

黄连土壤阿魏酸降解菌的筛选及降解特性^①

刘云露, 郑守豪, 叶磊鑫, 廖国建, 胡昌华

西南大学药学院, 重庆 400716

摘要:为筛选黄连土壤来源的阿魏酸降解菌,从黄连种植基地的土壤中分离能够在以阿魏酸为唯一碳源的培养基中生长的真菌,ITS 序列比对鉴定种属,采用高效液相色谱法检测菌株在不同条件下对阿魏酸的降解能力.结果表明:获得对阿魏酸具有降解能力的真菌 F-0056,鉴定为齿孢青霉(*Penicillium daleae*);外源阿魏酸添加量为 200 $\mu\text{g/mL}$ 时,菌株 F-0056 培养 72 h 后阿魏酸降解率达 87.5%;真菌 F-0056 在土壤环境下 144 h 对阿魏酸降解效率达 71.8%.

关键词:黄连;阿魏酸;降解菌;土壤微生物;连作障碍

中图分类号: S567.5⁺2

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2019)01-0046-05

黄连(*Coptis chinensis*)是毛茛科多年生草本植物,有效药用成分为根部小檗碱^[1],常用于治疗肠胃湿热、呕吐等疾病.我国黄连主要生长于湖北、贵州、重庆等地,连作障碍是限制黄连产量的重要原因,种植一轮的土壤通常需要休地 5~10 a,这一现象也普遍存在于三七、太子参和地黄等药材种植中^[2-3],造成该现象的原因包括土壤养分变化、酚酸类化感物质积累、土壤微生态失衡等^[4].植物根系不断分泌化感物质到土壤中,高浓度的酚酸类化感物质破坏细胞膜功能^[5],限制幼苗生长,抑制种子萌发所需的关键酶^[6],其中阿魏酸(Ferulic acid)造成植株体内保护酶活性急剧下降进而强烈抑制幼苗根的生长.黄连在种植过程中产生的对羟基苯甲酸、香草酸、阿魏酸等酚酸类化感物质随种植年限增加而不断积累^[7],这些化感物质的积累是导致黄连连作障碍的重要原因.

鉴于阿魏酸是黄连种植过程中大量积累的酚酸类物质,对幼苗根的生长的严重影响,作者从重庆市石柱县黄连种植土壤中筛选得到 10 株可以分解利用阿魏酸的真菌,挑选降解效果最好的菌株进行鉴定和降解特性测试,并模拟土壤环境检测对阿魏酸的降解效果,以期丰富黄连土壤来源的阿魏酸降解菌资源,为修复黄连连作障碍奠定一定的基础.

1 材料与方法

1.1 样品采集和微生物的分离纯化

黄连根际土壤样品采自重庆石柱县黄连种植基地,无菌袋带回实验室当日处理.去除杂质后以无菌水梯度稀释,均匀涂布于加入 25 mg/L 氯霉素的 PDA 培养基上,于 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养至形成可见菌落后转接至无抗培养基中纯化培养.

1.2 酚酸降解菌筛选

将真菌制成有效菌数为 1×10^7 cfu/mL 的孢子悬液.50 mL 无机盐培养基中阿魏酸添加量为 200 $\mu\text{g/mL}$,

① 收稿日期: 2018-10-10

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFC1702600);重庆市社会民生科技创新专项项目(cstc2016shmszx80102).

作者简介: 刘云露(1995-),女,硕士研究生,主要从事中草药微生物组研究.

通信作者: 胡昌华,教授.

孢子悬液接种量为 1%，28℃下培养 72 h. 收集菌体烘至恒重，计菌体质量增加量. 取发酵液用等体积乙酸乙酯萃取后蒸干回溶于甲醇，高效液相检测阿魏酸质量浓度. 色谱条件：分离柱为 Waters 公司的 symmetey C18 柱，检测波长为 280 nm，柱温 30℃，进样量为 20 μL，流动相组分为甲醇和水(冰醋酸 pH 值调节至 2.8)，体积流量为 1 mL/min. 梯度洗脱设置：在 12 min 时，甲醇和水的体积比为 40：60，其他时间(0,0.1,20 min)二者的体积比为 30：70.

1.3 基因组提取和 ITS 鉴定

以 SDS 法裂解菌体提取基因组作为模板，真菌 ITS 通用引物(27F: AGAGTTTGATCMT GGCT-CAG/1525R: AAGGAGGTGWTCCARCC)进行 PCR 反应. PCR 反应条件如下：95℃预变性 5 min，94℃变性 30 s，55℃退火 30 s，72℃延伸 45 s，共 30 个循环. 扩增所得片段电泳检测后送华大基因公司测序，所得菌株 F-0056 的 ITS 序列使用软件 MEGA7.0 进行系统发育分析，并提交至 GenBank，获得的登录号为 MH817153.

1.4 阿魏酸的降解特性测试

50 mL 无机盐培养基中阿魏酸添加量分别为 200,400,600,800 和 1 000 μg/mL，孢子悬液接种量为 1%，在 28℃条件下 180 r/min 转速培养 72 h 后 HPLC 检测阿魏酸质量浓度；50 mL 无机盐培养基中阿魏酸添加量为 200 μg/mL，孢子悬液接种量同样为 1%，28℃条件下 180 r/min 转速培养，分别于 24,48,72 和 96 h 时 HPLC 检测阿魏酸质量浓度.

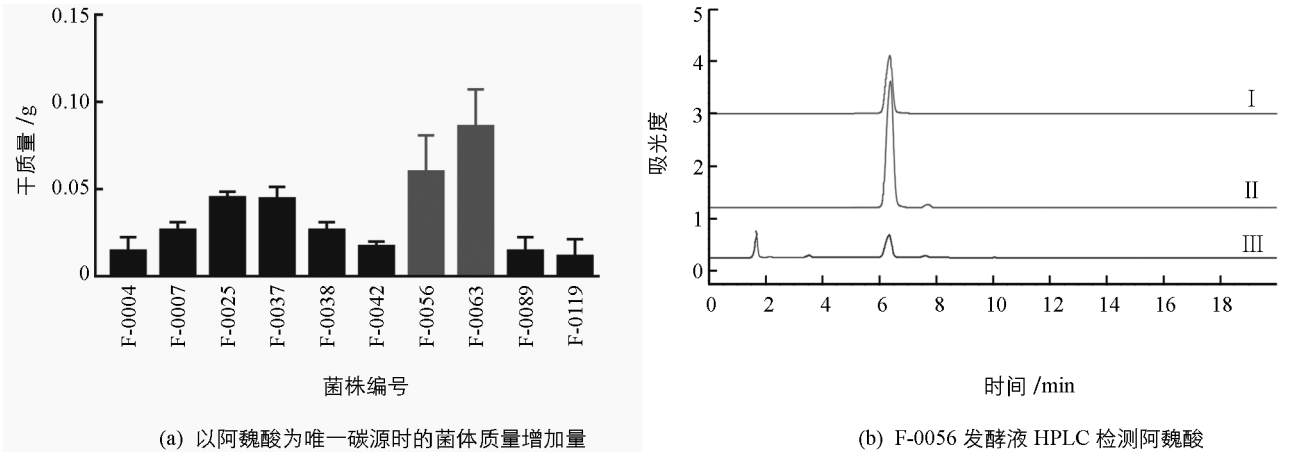
1.5 土壤环境下 F-0056 对阿魏酸的降解效果

挖取黄壤土适量，将有效菌数为 1×10^7 cfu/mL 的 F-0056 孢子悬液以 10：1 的比列接种至 1 kg 的土壤中，以添加等量无菌水为对照，外源阿魏酸添加量为 1 mg/mL，室温条件下存放. 每隔 6 d 取每组土壤各 50 g，以 150 mL 乙酸乙酯萃取，HPLC 检测阿魏酸质量分数变化.

2 结果与分析

2.1 阿魏酸降解真菌的筛选

从黄连根际土壤中分离纯化得到真菌 46 株，接种至以阿魏酸为唯一碳源的培养基中 72 h 后，根据菌体质量增加量初步得到 10 株可在阿魏酸为唯一碳源的培养基中生长的真菌，表明它们可能有分解利用阿魏酸的能力，其中菌株编号为 F-0056 和 F-0063 的菌体质量增加最明显，菌株质量增加情况见图 1a. HPLC 检测菌株 F-0056 发酵液中阿魏酸残留量(图 1b)，发现培养 72 h 后 F-0056 几乎完全降解了阿魏酸，表明该菌具有高效降解阿魏酸的能力.



I 所示 6.38 min 吸收峰为阿魏酸空白标准品，II 为未加入孢子悬液时阿魏酸的量，III 为发酵前加入 F-0056 孢子悬液，72 h 后检测到阿魏酸的量.

图 1 阿魏酸降解菌筛选

2.2 菌株 F-0056 的鉴定

提取 F-0056 菌株基因组 DNA，扩增 ITS 片段并测序比对，发现该菌株的 ITS 序列与图 2a 中所示 3

株齿孢青霉 ITS 序列相似度达 99%, 故初步鉴定为齿孢青霉(*Penicillium daleae*). 固体 PDA 培养基上培养 2 d 时 F-0056 菌落为白色丝绒状, 第 4 d 时开始产绿色孢子, 菌落形态见图 2b; 刮取适量菌丝和孢子镜检可见由具横隔的分枝菌丝构成的营养菌丝体, 并分化出青霉所特有的直立分生孢子梗, 顶端可见成串孢子链(图 2c).

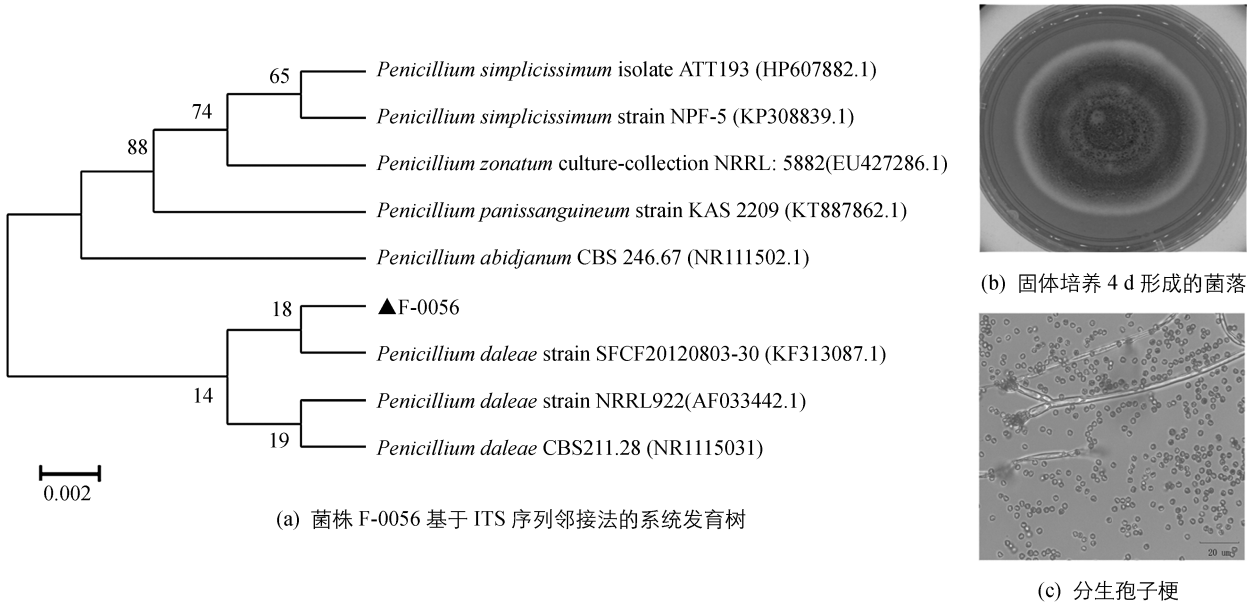


图 2 菌株 F-0056 的鉴定

2.3 菌株 F-0056 对液体培养基中阿魏酸的降解特性

检测菌株 F-0056 培养 72 h 后阿魏酸的残留量, 发现外源阿魏酸添加量为 200 $\mu\text{g/mL}$ 时降解效率最高, 降解率达 87.5%(图 3a). 随着外源阿魏酸添加量的增加, 降解效果逐渐下降, 当阿魏酸添加量增加至 800 $\mu\text{g/mL}$ 时降解效率降至 11.5%. 等量外源阿魏酸条件下发酵 24, 48, 72 和 96 h 时阿魏酸降解效率见图 3b, 相对于加入无菌水的空白对照而言, 加入 F-0056 孢子悬液后阿魏酸的降解率随时间呈增长趋势, 96 h 时降解率达 98.9%.

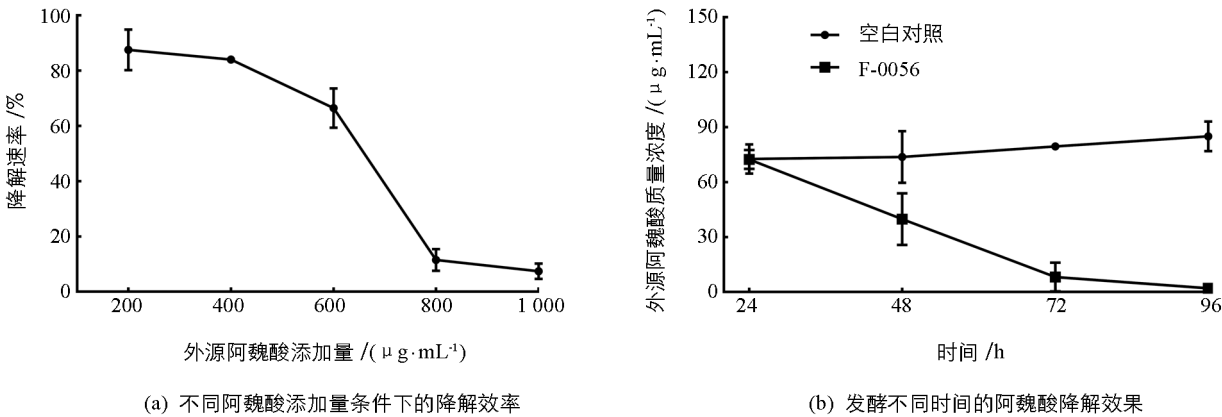


图 3 F-0056 对液体培养基中阿魏酸的降解特性

2.4 菌株 F-0056 在土壤环境中对阿魏酸的降解效果

为了测试 F-0056 在土壤环境中的降解效果, 模拟土壤条件定时检测该菌株对土壤中阿魏酸的分解(图 4), 发现未加入孢子悬液的对照组土壤中阿魏酸质量分数在前 18 d 有缓慢下降趋势, 而土壤中加入 F-0056 孢子悬液后对阿魏酸降解效果明显. 第 6 d 时加入该菌的土壤中阿魏酸降解率达 71.8%, 明显高

于未加入降解菌的土壤中阿魏酸的降解速率, 24 d 时土壤中阿魏酸几乎全部降解。

3 结论与讨论

根茎类药材种植过程中普遍存在连作障碍, 严重限制中药材的产量及品质。黄连在种植过程中产生的酚酸类化感物质对黄连幼苗的生长有抑制作用, 其中以香草酸、4-香豆酸、阿魏酸对黄连生长的影响最为显著^[8-9]。阿魏酸是土壤中主要存在的酚酸类物质, 会造成植株体内保护酶活性急剧下降而抑制幼苗根系生长, 其他种类酚酸

则干扰植物的光合作用、抑制植物对矿质营养元素的吸收, 从而影响植株的正常生长^[10-11]。利用微生物降解环境中的有害物质, 作为一项高效、环保的技术而受到人们的青睐^[12-13], 如土壤中筛选到 3 株降解西瓜根系分泌物的放线菌, 能降解土壤中阿魏酸的同时也是甜瓜枯萎病的拮抗菌^[14]; AM 真菌是土壤生态系统中植物根系的互惠共生体, 能够有效缓解连作障碍^[15]; 黄孢毛平革菌在 300 mg/L 阿魏酸培养基中降解效率为 99%^[16]。作者从不同年份的黄连种植土壤中筛选得到 10 株能够分解利用阿魏酸的真菌, 其中一株齿孢青霉对阿魏酸具有高效降解能力, 培养 4 d 的降解效率高达 98.9%。更为重要的是, 该菌能够在盆栽土壤中快速、有效地分解阿魏酸, 表明该菌可能用于黄连连作土壤中阿魏酸的降解。此外, 齿孢青霉对立枯病菌、锈腐病菌和黑斑病菌等植物病原菌有抑菌效果^[17], 因此该菌株除了可以用于缓解土壤中阿魏酸积累造成的连作障碍, 还可能具有潜在的生防效果, 这需要进一步研究。本研究从黄连土壤中分离得到多株阿魏酸降解菌, 丰富了土壤来源的阿魏酸降解菌资源, 为快速修复化感物质积累造成的中草药连作障碍奠定了一定的基础。

参考文献:

- [1] MENG Fan-cheng, WU Zheng-feng, YIN Zhi-qi, et al. *Coptidis rhizoma* and Its Main Bioactive Components: Recent Advances in Chemical Investigation, Quality Evaluation and Pharmacological Activity [J]. Chinese Medicine, 2018, 13(13): 1-18.
- [2] TAN Yong, CUI Yin-shan, LI Hao-yu, et al. Rhizospheric Soil and Root Endogenous Fungal Diversity and Composition in Response to Continuous *Panax notoginseng* Cropping Practices [J]. Microbiological Research, 2017, 194: 10-19.
- [3] CHEN Shao-li, ZHOU Bao-li, LIN Shan-shan, et al. Accumulation of Cinnamic Acid and Vanillin in *Eggplant* Root Exudates and the Relationship with Continuous Cropping Obstacle [J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10(14): 2659-2665.
- [4] DONG Lin-lin, XU Jiang, FENG Guangquan, et al. Soil Bacterial and Fungal Community Dynamics in Relation to *Panax notoginseng* Death Rate in a Continuous Cropping System [J]. Scientific Reports, 2016, 6(31802): 1-11.
- [5] KOLE R K, KARMAKAR P R, POI R, et al. Allelopathic Inhibition of *Teak* Leaf Extract: a Potential Pre-Emergent Herbicide [J]. Journal of Crop and Weed, 2011, 7(1): 101-109.
- [6] YAN Jian, BI Hai-hong, LIU Yong-zhu, et al. Phenolic Compounds from *Merremia umbellata* subsp. *orientalis* and Their Allelopathic Effects on *Arabidopsis* Seed Germination [J]. Molecules, 2010, 15(11): 8241-8250.
- [7] 张 丹, 钟国跃, 曹伟国, 等. 重庆黄连种植土壤中酚酸类物质累积与消减规律的研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2015, 17(7): 1419-1424.
- [8] 李阳波, 何林卫, 张 薇, 等. 黄连须根浸提液对土壤微生物及酶活性的影响 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(21): 4205-4210.

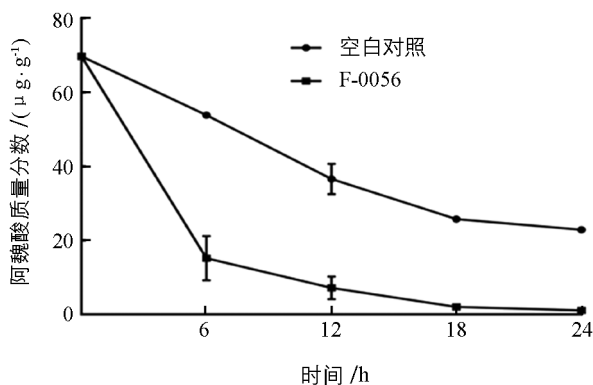


图 4 F-0056 在土壤环境下对阿魏酸的降解

[9] FIERER N. Embracing the Unknown: Disentangling the Complexities of the Soil Microbiome [J]. Nature Reviews Microbiology, 2017, 15(10): 579—590.

[10] ALRUMMAN S A, STANDING D B, PATON G I. Effects of Hydrocarbon Contamination on Soil Microbial Community and Enzyme Activity [J]. Journal of King Saud University Science, 2015, 27(1): 31—41.

[11] QH X H, WANG JingGuo. Effect of Amendments with Different Phenolic Acids on Soil Microbial Biomass, Activity, and Community Diversity [J]. Applied Soil Ecology, 2008, 39(2): 172—179.

[12] 徐海燕, 雷世梅, 熊伟, 等. 丛枝菌根化枳橙根际微生态环境的研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2012, 34(10): 65—71.

[13] SANTHANAM R, LUU V T, WEINHOLD A, et al. Native Root-Associated Bacteria Rescue a Plant from a Sudden Wilt Disease That Emerged During Continuous Cropping [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(36): E5013—E5020.

[14] 张一迪. 甜瓜自毒物质降解菌的筛选及其降解作用研究 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2018.

[15] FAVRE P, BAPAUME L, BOSSOLINI E, et al. A Novel Bioinformatics Pipeline to Discover Genes Related to Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis Based on Their Evolutionary Conservation Pattern Among Higher Plants [J]. BMC Plant Biology, 2014, 14(333): 1—20.

[16] 徐淑霞, 张世敏, 尤晓颜, 等. 黄孢原毛平革菌对黄连连作土壤酚酸物质的降解 [J]. 应用生态学报, 2008, 19(11): 2480—2484.

[17] 赵智灵, 刘学周, 魏晓雨, 等. 人参可利用内生菌株的筛选和鉴定 [J]. 中草药, 2015, 46(14): 2143—2148.

Isolation and Degradation Characteristics of Ferulic Acid-Degrading Fungi in Rhizosphere Soil of *Coptis chinensis*

LIU Yun-lu, ZHENG Shou-hao, YE Lei-xin,
LIAO Guo-jian, HU Chang-hua

School of Pharmaceutical Science and Chinese Medicine, Southwest University, Chongqing 400716, China

Abstract: In order to screen ferulic acid-degrading microbes from rhizosphere soil of *Coptis chinensis*, a fungus strain which could grow in a medium with ferulic acid as the sole carbon source was isolated from the soil of a *C. chinensis* plantation. With ITS (internal transcribed spacer) sequence analysis this strain (F-0056) was identified as *Penicillium daleae*. High performance liquid chromatography (HPLC) was used to determine its degradation ability of ferulic acid under different conditions, and the results showed that the ferulic acid degradation rate of F-0056 reached 87.5% after 72 hours' culture in a medium supplemented with ferulic acid at 200 μg/mL and 71.8 % in a soil environment after 144 hours.

Key words: *Coptis chinensis*; ferulic acid; degrading microbe; soil microorganism; continuous cropping obstacle

责任编辑 王新娟