

# 铁皮石斛内生细菌的分离鉴定与酶活性分析

俞 婕, 周小风, 胡秀芳

(浙江理工大学生命科学学院, 杭州 310018)

**摘 要:** 从铁皮石斛组织中分离获得内生细菌 52 株, 其中根部分离得到 42 株, 茎部分离得到 10 株。编号为 FHGXJ7、FHGXJ15-1、FHJXJ3、FHJXJ5 的 4 株菌株在 NA 培养基上生长较快、菌落较大且菌落数较多, 为优势种群。对优势菌株进行鉴定及酶活性检测, 结果表明, 4 株菌株分别鉴定为芽孢杆菌属未知种、苏云金芽孢杆菌、木糖氧化无色杆菌和解淀粉芽孢杆菌, 这些菌具有不同程度的蛋白酶、淀粉酶、卵磷脂酶和固氮酶活性。

**关键词:** 铁皮石斛; 内生细菌; 分离; 鉴定; 酶活性

**中图分类号:** Q936

**文献标志码:** A

## 0 引 言

铁皮石斛 (*Dendrobium officinale*) 是中国传统名贵中药, 具有滋阴清热、益胃生津、润肺明目、补肾积精、及提高人体免疫力、防癌、抗衰老等诸多神奇的治疗与保健功能<sup>[1]</sup>。然而, 铁皮石斛自然资源濒临灭绝, 人工种植已成为铁皮石斛植物原料的主要来源。因此, 促进人工种植铁皮石斛的生长以及保持其药效成分成为铁皮石斛产业的重要课题。

铁皮石斛内生菌(包括内生真菌和内生细菌)在其生长和发育过程中扮演重要角色。大量研究显示, 内生真菌具有促进铁皮石斛种子萌发<sup>[2]</sup>, 促进 C、N、P 等营养物质的吸收<sup>[3]</sup>, 分泌植物生长激素<sup>[4]</sup>等作用; 内生细菌对宿主植物也有积极作用, 主要包括固氮作用<sup>[5-6]</sup>、促进矿质元素吸收<sup>[7]</sup>、产生植物激素<sup>[8]</sup>、分泌抗生素类物质抵御植物病原菌的侵害<sup>[9]</sup>及促进植物次级代谢<sup>[10]</sup>等。然而, 关于内生细菌在中药铁皮石斛中的报道却较为少见, 铁皮石斛内生细菌对宿主的促生作用研究有待进一步开展。因此, 本论文研究铁皮石斛内生细菌, 旨在丰富铁皮石斛的内生细菌资源, 同时对其优势种群进行鉴定和酶活性检测, 以获得具有潜在的促进铁皮石斛生长

作用的内生细菌菌株, 进一步为铁皮石斛的促生研究奠定基础, 从而推动铁皮石斛产业的发展。

## 1 实验材料与方法

### 1.1 实验材料

供试铁皮石斛样品采自浙江奉化种植基地。

分离培养基: 牛肉膏蛋白胨培养基 (NA) (蛋白胨 10 g, 牛肉膏 3 g, NaCl 5 g, 琼脂 15 g, H<sub>2</sub>O 1 000 mL, pH 7.4~7.6)。蛋白酶活性检测培养基采用脱脂牛奶培养基 (脱脂奶粉 15 g, 琼脂 15 g, H<sub>2</sub>O 1 000 mL, pH 7.0~7.2); 淀粉酶活性检测采用可溶性淀粉培养基 (可溶性淀粉 10 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2 g, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.025 g, 蛋白胨 5 g, CaCl<sub>2</sub> 0.13 g, pH 5.5); 磷脂降解酶活性检测用卵磷脂培养基 (胰蛋白胨 10 g, 酵母膏 3 g, NaCl 5 g, 琼脂粉 20 g, H<sub>2</sub>O 1 000 mL, 灭菌后冷却至 50℃ 左右, 每 100 mL 培养基加入 50% 无菌卵黄盐水悬液 10~15 mL 并摇匀); 固氮酶活性检测用无氮 Aleksandrov 培养基 (蔗糖 5.0 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5 g, 1% FeCl<sub>3</sub> 0.005 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 2.0 g, 土壤矿物 1.0 g, 琼脂粉 20 g, H<sub>2</sub>O 1 000 mL, pH 7.0~7.2)。

收稿日期: 2013-01-22

基金项目: 浙江省自然科学基金项目 (Y12C030034)

作者简介: 俞 婕 (1987-), 女, 浙江绍兴人, 硕士研究生, 主要从事微生物分子生态学研究。

通信作者: 胡秀芳 E-mail: huxiuf@zstu.edu.cn

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 内生细菌的分离与培养

植物样品先用流水充分冲洗,去掉表面土壤颗粒等杂质后转移至超净台内,用无菌水清洗2次,每次约1 min;接着用70%酒精消毒20 s;3%次氯酸钠溶液消毒4 min,最后用无菌水洗涤3次。将预处理后的根、茎分别放入无菌碾钵中,加入2 mL 无菌水,充分碾磨,静置15 min后,取其悬浮液用无菌水进行系列梯度稀释。将100  $\mu$ L 系列稀释液涂布于NA培养基上,28℃培养2~3 d。根据培养过程中菌落在培养基上的生长快慢、菌落大小和菌落数多少,挑选出内生细菌优势种群。

### 1.2.2 酶活性检测

将内生细菌优势菌株分别接种于脱脂牛奶培养基、卵磷脂培养基上,于28℃培养5~7 d,如菌落周围出现透明圈,表明菌株具有蛋白酶和卵磷脂酶活性;接种于可溶性淀粉培养基上,于28℃培养5~10 d,将碘液滴在培养基上,若菌落周围出现透明圈,表明菌株具有淀粉酶活性;接种于无氮培养基上,于28℃培养5~7 d,如菌株能生长,表明其具有固氮酶活性。

### 1.2.3 菌株鉴定

#### 1.2.3.1 形态观察

采用涂布法或划线法将内生细菌接种于NA培养基上,30℃培养24 h后,观察菌落形态。同时收集菌体,进行革兰氏染色,在光学显微镜下观察其革兰氏染色特征和菌体形态,并进行描述。

#### 1.2.3.2 分子鉴定

细菌的DNA提取参考Duineveld等<sup>[1]</sup>的DNA提取方法。以提取的基因组DNA为模板,采用细菌16S rDNA通用引物fD1(5'-AGAGTTTGATCCTG-GCTCAG-3')和rP(5'-TACGGYTACCTTGTAC GACTT-3')进行PCR扩增。扩增体系为:10×PCR Buffer 5  $\mu$ L,10 mM dNTP Mixture 1  $\mu$ L,10  $\mu$ mol/L上、下游引物各2  $\mu$ L,DNA模板1  $\mu$ L,5 U/ $\mu$ L Taq 酶0.4  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O补足至50  $\mu$ L。扩增条件为:94℃预变性5 min;94℃变性1 min,56℃复性1 min,72℃延伸2 min,32个循环;最后72℃延伸10 min。反应结束后,取5  $\mu$ L PCR产物,1.0%琼脂糖电泳检测。将PCR产物回收,并进行克隆、测序。测序获得序列在NCBI上进行BLAST比对,确定菌株的分类地位。

## 2 实验结果

### 2.1 内生细菌的分离

从铁皮石斛组织样品中分离得到内生细菌共计

52株,其中从根部分离得42株,从茎部分离得10株。其中,编号为FHGXJ7、FHGXJ15-1的根部内生细菌和编号为FHJXJ3、FHJXJ5的茎部内生细菌在培养基上的生长速度较快、菌落较大且菌落数较多,确定为优势种群。

### 2.2 优势种群鉴定

内生细菌FHGXJ7在NA培养基上30℃培养48 h后的菌落形态如图1,菌落呈奶黄色,表面和边缘较光滑,菌落扁平,湿润,菌体为长杆状,呈革兰氏阳性。16S rRNA序列比对分析结果表明,FHGXJ7与芽孢杆菌属的*Bacillus sp.* (AB680191.1) 同源性最高,其序列相似性为99%,可以鉴定其为芽孢杆菌属菌株。

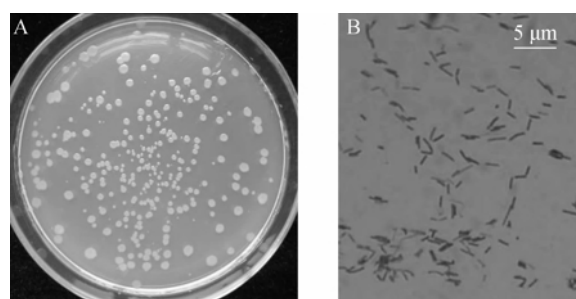


图1 FHGXJ7的菌落形态和菌体形态

内生细菌FHGXJ15-1在NA培养基上30℃培养48 h后的菌落形态和菌体形态见图2,菌落呈肉色,表面平整、较光滑,边缘不规则,菌体为长杆状,呈革兰氏阳性。16S rRNA序列比对分析结果表明,FHGXJ15-1与苏云金芽孢杆菌*Bacillus thuringiensis* (AB738791.1) 同源性最高,其序列相似性为100%,可以鉴定其为苏云金芽孢杆菌。

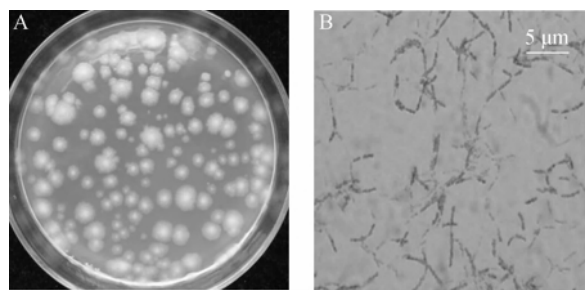


图2 FHGXJ15-1的菌落形态和菌体形态

内生细菌FHJXJ3在NA培养基上30℃培养48 h后,菌落形态如图3,菌落呈淡肉色,边缘光滑平整,表面光滑,菌落较小,稍凸起,较湿润,菌体为短杆状,呈革兰氏阳性。16S rRNA序列比对分析结果表明,FHJXJ3与木糖氧化无色杆菌*Achromobacter xylosoxidans* (AB680773.1) 同源性最高,其序列相似性为100%,可以鉴定其为木糖氧化无色杆菌。

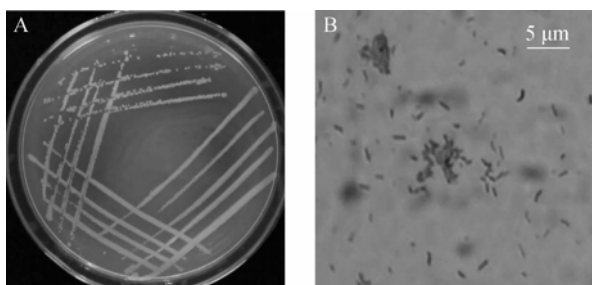


图3 FHJXJ3的菌落形态和菌体形态

内生细菌 FHJXJ5 在 NA 培养基上 30℃ 培养 48 h 后,菌落形态如图 4,菌落呈浅肉色,表面和边缘较光滑,菌落有凹陷,较湿润,菌体为短杆状,呈革兰氏阳性。16S rRNA 序列比对分析结果表明, FHJXJ5 与解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* (JN700105.1) 同源性最高,其序列相似性为 100%,可以鉴定为解淀粉芽孢杆菌。

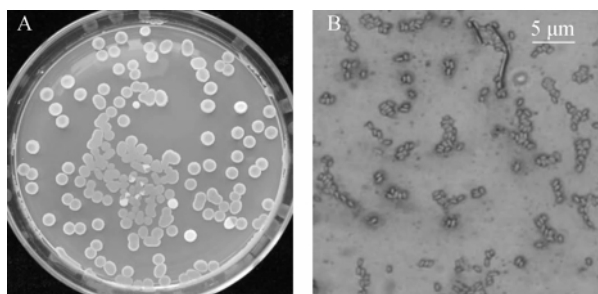


图4 FHJXJ5的菌落形态和菌体形态

### 2.3 酶活性检测

对铁皮石斛的优势内生细菌菌株 FHGXJ7、FHGXJ15-1、FHJXJ3、FHJXJ5 进行蛋白酶、淀粉酶、卵磷脂酶和固氮酶的活性检测。其中, FHGXJ7 的酶活性检测结果显示其在脱脂牛奶培养基和淀粉培养基上出现较小透明圈(图 5A 和 B),在无氮培养基上可以生长但菌落较小,在卵磷脂培养基上没有出现透明圈,表明其没有卵磷脂酶活性,而具有一定的蛋白酶、淀粉酶和固氮酶活性。

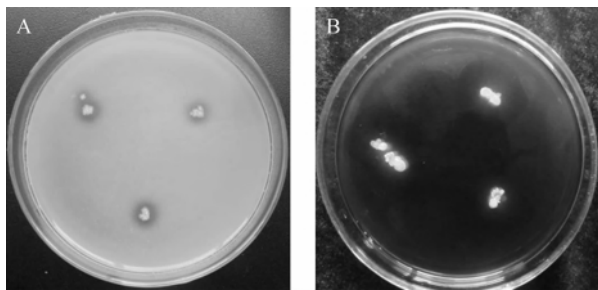


图5 FHGXJ7的酶活性检测

FHGXJ15-1 的酶活性检测结果显示其在脱脂牛奶培养基、淀粉培养基上出现透明圈(图 6A 和 B),在卵磷脂培养基上出现白色沉淀圈(图 6C),在无氮培养

基上可以生长但菌落较小且趋于透明(图 6D),表明其具有蛋白酶、淀粉酶、卵磷脂酶和一定的固氮酶活性。

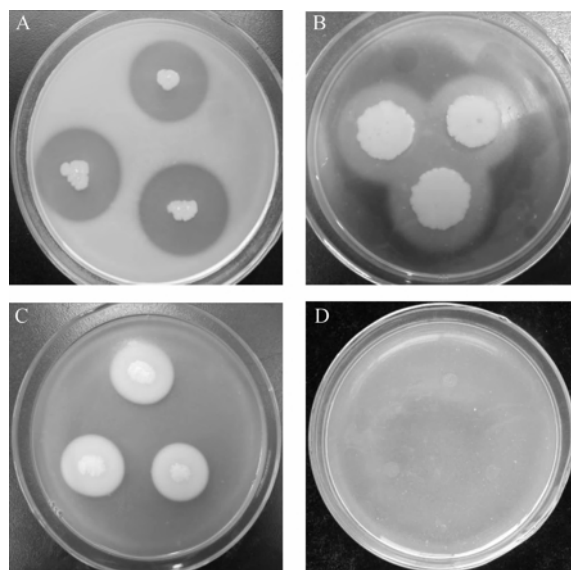


图6 FHGXJ15-1的酶活性检测

FHJXJ3 的酶活性检测结果显示其在脱脂牛奶培养基和淀粉培养基上没有出现透明圈,在卵磷脂培养基上出现一圈白色沉淀(图 7A),在无氮培养基上可以生长但菌落较小且趋于透明(图 7B),表明其没有蛋白酶和淀粉酶活性,而具有卵磷脂酶活性和一定的固氮酶活性。

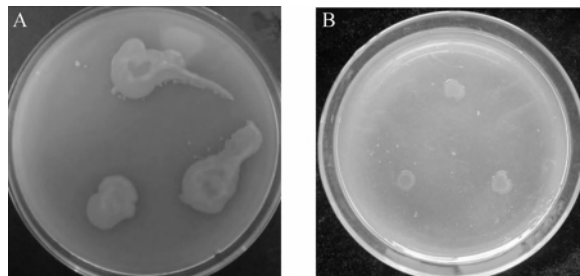


图7 FHJXJ3的酶活性检测

FHJXJ5 的酶活性检测结果显示其在脱脂牛奶培养基上没有出现透明圈,在淀粉培养基上出现较大的透明圈(图 8A),在卵磷脂培养基上出现较小透明圈(图 8B),在无氮培养基上可以生长但菌落较小,表明其没有蛋白酶活性,而具有较强的淀粉酶活性和一定的卵磷脂酶和固氮酶活性。

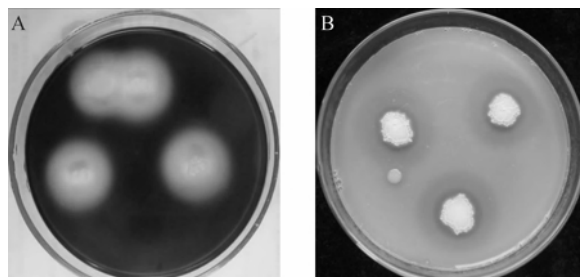


图8 FHJXJ5的酶活性检测

### 3 讨 论

铁皮石斛内生细菌的分离结果表明,铁皮石斛植株内存在丰富的内生细菌,这与 De Boer<sup>[12]</sup>、Galdiano<sup>[13]</sup>等从兰科植物中分离内生细菌的结果相同。其中,从根部分离的内生细菌数量(42 株)多于从茎部分离的内生细菌数量(10 株),由此推测根部定植的内生细菌数量比茎部多。其原因可能是根部是植物吸收营养物质的主要器官,新陈代谢非常旺盛,内生细菌在此处定植有利于与植物进行营养物质的交换。

根据所分离内生细菌在培养基上的生长速度、菌落大小和菌落数多少,获得了铁皮石斛内生细菌的优势种群。经鉴定,4 株优势内生细菌中有 3 株属于芽孢杆菌属,另外 1 株木糖氧化杆菌属于伯克氏菌目,这与杨娜等<sup>[14]</sup>从兰科植物蕙兰中分离到的优势种群和次优势种群结果较为一致。其中,优势菌株苏云金芽孢杆菌,已广泛应用于生物杀虫领域,同时又对非目标生物安全无害。优势菌株解淀粉芽孢杆菌能够分泌抗菌类物质而抑制多种细菌、真菌的生长,因而在农业上具有生物农药的应用潜力。可见,芽孢杆菌属等在兰科植物体内分布较广泛,且其中一些菌株对宿主植物表现出一定的积极作用。

苏云金芽孢杆菌具有较强的蛋白酶、淀粉酶和卵磷脂酶活性,解淀粉芽孢杆菌具有较强的淀粉酶活性和一定的卵磷脂酶活性,4 株优势内生细菌均表现一定的固氮酶活性。内生细菌具有这些酶活性,表明其具有分解蛋白质、淀粉、脂类等营养物质和固氮能力,有利于促进宿主植物的生长。因此,具有丰富酶活性的内生细菌菌株具有促进植物生长的潜力,值得进一步研究。

总之,铁皮石斛植株内存在丰富的内生细菌,其优势种群表现出一定的蛋白酶、淀粉酶、卵磷脂酶和固氮酶活性,对宿主植物——铁皮石斛的优质规模种植具有积极的意义。

### 参考文献:

- [1] 曹 忠. 清补良药: 石斛[J]. 东方药膳, 2009, 8: 42-43.
- [2] Waterman R J, Bidartondo M. Deception above, deception below: linking pollination and mycorrhizal biology of orchids[J]. J Exp Bot, 2008, 59(5): 1085-1096.
- [3] Gao W W, Guo S X. Effects of endophytic fungal hyphae and their metabolites on the growth of *Dendrobium can-*

- didum* and *Anoectochilus roxburghii*[J]. Acta Academiae Medicinae Sinicae, 2001, 6(23): 556-559.
- [4] 张集慧, 王春兰, 郭顺星. 兰科药用植物 5 种内生真菌产生的植物激素[J]. 中国医学科学院学报, 1999, 6(21): 460-465.
- [5] Hurek T, Handley L L, Reinhold-Hurek B, et al. *Azotarcus* grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state[J]. Mol Plant Microbe Interact, 2002, 15(3): 233-242.
- [6] Iniguez A L, Dong Y, Triplett E W. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342[J]. Mol Plant Microbe Interact, 2004, 17(10): 1078-1085.
- [7] Sturz A V, Christie B R, Nowak J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production[J]. Crit Rev Plant Sci, 2000, 19(1): 1-13.
- [8] Lee S, Flores-Encarnacion M, Contreras-Zentella M, et al. Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome *c* biogenesis genes[J]. J Bacteriol, 2004, 186(16): 5384-5391.
- [9] 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.
- [10] Shimaila R, Trevor C C, Bernard R G. Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial Endophytes[J]. Appl Soil Ecology, 2012, 61(3): 217-224.
- [11] Duineveld B M, Rosado A S, van Elsas J D, et al. Analysis of the dynamics of bacterial communities in the rhizosphere of the chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis and substrate utilization patterns [J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(12): 4950-4957.
- [12] De Boer W, Folman L B, Summerbell R C, et al. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development[J]. FEMS Microbiol Rev, 2005, 29(4): 795-811.
- [13] Galdiano R F, Penrinho E, Castellane T, et al. Auxin-producing bacteria isolated from the roots of *Cattleya walkeriana*, an endangered brazilian orchid, and their role in acclimatization[J]. R Bras Ci Solo, 2011, 35(3): 729-737.
- [14] 杨 娜, 杨 波. 蕙兰根部内生细菌多样性及季节动态变化[J]. 植物科学学报, 2011, 29(2): 156-163.

## Separation and Identification of Endophytic Bacteria in *Dendrobium Officinale* and Analysis on Enzyme Activity

YU Jie, ZHOU Xiao-feng, HU Xiu-fang

(School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** 52 strains of endophytic bacteria are obtained by separation from *dendrobium officinale* tissue, among which 42 are separated from the root and 10 are separated from the stem. Four strains respectively numbered as FHGXJ7, FHGXJ15-1, FHJXJ3 and FHJXJ5 have rapid growth and large and many bacterial colonies in NA culture medium and are dominant population. The result of identification of dominant strains and enzyme activity test shows that four strains are respectively an unknown species of genus bacillus, bacillus thuringiensis, achromobacter xylosoxidans and bacillus amyloliquefaciens, which have different degrees of activity of protease, amylase, lecithinase and nitrogenase activity.

**Key words:** *dendrobium officinale*; endophytic bacteria; separation; identify; enzyme activity

(责任编辑: 许惠儿)

---

(上接第 890 页)

## Research on Regulation of Estrogen Receptor Beta by ILF3 Protein

HUANG Yun-xian, ZHANG Feng-qun, JIA Jun-xiang, DING Ming, ZHAO Fu-kun

(School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** The physiological effect of estrogen in vivo is regulated through the mediation of estrogen receptors ER $\beta$  and ER $\alpha$ . ER $\beta$  has regulating effect in the occurrence and development process of breast cancer, prostatic cancer, colon cancer and ovarian cancer. ILF3 is a member of RNA binding protein and participates in cell cycle regulation. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) proves that ILF3 protein can bond with ER $\beta$  mRNA 3'UTR. Estrogen receptor can mediate estrogen receptor to realize its function and ILF3 protein might participate in the regulation of signal channel of estrogen receptor through binding with ER $\beta$ . To discuss their relationship and regulatory mechanism, this paper establishes lentiviral vector of ILF3 overexpression and detects the expression of ER $\beta$  protein through western blot. In terms of protein level, the expression quantity of ER $\beta$  protein increases with the increase of ILF3 protein quantity and ILF3 has positive regulation effect on ER $\beta$ . MTT experiment detects that ILF3 gene expression has influence on MCF-7 cell viability.

**Key words:** ILF3; ER $\beta$ ; regulation of expression; MTT

(责任编辑: 许惠儿)