

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
49(11): 1494 - 1501; 4 November 2009  
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 海洋芽孢杆菌 (*Bacillus marinus*) B-9987 菌株抑制病原真菌机理

高伟<sup>1,2</sup>, 田黎<sup>1,2\*</sup>, 周俊英<sup>3</sup>, 史振平<sup>1</sup>, 郑立<sup>2</sup>, 崔志松<sup>2</sup>, 李元广<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>青岛科技大学化工学院, 青岛 266042)

(<sup>2</sup>国家海洋局第一海洋研究所, 青岛 266061)

(<sup>3</sup>青岛城阳农业局, 青岛 266000)

(<sup>4</sup>华东理工大学生物工程学院, 上海 200237)

**摘要:**【目的】探讨海洋芽孢杆菌 (*Bacillus marinus*) B-9987 菌株的代谢产物 BMME-1, 对植物病原真菌茄链格孢菌的抑菌作用机理。【方法】分别使用分光光度法、气相色谱-质谱 GC-MS 联用技术、红外光谱法等, 检测了 BMME-1 处理病原真菌后, 菌体渗透性、细胞壁及细胞膜成份的变化。【结果】BMME-1 对茄链格孢菌的抑菌中浓度 (MIC<sub>50</sub>) 为 6.2 mg/L, 最小杀菌浓度 (MFC) 为 50 mg/L, 在 MIC<sub>50</sub> 浓度或高于此浓度处理靶标菌, 将导致菌体蛋白质、核酸等大分子物质的外流; 处理菌株葡聚糖结构 β-型糖苷键、碳—氧键 (C—O)、碳—氢键 (C—H) 等基团的特征吸收强度降低, —OH、C=O 的伸缩振动吸收强度升高; 菌体细胞壁几丁质结构中酰胺 I 键吸收强度发生变化; 与对照菌株的麦角甾醇含量 (62.52 ± 3.31%) 相比, 处理菌株麦角甾醇减少为 (56.36 ± 2.52)%, 同时出现麦角固醇合成中间产物粪甾醇。【结论】BMME-1 对病原真菌的抑制表现为: 干扰细胞膜麦角甾醇的合成从而改变了细胞的通透性; 对细胞壁葡聚糖结构的影响较大而几丁质次之。

**关键词:** 海洋芽孢杆菌; 抑菌机制; 葡聚糖; 几丁质; 麦角固醇

**中图分类号:** Q935      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2009) 11-1494-08

长期以来, 由微生物代谢产物筛选和开发抑制病原真菌的活性物质, 一直是医药和农药领域研究的重点, 每年都有大量的文章发表, 但真正能继续深入研究的非常少, 其中对做为靶标的病原真菌的抑菌机制研究难度较大, 是继续深入研究的主要障碍之一。国内外对于抗真菌药物作用机制研究的报道大致可分为 3 个方面: 一是作用于真菌细胞壁合成, 包括抑制真菌细胞壁主要成份 β-(1, 3)-D-葡聚糖, 甘露糖蛋白, 以及几丁质; 二是作用于真菌细胞膜中甾醇合成及磷脂双分子层; 三是作用于核酸蛋白质

等大分子物质的合成和能量的产生传递系统<sup>[1]</sup>。这些研究多集中在人体病原真菌, 而对植物病原真菌很少涉及。本文选择研究菌株为筛选自海洋生境的海洋芽孢杆菌 (*Bacillus marinus*), 海洋微生物作为农药新资源是农药研发领域关注的热点。选择的靶标病原真菌茄链格孢菌 (*Alternaria solani*) 是一种主要寄生在茄科植物番茄和马铃薯, 侵染地域广, 分布普遍的植物病原真菌, 在植物的整个生长期都有发生, 严重影响番茄和马铃薯品质和产量<sup>[2]</sup>。经课题组前期测试, 该菌具有良好的靶标病原真菌的特性,

基金项目: 国家“863 计划”(2007AA09Z435, 2007AA091507, 2008AA09Z407); 国家自然科学基金(40776098, 40976104, 20602009)

\* 通信作者。Tel: +86-532-88967423; Fax: +86-532-88967423; E-mail: wshw8@yahoo.com.cn

作者简介: 高伟(1983-), 男, 山东滨州人, 硕士研究生, 从事海洋微生物的研究。

收稿日期: 2009-06-30; 修回日期: 2009-08-13

比由日本专家建立并在国内外通用的抗真菌、肿瘤稻瘟霉模型中使用的稻瘟霉菌靶标菌<sup>[3]</sup>,个体大,色素明显,产孢丰富,容易观察,抑制茄链格孢菌的物质对大多数植物病原真菌都有一定的作用,具有较好的病原真菌代表性<sup>[4]</sup>,因此研究结果不仅适用于茄链格孢菌菌株,而且将对其它植物病原真菌的抑制机理研究具有较好的参考价值。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 供试菌株及培养基:**海洋芽孢杆菌(*Bacillus marinus*) B-9987 菌株,分离自渤海潮间带盐生植物,课题组前期对该菌株的生物学特性、人工培养发酵与代谢调控、植物活体与离体抗菌测试等方面进行了较为细致的研究,该菌株产生的抑菌物质对多种植物病原真菌、细菌具有较强的抑制作用,从菌株发酵物获得 7 个具有不同抗菌效果的多烯大环内酯类化合物,活菌制剂经动物毒理测试,证明对动物无毒或微毒、无致病性,菌株保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC),保藏号为 CGMCC No. 2095。植物病原真菌:引起多种植物早疫病的茄链格孢菌(*Alternaria solani*)来自本实验室保藏菌株。B-9987 培养基:适合 B-9987 菌株生长和产生抑菌物质的优化海水蛋白胨培养基<sup>[4]</sup>,用于细菌 B-9987 菌株培养。

PDA 培养基:用于真菌茄链格孢菌培养。

**1.1.2 主要仪器和试剂:**TurboVap II 型氨吹浓缩仪(美国 Zymark, Palo Alto 公司);6890N GC/5973N MS 型气相色谱-质谱仪(美国 Agilent 公司);Thermo Nicolet 370TF-IR 红外光谱仪;硅烷化试剂 N, O-(三甲基硅)三氟乙酰胺(BSTFA + 1% TMCS, Fluka 公司);环己烷,氯仿色谱均购于 Merck 公司;DMSO,石油醚,无水乙醇,盐酸,氢氧化钠,溴化钾,甲醇,乙酸乙酯,硫酸钠,磷酸氢二钠,磷酸二氢钠均为国产分析纯。

### 1.2 海洋芽孢杆菌 B-9987 菌株抑菌物的制备

将 B-9987 菌株从斜面培养基转接至优化的海水蛋白胨液体培养基中,25℃,150 r/min,培养 36 h,即为种子液。种子液按 10% 接种量接种至 100 mL/250 mL 三角瓶中,同样条件培养 96 h。将培养获得 20 L 发酵液,参照 Xue 的方法提取活性物质<sup>[5]</sup>,取乙酸乙酯部分旋转蒸干,用 1% 的 DMSO 溶解,即为测试的抑菌物简称 BMME-1,为了排除乙酸乙酯与 DMSO 对抑菌测试的干扰,在下述试验中均以同样

方法处理未接菌培养液作为对照。

### 1.3 对靶标菌抑制与杀菌标准建立测试

制备茄链格孢菌孢子悬浮液,使其孢子浓度为  $5.0 \times 10^5$  cfu/mL,接入 96 孔板,加入不同浓度 BMME-1 处理 3 h,倒置显微镜观察孢子萌发情况,血球计数板计数;将不萌发处理浓度孢子,使用无菌蒸馏水清洗两次,转接入茄链格孢菌原始生长的 PDA 培养基,25℃培养 3 d,每个处理重复 3 次。结果判定,以 50% 孢子不萌发为 MIC<sub>50</sub>(即真菌生长 50% 被抑制时的药物浓度)<sup>[6]</sup>;将此移入 PDA 培养基后,未见菌丝生长浓度为最低杀菌浓度 MFC。以上操作重复 3 次。

### 1.4 对靶标真菌最佳用药时间测试

将浓度为  $5.0 \times 10^5$  cfu/mL 的茄链格孢菌孢子悬浮液加入 100 mL/250 mL 三角瓶中,每 100 mL PDA 培养液加入孢子悬浮液 500 μL,分别于病原真菌静止期、对数期、稳定期添加 BMME-1 终浓度至 12.4 mg/L,150 r/min,25℃培养,每 24 h 取样,抽滤去除培养液,100 mL 蒸馏水清洗,60℃,烘干至恒重,称量菌丝体重量,以 0.1% DMSO 溶液处理菌体为对照,每个处理设 3 个重复。

### 1.5 茄链格孢菌菌丝通透性测试

参照 Latoud<sup>[7]</sup>的方法,茄链格孢菌孢子于 PDA 液体培养基,25℃ 125 r/min 振荡培养 24 h 后,6000 r/min,离心 15 min,收集幼嫩菌丝体,重新悬浮于 0.05 mol/L pH6.8 柠檬酸-磷酸盐缓冲液中。加入 BMME-1,使其终浓度达 MIC<sub>50</sub> 浓度值,对照添加 0.1% DMSO 溶液。分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 后取样,离心除去菌体,用分光光度计检测处理后茄链格孢菌细胞外液在 260 nm 和 280 nm 处吸光度变化。

### 1.6 茄链格孢菌甾醇成份的测定

茄链格孢菌接种于 PDA 培养液中,150 r/min 振荡培养 16 h,使其处于延滞期后期,取菌液 2 mL 和 PDA 培养液 98 mL 加入 50 mL 锥形瓶,最后加入 BMME-1 溶液,调节终浓度达到 MIC<sub>50</sub> 浓度值振荡培养 36 h。菌液于 6000 r/min 离心 10 min,磷酸缓冲液(PBS)洗涤两次,去上清。称湿菌 0.25 g 于 20 mL 指形管中,加 PBS 1.25 mL 和新鲜配制的皂化剂 3 mL,混匀,80℃水浴皂化 60 min。加石油醚(沸程 30 ~ 60℃)6 mL 提取 2 次,合并提取液,蒸馏水 6 mL 洗涤 1 次,醚层于 60℃水浴挥干,得未皂化脂,加环己烷溶解,使溶液体积为 1 mL/g 湿菌,-20℃保存<sup>[8]</sup>。将得到的未皂化脂环己烷溶液各取 200 μL 加入 1.5 mL 离心管中,于氮气下吹干后,加 TMSFA 30 μL

混匀,置 30℃温箱中反应 24 h,用氮气吹去残余衍生生化试剂,再加入氯仿 100  $\mu\text{L}$ ,充分混匀溶解,直接进样 0.5  $\mu\text{L}$ ,GC-MS 分析测定。

### 1.7 茄链格孢菌细胞壁成份的测定

**1.7.1 茄链格孢菌细胞壁葡聚糖成份的测定:** BMME-1 处理茄链格孢菌步骤同“1.6 节”,6000 r/min 离心 10 min 收集菌体,用 PBS 洗 2 次,蒸馏水洗 3 次,冻干。将 0.1g 干菌体悬浮于 50 mL 1 mol/L 的 NaOH 溶液中,100℃下剧烈搅拌 1 h,冷却后 6000 r/min 离心 15 min,弃上清,沉淀用 50 mL 0.75 mol/L 的氢氧化钠(NaOH)溶液悬浮,100℃维持 15 min,冷却后用 HCl 调 pH 至 4.5,用 10 mL 双蒸水洗 2 次,20 mL 无水乙醇脱水两次,再用 20 mL 乙醚脱水,风干,得到的白色粉末即为葡聚糖<sup>[9]</sup>。将提取的葡聚糖用 KBr 压片做红外光谱。

**1.7.2 茄链格孢菌细胞壁几丁质成份的测定:** BMME-1 处理茄链格孢菌步骤同 1.6,6000 r/min 离心 10 min 收集菌体,用 PBS 洗两次,蒸馏水洗 3 次,冻干。按 1:50(g/mL)的比例加入 1 mol/L 的氢氧化钠,剧烈搅拌,超声处理 20 min,10000 r/min 离心 1 min,重复 3 次。将超声处理的菌液,121℃高压加热 30 min,6000 r/min 离心,弃上清,将沉淀用蒸馏水清洗 3 次,加 50 mL 1 mol/L 盐酸 100℃于回流瓶内抽提 3 h。6000 r/min 离心取上清,20% NaOH 调节滤液 pH 至 9.5。10000 r/min 离心 10 min 收集沉淀,沉淀经无水乙醇脱水两次,60℃真空干燥至恒重,便成为几丁质粗纯品<sup>[10]</sup>。再用浓盐酸处理,即每 1 g 样品中加入 5 mL 丙酮,混匀后加入约 100 mL 的浓盐酸,待溶解后将清液加入至 3 倍的体积的冷蒸馏水中,低温下放置过夜,离心,除去清液,用水洗净沉淀物至中性,干燥后即获得纯的几丁质样品。

## 2 结果和分析

### 2.1 对靶标菌抑制标准及特征

BMME-1 处理茄链格孢菌,孢子萌发明显受抑制。这种抑制作用随着 BMME-1 浓度的增高而加强。当 BMME-1 浓度在 6.2 mg/L 浓度下孢子有半数萌发,增加到 50 mg/L 时,孢子完全不萌发,接入不含药 PDA 培养基后未见有菌丝生长。BMME-1 对茄链格孢菌的半数抑制浓度( $\text{MIC}_{50}$ )为 6.2 mg/L,最低杀菌浓度(MFC)为 50 mg/L。在  $\text{MIC}_{50}$  浓度处理 3 h 后,茄链格孢菌孢子及芽管顶端膨大成泡囊,引起细胞壁破裂,细胞质外流,如图 1。推测代谢物作用于病原真菌细胞壁和细胞膜,从而导致了细胞形态结

构的变化。

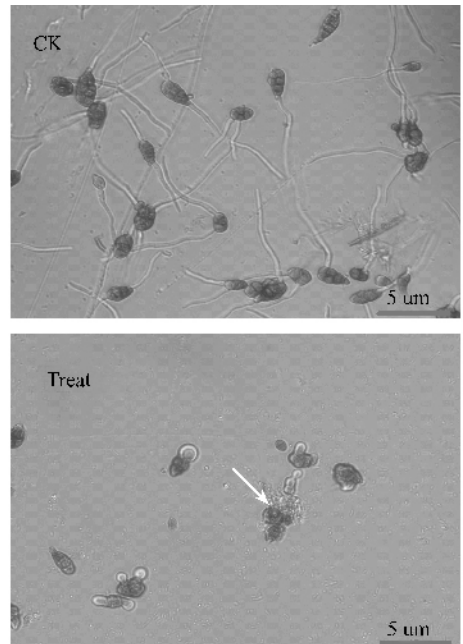


图 1 BMME-1 对茄链格孢菌形态的影响

Fig.1 Effect of BMME-1 on the morphous of *Alternaria solani*

### 2.2 抑制病原菌最适时间确定

试验证明,茄链格孢菌延滞期、对数期、稳定期分别开始于接种后第 1、3、6 天。分别在此时期加入 BMME-1 后,菌体生长如图 2。如图所示,在延滞期加入 BMME-1,抑制菌体生长效果最明显,菌体干均重低于 0.4 g;在对数期、稳定期加入,对菌体生长的抑制作用不明显,但加速了菌体的衰亡,表现为菌丝球散为絮状,沉淀较早。由此将下述试验加入 BMME-1 的时间确定在 36 h,菌株的生长延滞期后期。

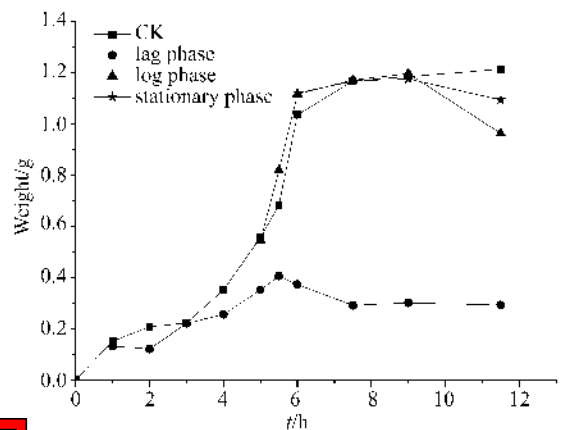


图 2 BMME-1 对茄链格孢菌菌丝生长的影响

Fig.2 The effect of BMME-1 on the growth curve of *Alternaria solani*.

### 2.3 对菌丝渗透性的影响

由于核酸、蛋白质分别在 260 nm、280 nm 处有

最大吸收峰,因此检测的病原真菌细胞外液在 260 nm、280 nm 处紫外吸光度的变化,可有效反映细胞的渗透性变化。由图 3 可知, BMME-1 作用茄链格孢菌从 0 h 至 6 h 内,与对照相比,细胞外液核酸、蛋白质含量逐渐增加。6 h 后,核酸、蛋白质含量变化趋于平缓。表明 BMME-1 处理菌体后影响了细胞的通透性,导致核酸、蛋白质等大分子物质的外流。

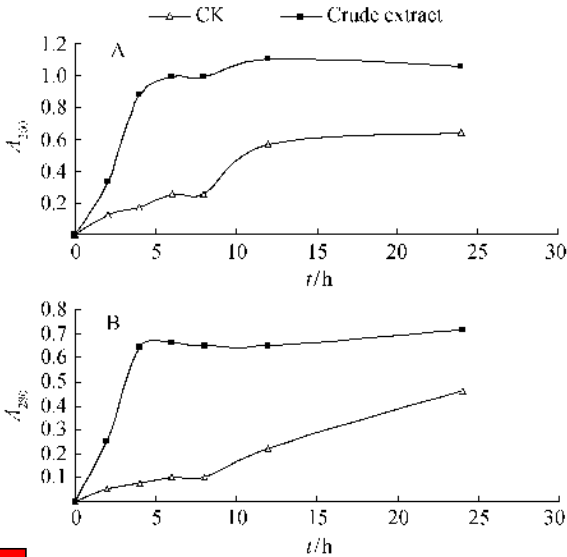


图 3 BMME-1 对茄链格孢菌菌丝渗透性的影响

Fig.3 Effect of BMME-1 on the permeability of *Alternaria solani*. A. absorbance of *Alternaria solani* extracellular fluid under 260nm wavelength; B. absorbance of *Alternaria solani* extracellular fluid under 280nm wavelength.

## 2.4 对茄链格孢菌甾醇成份生物合成的影响

BMME-1 处理茄链格孢菌和对照菌株未皂化脂成份,经面积归一化法计算麦角甾醇组份在总甾醇中所占的百分比。对照菌株中麦角甾醇含量为  $(62.52 \pm 3.31)\%$ ,而处理菌麦角甾醇含量则减少为

$(56.363 \pm 2.52)\%$ ,同时出现一个新峰如图 4-B 所示,与 NBS 谱库对照,该化合物为粪甾醇,其含量为  $(1.670 \pm 0.36)\%$ ,粪甾醇为麦角甾醇合成途径中中间产物,说明 BMME-1 处理靶标菌影响了其麦角甾醇的合成,导致茄链格孢菌细胞膜成份变化,从而影响了细胞膜的通透性。

## 2.5 对茄链格孢菌细胞壁合成的影响

**2.5.1 对茄链格孢菌葡聚糖合成的影响:**病原真菌细胞壁葡聚糖成份的红外图谱显示,  $3410 \text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰是—OH 的伸缩振动吸收峰,  $2923 \text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰是 C—H 的伸缩振动吸收峰,  $1652 \text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰是 C=O 的伸缩振动吸收峰,  $1076 \text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰是环上碳—氧(C—O)吸收峰<sup>[11]</sup>,在  $890 \text{ cm}^{-1}$  处为  $\beta$ -型糖苷键的特征吸收峰,表明茄链格孢菌葡聚糖为  $\beta$ -葡聚糖。与对照菌株相比,处理菌株  $\beta$ -型糖苷键、碳—氧(C—O)、C—H 的特征吸收峰峰值降低;—OH、C=O 的伸缩振动吸收峰的峰值则升高(图 5)。表明经 BMME-1 处理后,葡聚糖的糖苷键及碳—氧键被破坏,相应形成—OH、C=O,对应红外光谱这两个键的特征吸收峰的增加。此结构的变化表明葡聚糖单糖分子间糖苷键的断裂及环式葡萄糖分子形成链式结构,葡聚糖成份形成不稳定结构,导致细胞壁的膨大破裂。

**2.5.2 对茄链格孢菌几丁质合成的影响:**对比不同样品细胞壁几丁质成份的红外图谱显示,样品在  $1650 \text{ cm}^{-1}$ 、 $860 \text{ cm}^{-1}$ (此处为  $\alpha$ -型几丁质的特征吸收峰)具吸收峰,表明茄链格孢菌为几丁质为  $\alpha$ -多糖。处理菌体与对照菌株红外光谱,在  $1631 \text{ cm}^{-1}$ 、 $1072 \text{ cm}^{-1}$  处有较大差异,如图 6 所示。其中  $1631 \text{ cm}^{-1}$  为的酰胺 I 的吸收峰,此峰主要反应几丁

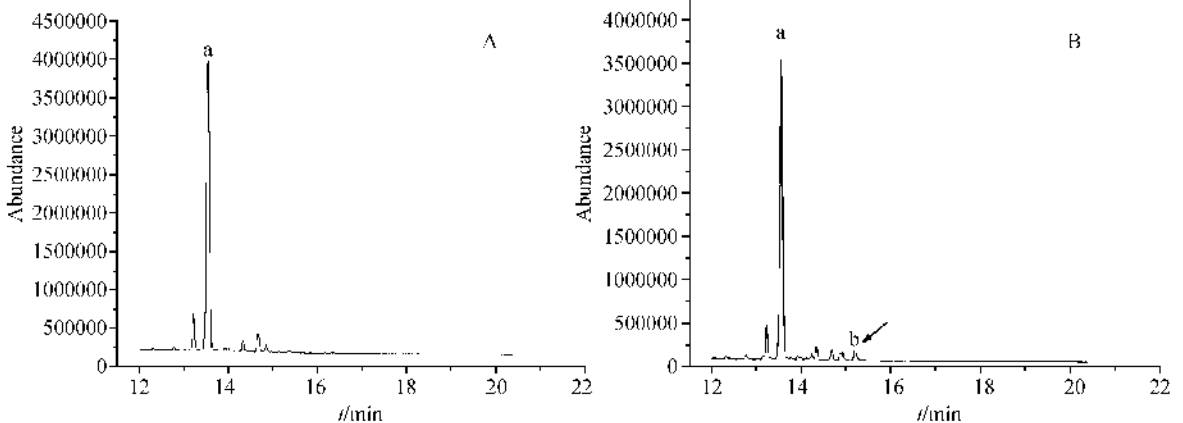


图 4 茄链格孢菌气相色谱图

Fig.4 GC chromatogram of *Alternaria solani*. A: CK, B: Treat with crude extract; a: Ergosterol, b: Cholesterol.

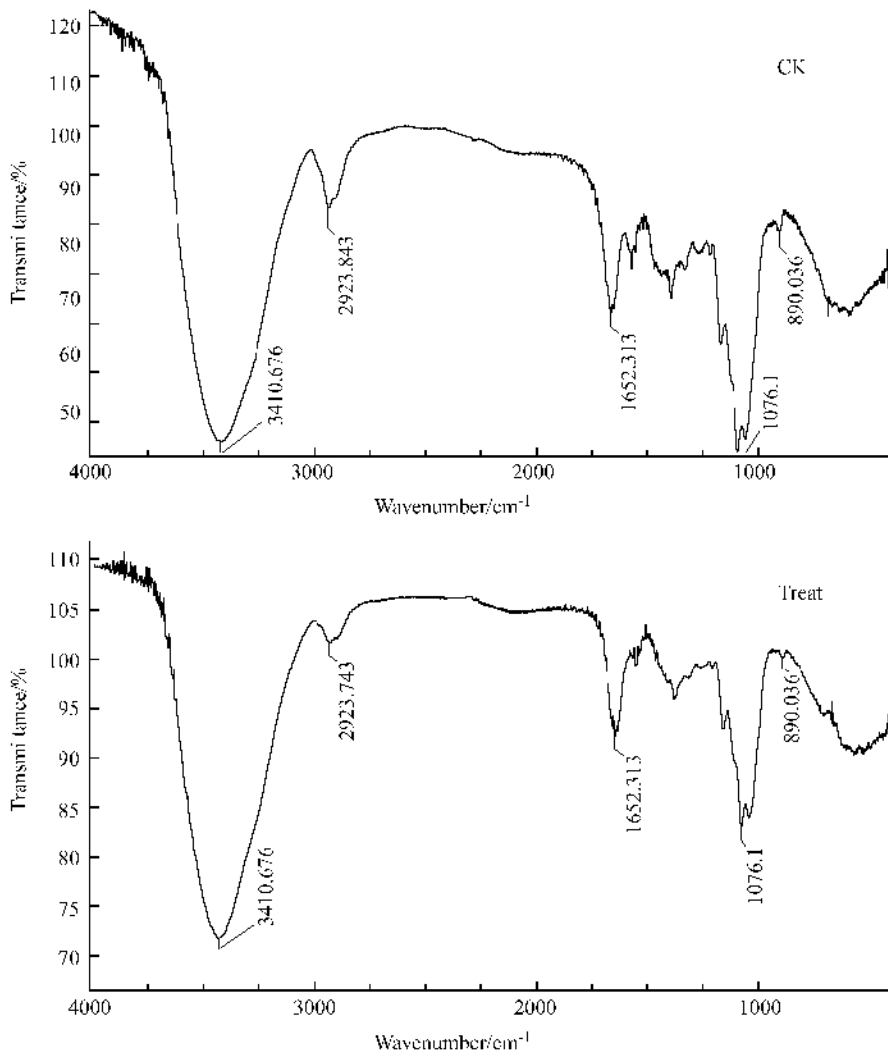


图 5 BMME-1 处理前后茄链格孢菌葡聚糖红外光谱图

Fig. 5 The FT-IR spectrum of glucan from *Alternaria solani* (CK and treated with BMME-1).

质的脱乙酰度,  $1072\text{ cm}^{-1}$  为醇羟基的变角振动吸收峰。实验结果表明, BMME-1 处理菌体后几丁质的酰胺键的变化, 但根据几丁质的化学结构, 酰胺键的变化对几丁质结构的稳定影响不大, 表明 BMME-1 对几丁质结构稳定性影响较小。

### 3 讨论

杀菌剂对病原菌的作用机理的研究是新杀菌剂的研发必需的基础工作之一。杀菌作用机理的阐明可为增效剂的选择、杀菌剂剂型的设计、杀菌剂的混用提供理论依据。海洋芽孢杆菌 B-9987 菌株代谢产物对茄链格孢菌的作用表现在, 能够使正在萌发的分生孢子或已形成的芽管膨大生出较大的泡囊,

继而泡囊破裂, 原生质泄漏。由此推测 BMME-1 对病菌的作用位点可能是菌体的膜或细胞壁。

病原微生物的细胞膜重要功能之一就是维持细胞通透性, 细胞依靠膜通透性摄取细胞外物质, 排出细胞内物质, 维持其生理功能, 而细胞的损伤往往表现出细胞膜通透性异常增加。已有研究表明, 作用于细胞膜的抗菌物质往往能够引起蛋白质、核酸、ATP 等物质的外泄<sup>[12-13]</sup>。本实验也证明 BMME-1 处理靶标菌后, 其细胞外液核酸、蛋白质含量逐渐增加, 表明活性物质引起了细胞膜通透性的变化。试验又进一步通过对病原菌细胞膜的组份的测试, 以探究引起这种变化的根源。麦角甾醇是真菌细胞膜上一类重要脂类成份, 维持了细胞膜流动性、稳定性

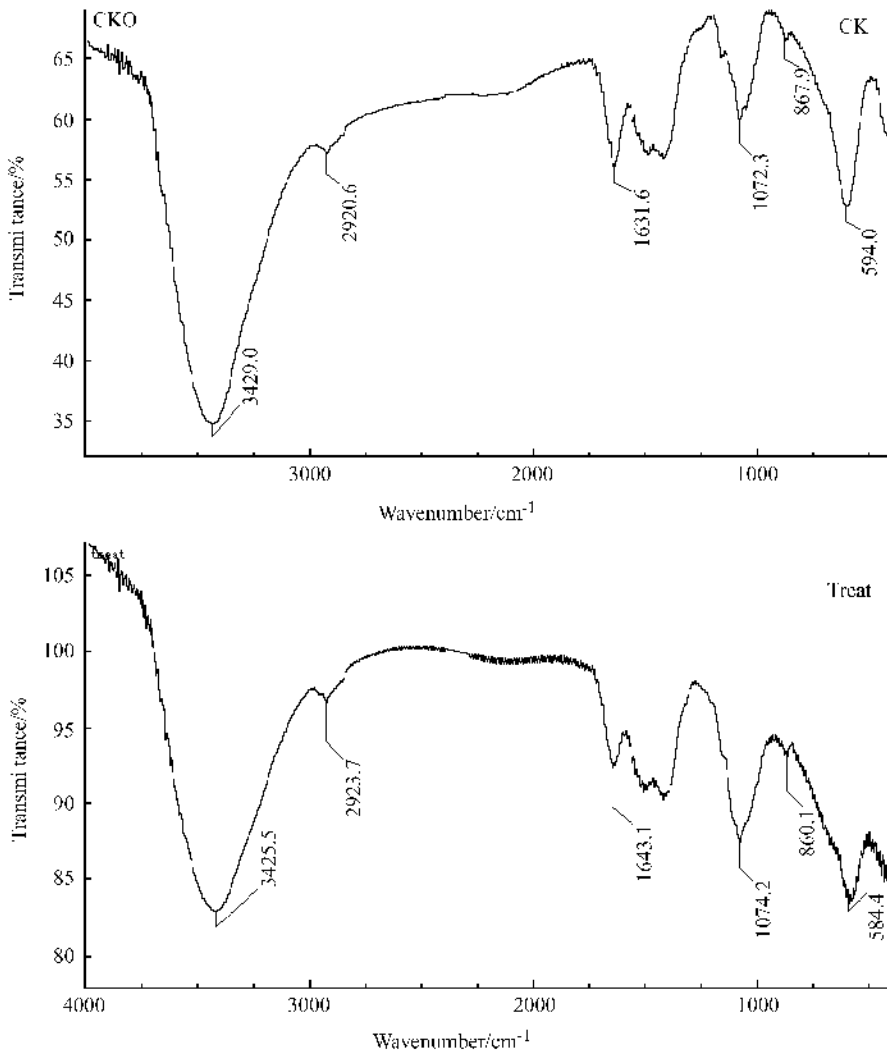


图6 BMME-1 处理前后茄链格孢菌几丁质红外光谱图

Fig.6 The FT-IR spectrum of Chitin from *Alternaria solani* (CK and treated with BMME-1).

及膜结合蛋白活性,其合成路径是多数抗真菌药物的作用靶点<sup>[14]</sup>。课题组从 B-9987 菌株发酵物的乙酸乙酯提取部分获得 7 个多烯大环内酯类化合物<sup>[7]</sup>,据报道多烯大环内酯类药物如两性霉素<sup>[15]</sup>也是通过作用于细胞膜麦角甾醇成分,影响细胞的通透性,从而达到抑菌杀菌的结果。本研究通过 GC-MS 分析,BMME-1 作用后,处理菌株的麦角甾醇含量有所减少,但与对照相比较,差异性不显著。在处理菌株色谱图检测出麦角固醇前体物粪甾醇,而对照菌株未检测出,故推测为麦角甾醇合成的中间途径受到干扰而引起细胞膜通透性变化。

真菌细胞壁与细胞膜组成了细胞的主要的保护

屏障,通过控制细胞内膨胀压力以维持菌体的完整性。同时也是人类选择高效低毒药物的关注靶位,其代谢与真菌生长和分裂密切相关,葡聚糖和几丁质为真菌细胞壁重要组成成份。细胞壁各种成份通过键交联而成的大分子物质,干扰真葡聚糖、几丁质等细胞壁组成物一种或多种的合成,将会对真菌产生致命的作用,而对无细胞壁的高等动物无害<sup>[16]</sup>。红外光谱结果显示,用 BMME-1 处理茄链格孢菌的葡聚糖结构中,其  $\beta$ -型糖苷键、环上碳—氧(C—O)、C—H 吸收峰减少,相应的一OH、C=O 基团含量增加。根据  $\beta$ -型葡聚糖结构,葡聚糖成份的糖苷键及半缩醛结构由于 BMME-1 的作用,糖苷键形

成—OH 结构,半缩醛则形成开环结构既葡萄糖单体以链式结构存在,从而使 C=O 吸收峰的增加,这一系列构型的变化导致 C—H 吸收峰的变化。葡萄糖的链式结构及糖苷键的减少,导致葡聚糖的交联程度的降低,造成茄链格孢菌的细胞壁结构异常,细胞脆弱,容易破裂。而对该细胞壁几丁质成份的测定发现,只有酰胺 I 的吸收峰和醇羟基的变角振动吸收峰有所变化,根据几丁质的化学结构,认为 BMME-1 对茄链格孢菌的几丁质作用不是很明显。综上所述, BMME-1 主要作用是抑制病原真菌细胞壁的葡聚糖合成,同时也干扰了其细胞膜麦角甾醇合成的中间途径,导致菌体膨大、破裂,内容物外流,最终使细胞解体,从而达到抑菌的作用,但对病原真菌细胞壁和细胞膜合成过程中主要作用位点确定,还有待进一步研究。

## 参考文献

- [ 1 ] Franklin TJ, Snow GA. *Biochemistry and molecular biology of antimicrobial drug action* (sixth edition). USA, Springer Science and Business Media, 2005.
- [ 2 ] MacDonald W, Peters RD, Coffin RH, et al. Effect of strobilurin fungicides on control of early blight (*Alternaria solani*) and yield of potatoes grown under two N fertility regimes. *Phytoprotection*, 2007, 88(1): 9 – 15.
- [ 3 ] Takahashi H, Iwasaki S, Kobayashi H, et al. Studies on macrocyclic lactone antibiotics VI: Antibiotic and anti-tubulin activity of new antitumor antibiotics, rhizoxins and its homologues. *Journal of Antibiotics*, 1987, 40 – 66.
- [ 4 ] Wen ZB, Pei YH, Tian L, et al. Research on Gaining Pharmaceutical Marine Microorganisms and Their Biological Characters. *Acta Oceanologica Sinica*. 2006, 25(6): 153 – 161.
- [ 5 ] Xue CM, Tian L, Xu MJ, et al. Macrolactins S-U, Two New 24-Membered Lactones and a New Polyene from Marine Bacterium *Bacillus marinus*. *Journal of Antibiotics*. 2008, 61(11): 668 – 674.
- [ 6 ] Hayashi H, Sunaga R, Furihata K, et al. Isolation and structures of an antifungal antibiotics, Fusarielin A, and related compounds produced by a *Fusarium* sp.. *Antibiotics*, 1995, 48 – 42.
- [ 7 ] Latoud C, Peypoux F, Michel G. Action of iturin A, an antifungal antibiotic from *Bacillus subtilis* on the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Modifications of membrane permeability and lipid composition. *The Journal of Antibiotics (tokyo)*, 1987, 40(11): 1588 – 1895.
- [ 8 ] Gleispach H. The use of different silylating agents for structure analysis of steroids. *Journal of Chromatography*, 1974, 91(4): 407 – 412.
- [ 9 ] Wang TQ, Li HX, Wang MY, et al. Integrative Extraction of Ergosterol, (1 → 3)- $\alpha$ -D-Glucan and Chitosan from *Penicillium chrysogenum* Mycelia. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 2007, 15(5): 725 – 729.
- [ 10 ] 赵颖, 罗璇, 钟晓凌, 等. 红酵母细胞壁中几丁质及壳聚糖的红外光谱研究, 红外 (*Infrared*), 2007, 28(11).
- [ 11 ] 周鹏, 谢明勇, 傅博强. 多糖的结构研究. 南昌大学学报(理科版) (*Journal of Nanchang University: Natural Science*), 2001, 25(2): 197 – 204.
- [ 12 ] Odds FC, Brown AJP, Gow NAR. Antifungal agents: Mechanisms of action. *Trends in Microbiology*, 2003, 11(6): 272 – 279.
- [ 13 ] 陈威, 吴清平, 张菊梅, 等. 壳聚糖抑菌机制的初步研究. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2008, 48(2): 164 – 168.
- [ 14 ] Sanglard D, Ischer F, Parkinson T, et al. *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2003, 47(8): 2404 – 2413.
- [ 15 ] Maciej B, Kamil S, Jacek C, et al. Molecular modelling of membrane activity of amphotericin B, a polyene macrolide antifungal antibiotic. *Acta Biochimica Polonica*, 2005, 52(3): 655 – 658.
- [ 16 ] David WD. Echinocandin Antifungal. *The Lancet*, 2003, 362: 1142 – 1151.

## Antifungal mechanism of *Bacillus marinus* B-9987

Wei Gao<sup>1,2</sup>, Li Tian<sup>1,2\*</sup>, Junying Zhou<sup>3</sup>, Zhenping Shi<sup>1</sup>, Li Zheng<sup>2</sup>, Zhisong Cui<sup>2</sup>, Yuanguang Li<sup>4</sup>

(<sup>1</sup> Biology Department, Qingdao University of Science & Technology, Qingdao 266042, China)

(<sup>2</sup> The First Institute of Oceanography, Qingdao 266061, China)

(<sup>3</sup> Qingdao Agriculture Bureau of Chengyang, Qingdao 266000, China)

(<sup>4</sup> East China University of Science and Technology, School of Biological Engineering, Shanghai 200237, China)

**Abstract:** [Objective] We studied the antifungal effect of the metabolite BMME-1 from *Bacillus marinus* B-9987, to reveal its antifungal mechanism. [Methods] The permeability of the *Alternaria solani* was tested by spectrophotometer after the treating the crude extracts of B-9987. The composition of cell wall and the sterol components of the fungal plasmalemma of *Alternaria solani* were analyzed with Infrared Spectrum and GC-MS, respectively. [Results] We found that the metabolites of B-9987 had strong antifungal activity with MIC<sub>50</sub> and MFC value being 6.2mg/L and 50mg/L. The absorbance in extracellular fluid detection showed that the tegument of the fungi was impaired. The detection of glucan and chitin indicated the change in the structure of the cell wall. The absorption peak of the carbon-hydrogen bond,  $\beta$ -glucosidic bond, carbon - oxygen bond was attenuated but the hydroxyl, carbonyl absorption was enhanced on the contrary. There were only one peak change in chitin chromatogram on the absorption of amide linkage comparing to the control. These changes on the structure may affect the stability of the fungal cell wall. Ergosterol was the predominant component of sterol with the proportion of  $62.52 \pm 3.31\%$  in control cells, but showed a decline during treatment with BMME-1 at a concentration of  $56.36 \pm 2.52\%$ . Accumulation of coprostanol, the precursor of ergosterol, was found in the test. [Conclusion] From the result we can conclude that the antifungal mechanism of the crude extracts was interfering of ergosterol synthesis resulting in the change on permeability, and also mainly changed the structure of the cell wall, mainly acting on the glucan synthesis.

**Keywords:** *Bacillus marinus*; antifungal mechanism; glucan; chitin; ergosterol

( 本文责编 张晓丽 )