

灯台树内生放线菌多样性及抗菌活性评价

黄海玉¹ 李洁^{1,2} 赵国振¹ 朱文勇¹ 段学伟¹ 李秀萍¹ 赵立兴¹ 徐丽华^{1*}

(1. 云南大学 云南省微生物研究所 云南省生物资源保护与利用重点实验室 云南 昆明 650091)

(2. 中国科学院南海海洋研究所 广东省海洋药物重点实验室 广东 广州 510301)

摘要: 从云南西双版纳采集 7 份灯台树样品, 经过表面消毒, 用 4 种分离培养基分离得到 105 株内生放线菌。经 16S rRNA 基因序列分析鉴定, 分布于 7 个科 9 个属。利用 5 种植物病原真菌指示菌对所有菌株的发酵液进行抗菌活性检测。结果显示, 有 12.4%、14.3%、11.4%、12.4%、8.6% 的菌株分别对镰刀霉、疫霉、赤星霉、苹果炭疽、白色念珠菌有抗性。对 3 株具有广谱抗菌活性的菌株进行再次发酵和抗菌活性复筛, 结果显示这 3 株的抗菌活性稳定, 并可能含有生物碱类化合物。

关键词: 灯台树, 内生放线菌, 分离, 鉴定, 抗菌活性

Diversity and antimicrobial activities of endophytic actinomycetes isolated from *Alstonia scholar*

HUANG Hai-Yu¹ LI Jie^{1,2} ZHAO Guo-Zhen¹ ZHU Wen-Yong¹ DUAN Xue-Wei¹
LI Xiu-Ping¹ ZHAO Li-Xing¹ XU Li-Hua^{1*}

(1. Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-resources, Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming, Yunnan 650091, China)

(2. Guangdong Key Laboratory of Marine Materia Medica, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510301, China)

Abstract: One hundred and five endophytic actinomycetes were isolated using four different media from surface-sterilized tissues of 7 plants samples of *Alstonia scholar* collected from Xishuangbanna Yunnan province, southeast China. The results showed that they belong to 9 genera, 7 families by 16S rRNA gene sequences analysis. All actinomycete strains fermentation liquids were carried out the antimicrobial activities test against five plant pathogenic fungi. The results showed that 12.4%, 14.3%, 11.4%, 12.4%, 8.6% endophytic actinomycetes presented antimicrobial activity for *Fusarium graminearum*, *Phytophthora nicotianae*, *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Candida albicans*, respectively. Three strains with strong antibacterial activities were refermented and

rescreened, their antimicrobial activities were stability, and may produce alkaloids.

Keywords: *Alstonia scholar*, Endophytic actinomycetes, Isolation, Identification, Antimicrobial activity

灯台树 *Alstonia scholar* (L) R. Bro., 属夹竹桃科(Apocynaceae)鸡骨常山属的常绿乔木。灯台树在民间用树皮治疗头疼、伤风、支气管炎、妊娠呕吐和溃疡出血等^[1-2], 其提取物具有细胞毒活性、抗肿瘤活性, 可治疗呼吸道和消化道疾病等^[3-4]。目前, 灯台树的研究主要集中在对其化学成分、药理和药效作用方面^[5-7], 且有一定的药理活性, 因此受到研究者的广泛关注, 但关于灯台树内生菌的研究尚未见报道。1993年 Stierle 等^[8]从短叶紫杉中发现产紫杉醇的内生真菌, 从而激发了人们研究植物内生菌的极大兴趣。近几年的研究表明, 从植物内生菌代谢产物中分离到的活性物质, 大约有 51%是未知的新化合物, 而从土壤微生物代谢产物中分离新化合物的几率只有 38%^[9], 从而使植物内生菌得到广泛关注。放线菌是一类广泛存在于植物中, 而且产生抗生素及生物活性物质最多的微生物资源, 当前临床和农牧业上应用的抗生素有 60%以上是放线菌生产的^[10]。本文采用纯培养法分离灯台树内生放线菌, 通过对物种多样性、抗菌活性和分类学研究, 为药用微生物资源的研究、保护和寻找微生物源的自然产物提供一定的理论依据和实践指导。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样品: 灯台树样品于 2009 年 6 月采自西双版纳。

1.1.2 培养基: (1) 分离培养基:

TWYE^[11](g/L): 酵母浸膏 0.25, K₂HPO₄ 0.5, 琼脂 15, pH 7.2。

海藻糖-脯氨酸培养基(g/L): 海藻糖 6, 脯氨酸 1, KNO₃ 0.5, Na₂HPO₄ 0.3, MgSO₄·7H₂O 0.2, CaCl₂ 0.3, 琼脂 15, pH 7.2。

L-天门冬氨酸-纤维素培养基(g/L): L-天门冬氨酸 1, 纤维素 3, K₂HPO₄ 1, 琼脂 15, pH 7.2。

丙酸钠培养基(g/L): 丙酸钠 2, NH₄NO₃ 0.1, KCl 0.1, MgSO₄ 0.05, FeSO₄ 0.05, 琼脂 15, pH 7.2。

每种分离培养基均加入如下抑制剂: 萘啶酮酸 25 mg/L, 重铬酸钾 25 mg/L。

(2) 发酵培养基(g/L): 可溶性淀粉 10, 葡萄糖 10, 蛋白胨 5, 酵母膏 5, NaCl 4, K₂HPO₄ 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.5, CaCO₃ 2, pH 7.2。

(3) 抗菌实验培养基(PDA 培养基, g/L)^[12]: 马铃薯(去皮) 200, 葡萄糖 20, 琼脂 15, pH 自然。

1.1.3 主要试剂和仪器: 薄层层析用 GF254 硅胶购自青岛海洋化工厂; 改良碘化铋钾试剂用时新鲜配制, 溶菌酶、蛋白酶、dNTPs、Taq 酶等购自上海生物工程技术有限公司; DNA Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司, 其余试剂为国产分析纯试剂。电泳仪为 Bio-Rad, PCR 仪为 Biometra 公司, 旋转蒸发仪为德国 Heidolph 公司的 Laborota 4000。

1.1.4 指示菌株: 镰刀霉 *Fusarium graminearum*、疫霉 *Phytophthora nicotianae*、赤星霉 *Alternaria alternate*、苹果炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides*、白色念珠菌 *Candida albicans*, 均由云南大学云南省微生物研究所提供。

1.2 方 法

1.2.1 灯台树内生放线菌的分离: 将灯台树样品表面用自来水清洗干净, 然后按如下步骤进行表面消毒: 0.01% Tween 20 浸泡 1 min, 有效氯含量为 5% 的次氯酸钠浸泡 3-4 min (根、茎、叶的处理时间不同), 用无菌水清洗 3 次, 无菌 2.5% 硫代硫酸钠浸泡 10 min, 75% 乙醇处理 5 min, 无菌水清洗多次, 最后用无菌 5% 碳酸氢钠浸泡 10 min。取 0.2 mL 最后一遍清洗植物样品的水涂布于 ISP 2 固体培养基上, 28 °C 培养 3-6 周, 进行消毒效果检测。在无菌条件下将植物组织粉碎后撒在分离平板上, 分离培养基中加入 25 mg/L 重铬酸钾和萘啶酮酸作为抑制剂, 在 28 °C 培养 4 周后挑菌。

1.2.2 灯台树内生放线菌的系统发育分析: 选取代表性菌株进行 DNA 的提取^[13]。用 PA (8-27f: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 做为正向引物, 扩增 16S rRNA 基因部分片段(953-1 134 bp)。PCR

产物直接送上海生工生物技术有限公司测序, 所测序列利用 BLAST 软件进行序列相似性分析, 用 MEGA 3.1 的 Neighbor-Joining 法^[14]构建系统进化树。

1.2.3 内生放线菌摇瓶发酵: 将实验菌株接种于 100 mL 发酵培养液中, 28 °C、200 r/min 摇床振荡培养 168 h, 离心, 取上清液备用。

1.2.4 抗菌活性检测: 用双层平板法^[15]检测试验菌株的抗菌活性, 每孔滴加 80 μ L 发酵液, 空白培养基作阴性对照, 在 28 °C 培养 24–48 h。并且进行抗菌活性的复筛, 方法与初筛一致。

1.2.5 生物碱检测: 取较强抗菌活性菌株的发酵液用乙酸乙酯萃取, 旋转蒸发仪蒸干后用适量的甲醇溶解置于 4 °C 冷藏备用。用 GF254 层析板展层, 254 nm 检测是否具有荧光点, 然后再用改良的碘化铊钾显色。

2 结果与分析

2.1 灯台树内生放线菌多样性

表面消毒效果检测显示, 在 28 °C 培养 4 周的平板均没有菌落长出, 证明植物样品表面消毒彻底, 所分离得到的菌株均为植物内生菌。

用上述 4 种分离培养基从 7 份灯台树样品中共分离到 105 株放线菌, 根据菌株在 ISP 2 培养基上的菌落形态和颜色的差异去重复, 从中选取 17 株代表性菌株。16S rRNA 基因发育分析的结果显示(图 1) 它们分属于 6 个亚目, 7 个科, 9 个属, 分别为: 链霉菌亚目(Suborder Streptomycineae)中链霉菌科(Streptomycineae)的链霉菌属(*Streptomyces*); 棒杆菌亚目(Suborder Corynebacterineae)中诺卡氏菌科(Nocardiaceae)的诺卡氏菌属(*Nocardia*)和红球菌属(*Rhodococcus*); 丙酸杆菌亚目(Suborder Propionibacterineae)中类诺卡氏菌科(Nocardioidaceae)的韩国生工菌属(*Kribbella*); 小单孢菌亚目(Suborder Micromonosporineae)中小单孢菌科(Micromonosporaceae)的小单孢菌属(*Micromonospora*); 微球菌亚目(Suborder Micrococccineae)中微球菌科(Micrococccaceae)的微杆菌属(*Micrococcus*)和考克氏菌属(*Kocuria*); 假诺卡氏菌亚目(Suborder Pseudonocardineae)中假诺卡氏菌科

(Pseudonocardaceae) 的假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*); 链孢囊菌亚目(Suborder Streptosporangineae)中高温单孢菌科(Thermomonosporaceae)的珊瑚放线菌属(*Actinocorallia*)^[16]。17 株代表菌株中链霉菌属(*Streptomyces*) 7 株, 诺卡氏菌属(*Nocardia*) 2 株, 韩国生工菌属(*Kribbella*) 2 株, 小单孢菌属(*Micromonospora*) 1 株, 红球菌属(*Rhodococcus*) 1 株, 微杆菌属(*Micrococcus*) 1 株, 假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*) 1 株, 考克氏菌属(*Kocuria*) 1 株, 珊瑚放线菌属(*Actinocorallia*) 1 株。该结果表明, 灯台树植物内具有丰富的放线菌物种多样性, 其优势类群为链霉菌(*Streptomyces*), 其次是诺卡氏菌属(*Nocardia*)和假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*)。

2.2 抗菌活性评价

抗菌活性检测结果表明(表 1), 在所检测的 105 株放线菌中有 33 株表现出至少对 1 种指示菌有抗菌活性, 占检测菌株的 31.4%, 阴性对照没有表现出抗菌活性, 有 12.4%、14.3%、11.4%、12.4%和 8.6% 的菌株分别对镰刀霉、疫霉、赤星霉、苹果炭疽和白色念珠菌有抗性。16S rRNA 基因分析结果显示, 这些菌株以链霉菌为主, 稀有放线菌大部分都未表现出活性。结果表明, 链霉菌依然是活性物质的主要菌源, 此外这也可能与菌株的发酵条件有关。其中有 3 株菌 YIM 61644、YIM 61744 和 YIM 61757 对 5 种指示菌均具有较强的活性, 复筛的结果说明这 3 株菌在所选发酵培养基上活性稳定, 具有一定的开发潜力。

2.3 生物碱检测

灯台树化学成份研究表明, 其代谢产物以生物碱为主^[17], 而且具有抗菌和抗肿瘤等活性^[18]。为探索灯台内生放线菌中是否存在类似灯台树中的生物碱类化合物, 我们对 3 株高活性广谱抗菌菌株的代谢产物进行了生物碱化学筛选, 经过紫外观察和生物碱通用显色剂碘化铊钾显色检测, 菌株 YIM 61644、YIM 61744 和 YIM 61757 这 3 株菌的发酵提取物在 254 nm 紫外观察时均有明显的斑点, 并经碘化铊显色时均显黄色, 说明这 3 株菌有可能产生生物碱, 值得深入研究。

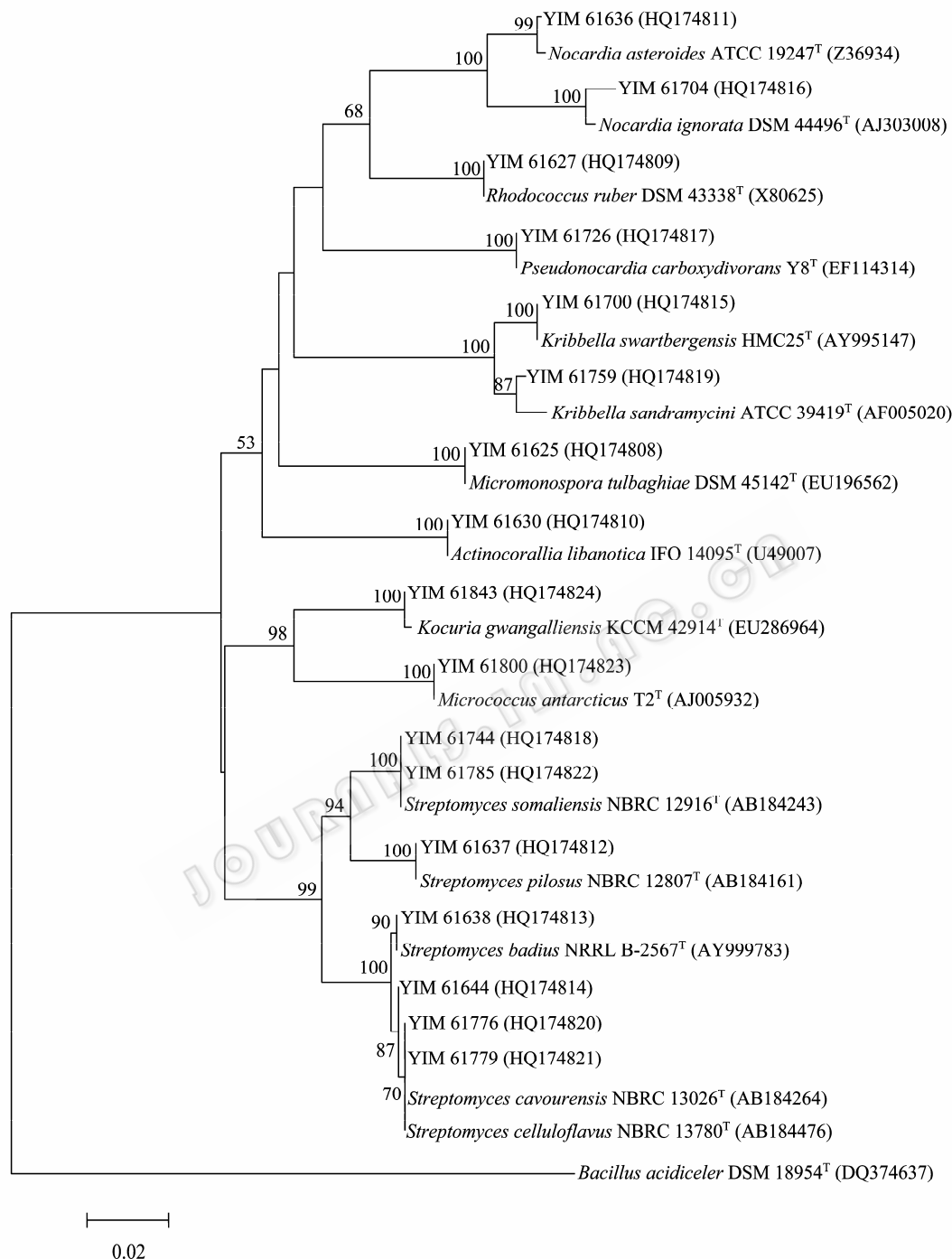


图 1 根据 16S rRNA 基因序列构建部分菌株系统进化树

Fig. 1 Neighbour-Joining phylogenetic tree based on almost-complete 16S rRNA gene sequences

Note: Numbers at nodes are levels of bootstrap support for branch points, based on 1 000 resamplings; Values are shown only if greater than 50%. The GenBank accession number are showed in parentheses after each strain name. The sequence of *Bacillus acidicer* DSM 18954^T was used as the outgroup. Bar, 2% nucleotide substitutions per position.

表1 分离菌株的抗菌活性
Table 1 Antimicrobial activity tests of isolates (mm)

菌号 No. of strains	属名 Genus name	镰刀霉 <i>Fusarium Graminearum</i>	疫霉 <i>Phytophthora nicotianae</i>	赤星霉 <i>Alternariaal ternata</i>	苹果炭疽 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	白色念珠菌 <i>Candida albicans</i>
YIM 61628	<i>Streptomyces</i>	-	-	4	-	-
YIM 61631	<i>Streptomyces</i>	-	-	-	3	-
YIM 61632	<i>Streptomyces</i>	5	5	-	4	4
YIM 61633	<i>Streptomyces</i>	-	-	6	-	-
YIM 61634	<i>Streptomyces</i>	-	4	-	4	5
YIM 61640	<i>Streptomyces</i>	5	-	-	10	8
YIM 61644	<i>Streptomyces</i>	16	4	8	7	9
YIM 61700	<i>Kribbella</i>	8	-	-	9	5
YIM 61704	<i>Nocardia</i>	4	11	-	-	-
YIM 61744	<i>Streptomyces</i>	8	14	12	5	-
YIM 61757	<i>Streptomyces</i>	1	11	9	-	12
YIM 61758	<i>Streptomyces</i>	12	-	-	-	-
YIM 61760	<i>Streptomyces</i>	11	-	12	-	-
YIM 61761	<i>Streptomyces</i>	10	-	-	-	9
YIM 61769	<i>Streptomyces</i>	-	-	-	10	-
YIM 61770	<i>Streptomyces</i>	-	-	1	-	-
YIM 61777	<i>Streptomyces</i>	-	-	-	-	-
YIM 61778	<i>Streptomyces</i>	12	10	-	-	-
YIM 61779	<i>Streptomyces</i>	10	6	-	-	-
YIM 61780	<i>Streptomyces</i>	13	-	-	-	10
YIM 61792	<i>Streptomyces</i>	-	9	-	8	-
YIM 61796	<i>Streptomyces</i>	-	-	-	10	-
YIM 61799	<i>Streptomyces</i>	-	4	-	-	-
YIM 61800	<i>Micrococcus</i>	-	9	-	8	-
YIM 61801	<i>Streptomyces</i>	-	8	-	10	-
YIM 61805	<i>Streptomyces</i>	-	6	-	-	-
YIM 61806	<i>Streptomyces</i>	-	-	-	-	12
YIM 61808	<i>Streptomyces</i>	-	-	8	10	-
YIM 61809	<i>Streptomyces</i>	-	11	-	-	-
YIM 61810	<i>Streptomyces</i>	-	12	9	-	-
YIM 61816	<i>Streptomyces</i>	-	-	12	-	-
YIM 61819	<i>Streptomyces</i>	-	-	10	-	-
YIM 61823	<i>Streptomyces</i>	-	-	5	-	-

注: 数字: 抗菌活性圈直径; -: 未检测到活性。

Note: Numbers: Diameter of inhibition activity transparent circle; -: Negative.

3 讨论

随着从来源于普通环境土壤微生物中分离、筛选新化合物几率的不断下降,人们已经逐步将注意力转向了特殊生境的微生物^[19]。植物内生菌能够产生结构新颖、功能特殊的次生代谢产物,并且由于植物内生菌在植物体内经过与植物宿主的长期协同进化,使植物内生菌可能产生与宿主植物一样或是相似以及独特代谢产物的潜力,因此成为发现天然活性产物的重要来源,也是发现新化合物和新药物的潜在资源,在农业和医药业中具有重要的应用前景^[20]。本研究表明,分离得到的105株内生放线菌分布于7个科9个属,显示了灯台树内存在丰富的内生放线菌。它们对植物病原菌具有普遍的抗性,部分菌株对所检测的所有指示菌均有较好的广谱抗性,而且抗菌活性稳定。本研究筛选到3株具有较好广谱抗菌活性的链霉菌菌株,其活性可能与它们代谢产物中的生物碱有关系,值得进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院昆明植物研究所. 云南植物志(3)[M]. 北京: 科学出版社, 1983.
- [2] 中国傣医药彩色图谱[M]. 昆明: 云南民族出版社, 2003.
- [3] Jagetia GC, Baliga MS, Venkatesh P, et al. Evaluation of the cytotoxic effect of the monoterpene indole alkaloid echitamine *in vitro* and in tumour-bearing mice[J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2005, 57(9): 1213-1219.
- [4] Saraswathi V, Ramamoorthy N, Subramaniam S, et al. Inhibition of glycolysis and respiration of sarcoma-180 cell by echitamine chloride[J]. Chemotherapy, 1998, 44(3): 198-205.
- [5] Jagetia GCJ, Baliga MS. Modulation of antineoplastic activity of cyclophosphamide by *Alstonia scholaris* in the Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice[J]. Journal of Experimental Therapeutics and Oncology, 2003, 3(5): 272-282.
- [6] Khan MR, Omoloso AD, Kihara M. Antibacterial activity of *Alstonia scholaris* and lea tetramera[J]. Journal of Fitoerapia, 2003(74): 736-740.
- [7] Baliga MS, Jagetia GC, Nui-Loor J, et al. The evaluation of the acute toxicity and long term safety of Hydroalcoholic extract of Saphthaparna (*Alstonia scholaris*)[J]. Toxicology Letters, 2004(151): 317-326.
- [8] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew[J]. Science, 1993, 260(5105): 214-216.
- [9] Strobel GA. Endophytes as sources of bioactive products[J]. Microbes Infect, 2003, 5(6): 535-544.
- [10] 陈云, 曹艳茹, 蔡祥凤, 等. 植物内生菌发酵培养基的初探[J]. 中国抗生素杂志, 2008, 33(9): 524-527.
- [11] Coombs JT, Franco CMM. Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots[J]. Appl and Environl Microbiol, 2003, 69(9): 5603-5608.
- [12] 戴水莲, 林警, 高丽. PDA培养基中加入青霉素、链霉素的抗菌作用试验简报[J]. 中国食用菌, 2007, 26(4): 53-54.
- [13] Li WJ, Xu P, Schumann P, et al. *Georgenia ruanii* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from forest soil in Yunnan (China), and emended description of the genus *Georgenia*[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2007, 57(7): 1424-1428.
- [14] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Mol Biol Evol, 1987, 4(4): 406-425.
- [15] 林永成, 周世宁. 海洋微生物及其代谢产物[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [16] Zhi XY, Li WJ, Stackebrandt E. An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class *Actinobacteria*, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2009, 59(3): 589-608.
- [17] Kam TS, Nyeoh KT, Sim KM, et al. Alkaloids from *Alstonia scholaris*[J]. Phytochemistry, 1997, 45(6): 1303-1305.
- [18] Xu Y, Feng T, Cai XH, et al. A new C₁₃-norisoprenoid from leaves of *Alstonia scholaris*[J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2009, 7(1): 21-23.
- [19] 李文均, 徐平, 徐丽华, 等. 极端环境中的放线菌资源[J]. 微生物学通报, 2003, 30(4): 125-127.
- [20] 邹文欣, 谭仁祥. 植物内生菌研究新进展[J]. 植物学报, 2001, 43(9): 881.