

沈玉平, 袁志辉, 刘弘承, 等. 球黑孢菌 Gbh45 菌株抗姜青枯菌活性物质分离鉴定及抗菌机制[J]. 江苏农业学报, 2025, 41(11): 2134-2145.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2025.11.007

球黑孢菌 Gbh45 菌株抗姜青枯菌活性物质分离鉴定及抗菌机制

沈玉平¹, 袁志辉^{1,2}, 刘弘承¹, 邵金华¹, 赵昌会¹, 何福林^{1,2}, 张祖姣¹

(1. 湖南科技学院化学与生物工程学院, 湖南 永州 425199; 2. 湖南省银杏工程技术研究中心, 湖南 永州 425199)

摘要: 本研究旨在确定球黑孢菌 (*Nigrospora sphaerica*) Gbh45 菌株发酵液中抗姜青枯菌 (*Ralstonia solanacearum*) 的活性成分, 并揭示其抗菌作用机制。为此, 采用硅胶柱层析、半制备高效液相色谱法 (HPLC) 和核磁共振波谱法对球黑孢菌 Gbh45 菌株发酵液抗菌活性成分进行分离鉴定。通过测定姜青枯菌的生长情况、最小抑菌质量浓度 (MIC) 和半抑菌质量浓度 (IC_{50}) 评价球黑孢菌 Gbh45 菌株活性次生代谢物的抗菌效果。进一步通过检测细胞膜完整性、细胞壁破损情况和胞内活性氧 (ROS) 水平探究其抗菌机制。结果显示, 球黑孢菌 Gbh45 菌株的抗菌活性次生代谢物为蒽醌类化合物 9 α -hydroxydihydrodesoxybostrycin (9 α -HDDDB), 对姜青枯菌的最小抗菌质量浓度仅为 25.000 μ g/mL, 半抑菌质量浓度为 8.974 μ g/mL。9 α -HDDDB 主要通过破坏细胞膜完整性, 导致细胞壁破损, 诱导细胞积累活性氧 (ROS) 的方式来抑制姜青枯菌生长。此外, 9 α -HDDDB 还对食源性病原菌大肠杆菌 O157:H7 菌株和金黄色葡萄球菌展现出良好的抑制效果, 显示其作为青枯菌生物农药和食品抗菌剂的巨大应用前景。

关键词: 球黑孢菌; 生姜; 青枯菌; 活性次生代谢物; 抗菌机制

中图分类号: S482⁺7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2025)11-2134-12

Isolation, identification and antibacterial mechanism of active substances from *Nigrospora sphaerica* Gbh45 strain against *Ralstonia solanacearum*

SHEN Yuping¹, YUAN Zhihui^{1,2}, LIU Hongcheng¹, SHAO Jinhua¹, ZHAO Changhui¹, HE Fulin^{1,2}, ZHANG Zujiao¹

(1. School of Chemistry and Bioengineering, Hunan University of Science and Engineering, Yongzhou 425199, China; 2. Hunan Provincial Engineering Research Center for Ginkgo Biloba, Yongzhou 425199, China)

Abstract: The aim of this study is to identify the active components in the fermentation broth of *Nigrospora sphaerica* Gbh45 strain that are effective against *Ralstonia solanacearum*, and to elucidate their antibacterial mechanism. Accordingly, we isolated and identified the antimicrobial active components in the fermentation broth of *Nigrospora sphaerica* Gbh45 strain using silica gel column chromatography, semi-preparative high-performance liquid chromatography (HPLC), and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. We evaluated the antibacterial effects of the active secondary metabolites from *Nigrospora sphaerica* Gbh45 strain by measuring the growth curves of *Ralstonia solanacearum*, along with the minimum inhibitory concentration (MIC) and half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}). Moreover, we further investigated the antibacterial mechanism by assessing cell membrane integrity, cell wall damage, and intracellular reactive oxygen species (ROS) levels. The results indicated that the antimicrobial secondary metabolite from *Nigrospora sphaerica* Gbh45 was identified as an anthraquinone compound,

收稿日期: 2024-12-19

基金项目: 湖南省教育厅科学研究项目 (22B0804); 湖南省自然科学基金项目 (2024JJ7185, 2024JJ7196); 湖南省普通高校教学改革研究项目 (HNJG-20231105)

作者简介: 沈玉平 (1981-), 男, 湖南永州人, 博士, 副教授, 研究方向为农业工程。(E-mail) shenyup@mail3.sysu.edu.cn

通讯作者: 张祖姣, (E-mail) zhang_zujiao@126.com

inhibitory concentration (MIC) and half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}). Moreover, we further investigated the antibacterial mechanism by assessing cell membrane integrity, cell wall damage, and intracellular reactive oxygen species (ROS) levels. The results indicated that the antimicrobial secondary metabolite from *Nigrospora sphaerica* Gbh45 was identified as an anthraquinone compound,

9 α -hydroxydihydrodesoxybostrycin (9 α -HDDB). It exhibited a minimum inhibitory concentration of 25.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and a half-maximal inhibitory concentration of 8.974 $\mu\text{g}/\text{mL}$ against *Ralstonia solanacearum*. 9 α -HDDB inhibits the growth of *Ralstonia solanacearum* primarily by disrupting cell membrane integrity, leading to cell wall damage and thereby inducing the accumulation of intracellular reactive oxygen species (ROS). The results showed that 9 α -HDDB also exhibited strong inhibitory effects against the foodborne pathogens *Escherichia coli* O157 : H7 and *Staphylococcus aureus*, indicating its significant potential for development as both a biocontrol agent against *Ralstonia solanacearum* and a food antimicrobial agent.

Key words: *Nigrospora sphaerica*; ginger; *Ralstonia solanacearum*; active secondary metabolites; antibacterial mechanism

生姜 (*Zingiber officinale* Roscoe) 是中国广泛种植的一种药食同源植物,富含姜辣素、姜烯酚、姜酮等多种生理活性物质,除用作调味品外,还可预防和治疗消化不良、肠绞痛和失眠等疾病,具有重要的经济价值和药用价值^[1-3]。姜瘟病是由姜青枯菌 (*Ralstonia solanacearum*) 引发的一种破坏性极强的土传性病害,严重危害生姜生产^[4]。目前姜瘟病无特效预防和控制措施,常规防治手段包括化学农药、土壤消毒和轮作。化学农药一方面易导致病原菌产生耐药性,另一方面会导致环境污染;土壤消毒在杀死病原菌的同时也会杀死土壤中有益微生物,导致土壤板结,肥力下降;轮作虽然在一定程度上能够降低姜瘟病的发病率,但无法从根本上防止该病发生^[5]。因此,当前生产上迫切需要开发安全高效的姜瘟病防治技术,以保障生姜的安全生产。

生物防治是一种基于生物物种间关系、天然产物或生物技术的病虫害防控方法,绿色安全高效,符合现代农业可持续发展的要求^[6]。天然产物主要包括动物、植物和微生物自身成分或其生命过程中合成的物质,其种类繁多、来源广泛,一般具有多种生理活性功能,被公认为新药和新型抗菌剂的重要来源,是化学杀菌剂的优良替代品^[7]。目前,天然产物已对多种植物病害病原菌展现出良好的抑制效果,如原儿茶酸^[8]、蛇床子素^[9]、4'-去甲基表鬼臼毒素^[10]分别高效抑制马铃薯环腐病病原菌密执安棒状杆菌 (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*)、食源性病原菌李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)、水稻白叶枯病病原菌稻黄单胞菌 (*Xanthomonas oryzae*)。研究发现,天然产物对青枯菌具有良好的抑制作用。山竹 (*Garcinia mangostana* L.) 皮活性成分 γ -山竹素对马铃薯青枯菌的半抑菌质量浓度 (IC_{50}) 为 $(34.7 \pm 1.5) \mu\text{g}/\text{mL}$, γ -山竹素可有效减轻马铃薯青枯病发病症状^[11]。马缨丹 (*Lantana camara* L.) 精油中多种单帖化合物香茅醛、柠檬

烯、香芹酮、樟脑和百里酚也可高效抑制马铃薯青枯菌^[12]。黄皮 (*Clausena lansium*) 活性成分黄皮新肉桂酰胺 B 可有效抑制烟草青枯菌生长,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 黄皮新肉桂酰胺 B 可使烟草 21 d 内的发病率降低 93.19%,其应用效果是链霉素的 40 倍^[13]。马齿苋内生真菌橘青霉的活性次级代谢物橘霉素对青枯菌的抑制效果是链霉素的 3.4 倍^[14]。

本研究前期获得了 1 株高效拮抗姜青枯菌的银杏内生真菌 *Nigrospora sphaerica* Gbh45 菌株,其发酵液可强烈抑制姜青枯菌生长,即便经紫外线、酸、碱和高温处理,其抑菌活性仍无明显变化^[15]。为进一步确定发酵液活性成分,探明其作用机制,本研究采用柱层析、半制备高效液相色谱和核磁共振波谱对发酵液中抗姜青枯菌活性次级代谢物进行了分离和鉴定,同时从姜青枯菌细胞膜完整性、细胞壁损伤情况和氧化应激等方面阐释其抗菌作用机制,以期姜瘟病的生物防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料与仪器

1.1.1 菌株 球黑孢菌 Gbh45 菌株 (*N. sphaerica* Gbh 45, CCTCCM 2018755)^[15]、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) O157 : H7 菌株和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 菌株均为本实验室保存;姜青枯菌 (*R. solanacearum*)^[16] 从发病生姜组织中分离并保存于本实验室。

1.1.2 培养基 马铃薯葡萄糖固体 (PDA) 和液体 (PDB) 培养基用于培养球黑孢菌菌株 Gbh45。LB 培养基用于培养大肠杆菌和金黄色葡萄球菌。营养肉汤固体 (NA) 和液体培养基 (NB) 用于培养姜青枯菌。

1.1.3 主要仪器与试剂 本研究中应用的仪器和试剂等包括 AV III -600 核磁共振波谱仪 (德国 Bruker 公司产品)、Waters 1525EF 分析兼半制备高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司产品)、Thermo Multiskan

FC 酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品)、ZHUY-1112F 恒温摇床(上海智城分析仪器制造有限公司产品)、DDS-307A 电导率仪(上海雷磁科学仪器有限公司产品)、R-1001VN 旋转蒸发器(郑州长城科工贸有限公司产品);硅胶试剂(100~200 目,200~300 目)、预制硅胶板 GF254(青岛海洋化工厂产品)、Symmetry-C18 分析色谱柱(规格:150.0 mm×4.6 mm, 粒径:5 μm)、Zorbax SB-C18 半制备色谱柱(规格:250.0 mm×9.4 mm, 粒径:5 μm)、硫酸链霉素[生工生物工程(上海)股份有限公司产品]、色谱级甲醇和乙腈(上海安谱实验科技股份有限公司产品),其余化学试剂均为国产分析纯试剂。三磷酸腺苷(ATP)催化水解酶、碱性磷酸酶(AKP)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、活性氧(ROS)检测试剂盒均购自南京建成生物工程公司。

1.2 试验方法

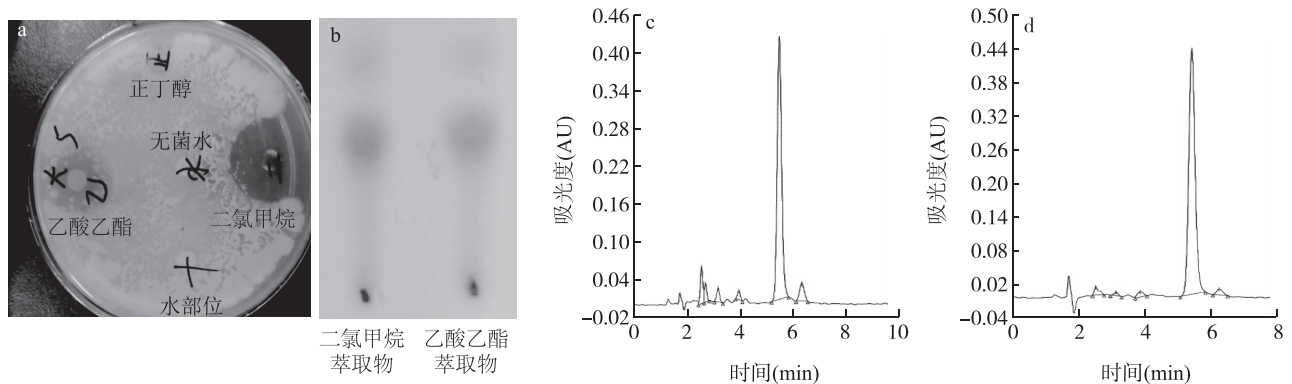
1.2.1 发酵液的制备 将球黑孢菌 Gbh45 菌株活化后接种至体积 100 mL、装液量 20% 的摇瓶中,200 r/min、30 °C 摇床恒温振荡培养 24 h,制备种子液,按 5% 的接种量接种至体积 250 mL、装液量 20% 的摇瓶中,200 r/min、30 °C 摇床恒温振荡培养 7 d,双层纱布过滤,收集滤液,用于抗菌活性物质的分离纯化。

1.2.2 抗菌活性测定 抗菌活性物质分离纯化过程中采用纸片扩散法(Kirby-bauer test)^[17] 监测不同萃取部位活性物质对姜青枯菌的抗菌活性。采用牛津杯法^[18] 测定球黑孢菌菌株 Gbh45 活性次生代谢物对 *E.coli* O157:H7 菌株和 *S.aureus* 的抗菌效果。具体操作是:使用血细胞计数板将青枯菌培养液含量稀释

至约 1×10^5 个菌体,1 mL,吸取 100 μL 于 NA 平板涂布均匀,取无菌滤纸片(直径 6 mm)或牛津杯置于平板上,在纸片中央加入 10 μL 萃取液或牛津杯中加入 150 μL 活性次生代谢物溶液,以相同体积的硫酸链霉素(质量浓度为 250 μg/mL,阳性)和无菌水(阴性)作为对照,30 °C 恒温培养 24 h,测定抑菌圈直径,监测各萃取部位活性物质的抗菌活性并测定抗菌效果。

1.2.3 抗姜青枯菌活性次生代谢物的分离纯化

采用方法 1.2.2 中的纸片扩散法监测各萃取部位活性物质的抗菌活性,通过硅胶柱层析和半制备高效液相色谱分离纯化抗菌活性次生代谢物。取球黑孢菌菌株 Gbh45 发酵液 2 L,依次用二氯甲烷、乙酸乙酯和正丁醇萃取 3 次,减压浓缩获得二氯甲烷萃取物 80 mg、乙酸乙酯萃取物 400 mg、正丁醇萃取物 280 mg 和水浸取物 150 mg。抗菌活性监测结果(图 1)显示,乙酸乙酯萃取物和二氯甲烷萃取物均具有抗菌活性(图 1a),且其薄层层析色谱图(图 1b)和采用高效液相色谱法(HPLC)获得的色谱图(图 1c 和图 1d)基本一致,因此将二者合并分离纯化。以二甲基亚砜(DMSO)溶解合并后的粗浸膏进行硅胶柱层析,用石油醚和乙酸乙酯按照一定比例(5:1→1:1)混合后进行梯度洗脱操作,在洗脱过程中得到 8 个流分,分别标记为 Fr.1~Fr.8,其中 Fr.4 流分为 100 mg,Fr.5 流分为 300 mg,它们均具有抗菌活性。对其合并后进一步通过半制备 HPLC(甲醇:0.1%甲酸溶液=30:70,体积比,4 mL/min)纯化,获得 12 mg 单体,分别以甲醇和乙腈为流动相单体进行 HPLC 检测,均为单一峰,化学纯度大于 95%,可用于结构鉴定。



a:不同萃取部位活性物质对姜青枯菌的抗菌活性,无菌水为对照;b:二氯甲烷和乙酸乙酯萃取物薄层层析色谱图;c:乙酸乙酯萃取物高效液相色谱(HPLC)谱图;d:二氯甲烷萃取物 HPLC 谱图。

图 1 姜青枯菌抗菌活性物质的萃取

Fig.1 Extraction of the antibacterial active substances against *Ralstonia solanacearum*

1.2.4 抗姜青枯菌活性次生代谢物的结构鉴定

将分离的单体化合物干燥过夜,以氘代甲醇溶解通过核磁共振波谱仪测定¹H-NMR谱和¹³C-NMR谱,并通过HR-EI-MS谱测定化合物的相对分子量,联合解析化合物结构。

1.2.5 MIC和IC₅₀的测定 采用二倍稀释法^[19]测定活性次生代谢物对姜青枯菌的最小抑菌质量浓度(MIC),通过GraphPad Prism软件拟合曲线并计算半抑菌质量浓度(IC₅₀)。应用96孔板,在各孔依次加入NB培养基100 μL,随后在A1孔中加入质量浓度为200 μg/mL的活性次生代谢物100 μL,混匀后吸取100 μL至A2孔,继续混匀后吸取100 μL至A3孔,如此重复至A5孔,随后向各孔依次加入100 μL预先制备的姜青枯菌悬液(OD₆₀₀为0.2),因此A1~A5孔活性次生代谢物质量浓度分别为50.00 μg/mL、25.00 μg/mL、12.50 μg/mL、6.25 μg/mL、3.12 μg/mL,对照组添加NA培养基100 μL,并加入100 μL姜青枯菌菌液,密封后于30℃条件下培养24 h,每个处理重复3次。无沉淀孔,无菌生长的活性次生代谢物浓度即为最小抑菌浓度。测定各孔OD₆₀₀,按照公式(1)计算抑制率,以次生代谢物质量浓度为横坐标,以抑制率为纵坐标,应用GraphPad Prism 8绘图并拟合曲线,计算IC₅₀。

抑制率 =

$$\left(1 - \frac{\text{药物组 } OD_{600} - \text{空白药物 } OD_{600}}{\text{对照组 } OD_{600} - \text{空白培养基 } OD_{600}}\right) \times 100\% \quad (1)$$

1.2.6 生长曲线测定 以OD₆₀₀=0.1为初始接种量分别接种至装有50 mL NB培养基的250 mL摇瓶中,加入适量活性次生代谢物,使其终质量浓度分别为0×MIC(即DMSO溶剂组)、1×MIC、3×MIC,以无菌水为对照(CK),于37℃、180 r/min条件下培养,以培养时间为横坐标,以OD₆₀₀为纵坐标绘制生长曲线。

1.2.7 细胞膜完整性测定 通过测定相对电导率、OD₂₆₀和胞外游离蛋白质浓度,间接表征活性次生代谢物对姜青枯菌细胞膜的破坏作用。相对电导率测定参照Diao等^[20]的方法测定。姜青枯菌培养至对数生长期(约10 h)后,5 000 g离心3 min后收集菌体,以5%葡萄糖溶液洗涤3~5次,直至其电导率与5%葡萄糖溶液相等,随后调节菌体浓度至1 mL 1×10⁸个,即为等渗姜青枯菌悬液。将适量球黑孢菌Gbh45菌株活性次生代谢物加入5%葡萄糖溶液和等渗姜青枯菌悬液中,调整其质量浓度为0×MIC(即DMSO溶

剂组)、1×MIC和3×MIC,30℃、180 r/min处理0 min、15 min、30 min、60 min、90 min、180 min,测定其电导率。同时,将等渗姜青枯菌悬液煮沸5 min,测定其电导率,按照公式(2)计算相对电导率。

$$\text{相对电导率} = \frac{L_2 - L_1}{L_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中,L₀表示等渗姜青枯菌液煮沸后的电导率;L₁表示5%葡萄糖溶液加入活性次生代谢物后的电导率;L₂表示活性次生代谢物处理组电导率。

游离核酸质量浓度的测定参照Dong等^[21]的方法适当改进后进行。5 000 g离心3 min收集姜青枯菌对数生长期菌体,用0.1 mol/L的磷酸缓冲液(pH为7.2)洗涤2次,并调节菌体含量至1 mL 1×10⁸个,加入适量活性次生代谢物调整其质量浓度为0×MIC、1×MIC和3×MIC,以磷酸缓冲液为对照,30℃、180 r/min培养,0 min、5 min、15 min、30 min、60 min、90 min和180 min时取样,5 000 g离心3 min,取上清液100 μL,测定OD₂₆₀。胞外游离蛋白质质量浓度测定按照Hu等^[22]报道的方法,采用考马斯亮蓝染色法测定。

1.2.8 姜青枯菌代谢系统酶活力测定 5 000 g离心3 min后收集姜青枯菌对数生长期菌体,以0.1 mol/L的磷酸缓冲液(pH为7.2)洗涤2次,调节菌体含量至1 mL 10⁸个,添加适量活性次生代谢物,调整其质量浓度至0×MIC、1×MIC和3×MIC,30℃、180 r/min恒温振荡培养48 h,在0 h、2 h、4 h、6 h、8 h、10 h、12 h、24 h、48 h时取样,4℃、5 000 g离心3 min后收集细胞,菌体沉淀以0.1 mol/L的磷酸缓冲液(pH为7.2)洗涤2次,使用超声波细胞破碎仪破碎菌体,按照方法1.2.7中的方法测定蛋白质质量浓度,利用试剂盒分别测定ATP催化水解酶、AKP、SOD、CAT、GSH-Px活力。ATP催化水解酶活力单位为1 h,1 mg菌体蛋白质中ATP催化水解酶分解ATP生成1 μmol无机磷的量。AKP活力单位为1 g菌体蛋白质15 min在37℃条件下与基质作用产生1 mg酚的量;SOD活力单位为1 mg菌体蛋白质在1 mL反应液SOD抑制率达50%时所对应的量;CAT活力单位为1 mg菌体蛋白质1 s分解1 μmol H₂O₂所对应的量;GSH-Px活力单位为扣除非酶反应,1 mg蛋白质在37℃条件下1 min使反应体系中谷胱甘肽浓度降低1 μmol/L的量。

1.2.9 活性氧含量测定 采用ROS试剂盒测定胞

内 ROS 水平。姜青枯菌培养至对数生长期后,测定 OD_{600} , 每次吸取 $10 \times OD_{600}$ 值的菌液(如菌液 OD_{600} 值为 5, 则取 2 mL), $5\ 000\ g$ 离心 3 min 收集菌体, 重悬于 $0 \times MIC$ 、 $1 \times MIC$ 、 $3 \times MIC$ 活性次生代谢物溶液, 以 $0.1\ mol/L$ 磷酸缓冲液(pH 为 7.2)为对照, $30\ ^\circ C$ 、 $180\ r/min$ 处理 10 h。处理完毕后, $5\ 000\ g$ 离心 3 min 收集菌体, 重悬于 $10\ \mu mol/L$ 的 2', 7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)溶液, $37\ ^\circ C$ 暗处反应 30 min, $5\ 000\ g$ 离心 3 min, 无菌去离子水洗涤 3 次, 以 $0.1\ mol/L$ 磷酸缓冲液(pH 为 7.2)重悬细胞, 使用 $488\ nm$ 的激发光, 测定 $525\ nm$ 处荧光强度, 以荧光强度表征 ROS 水平。

1.3 数据统计与分析

每个试验重复 3 次, 数据采用平均值 \pm 标准差表示, 使用 SPSS 17.0 进行数据统计和分析, 采用 t 检验进行显著性差异分析($P < 0.05$ 表示差异达显著水平; $P < 0.001$ 表示差异达极显著水平), 使用 Origin 2024 作图。

2 结果与分析

2.1 抗菌活性次生代谢物的结构

通过 HR-EI-MS 和核磁共振波谱 1H -NMR 谱、 ^{13}C -NMR 谱, 并结合文献鉴定了活性次生代谢物结构。在 $600\ MHz$ 、 CD_3OD 溶剂下测定的核磁共振波谱数据见表 1。

1H -NMR 数据显示, 活性次生代谢物有 1 个五取代苯环(δ_H 6.43, 1 H, br s, H-6), 2 个连氧次甲基(δ_H 4.73, 1 H, d, $J = 10.0\ Hz$, H-9; δ_H 3.45, 1 H, dd, $J = 11.7\ Hz, 3.5\ Hz$, H-3), 1 个甲氧基(δ_H 3.88, 3 H, s, OCH_3 -12), 2 个次甲基(δ_H 2.35, 1 H, m, H-1a; δ_H 2.35, 1 H, m, H-4a), 2 个亚甲基(δ_H 2.28, 1 H, dt, $J = 12.8\ Hz, 3.7\ Hz, 1.65, 1\ H, m$, H-4; δ_H 2.15, 1 H, dq, $J = 4.2\ Hz, 12.0\ Hz, 1.32, 1\ H, m$, H-1), 1 个甲基(δ_H 1.31, 3 H, s, CH_3 -11)。 ^{13}C -NMR 数据显示, 活性次生代谢物具有 16 个碳, 包括 1 个裸露羰基(δ_C 203.8, C-10), 3 个连氧苯环碳(δ_C 159.8, C-5; δ_C 157.0, C-7; δ_C 138.8, C-8), 2 个不连氧苯环碳(δ_C 128.7, C-9a; δ_C 109.3, C-10a), 1 个苯环次甲基碳(δ_C 100.2, C-6), 2 个连氧次甲基碳(δ_C 75.5, C-3; δ_C 73.8, C-9), 1 个连氧季碳(δ_C 71.6, C-2), 1 个甲氧基碳(δ_C 56.7, C-12), 2 个次甲基碳(δ_C 47.7, C-4a; δ_C 42.3, C-1a), 2 个亚甲基碳(δ_C 42.3, C-1; δ_C 30.2, C-4), 1 个甲基碳(δ_C

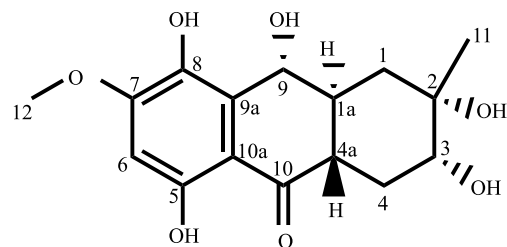
27.2, C-11)。结合 HR-EI-MS 数据, 由此确定化合物分子式为 $C_{16}H_{20}O_7$, 有 7 个不饱和度。此外, 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据与文献[23]中的结果基本一致, 因此可以确定活性次生代谢物为葱醌类化合物 9α -hydroxydihydrodesoxybostrycin (9α -HDDDB), 化学结构见图 2。

表 1 活性次生代谢物核磁共振波谱数据

Table 1 Nuclear magnetic resonance data of the bioactive secondary metabolite

位置	化学位移(碳谱) (^{13}C NMR)/ δ_C	化学位移(氢谱) (1H NMR)/ δ_H
1	42.30, CH_2	2.15, dq ($J = 4.2, 12.0$) 1.32, m
1a	42.30, CH	2.35, m
2	71.60, C	
3	75.50, CH	3.45, dd ($J = 11.7, 3.5$)
4	30.20, CH_2	1.65, m 2.28, dt ($J = 12.8, 3.7$)
4a	47.70, CH	2.35, m
5	159.80, C	
6	100.20, CH	6.43, br s
7	157.00, C	
8	138.80, C	
9	73.80, CH	4.73, d ($J = 10.0$)
9a	128.70, C	
10	203.80, C	
10a	109.30, C	
11	27.20, CH_3	1.31, s

dq, m, dd, dt, br s, d, s 代表不同自旋-自旋耦合裂分情况; J : 耦合常数, 反映氢核间相互作用。



1, 1a, 2~4, 4a, 5~9, 9a, 10, 10a, 11 见表 1。

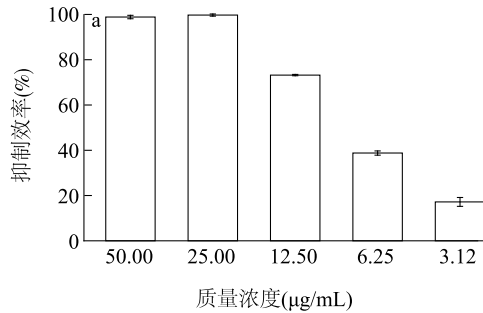
图 2 活性次生代谢物的化学结构

Fig.2 The chemical structure of the bioactive secondary metabolite

2.2 MIC 和 IC_{50}

分别测定不同质量浓度活性次生代谢物 (9α -HDDDB) 处理组的 OD_{600} 值, 计算其对姜青枯菌的抑制率(图 3)。结果显示, 活性次生代谢物 (9α -HD-

DB)对姜青枯菌的抑制效率随质量浓度的提高逐步增强,25.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 可完全抑制姜青枯菌的生长



a: 9 α -HDDB 对姜青枯菌的抑制效率; b: 96 孔板中不同质量浓度 9 α -HDDB 处理组姜青枯菌的生长情况。

图 3 活性次生代谢物(9 α -HDDB)对姜青枯菌的抑制作用

Fig.3 Inhibitory effect of the bioactive secondary metabolite (9 α -HDDB) on *Ralstonia solanacearum*

以抑制率为纵坐标,活性次生代谢物(9 α -HDDB)质量浓度为横坐标作图,并对曲线进行非线性拟合,获得方程式(3),得出 $IC_{50} = 8.974 \mu\text{g}/\text{mL}$ (图4)。由抑制曲线可知,活性次生代谢物(9 α -HDDB)在较低的质量浓度下即可高效抑制姜青枯菌,并且具有质量浓度依赖性。

$$Y = 11.90 + \frac{90.4}{1 + 10^{(\lg 8.974 - x) \times 2.546}} \quad (3)$$

公式(3)中, Y 为抑制率(%); x 为活性次生代谢物(9 α -HDDB)质量浓度取对数后的值。

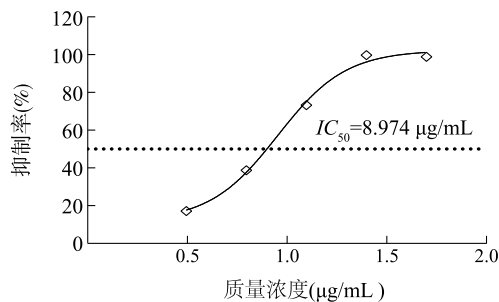


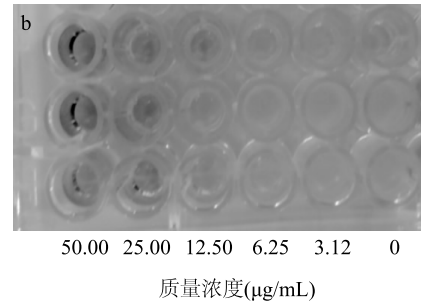
图 4 活性次生代谢物(9 α -HDDB)对姜青枯菌的抑制曲线

Fig.4 The inhibition curve of the bioactive secondary metabolite (9 α -HDDB) against *Ralstonia solanacearum*

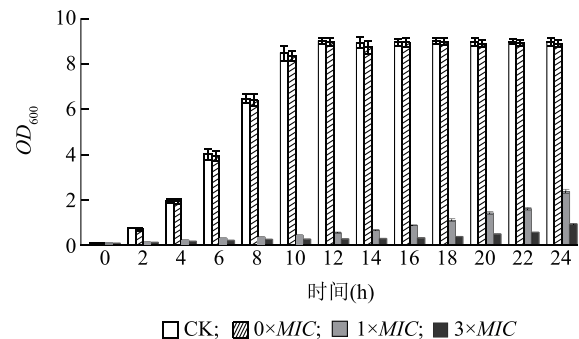
2.3 活性次生代谢物(9 α -HDDB)对姜青枯菌生长的影响

分别测定无菌水对照(CK)、0 \times MIC 处理、1 \times MIC 处理、3 \times MIC 处理姜青枯菌生长情况。结果(图5)显示,CK 和0 \times MIC 处理姜青枯菌生长随着时间延长呈先上升后趋于平稳态势,说明溶剂 DMSO 对姜青枯菌并无抑制作用。但是,1 \times MIC 处理和3 \times MIC 处理姜青

(图3b),因此 MIC 为 25.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。



枯菌生长速率明显下降,24 h 时1 \times MIC 处理和3 \times MIC 处理的 OD_{600} ,分别为 CK 的 26.37%和 10.67%,说明 9 α -HDDB 可高效抑制姜青枯菌生长。



CK: 无菌水(对照); 0 \times MIC: 不添加 9 α -HDDB, 仅加入 DMSO 溶剂,1 \times MIC: 9 α -HDDB 对姜青枯菌的最小抑菌浓度; 3 \times MIC: 3 倍的 9 α -HDDB 对姜青枯菌的最小抑菌浓度。

图 5 不同质量浓度活性次生代谢物(9 α -HDDB)处理姜青枯菌生长情况

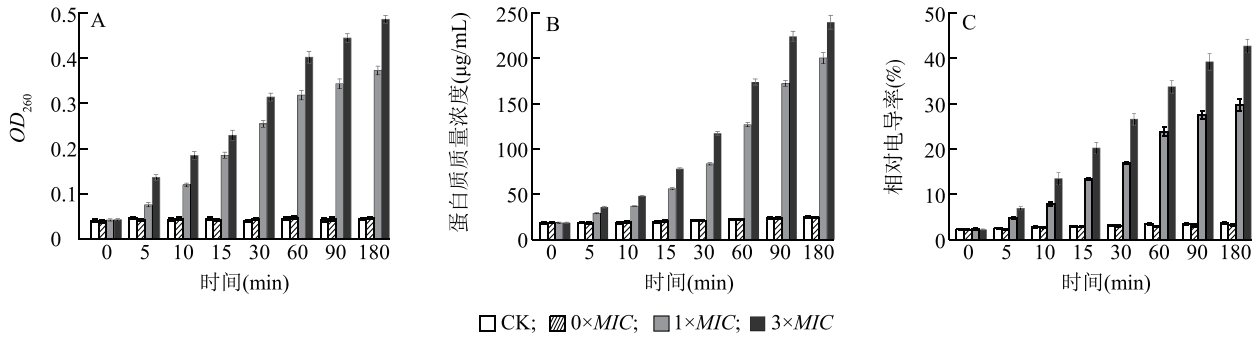
Fig.5 Growth of ginger *Ralstonia solanacearum* treated with the bioactive secondary metabolite (9 α -HDDB) at different concentrations

2.4 活性次生代谢物(9 α -HDDB)对姜青枯菌的抗菌作用

2.4.1 9 α -HDDB 对细胞膜完整性的影响 细胞膜具有稳定胞内离子浓度,阻止 DNA、RNA、蛋白质、多糖等细胞内容物渗漏的功能。细胞膜完整性受损时,通透性将增大,细胞内容物如 DNA、RNA、蛋白质及电解质外溢,培养液电导率、游离核酸和蛋白质浓度将上升^[24]。因此,可通过测定 OD_{260} 值、胞外游离蛋白质质量浓度和相对电导率间接测定细胞膜的

完整性。如图 6 所示,1×MIC 和3×MIC 处理的 OD_{260} 值、胞外游离蛋白质质量浓度和相对电导率较对照均呈明显的上升趋势;而0×MIC 处理变化趋势与对照基本一致,说明溶剂 DMSO 对细胞膜无破坏效果。90 min 时,1×MIC 处理的 OD_{260} 值、胞外游离蛋白质质量浓度、相对电导率分别是对照的 8.17 倍、

7.35 倍、7.44 倍,3×MIC 处理的 OD_{260} 值、胞外游离蛋白质质量浓度、相对电导率分别是对照的 10.57 倍、9.55 倍、10.63 倍,这说明 9 α -HDDB 可有效破坏姜青枯菌细胞膜完整性,加剧姜青枯菌细胞内容物外溢,并且其破坏作用随 9 α -HDDB 质量浓度的升高和处理时间的延长而增强。



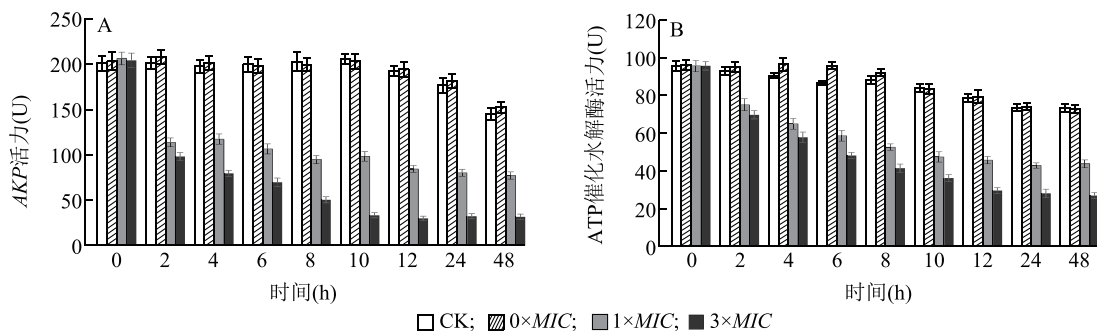
A:各处理 OD_{260} 值;B:各处理胞外游离蛋白质质量浓度;C:各处理相对电导率。CK、0×MIC、1×MIC、3×MIC 见图 5 注。

图 6 活性次生代谢物(9 α -HDDB)处理对姜青枯菌细胞膜完整性的影响

Fig.6 Effects of the bioactive secondary metabolite (9 α -HDDB) on cell membrane integrity of *Ralstonia solanacearum*

2.4.2 活性次生代谢物(9 α -HDDB)对 AKP 和 ATP 催化水解酶活力的影响 AKP 是位于细胞膜外膜表面和细胞壁内侧的周质空间酶,ATP 催化水解酶是一种膜蛋白酶,与营养物质运输、胞内能量平衡和细胞信号转导等多种细胞功能相关,细胞壁受损将导致 AKP 和 ATP 催化水解酶渗漏至胞外,胞内酶活力下降^[25-28]。因此,AKP 和 ATP 催化水解酶的活力变化可间接反映 9 α -HDDB 对姜青枯菌细胞壁的破坏作用。如图 7 所示,处理0~12 h,1×MIC 处理和3×MIC 处理胞内 AKP 活力和 ATP 催化水解酶活力急剧下降,与 0 h 相比,处理 12 h 时1×MIC 处理和3×MIC 处理胞内 AKP 活力分别下降 59.12% 和

85.45%,ATP 催化水解酶活力分别下降 52.21% 和 69.09%;而 CK 和0×MIC 处理 AKP 活力仅下降 4.29% 和 4.39%,ATP 催化水解酶活力仅下降 17.82% 和 17.43%。处理12~48 h,CK 和0×MIC 处理 AKP 活力和 ATP 催化水解酶活力有一定程度下降,而1×MIC 处理和3×MIC 处理则无明显变化。上述结果表明,9 α -HDDB 可快速高效地破坏姜青枯菌细胞壁,并且其破坏作用具有时间和剂量依赖性。此外,12~48 h CK 和0×MIC 处理 AKP 活力和 ATP 催化水解酶活力之所以下降,主要是因为菌体细胞长时间处于无营养环境中,细胞衰老加速并开始自溶,导致细胞壁发生渗漏。



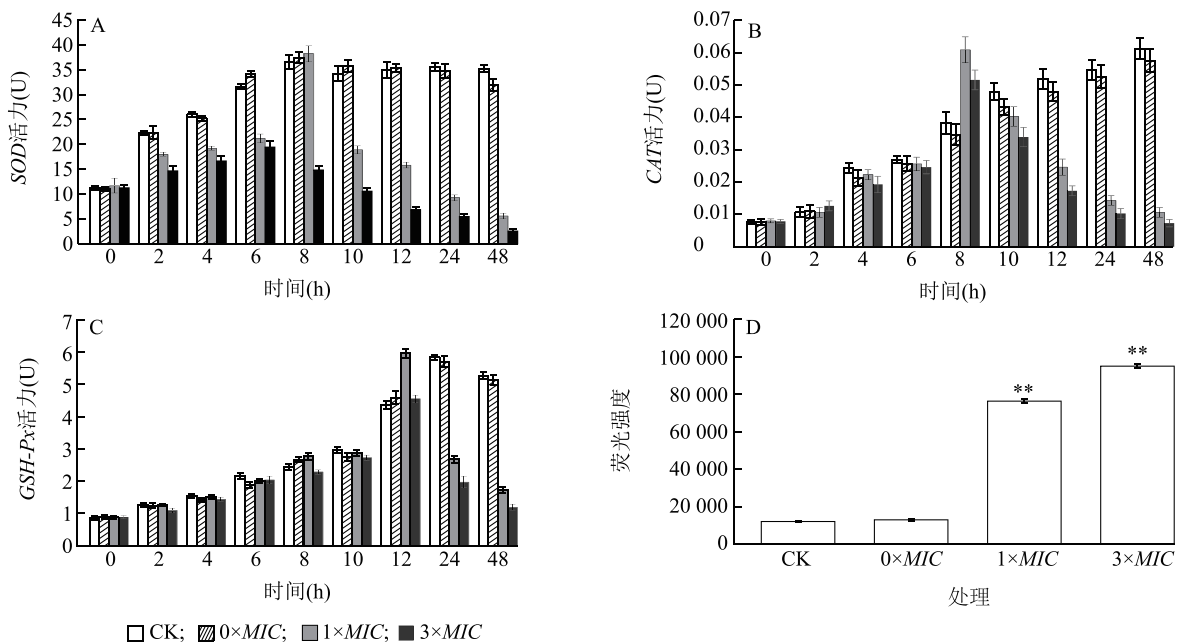
A:各处理对 AKP 活力的影响;B:各处理对 ATP 催化水解酶活力的影响。CK、0×MIC、1×MIC、3×MIC 见图 5 注。

图 7 活性次生代谢物(9 α -HDDB)对碱性磷酸酶(AKP)活力和三磷酸腺苷(ATP)催化水解酶活力的影响

Fig.7 Effects of the bioactive secondary metabolite (9 α -HDDB) on alkaline phosphatase (AKP) activity and adenosine triphosphate (ATP) hydrolytic enzyme activity

2.4.3 9α -HDDB 对抗氧化酶 *SOD*、*CAT*、*GSH-Px* 活力和胞内 ROS 水平的影响 氧化应激是机体在长期进化过程中形成的一种自我保护机制,即 ROS 水平的升高能快速诱导 *SOD*、*CAT* 和 *GSH-Px* 等抗氧化酶的表达,清除 ROS,维持氧化还原平衡。但是当 ROS 的产生超过细胞最大清除能力时,会导致氧化应激保护系统崩溃,机体受到氧化损伤甚至死亡^[29-30]。如图 8 所示,随着处理时间的延长,CK 和 $0\times MIC$ 处理 *SOD* 活力持续上升,并在 8 h 时达到峰值,随后趋于平稳;*CAT* 活力在整个处理期间持续上升,在 48 h 达到峰值;*GSH-Px* 活力稳步上升,在 24 h 达到峰值,随后出现下降; $0\times MIC$ 处理 *SOD*、*CAT*、*GSH-Px* 活力变化与 CK 无明显差异,说明溶剂 DM-SO 对姜青枯菌无氧化胁迫作用。 $1\times MIC$ 处理和 $3\times MIC$ 处理 *SOD*、*CAT* 和 *GSH-Px* 酶活力则呈现先上

升后下降的趋势,并且其抗氧化酶活力较 CK 和 $0\times MIC$ 处理先达到峰值,此后酶活力总体上小于同期 CK 处理和 $0\times MIC$ 处理。 $3\times MIC$ 处理抗氧化酶活力均明显小于 $1\times MIC$ 处理。这可能是因为 9α -HDDB 可快速诱导细胞积累大量 ROS,形成氧化损伤,引发细胞功能障碍,导致抗氧化酶系统崩溃,抗氧化酶活力下降。检测 9α -HDDB 处理 12 h 后姜青枯菌的胞内 ROS 水平发现,CK 和 $0\times MIC$ 处理 ROS 处于较低水平且两者之间无显著性差异,但是 $1\times MIC$ 处理和 $3\times MIC$ 处理 ROS 水平分别是对照处理的 6.33 倍和 7.34 倍,与 CK、 $0\times MIC$ 处理相比均达极显著水平 ($P<0.001$) (图 8D),这说明 9α -HDDB 可快速诱导姜青枯菌细胞产生 ROS,导致氧化应激保护系统崩溃,造成氧化损伤,从而抑制姜青枯菌生长。



A:各处理 *SOD* 活力;B:各处理 *CAT* 活力;C:各处理 *GSH-Px* 活力;D:各处理 12 h 时荧光强度。CK、 $0\times MIC$ 、 $1\times MIC$ 、 $3\times MIC$ 见图 5 注。图柱上 ** 表示与 CK 相比差异达 0.001 水平。

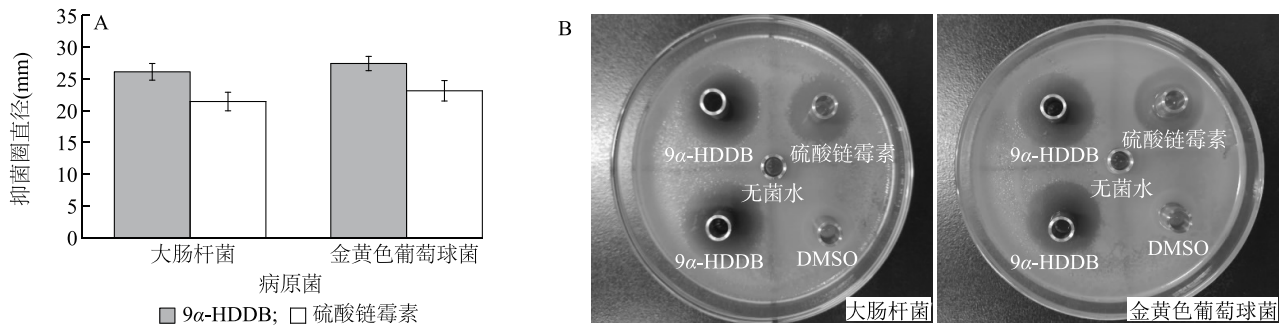
图 8 活性次生代谢物 (9α -HDDB) 对姜青枯菌 *SOD*、*CAT*、*GSH-Px* 活力和 ROS 水平的影响

Fig.8 Effects of the bioactive secondary metabolite (9α -HDDB) on the activities of superoxide dismutase (*SOD*), catalase (*CAT*), glutathione peroxidase (*GSH-Px*), and the level of reactive oxygen species (ROS) in *Ralstonia solanacearum*

2.5 活性次生代谢物 (9α -HDDB) 对食源性病原菌的拮抗作用

以硫酸链霉素为阳性对照,研究 $1\times MIC$ 的 9α -HDDB 对食源性病原菌大肠杆菌 O157:H7 菌株和金黄色葡萄球菌的抗菌活性。由图 9 可以看出, $1\times MIC$ 的 9α -HDDB 和 $250\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 硫酸链霉素对大肠杆菌 O157:H7

菌株的抑菌圈直径分别为 (26.21 ± 1.32) mm 和 (21.52 ± 1.47) mm,差异显著 ($P<0.05$),此外对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径分别为 (27.52 ± 1.13) mm 和 (23.22 ± 1.61) mm,差异显著 ($P<0.05$),说明 9α -HDDB 对大肠杆菌 O157:H7 菌株和金黄色葡萄球菌均具有良好的拮抗作用,其效果显著优于硫酸链霉素。



A: 9α-HDDB 和硫酸链霉素对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径; B: 各处理对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的拮抗作用。

图 9 活性次生代谢物(9α-HDDB)对大肠杆菌(*Escherichia coli*) O157:H7和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的拮抗作用

Fig.9 Antagonistic effect of the bioactive secondary metabolite (9α-HDDB) on *Escherichia coli* O157:H7 strain and *Staphylococcus aureus*

3 讨论

3.1 活性次生代谢物(9α-HDDB)对姜青枯菌的抗菌活性

姜瘟病是一种破坏性极强的土传病害,目前无特效防治药物。天然产物因环保、安全、高效备受关注,被视为新型杀菌剂的重要来源。目前,已发现多种植物源和微生物源天然产物对青枯菌具有良好的抗菌活性。例如,植物源天然产物骆驼蓬碱^[31]、7-甲氧基香豆素(7-methoxycoumarin)和薄荷精油对青枯菌的 MIC 分别为 120 μg/mL、75 mg/mL 和 2.02 mg/mL, 1×MIC 骆驼蓬碱杀菌率可达 90%, 7-甲氧基香豆素最低杀菌质量浓度为 75 mg/mL^[32]。短短芽孢杆菌(*Brevibacillus brevis*) B011 菌株活性次生代谢物伊短菌素 A 和 N-乙酰基色胺在质量浓度分别为 0.4 mg/mL 和 10.0 mg/mL 时即可完全抑制青枯菌生长^[33]。海绵共附生菌(*Streptomyces olivaceus*) LHW2444 菌株活性次生代谢物吡咯-2-甲酸在质量浓度为 16 μg/mL 时对青枯菌的抑制率接近 80%^[34]。一株链霉菌(*Streptomyces* sp.) NEAU-HV9 菌株次生代谢物放线菌素 D 对番茄青枯菌的 MIC 为 0.6 mg/mL, 可显著降低番茄幼苗发病率^[35]。本研究通过有机溶剂萃取、硅胶柱层析、半制备高效液相色谱法和核磁共振波谱法等,从银杏内生球黑孢菌 Gbh45 菌株^[15]发酵液中分离鉴定到一种高效抑制姜青枯菌的活性次生代谢物 9α-HDDB, 其 MIC 仅为 25.000 μg/mL, IC₅₀ 为 8.974 μg/mL。此外, 9α-HDDB 还可高效抑制食源性病原菌大肠杆菌 O157:H7 菌株和金黄色葡萄球菌, 其效果显著优于硫酸链霉素。

目前,并无 9α-HDDB 大规模开发应用的相关报道,其毒性和环境安全性仍需进一步评估。9α-HDDB 为卷线孢菌素衍生物,具有典型的萹醌骨架。目前,卷线孢菌素已应用于抗肿瘤研究^[36]和作为食品添加剂^[37]。杨倩^[38]以模式生物秀丽线虫(*Caenorhabditis elegans*)为测试对象,对卷线孢菌素进行安全评价,结果显示其对秀丽线虫的毒性作用、运动和摄食能力、生活史以及卵孵化的影响与食品级红曲红色素一致,具有较好的安全性。黄政凯等^[39]等调查发现,萹醌类中药具有较好的安全性,仅在超量或长期服用的情况下会出现不良反应。尽管卷线孢菌素和萹醌具有较好的生物安全性,9α-HDDB 为卷线孢菌素衍生物,属于萹醌类化合物,但应用于生物防治或作为食品抑菌剂前还需要进行秀丽线虫、小鼠以及高等哺乳动物的系统性安全评价。

9α-HDDB 对姜青枯菌的 MIC 显著低于目前文献报道的一些天然产物对青枯菌的 MIC, 这表明其对姜青枯菌的预防和控制具有巨大的潜力,在保证生物安全的前提下,9α-HDDB 具有作为青枯菌生物农药和细菌抗菌剂的广阔前景。

3.2 活性次生代谢物(9α-HDDB)对姜青枯菌的抗菌作用机制

9α-HDDB 是一种萹醌类化合物,而萹醌及其衍生物大多具有抗菌功能,抗菌机制主要包括抑制生物膜形成,破坏细胞壁,抑制核酸和蛋白质合成,影响信号传导,以及阻断能量代谢等^[40-42]。为深入探究 9α-HDDB 的抗菌作用机制,本研究进行了游离核酸、游离蛋白质、相对电导率、AKP 活力、ATP 催化水解酶活力、SOD 活力、CAT 活力、GSH-Px 活力和胞内 ROS 水平测定,从细胞膜完整性被破坏、细胞壁

受损和氧化应激 3 个维度阐释了 9 α -HDDB 的抗菌作用机制。

细菌细胞膜与细胞渗透压、营养物质运输、能量代谢等生理过程密切相关,对于细菌的生长繁殖和维持细胞稳态具有重要意义。但是,如果细胞膜遭到破坏,电解质、核酸、蛋白质、多糖等细胞内容物将渗漏,菌体生长受到抑制,甚至死亡^[43]。因此,细胞膜也被认为是一种重要的抗菌靶点。研究结果证实,多种天然蒽醌衍生物具有破坏细菌细胞膜完整性,增大其通透性的功能。例如,坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)中提取的 1,8-二羟基蒽醌可造成金黄色葡萄球菌细胞膜破损,导致胞内蛋白质等内容物外溢^[44];石蕊地衣(*Nephroma laevigatum*)中提取的 1,3,8-三羟基-4-氯-6-甲基蒽醌处理蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌,可破坏细胞膜并增大其通透性,使胞内 K⁺ 等电解质泄漏,诱导细胞膜去极化及 DNA 缩合^[45];大黄(*Rheum palmatum* L.)中提取的大黄素可破坏嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)细胞膜完整性,使 K⁺ 等细胞内容物外溢^[46]。此外,Liu 等^[47]通过透射电镜观察发现,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 大黄素可使耐甲氧西林金黄色葡萄球菌细胞膜变薄。本研究也获得了类似的结果,以 9 α -HDDB 处理姜青枯菌细胞,其胞外 OD₂₆₀ 值、游离蛋白质浓度和相对导电率较对照显著增加,并随着时间的延长和质量浓度的增加而加剧,这表明 9 α -HDDB 可迅速破坏细胞膜完整性,使细胞膜通透性增大,促使细胞内容物外溢,从而抑制姜青枯菌生长。

AKP 和 ATP 催化水解酶是定位于细胞膜外膜与细胞壁之间周质空间的酶类。当细胞壁受损时,这些酶会渗漏至胞外,导致 AKP 和 ATP 催化水解酶活力下降^[25-28]。因此,AKP 和 ATP 催化水解酶的活力变化可间接反映细胞壁的受损程度。Wei 等^[44]研究发现,以 1,8-二羟基蒽醌处理金黄色葡萄球菌后,4 h 内其胞外 AKP 活力急速上升,随后 12 h 平缓上升,而对照则无明显变化。Liu 等^[47]通过透射电镜观察发现,16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 大黄素可使耐甲氧西林金黄色葡萄球菌细胞裂解。宋军等^[48]同样发现,大黄酸处理伪中间葡萄球菌(*Staphylococcus pseudintermedius*)后,透射电镜观察发现其细胞壁破裂,内容物外溢。与上述研究结果类似,本研究中 9 α -HDDB 处理姜青枯菌后,胞内 AKP 和 ATP 催化水解酶活力

较对照显著下降,表明 9 α -HDDB 对姜青枯菌细胞壁具有明显的破坏作用,此外 ATP 催化水解酶的外溢也会影响细胞能量代谢,进一步强化对姜青枯菌的抑制作用。

ROS 为细胞有氧代谢生成的次级代谢产物^[49-50],低水平时具有信号分子功能,正常细胞可通过氧化应激保护系统,如抗氧化酶和还原型小分子化合物,精准调控 ROS 处于较低水平。但是,过高水平的 ROS 会导致过氧化应激防御系统崩溃,引起蛋白质、DNA 和膜脂等生物大分子氧化损伤,导致细胞功能障碍甚至死亡^[51]。因此,诱导细胞快速积累 ROS 也是一种重要的抗菌策略。研究发现,一些蒽醌衍生物可诱导细菌积累 ROS。宋军等^[48]以 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 大黄酸处理伪中间葡萄球菌(*Staphylococcus pseudintermedius*),发现其 ROS 水平较对照高 2.9 倍。Liu 等^[52]以氨基乙醇取代大黄酸的羟基获得新的化合物 RH17,发现 RH17 可通过破坏细胞膜、干扰能量代谢和诱导胞内 ROS 快速积累的方式杀灭金黄色葡萄球菌。本研究同样获得了类似的研究结果,以 1 \times MIC 和 3 \times MIC 的 9 α -HDDB 处理姜青枯菌细胞,发现 ROS 水平分别是对照的 6.33 倍和 7.34 倍,这表明 9 α -HDDB 可诱导细胞大量积累 ROS,从而抑制姜青枯菌生长。

4 结论

球黑孢菌 Gbh45 菌株产生的活性次生代谢物 9 α -HDDB 对姜青枯菌具有高效抑制作用,其最小抑菌质量浓度显著低于文献报道的其他天然抑菌物质。作用机制研究结果表明,9 α -HDDB 可通过多重途径抑制病原菌:破坏细胞膜完整性并增大其通透性,导致细胞内容物泄漏;损伤细胞壁结构;同时诱导细胞内活性氧(ROS)过量积累。此外,该活性次生代谢物对常见食源性病原菌大肠杆菌 O157:H7 菌株和金黄色葡萄球菌也表现出良好的抗菌活性。本研究结果不仅揭示了 9 α -HDDB 作为青枯菌生物农药及食品抗菌剂的潜在应用价值,也为姜青枯菌的生物防治提供了重要的理论依据和技术支撑。

参考文献:

- [1] MA R H, NI Z J, ZHU Y Y, et al. A recent update on the multifaceted health benefits associated with ginger and its bioactive components[J]. Food & Function, 2021, 12(2): 519-542.

- [2] CHAUHAN N. Pharmacological aspects of 6-gingerol: a review[J]. *Agricultural Science Digest*, 2022, 42(5): 528-533.
- [3] UNUOFIN J O, MASUKU N P, PAIMO O K, et al. Ginger from farmyard to town: nutritional and pharmacological applications[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 12: 779352.
- [4] INOUE T, IYAMA K, ASAKUMA M, et al. Screening and risk assessment of biological control agents against bacterial wilt of ginger[J]. *Biological Control*, 2022, 175: 105059.
- [5] JIANG G F, WEI Z, XU J, et al. Bacterial wilt in China: history, current status, and future perspectives[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1549.
- [6] ADELEKE B S, AYILARA M S, AKINOLA S A, et al. Biocontrol mechanisms of endophytic fungi[J]. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 2022, 32(1): 46.
- [7] CHEN C H, CHEN L, MAO C Y, et al. Natural extracts for antibacterial applications[J]. *Small*, 2024, 20(9): 2306553.
- [8] CAI J, SUN L J, WANG Q. Antibacterial activity and mechanism of Protocatechuic acid against bacterial canker of tomato fruits caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* [J]. *Food Bioscience*, 2024, 60: 104437.
- [9] KONG Y, YAN H, HU J J, et al. Antibacterial activity and mechanism of action of osthole against *Listeria monocytogenes* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(19): 10853-10861.
- [10] ZHOU X, YE H J, GAO X H, et al. The discovery of natural 4'-demethylepipodophyllotoxin from renewable *Dyosma versipellis* species as a novel bacterial cell division inhibitor for controlling intractable diseases in rice[J]. *Industrial Crops and Products*, 2021, 174: 114182.
- [11] LI P, YANG Z Y, TANG B L, et al. Identification of xanthenes from the mangosteen pericarp that inhibit the growth of *Ralstonia solanacearum* [J]. *ACS Omega*, 2019, 5(1): 334-343.
- [12] MOHAMED A A, BEHIRY S I, YOUNES H A, et al. Antibacterial activity of three essential oils and some monoterpenes against *Ralstonia solanacearum* phylotype II isolated from potato [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2019, 135: 103604.
- [13] LI L C, FENG X J, TANG M, et al. Antibacterial activity of Lanthiumamide B to tobacco bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) [J]. *Microbiological Research*, 2014, 169(7/8): 522-526.
- [14] 张倩, 黎平, 何子康, 等. 马齿苋内生菌橘青霉和波兰青霉中抗青枯菌的活性物质[J]. *热带亚热带植物学报*, 2019, 27(6): 731-738.
- [15] 张祖姣, 袁志辉, 赵子豪, 等. 抗姜青枯菌银杏内生真菌的分离及抑菌特性[J]. *中国生物防治学报*, 2018, 34(6): 890-896.
- [16] 刘志, 陈婷, 龙雯素, 等. 江永生姜青枯病原菌的分离与鉴定[J]. *湖南科技学院学报*, 2019, 40(10): 35-37, 52.
- [17] AMOON H, MOGHADAM A, HAJKARIM M C. Synthesis, characterization, and investigation of antibacterial activity of Novel CMC/CuO NPs/CQDs bionanocomposite coating [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 268: 131922.
- [18] WANG N, LIU X Y, MA Y, et al. Identification of polyphenol extracts from flaxseed and study on its bacteriostatic mechanism [J]. *Food Bioscience*, 2024, 58: 103618.
- [19] CABAÑAS R, ABARCA M L, BRAGULAT M R, et al. *In vitro* activity of imazalil against *Penicillium expansum*: comparison of the CLSI M38-a broth microdilution method with traditional techniques [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, 129(1): 26-29.
- [20] DIAO W R, ZHANG L L, FENG S S, et al. Chemical composition, antibacterial activity, and mechanism of action of the essential oil from *Amomum kravanh* [J]. *Journal of Food Protection*, 2014, 77(10): 1740-1746.
- [21] DONG S X, YANG X S, ZHAO L, et al. Antibacterial activity and mechanism of action saponins from *Chenopodium quinoa* Willd. husks against foodborne pathogenic bacteria [J]. *Industrial Crops and Products*, 2020, 149: 112350.
- [22] HU W, LI C Z, DAI J M, et al. Antibacterial activity and mechanism of *Litsea cubeba* essential oil against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) [J]. *Industrial Crops and Products*, 2019, 130: 34-41.
- [23] SOMMART U, RUKACHAISIRIKUL V, SUKPODMA Y, et al. Hydronaphthalenones and a dihydroramulosin from the endophytic fungus PSU-N24 [J]. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2008, 56(12): 1687-1690.
- [24] JU J, XIE Y F, YU H, et al. Synergistic inhibition effect of citral and eugenol against *Aspergillus niger* and their application in bread preservation [J]. *Food Chemistry*, 2020, 310: 125974.
- [25] SONG W, XIN J Y, YU C, et al. Alkyl ferulic acid esters: evaluating their structure and antibacterial properties [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1135308.
- [26] LAN W Q, ZHAO X Y, CHEN M L, et al. Antimicrobial activity and mechanism of oregano essential oil against *Shewanella putrefaciens* [J]. *Journal of Food Safety*, 2022, 42(1): 12952.
- [27] ABDULKAREEM A O, OLAFIMIHAN T F, AKINBOBOLA O O, et al. Effect of untreated pharmaceutical plant effluent on cardiac $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ and $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ activities in mice (*Mus musculus*) [J]. *Toxicology Reports*, 2019, 6: 439-443.
- [28] FAN W W, YUAN G Q, LI Q Q, et al. Antibacterial mechanisms of methyl gallate against *Ralstonia solanacearum* [J]. *Australasian Plant Pathology*, 2014, 43(1): 1-7.
- [29] CERDÁ-BERNAD D, VALERO-CASES E, PASTOR J J, et al. Saffron bioactives crocin, crocetin and safranal: effect on oxidative stress and mechanisms of action [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2022, 62(12): 3232-3249.
- [30] HE R R, WU H, LIU J C, et al. Mechanism of membrane damage to *Shigella sonnei* by linalool from plant essential oils: a driver of oxidative stress [J]. *Industrial Crops and Products*, 2023, 193: 116255.
- [31] XIA H K, HUANG Y X, WU R Y, et al. A screening identifies harmine as a novel antibacterial compound against *Ralstonia so-*

- lanacearum* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14:1269567.
- [32] TU Q B, SHI H C, LI P, et al. Antibacterial activity of ferulic acid ester against *Ralstonia solanacearum* and its synergy with essential oils [J]. *Sustainability*, 2022, 14(24):16348.
- [33] 周向平, 陈武, 刘天波, 等. *Brevibacillus brevis* B011 次级代谢物中抗青枯菌活性物质的纯化鉴定及生物合成基因簇分析 [J]. *核农学报*, 2023, 37(5):927-937.
- [34] 孙煜炜, 蒋林, 李蕾, 等. 海绵共附生菌 *Streptomyces olivaceus* LHW2444 的分离鉴定及其抗青枯菌活性代谢产物研究 [J]. *中国海洋药物*, 2023, 42(4):1-7.
- [35] LING L, HAN X Y, LI X, et al. A *Streptomyces* sp. NEAU-HV9: isolation, identification, and potential as a biocontrol agent against *Ralstonia solanacearum* of tomato plants [J]. *Microorganisms*, 2020, 8(3):351.
- [36] JIE J, SHI L, YUE S H, et al. Bostrycin inhibits growth of tongue squamous cell carcinoma cells by inducing mitochondrial apoptosis [J]. *Translational Cancer Research*, 2020, 9(6):3926-3936.
- [37] HUANG Y H, YANG W J, CHENG C Y, et al. Bostrycin production by agro-industrial residues and its potential for food processing [J]. *Food Science and Biotechnology*, 2017, 26(3):715-721.
- [38] 杨倩. 蕲艾内生菌 HCH285 的卷线孢菌素活性及安全性研究 [D]. 武汉:华中农业大学, 2018.
- [39] 黄政凯, 张冰, 林志健, 等. 萜醌类中药的安全问题分析及合理应用思考 [J]. *中国药物警戒*, 2021, 18(6):532-536.
- [40] QUN T, ZHOU T T, HAO J K, et al. Antibacterial activities of anthraquinones: structure-activity relationships and action mechanisms [J]. *RSC Medicinal Chemistry*, 2023, 14(8):1446-1471.
- [41] JI X S, DAI D C, WANG Y T, et al. Two new anthraquinone derivatives from *Saprosma crassipes* H.S.Lo [J]. *Natural Product Research*, 2024, 38(1):91-96.
- [42] QI J, ZHAO P P, ZHAO L Y, et al. Anthraquinone derivatives from a sea cucumber-derived *Trichoderma* sp. fungus with antibacterial activities [J]. *Chemistry of Natural Compounds*, 2020, 56(1):112-114.
- [43] HURDLE J G, O'NEILL A J, CHOPRA I, et al. Targeting bacterial membrane function: an underexploited mechanism for treating persistent infections [J]. *Nature Reviews. Microbiology*, 2011, 9(1):62-75.
- [44] WEI Y X, LIU Q, YU J, et al. Antibacterial mode of action of 1, 8-dihydroxy-anthraquinone from *Porphyra haitanensis* against *Staphylococcus aureus* [J]. *Natural Product Research*, 2015, 29(10):976-979.
- [45] DUAN F X, XIN G, NIU H, et al. Chlorinated emodin as a natural antibacterial agent against drug-resistant bacteria through dual influence on bacterial cell membranes and DNA [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1):12721.
- [46] REN M C, CHEN R L, ZHOU Q L, et al. Comparative study of antibacterial properties of emodin and enrofloxacin against *Aeromonas hydrophila* [J]. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamigdeh*, 2014, 66:976.
- [47] LIU M, PENG W, QIN R X, et al. The direct anti-MRSA effect of emodin via damaging cell membrane [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(18):7699-7709.
- [48] 宋军, 周志新, 付琳清, 等. 大黄酸对伪中间葡萄球菌的抗菌活性及作用机制 [J]. *畜牧兽医学报*, 2021, 52(8):2275-2283.
- [49] 陈晨, 杨凯波, 王奎萍. 不同胁迫对植物生长发育的影响及植物抗胁迫机制综述 [J]. *江苏农业科学*, 2024, 52(19):15-24.
- [50] 王兆丰, 代华, 高义霞, 等. 多酚处理对甜樱桃采后品质和活性氧代谢的影响 [J]. *南方农业学报*, 2024, 55(2):578-588.
- [51] LAM P L, WONG R S, LAM K H, et al. The role of reactive oxygen species in the biological activity of antimicrobial agents: an updated mini review [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2020, 320:109023.
- [52] LIU X J, LIU Y, SONG M R, et al. A rhein-based derivative targets *Staphylococcus aureus* [J]. *Antibiotics*, 2024, 13(9):882.

(责任编辑:黄克玲)