



高寒特境中甸黄芪植物根际微生物物种多样性及其抗生物膜活性成分

龚高芬^{1,2}, 窦峥嵘^{1,2}, 周国军^{1,2}, 丁佳洁^{1,2}, 申晓春^{1,2}, 陈晓洁^{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

龚高芬, 窦峥嵘, 周国军, 丁佳洁, 申晓春, 陈晓洁, 姜北, 王开玲. 高寒特境中甸黄芪植物根际微生物物种多样性及其抗生物膜活性成分[J]. 微生物学报, 2023, 63(10): 3967-3986.

GONG Gaofen, DOU Zhengrong, ZHOU Guojun, DING Jiajie, SHEN Xiaochun, CHEN Xiaojie, JIANG Bei, WANG Kailing. Species diversity and anti-biofilm components of rhizosphere microorganisms derived from *Astragalus forrestii* in special high-cold environments[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(10): 3967-3986.

摘要: 滇西北高寒地区分布着丰富的黄芪属植物资源, 该属植物“根际效应”明显, 其根际微生物极具抗菌药用资源研究价值。【目的】认知滇西北高寒特境中甸黄芪根际微生物的物种多样性, 探究其可培养菌株次生代谢产物的化学多样性及抗菌、抗生物膜活性。【方法】采用宏基因组和微生物纯培养方法对中甸黄芪植物根际微生物进行物种多样性分析, 同时采用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)、超高效液相色谱-质谱联用法(ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry, UPLC-MS)结合“微量肉汤稀释法”“孔板法”等多级联合筛选策略综合评估可培养菌株的抗菌活性药源研究价值。【结果】对中甸黄芪根际土壤样本的微生物分类操作单元(operational taxonomic units, OTU)进行分类注释, 得到 22 门 54 纲 105 目 187 科 316 属 856 种微生物, 其中优势菌群为慢生根瘤菌属。纯培养共获得 27 属 54 种 95 株可培养菌株, 包括 20 属 33 种 54 株细菌和 7 属 21 种 41 株真菌, 优势属分别为芽孢杆菌属和青霉菌属。其中, 1 株细菌 *Pseudomonas tolaasii* ZTB4 和 3 株真菌 *Aspergillus tabacinus* ZNF17、*Lecanicillium aphanocladii* ZNF15、*Umbelopsis nana* ZTF31 的次生代谢产物具有广谱抗菌活性。同时, 菌株 ZTB4 和 ZNF17

资助项目: 国家自然科学基金(32060032); 云南省科技厅面上项目(202001AT070022, 202301AT070157); 大理大学高层次人才科研经费专项(KYBS2021099)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32060032), the Basic Research Projects of Department of Science and Technology of Yunnan Province (202001AT070022, 202301AT070157), and the Scientific Research Foundation for High-level Talents of Dali University (KYBS2021099).

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-872-2257259, E-mail: kailingw@dali.edu.cn

Received: 2023-03-05; Accepted: 2023-07-03; Published online: 2023-07-24

的次生代谢产物也显示出优秀的抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)生物膜活性, 并已验证这2株菌株的主要活性成分分别为环脂肽类与黄酮类。【结论】中甸黄芪植物根际微生物物种多样性较为丰富, 其可培养菌株次生代谢产物有较好的化学多样性和抗菌、抗生物膜活性。研究结果为我国特境特色微生物药用资源的开发利用提供理论依据。
关键词: 高寒特殊生境; 中甸黄芪; 根际微生物; 抗生物膜活性; 托拉斯假单胞菌; 烟草曲霉

Species diversity and anti-biofilm components of rhizosphere microorganisms derived from *Astragalus forrestii* in special high-cold environments

GONG Gaofen^{1,2}, DOU Zhengrong^{1,2}, ZHOU Guojun^{1,2}, DING Jiajie^{1,2}, SHEN Xiaochun^{1,2}, CHEN Xiaojie^{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

Abstract: There are abundant plant resources of *Astragalus* in the high-cold region of northwestern Yunnan. These plants have obvious rhizosphere effect and their rhizosphere microorganisms are considered medicinal resources with great antimicrobial potential. **[Objective]** To understand the species diversity of rhizosphere microorganisms of *Astragalus forrestii* growing in the special high-cold environment of northwestern Yunnan, and the chemical diversity and the antimicrobial and anti-biofilm activities of the secondary metabolites produced by cultivable strains. **[Methods]** Metagenomic sequencing and culture-dependent method were employed to explore the microbial diversity in the rhizosphere soil of *A. forrestii*. High performance liquid chromatography (HPLC) and ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS) were combined with broth microdilution and microplate assays to evaluate the chemical diversity and antimicrobial and anti-biofilm activities of the ethyl acetate (EA) extracts of strain fermentation broths. **[Results]** The operational taxonomic units of the rhizosphere soil samples of *A. forrestii* were classified and annotated to 856 species belonging to 316 genera, 187 families, 105 orders, 54 classes, and 22 phyla. *Bradyrhizobium* was the dominant genus. A total of 95 cultivable strains of 54 species belonging to 27 genera were obtained, including 54 bacterial strains of 33 species belonging to 20 genera and 41 fungal strains of 21 species belonging to 7 genera, among which *Bacillus* and *Penicillium* were predominant. The secondary metabolites of the bacterial strain *Pseudomonas tolaasii* ZTB4 and the fungal strains *Aspergillus tabacinus* ZNF17, *Lecanicillium aphanocladii* ZNF15, and *Umbelopsis nana* ZTF31 displayed broad-spectrum antimicrobial activities. The secondary metabolites of strains ZTB4 and ZNF17 showed strong inhibitory activity against the biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). The main active components of these two

strains were cyclic lipopeptides and flavonoids, respectively. **[Conclusion]** The rhizosphere soil of *A. forrestii* harbors rich microorganism, and the secondary metabolites of some cultivable strains have high chemical diversity and strong antimicrobial and anti-biofilm activities. The results provide a theoretical basis for the development and utilization of characteristic microbial medicinal resources in special environments in China.

Keywords: special high-cold environment; *Astragalus forrestii*; rhizosphere microorganism; anti-biofilm activity; *Pseudomonas tolaasii*; *Aspergillus tabacinus*

黄芪(*Astragalus*)为多年生、深根系的豆科植物,“根际效应”明显,主要表现为其根系分泌物及凋落物不断输入根际土壤,为根际微生物提供了丰富的营养,使得根际微生物数量和活性显著高于非根际土壤。近年研究者对黄芪属植物根际微生物药用资源的研究主要集中在蒙古黄芪及少数几种能够指示草地退化的黄芪,而对其他黄芪属植物的根际微生物资源的研究较少。例如,牟建平等^[1]采用高通量测序技术考察了甘肃6个不同黄芪种植地黄芪根际微生物的群落结构及多样性,结果显示6个种植地的子囊菌门相对丰度均较高。李冰圳等^[2]采用 Illumina MiSeq 高通量测序技术对蒙古黄芪不同生育期根际微生物进行检测,结果显示蒙古黄芪在不同发育期的优势菌群种类相似,即均为放线菌门、变形菌门、厚壁菌门和绿弯菌门,但相对丰度差异较大。李国斌等^[3]采用平板法对受干旱胁迫下的蒙古黄芪根际微生物群落特征进行研究,结果显示受干旱影响的黄芪根际细菌和放线菌种群数量表现出先增后减的趋势,而根际真菌数量则呈持续下降的趋势。云南虽无正品黄芪分布,但由于其独特的气候、地形等环境因素,在滇西北高寒地区分布着物种丰富的黄芪属植物,据统计目前已有各类黄芪属植物约50种^[4],且多种近源植物作为正品黄芪代用品在民间被广泛使用^[5]。但由于这些地区处于“三江并流”的核心地带,同时又位于青藏高原南部,海拔高、气候寒冷、紫外线强、

昼夜温差大,自然条件极为恶劣。故目前对生长于滇西北高寒生境中的黄芪属植物及其微生物资源的研究认识和开发利用度极低,仅有钱子刚等^[6]和姜北课题组^[7-9]开展过一些相关植物资源分类和植物化学方面的研究,以及本课题组陈成等^[10]前期报道的从白马雪山云南黄芪植物根际微生物中分离得到了一株高效抗 MRSA 生物膜活性曲霉属真菌 *Aspergillus fumigatus* YNF5 的研究。因此,滇西北高寒特境黄芪属植物根际微生物极具药用资源研究价值。

细菌生物膜(bacterial biofilm, BBF),以下简称“生物膜”,是指附着于有生命或无生命物体表面包裹在由细菌自身分泌的细胞外基质中的具有三维组织结构的细菌群体,被认为是造成耐药菌耐药性增强及感染难以治愈的重要原因之一^[11]。针对生物膜目前尚无特效药物,寻找满足临床需要的新型抗菌、抗生物膜活性成分成为迫切需要。随着人们对普通环境微生物的反复研究,从该类资源中找到新型抗菌、抗生物膜活性化合物愈发困难。因此,越来越多的研究者开始将抗生素药源研发聚焦于研究相对较少的特殊生态环境(以下简称“特境”)中的微生物,尤其是从特境微生物中发掘抗生素活性成分。目前特境微生物抗生素活性天然药物研究主要集中于海洋生境^[12]、红树林湿地^[13]以及昆虫肠道^[14]等,而高海拔微生物的研究相对较少。滇西北黄芪属植物生长于高寒环境中,其根际微生物更具抗逆性,在进化过程中可能

会产生特殊的活性物质。课题组前期研究^[10]已初步表明,云南白马雪山黄芪属植物根际微生物具有较好的抗生物膜活性药用资源研究价值。因此,基于滇西北高寒特境黄芪属植物根际微生物的药源研究,从中发掘高效抗生物膜活性次生代谢产物,对于解决目前抗生物膜活性天然药源紧张问题具有十分重要的现实意义。

中甸黄芪(*Astragalus forrestii*),别名丽江黄芪、密花黄芪,是中国特有植物,主要分布于云南西北部(丽江、中甸)等地^[15],目前未见任何关于中甸黄芪的报道。本研究对采集自云南省迪庆藏族自治州香格里拉市南部小中甸镇(海拔 3 225 m)的中甸黄芪植物根际微生物进行研究,利用宏基因组测序技术与传统微生物纯培养法对中甸黄芪植物根际微生物物种多样性进行探究,并利用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)、超高效液相色谱-质谱联用法(ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry, UPLC-MS)对菌株次生代谢产物进行化学多样性筛选,结合“微量肉汤稀释法”“孔板法”等进行抗菌、抗生物膜活性筛选,旨在认识中甸黄芪植物根际可培养微生物的物种组成,获得高效抗菌、抗菌膜活性菌株及其次生代谢产物,为该植物根际微生物的抗生物膜活性成分深入发掘提供数据支撑和菌株基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样品及主要试剂、仪器

黄芪样品于 2021 年 9 月 24 日(中甸黄芪花果期)采集自云南省迪庆藏族自治州香格里拉市南部小中甸(27°26'N, 99°49'E, 海拔 3 225 m),并经云南省滇西抗病原植物资源筛选重点实验室姜北教授鉴定为中甸黄芪(*Astragalus forrestii*)。将中甸黄芪样品整株挖出,抖落根

部附着土壤后,黄芪全株及根系周围 5 cm 的土壤分别装入大号无菌自封袋中,低温运至实验室,4 °C 冰箱保存,48 h 内完成涂布处理。中甸黄芪根际土壤理化性质如下:pH 5.29,有机质 OM 55.125 g/kg,全氮 TN、全磷 TP 及全钾 TK 含量分别为 3.372、1.659、13.036 g/kg。

试剂及仪器: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 快速抽提试剂盒和 PCR 扩增引物及 PCR 试剂 *Taq* PCR Master Mix,生工生物工程(上海)股份有限公司;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;1260 型高效液相色谱仪,安捷伦科技有限公司;UltiMate3000 型超高效液相色谱仪,戴安公司;Compact 型质谱系统,Bruker Daltonics 公司。

1.1.2 供试菌株及主要培养基

供试菌株:耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, MRSA ATCC 43300)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus* ATCC 25923)、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)、耐万古霉素粪肠球菌(vancomycin resistant *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, VRE ATCC 51299)、粪肠球菌(*E. faecalis* ATCC 29212)、屎肠球菌(*E. faecium* ATCC 35667)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* NCIB 3610)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883)、副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802)。以上菌株由深圳大学生命与海洋科学学院徐颖教授团队惠赠,本课题组鉴定并保藏至云南省

滇西抗病原植物资源筛选重点实验室菌种资源库。

R2A 培养基、PDA 培养基、LB 培养基、改良高氏 1 号培养基均购自阿拉丁试剂(上海)有限公司; BHI 培养基购自北京依珊汇通科技有限公司; 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; 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 。

1.2 菌株的分离、纯化及物种鉴定

1.2.1 样品处理和涂布

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 的比例混合, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 振荡 4 h, 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液备用。

将该土壤浸渍汁梯度稀释成 10^{-1} – 10^{-5} 倍, 取各样品稀释液 200 μL 均匀涂布于 R2A、改良高氏 1 号和 PDA 培养基, 将已涂布平板置于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中倒置培养 2–5 d。

1.2.2 菌株的分离纯化

待平板长出菌落后用体视显微镜观察菌落形态、颜色和大小, 挑出形态各异、大小不一的单菌落, 并将单菌落反复进行纯化培养直至获得纯的可培养菌株。

1.2.3 菌株的鉴定

参照陈成等^[10]描述的方法进行, 将条带明亮符合条件的 PCR 扩增产物(16S rRNA 和 ITS 基因扩增序列)送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。根据测序结果, 将拼接好的序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对, 记录相似度最高的菌株名称和相似度值, 以大于 97% 的菌株作为标准, 确定菌株物种信息。所得菌株测序数据已全部上传至 NCBI GenBank, 登录号为 OQ851775–OQ851828 和 OQ851831–OQ851871。

1.3 中甸黄芪根际土壤样本的宏基因组测序

1.3.1 样本的提取和检测

采用 CTAB 法对中甸黄芪植物根际土壤样品进行基因组 DNA 的提取, 利用 Agilent 5400 检测 DNA 的浓度、完整性以及纯度。

1.3.2 文库构建及库检

使用 NEBNext[®] Ultra[™] DNA Library Prep Kit for Illumina (NEB) 构建文库。检测合格的 DNA 样品用 Covaris 超声波破碎仪随机打断成长度约为 350 bp 的片段 DNA 片段经末端修复、polyA 尾、加测序接头、纯化和 PCR 扩增等步骤完成整个文库制备。最后, 利用 AMPure XP 系统对 PCR 产物进行纯化, 使用 Agilent 2100 对文库的 insert size 进行检测, 并使用实时 PCR 对文库浓度进行定量分析。

1.3.3 测序质控及数据处理

利用 Illumina NovaSeq 高通量测序平台进行宏基因组测序, 测序结束后的原始数据采用 KneadData 软件对其进行质控和去宿主(质控前后用 FastQC 来检测质控的合理性和效果)。高通量测序后通过质控获得有效序列约 22 458 082 bp, 有效率为 92%, 质量分数 Q20 平均约为 98%, 质量分数 Q30 平均约为 93%, GC 含量占比为 60%, 上述结果表明有效数据质量及可信度均较高(表 1)。

1.3.4 宏基因组数据分析

使用 Kraken2 对样本的有效序列进行注释分类, 然后用 Bracken 来对样本中物种的实际丰度进行估计。使用 HUMAnN2 软件, 将质控和去宿主之后的序列与蛋白质数据库(UniRef90)进行比对, 据 UniRef90 的 ID 和各个功能数据库 ID 的对应关系, 对样本的功能进行注释并统计其功能相对丰度。中甸黄芪根际微生物宏基因组原始数据已上传至 NCBI SRA 中, 登录号为 PRJNA960883。

表 1 中甸黄芪根际土壤微生物宏基因组测序数据

Table 1 Data of rhizosphere soil microorganisms of *Astragalus forrestii* by metagenomic sequencing

Sample	Raw data				Clean data			GC (%)	Cleaned (%)
	Reads (bp)	Base (GB)	Q20 (%)	Q30 (%)	Reads (bp)	Q20 (%)	Q30 (%)		
AFS-R1	26 404 220	7.92	95.95	90.05	24 501 763	97.89	93.11	60.00	92.79
AFS-R2	24 573 856	7.37	96.17	90.51	22 814 567	98.04	93.49	60.00	92.84
AFS-R3	21 678 605	6.50	96.10	90.39	20 057 918	98.03	93.47	60.00	92.52

1.4 菌株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 富集培养 1–2 d, 将培养好的种子液以接种量 4–5 mL 转接到 80 mL SGTYP 培养基中, 置于 28 °C、150 r/min 摇床上培养 3 d。挑取 0.3 g 左右的真菌菌体接种至 100 mL PDB 培养基内, 28 °C、150 r/min 富集培养 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(ethyl acetate, EA)萃取, 摇晃均匀, 超声 10 min, 静置 12 h 后回收 EA, EA 粗浸膏用甲醇少量多次转移至 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。

1.5 可培养菌株发酵液乙酸乙酯粗浸膏的化学筛选及排重

使用 HPLC 对菌株发酵液的 EA 粗浸膏进行化学筛选, 以空白 SGTYP 培养基(细菌)或 PDB 培养基和大米空白培养基(真菌)为对照, 挑选含除培养基组分的菌株发酵液 EA 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 μ m, 4.6 mm \times 250 mm); 色谱条件: 流速 1.0 mL/min, 进样量 5 μ L; 检测波长 190、210、254 和 330 nm;

流动相: 水(A)-甲醇(B)。细菌发酵液 EA 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 EA 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。

UPLC-MS 色谱条件: 色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C18 快速柱(2.7 μ m, 2.1 mm \times 100 mm); 流动相 A: 水; 流动相 B: 乙腈。梯度洗脱: 0–3 min, 5%–100% B; 3–8 min, 100% B。流速 0.4 mL/min, 进样量 5 μ L, 检测波长 210 nm。质谱条件: 以 ESI 为电喷雾离子源, 正离子模式进行扫描, 253.8 kPa 雾化器压力, He 为干燥气体, 8 L/min 气体流速, 220 °C 离子源温度, 350 °C 干燥温度, 4 kV 毛细管电压, m/z 50–2 000 范围内扫描。

1.6 抗菌活性测定

抗菌活性检测采用“微量肉汤稀释法”, 参考文献[10,16]方法进行, 将病原指示菌接种至液体 LB 培养基中, 于 37 °C、160 r/min 培养 8–12 h, 将培养好的菌液稀释至 5×10^5 CFU/mL, 取 1 mL 稀释后的菌液加入到 48 孔板中, 加入适量菌株发酵液 EA 粗浸膏母液后, 稀释至适宜浓度(最高测试浓度为 50 μ g/mL), 阴性对照为 2 μ L DMSO, 阳性对照为终浓度 12.5 μ g/mL 的万古霉素(革兰氏阳性菌)或环丙沙星(革兰氏阴性菌), 空白对照为同体积不加菌液和样品

的 LB 培养基, 每个浓度设置 3 个重复。将 48 孔板置于 37 °C 恒温培养箱中培养 24 h 后用酶标仪测定各孔的吸光度值。

1.7 抗生物膜活性测定

以 MRSA 生物膜为供试对象, 挑选具有广谱抗菌活性且化学多样性丰富的菌株次生代谢产物为进行抗生物膜活性测定的目标样品。抗生物膜活性测定包括抑制生物膜形成和清除成熟生物膜活性两个方面。具体方法参照文献[17]进行。

1.7.1 抑制生物膜形成活性筛选

挑取 MRSA 单菌落置于 LB 液体培养基中 37 °C、160 r/min 培养过夜, 将培养好的菌液稀释至约 5×10^5 CFU/mL, 在 24 孔板每孔中加入 1 mL 菌液, 将样品稀释至 MIC 浓度以下, 设置 4 个浓度梯度, 依次将稀释好的样品加入至孔板中混合均匀, 2 μ L DMSO 作为阴性对照, 终浓度 12.5 μ g/mL 的万古霉素作为阳性对照, 每个浓度梯度设置 3 个重复。置于 37 °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 °C 干燥 30 min 后向每孔加入 1 mL 的结晶紫 (crystal violet, CV) (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} 。得到的活性数据使用 GraphPad Prism 8.0 进行作图分析。

1.7.2 清除成熟生物膜活性筛选

吸取浓度为 5×10^5 CFU/mL 的菌液 1 mL 加入 24 孔板, 孔板置于 37 °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。以含 0.5% 葡萄糖的 LB 培养基将菌株发酵液 EA 粗浸膏稀释至 300、250、200、150、100 μ g/mL, 取 1 mL 稀释样品加入洗涤后的孔板中, 另设阴性对照组 (2 μ L DMSO) 每个组别

3 个重复。加液后的孔板置于 37 °C 培养箱中培养 18–24 h 后, 参照 1.7.1 进行洗膜后, 用噻唑蓝 (thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT) 染色法测定样品对 MRSA 成熟生物膜膜内活菌的清除活性。测定吸光度后计算目标菌株发酵液 EA 粗浸膏对 MRSA 生物膜的抑膜率和清除率。计算公式为: 抑膜率/清除率 = (阴性 OD_{550} 值 - 样品 OD_{550} 值) / 阴性 OD_{550} 值 $\times 100\%$ 。得到的活性数据使用 GraphPad Prism 8.0 进行作图分析。

1.8 数据处理及分析

使用 Excel 2019、GraphPad Prism 8.0、SPSS 25.0 等软件对数据进行统计分析及绘图; 采用单因素方差分析检验样品不同浓度下的抗菌活性及抗生物膜活性。

2 结果与分析

2.1 基于宏基因组测序的植物根际微生物物种多样性分析

使用 Kraken2 对中甸黄芪土壤样本的有效序列进行物种注释分类, 共注释得到 22 门 54 纲 105 目 187 科 316 属 856 种微生物, 分别在门和属水平对相对丰度较高的类群进行物种分析, 结果显示优势门为变形菌门、放线菌门和酸杆菌门, 相对丰度分别为 64.42%、11.63% 和 2.09%, 相对丰度低于 1% 的菌群中占比最高的是子囊菌门 (0.75%) 和厚壁菌门 (0.30%) (图 1A); 优势属为慢生根瘤菌属、副伯克霍尔德氏菌属、分枝杆菌属、贪铜菌属和阿菲波菌属, 其相对丰度分别为 49.13%、5.23%、5.14%、1.82% 和 1.80% (图 1B)。从整体水平上看, 占比最为丰富的是变形菌门中的慢生根瘤菌属, 且在丰度占比前 20 的门和属中仅有子囊菌门、担子菌门 2 个门和晶杯菌属 1 个属为真菌, 其余均为细菌。

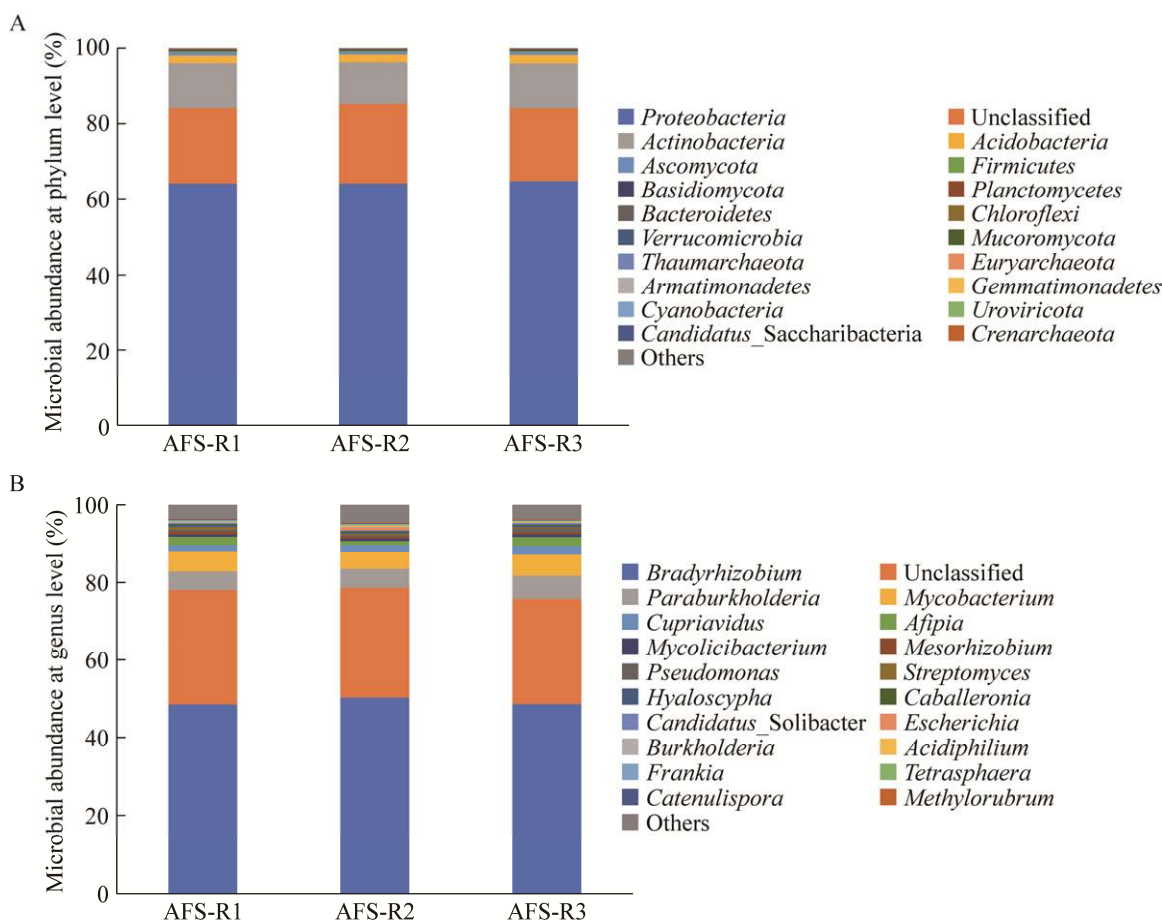


图 1 中甸黄芪根际土壤微生物在门(A)及属(B)水平上的组成(相对丰度前 20)

Figure 1 The soil microbial composition of *Astragalus forrestii* rhizosphere at the phylum (A) and genus (B) levels (top 20).

2.2 根际微生物的 KEGG 注释结果分析

通过 KEGG 注释统计中甸黄芪根际土壤微生物可能参与或涉及到的代谢途径。结果表明, 代谢途径主要集中于新陈代谢(metabolism), 占比为 72.73%(图 2A)。如图 2B 所示, 丰度占比最高的代谢通路为氨基酸代谢(amino acid metabolism, 12.56%)和碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism, 11.31%), 而萜类化合物和聚酮化合物代谢(metabolism of terpenoids and polyketides)和其他次生代谢产物的生物合成(biosynthesis of other secondary metabolites)占比较少, 分别

占比 4.03%和 3.92%, 以上结果提示中甸黄芪根际土壤微生物的次生代谢产物中含有脂肽、聚酮及萜类化合物的可能性极高。

2.3 根际可培养微生物的物种多样性

从中甸黄芪植物根际微生物中共分离得到 7 门 16 纲 27 属 54 种共 95 株可培养菌株, 包括 4 门 10 纲 20 属 33 种 54 株细菌(表 2)和 3 门 6 纲 7 属 21 种 41 株真菌(表 3)。从门水平看, 54 株中甸黄芪根际可培养细菌分属于厚壁菌门、放线菌门、变形菌门和拟杆菌门, 其中优势门为变形菌门, 占比 38.89%, 其次为厚壁菌

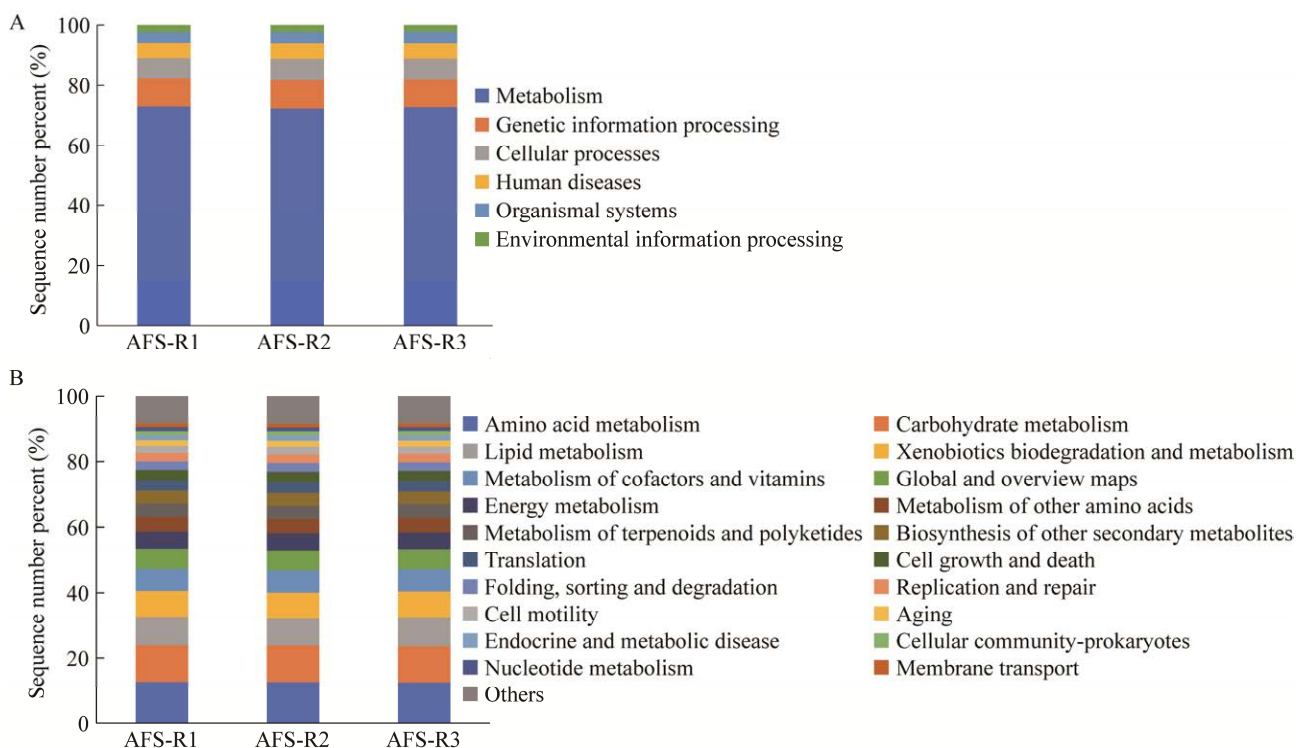


图 2 基于 level 1 (A)和 level 2 (B)层级分析的中甸黄芪根际土壤微生物的 KEGG 功能注释
 Figure 2 Functional annotation of KEGG in rhizosphere soil microorganisms of *Astragalus forrestii* at the levels 1 (A) and 2 (B).

门, 占比 27.78%; 41 株真菌属于子囊菌门、真菌门和毛霉菌门, 优势门为子囊菌门, 占比 60.98%。从属水平上看, 细菌优势属为芽孢杆菌属, 共 4 种 10 株, 其次为假单胞菌属, 共 5 种 8 株; 真菌优势属为青霉属, 共 5 种 14 株, 其次为曲霉属, 共 3 种 10 株, 此外木霉属共分离得到 5 种 8 株。以上结果表明, 中甸黄芪植物根际可培养微生物具有较好的物种多样性, 可能会产生化学结构多样、活性丰富的次生代谢产物。

综合上述宏基因组测序结果与传统纯培养方法所得微生物物种分布格局分析可知, 两种方法获得的优势菌群具有较好一致性, 即变形菌门、厚壁菌门、放线菌门、子囊菌门和毛霉菌门均为优势菌群, 并且仅在物种丰度差异上

有细微差别, 这也说明了本研究中中甸黄芪植物根际微生物可培养菌株的溯源具有一定可信度。但从属水平上看, 高通量宏基因组测序法检测得到的优势属如慢生根瘤菌属、副伯克霍尔德氏菌属、分枝杆菌属和阿菲波菌属等均未在纯培养法中分离得到, 这可能与本研究中培养基无法满足特殊菌株的生长有关。

2.4 基于 HPLC 化学筛选的根际可培养微生物次生代谢产物的化学多样性

使用 HPLC 对上述代表性 44 株细菌和 15 株真菌发酵液 EA 粗浸膏进行化学多样性分析发现, 与空白 SGTYP 培养基比较, 共 9 株细菌的次生代谢产物具有较好化学多样性, 其中菌株 *Stenotrophomonas maltophilia* ZNB16、*Bacillus subtilis* ZTB23、*Arthrobacter bambusae* ZTB5

表 2 分离自滇西北高寒特境的中甸黄芪根际细菌

Table 2 Bacteria isolated from *Astragalus forrestii* rhizosphere in special high-cold environment of northwestern Yunnan

Phylogenetic group (genus)	Nearest type strain (accession No.)	Number of strains	Sequence identity (%)
<i>Bacillus</i>	<i>B. weihenstephanensis</i> (FR727703.1)	2	100
	<i>B. velezensis</i> (MT649755.1)	2	100
	<i>B. mycoides</i> (MT586023.1)	5	100
	<i>B. subtilis</i> (MT645613.1)	1	100
<i>Paenibacillus</i>	<i>P. terrae</i> (KR085811.1)	1	99
	<i>P. terrae</i> (LC127093.1, MT634584.1)	2, 2	100
<i>Arthrobacter</i>	<i>A. bambusae</i> (MN710453.1)	2	99
	<i>A. bambusae</i> (LN890163.1)	1	100
	<i>A. nicotinovorans</i> (FN908773.1)	2	99
<i>Microbacterium</i>	<i>M. phyllosphaerae</i> (MT533897.1)	1	100
<i>Streptomyces</i>	<i>S. indigoferus</i> (KY407747.1)	2	100
	<i>S. graminifolii</i> (OK668241.1)	1	100
	<i>S. fildesensis</i> (MK742730.1)	1	100
<i>Streptacidiphilus</i>	<i>S. carbonis</i> (MW597713.1)	1	100
<i>Kutzneria</i>	<i>K. chonburiensis</i> (NR_145619.1)	1	99
<i>Amycolatopsis</i>	<i>A. regifaucium</i> (AY129769.1)	1	100
<i>Collimonas</i>	<i>C. fungivorans</i> (AB740926.1)	1	99
<i>Cupriavidus</i>	<i>C. basilensis</i> (KF312291.1)	2	98
<i>Duganella</i>	<i>D. zoogloeoides</i> (JQ689172.1)	1	98
	<i>D. alba</i> (NR-170532.1)	1	97
<i>Pseudomonas</i>	<i>P. orientalis</i> (CP027726.1, MT605336.1)	2, 1	100
	<i>P. koreensis</i> (AB495131.1)	1	99
	<i>P. koreensis</i> (MN602520.1)	1	100
	<i>P. tolaasii</i> (MT561438.1)	1	100
	<i>P. yamanorum</i> (CP012400.1)	1	100
	<i>P. rhodesiae</i> (MG571697.1)	1	100
<i>Ewingella</i>	<i>E. americana</i> (KY400216.1)	1	100
<i>Pantoea</i>	<i>P. vagans</i> (KC139414.1)	1	98
	<i>p. agglomerans</i> (MT561437.1)	1	100
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>S. maltophilia</i> (MN922522.1)	1	100
<i>Serratia</i>	<i>S. plymuthica</i> (CP053398.1)	2	100
<i>Mesorhizobium</i>	<i>M. shangrilense</i> (NR_116163.1)	1	100
<i>Pedobacter</i>	<i>P. wanjuense</i> (MT071385.1)	2	99
<i>Mucilaginibacter</i>	<i>M. celer</i> (CP032869.1)	1	99
<i>Chryseobacterium</i>	<i>C. gwangjuense</i> (NR-135722.1)	2	98
<i>Flavobacterium</i>	<i>F. johnsoniae</i> (KC122700.1)	1	99

表 3 分离自滇西北高寒特境的中甸黄芪根际真菌

Table 3 Fungi isolated from *Astragalus forrestii* rhizosphere in special high-cold environment of northwestern Yunnan

Phylogenetic group (genus)	Nearest type strain (accession No.)	Number of strains	Sequence identity (%)
<i>Aspergillus</i>	<i>A. fumigatus</i> (MK887927.1, MT597442.1, MN588060.1, MN634608.1, MN473284.1, MK419096.1, MT558945.1)	1, 1, 1, 1, 1, 1, 1	100
	<i>A. versicolor</i> (MT582751.1)	1	100
	<i>A. tabacinus</i> (MT102849.1)	2	100
<i>Penicillium</i>	<i>P. cluniae</i> (KF296406.1)	1	100
	<i>P. vasconiae</i> (MH861218.1)	10	100
	<i>P. suaveolens</i> (MH864249.1)	1	99
	<i>P. thomii</i> (MN955120.1)	1	100
	<i>P. glabrum</i> (MH865723.1)	1	100
<i>Lecanicillium</i>	<i>L. aphanocladii</i> (MN944423.1)	1	100
<i>Cladosporium</i>	<i>C. cladosporioides</i> (MH425309.1)	1	100
<i>Trichoderma</i>	<i>T. atroviride</i> (MT514373.1)	3	100
	<i>T. paraviridescens</i> (MN900599.1)	1	100
	<i>T. koningiopsis</i> (KU645324.1, MT131273.1)	1, 1	100
	<i>T. viride</i> (MN594481.1)	1	100
	<i>T. longipile</i> (AY737763.1)	1	100
<i>Mortierella</i>	<i>M. minutissima</i> (MH474282.1)	1	100
	<i>M. alpina</i> (MH859872.1)	2	100
	<i>M. verticillata</i> (MT028128.1)	1	99
<i>Umbelopsis</i>	<i>U. vinacea</i> (KT354998.1)	1	99
	<i>U. ramanniana</i> (MF417273.1)	1	98
	<i>U. nana</i> (MT344188.1)	1	100

最为丰富(图 3A), 这些菌株的次生代谢产物的保留时间主要集中在 18–23 min, 属于中等极性化合物, 但假单胞属菌株 *Pseudomonas tolaasii* ZTB4 的次生代谢产物出现在 37 min 左右, 为小极性化合物, 紫外吸收与已报道的 *P. tolaasii* 产生的脂肽类托拉斯毒素相似, 该毒素能有效抑制病原真菌立枯丝核的生长^[18]。与空白大米和 PDB 培养基比较, 共计 5 株真菌菌株发酵液的 EA 粗浸膏呈现出化学多样性(图 3B、3C), 包括 2 株曲霉属、2 株青霉属和 1 株枝孢属真菌, 其中化学多样性最为丰富的是 *Aspergillus tabacinus* ZNF17, 其次生代谢产物保留时间出现在 27–40 min, 极性中等偏小, 查阅相关文

献发现该菌株目前研究的极少, 仅有关于其为曲霉属新种^[19]、菌株具有降解新型污染物活性^[20]以及从天山雪莲中分离得到的该菌发酵液 EA 粗浸膏能产黄酮类化合物的报道^[21]。同时, 已通过 TLC 及显色反应初步验证菌株 ZNF17 的次生代谢产物主要成分为黄酮类化合物, 这也与文献报道的天山雪莲来源烟草曲霉发酵液 EA 粗浸膏所产化合物类型一致。

2.5 可培养菌株次生代谢产物的抗菌活性

依据上述 HPLC 化学筛选结果, 对化学多样性较为丰富的代表性菌株发酵液 EA 粗浸膏进行抗菌活性筛选。如表 4 所示, 共 1 株细菌 *Pseudomonas tolaasii* ZTB4 和 4 株真菌 *Penicillium*

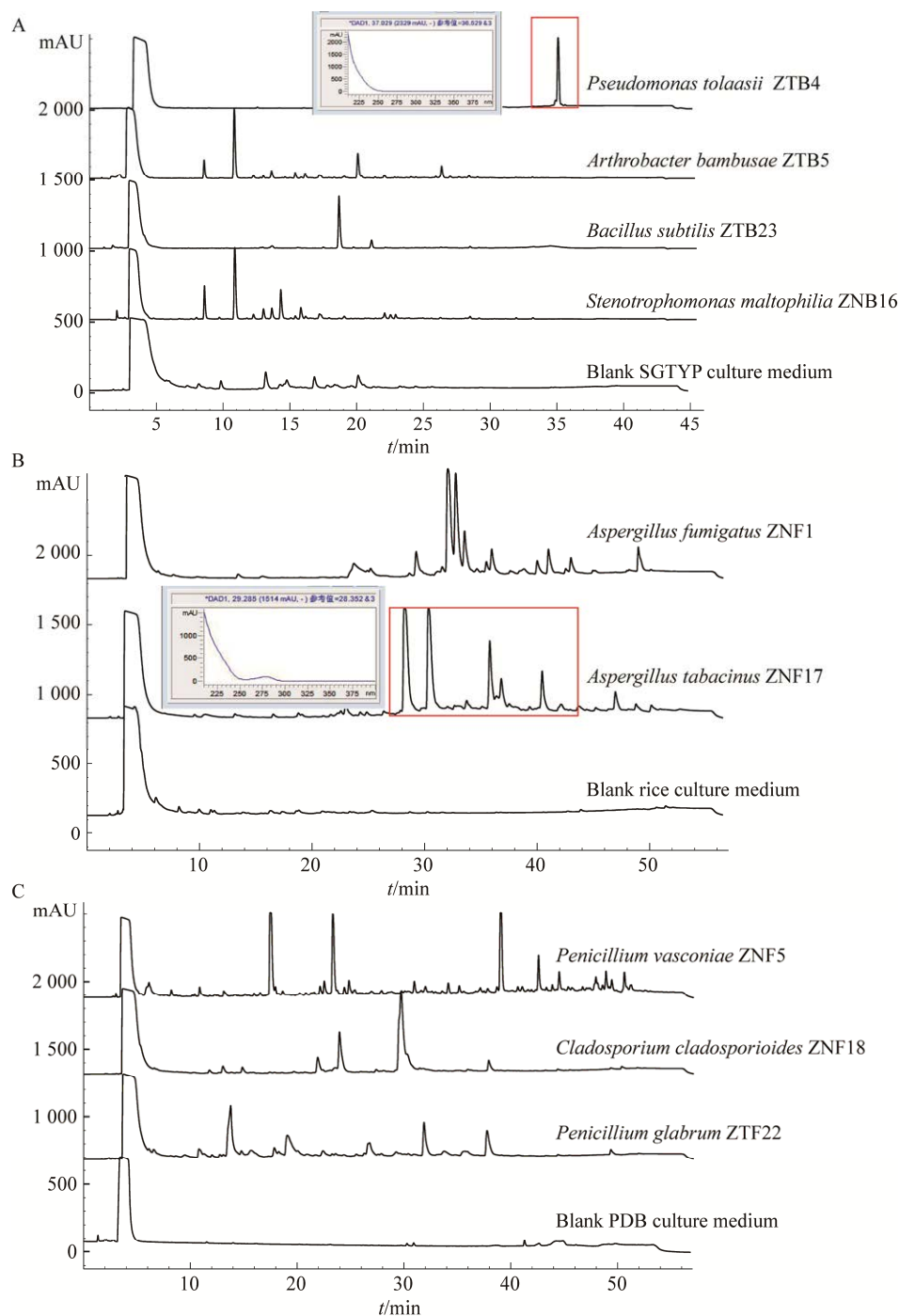


图 3 中甸黄芪菌株发酵液乙酸乙酯粗浸膏 HPLC 谱图

Figure 3 HPLC spectra of crude ethyl acetate (EA) extractions of fermentation broth of rhizosphere microorganisms derived from *Astragalus forrestii*. A–C: HPLC spectra of crude EA extractions of the broth of blank SGTYP culture medium and the fermentation broth of bacteria *Stenotrophomonas maltophilia* ZNB16, *Bacillus subtilis* ZTB23, *Arthrobacter bambusae* ZTB5, and *Pseudomonas tolaasii* ZTB4 (A), the blank rice culture medium and the fermentation broth of fungi *Aspergillus tabacinus* ZNF17 and *A. fumigatus* ZNF1 (B), and the broth of blank PDB culture medium and the fermentation broth of fungi *Penicillium glabrum* ZTF22, *P. vasconiae* ZNF5, and *Cladosporium cladosporioides* ZNF18 (C).

表 4 菌株发酵液乙酸乙酯粗浸膏对受试病原菌的抗菌活性

Table 4 Anti-bacterial activity of the ethyl acetate crude extracts of microbial fermentation broth against the tested pathogens ($\mu\text{g/mL}$)

Strain	<i>Pseudomonas tolaasii</i> ZTB4	<i>Penicillium vasconiae</i> ZNF5	<i>Lecanicillium aphanocladii</i> ZNF15	<i>Aspergillus tabacinus</i> ZNF17	<i>Umbelopsis nana</i> ZTF31
<i>Bacillus subtilis</i> NCIB 3610	7.50	–	50.00	15.00	50.00
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 35667	7.50	–	–	–	–
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	7.50	–	50.00	–	50.00
vancomycin resistant <i>E. faecalis</i> (VRE) ATCC 51299	14.38	–	50.00	–	50.00
<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 13813	6.25	50.00	50.00	15.00	50.00
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	20.00	–	50.00	20.00	50.00
methicillin-resistant <i>S. aureus</i> (MRSA) ATCC 43300	–	–	25.00	37.50	50.00
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	–	–	50.00	20.00	25.00
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	–	–	50.00	30.00	50.00
<i>Vibrio parahemolyticus</i> ATCC 17802	–	–	50.00	–	–
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	–	–	–	50.00	–

–: No anti-bacterial activity at the concentration of 50 $\mu\text{g/mL}$. Bold fonts represent the ethyl acetate crude extracts of microbial fermentation broth have more significant anti-bacterial activity.

vasconiae ZNF5、*Lecanicillium aphanocladii* ZNF15、*Aspergillus tabacinus* ZNF17、*Umbelopsis nana* ZTF31 发酵液 EA 粗浸膏对 MRSA ATCC 43300、金黄色葡萄球菌 ATCC 25923、无乳链球菌 ATCC 13813 等 11 种病原菌具有不同程度的抗菌活性。其中假单胞菌属细菌 ZTB4 发酵液 EA 粗浸膏有较强的抗革兰阳性菌活性(MIC 范围为 6.25–20.00 $\mu\text{g/mL}$)，尤其对无乳链球菌的 MIC 为 6.25 $\mu\text{g/mL}$ ，对 2 株肠球菌和枯草芽孢杆菌的 MIC 均为 7.50 $\mu\text{g/mL}$ ，但对 2 株革兰阴性菌并未表现出活性；曲霉属菌株 ZNF17 发酵液 EA 粗浸膏具有广谱抗菌活性，即对 6 株革兰阳性受试病原菌及 1 株革兰阴性菌肺炎克雷伯菌 ATCC 13883 均表现出中等至较强的抗菌活性(MIC 范围为 15.00–50.00 $\mu\text{g/mL}$)；轮枝菌属真菌 ZNF15 发酵液 EA 粗浸膏对所测革兰阳性菌几乎均有中等强度的抗菌活性(MIC 范围为 25.00–50.00 $\mu\text{g/mL}$)，此外还对副溶血性弧

菌 ATCC 17802 有抗菌活性(MIC 为 50.00 $\mu\text{g/mL}$)；伞形霉菌 ZTF31 发酵液粗浸膏对 8 株革兰阳性菌表现出中等强度抗菌活性(MIC 范围为 25.00–50.00 $\mu\text{g/mL}$)。以上结果表明中甸黄芪根际可培养菌株发酵液 EA 粗浸膏具有较强抗菌活性，尤其是菌株 ZTB4 和 ZNF17 极具抗菌活性药源研发价值。

2.6 目标菌株的抗生物膜活性

综合上述化学多样性与抗菌活性筛选结果，将托拉斯假单胞菌 *Pseudomonas tolaasii* ZTB4 和烟草曲霉 *Aspergillus tabacinus* ZNF17 确定为目标菌株，并对其发酵液 EA 粗浸膏以 MRSA 生物膜为受试对象进行抗生物膜活性筛选。CV 染色结果与剩余的生物膜量有关，MTT 染色结果与膜内活菌数有关。CV 染色法结果显示，菌株 ZTB4 发酵液 EA 粗浸膏在 25 $\mu\text{g/mL}$ 对 MRSA 生物膜生长显示出明显的抑制作用(图 4A)且抑膜率超过 50% (图 5A)，但该粗浸

膏在 25 $\mu\text{g/mL}$ 时无抗 MRSA 活性；菌株 ZNF17 发酵液 EA 粗浸膏也在低于其 MIC 值(即在 30 $\mu\text{g/mL}$ 下)时对 MRSA 生物膜生长有明显抑制作用(图 4B)，但抑膜率低于 50% (图 5B)。MTT 染色结果显示，菌株 ZTB4 发酵液 EA 粗浸膏在浓度为 150–300 $\mu\text{g/mL}$ 时对 MRSA 生物膜有明显清除活性且有明显的剂量依赖性(图 4C 和图 5C)，且在浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 时清除率达 58.86%；菌株 ZNF17 发酵液 EA 粗浸膏在浓度为 150–300 $\mu\text{g/mL}$ 时同样显示出明显的清除 MRSA 生物膜活性但无明显的剂量依赖性(图 4D 和图 5D)，且在浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 下清除率就达到 50% 以上。综合上述活性结果发现，菌株 ZTB4 和 ZNF17 的次生代谢产物对

MRSA 的生物膜抑制活性浓度均在其 MIC 值以下，这一现象表明这 2 株菌株发酵液 EA 粗浸膏发挥抗 MRSA 生物膜作用并非是通过简单“杀菌”作用来实现的，但其具体作用机制仍需深入研究。

2.7 托拉斯假单胞菌(*Pseudomonas tolaasii*) ZTB4 次生代谢产物的液质分析

采用 UPLC-MS 对菌株 *Pseudomonas tolaasii* ZTB4 的次生代谢产物(图 6A)进行分析，结合文献调研，推测该菌株的次生代谢产物包含 viscosinamide B^[22]或 pseudodesmin B^[23] (峰 1) 和 viscosinamide A (或称为 viscosinamide^[24])或 pseudodesmin A^[23] (峰 2)。现将质谱解析过程介绍如下：

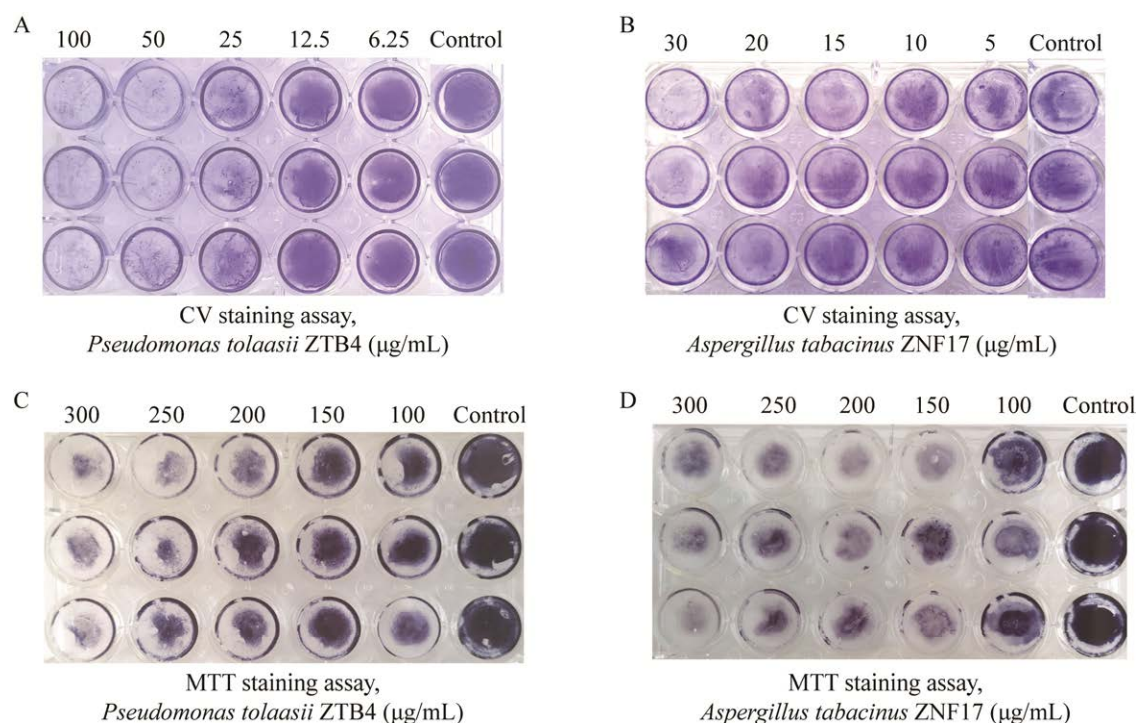


图 4 托拉斯假单胞菌 ZTB4 和烟草曲霉 ZNF17 发酵液乙酸乙酯粗浸膏的抗 MRSA 生物膜活性
Figure 4 Anti-biofilm activity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) of the ethyl acetate (EA) crude extracts of the fermentation broth of *Pseudomonas tolaasii* ZTB4 and *Aspergillus tabacinus* ZNF17. A, B: Biofilm inhibition activity of the EA crude extracts of strain ZTB4 (A) and ZNF17 (B) fermentation broth against MRSA with CV staining assay. C, D: Biofilm eradication activity of the EA crude extracts of strain ZTB4 (C) and ZNF17 (D) fermentation broth against MRSA with MTT staining assay.

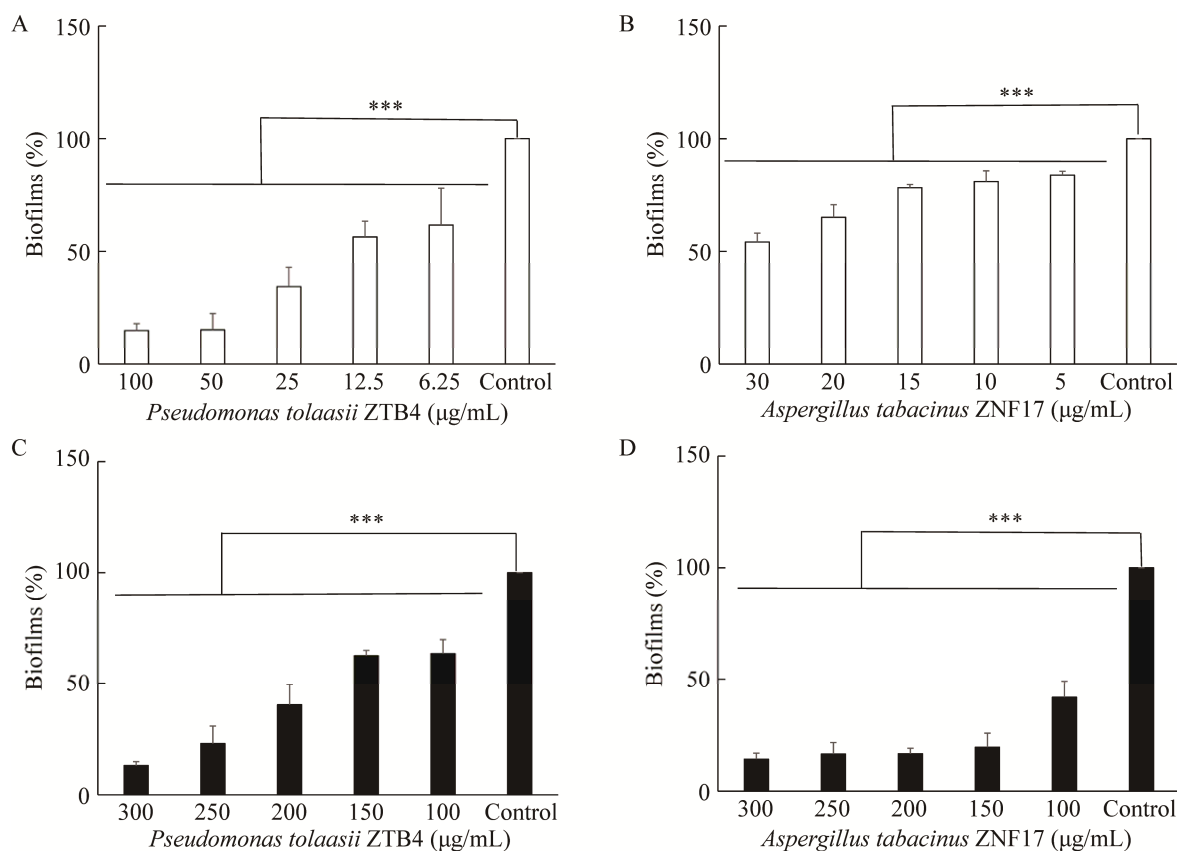


图 5 托拉斯假单胞菌 ZTB4 和烟草曲霉 ZNF17 发酵液乙酸乙酯粗浸膏的抗 MRSA 生物膜活性潜力分析

Figure 5 Analysis of the anti-biofilm activity potential of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) of the ethyl acetate (EA) crude extracts of the fermentation broth of *Pseudomonas tolaasii* ZTB4 and *Aspergillus tabacinus* ZNF17. A, B: Biofilm inhibition activity of strain ZTB4 (A) and ZNF17 (B) fermentation broth against MRSA with CV staining assay. C, D: Biofilm eradication activity of strain ZTB4 (C) and ZNF17 (D) against MRSA with MTT staining assay. The same volume of DMSO was used as negative control. Results are presented as percentages of the control. The data represent mean±SD (n=9); ***: P<0.001.

通过 UPLC-MS 测试, 在正离子模式下进行扫描, 峰 1 的[M+H]⁺为 m/z 1 111.686 5, 与分子式 C₅₃H₉₄N₁₀O₁₅ ([M+H]⁺计算值: 1 111.697 3)相符, 通过二级质谱分析(图 6B), 得到碎片离子有 m/z 828.477 8、700.418 1、617.385 7、594.384 1、518.318 0、495.315 9、412.279 1 和 284.220 7 等, 其可能的裂解部位在图 7 中以 viscosinamide B 为例所示, 结合样品生物来源与文献数据比对^[22-23], 推测其结构为多肽 viscosinamide B 或

pseudodesmin B (图 7A)。峰 2 的[M+H]⁺为 m/z 1 125.704 1, 与分子式 C₅₄H₉₆N₁₀O₁₅ ([M+H]⁺计算值: 1 125.712 9)相符, 通过二级质谱分析(图 6C), 得到碎片离子有 m/z 842.494 5、714.432 3、631.399 9、594.382 9、532.333 5、495.312 3、412.279 0 和 284.220 0 等, 其可能的裂解部位如图 7 中以 viscosinamide A 为例所示, 结合样品生物来源与文献数据比对^[23-24], 推测其结构为多肽 viscosinamide A 或 pseudodesmin A (图 7B)。

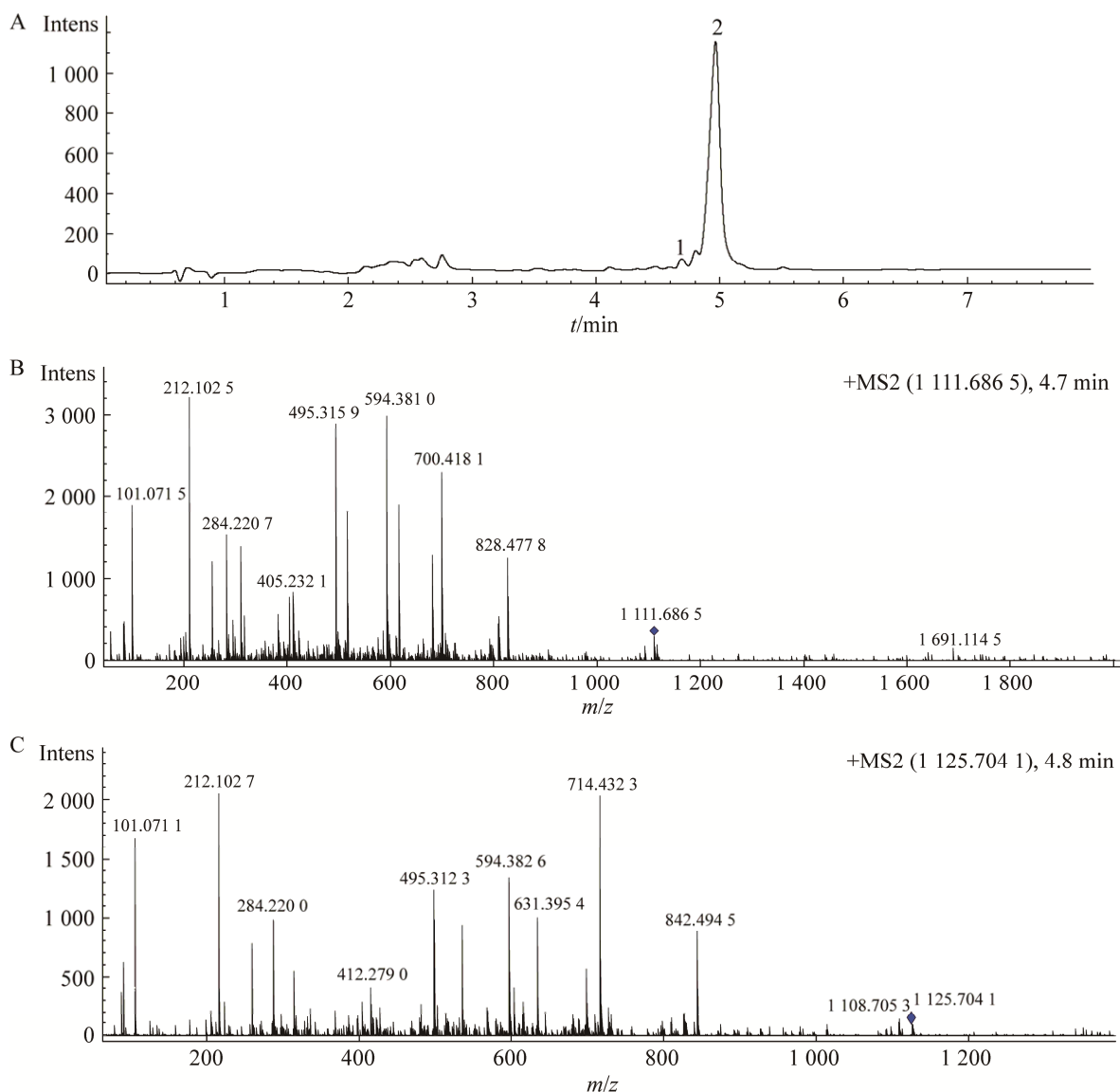


图 6 菌株 *Pseudomonas tolaasii* ZTB4 色谱图(A)及峰 1 (B)与峰 2 (C) MS 图

Figure 6 Chromatograms (A) of *Pseudomonas tolaasii* ZTB4 and MS spectra of peak 1 (B) and peak 2 (C).

3 讨论与结论

本次采样地点为云南香格里拉小中甸镇(海拔 3 325 m), 其海拔高度低于已报道^[10]的云南黄芪与灰毛康定黄芪采集地点白马雪山(海拔 4 420–4 479 m), 但两地生态系统均具有高寒、高海拔、低压的特点, 且随着海拔的升高, 地上的植被密度及凋落物会随之减少, 土

壤中的全氮和磷的含量降低进而会影响土壤中菌群多样性及群落组成的改变。与生长于更高海拔的云南黄芪、灰毛康定黄芪^[10]的植物根际微生物物种组成相比, 低海拔分布的中甸黄芪可能由于土壤中有机质、腐殖质含量更高, 因此其植物根际微生物拥有更为丰富多样的物种群落组成。同时, 中甸黄芪与云南黄芪、灰毛康定黄芪植物根际可培养菌株共有部分菌群并

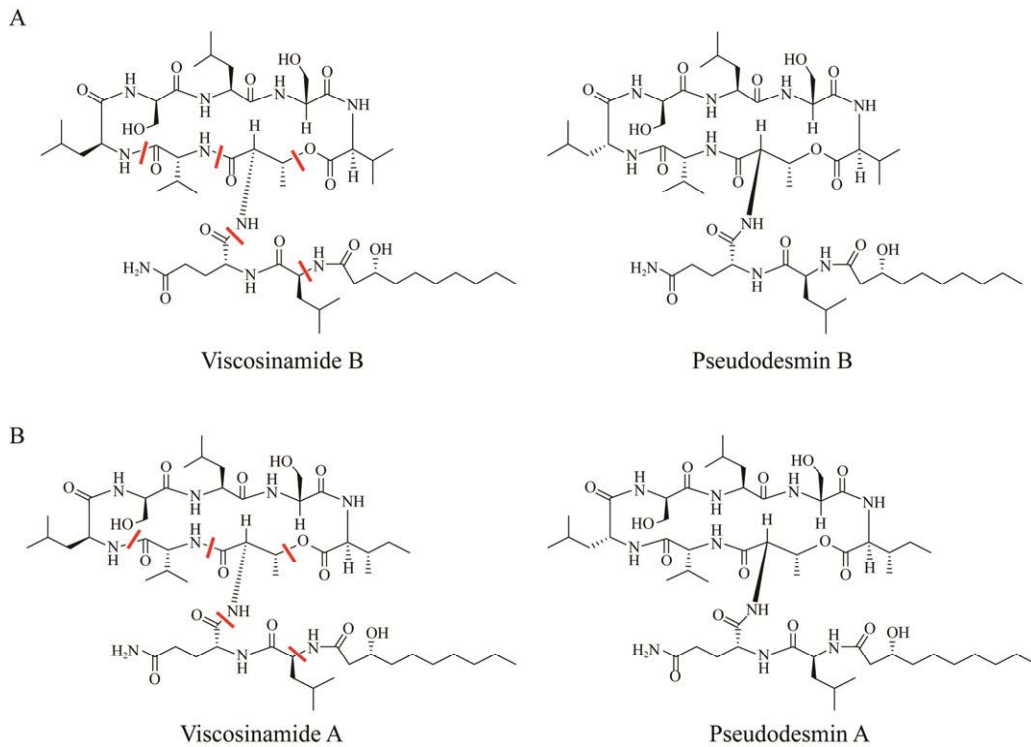


图 7 化合物 1 (A)与化合物 2 (B)的可能化学结构及化合物 viscosinamides B/A 可能的 ESI-MS/MS 裂解部位示例

Figure 7 The proposed chemical structure of compounds 1 (A) and 2 (B), and the ESI-MS/MS fragmentation of viscosinamides B/A.

且又各有其独有属。其中，寡养单胞菌属、节杆菌属、芽孢杆菌属等共有属生防菌的广泛分布可能与这 3 种黄芪均来源于滇西北高寒高海拔的特殊生境，需要极强的环境适应性和抗逆性有关；而中甸黄芪所独有的中慢生根瘤属细菌与云南黄芪独有的慢生根瘤菌属细菌均为具有固氮作用的根瘤菌，这是因为其来源均属豆科植物；分离自更高海拔的云南黄芪与灰毛康定黄芪独有的微小杆菌属细菌并未在中甸黄芪中得到，据报道该属细菌能够在多种极端环境中分离得到具有嗜极性^[25]，这可能是因为云南黄芪与灰毛康定黄芪的生长环境更为极端；而分离自中甸黄芪的独有山冈单胞菌属，该属细菌多分离自高山草甸土壤^[26]，其来源与中甸黄芪生境相符，链嗜酸菌属被报道^[27]具有嗜酸性

这一特性也与中甸黄芪土壤环境呈酸性有关，而在较高海拔的两种黄芪根际样品中并未分离得到以上 2 个属细菌，其原因可能与这 2 种黄芪属植物生长于流石滩与陡坡草地且土壤 pH 均呈中性至弱碱性有关。以上研究结果说明，生长于不同海拔生境的黄芪属植物根际微生物的物种分布具有明显的特异性，且可能为其宿主植物生长发育起着重要作用，同时也为后期滇西北黄芪属植物根际微生物及其次生代谢产物的研究提供数据参考。

本研究发现中甸黄芪根际可培养菌株次生代谢产物具有丰富的化学多样性和较好的抗菌及抗生物膜活性。例如，所得优势属芽孢杆菌属被报道^[28]可产生细菌素、脂肽类、氨基酸等多种次生代谢产物，具有抗菌和抗植物病害等

多种生物活性；链霉菌属是公认的抗生素的主要生产者，几乎 90%放线菌所产抗生素均来自于链霉菌^[29]；曲霉属真菌在自然界中广泛存在并且目前已有超百种化合物被分离得到，其中海洋拉远曲霉属真菌产生的二酮哌嗪类化合物 plinbulin 具有良好的抗肿瘤作用，目前已进入三期临床^[30]。上述具有抗菌活性优势属种菌株的广泛存在可能使得中甸黄芪在较为恶劣的高寒生境中具有较好的抗逆性。同时，本研究中标菌株托拉斯假单胞菌(*Pseudomonas tolaasii*) ZTB4 的活性成分确定为环脂肽类化合物 viscosinamide B/A 或 pseudodesmin B/A。据报道^[31]该类化合物主要来自荧光假单胞菌和绿叶假单胞菌，已被证实具有广谱的抗革兰阳性菌活性但并无抗革兰阴性菌活性^[23]，并且化合物 pseudodesmin A 的全合成途径已明确^[32]。本研究首次报道了化合物 viscosinamide B/A 或 pseudodesmin B/A 源自假单胞属的托拉斯假单胞菌及该类化合物的高效抗 MRSA 生物膜活性，进一步丰富了该多肽类化合物的生物来源，为后续该类化合物的抗生物膜活性深入研究奠定基础。另一目标菌株烟草曲霉(*Aspergillus tabacinus*) ZNF17 目前仅被报道为曲霉属真菌的一个新种^[19]，Conejo-Saucedo 等^[20]从污水污泥中分离得到该种真菌，被证实具有降解新型污染物的作用；吾尔恩·阿合别尔迪等^[21]从天山雪莲中分离得到的该菌种，发现其能产生黄酮类次生代谢产物，该产物类型与本研究菌株 ZNF17 的次生代谢产物类型一致，但关于该种菌株所产黄酮类次生代谢产物的抗菌、抗生物膜活性及天然产物成分结构鉴定研究等方面并未见详细报道。更为重要的是，上述 2 株菌株发酵液 EA 粗浸膏在低于其 MIC 值浓度下均具有明显的抑制 MRSA 生物膜活性，并且能够显著减少 MRSA 生物膜形成过程中的活菌数，减

少生物膜量，表明其次生代谢产物并非通过简单的抗菌作用来发挥抗生物膜活性，因此更具新型抗菌活性药源研发潜力。此外，本研究中 KEGG 数据库的代谢途径预测结果显示，中甸黄芪根际土壤微生物占比最高的代谢通路为氨基酸代谢和碳水化合物代谢，其次为萜类化合物和聚酮化合物代谢，这些化合物预测类型也与目前已检测得到的环脂肽类与黄酮类次生代谢产物具有较好吻合性，提示该 KEGG 功能注释预测结果也可为后续其他菌株次生代谢产物的化学筛选提供参考。

综上所述，滇西北高寒特境中甸黄芪植物根际微生物的物种组成较为丰富，菌株次生代谢产物具有较好的化学多样性及抗菌、抗生物膜活性，尤其是源自托拉斯假单胞菌(*Pseudomonas tolaasii*) ZTB4 环脂肽类和烟草曲霉(*Aspergillus tabacinus*) ZNF17 的黄酮类具有较好的抗生物膜活性药用先导化合物研发潜力。本研究对深入发掘我国特境特色微生物的抗生物膜活性药源具有一定借鉴意义。

参考文献

- [1] 牟建平, 滕宝霞, 史中飞, 贺晓文, 赖晶, 朱玲, 肖静, 曾小梅. 基于高通量测序考察甘肃黄芪种植区根际土壤微生物群落结构及多样性[J]. 中国野生植物资源, 2022, 41(3): 15-24.
MU JP, TENG BX, SHI ZF, HE XW, LAI J, ZHU L, XIAO J, ZENG XM. Examining the structure and diversity of inter-root soil microbial communities in *Astragalus membranaceus* plantation areas of Gansu based on high-throughput sequencing[J]. *Chinese Wild Plant Resources*, 2022, 41(3): 15-24 (in Chinese).
- [2] 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).
- [3] 李国斌, 李光跃, 孙窗舒, 贾鑫, 陈贵林. 干旱胁迫对蒙古黄芪生物量及其根际微生物种群数量的影响[J]. 西北植物学报, 2015, 35(9): 1868-1874.
LI GB, LI GY, SUN CS, JIA X, CHEN GL. Rhizosphere microbe quantity and biomass accumulation of *Astragalus mongholicus* under drought stress[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2015, 35(9): 1868-1874 (in Chinese).
- [4] 吴征镒. 云南植物志-第十卷, 种子植物[M]. 北京: 科学出版社, 2006.
WU ZY. Flora Yunnanica-Tomus 10, *Spermatophyta*[M]. Beijing: Science Press, 2006 (in Chinese).
- [5] 田新雁, 刘亚玲, 杨月娥, 姜北. 7 种有代表性云南黄芪属植物药材的生药学研究[J]. 中药材, 2013, 36(8): 1257-1262.
TIAN XY, LIU YL, YANG YE, JIANG B. Pharmacognostical study on seven species from *Astragalus* genus in Yunnan[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2013, 36(8): 1257-1262 (in Chinese).
- [6] 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).
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 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 C, GONG GF, LIANG JY, DOU ZR, DING JJ, JIANG B, WANG KL. 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 (in Chinese).
- [11] CIOFU O, MOSER C, JENSEN PØ, HØIBY N. Tolerance and resistance of microbial biofilms[J]. Nature Reviews Microbiology, 2022, 20(10): 621-635.
- [12] WANG KL, DOU ZR, GONG GF, LI HF, JIANG B, XU Y. Anti-larval and anti-algal natural products from marine microorganisms as sources of anti-biofilm agents[J]. Marine Drugs, 2022, 20(2): 90.
- [13] ANCHEEVA E, DALETOS G, PROKSCH P. Lead compounds from mangrove-associated microorganisms[J]. Marine Drugs, 2018, 16(9): 319.
- [14] XIAO YS, ZHANG B, ZHANG M, GUO ZK, DENG XZ, SHI J, LI W, JIAO RH, TAN RX, GE HM. Rifamorpholines A-E, potential antibiotics from locust-associated actinobacteria *Amycolatopsis* sp. Hca4[J]. Organic & Biomolecular Chemistry, 2017, 15(18): 3909-3916.
- [15] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志-第四十二卷, 第一分册[M]. 北京: 科学出版社, 1993.
Editorial Committee of Flora of China Chinese Academy of Sciences. Flora of China, 42(1)[M]. Beijing: Science Press, 2006 (in Chinese).
- [16] 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 ST, 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).
- [17] 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.
- [18] BASSARELLO C, LAZZARONI S, BIFULCO G, LO CANTORE P, IACOBELLIS NS, RICCIO R, GOMEZ-PALOMA L, EVIDENTE A. Tolaasins A-E, five new lipodepsipeptides produced by *Pseudomonas tolaasii*[J]. Journal of Natural Products, 2004, 67(5): 811-816.

- [19] JURJEVIC Z, PETERSON SW, HORN BW. *Aspergillus* section *Versicolores*: nine new species and multilocus DNA sequence based phylogeny[J]. *IMA Fungus*, 2012, 3(1): 59-79.
- [20] CONEJO-SAUCEDO U, LEDEZMA-VILLANUEVA A, ÁNGELES DE PAZ G, HERRERO-CERVERA M, CALVO C, ARANDA E. Evaluation of the potential of sewage sludge mycobiome to degrade high diclofenac and bisphenol-a concentrations[J]. *Toxics*, 2021, 9(6): 115.
- [21] 吾尔恩·阿合别尔迪, 郭宇芳, 木古丽·木哈西, 恩特马克·布拉提白, 焦子伟, 努尔买买提. 天山雪莲中产黄酮内生真菌的筛选和鉴定[J]. *中成药*, 2017, 39(11): 2424-2427.
- AKHBERDI OREN, GUO YF, MUHAXI MUGULI, BORRATHYBAY ENTOMACK, JIAO ZW, NUER MAIMAITI. Screening and identification of endophytic fungi producing flavonoids from *Saussurea involucrata*[J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2017, 39(11): 2424-2427 (in Chinese).
- [22] GEUDENS N, de VLEESCHOUWER M, FEHÉR K, ROKNI-ZADEH H, GHEQUIRE MGK, MADDER A, de MOT R, MARTINS JC, SINNAEVE D. Impact of a stereocentre inversion in cyclic lipodepsipeptides from the viscosin group: a comparative study of the viscosinamide and pseudodesmin conformation and self-assembly[J]. *ChemBioChem*, 2014, 15(18): 2736-2746.
- [23] SINNAEVE D, MICHAUX C, van HEMEL J, VANDENKERCKHOVE J, PEYS E, BORREMANS FAM, SAS B, WOUTERS J, MARTINS JC. Structure and X-ray conformation of pseudodesmins A and B, two new cyclic lipodepsipeptides from *Pseudomonas* bacteria[J]. *Tetrahedron*, 2009, 65(21): 4173-4181.
- [24] NIELSEN TH, CHRISTOPHERSEN C, ANTHONI U, SORENSEN J. Viscosinamide, a new cyclic depsipeptide with surfactant and antifungal properties produced by *Pseudomonas fluorescens* DR54[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 1999, 87(1): 80-90.
- [25] KASANA RC, PANDEY CB. *Exiguobacterium*: an overview of a versatile genus with potential in industry and agriculture[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2018, 38(1): 141-156.
- [26] 李洁琼, 张殿朋, 卢彩鸽, 吴慧玲, 于莉, 刘伟成. *Collimonas* sp. ZL261 蛋白酶基因的克隆、表达及其酶学特性[J]. *核农学报*, 2014, 28(8): 1370-1378.
- LI JQ, ZHANG DP, LU CG, WU HL, YU L, LIU WC. Gene cloning, expression and the characterization of the protease produced by *Collimonas* sp. ZL261[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2014, 28(8): 1370-1378 (in Chinese).
- [27] GOLINSKA P, KIM BY, DAHM H, GOODFELLOW M. *Streptacidiphilus hamsterleyensis* sp. nov., isolated from a spruce forest soil[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2013, 104(6): 965-972.
- [28] XIAO S, CHEN N, CHAI ZX, ZHOU MD, XIAO C, ZHAO SQ, YANG XL. Secondary metabolites from marine-derived *Bacillus*: a comprehensive review of origins, structures, and bioactivities[J]. *Marine Drugs*, 2022, 20(9): 567.
- [29] 李炜, 刘志恒. 链霉菌分类研究进展[J]. *微生物学报*, 2001, 41(1): 121-126.
- LI W, LIU ZH. The advance on taxonomy of *Streptomyces*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2001, 41(1): 121-126 (in Chinese).
- [30] LIU Z, FRANK M, YU XQ, YU HQ, TRAN-CONG NM, GAO Y, PROKSCH P. Secondary metabolites from marine-derived fungi from China[J]. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 2020, 111: 81-153.
- [31] ONI FE, GEUDENS N, ADIOBO A, OMOBOYE OO, ENOW EA, ONYEKA JT, SALAMI AE, de MOT R, MARTINS JC, HÖFTE M. Biosynthesis and antimicrobial activity of pseudodesmin and viscosinamide cyclic lipopeptides produced by pseudomonads associated with the cocoyam rhizosphere[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(7): 1079.
- [32] de VLEESCHOUWER M, SINNAEVE D, van DEN BEGIN J, COENYE T, MARTINS JC, MADDER A. Rapid total synthesis of cyclic lipodepsipeptides as a premise to investigate their self-assembly and biological activity[J]. *Chemistry a European Journal*, 2014, 20(25): 7766-7775.