

浑圆链霉菌QH-16鉴定及抑菌活性产物的结构研究

李志田^{1,2}, 蔡淑琳², 王合³, 杨海青⁴, 赵娟², 刘德文², 刘娅¹, 张殿朋^{2*}

(1. 石河子大学食品学院, 石河子 832003; 2. 北京市农林科学院植物保护环境保护研究所, 北京 100097; 3. 北京市林业保护站, 北京 100029; 4. 北京市平谷区果品办公室, 北京 101200)

摘要: 拮抗放线菌能够产生具有较高商业价值的生物活性物质, 应用潜力巨大。本研究以桃细菌性穿孔病菌 *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* 为指示菌, 采用平板对峙法从已有拮抗菌库中筛选对病原菌具有抑制作用的拮抗放线菌, 发现菌株 QH-16 的拮抗效果最佳, 通过 16S rDNA 序列分析, 结合形态特征、培养特性和生理特性, 鉴定该菌为浑圆链霉菌 *Streptomyces globosus*。离体测定其对多种植物病原菌及细菌具有很好的抑菌作用, 琼脂平板打孔法测定对禾谷镰刀菌的抑菌带宽达 14 mm; 对枯草芽孢杆菌抑菌圈直径达 24 mm。采用溶剂萃取法提取菌株 QH-16 发酵产物的活性成分, 通过硅胶柱层析、制备型薄层色谱 (PLC) 以及循环制备型色谱制备纯品化合物, 经核磁共振法解析, 确定其中的抑菌活性单体化合物为邻苯二甲酸二丁酯。

关键词: 桃细菌性穿孔病菌; 放线菌; 鉴定; 活性物质

中文分类号: S467 文献标识码: A 文章编号: 1005-9261(2021)01-0156-09

Identification of Actinomycete Strain QH-16 and Structural Analysis of Its Active Products

LI Zhitian^{1,2}, CAI Shulin², WANG He³, YANG Haiqing⁴, ZHAO Juan², LIU Dewen², LIU Ya¹, ZHANG Dianpeng^{2*}

(1. School of Food, Shihezi University, Shihezi 832000, China; 2. Institute of Plant and Environment Protection, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China; 3. Forest Pest Management and Quarantine Station of Beijing, Beijing 100029, China; 4. Beijing Pinggu District Fruit Office, Beijing 101200, China)

Abstract: Antagonistic actinomycetes can produce bioactive compounds with high commercial value and great application potential. In this study, *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* was used as the indicator bacteria, and five antagonistic actinomycetes showing inhibition action on pathogen by dual culture assay were screened and strain QH-16 presented the highest antagonistic efficacy. Strain QH-16 was identified by 16S rDNA sequence analysis, morphological observation, cultural and physiological characteristics. The results showed that strain QH-16 was identified as *Streptomyces globosus*. The filtrate from ferment broth of strain QH-16 could inhibit *Fusarium graminearum* and *Bacillus subtilis*, with inhibition bands of 14 mm and 22 mm, respectively. The active ingredients of the fermentation products were extracted by solvent extraction and purified by silica gel column chromatography, thin layer chromatography for preparation (PLC) and preparative analyzed by nuclear magnetic resonanc, the main active product in the fermentation products was identified to be dibutyl phthalate.

Key words: *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*; actinomycete; identification; active product

历年来, 由桃细菌性穿孔病引发的病害对桃产业造成了巨大的经济损失, 该病害也是世界上最严重的植物病害之一^[1,2], 其主要病原菌为 *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (*Xap*)。目前, 化学防治是有效的防

收稿日期: 2020-06-12

基金项目: 北京市农林科学院科技创新能力建设专项 (KJ CX20200203, KJ CX20180408)

作者简介: 李志田, 硕士研究生, E-mail: t295739292@163.com; *通信作者, 博士, 副研究员, E-mail: dreamstar26@126.com。

DOI: 10.16409/j.cnki.2095-039x.2021.01.029

治方法, 但存在严重的环境污染问题。因此, 利用环境友好、生态和谐、有利食品安全的生物防治技术已成为植物病虫害防治的新趋势。生防微生物是生物农药的重要来源, 其中放线菌是人们研究最早、并应用于生产中的一类拮抗微生物, 它可以产生多种抗生素、植物激素、水解酶等抑菌活性物质, 对于抑制病菌生长, 提高植物抗病性具有重要作用, 是颇具潜力的生物农药^[3-5]。据统计, 微生物产生具有生物活性的次级代谢物约 22500 余种, 其中具有拮抗活性的约 16500 种, 在这些拮抗物质当中有 10100 种 (45%) 产自于放线菌^[6]。因此, 对拮抗放线菌的筛选、鉴定及其活性物质的结构鉴定等研究已经受到国内外学者的青睐, 国外学者 Higginbotham 和 Murphy^[7]分离了一株抑制金黄色葡萄球菌的放线菌, 经 DNA 杂交显示该菌株与浑圆链霉菌有 80% 的同源性; 王聪等^[8]从广西分离一株海洋放线菌, 并在次生代谢物中分离鉴定得到星型孢菌素; 刘伟等^[9]从一株海洋小链霉菌 DY2741 代谢产物中也分离到对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌均具有抑制作用的邻苯二甲酸二丁酯。本文通过平板对峙法从已有拮抗菌库中筛选对桃细菌性穿孔病菌具有拮抗效果的高效放线菌株, 从形态学及分子生物学方面确定其分类学地位, 并对该菌株发酵液抑菌活性产物进行研究, 表征其结构, 从而为新型生物农药的深入研究开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株、培养基

1.1.1 供试菌株 菌株编号 QH-16、XJ-39、XJ-35 均由北京市农林科学院植物保护环境保护研究所生物防治研究室提供, 从新疆和青海的土样中分离。指示菌株: 番茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea*、西瓜枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*、草莓炭疽病菌 *Strawberry anthracnose*、人参根腐病菌 *Fusarium oxysporum*、禾谷镰刀病菌 *Fusarium graminearum*、玉米大斑病菌 *Exserohilum turcicum*、桃褐腐病菌 *Monilinia fructicola*、西瓜嗜酸菌 *Acidovorax citrulli*、枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis*、大肠杆菌 *Escherichia coli*、桃细菌性穿孔病菌 *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, 以上菌株由北京市农林科学院植物保护环境保护研究所生物防治研究室分离。

1.1.2 供试培养基 PDA 培养基^[10]用于拮抗试验, 高氏一号培养基用于发酵培养^[10]。生理生化特性测定所用参见《伯杰细菌鉴定手册》^[11]和《链霉菌鉴定手册》^[12], 放线菌形态观察采用高氏一号培养基, 菌种鉴定则分别采用高氏一号培养基、察氏琼脂培养基、葡萄糖-天门冬素琼脂培养基、葡萄糖-酵母膏琼脂培养基、淀粉琼脂培养基、伊莫松琼脂培养基、马铃薯琼脂培养基、无机盐-淀粉琼脂培养基、蛋白胨-酵母膏琼脂培养基。

1.2 仪器与试剂

循环制备液相 LH-9100 (北京佳仪分析设备有限公司), 液相色谱 Agilent 1200 (美国 Agilent 科技有限公司), 分析型色谱柱为 Develosil ODS-HG-5 (日本野村化学), 硅胶柱层析所用硅胶为 200~300 目 (青岛海洋化工有限公司), 薄层层析用分析板 GF254 (青岛海洋化工有限公司), 制备型薄层层析用分析板 PLC Silica gel 60 F254 (默克化工技术有限公司), 旋转蒸发仪 RE-5000 (上海振捷实验设备有限公司), Varian 核磁共振仪 (美国瓦里安有限公司), 液相色谱所用甲醇为色谱纯 (国药集团化学试剂有限公司), 其他试剂为化学纯或分析纯。

1.3 放线菌的筛选

以桃细菌性穿孔病菌 (*Xap*) 为靶标菌, 采用平板对峙法对北京市农林科学院植物保护环境保护研究所生物防治研究室菌种库中 85 株放线菌菌株进行抑菌活性测定。拮抗放线菌接种于 PDA 培养基上, 置于 28 °C 培养箱培养 2 d, 将摇瓶培养 24 h 的桃细菌性穿孔病菌 (*Xap*) 菌液用无菌水稀释 5 倍后均匀涂布于接有拮抗放线菌的平板上, 以不接拮抗菌株为对照, 28 °C 培养 3 d。每种供试拮抗放线菌设 3 次重复, 观察抑菌效果。

1.4 菌株 QH-16 的鉴定

1.4.1 形态学特征 采用平皿插片法, 将菌株 QH-16 接种于高氏一号培养基上, 将灭菌的盖玻片斜插入培养基中, 放置于 28 °C 恒温培养箱中培养 7~14 d, 在光学显微镜下观察基内菌丝和气生菌丝的形态并拍照。

1.4.2 培养特征及生理特征分析 方法参考《伯杰细菌鉴定手册》^[11]和《链霉菌鉴定手册》^[12]。

1.4.3 菌株QH-16的16S rDNA 序列分析 用普通细菌基因组提取试剂盒提取菌株QH-16的基因组DNA后,利用16S rDNA 的引物243F: 5'-GGATGAGCCCCGCGCCTA-3', A3R: 5'-CCAGCCCCACCTTCGAC-3',对菌株QH-16的16S rDNA 序列进行PCR 扩增。PCR 运行程序: 95 °C预变性5 min; 94 °C变性1 min, 60 °C退火30 s, 72 °C延伸45 s, 共35个循环; 72 °C延伸10 min。所得产物由北京天一辉远生物公司进行序列测定。其余序列均下载于NCBI 网站,进化距离的计算采用邻接法,用MEGA v.5.0 软件构建系统发育树。

1.5 菌株QH-16 发酵液的制备

采用500 mL 摇瓶发酵培养法。装液量200 mL,接种量6.5%,28 °C、180 r/min 摇床培养5 d后,将发酵培养基用快速定性滤纸抽滤,经无菌微孔滤膜(0.22 μm)滤去菌体的上清液,备用。

1.6 菌株QH-16 抑菌谱的测定

1.6.1 真菌抑菌谱的测定 在PDA 平板中心接种直径5 mm 的1.1.1 中供试真菌菌饼,平板边缘用直径5 mm 打孔器打孔,取出琼脂塞,最后分别在琼脂孔中加入100 μL 经过滤的菌株QH-16 的菌液,设置未接种菌液为空白对照,28 °C 恒温培养3 d,观察抑菌带的情况,每个处理重复3 次。

1.6.2 细菌抑菌谱的测定 抗细菌活性检测采用琼脂平板打孔法。将100 μL 指示细菌菌悬液均匀涂布于直径为9 cm 的PDA 培养基平板上,然后用直径5 mm 打孔器在平板中心打孔,取出琼脂塞,最后分别在琼脂孔中加入100 μL 经过滤的菌株QH-16 的菌液。设置未接种菌液为空白对照,28 °C 恒温培养2 d,观察结果,每个试验重复3 次。

1.7 抑菌物质的提取分离及结构鉴定

1.7.1 抑菌物质的提取 菌株QH-16 发酵产物经预处理获得发酵液60 L,用等体积的乙酸乙酯萃取3 次,有机相经35 °C 减压浓缩,得到粗提物5.719 g,置于-20 °C 冰箱保存。

1.7.2 硅胶柱层析分离 采用硅胶柱进行初步分离,硅胶柱的直径和长为2.5 cm×60 cm。装柱体积为200 mL,干法上样,用6 种不同极性的洗脱液进行洗脱,分别是石油醚:乙酸乙酯=10:1 (V/V) 440 mL,石油醚:乙酸乙酯=5:1 (V/V) 360 mL,100%二氯甲烷1000 mL,二氯甲烷:甲醇=5:1 (V/V) 600 mL,二氯甲烷:甲醇=2:1 (V/V) 600 mL,二氯甲烷:甲醇=1:1 (V/V) 600 mL,按极性顺序梯度洗脱,合并得到6 个组分。以琼脂平板打孔法来确定组分的抑菌活性,组分T1 具有较强的抑菌活性。

1.7.3 制备型薄层层析分离纯化 硅胶柱层析获得抑菌活性组分T1,采用制备薄层层析进一步分离纯化,以石油醚:乙酸乙酯=10:1 为展开剂,将分离得到的不同组分进行抗菌活性测定,获得的抑菌活性组分T1-1。

1.7.4 制备循环液相 用少量色谱甲醇充分溶解具有抑菌活性的样品,0.22 μm 有机微孔滤膜过滤,循环制备液相色谱进行制备。流动相为70%色谱甲醇+30%水,检测波长为254 nm,进样量2.5 mL,以3.5 mL/min 流速洗脱120 min。

1.7.5 抗菌活性组分的结构鉴定 对所获得化合物T1-1 进行核磁共振(NMR),结合数据库对所得纯品进行结构推断。

1.8 单体物质的抑菌活性测定

取100 μL 已经活化的桃细菌性穿孔病菌(*Xap*) 均匀涂布于直径为9 cm 的PDA 培养基平板上,用直径5 mm 打孔器在平板中心打孔,取出琼脂塞,在琼脂孔中加入60 μL 用甲醇溶解的化合物,设置甲醇作为空白对照,放置于28 °C 恒温培养箱培养2 d,每个试验重复3 次。

2 结果与分析

2.1 放线菌QH-16 的抑菌活性及其鉴定

以桃细菌性穿孔病菌(*Xap*) 作为指示菌,采用平板对峙培养法,对北京市农林科学院植物保护环境保护研究所生物防治研究室菌种库中85 株放线菌菌株进行活性筛选,共筛选出3 株有明显拮抗作用的菌株(图1),其中菌株QH-16 菌抑菌直径最大,约为46 mm。

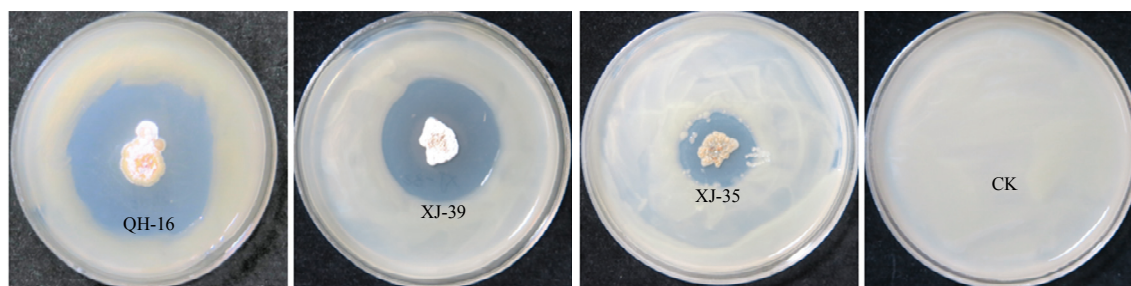
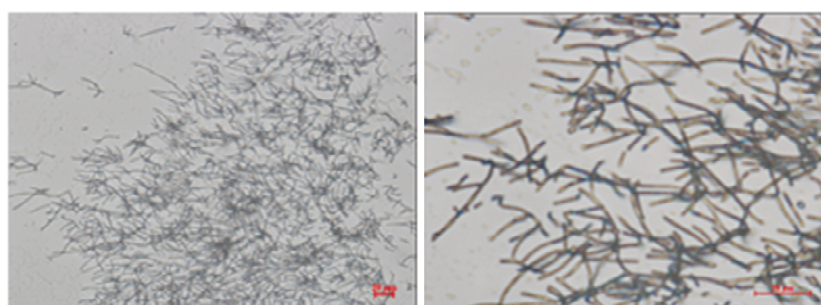


图 1 部分放线菌菌株对病原菌 *Xap* 的抑菌活性

Fig. 1 Inhibitory activities of antagonism against pathogen *Xap*

2.2 菌株 QH-16 的鉴定

显微观察结果表明，菌株 QH-16 在高氏一号培养基上，菌落生长繁茂，气生菌丝淡粉色，基内菌丝浅褐色，菌丝呈短直状（图 2）。将菌株 QH-16 接种在不同培养基培养 7~14 d 后，发现其高氏一号、察氏、葡萄糖-天门冬素、淀粉、PDA、无机盐-淀粉、蛋白胨-酵母膏这 7 种培养基上，菌丝生长旺盛，基内菌丝为浅褐色、红褐色或棕黄色（偏褐色），气生菌丝显现为淡粉色、灰白色或暗灰色；在伊莫松和葡萄糖-酵母膏培养基上长势一般，无可溶性色素产生（表 1）。菌株 QH-16 能够利用葡萄糖、乳糖、甘油、山梨醇、蔗糖、木糖和阿拉伯糖，无法利用鼠李糖、甘露糖、半乳糖；能够利用牛肉膏、蛋白胨和酵母浸，无法利用硫酸铵（表 2）。根据同源性从高到低的选择原则，建立系统发育树（图 3）。通过序列



A: 10×20; B: 10×40

图 2 菌株 QH-16 的形态特征

Fig. 2 Modal characteristics pictures of QH-16 strain

表 1 放线菌菌株 QH-16 的生长状况和培养特征

Table 1 The growth status and culture characteristics of actinomycetes QH-16

培养基 Medium	生长状况 Growth status	气生菌丝 Aerial mycelium	基内菌丝 Substrate mycelium	可溶性色素 Soluble pigment
高氏一号培养基 Gaoshi No.1 agar	+++	淡粉	浅褐	无
察氏琼脂 Sucrose czapek's agar	+++	灰白	浅褐	暗褐
葡萄糖-天门冬素琼脂 Glucose asparagine agar	+++	淡粉	棕黄	暗褐
葡萄糖-酵母膏琼脂 Glucose yeast-extract agar	++	暗灰	棕黄	无
淀粉琼脂 Starch agar	+++	暗灰	棕黄	暗褐
伊莫松琼脂 Tresner agar	++	暗灰	棕黄	无
马铃薯琼脂 PDA	+++	暗灰	红褐	暗褐
无机盐-淀粉琼脂 Starch ammonium agar	+++	淡粉	浅褐	无
蛋白胨-酵母膏琼脂 Yeast Extract Peptone	+++	暗灰	浅褐	暗褐

注：“++、+++”分别表示生长状况一般、很好。

Note: “++ and +++” mean the growth condition normal and very good, respectively.

比对, 放线菌 QH-16 与浑圆链霉菌 *S. globosus* 在同一系统进化分支上, 且与浑圆链霉菌 LZH-48 相似度为 99.74%。再结合培养特性观察、生理试验的验证, 结果表明菌株 QH-16 的培养特性和生理特性与浑圆链霉菌基本符合, 因此, 确定菌株 QH-16 为浑圆链霉菌。

表 2 放线菌菌株 QH-16 碳源和氮源的利用

Table 2 Utilization of carbon source and nitrogen source of actinomycete strain QH-16

碳源利用 Utilization condition	结果 Results	氮源利用 Nitrogen sources	结果 Results
甘露醇 Mannitol	—	硝酸钾 KNO ₃	++
葡萄糖 Glucose	++	牛肉膏 Beef extract	+++
乳糖 lactose	+	硫酸铵 (NH ₄) ₂ SO ₄	—
甘油 glycerinum	+	蛋白胨 Peptone	+++
阿拉伯糖 arabinose	++	酵母浸粉 Yeast extract	+++
木糖 Xylopyranose	++		
半乳糖 galactose	—		
山梨醇 sorbitol	+		
鼠李糖 rhamnose	—		
蔗糖 sucrose	+		

注: “—、+、++、+++” 分别表示生长状况不好、一般、良好、很好。

Note: “—, +, ++ and +++” mean the growth condition bad, normal, good and very good, respectively

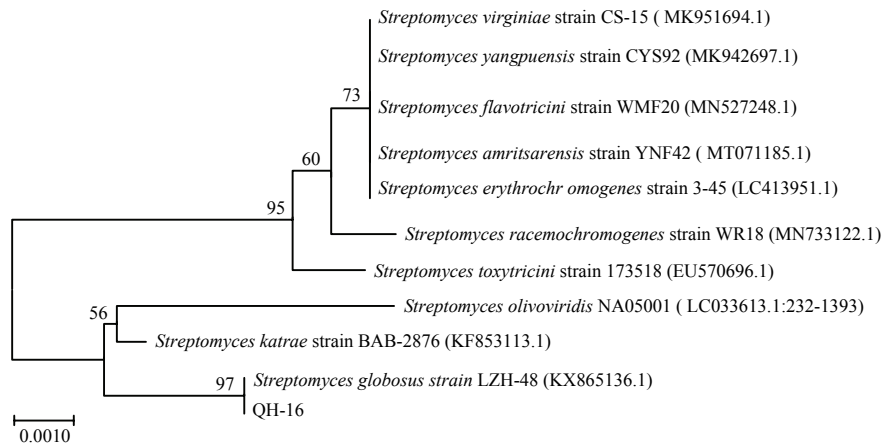


图 3 放线菌 QH-16 的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of actinomycete QH-16

2.3 菌株 QH-16 抑菌谱的测定

菌株 QH-16 在 PDA 平板上对部分供试的病原真菌具有抑制作用, 测定其发酵液对禾谷镰刀菌的抑菌带宽达 14 mm, 对番茄灰霉病菌的抑菌带宽达 11 mm。采用琼脂平板打孔法测定其发酵液对除大肠杆菌外的革兰氏阳性菌和阴性菌都能产生一定的抑菌圈, 对桃细菌性穿孔病菌的抑菌圈为 31 mm, 对西瓜嗜酸菌的抑菌圈为 20 mm, 对枯草芽胞杆菌的抑菌圈为 22 mm (表 3)。可见, 菌株 QH-16 具有良好的广谱抗菌特性。

2.4 粗提物的分离纯化结果

60 L 发酵液经乙酸乙酯粗提, 减压浓缩得粗提物 5.719 g 油状浸膏。分别用不同配比的洗脱液进行梯度洗脱, 按照编号排列。将样品中的物质浓缩后, 经薄层层析板检测, 据 TLC 检测紫外灯结果, 合并相同斑点 1~2 管、3~4 管、5~32 管、33~37 管、38~41 管、42~46 管, 得到 6 个组分, 分别标记为 T1、T2、T3、T4、T5、T6, 通过抑菌活性检测, T1 组分有抑菌活性, T2、T3、T4、T5、T6 组分无抑菌活性 (表 4)。T1 经旋转蒸发至少量液体后, 收集到样品管中挥发至干, 称重为 132.30 mg。T1 经 TLC 检测,

出现 2 个清晰条带, 且迁移率相差较大, 采用制备薄层层析进一步纯化, 得到组分 T1-1 和 T1-2。抑菌活性检测 T1-1 具有抑菌活性, T1-2 无抑菌活性。组分 T1-1 经循环制备液相色谱制备, 获得纯度较高的化合物。

化合物 T1-1 为黄色油状物质, 其核磁共振谱氢谱 $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CD_3OD) (图 4), $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) (图 5), $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) 数据 (表 5) 中共显示 5 个氢信号, δ : 7.72 (2H, dd, $J=5.7, 3.3$ Hz, H-2,5), 7.63 (2H, dd, $J=5.7, 3.3$ Hz, H-3,4), 4.30 (4H, t, $J=6.6$ Hz, H-1'), 1.73 (4H, m, H-2'), 1.47 (4H, m, H-3'), 0.99 (6H, t, $J=7.4$ Hz, H-4')。7 个 C 信号, δ : 169.27 (7-COO), 133.55 (C-1, 6), 132.32 (C-3, 4), 129.84 (C-2, 5), 66.63 (C-1'), 31.70 (C-2'), 20.25 (C-3'), 14.05 (C-4')。

表 3 菌株 QH-16 抑菌活性
Table 3 Inhibiting activity of QH-16

	指示菌 Indicator	拮抗带宽 Inhibitory zone (mm)	拮抗活性 Inhibitory activity
真菌 Fungi	番茄灰霉病菌 <i>Botrytis cinerea</i>	11	+
	西瓜枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	-	-
	草莓炭疽病菌 <i>Strawberry anthracnose</i>	-	-
	人参根腐病菌 <i>Fusarium oxysporum</i>	-	-
	禾谷镰刀病菌 <i>Fusarium graminearum</i>	14	++
	玉米大斑病菌 <i>Exserohilum turcicum</i>	-	-
细菌 Bacteria	桃褐腐病菌 <i>Monilinia fructicola</i>	10	+
	西瓜嗜酸菌 <i>Acidovorax citrulli</i>	20	+++
	枯草芽胞杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	22	+++
	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	-	-
	桃细菌性穿孔病菌 <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	31	++++

注: “-” 表示无抑菌活性; “+, ++, +++, ++++” 分别示抑菌圈带宽在 8~13、13~19、19~24、24~30 mm。

Note: “-” showed no inhibitory activity; “+, ++, +++, ++++” showed that the inhibitory zone were 8~13, 13~19, 19~24, 24~30 mm, respectively.

表 4 粗提物的硅胶柱层析结果

Table 4 The result of crude extracts after silica gel column chromatography

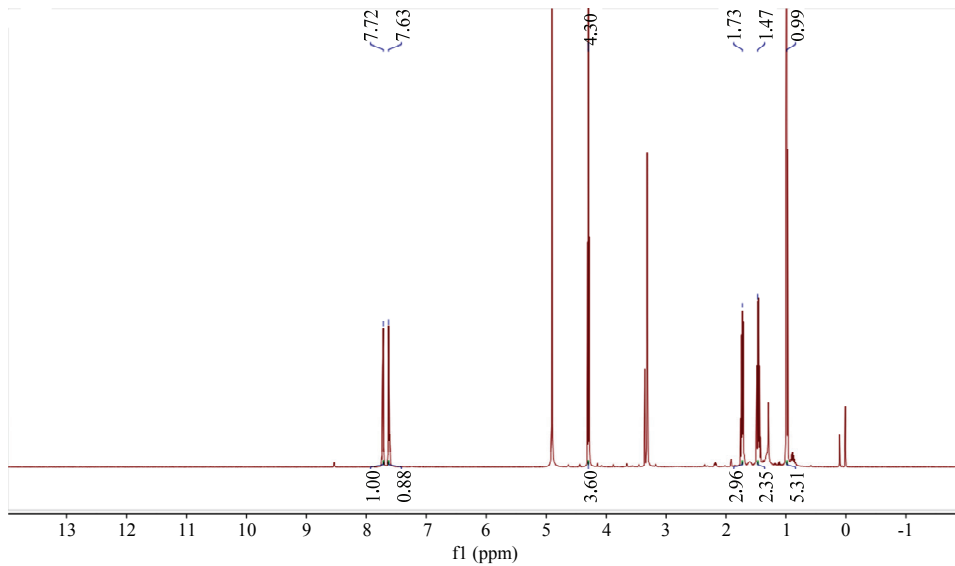
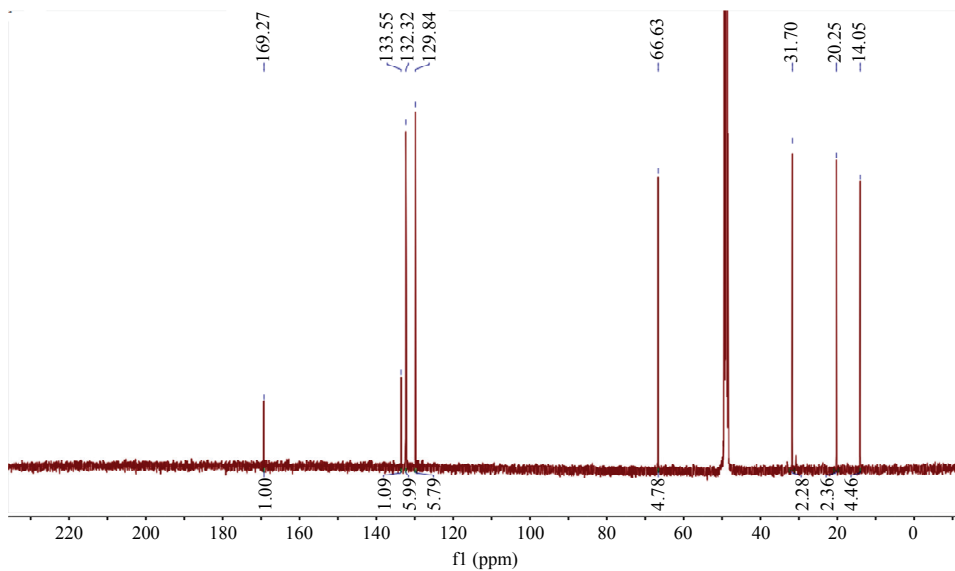
洗脱剂比例 Elution ratio	洗脱体积 Elution volume (mL)	样品管 Sample tube	抑菌活性 Antibacterial activity
石油醚:乙酸乙酯=10:1	440	1~2 (T1)	+
石油醚:乙酸乙酯=5:1	360	3~4 (T2)	-
二氯甲烷	1000	5~32 (T3)	-
二氯甲烷:甲醇=5:1	600	33~37 (T4)	-
二氯甲烷:甲醇=2:1	600	38~41 (T5)	-
二氯甲烷:甲醇=1:1	600	42~46 (T6)	-

注: “+” 表示有抑菌活性; “-” 表示无抑菌活性。

Note: “+” showed antibacterial activity to *Xap*; “-” showed no antibacterial activity to *Xap*.

表 5 纯化化合物的 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据 (CD_3OD , 500/125 MHz)
Table 5 $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ data of purified compound (CD_3OD , 500/125 MHz)

No.	δ_{H} /ppm	δ_{C}
7		169.27
1,6		133.55
3,4	7.63 (2H, dd)	132.32
2,5	7.72 (2H, dd)	129.84
1',1''	4.30 (4H, t)	66.63
2',2''	1.73 (4H, m)	31.07
3',3''	1.47 (4H, m)	20.25
4',4''	0.99 (6H, t)	14.05

图 4 单体化合物的 ^1H NMR 谱Fig. 4 ^1H NMR spectrum of purified compound图 5 单体化合物的 ^{13}C -NMR 谱Fig. 5 ^{13}C -NMR spectrum of purified compound

经过文献对比,发现该化合物与已知化合物邻苯二甲酸二丁酯^[13]的核磁数据一致,因此鉴定该化合物为邻苯二甲酸二丁酯(图 6)。

2.5 分离产物的活性测定结果

通过用琼脂平板打孔法测定制备产物 T1-1 的活性,制备产物 T1-1 对桃细菌性穿孔病菌表现抑菌作用,其中 B 为溶剂甲醇(图 7)。

3 讨论

本研究采用平板对峙法筛选出一株对桃细菌性穿孔病菌具有较强拮抗作用的放线菌 QH-16,通过形态特征观察、培养特性观察、生理试验和 16S rDNA

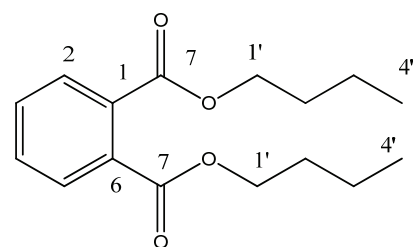


图 6 邻苯二甲酸二丁酯的结构图

Fig. 6 The chemical structure of DBP

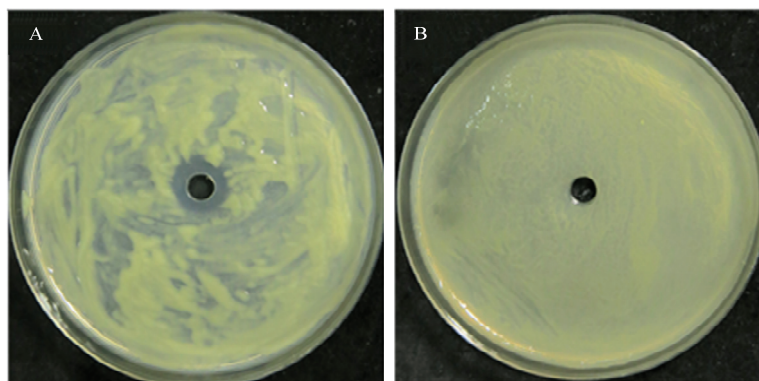


图 7 单体物质的抑菌活性

Fig. 7 Antibacterial effect of the prepared products

序列分析, 确定菌株 QH-16 为浑圆链霉菌 *S. globosus*。该菌株的代谢产物对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和真菌均表现出抑制作用, 因此, 可作为抗菌活性物质产生菌的优良菌株。国内外已有研究发现噬菌体^[14]、荧光假单胞菌^[15]、枯草芽胞杆菌^[16]、无治病性的荧光假单胞菌^[17]、秸秆木霉菌以及寡聚糖^[18]对桃细菌性穿孔病菌具有抑制作用, 但没有桃细菌性穿孔病拮抗放线菌的相关报道。

本研究经萃取、硅胶柱层析、制备型薄层层析板和循环制备液相色谱等步骤, 从该菌株的发酵产物中提取、分离纯化得到化合物并初步鉴定产物的结构。最终通过 NMR 核对, 确定活性产物为邻苯二甲酸二丁酯。邻苯二甲酸二丁酯在雷公藤^[19]、海洋海藻类、山芝麻、香芸火绒草^[20]、对结白蜡树^[21]、多脂大戟^[22]、三白草、红花酢浆花、植物姜等多种植物均有发现, 表明邻苯二甲酸二丁酯为天然产物。同时, 在细菌属、放线菌属, 真菌属均发现有邻苯二甲酸二丁酯的产生。国内外有很多关于邻苯二甲酸二丁酯抑菌活性研究的报道。徐云玲等^[20]在藏药香芸火绒草中分离纯化得到 17 种天然产物, 其中就有邻苯二甲酸二丁酯, 并通过实验证明邻苯二甲酸二丁酯对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和蜡状芽胞杆菌均具有抑制作用。张良菊^[21]在对节白蜡树中也发现了邻苯二甲酸二丁酯, 证明了其对多种真菌病原菌均具有抑制作用, 其中对水稻纹枯病和小麦赤霉病具有极强的抑菌效果。马桂珍等^[23]在海洋多粘类芽胞杆菌 L₁-9 中分离鉴定了抗菌活性物质邻苯二甲酸二丁酯, 证明其对 5 种病原真菌和细菌都具有抑制作用。Roy 等^[24]研究表明链霉菌 *S. albidoflavus* 321.2 产生的邻苯二甲酸二丁酯对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌及酿酒酵母菌 *S. cerevisiae*、黑曲霉 *Aspergillus niger*、苍白弯孢菌 *Curvularia pallescens* 均具有较强的抑制作用。顾晓洁等^[25]研究发现在海洋厌氧反硝化细菌 *Pseudomonas stutzeri* (No. DN7) 也有邻苯二甲酸二丁酯的产生, 其对枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* 和铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* 具有较强抑菌活性。Ramesh 和 Mohanraju^[26]发现海洋生物发光细菌对 17 种病原菌具有抑菌活性, 其活性成分中检测出邻苯二甲酸二丁酯。Ahsan 等^[27]从链霉菌 KX852460 代谢产物中分离得到邻苯二甲酸二丁酯, 其对立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani* 较强的抑制作用。但是, 目前并未有在浑圆链霉菌代谢产物中分离纯化得到邻苯二甲酸二丁酯的相关报道。

本研究通过分离筛选得到抗菌活性的浑圆链霉菌 QH-16, 从该菌株的发酵产物中分离纯化得到活性产物邻苯二甲酸二丁酯, 但是对其药理及毒理作用有待进一步研究。同时, 浑圆链霉菌的代谢产物报道较少, 今后继续开展菌株 QH-16 代谢产物其他抗菌成分的分离、结构鉴定以及田间试验。

参 考 文 献

- [1] Lamichhane J R. *Xanthomonas arboricola* diseases of stone fruit, almond, and walnut trees: progress toward understanding and management[J]. Plant Disease, 2014, 98(12): 1600-1610.
- [2] 王程安. 桃穿孔病病原菌的分离与鉴定[D]. 北京: 中国农业科学院, 2018.
- [3] Bednarek P, Kwon C, Schulze-Lefert P. Not a peripheral issue: secretion in plant-microbe interactions[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2010, 13(4): 378-387.
- [4] Kim Y C, Leveau J, Gardener B B M, et al. The multifactorial basis for plant health promotion by plant-associated bacteria[J]. Applied Environmental

- Microbiology, 2011, 77(5): 1548-1555.
- [5] 梁春浩, 臧超群, 安福涛, 等. 葡萄霜霉病菌拮抗放线菌 PY-1 发酵条件优化[J]. 中国生物防治学报, 2015, 31(6): 921-929.
- [6] Berdy J. Bioactive microbial metabolites[J]. The Journal of Antibiotics, 2005, 58(1): 1-26.
- [7] Higginbotham S J, Murphy C D. Identification and characterisation of a *Streptomyces* sp. isolate exhibiting activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Microbiological Research, 2010, 165(1): 82-86.
- [8] 王聪, 王坤, 姜明国, 等. 广西北部湾放线菌的分离筛选及活性产物的鉴定[J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(7): 1170-1176.
- [9] 刘伟, 徐涛, 蔡敬民, 等. 海洋小链霉菌 DY2741 抗菌物质的溶解性质及分离纯化[J]. 食品科学, 2010, 31(15): 177-180.
- [10] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 194-351.
- [11] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册(第八版)[M]. 北京: 科学出版社, 1984.
- [12] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组. 链霉菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1975, 298-303.
- [13] 侯志帆, 梁永红, 何礼标, 等. 灵芝双向固体发酵雷公藤后菌质化学成分变化初步研究[J]. 中草药, 2012, 43(2): 234-237.
- [14] Zaccardelli M, Saccardi A, Gambin E, et al. *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* bacteriophages on peach trees and their potential use for biological control[J]. Phytopathologia Mediterranea, 1994, 31: 133-140.
- [15] Biondi E, Dallai D, Brunelli A, et al. Use of a bacterial antagonist for the biological control of bacterial leaf/fruit spot of stone fruits[J]. International Organisation for Biological and Integrated Control/West Palaearctic Regional Section Bulletin, 2009, 43: 277-281.
- [16] Eşitken A, Karlidağ H, Ercişli S, et al. Effects of foliar application of *Bacillus subtilis* Osu-142 on the yield, growth and control of shot-hole disease (coryneum blight)[J]. European Journal of Horticultural Science, 2002, 67(4): 139-142.
- [17] Kawaguchi A, Inoue K, Inoue Y. Biological control of bacterial spot on peach by nonpathogenic *Xanthomonas campestris* strains AZ98101 and AZ98106[J]. Journal of General Plant Pathology, 2014, 80(2): 158-163.
- [18] 孙兴全, 王秉丽, 陈捷, 等. 秸秆木霉对桃树穿孔病病害防效试验[J]. 安徽农学通报, 2011, 17(12): 156-157.
- [19] 严振, 田洋, 马跃平, 等. 雷公藤根化学成分研究[J]. 中国现代中药, 2010, 12(1): 23.
- [20] 徐云玲, 祝汪洋, 谭静玲, 等. 藏药香芸火绒草化学成分及抗菌活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2019(3): 13.
- [21] 张良菊, 徐慧慧, 徐志红, 等. 对节白蜡树叶中挥发性成分提取, GC-MS 分析及杀菌活性研究[J]. 河南农业科学, 2017, 46(6): 80-83.
- [22] 张艳楠, 吉腾飞, 顾政一. 大戟脂化学成分的研究[J]. 新疆医科大学学报, 2019, 42(5): 667-672.
- [23] 马桂珍, 付泓润, 吴少杰, 等. 海洋多粘类芽胞杆菌 L₁-9 抗菌活性产物的分离与结构鉴定[J]. 植物病理学报, 2014, 44(5): 486-496.
- [24] Roy R N, Laskar S, Sen S. Dibutyl phthalate, the bioactive compound produced by *Streptomyces albidoflavus* 321.2[J]. Microbiological Research, 2006, 161(2): 121-126.
- [25] 顾晓洁, 穆军, 张翼, 等. 海洋厌氧反硝化细菌 *Pseudomonas stutzeri* 抗菌活性物质的研究[J]. 大连交通大学学报, 2011, 32(4): 66-69.
- [26] Ramesh C H, Mohanraju R. Antibacterial activity of marine bioluminescent bacteria[J]. Indian Journal of Marine Sciences, 2017, 46(10): 2063-2074.
- [27] Ahsan T, Chen J, Zhao X, et al. Extraction and identification of bioactive compounds (eicosane and dibutyl phthalate) produced by *Streptomyces* strain KX852460 for the biological control of *Rhizoctonia solani* AG-3 strain KX852461 to control target spot disease in tobacco leaf[J]. AMB Express, 2017, 7(1): 54.

(责任编辑: 吕平香)