

研究报告

蜘蛛抱蛋属植物内生细菌的多样性及其抗菌活性筛选

方晓梅¹ 柏菁璘¹ 游雪甫¹ 马百平² 张玉琴¹ 余利岩^{1*}

(1. 中国医学科学院北京协和医学院医药生物技术研究所 北京 100050)

(2. 军事医学科学院放射与辐射医学研究所 北京 100850)

摘要:【背景】药用植物中蕴含多样性丰富的内生菌资源, 这些微生物产生的多种新型物质在制药领域表现出较好的应用前景。【目的】研究蜘蛛抱蛋属(*Aspidistra* Ker-Gawl.)植物内生细菌的多样性, 探索药用植物内生细菌在药用活性产物方面的开发潜力, 以期发现具有抗菌活性的次级代谢产物。【方法】对9种13株新鲜的蜘蛛抱蛋植物进行表面消毒, 采用5种分离培养基分离内生细菌; 根据菌落形态特征排除重复菌株, 并测定其16S rRNA基因序列, 构建系统进化树分析内生细菌多样性; 将菌株分别用2种培养基发酵, 使用耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis* ATCC 700044)、水稻白叶枯菌(*Xanthomonas oryzae* PXO99A)、白色念珠菌(*Candida albicans* ATCC 10231)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603)和耐药粪肠球菌 HH22 (*Enterococcus faecalis* HH22) 5种检定菌对分离菌株的发酵液进行抑菌活性筛选。【结果】从植物组织中分离得到了234株内生细菌, 根据形态初步排重得到156株植物内生细菌; 基于16S rRNA基因序列构建的系统进化树显示它们分属于3门10目22科29属, 其中链霉菌属(*Streptomyces*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)和根瘤菌属(*Rhizobium*)的菌株广泛地分布在不同种的蜘蛛抱蛋植株中, 且占据一定优势; 发现可能的潜在新分类单元6个; 156株内生细菌中38株菌的发酵液具有抑菌活性, 初筛阳性率为23.7%。【结论】蜘蛛抱蛋植物组织中含有种类多样的内生细菌, 它们可能是抗菌生物活性次级代谢产物的有效来源。

关键词: 蜘蛛抱蛋, 内生细菌, 多样性, 抑菌活性

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31400045, 81373452, 81321004); CAMS Initiative for Innovative Medicine (2016-I2M-2-002); National Infrastructure of Microbial Resources (NIMR-2017-3); State Project for Essential Drug Research and Development (2018ZX09711001-007-001)

*Corresponding author: Tel: 86-10-63187118; E-mail: yly@cpcc.ac.cn

Received: April 08, 2017; **Accepted:** November 23, 2017; **Published online** (www.cnki.net): December 27, 2017

基金项目: 国家自然科学基金(31400045, 81373452, 81321004); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2016-I2M-2-002); 国家微生物资源平台建设(NIMR-2017-3); 国家重大新药创制课题(2018ZX09711001-007-001)

*通信作者: Tel: 86-10-63187118; E-mail: yly@cpcc.ac.cn

收稿日期: 2017-04-08; 接受日期: 2017-11-23; 网络首发日期(www.cnki.net): 2017-12-27

Endophytic bacteria diversity of *Aspidistra* Ker-Gawl. and their antimicrobial activities

FANG Xiao-Mei¹ BAI Jing-Lin¹ YOU Xue-Fu¹ MA Bai-Ping²
ZHANG Yu-Qin¹ YU Li-Yan^{1*}

(1. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

(2. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: [Background] Medicinal plants constitute the huge diversity of endophytic bacteria. These microbes have potential to synthesis of numerous novel compounds that can be exploited in pharmaceutical industries. [Objective] For the purpose of exploring the pharmaceutically potential of the endophytes in medicinal plants and finding antimicrobial secondary metabolites, endophytic bacteria diversity of *Aspidistra* Ker-Gawl. was investigated. [Methods] After surface sterilization, the tissue fragments of 13 plants, which were classified into 9 different species, were inoculated onto 5 diverse isolation media. Duplicate isolates were eliminated by colony properties. Based on 16S rRNA gene sequencing results, Neighbour-Joining phylogenetic tree was constructed to analyze the endophytic bacteria diversity in *Aspidistra* spp. All the non-duplicated isolates were fermented with two kinds of media. The antimicrobial activities of the endophytic motablisms were detected with 5 testing strains, including *Mycobacterium smegmatis* ATCC 700044, *Xanthomonas oryzae* PXO99A, *Candida albicans* ATCC 10231, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 and resistant strain *Enterococcus faecalis* HH22. [Results] A total of 234 endophytic bacteria were isolated from different plant tissues and 156 non-duplicated strains were confirmed after colony properties checking. These endophytic bacteria strains were classified into 3 phyla, 10 orders, 22 families and 29 genera. Notably, *Streptomyces* sp., *Bacillus* sp., *Microbacterium* sp., *Paenibacillus* sp. and *Rhizobium* sp. were the predominant species in *Aspidistra* spp., and 6 potential novel species were found. The fermentation broth from 38 isolates (23.7%) showed antimicrobial activities. [Conclusion] The data of this study showed an unexpected diversity of endophytes inside the *Aspidistra* tissues, and suggested that endophytic bacteria of the *Aspidistra* tissues are promising sources of new natural secondary metabolites with favorable antimicrobial activities.

Keywords: *Aspidistra*, Endophytic bacteria, Diversity, Antimicrobial activity

现阶段的内生菌研究中, Petrini 提出的内生菌概念被广泛接受^[1]。他将内生菌定义为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微生物^[2]。植物内生菌与宿主植物长期共处存在复杂的微生态关系: 一方面, 植物内生菌侵入宿主植物后, 不易受外界环境条件的影响, 具有相对稳定的生存空间, 可以长期在其中定殖和分布^[3]; 另一方面, 内生菌次级代谢产物具有刺激植物生长发育或提高宿主植物胁迫抗性能力的作用^[4]。Schulz 和 Boyle 将内生菌与其宿主的关系假定为一种“对抗的平衡”^[5]。药用植

物内生菌不仅能够参与植物次生代谢及成分的转化合成, 而且还可独立产生丰富的次级代谢产物, 其中不乏有应用前景广阔的新型生物活性物质^[6-8], 在制药领域具有巨大的潜力^[9]。以临床公认的抗肿瘤药物——紫杉醇为代表, 学者们对植物内生真菌进行了广泛、深入的研究, 然而有关植物内生细菌的生物学作用及其活性物质的研究却相对滞后^[3]。随着各生物学领域的不断发展, 学者们认为植物内生细菌具备更多独特的生物学特性, 将会成为新兴的微生物资源, 对人类生活发挥更大的作用^[4,10-11]。目前学者们已经从内生细菌获得了潜在的具有抗

菌、抗氧化、抗神经变性疾病和酶抑制剂属性的药物先导化合物^[8-16]。蜘蛛抱蛋是百合科蜘蛛抱蛋属的多年生草本植物,其根状茎有祛风解毒、散瘀止痛、健胃生肌等功效。现代药理研究表明,蜘蛛抱蛋的挥发性分泌物对木霉、黑曲霉和金黄色葡萄球菌的生长抑制较强^[17];从卵叶蜘蛛抱蛋中分离到的卵叶酮 A 对革兰氏阴性菌的抑菌效果优于盐酸小檗碱^[18]。还有研究表明蜘蛛抱蛋煎剂对结肠炎耶尔森菌和摩根变形杆菌有抑制作用,而且能够增加胃蛋白酶活性,具有较好的抗溃疡作用^[19]。该药在民间使用量日益增长,然而蜘蛛抱蛋分布区域狭窄,种群较稀少,加之人为大量采挖严重,资源急剧减少^[19]。本文拟对采集自贵州植物园的 9 种 13 株蜘蛛抱蛋植物进行内生菌的多样性研究,并对分离到的菌株进行多种抗菌活性筛选,为寻找能够产生新颖化学结构和作用机理次级代谢产物的生物活性菌株奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物样品

蜘蛛抱蛋属 9 个种的 13 株植物采集于贵阳药用植物园。植物名称详见表 1。

1.2 主要试剂

抑制剂(mg/L):萘啶酮酸 25.0,氨基曲南 25.0,制霉菌素 50.0,重铬酸钾 25.0。抑制剂均购自美国 Sigma 公司。

1.3 培养基

1.3.1 分离培养基

M1 (g/L):酵母粉 0.25,磷酸氢二钾 0.50,琼脂 15.00, pH 7.2。

M3 (g/L):丙酸钠 2.00,硝酸铵 0.10,氯化钾 0.10,七水硫酸镁 0.05,七水硫酸亚铁 0.05,琼脂 15.00, pH 7.2。

M4 (g/L):淀粉 2.00,磷酸氢二钾 0.50,硫酸镁 0.50,硝酸钾 1.00,氯化钠 0.40, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01,琼脂 15.00, pH 7.2。

M5 (g/L):琥珀酸钠 0.90,磷酸二氢铵 0.50,七

水硫酸镁 0.10,七水硫酸亚铁 0.01,琼脂 15.00, pH 7.2。

M6 (g/L):复合维生素 0.01,琼脂 15.00, pH 7.2。

以上培养基均 1×10^5 Pa 灭菌 15 min。

1.3.2 菌株纯化及继代培养基

PYG 培养基(g/L):蛋白胨 3.0,酵母粉 5.0,丙三醇 10 mL, pH 7.2。 1×10^5 Pa 灭菌 15 min。

1.3.3 发酵培养基

放线菌 A1 培养基(g/L):黄豆粉 15.0,可溶性淀粉 30.0,磷酸氢二钾 0.5,硫酸亚铁 0.5,硫代硫酸钠 20.0 μg ,氯化钾 0.3, pH 7.2。 1×10^5 Pa 灭菌 15 min。

放线菌 A2 培养基(g/L):葡萄糖 10.0,可溶性淀粉 30.0,棉籽饼粉 20.0,酵母膏 3.0,硫酸铵 3.0,硫酸镁 1.0,磷酸氢二钾 1.0,氯化钠 1.0,碳酸钙 5.0, pH 7.2。 1×10^5 Pa 灭菌 15 min。

细菌 B1 培养基(g/L):葡萄糖 20.0,干酵母 3.0,硫酸镁 0.5,氯化钠 0.5,黄豆饼粉 20.0,磷酸氢二钾 1.0,氯化钾 0.5,维生素 B 0.5 μg 。 1×10^5 Pa 灭菌 15 min。

细菌 B2 培养基(g/L):大豆蛋白胨 20.0,葡萄糖 2.5,氯化钠 5.0,磷酸氢二钾 2.5,维生素 B 0.5 μg 。 1×10^5 Pa 灭菌 15 min。

1.4 检定菌

耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis* ATCC 700044)、水稻白叶枯菌(*Xanthomonas oryzae* PXO99A)、白色念珠菌(*Candida albicans* ATCC 10231)、肺炎雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603)、粪肠球菌 HH22 (*Enterococcus faecalis* HH22, 临床分离株,对庆大霉素、青霉素、红霉素和四环素等多重耐药),由中国药学微生物菌种保藏管理中心和本所药理室保藏。

1.5 植物表面消毒及菌株分离、保藏

植物表面消毒、内生菌分离及菌株保藏参考魏玉珍等^[20]的方法。

1.6 菌种初步鉴定和多样性分析

菌种初步鉴定参照徐丽华等主编的《放线菌系统学》相关方法操作^[21]。将同一植物组织来源的内生菌根据菌落和菌体形态初步观察排除重复菌株,

表 1 蜘蛛抱蛋植物内生细菌分离结果

Table 1 Endophytic bacteria isolated from *Aspidistra* spp.

植物编号 Plant No.	植物名称 Species of <i>Aspidistra</i>	植物组织部位 Plant tissue	各植物组织中分离得到的细菌数量(株)		从不同培养基上分离得到的细菌数量(株)					合计(株) Total
			Strain numbers isolated from different tissues		Strain numbers isolated from different media					
			根 Root	叶 Leaf	M1	M3	M4	M5	M6	
1	广西蜘蛛抱蛋	根	18	0	1	0	0	14	3	18
	<i>A. retusa</i>	叶	0	0	0	0	0	0	0	0
2	贵州蜘蛛抱蛋	根	13	0	1	2	3	5	2	13
	<i>A. guizhouensis</i>	叶	0	3	0	1	2	0	0	3
3	荔波蜘蛛抱蛋	根	18	0	0	4	7	4	3	18
	<i>A. liboensis</i>	叶	0	10	2	4	0	1	3	10
4	平塘蜘蛛抱蛋	根	25	0	3	9	2	8	3	25
	<i>A. pingtangensis</i>	叶	0	0	0	0	0	0	0	0
5	伞柱蜘蛛抱蛋	根	9	0	0	4	0	1	4	9
	<i>A. fungilliformis</i>	叶	0	0	0	0	0	0	0	0
6	伞柱蜘蛛抱蛋	根	8	0	5	0	1	1	1	8
	<i>A. fungilliformis</i>	叶	0	1	0	0	0	1	0	1
7	四川蜘蛛抱蛋	根	16	0	3	1	2	2	8	16
	<i>A. sichuanensis</i>	叶	0	11	4	2	0	0	5	11
8	四川蜘蛛抱蛋	根	15	0	6	0	0	2	7	15
	<i>A. sichuanensis</i>	叶	0	3	1	0	0	2	0	3
9	四川蜘蛛抱蛋	根	7	0	1	0	1	1	4	7
	<i>A. sichuanensis</i>	叶	0	0	0	0	0	0	0	0
10	线叶蜘蛛抱蛋	根	16	0	3	4	5	0	4	16
	<i>A. linearifolia</i>	叶	0	3	1	0	0	2	0	3
11	线叶蜘蛛抱蛋	根	15	0	12	1	2	0	0	15
	<i>A. linearifolia</i>	叶	0	5	0	3	2	0	0	5
12	长瓣蜘蛛抱蛋	根	5	0	0	0	3	0	2	5
	<i>A. longipetala</i>	叶	0	3	0	1	1	1	0	3
13	蜘蛛抱蛋	根	23	0	3	4	6	5	5	23
	<i>A. elatior</i>	叶	0	7	1	1	2	1	2	7
小计 Subtotal	13 株植物 26 个植物组织 13 Species, 26 Tissues		188	46	47	41	39	51	56	234

并统计分离菌株的组织来源及培养基。将同一宿主植物来源的分离菌株进一步依据形态特征排重。测定内生细菌的 16S rRNA 基因序列, 并将结果提交 EzTaxon 网站(<http://www.eztaxon.org>)^[22], 与相关属种中有效发表菌株的 16S rRNA 基因序列比对, 初步判定菌株的所属类群。利用软件(<http://bioinfo.cnb.csic.es/tools/venny>)绘制 Venn 图, 比较内生菌种群在不同植物组织(根部组织和叶片组织)中的

生态分布情况; 根据 Eztaxon 中序列对比结果, 从 GenBank 数据库中调集相关序列, 运用 ClustalX 1.8 软件进行比对并计算供试菌株与参比菌株之间的序列相似性^[23]; 应用 MEGA 5.0 软件^[24]采用邻接法(Neighbour-Joining)构建系统进化树, 分析内生细菌的系统发育地位及物种多样性特点。

1.7 发酵液抗菌活性测定

将内生细菌依据菌株类型分别接种于 2 种发

酵培养基中(典型放线菌形态菌株接种于放线菌 A1、A2 培养基, 细菌形态菌株接种于细菌 B1、B2 培养基), 28 °C、200 r/min 培养 6 d。取 7.5 mL 发酵液于 4 °C、6 000 r/min 离心 10 min 得到上清; 菌体部分用 7.5 mL 丙酮抽提, 4 °C 低温真空浓缩至干燥后溶于 1 mL 的 DMSO 中得到菌体粗提样品。用直径为 6 mm 的圆形无菌滤纸片分别吸取 40 μ L 发酵液上清和菌体粗提样品, 置于含有相应检测菌的检定平板上, 培养 18 h 后测定抑菌圈直径大小。

2 结果与分析

2.1 蜘蛛抱蛋植株内生细菌分离结果

内生细菌在植物体中的分布具有普遍性、多样

性的特点, 在目前研究过的所有植物中均发现有内生细菌^[8]。本研究从 9 个种 13 株 26 份蜘蛛抱蛋植物组织中初步分离得到 234 株纯培养物(表 1)。由表 1 可知, 内生细菌普遍存在于不同种的蜘蛛抱蛋植物中, 根部组织来源的菌株数量明显高于叶片组织; M5 和 M6 培养基的分离效果较好, 分别得到 51 和 56 株纯培养物。

2.2 蜘蛛抱蛋内生细菌在宿主植株内的生态分布

将分离得到的内生细菌按照宿主植株来源不同, 经过形态排重后最终得到 156 株纯培养物, 测定其 16S rRNA 基因序列。将结果提交 EzTaxon 网站, 初步判定这些内生细菌分属于 29 个属。Venn 图(图 1)显示芽孢杆菌属(*Bacillus*)、链霉菌属(*Streptomyces*)

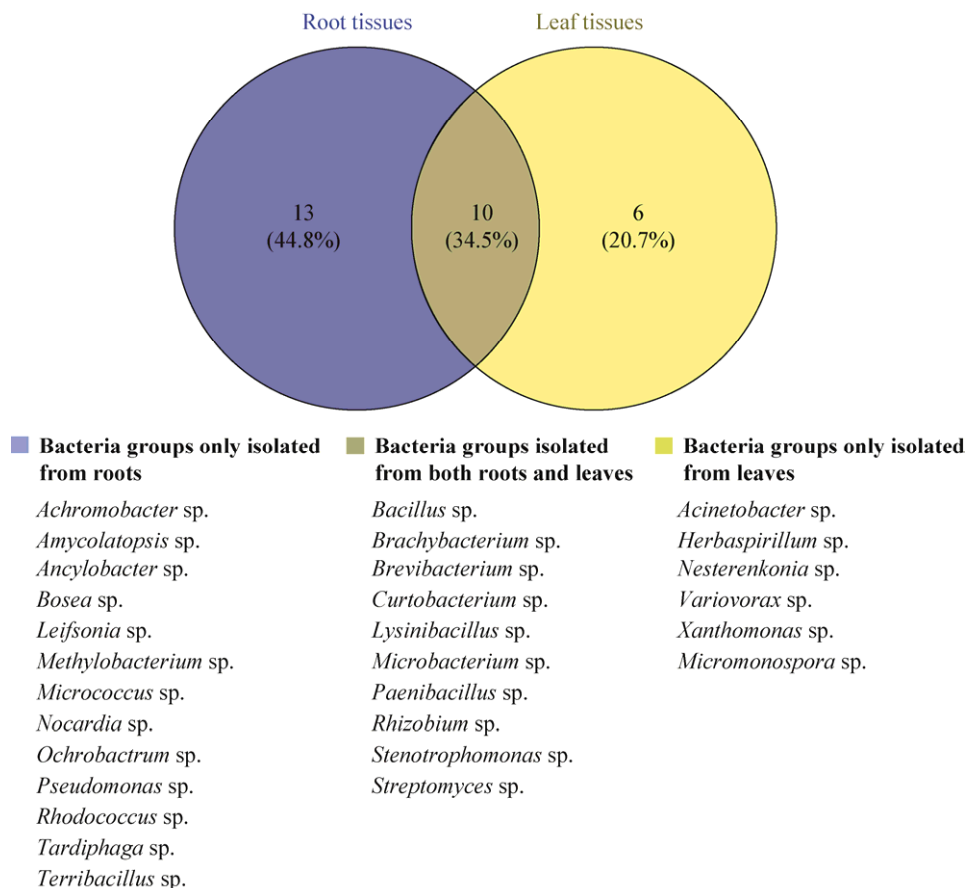


图 1 蜘蛛抱蛋植株根部和茎部组织分离得到的微生物类群比较 Venn 图

Figure 1 Venn map of endophytic bacteria groups isolated from different plant tissues of *Aspidistra* spp.

等 10 个属的菌株在根部和叶片组织均有分布, 占内生菌种属总数的 34.5%; 13 个菌属的菌株(如 *Achromobacter* sp.、*Amycolatopsis* sp.、*Ancylobacter* sp. 等)仅在根部组织中分离得到, 占 44.8%, 6 个菌属的菌株仅在叶片组织中分离得到(如 *Acinetobacter* sp.、*Herbaspirillum* sp.和 *Nesterenkonia* sp.等), 占 20.7%。

2.3 蜘蛛抱蛋植株内生细菌基于 16S rRNA 基因序列的多样性分析

16S rRNA 基因序列比对结果显示蜘蛛抱蛋内生菌呈现出较丰富的物种多样性: (1) 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统进化树(图 2)显示 156 个菌株分属于放线菌门、变形菌门和厚壁菌门 3 个门,

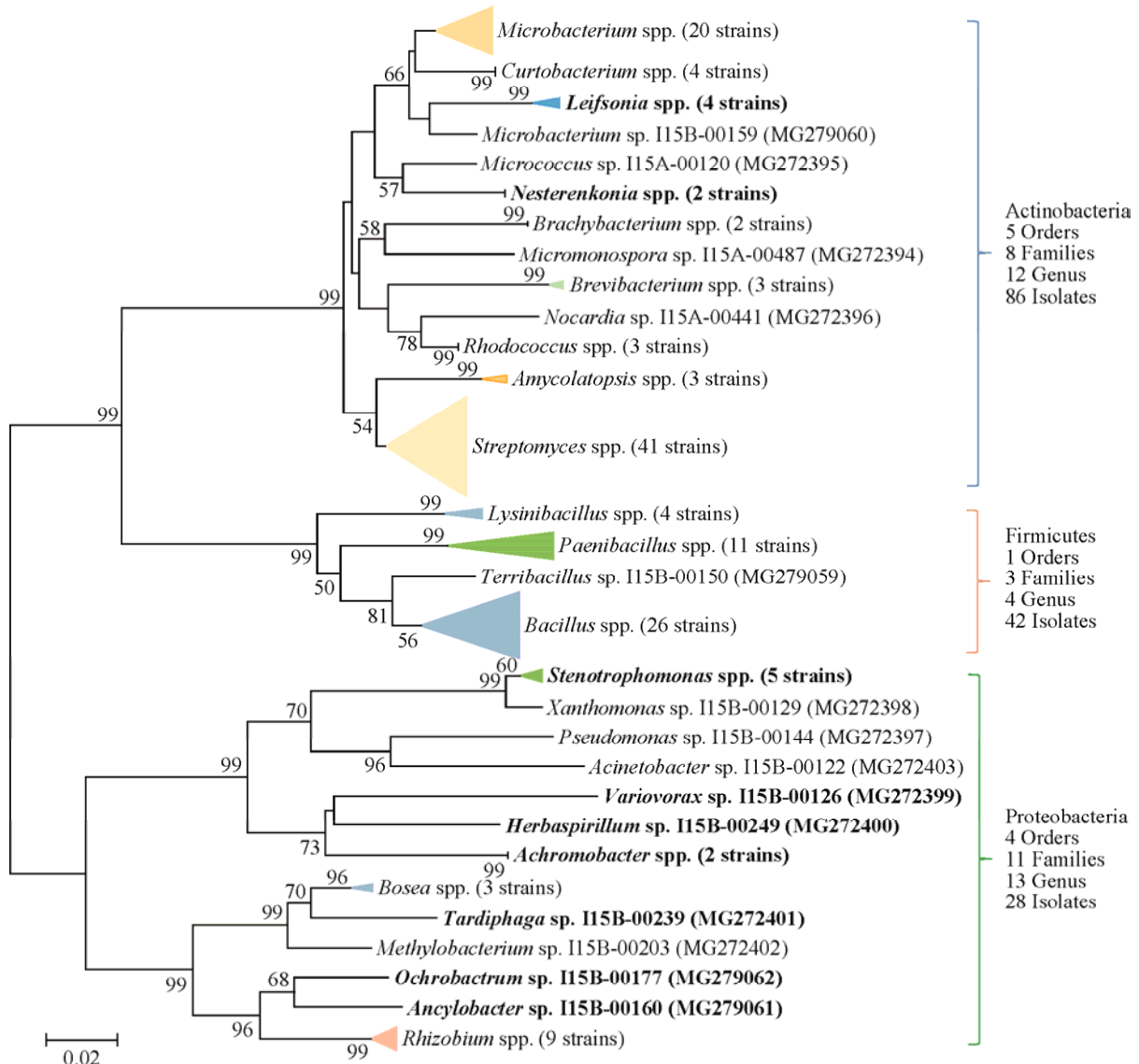


图 2 156 株蜘蛛抱蛋内生细菌基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树

Figure 2 Neighbour-Joining phylogenetic tree based on the 16S rRNA genes sequence of 156 endophytic bacteria isolated from *Aspidistra* spp.

注: 菌种名称后括号内的数字代表该属内分离得到的菌株数目; 菌株名称后括号内的序号为 NCBI 序列编号; 分支点上数字为重复 1 000 次的自展值; 标尺 0.02 为核苷酸替换率; 加粗字体的菌株为潜在的新的分类单元或稀有种属。

Note: Numbers after the spp. indicate the number of isolated strains; NCBI accession numbers were listed behind strain numbers. Numbers at nodes indicate percentage levels of bootstrap support based on a Neighbour-Joining analysis of 1 000 resampled datasets. The scale bar indicates 0.02 substitutions per nucleotide position. The strains marked bold font indicate the potential novel or rare species.

10个目22个科的29个属。其中放线菌门86株,占55.1%,归属于5个目8个科12个属;厚壁菌门42株,占26.9%,归属于Bacillales目3个科的4个属;变形菌门28株,占17.9%,归属于4个目11个科的13个属。(2)内生菌中链霉菌属(*Streptomyces*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)占据一定的优势,分别分离到41、26、20和11株。(3)分离得到了一些稀有的物种,如*Ochrobactrum*、*Stenotrophomonas*、*Variovorax*、*Herbaspirillum*、*Achromobacter*、*Tardiphaga*等属的菌株。此外,分离得到的7个菌株与其近源菌株的16S rRNA基因序列相似性低于98.5%,可能代表了6个潜在的新分类单元(新种),它们分别属于微杆菌属(*Microbacterium*)、涅斯捷连科氏菌属(*Nesterenkonia*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、屈曲杆菌属(*Ancylobacter*)、短杆菌属(*Brevibacterium*)和嗜麦芽窄食单胞菌属(*Stenotrophomonas*),其确切的分类地位需要综合多相分类的各方面数据来进一步确定^[25]。

2.4 次级代谢产物抗菌活性筛选

以耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis* ATCC 700044)、水稻白叶枯菌(*Xanthomonas oryzae* PXO99A)、白色念珠菌(*Candida albicans* ATCC 10231)、肺炎雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603)和粪肠球菌 HH22 (*Enterococcus faecalis* HH22)为检定菌,对分离到的156株内生菌发酵液离心、粗提得到的624份上清和菌体粗提样品进行了抗菌(包括抗耐药菌)活性的初步检测,发现38株内生菌的48份发酵液粗提品显示了对检定菌的抗菌活性,初筛菌株阳性率为23.7%(表2)。阳性发酵液中有31份发酵液粗提品对一种或多种检定菌表现出较强的抑制活性(抑菌直径>10 mm);25份发酵液具有广谱抗菌特性,同时对2种以上检定菌有抑制作用,而其余23个发酵液则表现出相对特异的抗菌活性。

对38株初筛阳性菌株的16S rRNA基因序列对比结果(表2)的统计分析表明,初筛阳性菌株主要

集中在*Streptomyces*属(19株)、*Bacillus*属(14株)以及*Paenibacillus*属(3株),放线菌和芽孢菌是本研究中初筛阳性代谢产物的主要来源。

统计38株初筛阳性菌株的植物来源,发现它们广泛分布于蜘蛛抱蛋植物宿主的根和叶中(表2)。不同发酵培养基的成分对内生细菌的抗菌活性有一定影响,12株A1培养基发酵的放线菌表现出抑菌活性,19株A2培养基发酵的放线菌表现出活性,2种培养基对放线菌发酵液的抑菌活性贡献相当,而初筛阳性细菌只有在使用B1培养基时才能发酵出活性。

3 讨论与结论

本研究采用5种培养基对蜘蛛抱蛋属9个种的植株(根、叶)进行了内生细菌分离,共分离得到内生菌234株,研究表明内生菌存在于不同种植物体内,其分布具有广泛性。内生菌分离实验表明M5(琥珀酸钠)和M6(水琼脂)培养基的分离效果较好,进一步验证了琥珀酸钠对细菌的分离具有较好的选择作用^[26]。本实验中寡营养培养基(M6)在分离过程中避免了常规菌群的快速繁殖,因而也取得了较好的分离效果。

迄今为止,蜘蛛抱蛋属药用植物内生菌的多样性研究尚未见报道。基于16S rRNA基因序列的系统发育分析表明,156株蜘蛛抱蛋内生菌分属于放线菌门、厚壁菌门和变形杆菌门。上述三大类群微生物广泛存在于不同种的蜘蛛抱蛋植株中,尤其是以链霉菌属、芽孢菌属、微杆菌属、类芽孢属和根瘤菌属等最为普遍。前期有科学家也发现人参、甘蔗、瑞香狼毒等植物的优势内生菌群为放线菌门的链霉菌、微杆菌和微球菌,厚壁菌门的芽孢杆菌、类芽孢杆菌,以及变形杆菌门的根瘤菌和葡糖醋杆菌^[27-29]。除了这些普遍存在的内生菌群外,本研究还在蜘蛛抱蛋植株中发现了一些稀有的种属和7个潜在的微生物新物种,这对于开发药用植物内生细菌资源具有重要的研究意义。

表 2 初筛阳性菌株来源及其抗菌活性结果

Table 2 Source of positive activity strains and their antibiotic activities

发酵编号 Fermentation No.	菌株号 Strain No.	菌株来源 Isolation source	近源菌株 Top-hit type strain	发酵液上清抗菌活性(抑菌圈直径, mm)						菌体粗提样品抗菌活性(抑菌圈直径, mm)									
				PX099A	HH22	ATCC 700603	ATCC 700044	ATCC 10231	+	-	PX099A	HH22	ATCC 700603	ATCC 700044	ATCC 10231	+	-		
I15AB-00404	I15A-00404	线叶蜘蛛抱蛋根部	<i>S. somaliensis</i> NBRC 12916 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
I15AA-00409	I15A-00409	线叶蜘蛛抱蛋根部	<i>S. fulvissimus</i> DSM 40593 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
I15AB-00409	I15A-00409	线叶蜘蛛抱蛋根部	<i>S. fulvissimus</i> DSM 40593 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
I15AB-00411	I15A-00411	荔波蜘蛛抱蛋根部	<i>S. badius</i> NRRL B-2567 ^T	-	-	-	-	10.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I15AA-00412	I15A-00412	荔波蜘蛛抱蛋根部	<i>S. pluricOLORescens</i> NBRC 12808 ^T	-	11.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I15AB-00412	I15A-00412	荔波蜘蛛抱蛋根部	<i>S. pluricOLORescens</i> NBRC 12808 ^T	+	+	14.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.5
I15AA-00413	I15A-00413	荔波蜘蛛抱蛋叶片	<i>S. tendae</i> ATCC 19812 ^T	11.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
I15AB-00413	I15A-00413	荔波蜘蛛抱蛋叶片	<i>S. tendae</i> ATCC 19812 ^T	-	14.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I15AB-00415	I15A-00415	罗甸蜘蛛抱蛋根部	<i>S. hydrogenans</i> NBRC 13475 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.0
I15AB-00416	I15A-00416	荔波蜘蛛抱蛋根部	<i>S. hydrogenans</i> NBRC 13475 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.0
I15AA-00418	I15A-00418	荔波蜘蛛抱蛋根部	<i>S. hydrogenans</i> NBRC 13475 ^T	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
I15AB-00418	I15A-00418	荔波蜘蛛抱蛋根部	<i>S. hydrogenans</i> NBRC 13475 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.0
I15AA-00420	I15A-00420	荔波蜘蛛抱蛋根部	<i>S. sindenensis</i> NBRC 13475 ^T	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
I15AB-00420	I15A-00420	荔波蜘蛛抱蛋根部	<i>S. sindenensis</i> NBRC 13475 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
I15AB-00423	I15A-00423	伞柱蜘蛛抱蛋根部	<i>S. hydrogenans</i> NBRC 13476 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.0
I15AA-00424	I15A-00424	伞柱蜘蛛抱蛋根部	<i>S. badius</i> NRRL B-2567 ^T	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I15AA-00432	I15A-00432	四川蜘蛛抱蛋叶片	<i>S. vinaceusdrappus</i> NRRL 2363 ^T	-	-	13.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I15AB-00432	I15A-00432	四川蜘蛛抱蛋叶片	<i>S. vinaceusdrappus</i> NRRL 2363 ^T	13.0	-	-	21.0	-	-	-	-	-	-	-	-	16.0	21.0	16.0	10.0
I15AB-00435	I15A-00435	四川蜘蛛抱蛋叶片	<i>S. rocheti</i> NBRC 12908 ^T	15.0	-	-	18.0	-	-	-	-	-	-	-	13.5	12.0	8.0	-	-
I15AA-00442	I15A-00442	线叶蜘蛛抱蛋根部	<i>St. chelaiiphaga</i> LPM-5 ^T	9.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I15AB-00452	I15A-00452	线叶蜘蛛抱蛋叶片	<i>St. plicatus</i> NBRC 13071 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	16.0	15.0	11.0	-
I15AB-00457	I15A-00457	线叶蜘蛛抱蛋根部	<i>A. tolypomycina</i> DSM 44544 ^T	-	14.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
I15AA-00458	I15A-00458	贵州蜘蛛抱蛋根部	<i>S. plicatus</i> NBRC 13071 ^T	-	-	-	11.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I15AB-00458	I15A-00458	贵州蜘蛛抱蛋根部	<i>S. plicatus</i> NBRC 13071 ^T	10.0	-	-	19.0	-	-	-	-	-	-	15.0	22.0	21.0	12.0	12.0	6.0

(待续)

目前已报道的内生菌大多可产生如抗肿瘤或抗菌类等活性成分^[30]。Cho 等发现一些人参内生菌(类芽孢杆菌、芽孢杆菌和假单胞菌等)具有对植物病原真菌生物防治的潜在活性^[27]。本研究发现 23.7%的蜘蛛抱蛋内生菌发酵液具有抑菌活性,其中链霉菌属、芽孢菌属以及类芽孢属的代谢产物在抗菌活性方面表现了较大潜力。此外,发酵培养基的选择对微生物次级代谢产物的产生具有重要的作用,本研究中得到的 624 份发酵液上清及菌体粗提样品中有 48 份样品表现出抑菌活性,它们为 A1、A2 及 B1 培养基发酵得到,而 B2 培养基发酵得到的发酵液没有表现出抑菌活性,提示在发酵培养基中加入适量棉籽饼粉或黄豆饼粉等有机氮源,可能有利于微生物合成活性次级代谢产物。有机氮源在其他抗生素(如青霉素)发酵过程中的应用也起到了促进效价提升作用^[31]。

多样性的物种可以为寻找多样性的化合物提供机会,期望在多样性丰富的内生菌中寻找更多在化学结构和作用机理上有前景的新药以满足人类治疗的需求。目前本研究已经筛选得到 38 株具备不同药理活性的阳性菌。本实验分离得到的 *Ochrobactrum*、*Stenotrophomonas*、*Variovorax* 等稀有种属的菌株或者潜在新种菌株的代谢产物未表现出抗菌活性,极大可能是由于我们对这类微生物知之甚少,利用现有的培养条件不能满足它们的生长需求,或者某种代谢途径在普通培养条件下不能表达或表达较弱,而导致其代谢产物未能表现出药理活性。在前期的研究中,科学家也从植物组织中分离得到了类似的稀有微生物^[32-37]。这些菌属的菌株在以往的研究中体现了丰富的生理活性潜能,如 *Herbaspirillum* sp.、*Stenotrophomonas* sp. 等菌株在植物的根瘤中起到了固氮作用^[38-39]; *Leifsonia* sp.、*Ochrobactrum* sp. 等菌株能够分泌吡啶乙酸促进植物生长^[40-41]; 在 *Variovorax* sp. 的菌株中发现了能够编码木质纤维素降解酶的基因组^[42]; *Achromobacter* sp.、*Stenotrophomonas* sp. 等菌株对常见的根际真菌冻土毛霉(*Mucor hiemalis*)具有强

烈的拮抗作用,并且能够抑制植物致病真菌立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)^[43-44]; *Leifsonia* sp. 能够脱去 7-木糖基-10-脱乙酰基浆果赤霉素 III 和 7-木糖基-10-脱乙酰紫杉醇中的木糖基,产生 10-脱乙酰基浆果赤霉素 III 和抗癌药物紫杉醇前体 10-脱乙酰紫杉醇^[45]。由此推测这些较为稀有的内生菌与其宿主植物及其它微生物之间通过不同代谢途径相互作用,它们在环境压力下各自形成不同的“适应”或“御敌”策略,产生许多具有应用潜力的生物活性物质,发挥多种多样的生物学功能,从而达到自身的物质需求平衡。

在后续的研究中,积极探索这些稀有微生物的分离、培养条件,采取传统的药物模型和基因筛选相结合的策略对药用植物内生菌进行药理活性潜力评估,将为药用植物内生细菌资源的开发提供更全面的参考。

致谢:感谢军事医学科学院放射医学研究所马百平研究员在药用植物功效判定方面的悉心指导,感谢中国医学科学院药用植物研究所郭宝林研究员在药用植物采集和鉴定方面给予的大力帮助。

REFERENCES

- [1] Petrini O. Fungal endophytes of tree leaves[A]//Andrews JH, Hirano SS. Microbial Ecology of Leaves[M]. New York: Springer-Verlag, 1991: 179-197
- [2] Guo LD. Advances of researches on endophytic fungi[J]. Mycosystema, 2001, 20(1): 148-152 (in Chinese)
郭良栋. 内生真菌研究进展[J]. 菌物学报, 2001, 20(1): 148-152
- [3] Feng TX, Wang L, Chen HM, et al. Research advances on function and bioactive substances of Endophytic actinomycetes[J]. China Biotechnology, 2015, 35(4): 98-106 (in Chinese)
冯天祥, 王玲, 陈海敏, 等. 植物内生放线菌功能及生物活性物质研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2015, 35(4): 98-106
- [4] Beiranvand M, Amin M, Hashemi-Shahraki A, et al. Antimicrobial activity of endophytic bacterial populations isolated from medical plants of Iran[J]. Iranian Journal of Microbiology, 2017, 9(1): 11-18
- [5] Schulz B, Boyle C. The endophytic continuum[J]. Mycological Research, 2005, 109(6): 661-686
- [6] Li JY, Strobel G, Sidhu R, et al. Endophytic taxol-producing fungi from bald cypress, *Taxodium distichum*[J]. Microbiology, 1996, 142(Pt 8): 2223-2226
- [7] Nalini MS, Prakash HS. Diversity and bioprospecting of

- actinomycete endophytes from the medicinal plants[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2017, 64(4): 261-270
- [8] Stone JK, Bacon CW, White JF, et al. An overview of endophytic microbes: endophytism defined[A]//Bacon CE, White JF Jr. *Microbial Endophytes*[M]. New York: Marcel Dekker, 2000: 29-33
- [9] Golinska P, Wypij M, Agarkar G, et al. Endophytic actinobacteria of medicinal plants: diversity and bioactivity[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2015, 108(2): 267-289
- [10] Dinesh R, Srinivasan V, Sheeja TE, et al. Endophytic actinobacteria: diversity, secondary metabolism and mechanisms to unsilence biosynthetic gene clusters[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2017, 43(5): 546-566
- [11] Matsumoto A, Takahashi Y. Endophytic actinomycetes: promising source of novel bioactive compounds[J]. *Journal of Antibiotics*, 2017, 70(5): 514-519
- [12] Chen YT, Yuan Q, Shan LT, et al. Antitumor activity of bacterial exopolysaccharides from the endophyte *Bacillus amyloliquefaciens* sp. isolated from *Ophiopogon japonicus*[J]. *Oncology Letters*, 2013, 5(6): 1787-1792
- [13] Taechowisan T, Wanbanjob A, Tuntiwachwuttikul P, et al. Identification of *Streptomyces* sp. Tc022, an endophyte in *Alpinia galanga*, and the isolation of actinomycin D[J]. *Annals of Microbiology*, 2006, 56(2): 113-117
- [14] Jasmine DJ, Agastian P. *In vitro* antioxidant activity and *in vivo* alpha glucosidase activity of endophytic actinomycetes isolated from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don[J]. *Journal of Pharmacy Research*, 2013, 6(6): 674-678
- [15] Zhou H, Yang YB, Peng TF, et al. Metabolites of *Streptomyces* sp., an endophytic actinomycete from *Alpinia oxyphylla*[J]. *Natural Product Research*, 2014, 28(4): 265-267
- [16] Indananda C, Igarashi Y, Ikeda M, et al. Linfuranone A, a new polyketide from plant-derived *Microbispora* sp. GMKU 363[J]. *The Journal of Antibiotics*, 2013, 66(11): 675-677
- [17] Guo AJ. Study on characteristic of carbon fixation and transpiration of 10 interior foliage plants[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Forestry University, 2004 (in Chinese)
郭阿君. 10 种室内观叶植物固碳释氧、蒸腾、抑菌特性的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学硕士学位论文, 2004
- [18] Liang XX, Kong LX, He M. A new homoisoflavone compound as a potent antibacterial agent from *Aspidistra typica* baill[J]. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 2016, 25(9): 700-703
- [19] Jiang XH, She CW, Zhang M, et al. A primary study on the ecology of medicinal plants *A. triloba* F. T. Wang et K. Y. Lang[J]. *Northern Horticulture*, 2010(8): 33-35 (in Chinese)
蒋向辉, 余朝文, 张敏, 等. 珍稀药用植物湖南蜘蛛抱蛋生态学初步研究[J]. *北方园艺*, 2010(8): 33-35
- [20] Wei YZ, Zhang YQ, Zhao LL, et al. Isolation, screening and preliminary identification of endophytic actinobacteria from Mangroves at Shankou of Guangxi Province[J]. *Microbiology China*, 2010, 37(6): 823-828 (in Chinese)
魏玉珍, 张玉琴, 赵莉莉, 等. 广西山口红树林内生放线菌的分离、筛选及初步鉴定[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(6): 823-828
- [21] Xu LH, Li WJ, Liu ZH, et al. Actinomycete Systematic—Principle, Methods and Practice[M]. Beijing: Science Press, 2007: 40-47,66-80,119-128 (in Chinese)
徐丽华, 李文均, 刘志恒, 等. *放线菌系统学——原理、方法及实践*[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 40-47,66-80,119-128
- [22] Chun J, Lee JH, Jung Y, et al. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(Pt 10): 2259-2261
- [23] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(24): 4876-4882
- [24] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731-2739
- [25] Stackebrandt E, Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards[J]. *Microbiology Today*, 2006, 33(4): 152-155
- [26] Zhang JL, Qin YL, Xiong ZJ, et al. The selective isolation of endophytic actinomycetes[J]. *Microbiology China*, 2013, 40(7): 1305-1313 (in Chinese)
张金丽, 秦玉丽, 熊子君, 等. 植物内生放线菌的选择性分离[J]. *微生物学通报*, 2013, 40(7): 1305-1313
- [27] Cho KM, Hong SY, Lee SM, et al. Endophytic bacterial communities in ginseng and their antifungal activity against pathogens[J]. *Microbial Ecology*, 2007, 54(2): 341-351
- [28] Velázquez E, Rojas M, Lorite MJ, et al. Genetic diversity of endophytic bacteria which could be found in the apoplastic sap of the medullary parenchyma of the stem of healthy sugarcane plants[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2008, 48(2): 118-124
- [29] Du HJ, Su J, Yu LY, et al. Isolation and physiological characteristics of endophytic actinobacteria from medicinal plants[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(1): 15-23 (in Chinese)
杜慧竟, 苏静, 余利岩, 等. 药用植物内生放线菌的分离和生物学特性[J]. *微生物学报*, 2013, 53(1): 15-23
- [30] Tan RX, Zou WX. Endophytes: a rich source of functional metabolites[J]. *Natural Product Reports*, 2001, 18(4): 448-459
- [31] Cui JQ. The function of organic nitrogen source in penicillin fermentation[J]. *Journal of Science and Technology Innovation and Application*, 2012(1): 41 (in Chinese)
崔节泉. 有机氮源在青霉素发酵生产过程中的作用[J]. *科技创新与应用*, 2012(1): 41
- [32] Qiu FB, Huang Y, Sun L, et al. *Leifsonia ginsengi* sp. nov., isolated from ginseng root[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(Pt 2): 405-408
- [33] Bertrand H, Plassard C, Pinochet X, et al. Stimulation of the ionic transport system in *Brassica napus* by a plant growth-promoting rhizobacterium (*Achromobacter* sp.)[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2000, 46(3): 229-236
- [34] Rothballer M, Schmid M, Klein I, et al. *Herbaspirillum hiltneri* sp. nov., isolated from surface-sterilized wheat roots[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*,

- 2006, 56(Pt 6): 1341-1348
- [35] Xin YH, Zhou YG, Zhou HL, et al. *Ancylobacter rudongensis* sp. nov., isolated from roots of *Spartina anglica*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54(Pt 2): 385-388
- [36] de Meyer SE, Coorevits A, Willems A. *Tardiphaga robiniae*, gen. nov., sp. nov., a new genus in the family Bradyrhizobiaceae isolated from *Robinia pseudoacacia* in Flanders (Belgium)[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2012, 35(4): 205-214
- [37] Gao JL, Yuan M, Wang XM, et al. *Variovorax guangxiensis* sp. nov., an aerobic, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase producing bacterium isolated from banana rhizosphere[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2015, 107(1): 65-72
- [38] Valverde A, Velázquez E, Gutiérrez C, et al. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, 53(Pt 6): 1979-1983
- [39] Ramos PL, van Trappen S, Thompson FL, et al. Screening for endophytic nitrogen-fixing bacteria in Brazilian sugar cane varieties used in organic farming and description of *Stenotrophomonas pavanii* sp. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2011, 61(Pt 4): 926-931
- [40] Kang SM, Asaf S, Kim SJ, et al. Complete genome sequence of plant growth-promoting bacterium *Leifsonia xyli* SE134, a possible gibberellin and auxin producer[J]. Journal of Biotechnology, 2016, 239: 34-38
- [41] Yu X, Li Y, Cui Y, et al. An indoleacetic acid-producing *Ochrobactrum* sp. MGJ11 counteracts cadmium effect on soybean by promoting plant growth[J]. Journal of Applied Microbiology, 2017, 122(4): 987-996
- [42] Woo HL, Deangelis KM, Teshima H, et al. High-quality draft genome sequences of four lignocellulose-degrading bacteria isolated from Puerto Rican forest soil: *Gordonia* sp., *Paenibacillus* sp., *Variovorax* sp., and *Vogesella* sp.[J]. Genome Announcements, 2017, 5(18): e00300-17
- [43] Wolf A, Fritze A, Hagemann M, et al. *Stenotrophomonas rhizophila* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with antifungal properties[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2002, 52(Pt 6): 1937-1944
- [44] de Boer W, Hundscheid MPJ, Gunnewiek PJAK, et al. Antifungal rhizosphere bacteria can increase as response to the presence of saprotrophic fungi[J]. PLoS One, 2015, 10(9): e0137988
- [45] Hao DC, Ge GB, Yang L. Bacterial diversity of *Taxus* rhizosphere: culture-independent and culture-dependent approaches[J]. FEMS Microbiology Letters, 2008, 284(2): 204-212

~~~~~  
(上接 p.804)

## 征 稿 简 则

### 4 特别说明

4.1 关于测序类论文: 凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲) 或 GenBank (美国) 或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.) 后再投来。

4.2 关于版权: (1) 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。(2) 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的 (即各种文字、各种介质的) 版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。(3) 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。(4) 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

4.3 审稿程序及提前发表: (1) 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登录我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登录我刊系统上传修改稿, 编辑部复审通过后将发出稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。(2) 本刊对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。

### 5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

### 6 联系方式

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; 网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>