

怀地黄活性内生菌的分离鉴定及抗菌抗肿瘤活性

杨清香* 谢永生 张昊 李学梅

(河南师范大学生命科学学院 河南 新乡 453007)

摘要: 利用平板分离法从怀地黄(*Rehmannia glutinosa* Libosch)中分离出内生菌共 130 株, 包括 67 株细菌、50 株真菌和 13 株放线菌。利用大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和黑曲霉作为供试菌株, 通过对峙试验和平板点接法筛选出 8 株对 3 种供试菌株均具有较强拮抗作用的内生菌。经菌种形态观察、生理生化实验以及 16S rRNA 序列测定, 这 8 株活性内生菌均为假单胞菌属的细菌, 并分别与 *Pseudomonas fluorescens*、*Pseudomonas thivervalensis*、*Pseudomonas chlororaphis*、*Pseudomonas koreensis* 和一个未定种具有最高相似性。对这 8 株活性内生菌进行液体发酵、不同有机溶剂抽提和抗菌抗肿瘤研究, 结果表明它们的乙醇抽提物和乙酸乙酯抽提物均不同程度地对 3 种供试菌株和食管癌细胞系 Ec9706 具有抑制作用。其中 2-2 号菌株(*Pseudomonas chlororaphis*)抗菌抗肿瘤作用最强, 具有重要的开发价值。

关键词: 内生菌, 怀地黄, 抗菌, 抗肿瘤

Isolation, Identification and Antagonism on Microorganisms and Cancer Cells by Active Endophytes from *Rehmannia glutinosa* Libosch

YANG Qing-Xiang* XIE Yong-Sheng ZHANG Hao LI Xue-Mei

(College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang, Henan 453007, China)

Abstract: Using the methods of plate cultivation, 130 strains of endophytes were isolated from *Rehmannia glutinosa* Libosch, including 67 bacteria, 50 fungi and 13 actinomycetes. From them, 8 isolates of bacteria were selected due to their high and wide antagonistic activities to the tested microbial strains, *Escherichia coli*, *Staphalocolcus aureus* and *Aspergillus niger* on the plate confrontation. The 8 active strains of bacteria were classified to genus of *Pseudomonas* and shared the highest identities respectively with 5 species including *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas thivervalensi*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas koreensis* and one unidentified according to their morphological, physiological and chemical characteristics and 16S rRNA sequences. Active products were obtained from the 8 strains through liquid fermentation and further extraction by different organic solvents. Activity studies indicated that the extraction products from all the 8 strains using ethyl acetate or ethanol exhibited significant inhibition on the 3 tested types of microorganisms and esophageal cancer cells

Ec9706. Among them, strain 2-2 had the highest activities of both anti-microorganisms and anticancer showing important value of development.

Keywords: Endophytes, *Rehmannia glutinosa* Libosch, Antibacterial, Anticancer

植物内生菌(Endophyte)是指一类在其部分或全部生活史中存活于健康植物组织内部,而不使宿主植物表现出明显感染症状的微生物^[1]。它们不仅在植物体内广泛存在,并且具有丰富的多样性^[2-3]。由于植物内生菌与植物之间长期的共生关系,使得这类微生物的功能和活性有别于其他环境中的微生物。除了具有对植物的促生长^[4]和赋予植物抗逆性^[5]的作用之外,一些植物中的内生菌还可以产生同植物宿主相同或者相似的活性物质。最典型的例子是紫杉醇,该物质是1971年美国学者Wani从短叶红豆杉中分离出的微量抗肿瘤活性物质^[6],20多年后另一美国学者从该植物的树皮中分离到一种内生真菌*Taxomyces andreanae*,可以通过发酵的方式产生紫杉醇^[7]。目前从植物内生菌中开发的长春碱、鬼臼毒素、球毛壳甲素A、香豆素等都被证明具有很好的抗菌抗肿瘤活性^[8]。

怀地黄^[9](*Rehmannia glutinosa* Libosch)为玄参科(*Scrophulariaceae*)地黄属(*Rehmannia*)多年生草本植物,生长时期主要为育苗期和成熟期2个时期,怀地黄具有多种药效,是常用的治病养生、滋补保健、清热凉血、养阴生津的中药材。近年来,国内学者对怀地黄种植、快繁以及保健作用进行了广泛研究,然而怀地黄内生菌特别是开发活性内生菌的研究还没有报道。

本研究以河南温县道地怀地黄为材料,从植物的各个部位大量分离内生菌,并通过活性筛选的方法从中获得抗菌抗肿瘤活性菌株。

1 材料与方 法

1.1 供试植物

采用多点采样法,分别于2008年9月和2009年3月于河南省温县农用大田采集育苗期和成熟期的怀地黄整棵植株,尽量保持完整性以避免外伤,带回实验室于4℃保存待用。

1.2 培养基^[10]

真菌培养采用PDA琼脂培养基,灭菌后加入硫酸链霉素,使其终浓度为100 mg/L。细菌培养采用牛肉膏蛋白胨培养基。放线菌培养采用高氏一号培

养基。

1.3 内生菌的分离纯化

取新鲜的怀地黄块根,用清水洗去表面泥土,晾干。在无菌条件下去除表皮,依次用70%乙醇、0.1%升汞溶液和70%乙醇分别浸泡3、3和1 min,然后用无菌水清洗5-7次,晾干;取最后一次清洗水涂布于3种培养基上,28℃培养3-5 d,检测表面消毒是否彻底。用无菌刀片将消毒后的怀地黄块根切成1 cm见方的小块,分别接种于3种培养基上,于37℃(细菌)和28℃(真菌和放线菌)培养3-5 d。待平板上怀地黄块周围长出菌后,转移到新鲜培养基上进行划线分纯。

怀地黄叶称取1 g,按照上述方法无菌处理后,在无菌的盛有石英砂的研钵内进行研磨,并用无菌水制成溶液涂布在3种培养基平板上,同上述方法进行培养和菌种分离纯化。

1.4 抗菌活性内生菌的筛选

选取大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphalocolcus aureus*)和黑曲霉(*Aspergillus niger*)作为活性内生菌筛选的供试菌种。抗细菌内生菌的筛选采用平板点接法,供试菌株的接种浓度为 10^5-10^6 CFU/mL,均匀涂布于牛肉膏蛋白胨培养基上之后,将分离出的内生菌点接于平板上,37℃培养48-72 h,观察抑菌圈。抗真菌内生菌的筛选采用平板对峙法,即将分离出的内生菌和黑曲霉分别接种于PDA平板上,两者间隔3 cm,于28℃培养5-7 d,观察黑曲霉菌落生长情况及抑制效果。

1.5 活性内生菌发酵产物的制备和活性成分的提取

采用有机溶剂提取法提取发酵产物活性成分^[11]。将筛选出的具有抗菌活性的内生菌,接种于牛肉膏蛋白胨液体培养基,37℃、180 r/min摇床培养2 d获得发酵液。发酵液分别用等体积的95%乙醇、石油醚和乙酸乙酯抽提,等体积无水乙醇沉淀24 h,8000 r/min离心10 min,取上清液,干燥获得干粉并用于抗菌抗肿瘤实验。

1.6 活性发酵产物的抗菌抗肿瘤实验

将上述获得的干粉状抽提物溶解于无菌水中,

配置成 5 g/L 活性物质溶液(pH 7.0 左右, 不做调整), 利用 KB 纸片法和菌丝生长速率法测量发酵产物的抑菌效果^[12]。细菌的抑制效果通过抑菌圈的大小进行比较; 真菌的抑制效果采用抑菌率进行计算获得, 即将制备好的活性物质溶液按照 1 : 20 加入 PDA 培养基中制成平板, 将活化的黑曲霉用无菌平板打孔器打成直径 5 mm 的菌块, 放于培养基上, 7 d 后观察菌落直径大小, 以不加活性物质的为对照, 按如下公式计算抑菌率

$$\text{抑菌率} = (\text{对照平板菌落直径} - \text{发酵液平板菌落直径}) / \text{对照平板菌落直径} \times 100\%$$

本试验采用食管癌细胞系 Ec9706 为供试细胞进行抗肿瘤实验^[13]。将对数生长期的 Ec9706 食管癌细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化 1 min, 离心收集细胞, 在 96 孔板中按照每孔约 5000 个细胞的量进行铺板, 加入培养液并在 CO₂ 培养箱中培养。将上述活性物质干粉用 pH 7.2 的磷酸缓冲液分别配制成 200 mg/L 的溶液, 无菌滤器过滤后按每孔 50 μL 加入培养 12 h 的 96 孔板中, 继续培养 2-3 h, 显微镜观察。阴性对照组以同样的方法培养, 以同量的磷酸缓冲液代替活性物质溶液。选取 5 个视野计算平均抑制率。抑制率按下列公式计算。

$$\text{抑制率} = \frac{\text{被抑制的细胞数量}}{(\text{生长良好的细胞数量} + \text{被抑制的细胞数量})} \times 100\%$$

1.7 菌种鉴定

将纯化后的菌株进行菌落形态观察、革兰氏染色、生理生化指标测定^[14]和 16S rRNA 的扩增和测序。采用 16S rRNA 通用引物 27f (5'-AGAGTTTGA TCCTGGCTCAG-3') 和 1492r (5'-GGTTACCTTG TTACGACTT-3') 按照常规方法进行 PCR 扩增^[15]。PCR 产物经纯化后由上海生工生物工程有限公司测序。获得的 16S rRNA 序列提交 GenBank 并取得序列号如下: HM057099 (3-7)、HM057100 (3-8)、HM057101 (3-10)、HM057102 (3-11)、HM057103 (3-14)、HM057104 (4-4)、HM057105 (2-2) 和 HM057106 (Y3-3)。

对菌株的 16S rRNA 序列进行 BLAST 比对, 选取相似序列, 利用 MEGA 4.1 软件构建系统进化树, 根据菌株的形态、生理生化特征和 16S rRNA 序列分析结果确定菌株的分类地位。

2 结果与讨论

2.1 怀地黄内生菌的分离和抗菌活性内生菌的初步筛选

按照材料和方法所述, 利用 3 种不同的培养基, 对秋季育苗期和春季成熟期怀地黄叶和块根中的内生细菌、真菌和放线菌进行分离。共分离出内生菌 130 株, 包括 67 株细菌、50 株真菌和 13 株放线菌。其中在块根中分离到菌株 105 株, 叶中 25 株(表 1)。对分离的内生菌通过平板对峙实验进行抗菌活性内生菌的初步筛选, 结果见表 2。

微生物 Microorganisms		块根 Roots	叶片 Leaves	合计 Total
细菌 Bacteria	秋季	17	10	67
	春季	36	4	
真菌 Fungi	秋季	16	6	50
	春季	26	2	
放线菌 Actinomycetes	秋季	4	2	13
	春季	6	1	

由表 2 中可知, 从分离的内生菌中共筛选出对供试菌株中的一种或者多种有拮抗效果的菌株 31 株, 占总分离内生菌的 23.84%。其中 15 株来自秋季育苗期的怀地黄, 16 株来自春季怀地黄, 由此可见, 怀地黄生长期的选择对筛选活性内生菌没有影响。从活性内生菌分离部位来看, 由于总的内生菌分离结果是块根中明显多于叶子中, 因此从块根中分离到的活性内生菌数目也明显多于叶子中, 这应该与块根是主要的营养物质和活性物质储存场所的功能相关。但是, 如果从分离到的活性内生菌占内生菌比例看, 叶子(24%)和块根(22.9%)中的比例没有明显差别, 说明内生菌在块根和叶子之间具有相互转移性。本研究所选择的供试菌株中, 大肠杆菌和金黄色葡萄球菌分别作为革兰氏阴性菌和阳性菌的代表, 而黑曲霉则是霉菌的代表, 由此可见, 这些内生菌在植物体内形成一个广谱性的内生微生态防护系统, 有效预防植物被其他微生物感染。有关这些活性内生菌对怀地黄病源性微生物的拮抗作用有待进一步研究。

在这 31 株活性内生菌中, 对革兰氏阴性和阳性

菌以及霉菌都具有较强抑制作用的菌株共 8 株, 占总分离菌株的 6.15%, 占有拮抗效果菌株的 25.8%。活性内生菌对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和霉菌的抑制效果举例见图 1。

2.2 活性内生菌的生理生化特征及菌种鉴定

对这 8 株内生菌经过革兰氏染色、细胞形态观察和生理生化测定, 结果如表 3 所示。从这 8 株菌的形态和生理生化特征看, 均为杆状、革兰氏染色阴

性、能产生接触酶和氧化酶、硝酸盐还原阳性、葡萄糖发酵阴性、不能产生淀粉酶, 这些特征均符合 *Pseudomonas* (假单胞菌属) 的典型特征^[14]。大部分菌株能产生蛋白酶和脂肪酶。进一步对它们进行 16S rRNA 的扩增和测序, 并经 BLAST 比对后, 发现它们与已报道的菌株的相似性都在 98% 以上, 而且与形态和生理生化测定结果完全一致, 属于假单胞菌属细菌。

表 2 怀地黄内生菌对 3 种供试菌种的拮抗作用

Table 2 Antagonism of the endophytes from *Rehmannia glutinosa* Libosch on the three tested microorganisms

菌株号 Strain No.	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	黑曲霉 <i>A. niger</i>	菌株号 Strain No.	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	黑曲霉 <i>A. niger</i>
1-2	+	+	-	3-1	-	-	+
1-6	+	++	-	3-2	-	+	-
1-7	+	+	-	3-6	-	+	-
1-9	-	+	+	3-7	++	++	+
1-11	-	-	+	3-8	++	++	+
Y1-1	+	+	-	3-10	++	++	+
Y1-2	-	+	+	3-11	++	++	+
2-2	++	++	+	3-14	++	++	+
2-8	-	-	+	Y3-3	++	++	+
2-9	-	-	-	4-3	-	++	-
2-10	-	+	-	4-4	++	++	+
2-13	+	+	+	4-7	-	+	+
Y2-5	++	+	-	4-8	-	+	+
Y2-6	-	+	-	4-13	-	+	+
Y2-8	-	+	+	4-16	+	+	-
				Y4-1	-	+	-

注: +: 具有抑制作用; ++: 强抑制作用; -: 无抑制作用。

Note: +: Inhibited; ++: Strongly inhibited; -: No Inhibition.

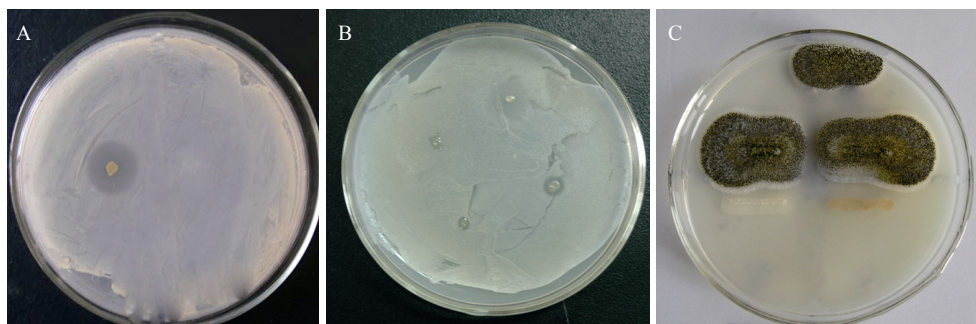


图 1 所分离活性内生菌对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和黑曲霉的抑制效果

Fig. 1 Inhibition effects of the isolated endophytes on the tested microorganisms

注: A: 金黄色葡萄球菌; B: 大肠杆菌; C: 黑曲霉。

Note: A: *E. coli*; B: *S. aureus*; C: *A. nigar*.

表 3 8 株活性内生菌的菌体、菌落形态及生理生化特征
Table 3 Morphological and physiological characteristics of the 8 strains of active endophytes

菌株特征 Characteristics	3-7	3-8	3-10	3-11	3-14	Y3-3	4-4	2-2
细胞形态 Cell shape	杆状	杆状	短杆状	杆状	短杆状	杆状	杆状	杆状
菌落特征 Colony characteristics	乳白、湿润、 圆形、 边缘整齐	浅黄、湿润、 圆形、 边缘整齐	浅黄、湿润、 圆形、 边缘整齐	乳白、湿润、 圆形、 边缘不规则	浅黄、湿润、 圆形、 边缘整齐	浅黄、湿润、 圆形、边缘整 齐	乳白、湿润、 圆形、 边缘整齐	橙黄、湿润、 圆形、 边缘整齐
革兰氏染色/G ⁺ /G ⁻ Gram stain	G ⁻	G ⁻	G ⁻	G ⁻	G ⁻	G ⁻	G ⁻	G ⁻
蛋白酶 Protease	+	+	-	+	-	+	+	-
脂肪酶 Lipase	-	+	+	+	+	+	-	+
淀粉酶 Amylase	-	-	-	-	-	-	-	-
接触酶 Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+
氧化酶 Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+
葡萄糖发酵 Glucose fermentation	-	-	-	-	-	-	-	-
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+	+	+

系统发育分析表明这 8 株活性内生菌分别与假单胞菌属中的 5 个种聚在一起, 包括 *Pseudomonas fluorescens*、*Pseudomonas thivervalensis*、*Pseudomonas chlororaphis*、*Pseudomonas koreensis* 和一个未定种, 如图 2 所示。

菌株 3-8、3-14 和 3-10 都与 *Pseudomonas fluorescens* 聚在一起, 相似性达到 98% 以上。其中 3-8 和 3-14 的 16S rRNA 序列有 16 个碱基的差别, 3-8 和 3-10 之间有 19 个碱基的差别, 3-10 和 3-14 之间有 23 个碱基的差别。它们除了具有假单胞菌属细菌的一般特征外, 能够产生黄橙色细胞色素而使菌落呈现乳黄色, 这正是 *Pseudomonas fluorescens* 的典型特征。该种微生物由于具有生物控制作用而近年来受到关注。Kass 等人早在 2003 年发现该种的一些菌株(CHA0 或 Pf-5)可以保护一些植物的根免受寄生真菌 *Fusarium*、*Pythium* 以及一些植物线虫的损害^[16]。但是有关植物保护作用的机理目前不是很清楚, 从不同菌株中获得的研究证据表明可能在几方面发挥作用, 即在宿主植物中诱导系统性的阻抗作用防止病菌感染; 在获取铁离子等营养物方面比其他土壤微生物具有优势, 因而在土壤环境中能够产生竞争生长优势, 阻止其他病原微生物的感染; 能够产生对其他土壤微生物具有拮抗性的物质, 例

如吩嗪类抗生素或者氰化氢等物质而抑制病原微生物生长^[17]。该种微生物的某些菌株可以通过培养产生抗生素(莫匹罗星), 用于皮肤、耳朵、眼睛等的感染治疗, 无酸莫匹罗星盐和酯目前已经广泛应用于化妆品、药膏以及喷剂中用于治疗金黄色葡萄球菌抗药菌株感染的治疗。

菌株 Y3-3 和 4-4 序列之间相差 8 个碱基, 它们与 *Pseudomonas thivervalensis* 聚在一起, 相似性达到 99%。这两株菌的菌落颜色有所差别, 一些重要的生理生化特征完全一致, 并且符合该种细菌的基本特征。该种的微生物是与荧光假单胞菌比较接近的一个种, 因最早分离自法国的 Thiverval 而定名。该种的多数菌株分离自拟南芥的根中^[18], 可见是一种常见的植物内生菌, 但有关该种菌与植物的关系以及对其他微生物拮抗性的研究很少。

菌株 2-2 和 *Pseudomonas chlororaphis* 聚在一起, 相似性达到 99%。其菌落呈橙黄色, 说明能够产生黄橙色色素, 与 *Pseudomonas chlororaphis* 特征一致。近年来的研究表明该种微生物在植物病害防治方面有很好的效果, 主要通过产生吩嗪类抗生素而发挥对植物病原性真菌感染的拮抗作用, 研究表明其对烟草、棉花、辣椒等的致病菌有很好的抑制作用^[19-20]。

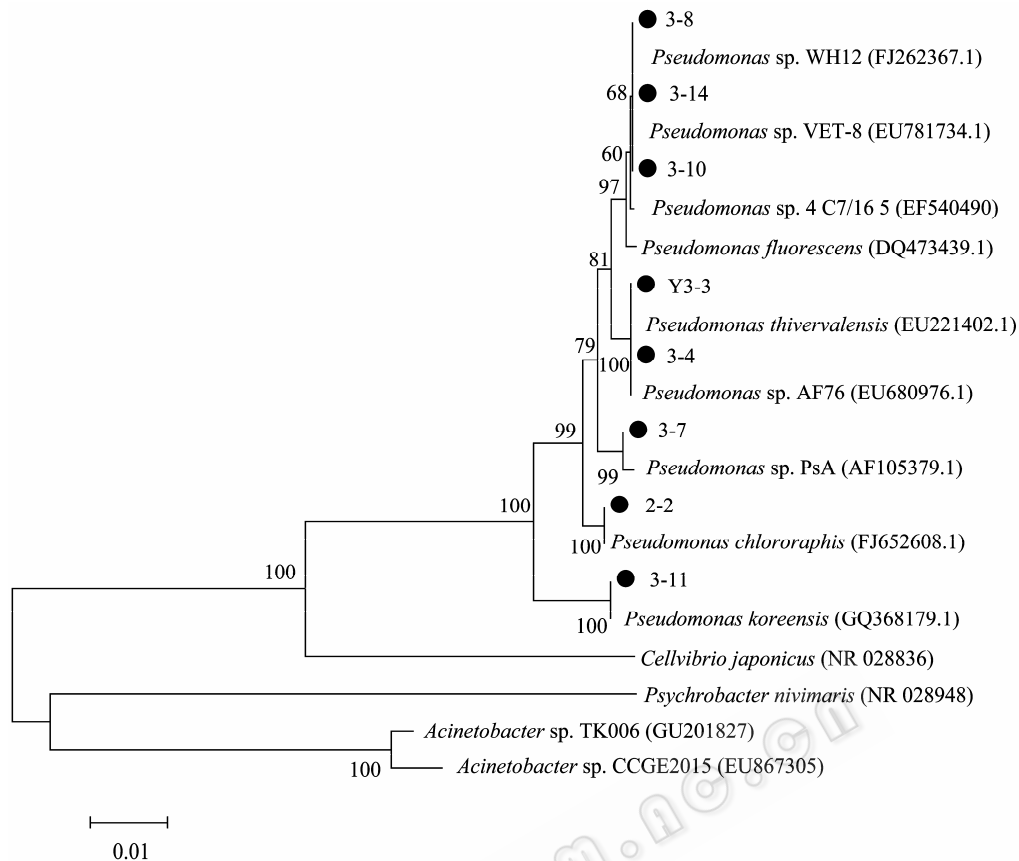


图 2 根据 16S rDNA 全长序列构建的 8 株活性内生菌的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of the 8 strains of active endophytes established by the full length of the 16S rDNA sequences

菌株 3-1 和 *Pseudomonas koreensis* 聚在一起, 相似性达到 98%。近年来对 *Pseudomonas koreensis* 的研究很少, 有学者在韩国农场土壤中发现有 *Pseudomonas koreensis* 的新种^[24]。

菌株 3-7 不能与任何确定的种聚在一起, 但应该是完全不同于上述 4 个种。与其相似的菌株 *Pseudomonas* sp. PsA 分离自根际土壤中。

由以上分析可见, 在所获得的 8 株内生菌中, 大多数种与植物内生菌相关, 其中两个种曾被报道在植物中具有抗细菌、真菌感染的活性, 但是未见从药用植物怀地黄中分离这种活性内生菌的报道。

2.3 活性内生菌的液体发酵产物抑菌效果研究

按照材料与方法所述, 对这 8 株活性内生菌进行液体培养和发酵产物活性物质的制备。这些活性物质对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制效果见表 4, 对黑曲霉的抑制效果见表 5。

从表 4 可以看出, 8 株活性内生菌的发酵产物对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌都有不同程度的抑制作用, 其中 3-8 号和 2-2 号菌对两种供试菌的抑制效果最明显, 它们在大肠杆菌和金黄色葡萄球菌平板上

的抑菌圈直径分别达到 21 mm–26 mm。同时从表 5 中可以看出 2-2 号菌对黑曲霉的抑制效果也最好, 与对照平板相比, 抑制率达到了 55.87%。黑曲霉在有 2-2 号和 3-7 号菌株的发酵产物平板上生长速度明显缓慢, 5 d 培养时间内基本不能形成孢子, 菌丝呈浅黄色, 生长状态明显较差。

表 4 8 株活性内生菌发酵产物对供试细菌的抑制效果 (抑菌圈直径 mm)

Table 4 Inhibition effects of the fermentative products from the 8 strains of active endophytes on the tested bacteria (The diameter of inhibition zone was indicated as mm)

样品 Samples	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>
3-7	17.5	无
3-8	26.0	21.0
3-10	17.1	16.0
3-11	15.6	16.1
3-14	17.5	17.8
Y3-3	无	15.5
4-4	16.9	16.0
2-2	22.0	26.0

表 5 8 株内生菌发酵产物对黑曲霉的抑制效果(培养 5 d)
Table 5 Inhibition effects of the fermentative products from the 8 strains of active endophytes on the rested strain of *A. niger* (After 5 days' cultivation)

样品 Samples	菌落直径 Diameter of colonies (mm)	抑制率 Inhibition ratio (%)	生长状态 Growing state
0	24.00	0	菌丝生长状态好, 生成黑色孢子
3-7	12.00	45.83	菌丝生长很慢, 不能生成孢子
3-8	19.50	18.75	菌丝生长慢, 孢子生长状态不好
3-10	17.00	29.17	菌丝生长慢, 孢子生长状态不好
3-11	15.25	36.46	菌丝生长慢, 孢子生长状态不好
3-14	23.25	3.13	菌丝生长状态好, 能生成孢子
Y3-3	17.50	27.03	菌丝生长慢, 孢子生长状态不好
4-4	20.10	16.20	菌丝生长慢, 孢子生长状态不好
2-2	10.60	55.87	菌丝生长很慢, 不能生成孢子

2.4 发酵产物的抗肿瘤效果研究

按照材料与方法所述, 将获得的活性物质作用于对数生长期的 Ec9706 食管癌细胞进行抗肿瘤试验, 结果见表 6。

显微镜观察表明, 在 96 孔板培养物中具有抑制效果的细胞不同程度脱落、变形甚至凋亡。其中效果最明显的是 2-2 号菌的乙酸乙酯抽提物和乙醇抽提物(图 3)。虽然该菌株如前所述曾被报道过在多种

植物中具有抗真菌感染的作用, 并能产生抗生素, 但有关抗肿瘤的报道还未发现。不同的植物赋予其内生菌不同的特性, 本研究中 2-2 号菌株应该是从怀地黄中获得了产生同时具有抗菌抗肿瘤活性物质的能力, 因此具有重要的开发价值。

从表 6 中可以看出, 不同溶剂提取对活性物质的获得影响很大, 所有菌株的石油醚提取物几乎没有抗肿瘤活性, 而乙酸乙酯和乙醇提取物都具有抗肿瘤活性, 并且两者之间没有明显差别。说明活性内生菌产生的活性物质比较容易溶解在这两种溶剂中。抗肿瘤研究结果表明, 这 8 株活性内生菌的发酵产物对 Ec9706 食管癌细胞的抑制率在 14.5%–34.2%。其中 2-2 号内生菌的乙酸乙酯和乙醇提取物对 Ec9706 食管癌细胞的抑制率最高, 分别达到 32.8%和 34.4%。由于在制备活性物质干粉过程中已经将有机溶剂全部蒸发掉, 因此完全可以排除有机溶剂的影响, 同时在以 pH 7.2 的磷酸缓冲液作为阴性对照的肿瘤培养物中, 细胞贴壁和生长情况良好, 细胞变形脱落比例不足 1%, 如图 3A 所示。这些结果证明所分离的活性内生菌的发酵产物提取物中确实具有抗肿瘤成分存在。

该研究结果只是一个初步的活性检测, 因此所获得的抑制率并不是很理想, 进一步的工作还需要对这些活性内生菌发酵培养基、发酵条件、活性物质提取以及肿瘤细胞株的选择等方面进行深入研究。

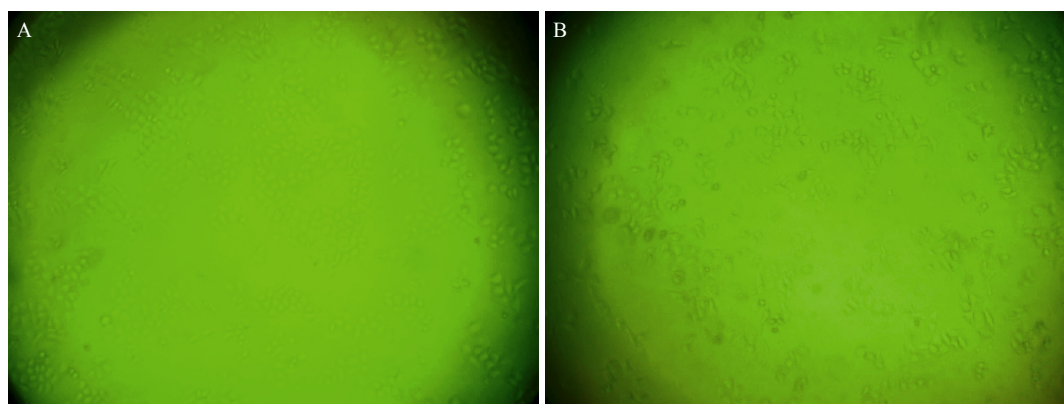


图 3 2-2 号菌株发酵液乙酸乙酯提取物对 Ec9706 食管癌细胞的抑制效果

Fig. 3 Inhibition effects of the acetic ether extracted products from strain 2-2 on esophageal cancer cells Ec9706

注: A: 对照; B: 乙酸乙酯提取物。

Note: A: Control; B: Extracted products in lipid soluble phase.

表 6 8 株活性内生菌发酵液不同溶剂提取物对 Ec9706 食管癌细胞的抑制效果(结果为 5 个视野抑制率的平均值, %)
 Table 6 Inhibition effects of the extracted products from the 8 strains of active endophytes in different solvents on esophageal cancer cell Ec9706 (The values are average from 5 views under a microscope, %)

样品 Sample	石油醚提取物 Ether extracted products	乙酸乙酯提取物 Acetic ether extracted products	乙醇提取物 Ethanol extract products
3-7	无	14.5	15.7
3-8	无	17.5	17.2
3-10	无	15.0	18.9
3-11	无	18.2	22.8
3-14	无	25.6	32.3
Y3-3	无	25.6	28.9
4-4	13.5	28.5	30.2
2-2	无	32.8	34.4

3 结论

本研究从药用植物怀地黄中分离获得 8 株活性内生菌, 它们的发酵产物都对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和黑曲霉有较强抑制作用, 对 Ec9706 食管癌细胞有一定抑制活性。其中 2-2 号菌株(*Pseudomonas chlororaphis*)抗细菌、真菌和抗肿瘤活性最为明显, 具有重要的开发价值。

所分离到的 8 株活性内生菌经鉴定都属于假单胞菌属细菌, 并分属于 5 个不同的种。这些种大多数曾被报道过与植物抗细菌真菌感染有关, 有些还能够产生抗生素, 但是未见过有从怀地黄中分离的报道, 也未见过同时具有抗肿瘤活性的报道。

参 考 文 献

- [1] Zhang Y, Proenca R, Maffei M, *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 1994(372): 425-432.
- [2] Vanessa MC, Christopher M, Franco M. Analysis of the endophytic actinobacterial population in the roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) by terminal restriction fragment length polymorphism and sequencing of 16S rRNA clones. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**(3): 1787-1794.
- [3] Coombs JT, Franco CM. Visualization of an endophytic reptomycetes species in wheat seed. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(7): 42602-42621.
- [4] Clemence C, Eric G, Yves P, *et al.* Photosynthetic bradyrhizobia are natural endophytes of the African wild rice *Oryza breviliguulata*. *Appl Environ Microbiol*, 2000(2): 5437-5447.
- [5] Chen CE, Bauske M, Mussonq, *et al.* Biological control of *Fusarium wilt* on cotton by use of endophytic bacteria.

Biological Control, 1995(5): 83-91.

- [6] Wani MC, Taylor HL, Wall ME, *et al.* Plant antitumor agents. VI. the isolation and structure of Taxol. a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc*, 1971(93): 23-25.
- [7] Stierle A, Stmllel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew (*Taxus brifolia*). *Science*, 1993(260): 214.
- [8] 王利国, 潘超美, 贺红, 等. 抗肿瘤药用植物及其内生菌活性代谢产物研究进展. 广州中医药大学学报, 2008, **3**(25): 2.
- [9] 周春娥, 路淑霞, 周延清, 等. 谷风平怀地黄的研究概况. 安徽农业科学, 2008, **36**(32): 14140-14141, 14165.
- [10] 沈萍. 微生物学实验. 第 3 版. 北京: 高等教育出版社, 1999: 49.
- [11] 陈玉昆. 中药生产工艺学. 沈阳: 沈阳出版社, 1992.
- [12] Qin BF, Zhou L, Miao F, *et al.* Study on the antifungal components in the root of *Stellera chamaejasme*. *Acta Bot Boreal Occident Sinc*, 2003, **23**(11): 1977-1980 (in china).
- [13] 刘吉华, 徐伯阳. 喜树内生真菌的分离及其抗肿瘤活性代谢产物的筛选方法. 植物资源与环境学报, 2004(4): 248-251.
- [14] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [15] Yang Q, Zhang J, Zhu K, *et al.* Influence of oxytetracycline on the structure and activity of microbial community in wheat rhizosphere soil. *Journal of Environmentan Sciences*, 2009, **21**(7): 954-959.
- [16] Haas D, Keel C. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annual Reviews of Phytopathology*, 2003(41): 117-153.
- [17] Haas D, Defago G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews in Microbiology*, 2005, **3**(4): 307-319.
- [18] Achouak W, Sutra L, Heulin T, *et al.* *Pseudomonas brassicacearum* sp. nov. and *Pseudomonas thivervalensis* sp. nov., two root-associated bacteria isolated from *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2000(50): 9-18.
- [19] Chin-A-Woeng TF, Bloemberg TF, Mulders GV, *et al.* Root colonization by phenazine-1-carboxamide-producing bacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is essential for biocontrol of tomato foot and root rot. *Mol Plant Microbe Interact*, 2000, **13**(12): 1340-1345.
- [20] 王远山, 王平. 绿针假单胞菌 PL9 菌株对烟草疫霉的拮抗作用研究. 华中农业大学学报, 2002, **21**(3): 248-251.
- [21] Kwon SW, Kim JS, Park IC, *et al.* *Pseudomonas koreensis* sp. nov., *Pseudomonas umsongsensis* sp. nov. and *Pseudomonas jinjuensis* sp. nov., novel species from farm soils in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, **3**(1): 9-12.