

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202106012

侯师师, 梁考云, 高程海, 等, 2023. 红树木榄生境中可培养细菌物种多样性及其体外抗乙型肝炎病毒活性研究 [J]. 广西植物, 43(4): 616–625.

HOU SS, LIANG KY, GAO CH, et al., 2023. Species diversity and anti-hepatitis B virus activity of culturable bacteria isolated from the habitat of *Bruguiera gymnorhiza* [J]. *Guihaia*, 43(4): 616–625.



红树木榄生境中可培养细菌物种多样性及其体外抗乙型肝炎病毒活性研究

侯师师, 梁考云, 高程海, 蒋翠萍, 唐倩倩, 刘永宏, 易湘茜*

(广西中医药大学 海洋药物研究院/药学院, 南宁 530200)

摘要: 红树生境中微生物菌群丰富, 其次生代谢产物结构新颖, 是挖掘新型药物的重要来源。该研究利用纯培养技术和 16S rRNA 分子生物学技术确定细菌种属, 并进行物种多样性分析; 以 HepG2.2.15 细胞株为模型, 通过 MTT 和 PCR 技术测试细菌代谢产物的抗乙型肝炎病毒活性; 使用 LC-HRMS 技术对活性菌株代谢产物进行初步分析, 初步评价木榄沉积物、根、叶以及胚轴的可培养细菌多样性以及细菌代谢物生物活性, 寻找抗乙型肝炎病毒的药源菌株。结果表明: (1) 共获得细菌 59 种, 分属于 4 门 5 纲 14 目 23 科 36 属, 其中芽孢杆菌属为优势菌属; 菌株 GXIMD07402、GXIMD07665、GXIMD07384 分别为 *Pseudoocceanicola* 属、*Thioclava* 属和 *Aestuariibaculum* 属的潜在新种。(2) 抗乙型肝炎病毒活性结果显示 GXIMD07366、GXIMD07616、GXIMD07384、GXIMD07550、GXIMD07445X 提取物能显著降低 HepG2.2.15 细胞上清液中 HBV DNA 水平 ($P < 0.05$), 抑制率分别为 51%、47%、63%、52%、47%。(3) 初步鉴定强活性菌株 GXIMD07384 的 4 个主要代谢产物有 adenosine、cyclo(L-Pro-L-OMet)、acremine G 和 7,8-dimethylbenzo[*g*]pteridine-2,4(1*H*,3*H*)-dione。综上所述, 木榄生境中可培养细菌物种多样性丰富且含有能产生抗乙型肝炎病毒活性化合物的菌株。该研究结果为后续海洋微生物资源的应用提供了基础。

关键词: 木榄, 可培养细菌, 物种多样性, 代谢产物, 抗乙型肝炎病毒活性

中图分类号: Q939.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2023)04-0616-10

Species diversity and anti-hepatitis B virus activity of culturable bacteria isolated from the habitat of *Bruguiera gymnorhiza*

HOU Shishi, LIANG Kaoyun, GAO Chenghai, JIANG Cuiping,
TANG Qianqian, LIU Yonghong, YI Xiangxi*

(Institute of Marine Drugs/Faculty of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China)

收稿日期: 2021-10-25

基金项目: 国家自然科学基金(81903533, U20A20101); 广西自然科学基金(2018GXNSFAA281268, 20GXNSFGA297002); 校级项目(YCXJ2021133)。

第一作者: 侯师师(1996-), 硕士研究生, 主要从事海洋中药物质基础与产品开发研究, (E-mail) 18434376392@163.com。

*通信作者: 易湘茜, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事海洋生物资源应用研究, (E-mail) 42672960@qq.com。

Abstract: Mangrove habitat is rich in microbial flora and its secondary metabolites have novel structure, which is an important source for mining new drugs. This study preliminarily evaluated the culturable bacterial diversity of sediments, roots, leaves and hypocotyls of *Bruguiera gymnorhiza* and the biological activity of bacterial metabolites, and looked for anti-HBV drug source strains. Pure culture technique and 16S rRNA molecular biology technique were employed to determine the species of bacteria and analyze the species diversity. Using HepG2.2.15 cell line as a model, the anti-HBV activity of bacterial metabolites was tested by MTT and PCR techniques. The secondary metabolites of active bacteria were preliminarily analyzed by LC-HRMS technique. The results were as follows: (1) A total of 59 species of bacteria were obtained, belonging to 4 phyla, 5 classes, 14 orders, 23 families, and 36 genera, among which *Bacillus* was the dominant genus. Strains GXIMD07402, GXIMD07665 and GXIMD07384 were potential new species of *Pseudoaerobicola*, *Thioclava* and *Aestuariatibaculum*, respectively. (2) The results of anti-HBV activity showed that GXIMD07366, GXIMD07616, GXIMD07384, GXIMD07550 and GXIMD07445X could significantly reduce the level of HBV DNA in the supernatant of HepG2.2.15 cells ($P < 0.05$), and the inhibition rates were 51%, 47%, 63%, 52% and 47%. (3) Four main secondary metabolites of the highly active strain GXIMD07384 were preliminarily identified as Adenosine, Cyclo(L-Pro-L-OMet), Acremine G and 7,8-dimethylbenzo[*g*]pteridine -2,4(1*H*,3*H*)-dione. The results of the study confirm that the species diversity of culturable bacteria in the habitat of *Bruguiera gymnorhiza* is rich, and it contains strains that can produce anti-HBV active compounds, which provide a basis for the subsequent application of marine microbial resources.

Key words: *Bruguiera gymnorhiza*, culturable bacteria, species diversity, metabolites, anti-HBV activity

红树林是独特的沿海生态系统,物质流、能量流密集,表现出较高的生产力,孕育着庞大的微生物群落,是新物种和多种生物活性化合物的来源(Lin et al., 2019)。细菌作为微生物的最大类群,在工业、医药等方面有着重要价值。Jiang等(2018)从广西北仑口5种红树植物中分离得到101株内生放线菌,包括7株潜在新种,抑菌试验中31株菌显示阳性,其中21株菌对抗性病原体表现出抑制活性。李菲等(2021)从海芒果根际和组织中分离出可培养细菌71株,其中15株菌株具有抗农用真菌活性,其基因组DNA均扩增出至少1种次级代谢产物合成基因。李蜜等(2018)从海南西海岸红树植物中分离得到32株细菌,其中1株为新物种、3株能延缓线虫衰老的活性菌株。红树生境细菌资源丰富,是发现活性天然产物的重要来源,值得我们进一步探索。

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是一种嗜肝型DNA病毒,长期感染会引发肝硬化、肝癌,严重危害人类健康(Sarin, 2016)。全球乙肝表面抗原(HBV surface antigen, HBsAg)阳性率为3.9%,约2.92亿患者,每年有100多万人死于HBV感染所致的终末期疾病(Razavi-Shearer et al., 2018)。中国普通人群的HBV感染率为6.89%,乙肝病毒患者有8300万人,每年有30万人因慢性乙型肝炎

致死(Wang et al., 2019)。目前,公认治疗乙型肝炎有效的药物主要是干扰素和核苷类药物,但它们在临床应用中存在副作用大、价格昂贵、易耐药以及治愈率低等诸多不足(Zhang et al., 2015; Shi et al., 2017)。因此,寻找新型高效的抗乙肝病毒药物仍为我国亟待解决的难题。木榄(*Bruguiera gymnorhiza*)为红树科木榄属植物,具有清热解毒功效,京族医书有用其主治乙型肝炎的记录(张帅等, 2016)。本课题组前期从木榄胚轴中分离得到7个有抑制乙肝病毒复制活性的氰苷类化合物,其 IC_{50} 值范围为 $(5.1 \pm 0.2) \sim (87.7 \pm 5.8) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Yi et al., 2015)。然而,由于红树资源的生态价值突出,加之难再生性,使得大规模采集木榄胚轴用于抗乙肝病毒的研究受到制约。而微生物具有菌种易保存、生长周期短、代谢可调控等优点,因此可大规模发酵成为药物开发的战略资源。目前,有关木榄生境中可培养细菌的研究报道较少且多集中于抑菌活性。Ding等(2011)从木榄茎部内生链霉菌 *Streptomyces* sp. 中分离得到4个新的安莎霉素类大环内酯化合物 divergolides A~D, 对 *Bacillus subtilis*、*Mycobacterium vaccae*、MRSA 和 VRE 多种细菌有较强的抑制活性。Yan等(2010)从木榄叶中分离得到1株链霉菌 *Streptomyces albidoflavus*, 从中分离得到第一个天然的8-乙酰氧

基的抗霉素 antimycin A18,对植物病原菌有良好的杀菌活性,而抗乙肝病毒活性未见报道。因此,本研究开展木榄生境中可培养细菌物种多样性探索,并测试其代谢产物抗乙肝病毒活性,以期药用红树资源充分挖掘利用和抗乙肝药物开发提供药源菌株。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 样品 2019年5月在广西北仑河口红树林自然保护区(108°14'11" E,19°36'55" N)采集木榄的生境沉积物、根、叶、胚轴样品。对木榄沉积物用灭菌铲挖取深度为5 cm的土壤,对木榄的根、叶、胚轴直接采取后用无菌水冲洗表面,将各样品分装在密封袋内,保存于采样冰盒中,带回实验室处理。

1.1.2 培养基 分离培养基:共10种,包括燕麦培养基(P3)、酪氨酸-天冬酰胺培养基(P7)、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)、棉籽糖-组氨酸培养基(M11)、改良的高氏培养基(AGG)、R2A、2216E,培养基详细配方参考李蜜等(2020)的方法。纯化培养基:改良ISP2固体培养基(酵母提取物2.0 g、麦芽提取物2.0 g、葡萄糖2.0 g、琼脂20.0 g和海水1 000 mL)。发酵培养基:改良ISP2液体培养基,含0.1%小球藻的改良ISP2液体培养基。细胞完全培养基:90% DMEM培养基、10%胎牛血清、100 U·mL⁻¹青链霉素。

1.1.3 细胞 HepG2.2.15细胞株:广西艾滋病防治研究重点实验室叶力教授惠赠。

1.1.4 试剂 Chelex-100树脂、2×Easy Taq Supermix购于美国BioRad公司;16S rRNA基因扩增引物对27F和1492R购于全式金生物技术有限公司;DMEM培养基、胎牛血清、青链霉素、生物级二甲基亚砜(DMSO)购于美国Gibco公司;噻唑蓝(MTT)购于美国Sigma公司;拉米夫定(3TC)购于上海麦克林生化科技有限公司;DNA病毒基因组提取试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司(中国,北京);HBV DNA定量测定试剂盒购于湖南圣湘生物科技有限公司;其他分离培养基用试剂均为国产分析纯。

1.1.5 主要仪器 SW-CJ-2F超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);TAdvanced 96PCR扩增仪(Biometra,德国);ZWYP-2102恒温培养振荡器(上海智城分析仪器制造有限公司);HR1500-II B2生物安全柜(青岛海尔生物医疗股份有限公司);MCO-170AICDL-PC全波长多功能酶标仪(Tecan,瑞士);Light Cycler480 II高通量实时荧光定量PCR系统(Roche,瑞士)。

1.2 方法

1.2.1 样品的预处理 样品处理参考李菲等(2018)的方法。首先将木榄的根、叶、胚轴先用无菌水清洗,然后用75%酒精浸泡2 min,最后用无菌水冲洗除去酒精。取大约2.0 g沉积物样品和木榄各组织样品,分别置于无菌研钵中,加2 mL海水充分研磨,作为样品原液。用无菌海水依次稀释成1×10⁻³、1×10⁻⁴ g·mL⁻¹样液。

1.2.2 木榄生境中可培养细菌的分离纯化 取1×10⁻³、1×10⁻⁴ g·mL⁻¹的样液100 μL均匀涂布于10种分离培养基中,在28℃恒温培养箱中倒置培养2~6周,不同形态的单菌落被挑取后,接种于ISP2培养基,利用三区划线纯化菌株。将生长良好且无污染的菌体保藏于20%(V/V)甘油管中,置于4℃冰箱中短期存放,于-80℃冰箱中长期保存。

1.2.3 细菌的分子生物学鉴定 提取目标菌株的基因组DNA采用Chelex-100 Resin法(周双清等,2010)并参照Walsh等(1991)的方法进行PCR梯度扩增。通用引物27F和1492R用于16S rRNA基因片段的扩增。用1%琼脂糖(m/V)凝胶电泳检测扩增产物后,委托上海美吉生物医药技术有限公司广州分公司完成16S rRNA基因测序。测序结果经SeqMan软件整理,利用EzBioCloud(<https://www.ezbiocloud.net/>)服务器进行在线分析(Kim et al., 2012)获取同源性最高的典型菌株序列,通过比对进行物种多样性分析,序列相似度<98.65%视为潜在新物种(Kim et al., 2014)。利用Venny在线分析网站,在属级水平上对木榄不同来源细菌类群分布进行韦恩图分析。

1.2.4 菌株代谢产物的制备及代谢产物多样性的筛选 将对数生长期菌株分别接种到两种液体发酵培养基后,于28℃、180 r·min⁻¹摇床发酵培养7 d。发酵液用等体积乙酸乙酯萃取,萃取相经减压浓缩后置于干燥器中低温保存备用。利用HPLC-DAD技术分析菌株代谢产物,初步筛选出代谢产

物较为丰富的菌。分别将 ISP2 液体培养基发酵产物命名为“细菌编号”,含 0.1% 小球藻的改良 ISP2 液体培养基发酵产物命名为“细菌编号 X”,两份空白培养基对照命名为“GXIMD00000”和“GXIMD00000X”。

1.2.5 菌株代谢产物对 HepG2.2.15 细胞增殖的影响 对代谢产物较为丰富的菌株进行抗乙肝病毒实验,加生物级 DMSO 完全溶解后用完全培养基稀释至浓度为 500、250、125 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。取对数生长期细胞,调整细胞浓度为 5×10^4 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$,接种于 96 孔板上,每孔 100 μL ,贴壁培养 24 h 后,换入含药培养液,同时设空白组和阳性对照组(100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 3TC)。培养 72 h 后吸取上清液,加入 5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ MTT 溶液 50 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h,弃去孔内 MTT 溶液,加入 DMSO 100 μL ,震荡 10 min。在 490 nm 波长下测定各孔光吸收值,计算细胞存活率。细胞存活率(%)=(实验组 A_{490} 值/阴性对照孔 A_{490} 值) $\times 100\%$ 。

1.2.6 检测菌株代谢产物对 HepG2.2.15 细胞上清液中 HBV DNA 的影响 选取对细胞增殖无抑制作用的菌株代谢产物进行后续抗乙肝病毒活性实验。取对数生长期 HepG2.2.15 细胞制成 5×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 细胞悬浮液,接种于 24 孔板上,每孔 1 mL,24 h 贴壁培养,换入含药培养液。第 6 天收集细胞上清液,按照病毒 DNA 制备试剂盒的步骤操作获得高纯度的 HBV DNA,运用乙型肝炎核酸定量检测试剂盒检测细胞上清液中 HBV DNA 水平。

2 结果与分析

2.1 木榄生境中可培养细菌的多样性分布

2.1.1 木榄可培养细菌的多样性分析 利用 10 种分离培养基,通过菌株形态学和 16S rRNA 基因测序技术进行排重,共获得可培养细菌 59 种(表 1)。由表 1 可知,59 种细菌归属于 4 门 5 纲 14 目 23 科 36 属,分别为 Actinobacteria(放线菌纲) 10 属 15 种、Flavobacteria(黄杆菌纲) 3 属 3 种、Bacillia(芽孢杆菌纲) 6 属 17 种、Alphaproteobacteria(α -变形杆菌纲) 10 属 13 种、Gammaproteobacteria(γ -变形杆菌纲) 7 属 11 种。其中,*Bacillus*(芽孢杆菌属)为本次研究的优势菌属,分离得到菌株 9 株,占总菌株数的 15.3%;*Staphylococcus*(球菌属)为次优势菌属,共分离得

到菌株 4 株,占比为 6.8%。

通过 EzBioCloud 服务器进行 16S rRNA 基因序列比对分析,有 3 株菌株与有效描述的物种表现出低序列相似性(<98.65%),对潜在的新菌株进行了 16S rRNA 基因的完整测序(>1 330 bp)后,发现 GXIMD07402(GenBank 登录号:MT613339)与 *Pseudoceanicola aestuarii* E2-1^T 的最高相似度为 96.33%,GXIMD07665(GenBank 登录号:MW709434)与 *Thioclava pacifica* DSM 10166^T 和 *Thioclava marina* MPZS01000005^T 的最高相似度均为 96.24%,GXIMD07384 与 *Aestuariibaculum suncheonense* SC17^T 的最高相似度为 98.52%,可能为新的物种。

2.1.2 木榄生境中可培养细菌在样品中的分布

由图 1 和图 2 可知,从木榄沉积物分离得到的菌株种类最为丰富,共获得菌株 27 属 40 种;木榄不同组织部位中,根分离得到的菌种数目最多,共获得 12 属 17 种;木榄沉积物是放线菌纲的重要来源,其中 10 属 14 种细菌均从木榄沉积物获得,仅 *Brevibacterium casei* 分离自木榄胚轴;黄杆菌纲细菌均分离自沉积物和根, γ -变形菌纲细菌除 *Pseudomonas stutzeri* 外,其余 10 种均来源于木榄的沉积物和根部;从木榄的胚轴、叶分离得到的细菌丰富度较低,从木榄胚轴分离得到菌株 7 属 13 种,从木榄叶分离得到最少菌株种类为 7 属 9 种。

在属级水平上对木榄生境来源的细菌进行 Venny 分析,木榄沉积物和木榄各组织中仅存在 1 个共有菌属 *Bacillus*。沉积物和木榄根含有 *Demequina*、*Myroides*、*Bacillus*、*Staphylococcus*、*Pseudoceanicola*、*Microbulbifer*、*Vibrio* 7 个相同菌属,共有菌属丰富度明显优于沉积物和木榄其他组织部位。

2.1.3 不同培养基对木榄生境中可培养细菌的分离效果 由图 3 可知,2216E 培养基分离得到的菌种数目最多,为 24 株,菌属分布最为广泛,包括 *Aestuariibaculum*、*Bacillus*、*Demequina* 等 11 属,2 株新菌 GXIMD07402 和 GXIMD07384 均分离自该培养基。其次是 M7(20 种)、R2A(16 种)和 AGG(15 种)培养基,菌属丰富度较高,均分离得到 *Bacillus*、*Microbulbifer*、*Pantoea*、*Staphylococcus*、*Vibrio* 属菌株。P3 和 P7 得到菌株 9 属 14 种和 7 属 10 种,另 1 株新菌 GXIMD B331 分离自 P7 培养基。其余 4 种培养基 M5(5 种)、M9(8 种)、M10(6 种)

表 1 木榄生境中可培养细菌的物种组成

Table 1 Species composition of culturable bacteria in the habitat of *Bruguiera gymnorhiza*

属类群 Genera group	菌株编号 Strain number	最相近菌株 (BLAST) The most related species (BLAST)	相似度 Similarity (%)	来源 Source
<i>Dietzia</i> sp.	GXIMD07588	<i>D. aurantiaca</i> (FR821260)	99.12	1-1、1-3
<i>Brevibacterium</i> sp.	GXIMD08275	<i>B. casei</i> (X76564)	99.60	1-4
<i>Demequina</i> sp.	GXIMD07727	<i>D. maris</i> (BBLX01000020)	98.95	1-1
	GXIMD07550	<i>D. salsinemoris</i> (BBQZ01000002)	99.21	1-1、1-2
<i>Janibacter</i> sp.	GXIMD07490	<i>J. melonis</i> (AY522568)	99.51	1-1
<i>Kytococcus</i> sp.	GXIMD07662	<i>K. schroeteri</i> (AJ297722)	99.49	1-1
<i>Microbacterium</i> sp.	GXIMD07699	<i>M. oxydans</i> (Y17227)	100.00	1-1
	GXIMD07387	<i>M. thalassium</i> (AB004713)	99.20	1-1
<i>Kocuria</i> sp.	GXIMD07701	<i>K. arsenatis</i> (KM874399)	99.87	1-1
	GXIMD08246	<i>luteus</i> (CP001628)	99.74	1-1、1-4
<i>Micrococcus</i> sp.	GXIMD08005	<i>M. endophyticus</i> (EU005372)	99.09	1-1
	GXIMD08061	<i>M. aloeverae</i> (CP001628)	100.00	1-1、1-4
<i>Kitasatospora</i> sp.	GXIMD07391	<i>K. albolonga</i> (AB184425)	99.62	1-1
<i>Streptomyces</i> sp.	GXIMD07709	<i>S. spiralis</i> (AB184575)	99.36	1-1
<i>Myroides</i> sp.	GXIMD07367	<i>M. odoratimimus</i> subsp. <i>xuanwuensis</i> (jgi.1107767)	98.76	1-1、1-2
<i>Sinomicrobium</i> sp.	GXIMD07572	<i>S. oceani</i> (JQ352762)	100.00	1-2
<i>Aestuariibaculum</i> sp.	GXIMD07384	<i>A. suncheonense</i> (JF751043)	98.52	1-1
	GXIMD07385	<i>B. altitudinis</i> (ASJC01000029)	99.49	1-1、1-2、1-3、1-4
<i>Bacillus</i> sp.	GXIMD07622	<i>B. aryabhattai</i> (EF114313)	99.62	1-1
	GXIMD07385	<i>B. filamentosus</i> (KF265351)	99.74	1-1
	GXIMD07390	<i>B. siamensis</i> (AJVF01000043)	99.50	1-1、1-2、1-4
	GXIMD07462	<i>B. wiedmannii</i> (LOBC01000053)	99.10	1-1
	GXIMD07450	<i>B. funiculus</i> (AB049195)	99.87	1-4
	GXIMD08241	<i>B. pseudomycooides</i> (ACMX01000133)	99.62	1-2
	GXIMD07715	<i>B. vietnamensis</i> (AB099708)	99.57	1-3
	GXIMD07471	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>Stercoris</i> (D7XPN1)	99.33	1-1、1-2
<i>Fictibacillus</i> sp.	GXIMD07712	<i>F. enclensis</i> (JF893461)	98.69	1-1
<i>Halobacillus</i> sp.	GXIMD07459	<i>H. salinus</i> (AF500003)	98.85	1-1
<i>Alkalihalobacillus</i> sp.	GXIMD07696	<i>A. hwajinpoensis</i> (AF541966)	99.23	1-2
<i>Cytobacillus</i> sp.	GXIMD07748	<i>C. kochii</i> (FN995265)	99.87	1-1
	GXIMD07629	<i>S. arlettae</i> (AB009933)	100.00	1-1、1-4、1-2
<i>Staphylococcus</i> sp.	GXIMD08278	<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (AMYL01000007)	99.87	1-1、1-4
	GXIMD08273	<i>S. warneri</i> (L37603)	100.00	1-4、1-2
	GXIMD07366	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>Saprophyticus</i> (AP008934)	99.36	1-3
<i>Brevundimonas</i> sp.	GXIMD08242	<i>B. vesicularis</i> (BCWM01000033)	99.62	1-4
<i>Rhizobium</i> sp.	GXIMD07370	<i>R. halophytocola</i> (GU322905)	98.97	1-2
<i>Paracoccus</i> sp.	GXIMD07420	<i>P. marcusii</i> (Y12703)	99.21	1-3、1-4
	GXIMD08265	<i>P. halotolerans</i> (KY039331)	98.67	1-4
<i>Pararhodobacter</i> sp.	GXIMD07616	<i>P. aggregans</i> (AM403160)	98.72	1-3
<i>Pseudoceanicola</i> sp.	GXIMD07402	<i>P. aestuarii</i> (MN929131)	96.33	1-1
	GXIMD07813	<i>P. nanhaiensis</i> (JHZF01000008)	98.69	1-2
<i>Ruegeria</i> sp.	GXIMD07799	<i>R. profunda</i> (LQBP01000024)	99.00	1-1

续表 1

属类群 Genera group	菌株编号 Strain number	最相近菌株 (BLAST) The most related species (BLAST)	相似度 Similarity (%)	来源 Source
<i>Thioclava</i> sp.	GXIMD07665	<i>T. pacifica</i> (AUND01000024)	96.24	1-2
<i>Salipiger</i> sp.	GXIMD07369	<i>S. pacificus</i> (jgi.1055276)	99.45	1-1
<i>Erythrobacte</i> sp.	GXIMD07443	<i>E. flavus</i> (AF500004)	98.65	1-2
<i>Qipengyuania</i> sp.	GXIMD07468	<i>Q. aquimaris</i> (AY461441)	98.96	1-1
	GXIMD07576	<i>Q. vulgaris</i> (AY706935)	99.35	1-1、1-3
	GXIMD07445	<i>Q. pelagi</i> (HQ203045)	98.80	1-3
<i>Shewanella</i> sp.	GXIMD08125	<i>S. algae</i> (BAL001000089)	99.61	1-2
<i>Microbulbifer</i> sp.	GXIMD07512	<i>M. hydrolyticus</i> (AJ608704)	98.81	1-1
	GXIMD07784	<i>M. pacificus</i> (DQ993341)	99.87	1-1
	GXIMD07514	<i>M. salipaludis</i> (AF479688)	99.36	1-1、1-2
<i>Pantoea</i> sp.	GXIMD07363	<i>P. dispersa</i> (DQ504305)	100.00	1-1、1-4
<i>Klebsiella</i> sp.	GXIMD07545	<i>K. grimontii</i> (FZTC01000044)	99.87	1-1
<i>Serratia</i> sp.	GXIMD07526	<i>S. rubidaea</i> (AB004751)	98.85	1-1
<i>Pseudomonas</i> sp.	GXIMD07478	<i>P. kunmingensis</i> (JQ246444)	99.23	1-1
	GXIMD07516	<i>P. stutzeri</i> (CP002881)	99.75	1-3
<i>Vibrio</i> sp.	GXIMD07790	<i>V. azureus</i> (BATL01000140)	99.74	1-1
	GXIMD07687	<i>V. plantisponsor</i> (GQ352641)	99.72	1-1、1-2

注: 1-1. 沉积物; 1-2. 根; 1-3. 叶; 1-4. 胚轴。

Note: 1-1. Sediment; 1-2. Root; 1-3. Leaf; 1-4. Hypocotyl.

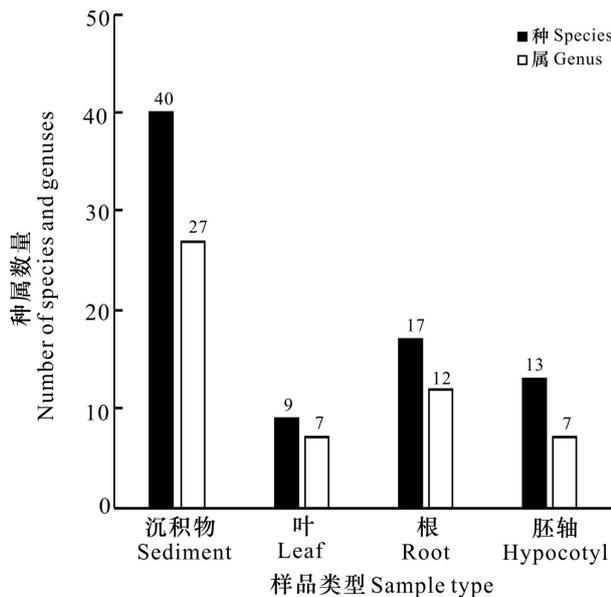


图 1 不同样品分离得到的细菌种属

Fig. 1 Bacterial species and genera isolated from different samples

和 M11(6 种)均分离得到 *Bacillus*、*Pantoea* 属菌株。从菌种数量、菌属丰富度和物种新颖性而言, 2216E 培养基均为此次分离的最优介质。

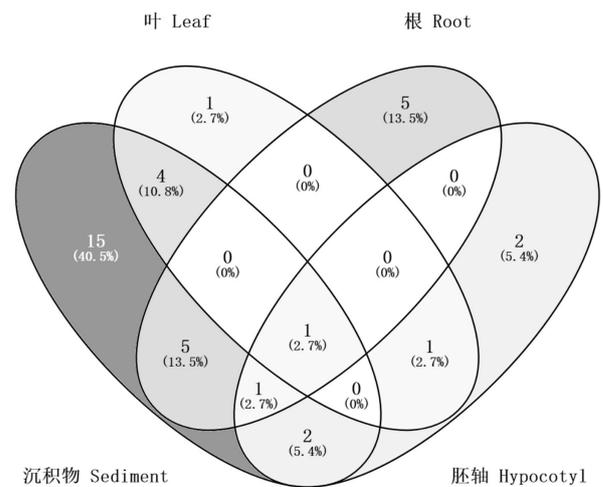


图 2 不同样品可培养细菌属级群类分布韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of the distribution of bacterial genera in different samples

2.2 木榄可培养细菌的抗乙肝病毒活性分析

2.2.1 木榄可培养细菌对 HepG2.2.15 细胞增殖的影响 表 2 结果表明, 在 $125 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度下, 与空白组相比, 2 份空白培养基作用下的细胞存活率无明显差异, 即对细胞无毒副作用 ($P > 0.05$)。25

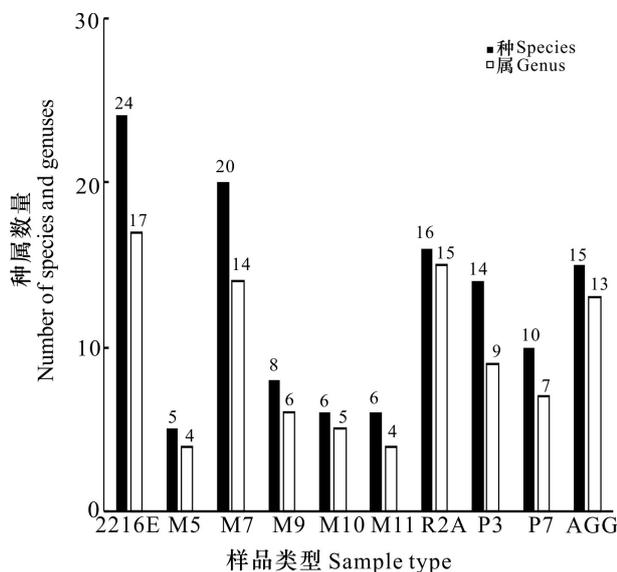


图 3 不同培养基的分离效果

Fig. 3 Bacterial species and genus isolated from different media

份菌株发酵产物中, 14 份菌株代谢产物对 HepG2.2.15 细胞无明显的毒副作用, 对细胞增殖无明显抑制作用, 可以进一步测试 14 份样品对细胞分泌 HBV DNA 的抑制作用。

2.2.2 木榄可培养细菌对 HepG2.2.15 细胞分泌 HBV DNA 的抑制作用 由图 4 可知, 与空白组相比, 2 份空白培养基对 HepG2.2.15 细胞上清液中 HBV DNA 水平无明显降低作用 ($P > 0.05$)。GXIMD07366 (*Staphylococcus saprophyticus* subsp. *Saprophyticus*)、GXIMD07616 (*Pararhodobacter aggregans*)、GXIMD07384 (*Aestuuriabaculum suncheonense*)、GXIMD07550 (*Demequina salsinemoris*) 和 GXIMD07445X (*Erythrobacter citreus*) 能显著降低 HepG2.2.15 细胞上清液中 HBV DNA 水平 ($P < 0.05$), 抑制率分别为 51%、47%、63%、52%、47%, GXIMD07384 的抗乙肝病毒效果最为显著, 与 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 阳性药物 3TC 作用相比, 细胞上清液中 HBV DNA 水平均有极显著降低 ($P < 0.01$)。

2.3 GXIMD07384 代谢产物的分析

GXIMD07384 (*Aestuuriabaculum* sp.) 为潜在新物种, 其代谢产物能显著抑制 HepG2.2.15 中 HBV DNA 复制。利用 LC-HRMS 分析其主要代谢产物, 初步鉴定了 4 个化合物, 保留时间分别为 3.8、11.7、14.5、26.1 min, 分子离子峰依次为 $[M+H]^+$ 268.104 7、245.095 7、395.181 9 和 243.089 6, 结合各色谱峰的二级质谱图碎片信息, 经与文献

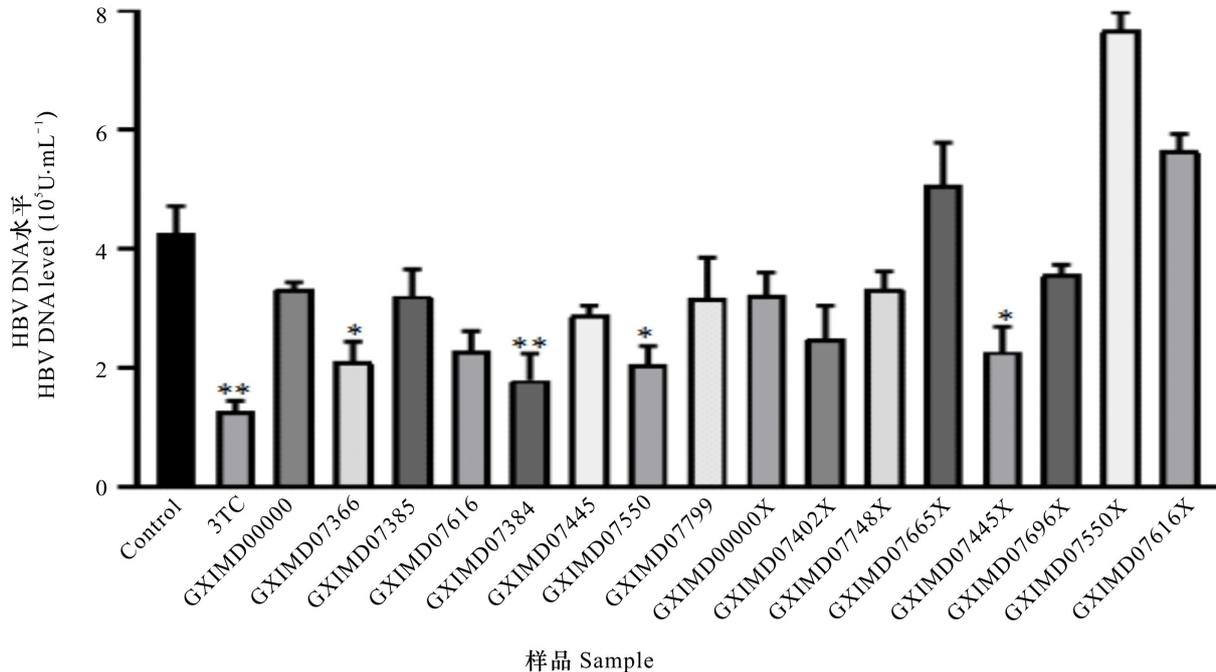
表 2 样品对 HepG2.2.15 细胞增殖的影响 (平均值 \pm 标准差, $n=3$)Table 2 Proliferation effects of samples on HepG2.2.15 cells ($x \pm s$, $n=3$)

样品 Sample	细胞存活率 Cell viability (%)	细胞抑制率 Cell inhibition rate (%)
Control	100.00 \pm 4.46	—
3TC	95.21 \pm 3.97	4.79
GXIMD00000	102.23 \pm 6.85 Δ	—
GXIMD07445	100.41 \pm 3.51 Δ	—
GXIMD07616	103.63 \pm 3.63 Δ	—
GXIMD07550	120.26 \pm 4.62** Δ	—
GXIMD07696	83.99 \pm 15.28**	16.01
GXIMD07665	71.86 \pm 2.65**	28.14
GXIMD07748	89.10 \pm 4.70*	10.90
GXIMD07526	76.24 \pm 0.81**	23.76
GXIMD07363	60.69 \pm 3.98**	39.31
GXIMD07385	94.70 \pm 8.15 Δ	5.30
GXIMD07387	78.74 \pm 1.24**	21.26
GXIMD08246	52.93 \pm 2.04**	47.07
GXIMD07402	85.12 \pm 2.51*	14.88
GXIMD07366	94.27 \pm 2.26 Δ	5.73
GXIMD07384	109.48 \pm 2.04** Δ	—
GXIMD07490	69.60 \pm 1.54**	30.40
GXIMD07799	95.71 \pm 0.96 Δ	4.29
GXIMD00000X	99.13 \pm 2.14 Δ	0.70
GXIMD07445X	99.34 \pm 3.08 Δ	0.66
GXIMD07616X	104.56 \pm 2.18 Δ	—
GXIMD07550X	110.19 \pm 1.92** Δ	—
GXIMD07696X	97.04 \pm 11.67 Δ	2.96
GXIMD07665X	104.89 \pm 3.46 Δ	—
GXIMD07748X	91.31 \pm 4.54 Δ	8.69
GXIMD07526X	84.84 \pm 2.44*	15.16
GXIMD07784X	87.17 \pm 2.71*	12.83
GXIMD07402X	107.80 \pm 6.72** Δ	—

注: 与空白对照组比较, *表示差异显著 ($P < 0.05$), **表示差异极显著 ($P < 0.01$); Δ 表示对细胞无毒副作用组; — 表示细胞抑制率为负值。

Note: * indicates significant difference ($P < 0.05$), ** indicates extremely significant difference ($P < 0.01$), compared with blank control group; Δ indicates a group of non-toxic side effects; — indicates the cell inhibition rate is negative.

比对, 初步推断化合物为 adenosine (Kuchkarova et al., 2020)、cyclo(L-Pro-L-OMet) (Yang et al., 2013)、



与空白对照组比较, *表示差异显著($P<0.05$), **表示差异极显著($P<0.01$)。

* indicates significant difference ($P<0.05$), ** indicates extremely significant difference ($P<0.01$), compared with blank control group.

图 4 细菌代谢产物对 HepG2.2.15 细胞上清液中 HBV DNA 的影响

Fig. 4 Effects of bacterial metabolites on HBV DNA in supernatant of HepG2.2.15 cell

acremine G (Arnone et al., 2008) 和 7,8-dimethylbenzo [g]pteridine-2,4(1H,3H)-dione (杨建香, 2015)。

3 讨论与结论

红树林蕴藏着丰富而独特的微生物资源,微生物物种多样性的研究,是红树及微生物资源利用的重要内容。然而,海洋中绝大多数微生物尚不能被现有的培养方法和技术进行分离培养,出现这种现象的一个重要原因是天然环境中很多微生物处于休眠状态,该状态是微生物在长期的进化过程中逐渐形成的可逆的低代谢活力的生存模式 (Mu et al., 2018)。由于芽孢杆菌属菌株产淀粉酶、蛋白酶、葡聚糖、纤维素酶和几丁质酶等多种生物活性酶,与红树生态系统中高有机质环境相适应,因此其生长状态较为活跃,是红树可培养细菌中研究的优势菌属 (孙倩和林海鹏, 2015; 赵雅慧等, 2018)。本研究对木榄生物样品中可培养细菌进行分离鉴定,共获得细菌 59 株,隶属于 36 属,其中芽孢杆菌属为优势菌属。此次实验得到

了物种多样性较为丰富的红树细菌,包括 3 株潜在新物种,隶属于 *Pseudoceanicola*、*Thioclava* 和 *Aestuariibaculum* 属,目前报道 *Aestuariibaculum* 属细菌仅有 3 种 (Jeong et al., 2013; Lee et al., 2013; Jiwon et al., 2018),均分离自海洋生境,从而扩充了红树微生物资源。随着科技进步,自然环境营养成分的检测以及宏基因组测序技术的发展和复苏机制的探讨,可为培养技术提供借鉴,从而发掘出更为丰富的微生物。

红树微生物具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化等多种生物活性,是活性天然产物的重要来源 (洪葵, 2013)。不同红树的微生物类群存在差异,微生物在与宿主植物的长期互作过程中交换信息和遗传物质,从而有着类似或相同的代谢途径,生成相同或相似的活性代谢产物 (王景仪等, 2020)。本课题组前期研究从木榄植物中分离得到抗乙肝病毒活性化合物,本研究以转染 HBV 的 HepG 2.2.15 细胞株为模型,发现 5 株细菌在药物浓度为 $125 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,能显著降低细胞上清液中 HBV DNA 水平,5 株活性菌株分别隶属于 *Staphylococcus*、

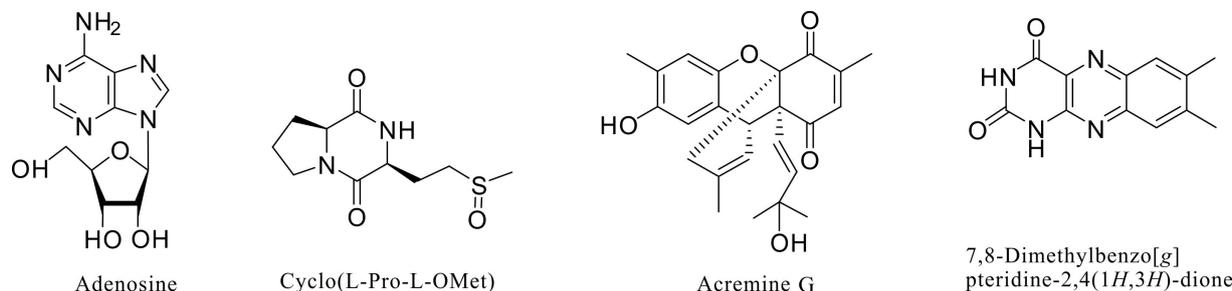


图 5 活性菌株 GXIMD07384 中 4 个次级代谢产物结构

Fig. 5 Structures of four secondary metabolites in active strain GXIMD07384

Pararhodobacter、*Aestuuriibaculum*、*Demequina* 和 *Erythrobacter*、*Aestuuriibaculum* 属菌株抗乙型肝炎病毒活性效果极为显著,木榄植物和微生物均能产生抗乙型肝炎病毒活性物质。其中,*Staphylococcus* 属菌株被指出其基因簇 ISK-1 编码产生的一种免疫蛋白 NukH,在宿主免疫中具有协同作用(Sashihara et al., 2013)。*Aestuuriibaculum* 属菌株作为稀有菌属的潜在新菌株,抗乙型肝炎病毒活性效果显著,说明在发酵过程中产生了抑制乙型肝炎病毒的强活性代谢产物,因此得到了更多关注。通过高分辨质谱数据初步鉴定了 4 个主要代谢产物为 adenosine、cyclo(L-Pro-L-OMet)、acremine G 和 7,8-dimethylbenzo[g]pteridine-2,4(1H,3H)-dione。其中,adenosine 作为核苷类化合物,已被证实在体外细胞实验中具有抗乙型肝炎病毒活性,EC₅₀ 值为 1.5 μmol · L⁻¹(董春红和常俊标,2005)。活性菌株浓度为 125 μg · mL⁻¹,其抑制率达到 63%,抗病毒效果强于 adenosine,可能因为该菌株代谢产物中含有其他活性成分,二者协同发挥抗病毒作用。然而,其活性菌株的代谢产物和作用机制仍有待进一步研究,植物和微生物的生态学关系也有待进一步探索。

木榄生境中可培养细菌及抗乙型肝炎病毒活性研究内容的开展,为抗乙型肝炎病毒活性药物的发掘提供了新的药用来源,进一步完善了药用红树木榄的微生物物种及其药用价值。

参考文献:

- ARNONE A, NASINI G, PANZERI W, et al., 2008. Acremine G, dimeric metabolite from cultures of *Acremonium byssoides* A20 [J]. *J Nat Prod*, 71(1): 146–149.
- DING L, MAIER A, FIEBIG HH, et al., 2011. Divergolides A-D from a mangrove endophyte reveal an unparalleled plasticity in ansa-macrolide biosynthesis [J]. *Angew Chem Int Ed*, 50(7): 1630–1634.
- DONG CH, CHANG JB, 2005. Advances in L-nucleoside anti-HIV and anti-HBV agents [J]. *Prog Chem*, 17(5): 916–923. [董春红, 常俊标, 2005. L-核苷类抗 HIV、HBV 活性化合物研究进展 [J]. *化学进展*, 17(5): 916–923.]
- HONG K, 2013. Research progress of mangrove actinomycetes and their natural products [J]. *Acta Microbiol Sin*, 53: 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: 1131–1141.]
- JEONG SH, PARK MS, JIN HM, et al., 2013. *Aestuuriibaculum suncheonense* gen. nov., sp. nov., a marine bacterium of the family Flavobacteriaceae isolated from a tidal flat and emended descriptions of the genera *Gaetbulibacter* and *Tamlana* [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 63(1): 332–338.
- 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]. *Front Microbiol*, 9(4): 868–879.
- JIWON C, DONGWOOK L, HYEONG JJ, et al., 2018. *Aestuuriibaculum marinum* sp. nov., a marine bacterium isolated from seawater in South Korea [J]. *J Microbiol*, 56(9): 614–618.
- 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(1): 346–351.
- KIM OS, CHO YJ, LEE K, et al., 2012. Introducing EzTaxone; a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 62: 716–721.
- KUCHKAROVA NN, TOSHMATOV ZO, ZHOU S, et al., 2020. Secondary metabolites with plant growth regulator activity produced by an endophytic fungus *Purpureocillium* sp. from *Solanum rostratum* [J]. *Chem Nat Compd*, 56(4):

- 775-776.
- LEE JB, KIM BC, KIM H, 2013. *Aestuariibaculum scopimerae* sp. nov., isolated from the globular ghost crab, *Scopimera globosa* [J]. J Microbiol, 51(6): 736-740.
- LI F, GAO CH, YU L, et al., 2018. Diversity and antifungal activity of endophytic and rhizospheric bacteria isolated from *Ruppia maritima* [J]. Guihaia, 38(7): 924-933. [李菲, 高程海, 余炼, 等, 2018. 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, 38(7): 924-933.]
- LI F, HUANG SS, HU WJ, et al., 2021. Studies on endophytic and rhizosphere bacterial diversity and antifungal activity of semi-mangrove mango [J]. Chin J Antibiot, 46(5): 396-405. [李菲, 黄庶识, 胡文进, 等, 2021. 半红树植物海芒果内生与根际细菌多样性及抗农用真菌活性研究 [J]. 中国抗生素杂志, 46(5): 396-405.]
- LI M, GAO CH, JIANG S, et al., 2020. Diversity and anti-aging activity of endophytic bacteria from true mangrove plants collected from the west coast of Hainan [J]. Guihaia, 40(3): 311-319. [李蜜, 高程海, 姜舒, 等, 2020. 海南西海岸真红树林内生细菌多样性及其延缓衰老活性研究 [J]. 广西植物, 40(3): 311-319.]
- LIN XL, HETHARUA B, LIN L, et al., 2019. Mangrove sediment microbiome: adaptive microbial assemblages and their routed biogeochemical processes in Yunxiao Mangrove National Nature Reserve, China [J]. Microb Ecol, 78: 57-69.
- MU DS, LIANG QY, WANG XM, et al., 2018. Metatranscriptomic and comparative genomic insights into resuscitation mechanisms during enrichment culturing [J]. Microbiome, 6(1): 230-244.
- RAN XQ, ZHANG G, LI S, et al., 2017. Characterization and antitumor activity of camptothecin from endophytic fungus *fusarium solani* isolated from *Camptotheca acuminata* [J]. Afr Health Sci, 17(2): 566-574.
- RAZAVI-SHERAER D, GAMKRELIDZE I, NGUYEN MH, et al., 2018. Global prevalence, treatment, and prevention of hepatitis B virus infection in 2016: a modelling study [J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 3(6): 383-403.
- SARIN SK, 2016. Asian-Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatitis B: a 2015 update [J]. Hepatol Int, 10(1): 1-98.
- SASHIHAR T, KIMURA H, HIGUCHI T, et al., 2000. A novel lantibiotic, nukacin ISK-1, of *Staphylococcus warneri* ISK-1: cloning of the structural gene and identification of the structure [J]. J Agric Chem Soc Jpn, 64(11): 2420-2428.
- SHI H, HAN ZP, LIU J, et al., 2017. Comparing efficacy of lamivudine, adefovir dipivoxil, telbivudine, and entecavir in treating nucleoside analogues naïve for HBeAg-negative hepatitis B with medium hepatitis B virus (HBV) DNA levels [J]. Med Sci Monit, 23(1): 5230-5236.
- SUN Q, LIN HP, 2015. Research status of strains producing cellulase in mangrove environment [J]. Guangdong Chem Ind, 42(18): 119. [孙倩, 林海鹏, 2015. 红树林环境产纤维素酶菌株的研究现状 [J]. 广东化工, 42(18): 119.]
- WANG H, MEN PX, XIAO YF, et al., 2019. Hepatitis B infection in the general population of China: a systematic review and meta-analysis [J]. BMC Infect Dis, 19: 811.
- WANG JY, LI MQ, LI YR, et al., 2014. Research progress on diversity and biological function of endophytic fungi in medicinal plants [J]. Biotic Resour, 42(2): 164-172. [王景仪, 李梦秋, 李艳茹, 等, 2014. 药用植物内生真菌的多样性及生物功能研究进展 [J]. 生物资源, 42(2): 164-172.]
- 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.
- YANG JX, 2015. Metabolites of mangrove endophytic fungus Sk-2 from the South China Sea [J]. J Guilin Norm Coll, 29(4): 170-172. [杨建香, 2015. 南海红树林内生真菌 Sk-2 代谢产物研究 [J]. 桂林师范高等专科学校学报, 29(4): 170-172.]
- YANG XQ, YANG YB, ZHOU H, et al., 2013. New megastigmane glycoside and alkaloids from *Streptomyces* sp. YIM 63342 [J]. Nat Prod Res, 27(13): 1191-1196.
- YAN LL, HAN NN, ZHANG YQ, et al., 2010. Antimycin A18 produced by an endophytic *Streptomyces albidoflavus* isolated from a mangrove plant [J]. J Antibiot, 63(5): 259-261.
- YI XX, DENG JG, GAO CH, et al., 2015. Four new cyclohexylideneacetonitrile derivatives from the hypocotyl of mangrove (*Bruguiera gymnorrhiza*) [J]. Molecules, 20(8): 14565-14575.
- ZHANG EJ, KOSINSKA A, LU MJ, et al., 2015. Current status of immunomodulatory therapy in chronic hepatitis B, fifty years after discovery of the virus: Search for the "magic bullet" to kill cccDNA [J]. Antiviral Res, 123: 193-203.
- ZHANG S, HUANG SS, YANG JF, et al., 2016. First exploration of Jing nationality medicine [J]. Chin Nat Folk Med, 25(2): 1-2. [张帅, 黄思诗, 杨家福, 等, 2016. 京族医药初探 [J]. 中国民族民间医药, 25(2): 1-2.]
- ZHAO YH, ZHANG SL, WU JF, et al., 2018. Screening the diversity and activity of culturable bacteria isolated from mangrove rhizosphere soil at Shankou [J]. J Mar, 40(8): 138-151. [赵雅慧, 张舒琳, 吴家法, 等, 2018. 山口红树林根际土壤可培养细菌多样性及其活性筛选 [J]. 海洋学报, 40(8): 138-151.]
- ZHOU SQ, HUANG XL, HUANG DY, et al., 2010. A rapid method for extracting DNA from actinomycetes by Chelex-100 [J]. Biotechnol Bull, 22(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, 22(2): 123-125.]