

# 云雾龙胆内生菌的分离鉴定及抗菌活性分析

黄海东<sup>1\*</sup> 杨红澎<sup>1</sup> 王玉<sup>1</sup> 吴疆<sup>1</sup> 确生<sup>2</sup> 尤丽娟<sup>1</sup> 胡双双<sup>1</sup>

(1. 天津农学院 农学系 天津 300384)

(2. 青海师范大学 民族师范学院化学系 青海 西宁 810008)

**摘要:** 从云雾龙胆(*Gentiana nubigena*)中分离到一株具有抗菌活性的内生细菌 LD5, 该菌株的发酵上清液对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的生长有显著的抑制作用。通过形态学、生理生化及 16S rDNA 系统进化分析, 鉴定 LD5 为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。菌株 LD5 能合成黄酮类化合物、龙胆苦苷, 以及一种与云雾龙胆醇提取物相似的代谢产物。

**关键词:** 内生菌, 云雾龙胆, 龙胆苦苷

## Isolation and Antibiotic Activities of Endophytes in *Gentiana nubigena*

HUANG Hai-Dong<sup>1\*</sup> YANG Hong-Peng<sup>1</sup> WANG Yu<sup>1</sup> WU Jiang<sup>1</sup> QUE Sheng<sup>2</sup>  
YOU Li-Juan<sup>1</sup> HU Shuang-Shuang<sup>1</sup>

(1. Department of Agriculture, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China)

(2. Department of Chemistry, Minorities Normal College, Qinghai Normal University, Xining, Qinghai 810008, China)

**Abstract:** Endophytic strain LD5 was isolated from the stems of *Gentiana nubigena*. The fermentation broth of LD5 showed antibiosis activities against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. According to the characteristics of morphology, physiology and biochemistry tests and the comparison of 16S rDNA sequence, strain LD5 was identified as *Bacillus amyloliquefaciens*. Strain LD5 could produce flavonoids, gentiopicoside, and a kind of analogue of alcoholic extract from *Gentiana nubigena*.

**Keywords:** Endophyte, *Gentiana nubigena*, Gentiopicoside

植物内生菌(Plant endophyte)是指那些在生活史的一定阶段或全部阶段生活于植物组织内, 不引起宿主植物明显感染症状的微生物。几乎所有植物中都存在内生菌, 它们主要存活于植物细胞内或细胞间隙的特殊环境中, 其种类丰富, 主要包括细菌、真菌和放线菌<sup>[1-2]</sup>。近年来的研究表明, 内生菌能够参与植物次生代谢及其成分的转化合成, 还能独立产生丰富的次生代谢产物<sup>[3-4]</sup>, 是天然产物的重要

来源, 也是宝贵的菌种资源库。我国的植物物种资源丰富, 药用植物有 1 万多种, 对其内生菌及其产生的活性成分进行研究有着广阔的前景。云雾龙胆(*Gentiana nubigena*)是龙胆科龙胆属多年生宿根草本植物, 具有利胆、抗炎、健胃、降压等作用, 是龙胆属植物中少数未被系统研究过的珍贵药材<sup>[5]</sup>。本文从云雾龙胆中分离得到 9 株内生细菌, 对具有显著抑菌活性的菌株 LD5 进行了分类鉴定和抗菌活性

\* 通讯作者: Tel: 86-22-23781298; E: hdhuang@tjau.edu.cn  
收稿日期: 2010-01-24; 接受日期: 2010-03-24

物质的分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 云雾龙胆:** 由青海省藏医药研究院药物研究所提供。

**1.1.2 菌株:** 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、黄瓜灰霉病菌(*Botrytis cinerea* Pers.), 由本实验室保藏。

### 1.2 培养基

筛选培养基 1: 蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, NaCl 10 g, 云雾龙胆浸提液 1 mL, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.0–7.5。

筛选培养基 2: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 云雾龙胆浸提液 1 mL, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.0–7.5。

发酵培养基: 蔗糖 30 g, 蛋白胨 2 g,  $K_2HPO_4$  0.3 g, NaCl 0.1 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.0–7.5。

### 1.3 试剂

龙胆苦苷(中国药品生物制品鉴定所), 乙腈(色谱纯, 天津康科德科技公司), 硅胶 GF254(青岛海洋化工公司), 细菌全基因组 DNA 提取试剂盒(上海生工); PCR 主要试剂(赛百盛公司); DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒(V-gene 公司); pGEM-T Easy 载体(Promega 公司); 其他试剂均为分析纯。

### 1.4 云雾龙胆内生菌的分离

取一段云雾龙胆的茎, 无菌水冲洗 2 次, 用无菌滤纸吸干水分; 在 70%乙醇溶液中浸泡 2 min, 再用 0.1%升汞浸泡 30 s, 无菌水冲洗 3 次。在无菌条件下用刀片将外皮削去, 并截成 1 cm 左右的小段, 置于筛选培养基表面, 30°C 培养 4–8 d。待平板有菌长出后, 平板划线纯化, 直至得到单菌落, 斜面保存备用。

### 1.5 内生菌发酵液的制备

250 mL 三角瓶装 100 mL 发酵培养基, 接种后置于旋转式摇床上, 180 r/min, 30°C 培养 48 h, 发酵液在 6000 r/min 离心 10 min, 取上清液用于抗菌活性测定。

### 1.6 抗菌活性测定

将供试靶菌株活化和扩大培养, 用无菌生理盐水稀释制成  $10^6$  CFU/mL 菌悬液, 0.2 mL 菌悬液与灭菌 LB 培养基 15 mL 混合制成平板, 凝固后, 用灭

过菌的 6 mm 直径打孔器在每个平板上打孔, 每平板打孔 4 个, 除去孔内琼脂并向孔中加入 0.1 mL 发酵上清液, 以无菌蒸馏水和云雾龙胆浸提液为对照, 30°C 培养 48 h, 观察抑菌圈。为了确保结果的准确性, 每平板设 3 个重复。

### 1.7 内生菌 LD5 的分类鉴定

**1.7.1 内生菌 LD5 的形态特征:** 取固体平板上培养 48 h 的菌株进行革兰氏染色、芽孢染色、鞭毛染色, 观察内生菌的形态特征。

**1.7.2 内生菌 LD5 的生理生化特征:** 氧化酶、接触酶、 $H_2S$  产生、吡啶、硝酸盐还原、脲酶等试验参照文献[6]进行。

**1.7.3 内生菌 LD5 的 16S rDNA 序列测定及系统进化分析:** 将菌株 LD5 于 30°C 培养 24 h, 离心后, 用 0.5 mol/L NaCl 洗 1 次, 用 1 g/L 溶菌酶溶液悬浮菌体, 37°C 作用 30 min, 用 UNIQ-10 试剂盒提取细菌基因组 DNA。以菌株 LD5 的基因组 DNA 为模板, 用细菌 16S rDNA 通用引物 27F (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1541R (5'-AAGGAGGTGATCAGCCGCA-3')扩增得到目的基因片段, 经琼脂糖凝胶电泳纯化后与 pGEM-T Easy 载体(Promega 公司)连接, 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 用 X-gal 平板筛选含有插入 DNA 片段的白色转化子, 经限制性内切酶酶切鉴定后送北京三博公司测序。将得到的 16S rDNA 序列与 GenBank 中的核酸数据进行 BLAST 比对, 搜索得到与其同源性最高的相关序列<sup>[7]</sup>, 采用软件 ClustalX 1.8 对所获得的核苷酸序列进行分析, 得到序列之间的相似值; 用软件 MEGA 2.0 计算出序列的系统进化距离, 采用邻位相连法构建系统进化树<sup>[8]</sup>。

### 1.8 内生菌抗菌活性物质的初步鉴定

**1.8.1 抗菌活性物质的提取及定性分析:** 将菌株 LD5 接种于装液量为 100 mL/250 mL 的摇瓶中, 30°C、150 r/min 的条件下摇床振荡培养 60 h。每瓶发酵液中均加入 100 mL 正丁醇, 剧烈振荡 5 min, 4000 r/min 离心 15 min 后取上层的有机相, 旋转蒸发至干, 用甲醇复溶后得到产物提取液。利用薄层显色法进行糖、脂、肽和黄酮类物质的定性分析<sup>[9–11]</sup>。

**1.8.2 TLC 检测龙胆苦苷:** 按照文献[12]对龙胆苦苷鉴别的方法进行 TLC 检测, 取 5  $\mu$ L 提取液, 用微量移液器点于薄层层析板上, 以氯仿-甲醇 (10:1, V/V) 为展开剂, 展开后晾干, 置紫外灯 (254 nm) 下观察。

**1.8.3 HPLC 检测:** 按照 1.8.1 的方法制备样品, 用 Agilent1100 高效液相色谱仪进行分析检测<sup>[13]</sup>, 使用 C18 反相柱, 流动相为乙腈-水(20:80, *V/V*), 流速为 0.8 mL/min, 检测波长 254 nm, 进样量为 20  $\mu$ L。

2 结果与分析

2.1 云雾龙胆内生菌的分离及抗菌效果测定

从云雾龙胆中分离得到 9 株内生细菌, 制备内生菌发酵液, 以无菌水为阴性对照, 5 g/L 的龙胆苦苷和云雾龙胆的甲醇提取液<sup>[14]</sup>为阳性对照, 用混菌琼脂平板打孔法测定抑菌活性。结果表明云雾龙胆的甲醇提取液能抑制金黄色葡萄球菌、大肠杆菌的生长, 不能抑制黄瓜灰霉病菌; 龙胆苦苷仅对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的生长有轻微的抑制作用; 菌株 LD5 发酵上清液能明显抑制平板上金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的生长(图 1), 但不能抑制黄瓜灰霉病菌的生长。

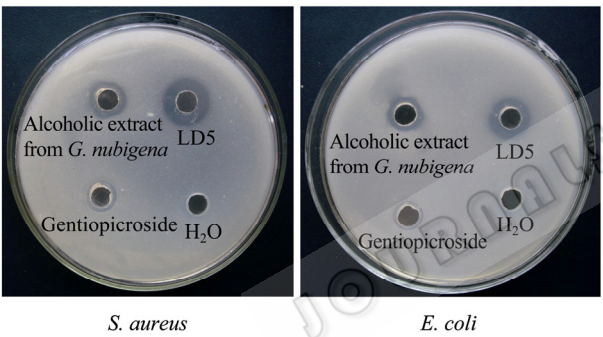


图 1 菌株 LD5 对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌生长的抑制作用  
Fig. 1 Antibiotic activity toward *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* of strain LD5

2.2 菌株 LD5 的分类鉴定

**2.2.1 形态特征:** 在固体平板上 30℃ 培养 2 d, 菌株 LD5 形成乳白色不透明菌落, 菌落圆形, 直径 1 mm–2 mm, 不分泌色素; LD5 菌体细胞为短杆状, 大小(0.8–1.0)  $\mu$ m  $\times$  (1.6–2.0)  $\mu$ m, 革兰氏阳性, 有芽孢。

**2.2.2 生理生化特征:** 菌株 LD5 的生长温度范围为 6℃–50℃, pH 范围 5.5–8.5, NaCl 浓度范围 0–9%; 能够利用的碳源有: 葡萄糖、蔗糖、糊精、淀粉、乳糖、甘露醇、山梨醇、棉子糖、淀粉和 N-乙酰-葡萄糖胺, 不能利用树胶醛糖、木糖、半乳糖和鼠李糖。其他生理生化指标的实验结果如表 1 所示。

表 1 菌株 LD5 的生理生化特征 Table 1 Physio-biochemical characteristics of strain LD5	
Characteristics	Result
Oxidase	+
Catalase	+
H <sub>2</sub> S production	–
Indole production	–
Nitrate reduction	+
Use of citrate	+
M. R.	–
V. P	–
Hydrolysis of starch	+
Hydrolysis of aesculin	+
Hydrolysis of casein	+
Hydrolysis of carbamide	–
Hydrolysis of gelatin	–

**2.2.3 16S rDNA 序列测定及系统进化分析:** PCR 扩增得到菌株 LD5 的 16S rDNA 片段, 经 DNA 测序长度为 1493 bp, 在 GenBank/EMBL/DDBJ 中的序列登录号为 GQ853414。

将 16S rDNA 序列与 GenBank 数据库中的序列进行 BLAST 比对, 结果表明菌株 LD5 与芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)的同源性较高, 且与 *Bacillus amylo-liquefaciens* ATCC 23350 和 *Bacillus subtilis* CCM 2216 的同源性最高, 分别为达到 90.0%和 98.9%。将其与芽孢杆菌属 8 个相近的种进行遗传距离计算, 用邻位相连法构建系统进化树(图 2), 可以看出, 菌株 LD5 与解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amylo-liquefaciens*)划分在同一簇内, 结合形态学和生理生化特征指标, 确定云雾龙胆内生菌 LD5 为解淀粉芽孢杆菌。

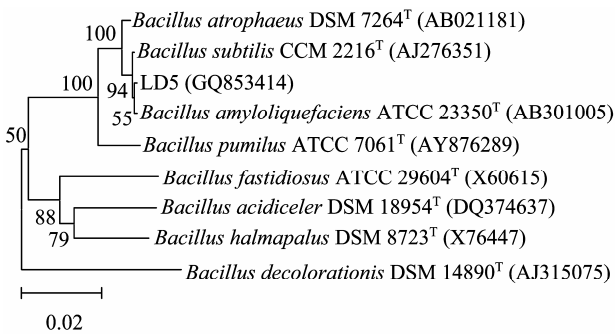


图 2 菌株 LD5 的 16S rDNA 序列系统进化树  
Fig. 2 Phylogenetic tree of LD5 16S rDNA sequences

### 2.3 内生菌抗菌活性物质的初步分析

按照 1.8.1 的方法对内生菌 LD5 的抗菌活性物质进行提取, 提取液对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的生长有明显抑制作用, 定性分析表明提取液中含有黄酮类物质, 而不含糖、脂、肽组分; 按照《中国药典》2005 版对龙胆苦苷鉴别的方法, 对菌株 LD5 的发酵提取物与云雾龙胆的甲醇提取物进行检测, 在 254 nm 紫外灯下能观察到 Rf 值相同的

荧光斑点, 说明样品都含有龙胆苦苷及其结构类似物。

为进一步确定菌株 LD5 发酵液中抗菌活性物质的类型, 用 HPLC 法将内生菌代谢产物与云雾龙胆醇提物及龙胆苦苷标准品进行比较分析。结果如图 3 所示, 菌株 LD5 的发酵提取物中含有少量的龙胆苦苷(保留时间 11.7 min), 以及与云雾龙胆醇提物结构相似的一种化学成分(保留时间 12.3 min)。

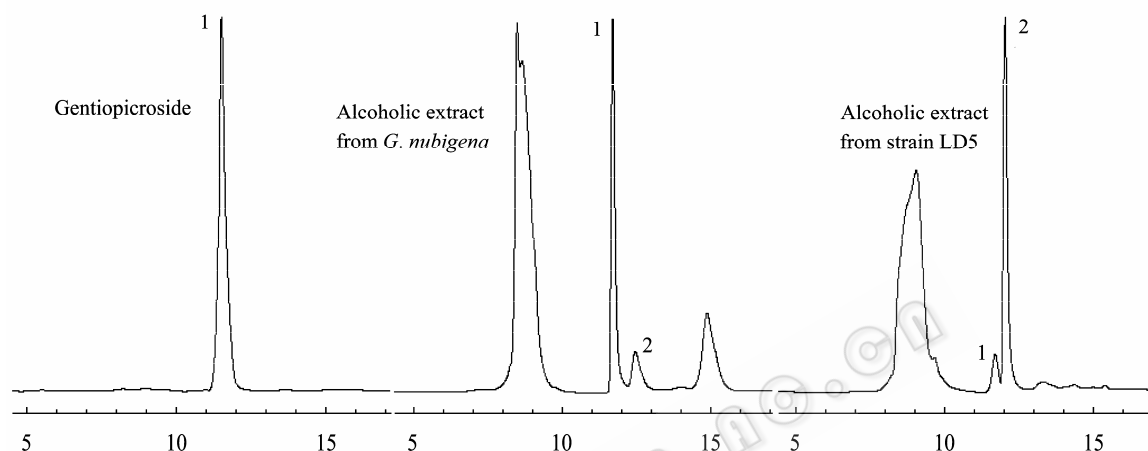


图 3 内生菌 LD5 代谢产物的 HPLC 分析  
Fig. 3 HPLC analysis of metabolites of endophyte LD5

## 3 讨论

龙胆属植物在全世界约有 400 余种, 其主要特征性化学成分为龙胆苦苷。我国有丰富的龙胆属植物资源, 其中 162 种、32 变种为我国所特有, 有些属于濒危保护植物<sup>[15]</sup>, 对其内生菌进行系统的分离和研究, 可以保护濒危植物的内生菌资源, 并开发新的生物活性代谢物质。本研究从云雾龙胆中分离到内生菌 LD5, 多相分类鉴定表明 LD5 为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。芽孢杆菌广泛存在于自然界中, 是常见的植物内生细菌, 可以产生杆菌肽、环脂、氨基酸类、核酸类、类噬菌体颗粒等多种抗菌物质, 能抑制多种植物及人类病原菌<sup>[16]</sup>。内生菌 LD5 能合成黄酮类物质、龙胆苦苷, 以及一种与宿主植物云雾龙胆相同的代谢产物, 对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的生长有显著的抑制作用; LD5 是否还能合成其他水溶性抗菌活性成份, 以及各种活性成分的生物功能, 还需要进一步的深入研究。

## 参考文献

- [1] Tan RX, Zou WX. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *J Natural Product Reports*, 2001, **18**(4): 448-449.
- [2] 丁小维, 刘开辉, 邓百万, 等. 中国红豆杉内生细菌的分离鉴定及活性研究. *微生物学通报*, 2008, **35**(10): 1577-1580.
- [3] Souwalak P, Nattawut R, Vatcharin R, et al. Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Garcinia* species. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2006, **48**(3): 367-372.
- [4] 黄宝康, 秦路平. 药用植物内生菌的生物多样性及活性成分. *药学实践杂志*, 2006, **24**(4): 193-196.
- [5] 曹裴华, 李冲. 龙胆属植物化学成分及药理作用的研究进展. *中国新药杂志*, 2008, **17**(1): 27-29.
- [6] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 267-295.
- [7] Haidong H, Wei W, Ting M, et al. *Sphingomonas sanxanigenens* sp. nov., isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*,

- 2009, **59**(4): 719-723.
- [8] Francois J, Julie D. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends in Biochemical Sciences*, 1998, **23**(10): 403-405.
- [9] 李丹, 黄磊, 李国强, 等. 羟降解菌株 T7-2 产生的生物乳化剂及其理化性质研究. *微生物学通报*, 2008, **35**(5): 653-660.
- [10] 庄向平. 银杏叶中黄酮含量的测定和提取方法. *中草药*, 1992, **23**(3): 122-124.
- [11] 张冬冬, 王春艳, 解春华. 薄层层析法测定黄花菜中黄酮成份. *中国卫生检验杂志*, 2002, **12**(4): 445.
- [12] 国家药典委员会. *中华人民共和国药典*. 2005 年版. 北京: 化学工业出版社, 2005: 64.
- [13] 魏岚, 陈晓辉, 张鹏, 等. 龙胆药材的高效液相指纹图谱及聚类分析. *沈阳药科大学学报*, 2007, **24**(5): 292-294.
- [14] 丁文雅, 张婷婷, 王强, 等. 7 种龙胆科蒙药药材中龙胆苦苷的含量测定. *中国药科大学学报*, 2008, **39**(1): 52-54.
- [15] 郎楷永. 中国的龙胆. *科技导报*, 2008(1): 64.
- [16] 齐东梅, 梁启美, 惠明, 等. 棉花枯萎、黄萎病拮抗芽孢杆菌的抗菌蛋白特性. *微生物学通报*, 2005, **32**(4): 42-46.

## 编辑部公告

### 中国科学院微生物研究所期刊广告部简介

中国科学院微生物研究所期刊广告部于 2007 年 3 月正式成立, 已取得北京市工商行政管理局正式批准的广告经营许可证(京海工商广字第 8107 号)。广告部代理《生物工程学报》、《微生物学报》、《微生物学通报》、《菌物学报》四个期刊的广告经营业务, 此四种期刊均为中国自然科学核心期刊, 国内外公开发行, 主要报道微生物学和生物技术领域的最新研究成果和研究动态, 已被美国化学文摘(CA)、生物学文摘(BA)、医学索引(MEDLINE)、俄罗斯文摘杂志(AJ)及《中国学术期刊文摘》、《生物学文摘》等国内外著名数据库和检索期刊收录, 是促进国内外学术交流的重要科技期刊。

广告刊登内容主要包括大型生化仪器(如显微镜、离心机、色谱仪、无菌操作台、大、中、小型发酵罐)、设备耗材(如 PCR 仪、细胞生物反应器、微量移液器、离心管、杂交膜)及生化试剂(如各种酶、载体、试剂盒)等的产品宣传信息, 也可以发布生物技术人才招聘信息、会议消息、以及与生命科学有关的各类服务信息。广告部以严谨、诚信为原则, 愿与从事生物技术产品生产与销售的各类厂商和公司精诚合作, 共同发展。如有刊登广告的需要, 欢迎与我们电话或 E-mail 联系获取各刊版位及报价信息! 也可以登陆各刊网站, 了解更多详情。

**提示:** 从 2007 年起, 各公司与此四刊签订的广告费用请汇入以下新账号:

收款单位: 中国科学院微生物研究所

开户银行: 中国工商银行北京分行海淀西区支行

帐号: 0200004509089117425

中国科学院微生物研究所·期刊广告部

联系电话: 010-64807336; 010-64807521

联系人: 武文 王闵

电子信箱: gg@im.ac.cn

网 址: <http://journals.im.ac.cn>