

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201805009

李蜜, 易湘茜, 杨彩妮, 等. 海南西海岸红树林伴生植物内生放线菌多样性及其延缓衰老活性初筛 [J]. 广西植物, 2020, 40(3): 293–300.

LI M, YI XX, YANG CN, et al. Diversity and anti-aging activity of endophytic actinobacteria from associated mangrove plants collected from west coast of Hainan [J]. *Guihaia*, 2020, 40(3): 293–300.

海南西海岸红树林伴生植物内生放线菌多样性及其延缓衰老活性初筛

李 蜜, 易湘茜, 杨彩妮, 庞晓婷, 姜 舒, 高程海*

(广西中医药大学 海洋药物研究院/药学院/广西中药药效研究重点实验室, 南宁 530200)

摘 要: 为寻找新型抗衰老药物, 该文以海南西海岸红树林伴生植物为研究对象, 采用 9 种不同培养基从 7 种伴生植物 21 份样品中分离纯化放线菌, 通过 PCR 扩增, 16S rRNA 基因序列分析已纯化放线菌的多样性, 利用秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 模型筛选菌株来进行延缓衰老活性研究。结果表明: (1) 从 7 种伴生植物 21 份样品中共分离到 26 株海洋放线菌, 隶属于 9 科 15 属, 分别为拟诺卡菌属、短状杆菌属、短小杆菌属、*Demequina*、戈登氏菌属、类诺卡氏菌属、*Lysinimicrobium*、细杆菌属、假诺卡氏菌属、微球菌属、原小单孢菌属、拟无枝酸菌属、*Yimella*、北里孢菌属和链霉菌属, 其中链霉菌属为优势菌属。(2) 经秀丽隐杆线虫模型筛选, 发现有 2 株海洋放线菌的发酵粗提物具有延缓秀丽隐杆线虫衰老的作用。综上结果说明海南西海岸红树林伴生植物中含有丰富多样的药用放线菌资源, 为海洋放线菌抗衰老研究奠定了基础。

关键词: 伴生植物, 物种多样性, 内生放线菌, 抗衰老活性

中图分类号: Q939.1 文献标识码: A

文章编号: 1000-3142(2020)03-0293-08

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Diversity and anti-aging activity of endophytic actinobacteria from associated mangrove plants collected from west coast of Hainan

LI Mi, YI Xiangxi, YANG Caini, PANG Xiaoting, JIANG Shu, GAO Chenghai*

(Institutes of Marine Drugs/Faculty of Pharmacy/Guangxi Key Laboratory of Efficacy Study on Chinese Materia Medica, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China)

Abstract: In order to search for new anti-aging drugs, actinobacteria were isolated from seven associated mangrove plants and nine different isolation media. The strain diversities were analyzed by using PCR amplification and comparison

收稿日期: 2019-02-15

基金项目: 国家自然科学基金(41566004); 广西中医药大学岐黄工程高层次人才团队培育项目(2018006); 广西中医药大学 2017 年引进博士科研启动基金(2017BS039); 广西中药药效研究重点实验室资助项目(17-259-20) [Supported by the National Natural Science Foundation of China (41566004); Development Program of High-Level Talent Team under Qihuang Project of Guangxi University of Chinese Medicine (2018006); Research Launching Fund for Introduced Doctors from Guangxi University of Chinese Medicine in 2017 (2017BS039); Guangxi Key Laboratory of Efficacy Study on Chinese Materia Medica (17-259-20)]。

作者简介: 李蜜(1995-), 女(壮), 广西柳州人, 硕士研究生, 主要从事海洋中药物物质基础与产品开发研究, (E-mail) 18878552446@163.com。

*通信作者: 高程海, 博士, 研究员, 硕士研究生导师, 主要从事海洋药用微生物资源与应用研究, (E-mail) 1178740043@qq.com。

of 16S rRNA gene sequences. The anti-aging activities of the actinobacteria were analyzed by using *Caenorhabditis elegans* screening models. The results were as follows: (1) A total of 26 marine actinobacteria were isolated from 21 samples of seven associated mangrove plants, belonging to nine families and fifteen genera consist of *Nocardiopsis*, *Brachybacterium*, *Curtobacterium*, *Demequina*, *Gordonia*, *Nocardioideis*, *Lysinimicrobium*, *Microbacterium*, *Pseudonocardia*, *Micrococcus*, *Promicromonospora*, *Amycolatopsis*, *Yimella*, *Kitasatospora* and *Streptomyces*, and the dominant genus was *Streptomyces*. (2) Two kinds of actinobacteria were found to have anti-aging effect by *Caenorhabditis elegans* screening models. All the above results indicate that there are abundant medical actinobacteria resources in the west coast of Hainan, and the study provides research fundamental data for anti-aging research of marine actinobacteria.

Key words: associated mangrove plants, species diversity, endophytic actinobacteria, anti-aging activity

红树林是热带亚热带海岸潮间带的木本植物群落,其伴生植物指偶尔出现于红树林最内缘或边缘地带的海岸、海滨、盐生或陆生植物,被认为是红树林的边缘物种(陶曙红等,2016)。近年来,随着陆地生物资源的广泛研究和日渐枯竭,海洋微生物资源备受科学家们的关注。许多海洋微生物与海洋动植物共生,以获得生存必需的营养(李艳华和张利平,2003)。海南西海岸分布着丰富多样的红树林植物,为保护国家资源建立了多个红树林自然保护区,包括儋州新英湾红树林市级自然保护区、临高文澜江县级自然保护区和临高彩桥红树林县级自然保护区等,为科学研究提供丰富的研究材料。与其他近海环境相比,红树林是分离放线菌的理想环境(洪葵,2013)。目前已发现 22 000 多个微生物活性产物,其中约 70% 由海洋放线菌产生,具有多种生理活性,包括抗菌、抗肿瘤、抗病毒、增强免疫等(Manivasagana et al., 2014)。李飞娜等(2017)从澳门红树林植物中分离到 192 株内生放线菌,其中获得 2 株放线菌新种,6 株潜在放线菌新种中 5 株具有抗菌活性。有研究报道,海洋放线菌 ACMA006 的发酵产物具有很强的抗肿瘤活性和较好的抑菌活性(袁献温和杨瑞丽,2009)。有关微生物次级代谢产物的药理活性报道很多(李菲等,2017;袁献温和杨瑞丽,2009),但对于微生物抗衰老方面的研究则相对较少。线虫是经典模式生物,具有生命周期短、易培养、易观察、基因组容量小且图谱清晰等优势(吕婷,2014),目前已广泛应用到抗衰老药物的筛选和研究过程中(吕婷,2014;王艳菊等,2014)。随着社会的发展和人们生活水平的不断提高,人口老龄化已成为当前不可阻挡的趋势(薛晓利等,2017)。2010 年全国 60 岁以上的老年人口占人口总数的 13.26%,预计到 21 世纪中叶,将达到 4.5 亿,约占总人口的 1/3(曾尔亢等,2012)。由此可

见,抗衰老药物的研究是当前重要而紧迫的任务(吕婷,2014)。

目前,国内外关于线虫延缓衰老模型的研究主要集中于中药提取物和保健产品的延缓衰老研究(黄正杰等,2013),而关于利用海洋微生物发酵产物对线虫衰老模型的研究报道较少。海洋微生物拥有独特的活性次级代谢产物,其代谢产物的抗衰老研究值得深入探讨。到目前为止,未见有关于红树林伴生植物共生微生物多样性的研究报道。本研究采用秀丽隐杆线虫作为延缓衰老研究的模式生物,以特殊生境的海洋伴生植物为研究对象,采用纯培养技术开展其内生放线菌多样性及其发酵产物对线虫衰老活性的研究,为研究红树林放线菌群落组成提供参考,以及期望获得强活性菌株,为开发新型抗衰老药物提供强活性菌源。

1 材料与方法

1.1 材料

所用材料为 7 种伴生植物样品:海马齿(*Sesuvium portulacastrum*)、厚藤(*Ipomoea pes-caprae*)、鱼藤(*Derris trifoliata*)、曼陀罗(*Datura stramonium*)、苦郎树(*Clerodendrum inerme*)、猩猩草(*Euphorbia cyathophora*)、弯枝黄檀(*Dalbergia candanensis*)。材料由广西中医药大学高程海研究员鉴定。样品于 2017 年 7 月采集于海南西海岸的红树林,经纬度、物种编号、植物种类及组织等信息见表 1 所示。分别采取花、茎、叶和胚轴,先用无菌水冲洗样品表面 3 遍,立即装入密封采样袋,置于采样冰盒中 24 h 内送回实验室;然后进行研磨、稀释涂布、培养。野生秀丽线虫用于本研究抗衰老活性的初步筛选,由广西科学院汪斌博士惠赠。

1.2 方法

1.2.1 伴生植物样品的处理 去除伴生植物表面的

表 1 样品采集信息

Table 1 Information of collected samples

样品编号 Sample code	植物名称 Plant name	植物组织 Plant tissue	经纬度 Longitude and latitude
H1	海马齿 <i>Sesuvium portulacastrum</i>	叶、茎 Leaf and stem	109°33'50'E、 19°51'27'N
H2	厚藤 <i>Ipomoea pes-caprae</i>	花、茎、叶 Blossom, stem and leaf	109°33'50'E、 19°51'27'N
H3	鱼藤 <i>Derris trifoliata</i>	花、茎、叶 Blossom, stem and leaf	109°59'37'E、 15°55'07'N
H4	曼陀罗 <i>Datura stramonium</i>	花、茎、叶、胚轴 Blossom, stem, leaf and hypocotyl	109°33'50'E、 19°51'27'N
H5	苦郎树 <i>Clerodendrum inerme</i>	茎、叶、胚轴 Stem, leaf and hypocotyl	109°59'37'E、 19°55'07'N
H6	猩猩草 <i>Euphorbia cyathophora</i>	花、茎、叶 Blossom, stem and leaf	109°33'50'E、 19°51'27'N
H7	弯枝黄檀 <i>Dalbergia candenatensis</i>	茎、叶、胚轴 Stem, leaf and hypocotyl	109°33'50'E、 19°51'27'N

杂质,分别选取完整无病虫害的花、茎、叶、胚轴进行表面消毒,先用 5% 的次氯酸钠溶液浸泡 8 min, 无菌水冲洗 3 次;再用 75% 的酒精溶液浸泡 5 min, 无菌水冲洗 3 次。分离培养基参考李飞娜等 (2017)。分别取少量表面消毒后的植物材料约 2 g 于研钵中充分研磨,吸取 2 mL 无菌水与研磨后的浆液混匀,此浓度液作为样品原液,再依次稀释到 10⁻⁴组织悬液。分别取 100 μL 10⁻⁴组织悬液涂布在 9 种分离培养基 (AGG、M4、M5、M7、M9、M10、ISP7、ISP3 和 M11) 上,样品原液置于 4 ℃ 冰箱暂存。

1.2.2 菌株的分离纯化及保藏 参考吴家法等 (2017) 的方法,分离平板置于 28 ℃ 恒温培养箱培养 2~8 周通过形态观察,挑选质地致密程度较高,边缘内陷明显的放线菌菌落在 ISP2 培养基上进行三区划线纯化,如有杂菌则进行二次纯化或多次纯化,直至得到单一纯净的菌落,并记录菌落数及菌落的形态特征。获得纯菌株采用 Chelex-100 法 (周双清等,2010) 提取基因组 DNA;参照 Walsh et al. (1991) 的方法进行 PCR 梯度扩增,扩增引物为通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。

PCR 反应条件:94 ℃ 预变性 5 min,后进行 30 个循环 (94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 90 s),循环结束后,72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,利用 Bio-RAD 凝胶成像仪观察电泳结果。Gel Logic 2200 Pro 凝胶成像仪检验条带合格后委托上海美吉生物医药技术有限公司广州分公司进行测序。测序结果经 DNA Star 软件整理,利用数据库 EzBioCloud (<http://www.eztaxon.org/>) (Kim et al.,2009) 及 Blast 网站进行在线比对;对 16S rRNA 基因序列进行相似性比对搜索。将纯化好的菌株制成 20% (V/V) 甘油管保存于 -80 ℃ 超低温冰箱中。

1.2.3 放线菌粗提物的制备 参考覃媚等 (2016) 的方法,从 ISP2 固体培养基上挑取 26 株对数生长期的菌丝接种到 200 mL ISP2 液体培养基中,在恒温振荡培养箱中 28 ℃、180 r·min⁻¹ 发酵 7 d;离心收集发酵液,发酵液用乙酸乙酯萃取 (用符号 E 表示),取上层乙酸乙酯层浓缩备用;菌体 (用符号 T 表示) 用丙酮破壁后甲醇萃取浓缩干燥,收集粗提物,用于线虫抗衰老活性的初步筛选。

1.2.4 线虫的寿命实验 参考 Lakowski & Hekimi (1998) 的方法,检测 26 株放线菌发酵粗提物是否具有延缓线虫衰老的作用。将线虫涂布于含有 OP50 的 NGM (nematode growth media) 固体培养基上,置于 20 ℃ 恒温培养箱培养约 48 h 后可见 L4 期成熟线虫,此时线虫可用于实验 (Brenner, 1974)。NGM 固体培养基 (黄正杰等,2013):NaCl 3 g,蛋白胨 2.5 g,Agar 17 g,去离子水 975 mL。121 ℃,20 min,灭菌后,待培养基温度降至 55 ℃,依次加入 CaCl₂ 1 mL,MgSO₄ 1 mL,K₃PO₄ 25 mL,5 mg·mL⁻¹胆固醇 1 mL,混匀后,倒入一次性平板,平板至少放置 1 d 后可用或置于 4 ℃ 下一个月使用完毕。

线虫的同期化:取传代后线虫用约 10 mL 的 M9 缓冲液 (Na₂HPO₄ 6 g,KH₂PO₄ 3 g,NaCl 5 g,MgSO₄·7H₂O 0.25 g,去离子水 1 L) 重复清洗到 15 mL 离心管中,用微孔滤膜过滤,取下层液体备用。100 mL 大肠杆菌发酵液离心,去掉上清液,备用。取含有大量虫卵的液体滴加于涂布有 OP50 的 NGM 平板中心,平板中还需加入一定量的 FDU 抑制线虫后代的产生。

寿命实验:将菌体粗提物样品浸膏溶解于 2% DMSO 中,终浓度为 100 mg·L⁻¹ (实验组),阿维菌

素 100 mg · L⁻¹(阳性对照) ,DMSO 0 mg · L⁻¹(空白对照)涂布于含有 OP50 的 NGM 平板上,每块平板挑去 20 条处于 L4 期的线虫,每组取 5 个平板,置于 20 ℃ 下恒温箱培养,此时记为寿命实验第 0 天。每天观察并记录线虫存活的数量。DMSO 在线虫寿命实验中的安全剂量为 2%,本研究未超过安全使用剂量,不会影响实验结果。

活性菌株粗提物液质谱图:取具有延缓线虫衰老活性的菌株粗提物 5 mg,配制成一定浓度的溶液来进行液质联用(HPLC-MS) 谱图扫描,液相色谱柱为 Luna 5u C18(2) 100A 150 mm × 4.60 mm 5 micron,流动相为甲醇-水(含 0.1% 甲酸),流速为 1 mL · min⁻¹,分析时间为 50 min,梯度洗脱。质谱采用电喷雾离子源(ESI 源),源喷射电压(IS) 为 4 500 V,雾化温度为 180 ℃。根据质谱图信息分子离子峰,通过查阅 SciFinder 来初步推断代谢产物类型。

1.3 统计分析

所有数据采用 SPSS Statistics 17.0 进行统计分析,图表采用 Excel 2013 和 Graphpad prim 5 绘制,通过 DNA Star 软件进行序列整理和 MEGA5.0 软件构建系统发育树及聚类分析,DataAnalysis 进行液质联用分析。

2 结果与分析

2.1 红树林伴生植物内生放线菌多样性分析

根据菌落形态特征进行初步排重后,选择 62 株菌进行 16S rRNA 基因扩增和序列比对分析,结果表明 62 株细菌中 26 株为放线菌,分布于 6 个目 9 个科 15 个属。26 株内生放线菌在 15 个属的多样性分布如图 1 所示,链霉菌属(*Streptomyces*) 分离出 5 株菌,占所分离放线菌株总数的 19.23%。此次研究分离到的稀有放线菌包括拟诺卡菌属(*Nocardiopsis*)、短状杆菌属(*Brachybacterium*)、短小杆菌属(*Curtobacterium*)、*Demequina*、戈登氏菌属(*Gordonia*)、类诺卡氏菌属(*Nocardioides*)、*Lysinimicrobium*、细杆菌属(*Microbacterium*)、假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*)、微球菌属(*Micrococcus*)、原小单孢菌属(*Promicromonospora*)、拟无枝酸菌属(*Amycolatopsis*)、*Yimella*、北里孢菌属(*Kitasatospora*) ,占分离放线菌总数的 80.76%。

26 株可培养内生放线菌的物种组成见表 2。

表 2 26 株可培养内生放线菌的物种组成
Table 2 Species of culturable 26 endophytic actinobacteria

菌株编号 Strain code	相近种 Origin	16S rRNA 基因序列 相似性 16S rRNA sequence identity (%)
IMDGX 6028	<i>Amycolatopsis niigatensis</i>	97.76
IMDGX 6049	<i>Brachybacterium sacelli</i>	97.23
IMDGX 6169	<i>Streptomyces antibioticus</i>	99.61
IMDGX 6193	<i>S. marokkonensis</i>	98.70
IMDGX 6225	<i>Gordonia hongkongensis</i>	99.74
IMDGX 6247	<i>Streptomyces albaduncus</i>	99.61
IMDGX 6364	<i>Pseudonocardia carboxydivorans</i>	100
IMDGX 6578	<i>Nocardioides simplex</i>	99.35
IMDGX 6046	<i>Brevibacterium iodinum</i>	98.80
IMDGX 6048	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i>	99.74
IMDGX 6118	<i>Curtobacterium albidum</i>	99.33
IMDGX 6119	<i>Demequina salsinensis</i>	99.10
IMDGX 6131	<i>Isoptericola jiangsuensis</i>	99.49
IMDGX 6137	<i>Microbacterium saccharophilum</i>	98.15
IMDGX 6150	<i>Streptomyces carpaticus</i>	98.95
IMDGX 6173	<i>Lysinimicrobium pelophilum</i>	98.32
IMDGX 6195	<i>Streptomyces novaecaesareae</i>	100
IMDGX 6239	<i>Nocardiopsis prasina</i>	98.44
IMDGX 6270	<i>Brevibacterium permense</i>	97.75
IMDGX 6313	<i>Microbacterium arborescens</i>	99.09
IMDGX 6316	<i>M. proteolyticum</i>	99.48
IMDGX 6326	<i>Curtobacterium citreum</i>	99.49
IMDGX 6329	<i>Streptomyces drozdowiczii</i>	99.35
IMDGX 6458	<i>Nocardiopsis synnemataformans</i>	99.49
IMDGX 6469	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	99.87
IMDGX 6469-1	<i>Yimella lutea</i>	98.39

根据放线菌菌株与典型菌株比对,16S rRNA 基因序列相似性小于 98.5% 的菌株是新种的可能性为 80%(徐丽华等,2007)。16S rRNA 基因序列相似性比对分析结果显示菌株 IMDGX 6028、IMDGX 6049、IMDGX 6137、IMDGX 6173、IMDGX 6270、IMDGX 6239 和 IMDGX 6469-1 与有效发表菌株

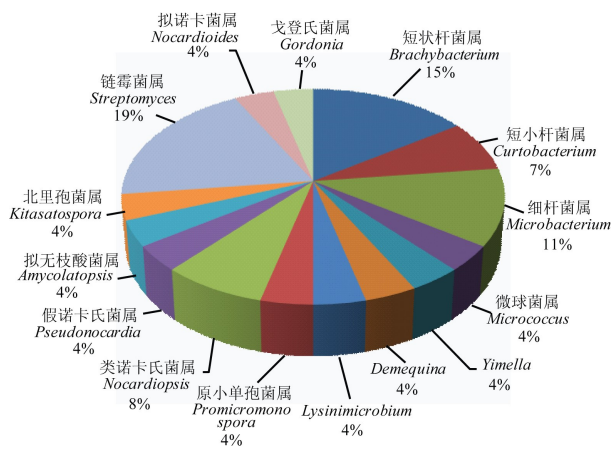


图 1 26 株内生放线菌在 15 个属的多样性分布
Fig. 1 Diversities of 26 strains of endophytic actinobacteria in the fifteen genera

Amycolatopsis niigatensis、*Brachybacterium sacelli*、*Microbacterium saccharophilum*、*Lysinimicrobium pelophilum*、*Brevibacterium permense*、*Nocardiopsis prasina* 和 *Yimella lutea* 的最高相似度分别为 97.76%、97.23%、98.15%、98.32%、97.75%、98.44%和98.39%，即这 7 株菌株有可能为潜在的放线菌新物种。

2.2 26 株内生放线菌在植物组织、植物种类及培养基中的分布

由图 2 可知,M7 培养基分离得到的菌株数量和多样性最多,分别为 12 株放线菌,隶属于 9 个属;其次是 P3 培养基,分离得到 11 株放线菌,隶属于 8 个属;第三是 M4 培养基,分离得到 9 株放线菌,隶属于 7 个属。其中,M7 和 M4 两种培养基均含有 L-天冬酰胺作为氨基酸来满足放线菌的营养需求。这三种不同的培养基分离得到的菌株数量和多样性均较多,可作为今后培养放线菌的首选培养基。M11 培养基(棉子糖-组氨酸培养基)分离得到菌株数量和多样性均最少,为 4 株放线菌,隶属于 4 个属。

从不同植物组织分离得到的放线菌菌株数量和多样性结果见图 3。从茎中分离得到的放线菌菌株数量和多样性最多,为 18 株放线菌,隶属于 12 个属;其次是叶子分离得到 16 株放线菌,隶属于 10 个属;胚轴中分离得到的菌株数量和多样性较少。

从图 4 可见,H5 苦郎树植物分离得到 13 株放线菌,隶属于 8 个属;H3 鱼藤分离得到 10 株放线

菌,隶属于 5 个属;H7 弯枝黄檀分离得到 8 株放线菌,隶属于 8 个属。

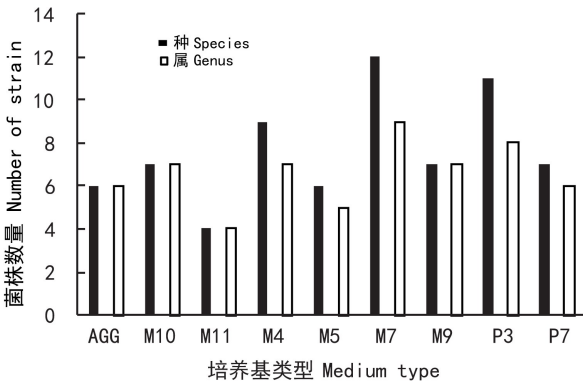


图 2 不同培养基分离得到的内生放线菌
Fig. 2 Endophytic actinobacteria isolated from different media

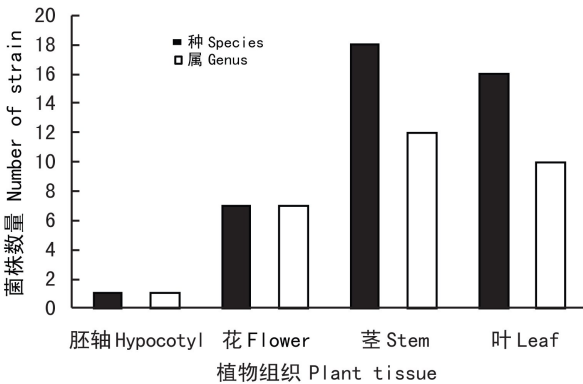


图 3 不同植物组织分离得到的内生放线菌
Fig. 3 Endophytic actinobacteria isolated from different plant tissues

2.3 伴生植物放线菌发酵产物延缓衰老活性分析

对伴生植物样品中获得的 26 株内生放线菌的乙酸乙酯萃取物(E)和菌体的甲醇萃取物(T)进行线虫延缓衰老活性筛选,采用 SPSS Statistics 17.0 进行统计分析,以平均值±标准差表示。由表 3 可知,IMDGX 6364T 和 IMDGX 6193T 这 2 株放线菌具有显著延缓线虫衰老的活性,分别从曼陀罗叶子和苦郎树叶子中分离得到。两株放线菌 IMDGX 6364 和 IMDGX 6193 分别对其发酵所得乙酸乙酯粗提物和菌体的甲醇粗提物进行线虫寿命实验,表明它们菌体的甲醇粗提物具有显著的延缓衰老活性。

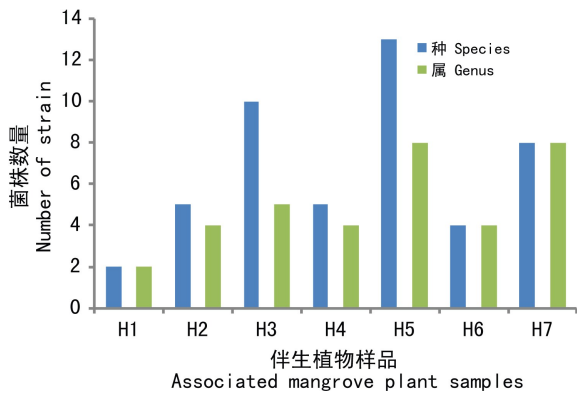


图 4 不同伴生植物样品分离得到的内生放线菌
Fig. 4 Endophytic actinobacteria isolated from different associated mangrove plant samples

表 3 26 株内生放线菌培养液粗提物具有抗衰老活性的菌株平均寿命

Table 3 Average lifetime of the extracts from 26 endophytic actinobacteria associated with anti-aging activities

菌株编号 Strain code	平均寿命 Average lifetime (d)
IMDGX 6364T	11.67±2.08 **
IMDGX 6239T	5.66±1.53
IMDGX 6193T	13.00±1.73 **
IMDGX 6088T	4.33±1.53
IMDGX 6159E	6.33±3.51
IMDGX 6139E	6.00±3.61
IMDGX 6028E	4.37±2.08

注: ** 与空白对照组比较, 差异极显著 ($P<0.01$); E 表示发酵液用乙酸乙酯萃取; T 表示发酵菌体用丙酮破壁后用甲醇萃取。

Note: ** refers to extremely significant differences compared with the blank control group ($P<0.01$); E indicates extract from ethyl acetate; T indicates extract from methyl alcohol.

根据液质联用谱图信息可知,IMDGX 6193T 的代谢产物在 3.3 min 存在一较明显的峰,IMDGX 6364T 在 3.0 min 有明显的峰,分析两活性菌株的高分辨质谱图可知分子离子峰分别为 MS m/z 305.2110 和 MS m/z 190.1078,根据 SciFinder 检索初步推断其代谢产物分别为 Elsinopirin A (Frank et al., 2018) 和 N-Methylcalystegine B₃ (Naoki et al., 1997),其中 Elsinopirin A 的化学结构如图 5 所示。

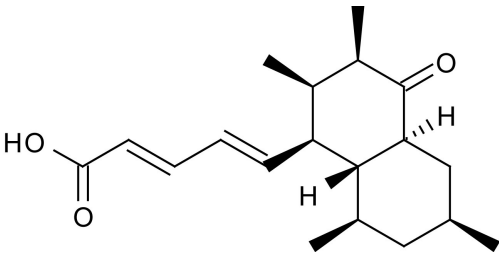


图 5 Elsinopirin A 化合物结构图
Fig. 5 Structure of Elsinopirin A

3 讨论与结论

我国红树林主要分布于海南、广东、广西、福建及台湾、香港、澳门等地。红树林相比陆地环境,强辐射、高盐和低氧等特殊生境,所蕴育的放线菌类群丰富,使放线菌具有更高的拮抗性。近年来,红树放线菌及其次生代谢产物的研究逐渐增多(吴家法等,2017;李菲等,2017)。许敏等(2016)从广东湛江红树林植物中分离得到的内生放线菌中有 3 株具有较强杀线虫活性,同时 22.64% 菌株具有抗生素合成基因簇。为探索海南西海岸红树林伴生植物内生放线菌资源的特征,本研究对采集的 7 种伴生植物,利用 9 种分离培养基,对样品各个部位的内生放线菌进行分析,共分离获得内生放线菌 26 株,隶属于 6 个目 9 个科 15 个属。植物不同部位,其内生放线菌的含量有所不同,茎中分离的放线菌含量最多,叶子中次之,胚轴中最少。海南西海岸海洋生物多样化,本研究从伴生红树中分离发现 8 株链霉菌外,还发现短状杆菌属 (*Brachybacterium*)、短小杆菌属 (*Curto-bacterium*)、戈登氏菌属 (*Gordonia*)、北里孢菌属 (*Kitasatospora*) 等稀有放线菌,为寻找新抗生素提供丰富菌源。

以线虫为模型测定 26 株内生放线菌是否具有抗衰老活性。结果显示,2 株内生放线菌 *Pseudonocardia carboxydivorans* 和 *Streptomyces marokkonensis* 具有显著延缓线虫衰老的活性,分别归属于假诺卡氏属和链霉菌属。根据液质联用谱图信息,可知这两株放线菌分别含有结构类似 N-Methylcalystegine B₃ 和 Elsinopirin A 的化合物。据报道,*Pseudonocardia carboxydivorans* 可从土壤和植物样品中分离

得到 (Navarromartinez et al., 2017), Park et al. (2008) 发现它对枯草芽孢杆菌类可产生抑制作用。Tanvir et al. (2016) 通过 HPLC-MS 测试其主要活性次级代谢产物为酰胺类化合物。本研究通过秀丽隐杆线虫的衰老模型表明两者均能显著延缓线虫衰老, 具有一定的抗衰老活性。

通常环境微生物中只有 1% 能够被实验室培养 (吴家法等, 2017)。本实验通过综合各研究团队所用的分离培养基营养成分, 用 9 种不同营养成分的分离培养基共得到分布于 9 个科 15 个属的 26 株放线菌, 所获稀有放线菌数量和种类相对较高, 说明海南西海岸红树林伴生植物具有丰富的多样性, 为后期放线菌分离方法研究提供可靠依据, 为进一步解决人类疾病的实际问题, 寻找具有延缓衰老药物提供活性菌株。目前, 人类对海洋内生放线菌的了解很有限, 摸索适合红树内生菌研究的方法, 尽可能多地分离纯化难培养或未培养的微生物仍是当前微生物研究的重要内容。

参考文献:

- BRENNER S, 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans* [J]. *Genetics*, 77(1):71.
- CHEN L, WANG W, ZHANG Y, et al., 2009. Recent progresses in mangrove conservation, restoration and research in China [J]. *J Plant Ecol*, 2(2):45-54.
- FRANK S, KATHRIN P, SCHROERS HJ, et al., 2018. Elsinopirins A - D, decalin polyketides from the ascomycete *elsinoë pyri* [J]. *Biomolecules*, 8(8):1-10.
- HONG K, 2013. Actinomycetes from mangrove and their secondary metabolites [J]. *Acta Microbiol Sin*, 53(11):1131-1141. [洪葵, 2013. 红树林放线菌及其天然产物研究进展 [J]. *微生物学报*, 53(11):1131-1141.]
- HUANG ZJ, CUI JY, REN FZ, et al., 2013. Study on anti-aging effects of crude extract of giant salamander on *Caenorhabditis elegans* [J]. *J Food Ind*, 34(1):122-125. [黄正杰, 崔建云, 任发政, 等, 2013. 大鲵粗提物延缓秀丽线虫衰老的研究 [J]. *食品工业*, 34(1):122-125.]
- KIM KH, ROH SW, CHANG HW, et al., 2009. *Nitratireductor basaltis* sp. nov. isolated from black beach sand [J]. *Int J Syst & Evol Microbiol*, 59(1):135-8.
- LAKOWSKI B, HEKIMI S, 1998. The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(22):13091-6.
- LI F, GAO CH, YU L, et al., 2017. Diversity of endophytic bacteria isolated from *Kandelia candel* and its *in-vitro* activity against *Ustilago scitaminea* Sydow [J]. *Chin J Antibiot*, 42(4):318-320. [李菲, 高程海, 余炼, 等, 2017. 秋茄内生细菌多样性及抑制甘蔗黑穗霉菌活性研究 [J]. *中国抗生素杂志*, 42(4):318-320.]
- LI FN, PAN Z, TUO L, et al., 2017. Studies on the diversity and novelty of endophytic actinobacteria isolated from mangrove plants collected in Macao [J]. *Chin J Antibiot*, 42(4):284-293. [李飞娜, 潘臻, 庾利, 等, 2017. 澳门红树林植物内生放线菌多样性及新颖性研究 [J]. *中国抗生素杂志*, 42(4):284-293.]
- LI YH, ZHANG LP, 2003. Exploitation and utilization of marine microbial resources [J]. *Microbiol Chin*, 30(3):113-114. [李艳华, 张利平, 2003. 海洋微生物资源的开发与利用 [J]. *微生物学通报*, 30(3):113-114.]
- LÜ T, 2014. Study on the anti-aging of plant extracts by using the model organism *Samsonite* [D]. Nanjing: Nanjing Normal University. [吕婷, 2014. 利用模式生物秀丽隐杆线虫对植物提取物抗衰老的研究 [D]. 南京: 南京师范大学.]
- NAVARROMARTINEZ, A, COROMINAS N, SAINZ DBC, et al., 2017. *Pseudonocardia carboxydivorans* in human cerebrospinal fluid: A case report in a patient with traumatic brain injury [J]. *Bmc Infect Dis*, 17(1):472.
- NAOKI A, ATSUSHI K, MIWA M, et al., 1997. Specific agalactosidase inhibitors, N-methylcalystegines structure and activity relationships of calystegines from *Lycium chinense* [J]. *Eur J Biochem*, 248:296-303.
- MANIVASAGAN P, VENKATESAN J, SIVAKUMAR K, et al., 2014. Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria [J]. *Microbiol Res*, 169(4):262-278.
- PARK SW, PARK ST, LEE JE, et al., 2008. *Pseudonocardia carboxydivorans* sp. nov. a carbon monoxide-oxidizing actinomycete and an emended description of the genus *Pseudonocardia* [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 58(11):2475-2478.
- QIN M, YU QW, ZHU LB, et al., 2016. Diversity of epiphytic bacteria of three species of gracilaria and their bacteriostatic activities [J]. *J S Agric*, 47(11):1966-1973. [覃媚, 于清武, 竺利波, 等, 2016. 三种江蓠共附生细菌多样性及抑菌活性分析 [J]. *南方农业学报*, 47(11):1966-1973.]
- TANVIR R, SAJID I, HASNAIN S, et al., 2016. Rare *Actinomycetes* *nocardia caishijiensis* and *Pseudonocardia carboxydivorans* as endophytes, their bioactivity and metabolites evaluation [J]. *Microbiol Res*, 185:22.
- TAO SH, YANG YX, ZHANG Y, et al., 2016. Study on the chemical constituents of the mangrove associated plant *Abrus precatorius* L. [J]. *J Guangdong Pharm Univ*, 32(4):425-427. [陶曙红, 杨雅贤, 张珂, 等, 2016. 红树伴生植物相思子的化学成分研究 [J]. *广东药学院学报*, 32(4):425-427.]
- WALSH PS, METZGER DA, 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 YJ, MA JW, WANG XZ, et al., 2014. Potential anti-aging effects of grape seed procyanidins on *Caenorhabditis elegans* [J]. *Sci Technol Food Ind*, 35(20):369–373. [王艳菊, 马建伟, 王曦苗, 等, 2014. 葡萄籽原花青素对秀丽隐杆线虫抗衰老的影响 [J]. *食品工业科技*, 35(20):369–373.]
- WU JF, WU ST, LI ZM, et al., 2017. Biodiversity and screening of culturable actinobacteria against fusarium oxysporum isolated from mangrove soil in Maowei Sea [J]. *Chin J Antibiot*, 42(4):294–301. [吴家法, 吴思婷, 李智鸣, 等, 2017. 茅尾海红树林土壤可培养放线菌多样性及其抗尖孢镰刀菌活性分析 [J]. *中国抗生素杂志*, 42(4):294–301.]
- XUE XL, ZHANG JQ, SONG SJ, et al., 2017. Aging and aging related neurodegenerative disease models and drug screening based on *Caenorhabditis elegans*: Research progress [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 31(5):429–438. [薛晓利, 张建琴, 宋少娟, 等, 2017. 秀丽隐杆线虫衰老与衰老相关神经退行性疾病模型及药物筛选研究进展 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 31(5):429–438.]
- XU LH, LI WJ, LIU ZH, et al., 2007. Actinomycete systematics—principle method and practice [M]. Beijing: Science Press. [徐丽华, 李文均, 刘志恒, 2007. 放线菌系统学——原理、方法及实践 [M]. 北京:科学出版社.]
- XU M, LI J, DAI SJ, et al., 2016. Study on diversity and bio-activity of actinobacteria isolated from mangrove plants collected from Zhanjiang in Guangdong Province [J]. *Chin J Antibiot*, 41(1):26–34. [许敏, 李静, 戴素娟, 等, 2016. 广东湛江红树林植物内生放线菌资源勘探及生物活性研究 [J]. *中国抗生素杂志*, 41(1):26–34.]
- YUAN XW, YANG RL, 2009. Isolation and identification of one marine actinomycete strain exhibiting antitumor activity [J]. *Microbiol Chin*, 36(1):78–83. [袁献温, 杨瑞丽, 2009. 一株具有抗肿瘤活性的海洋放线菌的分离和鉴定 [J]. *微生物学通报*, 36(1):78–83.]
- ZENG EK, SUN YH, DUAN L, et al., 2012. Aging of Chinese population and science of aging [J]. *Chin J Soc Med*, 29(6):388–389. [曾尔亢, 孙煜昊, 段凌, 等, 2012. 我国人口老龄化与衰老科学 [J]. *中国社会医学杂志*, 29(6):388–389.]
- ZHOU SQ, HUANG XL, HUANG DY, et al., 2010. A rapid method for extracting DNA from a ctinomycetes by Chelex-100 [J]. *Biotechnol Bull*, (2):123–125. [周双清, 黄小龙, 黄东益, 等, 2010. Chelex-100 快速提取放线菌 DNA 作为 PCR 扩增模板 [J]. *生物技术通报*, (2):123–125.]

(责任编辑 何永艳)