

几种稻田固氮蓝藻挥发物的气相色谱-质谱分析

张定煌¹, 周伊薇^{2*}, 李盛安³, 包江桥², 冯敏铃³, 贺鸿志^{2*} (1. 中山市农业科技推广中心, 广东中山 52840; 2. 广东省现代生态农业与循环农业工程技术研究中心, 华南农业大学, 广东广州 510642; 3. 中山市农产品质量监督检验所, 广东中山 528401)

摘要 [目的] 分析稻田固氮蓝藻挥发性成分, 评估其应用潜力。[方法] 采用气相色谱-质谱联用(GC-MS)分析方法对5株稻田固氮蓝藻的挥发性化学成分进行分析与鉴定。[结果] 固氮蓝藻挥发性成分中有多种生物活性功能的烷烃、酚类和酯类物质, 具有抗动植物病原微生物、抑制有害藻类、抗草、杀虫等作用。[结论] 稻田固氮蓝藻在生物源药物、杀藻剂和农药等生产领域具有应用价值。

关键词 固氮蓝藻; 挥发性化学物质; 气相色谱-质谱联用; 生物活性

中图分类号 S-3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)03-0145-04

Volatiles Analysis of Several Nitrogen-fixing Cyanobacteria Isolated from Rice Fields Using Gas Chromatography-mass Spectrometry
ZHANG Ding-huang¹, ZHOU Yi-wei², LI Sheng-an³ et al (1. Zhongshan Agricultural Science and Technology Extension Center, Zhongshan, Guangdong 528401; 2. Guangdong Engineering Research Center for Modern Eco-agriculture and Circular Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642; 3. Zhongshan Quality Supervision & Inspection Institute of Agricultural Products, Zhongshan, Guangdong 528401)

Abstract [Objective] The aim was to analyze volatiles of several nitrogen-fixing cyanobacteria isolated from rice fields to evaluate its potential applications. [Method] The volatile compounds of five nitrogen-fixing cyanobacteria were isolated and identified by using gas chromatography-mass spectrometry. [Result] Some alkane, phenols and esters appeared in algae with some biological activities in inhibiting or killing animal and plant pathogenic microorganisms, harmful algae, weeds, insects, etc. [Conclusion] It illustrates that nitrogen-fixing cyanobacteria isolated from rice-field can be used as biological source drug, pesticide and algicide.

Key words Nitrogen-fixing cyanobacteria; Volatile compounds; Gas chromatography-mass spectrometry; Biological activity

固氮蓝藻是能进行固氮作用的蓝藻的总称^[1], 现已发现的固氮蓝藻有150余种, 是热带亚热带地区重要的微生物资源^[1-2]。固氮蓝藻在生物肥料、生物农药、功能食品、新药物、新能源、新材料、污染修复等方面具有广阔的应用前景。1939年印度首次报道用固氮蓝藻肥田, 之后许多研究证明稻田接种固氮蓝藻可增产^[3]。目前随着对固氮蓝藻应用基础和基础研究方面的发展, 其在农业生产中的应用潜力正在得到更全面和深入的认识, 而其在农业环境污染修复、农业病虫害防治、农业废弃物利用等方面的应用也成为了目前的热点^[2]。固氮蓝藻可以产生大量性质各异的次级代谢物, 已有部分藻源化合物在医学方面得到商业化应用, 但固氮蓝藻可能仍然有天然活性成分尚待发掘和利用。鉴于此, 笔者采用气相色谱-质谱联用法对5株稻田固氮蓝藻产生的胞内胞外挥发性化学成分进行了分析鉴定, 以评估其应用潜力。

1 材料与方 法

1.1 材料 试验所用5株分离自稻田、具有异形胞的丝状固氮蓝藻为 *Nostoc* sp. (FACHB-85)、*Nostoc paludosum* (FACHB-89)、*Nostoc* sp. (FACHB-131)、*Anabaena oryzae* (FACHB-604)、*Anabaena azotica* (FACHB-119), 均购自中国科学院水生生物研究所淡水藻种库。藻培养试验采用BG11无氮培养基。所有化学试剂均为分析纯, 试验用水为超纯水, 所用萃取溶剂均为色谱纯。

基金项目 广东省科技计划项目(2015A020209152, 2016A030303050); 中山市科技计划项目(2014A2FC239); 广东省大学生创新创业训练计划项目(201610564066)。

作者简介 张定煌(1965—), 男, 湖南永州人, 高级农艺师, 从事农业技术推广和农产品检测工作。*通讯作者: 周伊薇, 硕士研究生, 研究方向: 农业生态学; 贺鸿志, 副教授, 博士, 从事农业生态和污染生态学研究。

收稿日期 2017-10-30

1.2 方 法

1.2.1 藻培养方法 在500 mL玻璃三角瓶中加入BG11无氮培养基200 mL, 121 °C高压蒸汽灭菌20 min, 无菌条件下接种10 mL对数生长期的藻种。在光照培养箱、温度28.5 °C、光照3 000 lx条件下培养, 每天摇瓶3~6次, 共培养14 d(对数生长后期)。

1.2.2 藻培养液和藻细胞挥发物提取 采用离心法分离藻细胞和培养液, 离心获得上清液, 经0.22 μm微孔滤膜过滤后加入20 mL色谱纯乙酸乙酯, 在摇床上避光振荡1 h。将混合液转移到250 mL分液漏斗中, 静置, 分层后进行分液, 保留乙酸乙酯相, 加无水硫酸钠除去水分后, 在旋转蒸发仪上蒸发至干, 加色谱纯乙酸乙酯定容至2 mL, 经0.22 μm微孔滤膜过滤后即可用于气相色谱-质谱分析。上述离心获得的藻细胞冻干后, 加入20 mL色谱纯乙酸乙酯, 在摇床上密封避光振荡24 h。经0.22 μm微孔滤膜过滤后, 用无水硫酸钠除水, 再经旋转蒸发至干, 加乙酸乙酯定容至2 mL, 滤膜过滤后用于分析。

1.2.3 气相色谱-质谱测定条件和方 法 HP-5MS毛细管色谱柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm); 进样口温度: 250 °C; 进样方式: 不分流进样; 进样量: 1 μL; 柱流速为1.0 mL/min; 载气: 高纯氦气; 程序升温: 70 °C保持1 min, 以20 °C/min的速度升温至220 °C, 保持2 min, 再以10 °C/min的速度升温至280 °C, 保持15 min; 质谱条件: 离子源230 °C, 四极杆150 °C; 离子源及电压: EI源70 eV; 质量扫描范围: 40~500 m/z; 检索谱库: NIST14.L。

2 结果与分析

2.1 藻细胞培养液中的外泌挥发物分析 用色谱纯乙酸乙酯萃取获得了藻细胞培养液中挥发性物质, 其代表性的

GC-MS分析图谱见图1。由图1可知,胞外液有20多个较大的色谱峰。经质谱分析并进行数据库匹配后的结果见表1(仅选择匹配度超过80%的物质)。由表1可知,FACHB-85、FACHB-89、FACHB-131、FACHB-604和FACHB-119确认出现的挥发物分别有11、13、9、7和7个。化合物类型主

要包括烷烃类、卤代烃类、硅烷类、酚类和酯类。其中,2,4-二叔丁基酚、邻苯二甲酸二异丁酯、邻苯二甲酸二仲丁酯、邻苯二甲酸二丁酯、己二酸二(2-乙基己基)酯、邻苯二甲酸,6-乙基-3-辛基-2-乙基己酯在5株藻的胞外液中均有出现。

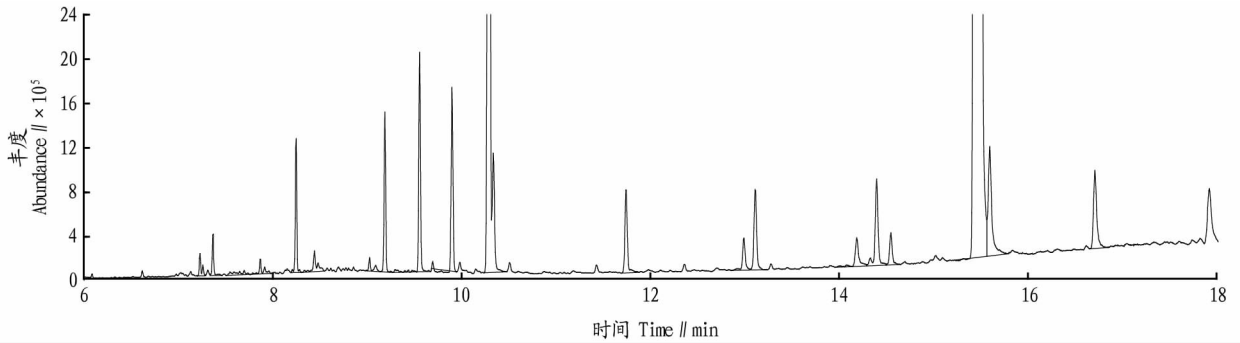


图1 培养液中挥发物代表性色谱图(FACHB-89)

Fig.1 A representative chromatography of volatiles in algal culture filtrate(FACHB-89)

按照色谱峰面积占比,念珠藻FACHB-85和FACHB-89的培养滤液中出现的主要物质均为邻苯二甲酸,6-乙基-3-辛基-2-乙基己酯,其次为邻苯二甲酸二丁酯,这2种物质之和分别占2种藻胞外分泌挥发物的94%和85%以上。但同为念珠藻属的FACHB-131却与这两者存在很大

差异,而与鱼腥藻属的FACHB-119非常接近,主要物质为邻苯二甲酸二异丁酯、邻苯二甲酸二丁酯、己二酸二(2-乙基己基)酯和2,4-二叔丁基酚。FACHB-604则主要是邻苯二甲酸二异丁酯,占91.2%。

表1 藻培养滤液中挥发物的气相色谱-质谱分析结果

Table 1 GC-MS results of volatiles in algal culture filtrate

| 保留时间 Time//min | 谱库中匹配的化合物 Compounds matching in the spectrum library | 色谱峰面积占比 The proportion of chromatographic peak area//% | | | | |
|-------------------|---|--|----------|-----------|-----------|-----------|
| | | FACHB-85 | FACHB-89 | FACHB-131 | FACHB-604 | FACHB-119 |
| 7.230 | 十四甲基环七硅氧烷 | — | 0.18 | — | — | — |
| 7.367 | 2,4-二叔丁基酚 | 0.36 | 0.27 | 12.24 | 1.95 | 9.45 |
| 7.869 | 十六烷 | 0.20 | 0.32 | 2.86 | — | 4.10 |
| 8.442 | 十七烷 | 0.24 | 0.29 | — | — | — |
| 8.480 | 1-碘壬烷 | — | — | 5.83 | — | — |
| 9.027 | 十八烷 | 0.09 | 0.15 | — | — | — |
| 9.189 | 十八甲基环九硅氧烷 | — | 1.01 | — | — | — |
| 9.557 | 邻苯二甲酸二异丁酯 | 1.65 | 1.55 | 27.33 | 91.20 | 15.69 |
| 9.901 | 邻苯二甲酸二仲丁酯 | 1.50 | 1.23 | 4.62 | 1.19 | 3.27 |
| 9.982 | 7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro[4,5]deca-6,9-diene-2,8-dione | — | — | 5.43 | 0.63 | — |
| 10.290 | 邻苯二甲酸二丁酯 | 16.75 | 16.00 | 22.15 | 1.56 | 15.07 |
| 12.990 | 丁基十二烷基邻苯二甲酸酯 | 0.44 | 0.36 | — | — | — |
| 14.190 | 己二酸二(2-乙基己基)酯 | 0.46 | 0.44 | 16.14 | 2.48 | 27.70 |
| 14.550 | 2-乙基己基二苯基磷酸酯 | 0.39 | 0.35 | — | — | — |
| 15.490 | 邻苯二甲酸,6-乙基-3-辛基-2-乙基己酯 | 77.93 | 69.51 | 2.30 | 1.00 | 10.63 |

2.2 藻细胞中的挥发物分析 用色谱纯乙酸乙酯萃取获得了藻细胞中的挥发性物质,其代表性的GC-MS分析图谱

见图2。由图2可知,细胞提取液也有20多个较大的色谱峰。经质谱分析并进行数据库匹配后的结果见表2(仅选择

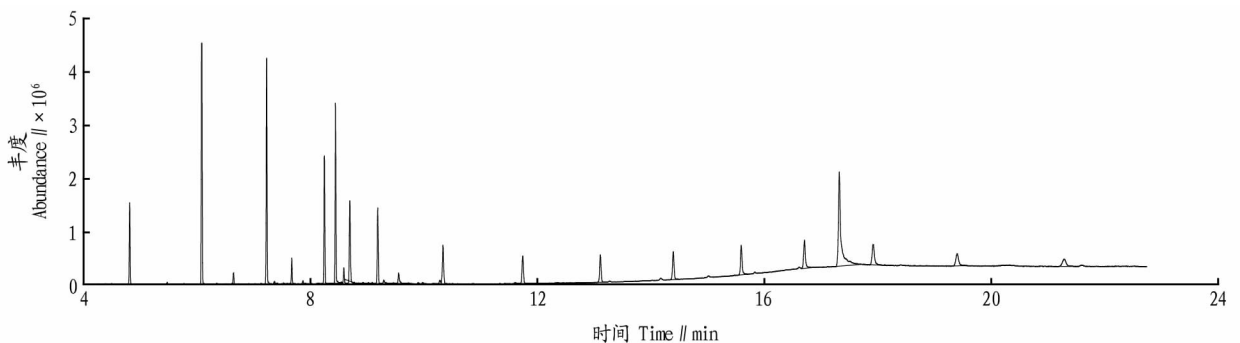


图2 藻细胞中挥发物代表性色谱(FACHB-131)

Fig.2 A representative chromatography of volatiles in algal cells(FACHB-131)

匹配度超过 80% 的物质)。由表 2 可知, FACHB - 85、FACHB - 89、FACHB - 131、FACHB - 604 和 FACHB - 119 确认出现的挥发物分别有 10、9、11、9 和 7 个。化合物类型主要包括硅烷类、烷烃类、酯类和酰胺类, 这与培养液中的结果有

较大的差别。

2.3 藻产挥发物活性成分应用潜力评估 将试验获得的挥发性物质进行了进一步分析以评估可能的活性成分, 结果见表 3。由表 3 可知, 国内外研究已经证实的活性物质主要包

表 2 藻细胞中挥发物气相色谱-质谱分析结果

Table 2 GC-MS results of volatiles in algal cells

| 保留时间 Time//min | 谱库中匹配的化合物 Compounds matching in the spectrum library | 色谱峰面积占比 The proportion of chromatographic peak area//% | | | | |
|-------------------|---|--|------------|-------------|-------------|-------------|
| | | FACHB - 85 | FACHB - 89 | FACHB - 131 | FACHB - 604 | FACHB - 119 |
| 4.816 | 十甲基环五硅氧烷 | 3.80 | 4.33 | 4.12 | 4.63 | 4.70 |
| 6.086 | 十二甲基环六硅氧烷 | 13.94 | 16.49 | 15.08 | 16.17 | 17.09 |
| 6.645 | 十四甲基环六硅氧烷 | 0.62 | 0.71 | 0.64 | — | — |
| 7.229 | 十四甲基环七硅氧烷 | — | 12.62 | 11.49 | 11.48 | 12.65 |
| 7.673 | 十甲基环五硅氧烷 | 1.65 | 1.49 | 1.68 | 1.26 | 1.65 |
| 8.443 | 十七烷 | 11.28 | 3.46 | 8.63 | 6.41 | 3.80 |
| 8.696 | 7-甲基十七烷 | 5.63 | 2.06 | 4.84 | 3.98 | — |
| 9.189 | 十八甲基环九硅氧烷 | 4.71 | — | — | 4.83 | — |
| 9.558 | 邻苯二甲酸二异丁酯 | — | — | 0.91 | 14.15 | — |
| 15.600 | 二十甲基环十硅氧烷 | — | — | 3.10 | — | — |
| 17.320 | 芥酸酰胺 | 10.43 | 10.33 | 15.57 | — | 11.24 |
| 19.400 | 十六甲基八硅氧烷 | 2.28 | — | — | 1.75 | 2.55 |
| 21.290 | 十六甲基八硅氧烷 | 1.54 | 2.02 | 1.71 | — | — |

表 3 藻产挥发物活性成分应用潜力评估

Table 3 Application potential analysis of volatiles produced by algal cells

| 类别 Type | 化合物名称 Compound name | CAS# | 化学式 Chemical formula | 结构式 Structure | 文献报道活性 Activity reported in literature |
|-------------|------------------------|--------------|--|------------------|---|
| 烷烃 Alkanes | 十七烷 | 629-78-7 | C ₁₇ H ₃₆ | | 抗病原微生物 ^[4-6] |
| | 7-甲基-十七烷 | 20959-33-5 | C ₁₈ H ₃₈ | | 抗病原微生物 ^[4] 、性信息素 ^[7] |
| 酚类 Phenolic | 2,4-二叔丁基酚 | 96-76-4 | C ₁₄ H ₂₂ O | | 抑制有害生物膜 ^[8-11] 、抗草 ^[12] 、抗菌 ^[13] 、抗氧化 ^[14] 、杀虫 ^[15] 、抗植物病 ^[16-17] |
| 酯类 Esters | 邻苯二甲酸二异丁酯 | 84-69-5 | C ₁₆ H ₂₂ O ₄ | | 抑制有害藻 ^[18] 、抗植物病害 ^[22] |
| | 丁基十二烷基邻苯二甲酸酯 | 1000308-93-9 | C ₂₄ H ₃₈ O ₄ | | 抑制有害藻 ^[19] |
| | 邻苯二甲酸二丁酯 | 84-74-2 | C ₁₆ H ₂₂ O ₄ | | 抑制有害藻 ^[18,20] 、抗植物病害 ^[23] |
| | 邻苯二甲酸,6-乙基-3-辛基-2-乙基己酯 | 1000315-53-8 | C ₂₆ H ₄₂ O ₄ | | 杀虫 ^[26] |
| | 己二酸二(2-乙基己基)酯 | 103-23-1 | C ₂₂ H ₄₂ O ₄ | | 抗植物病害 ^[24-25] 、抑制有害藻 ^[21] |
| 硅烷 Silane | 十八甲基环九硅氧烷 | 556-71-8 | C ₁₈ H ₅₄ O ₉ Si ₉ | | 疑似抗菌活性物质 ^[23] |

括烷烃类、酚类、脂类和硅烷类共计9种物质。其中烷烃类为十七烷和7-甲基-十七烷,两者均具有抗病原微生物的作用^[4],而7-甲基-十七烷可以作为性信息素^[7]。酚类为2,4-二叔丁基酚,具有抗植物病害、抑制有害生物膜、抗草、抗菌、抗氧化、杀虫等多重作用^[8-17],特别是近年来其在破坏有害生物膜方面的作用引起广泛关注^[8-11]。在酯类方面,其主要的活性作用为抑制有害藻类,如水华藻微囊藻和赤潮藻短凯伦藻^[18-21]。同时,部分具有抗作物病害的作用^[22-25]。而邻苯二甲酸,6-乙基-3-辛基-2-乙基己酯甚至具有一定的抗虫作用^[26]。这都说明虽然作为塑化剂的主要成分的邻苯二甲酸酯类物质被认为是环境污染物质,但在某些条件下可作为生物源杀藻剂和农药使用。已经有研究表明,很多淡水藻类均能产生邻苯二甲酸酯类物质,可以在胁迫条件下释放到环境中^[27]。此外,硅烷中十八甲基环九硅氧烷被认为可能具有抗菌活性^[23]。

3 结论

采用气相色谱-质谱联用(GC-MS)分析方法对5株稻田固氮蓝藻的挥发性化学成分进行分析与鉴定。结果表明,固氮蓝藻挥发性成分中有多种生物活性功能的烷烃、酚类和酯类物质,具有抗动植物病原微生物、抑制有害藻类、抗草、杀虫等作用,说明稻田固氮蓝藻在生物源药物、杀藻剂和农药等生产方面具有应用价值。

参考文献

- [1] PRASANNA R, BABU S, RANA A, et al. Evaluating the establishment and agronomic proficiency of cyanobacterial consortia as organic options in wheat-rice cropping sequence[J]. *Experimental agriculture*, 2013, 49(3): 416-434.
- [2] SINGH N K, DHAR D W, TABASSUM R. Role of cyanobacteria in crop protection[J]. *Proceedings of the national academy of sciences, India section B: Biological sciences*, 2016, 86(1): 1-8.
- [3] 黎尚豪. 固氮蓝藻作为晚稻肥源的研究[J]. *水生生物学集刊*, 1981, 7(3): 417-423.
- [4] KHAIRY H M, EL-KASSAS H Y. Active substance from some blue green algal species used as antimicrobial agents[J]. *African journal of biotechnology*, 2010, 9(19): 2789-2800.
- [5] OZDEMIR G, KARABAY N U, DALAY M C, et al. Antibacterial activity of volatile component and various extracts of *Spirulina platensis*[J]. *Phytotherapy research*, 2004, 18(9): 754-757.
- [6] 殷献华, 李天磊, 潘卫东, 等. 蕈草挥发油化学成分分析及其抑菌作用研究[J]. *山地农业生物学报*, 2010, 29(5): 415-418.
- [7] ROELOFS W L, CARDE R T. Hydrocarbon sex pheromone in tiger moths (Arctiidae)[J]. *Science*, 1971, 171(3972): 684-686.
- [8] PADMAVATHI A R, BAKKIYARAJ D, THAJUDDIN N, et al. Effect of 2, 4-di-tert-butylphenol on growth and biofilm formation by an opportunistic fungus *Candida albicans*[J]. *Biofouling*, 2015, 31(7): 565-574.

- [9] VISZWAPRIYA D, PRITHIKA U, DEEBIKA S, et al. *In vitro* and *in vivo* antibiofilm potential of 2,4-Di-tert-butylphenol from seaweed surface associated bacterium *Bacillus subtilis* against group A streptococcus[J]. *Microbiological research*, 2016, 191: 19-31.
- [10] PADMAVATHI A R, ABINAYA B, PANDIAN S K. Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl) of marine bacterial origin inhibits quorum sensing mediated biofilm formation in the uropathogen *Serratia marcescens*[J]. *Biofouling*, 2014, 30(9): 1111-1122.
- [11] PADMAVATHI A R, PERIYASAMY M, PANDIAN S K. Assessment of 2, 4-Di-tert-butylphenol induced modifications in extracellular polymeric substances of *Serratia marcescens*[J]. *Bioresource technology*, 2015, 188: 185-189.
- [12] CHUAH T S, NORHAFAZAH M Z, NAIMAH A H, et al. Phytotoxic activity of the allelochemical, 2,4-di-tert-butylphenol on two selected weed species[J]. *Sains malaysia*, 2016, 45(6): 963-967.
- [13] DHARNI S, SANCHITA, MAURYA A, et al. Purification, characterization, and *in vitro* activity of 2,4-di-tert-butylphenol from *Pseudomonas monteilii* PsF84: Conformational and molecular docking studies[J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2014, 62(26): 6138-6146.
- [14] CHOI S J, KIM J K, KIM H K, et al. 2,4-di-tert-butylphenol from sweet potato protects against oxidative stress in Pc12 cells and in mice[J]. *Journal of medicinal food*, 2013, 16(11): 977-983.
- [15] 王再强, 吴毅歆, 周红, 等. 2,4-二叔丁基苯酚对秀丽隐杆线虫的毒杀作用[J]. *农药*, 2014, 53(4): 298-300.
- [16] 周宝利, 李娜, 刘双双, 等. 2,4-二叔丁基苯酚对番茄叶霉病及幼苗生长的影响[J]. *生态学杂志*, 2013, 32(5): 1203-1207.
- [17] GAO Z F, ZHANG B J, LIU H P, et al. Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*[J]. *Biological control*, 2017, 105: 27-39.
- [18] LIU N, WEN F L, LI F M, et al. Inhibitory mechanism of phthalate esters on *Karenia brevis*[J]. *Chemosphere*, 2016, 155: 498-508.
- [19] 张胜娟, 夏文彤, 杨晓辉, 等. 槐叶萍抑藻效应及其抑藻物质的分离鉴定[J]. *卫生研究*, 2016, 45(3): 442-447.
- [20] ZHANG P, ZHAI C M, WANG X X, et al. Growth competition between *Microcystis aeruginosa* and *Quadrigula chodatii* under controlled conditions[J]. *Journal of applied phycology*, 2013, 25(2): 555-565.
- [21] CHOE S, JUNG I H. Growth inhibition of freshwater algae by ester compounds released from rotted plants[J]. *Journal of industrial and engineering chemistry*, 2002, 8(4): 297-304.
- [22] 周宝利, 陈丰, 刘娜, 等. 邻苯二甲酸二异丁酯对茄子黄萎病及其幼苗生长的化感作用[J]. *西北农业学报*, 2010, 19(4): 179-183.
- [23] AHSAN T, CHEN J G, ZHAO X X, et al. Extraction and identification of bioactive compounds (eicosane and dibutyl phthalate) produced by *Streptomyces strain* KX852460 for the biological control of *Rhizoctonia solani*[J]. *Amb express*, 2017, 7: 54.
- [24] 白雪娜, 谷继成, 成军, 等. 瑞香狼毒根的超临界萃取物抑菌活性和成分分析[J]. *林业科学*, 2012, 48(2): 169-174.
- [25] DONG S J, BI X D, WANG N, et al. Algalicidal activities of *Cladophora fracta* on red tide-forming microalgae *Heterosigma akashiwo* and *Gymnodinium breve*[J]. *Allelopathy journal*, 2016, 37(2): 231-240.
- [26] 贾双双. 番茄砧木对南方根结线虫抗性鉴定及抗性机制研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2012.
- [27] BABU B, WU J T. Production of phthalate esters by nuisance freshwater algae and cyanobacteria[J]. *Science of the total environment*, 2010, 408(21): 4969-4975.

科技论文写作规范——数字

公历世纪、年代、年、月、日、时刻和各种计数和计量,均用阿拉伯数字。年份不能简写,如1990年不能写成90年,文中避免出现“去年”“今年”等写法。小于1的小数点前的零不能省略,如0.2456不能写成.2456。小数点前或后超过4位数(含4位数),从小数点向左右每3位空半格,不用“,”隔开。如18 072. 235 71。尾数多的数字(5位以上)和小数点后位数多的小数,宜采用 $\times 10^n$ (n 为正负整数)的写法。数字应正确地写出有效数字,任何一个数字,只允许最后一位存在误差。