

罗布麻内生细菌的 分离鉴定及抑菌活性

彭秋萍^{1,2},毛 涵^{2,3},代 飞²,杨智慧²,汤新慧^{1,2},薛 菲^{1,2,*}

(1.江苏省盐土生物资源研究重点实验室,江苏盐城 224051;

2.盐城师范学院海洋与生物工程学院,江苏盐城 224051;

3.南京工业大学生物与制药工程学院,江苏南京 211816)

摘 要:目的:研究罗布麻内生细菌及其抑菌活性,旨在深入开发新资源。方法:以红花罗布麻为研究对象,采用平板分离法从中分离内生细菌,利用牛津杯法对其发酵物进行抑菌活性研究,对有抑菌活性的菌株进行形态特征观察和16S rRNA序列同源性分析。结果:筛选出的D1菌株对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、藤黄微球菌和枯草芽孢杆菌四株供试指示菌均有明显的抑制作用,D3菌株对藤黄微球菌和枯草芽孢杆菌有一定的抑菌作用。结合菌株的形态学特征和16S rRNA序列同源性分析,将D1鉴定为假单胞菌,D3鉴定为菠萝泛菌。结论:罗布麻中蕴含着具有抑菌活性的内生细菌资源,可进一步的开发利用。

关键词:罗布麻,植物内生菌,抑菌活性

Isolation and identification of endophytic bacteria from *Apocynum venetum* L. and antibacterial activity

PENG Qiu-ping^{1,2}, MAO Han^{2,3}, DAI Fei², YANG Zhi-hui², TANG Xin-hui^{1,2}, XUE Fei^{1,2,*}

(1.Jiangsu Provincial Key Laboratory of Saline Bioresources, Yancheng 224051, China;

2.College of Ocean and Biological Engineering, Yancheng Teachers University, Yancheng 224051, China;

3.College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Technology University, Nanjing 211816, China)

Abstract: Objective: To study the endophytic bacteria from *Apocynum venetum* L. and their antibacterial activity in order to find novel resources. Methods: Endophytic bacteria were isolated from *Apocynum venetum* L. by using the method of plate cultivation, and the antibacterial activity of the fermented metabolites was studied by the Oxford Cup method. Meanwhile, the target endophytic bacteria were identified by 16S rRNA sequence homologous analysis combined with their physiological and biochemical characteristics. Results: The fermentation broths of endophytic bacteria showed different antibacterial activity. The strain D1 had inhibitory effect on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus lutea* and *Bacillus subtilis*, the strain D3 had inhibitory effect on *Micrococcus lutea* and *Bacillus subtilis*. The D1 was identified to be *Pseudomonas hunanensis*, and D3 was identified to be *Pantoea ananatis*. Conclusion: The results showed that *Apocynum venetum* L. contains abundant endophytic bacteria resources with antibacterial activity, which could be further developed and utilized.

Key words: *Apocynum venetum* L.; endophyte; antibacterial activity

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2018)05-0106-05

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2018.05.020

植物内生菌泛指一切生活在植物体内而不使植物组织显示出明显感染症状的腐生、寄生微生物^[1-2],主要包括内生细菌、内生真菌和内生放线菌,普遍存在于各种药用植物中^[3]。内生菌与宿主植物在长期进化过程中,相互之间形成了复杂的内共生关系,使其存在于植物各组织和器官内,并参与到植

物生长的各个阶段,具备了产生与宿主植物的活性代谢产物相同或相似化合物的能力^[4]。现有的研究表明,植物内生菌分布广、种类多,并且能产生许多生理活性物质,在农业和医药方面具有很大的研究价值^[5],具有良好的开发利用前景。

江苏沿海的红花罗布麻(*Apocynum Venetum*

收稿日期:2017-07-06

作者简介:彭秋萍(1994-),女,本科,研究方向:食品微生物,E-mail:1037668588@qq.com。

*通讯作者:薛菲(1981-),女,硕士,讲师,主要从事微生物学方面的研究,E-mail:yingmufeixue@126.com。

基金项目:江苏省盐土生物资源研究重点实验室开放课题(JKLBS2013010);盐城师范学院自然科学基金项目(16YCKLQ003);国家级大学生创新训练计划项目(201610324003);江苏省“青蓝工程”科技创新团队项目。

Linn)是一种盐碱地指示植物,野生于沿海盐碱洼地,具有清热泻火、平肝熄风、养心安神、利尿消肿的作用,是十分宝贵的野生药用植物资源。近年来国内外关于罗布麻的研究主要集中在其耐盐机理^[6]、引种栽培驯化技术^[7]、纤维资源利用^[8-9]和活性成分药用价值^[10-12]等方面,对其内生菌筛选的研究较少。

本文以盐城滩涂丹顶鹤自然保护区采到的野生罗布麻为材料,分离筛选其内生细菌,鉴定并研究其抑菌能力,为筛选出具有产生药用价值代谢产物能力的菌种,为有效地开发利用和保护本地地区的罗布麻内生菌资源提供参考。

1 材料与方法

1.1 原料与仪器

罗布麻 采于江苏盐城滩涂丹顶鹤自然保护区;供试指示菌:A: *Escherichia coli* (大肠杆菌)、B: *Staphylococcus aureus* (金黄色葡萄球菌)、C: *Micrococcus lutea* (藤黄微球菌)、D: *Bacillus subtilis* (枯草芽孢杆菌) 中国菌种保藏中心;无水乙醇、次氯酸钠溶液、硫代硫酸钠等 均为国产化学纯,购于江苏彤晟化学试剂有限公司;1,1-二苯基-2-苦基肼自由基(DPPH) 购于上海蓝季生物;营养琼脂(NA培养基)、LB肉汤培养基、琼脂粉 购于杭州百思生物技术有限公司;PCR所用Buffer、dNTP、Taq酶等 购自大连宝生物工程有限公司。

立式压力蒸汽灭菌器、电热恒温培养箱 上海博逊实业有限公司医疗设备厂;TGL-16gR高速冷冻离心机 上海安亭科学仪器厂;EI204电子分析天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;超净工作台、JJ-2组织捣碎机、PHS-3C精密酸度计 上海康华生化仪器制造有限公司;HH-6数显恒温水浴锅 金坛市三和仪器有限公司;DHG-9023A液晶鼓风干燥箱 太仓市华丽达实验设备有限公司;WFJ2000可见分光光度计 尤尼柯(上海)仪器有限公司;DYY-12型电泳仪 上海京工实业有限公司;PCR仪 上海赛默科技发展有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 内生菌的分离 将采集的新鲜罗布麻根、茎样品冲洗,无菌条件下剥去韧皮部,在超净工作台上按如下程序进行表面消毒:5%次氯酸钠浸5~10 min后2.5%硫代硫酸钠浸10 min,无菌水冲洗后用75%的乙醇浸3~5 min,无菌水冲洗6次。样品经前述处理后用无菌研钵磨碎并依次稀释到10⁻¹至10⁻⁴浓度,取100 μL 10⁻²至10⁻⁴浓度的稀释液,涂布于NA培养基37℃培养,观察,待平板长出菌落后反复多次分离和纯化,得到典型单菌落后斜面(营养琼脂培养基)及甘油管分别贮藏;另外取最后清洗样本的无菌水100 μL涂布NA培养基,37℃培养48 h以验证表面消毒是否彻底^[13-15]。

1.2.2 抑菌活性研究 采用牛津杯法^[16]作抑菌活性研究。将供试指示菌(A.大肠杆菌,B.金黄色葡萄球菌,C.藤黄微球菌,D.枯草芽孢杆菌)在无菌操作下接入100 mL LB液体培养基上,37℃,160 r/min振荡培养18 h后,在超净工作台中吸取200 μL菌悬液,

用涂布棒将其均匀涂布于新鲜的LB固体培养基上,在每个平板的适当位置放置三个灭过菌的牛津杯,牛津杯中加入150 μL活化的内生菌发酵液,每个菌两个重复。37℃培养24 h后取出观察并测量其抑菌圈的直径。

1.2.3 内生细菌形态学观察、培养特征和生理生化特征鉴定 将内生细菌划线接种至NA固体培养基上,37℃培养48 h,参照《伯杰氏细菌鉴定手册》^[17]和《常见细菌系统鉴定手册》^[18]等观察菌落形态,并进行生理生化实验。

1.2.4 生长曲线测定 将已分离纯化的菌株接种于LB液体培养基中,37℃振荡活化培养18 h后待用。吸取4 mL转接于已编号的LB液体培养基中,同样条件下培养,在0、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、24、28 h时分别测其OD₆₂₅值,测量时以未接菌的LB液体培养基为对照,每次三重复,取平均值。以培养时间为横坐标,OD₆₂₅值为纵坐标,绘制生长曲线^[19]。

1.2.5 菌株的16S rRNA基因序列的扩增及测定 将纯化后的菌株按照常规方法^[20]进行PCR进行扩增。采用引物为:27f(5'-AGAGTTTIGATCC TGGCTCAG-3')和1492r(5'-AAGGAGGTGATCC AGCCGCA-3')。扩增后将产物送至上海生物工程技术服务有限公司测序。将序列信息输入NCBI数据库进行BLASTN分析。

2 结果与分析

2.1 内生细菌的分离筛选

采用组织表面消毒法后,对罗布麻进行内生细菌的分离,共获得8株内生细菌,其中从根中分离得到5株分别编号为D1、D2、D3、D4和D5,从茎中分离得到3株,分别编号为D6、D7和D8,说明在罗布麻不同组织部位存在大量的内生细菌。

2.2 内生细菌发酵液的抑菌实验结果

筛选出的8株罗布麻内生细菌的抑菌实验测定结果见表1,图1是表1中出现抑制圈的对应平板结果图。

表1 八株内生细菌对指示菌的抑菌活性测试结果

Table 1 The results of antibacterial activity of eight endophytic bacteria on the indicato bacteria

菌株编号	供试指示菌			
	A	B	C	D
D1	++	++	++	++
D2	-	-	-	-
D3	-	-	+	+
D4	-	-	-	-
D5	-	-	-	-
D6	-	-	-	-
D7	-	-	-	-
D8	-	-	-	-

注:“-”表示无抑菌圈;“+”表示抑菌圈直径15~20 mm;“++”表示抑菌圈直径20~25 mm;“+++”表示抑菌圈直径>25 mm。

由表1可知,菌株D1对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、藤黄微球菌和枯草芽孢杆菌四株供试指示菌

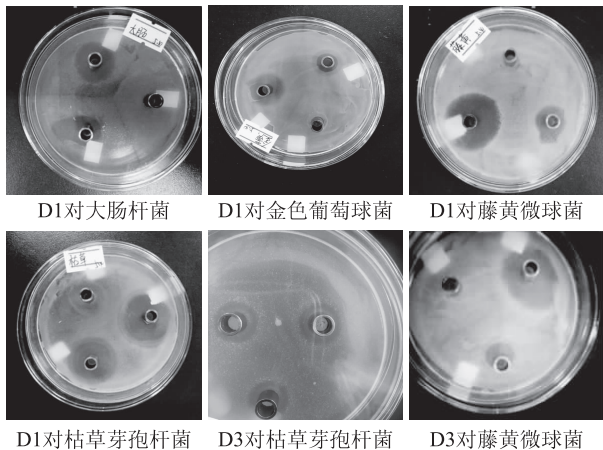


图1 部分菌株的抑菌活性结果

Fig.1 The results of antibacterial activity of some strains

均有明显的抑制作用,D3 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌没有抑菌作用,对藤黄微球菌和枯草芽孢杆菌有一定的抑菌作用,其余菌株则对四株供试指示菌均没有抑菌作用,故选定 D1 和 D3 进行进一步研究。

2.3 菌株 D1 和 D3 的鉴定

2.3.1 菌株的形态特征 菌株在 NA 固体培养基上 37℃培养 48 h 后,D1 菌株的菌落呈圆形,乳白色,中间隆起,干燥,有明显的双圈,D3 菌株的菌落呈圆形,淡黄色,中心突起,表面湿润,见图 2。

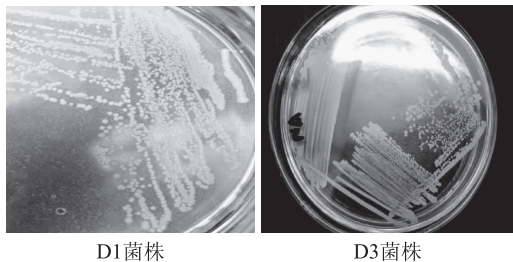


图2 菌株 D1 和 D3 的菌落形态

Fig.2 Colony morphology of the strains D1 and D3

2.3.2 D1 和 D3 的生理生化实验结果 菌株 D1 和 D3 的生理生化实验结果如表 2 所示。

表2 菌株的生理生化实验结果
Table 2 The results of physiological and biochemical experiments of strains

实验项目	菌株	
	D1	D3
D-葡萄糖发酵	产酸不产气	产酸不产气
淀粉水解	+	+
明胶液化	-	-
H ₂ S 的产生	-	-
吲哚实验	-	-
V.P 实验	+	+
M.R 实验	-	-
过氧化氢酶活性检测	+	+

由表 2 可知,菌株 D1、D3 能利用 D-葡萄糖产酸但不产气,能水解淀粉但不能液化明胶,不能产 H₂S 也不能生成吲哚,V.P 实验和过氧化氢酶反应阳性而

M.R 实验阴性。

2.3.3 D1 和 D3 的生长曲线 菌株 D1 和 D3 的生长曲线如图 3 所示。

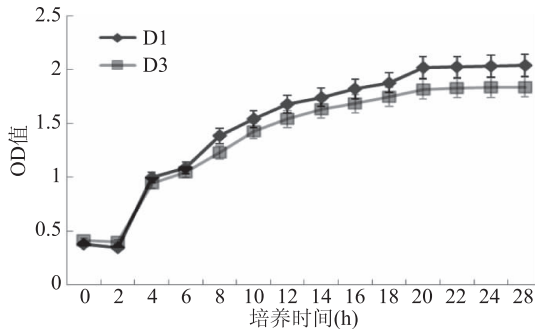


图3 菌株 D1 和 D3 的生长曲线

Fig.3 Growth curves of strains D1 and D3

由图 3 可知,D1 和 D3 菌株在 2 h 内处于延缓期,2~20 h 内处于对数生长期,20 h 到 28 h 趋于平稳达到平稳期。D1 菌株的长势比 D3 菌稍好。

2.3.4 菌株的 16S rRNA 基因序列的扩增 将 D1 和 D3 菌株的 DNA PCR 扩增后得到的 DNA 片段进行电泳。其中,M 泳道是 5000 bp Marker (DNA meter S),第 1~4 泳道是 D1,第 5~8 泳道是 D3,结果如图 4 所示。由图 4 可知,D1 和 D3 两株菌的 DNA 均为 1000~1500 bp 左右。

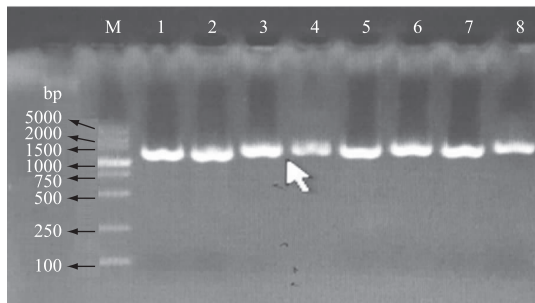


图4 菌株 D1 和 D3 的 DNA 扩增产物电泳图

Fig.4 The DNA amplification products electrophoresis of strains D1 and D3

2.3.5 罗布麻内生菌的系统发育树 对于从罗布麻中分离到的内生菌株 D1 和 D3,利用邻接法构建其 16S rRNA 基因系统发育树,结果如图 5 和图 6 所示。

由图 5 可知,菌株 D1 与 *Pseudomonas* 属的亲缘关系最近,与 *Pseudomonas hunanensis* LV^T 的同缘性为 99.7%,与 *Pseudomonas* sp.ATH-43 的同缘性为 99.5%,与 *Pseudomonas* sp.KT2440 的同缘性为 99.3%。结合其形态特征和生理生化特征,将其鉴定为假单胞菌(*Pseudomonas hunanensis*)。

由图 6 可知,菌株 D3 与 *Pantoea* 属的亲缘关系最近,与 *Pantoea ananatis* LMG 2665^T 的同缘性为 99.2%,与 *Pantoea conspicua* LMG 24534^T 的同缘性为 98.8%,与 *Pantoea vagans* LMG 24199^T 的同缘性为 98.7%。结合其形态特征和生理生化特征,将其鉴定为菠萝泛菌(*Pantoea ananatis*)。

3 结论

从采集于江苏沿海的野生红花罗布麻根和茎中

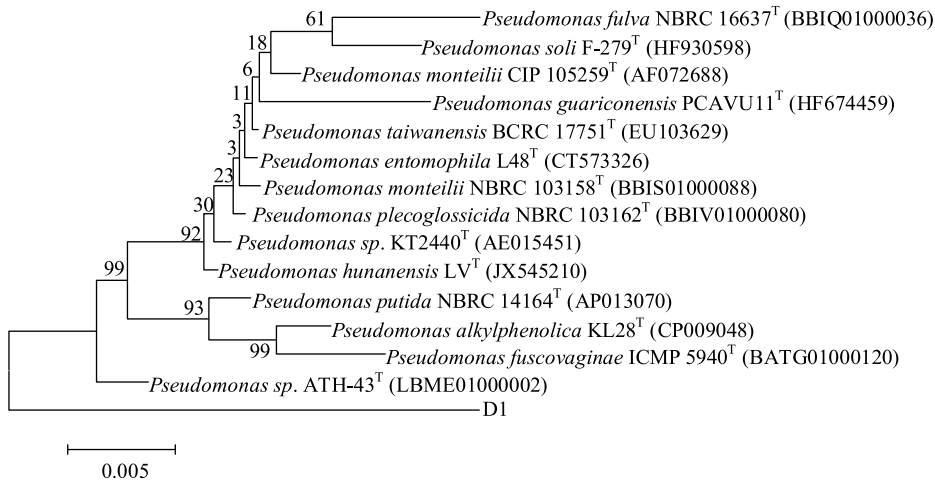


图5 菌株 D1 的系统发育进化树

Fig.5 Phylogenetic tree of strain D1

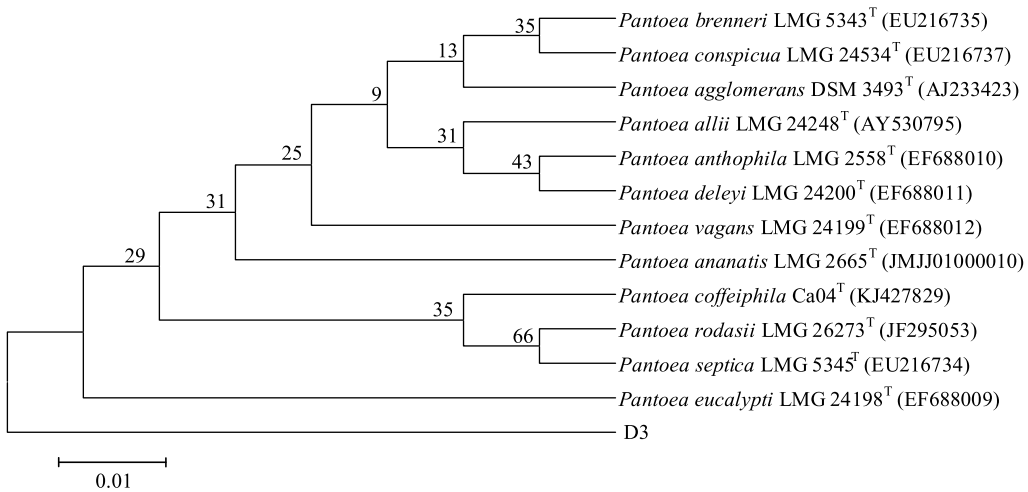


图6 菌株 D3 的系统发育进化树

Fig.6 Phylogenetic tree of strain D3

共分离得到 8 株内生细菌,利用牛津杯法对其进行抑菌活性研究,发现 D3 菌株对藤黄微球菌和枯草芽孢杆菌有一定的抑菌作用,D1 菌株对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、藤黄微球菌和枯草芽孢杆菌四株供试指示菌均有抑制作用,且抑菌能力较强。采用 16S rRNA 基因序列对分离出的 D1 和 D3 菌株进行分子生物学鉴定,结合其形态特征和生理生化特征,将其分别鉴定为假单胞菌(*Pseudomonas hunanensis*)和菠萝泛菌(*Pantoea ananatis*)。

由本实验可知,由野生红花罗布麻根和茎中筛选出的内生细菌 D1 和 D3 具有一定的抑菌活性,本研究仅对其做了初步的探讨,其发酵液中的活性成分如何提取、产量与发酵条件之间有无关系以及活性成分能否作为药用资源开发利用等均有待进一步研究。

参考文献

[1] Mei-ling Yao. A novel biotransformation of astragalosides to astragaloside IV with the deacetylation of fungal endophyte *Penicillium canescens* [J]. *Process Biochemistry*, 2014, 49 (5) : 807-812.

[2] 戴传超,余伯阳,徐增莱,等.环境因子对乌相内生真菌生长及脂肪酸的影响[J].*应用生态学报*,2003,14(9):1525-1528.

[3] Oono R, Lefèvre E, Simha A, et al. A comparison of the community diversity of foliar fungal endophytes between seedling and adult loblolly pines (*Pinus taeda*) [J]. *Fungal Biology*, 2015, 119(10):917-928.

[4] Strobel Gary A. Endophytes as sources of bioactive products[J]. *Microbes and infection/Institut Pasteur*, 2003, 5(6): 535-544.

[5] 黄晓辉,李珊,谭周进,等.植物内生放线菌研究进展[J]. *生物技术通报*, 2008(1):42-46.

[6] 石秋梅,邓翻云,吴敏言,等.罗布麻和大叶白麻种子萌发及幼苗生长耐盐性研究[J]. *北方园艺*, 2014(12):128-133.

[7] 陈敏,赵学勇,左小安,等.荒漠生境罗布麻(*Apocynum venetum*)传粉生物学比较[J]. *中国沙漠*, 2016, 36(1):124-130.

[8] 王莉,张健飞,巩继贤,等.罗布麻纤维的微观结构及其力学性能研究[J]. *上海毛麻科技*, 2012(1):2-5.

[9] Han G, Wang L, Liu M, et al. Component analysis and microfiber arrangement of *Apocynum venetum* fibers: The MS and AFM study[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2008, 72(4):652-656.

(下转第 118 页)

and the role of Methionine, restriction in growth control and life-span extension[J]. Cancer Treat Rev, 2012, 38(6): 726-736.

[5] 夏立亮, 于源华, 薛冉, 等. L-蛋氨酸 γ -裂解酶的研究进展[J]. 生物技术通报, 2009(10): 70-74.

[6] Park MS, Patel SR, Ludwig JA, et al. Activity of temozolomide and bevacizumab in the treatment of locally advanced, recurrent, and metastatic hemangiopericytoma and malignant solitary fibrous tumor[J]. Cancer, 2011, 117(21): 4939-4947.

[7] 龚娇, 田长富. 蛋氨酸依赖性对肿瘤生长抑制的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2017, 25(3): 499-501.

[8] 王琳, 王馨. 靶向时代肿瘤疗效评价标准的探索[J]. 中国肿瘤临床, 2015, 42(6): 366-370.

[9] Fabien Gay, Karine Aguer, Karine Sénéchal, et al. Methionine tumor starvation by erythrocyte-encapsulated methionine gamma-lyase activity controlled with per os vitamin B6[J]. Cancer Medicine, 2017, 6(6): 1437-1452.

[10] 姚健. 蛋氨酸裂解酶的真核表达及其应用[D]. 长春: 长春理工大学, 2012.

(上接第 109 页)

[10] 俞莹, 薛菲, 刘顺刚, 等. 响应面法优化提取罗布麻可溶性膳食纤维的工艺研究[J]. 食品工业, 2016(2): 39-42.

[11] 吴冬青, 杨昕劼, 安红钢, 等. 响应面法优化罗布麻叶黄酮提取工艺研究[J]. 食品工业科技, 2011(5): 327-329.

[12] 麻浩, 郁崇文, 粟建光, 等. 罗布麻的研究现状与开发利用[J]. 中国麻业科学, 2017(3): 146-152.

[13] 秦盛, 赵立兴, 陈云, 等. 药用植物内生放线菌的分离、筛选及活性菌株 YIM 61470 鉴定[J]. 微生物学通报, 2009, 36(11): 1693-1699.

[14] 许然. 59 种药用植物内生菌的分离、鉴定及 PQQ 产生菌的筛选[D]. 保定: 河北大学, 2013.

[15] 何劲, 雷帮星, 康冀川, 等. 石斛抗真菌内生细菌的筛选及其抗菌特性的初步研究[J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2009, 31(6): 92-96.

(上接第 112 页)

[J]. 徐州医学院学报, 2002, 22(2): 148-151.

[3] 王晓霖, 杨靖亚, 刘建文. 壳聚糖衍生物在抗肿瘤方面的研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2008, 13(8): 952-956.

[4] 孙晓婷, 马建伟. 医用壳聚糖敷料研究进展[J]. 产业用纺织品, 2015(7): 1-5.

[5] 杨靖亚, 刘建文, 刘承初, 等. 羧甲基壳聚糖对人高转移肺癌细胞-95-D 增殖能力和体外转移能力的抑制作用[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2006, 11(6): 640-643.

[6] 邓守恒, 孙各琴, 周有利, 等. 单独和合用硒化壳聚糖与阿霉素对 K562 细胞作用的研究[J]. 广东微量元素科学, 2005, 12(3): 14-16.

[7] 杨靖亚, 王晓霖, 张建. 羧甲基壳聚糖与阿霉素联合用药的体外抗肿瘤作用[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2009, 14(11): 1253-1258.

[8] Chen ZY, Zhu QY, Wong YF, et al. Stabilizing effect of ascorbic acid on green tea catechins[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46(7): 2512-2516.

[11] 李慧贤, 杜纪坤, 黄雅丽, 等. 一个深海甲硫氨酸 γ -裂解酶基因及其产物特征[R]. 中国酶工程学术研讨会, 2011.

[12] 谢鹏, 梁淑娃, 秦鹏, 等. 甲硫氨酸 γ -裂解酶效价测定方法的研究[J]. 今日药学, 2016(3): 162-164.

[13] Agarabi C, Schiel E, Lute S, et al. Bioreactor process parameter screening utilizing a Plackett-Burman design for a model monoclonal antibody[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015, 104(6): 1919-1928.

[14] PS Dayana, AK Bakthavatsalam. Optimization of phenol degradation by the microalga Chlorella pyrenoidosa using Plackett-Burman Design and Response Surface Methodology[J]. Bioresource Technology, 2016, 207: 150-156.

[15] Dwivedi, Sharma. Application of Box-Behnken design in optimization of biodiesel yield from Pongamia oil and its stability analysis[J]. Fuel, 2015, 145(18): 256-262.

[16] Ferreira, Bruns, Ferreira, et al. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods[J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 597(2): 179.

2009, 31(6): 92-96.

[16] 何舟, 陈新, 杨桃, 等. 箬叶中抑菌成分的提取及抑菌实验[J]. 武汉工业学院学报, 2013(1): 35-39.

[17] Bergey D H, Harrison F C, Breed R S, et al. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. BAILLIERE, TINDALL & COX, 1957.

[18] 蔡妙英, 东秀珠. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.

[19] 李刚, 尹志刚, 陈振, 等. 拮抗细菌 EBS05 生长曲线及粗提物抑菌活性测定[J]. 浙江农业科学, 2015, 56(3): 369-372.

[20] Kameyama A, Matsuno Y K. Supported Molecular Matrix Electrophoresis[J]. Methods in Molecular Biology, 2015, 1314: 303-311.

[9] 戴体俊. 合并用药的定量分析[J]. 中国药理学通报, 1998, 14(5): 479-480.

[10] Kim DY, Kim MJ, Kim HB, et al. Suppression of multidrug resistance by treatment with TRAIL in human ovarian and breast cancer cells with high level of c-Myc[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 2011, 1812(7): 796-805.

[11] Wang JX, Zhang YZ, Wang ST, et al. Bioinspired colloidal photonic crystals with controllable wettability[J]. Accounts of Chemical Research, 2011, 44(6): 405-415.

[12] Jadidi-Niaragh F, Atyabi F, Rastegari A, et al. Downregulation of CD73 in 4T1 breast cancer cells through siRNA-loaded chitosan-lactate nanoparticles[J]. Tumour Biology: the Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, 2016, 37(6): 8403-8412.

[13] Price JE. Clonogenicity and experimental metastatic potential of spontaneous mouse mammary neoplasms[J]. Journal of the National Cancer Institute, 1986, 77(2): 529-535.