

洋葱伯克霍尔德菌 CF-66 抗菌物质的分离纯化及性质的研究

权春善¹ 郑 维¹ 曹治明¹ 王军华² 范圣第¹

(¹ 大连民族学院生命科学学院 大连 116600)

(² 大连理工大学环境与生命学院 大连 116024)

摘 要 洋葱伯克霍尔德菌 CF-66 能够抑制立枯丝核菌等若干植物病原菌和其它一些真菌的生长。CF-66 菌发酵液的粗提液通过 Sephadex-75pg、Sephacryl S-100 柱层析分离纯化, 获得抗菌物质 CF66I。此抗菌物质耐热性强, 耐碱, 但在强酸性条件下不稳定。低浓度有机溶剂的存在有利于抑菌活性的提高。对其结构的研究表明 CF66I 是以 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ 为主要单元结构并带有酰氨键的化合物。

关键词 洋葱伯克霍尔德菌, 分离纯化, 抑菌活性

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2005)05-0707-04

植物真菌病害是造成农业损失的主要原因之一。随着环保意识的提高, 利用微生物来抑制植物病原菌成为相关科技工作者关注的焦点。近年, 为防止农作物受霉菌类病原菌的侵害, 国外一些研究所利用洋葱伯克霍尔德菌等生防菌研制出各种生物农药^[1,2]。洋葱伯克霍尔德菌产生多种次级代谢产物如硝吡咯菌素、吩嗪、Cepabactin、Cepaciamide A、Cepacidine A 以及其它未被鉴定的挥发或不挥发的物质^[3~5]。由于这种细菌可将存在于除草剂和农药中的氯化芳香族化合物作为炭源使用, 因此亦可作为生物修复剂去分解难以降解的除草剂和农药^[6,7]。另外, 一些洋葱伯克霍尔德菌可产生降解非营养物质如三氯乙烯的酶, 而三氯乙烯用于干洗业和作为脱脂试剂使用, 是污染水源的主要原因之一^[8]。本实验室成功地分离了对立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani* Kühn) 及尖镰孢菌 (*Fusarium oxysporum*) 等真菌有强烈抑制作用的 CF-66 菌株, 并通过生理生化特性研究和 16S rDNA 序列分析鉴定该菌为洋葱伯克霍尔德菌。Species-specific PCR 结果证明该菌株不属于洋葱伯克霍尔德菌群中的 genomovar II 或 III, 而是归属于 genomovar V。而目前普遍认为 genomovar V 对囊性纤维化患者是没有致病性的^[9,10]。

本文将详细报道抗菌活性物质 CF66I 的分离纯化及其性质, 其结果为开发出新型生物农药提供了必要的前提条件。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:拮抗菌: *Burkholderia cepacia* CF-66 由本研究室筛选分离。检测菌: 立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani* Kühn), 尖镰孢菌 (*Fusarium oxysporum*) 均由广岛大学太田钦幸教授提供。其它指示菌均由日本广岛大学菌种保藏中心提供。

1.1.2 柱分离材料和分离系统: Superdex 75pg 和 Sephacryl S-100 为瑞典 Pharmacia 公司产品; Shodex Asahipak ODP-50 6IX (150 × 4.6 mm) 系日本 TOSHO 公司产品; 所用仪器为 Pharmacia 公司的 ÄKTA Explorer 层析系统及日本岛津公司的 HPLC。

1.2 抗菌物质粗提液的制备

将 CF-66 菌接种到土豆汁液体培养基 (Potato Dextrose) 中, 30℃ 摇瓶培养 (200r/min) 48h 后, 常温 8000r/min 离心 30min。上清液经中空纤维超滤系统超滤浓缩后 (截留分子量为 10kD) 6000r/min 离心取上清液, 即得到粗提液。

1.3 抑菌活性测定方法

采用对峙法测定: 在 PDA 平板 (中央带有牛津杯) 上, 距离牛津杯 2.5cm 处的四面垂直方向各接上一块病原菌, 牛津杯内注入 100μL 的 CF-66 菌体培养上清液, 28℃ 培养 48h, 测量抑菌圈大小。

1.4 抗菌物质的制备和纯化

提纯步骤: 粗提液 → 用旋转蒸发仪浓缩 → 溶

基金项目 辽宁省自然科学基金项目 (2040949)

作者简介 权春善 (1973 -) 女, 黑龙江人, 副教授, 主要从事微生物学及分子生物学研究。Tel: 86-411-87532756; Fax: 86-411-87644496;

E-mail: mikyeken@dlnu.edu.cn.

收稿日期 2005-03-14, 修回日期 2005-06-22

于 5mL 磷酸缓冲液中(20mmol/L, pH6.0)→Superdex 75pg 柱纯化→冷冻干燥浓缩→Sephacryl S-100 柱纯化→HPLC 鉴定→得到纯品。

Superdex 75pg 柱层析:将 Superdex 75pg 柱(26/60)垂直固定于 HiLoad™ System I 柱架上,用 20mmol/L pH6.0 磷酸缓冲液平衡。取适量的抗菌物质粗提液上样,然后用相同缓冲液洗脱,流速为 3mL/min,收集活性组分供进一步纯化。

Sephacryl S-100 柱层析:Sephacryl S-100(16/60)柱固定于 AKTA Explorer System 上,用上述磷酸缓冲液进行平衡。取适量的上述活性部分上样后,再用同种缓冲液洗脱,收集活性组分,供以下实验使用。

HPLC 鉴定:系统为 HITACHI LC-10A,分离柱为 Shodex Asahipak ODP-50 6IX(150mm×4.6mm)。流动相为 20mmol/L 磷酸缓冲液(pH6.0),流速为 1mL/min,检测波长为 210nm。

1.5 稳定性的测定

1.5.1 对温度的敏感性实验:分离纯化得到的抗菌物质(0.5mg/mL)分别置于 30℃~100℃处理 30min,100kPa 灭菌 30min,用未处理样品为对照,检测其抑菌活性,将对照的抑菌活性定为 100%。

1.5.2 对 pH 的敏感性实验:将样品用 500μL pH 各为 2.5、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0 的缓冲液溶解(溶解后的浓度为 0.3mg/mL),室温下静置 24h 后,检测其抑菌活性。

1.5.3 对有机溶剂的敏感性实验:将 180μL 乙醇、甲醇、丙酮、氯仿等四种有机溶剂分别与 20μL 抗菌物质溶液(0.3mg/mL)进行混合,在室温下静置 4h,混匀,检测其抑菌活性。为去除有机溶剂本身对指示菌的影响,将待测样品加样到牛津杯孔,在室温放置一个晚上后于 28℃培养 2d。

1.6 抑菌谱的测定

用杯碟法分别检测提纯的抗菌物质(0.5mg/mL)对各种霉菌、酵母菌、细菌的抑菌活性。

1.7 结构分析

1.7.1 紫外分光光度法:采用日本日立公司的 UV2800 紫外可见光谱仪扫描。

1.7.2 分子构型分析:采用红外光谱分析,用日本日立公司的 FTIR 8101 红外光谱仪进行测定。

1.7.3 元素组成分析:采用德国贺利公司的 Elementar VARIO-EL 元素分析仪测定 C、H、N 的含量。

1.7.4 ¹H-NMR 谱图分析:采用日本电子的 JEOLCP 600 核磁共振仪测定。

2 结果

2.1 抗菌物质 CF66I 的分离纯化

2.1.2 Superdex 75pg 柱层析:洗脱结果如图 1-A 所示,分离得到 3 个峰,用立枯丝核菌为指示菌进行检测,峰 I 有很强的抑菌活性,而峰 II、峰 III 没有发现抑菌活性,以活性最大与最小一半处为上、下限,合并收集峰 I,浓缩后保存。

2.1.3 Sephacryl S-100 柱层析:经 Superdex 75pg 柱层析后的活性峰 I 浓缩液加样到预先用磷酸缓冲液平衡的 Sephacryl S-100 柱上,待上样后用磷酸缓冲液(20mmol/L, pH6.0)进行洗脱,洗脱结果如图 1-B 所示,分离得到两个主峰。经检测峰 I 有抑菌活性,而峰 II 没有抑菌活性。收集活性组分峰 I,浓缩后保存。

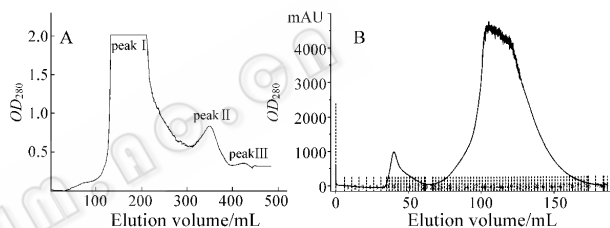


图 1 抗菌物质 CF66I 的层析图谱

Fig.1 Gel permeation chromatography of CF66I

A: Superdex 75pg column; B: Sephacryl S-100 column.

2.1.4 抗菌物质的纯度检测:从抗菌物质的高效液相谱图看,只在 3.971min 处出现一个明显的吸收峰(图 2)。收集该峰检测活性发现,其比活性为 3.8mm/μg,而上样样品的比活性为 4.0mm/μg,因此可证明样品纯度较高。比活有所降低可能是因为收集时的误差引起的。

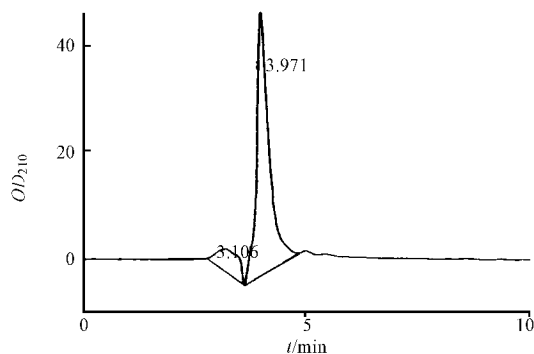


图 2 抗菌物质 CF66I 的高效液相色谱图

Fig.2 HPLC analysis of CF66I

2.2 抗菌物质 CF66I 的性质

2.2.1 CF66I 对温度的敏感性:在 30℃~100℃范围内对抗菌物质加热处理 30min,其活性与对照相差

无几(表略)。在 121℃高温高压下灭菌 30min ,也未发现失活现象。

2.2.2 CF66I 对 pH 的敏感性 :将纯化得到的抗菌物质溶于不同 pH 的缓冲液 ,并于室温下静置 24h ,发现 pH 值在 3.0 和 11.0 范围内抗菌活性无较大变化 ,而当 pH 值小于 3.0 时 ,抗菌活性明显降低。

2.2.3 CF66I 对有机溶剂的敏感性 :将乙醇、甲醇、丙酮、氯仿四种有机溶剂与抗菌物质溶液混合 ,使其终浓度为 10%(V/V) ,并在室温下静置 4h 检测其抑菌活性。以相同浓度的抗菌液为对照。结果发现 ,有机溶剂存在时 ,抗菌物质的活性均提高了 30% ,表明低浓度有机溶剂的存在利于抗菌活性的提高。

2.2.4 抗菌谱 :CF66I 对霉菌均表现很好的抑菌活性 ,对酵母菌也有很强的抑菌活性 ,特别是对白色念珠菌(*Candida albicans*)。对所有被测细菌 ,CF66I 均未测出抑菌活性(表 1)。

表 1 抗菌物质 CF66I 的抑菌谱

Table 1 Antimicrobial spectrum of CF66I

Indicator strains	Width of zone inhibition/mm
26 <i>Rhizoctonia solani</i> kühn O-28	
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>spinaciae</i> O-27	20
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ladicis-lycopersici</i> O-34	14
<i>Rosellinia necatrix</i>	15
<i>Aspergillus flavus</i> Link Fries <i>fgbbosos</i>	18
<i>Aspergillus flavus</i> Link Fries var. <i>oryzae</i>	16
<i>Aspergillus niger</i> var <i>Tie shem</i>	18
<i>Mucor hiemolis</i> Wehmer <i>fihiemalis</i>	8
<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom	10
<i>Rhizopus oryzae</i> Went &Prinsen Geerings	7
<i>Candida albicans</i> (Robin) Berkbont	29
<i>Cryptococcus meoformens</i> (San felice) Vaillenism	18
<i>Pichia membranae faciens</i> Hansen	22
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Meyer ex Hansen	20
<i>Escherichia coli</i>	0
<i>Bacillus subtilis</i>	0
<i>Staphyrococcus aureus</i>	0

2.3 抗菌物质 CF66I 的结构分析

2.3.1 紫外光谱分析 :对抗菌物质 CF66I 水溶液进行紫外扫描 ,发现最大吸收峰位于 206.36nm 处 ,在 240 ~ 290nm 范围内出现较平滑而弱的吸收峰。另外 ,无 260nm 的核酸吸收峰和 280nm 处的蛋白质吸收峰 ,说明不是核酸和蛋白质(图 3-A)。

2.3.2 红外光谱分析结果 :谱图的基团特征吸收峰显示(图 3-B) ,此化合物含有酰氨键(3433.7 cm^{-1} , 1643.6 cm^{-1}) 卤代烃类(518.9 cm^{-1}) ,而且还含有醚键(1076.4 cm^{-1})。

2.3.3 $^1\text{H-NMR}$ 谱图分析结果 :在 0.8mg/L 和 1.2mg/L 处有吸收峰 ,可预测含有(CH_2) $_n\text{CH}_3$ 结构 ,但因其吸收非常弱 ,可判断此结构在整个分子结构中只占一小部分 ;在 2mg/L 处出现的一条很窄的吸收峰 ,可判断是来源于($\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$)等的 H ;3.5 ~ 4.5mg/L 处出现的复杂的吸收峰应是此化合物的特征峰 ,但由于 5mg/L 附近的重水吸收峰影响其分析 ,初步可判断有($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$) $_n$ 结构(图 3-C)。

2.3.4 元素组成分析结果 :元素分析结果表明 ,其 C、H、N 含量分别是 7.25%、2.52% 和 0.82%。

3 讨论

近年 ,洋葱伯克霍尔德菌已广泛用于生物农药和生物肥料的制作中^[11 12]。洋葱伯克霍尔德菌能产生多种具有抗菌活性的代谢产物如铁载体(*Pyochelin* , *Pyoverdine*) 吩嗪、硝吡咯菌素、苯基吡咯、单萜生物碱、*Cepaciamide A*(*B*)、*Cepacidine A*(*B*)、*Cepacin A*(*B*)。洋葱伯克霍尔德菌分泌的铁载体可分为两大类 :一类称 *Pyochelin* ,是一种不溶水的低分子量的噻唑衍生物 ,结合铁离子的能力相对弱 ,另外一类称为 *Pyoverdine* ,是水溶性的黄绿色素 ,在 400nm 处有一个很好的吸收峰 ,在紫外线的照射下

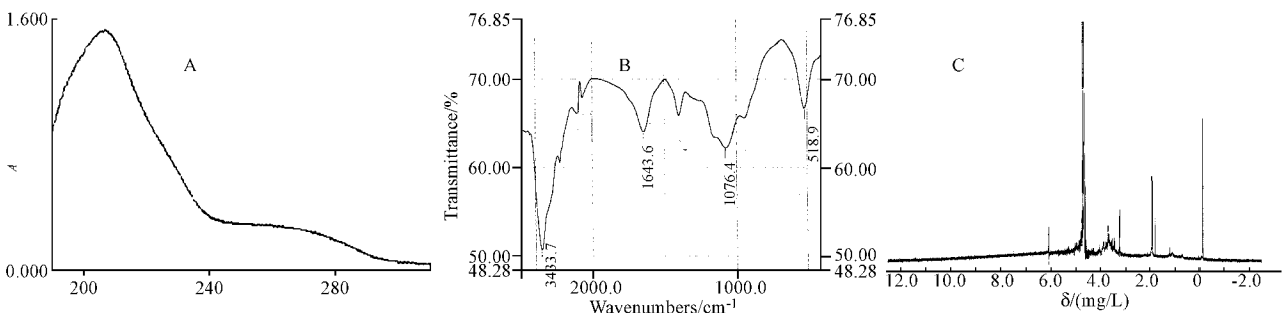


图 3 CF66I 的结构分析图

Fig.3 Structure analysis of CF66I

A : UV spectrum ; B : IR spectrum ; C : $^1\text{H-NMR}$ spectrum.

可以发光,还含有一个多肽链。Cepaciamide 对灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)和扩展青霉(*Penicillium expansum*)等真菌具有强烈抗菌作用,是含有脂肪链的 3-氨基 2-二乙基嘧啶二酮。Cepacidine 为糖肽(glycopeptide)类物质,Cepacin 为乙炔类抗菌物质。

本文对洋葱伯克霍尔德菌 CF-66 产生的抗菌物质进行了分离纯化并对其化学结构进行了初步研究。在纯化过程中曾经尝试用有机溶剂(甲醇、氯仿、乙酸乙酯等)萃取,但均未获成功。精制得到的化合物易溶于水,不溶于有机溶剂。双缩尿反应结果和苯酚-硫酸法测定糖含量结果表明此抗菌物质并非蛋白类和糖类物质。CF66I 耐热性强,耐碱,但在强酸性条件下不稳定。低浓度有机溶剂的存在可提高抗菌活性。综合紫外、红外、 $^1\text{H-NMR}$ 谱图分析结果,可初步认定抗菌物质 CF66I 是以 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ 为主要单元结构并带有酰氨键的化合物。这些结构特征与上述的洋葱伯克霍尔德菌产生的具有抗菌活性的其它代谢产物都没有相似之处,可以考虑是一种新型代谢产物。此抗菌物质的元素分析结果表明,其 C、H、N 含量分别是 7.25%、2.52% 和 0.82%。为了确定 CF66I 的分子量测定了质谱,但由于化合物的分子组成问题没有得到满意的结果。从元素分析和质谱测定结果判断此抗菌物质极可能含有大量无机元素。具体化学组成和结构,以及对植物病原微生物的抑制机理等有待于进一步鉴定。

参 考 文 献

- [1] Cartwright D K, Benson D M. *Pseudomonas cepacia* strain 5.5B and method of controlling *Rhizoctonia solani*. U. S. Patent, 1994, 5,

288 633.

- [2] Lacy D E, Spencer D A, Goldstein A, et al. Chronic granulomatous disease presenting in childhood with *Pseudomonas cepacia* septicaemia. *J Infect*, 1993, **27**: 301–304.
- [3] El(Banna N, Winkelmann G. Pyrrolnitrin from *Burkholderia cepacia*: antibiotic activity against fungi and novel activities against streptomycetes. *J Appl Microbiol*, 1998, **85**: 69–78.
- [4] Meyer J M, Hohnadel D, Halle F. Cepabactin from *Pseudomonas cepacia*, a new type of siderophore. *J Gen Microbiol*, 1989, **135**: 1479–1487.
- [5] Roitman J N, Mahoney N E, Janisiewicz W J. Production and composition of phenylpyrrole metabolites produced by *Pseudomonas cepacia*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1990, **34**: 381–386.
- [6] Kilbane J J, Chatterjee D K, Chakraborty A M. Detoxification of 2, 4, 5-trichlorophenoxyacetic acid from contaminated soil by *Pseudomonas cepacia*. *Appl Environ Microbiol*, 1983, **45**: 1697–1700.
- [7] Holmes A, Govan J, Goldstein R. Agricultural use of *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia*: a threat to human health. *Emerg Infect Dis*, 1998, **4**: 221–227.
- [8] Folsom B R, Chapman P J, Pritchard P H. Phenol and trichloroethylene degradation by *Pseudomonas cepacia* G4: kinetics and interaction between substrates. *Appl Environ Microbiol*, 1990, **56**: 1279–1285.
- [9] Vandamme P, Henry D, Coenye T, et al. *Burkholderia anthina* sp. nov. and *Burkholderia pyrrocinia*, two additional *Burkholderia cepacia* complex bacteria, may confound results of new molecular diagnostic tools. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2002, **33**: 143–149.
- [10] 郑维, 权春善, 范圣第. 产生多种抗真菌活性物质菌种的筛选分离和鉴定. 大连民族学院学报, 2004, **5**: 37–42.
- [11] Hwang J, Chilton W S, Benson D M. Pyrrolnitrin production by *Burkholderia cepacia* and biocontrol of *Rhizoctonia* stem rot of poinsettia. *Benson Biological Control*, 2002, **25**: 56–63.
- [12] Li W, Roberts D P, Dery P D, et al. Broad spectrum anti-biotic activity and disease suppression by the potential biocontrol agent *Burkholderia ambifaria* BC-F. *Crop Protection*, 2002, **21**: 129–135.

Purification and properties of antibiotic from *Burkholderia cepacia* CF-66

QUAN Chun-shan^{1*} ZHENG Wei¹ CAO Zhi-ming¹ WANG Jun-hua² FAN Sheng-di¹

(¹ College of Life Science, Dalian Nationalities University, Dalian 116600, China)

(² School of Environmental and Biological Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: *Burkholderia cepacia* CF-66 isolated from compost showed antifungal activity against plant pathogens such as *Rhizoctonia solani* and some other fungi. CF66I produced by *Burkholderia cepacia* CF-66 was separated by gel chromatography using Sephadex-75pg and Sephacryl S-100 column. CF66I has very high degree of stability of antifungal activity under higher temperature and alkaline conditions. Some organic solvents could improve its activity at low concentration. The research for the structure of CF66I find that it is a compound with amide bonds and its main structural units is $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$.

Key words: *Burkholderia cepacia*, Isolation, Purification, Antibiotic activity

Foundation item: Natural Science Foundation of Liaoning Province (2040949)

* Corresponding author. Tel: 86-411-87532756; Fax: 86-411-87644496; E-mail: mikyeken@dlnu.edu.cn

Received date: 03-14-2005