个有效鉴定放线菌属，而纯培养分离到的放线菌只有 4 个属，可见大部分的放线菌仍然不能通过纯培养获得。而纯培养获得的红球菌属和北里孢菌属用高通量测序技术却未能检测出。

2.3 抑菌活性初筛及化合物合成基因检测

对 33 株代表菌株进行聚酮合成酶基因（PKS I 和 PKS II）和非核糖体多肽合成酶基因（NRPS）筛选，由图 5 可知，大多数代表菌株的 PKS II 和 NRPS 基因均呈阳性（PKS II 基因阳性率 97.97%，NRPS 基因阳性率 90.91%），而聚酮合成酶 PKS I 基因的阳性率很低（0.09%）。所有的代表菌株都

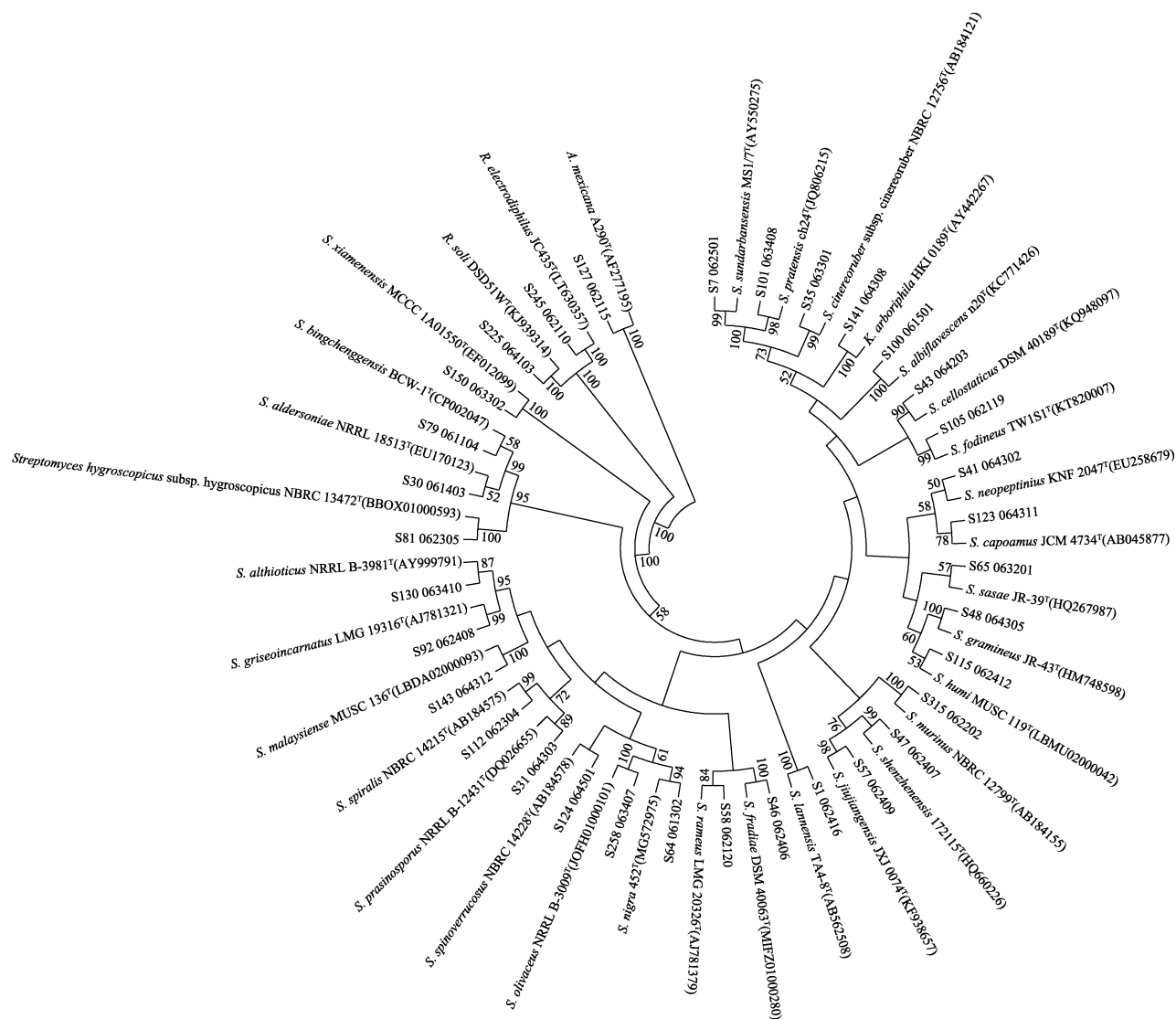
表 3 代表菌株的 16S rRNA 基因序列分析及分离来源

Tab. 3 Taxonomic identification, number of isolates recovered from different media and different pretreatment

代表菌株编号 Strains No.	最相近的模式菌株 Closest related type strain	相似性 Similarity /%	分离物数量 Number of isolates	培养基 Medium (n)					预处理 Retreatment (n)			
				AI	MG	ISP2	GA	HV	a	b	c	d
062416	<i>Streptomyces lannensis</i> TA4-8	100.00	4	0	0	2	2	0	2	1	0	1
062501	<i>Streptomyces sundarbensensis</i> MS1/7	99.86	2	1	0	0	0	1	0	1	1	0
061403	<i>Streptomyces aldersoniae</i> NRRL 18513	99.79	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0
064303	<i>Streptomyces prasinosporus</i> NRRL B-12431	98.77	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
063301	<i>Streptomyces cinereoruber</i> subsp. cinereoruber NBRC 12756	99.78	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0
064302	<i>Streptomyces neopeptinius</i> KNF 2047	99.07	3	0	0	2	0	1	0	1	0	2
064203	<i>Streptomyces cellostaticus</i> DSM 40189	99.28	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
062406	<i>Streptomyces fradiae</i> DSM 40063	99.86	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
062407	<i>Streptomyces shenzhenensis</i> subsp. <i>oryzicola</i> W18L9	99.64	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
064305	<i>Streptomyces gramineus</i> JR-43	100.00	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
062409	<i>Streptomyces jiujiangensis</i> JXJ 0074	98.92	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
062120	<i>Streptomyces rameus</i> LMG 20326	98.55	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
061302	<i>Streptomyces nigra</i> 452	99.78	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
063201	<i>Streptomyces sasae</i> JR-39	98.98	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0
061104	<i>Streptomyces bingchenggensis</i> BCW-1	99.78	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
062305	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> subsp. <i>hygroscopicus</i> NBRC 13472	99.72	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
062408	<i>Streptomyces griseoincarnatus</i> LMG 19316	99.71	2	0	0	1	1	0	0	1	0	1
061501	<i>Streptomyces albiflavescens</i> n20	99.86	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
063408	<i>Streptomyces pratensis</i> ch24	100.00	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0
062119	<i>Streptomyces fodineus</i> TW1S1	99.42	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
062304	<i>Streptomyces spiralis</i> NBRC 14215	99.36	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
062412	<i>Streptomyces humi</i> MUSC 119	99.35	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
064311	<i>Streptomyces capoamus</i> JCM 4734	99.35	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
064501	<i>Streptomyces spinoverrucosus</i> NBRC 14228	99.19	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
063410	<i>Streptomyces althioticus</i> NRRL B-3981	99.86	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0
064312	<i>Streptomyces malaysiense</i> MUSC 136	99.64	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
063302	<i>Streptomyces xiamenensis</i> MCCC 1A01550	99.64	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0
063407	<i>Streptomyces olivaceus</i> NRRL B-3009	99.93	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0
062202	<i>Streptomyces murinus</i> NBRC 12799	100.00	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0
064103	<i>Rhodococcus soli</i> DSD51W	99.28	2	1	0	0	1	0	0	0	1	1
062110	<i>Rhodococcus electrodiphilus</i> JC435	99.93	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
062115	<i>Actinomadura mexicana</i> A290	99.49	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
064308	<i>Kitasatospora arboriphila</i> HKI 0189	99.56	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Total			41	7	2	16	12	4	6	16	8	12

注：a 代表湿土湿热稀释涂布法；b 代表干土湿热稀释涂布法；c 代表湿土印章法；d 代表干土印章法；n 代表不同培养基或预处理方法得到的菌株的数量。

Note: a is for the dilution plate technique with pretreatment at 55 ℃ in a waterbath for 20 min of wet soil samples; b is for the dilution plate technique with pretreatment at 55 ℃ in a waterbath for 20 min of dry soil samples; c is for the plate stamping technique of wet soil samples; d is for the plate stamping technique of dry soil samples; n is for the number of isolates recovered from different media or different pretreatment.



节点处的值为自展值（仅显示大于 50% 的自展值）。

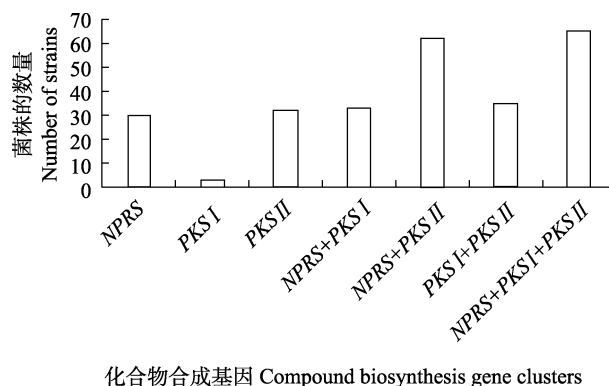
The numbers in the branching points are bootstrap values (only bootstrap values greater than 50% are shown).

图 4 基于 16S rRNA 基因序列构建的代表菌株与最相近种之间的系统发育树

Fig. 4 Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence, showing the relationships among representative strains and their closest related type strains

至少有 1 个功能基因呈阳性。本研究结果说明老鼠簕根际土壤放线菌在合成聚酮类和非核糖体肽类化合物方面具有较好的潜能。

所有代表菌株的抑菌活性筛选结果（图 6）表明：24.24% 根际放线菌具有抗 1 种及以上指示菌的活性，其中链霉菌 062202 对金黄色葡萄球菌和白色念珠菌均有很强抑菌活性，其抑菌圈分别是 22 mm 和 18 mm。另外，链霉菌 062305 对白色念珠菌具有较强抑菌活性，马杜拉放线菌 062115 对金黄色葡萄球菌具有较强抑菌活性。本研究 3 类化合物合成基因与抑菌活性之间无直接联系，有待于进一步研究。



化合物合成基因 Compound biosynthesis gene clusters

图 5 代表菌株化合物合成基因 NRPS、PKS I 和 PKS II 筛选

Fig. 5 Screening of compound synthesis genes NRPS, PKS I and PKS II of representative strains.

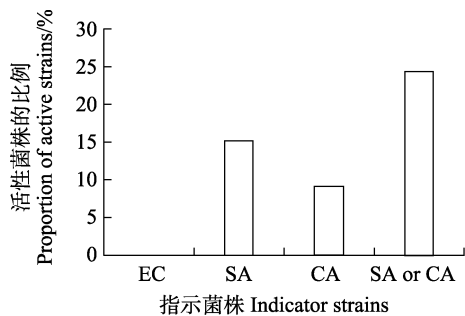


图 6 代表菌株抗菌活性筛选

Fig. 6 Antibacterial activity screening of representative strains

3 讨论

海南省东寨港红树林自然保护区因其独特的气候条件和地理环境，造就了丰富的植物和微生物多样性。传统的红树植物相关的研究主要集中在红树植物提取物的药物开发、内生菌的分离与活性筛选，近年来，随着高通量测序技术的不断进步，通过结合高通量测序技术和传统培养方法对红树植物根系相关微生物的研究越来越多^[4, 20-22]。然而，对热带红树林生态系统中红树植物老鼠簕根际的细菌群落，特别是微生物天然产物的主要生产者——放线菌群落组成的全面了解仍然缺乏。

关于老鼠簕根际土壤放线菌多样性，国内已有一些相关报道。王蓉等^[23]曾对文昌头苑、深圳福田和文昌清澜的老鼠簕根际放线菌、细菌和真菌进行了整体评价分析，但未对老鼠簕根际土壤放线菌的多样性和主要类群展开分析。唐依莉^[24]在非培养和培养水平上对海南文昌和广西北海老鼠簕的根际土壤放线菌的多样性进行了较为全面的分析，在海南文昌和广西北海的样品中分别得到 38 个和 39 个已注释的放线菌属。而本研究中共得到 33 个已注释的放线菌属。虽然得到的放线菌种群数量接近，但具体的菌属却差别较大。在本研究（海南东寨港）得到的已注释的放线菌属中，有 8 个在海南文昌和广西北海的样品中均检测到（*Ilumatobacter*、*Actinomadura*、*Frankia*、*Micromonospora*、*Mycobacterium*、*Nocardioide*s、*Pseudonocardia*、*Streptomyces*），有 11 个在海南文昌的样品中被检测到，有 15 个在广西北海的样品中被检测到，但是仍有 18 个放线菌属均未在海南文昌和广西北海的样品中出现。同样，在海南文昌的样品中得到的已注释的放线菌属中，有 27 个未在本研究中出现，在广西北海的样品中得到的已注释的放线菌属中，有 24 个未在本研究出

现。在本研究的 5 份老鼠簕根际土壤样品中丰度最高的放线菌属均为 *Ilumatobacter*，而在海南文昌的 5 份样品中，丰度最高的放线菌属分别是 *Actinoallomurus*、*Streptomyces*、*Micromonospora*、*Actinoallomurus*、*Micromonospora*，在广西北海的 4 份样品中丰度最高的放线菌属分别是 *Mycobacterium*、*Ilumatobacter*、*Micromonospora*、*Ilumatobacter*。因此，可以得知本研究 5 份样品中丰度最高的放线菌属和广西北海的 2 份样品中的相同，而和海南文昌的 5 份样品完全不同。综上，本研究与海南文昌和广西北海 2 个地点老鼠簕根际放线菌的多样性存在较大差异，综合分析其主要原因有 2 个：（1）土壤本身的差异。在海南文昌和广西北海的研究中是以未附着在根上的土壤为根际土壤，这些研究与当时国内公认的根际土壤的定义吻合^[25]，但与目前国际公认的根际土壤的定义存在差异。随着土壤-植物根系-微生物相互关系研究的不断深入，国际上将根系相关隔室进行了更为精准的定义，其中根际土壤指的是直接附着在根周围且无法抖掉的土，而未直接附着在根周围且能抖掉的土则被定义为非根际土壤^[4, 26]。因此，当时的根际土壤，现在已经划归到非根际土壤的范畴。本研究以目前国际公认的根际土壤的采集标准进行取样，因此，严格来讲，是首次采用符合现行标准的根际土壤进行的老鼠簕根际放线菌多样性分析。（2）选取的测序引物的差异。不同引物的偏好性也可能会造成得到的菌群出现差异。另一方面，在培养水平上，本研究得到的链霉菌属在海南文昌和广西北海的样品中均分离得到，本研究得到的马杜拉放线菌属在海南文昌的样品中分离得到，但未在广西北海的样品中发现，而红球菌属和北里孢菌均未在海南文昌和广西北海的样品中发现；同样，在海南文昌样品中得到的小单孢菌属，*Actinoallomurus*、*Polymorphospora*、*Sphaerisorangium*、*Microbispora*、*Actinomycetospora*、*Actinopolymorpha*、*Cellulosimicrobium*，在广西北海样品中得到的 *Plantactinospora*、*Microbispora*、*Actinaurispora*、*Actinoplanes*、*Actinomycetospora*、*Glycomyces*、*Jishengella* 均并未在本研究中分离到。在本研究得到的放线菌中丰度最高的是链霉菌属，而在海南文昌和广西北海的样品中得到最多的是小单孢菌属，其次是链霉菌属。造成培养水平上存在较大差异的原因也是多方面的，主要有以下几点：

(1)和上述非培养水平上一样,土壤本身存在差异;(2)选择的分离培养基不同,海南文昌和广西北海选用的是 OA5、OA7、OA9、1/10 ATCC172、RH、SM2 这 6 种分离培养基,而本研究选择的是 AI、MG、ISP2、GA、HV 这 5 种培养基,培养基的差异会直接影响分离到的放线菌的菌群分布情况;(3)本研究选用的抗生素类型与海南文昌和广西北海的研究类似,为了重复筛选问题,参考相关文献^[27],适当提高了抗生素的浓度,这也是本研究得到的放线菌的数量相对较少的原因,同时也是本研究能筛选到较多潜在的新放线菌的重要原因。

本研究通过高通量测序和纯培养的方法进行研究,共获得 35 个有效鉴定的放线菌属,且 2 种方法得到的放线菌的群落表现出明显的多样性差异。此外,通过对功能基因的预测、纯培养菌株的 16S rRNA 基因序列比对、化合物合成基因的检测和抗菌活性检测,显示老鼠簕根际中蕴藏着较多的潜在放线菌新种和具有产生生物活性物质的放线菌菌株。总体来说,本研究结果得出东寨港红树林红树植物根际放线菌具有丰富的多样性和药物开发潜能,是重要的微生物资源。

本研究先利用高通量测序从门水平上对老鼠簕根际土壤的细菌群落进行了整体的分析。变形菌门是老鼠簕根际土壤中的第一优势菌门。具有高度多样性的变形菌广泛存在于海洋环境中,参与重要的养分循环过程^[28]。本研究的重点对象放线菌门也是优势菌门之一。众所周知,放线菌是临床上先导化合物的主要生产者^[29],是生物技术、医学和农业领域的杰出参与者。

根系相关微生物多样性受地理位置、宿主植物、生境、土壤类型等多方面的影响。本研究选择热带地区红树植物老鼠簕根际土壤为研究对象,通过高通量测序和传统纯培养方法对其中的放线菌的多样性进行了比较和分析。从结果可以看出,2 种方法得到的放线菌群落结构存在明显的差别,高通量测序注释得到的放线菌在物种多样性上远大于传统的纯培养,并且发现了大量的未知放线菌类群,此方法能更大程度地反映根际土中的微生物组成情况,并能预测微生物群落的一些功能,为后续纯培养获得更多目标物种提供依据。但是,高通量测序并未覆盖到所有的纯培养放线菌,表明高通量测序方法也有一定的局限性,先前的研究也证实了这一点^[24]。此外,2 种

方法得到的优势菌属差别也较大,纯培养得到的最大优势属是链霉菌属,而高通量测序得到的最大优势属则是 *Ilumatobacter*。2 种方法得到的结果存在差异,主要有以下 2 个因素:(1)选取的 16S rRNA 基因 V3~V4 区序列不足以分辨所有放线菌群落导致放线菌无法被检测出;(2)在纯培养的过程中,为了除去生长较快的细菌、真菌,采用的预处理方式(风干土壤、湿热等)和选择性分离方法(添加抗生素、不同的培养基成分等)均会对获得的放线菌种群产生影响。因此,为了获得更全面的根际放线菌的多样性,需要将高通量测序和纯培养方法结合起来进行分析,2 种方法是相互补充的关系。本研究为系统地发掘根际放线菌资源,深入探索新的生物活性微生物天然产物提供了重要的科学依据。

致谢: 样品采集得到海南东寨港国家级自然保护区管理局工作人员的大力协助。

参考文献

- [1] CAI R S, DING R Y, YAN X H, LI C H, SUN J, TAN H J, MEN W, GUO H X, WANG C. Adaptive response of Dongzhaigang mangrove in China to future sea level rise[J]. Scientific Reports, 2022, 12(1): 11495-11506.
- [2] 周晨昊, 毛覃愉, 徐晓, 方长明, 骆永明, 李博. 中国海岸带蓝碳生态系统碳汇潜力的初步分析[J]. 中国科学: 生命科学, 2016, 46(4): 475-486.
ZHOU C H, MAO Q Y, XU X, FANG C M, LUO Y M, LI B. Preliminary analysis of C sequestration potential of blue carbon ecosystems on Chinese coastal zone[J]. Scientia Sinica(Vitae), 2016, 46(4): 475-486. (in Chinese)
- [3] JONES P, GARCIA B J, FURCHES A, TUSKAN G A, JACOBSON D. Plant Host-associated mechanisms for microbial selection[J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 862-875.
- [4] ZHUANG W, YU X L, HU R W, LUO Z W, LIU X Y, ZHENG X F, XIAO F S, PENG Y S, HE Q, TIAN Y, YANG T, WANG S Q, SHU L F, YAN Q Y, WANG C, HE Z L. Diversity, function and assembly of mangrove root-associated microbial communities at a continuous fine-scale[J]. NPJ Biofilms Microbiomes, 2020, 6(1): 52-61.
- [5] PANTIGOSO H A, NEWBERGER D, VIVANCO J M. The rhizosphere microbiome: plant-microbial interactions for resource acquisition[J]. Journal of Applied Microbiology, 2022, 133(5): 2864-2876.
- [6] CHOI H J, KIM D W, CHOI Y W, LEE Y G, LEE Y I, JEONG Y K, JOO W H. Broad-spectrum *in vitro* antimicro-

- bial activities of *Streptomyces* sp strain BCNU 1001[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2012, 17: 576-583.
- [7] JOSE P A, MAHARSHI A, JHA B. Actinobacteria in natural products research: progress and prospects[J]. Microbiological Research, 2021, 246: 126708-126721.
- [8] LIU J Y, PENG M J, LI Y G. Phylogenetic diversity of nitrogen-fixing bacteria and the *nifH* gene from mangrove rhizosphere soil[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2012, 58: 531-539.
- [9] 金城. 老鼠簕内生放线菌[J]. 微生物学通报, 2013, 40(9): 1742.
JIN C. Endophytic actinomycetes in *Acanthus ilicifolius*[J]. Microbiology China, 2013, 40(9): 1742. (in Chinese)
- [10] KARIM R, BEGUM M M, ALIM M A, UDDIN M S, KABIR M T, KHAN A F, ISLAM T, KHAN S I, RAHMAN M S. Effects of alcoholic extracts of bangladeshi mangrove *Acanthus ilicifolius* Linn. (Acanthaceae) leaf and stem on atherogenic model of wistar albino rats[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2021, 2021: 7539037.
- [11] 王鹏, 陈波, 张华. 基于高通量测序的鄱阳湖典型湿地土壤细菌群落特征分析[J]. 生态学报, 2017, 37(5): 1650-1658.
WANG P, CHEN B, ZHANG H. High throughput sequencing analysis of bacterial communities in soils of a typical Poyang Lake wetland[J]. Acta Ecologica Sinica, 2017, 37: 1650-1658. (in Chinese)
- [12] QUAST C, PRUESSE E, YILMAZ P, GERKEN J, SCHWEER T, YARZA P, PEPLIES J, GLOCKNER F O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41: D590-596.
- [13] DOUGLAS G M, MAFFEI V J, ZANEVELD J, YURGEL S N, LANGILLE M G I. PICRUST2: an improved and extensible approach for metagenome inference[J]. Cold Spring Harbor Laboratory, 2019. DOI: 10.1101/672295.
- [14] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4: 406-425.
- [15] TAMURA K, STECHER G, KUMAR S. MEGA 11: molecular evolutionary genetics analysis version 11[J]. Molecular Biology and Evolution, 2021, 38(7): 3022-3027.
- [16] Felsenstein J. Phylogenies and the comparative method[J]. The American Naturalist, 1985, 126: 1-25.
- [17] 龙梦, 樊慧敏, 夏洪丽, 汪志文, 喻大鹏, 夏立群, 鲁义善. 深圳红树林沉积物可培养细菌多样性及其生物活性筛选[J]. 广东海洋大学学报, 2022, 42(6): 88-96.
LONG M, FAN H M, XIA H L, WANG Z W, YU D P, XIA L Q, LU Y S. Diversity and bioactivity screening of culturable bacteria in Shenzhen mangrove sediments[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2022, 42(6): 88-96. (in Chinese)
- [18] 陈东波, 柳成宾, 姜怡, 吕元林, 姜成林. 来自西双版纳3种有毒植物的免培养与纯培养放线菌多样性及生物活性[J]. 微生物学通报, 2018, 45(5): 1100-1111.
CHEN D B, LIU C B, JIANG Y, LYU Y L, JIANG C L. Diversity and bioactivity of un-cultured and cultivable actinomycetes from three toxic plants in Xishuangbanna, China[J]. Microbiology China, 2018, 45(5): 1100-1111. (in Chinese)
- [19] CHUN J, OREN A, VENTOSA A, CHRISTENSEN H, ARAHAL D R, DA COSTA M S, ROONEY A P, YI H, XU X W, DE MEYER S, TRUJILLO M E. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2018, 68(1): 461-466.
- [20] 范习贝, 梁前勇, 牛明扬, 余甜甜, 王寅熠, 王风平. 中国南海北部陆坡沉积物古菌多样性及丰度分析[J]. 微生物学通报, 2017, 44(7): 1589-1601.
FAN X B, LIANG Q Y, NIU M Y, YU T T, WANG Y Z, WANG F P. The diversity and richness of archaea in the northern continental slope of South China Sea[J]. Microbiology China, 2017, 44(7): 1589-1601. (in Chinese)
- [21] SANKA LOGANATHACHETTI D, POOSAKKANNU A, MUTHURAMAN S. Fungal community assemblage of different soil compartments in mangrove ecosystem[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 8560-8568.
- [22] SIMOES M F, ANTUNES A, OTTONI C A, AMINI M S, ALAM I, ALZUBAIDY H, MOKHTAR N A, ARCHER J A, BAJIC V B. Soil and rhizosphere associated fungi in gray mangroves (*Avicennia marina*) from the Red Sea—a metagenomic approach[J]. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2015, 13: 310-320.
- [23] 王蓉, 洪葵. 老鼠簕(*Acanthus ilicifolius* L.)根际内生菌分离与活性评价[J]. 微生物学杂志, 2007, 27(3): 24-26.
WANG R, HONG K. Isolation and activity assessment of rhizospheric and symbiotic microbes from bear's-breech (*Acanthus ilicifolius*)[J]. Journal of Microbiology, 2007, 27(3): 24-26. (in Chinese)
- [24] 唐依莉. 老鼠簕根际土壤放线菌培养与非培养水平多样性、菌株生理活性及新种鉴定[D]. 海口: 海南大学, 2012.
TANG Y L. Biodiversity and physiologically activities of actinobacteria from rhizosphere soil of mangrove plant *Acanthus ilicifolius* by culture-dependant and -independent approach and identification of a novel *Actinoallomurus*[D]. Haikou: Hainan University, 2012. (in Chinese)

- [25] 陈华, 洪葵, 庄令, 钟秋平. 海南红树林的微生物生态分布及细胞毒活性评价[J]. 热带作物学报, 2006, 27(1): 59-63.
- CHEN H, HONG K, ZHUANG L, ZHONG Q P. Isolation and cytotoxic activity evaluation of microorganisms from mangrove in Hainan[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2006, 27(1): 59-63. (in Chinese)
- [26] EDWARDS J, JOHNSON C, SANTOS-MEDELLÍN C, LURIE E, PODISHETTY N K, BHATNAGAR S, EISEN J A, SUNDARESAN V. Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2015, 112(8): E911-E920.
- [27] 黄美娟. 金铁锁根、根际土可培养放线菌多样性与免培养原核微生物群落关联性研究[D]. 昆明: 云南大学, 2016.
- HUANG M J. Study on the diversity of culturable actinobacteria and the relevance of non-culture prokaryotes in the roots and rhizosphere soil of *Psammosilence tunicoides*[D]. Kunming: Yunnan University, 2016. (in Chinese)
- [28] ZHOU Z, TRAN P Q, KIEFT K, ANANTHARAMAN K. Genome diversification in globally distributed novel marine Proteobacteria is linked to environmental adaptation[J]. The ISME Journal, 2020, 14: 2060-2077.
- [29] BARKA E A, VATSA P, SANCHEZ L, GAVEAU-VAILLANT N, JACQUARD C, MEIER-KOLTHOFF J P, KLENK H P, CLEMENT C, OUHDOUCH Y, VAN WEZEL G P. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2016, 80: 1-43.