

新疆恰玛古内生细菌多样性及功能特性

叶艺洁¹,张芯语¹,木尼热·木塔力甫¹,林杨²,张志东^{2*}

(1. 新疆农业大学 食品科学与药学学院,新疆 乌鲁木齐 830052;2. 新疆农业科学院 微生物应用研究所,新疆特殊环境微生物实验室,新疆 乌鲁木齐 830091)

摘要: 为分析新疆恰玛古内生细菌多样性,挖掘潜在的微生物资源及功能,利用高通量测序法对新疆恰玛古内生细菌结构组成进行分析,同时对传统培养法分离筛选得到的内生细菌进行16S rRNA基因序列分子鉴定,进而对菌株的益生特性进行研究。高通量测序结果显示,新疆恰玛古内生细菌共包括181个有效操作分类单元,涉及细菌域的5个门、33个属。通过分离筛选共获得15株菌,分别归属于放线菌门(Actinobacteria)、变形杆菌门(Proteobacteria)和厚壁菌门(Firmicutes)的9个属。同时,获得7个未在高通量测序中检出的属类群。

关键词: 新疆恰玛古;内生细菌;高通量测序;多样性;功能特性

Diversity and Functional Properties of Endophytic Bacteria in Xinjiang *Brassica rapa* L.

YE Yijie¹,ZHANG Xinyu¹,MUNIRE Mutalifu¹,LIN Yang²,ZHANG Zhidong^{2*}

(1. College of Food and Pharmaceutical Sciences, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, Xinjiang, China;2. Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Xinjiang Key Laboratory of Special Environmental Microbiology, Urumqi 830091, Xinjiang, China)

Abstract: In order to analyze the diversity of the endophytic bacteria in Xinjiang *Brassica rapa* L. and explore the potential microbial resources and functions, high-throughput sequencing was used to analyze the structural composition of the endophytic bacteria in Xinjiang *Brassica rapa* L.. The endophytic bacteria isolated and screened by traditional culture method were processed with molecular identification of 16S rRNA gene sequences, and the probiotic properties of strains were studied. The high-throughput sequencing results showed that the endophytic bacteria in Xinjiang *Brassica rapa* L. included 181 valid operational taxonomic units, involving five phyla and 33 genera in the bacterial domain. 15 strains were obtained after isolation and screening, respectively belonging to nine genera of *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Firmicutes* phyla. At the same time, seven genera that were not detected in the high-throughput sequencing were obtained.

Key words: Xinjiang *Brassica rapa* L.; endophytic bacteria; high-throughput sequencing; diversity; functional properties

引文格式:

叶艺洁,张芯语,木尼热·木塔力甫,等.新疆恰玛古内生细菌多样性及功能特性[J].食品研究与开发,2025,46(2):32-39.

YE Yijie, ZHANG Xinyu, MUNIRE Mutalifu, et al. Diversity and Functional Properties of Endophytic Bacteria in Xinjiang *Brassica rapa* L.[J]. Food Research and Development, 2025, 46(2): 32-39.

植物内生菌泛指那些生活在植物组织内,暂时不引起宿主出现明显病害症状、产生各种次生代谢物^[1],以发挥自身作用的微生物,其中一些具有巨大的生物

活性^[2]。植物作为药用化合物的来源,在维持人类健康方面一直发挥着重要作用,并可以作为非生物胁迫的修复剂^[3]。迄今为止,大量研究集中于内生微生物

基金项目:新疆维吾尔自治区重点研发任务专项(2022B02053-3);新疆农业科学院农业科技创新稳定支持专项(xjnykwdzc-2022005);新疆维吾尔自治区重点研发计划(厅厅联动)项目(2022B02044-2)

作者简介:叶艺洁(1996—),女(汉),硕士研究生,研究方向:食品加工与安全。

*通信作者:张志东(1977—),男,研究员,研究方向:特殊环境微生物及益生菌资源。

与宿主植物的相互作用,如根际中存在的植物根际促生菌^[4]。现有研究表明,所有植物中均存在丰富的内生菌,但目前仅研究了其中一小部分,绝大多数处于未知状态^[5]。因此,大力开展植物内生菌相关研究不仅对进一步探究微生物的群落演替和潜在微生物资源的挖掘有重要价值,也对在天然药源和食品工业等方面具有较大应用潜力的微生物菌株筛选有重要意义。

恰玛古(*Brassica rapa* L.)又名芜菁,十字花科。维吾尔语为“恰玛古”,主要产自新疆天山南部、塔里木盆地西北和新疆阿克苏的红色沙漠长寿区,是新疆人民自古以来普遍食用的主要蔬菜之一^[6-8],是被维吾尔族人们誉为“小人参”的食药两用植物。研究发现,恰玛古是高碱性植物,可对酸性体质的人群起到平衡作用;富含皂苷、多糖、类黄酮、硫代葡萄糖苷、脂肪酸及人体所需的铁、钙、磷、维生素类等营养成分,具有安神、抗疲劳、抗氧化^[9]、抗肿瘤^[10]、降血糖、治疗肺咳等功效^[11-14]。一般来说,内生菌与宿主协同进化,具有与宿主类似的功能与活性物质^[15]。目前有关恰玛古内生菌的研究主要集中在内生真菌^[16]。赵燃等^[17]通过传统微生物培养方法对我国新疆恰玛古内生细菌进行分离及筛选,并进行了初步聚类,共得到48株内生细菌,分为7个可操作分类单元(operational taxonomic units, OTUs)。仅依靠传统方法对内生细菌进行多样性及群落分布结构特征分析,并不全面、客观^[17]。

本研究利用高通量测序技术结合传统培养方法,对新疆恰玛古内生细菌群落结构组成进行分析,并对其耐温、耐盐、功能酶活、抗氧化、抑菌等功能特性进行研究,旨在初步阐明新疆恰玛古中内生细菌群落的多样性,同时,从微生物角度解析恰玛古与内生细菌间的潜在联系及其药食作用,为进一步挖掘新疆恰玛古中相关活性物质、益生菌群及开发利用相关资源等研究提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

恰玛古(*Brassica rapa* L.)于2020年5月采自乌鲁木齐,选择果实自然成熟、无病变、无机械伤痕且表皮光泽、大小、硬度等表现正常的恰玛古,12 h内带回实验室,于4℃贮藏,并在48 h内尽快开展表面消毒和内生细菌分离筛选等工作。

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、青霉菌(*Penicillium*):新疆微生物资源保藏管理中心;TSA培养基、NA培养基、NB培养基、R2A基础琼脂培养基、LB液体培养基、PDA琼脂培养基(含氯霉素)、PDA液体培养基、察氏培养基:青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。

细菌基因组DNA提取试剂盒:天根生化科技有限公司;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)、引物、*Taq*酶(2×):生工生物工程(上海)有限公司;可溶性淀粉、Tween 80:天津市北联精细化学品开发有限公司;脱脂奶粉:美国BD公司;羧甲基纤维素钠:天津永晟精细化工有限公司;无水乙醇:上海实验器材股份有限公司;硫酸亚铁、过氧化氢、水杨酸:天津市科密欧化学试剂有限公司。所用试剂均为分析纯。

1.2 培养基配制

淀粉酶筛选培养基:R2A基础琼脂培养基中加入1%可溶性淀粉,调整pH值至7.0,加热溶解后灭菌。

蛋白酶筛选培养基:R2A基础琼脂培养基与1%脱脂奶粉分开灭菌,灭菌后待60℃时将1%脱脂奶粉以15%的量加入R2A培养基,混匀后倒平板。

果胶酶筛选培养基:果胶5 g,葡萄糖0.5 g,氯化钠0.5 g,硝酸钾1 g,无水磷酸二氢钾0.5 g,溴酚蓝0.1 g(与培养基分开灭菌,60℃与培养基混匀后倒板),微量盐溶液(硫酸铁2 g,硫酸铜1 g,硫酸锌1 g,硫酸锰1 g,蒸馏水100 mL,pH7.0)1 mL,琼脂16 g,蒸馏水1 000 mL,pH7.0左右。

纤维素酶筛选培养基:R2A基础琼脂培养基中加入1%羧甲基纤维素钠(加热溶解后加入到培养基中)。

酯化酶筛选培养基:R2A基础琼脂培养基中加入1%Tween 80(与培养基分开灭菌,60℃与培养基混匀后倒板)。

以上培养基的灭菌条件均为121℃、15 min。

1.3 仪器与设备

净化工作台(SW-CJ-2F):苏州安泰空气技术有限公司;恒温培养箱(SPX-250BF):上海福玛实验设备有限公司;冷藏柜(SC-316):海尔集团公司;自动高压蒸汽杀菌锅(HVE-50):日本HIRAYAMA公司;分光光度计(UVZ2550):日本岛津公司;TS恒温振荡器(TS-2102C):德国耶拿分析仪器股份公司;全自动菌落计数器(ZX-300):泽析生物科技有限公司;聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)仪(ABI2720):美国赛默飞世尔科技有限公司;光学显微镜(Ci-L):日本尼康公司;高速冷冻离心机(PLCD):德国Sigma实验室离心机股份有限公司;电热恒温培养箱(DHP-9082):上海一恒科学仪器有限公司。

1.4 方法

1.4.1 样品表面消毒

将恰玛古用自来水冲洗多次后,用75%酒精浸泡30~60 s,然后用无菌水冲洗3~4次,再用2.5%次氯酸钠浸泡3 min,然后用无菌水冲洗3~5次,放在无菌滤纸片上,待水吸干后备用。

以表面消毒结果为对照,取0.1 mL最后1次冲洗

试样后的无菌水涂布于 NA 培养基上,置于相同条件下培养,设置 3 个重复。若无任何杂菌长出,表明表面消毒彻底,分离到的即为内生菌。

1.4.2 高通量测序及数据处理

取适量经过表面消毒后的恰玛古样品浸于液氮冷冻后研磨至粉状,按照十六烷基三甲基溴化铵(etytrimethylammonium - ammoniumbromide, CTAB) 基因组 DNA 提取试剂盒说明书提供的试验操作步骤对其基因组 DNA 进行提取,设置 3 个重复,经凝胶电泳检测,合格浓度的 DNA 作为 PCR 扩增模板使用。模板添加引物为 799 F (AACMGATTAGATACCCKG) 和 1 193 R (ACGTCATCCCCACCTTCC),扩增 16S rRNA 基因序列的 V5~V7 可变区,PCR 条件:94 °C、5 min,94 °C、30 s,60 °C、30 s,72 °C、30 s,30 个循环;72 °C 延伸 10 min。扩增 PCR 产物经电泳检测切胶回收,并检测浓度调至一致后,将样品送至北京诺禾致源生物信息科技有限公司进行高通量测序。

所得的测序数据经去除冗余和无效序列后,对有效序列 Tags 聚类,以同源性大于 97% 聚为一个 OTUs,作为一个假定的分类单元。选取代表性序列,通过 RDP classifier 软件进行物种分类,确定 OTUs 之间的分类地位。

1.4.3 菌株的分离、纯化

样品表面消毒后,无菌条件下去皮并称取 200 g 进行匀浆。将组织悬液按浓度梯度稀释法稀释至 10^{-5} ,分别取 0.1 mL 涂布在各类培养基上,每个梯度设置 3 个重复,于 30 °C 条件下进行培养。每 24 h 观察一次培养皿的变化情况。

待培养基长出菌落后,挑取颜色、大小、形态不同的单菌落依次转接至新的固体培养基,每株菌纯化 2~3 次后编号并转接至试管斜面上,各保存 3 支,培养 3~7 d,于 4 °C 冰箱保藏。

1.4.4 菌株的分子鉴定

采用菌落克隆方法,利用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27 F 和 1 492 R 在 PCR 扩增仪中进行 PCR 扩增。条件为 94 °C、5 min,94 °C、30 s,72 °C、1.5 min,72 °C、10 min,35 个循环;72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经切胶纯化回收后,送至北京鼎国生物技术有限公司进行测序。

所测得的序列与 EzTaxon 数据库 (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon/identify>) 进行比对,并调取相似性最高模式菌株序列,使用 MEGA 7.0 进行 ClustalX 多重比对,使用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树,自举值(Bootstrap)为 1 000,初步确定菌株的生物学分类地位。

1.4.5 菌株的生长特性测定

生长温度试验:挑取分离纯化后的菌株于 NA 培

养基上划线,分别置于 10、20、30、37 °C 和 45 °C 的恒温培养箱中培养 48 h,观察菌株的生长情况,并记录结果。

耐盐试验:挑取分离纯化后的菌株分别于含有 2%、5%、7% 和 10% NaCl 的 NA 培养基上划线,于 30 °C 恒温培养箱中培养 48 h,观察菌株的生长情况,并记录结果。

1.4.6 产功能酶菌株的检测

淀粉酶:菌株接种到淀粉酶筛选培养基上,30 °C 培养 48 h 后,0.1% 的碘液浸染 5 min,菌落周围出现透明圈即为产淀粉酶阳性菌;反之为阴性。

酯化酶和蛋白酶:菌株分别接种到蛋白酶和酯化酶筛选培养基上,30 °C 培养 48 h 后,菌落周围出现白色晕圈即为产蛋白酶阳性菌;反之为阴性。

纤维素酶:菌株接种到纤维素酶筛选培养基上,30 °C 培养 48 h 后,0.1% 的刚果红水溶液浸染 30 min,菌落周围出现透明圈即为产纤维素酶阳性菌;反之为阴性。

果胶酶:菌株接种到果胶酶筛选培养基上,30 °C 培养 48 h 后,菌落周边出现淡蓝紫色或黄绿色透明圈即为产果胶酶阳性;反之为阴性。

1.4.7 内生菌发酵液的制备

分别挑取菌株单菌落于 5 mL LB 液体培养基中,30 °C、120 r/min 振荡培养 24 h,分别移取 0.5 mL 菌液于 50 mL LB 液体培养基中,30 °C、120 r/min 振荡培养 3 d 后,5 000 r/min 离心 10 min,上清液用于抗氧化活性的测定。

1.4.8 内生菌发酵液的活性测定

DPPH 自由基清除能力测定:向 1 mL 内生菌发酵液样品中加入 0.2 mmol/L 的 DPPH 无水乙醇溶液 1 mL,充分混匀,室温避光反应 30 min,测定 517 nm 处吸光度(A_1)。以无水乙醇代替 DPPH 溶液为对照并测定吸光度(A_2),以 0.2 mmol/L 的 DPPH 无水乙醇溶液为空白并测定吸光度(A_0),以 1 mg/mL 的 V_C 溶液为阳性对照,以无菌水代替待测物为阴性对照,用无水乙醇调零。DPPH 自由基清除率($Z, \%$)计算公式如下。

$$Z = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0} \right) \times 100$$

羟基自由基清除能力测定:分别取 1 mL 待测样、1 mL 硫酸亚铁(9 mmol/L)、1 mL 过氧化氢(10 mmol/L),混合均匀,37 °C 恒温水浴 10 min,加入 1 mL 水杨酸(9 mmol/L),混匀,37 °C 静置 30 min,测定 510 nm 处吸光度(A_1),以蒸馏水代替过氧化氢作样品对照测定 510 nm 处吸光度(A_2),以蒸馏水代替待测物作空白对照测定 510 nm 处吸光度(A_0),以 1 mg/mL 的 V_C 溶液作阳性对照,用蒸馏水调零。羟基自由基清除率

($M, \%$)计算公式如下。

$$M = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0} \right) \times 100$$

1.4.9 菌株的抑菌活性测定

挑取新鲜培养的标准指示菌株大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌各一环接种于 LB 液体培养基中, 30 °C、120 r/min 振荡培养 16 h, 分别移取 100 μ L 发酵菌液, 涂布于 NA 固体培养基。待菌液吸收后, 将菌株分别点接于划定区域中心, 30 °C 恒温培养箱中培养 48 h, 观察菌株产抑菌圈情况; 青霉菌用无菌生理盐水制成孢子悬液涂布于平板, 点接待测菌株, 培养 48 h 后观察菌株产抑菌圈情况并记录结果^[18]。

1.5 数据处理

运用 DPS v9.50、Excel 2010 等软件进行统计学分析, MEGA 7.0 构建菌株系统发育树, Origin 2021 进行图表绘制。

2 结果与分析

2.1 高通量测序法分析内生细菌群落分布特征

通过对恰玛古样品进行高通量测序, 测得内生细菌 OTUs 491 个, 共获得原始序列条数 161 943 条, 有效过滤掉低质量的序列, 去冗余处理后, 质控序列数为 142 509 条。采用 97% 相似水平作为标准界定 OTUs, 利用 RDP classifie 对样品中 OTUs 代表序列依次进行门和属分类信息分析, 进一步挖掘样品的群落组成。结果表明, 恰玛古内生细菌群落共涉及 5 个门和 33 个属, 具有较高的多样性。门水平上的恰玛古内生细菌群落组成见图 1。

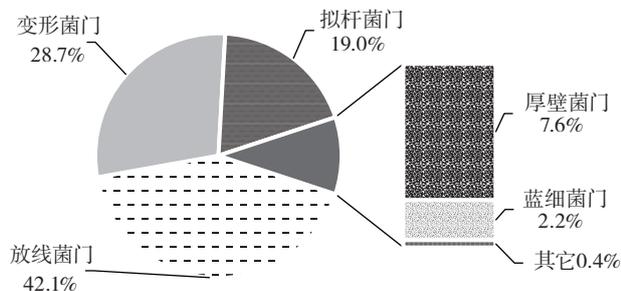


图 1 门水平上的恰玛古内生细菌群落组成

Fig.1 Community composition of endophytic bacteria in *Brassica rapa* L. at phylum level

由图 1 可知, 恰玛古内生细菌群落的主要组成为放线菌门 (Actinobacteria)、变形菌门 (Proteobacteria) 和拟杆菌门 (Bacteroidetes), 分别占总体的 42.1%、28.7%、19.0%, 约占总体的 89.8%; 其次是厚壁菌门 (Firmicutes)、蓝细菌门 (Cyanobacteria), 分别占总体的 7.6%、2.2%。属水平上主要的恰玛古内生细菌群落组

成见表 1。

表 1 属水平上主要的恰玛古内生细菌群落组成

Table 1 Community composition of major endophytic bacteria in *Brassica rapa* L. at genus level

名称	序列数量	相对含量/%
原小单孢菌属	10 809	20.85
假单胞菌属	7 266	14.01
链霉菌属	4 796	9.25
拟杆菌属	4 065	7.84
未分类属	2 124	4.10
乳杆菌属	1 405	2.71
泛菌属	1 402	2.70
未分类蓝细菌属	1 150	2.22
微杆菌属	1 043	2.01
地杆菌属	998	1.92
短小杆菌属	922	1.78
副拟杆菌属	896	1.73
贪噬菌属	862	1.66
节杆菌属	689	1.33
类诺卡氏属	578	1.11
双歧杆菌属	577	1.11
链球菌属	551	1.06

选取恰玛古的内生细菌群落属水平前 17 位的主要内生细菌群落进行分析。由表 1 可知, 主要菌属由原小单孢菌属 (*Promicromonospora*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、链霉菌属 (*Streptomyces*) 和拟杆菌属 (*Bacteroides*) 组成, 分别占总体的 20.85%、14.01%、9.25% 和 7.84%, 约占总体的 51.95%, 研究表明, 小单孢菌属 (*Micromonospora*) 所产的多种代谢产物具有抗菌、抗肿瘤、抗艾滋病病毒、产脂肪酶^[19]和降解纤维素酶的活性等多种生物活性^[20]; 其次为乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、泛菌属 (*Pantoea*)、未分类蓝细菌属 (*unidentified Cyanobacteria*) 和微杆菌属 (*Microbacterium*), 分别占总体的 2.71%、2.70%、2.22% 和 2.01%。此外, 研究发现, 存在 4.1% 的菌属与已知模式菌株序列的相似性小于 98.5%, 其中最低的仅为 85.2%, 初步认定为潜在新属。因此, 恰玛古中存在大量的潜在微生物新物种资源, 有待进一步挖掘开发。

2.2 恰玛古内生细菌的分离

经不同分离培养基培养 3~7 d 后, 根据菌落形态观察, 共挑取各类菌株 29 株。通过共同接种至 NA 培养基中, 观察菌落形态和显微形态去重后, 获得试验菌株 15 株。菌株的来源统计情况见表 2。

2.3 内生细菌多样性分析

15 株试验菌株的 16S rRNA 基因序列经 PCR 扩增和测序后, 运用 EzTaxon 数据库 (<http://www.ezbiocloud.net/identify>) 进行相似度比较, 结果见图 2。

表2 主要菌属 OTUs 所占比例

Table 2 Ratio of OTUs in major genera

培养基	菌株数量	涉及属数量	比例/%
PDA 培养基	1	1	6.67
TSA 培养基	5	5	33.33
LB 培养基	2	2	13.33
NA 培养基	3	2	20.00
R2A 培养基	2	2	13.33
察氏培养基	2	2	13.33

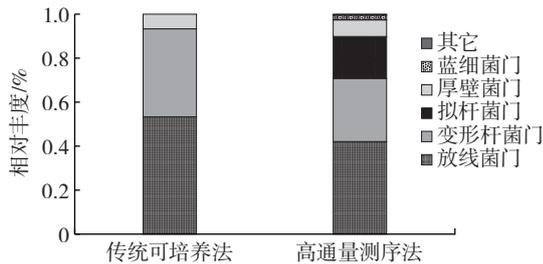


图2 门水平上的恰玛古内生细菌群落组成

Fig.2 Community composition of endophytic bacteria in *Brassica rapa* L. at phylum level

由图2可知,在门水平中,放线菌门(Actinobacteria)为所得恰玛古内生细菌的主要菌门,约占总菌数的53.33%;其次为变形杆菌门(Proteobacteria),约占总菌数的40%;而厚壁菌门(Firmicutes)仅占总菌数6.67%。与高通量测序结果相比,恰玛古共涉及5个门,放线菌门为恰玛古可培养细菌的主要菌门,约占总菌群的42.08%,其次为变形菌门和拟杆菌门(Bacteroidetes),分别约占总菌群的28.72%、19.04%;而厚壁菌门、蓝细菌门(Cyanobacteria)分别仅占7.55%、2.22%。

分别调取各菌株相似性最高模式菌株序列构建系统发育树,结果见图3。

由图3可知,恰玛古可培养细菌种类较为丰富,所得15株菌分别属于3个门、9个属。其中,放线菌门所含种属最为丰富,共涉及5个属,分别为分歧杆菌属(*Mycolicibacterium*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、戈登氏菌属(*Gordonia*)、冷杆菌属(*Frigoribacterium*)和微杆菌属(*Microbacterium*)。丰富的内生放线菌资源能够在恰玛古对营养的吸收和维持自身微生态平衡中起到关键作

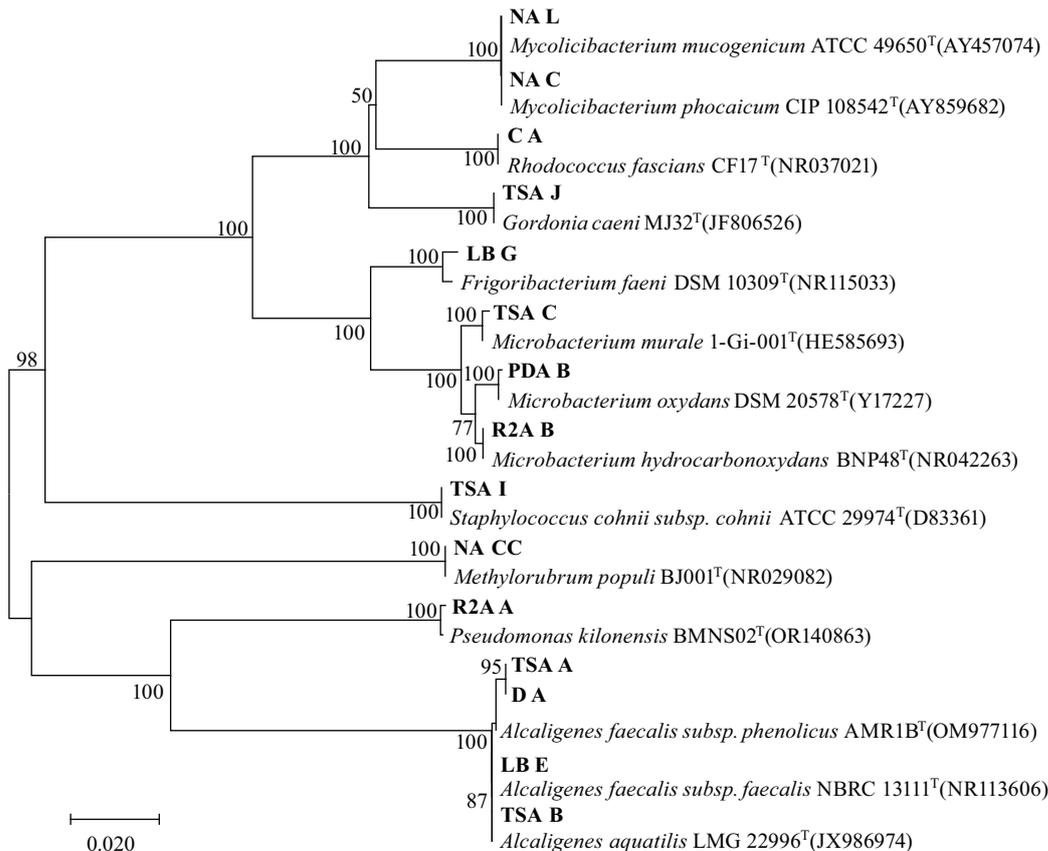


图3 基于内生细菌的16S rRNA基因序列构建的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence of endophytic bacteria

用^[21]。赖国栋等^[22]从腐木与土壤中分离、筛选出4株具有较高纤维素降解能力的链霉菌菌株。变形菌门分别涉及假单胞菌属(*Pseudomonas*)、粪产碱杆菌属(*Alcaligenes*)和甲基杆菌属(*Methylobacterium*)3个属,其中,

粪产碱杆菌能将甲壳素转化为壳聚糖用于生物降解^[23]、缓解赭曲霉毒素A诱导的免疫损伤和炎症反应^[24]。厚壁菌门涉及种属最少,仅包含葡萄球菌属(*Staphylococcus*)。

此外,与高通量测序结果相比,通过可培养法所得的粪产碱杆菌属(*Alcaligenes*)、甲基杆菌属(*Methylorubrum*)、分歧杆菌属(*Mycolicibacterium*)、冷杆菌属(*Frigoribacterium*)、戈登氏菌属(*Gordonia*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)和红球菌属(*Rhodococcus*)在本次高通量测序结果中却未检出。

2.4 菌株的生长温度及耐盐特性

菌株在不同温度和盐浓度条件下的生长情况见表3。

表3 菌株在不同温度和不同盐浓度下的生长情况

Table 3 Growth of strains at different temperatures and salt concentrations

菌株	温度/℃					盐浓度/%			
	10	20	30	37	45	2	5	7	10
TSA C	+	+	+	+	-	+	+	-	-
R2A A	+	+	+	+	-	+	+	-	-
R2A B	+	+	+	+	-	+	+	-	-
TSA B	+	+	+	+	-	+	+	+	-
PDA B	+	+	+	+	-	+	+	-	-
NA CC	-	-	+	-	-	+	-	-	-
NA C	-	+	+	+	-	+	-	-	-
LB G	+	+	+	+	-	+	+	+	-
TSA J	+	+	+	+	-	+	+	+	+
TSA A	+	+	+	+	-	+	+	+	-
LB E	+	+	+	+	-	+	+	+	-
TSA I	+	+	+	+	-	+	+	+	+
C A	+	+	+	-	-	+	+	+	-
D A	+	+	+	+	-	+	+	+	-
NA L	+	+	+	+	-	+	+	-	-

注: +表示菌株正常生长; -表示菌株没有生长。

由表3可知,菌株在30℃条件下均能正常生长;同时多数菌株能够耐受低温,在10℃条件下仍可以生长;而温度为45℃时,所有菌株则均未生长。所有菌株均能耐受2%的NaCl;而随着NaCl浓度的升高,菌株的生长受到明显抑制。当NaCl浓度为7%时,仍有半数菌株能够正常生长;而NaCl浓度为10%时,仅有

两株菌株能够生长。

2.5 恰玛古内生细菌产酶特性分析

内生细菌产功能性酶的能力见表4。

表4 菌株功能酶活性

Table 4 Functional enzyme activity of strains

菌株	属名	蛋白酶	脂肪酶	纤维素酶	淀粉酶	果胶酶
TSA C	微杆菌属	++	-	++	++	-
R2A A	假单胞菌属	+	+	++	+	+
R2A B	微杆菌属	+	-	++	++	-
TSA B	粪产碱杆菌属	-	-	+	-	-
PDA B	微杆菌属	+	-	+	+	-
NA CC	甲基杆菌属	+	-	+	+	-
NA C	分歧杆菌属	-	+	+	+	-
LB G	冷杆菌属	+	-	+	++	-
TSA J	戈登氏菌属	-	-	-	-	-
TSA A	粪产碱杆菌属	-	-	+	-	-
LB E	粪产碱杆菌属	-	-	+	-	-
TSA I	葡萄球菌属	-	++	+	++	-
C A	红球菌属	-	-	-	-	-
D A	粪产碱杆菌属	-	-	-	-	-
NA L	分歧杆菌属	-	-	-	-	-

注: ++表示透明圈直径/菌落直径>3; +表示透明圈直径/菌落直径>1; -表示没有透明圈出现。

由表4可知,具有产纤维素酶活性的菌株数量占绝大多数,其次为产淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶类菌株,而具有产果胶酶活性的菌株数量最少。其中,11株菌具有较强的产纤维素酶活性;8株菌具有产淀粉酶活性,50%的菌株活性较强;6株菌具有产蛋白酶活性;3株菌具有产脂肪酶活性;而具有产果胶酶活性的菌株仅为1株。同时研究发现,8株菌具有2种或2种以上的功能酶产生能力。以上结果说明,恰玛古中的内生菌种类多样,且存在大量具有丰富功能酶产生菌。

2.6 内生细菌代谢产物的抗氧化活性

内生细菌代谢产物对DPPH自由基、羟基自由基的清除能力见图4。

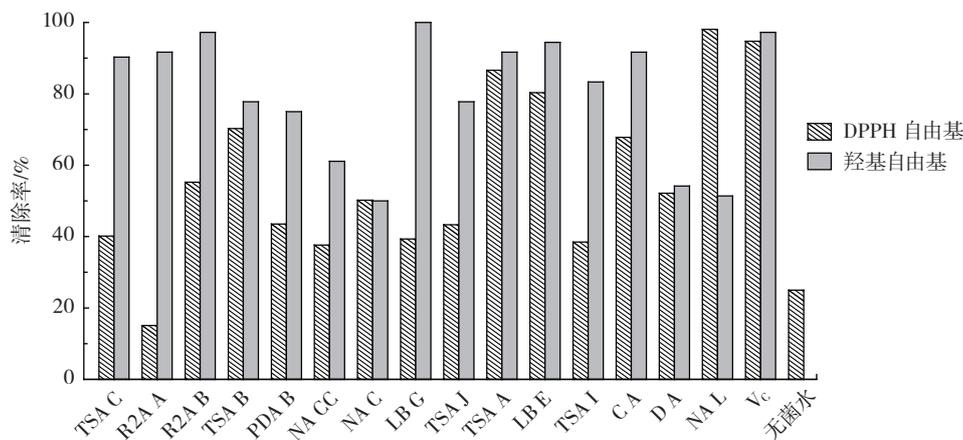


图4 菌株代谢产物对DPPH自由基、羟基自由基的清除能力

Fig.4 DPPH and hydroxyl free radical scavenging activity of metabolites from strains

由图4可知,内生细菌代谢产物对不同的自由基表现出不同的清除能力,其中对羟基自由基的清除效果较好,清除率均在50%以上,且有5株菌株的清除率大于90%,与1 mg/mL V_c的清除率相近;同时对DPPH自由基的平均清除率达54.55%,其中有20%菌株的清除能力超过80%,抗氧化能力良好。

2.7 菌株的抑菌性能

内生细菌的抑菌能力见表5。

表5 菌株的抑菌活性

Table 5 Antibacterial activity of strains

菌株	大肠埃希菌	枯草芽孢杆菌	金黄色葡萄球菌	青霉菌	白色念珠菌
TSA C	++	-	-	-	-
R2A A	+	+	++	+	++
R2A B	++	-	-	-	-
TSA B	+	-	++	+	-
PDA B	+	-	+	-	-
NA CC	-	-	-	-	-
NA C	-	-	-	-	-
LB G	++	++	++	-	-
TSA J	-	-	-	-	-
TSA A	+	++	++	++	-
LB E	++	++	++	++	-
TSA I	-	-	-	-	-
CA	-	-	-	-	-
DA	-	-	-	-	-
NA L	-	+	-	-	-

注:++表示透明圈直径/菌落直径>1.5;+表示透明圈直径/菌落直径>1;-表示没有透明圈出现。

由表5可知,对大肠埃希菌(*Escherichia coli*)有抑制作用的菌株有8株,其中4株有较强的抑制作用;对枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)有抑制作用的菌株有5株,其中3株的抑制作用较强;另外,对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)有抑制作用的6株菌株大多表现出较强的抑制性;而对青霉菌(*Penicillium*)、白色念珠菌(*Moniliaalbican*)呈现出抑制性的菌株较少,仅有1株菌株对白色念珠菌(*Moniliaalbican*)表现出抑制性。同时发现,有5株菌株至少对3种病原菌具有抑制作用。

3 结论

本研究利用高通量测序技术结合传统培养方法,对新疆恰玛古内生细菌群落结构组成进行分析。高通量测序结果显示,恰玛古采后内生细菌群落共涉及5个门、17个目和33个属。原小单孢菌属 OTUs 所占比例最高(20.85%)。可培养筛选共获得15株菌,归类为3个门、9个属,其中,粪产碱杆菌属占总菌群比例最大(26.7%)。所得内生菌均表现出较好耐盐,低温生

长特性;53.33%菌株具有2种或2种以上的功能酶产生能力,且表现出良好自由基清除能力;菌株对不同病原菌大肠埃希菌有抑制作用,5株菌株对枯草芽孢杆菌有抑制作用,6株菌株对金黄色葡萄球菌有较强的抑制性,同时有5株菌株至少对3种病原菌具有抑制作用。本研究为进一步挖掘和利用恰玛古内生菌的益生菌资源提供了理论依据。

参考文献:

- [1] CHATTERJEE S, GHOSH R, MANDAL N C. Production of bioactive compounds with bactericidal and antioxidant potential by endophytic fungus *Alternaria alternata* AE1 isolated from *Azadirachta indica* A. Juss[J]. PLoS One, 2019, 14(4): e0214744.
- [2] ZHAO J, SHAN T, MOU Y, et al. Plant-derived bioactive compounds produced by endophytic fungi[J]. Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 2011, 11(2): 159-168.
- [3] 靳锦,赵庆,张晓梅,等.植物内生菌活性代谢产物最新研究进展[J].微生物学杂志,2018,38(3):103-113.
JIN Jin, ZHAO Qing, ZHANG Xiaomei, et al. Research progress on bioactive products from endophytes[J]. Journal of Microbiology, 2018, 38(3): 103-113.
- [4] 黄雪珍,赵龙飞.药用植物内生菌对宿主植物促生作用机制研究进展[J].微生物学通报,2023,50(4):1653-1665.
HUANG Xuezheng, ZHAO Longfei. Mechanism of endophytes of medicinal plants in promoting the growth of host plants[J]. Microbiology China, 2023, 50(4): 1653-1665.
- [5] 何小慧.基于高通量测序的藜麦内生微生物群落结构分析[D].成都:成都大学,2021.
HE Xiaohui. Analysis of endophytic microbial community structure of quinoa based on high-throughput sequencing[D]. Chengdu: Chengdu University, 2021.
- [6] 冯琪.恰玛古提取物抗氧化活性、护肝功效分析[J].现代食品,2024(10):105-107.
FENG Qi. Analysis of antioxidant activity, hepatoprotective efficacy of *Brassica rapa* L extracts[J]. Modern Food, 2024(10): 105-107.
- [7] 王丽萍,王航宇,谭勇,等.维药恰玛古的研究进展[J].农垦医学,2012,34(6):525-530.
WANG Liping, WANG Hangyu, TAN Yong, et al. Research progress of Uyghur medicine Chamagu[J]. Journal of Nongken Medicine, 2012, 34(6): 525-530.
- [8] 王证德,平措绕吉,刘莹,等.芜菁的化学成分和生物活性研究进展[J].中南药学,2023,21(9):2391-2399.
WANG Zhengde, PING Cuoraoji, LIU Ying, et al. Research progress in chemical constituents and biological activities of *Brassica rapa* L[J]. Central South Pharmacy, 2023, 21(9): 2391-2399.
- [9] 陈文彬,史毅,张博文,等.恰玛古黄酮类化学成分及其药理活性研究进展[J].江西中医药大学学报,2019,31(3):115-118.
CHEN Wenbin, SHI Yi, ZHANG Bowen, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activity of flavonoids from *Brassica rapa* L[J]. Journal of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, 2019, 31(3): 115-118.
- [10] 刘展,盛朋飞.新疆地产植物恰玛古活性成分及抗肿瘤机制的研究进展[J].癌症进展,2019,17(20):2361-2363.
LIU Zhan, SHENG Pengfei. Research progress of active components and anti-tumor mechanism of Chamagu from Xinjiang[J]. Oncology Progress, 2019, 17(20): 2361-2363.

- [11] 王萍, 于新, 陈于陇, 等. 恰玛古食用与药用研究进展[J]. 仲恺农业工程学院学报, 2021, 34(1): 63-70.
WANG Ping, YU Xin, CHEN Yulong, et al. Advances in research on edible and medicinal use of Qiamagu[J]. Journal of Zhongkai University of Agriculture and Engineering, 2021, 34(1): 63-70.
- [12] 蔡啸镛, 刘跃峰. 恰玛古多糖的纯化及对运动小鼠抗疲劳活性研究[J]. 食品工业, 2015, 36(8): 59-62.
CAI Xiaodi, LIU Yuefeng. Purification process of polysaccharide from qamgur and its anti-fatigue activity[J]. The Food Industry, 2015, 36(8): 59-62.
- [13] 孙艳, 安熙强, 马媛, 等. 恰玛古膏膏对小鼠免疫功能的影响[J]. 中国医药导报, 2010, 7(6): 20-22.
SUN Yan, AN Xiqiang, MA Yuan, et al. The effect of *Brassica Campestris* Ointment on immune function of mice[J]. China Medical Herald, 2010, 7(6): 20-22.
- [14] SOENGAS P, VELASCO P, FERNÁNDEZ J C, et al. New vegetable *Brassica* foods: A promising source of bioactive compounds [J]. Foods, 2021, 10(12): 2911.
- [15] 梁寒峭, 迪丽达尔·库德热提, 白飞荣, 等. 新疆特色植物恰玛古块根内生真菌的分离与鉴定[J]. 生物技术通报, 2017, 33(2): 131-136.
LIANG Hanqiao, LIANG Hanqiao, BAI Feirong, et al. Isolation and identification of endophytic fungi from the rhizomes of Xinjiang-specific plant *Brassica rapa*[J]. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(2): 131-136.
- [16] 王志伟, 纪燕玲, 陈永敢. 植物内生菌研究及其科学意义[J]. 微生物学通报, 2015, 42(2): 349-363.
WANG Zhiwei, JI Yanling, CHEN Yonggan. Studies and biological significances of plant endophytes[J]. Microbiology China, 2015, 42(2): 349-363.
- [17] 赵燃, 迪丽达尔·库德热提, 姚粟, 等. 新疆特色药食同源植物恰玛古内生细菌的分离与筛选[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(9): 126-129.
ZHAO Ran, DILIDAER Kudereti, YAO Su, et al. Separation and screening of endophytic bacteria in Xinjiang Turnip(*Brassica rapa* L.)[J]. Food and Fermentation Industries, 2016, 42(9): 126-129.
- [18] 林杨, 顾美英, 孙建, 等. 阿克苏地区传统酸乳中乳酸菌筛选及安全性初步评价[J]. 微生物学杂志, 2022, 42(1): 26-33.
LIN Yang, GU Meiyong, SUN Jian, et al. Screening and safety evaluation of lactobacteria from traditional yogurt in Aksu Region [J]. Journal of Microbiology, 2022, 42(1): 26-33.
- [19] 高帅, 刘占文, 骆新荣, 等. 塔里木河淤泥小单孢菌抗生素合成基因筛选及抑菌活性初探[J]. 塔里木大学学报, 2023, 35(2): 13-22.
GAO Shuai, LIU Zhanwen, LUO Xinrong, et al. Screening of antibiotic synthesis genes and exploring antimicrobial activity of *Micromonospora* from Tarim River sediment[J]. Journal of Tarim University, 2023, 35(2): 13-22.
- [20] 杨星鹏, 张志斌, 朱笃. 小单胞菌属次级代谢产物及其生物活性研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(5): 908-915, 921.
YANG Xingpeng, ZHANG Zhibin, ZHU Du. Review on secondary metabolites and its biological activities from genus *Micromonospora* [J]. Natural Product Research and Development, 2019, 31(5): 908-915, 921.
- [21] 郑倩, 孙玉萍, 魏婕, 等. 新疆特色药食两用植物恰玛古内生放线菌的分离与鉴定[J]. 生物资源, 2020, 42(6): 691-697.
ZHENG Qian, SUN Yuping, WEI Jie, et al. Isolation and identification of endophytic actinomycetes from medicinal and edible plant Qamgur in Xinjiang[J]. Biotic Resources, 2020, 42(6): 691-697.
- [22] 赖国栋, 秦长生, 赵丹阳, 等. 纤维素降解菌株的分离与筛选[J]. 林业与环境科学, 2021, 37(4): 24-32.
LAI Guodong, QIN Changsheng, ZHAO Danyang, et al. Isolation and screening of cellulose degrading strains[J]. Forestry and Environmental Science, 2021, 37(4): 24-32.
- [23] AMER O A, ALI S S, AZAB M, et al. Exploring new marine bacterial species, *Alcaligenes faecalis* Alca F2018 valued for bioconversion of shrimp chitin to chitosan for concomitant biotechnological applications[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 196: 35-45.
- [24] ZHENG R, QING H R, MA Q G, et al. A newly isolated *Alcaligenes faecalis* ANSA176 with the capability of alleviating immune injury and inflammation through efficiently degrading ochratoxin A[J]. Toxins, 2022, 14(8): 569.

责任编辑:冯娜

收稿日期:2023-11-15