

# 七叶树内生细菌的分离鉴定及生物活性研究

王 娇<sup>1,2</sup>,解修超<sup>1,2</sup>,邓百万<sup>1,2</sup>,罗阳兰<sup>1,2</sup>,刘军生<sup>1,2</sup>

(1. 陕西理工大学 生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723001; 2. 陕西省食药菌工程技术研究中心, 陕西 汉中 723001)

**摘要:**为揭示内生细菌与七叶树之间的相互关系,从七叶树的根茎中分离鉴定内生细菌,测定其对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)等4种靶标菌的抑菌活性,同时构建系统发育树,分析其亲缘关系。筛选产IAA菌株,测定其产量,为菌肥的研发提供潜在资源。采用平板分离法分离七叶树内生细菌,并对其进行菌株鉴定;采用滤纸片扩散法测定七叶树内生细菌培养物对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)等四种靶标菌的抑菌活性。采用Salkowski法测定产IAA的能力。结果表明:共分离出48株内生细菌,分属于4个属,分布最广的类群是芽孢杆菌属(*Bacillus*),占总菌株的68.4%,共有3个属的28株内生细菌至少对一株拮抗菌株具有抗菌活性,占总菌株的58%。共筛选出5株产IAA的菌株,分别是WJ-66、WJ-7、WJ-57、WJ-89、WJ-19,其中WJ-7的吲哚乙酸产量为22.768 mg·L<sup>-1</sup>。七叶树中蕴含大量具有抑菌活性的内生细菌产IAA的菌株,可为寻找和开发新型抑菌生物制剂和微生物菌肥提供菌种资源。

**关键词:**七叶树;内生细菌;分离鉴定;抑菌活性;吲哚乙酸(IAA)

**中图分类号:**S687 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2017)11-0071-05 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2017.11.0071

七叶树又名娑罗树,属七叶树科多年生木本植物,是国家一级保护树种,我国珍稀的庭院绿化树种之一<sup>[1]</sup>。干燥种子为著名中药材娑罗子。富含七叶皂苷A、B、C、D,药理研究发现,七叶皂苷对脑瘤、动脉硬化、血栓性水肿等疾病具有独特的疗效<sup>[2-3]</sup>。陕西省汉中地区是梭罗果的重要产区,由于近年来野生七叶树资源过度开发利用,加之生存环境破坏严重,使得七叶树的野生资源越来越匮乏,仅秦岭地区有野生七叶树<sup>[4]</sup>。

植物内生细菌与宿主植物长期共存、协同进化,是植物微生态系统中一个重要的组成部分。其次生代谢产物十分丰富,是新化合物、新能源的潜在资源<sup>[5-7]</sup>。而七叶树内生细菌在国内外尚未见报道,本文探究了七叶树内生细菌多样性、对靶标菌的抑菌活性及其产IAA的能力。通过本研究筛选得到具有抑菌活性及促生潜力的七叶树内生细菌资源。初步揭示内生细菌与七叶树之间的相互关系,进一步应用内生细菌与宿主植株建立

良好共生关系,为娑罗子药材活性成分积累和配比提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试材料 七叶树于2016年6月采自陕西省汉中市留坝紫柏山林场。地理位置为N33°40'51",E106°49'56"。采样时挑选无病害健康植株。取材部位为根、茎、叶。

1.1.2 供试病原菌 供试细菌为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、大肠埃希菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、白色念珠菌(*Candida albicans*),由陕西省食药菌工程技术中心提供。

1.1.3 培养基及相关试剂 分离培养基(LB培养基):牛肉膏5 g,蛋白胨10 g,氯化钠5 g,琼脂15 g,蒸馏水1 000 mL。发酵培养基(LB液体培养基):牛肉膏5 g,蛋白胨10 g,氯化钠5 g,蒸馏水1 000 mL。

Ezup柱式细菌基因组DNA抽提试剂盒(产品编号:B518255)、0.5 mol·L<sup>-1</sup> FeCl<sub>3</sub>、35%高氯酸(以上药品均为分析纯)。

1.1.4 主要仪器和设备 立式压力蒸汽灭菌锅(上海博讯实业有限公司医疗设备厂)、双人双面净化工作台(SW-CJ-2F,苏净集团苏州净化设备有限公司)、生化培养箱(XPX-250BSH-II,上海新苗医疗器械制造有限公司)、电子天平(BSA8

收稿日期:2017-09-21

基金项目:陕西省教育厅科研专项资助项目(16JK1158);秦巴山区生物资源综合开发协同创新中心自然科学研究资助项目(QBXT-Z(P)-15-2)

第一作者简介:王娇(1991-),女,陕西省渭南市人,在读硕士,从事微生物代谢产物活性物质研究。E-mail:634173166@qq.com。

通讯作者:解修超(1978-),男,山东省临沂市人,博士,副教授,硕士研究生导师,从事微生物代谢产物活性物质研究。E-mail:44557987@qq.com。

201, MAX=8 200 g, d=0.1 g, 北京赛多利斯科学仪器有限公司)、小型台式高速冷冻离心机(Centrifuge 5424R, 上海艾研生物科技有限公司)、PCR 仪(TC-4000, 英国 TECHEN 公司)等。

## 1.2 方法

1.2.1 内生细菌的分离与纯化 内生细菌的分离采用组织匀浆法。分离材料用自来水冲洗, 进行预处理, 75% 的酒精漂洗 1 min, 无菌水漂洗 3 次, 0.1% 的氯化汞漂洗 3 次, 无菌水漂洗 3 次, 75% 的酒精漂洗 30 s, 无菌水漂洗 5 次进行表面消毒。消毒后的材料用无菌手术剪剪成 2 mm×2 mm, 分别置于灭菌研钵中, 按照 1:10 的比例加入无菌水进行研磨, 研磨成浆状后静置 30 min, 移液枪吸取样品研磨液 1 mL, 移到配置好的盛有 LB 培养基的培养皿中, 用灭菌的涂布棒涂布均匀, 以最后一次的冲洗液为对照, 3 d 后若无菌落长出, 表明在研磨液中长出的菌株是内生细菌。将培养皿用封口膜密封后置于 37 ℃ 培养 1~3 d, 期间根据菌落形态、颜色和大小挑取单菌落, 多次划线培养至单菌落, 转接至斜面进行保存。

1.2.2 形态特征观察 将细菌培养 48 h, 对其形态进行观察, 记录菌落大小、颜色、湿润度、透明度、边缘是否光滑以及是否突起等特点对分离菌株进行初步排重。

1.2.3 内生细菌基因组 DNA 提取 采用 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒。

1.2.4 菌株的 16S rDNA 基因扩增及系统发育树构建 提取该菌株的基因组, 以 E-27-F/1492r 为上下游引物, 扩增该菌株的 16S rDNA。将菌株的 16S rDNA 序列用 Blast 进行多重序列比对, 再用软件 MEGA7.0 构建 16S rDNA 系统发育树。

1.2.5 抑菌试验 将分离得到的七叶树内生细菌接种于 LB 液体培养基中, 置于 120 r·min<sup>-1</sup> 37 ℃ 恒温摇床, 培养 3 d, 取出, 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 取上清, 作为七叶树内生细菌供试液。

抑菌试验采用滤纸片法: 将指示细菌菌液(约 1×10<sup>8</sup> CFU·mL<sup>-1</sup>) 涂布于 LB 平板, 在适当位置贴上已灭菌的滤纸片(Φ=6 mm), 分别吸取发酵液 5 μL 置于滤纸片上, 无菌水做对照(CK), 每个样品重复 3 次。37 ℃ 培养 1~3 d, 观察细菌生长情况及抑菌圈大小。

1.2.6 产 IAA 活性菌株筛选及产量测定 采用 Salkowski 法测定产 IAA 能力, 将菌株接种到液

体 LB 培养基中, 30 ℃ 下 160 r·min<sup>-1</sup> 培养 12 h。测定吸光度后将菌液在工作台操作下稀释到吸光度 0.8 左右。取 0.2 mL 接种到 8 mL 含 100 mg·L<sup>-1</sup> 色氨酸牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 培养 48 h 后 10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 取上清液 2 mL 加入 4 mL Salkowski 显色液(10 mL 0.5 mol·L<sup>-1</sup> FeCl<sub>3</sub> 和 500 mL 35% 高氯酸混合), 暗处放置 0.5 h 后在 540 nm 下测定吸光度。

标准曲线的绘制: 100 mg·L<sup>-1</sup> 的 IAA 溶液梯度稀释成 20、40、60、80、100 mg·L<sup>-1</sup>, 与菌液同样加入 Salkowski 显色液处理后在 540 nm 波长下测定吸光度, 去离子水为参比液。以 IAA 浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标绘制标准曲线, 根据标准曲线计算菌液中 IAA 含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 内生细菌分离结果

从七叶树根茎中共分离得到 48 株内生细菌。其中芽孢杆菌属(*Bacillus*) 42 株, 勒克氏菌属(*Leclercia*) 3 株, 泛生菌属(*Pantoea*) 2 株, 摩根氏菌属(*Morganella*) 1 株。

### 2.2 菌株的 16SrDNA 的扩增与测序及系统发育树分析

扩增序列条带都在 1 500 bp 左右, 将琼脂糖电泳清晰的 PCR 产物于上海生工测序。48 株内生细菌均获得测序结果。

对已分离的 48 株细菌中的 11 株内生细菌及其同源菌株基于 16S rDNA 基因序列构建系统发育树(见图 1)。可以看出, 这 11 株有活性的菌株分属于芽孢杆菌属、摩根氏菌属、勒克氏菌属和泛菌属。其中 WJ-61、WJ-51、WJ-17、WJ-1、WJ-83、WJ-87、WJ-78、WJ-57 亲缘关系较近, 都属于芽孢杆菌属; WJ-34、WJ-81、WJ-31 独立形成一支, 它们分别属于摩根氏菌属、勒克氏菌属、泛菌属。

### 2.3 七叶树内生细菌的抑菌活性

以常见的 4 种病原菌作为靶标菌, 采用滤纸片扩散法对七叶树内生细菌抑菌活性检测, 结果见表 1, 20 株细菌具有不同程度的抑菌活性, 占分离菌株的 41.7%, 对枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念球菌均有抑制作用的菌株分别为 WJ-1、WJ-47、WJ-51、WJ-57、WJ-61、WJ-66、WJ-83、WJ-87。这 20 株菌对枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌抑制作用比白色念球菌的抑制作用强。WJ-34 仅对枯草芽孢杆菌有抑制作用。

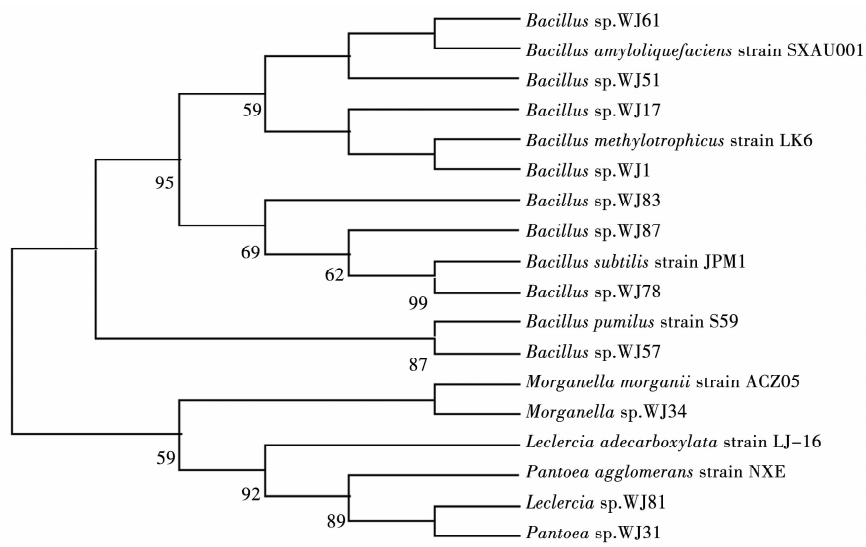


图 1 11 株内生细菌及其同源菌株基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree constructed from 11 endophytic bacteria and their homologous strains based on 16S rRNA gene sequence

表 1 七叶树内生细菌对靶标菌的抑制作用

Table 1 Inhibition of *Aesculus endophytic* bacteria on the target bacteria

菌株 Strain	靶标菌株 Target strain				空白对照 CK
	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	大肠埃希菌 <i>Escherichia coli</i>	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	白色念球菌 <i>Candida albicans</i>	
WJ61	+++	+++	+++	+	-
WJ28	++	+	-	-	-
WJ47'	++	+	++	+	-
WJ38	+	+	++	-	-
WJ37'	+	+	++	-	-
WJ68'	++	+	+	-	-
WJ87	++	++	++	+	-
WJ51	+	+	++	+	-
WJ66	++	+	++	+	-
WJ72	+	+	+	-	-
WJ57	++	+	+++	+	-
WJ83	++	+++	+++	+	-
WJ78	++	+	-	-	-
WJ1	++	++	++	+	-
WJ57'	+	+	-	-	-
WJ95	++	-	++	-	-
WJ17	++	+	++	-	-
WJ92	+	++	++	-	-
WJ34	+	-	-	-	-
WJ40	+	++	+	-	-

+: 抑菌直径为 8.00~13.00 mm; ++: 抑菌直径为 13.00~18.00 mm; -: 无抑菌活性。  
+: Antibacterial diameter 8.00~13.00 mm; ++: Antibacterial diameter 13.00~18.00 mm; -: No antibacterial activity.

## 2.4 产吲哚乙酸菌株的筛选及分析

从48株菌株种筛选到5株产IAA能力较好的菌株(见图2),在540 nm下测定吸光度,绘制标准曲线(见图3)。100 mg·L<sup>-1</sup>的IAA溶液梯度稀释成20、40、60、80、100 mg·L<sup>-1</sup>,与菌液同样加入Salkowski显色液处理后在540 nm波长下测定吸光度,去离子水为参比液。以IAA浓度为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线,根据标准曲线计算菌液中IAA含量。



图2 菌株显色液反应

Fig. 2 The color reaction of strains

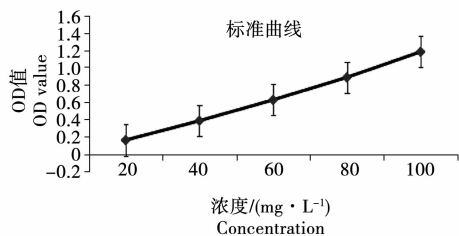


图3 IAA标准曲线

Fig. 3 The standard curve of IAA

标准曲线  $y = 7.9861x + 0.8845$

$R^2 = 0.9955$

菌株WJ-66、WJ-89、WJ-7、WJ-57、WJ-19的发酵液中IAA含量分别为16.160、19.196、22.768、18.303、16.518 mg·L<sup>-1</sup>(见图4)。

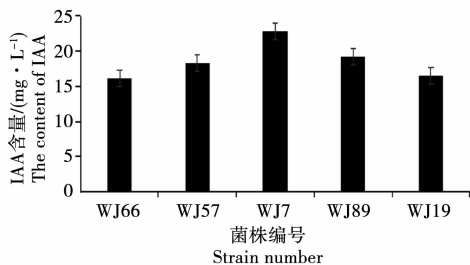


图4 菌株IAA含量

Fig. 4 The content of IAA

## 3 结论与讨论

本研究结果显示,七叶树内生细菌分属于芽

孢杆菌属(*Bacillus*), 勒克氏菌属(*Leclercia*), 泛生菌属(*Pantoea*), 摩根氏菌属(*Morganella*)4个类群, 均被证明在其它植物内生细菌中出现<sup>[8-10]</sup>。说明七叶树内生细菌与其它植物内生细菌具有一定共性。其中, 芽孢杆菌属为优势种群。这一结论与张敏<sup>[11]</sup>等研究甘草内生细菌多样性时报道的优势菌群为芽孢杆菌属等结果一致。以芽孢杆菌为主要内生细菌种群, 说明在众多内生细菌与七叶树长期互利共生过程中芽孢杆菌已经成为最适应寄主的菌群, 可能成为改善宿主抗病、抗逆能力的主要有益功能菌群。这一结论与罗明<sup>[12]</sup>等的研究结果相一致。

芽孢杆菌属的一些细菌能产生多种不同的抗生素<sup>[13]</sup>。七叶树内生细菌的抑菌试验表明, 七叶树内生细菌对大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念球菌都有一定的抑菌活性, 尤其对枯草芽孢杆菌抑菌作用最为明显。这与枸杞、沙冬青和红豆杉<sup>[14-16]</sup>等植物内生细菌的抑菌效果相一致。大多树七叶树内生菌菌株对白色念球菌的抑菌效果都不明显, 与李雁津<sup>[17]</sup>对骏枣内生细菌拮抗菌株筛选的研究结果不同, 这表明不同宿主的内生菌代谢产物的抑菌效果存在显著差异, 可能与宿主植物的种类及其所处地域环境、气候等因素有关。

芽孢杆菌属和泛菌属的许多菌株可以分泌IAA和赤霉素等, 能有效促进植物的生长<sup>[18-19]</sup>。李淑彬、周佳宇<sup>[20-21]</sup>等从茅苍术叶片和高良姜中均分离得到高产IAA菌株。本研究分离获得的48株内生细菌菌株中, 有5株可使Salkowski比色液变红, 说明这些菌株具有产IAA能力。对其产IAA的能力进行定量检测, 结果显示, 菌株WJ-7的发酵液中IAA含量最高为22.768 mg·L<sup>-1</sup>。如果这些具有促生潜力的内生细菌菌株能与七叶树建立良好的共生关系。必然会对七叶树产娑罗子药材的产量和品质产生影响。在生产实践中合理运用内生细菌与宿主植物七叶树的互相作用关系, 协同发挥促生功能, 以期增加娑罗子的产量和品质。

## 参考文献:

- [1] 徐永辉. 世界四大行道树种之一——七叶树[J]. 黑龙江科技信息, 2013(11): 260.
- [2] 王绪英, 赵永芳. 中药娑罗子的化学组分及七叶皂苷药用价值的研究[J]. 唐山师范学院学报, 2001(5): 7-11.
- [3] 倪洪岩, 姜静, 孙美波. 七叶皂苷钠治疗脑出血的临床观察[J]. 当代医学, 2017, 23(4): 14-16.

- [4] 中国植物物种信息数据库. 七叶树[DB/OL]. [2017-09-21]. <http://name.iflora.cn/Home/Search?q=七叶树>.
- [5] 马莲菊,王金缘,张崑璐,等. 植物内生菌次生代谢产物活性多样性及其应用前景[J]. 沈阳师范大学学报(自然科学版),2017,35(3):344-348.
- [6] Wang Y, Yang Ch D, Yao Y L, et al. The diversity and potential function of endophytic bacteria isolated from *Ko-breasia capillifolia* at alpine grasslands on the Tibetan Plateau, China[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2016, 15(9):2153-2162.
- [7] Dina Barman, Mamta Sahana Dkhar. Amylolytic activity and its parametric optimization of an endophytic bacterium *Bacillus subtilis* with an ethno-medicinal origin[J]. Biologia, 2015, 70(3):283.
- [8] 杨瑞先,王祖华,耿龙波,等. 芍药根部培养内生细菌多样性研究[J]. 洛阳理工学院学报(自然科学版), 2015, 25(4): 1-6.
- [9] 任慧爽,徐伟芳,王爱印,等. 桑树内生细菌多样性及内生拮抗活性菌群的研究[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2017, 39(1):36-45.
- [10] 蓝江林,刘波,朱育菁,等. 茄种植物内生细菌群落结构与多样性[J]. 生态环境学报, 2009, 18(4):1433-1442.
- [11] 张敏,沈德龙,饶小莉,等. 甘草内生细菌多样性研究[J]. 微生物学通报, 2008(4):524-528.
- [12] 罗明,芦云,张祥林. 棉花内生细菌的分离及生防益菌的筛选[J]. 新疆农业科学, 2004(5):277-282.
- [13] Picard C, Di Cello F, Ventura M, et al. Frequency and biodiversity of 2,4-diacetylphloroglucinol producing bacteria isolated from the maize rhizosphere at different stage of plant growth[J]. Appl Environ microbial, 2000, 66:984-955.
- [14] 杜晓宁,徐惠娟,黄盼盼,等. 宁夏枸杞内生细菌的多样性及其抑菌活性研究[J]. 微生物学通报, 2015, 42(9): 1779-1787.
- [15] 毕江涛,杨薇,李萍,等. 濒危药用植物沙冬青内生细菌分离及其抑菌活性初步分析[J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(12):1621-1626, 1652.
- [16] 赵赞鑫,刘开辉,邓百万,等. 2株中国红豆杉内生细菌代谢产物抑菌活性物质的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2010, 29(4):617-623.
- [17] 李雁津. 骏枣内生细菌的分离、鉴定与拮抗菌的筛选[D]. 太原:山西医科大学, 2012.
- [18] Rana A, Saharan B, Joshi M, et al. Identification of multi-trait PGPR isolates and evaluating their potential as inoculants for wheat [J]. Annals of Microbiology, 2011, 61: 893-900.
- [19] Arun P, Sanjay K, Ankit P, et al. Microbial and chemical sources of phosphorus supply modulate the yield and chemical composition of essential oil rose-scented geranium (*Pelargonium species*) in sodic soil [J]. Biology and Fertility of Soils, 2012, 48:117-122.
- [20] 李淑彬,黄娟,周仁超,等. 南药植物高良姜内生细菌多样性及其促生潜力[J]. 生态学报, 2015, 35(10):3204-3213.
- [21] 周佳宇,贾永,王宏伟,等. 茅苍术叶片可培养内生细菌多样性及其促生潜力[J]. 生态学报, 2013, 33(4): 1106-1117.

## Isolation, Identification and Biological Activity of Endophytic Bacteria in *Aesculus sinensis*

WANG Jiao<sup>1,2</sup>, XIE Xiu-chao<sup>1,2</sup>, DENG Bai-wan<sup>1,2</sup>, LUO Yang-lan<sup>1,2</sup>, LIU Jun-sheng<sup>1,2</sup>

(1. College of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong, Shaanxi 723000; 2. Shaanxi Edible and Medicinal Fungus Engineering Technology Research Center, Hanzhong, Shaanxi 723000)

**Abstract:** In order to reveal the relationship between endophytic bacteria and *Aesculus sinensis*, isolation and identification of endophytic bacteria from the root of the *Aesculus sinensis*, and its antibacterial activity against four target pathogens such as *Staphylococcus aureus* was determined. At the same time, the phylogenetic tree was constructed and its genetic relationship was analyzed. The IAA strain was screened and its yield was measured to provide potential resources for the development of bacterial manure. The bacteria were isolated from *Aesculus sinensis* by plate separation, and the strains were identified; determination of antibacterial activity of endophytic bacteria cultivars of *Aesculus sinensis* to four pathogens of *Escherichia coli* by filter paper diffusion method. The results showed that 48 strains of endophytic bacteria were isolated, belonging to 4 genera, the most widely distributed group was *Bacillus*, accounting for 68.4% of the total strain. A total of 28 strains of three genera had antibacterial activity against at least one antagonistic strain, accounting for 58% of the total strain. A total of 5 strains of IAA producing WJ66, WJ-7, WJ-57, WJ89 and WJ-9 were screened, of which the yield of WJ-7 was 22.768 mg·L<sup>-1</sup>. *Aesculus sinensis* contains a lot of antibacterial endophytic bacteria, opening up a new way to find and develop new antibacterial biological agents. At the same time, IAA-producing strains can lay the foundation for the development and utilization of microbial fertilizer.

**Keywords:** *Aesculus sinensis*; endophytic bacteria; identification; antibacterial activity; IAA