

· 基础研究 ·

中华地鳖虫肠道内生真菌的分离鉴定及抑菌活性研究[△]

李娜, 李凡, 胡高升, 赵玥, 贾景明*

沈阳药科大学 中药学院, 辽宁 沈阳 110016

[摘要] 目的: 研究中华地鳖虫肠道内生真菌及其抑菌活性, 为发现新型活性天然产物提供一条重要的途径。方法: 采用平板分离法从地鳖虫肠道内分离内生真菌, 利用滤纸片法对其进行抑菌活性研究, 并对菌株的总 DNA 进行提取, 利用通用引物 ITS1 和 ITS4 对菌株 18S rDNA ITS 序列进行扩增和测序, 将测序结果进行同源性比对分析, 确定活性菌株的分类地位。结果: 从中华地鳖虫肠道中共分离出 8 株内生真菌。其中, 菌株 DB-1 对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和白色念珠菌都有一定的抑制作用, 经比对分析后鉴定菌株 DB-1 为深绿木霉 *Trichoderma atroviride*。结论: 中华地鳖虫肠道内具有抑菌活性的内生真菌资源可做进一步研究利用。

[关键词] 中华地鳖虫; 肠道内生真菌; 抑菌活性

[中图分类号] R282.74; R284; R282.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2019)09-1246-05
doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20190218010

Isolation and Identification of Intestinal Endophytic Fungi from *Eupolyphaga sinensis* and Its Antibacterial Activity

LI Na, LI Fan, HU Gao-sheng, ZHAO Yue, JIA Jing-ming*

School of Traditional Chinese Medicine, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

[Abstract] **Objective:** To study the intestinal endophytic fungi from *Eupolyphaga sinensis* and their antibacterial activity in order to provide an important way for discovery of new active natural products. **Methods:** Endophytic fungi were isolated from the intestines of *E. sinensis* by using the method of plate cultivation, and the antibacterial activity of the fermented metabolites was studied by the scrip diffusion method. The total DNA were extracted, and the 18S rDNA ITS were amplified and sequenced with primer ITS1 and ITS4, then the results of sequencing were analyzed comparatively based on homology to confirm the classification of active strains. **Results:** 23 strains of endophytic fungi were isolated. The strain DB-1 had inhibitory effect on *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Candida albicans*. The DB-1 was identified as *Trichoderma atroviride* by comparative analysis. **Conclusion:** The results showed that the intestines of *E. sinensis* contain abundant endophytic fungi resources with antibacterial activity, which could be further developed and utilized.

[Keywords] *Eupolyphaga sinensis*; intestinal endophytic fungi; antibacterial activity

昆虫含有大量的昆虫肠道菌, 包括许多昆虫致病菌及互惠共生菌等。一些肠道微生物生活在昆虫肠道内并与宿主一起进行协同进化, 在进化的过程中逐渐形成了自己独特的代谢途径, 并且发生了形态化及基因型变化^[1-2]。研究表明, 一些肠道共生菌能够为宿主提供一些宿主需要的重要营养物质, 帮助宿主抵御一些致病菌的抗生素, 还会产生一些活性次生代谢产物, 促进宿主的生长, 提升竞争能力。昆虫与微生物保持多样的共生关系, 这种共生关系可能对宿主昆虫具有重要的生存意义, 如半翅目蚜虫共生菌

Buchnera sp. 和红兵臭虫共生菌 *Coriobacterium* sp. 为宿主提供昆虫不能合成的维生素 B 族化合物^[3-4]; 白蚁肠道菌 *Bacteroides* 和 *Citrobacter* 为宿主昆虫清理肠道内的含氮有机废物^[5]; 某些兼性共生菌可以产生活性小分子代谢产物, 帮助宿主昆虫抵御致病菌和外来天敌入侵等。研究者将共生菌产生的活性小分子应用于药学研究时发现, 某些小分子具有明显的抗菌、抗癌和免疫抑制活性, 提示昆虫共生菌作为新药物来源的可能性^[6-7]。作为新天然产物的来源之一, 昆虫共生菌正受到越来越多药物化学家的关注。

[△] [基金项目] 辽宁省教育厅项目(201610163L19)

* [通信作者] 贾景明, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中药资源学; E-mail: jiajingming@163.com

中华地鳖虫 *Eupolyphaga sinensis* Walker 又名地鳖虫、土鳖虫、土元等, 为节肢动物门昆虫纲蜚蠊目鳖蠊科昆虫, 是《中华人民共和国药典》收录的常用中药地鳖虫的主要来源之一, 雌虫全体入药, 具有破瘀血、续筋骨等作用, 用于筋骨折伤、瘀血经闭、症瘕痞块^[8]。

近年来, 关于地鳖虫的研究主要集中在化学成分、药理作用及保健作用方面^[9], 而关于地鳖虫肠道内生真菌的研究未见报道。因此, 本文对中华地鳖虫肠道内生真菌进行了分离鉴定, 并对其次级代谢产物进行了抑菌活性研究, 旨在为发现新型活性天然产物提供一条重要途径。

1 材料

1.1 试剂与仪器

蔗糖(天津市大茂化学试剂厂); 蛋白胨(北京奥博星生物技术有限责任公司); 琼脂粉(天津市科密欧化学试剂有限公司); 琼脂糖(西班牙 Biowest); $2 \times Taq$ Master Mix(南京诺唯赞生物科技有限公司); 硫酸链霉素、青霉素、EZup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒(上海生工生物工程公司); Marker DM2000(康为世纪生物科技有限公司), 其余试剂均为分析纯。

超净工作台(上海树立仪器仪表有限公司); 立式压力蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械厂); 生化培养箱(上海新苗医疗器械制造有限公司); 振荡培养箱 ZQTY-50F(上海知楚仪器有限公司); PCR 仪(美国 Life Technologies 公司); 电泳仪 EPS-300、水平电泳槽 HE-120、Tanon-1600 凝胶成像系统(上海天能科技有限公司); 台式高速冷冻离心机 TGL-16(湘仪离心机仪器有限公司); 紫外-可见分光光度计 [尤尼柯(上海)仪器有限公司]; 恒温水浴锅(郑州长城科工贸有限公司)。

1.2 实验材料

研究材料为地鳖虫, 购于临沂市兴荣土元养殖专业合作社, 由沈阳药科大学中药学院贾景明教授鉴定为中华地鳖虫 *E. sinensis*。

1.3 供试用病原菌

抑菌实验用标准菌株为金黄色葡萄球菌 CMCC (B)26003、枯草芽孢杆菌 CMCC (B)63501、白色念珠菌 CMCC (F)98001, 购于中国医学细菌保藏管理中心。

1.4 培养基(自制)

麦芽浸汁琼脂培养基(Malt Extracts Agar medium, MEA): 生麦芽 20 g, 加水煮沸 30 min 后过滤取汁, 加入蔗糖 20 g、蛋白胨 1 g、琼脂 20 g、去离子水 1000 mL, 高压灭菌备用。不加琼脂为相应液体培养基(ME)。牛肉膏蛋白胨培养基: 牛肉膏 3 g、蛋白胨 10 g、氯化钠 5 g、琼脂 15 g、去离子水 1000 mL, 高压灭菌备用。沙氏培养基: 蛋白胨 10 g、葡萄糖 40 g、氯化钠 5 g、琼脂 14 g、去离子水 1000 mL, 高压灭菌备用。

2 方法

2.1 内生真菌分离及纯化

地鳖虫饥饿 24 h, 无菌条件下, 3.5% 次氯酸钠消毒 2 min, 75% 乙醇浸泡 3 min, 无菌水冲洗 5 次, 吸取最后一次冲洗液 200 μ L 涂布平板, 用于表面消毒检查。用无菌剪刀解剖虫体, 取前肠和中肠置于无菌研钵中, 加无菌水充分研磨, 涡旋后离心, 取上清液 1 mL, 十倍稀释法稀释为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 等 5 个浓度($g \cdot mL^{-1}$), 每个浓度取 200 μ L 涂布于 MEA 培养基中, 28 $^{\circ}C$ 倒置培养。待平板长出菌落后, 反复多次划线培养进行分离纯化, 得到单菌落。

2.2 内生真菌发酵产物提取

将已纯化的菌株, 接种至装有 75 mL ME 培养基的 150 mL 锥形瓶中, 于 28 $^{\circ}C$ 、180 $r \cdot min^{-1}$ 摇床培养 3 d 作为种子液, 再以 5% 的接种量接种到 ME 培养基中, 180 $r \cdot min^{-1}$ 摇床培养 7 d, 双层滤纸过滤后离心, 取上清, 过 0.22 μm 滤膜, 用于抑菌活性初筛。将抑菌活性较好的内生真菌发酵培养 7 d 后, 发酵液用 4~6 层纱布过滤后, 乙酸乙酯及正丁醇等体积萃取 3 次, 浓缩萃取液得发酵产物浸膏, 甲醇溶解, 4 $^{\circ}C$ 保存备用。

2.3 内生真菌发酵产物的抑菌活性

采用滤纸片法^[10]进行内生真菌的抑菌活性研究。将金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌, 室温活化 5 h 后接种至相应的液体培养基(牛肉膏蛋白胨液体培养基、沙氏培养基)于 28 $^{\circ}C$ 、160 $r \cdot min^{-1}$ 摇床中发酵培养至 A_{600} 为 0.5。分别移取上述菌液各 200 μ L, 分别均匀涂布于营养琼脂培养基平板和沙

氏固体培养基平板。将内生真菌发酵液从冰箱取出,将无菌滤纸片分别放于无菌培养皿中,吸取发酵液至无菌培养皿中,浸泡2 h后,用无菌镊子夹取滤纸片,在培养皿边缘处刮去多余液体,贴于实验菌株平板。其中金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌组设置硫酸链霉素($10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)为相应的阳性对照,0.9%氯化钠溶液为阴性对照;白色念珠菌组设置制霉菌素($0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)为阳性对照,0.9%氯化钠溶液为阴性对照。将贴好滤纸片的平板于 $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中倒置培养18~24 h,观察抑菌圈大小并测量。将抑菌效果较好的菌株进行发酵培养,按2.2项下方法进行萃取,用甲醇将乙酸乙酯层、正丁醇层及水层浸膏配成质量浓度为 $30 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的待测样品,将无菌滤纸片分别放于无菌培养皿中,吸取待测样品滴至无菌培养皿中,浸泡2 h,待甲醇完全挥发后,用无菌镊子夹取滤纸片,贴于实验菌株平板。将贴好滤纸片的平板于 $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中倒置培养18~24 h,观察抑菌圈大小并测量。

2.4 内生真菌的鉴定

将抑菌活性较好的菌株(DB-1)接种至液体培养基,于 $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床培养7 d,试剂盒法提取DNA,采用通用引物ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')进行扩增和测序。扩增程序为: $94 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性2 min; $94 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性1 min; $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火1 min, $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min, $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 后延伸5 min; $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保温2 min,35个循环。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后,送苏州金唯智生物科技公司进行序列测定,所得序列在NCBI/GenBank数据库中进行BLAST同源分析。

2.5 内生真菌生长曲线

取菌种接种至装有200 mL ME培养基的500 mL锥形瓶,于 $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养3 d后,以5%的接种量将种子液接种至装有200 mL ME培养基的500 mL锥形瓶中,于 $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养,每天定时取3瓶,将菌丝和菌液分离,用蒸馏水洗净菌丝上的菌液后放在蒸发皿中,放入 $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烘干后称质量,分别记录10 d菌丝体的干质量。以生长时间为横坐标,菌丝体干质量为纵坐标绘制生长曲线。

3 结果

3.1 内生真菌的分离

在表面消毒效果检验中,最后一次漂洗液涂板培养平板中,未发现有微生物生长,表明虫体的表面消毒效果良好,证明所分离得到的内生真菌来源于虫体肠道内部。通过分离纯化,从地鳖虫肠道共分离内生真菌8株。分别命名为DB-1~DB-8。

3.2 内生真菌发酵液的抑菌实验结果

筛选出来的8株地鳖虫肠道内生真菌的抑菌实验,结果见表1。

表1 八株地鳖虫内生真菌对供试病原菌的抑菌结果

菌株编号	供试病原菌		
	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	白色念珠菌
DB-1	+	+	+
DB-2	-	-	-
DB-3	-	-	-
DB-4	-	-	-
DB-5	-	-	-
DB-6	-	-	-
DB-7	-	-	-
DB-8	-	-	-

注: -表示无抑菌圈; +表示有抑菌圈。

由表1可知,菌株DB-1对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和白色念珠菌都有一定的抑菌作用,其余菌株则对3株供试病原菌均没有抑菌作用,故选定DB-1进行进一步研究。

3.3 菌种鉴定结果

DB-1菌种的rDNA ITS序列结果如下:GTGAGGGGAAGTCTGATCCGAGGTCAACATTTTCAGAA-GTTGGGTGTTTTACGGACGTGGACGCGCCGCGCTCC-CGGTGGCAGTTGTGCAAACACTACTGCCGAGGAGAGGC-TGCCGGCAGACCCGCACTGTATTTCCGGGGCCGGGAT-CCCGTCTTAG-GGGCTCCCGAGGTCCCCAACGCCGA-CCCCCGGAGGGGTTCCGAGGTTGAAATGACGCTCG-GACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAA-TGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCCTGAATTTCTGC-AATTCACATTAATTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCA-TCCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTT-TTGATTCATTTTTGAATTTTTGCTCAGAGCTGTAAGAA-ATAACGTCCGCGAGGGGACTACAGAAAAGACTTTG-

GTGGTCCCTCCGGCGGGCGCCTGGTTCCGGGGCTG-
CGACGCACCCGGGGCGTGACCCCGCCGAGGCAACA-
GTTTGGTATGGTTCACATTGGGTTTGGGAGTTGTA-
CTCGGTAATGATCCCTCCGCAGGTTACCAACAGAA-
ACCTTGTACGACTATACTTCCACCAAGGTGAACA-
AAAAAAGGTTGCCCGGGGGGGTAGCCCGGGGG-
GGTCCACCCGACCCGGGGCCGCGGAAGGACCACAAA-
CTTATACTGTAGTCTTCGGGATTTTATTTCTA。将序
列结果在 NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)上进行 BLAST 比对分析,发现菌株 DB-1
的扩增片段的碱基序列与 GenBank 中 *Trichoderma
atroviride* 的 rDNA ITS 序列(序列号为 MG972798.1)
同源性高达 99%,由此证明 DB-1 为深绿木霉
Trichoderma atroviride。图 1 为菌株 DB-1 的菌落形态图。

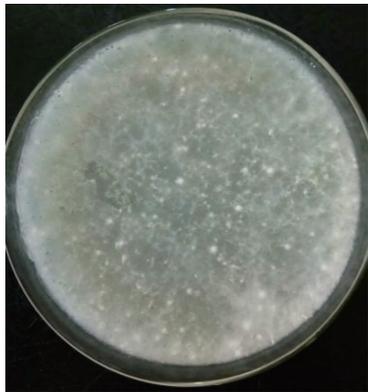


图 1 菌株 DB-1 的菌落形态图

3.4 生长曲线

菌株 DB-1 菌丝干质量见表 2,生长曲线见图 2。

表 2 菌株 DB-1 菌丝干质量($n=30$)

培养时间/d	菌丝体干质量/g			$\bar{x} \pm s$
	S1	S2	S3	
1	0.17	0.16	0.16	0.16 ± 0.01
2	0.26	0.25	0.21	0.24 ± 0.02
3	0.35	0.31	0.28	0.31 ± 0.04
4	0.33	0.29	0.34	0.32 ± 0.03
5	0.36	0.39	0.35	0.37 ± 0.02
6	0.40	0.44	0.38	0.41 ± 0.03
7	0.47	0.43	0.41	0.44 ± 0.03
8	0.47	0.43	0.46	0.45 ± 0.02
9	0.44	0.41	0.41	0.42 ± 0.01
10	0.38	0.44	0.42	0.42 ± 0.03

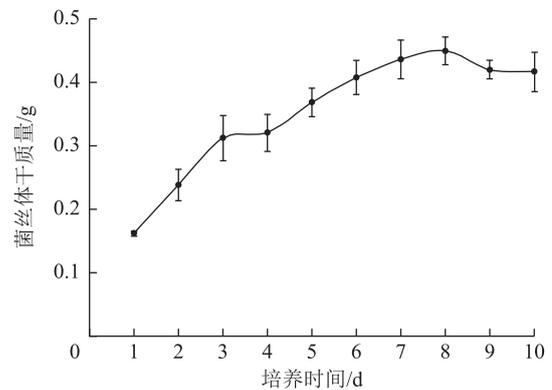


图 2 中华地鳖肠道内生真菌 DB-1 生长曲线图

由图 2 可知, DB-1 菌株的生长周期为 7~8 d,在第 8 天菌丝干质量达到最大,然后逐渐降低,之后达到平稳期。因此,研究 DB-1 菌株发酵产物的抑菌活性时,选择培养时间为 8 d。

3.5 DB-1 菌株抑菌实验结果

DB-1 菌株发酵产物抑菌活性结果见图 3,抑菌圈直径大小见表 3。由表 3 可知,只有乙酸乙酯层具有抑菌活性,其他各部位(正丁醇层及水层)均没有抑菌活性。

表 3 DB-1 发酵产物抑菌活性测试($\bar{x} \pm s, n=30$)

病原菌	cm				
	1E	1B	1H	+	-
金黄色葡萄球菌	1.94 ± 0.08	—	—	3.18 ± 0.05	—
枯草芽孢杆菌	1.80 ± 0.07	—	—	3.21 ± 0.04	—
白色念珠菌	1.50 ± 0.09	—	—	1.81 ± 0.03	—

注: 1E 为乙酸乙酯层; 1B 为正丁醇层; 1H 为水层; + 为阳性对照; - 为阴性对照。

4 讨论

与化学合成药物相比,微生物药物具有微生物来源丰富;次级代谢产物结构新颖,活性独特;生长周期短、代谢易于控制,可工业化生产且无环境压力;可有目的进行生物合成改造等诸多优势,具有广阔的应用前景。

地鳖虫是一种食性杂、不传瘟、繁殖快的一类药用昆虫,非常容易饲养,猜测其肠道内应该具有抑制病原菌的内生菌。因此,本文从地鳖虫肠道中分离出 8 株内生真菌,其中一株对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和白色念珠菌具有抑制活性,经过鉴定为深绿木霉 *Trichoderma atroviride*。深绿木霉为木霉属 *Trichoderma* Pers. ex Fr. 真菌,在分类上隶属于

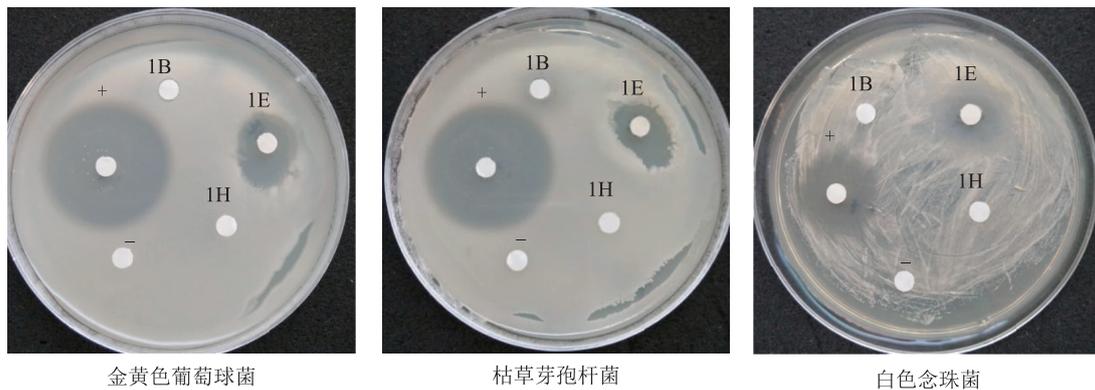


图3 DB-1菌株发酵产物抑菌活性结果

半知菌类、丛梗孢目、丛梗孢科、丛梗孢科单胞亚科、头孢霉族^[11]，广泛存在于植物根际土壤、叶围、种子以及球茎等生态环境中^[12]，是重要的酶和抗生素的生产菌株，主要产纤维素酶和丁质酶类以及木霉素、胶霉素、绿木霉素和抗菌肽等，是迄今为止用于防治植物病害的生防菌研究中利用最多的植物病原拮抗真菌^[13]。

本文对深绿木霉的发酵产物利用乙酸乙酯及正丁醇进行了萃取，在对各萃取部位进行抑菌实验时，发现只有乙酸乙酯层具有抑菌活性，正丁醇层及水层均没有抑菌活性，由此判定抑菌活性成分存在于乙酸乙酯层。但是，抑菌成分是什么，是否为抗生素类或者其他成分，是本课题组正在研究的内容。

因此，本课题组接下来对其发酵液中抑菌活性成分如何提取、产量与发酵条件之间有无关系以及活性成分能否作为药用资源开发利用等问题进行研究。另外，在DB-1发酵培养过程中，发现其发酵液有一定的香味，其抑菌作用是否与其香味成分有关系以及其香味成分是什么，也是本课题组接下来要研究的工作，以期筛选和研发新型药物提供参考。

参考文献

- [1] PONTES M H, DALE C. Culture and manipulation of insect facultative symbionts [J]. Trends Microbiol, 2006, 14(9): 406-412.
- [2] KIM J K, KWON J Y, KIM S K, et al. Purine biosynthesis, biofilm formation, and persistence of an insect-microbe gut symbiosis [J]. Appl Environ Microbiol, 2014, 80(14): 4374-4382.
- [3] NAKABACHI A, ISHIKAWA H. Provision of riboflavin to the host aphid, *Acyrtosiphon pisum*, by endosymbiotic bacteria, *Buchnera* [J]. J Insect Physiol, 1999, 45(1): 1-6.
- [4] DURVASULA R V, SUNDARAM R K, KIRSCH P, et al. Genetic transformation of a *Corynebacterial* symbiont from the Chagas disease vector *Triatoma infestans* [J]. Exp Parasitol, 2008, 119(1): 94-98.
- [5] DOUGLAS A E. The microbial dimension in insect nutritional ecology [J]. Funct Ecol, 2009, 23(1): 38-47.
- [6] CRAWFORD J M, CLARDY J. Bacterial symbionts and natural products [J]. Chem Commun, 2011, 47(27): 7559-7556.
- [7] SEIPKE R F, KALTENPOTH M, HUTCHINGS M I. Streptomyces as symbionts: an emerging and widespread theme? [J]. FEMS Microbiol Rev, 2012, 36(4): 862-876.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 19.
- [9] 罗情, 巫秀美, 郭娜娜, 等. 地鳖虫的化学成分和药理活性研究进展 [J]. 中国医药科学, 2015, 5(17): 41-44.
- [10] 董爱君, 刘华臣, 刘冰, 等. 肉桂酸薄荷酯的合成及抑菌活性研究 [J]. 食品科技, 2017, 42(5): 253-256.
- [11] 魏景超. 真菌鉴定手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 493.
- [12] 韩长志. 植物病害生防菌的研究现状及发展趋势 [J]. 中国森林病虫, 2015, 34(1): 33-37.
- [13] 陈云芳, 高渊. 木霉菌在植物病害生物防治中的应用 [J]. 江苏农业科学, 2008(5): 123-125.

(收稿日期: 2019-02-18 编辑: 王笑辉)