

研究报告

唐古特大黄内生细菌多样性及抗菌活性

周艳莉¹, 于雪³, 姜侃^{*2}, 年芳^{*1}, 张威³, 刘光琇³

1 甘肃农业大学 理学院, 甘肃 兰州 730070

2 甘肃农业大学 农学院, 甘肃 兰州 730070

3 中国科学院西北生态环境资源研究院 甘肃省极端环境微生物重点实验室, 甘肃 兰州 730000

周艳莉, 于雪, 姜侃, 年芳, 张威, 刘光琇. 唐古特大黄内生细菌多样性及抗菌活性[J]. 微生物学通报, 2025, 52(4): 1475-1490.

ZHOU Yanli, YU Xue, JIANG Kan, NIAN Fang, ZHANG Wei, LIU Guangxiu. Diversity and antibacterial activity of endophytic bacteria in *Rheum tanguticum*[J]. Microbiology China, 2025, 52(4): 1475-1490.

摘要:【背景】由于抗生素的过度使用和误用, 加速了耐药细菌的出现, 对全球卫生与发展构成威胁, 因此迫切需要开发新型抗生素。唐古特大黄(*Rheum tanguticum*)是一种传统中药, 具有多种药效活性成分, 药理作用主要有抗菌、抗病毒、止血、利胆、抗肿瘤。植物内生菌在与宿主长期进化的过程中会产生与宿主相同或相似的代谢产物, 已成为人们寻找新型抗菌药物的重要来源。【目的】探究唐古特大黄内生细菌的多样性, 筛选出具有抗菌活性的细菌, 为开发天然抗菌药物提供微生物资源。

【方法】采用稀释涂布法在3种培养基上分离内生细菌, 通过16S rRNA基因序列确定内生细菌的分类地位; 采用琼脂块法对内生细菌进行抑菌活性初筛; 对目标菌株进行抑菌活性检测和全基因组测序分析。【结果】从唐古特大黄中共分离得到100株内生细菌, 分属于4门8纲17目26科43属, 其中厚壁菌门(*Firmicutes*, 35%)为优势菌门, 芽孢杆菌属(*Bacillus*, 9%)为优势菌属。抑菌活性初筛结果显示, 有13株菌对不同病原菌表现出了抑制作用, 其中1株类芽孢杆菌(*Paenibacillus* sp.) RTM5-22对5种病原菌有很好的抑制活性; 菌株RTM5-22液体发酵正丁醇相粗提物对7种病原菌均有抑制活性; 菌株RTM5-22基因组中包含聚酮类、萜烯类、核糖体合成和翻译后修饰肽等次级代谢基因簇。【结论】唐古特大黄内生细菌物种多样性较为丰富, 而且获得多株具有抗菌活性的菌株, 为唐古特大黄内生细菌的后续研究提供数据支撑。菌株RTM5-22的代谢产物有广谱抗菌活性, 可为寻找新型、高效的天然抑菌活性物质提供新的菌种资源。

关键词: 唐古特大黄; 内生细菌; 多样性; 全基因组测序; 抗菌活性

资助项目: 甘肃农业大学公招博士科研启动基金(GAU-KYQD-2019-01); 甘肃省极端环境微生物重点实验室开放基金(EEMRE201902)

This work was supported by the Scientific Research Start-up Funds for Openly-Recruited Doctors of Gansu Agricultural University (GAU-KYQD-2019-01) and the Open Fund of Key Laboratory of Extreme Environmental Microbial Resources and Engineering, Gansu Province (EEMRE201902).

*Corresponding authors. E-mail: JIANG Kan, jiangk@gsau.edu.cn; NIAN Fang, nianf@gsau.edu.cn

Received: 2024-07-14; Accepted: 2024-09-04; Published online: 2024-09-30

Diversity and antibacterial activity of endophytic bacteria in *Rheum tanguticum*

ZHOU Yanli¹, YU Xue³, JIANG Kan^{*2}, NIAN Fang^{*1}, ZHANG Wei³, LIU Guangxiu³

1 College of Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu, China

2 Agronomy College, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu, China

3 Key Laboratory of Extreme Environmental Microbial Resources and Engineering, Gansu Province, Northwest Institute of Eco-environment and Resources, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, Gansu, China

Abstract: [Background] The overuse and misuse of antibiotics accelerate the emergence of drug-resistant bacteria and pose a threat to global health and development. Therefore, it is urgent to develop new antibiotics. *Rheum tanguticum*, a Chinese medicinal herb, contains a variety of active ingredients and has antimicrobial, antiviral, hemostatic, cholagogic, and antitumor effects. Endophytes of medicinal plants can produce the same or similar metabolites in the long-term evolution with their hosts, becoming an important source for the development of new drugs. [Objective] To explore the diversity of endophytic bacteria in *R. tanguticum* and screen out the bacteria with antibacterial activity, thus providing microbial resources for the development of natural antibacterial drugs. [Methods] The endophytic bacteria were isolated by dilution coating on three culture media and identified by 16S rRNA gene sequencing. The agar block method was used to screen the endophytic bacteria with antibacterial activity. The antibacterial activities and whole genome sequences of the strains screened out were determined. [Results] A total of 100 strains of endophytic bacteria were isolated from *R. tanguticum*, belonging to 43 genera, 26 families, 17 orders, 8 classes of 4 phyla, of which *Firmicutes* was the dominant phylum (35%) and *Bacillus* (9%) was the dominant genus. The preliminary screening results showed that 13 strains exerted inhibitory effects on different pathogens, and one of them, RTM5-22, had strong inhibitory effects on 5 pathogenic bacteria. The crude n-butanol extract of the fermentation broth of RTM5-22 showed inhibitory activities against 7 pathogens. The genome of RTM5-22 contained the gene clusters for synthesizing secondary metabolites such as polyketones and terpenes, ribosomes, and post-translational modified peptides. [Conclusion] There are rich endophytic bacteria in *R. tanguticum*. We isolated a number of strains with excellent antibacterial activities, which provides data support for the follow-up study of endophytic bacteria from *R. tanguticum*. The metabolites of RTM5-22 have broad-spectrum antibacterial activities, which can provide resources for mining new and efficient natural antibacterial substances.

Keywords: *Rheum tanguticum*; endophytic bacteria; diversity; whole genome sequencing; antimicrobial activity

植物内生菌是存在于植物组织内,并能与植物建立协调关系的一类微生物^[1]。植物内生菌分布广泛,种类繁多,能产生多种不同的代

谢产物^[2]。随着抗生素的过度使用,导致耐药细菌的出现且耐药程度不断加强,因此寻找新型抗菌药物就尤为紧迫。自 1898 年 Vogl 从

黑麦草种子中分离出第一株内生菌后,这种新的微生物资源受到国内外学者的广泛关注^[3]。研究显示,从植物内生菌中分离的化合物中51%是以前没有发现的^[4],其中多种化合物具有广谱抗菌活性,这对抗菌活性物质的开发具有重大的意义。植物内生菌为抗菌活性成分的筛选开辟了新的来源,具有诱人的研究前景。

大黄为蓼科植物掌叶大黄、唐古特大黄(*Rheum tanguticum*)或药用大黄的根和根茎^[5]。唐古特大黄含有蒽醌类、吡喃酮类和鞣质类等多种化学成分^[6]。古典记载唐古特大黄有泻下攻积、清热泻火、逐瘀通经的功效,现代药理学研究发现唐古特大黄还具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、保肝利肾等功效^[7]。

目前,对唐古特大黄内生细菌的研究极少,仅见廖敏等^[8]对唐古特大黄内生放线菌的生防作用研究进行报道。因此,本文对唐古特大黄内生细菌多样性进行研究,并以7种常见的病原菌为指示菌筛选具有抗菌活性的菌株,旨在为发现具有潜在药用价值的生物活性天然产物提供新的菌种资源。

1 材料与方法

1.1 样品

2023年4月在甘肃省定西市(35°34'51.7"N, 104°37'22.7"E)采摘1株健康的唐古特大黄,使用根及根茎部分(图1)进行后续实验,样品储存在4℃备用。

革兰氏阳性菌:苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、巴氏葡萄球菌(*Staphylococcus pasteurii*);革兰氏阴性菌:铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*),以上供试病原菌由甘肃省极端环境微生物资源与工程重点实验室提供。

1.2 培养基

(1)分离纯化培养基:胰蛋白胨大豆琼脂(tryptone soya agar, TSA)培养基,参考文献^[9]配制;R₂A培养基和ISP2培养基配方参考中国普通微生物菌种保藏管理中心(<https://cgmcc.net/>)。



图1 供试植物样品

Figure 1 Plant sample for test.

(2) 指示菌培养基: LB 培养基参考中国普通微生物菌种保藏管理中心(<https://cgmcc.net/>)配制。

(3) 种子培养基: 改良 LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, 氯化钠 1.0。

(4) 发酵培养基: 胰酪胨大豆酵母浸膏肉汤 (trypticase soy-yeast extract broth, TSB-YE) 培养基参考中国普通微生物菌种保藏管理中心(<https://cgmcc.net/>)配制; 改良 0.1×TSB 培养基参考文献[10]配制; SST 培养基(g/L): 可溶性淀粉 20.0, 蔗糖 10.0, 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 3.0, 氯化钠 5.0; Landy 培养基参考文献[11]配制。

1.3 主要试剂和仪器

通用引物 27F 和 1492R, 北京擎科生物科技股份有限公司。梯度 PCR 仪, 安捷伦科技有限公司; 恒温振荡培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司。

1.4 内生细菌的分离纯化

对植物表面进行消毒, 具体步骤如下: (1) 取新鲜的唐古特大黄根及根茎, 清洗干净表面泥土; (2) 在超净工作台内用无菌水冲洗 3 遍, 75% 的乙醇消毒 5 min 后用无菌水清洗 3 次; (3) 2% NaClO 浸泡 5 min 后无菌水清洗 3 次; (4) 10% NaHCO₃ 处理 10 min, 无菌水清洗 3 次后备用。

取 100 μL 最后一次冲洗的无菌水在 TSA、ISP2、R₂A 培养基上进行涂布, 30 °C 培养 7 d, 根据菌落生长情况判断表面消毒是否充分。

将上述处理好的 5 g 样品放入无菌研钵中, 分次加入 10 mL 无菌生理盐水进行研磨。充分研磨后转移到无菌离心管中, 超声波清洗机(超声频率 40 kHz、超声功率 60 W)超声 10 min 后, 取匀浆原液进行梯度稀释。设匀浆原液为 10⁰, 随后用无菌生理盐水进行逐步稀释, 得到 10⁻¹ 和 10⁻² 的稀释液。取不同浓度的稀释液 100 μL 涂布在 TSA、ISP2、R₂A 培养基上, 于 30 °C 培养。培养基上长出菌落后根据菌落形态选择单菌

落在培养基上纯化。内生细菌数量(CFU/g)=(10×单皿平均菌落总数×稀释倍数)/植物组织质量。用冻存管将纯化后的菌株保存在灭菌后的 20% 甘油中, 置于 -80 °C 超低温冰箱中保存。

1.5 内生细菌的鉴定

在超净工作台中, 用经过灭菌处理的枪头挑取单菌落于 25 μL PCR 反应体系中^[12], 并充分混合, 采用 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: 2×Rapid Taq Master Mix 12.5 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, ddH₂O 10.5 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1.5 min, 30 个循环; 72 °C 5 min。PCR 扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶检测, 将条带清晰的产物送至北京擎科生物科技股份有限公司测序。

将分离纯化菌株的 16S rRNA 基因序列结果在韩国标准菌株数据库 EzBioCloud (www.ezbiocloud.net/)^[13] 网站中进行比对。比对结果使用 MEGA 11.0^[14] 软件, 采用邻接(neighbor-joining)法, 使用 1 500 次的 bootstrap 构建系统发育树, 进行系统发育学分析。

1.6 抑菌菌株的筛选

使用琼脂块法^[15]检测抑菌活性。将用于抑菌活性测试的病原菌在 LB 培养基中 37 °C 培养 6 h 至对数生长期。提前在分离出来的内生细菌平板上用 6 mm 打孔器打出菌饼备用。待灭菌后的固体 LB 培养基温度降至 60 °C 左右, 加入病原菌菌液 1 mL, 混合均匀后倒入培养皿中, 凝固后使用。加有菌液的 LB 培养基凝固后, 使用打孔器打孔, 取出琼脂块后在孔内加入阳性对照卡那霉素(10 mg/mL), 并将内生细菌的菌饼均匀放到制作好的菌液平板上, 37 °C 培养过夜, 测量抑菌圈的大小。

1.7 目标菌株的抗菌活性测定

挑取目标菌株单菌落于种子培养基中, 30 °C、180 r/min 培养 2 d 作为种子液。以 10% 的接种量将种子液接种到 4 种发酵培养基中, 30 °C、180 r/min 培养 3 d 后分别使用等量乙酸乙酯、正丁醇萃取于 4 °C、8 000 r/min 离心 8 min 后的发酵液。使用旋转蒸发仪除去有机溶剂后用甲醇重新溶解备用。

以 10% 的接种量将种子液接种到筛选出的发酵培养基中, 30 °C、180 r/min 培养 2–8 d。发酵液在 4 °C、8 000 r/min 离心 8 min 后分别用乙酸乙酯、正丁醇萃取, 旋转蒸发仪除去有机溶剂后用甲醇重新溶解备用。

采用打孔法^[16]检测抑菌活性, 使用 6 mm 打孔器在制作好的菌液平板上打孔, 取出琼脂块后在孔中加入待测的样品, 37 °C 培养过夜, 测量抑菌圈的大小。

1.8 目标菌株系统发育树的构建

将目标菌株的 16S rRNA 基因序列结果在标准菌株数据库 EzBioCloud 网站中进行比对。选择最相似的 14 个菌株采用邻接法, 使用 1 500 次的 bootstrap 构建系统发育树, 进行系统发育学分析。

1.9 目标菌株的全基因组分析

采用 Illumina 二代测序和 PacBio 三代测序结合的方式, 对目标菌株进行全基因组测序。通过 GC-depth 点图和深度-频率分布图对初步组装得到的基因组序列进行质量评估。对质控后的符合要求的序列通过组装软件 unicycler v0.4.8^[17] 进行三代序列组装, 并借助 pilon v1.22^[18] 软件进行序列校正。使用上海美吉生物医药科技有限公司云工具对菌株 RTM5-22 及与其相似性较高的模式菌株进行平均核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI)分析^[19]。编

码序列与同源基因组簇(clusters of orthologous groups, COG)数据库^[20]和碳水化合物活性酶(carbohydrate-active enzymes, CAZy)^[21]数据库进行比对和注释, 通过 antiSMASH^[22]数据库对菌株的次级代谢产物合成基因簇进行分析。

2 结果与分析

2.1 唐古特大黄内生细菌的分离鉴定及其多样性结果

唐古特大黄根及根茎部分表面消毒后, 最后一次漂洗液在 30 °C 培养 3–7 d, 在 TSA、ISP2、R₂A 培养基上未见菌落生长, 说明表面消毒彻底。

根据菌落形态和培养特征除去重复后, 在 TSA、ISP-2、R₂A 培养基上共分离纯化出 100 株菌株, 部分菌落形态如图 2 所示。从 TSA 培养基中分离的唐古特大黄内生细菌数量最多, 为 8 400 CFU/g; 其次是 ISP2 培养基, 为 7 400 CFU/g; 从 R₂A 培养基上获得的细菌数量最少, 为 6 600 CFU/g。将细菌的 16S rRNA 基因序列在 EzBioCloud 数据库中进行比对(序列已经提交到 NCBI 的 GenBank 数据库中), 具体比对结果如表 1 所示。基于 16S rRNA 基因进行系统发育分析发现(图 3), 可培养获得的 100 株菌可归为 4 个不同的进化分支, 分别为放线菌门(*Actinomycetota*) (30%)、拟杆菌门(*Bacteroidota*) (6%)、厚壁菌门(*Firmicutes*) (35%)、变形菌门(*Proteobacteria*) (29%); 隶属于 4 门 8 纲 17 目 26 科 43 属, 由图 4 可知, 内生细菌中芽孢杆菌属(*Bacillus*)为优势菌属, 占分离菌株总数的 9%; 其次为类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、近芽孢杆菌属(*Peribacillus*)和拉恩氏菌属(*Rahnella*), 分别占内生细菌总数的 7%、6%和 6%。此外, 相似性小于 98.65%^[23]的菌株有 12 个, 可能为潜在新种, 需要后续进一步研究。



图 2 部分可培养菌株的形态特征

Figure 2 Morphological characteristics of some culturable bacteria.

表 1 可培养细菌序列比对结果

Table 1 Results of sequence alignment of culturable bacteria

Phylum	Class	Genus	Similar strain	Similarity (%)	Number of strains	
Actinomycetota	Actinomycetia	<i>Agrococcus</i>	<i>Agrococcus citreus</i> IAM 15145	99.78	1	
			<i>Amycolatopsis</i>	<i>Amycolatopsis camponoti</i> A23	99.06	1
				<i>A. camponoti</i> A23	99.20	1
				<i>A. rhabdoformis</i> SB026	99.33	1
		<i>Arthrobacter</i>	<i>Arthrobacter oryzae</i> DSM 25586	99.93	1	
		<i>Cellulomonas</i>	<i>Cellulomonas hominis</i> JCM 12133	98.20	2	
			<i>C. hominis</i> JCM 12133	98.27	2	
			<i>C. hominis</i> JCM 12133	98.35	1	
		<i>Cellulosimicrobium</i>	<i>Cellulosimicrobium funkei</i> ATCC BAA-886	99.86	1	
		<i>Kocuria</i>	<i>Kocuria palustris</i> DSM 11925	99.93	1	
			<i>K. rosea</i> DSM 20447	99.71	1	
		<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacterium pygmaeum</i> DSM 23142	99.43	2	
			<i>M. pygmaeum</i> DSM 23142	99.49	1	
			<i>M. pygmaeum</i> DSM 23142	99.64	1	
			<i>M. paraoxydans</i> NBRC 103076	99.71	1	
		<i>Micrococcus</i>	<i>Micrococcus terreus</i> CGMCC 1.7054	99.93	1	
		<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora hortensis</i> NIE111	99.71	1	
			<i>M. zamorensis</i> DSM 45600	99.93	1	
			<i>M. arida</i> LB32	99.78	1	

(待续)

(续表 1)

Phylum	Class	Genus	Similar strain	Similarity (%)	Number of strains
			<i>M. trifolii</i> NIE79	99.85	1
			<i>M. veneta</i> CAP181	98.92	1
		<i>Mycobacterium</i>	<i>Mycobacterium neglectum</i> CECT 8778	98.33	1
		<i>Nocardia</i>	<i>Nocardia salmonicida</i> subsp. <i>cummidelens</i> R89	98.70	1
		<i>Pseudarthrobacter</i>	<i>Pseudarthrobacter humi</i> RMG13	99.42	1
		<i>Rhodococcus</i>	<i>Rhodococcus oryzae</i> NEAU-CX67	99.06	1
			<i>R. qingshengii</i> JCM 15477	99.57	1
		<i>Rothia</i>	<i>Rothia marina</i> JSM 078151	99.93	1
<i>Bacteroidota</i>	<i>Cytophagia</i>	<i>Siphonobacter</i>	<i>Siphonobacter aquaeclarae</i> DSM 21668	99.63	1
			<i>S. aquaeclarae</i> DSM 21668	99.71	1
	<i>Flavobacteriia</i>	<i>Epilithonimonas</i>	<i>Epilithonimonas pallida</i> DSM 18015	99.20	1
			<i>E. pallida</i> DSM 18015	99.21	1
			<i>E. pallida</i> DSM 18015	99.42	1
	<i>Sphingobacteriia</i>	<i>Pedobacter</i>	<i>Pedobacter helvus</i> P-25	98.04	1
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus arachidis</i> SY8	97.13	1
			<i>B. arachidis</i> SY8	97.92	1
			<i>B. arachidis</i> SY8	98.49	1
			<i>B. arachidis</i> SY8	98.78	1
			<i>B. paramycooides</i> NH24A2	98.61	1
			<i>B. paramycooides</i> NH24A2	98.94	1
			<i>B. mycooides</i> DSM 2048	99.93	1
			<i>B. paranthracis</i> KCTC 33714	99.79	1
			<i>B. dafuensis</i> FJAT-25496	98.83	1
		<i>Cohnella</i>	<i>Cohnella cellulositytica</i> FCN3-3	97.83	1
		<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus gallinarum</i> NBRC 100675	99.93	3
			<i>E. hulanensis</i> 190-7(T)	99.86	1
		<i>Exiguobacterium</i>	<i>Exiguobacterium mexicanum</i> 8N(T)	99.13	1
		<i>Gottfriedia</i>	<i>Gottfriedia solisilvae</i> NEAU-cbsb5	99.44	1
		<i>Lysinibacillus</i>	<i>Lysinibacillus contaminans</i> DSM 25560	98.94	1
		<i>Neobacillus</i>	<i>Neobacillus drentensis</i> LMG 21831	99.93	3
		<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus vietnamensis</i> N4(T)	96.89	1
			<i>P. albidus</i> Q4-3	98.11	1
			<i>P. anseongense</i> MAH-34	98.79	1
			<i>P. borealis</i> DSM 13188	98.39	1
			<i>P. lupini</i> RLAHU15	99.79	1
			<i>P. nebraskensis</i> JJ-59	98.79	1

(待续)

(续表 1)

Phylum	Class	Genus	Similar strain	Similarity (%)	Number of strains
			<i>P. paridis</i> py1325(T)	97.08	1
		<i>Paenisporosarcina</i>	<i>Paenisporosarcina macmurdoensis</i> CMS 21w	99.65	1
		<i>Peribacillus</i>	<i>Peribacillus butanolivorans</i> DSM 18926	94.30	1
			<i>P. butanolivorans</i> DSM 18926	99.65	1
			<i>P. butanolivorans</i> DSM 18926	99.72	1
			<i>P. frigorigerans</i> DSM 8801	99.37	1
			<i>P. simplex</i> NBRC 15720	99.65	1
			<i>P. simplex</i> NBRC 15720	100.00	1
		<i>Psychrobacillus</i>	<i>Psychrobacillus psychrodurans</i> DSM 11713	99.27	1
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Agrobacteri</i>	<i>Agrobacterium radiobacter</i> IIF1SW-B1	100.00	1
		<i>Brevundimonas</i>	<i>Brevundimonas vesicularis</i> NBRC 12165	99.77	2
		<i>Rhizobium</i>	<i>Rhizobium rhizogenes</i> NBRC 13257	99.63	2
			<i>R. smilacinae</i> PTYR-5	99.78	2
			<i>R. sophorae</i> CCBAU 03386	100.00	1
		<i>Sphingomonas</i>	<i>Sphingomonas hankookensis</i> ODN7	99.79	1
		<i>Comamonas</i>	<i>Comamonas terrigena</i> NBRC 13299	99.57	1
			<i>C. terrigena</i> NBRC 13299	99.71	1
	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Delftia</i>	<i>Delftia tsuruhatensis</i> NBRC 16741	99.86	1
		<i>Janthinobacterium</i>	<i>Janthinobacterium tructae</i> SNU WT3	99.93	1
		<i>Massilia</i>	<i>Massilia niabensis</i> 5420S-26(T)	98.63	1
	<i>Gamma</i> <i>proteobacteria</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter lwoffii</i> DSM 2403	99.79	1
			<i>A. pittii</i> CIP 70.29	99.64	1
			<i>A. pittii</i> CIP 70.29	99.79	1
		<i>Citrobacter</i>	<i>Citrobacter freundii</i> A60	98.38	1
		<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>hoffmannii</i> DSM 14563	99.43	1
		<i>Moraxella</i>	<i>Moraxella osloensis</i> CCUG 350	99.21	1
		<i>Prolinoborus</i>	<i>Prolinoborus fasciculus</i> CIP 103579	99.78	1
		<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas parafulva</i> NBRC 16636	99.36	1
			<i>P. parafulva</i> NBRC 16636	99.57	1
		<i>Rahnella</i>	<i>Rahnella bonaserana</i> DSM 112610	99.78	1
			<i>R. ecdela</i> DSM 112612	99.70	1
			<i>R. ecdela</i> DSM 112612	99.78	1
			<i>R. Victorian</i> FRB 225	99.63	1
			<i>R. Victoriana</i> FRB 225	99.81	1
			<i>R. Victoriana</i> FRB 225	99.85	1

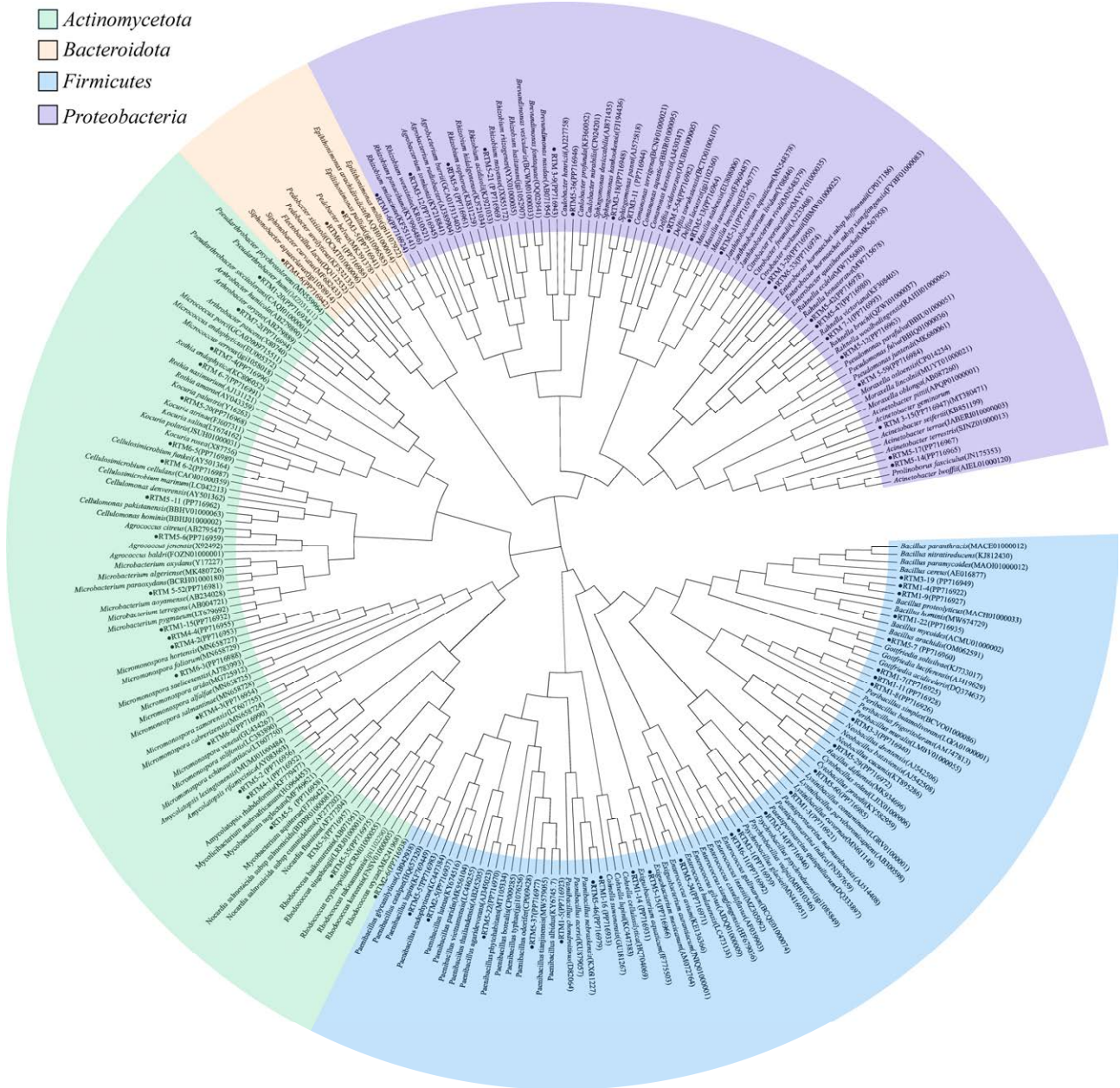


图 3 基于 16S rRNA 基因序列构建的可培养细菌的系统发育树
 Figure 3 Phylogenetic tree of culturable bacteria based on 16S rRNA gene sequences.

2.2 拮抗细菌筛选结果

采用琼脂块法对分离得到的内生细菌进行抑菌活性测定，筛选对 7 种病原菌有拮抗作用的菌株，结果见表 2。抗菌活性结果显示，有 13 株菌株对不同病原菌表现出了抑制作用，13 株拮抗菌株属于 4 门 12 属；其中 10 株菌能

抑制苏云金芽孢杆菌，11 株菌能抑制金黄色葡萄球菌和巴氏葡萄球菌，12 株菌能抑制表皮葡萄球菌，4 株菌能抑制大肠杆菌。将筛选出来的 1 株具有良好抑菌活性且与相近菌株 16S rRNA 相似度小于 98.65%的内生细菌命名为 RTM5-22。

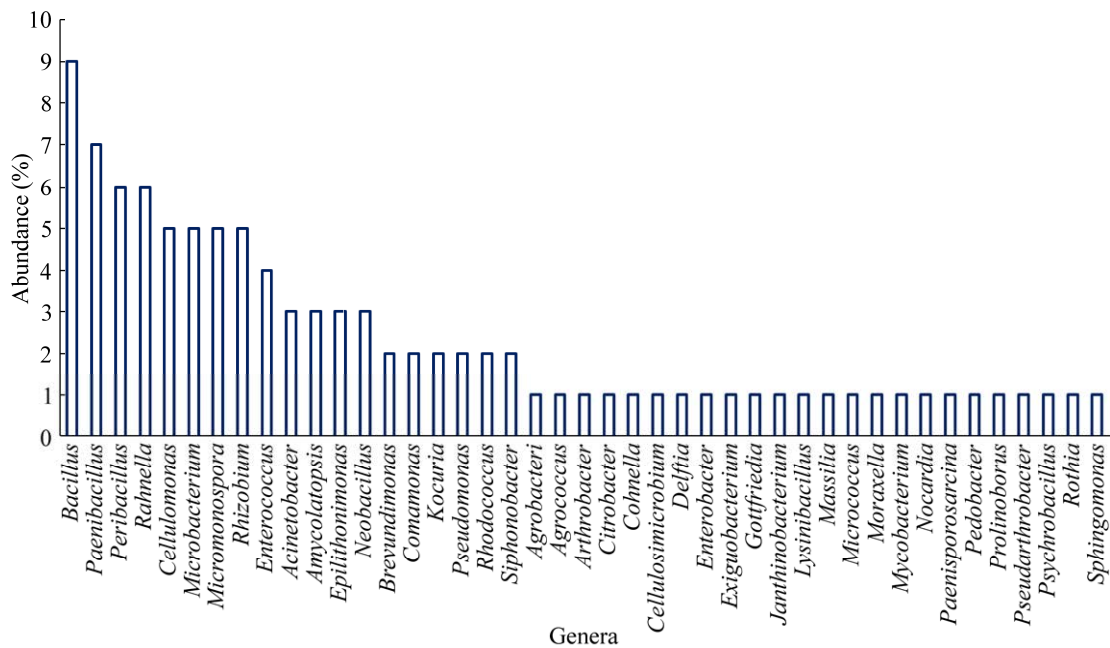


图 4 可培养内生细菌属水平相对丰度

Figure 4 Abundance of culturable endophytic bacteria genera level.

表 2 内生细菌对病原菌的抑制作用

Table 2 Inhibitory effects against pathogenic bacteria of endophytic bacteria (mm)

Strain	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	<i>Escherichia coli</i>
RTM1-14	9.83±0.29	14.90±0.17	—	—	11.57±0.51	15.93±0.12	—
RTM1-15	6.90±0.17	6.77±0.25	—	—	9.87±0.23	8.93±0.12	10.83±0.29
RTM3-6	11.90±0.17	19.27±0.25	—	—	19.83±0.29	21.73±0.25	—
RTM3-18	10.73±0.25	11.93±0.12	—	—	13.77±0.25	10.80±0.35	15.93±0.12
RTM5-7	7.73±0.25	13.77±0.25	—	—	12.87±0.15	9.83±0.29	—
RTM5-22	14.73±0.38	14.90±0.17	—	—	15.77±0.25	16.23±0.25	17.87±0.23
RTM5-29	6.87±0.23	9.90±0.17	—	—	9.77±0.25	—	—
RTM5-37	9.73±0.25	14.83±0.21	—	—	15.90±0.17	16.70±0.30	—
RTM5-50	10.87±0.23	19.87±0.15	—	—	17.43±0.12	19.83±0.29	—
RTM5-59	—	—	—	—	—	14.73±0.25	—
RTM5-60	—	9.80±0.20	—	—	9.83±0.29	11.73±0.25	—
RTM6-1	5.27±0.25	6.83±0.29	—	—	7.87±0.23	6.67±0.31	9.83±0.29
RTM7-4	—	—	—	—	9.80±0.35	—	—

—: 无抑菌活性。

—: No antibacterial activity.

2.3 菌株 RTM5-22 的抑菌活性检测结果

采用琼脂块法从唐古特大黄内生细菌中筛选到 1 株类芽孢杆菌(*Paenibacillus* sp.) RTM5-22, 其对 5 株病原菌表现出显著活性。再用打孔法对

菌株 RTM5-22 的发酵液乙酸乙酯相及发酵液正丁醇相进行抑菌活性检测。结果显示, TSB-YE 作为发酵培养基时, 乙酸乙酯相粗提物对 *Bacillus thuringiensis*、*Staphylococcus aureus* 有抑制活

性, 正丁醇相粗提物无活性; 改良 0.1×TSB 作为发酵培养基时, 乙酸乙酯相和正丁醇相粗提物均无抑制活性; SST 作为发酵培养基时, 乙酸乙酯相粗提物无活性, 正丁醇相粗提物对 *Bacillus thuringiensis* 有抑制活性; Landy 作为发酵培养基时, 乙酸乙酯相粗提物无活性, 正丁醇相粗提物对 7 种病原菌均有活性。因此选择 Landy 为发酵培养基。

如图 5 所示, Landy 作为发酵培养基时, 发酵 2–8 d 正丁醇相粗提物对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均有抑制效果, 并且对巴氏葡萄球菌(*Staphylococcus pasteurii*)的抑制效果最好; 发酵时间在第 3 天时, 菌株 RTM5-22 的代谢产物积累达到最大。

2.4 菌株 RTM5-22 的分子生物学鉴定结果

经 16S rRNA 基因序列比对分析发现, 菌株 RTM5-22 与亲缘关系最密切的菌株相似度为 96.89%, 小于目前新种划分的界限值 98.65%。

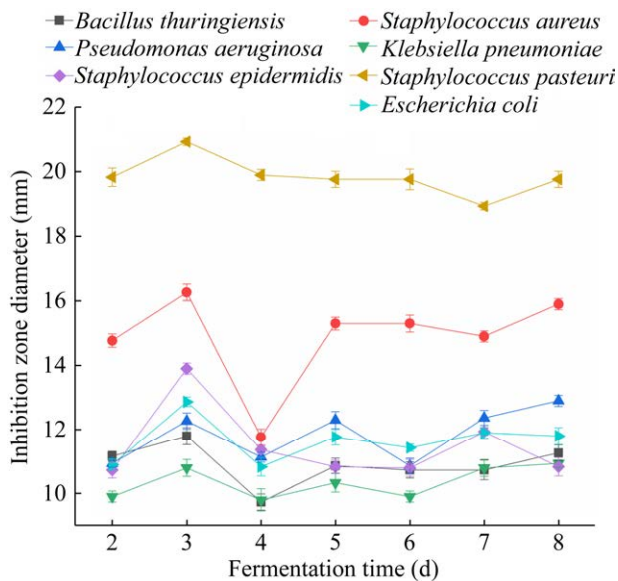


图 5 菌株 RTM5-22 对病原菌的抑制作用
Figure 5 Inhibitory effects against pathogenic bacteria of strain RTM5-22.

通过对 16S rRNA 基因序列构建系统发育树, 发现菌株 RTM5-22 在系统发育树上形成一个独立进化分支(图 6); 新物种划分的标准之一是 ANI 值小于 95%^[24], 基于全基因组序列, 菌株 RTM5-22 与相似性较高的模式菌株之间的 ANI 值均小于 95% (表 3), 低于物种判断的临界值。因此可判断菌株 RTM5-22 是类芽孢杆菌属的 1 个潜在新种。

2.5 菌株 RTM5-22 的全基因组分析结果

菌株 RTM5-22 全基因组大小为 7 092 321 bp, 在整个基因组水平上的平均 G+C 含量为 44.57%, 共编码 6 156 个基因。统计信息见表 4, 基因组圈图见图 7。

COG 注释结果显示, 菌株 RTM5-22 共有 4 753 个基因被注释到 23 组 COG 功能中。在 RTM5-22 注释到的基因中, 参与代谢的基因有 2 206 个, 表明菌株有很强的代谢能力。防御机制注释量为 167 个, 表明在抵抗外界环境胁迫上可能具有一定潜力^[25]。因此, 这株分离自唐古特大黄的内生细菌, 在根际土壤和植物体内有良好的适应性。

根据碳水化合物活性酶分析结果可知, RTM5-22 编码的 CAZy 酶类基因家族有 301 个。为了从遗传水平阐明 RTM5-22 的抑菌活性, 本研究分析了抑菌相关的基因, 共注释到与降解病原菌细胞壁相关的酶基因有 10 个, 如 β -1,3-葡聚糖酶(EC 3.2.1.6)、肽聚糖裂解酶(EC 4.2.2.n1)、几丁质酶(EC 3.2.1.14)、溶菌酶(EC 3.2.1.17)等。此外, 还发现大约 50 个残基的模块附着在 GH18、GH19、GH23、GH24、GH25 和 GH73 家族的各种酶上, 即分解几丁质或肽聚糖的酶^[26]。

antiSMASH 分析发现, RTM5-22 共预测到 9 个有明确信息的次级代谢产物基因簇, 基因簇类型为 T3PKS、LAP、terpene、ectoine、lasso peptide、proteusin、resorcinol, 统计信息见表 4,

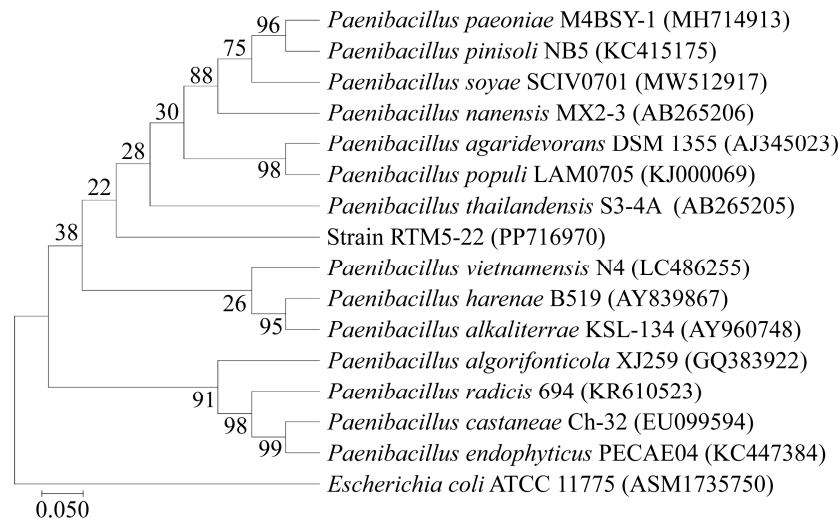


图 6 基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株 RTM5-22 的系统发育树 括号内数值为菌株 GenBank 登录号; 分支点处数字表示 bootstrap 支持率; 标尺刻度 0.050 表示序列进化分支差异; 选择的外群是 *Escherichia coli* ATCC 11775。

Figure 6 Phylogenetic tree of strain RTM5-22 constructed based on 16S rRNA gene sequence. Numbers in parentheses are GenBank accession numbers; The numbers on the branch points indicate the support rate for bootstrap; Scale 0.050 represents sequence evolutionary branching differences; The selected out-groups is *Escherichia coli* ATCC 11775.

表 3 菌株 RTM5-22 与相近菌株的 ANI 计算结果
Table 3 ANI scores between RTM5-22 and closely related *Paenibacillus* species

Related <i>Paenibacillus</i> species	RTM5-22	
	ANiB (%)	ANIm (%)
<i>Paenibacillus vietnamensis</i>	73.49	83.78
<i>Paenibacillus agaridevorans</i>	73.88	86.67
<i>Paenibacillus paeoniae</i>	73.56	84.77
<i>Paenibacillus harenae</i>	73.83	83.43
<i>Paenibacillus castaneae</i>	74.82	85.45
<i>Paenibacillus pinisoli</i>	73.86	84.02
<i>Paenibacillus soyae</i>	73.19	84.00
<i>Paenibacillus nanensis</i>	73.29	83.68
<i>Paenibacillus alkaliterrae</i>	74.19	83.42
<i>Paenibacillus endophyticus</i>	74.02	84.24
<i>Paenibacillus algorifonticola</i>	72.91	84.76
<i>Paenibacillus luteus</i>	73.83	84.64
<i>Paenibacillus paridis</i>	73.71	83.93
<i>Paenibacillus montaniterrae</i>	72.54	83.97
<i>Paenibacillus liaoningensis</i>	73.63	84.65

ANiB: 使用 BLAST 软件计算的 ANI 值; ANIm: 使用 MUMmer 软件计算的 ANI 值。

ANiB: ANI scores based on BLAST; ANIm: ANI scores based on MUMmer server.

表 4 RTM5-22 的基因组特征和预测产生的代谢物类别

Table 4 Genome characteristics and the classes of metabolites predicted of RTM5-22

Characteristic	<i>Paenibacillus</i> sp. RTM5-22
Size (bp)	7 092 321
G+C content (%)	44.57
Number of coding sequences	6 156
tRNA	73
rRNA	27
sRNA	59
T3PKS	1
LAP	1
Terpene	2
Ectoine	1
Lasso peptide	2
Proteusin	1
Resorcinol	1

这些聚酮类、萜烯类、核糖体合成和翻译后修饰肽是菌株 RTM5-22 抗菌的物质基础。其中 2 个 lasso peptide 类基因簇与抗菌物质 paeninodin^[27]

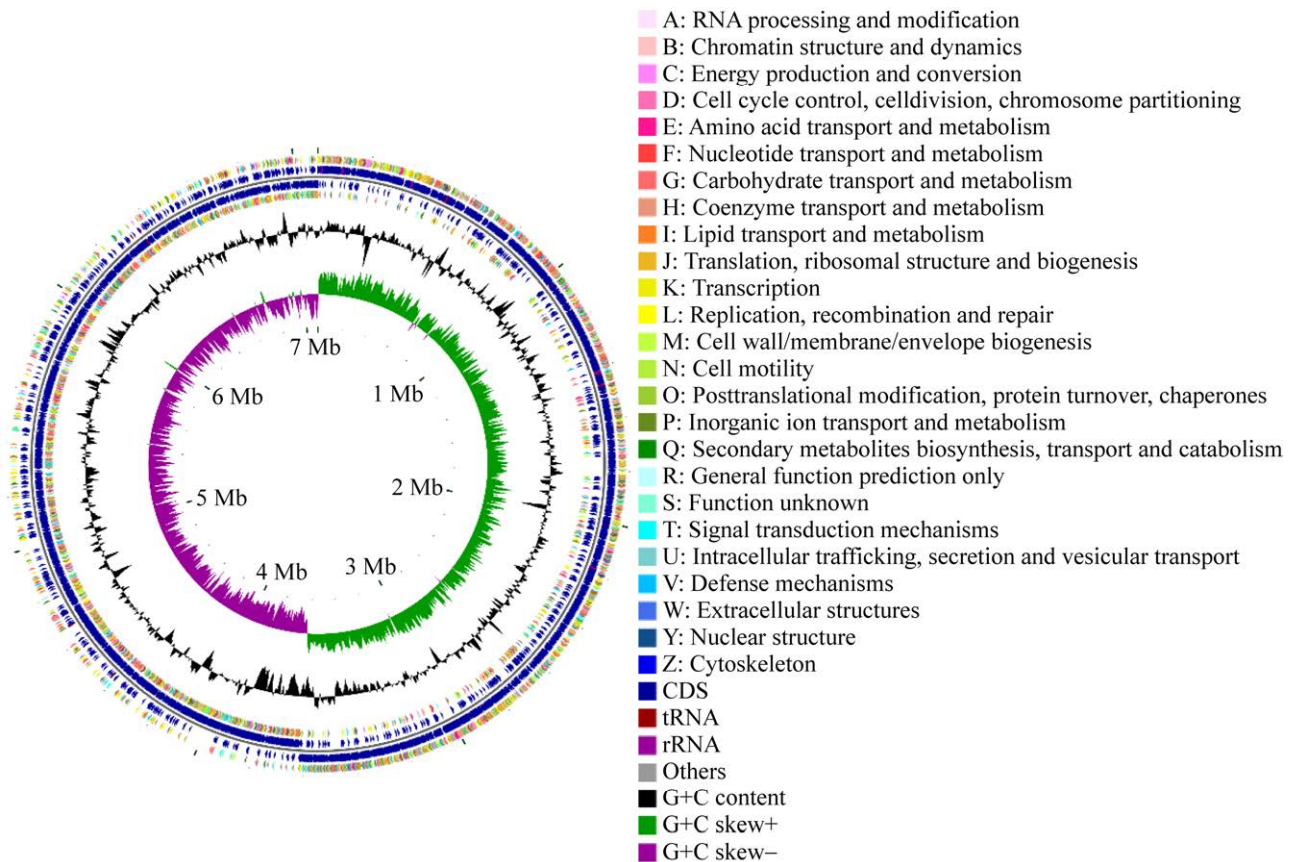


图7 RTM5-22 基因组圈图 从外到内, 圈1为正链上的CDS; 圈2为正链上的CDS、tRNA、rRNA; 圈3为负链上的CDS、tRNA、rRNA; 圈4为负链上的CDS; 圈5为G+C含量; 圈6为G+C Skew。
Figure 7 Circular genome map of strain RTM5-22. From outside to inside, circle 1: CDS on positive chains; circle 2: CDS, tRNA, and rRNA on positive chains; circle 3: CDS, tRNA, and rRNA on negative; circle 4: CDS on negative chains; circle 5: G+C content; circle 6: G+C skew.

相似度分别为 60%和 100%, 合成基因簇线型图谱见图 8。T3PKS、LAP 和 terpene 次级代谢产物合成基因簇未找到相似基因簇, 说明该菌株可能会产生新的具有抑菌活性的化合物, 有待进一步研究。

3 讨论

植物宿主和内生菌由于共存和进化而形成了复杂的互惠共生关系, 维持这种关系的物质基础是内生菌或宿主植物的次生代谢产物。一方面宿主为内生菌提供生长必需的营养物质;

另一方面内生菌可调节植物的生长和发育^[28]。内生菌对宿主植物有广泛的生物学作用, 宿主植物的优良性状与内生菌息息相关。因此, 深入研究植物内生菌的种群结构及生物学功能具有重要意义^[29]。

本研究中共分离到 100 株唐古特大黄内生细菌。通过 16S rRNA 基因比对分析, 可培养获得的所有菌株隶属于 4 门 8 纲 17 目 26 科 43 属, 具有丰富的多样性。研究表明, 植物中分离到的内生细菌大多是芽孢杆菌属^[30]。本研究中优势菌属为芽孢杆菌属, 占 9%。这与其他研究

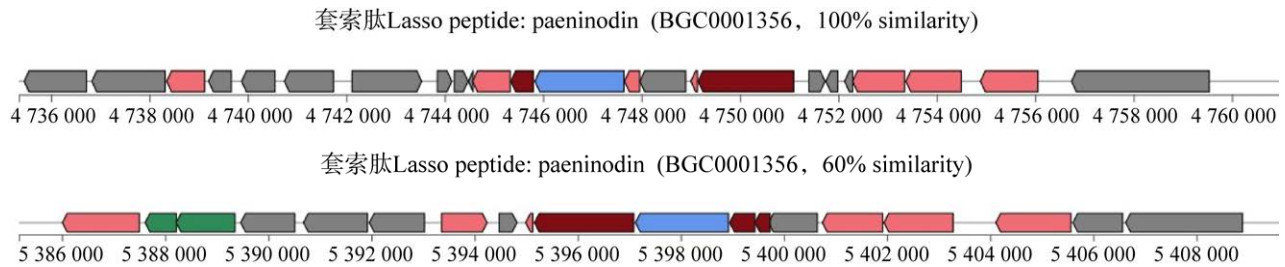


图 8 RTM5-22 抗生素合成基因簇线型图谱

Figure 8 Linear map of antibiotic synthesis gene clusters of RTM5-22.

者的结果一致, 但本研究中分离到的土地杆菌属(*Pedobacter*)、科恩氏菌属(*Cohnella*)、类芽孢八叠球菌属(*Paenisporosarcina*)等属很少见, 增加了植物内生可培养细菌的范畴。

随着杀菌剂的大量使用, 导致耐药性菌株的出现。来源广泛、易于培养的内生菌, 成为近年来天然抗菌剂研发的热点^[31]。本研究对唐古特大黄的内生细菌进行了分离纯化, 并对内生细菌的抗菌活性进行了筛选, 发现 13 株菌对 7 种病原菌有不同程度的拮抗活性。研究结果揭示了唐古特大黄中存在丰富的内生细菌资源, 并且具有产生抗菌活性代谢产物的巨大潜力。

此外, 对筛选出一株有显著抑菌作用的类芽孢杆菌 RTM5-22 进行进一步研究后发现, 发酵培养基为 Landy 培养基时 RTM5-22 的发酵提取物对 7 种病原菌均有抑制作用, 并且在发酵第 2-8 天均能产生抑菌活性物质, 活性物质分布在发酵液的正丁醇相中。通过 16S rRNA 基因序列和 ANI 分析发现, 菌株 RTM5-22 在基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树上形成了单独的一支, 与相似菌株的 ANI 值低于 95%, 可判断菌株 RTM5-22 是来源于唐古特大黄的潜在新种。新物种的描述还需要完成菌株的多相分类分析(表型特征、培养特征、生理生化和化学组分等)和在国际菌种保藏机构的保藏, 后期

将补充这些工作完善对新菌种的描述。

利用生物信息学对菌株的全基因组序列进行分析, 结果显示菌株 RTM5-22 具有合成 T3PKS、LAP、terpene、lasso peptide 等抗性化合物的基因簇, 以及 β -1,3-葡聚糖酶、溶菌酶等相关的基因。Terpene 对细菌和真菌等耐药病原菌具有较强的抗菌活性^[32]; T3PKS 是聚酮类化合物, 可用于研制抗生素、抗菌剂等^[33]; LAP 对常见病原菌有很强的抑制活性^[34]; Lasso peptide 是由核糖体合成并经过翻译后修饰产生的一类具有套索构型的生物活性肽, 具有抗细菌或真菌的作用^[35]; β -1,3-葡聚糖酶、溶菌酶等可通过降解病原菌细胞壁, 使病原菌死亡^[36]。

4 结论

本研究从唐古特大黄中分离得到 100 株内生细菌, 分属于 4 门 8 纲 17 目 26 科 43 属, 13 株菌对不同病原菌表现出拮抗活性。其中一株类芽孢杆菌 RTM5-22 的液体发酵正丁醇相粗提物对 7 种病原菌均表现出拮抗活性。全基因组分析表明该菌株含有合成抗性化合物相关的基因簇和降解病原菌细胞壁的相关基因。综上所述, 菌株 RTM5-22 具有产活性天然产物的潜力, 可为寻找新型、高效的天然抑菌活性物质提供新的菌种资源, 并为菌株的进一步研究提供试验依据。

REFERENCES

- [1] 杜晓宁, 徐惠娟, 黄盼盼, 代金霞. 宁夏枸杞内生细菌的多样性及其抑菌活性研究[J]. 微生物学通报, 2015, 42(9): 1779-1787.
DU XN, XU HJ, HUANG PP, DAI JX. Diversity and antimicrobial activity of endophytic bacteria isolated from *Lycium barbarum* of Ningxia[J]. Microbiology China, 2015, 42(9): 1779-1787 (in Chinese).
- [2] 黄敬瑜, 张楚军, 姚瑜龙, 高旭, 侯梓淇, 张露, 李欧. 植物内生菌生物抗菌活性物质研究进展[J]. 生物工程学报, 2017, 33(2): 178-186.
HUANG JY, ZHANG CJ, YAO YL, GAO X, HOU ZQ, ZHANG L, LI O. Progress in antimicrobial substances of endophytes[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2017, 33(2): 178-186 (in Chinese).
- [3] 岳伟. 何首乌内生真菌生物活性及其次生代谢产物的研究[D]. 上海: 华东师范大学硕士学位论文, 2014.
YUE W. Bioactivity of endophytic fungi from *Polygonum multiflorum* Thunb. and their secondary metabolites[D]. Shanghai: Master's Thesis of East China Normal University, 2014 (in Chinese).
- [4] 李静, 戴素娟, 庾利, 蒋忠科, 刘少伟, 姜明国, 姜蓉, 孙承航. 海南东寨港真红树植物内生放线菌多样性及其抗菌活性[J]. 微生物学通报, 2016, 43(8): 1753-1765.
LI J, DAI SJ, TUO L, JIANG ZK, LIU SW, JIANG MG, JIANG R, SUN CH. Diversity and antimicrobial activity of endophytic *Actinobacteria* isolated from eumangroves collected in Dongzhaigang of Hainan Province[J]. Microbiology China, 2016, 43(8): 1753-1765 (in Chinese).
- [5] 葛建华, 刘训红, 许虎, 徐丹洋, 白发平. 基于化学分析的不同品种大黄区分研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(12): 2309-2313.
GE JH, LIU XH, XU H, XU DY, BAI FP. Identification of different varieties of *Rhei Radix et Rhizoma* based on chemical analysis[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2015, 40(12): 2309-2313 (in Chinese).
- [6] 曹强, 郭亚菲, 叶蕾蕾, 张成园, 寇仁博, 郭政. 大黄及其活性成分抗炎作用及机制的研究进展[J]. 中草药, 2022, 53(22): 7285-7294.
CAO Q, GUO YF, YE LL, ZHANG CY, KOU RB, GUO M. Research progress on anti-inflammatory effects and mechanism of *Rhei Radix et Rhizoma* and its active components[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2022, 53(22): 7285-7294 (in Chinese).
- [7] 拉门措, 王瑶, 李妍, 崔云斌, 邹登朗. 基于分子对接技术的唐古特大黄抗炎活性成分筛选研究[J]. 青海草业, 2023, 32(1): 15-21.
LA MC, WANG Y, LI Y, CUI YB, ZOU DL. Screening of anti-inflammatory components of *Rheum tanguticum* maxim based on molecular docking technique[J]. Qinghai Prataculture, 2023, 32(1): 15-21 (in Chinese).
- [8] 廖敏, 张波, 范中菡, 陈熊春蕊, 张小平. 唐古特大黄内生放线菌分离鉴定及生防作用研究[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2017, 54(2): 381-386.
LIAO M, ZHANG B, FAN ZH, CHEN X, ZHANG XP. Isolation of endophytic actinomycetes from *Rheum tanguticum* and its application in biological control of *Magnaporthe grisea*[J]. Journal of Sichuan University (Natural Science Edition), 2017, 54(2): 381-386 (in Chinese).
- [9] 方芳. 一株黑水虻肠道共生细菌的分离鉴定及其功能的初步研究[D]. 武汉: 华中师范大学硕士学位论文, 2020.
FANG F. Characterization of a novel bacterial strain isolated from the gut of *Hermetia illucens* and the preliminary study on its function[D]. Wuhan: Master's Thesis of Central China Normal University, 2020 (in Chinese).
- [10] von der WEID I, ALVIANO DS, SANTOS AS, SOARES RA, ALVIANO CS, SELDIN L. Antimicrobial activity of *Paenibacillus peoriae* strain NRRL BD-62 against a broad spectrum of phytopathogenic bacteria and fungi[J]. Journal of Applied Microbiology, 2003, 95(5): 1143-1151.
- [11] DENG Y, LU ZX, LU FX, ZHANG C, WANG Y, ZHAO HZ, BIE XM. Identification of LI-F type antibiotics and di-n-butyl phthalate produced by *Paenibacillus polymyxa*[J]. Journal of Microbiological Methods, 2011, 85(3): 175-182.
- [12] WALCH G, KNAPP M, RAINER G, PEINTNER U. Colony-PCR is a rapid method for DNA amplification of hyphomycetes[J]. Journal of Fungi, 2016, 2(2): 12.
- [13] CHUN J, LEE JH, JUNG Y, KIM M, KIM S, KIM BK, LIM YW. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(Pt 10): 2259-2261.
- [14] TAMURA K, STECHER G, KUMAR S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11[J]. Molecular Biology and Evolution, 2021, 38(7): 3022-3027.
- [15] ICHIKAWA T, DATE M, ISHIKURA T, OZAKI A. Improvement of kasugamycin-producing strain by the agar piece method and the prototroph method[J]. Folia Microbiologica, 1971, 16(3): 218-224.
- [16] 王世强. 打孔法测定抗生素的效价[J]. 生物学通报, 2005, 40(3): 2.
WANG SQ. Determination of antibiotic titer by punching method[J]. Bulletin of Biology, 2005, 40(3): 2 (in Chinese).
- [17] WICK RR, JUDD LM, GORRIE CL, HOLT KE. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads[J]. PLoS Computational Biology, 2017, 13(6): e1005595.
- [18] WALKER BJ, ABEEL T, SHEA T, PRIEST M, ABOUELLIEL A, SAKTHIKUMAR S, CUOMO CA, ZENG QD, WORTMAN J, YOUNG SK, EARL AM. Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement[J]. PLoS One, 2014, 9(11): e112963.
- [19] REN Y, YU G, SHI CP, LIU LM, GUO Q, HAN C, ZHANG D, ZHANG L, LIU BX, GAO H, ZENG J, ZHOU Y, QIU YH, WEI J, LUO YC, ZHU FJ, LI XJ, WU Q, LI B, FU WY, et al. Majorbio Cloud: a one-stop, comprehensive bioinformatic platform for multiomics analyses[J]. iMeta, 2022, 1(2): e12.
- [20] TATUSOV RL, GALPERIN MY, NATALE DA, KOONIN EV. The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(1): 33-36.
- [21] LOMBARD V, GOLACONDA RAMULU H, DRULA

- E, COUTINHO PM, HENRISSAT B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(Database issue): D490-D495.
- [22] MEDEMA MH, BLIN K, CIMERMANCIC P, de JAGER V, ZAKRZEWSKI P, FISCHBACH MA, WEBER T, TAKANO E, BREITLING R. antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(Web Server issue): W339-W346.
- [23] 刘超兰, 黎江华, 郭义东. 2株小双孢菌新种的全基因组测序分析与抗菌活性测定[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(5): 1662-1673.
- LIU CL, LI JH, GUO YD. Whole genome sequencing and antibacterial activity determination of two novel species of *Microbispora*[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(5): 1662-1673 (in Chinese).
- [24] 伍茜, 李雄婕, 喻东, 吴晓仪, 程建国, 罗燕, 王印, 杨泽晓, 姚学萍. 林麝源支气管败血波氏杆菌 FMDBb1 株的分离鉴定及全基因组序列分析[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(12): 4731-4741.
- WU X, LI XJ, YU D, WU XY, CHENG JG, LUO Y, WANG Y, YANG ZX, YAO XP. Isolation, identification and whole-genome analysis of *Bordetella bronchiseptica* FMDBb1 from forest musk Deer (*Moschus berezovskii*)[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(12): 4731-4741 (in Chinese).
- [25] 夏天. *Paenibacillus* sp. *Aloe-11* 全基因组测序及其比较基因组学研究[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2012.
- XIA T. Genome sequencing of the *Paenibacillus* sp. *Aloe-11* and comparison with its closely related bacteria[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2012 (in Chinese).
- [26] 田凤鸣, 陈强, 何九军, 卓平清, 王让军, 王国斌, 张晓娜. 一株花椒根腐病拮抗菌的分离鉴定及全基因组序列分析[J]. *微生物学通报*, 2022, 49(8): 3205-3219.
- TIAN FM, CHEN Q, HE JJ, ZHUO PQ, WANG RJ, WANG GB, ZHANG XN. Isolation, identification, and whole genome analysis of a strain against *Zanthoxylum bungeanum* root rot[J]. *Microbiology China*, 2022, 49(8): 3205-3219 (in Chinese).
- [27] MOKHTAR NFK, HASHIM AM, HANISH I, ZULKARNAIN A, RAJA NHARI RMH, ABDUL SANI AA, ABBASILIASI S, ARIFF A, MUSTAFA S, RAHIM RA. The discovery of new antilisterial proteins from *Paenibacillus polymyxa* Kp10 via genome mining and mass spectrometry[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 960.
- [28] 杜晓宁. 宁夏枸杞可培养内生菌的多样性及其生物活性研究[D]. 银川: 宁夏大学硕士学位论文, 2016.
- DU XN. Diversity and biological activity of endophytes isolated from *Lycium barbarum* of Ningxia[D]. Yinchuan: Master's Thesis of Ningxia University, 2016 (in Chinese).
- [29] 高沙尔·卡依尔哈力, 热子亚·麦麦吐逊, 祖丽皮亚·玉努斯. 地锦草内生细菌多样性、拮抗及促生特性测定[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(2): 392-406.
- Gaoshar·Kayierhali, Raziye·Memettursun, Zulfiya·Yunus. Endophytic bacteria from *Euphorbia humifusa*: diversity, antagonism and growth-promoting activities[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(2): 392-406 (in Chinese).
- [30] 杨成德, 王玉琴, 陈秀蓉, 张振粉, 薛莉, 王颖, 姚玉玲. 2种蒿草属牧草休眠期内生细菌多样性研究[J]. *草业学报*, 2016, 25(8): 136-144.
- YANG CD, WANG YQ, CHEN XR, ZHANG ZF, XUE L, WANG Y, YAO YL. Diversity of endophytic bacteria isolated from *Kobresia* during winter dormancy[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2016, 25(8): 136-144 (in Chinese).
- [31] 解修超. 红树植物内生放线菌的分离鉴定和2株海洋链霉菌活性代谢产物的分离鉴定[D]. 海口: 华南热带农业大学博士学位论文, 2007.
- XIE XC. Isolation and identification of the endophytic actinomycetes from mangrove and isolation and identification of the bioactive metabolites of two marine *Streptomyces*[D]. Haikou: Doctoral Dissertation of South China University of Tropical Agriculture, 2007 (in Chinese).
- [32] MAHIZAN NA, YANG SK, MOO CL, SONG AA, CHONG CM, CHONG CW, ABUSHELAIABI A, LIM SE, LAI KS. Terpene derivatives as a potential agent against antimicrobial resistance (AMR) pathogens[J]. *Molecules*, 2019, 24(14): 2631.
- [33] 祝友朋, 韩长志. 不同营养类型植物病原真菌次生代谢产物合成基因簇的差异性研究[J]. *华中农业大学学报*, 2020, 39(6): 37-43.
- ZHU YP, HAN CZ. Differences in gene clusters of synthesizing secondary metabolites of plant pathogenic fungi with different nutritional types[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2020, 39(6): 37-43 (in Chinese).
- [34] MIR MA, ALTUHAM SA, MONDAL S, BASHIR N, DERA AA, ALFHILI MA. Antibacterial and antibiofilm activities of β -lapachone by modulating the catalase enzyme[J]. *Antibiotics*, 2023, 12(3): 576.
- [35] ZHAO N, PAN YX, CHENG Z, LIU HG. Lasso peptide, a highly stable structure and designable multifunctional backbone[J]. *Amino Acids*, 2016, 48(6): 1347-1356.
- [36] 孙平平, 崔建潮, 贾晓辉, 王文辉. 贝莱斯芽孢杆菌 L-1 对梨灰霉和青霉菌的抑制作用评价及全基因组分析[J]. *微生物学报*, 2018, 58(9): 1637-1646.
- SUN PP, CUI JC, JIA XH, WANG WH. Complete genome analysis of *Bacillus velezensis* L-1 and its inhibitory effect on pear gray and blue mold[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(9): 1637-1646 (in Chinese).