

# 放线菌 A19 菌株次生代谢产物的初步研究

申端玉<sup>a,b,c</sup>, 魏少鹏<sup>a</sup>, 姬志勤<sup>a</sup>, 吴文君<sup>a,b</sup>

(西北农林科技大学 a 农药研究所; b 理学院; c 国家生命科学与技术人才培养基地, 陕西 杨凌 712100)

**[摘要]** **【目的】**对放线菌 A19 菌株发酵液中的次生代谢产物进行初步研究,以了解其抑菌活性及其稳定性。**【方法】**采用抑制菌丝生长法、管碟法、盆栽试验等方法,测定了 A19 菌株发酵液的抑菌活性和发酵液中有效成分的热稳定性及酸碱稳定性;并以活性追踪为指导,采用大孔吸附树脂、硅胶柱层析、高效液相色谱等技术对其有效成分进行了分离。**【结果】**室内生测发现,A19 菌株发酵液对 10 种供试病原真菌均有明显的抑制作用,其中对小麦根腐病菌的抑制效果最好,抑制率达 100%;对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和 L-链球菌 3 种病原细菌也有较好的抑制作用,其中对枯草芽孢杆菌的抑制作用最强,抑菌圈直径达到 21 mm。盆栽试验表明,A19 菌株发酵液对小麦白粉病有一定的保护作用和治疗作用,防治效果分别为 54.3% 和 65.0%。A19 菌株发酵液对热稳定,对酸碱不稳定。从 A19 菌株的发酵液中分离得到 15-1,15-2 和 15-3 3 种化合物,其中 15-2 鉴定为 7-羟基-3 异丁基六氢吡咯[1,2- $\alpha$ ]吡嗪-1,4-二酮。**【结论】**放线菌 A19 菌株发酵液抗菌谱较广,具有较好的研究价值。

**[关键词]** A19 菌株;次生代谢产物;发酵产物;生物活性

**[中图分类号]** S482.2<sup>+</sup>92;S481<sup>+</sup>.9

**[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2008)01-0173-06

## Primary studies on the secondary metabolic products of strain A19 of actinomycetes

SHEN Duan-yu<sup>a,b,c</sup>, WEI Shao-peng<sup>a</sup>, JI Zhi-qin<sup>a</sup>, WU Wen-jun<sup>a,b</sup>

(a Institute of Pesticide; b College of Science; c The National Base of Life Science and Biotechnology Education,  
Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** **【Objective】** Primary studies on the secondary metabolic products of an actinomycete strain, A19 were conducted to know its fungicidal activity and stability. **【Method】** Fungicidal activity of the fermentation broth of strain A19 was studied by means of inhibition of mycelium growth rate, agar diffusion method and pot tests respectively. And its stability to temperature, acid and alkali were tested. The bioactive compounds in the fermentation broth were isolated by the methods of macroporous adsorption resin, silica gel column chromatography and high performance liquid chromatography. **【Result】** The results of *in vitro* test showed that the fermentation broth appeared obvious inhibition against ten tested pathogens, and the best inhibition was observed in the treatment of *Bipolaris sorokiniana*. It could also control effectively against three tested bacteria, in which the treatment of *Bacillus subtilis* had the best efficacy. The results of pot test indicated that the fermentation products had both protection and therapeutic efficacy on wheat powdery mildew. Compound 15-1, 15-2 and 15-3 isolated from the fermentation products, 15-2 was identified as 7-hydroxy-3-isobutylhexahydro pyrrolo[1,2- $\alpha$ ]pyrazine-1,4-dione. **【Conclusion】** The antagonistic spectrum of the fermentation broth of strain A19 was extensive and worth to study.

\* [收稿日期] 2007-01-26

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划项目(2003CB114404)

[作者简介] 申端玉(1983—),男,山东菏泽人,在读硕士,主要从事天然产物化学研究。E-mail: shendy103@163.com

[通讯作者] 姬志勤(1971—),男,山西永济人,讲师,主要从事天然产物化学研究。E-mail: jizhiqin@163.com

**Key words:** strain A19; secondary metabolic products; fermentation products; bioactivity

据联合国粮农组织统计,全世界因病虫害造成的损失约占作物总产量的 13%,其中谷物损失达 20%~40%,每年损失达上千亿美元<sup>[1-2]</sup>。上世纪随着化学工业技术的飞速发展,化学农药已广泛应用于农业生产,并有效地提高了土地的单位面积产量,既提高了经济效益,也满足了人们对粮食的需求。然而,由于化学农药的不合理使用,因之带来的负面影响也日趋严重<sup>[3]</sup>。为了保护环境,维护生态和人类健康安全的需要,开发和使用生物农药已成为农药工业发展的一个趋势,其中从微生物代谢产物中寻找生物农药是新农药开发研究的重要途径之一<sup>[4]</sup>。近 10 年来,我国研究发现的农用抗生素新品种不断增加<sup>[5]</sup>,如广东农科院植保所报道的万隆霉素、西北农林科技大学报道的瑞拉霉素和秦岭霉素<sup>[6]</sup>、浙江农科院微生物所报道的抑霉菌素、上海农药研究所报道的金核霉素和磷氮霉素、江西农业大学报道的梅岭霉素、中国医学科学院生物技术研究所以报道的波拉霉素等。A19 菌株是从陕西礼泉土壤中分离筛选得到的 1 株放线菌菌株,本研究对其杀菌谱及有效成分稳定性进行了初步研究,以期了解其研究价值和发展潜力,为新型生物农药的开发奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材 料

1.1.1 放线菌 A19 菌株 A19 是从陕西礼泉土壤中分离筛选得到 1 株放线菌菌株。

1.2.2 培养基 (1)高氏一号培养基。可溶性淀粉 20 g, NaCl 0.5 g, FeSO<sub>4</sub> 0.01 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5 g, KNO<sub>3</sub> 1 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH7.2~7.4, 121 °C 高压灭菌 30 min。(2)牛肉膏蛋白胨琼脂培养基。牛肉膏 3 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 琼脂 20 g, pH7.2~7.4, 121 °C 高压灭菌 30 min。(3)PDA 培养基。马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL, 121 °C 高压灭菌 30 min。(4)小米浸液培养基。小米 10 g, 葡萄糖 10 g, NaCl 2 g, 蛋白胨 3 g, CaCO<sub>3</sub> 2 g, pH7.2~7.4, 蒸馏水 1 000 mL, 121 °C 高压灭菌 30 min。

1.1.3 供试真菌 供试真菌有烟草赤星病菌(*Alternaria longipes*)、小麦根腐病菌(*Bipolaris sorokiniana*)、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)、番茄叶霉病菌(*Fulvia fulvum*)、苹果炭疽病

菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、马铃薯干腐病菌(*Fusarium oxysporium*)、玉米大斑病菌(*Exserohilum turcicum*)、玉米弯孢叶斑病菌(*Curvularia lunata*)、苹果灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、玉米小斑病菌(*Bipolaria maydis*)、小麦白粉病菌(*Erysiphe graminis*),均由西北农林科技大学植物病理研究室提供。

1.1.4 供试细菌 供试细菌有枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和 L-链球菌(*L-streptococcus*),均购自中国普通微生物菌种保藏管理中心。

### 1.2 A19 菌株发酵液的制备

在 250 mL 的三角瓶中装入 100 mL 小米浸液培养基,灭菌冷却后,接入 A19 菌株孢子悬浮液,接种量为 100 mL/L,摇床转速为 180~190 r/min, 28 °C 振荡培养 4 d 后过滤,收集滤液。

### 1.3 A19 菌株发酵液抑菌活性的测定

1.3.1 抑制菌丝生长速率法 取发酵液原液 1 mL 与 9 mL 融化的 PDA 培养基混匀,倒入无菌培养皿中制成带药培养基平板,以不加发酵液的 PDA 培养基为对照。接种供试菌菌饼,28 °C 恒温箱中培养 72 h 后,用十字交叉法测量供试菌菌落直径,每处理重复 3 次。按下式计算菌丝生长抑制率<sup>[7-8]</sup>:

菌丝生长抑制率/%=(对照菌落生长直径-处理菌落生长直径)/对照菌落生长直径×100%。

1.3.2 抑制孢子萌发法 取供试病原菌孢子配成孢子悬浮液,在 10×10 低倍镜下,每个视野有 30~40 个孢子。将 A19 菌株发酵液与孢子悬浮液混合,取 1 滴滴加在凹玻片上,以不加发酵液的孢子悬浮液为对照。在 25 °C 下保湿培养 6 h 后,检查对照孢子的萌发情况,每处理重复 3 次。以孢子芽管长度大于孢子短半径者为萌发,当对照的萌发率达到 85%后,检查所有处理的孢子萌发率。按下式计算孢子萌发抑制率<sup>[8]</sup>:

孢子萌发抑制率/%=(对照孢子萌发率-处理孢子萌发率)/对照孢子萌发率×100%。

1.3.3 管碟法 将培养好的供试菌与适量牛肉膏蛋白胨琼脂培养基充分混匀,倒入 9 cm 培养皿中制成带菌平板,每个平板上放 4 个牛津杯(内径 0.6 cm,外径 0.8 cm,高 1.0 cm 的不锈钢杯),每管加入 0.2 mL 发酵液,以蒸馏水为对照,置 37 °C 恒温箱中培养 24 h 后,用十字交叉法测量抑菌圈直径<sup>[8]</sup>,每

处理重复 3 次。

1.3.4 盆栽试验 (1)保护作用测定。先在盆栽小麦苗上喷施发酵液,24 h 后在植株上接种小麦白粉病菌。每处理重复 4 次,每重复 1 盆。以未喷施发酵液的盆栽小麦苗为对照。1 周后按小麦白粉病分级标准<sup>[9]</sup>进行病情调查。(2)治疗作用测定。先在保湿条件下接种供试小麦白粉病菌,24 h 后在小麦苗上喷施发酵液。每处理重复 4 次,每重复 1 盆。1 周后按小麦白粉病分级标准<sup>[9]</sup>进行病情调查,并按下式计算病情指数和防治效果<sup>[10-11]</sup>：

$$\text{病情指数} = \frac{\sum(\text{病级叶数} \times \text{代表级数})}{\text{叶数总数} \times \text{最高代表级值}} \times 100;$$

$$\text{防治效果}/\% = \frac{\text{对照组病情指数} - \text{处理组病情指数}}{\text{对照组病情指数}} \times 100\%。$$

#### 1.4 A19 菌株发酵液有效成分稳定性的测定

1.4.1 热稳定性的测定 将菌株发酵液在 60, 80 ℃下分别处理 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0 和 8.0 h, 待自然冷却后, 以原发酵液为对照, 管碟法测定各处理枯草芽孢杆菌抑菌圈直径的变化<sup>[12]</sup>, 每处理重复 3 次。

1.4.2 酸碱稳定性的测定 用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 将菌株发酵液 pH 值分别调节为 1, 3, 5, 9, 11 和 13, 于室温下分别放置 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 h 后取样, 以原发酵液为对照, 测定其对枯草芽孢杆菌抑菌活性的变化(测前调节 pH 值使之与原发酵液相同)<sup>[12]</sup>。每处理重复 3 次。

#### 1.5 A19 菌株发酵液有效成分的分离鉴定

1.5.1 发酵液中有有效成分的初步定性 参考周德庆<sup>[13]</sup>的方法。采用 Doskochilova 溶剂系统, 其中 I. 用水饱和的正丁醇; II. 用水饱和的正丁醇, 内含 2% 对甲基苯磺酸; III. V(正丁醇) : V(醋酸) : V(水) = 2 : 1 : 1; IV. 用水饱和的正丁醇, 内含 2% 六氢吡啶; V. 0.5 mol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液, 用正丁醇饱和; VI. 用正丁醇饱和的水, 内含 2% 对甲基苯磺酸; VII. V(苯) : V(甲醇) = 4 : 1, 滤纸经 0.5 mol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液处理; VIII. V(甲醇) : V(水) = 75 : 25, 水中含 NaCl 3%, 滤纸用 5% 硫酸钠处理。取样品 2 μL 点 to 新华滤纸条(0.5 cm × 20 cm)下端 5 cm 处, 在密闭的大试管中(1.5 cm × 18 cm)上行展开, 溶剂为 5 mL, 滤纸使用前先用展开剂饱和 30 min。溶剂扩展到 15 cm 处停止层析。采用生物显影法, 将培养好的枯草芽孢杆菌与适量牛肉膏蛋白胨琼脂培养基充分混匀后, 倒入平板中铺平冷却, 然后将晾干的层析纸条贴于平板上, 在 37 ℃

恒温箱中培养 12 h(之前放入 4 ℃冰箱 1 h)后, 检查结果并测定 *R<sub>f</sub>* 值。

1.5.2 发酵液中有有效成分的分离纯化及其结构鉴定 (1)用处理好的大孔吸附树脂(HPD600)静态吸附 2 d, 然后上柱, 纯甲醇洗脱(4 L), 旋转蒸发仪蒸干, 得到浸膏(40 g)。(2)浸膏用甲醇溶解后, 用 100~200 目硅胶(硅胶均为青岛海洋化工有限公司生产)拌样, 200~300 目硅胶以氯仿为溶剂湿法装柱。以氯仿甲醇溶液(V(氯仿) : V(甲醇)为 10 : 0, 9 : 1, 8 : 2, 7 : 3, 6 : 4, 5 : 5, 0 : 10)为洗脱剂洗脱, 每个比例的冲洗体积为 400 mL, 每份接 50 mL, 总共接得 56 份。用薄层硅胶板将含相同成分的组分合并浓缩, 以枯草芽孢杆菌为供试菌, 滤纸片法(5 mm 圆形滤纸, 点样 5 μL, 吹干后贴于带菌皿上)测定各组分活性。(3)对其中活性最好的 15 号组分用反相制备柱(Hypersil ODS2, 5 μm, 10 mm × 250 mm)进行切割分离。流动相为 V(甲醇) : V(水) = 2 : 8, 检测波长为 230 nm, 流速为 3 mL/min, 结果得到 3 种化合物, 分别记为 15-1, 15-2 和 15-3, 其中 15-3 的量极少。采用核磁共振谱、质谱并结合相关文献对 15-1 和 15-2 进行鉴定。

1.5.3 化合物抑菌活性测定 将 15-1 和 15-2 配成 1 000 μg/mL 的水溶液, 以水为对照, 采用管碟法测定其对枯草芽孢杆菌的抑菌效果。以玉米大斑病菌、小麦根腐病菌、烟草赤星病菌为供试病原菌, 测定其对孢子萌发的抑制作用。

## 2 结果与分析

### 2.1 A19 菌株发酵液的抑菌作用

2.1.1 抑制菌丝生长的作用 从表 1 可以看出, A19 菌株发酵液对小麦根腐病菌的抑制效果最好, 菌丝生长抑制率达到 100%; 对苹果灰霉病菌、玉米小斑病菌、玉米大斑病菌的菌丝生长抑制率在 80% 以上; 对烟草赤星病菌、小麦赤霉病菌、马铃薯干腐病菌、苹果炭疽病菌的菌丝生长抑制率在 70% 以上; 对番茄叶霉病菌、玉米弯孢叶斑病菌的菌丝生长抑制率在 60% 左右。由此可以看出, A19 菌株抗菌谱较广, 抗菌效果较好。

2.1.2 抑制孢子萌发的作用 从表 2 可以看出, A19 菌株发酵液对真菌病害的孢子萌发有较好的抑制作用, 对玉米大斑病菌、小麦根腐病菌、烟草赤星病菌孢子萌发的抑制率分别为 66.5%, 73.7% 和 70.2%。

表 1 A19 菌株发酵液对供试真菌菌丝生长的抑制作用  
Table 1 Tests of fermentation broth A19 against fungi

| 供试病原菌<br>Tested pathogens                    | 菌落直径/mm<br>Colony diameter |              | 抑制率/%<br>Inhibition rate |
|----------------------------------------------|----------------------------|--------------|--------------------------|
|                                              | 对照 CK                      | 处理 Treatment |                          |
| 烟草赤星病菌 <i>Alternaria longipes</i>            | 47.0                       | 16.0         | 73.8                     |
| 小麦赤霉病菌 <i>Fusarium graminearum</i>           | 50.0                       | 16.5         | 74.4                     |
| 小麦根腐病菌 <i>Bipolarissorokiniana</i>           | 28.0                       | 5.0          | 100                      |
| 番茄叶霉病菌 <i>Fulvia fulvum</i>                  | 38.5                       | 16.5         | 65.7                     |
| 玉米弯孢叶斑病菌 <i>Curvularia lunata</i>            | 43.0                       | 21.0         | 57.9                     |
| 马铃薯干腐病菌 <i>Fusarium oxysporium</i>           | 36.0                       | 14.0         | 71.0                     |
| 苹果炭疽病菌 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> | 34.0                       | 13.0         | 72.4                     |
| 苹果灰霉病菌 <i>Botrytis cinerea</i>               | 37.5                       | 9.0          | 87.7                     |
| 玉米小斑病菌 <i>Bipolaria maydis</i>               | 35.0                       | 10.0         | 83.3                     |
| 玉米大斑病菌 <i>Exserlhilum turcicum</i>           | 47.0                       | 13.0         | 81.0                     |

注:表中数据为 3 次重复的平均值。  
Note:All values are means of three replicates.

表 2 A19 菌株发酵液对供试真菌孢子萌发的抑制作用  
Table 2 Inhibition activity of fermentation broth of A19 against spore germination of fungi

| 供试病原菌<br>Tested pathogens          | 萌发率/%<br>Germination rate |              | 抑制率/%<br>Inhibition rate |
|------------------------------------|---------------------------|--------------|--------------------------|
|                                    | 对照 CK                     | 处理 Treatment |                          |
| 玉米大斑病菌 <i>Exserohilum turcicum</i> | 91.2                      | 30.5         | 66.5                     |
| 小麦根腐病菌 <i>Bipolaris orokiniana</i> | 87.7                      | 23.1         | 73.7                     |
| 烟草赤星病菌 <i>Alternaria longipes</i>  | 89.2                      | 26.6         | 70.2                     |

2.1.3 抑制细菌生长的作用 从表 3 可以看出, A19 菌株发酵液对枯草芽孢杆菌的抑菌圈直径为 21.0 mm,且抑菌圈透明,对 *L*-链球菌及金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径分别为 20.0 和 17.0 mm,且抑菌

圈清晰,表明发酵液对供试细菌有明显的抑制作用。  
2.1.4 对小麦白粉病的作用 从盆栽试验结果(表 4)可以看出,A19 菌株发酵液对小麦白粉病有一定的保护和治疗作用,防治效果分别为 54.3%和 65.0%。

表 3 A19 菌株发酵液对供试细菌的抑制作用  
Table 3 Tests of fermentation broth of A19 against bacteria

| 供试病原菌<br>Tested pathogens            | 抑菌圈直径/mm<br>Diameter of inhibition zone | 供试病原菌<br>Tested pathogens            | 抑菌圈直径/mm<br>Diameter of inhibition zone |
|--------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------|
| 枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>      | 21.0(+++)                               | <i>L</i> -链球菌 <i>L-Streptococcus</i> | 20.0(++)                                |
| 金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i> | 17.0(++)                                |                                      |                                         |

注:数据为 3 次重复的平均值,“+”表示抑菌圈可见,“++”表示抑菌圈清晰,“+++”表示抑菌圈透明。  
Note:All values are means of three replicates.“+”means eyeable,“++”means clear,“+++” means diaphanous.

表 4 A19 菌株发酵液对小麦白粉病的保护和治疗作用  
Table 4 Protection and therapeutic effect of fermentation broth of strain A19 on wheat powdery mildew

| 处理方式<br>Processing mode | 病情指数 Disease index |              | 防治效果/%<br>Control effect |
|-------------------------|--------------------|--------------|--------------------------|
|                         | 对照 CK              | 处理 Treatment |                          |
| 保护 Protection           | 77.2               | 35.3         | 54.3                     |
| 治疗 Therapy              | 71.9               | 25.2         | 65.0                     |

2.2 A19 菌株发酵液有效成分的稳定性  
2.2.1 热稳定性 从图 1 可以看出,在 60℃下加热 8 h,A19 菌株发酵液的抑菌效果无明显变化,即使在 80 ℃下加热 2 h,其对枯草芽孢杆菌的抑制效果仍无明显变化,加热 2 h 以上时抑菌圈直径仅减小 2.4%,说明 A19 菌株发酵液中的有效成分具有良好的热稳定性。  
2.2.2 酸碱稳定性 由图 2 可以看出,在 pH 值为 5 时,发酵液抑菌效果在 4 h 内无明显变化。随酸性

的增强,抑菌圈直径减小幅度较大,当 pH 值为 1 时,放置 8 h 后抑菌圈直径减小了 42.8%。当 pH 值为 9 时,放置 0.5 h 后抑菌圈直径即减小了 14.3%;随着碱性的进一步增强,抑菌圈直径显著减小,当 pH 值为 13 时,放置 8 h 后抑菌圈直径减小了 50%。这说明 A19 菌株发酵液有效成分的酸碱稳定性较差,在 pH 值为 5~7 时(发酵液 pH 值约为 7)其抑菌作用较为稳定。

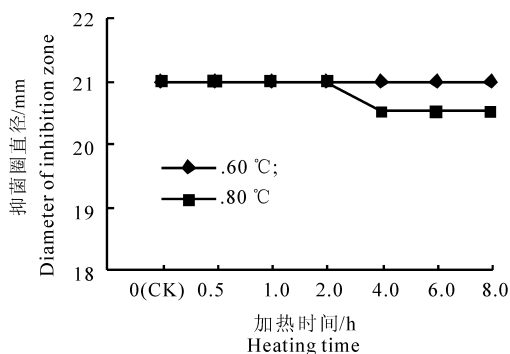


图 1 不同温度下加热 0~8 h 时 A19 菌株发酵液对枯草芽孢杆菌的抑制作用

Fig. 1 Inhibition effect of fermentation broth of A19 strain at different temperature against *Bacillus subtilis*

### 2.3 A19 菌株发酵液中有效成分的鉴定

2.3.1 发酵液中有有效成分的 Doskochilova 溶剂系统鉴定 由图 3 可以看出,A19 菌株发酵液中的有效成分在溶剂 I、II、III、IV、VII、VIII 中 *Rf* 值较大,在溶剂 V、VI 中几乎不移动,*Rf* 值为 0,参照经典的各类抗生素纸色谱图<sup>[14]</sup>可以初步判断,A19 菌株发酵液中的主要有效成分为金色抗霉素类抗生素。

2.3.2 化合物 15-1、15-2 的结构鉴定 A19 菌株发酵液经柱层析及反相制备色谱纯化,可得到 15-1、15-2 和 15-3 3 种化合物,其中 15-3 的量极少。采用质谱及核磁共振技术对化合物 15-2 的结构进行鉴定,结果表明,化合物 15-2 为无色结晶,m. p. 178~179 °C.  $[\alpha]_D^{28} = -148.2^\circ (c=1, H_2O)$ 。ESI-MS:

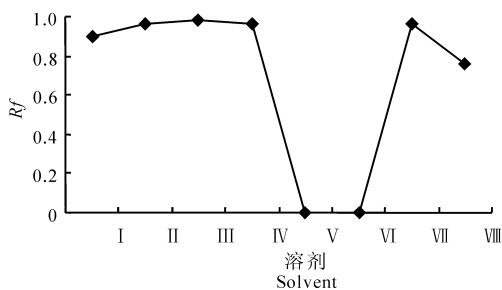


图 3 A19 菌株发酵液在 Doskochilova 溶剂系统中的 *Rf* 曲线

Fig. 3 *Rf* picture of the fermentation broths of A19 in Doskochilova system

初步鉴定认为化合物 15-1 为环二肽类化合物,其具体结构尚需进一步确证。

2.3.3 化合物抑菌效果的分析 对化合物 15-1 和 15-2 抑菌活性的分析表明,化合物 15-2 对枯草芽孢杆菌有一定的抑菌活性,抑菌圈直径为 6 mm(抑菌圈可见);其对玉米大斑病菌、小麦根腐病菌、烟草赤星病菌孢子萌发的抑制率分别为 57.0%,67.3%,

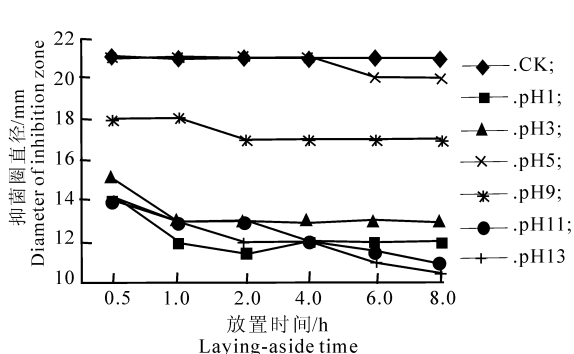


图 2 不同 pH 值下 A19 菌株发酵液对枯草芽孢杆菌的抑制作用

Fig. 2 Inhibition effect of fermentation broth of A19 strain at different pH against *Bacillus subtilis*

$m/z$  227( $[M+H]^+$ ),表明分子质量为 226。结合碳氢谱可确定其分子式为  $C_{11}H_{18}N_2O_3$ 。核磁数据为:<sup>13</sup>C NMR ( $CD_3OD$ , 75 MHz,  $\delta$ ppm): 22.20, 23.30, 25.79, 38.17, 39.40, 54.61, 55.17, 58.71, 59.12, 169.63, 173.05; <sup>1</sup>H NMR ( $CD_3OD$ , 300 MHz,  $\delta$  ppm): 0.94(6H, d,  $J=1.5$ ), 1.47~1.54(1H, m), 1.85~1.96(2H, m), 2.08(1H, ddd,  $J=4.2, 11.1, 13.5$ ), 2.23~2.31(1H, m), 3.45(1H, d,  $J=12.3$ ), 3.66(1H, d,  $J=4.5$ ), 4.16(1H, m), 4.50(2H, m)。以上数据与文献[15]报道的 7-羟基-3 异丁基六氢吡咯[1,2- $\alpha$ ]吡嗪-1,4-二酮基本一致,故初步鉴定化合物 15-2 为 7-羟基-3 异丁基六氢吡咯[1,2- $\alpha$ ]吡嗪-1,4-二酮。其结构如图 4 所示。

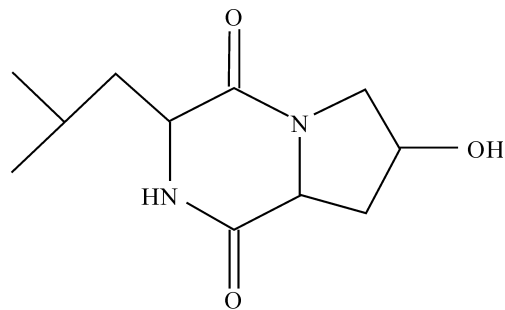


图 4 7-羟基-3 异丁基六氢吡咯[1,2- $\alpha$ ]吡嗪-1,4-二酮的结构式

Fig. 4 Structure of 7-hydroxy-3-isobutylhexahydropyrrolo[1,2- $\alpha$ ]pyrazine-1,4-dione

55.5%。化合物 15-1 对 4 种病原菌均无抑制效果。

## 3 小结与讨论

通过对 A19 菌株发酵液中有有效成分进行抗真菌与抗细菌效果测定发现,该菌株发酵液中的有效成分对多种引致植物病害的病原菌,均有较强的抑制作用,抗菌谱较广。稳定性试验表明,菌株发酵液

中的有效成分对热稳定,对酸碱不稳定。对从 A19 菌株发酵液中分离到的化合物 15-1 和 15-2 的鉴定表明,化合物 15-2 为 7-羟基-3-异丁基六氢吡咯[1, 2- $\alpha$ ]吡嗪-1,4-二酮,化合物 15-1 为环二肽类化合物,其中 15-2 具有一定的抑菌活性。

A19 菌株对多种植物病原菌均有较好的抑制效果,具有一定的研究价值。但是本研究在活体生测这一部分做得较少,而且所做试验也只限于盆栽试验,以后应注意在活体生测方面加强研究。A19 菌株发酵液中有效成分对热稳定,这为以后发酵液的预处理及分离后浓缩条件的确定提供了参考;其有效成分对酸碱不稳定,因此在选择其有效成分提取分离的条件时,一定要注意 pH 值的影响。

化合物 15-2 有一定的抑菌活性,但活性较低。Ienaga K 等<sup>[15]</sup>曾从兔子皮肤组织的提取物中分离得到该化合物,据报道其具有植物生长调节剂的作用。从国内外文献来看,目前还没有关于其抑菌活性的报道。比较化合物 15-2 与 A19 发酵液的抑菌活性可见,其并非发酵液中最主要的活性成分,发酵液中的高活性成分尚未分离得到,其原因可能是该活性成分未能从硅胶柱上解析,或活性成分被发酵液中其他物质包夹而未能洗脱。因此,分离其中的高活性成分将是下一步研究工作的重点。

## [参考文献]

- [1] 李永红. 农药的发展与人类的健康[J]. 生物学通报, 2001, 36(5): 12-14.  
Li Y H. Development of Pesticide and peoples health[J]. Bulletin of Biology, 2001, 36(5): 12-14. (in Chinese)
- [2] 赵兴秀, 何义国. 微生物农药的研究应用及前景展望[J]. 四川理工学院学报: 自然科学版, 2005, 18(1): 108-110.  
Zhao X X, He Y G. Recent development in research and the future of microbial pesticides[J]. Journal of SiChuan University of Science & Engineerin; Natural Science Edition, 2005, 18(1): 108-110. (in Chinese)
- [3] 余凤玉, 李振华, 曾会才. 抗真菌农用抗生素的研究进展[J]. 热带农业科学, 2005, 25(1): 60-65.  
Yu F Y, Li Z H, Zeng H C. Progress on the research in antifungal agricultural antibiotics[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2005, 25(1): 60-65. (in Chinese)
- [4] 文才艺, 吴元华, 田秀玲. 微生物源生物化学农药的研究与开发进展[J]. 农药, 2004, 43(10): 438-448.  
Wen C Y, Wu Y H, Tian X L. Advances in research and development of biochemical pesticides of microbial origin[J]. Chinese Journal of Pesticides, 2004, 43(10): 438-448. (in Chinese)
- [5] 朱昌雄, 陈守文, 刘放, 等. 我国发酵微生物农药的发展概况与趋势[J]. 生物加工过程. 2003, 1(1): 37-41.  
Zhu C X, Chen S W, Liu F, et al. Development trend and survey

- of ferment micro-pesticide in China[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2003, 1(1): 37-41. (in Chinese)
- [6] 龙建友. 秦岭链霉菌开发利用的前期基础研究[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2006.  
Long J Y. Basic studies in earlier stage on development of *Streptomyces qinlingensis* Sp. NOV [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A & F University, 2006. (in Chinese)
- [7] 刘晓妹, 陈秀蓉, 蒲金基. 两株芽孢杆菌无菌液抗菌谱及稳定性测定[J]. 中国生物防治, 2003, 19(3): 141-143.  
Liu X M, Chen X R, Pu J J. Tests of antagonistic spectrum and stability of cell-free filtrates of bacillus B1 and B2[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2003, 19(3): 141-143. (in Chinese)
- [8] 龙建友, 姬志勤, 师宝君, 等. 一株抗生素产生菌 No. 24 菌株发酵液抗菌谱及稳定性测定研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2004, 32(11): 61-64.  
Long J Y, Ji Z Q, Shi B J, et al. Studies of antagonistic spectrum and stability of fermentation of No. 24 strain producing one antibiotic[J]. Journal of Northwest A & F University: Natural Science Edition, 2004, 32(11): 61-64. (in Chinese)
- [9] 农业部农药检定所生测室. 农药田间药效试验准则(一)[S]. 北京: 中国标准出版社, 1993.  
Department of Agriculture Pesticides Test Bioassay Room. Field Trials of pesticide guidelines (I) [S]. Beijing: Standards Press of China, 1993. (in Chinese)
- [10] 慕立义, 吴文君, 王开运. 植物化学保护研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1994: 102-105.  
Mu L Y, Wu W J, Wang K Y. Plants chemical protection research methods[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1994: 102-105. (in Chinese)
- [11] 陈年春. 农药生物测定技术[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1991: 43-44.  
Chen N C. Pesticide bioassay technology[M]. Beijing: Beijing Agricultrual University Press, 1991: 43-44. (in Chinese)
- [12] 郭正彦. 放线菌 M10 菌株鉴定及发酵液中抑菌成分初步分离的研究[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2006.  
Guo Z Y. Primary studies on identification of actinomycete M10 and separation of antimicrobial ingredients from the fermentation broth[D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A & F University, 2006. (in Chinese)
- [13] 周德庆. 微生物实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1997: 339-345.  
Zhou D Q. Microbe experiment manual[M]. Shanghai: Shanghai Technology Press, 1997: 339-345. (in Chinese)
- [14] 张致平. 微生物药理学[M]. 北京: 北京化学工业出版社, 2003: 226-229.  
Zhang Z P. Microbe Medication[M]. Beijing: Beijing Chemistry Industry Press, 2003: 226-229. (in Chinese)
- [15] Ienaga K, Nakamura K, Goto T. Bioactive compounds produced in animal tissues II. Two diketopiperidine plant growth regulators isolated from inflamed rabbit skin tissue[J]. Tetrahedron Letters, 1987, 28(12): 1285-1286.