

研究报告

白马雪山云南黄芪与灰毛康定黄芪根际微生物物种多样性及抗生物膜活性菌株筛选

陈成^{1,2}, 龚高芬^{1,2}, 梁锦有³, 窦峥嵘^{1,2}, 丁佳洁^{1,2}, 姜北^{1,2}, 王开玲^{*1,2}

1 云南省滇西抗病原植物资源筛选重点实验室(培育), 云南 大理 671000

2 大理大学药物研究所, 云南 大理 671000

3 深圳大学生命与海洋科学学院, 广东 深圳 518060

陈成, 龚高芬, 梁锦有, 窦峥嵘, 丁佳洁, 姜北, 王开玲. 白马雪山云南黄芪与灰毛康定黄芪根际微生物物种多样性及抗生物膜活性菌株筛选[J]. 微生物学通报, 2022, 49(9): 3813-3836

Chen Cheng, Gong Gaofen, Liang Jinyou, Dou Zhengrong, Ding Jiajie, Jiang Bei, Wang Kailing. Rhizosphere microbial diversity of *Astragalus yunnanensis* and *A. tatsienensis* var. *incanus* in Baima Snow Mountain and screening of microorganisms with anti-biofilm activity[J]. Microbiology China, 2022, 49(9): 3813-3836

摘要: 【背景】细菌生物膜是造成病原菌耐药性增强和持续感染的主要因素,但目前尚无针对抗菌膜的特效药物。特境植物根际微生物可产生大量具有提高宿主免疫功能的活性成分,极具抗生物膜药源开发潜力。【目的】了解滇西北高寒特境白马雪山分布的云南黄芪与灰毛康定黄芪植物根际微生物的物种多样性,并对可培养菌株进行抑菌与抗生物膜活性筛选。【方法】采用宏基因组技术结合传统微生物培养方法,对采自我国云南迪庆藏族自治州德钦县白马雪山的云南黄芪与灰毛康定黄芪的根际微生物进行物种多样性研究,并通过“孔板法”测定其可培养菌株发酵液乙酸乙酯粗浸膏的抗菌、抗生物膜活性。【结果】宏基因组测序结果显示,云南黄芪根际土壤样本中的微生物来自6门7纲8目8科9属10种,其中栖热菌属为优势菌群;灰毛康定黄芪根际土壤样本中的微生物来自6门8纲10目11科14属15种,其中慢生根瘤菌属为优势菌群。通过纯培养共获得145株可培养菌株,包括112株细菌和33株真菌。其中,云南黄芪根际细菌59株,共计16属35种,优势属为假单胞菌属和链霉菌属;根际真菌19株,共计4属5种,优势属为曲霉属;灰毛康定黄芪根际细菌53株,归属于16属29种,优势属为芽孢杆菌属与寡养单胞菌属;根际真菌14株,归属于3属4种,优势属为曲霉属。从不同种水平上选择51株细菌和7株真菌为

基金项目: 国家自然科学基金(32060032); 云南省科技厅基础研究专项面上项目(202001AT070022); 大理大学高层次人才科研经费专项(KYBS2021099)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (32060032); Basic Research Project of Department of Science and Technology of Yunnan Province (202001AT070022); Scientific Research Foundation for High-Level Talents of Dali University (KYBS2021099)

*Corresponding author: E-mail: kailingw@dali.edu.cn

Received: 2022-01-16; Accepted: 2022-04-15; Published online: 2022-06-08

代表菌株进行抗生素药源评估,发现5株细菌及1株真菌发酵液的乙酸乙酯粗浸膏具有中等至较强的抗革兰阳性菌活性,而且其中4株具有抗MRSA生物膜活性,最终确定了链霉菌属放线菌 *Streptomyces fulvissimus* KTA1 和曲霉属真菌 *Aspergillus fumigatus* YNF5 为潜力活性菌株。【结论】首次报道了滇西北地区高寒特境黄芪属植物根际微生物具有较好的物种多样性,而且具有一定的抗生素药用资源开发潜力。本研究对滇西北高寒特境特色植物来源的微生物资源开发利用与保护具有重要的借鉴意义。

关键词: 高寒特殊生境; 云南黄芪; 灰毛康定黄芪; 根际微生物; 抗菌; 抗生物膜

Rhizosphere microbial diversity of *Astragalus yunnanensis* and *A. tatsienensis* var. *incanus* in Baima Snow Mountain and screening of microorganisms with anti-biofilm activity

CHEN Cheng^{1,2}, GONG Gaofen^{1,2}, LIANG Jinyou³, DOU Zhengrong^{1,2}, DING Jiajie^{1,2}, JIANG Bei^{1,2}, WANG Kailing^{*1,2}

1 Yunnan Key Laboratory of Screening and Research on Anti-pathogenic Plant Resources from Western Yunnan (Cultivation), Dali 671000, Yunnan, China

2 Institute of Materia Medica, Dali University, Dali 671000, Yunnan, China

3 College of Life Sciences and Oceanography, Shenzhen University, Shenzhen 518060, Guangdong, China

Abstract: [Background] Bacterial biofilm is a major factor causing bacterial resistance and recurrent nosocomial infections. But up to now there have been no effective anti-biofilm drugs. Rhizosphere microorganisms of some plants in high-cold, special environment can produce large quantities of active components which can improve the host immunity, and are thought to be a medicinal resource with great anti-biofilm potential. [Objective] To understand the rhizosphere microbial diversity of *Astragalus yunnanensis* and *A. tatsienensis* var. *incanus* growing in Baima Snow Mountain, and to screen cultivable strains with antibacterial and anti-biofilm activities. [Methods] In this study, metagenomics and traditional culture-dependent methods were employed to explore the rhizosphere microbial diversity of *A. yunnanensis* and *A. tatsienensis* var. *incanus* from Baima Snow Mountain in Deqin County, Diqing Tibetan Autonomous Prefecture, Yunnan Province. The microplate assay was conducted for determining the antibacterial and anti-biofilm activity of these cultivable microbes. [Results] Metagenomic sequencing indicated that the rhizosphere microorganisms of *A. yunnanensis* samples belonged to 6 phyla, 7 classes, 8 orders, 8 families, 9 genera and 10 species, and *Thermus* was the dominant microflora. The rhizosphere microbes of *A. tatsienensis* var. *incanus* samples belonged to 6 phyla, 8 classes, 10 orders, 11 families, 14 genera and 15 species, and *Bradyrhizobium* was the dominant microflora. A total of 145 cultivable strains were obtained by pure cultivation, including 112 bacteria and 33 fungi. Among them, 59 bacterial strains of 16 genera and 35 species and 19 fungal strains of 4 genera and 5 species were isolated from the rhizosphere soil of *A. yunnanensis*, with *Streptomyces*, *Pseudomonas* and *Aspergillus* being predominant. The other 53 bacterial isolates of 16 genera and 29 species and 14 fungal

isolates of 3 genera and 4 species were derived from the rhizosphere soil of *A. tatsienensis* var. *incanus*, among which *Bacillus*, *Stenotrophomonas* and *Aspergillus* were the most abundant genera. For the screened microbes with antibacterial and anti-biofilm activity, 51 bacterial strains and 7 fungal strains were chosen at different species levels as representatives to explore their potential as medicinal resources of natural antibiotics. The crude ethyl acetate extract of the fermentation broth of 5 bacteria and 1 fungus were demonstrated to have moderate to strong activity against Gram-positive pathogens, and 4 strains of them showed anti-biofilm activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Finally, two microbial strains *Streptomyces fulvissimus* KTA1 and *Aspergillus fumigatus* YNF5 were considered as the promising bioactive strains. **[Conclusion]** It is reported for the first time that there is abundant species community composition in the rhizosphere microorganisms of *Astragalus* plants distributed in northwestern Yunnan province. These cultivable microorganisms could be regarded as a great medicinal source for the exploitation of natural antibiotics. This study was significant for utilization and protection of characteristic plants-associated microorganisms in high-cold, special environment of northwestern Yunnan.

Keywords: high-cold, special environment; *Astragalus yunnanensis*; *Astragalus tatsienensis* var. *incanus*; rhizosphere microorganism; antibacterial activity; anti-biofilm activity

生活在极寒冰川、动植物内环境、植物根际、温泉等特殊生态环境中的微生物被称作特殊生境微生物, 该类微生物为了应对异质环境往往会进化出独特的生态适应机制, 具有耐寒、耐压、耐高温等特性, 或可产生结构新颖独特、活性多样的次生代谢产物, 极具药源开发潜力^[1]。在植物根系与土壤交际的狭窄区域内存在较丰富的微生物群落, 区域内根际微生物与植物相互作用, 直接或间接影响自然生态系统中宿主植物群落的构成, 这些根际微生物也被视为植物的第二微生物组^[2]。近年的研究结果表明, 植物根际微生物在植物-土壤-微生物互作体系中占有重要地位, 尤其是特境植物根际微生物具有较丰富的群落构成, 在植物生长发育及免疫应答等方面具有重要作用, 极具药用资源开发潜力^[3]。

黄芪(*Astragalus*)作为多年生、深根系的草本药用植物, 其植物根际微生物的种类与数量明显高于非根际且根际效应明显^[4]。目前, 除药典记载的蒙古黄芪(*A. membranaceus* var. *mongholicus*)和少数几种被看作草地退化指示

植物的黄芪外, 在中国广泛分布的其他黄芪属植物的根际微生物资源研究至今未见详细报道。李冰圳等^[5]采用 Illumina MiSeq 高通量测序技术比较了蒙古黄芪在不同生长期根际土壤的微生物物种多样性, 结果显示蒙古黄芪的根际优势菌群主要为放线菌门、变形菌门、厚壁菌门和绿弯菌门。Sun 等^[6]采用 16S rRNA 基因和 ITS 扩增子测序技术检测了蒙古黄芪根际土壤中细菌和真菌的物种组成, 发现该种黄芪根际中的优势菌群主要为放线菌门、厚壁菌门、酸杆菌门、子囊菌门和担子菌门。李敬科^[7]采用纯培养方法和 16S rRNA 基因扩增子测序技术分析了青藏高原的毛柱黄芪、团垫黄芪、密花黄芪、云南黄芪、笔直黄芪和丛生黄耆等 6 种黄芪属植物根际土壤细菌的多样性, 从这 6 种黄芪根际土壤样本中分离得到了共 9 个属 23 个种的细菌, 并报道这 6 种黄芪属植物根际土壤样本中细菌的优势菌门主要分布在变形菌门、厚壁菌门和放线菌门。

我国滇川藏交界高海拔地区为中国黄芪属植物的主要分布区域之一, 生长着众多应用价

值较高的黄芪属植物, 部分为该地区特有种, 但该地区地形复杂、人迹罕至, 有关黄芪属植物及其微生物资源的研究认识与开发利用程度均很低^[8-12]。本课题组前期进行滇西北药用植物资源分布调查时发现, 在我国云南省迪庆藏族自治州德钦县白马雪山自然保护区少量分布着云南黄芪(*Astragalus yunnanensis*)与灰毛康定黄芪(*A. tatsienensis* var. *incanus*), 其中灰毛康定黄芪为狭窄分布于香格里拉地区的特有种, 而且目前仅有滇西北高寒特境黄芪云南黄芪与灰毛康定黄芪地下部分化学成分的研究报道^[13-14], 未见其微生物资源的相关报道。白马雪山地处横断山脉中段, 金沙江、澜沧江、怒江三江并流核心地带, 平均海拔逾 4 000 m, 大部分平缓地带常年被积雪与冰川覆盖。生长于白马雪山流石滩石隙或陡坡中的这两种黄芪属植物根系错杂, 长年经受低温、低压、强紫外、寡营养的生态环境考验, 其根际微生物在宿主植物与复杂生态环境的驱动下可能具有较丰富特殊的物种群落构成, 较易产生结构新颖、活性多样的次生代谢产物, 药用资源潜力亟待开发。

细菌生物被膜(bacterial biofilm)是由附着于实体表面的细菌包裹于自身分泌的含水聚合性基质所组成的结构性细菌种群, 是引起细菌耐药性增强和持续性感染的主要因素之一^[15]。目前尚无针对细菌生物膜的特效治疗药物, 抗生素仍为主要治疗手段, 但近年临床主要病原菌耐药率逐年上升, 研发具有新作用靶点的高效低毒抗菌药物已成为临床对抗病原菌感染的迫切需要。目前, 特境来源微生物的药源潜力挖掘已成为抗菌、抗菌膜天然药物研发的新趋势, 而且主要集中于海洋环境^[16], 高海拔特境植物根际微生物的研究目前仍集中于微生物-植物互作相关方面, 其作为药用资源的开发鲜有报道。

目前人类对微生物的认知依旧存在极大的局限性, 生态环境中仍然存在大量的不可培养或难培养微生物, 仅有小部分可培养微生物被发现并加以利用^[17]。应用宏基因组测序等免培养现代分子生物学技术研究微生物群落物种构成, 可帮助人们宏观认识植物根际微生物的物种多样性, 加深对环境与生态互作的理解。然而, 要具体挖掘微生物的药用潜力, 深入分析微生物的次生代谢产物化学多样性及其抗菌、抗生物膜活性与作用机制, 还需要使用传统分离技术获得纯培养菌株。

本研究应用宏基因组测序技术宏观认识滇西北白马雪山分布的云南黄芪与灰毛康定黄芪根际微生物的物种多样性, 同时采用传统微生物纯培养方法对这两种植物的根际微生物进行分离、培养与发酵, 通过“孔板法”对可培养菌株发酵液乙酸乙酯粗浸膏进行抑菌及抗生物膜活性测定, 以期增强人们对滇西北高寒特境微生物药用资源的认识, 发掘可产生具有新颖化学结构和优良抗菌、抗生物膜活性次生代谢产物的微生物菌株, 从而将抗生素药源开发拓展至目前研究较少的滇西北高寒特境特色植物来源的微生物, 为我国高寒特境微生物药源研发提供数据支撑与技术参考。

1 材料与方法

1.1 样品采集

样品于 2020 年 6 月(云南黄芪、灰毛康定黄芪花果期)采自云南省迪庆藏族自治州德钦县白马雪山流石滩(28°23′–28°25′N, 99°10′–99°12′E, 海拔 4 420–4 479 m), 植物经大理大学药物研究所姜北教授鉴定为云南黄芪(*Astragalus yunnanensis*)与灰毛康定黄芪(*A. tatsienensis* var. *incanus*)。将黄芪根系完整刨出后, 抖落松散土壤, 植物全株及根系紧密附着

土壤装入无菌自封袋, 低温运输至实验室, 4 °C冰箱保存, 48 h内完成涂布处理。样点信息及土壤理化性质见表1。

1.2 供试菌株、培养基、主要试剂和仪器

供试菌株: 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) ATCC 43300、金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) ATCC 29213、表皮葡萄球菌 (*S. epidermidis*) ATCC 12228、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) ATCC 13813、单增李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) ATCC 19115、粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) ATCC 29212、屎肠球菌 (*E. faecium*) ATCC 35667、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) ATCC 6051、铜绿假单胞菌 PAO1 (*Pseudomonas aeruginosa*) ATCC 15692 和大肠杆菌 (*Escherichia coli*) ATCC 25922, 以上菌株由深圳大学生命与海洋科学学院提供, 本实验室鉴定并保藏。

R2A 培养基: 酵母提取物 0.5 g, 蛋白胨 0.5 g, 酪蛋白水解物 0.5 g, 葡萄糖 0.5 g, 可溶性淀粉 0.5 g, 磷酸氢二钾 0.3 g, 无水硫酸镁 0.024 g, 丙酮酸钠 0.3 g, 琼脂 15.0 g, 蒸馏水定容至 1 L, 调节 pH 至 7.0±0.2, 广东环凯微生物科技有限公司; PDA 培养基: 马铃薯 200.0 g, 葡萄糖 20.0 g, 琼脂 15.0 g, 蒸馏水定容至 1 L, 自然 pH, 阿拉丁试剂(上海)有限公司; PDB 液体培养基: 马铃薯 200.0 g, 葡萄糖 20.0 g, 蒸

馏水定容至 1 L, 自然 pH, 阿拉丁试剂(上海)有限公司; SGTYP 培养基: 可溶性淀粉 5.0 g, 葡萄糖 5.0 g, 胰蛋白胨 1.0 g, 蛋白胨 1.0 g, 酵母提取物 1.0 g, 蒸馏水定容至 1 L, 调节 pH 至 7.5±0.2, 阿拉丁试剂(上海)有限公司; LB 培养基: 胰蛋白胨 10.0 g, 酵母提取物 5.0 g, 氯化钠 10.0 g, 蒸馏水定容至 1 L, 调节 pH 至 7.2–7.4, 阿拉丁试剂(上海)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; 真菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒、PCR 扩增引物及 PCR 试剂 Taq PCR Master Mix (2×, blue dye), 生工生物工程(上海)股份有限公司; DNeasy PowerSoil Kit 土壤基因组 DNA 提取试剂盒, Qiagen 公司; Lysis Buffer for Microorganism to Direct PCR, TaKaRa BIO 株式会社。PCR 仪, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 旋涡振荡器, Scientific Industries 公司; 琼脂糖凝胶电泳仪, Bio-Rad 公司。

1.3 黄芪根际微生物宏基因组学研究

1.3.1 宏基因组 DNA 的提取

取采集的土壤, 使用 DNeasy PowerSoil Kit 提取微生物宏基因组 DNA, 采用紫外分光光度计与琼脂糖凝胶电泳对提取的 DNA 进行质检。获取的 DNA 样本用 Illumina TruSeq Nano DNA LT 文库制备试剂盒处理, 使用 Illumina HiSeq X-Ten Platform 进行双端测序并构建测序文库。

表 1 云南黄芪与灰毛康定黄芪根际土壤采样点位置及土壤理化性质

Table 1 Geographical location and physicochemical properties of rhizosphere soil samples from *Astragalus yunnanensis* and *A. tatsienensis* var. *incanus*

来源植物 Source	地理位置 Geo-location	pH	有机质 OM (%)	全氮 TN (%)	全磷 TP (%)	全钾 TK (%)	铵态氮 NH ₄ ⁺ -N (mg/kg)	硝态氮 NO ₃ ⁻ -N (mg/kg)	有效磷 AP (mg/kg)	有效钾 AK (mg/kg)
<i>Astragalus yunnanensis</i>	28°23'N, 99°10'E	7.59	38.14	1.07	0.26	1.03	49.57	11.07	36.94	103.35
<i>A. tatsienensis</i> var. <i>incanus</i>	28°25'N, 99°12'E	7.52	41.29	1.58	0.21	1.26	55.44	20.57	25.91	152.37

1.3.2 数据分析

使用 Cutadapt 软件(V1.2.1)删去测序读数接头, 去除低质量读数。基于 mpa_v30_CHOCOPhlAn_201901 数据库, 利用 MetaPhlan3 对处理过的数据进行物种注释, 获取环境中微生物的丰度。使用 GraPhlan 软件^[18]分析并构建黄芪根际微生物群落结构图。使用 KEGG GhostKOALA 工具对蛋白序列进行在线功能注释。

1.3.3 数据上传

云南黄芪与灰毛康定黄芪根际微生物测序原始数据已上传至 NCBI SRA 中, 登录号为 PRJNA813356。

1.4 样品分离培养方法

1.4.1 样品涂布

土壤浸渍汁准备: 刮取 1 g 附着于植物根系的土壤样品和无菌蒸馏水以 1:1 (质量体积比)的比例混合, 28 °C、150 r/min 振荡 4 h, 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液备用。

以上所得浸汁以稀释涂布法(10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} g/mL)分别吸取 200 μ L 稀释液均匀涂布于 R2A 和 PDA 培养基, 将已涂布平板置于 28 °C 恒温箱中倒置培养 2–5 d。

1.4.2 菌株分离与纯化

体视显微镜下观察并挑取颜色、大小、形态不一的单菌落反复分离纯化, 直至获得纯化菌株。挑取纯化后的细菌单菌落接种至 LB 液体培养基, 真菌则挑取少量边缘菌丝接种至 PDB 液体培养基, 28 °C、150 r/min 培养 2–3 d 后, 加入一定量的甘油配制成 15%甘油-菌液混合液置于冻存管中, 保藏于-80 °C 冰箱。

1.5 菌种鉴定

细菌 DNA 分子提取依照试剂盒说明进行, 以所得 DNA 样品为模板进行 16S rRNA 基因的 PCR 扩增, 引物为 27F (5'-AGAGTTTGAT

CCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGGCTACC TTGTTACGACTT-3')。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s; 56 °C 30 s; 72 °C 2 min; 共 32 个循环; 72 °C 8 min。真菌 DNA 分子提取使用裂解液(Lysis Buffer for Microorganism to Direct PCR)进行, 挑取少量菌丝置于含有 50 μ L Lysis Buffer 的离心管中搅动数下, 菌液 80 °C 热变性 15 min 后 3 000 r/min 离心 30 s, 取 2 μ L 上清液作为 PCR 反应模板, 以 ITS1 (5'-TCCGT AGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4 (5'-TCCGTA GGTGAACCTGCGG-3')为引物进行 PCR 扩增。将符合条件的 PCR 扩增产物委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。使用 BioEdit 观察基因序列峰图, 挑选测序成功的序列剪辑拼接, 在 NCBI GenBank 中进行相似性比较, 以相似度最高(97%–100%)的已知参考菌株作为标准, 确定菌株物种信息。细菌纯培养菌株的 16S rRNA 基因测序数据与真菌纯培养菌株 18S rRNA 基因测序数据已全部上传至 NCBI GenBank, 登录号分别为 OM841569–OM841680 与 OM841682–OM841714。

1.6 菌株小规模发酵培养及其发酵液乙酸乙酯粗浸膏的获得

挑取已纯化的细菌接种至 LB 液体培养基中, 28 °C、160 r/min 培养 1–2 d, 将培养好的种子液以 10%接种量转接到 100 mL SGTYP 培养基中, 置于 28 °C、150 r/min 摇床上培养 3 d。真菌则挑取 0.3 g 左右的菌体接种至 100 mL PDB 培养基内, 28 °C、150 r/min 培养 3 d 后吸取 20 mL 种子液转接至大米培养基(80 g 大米加入 100 mL 蒸馏水)中, 28 °C 静置培养 30 d。所得发酵液均以 1:1.5 (体积比)的乙酸乙酯萃取, 摇晃均匀, 静置 12 h 后回收乙酸乙酯, 粗提物用少量甲醇转移至 2 mL 离心管中, 挥干后加

入二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)溶解至母液浓度为 25 mg/mL (细菌)或 50 mg/mL (真菌)备用。

1.7 可培养菌株发酵液乙酸乙酯粗浸膏的化学筛选与排重

使用 HPLC 对菌株发酵液的乙酸乙酯粗浸膏进行化学筛选, 以空白 SGTYP 培养基(细菌)或 PDB 培养基(真菌)为对照, 挑选含有非培养基组分的菌株发酵液乙酸乙酯粗浸膏进行活性测定。

高效液相色谱仪: 安捷伦 Agilent 1260; 色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C18 (规格 5 μm , 4.6 mm \times 250 mm); 色谱条件: 流速 1.0 mL/min, 进样量 5 μL ; 检测波长: 190、210、254 和 330 nm; 流动相: 水(A)-甲醇(B)。细菌发酵液乙酸乙酯粗浸膏梯度洗脱程序: 0–35 min, 5%–100% B; 35–40 min, 100% B; 40–41 min, 100%–5% B; 41–46 min, 100% B。真菌发酵液乙酸乙酯粗浸膏梯度洗脱程序: 0–45 min, 5%–100% B; 45–50 min, 100% B; 50–52 min, 100%–5% B; 52–57 min, 100% B。

1.8 抗菌活性测定

参考文献[16,19], 使用“孔板法”对可培养菌株发酵液的乙酸乙酯粗浸膏进行抑菌活性测定。挑取平板单菌落接种至含有 4 mL LB 培养基的 15 mL 离心管中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 培养 8–12 h, 将菌液稀释至 5×10^5 CFU/mL, 取 1 mL 稀释后的种子液加入 48 孔板中, 采取倍半稀释法将受试菌株发酵产物粗提物分别稀释至 100、50、25、12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 24 h, 酶标仪测量各孔的吸光度以检测 MRSA 生长状况。2 μL DMSO 作为阴性对照, 终浓度 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的万古霉素作为阳性对照, 另设空白对照, 每个浓度 3 个复孔。

1.9 抗 MRSA 生物膜活性测定

抗生物膜活性主要包括抑制生物膜生长和清除成熟生物膜两部分, 选取 MRSA ATCC 43300 生物膜为受试对象, 参考文献[16,19-20]的方法进行抗 MRSA 生物膜活性测定。

1.9.1 抑制 MRSA 生物膜形成活性筛选

挑取 MRSA 单菌落置于 LB 液体培养基 37 $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 培养过夜, 菌液稀释至约 5×10^5 CFU/mL, 24 孔板每孔加入 1 mL 菌液, 参照 1.7 的方法加入样品至 100、50、25、12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。2 μL DMSO 作为阴性对照, 终浓度 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的万古霉素作为阳性对照。置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养, 24 h 后弃上层菌液, 加入同体积灭菌 PBS 溶液反复洗涤 3 次, 弃去板内液体, 37 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 30 min 后向每孔加入 1 mL 的结晶紫(0.1%)静置 10 min, 以流水小心清洗孔板, 用 1 mL 30%的乙酸溶液溶解底部染色生物膜, 酶标仪测定各孔 OD_{550} 。

1.9.2 清除成熟 MRSA 生物膜活性筛选

吸取浓度为 5×10^5 CFU/mL 的 MRSA 菌液 1 mL 加入 24 孔板, 孔板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养, 24 h 后弃菌液, 加入同体积灭菌 PBS 溶液反复洗涤 2 次。以 LB 培养基将菌株乙酸乙酯粗浸膏稀释至 300、200、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 取 1 mL 稀释样品加入洗涤后的孔板中, 另设空白对照组、阴性对照组(2 μL DMSO)与万古霉素组(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 每个组别 4 个复孔。加液后的孔板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养, 参照 1.8 方法对孔板进行染色并测定 OD_{550} 。

2 结果与分析

2.1 云南黄芪与灰毛康定黄芪根际微生物 DNA 提取质量结果

分别抽提云南黄芪与灰毛康定黄芪根际土

壤微生物基因组 DNA, 经 Picogreen 荧光检测, 云南黄芪根际土壤 DNA 总量为 0.386 μg , 荧光浓度为 7.72 $\text{ng}/\mu\text{L}$; 灰毛康定黄芪根际土壤 DNA 总量为 0.410 μg , 荧光浓度为 8.20 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 其样品质量符合宏基因组建库需要。

2.2 基于宏基因组测序进行云南黄芪与灰毛康定黄芪根际微生物多样性分析

使用 GraPhlAn 分别构建云南黄芪与灰毛康定黄芪根际微生物群落结构分支图(图 1), 并对云南黄芪与灰毛康定黄芪根际土壤微生物的操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)在门和属水平进行归类和整理(图 2)。如图 2 所示, 在门水平, 云南黄芪根际微生物主要隶属于 6 个门, 其中, 异常球菌-栖热菌门(*Deinococcus-Thermus*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、浮霉菌门(*Planctomycetes*)和硝化螺旋菌门(*Nitrospirae*)共占比 99%以上, 异常球菌-栖热菌门相对丰度可达 47.62%, 变形菌门丰度达 42.15%, 放线菌门、浮霉菌门和硝化螺旋菌门分别占比 3.85%、3.67%和 1.76%, 绿弯菌门(*Chloroflexi*)占比仅 0.96%。灰毛康定黄芪根际微生物主要隶属于变形菌门、异常球菌-栖热菌门、放线菌门、浮霉菌门、衣原体门(*Chlamydiae*)与绿弯菌门, 丰度分别占比 44.35%、16.75%、15.72%、12.33%、6.69%和 4.16%。云南黄芪根际物种丰度较高的目主要有栖热菌目(*Thermales*)、伯克氏菌目(*Burkholderiales*)及根瘤菌目(*Rhizobiales*), 灰毛康定黄芪根际微生物物种丰度较高的目主要为根瘤菌目、栖热菌目、嗜热油菌目(*Thermoleophilales*)与 *Planctomycetia*。两组样品差异较大的科为衣原体科(*Chlamydiaceae*)、伊索菌科(*Isosphaeraceae*)、出芽菌科(*Gemmataceae*)和肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)。

基于属水平的比较分析表明, 云南黄芪根际土壤样本中相对丰度大于 1%的属主要有栖热菌属(*Thermus*, 47.62%)、极地单胞菌属(*Polaromonas*, 24.36%)、慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*, 9.48%)、博斯氏菌属(*Bosea*, 8.31%)、*Fimbriiglobus* (3.67%)、栖热嗜油菌属(*Thermoleophilum*, 3.11%)与硝化螺菌属(*Nitrospira*, 1.76%)等 7 个属。灰毛康定黄芪根际样本中丰度大于 1%的菌属从高到低依次为慢生根瘤菌属(22.64%)、栖热菌属(16.75%)、栖热嗜油菌属(13.78%)、*Paludisphaera* (2.75%)、衣原体属(*Chlamydia*, 6.69%)、博斯氏菌属(6.34%)、贪噬菌属(*Variovorax*, 6.13%)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*, 4.37%)、*Nitrolancea* (4.16%)、极地单胞菌属(2.75%)、*Patulibacter* (1.94%)、*Rhodospirillales_unclassified* (1.73%)和出芽菌属(*Gemmata*, 1.20%)等 13 个属。

从以上结果可以看出, 异常球菌-栖热菌门、变形菌门、放线菌门与浮霉菌门为云南黄芪与灰毛康定黄芪根际微生物群落中共有的相对丰度较高的门, 栖热菌属、极地单胞菌属、慢生根瘤菌属、博斯氏菌属与栖热嗜油菌属为共有的相对丰度较高的属。云南黄芪根际微生物中硝化螺旋菌门与隶属该门的硝化螺旋菌属细菌占有一定优势地位(相对丰度大于 1%), 但该门未在灰毛康定黄芪根际微生物中检测到。此外, 衣原体此类特殊原核生物在灰毛康定黄芪根际微生物群落中有着更高的丰度占比。值得关注的是, 在属水平上, 云南黄芪根际微生物的分布更为集中, 相对丰度大于 1%的属共 7 个; 而灰毛康定黄芪根际微生物物种多样性更为丰富, 相对丰度大于 1%的属共 13 个, 优势属相对丰度比差距较小。

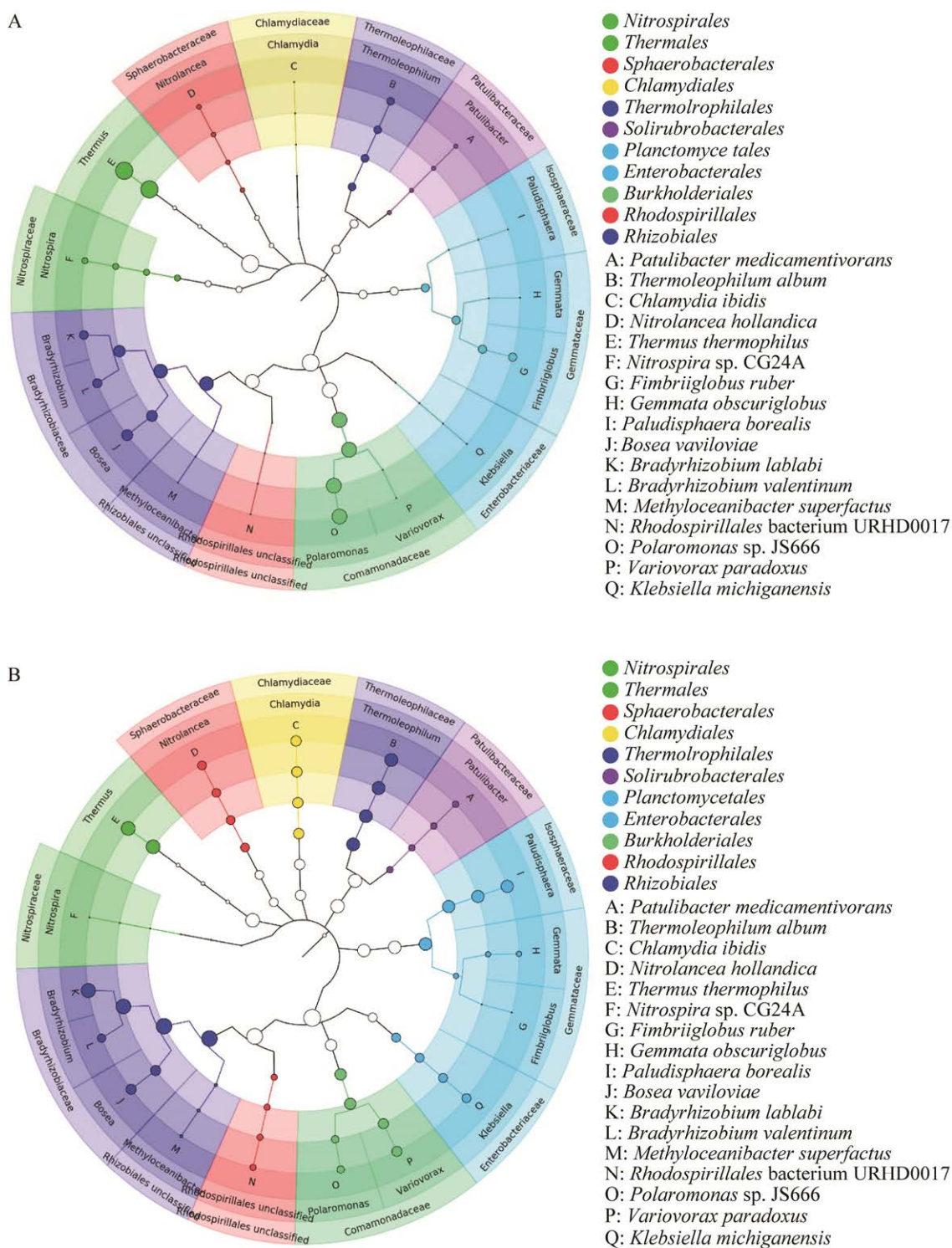


图 1 基于 GraPhlAn 的云南黄芪(A)与灰毛康定黄芪(B)根际土壤样本总体分类等级树图
 Figure 1 Phylogenetic tree of the *Astragalus yunnanensis* (A) and *A. tatsienensis* var. *incanus* (B) rhizosphere soil samples based on GraPhlAn.

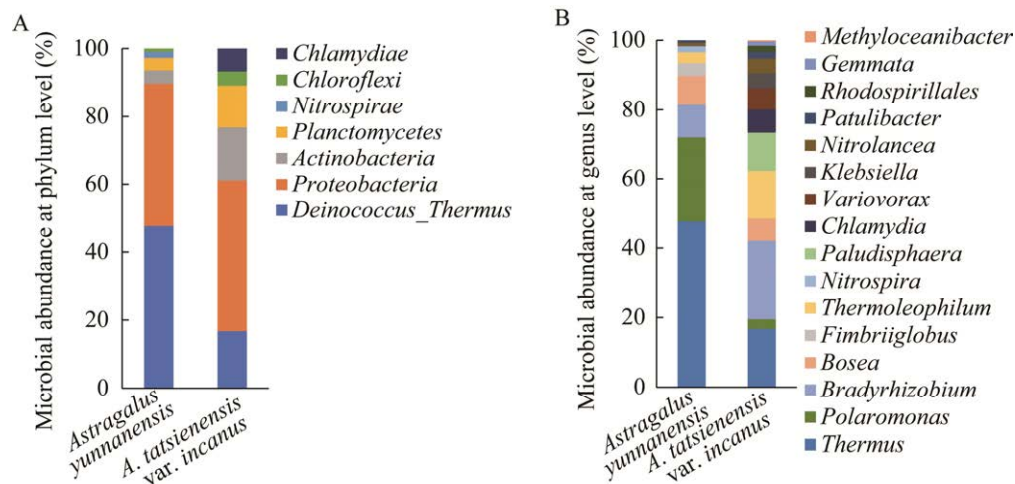


图 2 依据宏基因组测序结果分析云南黄芪与灰毛康定黄芪根际微生物在门(A)及属(B)水平上的组成
Figure 2 The microbial composition of *Astragalus yunnanensis* and *A. tatsienensis* var. *incanus* rhizosphere at the phylum (A) and genus (B) levels analyzed by metagenomics methods.

2.3 云南黄芪与灰毛康定黄芪植物根际微生物功能预测

使用 KEGG GhostKOALA 在线模块对云南黄芪与灰毛康定黄芪根际微生物群落的潜在功能进行预测(表 2), 云南黄芪与灰毛康定黄芪根际微生物基因组中, 丰富度较高的代谢通路基本一致, 主要富集在代谢与次生代谢产物的生物合成方面。在代谢与生物合成相关通路之中, 萜类骨架的生物合成 (terpenoid backbone

biosynthesis, 0.02%)、异喹啉生物碱生物合成 (isoquinoline alkaloid biosynthesis, 0.01%)、莜菪烷、哌啶与吡啶生物合成 (tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis, 0.01%) 与链霉素的生物合成 (streptomycin biosynthesis, 0.01%) 较其他生物合成通路有较高的丰富度, 提示在云南黄芪与灰毛康定黄芪根际微生物的次生代谢产物中, 含有萜类或生物碱的可能性较高。

表 2 云南黄芪与灰毛康定黄芪根际土壤微生物 KEGG 功能注释

Table 2 Functional annotation of KEGG in rhizosphere soil microorganisms of *Astragalus yunnanensis* and *A. tatsienensis* var. *incanus* (%)

功能类别	云南黄芪	灰毛康定黄芪
Functional category	<i>Astragalus yunnanensis</i>	<i>A. tatsienensis</i> var. <i>incanus</i>
代谢途径 Metabolic pathway	1.41	1.03
次生代谢产物的生物合成	0.46	0.32
Biosynthesis of secondary metabolites		
不同环境中的微生物代谢	0.40	0.30
Microbial metabolism in diverse environments		
ABC 运输 ABC transporters	0.19	0.14
辅助因子生物合成 Biosynthesis of cofactors	0.18	0.12
碳代谢 Carbon metabolism	0.15	0.10
双组分系统 Two-component system	0.14	0.10
氨基酸的生物合成 Biosynthesis of amino acids	0.12	0.08
嘌呤代谢 Purine metabolism	0.09	0.07
MAPK 信号通路 MAPK signaling pathway	0.08	0.06

2.4 云南黄芪与灰毛康定黄芪植物根际可培养微生物的物种多样性

对云南黄芪和灰毛康定黄芪植物根际样品进行了微生物分离、纯化、培养与物种鉴定(表 3), 共分离得到 112 株细菌, 分属于 4 个门 6 个纲 23 个属和 51 个种。如图 3 所示, 分离自云南黄芪根际的 59 株细菌主要归属于变形菌门、放线菌门、厚壁菌门和拟杆菌门, 分别占总分离菌株的 50.85%、33.90%、13.56%和 1.69%。从属水平上看, 变形菌门中的假单胞菌属最多, 共分离得到 10 株, 属于 6 个种; 第二大优势属为放线菌门中的链霉菌属, 共分离得到 9 株, 属于 5 个种; 其次为芽孢杆菌属(*Bacillus*)与节杆菌属(*Arthrobacter*), 分别分得 7 株与 6 株, 归于各自属内的 3 个种和 5 个种。从灰毛康定黄芪根际共分离得细菌 53 株, 与云南黄芪根际可培养细菌相较而言缺少来自拟杆菌门的分离株, 菌株分布在 16 个属 29 个种。灰毛康定黄芪根际可培养细菌更多为变形菌门, 共 32 株, 占比 60.38%; 其次为厚壁菌门, 共 13 株, 占比 24.53%; 另有 8 株放线菌门细菌占比 15.09%。从灰毛康定黄芪根际分离得到的可培养细菌中, 厚壁菌门的芽孢杆菌属数量最多, 共分离得到 12 株, 属于 4 个种; 其次为寡养单胞菌属, 分得 11 株, 归于 2 个种; 同时相对丰度大于 10%的还有假单胞菌属, 分得 7 株, 属于 4 个种。假单胞菌属与芽孢杆菌属为这两种黄芪根际可培养细菌的共有优势菌群。如表 4 所示, 从云南黄芪和灰毛康定黄芪根际样品分别得到 19 和 14 株真菌。其中, 云南黄芪的 19 株根际真菌分别属于曲霉属、青霉属(*Penicillium*)、篮状菌属(*Talaromyces*)及木霉属(*Trichoderma*), 共 4 属 5 种; 灰毛康定黄芪的 14 株根际真菌分别属于曲霉属、青霉属及弯颈霉属(*Tolypocladium*), 共 3 属 4 种。曲霉属真菌在上述两种黄芪根际可培养真菌中均占有优势

地位, 其根际可培养曲霉属菌株数目占比均达到 80%以上。以上研究结果表明云南白马雪山高寒特境云南黄芪与灰毛康定黄芪根际微生物的物种多样性较丰富。

综合比较分析宏基因组测序与纯培养分离所得微生物群落构成的结果可知, 在门水平上, 免培养法与传统培养方法所得微生物优势菌群具有一定的相似性。例如, 本研究中利用传统分离培养模式分离得到的云南黄芪根际微生物的两大优势门变形菌门(50.85%)与放线菌门(33.90%)在宏基因组测序结果中同样占有优势地位(变形菌门相对丰度为 42.15%, 放线菌门相对丰度为 3.85%); 灰毛康定黄芪根际可培养微生物优势门变形菌门(60.38%)与放线菌门(15.09%)在宏基因组测序中也同样占有优势地位(变形菌门相对丰度为 44.35%, 放线菌门相对丰度为 15.72%)。但从属这一分类水平上看, 采用高通量测序构建的云南黄芪与灰毛康定黄芪根际微生物群落结构中占主要优势的栖热菌属、极地单胞菌属、慢生根瘤菌属与博斯氏菌属等, 均未能通过传统分离培养技术分离得到。

2.5 黄芪根际可培养微生物次生代谢产物的抑菌活性

通过“孔板法”^[16,19]选取可培养代表性 51 株细菌和 7 株真菌发酵液的乙酸乙酯粗浸膏进行抗菌活性测定, 发现部分菌株发酵液的乙酸乙酯粗浸膏对金黄色葡萄球菌 ATCC 29213、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 ATCC 43300、单增李斯特菌 ATCC 19115、表皮葡萄球菌 ATCC 12228、粪肠球菌 ATCC 29212、屎肠球菌 ATCC 35667、枯草芽孢杆菌 ATCC 6051 及无乳链球菌 ATCC 13813 等 8 株革兰氏阳性菌表现出一定的抑菌活性(表 5 与表 6)。但是所测粗浸膏对革兰氏阴性菌铜绿假单胞菌 PAO1 与大肠杆菌 ATCC 25922 均无明显抑制作用(最小抑菌浓度大于 100 $\mu\text{g/mL}$)。

表3 云南黄芪与灰毛康定黄芪根际可培养细菌菌株信息

Table 3 The information of culturable bacterium isolated from *Astragalus yunnanensis* and *A. tatsienensis* var. *incanus* rhizosphere

来源	门	纲	物种	分离编号	登录号	相似度		
Sources	Phylum	Class	Species	Isolate ID	Accession No.	Similarity (%)		
<i>Astragalus yunnanensis</i>	Actinobacteria	Actinomycetia	<i>Arthrobacter bambusae</i>	YTB23	MK318572.1	100.00		
			<i>Arthrobacter bambusae</i>	YTB14	MK318572.1	99.85		
			<i>A. nicotinovorans</i>	YTB11	FN908760.1	99.92		
			<i>A. nitroguajacolicus</i>	YTB20	KR085875.1	99.92		
			<i>A. pascens</i>	YTB3	MT373553.1	99.92		
				YTB16	MT373553.1	100.00		
			<i>Brevibacterium celere</i>	YTB6	KU147446.1	98.09		
			<i>Microbacterium hatanonis</i>	YNB1	KY775496.1	99.85		
			<i>M. phyllosphaerae</i>	YTA8	MF541529.1	99.58		
			<i>Rhodococcus qingshengii</i>	YTB4	MN826591.1	100.00		
			<i>Rhodococcus qingshengii</i>	YTB19	MN826576.1	100.00		
			<i>Streptomyces cirratus</i>	YTA1	MT083993.1	100.00		
				YTA2	MT083996.1	100.00		
			<i>S. colombiensis</i>	YTA13	MW391680.1	100.00		
				YTB15	MW391681.1	100.00		
				YTA5	MW391681.1	99.92		
			<i>S. finlayi</i>	YTA3	KP718539.1	100.00		
			<i>S. fulvissimus</i>	YTA9	NZ_CP054926.1	98.94		
				YTA12	LC551891.1	100.00		
			<i>S. hypolithicus</i>	YTA4	JQ422166.1	97.89		
			<i>Bacteroidetes</i>	Flavobacteria	<i>Flavobacterium hydatis</i>	YTB7	KF704084.1	99.52
			<i>Firmicutes</i>		Bacilli	<i>Bacillus subtilis</i>	YNB13	MF590152.1
				YTB1		MT487700.1	100.00	
	YNB16	MT539995.1	100.00					
<i>B. thuringiensis</i>	YTB8	OK394047.1	100.00					
	YNB20	NZ_CP076542.1	100.00					
<i>B. velezensis</i>	YNB15	MT626060.1	100.00					
	YNB19	MT649755.1	100.00					
<i>Exiguobacterium acetylicum</i>	YNB4	MT367809.1	100.00					
<i>Proteobacteria</i>	Alphaproteobacteria	<i>Brevundimonas bullata</i>	YNB21	MK737369.1		99.91		
		<i>B. vesicularis</i>	YNB7	MN758851.1		98.72		
		YNB10	MN758851.1	100.00				
		YNB17	MN932333.1	100.00				
		YNB12	MN181159.1	100.00				
<i>Sphingobium yanoikuyae</i>		YNB6	LC506140.1	99.92				
<i>Sphingomonas olei</i>		YNB5	MN559812.1	99.52				
		YNB18	MN559812.1	100.00				

(待续)

(续表 3)

<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Delftia acidovorans</i>	YTB12	NZ_KN046795.1	100.00		
		YTA11	MN173541.1	98.16		
		YTB10	MK414884.1	99.93		
		YTA6	MK414884.1	99.85		
		YTA7	MK414884.1	100.00		
		<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	YNB9	CP037424.1	100.00
				YTB2	MN911371.1	100.00
<i>A. calcoaceticus</i>	YNB11		MT386200.1	99.09		
	<i>Enterobacter cancerogenus</i>		YNB8	KT766065.1	99.85	
<i>Pseudomonas helmanticensis</i>	YNB22		MK070159.1	100.00		
	YNB23		MN758778.1	100.00		
<i>P. jessenii</i>	YTB21		MK883111.1	100.00		
	<i>P. lini</i>		YTB5	KF704098.1	99.92	
YTB9			KF704098.1	100.00		
YTB18			JX122159.1	100.00		
<i>P. mandelii</i>	YTB22		MN865165.1	100.00		
	YTB17		JN637321.1	100.00		
	<i>P. migulae</i>		YTB13	MN758789.1	99.63	
<i>P. putida</i>			YNB3	MT114497.1	100.00	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	YNB14		MH669295.1	100.00		
	YTA10	MT605300.1	100.00			
<i>A. tatsienensis</i> Actinobacteria Actinomycetia var. <i>incanu</i>	<i>S. rhizophila</i>	YNB2	MH828345.1	98.82		
		<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i>	KNB11	JX122169.1	100.00	
	<i>Microbacterium oxydans</i>	KTB13	MT533951.1	100.00		
	<i>M. phyllosphaerae</i>	KTB3	MT533897.1	100.00		
	<i>M. resistens</i>	KTB1	MK517595.1	99.77		
	<i>Streptomyces avidinii</i>	KTA9	NZ_BMVL010000 53.1	99.77		
	<i>S. cyaneofuscatus</i>	KTA3	EU841567.1	99.92		
	<i>S. fulvissimus</i>	KTA6	LC551891.1	100.00		
		KTA1	LC551888.1	100.00		
	<i>Firmicutes</i> <i>Bacilli</i>	<i>Bacillus cereus</i>	KNB14	MT611946.1	100.00	
KNB17			MG966498.1	100.00		
<i>B. subtilis</i>		KNB16	OL477457.1	100.00		
		KNB23	MT539995.1	100.00		
		KNB3	MT539995.1	99.93		
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>		KTB6	MT538485.1	100.00		
		KTB9	MT538485.1	99.93		
		KTB8	MT538491.1	100.00		
		KTB11	MT538485.1	99.75		

(待续)

(续表 3)

		KTB14	CP053102.1	100.00
	<i>B. velezensis</i>	KNB9	OL477461.1	100.00
		KNB2	MT649755.1	100.00
	<i>Exiguobacterium acetylicum</i>	KTB27	KU922383.1	100.00
<i>Proteobacteria Alphaproteobacteria</i>	<i>Microvirga ossetica</i>	KTB21	NR_156049.1	98.77
	<i>Ochrobactrum haematophilum</i>	KTB20	MT436099.1	100.00
	<i>Phyllobacterium trifolii</i>	KNB21	JX840396.1	100.00
	<i>Sphingobium yanoikuyae</i>	KNB6	HF930763.1	100.00
<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Achromobacter marplatensis</i>	KTB15	MT299752.1	99.32
		KTB12	MT299752.1	100.00
	<i>A. spanius</i>	KTB4	MT409527.1	100.00
		KTB22	MT409527.1	99.73
	<i>Delftia acidovorans</i>	KTB17	MK414884.1	99.67
		KTA8	MK414884.1	100.00
<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	KTB19	MT436393.1	100.00
	<i>A. pittii</i>	KNB8	CP049806.1	99.37
	<i>Luteibacter anthropi</i>	KTB5	KX982773.1	99.35
	<i>Pseudomonas baetica</i>	KNB19	MT078669.1	100.00
	<i>P. jessenii</i>	KNB18	MT065741.1	100.00
		KNB22	MN758767.1	100.00
		KNB12	MN758767.1	99.92
	<i>P. mandelii</i>	KNB4	MN865165.1	100.00
		KNB1	MH482219.1	99.77
	<i>P. tolaasii</i>	KNB20	MT561438.1	100.00
	<i>Serratia fonticola</i>	KNB24	MK235159.1	100.00
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	KTB10	MT275807.1	99.74
	<i>S. rhizophila</i>	KTB23	KM524119.1	100.00
		KTB16	KY457743.1	100.00
		KTB18	KY457743.1	99.85
		KNB15	MK737402.1	99.93
		KNB13	MN753976.1	100.00
		KNB7	MN753976.1	99.1
		KNB5	MN753976.1	99.93
		KNB10	MK737107.1	100.00
		KTB2	MK737140.1	99.67
		KTB7	MK737140.1	100.00

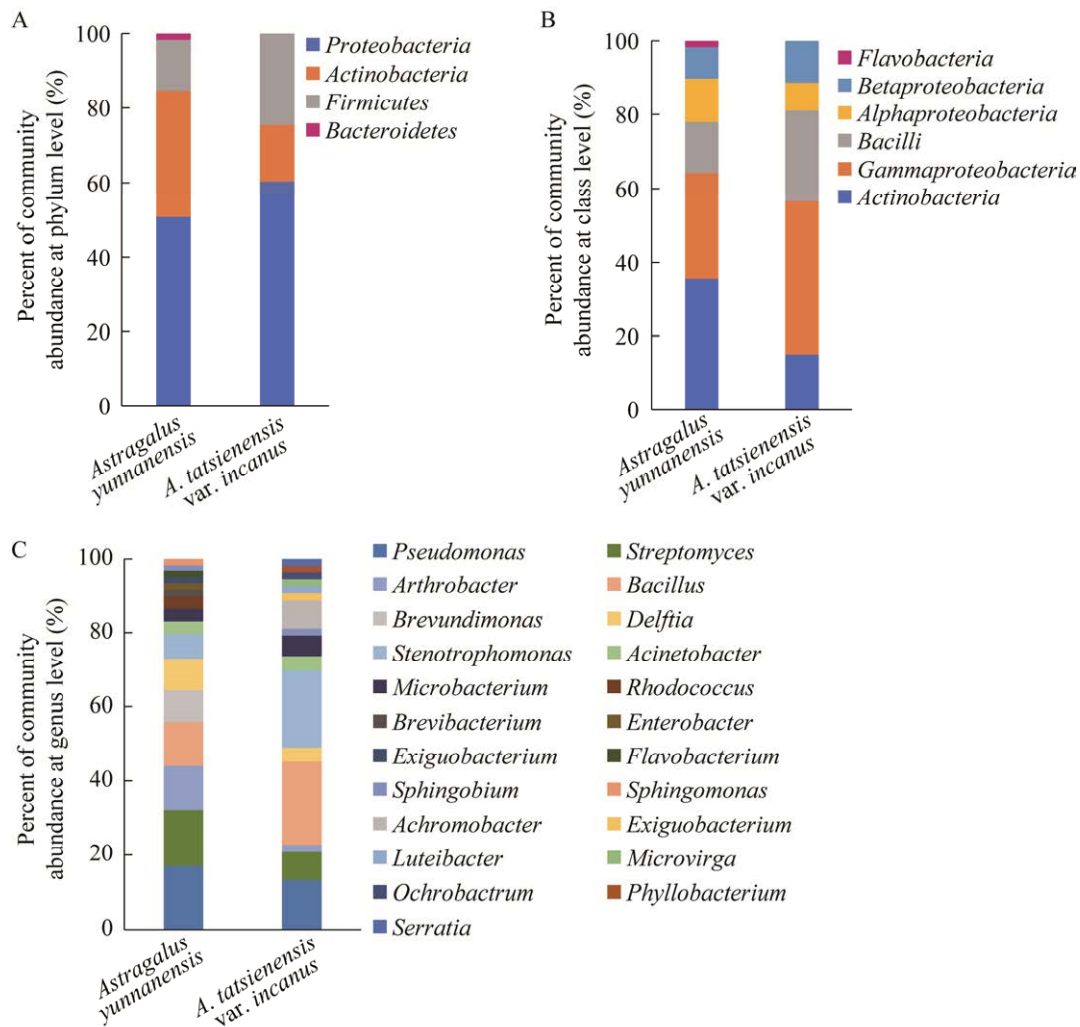


图 3 依据纯培养物种鉴定结果分析云南黄芪与灰毛康定黄芪根际可培养细菌与放线菌门(A)、纲(B)及属(C)水平上的组成

Figure 3 The culturable bacterial composition of *Astragalus yunnanensis* and *A. tatsienensis* var. *incanus* rhizosphere at the phylum (A), class (B) and genus (C) levels.

如表 5 与表 6 所示, 云南黄芪根际真菌 *Aspergillus fumigatus* YNF5 发酵液的乙酸乙酯粗浸膏对已测革兰氏阳性菌均表现出较强至中等抑菌活性, 而且对其中表皮葡萄球菌、无乳链球菌、屎肠球菌的最小抑菌浓度 (minimal inhibit concentration, MIC) 值为 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。云南黄芪根际细菌 YNB22 与 YNB23 均归属于 *Pseudomonas helmanticensis*, 其中 YNB22 对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、金黄色葡萄球菌和

枯草芽孢杆菌的 MIC 值均为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 对无乳链球菌和单增李斯特菌的 MIC 值均为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 对屎肠球菌的 MIC 值为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 而 YNB23 仅对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌和金黄色葡萄球菌有较强的抑制作用, 其 MIC 值均为 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。灰毛康定黄芪根际放线菌 *Streptomyces fulvissimus* KTA1 发酵液的乙酸乙酯粗浸膏在浓度范围为 6.25–12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时可有效抑制上述 8 种革兰氏阳性菌的生长。灰毛康定黄芪根

际假单胞菌属细菌 *P. tolaasii* KNB20 对无乳链球菌、粪肠球菌、屎肠球菌及枯草芽孢杆菌有较强抑制作用, MIC 值均为 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 细菌 *Stenotrophomonas maltophilia* KTB10 对粪肠球

菌和枯草芽孢杆菌的 MIC 值均为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、无乳链球菌的 MIC 值均为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 对屎肠球菌、单增李斯特菌的 MIC 值为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

表 4 云南黄芪与灰毛康定黄芪根际可培养真菌菌株信息

Table 4 The information of culturable fungi isolated from *Astragalus yunnanensis* and *A. tatsienensis* var. *incanus* rhizosphere

来源	物种	分离编号	登录号	相似度
Sources	Species	Isolate ID	Accession No.	Similarity (%)
<i>Astragalus yunnanensis</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	YTF5	MT558940.1	100.00
		YTF7	MH536093.1	100.00
		YTF6	MH864623.1	100.00
		YNF1	MG991639.1	100.00
		YNF7	MN473284.1	100.00
		YTF1	MN473284.1	99.79
		YNF6	MT597427.1	99.83
		YTF2	MT597427.1	100.00
		YNF9	MT597427.1	99.82
		YNF8	MH911361.1	99.83
	YNF5	MF590118.1	99.83	
	<i>A. niger</i>	YTF11	MG228419.1	100.00
		YNF3	MT597436.1	100.00
		YTF3	MT597436.1	100.00
		YTF9	MT597437.1	100.00
		YNF4	MT597435.1	100.00
		<i>Penicillium polonicum</i>	YNF2	MT529889.1
<i>Talaromyces amestolkiae</i>		YTF8	MN549518.1	100.00
<i>Trichoderma asperellum</i>	YTF13	MT341772.1	100.00	
<i>Astragalus tatsienensis</i> var. <i>incanus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	KNF3	MH864623.1	100.00
		KNF7	MG991579.1	100.00
		KNF1	MG991593.1	100.00
	<i>A. niger</i>	KNF2	MN473284.1	100.00
		KTF4	MN473284.1	99.79
		KTF7	MT597427.1	100.00
		KTF1	MK419094.1	100.00
		KTF5	MH511143.1	99.31
		KNF6	MT597436.1	100.00
		KNF4	MT597437.1	99.20
	<i>Penicillium sumatraense</i>	KNF5	MT597437.1	100.00
		KTF6	MT597435.1	100.00
		KTF2	MT582791.1	100.00
<i>Tolypocladium inflatum</i>	KTF3	MK020177.1	99.79	

表 5 对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 ATCC 43300、金黄色葡萄球菌 ATCC 29213、表皮葡萄球菌 ATCC 12228 和无乳链球菌 ATCC 13813 具有抑制作用的菌株

Table 5 Strains with antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *S. epidermidis* ATCC 12228 and *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813

菌株 Strain	耐甲氧西林金黄色 葡萄球菌 MRSA	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	表皮葡萄球菌 <i>S. epidermidis</i>	无乳链球菌 <i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i> YNF5	+++	+++	++++	++++
<i>Pseudomonas helmanticensis</i> YNB22	+	+	-	++
<i>P. helmanticensis</i> YNB23	++++	++++	-	-
<i>P. tolaasii</i> KNB20	-	-	-	++++
<i>Streptomyces fulvissimus</i> KTA1	++++	++++	++++	++++
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> KTB10	++	++	-	++

注: +++++: $6.25 \mu\text{g/mL} < \text{MIC} \leq 12.5 \mu\text{g/mL}$; +++: $12.5 \mu\text{g/mL} < \text{MIC} \leq 25 \mu\text{g/mL}$; ++: $25 \mu\text{g/mL} < \text{MIC} \leq 50 \mu\text{g/mL}$; +: $50 \mu\text{g/mL} < \text{MIC} \leq 100 \mu\text{g/mL}$; -: 无拮抗作用

Note: +++++: $6.25 \mu\text{g/mL} < \text{MIC} \leq 12.5 \mu\text{g/mL}$; +++: $12.5 \mu\text{g/mL} < \text{MIC} \leq 25 \mu\text{g/mL}$; ++: $25 \mu\text{g/mL} < \text{MIC} \leq 50 \mu\text{g/mL}$; +: $50 \mu\text{g/mL} < \text{MIC} \leq 100 \mu\text{g/mL}$; -: No antibacterial activity.

表 6 对粪肠球菌 ATCC 29212、屎肠球菌 ATCC 35667、枯草芽孢杆菌 ATCC 6051 和单增李斯特菌 ATCC 19115 具有抑制作用的菌株

Table 6 Strains with antibacterial activity against *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *E. faecium* ATCC 35667, *Bacillus subtilis* ATCC 6051 and *Listeria monocytogenes* ATCC 19115

菌株信息 Strain	粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i>	屎肠球菌 <i>E. faecium</i>	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	单增李斯特菌 <i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i> YNF5	-	++++	+	+++
<i>Pseudomonas helmanticensis</i> YNB22	-	+++	+	++
<i>P. helmanticensis</i> YNB23	-	-	-	-
<i>P. tolaasii</i> KNB20	++++	++++	++++	-
<i>Streptomyces fulvissimus</i> KTA1	++++	++++	++++	++++
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> KTB10	+	+++	+	++

注: +++++: $6.25 \mu\text{g/mL} < \text{MIC} \leq 12.5 \mu\text{g/mL}$; +++: $12.5 \mu\text{g/mL} < \text{MIC} \leq 25 \mu\text{g/mL}$; ++: $25 \mu\text{g/mL} < \text{MIC} \leq 50 \mu\text{g/mL}$; +: $50 \mu\text{g/mL} < \text{MIC} \leq 100 \mu\text{g/mL}$; -: 无拮抗作用

Note: +++++: $6.25 \mu\text{g/mL} < \text{MIC} \leq 12.5 \mu\text{g/mL}$; +++: $12.5 \mu\text{g/mL} < \text{MIC} \leq 25 \mu\text{g/mL}$; ++: $25 \mu\text{g/mL} < \text{MIC} \leq 50 \mu\text{g/mL}$; +: $50 \mu\text{g/mL} < \text{MIC} \leq 100 \mu\text{g/mL}$; -: No antibacterial activity.

2.6 抗 MRSA 生物膜活性筛选

抗生物膜活性主要包括抑制生物膜形成与清除成熟生物膜活性两个方面, 通常一些抗菌活性物质能够通过抑制微生物生长来抑制微生物菌膜的形成, 但并不具有清除成熟生物被膜的能力。以耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 ATCC 43300 为受试菌株, 通过筛选得到 4 株活性菌

株(表 7), 分别为 *Aspergillus fumigatus* YNF5、*Pseudomonas helmanticensis* YNB22、*Streptomyces fulvissimus* KTA1 及 *Stenotrophomonas maltophilia* KTB10, 这些菌株发酵液的乙酸乙酯粗浸膏分别在 25、100、12.5 及 50 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下可明显抑制 MRSA 生物膜形成, 但由于这些菌株在上述抑膜浓度下

也表现出较好的抗菌活性, 所以其抑膜效果很可能是通过抑菌作用实现的。随后分别通过结晶紫 (crystal violet, CV) 和噻唑蓝 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 染色测定了活性菌株对成熟 MRSA 生物膜的清除能力, 发现仅有真菌菌株 *A. fumigatus* YNF5 发酵液的乙酸乙酯粗浸膏在浓度为 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时能够较好地清除成熟 MRSA 生物膜, 减少生物膜量(图 4)。

2.7 活性菌株的化学筛选及目标菌株的确定

使用 HPLC 对上述 6 株活性菌株发酵液乙

酸乙酯粗浸膏进行指纹图谱采集, 如图 5 所示, 与空白 PDB 发酵培养基比较, 云南黄芪根际真菌 *A. fumigatus* YNF5 次生代谢产物丰富, 其保留时间段为 28–34 min。如图 6 所示, 与空白 SGTYP 发酵培养基相比, 云南黄芪根际细菌 *Pseudomonas helmanticensis* YNB22 的次生代谢产物保留时间在 5 min 左右, 极性较大; 而其同种菌株 *P. helmanticensis* YNB23 次生代谢产物的保留时间段则为 23–30 min, 属于中等极性化合物。灰毛康定黄芪根际放线菌

表 7 具有抗 MRSA 生物膜活性的菌株

Table 7 Strains with anti-biofilm activity

菌株 Strain	抑制生物膜形成 Biofilm inhibition	清除成熟生物膜 Biofilm eradication
<i>Aspergillus fumigatus</i> YNF5	+	+
<i>Pseudomonas helmanticensis</i> YNB22	+	-
<i>Streptomyces fulvissimus</i> KTA1	+	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> KTB10	+	-

注: +: 具有抑制作用; -: 无抑制作用

Note: +: With anti-biofilm activity; -: No anti-biofilm activity.

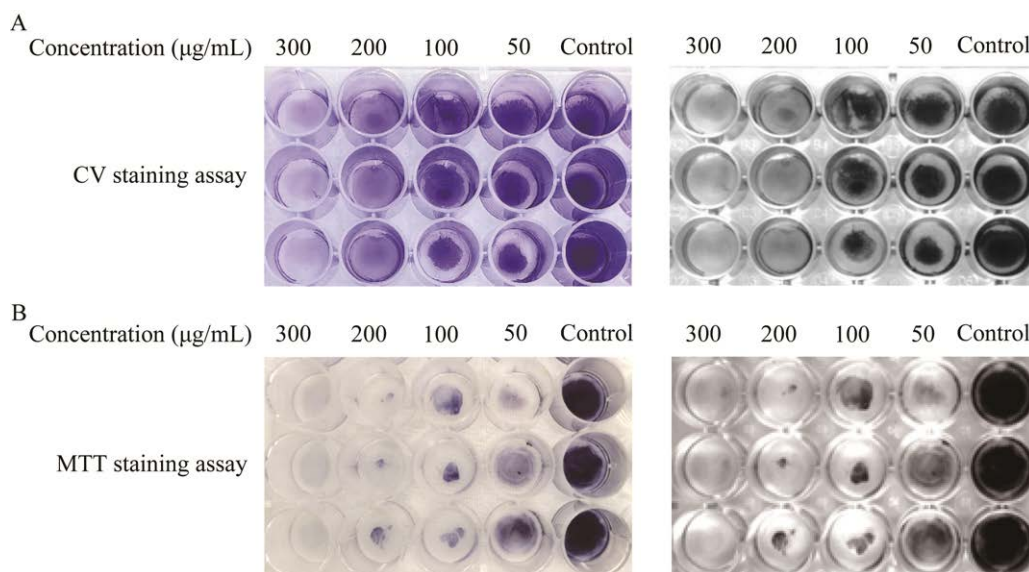


图 4 云南黄芪根际真菌 YNF5 发酵液乙酸乙酯粗浸膏清除成熟 MRSA 生物膜 A: 使用 50–300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 样品处理成熟生物膜 24 h, 利用结晶紫对 MRSA 生物膜进行染色; B: 使用 50–300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 样品处理成熟生物膜 24 h, 利用噻唑蓝对 MRSA 生物膜进行染色。使用相同体积的 DMSO 作为阴性对照

Figure 4 The eradication effect on the MRSA biofilm of the *Aspergillus fumigatus* YNF5 fermented extract of rhizosphere soil of *Astragalus yunnanensis*. A: The MRSA biofilms were treated with 50–300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of samples for 24 h before staining with CV solution; B: The MRSA biofilms were treated with 50–300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of samples for 24 h before staining with MTT solution. The same volume of DMSO was used as negative control.

Streptomyces fulvissimus KTA1 发酵液的乙酸乙酯粗浸膏的 HPLC 指纹谱图在 27 min 与 32 min 处存在 2 个较高的峰, 极性中等偏小。灰毛康定根际细菌 *Stenotrophomonas maltophilia* KTB10 的次生代谢产物保留时间为 24 min 左右。综上, 真菌 *A. fumigatus* YNF5、细菌 *P. helmanticensis* YNB23 与放线菌 *S. fulvissimus* KTA1 具有较好的化学多样性, 而且其次生代谢产物属于中等极性小分子化合物, 可能具有较好的抗生素小分子天然产物开发潜力。对这 3 株菌进行相关文献调研发现, 真菌 *A. fumigatus* 次生代谢产物主要包括烟曲霉醌、胶毒素与烟曲霉酸等, 而且部分化合物已报道具有抗菌和抗肿瘤活性^[21]。2008 年 Malik 等^[22]报道放线菌 *S. fulvissimus* 可分泌一种抗菌肽, 对 MRSA 有显著抑制活性; 细菌 *P. helmanticensis* 被报道作为姜科植物内生细菌分离出其产生的邻苯二甲酸二异辛酯是抗念珠菌的主要活性物

质^[23]。综合上述文献调研及抗菌、抗 MRSA 生物膜活性筛选与 HPLC 化学筛选结果, 最终确定真菌 *A. fumigatus* YNF5 与放线菌 *S. fulvissimus* KTA1 为目标菌株, 后续将对其次生代谢产物进行深入研究。

3 讨论与结论

本研究通过宏基因组技术构建滇西北高寒特境云南黄芪与灰毛康定黄芪根际微生物测序文库, 发现云南黄芪与灰毛康定黄芪根际微生物菌群结构较为相似, 但丰度占比不同。两种黄芪根际微生物均主要由异常球菌-栖热菌门、变形菌门和放线菌门组成, 栖热菌属、栖热嗜油菌属、慢生根瘤菌属与博斯氏菌属为两种黄芪根际微生物所共有并占据一定优势地位的种群。其中, 检测到根瘤菌的大量存在可能与黄芪属于豆科植物且该类植物能够被根瘤菌侵袭

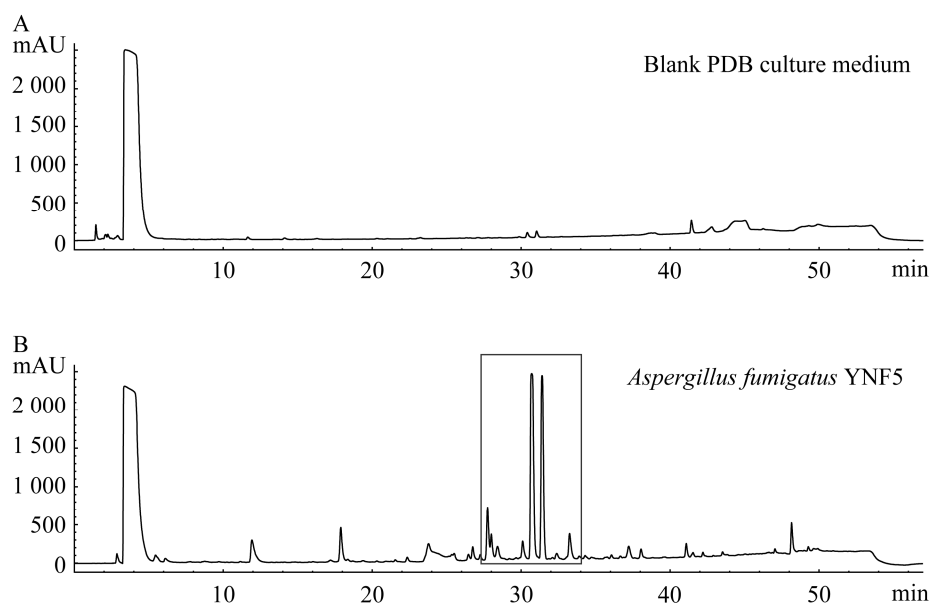


图 5 空白 PDB 培养基(A)与活性菌株 *Aspergillus fumigatus* YNF5 (B)发酵液乙酸乙酯粗浸膏的 HPLC 谱图

Figure 5 HPLC spectra of crude ethyl acetate extractions of the blank PDB culture medium (A) and *Aspergillus fumigatus* YNF5 (B) fermentation broth.

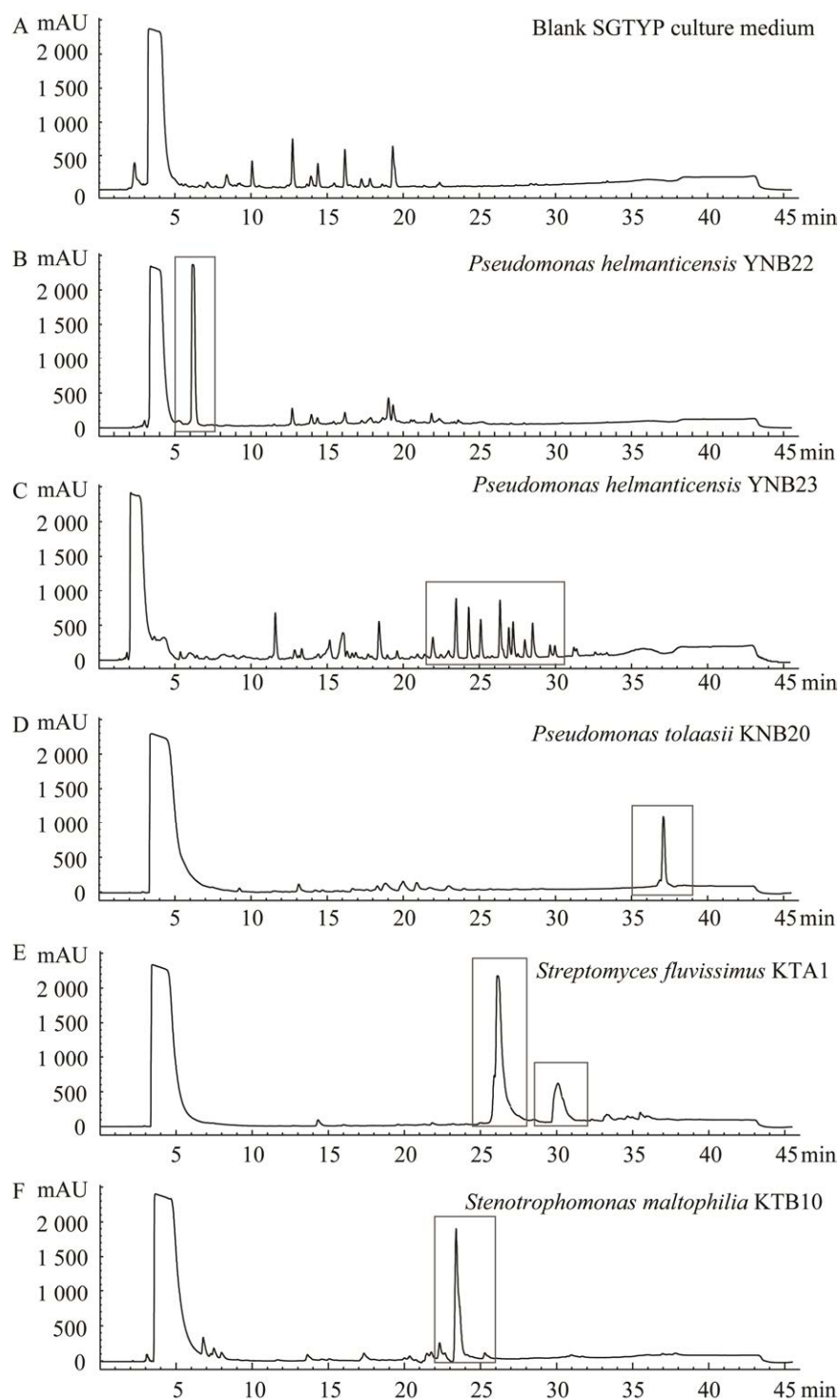


图 6 空白 SGTYP 培养基(A)、活性菌株 *Pseudomonas helmanticensis* YNB22 (B)、*P. helmanticensis* YNB23 (C)、*P. tolaasii* KNB20 (D)、*Streptomyces fluvisissimus* KTA1 (E)与 *Stenotrophomonas maltophilia* KTB10 (F)发酵液乙酸乙酯粗浸膏的 HPLC 谱图

Figure 6 HPLC spectra of crude ethyl acetate extractions of the blank SGTYP culture medium (A), *Pseudomonas helmanticensis* YNB22 (B), *P. helmanticensis* YNB23 (C), *P. tolaasii* KNB20 (D), *Streptomyces fluvisissimus* KTA1 (E) and *Stenotrophomonas maltophilia* KTB10 (F) fermentation broth.

形成根瘤并固氮相关。在云南黄芪与灰毛康定黄芪根际样本中存在丰度较高的慢生根瘤菌为共生固氮菌, 该类微生物可通过与宿主植物共生结瘤来有效固氮, 但其是否能与云南黄芪与灰毛康定黄芪结瘤仍需进一步探索。据文献报道, 博斯氏菌属细菌能够将三价砷生物氧化为五价砷并降低其毒性, 该属细菌也被报道能够从豆科植物根瘤中分离^[24-25]。云南黄芪根际微生物优势属极地单胞菌属在灰毛康定黄芪根际中同样也有分布, 该属细菌被报道是冰川微生物组的重要组成部分, 极地单胞菌属微生物的部分质粒可能协助宿主应对寒冷环境^[26], 说明该属细菌能够较好地适应寒冷环境, 在高寒生境黄芪的生长中发挥一定作用。另外, 云南黄芪与灰毛康定黄芪所生长的白马雪山高海拔地区常年低温, 但在这两种黄芪根际土壤中却被检测出大量含有栖热菌属、栖热嗜油菌属等嗜热菌。李敬科^[7]使用 16S rRNA 基因扩增子测序技术检测了生长于青藏高原麦地卡盆地的云南黄芪的根际土壤细菌, 结果显示青藏高原云南黄芪根际细菌主要分布于变形菌门、厚壁菌门、放线菌门和拟杆菌门, 与本研究云南黄芪根际细菌菌群较为相似, 但缺少了栖热菌门。Li 等^[27]采用 16S rRNA 基因 V6 高变区测序技术对滇西北地区梅里雪山山系的明永冰川土壤微生物进行了检测分析, 同样发现土壤中异常球菌-栖热菌门为优势种群, 推测可能是由于喜马拉雅山系地质活动活跃, 地热资源尤为丰富, 嗜热微生物广泛分布。此外, 本研究于 6 月雨季对云南黄芪与灰毛康定黄芪根际土壤进行采样, 较为充足的雨水可能也使得栖热菌广泛分布。

本研究同时采用传统微生物培养方法对云南黄芪与灰毛康定黄芪根际微生物进行了分离、培养与鉴定, 发现这两种黄芪根际可培养微生物在多个分类水平上具有差异, 而且优势菌

群存在不同, 各自特有小部分菌群。李敬科^[7]从青藏高原云南黄芪根际土壤中分离出寡养单胞菌属、假单胞菌属与芽孢杆菌属细菌, 这 3 个属的细菌在本研究中也同样分离得到。植物样本云南黄芪多分布于白马雪山自然保护区流石滩的石隙中, 根系沿岩屑曲折生长; 灰毛康定黄芪分布的海拔略高于云南黄芪, 主要生长在陡坡草地上。文献报道土壤生态系统的物质循环会影响土壤中微生物的群落构成^[28], 从本研究中云南黄芪与灰毛康定黄芪根际土壤理化性质结果可以看出, 灰毛康定黄芪根际土壤中的有机质、全氮、全钾、铵态氮、硝态氮与有效钾等指标数值均高于云南黄芪根际土壤, 土壤氮元素、钾元素与有机质等差异可能导致这两种黄芪根际优势菌群不同, 这一点有待深入研究。同时, 物种多样性受时间与空间尺度所影响, 历史偶然事件的发生对依赖传统培养方法的可培养微生物的分离影响较大^[29]。

综合比较上述云南黄芪与灰毛康定黄芪根际土壤微生物宏基因组学研究结果与传统培养方法所得菌株结果发现, 免培养方法与可培养法所得到的优势菌群并非完全一致, 主要表现为依据宏基因组结果, 这两种黄芪优势菌群为栖热菌属、栖热嗜油菌属、慢生根瘤菌属、博斯氏菌属与极地单胞菌属等, 而本研究中黄芪根际可培养细菌集中于自然界广泛存在的假单胞菌属、芽孢杆菌属和寡养单胞菌属等, 可培养真菌则集中于曲霉属, 这可能与特境微生物对培养条件有着更高的要求有关, 自然界中仅有极小的一部分微生物能够被分离培养, 而且纯培养研究方法仅能够针对已获得的菌株进行测序, 获得的基因组单一且信息量低, 在该条件下, 基于实验室培养分离方法获得的微生物物种多样性有一定的局限性。同时, 很多微生物由于自身物种的独特性, 即使满足了特殊生

境的培养条件,也很难在实验室获取纯培养物。以上结果也提示人们传统人工分离培养方法所得到的微生物群落构成并不一定能够真实反映自然环境样本中的微生物种群结构,若要全面认识自然环境样本的物种群落构成并获得大量可培养菌株,仍然需要在宏基因组测序结果基础上对菌株分离方法与培养条件进行多样化尝试,以期得到更多具有应用价值的微生物菌株。

白马雪山采样地点高海拔、强紫外、低气压与植物根际等外界条件可能使微生物产生结构新颖、活性多样的次生代谢产物。例如,本研究中分离得到的菌株数目较多、占有优势地位的假单胞菌属与芽孢杆菌属细菌,如亚麻假单胞菌(*Pseudomonas lini*)和枯草芽孢杆菌等,研究表明其具有较强的抗逆、抗菌防病能力,能够通过分泌吡啶乙酸或提高植物耐盐度等机制促进植物生长^[30-31],说明该两属中的细菌可能在高寒生境黄芪的生长中发挥重要作用。曲霉属真菌被多次报道^[32]为多种植物根际常见的生态类群之一,部分曲霉属真菌能够溶磷、解钾、产吡啶乙酸或对植物病原菌有抑制作用,通过多种方式发挥促生防病功能。本研究对获得的 58 株代表性可培养菌株发酵液的乙酸乙酯粗浸膏进行了抗菌、抗生物膜活性测定,筛选得到 6 株具有中等至较强抑菌活性的菌株,其中灰毛康定黄芪根际放线菌 *Streptomyces fulvissimus* KTA1 对金黄色葡萄球菌、MRSA、单增李斯特菌、表皮葡萄球菌、粪肠球菌、尿肠球菌、枯草芽孢杆菌及无乳链球菌等 8 种革兰氏阳性菌表现出广谱强效抑菌活性。Malik 等^[22]也曾通过琼脂扩散法测定 *S. fulvissimus* 发酵产物对蜡状芽孢杆菌、藤黄微球菌及 MRSA 等的抑菌活性,但其发酵产物活性单体化合物及抗菌机制均尚未得到阐明,值得深入研究。同时,本研究发现一株曲霉属真菌 *Aspergillus*

fumigatus YNF5 发酵液乙酸乙酯粗浸膏对 MRSA、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、无乳链球菌、枯草芽孢杆菌、尿肠球菌及单增李斯特菌等 7 种革兰氏阳性菌均表现出较强的抗菌活性,这与文献报道的该种真菌次生代谢产物具有较强的抗菌活性一致^[21]。此外,在对可培养菌株进行发酵时发现,即使同一属种但不同株的微生物菌株其次生代谢产物可能也存在一定区别,例如活性细菌菌株 YNB22 与 YNB23 同属于 *Pseudomonas helmanticensis*,但其液相指纹谱图显示次生代谢产物保留时间并不一致,而且 YNB22 发酵液乙酸乙酯粗浸膏表现出广谱的抑菌活性,而 YNB23 则只针对 MRSA 与金黄色葡萄球菌有较好的抑菌活性;另有同属于 *Streptomyces fulvissimus* 的放线菌菌株 KTA1 与 KTA4 也表现出不同的抗菌活性,而且 KTA1 具有广谱强效抑菌活性,这种现象的存在也提示我们即使已有较多文献报道 *Aspergillus fumigatus* 菌株的活性次生代谢产物,但其仍有一定的药源潜力发掘空间。综上所述,高寒特境云南黄芪与灰毛康定黄芪部分根际可培养微生物具有一定的抗生素药源研发潜力。

病原微生物在生物体内并非简单孤立存在,多数微生物能够通过群体感应来进行信号交流并进行一系列生命活动,如形成生物膜来对抗外界刺激,这也导致微生物对抗生素的敏感度下降而耐药性上升,目前临床尚无针对生物膜的特效药物,开发靶点新、低毒且高效的抗生物膜药物迫在眉睫。本研究经抗 MRSA 生物膜活性菌株初筛发现,3 株细菌和 1 株真菌能够抑制 MRSA 生物膜的形成,尤其是真菌 *A. fumigatus* YNF5 在浓度为 300 $\mu\text{g/mL}$ 时能够显著减少 MRSA 生物被膜形成过程中的活菌数,从而降低成熟 MRSA 生物膜量。该结果表明菌

株 YNF5 并非通过简单抑菌作用发挥抗生物膜活性, 具有较好的抗生物膜药源开发潜力。如前文所述, 烟曲霉 *A. fumigatus* 的部分次生代谢产物表现出较强的抗菌活性, 而且对短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)生物膜具有清除能力^[33], 但该菌的抗 MRSA 生物膜活性次生代谢产物仍未见报道, 后续将对菌株 YNF5 的抗生物膜活性单体化合物进行分离纯化与结构鉴定, 并对其抗生物膜机制进一步探索。

综上所述, 本研究首次对我国云南德钦县白马雪山高寒特境云南黄芪与灰毛康定黄芪根际微生物的物种多样性及其药用资源潜力进行全面探究, 发现这两种黄芪根际微生物群落具有一定的物种多样性, 而且其次生代谢产物具有较好的抗菌、抗生物膜药源开发潜力, 所得研究结果将为后续我国特境微生物的抗生素药源研究提供菌株基础与技术参考, 也为今后保护与合理开发利用高寒特境特色植物及其微生物资源提供参考。

REFERENCES

- [1] 唐永红, 曹庸, 卢成瑛, 黄早成. 特殊生境微生物及其活性代谢产物研究进展[J]. 微生物学通报, 2006, 33(4): 163-166
Tang YH, Cao Y, Lu CY, Huang ZC. Research progress of the active metabolites of special eco-environment microorganisms[J]. Microbiology China, 2006, 33(4): 163-166 (in Chinese)
- [2] Berendsen RL, Pieterse CMJ, Bakker PAHM. The rhizosphere microbiome and plant health[J]. Trends in Plant Science, 2012, 17(8): 478-486
- [3] Djukic I, Zehetner F, Mentler A, Gerzabek MH. Microbial community composition and activity in different Alpine vegetation zones[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2010, 42(2): 155-161
- [4] 孙海峰, 康宝玲, 高彦云, 郭兰萍, 秦雪梅. 基于 ARISA 指纹图谱技术的浑源黄芪根际微生物菌群特征剖析[J]. 中草药, 2016, 47(12): 2157-2162
Sun HF, Kang BL, Gao YY, Guo LP, Qin XM. Characterization of rhizospheric microbial flora of Hunyuan *Astragalus Mongolicus* Radix by ARISA fingerprinting[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2016, 47(12): 2157-2162 (in Chinese)
- [5] 李冰圳, 李国斌, 苏优拉, 孙淑英, 陈贵林. 蒙古黄芪不同生育期黄酮类成分积累及其根际微生物多样性研究[J]. 西北植物学报, 2020, 40(5): 828-837
Li BZ, Li GB, Su YL, Sun SY, Chen GL. Accumulation of flavonoids and diversity of rhizosphere microorganisms in *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao in different growth stages[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2020, 40(5): 828-837 (in Chinese)
- [6] Sun CS, Li BZ, Su YL, Jia X, Chen GL. Dynamic succession of soil microbial community during continuous cropping of *Astragalus membranaceus* Bge. var. *mongholicus* (Bge.) [J]. PeerJ, 2019. DOI: 10.7287/peerj.preprints.27600v1
- [7] 李敬科. 青藏高原六种黄耆属植物根际土壤细菌多样性研究[D]. 拉萨: 西藏大学硕士学位论文, 2021
Li JK. Study on bacterial diversity of rhizosphere soil of six species of *Astragalus* in Qinghai-Tibet Plateau[D]. Lhasa: Master's Thesis of Tibet University, 2021 (in Chinese)
- [8] 钱子刚, 贾向云, 戴蓉, 顾德顺, 皮文林. 云南黄芪药用植物物种多样性研究[J]. 云南中医学院学报, 1997, 20(1): 4-7,12
Qian ZG, Jia XY, Dai R, Gu DS, Pi WL. Study on species diversity of medicinal plant, genus *Astragalus* in Yunnan[J]. Journal of Yunnan College of Traditional Chinese Medicine, 1997, 20(1): 4-7,12 (in Chinese)
- [9] 钱子刚, 顾德顺, 杨吕华. 中药黄芪及其滇西北近缘种生药学研究[J]. 云南中医学院学报, 1995, 18(4): 1-6
Qian ZG, Gu DS, Yang LH. Studies on pharmacognosy of *Radix Astragali* and its close relative species in northwest Yunnan[J]. Journal of Yunnan College of Traditional Chinese Medicine, 1995, 18(4): 1-6 (in Chinese)
- [10] Zhang DQ, Yang J, Jiang B. Isolation and characterization of 23 microsatellite loci in *Astragalus camptodontus* (Leguminosae), a traditional medicinal plant in Yunnan province[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2013, 50: 448-451
- [11] Xiao CJ, Zhang Y, Qiu L, Dong X, Jiang B. Schistosomicidal and antioxidant flavonoids from *Astragalus englerianus*[J]. Planta Medica, 2014, 80(18): 1727-1731
- [12] Xiao CJ, Zhang Y, Qiu L, Xu W, Zhao MZ, Dong X, Jiang B. A new schistosomicidal and antioxidative phenylpropanoid from *Astragalus englerianus*[J]. Journal of Asian Natural Products Research, 2015, 17(7): 772-777
- [13] 王靖雯, 徐伟, 肖朝江, 董相, 姜北. 灰毛康定黄芪地下部分化学成分研究[J]. 中草药, 2019, 50(7): 1527-1531
Wang JW, Xu W, Xiao CJ, Dong X, Jiang B. Chemical

- constituents of underground parts of *Astragalus tatsienensis* var. *incanus*[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2019, 50(7): 1527-1531 (in Chinese)
- [14] Zhao MZ, Shen Y, Xu W, Chen YZ, Xiao CJ, Jiang B. A new lignan glycoside from *Astragalus yunnanensis*[J]. Journal of Asian Natural Products Research, 2020, 22(6): 594-600
- [15] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections[J]. Science, 1999, 284(5418): 1318-1322
- [16] Song ZM, Zhang JL, Zhou K, Yue LM, Zhang Y, Wang CY, Wang KL, Xu Y. Anthraquinones as potential antibiofilm agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 709826
- [17] Kaeberlein T, Lewis K, Epstein SS. Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment[J]. Science, 2002, 296(5570): 1127-1129
- [18] Asnicar F, Weingart G, Tickle TL, Huttenhower C, Segata N. Compact graphical representation of phylogenetic data and metadata with GraPhlAn[J]. PeerJ, 2015, 3: e1029
- [19] 梁锦有, 张骏梁, 郑晓丽, 陈烁钿, 杨鹏, 廖孟滨, 徐颖. 石磺海牛共附生细菌的分离和活性菌株筛选[J]. 微生物学报, 2021, 61(4): 862-874
Liang JY, Zhang JL, Zheng XL, Chen SD, Yang P, Liao MB, Xu Y. Isolation and identification of the symbiotic bacteria of *Homoiodoris japonica* and screen of bioactive metabolite producing bacteria[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(4): 862-874 (in Chinese)
- [20] Yin Q, Liang JY, Zhang WP, Zhang L, Hu ZL, Zhang Y, Xu Y. Butenolide, a marine-derived broad-spectrum antibiofilm agent against both Gram-positive and gram-negative pathogenic bacteria[J]. Marine Biotechnology, 2019, 21(1): 88-98
- [21] Frisvad JC, Rank C, Nielsen KF, Larsen TO. Metabolomics of *Aspergillus fumigatus*[J]. Medical Mycology, 2009, 47(sup1): S53-S71
- [22] Malik H, Sur B, Singhal N, Bihari V. Antimicrobial protein from *Streptomyces fulvissimus* inhibitory to methicillin resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Indian Journal of Experimental Biology, 2008, 46(4): 254-257
- [23] Sulistiyani TR, Masrukhin, Purnaningsih I, Napitupulu TP, Budiyanto A, Kanti A, Sudiana IM. Endophytic bacteria diversity from Zingiberaceae and anticandidal characterization produced by *Pseudomonas helmanticensis*[J]. Jurnal Teknologi, 2020, 83(1): 7-17
- [24] Zakhia F, Jeder H, Willems A, Gillis M, Dreyfus B, de Lajudie P. Diverse bacteria associated with root nodules of spontaneous legumes in Tunisia and first report for nifH-like gene within the genera *Microbacterium* and *Starkeya*[J]. Microbial Ecology, 2006, 51(3): 375-393
- [25] Pang CM, Liu WT. Community structure analysis of reverse osmosis membrane biofilms and the significance of *Rhizobiales* bacteria in biofouling[J]. Environmental Science & Technology, 2007, 41(13): 4728-4734
- [26] Ciok A, Budzik K, Zdanowski MK, Gawor J, Grzesiak J, Decewicz P, Gromadka R, Bartosik D, Dziewit L. Plasmids of psychrotolerant *Polaromonas* spp. isolated from Arctic and Antarctic glaciers - diversity and role in adaptation to polar environments[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1285
- [27] Li HY, Taj MK, Ji XL, Zhang Q, Lin LB, Zhou ZM, Wei YL. Bacterial communities in soil samples from the Mingyong Glacier of southwestern China[J]. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 2017, 30(3): 689-696
- [28] 吴林坤, 林向民, 林文雄. 根系分泌物介导下植物-土壤-微生物互作关系研究进展与展望[J]. 植物生态学报, 2014, 38(3): 298-310
Wu LK, Lin XM, Lin WX. Advances and perspective in research on plant-soil-microbe interactions mediated by root exudates[J]. Chinese Journal of Plant Ecology, 2014, 38(3): 298-310 (in Chinese)
- [29] Zhang YM, Lu L, Chang XL, Jiang F, Gao XD, Yao YF, Li CS, Cao SN, Zhou QM, Peng F. Small-scale soil microbial community heterogeneity linked to landform historical events on King George Island, maritime Antarctica[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 3065
- [30] Salwan R, Sharma V, Saini R, Pandey M. Identification of plant beneficial *Bacillus* spp. for resilient agricultural ecosystem[J]. Current Research in Microbial Sciences, 2021, 2: 100046
- [31] Mihalache G, Zamfirache MM, Hamburda S, Stoleru V, Munteanu N, Stefan M. Synergistic effect of *Pseudomonas lini* and *Bacillus pumilus* on runner bean growth enhancement[J]. Environmental Engineering and Management Journal, 2016, 15(8): 1823-1831
- [32] 周亚男, 韩小斌, 魏可可, 苟剑渝, 王先勃, 张成省, 郑艳芬. 烟草根际可培养微生物多样性及防病促生菌的筛选[J]. 微生物学通报, 2021, 48(12): 4649-4663
Zhou YN, Han XB, Wei KK, Gou JY, Wang XB, Zhang CS, Zheng YF. The culturable microbial diversity in tobacco rhizosphere and their plant growth-promoting and biocontrol properties[J]. Microbiology China, 2021, 48(12): 4649-4663 (in Chinese)
- [33] Kollakalnaduvil Raghavan RM, Ali Pannippara M, Kesav S, Mathew A, G Bhat S, Hatha AA M, KK E. MFAP9: characterization of an extracellular thermostable antibacterial peptide from marine fungus with biofilm eradication potential[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2021, 194: 113808