

## 青霉 TS67 菌株活性产物的抗真菌作用

王淑媛 王素英\* 涂敏勤

(天津商业大学生物技术与食品科学学院 天津市食品生物技术重点实验室 天津 300134)

**摘要:** 本文初步探讨了青霉 TS67(*Penicillium* sp.)的发酵活性产物对植物病原真菌的抑制作用机理,实验结果表明,用其 50%的发酵液分别处理玉蜀黍平脐蠕孢菌(*Bipolaris maydis*)和大豆尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)120 h 后,菌丝生长的抑制率分别为 77.78%和 70.30%,对孢子产生的抑制率分别达 58.8%和 73.5%;同时发现用 50%发酵液处理病原菌的无性繁殖孢子 12 h 后,孢子萌发抑制率分别达 78.3%和 62.0%。经显微镜观察抗菌活性物质处理后的菌丝体,发现菌丝体表面瘤状畸形、菌丝生长顶端不规则膨胀、内部发生原生质浓缩,初步推测青霉 TS67 主要通过影响植物病原真菌的细胞壁而实现抑制作用。

**关键词:** 抑菌活性, 机理

## The Antifungal Mechanism of Bioactive Metabolites Produced by *Penicillium* sp. TS67

WANG Shu-Yuan WANG Su-Ying\* TU Min-Qin

(College of Biotechnology and Food Science, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134)

**Abstract:** The antifungal mechanism of the TS67(*Penicillium* sp.) producing bioactive metabolites was investigated in this paper. The test indicated that mycelia growth, spores forming and spores germination of *Bipolaris maydis* and *Fusarium oxysporum* can be inhibited by metabolites, after 50% fermentation broth acting 120 hours, the inhibition rate of hyphal growth can reach about 77.78%, 70.30%, the inhibition rate of spores forming also arrived at 58.8%, 73.5%; under 50% fermentation broth acting 12 hours, the inhibition rate of spores germination were up to 78.3%, 62.0%, the mycelia under activity metabolites conditoin also showed surface nodulation and growing point expanding irregularly, protoplasmic condensing, etc. Based on all these results, we may draw a conclusion that activity metabolites maybe target at fungal cell wall.

**Keywords:** Antifungal activity, Mechanism

随着现代农业的发展及人类对保护环境和生态认识的提高,作为生物防治重要内容的微生物农药,因具有来源广、成本低、易于降解、残留小、毒性低等特点,成为开发农用抗生素的重要途径和发展

方向<sup>[1]</sup>。人们已经认识到海洋这一特殊生境造就了微生物种类及代谢途径特异性,可以产生大量有价值的完全不同于陆地微生物的新颖生物活性物质,海洋微生物将是今后获得新的农用抗生素的重要资

基金项目: 天津市高等学校科技发展基金项目(No. 2004zd20)

\* 通讯作者: Tel: 022-81720629; Fax: 022-26675780; 信箱: wsying@tjcu.edu.cn

收稿日期: 2008-01-17; 接受日期: 2008-03-21

源<sup>[2,3]</sup>。我国利用海洋微生物代谢产物研制农用抗生素的研究刚刚起步,且主要集中在黄海和东海海域。青霉 TS67(*Penicillium* sp.)分离自渤海近海海域水样,对玉蜀黍平脐蠕孢菌(*Bipolaris maydis*)和大豆尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)具有很强的抑制作用,本实验拟在细胞水平上初步探讨该菌株发酵活性产物的抑菌机理,为该菌株的开发利用提供理论指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 菌种: 青霉 TS67(*Penicillium* sp.)菌株分离自渤海近海海域水样。

植物病原真菌: 玉蜀黍平脐蠕孢菌(*Bipolaris maydis*)、大豆尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)为本实验室的保藏菌种。

1.1.2 培养基: PDA 固体培养基, PDA 液体培养基见参考文献[4]。

海洋真菌发酵培养基: 葡萄糖 10 g, 蛋白胨 2 g, 酵母膏 1 g, 蒸馏水 400 mL, 人工海水 600 mL。

### 1.2 实验方法

1.2.1 青霉 TS67 发酵液的制备: 将青霉 TS67 接种在 PDA 固体培养基上, 28℃活化 5 d, 转接至含 50 mL 海洋真菌液体培养基的 250 mL 三角瓶中, 28℃、170 r/min 培养 4 d~5 d, 待发酵液的 pH 值降为 4.8~5.0 时, 终止发酵, 并将得到的发酵液过滤除去菌丝体, 收集上清液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 制成无菌发酵液备用。

1.2.2 对病原真菌菌丝抑制作用的测定-菌落生长法<sup>[5]</sup>: 将病原菌在 PDA 固体平板上培养 3 d 形成单菌落, 将发酵液用无菌水稀释成浓度为 50%、25%、12.5%的发酵液, 然后分别取浓度为 100%、50%、25%、12.5%发酵液和融化的 50 mL PDA 培养基各 6 mL 立即混匀倒平板, 制成含有发酵液浓度为 50%、25%、12.5%、6.25%的固体培养基, 取直径 5 mm 的菌块分别放于培养基中央, 以加相同体积的无菌水 PDA 平板为对照, 每个浓度重复 3 次, 28℃下培养, 每隔 24 h 采用十字交叉法, 观察测定菌落直径, 直至 120 h, 与对照菌落比较, 计算菌丝生长抑制率。公式如下:

$$\text{抑菌率} = (\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}) / \text{对照菌落直径} \times 100\%$$

1.2.3 对病原菌形成无性孢子的影响: 将上述培养 120 h 的病原菌菌落, 用打孔器于距菌落边缘 3 mm~4 mm 处打取菌块, 放入试管内加入 5 mL 蒸馏水, 将菌块上的孢子全部洗下, 用血球计数板直接计数, 每皿取 2 块, 每个菌块计数 3 次, 将 6 个观察数据平均, 作为实验数据。

1.2.4 病原菌无性孢子萌发率的测定—悬滴法<sup>[5]</sup>: 将病原菌的孢子悬液与不同浓度的发酵液各 100 μL 混合, 使发酵液的最终浓度为 50%、25%、12.5%、6.25%, 将 200 μL 混合液置于凹玻片上, 28℃培养 12 h 后在光学显微镜下观察孢子萌发的情况, 每个处理重复 3 次, 随机取 3 个高倍镜视野下(每个视野下约 100 个孢子)孢子萌发(以芽管长度超过孢子直径一半记为萌发)平均数, 与对照比较, 计算各处理的孢子萌发抑制率。公式如下:

$$\text{孢子萌发抑制率} = (\text{对照萌发率} - \text{处理萌发率}) / \text{对照萌发率} \times 100\%$$

1.2.5 对病原菌菌丝形态的影响: 将 0.2 mL 病原菌孢子悬液接种到 2.8 mL 的 PDA 液体培养基中, 28℃恒温静止培养 24 h 后, 加入 3.0 mL 不同浓度的发酵液使其终浓度分别为 50%、25%、12.5%, 28℃继续静止培养 12 h, 光学显微镜下观测菌丝形态变化。将玉蜀黍平脐蠕孢菌在 PDA 固体平板上培养 3 d, 形成均匀的菌落后用 5 mm 打孔器打取菌落边缘均一的菌块作接种物, 置于含 50%发酵液的 PDA 固体培养基中央, 以加相同体积的灭菌水 PDA 固体培养基为对照, 28℃培养, 于 3 d 和 5 d 分别取样用扫描电镜观察。

## 2 结果与分析

### 2.1 对菌丝生长的抑制作用

采用菌落生长法, 测定了不同浓度的发酵液对玉蜀黍平脐蠕孢菌和大豆尖孢镰刀菌菌丝生长的影响, 结果见图 1 和图 2。从图中可以看出: 不同浓度的发酵液对两种病原菌菌丝的生长均有一定的抑制作用, 且随着发酵液浓度的增加, 抑菌效果明显增强。在含 6.25%发酵液的 PDA 平板上, 病原菌菌落的大小与对照无明显差异; 在含 12.5%发酵液的 PDA 平板上, 前 24 h 内菌落扩张较缓慢, 48 h 后随着培养时间的延长, 病原菌落直径与对照菌落的差异变小; 在含 25%发酵液的 PDA 平板上, 病原菌菌落与对照菌落有明显的差异, 且扩展缓慢; 含 50%

发酵液 PDA 平板上,病原菌菌落几乎不扩展,48 h 后开始缓慢扩展,菌落与对照有显著的差异。将图 1 和图 2 进行比较,可以看出发酵液对玉蜀黍平脐蠕孢菌菌丝生长的抑制作用大于大豆尖孢镰刀菌,浓度为 50%的发酵液处理玉蜀黍平脐蠕孢菌和大豆尖孢镰刀菌 120 h 后,菌丝生长的抑制率分别为 77.78%和 70.30%。

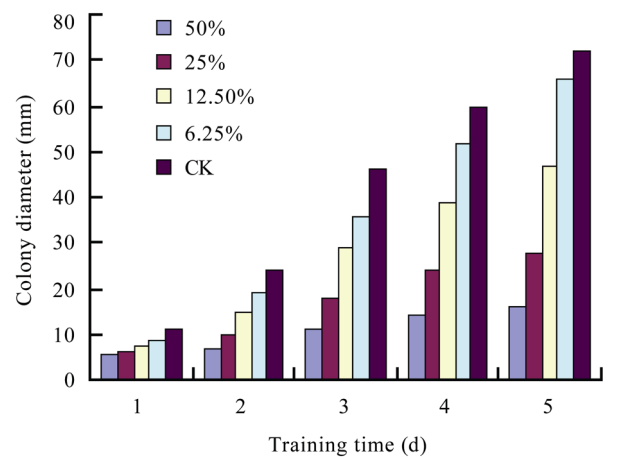


图 1 发酵液对玉蜀黍平脐蠕孢菌生长的影响  
Fig. 1 Effects on hyphal growth of *Bipolaris maydis*

2.2 对病原菌形成无性孢子和孢子萌发的抑制作用

采用直接计数和悬滴法分别测定了青霉 TS67 发酵液对病原菌无性孢子产生和孢子萌发的影响,实验结果见表 1。

由表 1 可知不同浓度的发酵液对玉蜀黍平脐蠕孢菌和大豆尖孢镰刀菌孢子产生不同程度的影响,

并且随着发酵液浓度减弱,对两种植物病真菌孢子产生抑制作用逐渐减弱。其中,50%发酵液对玉蜀黍平脐蠕孢菌和大豆尖孢镰刀菌孢子产生抑制率分别达 58.8%和 73.5%,可见发酵液中的活性产物不仅抑制病原菌菌丝的生长,更重要的是导致其产孢能力的下降,从而使病菌丧失侵染能力。

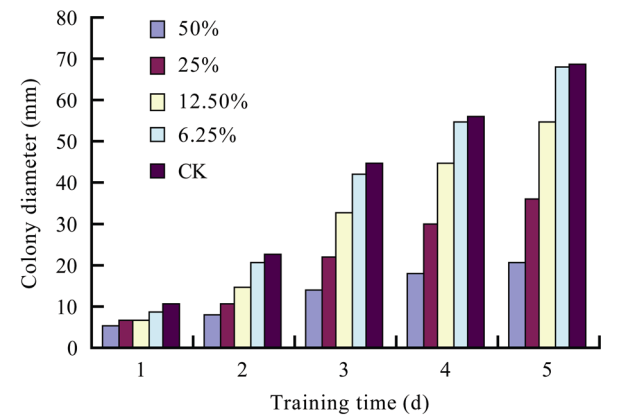


图 2 发酵液对大豆尖孢镰刀菌生长的影响  
Fig. 2 Effects on hyphal growth of *Fusarium oxysporum*

孢子萌发实验结果表明:当培养达到 12 h 时,对照组的孢子萌发率比较高,而经不同浓度发酵液处理的病原菌孢子的萌发均受到一定程度的抑制,浓度为 50%发酵液对玉蜀黍平脐蠕孢菌和大豆尖孢镰刀菌孢子萌发抑制率分别为 78.3%和 62.0%,随着发酵液浓度的减少,抑菌作用降低,孢子萌发率上升,浓度为 6.25%的发酵液对孢子萌发的抑制作用不明显。

表 1 对病原真菌孢子产生和孢子萌发的影响						
Table 1 Effects on spores forming and spores germination of pathogenic fungi						
病原真菌 Pathogenic fungus	发酵液浓度 Fermentation bro concentration (%)	菌块孢子数 Spores quantity fungus block (×1 <sup>5</sup> )	孢子产生抑制率 Inhibition rate of spores forming (%)	孢子萌发率 Sporesgerminat on rate (%)	孢子萌发抑制率 Inhibition rate of spores germination (%)	
玉蜀黍平 脐蠕孢 <i>Bipolaris maydis</i>	50	0.59	58.8	17.9	78.3	
	25	0.75	44.9	39.2	52.5	
	12.5	1.02	25.0	55.6	32.7	
	6.25	1.24	8.8	75.1	9.1	
	0	1.36	0	82.6	0	
大豆尖孢 镰刀菌 <i>Fusarium oxysporum</i>	50	0.31	73.5	26.8	62.0	
	25	0.53	54.7	37.6	46.7	
	12.5	0.80	31.6	52.3	25.8	
	6.25	0.94	19.7	65.9	6.5	
	0	1.17	0	70.5	0	

## 2.3 对菌丝形态的影响

**2.3.1 病原菌菌丝形态变化的光学显微镜观察:** 用油镜观察青霉 TS67 菌株对病原菌菌丝形态的影响, 发现用 12.5% 的发酵液处理两种病原真菌 12 h 后, 菌丝生长缓慢, 有的菌丝停止生长, 菌丝表面有突起; 用 25% 发酵液处理 12 h 后, 两种病原菌菌丝体表面有许多瘤状畸形, 尤其是对菌丝的顶端生长点有较大的影响, 菌丝生长顶端严重的不规则膨胀, 菌丝体内部出现原生质浓缩的现象; 用 50% 发酵液处理两种病原菌 12 h 后均出现菌丝体断裂, 菌丝体表面严重畸形; 而未经发酵液处理的玉蜀黍平脐蠕孢菌和大豆尖孢镰刀菌菌丝粗细均匀, 菌丝饱满, 表面光滑, 可见 TS67 菌株的发酵活性产物一方面破坏细胞壁的结构而使菌丝形态发生显著的变化, 另一方面通过影响细胞壁的形成而抑制病原菌的生长。

**2.3.2 病原菌菌丝形态变化的扫描电镜观察:** 通过

扫描电镜观察发现未经发酵液处理的菌丝粗细均匀, 菌丝饱满, 表面光滑(见图 a), 而用发酵液处理过的菌丝较细, 表面凹凸不平, 菌丝整体粗细不均匀, 发酵液处理 3 d 后, 菌丝顶端出现皱缩, 无规则卷曲(见图 b), 菌丝局部膨大, 并有断裂现象(见图 c), 菌丝生长点出现畸变(见图 d), 发酵液处理 5 d 后, 菌丝大部分部位失水畸形(见图 e), 菌丝不完整, 出现严重断裂(见图 f)等现象, 由此我们可以得出, TS67 菌株发酵液能够很好的抑制玉蜀黍平脐蠕孢菌的正常生长, 并且进一步证实了 TS67 菌株发酵活性产物对菌丝的生长点有较大的影响, 出现菌丝生长顶端不规则膨胀以及皱缩, 可能的原因是影响细胞壁的合成, 使得真菌细胞壁厚薄不均匀, 从而影响细胞膜的合成, 改变细胞膜的通透性, 从而破坏菌丝正常的生理代谢, 并导致菌体出现皱缩或膨胀的现象<sup>[6-8]</sup>。

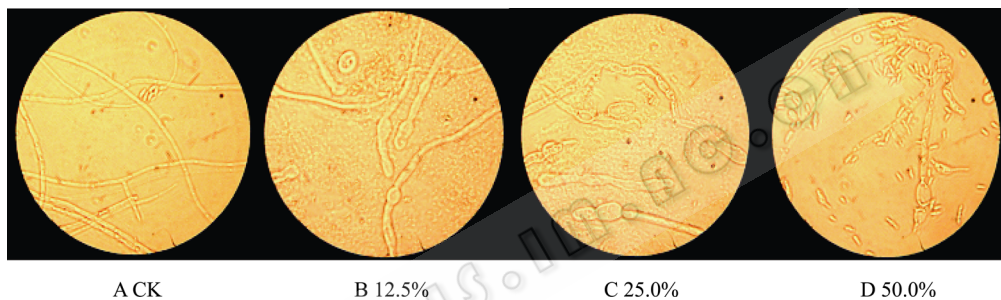


图 3 不同浓度的发酵液对玉蜀黍平脐蠕孢菌菌丝的影响(100×)

Fig.3 Effects on hyphal growth of *Bipolaris maydis* by different fermentation broth concentration (100×)

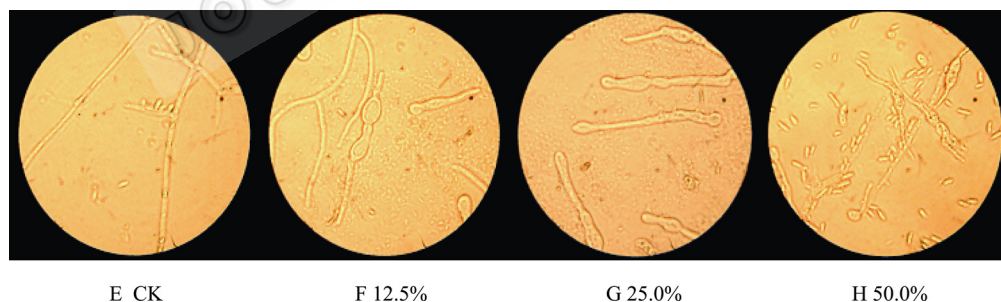


图 4 不同浓度的发酵液对大豆尖孢镰刀菌菌丝的影响(100×)

Fig. 4 Effects on hyphal growth of *Fusarium oxysporum* by different fermentation broth concentration(100×)

## 3 结论

通过上述系列实验, 发现青霉 TS67 菌株的液体发酵活性产物不仅能够有效抑制玉蜀黍平脐蠕孢菌(*Bipolaris maydis*)、大豆尖孢镰刀菌(*Fusarium*

*oxysporum*)的菌丝生长, 无性孢子的形成和萌发, 而且使菌丝体表面产生许多瘤状突起, 菌丝局部严重膨大, 并有断裂现象, 菌丝生长点畸变, 出现菌丝生长顶端膨胀, 由此可见青霉 TS67 菌株产生的活性代谢产物是通过作用于病原真菌的细胞壁, 使

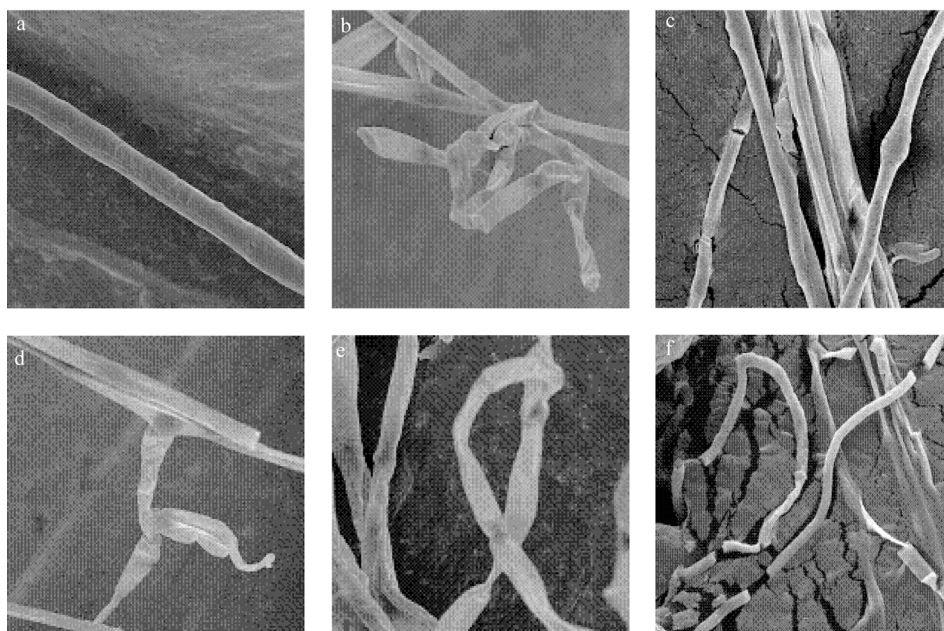


图5 扫描电镜观察活性产物对玉蜀黍平脐蠕孢菌丝形态的影响(1800×)

Fig. 5 Effects on mycelia shape of by *Bipolaris maydis* fermentation broth under Scanning electron microscope(1800×)

a: 正常菌丝; b,c,d: 50%发酵液作用 3 d; e,f: 50%发酵液作用 5 d

a: Normal mycelia; b,c,d: Under 50% fermentation broth for 3 d; e,f: Under 50% fermentation broth for 5 d

细胞壁变薄或失去完整性,造成细胞膜暴露,最后由于渗透压差导致原生质泄漏,最终导致病原菌死亡,这一结论与 Maertens<sup>[9]</sup>和 Castelli<sup>[10]</sup>在真菌细胞壁机理研究中报道一致。另外田黎等<sup>[11]</sup>、屈海泳等<sup>[12]</sup>和段琦梅等<sup>[13]</sup>研究微生物胞外代谢产物对植物病原真菌拮抗机制的初步研究中均发现类似的现象,并推测其与病原真菌的细胞壁有关。

为了进一步证实上述结论,阐明青霉 TS67 菌株发酵活性产物抑制植物病原菌的分子机制,将在青霉 TS67 发酵活性产物分离纯化的基础上,分析其化学性质和化学结构,并利用高纯度的抗菌活性物质与病原真菌的不同细胞结构作用,以提出完整的抗菌机理,为青霉 TS67 菌株的开发利用提供思路和依据。

## 参 考 文 献

- [1] 胡 霞,苑艳辉,姚卫容,等. 微生物农药发展概况. 农药, 2005, 44(2): 49-52.
- [2] Byun G, Mochizuki H, Adachi M, *et al.* Novel antifungal dike-topiperazine from marine fungus. *The Journal of Antibiotics*, 2003, 56(2): 102-106.
- [3] Liu CH, Liu JY, Huang LL, *et al.* Absolute configuration of keisslone, a new antimicrobial metabolite from *Keissleriella* sp. YS4108, a marine filamentous fungus. *The Journal of Plant Medicine*, 2003, 69(5): 481-483.
- [4] 赵 斌,何绍江. 微生物学实验. 北京: 科学出版社, 2002, p.8.
- [5] 孔凡彬,高扬帆,陈锡岭,等. 9种药剂对玉米小斑病菌的室内抑菌试验. 2006, 37(2): 148-149.
- [6] 孙延忠,曾洪梅,李国庆. 抗生素对微生物作用的研究. 微生物学杂志, 2003, 23(3): 44-47.
- [7] Douglas CM. Fungal  $\beta(1,3)$ -D-glucan synthesis. *Med Mycol*, 2001, 39: 55-66.
- [8] 窦 洁,袁 生,薛绍白. 丝状真菌的顶端生长及与细胞壁关系研究进展. 微生物杂志, 1997, 17(3): 46-51.
- [9] Maertens JA, Boogaoerts MA. Fungal cell wall inhibitors emphasis on clinical aspects. *Curr Pharm Des*, 2000, 6(2): 225-229.
- [10] Lopez SN, Castelli MV, Zacchino SA, *et al.* In vitro antifungal evaluation an structure activity relationships of a new series of chalcone derivatives and synthetic analogues with inhibitory properties against polymer of the fungal cell wall. *Bioorg Med Chem*, 2001, 9(8): 1999-2002.
- [11] 田 黎,顾振芳,陈 杰,等. 海洋细菌 B-9987 菌株产生的抑菌物质及对几种植物病原真菌的作用. 植物病理学报, 2003, 33(1): 77-80.
- [12] 屈海泳,罗 曼,蒋立科,等. T90-1 木霉菌的筛选和对草莓灰霉病菌作用机制的研究. 微生物学报, 2004, 44(2): 243-247.
- [13] 段琦梅,慕小倩,安德荣,等. S-159-06 菌株活性产物对植物病原菌的抑菌谱及拮抗机理初探. 西北植物学报, 2004, 24(6): 1088-1092.