

基于改良原位培养的红树林可培养细菌多样性及抑菌活性研究

李王靖^{1,2,3}, 李 蜜^{1,2,3}, 高梦蝶^{1,2,3}, 徐淑芬^{1,2,3}, 刘永宏^{1,2,3},

高程海^{1,2,3}, 易湘茜^{1,2,3*}

(1. 广西中医药大学 海洋药物研究院/药学院, 南宁 530200; 2. 广西海洋药物重点实验室/海洋中药资源高效利用广西高校工程研究中心, 南宁 530200; 3. 北部湾海洋药物和生物制品开发利用工程技术创新中心, 南宁 530200)

摘 要: 为探究具有抑制人类病原菌活性的海洋细菌资源, 该研究采用改良原位培养装置, 从北部湾 10 种红树根际土壤中富集海洋可培养细菌, 通过 16S rRNA 基因序列鉴定可培养细菌种属, 并采用滤纸片扩散法筛选具有抑制人类病原菌活性的海洋可培养细菌。结果表明:

(1) 获得 240 种海洋可培养细菌, 隶属于 4 门 8 纲 27 目 54 科 95 属, 链霉菌属为优势属, 占 26.7%。(2) 16S rRNA 相似度结果显示, 13 株海洋可培养细菌可能为新物种, 其中菌株 GXIMD 04217 与标准菌株 *Photobacterium lucens* CAIM 1938^T 的 16S rRNA 最高相似度为 92.94%。(3) 25 种海洋可培养放线菌对至少 1 种人类致病菌有显著抑制活性, 其中 GXIMD 04328 和 GXIMD 04558 对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、马尔尼菲蓝状菌的抑菌圈分别达 (23.5±2.5) mm 和 (21.2±0.4) mm。(4) 7 种海洋可培养细菌具广谱抑制活性, 可抑制多种人类致病菌。综上所述, 采用改良培养装置从红树根际土壤中获得多样性丰富的可培养细菌, 是发现海洋新型菌株和活性菌株的有效途径。

关键词: 红树土壤, 原位培养装置, 海洋可培养细菌, 抑制人类病原菌, 放线菌

中图分类号: Q948 **文献标识码:** A

Diversity and antibacterial activity of culturable bacteria isolated from mangrove based on improved *in situ* culture

LI Wangjin^{1,2,3}, LI Mi^{1,2,3}, GAO Mengdie^{1,2,3}, XU Shufen^{1,2,3}, LIU Yonghong^{1,2,3},
GAO Chenghai^{1,2,3}, YI Xiangxi^{1,2,3*}

(1. *Institutes of Marine Drugs/Faculty of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China*; 2. *Guangxi Key Laboratory of Marine Drugs/Guangxi University Engineering Research Center of High-Efficient Utilization of Marine Traditional Chinese Medicine Resources, Nanning 530200, China*; 3. *Beibu Gulf Marine Medicine and Bioproducts Engineering Technology Innovation Center, Nanning 530200, China*)

Abstract: In order to explore marine bacterial resources that exhibit inhibitory activity against human pathogenic bacteria. A improved *in situ* cultivation technique was implemented, markedly increasing the isolation of culturable bacterial from the rhizosphere soil of ten mangrove plants

基金项目: 广西重点研发计划项目 (AB24010109); 国家自然科学基金 (42466005); 广西青年岐黄学者培养项目 (GXQH202412); 广西中医药大学岐黄工程高层次人才团队培育项目 (202404); 广西中医药大学高层次人才培育创新团队项目 (2022A007); 广西中医药大学桂派杏林拔尖人才资助项目 (2022C008); 2025 年广西向海经济人才培养支持专项 (2025XHRC27)。

第一作者: 李王靖 (2000—), 硕士研究生, 初级, 主要从事海洋中药物质基础与产品开发研究, (E-mail)1761158922@qq.com。

***通信作者:** 易湘茜, 博士, 教授, 主要从事海洋药用微生物资源与应用研究, (E-mail)yixiangxi2017@163.com。

growing along the Beibu Gulf. The 16S rRNA gene was sequenced to assign taxonomic identity to bacterial isolates, and their antimicrobial potential was assessed with the filter-paper disk diffusion assay. The results were as follows: (1) A total of 240 species assigned to 95 genera, 54 families, 27 orders, 8 classes, and 4 phyla were recovered, among which *Streptomyces* dominated, comprising 26.7 % of all isolates. (2) Based on 16S rRNA gene comparisons, 13 strains may represent novel species, including strain *Photobacterium lucens* GXIMD 04217, which exhibited the sequence similarity of 92.94% and may represent a potential new genus. (3) Furthermore, antimicrobial screening identified 25 *Actinomycete* strains that significantly antimicrobial activity against at least one pathogenic bacterium. Notably, GXIMD 04328 and GXIMD 04558 exhibited significant inhibitory activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Talaromyces marneffe*, with inhibition zone diameters of (23.5±2.5) mm and (21.2±0.4) mm, respectively. (4) Seven of the active strains exhibited broad-spectrum antimicrobial activity and were able to inhibit a range of human pathogenic bacteria. In conclusion, the rhizosphere soils of mangrove in Beibu Gulf harbor abundant microbial resources, and that the improved *in situ* cultivation is an effective strategy for discovering novel bacterial species and bioactive strains.

Key words: mangrove soil, *in situ* culture device, culturable bacteria of marine, inhibition of human pathogenic bacteria, actinomycetes

红树林生态系统具有高温、高湿度、高盐度和高有机质等特点 (Saranraj et al., 2015), 其土壤中蕴含着大量的微生物, 占生态系统总生物量的 91% (Sefrji et al., 2022)。大部分海洋微生物处于活的非可培养状态, 只有约 1% 的海洋微生物能够在实验室条件下培养 (Rinke et al., 2013)。原位培养是由原生环境提供微生物营养物质和生长所需的信号分子, 对微生物进行富集培养, 再通过纯培养获得单一菌落的分离培养技术 (王冲, 2019)。据 2021—2024 年文献报道, 通过传统分离方法从北部湾红树林土壤分离得到的潜在新菌 (<98.65%) 比例约为 2.3% (徐新亚等, 2020; 李飞娜, 2021; 李王靖等, 2023)。海洋环境复杂多变, 难以完全模拟原生境、微量营养物质缺失、微生物间生物联系切断等条件制约, 部分微生物为避免外界环境威胁, 启动自我保护机制而进入休眠状态 (周春云等, 2022), 因此实验室获得的可培养菌株种类极其有限。采用陷阱室作为原位培养装置, 能有效富集环境中的放线菌 (Kaeberlein et al., 2002; Gavrish et al., 2008)。

李飞娜 (2021) 使用陷阱室从广西茅尾海和福田红树林土壤中分离得到 367 株放线菌, 对 85 株代表性菌株进行抑菌活性初筛, 发现 45 株放线菌具有抑菌活性。姜明国等 (2015) 从广西红树林根际土壤中分离得到 113 株放线菌, 发现 1 株细菌 16S rRNA 序列相似性与拟诺卡氏菌属相比为 90%, 可能代表了 1 个细菌新属。原野 (2021) 使用 m-iChip 原位培养法从红树林环境中获得 144 株细菌, 其中潜在新物种 12 株 (8.33%), 与常规平板法相比, 显著提高了分离效率。朱苏婷 (2022) 使用改良 iChip 原位培养技术获得 386 株菌株, 它们分布于 10 纲 34 目 51 科 146 属, 其中 93 株细菌新资源。采用原位培养法分离的未培养细菌多样性和出新率远大于传统培养法 (Zhao et al., 2023; Lammers et al., 2025)。然而, 在红树林生态系统中由于盐度和生物活动等影响, 微生物诱捕装置的破坏率超过 40% (Li et al., 2020), 因此本研究拟对原位培养装置进行改良以提高样品回收率。

目前, 临床应用中抗生素滥用现象极其普遍, 据报道预测, 到 2050 年, 全球每年死于抗生素耐药性相关疾病的人数约 1 000 万人 (El-Kurdi et al., 2021)。因此, 必须不断发掘和应

用新的抗生素以应对抗生素耐药危害。红树林是海洋中的热带雨林，是获取抗生素资源的重要源泉。北部湾海域拥有丰富的红树林资源，其生境是发掘具有新型抗菌活性的潜在药源微生物的重要栖息地。本研究以北部湾 10 种不同红树植物根际土壤为对象，采用改良原位培养装置对样品中的可培养细菌进行富集和分离，并采用滤纸片扩散法评价其中的放线菌对 5 种人类致病菌（耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌和马尔尼菲蓝状菌）的抑制活性，拟探讨以下问题：（1）改良原位培养装置对可培养细菌的富集效果；（2）分离获得的可培养放线菌对目标致病菌的抑菌活性。本研究旨在为丰富红树林可培养细菌及新物种提供指导，为后续挖掘新型抗生素提供活性菌株资源。

1 材料与方法

1.1 改良原位培养装置

改良捕集器由 2 个塑料垫圈和 0.45 μm 孔径的滤膜组成，在捕集器内部填充 2 mL 原位培养基（1%琼脂），在滤膜边缘额外覆盖 2 个垫圈，防止海洋腐蚀引起的脱胶（图 1：a）。同时增设由塑料网（孔径 3 mm）和塑料试管支架组成的保护装置，以保护微生物捕集器免受海水冲蚀。每个防护装置可容纳 1 组共 6 个微生物陷阱（图 1：b）。

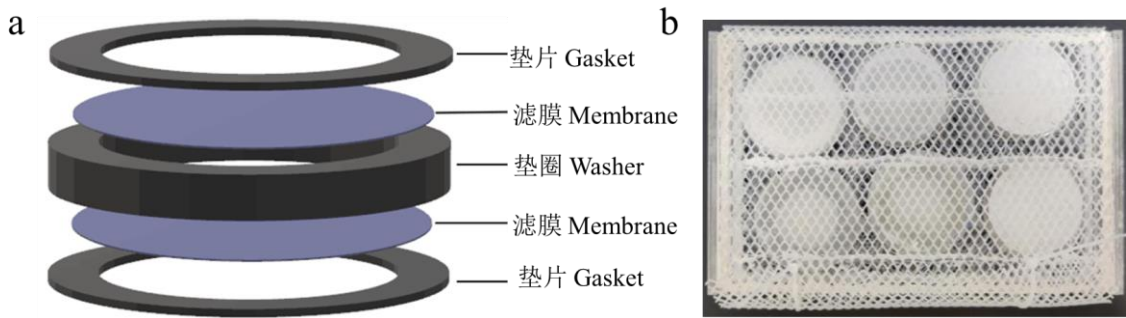


图 1 改良原位培养装置结构

Fig. 1 The structural of the improved *in situ* culture device

1.2 样本收集

2022 年 8 月，于广西防城港红树林的 2 个潮间带地点和广西钦州红树林的 5 个潮间带地点共 10 种不同红树植物根际环境中埋藏了 26 组原位培养装置，埋藏深度约为 10 cm，30 d 后取回，取出原位培养装置直接放置到无菌样品袋中带回实验室。样品信息如表 1 所示。红树植物物种由广西中医药大学刘昕明副研究员进行鉴定。

表 1 样品信息

Table 1 Information of sample

地点 Location	地点编号 Location No.	样品种类 Type of sample	样品数量 Number of samples	经纬度坐标 Coordinate of latitude and longitude
防城港市 Fangchenggang City	F1	海杧果 <i>Cerbera manghas</i>	3	108°13'E、21°37'N
	F1	木麻黄 <i>Casuarina equisetifolia</i>	1	108°13'E、21°37'N
	F1	桐棉 <i>Thespesia populnea</i>	1	108°13'E、21°37'N
	F1	蜡烛果 <i>Aegiceras corniculatum</i>	1	108°13'E、21°37'N
	F1	木榄 <i>Bruguiera gymnorhiza</i>	3	108°13'E、21°37'N
	F2	秋茄树 <i>Kandelia obovata</i>	3	108°22'E、21°38'N

地点 Location	地点编号 Location No.	样品种类 Type of sample	样品数量 Number of samples	经纬度坐标 Coordinate of latitude and longitude
钦州市 Qinzhou City	F2	海榄雌 <i>Avicennia marina</i>	3	108°22'E、21°38'N
	Q1	蜡烛果 <i>A. corniculatum</i>	2	108°31'E、21°53'N
	Q1	黄槿 <i>Talipariti tiliaceum</i>	1	108°31'E、21°53'N
	Q1	无瓣海桑 <i>Sonneratia apetala</i>	2	108°31'E、21°53'N
	Q2	卤蕨 <i>Acrostichum aureum</i>	1	108°29'E、21°52'N
	Q3	木榄 <i>B. gymnorhiza</i>	1	108°36'E、21°51'N
	Q4	海榄雌 <i>A. marina</i>	2	108°48'E、21°38'N
	Q5	海漆 <i>Excoecaria agallocha</i>	1	108°14'E、21°37'N

1.3 培养基配方

原位培养基（g L⁻¹）：琼脂 10 g，pH 7.2。

分离培养基：选择 10 种不同的分离培养基（2216E、AGG、AIA、Am6-1、HV、NBRC、R2A、ISP2、ISP3 和 ISP7），培养基配方参考李王靖等（2023）。

纯化培养基：LB 固体培养基。

发酵培养基：发酵种子液选用 TSB 液体培养基；发酵培养基参考李王靖等（2023）的方法，选用 Am6 液体培养基。

指示菌培养基：LB 培养基用于人类致病菌的细菌种子液的培养和检定板的制作。RPMI 1640 液体培养基用于马尔尼菲蓝状菌种子液培养，脑心浸粉葡萄糖固体培养基用于马尔尼菲蓝状菌检定板的制作。

1.4 细菌分离、纯化、鉴定及保藏

样品处理参考李飞娜（2021）的方法：在红树根际环境培养 30 d 后取回原位培养装置，使用无菌海水冲洗表面并检查破损情况。在确认细菌陷阱密封性后，打开陷阱膜，取出原位培养基，置于 5 mL 离心管中，加入 2 mL 无菌海水，搅碎培养基并振荡混匀，即得样品原液。分别用无菌海水稀释至 10⁻² 和 10⁻³ 浓度，取 100 μL 涂布于 10 种细菌分离培养基，28 °C 恒温培养 30 d。采用 LB 琼脂培养基对具有明显形态特征的细菌进行分离和纯化。

根据菌株生长的形态特征，使用无菌竹签将不同形态菌落挑取到 LB 固体培养基中，采用三区划线法进行菌株分离纯化，置于 28 °C 恒温培养箱中培养 2~5 d，记录菌落特征并编号。将菌株制成 25%（m/m）甘油管于 -80 °C 中冷冻保藏（黎芳婷等，2022）。使用 Chelex-100 树脂法提取细菌 DNA，参照 Walsh 等（1991）的方法对菌株 DNA 进行 PCR 梯度扩增。扩增产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检验，凝胶成像仪检验有条带为合格样品，委托生工生物工程（上海）股份有限公司广州分公司进行纯化测序。使用 SeqMan 软件分析 16S rRNA 基因序列，并在 EzBioCloud 数据库（<https://www.ezbiocloud.net/identify>）中进行相似度比对，使用 MEGA11 软件构建潜在新物种系统发育树。

1.5 可培养细菌发酵粗提物的制备

刮取对数生长期的放线菌至 100 mL TSB 培养基中，于恒温培养摇床中（180 r min⁻¹，28 °C）培养 2 d 得到种子液。按照（种子液：Am6 培养基=1：12，m/m）比例将种子液接种于 200 mL 的 Am6 液体培养基中，28 °C 振荡培养 7 d（李蜜等，2020）。使用乙酸乙酯等体积萃取发酵液 3 次，置于旋转蒸发仪中浓缩，用甲醇重新溶解，干燥后放入 4 °C 医用冷藏箱中保存备用。

1.6 可培养细菌抑制人类病原菌活性筛选

采用滤纸片法检测可培养放线菌的抑菌活性。以耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 ATCC 43300、肺炎克雷伯菌 ATCC 13883、鲍曼不动杆菌 ATCC 19606、铜绿假单胞菌 ATCC 27853 和马尔尼菲蓝状菌 ATCC 58950 作为指示微生物。

细菌检定板的制备：参考李正媛等（2023）的方法制备检定板，将对数生长区的 4 种指示菌接种于 50 mL LB 液体培养基中，放入恒温摇床中（ 180 r min^{-1} ， $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ ）培养 6 h 获得种子液，将种子液以 0.2% 的浓度接种至温度为 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右的 LB 琼脂培养基中，摇匀后倒入一次性培养皿，凝固即得检定板。

马尔尼菲蓝状菌检定板的制备（Wang et al., 2024）：取适量菌体至 PBS 缓冲液中，经无菌过滤器滤掉菌丝体，将过滤后的菌体接种至 RPMI 1640 液体培养基放入恒温摇床中（ $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 180 r min^{-1} ）培养 2 d，待菌液 OD_{560} 值为 0.7 时，即为备用菌悬液。菌悬液按照 BHI 培养基=1：25 的比例加入 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右的 BHI 培养基中，摇匀后倒入一次性培养皿，凝固即得检定板。

使用滤纸片扩散法进行抑菌活性筛选（黎芳婷等，2022），将装载有 $12\text{ }\mu\text{L}$ 放线菌粗提物（ $20.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ）的 6 mm 无菌滤纸片置于指示菌检定板上。以 $6\text{ }\mu\text{L}$ 甲氧苄啶（TMP， $2.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ）和环丙沙星（ $2.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ）作为细菌检定板的阳性对照， $6\text{ }\mu\text{L}$ 两性霉素 B（AMB， $2.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ）作为真菌检定板的阳性对照，等量甲醇（分析纯）为阴性对照。将检定板 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 2~3 d，根据抑菌圈直径大小评估放线菌粗提物的抗菌活性强弱，所有实验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 改良原位培养获得的可培养细菌多样性

从 10 种不同的红树根际土壤中回收到 26 组 156 个微生物捕集器，其中 3 个捕集器在膜表面出现不规则的孔洞状，表明改良的微生物捕集器具有较高的样品回收率，对复杂的红树林生境具有较强的适应性。

经原位培养富集，从 10 种不同红树植物生境中共获得 240 种细菌，隶属于 4 门 8 纲 27 目 54 科 95 属，优势属为链霉菌属（*Streptomyces*），占 26.7%，其次为假单胞菌属（*Pseudomonas*）和弧菌属（*Vibrio*）。从 10 种红树植物土壤原位培养样品中分离获得的细菌种类，最多的是蜡烛果（*A. corniculatum*，63 种 33 属），其次为秋茄树（*K. obovata*，36 种 26 属）、海榄雌（*A. marina*，29 种 19 属）、木榄（*B. gymnorhiza*，23 种 18 属）、无瓣海桑（*S. apetala*，22 种 14 属）、木麻黄（*C. equisetifolia*，18 种 11 属）、卤蕨（*A. aureum*，14 种 9 属）、海漆（*E. agallocha*，14 种 11 属）、海芒果（*C. manghas*，12 种 6 属）、桐棉（*T. populnea*，9 种 8 属），结果如图 2 所示。

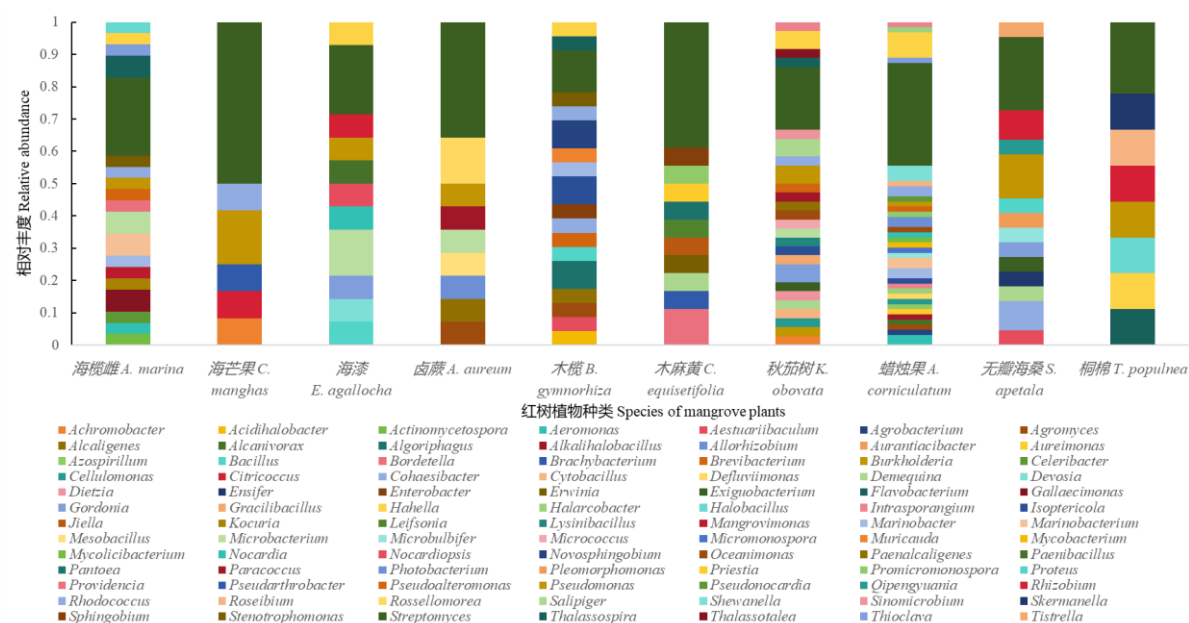


图 2 10 种红树林根际土壤原位培养样品可培养细菌多样性

Fig. 2 The improved *in situ* cultivation technique reveals the cultivable bacterial diversity in ten mangrove rhizosphere soil

本次实验共获得 13 株 16S rRNA 基因相似度小于 98.65% 的细菌，参考 Kim 等（2014）的方法，当 16S rRNA 基因序列相似性小于 98.65% 时，该细菌可能为潜在新物种，潜在新物种信息如表 2 和图 3 所示。其中，菌株 GXIMD 04217 和 GXIMD 01310 分别来源于黄槿和蜡烛果的根际环境，菌株 GXIMD 04217 与模式菌株 *Photobacterium lucens* CAIM 1938^T 最高相似度为 92.94%，GXIMD 01310 与 *Gallaecimonas mangrovi* HK-28^T 最高相似度为 96.98%，经系统分类学鉴定，GXIMD 01310 为 *Gallaecimonas* 属的 1 个新物种，命名为 *Gallaecimonas aegicerasi* sp. nov.；菌株 GXIMD 04217 为 Gammaproteobacteria 纲中的 1 个新科，命名为 *Aegicerasvorax qinzhovensis* gen. nov., sp. nov. 并成立新科 *Aegicerasvoracaceae* fam. nov.，相关成果已发表至，Antonie van Leeuwenhoek（Li et al., 2025）。

表 2 潜在新物种信息

Table 2 Information of potential new species

编号 Strain code	来源 Derived from	细菌相近种 Phylogenetically close species	相似度 Similarity (%)
GXIMD 04355	海榄雌土壤 <i>A. marina</i> soil	<i>Streptomyces chengmaiensis</i>	96.60
GXIMD 04303	海榄雌土壤 <i>A. marina</i> soil	<i>Oceanimonas doudoroffii</i>	97.82
GXIMD 04445	海榄雌土壤 <i>A. marina</i> soil	<i>Mycobacterium poriferae</i>	98.45
GXIMD 04364	蜡烛果土壤 <i>A. marina</i> soil	<i>Marinobacterium mangrovicola</i>	97.67
GXIMD 01310	蜡烛果土壤 <i>A. marina</i> soil	<i>Gallaecimonas mangrovi</i>	96.98
GXIMD 04177	蜡烛果土壤 <i>A. marina</i> soil	<i>M. excoecariae</i>	98.03
GXIMD 04330	桐棉土壤 <i>C. equisetifolia</i> soil	<i>Demequina aurantiaca</i>	98.05
GXIMD 04362	桐棉土壤 <i>C. equisetifolia</i> soil	<i>Pseudomonas oleovorans</i> subsp. <i>oleovorans</i>	97.98
GXIMD 04774	卤蕨土壤 <i>S. alterniflora</i> soil	<i>Aurantiacibacter aquimixticola</i>	98.15
GXIMD 01330	黄槿土壤 <i>A. corniculatum</i> soil	<i>Xanthobacter tagetidis</i>	97.82
GXIMD 01375	黄槿土壤 <i>A. corniculatum</i> soil	<i>Mycobacterium longobardum</i>	98.33

编号 Strain	来源 Derived from	细菌相近种 Phylogenetically close species	相似度 Similarity (%)
GXIMD 04217	黄槿土壤 <i>A. corniculatum</i> soil	<i>Photobacterium lucens</i>	92.94
GXIMD 01846	海榄雌土壤 <i>A. marina</i> soil	<i>Cohaesibacter marisflavi</i>	97.37

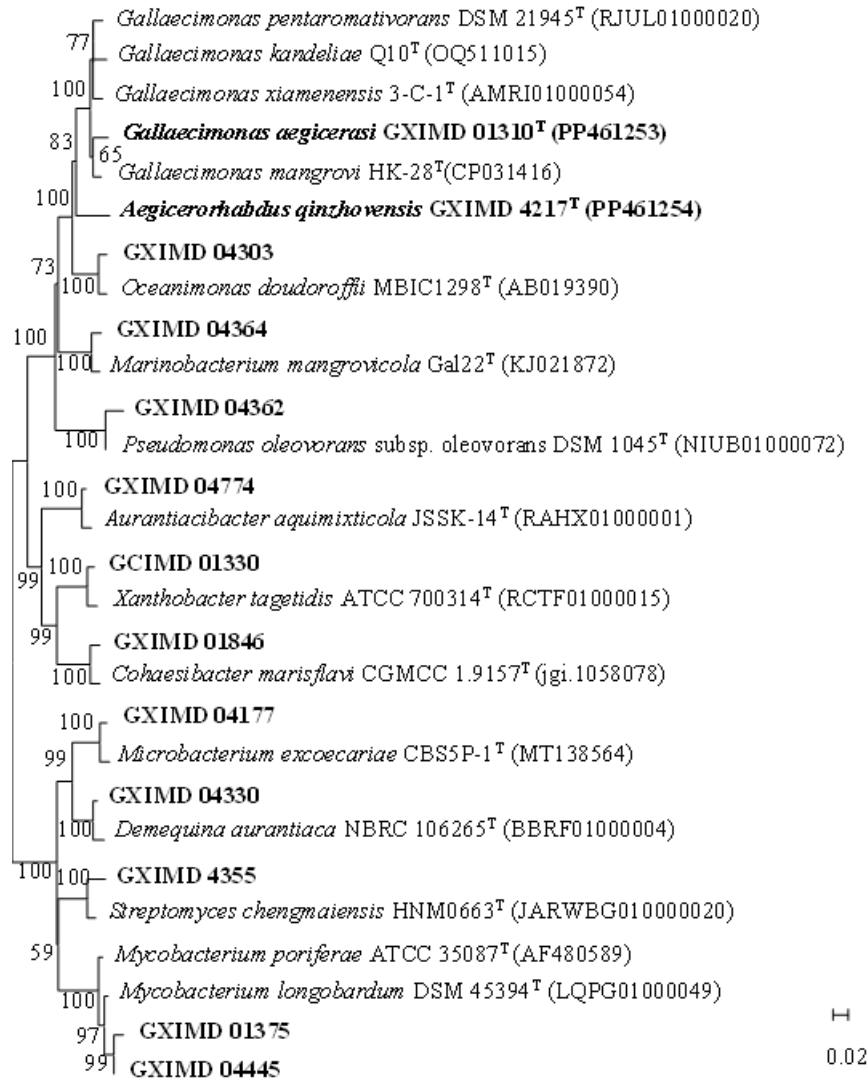


图 3 潜在新物种的邻接系统发育树

Fig. 3 The Neighbor-Joining tree of the potential novel species

2.2 不同培养基可培养细菌多样性分析

不同培养基细菌多样性结果显示，AGG 培养基对红树林生境细菌尤其是放线菌的分离效果最好，共分离得到 56 种可培养细菌，其中放线菌有 37 种（图 4）。该培养基中含有大量淀粉和多种硝酸盐成分，说明两地红树根际环境细菌偏好以淀粉作为生长所需的碳源。除 AGG 培养基外，细菌多样性较为丰富的培养基分别为 AIA、NBRC 和 ISP3 培养基，分别获得可培养细菌 41 种、26 种和 24 种。

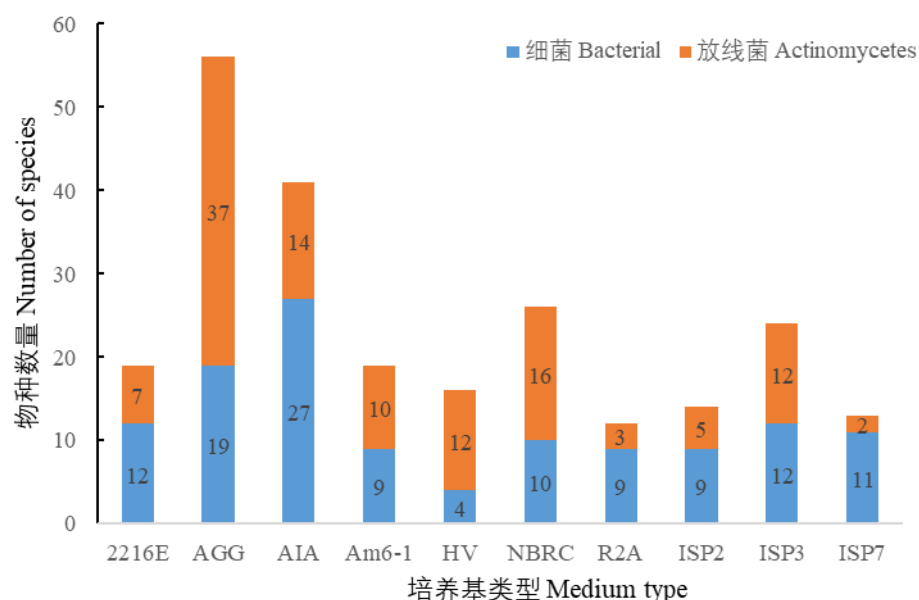


图 4 10 种培养基可培养细菌数量

Fig. 4 Number of bacteria isolated from ten kinds of media

2.3 可培养放线菌发酵粗提物抑制病原菌活性

采用滤纸片扩散法测定 114 种放线菌的抑菌活性，结果（表 3）显示，25 种放线菌至少对一种指示菌具有抑菌活性。活性菌株分布于 7 个属，其中链霉菌属（*Streptomyces*）活性菌株数量最多，共筛选获得 16 种占活性菌株总数的 64.0%。其余放线菌属为短杆菌属（*Brevibacterium* sp.）、拟诺卡氏菌属（*Nocardiopsis* sp.）、微杆菌属（*Microbacterium* sp.）、农霉菌属（*Agromyces* sp.）、原小单孢菌属（*Promicromonospora* sp.）和短状杆菌属（*Brachybacterium* sp.）。

表 3 25 种可培养海洋放线菌抑菌活性

Table 3 Antibacterial activity of 25 strains of *Actinomycetes*

菌株编号 Strain code	细菌相近种 Phylogenetically close species	抑菌圈直径 Diameter of bactericidal zone ($\bar{X} \pm S$, mm)				
		Methicillin-Re	A.	K.	P.	T. marneffe
		sistant S. aureus	baumannii	pneumoniae	aeruginosa	
GXIMD 04326	<i>Streptomyces exfoliatus</i>	7.5 $\pm$ 0.2	—	—	—	—
GXIMD 04373	<i>S. nogalater</i>	8.3 $\pm$ 0.8	—	—	—	—
GXIMD 04378	<i>S. alboniger</i>	9.2 $\pm$ 0.1	—	—	—	—
GXIMD 04372	<i>S. hebeiensis</i>	11.5 $\pm$ 0.2	—	8.7 $\pm$ 1.5	—	11.7 $\pm$ 0.1
GXIMD 04322	<i>S. malachitospinus</i>	—	—	6.7 $\pm$ 0.1	—	—
GXIMD 04313	<i>S. hawaiiensis</i>	—	—	11.7 $\pm$ 0.2	—	—
GXIMD 04323	<i>S. daghestanicus</i>	—	—	—	—	15.3 $\pm$ 0.2
GXIMD 04336	<i>S. koyangensis</i>	—	—	—	—	12.8 $\pm$ 0.5
GXIMD 04484	<i>S. lydicus</i>	7.5 $\pm$ 0.2	—	—	—	10.3 $\pm$ 0.2
GXIMD 04486	<i>S. caniferus</i>	—	—	—	—	9.3 $\pm$ 0.2
GXIMD 04328	<i>S. antibioticus</i>	23.5 $\pm$ 2.5	8.5 $\pm$ 0.2	8.3 $\pm$ 1.5	—	11.2 $\pm$ 0.4

菌株编号 Strain code	细菌相近种 Phylogenetically close species	抑菌圈直径 Diameter of bactericidal zone ($\bar{X} \pm S$, mm)				
		Methicillin-Re sistant <i>S.</i> <i>aureus</i>	<i>A.</i> <i>baumannii</i>	<i>K.</i> <i>pneumoniae</i>	<i>P.</i> <i>aeruginosa</i>	<i>T. marneffei</i>
GXIMD 04442	<i>S. angustmyceticus</i>	—		—	—	15.8±0.7
GXIMD 04525	<i>S. qinglanensis</i>	11.8±0.2	10.2±0.4	11.8±0.1	—	—
GXIMD 04529	<i>S. pluripotens</i>	16.5±0.2	—	9.3±1.5	—	—
GXIMD 04589	<i>S. filipinensis</i>	8.6±0.9	—	6.8±0.1	—	—
GXIMD 04504	<i>S. siوياensis</i>	6.6±0.1	6.5±0.2	—	—	—
GXIMD 04446	<i>Brevibacterium</i> <i>epidermidis</i>	9±1.2	—	—	—	—
GXIMD 04481	<i>Microbacterium</i> <i>trichothecenolyticum</i>	8.5±0.2	—	7.0±0.5	—	8.2±0.2
GXIMD 04587	<i>M. esteraromaticum</i>	12.8±2.3	12.4±1.2	14.8±0.7	8.2±1.4	
GXIMD 04538	<i>M. ketosireducens</i>	7.9±0.1	—	—	6.8±0.7	13.2±0.4
GXIMD 04558	<i>Nocardiosis alba</i>	14.4±5.7	7.1±0.4	—	—	21.2±0.4
GXIMD 04573	<i>Agromyces arachidis</i>	9.1±0.1	8.0±0.6	8.1±0.4	—	—
GXIMD 04477	<i>A. binzhouensis</i>	7.4±0.5	—	7.1±0.4	—	8.2±0.4
GXIMD 04324	<i>Promicromonospora</i> <i>sukumoe</i>	9.2±0.1	—	7.2±0.4	—	9.5±0.2
GXIMD 04300	<i>Brachybacterium</i> <i>paraconglomeratum</i>	—	—	—	—	14.5±0.2
阳性对照 A	甲氧苄氨嘧啶	14.5±1.1	12.1±1.4	18.5±1.2	—	—
positive control A	Trimethoprim					
阳性对照 B	环丙沙星	—	—	—	15.2±1.5	—
positive control B	Ciprofloxacin					
阳性对照 C	两性霉素 B	—	—	—	—	15.5±0.8
positive control C	Amphotericin B					

注：—表示无活性。

Note: — indicates no activity.

其中，活性菌株河北链霉菌（*S. hebeiensis* GXIMD 04372）、抗生链霉菌（*S. antibioticus* GXIMD 04328）、解镰刀菌素微杆菌（*M. trichothecenolyticum* GXIMD 04481）、酮还原微杆菌（*M. ketosireducens* GXIMD 04538）、白色拟诺卡氏菌（*Nocardiosis alba* GXIMD 04558）、滨州壤霉菌（*A. binzhouensis* GXIMD 04477）、苏库莫原微单孢菌（*P. sukumoe* GXIMD 04324）具有广谱抑菌活性，对革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌和真菌均有抑制作用。抗生链霉菌（*S. antibioticus* GXIMD 04328）和白色拟诺卡氏菌（*N. alba* GXIMD 04558）粗提物（12 μL、20.0 mg·mL⁻¹）分别对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌[抑菌圈直径（23.5±2.5） mm]和马尔尼菲蓝状菌[抑菌圈直径（21.2±0.4） mm]具有显著的抑菌活性（图 5）。

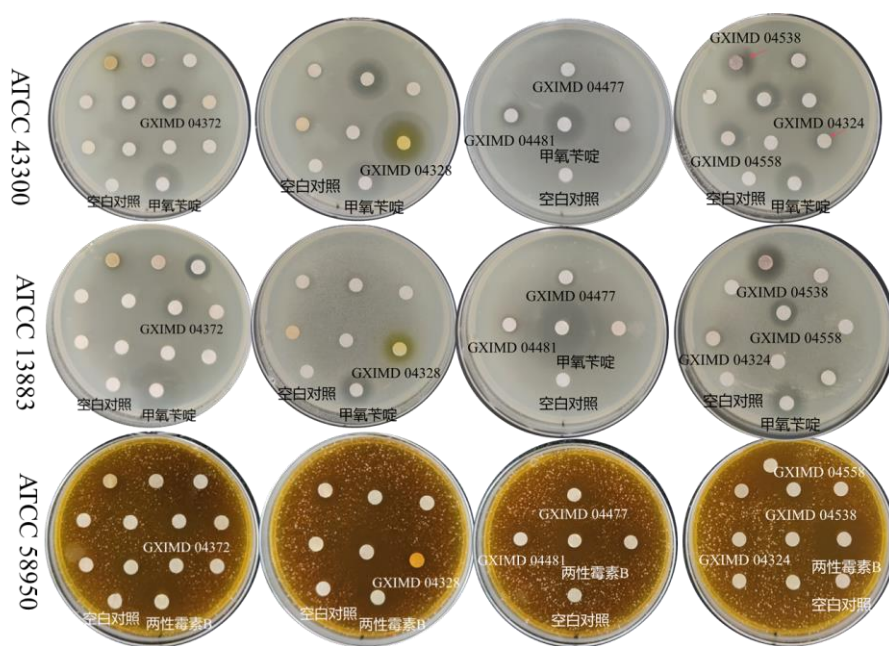


图 5 7 种活性菌株的抑菌效果

Fig. 5 Antibacterial effect of seven active strains

3 讨论与结论

原位培养是获取难/未培养微生物的有效方式之一，但存在培养装置易破损的问题。李飞娜（2021）在红树林环境的原位培养中发现，60 个原位培养装置中 25 个装置破损，破损率高达 41.67%。本研究在广西防城港和钦州红树林生境的 15 个采样点，埋藏并回收了 26 组共 216 个原位培养装置，经检查发现，只有 3 个装置出现脱胶和破损问题，影响了密封性，完好率达到 98.61%，这是因为原位培养装置添加的垫圈能有效减少微孔滤膜边缘黏合处和海水的直接接触，有效缓解海水腐蚀的情况。保护装置的设计在不影响原位培养装置充分接触土壤的情况下，减少了红树林生境活跃生物活动对装置的破坏，有效提高了样品回收的成功率和方便性。

采用原位培养方法，可以提升海洋可培养菌株的数量，同时增加新菌株发现比例。本研究通过改良原位培养装置从红树土壤中共分离得到 13 株潜在新物种，其中 58.8%属于变形菌门，35.3%属于放线菌门，5.9%属于拟杆菌门。链霉菌属（*Streptomyces*）为本次原位培养的优势菌属，分布于每种红树植物原位培养样品中，该结果与姜明国和李飞娜的研究结果一致（姜明国等，2015；李飞娜，2021），主要由于在微生物陷阱中，使用 0.45 μm 微孔膜选择性富集了丝状放线菌。其次为假单胞菌属（*Pseudomonas*）、弧菌属（*Vibrio*）和微杆菌属（*Microbacterium*）等体积较小且具有运动能力的菌属，这类菌属的细胞体积较小，鞭毛介导的运动性增强，能有效进入原位培养基中富集生长（Jung et al., 2013；王羚邨等，2023）。

放线菌是重要的抗生素来源，本研究筛选获得的 25 种放线菌对至少 1 种指示菌具有抑菌活性，链霉菌属（*Streptomyces*）为主要活性菌种，共获得 16 种，占活性菌株总数的 64.0%，其次是微细菌（*Microbacterium*）和农霉菌（*Agromyces*）。25 种活性菌株中，菌株 GXIMD 04573 首次报道对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌具有抑制活性。菌株 *S. daghestanicus* GXIMD 04323（ 15.3 ± 0.2 ）、*S. angustmyceticus* GXIMD 04442（ 15.8 ± 0.7 ）和 *B. paraconglomeratum* GXIMD 04300（ 14.5 ± 0.2 ）首次发现对马尔尼菲蓝状菌具有较强的抑菌活性，为马尔尼菲蓝状菌抗生素药物开发提供有效活性菌株资源。

本研究采用改良原位培养技术,从北部湾 10 种红树林根际土壤中分离出 240 种可培养细菌,其中包含 13 个潜在新分类群。25 种放线菌对多种人类致病菌表现出抑制作用,说明海洋放线菌是新型抗生素生产来源的潜力菌株且具有较大研究潜力。

参考文献:

- EL-KURDI N, ABDULLA H, HANORA A, 2021. Anti-quorum sensing activity of some marine bacteria isolated from different marine resources in Egypt[J]. *Biotechnology Letters*, 43: 455-468.
- GAVRISH E, BOLLMANN A, EPSTEIN S, et al., 2008. A trap for *in situ* cultivation of filamentous actinobacteria[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 72(3): 257-262.
- HUANG Z, LAI Q, 2020. *Mabikibacter ruber* Choi et al. 2017 is a later heterotypic synonym of *Notoacmeibacter marinus* Huang et al. 2017[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(1): 439-441.
- LAMMERS A B, GARBEVA P, BILDE T, et al., 2025. A modified iChip for *in situ* cultivation of bacteria in arid environments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 91(2): e0132524.
- ZHAO J, SHAKIR Y, DENG Y, et al., 2023. Use of modified iChip for the cultivation of thermo-tolerant microorganisms from the hot spring[J]. *BMC Microbiology*, 23: 56.
- JUNG D, SEO E Y, EPSTEIN S S, et al., 2013. A new method for microbial cultivation and its application to bacterial community analysis in Buus Nuur, Mongolia[J]. *Fundamental and Applied Limnology*, 104(19): 187-208.
- JIANG M G, GAN G H, YANG L F, et al., 2015. *In situ* isolation of actinomycetes and screening bioactive potential from mangrove rhizosphere soils in Guangxi[J]. *Haiyang Xuebao*, 37(2): 55-64. [姜明国, 甘光华, 杨立芳, 等, 2015. 广西红树林根际土壤放线菌的原位培养分离及其活性筛选[J]. *海洋学报*, 37(2): 55-64.]
- KIM M, OH H S, PARK S C, et al., 2014. 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*, 64(2): 346-351.
- KAEBERLEIN T, LEWIS K, EPSTEIN S S, 2002. Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment[J]. *Science*, 296(5570):1127-1129.
- LI F N, 2020. *Bioprospecting of Actinobacteria as Pharmaceutical Resource from Mangrove and Desert, and Taxonomic Studies on New Species*[D]. Beijing: Peking Union Medical College. [李飞娜, 2021. 红树林和沙漠环境药用放线菌资源勘探及新物种分类学研究[D]. 北京: 北京协和医学院.]
- LI F T, LI M, XU S F, et al., 2022. Study on diversity and biological activity of culturable bacteria in three true mangrove plants in Guangxi[J]. *Guihaia*, 42(8): 1294-1303. [黎芳婷, 李蜜, 徐淑芬, 等, 2022. 广西三种真红树植物可培养细菌多样性及其生物活性初筛[J]. *广西植物*, 42(8): 1294-1303.]
- LI M, HOU S S, YIN J L, et al., 2020. Diversity and nematicidal activity of endophytic bacteria from mangrove plants collected from Beibu Gulf coast at Xuwen[J]. *Guihaia*, 40(3): 301-310. [李蜜, 侯师师, 银江林, 等, 2020. 北部湾徐闻海域红树内生细菌物种多样性及其杀线虫活性研究[J]. *广西植物*, 40(3): 301-310.]
- LI W J, LI M, XU S F, et al., 2023. Research of antibacterial activity and culturable bacteria isolate from mangrove rhizosphere soil in Maowei Sea[J]. *Guihaia*, 43(11): 1999-2007. [李王靖, 李蜜, 徐淑芬, 等, 2023. 茅尾海红树根际土壤可培养细菌多样性及抑菌活性研究[J]. *广西植物*, 43(11): 1999-2007.]
- LI Z Y, CHEN Q, TANG Z Z, et al., 2023. Study on the biodiversity and biological activity of marine fungi isolated from Guangxi Beibu Gulf[J]. *Guangxi Sciences*, 30(4): 706-712. [李正媛, 陈琼, 唐振洲, 等, 2023. 北部湾广西海域海洋真菌多样性及其生物活性研究[J]. *广西科学*, 30(4): 706-712.]
- SARANRAJ P, SUJITHA D, 2015. Mangrove medicinal plants: A review[J]. *American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences*, 7(3): 146-156.
- LI M, LI W J, GAO M D, et al., 2025. A new family of the order Alteromonadales, *Aegicerorhabdaceae* fam. nov. with description of two novel species *Aegicerorhabdus qinzhovens* gen. nov., sp. nov., and *Gallaecimonas aegicerasi* sp. nov.[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 118: 192.
- SEFRJI F O, MARASCO R, MICHOUD G, et al., 2022. Insights into the cultivable bacterial fraction of sediments from the red sea mangroves and physiological, chemotaxonomic, and genomic characterization of *Mangrovibacillus cuniculi* gen. nov., sp. nov., a novel member of the Bacillaceae family[J]. *Frontiers in Microbiology*, 13: 777986.
- WANG LL, ZHANG X, WANG JS, et al., 2023. Utilization status and development countermeasures

- of mangrove medicinal resources in the marine-terrestrial interlaced zone[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis*, 59(4): 704-718. [王羚娜, 张昕, 王健松, 等, 2023. 海陆交错带红树植物药用资源利用现状及开发对策[J]. *北京大学学报(自然科学版)*, 59(4): 704-718.]
- WANG Z, YIN J, BAI M, et al., 2024. New polyene macrolide compounds from mangrove-derived strain *Streptomyces hiroshimensis* GXIMD06359: Isolation, antifungal activity, and mechanism against *Talaromyces marneffe*[J]. *Marine Drugs*, 22(1): 38.
- WALSH P, METZGER D, HIGUCHI R, 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material[J]. *Biotechniques*, 10(4): 506-513.
- WANG C, 2019. Preliminary application of sandwich plate technology in mining marine bacterial resources and taxonomic identification of three novel strains[D]. Jinan: Shandong University [王冲, 2019. 夹心平板技术在海洋细菌资源挖掘中的初步应用及三株新菌的分类鉴定[D]. 济南: 山东大学.]
- XU X Y, YANG H, NING X Q, et al., 2020. Research progress of marine microbial diversity and chemical diversity in Beibu Gulf [J]. *Guangxi Sciences*, 27(5): 433-450. [徐新亚, 杨宏, 宁小清, 等, 2020. 北部湾海洋微生物物种多样性与化学多样性研究进展[J]. *广西科学*, 27(5): 433-450.]
- YUAN Y, 2021. A study on bacteria *in situ* cultivation and isolation in mangrove sediments by using ichip method[D]. Ningbo: Ningbo University [原野, 2021. 红树林沉积物细菌的 ichip 原位培养分离方法研究[D]. 宁波: 宁波大学.]
- ZHOU C Y, ZHANG Q, ZHANG H W, et al., 2022. Advances in research on new techniques of marine microorganism culture [J]. *Progress in Pharmaceutical Sciences*, 46(3): 198-207. [周春云, 张琪, 张瀚文, 等, 2022. 海洋微生物培养新技术研究进展[J]. *药学进展*, 46(3): 198-207.]
- ZHU S T, 2022. Diversity analysis and polyphasic taxonomy of mangrove bacteria in Dongzhai Port, Haikou[D]. Ningbo: Ningbo University. [朱苏婷, 2022. 海口东寨港红树林细菌多样性及菌株多相分类学研究[D]. 宁波: 宁波大学.]