

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (4) :401 - 411; 4 April 2015
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140460

高产申嗪霉素和吩嗪-1-酰胺的水稻根际铜绿假单胞菌 PA1201 分离、鉴定与应用潜力

周莲, 蒋海霞, 金凯明, 孙爽, 张薇, 张雪洪, 何亚文*

微生物代谢国家重点实验室, 上海交通大学生命科学与技术学院, 上海 200240

摘要:【目的】从水稻根际筛选能高效抑制水稻病原菌的细菌, 分析和鉴定其形态和生化特征, 为开发新型绿色农药奠定基础。【方法】从水稻根际分离能以 1-氨基环丙烷-1-羧酸 (ACC) 为唯一碳源的菌株, 根据菌株形态和生化特性、16S rDNA 序列比对和磷脂脂肪酸图谱, 对该菌株进行鉴定。通过氯仿萃取抽提、高效液相色谱分析, 确定菌株 PA1201 在 PPM 培养基和黄豆粉培养基中申嗪霉素和吩嗪-1-酰胺的产量。【结果】菌株 PA1201 能有效抑制水稻纹枯病菌和水稻白叶枯病菌的生长, 属于铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa* sp. PA1201); PA1201 产生两种抑菌代谢产物申嗪霉素和吩嗪-1-酰胺, 在 PPM 和黄豆粉培养基中申嗪霉素的产量可达 81.7 mg/L 和 926.9 mg/L, 吩嗪-1-酰胺的产量亦可达 18.1 mg/L 和 489.5 mg/L; PA1201 产生大量胞外蛋白酶, 对人肺腺癌细胞系 A549 和黑腹果蝇具有一定毒性。【结论】PA1201 的申嗪霉素产量比现有生产菌株的出发菌株 M18 高 3 - 4 倍, 还能产生另一种抑菌活性更高的衍生物吩嗪-1-酰胺, 具有进一步开发的潜力。

关键词:假单胞菌, 申嗪霉素, 吩嗪-1-酰胺, 绿色农药, 应用潜力

中图分类号: Q939 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 04-0401-11

水稻纹枯病 (Rice Sheath Blight) 是一种世界性病害, 由水稻纹枯病菌, 学名为立枯丝核菌 (*Rhizotonia solani* Kühn), 侵染引起, 导致水稻平均减产 10% - 15%, 造成严重的经济损失^[1-3]。由于水稻中高抗纹枯病种质资源较少, 常规抗病育种至今成效不大; 纹枯病抗性性状受多基因控制, 难以运用现代转基因技术获得抗病品种, 因此, 化学防治依然是防治纹枯病的主要方式。井冈霉素是我国目前防治水稻纹枯病的主导农药^[4], 于 20 世纪 70 年代

开始推广使用。历经 40 多年的单一使用, 我国部分地区纹枯病菌对井冈霉素出现了不同程度的抗药性, 田间使用量不断提高, 迫切需要研发有类似效果的新型替代生物农药。

研发生物农药的途径之一是筛选和利用拮抗微生物, 目前国内外已分离和鉴定一批能抑制水稻纹枯病菌生长的生防菌株。曹琦琦等^[3]从根际土壤中分离得到枯草芽孢杆菌 NB12 (*Bacillus subtilis* NB12) 和放线菌 NA1 (*Streptomyces triostinicus*

基金项目: 国家高技术研究发展计划——“国家 863 计划”(2012AA022107); 十二五科技支撑计划 (2012BAD19B0106)

* 通信作者。Tel: +86-21-34207941; Fax: +86-21-34205709; E-mail: yawenhe@sjtu.edu.cn

作者简介: 周莲 (1979 -), 女, 上海人, 助理研究员, 博士, 研究方向为微生物源绿色农药研发、微生物群体感应分子机理。E-mail: lianzhou@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2014-09-28; 修回日期: 2014-10-30

NA1),二者对水稻纹枯病菌菌丝生长的抑制率分别可达75%和84%。陈思宇等^[2]报道了枯草芽孢杆菌SF-181 (*Bacillus subtilis* SF-181)对水稻纹枯病菌的抑制率为89%;荧光假单胞菌XF-174 (*Pseudomonas fluorescens* XF-174)对水稻白叶枯病菌、细菌性条斑病菌、稻瘟菌和水稻纹枯病菌的生长均具有抑制作用。Bhaktavatchalu等和Shanmugaiah等分别分离到了两株拮抗铜绿假单胞菌FP6和MML2212 (*Pseudomonas aeruginosa* FP6, MML2212)^[5-6],前者对包括水稻纹枯病菌在内的8种植物病原真菌具有显著抑制作用^[5],后者产生的次级代谢产物吩嗪-1-酰胺(phenazine-1-carboxamide,简称PCN)能够有效抑制纹枯菌和白叶枯菌的生长^[6]。目前这些菌株的拮抗机理和应用研究尚未见进一步报道。

上海交通大学生命科学技术学院相关团队10多年前从水稻、甜瓜和辣椒等植物根际土壤样品中分离和筛选到了一批具有抑菌活性的假单胞菌M18、GP72和SJT25等^[7-9]。甜瓜根际铜绿假单胞菌M18 (*Pseudomonas aeruginosa* M18)能产生至少两种抑菌代谢产物申嗪霉素(化学名称为吩嗪-1-羧酸,phenazine-1-carboxylic acid,简称PCA)和藤黄绿菌素^[10]。申嗪霉素能有效抑制水稻纹枯病菌和西瓜枯萎病菌的生长,且对人体和动物安全,对环境友好。为了提高申嗪霉素的发酵效价,促进申嗪霉素的产业化和应用,许煜泉教授等首先阐明了M18中申嗪霉素的生物合成途径和初步的调控机理^[11-15];在此基础上,对M18菌株进行了多轮定向遗传改造,所得高产菌株经发酵工艺优化后申嗪霉素的发酵效价达到4.7 g/L^[11-12,16-17]。上海农乐生物制品有限公司成功研发了申嗪霉素水相提取工艺和对环境友好的悬浮剂剂型。2008-2009年期间,在全国10个省、市完成的大田试验结果表明:1%申嗪霉素悬浮剂能有效防治水稻纹枯病,平均防效超过80%,优于目前的主导农药^[18-19]。申嗪霉素原药和1%悬浮剂于2011年获得农药登记证,目前处于推广应用阶段。但是,由于目前的高产工程菌株是借助质粒pME6032过表达申嗪霉素合成基因簇 $phzA1-G1$ 实现的,该基因簇在发酵过程中表达不稳定,导致申嗪霉素发酵效价偏低,造成生产成本和用药成本偏高,严重影响申嗪霉素的推广应用。因此,急需开发稳定、高产的新型工程菌株。

本试验在我国中部重庆市郊区采集健康水稻根际土壤,从中分离并筛选出一系列能抑制水稻纹枯病菌生长的假单胞菌菌株。菌株PA1201的申嗪霉素产量比现有M18菌株高3-4倍,还产生具有更高抑菌活性的代谢产物吩嗪-1-酰胺,为开发更高产申嗪霉素工程菌株和研发新型农用抗生素提供了新的微生物资源。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株:PA1201是从重庆市郊区水稻根际土壤样品中分离纯化而得;水稻纹枯病菌、水稻白叶枯病菌PX099A、铜绿假单胞菌M18、大肠杆菌DH5 α 、人肺腺癌细胞系A549以及黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*) Canton-S品系均系本实验室收藏。

1.1.2 供试培养基:(1)马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA, g/L):葡萄糖20 g,马铃薯200 g,琼脂15 g。(2)NA培养基(g/L):蛋白胨5 g,牛肉浸膏3 g,蔗糖5 g,酵母提取物1 g,琼脂8 g, pH 6.8。(3)溶菌肉汤培养基(LB, g/L):胰蛋白胨10 g,酵母提取物5 g,氯化钠10 g,琼脂15 g, pH 7.0。(4)胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSBA, g/L):胰蛋白胨17 g,蛋白胨3 g,葡萄糖2.5 g,氯化钠5 g,磷酸氢二钾2.5 g,琼脂15 g, pH 7.0。(5)黄豆粉培养基(g/L):黄豆粉65 g,玉米浆16 g,葡萄糖12 g,无水乙醇22 mL。(6)色素促生培养基(PPM, g/L):胰蛋白胨22 g,葡萄糖20 g,硝酸钾5 g, pH 7.5。(7)假单胞F培养基(PAF, g/L):蛋白胨10 g,酪蛋白水解物10 g,硫酸镁1.5 g,磷酸二氢钾1.5 g,甘油10 mL, pH 7.0。(8)DF培养基(g/L):硫酸铵2 g,磷酸二氢钾4 g,磷酸氢二钠6 g,七水合硫酸镁0.2 g,七水合硫酸亚铁1 g,硼酸10 μ g,硫酸锰10 μ g,硫酸铜50 μ g,氧化钼10 μ g, pH 7.0。(9)ADF培养基(g/L):1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)0.3 g,磷酸二氢钾4 g,磷酸氢二钠6 g,七水合硫酸镁0.2 g,七水合硫酸亚铁1 g,硼酸10 μ g,硫酸锰10 μ g,硫酸铜50 μ g,氧化钼10 μ g, pH 7.0。(10)果蝇饲料玉米粉培养基(g/L):酵母粉23.5 g,玉米粉80 g,红糖137.5 g,对羟基苯甲酸甲酯2 g,无水乙醇20 mL,丙酸6.25 mL,琼脂7.5 g。(11)LB蔗糖培养基(g/L):胰蛋白胨

8 g, 酵母提取物 4 g, 氯化钠 4 g, 蔗糖 40 g, pH 7.2。

(12) 蔗糖琼脂 (g/L): 蔗糖 50g, 琼脂 15 g。

1.1.3 试剂和主要仪器: 细胞毒性检测试剂盒购自瑞士 Roche 公司 (Cytotoxicity Detection Kit (LDH), 货号: 11644793001); DMEM 高糖培养液和胎牛血清购于美国 Gibco 公司; 甲醇 (HPLC 级)、乙腈 (HPLC 级) 购自于 Fisher 公司。引物、常规试剂 (分析纯) 和抗生素购自于生工生物工程 (上海) 股份有限公司。Q5[®] 高保真 DNA 聚合酶 (货号: M0491L) 购自于 New England Biolabs[®]。T4 连接酶, dNTP 和限制性内切酶购自于宝生物工程 (大连) 有限公司。电子显微镜为美国 FEI 公司的 120kV 生物型透射电镜 (型号: Tecnai G2 spirit Biotwin)。高效液相色谱仪为安捷伦 1260 型高效液相色谱仪。超高效液相色谱-飞行时间质谱仪为安捷伦 1290 型超高效液相色谱串联安捷伦 6230 型飞行时间质谱仪。

1.2 拮抗细菌的分离

在重庆市郊区水稻大田中选取健康水稻植株, 取其根系, 洗净根表浮土, 称取根系样品 3 g, 切成小段放入 50 mL PAF 培养基中悬浮震荡培养 24 h (28℃, 200 r/min)。取 1 mL 培养液接种于 50 mL DF 培养基中, 震荡培养 24 h。随后取 1 mL 培养液接种于 50 mL ADF 培养基中, 震荡培养 24 h 后, 取培养液 200 μL 涂布于 ADF 琼脂平板上, 在 28℃ 下培养 5 d, 挑取形态不同的单菌落编号, 并进行甘油冻存。

采用同步法测定所分离菌株对水稻纹枯病菌的菌丝生长抑制。用无菌牙签将已编号的待测试菌株呈“十”字接种于距平板中心 2 cm 处 (每个平板可测试 4 株细菌), 28℃ 培养 2 d 后, 在该平板中心, 接种直径为 8 mm、长满水稻纹枯病菌菌丝的琼脂圆片, 继续培养 3 d 后, 观察纹枯菌的生长, 评价抑菌效果。每个菌株重复测试 3 次。

1.3 假单胞菌株对水稻白叶枯菌的抑菌活性测定

将水稻白叶枯病菌 PXO99A 接种于 NA 液体培养基中, 震荡培养 24 h 后 (200 r/min, 28℃), 调整菌液 OD_{600} 至 1.0, 取 2.5 mL 菌液接种于 200 mL 已融化 (42℃) 的 NA 琼脂培养基中, 迅速混匀后分别倒入培养皿 ($\Phi = 90$ mm) 中, 每皿 20 mL。平板凝固干燥后, 将待测菌株点接于该平板上, 置于在 28℃ 恒温培养箱中培养 48 h 后, 测定抑菌圈直径。本实验设 3 次独立重复, 以大肠杆菌 DH5 α 菌株为负对照。

1.4 菌株 PA1201 的鉴定

1.4.1 菌落形态: 用接种环蘸取适量菌液, 在 LB 琼脂平板上采用四区划线法划线接种, 晾干后置于 28℃ 恒温培养箱中培养 3 d, 观察平板上单个菌落的形态。

1.4.2 细胞形态观察: 将菌株 PA1201 接种于 LB 琼脂平板上, 在 28℃ 条件下培养 24 h, 用无菌接种环从平板上挑取单菌落, 悬浮于 1 mL 无菌纯水中清洗菌体表面杂质后, 以 3000 r/min 的转速离心 5 min 后去上清, 如此反复清洗 5 次。将洗净的菌体重悬于 1 mL 无菌纯水中, 取少许滴加于铜网表面, 钨灯下烘干后, 在透射电镜 (型号: Tecnai G2 spirit Biotwin) 下观察 PA1201 细胞形态。

1.4.3 16S rDNA 基因序列的扩增和序列分析: 使用细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒 (生工) 提取 PA1201 基因组 DNA, 以此为模板, 用 Q5[®] 高保真 DNA 聚合酶 (New England Biolabs[®]) 和通用引物 16S-27F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') 和 16S-1472R (5'-ACGTTACCTTGTACACTT-3') 扩增 16S rDNA 片段; 使用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒纯化回收 PCR 扩增产物, 交由生工生物工程 (上海) 有限公司测序。测序结果在 GenBank 上利用 BLAST 程序进行相似性比对, 并运用 MEGA6.0 的 Neighbor-Joining (NJ) 方法构建系统发育树。

1.4.4 磷脂脂肪酸图谱分析: 通过四区划线法, 将 PA1201 接种于 TSBA 平板上, 在 28℃ 条件下培养 24 h - 36 h 后, 刮取平板上第三区的 PA1201 菌体 20 mg, 根据 MIDI SHERLOCK 操作手册上的方法, 进行磷脂脂肪酸 (PLFA) 的提取和气相质谱分析。

1.4.5 抗生素最低抑菌浓度测定: PA1201 新鲜菌落接种于 LB 液体培养基中摇瓶培养至 $OD_{600} = 1.0$, 转移 10 μL 菌液至 100 孔培养板中, 再分别向每孔加 150 μL 含有不同浓度抗生素 (包括: 卡那霉素、羧苄青霉素、庆大霉素、四环素、壮观霉素、头孢氨苄和青霉素 G) 的 LB 液体培养基, 置于全自动微生物生长曲线分析仪 (Bioscreen) 中 28℃ 培养, 实时监测 PA1201 的生长情况。培养 48 h 后, 绘制 PA1201 生长曲线, 确定不同抗生素抑制 PA1201 生长的最低浓度。

1.5 申嗉霉素和吩嗪-1-酰胺的提取和定量分析鉴定

1.5.1 发酵培养条件: 从 LB 平板上挑取 PA1201

单菌落接种至 5 mL PPM 液体培养基中过夜震荡培养 (28℃, 200 r/min), 调整菌液 OD_{600} 至 1.0 作为种子液。按 1% 的接种量将种子液接种至 50 mL PPM 或 65 mL 黄豆粉发酵培养液中, 在恒温摇床 (28℃, 200 r/min) 中培养 24 h 至 72 h。

1.5.2 申嗪霉素和吩嗪-1-酰胺提取和检测: 在不同发酵时间点分别取发酵液 180 μ L 至 1.5 mL EP 管, 加入 20 μ L 6 mol/L 盐酸, 调节 pH 值至 3 左右; 加入 540 μ L 氯仿, 震荡混匀 2 min, 离心分层; 转移氯仿相 100 μ L 至 HPLC 样品管中供分析; 通过高效液相色谱 (HPLC, Agilent 1260) 对氯仿提取混合物中申嗪霉素和吩嗪-1-酰胺进行定量分析; 分析参数如下: 进样量为 1.5 μ L, 检测波长为 252 nm, 流动相为乙腈: 乙酸铵 (5 mmol/L) 溶液 = 60:40 (V/V), 流速为 0.7 mL/min, 色谱柱为 Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 反相柱, 柱温 30℃。

1.6 申嗪霉素和吩嗪-1-酰胺的质谱分析

通过超高效液相色谱 (UHPLC, Agilent 1290) 对氯仿提取混合物中申嗪霉素和吩嗪-1-酰胺进行分离, 随后在正离子模式下, 经飞行时间质谱仪 (TOF MS, Agilent 6230) 对化合物分子量进行鉴定; 分离参数如下: 进样量为 2 μ L, 检测波长为 252 nm, 流动相为甲醇: 乙酸铵 (2 mmol/L) 溶液 = 50:50 (V/V), 流速为 0.2 mL/min, 色谱柱为 Agilent ZORBAX Extend-C18 反相柱, 柱温 30℃。

1.7 乳酸脱氢酶 (LDH) 释放法测定细胞毒性

用含 1% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液将 A549 细胞浓度调整到 1×10^5 /mL, 取 100 μ L 加入 96 孔细胞培养板中, 置于 37℃、通气量为 5% 的二氧化碳恒温培养箱中培养 2 h, 确保细胞完全贴壁。用含 1% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液重悬新鲜培养的 PA1201、M18 和 DH5 α 菌体, 并将菌液浓度调整至 1×10^8 CFU/mL。取 5 μ L 菌液加入细胞培养孔中, 使细菌对细胞的复感指数 (MOI) 达到 50 左右, 37℃ 共培养 4 h 后, 依照试剂盒操作手册测定吸光值 A_{492} , 以表示 LDH 的释放。实验中设有 3 孔 A549 细胞正常培养 (无细菌感染) 作为阴性对照和 3 个添加 1% Triton-X 100 的 A549 细胞培养液作为阳性对照。根据以下公式计算细胞毒性 (%) = (实验组吸光值 - 阴性对照组吸光值) / (阳性对照组吸光值 - 阴性对照组吸光值) \times 100%。实验中, 每个菌株设 6 个重复。

1.8 果蝇存活测定

菌株 M18 和 PA1201 在 LB 培养基中过夜培养至 $OD_{600} = 3.0$, 离心收集 1 mL 菌体, 用等体积 LB 液体培养基清洗后, 重新悬浮在 150 μ L LB 蔗糖培养液中; 取直径为 2.4 cm 的无菌滤纸片 (Whatman) 置于培养瓶底部蔗糖琼脂表面, 将上述 150 μ L 菌液均匀涂布在滤纸片上; 每瓶中放入已禁食 5 h 的成年果蝇 (3-5 天龄) 10 只, 在 25℃ 光照培养箱 (16 h 光照) 中培养, 每日监测并记录果蝇存活数。

2 结果

2.1 PA1201 的分离和抑菌活性

采用材料和方法 1.2 中所描述的分选步骤, 从水稻根际土壤样品中分离到菌落形态有差异的菌株 89 株; 以水稻纹枯病菌作为指示菌, 筛选出有拮抗作用的菌株 10 株, 其中编号为 PA1201 的菌株对水稻纹枯病菌丝生长的抑制效果最佳 (图 1-C)。进一步实验结果显示: PA1201 菌株也能有效抑制水稻白叶枯菌 PXO99A 的生长 (图 1-D)。

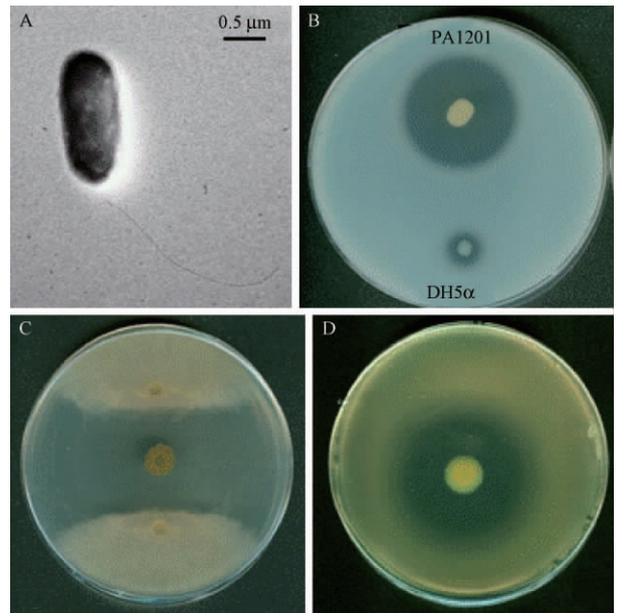


图 1. 菌株 PA1201 的形态和生化特征以及抑菌活性

Figure 1. Characterization of PA1201's morphological and biochemical traits, and its inhibitory effects on the growth of rice pathogens. A: Strain PA1201 is short-rod shape bacterium with single polar flagellum. B: PA1201 produces large amount of extracellular protease; C: PA1201 inhibits the growth of *Rhizotonia solani* Kühn; D: PA1201 inhibits the growth of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.

2.2 PA1201 的形态和生化特征

PA1201 革兰氏染色呈红色, 属革兰氏阴性细菌。在电镜下, PA1201 菌体为短杆状, 大小为 $(1.5 - 2.5) \mu\text{m} \times (0.5 - 1) \mu\text{m}$, 有极性单生鞭毛, 具有运动性 (图 1-A)。在 LB 琼脂平板上好氧培养 48 h 后, 浅黄色菌落表面平滑、有光泽、边缘整齐、直径为 2 - 3 mm。在含有 1.5% 脱脂奶粉的 LB 平板上培养 48 h 后, 菌落周围出现直径为 30 - 35 mm 的透明圈, 说明该菌株可产生和分泌大量胞外蛋白酶 (图 1-B)。

2.3 PA1201 属铜绿假单胞菌

以 PA1201 的基因组 DNA 为模板, 采用 16S-27F 和 16S-1472R 为引物进行 PCR 扩增, 得到单一、明亮的条带。纯化后的 DNA 片段测序分析得到 1497 个碱基, 在 GenBank 中的序列登录号为 KM386632。与 NCBI GenBank 数据库中的序列进行

比对分析和亲缘关系进化树分析的结果均显示: 菌株 PA1201 的 16S rDNA 序列与铜绿假单胞菌同位点序列同源性达到 100% (图 2); 因此, 将该菌初步鉴定为铜绿假单胞菌 PA1201 生防株。活体细菌细胞膜上的磷脂脂肪酸 (phospholipid fatty acids, PLFAs) 是细胞膜的重要组成部分, PLFA 的组成和含量水平具有种属特异性^[20]。表 1 显示菌株 PA1201 细胞膜中 PLFAs 的组成与含量, 主要特征峰值 $C_{16:1} \omega 7c$ 或 $C_{16:1} \omega 6c$ 、 $C_{16:0}$ 和 $C_{18:1} \omega 7c$ 分别占全细胞组分的 12.71%、22.97% 和 44.13%。与 RTSBA6 6.10 数据库比对结果显示菌株 PA1201 与铜绿假单胞菌的相似性指数 (SIM INDEX) 达到 0.787, 进一步说明该菌株属铜绿假单胞菌。综上所述, 我们将 PA1201 菌株定名为 *Pseudomonas aeruginosa* PA1201。

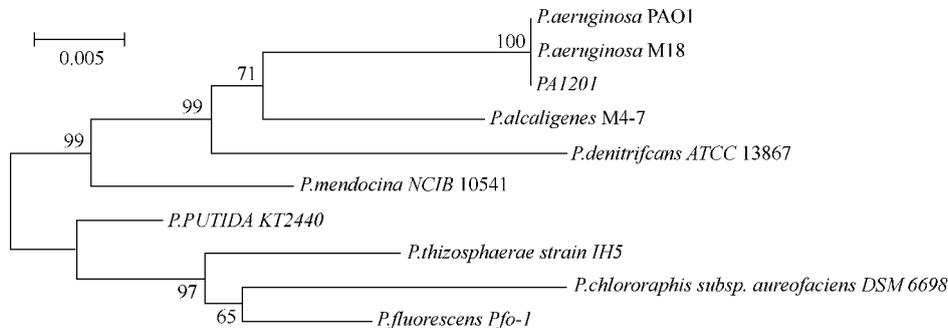


图 2. 菌株 PA1201 16S rDNA 基因序列系统发育树

Figure 2. Phylogenetic tree derived from 16S rDNA gene sequences of strain PA1201. The number at each branch point is the percentage supported by bootstrap. Bar, 0.005% sequence divergence.

2.4 PA1201 菌株对不同抗生素的敏感性

铜绿假单胞菌分布广泛, 存在于土壤、水体、空气、人体体表、呼吸道等环境中, 是动、植物的条件致病菌。铜绿假单胞菌的一个重要特征是它对许多抗生素都具有抗药性^[21]。根据本研究的实验结果, PA1201 对 6 种抗生素均有一定的抗性, 能抗较高浓度的头孢氨苄 (Cefalexin) 和壮观霉素 (Spectinomycin), 最低生长抑制浓度可达 2 mg/mL; 但对庆大霉素 (Gentamicin) 敏感, 最低生长抑制浓度为 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (表 2)。

2.5 PA1201 菌株高产申嗪霉素和吩嗪-1-酰胺

上海交通大学分离的甜瓜根际铜绿假单胞菌 M18 是申嗪霉素高产菌株的出发菌株。在 PPM 和黄豆粉培养基中, 申嗪霉素的产量分别约为 50 mg/L 和 250 mg/L。由于 M18 中负责将申嗪霉素转化为吩嗪-1-酰胺的 *phzH* 基因的第 904 个碱基发生了

C→T 的点突变, 产生了一个 TAG 终止密码子, 没有 *phzH* 产物表达, 因此, M18 不产生吩嗪-1-酰胺^[22-24]。根据前述方法, 通过 HPLC 检测菌株 PA1201 发酵提取液中申嗪霉素的产生, 我们发现菌株 PA1201 在 PPM 发酵提取液中, 主要含有两个化合物 a 和 b, 出峰时间分别在 1.9 min 和 2.8 min (图 3-A), 分别与申嗪霉素标样及吩嗪-1-酰胺标样的出峰时间一致 (图 3-B、C)。通过 LC/MS 分析, 化合物 a 的离子丰度主要出现在 m/z 225.0660 和 m/z 247.0478, 这分别与质子化申嗪霉素 $[C_{13}H_8N_2O_2 + H]^+$ (m/z 225.0569) 和钠离子化申嗪霉素 $[C_{13}H_8N_2O_2 + Na]^+$ (m/z 247.0478) 的质荷比一致 (图 3-D); 而化合物 b 的离子丰度主要出现在 m/z 224.0833 和 m/z 246.0652, 这分别与质子化吩嗪-1-酰胺 $[C_{13}H_9N_3O + H]^+$ (m/z 224.0818) 和钠离子化申嗪霉素 $[C_{13}H_9N_3O + Na]^+$ (m/z 246.0638) 的质

荷比一致(图 3-E)。综上所述,我们确定菌株 PA1201 在 PPM 培养基中能同时合成大量申嗪霉素和吩嗪-1-酰胺。

表 1. 菌株 PA1201 细胞膜中磷脂脂肪酸的组成与含量

Table 1. The composition and percentage of PLFAs in the membrane of PA1201

RT	Response	Peak Name	Percent
0.7426	441876	—	—
0.7516	8.549E+8	solvent peak	—
1.0871	718	—	—
1.2399	2108	10:0	0.51
1.3342	2252	—	—
1.4783	1209	—	—
1.5369	16353	10:0 3OH	3.54
1.6646	17270	12:0	3.57
1.7606	1198	—	—
1.7992	1365	unknown 12.502	—
1.9305	325	13:0	0.06
1.9929	23947	12:0 2OH	4.44
2.0294	2920	12:1 3OH	0.54
2.0756	24597	12:0 3OH	4.45
2.1765	444	—	—
2.2271	3270	14:0	0.56
2.3213	443	—	—
2.5390	1928	15:0	—
2.6421	1419	—	—
2.7045	734	14:0 3OH/16:1 iso I	0.11
2.8078	85732	16:1 w7c/16:1 w6c	12.71
2.8353	425	16:1 w5c	0.06
2.8597	156686	16:0	22.97
3.0623	450	17:0 iso	0.06
3.1213	2250	17:1 w8c	0.31
3.1522	2367	17:0 cyclo	0.33
3.1800	1596	17:0	0.22
3.4504	329504	18:1 w7c	44.13
3.4785	388	18:1 w5c	0.05
3.4985	6999	18:0	0.93
3.7534	571	—	—
3.7876	3243	19:0 cyclo w8c	0.43

Fatty acid profiles of PA1201 were compared with the profiles in the Sherlock bacterial fatty acid reference library RTSBA6 6.10 of MIDI, Inc. PA1201 belongs to *Pseudomonas-aeruginosa*-GC subgroup A (SIM INDEX = 0.787).

表 2. PA1201 的最低抗生素抑菌浓度。

Table 2. The minimal inhibitory concentration (MIC) of antibiotics in PA1201

Antibiotics	MIC ($\mu\text{g/mL}$)
Kanamycin	1000
Carbenicillin	250
Gentamicin	12.5
Tetracycline	50
Spectinomycin	2000
Cefalexin	2000
Penicillin G	1000

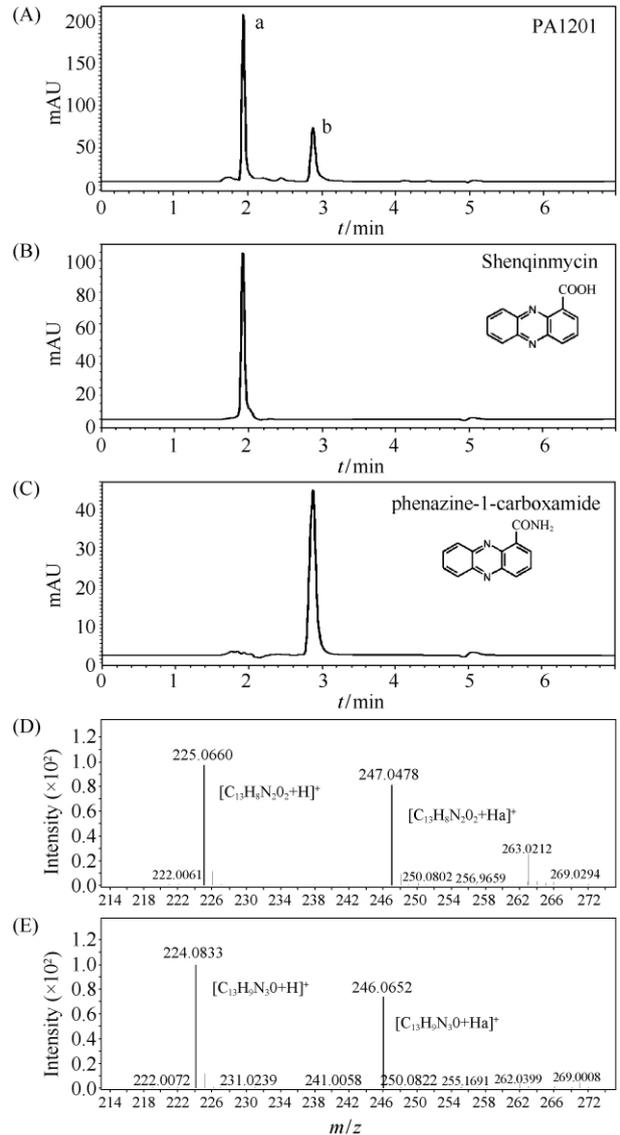


图 3. 菌株 PA1201 产生申嗪霉素和吩嗪-1-酰胺两种抑菌代谢产物

Figure 3. PA1201 produces Shenqinmycin and phenazine-1-carboxamide. A: HPLC analysis of strain PA1201 culture supernatant crude extract; B: HPLC analysis of Shenqinmycin; C: HPLC analysis of Phenazine-1-carboxylamide; D: LC-MS analysis of the compound a; E: LC-MS analysis of the compound b.

在 PPM 培养基中, M18 和 PA1201 在 28℃ 和 37℃ 的生长基本一致 (图 4-A); 在 28℃ 条件下, PA1201 菌株申嗪霉素产量 36 h 时达到最高, 81.7 mg/L, 优于 M18 菌株 (61.1 mg/L); PA1201 还产生吩嗪-1-酰胺, 产量随着发酵时间的推移逐渐积累, 在 48h 达到最高 18.1 mg/L; 菌株 M18 则不产吩嗪-

1-酰胺 (图 4-B、C)。在 37℃ 条件下, PA1201 菌株申嗪霉素的产量降低至 39.6 mg/L, 但仍是 M18 菌株 (11.8 mg/L) 的 3.3 倍; PA1201 菌株的吩嗪-1-酰胺产量为 1.2 mg/L, 远低于在 28℃ 条件下吩嗪-1-酰胺产量 (图 4-B、C)。

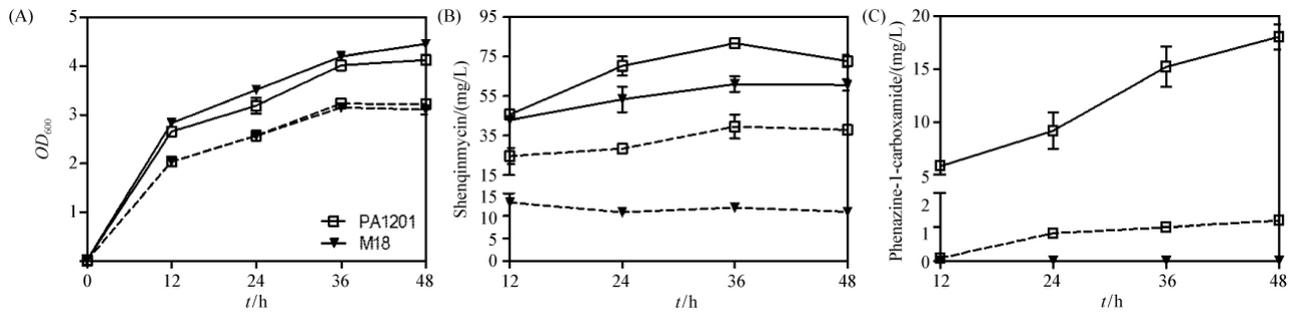


图 4. PA1201 在 PPM 培养基中申嗪霉素和吩嗪-1-酰胺产生曲线

Figure 4. Quantitative analysis of Shenqinmycin and phenazine-1-carboxamide production by strain PA1201 in PPM medium. A: Growth time course of PA1201 and M18; B: Shenqinmycin production curve; C: Phenazine-1-carboxamide production curve. Square indicates PA1201; triangle indicates M18; Solid line indicates 28°C growth condition whereas dotted line indicates 37°C growth condition. The original Shenqinmycin production strain M18 was used as control. Data are the means \pm standard deviation of three independent assays.

在黄豆粉培养基中, 28℃ 条件下, 菌株 PA1201 产生大量申嗪霉素和吩嗪-1-酰胺, 并且产量分别高达 926.9 mg/L 和 489.5 mg/L; 菌株 M18 申嗪霉素产量为 248.9 mg/L, 仅为 PA1201 申嗪霉素产量的

26.9% (图 5-A、B); 在 37℃ 条件下, 菌株 PA1201 和 M18 的申嗪霉素产量分别为 104.8 mg/L 和 35.5 mg/L, 菌株 PA1201 的吩嗪-1-酰胺产量也下降至 41.9 mg/L (图 5-A、B)。

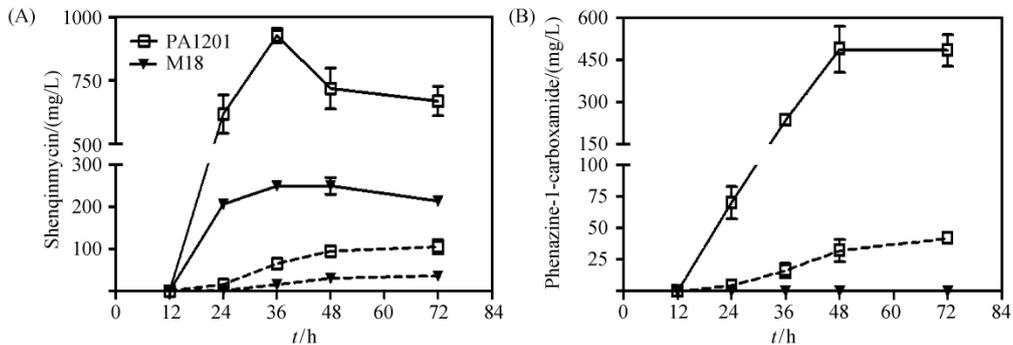


图 5. PA1201 在黄豆粉培养基中申嗪霉素和吩嗪-1-酰胺产生曲线

Figure 5. Quantitative analysis of Shenqinmycin and phenazine-1-carboxamide production by strain PA1201 in the medium supplemented with soybean meal and corn steep liquor. A: Shenqinmycin production curve; B: Phenazine-1-carboxamide production curve. Square indicates PA1201; triangle indicates M18; Solid line indicates 28°C growth condition whereas dotted line indicates 37°C growth condition. The original Shenqinmycin production strain M18 was used as control. Data are the means \pm standard deviation of three independent assays.

2.6 PA1201 菌株的致病性分析

罗氏公司的细胞毒性检测试剂盒是检测细胞毒性的常用方法。利用这一方法, 以人肺腺癌细胞系 A549 作为指示株系, 检测 PA1201 细胞毒性。我们发现: 在复感指数为 50 的条件下, 共培养 4 小时后,

PA1201 对 A549 细胞的相对细胞毒性为 37.4%, 略低于菌株 M18 对 A549 细胞的细胞毒性 (47.0%), 但显著高于对照菌株大肠杆菌 DH5 α 对 A549 细胞的细胞毒性 (15.1%) (图 6-A)。

我们进一步用 PA1201、M18 和大肠杆菌 DH5 α

分别喂食黑腹果蝇,记录并比较喂食后果蝇的存活时间。结果表明:喂食了 PA1201 和 M18 的果蝇的存活曲线类似,分别在喂食后第 7 天和第 8 天全部死亡;饲喂大肠杆菌 DH5 α 的果蝇在第 8 天的存活率仍为 100% (图 6-B)。

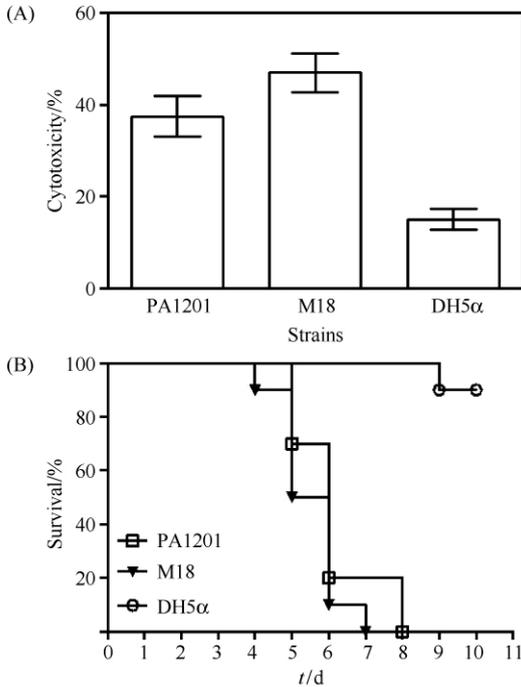


图 6. 菌株 PA1201 的毒性分析

Figure 6. Toxicity analysis on strain PA1201. A: The cytotoxicity of PA1201, M18 and DH5 α towards cell line A549; B: Survival rate of *Drosophila melanogaster* after bacterial feeding. Data are the means \square standard deviation of three independent assays.

3 讨论

PA1201 是一株来自水稻根际的假单胞菌,能有效抑制水稻纹枯病菌和水稻白叶枯病菌的生长;16S rDNA 序列分析和进一步的生化特征鉴定表明该菌株为铜绿假单胞菌。具有类似生防功能的铜绿假单胞菌株在国内外已有相当多的报道^[5-8,25],目前对这些菌株的研究大多仅限于室内病害防治效果研究;除 M18 菌株外,其他菌株很少涉及到详细的抑菌代谢产物定量和定性研究。本研究系统比较了 PA1201 和 M18 两个菌株在不同培养条件下吩嗪类代谢产物的产量,与 M18 相比,PA1201 具有两方面的优势:(1) PA1201 在两种培养基和两种温度条件下的申嗪霉素产量显著高于已知的 M18 菌株(图 4

-5);也远远高于其它临床分离的铜绿假单胞菌株 PAO1 等(蒋海霞等,待发表);(2) PA1201 菌株还产生另一种代谢产物吩嗪-1-酰胺,在黄豆粉发酵培养基中,其最高产量达 489.5 mg/L,接近申嗪霉素产量。据我们所知,在目前全世界所报道的生防假单胞菌中,PA1201 的申嗪霉素和吩嗪-1-酰胺产量均为最高。

申嗪霉素和吩嗪-1-酰胺是许多植物根际生防细菌产生的次级代谢产物,均具有抑制植物病原细菌和病原真菌生长的功能^[10,22,24-25]。目前的初步研究结果表明:由于申嗪霉素分子带有一个羧基(图 3-B),导致其抑菌活性受环境 pH 影响明显;在酸性环境中(pH 介于 3.1 和 4.9 之间)抑菌活性强,但随着 pH 升高,申嗪霉素的抑菌活性逐渐下降;当 pH \geq 6.4 时,其抑菌活性显著下降。吩嗪-1-酰胺分子以中性酰胺基团取代了申嗪霉素分子中原有的羧基基团(图 3-C),在不同 pH 值条件下,抑菌活性稳定;在碱性条件下,抑菌活性是申嗪霉素的 5-10 倍^[25]。因此,PA1201 不仅具有潜力开发成为更高产的申嗪霉素工程菌株,还是开发新型绿色农药吩嗪-1-酰胺的理想菌株。今后,高产申嗪霉素的分子机理和如何进一步提高该菌株申嗪霉素和吩嗪-1-酰胺的发酵效价将是我们的研究重点。

假单胞菌在地球上广泛分布,具有适应性强和代谢多样性等特点,在环境修复和生物防治等方面具有很大的应用潜力,但是假单胞菌属中的铜绿假单胞菌属动、植物和人类条件致病菌,对免疫力受影响的病人具有一定的威胁性;另一方面,许多铜绿假单胞菌株都有很强的抗药性,是临床上产生“超级细菌”的重要来源之一。虽然 PA1201 来源于水稻根际,但仍然对人肺腺癌细胞系和果蝇具有一定的毒性,因此开发利用 PA1201 菌株必须非常谨慎。铜绿假单胞菌的致病机制在近 30 年间得到了广泛地研究,它们可利用多重信号传导系统,如群体感应系统、双组份系统和依赖于 cAMP、ppGpp 或 c-di-GMP 的二级信使信号系统调控致病性或适应性基因的表达,产生三型分泌效应蛋白、外毒素 A、碱性蛋白酶、磷脂酶 C 等致病因子^[26,27]。过去十多年的研究工作也表明:敲除铜绿假单胞菌中的上述致病相关基因能显著降低其致病性和细胞毒性^[28-30]。因此,下一阶段 PA1201 的开发利用工作还应包括:通过基因工程手段,对该菌株进行一系列遗传改造,

降低其致病性和细胞毒性。

参考文献

- [1] 李明桃. 水稻纹枯病的病理学特性和防治方法. 农业灾害研究, 2012, 2 (05) : 1-3, 7.
- [2] Chen SY, Chen ZY, Zhang RS. Screening and evaluation of antagonistic bacteria against *Rhizoctonia solani*. *Acta Phytophylacica Sinica*, 2013, 40 (3) : 212-218. (in Chinese)
陈思宇, 陈志谊, 张荣胜. 水稻纹枯病菌拮抗细菌的筛选及鉴定. 植物保护学报, 2013, 40 (3) : 212-218.
- [3] Cao QQ, Zhou DB, Zheng L, Yang M, Zhou EX. Screening, identification and cultivation conditions of microbes antagonistic to rice sheath blight fungus *Rhizoctonia solani*. *Chinese Journal of Biological Control*, 2013, 29 (2) : 270-276. (in Chinese)
曹琦琦, 周登博, 郑丽, 杨媚, 周而勋. 水稻纹枯病菌拮抗菌的筛选、鉴定及培养条件探索. 中国生物防治学报, 2013, 29 (2) : 270-276.
- [4] Yang M, Yang YQ, Li HM, Shu CW, Zhou EX. Effects of Jinggangmycin on the growth and development of *Rhizoctonia solani* Kühn causal agent of rice sheath blight. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2012, 31 (4) : 445-449. (in Chinese)
杨媚, 杨迎青, 李明海, 舒灿伟, 周而勋. 井冈霉素对水稻纹枯病菌生长发育的影响. 华中农业大学学报, 2012, 31 (4) : 445-449.
- [5] Bhakthavathalu S, Shivakumar S, Sullia SB. Characterization of multiple plant growth promotion traits of *Pseudomonas aeruginosa* FP6, a potential stress tolerant biocontrol agent. *Annals of Biological Research*, 2013, 4 (2) : 214-223.
- [6] Shanmugaiah V, Mathivanan N, Varghese B. Purification, crystal structure and antimicrobial activity of phenazine-1-carboxamide produced by a growth-promoting biocontrol bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MML2212. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 108 : 703-711.
- [7] Xu YQ, Tang WN, Zheng YL, Zhong ZX, Xu DW. Screening of *pseudomonas* M18 and its biological control of cucumber wilt disease under commercial greenhouse. *Journal of Shanghai Jiaotong University*, 1999, 33 (2) : 210-213. (in Chinese)
许煜泉, 唐玮宁, 郑有丽, 钟仲贤, 徐悌惟. 筛选假单胞菌株 M18 防治大棚黄瓜枯萎病害. 上海交通大学学报, 1999, 33 (2) : 210-213.
- [8] Liu H, He Y, Jiang H, Peng H, Huang X, Zhang X, Thomashow LS, Xu Y. Characterization of a phenazine-producing strain *Pseudomonas chlororaphis* GP72 with broad-spectrum antifungal activity from green pepper rhizosphere. *Current Microbiology*, 2007, 54 (4) : 302-306.
- [9] Wang XY, Xu YQ, Lin SJ, Liu ZZ, Zhong JJ. Novel antiphytopathogenic compound 2-heptyl-5-hexylfuran-3-carboxylic acid, produced by newly isolated *Pseudomonas* sp. strain SJT25. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77 (17) : 6253-6257.
- [10] Hu HB, Xu YQ, Chen F, Xue, HZ, Hur, BK. Isolation and characterization of a new fluorescent strain that produces both phenazine 1-carboxylic acid and pyoluteorin. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2005, 15 (1) : 86-90.
- [11] Su JJ, Zhou Q, Zhang HY, Li YQ, Huang XQ, Xu YQ. Medium optimization for phenazine-1-carboxylic acid production by a *gacA qscR* double mutant of *Pseudomonas* sp. M18 using response surface methodology. *Bioresource Technology*, 2010, 101 (11) : 4089-4095.
- [12] Zhou Q, Su JJ, Jiang HX, Huang XQ, Xu YQ. Optimization of phenazine-1-carboxylic acid production by a *gacA/qscR*-inactivated *Pseudomonas* sp. M18GQ harboring pME6032Phz using response surface methodology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86 (6) : 1761-1773.
- [13] Huang JF, Xu YQ, Zhang H, Li YQ, Huang XQ, Ren B, Zhang XH. Temperature-dependent expression of *phzM* and its regulatory genes *lasI* and *ptsP* in rhizosphere isolate *Pseudomonas* sp. strain M18. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75 (20) : 6568-6580.
- [14] Li YQ, Du XL, Lu ZJ, Wu DQ, Zhao Y, Ren B, Huang JF, Huang XQ, Xu YQ. Regulatory feedback loop of two *phz* gene clusters through 5'-untranslated regions in *Pseudomonas* sp. M18. *PLoS One*, 2011, 6 (4) : e19413.
- [15] Ren B, Shen HF, Lu ZJ, Liu HM, Xu YQ. The *phzA2-G2* transcript exhibits direct RsmA-mediated activation in *Pseudomonas aeruginosa* M18. *PLoS One*, 2014, 9 (2) : e89653.
- [16] Li YQ, Jiang HX, Xu YQ, Zhang XH. Optimization of nutrient components for enhanced phenazine-1-carboxylic acid production by *gacA*-inactivated *Pseudomonas* sp. M18G using response surface method. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 77 (6) : 1207-

- 1217.
- [17] Du XL, Li YQ, Zhou WP, Zhou Q, Liu HM, Xu YQ. Phenazine-1-carboxylic acid production in a chromosomally non-scar triple-deleted mutant *Pseudomonas aeruginosa* using statistical experimental designs to optimize yield. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97 (17) :7767-7778.
- [18] Chen HX, Du XB, Zhang S, Li BX. Field efficacy of Shengqingmycin on rice sheath blight (*Rhizoctonia solani*). *Acta Agriculturae Shanghai*, 2012, 28 (2) : 69-71. (in Chinese)
陈海霞,杜兴彬,张穗,李帮学. 申嗟霉素对水稻纹枯病的田间防效分析. 上海农业学报,2012, 28 (2) : 69-71.
- [19] Shen LJ. The high efficiency, broad-spectrum, safe biological fungicide: Shenqinmycin. *World Pesticides*, 2011, 33 (3) : 58-58. (in Chinese)
沈丽娟. 高效、广谱、安全生物杀菌剂——申嗟霉素. 世界农药,2011,33 (3) : 58-58.
- [20] Lin YZ, Liu B, Zhang QF, Fu XR. The Development of the program PLFAEco for analysis of the phospholipid fatty acids (PLFAs) biomarkers detected from the microbial community in soil samples. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2009, 25 (14) :286-290. (in Chinese)
林营志,刘波,张秋芳,傅秀荣. 土壤微生物群落磷脂脂肪酸生物标记. 中国农学通报,2009, 25 (14) :286-290.
- [21] Soto SM. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence*, 2013, 4 (3) :223-229.
- [22] Chin-A-Woeng TFC, Thomas-Oates JE, Lugtenberg BJ, Bloemberg GV. Introduction of the *phzH* gene of *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 extends the range of biocontrol ability of phenazine-1-carboxylic acid-producing *Pseudomonas* spp. strains. *Molecular plant-microbe interactions*, 2001, 14: 1006-1015.
- [23] Wu DQ, Ye J, Ou HY, Wei X, Huang XQ, He YW, Xu YQ. Genomic analysis and temperature-dependent transcriptome profiles of the rhizosphere originating strain *Pseudomonas aeruginosa* M18. *BMC Genomics*, 2011, 12 (1) : 438.
- [24] 许煜泉,申慧峰,何亚文,周万平. 一种用于生产新型微生物源杀菌剂的生物工程菌株及其应用: 中国, CN 102399737 A. [P] 2012-04-04.
- [25] Chin-A-Woeng TFC, Bloemberg GV, van der Bij AJ, van der Drift KMG, Schripsema J, Kroon B, Scheffer RJ, Keel C, Bakker PAHM, Tichy HV, de Bruijn FJ, Thomas-Oates JE, Lugtenberg BJJ. Biocontrol by phenazine-1-carboxamide-producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 of tomato root rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicislycopersici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1998, 11: 1069-1077.
- [26] Jimenez PN, Koch G, Thompson JA, Xavier KB, Cool RH, Quax WJ. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2012, 76 (1) :46-65.
- [27] Silby MW, Winstanley C, Godfrey SA, Levy SB, Jackson RW. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiology Reviews*, 2011, 35 (4) :652-80.
- [28] Harrison EM, Carter ME, Luck S, Ou HY, He X, Deng Z, O'Callaghan C, Kadioglu A, Rajakumar K. Pathogenicity islands PAPI-1 and PAPI-2 contribute individually and synergistically to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14. *Infection and Immunity*, 2010, 78 (4) :1437-1446.
- [29] Feinbaum RL, Urbach JM, Liberati NT, Djonovic S, Adonizio A, Carvunis AR, Ausubel FM. Genome-wide identification of *Pseudomonas aeruginosa* virulence-related genes using a *Caenorhabditis elegans* infection model. *PLoS Pathogens*, 2012, 8 (7) :e1002813.
- [30] Jyot J, Balloy V, Jouvion G, Verma A, Touqui L, Huerre M, Chignard M, Ramphal R. Type II secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: in vivo evidence of a significant role in death due to lung infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 2011,203 (10) :1369-1377.

Isolation, identification and characterization of rice rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* PA1201 producing high level of biopesticide “Shenqinmycin” and phenazine-1-carboxamide

Lian Zhou, Haixia Jiang, Kaiming Jin, Shuang Sun, Wei Zhang, Xuehong Zhang, Ya-Wen He*

State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences & Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: [Objective] To identify bacterial strains with the inhibitory activity to rice pathogens, and to evaluate their potentials for the development of new biopesticides. [Methods] Rice rhizosphere *Pseudomonas* strains were isolated using 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as the sole carbon source. Strain PA1201 was further identified through morphological analysis, biochemical characterization, 16S rDNA sequence analysis and phospholipid fatty acid profiling. Qualitative and quantitative analysis of the production of the green pesticide Shenqinmycin as well as phenazine-1-carboxamide produced by PA1201 was done by HPLC. Cytotoxicity of PA1201 was evaluated using human alveolar epithelial cell line A549 and *Drosophila melanogaster* as hosts. [Results] Strain PA1201 inhibited *Rhizotonia solani* Kühn and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, the causal agents of rice sheath blight and bacterial blight, respectively. It was further identified as *Pseudomonas aeruginosa* PA1201, which produces shenqinmycin and phenazine-1-carboxamide. The fermentation titer of shenqinmycin and phenazine-1-carboxamide in the PPM medium was 81.7 mg/L and 18.1 mg/L, respectively. In the medium supplemented with soybean meal and corn steep liquor, the level of shenqinmycin and phenazine-1-carboxamide reached 926.9 mg/L and 489.5 mg/L. PA1201 also produced high level of extracellular protease and was toxic to human cell line and fruit fly. [Conclusion] Strain PA1201 could be engineered for higher yield of Shenqinmycin or for a new biopesticide.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Shenqinmycin; phenazine-1-carboxamide, biopesticide

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2012AA022107) and by The 12th Five Years Key Programs for Science and Technology Development of China (2012BAD19B0106)

* Corresponding author. Tel: +86-21-34207941; Fax: +86-21-34205709; E-mail: yawenhe@sjtu.edu.cn

Received: 28 September 2014 / Revised: 2014-10-30