

放线菌生物碱的抗菌活性试验

朱桂如 李家藻 杨 涛 黄国宝*

(中国科学院西北高原生物研究所)

张国伟 邢桂香 阎逊初

(中国科学院微生物研究所)

微生物产生生物碱的研究在国外开始较早(Highet, 1956),但进展较慢。后来由于陆续发现了一些新型的放线菌生物碱具有明显的生理活性和抗微生物活性,其中不少在病虫害防治和临床上有实用价值(Johnson, 1962; Omura, Sutoshi, 1974),因而引起科学家们的重视,研究进展较快(Terashima, 1970; Onda, 1974; Omura, 1974, 1977; 李家藻, 1980)。放线菌生物碱的研究以往在我国尚未开展。为了开发利用青藏高原的放线菌资源,我们继真菌生物碱的研究(李家藻, 1979、1979a)之后,又进行了放线菌生物碱的研究工作。

一、材料和方法

(一) 供试菌株

1. 供筛选用的菌株是从青藏高原部分地区土壤中分离出的放线菌共 512 株。

2. 供作抗微生物活性实验的菌株系中国科学院微生物所提供:有大肠杆菌(*Escherichia coli*),金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和能引起作物病害的病原菌如:稻白叶枯黄杆菌(*Xanthomonas oryzae*)软腐病欧氏杆菌(*Erwinia arceidae*),大斑病长孺孢菌(*Helminthosporium turcicum*),灰葡萄孢霉(*Botrytis cinerea*),以及一些有代表性的菌株如:枯草杆菌(*Bacillus subtilis*),普通变形杆菌(*Proteus vulgaris*),烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)等 23 株。

(二) 产生生物碱放线菌株的筛选

1. 供试培养基的选择:采用了A培养基和D培养基(Terashima, 1970); Y培养基(经作者等修改的A培养基,即用酵母膏取代酪素氨基酸); GU培养基(Massingll, 1967);修改的察氏培养基等5种培养基进行比较试验。

以上5种培养基均调至 pH 为 7.0,用 250 毫升三角瓶,每瓶装 40 毫升培养基,1 公

* 现在安徽省生物研究所。

本文 1986 年 1 月 8 日收到。

斤/厘米²灭菌。接种后, 28℃ 静置培养 10 天, 用薄层层析法检查生物碱的有无。

2. 菌株产生生物碱的鉴别法: 在长有放线菌的斜面试管内, 注入酸性乙醇溶液(含有 0.1% 盐酸的 95% 乙醇溶液) 10 毫升。过夜, 倾出酸性乙醇溶液, 在 55—60℃ 烘箱中烘干, 加 10% 氨水 2 毫升, 搅拌使残留物溶解, 然后转入 25 毫升分液漏斗中并加入 2 毫升氯仿, 进一步萃取, 摇匀, 使生物碱转入氯仿中, 将氯仿浓缩至 0.1 毫升, 用毛细管吸取氯仿液置硅胶 G 薄层板 (26 × 76 毫米) 层析。展开剂为氯仿: 甲醇 = 95:5 (V/V) 的混合试剂, 显色剂为碘化铋钾试剂: 碘-碘化钾试剂 = 1:1 的混合试剂(李家藻, 1979)。经层析产生橘黄-棕-褐色斑点的表示菌株具有生物碱阳性反应。

(三) 放线菌生物碱抗微生物活性试验

1. 含生物碱的无菌滤纸片制备: 将有生物碱阳性反应的放线菌株接种在供筛选用培养基平板上, 28℃ 培养 10 天后加酸性乙醇溶液 10 毫升, 浸泡过夜, 倾出浸提液置于 100 毫升瓷蒸发皿中, 55—60℃ 烘干, 按与上节相同的方法加氯仿萃取生物碱, 再用与氯仿等体积的酸水(含 0.1% 盐酸的蒸馏水)使生物碱转入酸水中, 将酸水浓缩到 0.5 毫升, 吸取 0.05 毫升加到直径 11 毫米的无菌滤纸片上备用。

2. 抑菌圈大小的测量: 将供试的实验菌分别用涂抹法接种在各自适合的培养基平板上, 然后将浸有放线菌生物碱提取液的滤纸片平贴于上述平板上。用浸有含 0.1% 盐酸蒸馏水的滤纸片作对照。试验重复 3 次。根据各实验菌的生长所需的温度及时间分别进行培养和测量抑菌圈直径的大小。

二、结果和讨论

(一) 筛选培养基的选择

在分离获得的 512 株放线菌中, 任意取其中 50 株, 分别接种在上述 5 种培养基上, 培

表 1 五种不同培养基对 50 株放线菌产生生物碱能力的比较

Table 1 The comparison of five culture medium for alkaloid screening of Actinomycetes

培养基名称 Culture medium	能生长的菌株数 Number of growing strains	显示生物碱阳性反应菌株数 Number of strains showing positive reaction alkaloid test					Total	%
		+	++	+++	++++			
A	50	2	1	2	0	5	10	
C	47	3	0	0	0	3	6	
D	31	11	0	0	0	11	22	
GU	48	7	0	0	0	7	14	
Y	50	10	2	1	1	14	28	

养一定时间后, 从生长势和生物碱反应可以看出(表 1), 以 Y 培养基最适于放线菌生物碱筛选。供试的 50 株放线菌均生长良好, 并且显示生物碱阳性反应的菌株数也最高(28%)

(二) 产生生物碱的放线菌数量及其优势种

试验结果表明, 在供试的 512 株放线菌中, 显示生物碱阳性反应的有 121 株, 占筛选

表 2 放线菌生物碱薄层层析结果

Table 2 Thin layer chromatography of alkaloid extract from some strains of Actinomycetes

放线菌名称 Name of actinomycetes	菌号 Number of strains	色点强度 Strength of spot	色点颜色 Colour of spot	Rf 值 Rf value
加利利链霉菌西宁变种 <i>Streptomyces galilaeus</i> var. <i>xiningensis</i>	A. 3	+++	桔红 (orange)	0.42
锈赤蜡黄链霉菌浅色变种 <i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i> var. <i>pallens</i>	A. 62	++	棕 (brown)	0.13
锈赤蜡黄链霉菌浅色变种 <i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i> var. <i>pallens</i>	A. 249	++	棕 (brown)	0.14
锈赤蜡黄链霉菌浅色变种 <i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i> var. <i>pallens</i>	A. 252	+++	桔红 (orange)	0.13
锈赤蜡黄链霉菌浅色变种 <i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i> var. <i>pallens</i>	A. 614	++	桔红 (orange)	0.19
锈赤蜡黄链霉菌浅色变种 <i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i> var. <i>pallens</i>	A. 628	+++	桔红 (orange)	0.30
锈赤蜡黄链霉菌浅色变种 <i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i> var. <i>pallens</i>	A. 975	++++	桔红 (orange)	0.06
锈赤蜡黄链霉菌浅色变种 <i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i> var. <i>pallens</i>	A. 1046	++	桔红 (orange)	0.13
锈赤蜡黄链霉菌浅色变种 <i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i> var. <i>pallens</i>	A. 1084	++++	桔红 (orange)	0.09
锈赤蜡黄链霉菌浅色变种 <i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i> var. <i>pallens</i>	A. 1085	++++	桔红 (orange)	0.13
锈赤蜡黄链霉菌浅色变种 <i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i> var. <i>pallens</i>	A. 1144	+++	桔红 (orange)	0.21
栗色球孢链霉菌 <i>Streptomyces castaneoglobisporus</i>	A. 1154	+++	桔红 (orange)	0.05
柱形孢链霉菌 <i>Streptomyces cylindrosporus</i>	A. 1214	+++	桔红 (orange)	0.11
灰色链霉菌 <i>Streptomyces griseus</i>	A. 372	+++	桔红 (orange)	0.19

总数的 23.6%，其中生物碱反应较强的有 44 株，占显示阳性反应菌株数的 36.4%。其中已鉴定种名的有 14 株。其薄层层析结果见表 2。

从表 2 可以看出，生物碱反应较强的 14 株放线菌均属链霉菌科，链霉菌属 (*Streptomyces*)。其中锈赤蜡黄链霉菌浅色变种 (*Streptomyces rubiginosohelvolus* var. *pallens*) 加利利链霉菌西宁变种 (*Streptomyces galilaeus* var. *xiningensis*) (张国伟, 1986)，栗色球孢链霉菌 (*Streptomyces castaneoglobisporus*) 和柱形孢链霉菌 (*Streptomyces cylindrosporus*)。在文献中尚未见产生生物碱的报道。

(三) 放线菌生物碱抗微生物的活性

在 121 株有生物碱阳性反应的菌株中，有 54 株放线菌生物碱提取液都有不同程度的抑菌作用，如：A. 268、A. 278 均对 9 种试验菌有抑制作用；A. 381 对 12 种试验菌有抑制作用。试验结果见表 3。

表3 放线菌生物碱的抑菌作用

Table 3 The antimicrobial activities of alkaloids from Actinomycetes

试验菌名称 Name of testing microbes	产放线菌生物碱的数量 Number of Actinomycetes producing alkaloid												
	109	249	252	268	278	331	372	381	563	572	576	664	1332
金黄色葡萄球菌 As. 1.89 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	+		+		+		+				+		
枯草杆菌 As. 1.210 (<i>Bacillus subtilis</i>)	+							+					
藤黄八叠球菌 As. 1.880 (<i>Sarcina lutea</i>)		+			+		+	+	+	+	+	+	
大肠杆菌 As. 1.77 (<i>Escherichia coli</i>)	+	+	+	+	+	+				+	+		+
普通变形杆菌 As. 1.49 (<i>Proteus vulgaris</i>)	+			+	+	+	+						
稻白叶枯病黄杆菌 As. 1.859 (<i>Xanthomonas oryzae</i>)		+	+	+	+			+					+
软腐病欧氏杆菌 As. 1.141 (<i>Klebsiella aerogenes</i>)	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+
耻垢分枝杆菌 As. 1.1 (<i>Mycobacterium smegmatis</i>)	+		+	+	+		+	+	+			+	
白假丝酵母 As. 2.538 (<i>Candida albicans</i>)						+		+					
产黄青霉 As. 3.3905 (<i>Penicillium chryseogenum</i>)		+		+	+	+	+	+		+		+	
意大利青霉 As. 3.2631 (<i>Penicillium italicum</i>)		+					+	+					+
甘薯长喙壳菌 As. 3.2777 (<i>Ceratocytis fimbriata</i>)			+	+				+	+	+			
佐佐木薄膜草菌 As. 3.2872 (<i>Pellicularia sasakii</i>)													+
玉蜀黍赤霉菌 As. 3.2873 (<i>Gibberella zeae</i>)						+							
官部旋孢腔菌 As. 3.2622 (<i>Cochliobolus miyabeanus</i>)													+
大斑病长孢菌 As. 3.3114 (<i>Helminthosporium turcicum</i>)	+	+	+						+		+		+
玉蜀黍长孢菌 As. 3.3119 (<i>Helminthosporium maydis</i>)												+	+
小麦全蚀病菌 As. 3.3496 (<i>Gaeumannomyces graminis</i>)												+	
烟曲霉 As. 3.2910 (<i>Aspergillus fumigatus</i>)							+	+	+	+	+		
稻梨孢菌 As. 3.3283 (<i>Fusicularia oryzae</i>)		+	+	+				+		+	+	+	
黑曲霉 As. 3.315 (<i>Aspergillus niger</i>)	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	
玉蜀黍黑粉菌 As. 5.127 (<i>Ustilago mydis</i>)		+					+	+					+
合计 Total	8	8	8	9	9	8	8	12	7	7	8	8	8

放线菌生物碱提取液的抑菌试验证明了一些放线菌产生的生物碱对某些病原菌有较强的抑制作用,抑菌圈直径达 2.0—3.5 厘米 (表 4) 这对今后进一步开发利用这些放线菌资源有一定的参考价值。

表 4 放线菌生物碱提取液的抑菌作用
Table 4 Antimicrobial effect of alkaloidal extracts from Actinomycetes

放线菌生物碱编号 Alkaloidal extract of Actinomycetes	被 抑 试 验 菌 名 称 Name of antimicrobial testing microbes	抑菌圈直径(厘米) Diameter of antimicrobial cycle (cm)
A. 628	金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	2.8
A. 628	藤黄八叠球菌 (<i>Sarcina lutea</i>)	2.7
A. 887	稻白叶枯病黄杆菌 (<i>Xanthomonas oryzae</i>)	3.3
A. 887	软腐病欧文氏杆菌 (<i>Erwinia aroidae</i>)	3.5
A. 372	藤黄八叠球菌 (<i>Sarcina lutea</i>)	2.0
A. 887	金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	2.5
A. 252	甘薯长喙壳菌 (<i>Ceratocystis fimbriata</i>)	3.0
A. 887	甘薯长喙壳菌 (<i>Ceratocystis fimbriata</i>)	2.8
Control	对照	0

参 考 文 献

- 李家藻、朱桂如、黄国宝、杨涛、唐诗声, 1979, 真菌生物碱的研究 I, 产生物碱的真菌的筛选, 微生物学报, **19**(2): 175。
- 李家藻、朱桂如, 1979a, 真菌生物碱筛选方法的研究, 微生物学通报, **6**(6): 15。
- 李家藻, 1980, 微生物碱研究的进展和展望, 微生物学通报, **8**(1): 30。
- 高 泽, Г. Ф., (戴冠群、袁永生译), 拮抗性放线菌的分类问题, 68—90, 科学出版社。
- 张国伟、邢桂香、阎逸初、朱桂如、李家藻、杨 涛、黄国宝, 1986, 链霉菌属中的两个新亚种, 微生物学报, **26**(2): 101—104。
- Highet R. J., V. Prelog, 1956, Metabolic products of ac inomycetes. XVIII. Actiphenol *Helv. Chem. Acta*, **42**: 1523—1526.
- Johnson F., 1962, Glutarimide antibiotics. I. The synthesis of actiphenol. *J. Org. Chem.* **27**: 3658—3660.
- Massingll J., Jr., and Joe E. Hodgkins, 1967, Alkaloids of bacteria. *Phytochemistry*, **6**(7): 977—982.
- Omura, Sutoshi, 1974, Prindicin, a new alkaloid from streptomycetes strain. Taxonomy, fermentation, isolation, and biological activity. *Agr. Biol. Chem.*, **38**(5): 899—906.
- Omura, S.: Y. Iwai; A. Hirano, 1977, A new alkaloid AM-2282 of streptomycetes origin—Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. *J. Antibiot.*, **30**(4): 275—282.
- Onda, M., Konda, Y., 1974, Alkaloid from streptomycetes species NA-337. *Chem. Pharm. Bull.*, **22**(12): 2916—2920.
- Terashima, Tadashi, Yoshi Kuroda; Yasuyuki Kaneko, 1970, Studies on alkaloids of streptomycetes: I. Screening of alkaloid-producing microorganisms and pharmacological activity of alkaloids. *Agr. Biol. Chem.*, **34**(5): 747—752.

STUDIES ON ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ALKALOID SUBSTANCES FROM ACTINOMYCETES

Zhu Guiru Li Jiazao Yang Tao Huang Guobao

(Northwest Plateau Institute of Biology, Academia Sinica)

Zhang Guowei Xing Guixiang Yan Xunchu

(Institute of Microbiology, Academia Sinica)

By the use of thin layer chromatography of alkaloid screening method, the presence of alkaloid and its antimicrobial activity in the culture extracts of 512 strains of Actinomycetes isolated from the soils of Qinghai-Xizang Plateau and adjacent area were investigated. The experimental results indicated that the number of strains of actinomycetes whose culture extracts giving positive alkaloid test was 121 (23.6%).

Fourteen strains whose culture extracts demonstrated comparatively strong positive confirmatory alkaloid test all belong to *Streptomyces*. Some species of alkaloid producing from *Streptomyces* including *S. rubiginosohelvolus* var. *pallens*., *S. galilaeus* var. *xiningensis*, *S. castaneoglobisprus*, *S. cylindrosporus* have not been previously reported.

Among above mentioned 121 strains of Actinomycetes, 57 strains whose extracted alkaloid substances have antimicrobial activities. A 268, A. 278, A. 381, have rather wide antimicrobial spectra against *Ceraticystis fimbriata*, *Escherichia coli*, *Piricularia oryzae*, *Xanthomonas oryzae*, *Erwinia aroideae*, *Mycobacterium smegmatis* and *Proteus vulgaris* etc.; A. 252, A. 372, A. 628, A. 887 have comparatively strong antimicrobial activities against *Ceraticystis fimbriata*, *Staphylococcus aureus*, *Xanthomonds oryzae*, *Erwinia aroideae* respectively.