

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*

54(6):624-634; 4 June 2014

ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q

http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.06.004

链霉菌 TJ430 的鉴定及产物结构

杨少彬, 黄永春*, 王常荣, 赵鹏, 张伟

农业部环境保护科研监测所, 天津 300191

摘要:【目的】通过对分离获得的土壤耐热放线菌株进行鉴定, 并对该菌株产生的抗菌活性产物进行分离纯化和结构解析, 达到判定该菌株归属及其产物新颖性目的。【方法】采用干热法对土壤样品进行前处理; 采用经改良的 HV 培养基分离土壤耐热放线菌; 通过琼脂块快速初筛法对分离获得的耐热放线菌进行生物活性快速评价; 分别采用形态学观察法、细胞化学组分分析法、生理生化及酶学特征分析、16S rDNA 序列分析、DNA 杂交法, 对分离获得的编号为 TJ430 的菌株进行菌株鉴定; 采用柱层析法和制备色谱法, 对发酵获得的有效成分粗提物进行分离纯化; 采用红外光谱法、高分辨质谱法对分离获得的生物活性成分代谢产物进行结构探索。【结果】共分离获得 570 株耐热放线菌; 抗菌活性快速初筛表明, 编号为 TJ430 的菌株表现出优良的抗卵菌及广谱抗真菌活性; 采用多种方法对菌株 TJ430 进行鉴定, 结果表明该菌株为一株卡吾尔链霉菌; 最终分离获得了纯度高达 98% 以上的有效成分纯品化合物; 该有效成分的分子式为 $C_{40}H_{66}N_3O_{11}$, 分子量为 765; 分子中应含有亚胺基、甲基、亚甲基、羰基、共价双键、异丙基等化学基团。【结论】目前对该抗菌活性成分的详细化学结构研究尚有待深入, 但该抗菌活性成分极有可能是一种新型化合物, 具有较好的开发应用前景。

关键词: 菌株鉴定, 农用抗生素, 分离纯化, 结构鉴定

中图分类号: Q935 **文章编号:** 0001-6209(2014)06-0624-11

疫霉属的多种植物病原菌都可给农业生产造成巨大损失。该类病原菌可引起农作物的根腐病、冠腐病、叶腐病、烂果, 严重影响食物、纤维、森林树木以及景观植物的生产^[1]。仅以晚疫病为例, 该病每年给全球马铃薯生产造成的损失即可高达 67 亿美元^[2]。为防治该类病害, 全球每年花费在疫霉菌病害防治上的费用可达到真菌剂市场的 25%^[3]。

疫霉属植物病害较难防治, 多种广谱抗真菌药

剂对该类病原菌都疗效甚微而且鲜有替代品种。目前已研发出的多种专门防治疫霉属及其它卵菌病害的化学药物如氯唑灵、甲霜灵、精甲霜灵、乙磷铝等, 虽然在疫霉属病害防治上起到了一定作用, 但由于这些化学合成杀菌剂的过量及不当使用^[4]以及疫霉属病原菌自身的超强适应性^[5], 导致该类病原菌的抗药性迅速增强。目前农业生产上亟需可有效防除该类病原菌的新型杀菌剂出现。

基金项目: 天津市自然科学基金(12JCYBJC19900); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(农业部环境保护科研监测所)自主项目(2013SZJJHYC03)

* 通信作者。Tel: +86-22-23618072; E-mail: nyllab@126.com

作者简介: 杨少彬(1990-), 男, 山东省烟台市人, 硕士研究生, 主要从事农用抗生素研发。E-mail: kele.dq@gmail.com

收稿日期: 2013-12-11; **修回日期:** 2014-01-27

在植物病害控制应用方面,天然产物这一宝库尚未得到有效开发^[6]。到目前为止,放线菌中的链霉菌提供了约一半的天然抗生素,并将继续提供新型生物活性代谢产物^[7]。为解除植物病原菌的抗药性,从天然产物中寻找新型替代农药的研究受到高度重视。

本实验室在前期研究中,通过改进分离方法,从云南元阳土壤样品中筛选到一株对辣椒疫霉菌、马铃薯晚疫病菌及多种植物病原真菌都具有较强抗性的编号为 TJ430 的耐热放线菌^[8],并对该菌株的发酵条件^[9]、有效成分的大孔树脂吸附条件^[10]进行了研究。本研究进一步报道了该菌株的鉴定结果,并对该抗菌成分的化学结构进行了探索。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: TJ430 菌株在本研究中分离筛选获得。用于筛选试验的生物活性指示菌株包括辣椒疫霉菌 (*Phytophthora capsici leonian*)、马铃薯晚疫病菌 (*Phytophthora infestans de Bary*)、蕃茄灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*)、黄瓜炭疽病菌 (*Colletotrichum lagenarium*)、棉花枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、稻瘟病菌 (*Magnaporthe grisea*) 等由天津市农业科学院植物保护研究所王万立研究员惠赠。

1.1.2 培养基: 分离筛选用培养基为改良的 HV 培养基^[8,11]。耐热放线菌株复筛培养基和菌株 TJ430 液体发酵培养基分别采用文献报道方法^[8-9]。真菌培养基为土豆培养基 (PDA),晚疫病菌培养基采用黑麦培养基^[12]。

1.1.3 主要仪器和试剂: Biolog GEN III 微孔板和基础培养液购于美国 BIOLOG 中国代理, API 50CH 和 ZYM 试剂条及相关试剂购于梅里埃公司。DNA 凝胶回收纯化试剂盒、PCR 反应的各种试剂均购自大连 TaKaRa 公司;生物活性成分分离纯化用各种化学试剂均为国产分析纯试剂;全细胞脂肪酸测定采用 Agilent6890 型气相色谱仪,配 FID 检测器;菌株形态观察采用 Hitachi S-4800 型扫描电镜;生物活性成分的红外光谱扫描采用 Shimadzu IR470 型红外光谱仪;高分辨质谱测定采用 Varian 公司生产的高分辨质谱仪;洗脱液中有效成份测定采用岛津公司

生产的 LD-6A 型液相色谱仪。

1.2 菌种的分离

将从全国各地采集的共 45 份土壤样品风干后研磨成粉,在 100℃ 下高温烘烤 60 min。称取 1 g 预处理好的土壤样品于无菌试管中,加入 10 mL 无菌水,充分震荡,经 10 倍系列稀释后取 200 μL 涂布平板,28℃ 倒置培养 15 - 25 d。用接种针挑取单菌落于培养皿内划线,28℃ 培养 14 d,用直径 5 mm 的打孔器打制带菌落的琼脂块,分别接种到混合有指示菌的 15 cm 培养皿中,于生化培养箱中培养 2 - 7 d,观察抑菌情况并测量抑菌圈直径。初筛获得的单菌落经复筛液体培养基发酵后,取经离心的发酵上清液采用管碟法^[13]测定抑菌活性。

1.3 菌株鉴定

1.3.1 形态特征: 分别将分离获得的编号为 TJ430 的菌株接种在 ISP2、ISP3、ISP4、ISP5 以及察氏培养基上,在生化培养箱内于 28℃ 下培养 7 d。观察记录基内菌丝、气生菌丝、生长情况和可溶性色素的产生情况及颜色。选择生长较好的培养基做埋片观察细胞形态。

取埋片用 2.5% 的戊二醛固定 12 h 后,用 pH7.2 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液漂洗 3 次,转入 1% 的锇酸缓冲液中固定 1h,再用上述缓冲液漂洗 3 次,经过 50%、70%、90%、100% 的乙醇梯度脱水,置醋酸异戊酯中 20min,取出,临界点干燥,喷金后于扫描电子显微镜下观察菌体形态特征^[14]。

1.3.2 细胞化学组分分析: 参照王平的方法^[15]进行菌株细胞壁二氨基庚二酸 (DPA)、特征性氨基酸和糖型分析。采用气相色谱法进行全细胞脂肪酸测定^[16],脂肪酸甲酯标准样品均购自 Sigma 公司。

1.3.3 生理生化及酶学特征分析: 利用 Biolog GEN III 微孔板进行唯一碳源利用试验,利用 API50CH 试剂条和 50CHB 培养基进行唯一碳源产酸试验,利用 API ZYM 试剂条进行酶学特性试验^[17]。

1.3.4 16S rDNA 序列分析: 放线菌 TJ430 基因组 DNA 的提取采用微波快速提取法^[18],并以此为模板进行 PCR 扩增。16S rDNA 扩增用 PCR 引物: (Primer A: 5' -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3'; Primer B: 5' -AAGGAGGTGATCCAGCCGCA -3')。PCR 扩增条件: 95℃ 5min; 94℃ 1min, 56℃ 1min, 72℃ 3min, 35 个循环。PCR 产物测序由北京宝杰罗生物科技有限公司完成。将所测得的 16S rDNA

序列与 GenBank 数据库中的 16S rDNA 序列进行相似性比较分析,并利用 DNAMAN 5.0 软件绘制系统发育进化树。

1.3.5 DNA 杂交试验:采用热变性温度法 (T_m) 测定菌株 TJ430DNA 中 (G + C) mol%,以 *E. coli* K-12 为参比^[19],分别采用复性速率液相分子杂交法^[20]进行菌株 *Streptomyces albolongus* DSM40570、*Streptomyces celluloflavus* DSM40839 以及 *Streptomyces cavourensis* DSM40300 的 DNA 与菌株 TJ430 DNA 杂交试验。

1.4 有效成分的化学结构探索

1.4.1 有效成分的分离纯化:采用二级发酵法制备发酵液 30 L^[9],加醋酸调节 pH 到 3.0 - 4.0 之间,放置隔夜。离心收集下层沉淀,经丙酮浸提 3 次并经旋转蒸发器浓缩后,用丙酮定容至 1.0L。用移液管吸取 1.0 mL 该溶液,于通风橱中风干后溶于 1.0 mL 甲醇中,经 0.45 μm 的滤膜过滤后进液相色谱测定有效成分含量。向上述定容至 1.0 L 的丙酮溶液中加入 200g 粒度为 200 - 300 目柱层析硅胶,于通风橱中挥发尽有机溶剂后装填于硅胶层析柱的柱头。以乙酸乙酯为洗脱剂联通洗脱装置,在紫外检测器监控下以 500 mL/瓶收集洗脱液。分别取各收集瓶中洗脱液以液相色谱法监控各收集瓶中有效成份含量,合并含有有效成分的组分。

将硅胶柱分离获得的含有有效成分的组分,在旋转蒸发器上蒸干后溶解于 1.0 L 的甲醇中,取样经 0.45 μm 的滤膜过滤后进液相色谱测定有效成分含量。向其中加入 50 g 直径为 50 μm 的 C_{18} 柱层析填料,于通风橱中挥发尽甲醇后装填于 C_{18} 层析柱的柱头。联通洗脱装置在紫外检测器监控下,分别用 30%、40%、50%、60%、70%、80% 的甲醇水洗脱,按照 500 mL/瓶分部收集洗脱液,其中 30% - 60% 及 80% 甲醇水洗脱液每个浓度采用 2.0 L 洗脱,70% 洗脱液采用 4.0L 洗脱,仍采用液相色谱法监控各收集瓶中有效成分含量,合并高纯度组分,浓缩定容至 1.0 L,取样分析有效成分含量。进一步采用制备色谱进一步纯化,制备获得更高纯度样品。

1.4.2 室内抗菌谱测试:称取 10 mg 上述步骤中分离获得的抗生素纯品化合物,溶于 50 mL 甲醇中,用蒸馏水稀释到 1000 mL,配制成 10 mg/L 的水溶液。分别在土豆培养基 (PDA) 和牛肉膏蛋白胨培养基上,采用管碟法^[13]测定该水溶液对 16 种植物病原

真菌和 2 种植物病原细菌的抗菌活性,用直尺测量抑菌圈直径。

1.4.3 有效成分化学结构探索:利用配备激光辅助基质解析电离源 (MALDI) 的高分辨质谱仪在阳离子模式下测定该有效成分的准确分子量,并利用随机附带的软件分析有效成分的可能分子式构成情况。将分离获得的有效成分与溴化钾混合后压片,利用红外光谱扫描有效成分的红外吸收值。

2 结果

2.1 菌株的分离与筛选

从采集的 45 份土壤样品中共选择性分离到 570 株耐热放线菌菌株。分别以 7 种病原菌为指示菌,采用琼脂块法进行的初筛试验表明,共有 212 个菌株表现出了抗真菌或疫霉菌活性,占总菌株数量的 37.2%,从中挑选出 12 株对部分指示菌具有较强抑制作用的或具有广谱抗菌活性的菌株进行复筛,量取抑菌圈直径,结果显示 (表 1),有 4 株菌株 (TJ211、TJ231、TJ234、TJ430) 发酵液对所有指示菌具有抑制作用,但以 TJ430 菌株抑制效果最明显。本研究挑选菌株 TJ430 做进一步研究。

2.2 菌株鉴定

2.2.1 形态特征:TJ430 在 ISP2、ISP4、ISP5 培养基上气丝和基丝丰富,气丝白色至浅灰黄色,基丝反面乳白色至浅黄灰色。无可溶性色素。孢子丝螺旋形,可达 3 - 4 圈。孢子卵圆形,表面有刺,如图 1 所示。

2.2.2 TJ430 细胞化学组分分析:利用 TLC 显色法分析结果表明,菌株 TJ430 细胞壁含有 LL-DAP 和甘氨酸,无特征性糖,为胞壁 I 型放线菌。

利用气相色谱对菌株 TJ430 全细胞脂肪酸甲酯的测定结果表明,按照保留时间计算共检出 18 种脂肪酸甲酯,按峰面积归一化法计算各脂肪酸甲酯的百分含量,其中 14:0 ISO (7.15%)、15:0 ISO (23.26%)、15:0 (28.48%)、16:0 ISO (14.52%)、16:0 (2.90%)、17:1 ANTEISO C (3.46%)、17:0 ANTEISO (4.87%) 17:0 ISO (3.33%)、17:0 CYCLO (1.94%),其余种类脂肪酸甲酯含量均在 1% 以下。可见菌株 TJ430 细胞中的脂肪酸组分主要应为 14 - 17 碳的脂肪酸,与文献报道^[19 - 20]中链霉菌全细胞脂肪酸主要为 14 - 17 碳脂肪酸结论一致,该菌

株应归入链霉菌属。

表 1. 部分耐热放线菌抗菌活性复筛结果

Table 1. The re-screening results of the antimicrobial activity of part heat resistant actinomycetes

strain	inhibition zone diameter / cm						
	phytophthora	phytophthora	botrytis	cucumber	cotton-wilt	aspergillus	rice blast fungus
	capsici	infestans	cinerea	anthracnose	fusarium	niger	
TJ38	20.2	—	14.7	—	—	24.1	20.2
TJ56	18.0	—	—	15.1	13.4	11.5	20.9
TJ163	15.4	12.7	18.4	—	19.7	28.0	20.2
TJ211	16.0	15.1	17.4	16.4	15.4	19.4	22.1
TJ231	31.3	23.7	18.9	25.1	21.6	23.5	23.3
TJ234	12.7	15.7	21.6	22.1	16.0	15.1	18.6
TJ278	14.7	15.1	22.3	20.7	—	—	12.5
TJ348	18.2	14.9	16.2	—	10.4	10.5	20.7
TJ349	34.2	20.9	—	14.2	—	9.5	—
TJ357	24.2	—	18.1	—	13.2	19.7	12.5
TJ430	30.0	35.3	22.7	29.4	26.9	23.1	24.3
TJ561	22.6	18.1	—	—	23.3	22.4	25.7

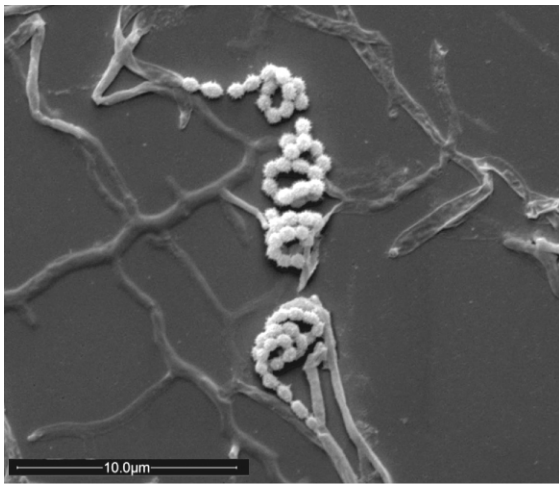


图 1. 菌株 TJ430 的扫描电镜照片 (8000 ×)

Figure 1. The scanning electron micrograph of strain TJ430 (8000 ×).

2.2.3 培养特征: 利用 Biolog GEN III 微孔板对菌株 TJ430 单一碳源利用情况的考察结果表明, 在备选的 71 种碳源中, 菌株 TJ430 可利用糊精 (dextrin)、D-海藻糖 (D-trehalose)、D-纤维二糖 (D-cellobiose)、D-水杨苷 (D-salicin)、乙酰氨基葡萄糖 (N-acetyl-D-glucosamine)、 α -葡萄糖 (α -D-glucose)、肌苷 (inosine)、D-甘露醇 (D-mannitol)、D-阿拉伯糖醇 (D-arabitol)、甘油 (glycerol)、明胶 (gelatin)、谷氨酸 (L-glutamic acid)、组氨酸 (L-histidine)、焦谷氨酸 (L-pyroglutamic acid)、丝氨酸 (L-serine)、葡萄糖酸 (D-gluconic acid)、葡萄糖醛酸 (D-glucuronic acid)、

葡萄糖醛酰胺 (glucuronamide)、奎尼酸 (quinic acid)、乳酸 (L-lactic acid)、柠檬酸 (citric acid)、苹果酸 (L-malic acid)、丙酸 (propionic acid), 共计 23 种碳源。

利用 API 50CH 试纸条进行的产酸试验结果表明, 在供试的 49 种糖中, 当菌株 TJ430 以 D-阿拉伯糖 (D-arabinose)、葡萄糖 (D-glucose)、肌醇 (inositol)、七叶苷柠檬酸铁 (esculin ferric citrate)、葡萄糖酸钾 (potassium gluconate) 做唯一碳源时产酸试验呈阳性。

利用 API ZYM 酶学试剂条对 19 种酶进行的酶学特性试验表明, 菌株 TJ430 在培养过程中可产生碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase)、脂肪酶 [esterase lipase (C_8)]、亮氨酸氨基肽酶 (leucine arylamidase)、缬氨酸酶 (valine arylamidase)、光氨酸酶 (cystine arylamidase)、胰蛋白酶 (trypsin)、 α -糜蛋白酶 (α -chymotrypsin)、酸性磷酸酶 (acid phosphatase)、 α -葡萄糖苷酶 (α -glucosidase)、 β -葡萄糖苷酶 (β -glucosidase) 共 10 种酶。

2.2.4 16S rDNA 全序列的相似性比较和系统发育分析: TJ430 的 16S rDNA 基因序列全长 1410bp。将获得的基因序列与 GenBank 数据库中的相关种进行比较发现, 菌株 TJ430 的 16S rDNA 序列与 *Streptomyces albolongus* DSM40570、*Streptomyces celluloflavus* DSM40839 以及 *Streptomyces cavourensis* DSM40300 相似性均在 99% 以上。在基于 16S

rDNA 基因分析的系统进化树上(如图 2 所示),菌株 TJ430 和 *Streptomyces albolongus* DSM40570、*Streptomyces celluloflavus* DSM40839 以及 *Streptomyces*

cavourensis DSM40300 聚在一个稳定的进化分支上。仅据 16S rDNA 基因序列尚且不能将该菌株划分到确切的种。

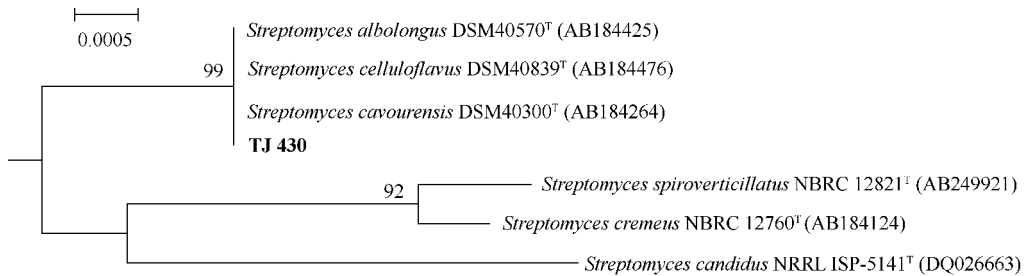


图 2. 菌株 TJ430 及其近源菌株的系统进化树

Figure 2. Phylogenetic neighbour-joining tree based on 16S rRNA gene sequences analysis showing the phylogenetic relationships of TJ 430 within the genus *Streptomyces*. Bootstrap percentage values (> 50%) based on 1000 tree replications are indicated at the branching points. Numbers in parentheses represent in the sequences accession number in GenBank. Bar, 0.05% sequence divergence. T, type strain.

2.2.5 DNA 杂交试验: 菌株 TJ430 的 G + C 含量为 71.4%。与 3 株相似菌株的 DNA 杂交试验结果如表 2 所示。

表 2. 菌株 TJ430 与 3 株链霉菌株的 DNA 杂交值

Table 2. The DNA hybridization value of TJ430 with three *Streptomyces* strains

strain	hybridization rate / %	$\Delta T_m / ^\circ\text{C}$
<i>S. albolongus</i> DSM40570	57.2	3.1
<i>S. celluloflavus</i> DSM40839	61.1	2.4
<i>S. cavourensis</i> DSM40300	73.4	1.9

由表 2 可见, 菌株 TJ430 与 *Streptomyces albolongus* DSM40570、*Streptomyces celluloflavus* DSM40839 以及 *Streptomyces cavourensis* DSM40300 的基因组 DNA-DNA 杂交值分别为: 57.2%、61.1% 和 73.4%。前两个数值均低于 70%, 表明菌株 TJ430 和 *Streptomyces albolongus* DSM40570、*Streptomyces celluloflavus* DSM40839 分属于不同的基因种; 菌株 TJ430 和 *Streptomyces cavourensis* DSM40300 的基因组 DNA-DNA 杂交值高于 70% 且 $\Delta T_m < 5^\circ\text{C}$, 表明这两个菌株属于同一个基因种。

综上, 结合形态学特征、培养特征、细胞化学组分分析、16S rDNA 序列分析以及 DNA 杂交试验结果, 可将菌株 TJ430 的分类地位确定为链霉菌属的

卡伍尔链霉菌 (*S. cavourensis*)。

2.3 有效成分的分离纯化

在紫外检测器监控下, 以 500mL/瓶对洗脱液进行分部收集, 其中硅胶柱洗脱液共收集 15 瓶洗脱液, C_{18} 柱洗脱液共收集 24 瓶。对于硅胶柱洗脱液, 用移液管分别从各收集瓶中吸取 1.0mL 洗脱液于 10.0mL 小烧杯中, 常温下于通风橱中风干, 加入 2.0mL 甲醇复溶, 并经 $0.45\mu\text{m}$ 的滤膜过滤后进液相色谱检测, 记录各收集瓶中有效成分的峰高。对于 C_{18} 柱洗脱液, 直接吸取瓶中洗脱液经 $0.45\mu\text{m}$ 的滤膜过滤后, 进液相色谱测定。结果如图 3 所示。

由图 3 可见, 采用硅胶柱分离有效成分时, 有效成分主要集中于 2[#] - 5[#] 瓶中, 其中 4[#] 瓶中有有效成分浓度最高, 合并上述 4 瓶洗脱液供进一步过柱分离。当采用 C_{18} 柱分离时, 有效成分主要集中于 19[#] - 22[#] 号瓶, 其中最大浓度出现于 20[#] 号瓶, 且 19[#] - 22[#] 号瓶中有有效成分的纯度较高, 合并上述 4 瓶洗脱液供进一步制备色谱分离。

分别采用液相色谱测定上柱前后定容至 1.0L 的洗脱液中有有效成分峰高, 以峰高之比计算过柱回收率, 同时采用面积归一化法计算有效成分的纯度, 结果如表 3 所示。

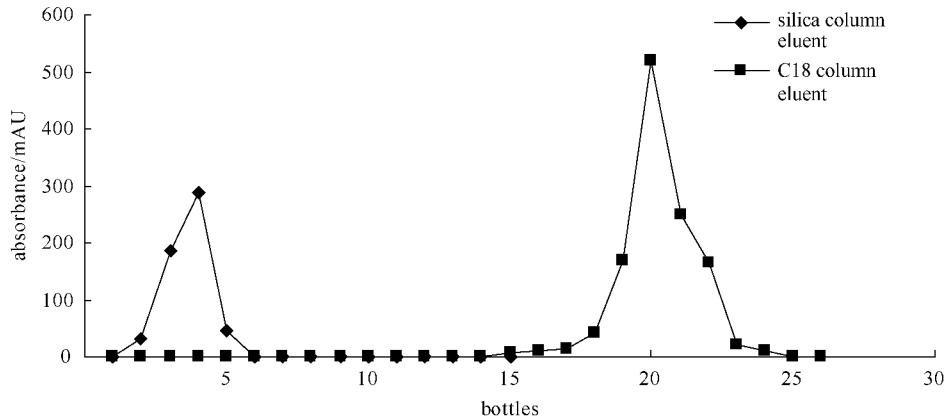


图 3. 有效成分在硅胶和 C₁₈ 柱上的洗脱曲线

Figure 3. The elution curve of the active ingredient on Silica and C₁₈ column.

表 3. 过柱后有效成分回收率及纯度

Table 3. The recovery and purity of the active ingredient through the column

column species	constant volume of pre-column /L	peak height of pre-column /mAU	constant volume of pre-column /L	peak height of post-column /mAU	recovery of the active ingredient /%	purity of the active ingredient /%
silica gel column	1.0	101.50	1.0	84.70	83.44	60.18
C ₁₈ column	1.0	83.44	1.0	73.52	88.11	91.33

Data in the table are the mean of three repeats.

由表 3 可见,过一次硅胶柱后有效成分的回收率可达到 83.44%,有效成分纯度可达到 60.18%,进一步采用 C₁₈ 柱分离,有效成分的回收率可达到 88.11%,有效成分纯度可达到 91.33%。两次过柱回收率均较高,满足纯化要求。当采用 C₁₈ 柱分离一次后,有效成分纯度已经可以达到 90% 以上,进一步采用制备色谱分离一次以后,有效成分纯度可达到 98% 以上,满足化学结构探索分析要求。

2.4 分离获得有效成分的抗菌活性

以分离获得的浓度为 10mg/L 的抗生素纯品水溶液,对番茄灰霉病菌、小麦赤霉病菌等 16 种植物病原真菌,青枯病菌、水稻白叶枯病菌两种植物病原细菌的室内抑制结果如表 4 所示。该抗生素的纯品水溶液对所测试的 16 种植物病原真菌和 2 种植物病原细菌都具有较强抗性,而且兼具抗真菌和细菌功能。

2.5 菌株 TJ430 代谢产物的化学结构探索

2.5.1 红外吸收光谱:利用红外光谱对分离获得的有效成分进行扫描,结果如图 4 所示。该生物活性成分在 3429 cm⁻¹ 附近处存在明显伸缩振动,表明分子中存在仲氨(-NH)基团;在 3254 cm⁻¹ 附近处存在明显伸缩振动,该位置是羟基(-OH)基团存

表 4. 菌株 TJ430 发酵液对不同植物病原菌的室内抑制效果

Table 4. The inhibitory effects of the strain TJ430 broth on different plant pathogens

pathogen	inhibition zone diameter /mm
<i>Botrytis cinerea</i>	25.3
<i>Fusarium graminearum</i>	12.4
<i>Alternaria solani</i>	24.4
<i>Aspergillus niger</i>	19.3
<i>Alternaria brassicae</i>	21.2
<i>Rhizoctonia solani</i>	17.8
<i>Alternaria alternata</i>	16.9
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	17.7
<i>Phytophthora capsici</i>	30.7
<i>Cotton-wilt fusarium</i>	16.8
<i>Fusarium oxysporum</i>	20.6
<i>Cercospora personata</i>	18.4
<i>Phytophthora infestans</i>	15.8
<i>Mycosphaerella melonis</i>	14.7
<i>Rice blast fungus</i>	30.3
<i>Corynespora cassiicola</i>	16.3
<i>Ralstonia solanacearum</i>	13.9
<i>Xanthomonas oryzae</i>	25.5

在的特征位置,在 1245 cm⁻¹ 附近处存在吸收峰则进一步确证含有羟基;在 3078 cm⁻¹ 附近处存在吸

收说明有末端不饱和双键 ($=\text{CH}_2$) 基团存在; 在 2967 cm^{-1} 和 2874 cm^{-1} 附近处存在吸收, 表明有甲基 ($-\text{CH}_3$) 基团存在; 在 2930 cm^{-1} 附近处的强烈伸缩振动是亚甲基 ($-\text{CH}_2$) 基团的特征吸收, 在 1449 m^{-1} 和 1365 cm^{-1} 附近处出现吸收峰则进一步确证

分子结构中存在甲基和亚甲基基团; 在 1720 cm^{-1} 附近处出现吸收峰表明分子中含有羰基 ($\text{C}=\text{O}$); 在 1170 cm^{-1} 附近处出现吸收峰, 则表明存在异丙基 ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$) 基团; 在 1688 cm^{-1} 、 1620 cm^{-1} 附近处出现吸收说明分子中存在碳-碳 ($\text{C}=\text{C}$) 双键。

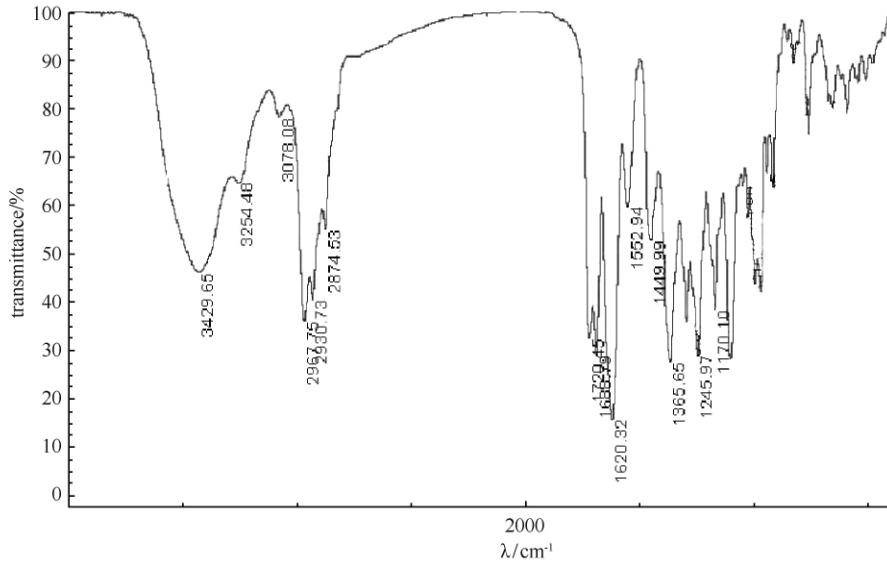


图 4. 生物活性成分的红外光谱图

Figure 4. The IR spectrum of the bioactive ingredient.

2.5.2 高分辨质谱分析: 利用配备 MALDI 离子化源的高分辨质谱对分离获得的样品进行分析, 结果如图 5 所示。由图 5 可见, 最高的分子离子峰出现在 787 处, 同时在 788, 789 处伴随出现 2 个同位素峰。在 773 和 803 处也各出现 1 个分子离子峰并同时伴随有各自的同位素峰。由于 773 处和 803 处出现的峰高显著低于 787 处峰值, 因此可初步判定活

性成分的准分子离子峰为 787.4568。但是由于准分子离子峰中可能还会含有 K^+ 、 Na^+ 等金属元素, 因此继续利用随机附带的质谱图解析软件对该生物活性成分的可能分子式构成情况进行预测。结果显示 (表 5, 表 6), 无论在活性成分分子中可能含有钾离子还是钠离子的情况下, 活性成分的可能分子式构成中有共同的情况存在, 即 $\text{C}_{40}\text{H}_{66}\text{N}_3\text{O}_{11}$ 。从 2 个

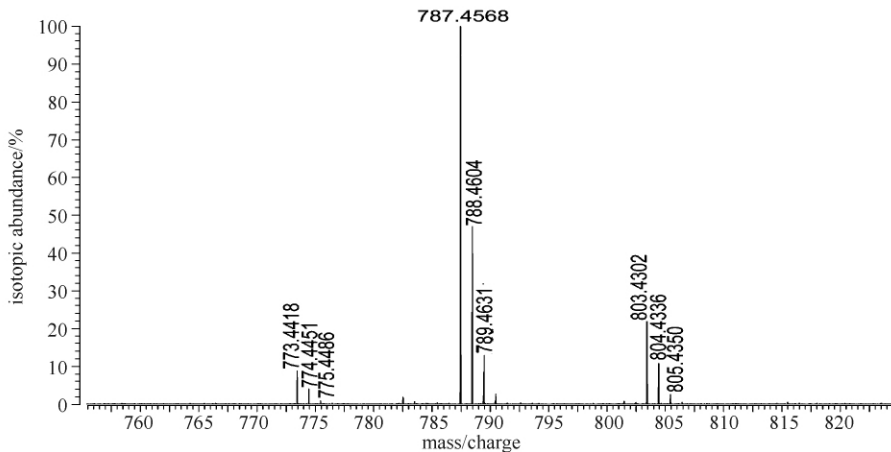


图 5. 生物活性成份的高分辨质谱图

Figure 5. The high-resolution mass spectrum of the bioactive ingredients.

峰代表的分子量差异看, 803. 4302 与 787. 4568 相差 15. 9734, 正好为钾原子 (原子量 38. 9637) 与钠原子 (原子量 22. 9898) 的原子量之差 (15. 9739), 即 803. 4302 和 787. 4568 分别代表同一分子在与不同金属原子结合时的表观分子量差异。据此可推断出活性成分的分子式应为 $C_{40}H_{66}N_3O_{11}$, 分子量为 764. 9780 即 765, 符合氮规则^[21]。而图 5 中 773 处峰与主峰分子量 (787) 相差 14, 正好为一个亚甲基 (CH_2) 的分子量, 因此推测该物质应该为主成分的一个同系物。

表 5. 准分子离子峰中含有钠离子时的可能分子式

Table 5. The possible molecular formula when containing sodium ion in molecular ion peak

m/z	delta m/z /ppm	DBE	molecular formula
787. 45628	0. 53	4. 5	$C_{37}H_{68}N_2O_{14}Na^{+1}$
787. 45762	-1. 16	9. 5	$C_{38}H_{64}N_6O_{10}Na^{+1}$
787. 45494	2. 24	5. 0	$C_{35}H_{66}N_5O_{13}Na^{+1}$
787. 45896	-2. 87	9. 0	$C_{40}H_{66}N_3O_{11}Na^{+1}$
787. 46029	-4. 56	14. 0	$C_{41}H_{62}N_7O_7Na^{+1}$

表 6. 准分子离子峰中含有钾离子时的可能分子式

Table 6. The possible molecular formula when containing potassium ion in molecular ion peak

m/z	delta m/z /ppm	DBE	molecular formula
803. 43022	-0. 14	4. 5	$C_{37}H_{68}N_2O_{14}K^{+1}$
803. 42887	1. 53	5. 0	$C_{35}H_{66}N_5O_{13}K^{+1}$
803. 43155	-1. 81	9. 5	$C_{38}H_{64}N_6O_{10}K^{+1}$
803. 43290	-3. 48	9. 0	$C_{40}H_{66}N_3O_{11}K^{+1}$

3 讨论

天然产物具有丰富的化学结构多样性特征, 具备发现新型抗菌生物活性成分的巨大潜力^[1]。据统计目前从微生物中分离获得的生物活性化合物已达 22500 个, 其中 45% 来源于放线菌, 38% 来源于真菌, 17% 来源于单细胞细菌^[22]。然而从普通常规放线菌中发现新型代谢产物的可能性已经很低了^[23], 不断重复发现已知化合物的现象一直困扰着世界各国科研工作者。本研究在筛选菌株时采用干热法对土壤样品进行预处理, 去除了大部分常规放线菌, 同时在分离过程中采用经过改良的 HV 培养基, 进一步保证了所获得菌株的稀有性。通过近一年的持续分离, 获得了多种耐热放线菌, 包括多种链

霉菌、小单孢菌、小双孢菌、马杜拉放线菌、游动放线菌等多种耐热放线菌株^[9]。室内生物活性测试结果表明, 编号为 TJ430 的菌株不仅对典型的卵菌类植物病害如晚疫病表现出良好抗性, 而且具有广谱抗真菌活性。

脂肪酸是细胞中一种稳定而富有的化学成分, 不受生化反应变异及质粒丢失等因素的影响, 是理想的菌株分型依据之一^[24]。现代微生物学研究表明, 细菌细胞中普遍存在的脂肪酸成分与细菌的 DNA 具有高度的同源性, 各种细菌具有其特征性的脂肪酸指纹图谱^[25]。本研究利用细胞脂肪酸分析法成功将菌株 TJ430 确定到链霉菌属。根据 16S rDNA 序列构建进化树进行分类的方法, 在细菌分类学上已得到广泛应用。该方法相较于传统分类学方法具有准确、快速、灵敏的优点^[26]。在本研究中, 运用该方法虽然仍不能将菌株 TJ430 准确归属到种的水平, 但是已经锁定到较窄范围以内。1987 年, 国际系统细菌学委员会规定 DNA 同源性 $\geq 70\%$ 、杂交分子的热解链温度差 $\Delta T_m \leq 5^\circ C$ 为细菌种的界限^[27]。本研究中进一步采用 DNA 杂交技术对菌株 TJ430 进行归属, 结果表明菌株 TJ430 只与 *Streptomyces cavourensis* DSM40300 的基因组 DNA-DNA 杂交值大于 70%, 且 $\Delta T_m < 5^\circ C$, 表明这两个菌株属于同一个基因种。

卡伍尔链霉菌可产生色霉素 (chromomycin)^[28-29], 但是文献报道的色霉素分子式为 $C_{57}H_{82}O_{25}$ 、分子量为 1183, 主要具备抗癌功能。本研究获得的活性产物主要具有抗卵菌及真菌功能, 利用高分辨率质谱分析获得的该活性成分分子式为 $C_{40}H_{66}N_3O_{11}$, 分子量为 765, 显然与色霉素具有不同的化学结构和生物活性。红外光谱技术在天然产物化学结构探索中具有重要作用, 利用该技术可提供特定化学基团存在的证据, 但是仅利用该技术所获得的化学结构信息仍然有限, 还需结合其它技术如核磁共振对该活性成分的详细化学结构进行深入探索。根据目前已经获得的初步信息推断, 该生物活性成分很可能是一种新型抗菌化合物。

疫霉属的卵菌类病害如晚疫病菌, 在分类学上更加接近于藻类^[30], 该类病原菌在农业生产上不仅危害巨大而且很难防治, 目前缺乏疗效显著的化学防除药剂。本研究中筛选到的卡伍尔链霉菌代谢产物不仅在实验室内表现出良好的抗疫霉菌生物活

性,而且以 150mg/L 该产物纯品水溶液,在温室内进行的防治番茄晚疫病试验表明,该有效成分对番茄晚疫病的防效可达 90% 以上(结果尚未发表),表现出了良好的开发应用前景。

参考文献

- [1] Verpoorte R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. *Drug Discovery Today*, 1998, 3: 232-238.
- [2] Haas BJ, Kamoun S, Zody MC, Jiang RH, Handsaker RE, Cano LM, Grabherr M, Kodira CD, Raffaele S, Torto-Alalibo T, Bozkurt TO, Ah-Fong AM, Alvarado L, Anderson VL, Armstrong MR, Avrova A, Baxter L, Beynon J, Boevink PC, Bollmann SR, Bos JL, Bulone V, Cai G, Cakir C, Carrington JC, Chawner M, Conti L, Costanzo S, Ewan R, Fahlgren N, Fischbach MA, Fugelstad J, Gilroy EM, Gnerre S, Green PJ, Grenville-Briggs LJ, Griffith J, Grünwald NJ, Horn K, Horner NR, Hu CH, Huitema E, Jeong DH, Jones AM, Jones JD, Jones RW, Karlsson EK, Kunjeti SG, Lamour K, Liu Z, Ma L, Maclean D, Chibucos MC, McDonald H, McWalters J, Meijer HJ, Morgan W, Morris PF, Munro CA, O'Neill K, Ospina-Giraldo M, Pinzón A, Pritchard L, Ramsahoye B, Ren Q, Restrepo S, Roy S, Sadanandom A, Savidor A, Schornack S, Schwartz DC, Schumann UD, Schwessinger B, Seyer L, Sharpe T, Silvar C, Song J, Studholme DJ, Sykes S, Thines M, van de Vondervoort PJ, Phuntumart V, Wawra S, Weide R, Win J, Young C, Zhou S, Fry W, Meyers BC, van West P, Ristaino J, Govers F, Birch PR, Whisson SC, Judelson HS, Nusbaum C. Genome sequence and analysis of the irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature*, 2009, 461 (7262): 393-398.
- [3] Schwinn FJ, Staub T. Phenylamides and other fungicides against Oomycetes. // Lyr H. ed. *Modern Selective Fungicides: Properties, Applications, Mechanisms of Action*. London: Longman Scientific and Technical, 1987: 259-273.
- [4] Thind TS. Fungicide resistance: a perpetual challenge in disease control. *Journal of Mycology and Plant Pathology*, 2008, 38: 407-418.
- [5] Davidse LC, Looijen D, Turkensteen, LJ, Van Der Wal D. Occurrence of metalaxyl-resistant strains of *Phytophthora infestans* in Dutch potato fields. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 1981, 87:65-68.
- [6] Jeanne MK, Steven NJ, Marc S, David EW. A rapid microbioassay for discovery of novel fungicides for *Phytophthora* spp.. *Phytopathology*, 2003, 93 (1): 46-53.
- [7] Berdy J. Bioactive microbial metabolites. *Journal of Antibiotic*, 2005, 58: 1-26.
- [8] Tan Y, Peng Y, Huang Y. Selective separation of actinomycetes from soils and rapid evaluation of anti-phytopathogenic activity of their metabolites. *Plant Protection*, 2011, 37 (1): 120-123. (in Chinese)
谭悠久,彭祎,黄永春. 土壤放线菌的选择性分离及其代谢产物抗菌活性评价. *植物保护*, 2011, 37 (1): 120-123.
- [9] Tan Y, Peng Y, Huang Y. Optimization of fermentation conditions for obtaining antibiotics 430 from *Streptomyces* strain TJ430. *Guangxi Agricultural Sciences*, 2010, 46 (6): 565-568. (in Chinese)
谭悠久,彭祎,黄永春. 抗菌素 430 产生菌发酵条件研究. *广西农业科学*, 2010, 41 (6): 565-568.
- [10] Huang Y, Liu H, Zhao P, Zhang W, Chen Z. Preliminary research on the separation of an agro-antibiotic from the fermentation broth of the *Streptomyces* strain TJ430 by macroporous absorption resin D-401. *Plant Protection*, 2013, 39 (4): 85-89. (in Chinese)
黄永春,刘红梅,赵鹏,张伟,陈志永. 采用大孔吸附树脂 D-401 初步分离提取 TJ430 菌株发酵液中的抗生素. *植物保护*, 2013, 39 (4): 85-89.
- [11] Hayakawa M, Nonomura H. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *Journal of Fermentation Technology*, 1987, 65: 501-509.
- [12] Yang Y, Xiao L, Hu X. Study on the relationship between the Toxin of *Phytophthora infestans* and resistance of potato. *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, 42 (6): 2202-2210. (in Chinese)
杨艳丽,肖浪涛,胡先奇. 马铃薯晚疫病菌毒素与寄主品种抗性关系研究. *中国农业科学*, 2009, 42 (6): 2202-2210.
- [13] Li Q, Liu H, Chen Z, Zhang L, Xie T. The research on the cylinder-plate method applied in measuring the synergiser in the supernatant of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology China*, 2002, 29 (3): 73-74. (in Chinese)
李青,刘华梅,陈振民,张亮,谢天健. 管碟法测定苏云

金杆菌上清液中增效物质含量的研究. 微生物学通报, 2002, 29 (3) : 73-74.

- [14] Zhang L, Liu C, Gao Z, Cao Y, Bai G. Research on the classification of *Streptomyces* strain ZG0429 and purification of streptavidin. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 47 (1) : 7-10. (in Chinese)
张蕾, 刘春琴, 高智慧, 曹宇, 白钢. 链霉菌 ZG0429 的分类鉴定与链霉菌亲和素的分离纯化研究. 微生物学报, 2007, 47 (1) : 7-10.
- [15] Wang P. Rapid determination of amino acid and monosaccharide in bacteria by thin layer chromatography. *Microbiology China*, 1986 13 (5) : 228-231. (in Chinese)
王平. 测定放线菌菌体中氨基酸和单糖的快速方法——薄层层析法. 微生物学通报, 1986, 13 (5) : 228-231.
- [16] Liu Z, Zhang H, Zhou L, Hua Q. Analysis of composition of microorganism cellular fatty acid. *Chemistry and Bioengineering*, 2011, 28 (10) : 85-87. (in Chinese)
柳志杰, 章辉, 周利, 花强. 微生物细胞脂肪酸的组成分析. 化学与生物工程, 2011, 28 (10) : 85-87.
- [17] Du H, Su J, Yu L, Zhang Y. Isolation and physiological characteristics of endophytic actinobacteria from medicinal plants. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53 (1) : 15-23. (in Chinese)
杜慧竟, 苏静, 余利岩, 张玉琴. 药用植物内生放线菌的分离和生物学特征. 微生物学报, 2013, 53 (1) : 15-23.
- [18] Xu P, Li W, Xu L, Jiang C. A microwave based method for genomic DNA extraction from actinomycetes. *Microbiology China*, 2003, 30 (4) : 82-84. (in Chinese)
徐平, 李文均, 徐丽华, 姜成林. 微波法快速提取放线菌基因组 DNA. 微生物学通报, 2003, 30 (4) : 82-84.
- [19] Xu L, Wang E, Shi J. DNA-DNA hybridization and G + C mol% test of rhizobia isolated from astragalus membranaceus. *Journal of Gansu Lianhe University (Natural Sciences)*, 2011, 25 (2) : 55-57. (in Chinese)
徐琳, 王恩军, 石建锋. 膜荚黄芪根瘤菌 DNA 的 G + Cmol% 测定及 DNA-DNA 杂交. 甘肃联合大学学报, 2011, 25 (2) : 55-57.
- [20] Wei G, Chen W, Zhu M. Analysis of 16S rDNA sequence and DNA-DNA hybridization of rhizobia isolated from *Indigofera* sp. *Acta Genetica Sinica*, 2000, 27 (11) : 1027-1032. (in Chinese)
韦革宏, 陈文新, 朱铭莪. 木蓝根瘤菌的 16S rDNA 全序列分析及 DNA-DNA 杂交. 遗传学报, 2000, 27 (11) : 1027-1032.
- [21] 陈耀祖, 涂亚平. 有机质谱原理及应用. 北京: 科学出版社, 2004: 128-129.
- [22] Demain AL, Sanchez S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *Journal of Antibiotic*, 2009, 62 : 5-16.
- [23] Masayuki H. Studies on the isolation and distribution of rare actinomycetes in soil. *Actinomycetologica*, 2008, 22 (1) : 12-19.
- [24] Chen J, Deng X, Ke C, Cui B, Ke B, Liu M, Tan H, Li B. Analysis of the fatty acid components of brucella strains in Guangdong province. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2010, 26 (2) : 131-139. (in Chinese)
陈经雕, 邓小玲, 柯昌文, 崔步文, 柯碧霞, 刘美真, 谭海玲, 李柏生. 广东省布鲁氏菌菌株脂肪酸成分. 中国人兽共患病学报, 2010, 26 (2) : 131-139.
- [25] Liu Z, Cai X, Zhu P, Guan P, Xu W, Wu L. Study on species identification of *Mycobacteria* by gas chromatography analysis of whole-cell fatty acid. *Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases*, 2005, 28 (6) : 403-406. (in Chinese)
刘志辉, 蔡杏珊, 竺澎波, 关平, 许婉华, 吴龙章. 应用气相色谱技术分析全细胞脂肪酸快速鉴定分枝杆菌. 中华结核和呼吸杂志, 2005, 28 (6) : 403-406.
- [26] Bie X, Lu Z, Fang Y, Zeng Q, Lu F, Yuan Y. Identification of a microorganism strain producing the antimicrobial substance with 16S rDNA sequence analysis. *Food Science*, 2006, 27 (11) : 466-470. (in Chinese)
别小妹, 陆兆新, 房耀维, 曾泉, 吕凤霞, 袁勇军. 利用 16S rDNA 序列分析鉴定一株产抗菌物质的微生物菌株. 食品科学, 2006, 27 (11) : 466-470.
- [27] Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O, Krichersky MI, Moore LH, Moore WEC, Murray RGE, Stackebrandt E, Starr MP, Truper HG. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1987, 4 : 463-464.
- [28] Wu XC, Wen YP, Qian CD, Li O, Fang HH, Chen WF. Taxonomic study of a chromomycin-producing strain and reclassification of *Streptomyces cavourensis* subsp. *Washingtonensis* as a later synonym of *Streptomyces griseus*. *International Journal of Systematic and*

Evolutionary Microbiology, 2008, 58: 2783-2787.

Bacteriology, 1978, 28: 45-53.

[29] Skarbek JD, Brady LR. *Streptomyces cavourensis* sp. nov. (nom. rev.) and *Streptomyces cavourensis* subsp. *Washingtonensis* subsp. nov., a chromomycin-producing subspecies. *International Journal of Systematic*

[30] Nakagawa K, Hara C, Tokuyama S, Tokuyama S, Takada K, Imamura N. Saprolymycins A-E, new angucycline antibiotics active against *Saprolegnia parasitica*. *The Journal of Antibiotics*, 2012, 65: 599-607.

Isolation, identification of TJ430 strain and characterization of its antifungal metabolite

Shaobin Yang, Yongchun Huang^{*}, Changrong Wang, Peng Zhao, Wei Zhang

Institute of Agro-environment Protection, Ministry of Agriculture, Tianjin 300191, China

Abstract: [Objective] To screen new agro-antibiotics, rare actinomycetes were isolated by improved separation methods from soil samples and the chemical structure of the antifungal active product was elucidated. [Methods] Dry heating method was used for soil samples pretreatment and the improved HV separation medium for rare actinomycetes separation; agar block rapid screening was used for the rapid evaluation of rare actinomycetes biological activity. For the identification of a strain numbered TJ430, morphology observation, cell chemical composition analysis, physiological and biochemical analysis, enzymology characteristics analysis, 16 S rDNA sequence analysis, and DNA hybridization method were used. Bioactive crude extract from fermentation was purified by column chromatography and preparative chromatography; infrared spectroscopy and high resolution mass spectrometry was used for structure elucidation of bioactive ingredient. [Results] A total of 570 rare actinomycetes strains were isolated. Antibacterial activity of rapid screen showed that the numbed TJ430 strain showed excellent anti oomycetes and broad-spectrum antifungal activity. Strain identification results show that the strain is a *S. cavourensis*. The molecular formulas of the effective ingredient is $C_{40}H_{66}N_3O_{11}$, molecular weight is 765. Amino, methyl, methylene, carbonyl, covalent bond, isopropyl and other chemical groups should contained in the molecular. [Conclusion] The characterized antibacterial active ingredient has good development prospect.

Keywords: strain identification, agro-antibiotic, purification, structure elucidation

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Natural Science Foundation of Tianjin of China (12JCYBJC19900)

^{*} Corresponding author. Tel: +86-22-23618072; E-mail: nylab@126.com

Received: 11 December 2013 / Revised: 27 January 2014