

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201709013

引文格式: 李菲, 高程海, 余炼, 等. 川蔓藻内生及根际细菌多样性与抑菌活性研究 [J]. 广西植物, 2018, 38(7): 924-933
LI F, GAO CH, YU L, et al. Diversity and antifungal activity of endophytic and rhizospheric bacteria isolated from *Ruppia maritima* [J].
Guihaia, 2018, 38(7): 924-933

川蔓藻内生及根际细菌多样性与抑菌活性研究

李菲¹, 高程海^{1,2}, 余炼³, 李家怡^{1,3}, 易湘茜^{2*}

- (1. 广西科学院 广西海洋天然产物与组合生物合成化学重点实验室培育基地, 南宁 530007;
2. 广西中医药大学 广西北部湾海洋中药应用技术与产品研发实验室, 南宁 530200;
3. 广西大学 轻工与食品工程学院, 南宁 530004)

摘要: 该研究采用稀释涂布法结合形态观察、16S rRNA 基因序列分析, 对广西北海川蔓藻 (*Ruppia maritima*) 内生及根际细菌的物种多样性进行了研究, 并采用琼脂扩散法和光度计法分析了其粗提物抑制马尔尼菲青霉菌活性。结果表明: 从川蔓藻中分离到可培养内生细菌 26 株, 根际可培养细菌 31 株。分别将内生细菌归属为 10 科 12 属 13 种, 根际分离出细菌归属为 9 科 14 属 19 种, 其中 5 株根际细菌可能为潜在新种。获得 8 株细菌对马尔尼菲青霉菌有抑制活性, 总阳性率为 25.0%。其中, 菌株 BGMRC 2015、BGMRC 2059、BGMRC 2043 的粗提物表现出较强的抑制马尔尼菲青霉菌效果, 其 MIC 分别为 (1.800±0.045)、(1.881±0.061)、(1.604±0.021) mg·mL⁻¹。川蔓藻中可培养细菌具有较高的物种多样性, 蕴藏着丰富的新物种资源, 且富含抑菌活性良好的菌株。

关键词: 川蔓藻, 细菌, 物种多样性, 马尔尼菲青霉菌, 抑菌活性

中图分类号: Q939.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2018)07-0924-10

Diversity and antifungal activity of endophytic and rhizospheric bacteria isolated from *Ruppia maritima*

LI Fei¹, GAO Chenghai^{1,2}, YU Lian³, LI Jiayi^{1,3}, YI Xiangxi^{2*}

- (1. Guangxi Key Laboratory of Marine Natural Products and Combinatorial Biosynthesis Chemistry, Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530007, China; 2. Application Technology and Product Development Laboratory of Marine Traditional Chinese Medicine in Beibu Gulf of Guangxi, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China; 3. College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract: The purpose of this study was to investigate the diversity of endophytic and rhizospheric bacteria of *Ruppia maritima* collected from Beihai City and antifungal activities against *Penicilliosis marneffeii*. The endophytic and rhizo-

收稿日期: 2017-10-10

基金项目: 国家自然科学基金(81260480, 21662006); 广西自然科学基金(2015GXNSFBA139195); 广西高校科学技术研究项目(KY2015YB146); 广西科技计划项目(AD17129019) [Supported by the National Natural Science Foundation of China (81260480, 21662006); Natural Science Foundation of Guangxi (2015GXNSFBA139195); Science and Technology Research Program of Guangxi Colleges and Universities (KY2015YB146); Key Program of Science and Technology Department of Guangxi (AD17129019)]。

作者简介: 李菲 (1988-), 女, 广西南宁市人, 硕士, 助理研究员, 主要从事海洋微生物资源研究, (E-mail) finylee@yeah.net。

* 通信作者: 易湘茜, 博士, 副教授, 主要从事海洋天然药物化学研究, (E-mail) 42672960@qq.com。

sphere bacteria isolated from *Ruppia maritima* were analyzed by method of dilution butteron on plate. 16S rRNA gene sequencing was employed to explore species diversities and the effects of the crude extract from bacteria against *Penicilliosis marneffei* with agar diffusion method and spectrophotometer method. Total of 26 strains of endophytic bacteria and 31 strains of rhizosphere bacteria were isolated from *Ruppia maritima*. Thirteen species of endophytic bacteria were obtained and classified into twelve genera and ten families. Nineteen species of bacteria were isolated from rhizosphere and belonging to fourteen generas and nine families. And five strains in the rhizosphere were potential new genera. Crude extracts of eight strains showed inhibition effect against *Penicilliosis marneffei*, three of which had strong antifungal activities, and their MIC₅₀ were (1.800 ± 0.045), (1.881 ± 0.061) and (1.604 ± 0.021) mg · mL⁻¹. Endophytic and rhizospheric bacteria of *Ruppia maritima* are genetically diverse and most of them showed strong inhibition effects against *Penicilliosis marneffei*.

Key words: *Ruppia maritima*, bacteria, species diversity, *Penicilliosis marneffei*, antifungal activities

马尔尼菲青霉菌 (*Penicilliosis marneffei*) 是一种独特的具有传染性的二相性真菌,在东南亚地区的艾滋病患者中最为常见,通常能感染 AIDS 患者及使用类固醇皮质激素的病人,可作为诊断 AIDS 的一个辅助指标 (Huang et al, 2013)。马尔尼菲青霉菌是一种条件致病菌,容易感染免疫功能低的人群,并引发播散性的马尔尼菲青霉病。近年来,激素和免疫抑制剂以及广谱抗生素使用广泛,加上介入治疗和器官移植的开展,艾滋病病人增加迅速,原发性和继发性免疫功能低的人群逐渐扩大,因此马尔尼菲青霉病不断增多。若不能及时获得确诊和有效的抗真菌治疗,其死亡率极高 (Wong et al, 2001)。目前,治疗马尔尼菲青霉菌病的药物有氟康唑、伊曲康唑、两性霉素 B 等,往往都是两种及两种以上药物结合使用。氟康唑作为首选药物,其副反应小,但治疗青霉菌疗效差,复发率高。因此,寻找到低剂量、高活性及副反应小的马尔尼菲青霉菌抑制剂显得尤为重要。

川蔓藻是一种分布广泛的底栖水生维管束植物,是全球温带、亚热带海域及盐湖地区中发生自然恢复的先锋植物,具有强的耐盐性和去除氮磷能力。据报道,川蔓藻中的化学成分具有很好的生物活性, Dellagreca et al (2000) 从川蔓藻中分离到 7 种具有抑制小球藻和羊角月牙藻活性的半日花烷型二萜类化合物。目前,川蔓藻的研究工作大部分集中在培育、防护、生态作用及其内在成分影响因素上,而关于川蔓藻相关微生物研究未见报道,且马尔尼菲青霉菌体外活性筛选的研究也鲜有报道。

对广西北海滩涂川蔓藻 (*Ruppia maritima*) 中可培养内生和根际细菌进行多样性分析,并展开细菌发酵粗提物对马尔尼菲青霉菌的抑制活性研究,以期为广西北海滩涂川蔓藻开发利用以及临床耐药性马尔尼菲青霉菌抑制剂的研发提供前期基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本 2015 年 4 月 27 日直接在广西北海滩涂 (108°50'42" E, 21°55'25" N) 采集川蔓藻。用密封袋装好,并将根部周边土壤一起装在密封袋内,带回处理。

1.1.2 试剂和仪器 试剂:培养基原料、TAE 缓冲液、2×EasyTaq SuperMix、引物 (27f 和 1492r)、DNA Marker、GoldView 核酸染料等购自北京康为世纪生物科技有限公司;Chelex-100 树脂购自美国 BioRad 公司;其他有机试剂均为国产的分析纯试剂。仪器:SW-CJ-2F 型超净工作台 (杭州佳滤设备有限公司), HH.B11-BS-II 型恒温培养箱 (东莞市恒宇仪器有限公司), 恒温振荡器 (美国 CRYSTAL), VB-55 型高压灭菌锅 (德国 SYSTEC), MINIB-100 型金属浴 (杭州米欧仪器有限公司), MINI-6k 型迷你离心机 (常州市国旺仪器制造有限公司), Tgradient 型 PCR 扩增仪 (德国 Biometra), 电泳仪 (美国 BioRad), N1000 型旋转蒸发仪 (日本 EYELA), 凝胶成像仪 (Carestream), VCX750 细胞破碎仪 (美国 Sonics)。

表 1 分离培养基
Table 1 Isolation of culture media

培养基 Culture medium	主要成分 Main constituent	其他成分 Other constituent
AGG	可溶性淀粉 10.0 g, 葡萄糖 1.0 g, 甘油 5 mL Starch soluble starch 10.0 g, glucose 1.0 g, glycerol 5 mL	复合盐母液 10 mL Lonic salt concentrate 10 mL 琼脂 13.0 g, 去离子水 1 000 mL, pH 7.2~7.4 Agar 13.0 g, pure water 1 000 mL, pH 7.2~7.4
M7	酵母粉 5.0 g, L-天门冬酰胺 1.0 g, 甘油 10 mL Yeast powder 5.0 g, L-asparagine 1.0 g, glycerol 10 mL	复合盐母液 10 mL Lonic salt concentrate 10 mL 琼脂 13.0 g, 去离子水 1 000 mL, pH 7.2~7.4 Agar 13.0 g, pure water 1 000 mL, pH 7.2~7.4
M9	精氨酸 1.0 g, 甘油 6 mL Arginine 1.0 g, glycerol 6 mL	复合盐母液 10 mL Lonic salt concentrate 10 mL 琼脂 13.0 g, 去离子水 1 000 mL, pH 7.2~7.4 Agar 13.0 g, pure water 1 000 mL, pH 7.2~7.4
M10	葡萄糖 10.0 g, 酸水解酪蛋白 0.5 g Glucose 10.0 g, casein hydrolysate 0.5 g	复合盐母液 10 mL Lonic salt concentrate 10 mL 琼脂 13.0 g, 去离子水 1 000 mL, pH 7.2~7.4 Agar 13.0 g, pure water 1 000 mL, pH 7.2~7.4
2216E	蛋白胨 5.0 g, 酵母膏 1.0 g, 磷酸高铁 0.1 g Peptone 5.0 g, yeast extract 1.0 g, ferric phosphate 0.1 g	— 琼脂 13.0 g, 海水 1 000 mL, pH 7.6~7.8 Agar 13.0 g, sea water 1 000 mL, pH 7.6~7.8

注: 复合盐母液包含 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, KNO_3 0.5 g, NaCl 0.5 g, K_2HPO_4 0.5 g, NH_4NO_3 0.1 g, $FeSO_4$ 0.01 g, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001 g, 去离子水 10 mL。

Note: Lonic salt concentrate includes $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, KNO_3 0.5 g, NaCl 0.5 g, K_2HPO_4 0.5 g, NH_4NO_3 0.1 g, $FeSO_4$ 0.01 g, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001 g, Pure water 10 mL.

1.1.3 培养基 (1)分离培养基:2216E, M10, M7, M9 和 AGG, 详情见表 1。(2)纯化培养基为改良的 ISP2 固体培养基。其中, 酵母提取物为 2.0 g, 麦芽提取物为 2.0 g, 葡萄糖为 2.0 g, 琼脂为 14.0 g, 海水为 1 000 mL。(3)发酵培养基为改良的 ISP2 液体培养基。(4)指示菌培养基为 PDA 固体培养基和 RPMI 1640 液体培养基。

1.1.4 指示菌 马尔尼菲青霉菌, 购买于北京百欧博伟生物技术有限公司。

1.2 菌株的分离纯化

1.2.1 植物组织预处理 参照沟叶结缕草表面灭菌方法(王栋等, 2008), 先将川蔓藻用无菌水清洗, 再用 75% 的酒精溶液浸泡 2 min, 最后用无菌水冲洗 3 遍以去除酒精。收集川蔓藻的最后 1 次漂洗液(表面消毒后的), 并涂布在 ISP2 平板上, 28 °C 培养 72 h 后若未见菌落生长, 说明川蔓藻表面消毒彻底。取样品 0.5 g 进行研磨, 先在研磨好的样品中加入 1 mL 的无菌水, 混合均匀后, 制成

10^{-1} 的植物悬液, 然后依次制成 10^{-2} 、 10^{-3} 稀释度的样液, 待用。

1.2.2 根际预处理 用灭菌的竹签轻轻拨开川蔓藻根部土壤, 使其根系暴露出来, 收集根须表面附着的土壤(距离根须 5 mm 以内), 先称取 2.0 g 土壤样品装于 20 mL 无菌水(内有玻璃珠)的锥形瓶中, 手动摇匀, 使其充分均质即可, 然后依次制成 10^{-2} 、 10^{-3} 稀释度的样液, 尽快涂布处理。

1.2.3 接种 分别取各梯度稀释后的样液 0.2 mL, 接种于 5 种分离培养基中, 每个浓度梯度平行接种于 2 个平板, 28 °C 培养 21 d 后观察形态变化, 并挑选不同的菌落进行纯化, 同时记录菌落数和形态特征。将纯化后的菌株制成冻干牛奶管于 4 °C 中保存, 同时制成 20% (v/v) 甘油管保存于 -80 °C 中。

1.3 16S rRNA 的系统发育分析

用 chelex-100 树脂提取菌种的 DNA(周双清等, 2010), PCR 扩增参照 Walsh et al(1991) 的方

法进行。扩增和测序引物均为细菌通用引物,即 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3') 和 1492R (5'-GGTACCTTGTACGACTT-3')。PCR 反应条件:94 ℃ 预变性 8 min,94 ℃ 变性 50 s,55 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 90 s,共 30 个循环,循环结束后,72 ℃ 延伸维持 10 min。将扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测合格后,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。将 5 株潜在新种的 PCR 扩增产物条带切胶回收,连接 pEASY-T1 克隆载体后,转化至 Trans-T1 感受态细胞中,通过蓝白筛选,挑取阳性克隆子,采用 PCR 法验证克隆的片段大小并送上海美吉生物医药技术有限公司广州分公司测序。将测序结果利用 DNASTar 软件进行整理,用 EzTaxon 服务器 (<http://www.eztaxon.org/>) 进行在线比对;选取同源性最高的菌株序列作为参比对象,用 MEGA5.0 软件,采用 Neighbor-Joining 法构建系统树,用 Bootstrap 1 000 次检测各分支的置信值,对各菌株的系统发育地位进行分析 (Tamura et al, 2011)。

1.4 细菌粗提物对马尔尼菲青霉菌的敏感性

1.4.1 琼脂扩散法筛选活性菌株

采用改良的琼脂扩散法 (韦高和李菊裳, 2005) 测定马尔尼菲青霉菌扩散区域大小。挑取少量菌体,接种于 RPMI 1640 液体培养基中,于 25 ℃、180 r·min⁻¹ 下摇床培养 24 h,制备菌悬液。将 1% 菌悬液 (v/v) 加入灭菌后的 PDA 固体培养基 (冷却至 55 ℃ 左右) 中混匀,将 15 mL 培养基倒入灭菌平皿中。待培养基凝固,然后将培养好的马尔尼菲青霉菌打成直径为 6 mm 的菌饼 (初始菌饼) 贴于平皿中,使有菌丝面朝下贴于每个含待测菌的 PDA 固体培养基中,每个板 4 块菌饼,阴性对照为 PDA 固体培养基,25 ℃ 恒温培养。隔天观察一次结果,并用游标卡尺测定马尔尼菲青霉菌扩散区域大小,每个实验重复 2 次。

1.4.2 光度计法确定 MIC 值

根据真菌药物敏感试验的标准化文件中的 M38-A2 (丝状真菌稀释法药物敏感试验的参考方法-第二版) 说明,设计体外抑制马尔尼菲青霉菌活性测定实验。

1.4.2.1 阳性对照组浓度值的确定

参照体外抗真菌药敏实验微量稀释 (Morace et al, 2002)、酶标仪

测定抗菌物质抑菌活性 (周子雄等, 2014) 和气丝状真菌吸光度测定 (Kajimura & Kaneda, 1996)。在无菌条件下,使用 96 孔板进行实验。以马尔尼菲青霉菌作为目的菌株,将菌接种于 PDA 培养基上,25 ℃ 培养 3 d,用 RPMI 1640 液体培养基配制孢子悬浮液,使得培养液中孢子浓度为 0.4~5×10⁴ cfu·mL⁻¹。将 100 μL 孢子悬浮液加入 96 孔板中,用少量 DMSO 溶解两性霉素 B (AMB) 和酮康唑 (KET),分别加入 96 孔板中,使其终浓度分别为 0.001、0.01、0.1、1 及 10 μg·mL⁻¹。平衡 5 min 后,测定 540 nm 波长的 OD 值,记为 OD₁ 值;将 96 孔板放置 25 ℃ 培养 3 d 后,测定 540 nm 波长的 OD 值,记为 OD₂ 值。以 DMSO 作为空白对照。实验重复 2 次,确定两性霉素 AMB 的 MIC₁₀₀ (完全抑制真菌的最小抑制浓度的 MIC,下同) 和酮康唑 KET 的 MIC₈₀ (抑制 80% 真菌最小抑制浓度的 MIC,下同),重复实验验证,最终确定两性霉素 B (AMB) 和酮康唑 (KET) 对马尔尼菲青霉菌最低抑制浓度 MIC 值。

计算公式:

$$\text{抑制率} = \frac{\Delta OD_{\text{空白组}} - (\overline{OD_1} - \overline{OD_2})}{\Delta OD_{\text{空白组}}} \times 100\%。$$

1.4.2.2 细菌粗提物的制备

将活性好的细菌置于 ISP2 固体培养基上培养,取生长于对数期后的菌株接种于装有 100 mL 发酵培养液的 500 mL 锥形瓶中,每株菌接种 6 瓶,180 r·min⁻¹,28 ℃ 培养 7 d。发酵液用细胞破碎仪处理 20 min,将处理后的发酵液用 1:1 (v/v) 乙酸乙酯萃取 3 次,每次间隔至少 20 min。浓缩干燥后,置于干燥器中保存,备用。

1.4.2.3 菌株发酵粗提物的最小抑制浓度 MIC₅₀

将马尔尼菲青霉菌接种于 PDA 固体培养基上,25 ℃ 培养 3 d,用 RPMI 1640 液体培养基配制孢子悬浮液,使得培养液中孢子浓度为 0.4~5×10⁴ cfu·mL⁻¹。用 DMSO 和 RPMI 1640 液体培养基将菌株发酵粗提物配制一系列浓度药液。取 100 μL 菌悬液和 100 μL 药液加入 96 孔板中,药液终浓度为 1.25、2.5、5.0 mg·mL⁻¹。每浓度设置 3 个平行,以 4 μg·mL⁻¹ 酮康唑为阳性对照组,DMSO 为空白对照。记录和计算数据,每组实验重复两次。

表 2 川蔓藻内生及根际细菌的组成

Table 2 Composition of endophytic and rhizospheric bacteria in *Ruppia maritima*

来源 Source	目 Order	科 Family	属 Genus	菌株数量 No. of strains
组织 Tissue	交替单胞菌目 Alteromonadales	交替单胞菌科 Alteromonadaceae	微泡菌属 <i>Microbulbifer</i>	2
根际 Rhizosphere			盐场单胞菌属 <i>Salinimonas</i>	1
组织 Tissue	芽孢杆菌目 Bacillales	芽孢杆菌科 Bacillaceae	喜盐芽孢杆菌属 <i>Halobacillus</i>	1
组织和根际 Tissue and rhizosphere			芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	5
组织 Tissue	黄杆菌目 Flavobacteriales	黄杆菌科 Flavobacteriaceae	济州岛古名菌属 <i>Tamlana</i>	1
组织 Tissue			<i>Aestuiriibaculum</i>	1
组织 Tissue			<i>Hwangdonia</i>	1
根际 Rhizosphere	微球菌目 Micrococcales	纤维素单胞菌科 Cellulomonadaceae	纤维单胞菌属 <i>Cellulomonas</i>	1
根际 Rhizosphere		Dermacoccaceae	<i>Flexivirga</i>	1
根际 Rhizosphere		Microbacteriaceae	微杆菌属 <i>Microbacterium</i>	1
组织 Tissue		河氏菌科 Hahellaceae	霍氏菌属 <i>Hahella</i>	1
根际 Rhizosphere	海洋螺菌目 Oceanospirillales	Halomonadaceae	盐单胞菌属 <i>Halomonas</i>	1
根际 Rhizosphere			栖盐田菌属 <i>Salinicola</i>	2
组织和根际 Tissue and rhizosphere	假单胞菌目 Pseudomonadales	假单胞菌科 Pseudomonadaceae	假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	2
组织 Tissue	根瘤菌目 Rhizobiales	根瘤菌科 Rhizobiaceae	根瘤菌属 <i>Rhizobium</i>	1
根际 Rhizosphere		生丝微菌科 Hyphomicrobiaceae	德沃斯氏菌属 <i>Devosia</i>	1
组织 Tissue	红杆菌目 Rhodobacterales	红杆菌科 Rhodobacteraceae	<i>Albidovulum</i>	1
组织 Tissue			斯塔普氏菌属 <i>Stappia</i>	1
组织 Tissue			栖海洋菌属 <i>Oceanicola</i>	1
根际 Rhizosphere			副球菌属 <i>Paracoccus</i>	1
根际 Rhizosphere			小红卵菌属 <i>Rhodovulum</i>	1
组织 Tissue	鞘脂单胞菌目 Sphingomonadales	赤杆菌科 Erythrobacteraceae	红色杆菌属 <i>Erythrobacter</i>	1
根际 Rhizosphere			<i>Stakelama</i>	1
组织 Tissue	链霉菌目 Streptomycetales	链霉菌科 Streptomycetaceae	链霉菌属 <i>Streptomyces</i>	1

2 结果与分析

2.1 川蔓藻中内生及根际细菌多样性分析

采用 5 种分离培养基,从川蔓藻组织和根际中

分别分离到可培养内生细菌 26 株和 31 株,按照菌落的大小、形态、颜色和出现时间等进行细菌排重,选取 44 株细菌进行 16S rRNA 基因序列对比,获得 13 种内生细菌及 19 种根际细菌,隶属于 14 科 24 属(表 2)。

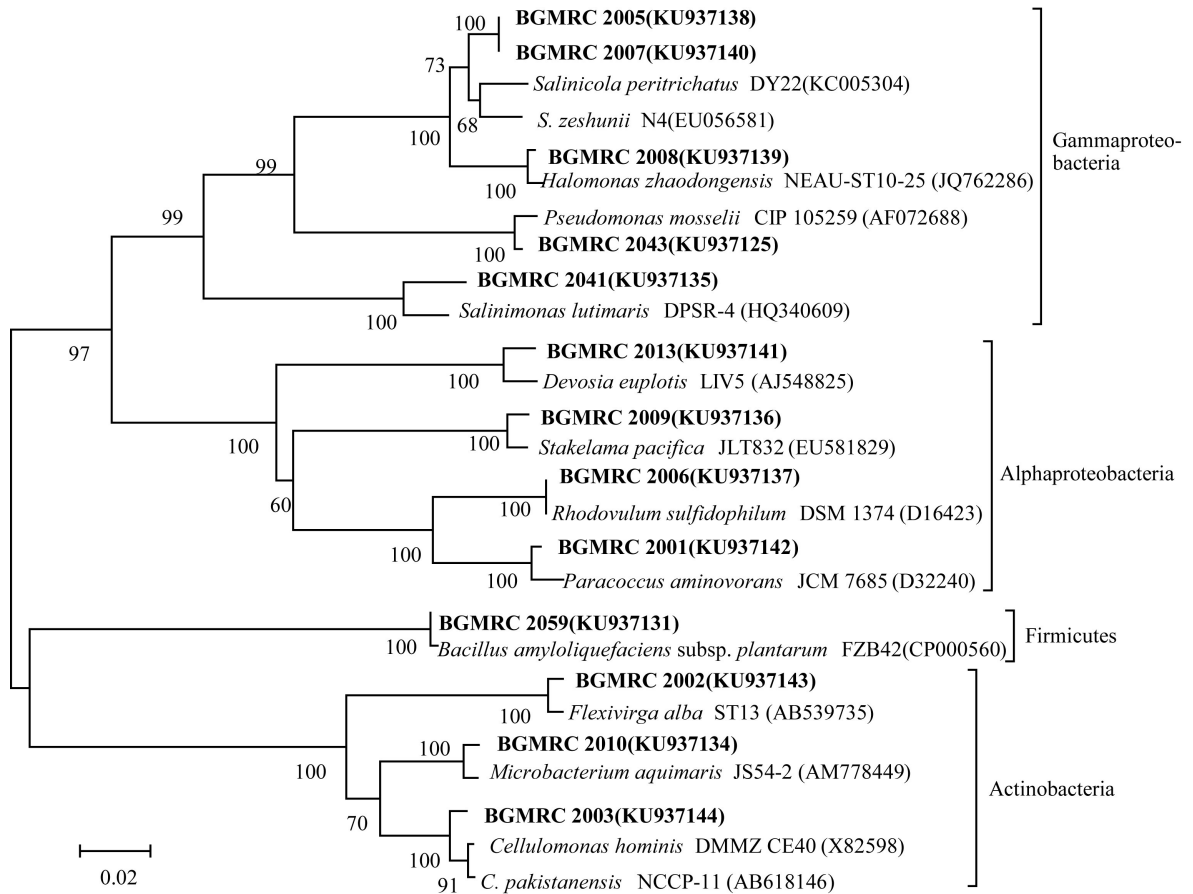


图 1 川蔓藻内生细菌 16S rRNA 的菌株系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of endophytic bacterial strain 16S rRNA in *Ruppia maritima*

初步鉴定结果表明,川蔓藻内生细菌隶属于 3 门 8 科 12 属。根据 13 株内生细菌及其参比菌株的 16S rRNA 基因序列构建的 N-J 系统进化树(图 1)。初步鉴定结果表明,川蔓藻根际细菌隶属于 4 门 8 科 14 属。根据 19 株根际细菌及其参比菌株的 16S rRNA 基因序列构建的 N-J 系统进化树(图 2)。

从川蔓藻根际中分离到 5 株细菌的 16S rRNA 基因序列(约 1 500 bp),它们与其最近缘的典型菌株序列相似性低于 97%。菌株 BGMRC 2019 与红杆菌科的有效发表菌株 *Albidovulum xiamenense* YBY-7^T(HQ709061),BGMRC 2046 与 *Stappia_f* 科的有效发表菌株 *Stappia indica* B106^T(EU726271),BGMRC 2048 与黄杆菌科的有效发表菌株 *Hwangdonia seohaensis* HD-3^T(JX546142),BGMRC 2050 与根瘤菌科的有效发表菌株

Rhizobium sphaerophysae CCNWGS0238^T(FJ154088),BGMRC 2054 与红杆菌科有效发表菌株 *Oceanicola litoreus* M-M22^T(JX291104)发育关系最密切,其相似率分别为 93.46%、95.96%、95.27%、96.10% 和 96.03%。基于 16S rRNA 基因序列,5 株潜在新种与其所在菌科中邻近菌株构建的 N-J 系统进化树,均能与其相似菌株在进化树上聚为一簇,在采用 Maximum-Likelihood 法和 Maximum-Parsimony 法构建的系统进化树中 5 株菌种同样形成了一个独立分枝。由此推测,菌株 BGMRC 2019、BGMRC 2046、BGMRC 2048、BGMRC 2050 及 BGMRC 2054 分别为红杆菌科、*Stappia_f* 科、黄杆菌科、根瘤菌科及红杆菌科中的一个潜在新分类单元。

2.2 不同培养基对内生及根际细菌的分离效果

采用 5 种分离培养基,从川蔓藻组织及其根际

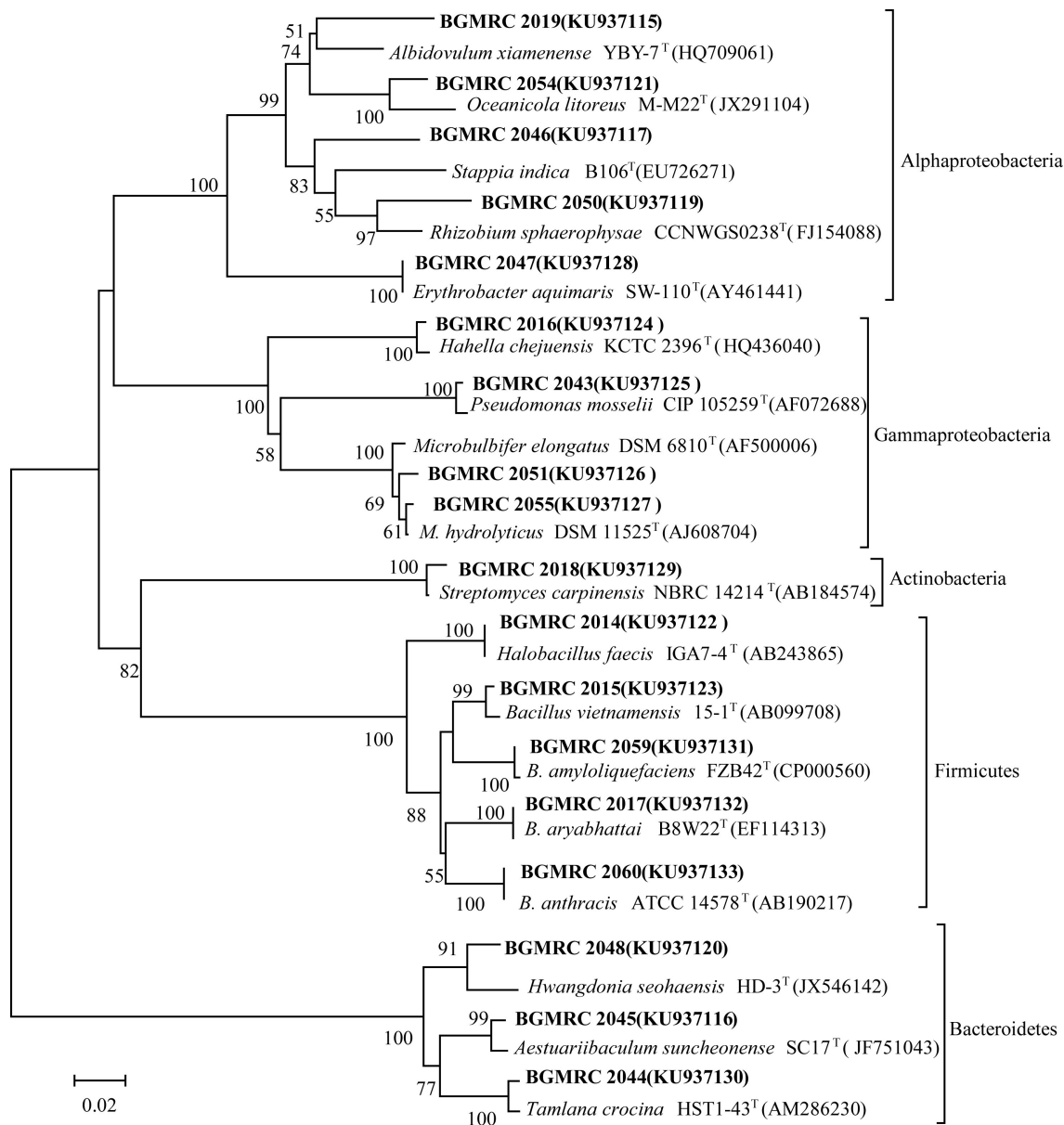


图 2 川蔓藻根际细菌 16S rRNA 的菌株系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of bacterial strain 16S rRNA in rhizosphere of *Ruppia maritima*

中分离到细菌共 57 株, 其中将 44 株细菌进行测序比对, 它们在不同培养基上的分离效果如图 3 所示。从 5 种分离培养基的分离效果来看, M10 培养基(含有水解酪素)分离到的细菌种类最多, 包含 12 个菌属; M9 培养基(含有精氨酸、寡营养)分离到的细菌种类最少。根据菌落数的统计结果, AGG、M10、M7、M9 和 2216E 培养基上菌落数分别为 1.2×10^5 、 1.8×10^5 、 4.0×10^4 、 6.0×10^4 和 5.0×10^4

cfu · mL⁻¹。M10 分离培养基获得 13 株细菌, 隶属于 12 属, 其获得的菌株数和多样性均较高; M9 分离培养基获得 5 株细菌, 获得的细菌数较少, 且多样性较少。就新颖性而言, 16S rRNA 基因序列相似性小于 97% 的菌株共有 5 株, 占分离细菌总数的 8.77%。其中 2 株潜在新菌(2048 和 2054)从 M10 培养基分离获得, 4 株(2019, 2046, 2048 和 2050)潜在新菌从 2216E 培养基分离获得。

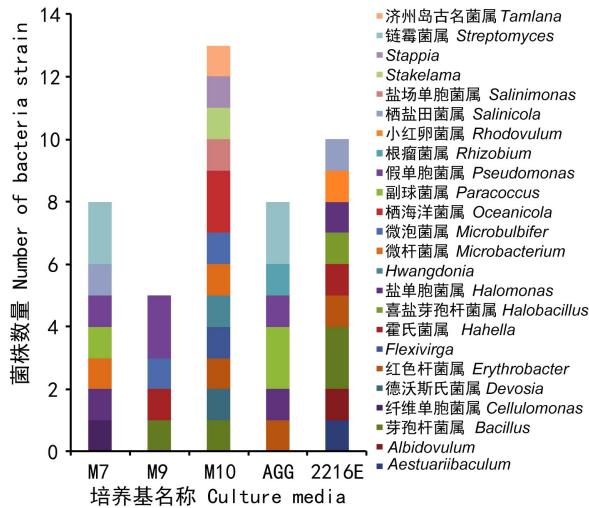


图 3 不同培养基分离细菌数量

Fig. 3 Distribution of 44 strains of different media

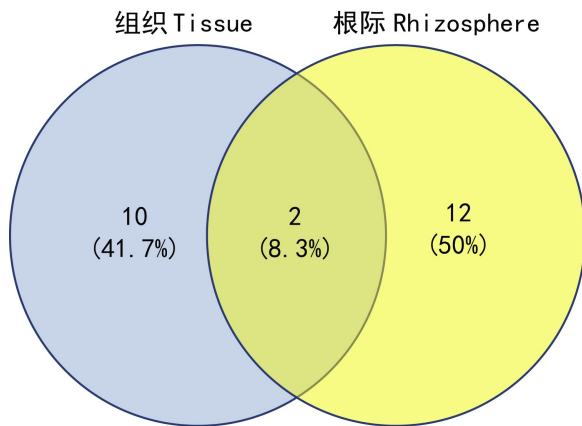


图 4 川蔓藻组织及根际来源内生细菌属级群类分布韦恩图

Fig. 4 Venn of genera in endophytic and rhizospheric bacterial isolated from *Ruppia maritima*

2.3 内生及根际细菌的属级水平上的韦恩图分析

在属级水平上对川蔓藻组织及其根际来源细菌进行 venn 分析(图 4),从川蔓藻组织来源的 13 株细菌,隶属于 12 属,而从根际来源的 19 株细菌,隶属于 14 属。韦恩图显示,从川蔓藻组织和根际中获得细菌种类存在较大的差异,共同含有两个属 *Pseudomonas* sp. 和 *Bacillus* sp.。

2.4 细菌发酵粗提物对马尔尼菲青霉菌的抑制活性

2.4.1 活性菌株筛选结果 对分离纯化的 32 株细菌进行活性筛选,结果表明,有 8 株细菌具有抑制效果,总阳性率为 25.0%。其中,有 3 株细菌表现出极强的抑制效果(图 6)。马尔尼菲青霉菌扩散的区域越小,其生长受到抑制作用越大,反之则越小。空白对照板的马尔尼菲青霉菌扩散区域达到 18~25 mm,实验组的马尔尼菲青霉菌扩散区域小于 12 mm,含 BGMRC 2043 菌液板上未观察到马尔尼菲青霉菌扩散区。

2.4.2 光度计法确定 MIC 值 重复实验结果显示,两性霉素 B (AMB) 的 MIC_{100} 为 $(3.573 \pm 0.121) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 酮康唑 (KET) 的 MIC_{80} 为 $(3.828 \pm 0.074) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, DMSO 对马尔尼菲青霉菌无抑制作用。

选取 3 株活性高的菌株进行抑菌活性效果测定。表 3 结果显示,在药液浓度为 $1.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,2015 和 2059 菌对马尔尼菲青霉菌的抑菌率均很相近,而 2043 菌株的抑菌率是 2015 和 2059 菌的近两倍;在药液浓度为 2.5 和 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,2015、2059 和 2043 菌对马尔尼菲青霉菌的抑菌率均很相近。用 SPSS 软件计算 3 株细菌粗提物抑制 50% 马尔尼菲青霉菌的药物浓度,即 MIC_{50} 。2043 菌株粗提物的抑菌效果最佳,其 MIC_{50} 为 $(1.604 \pm 0.021) \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$;2015 和 2059 菌的抑菌效果相近,其 MIC_{50} 值分别为 (1.800 ± 0.045) 、 $(1.881 \pm 0.061) \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。另外,阳性对照选用 $4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 酮康唑,其抑菌率为 0.8592 ± 0.012 。

3 讨论

存在于潮间带生态系统中的微生物类群具有高生产力和多样性,它们不断将凋亡的潮间带生物中的营养物质转化为植物可利用的 C、P 等,同时潮间带植物茎、叶、根的渗出物又为微生物的生长提供养分,使其周围的微生物多样性更加丰富(杨隽嫻,2008)。与南方沿海潮间带生长的红树植物相比,近海潮间带盐生植物的研究相对较少。

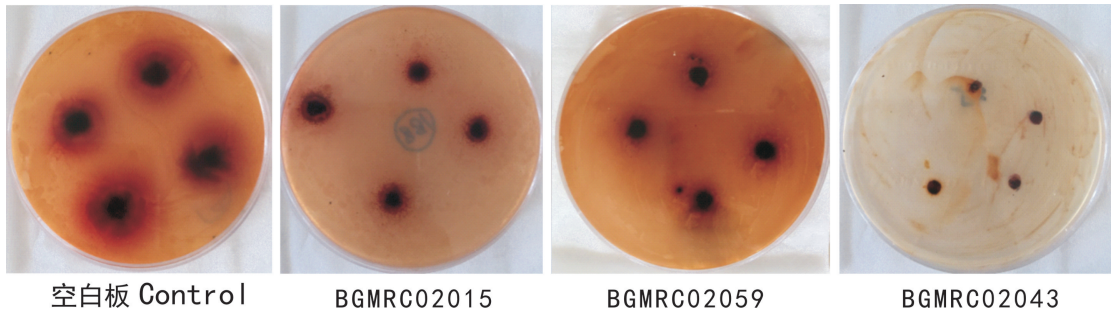


图 5 培养 1 周后马尔尼菲青霉菌的抑制效果

Fig. 5 Antifungal effects against *Penicilliosis marneffeii* after one week

表 3 3 株细菌抑制马尔尼菲青霉菌的抑制率

Table 3 Antifungal rates of three strains against *Penicilliosis marneffeii*

菌株编号 Code of bacterial strain	粗提物浓度 Concentration of crude extract ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)		
	1.25	2.5	5.0
BGMRC 2015	0.175±0.006	0.587±0.017	0.651±0.012
BGMRC 2059	0.151±0.017	0.583±0.003	0.636±0.011
BGMRC 2043	0.316±0.008	0.602±0.006	0.777±0.013

川蔓藻作为一种盐生植物生存在潮汐带间,与陆地人工培育的川蔓藻的生存环境极其不同,其代谢途径会为了适应生存环境而发生相应改变。为了掌握广西北海滩涂上川蔓藻中可培养的内生与根际细菌组成,本研究分别对川蔓藻的组织与根际进行采样,利用 5 种培养基,从中分离获得了大量细菌资源。研究发现,川蔓藻内生及根系呈现出较高的细菌生物多样性,从川蔓藻中分离到可培养内生细菌 26 株,归属为 10 科 12 属 13 种;根际可培养细菌 31 株,归属为 9 科 14 属 19 种,其中 5 株根际细菌为潜在新物种。其中,在植物内和根际中均分离到优势菌属 *Pseudomonas* sp. 和 *Bacillus* sp., 其能广泛分布在动植物内部及其生长的环境,两者间即存在着相互竞争,又相互产生作用。普遍认为,根际土壤细菌是植物根部内生细菌主要来源,它在植物根系的微生物环境中对物质和能量的转化起重要作用(庞欣等,2000)。结果显示,

在植物内和根际中分离到两个共同属,即 *Pseudomonas* sp. 和 *Bacillus* sp., 这一结果与部分研究报道大相庭径。陆松柳等(2011)研究发现,植物根际微生物的数量、类群、优势种等存在很大差异,这主要与植物根系分泌物的种类和数量有关系,分泌物会随植物种类的不同而存在差异。根系分泌物是植物作用于湿地微环境的重要途径之一(夏北成等,1998),植物通过根系分泌物的释放来改变根际微生物群落结构。土壤环境受到植物生长的影响,使得土壤微生物群落的结构和多样性发生改变,受植被影响的土壤环境中土壤微生物群落多样性比其他未受植被影响土壤环境中的微生物群落多样性要高很多。

对这 32 株细菌进行抑菌活性研究,发现有 8 株细菌对马尔尼菲青霉菌有抑制作用,总阳性率为 25.0%;其中,有 3 株细菌表现出极强的抑菌活性。该 3 株细菌为 BGMRC 2015、BGMRC 2059 和 BGMRC 2043,分别与 *Bacillus vietnamensis* 15-1^T、*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42^T 和 *Pseudomonas mosselii* CIP 105259^T 相似性最高。其中,BGMRC2043 的 MIC₅₀ 为 (1.604±0.021) $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。多种芽孢杆菌属的细菌通过竞争营养空间、产生脂肽类抗生素、诱导植物系统抗性等,具有抗菌、抗肿瘤和抗炎症等生物活性(唐金山等,2008)。对于菌株 *P. mosselii* CIP 105259^T, Nishanth et al(2016)系统地进行了该菌代谢产物的活性实验分析,其代谢产物中有活性小分子 Pseudopyronine B,具有很好的抑制革兰氏阳性细

菌、抗植物病原真菌、抑制细胞增长及抗癌等活性。本研究发现, *P. mosselii* CIP 105259^T对马尔尼菲青霉菌也具有极强的抑制活性, 本研究丰富对 *P. mosselii* CIP 105259^T菌株抑菌活性的认识, 也为开发新的抗生素及活性药物等下游工作提供很好的依据。

参考文献:

- DELLAGRECA M, FIORENTINO A, ISIDORI M, et al, 2000. Antialgal ent-labdane diterpenes from *ruppia maritima* [J]. *Phytochemistry*, 55(8): 909.
- HUANG Z, HU Y, SHOU L, et al, 2013. Isolation and partial characterization of cyclic lipopeptide antibiotics produced by *Paenibacillus chimensis* B7 [J]. *BMC Microbiol*, 13(1): 1-8.
- KAJIMURA Y, KANEDA M, 1996. Fusaricidin A, a new depsipeptide antibiotic produced by *Bacillus polymyxa* KT8. Taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological activity [J]. *Cheminform*, 49(2): 129-135.
- LU SL, ZHANG C, XU JW, 2011. Root exudates of wetland plants and the influence on the microbial community in constructed wetlands [J]. *Ecol Environ Sci*, 20(4): 676-680. [陆松柳, 张辰, 徐俊伟, 2011. 植物根系分泌物分析及对湿地微生物群落的影响研究 [J]. *生态环境学报*, 20(4): 676-680.]
- MORACE G, AMATO G, BISTONI F, et al, 2002. Multicenter comparative evaluation of six commercial systems and the national committee for clinical laboratory standards M27-A Broth microdilution method for *Fluconazole susceptibility* testing of *Candida species* [J]. *J Clin Microbiol*, 40(8): 2953-2958.
- NISHANTH KS, ARAVIND SR, JUBI J, et al, 2016. Pseudopyronine B: A potent antimicrobial and anticancer molecule isolated from a *Pseudomonas mosselii* [J]. *Front Microbiol*, 7(79): 1-15.
- PANG X, ZHANG FS, WANG JG, 2000. Effect of different nitrogen levels on SMB-N and microbial activity [J]. *Plant Nutr Fert Sci*, 6(4): 476-480. [庞欣, 张福锁, 王敬国, 2000. 不同供氮水平对根际微生物量氮及微生物活度的影响 [J]. *植物营养与肥料学报*, 6(4): 476-480.]
- TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al, 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Mol Biol Evol*, 28(10): 2731-2739.
- TANG JS, GAO H, DAI Y, et al, 2008. Progress on the studies of cyclic lipopeptides [J]. *Acta Pharm Sin*, 43(9): 873-883. [唐金山, 高昊, 戴毅, 等, 2008. 环脂肽类成分研究进展 [J]. *药学学报*, 43(9): 873-883.]
- 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 D, KEYIMU MHMT, YU YX, et al, 2008. Screening of surface sterilization methods in the tissue culture of *Zoysia matrella* [J]. *J Anhui Agric Sci*, 36(20): 8560-8561. [王栋, 买合木提·克衣木, 王永雄, 等, 2008. 沟叶结缕草组织培养表面灭菌方法的筛选 [J]. *安徽农业科学*, 36(20): 8560-8561.]
- WEI G, LI JS, 2005. Susceptibility study on molecular biology and diphasic form of *Penicilliosis marneffei* to the antifungal agents *in vitro* [J]. *Intern Med Chin*, (1): 119-121. [韦高, 李菊裳, 2005. 马尔尼菲青霉分子生物学及体外药敏试验的进展 [J]. *中国医学文摘: 内科学*, 2005(1): 119-121.]
- WONG SSY, WONG KH, HUI WT, et al, 2001. Differences in clinical and laboratory diagnostic characteristics of *Penicilliosis marneffei* in human immunodeficiency virus (HIV)- and non-HIV-infected patients [J]. *J Clin Microbiol*, 39(12): 4535-4540.
- XIA BC, ZHOU JZ, TIEDJE JM, 1998. Effects of overlying vegetation on soil microbial community structures and their activity [J]. *Acta Sci Nat Univ Sunyatseni*, 37(3): 94-98. [夏北成, ZHOU JZ, TIEDJE JM, 1998. 土壤微生物群落及其活性与植被的关系 [J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 37(3): 94-98.]
- YANG JX, 2008. The collection and identification of medicine microorganisms in plant habitats of littoral zone [D]. Qingdao: Qingdao Univ Sci Technol. [杨隽嫻, 2008. 潮间带植物生境药用微生物的获得与鉴定 [D]. 青岛: 青岛科技大学.]
- ZHOU SQ, HUANG XL, HUANG DY, et al, 2010. A rapid method for extracting DNA from actinomycetes by Chelex-100 [J]. *Biotechnol Bull*, 26(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*, 26(2): 123-125.]
- ZHOU ZX, HUANG QH, ZHU S, et al, 2014. Establishment of rapid determining method for antibacterial activity by microplate reader [J]. *Adv Microbiol*, 3: 29-35. [周子雄, 黄庆华, 朱爽, 等, 2014. 酶标仪快速测定抗菌物质抑菌活性方法的建立 [J]. *微生物前沿*, 3: 29-35.]