



研究报告

伯克霍尔德菌 HQB-1 抑制香蕉枯萎病菌的活性化合物分离鉴定

王明元^{*1,2} 徐志周² 刘建福¹ 李文魁³ 林思锻⁴

1 华侨大学园艺科学与工程研究所 福建 厦门 361021

2 华侨大学生物工程与技术系 福建 厦门 361021

3 三达膜科技(厦门)有限公司 福建 厦门 361022

4 泉州市洛江区农业科学研究所 福建 泉州 362011

摘要:【背景】伯克霍尔德菌 HQB-1 对香蕉枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4, Foc TR4)具有良好的防治效果。【目的】从菌株 HQB-1 发酵液中分离活性化合物并通过超高效液相联用质谱进行检测, 获得该菌株具有良好生防作用的单体化合物。【方法】以 HQB-1 为目标菌株, 大批量发酵并进行发酵液分离、提纯, 通过超高效液相联用质谱法与核磁共振波谱法鉴定活性化合物。【结果】 HQB-1 菌株发酵液中的蛋白对 Foc TR4 无抑制作用; HQB-1 菌株产生儿茶酚型铁载体, 而不产生异羟肟酸型铁载体; 对 HQB-1 菌株发酵液离心、浓缩、干燥, 获得乙酸乙酯浸膏(粗提物), 经过大孔树脂柱的充分吸附, 在 30%、60%及无水甲醇的洗脱下获得组分 1–3, 对 Foc TR4 的抑菌率分别为 10.06%、27.82%和 51.40%; 选择抑菌率最大的组分 3 过硅胶柱层析, 获得黄绿色晶体。该化合物在 365 nm 波长下具有最大吸收峰, 将核磁共振图谱与 SciFinder 和 SDBS 信息数据库进行图谱比对, 将该抑菌活性化合物鉴定为吩嗪-1-羧酸(Phenazine-1-Carboxylic Acid, PCA)。PCA 对 Foc TR4 的最小抑菌浓度最低, 仅为 1.563 $\mu\text{g/mL}$, 说明 PCA 对 Foc TR4 的抑制效果较强。【结论】从 HQB-1 菌株中分离得到活性化合物 PCA, PCA 的发现为香蕉枯萎病的生物防治奠定了良好的理论基础。

关键词: 伯克霍尔德, HQB-1 菌株, 抑菌化合物, 分离纯化, 吩嗪-1-羧酸

Foundation items: Special Project on Education and Research of Fujian Province (2017N5009); Promotion Program for Young and Middle-Aged Teacher in Science and Technology Research of Huaqiao University (ZQN-YX507); Quanzhou Science and Technology Project (2019N029)

***Corresponding author:** Tel: 86-592-6162300; E-mail: w_mingyuan@163.com

Received: 24-08-2020; **Accepted:** 18-09-2020; **Published online:** 25-11-2020

基金项目: 福建省科技厅高校产学研重大项目(2017N5009); 华侨大学青年教师科研提升计划(ZQN-YX507); 泉州市科技计划(2019N029)

***通信作者:** Tel: 0592-6162300; E-mail: w_mingyuan@163.com

收稿日期: 2020-08-24; **接受日期:** 2020-09-18; **网络首发日期:** 2020-11-25

Isolation and identification of bioactive compounds of *Burkholderia* HQB-1 strain inhibiting banana wilt

WANG Mingyuan^{*1,2} XU Zhizhou² LIU Jianfu¹ LI Wenkui³ LIN Siduan⁴

1 Institute of Horticultural Science and Engineering, Huaqiao University, Xiamen, Fujian 361021, China

2 Department of Biological Engineering and Technology, Huaqiao University, Xiamen, Fujian 361021, China

3 Suntar Membrane Technology (Xiamen) Limited Company, Xiamen, Fujian 361022, China

4 Institute of Agricultural Sciences in Luojiang District of Quanzhou, Quanzhou, Fujian 362011, China

Abstract: [Background] *Burkholderia* HQB-1 has good control effect on banana fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 (Foc TR4)). [Objective] The active compound was separated from the fermentation broth of HQB-1 strain, and the active compound was detected by HPLC-MS to obtain the monomer compound with good biocontrol effect. [Methods] HQB-1 strain was fermented in large quantities, and then the fermentation broth was separated and purified. The active compounds were identified by HPLC-MS and NMR. [Results] The protein from fermentation broth of HQB-1 strain had no inhibitory effect on Foc TR4. The catechol type iron carrier rather than hydroxamic acid type iron carrier was produced from HQB-1 strain. HQB-1 strain fermentation broth was centrifuged, concentrated and dried to obtain ethyl acetate extract (crude extract), which was then fully adsorbed by macroporous resin column. The components 1–3 were obtained after eluting by 30%, 60% and anhydrous methanol, and the corresponding inhibitory rate to Foc TR4 was 10.06%, 27.82% and 51.40% respectively. The component with the highest inhibitory rate was selected, and the yellow green crystal was obtained through silica gel column chromatography. The compound had a maximum absorption peak at 365 nm wavelength. The antibacterial activity compound was identified as phenazine-1-carboxylic acid (PCA), after the comparative analysis of NMR spectrum with SciFinder and SDBS information database. The minimum inhibitory concentration (MIC) of PCA to Foc TR4 was the lowest, only 1.563 µg/mL, indicating that PCA had a strong inhibitory effect on Foc TR4. [Conclusion] The active compound PCA isolated from HQB-1 strain had the biocontrol effect on banana fusarium wilt.

Keywords: burkholder, HQB-1 strain, antibacterial compound, separation and purification, phenazine-1-carboxylic acid

伯克霍尔德菌作为生防菌剂, 防治植物病原菌已有报道^[1-2]。研究发现该菌可产生复杂而丰富的次级代谢产物, 包括非核苷酸多肽类、铁载体以及抗生素类(如聚酮等)天然活性物质, 这些物质在拮抗植物病原菌的生物防治中具有重要作用^[3-4]。研究发现, 伯克霍尔德菌株 WP40 和 WP42 起决定作用的生物活性物质是合成铁载体^[5]。任嘉红等^[6]认为吡咯伯克霍尔德菌(*Burkholderia pyrrocinia*) JK-SH007 菌株对杨树溃疡病菌金黄壳囊孢(*Cytospora chrysosperma*)、拟茎点霉(*Phomopsis macrospore*)、七叶树壳梭孢(*Fusicoccum aesculi*)起抑制作用的蛋白组分是 A-II-2。洋葱伯克霍尔德

菌 CF-66 对真菌类病原菌具有强烈的抑制作用, 其发酵液经分离纯化得到一种生物活性成分——环二肽 Cyclo(Phe-Pro)^[7]。

香蕉(*Musa* spp.)是重要的经济作物, 也是全球贸易量最大的水果, 与柑橘、葡萄、苹果共同被联合国粮农组织列为世界四大水果。2019 年, 我国香蕉种植面积超过 32 万 hm², 产量超过 1 000 万 t (数据来源于 2019 年香蕉产业体系), 香蕉产业已成为我国南方地区重要的农业经济支柱。然而, 由尖孢镰孢菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, Foc)引起的香蕉枯萎病发病严重, 导致香蕉组织死亡、树体连片枯萎, 严重影响我国香蕉产业的健

康发展^[8]。

本实验室前期筛选出 1 株伯克霍尔德菌 HQB-1, 该菌株发酵液对香蕉枯萎病菌具有良好的抑制效果^[9]。尽管该菌株表现出良好的生防效果, 但其抑制香蕉枯萎病菌的生物活性物质依然不清楚。本研究对伯克霍尔德菌 HQB-1 发酵液中的抑菌活性化合物进行分离、提纯, 并通过超高效液相联用质谱法对其化学结构进行鉴定, 以确定伯克霍尔德菌 HQB-1 发酵产物中的主要抑菌活性成分。本研究的开展, 将进一步明确伯克霍尔德菌 HQB-1 的生防机理, 可为香蕉枯萎病的防治提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

HQB-1 菌株来自华侨大学园艺植物生物学实验室, 伯克霍尔德菌, 革兰氏阴性, 菌落形态呈白色, 圆形, 表面光滑, 有光泽, 边缘整齐, 不透明, 不产生荧光。细菌形态呈直杆状, 菌体大小为 $(1.2-2.5) \mu\text{m} \times (0.5-1.0) \mu\text{m}$ 。

供试病原菌: 尖孢镰孢菌古巴专化型 4 号生理小种(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4, Foc TR4), 由广东省农业科学院果树研究所提供。

试剂均为国产分析纯, 厦门绿茵试剂玻仪有限公司; 超高效(压)液相色谱仪、超高效(压)液相色谱/四极杆飞行时间质谱仪, Agilent 公司; 核磁共振波谱仪, Bruker 公司; 即用型透析袋(2 000 Da), 北京索来宝科技有限公司。

钼酸盐溶液: NaNO_2 10 g, Na_2MoO_4 10 g, 去离子水定容至 100 mL。

$\text{FeCl}_3\text{-HClO}_4$ 溶液: 1 mL 0.5 mol/L FeCl_3 , 50 mL 35% HClO_4 , 混合均匀。

CAS 检测液的配制: 1 mmol/L 铬天青(CAS), 0.1 mmol/L FeCl_3 , 4 mmol/L 十六烷基三甲基溴化胺(HDTMA)。CAS 检测培养基: 蔗糖 0.2 g, 酸水解酪蛋白 0.3 g, 1 mmol/L CaCl_2

100 μL , 1 mmol/L MgSO_4 2 mL, 琼脂 1.8 g, 在约 60 °C 时缓慢加入 0.1 mol/L PBS 缓冲液(pH 6.8-7.0)和 CAS 检测液各 5 mL, 即得蓝色检测培养基。以上所有溶液均用去离子水配制。

NB 培养基(g/L): 牛肉膏 3.0, 蛋白胨 5.0, pH 7.0-7.2。

KMB 液体培养基参考龙云川等^[10]方法配制。

发酵培养基(g/L): 牛肉膏 5.0, 酵母浸粉 10.0, NaCl 5.0。

1.2 方法

1.2.1 HQB-1 菌株发酵液中蛋白酶类物质的抑菌活性检测

HQB-1 菌株发酵上清液制备: 以 1% 的接种量接种 NB 培养基, 27 °C、200 r/min 培养 36 h, 10 000 r/min 离心 15 min, 取上清备用。

采用硫酸铵沉淀法分离抑菌活性物质^[11], 有改动。取 HQB-1 菌株发酵上清液 5 mL, 分别通过 10%、30%、50%、70% 和 80% 的硫酸铵分级沉淀后, 于 4 °C 静置过夜, 以 80% 饱和硫酸铵的空白培养液作为对照, 经 12 000 r/min 离心 20 min 后分别收集上清和蛋白质沉淀, 通过平板对峙法分别对上清和沉淀进行抑菌活性测试。

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

透析法: 将透析袋剪成 10-20 cm 的小段, 在大体积的 2% 碳酸氢钠和 1 mmol/L EDTA (pH 8.0) 中将透析袋煮沸 10 min, 用蒸馏水彻底清洗透析袋; 再放在 1 mmol/L EDTA (pH 8.0) 中煮沸 10 min, 冷却后存放于 4 °C, 并确保透析袋始终浸没在溶液内, 使用前在透析袋内装满蒸馏水然后排出, 将之清洗干净。

取 HQB-1 菌株发酵上清液 5 mL 装入透析袋, 放在加入适量(500 mL)透析液(PBS 缓冲液, pH 7.2-7.4)的空白烧杯中, 4 °C 过夜, 中间更换透析溶液 3-4 次。经 12 000 r/min 离心 20 min 后, 分别收集上清和蛋白质沉淀, 通过上述的平板对峙法分别对上清和沉淀进行抑菌活性测试。

1.2.2 HQB-1 菌株发酵液中的铁载体检测

铁载体定性检测: HQB-1 菌株产铁载体检测采用改进的 CAS 检测平板法^[12-13]。将活化的 HQB-1 菌株接种至冷却后的蓝色检测平板中, 置于 27 °C 培养箱中培养 24 h, 定期观察菌株生长情况及培养基颜色变化, 拍照记录结果。

铁载体类型鉴定参考文献[14-15]: 将 HQB-1 菌株接种于 KMB 液体培养基, 在 27 °C、200 r/min 发酵 3 d, 取菌株 MKB 发酵液 4 mL, 于 10 000 r/min 离心 10 min 保留上清液。

采用 Arnow 法检测儿茶酚型铁载体: 取 HQB-1 菌株发酵上清液 1 mL, 依次加入 1 mL 0.5 mol/L 的 HCl 和 1 mL 钼酸盐溶液至颜色变黄, 再加入 1 mL 0.5 mol/L 的 NaOH, 当溶液由黄变红并保持 15 min 不变色, 则证明存在儿茶酚型铁载体。

FeCl₃-HClO₄ 试验检验异羟肟酸型铁载体: 取 HQB-1 菌株发酵上清液 0.5 mL, 加入 2.5 mL 5 mmol/L 高氯酸铁溶液, 若颜色变红则说明存在异羟肟酸型铁载体, 若颜色变黄则说明不存在。以上试验均以无菌培养液和蒸馏水作为对照组, 其他步骤相同。

铁载体定量检测参考赵翔等^[13]方法。取 HQB-1 菌株发酵液, 10 000 r/min 离心 10 min, 利用 0.22 μm 针式过滤器过滤, 将上清液稀释与等体积的 CAS 检测液混合; 充分反应后检测 OD₆₃₀, 得到吸光值 A; 以去离子水与 CAS 检测液等体积混合测得的 A_r 为对照, A/A_r 值越低, 表明铁载体含量越高。

1.2.3 HQB-1 菌株批量发酵与抑菌物质粗提

将 HQB-1 菌株接入发酵培养基进行批量发酵, 初始接种量为 1% (体积比), 转速 200 r/min, 培养温度 27 °C, pH 为 7.0。以 1% 的接种量接种至装有 40 L 培养基的 200 L 发酵罐中进行发酵, 每隔 12 h 取样, 观察菌体生长情况, 并进行 OD₆₀₀ 值检测。经过 36 h 发酵后, 收集样品。将上述收集到的 40 L HQB-1 菌株发酵液置于抽滤机中, 以流速为 10 L/h 将菌体与上清液分离开, 并分别收集于新

的空桶中, 再通过 200 nm 陶瓷膜进行二级抽滤和浓缩, 共获得发酵上清浓缩液 5 L。

抑菌物质初步提取: 采用有机试剂萃取法, 将发酵上清浓缩液与等量乙酸乙酯混合均匀, 置于分液漏斗中萃取, 重复 3 次, 合并乙酸乙酯层; 再通过 40 °C 旋转蒸发仪浓缩至蒸干水分, 经真空干燥箱 40 °C 干燥 2 h 后置于干燥皿中称重备用。

1.2.4 抑菌物质的柱层析分离

将乙酸乙酯粗提物溶解于水中, 过大孔吸附树脂^[16], 分别以 30%、60% 及无水甲醇进行洗脱, 收集洗脱组分 1-3, 并通过毒力平板法检测不同组分的抑菌活性。对抑菌效果最强的组分 3 进行硅胶柱层析^[17], 收集亚组分 1-3, 并通过毒力平板法检测不同亚组分的抑菌活性。

采用薄层层析(Thin Layer Chromatography, TLC)生物活性自显影法对抑菌活性化合物进行定性检测, 用紫外分析仪进行观察并标记化合物的位置。

1.2.5 抑菌化合物的化学结构解析

取少量抑菌活性化合物溶解于无水甲醇中, 通过紫外可见分光光度计进行不同波段的扫描(200-800 nm), 确定其最大吸收波长。

取少量抑菌活性化合物进行抑菌化合物高效液相色谱(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)检测, 色谱柱冲洗程序为: 初始流动相(5% 甲醇, 体积比) 0.1 min, 线性梯度(至 95% 甲醇, 体积比)洗脱 6 min, 在 6-8 min 内降至 5% 甲醇。其他分析参数为: 进样量为 5 μL, 流动相 A 为水(含 0.1% 乙酸), 流动相 B 为无水甲醇, 体积比为 30:70, 流速为 0.4 mL/min, 紫外检测波长为 365 nm。

采用超高效液相联用质谱(Q-TOF)检测抑菌活性物质, 检测条件为: 干燥气为高纯 N₂, 毛细管电压 4 kV, 雾化器压力 35 psig, 碎裂电压 140 V, 干燥器温度 200 °C, 干燥气流速 9 L/min, 鞘气温度 350 °C, 鞘气流速 10 L/min, 离子扫描范围为 100-1 100 m/z。二级质谱参数中碰撞能量设定为 10-40 eV。通过 Mass Hunter Qualitative Analysis

(B.07.00)软件进行数据处理和分析。

使用核磁共振波谱仪 Avance III 500 MHz, 30 °C 条件下用 5 mm 探针进行样品的氢谱 ($^1\text{H-NMR}$)和碳谱($^{13}\text{C-NMR}$)检测。核磁共振波谱检测结果用 MestReNova (6.1.1-6384)软件处理和分析。

1.2.6 活性化合物的最小抑菌浓度检测

采用 96 孔板微量滴定法^[18]检测 PCA 对香蕉枯萎病菌 (*Foc TR4*)、炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*)、灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*)及香蕉叶斑病菌 (*Curvulatia fallax*)等多种常见植物病原真菌的最小抑菌浓度 (Minimum Inhibitory Concentration, MIC)。

2 结果与分析

2.1 HQB-1 菌株发酵液中蛋白酶类物质的检测

采用硫酸铵分级沉淀法及透析法提取 HQB-1 菌株发酵液中的蛋白酶类物质, 然后通过平板对峙法分别对上清和蛋白沉淀进行抑菌活性测试。结果表明, 30%与 50%硫酸铵沉淀对 *Foc TR4* 菌丝有微弱的抑菌效果, 但均不超过 5%, 而 10%、70%、80%硫酸铵沉淀及透析法获得的蛋白提取液均未显示抑菌活性, 初步推断 HQB-1 菌株对 *Foc TR4* 起拮抗作用的是非蛋白酶类物质。

2.2 HQB-1 菌株发酵液中铁载体的检测

由图 1 可知, HQB-1 菌株在 30 °C、蓝色检测平板中生长良好, 培养约 12 h 菌落周围便形成明显晕圈; 培养 24 h 后周围产生半径约为 1.2 cm 的橘黄色晕圈, 产铁载体圈与菌落直径比约为 3.5:1。表明 HQB-1 菌株在生长过程中可分泌产生铁载体, 能螯合 CAS 染液中的 Fe^{3+} , 从而导致培养基颜色由蓝变橙, 在 CAS 检测平板上形成铁载体分泌圈, 并且在相同条件下, 晕圈直径越大的细菌产铁载体能力越高。

Arnow 检测结果显示, HQB-1 菌株发酵液试管中出现一定程度的变红现象(图 2A), 并且保持在 15 min 内颜色无变化, 表明 HQB-1 菌株发酵液中含有儿茶酚型铁载体。高氯酸铁试验结果如图

2B 所示, 反应颜色呈黄色而未变红, 表明 HQB-1 菌株不产生异羟肟酸型铁载体。

一般情况下, 高产铁载体细菌的 A/A_r 低于 0.5^[19]。表 1 中不同稀释倍数样品的 A/A_r 值均在 0.99–1.03 之间, 说明 HQB-1 菌株虽能产生一定量的铁载体以保证自身生长发育所需, 并非高产铁载体菌株。

2.3 HQB-1 抑菌物质的柱层析分离

对 HQB-1 菌株发酵液离心、浓缩、干燥, 共获得 36 g 乙酸乙酯浸膏(粗提物)。乙酸乙酯浸膏经过大孔树脂柱的充分吸附, 在 30%、60%及无水甲醇的洗脱下获得组分 1–3 (图 3)。各组分抑菌率分

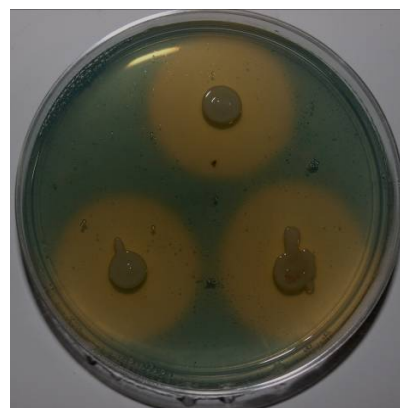


图 1 HQB-1 菌株铁载体检测结果

Figure 1 The siderophore detection of strain HQB-1

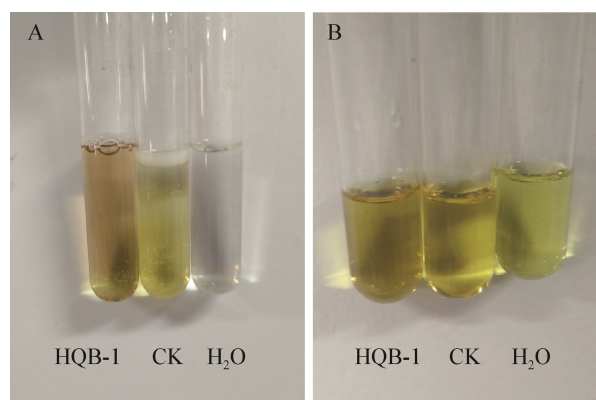


图 2 HQB-1 菌株产铁载体类型检测

Figure 2 Detection of siderophore type of strain HQB-1

注: A: 儿茶酚型铁载体检测; B: 异羟肟酸型铁载体检测

Note: A: Detection of catechol type; B: Detection of hydroxamic acid type

表 1 HQB-1 菌株发酵液中铁载体的定量检测

Table 1 Quantitative detection of siderophore in fermentation broth of strain HQB-1

稀释倍数 Dilution Ratio	CK (A_t)	HQB-1 (A)	A/A_t
4	2.483	2.507	1.009
6	2.536	2.529	0.997
8	2.456	2.531	1.031
10	2.528	2.513	0.994

注: A/A_t 比值越小, 铁载体含量越高

Note: The smaller the A/A_t ratio, the higher the content of iron carrier

别为 10.06%、27.82% 和 51.40%, 表明 HQB-1 菌株产生的抑菌活性物质在甲醇中的溶解度随甲醇浓度升高而增大。

将组分 3 过硅胶柱层析, 以氯仿/甲醇体系进行梯度洗脱, 其中 1:9 (体积比) 洗脱获得的亚组分 3 显示出较强的抑菌活性。同时, 亚组分 3 的 TLC 结果证明在展开剂(氯仿:甲醇=1:9)下有好的展开效果, 在 254 nm 下有一特征性主斑点(图 4), 推测该斑点物质可能为 HQB-1 菌株发挥抑菌作用的主要活性组分。将该组分通过旋转蒸发仪去除有机试剂, 真空干燥后称重, 获得约 35.20 mg 的黄绿色晶体, 得率约为 73.17%。

该黄绿色晶体配制成溶液, 其对 Foc TR4 的最小抑菌浓度为 1.563 $\mu\text{g/mL}$, 同时, 5、25 和 50 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的溶液对 Foc TR4 抑菌率分别达到 78.88%、87.72% 和 100%。

2.4 抑菌化合物的化学结构解析

抑菌化合物在 200–800 nm 的紫外吸收光谱结果表明, 该化合物在 365 nm 波长下具有最大吸收峰, 推测该化合物化学结构中可能存在吩嗪环结构。

不同浓度抑菌化合物溶液 365 nm 吸光值检测结果表明, 抑菌化合物浓度与吸光值呈良好线性关系。以吸光值为纵坐标 Y , 抑菌化合物的质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$) 为横坐标 X , 得回归方程 $Y=0.069\ 22+0.061\ 71X$, 其中 $R^2>0.999$, 表明拟合程度较好。因此, 以该最大吸收波长 365 nm 作为 HPLC 的检测波长。

该抑菌化合物在高效液相色谱 365 nm 检测波长下分离效果良好, 单一最大吸收峰的保留时间为 1.617 min。抑菌化合物分子的 Q-TOF 一级质谱图显示存在 2 个较强的离子峰, 分别为 $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 223.048 8 和 m/z 179.058 8。

通过对分子式预测功能, 得到抑菌化合物假定得分最高的分子式为 $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2$, 理论值为 $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 223.051 3, 实测值为 m/z 223.051 2, 偏差为 $-1\ \text{mg/L}$, 小于 5 mg/L 的化合物结构分析最小误差。在负离子模式下, 二级质谱中出现一个丰度较大的特征碎片离子峰 $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 179.057 6, 与吩嗪环的质谱信息相近, 推测该碎片可能由化合物丢失一个羧基 ($-\text{COOH}$) 而形成。根据文献报道并与相关数据库对比, 推断抑菌化合物可能为吩嗪-1-羧酸(Phenazine-1-Carboxylic Acid, PCA)。

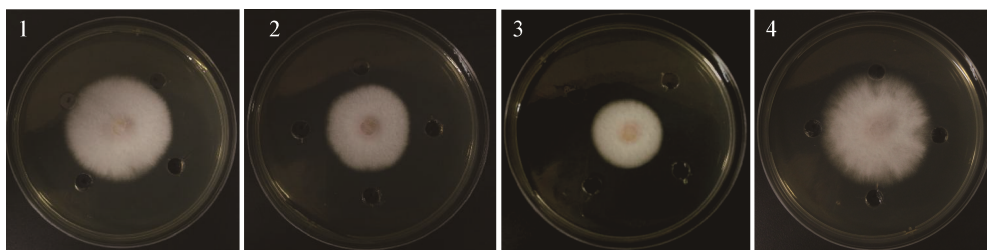


图 3 不同浓度甲醇洗脱下各组分的抑菌效果

Figure 3 Antifungal effect of fraction 1–3 eluted by different concentrations of methanol

注: 1: 30% 甲醇洗脱; 2: 60% 甲醇洗脱; 3: 无水甲醇洗脱; 4: 对照

Note: 1: Eluted by 30% methanol; 2: Eluted by 60% methanol; 3: Eluted by 100% methanol; 4: Control

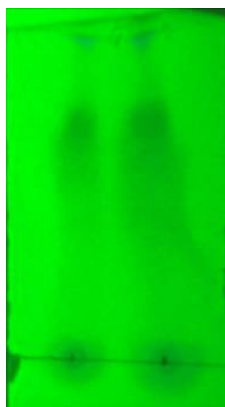


图 4 亚组分 3 TLC 检测结果

Figure 4 TLC of subcomponent 3

抑菌化合物的核磁共振波谱检测结果如图 5、图 6 所示, 各峰形积分情况如下: ^{13}C -NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 165.93 (s), 137.42 (s), 135.11 (s), 133.24 (s), 131.75 (s), 130.28 (s), 130.07 (s), 127.96 (s), 77.30 (s), 77.04 (s), 76.79 (s). ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 15.58 (s, 30H), 8.98 (dd, $J=7.0$, 1.3 Hz, 28H), 8.98 (dd, $J=7.0$,

1.3 Hz, 33H), 8.53 (dd, $J=8.7$, 1.3 Hz, 28H), 8.64–8.34 (m, 47H), 8.38–8.32 (m, 28H), 8.42–8.11 (m, 60H), 8.32–8.25 (m, 30H), 8.09–7.97 (m, 87H), 8.11–7.86 (m, 90H), 7.27 (s, 12H), 7.27 (s, 9H), 0.00 (s, 6H), 0.00 (s, 7H)。

在 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR 图谱中, 分别获得 8 个和 13 个高分辨信号。由图 5 可知, 化学位移 δ_{H} 7.30–9.00 区域的 7 个峰为芳香质子峰, δ_{H} 15.58 处的峰为羧酸质子峰, 验证了质谱中存在羧基 ($-\text{COOH}$) 的推测。在 ^{13}C -NMR 图谱中(图 6), δ_{C} 124.91–144.07 区域的 12 个峰处于芳香碳的检测范围, 这表明该分子可能具有对称的化学结构。 δ_{C} 165.93 处的峰值明确地表明化合物分子结构中存在羰基碳。同时, 将核磁共振图谱与 SciFinder (<http://scifinder.cas.org>) 和 SDBS 信息数据库 (<https://SDBS.db.aist.go.jp/>) 进行图谱比对, 将该抑菌活性化合物鉴定为 PCA(图 7)。

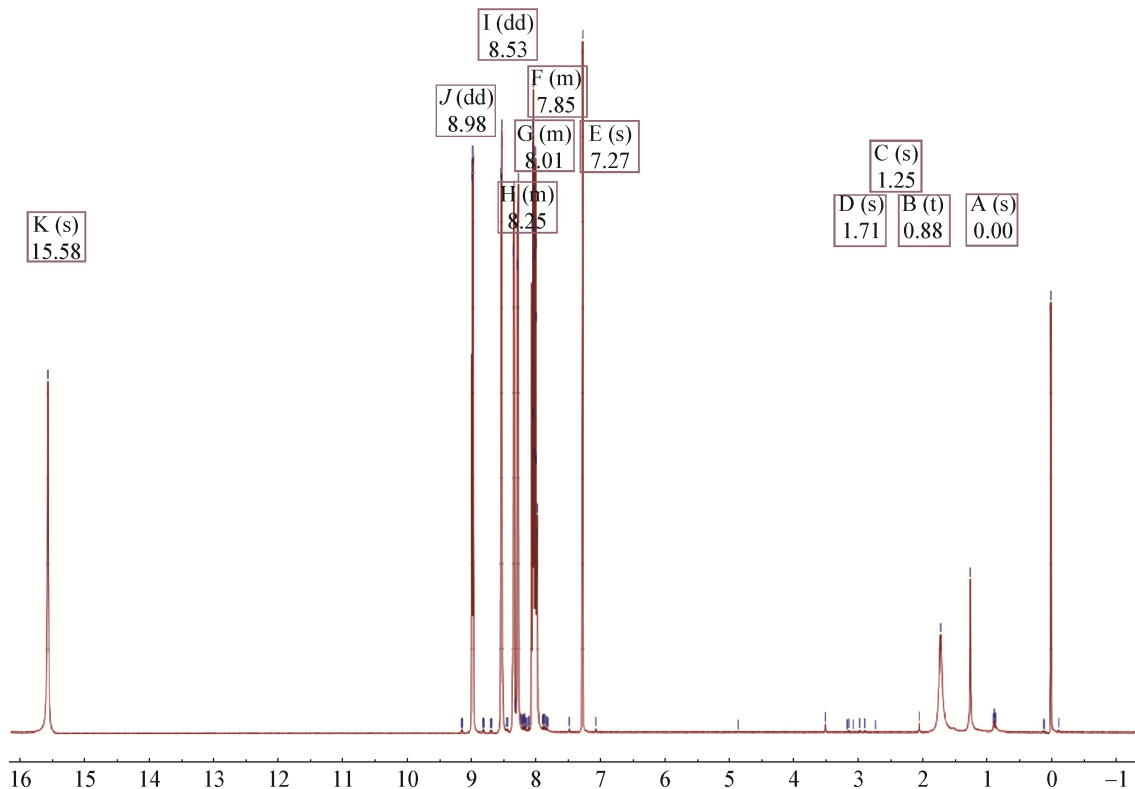


图 5 抑菌化合物的核磁共振氢谱

Figure 5 ^1H -NMR spectrum of antifungal compound

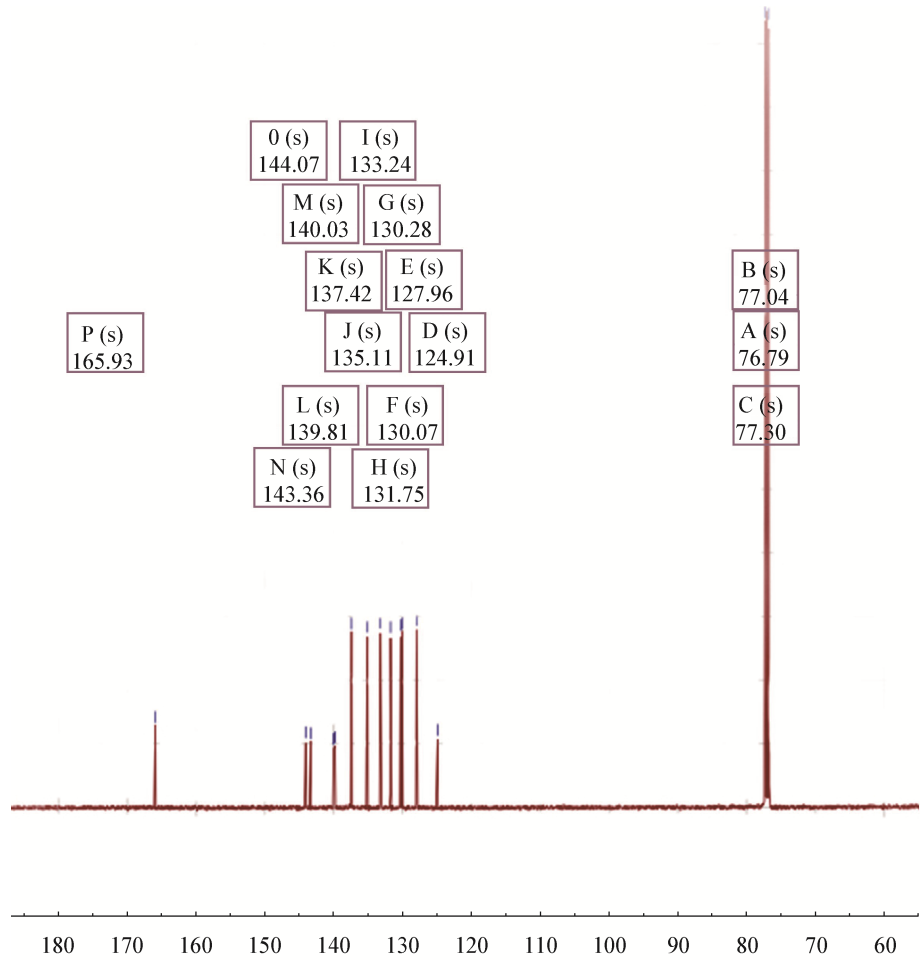


图 6 抑菌化合物的核磁共振碳谱
Figure 6 ¹³C-NMR spectrum of antifungal compound

表 2 为 96 孔板微量滴定试验的结果，从中可知 PCA 对 Foc TR4、炭疽病菌、灰霉病菌和香蕉叶斑病菌的 MIC 值分别为 1.563、6.125、1.563 和 3.125 (表 2)，均低于多菌灵处理组，表明 PCA 抑菌效率比多菌灵更强。其中，PCA 对 Foc TR4 的 MIC 值最低，仅为 1.563 μg/mL，说明 PCA 对 Foc

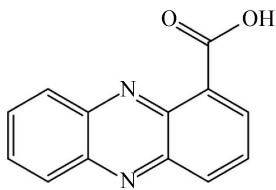


图 7 PCA 的化学结构式
Figure 7 Chemical structure of PCA

表 2 PCA 拮抗多种病原菌的 MIC 值
Table 2 MIC values of PCA against pathogenic fungi

病原菌 Pathogenic fungi	PCA (μg/mL)	多菌灵 Carbendazim (μg/mL)	0.1% DMSO (μg/mL)
Foc TR4	≥1.563	≥3.125	—
炭疽病菌 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	≥6.125	≥12.5	—
灰霉病菌 <i>Botrytis cinerea</i>	≥1.563	≥6.25	—
香蕉叶斑病菌 <i>Curvulatia fallax</i>	≥3.125	≥6.25	—

注：—：没有抑菌效果
Note: —: No antimicrobial effects

TR4 的抑制效果较强。同时, 0.1% DMSO 处理对供试病原菌均无抑制作用。

3 讨论与结论

通过对抑菌化合物的化学结构进行鉴定, 能够清晰地分析伯克霍尔德菌 HQB-1 的主要抑菌组分。UV 结果显示, 抑菌化合物在 365 nm 波长下具有最大吸收, 推测其分子结构中可能存在吩嗪环的结构。超高效液相联用质谱技术兼顾了液相色谱的分离能力和质谱的分辨能力, 利用各元素、官能团之间数目不同所导致的分子量差异进行推测, 再分别进行质谱碎片分析, 能够有效地预测未知物的分子量和化学结构。

¹H-NMR 氢谱显示, 抑菌化合物中存在 8 个芳香质子, 并且芳香环中 ABCD 对称的结构特征通常存在于吩嗪衍生物中。¹³C-NMR 碳谱显示, 化合物中存在 1 个明显的羰基碳, 证明化合物中含 1 个羧基, 而 13 个芳香碳表明目标分子具有高度对称的结构^[11]。同时, 将核磁检测图谱与数据库对比, 最终确定抑菌化合物为吩嗪-1-羧酸(PCA)。Bilal 等^[20]同样利用大孔树脂从绿针假单胞菌(*Pseudomonas chlororaphis*)菌株中分离得到 PCA, 本研究与前人研究结果一致。

PCA 是一种杂环活性化合物, 对土传病原菌具有良好的生防作用^[21-22]。研究认为荧光假单胞菌 HC1-07 和 HC9-07 的主要生防机制分别是产生 PCA 和环脂肽^[23]。产 PCA 的荧光假单胞菌 LBUM223 对马铃薯疮痂病菌具有良好的生物防治效果^[24]。绿针假单胞菌 30-84 因产生 PCA, 被认为是抑制小麦根际真菌病原菌的生物防治剂^[25]。Mavrodi 等^[26]则在小麦和大麦根系或根际发现 68 株产 PCA 的荧光假单胞菌。

已有研究表明, 伯克霍尔德菌具有明显的抑制病原菌作用^[27]。宫安东等^[28]认为, 伯克霍尔德菌 WY6-5 产生的活性成分主要是二甲基二硫, 对黄曲霉抑菌率高达 95%。另有研究表明, 伯克霍尔德菌 JK-SH007 对杨树溃疡病防治效果良好, 进

一步分析发现挥发性有机物(二甲基二硫醚等)起主要贡献^[29-30]。在本研究中, 伯克霍尔德菌 HQB-1 生防活性成分是 PCA, 此发现进一步完善了伯克霍尔德菌生防活性成分, 为生物农药的研制提供了新的思路。同时, 我国香蕉枯萎病的生防菌多以芽孢杆菌^[31]和链霉菌^[32-33]等为主。本研究丰富了我国农业生防菌资源库, 为香蕉枯萎病的防治提供了新的选择。

研究认为, PCA 对真核生物和细菌的影响是由于它们能够使保护生物体免受氧化应激的蛋白质失活^[34-35]。研究表明, 绿脓杆菌 LV 菌株产生的 PCA 可导致番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)菌丝扭曲变形, 损伤严重^[36]。此外, PCA 通过诱导活性氧的积累导致水稻黄单胞杆菌细胞死亡, 从而达到生防作用^[37]。

本研究发现, 伯克霍尔德菌 HQB-1 可产生一定量儿茶酚型的铁载体, 但定量试验证明 HQB-1 并非高产铁载体菌株。因此, 推测微生物产生铁载体并不是简单的累积效应, 而是与其生长状态密切相关的。研究表明, 菌株分泌铁载体受培养条件、培养时间等因素影响。韩立荣^[38]探究了培养条件对菌株铁载体分泌的影响, 发现培养基碳源、氮源、pH、培养温度等条件影响着铁载体的合成。赵翔等^[13]发现亚铁离子可严格抑制荧光假单胞菌素的合成, 但也可诱导儿茶酚型铁载体的分泌。因此, 菌株分泌铁载体受多因素影响, 其产铁载体调控机制还需进一步研究。

综上所述, 基于伯克霍尔德菌发酵液具有生物活性成分的前提, 本研究成功从 HQB-1 菌株中分离鉴定出 PCA 组分, 结合以往研究报道, 推测 PCA 是伯克霍尔德菌 HQB-1 抑制香蕉枯萎病菌的主要活性成分, 这为香蕉枯萎病的防治提供了理论依据, 但 PCA 的生防分子机制还需要进一步研究。

REFERENCES

- [1] Perin L, Martínez-Aguilar L, Castro-González R, Estrada-De Los Santos P, Cabellos-Avelar T, Guedes HV, Reis VM, Caballero-Mellado J. Diazotrophic *Burkholderia*

- species associated with field-grown maize and sugarcane[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(5): 3103-3110
- [2] Araújo WL, Creason AL, Mano ET, Camargo-Neves AA, Minami SN, Chang JH, Loper JE. Genome sequencing and transposon mutagenesis of *Burkholderia seminalis* strain TC3.4.2R3 identify genes contributing to suppression of orchid necrosis caused by *B. gladioli*[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2016, 29(6): 435-446
- [3] Gajbhiye MH, Kapadnis BP. Antifungal-activity-producing lactic acid bacteria as biocontrol agents in plants[J]. *Biocontrol Science and Technology*, 2016, 26(11): 1451-1470
- [4] Roquigny R, Novinscak A, Arseneault T, Joly DL, Filion M. Transcriptome alteration in *Phytophthora infestans* in response to phenazine-1-carboxylic acid production by *Pseudomonas fluorescens* strain LBUM223[J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 474
- [5] Kandel SL, Firrincieli A, Joubert PM, Okubara PA, Leston ND, McGeorge KM, Mugnozza GS, Harfouche A, Kim SH, Doty SL. An *in vitro* study of bio-control and plant growth promotion potential of *Salicaceae* endophytes[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 386
- [6] Ren JH, Wu XQ, Liu H, Ye JR. Isolation and purification of antifungal protein from *Burkholderia pyrrocinia* JK-SH007[J]. *Microbiology China*, 2010, 37(6): 872-880 (in Chinese)
任嘉红, 吴小芹, 刘辉, 叶建仁. 吡咯伯克霍尔德氏菌 JK-SH007 抗菌蛋白的分离纯化[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(6): 872-880
- [7] Wang AJ, Quan CS, Wang JH, Wang JH, Fan SD. Purification and antifungal characterization of a diketopiperazine from *Burkholderia cepacia* CF-66[J]. *China Biotechnology*, 2009, 29(12): 43-48 (in Chinese)
王艾晶, 权春善, 王建华, 王军华, 范圣第. 洋葱伯克霍尔德菌 CF-66 环二肽的分离纯化及抑菌活性研究[J]. *中国生物工程杂志*, 2009, 29(12): 43-48
- [8] Liu AK, Zhang PF, Bai BX, Bai FL, Jin TT, Ren JH. Volatile organic compounds of endophytic *Burkholderia pyrrocinia* strain JK-SH007 promote disease resistance in poplar[J]. *Plant Disease*, 2020, 104(6): 1610-1620
- [9] Xu ZZ, Wang MY, Du JP, Liu JF, Ou SW, Qin ZY, Yang KR. Isolation, identification and fermentation optimization of an antagonistic bacterial strain HQB-1 against banana wilt disease[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(7): 1611-1618 (in Chinese)
徐志周, 王明元, 杜锦鹏, 刘建福, 欧树文, 秦紫艺, 杨可然. 一株香蕉枯萎病拮抗菌 HQB-1 的分离鉴定及其发酵条件优化[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(7): 1611-1618
- [10] Long YC, Chen X, Zhou SQ. Isolation, identification and assessment on selenium biofortification of siderophore-producing rhizobacteria[J]. *Current Biotechnology*, 2017, 7(5): 402-408 (in Chinese)
- 龙云川, 陈轩, 周少奇. 高产铁载体根际菌的筛选鉴定及硝活化特性评价[J]. *生物技术进展*, 2017, 7(5): 402-408
- [11] Jia CY, Zhang YH, Ma XK. Analysis and preliminary identification of antagonistic substance producing by an anti-bacteria strain[J]. *Journal of Hubei University: Natural Science*, 2012, 34(4): 378-383 (in Chinese)
贾翠英, 张玉辉, 马晓况. 一株拮抗细菌所产抑菌物质的特性分析及初步鉴定[J]. *湖北大学学报: 自然科学版*, 2012, 34(4): 378-383
- [12] Bultreys A, Gheysen I, Maraite H, De Hoffmann E. Characterization of fluorescent and nonfluorescent peptide siderophores produced by *Pseudomonas syringae* strains and their potential use in strain identification[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(4): 1718-1727
- [13] Zhao X, Xie ZX, Chen SX, Shen P. Improvement and analysis in over-siderophores production bacteria filtrating and detecting[J]. *Microbiology China*, 2006, 33(6): 95-98 (in Chinese)
赵翔, 谢志雄, 陈绍兴, 沈萍. 适合高产铁载体细菌筛选、检测体系的改进与探析[J]. *微生物学通报*, 2006, 33(6): 95-98
- [14] Shenker M, Oliver I, Helmann M, Hadar Y, Chen Y. Utilization by tomatoes of iron mediated by a siderophore produced by *Rhizopus arrhizus*[J]. *Journal of Plant Nutrition*, 1992, 15(10): 2173-2182
- [15] Sun M. ARTP selection of high siderophore productions trains and preliminary analysis on mechanism of the siderophore improving[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2017 (in Chinese)
孙萌. 铁载体高产菌株的 ARTP 选育及其铁载体产量提高机理的初步分析[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2017
- [16] Xin BY, Zheng JS, Xu ZY, Li CZ, Ruan LF, Peng DH, Sun M. Three novel lantibiotics, ticins A1, A3, and A4, have extremely stable properties and are promising food biopreservatives[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(20): 6964-6972
- [17] Nie YY, Liu YY, Yang WC, Li YM, Xu MX, Lei XL, Zhang Y. Bioactive secondary metabolites from the fungus *Talaromyces* sp. isolated from coral *Porites pukoensis*[J]. *Mycosystema*, 2019, 38(4): 585-593 (in Chinese)
聂影影, 刘亚月, 杨文聪, 黎燕媚, 许茂鑫, 雷晓凌, 张翼. 来自普哥滨珊瑚的一株 *Talaromyces* sp. 真菌的活性次生代谢产物[J]. *菌物学报*, 2019, 38(4): 585-593
- [18] Wang XN, Radwan MM, Taráwneh AH, Gao JT, Wedge DE, Rosa LH, Cutler HG, Cutler SJ. Antifungal activity against plant pathogens of metabolites from the endophytic fungus *Cladosporium cladosporioides*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(19): 4551-4555
- [19] Wang P, Dong B, Li FD, Hu ZJ. Detection and determination of the siderophores produced by wheat

- rhizobacteria[J]. Microbiology China, 1994, 21(6): 323-326 (in Chinese)
王平, 董飏, 李阜棣, 胡正嘉. 小麦根圈细菌铁载体的检测[J]. 微生物学通报, 1994, 21(6): 323-326
- [20] Bilal M, Yue SJ, Hu HB, Wang W, Zhang XH. Adsorption/desorption characteristics, separation and purification of phenazine-1-carboxylic acid from fermentation extract by macroporous adsorbing resins[J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2018, 93(11): 3176-3184
- [21] Hu HB, Xu YQ, Chen F, Zhang XH, Hur BK. Isolation and characterization of a new fluorescent *Pseudomonas* strain that produces both phenazine 1-carboxylic acid and pyoluteorin[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2005, 15(1): 86-90
- [22] Pierson LS, Pierson EA. Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 86(6): 1659-1670
- [23] Yang MM, Mavrodi DV, Mavrodi OV, Thomashow LS, Weller DM. Construction of a recombinant strain of *Pseudomonas fluorescens* producing both phenazine-1-carboxylic acid and cyclic lipopeptide for the biocontrol of take-all disease of wheat[J]. European Journal of Plant Pathology, 2017, 149(3): 683-694
- [24] Roquigny R, Novinscak A, Léger G, Marcoux N, Joly DL, Filion M. Deciphering the rhizosphere and geocaulosphere microbiomes of potato following inoculation with the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* strain LBUM223[J]. Phytobiomes Journal, 2018, 2(2): 92-99
- [25] Yu JM, Wang DP, Pierson LS, Pierson EA. Effect of producing different phenazines on bacterial fitness and biological control in *Pseudomonas chlororaphis* 30-84[J]. The Plant Pathology Journal, 2018, 34(1): 44-58
- [26] Mavrodi DV, Mavrodi OV, Parejko JA, Bonsall RF, Kwak YS, Paulitz TC, Thomashow LS, Weller DM. Accumulation of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid in the rhizosphere of dryland cereals[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(3): 804-812
- [27] Barka EA, Nowak J, Clément C. Enhancement of chilling resistance of inoculated grapevine plantlets with a plant growth-promoting rhizobacterium, *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN[J]. Applied and Environmental Microbiology, 72(11): 7246-7252
- [28] Gong AD, Dong FY, Wu NN, Kong XW, Zhao Q, Yan JL, Dimuna C. Inhibitory effect of dimethyl disulfide from *Burkholderia pyrrocinia* WY6-5 on *Aspergillus flavus* and aflatoxins in peanuts during storage period[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2019, 52(17): 2972-2982 (in Chinese)
宫安东, 董飞燕, 吴楠楠, 孔宪巍, 赵倩, 闫建丽, Dimuna C. 吡咯伯克霍尔德菌 WY6-5 产二甲基二硫对储藏期花生黄曲霉及毒素的抑制作用[J]. 中国农业科学, 2019, 52(17): 2972-2982
- [29] Carrión VJ, Cordovez V, Tyc O, Etalo DW, De Bruijn I, De Jager VCL, Medema MH, Eberl L, Raaijmakers JM. Involvement of *Burkholderiaceae* and sulfurous volatiles in disease-suppressive soils[J]. The ISME Journal, 2018, 12(9): 2307-2321
- [30] Liu SW, Li J, Zhang Y, Liu N, Viljoen A, Mostert D, Zuo CW, Hu CH, Bi FC, Gao HJ, et al. Fusaric acid instigates the invasion of banana by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* TR4[J]. New Phytologist, 2020, 225(2): 913-929
- [31] Zhang N, Wu K, He X, Li SQ, Zhang ZH, Shen B, Yang XM, Zhang RF, Huang QW, Shen QR. A new bioorganic fertilizer can effectively control banana wilt by strong colonization with *Bacillus subtilis* N11[J]. Plant and Soil, 2011, 344(1/2): 87-97
- [32] Zhou DB, Jing T, Qi DF, Feng RJ, Duan YJ, Chen YF, Wang F, Zhang XY, Xie JH. Isolation and identification of *Streptomyces lunalinharesii* and its control effect on the banana fusarium wilt disease[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2017, 44(4): 664-674 (in Chinese)
周登博, 井涛, 起登凤, 冯仁军, 段雅捷, 陈宇丰, 王飞, 张锡炎, 谢江辉. 抗香蕉枯萎病菌的卢娜林瑞链霉菌的分离及防效鉴定[J]. 园艺学报, 2017, 44(4): 664-674
- [33] Duan YJ, Chen J, He W, Chen JJ, Pang ZC, Hu HG, Xie JH. Fermentation optimization and disease suppression ability of a *Streptomyces* sp. FS-4 from banana rhizosphere soil[J]. BMC Microbiology, 2020, 20(1): 24
- [34] Lau GW, Hassett DJ, Ran HM, Kong FS. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection[J]. Trends in Molecular Medicine, 2004, 10(12): 599-606
- [35] O'Malley YQ, Reszka KJ, Spitz DR, Denning GM, Britigan BE. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin directly oxidizes glutathione and decreases its levels in airway epithelial cells[J]. American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology, 2004, 287(1): L94-L103
- [36] Simionato AS, Navarro MOP, De Jesus MLA, Barazetti AR, Da Silva CS, Simões GC, Balbi-Peña MI, De Mello JCP, Panagio LA, De Almeida RSC, et al. The Effect of phenazine-1-carboxylic acid on mycelial growth of *Botrytis cinerea* produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1102
- [37] Puopolo G, Masi M, Raio A, Andolfi A, Zoina A, Cimmino A, Evidente A. Insights on the susceptibility of plant pathogenic fungi to phenazine-1-carboxylic acid and its chemical derivatives[J]. Natural Product Research, 2013, 27(11): 956-966
- [38] Han LR. Screening of bio-control antagonism and its functional development for control soil-borne disease[D]. Yangling: Doctoral Dissertation of Northwest A & F University, 2010 (in Chinese)
韩立荣. 一株土传病害生防菌的筛选及其功能开发[D]. 杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文, 2010