

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201904036

姜舒, 李蜜, 侯师师, 等. 海南西海岸真红树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): 327-334  
JIANG S, LI M, HOU SS, et al. Diversity and anti-aging activity of endophytic actinobacteria from true mangrove plants collected from the west coast of Hainan [J]. *Guihaia*, 2020, 40(3): 327-334.

## 海南西海岸真红树内生放线菌多样性及其延缓衰老活性初筛

姜舒, 李蜜, 侯师师, 韩敏敏, 银江林, 高程海\*

(广西中医药大学 海洋药物研究院/药学院, 南宁 530200)

**摘要:** 为了发掘红树林内生放线菌资源和进行新型海洋药物研究, 该文选择海南西海岸 14 种真红树的根、茎、叶、花、胚轴为研究对象, 采用 9 种不同分离培养基[改良的高氏培养基(AGG)、海藻糖-天冬酰胺培养基(M4)、海藻糖-脯氨酸培养基(M5)、改良 ISP5 培养基(M7)、精氨酸-天冬酰胺培养基(M9)、改良淀粉-水解酪素培养基(M10)、酪氨酸-天冬酰胺培养基(P7)、燕麦培养基(P3)、棉籽糖-组氨酸培养基(M11)], 结合稀释涂布法和三线划线法从真红树组织中分离菌株, 基于菌株 16S rRNA 基因序列信息等分子生物学鉴定方法对获得的海洋放线菌进行多样性分析, 并使用模式生物秀丽隐杆线虫对所得内生放线菌的延缓衰老活性进行研究。结果表明:(1)从 46 份真红树组织中共获得 24 株放线菌, 隶属于 7 科 11 属, 其中 9 株菌株为链霉菌属(*Streptomyces*), 且 IMDGX 6270、IMDGX 6137 和 IMDGX 6173 为 3 株疑似潜在新菌株。(2)秀丽隐杆线虫模型筛选发现 4 株放线菌(IMDGX 6157、IMDGX 6182、IMDGX 6248、IMDGX 6360)具有延缓衰老的活性, 与空白组比较, 生存时间分别延长 17.16%、28.11%、29.05%、27.10%。综上结果说明海南西海岸区域真红树植物中可能含有较丰富的放线菌资源, 能够为延缓衰老药物的研发提供新来源。

**关键词:** 物种多样性, 内生放线菌, 真红树, 延缓衰老活性

中图分类号: Q939.1 文献标识码: A

文章编号: 1000-3142(2020)03-0327-08

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



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

JIANG Shu, LI Mi, HOU Shishi, HAN Minmin, YIN Jianglin, GAO Chenghai\*

(Institutes of Marine Drugs / College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China)

**Abstract:** In order to find endophytic actinomycetes resources and research on new marine drugs, we studied the diversity and anti-aging activity of endophytic actinobacteria from true mangrove plants of the west coast of Hainan. In this study,

收稿日期: 2019-08-22

基金项目: 国家自然科学基金(41566004) [Supported by the National Natural Science Foundation of China (41566004)].

作者简介: 姜舒(1993-), 女, 山东青州人, 硕士研究生, 主要从事海洋药物物质基础与产品开发研究, (E-mail) 2450246320@qq.com。

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

roots, stems, leaves, flowers and hypocotyl of 14 species of true mangrove plants from the west coast of Hainan were selected as research objects. Twenty-four strains of actinobacteria were obtained, from 46 plant tissues of true mangrove plants, by using improved Gause's medium (AGG), trehalose-asparagine medium (M4), trehalose-proline medium (M5), improved ISP5 medium (M7), arginine-asparagine medium (M9), improved starch-hydrolyzed casein medium (M10), tyrosine-asparagine medium (P7), oat medium (P3), cottonseed sugar-histidine medium (M11) of nine kinds of different media, through dilution coating method and the third line marking method. The diversity of marine actinobacteria was analyzed by molecular biological identification methods such as 16S rRNA gene sequence information. The anti-aging activities of endophytic actinobacteria were analyzed by using *Caenorhabditis elegans* screening models. The results were as follows: (1) A total of 24 strains of actinobacteria were isolated from 46 plant tissues of true mangrove plants and distributed in eleven genera, seven families. Nine strains belonged to *Streptomyces*. Moreover, IMDGX 6270, IMDGX 6137 and IMDGX 6173 were three suspected potential new strains. The number of strains isolated from each sample varied greatly. Among them, the leaves had the largest number of strains and the richest diversity (18 strains). Next, eight strains were obtained from the stem. The number of roots was four, which may be related to the large number of stem and leaf tissue samples, and the number and diversity of strains isolated from M5 medium were the highest, while the number and diversity of strains isolated from M11 medium were the lowest. The results showed that the isolation medium with different nutrients had a great influence on the growth of microorganisms. (2) In addition, four strains of actinobacteria were screened by *Caenorhabditis elegans* model and showed anti-aging activity, and the survival time was increased by 17.16%, 28.11%, 29.05% and 27.10%, respectively, compared with the blank group. This indicates that there may be abundant actinobacteria resources in the mangrove plants in the west coast of Hainan, which can provide a new source for the research and development of anti-aging drugs.

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

红树林是海岸潮间带特有的两栖植物群落(陈振明等,2006)。真红树是一种木本植物,只能在潮间带生长,不能在陆地环境中正常繁殖和生存(Lin,1995)。为适应特殊的生长环境,红树植物内部可能存在着特殊的化学物质参与其自身防御(Bandaranayake,1982;刘颖和刘峰,2008),这些特殊的化学物质可能是由植物组织内生微生物产生或合成的次级代谢产物(黄宝康和秦路平,2006)。红树林放线菌具有代谢途径独特、多样性强、种类繁多等优势(Azman et al.,2018),现已从红树中分离得到多样性丰富的放线菌菌株(Suksaard et al.,2015)。李飞娜等(2017)从澳门路氹城生态保护区采集的12份红树植物样品中分离得到192株内生放线菌,基因序列相似性低于98.6%的菌株共有22株,抗菌活性筛选结果显示5株具有抗菌活性。李静等(2016)从海南东寨港14种真红树样品中得到放线菌146株,其中40株具有抗菌活性。Jiang et al.(2018)从北仑河口国家级自然保护区采集的红树林植物样品中分离到101株放线菌,隶属于28个属。可见红树林由于特殊的生长环境,使得其内生放线菌呈现丰富的多样性,并具有较强的物种新颖性和生物活性。

海南西海岸位于北部湾东侧,拥有东方市四必湾、儋州市儋州湾、儋州市峨蔓镇盐丁、临高县新盈湾、临高县马袅湾和澄迈县花场湾6个红树林主要分布区,是北部湾的重要组成部分。海南西海岸拥有 $9.423 \times 10^6 \text{ m}^2$ 的红树林,约占海南岛红树林面积的20%(范作卿等,2017)。现阶段对海南岛红树林内生菌研究多集中在东海岸区域(如东寨港、清澜港等),对西海岸红树林的研究较少,这可能与西海岸红树林种类组成较为简单有关(范作卿等,2017)。因此,对西海岸红树林内生放线菌的研究会使北部湾红树林内生菌研究更加完善,也有利于海南西海岸红树植物的保护。

秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)是在放线菌活性筛选方面应用普遍的模式生物(Brenner et al.,1974;齐丽娟,2015;鞠守勇和陈其国,2018)。现阶段对红树植物样品中分离得到的内生放线菌活性研究主要集中在抑菌活性、杀虫活性和抗肿瘤细胞活性等(Kubota et al.,2004;Wang et al.,2010;Azman et al.,2018),有关微生物次级代谢产物抗衰老活性的研究则相对较少(许敏等,2016)。本实验利用秀丽隐杆线虫模型研究海南西海岸区域真红树内生放线菌对线虫寿命的影

响,以该区域 14 种真红树植物为研究对象,通过纯化培养技术分离菌株,利用菌株的 16S rRNA 基因序列分析并鉴定真红树内生放线菌的多样性,丰富该海域真红树内生放线菌新物种,挖掘微生物的潜在药理活性,对海洋微生物资源的开发利用具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和仪器

1.1.1 仪器和设备 SW-CJ-2F 洁净工作台, HVE-5 高压灭菌锅, OLYMPUS SZX 16 体视镜, B11-BS- II 电热恒温培养箱。

1.1.2 材料和试剂 大肠埃希菌(OP50)和野生型秀丽隐杆线虫(N2)均由广西科学院汪斌博士惠赠。5%次氯酸钠购于杭州朗索医用消毒剂有限公司; chelex-100 树脂、2×Easy Taq Supermix 购于美国 Bio-Rad 公司; PCR 引物(27F, 1492R)购于北京全式金生物技术有限公司; 二甲基亚砜(DMSO)等其他试剂均为分析纯,购于西陇科学股份有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 样本来源与采集 14 种真红树植物 46 份植物组织于 2017 年 7 月采集于海南西海岸区域的红树林,具体信息见表 1。H1-H7 真红树植物的地理位置为 109°59'37" E、19°55'07" N, H8-H14 的地理位置为 109°31'50" E、19°51'26" N。菌株载体用无菌水冲洗 3 次后立即装入密封采样袋,置于采样冰盒中,24 h 内完成菌株分离。

1.2.2 菌株的分离纯化与保藏 参考李家怡等(2018)的样品处理方法,用 5%次氯酸钠溶液浸泡 8 min,对红树植物各个组织样品进行表面消毒,无菌水冲洗残余液体;75%的酒精溶液浸泡 5 min,无菌水冲洗至无酒精味。分别取表面消毒后的植物材料(约 2 g)充分研磨,吸取 2 mL 无菌水与样品充分混匀,该浓度液体为样品原液,取 1 mL 原液用无菌水稀释到  $10^{-4}$  于 4 °C 冰箱暂存。取  $10^{-4}$  组织悬液 0.2 mL,分别接种于 AGG、M4、M5、M7、M9、M10、P7、P3、M11 9 种分离培养基(表 2)中,于 28 °C 恒温培养箱培养 2~8 周;通过颜色、大小、形态等指标观察,挑选不同的菌落在 ISP2 纯化培养基上进行三区划线纯化,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。纯化好的菌株制成 20%(V/V)甘油管保藏于 -80 °C。

表 1 样品采集信息  
Table 1 Information of collected samples

样品编号 Code of sample	植物名称 Plant name	植物组织 Plant tissue
H1	桐花树 <i>Aegiceras corniculatum</i>	茎、叶、胚轴 Stem, leaf, hypocotyl
H2	红海榄 <i>Rhizophora stylosa</i>	花、茎、叶、胚轴、根 Blossom, stem, leaf, hypocotyl, root
H3	榄李 <i>Lumnitzera racemosa</i>	茎、叶、胚轴 Stem, leaf, hypocotyl
H4	白骨壤 <i>Avicennia marina</i>	花、茎、叶、胚轴 Blossom, stem, leaf, hypocotyl
H5	桐花树 <i>Aegiceras corniculatum</i>	茎、叶、胚轴、根 Stem, leaf, hypocotyl, root
H6	白骨壤 <i>Avicennia marina</i>	茎、叶、胚轴 Stem, leaf, hypocotyl
H7	红海榄 <i>Rhizophora stylosa</i>	茎、叶、胚轴、根 Stem, leaf, hypocotyl, root
H8	白骨壤 <i>Avicennia marina</i>	茎、叶 Stem, leaf
H9	木果楝 <i>Xylocarpus granatum</i>	茎、叶、胚轴、根 Stem, leaf, hypocotyl, root
H10	瓶花木 <i>Scyphiphora hydrophyllacea</i>	茎、胚轴 Stem, hypocotyl,
H11	桐花树 <i>Aegiceras corniculatum</i>	茎、叶、胚轴 Stem, leaf, hypocotyl
H12	红树 <i>Rhizophora apiculata</i>	茎、叶、胚轴、根 Stem, leaf, hypocotyl, root
H13	木榄 <i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	茎、叶、胚轴 Stem, leaf, hypocotyl
H14	卤蕨 <i>Acrostichum aureum</i>	茎、叶 Stem, leaf

1.2.3 菌株的 16S rRNA 基因序列的系统发育学分析 系统发育学分析基因组 DNA 的提取和 PCR 梯度扩增参照 Walsh et al.(1991)的方法进行。所有菌株均在 ISP2 培养基上三区划线纯化,根据菌落形态特征进行初步排重,不同形态的菌株利用 Chelex-100 树脂法提取菌株 DNA,16S rRNA 基因扩增和序列分析。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条带,检验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(<https://www.ezbiocloud.net/>)(Kim et al., 2009)进行在线比对;对 16S rRNA 基因序列进行相似性比对搜索,从中选取相似性较高且是有效描述的典型菌株的 16S rRNA 基因序列作为参比对象。

表2 分离培养基信息

Table 2 Information of isolation media

培养基 Medium	培养基配方 Medium components
AGG	淀粉 10 g, 葡萄糖 1 g, 甘油 5 mL Starch soluble 10 g, glucose anhydrous 1 g, glycerol 5 mL
M4	L-天冬酰胺 1 g, 海藻糖 5 g L-Asparagine 1 g, trehalose 5 g
M5	海藻糖 5 g, 脯氨酸 1 g Trehalose 5 g, proline 1 g
M7	酵母粉 5 g, L-天冬酰胺 1 g, 甘油 10 mL Yeast extract 5 g, L-Asparagine 1 g, glycerol 10 mL
M9	精氨酸 1 g, L-天冬酰胺 1 g, 甘油 6 mL Arginine 1 g, L-Asparagine 1 g, glycerol 6 mL
M10	葡萄糖 10 g, 酸水解酪素 0.5 g Glucose 10 g, casein hydrolysate 0.5 g
P7	L-酪氨酸 0.5 g, L-天冬酰胺 1 g, 甘油 15 mL L-Tyrosine 0.5 g, L-Asparagine 1 g, glycerol 15 mL
P3	燕麦粉琼脂 20 g Oatmeal agar 20 g
M11	棉籽糖 5 g, L-组氨酸 1 g Raffinose pentahydrate 5 g, L-Histidine 1 g
ISP2	酵母粉 2 g, 麦芽提取物 2 g, 葡萄糖 2 g Yeast extract 2 g, malt extract 2 g, glucose 2 g

1.2.4 菌株代谢产物的提取制备 参考覃媚等(2016)的方法,将24株对数生长期的放线菌接种到200 mL液体培养基,于恒温震荡培养箱中发酵7 d,发酵液用等体积乙酸乙酯萃取3次,取乙酸乙酯层浓缩干燥后为代谢粗提物。将粗提物用0.1% DMSO 稀释至  $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  备用。

1.2.5 延缓衰老活性测定 参考 Brenner(1974)的方法。用 M9 缓冲液将培养至产卵期的雌雄同体秀丽隐杆线虫冲洗3次,以1:3的比例加入裂解液(1 mL  $5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 NaOH 和 0.5 mL 5% 的 NaClO 混匀)。震荡离心后,置于  $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  生化培养箱中培养 48 h 后可得 L4 期线虫。将培养好的 L4 期线虫挑至已加入溶有待测样品的 70  $\mu\text{L}$  OP50 *Escherichia coli* 的 NGM 培养基上进行培养,每组2板,每板20条,此时培养天数记为0 d。此后,隔天对培养基的线虫进行计数,观察并记录线虫死亡数量(在寿命实验期间,发现线虫对外界刺激没有应答时视为死亡;剔除逃离培养基表面而干死、虫卵在体内孵化而成袋样虫或者钻进培养基内部的线虫),直至线虫全部死亡。实验平行3次。

### 1.3 统计分析

所有数据采用 SPSS 22.0 进行统计分析,寿命

实验数据使用 Kalpan-Meir 存活曲线分析程序分析,加样处理组和对照组之间的比较使用 Kaplan-Meier Log-rank 两两比较程序分析。使用 Graphpad Prism 7.00 软件制图表,通过 DNA Star 软件进行序列整理。

## 2 结果与分析

### 2.1 真红树植物内生放线菌多样性分析

选择73株菌进行16S rRNA基因序列比对,结果表明24株为放线菌,分布于1个纲4个目7个科11个属,其多样性分布如表3所示。其中,有9株菌为链霉菌属(*Streptomyces*),占所分离放线菌株总数的37.50%。根据放线菌16S rRNA基因序列相似性小于98.65%的菌株属于潜在新物种的归类原则(Kim, 2014)。菌株 IMDGX 6270 *Brevibacterium* sp.、IMDGX 6137 *Microbacterium* sp. 和 IMDGX 6173 *Lysinimicrobium* sp. 分别与有效发表菌株 *Brevibacterium permense*、*Microbacterium saccharophilum*、*Lysinimicrobium pelophilum* 的最高相似度为97.72%、98.15%、98.32%,可能为潜在的新物种。

### 2.2 24株内生放线菌在植物样品、不同植物组织及培养基中的分布

14种植物样品,9种不同分离培养基及5种(根、茎、叶、花、胚轴)不同植物组织的分布情况如图1-图3所示。从图1可见,不同植物样品中分离到的菌株数量变化为  $\text{H4} > \text{H9} > \text{H2} > \text{H3} > \text{H5} = \text{H7} > \text{H12} > \text{H13} > \text{H1} = \text{H6} = \text{H11} > \text{H8} = \text{H14} > \text{H10}$ ; 属的分布依次为  $\text{H4} > \text{H9} > \text{H5} = \text{H2} > \text{H7} > \text{H3} = \text{H12} = \text{H13} > \text{H1} = \text{H6} = \text{H11} > \text{H8} = \text{H14} > \text{H10}$ 。由图2所示,根、茎、叶、花、胚轴5种不同植物组织分离得到放线菌数量大小顺序为叶>茎>胚轴>花>根,其中叶子得到18株放线菌,隶属于10个属,其数量最多且多样性最为丰富。由图3可知,不同培养基分离得到的菌株数量趋势为  $\text{M5} > \text{P7} = \text{M7} > \text{P3} = \text{M4} = \text{M10} > \text{M9} > \text{AGG} > \text{M11}$ ; 菌株多样性趋势为  $\text{M5} = \text{M7} > \text{P7} > \text{P3} = \text{M4} = \text{M10} > \text{M9} > \text{AGG} > \text{M11}$ 。其中, M5 培养基培养得到的菌株数量最多,且多样性最为丰富。

### 2.3 真红树植物内生放线菌发酵产物延缓衰老活性分析

与空白组 [ $(16.9 \pm 7.06) \text{ d}$ ] 相比, IMDGX 6157、IMDGX 6182、IMDGX 6248、IMDGX 6360 4个

表 3 24 株可培养内生放线菌的物种组成

Table 3 Compositions of culturable  
24 endophytic actinobacteria

菌株编号 Strain code	相近种 Origin	相似性 Identity (%)
IMDGX 6270	<i>Brevibacterium permense</i>	97.75
IMDGX 6137	<i>Microbacterium saccharophilum</i>	98.15
IMDGX 6173	<i>Lysinimicrobium pelophilum</i>	98.32
IMDGX 6239	<i>Nocardiopsis prasina</i>	98.70
IMDGX 6220	<i>Streptomyces nogalater</i>	98.85
IMDGX 6012	<i>Amycolatopsis lexictonensis</i>	99.87
IMDGX 6048	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i>	99.74
IMDGX 6046	<i>Brevibacterium iodinum</i>	98.80
IMDGX 6118	<i>Curtobacterium albidum</i>	99.33
IMDGX 6326	<i>C. citreum</i>	99.49
IMDGX 6119	<i>Demequina salsinemoris</i>	99.10
IMDGX 6131	<i>Isoptericola jiangsuensis</i>	99.49
IMDGX 6316	<i>Microbacterium proteolyticum</i>	99.48
IMDGX 6469	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	99.87
IMDGX 6458	<i>Nocardiopsis synnemataformans</i>	99.49
IMDGX 6150	<i>Streptomyces carpaticus</i>	98.95
IMDGX 6157	<i>S. decoyicus</i>	99.34
IMDGX 6183	<i>S. glebosus</i>	98.93
IMDGX 6359	<i>S. hiroshimensis</i>	99.34
IMDGX 6039	<i>S. misionensis</i>	99.09
IMDGX 6195	<i>S. novaecaesareae</i>	100.00
IMDGX 6248	<i>S. olivaceus</i>	99.09
IMDGX 6360	<i>S. tritolerans</i>	99.48
IMDGX 6182	<i>S. xantholiticus</i>	99.87

菌株均能显著延长线虫寿命 ( $P < 0.05$ )。IMDGX 6157、IMDGX 6182、IMDGX 6248 和 IMDGX 6360 4 个菌株组线虫的平均寿命和最长寿命分别为 ( $19.80 \pm 1.26$ )、22.32 d, ( $21.65 \pm 0.47$ )、22.58 d, ( $21.81 \pm 0.36$ )、22.63 d, ( $21.48 \pm 0.74$ )、22.01 d (表 4)。4 个菌株组线虫平均寿命较空白组分别延长 17.16%、28.11%、29.05% 和 27.10%。

### 3 讨论与结论

本研究采用 9 种分离培养基对海南西海岸 14

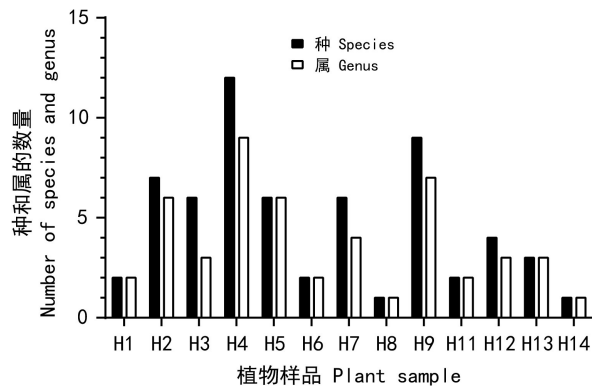
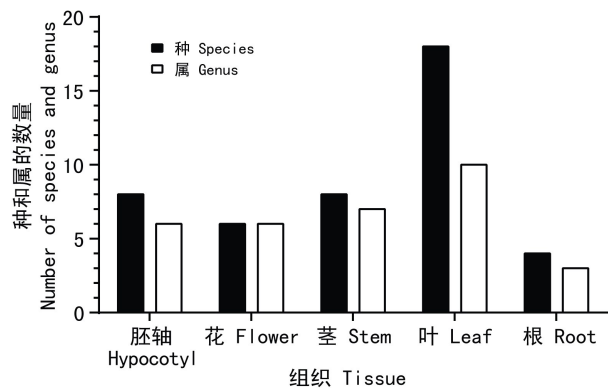
图 1 不同真红树植物样品中  
分离得到的内生放线菌Fig. 1 Endophytic actinobacteria isolated  
from different true mangrove plant tissues

图 2 不同植物组织分离得到的内生放线菌

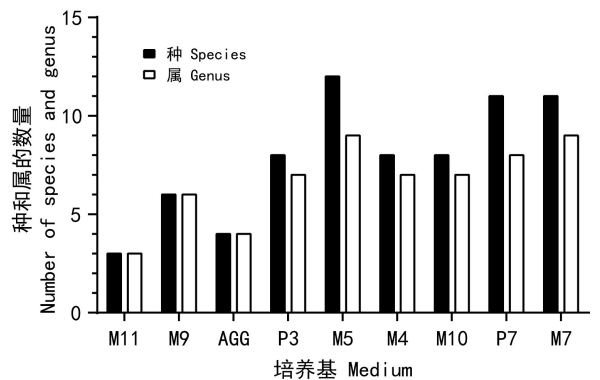
Fig. 2 Endophytic actinobacteria isolated  
from different plant tissues

图 3 不同培养基分离得到的内生放线菌

Fig. 3 Endophytic actinobacteria isolated  
from different media

种真红树不同部位样本进行内生放线菌的分离纯化, 得到 24 株放线菌, 分布在 1 个纲 4 个目 7 个科

表 4 内生放线菌代谢产物对秀丽隐杆线虫寿命影响

Table 4 *Caenorhabditis elegans* survival lifetime of the extracts from endophytic actinobacteria

菌株编号 Strain code	平均寿命 Average lifetime (d)	最长寿命 Maximum lifetime (d)	菌株编号 Strain code	平均寿命 Average lifetime (d)	最长寿命 Maximum lifetime (d)
空白组 Blank control group	16.90±0.91	20.41	IMDGX 6270	15.57±0.42	16.60
IMDGX 6012	16.55±0.53	20.59	IMDGX 6137	16.13±1.23	18.21
IMDGX 6048	16.75±0.79	18.30	IMDGX 6046	16.33±0.88	19.25
IMDGX 6326	18.67±0.75	20.14	IMDGX 6118	18.05±0.61	20.07
IMDGX 6131	14.06±0.91	15.88	IMDGX 6173	16.33±0.91	18.35
IMDGX 6458	16.25±0.82	18.99	IMDGX 6316	18.01±1.24	21.98
IMDGX 6359	12.88±1.09 *	15.06	IMDGX 6469	13.32±1.32 *	16.13
IMDGX 6039	18.55±0.64	21.81	IMDGX 6150	14.21±1.01	16.02
IMDGX 6195	16.47±0.59	19.63	IMDGX 6157	13.47±0.81	15.56
IMDGX 6220	17.16±1.03	19.23	IMDGX 6183	13.65±1.34	15.73
IMDGX 6157	19.80±1.26 *	22.32	IMDGX 6248	21.81±0.36 *	22.63
IMDGX 6182	21.65±0.47 *	22.58	IMDGX 6360	21.48±0.74 *	22.01
IMDGX 6239	15.53±0.63	17.93			

注:数据=平均值±标准差,  $n=40$ 。\* 与空白组比较, 差异显著 ( $P<0.05$ ); \*\* 与空白组比较, 差异极显著 ( $P<0.01$ )。

Note: Value =  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=40$ . \* refers to significant differences compared with the blank control group ( $P<0.05$ ); \*\* refers to extremely significant differences compared with the blank control group ( $P<0.01$ ).

11 个属。其中链霉菌属的菌株最多, 为 9 株, 这与 Challis & Hopwoel (2003) 的研究结果相同。本研究还得到 3 株疑似潜在新物种 IMDGX 6270 *Brevibacterium* sp.、IMDGX 6137 *Microbacterium* sp.、IMDGX 6173 *Lysinimicrobium* sp. (相似性均小于 98.65%), 丰富了海南西海岸放线菌资源。研究结果显示, 从各样本中分离的菌株数量差别较大。其中, 叶中得到菌株数最多且多样性最为丰富, 为 18 株; 茎中次之, 为 8 株; 根部最少, 为 4 株。这与 Mesta et al. (2017) 和 Yang et al. (2018) 研究发现菌株数从根部向上逐渐减少的结果略有不同, 这可能与茎和叶组织样本数量较多有关。本研究还显示, M5 培养基分离得到的菌株数量和多样性均最多, M11 培养基分离得到菌株数量和多样性最少, 结果表明不同营养成分的分离培养基对微生物的生长影响较大。

通过研究海南西海岸 14 种真红树内生放线菌对线虫延缓衰老的活性, 24 株内生放线菌经秀丽隐杆线虫模型筛选后获得 4 株具有延缓衰老活性, 分别为从红海榄叶中分离到的菌株 IMDGX

6248 和 IMDGX 6360 以及从榄李叶中分离到的菌株 IMDGX 6157 和 IMDGX 6182, 其中菌株 IMDGX 6248 的延缓衰老活性最强。有研究证明, IMDGX 6248 代谢产生的特曲霉素 C 糖基化衍生物埃罗霉素 (elloramycin) 具有抗革兰氏阳性细菌活性和抗肿瘤活性 (Blanco et al., 2001)。Chung et al. (2005) 的研究结果显示, 菌株 IMDGX 6157 是对可引起植物根腐病的丝核菌有较强拮抗作用的放线菌之一, 能防治大白菜的根腐病, 且对种子萌发无不良影响。这表明海南西海岸红树林植物内生放线菌可能是发现新物种和具有延缓衰老等生物活性天然产物的潜在来源, 但其延缓衰老活性作用物质、机制和机理等还不明确, 需进一步深入研究。

#### 参考文献:

AZMAN AS, OTHMAN I, FANG CM, et al., 2017. Antibacterial, anticancer and neuroprotective activities of rare actinobacteria from mangrove forest soils [J]. Ind J Microbiol,

- 57(13): 177-187.
- BANDARANAYAKE WM, 1998. Traditional and medicinal use of mangroves [J]. *Mangr Salt Marsh*, 2(1): 133-148.
- BLANCO A, PATALLO A, BRANA, et al., 2001. Identification of a sugar flexible glycosyltransferase from *Streptomyces olivaceus*, the producer of the antitumor polyketide elloramycin [J]. *Chem Biol*, 8(3): 253-263.
- BRENNER S, 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans* [J]. *Genetics*, 77(1): 71-83.
- CHALLIS GL, HOPWOOD DA, 2003. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species [J]. *Proc Nat Acad Sci*, 100(2): 14555-14561.
- CHEN ZM, HE JJ, HE H, et al., 2006. Isolation and screening of endophytic antifungal bacteria mangroves [J]. *Microbiol Chin*, 33(3): 18-23. [陈振明, 何进坚, 何红, 等, 2006. 红树林内生细菌的分离及拮抗菌筛选 [J]. *微生物学通报*, 33(3): 18-23.]
- CHUNG WC, HUANG JW, HUANG HC, 2005. Formulation of a soil biofungicide for control of damping-off of Chinese cabbage (*Brassica chinensis*) caused by *Rhizoctonia solani* [J]. *Biol Control*, 32(2): 260-294.
- FAN ZQ, WU H, GU YY, et al., 2017. Current situation of research and exploitation on marine plants and salt-tolerant plants [J]. *Shandong Agric Sci*, 49(2): 168-172. [范作卿, 吴昊, 顾寅钰, 等, 2017. 海洋植物与耐盐植物研究与开发利用现状 [J]. *山东农业科学*, 49(2): 168-172.]
- GUI LY, 2015. Isolation, identification and bioactivity of endophytic actinomycetes from mangrove plants in Beilun River [J]. *J Agr Biotechnol*, 23(7): 894-904.
- HUANG BK, QIN LP, 2006. Biological diversity and active ingredients of endophytic bacteria of medicinal plants [J]. *Chin Pharm J*, 24(4): 193-196. [黄宝康, 秦路平, 2006. 药用植物内生菌的生物多样性及活性成分 [J]. *药学实践杂志*, 24(4): 193-196.]
- JIANG ZK, TUO L, HUANG DL, et al., 2018. Diversity, novelty, and antimicrobial activity of endophytic actinobacteria from mangrove plants in Beilun Estuary National Nature Reserve of Guangxi, China. [J]. *Fr Mol B*, 9(3): 868-875.
- JING JJ, YAN W, JING NC, et al., 2017. Anti-aging and redox state regulation effects of A-type proanthocyanidins-rich cranberry concentrate and its comparison with grape seed extract in mice [J]. *J Funct Foods*, 30(6): 63-73.
- JU SY, CHEN QG, 2018. Advances in host-pathogen interactions using *caenorhabditis elegans* as host model [J]. *Progr Vet Med*, 39(7): 108-113. [鞠守勇, 陈其国, 2018. 秀丽隐杆线虫作为病原菌宿主模型的研究概述 [J]. *动物医学进展*, 39(7): 108-113.]
- KIM KH, ROH SW, CHANG HW, et al., 2009. *Nocardioides basaltis* sp. nov, isolated from black beach sand [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 59(8): 42-47.
- KIM M, OH HS, PARK SC, et al., 2014. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 64(3): 346-351.
- KUBOTA NK, OHTA S, OHTA E, et al., 2004. Two new analogues of the cytotoxic substance BE-52211 from *Streptomyces* sp. [J]. *J Nat Prod*, 67(1): 85-7.
- LEARN HL, NURULLHUDDA Z, ADZZIE SA, et al., 2014. Diversity and antimicrobial activities of actinobacteria isolated from tropical mangrove sediments in Malaysia [J]. *Sci World J*, 14(4): 1-14.
- 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 J, DAI SJ, TUO L, et al., 2016. Diversity and antimicrobial activity of endophytic actinobacteria isolated from eumangroves collected in Dongzhaigang of Hainan Province [J]. *Microbiol Chin*, 43(8): 1753-1765. [李静, 戴素娟, 庾利, 等, 2016. 海南东寨港真红树植物内生放线菌多样性及其抗菌活性 [J]. *微生物学通报*, 43(8): 1753-1765.]
- LI JY, ZHOU WH, LI F, et al., 2017. Diversity of cultivated marine bacteria and antibacterial activity of endophytic bacterial in *Rhizophora stylosa* [J]. *Guihaia*, 37(3): 308-314. [李家怡, 周文红, 李菲, 等, 2017. 红海榄内生细菌多样性及其抑制鱼类致病菌活性研究 [J]. *广西植物*, 37(3): 308-314.]
- LIN P, 1997. *Mangrove ecology from China* [M]. Beijing: Science Press. [林鹏, 1997. *中国红树林生态系* [M]. 北京: 科学出版社]
- LIN P, ZHANG YB, DENG AY, et al., 2005. Microflora and antimicrobial activities of soil microorganisms in mangrove forests in the Jiulong Estuary, China [J]. *Acta Oecnaol Sin*, 27(3): 133-141. [林鹏, 张瑜斌, 邓爱英, 等, 2005. 九龙江口红树林土壤微生物的类群及抗菌活性 [J]. *海洋学报*, 27(3): 133-141.]
- LIU CB, JIANG Y, WANG XY, et al., 2017. Diversity antimicrobial activity and biosynthetic potential of cultivable actinomycetes associated with lichen symbiosis [J]. *Microb Ecol*, 74(3): 570-584.
- LIU Y, LIU F, 2008. Study on separation of symbiotic and epiphytic microorganisms of three kinds of mangrove plants in different locations and their bioactive differences [J]. *J Anhui Agric Sci*, 36(15): 6364-6366. [刘颖, 刘峰, 2008. 不同地点的三种红树共附生微生物分离及生物活性差异的研究 [J]. *安徽农业科学*, 36(15): 6364-6366.]

- LI YQ, LI YQ, LI MG, et al., 2008. Antibiotics produced by rare actinomycetes [J]. *China J Antibiot*, 33(4): 193–197. [李一青, 李艳琼, 李铭刚, 等, 2008. 稀有放线菌产生的抗生素 [J]. *中国抗生素杂志*, 33(4): 193–197.]
- MESTA SC, ONKARAPPA R, MEGHANA S, et al., 2018. Phosphate solubilizing endophytic actinomycetes from mangrove plants *Rhizophora mucronata* and *Sonneratia caseolaris* and its effect on seedling vigour [J]. *Res J Technol Pharm*, 11(3): 1172–1178.
- QI LJ, LI GJ, MA L, et al., 2015. Advances in the application of caenorhabditis elegans in the evaluation of ecotoxicology [J]. *J Toxicol*, 29(1): 60–65. [齐丽娟, 李国君, 马玲, 等, 2015. 秀丽隐杆线虫在生态毒理学评价中应用研究进展 [J]. *毒理学杂志*, 29(1): 60–65.]
- 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.]
- SUKSAARD P, DUANGMAL K, SRIVIBOOL R, et al., 2015. *Jiangella mangrovi* sp. nov. isolated from mangrove soil [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 65(8): 2569–2573.
- TANG YL, XIE XC, HONG K, 2012. Identification and evaluation of physiologically active root endophytic actinomycetes from mangrove plants in Hainan Province [J]. *J Trop Biol*, 3(1): 32–37. [唐依莉, 谢修超, 洪葵, 2012. 红树植物根内生放线菌的分离鉴定及其生理活性的评价 [J]. *热带生物学报*, 3(1): 32–37.]
- WAKSMAN SA, 1943. Production and activity of streptothricin [J]. *Bacteriology*, 46(3): 299–310.
- WANG XJ, WANG M, WANG JD, et al., 2010. Isolation and identification of novel macrocyclic lactones from *Streptomyces avermitilis* NEAU1069 with acaricidal and nematocidal activity [J]. *J Carbohyd Res Food Chem*, 58(5): 2710–2731.
- WEI YZ, ZHANG YQ, ZHAO LL, et al., 2010. Isolation, screening and preliminary identification of endophytic actinobacteria from mangroves at shankou of Guangxi Province [J]. *Microbiol Chin*, 37(6): 823–828. [魏玉珍, 张玉琴, 赵莉莉, 等, 2010. 广西山口红树林内生放线菌的分离、筛选及初步鉴定 [J]. *微生物学通报*, 37(6): 823–828.]
- XU M, LI J, DAI SJ, et al., 2016. Study on diversity and bioactivity 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.]
- YANG GL, YANG LF, JIANG MG, et al., 2015. Isolation, identification and bioactivity of endophytic actinomycetes from mangrove plants in Beilun River [J]. *J Agric Biotechnol*, 23(7): 894–904. [杨桂柳, 杨立芳, 姜明国, 等, 2015. 北仑河红树林内生放线菌分离、鉴定及活性研究 [J]. *农业生物技术学报*, 23(7): 894–904.]
- ZHANG ZM, PAN XH, ZHOU S, et al., 2018. Aging effects of dendrobium nobile polysaccharides on caenorhabditis elegans [J]. *Guizhou Med J*, 42(8): 913–916. [张宗敏, 潘先花, 周姝, 等, 2018. 金钗石斛多糖对秀丽隐杆线虫衰老的影响 [J]. *贵州医药*, 42(8): 913–916.]

(责任编辑 何永艳)