

土壤中拮抗菌株铜绿假单胞菌 HBD-12 次级代谢产物的分离鉴定及其体外抗菌抗肿瘤活性检测

李肖鹤, 李健, 后文, 郑沈, 朱向东

江西农业大学 生物科学与工程学院, 江西 南昌 330045

李肖鹤, 李健, 后文, 等. 土壤中拮抗菌株铜绿假单胞菌 HBD-12 次级代谢产物的分离鉴定及其体外抗菌抗肿瘤活性检测. 生物工程学报, 2020, 36(11): 2451-2458.

Li XH, Li J, Hou W, et al. Isolation, structural identification of secondary metabolites from *Pseudomonas aeruginosa* HBD-12 with antibacterial and antitumor activities. Chin J Biotech, 2020, 36(11): 2451-2458.

摘要: 为从土壤中筛到具有抗菌和抗肿瘤等生物活性的菌株, 以孕烯醇酮作为唯一碳源进行筛菌, 经分子生物学鉴定及菌株发酵液抑菌活性测定, 发现一株铜绿假单胞菌 HBD-12 对大肠杆菌、苏云金芽孢杆菌、指状青霉、意大利青霉具有较好抑菌效果。运用柱层析法分离纯化该菌株发酵液成分, 采用波谱法解析所得单体化合物结构, 并使用 HTRF 激酶检测试剂盒测定其抗肿瘤活性。结果显示: 分离得到的单体化合物 1-羟基-9,10-二氮杂菲和 3-羟基-9,10-二氮杂菲均具有显著的抗肿瘤活性。在浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 1-羟基-9,10-二氮杂菲和 3-羟基-9,10-二氮杂菲对 Aurora 激酶 A 的抑制率分别为 $78.39\% \pm 2.29\%$ 和 $60.34\% \pm 8.35\%$ 。由此可见该菌株的次级代谢产物对新型抗菌、抗肿瘤药物的研发具有很好的利用价值。

关键词: 铜绿假单胞菌, 抑菌活性, 次级代谢产物, 分离纯化, 结构解析, 抗肿瘤活性

Isolation, structural identification of secondary metabolites from *Pseudomonas aeruginosa* HBD-12 with antibacterial and antitumor activities

Xiaohe Li, Jian Li, Wen Hou, Shen Zheng, and Xiangdong Zhu

College of Biological Science and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, Jiangxi, China

Abstract: To screen strains with antibacterial and antitumor activity, pregnenolone was used as the sole carbon source for screening bacteria from soil. Based on bacteriostatic activity assay, *Pseudomonas aeruginosa* HBD-12 was found to be effectively inhibiting the growth of *Escherichia coli*, *Bacillus thuringiensis*, *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*, and its fermentation broth was separated and purified using column chromatography. Then, structure of the obtained

Received: March 24, 2020; **Accepted:** June 11, 2020

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 21366012), Jiangxi Provincial Department of Education Science and Technology Plan Project (No. GJJ170286).

Corresponding author: Xiangdong Zhu. Tel: +86-791-83813459; E-mail: zhuxdau@jxau.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 21366012), 江西省教育厅科技计划 (No. GJJ170286) 资助。

网络出版时间: 2020-06-16

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200615.1206.003.html>

monomeric compounds was analyzed by spectrum analysis, and their antitumor activity was measured using HTRF kinase detection kit. The isolated monomeric compounds 1-hydroxy-9,10-phenanthroline and 3-hydroxy-9,10-dihydrophenanthroline had significant antitumor activity. At 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1-hydroxy-9,10-phenanthroline and 3-hydroxy-9,10-dihydrophenanthroline inhibited $78.39\pm 2.29\%$ and $60.34\pm 8.35\%$ Aurora kinase A, respectively. Therefore, the secondary metabolites of *Pseudomonas aeruginosa* HBD-12 have the potential to develop antibacterial and antitumor drugs.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, bacteriostatic activity, secondary metabolite, isolation and purification, structural characterization, antitumor activity

微生物分布广泛, 因其次级代谢产物结构新颖、活性多样成为了微生物药物研发的重要资源^[1-2]。自从微生物次级代谢产物中提取出青霉素以来^[3], 沿用青霉素的制作方法, 人们又相继发现卡那霉素、红霉素、链霉素等常见抗生素, 并将其成功运用到了临床治疗当中^[4-6]。近年来, 随着医药领域的飞速发展, 存在于微生物次级代谢产物中的活性物质也越来越多地被发掘利用。舒雪纯等^[7]从粉红粘帚霉发酵提取物中分离得到 6 种化合物, 经检测发现所有化合物对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌等 4 种病原菌具有显著抑制活性。Yu 等^[8]从曲霉 *Aspergillus versicolor* 中得到 3 个四羟基蒽酮二聚体, 其中 5-epiasperdichrome 化合物对铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、溶血性弧菌等存在抑制作用; Chiba 等^[9]从一株梅花状青霉 FKI-7215 发酵液中分离得到产物 Herquiline A, 经研究发现该产物能够抑制流感病毒复制。丰富的微生物资源拓宽了微生物药物研发的来源, 但目前为止可在实验室培养的微生物仅占微生物总数的 1%^[10]。因此, 对微生物次级代谢产物的开发与研究显得十分重要。

此外, 采用生物转化技术进行结构修饰或改造化合物能够得到前体所不具有的新特征性化合物^[11-13]。Ma 等^[14]用枯草芽孢杆菌对甘草次酸进行微生物转化得到 5 种具有抗炎活性的新代谢产物。Yu 等^[15]对人参中的 Rb1、Re 及 Rg1 等成分进行了微生物转化, 产物的量和抗炎症的效果明显提高 ($P<0.05$)。匍匐根霉转化孕烯醇酮能产生对胆碱酯酶、酪氨酸酶抑制活性较母体更高的产物^[16]。近年来, 利用微生物转化甾体化合物并对其产物活性进行研究的学者也

日益增多^[17-18], 截至目前记录在案的甾醇类药物多达 300 余种, 成为仅次于抗生素的畅销药^[19]。

本研究中, 以孕烯醇酮为唯一碳源制作筛选培养基, 筛选到一株铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* HBD-12, 采用管碟法^[20]分别测定了该菌株对 8 种指示菌的抑菌活性, 并对 HBD-12 菌株的次生代谢产物进行初步分离纯化及结构鉴定, 以 Aurora A 为筛选模型对已分离的单体化合物进行抗肿瘤活性测定。期望此项研究能为微生物资源在甾醇类药物以及抗菌、抗肿瘤药物的研发应用提供科学的参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

土样: 于 2019 年 3 月, 采用五点取样法从武汉科技大学垃圾回收点所置放垃圾堆周围采取土样。

供试菌种: 指状青霉 *Penicillium digitatum*、大肠杆菌 *Escherichia coli*、苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis*、意大利青霉 *Penicillium italicum* 等均由江西农业大学生物科学与工程学院实验室提供。

试剂: 孕烯醇酮 (上海阿拉丁试剂有限公司); Sephadex LH20 (Pharmacia 公司, 美国); GF245 硅胶层析板 (青岛海洋化工有限公司); 甲醇、氯仿 (国药集团); HTRF 激酶检测试剂盒 (Cisbio 公司)。

1.2 仪器

旋转蒸发器 (EYELAN-1100, Tokyo Rikakikai Co.LTD.); 质谱仪 Agilent G6220A (Agilent, 美国); 核磁共振仪 Avance600 (Bruker

公司, 瑞士)。

1.3 培养基

马铃薯培养基 (g/L): 土豆 200, 葡萄糖 20, pH 自然。

富集培养基 (g/L): 土豆 200, 葡萄糖 20, 酵母膏 5, pH 自然。

筛选培养基 (g/L): 孕烯醇酮 1, SDS 0.5, KNO_3 1, MgSO_4 0.5, K_2HPO_4 0.5, NaCl 0.5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, 琼脂 20, pH 7.0。

1.4 菌落筛选

参照范丹等的方法^[21]稍作修改, 将 10 g 土样加入到盛有 90 mL 无菌水的锥形瓶中, 放置于 28 °C、180 r/min 的摇床中振荡培养 30 min, 静置后取上清液 1 mL 加入到富集培养基中, 30 °C、180 r/min 摇床中振荡培养 24 h, 从富集培养液中取 200 μL 加入到 100 mL 液体筛选培养基中, 30 °C、180 r/min 摇床中振荡培养 36 h, 经过 3 次转移培养之后, 取 200 μL 涂布于固体筛选培养基中, 30 °C 恒温培养箱倒置培养, 根据不同菌落形态挑出单菌落接种在斜面培养基中, 4 °C 冰箱进行保藏。

1.5 抑菌活性测定

活化分离到的菌株接种于发酵培养基中, 30 °C、180 r/min 摇床振荡培养至稳定期, 4 °C、5 000 r/min 冷冻离心 20 min 得到发酵上清液备用。将大肠杆菌、苏云金芽孢杆菌、意大利青霉、指状青霉等 4 株待测指示菌菌悬液按 1% 的接种量, 分别加入到冷却至 50 °C 左右的 LB 和 PDA 培养基中制备待测琼脂平板。利用管碟法对菌株进行抑菌活性测定, 在每个待测平板中放置 3 个牛津杯, 分别在牛津杯中加入 200 μL 无菌水、发酵液上清液、1/2 浓度发酵液上清液和 1/4 浓度发酵液上清液, 细菌指示菌 37 °C 恒温培养箱培养 1 d、真菌指示菌 28 °C 恒温培养箱培养 3 d 后, 观察是否有抑菌圈并测量其大小。

1.6 菌株的鉴定

挑取菌株划线接种于 LB 培养基上, 37 °C 恒温培养箱中培养 24 h 后观察菌株的形态特征, 并对菌株进行相关生理生化实验。

利用 Ezup 柱式细菌基因组提取试剂盒 (生工生物工程 (上海) 股份有限公司) 提取菌株基因组 DNA, 以 PrimerA (5'-AGTTTGATCMTGGCTCAG-3') 和 PrimerB (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 为上下游引物对菌株的 16S rDNA 进行扩增。PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测后, 切胶回收, 送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序, 获得序列上传到 GenBank 中进行 BLAST 序列分析比对, 用 MEGA (7.0) 软件中的邻接法 (Neighbor-Joining 法) 构建系统发育树^[22], 对该菌株的分类地位进行分析。

1.7 次级代谢产物的分离

菌体发酵液经离心得到上清液, 用等体积氯仿反复萃取发酵上清液 3 次, 然后用真空旋转蒸发器对有机相进行 40 °C 浓缩干燥, 用适量硅胶拌样, 干法上样后, 使用 200–300 目的硅胶层析柱进行分离, 洗脱剂氯仿: 甲醇=100:1、100:2、100:3、100:4 一直到 100:25 梯度洗脱, 每 30 mL 收集一馏分, 进行 TLC 分析检测, 合并相同馏分, 质量较大的合并相上样于 Sephadex LH-20 凝胶柱进行凝胶色谱分离, 洗脱剂甲醇: 氯仿=1:1 洗脱, 收集各馏分, TLC 分析检测, 合并相同组分, 质量较大的合并相用 Rp-C 18 反相色谱, 洗脱剂甲醇: 水=3:7、4:6、1:1、7:3、10:0 进行洗脱, TLC 分析检测, 合并相同组分, 对产物进行波谱鉴定分析。

1.8 化合物的结构鉴定

利用 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ (DEPT 90° 和 135°)、 $^2\text{D-NMR}$ (HSQC, HMBC) 等核磁共振波谱仪对分离产物进行分析, 氘代氯仿作为溶剂, 内标为四甲基硅烷, 再利用一级质谱图测定化合物的相对分子质量, 甲醇作为溶剂, 进一步验证所得化合物的结构。

1.9 抗肿瘤活性检测

用 DMSO 溶解两个单体化合物, 低温保存, 确保 DMSO 在最终反应体系中的浓度控制在不影响检测活性的范围之内。确定化合物浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 以 Aurora-A 激酶 (AURKA) 为筛选模型, 使用 HTRF 试剂盒 (Cisbio 公司提供) 检测活性。采用 HTRF 技术, 底物具有单磷酸化位点, 其一端接上生物素。在生物素端, 生物素能与 streptavidin-XL 665 (acceptor) 相连, 完成标记。而在经过磷酸化之后, 该底物与抗磷酸化位点的抗体 (已标有 Donor) 结合, 从而产生 FRET 信号。

2 结果与分析

2.1 筛选结果

通过筛选得到 3 株真菌、3 株细菌能以孕烯

醇酮作为唯一碳源进行生长繁殖, 分别对这 6 株菌进行纯化并保藏。

2.2 抑菌活性测定

经测定观察发现菌株 HBD-12 对大肠杆菌、苏云金芽孢杆菌、意大利青霉、指状青霉都有一定的抑菌活性 (图 1)。数据显示 (表 1), 抑菌活性随发酵液浓度的增加而增大 ($P < 0.05$)。

2.3 菌株的鉴定

菌株 HBD-12 的 16S rDNA 测序结果在 GenBank 中进行 Blast 比对分析, 上传序列号为 MK817578, 并绘制 Neighbor-Joining 系统发育树 (图 2), 系统发育树显示 HBD-12 菌株与铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* FDB 和 *Pseudomonas aeruginosa* OF4 亲缘关系最近。因此确定 HBD-12 菌株归为 *Pseudomonas aeruginosa*。

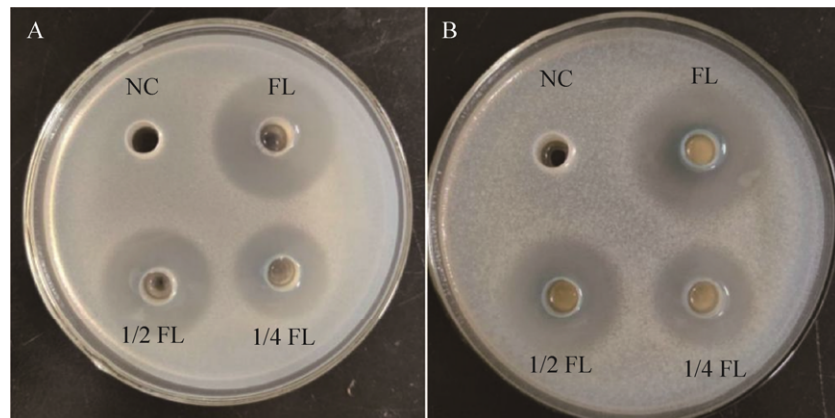


图 1 HBD-12 菌株对大肠杆菌 (A) 和苏云金芽孢杆菌 (B) 的抑制作用

Fig. 1 The inhibitory effects of *Pseudomonas aeruginosa* HBD-12 fermentation broth on *E. coli* (A) and *B. thuringiensis* (B). NC: negative control; FL: fermentation liquor.

表 1 HBD-12 菌株对指示菌的抑制作用

Table 1 The inhibitory effects of *Pseudomonas aeruginosa* HBD-12 fermentation broth on indicator bacteria

Indicator bacteria	Inhibition zone diameter (mm)		
	Fermentation liquid	1/2 Fermentation liquid	1/4 Fermentation liquid
<i>Escherichia coli</i>	37.23±0.25a	31.08±0.96b	25.10±1.69c
<i>Bacillus thuringiensis</i>	32.00±1.54a	26.10±1.43b	21.88±2.13c
<i>Penicillium italicum</i>	38.80±0.52a	30.12±2.02b	26.00±1.53c
<i>Penicillium digitatum</i>	39.30±1.18a	31.09±0.87b	25.27±1.57c

Different lowercase letters in the same line showed significant differences at 0.05 level.

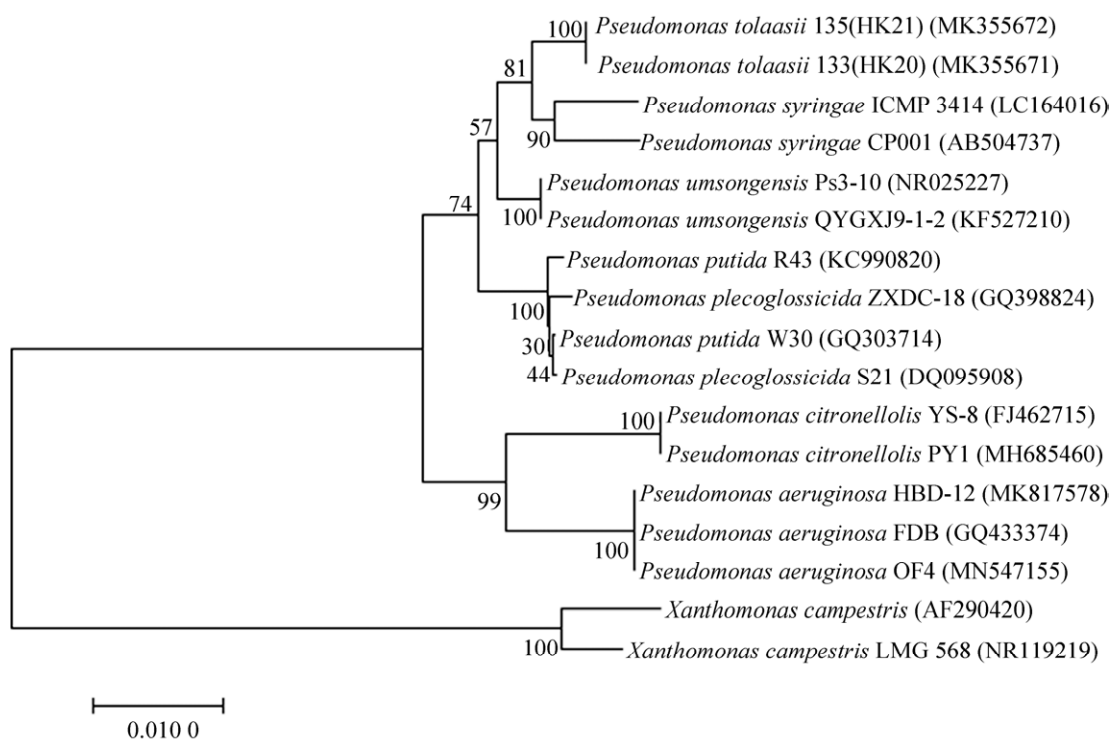


图 2 菌株 HBD-12 的系统发育聚类图 (邻接法)

Fig. 2 The Neighbor-Joining tree of strain HBD-12.

Pseudomonas aeruginosa HBD-12 菌株为革兰氏阴性杆菌, 37 °C 条件下在牛肉膏蛋白胨培养基中培养, 开始为蓝绿色, 培养 3 d 后颜色加深变为紫红色, 菌落光滑, 略微凸起, 呈粘稠状。光学显微镜下观察菌体为杆状, 长短不一 (图 3)。



图 3 菌株 *Pseudomonas aeruginosa* HBD-12 的菌落

Fig. 3 The morphology of the colony of *Pseudomonas aeruginosa* HBD-12.

2.4 菌株 HBD-12 次级代谢产物的分离

经过大批量发酵菌株 HBD-12 共获得 6 L 发酵液, 浓缩后用氯仿萃取得到 2 g 浸膏, 依次运用各分离技术分离纯化, 最终获得 2 个单一化合物, 其中化合物 HBD1 的质量为 24.1 mg, 化合物 HBD2 的质量为 4.2 mg。

2.5 菌株 HBD-12 次级代谢产物结构解析

化合物 1 (HBD-1) 的结构鉴定: 从 ^{13}C -NMR 谱可知, 化合物有 12 个碳信号。DEPT 图谱显示 7 个次甲基, 且在低磁场中, 化学位移值 δ 分别为 131.9、130.8、130.4、129.6、129.1、119.8 和 108.9, 还有 5 个季碳信号。负离子模式 ESI-MS 数据显示准分子离子峰质荷比 (m/z) 为 195.056 1 (计算为 195.055 8), 推测其化学式为 $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}$ 。由 HSQC 图谱可知氢的信号 δ 7.24、7.76、7.78、7.83、7.85、8.19 和 8.27 与碳信号 δ 108.9、131.9、119.8、130.4、130.8、129.1 和 129.6 相关, 综合

确定化合物 HBD1 为 1-羟基-9,10-二氮杂菲。

化合物 2 (HBD-2) 的结构鉴定: 从 ^{13}C -NMR 谱可知, 化合物有 12 个碳信号。DEPT 图谱显示 7 个次甲基, 低磁场中有 5 个季碳。ESI-MS 数据显准分子离子峰质荷比 (m/z) 为 197.071 6 (计算为 197.071 4), 推测化学式为 $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}$ 。由 HSQC 图谱可知氢的信号 δ 7.93、7.95、7.98、8.24、8.30、8.45 和 9.02 与碳信号 δ 131.8、131.1、129.4、129.1、129.7、134.3、136.0 相关。此外, 2 个 N 上的氢化学位移分别是 10.78 和 6.41。 ^1H - ^1H -SOCY 谱表明 δ 9.02 与 8.45 及 7.93 相关, 综上确定化合物 HBD2 为 3-羟基-9,10-二氢二氮杂菲。

2.6 化合物抑制 Aurora-A 活性测定

使用 Cisbio 公司的 HTRF 激酶检测试剂盒对浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 1-羟基-9,10-二氮杂菲 (HBD1) 和 3-羟基-9,10-二氢二氮杂菲 (HBD2) 进行活性检测, 实验结果显示, 两种化合物对 Aurora-A 均具有抑制活性 (表 2)。

3 讨论

铜绿假单胞菌次级代谢产物种类繁多, 主要包括生长素、铁载体、抗生素、酶和糖类等。据报道显示, Supothina 等^[23]从铜绿假单胞菌中分离出 12 种 4-羟基喹啉衍生物和 3 种吩嗪类生物碱, 它们分别表现出抗疟疾活性以及对癌症细胞的毒性作用。Gupta 等^[24]研究证明, 铜绿假单胞菌能够产生胞外几丁质酶可以防治癌细胞的转移并具有除菌作用。周莲等^[25]研究发现, 铜绿假单胞菌可产生申嗪霉素和吩嗪-1-酰胺, 提示了该菌株具有潜在的抗菌、抗肿瘤等生物活性。

表 2 活性物质对 Aurora-A 抑制

Table 2 Inhibition of compounds against Aurora-A

ID	Sample	Conc ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Type	Result (%)
1	HBD1	20	% Inhibition	78.39 \pm 2.29
2	HBD2	20	% Inhibition	60.34 \pm 8.35

在本研究中, 我们以孕烯醇酮作为唯一碳源制作筛选培养基, 对采自武汉科技学院的土样进行筛菌, 得到一株 *Pseudomonas aeruginosa* HBD-12, 经抑菌活性测定发现该菌株对大肠杆菌、苏云金芽孢杆菌、意大利青霉和指状青霉具有较强的抑制作用, 结合 Wang 等^[26]研究发现, 铜绿假单胞菌能够产生吩嗪-1-羧酸或吩嗪-1-甲酰胺类抗生素, 其中吩嗪-1-羧酸对多种植物病原菌具有抑制作用, 初步推测菌株 *Pseudomonas aeruginosa* HBD-12 次级代谢产物中可能含有吩嗪类化合物, 其在生防药物的研发中具有很好的应用价值。运用柱层析法分离该菌株次级代谢产物得到了 2 个单体化合物, 经波谱分析鉴定结果显示 HBD1 为 1-羟基-9,10-二氮杂菲, 质量为 24.10 mg; HBD2 为 3-羟基-9,10-二氢二氮杂菲, 质量为 4.20 mg。我们首次把 Aurora-A 激酶作为筛选模型, 测定两个化合物的抗肿瘤活性, 发现这两个化合物均能够抑制 AURKA 的活性, 其中化合物 1-羟基-9,10-二氮杂菲对 AURKA 的抑制率高达 78.39% \pm 2.29%。Katayama 等^[27]研究表明, 抑制 Aurora 激酶的活性会破坏细胞周期, 阻止细胞增殖, 引起多种类型的肿瘤细胞凋亡。后续研究可对该化合物进行肿瘤细胞系的验证试验, 以期可以将该化合物作为 Aurora 激酶的特异性抑制剂为肿瘤治疗提供新的资源。由于化合物质量较少, 未对单体化合物进行抑菌活性测定。研究发现, 转录调控因子 Pip 对铜绿假单胞菌吩嗪合成代谢具有促进作用, 提高了次生代谢产物的量^[28]。接下来可通过优化发酵工艺和条件或利用合成的方法进一步提高发酵效率, 并对该菌株的抑菌机理进行深入研究。

REFERENCES

- [1] Tao LY, Zhang YW, Li YQ, et al. Detection of volatile metabolites of *Trichoderma asperellum* and its analysis of antagonistic activity. *Chin J Biotech*, 2020, 36(6): 1–9 (in Chinese).

- 陶玲芸, 张怡雯, 李雅乾, 等. 棘孢木霉挥发性次级代谢产物检测及抑菌活性分析. 生物工程学报, 2020, 36(6): 1–9.
- [2] Quan CS, Liu J, Zhou W, et al. Isolation, purification and antitumor activity of Bacillomycin D from *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426. Chin J Biotech, 2018, 34(2): 235–245 (in Chinese).
权春善, 刘静, 周伟, 等. 解淀粉芽孢杆菌 Q-426 Bacillomycin D 的分离纯化及其抗肿瘤活性. 生物工程学报, 2018, 34(2): 235–245.
- [3] Yang SC, Lin CH, Sung CT, et al. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. Front Microbiol, 2014, 5: 241.
- [4] Zhang GZ, Luo YH. The advances of the research on macrolide antibiotics. Prog Veterin Med, 2004, 25(3): 33–36 (in Chinese).
张桂枝, 罗永煌. 大环内酯类抗生素研究进展. 动物医学进展, 2004, 25(3): 33–36.
- [5] Lee YR, Burton CE. Eravacycline, a newly approved fluorocycline. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2019, 38(10): 1787–1794.
- [6] Vázquez-Laslop N, Mankin AS. How macrolide antibiotics work. Trends Biochem Sci, 2019, 43(9): 668–684.
- [7] Shu XC, Zhang YB, Guan LL, et al. Antibacterial secondary metabolites of *Clonostachysrosea*, an endophytic fungus from *Blumeabalsamifera* (L.) DC. Chin J Biotech, 2020, 36(8): 1–10 (in Chinese).
舒雪纯, 张影波, 官玲亮, 等. 艾纳香内生真菌粉红粘帚霉抗菌次生代谢产物. 生物工程学报, 2020, 36(8): 1–10.
- [8] Yu GH, Wu GW, Sun ZC, et al. Cytotoxic Tetrahydroxanthone Dimers from the mangrove-associated fungus *Aspergillus versicolor* HDN1009. Mar Drugs, 2018, 16(9): 335.
- [9] Chiba T, Asami Y, Suga T, et al. Herquiline A, produced by *Penicillium herquei* FKI-7215, exhibits anti-influenza virus properties. Biosci Biotechnol Biochem, 2017, 81(1): 59–62.
- [10] Zhang ZY, Ding LJ, He S. Research Progress on *in situ* cultivation of uncultured microorganisms. Nat Prod Res Dev, 2018, 30(5): 907–913 (in Chinese).
张作艳, 丁立建, 何山. 未培养微生物原位培养技术研究进展. 天然产物研究与开发, 2018, 30(5): 907–913.
- [11] Restaino OF, Marseglia M, De Castro C, et al. Biotechnological transformation of hydrocortisone to 16 α -hydroxy hydrocortisone by *Streptomyces roseochromogenes*. Appl Microbiol Biotechnol, 2014, 98(3): 1291–1299.
- [12] De Pádua RM, Meitinger N, Filho JDDS, et al. Biotransformation of 21-*O*-acetyl-deoxycorticosterone by cell suspension cultures of *Digitalis lanata* (strain W. 1. 4). Steroids, 2012, 77(13): 1373–1380.
- [13] Sultan S, Noor MZBM, Anouar E, et al. Structure and absolute configuration of 20 β -hydroxyprednisolone, a biotransformed product of prednisolone by the marine endophytic fungus *Penicillium lapidosum*. Molecules, 2014, 19(9): 13775–13787.
- [14] Ma Y, Liu JM, Chen RD, et al. Microbial transformation of glycyrrhetic acid and potent neural anti-inflammatory activity of the metabolites. Chin Chem Lett, 2017, 28(6): 1200–1204.
- [15] Yu SS, Zhou XL, Li F, et al. Microbial transformation of ginsenoside Rb1, Re and Rg1 and its contribution to the improved anti-inflammatory activity of ginseng. Sci Rep, 2017, 7: 138.
- [16] Sultana N. Microbial biotransformation of bioactive and clinically useful steroids and some salient features of steroids and biotransformation. Steroids, 2018, 136: 76–92.
- [17] Bhatti HN, Khera RA. Biological transformations of steroidal compounds: a review. Steroids, 2012, 77(12): 1267–1290.
- [18] Andrushina VA, Druzhinina AV, Yaderets VV, et al. Hydroxylation of steroids by *Curvularia lunata* mycelium in the presence of methyl- β -cyclodextrine. Appl Biochem Microbiol, 2011, 47(1): 42–48.
- [19] Tong WY, Dong X. Microbial biotransformation: recent developments on steroid drugs. Recent Patents Biotechnol, 2009, 3(2): 141–153.
- [20] Han NN, Dai Q, Yu LN, et al. Influence of the differences of gentamicin components on the reliability test of the potency determination. Chin J Antibiot, 2018, 43(2): 211–215 (in Chinese).
韩宁宁, 戴青, 于丽娜, 等. 庆大霉素组分差异对效价测定可靠性测验的影响. 中国抗生素杂志, 2018, 43(2): 211–215.

- [21] Fan D, Xiong BJ, Pang CP, et al. Screening and optimization of cholesterol conversion strain. *Acta Microbiol Sin*, 2014, 54(10): 1161–1170 (in Chinese).
范丹, 熊冰剑, 庞翠萍, 等. 胆固醇转化菌株的筛选及发酵条件优化. *微生物学报*, 2014, 54(10): 1161–1170.
- [22] Wang RL, Xu WF, Wang F, et al. Isolation and identification of an antagonistic endophytic bacterium from mulberry for biocontrol against *Boeremia exigua*. *Acta Microbiol Sin*, 2019, 59(11): 2130–2143 (in Chinese).
王若琳, 徐伟芳, 王飞, 等. 桑树内生拮抗菌的分离鉴定及其对桑断枝烂叶病的生防初探. *微生物学报*, 2019, 59(11): 2130–2143.
- [23] Supong K, Thawai C, Supothina S, et al. Antimicrobial and anti-oxidant activities of quinoline alkaloids from *Pseudomonas aeruginosa* BCC76810. *Phytochem Lett*, 2016, 17: 100–106.
- [24] Gupta CP, Kumar B, Dubey RC, et al. Chitinase-mediated destructive antagonistic potential of *Pseudomonas aeruginosa* GRC₁ against *Sclerotinia sclerotiorum* causing stem rot of peanut. *Biocontrol*, 2006, 51(6): 821–835.
- [25] Zhou L, Jiang HX, Jin KM, et al. Isolation, identification and characterization of rice rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* PA1201 producing high level of biopesticide “Shenqinmycin” and phenazine-1-carboxamide. *Acta Microbiol Sin*, 2015, 55(4): 401–411 (in Chinese).
周莲, 蒋海霞, 金凯明, 等. 高产申嗪霉素和吩嗪-1-酰胺的水稻根际铜绿假单胞菌 PA1201 分离、鉴定与应用潜力. *微生物学报*, 2015, 55(4): 401–411.
- [26] Wang B, Waters AL, Sims JW, et al. Complex Marine Natural Products as Potential Epigenetic and Production Regulators of Antibiotics from a Marine *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Ecol*, 2013, 65(4): 1068–1075.
- [27] Katayama H, Sen S. Aurora kinase inhibitors as anticancer molecules. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1799(10/12): 829–839.
- [28] Zhang Y, Cui QN, Zhao Z, et al. Positive regulation in expression of the phenazine-producing operon *phz2* mediated by *pip* in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Acta Microbiol Sin*, 2013, 53(2): 127–135 (in Chinese).
张圆, 崔钦娜, 赵哲, 等. Pip 介导铜绿假单胞菌吩嗪基因簇 *phz2* 的表达. *微生物学报*, 2013, 53(2): 127–135.

(本文责编 郝丽芳)