



茅尾海无瓣海桑内生细菌多样性及其细胞毒活性

李菲^{1,2}, 高程海², 竺利波², 余炼^{1,2}, 覃媚^{1,2}, 颜栋美^{1*}

¹ 广西大学轻工与食品工程学院, 广西 南宁 530004

² 广西科学院广西近海海洋环境科学重点实验室, 广西 南宁 530007

摘要: 【目的】对无瓣海桑各组织器官内生细菌的分布特征、物种多样性及细胞毒活性进行分析。【方法】采用稀释涂布法分析无瓣海桑内生细菌的菌落形态及分布。利用16S rRNA基因序列进行系统发育分析, 探讨无瓣海桑内生细菌的物种多样性。利用MTT法测试内生细菌培养液的乙酸乙酯提取物细胞毒活性。【结果】从各组织器官中分离出内生细菌38株, 隶属12科21属(其中5属未定科), 内生细菌数量和群落结构组成存在明显的组织特异性。在分离的菌株中, 有5株菌与已有细菌物种典型菌株的全长16S rRNA基因相似性低于97%, 代表着潜在新属或新种。5株内生细菌(R74、R71、S92、S85、S84)具有较强的细胞毒活性。【结论】无瓣海桑中可培养内生细菌的物种多样性丰富, 潜藏较丰富的新物种资源, 且含有较为丰富的活性菌株。

关键词: 无瓣海桑, 内生细菌, 16S rRNA, 物种多样性, 细胞毒活性

红树林(Mangrove)是生长于热带、亚热带海岸和河口潮间带的木本植物群落, 不仅指红树植物, 还指这一系统中由丰富的生物群落包括红树、细菌、真菌、放线菌、微藻、大型藻、无脊椎动物、鸟类、哺乳动物等所形成的红树林生态系统(Mangrove ecosystems)^[1]。红树林属于海洋四大高生产力生态系统之一, 其占据陆地面积不到全球陆地的千分之一, 却有相当于亚马逊热带雨林的的生产力。红树林独特的生态环境及丰富的生物多样性吸引着众多学者, 研究范围也逐渐从育苗^[2]、造林^[3]、植物学及生态学^[4]等领域向微生物

学领域过渡。近年来, 随着红树林微生物研究的深入开展, 从红树林中获得了许多特殊功能菌。研究发现, 不仅参与了植物次生代谢过程, 而且还能够独立产生丰富的次生代谢产物, 是天然产物的重要来源^[5]。红树内生菌株的次生代谢产物多具有抗肿瘤^[6]、抗真菌^[7]、抗疟^[8]和杀虫功能等^[9-10]。

无瓣海桑(*Sonneratia apetala*)为海桑科(Sonneratiaceae)海桑属(*Sonneratia*)乔木, 树高15–20 m; 主干呈圆柱形, 茎干灰色, 幼时为浅绿色。无瓣海桑小枝纤细下垂, 有隆起的节, 叶对

基金项目: 国家自然科学基金(81260480); 广西科学研究与技术开发计划(14123001-7)

*通信作者。Tel: +86-771-2503975; Fax: +86-771-2503968; E-mail: ydm0202@163.com

收稿日期: 2015-07-31; 修回日期: 2015-09-17; 网络出版日期: 2015-10-21

生, 厚革质, 椭圆形至长椭圆形, 叶柄淡绿色至粉红色, 主脉明显, 在背部隆起^[11]。无瓣海桑是一种生态适应性广的红树植物, 具有显著的高生物量与能量积累、高归还量和落叶快速分解的特性^[12]。2007年, 廖岩等研究无瓣海桑在不同盐度胁迫下的生理响应, 发现无瓣海桑的净光合速率、气孔导度与蒸腾速率与盐度呈负相关, 可溶性糖含量与盐度呈正相关, 抗性物质含量与盐度呈正相关^[13]。2013年, 唐密等研究发现无瓣海桑在1.5%盐度时长势良好, 栅栏组织层数最多, 适合作为人工湿地建群种和优势种种植^[14]。无瓣海桑的高适应性, 为内生微生物提供很好的定殖场所。

茅尾海自治区级红树林自然保护区位于钦州市的钦南区和钦州港区, 面向北部湾, 总面积2784公顷, 红树林面积1892.7公顷, 拥有独特的岩生红树林和七十二泾的“龙泾还珠”岛群红树林景观。保护区内有红树植物11科16种(即木榄、秋茄、红海榄、白骨壤、老鼠簕等), 占全国红树种类的43.2%。目前, 还未发现有学者对该保护区内的红树植物内生细菌进行研究。针对广西茅尾海自治区级红树林自然保护区的特殊生境, 本研究选取该保护区内的一种红树植物——无瓣海桑, 以无瓣海桑的各部位作为研究对象, 通过分离内生细菌菌株, 并根据其16S rRNA基因序列信息对获得的菌株进行分子鉴定以及系统发育分析, 获得无瓣海桑中可培养细菌的多样性信息, 为研究无瓣海桑细菌群落组成提供资料。同时, 通过研究无瓣海桑内生细菌发酵粗提物的细胞毒活性, 以期获得具有强细胞毒活性的菌株, 为深入研究无瓣海桑内生菌功能提供前期基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样本来源及采集方法: 无瓣海桑采集于广西钦州茅尾海红树林保护区(E: 108°36'14", N:

21°44'53"), 退潮后1 h采集。采集样品在24 h内完成菌株分离。

1.1.2 供试细胞: HepG2.2.15细胞株, 由中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心提供。

1.2 菌株的分离纯化

用无菌海水分别清洗无瓣海桑的根、茎、叶、皮和果实等各组织器官, 用5%次氯酸钠浸泡3 min后, 再用无菌海水冲洗3遍, 然后再用75%的酒精溶液浸泡1 min, 最后用无菌海水冲洗3遍以去除酒精。取5 cm×5 cm的样品进行研磨, 研磨好的样品加入1 mL无菌水, 混匀后, 作为10⁻¹的植物悬液, 再依次制成10⁻²、10⁻³稀释度的样液, 分别取各梯度稀释后的样液0.2 mL, 接种于2216E、M5、M4、M1、M6、M7、M9、Gause NO.1、AGG等9种不同培养基中, 28 °C培养15 d后进行菌落计数和菌株分离。取最后1次漂洗液涂布于平板上以检测无瓣海桑各组织表面消毒是否彻底, 纯化后的菌株制成冻干牛奶管保藏于4 °C, 同时制成20% (W/V)甘油管保藏于-80 °C。

1.3 菌株的16S rRNA基因序列分析

DNA的提取、16S rRNA基因的PCR扩增参照Walsh的方法^[15]进行。扩增和测序引物为细菌通用引物27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3')和1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'), PCR反应条件: 94 °C 8 min; 94 °C 50 s, 55 °C 45 s, 72 °C 90 s, 共30个循环; 72 °C 10 min。扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测合格后, 委托北京华大基因研究中心进行测序。测序结果在GenBank中进行BLAST同源性搜索, 获得同源性相近的菌种序列, Clustal X多重比对后, 运用MEGA 5.0软件, 采用Neighbor-Joining法构建系统树, Bootstrap 1000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^[16]。通过venny在线分析网站, 在属级水平上对无瓣海桑根、茎、叶、皮、果实来源细菌类群分布进行韦恩图

分析^[17]。

1.4 细胞毒活性

参考Mosmann等^[18]报道测定内生细菌的细胞毒活性。以HepG2.2.15细胞作为目的细胞, 培养基为含10%BCS的1640培养基。用适量2.5 g/L胰蛋白酶消化细胞, 按 2×10^4 细胞/孔分种于96孔板, 每孔100 μ L, 置于37 $^{\circ}$ C、0.5% CO₂培养箱中培养24 h。将DMSO溶解粗提物加入培养物中, 使得每孔样品浓度为300 mg/L, 以DMSO作为阴性对照, 37 $^{\circ}$ C、0.5% CO₂培养箱中培养48 h。取出96孔板, 每孔加入50 μ L MTT (1 g/L), 继续培养4 h。弃培养液, 每孔加入100 μ L的DMSO, 37 $^{\circ}$ C振荡10 min, 450 nm波长测定每孔的光吸收, 抑制率(IR) $\geq 50\%$ 认为具有细胞毒活性。

2 结果和分析

2.1 内生细菌的分离纯化及其多样性

无瓣海桑各组织表面消毒后的最后1次漂洗液涂布在ISP2平板上, 若28 $^{\circ}$ C培养72 h后未见菌落生长, 即说明组织表面消毒彻底。菌落计数结果表明, 不同组织中定殖的内生细菌数量有明显差异。无瓣海桑根、茎、叶、树皮及果实样品在平板上的菌落形成数量分别为 1.1×10^5 、 7.0×10^4 、 4.0×10^4 、 1.0×10^5 、 5.0×10^4 CFU/mL。根据菌落的大小、形态、颜色和出现时间等特征从无瓣海桑各组织共分离获得38株内生细菌(表1), 隶属12科21属(其中5属未定科), 内生细菌数量和群落结构组成存在明显的组织特异性, 其数量表现为皮>根>茎>叶>果实。多样性表现为根>皮>茎>叶>果实。

2.2 无瓣海桑可培养的内生细菌群类比较

在属级水平上对无瓣海桑的根、茎、叶、皮来源细菌进行venny分析, 韦恩图(图1)显示, 不同部位中的可培养微生物有很大差异。其中, 从根部样品中分离获得的属有11个, 皮中分离获得

的属有9个, 茎中分离到的属5个, 叶中分离到的属有3个。根、叶、皮样品中只有一个共有菌属*Bacillus*, 根和茎也只有一个共有菌属*Sphingomonas*。可以推断, 沿着树木生长所需营养物质的输送方向, 内生细菌的多样性是逐渐减少的。有研究表明, 红树林根部的渗出物将为细菌的生长提供养分, 内生细菌定居在红树林根部又促进根部产生更多的渗出物, 使得根基微生物的多样性更加丰富^[19]。

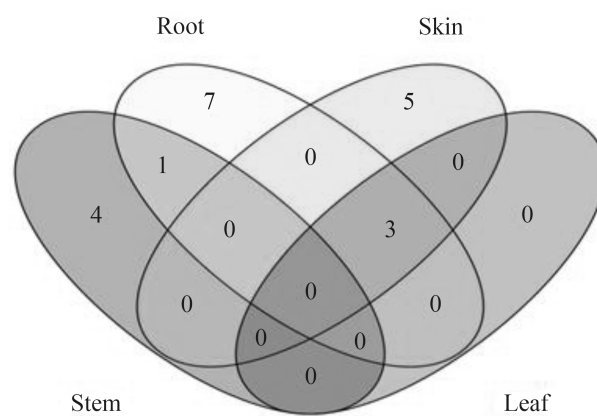


图1. 无瓣海桑各部来源内生细菌属级群类分布韦恩图
Figure 1. Venny of endophytic bacteria genera in *Sonneratia apetala*.

2.3 菌株系统发育分析

基于细菌16S rRNA基因序列的系统发育多样性分析, 发现从无瓣海桑中分离到的细菌都分布在4个类群, 分别为 γ -变形菌纲、 α -变形菌纲、厚壁菌门和放线菌门。其中树根中细菌数较多的为厚壁菌门, 分别有6株, 均分布在*Bacillales*。茎中细菌数较多的为 α -变形菌纲, 共有5株, 分布在*Sphingomonadales*和*Rhizobiales*两个目中。从分离菌株中发现有5株细菌的16S rRNA基因序列(约1500 bp)与其最近缘的典型菌株序列相似性低于97%。基于系统发育分析认为这些菌株代表潜在新属或新种。从无瓣海桑的皮部分离得到的BGMRC 0050与*Sphingomonas hankookensis*

表 1. 无瓣海桑内生细菌的多样性
Table 1. Diversity of endophytic bacterial in *Sonneratia apetala*

Endophytic bacterial	Family	Genus	BLAST results	Identity/%
R72		<i>Actinotalea</i>	<i>Actinotalea ferrariae</i> HQ730135	97
S16、F14、L65、R78、R74、R10、R70、S4	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> CP000560	99
			<i>Bacillus aryabhatai</i> EF114313	99
			<i>Bacillus bataviensis</i> AJ542508	99
			<i>Bacillus isronensis</i> AMCK01000046	99
			<i>Bacillus methylotrophicus</i> EU194897	99
			<i>Bacillus stratosphericus</i> AJ831841	99
R69	<i>Paenibacillaceae</i>	<i>Brevibacillus</i>	<i>Brevibacillus brevis</i> AP008955	99
S5	<i>Promicromonosporaceae</i>	<i>Cellulosimicrobium</i>	<i>Cellulosimicrobium funkei</i> AY501364	99
R71	<i>Paenibacillaceae</i>	<i>Cohnella</i>	<i>Cohnella luojiensis</i> GQ214052	96
R129			<i>Cohnella boryungensis</i> HM061613	99
S124		<i>Curtobacterium</i>	<i>Curtobacterium citreum</i> X77436	99
S84	<i>Erythrobacteraceae</i>	<i>Erythrobacter</i>	<i>Erythrobacter flavus</i> AF500004	99
R75		<i>Fictibacillus</i>	<i>Fictibacillus rigui</i> EU939689	99
S51	<i>Intrasporangiaceae</i>	<i>Janibacter</i>	<i>Janibacter melonis</i> AY522568	99
S23	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> HG933295	99
S68	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacterium oleivorans</i> AJ698725	99
S100	<i>Micromonosporaceae</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora aurantiaca</i> CP002162	99
R128	<i>Mycobacteriaceae</i>	<i>Mycobacterium</i>	<i>Mycobacterium farcinogenes</i> AF055333	99
S92		<i>Nocardioidea</i>	<i>Nocardioidea alpinus</i> GU784866	96
S90、S93			<i>Nocardioidea aquiterrae</i> AF529063	99
			<i>Nocardioidea hwasunensis</i> AM295258	99
S85	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Novosphingobium</i>	<i>Novosphingobium mathurense</i> EF424403	99
R130、F118、L82、S15	<i>Paenibacillaceae</i>	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus lautus</i> D784773	99
			<i>Paenibacillus massiliensis</i> AY230766	99
			<i>Paenibacillus woosongensis</i> AY847463	99
R145		<i>Paenisporosarcina</i>	<i>Paenisporosarcina antarctica</i> EF154512	99
S89	<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Rhizobium</i>	<i>Rhizobium vitis</i> D14502	96
S91、S86			<i>Rhizobium smilacinae</i> KF551141	99
S50	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Sphingomonas</i>	<i>Sphingomonas mucosissima</i> AM229669	97
S40			<i>Sphingomonas melonis</i> KB900605	99
L141、S36			<i>Sphingomonas astaxanthinifaciens</i> AB277583	99
			<i>Sphingomonas hankookensis</i> FJ194436	99
S43	<i>Sterptomycetaceae</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces xiamenensis</i> EF012099	99

Leaf, root, fruit, stem, skin of *Sonneratia apetala* are expressed by the L, R, F, S.

ODN^T发育关系最密切; 无瓣海桑的根部分离得到的BGMRC 0071与*Cohnella luojiensis* HY-22R^T, BGMRC 0072与*Actinotalea ferrariae* CF5-4^T发育关系最密切; 无瓣海桑的茎部分离得到的BGMRC 0089与*Rhizobium vitis* NCPPB 3554^T, BGMRC 0092与*Nocardioides alpinus* Cr7-14^T发育关系最密切。各菌株16S rRNA基因序列构建的系统发育树如图2所示。

2.4 无瓣海桑内生细菌的细胞毒活性

MTT法检测存活细胞灵敏度高, 重复性和稳定性也较好, 是测定细胞存活率的常用方法之一。在分离到的38株内生细菌中, 有5株细菌的培养液提取物对细胞生长产生影响, 表现出一定的毒性作用。R74和R71两株细菌培养液粗提物对HepG2细胞表现出较高的抑制率, 并以R71为最高。5株细菌的ID₅₀值范围从48.79 mg/L到183.43 mg/L, 具体见表2。

表 2. 无瓣海桑内生细菌培养液粗提物具有细胞毒活性菌株的ID₅₀值
Table 2. The ID₅₀ of the extracts from bacteria associated with *Sonneratia apetala*

Endophytic bacterial	The most related species	ID ₅₀ (mg/L)
R74	<i>Bacillus methylotrophicus</i> (EU194897)	79.98±1.94
R71	<i>Cohnella luojiensis</i> (GQ214052)	48.79±2.88
S92	<i>Nocardioides alpinus</i> (GU784866)	183.43±3.12
S85	<i>Novosphingobium mathurense</i> (EF424403)	120.62±2.97
S84	<i>Erythrobacter flavus</i> (AF500004)	111.03±2.55

品处理的方式和外部环境的不同而引起。在种群分布上, 无瓣海桑根部分离的内生细菌较其他部位的更为丰富, 分布11个属, 其中7个特有属。目前普遍认为土壤是内生细菌的主要来源, 土壤内微生物进入宿主后, 随着蒸腾作用沿着维管束由地下部分逐渐向地上部位扩增, 因而地下部位内生菌的数量多于地上部位^[26]。

从钦州茅尾海保护区的无瓣海桑内分离到的38株内生细菌, 有5株细菌其培养液粗提物具有细

3 结论和讨论

大量研究表明, 内生菌的分布特征和群落结构受到宿主植物基因型和外界环境因子的影响, 即使同一种植物, 不同组织中内生细菌的种类和数量也不完全相同, 存在复杂的多样性^[20-22]。为了掌握茅尾海红树林自然保护区的无瓣海桑中内生细菌的组成, 本研究分别对无瓣海桑的根、茎、叶、皮和果实进行采样, 利用8种培养基, 从中分离获得了大量内生细菌资源。研究结果表明, 分离的38株内生细菌分属于12科21属(其中5属未定科), 有5株潜在的新属或新种, 多样性较为丰富。在无瓣海桑不同部位中, 其内生细菌的含量有所不同。根部和皮部中分离的细菌含量最多, 茎中细菌含量为其次, 叶子和果实中最少, 这与Rosenblueth等^[23]、魏玉珍等^[24]的研究结果比较相近, 但与陈振明等^[25]的研究结果有所不同。推测原因可能是红树取样地点、季节、品种、样

胞毒活性, 其中R74和R71两株细胞培养液粗提物对Hep G2细胞表现出比较高的抑制率, 并以R71为最高。R71属于芽孢杆菌(*Bacillus*), 是土壤土著细菌。已有研究表明, 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作用对植物病原菌产生广谱抗性。日本海滨的蜗牛体表分离到细菌*Bacillus cereus* SCRC-4h1-2, 其发酵液具有高的细胞毒活性, 从发酵液中提取到的2个环脂肽对鼠白血病细

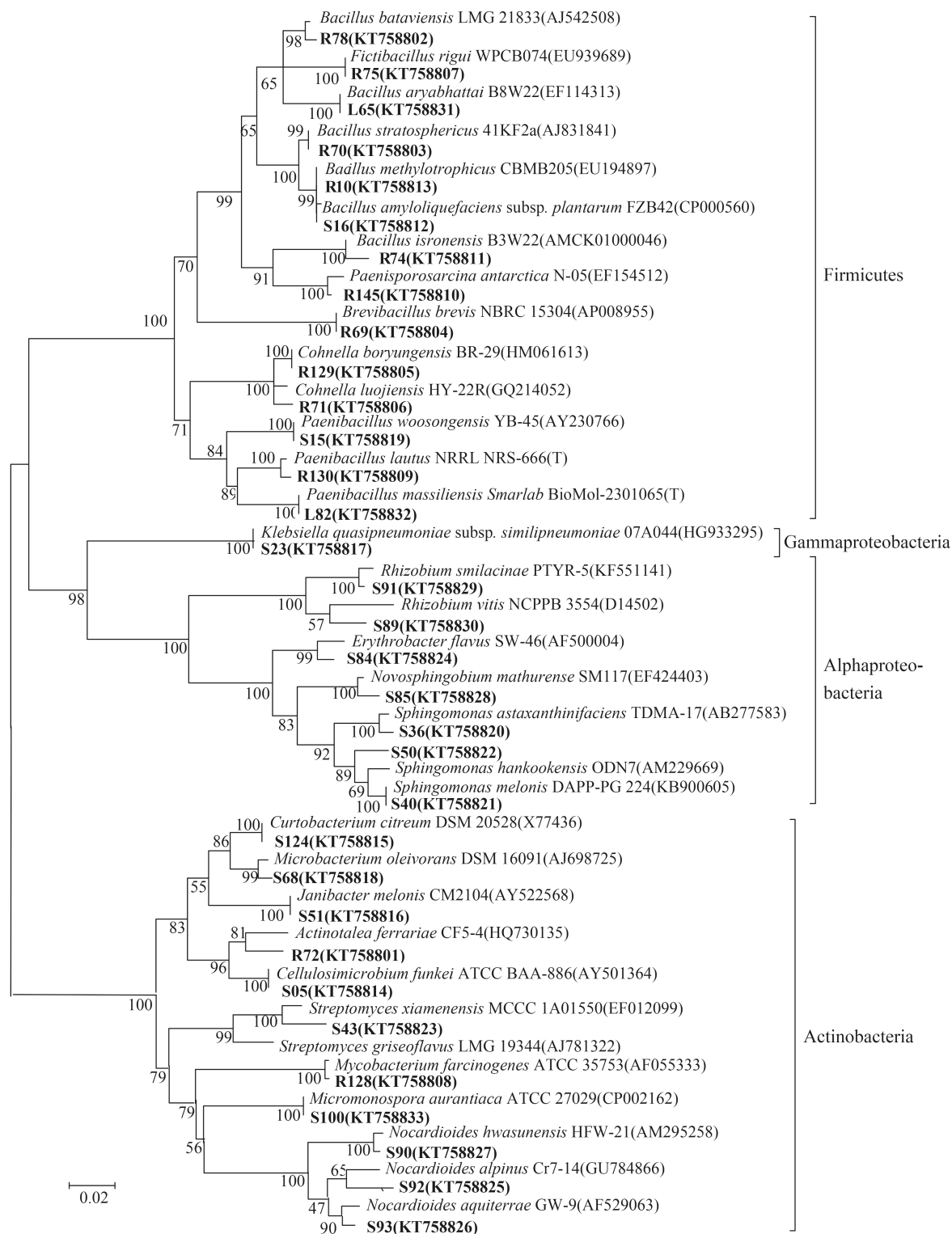


图 2. 无瓣海桑内生细菌16S rRNA的菌株系统发育树

Figure 2. Phylogenetic analysis of endophytic bacteria 16S rRNA in *Sonneratia apetala*. The number in parentheses is accession number in GenBank. Node number represents the confidence level of relatives, the length of branches represents the evolutionary distance and the coefficient is 0.02.

胞系P388表现出潜在的高拮抗^[27]。经化学多样性研究发现, R71发酵物中富含24元大环内酯类化合物macrolactins。Macrolactins是由24元内酯环组成的多烯大环内酯类化合物, 目前已经从海洋来源的*Bacillus*属中分离到的macrolactins A-V, 7-O-succinyl macrolactin A和7-O-succinyl macrolactin F等, 这些化合物表现出强的抗菌、抗肿瘤和抗病毒活性^[28-36]。

红树林所处的盐胁迫、高矿物组成、强还原性、强酸性、频繁潮汐、强风、高温、强紫外辐射、缺氧污泥、寡营养等特殊生境^[37], 为红树内生微生物创造了特殊环境^[38]。内生菌定殖在红树植物体内, 一方面吸收红树植物的营养和能量, 另一方面丰富了红树植物体内的基因组总量, 给红树植物带来了新的功能或功能增强的可能。内生菌与宿主植物相互影响和作用, 丰富了生物多样性, 为内生菌产生重要次级代谢产物提供条件。但是, 目前人类对红树内生菌的了解很有限, 采样、分离和培养技术及设备的相对落后严重制约着对红树内生菌生物活性物质的研究, 将红树林生态环境研究与红树内生菌生物研究相结合, 摸索适合红树内生菌研究方法, 尽可能多的分离纯化难培养或未培养的微生物, 这将大大推进该领域的研究和发展。

参考文献

- [1] Liu F, Hong K. The metabolic and bioactive product from mangrove environment. *Hainan Medical Journal*, 2006, 17(5): 171-173. (in Chinese)
刘峰, 洪葵. 红树林微生物及其代谢产物多样性. 海南医学, 2006, 17(5): 171-173.
- [2] He BY, Mo ZC. Study on the growth and damage factors during the afforestation with artificial seedlings of *Rhizophora stylosa* in a Bare Tidal Flat in Guangxi. *Journal of Guangxi Academy of Sciences*, 1995, 11(3/4): 37-42. (in Chinese)
何斌源, 莫竹承. 红海榄人工苗光滩造林的生长及胁迫因子研究. 广西科学院学报, 1995, 11(3/4): 37-42.
- [3] Chen YJ, Liao BW, Li M, Deng ZH, Wei JF, Guan W. Field planting experiments of mangrove on high-salinity beaches. *Journal of South China Agricultural University*, 2014, 35(2): 78-85. (in Chinese)
陈玉军, 廖宝文, 李玫, 邓智泓, 魏军发, 管伟. 高盐度海滩红树林造林试验. 华南农业大学学报, 2014, 35(2): 78-85.
- [4] Siikamäki J, Sanchirico JN, Jardine SL. Global economic potential for reducing carbon dioxide emissions from mangrove loss. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 2012, 109(36): 14369-14374.
- [5] Miller KI, Qing C, Sze DMY, Roufogalis BD, Neilan BA. Culturable endophytes of medicinal plants and the genetic basis for their bioactivity. *Microbial Ecology*, 2012, 64(2): 431-439.
- [6] Li FC, Maskey RP, Qin S, Sattler I, Fiebig HH, Maier A, Zeeck A, Laatsch H. Chinikomycins A and B: isolation, structure elucidation, and biological activity of novel antibiotics from a marine *Streptomyces* sp. isolate M045. *Journal of Natural Products*, 2005, 68(3): 349-353.
- [7] Wu SJ, Wang SJ, Li FC, Qin S, Hou ZM, Cui HX. Distribution and antimicrobial activity of marine actinomycetes in Jiaozhou Bay. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2006, 25(5): 10-13. (in Chinese)
吴少杰, 王淑军, 李富超, 秦松, 侯竹美, 崔洪霞. 胶州湾海洋放线菌的分布及其抗微生物活性. 中国海洋药物, 2006, 25(5): 10-13.
- [8] Maskey RP, Helmke E, Kayser O, Fiebig HH, Maier A, Busche A, Laatsch H. Anti-cancer and antibacterial trioxacarcins with high anti-malaria activity from a marine *Streptomyces* and their absolute stereochemistry. *The Journal of Antibiotics*, 2004, 57(12): 771-779.
- [9] Xiong L, Li J, Kong F. *Streptomyces* sp. 173, an insecticidal micro-organism from marine. *Letters in Applied Microbiology*, 2004, 38(1): 32-37.
- [10] Pan YD, Yang WG, Hou WF, Qiu DH. Screening and identifying of marine actinomycetes producing substance with insecticidal activity. *Marine Science Bulletin*, 2006, 25(4): 92-96. (in Chinese)
潘云娣, 杨文鸽, 候温甫, 裘迪红. 产杀虫活性物质海洋放线菌的筛选和初步鉴定. 海洋通报, 2006, 25(4): 92-96.
- [11] Tian GH, Chen LY, Peng SL, Yang XB, Chen JQ, Chen MR, Li J, Zeng Y, Lei ZS. Ecological traits of invasiveness of alien mangrove species *Sonneratia apetala*. *Ecology and Environment*, 2010, 19(12): 3014-3020. (in Chinese)
田广红, 陈蕾伊, 彭少麟, 杨雄邦, 陈俊勤, 陈沐荣, 李静, 曾艳, 雷振胜. 外来红树植物无瓣海桑的入侵生态特征. 生态环境学报, 2010, 19(12): 3014-3020.
- [12] Liao BW, Zheng SF, Chen YJ, Li M, Li YD. Biological

- characteristics and ecological adaptability for non-indigenous mangrove species *Sonneratia apetala*. *Chinese Journal of Ecology*, 2004, 23(1): 10–15. (in Chinese)
- 廖宝文, 郑松发, 陈玉军, 李玫, 李意德. 外来红树植物无瓣海桑生物学特性与生态环境适应性分析. *生态学杂志*, 2004, 23(1): 10–15.
- [13] Liao Y, Chen GZ. Research on physiological adaptability of three mangrove species to salt stress. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(6): 2208–2214. (in Chinese)
- 廖岩, 陈桂珠. 三种红树植物对盐胁迫的生理适应. *生态学报*, 2007, 27(6): 2208–2214.
- [14] Tang M, Li K, Xiang HY, Dong X, Jin HX, Wang Y, Yang HJ, Zhang ZX. Research on ecological, physiological and morphological adaptability of two mangrove species to salt stress. *Ecological Science*, 2014, 33(3): 513–519. (in Chinese)
- 唐密, 李昆, 向洪勇, 董雪, 金会鑫, 王悦, 杨海军, 张振兴. 盐胁迫对两种红树植物生态、生理及解剖结构的影响. *生态科学*, 2014, 33(3): 513–519.
- [15] Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, 1991, 10(4): 506–513.
- [16] Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731–2739.
- [17] Tap J, Mondot S, Levenez F, Pelletier E, Caron C, Furet JP, Ugarte E, Muñoz-Tamayo R, Paslier DLE, Nalin R, Dore J, Leclerc M. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(10): 2574–2584.
- [18] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 1983, 65(1/2): 55–63.
- [19] Lynch JM, Whipps JM. Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and Soil*, 1990, 129(1): 1–10.
- [20] Zhang M, Shen DL, Rao XL, Cao FM, Jiang X, Li J. Diversity of endophytic bacteria isolated from *Glycyrrhiza*. *Microbiology China*, 2008, 35(4): 524–528. (in Chinese)
- 张敏, 沈德龙, 饶小莉, 曹凤明, 姜昕, 李俊. 甘草内生细菌多样性研究. *微生物学通报*, 2008, 35(4): 524–528.
- [21] Andreote FD, da Rocha UN, Araújo WL, Azevedo JL, van Overbeek LS. Effect of bacterial inoculation, plant genotype and developmental stage on root-associated and endophytic bacterial communities in potato (*Solanum tuberosum*). *Antonie van Leeuwenhoek*, 2010, 97(4): 389–399.
- [22] van Overbeek L, van Elsas JD. Effects of plant genotype and growth stage on the structure of bacterial communities associated with potato (*Solanum tuberosum* L.). *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 64(2): 283–296.
- [23] Rosenblueth M, Martínez-Romero E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2006, 19(8): 827–837.
- [24] Wei YZ, Zhang YQ, Zhao LL, Li QP, Su J, Liu HY, Sun CH, Yu LY. Isolation, screening and preliminary identification of endophytic actinobacteria from Mangroves at Shankou of Guangxi province. *Microbiology China*, 2010, 37(6): 823–838. (in Chinese)
- 魏玉珍, 张玉琴, 赵莉莉, 李秋萍, 苏静, 刘红宇, 孙承航, 余利岩. 广西山口红树林内生放线菌的分离、筛选及初步鉴定. *微生物学通报*, 2010, 37(6): 823–828.
- [25] Chen ZM, He JJ, He H, Zhang XF, Song WD. Isolation and screening of endophytic antifungal bacteria from mangroves. *Microbiology China*, 2006, 33(3): 18–23. (in Chinese)
- 陈振明, 何进坚, 何红, 张兴锋, 宋文东. 红树林内生细菌的分离及拮抗菌筛选. *微生物学通报*, 2006, 33(3): 18–23.
- [26] Hollis JP. Bacteria in the healthy potato tissue. *Phytopathology*, 1951, 41: 350–366.
- [27] Huang YJ, Huang YL, Liu SZ, Zheng ZH, Song SY, Su WJ. Screening of marine bacterial strain with immunoactive exopolysaccharide. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 2004, 23(1): 38–42. (in Chinese)
- 黄耀坚, 黄益丽, 刘三震, 郑忠辉, 宋思扬, 苏文金. 具有免疫活性多糖海洋细菌菌株的筛选. *台湾海峡*, 2004, 23(1): 38–42.
- [28] Lu XL, Xu QZ, Shen YH, Liu XY, Jiao BH, Zhang WD, Ni KY. Macrolactin S, a novel macrolactin antibiotic from marine *Bacillus* sp. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, 2008, 22(4): 342–347.
- [29] Gustafson K, Roman M, Fenical W. The macrolactins, a novel class of antiviral and cytotoxic macrolides from a deep-sea marine bacterium. *Journal of the American Chemical Society*, 1989, 111(19): 7519–7524.
- [30] Rychnovsky SD, Skalitzyk DJ, Pathirana C, Jensen PR, Fenical W. Stereochemistry of the macrolactins. *Journal of the American Chemical Society*, 1992, 114(20): 671–677.
- [31] Nagao T, Adachi K, Sakai M, Nishijima M, Sano H. Novel macrolactins as antibiotic lactones from a marine bacterium. *The Journal of Antibiotics*, 2001, 54(4): 333–339.
- [32] Yoo JS, Zheng CJ, Lee S, Kwak JH, Kim WG. Macrolactin N,

- a new peptide deformylase inhibitor produced by *Bacillus subtilis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2006, 16(18): 4889–4892.
- [33] Jaruchoktaweecha C, Suwanborirux K, Tanasupawatt S, Kittakoop P, Menasveta P. New macrolactins from a marine *Bacillus* sp. Sc026. *Journal of Natural Products*, 2000, 63(7): 984–986.
- [34] Romero-Tabarez M, Jansen R, Sylla M, Lünsdorf H, Häußler S, Santosa DA, Timmis KN, Molinari G. 7-O-Malonyl macrolactin A, a new macrolactin antibiotic from *Bacillus subtilis* active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin-resistant Enterococci, and a small-colony variant of *Burkholderia cepacia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2006, 50(5): 1701–1709.
- [35] Xue CM, Tian L, Xu MJ, Deng ZW, Lin WH. A new 24-membered lactone and a new polyene δ -lactone from the marine bacterium *Bacillus marinus*. *The Journal of Antibiotics*, 2008, 61(11): 668–674.
- [36] Gao CH, Tian XP, Qi SH, Luo XM, Wang P, Zhang S. Antibacterial and antilarval compounds from marine gorgonian-associated bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* SCSIO 00856. *The Journal of Antibiotics*, 2010, 63(4): 191–193.
- [37] Hong K. Actinomycetes from mangrove and their secondary metabolites. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(11): 1131–1141. (in Chinese)
洪葵. 红树林放线菌及其天然产物研究进展. 微生物学报, 2013, 53(11): 1131–1141.
- [38] Liu M, Wang JH, Jiang J, Yang BL, Wen XH, Chen YF, Liu L. Advances in the studies on the application of marine microorganism in biological pesticides. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2014, 30(3): 232–236. (in Chinese)
刘淼, 王继红, 姜健, 杨宝灵, 温小红, 陈玉飞, 刘丽. 海洋微生物应用于生物农药的研究进展. 中国农学通报, 2014, 30(3): 232–236.

Diversity and cytotoxic activity of endophytic bacteria isolated from *Sonneratia apetala* of Maowei Sea

Fei Li^{1,2}, Chenghai Gao², Libo Zhu¹, Lian Yu^{1,2}, Mei Qin^{1,2}, Dongmei Yan^{1*}

¹ College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

² Guangxi Key Laboratory of Marine Environmental Science, Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530007, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Abstract: [Objective] The purpose of this study was to study the distribution, diversity and cytotoxic activity of endophytic bacteria of *Sonneratia apetala* collected from Maowei Sea, Qinzhou city. [Methods] The 16S rRNA gene sequencing and MTT were used to explore the diversity and cytotoxic activity of endophytic bacteria isolated from different organs and tissues of *Sonneratia apetala*. [Results] Total of 38 isolates were obtained. The result of diversity analysis showed that these isolates could be phylogenetically classified into 21 genera and 12 families, based on their 16S rRNA gene sequencing. Of them 5 were potential new genera or new genus. Five strains (R74, R71, S92, S85 and S84) had cytotoxic activity against human liver carcinoma Hep G2 cell line. [Conclusion] Endophytic bacteria of *Sonneratia apetala* are genetically diverse and most of them have abundant new bioactivities.

Keywords: *Sonneratia apetala*, endophytic bacteria, 16S rRNA, genetic diversity, cytotoxic activity

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81260480) and by the Key Project of Science and Technology Department of GuangXi (14123001-7)

*Corresponding author. Tel: +86-771-2503975; Fax: +86-771-2503968; E-mail: ydm0202@163.com

Received: 31 July 2015; Revised: 17 September 2015; Published online: 21 October 2015