

研究报告



炭样小单孢菌产抗生素对水稻细菌性条斑病菌的抗菌作用及其机理

黄运红 任雨涵 邹龙 倪海燕 龙中儿*

江西师范大学生命科学学院 江西 南昌 330022

摘要:【背景】水稻细菌性条斑病菌为水稻细菌性条斑病的病原菌,土壤中分离到的一株具有广谱抗菌活性的炭样小单孢菌 JXNU-1,其发酵产物(即抗生素 JX)对植物病原菌具有较强的抑菌活性。【目的】研究抗生素 JX 对水稻细菌性条斑病菌的抗菌作用及其机理。【方法】采用杯碟法测定抑菌圈大小,二倍稀释法测定最低抑菌浓度、最低杀菌浓度,并且从菌体形态观察、电导率变化、培养液大分子漏出、蛋白质合成、核酸合成和膜电位变化 6 个方面探究其作用机理。【结果】抗生素 JX 对水稻细菌性条斑病菌的抑菌圈直径达 18.84 ± 0.28 mm,最低抑菌浓度和最低杀菌浓度分别为 $1.39 \mu\text{g/mL}$ 和 $2.78 \mu\text{g/mL}$,且杀菌速度很快,作用 12 h 的杀菌率达 100%。在抗生素 JX 作用下,水稻细菌性条斑病菌的细胞形态发生改变,培养液电导率、膜电位和大分子漏出量均随抗生素浓度增加而增大,但菌体蛋白质含量随着抗生素浓度增加而降低,同时,通过实时荧光定量 PCR 方法检测发现 *ef-p* 表达量下调。【结论】抗生素 JX 对水稻细菌性条斑病菌具有较强的抗菌作用,推测其抑菌机理是通过抑制菌体蛋白质的生物合成和影响细胞膜完整性而起作用。

关键词: 炭样小单孢菌, 抗生素 JX, 水稻细菌性条斑病菌, 抑菌机理

Antibiotics produced by *Micromonospora carbonacea* against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*

HUANG Yun-Hong REN Yu-Han ZOU Long NI Hai-Yan LONG Zhong-Er*

College of Life Sciences, Jiangxi Normal University, Nanchang, Jiangxi 330022, China

Abstract: [Background] *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* is a pathogen to cause rice bacterial leaf streak. *Micromonospora carbonacea* JXNU-1 with broad-spectrum antibacterial activities was isolated from soil previously, and its fermentation products (designated as “antibiotic JX”) show strong antibacterial activity against plant pathogenic bacteria. [Objective] The antibacterial activity of antibiotic JX against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* and its mechanism were studied. [Methods] The size of the inhibition zone was measured with cylinder plate method, and the determination of minimum inhibitory

Foundation items: Natural Science Foundation of Jiangxi Province (20161BAB204174); Science and Technology Program of Jiangxi Province (20161BBF60077); Graduate Student Innovation Fund of Jiangxi Normal University (YJS2017059)

*Corresponding author: Tel: 86-791-88120399; E-mail: jxnulze@163.com

Received: 16-05-2018; Accepted: 19-09-2018; Published online: 28-12-2018

基金项目: 江西省自然科学基金(20161BAB204174); 江西省科技支撑计划(20161BBF60077); 江西师范大学研究生创新基金(YJS2017059)

*通信作者: Tel: 0791-88120399; E-mail: jxnulze@163.com

收稿日期: 2018-05-16; 接受日期: 2018-09-19; 网络首发日期: 2018-12-28

concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) was performed by serial tube double dilution. Additionally, the mechanism was elaborated through the investigations of cell morphology, electrical conductivity of bacterial suspension, macromolecule leakage, biosynthesis level of protein and nucleic acid and bacterial membrane potential. **[Results]** The average diameter of inhibition zones was 18.84 ± 0.28 mm. The MIC and MBC was $1.39 \mu\text{g/mL}$ and $2.78 \mu\text{g/mL}$, respectively. Complete sterilization was achieved within 12 hours, indicating a fast sterilization of antibiotic JX. In the presence of antibiotic JX, an obvious change was observed for the cell morphology of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. Moreover, the conductivity and macromolecule leakage of bacterial suspension as well as bacterial membrane potential increased with antibiotic concentration, but the protein content decreased. The down-regulated *ef-p* expression was detected by real-time fluorescence quantitative PCR. **[Conclusion]** The antibiotic JX exhibits a strong antibacterial ability against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* by means of disturbing the integrity of bacterial membranes and inhibiting biosynthesis of proteins.

Keywords: *Micromonospora carbonacea*, Antibiotic JX, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, Antibacterial mechanism

水稻细菌性条斑病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, Xoc)引起的水稻细菌性条斑病是影响水稻生产的重要细菌性病害之一。Xoc 通过水稻叶片的气孔或者伤口侵染水稻的叶肉组织, 在寄主中增殖, 从而导致病害。水稻发病后, 一般减产 15%–25%, 严重的减产 40%–60%, 对水稻的高产、稳产造成了严重威胁。目前, 化学防治仍然是防治水稻细菌性条斑病的主要手段, 但其存在污染环境、易产生抗药性等不足。

农用抗生素的发现及其开发利用对水稻细菌性条斑病的防治开辟了新的途径。它具有生物活性高, 易被土壤中微生物分解而不污染环境, 对人畜安全及不易产生抗药性等特点, 而深受学者广泛关注。朱凯等^[1]探讨了禾长蠕孢菌的代谢产物粗毒素对水稻细菌性条斑病菌的抑制作用。张荣

胜等^[2]研究了解淀粉芽孢杆菌 Lx-11 产生的 Surfactin 类物质对水稻细菌性条斑病菌的抑制作用。沈素文等^[3]研究了农用链霉素对水稻细菌性条斑病菌的抑制作用。本课题组从南昌瑶湖农田土壤样品中分离到一株具有广谱抗菌活性的炭样小单孢菌 JXNU-1^[4], 系统研究了该菌发酵产抗生素的工艺流程, 确定了产生抗生素的影响因素及其作用规律^[5]。同时, 建立了从炭样小单孢菌 JXNU-1 发酵液中分离纯化抗生素的方法, 并从中获得了分析纯的单组分、粉末状抗生素产品^[6], 该抗生素在中性和碱性条件下具有极高的热稳定性, 该抗生素经紫外-可见光谱、红外光谱、质谱及核磁共振等仪器分析确定为核苷类抗生素 JX (图 1), 文献检索显示该结构与所发现的已知抗生素结构均不同, 表明该抗生素为一全新结构的抗生素。抗生素 JX 对烟

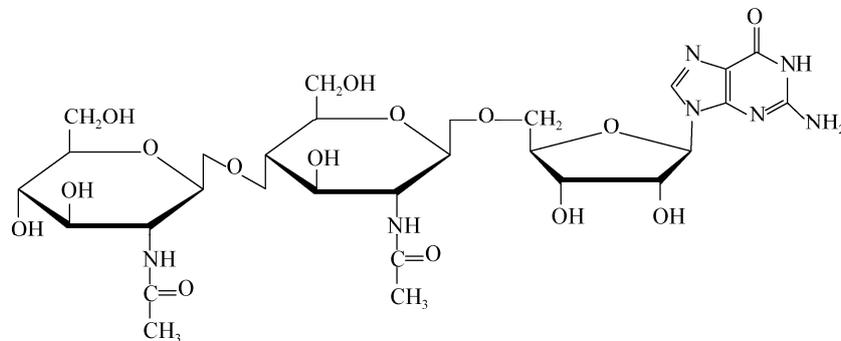


图 1 抗生素 JX 的化学结构式

Figure 1 The chemical structural formula of antibiotics JX

草赤星病菌、小麦赤霉病菌、水稻纹枯病菌和柑橘溃疡病菌等植物病原真菌^[7], 以及水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)等植物病原细菌具有较强的抑制活性^[8]。本实验以水稻细菌性条斑病菌为靶菌, 探究抗生素 JX 对其抑菌活性及作用机理, 为开发新型农用抗生素奠定理论基础。

1 材料与方 法

1.1 实验菌种

炭样小单孢菌 JXNU-1、水稻细菌性条斑病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*)均由本实验室提供。

1.2 培养基

高氏 1 号培养基(g/L): 可溶性淀粉 20.0, KNO₃ 1.0, NaCl 0.5, K₂HPO₄ 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.5, FeSO₄·7H₂O 0.01, 琼脂 18.0, pH 7.2-7.4, 1×10⁵ Pa 灭菌 20 min。

牛肉膏蛋白胨琼脂培养基(g/L): 蔗糖 10.0, 牛肉膏 3.0, 蛋白胨 6.0, 琼脂 18.0, pH 7.0, 1×10⁵ Pa 灭菌 20 min。

种子培养基(g/L): 蔗糖 22.5, 黄豆 12.5, NaCl 1.0, KH₂PO₄ 0.2, Na₂SO₄ 0.1, CaCO₃ 2.0, FeSO₄·7H₂O 0.01, pH 7.2, 1×10⁵ Pa 灭菌 20 min。

发酵培养基(g/L): 淀粉 20.0, 蔗糖 13.0, 花生饼粉 35.0, KH₂PO₄ 0.1, Na₂SO₄ 0.1, NaCl 1.0, FeSO₄·7H₂O 0.01, CaCO₃ 3.0, pH 7.7, 1×10⁵ Pa 灭菌 20 min。

1.3 主要试剂和仪器

DAPI、罗丹明 123, 北京索莱宝科技有限公司; 考马斯亮蓝 G-250, 天津市永大化学试剂开发中心; 细菌总 RNA 提取试剂盒, 天根生物科技(北京)有限公司; 反转录试剂盒 PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)、实时荧光定量试剂盒 SYBR Premix ExTaq™ GC (Perfect Real Time), 大连宝生物有限公司。

DDS-307 型电导率仪, 上海越平科学仪器有限公司; 超声波破碎仪, 赛飞中国有限公司; 紫

外可见光分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; 扫描电子显微镜, 日立高新技术公司; 荧光定量恒温金属浴, Thermo Scientific 公司。

1.4 实验方法

1.4.1 炭样小单孢菌的发酵培养

炭样小单孢菌 JXNU-1 于高氏 1 号平板划线 28 °C 倒置培养 7 d 后, 挑取单菌落接种至装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 锥形瓶中, 28 °C、200 r/min 摇瓶培养 4 d 后, 以 6%接种量接种于装有 20 mL 发酵培养基的 250 mL 锥形瓶中, 28 °C、200 r/min 摇瓶培养 108 h。

1.4.2 炭样小单孢菌抗生素 JX 的制备

将发酵液 8 000 r/min 离心 10 min 收集上清液, 用新华滤纸过滤除去油脂, 然后向滤液中加入 2 倍体积无水乙醇, 于 4 °C 静置 4 h 后离心收集上清液, 并调 pH 7.0。旋转蒸发彻底去除乙醇后, 1×10⁵ Pa 灭菌 20 min, 备用。

1.4.3 菌悬液制备

将水稻细菌性条斑病菌平板划线活化, 挑取单菌落接种于斜面, 置于 28 °C 培养 24 h, 无菌生理盐水冲洗斜面菌液, 并将其浓度调整至 650 nm 波长下透光率为 20%, 4 °C 保存备用。

1.4.4 抗生素 JX 的抑菌作用

采用杯碟法^[9]测定抗生素 JX 的抗菌活性, 以抑菌圈的直径大小表示抗菌活性的强弱。以游标卡尺采用十字交叉的方法测量抑菌圈的直径。采用试管二倍稀释法^[10]测定抗生素的最低抑菌浓度 (Minimum inhibitory concentration, MIC)。

1.4.5 抗生素 JX 的杀菌作用

抗生素的最低杀菌浓度 (Minimum bactericidal concentration, MBC) 和抗生素的时间-杀菌曲线具体实验操作步骤参见文献^[9]。

1.4.6 抗生素 JX 对水稻细菌性条斑病菌生长的影响

配制含抗生素的牛肉膏蛋白胨(NB)液体培养基, 按 2% (体积比)的接种量将培养至对数期的 Xoc 接种于含有 50 mL NB 液体培养基的 250 mL 三

角瓶中, NB 液体培养基中抗生素 JX 终浓度分别为 1 倍 MIC 和 0.5 倍 MIC, 以无菌生理盐水为空白对照, 在 28 °C、200 r/min 条件下培养, 每 2 h 取样, 测定 OD_{600} 值。

1.4.7 抗生素 JX 对水稻细菌性条斑病菌的抑菌机理

(1) 抗生素 JX 对菌体形态的影响。配制含抗生素的 NB 液体培养基, 接入供试菌(2%, 体积比), 使抗生素的终浓度为 1 倍 MIC 和 0.5 倍 MIC, 在 28 °C、200 r/min 条件下培养 12 h, 以无菌生理盐水为空白对照, 取样制片镀金, 采用扫描电子显微镜扫描观察菌体形态特征。

(2) 抗生素 JX 对菌体培养液电导率的影响。参照 Lou 等^[11]的方法, 稍作改进。取对数期的 Xoc 菌液, 5 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 无菌 0.1 mol/mL 磷酸缓冲液(pH 7.4)洗涤 3 次, 菌体重悬, 使其 OD_{600} 值为 0.7, 保存备用, 分别添加适当抗生素 JX, 使其终浓度分别为 0.5 倍 MIC 和 1 倍 MIC, 同时 PBS 为空白对照。分别于 0、20、40、60 和 120 min 时取样, 5 000 r/min 离心 10 min, 取上清液稀释 10 倍后, 利用电导仪测定其电导率。

(3) 抗生素 JX 对菌体大分子物质泄漏量的影响。参考王唯霖^[12]的方法, 稍作改进。将对数期的 Xoc 菌液(2%, 体积比)分别接种于含抗生素 JX 的 50 mL/250 mL NB 液体培养基中, 抗生素 JX 终浓度为 0.2、0.5、0.8 和 1 倍 MIC, 在 28 °C、200 r/min 条件下培养 12 h, 分别取 5 mL 样品, 5 000 r/min 离心 10 min 后取上清, 以含有相同浓度抗生素 JX 的 NB 液体培养基进行校正, 用紫外分光光度计于 260 nm 波长下测定上清液的吸光值。同时以不加抗生素的为对照。

(4) 抗生素 JX 对水稻细菌性条斑病菌膜电位的影响。参考 Novo 等^[13]的方法, 稍作改进。抗生素 JX 处理 Xoc 的具体方法参见(3), 在 28 °C、200 r/min 条件下培养 12 h, 5 000 r/min 离心 10 min 弃上清, 用 PBS 洗涤菌体 3 次, 菌体重悬, 使其 OD_{600} 值为 0.7。用 PBS 配制浓度为 1 mg/mL 的罗丹明 123 母液, 分别加入菌液中, 使终浓度为 2 μ g/mL, 避光孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次, 菌体

重悬, 在荧光分光光度计下于激发波长 480 nm 和发射波长 530 nm 测定样品的荧光强度。

(5) 抗生素 JX 对水稻细菌性条斑病菌蛋白质含量的影响。参考彭伟梦等^[14]的方法, 稍作改进。抗生素 JX 处理 Xoc 的具体方法参见(3), 在 28 °C、200 r/min 条件下培养 12 h, 5 000 r/min 离心 10 min 弃上清, 用 PBS (pH 7.4)洗涤菌体 3 次, 小心除去离心管壁上水珠, 计量菌体湿重。加入 PBS 重悬菌体, 超声处理(工作 3 s, 间歇 5 s, 共 10 min), 12 000 r/min 离心 10 min 后弃沉淀, 用考马斯亮蓝法测定上清液中蛋白质浓度, 并计算出单位湿重菌体中的蛋白质含量。

(6) 蛋白合成相关基因 *ef-p* 表达量变化分析。抗生素 JX 处理 Xoc 的具体方法参见(3), 根据细菌总 RNA 提取试剂盒提取 RNA, 根据 *ef-p* 所在基因序列利用 Primer 3.0 在线(<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)设计 qRT-PCR 的引物(内参基因为 16S rRNA 基因)进行检测, 引物序列如表 1 所示。按照反转录试剂盒 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)说明书转录合成 cDNA; 以多条件处理下反转录获得的 cDNA 为模板, 采用 SYBR Green 相对定量方法检测目的基因 *ef-p* 和内参基因 16S rRNA 的表达量。

荧光定量 PCR 反应结果以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值作为衡量表达量变化情况的指标, 使用这一方法便可直接得到目的基因相对于内参基因的量。若该值大于 1, 则说明特征基因表达量上调; 若该值小于 1, 则说明特征基因表达量下调^[15]。

(7) 抗生素 JX 对水稻细菌性条斑病菌核酸合成量的影响。参考王倩等^[16]方法, 稍作改进。抗生

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Sequences of qRT-PCR primers

引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequence (5'→3')
16S-F	TGGTAGTCCACGCCCTAAAC
16S-R	CTGGAAAGTTCCGTGGATGT
Ef-p-F	ACGGCATGAAGATCCTTGTC
Ef-p-R	GCCATCGCTGTAAAGGTAGC

素 JX 处理 *Xoc* 的具体方法参见(3), 在 28 °C、200 r/min 条件下培养 12 h, 5 000 r/min 离心 10 min 弃上清, 用 PBS 洗涤菌体 3 次, 菌体重悬, 使其 OD_{600} 值为 0.7, 分别取 1 mL 菌悬液, 加入 3 倍体积浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 DAPI 染液, 振荡 10 min, PBS 洗涤 3 遍, 菌体重悬。在荧光光度计下分别于激发波长 364 nm 和 400 nm 下测定细胞 DNA 和 RNA 的荧光强度。

2 结果与分析

2.1 抗生素 JX 的抑菌作用

以水稻细菌性条斑病菌为供试菌株, 将预处理发酵液注入牛津杯, 无菌生理盐水为空白对照, 如图 2 所示, 抑菌圈直径为 18.84 ± 0.28 mm; 试管二倍稀释法实验结果显示最低抑菌浓度为 1.39 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 表明抗生素 JX 对水稻细菌性条斑病菌有较强的抑菌作用。

2.2 抗生素 JX 的杀菌作用

最低杀菌浓度和时间-杀菌曲线是定量评价抗生素杀菌效力的参数, 其中最低杀菌浓度可用于评价抗生素的杀菌强度, 时间-杀菌曲线是评价抗

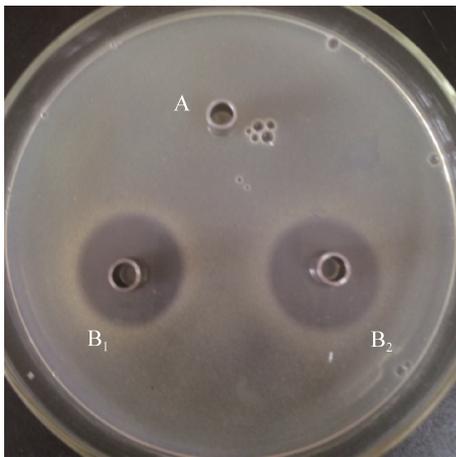


图 2 抗生素 JX 抗水稻细菌性条斑病菌结果
Figure 2 The antibacterial result of antibiotic JX against *X. oryzae* pv. *oryzicola*

注: A: 无菌生理盐水; B₁ 和 B₂: 抗生素 JX.

Note: A: Stroke-physiological saline solution; B₁ and B₂: Antibiotic JX.

生素对靶菌的杀菌速率的参数。试管二倍稀释法实验结果显示抗生素 JX 对水稻细菌性条斑病菌的最低杀菌浓度为 2.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。抗生素 JX 对 *Xoc* 的时间-杀菌曲线如图 3 所示, 6 h 时杀菌率就达 60%, 12 h 达到 100%, 表明抗生素 JX 对条斑病菌具有较快的杀菌速度。

2.3 抗生素 JX 对水稻细菌性条斑病菌生长的影响

抗生素 JX 对 *Xoc* 生长的影响实验结果如图 4 所示, 可见抗生素 JX 对 *Xoc* 的生长规律不会产生明显的影响, 随着培养时间的延长菌体浓度逐渐增加, 实验组和对照组的生长曲线均可大致分为延滞期、指数期、稳定期和衰亡期 4 个时期。但

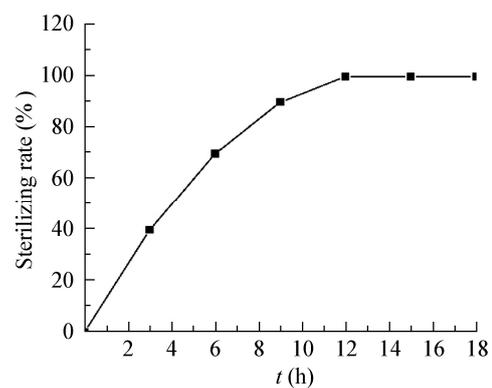


图 3 炭样小单孢菌 JXNU-1 产抗生素 JX 的杀菌曲线
Figure 3 Killing curve of antibiotic JX from *Micromonospora carbonacea* JXNU-1

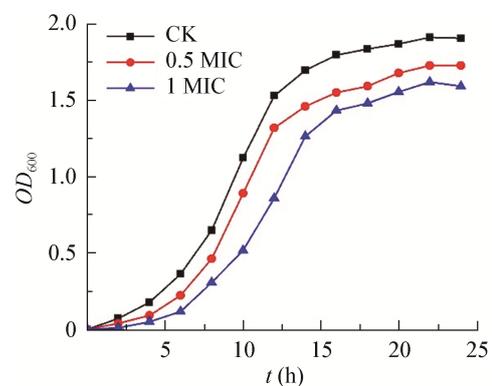


图 4 抗生素 JX 对条斑病菌生长曲线的影响
Figure 4 Effect of the antibiotic JX on the growth of *X. oryzae* pv. *oryzicola*

是, 随着抗生素 JX 浓度的增加, Xoc 生长曲线的延滞期增长, 指数期延后, 而且稳定期的菌体浓度降低。结果进一步表明抗生素 JX 影响水稻细菌性条斑病菌的生长速度与菌体浓度。

2.4 抗生素 JX 对水稻细菌性条斑病菌的抑菌机理

2.4.1 抗生素 JX 对菌体形态的影响

抗生素 JX 对 Xoc 细胞形态的影响通过扫描电子显微镜进行观察, 结果如图 5 所示, 对照组中, Xoc 菌体形态完整规则, 细胞表面光滑; 而在最低抑菌浓度的抗生素作用下, 细菌个体明显变长呈丝状, 菌体表面发生凹陷, 边缘破损, 形态完整性遭到了破坏。因此, 推测 Xoc 的细胞分裂受到抑制和抗生素 JX 透过菌体细胞壁, 造成细胞膜破损。

2.4.2 抗生素 JX 对水稻细菌性条斑病菌细胞膜的影响

菌液中电导率的变化可反映抗生素对菌体膜通透性的影响^[17]。抗生素 JX 对 Xoc 培养液电导率的影响结果如图 6 所示。实验初期, Xoc 的培养液电导率随着培养时间的增加而增大, 对照组的电导率在 1 h 后不再上升, 但是 0.5 倍 MIC 和 1 倍 MIC 处理组的电导率仍然表现出不同程度的上升。在抗生素 JX 作用 2 h 时, 0.5 倍 MIC 和 1 倍 MIC 处理组与对照组比较, 电导率分别增加

了 0.29 倍和 1.21 倍, 表明菌液电导率大小与抗生素 JX 作用质量浓度呈正相关。细胞膜是细胞的重要物质运输屏障, 细胞膜结构的稳定性控制着 K^+ 、 Na^+ 、 H^+ 等导电离子的跨膜运输, 正常生理条件下这些导电离子不能通过单纯的渗透作用进行跨膜转运^[18]。因此, 推测抗生素 JX 作用 Xoc 可能会导致菌体细胞内电解质(Na^+ 、 K^+ 、 H^+)外漏至培养液中从而增加培养液电导率, 也就是说抗生素 JX 会增强 Xoc 细胞膜的通透性。

为进一步探究抗生素 JX 对 Xoc 细胞膜通透性的影响, 对加入抗生素后菌体大分子物质的外漏情况进行测定。通过测定加药前后培养液中核酸(DNA 和 RNA)的变化可推测药物对细胞膜完整性的影响^[19]。由于 DNA、RNA 等大分子物质在波长 260 nm 下有较强的吸光值, 因此可依据此值来考察细胞膜的完整性。抗生素 JX 对 Xoc 核酸泄漏量的影响结果如图 7 所示。在抗生素 JX 浓度为 0–0.8 倍 MIC 时, 核酸泄漏量随着抗生素浓度的增加而增加, 但抗生素 JX 浓度为 1 倍 MIC 时, 由于高浓度的抗生素导致菌体量的大量减少, 核酸泄漏量反而降低。结果进一步证明抗生素 JX 影响了菌体细胞膜的完整性, 导致核酸大分子物质外漏。

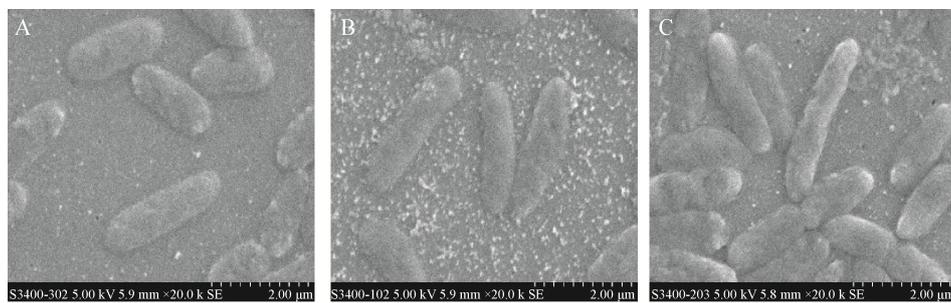


图 5 扫描电镜下抗生素 JX 对条斑病菌细胞形态的影响(20 000×)

Figure 5 Effect of antibiotic JX on cell morphology of *X. oryzae* pv. *oryzicola* using SEM observation (20 000×)

注: A: 对照组; B: 0.5 倍 MIC 处理组; C: 1 倍 MIC 处理组。

Note: A: Control group; B: Treatment group of 0.5 fold MIC; C: Treatment group of 1 fold MIC.

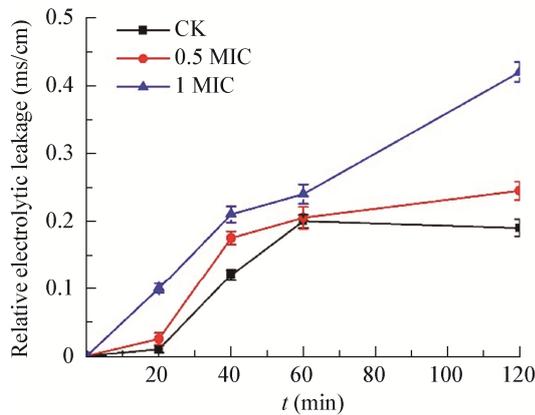


图 6 抗生素 JX 对培养液电导率的影响

Figure 6 Effect of antibiotic JX on the relative electrolytic leakage of medium

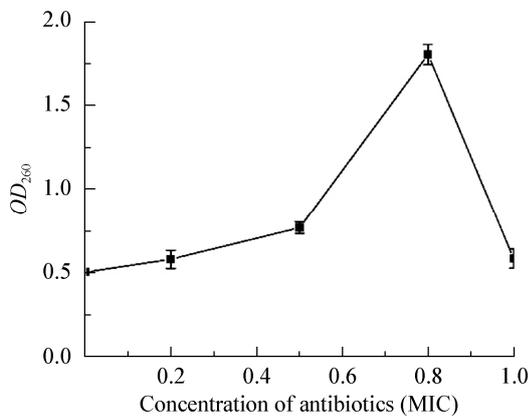


图 7 抗生素 JX 对 Xoc 核酸泄漏的影响

Figure 7 Effect of antibiotic JX on the leakage of nucleic acid of *X. oryzae* pv. *oryzicola*

膜电位几乎存在于所有的细胞中, 并对细胞的功能起着决定性的作用, 由于带电离子的跨膜运动, 使膜内外的电荷发生变化, 从而使膜电位发生变化, 而膜电位的增大或减小都会使细胞的功能状态发生改变^[20]。罗丹明 123 (Rhodamine 123) 是一种可透过细胞膜的阳离子荧光染料, 它的荧光强度可反映膜电位的变化, 因此用其来表征菌体膜电位的高低。抗生素 JX 对 Xoc 膜电位的影响情况如图 8 所示, 随着抗生素浓度的增加, 膜电位增大。在 1 倍 MIC 抗生素 JX 处理下, 菌体荧光强度为 649.85, 比对照组增加了 2.6 倍。结果表明抗生素 JX 可能会诱导菌体膜电位超极化, 导致膜电势的升高, 引起细胞内含物渗漏而促使细胞发生凋亡。

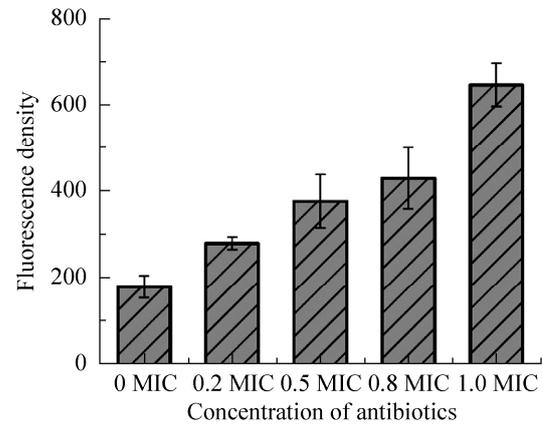


图 8 抗生素 JX 对水稻细菌性条斑病菌膜电位的影响

Figure 8 Effect of antibiotic JX on cell membrane potential of *X. oryzae* pv. *oryzicola*

2.4.3 抗生素 JX 对水稻细菌性条斑病菌蛋白质合成量的影响

蛋白质是微生物结构和生命活动的重要物质基础。如果蛋白质合成受到抑制, 其生命活动规律必然受到影响。抗生素 JX 对 Xoc 蛋白质合成的影响结果如图 9 所示, 随着抗生素浓度的增加, 蛋白质含量呈现先升后降的趋势。由于在低浓度抗生素处理时, 菌体进入恶劣环境启动某些自身保护机制, 刺激保护酶的生物合成, 从而导致蛋白量的短暂增加。但随着抗生素浓度的继续增加, 蛋白质的合成受阻, 菌体生长也受到抑制, 从而导致蛋白量的减少。周洁尘等^[21]报道了垂序商陆及胜红蓟提取物对炭疽病菌体内蛋白质含量的影响结果与本研究结果类似。

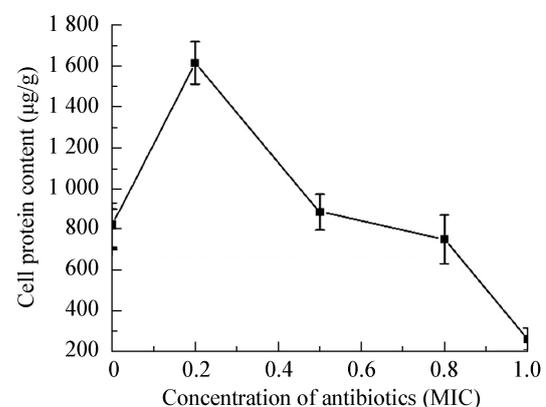


图 9 抗生素 JX 对水稻细菌性条斑病菌蛋白质合成的影响

Figure 9 Effect of the antibiotic JX on protein synthesis of *X. oryzae* pv. *oryzicola*

EF-P 是广泛存在于细菌中的一类蛋白质翻译延伸因子, 与真核生物的 eIF5A 同源, 其类似 tRNA 的构象使其能够深入核糖体肽基合成的中心位置, 参与蛋白质的翻译延伸。为进一步探究抗生素 JX 对 Xoc 蛋白质合成的影响, 选择 16S rRNA 基因为内参基因, 采用 RT-PCR 技术分析了抗生素 JX 作用下 EF-P 蛋白的 mRNA 表达水平。结果如图 10 所示, 在 0.5、1 倍 MIC 浓度抗生素 JX 作用下, *ef-p* 的 mRNA 相对表达含量分别为 0.61 和 0.55, 均小于 1, 且随着抗生素浓度的增加而降低, 表明 EF-P 表达量下调, 抗生素 JX 进而抑制了 Xoc 蛋白质生物合成。陈鹏^[22]采用 RT-PCR 技术分析了抗生素 JX 作用下嗜根考克氏菌蛋白质合成相关的 EF-P 蛋白的 mRNA 表达水平, 结果表明抗生素 JX 也显著抑制了嗜根考克氏菌 EF-P 蛋白的生物合成。

2.4.4 抗生素 JX 对水稻细菌性条斑病菌核酸含量的影响

DAPI 是一种可以与 DNA 和 RNA 结合的荧光染料, 荧光强度可直接反映核酸含量。抗生素 JX 对 Xoc 核酸合成的影响如图 11 所示, 随着抗生素 JX 浓度的增加, 菌体的荧光强度没有发生明显变化, 即 Xoc 核酸合成量未受影响。结果表明, 抗生素 JX 对 Xoc 核酸合成没有显著影响。

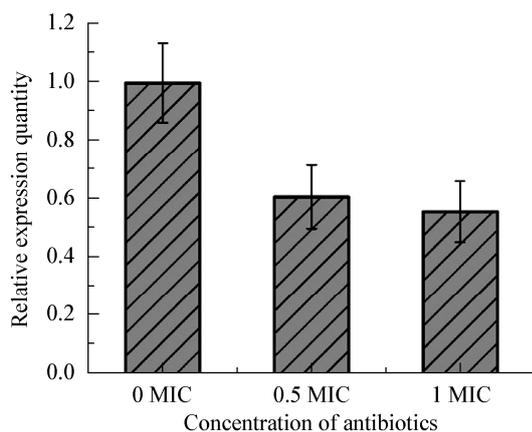


图 10 抗生素 JX 作用下水稻细菌性条斑病菌 *ef-p* 的相对表达量

Figure 10 The relative expression of *ef-p* in *X. oryzae* pv. *oryricola* in the presence or absence of antibiotic JX

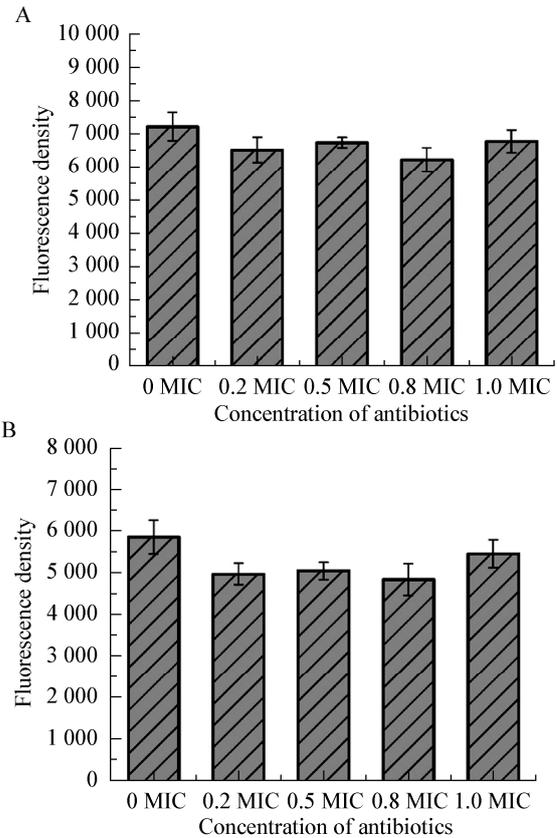


图 11 抗生素 JX 对水稻细菌性条斑病菌 DNA (A)和 RNA (B)合成的影响

Figure 11 Effect of antibiotic JX on biosynthesis of DNA (A) and RNA (B) of *X. oryzae* pv. *oryricola*

3 讨论与结论

农用抗生素是由微生物产生的次级代谢产物, 在低微浓度时即抑制或杀灭农作物病、虫、草害或调节作物的生长发育^[23]。本实验中, 炭样小单孢菌 JXNU-1 发酵液对水稻细菌性条斑病菌抑菌直径为 18.84 ± 0.28 mm, 最低抑菌浓度和最低杀菌浓度分别为 $1.39 \mu\text{g/mL}$ 和 $2.78 \mu\text{g/mL}$, 12 h 杀菌率达 100%, 表明抗生素 JX 具有较强的抗菌作用。禾长蠕孢菌发酵液对水稻细菌性条斑病菌抑菌直径仅为 14.50 mm, 最低抑菌浓度和最低杀菌浓度分别为 1.5625 mg/mL 和 6.25 mg/mL ^[1]。

核苷类抗生素是一类主要由微生物产生的, 具有生物活性次级代谢产物, 包括核苷、核苷酸及其衍生物, 如嘌呤霉素、杀稻瘟毒素 S、尼克霉

素、多氧霉素、中生菌素。由于核苷、核苷酸在生物体内初级代谢中扮演着重要角色,如作为能量供体、信使分子、辅助因子等,因此核苷类抗生素具有抗细菌、抗真菌、抗锥虫、抗肿瘤、抗病毒等多种生物活性^[24]。核苷类抗生素的抗菌作用机理与结构密切相关,结构简单的核苷类抗生素通常抑制核酸的生物合成,结构复杂的核苷类抗生素则对蛋白质或细胞壁的生物合成进行抑制。嘌呤霉素的作用机制是抑制蛋白质合成过程中 70S 或 80S 核糖体肽链的延伸,因此具有广谱抗菌活性^[25]。多氧霉素的作用机制是 UDP-N-乙酰葡萄糖酰胺的竞争性抑制剂,导致细胞壁的生物合成受阻^[26]。在抗生素 JX 作用下, Xoc 菌体形态变大,表面粗糙甚至凹陷,蛋白质的生物合成受阻,细胞分裂受到抑制,从而影响菌体生长繁殖。同时,抗生素 JX 会与菌体细胞膜相互作用,增加细胞膜通透性,造成胞质内物质如 Na⁺、K⁺、核酸等的渗漏,从而造成细胞的生理功能紊乱,抑制了细胞的正常生长。张慧茹等^[27]通过测定绞股蓝内生真菌 JY25 发酵液对大肠杆菌的菌体超微结构、细胞壁、细胞膜及蛋白质合成的影响,证明 JY25 发酵液通过改变大肠杆菌细胞膜通透性和影响蛋白质合成进而影响其生长繁殖。王永刚等^[28]通过测定链格孢菌醋酸乙酯提取物(B06e)对大肠杆菌的菌体显微形态、DNA 结构、培养液电导率、核酸和蛋白质的影响,证明了 B06e 通过破坏大肠杆菌细胞膜完整性和 DNA 的结构,使得细菌代谢紊乱,最终导致细菌丧失了生长繁殖的能力。

小单孢菌科菌(*Micromonpoaceae*)是一类分布广泛且具多种生物活性的稀有放线菌。它不仅能产生氨基类、大环内酯类、寡糖类、糖类和安沙霉素类等抗生素,还能产生一些具有独特结构的抗肿瘤抗生素^[29]。炭样小单孢菌 JXNU-1 所产抗生素 JX 是一种新型核苷类抗生素,对水稻细菌性条斑病菌具有较强的抑菌活性且杀菌迅速。抗生素 JX 对水稻细菌性条斑病菌作用机制是通过抑制蛋白质的生物合成,抑制细胞分裂,同时增大菌体细胞膜通

透性,破坏细胞膜完整性,导致细胞死亡而起作用。

REFERENCES

- [1] Zhu K, Duan GF, Zhang JP, et al. Inhibition of rice bacterial leaf stripe by filtrate and crude toxins of *Helminthosporium gramineum* Rabenhf. sp. *echinoclone*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2010, 26(8): 240-242 (in Chinese)
朱凯, 段桂芳, 张建萍, 等. 禾长蠕孢菌代谢产物抑制水稻细菌性条斑病菌[J]. 中国农学通报, 2010, 26(8): 240-242
- [2] Zhang RS, Wang XY, Luo CP, et al. Identification of the lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* Lx-11 and biocontrol efficacy of surfactin against bacterial leaf streak[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2013, 46(10): 2014-2021 (in Chinese)
张荣胜, 王晓宇, 罗楚平, 等. 解淀粉芽孢杆菌 Lx-11 产脂肽类物质鉴定及表面活性素对水稻细菌性条斑病的防治作用[J]. 中国农业科学, 2013, 46(10): 2014-2021
- [3] Shen SW, Liu YF, Zhou SJ, et al. The study of synergistic control of bacterial leaf streak with 4 antagonistic bacteria, streptomycin and leaf Kyzalone[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2010(4): 98-100 (in Chinese)
沈素文, 刘永锋, 周苏津, 等. 4 株拮抗细菌与链霉素、叶枯唑协同控制水稻细菌性条斑病研究[J]. 江苏农业科学, 2010(4): 98-100
- [4] Long ZE, Zhu YJ, Huang YH, et al. Isolation and identification of a strain of *Micromonospora* with broad-spectrum antimicrobial activity[J]. Microbiology China, 2008, 35(3): 378-383 (in Chinese)
龙中儿, 朱跃进, 黄运红, 等. 一株具有广谱抗菌活性小单孢菌的分离和鉴定[J]. 微生物学通报, 2008, 35(3): 378-383
- [5] Zhu YJ, Long ZE, Huang YH, et al. Studies on fermentation technology for a strain of rare actinomycete producing antibiotics[J]. Chemistry & Bioengineering, 2006, 23(12): 39-42 (in Chinese)
朱跃进, 龙中儿, 黄运红, 等. 一株稀有放线菌发酵产抗生素的工艺研究[J]. 化学与生物工程, 2006, 23(12): 39-42
- [6] Long ZE, Zhu YJ, Huang YH, et al. Isolation and purification of antibiotic from the fermentation broth of *Micromonospora carbonacea* JXNU-1 and its physical-chemical properties[J]. Microbiology China, 2008, 35(9): 1450-1454 (in Chinese)
龙中儿, 朱跃进, 黄运红, 等. 炭样小单孢菌 JXNU-1 广谱抗生素产物的分离及其理化性质[J]. 微生物学通报, 2008, 35(9): 1450-1454
- [7] Huang YH, Gao XQ, Long ZE. The antibacterial activities of antibiotics produced by *Micromonospora carbonacea* to plant pathogenic fungi[J]. Agrochemicals, 2009, 48(11): 843-845 (in Chinese)
黄运红, 高兴强, 龙中儿. 炭样小单孢菌抗生素抗植物病原真菌作用[J]. 农药, 2009, 48(11): 843-845
- [8] Dai F, Huang YH, Ning X, et al. Antibacterial activities of antibiotics produced by *Micromonospora carbonacea* to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*[J]. Agrochemicals, 2011, 50(4): 302-304 (in Chinese)

- 戴菲, 黄运红, 宁茜, 等. 炭样小单孢菌抗生素对水稻白叶枯病菌的抑菌作用[J]. 农药, 2011, 50(4): 302-304
- [9] Shen P, Fan XR, Li GW. Experiment of Microbiology[M]. Beijing: Higher Education Press, 2003: 111-113 (in Chinese)
沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003: 111-113
- [10] Xu SY, Bian RL, Chen X. Methodology of Pharmacological Experiment[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2006: 1647-1664 (in Chinese)
徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 1647-1664
- [11] Lou ZX, Wang HX, Zhu S, et al. Antibacterial activity and mechanism of action of chlorogenic acid[J]. Journal of Food Science, 2011, 76(6): M398-M403
- [12] Wang WL. Study on the antibacterial mechanism of herbal extracts and drug resistance of *E. coli*[D]. Baoding: Master's Thesis of Agricultural University of Hebei, 2015 (in Chinese)
王唯霖. 中草药提取物的抑菌机理及对大肠杆菌的耐药性研究[D]. 保定: 河北农业大学硕士学位论文, 2015
- [13] Novo D, Perlmutter NG, Hunt RH, et al. Accurate flow cytometric membrane potential measurement in bacteria using diethyloxycarbocyanine and a ratiometric technique[J]. Cytometry, 1999, 35(1): 55-63
- [14] Peng WM, Huang YH, Li J, et al. Studies on the antimicrobial activity and its mechanism of an antibiotic, from *Micromonospora carbonacea* JXNU-1, against gram-negative bacteria *in vitro*[J]. Journal of Jiangxi Normal University (Natural Science), 2013, 37(2): 162-165 (in Chinese)
彭伟梦, 黄运红, 李瑾, 等. 炭样小单孢菌 JXNU-1 产抗生素对 G 的体外抗菌作用及其机理的初步研究[J]. 江西师范大学学报: 自然科学版, 2013, 37(2): 162-165
- [15] Kim BR, Nam HY, Kim SU, et al. Normalization of reverse transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice[J]. Biotechnology Letters, 2003, 25(21): 1869-1872
- [16] Wang Q, Xie MJ. Antibacterial activity and mechanism of Luteolin on *Staphylococcus aureus*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2010, 50(9): 1180-1184 (in Chinese)
王倩, 谢明杰. 木犀草素对金黄色葡萄球菌的抑菌活性及其机制[J]. 微生物学报, 2010, 50(9): 1180-1184
- [17] Zhang YB, Liu XY, Jiang PP, et al. Mechanism and antibacterial activity of cinnamaldehyde against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*[J]. Modern Food Science & Technology, 2015, 31(5): 31-35 (in Chinese)
张赞彬, 刘笑宇, 姜萍萍, 等. 肉桂醛对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌作用及抑菌机理研究[J]. 现代食品科技, 2015, 31(5): 31-35
- [18] Cox SD, Mann CM, Markham JL, et al. Determining the antimicrobial actions of tea tree oil[J]. Molecules, 2001, 6(2): 87-91
- [19] Chen CZ, Cooper SL. Interactions between dendrimer biocides and bacterial membranes[J]. Biomaterials, 2002, 23(16): 3359-3368
- [20] Li W. Study about membrane potential in physiology hyperpolarization and depolarization[J]. World Health Digest, 2012(48): 57-58 (in Chinese)
李薇. 浅谈生理学中的膜电位——超极化和去极化[J]. 中外健康文摘, 2012(48): 57-58
- [21] Zhou JC, Zhou GY, Liu JA, et al. Antifungal mechanisms of the ethyl acetate extracts from *Phytolacca americana* and *Ageratum conyzoides* against *Colletotrichum gloeosporioides* of *Dalbergia odorifera*[J]. Plant Protection, 2017, 43(4): 46-50 (in Chinese)
周洁尘, 周国英, 刘君昂, 等. 垂序商陆及胜红蓼提取物对降香黄檀炭疽病菌的抑菌机理研究[J]. 植物保护, 2017, 43(4): 46-50
- [22] Chen P. Study on antagonism mechanisms of the antibiotics JX from *Microspore anthracis* JXNU-1 against *Kocuria rhizophila*[D]. Nanchang: Master's Thesis of Jiangxi Normal University, 2016 (in Chinese)
陈鹏. 炭样小单孢菌 JXNU-1 产抗生素 JX 对嗜根考克氏菌的拮抗作用机理研究[D]. 南昌: 江西师范大学硕士学位论文, 2016
- [23] Jiang XL, Xie DL. The mechanism of action of agricultural antibiotics[J]. Chinese Journal of Biological Control, 1994, 10(2): 76-81 (in Chinese)
蒋细良, 谢德龄. 农用抗生素的作用机理[J]. 中国生物防治, 1994, 10(2): 76-81
- [24] Isono K. Nucleoside antibiotics: structure, biological activity, and biosynthesis[J]. The Journal of Antibiotics, 1988, 41(12): 1711-1739
- [25] Vara J, Perez-Gonzalez JA, Jimenez A. Biosynthesis of puromycin by *Streptomyces alboniger*: characterization of puromycin N-acetyltransferase[J]. Biochemistry, 1985, 24(27): 8074-8081
- [26] Wolf H, Zähner H. Metabolic products of microorganisms. 99. Kirromycin[J]. Archiv Für Mikrobiologie, 1972, 83(2): 147-154
- [27] Zhang HR, Meng SX, Cao J, et al. Antibacterial mechanisms of endophytic fungi from *Gynostemma pentaphyllum* on *Escherichia coli*[J]. Microbiology China, 2015, 42(1): 157-162 (in Chinese)
张慧茹, 孟素香, 曹健, 等. 绞股蓝内生真菌抗大肠杆菌抗菌机制的研究[J]. 微生物学通报, 2015, 42(1): 157-162
- [28] Wang YG, Yang GR, Ma XQ, et al. Antibacterial mechanisms of endophytic fungi *Alternaria alternata* of ethyl acetate extract on *Escherichia coli*[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2018, 49(2): 374-381 (in Chinese)
王永刚, 杨光瑞, 马雪青, 等. 内生真菌链格孢菌醋酸乙酯提取物对大肠杆菌抑菌机制的研究[J]. 中草药, 2018, 49(2): 374-381
- [29] Zhang XM, Liu Q, Liu X, et al. Research progress on the *Micromonosporaceae* family[J]. Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition), 2013, 41(9): 175-185 (in Chinese)
张晓敏, 刘秋, 刘限, 等. 小单孢菌科研究进展[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2013, 41(9): 175-185