

陈帮丹,魏 洪,黄亚励,等. 猕猴桃果肉内生菌株鉴定及其抑菌活性分析[J]. 江苏农业科学,2018,46(12):71-75.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.12.016

猕猴桃果肉内生菌株鉴定及其抑菌活性分析

陈帮丹^{1,2}, 魏 洪¹, 黄亚励¹, 冯 丽¹, 李俞亭¹, 王芳胜¹

(1. 贵州医科大学微生物学教研室/贵州省医科大学感染与免疫学实验室, 贵州贵阳 550025;

2. 贵州省六盘水市人民医院检验科, 贵州六盘水 553000)

摘要:采用 PDA 和 LB 培养基培养新鲜的猕猴桃果肉内生菌,用平板对峙法筛选出具有抑菌活性的内生菌株,用平板倾注法测定筛选出的内生菌不同浓度发酵液对标准菌株和临床菌株的抑菌活性,并基于形态特征、生理生化特性、电镜扫描结果、16S rDNA 基因序列同源性分析、N-J 法系统发育树鉴定菌株。结果表明,从猕猴桃果肉中分离获得 3 株内生细菌,并初筛出 1 株抑菌活性较为明显的菌株,被鉴定为粪肠碱杆菌,能够抑制标准菌株大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌及临床菌株中革兰氏阴性菌株大肠埃希氏菌、阴沟肠杆菌、肺炎克雷伯菌的生长,对革兰氏阳性菌株金黄色葡萄球菌、溶血性葡萄球菌、肺炎链球菌的生长无作用。

关键词:猕猴桃;果肉;内生菌;抑菌活性;粪肠碱杆菌;金黄色葡萄球菌;大肠埃希氏菌

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)12-0071-04

我国植物资源丰富,从植物中分离和提取具活性物质的内生菌可应用于新型活性物质的生产,制造环保、高效的新药。Ezra 等从植物中分离得到具有抑菌活性的内生菌株对细菌、真菌有明显的抑制作用^[1],这为天然抗菌物质的研究提供了可靠、实用的理论依据^[2]。植物内生菌是生活在植物活性组织内较为特殊的微生物,包括潜伏在宿主体内的病原微生物,是植物组织内的正常菌群,也是植物微生物生态系统中的天然组成部分^[3]。有研究表明,内生细菌通常不会伤害植物的各种组织器官,而能够促进植物的生长^[4-5]。天然抗菌物质具有抑菌性强、无毒、性能稳定、广谱高效等优点,已成为食品及医药研究的热点^[6]。目前,从多种植物中已分离到内生菌株。程小梅等从猕猴桃枝、茎、叶及腐烂果实中可分离得到内生菌真菌和导致腐烂的细菌^[7-8];王美琴等从番茄内分离得到 642 株内生菌株,并应用平板法筛选出 2 株具有抑菌活性的菌株^[9];范晓静等从银杏内获得 1 株具有抑菌活性的解淀粉芽孢杆菌,并采用对峙法明确其抑菌活性^[10];梁盛年等从柑橘枝叶样本中分离得到内生细菌 55 株,经显微镜形态观察初步鉴定这些菌株分属 5 个属,并采用纸片扩散法(K-B 法)确定有 12 株具有抑菌活性^[11];王梦颖等使用平板倾注法从香蕉中获得具广谱活性的菌株^[12];Chen 等应用形态学、分子生物学从兰科植物的种子和根中分离鉴定得到植物内生菌^[13];Ziyake 等从骆驼刺中分离到 20 株内生菌,并采用琼脂扩散法筛选具抑菌活性的菌株^[14];Kumar 等从姜黄中分离到对大肠埃希菌有抑菌作用的内生菌^[15]。

猕猴桃为猕猴桃科猕猴桃属多年生落叶植物,果实营养

丰富,有“维生素 C 之王”的美称,深受消费者喜爱。贵州省修文县是猕猴桃之乡,种植面积达 15 万 hm²,挂果面积约为 3 330 hm²,产量超过 4 万 t。目前,未见有关新鲜健康猕猴桃果实分离到具抑菌活性菌株的报道。从高产的健康猕猴桃果实中分离鉴定内生菌,研究其抑菌谱和抑菌活性,对猕猴桃天然抗菌物质的开发应用具有重要意义,可为猕猴桃产业深加工发展提供新的方向,也为其产业开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

猕猴桃果实采集于贵州省修文县三金圣果有限公司猕猴桃园内。大肠埃希氏菌(ATCC25922)、金黄色葡萄球菌(ATCC25923)、枯草芽孢杆菌(ATCC6633)、白色念珠菌(ATCC10231)等标准菌株,由贵州医科大学感染与免疫实验室提供;大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、阴沟肠杆菌、肺炎链球菌、溶血性葡萄球菌等临床菌株,由贵州省六盘水市人民医院检验科分离鉴定并保存。Luria-Bertani 培养基(LB 培养基),由青岛雅各化学试剂有限公司提供;马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA 培养基),由鼎国生物技术有限公司提供;水解酪蛋白(Mueller-Hinton)培养基(MH 培养基),由杭州滨和微生物试剂有限公司提供。

1.2 试验方法

1.2.1 猕猴桃果实内生细菌的分离纯化 新鲜猕猴桃果实经 70% 乙醇溶液表面消毒^[10],用接种针挑取果肉分别于 PDA 培养基、LB 培养基上 28 ℃ 培养 7 d,观察菌落生长情况;转种培养 3 次以纯化菌株,4 ℃ 保存,备用。

1.2.2 猕猴桃果实内生拮抗菌株的筛选 采用平板对峙法^[16],在直径为 9 cm 的 PDA 平板中央接入链格孢菌;距中央 2.5 cm 处接入 1 环培养 24~48 h 的分离纯化菌株菌苔,28 ℃ 培养 3 d,以不接种菌株处理为对照,测定菌株对链格孢菌的抑菌活性。

1.2.3 分离菌株无菌发酵液的制备 在 150 mL 三角烧瓶中

收稿日期:2017-10-10

基金项目:贵州省科技合作项目[编号:(2015)7316、(2016)7367]。

作者简介:陈帮丹(1978—),女,贵州六盘水人,硕士,副主任技师,从事病原生物学研究。E-mail:82433287@qq.com。

通信作者:魏 洪,博士,副教授,从事病原生物学及天然药物的开发研究。E-mail:263676470@qq.com。

加入 30 mL PDA 液体培养基,接种内生菌到三角烧瓶中,37 ℃ 180 r/min 摇床培养 72 h,发酵液 4 ℃ 10 000 r/min 离心 10 min;取上清液,4 ℃ 10 000 r/min 离心 10 min;上清液用 0.45 μm 的水系、微孔滤膜过滤除菌,即得无菌发酵滤液。

1.2.4 分离菌株无菌发酵液平板倾注法培养 将无菌发酵滤液分别稀释 0.2、4、8、16 倍制成菌悬液,分别与 MH 培养基混匀;用 0.5 号麦氏比浊管分别将标准菌株、临床菌株配制成孢子浓度为 1.5×10^8 CFU/mL 的菌液,再用 0.9% 氯化钠溶液(生理盐水)稀释成孢子浓度为 1×10^5 CFU/mL 的菌液,接种在混匀的培养基表面,倒置于恒温箱 28 ℃ 中培养 24 ~ 48 h,观察其生长情况^[12]。

1.2.5 内生菌株的鉴定

1.2.5.1 生理生化特性鉴定^[17] 将保存的菌株复苏,接种于血平板培养基上,培养箱中 28 ℃ 培养 24 h;挑起单个菌落进行革兰氏染色,油镜(100×)下观察细菌形态;根据革兰氏染色情况,挑起上面培养的单个菌落,穿刺相应乳酸、甘露醇、蔗糖、麦芽糖、葡萄糖、木糖、七叶苷、鸟氨酸、赖氨酸、精氨酸、硝酸盐、靛基质、枸橼酸盐共 13 个生化管。

1.2.5.2 扫描电镜形态观察 取内生菌 1 mL 发酵液,8 000 r/min 室温离心 1 min;弃上清,加入 2.5% 戊二醛,4 ℃ 冰箱中固定 4 ~ 8 h,8 000 r/min 室温离心 1 min;弃上清,磷酸盐缓冲溶液(PBS 溶液)清洗 3 次,按 30%、50%、70%、80%、90% 顺序梯度脱水,每次加入后静置 15 min,8 000 r/min 室温离心 1 min;100% 乙醇洗涤 2 次,用 300 ~ 600 μL 无水乙醇重悬浮,待用;吸取重悬液 7 ~ 10 μL 置于干燥仪内干燥,将干燥好的样品用双面胶置于扫描电镜专用样品台上,经离子溅射喷金后在扫描电镜下观察菌体形态结构^[18]。

1.2.5.3 分子生物学鉴定 细菌菌株 DNA 的提取参照易润华等的方法^[19],应用 16S rDNA 进行 PCR 扩增;取 5 μL 扩增产物于 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳检测,DNA 目的条带送上海生工生物工程有限公司进行测序,将所得的 16S rRNA 基因序列用 Blast 软件与 GenBank 数据库进行相似性比对,采用 Mega 5.0 软件 N-J 法建立系统发育树。

2 结果与分析

2.1 猕猴桃果实内生菌的菌落特征

由图 1 可见,从猕猴桃果肉内分离出 3 株植物内生菌 M₁、M₂、M₃,经 PDA 培养基培养,内生菌 M₁ 菌落形态为灰色,内生菌 M₂ 菌落形态为黄褐色,内生菌 M₃ 菌落形态为白色,3 株内生菌均表面粗糙,呈绒状。

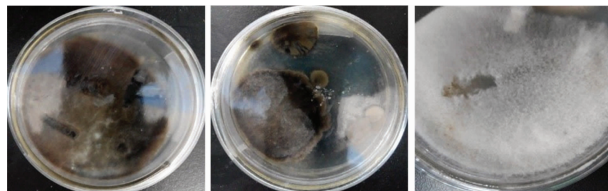


图1 猕猴桃果实中分离出的 M3 株内生菌菌落形态

2.2 猕猴桃果实内生菌拮抗菌株的筛选

试验结果(图 2)表明,只接种链格孢菌的 PDA 平板(对照)上,链格孢菌占领整个平板,而在对峙接种 M₃ 和链格孢菌的平板上,链格孢菌则没有越过 M₃,2 种菌之间抑菌带宽度达 0.5 cm,说明 M₃ 对链格孢菌丝生长有明显抑制作用。

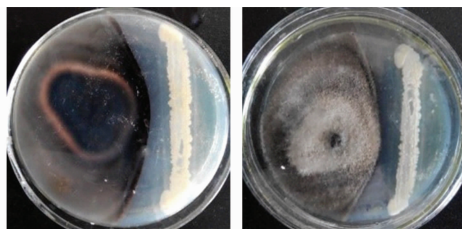
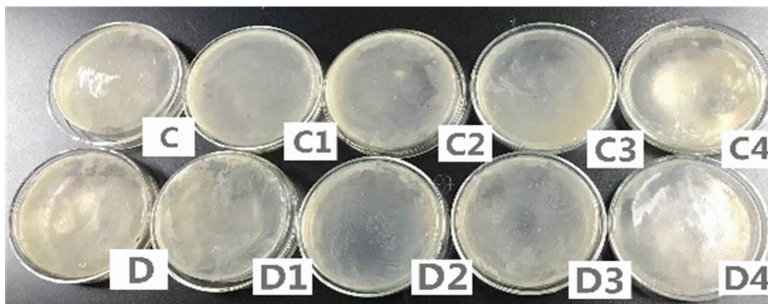


图2 对峙接种 M3 菌株与链格孢菌的菌落生长情况

2.3 猕猴桃果实内生菌株抑菌活性试验

2.3.1 对标准菌株的抑菌效果 由图 3 可见,M₃ 无菌发酵滤液原液及其稀释液对标准菌株大肠埃希氏菌(ATCC25922)、金黄色葡萄球菌(ATCC25923)有较好的抑菌效果,未见这 2 种菌株的生长。



C—大肠埃希氏菌;D—金黄色葡萄球菌,1~4—稀释倍数 2、4、8、16

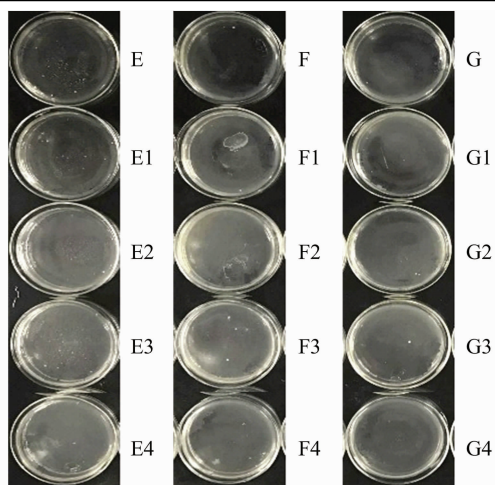
图3 M₃ 菌株无菌发酵液对标准菌株的抑菌效果

2.3.2 对临床菌株的抑菌效果 由图 4、图 5 可见,M₃ 菌株无菌发酵液对革兰氏阴性临床菌株大肠埃希氏菌、阴沟肠杆菌、肺炎克雷伯菌有较好的抑菌效果,上述细菌在不同浓度内生菌发酵液中均未见生长,而对革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌、溶血性葡萄球菌、肺炎链球菌的抑菌效果相对较差,上述细菌在不同浓度的内生菌发酵液中均有不同程度的生长。

2.4 内生菌株 M₃ 的鉴定

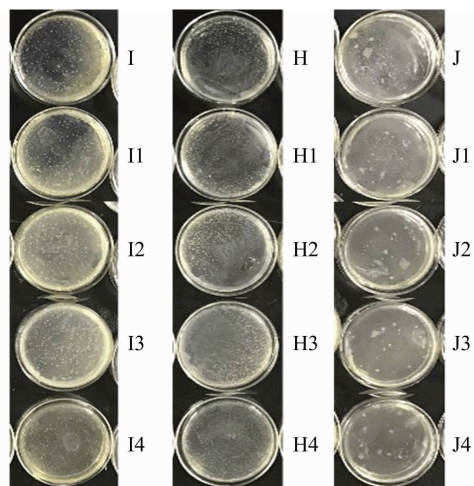
2.4.1 菌落形态观察 由图 6、图 7 可见,菌株 M₃ 在血琼脂平板上的菌落形态为灰白色、不规则、略凸起、湿润;革兰氏染色为阴性,菌体呈球状、杆状、球杆状。

2.4.2 电镜形态观察 由图 8 可知,M₃ 菌株孢子形态呈杆状,大小为 2.50 μm × 0.20 μm 左右。



E—大肠埃希氏菌；F—阴沟肠杆菌；G—肺炎克雷伯菌；
1~4—稀释倍数 2、4、8、16

图4 M_3 菌株无菌发酵液对革兰氏阴性菌的抑菌效果



I—金黄色葡萄球菌；H—溶血性葡萄球菌；J—肺炎链球菌；
1~4—稀释倍数 2、4、8、16

图5 M_3 菌株无菌发酵液对革兰氏阳性菌的抑菌效果

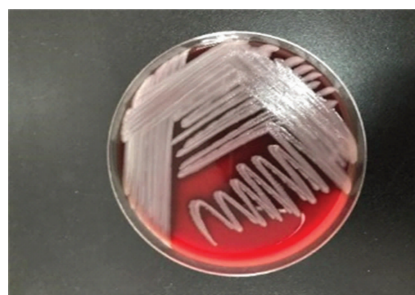


图6 M_3 菌株血平板培养的菌落形态

2.4.3 生理生化鉴定 由图9、表1和检索伯杰氏细菌鉴定手册可知, M_3 菌株的生理生化特性与碱杆菌属较为接近。

2.4.4 分子生物学和生物信息学鉴定 以 M_3 菌株的基因组 DNA 为模板,用细菌通用引物进行 PCR 扩增,得到 1 条约 1 500 bp 的 DNA 片段,用 DNA 回收试剂盒回收该片段进行测序,序列长度为 1 478 b,该序列与 GenBank 中 16S rDNA 序列进行比对, M_3 菌株的 16S rDNA 与产碱杆菌属的粪肠产



图7 M_3 菌株革兰氏染色油镜 100× 下的形态

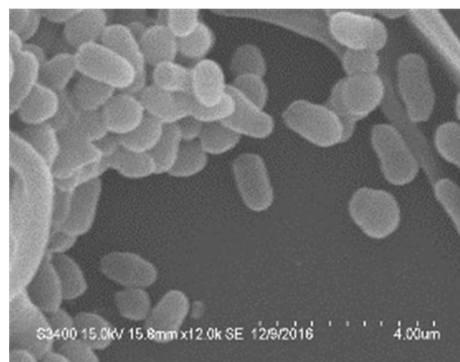
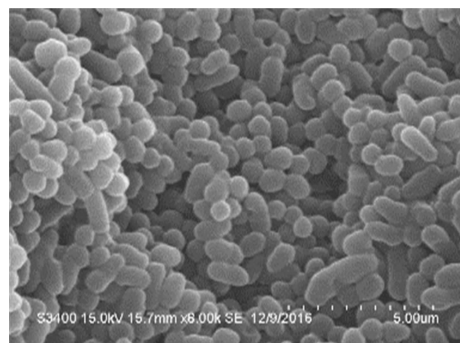


图8 M_3 菌株的电镜扫描结构

碱杆菌同源性高达 99.9%。由图 10 可见,菌株 M_3 与碱杆菌属在同一分支上,遗传进化距离相对最近,这与形态学观察及生理特性的测定结果一致,可确定 M_3 菌株属粪产碱杆菌,命名为 S1142 的 16S rDNA 序列已在 GenBank 中注册,序列号为 HM145896.1。

3 结论与讨论

本试验从新鲜猕猴桃果实中分离到 1 株对革兰氏阴性临床菌株有抑菌活性的内生细菌菌株 M_3 ,该菌株抗菌谱较广,抑菌效果较好,通过生理生化反应、革兰氏染色、电镜观察、16S rDNA 测序及分子生物学检测,构建系统发育树,鉴定 M_3 菌株属于粪产碱杆菌。粪产碱杆菌一般常见由土壤中分离得到^[20],发现带有多变性的质体,携带可制造酵素的基因,在生物工程中应用很广^[21],同时也广泛应用于制药工业、废水处理、去除农药有毒物质等方面。

随着抗生素的滥用,临床耐药菌的不断出现向人类发起一轮又一轮的挑战,以副作用小、安全性高的天然抗生素受到人们的青睐,国内外关于天然抑菌物质的抑菌研究近年来成

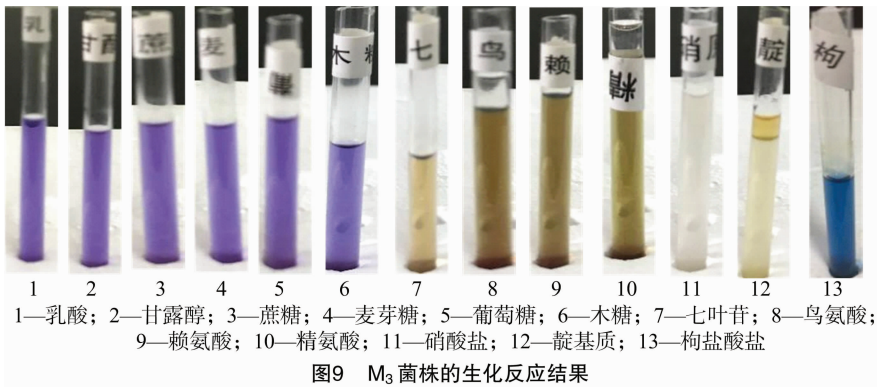


表 1 M₃ 菌株生化鉴定结果

生化管	M ₃ 菌株	碱杆菌属
乳糖	-	-
甘露醇	-	-
蔗糖	-	-
麦芽糖	-	-
葡萄糖	产碱性	产碱性
木糖	-	-
七叶苷	-	-
鸟氨	-	-
赖氨酸	-	-
精氨酸	-	-
硝酸盐	-	-
靛基质	-	-
枸橼酸盐	+	+

注：- 表示呈阴性；+ 表示呈阳性。

为热门。早在 10 多年前,赵跃等提出探索植物天然抗菌素作为新的治疗因子应用于临床及药物开发的建议^[22]。李杨等从梧桐科蛇婆子属植物中得到一个独特的喹啉酮生物碱,初步发现其甲基化衍生物对革兰阳性菌金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌等有抗菌活性^[23]。杨澍等从鱼腥草中分离出对体外金黄色葡萄球菌和白色念珠菌、对体内金黄色葡萄球菌有明显抑制菌作用的有效成分鱼腥素^[24]。本试验在猕猴桃果实中分离得到 M₃ 菌株,在医学天然抗菌物质的应用将会有重要的研究价值。M₃ 菌株发酵液在平板对峙试验中对链格孢菌有很强的拮抗能力;在平板倾注法中,能明显抑制标准菌株大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌;在临床菌株抑制试验中,革兰氏阴性菌大肠埃希氏菌、阴沟肠杆菌、肺炎克雷伯菌均未生长,在不同浓度 M₃ 菌株发酵液中,革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌、溶血性葡萄球菌、肺炎链球菌有不同程度的生长,

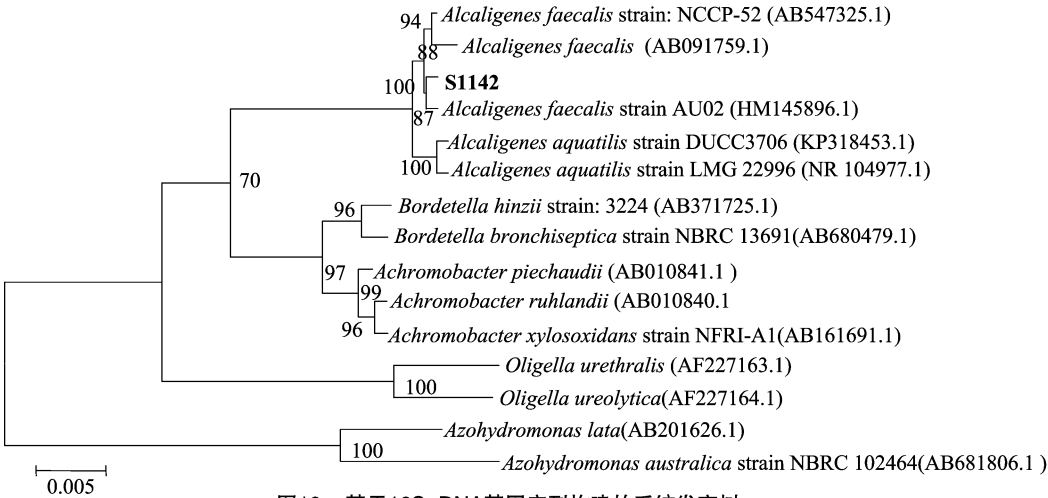


图10 基于16S rDNA基因序列构建的系统发育树

进一步证实猕猴桃内生菌 M₃ 菌株发酵菌液对革兰氏阴性菌有抑菌作用,对革兰氏阳性菌无明显的抑菌作用。

参考文献:

[1] Ezra D, Castillo U F, Strobel G A, et al. Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp (MSU - 2110) endophytic on *Monstera* sp[J]. Microbiology, 2004, 150 (4) :785 - 793.

[2] 田小曼, 吴云锋, 张 珏. 青蒿内生菌的分离及抗病活性物质的筛选[J]. 西北农业学报, 2008, 17 (4) :186 - 190.

[3] Stone J K, Bacon C W, White J J. An overview of endophytic microbes; endophytism defined [M]. New York: Marcel Dekker, 2000:3 - 29.

[4] 甘 瑾, 唐文林, 潘 禄, 等. 灵武红枣采后病原菌的分离及天然抗菌物质的筛选[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2007, 35 (10) :81 - 86.

[5] 黄玲玲, 陈蕾蕾, 裴纪莹, 等. 天然抗菌物质在果蔬防腐保鲜中的应用[J]. 安徽农业科学, 2013, 41 (31) :12439 - 12441.

[6] Kobayashi D Y, Palumbo J D. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture [M]//Bacon C W, White J F. Microbial endophytes. New York: Springer, 2000:199 - 233.

张晓明,张建春,常怀艳,等.斑腿蝗科 2 种短翅型蝗虫染色体的比较[J].江苏农业科学,2018,46(12):75-78.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.12.017

斑腿蝗科 2 种短翅型蝗虫染色体的比较

张晓明¹, 张建春², 常怀艳¹, 柳青^{1,3}

(1. 云南农业大学植物保护学院/云南省生物资源保护与利用国家重点实验室, 云南昆明 650201;
2. 云南省红河热带农业科学研究所, 云南河口 661300; 3. 保山学院资源环境学院, 云南保山 678000)

摘要: 为了解斑腿蝗科 (Catantopidae) 2 种短翅型蝗虫云南云秃蝗 [*Yunnanacris yunnanensis* (Ramme)] 和云南拟裸蝗 (*Conophymacris yunnanensis* Cheng) 的细胞遗传学特征, 采用常规的液氮冰冻压片法和 BSG 显带法对 2 种蝗虫的染色体核型和 C 带带型进行研究。结果表明, 云南云秃蝗染色体数目 $2n(\delta) = 21$, 染色体臂数为 21, 染色体组具有 9 对端着丝粒和 1 对亚端着丝粒染色体, 性染色体 X 为端着丝粒染色体; 云南拟裸蝗染色体数目 $2n(\delta) = 23$, 染色体臂数为 23, 染色体全部为端着丝粒染色体。染色体 C 带核型分析结果表明, 云南云秃蝗染色体有 16 条 C 带带纹, 其中有 11 条着丝粒带, 5 条端带, 染色体组异染色质总含量为 22.26%; 云南拟裸蝗有 18 条 C 带带纹, 其中有 12 条着丝粒带, 6 条端带, 染色体组异染色质总含量为 23.00%。2 种蝗虫除了具有相同的 XO 型性别决定机制外, 在其他的染色体核型和 C 带带型方面均表现出一定的差异。

关键词: 斑腿蝗科; 短翅蝗虫; 云南云秃蝗; 云南拟裸蝗; 染色体; C 带核型

中图分类号: Q962; S433.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)12-0075-04

蝗虫是蝗总科 (Acridoidea) 昆虫的总称, 全世界记载有 10 000 多种蝗虫。斑腿蝗科 (Catantopidae) 是蝗总科中最大

的科, 已知有 760 多个属近 4 000 种, 种类多、分布广, 其中有少数种类是农业、畜牧业和林业生产上的重要害虫。我国记录的有 100 多个属 430 多种斑腿蝗科昆虫, 主要分布于我国南方地区^[1-2]。

染色体是生物遗传物质的载体。在各生物类群中, 染色体结构特征具有相对稳定性, 不同类群的染色体数目、大小、形态、组型、减数分裂行为及异染色质分布等亦有不同^[3]。因此, 通过研究和分析染色体数目、结构和行为等细胞学特征, 可以为昆虫近缘种的鉴别、物种演化及亲缘关系分析提供

收稿日期: 2017-09-25

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31400351); 云南农业大学科研启动费 (编号: A2002291)。

作者简介: 张晓明 (1984—), 男, 云南保山人, 博士, 讲师, 主要从事农业昆虫及其防控研究。E-mail: zxmalex@126.com。

通信作者: 柳青, 博士, 副教授, 主要从事昆虫细胞分类学研究。E-mail: liuqingc065@126.com。

- [7] 程小梅, 彭亚军, 汤佳乐, 等. 猕猴桃采后致病菌的分离及中草药提取物对其抑菌效果初探[J]. 湖南农业科学, 2015(5): 81-83.
- [8] 廖林, 郭睿昕, 赵欣, 等. 软枣猕猴桃内生真菌的分离纯化及分子鉴定[J]. 湖北农业科学, 2016, 55(6): 1459-1462.
- [9] 王美琴, 陈俊美, 薛丽, 等. 番茄内生拈抗细菌的分离鉴定及培养条件研究[J]. 中国生态农业学报, 2008, 16(2): 441-445.
- [10] 范晓静, 黄未, 邱思鑫, 等. 银杏内生细菌的分离鉴定及抑菌活性初探[J]. 微生物学通报, 2013, 40(9): 1348-1368.
- [11] 梁盛年, 李充璧. 肇庆地区柑橘内生细菌的分离及初步鉴定[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(35): 12510-12512.
- [12] 王梦颖, 周登博, 井涛, 等. 不同品种香蕉内生菌分离及广谱拈抗菌的筛选[J]. 生物技术通报, 2014(8): 138-145.
- [13] Chen J, Wang H, Guo S X. Isolation and identification of endophytic and mycorrhizal fungi from seeds and roots of *Dendrobium* (Orchidaceae) [J]. Mycorrhiza, 2012, 22(4): 297-307.
- [14] Ziyake A, Mijeti W, Abulizi A, et al. Isolation of the endophyte from *Alhagi pseudalhagi* Desv and the analysis of the active ingredient of its metabolite [J]. Medicinal Plant, 2013(4): 7-13.
- [15] Kumar A, Singh R, Yadav A, et al. Isolation and characterization of bacterial endophytes of *Curcuma longa* L. [J]. Biotech, 2016, 6(1): 1-8.

- [16] 曲田丽, 张淑颖, 金玉兰. 合欢内生菌 H8 的分离、鉴定及其抗菌代谢物质研究[J]. 华北农学报, 2015, 30(1): 54-60.
- [17] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 349-388.
- [18] 于昕. 草莓灰霉病 (*Botrytis cinerea*) 的分离鉴定及其拈抗菌对枇杷保鲜的研究[D]. 成都: 四川大学, 2006.
- [19] 易润华, 朱西儒, 周而勋. 简化 CTAB 法快速微量提取丝状真菌 DNA[J]. 湛江海洋大学学报, 2003, 23(6): 72-73.
- [20] Zhang J F, Liu Z Q, Zhang X H, et al. Biotransformation of iminodiacetonitrile to iminodiacetic acid by *Alcaligenes faecalis*, cells immobilized in ACA-membrane liquid-core capsules [J]. Chemical Papers, 2014, 68(1): 53-64.
- [21] 叶乃芳, 凌华志, 黄颖, 等. 16S rRNA 序列分析技术对临床标本中疑难细菌的鉴定[J]. 安徽医科大学学报, 2015, 50(7): 1000-1003.
- [22] 赵跃, 王锐. 生物体内的天然抗菌素[J]. 世界科学, 1995(5): 17.
- [23] 李杨, 左国营. 生物碱类化合物抗菌活性研究进展[J]. 中草药, 2010, 41(6): 1006-1014.
- [24] 杨澍, 高杉. 天然产物抗菌作用的研究进展[J]. 天津中医药, 2016(2): 125-128.