

研究报告

抗水稻黄单胞菌的苏云金芽胞杆菌菌株筛选及其活性物质

王云鹏¹ 徐柳¹ 喻子牛^{1,2} 张吉斌^{1*}

(1. 华中农业大学 农业微生物学国家重点实验室 生命科学技术学院 微生物农药国家工程研究中心
湖北 武汉 430070)

(2. 武汉亿倍生物工程有限公司 湖北 武汉 430070)

摘要:【目的】从 400 株苏云金芽胞杆菌菌株中筛选出拮抗水稻黄单胞菌活性最好的菌株 YBT-2532, 并对其抑菌活性物质进行分离。【方法】对苏云金芽胞杆菌 YBT-2532 产生的活性物质理化特性进行测定。【结果】该活性物质对温度、蛋白酶、pH 均不敏感, 70 °C 处理 1 h 仍保留有 75% 的活性; 活性物质在 pH 2.0–12.0 较稳定; 该活性物质溶于甲醇、微溶于乙醇、不溶于丙酮、二氯甲烷和氯仿。利用凝胶过滤、离子交换层析、固相萃取、高效液相色谱技术, 对抑菌组分进行分离, 并通过 HPLC-IT-MS 方法确定其分子量。纯化的活性组分是一种分子量为 797.8 Da 的强极性水溶性小分子。【结论】该活性物质性质与已知的来源于苏云金芽胞杆菌的抗菌活性物质不同, 可能为新型抗菌物质。

关键词: 苏云金芽胞杆菌, 水稻黄单胞菌, 抑菌活性物质, 分离纯化

Characterization of an antibacterial substance from *Bacillus thuringiensis* against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

WANG Yun-Peng¹ XU Liu¹ YU Zi-Niu^{1,2} ZHANG Ji-Bin^{1*}

(1. State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Life Science and Biotechnology, National Engineering Research Center of Microbial Pesticides, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

(2. Wuhan Yiji Bioengineering Limited Company, Wuhan, Hubei 430070, China)

Abstract: [Objective] Strain YBT2532 was screened from 400 *Bacillus thuringiensis* strains against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Its antimicrobial substance was isolated. [Methods] Physical and biochemistry characteristics of the antimicrobial active substance produced by the *B. thuringiensis* strain YBT-2532 were determined. [Results] It is not sensitive to temperature, protease and pH. After incubation at 70 °C for 1 h, still 75% activity retained. Proteinase K, trypsin and pepsin had no effect on its activity. The active substance was stable in the pH range between 2.0 and 12.0. It can be dissolved in water and methanol, weakly dissolved in ethanol, insoluble in acetone, chloroform and dichloromethane. Purification of the active substance was achieved using gel chromatography, ion exchange chromatography, solid phase extraction and HPLC. The purified active substance was

*通讯作者: Tel: 86-27-87287701-8206; ✉: zhangjb@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2015-01-08; 接受日期: 2015-05-11; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-05-13

analyzed by HPLC-IT-MS. It is a polar water soluble small molecule of 797.8 Da. **[Conclusion]** A new antibacterial substance was obtained from an isolate of *Bacillus thuringiensis*.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, Antimicrobial substance, Purification

全世界有 27 亿人以水稻为主食, 90% 的水稻产自亚洲, 水稻白叶枯病是对水稻危害最严重的三大病害之一^[1], 在十大病原微生物中, 水稻黄单胞菌排名第四^[2]。目前水稻白叶枯病防治仍以化学农药为主, 而化学农药有污染环境、对人畜不安全、破坏生态环境等弊端。生物防治具有环境友好、易降解、对人畜无害等优点, 是防治植物病害的可行方案^[3]。

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)是目前最成功的生物农药^[4], 主要应用于植物害虫的防治。其在生长代谢过程中, 分泌了细菌素、脂肽、嗜铁素、几丁质酶、双效菌素等多种类型的抗菌活性物质。其中细菌素是具有杀菌或抑菌作用的肽类或蛋白质类物质, 通常只对同种或近缘种有抑菌或杀菌活性; 脂肽是一种表面活性剂, 可开发为环境友好型生物农药; 双效菌素是对多种植物病原真菌和细菌有抑制活性的小分子胺基多元醇类抗生素, 其抑菌机制尚不明确; 嗜铁素能结合微生物周围环境中极低浓度的 Fe^{3+} , 并将其运送到细胞内, 从而使产生菌与不能分泌嗜铁素的微生物相比, 获得了竞争优势, 从而杀死病原菌。人们对苏云金芽胞杆菌杀虫活性物质研究较多, 但对其杀菌活性发掘的较少。

本研究以水稻黄单胞菌为病原指示菌, 以 400 株苏云金芽胞杆菌菌株为菌种资源, 筛选出的具有拮抗水稻黄单胞菌的菌株。通过凝胶过滤、离子交换层析、固相萃取和高效液相色谱提取纯化该抗菌物质, 并对该物质的理化性质进行测定, 为该物质的鉴定及将来合理利用该物质打下基础。

1 材料与方法

1.1 菌种

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*)菌株

400 株, 由华中农业大学微生物学国家重点实验室菌种保藏中心提供。

水稻黄单胞菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*), 由华中农业大学微生物学国家重点实验室菌种保藏中心提供。

1.2 培养基

TSB 培养基用于 YBT2532 菌种的发酵, 协本氏培养基用于培养水稻黄单胞菌和测定抑菌活性, LB 培养基用于培养大肠杆菌和测定抑菌活性, PSA 培养基用于培养病原真菌和测定抑菌活性。以上培养基的配制方法参照文献[5-7]。

1.3 实验方法

1.3.1 拮抗菌株初筛: 采用打孔平板对峙法。苏云金芽胞杆菌摇瓶培养 48 h 后, 取 1 mL 发酵液, 4 °C、8 000 r/min 离心 15 min 去除菌体。打孔扩散法检测发酵液上清对水稻黄单胞菌的抑制活性。40 mL PSA 固体培养基加热融化后, 自然冷却至 50 °C 左右, 加入培养至对数生长期的水稻黄单胞菌菌液 200 μ L, 摇匀后倒平板。培养基凝固后, 用直径 5 mm 的打孔器均匀打 6 个孔, 每株菌发酵液上清加 3 个孔, 每孔加 100 μ L 发酵液上清。28 °C 恒温培养 36 h 后观察抑菌效果。

1.3.2 拮抗菌株复筛: 初筛有效果的菌株(点样孔周围有明显的透明抑菌圈), 为确定是菌体还是发酵液上清中的活性物质起的抑菌作用, 发酵液上清用 0.22 μ m 滤膜过滤除菌 2 次, 打孔扩散法检测对水稻黄单胞菌的抑制效果, 每株菌 3 个重复。

1.3.3 温室生防实验: (1) 水稻栽培。水稻种子用比重为 1.13 的 NaCl 溶液浸泡 1 h, 取用沉入底部的种子, 丢弃漂浮在水面的种子, 28 °C 蒸馏水浸种 3 d, 用 55 °C 温水浸种 2 h 对种子进行消毒。每个塑料碗内放入 800 g 经过灭菌处理的大田土, 将种

子放在土壤表面,每碗放 10 粒种子,种子发芽后,拔除生长不好的幼苗,每碗剩余 5 棵长势良好的幼苗。(2) 病原菌及生防样品制备。250 mL 三角瓶中装入 50 mL PSA 液体培养基,加入 100 μ L 水稻黄单胞菌菌种,28 $^{\circ}$ C、175 r/min 摇床培养 24 h 活化菌种。250 mL 三角瓶中装入 50 mL PSA 液体培养基,加入 100 μ L 经过活化的水稻黄单胞菌菌种,28 $^{\circ}$ C、175 r/min 摇床培养 17 h 至对数生长期。稀释涂布法用无菌 PSA 培养基将病原菌悬液菌浓调至 10^8 CFU/mL。农用链霉素药剂按照使用说明配制,每克农用链霉素粉剂兑 4 L 无菌水。250 mL 三角瓶中装入 50 mL TSB 液体培养基,加入 100 μ L 苏云金芽孢杆菌菌种,28 $^{\circ}$ C、175 r/min 摇床培养 12 h 活化菌种。250 mL 三角瓶中装入 50 mL TSB 液体培养基,加入 100 μ L 经过活化的苏云金芽孢杆菌菌种,28 $^{\circ}$ C、175 r/min 培养 48 h 活化菌种。发酵液 8 000 r/min 离心 15 min 去除菌体,得到发酵液上清。YBT-2532 发酵液上清拮抗水稻黄单胞菌活性物质粗提物制备方法为:YBT-2532 发酵液上清用冷冻干燥的方法浓缩 5 倍,浓缩液过葡聚糖凝胶柱 G-10,流动相为蒸馏水,流速 0.8 mL/min,检测波长 220 nm,回收第二个峰,回收液用冷冻干燥的方法浓缩 2 倍。(3) 实验分 4 组,分别为阴性对

照组、阳性对照组、发酵液上清处理组、粗提物处理组,每组 4 碗水稻,每碗 5 棵水稻,做 3 个重复。水稻种植 1 个月后,剪叶法接种病原菌,用无菌手术刀蘸取菌浓为 10^8 CFU/mL 的水稻黄单胞菌悬液,剪去水稻约 1 cm 长叶尖,阴性对照组接种无菌 TSB 培养基,每棵水稻接种 2 片叶片。分别于接种 2 d 和 9 d 后喷施生防药剂,阴性对照组每碗水稻喷施 20 mL 无菌 TSB 培养基,阳性对照组每碗水稻喷施 6.75 mL 农用链霉素,发酵液上清处理组每碗水稻喷施 20 mL 发酵液上清,粗提物处理组每碗水稻喷施 15 mL 活性物质粗提物。接种 15 d 后统计发病叶片病斑长度/叶片长度的百分比,作为病情指标。具体方法如图 1 所示。

1.3.4 活性物质理化性质研究: (1) 对温度的敏感性。制备 YBT-2532 发酵液,8 000 r/min 离心 15 min 去除菌体,冷冻干燥法将发酵液上清浓缩 2 倍,取发酵液上清浓缩液 5 mL,过滤除菌后分装成 10 份,每份 500 μ L。其中 9 份分别用 30、40、50、60、70、80、90 和 100 $^{\circ}$ C 水浴锅水浴处理 1 h 后,115 $^{\circ}$ C 再处理 30 min,一份不做处理为对照。0.22 μ m 滤膜过滤除菌后,打孔扩散法检测对水稻黄单胞菌的抑制活性,重复 3 次。(2) 对蛋白酶的敏感性。制备 YBT-2532 发酵液,8 000 r/min 离心 15 min 去除菌

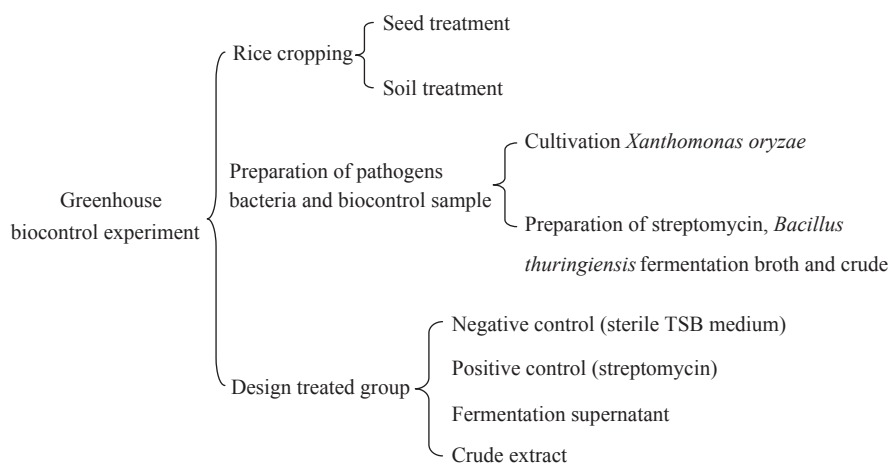


图 1 温室生防实验流程图

Figure 1 Flowchart of the greenhouse biocontrol experiment

体,取发酵液上清 8 mL,分装成 4 份,每份 2 mL,冷冻干燥法制成粉末。其中 3 份分别用 1 g/L 的蛋白酶 K 溶液、胰蛋白酶溶液、胃蛋白酶溶液 1 mL 复溶处理,处理温度均为 37 °C,处理时间均为 2 h,第 4 份用 1 mL 蒸馏水复溶,37 °C 水浴处理 2 h 为对照,0.22 μm 滤膜过滤除菌后,打孔扩散法检测对水稻黄单胞菌的活性,重复 3 次。(3) 对 pH 的敏感性。制备 YBT-2532 发酵液,8 000 r/min 离心 15 min 去除菌体,取发酵液上清 120 mL,冷冻干燥法浓缩至 60 mL,分装成 12 份,每份 5 mL,其中 11 份 pH 分别调至 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0,4 °C 放置 2 h,一份 pH 不做任何处理作为对照,0.22 μm 滤膜过滤除菌后,打孔扩散法检测对水稻黄单胞菌的活性,重复 3 次。检测后的 pH 为 2.0、3.0 和 4.0 的 3 组调回至 pH 9.0 附近,0.22 μm 滤膜过滤除菌后,打孔扩散法检测对水稻黄单胞菌的活性。pH 为 2.0、3.0 和 4.0 三组分别取出 1 mL,8 000 r/min 离心 5 min,沉淀用 1 mL 蒸馏水复溶,pH 值调至 9.0 附近,0.22 μm 滤膜过滤除菌后,打孔扩散法检测对水稻黄单胞菌的活性,重复 3 次。(4) 活性物质的亲水性分析。制备 YBT-2532 发酵液,8 000 r/min 离心 15 min 去除菌体,取发酵液上清 150 mL,分装成 5 份,每份 30 mL,冷冻干燥成粉末。分别用 30 mL 二氯甲烷、氯仿、丙酮、乙醇、甲醇复溶,4 °C 放置 2 h,8 000 r/min 离心 15 min,沉淀用 6 mL 蒸馏水复溶,pH 值调至 9.0 附近,上清 40 °C 旋转蒸发蒸干后用 6 mL 蒸馏水复溶,pH 值调至 9.0 附近,0.22 μm 滤膜过滤除菌后,打孔扩散法检测对水稻黄单胞菌的活性,发酵液上清 2 倍浓缩液为对照,重复 3 次。(5) 活性物质分子量初测。制备 YBT-2532 发酵液,8 000 r/min 离心 15 min 去除菌体,取 10 mL 发酵液上清,冷冻干燥法浓缩至 5 mL,发酵液上清浓缩液加入 10K 超滤管,6 000 r/min 离心至截留液为 500 μL,加入 10 mL 蒸馏水冲洗,6 000 r/min 离心至截留液为 1 mL;滤过液用 3K 超滤管超滤,

方法同上。3K 超滤管超滤冷冻干燥浓缩至 5 mL,将发酵液上清分为 10K 以上、3-10K、3K 以下 3 部分,0.22 μm 滤膜过滤除菌后,打孔扩散法检测对水稻黄单胞菌的活性,以发酵液上清 2 倍浓缩液为对照,重复 3 次。

1.3.5 凝胶层析:制成内径为 10 mm,高度为 450 mm 的葡聚糖凝胶 G-10 柱,上样液为发酵液上清 5 倍浓缩液,流动相为超纯水,流速为 0.8 mL/min,检测波长为 220 nm。回收各峰,打孔扩散法测定抑菌活性。

1.3.6 离子交换层析:制成内径为 10 mm、高度为 350 mm 的碱性阴离子 DEAE-52 柱,上样液为凝胶层析柱回收的峰 2,流动相为 pH 7.4 的 0.02 mol/L Tris-HCl 缓冲液和 0.02 mol/L Tris-HCl 缓冲液(内含 0.2 mol/L NaCl),流动相流速为 1 mL/min,检测波长为 220 nm。回收各峰,打孔扩散法测定抑菌活性。

1.3.7 固相萃取:选用 Supelclean™ LC-18 SPE 固相萃取柱,上样液为离子交换层析活性段,依次用 3 mL 超纯水、20%甲醇水溶液、40%甲醇水溶液、60%甲醇水溶液、80%甲醇水溶液和 100%甲醇冲洗,收集冲洗液,打孔扩散法测定抑菌活性。

1.3.8 全波长扫描:用紫外分光光度计进行全波长扫描,以固相萃取层析活性段为样品,扫描波长范围为 190-800 nm,每隔 1 nm 采样。初步判断 YBT-2532 拮抗水稻黄单胞菌活性物质的紫外吸收特性。

1.3.9 高效液相色谱:高效液相色谱采用 Agilent TC-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)反相柱。流动相为 5%甲醇溶液,回收各个峰,打孔扩散法测定抑菌活性。

1.3.10 二维液相色谱-离子阱质谱:采用二维液相色谱-离子阱质谱(LC-IT-MS)对回收液相活性段进行鉴定。使用 Agilent 1100 series 液质联用系统,液相条件如下:流动相组成 5%甲醇溶液,流速 0.4 mL/min,进样量 5 μL,检测波长 210 nm;质谱条件如下:离子源 ESI(正离子模式),干燥温度 320 °C,氮气压 0.28 MPa,干燥气流 10 mL/min,

毛细管电压 3 500 V, 出口毛细管电压 121.0 V, 扫描范围 50–800 m/z 。

2 结果

2.1 苏云金芽胞杆菌菌株抗水稻黄单胞菌离体筛选

对 400 株苏云金芽胞杆菌进行了抗水稻黄单胞菌初筛, 51 株菌株对水稻黄单胞菌有活性, 对初筛有活性的 51 株菌株发酵液上清经过过滤除菌后, 有 3 株 Bt 菌株仍表现出对水稻黄单胞菌的抑制活性, 分别是 YBT-2368、YBT-2474、YBT-2532。在孔的周围没有长出 Bt 菌落的情况下, 仍有明显的透明抑菌圈(图 2), 说明上述 3 株 Bt 菌株生长代谢过程中, 分泌了抑制水稻黄单胞菌的活性物质。

2.2 温室实验

接种 15 d 后测量发病叶片病斑长度/叶片长度, 统计病斑长度占接种叶片长度的比例, 用 SPSS 软件进行处理, 阳性对照组、发酵液上清处理组和活性物质粗提物处理组都与阴性对照组有显著差异(表 1)。

2.3 活性物质理化性质

2.3.1 温度敏感性: YBT-2532 拮抗水稻黄单胞菌活性物质经过 30 °C 和 40 °C 处理 1 h 对活性没有影响; 50、60、70 °C 处理 1 h, 活性物质活性有所下降; 80、90、100 °C 处理 1 h, 活性物质活性完全消失(表 2)。

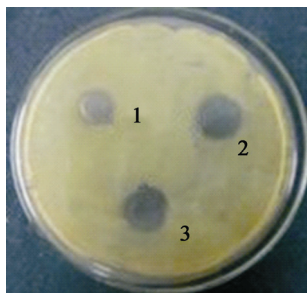


图 2 YBT-2368、YBT-2474、YBT-2532 无菌发酵液上清抑菌实验

Figure 2 The antibacterial activity of the filtered supernatant fluid of *Bacillus thuringiensis* strains YBT-2368, YBT-2474, YBT-2532

Note: 1: YBT-2368; 2: YBT-2474; 3: YBT-2532.

表 1 苏云金芽胞杆菌 YBT-2532 对水稻黄单胞菌的生防指标

Table 1 The biocontrol efficacy of *B. thuringiensis* YBT-2532 against rice bacterial blight

处理组 Treatment group	病斑长/叶长 Lesion length/Leaf length (%)
阴性对照 Negative control	47±9 c
阳性对照 Positive control	40±6 b
发酵液处理组 Broth treated group	39±4 b
粗提物处理组 Crude extract-treated group	33±6 a

注: 不同字母代表不同处理组之间存在显著差异, $P < 0.05$ 。

Note: Different letters represent significant differences between treatment groups, $P < 0.05$.

2.3.2 蛋白酶的敏感性: 经过胰蛋白酶、胃蛋白酶、蛋白酶 K 处理后, 活性物质仍保持着对水稻黄单胞菌的抑制活性, 说明 3 种蛋白酶均对活性物质没有影响。3 种蛋白酶均对水稻黄单胞菌无抑制活性(图 3)。

2.3.3 pH 的敏感性: 发酵液上清 pH 调至 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 时活性大大减弱, pH 调至 10.0、11.0、

表 2 温度对 YBT-2532 发酵液上清抗水稻黄单胞菌活性物质的影响

Table 2 Effect of heat on the activity of the antibacterial compounds produced by YBT-2532 against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

处理温度 Treat temperature (°C)	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter (mm)	保留活性 Retention activity (%)
20	22.2±0.3	100
30	22.2±0.3	100
40	22.2±0.3	100
50	21.2±0.3	95
60	20.2±0.3	91
70	16.7±0.3	75
80	0	0
90	0	0
100	0	0

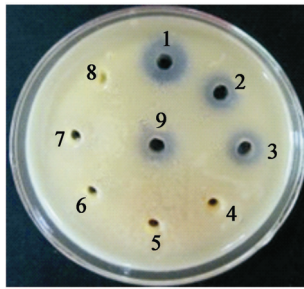


图3 蛋白酶对 YBT-2532 拮抗水稻黄单胞菌活性物质活性的影响

Figure 3 Effect of proteases on the activity of the antibacterial compounds produced by YBT-2532 against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

注: 1、2、3: 蛋白酶 K、胰蛋白酶、胃蛋白酶处理的发酵液上清; 5、6、7: 蛋白酶 K、胰蛋白酶、胃蛋白酶对照; 4、8: 空白对照; 9: 对照。

Note: 1, 2, 3: Proteinase K, trypsin, pepsin-treated fermentation broth supernatant; 5, 6, 7: Protease K, trypsin, pepsin; 4, 8: Blank control; 9: Control.

12.0 时活性增强。说明活性物质的最适 pH 偏碱, 在 pH 10.0 左右(图4)。发酵液上清 pH 调至 2.0、3.0、4.0, 离心取沉淀, 用蒸馏水复溶, pH 调至 9.0 附近, 均无活性。说明活性物质没有沉淀。发酵液上清 pH 调至 2.0、3.0、4.0, 离心取上清, 将 pH 调回至 9.0 附近, 活性得到恢复。说明活性物质没有变性, 活性物质的稳定 pH 范围为 pH 2.0–12.0, 适宜 pH 范围为 pH 8.0–12.0。

2.3.4 活性物质亲水性分析: YBT-2532 拮抗水稻黄单胞菌活性物质溶于甲醇, 微溶于乙醇, 不溶于丙酮、二氯甲烷、氯仿。甲醇提取液的活性大大强于乙醇提取液的活性。推测极性排序为: 乙醇 < 甲醇 < 活性物质 < 水。

2.3.5 活性物质分子量大小: YBT-2532 发酵液上清依次用 10K 和 3K 超滤管截留, 将发酵液上清分成 10K 以上、3–10K、3K 以下 3 部分, 结果显示仅 3K 超滤管滤过液对水稻黄单胞菌有抑制活性(图5), 说明 YBT-2532 拮抗水稻黄单胞菌活性物质的分子量在 3K 以下。

对活性物质的理化性质研究表明: (1) 温度在 30–70 °C 内和 pH 值在 8.0–12.0 的酸碱范围

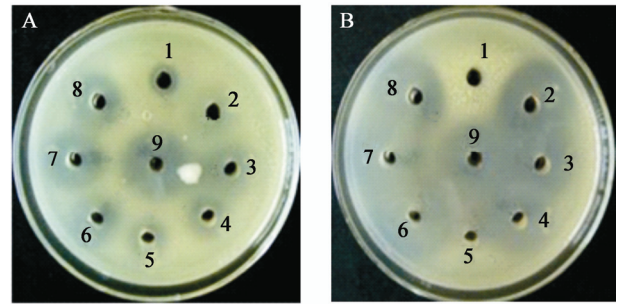


图4 pH 对 YBT-2532 拮抗水稻黄单胞菌活性物质活性的影响

Figure 4 Effect of pH on the activity of the antibacterial compounds produced by YBT-2532 against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

注: A: 1–8 分别为 pH 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 的发酵液上清; 9 为发酵液上清对照。B: 1、5 为空白对照; 2、6 为 pH 10.0 的发酵液上清; 3、7 为 pH 11.0 发酵液上清; 4、8 为 pH 12.0 发酵液上清; 9 为发酵液上清对照。

Note: A: 1–8 respectively are pH 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 fermentation supernatant; 9 is fermentation supernatant control. B: 1, 5 are control; 2, 6 are pH 10.0 fermentation supernatant; 3, 7 are pH 11.0 fermentation supernatant; 4, 8 are pH 12.0 fermentation supernatant; 9 is fermentation supernatant control.

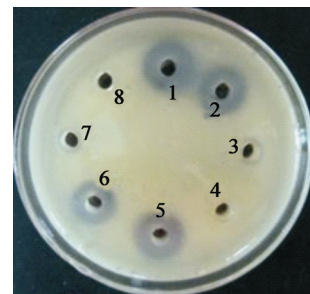


图5 YBT-2532 拮抗水稻黄单胞菌活性物质分子量估算

Figure 5 The molecular weight estimation of the antibacterial compounds produced by YBT-2532 against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

注: 1、5: 发酵液上清对照; 2、6: 3K 以下部分; 3、7: 3K–10K 部分; 4、8: 10K 以上部分。

Note: 1, 5: Fermentation supernatant control; 2, 6: Less than 3K section; 3, 7: Between 3K and 10K; 4, 8: More than 10K section.

内, 活性物质性质稳定; (2) 活性物质溶于甲醇, 微溶于乙醇, 不溶于丙酮、二氯甲烷、氯仿, 为强极性物质; (3) 3 种蛋白酶均对活性物质没有影响, 可以初步判断该活性物质不是蛋白质类分子。(4) 仅 3K 超滤管滤过液有抑制活性, 说明活性物质的

分子量在 3 kD 以下。

2.4 凝胶层析

YBT-2532 发酵液上清浓缩液经过葡聚糖凝胶 G-10 凝胶层析柱后, 被分成了 3 个峰(图 6), 抑菌试验结果显示仅第 2 个峰有活性。葡聚糖凝胶 G-10 可以分辨 700 Da 左右分子, 根据分子筛原理该活性物质分子量在 700 Da 左右。

2.5 离子交换层析

用阴离子交换柱 DEAE-52 进一步分离纯化活性物质, 共被分成了 4 个峰(图 7)。抑菌试验结果显

示, 仅第一个峰前 7 min 有活性。说明该活性物质未被 DEAE-52 吸附, 其在 pH 7.4 的 0.02 mol/L Tris-HCl 环境中可能带有正电荷。

2.6 固相萃取

活性物质进一步用 Supelclean™ LC-18 SPE 固相萃取柱除杂, 抑菌试验结果显示, 仅纯净水洗脱回收液有活性。Supelclean™ LC-18 SPE 固相萃取柱残留了部分无法洗脱的色素, 起到了除杂的作用, 并且对后续实验用到的高效液相色谱柱起到了保护作用。

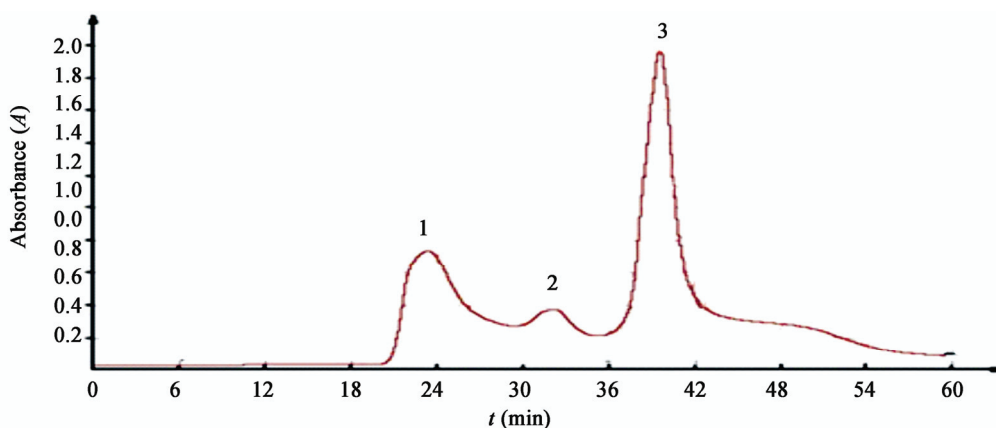


图 6 YBT-2532 拮抗水稻黄单胞菌活性物质凝胶层析分离

Figure 6 Separating the antibacterial compounds produced by YBT-2532 against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* by the method of gel chromatography

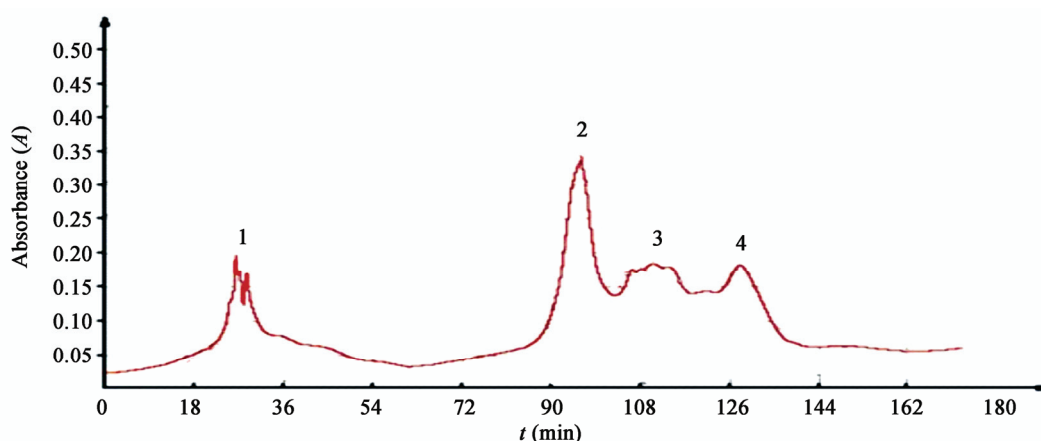


图 7 YBT-2532 拮抗水稻黄单胞菌活性物质离子交换法分离

Figure 7 Separating the antibacterial compounds produced by YBT-2532 against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* by the method of ion exchange chromatography

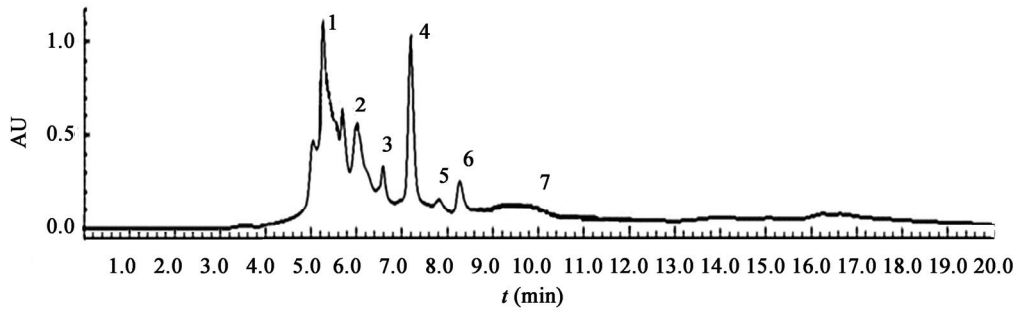


图 8 高效液相色谱法分离 YBT-2532 拮抗水稻黄单胞菌活性物质

Figure 8 Separating the antibacterial compounds produced by YBT-2532 against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* by the method of gel chromatography

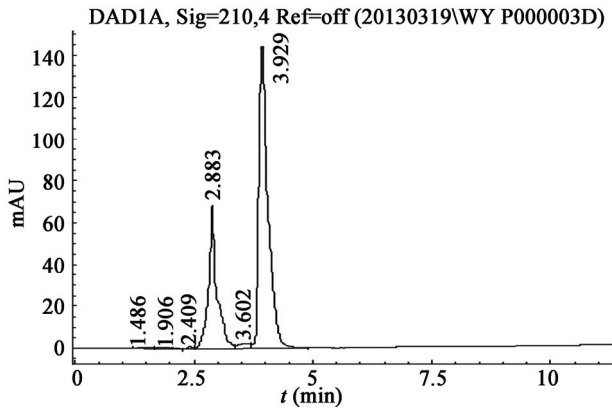


图 9 活性物质的高效液相色谱图

Figure 9 HPLC chromatograms of the active compound

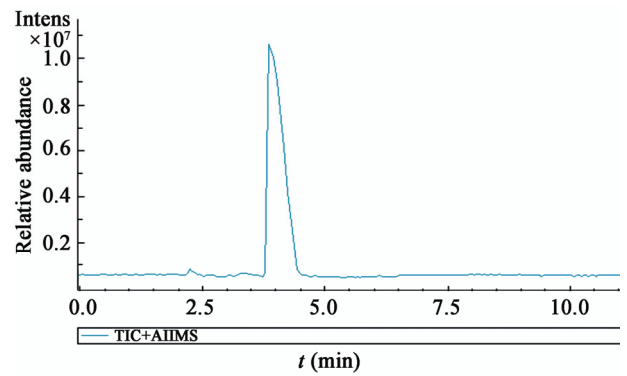


图 10 活性物质的总离子流

Figure 10 Total ion chromatogram of the active compound

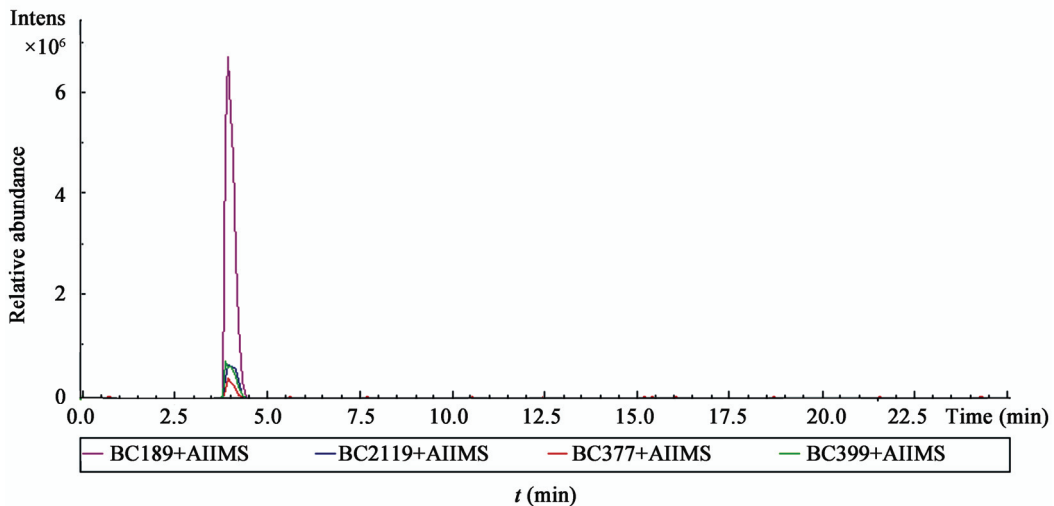


图 11 活性物质的提取离子流图

Figure 11 Extracted ion chromatogram of the active compound

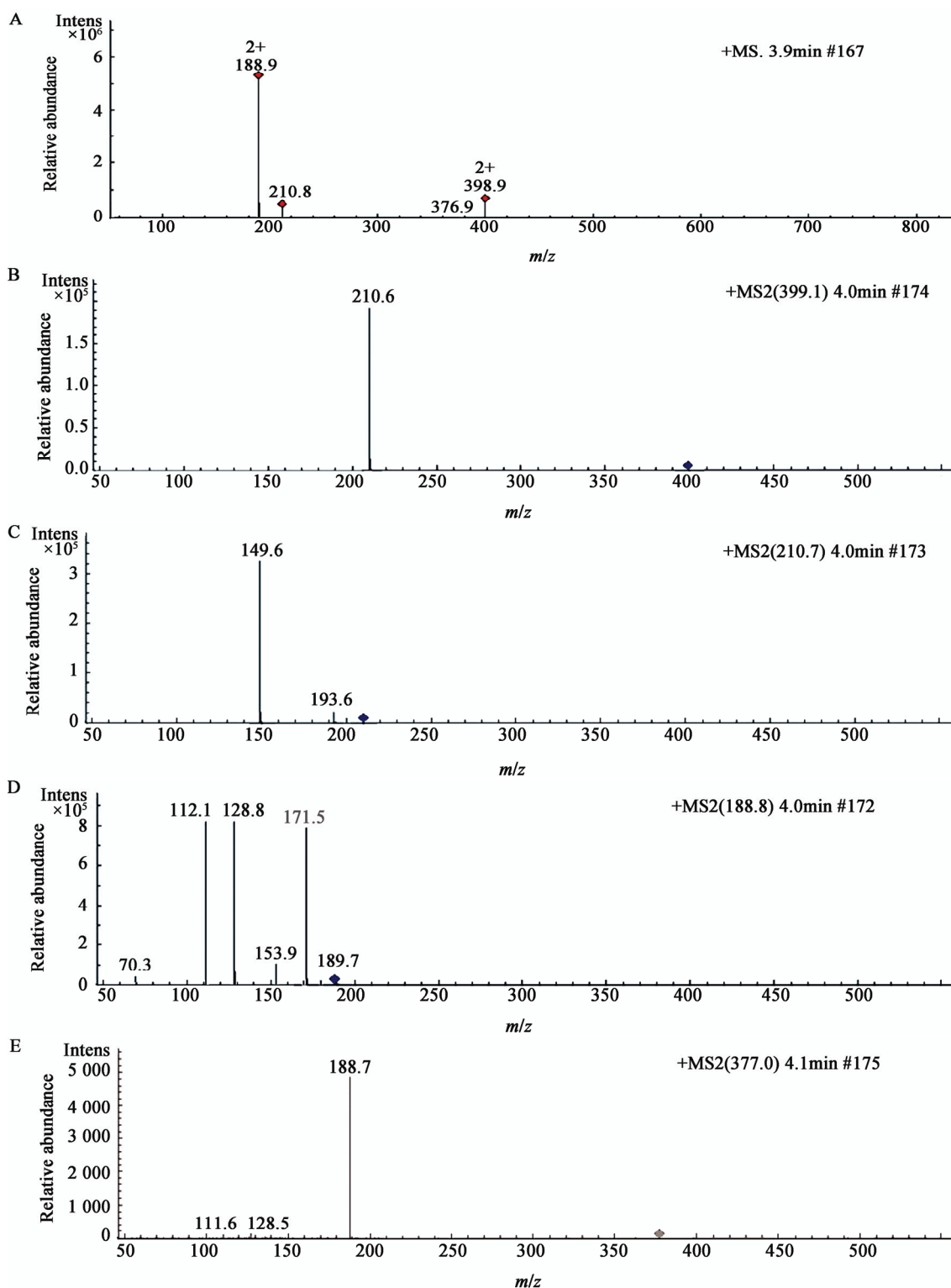


图 12 活性物质的 LC-IT-MS

Figure 12 HPLC-IT-MS spectra of antibacterial compound, the molecular weight was identified as 797.8 Da

注: A: 活性物质一级质谱; B: 碎片 398.8 二级质谱; C: 碎片 210.7 二级质谱; D: 碎片 188.8 二级质谱; E: 碎片 376.8 二级质谱.

Note: A: A mass of active substances; B: The secondary MS of fragment (398.8); C: The secondary MS of fragment (210.7); D: The secondary MS of fragment (188.8); E: The secondary MS of fragment (376.8).

2.7 全波长扫描

将活性物质进行全波长扫描, 结果显示, 该物质在 206–220 nm 处有紫外吸收, 吸收峰峰点在 210 nm 处。说明该活性物质结构上可能含有共轭双键。

2.8 高效液相色谱

通过高效液相色谱对活性物质进一步分离, 共得到 7 个峰, 其中 3 号峰和 4 号峰有活性, 4 号峰活性较强, 保留时间为 7.3 min, 为一个单峰(图 8)。3 号峰活性较弱, 且不能回收到纯品。

2.9 二维液相色谱-离子阱质谱

液质联用液相图(图 9)、总离子流图(图 10)和提取离子流图(图 11)表明该活性物质有很高的纯度, 达到了质谱的要求。从图 9 可以看出, 紧邻活性峰有一个溶剂峰, 但是提取离子流图溶剂峰消失, 说明该溶剂峰不影响质谱结果。

一级质谱图产生 4 个离子峰, 质荷比分别为: 183.9、210.8、376.9 和 398.9。定义 $A=[183.9]^{2+}$, $B=[210.8]^{1+}$, $C=[376.9]^{1+}$, $D=[398.9]^{2+}$ 。4 个片段的分子量大小分别为: $A=183.9 \times 2=377.8$; $B=210.8$; $C=376.9$; $D=398.9 \times 2=797.8$ (图 12)。

单从片段的分子量大小判断: $A=C$; $D=A+2B=C+2B$ 。D 为分子碎片峰, 活性物质分子量为 797.8 Da; A、C 为相同碎片离子峰, 只不过 A 带 2 个电荷, C 带 1 个电荷。活性物质的组成可能为 $D=A(B)_2=C(B)_2$ 。

3 结论

苏云金芽胞杆菌制剂作为无公害农药在杀虫方面已经得到广泛应用, 如果再开发出新型抗菌物质, 不仅可充分利用这一农业微生物菌种资源, 也将给予传统生物农药以新的生命力^[8]。

本文研究在前期对 400 株苏云金芽胞杆菌抗水稻黄单胞菌筛选基础上, 对抗菌效果好的菌株

YBT-2532 拮抗水稻黄单胞菌活性物质的理化性质, 分离纯化和结构进行了初步研究。该活性物质对温度、pH、蛋白酶不敏感, 是强极性水溶性小分子物质。而且分离纯化出一种活性物质, 通过 LC-IT-MS 方法鉴定了其分子量为 797.8 Da。该物质在 206–220 nm 处有吸收峰, 暗示着该活性物质含有共轭双键结构。该活性物质性质与已知的苏云金芽胞杆菌类抗菌活性物质不同, 可能为新型抗菌物质, 其分子结构还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Jabeen R, Ashraf M, Ahmad I, et al. Purification and bioassays of bioactive fraction from *Curcuma longa* against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causing blb disease in rice[J]. Pakistan Journal of Botany, 2011, 43(2): 1335-1342
- [2] John M, Stephane G, Shimpei M, et al. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology[J]. Molecular Plant Pathology, 2012, 13(6): 614-629
- [3] Mageshwaran V, Walia S, Annapurna K. Isolation and partial characterization of antibacterial lipopeptide produced by *Paenibacillus polymyxa* HKA-15 against phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* M-5[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 28(3): 909-917
- [4] Cao ZM. *Bacillus thuringiensis* and modern biological pesticide[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2008(20): 140,142 (in Chinese)
曹正明. 苏云金芽胞杆菌与现代生物农药[J]. 现代农业科技, 2008(20): 140,142
- [5] Shen SW, Liu YF, Zhou SJ, et al. Study on controlling rice bacterial leaf streak by four antagonistic bacteria strains, streptomycin and bismerthiazol[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2010(4): 98-100 (in Chinese)
沈素文, 刘永锋, 周苏津, 等. 4株拮抗细菌与链霉素, 叶枯唑协同控制水稻细菌性条斑病研究[J]. 江苏农业科学, 2010(4): 98-100
- [6] Liao YT, Cao GQ. Research on the antimicrobial of two natural plants extract[J]. Natural Product Research and Development, 2008, 19(4): 626-630 (in Chinese)
廖玉婷, 曹光群. 两种天然植物提取物的抑菌效果的快速评价与比较[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 19(4): 626-630
- [7] Lu NH, Xu RF, Wu LM, et al. Effects of different media on the growth reproduction and pathogenicity of *Rhizotonia cerealis*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2005, 21(2): 262-263,283 (in Chinese)
陆宁海, 徐瑞富, 吴利民, 等. 不同培养基对小麦纹枯病菌生长繁殖及致病力的影响[J]. 中国农学通报, 2005, 21(2): 262-263,283
- [8] Lu W, Cai J, Chen YH. Research Progress on chitinase of *Bacillus thuringiensis*[J]. Microbiology China, 2007, 34(1): 143-147 (in Chinese)
卢伟, 蔡峻, 陈月华. 苏云金芽胞杆菌几丁质酶的研究进展[J]. 微生物学通报, 2007, 34(1): 143-147