西北林学院学报 2007,22(1):31~33
Journal of Northwest Forestry University

辣木内生真菌产生抗菌物质的生物学特性研究

柯 野, 黄志福, 曾松荣*, 郑秋桦

(韶关学院 生物工程系,广东 韶关 512005)

摘 要:从辣木(*Moringa sp.*)中分离得到一株内生真菌(*Aspergillus sp.*),其发酵液对金黄色葡萄球菌和绿脓杆菌的生长有很强的抑制作用。曲霉 ly14 发酵液抑菌效果的最适碳源是麦芽糖,最适氮源是玉米浆,最适初始 pH 为 5,最适装液量为 50 mL 和最适培养时间 160 h,但生长因子(叶酸和 VB_{12}除外)和无机盐离子并不促进发酵夜得抑菌效果。

关键词:内生真菌;抗菌活性物质;生物学特性

中图分类号:S718.81 **文献标识码**:A **文章编号**:1001-7461(2007)01-0031-03

Biological Characteristics of Endophytic Fungi from *Moringa sp.* on Producing Antibiotic Active Substance

KE Ye, HUANG Zhi-fu, ZENG Song-rong, ZHENG Qiu-hua

(*Department of Biotechnology, Shaoguan University, Shaoguan, Guangdong* 512005, *China*)

Abstract: An *Aspergillus* sp. strain of endophytic fungi was isolated from *Moringa* sp.. The fermented broth of the strain strongly inhibited the growth of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa . It was proved in our test that the optimum C - souce, N - source, initial pH, medium capacity and culture period were maltose, corn steep liquor, 5.0, 50mL and 160h for inhibiting effect of the fermented broth, but the growth factors (except FH4 and VB_{12}) and inorganic ions couldn't promote the antibiotic activity of the fermented broth.

万方数据

key word: endophytic fungus; antibiotic active substance; biological characteristics

辣木(*Moringa* sp.)是多年生的多用途速生乔木植物,原产于热带、南亚热带的干旱或半干旱地区;在我国的部分地区引种获得了成功[1]。辣木叶片、果荚营养全面而丰富且富含多种矿物质、维生素,作为蔬菜和食品有增进营养和食疗保健功能;种子含有活性凝结成分,有净化水的特殊功能,因此辣木又被誉为"神奇之树"和"母亲最好的朋友"。有退热、消炎、排石、利尿、降压、止痛、强心和催欲等多方面的医疗保健功能[2]。

植物内生菌(endophytic fungi)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[3]。研究发现植物内生真菌能够产生多种生物活性物质(如抗癌物质、抗菌类物质、分解酶与酶抑制剂与植物生长调节物质等)[4]。植物内生真菌是一类潜在的产生生物活性物质的巨大资源。我国对辣木的研究主要集中于生长繁殖方面,而对其内生菌方面的研究未见报道。本文对辣木中分离出的内生真菌产生抗菌活性物质的菌株进行了分离鉴定,并对其产生抗菌物质的生物学特性进行了研究,为培养条件的优化,提供理论依据;也为其他植物内生真菌的生物学特性研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植株来源 新鲜植株辣木采自广东省粤北山区。

1.1.2 受试菌株 革兰氏阳性菌:金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*);革兰氏阴性菌:绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)

1.1.3 培养基 内生真菌的分离培养基:马铃薯葡萄糖琼脂培养基;发酵基础培养基:豆芽汁葡萄糖培养基,查氏液体培养基;受试菌培养基:牛肉膏蛋白胨培养基[5]。

收稿日期:2006-02-28 **修回日期**:2006-03-09

基金项目:首届香港铭源基金研究资助项目(20050202)

作者简介:柯野(1977-),男,四川泸州人,理学硕士,讲师,主要从事微生物学教学和科研工作。

* **通讯作者**:曾松荣。

1.2 方法

1.2.1 内生真菌的分离和纯化 按照参考文献[6]进行。

1.2.2 内生真菌的鉴定 按常规鉴定方法进行(参见文献[7,8])

1.2.3 不同碳源的发酵液对抑菌效果影响的试验 将豆芽汁葡萄糖培养基中的葡萄糖分别换成5%的其他碳源,配制成不同的培养液;接种内生真菌,25℃,130 r·min^{-1}摇床培养7 d,收集发酵液备用。

将37℃培养24 h的受试菌株,以平板活菌计数法定量其菌液浓度为106 CFU·mL^{-1},在直径9 cm灭菌培养皿中加入18~20 mL已融化冷却至50℃的牛肉膏蛋白胨培养基,立即旋转混匀。待琼脂凝固后,在培养皿底部画线,将平板分为均匀的三个区域;并取106 CFU·mL^{-1}的菌悬液均匀的涂布在培养基上,静置15 min,往每个区域里轻放一个已灭菌的牛津杯,取发酵液200 μL分别加到牛津杯中,37℃培养24 h,观察抑菌效果,并用游标卡尺测量抑菌圈直径。重复三次[9]。

1.2.4 不同氮源的发酵液对抑菌效果影响的试验 将查氏培养液的$NaNO_3$分别换成0.2%的其他氮源,配制成不同的培养液;按1.2.3的方法测定发酵液的抑菌圈直径。

万方数据

1.2.5 不同C/N的发酵液对抑菌效果影响的试验 以查氏培养液为基础培养基,$(NH_4)_2SO_4$代替$NaNO_3$作氮源,变化其在培养基中的含量来构成不同的C/N比,按1.2.3的方法测定不同发酵液的抑菌圈直径。

1.2.6 不同培养液量的发酵液对抑菌效果影响的试验 将查氏培养液,分装在500 mL的三角瓶,每瓶分别装不同量的培养基,按1.2.3的方法测定不同发酵液的抑菌圈直径。

1.2.7 不同无机盐离子的发酵液对抑菌效果影响的试验 以$(NH_4)_2SO_4$作氮源制备查氏培养液体(去除Mg^{2+}、Fe^{2+},其它无机离子浓度减半),分别加入不同离子为受试离子,浓度为10~4 moL·L^{-1},以不加无机离子为对照,按1.2.3的方法测定不同发酵液的抑菌圈直径。

1.2.8 不同生长因子的发酵液对抑菌效果影响的试验 以$(NH_4)_2SO_4$作氮源制备查氏培养液(各无机离子浓度减半),分别加入不同的生长因子,浓度为2 mg/100 mL,以不加生长因子为对照,按1.2.3的方法测定不同发酵液的抑菌圈直径。

1.2.9 不同初始pH值的发酵液对抑菌影响的试验 以玉米浆为氮源制备查氏培养液,将培养液调至为不同的初始pH,以未调pH值的为对照,按1.2.3的方法测定不同发酵液的抑菌圈直径。

1.2.10 不同时间段的发酵液对抑菌影响的试验 按麦芽糖5%,玉米浆0.2%,起始pH 5.0的方法配制培养液,分装在500 mL的三角瓶,装50 mL培养液,按1.2.3的方法测定不同时间段的发酵液的抑菌圈直径。并将相应时间段的菌丝体过滤,烘干至恒重,称量。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离鉴定结果

分离得到一株具有抗菌活性的内生真菌曲霉(*Aspergillus* sp.)。

2.2 不同碳源对抑菌效果的影响

表1表明,不同碳源对抑菌圈的影响较大,以麦芽糖的抑菌圈最大,表明产生的抗菌物质最多。

表1 不同碳源的发酵液对细菌生长的抑制效果

Table 1 The inhibiting effect of fermented broth of different carbon sources on the growth of bacteria

碳源	蔗糖	葡萄糖	淀粉	麦芽糖	乳糖
金黄色葡萄球菌/mm	23.67	21.73	22.33	25.83	24.25
绿脓杆菌/mm	23.68	19.53	20.53	24.77	22.64

注:抑菌圈直径为3次重复平均值,以下表同。

2.3 不同氮源对抑菌效果的影响

表2表明,氮源对抗菌物质的产生影响较大,尿素的抑菌圈最小,玉米浆的抑菌圈最大。

表2 不同氮源的发酵液对细菌生长的抑制效果

Table 2 The inhibiting effect of fermented broth of different nitrogen sources on the growth of bacteria

氮源 尿素	$NaNO_3$	$(NH_4)_2SO_4$	蛋白胨	玉米浆	酵母粉	黄豆粉
金黄色葡萄球菌/mm 12.03	19.49	21.00	20.59	22.25	21.67	21.13
绿脓杆菌/mm 12.00	18.85	19.27	19.98	23.87	21.26	21.64

2.4 C/N比对抑菌效果的影响

表3表明,较低或较高的C/N比均不利于抗菌物质的产生;当C/N比为30:1时,抗菌物质产生量最大。

表3 不同C/N比的发酵液对细菌生长的抑制效果

Table 3 The inhibiting effect of fermented broth of different C/N. on the growth of bacteria

C/N比	2:1	10:1	20:1	30:1	40:1	50:1	60:1	70:1	80:1	100:1
金黄色葡萄球菌/mm	无	无	14.56	20.64	17.35	16.25	16.15	11.73	11.24	无
绿脓杆菌/mm	无	无	14.40	19.82	16.25	15.50	14.21	13.79	11.89	无

2.5　装培养液量对抑菌效果的影响

表 4 表明，不同的装液量对抑菌效果影响显著，装培养基量越少，抑菌效果越好。装培养基量为 50 mL 时，产生的抗菌物质最多。

表 4　不同培养基装液量的发酵液对细菌生长的抑制效果

Table 4　The inhibiting effect of fermented broth of different medium capacity on the growth of bacteria

装培养基量/mL	50	100	150	200	250
金黄色葡萄球菌/mm	24.74	21.09	20.18	11.80	11.0
绿脓杆菌/mm	23.47	19.47	18.09	13.20	12.70

2.6　无机盐离子对抑菌效果的影响

表 5 表明，无机盐离子和对照的抑菌圈没有显著的变化，这表明无机盐离子并不促进抗菌物质的产生。

表 5　不同的无机离子的发酵液对细菌生长的抑制效果

Table 4　The inhibiting effect of fermented broth of different inorganic ions on the growth of bacteria

金属离子	ck	Mg^{2+}	Fe^{2+}	Zn^{2+}	Mn^{2+}	Ca^{2+}
金黄色葡萄球菌/mm	20.05	20.75	19.75	20.40	20.53	20.45
绿脓杆菌/mm	19.78	19.50	20.00	19.45	19.89	19.780

2.7　不同生长因子对抑菌效果的影响

表 6 表明，叶酸和 VB_{12} 的抑菌圈显著的大于对照，而其他没有显著的变化，这表明叶酸和 VB_{12} 能促进抗菌物质的产生。

表 6　不同生长因子的发酵液对细菌生长的抑制效果

Table 7　The inhibiting effect of fermented broth of different growth factors on the growth of bacteria

生长因子	ck	叶酸	VB_1	VB_6	VB_{12}	VC
金黄色葡萄球菌/mm	21.35	23.50	21.24	20.69	24.88	21.33
绿脓杆菌/mm	20.00	21.50	19.98	20.12	21.68	20.13

2.8　不同 pH 对抑菌效果的影响

表 7 表明，初始 pH 对抗菌物质的产生影响显著，在初始 pH5 时，抑菌效果最好(图 1)。

表 7　不同初始 pH 的发酵液对细菌生长的抑制效果

Table 7　The inhibiting effect of fermented broth of different initial pH on the growth of bacteria

pH 值	对照	pH5	pH6	pH7	pH8	pH9
金黄色葡萄球菌/mm	24.30	27.17	24.12	25.42	22.25	23.11
绿脓杆菌/mm	23.15	23.65	22.79	23.05	19.55	22.48

2.9　发酵时间对产生抗菌物质的影响

表 8 表明，培养 40 h 时没有抑制效果，但从 40 ~169 h 抑菌效果就逐渐的增强，160 h 发酵液对两种菌的抑制效果最强，随着时间的推移抑菌效果逐渐的减弱。

表 9 表明，培养至 136 h 过程中菌体生物量逐渐增强，136 h 菌体生物量最大，随着时间的推移，菌丝体出现了自溶现象，菌体生物量逐渐的减少。

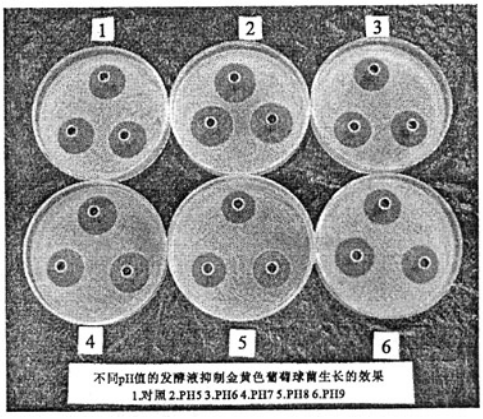


图 1　不同初始 pH 的发酵液对细菌生长的抑制作用

Fig. 1　The inhibiting effect of fermented broth of different initial pH on the growth

表 8　不同发酵时间段的发酵液对细菌生长的抑制效果

Table 8　The inhibiting effect of fermented broth of different culture period on the growth of bacteria

时间/h	40	64	88	112	136	160	184	208	232	256
金黄色葡萄球菌/mm	无	20.1	923.	6725.	5728.	6730.	9829.	9128.	9626.	7723.55
绿脓杆菌/mm	无	17.9	123.	2124.	6526.	9430.	0927.	0126.	6426.	3124.67

表 9　不同发酵时间段的曲霉生物量

Table 9　The effect of different culture period on the biomass of *Aspergillus* sp.

时间/h	40	64	88	112	136	160	184	208	232	256
菌丝体干重/g	0.28	0.34	0.43	0.47	0.51	0.48	0.45	0.44	0.40	0.35

3　结论与讨论

从辣木中分离出这样一株抗 G^+ 和 G^- 的内生真菌，说明该菌具有一定的潜在价值，有可能成为抗菌新药的研究开发利用提供一条途径，也为辣木的进一步利用提供参考。

通过该内生曲霉发酵液的抑菌试验发现，该曲霉产生抗菌物质受环境因素的影响较显著，特别是碳源、氮源、初始 pH、装液量和培养时间等方面，但是无机盐离子的影响较小。麦芽糖和玉米浆是较好的碳源和氮源、初始 pH 为 5、装液量 50 mL 和培养时间 160 h 时，发酵液的抑菌效果最好，则产生的抗菌物质最多。有待于进一步研究培养条件之间的互作，进一步探讨最佳的培养条件。

136 h 时曲霉的生物量最大，抑菌效果最佳的是 160 h，这说明抗菌物质是一种次生代谢产物，但

(下转第 42 页)

散,5种以下的小属和极小属共562个,占属总数的91.23%。说明本区系植物种类组成较为分散,属、种的多样性较高。

仙居县种子植物区系地理成分复杂,过渡性明显,分布区类型多样。属的分布区类型可划分为14类,它包括了我国种子植物除中亚分布外的所有分布区类型。其中以温带性成分为主,占53.08%;热带性成分的比例也较高,占44.57%,但典型的热带成分较少,多为热向亚热带延伸的成分。这表明仙居地处亚热带,为热带向温带过渡地区,植物区系明显地具有热带、亚热带与暖温带的双重性质,以亚热带性质为主。

仙居长期受相对稳定的亚热带气候的影响,境内地形比较复杂,未受第四纪冰川的严重影响,因而保留了较多的单型属、少型属和古老孑遗植物,说明本区系历史悠久,起源古老。本区系中有我国特有属13属,列为国家首批保护的珍稀濒危植物14种。

参考文献:

[1] 金则新. 浙江仙居俞坑森林群落优势种群结构与分布格局研究[J]. 武汉植物研究, 2000, 18(5): 383-389.

[2] 金则新. 浙江仙居俞坑森林群落特征研究[J]. 生态学杂志, 2001, 20(1): 22-25.

[3] 兆赖之. 括苍山湿润常绿阔叶林调查分析[J]. 浙江林学院学报, 1986, 3(1): 53-58.

[4.] 浙江植物志编辑委员会. 浙江植物志(各卷)[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1993.

[5] 楼炉焕, 金水虎. 浙江古田山自然保护区种子植物区系分析[J]. 北京林业大学学报, 2000, 5 (22): 33-39.

[6] 李锡文. 中国植物区系统计分析[J]. 云南植物研究, 1996, 18(4): 363-384.

[7] 金明龙. 新昌县种子植物区系的研究[J]. 浙江大学学报(理学版), 2004, 31(1): 95-102.

[8] 梅笑漫. 丽水白云山种子植物区系的研究[J]. 植物研究, 2004, 24(1): 27-34.

[9] 金孝锋, 丁炳扬, 郑朝宗, 等. 浙江百山祖自然保护区种子植物区系分析[J]. 云南植物研究, 2004, 26(6): 605-618.

[10] 吴征镒. 中国植物属的分布区类型[J]. 云南植物研究. 1991, (增刊Ⅳ): 1-139.

[11] 王景祥, 郑朝宗. 浙江植物区系[A]. 见: 章绍尧, 丁炳扬主编. 浙江植物志(总论卷)[M]. 杭州: 浙江科技出版社, 1993, 8-23.

[12] 于永福. 中国野生植物保护工作的里程碑——国家重点保护野生植物名录(第一批)出台[J]. 植物杂志, 1999, (5): 3-11.

万方数据

(上接第25页)

[9] Phillips J M, Hayman DS. Improved procedures for clearing and-staining parasitic and staining parasitic and vesicular arbuscular *mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection*[J]. Trans. Br. Mycol, Soc., 1970, 55: 158-161.

[10] 王平, 胡正嘉. 棉花VA菌根真菌的分离鉴定[J]. 华中农业大学学报, 1989, 8(1): 36-44.

[11] 盖京苹, 刘润进. 野生植物根围的丛枝菌根真菌Ⅰ[J]. 菌物系统, 2000, 19(1): 24-28.

[12] 盖京苹, 刘润进. 野生植物根围的丛枝菌根真菌Ⅱ[J]. 菌物系统, 2000, 19(2): 205-211.

[13] 贺学礼, 李生秀. 陕西农田土壤中VA菌根真菌资源及生态分布[J]. 菌物系统, 1999, 18(3): 337-340.

(上接第33页)

对其具体的结构和抗菌机理还需进一步的研究;建议进一步研究抗菌物质是否相同或相似于辣木的成分,还是一种新的抗菌物质,并评价其应用前景。

参考文献:

[1] 刘永红, 李会珍. 辣木的利用价值与栽培技术[J]. 福建热作科技, 2004, 29(2): 34-35

[2] 张燕平, 段琼芬, 苏建荣. 辣木的开发与利用[J]. 热带农业科学, 2004, 24(4): 42-48

[3] 郭良栋. 内生真菌研究进展[J]. 菌物系统, 2001, 20(1): 148-152.

[4] 邹文欣, 谭仁祥. 植物内生菌研究新进展[J]. 植物学报, 2001, 43(9): 881-892.

[5] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验(第三版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 2004. 214-222.

[6] 曾松荣, 徐倩雯, 叶保童, 等. 虎杖内生真菌的分离及产抗菌活性物质的筛选[J]. 菌物研究, 2005, 3(2): 24-26

[7] 中国科学院微生物研究所《常见与常用真菌》编写组. 常见与常用真菌[M]. 北京: 科学出版社, 1973. 31-249

[8] H L巴尼特, BB亨特. 沈崇尧译. 半知菌图解[M]. 北京: 科学出版社. 1997.

[9] 马绪荣, 苏德模. 药品微生物学检验手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 230-242.