

## 绞股蓝内生真菌抗大肠杆菌抗菌机制的研究

张慧茹<sup>1\*</sup> 孟素香<sup>1</sup> 曹健<sup>1,2</sup> 范文慧<sup>1</sup> 王钰飞<sup>1</sup> 李强<sup>1</sup>

(1. 河南工业大学 生物工程学院 河南 郑州 450001)

(2. 中原工学院 河南 郑州 450007)

**摘要:**【目的】药用植物内生真菌是一种新型抗生素的微生物资源,研究绞股蓝内生真菌 JY25 的抗菌机制对内生真菌的研发具有重要意义。【方法】以二倍稀释法测定发酵液的最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC);以 MIC 测定发酵液对大肠杆菌生长的抑制作用;扫描电镜观察发酵液作用下的大肠杆菌形态变化;同时,以  $\beta$ -半乳糖酶、碱性磷酸酶和电导率测定发酵液对细胞膜和细胞壁的损伤效果;采用考马斯亮蓝法检测发酵液对蛋白质合成的影响。【结果】JY25 发酵液对大肠杆菌 MIC 为 7 g/L、MBC 为 14 g/L; MIC 浓度的发酵液使细菌对数生长期延迟 12 h,菌体形态发生严重的畸形和破损;随着抑菌作用时间的延长,  $\beta$ -半乳糖酶含量增加、电导率增加,同时,实验发现大肠杆菌蛋白质合成异常,未检测到碱性磷酸酶。【结论】绞股蓝内生真菌 JY25 主要以破坏细菌的细胞膜及影响细菌蛋白质合成而抑制细菌生长。

**关键词:** 绞股蓝, 内生真菌, 抗菌机制, 大肠杆菌

## Antibacterial mechanisms of endophytic fungi from *Gynostemma pentaphyllum* on *Escherichia coli*

ZHANG Hui-Ru<sup>1\*</sup> MENG Su-Xiang<sup>1</sup> CAO Jian<sup>1,2</sup> FAN Wen-Hui<sup>1</sup>  
WANG Yu-Fei<sup>1</sup> LI-Qiang<sup>1</sup>

(1. College of Biological Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou, Henan 450001, China)

(2. Zhongyuan University of Technology, Zhengzhou, Henan 450007, China)

**Abstract:** [Objective] Endophytic fungi of medicine plants are the new microbial resource of antibiotic medicines. These antibacterial mechanisms of endophytic fungi named JY25 from *Gynostemma pentaphyllum* have important significance for the research and development of endophytic fungi. [Methods] The method of double dilution has adopted to measure the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of fermentation broth to *Escherichia coli*. Then, the JY25 fermentation broth with MIC concentrations was used to inhibit the growth of *E. coli*, and the morphology changes of *E. coli* were observed by scanning electron microscope. Meanwhile,  $\beta$ -galactosidase, alkaline phosphatase and conductivity were used to test the damaged effects of fermentation broth on *E. coli* cell membrane and cell wall. Finally, the effects of protein synthesis of *E. coli* were detected by coomassie blue method. [Results] The results showed that

基金项目: 郑州市科技发展规划项目(No. 2001NYXM229)

\*通讯作者: ✉: zhr67@163.com

收稿日期: 2014-05-04; 接受日期: 2014-07-30; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-07-31

MIC of JY25 fermentation broth to *E. coli* was 7 g/L, MBC was 14 g/L, and the fermentation broth with MIC concentration could delay the logarithmic growth of *E. coli* up to 12 h, with severe deformity and damage of cell morphology. With the extension of treating time, both the  $\beta$ -galactosidase activity and conductivity increased, and the protein synthesis was abnormal. The alkaline phosphatase did not be detected in the broth. **[Conclusion]** JY25 endophytic fungi from *Gynostemma pentaphyllum* primarily inhibited the growth of *E. coli* by damaging the cell membranes and impacting protein synthesis.

**Keywords:** *Gynostemma pentaphyllum*, Endophytic fungi, Antibacterial mechanism, *Escherichia coli*

植物内生真菌(Endophytic fungi)是和植物共同生长、互惠互利、协同作用的一类真菌。1993 年, Stierie 等首次获得了一株产紫杉醇的内生真菌<sup>[1]</sup>, 证实内生真菌能够产生相同或类似于植物的新型天然活性物质, 这些活性物质能发挥抗菌、抗癌、抗病毒、抗氧化等多种生物活性作用, 其活性物质的发现为人类研发新型药物开辟了新方向。

最新研究发现, 植物内生真菌也是抗生素的重要来源。人们从多种植物内生菌真中发现具有抗菌特性的活性物质。杨本寿等<sup>[2]</sup>从飞龙斩血(*Toddalia asiatica*)分离的 5 株内生真菌发酵产物的甲醇浸提液具有较宽的抑菌范围和较高的抑菌活性, 特别是菌株 F-GBY (*Fusarium*)对 30 种病原菌有抑菌作用。夏丽娟等<sup>[3]</sup>采用纸片扩散法从白莲(*White lotus*)、木榄(*Bruguiera gymnorhiza*)、秋茄(*Kandelia candel*)、桐花(*Aegiceras corniculatum*)、老鼠簕(*Acanthus illicifolius* L.)中共分离得到 50 株真菌, 其中 16 株真菌的代谢产物对至少 1 株病原菌有抑菌活性, 占总菌数的 30.77%, 其中对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的拮抗率最高达 32%。

绞股蓝(*Gynostemma pentaphyllum*)为葫芦科多年生蔓生草本植物, 含有皂苷、多糖、黄酮、有机酸、生物碱等多种活性成分。研究表明, 绞股蓝具有抗菌、抗氧化、抗癌、降血糖、调节免疫等多种药理作用<sup>[4]</sup>。其中, 绞股蓝皂苷在抗菌、抗氧化、抗肿瘤等方面发挥作用<sup>[5]</sup>, 多糖也具有降血糖、降血脂的疗效。周生亮等<sup>[6]</sup>从樟树(*Cinnamomum camphora*)、十大功劳(*Mahonia fortunei*)、女贞(*Ligustrum lucidum*)、荔枝草(*Salvia plebeian* R. Br.)及绞股蓝的叶片、茎和枝条等部位分离具有抗菌活性的内生真菌, 其中绞股蓝与其他几种药用植物相比, 是抗菌

活性菌株占所分离菌株百分比最高的植物, 说明绞股蓝中含有丰富的抗菌性内生真菌。范文慧<sup>[7]</sup>从绞股蓝中分离获得了具有抗菌特性的内生真菌菌株 JY25, 本实验对该菌株抗大肠杆菌的抑菌机制进行了研究, 从而为绞股蓝的综合开发利用奠定基础, 并为筛选新的抗生素菌种提供科学依据和理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株

指示菌: 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) CVCC8099, 购自中国兽医药品监察所。

绞股蓝内生真菌 JY25 菌株, 由河南工业大学生物工程学院动物生理实验室分离, 经形态学和分子生物学鉴定为子囊菌亚门(Ascomycotina)、核菌纲(Pyrenomycetes)、球壳目(Sphaeriales)、黑孢壳科(Melanospora)、毛壳菌属(*Chaetomium*)<sup>[8]</sup>。

### 1.2 主要试剂和仪器

碱性磷酸酶试剂盒, 购于南京建成科技有限公司; 半乳糖苷酶试剂盒 GMS60045.1, 购于上海杰美基因医药科技有限公司; SDS 十二烷基硫酸钠(SBH-BIO)、Tris 三羟基氯甲烷, 由 USA 分装; 蛋白胨、酵母膏, 购自北京市双旋微生物培养基制品厂。

BioTek 酶标仪(FLX800TBI 型号) 美国 BioTek 公司; 电泳仪电源(DYY-6C 型号)、垂直电泳槽(DYCZ-40D 型号), 北京市六一仪器厂; 电热恒温水浴锅(DK-98-1 型号), 天津市泰斯特仪器有限公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 JY25 菌株发酵液的制备:** 将 JY25 的菌丝三点接种于 PDA<sup>[9]</sup>固体培养基活化 28 °C 培养 4-5 d, 用直径为 7 mm 的打孔器取菌饼, 以 5%的接种量接

入装液量为 100 mL PDA 液体培养基的 250 mL 三角瓶中, 28 °C、160 r/min 振荡培养 6–7 d, 离心发酵液(8 000 r/min, 15 min), 取上清液备用。

**1.3.2 最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)测定:** 发酵液的质量浓度: 取 50 mL 发酵液于 45 °C 旋转蒸发, 将沉淀置 80 °C 烤箱烘至恒重, 电子天平称量, 计算出发酵液干重。发酵液质量浓度(g/L)=发酵液干重(g)/发酵液体积(L)。

采用二倍稀释法测定最小抑菌浓度: 将真菌发酵上清液作为原液, 用孔径 0.22  $\mu\text{m}$  的无菌滤膜过滤, 用灭过菌的牛肉膏蛋白胨液体培养基将原液稀释成 0、2、4、8、16、32、64、128 和 256 倍 9 个稀释度, 分别取不同稀释倍数的培养液 200  $\mu\text{L}$  依次加入 96 孔聚苯乙烯酶标板中, 每个稀释度设 4 个平行, 每孔加入指示菌菌悬液 10  $\mu\text{L}$  ( $10^6$  CFU/mL), 同时设阳性对照(牛肉膏蛋白胨液体培养基加指示菌)、阴性对照(仅含有牛肉膏蛋白胨液体培养基)。于 37 °C 培养箱中培养 24 h, 肉眼观察菌液澄清度以判断抑菌效果: 菌液浑浊则判断为有菌生长, 在澄清与浑浊的分界即为 MIC。以澄清孔中的培养液涂布于营养琼脂培养板上, 置于 37 °C 培养箱中培养 24 h, 以无菌生长的发酵液最小稀释浓度为 MBC, 每个浓度设 3 个平行。

**1.3.3 抑菌特性的测定:** 取对数生长期的大肠杆菌接种于牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 肉汤培养基调节细菌数达到  $10^6$  CFU/mL 作为对照组; 用含有 MIC 质量浓度的发酵液将细菌浓度调至  $10^6$  CFU/mL 作为加药组。于 130 r/min、37 °C 摇床培养 24 h, 每隔 2 h 取样一次, 测定  $OD_{600}$  值, 以培养时间(h)为横坐标,  $OD_{600}$  值为纵坐标, 绘制两组大肠杆菌的生长曲线。通过比较两组大肠杆菌的生长特性, 说明发酵液中活性物质对大肠杆菌的抑制作用。

**1.3.4 超微结构的观察:** 取对数生长期的指示菌制备成  $10^6$  CFU/mL 的菌悬液, 以加入 MIC 浓度的发酵液为实验组, 不加发酵液的菌悬液作为对照组, 37 °C、150 r/min 培养, 分别培养 2、4、6 h 后的指示菌为待测样品, 按照电镜样品制备方法制备样品, 送河南大学分析实验室观察菌体形态变化, 以

此说明发酵液对大肠杆菌形态有无破坏作用。

**1.3.5 菌体完整性的检测:** 以碱性磷酸酶试剂盒检测细胞壁的通透性,  $\beta$ -半乳糖酶试剂盒检测细胞膜的通透性, 并用电导率来验证。将含 MIC 浓度的发酵液和  $10^6$  CFU/mL 指示菌在 37 °C、150 r/min 摇床培养, 分别于 50、100、150、200、250 min 取样、离心, 测定上清液碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖酶和电导率随时间的变化, 并设置阳性对照组, 采用试剂盒检测有无酶的泄露, 进而说明细胞壁和细胞膜有无损伤。

**1.3.6 菌体蛋白质合成的检测:** 设置指示菌浓度为  $10^6$  CFU/mL、加入 MIC 浓度的发酵液为实验组, 同样浓度的菌悬液为对照组, 在 37 °C、150 r/min 摇床培养, 分别于 3、6、9 h 各取样 5 mL。待各样品均稀释成相同的  $OD_{600}$  值后, 10 000 r/min 离心 10 min, 取沉淀, 加入 50 mL 无菌水和 200  $\mu\text{L}$  上样缓冲液, 混匀, 于沸水浴中加热 4 min, 再次离心, 取上清液 40  $\mu\text{L}$  进行 SDS-PAGE 电泳, 以观察菌体蛋白质的变化。其中, 对照组与处理组的大肠杆菌需用裂解缓冲液进行细胞破碎得到菌体内总蛋白, 试验分别独立重复 3 次。对各样品采用考马斯亮蓝染色法进行蛋白定量测定, 验证发酵液对指示菌细胞蛋白合成的影响。

## 2 结果与分析

### 2.1 内生菌发酵液最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)

50 mL 的 JY25 发酵液经旋转蒸发和烘干后, 干重为 0.7 g, 计算得出发酵液质量浓度为 14 g/L。以二倍稀释法测定 JY25 发酵液对大肠杆菌有抑制作用, MIC 和 MBC 分别为 7 g/L 和 14 g/L, 说明绞股蓝内生真菌 JY25 的发酵液粗提物能够抑制大肠杆菌的生长。

### 2.2 对大肠杆菌的抑菌特性

以测定菌体生长曲线的方法观察发酵液在 24 h 内对指示菌的抑菌效果, 如图 1 所示。

从图 1 可以看出, 两组细菌在 2 h 取样时,  $OD$  值是基本一致的; 对照组的菌体在 4 h 后进入对数

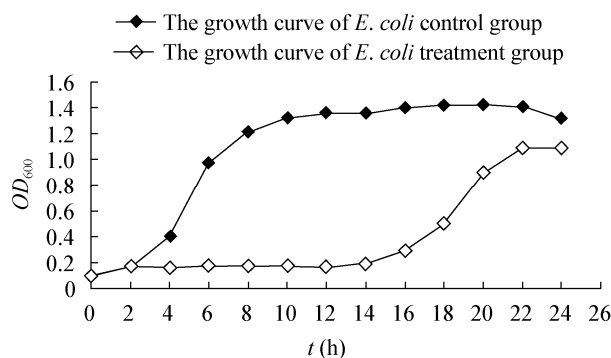


图1 发酵液对大肠杆菌生长曲线的影响

Figure 1 Effect of fermentation broth on the growth curve of *E. coli*

期, 8 h 基本达到稳定期, 而实验组的菌体持续抑制状态到 16 h,  $OD$  值没有明显变化, 16 h 才缓慢进入对数期, 在 22–24 h 基本达到稳定期。分析得出, 实验组比对照组推迟 12 h 左右进入对数期, 说明绞股蓝内生真菌 JY25 发酵液的活性物质抑制了大肠杆菌的生长和繁殖。

### 2.3 扫描电镜的超微结构

扫描电镜观察对照组的菌体: 菌体表面光滑, 形态完整、饱满、呈杆状分布, 没有细胞破损, 折光性较好(图 2)。

大肠杆菌经 MIC 浓度发酵液作用 2 h 后, 少数菌体有表面破损、断裂(图 3A); 作用 4 h 后, 菌体表面明显粗糙, 有些菌体变形(图 3B); 作用 6 h 后, 大部分菌体变形, 部分菌体伸长或者收缩成扁球形状, 多数菌体溢裂成两段, 细胞内容物大量泄漏(图 3C), 表明发酵液中活性物质严重影响大肠杆菌的细胞形态。

### 2.4 发酵液对菌体细胞完整性的影响

当细胞壁和细胞膜处于完整状态时, 位于细胞

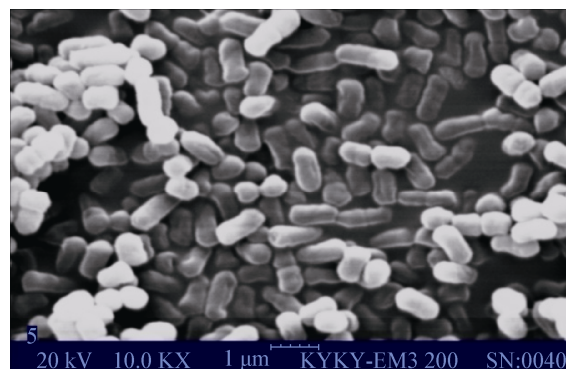


图2 大肠杆菌的扫描电镜形态(10 000×)

Figure 2 The morphology of *E. coli* by scanning electron microscopy (10 000×)

膜和细胞壁之间的碱性磷酸酶和细胞膜内的  $\beta$ -半乳糖苷酶在细胞外液中是无法检测到的, 但当细胞壁或细胞膜受到破坏, 其通透性增加, 则两者将被泄漏到细胞外液中, 因此, 通过检测细胞外液中两种酶可反映菌株 JY25 发酵液活性物质对细胞壁和细胞膜通透性的影响<sup>[10]</sup>。

**2.4.1 对菌体细胞壁的影响:** 无论实验次数的多少和作用时间的长短, 大肠杆菌与发酵液的菌悬液中均未检测到碱性磷酸酶存在, 说明发酵液未影响到细胞壁的通透性。

**2.4.2 发酵液对菌体细胞膜通透性的影响:** 以  $\beta$ -半乳糖苷酶试剂盒检测发酵液作用后的指示菌悬液, 结果见图 4。

从图 4 看出: 发酵液与大肠杆菌作用 50 min 后, 与对照组相比, 实验组的  $\beta$ -半乳糖苷酶开始增加, 随着作用时间的延长,  $\beta$ -半乳糖苷酶活性明显升高, 说明发酵液中活性物质影响了指示菌的细胞膜通透性, 使  $\beta$ -半乳糖苷酶外泄。

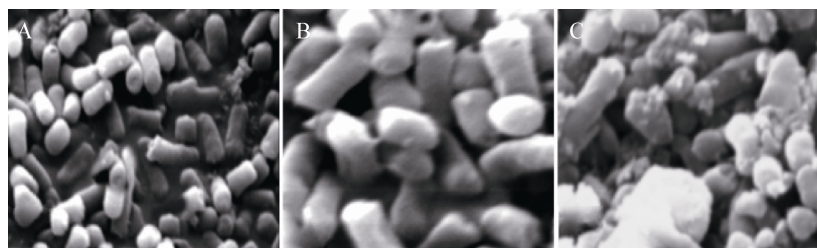


图3 发酵液对大肠杆菌形态的影响(10 000×)

Figure 3 Effect of fermentation broth on the morphology of *E. coli* (10 000×)

注: A: 作用 2 h 大肠杆菌形态; B: 作用 4 h 大肠杆菌形态; C: 作用 6 h 大肠杆菌形态。

Note: A: The morphology of *E. coli* at 2 h; B: The morphology of *E. coli* at 4 h; C: The morphology of *E. coli* at 6 h.

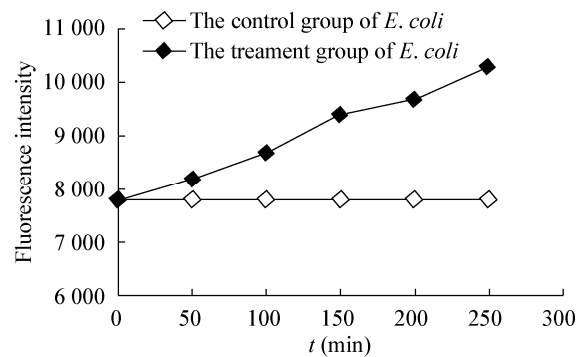


图 4 大肠杆菌的  $\beta$ -半乳糖苷酶渗漏  
Figure 4 The leakage of  $\beta$ -galactosidase in *E. coli*

检测菌悬液的电导率结果见图 5。从图 5 看出：真菌发酵液处理大肠杆菌 50 min 后，菌悬液的电导率明显高于对照组，随着时间的延长，对照组和实验组的电导率均表现持续增加，但可观察到二者之间的差距也有所增加。说明随着作用时间的延长，实验组胞内电解质渗漏略高于对照组，其细胞膜受到明显的破坏。对照组电导率增加的原因还需要进一步研究。

2.5 发酵液对指示菌细胞表达蛋白的影响

取发酵液与大肠杆菌作用的菌体蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分析(图 6)。结果证明：MIC 浓度发酵液作用下，大肠杆菌菌体蛋白电泳谱带与对照组的蛋白电泳谱带呈现明显的差别。处理 3 h 后，与对照组相比，实验组菌体蛋白有 9 条谱带明显减弱或缺失；6 h 后有 2 条谱带未出现；作用 9 h 后，二者谱带比较接近，仅 1 条谱带缺失。可以看出，在早期发酵液活性物质对菌体蛋白的影响较大，但随着作用时间的延长，菌体蛋白具有一定的自身恢复能力，这一结果与 2.2 的结果一致。

为进一步验证发酵液对细菌蛋白质合成的影响，取不同时间的菌悬液进行蛋白质含量的检测，结果如图 7 所示。

由图 7 可以看出，发酵液对大肠杆菌蛋白质合成具有显著的影响。实验组大肠杆菌在 9 h 时，蛋白浓度为 59.17 g/L，而未加发酵液处理的对照组大肠杆菌在 9 h 时，蛋白浓度为 464.69 g/L。证实随着作用时间的延长，处理组蛋白含量明显降低。

蛋白电泳和蛋白质含量的分析证实：绞股蓝内生真菌发酵液能够明显影响菌体蛋白的种类和数量。

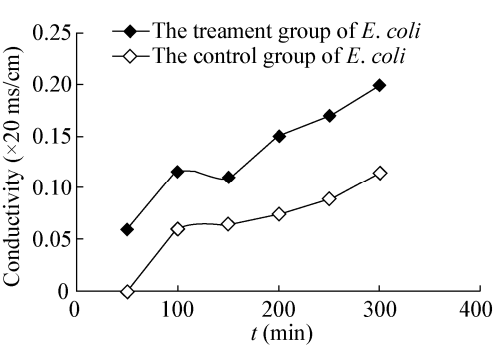


图 5 发酵液对大肠杆菌电导率的影响  
Figure 5 Effect of fermentation broth on the conductivity of *E. coli*

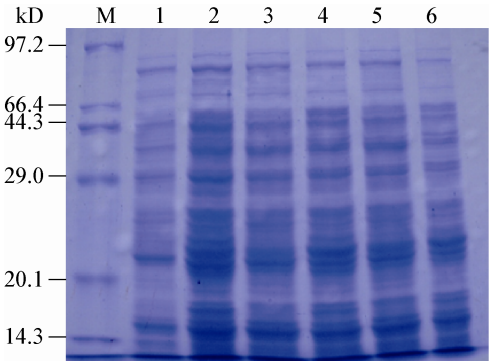


图 6 大肠杆菌总蛋白 SDS-PAGE 电泳图  
Figure 6 The SDS-PAGE electrophoretogram of *E. coli* total protein  
注：M：标准蛋白；1、3、5：发酵液作用 3、6、9 h 的大肠杆菌总蛋白；2、4、6：正常培养 3、6、9 h 的大肠杆菌总蛋白。  
Note: M: Standard protein; 1, 3, 5: The total protein of *E. coli* treated with fermentation broth at 3, 6, 9 h; 2, 4, 6: The total protein of normally cultured *E. coli* at 3, 6, 9 h.

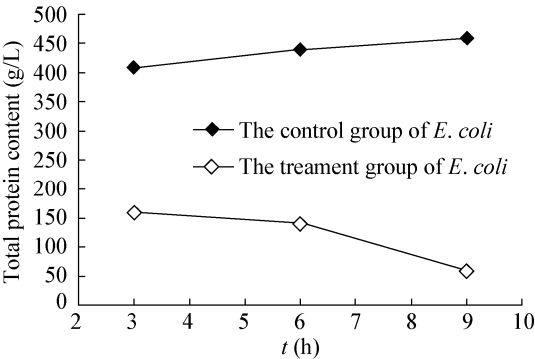


图 7 发酵液对大肠杆菌总蛋白质含量的影响  
Figure 7 Effect of fermentation broth on the total protein content of *E. coli*

### 3 讨论

抗菌机制的研究是抗生素抗菌研究的基础,也是其应用的前提。由于中草药有效成分复杂,因此关于中草药抗菌机制的研究相对较少。艾启俊等<sup>[11]</sup>对从鹿蹄草科植物中提取出的鹿蹄草素进行了抑菌机理研究,通过测定其对金黄色葡萄球菌的 MIC 和 MBC 浓度、细胞膜渗透性和扫描电镜观察,得出鹿蹄草素对金黄色葡萄球菌的抑制源于其对菌体细胞壁和细胞膜的破坏。贾春红<sup>[12]</sup>采用平皿打孔法和二倍稀释法测定自制方剂对致病性弧菌及希瓦氏菌的抗菌抑制试验,结果表明,在水中添加不同剂量的自制方剂,对菌群构成和菌落总数都有一定的影响,其抗菌机理是通过破坏细胞壁和细胞膜的完整性而导致细胞膜通透性增加造成的。本实验对抗菌性绞股蓝内生真菌 JY25 的抗菌机制进行了初步探讨,至今未见到有关绞股蓝内生真菌抗菌机制的相关报道。

本实验以绞股蓝内生真菌发酵液的抑菌时效特性、对细胞壁、细胞膜及菌体蛋白合成的影响等 4 个方面系统地探讨抗菌机制。发酵液对大肠杆菌的生长抑制时效主要表现在菌体的对数生长期,电镜观察也证实,作用 2-4 h 后菌体形态发生变化,从而影响大肠杆菌的生长和繁殖。以碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶及电导率检测发酵液对菌体作用的部位,发现虽然电镜观察到菌体发生破裂,但并未检测到细胞壁和细胞膜之间存在的碱性磷酸酶,说明发酵液并未破坏细胞壁的结构;细胞质中的  $\beta$ -半乳糖苷酶及电导率在发酵液作用 1-2 h 即发生明显变化,说明菌体的破裂主要来自于细胞膜,发酵液主要影响细胞膜的通透性,造成胞质内容物的渗漏,同时影响菌体蛋白合成的种类和数量,进而影响其生长繁殖。因此认为:绞股蓝内生真菌 JY25 发酵液主要通过影响细胞膜的通透性对大肠杆菌发挥抑制、杀伤效果。对于作用细胞膜的关键靶点分析还需要进一步的确定,最终为其应用提供科学依据。

### 参考文献

- [1] Stierie A, Strobel G, Stierie D, et al. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of *Pacific yew*[J]. Science, 1993, 260(5105): 214-216
- [2] Yang BS, Miao CP, Zhang JH, et al. Population distribution and antimicrobial activities of endophytes in *Toddalia asiatica*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2014, 54(3): 273-284 (in Chinese) 杨本寿, 苗翠苹, 张建华, 等. 飞龙斩血内生菌种群分布及抑菌活性检测[J]. 微生物学报, 2014, 54(3): 273-284
- [3] Xia LJ, Zhang K, Huang HR, et al. The antimicrobial activity of 5 kinds of mangrove fungi in rhizosphere soil and endophytic fungi[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2014, 30(4): 259-263 (in Chinese) 夏丽娟, 张焜, 黄华荣, 等. 5种红树根际土壤真菌和内生真菌的分离及抑制菌活性的研究[J]. 中国农学通报, 2014, 30(4): 259-263
- [4] Piao XL, Wu Q. Progressive studies on *Gynostemma pentaphyllum*[J]. Li Shi Zhen Medicine and Materia Medica Research, 2010, 21(7): 1758-1760 (in Chinese) 朴香兰, 吴倩. 绞股蓝研究进展[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(7): 1758-1760
- [5] Shang F, Wei XY, Liu Z, et al. Isolation, identification and antioxidant activity of an endophytic Fungi from *Gynostemma pentaphyllum makino*[J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2011, 18(6): 519-521 (in Chinese) 尚菲, 魏希颖, 刘竹, 等. 具有抗氧化活性的绞股蓝内生真菌的分离及研究[J]. 药物生物技术, 2011, 18(6): 519-521
- [6] Zhou SL, Chen CF, Fang XT, et al. Isolating of endophytic fungi from five medicinal plants and screening of their antibacterial activities[J]. Journal of Xuzhou Normal University (Natural Science Edition), 2007, 25(4): 69-72 (in Chinese) 周生亮, 陈才法, 房兴堂, 等. 5种药用植物内生真菌的分离及其抑菌活性的研究[J]. 徐州师范大学学报: 自然科学版, 2007, 25(4): 69-72
- [7] Fan WH. Preliminary study on isolation and identification and biological activities of antibacterial endophytic fungi from *Gynostemma*[D]. Henan: Master's Thesis of Henan University of Technology, 2012 (in Chinese) 范文慧. 抗菌性绞股蓝内生真菌的分离鉴定及生物学活性初步研究[D]. 河南: 河南工业大学硕士学位论文, 2012
- [8] Zhang HR, Xu CP, He XY, et al. The use of endophytic fungi from *Gynostemma pentaphyllum*. Chinese patent: 201310002710[P]. 2013-11-27 (in Chinese) 张慧茹, 许春平, 贺秀媛, 等. 绞股蓝内生真菌及其用途. 中国专利: 201310002710[P]. 2013-11-27
- [9] Zhang HR, Yi YJ, Zhao HY, et al. The PG2 molecule identification and antimicrobial substances in taraxacum herb[J]. Feed Industry, 2012, 33(9): 30-33 (in Chinese) 张慧茹, 伊艳杰, 赵红月, 等. 蒲公英内生真菌 PG2 分子鉴定及抑菌物质的研究[J]. 饲料工业, 2012, 33(9): 30-33
- [10] Shi CF, Yin ZQ, Wei Q, et al. Bacteriostatic action and mechanism of  $\alpha$ -terpineol on *Escherichia coli*[J]. Acta Veterinariae Zootechnica Sinica, 2013, 44(5): 796-801 (in Chinese) 石超峰, 殷中琼, 魏琴, 等.  $\alpha$ -松油醇对大肠杆菌的抑菌作用及其机理研究[J]. 畜牧兽医学报, 2013, 44(5): 796-801
- [11] Ai QJ, Yu QH, Zhang HX, et al. Studies on bacteriostatic action and antimicrobial mechanism of pyroline against *Staphylococcus aureus*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2007, 7(2): 33-36 (in Chinese) 艾启俊, 于庆华, 张红星, 等. 鹿蹄草素对金黄色葡萄球菌的抑制作用及其机理研究[J]. 中国食品学报, 2007, 7(2): 33-36
- [12] Jia CH. Antibacterial selection and mechanism of pathogenic *Vibrio* and *Shewanella* to Chinese herbal compounds[D]. Zhanjiang: Master's Thesis of Guang Dong Ocean University, 2013 (in Chinese) 贾春红. 抗致病性弧菌及希瓦氏菌有效中药与方剂的筛选、抗菌机理研究[D]. 湛江: 广东海洋大学硕士学位论文, 2013