

# 新疆圆柏叶内生菌的分离及其抑菌特性研究

祖丽皮亚·玉努斯

(新疆大学生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046)

**摘 要:** 对新疆圆柏叶内生菌进行分离, 确定分离条件, 分离纯化得到 7 株菌株, 采用打孔法对这 7 株菌的发酵液进行抑菌实验。结果表明: 其中两株菌的发酵液对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌呈现较强的抑菌活性。通过形态学观察和革兰氏染色, 确定 1 号菌株为革兰氏阳性球菌, 2 号菌株为革兰氏阴性球菌, 均无荚膜, 无芽孢, 不产酸, 不产气, 淀粉水解为阴性。

**关键词:** 新疆圆柏; 内生菌; 分离; 抑菌活性

Isolation of Preliminary Study on Endophytic Bacteria in *Sabina vulgaris* Ant. with Antibacterial Activity

Zulfiya YUNUS

(College of Life Sciences and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

**Abstract:** Seven bacteria strains were isolated from leaves of *Sabina vulgaris* Ant, and antibacterial activity of their fermentation products were evaluated according to the size of their antibacterial circles. Totally 2 endophytic bacterium exhibited antibacterial activity, which could inhibit the growth of *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. Colonial morphology observation and Gram staining of the 2 endophytic bacterium showed that one bacteria was coccus shaped, gram-positive, and the other was coccus shaped and gram-negative, both without capsule and spore, and without producing acid and amylase.

**Key words:** *Sabina vulgaris* Ant; endophytic bacteria; isolation; antibacterial activity

中图分类号: Q933

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)23-0294-03

内生菌是指那些在其生活史中的某一段时期生活在植物组织内, 对植物组织没有引起明显病害症状的菌。该定义还包括了那些在其生活史中的某一阶段表面寄生的腐生菌, 对宿主暂时没有伤害的潜伏性病原菌和根菌, 泛指一切生活在植物体内的腐生、寄生和共生的真菌、细菌、放线菌等微生物<sup>[1]</sup>。

新疆圆柏(*Sabina vulgaris* Ant.)为柏科(*Cupressaceae*)圆柏属(*Juniperus*)常绿匍匐灌木, 少数为乔木, 亦称沙地柏、叉子圆柏、双子柏、天山圆柏、爬地柏、砂地柏<sup>[2]</sup>。在新疆主要分布于阿尔泰山和天山山区的亚高山地带<sup>[3]</sup>。新疆圆柏的枝叶与种子可以入药, 主治风湿性关节炎、类风湿性关节炎、布氏杆菌病、皮肤瘙痒、小便不利、迎风流泪、视物不清、头痛等<sup>[4]</sup>。

在内生菌研究方面 Fernando 等<sup>[5]</sup>从圆柏属植物叶片中分离了内生真菌, 其产物具有很强的抗真菌活性。Amardeep 等<sup>[6]</sup>首次从圆柏属植物诱导组织中分离了抗肿瘤药物鬼臼毒素的内生真菌并用 HPLC、LC-MS 和 LC-

MS-MS 等仪器对其发酵产物进行了定性定量研究。但是, 关于新疆圆柏内生菌的研究尚未见报道。因此, 本实验对新疆圆柏的内生菌进行研究, 以期为其内生菌资源的开发利用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

新疆圆柏(*Sabina vulgaris* Ant.)采自新疆乌鲁木齐南山。

青霉素(化学纯) 哈尔滨制药总厂; 升汞(分析纯); 乙醇(分析纯);  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 结晶紫; 碘液; 番红; 孔雀绿。

### 1.2 菌种

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)均为本校微生物教研室保存菌种。

收稿日期: 2009-02-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(30560004); 新疆大学青年教师科研启动基金项目(QN040122)

作者简介: 祖丽皮亚·玉努斯(1970—), 女, 副教授, 硕士, 研究方向为微生物学。E-mail: zulfiya\_yunus@126.com

### 1.3 仪器与设备

LDZX-4DBI 型立式电热压力蒸汽灭菌锅、HH-5 型水浴锅、THZ-82 型恒温振荡培养箱、SPX 型智能生化培养箱、电热恒温鼓风干燥箱、离心机、电子天平、超净工作台、电炉、PHS-25 数显 pH 计、显微镜、分光光度计。

### 1.4 培养基

牛肉膏蛋白胨培养基, 培养细菌; 查氏培养基, 培养霉菌; 马铃薯培养基, 培养真菌; LB 培养基, 培养细菌; MEA 培养基, 培养真菌。

### 1.5 方法<sup>[7-10]</sup>

#### 1.5.1 内生菌的分离、纯化

##### 1.5.1.1 消毒处理时间的确定

将长势良好的新疆圆柏叶片用自来水清洗干净, 用 75% 乙醇浸泡 30s, 再用 0.1% 升汞于 1、2、3、4、5、6、7、8min 不同时间浸泡处理。然后用无菌水洗 5 次。用无菌镊子将叶片平放于牛肉膏蛋白胨固体平板培养基上, 每个培养皿放 10 片。37℃ 静置培养 4d。观察消毒处理是否完全, 确定适当的消毒处理时间。

##### 1.5.1.2 内生菌的分离纯化

取 2g 圆柏叶片, 按适当的时间进行消毒处理, 用无菌水洗 5 次, 取其中 1g 在研钵中研磨破碎, 然后加入 10ml 无菌蒸馏水, 经 3 层无菌纱布过滤, 收集滤液, 将滤液分别涂在 5 种培养基上, 每个平板涂 600 $\mu$ l 滤液。对照组每种培养基上放 5 片叶子。实验组, 对照组各设两个重复。LB 和牛肉膏蛋白胨固体平板培养基在 37℃ 培养 4d。PDA, MEA 和查氏固体平板培养基在 28℃ 培养 4d。观察是否有菌落出现, 若有菌落出现, 将其菌落用划线法在相应固体平板培养基上进行分离, 纯化, 直到得到单一菌落为止。

#### 1.5.2 内生菌的初步观察

对分离、纯化得到的内生菌进行形态观察、革兰氏染色、荚膜染色、芽孢染色、乳糖发酵、明胶液化指标初步鉴定。

#### 1.5.3 发酵液的制备

挑取分离、纯化得到的内生菌 37℃ 摇瓶发酵培养 72h, 吸取发酵液各 2ml。以 6000r/min 离心 6min, 吸取上清液, 121℃ 处理 15min, 离心, 上清液放 4℃ 冰箱保存备用。

#### 1.5.4 内生菌的抑菌实验

制备菌悬液: 将每个菌挑取一环, 稀释测  $OD_{610nm}$  值, 根据已经制好的 A-X 曲线得相应的菌悬液浓度, 实验中制备各种供试菌液的浓度为  $1 \times 10^4$  个/ml。

取制备好的菌悬液 0.1ml, 滴入已经倒有相应固体

培养基的培养皿表面, 用涂布棒均匀涂布在培养基的表面。用灭菌的直径为 6mm 打孔器在每个固体培养基上打 5 个孔, 加入 72h 摇瓶培养的发酵液, 以 2000U 的青霉素和 LB、牛肉膏蛋白胨液体培养基分别作为阳性对照和阴性对照并标记为 “+”, “-”。各孔加样量均为 100 $\mu$ l, 37℃ 培养 24h。每种菌作 3 个重复实验, 量取抑菌圈直径, 取平均值。

## 2 结果与分析

### 2.1 内生菌的分离纯化

经 0.1% 升汞处理 1、2、3min 的圆柏叶片 4d 培养后均出现污染现象, 4~8min 升汞处理的叶片未见污染现象。因此确定圆柏叶片消毒处理的最佳时间为 75% 乙醇处理 30s, 升汞处理 4min。按上述处理对叶片进行消毒处理, 研磨破碎后取滤液涂板, 培养 4d 却未见内生菌生长。重复实验 2 次, 结果均一致。

失败原因: 前几次实验所选用的材料是圆柏的幼嫩叶片, 叶片还未完全伸展, 层层包裹在一起。这样升汞处理后很难清除干净, 研磨破碎后残留的升汞将植物体内的内生菌全部杀死, 导致实验失败。

改进实验: 选用圆柏的老叶片作为实验材料, 按上述时间处理, 研磨破碎后取滤液 600 $\mu$ l 涂板, 并设置对照。每种培养基实验组, 对照组各设 3 个重复。培养 4d 后, 牛肉膏蛋白胨固体平板培养基和 LB 固体平板培养基上均有大量细菌出现, 而对照组无细菌生长。说明这些细菌确实是圆柏叶片内的内生菌。其他 3 种培养基继续培养 4d 后仍无细菌生长。

将内生菌在相应固体平板培养基上进行连续划线纯化后共获得 7 株菌。抑菌活性筛选结果显示: 其中两株细菌对供试菌有抑菌活性。1 号菌株在 LB 培养基上生长, 菌落为圆形, 光滑, 边缘整齐, 菌体黄色。2 号菌株在牛肉膏蛋白胨培养基上生长, 菌落为圆形, 光滑, 边缘整齐, 菌体肉白色。

### 2.2 内生菌特性初步观察结果

表 1 内生菌特性观察结果

Table 1 Characteristics of the 2 endophytic bacteria with antibacterial activity

菌株	形状	染色	荚膜	芽孢	乳糖发酵	淀粉水解
1 号菌株	球形	阳性	无	无	不产酸、不产气	阴性
2 号菌株	球形	阴性	无	无	不产酸、不产气	阴性

由表 1 可见, 1 号菌株为革兰氏阳性菌, 2 号菌株为革兰氏阴性菌。两株菌株均是球形, 无荚膜、无芽孢、不产酸、不产气、淀粉水解为阴性。

### 2.3 菌株发酵液抑菌实验结果

表2 菌株发酵液对供试菌的抑菌圈直径

Table 2 Diameter of antibacterial circle of fermentation liquor of the 2 bacteria

供试菌	1号菌株发酵液	2号菌株发酵液	青霉素
枯草芽孢杆菌	+++	++	+
金黄色葡萄球菌	++	++	+++
大肠杆菌	+	-	+++
绿脓杆菌	+	-	++

注: -, 小于 7mm; +, 7~10mm; ++, 11~14mm; +++, 15~20mm。

由表2可见, 分离得到的两株内生菌菌株除了大肠杆菌、绿脓杆菌之外, 对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌均有较强的抑制活性, 并且1号菌株抑菌活性略强于2号菌株。对于新疆圆柏内生菌发酵活性产物的分离, 纯化以及产物的分子水平鉴定, 有待于进一步研究。

### 3 讨论

从新疆圆柏中分离出7株内生细菌, 并对其进行了抑菌活性检测, 并对其中对供试菌有抑菌活性的两株菌的特性做了初步研究。为新疆圆柏内生菌的进一步分离奠定了实验基础, 也在实验水平上进一步完善了植物内生菌分离的操作技术。由于作者仅仅是利用常规培养方法对新疆圆柏内生菌进行体外培养, 再加上实验条件的限制, 肯定有很多的内生菌没有分离到, 有待于进一步研究。

用摇瓶培养的发酵上清液进行抑菌实验, 实验结果表明分离得到的两株内生菌分泌到胞外的物质具有抑菌活性。

内生菌与植物相互影响, 可能是在内生菌的影响下使得植物体自身分泌某种抑菌物质。这样植物体和内生菌结合在一起会对一些细菌产生毒害作用。植物与其体内的内生菌经过长期的协同进化, 彼此之间高度适应, 形成一种类似共生的关系。每种植物都为其体内的内生

菌营造了独特的生存环境, 内生菌也可能会对这种环境产生一定程度的依赖。但是内生菌的抑菌实验都是在常规培养的条件下进行的, 离开了赖以生存的环境可能会对内生菌次生代谢物的分泌产生一定的影响, 从而削弱了内生菌的抑菌活性。

### 参考文献:

- [1] LEUCHTMANN A I. Systematics, distribution, and host specificity of grass endophytes[J]. *Natural Toxins*, 1992, 1(3): 150-162.
- [2] 郑万钧. 中国树木志: 第一卷[M]. 北京: 中国林业出版社, 1983: 345-362.
- [3] 中国植物志编委会. 中国植物志: 第七卷[M]. 北京: 科学出版社, 1978: 359-360.
- [4] 江苏新医学院. 中药大词典[M]. 上海: 上海科技卫生出版社, 1977: 1886.
- [5] FERNANDO P, ANGELES C, GONZALO P. The discovery of enfumafungin, a novel antifungal compound produced by an endophytic *Hormonema* species biological activity and taxonomy of the producing organisms[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2000, 23(3): 333-343.
- [6] AMARDEEP K, SURIYA R. Isolation and identification of an endophytic strain of *Fusarium oxysporum* producing podophyllotoxin from *Juniperus recurva*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, 24(7): 1115-1121.
- [7] DAKE X, XIA X Y, XU N, et al. Isolation and identification of a novel endophytic bacterial strain with antifungal activity from the wild blueberry *Vaccinium uliginosum*[J]. *Annals of Microbiology*, 2007, 57(4): 673-676.
- [8] LIN X, LIU C H, HUANG Y J. Endophytic fungi from a pharmaceutical plant, *Camptotheca acuminata*: isolation, identification and bioactivity [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2007, 23(7): 1037-1040.
- [9] 秦宝福, 徐虹, 刘建党, 等. 风信子中抗青霉素内生菌的分离、筛选和活性检测[J]. *西北植物学报*, 2006, 26(7): 1449-1453.
- [10] LIU X L, DONG M S, CHEN X H. Antimicrobial activity of an endophytic *Xylaria* sp. YX-28 and identification of its antimicrobial compound 7-amino-4-methylcoumarin[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 78(2): 241-247.