

研究报告



金黄色葡萄球菌拮抗菌株的筛选鉴定及其抗菌物质分析

刘萍 王祖华 张七 史文静 杨宇昊 杨瑞先*

洛阳理工学院环境工程与化学学院 河南 洛阳 471023

摘要:【背景】植物内生菌的次生代谢产物是新型天然活性物质的重要来源。【目的】从芍药内生细菌中筛选对金黄色葡萄球菌有抑菌活性的菌株和次生代谢产物。【方法】采用平板对峙法筛选拮抗菌株,根据形态学特征和分子生物学的方法鉴定菌株,PCR 扩增检测合成脂肽类物质的功能基因;运用牛津杯法依次测定内生细菌发酵液和脂肽类粗提物的抑菌活性,利用 Sephadex LH-20 凝胶层析分离脂肽类物质,利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱分析具有抑菌作用的分离组分。【结果】共筛选出 13 株对金黄色葡萄球菌具有不同程度抑制作用的内生菌株,其中菌株 SY11 的抑菌作用最为显著,其发酵液和脂肽类粗提物均具有较强的抑制作用。结合形态学鉴定以及 16S rRNA 基因序列分析,鉴定其为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。PCR 扩增检测表明菌株 SY11 含有 3 个合成脂肽类物质的功能基因 *fenA*、*ituD* 和 *srfkn*,推测该菌株可能具有合成脂肽类物质的能力。根据具有抑菌活性分离组分的质谱分析结果,推测其有效物质的主要成分为 Bacillomycin D。【结论】解淀粉芽孢杆菌 SY11 对金黄色葡萄球菌有良好抑制效果,其脂肽类粗提物也具有较强的体外抑菌活性。本研究为芍药内生细菌的开发应用奠定了基础。

关键词: 芍药, 内生细菌, 抗菌活性, 鉴定, Sephadex LH-20 凝胶层析

Screening and identification of antagonistic strains against *Staphylococcus aureus*

LIU Ping WANG Zu-Hua ZHANG Qi SHI Wen-Jing YANG Yu-Hao YANG Rui-Xian*

School of Environmental Engineering and Chemistry, Luoyang Institute of Science and Technology, Luoyang, Henan 471023, China

Abstract: [Background] The secondary metabolites of endophytic bacteria are the important sources of new natural active substances. [Objective] We aimed to isolate the bacterial strains and their secondary metabolites with antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* from *Paeonia lactiflora*. [Methods] The antagonistic strains were screened against *Staphylococcus aureus* through the method of dual culture. The strains were indentified based on characteristics in morphology and DNA identification. The biosynthetic genes of lipopeptide were amplified using polymerase chain reaction, and the antibacterial activity of their fermentation and crude lipopeptides were detected using the method of Oxford cup. The antibacterial activity of the crude lipopeptides was isolated through Sephadex LH-20 gel chromatography,

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31500008)

*Corresponding author: E-mail: fairy19790805@163.com

Received: 28-06-2019; **Accepted:** 19-01-2020; **Published online:** 21-02-2020

基金项目: 国家自然科学基金(31500008)

*通信作者: E-mail: fairy19790805@163.com

收稿日期: 2019-06-28; **接受日期:** 2020-01-19; **网络首发日期:** 2020-02-21

which was analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry. **[Results]** A total of 13 antagonistic strains were screened from the endophytic bacteria isolates, which had different degrees of inhibition against *Staphylococcus aureus*. The isolates SY11 had the most obvious inhibition ability, and their fermentation and crude lipopeptides had strong inhibitory effect. The isolates SY11 was identified as *Bacillus amyloliquefaciens* based on characteristics in morphology and phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequences. Three biosynthetic genes of lipopeptide, *fenA*, *ituD* and *srfkn* were detected using polymerase chain reaction. The results suggested that the strain had the ability to synthesize lipopeptide. By further analysis of MALDI-TOF mass spectrometry. The main active substance was presumed as Bacillomycin D. **[Conclusion]** *Bacillus amyloliquefaciens* SY11 had significant inhibitory effect on *Staphylococcus aureus*, and their crude lipopeptides also showed inhibitory activity against *Staphylococcus aureus in vitro*, which laid the foundation for the further development and application of endophytes from *Paeonia lactiflora*.

Keywords: *Paeonia lactiflora*, Endophytic bacteria, Antibacterial activity, Identification, Sephadex LH-20 gel chromatography

金黄色葡萄球菌是引起食源性疾病发生率较高的病原菌之一, 由于抗生素的过度使用, 导致耐药菌株大量出现, 这使得其感染后的治疗变得更加困难。1993 年, Stierle 等从红豆杉中分离出一株内生真菌——安德氏紫杉霉(*Taxomyces andreanae*), 其能够合成紫杉醇, 为癌症的治疗提供了新的药物资源^[1]。此后, 研究者将目光转向植物内生菌。植物内生菌是一类存在于植物体内但又不明显引起植物病害的微生物, 其可以长期存在于植物体内, 也可以只存在于某一阶段。内生细菌是植物内生菌中主要的一类, 与其他微生物共同构成了植物体内的微生态系统, 在植物的生防中具有重要作用。目前已从各种不同植物的组织器官中分离获得了大量的内生菌。有研究者^[2-5]分别从不同植物中分离出许多内生菌, 并从中筛选出了对金黄色葡萄球菌有不同抑制效果的菌株。另有研究者从瑞香科植物(*daphnopsis americana*)茎杆上分离到对两株具多重耐药性的金黄色葡萄球菌和粪肠球菌具有明显抑制活性的内生真菌^[6]。由于植物内生菌与寄主长期共同生活, 二者互相影响能产生一致或相似功能的活性物质, 有研究者^[7-10]从不同植物中分离获得的内生菌能产生具有抗肿瘤、抗癌作用的次生代谢产物, 如抗菌蛋白、生物碱、脂肽类物质等。脂肽类物质是一类非核糖体肽, 由非核糖体多肽合成酶合成, 主要包括表面活性素(surfactin)、伊枯草菌素

(iturin)、丰源素(fengycin), 三种抗菌脂肽分别由 *fenA*、*srfkn*、*ituD* 功能基因合成。

芍药(*Paeonia lactiflora*)是芍药科的著名草本花卉, 具有极高的观赏价值和药用价值, 其根含有芍药甙和安息香酸, 具有镇痉、镇痛、通经作用, 根和叶富有的鞣质可制作成土农药, 能够杀大豆蚜虫和防治小麦秆锈病等。目前国内关于芍药内生菌的研究不多, 仅见从新疆块根芍药分离出粘质沙雷氏菌 XJU-PA-6 和枯草芽孢杆菌 XJU-PA-1, 研究表明粘质沙雷氏菌 XJU-PA-6 能够产生灵菌红素, 研究者对发酵条件也进行了优化^[11-12]; 枯草芽孢杆菌 XJU-PA-1 能够抑制玉米小斑病菌和苹果斑点落叶病菌^[13]。尚未见到有关芍药内生细菌拮抗金黄色葡萄球菌的报道。

本研究以芍药根部分离的内生细菌为材料, 筛选出对金黄色葡萄球菌有拮抗作用的内生细菌, 并将其发酵液和脂肽类粗提物进行体外抑菌活性检测, 然后将脂肽类粗提物经过 Sephadex LH-20 凝胶层析分离, 对有抑菌活性的分离组分进行质谱分析, 为以后寻找新颖的、具有抗金黄色葡萄球菌的活性代谢产物提供一定的资源。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物: 采用 5 点采样法, 2018 年 5、6 月份于洛阳隋唐植物园、洛阳国花园采集芍药根部进

行内生细菌的分离。

指示菌：金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* [ATCC6538])购于广东省微生物菌种保藏中心。

主要试剂和仪器：甲醇，天津市永大化学试剂有限公司；细菌基因组 DNA 提取试剂盒，天根生化科技(北京)有限公司；Premix TaqTM 试剂盒，TaKaRa 公司。HD-4A 层析图谱采集分析仪、核酸蛋白检测仪，南京大学普阳科学仪器研究所；基质辅助激光解析飞行时间质谱，岛津公司；SephadexTM LH-20，Pharmacia 公司。

培养基：参考文献[14]配制。

1.2 方法

1.2.1 内生菌的分离

将新采的芍药根部冲洗清理后，称取 2 g 进行表面灭菌：75%乙醇浸泡 30 s，无菌水清洗 3 次，再用 3%的次氯酸钠消毒 3 min，无菌水清洗 5 次，最后一次清洗后的无菌水作为对照。将灭菌后的材料置于无菌研钵内加入 10 mL 无菌水进行充分研磨，静置 15 min 后，取 100 μ L 匀浆上清液涂布在 TSA 培养基^[14]上，28 $^{\circ}$ C 培养 24 h，观察菌落特征并将不同形态特征的单菌落进行纯化和保存。

1.2.2 拮抗菌株的筛选

用平板对峙法对分离纯化的芍药内生细菌进行拮抗菌株的筛选。在 NA 固体培养基^[14]涂布浓度为 1.0×10^7 CFU/mL 的金黄色葡萄球菌菌液 100 μ L，将灭菌的滤纸片对称放置在平板上，取内生菌菌液 10 μ L 注射在滤纸片上，吸附 10 min 后，37 $^{\circ}$ C 倒置培养 24 h，观察并测量抑菌圈，选取抑菌效果明显的菌株用于进一步的实验。

1.2.3 发酵液的抑菌作用

将抑菌效果明显的菌株 30 $^{\circ}$ C、160 r/min 条件下，经 Landy 培养基^[14]发酵培养 72 h，取 5 mL 过滤除菌，采用牛津杯法进行抑菌实验。

1.2.4 脂肽类物质的粗提及抗菌活性的测定

用 6 mol/L 盐酸调节 1.2.3 步骤剩余上清液 pH 至 2.0，于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中静置过夜，10 000 r/min 离心 10 min 弃去上清收集沉淀，在沉淀中加入甲醇进行

抽提，抽提 2 次，合并 2 次抽提液，用 2 mol/L NaOH 调 pH 至 7.0。冷冻干燥后获得脂肽类粗提物。用 0.2 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0)溶解、过滤除菌后放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。脂肽类物质的抗菌活性检测采用牛津杯法。

1.2.5 拮抗菌株形态学及分子生物学鉴定

将具有最强抑菌效果的菌株在 NA 培养基上划线，37 $^{\circ}$ C 培养，观察其单菌落特征。参考沈萍等^[15]方法进行菌体的革兰氏染色。参考细菌 DNA 提取试剂盒说明书提取拮抗菌株 DNA。采用 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1429R (5'-CGGCTACCTTGTTACGAC-3')对其 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增^[16]，所有操作参见 Premix TaqTM 试剂盒说明，将产物测序后进行 BLAST 比对，并用 MEGA 7.0 软件构建系统进化树。

1.2.6 脂肽类物质功能基因的分析

以抑菌效果最好的菌株的 DNA 为模板，分别利用 3 个功能基因 *fen A* (FenAa、FenAb)、*srfk*n (Srfkn -1、Srfkn -2)和 *ituD* (ItuD-r、ItuD-f)的特异性引物进行扩增，引物序列(表 1)及扩增条件均参考文献[17-18]。取 PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.7 Sephadex LH-20 凝胶层析及有效组分的质谱分析

采用 Sephadex LH-20 凝胶层析分离脂肽类粗提物，上样体积为 2 mL，检测波长为 220 nm。结合时间和吸光度收集各个分离组分。将分离产物冷

表 1 扩增生防功能基因的引物序列

Table 1 The sequences of primers used for amplification of biocontrol function genes

No.	Primers	Primers sequence (5'→3')	Gene name
1	FenAa	AAGAGATTCAGTAAGTGGCCCATCCAG	<i>fenA</i>
	FenAb	CGCCCTTTGGGAAGAGGTGC	
2	Srfkn-1	AGCCGTCCTGTCTGACGACG	<i>srfk</i> n
	Srfkn-2	TCTGCTGCCATACCGCATAGTC	
3	ItuD-f	ATGAACAATCTTGCCTTTTTA	<i>ituD</i>
	ItuD-r	TTATTTTAAATTCCGCAATT	

冻干燥后用 0.2 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0)溶解, 过滤除菌后参照 1.2.3 方法做分离产物的抗菌活性测定, 将有抑菌效果的组分用基质辅助激光解吸飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)准确分析其分子量。分析条件为: 337 nm N_2 激光束电离, 电压 20 kV, 飞行距离为 1.6 m。

2 结果与分析

2.1 内生细菌的分离结果

芍药根部组织经表面灭菌和初次分离后, TSA 培养基内生长出了大量的菌落, 且菌落形态有较为明显的差异。挑出单菌落进行划线纯化培养后, 获得了共计 52 种内生细菌, 试验观察发现这 52 种内生菌涵盖了黄色、橘黄、淡黄色、白色等多种菌落颜色, 透明、半透明等特征, 还有诸多如干燥、湿润、凸起、有同心圆等菌落特征, 表明芍药内生细菌具有多样性。部分菌株的形态特征如图 1 所示。

2.2 具有抑菌活性内生菌株的筛选

通过对分离出的 52 株芍药内生菌进行抑制金黄色葡萄球菌的初步筛选, 结果共筛选出 13 株对金黄色葡萄球菌有抑制作用的内生菌。其中 6 株菌对金黄色葡萄球菌有较明显的抑制作用, 其抑菌带宽度达到 6 mm 以上(图 2), SY11 的抑菌效果最优, 其抑菌带宽度达到了 9.6 mm。

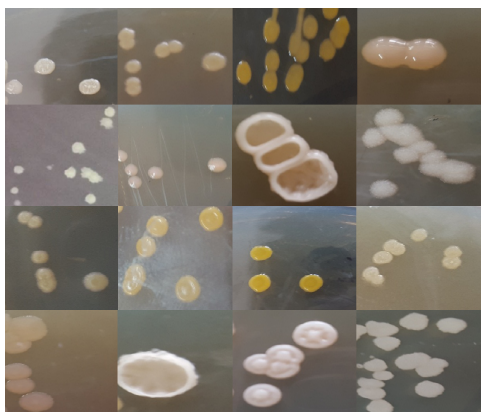


图 1 部分芍药内生细菌菌落形态

Figure 1 The colonial morphology of some endophytic bacteria from *Paeonia lactiflora*

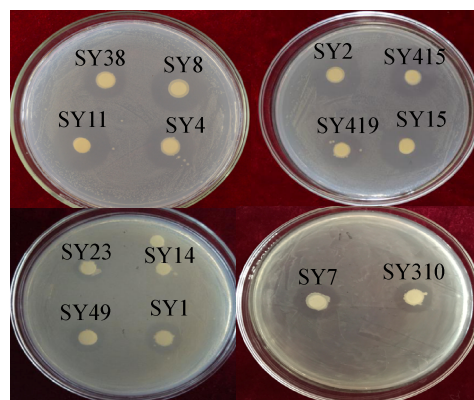


图 2 拮抗菌株对金黄色葡萄球菌的抑制作用

Figure 2 Screening of endophytic bacteria with inhibiting *Staphylococcus aureus*

2.3 拮抗菌株发酵液对金黄色葡萄球菌的抑制作用

抑菌效果较好的 6 株菌发酵培养后离心, 收集发酵液, 经过过滤除菌后做体外活性检测。结果显示其发酵液抑菌带宽度均为 5 mm 以上(图 3)。由图 3 可以看出, 发酵液对金黄色葡萄球菌的生长有显著抑制作用, 其中菌株 SY11 的抑菌效果最好, 抑菌带宽度为 10.8 mm。通过对比菌体抑菌实验结果发现发酵液的抑菌效果均优于菌体的效果。

2.4 脂肽类物质粗提物的抑制作用

对抑菌效果较好的菌株 SY11、SY15、SY2、SY8 的脂肽类物质过滤除菌后做体外活性检测。结果显示菌株 SY11 的脂肽类物质抑菌效果明显强于其他 3 株, 且强于 SY11 菌体和发酵液的抑菌效果, 抑菌带宽度在 12 mm 以上(图 4), 而其他菌株的脂肽类物质的抑菌效果则等于或略强于菌体和发酵

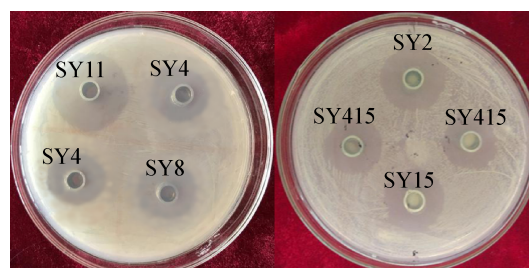


图 3 拮抗菌株发酵液对金黄色葡萄球菌的抑菌作用

Figure 3 The inhibitory effect of antagonistic strain fermentation against *Staphylococcus aureus*

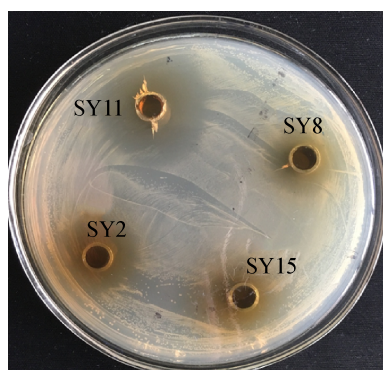


图 4 拮抗菌脂肽类粗提物对金黄色葡萄球菌的抑菌作用

Figure 4 Inhibition ability produced by lipopeptides compounds of the antagonistic strain against *Staphylococcus aureus*

液的抑菌效果,这表明菌株的拮抗作用主要依赖于其次生代谢产物——脂肽类物质。

2.5 菌体形态与生理生化鉴定

通过观察 SY11 的菌落,发现菌落平铺呈乳白色,表面干燥、不透明、边缘不规则、菌落略有异味。经革兰氏染色判断其为革兰氏阳性菌,经芽孢和鞭毛染色镜检后,发现有芽孢与鞭毛结构。生理生化试验结果为:菌株 SY11 能利用多种单糖;硝酸盐还原试验、吡啶试验、甲基红测定均为阴性反应;柠檬酸盐测定为阳性。综合以上结果,初步判断菌株 SY11 为芽孢杆菌属(*Bacillus*)的一种。

2.6 菌株 SY11 的 16S rRNA 基因序列测定

经测序,SY11 菌株的 16S rRNA 基因序列长度为 1 415 bp, GenBank 登录号为 MN135987。在 NCBI BLAST 上进行碱基序列对比分析,选取与

其序列相似性较高的菌株,通过 MEGA 7.0 软件中的邻近法构建系统发育树(图 5)。序列比对结果显示菌株 SY11 与解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)序列相似度高达 99%,构建的系统发育树显示,SY11 与解淀粉芽孢杆菌聚在同一簇内。结合形态学特征、生理生化试验和 16S rRNA 基因分子生物学分析,将菌株 SY11 鉴定为解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)。

2.7 脂肽类物质合成基因的分析

利用特定的 3 对引物对合成脂肽类物质的功能基因进行扩增,并电泳检测。电泳结果显示从菌株 SY11 中扩增到 *srfkn*、*ituD* 和 *fenA* 基因簇片段,并且目的基因片段都在 1 300 bp 左右,表明菌株 SY11 可能具有合成脂肽类物质中的主要抑菌物质表面活性素类(surfactin)、伊枯草菌素类(iturin)和丰原素类(fengycin)的潜力。

2.8 Sephadex LH-20 凝胶层析分离及有效成分的质谱分析

将脂肽类粗提物进行 Sephadex LH-20 凝胶层析分离,结合时间和 220 nm 处的吸光度收集分离组分,共得到 7 个组分,分别命名为 LP1-LP7,其中 LP4 吸光度值为 222。将各组分做抑菌活性检测,结果显示只有 LP4 对金黄色葡萄球菌具有良好的抑制作用,抑菌带宽达到了 5 mm (图 6)。将组分 LP4 进行基质辅助激光解吸飞行时间质谱,初步分析结果显示(图 7),组分 LP4 的 m/z 峰值[M+H]⁺分别为 1 059.886 2、1 073.819 1 和 1 087.694 5 Da,其中每个相差 14 Da。根据文献[19]报道,推测 m/z 峰值

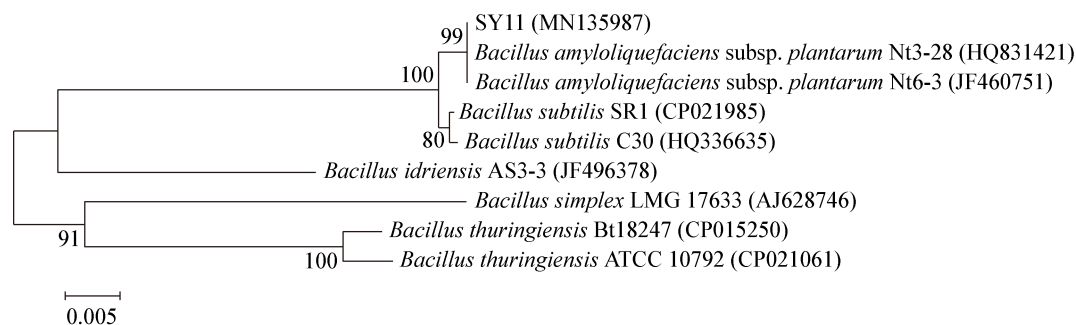


图 5 内生细菌基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树

Figure 5 Phylogenetic tree of endophytic bacteria based on 16S rRNA gene sequences

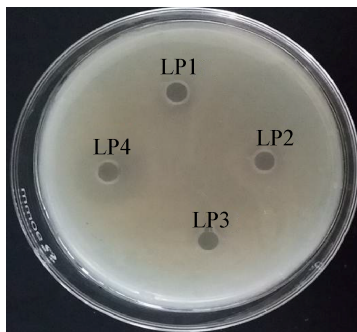


图6 不同组分对金黄色葡萄球菌的抑制作用

Figure 6 Inhibition of different components on *Staphylococcus aureus*

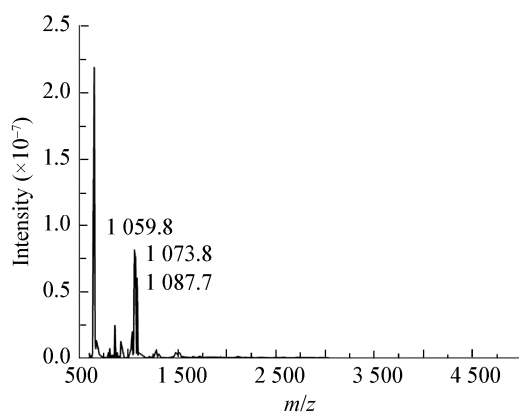


图7 组分LP4的基质辅助激光解吸飞行时间质谱

Figure 7 MALDI-TOF mass spectrum of active fraction LP4

[M+H]分别为 1 059.886 2、1 073.819 1 Da 的这两种化合物为脂肪酸链相差 1 个亚甲基($-\text{CH}_2-$)的 Bacillomycin D 同系物, 而 m/z 峰值[M+H]为 1 087.694 5 Da 的还未确定为何种物质。

3 讨论与结论

由于植物内生菌具有的独特的生防作用, 目前已有研究者从多种植物中分离得到对金黄色葡萄球菌有抑制作用的内生菌。在植物内生细菌中, 芽孢杆菌属为环境和植物体内的优势微生物种群, 已有研究表明, 从明党参^[20]、苔藓^[21]等多种植物中均分离得到了对金黄色葡萄球菌有抑制作用的芽孢杆菌属内生细菌, 其中从明党参中分离得到芽孢杆菌属菌株 NMJ10 对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径为 20.3 mm, 苔藓植物中分离得到的

巨大芽孢杆菌 Z12 对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径为 16.85 mm。解淀粉芽孢杆菌为芽孢杆菌属中常见的一类, 而且在自然界中分布广泛, 在抑菌方面有着自身的优势, 如抗菌谱广、对多种病原真菌和细菌都有抑制作用^[22]。目前对解淀粉芽孢杆菌的研究比较多, 但是对金黄色葡萄球菌抑制的报道并不多, 张兴锋等^[23]、张艳翠等^[24]分别从红树木榄叶、薄荷中分离得到解淀粉芽孢杆菌 CIII-3 和 BH2, 它们对金黄色葡萄球菌的抑制效果一般。徐燕尔等^[25]从水藻中分离得到的解淀粉芽孢杆菌 B2-5 和 B2-6 对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径均大于 25 mm。本研究从芍药中分离获得的解淀粉芽孢杆菌 SY11 的抑菌带宽为 9.6 mm, 其抑菌效果与之相差无几。菌株 SY11 是首次从芍药中分离并对金黄色葡萄球菌有较强抑制作用的解淀粉芽孢杆菌。

脂肽类物质是次生代谢产物的一类, 也是主要的抗菌物质之一, 具有理化性质稳定、抑菌效果明显、抑菌机制多样等特点^[26]。脂肽类物质主要有表面活性素、伊枯草菌素、丰源素 3 类。有研究报道伊枯草菌素对真菌有强烈的抑制作用, 所产生的脂肽类物质可以与磷脂、甾醇以及自身形成聚合物, 这些聚合物形成离子通道后使膜的透性增强, 从而使细胞生长受到抑制或死亡^[27-28]。关于伊枯草菌素对细菌有抑制作用的报道并不多。李红亚等^[29]从牛的新鲜粪便中获得一株对金黄色葡萄球菌有拮抗作用的枯草芽孢杆菌, 其脂肽类抗菌物质为伊枯草菌素家族中的 Mycosubtilin。刘佳欣等^[30]从海洋生物刺参肠道中分离出一株枯草芽孢杆菌能够有效抑制金黄色葡萄球菌, 其脂肽类物质也有较好的抑菌作用, 有效成分为 Bacillomycin D。因此可见, 脂肽类抗菌物质的分离提取为金黄色葡萄球菌的防治提供了先决条件。本研究获得的解淀粉芽孢杆菌 SY11 其次生代谢物脂肽类物质对金黄色葡萄球菌有明显的抑制作用, Sephadex LH-20 凝胶层析分离所得的有效组分经基质辅助激光解吸飞行时间质谱分析, 其 m/z 峰[M+H]分别为 1 059.886 2、1 073.819 1 Da 的物质是伊枯草菌素 Bacillomycin D

的同系物, 其中[M+H]⁺为 1 059.886 2 Da 的物质与刘佳欣等^[30]获得的 1 059.43 Da 的物质一致, 均为 Bacillomycin D 的 C16 同系物。本研究获得的 Bacillomycin D 及其同系物与李红亚等^[29]得到的 Mycosubtilin 均属于伊枯草菌素家族, 二者均对金黄色葡萄球菌有着强烈的抑菌效果。本研究中 *m/z* 峰值为 1 087.694 5 Da 的物质与江木兰等^[31]的研究一致, 他们对油菜内生菌 BY-2 产生的脂肽类抑菌物质进行了电离喷雾质谱测定, 其中一个物质的 *m/z* 峰值也为 1 087 Da, 但也未鉴定其结构, 该分子量与 1 073 Da 仅差 14 Da, 即一个-CH₂-。该分子结构还需进一步鉴定与分析研究。

REFERENCES

- [1] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of *Pacific yew*[J]. Science, 1993, 260(5105): 214-216
- [2] Zhou ZF, Kurtán T, Yang XH, et al. Penibruguieramine A, a novel pyrrolizidine alkaloid from the endophytic fungus *Penicillium* sp. GD6 associated with Chinese mangrove *Bruguiera gymnorhiza*[J]. Organic Letters, 2014, 16(5): 1390-1393
- [3] Xiao Q, Ye RY, He Y, et al. Pseurotin A isolated from the *Polygonum cuspidatum* endophytic fungus CB50 and its activity assay[J]. Biotechnology, 2013, 23(2): 69-74 (in Chinese)
肖青, 叶仁元, 何艳, 等. 一株产 Pseurotin A 的虎杖内生真菌 CB50 及其活性研究[J]. 生物技术, 2013, 23(2): 69-74
- [4] Li WH, Gao Y, Wang Y, et al. Study on screening and biochemical characteristics of endophytic bacteria in citrus tangerine peel[J]. Journal of University of Science and Technology Liaoning, 2018, 41(6): 457-461 (in Chinese)
李文赫, 高云, 王勇, 等. 沙糖桔皮内生菌筛选及生化特性研究[J]. 辽宁科技大学学报, 2018, 41(6): 457-461
- [5] Dhanya KI, Swati VI, Vanka KS, et al. Antimicrobial activity of *Ulva reticulata* and its endophytes[J]. Journal of Ocean University of China, 2016, 15(2): 363-369
- [6] Singh MP, Janso JE, Luckman SW, et al. Biological activity of guanacastepene, a novel diterpenoid antibiotic produced by an unidentified fungus CR115[J]. The Journal of Antibiotics, 2000, 53(3): 256-261
- [7] Hu CJ, Zhou PZ, Zhou Q. Identification of a pure culture of nodular endophyte from *Coriaria nepalensis*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 1997, 37(6): 417-422 (in Chinese)
胡传炯, 周平贞, 周启. 一株马桑根瘤内生菌纯培养物的分类鉴定[J]. 微生物学报, 1997, 37(6): 417-422
- [8] Chen CW, Sun QG, Zhu J, et al. Isolation and screening for endophyte with antitumor activities from three medicinal plants[J]. Microbiology China, 2010, 37(10): 1462-1466 (in Chinese)
陈传文, 孙前光, 朱军, 等. 三种药用植物内生菌的分离及其抗肿瘤活性菌株的筛选[J]. 微生物学通报, 2010, 37(10): 1462-1466
- [9] Ebrahim W, Kjer J, El Amrani M, et al. Pullularins E and F, two new peptides from the endophytic fungus *Bionectria ochroleuca* isolated from the mangrove plant *Sonneratia caseolaris*[J]. Marine Drugs, 2012, 10(5): 1081-1091
- [10] Zhao L. Study on secondary metabolites produced by endophytic bacteria isolated from root nodules of *Astragalus*[D]. Xianyang: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2009 (in Chinese)
赵亮. 黄芪根瘤内生菌次生代谢产物研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2009
- [11] Aynur-Abdurahman, Yu PP, Burabiya-Hasan, et al. Isolation and identification of red pigment producing bacterium XJU-PA-6 from *Paeonia anomala*[J]. Biotechnology, 2008, 18(5): 33-36 (in Chinese)
阿依努尔·阿不都热合曼, 于蘋蘋, 布热比亚·艾山, 等. 块根芍药产红色素内生菌 XJU-PA-6 的分离鉴定[J]. 生物技术, 2008, 18(5): 33-36
- [12] Buzohregul K, Gulzira Z, Ghopur M. Optimization of fermentation condition for prodigiosin by *Paeonia anomala* endophytic bacteria XJU-PA-6[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2015, 43(18): 26-28,36 (in Chinese)
布佐日古丽·喀迪尔, 古丽祖热·佐努尼, 吾甫尔·米吉提. 新疆块根芍药内生菌 XJU-PA-6 产灵菌红素发酵条件的优化[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(18): 26-28,36
- [13] Burabiya-Hasan, Aynur-Abdurahman, Mukaram-Yasen, et al. Isolation and identification of endophytic bacterium XJU-PA-1 from *Paeonia anomala*[J]. Biotechnology, 2011, 21(1): 51-54 (in Chinese)
布热比亚·艾山, 阿依努尔·阿不都热合曼, 米克热木·牙生, 等. 新疆块根芍药(*Paeonia anomala*)内生细菌 XJU-PA-1 的鉴定及特性分析[J]. 生物技术, 2011, 21(1): 51-54
- [14] Yang RX. Study of the biocontrol mechanisms of Ginkgo endophytic bacteria against pepper phytophthora blight[D]. Fuzhou: Doctoral Dissertation of Fujian Agriculture and Forest University, 2013 (in Chinese)
杨瑞先. 银杏内生细菌防治辣椒疫病机制研究[D]. 福州: 福建农林大学博士学位论文, 2013
- [15] Shen P, Chen XD. Experiment of Microbiology[M]. 4th ed. Beijing: Higher Education Press, 2007: 76-84 (in Chinese)
沈萍, 陈向东. 微生物学实验[M]. 4 版. 北京: 高等教育出版社, 2007: 76-84

- [16] Li BQ, Lu XY, Guo QG, et al. Isolation and identification of lipopeptides and volatile compounds produced by *Bacillus subtilis* strain BAB-1[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43(17): 3547-3554 (in Chinese)
李宝庆, 鹿秀云, 郭庆港, 等. 枯草芽孢杆菌 BAB-1 产脂肽类及挥发性物质的分离和鉴定[J]. *中国农业科学*, 2010, 43(17): 3547-3554
- [17] Koumoutsis A, Chen XH, Henne A, et al. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(4): 1084-1096
- [18] Hsieh FC, Lin TC, Meng M, et al. Comparing methods for identifying *Bacillus* strains capable of producing the antifungal lipopeptide iturin A[J]. *Current Microbiology*, 2008, 56(1): 1-5
- [19] Sun LJ. Isolation of endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2 and studies on its antimicrobial substances[D]. Nanjing: Doctoral Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2006 (in Chinese)
孙力军. 植物内生菌 *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2 的分离筛选及其抗菌物质的研究[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2006
- [20] Ye XW, Zhu RQ, Ni XC, et al. Isolation and identification of endophytes from radix changii (*Changium smyrnioides* Wolff) and its inhibitory effect on *Staphylococcus aureus*[J]. *Journal of Microbiology*, 2019, 39(3): 35-43 (in Chinese)
叶晓婉, 朱润琪, 倪新程, 等. 明党参内生菌的分离鉴定及其对金黄色葡萄球菌的抑制作用[J]. *微生物学杂志*, 2019, 39(3): 35-43
- [21] Zhang X, Wang T, Cui LZ, et al. Isolation, identification and antimicrobial activity screening of endophytic bacteria *Bacillus megaterium* z12 strain from bryophytes[J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2012, 37(6): 401-405, 420 (in Chinese)
张鑫, 王婷, 崔灵芝, 等. 苔藓内生菌 *Bacillus megaterium* z12 的分离、鉴定和抗菌活性筛选[J]. *中国抗生素杂志*, 2012, 37(6): 401-405, 420
- [22] Dong J, Ruan J, Xu N, et al. Identification of a *Bacillus amyloliquefaciens* strain with antibacterial activity[J]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2016, 38(4): 410-415 (in Chinese)
董靖, 阮晶, 胥宁, 等. 一株有抑菌活性解淀粉芽孢杆菌的鉴定[J]. *吉林农业大学学报*, 2016, 38(4): 410-415
- [23] Zhang XF, Liu F, He H, et al. Identification of endophytic bacterium CIII-1 strain from mangrove and isolation of its antimicrobial proteins[J]. *Microbiology China*, 2010, 37(2): 222-227 (in Chinese)
张兴锋, 柳凤, 何红, 等. 红树内生细菌 CIII-1 菌株鉴定及其胞外抗菌蛋白性质[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(2): 222-227
- [24] Zhang YC, Xie QJ, Zhu WP, et al. Identification and antibiotic activity of an endophytic bacterium in *Mentha haplocalyx* briq[J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2017(17): 68-69 (in Chinese)
张艳翠, 谢秋姣, 朱卫平, 等. 一株薄荷抑菌内生菌鉴定与抑菌活性分析[J]. *现代农业科技*, 2017(17): 68-69
- [25] Xu YE, Ding PH, Chen ML. Isolation and antimicrobial activity of bacteriostatic components of a *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. *Journal of Zhejiang Agricultural Sciences*, 2019, 60(9): 1516-1520 (in Chinese)
徐燕尔, 丁鹏辉, 陈明路. 一株解淀粉芽孢杆菌抑菌成分的分离与抑菌特性[J]. *浙江农业科学*, 2019, 60(9): 1516-1520
- [26] Deng JL, Liu HY, Wang PT, et al. Advances in lipopeptides from *Bacillus* spp.[J]. *Plant Protection*, 2010, 36(3): 20-25 (in Chinese)
邓建良, 刘红彦, 王鹏涛, 等. 生防芽孢杆菌脂肽抗生素研究进展[J]. *植物保护*, 2010, 36(3): 20-25
- [27] Ongena M, Jacques P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol[J]. *Trends in Microbiology*, 2008, 16(3): 115-125
- [28] Maget-Dana R, Peypoux F. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties[J]. *Toxicology*, 1994, 87(1/3): 151-174
- [29] Li HY, Li SN, Wang SX, et al. High-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass Spectrometry analysis of lipopeptides produced by probiotic *Bacillus* spp.[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2017, 29(4): 1191-1197 (in Chinese)
李红亚, 李术娜, 王树香, 等. 益生芽孢杆菌脂肽类抑菌成分的高效液相色谱-电喷雾串联质谱分析[J]. *动物营养学报*, 2017, 29(4): 1191-1197
- [30] Liu JX, Cong LN, Li C, et al. Analysis and identification of lipopeptide Bacillomycin D produced by *Bacillus subtilis* HS-A38[J]. *Industrial Microbiology*, 2017, 47(2): 11-17 (in Chinese)
刘佳欣, 丛丽娜, 李成, 等. 枯草芽孢杆菌 HS-A38 产抗菌脂肽 Bacillomycin D 的组分分析及鉴定[J]. *工业微生物*, 2017, 47(2): 11-17
- [31] Jiang ML, Wang GP, Hu XJ, et al. Antibiotic molecular structure identification of endophytic bacterial strain BY-2[J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2010, 32(2): 279-284 (in Chinese)
江木兰, 王国平, 胡小加, 等. 油菜内生菌 BY-2 的脂肽类抑菌物质的分子结构鉴定[J]. *中国油料作物学报*, 2010, 32(2): 279-284