

固相微萃取-气质法测定土壤挥发性抑菌物质*

许传坤 莫明和 张克勤**

(云南大学生物资源保护与利用国家重点实验室培育基地 昆明 650091)

摘要: 运用固相微萃取-气相色谱/质谱法 (SPME-GC/MS), 测定了参与土壤抑真菌作用的土壤挥发性成分和土壤细菌挥发性代谢物。通过比较土壤来源和土壤细菌来源的挥发性抑菌成分, 发现在强挥发性抑菌土壤和土壤细菌代谢物中普遍存在着三甲胺、二甲基二硫醚、3-甲基-2-戊酮、甲基吡嗪、2, 5-二甲基吡嗪、N, N-二甲基辛胺、十九烷等化合物。这些化合物很有可能就是参与土壤抑菌作用, 特别是挥发性物质抑菌作用的主要成分。另外, 为深入了解土壤中参与抑菌作用的挥发性化合物提供了简便有效的方法。

关键词: 固相微萃取, 土壤抑真菌作用, 气相色谱/质谱, 挥发性抑真菌物质

中图分类号: Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 05-0014-05

Identification of Volatile Fungistatic Compounds by Spme-GC/MX

XU Chuan-Kun MO Ming-He ZHANG Ke-Qin**

(Key Laboratory of Conservation and Utilization for Bioresource, Yunnan University, Kunming 650091)

Abstract: The composition of volatile compounds of soils and that of soil bacterial metabolites were identified by using the SPME-GC/MS method. Results showed that some compounds, trimethylamine, 3-methyl-2-pentanone, dimethyl disulfide, methyl pyrazine, 2, 5-dimethyl-pyrazine, benzaldehyde, N, N-dimethyloctylamine and nonadecane, subsisted commonly in soils and soil bacterial metabolites with strong fungistatic activity. These compounds may be the key antifungal factors in soil fungistasis, especially soil volatile fungistasis. Otherwise, the method used in this study was a good tool for further study of soil volatile fungistasis.

Key words: SPME, Soil fungistasis, GC/MS, Volatile fungistatic compound

通常, 真菌的繁殖体由于土壤抑真菌作用 (soil fungistasis) 的影响, 不能正常萌发^[1]。自从 Dobbs & Hinson^[2] 于 1953 年首次报道“土壤抑真菌作用”这一现象以来, 在随后的近 50 年里, 这一现象便成为了微生物土壤生态学领域中的研究热点之一。针对植物病虫草害开发的生物防治剂往往由于土壤抑菌作用导致生防菌孢子不能正常萌发而防效大为降低。故这一作用的机理也成为了生防研究的重点之一。影响土壤抑菌作用的许多因素, 如土壤理化条件、环境条件、真菌对土壤抑菌作用的敏感性、土壤中微生物群落组成等, 得到了广泛深入的研究^[1-4]。许多研究认为土壤中存在抑制繁殖体萌发的抑制因子, 特别是挥发性物质, 能够强烈地抑制真菌孢子的萌发。氨气、乙烯、烯丙醇等小分子化合物被证实在土壤抑菌过程中发挥着极其重要的作用^[1,5-7]。但是, 由于它们极强的挥发性和极低的浓度, 这些小分子化合物在研究中很难被检测。

* 国家自然科学基金项目, 云南省自然科学基金联合资助

科技部攻关项目 (No. 2002BA901A21)

云南省应基重点项目 (No. 2000C0012Z)

** 联系人 Tel: 0871-5034878, E-mail: kqzhang1@yahoo.com.cn

收稿日期: 2003-10-08, 修回日期: 2003-12-03

固相微萃取技术 (SPME) 是近年来发展起来一种无需溶剂, 集萃取、浓缩和进样为一体的样品前处理技术^[8], 广泛地应用于食品、香料、药品、尿样、环境污染物质、水体等痕量物质的检测^[9]。利用 SPME 纤维头薄膜对化合物的吸附、富集, 再与气相色谱/质谱联用, 最高可达 10^9 的检测级别。

本文利用顶空固相微萃取-气相色谱/质谱联用法, 对产生强抑真菌作用的土壤挥发性气体和土壤微生物挥发性代谢产物进行了定性分析。通过比较其共同性, 试图了解抑菌性土壤挥发成分的构成和产生来源, 并且为挥发性土壤抑菌物质的跟踪、检测鉴定建立一个简便高效的方法。

1 材料与方法

1.1 样品

从云南不同地区采集的, 经测定对真菌具有广泛抑制作用的土壤 (土壤对真菌孢子萌发的平均抑制率达到 70% 以上): X27、X55、X30、X67。从土壤中分离的可产生强抑制真菌孢子萌发气体的细菌菌株: S2715、S5502、S3010、S6703、S7406。

1.2 仪器

HP6890 气相色谱/5973 质谱联用仪 (Agilent Technologies, USA)。

SPME 手柄、SPME 样品萃取标准操作台 (Supelco, USA)、15 mL 顶空样品瓶。

SPME 萃取头: 100 μm PDMS 纤维头、75 μm CAR/PDMS 纤维头、65 μm PDMS/DVB 纤维头、65 μm CW/DVB 纤维头 (Supelco, USA)。

1.3 样品预处理

土样: 准确称取 2.0 g 新鲜土样于 15.0 mL 顶空样品瓶中, 加 0.2 mL 无菌水, 加盖密封, 室温下平衡 5 d。细菌: 接种于牛肉膏蛋白胨液体培养基中 37°C 摇瓶培养 24 h 后, 取 2.0 mL 发酵液于 15.0 mL 顶空瓶中, 加盖密封, 4°C 冰箱保藏。

1.4 分析步骤

将顶空瓶置于样品萃取台上, 将 SPME 的针头穿透样品瓶胶塞, 压下活塞使纤维头伸出不锈钢套管后暴露于样品上层空气中。固体土样, 室温下吸附 10 h; 细菌发酵液用磁力搅拌子中速搅拌, 加热, 吸附, 萃取 10 min, 迅速将纤维头缩回并拔出针头, 立即插入气相色谱的气化室, 推出纤维, 利用气化室高温热解析目标待测物 1~2 min。

1.5 GC/MS 条件

HP-5MS 石英毛细管柱; 载气为 He, 流速 1.0 mL/min; 进样口温度 250°C; 炉温: 起始 50°C, 保持 2 min, 以 8°C/min 升温至 180°C, 再以 10°C/min 升温至 240°C, 保持 5 min; 分流进样, 分流比 30:1; GC/MS 接口温度 280°C; 质谱扫描范围 35~550 u; 离子源: EI 源; 电子能量: 70 eV; 谱图检索: 采用 Wiley27.3 和 Nist98 谱库进行检索。

2 结果与讨论

2.1 萃取头选择

萃取头的选择是 SPME 的核心问题。非极性 100 μm PDMS 纤维头对非极性、弱极性 or 亲脂性组分灵敏度较高; 弱极性的 65 μm PDMS/DVB 纤维头对极性和非极性组分都有较好的吸附能力; 65 μm CW/DVB 纤维头对极性, 特别是水溶性较好的化合物有较高灵敏度; 而 75 μm CAR/PDMS 纤维头对于挥发性较强的, 如气体硫化物有很好的吸附

性¹⁹。我们分别用这四种萃取头,对空白牛肉膏蛋白胨液体培养基进行了 SPME-GC/MS 测定。结果显示,在空白牛肉膏蛋白胨液体培养基中,主要存在苯甲醛、苯乙醛、辛醛、环辛烷、壬醛、癸醛、十八醛、2-十一烯醛、十六醇、十七醇、二十五烷等化合物。通过比较出峰数和物质检出情况(表1),发现 75 μm CAR/PDMS 纤维头较其它 3 种

表 1 不同 SPME 纤维头的萃取能力比较

萃取头	出峰数	检出化合物数*
75 μm CAR/PDMS	28	11
65 μm CW/DVB	22	8
65 μm PDMS/DVB	19	8
100 μm PDMS	16	7

* 匹配率 $\geq 80\%$

萃取头,萃取范围宽,可检出化合物数多,对于极性、非极性和弱极性的挥发性小分子化合物具有很强的吸附能力。考虑到土壤抑菌作用发生于自然条件下,参与抑菌过程的挥发性成分的沸程必然较低,而且其中挥发性较强的极性、非极性和弱极性物质都可能存在,故最终选择 75 μm CAR/PDMS 纤维头进行挥发性抑菌物质的测定。

2.2 萃取条件优化

萃取温度、萃取时间也是 SPME 的重要影响因素。我们以空白牛肉膏蛋白胨液体培养基为测定样品,选用 75 μm CAR/PDMS 萃取纤维头,比较了不同萃取温度: 20 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $^{\circ}\text{C}$ 、50 $^{\circ}\text{C}$ 、80 $^{\circ}\text{C}$ 、100 $^{\circ}\text{C}$,不同萃取时间: 1 min、5 min、10 min、20 min、60 min 对萃取结果的影响(表2)。

表 2 不同萃取条件对 SPME-GC/MS 的影响

萃取条件		出峰数	可检出化合物数
温度 ($^{\circ}\text{C}$)	时间 (min)		
20	10	5	1
30		8	4
50		28	11
80		29	8
100		26	7
	1	4	0
	5	25	7
50	10	28	11
	20	28	11
	60	28	11

萃取温度低时,化合物不易挥发,顶空浓度较低,可吸附的化合物相对较少;温度高时,化合物挥发性增强,顶空浓度增加,可吸附化合物较多,但多数化合物与萃取头的吸附过程为放热过程,高温反而不利于萃取。故温度在 30 $^{\circ}\text{C}$ ~ 50 $^{\circ}\text{C}$ 范围较适于对挥发性物质的吸附萃取。试验结果显示:萃取时间 10 min, 30 $^{\circ}\text{C}$ 以下时,出峰数和可检出化合物种类很少; 50 $^{\circ}\text{C}$ 时,出峰数和可检出化合物数分别达到 28 和 11;而当温度升高至 80 $^{\circ}\text{C}$ 时,出峰数虽有增加,但可检出化合物数量明显减少。故 50 $^{\circ}\text{C}$ 为 75 μm CAR/PDMS 萃取纤维头的较适吸附温度。

在同一温度条件下,萃取纤维对待测物的萃取量与其在液相中的浓度和萃取时间成正比。50 $^{\circ}\text{C}$ 下, 1 min 时,多数化合物与萃取涂层的吸附尚未达到平衡; 5 min 时,挥发性较强的化合物,如苯甲醛、苯乙醛已达平衡;但挥发性较弱的组分,如癸醛、十八醛、2-十一烯醛、十六醇、十七醇、二十五烷等,要 10 min 才能达到平衡。但继续延

长萃取时间,已无助于提高萃取效果。且如果系统气密性不好,挥发性的化合物反而易于损失。另外,萃取温度过高或时间过长都会使 SPME 纤维头带上大量水分,影响 GC/MS 的检测和色谱柱寿命。

2.3 强抑菌性土壤挥发性成分和强抑菌性土壤细菌挥发性代谢物分析

土壤挥发性成分较为复杂,4种供试土样鉴定出组分16~21种(表3),占挥发性成分的80%左右。同时存在于所有土样中的组分有甲胺、三甲胺、二丁酮、二甲基二硫醚、3-甲基-2-戊酮、甲基吡嗪、2,5-二甲基吡嗪、苯、甲苯、乙基苯、苯甲醛、苯乙醛、N,N-二甲基辛胺、十九烷、二十烷等15种化合物。细菌发酵液中挥发性成分明显较土壤中的简单。除去空白培养基中的挥发性成分,我们比较5株不同土壤来源的细菌,发现在其代谢产物中,普遍存在着三甲胺、二甲基二硫醚、3-甲基-2-戊酮、甲基吡嗪、2,5-二甲基吡嗪、苯甲醛、N,N-二甲基辛胺、十九烷等易挥发性化合物。但从这些化合物的质量分数上看,没有浓度特别高的主导化合物。另外,这些化合物累计在总挥发性成分中比例达到80%以上,再一次肯定了 this 检测方法的可行性。

2.4 土壤挥发性成分和土壤细菌挥发性代谢物比较

通过比较强抑菌性土壤和土壤细菌代谢物中的挥发性成分(表3,图1),我们发现8种挥发性化合物,三甲胺、3-甲基-2-戊酮、二甲基二硫醚、甲基吡嗪、2,5-二甲基吡嗪、苯甲醛、N,N-二甲基辛胺和十九烷,普遍存在于土壤和细菌代谢物中。除三甲胺曾被研究对 *Geotrichum candidum* 的孢子萌发有抑制作用外^[10],其它均未见报道。但它们很可能就是参与土壤抑菌作用的主要挥发性物质,并且很可能就是由土壤中的微生物,特别是细菌的代谢过程产生。碱性环境被认为是导致土壤抑菌作用的一个重要因素,而三甲胺和N,N-二甲基辛胺都属于胺类化合物,能够使土壤pH升高,从而对真菌产生抑制作用。当然,挥发性化合物对真菌的抑制作用的机理不仅如此,它们还可能是引起真菌孢子细胞膜透性、渗透压改变或介导某种反应的关键因素。

表3 典型强抑菌性土壤(X27)和土壤细菌(S7406)代谢物中挥发性成分

化合物	质量分数(%)	
	土壤	土壤细菌
甲胺	2.98	-
三甲胺	4.07	5.82
乙烷	-	5.66
3-甲基戊烷	-	1.38
二丁酮	1.39	-
己烷	-	3.29
3-甲基-2-戊酮	3.15	5.24
二甲基二硫醚	9.81	6.37
甲基吡嗪	3.74	4.05
2,5-二甲基吡嗪	4.81	4.96
苯	5.72	-
乙基苯	1.34	-
甲苯	2.67	-
1,3-二甲基苯	1.79	-
1,2-二甲基苯	0.43	-
苯甲醛	5.67	6.59
苯乙醛	1.14	-

续表 3

N, N-二甲基辛胺	4.38	4.18
壬醛	3.81	2.94
甲酸辛酯	0.35	-
十九烷	0.21	5.47
二十烷	0.44	-

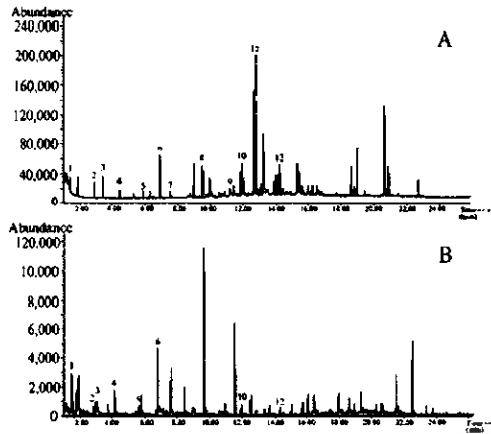


图 1 典型强抑菌性土壤细菌挥发性成分和土壤挥发性成分总离子流图

A 显示强挥发性抑菌活性的细菌, B 强挥发性抑菌活性的土壤

- 1 三甲胺, 2 3-甲基-2-戊酮, 3 二甲基二硫醚, 4 甲基吡嗪, 5 2, 5-二甲基吡嗪, 6 苯甲醛, 7 辛醛, 8 壬醛, 9 癸醛, 10 N, N-二甲基辛胺, 11 (E)-2-癸烯醇, 12 十九烷

3 结论

从试验结果可以看出, 通过对 SPME 和 GC/MS 条件优化, 固相微萃取-气相色谱/质谱法用于土壤挥发性成分和微生物挥发性代谢物检测时, 方法简便, 并且可以达到很高的灵敏度。比较强抑菌性土壤挥发性成分和强抑菌性土壤细菌挥发性代谢物后, 我们发现三甲胺、3-甲基-2-戊酮、二甲基二硫醚、甲基吡嗪、2, 5-二甲基吡嗪、苯甲醛、N, N-二甲基辛胺和十九烷等挥发性化合物普遍存在于其中, 很有可能就是参与土壤抑菌作用的重要挥发性抑制物。但是否如此, 还需结合体外抑菌作用测定等实验的结论来进一步深入研究。

参考文献

- [1] Lockwood J L. *Biological Reviews*, 1977, **52**: 1~36.
- [2] Dobbs C G, Hinson W H. *Nature*, 1953, **172**: 197~199.
- [3] Kouyeas V, Balis C. *Ann de L' Inst Phytopath Benaki (N S)*, 1968, **8**: 123~44.
- [4] Schuennp H, Frei E. *Can Microbiol*, 1969, **15**: 1273~1279.
- [5] Hora T S, Baker R. *Nature*, 1970, **225**: 1071~1072.
- [6] Smith A M. *Nature*, 1973, **246**: 311~313.
- [7] Ko W H, Hora F K, Herlieska E. *Phytopathology*, 1974, **64**: 1398~1400.
- [8] 吴广枫, 汤坚. *食品工业科技*, 2002, **9**: 96~98.
- [9] 卢培标, 文东宇. *广东公安科技*, 1999, **4**: 13~16.
- [10] Robinson P M, Mckee N D, Thompson L A A, *et al.* *Mycological Research*, 1989, **93**: 214~222.