

拮抗放线菌 A02 活性产物的分离和鉴别特性研究

卢彩鸽¹ 潘争艳² 刘伟成¹ 隋 勤¹ 裘季燕¹

(1. 北京市农林科学院 植物保护环境研究所, 北京 100097;

2. 辽宁省农业科学院 稻作研究所, 辽宁 沈阳 110101)

摘要: 为了明确利迪链霉菌 A02 抑菌活性物质的分离和鉴别特征, 利用 pH 纸层析和纸电泳试验检测了其离子特性, 有机溶剂萃取和硅胶薄层色谱分离测定了其极性, 捷克八溶剂系统纸层析、紫外光谱扫描、官能团化学反应和蛋白酶敏感性试验分析了其化学类型。结果表明, 菌株 A02 代谢活性产物在酸性和碱性溶液中呈电中性, 但其极性较强, 能被正丁醇高效萃取, 乙醇: 氨水: 水(8: 1: 1, V/V) 的溶剂组合对其薄层色谱分离效果较好; 对蛋白酶 K 和胰蛋白酶不敏感, 化学反应显示出饱和烯键或炔键、糖苷键、氨基和醛基特性; 结合纸层析谱型和紫外吸收图谱, 判断其为四烯大环内酯类抗生素。此结果揭示了利迪链霉菌产生四烯大环内酯类抗生素的新功能。

关键词: 利迪链霉菌; 活性产物; 特性; 四烯大环内酯

中图分类号: S476.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2011)04-0147-06

The Characteristics for Separation and Identification of the Bioactive Metabolite of Antagonistic Actinomyces A02

LU Cai-ge¹, PAN Zheng-yan², LIU Wei-cheng¹, SUI Qin¹, QIU Ji-yan¹

(1. Institute of Plant & Environment Protection, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China; 2. Rice Research Institute, Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang 110101, China)

Abstract: In order to investigate the characteristics for separation and identification of the antifungal substance produced by antagonistic *Streptomyces lydicus* A02, the methods of pH paper chromatography, paper electrophoresis, organic solvent extraction, silica gel TLC, Doskochilova solvent system paper chromatography, ultraviolet spectrum scan, functional group and proteinase test were respectively used to determine the ion property, the polarity, the ultraviolet absorption character, the main functional groups and the sensitivity to proteinases of the bioactive substance of strain A02. The results showed that the antifungal substance were electrically neutral and highly polar in solutions, which enabled it to be efficiently extracted with n-butyl alcohol as the extractant and separated by TLC with ethanol + aqua ammonia + water (8: 1: 1, V/V) as the solvent combination. Its antifungal activity was not affected by proteinase K and trypsin. There were functional groups of unsaturated alkyl, saccharide or glycoside, amino acid and aldehyde in its structure according to the chemical reactions. Doskochilova paper chromatographic pattern and ultraviolet absorption spectrum of the antifungal substance were in accordance with the characters of tetra-alkene macrolide antibiotic. The combination of the information referred to above reveal a new biological function for *S. lydicus* to produce tetra-alkene macrolide antibiotics.

Key words: *Streptomyces lydicus*; Antifungal substance; Characteristic; Tetra-alkene macrolide

由于现代可持续农业对环境和生态的要求, 生物农药的开发和应用已成为全球农药产业发展的新

趋势, 其绿色、环保、节能等优越特性比以往任何时期都更加受到世界各国的重视, 成为生物技术领域

收稿日期: 2011-05-16

基金项目: 北京市自然科学基金(6101001); 北京市科技计划课题(Z101105052010002); 北京市农林科学院项目(2010A006)

作者简介: 卢彩鸽(1975-), 女, 河南许昌人, 助理研究员, 博士, 主要从事微生物活性产物研究。

通讯作者: 刘伟成(1959-), 男, 辽宁凌源人, 研究员, 博士, 主要从事植物真菌病害及其生防微生物研究。

的研究热点^[1]。拮抗微生物是生物农药的重要来源,而放线菌是人们研究最早并应用到生产中的一类拮抗微生物^[2],产生抗菌活性物质是其抑制植物病害的最主要机制,因此,其代谢活性产物是决定其生防效果的最关键和最基本的要素,对菌株抑菌活性组分的分离和化学本质的鉴定是深入研究其作用机理、发酵调控、生产工艺乃至毒理学、环境行为和田间应用技术等的必要前提。

放线菌 A02 是从北京远郊森林土壤中分离筛选出的高效拮抗菌株,经鉴定为利迪链霉菌(*Streptomyces lydicus*),前期研究表明,该菌株能够产生高活性的抗真菌代谢产物,对果蔬作物灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、番茄早疫病菌(*Alternaria solani*)、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)、黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)等多种植物病原真菌均有强烈的抑制作用^[3];温室盆栽防治试验中其发酵液对番茄和甜椒灰霉病的平均防治效果分别达 75.17% 和 89.76%,对黄瓜枯萎病的平均防效为 65.15%^[4],表现出了良好的开发应用前景。本试验研究其代谢产物与分离鉴定相关的主要理化特性,旨在判定其抗菌活性组分的化学类型,并为其分离纯化和结构鉴定提供依据。

1 材料和方法

1.1 供试菌株和培养基

拮抗菌:利迪链霉菌 A02 由北京市农林科学院植物保护环境保护研究所从京郊森林土壤中分离筛选,本室保藏编号 JZB130002。指示菌:酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) ACCC20036 由中国农业微生物菌种保藏管理中心提供,番茄灰霉病菌 Bc-T03 由本室分离自京郊保护地番茄病株。

固体培养基:高氏一号琼脂和 PDA 培养基参照文献[5]的方法配制;菌株 A02 液体种子和发酵培养基:同文献[3]。

1.2 活性产物粗提物的制备

利迪链霉菌 A02 接种于高氏一号琼脂斜面培养基,28℃ 培养 7~10 d 至其产生足量的孢子,用无菌铂环刮取 2~3 环孢子接种于 250 mL 三角瓶内的 50 mL 液体种子培养基,28℃、200 r/min 振荡培养 24~30 h;种子培养液以 5% (V/V) 的接种量接种于 500 mL 三角瓶内的 100 mL 发酵培养基,31℃、240 r/min 振荡培养 96 h。取少量发酵液样品经 0.45 μm 的无菌微孔滤膜过滤除菌,滤液分别以酿酒酵母 ACCC20036 和番茄灰霉病菌 Bc-T03 为指示菌,利用洋菜打孔法^[6]进行活性检测;

确定活性后用 2 倍体积的无水乙醇预处理发酵液,4℃ 静置 2 h 沉淀菌体及其他固形物,上清液用 2 层滤纸以布氏漏斗真空抽滤,滤液在 45℃ 下减压浓缩至原处理发酵液体积的 1/20 量,该浓缩液即为下列试验中所用的活性物质粗提物,4℃ 保存备用。

1.3 活性产物的离子特性检测

1.3.1 pH 纸层析试验 参照文献[5]的方法,采用 pH 分别为 2、3、4、5、6、7、8 的 Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液和 pH 分别为 9 和 10 的甘氨酸-NaOH 缓冲液;溶剂系统为:水饱和的正丁醇、水饱和的乙酸乙酯、50% 乙醇;以粗提物为供试样品,采用平板生物学显迹法检测结果:用定制的方形玻璃盘制备 PDA 平板,以番茄灰霉病菌 Bc-T03 为指示菌,将层析后的滤纸条依次贴于平板上,置 25℃ 恒温培养 48 h,测量活性组分的展层距离,计算 R_f 值。

1.3.2 纸电泳试验 参照文献[5]的方法,采用 pH 8.0 的 0.05 mol/L 巴比妥缓冲液和 pH 4.0 的 0.1 mol/L 醋酸缓冲液;滤纸条大小为 18 cm × 1 cm;粗提物为供试样品,用微量加样器点样 15 μL,点样直径控制在 5 mm 以内;电泳条件为:电压 250 V,时间 2 h;平板生物学显迹法检测结果,计算 R_f 值。

1.4 活性产物的极性试验

1.4.1 有机溶剂萃取 选用四氯化碳、氯仿、乙醚、乙酸乙酯和正丁醇 5 种不同极性的有机试剂为萃取剂;A02 粗提物样品用去离子无菌水稀释 2 倍,分别与等体积萃取剂混合,120 r/min 室温振荡 1 h,混合液转移至分液漏斗,静置过夜分层,分别收集萃取相(有机相)和萃余相(水相),以番茄灰霉病菌 Bc-T03 为指示菌,设未经萃取的发酵液为对照,采用滤纸片琼脂扩散法^[7]检测其抑菌活性。

1.4.2 薄层色谱分离 称取 6 g 硅胶 GF254 (TLC 60 型,青岛海洋化工有限公司生产)放入研钵中,加入 18 mL 0.5% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)水溶液,充分研磨,在洁净干燥的 20 cm × 5 cm × 0.2 cm 玻璃板上涂平,自然风干后置干燥器中备用;用前在烘箱中 110℃ 活化 1.5 h,冷却至室温后取出,在距展层板一端 2 cm 和另一端 1 cm 处用铅笔画线,分别作为点样原点和展层终点;用微量加样器取粗提物样品沿点样原点呈条带状分多次均匀点样,每次约 20 μL,每点宽度控制在 5 mm 内,点样总量为 100 μL。选择弱极性和强极性 2 套溶剂系统,前者以苯和氯仿为主要溶剂,后者以甲醇、乙醇和正丁醇为主要溶剂,各组成 8 种溶剂组合,在层析缸中密闭上行

展层 15 cm;薄板置通风橱中挥发溶剂至干,在紫外检测仪上于 254 nm 下观察,测量展层距离并计算 R_f 值。将各条带、溶剂起点及前沿分别刮下,用甲醇浸提 2 h 后离心取上清,采用滤纸片琼脂扩散法测定各条带对番茄灰霉病菌 Bc-T03 的抑菌活性,确定活性带。

1.5 活性产物类型的鉴别

采用捷克八溶剂系统纸层析法^[5]。滤纸条规格为 18 cm × 1 cm,用微量加样器取粗提物样品 15 μ L 点样于原点,点样直径控制在 5 mm 以内,风干后分别在 8 种展层剂中上行展开至前沿线,取出纸条悬于通风橱中风干。以番茄灰霉病菌 Bc-T03 为指示菌,平板生物学显迹法检测结果,计算 R_f 值。

1.6 活性产物光吸收特性试验

活性产物粗提物样品用甲醇稀释 200 倍,漩涡振荡 10 min 充分混匀,10 000 r/min 离心 15 min,取上清,以甲醇为空白对照,采用 Beckman DU800 紫外/可见分光光度计进行紫外扫描,光谱采集条件为:波长范围 200 ~ 400 nm,扫描步长 0.5 nm,速度 600 nm/min;软件自动形成紫外吸收光谱图。

1.7 官能团的定性分析

按文献[8]的方法进行官能团化学反应试验。

1.8 蛋白酶敏感性试验

参照文献[9]的方法,粗提物样品用去离子无菌水稀释 10 倍,分别以蛋白酶 K (Merck 公司)和胰蛋白酶 (Sigma 公司)在 37℃ 水浴中依次处理 30, 60, 90, 120, 150 min,设未加蛋白酶的稀释样品为对照;以番茄灰霉病菌 Bc-T03 为指示菌,滤纸片琼脂扩散法检测各处理的抑菌活性,利用软件 SPSS13.0 进行统计学分析,比较其活性的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 发酵液及粗提物的抑菌活性

所得菌株 A02 摇瓶发酵液的无菌滤液对酿酒酵母 ACCC20036 和番茄灰霉病菌 Bc-T03 的抑菌圈直径分别达 32.0 mm 和 47.0 mm (图 1),表明此时菌株已在发酵液中产生了高活性的抗菌物质。发酵液经预处理、浓缩后的活性产物粗提物稀释至原浓度检测活性,其抑菌作用与浓缩前基本一致。

2.2 活性产物的离子特性

pH 纸层析结果显示,菌株 A02 粗提物在 3 种溶剂系统中各 pH 条件下展层的抑菌活性带 R_f 值变化不大,活性带基本与原点呈平行线排列,尤其在水饱和的乙酸乙酯层析系统中活性带均位于原

点(图 2),表现出中型抗生素的特征。

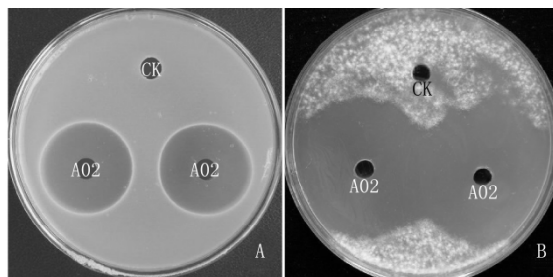
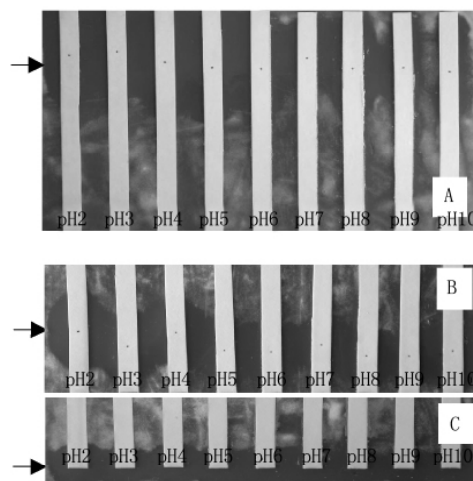


图 1 利迪链霉菌 A02 无菌发酵滤液对酵母菌 (A) 和番茄灰霉病菌 (B) 的抑菌活性

Fig. 1 The inhibition activity of the fermented broth filtrate of *Streptomyces lydicus* A02 against *Saccharomyces cerevisiae* (A) and *Botrytis cinerea* (B)



A. 50% 乙醇溶剂系统; B. 水饱和的正丁醇溶剂系统; C. 水饱和的乙酸乙酯溶剂系统。

A. 50% ethanol solvent system; B. Water-saturated n-butanol solvent system; C. Water-saturated ethyl acetate solvent system.

图 2 利迪链霉菌 A02 活性产物的 pH 纸层析图谱
Fig. 2 The pH paper chromatography profile of the bioactive metabolite of strain A02

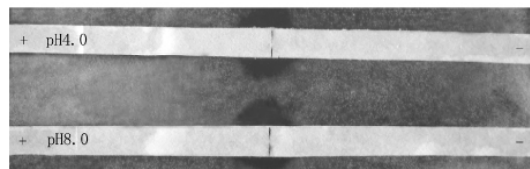


图 3 利迪链霉菌 A02 活性产物的纸电泳图谱

Fig. 3 The paper electrophoresis pattern of the bioactive metabolite of strain A02

从纸电泳图谱可见, A02 活性产物在酸性 (pH4.0) 和碱性 (pH8.0) 条件下电泳结果其抑菌活性带均出现在原点, 即其活性产物未发生迁移 (图 3), 表明其在酸、碱条件下均不产生带正、负电荷的离子, 在固定的电压和电流、一定的时间内其泳动不受溶液 pH 值的影响, 说明其为中性物质。这与 pH 纸层析结果相一致。

2.3 活性产物的极性

经不同萃取剂萃取的有机相和水相对番茄灰霉病菌的抑菌活性如表 1 所示,其中极性较大的正丁醇提取效果最好,乙酸乙酯次之,而极性较小的四氯化碳、氯仿和乙醚 3 种萃取剂有机相几乎均无抑菌活性,可见 A02 活性产物能溶于极性较大的有机溶剂。根据相似相溶原理,说明其具有较强的极性。

表 1 5 种萃取剂对菌株 A02 活性产物的萃取效果

Tab. 1 The extraction effect of 5 extractants on the bioactive metabolite of strain A02

| 萃取剂 Extractant | 抑菌圈直径/mm Diameter of inhibition zone | |
|-------------------------|--------------------------------------|------------------|
| | 有机相 Organic phase | 水相 Aqueous phase |
| 四氯化碳 Tetrachloromethane | 0.0 | 20.3 |
| 氯仿 Trichloromethane | 7.0 | 15.4 |
| 乙醚 Ethyl ether | 0.0 | 18.8 |
| 乙酸乙酯 Ethyl acetate | 19.4 | 0.0 |
| 正丁醇 n-Butyl alcohol | 21.6 | 0.0 |
| CK | — | 22.5 |

薄层色谱分离各组分活性检测的结果列于表 2,在以苯和氯仿为主要溶剂的弱极性系统中 8 种溶剂组合产生的活性带均出现在原点处,即活性组分未发生迁移;而以甲醇、乙醇和正丁醇为主要溶剂的较强极性系统中 8 种溶剂组合所产生的活性带均产生了一定的迁移,其迁移率随溶剂组合极性的增强表现出

上升的趋势,其中乙醇:氨水:水(8:1:1, V/V)的溶剂组合分离效果最好,各条带清晰,活性带迁移率(R_f)为 0.451,与杂质带距离较远(图 4)。结果说明 A02 活性产物在较强的溶剂系统中才能产生迁移,这与萃取分离结果相一致。

表 2 菌株 A02 活性产物的薄层色谱分离结果

Tab. 2 TLC result of the bioactive metabolite of strain A02

| 弱极性溶剂系统 The low polar solvent system | | 较强极性溶剂系统 The high polar solvent system | |
|---|-----------------------------------|---|-----------------------------------|
| 溶剂组合(V/V) Solvent combination | 活性带 R_f R_f of active band | 溶剂组合(V/V) Solvent combination | 活性带 R_f R_f of active band |
| 苯:丙酮(2:1) Benzene: Acetone | 0 | 氯仿:甲醇:水(2:3:1) Trichloromethane: Methanol: Water | 0.4 |
| 苯:甲醇(2:1) Benzene: Methanol | 0 | 氯仿:乙醇:水:正丁醇(2:3:1:0.5) Trichloromethane: Ethanol: Water: N-butyl alcohol | 0.2 |
| 苯:乙酸(2:1) Benzene: Acetic acid | 0 | 丙酮:乙醇:水(4:4:1) Acetone: Ethanol: Water | 脱尾 Trailing |
| 氯仿:甲醇:乙酸(98:1:1.5) Trichloromethane: Methanol: Acetic acid | 0 | 乙酸乙酯:乙醇:水(2:3:1) Ethyl acetate: Ethanol: Water | 0.509 |
| 氯仿:甲醇(8:1) Trichloromethane: Methanol | 0 | 乙醇:氨水:水(8:1:1) Ethanol: Aqua ammonia: Water | 0.451 |
| 氯仿:丙酮(2:1) Trichloromethane: Acetone | 0 | 正丁醇:丙酮:水(4:2:4) N-Butyl alcohol: Acetone: Water | 0.618 |
| 氯仿:甲醇(2:1) Trichloromethane: Methanol | 0 | 正丁醇:乙酸:水(2:1:1) N-Butyl alcohol: Acetic acid: Water | 0.727 |
| 氯仿:乙酸(2:1) Trichloromethane: Acetic acid | 0 | 正丁醇:甲醇:水(3:3:4) N-Butyl alcohol: Methanol: Water | 0.863 |

2.4 活性产物类别的初步判定

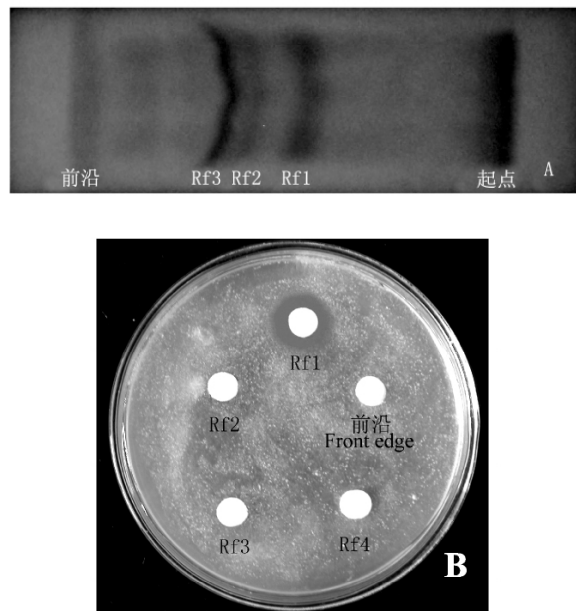
捷克八溶剂系统纸层析结果显示(图 5),菌株 A02 活性组分在溶剂组合Ⅲ中 R_f 值最大,为 0.77,说明其在这种溶剂系统中的溶解性最好;在溶剂组合Ⅵ中不显迹,推测其活性受对甲基苯磺酸的影响;在溶剂组合Ⅶ中 R_f 值最小,为 0.15,说明磷酸盐缓冲液对其迁移影响较大。与 6 大类抗生素的标准图谱^[5]相比较,所得 A02 的层析谱型与多烯类抗生素最接近,不同的是其在溶剂组合Ⅱ中显示有抗菌活性,故初步判定菌株 A02 的主要抗菌活性组分具有

多烯类化合物的特性。

2.5 活性产物的紫外吸收特性

由紫外吸收光谱可见, A02 活性产物在扫描的波长范围内有 3 个明显的吸收峰,呈笔架形分叉,吸光值分别为 1.794 3、2.473 2 和 2.441 1(图 6),这是多烯大环内酯类抗生素共有的特征性紫外吸收谱型;3 个吸收峰分别位于波长 290、303、318 nm 附近,其中最大吸收峰在 303 nm 附近,这与四烯类吸收峰的位置相近^[9]。以此判断 A02 抗菌活性产物应为四烯大环内酯类抗生素,进一步验证了捷克八

溶剂系统纸层析的测定结果。



溶剂组合为乙醇:氨水:水(8:1:1, V/V); R_f1 为活性带。
Solvent combination: Ethanol: Aqua ammonia: Water; R_f1 is the active band.

图 4 菌株 A02 活性产物的薄层色谱分离
(A) 及其抑菌活性(B)

Fig.4 TLC spectrum and the antifungal activity against *B. cinerea* of the bioactive metabolite of strain A02

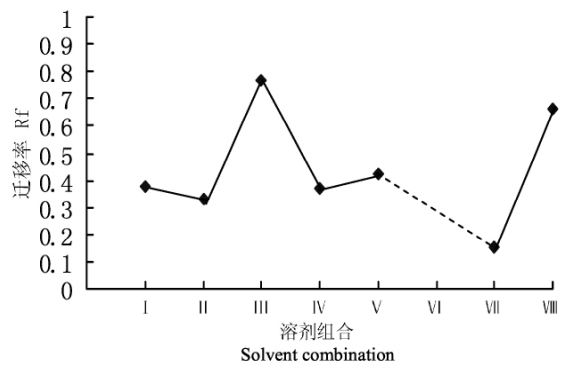


图 5 菌株 A02 活性产物的捷克八溶剂系统纸层析图谱
Fig.5 Paper chromatography pattern of the bioactive metabolite of strain A02 with Daskochilova solvent system

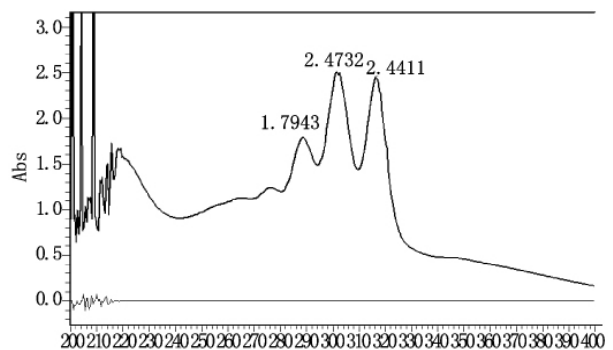


图 6 菌株 A02 活性产物的紫外吸收光谱
Fig.6 Ultraviolet absorption spectrum of the bioactive metabolite of strain A02

表 3 菌株 A02 活性产物的官能团化学反应

Tab.3 Chemical reactions for the functional group of bioactive metabolite of strain A02

| 试验项目 Experiment | 检测基团 Functional group | 反应结果 Result |
|--|-----------------------|-------------|
| α -萘酚试验 α -Naphthol test | 糖或糖苷 | + |
| 碱性酒石酸铜试验 Basic copper tartrate | 还原糖 | - |
| 茚三酮反应 Ninhydrin reaction | 氨基酸、伯氨基 | + |
| 双缩脲反应 Biuret reaction | 多肽、蛋白质 | - |
| 三氯化铁试验 $FeCl_3$ test | 酚 | - |
| 品红试验 Fuchsin test | 醛 | + |
| 高锰酸钾反应 $KMnO_4$ test | 不饱和烃基 | + |
| 浓硫酸反应 Concentrated H_2SO_4 test | 不饱和烃基 | + |

表 4 蛋白酶对菌株 A02 活性产物抑菌活性的影响

Tab.4 The effect of proteinases on antifungal activity of bioactive metabolite of strain A02

| 处理 Treatment | 抑菌圈直径/mm Diameter of inhibition zone | | | | |
|--------------------|--------------------------------------|--------|--------|---------|---------|
| | 30 min | 60 min | 90 min | 120 min | 150 min |
| 蛋白酶 K Proteinase K | 31.3 a | 32.2 a | 31.5 a | 31.3 a | 31.3 a |
| 胰蛋白酶 Trypsase | 32.0 a | 32.3 a | 31.5 a | 31.5 a | 31.5 a |
| CK | 32.3 a | 32.0 a | 31.8 a | 31.7 a | 31.7 a |

注:同一列内标有相同字母的均值在 $\alpha = 0.05$ 水平上无显著性差异。

Note: Within the same column, the means with a same letter are not significantly different at $\alpha = 0.05$ level according to analysis of variance.

2.6 活性产物的官能团化学反应

菌株 A02 活性产物的官能团反应结果如表 3 所示,其中 α -萘酚、茚三酮和品红试验呈阳性反应,说明活性产物分子结构中含有糖苷键、氨基和醛基;碱性酒石酸铜、三氯化铁和双缩脲反应呈阴性,表明其结构不含还原糖和酚基,亦不具蛋白质特性;与高

锰酸钾反应紫色褪去,并生成棕色沉淀,与浓硫酸反应呈红褐色,说明其结构中含有不饱和键或炔键。

2.7 活性产物的蛋白酶敏感性

蛋白酶 K、胰蛋白酶处理结果表明,在处理 30 ~ 150 min 内 A02 活性产物对番茄灰霉病菌的抑菌活性与对照相比均无显著性差异(表 4),说明

该抗菌物质对这 2 种蛋白酶不敏感,判断其不属于蛋白类物质。

3 结论和讨论

微生物产生的天然活性产物与人类的生活和健康关系密切,对其研究和开发历史悠久,迄今已发现逾万种微生物源活性产物^[10],在微生物药物的后续筛选中,已知化合物出现的几率远远大于新化合物,因此进行活性产物的早期快速鉴别,及时排除已知化合物以缩小筛选范围,对于提高新药获得几率十分重要。而活性产物的分离和鉴别特性是其早期鉴别的重要依据,也为其后续的分离纯化提供重要的指导信息。本研究结果表明,利迪链霉菌 A02 代谢活性产物在溶液中呈电中性,但其极性较强,这为在分离过程中 pH 值的控制及其适宜溶剂种类的选择提供了重要的依据,并通过不同极性溶剂系统的对比试验,筛选出了活性组分易于分离的有机溶剂组合,为确定后续的柱色谱条件奠定了基础;紫外光谱扫描显示其在波长 303 nm 处有最大吸收峰,可确定其为该活性产物定量检测的最适波长;蛋白酶敏感性试验和官能团化学反应排除了该活性产物为蛋白类物质的可能,并显示其含有不饱和烯键或炔键,结合捷克八溶剂系统纸层析图谱和紫外扫描光谱,判定其为四烯大环内酯类抗生素,分子结构中具有糖苷键、氨基、醛基,但不含还原糖和酚基,这为该菌株活性产物的新颖性分析及其最终鉴定和结构解析提供了重要的技术参数。

利迪链霉菌能够产生多种抗菌活性物质,而前人的研究多集中于医用抗生素,目前已报道的有广谱抗菌素和分枝杆菌的利迪霉素 (Lydimycin)、抗革兰氏阳性细菌和分枝杆菌的利迪链菌素 (Streptolydigin)^[11]、抗大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和肺炎克氏杆菌 (*Klebsiella pneumonia*) 等革兰氏阴性细菌的苹果酸氧霉素 (Malioxamycin)^[12]、抗金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 等革兰氏阳性细菌的抗生素 Lydicamycin^[13] 和抗厌氧菌的多肽类抗生素 Chandramycin^[14];利迪链霉菌用于植物病害生物防治的研究报道较少,目前已成功开发应用的利迪链霉菌主要是国外所开发的 WYEC108 生防菌株,它主要是靠分泌的几丁质酶 (Chitinase) 来破坏真菌细胞壁从而发挥抑制病原真菌的作用的^[15,16];上述文献中的抗菌活性产物均不具有多烯大环内酯的化学结构。本研究判定利迪链霉菌 A02 的代谢活性产物为四烯大环内酯类;根据笔者前期的研究结果,其对多种植物病原真菌均有强烈的抑制作用,但对供试的黄瓜细菌性角斑病菌 (*Pseudomonas syringae* pv.

Lachrymans)、辣椒疮痂病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*)、根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 和枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 等细菌无抑菌活性^[3],其抑菌谱明显不同于上述已知活性产物。据此认为菌株 A02 抗真菌代谢物质的研究是对利迪链霉菌产生天然活性产物的新发现,对其进一步的深入研究有望鉴定出新的抗菌化合物,并开发出植物病害生防微生物制剂新产品或新品种。

参考文献:

- [1] 邱德文. 我国生物农药现状分析与发展趋势 [J]. 植物保护, 2007, 33(5): 27-32.
- [2] 亢秀芳, 胡青平. 植物病害拮抗微生物的研究现状 [J]. 农业与技术, 2009, 29(1): 58-61.
- [3] 刘伟成, 裘季燕, 刘建华, 等. 一株利迪链霉菌及其在植物病害生物防治中的应用 [P]. 中国发明专利, ZL200610065620.9, 2009.
- [4] 潘争艳, 刘伟成, 裘季燕, 等. 放线菌 III-61 和 A-21 对蔬菜枯萎病和灰霉病的控制作用 [J]. 华北农学报, 2005, 20(4): 92-97.
- [5] 周德庆. 微生物学实验手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 194-351.
- [6] 鲁素芸. 植物病害生物防治学 [M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1993: 249.
- [7] Lu C G, Liu W C, Qiu J Y et al. Identification of an antifungal metabolite produced by a potential biocontrol actinomycetes strain A01 [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2008, 39: 701-707.
- [8] 文才艺. 农用抗生素 TS99 的分离纯化工艺 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2004.
- [9] 于婷, 尚玉珂, 李艳芳, 等. 短小芽孢杆菌 BSH-4 抗菌物质的提取及其特性 [J]. 植物保护学报, 2009, 36(1): 65-69.
- [10] 张致平. 微生物药物学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 179-181.
- [11] 张致平, 姚天爵. 抗生素与微生物产生的生物活性物质 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 302-418.
- [12] Takeuchi M, Inukai M, Enokita R, et al. Malioxamycin, a new antibiotic with spheroplast-forming activity. I. Producing organism, fermentation, isolation and characterization [J]. J Antibiot, 1980, 33(11): 1213-1219.
- [13] Hayakawa Y, Kanamaru N, Shimazu A, et al. Lydicamycin, a new antibiotic of a novel skeletal type I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activity [J]. J Antibiot, 1991, 44(3): 282-287.
- [14] Singh S K, Gurusiddaiah S. Production, purification, and characterization of chandramycin, a polypeptide antibiotic from *Streptomyces lydicus* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1984, 26(3): 394-400.
- [15] Yuan W M, Crawford D L. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots [J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61(8): 3119-3128.
- [16] Mahadevan B, Crawford D L. Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108 [J]. Enzyme Microb Tech, 1997, 20(7): 489-493.