

雪地茶内生真菌*Apiospora malaysiana*体外抑菌活性及稳定性研究

贺秋桦, 刘梦龙, 郭启新, 丁海燕

Study on Antimicrobial Activity and Stability of Endophytic Fungus *Apiospora malaysiana* from *Thamnia subuliformis* in Vitro

HE Qiuhua, LIU Menglong, GUO Qixin, and DING Haiyan

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023010047>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

合浦珍珠提取物对金黄色葡萄球菌的体外抑菌活性及稳定性研究

Antibacterial Activity and Stability of Hepu Pearl Extracts on the *Staphylococcus aureus* in Vitro

食品工业科技. 2020, 41(14): 108-113 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.14.018>

辅酶Q0的抑菌作用及稳定性研究

Antimicrobial effect and stability of coenzyme Q0

食品工业科技. 2017(24): 38-43 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.24.008>

白花丹参内生真菌HBG16的抗凝血活性研究

Anti-coagulation Activity of Endophytic Fungus HBG16 Isolated from *Salvia miltiorrhiza* Bge.f. alba

食品工业科技. 2019, 40(8): 97-101,107 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.08.017>

花生壳分级提取物抑菌活性及其稳定性

Antibacterial Characteristics and Stability of Fractionated Extracts from Peanut Hull

食品工业科技. 2020, 41(3): 120-124,130 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.03.022>

海带内生真菌的分离鉴定及其抑制乙酰胆碱酯酶活性的发酵工艺优化

Isolation, identification and fermentation process optimization of acetylcholinesterase inhibitory activity of endophytic fungus from *Laminaria japonica*

食品工业科技. 2017(18): 111-116 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.18.022>

丹参内生真菌产生淀粉酶菌株的筛选鉴定及酶学性质分析

Screening, identification of endophytic fungus producing raw starch-degrading enzyme from *Salvia miltiorrhiza* Bge. and its enzymatic properties

食品工业科技. 2017(09): 108-112 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.09.012>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

贺秋桦, 刘梦龙, 郭启新, 等. 雪地茶内生真菌 *Apiospora malaysiana* 体外抑菌活性及稳定性研究 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(21): 146–153. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023010047

HE Qiuhua, LIU Menglong, GUO Qixin, et al. Study on Antimicrobial Activity and Stability of Endophytic Fungus *Apiospora malaysiana* from *Thamnia subuliformis* in Vitro[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(21): 146–153. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023010047

· 生物工程 ·

雪地茶内生真菌 *Apiospora malaysiana* 体外抑菌活性及稳定性研究

贺秋桦¹, 刘梦龙¹, 郭启新², 丁海燕^{1,*}

(1.大理大学公共卫生学院, 云南大理 671000;

2.大理州质量技术监督综合检测中心, 云南大理 671000)

摘要:为探究雪地茶内生真菌 *Apiospora malaysiana* 抗菌药物开发潜力, 本研究在对比 6 种常用体外抑菌活性测定方法效果后, 进一步确定 *Apiospora malaysiana* 对常见致病微生物的抗菌谱。以敏感性最强的金黄色葡萄球菌为指示菌, 探究保存时间、温度、紫外照射时长、pH 等因素对 *Apiospora malaysiana* 体外抑菌活性稳定性的影响。结果表明, 使用三种抑制细菌检测方法(平板打孔法、滤纸片法和牛津杯法)对 *Apiospora malaysiana* 体外抑菌活性检测结果并的影响无显著性差异 ($P>0.05$), 但三种抑制真菌方法的结果显示, 菌丝生长速率法最优(抑制率 100%), 平板对峙法的效果远低于前者(抑制率只有 24.0%), 而滤纸圆片扩散法则无抑制效果。体外抑菌试验结果表明 *Apiospora malaysiana* 对多种革兰氏阳性菌和致病真菌有较强的抑制作用, 其中金黄色葡萄球菌对其敏感性最强(抑菌圈直径 18.3 mm, 高度敏感), 此外, *Apiospora malaysiana* 对致病真菌如耐药型白色念珠菌(高度敏感)、灰葡萄孢、立枯丝核菌(抑制率 100%)也具有较强抑菌活性。抑菌稳定性试验结果表明, 不同保存时间、温度、紫外照射时间对 *Apiospora malaysiana* 的体外抑菌活性均无显著影响 ($P>0.05$), 但 pH 对其抑菌活性影响较大 ($P<0.05$), 当 pH 低于其提取物本底 pH (5.5) 时, 抑菌圈直径降低, 当 pH 调整至高于其提取物本底 pH 时, *Apiospora malaysiana* 体外抑菌活性消失。本试验结果表明雪地茶内生真菌 *Apiospora malaysiana* 具有广泛、良好的抑菌活性, 且在常规条件下其体外抑菌稳定性较强, 有进一步开发为抗生素及食品保鲜剂的潜力。

关键词:雪地茶, 内生真菌, *Apiospora malaysiana*, 抑菌活性, 金黄色葡萄球菌, 稳定性

中图分类号: R155.5[†]1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)21-0146-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023010047

本文网刊:



Study on Antimicrobial Activity and Stability of Endophytic Fungus *Apiospora malaysiana* from *Thamnia subuliformis* in Vitro

HE Qiuhua¹, LIU Menglong¹, GUO Qixin², DING Haiyan^{1,*}

(1.School of Public Health, Dali University, Dali 671000, China;

2.Dali Quality and Technical Comprehensive Supervision Testing Center, Dali 671000, China)

Abstract: In order to explore the antibiotics development potential of the endophytic fungus *Apiospora malaysiana* from *Thamnia subuliformis*, the antimicrobial spectrum of *Apiospora malaysiana* against common pathogen was determined after comparing the effects of six commonly used methods for determination of *in vitro* antimicrobial activity. The effects of storage time, temperature, ultraviolet irradiation time, and pH on the stability of antimicrobial activities of *Apiospora malaysiana* *in vitro* were further investigated by using the most sensitive *Staphylococcus aureus* as the indicator bacterium. The results showed that there was no significant difference in the antimicrobial activity of *Apiospora malaysiana* *in vitro* by

收稿日期: 2023-01-10

基金项目: 云南省基础研究专项(202101AU070054); 云南省滇西抗病原植物资源筛选研究重点实验室开放项目(APR202105)。

作者简介: 贺秋桦(1997-), 女, 硕士研究生, 主要从事天然产物提取及慢性病的精准营养方面的研究, E-mail: heqq199708@163.com。

* 通信作者: 丁海燕(1988-), 女, 博士, 副教授, 主要从事农产品/中药材功能成分的提取及开发利用、果蔬生理生态及营养品质控制方面的研究, E-mail:

Helending1989@hotmail.com。

three methods (plate punching method, filter paper method, and Oxford cup method) ($P>0.05$). However, the results of the three fungal inhibition methods showed that the mycelial growth rate method was optimal (inhibition rate of 100%), the effect of the plate confrontation method was much lower than the former (inhibition rate of only 24.0%), and the filter paper diffusion method had no inhibiting effect. The results of *in vitro* antimicrobial test showed that *Apiospora malaysiana* had strong inhibiting effects on a variety of Gram-positive bacteria and pathogenic fungi, among which *Staphylococcus aureus* was the most sensitive (the diameter of the inhibition zone was 18.3 mm, highly sensitive). In addition, *Apiospora malaysiana* also had strong antimicrobial activity against pathogenic fungi such as drug-resistant *Candida albicans* (highly sensitive), *Botrytis cinerea*, and *Rhizoctonia solani* (inhibition rate of 100%). The results of the antimicrobial stability test showed that different storage time, temperature, and ultraviolet irradiation time had no significant effects on the *in vitro* antimicrobial activity of *Apiospora malaysiana* ($P>0.05$), but pH had a great effect on its *in vitro* antimicrobial activity ($P<0.05$). When pH was lower than the background pH (5.5) of the extract, the diameter of the inhibition zone decreased. When pH was adjusted to higher than the background pH of the extract, the *in vitro* antimicrobial activity of *Apiospora malaysiana* disappeared. The results showed that the endophytic fungus *Apiospora malaysiana* from *Thamnia subuliformis* had broad and great antimicrobial activity, and its antimicrobial stability *in vitro* was strong under normal conditions, which had the potential to be further developed into antibiotics and food preservatives.

Key words: *Thamnia subuliformis*; endophytic fungi; *Apiospora malaysiana*; antimicrobial activity; *Staphylococcus aureus*; stability

由致病微生物污染导致的食源性疾病每年危害着数十亿人的健康,特别在经济欠发达国家,该现象更加严重,世界卫生组织(WHO)将食品安全定为本世纪优先解决的重大问题之一^[1-2]。随着人们对食品安全的重视程度逐渐加深,开发新型安全高效的抗菌药物及食品防腐剂迫在眉睫。雪地茶(*Thamnia subuliformis* (Ehrh.) W. Culb.)又名太白茶、石白茶,霜降衣科地茶属地衣,主要生长在高海拔、高寒地区的阴湿岩石和苔地上,是我国传统名贵中药之一^[3]。作为天然的保健饮品和传统药物,雪地茶在民间常被人们以水煎服或泡饮以达到清热解毒、安神明目等目的^[3-4]。近年来,关于雪地茶生物活性的报道逐渐增多,如抗菌、抗肿瘤、延缓衰老、降血压等^[4-6]。在课题组前期研究中发现,雪地茶甲醇提取物对金黄色葡萄球菌、表面葡萄球菌等革兰氏阳性菌及甲型和乙型副伤寒杆菌、大肠杆菌等革兰氏阴性菌以及致病真菌白色念珠菌均具有较强的抑菌活性,且其提取物在高温、紫外照射等不良条件下抑菌活性稳定性较好^[4],具有进一步开发的潜力。但由于雪地茶生长环境特殊、生长极其缓慢,持续大量采收导致了雪地茶资源的枯竭,其药用价值及作用机理还未被充分挖掘已步入濒危灭绝的境地,保证其资源的可持续利用是当务之急^[7]。

研究发现雪地茶发挥抑菌活性的次生代谢产物大部分来自于其复合体中的真菌^[8]。内生真菌是存在于雪地茶体内且不会对其造成伤害的一类真菌^[9-10],可产生与宿主相同或相似的抑菌活性产物^[11],因此可作为雪地茶替代物开发其抑菌活性成分以缓解雪地茶资源短缺的问题^[12]。前期在建立雪地茶内生真菌资源库并进行抑菌活性初筛时发现,从雪地茶中分离得到的一株编号为 202109-Ts-F017 的内生真菌对多种耐药菌均有较好的抑菌活性,经文献调研其抑菌活性的报道尚未查见,因此对内生真菌

202109-Ts-F017 抑菌活性进行研究有重要的科学意义,但目前 202109-Ts-F017 的抑菌谱及体外抑菌稳定性尚未明确。

因此文章将以 202109-Ts-F017 为研究对象,在分别比较了几种常见的体外抑菌方法后,结合抑菌效果、操作便捷性以及经济性等因素,分别筛选出针对细菌和真菌的最优抑菌方法以进一步探究内生真菌 202109-Ts-F017 对常见食源性致病菌、植物致病菌的体外抑制活性,根据抑菌活性的结果,选择对 202109-Ts-F017 敏感性最高的致病菌作为指示菌,并对该内生真菌的体外抑菌活性稳定性进行研究,为雪地茶内生真菌资源的开发及利用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

菌株 202109-Ts-F017 为课题组从雪地茶中分离所得,经 ITS 序列比对鉴定为炭角菌目梨孢假壳属 *Apiospora malaysiana*(昆明擎科生物科技有限公司),菌种现保存于大理大学公共卫生学院微生物实验室;金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC 25923)、斯氏李斯特菌(*Listeria seeligeri* CICC 21671)、单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes* CMCC 21633)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228)、甲型副伤寒杆菌(*Salmonella paratyphi-A* BNCC 336664)、大肠埃希氏菌(*Escherichia coli* CMCC (B) 441027)、福氏志贺菌(*Shigella flexneri* CMCC 21534)、肺炎克雷伯杆菌(*Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352) 大理州质量技术监督综合检测中心提供;耐药型白色念珠菌(Drug-resistant *Candida albicans* ATCC 10231) 大理大学基础医学院提供;耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA ATCC 43300)、灰葡萄孢(*Botrytis cinerea* BNCC 119830)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia*

solani BNCC 356048)、油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum* BNCC 122299)、西瓜专化型尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* BNCC 225899)

购自北京北纳创联生物技术有限公司; 营养琼脂 北京陆桥技术股份有限公司; 胰酪大豆胨琼脂培养基、LB 肉汤、沙氏葡萄糖液体培养基、马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA 培养基)、马铃薯葡萄糖水培养基(PDB 培养基) 广东环凯微生物科技有限公司; 乙酸乙酯、二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)、氢氧化钠(NaOH)、盐酸(HCL) 分析纯, 上海麦克林生化科技有限公司; 盐酸左氧氟沙星片 山东罗欣药业集团股份有限公司; 氟胞嘧啶片 精华制药集团股份有限公司; 98% 异菌脲原药 上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

VS-1300L-U 型超净工作台 苏净集团泰安公司制造; MJ-54A 型高压蒸汽灭菌锅 施都凯仪器设备有限公司(上海)有限公司; GHP-9270 型隔水式恒温培养箱、HWS-28 型电热恒温水浴锅 上海一恒科学仪器有限公司; MQL-61R 型震荡培养箱 上海旻泉仪器有限公司; RE-3000 型旋转蒸发仪 上海亚荣生化仪器厂; T6 新世纪型紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司; SB-5200DTD 型超声波清洗机、Scientz-ND 型系列冷冻干燥机 宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 雪地茶内生真菌 *Apiospora malaysiana* 体外抑菌活性筛查

1.2.1.1 三种体外抗细菌活性筛查方法比较 *Apiospora malaysiana* 发酵液粗提物的制备: 参考周璇等^[13]的方法并做一定修改。取平板上生长良好的 *Apiospora malaysiana* 菌饼接种于无菌 PDB 培养基中, 在振荡摇床中以 150 r/min, 28 °C 培养条件培养 5~7 d 后, 用等体积乙酸乙酯对内生真菌发酵液分别进行超声 30 min(超声频率为 60 KHz, 温度为 28 °C)、抽滤、萃取等步骤, 重复上述步骤 3 次后, 取各萃取液有机层减压浓缩得 *Apiospora malaysiana* 发酵液粗提物。

含菌悬液平板的制备: 用接种环取适量 4 °C 保存的金黄色葡萄球菌菌体于无菌生理盐水中, 采用 0.5 麦氏比浊将菌液浓度调整至 10^8 CFU/mL 后, 以 2% 接菌量将调整好浓度的菌液接入 10 mL 的无菌 LB 肉汤中, 37 °C 振荡培养过夜。培养好的菌液通过 2 次离心弃去上清液后, 采用麦氏比浊法将菌液浓度调整至 10^6 CFU/mL 备用。将无菌营养琼脂培养基与配制好的菌液按 20 : 1 的体积比混匀后倒入培养皿中, 待其凝固后备用。

三种体外抗细菌活性筛查方法比较: 平板打孔法^[14]: 用 6 mm 的打孔器在培养基中打出 4 个等距的孔, 相邻两孔各加入 20 μ L 发酵液粗提物(100 mg/mL) 作为处理组, 另两孔分别加入 20 μ L 0.5 mg/mL 的盐

酸左氧氟沙星溶液(用 DMSO 配制)、DMSO 为阳性对照和阴性对照。滤纸片法^[15]: 将 6 mm 的滤纸片灭菌干燥后, 用无菌镊子夹取 4 份滤纸片等距贴放在培养基表面, 加样方式及其余处理同平板打孔法。牛津杯法^[16]: 用镊子夹取 4 只无菌的 6 mm 牛津杯等距轻放在含菌悬液的平板表面, 轻轻按压, 使之充分接触但不压迫琼脂表面, 加样方法及其余处理同平板打孔法。三种处理方法的平板均在培养箱 37 °C 正置培养 18 h 后观察抑菌圈形成情况。

1.2.1.2 三种体外抗真菌活性筛查方法比较 菌种活化: 将斜面生长良好的菌株接种在无菌 PDA 平板培养基上, 28 °C 培养 7 d 备用。

三种体外抗真菌活性筛查方法比较: 平板对峙法: 参考 Yu 等^[17]的方法并进行一定的修改。用 6 mm 打孔器在 *Apiospora malaysiana* 与灰葡萄孢菌落边缘菌丝生长旺盛的地方打取菌饼, 挑取两种真菌的菌饼放置在无菌 PDA 培养基, 两菌饼相距 3 mm。以只接种灰葡萄孢的 PDA 培养基、只含 PDA 培养基的平板作为对照组。滤纸圆片扩散法^[16]: 将 1.2.1.1 汇总到的发酵液粗提物用 DMSO 复溶至 100 mg/mL。用无菌镊子夹取 3 份无菌干燥的滤纸片等距置于 PDA 培养基表面, 其中一滤纸片加入 20 μ L 发酵液粗提物, 另两个滤纸片各分别加入 20 μ L 的 5 mg/mL 异菌脲溶液(用 DMSO 配制)、DMSO 溶液为阳性对照和阴性对照。菌丝生长速率法^[18]: 称取适量 1.2.1.1 中得到的 *Apiospora malaysiana* 发酵液粗提物并加入 PDA 培养基中混匀, 使得培养基中发酵液粗提物终浓度为 1 mg/mL, 待其凝固后备用。用 6 mm 打孔器在灰葡萄孢菌落边缘菌丝生长旺盛的地方打孔获取菌饼并将其置于制备好的培养基平板中央, 将灰葡萄孢菌饼放置在含 5 μ g/mL 的异菌脲溶液培养基中作为阳性对照, 以只含无菌 PDA 培养基接种同样大小的灰葡萄孢菌饼作为阴性对照。处理完成后, 在 28 °C 培养箱中倒置培养 5~7 d 后观察平板菌落生长情况。运用十字交叉法测量菌落直径, 三种方法抑制率计算公式为^[19]:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{(d_{(\text{阴性对照组})} - d_{(\text{处理组/阳性对照组})})}{d_{(\text{阴性对照组})}} \times 100。$$

1.2.1.3 *Apiospora malaysiana* 体外抑菌活性试验 根据 1.2.1.1 和 1.2.1.2 试验结果, 综合考虑各方面因素后, 分别选择平板打孔法、菌丝生长速率法探究 *Apiospora malaysiana* 的体外抑制细菌及真菌活性。在抑制细菌部分的试验中, 除菌液浓度调整中耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)为 10^5 CFU/mL, 其余菌株菌液浓度均为 10^6 CFU/mL、白色念珠菌及大肠杆菌菌悬液平板的制备使用涂布平板法、白色念珠菌的阳性对照为 5 mg/mL 的氟胞嘧啶溶液(用 DMSO 配制)三项以外, 其余操作方法同 1.2.1.1 平板打孔法。处理完成后在 37 °C 培养箱中正置培养 18 h 后, 观察并记录抑菌圈的大小, 参考 Li 等^[20]的

研究对 *Apiospora malaysiana* 体外抑菌活性进行判断。在菌丝生长速率法抑菌试验中,四种植物病原真菌的阳性对照均为 98% 异菌脲溶液(用 DMSO 配制),浓度分别为灰葡萄孢、立枯丝核菌 5 μg/mL,油菜菌核病菌、尖孢镰刀杆菌 20 μg/mL。其余步骤及计算公式同 1.2.1.2。

1.2.2 雪地茶内生真菌 *Apiospora malaysiana* 体外抑菌稳定性试验 根据 1.2.1.3 的试验结果,以对 *Apiospora malaysiana* 敏感性较高的致病菌金黄色葡萄球菌作为指示菌,运用平板打孔法探究 *Apiospora malaysiana* 在不同的保存时间、温度、紫外照射时间以及 pH 的影响下体外抑菌效果的稳定情况。

1.2.2.1 保存时间对 *Apiospora malaysiana* 体外抑菌活性的影响 参考郭星汝等^[21]的方法并进行一定修改。将 *Apiospora malaysiana* 发酵液粗提物用 DMSO 复溶到浓度为 100 mg/mL 后分别在 4 ℃ 冰箱避光保存 0(对照组)、3、7、14、21、28 d 后,采用平板打孔法测定其对金黄色葡萄球菌的抑菌圈大小,具体操作方法同 1.2.1.1。

1.2.2.2 温度对 *Apiospora malaysiana* 体外抑菌活性的影响 参考 Mao 等^[22]的方法并进行一定的修改。将 *Apiospora malaysiana* 发酵液粗提物用 DMSO 复溶到浓度为 100 mg/mL 后再分别在 4.0(对照组)、31.0(室温)、40.0、60.0、80.0、94.1 ℃(受云南大理地理海拔的影响,加热温度不能达到 100 ℃)的水浴锅中分别避光水浴处理 1 h,为保证发酵液量不改变,在水浴过程中均需加盖。采用平板打孔法测定其对金黄色葡萄球菌的抑菌圈大小,具体操作方法同 1.2.1.1。

1.2.2.3 紫外照射时间对 *Apiospora malaysiana* 体外抑菌活性的影响 参考王璇等^[23]的方法并进行一定的修改。将 *Apiospora malaysiana* 发酵液粗提物用 DMSO 复溶到浓度为 100 mg/mL 后分别在紫外灯下(功率 20 W,样品距紫外光源垂直距离 20 cm)分别照射 0(对照组)、15、30、45、60、75 min,采用平板打孔法测定其对金黄色葡萄球菌的抑菌圈大小,具体操作方法同 1.2.1.1。

1.2.2.4 pH 对 *Apiospora malaysiana* 体外抑菌活性的影响 参考 Zangeneh 等^[24]的方法并进行一定的修改。将 *Apiospora malaysiana* 发酵液粗提物用 DMSO 复溶到浓度为 100 mg/mL 后分别用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 溶液将发酵液粗提物 pH 调整至 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0,以未调整 pH 的发酵液粗提物作为对照组(pH5.5),采用平板打孔法测定其对金黄色葡萄球菌的抑菌圈大小,具体操作方法同 1.2.1.1。

1.3 数据处理

试验每个处理重复 5 次,试验结果均以均数±标准差(Mean±SD)表示,采用 SPSS 26.0 软件进行数据整理及分析,统计学方法采用单因素方差分析, $P<$

0.05 表示差异显著, $P<0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 雪地茶内生真菌 *Apiospora malaysiana* 体外抑菌活性试验

2.1.1 三种抑制细菌方法的比较 试验以金黄色葡萄球菌为指示菌,探究 3 种抑菌方法的抑菌效果,结果表明 *Apiospora malaysiana* 在三种抑菌方法试验中对金黄色葡萄球菌的抑菌圈大小无统计学差异($P>0.05$)(表 1),说明三种抑菌方法均可用于 *Apiospora malaysiana* 粗提物体外细菌抑制活性筛查。三种抑菌方法均属于琼脂扩散法,样品通过扩散均匀分布在琼脂中从而发挥抑菌作用,平板打孔法中样品接触琼脂的面积大于其余两种方法、样品接触琼脂的高度小于另两种方法,表明 *Apiospora malaysiana* 粗提物的扩散速度和范围与其接触培养基的面积、平板中接触培养基的高度均无关。但相较于另两种方法,平板打孔法在实际操作过程中操作更加便捷、污染可能性小、无需额外购买器材,且由于液体的表面张力作用,孔中样品不易流出,使得加样量可控,更能获得理想的抑菌圈^[25],因此后续试验选用平板打孔法来进一步验证 *Apiospora malaysiana* 对致病细菌的体外活性。

表 1 三种不同抑菌方法测定 *Apiospora malaysiana* 对金黄色葡萄球菌的抑制效果

Table 1 Inhibitory effect of *Apiospora malaysiana* on *Staphylococcus aureus* determined by three different antibacterial methods

方法	处理组(d/mm)	阳性对照(d/mm)
平板打孔法	18.3±0.4 ^{Ba}	30.5±0.5 ^{Aa}
滤纸片法	18.4±0.4 ^{Ba}	30.6±0.4 ^{Aa}
牛津杯法	18.1±0.2 ^{Ba}	30.5±0.4 ^{Aa}

注: 同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$); 同行不同大写字母表示差异显著($P<0.05$); 表2~表8同。

2.1.2 三种抑制真菌方法的比较 试验以灰葡萄孢为指示菌,探究不同抑制真菌方法的抑菌效果(表 2),结果表明 *Apiospora malaysiana* 在三种抑菌方法试验中对灰葡萄孢的抑菌效果都存在统计学差异($P<0.05$),菌丝生长速率法>平板对峙法>滤纸圆片扩散法。在菌丝生长速率法中,*Apiospora malaysiana* 发酵液粗提物对灰葡萄孢的抑菌率(100%)高于阳性对照异菌脲的抑制率(92.9%),猜测对 *Apiospora malaysiana* 发酵液粗提物继续分离纯化后可能得到数量较多的抑菌能力与异菌脲相似或者比其更强的单体化合物,并且可能与异菌脲抑菌机理(降低病原真菌侵染寄生植物重要的致病因子胞外多糖的含量从而达到抑菌的作用)相似^[26],为 *Apiospora malaysiana* 抑菌机理及靶点的研究提供理论参考,表明 *Apiospora malaysiana* 有开发成农用杀菌剂的巨大潜力。另外,菌丝生长速率法的处理组抑制率远高于平板对峙法的抑制率,其原因可能是 *Apiospora malaysiana* 的作用形式不同导致抑菌效果的不同-其发酵

液粗提物的抑菌效果远强于真菌菌块的作用,说明 *Apiospora malaysiana* 中存在的主要抑菌物质多溶于有机溶剂,且在提取浓缩后形成了较强的抑菌效果,除此之外,和菌丝生速率法可准确控制样品用量不同的是,平板对峙法只能作为定性研究^[27],表明菌丝生长速率法优于平板对峙法。而相较于菌丝生长速率法,滤纸圆片扩散法则无抑制效果,尽管二者使用的样品均为 *Apiospora malaysiana* 发酵液粗提物,但滤纸圆片扩散法中样品的浓度远低于菌丝生长速率法,说明试验样品的抑菌活性与浓度呈正相关,且其效果的评判具有较高的阈值,这与翟娅菲等^[28]的结果相一致,是滤纸片法所做不到的。综合上述结果,针对抑制真菌的活性筛查的试验方法的选择中,菌丝生长速率法更加敏感和准确,可反应待测物的真实抑菌情况,因此后续试验选用菌丝生长速率法进一步验证 *Apiospora malaysiana* 对植物致病真菌的体外抑菌活性。

表2 不同抑菌方法测定 *Apiospora malaysiana* 对灰葡萄孢的抑制效果

Table 2 Inhibitory effect of *Apiospora malaysiana* on *Botrytis cinerea* by different antifungal methods

方法	处理组抑制率(%)	阳性对照抑制率(%)
平板对峙法	24.0±1.7 ^b	—
滤纸圆片扩散法	0.0±0.0 ^{bc}	85.6±1.6 ^{Aa}
菌丝生长速率法	100.0±0.0 ^{Aa}	92.9±0.6 ^{Ba}

2.1.3 *Apiospora malaysiana* 体外抑菌活性试验 在明确活性筛查方法的优劣后,试验采取最优方法进一步探究 *Apiospora malaysiana* 对多种致病细菌如金黄色葡萄球菌、斯氏李斯特菌、单增李斯特菌、表面葡萄球菌、MRSA 等革兰氏阳性菌,甲型副伤寒杆菌、大肠埃希氏菌、福氏志贺菌、肺炎克雷伯菌等革兰氏阴性菌及致病真菌白色念珠菌(表3)、灰葡萄孢、油菜菌核病菌、立枯丝核菌以及西瓜专化型尖孢镰刀菌的抑制活性(表4)。5种致病菌对 *Apiospora malaysiana* 粗提物高度敏感,其抑菌圈直径排序为金黄色葡萄球菌>斯氏李斯特菌>单增李斯特菌>白色念珠菌>表面葡萄球菌,表明 *Apiospora malaysiana* 粗提物有广泛且良好的抑菌活性,有被开发成天然广谱抗菌先导化合物、食品保鲜剂的巨大潜力,特别是对危害广泛、临床耐药严重的金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌两种食源性致病菌的防治药物的开发有重要的现实意义^[29-31]。另外, *Apiospora malaysiana* 发酵液粗提物对革兰氏阳性菌有较强的抑制作用而对革兰氏阴性菌无抑制效果,猜测是粗提物阻止了革兰氏阳性菌细胞壁中独有的磷壁酸结构的生成,导致细胞壁合成受阻,从而达到抑菌作用,粗提物抑菌对象的偏向性提示我们或可把研究热点放在破坏致病细菌独有的细胞结构上,以为革兰氏阳性菌日益严重的耐药问题提供解决思路。另外, *Apiospora malaysiana* 发酵液粗提物对不同细菌的抑制作用存在统计学差

异($P<0.05$),说明不同细菌的细胞壁成分及含量有细微差别,导致对粗提物的敏感性不同。与此同时, *Apiospora malaysiana* 发酵液粗提物对灰葡萄孢、立枯丝核菌的抑制率达 100%,对油菜菌核病菌也有很强的抑制率(90%),对西瓜专化型尖孢镰刀菌的抑制率也超过了 50%,表明粗提物在子囊菌门及担子菌门致病真菌广泛的防治及应用潜力,另外有研究发现灰葡萄孢致病基因 BcPDR1 可以调控病菌的生长、发育和致病力,推测 BcPDR1 可以作为防治灰霉病药物筛选的新靶标^[32],提示粗提物或影响了病原真菌致病基因的表达从而达到抑菌效果,为粗提物的单体化合物后续抑菌作用靶点的选择提供了新思路。综上, *Apiospora malaysiana* 粗提物对不同的致病细菌、真菌均有较好的抑制作用,表明其有被开发成广谱抗菌药物及农用杀菌剂的巨大潜力。

表3 平板打孔法测定 *Apiospora malaysiana* 的体外抑菌作用

Table 3 Determination of *in vitro* antibacterial effect of *Apiospora malaysiana* by plate punching method

革兰氏染色	菌种	处理组(d/mm)	阳性对照(d/mm)	敏感性
革兰氏阳性菌	金黄色葡萄球菌	18.3±0.4 ^{Ba}	30.5±0.5 ^{Aa}	+++
	斯氏李斯特菌	17.0±0.4 ^{Bb}	28.7±0.4 ^{Ab}	+++
	单增李斯特菌	16.7±0.3 ^{Bb}	25.6±0.5 ^{Ac}	+++
	表面葡萄球菌	14.6±0.4 ^{Bd}	29.7±0.4 ^{Aab}	+++
革兰氏阴性菌	MRSA	11.4±0.3 ^{Be}	30.0±0.5 ^{Aab}	++
	甲型副伤寒杆菌	—	—	—
	大肠埃希氏菌	—	—	—
	福氏志贺菌	—	—	—
真菌	肺炎克雷伯菌	—	—	—
	白色念珠菌	15.8±0.5 ^{Bc}	24.8±0.8 ^{Ac}	+++

注: 抑菌圈直径小于等于6 mm为无抑菌活性,表示为“—”、抑菌圈直径大于6 mm小于8 mm为低度敏感,表示为“+”、大于8 mm小于14 mm为中度敏感,表示为“++”、大于14 mm小于20 mm为高度敏感,表示为“+++”、大于20 mm为极度敏感,表示为“++++”。

表4 菌丝生长速率法测定 *Apiospora malaysiana* 的体外抑菌作用

Table 4 Determination of *in vitro* bacteriostatic effect of *Apiospora malaysiana* by mycelium growth rate method

菌种	处理组(%)	阳性对照(%)
油菜菌核病菌	90.0±1.8 ^{Bb}	93.0±0.6 ^{Aa}
西瓜专化型尖孢镰刀菌	61.8±1.3 ^{Bc}	83.9±0.8 ^{Ab}
灰葡萄孢	100.0±0.0 ^{Aa}	92.9±0.6 ^{Ba}
立枯丝核菌	100.0±0.0 ^{Aa}	91.8±0.6 ^{Ba}

2.2 雪地茶内生真菌 *Apiospora malaysiana* 体外抑菌稳定性试验

在 2.1 实验结果的基础上,试验以敏感性最强的金黄色葡萄球菌为指示菌,进一步探究在不同的外界因素影响下 *Apiospora malaysiana* 的体外抑菌活性稳定性。以期为 *Apiospora malaysiana* 后续的抑菌活性物质开发利用提供理论基础。

2.2.1 保存时间对 *Apiospora malaysiana* 体外抑菌活性的影响 不同保存时间对 *Apiospora malaysiana*

体外抑菌活性的影响见表 5。*Apiospora malaysiana* 发酵液粗提物在 4 ℃ 冰箱保存 0、3、7、14、21、28 d 后,各处理组体外抑菌活性与对照组相比无统计学差异($P>0.05$)。说明 *Apiospora malaysiana* 发酵液粗提物有较强的稳定性,抑菌活性物质在 4 ℃ 环境中保存较长时间也不易发生变化,因此常规的保存方式及较长时间的保存对其抑菌活性不会造成影响。*Apiospora malaysiana* 发酵液粗提物保存时间的稳定性是其后续的抑菌活性开发的基础与保障。

表 5 保存时间对 *Apiospora malaysiana* 体外抑菌活性的影响

Table 5 Effect of preservation time on *in vitro* antibacterial activity of *Apiospora malaysiana*

保存时间(d)	金黄色葡萄球菌	
	处理组(d/mm)	阳性对照(d/mm)
0	18.3±0.4 ^{Ba}	30.5±0.5 ^{Aa}
3	18.4±0.3 ^{Ba}	30.6±0.5 ^{Aa}
7	18.6±0.3 ^{Ba}	30.4±0.5 ^{Aa}
14	18.5±0.3 ^{Ba}	30.8±0.3 ^{Aa}
21	18.4±0.4 ^{Ba}	30.5±0.5 ^{Aa}
28	18.4±0.3 ^{Ba}	30.5±0.5 ^{Aa}

2.2.2 温度对 *Apiospora malaysiana* 体外抑菌活性的影响 由表 6 可知, *Apiospora malaysiana* 发酵液粗提物经过不同温度处理后,体外抑菌活性与对照组相比没有显著差异($P>0.05$)。即使经过 94.1 ℃ 的高温处理 1 h 后,其抑菌活性依旧未发生明显变化,表明 *Apiospora malaysiana* 发酵液粗提物有较好的热稳定性。雪地茶中可能存在的某些抑菌活性物质如松萝酸有较高的熔点和沸点,高温处理下也不易发生分解^[4,33],学者在对松萝酸提取条件的优化研究中发现,提取温度达 95 ℃ 时对松萝酸的得率也无明显影响^[34],进一步佐证了试验结果。因此常规的试验温度更加不会对其抑菌活性造成影响。

表 6 温度对 *Apiospora malaysiana* 体外抑菌活性的影响

Table 6 Effect of temperature on *in vitro* antibacterial activity of *Apiospora malaysiana*

温度(℃)	金黄色葡萄球菌	
	处理组(d/mm)	阳性对照(d/mm)
4.0	18.3±0.4 ^{Ba}	30.5±0.5 ^{Aa}
室温(31.0)	18.5±0.4 ^{Ba}	30.7±0.4 ^{Aa}
40.0	18.4±0.4 ^{Ba}	30.6±0.4 ^{Aa}
60.0	18.4±0.3 ^{Ba}	30.6±0.4 ^{Aa}
80.0	18.4±0.4 ^{Ba}	30.4±0.4 ^{Aa}
94.1	18.4±0.3 ^{Ba}	30.7±0.6 ^{Aa}

2.2.3 紫外照射时间对 *Apiospora malaysiana* 体外抑菌活性的影响 表 7 显示不同紫外照射时间对 *Apiospora malaysiana* 体外抑菌活性的影响, *Apiospora malaysiana* 粗提物经不同时间的紫外照射后,抑菌活性与对照组相比没有显著差异($P>0.05$)。即使经过 1 h 以上的紫外光照射后,其抑菌活性仍与对照

组保持在同一水平,表明雪地茶内生真菌抑菌活性成分的性质较为稳定。已有研究证明雪地茶对紫外线有一定的耐受作用^[6],且生活在雪域高原的人们也常以食用雪地茶以抵抗紫外线的照射^[35],从而佐证了该试验结果。

表 7 紫外照射时间对 *Apiospora malaysiana* 体外抑菌活性的影响

Table 7 Effect of UV irradiation time on *in vitro* antibacterial activity of *Apiospora malaysiana*

紫外照射时间(min)	金黄色葡萄球菌	
	处理组(d/mm)	阳性对照(d/mm)
0	18.4±0.4 ^{Ba}	30.8±0.3 ^{Aa}
15	18.3±0.3 ^{Ba}	30.4±0.4 ^{Aa}
30	18.4±0.4 ^{Ba}	30.4±0.4 ^{Aa}
45	18.4±0.3 ^{Ba}	30.6±0.4 ^{Aa}
60	18.4±0.4 ^{Ba}	30.6±0.4 ^{Aa}
75	18.4±0.5 ^{Ba}	30.6±0.5 ^{Aa}

2.2.4 pH 对 *Apiospora malaysiana* 体外抑菌活性的影响 不同 pH 对 *Apiospora malaysiana* 体外抑菌活性的影响见表 8。当 pH 较低,为 2、4 时, *Apiospora malaysiana* 粗提物对金黄色葡萄球菌的抑菌活性较对照组略有降低($P<0.05$),但整体来说抑菌活性仍保持在对照组的 92% 以上。但当 pH 逐渐升高至 6、8、10 时, *Apiospora malaysiana* 对金黄色葡萄球菌的抑菌活性消失。上述结果表明 *Apiospora malaysiana* 粗提物对外界 pH 的变化较敏感, pH 的升高或降低对其抑菌活性均有影响,但酸性环境影响较小,当外界 pH 高于粗提物本底 pH 时,其体外抑菌活性消失。原因可能是地衣内生真菌发酵液粗提物的抑菌活性物质如酚酸及缩酚酸类物质偏酸性,由于其苯环被多个酚羟基取代,导致结构不稳定,加之酚羟基呈酸性,容易与碱性物质发生反应导致内生真菌抑菌活性物质失活^[36-37],因此在后续的试验及生产中应格外注意抗菌物质的酸碱特性与其活性的密切关系。

表 8 pH 对 *Apiospora malaysiana* 体外抑菌活性的影响

Table 8 Effect of pH on *in vitro* antibacterial activity of *Apiospora malaysiana*

pH	金黄色葡萄球菌	
	处理组(d/mm)	阳性对照(d/mm)
2	17.1±0.4 ^{Bb}	30.4±0.4 ^{Aa}
4	17.2±0.5 ^{Bb}	30.4±0.5 ^{Aa}
5.5(CK)	18.4±0.4 ^{Ba}	30.8±0.3 ^{Aa}
6	—	—
8	—	—
10	—	—

3 结论 本研究结果显示,常见的 3 种细菌抑制方法没有差异,说明 *Apiospora malaysiana* 发酵液粗提物的扩散速度和范围与其接触培养基的面积、接触培养基的高度均无关,而常见的 3 种真菌抑制方法存在

统计学差异,表明 *Apiospora malaysiana* 中存在的主要抑菌物质多溶于有机溶剂,且在提取浓缩后形成了较强的抑菌效果,试验样品的抑菌活性与浓度呈正相关,且其效果的评判具有较高的阈值,上述抑菌方法筛选结果表明平板打孔法和菌丝生长速率法分别是最合适的两种抑菌方法。*Apiospora malaysiana* 发酵液粗提物有广谱的抑菌效果,对革兰氏阳性菌、致病真菌都有较强的抑菌活性。以敏感性最强的金黄色葡萄球菌为指示菌,研究 *Apiospora malaysiana* 发酵液粗提物体外抑菌稳定性,保存时间、热处理及紫外照射时间对其体外抑菌活性无影响($P>0.05$),当 pH 调整至 2、4 时,其抑菌活性较本底 pH(5.5)略有降低,当 pH 调整至高于其本底 pH 时(pH6、8、10),其体外抑菌活性消失($P<0.05$),表明在 *Apiospora malaysiana* 开发利用过程中,较长时间的低温(4℃)保存、常见的热处理不会对其抑菌活性造成影响,也能满足较长时间(75 min)的紫外光灭菌处理条件,也有较好的 pH 稳定性,但酸碱处理中 pH 应不超过其发酵液粗提物本底 pH。以上结果表明雪地茶内生真菌 *Apiospora malaysiana* 可用于天然抗菌先导化合物以及食品保鲜剂的开发,但限于目前对雪地茶内生真菌生物活性物质分离纯化鉴定的相关研究尚处于起步阶段,该部分可参考的内容较少,因此雪地茶内生真菌的分离鉴定、生物活性研究等基础工作需持续进行。

参考文献

- [1] 谷清华. 云南省细菌性食源性疾病现状分析及防控对策研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2019. [GU Q H. Status analysis and prevention countermeasures of bacterial foodborne diseases in Yunnan Province[D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2019.]
- [2] 隋志伟, 薛蕾, 王晶, 等. 食源性细菌检测方法研究进展[J]. 中国药物与临床, 2015, 15(2): 196–199. [SUI Z W, XUE L, WANG J, et al. Research progress on detection methods of foodborne bacteria[J]. Chinese Remedies & Clinics, 2015, 15(2): 196–199.]
- [3] 程攀. 云南白雪茶研究现状及开发利用[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(11): 289–290, 294. [CHENG Z. Current research and exploitation of *Thamnia vermicularis* in Yunnan[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2015, 43(11): 289–290, 294.]
- [4] 任国媛, 郭启新, 王静, 等. 雪地茶甲醇提取物体外抑菌活性及其稳定性研究[J]. 食品工业科技, 2022, 43(1): 147–154. [REN G Y, GUO Q X, WANG J, et al. Antibacterial activity and stability of methanol extract from *Thamnia subuliformis* in vitro[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(1): 147–154.]
- [5] LI C, GUO X D, LEI M, et al. *Thamnia vermicularis* extract improves learning ability in APP/PS1 transgenic mice by ameliorating both Aβ and Tau pathologies[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2017, 38(1): 9–28.
- [6] YU H Y, SHEN X Q, LIU D, et al. The protective effects of β-sitosterol and vermicularin from *Thamnia vermicularis* (Sw.) Ach. against skin aging in vitro[J]. *Annals of the Brazilian Academy of Science*, 2019, 4(91): e20181088.
- [7] 杨美霞, 王立松, 王欣宇. 中国地茶属地衣的分类及地理分布研究[J]. *植物科学学报*, 2015, 33(2): 133–140. [YANG M X, WANG L S, WANG X Y. Taxonomic and geographic study on the lichen genus *Thamnia* from China[J]. *Plant Science Journal*, 2015, 33(2): 133–140.]
- [8] SHRESTHA G, CLAIR L. Lichen phenolics: Environmental effects[J]. *Polyphenols in Plants*, 2014: 53–62.
- [9] GAO H, ZOU J, LI J, et al. Endolichenic fungi: A potential treasure trove for discovery of special structures and bioactive compounds[J]. *Studies in Natural Products Chemistry*, 2016, 48: 347–397.
- [10] HONEGGER R. The symbiotic phenotype of lichen-forming *Ascomycetes* and their endo-and epibionts[J]. *The Mycota*, 2012, 9: 287–339.
- [11] ZHAO J, SHAN T, MOU Y, et al. Plant-derived bioactive compounds produced by endophytic fungi[J]. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2011, 11(2): 159–168.
- [12] YE K, AI H L, LIU J K. Identification and bioactivities of secondary metabolites derived from endophytic fungi isolated from Ethnomedicinal plants of Tujia in Hubei Province: A review[J]. *Natural Products and Bioprospecting*, 2021, 11(2): 185–205.
- [13] 周璇, 杨彩玲, 孟庆峰, 等. 拮抗临床致病菌的一株地衣内生真菌[J]. *菌物学报*, 2021, 40(1): 87–94. [ZHOU X, YANG C L, MENG Q F, et al. An endolichenic fungus inhibiting clinical pathogenic bacteria[J]. *Mycosystema*, 2021, 40(1): 87–94.]
- [14] 陈炳智, 杨立志, 郑丽珠, 等. 长裙竹荪抑菌活性物质的分离纯化及其抑菌效果[J]. *菌物学报*, 2020, 39(8): 1568–1579. [CHEN B Z, YANG L Z, ZHENG L Z, et al. Separation and purification of antibacterial component from *Dictyophora indusiata* and determination of its antibacterial effects[J]. *Mycosystema*, 2020, 39(8): 1568–1579.]
- [15] 牛彪, 金川, 梁剑平, 等. 牛至、香茅、丁香精油化学成分及体外抑菌活性研究[J]. *食品研究与开发*, 2020, 41(3): 46–52. [NIU B, JIN C, LIANG J P, et al. Chemical constituents and antibacterial activities of essential oils of origanum, citronella and clove in vitro[J]. *Food Research and Development*, 2020, 41(3): 46–52.]
- [16] 付少彬, 闫松, 辛庆, 等. 北极新奥尔松地区地衣内生真菌的抑菌活性[J]. *遵义医学院学报*, 2016, 39(5): 474–477. [FU S B, YAN S, XIN Q, et al. Study on the antimicrobial activity of endophytic fungi from lichens of Ny-Alesund, Arctic[J]. *Journal of Zunyi Medical University*, 2016, 39(5): 474–477.]
- [17] YU H R, YAN F, WANG Y, et al. Antagonistic effects of *Sphingomonas* and *Pseudomonas aeruginosa* on 4 kinds of pathogenic bacteria of ginseng[J]. *Asian Agricultural Research*, 2022, 14(5): 5.
- [18] 乔新荣, 刘红云, 杨俊杰, 等. 一株猫爪草内生真菌的鉴定、抑菌及抗氧化活性研究[J]. *时珍国医国药*, 2019, 30(12): 2919–2921. [QIAO X R, LIU H Y, YANG J J, et al. Identification, antimicrobial and antioxidant activities of one fungal endophyte strain from *Radix Ranunculi Ternati*[J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2019, 30(12): 2919–2921.]
- [19] 李佳琪, 胡海艳, 姚华雄, 等. 知母内生真菌多样性及其对浅表感染真菌的体外拮抗活性[J]. *中山大学学报(自然科学版)(中英文)*, 2022, 61(5): 84–93. [LI J Q, HU H Y, YAO H X, et al. Species diversity of endophytic fungi from *Anemarrhena asphodeloides* and their antagonistic activity in vitro against superficial pathogenic fungi[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2022, 61(5): 84–93.]
- [20] LI Z H, CAI M, LIU Y S, et al. Antibacterial activity and mechanisms of essential oil from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* [J]. *Molecules*, 2019, 24(8): 1577.
- [21] 郭星汝, 赵霞芳, 康乐乐, 等. 沙葱鲜汁的抑菌活性和稳定性

- [J]. 食品科技, 2021, 46(10): 200–206. [GUO X R, ZHAO X F, KANG L L, et al. Antimicrobial activities and stability of *Allium mongolicum* regel juice[J]. Food Science and Technology, 2021, 46(10): 200–206.]
- [22] MAO Y, ZHANG X J, XU Z H. Identification of antibacterial substances of *Lactobacillus plantarum* DY-6 for bacteriostatic action[J]. Food Science & Nutrition, 2020, 8(6): 1–10.
- [23] 王璇, 胡仲秋, 袁亚宏, 等. 天然抑菌剂对鲁氏接合酵母的抑菌作用[J]. 现代食品科技, 2018, 34(10): 94–102. [WANG X, HU Z Q, YUAN Y H, et al. Antimicrobial activity of natural antimicrobial agents against *Zygosaccharomyces rouxii*[J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(10): 94–102.]
- [24] ZANGENEH M, KHORRAMI S, KHALEGHI M. Bacteriostatic activity and partial characterization of the bacteriocin produced by *L. plantarum* sp. isolated from traditional sourdough[J]. Food Science & Nutrition, 2020, 8(11): 6024–6030.
- [25] 谢秀丽, 蒋月美. 药敏纸片法和打孔法检测细菌耐药性的方法比较[J]. 当代畜禽养殖业, 2016(8): 4–5. [XIE X L, JIANG Y M. Comparison of drug sensitivity paper method and perforation method in detecting bacterial resistance[J]. Modern Animal Husbandry, 2016(8): 4–5.]
- [26] 丛梦龙. 多菌灵对灰葡萄孢菌致病力低剂量刺激作用的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2018. [CONG M L. Stimulatory effects of sublethal doses of carbendazim on virulence of *Botrytis cinerea*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2018.]
- [27] 郑丽屏. 桑树内生真菌多样性及其化感、抗菌和抗氧化活性研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2018. [ZHENG L P, The diversity of endophytic fungi in *Morus alba* L. and their allelopathic, antiphytopathogenic and antioxidative activities[D]. Suzhou: Soochow University, 2018.]
- [28] 翟娅菲, 张星稀, 相启森, 等. 南瓜多糖的体外抑菌活性[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(10): 70–74. [ZHAI Y F, ZHANG X X, XIANG Q S, et al. Antibacterial activity of pumpkin polysaccharide *in vitro*[J]. Food Research and Development, 2019, 40(10): 70–74.]
- [29] 李亚菲, 李伟, 陈林, 等. 动物源金黄色葡萄球菌的流行特点及耐药机制研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2022, 47(9): 894–899. [LI Y F, LI W, CHEN L, et al. Research progress on epidemic characteristics and drug resistance mechanism of animal-derived *Staphylococcus aureus*[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2022, 47(9): 894–899.]
- [30] TRUONG H N, GARMYN D, GAL L, et al. Plant as a realized niche for *Listeria monocytogenes*[J]. Microbiology Open, 2021, 10(6): e1255.
- [31] ZHAO Q, HU P, LI Q Q, et al. Prevalence and transmission characteristics of *Listeria* species from ruminants in farm and slaughtering environment in China[J]. Emerging Microbes & Infections, 2021, 10(1): 356–364.
- [32] 刘晓颖, 魏雅迪, 李白, 等. 灰葡萄孢 BcPDR1 与 MAPK 途径基因 BcBMP1 和 BcBMP3 的关系[J]. 华北农学报, 2022, 37(S1): 318–323. [LIU X Y, WEI Y D, LI B, et al. Relationship between BcPDR1 gene and MAPK pathway genes BcBMP1 and BcBMP3 in *Botrytis cinerea*[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2022, 37(S1): 318–323.]
- [33] 柯发敏, 张开莲. 没食子酸的研究进展[J]. 泸州医学院学报, 2011, 34(4): 440–442. [KE F M, ZAHNG K L. Research progress of gallic acid[J]. Journal of Luzhou Medical College, 2011, 34(4): 440–442.]
- [34] 孙长霞, 苏印泉, 张柏林. 响应面法优化松萝酸提取条件的研究[J]. 食品科技, 2012, 37(12): 211–216. [ZHANG C X, SU Y Q, ZHANG B L. Optimization of extraction on usnic acid from *Usnea* by response surface methodology[J]. Food Science and Technology, 2012, 37(12): 211–216.]
- [35] 汪琼, 程挚, 鄢波. 丽江白雪茶化学成分的研究[J]. 广西植物, 2017, 37(12): 1586–1591. [WANG Q, CHENG Z, YAN B. Chemical constituents from *Thamnia vermicularis* in Lijiang[J]. Guihaia, 2017, 37(12): 1586–1591.]
- [36] 赵磊, 林文轩, 迟茜, 等. 甜叶菊废渣提取物抑菌活性及抑菌稳定性研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(24): 168–172. [ZHAO L, LIN W X, CHI Q, et al. Antibacterial activity and stability of *Stevia rebaudiana* waste extract[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(24): 168–172.]
- [37] 王静, 丁海燕. 酚酸类化合物抑菌作用研究进展[J]. 中成药, 2022, 44(6): 1906–1911. [WANG J, DING H Y. Research progress on antibacterial effect of phenolic acids[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2022, 44(6): 1906–1911.]