

海洋细菌 B-9987 胞外代谢产物的纯化 及抑菌机理初探*

何培青 田 黎 李光友 赵相增

(国家海洋局海洋生物活性物质重点实验室 青岛 266061)

(青岛蔬菜科技示范园 青岛 266200)

提要 由渤海海泥中分离得到 300 株菌株,从中筛选获得海洋生境芽孢杆菌 B-9987 菌株,其胞外物质经乙醚萃取、硅胶 G 薄层层析、官能团显色反应及紫外扫描,测其组分;以不同浓度 B-9987 菌株的抑菌液测定对植物病原真菌的抑制效果。结果表明, B-9987 菌株的胞外抑菌物质可能是酚类化合物;该物质对植物病原真菌茄交镰孢菌、大丽轮枝菌、黄枝孢菌、立枯丝核菌的抑制作用,主要是造成真菌孢子或菌丝末端膨大成球状,继而胞壁崩解,原生质外泄。对尖刀镰孢菌和莴苣霜霉菌的抑制作用,则表现为孢子萌发率降低和菌丝长度明显变短。该抑菌物质可望开发为农用抗生素。

关键词 海洋细菌, 抑菌物质, 分离纯化, 植物, 病原真菌, 抑菌机理

中图分类号 Q936

海洋生物中蕴藏着丰富的生物活性物质,很多具有重要的药用潜力(刘晓萍等, 2001; 耿美玉等, 2001; James *et al.*, 1996), 而海洋微生物,由于其特殊的生存环境及代谢途径,产生的胞外抑菌活性物质,往往与陆栖微生物的不同,因而,目前受到国内外的广泛关注(黄维真等, 1991; Cheng *et al.*, 1999; Wratten *et al.*, 1997)。近些年来,国外有文献报道,海洋生境芽孢杆菌能产生新颖的胞外抑菌物质(Canedo *et al.*, 1997; Gerard *et al.*, 1999), 而对其抑菌机理,尚未见有报道。本文报道海洋生境芽孢杆菌菌株(*Bacillus* sp., 代号 B-9987), 胞外抑菌物质分离纯化及其抑菌机理的研究结果,以期对 B-9987 菌株在植物病害的生物防治应用中提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 菌株

B-9987 菌株系 1999 年从渤海海泥中分离、其胞外代谢产物对数种植物病原真菌有很强的抑制作用的细菌(田黎等, 2001)。植物病原真菌尖刀镰孢菌(*Fusarium oxysporum*)、茄交镰孢菌(*Alterinaria solani*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)、莴苣霜霉菌(*Bremia lactucae*)、黄枝孢菌(*Cladosporium fulvum*)由本实验室提供,经耐盐

* 国家“863”项目资助, 2001AA620402 号; 山东省科技兴海重点项目, 001164604 号。何培青, 女, 出生于 1972 年 8 月, 硕士, 助理研究员, E-mail: hepeiqing@163.com

收稿日期: 2001-05-09, 收修改稿日期: 2002-05-17

驯化后, 作为抑菌活性及抑菌机理的指示菌。

1.2 培养基

PDA 培养基(中国微生物菌种保藏管理委员会, 1983)用于植物病原真菌的培养。MG 培养基(蛋白胨 0.3%; 酵母粉 0.1%; 葡萄糖 0.3%; NaCl 1.8%; pH = 7.0), 已测试为 B-9987 菌株产生抑菌物质的最适培养基(何培青等, 2001)。

1.3 抑菌活性的测定

纸碟法(方中达, 1982): 将含有 B-9987 菌株产生的抑菌物质(以下简称 GFB87)的滤纸片(直径为 7mm)吹干后, 贴在含有尖刀镰孢菌孢子的 PDA 平板上, 于 25℃培养 48h, 测量抑菌圈大小。

1.4 GFB87 的初步分离纯化

1.4.1 GFB87 的粗提取 将 B-9987 菌株接种于 MG 培养基, 于 25℃、150r/min 转速振荡培养 84h, 发酵液以 12000r/min 转速离心 10min 去菌体。将去菌体发酵液调节 pH = 3—4, 加入乙醚抽提 3 次, 并将萃取液用滤纸过滤后, 于 40℃旋转蒸干, 得到淡黄色不定型粗提物质, 4℃密封保存。

1.4.2 GFB87 的硅胶 G 薄层层析(TLC) 将粗提物溶于少量乙醚, 有机系微孔滤膜(孔径 0.45μm)过滤去残渣, 将上清液点在硅胶 G 板上(20cm × 15cm × 0.25mm), 经筛选后选用甲苯: 乙酸乙酯: 90% 甲酸(6: 3: 1)为展开剂, 展层完毕后干燥, 在 365nm 的紫外灯下观察。并用含 5% 硫酸的乙醇喷雾显色, 将每个斑点对应的组分刮下, 用 1ml 甲醇浸提, 取 25μl, 以纸碟法测定抑菌活性, 并计算活性组分的 R_f 值。同时作硅胶 G 空白对照。

1.4.3 GFB87 的官能团显色反应 将粗提物展层后干燥, 分别用茚三酮试剂、2, 4-二硝基苯肼试剂、重氮化氨基苯磺酸试剂(DSA)、重氮化对硝基苯胺试剂(DNA)、三氯化铁试剂、磷钼酸试剂、异羟肟酸铁试剂喷雾显色, 测其组分。

1.4.4 GFB87 的紫外扫描 将粗提物展层后干燥, 在 365nm 紫外灯下定位, 将活性斑点刮下, 用甲醇浸提, 调整体积到 4ml, 进行紫外扫描, 测其组分。同时作硅胶 G 空白对照。

1.5 GFB87 的抑菌作用

1.5.1 GFB87 对病原真菌孢子萌发影响的测定 将 B-9987 菌株的去菌体发酵液分别稀释至 2、4、8、16、32 倍, 制成不同浓度的抑菌液。取尖刀镰孢菌、茄交镰孢菌、大丽轮枝菌、黄枝孢菌、莴苣霜霉的孢子悬浮液(孢子浓度为 1×10^5 cell/ml)及抑菌液各 10μl, 滴置于凹玻片上, 混匀后倒置于纱布保湿的培养皿中, 25℃培养, 每个处理重复 3 次。每个浓度均每隔 2、3、4、5、6、8、12、20h, 分别于光学显微镜下观察孢子萌发情况(包括孢子萌发、芽管长度、菌丝生长)。以未接菌的同样稀释倍数的培养液作为对照。将对照组孢子萌发率定为 100%, 每个处理的孢子不萌发率与畸形膨大率之和, 换算成百分比, 表示抑菌率。

1.5.2 GFB87 对病原真菌菌丝生长影响的测定 取立枯丝核菌的菌丝悬浮液(菌体长度约为 50μm, 浓度为 1×10^3 cell/ml)及稀释至 2、4、8、16、32 倍的抑菌液各 10μl, 滴置于凹玻片上, 混匀后保温、保湿倒置培养, 每个浓度均每隔 8、12、20、48h, 分别于光学显微镜下观察菌丝生长情况。以未接菌的同样稀释倍数的培养液作为对照。

2 结果与分析

2.1 GFB87 的初步分离提纯

2.1.1 GFB87 硅胶 G 薄层层析结果 测定结果见表 1。由表 1 可知,粗提物经硅胶 G 薄层层析后,可分离出 3 条主要的活性带,在 365nm 紫外灯下可观察到明显的荧光,因此 GFB87 为多组分抑菌物质,其中组分 2 的抑菌活性最强。

表 1 GFB87 的薄层层析结果

Tab. 1 TLC analysis of GFB87

活性组分	迁移率 (R_f 值)	抑菌活性 (cm)	紫外 (365nm)
1	0.35	2.0	蓝紫色荧光
2	0.49	2.2	黄绿色荧光
3	0.84	1.5	蓝紫色荧光

2.1.2 GFB87 官能团显色反应结果 测定结果表明,茚三酮试剂反应呈阴性,可知 GFB87 不是蛋白、多肽、氨基酸类物质;2,4-二硝基苯肼试剂反应呈阴性,因此 GFB87 不含活泼羰基,如醛、酮;磷钼酸试剂反应呈阳性,可知 GFB87 为还原性物质;DSA 试剂、DNA 试剂反应呈橙黄色,三氯化铁试剂反应呈棕灰色,表明 GFB87 可能为酚类或香豆素类物质;异羟肟酸铁试剂显色为酯和内酯的特征反应,GFB87 反应呈阴性,因而不是香豆素类。初步分析可能为酚类化合物。

2.1.3 GFB87 的紫外扫描结果 紫外扫描的结果见图 1。组分 1:在 234nm、264nm 有 2 个主要的吸收峰;组分 2:在 235nm、267nm 有 2 个主要的吸收峰;组分 3:在 218nm、262nm、269nm 有 3 个主要的吸收峰。GFB87 的三个主要组分均在 260nm 附近有吸收峰,表明可能含有苯环;在 210—230nm 有吸收峰,表明可能存在两个双键的共轭系统。进一步推断,GFB87 为一系列结构近似的物质,且含有苯环结构。

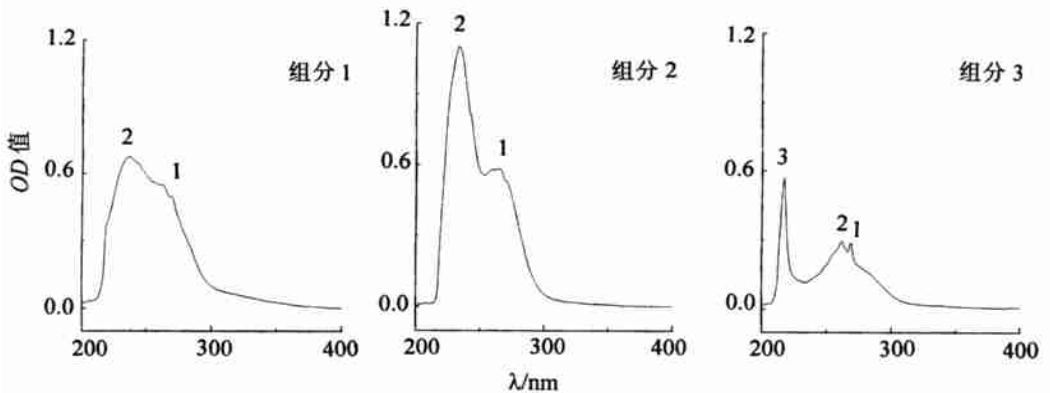


图 1 GFB87 紫外吸收光谱

Fig. 1 The ultraviolet absorption spectrum of GFB87

2.2 GFB87 的抑菌效果

2.2.1 GFB87 对病原真菌孢子萌发的影响 试验表明, 对照组茄交镰孢菌孢子的萌发正常, 可分为 2 个阶段: 培养 3—4h 时, 99% 的孢子已经开始萌发, 接着芽管增长(图 2: 1); 5—6h 后, 芽管生长成菌丝, 正常生长的菌丝形态光滑、粗细均匀。此后, 菌丝不断生长。

用稀释至 2—8 倍的 GFB87 抑菌液处理茄交镰孢菌孢子的结果表明, 3—4h 时, 正常萌发率低于 5%; 约 6% 的孢子在发芽点形成球形膨大。用稀释至 2—8 倍的抑菌液处理的孢子, 5—6h 后, 正常萌发率为 8%—32%, 芽管长度小于 80 μ m, 球形膨大约为 25%—42%, 抑菌率为 68%—92%; 用稀释至 16 倍的抑菌液处理, 抑菌率为 15%, 当稀释至 32 倍时, 孢子萌发接近对照组的。因此稀释至 2—8 倍, 为有效的抑菌浓度, 其中以 2 倍的效果最优, 见表 2。由表 2 还可以看出, 抑菌液的浓度越高, 萌发率就越低、芽管长度越短、畸形球状膨大数目越多。以 2 倍抑菌液处理 20h 后, 有的芽管在其顶端及底部也出现畸形膨大; 有的菌丝细胞产生膨大, 使整个菌丝成捻珠状。部分芽管和菌丝的球形膨大已破裂、崩解(图 2: 2)。

表 2 GFB87 对茄交镰孢菌孢子萌发的影响(5—6h)

Tab. 2 Effect of GFB87 on the germination of *A. solani* (5—6h)

抑菌液 (倍)	正常萌发率 (%)	芽管长度 (μ m)	膨大畸形 (%)	抑菌率 (%)
2	8	< 20	42	92
4	14	40	37	86
8	32	80	25	68
16	85	180	5	15
32	98	200	0	2
CK	100	> 240	0	0

在 20h, 用不同稀释倍数的 GFB87 抑菌液处理大丽轮枝菌和黄枝孢菌孢子, 可观察到与茄交镰孢菌相似的畸变过程。对照组的大丽轮枝菌孢子的萌发率达 80%, 芽管长度大于 30 μ m(图 2: 3); 而经稀释至 2 倍的抑菌液处理 20h, 正常萌发率小于 5%, 芽管长度约 3 μ m, 约 40% 孢子在发芽处有膨大畸形, 有的膨大呈捻珠状(图 2: 4)。

受抑的尖刀镰孢菌及莴苣霜霉菌孢子的萌发则表现为萌发率降低及菌丝长度明显变短。7—8h 时, 稀释至 2—16 倍的抑菌液处理尖刀镰孢菌孢子, 芽管长度明显低于对照, 而稀释至 4—32 倍的抑菌液对其萌发率的抑制作用不明显, 见表 3。

表 3 GFB87 对尖刀镰孢菌孢子萌发的影响(7—8h)

Tab. 3 Effect of GFB87 on the germination of *F. oxysporum* (7—8h)

抑菌液 (倍)	萌发率 (%)	芽管长度 (μ m)	抑菌率 (%)
2	35	12	65
4	70	30	30
8	90	75	10
16	32	95	98
80	150	5	2
CK	100	> 200	0

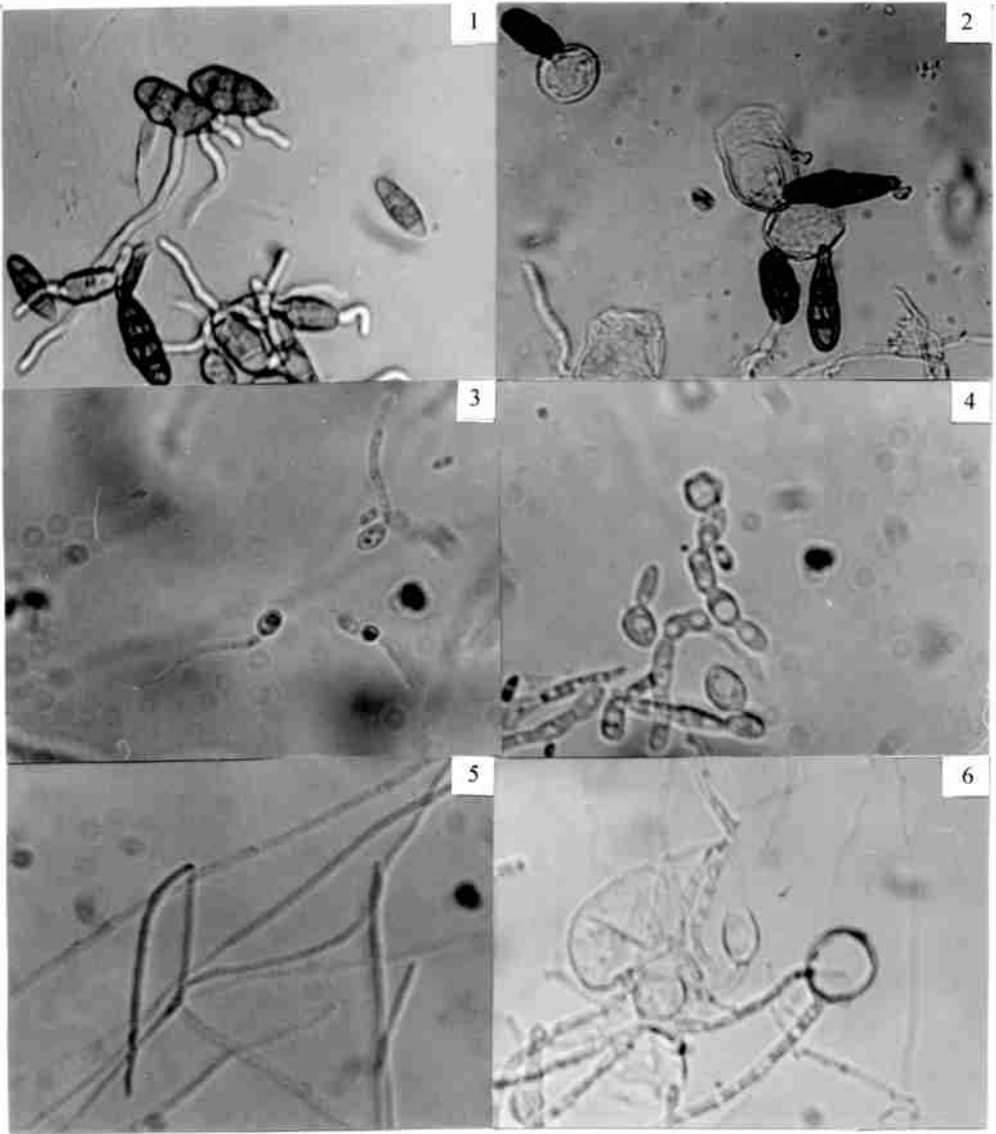


图2 GFB87对植物病原真菌孢子萌发及菌丝生长的影响

Fig. 2 Effect of GFB87 on the spore germination and hypha growth of plant pathogenic fungi

1. 对照组的茄交镰孢菌4h 芽管萌发正常($\times 250$); 2. 以2倍抑菌液处理20h后, 茄交镰孢菌孢子端部膨大成球状体, 已破裂($\times 250$); 3. 对照组的立枯丝核菌12h, 生长正常($\times 250$); 4. 以2倍抑菌液处理12h, 立枯丝核菌菌丝顶端膨大成球, 有的菌丝壁破裂($\times 250$); 5. 对照组的大丽轮枝菌20h 芽管萌发正常($\times 400$); 6. 以2倍抑菌液处理20h, 大丽轮枝菌孢子端部膨大成球状体($\times 400$)

2.2.2 GFB87对病原真菌菌丝生长的影响结果 试验表明, 对照组立枯丝核菌的菌丝培养12h时, 菌丝粗细均匀, 分支多(图2: 5)。以2倍抑菌液处理的菌丝, 12h时菌丝缓慢生长, 粗细不均, 分支少, 透明度下降; 20h后, 菌丝顶端呈球形膨大, 有的菌丝壁已破裂, 原生质泄漏(图2: 6)。用不同浓度抑菌液处理的菌丝, 其畸变过程近似。

3 讨论与结语

对抑菌物质的提取、纯化和测试初步认为, GFB87 为一系列结构近似的小分子物质, 可能是酚类化合物。国内很多报道认为, 陆栖芽孢杆菌产生的抑菌物质为大分子的蛋白或多肽。Canedo 等(1997)报道的海洋生境芽孢杆菌产生的抑菌物质为异构香豆素和环肽。

5—6h, 以稀释至 2—32 倍的 GFB87 抑菌液抑制茄交镰孢菌的试验表明, 以稀释至 2—8 倍的抑菌效果为好(抑菌率达 68%—92%), 稀释至 2 倍的效果为最佳(抑菌率达 92%), 黄昌华等(1996)报道陆栖芽孢杆菌 B-HCH 发酵滤液对几种植物病原真菌的抑制率达 40%—96.8%, 因此 GFB87 的 2 倍抑菌液具有较高的抑菌效价。

GFB87 抑菌液处理的病原孢子和菌丝大多是芽管或菌丝畸形膨大, 进而破裂, 表现为杀菌作用。造成这种异型的原因可能是真菌细胞壁上的纤维结构变形, 其结果意味着经过处理的真菌不能生长和繁殖。这一发现表明, 以海洋细菌 B-9987 菌株(*Bacillus* sp.)的胞外代谢产物, 作为抑菌物质用于植物病害的防治, 将具有很好的前景。

参 考 文 献

- 中国微生物菌种保藏管理委员会编著, 1983. 中国菌种目录. 北京: 轻工业出版社, 404—422
- 方中达, 1982. 植病研究方法. 北京: 农业出版社, 231
- 田 黎, 李光友, 2001. 海洋芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)的培养条件及产生的胞外抗菌蛋白. 海洋学报, 23(4): 95—100
- 刘晓萍, 王玉贞, 韩彦 等, 2001. 扇贝多肽在体外对免疫细胞活性的影响及其抗紫外线的氧化损伤作用. 海洋与湖沼, 32(4): 414—419
- 何培青, 田 黎, 李光友等, 2001. 海洋细菌 B-9987 发酵条件的优化及胞外抑菌物质的理化性质. 中国海洋药物, 20(2): 8—12
- 耿美玉, 辛现良, 李 静等, 2001. 新型海洋硫酸多糖 DPS 对大鼠脑缺血的保护作用. 海洋与湖沼, 32(2): 192—197
- 黄昌华, 郭崇明, 夏文胜等, 1996. B-HCH 菌株发酵滤液对植物病原真菌的作用. 中国生物防治, 12(3): 107—109
- 黄维真, 方金瑞, 1991. 海洋放线菌产生的抗生素 2B-B 的分离与鉴定. 中国抗生素杂志, 16(4): 305—306
- Canedo L M, Fernandez Puentes J L, Frand Baz J P, 1997. PM-94128, a new isocoumarin antitumor agent produced by a marine bacterium. J Antibiot, 50(2): 175—176
- Cheng X C, Jensen P R, Fenical W, 1999. Luisols A and B, new aromatic tetraols produced by an estuarine marine bacterium of the genus *Streptomyces* (Actinomycetales). J Nat Prod, 62(4): 608—610
- Gerard J M, Haden P, Kelly M T *et al*, 1999. Loloatins A-D, cyclic decapeptide antibiotics produced in culture by a tropical marine bacterium. J Nat Prod, 62(1): 80—85
- James S G, Hilmatroem C, kjelleberg S, 1996. Purification and characterization of a novel antibacterial protein from marine bacterium D2. Appl Environ Microbiol, 62: 2783—2788
- Wratten S J, Margaret S, Wand Raymond J A *et al*, 1997. Antibiotic metabolites from a marine Pseudomonad. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 11(3): 411—414

PRELIMINARY STUDY ON PURIFICATION AND ANTIFUNGAL MECHANISM OF METABOLITE FROM MARINE BACTERIUM B-9987 STRAIN (*BACILLUS* SP.)

HE Pei-Qing, TIAN Li, LI Guang-You, ZHAO Xiang-Zeng

(Key Lab of Marine Biological Active Substances, State Oceanic Administration, Qingdao, 266061)

(Model Base of Vegetable Science and Technology, Qingdao, 266200)

Abstract The strain of B-9987 (*Bacillus* sp.) was isolated from sea mud of Bohai Sea in 1999, its antibiotic substances (GFB87) are strongly against to various plant pathogenic fungi. The purification of GFB87, was studied by the steps of ethyl ether extraction, TLC detection, color reactions, and ultraviolet scan. The spore suspension of *Alterinaria solani*, *Verticillium dahliae*, *Cladosporium fulvum*, *Fusarium oxysporum*, *Bremia lactucae* and the hypha suspension of *Rhizoctonia solani* were treated by the culture filtrate of B-9987 strain diluted to 2—32 times. Then the treatments were cultured at 25 °C, and observed with optics microscope after 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 20 and 48 hours.

The results were as follow. GFB87 were primarily considered as phenolic compounds. Treated by GFB87 antifungi filtrate, the cells of hypha of *R. solani*, the spore tubes of *A. solani*, *V. dahliae* and *C. fulvum*, began to dilate to deformed spherical structure, then the cell walls were broken and the protoplasm leaked out (Fig. 2: 2, 4, 6), the fungi lost the ability to grow and multiply. More deformed cells were detected with the increase of incubation time.

The culture filtrate diluted to 2—8 times is available (antifungi rate, 68%—92%), diluted to twice is the best (antifungi rate, 92%). While the inhibited hypha cells of *F. oxysporum* and *B. lactucae* became obviously shortened, and their germination rate also decreased.

Key words Marine bacterium, Antifungal substance, Purification, Plant, Pathogenic fungi, Antifungal mechanism