

研究报告

海洋抑菌放线菌 Y15 的筛选、鉴定及其代谢产物理化性质

张孟 王艳婷 汪立平* 鄢若鸣 常帅帅

(上海海洋大学食品学院 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心

上海海洋大学食品热加工工程技术研究中心 上海 201306)

摘要:【目的】筛选产广谱、高效抑菌活性物质的海洋放线菌,为新型抗生素的开发奠定基础。【方法】采用琼脂块法初筛,打孔扩散法复筛,以金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌、枯草芽孢杆菌和单核细胞增生李斯特菌为指示菌从海泥样品中筛选目标菌株;利用 20 种指示菌株考查 Y10、Y11、Y15、Y16 和 Y21 的抑菌谱;通过形态观察和 16S rRNA 基因序列分析确定菌株分类地位;以单核细胞增生李斯特菌的 OD_{600} 值为指标探讨 Y15 抑菌活性物质对该菌的作用方式;以抑菌活性为指标研究 Y15 抑菌活性物质的理化性质。【结果】共分离 12 株具抑菌活性的海洋放线菌,其中 Y15 抑菌谱最广,对 20 种指示菌株中的 18 种具有抑菌活性,并且在 4 种培养基中均能产生抑菌活性物质。16S rRNA 基因序列分析表明 Y15 属于小单孢菌属,并与 *Micromonospora endolithica* 亲缘关系最近。Y15 抑菌活性物质在 144 h 达到最高值为 480 AU/mL,在 168–216 h 保持平衡为 320 AU/mL。Y15 抑菌活性物质对单核细胞李斯特菌作用方式为杀菌。Y15 抑菌活性物质在 -20–60 °C 抑菌活性保持稳定,在 80–120 °C 活性逐渐下降,但在 120 °C 处理 30 min 仍保留 37.5% 的活性;在 pH 7.0–10.0 抑菌活性稳定,在 pH 2.0–6.0 和 pH 11.0–12.0 抑菌活性均有所损失;Y15 抑菌活性物质对紫外和 4 种酶(蛋白酶 K、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶和 α -淀粉酶)处理均保持稳定,表明活性物质为非蛋白和非多肽类的抑菌物质。【结论】Y15 产生的活性物质具有良好的抑菌谱和抑菌活性,且较为稳定,具有较高的应用价值。

关键词: 海洋抑菌放线菌, 代谢产物, 理化性质, 抑菌谱, 小单孢菌属

Foundation item: Shanghai Engineering Center Construction of Science and Technology Committee (No. 11DZ2280300)

*Corresponding author: E-mail: lpwang@shou.edu.cn

Received: March 06, 2016; **Accepted:** June 08, 2016; **Published online** (www.cnki.net): June 21, 2016

基金项目: 上海市科学技术委员会工程中心建设项目(No. 11DZ2280300)

*通讯作者: E-mail: lpwang@shou.edu.cn

收稿日期: 2016-03-06; 接受日期: 2016-06-08; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-06-21

Screening, identification and characterization of marine antimicrobial actinomycetes Y15

ZHANG Meng WANG Yan-Ting WANG Li-Ping* WU Ruo-Ming CHANG Shuai-Shuai

(College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Product Processing & Preservation, Engineering Research Center of Food Thermal-processing Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: [Objective] This paper aims at screening marine actinomycetes with broad-spectrum and producing efficient antimicrobial active substance, to lay the foundation for the development of new antibiotics. [Methods] Using *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Listeria monocytogenes* as indicator bacteria, target bacteria from sea mud samples was primarily screened with agar block method, and further screened with punching diffusion method; twenty indicator bacteria were used to examine the antimicrobial spectrum of the new isolates Y10, Y11, Y15, Y16 and Y21; taxonomic status of the strain Y15 was determined by morphologic observation and 16S rRNA gene sequence analysis; mode of action of antimicrobial active substance to *Listeria monocytogenes* was studied according to indicator bacteria OD_{600} value; the antimicrobial activity was used as an index to study the physical and chemical properties of antimicrobial active substances produced by Y15. [Results] A total of 12 strains showing antimicrobial activities to antagonistic strains were isolated; wherein Y15 had the widest spectrum, and could be against 18 of the 20 kinds of indicator strains, and on four media it could produce antimicrobial active substances. The 16S rRNA gene sequence analysis showed that Y15 had closest relationship with *Micromonospora endolithica*. Activity of Y15 antimicrobial metabolites reached a maximum of 480 AU/mL in 144 h, maintained 320 AU/mL from 168 h to 216 h. The action mode of Y15 antimicrobial active substance to *Listeria monocytogenes* was sterilization. Antimicrobial activity of Y15 antimicrobial active substances remained stable from -20°C to 60°C , and gradually declined from 80°C to 120°C , but still retained 37.5% at 120°C for 30 min; antimicrobial activity remained stable from pH 7.0 to 10.0, and from pH 2.0 to 6.0 and pH 11.0 to 12.0 antimicrobial activity declined; Y15 antimicrobial substances processed in the UV and four kinds of enzymes (Proteinase K, Trypsin, Papain and α -Amylase) were stable, there were non-protein and non-peptide antimicrobial substances. [Conclusion] The active substances produced by Y15 showed good antimicrobial spectrum and activity, and were relatively stable, indicating a high application value in the future.

Keywords: Marine antimicrobial actinomycetes, Metabolites, Physicochemical properties, Antimicrobial spectrum, *Micromonospora*

随着抗生素的大量使用,病原菌耐药性逐渐增强,现有抗生素越来越不足以应对这种局面,因此迫切需要新型抗生素的快速和持续开发,以适应病原菌对抗生素敏感性改变的速度成为当前医药界的迫切需要^[1-3]。目前,已发现的抗生素约2/3来自于放线菌,其中约50%是由链霉菌属产生,而商业抗生素约75%是由链霉菌属代谢产物制得^[4-6]。近年来由于陆生放线菌产生的生物活性物质被重复发现和开发的几率上升,开发新型药

物的几率下降,促使人们将目光转向海洋环境^[7]。

众所周知,地球表面71%是由海洋覆盖,海洋资源丰富、物种繁多,更是微生物资源的宝库。由于海洋环境具有高盐、高压、低氧、低光照等特殊特性,因此这种环境中海洋微生物的种类约为陆地环境微生物的20多倍^[8-9]。有研究表明,约27%的海洋微生物能产生抑菌活性物质,且这些活性物质结构新颖、功能独特,具有优良的开发新型药物的潜力,尤其是海洋放线菌^[10]。自第一个

海洋专性放线菌盐孢菌属(*Salinospora*)被发现,使得海洋放线菌资源成为研究热点,很多学者在海洋中发现的新属放线菌绝大多数都可以产生抑菌活性物质^[11-12]。海洋放线菌产生的抑菌活性物质包括多烯类、聚酮类、核苷类、萜类、聚酯类、氨基糖苷类、萜环类、多肽类和糖肽类等,其功能涉及抗菌、抗肿瘤、抗疟、抗炎、杀虫、抗氧化、清除自由基等^[13-14]。近年来,海洋放线菌产新型抑菌活性物质不断被报道。Kock 等^[15]从海洋链霉菌属代谢产物中分离得到的新型活性物质多酚萜酮类和拒黄菌素甲基醚类具有良好的抗菌、抗癌和抗氧化作用,具有很高的应用价值。Fiedler 等^[16]从海洋放线菌新种 *Verrucosipora* 的代谢产物中分离得到新型氨基呋喃类抗生素,该物质具有良好的抗菌和抗癌能力,具有较高的应用前景。Asolkar 等^[17]从海洋盐孢菌属 *Salinispora arenicola* 代谢产物中分离得到一种可以抗菌和抗肿瘤的新型活性物质 Arenimycin。Song 等^[18]从深海链霉菌 *Streptomyces niveus* SCSIO 产生的代谢产物中分离得到一种新型萜聚酮类化合物 Marfuraquinocins A-D,该化合物对 MRSE 和肿瘤细胞具有显著的拮抗作用。目前已有超过 3 万种的海洋抑菌活性物质被发现,但未被发现的海洋抑菌活性物质远远超过这个数量^[19]。海洋放线菌作为产新型抑菌活性物质的潜在来源,对海洋抑菌放线菌进行筛选具有重要意义。随着陆栖新微生物资源的衰竭和海洋环境微生物分离技术的进步,未来海洋将成为新型药物开发的重要资源宝库^[20]。

本文从上海东海临港海域海泥样品中筛选具有抑菌活性的放线菌株,并对菌株进行鉴定,研究菌株代谢产物的抑菌谱及理化性质,为丰富我国抗生素资源奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 样品: 采自上海东海临港海域的海泥样品(30°52'9.5"N, 121°56'30.4"E)。

1.1.2 主要试剂: 重铬酸钾、萘啶酮酸、蛋白酶 K

(Proteinase K)、胰蛋白酶(Trypsin)、木瓜蛋白酶(Papain)、 α -淀粉酶(α -Amylase)等,国药集团化学试剂有限公司;细菌基因组提取试剂盒,通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')等,上海生工生物工程有限公司。

1.1.3 培养基: 分离和纯化培养基: 高氏一号(陈海水配制)^[1]。种子培养基: 高氏一号液体培养基(陈海水配制)^[1]。发酵培养基 F1: 高氏一号液体培养基(陈海水配制)^[1]; 发酵培养基 F2 (陈海水配制, g/L): 黄豆粉 20.00, 酵母粉 2.00, 可溶性淀粉 5.00, 硫酸镁 0.50, 磷酸氢二钾 0.50, 葡萄糖 20.00, pH 7.2; 发酵培养基 F3 (陈海水配制, g/L): 蔗糖 45.00, 黄豆粉 25.00, 磷酸氢二钾 0.20, 氯化钠 1.00, 硫酸钠 0.10, 七水硫酸亚铁 0.01, 碳酸钙 3.00, pH 7.2; 发酵培养基 F4 (陈海水配制, g/L): 可溶性淀粉 20.00, 黄豆粉 15.00, 葡萄糖 5.00, 酵母粉 2.50, 碳酸钙 1.00, pH 7.2。指示菌培养基 LB (g/L): 胰蛋白胨 10.00, 酵母粉 5.00, 氯化钠 10.00, 琼脂粉 10.00; 指示菌培养基 TSB-YE (g/L): 胰蛋白胨 17.00, 大豆蛋白胨 3.00, 酵母粉 6.00, 氯化钠 5.00, 磷酸氢二钾 2.50, 葡萄糖 2.50, 琼脂粉 10.00, pH 7.3; 指示菌培养基 MRS (g/L): 蛋白胨 10.00, 牛肉膏 10.00, 酵母粉 5.00, 柠檬酸氢二铵 2.00, 葡萄糖 20.00, 吐温(80) 1.00, 乙酸钠 5.00, 磷酸氢二钾 2.00, 硫酸镁 0.58, 硫酸锰 0.25, 琼脂 10.00, pH 6.5。

1.1.4 主要仪器: 紫外可见分光光度计, 上海尤尼柯有限公司; 冷冻离心机, 湖南湘仪离心机仪器有限公司; 立式压力蒸汽灭菌锅, 上海申安医疗器械厂; PCR 仪, 杭州朗基科学仪器有限公司; 水平电泳仪, 北京六一仪器厂; 凝胶成像仪, 美国 UVP 公司。

1.2 海洋抑菌放线菌筛选

1.2.1 海洋放线菌分离: 取 25 g 海泥加入 225 mL 林格氏液(0.90% NaCl, 0.04% CaCl₂, 0.04% KCl)中^[21], 无菌均质 5 min (10 次/s), 55 °C 水浴

6 min^[22], 梯度稀释至 10^{-5} , 各梯度取 100 μ L 涂布于分离培养基(倒平板前均加入通过 0.22 μ m 膜过滤除菌的终浓度为 50 mg/L 的重铬酸钾和 25 mg/L 的萘啶酮酸溶液^[23-25]), 28 °C 培养 7 d。待平板长出菌落, 挑取具有放线菌典型形态的菌落至纯化培养基, 纯化 3 次。

1.2.2 海洋抑菌放线菌初筛: 以金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)为指示菌(菌浓度均为 10^8 CFU/mL), 采用琼脂块法初筛, 参照顾忠旗^[26]和高鹏等^[27]的方法加以改进(用无菌打孔器打下直径为 7 mm 的含单菌落的供试菌琼脂块, 分别将琼脂块菌面朝下和菌面朝上放置于含指示菌的培养基上), 37 °C 培养 12 h, 对具有透明圈的菌进行下一步复筛。

1.2.3 海洋抑菌放线菌的复筛: 初筛具有抑菌活性的菌株均接种至种子液培养基, 28 °C、180 r/min 培养 72 h, 以 5%接种量接种至 100 mL 的 4 种发酵培养基中, 28 °C、180 r/min 发酵 7 d。取 10 mL 发酵液 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min, 取上清液经 0.22 μ m 滤膜过滤除菌, 得到无细胞发酵液。以金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌、枯草芽孢杆菌、单核细胞增生李斯特菌为指示菌(菌浓度均为 10^8 CFU/mL), 通过打孔扩散法(孔直径 7.00 mm, 无细胞发酵液注入量 50 μ L)进行复筛, 参照原居林^[28]的方法加以改进(取 50 μ L 指示菌菌悬液于无菌培养皿中, 再倒入灭菌的指示菌培养基与指示菌菌悬液混匀, 制成指示菌平板)。37 °C 培养 12 h, 十字交叉法测定抑菌圈大小。选择抑菌活性好的菌进行下一步抑菌谱实验。

1.3 抑菌谱实验

通过 1.2.3 方法制备 Y10、Y11、Y15、Y16 和 Y21 无细胞发酵液(发酵培养基分别为 F2、F2、F1、F1 和 F1), 利用 20 种指示菌菌株结合打孔扩散法测定抑菌圈大小, 选择抑菌谱最优的菌株进行下一步实验。

1.4 菌种鉴定

根据菌落形态进行初步鉴定, 再通过 16S rRNA 基因进一步鉴定^[29], 对测定的序列结果在 NCBI 网站上进行 BLAST 多序列比对, 并登录 EZBioCloud 网站寻找同源性近的菌株利用 MEGA 5.0 软件构建系统发育树。

1.5 Y15 抑菌活性物质产生、细胞干重和发酵液 pH 与时间的关系

将 Y15 种子液以 5%接种量接种于 200 mL 发酵培养基 F1, 28 °C、180 r/min 培养 48 h 后, 取发酵液 10 mL, 测定无细胞发酵液抑菌活性、pH 以及菌体干重(质量体积比), 此后每隔 24 h 测定上述指标一次, 连续测定至 288 h^[3,30]。抑菌活性(AU/mL)是通过二倍稀释法和打孔扩散法结合测定, 即将无细胞发酵液连续二倍稀释至 2^{-n} 倍, 以单核细胞增生李斯特菌为指示菌, 通过打孔扩散法判断有无明显抑菌圈, 取直至刚好无抑菌圈出现的前一个稀释倍数的倒数除以每孔无细胞发酵液注入量即为抑菌活性(AU/mL)^[31-32]。

1.6 Y15 抑菌活性物质对指示菌作用方式

接种单核细胞增生李斯特菌于 TSB-YE 培养基中, 分别培养 3 h (OD_{600} 为 0.021)和 7 h (OD_{600} 为 0.435)时, 以每百毫升指示菌液加入 20 mL 活性为 320 AU/mL 的 Y15 无细胞发酵液, 以加入等量的未发酵的空白培养基 F1 为对照, 每隔 1 h 测定 OD_{600} 值, 连续测定至 14 h^[33-34]。

1.7 Y15 抑菌活性物质理化性质研究

1.7.1 温度稳定性: 将抑菌活性为 320 AU/mL 的 Y15 无细胞发酵液分别置于 -20、0、20、40、60、80、100 °C 中处理 1 h 和 2 h, 120 °C 组处理 0.5、1 和 2 h, 之后测定抑菌活性^[35-36]。

1.7.2 pH 稳定性: 将抑菌活性为 320 AU/mL 的无细胞发酵液分别调节 pH 为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0, 37 °C 温浴 2 h, 再调回初始 pH 7.8, 以未处理组为对照, 测定抑菌活性^[37]。

1.7.3 紫外稳定性: 将抑菌活性为 320 AU/mL 的

无细胞发酵液分别置于 30 W 紫外灯下照射 10、20、30、40、50 和 60 min, 以未照射的无细胞发酵液为对照, 测定抑菌活性^[38]。

1.7.4 酶水解稳定性: 在抑菌活性为 320 AU/mL 的无细胞发酵上清液中分别加入终浓度为 1 g/L 的蛋白酶 K、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶和 α -淀粉酶, 在各种酶的最适 pH 和温度下处理 2 h, 再调回初始 pH 7.8, 以未处理组为对照, 测定抑菌活性^[36]。

2 结果与分析

2.1 具抑菌活性海洋放线菌的筛选

放线菌产生抑菌活性物质与其发酵条件和发酵培养基的选择有关, 如果发酵培养基选择不当, 可能就会造成漏筛^[25,39], 本文的研究结果支持了这一结论。表 1 表明海洋中很多微生物具有抑菌活性, 也表明同一菌株在不同发酵培养基中可能产生或不产生或产生浓度不同的抑菌活性物

质。Y10、Y11、Y15、Y16 和 Y21 相对于其它菌株均具有良好的抑菌性, Y15 和 Y21 均对 4 种指示菌具有抑菌性, Y10 和 Y16 对革兰氏阳性菌具有较好的抑菌活性, 因此初步选择 Y10、Y11、Y15、Y16 和 Y21 这 5 株菌为目标菌株。Y15 在 4 种发酵培养基中均具有抑菌性, 尤其在 F1 培养基中具有更优良的抑菌活性, 而 Y10、Y11、Y16 和 Y21 仅在其中 2 种或 3 种培养基中才产生抑菌性, 这表明 Y15 比 Y10、Y11、Y16 和 Y21 在产生抑菌活性物质的培养基选择方面更加广泛。Y15 在 F1 和 F4 培养基中产生的抑菌物质对 4 种指示菌均有抑菌性, 但在 F2 和 F3 培养基中产生的抑菌物质却对大肠埃希氏菌无抑菌性, 且对另外 3 株指示菌抑菌性也小于 F1 和 F4 培养基中产生的抑菌物质, 这表明 Y15 在 F2 和 F3 中产生的抑菌活性物质浓度没有在 F1 和 F4 中产生的高。

表 1 海洋抑菌放线菌在不同发酵培养基中的抑菌情况
Table 1 Inhibition effect of marine antimicrobial actinomycetes in different fermentation media

Strain number	F1				F2				F3				F4			
	S	E	B	L	S	E	B	L	S	E	B	L	S	E	B	L
Y1	++	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-
Y2	-	+++	-	+++	-	++	-	++	++	-	-	-	++	-	-	++
Y3	++	-	-	-	++	-	-	-	++	-	-	-	++	-	-	-
Y5	++	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	++	-	-	-
Y6	-	-	-	+++	-	-	-	++	-	-	+	++	-	-	-	++
Y9	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y10	-	-	-	-	++++	-	++++	+++	++++	-	++++	++	+++	-	+++	++
Y11	-	-	-	-	+++	++++	++++	-	+++	++	+++	-	+++	+++	+++	-
Y15	++++	++	+++	++++	+++	-	++	+++	+++	-	+++	+++	++++	++	+++	++++
Y16	+++	-	++++	++++	-	-	-	-	++	-	+++	-	++++	-	++++	+++
Y21	++++	++	+++	++++	-	-	-	-	+++	++	+++	+++	-	-	-	-
Y22	++	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	+	++	-	-	+

注: F1、F2、F3、F4 为 4 种发酵培养基。S: 金黄色葡萄球菌; E: 大肠埃希氏菌; B: 枯草芽孢杆菌; L: 单核细胞增生李斯特菌。++++: 抑菌圈直径大于 20 mm; +++: 抑菌圈直径在 15-20 mm 之间; ++: 抑菌圈直径在 10-15 mm 之间; +: 抑菌圈直径小于 10 mm; -: 无明显抑菌圈。

Note: F1, F2, F3 and F4 represent four kinds of fermentation medium. S: *S. aureus*; E: *E. coli*; B: *B. subtilis*; L: *L. monocytogenes*. ++++: Inhibition zone diameter greater than 20 mm; +++: The diameter of inhibition zone between 15 mm to 20 mm; ++: The diameter of inhibition zone between 10 mm to 15 mm; +: Inhibition zone diameter less than 10 mm; -: No obvious inhibition zone.

2.2 抑菌谱

为从 Y10、Y11、Y15、Y16 和 Y21 中选择目标菌进行下一步实验,用 12 株革兰氏阳性菌株(G^+)和 8 株革兰氏阴性菌株(G^-)对上述 5 株菌株进行抑菌谱测试,结果见表 2。从表 2 可以看出,Y15 对 12 株革兰氏阳性菌株均具有抑菌活性,且抑菌圈直径均在 13.45 mm 以上,其中对单核细胞增生李斯特菌 ATCC19112、单核细胞增生李斯特菌

ATCC13932 和金黄色葡萄球菌抑菌性最佳,抑菌圈分别达到 23.00、21.50 和 21.40 mm;革兰氏阴性菌株中除对沙门氏菌和柠檬酸杆菌无抑菌活性外对其余菌株均具有抑菌活性,尤其对维氏气单胞菌抑菌圈直径达 22.35 mm,但对除维氏气单胞菌和微黄奈瑟菌以外的其它革兰氏阴性菌株抑菌性较差,这可能是因为 Y15 抑菌活性物质对革兰氏阳性菌株的抑制性更好。Y10 对所有革兰氏阳性菌

表 2 Y10、Y11、Y15、Y16 和 Y21 的抑菌直径
Table 2 Diameter of inhibition zone of Y10, Y11, Y15, Y16 and Y21 (mm)

指示菌 Indicator bacteria	Y10	Y11	Y15	Y16	Y21
单核细胞增生李斯特菌 <i>L. monocytogenes</i> ATCC19112	15.34±0.02	0.00±0.00	23.00±0.28	20.33±0.57	20.09±0.03
单核细胞增生李斯特菌 ATCC19114	14.25±0.35	0.00±0.00	16.55±0.35	16.50±0.70	16.50±0.00
<i>L. monocytogenes</i> ATCC19114					
单核细胞增生李斯特菌 ATCC19117	14.75±0.35	0.00±0.00	17.50±0.00	18.65±0.49	18.10±0.14
<i>L. monocytogenes</i> ATCC19117					
单核细胞增生李斯特菌 ATCC13932	14.80±0.28	0.00±0.00	21.50±0.70	21.20±0.28	21.25±0.35
<i>L. monocytogenes</i> ATCC13932					
单核细胞增生李斯特菌 ATCC19116	14.50±0.70	0.00±0.00	14.35±0.21	15.25±0.35	14.70±0.42
<i>L. monocytogenes</i> ATCC19116					
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	20.23±0.23	19.90±6.17	21.40±0.14	19.60±0.55	20.17±0.76
枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	21.97±0.05	20.73±0.92	18.70±0.42	23.60±0.17	18.23±0.04
蜡样芽孢杆菌 F1-5-10	17.85±0.49	13.90±0.57	15.90±0.42	17.90±0.57	14.50±0.71
<i>B. cereus</i> F1-5-10					
里昂葡萄球菌 <i>S. lugdunensis</i>	18.50±0.71	17.35±0.21	19.35±0.21	17.25±0.35	17.00±0.70
嗜根考克氏菌 <i>K. rhizophila</i>	21.75±1.06	15.40±0.28	18.25±0.35	14.30±0.42	0.00±0.00
嗜酸乳杆菌 <i>L. acidophilus</i>	13.60±0.85	0.00±0.00	13.45±0.07	13.35±0.21	0.00±0.00
德氏乳杆菌 <i>L. delbrueckii</i>	12.40±0.85	0.00±0.00	14.15±0.21	14.50±0.70	0.00±0.00
微黄奈瑟菌 <i>N. subflava</i>	0.00±0.00	16.75±0.35	18.10±0.14	0.00±0.00	16.25±0.36
大肠埃希氏菌 <i>E. coli</i>	0.00±0.00	21.13±0.35	12.75±0.35	0.00±0.00	11.15±0.13
维氏气单胞菌 <i>A. veronii</i>	0.00±0.00	18.25±0.35	22.35±0.21	0.00±0.00	18.25±0.00
假单胞菌 <i>P. brassicacearum</i>	0.00±0.00	10.50±0.42	14.25±0.35	0.00±0.00	11.00±0.70
沙门氏菌 Y1 <i>S. typhi</i> Y1	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
柠檬酸杆菌 L3	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
<i>C. amalonaticus</i> L3					
副溶血性弧菌 33847	0.00±0.00	0.00±0.00	13.10±0.24	0.00±0.00	0.00±0.00
<i>V. parahaemolyticus</i> 33847					
副溶血性弧菌 33802	0.00±0.00	0.00±0.00	10.75±0.24	0.00±0.00	0.00±0.00
<i>V. parahaemolyticus</i> 33802					

株均具有抑菌活性, 其中对枯草芽孢杆菌的抑菌性最好, 抑菌圈直径可达 21.97 mm, 但对革兰氏阴性菌株无抑菌活性; Y11 仅对 5 株革兰氏阳性菌株和 4 株革兰氏阴性菌株具有抑菌性, 抑菌谱较窄; 同 Y10 一样, Y16 对所有革兰氏阳性菌株具有抑菌活性, 但对革兰氏阴性菌株无抑菌性; Y21 对 10 株革兰氏阳性菌株和 4 株革兰氏阴性菌株具有抑菌活性, 其中对单核细胞增生李斯特菌 ATCC13932 的抑菌活性最高, 抑菌圈直径达 21.25 mm, 但相对于 Y15 其抑菌活性和抑菌谱略差(表 2)。综合表 1 和表 2 可以看出, Y15 相对于 Y10、Y11、Y16 和 Y21 具有更好的抑菌活性和抑菌谱, 因此选择 Y15 作为目标菌株进行后续实验。从表 2 还可看出 Y15 产生的抑菌活性物质是一种广谱的抑菌活性物质, 具有一定的应用价值。

2.3 菌种鉴定

Y15 菌落在高氏一号培养基上呈圆形, 灰白色, 不透明, 无气生菌丝, 基内菌丝发达, 无色素产生。Y15 的 16S rRNA 基因经 PCR 扩增后测序, 将得到的基因序列提交到 GenBank 数据库, 获得登录号为: KU517850。Y15 基因序列经 BLAST 软件进行多序列比对后, 结果表明 Y15 与小单孢菌属(*Micromonospora*)的菌株具有较高的相似度, 并且与 *M. endolithica* 的相似性为 98%, 结

合形态学观察结果表明 Y15 是小单孢菌属中的成员。通过 EZBioCloud 获得与 Y15 相似度较高的菌株序列, 利用 MEGA 5.0 软件采用邻接法(Neighbor-Joining method)构建系统发育树, 结果如图 1 所示。Y15 与 *M. endolithica* 聚为一支, 表明二者亲缘关系最近。

2.4 Y15 抑菌活性物质产生、细胞干重和发酵液 pH 与时间的关系

为研究 Y15 抑菌活性物质产生、菌体干重和发酵液 pH 与时间的关系, 自 48 h 起每隔 24 h 测定各项指标至 288 h, 结果如图 2 所示。

由图 2 可知, 抑菌活性在 48–144 h 时一直增加, 在 96–120 h 时抑菌活性达到 320 AU/mL, 在 144 h 时达到最大值为 480 AU/mL, 在 168–216 h 时保持平衡为 320 AU/mL, 之后一直下降。百毫升菌体干重在 48–216 h 快速增长, 之后缓慢增长至平衡(0.73 g/100 mL), 因此 48–216 h 为 Y15 生长对数期, 216–288 h 为生长稳定期。发酵液 pH 基本呈上升趋势, 从 48 h 持续升高直至 168 h 后有少许下降, 在 168–216 h 基本保持稳定, 但在 216 h 后又持续上升, 这可能是因为 Y15 生长对数期产生的代谢产物有一些弱碱性物质, 在 216 h 后菌体进入生长稳定期, 因菌体死亡破裂或其它弱碱性代谢产物产生或二者兼有导致培养基 pH 继续升高。由图

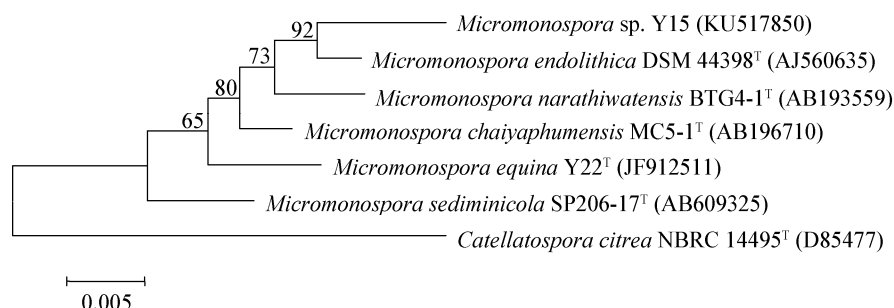


图 1 基于 16S rRNA 基因序列构建的小单孢菌系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of constructed based on 16S rRNA gene sequence

注: 分支点上的数字表示构建系统树时 1 000 次计算时形成该节点的百分比; 括号内数值为 GenBank 登录号; 标尺或刻度 0.005 代表 0.5% 的 16S rRNA 基因序列的进化差异。

Note: The bootstrap values (%) presented at the branches were calculated from 1 000 replications; Numbers in parentheses are GenBank accession numbers; The scale bar 0.005 represents 5 nucleotide substitutions per 1 000 nucleotides.

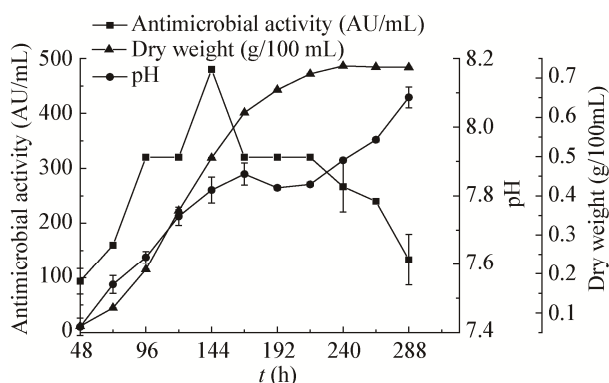


图2 Y15 抑菌活性物质产生、菌体干重和发酵液 pH 与时间关系曲线

Figure 2 Change of antimicrobial substance, dry cell weight and pH during Y15 fermentation

2 可以看出在生长对数期 Y15 抑菌活性升高并在最后保持稳定, 在 Y15 生长稳定期抑菌活性下降, 这一点研究与程沁园等^[40]和 Govindarajan 等^[3]研究结果相似, 因此在后续实验中取发酵 168–216 h 的发酵液。在菌体生长平稳期抑菌活性下降, 这可能是抑菌活性物质与菌体产生的其它代谢物反应导致活性下降。

2.5 Y15 抑菌活性物质对指示菌作用方式

图 3 表示了 Y15 抑菌活性物质对单核细胞增生李斯特菌的作用方式。可以看出在单核细胞增生李斯特菌生长对数期($OD_{600}=0.435$, 指示菌活菌数为 1.13×10^9 CFU/mL, 数据未显示)时加入活性为 320 AU/mL 的 Y15 发酵液, 单核细胞增生李斯特菌 OD_{600} 值先上升, 然后持续下降, 在 14 h 时 OD_{600} 值已经降到 0.200 (指示菌活菌数为 1.42×10^5 CFU/mL, 下降了近 4 个数量级, 数据未显示), 这可能是因为对数期菌浓度较大, 很多指示菌处于分裂期, 并且活性物质与指示菌结合反应可能需要一定的时间, 因此 OD_{600} 值先上升, 之后吸光度下降可能是因为 Y15 抑菌活性物质与指示菌完全结合后, 活性物质抑制指示菌细胞壁的合成, 或改变了细胞膜通透性, 或抑制细胞蛋白质合成, 或因其它方式导致指示菌死亡^[41], 因此 OD_{600} 值下降。在指示菌浓度较低时($OD_{600}=0.021$)加入 Y15 发酵液, 指示菌 OD_{600} 值持续下降至平衡($OD_{600}=0.01$)。无论指示

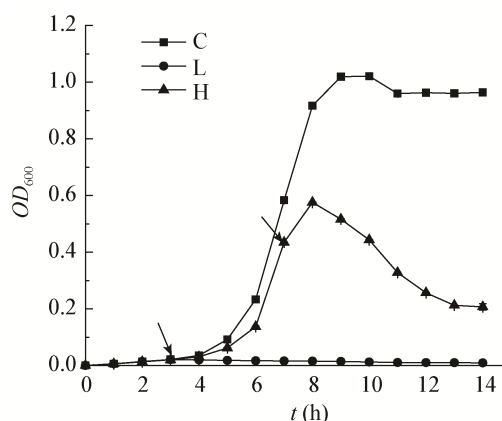


图3 Y15 抑菌活性物质对单核细胞增生李斯特菌作用方式
Figure 3 Action mode of antimicrobial substance of Y15 against *L. monocytogenes*

注: C: 对照组; L: 低浓度加入($OD_{600}=0.021$); H: 高浓度加入($OD_{600}=0.435$).

Note: C: Control; L: Low concentration ($OD_{600}=0.021$); H: High concentration ($OD_{600}=0.435$).

菌在低浓度还是高浓度时加入 Y15 抑菌活性物质, 指示菌 OD_{600} 值均下降, 因此 Y15 抑菌活性物质对单核细胞增生李斯特菌的作用方式为杀菌而不是抑菌, 这一点与 Todorov 等^[33]和 Abrams 等^[42]的细菌素研究结果相似。

2.6 Y15 抑菌活性物质理化性质

2.6.1 温度稳定性: Y15 温度稳定性如图 4 所示, 在 $-20-60^\circ\text{C}$ 具有良好的稳定性, 80°C 处理 1 h 和 2 h 活性分别下降为 240 AU/mL 和 160 AU/mL, 100°C 处理 1 h 和 2 h 活性分别下降为 120 AU/mL

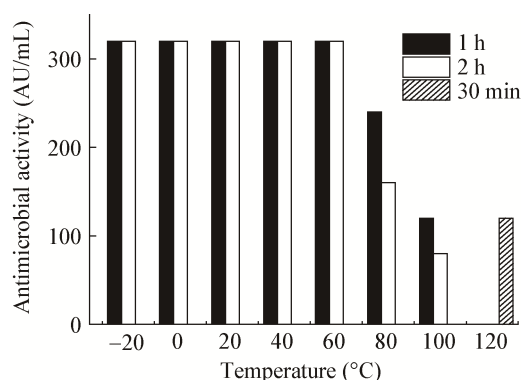


图4 温度对 Y15 抑菌活性物质的影响

Figure 4 Effect of temperature on activity of antimicrobial substance of Y15

和 80 AU/mL, 而 120 °C 处理 1 h 和 2 h 已无抑菌活性, 但在 120 °C 处理 30 min 仍保留 37.5% 的抑菌活性, 这表明在高温下抑菌活性是逐步丧失的。图 4 也表明 Y15 抑菌活性物质不耐高温, 但对中低温具有良好的稳定性, 这为后续实验保持温度提供了支持。

2.6.2 pH 稳定性: 由图 5 可以看出, Y15 抑菌活性物质在 pH 7.0–10.0 之间保持相对稳定的抑菌活性, 在 pH 6.0–2.0 和 pH 11.0–12.0 时相对于对照组抑菌活性均明显下降, 但在 pH 为 2.0 和 12.0 处理 2 h 后仍分别保留 25% 和 50% 的活性, 说明 Y15 抑菌活性物质在弱碱性和中性条件下相对稳定, 而在酸性和强碱性条件下稳定性较差, 尤其是酸性条件。因此在活性物质分离纯化过程中应保持 pH 在 7.0–10.0^[35]。

2.6.3 紫外稳定性: 紫外稳定性是抑菌活性物质开发药品、食品防腐剂的重要指标, 若紫外稳定性差将会降低药效^[38]。由图 6 可以看出紫外处理 Y15 发酵液 1 h 内对活性物质并无影响, 表明 Y15 抑菌活性物质具有良好的紫外稳定性。

2.6.4 酶水解稳定性: 由图 7 可以看出, Y15 抑菌活性物质对 3 种蛋白酶均具有良好的稳定性, 可以初步判断 Y15 抑菌活性物质不是蛋白质类和多肽类物质^[36]。同时 Y15 抑菌活性物质对 α -淀粉酶也

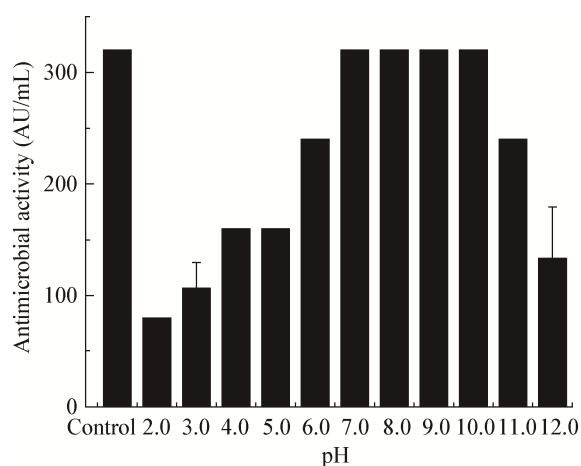


图 5 pH 对 Y15 抑菌活性物质的影响

Figure 5 Effect of pH on activity of antimicrobial substance of Y15

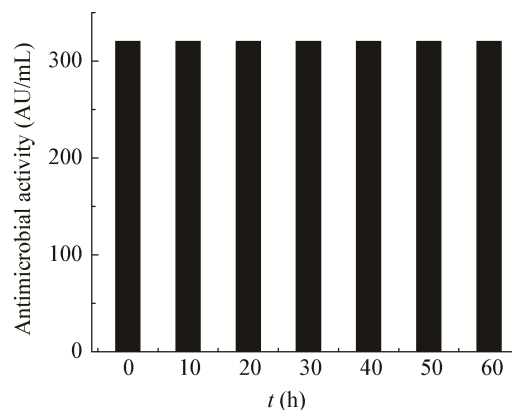


图 6 紫外对 Y15 抑菌活性物质的影响

Figure 6 Effect of UV on activity of antimicrobial substance of Y15

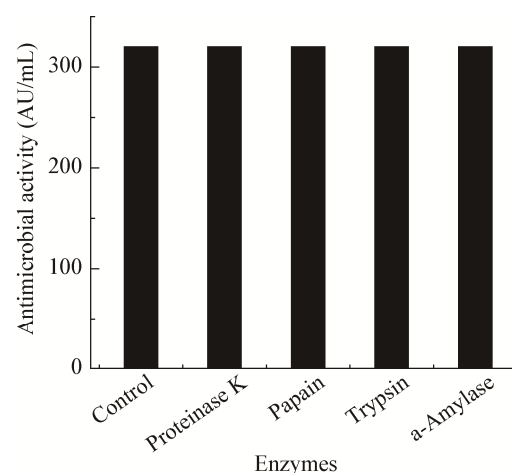


图 7 酶类对 Y15 抑菌活性物质的影响

Figure 7 Effect of various enzymes on activity of antimicrobial substance of Y15

具有相对稳定性, 这表明 Y15 抑菌活性物质不依赖于糖基化修饰^[34,43]。

3 讨论

海洋放线菌代谢产物功能独特、结构新颖, 近年来已成为研究热点。从产抑菌活性物质的数量和种类来看, 稀有放线菌——小单孢菌属都是仅次于链霉菌属的第二大类新型活性物质的来源, 但由于海洋小单孢菌属出菌率低, 被发现和应用率却远低于链霉菌属^[44]。

本研究从上海临港海域海泥样品中筛选具有抑菌活性的放线菌。所分离的 Y15 菌株对大多数指

示菌具有较好的抑菌活性,尤其对单核细胞增生李斯特菌、金黄色葡萄球菌和气单胞菌等表现出优良的抑菌作用(表2);相比于张晓敏等^[44]和龙中儿等^[45]分离的小单孢菌的抑菌谱,本研究分离的Y15抑菌谱更广,对供试的所有革兰氏阳性菌株均具有抑菌活性,对除沙门氏菌和柠檬酸杆菌以外的所有供试革兰氏阴性菌株也都具有抑菌活性,这表明Y15产生的抑菌活性物质具有广谱抑菌作用。单核细胞增生李斯特菌是水产品中一种常见致病微生物,国内对市场上即食食品中单核细胞增生李斯特菌污染情况最近一次大规模调查是在2012-2014年,结果发现阳性率为6.87%^[46],而本文所筛选的Y15对几种单核细胞增生李斯特菌、维氏气单胞菌和金黄色葡萄球菌均具有良好的抑菌活性,因此在水产品病原菌防治中也具有一定的研究意义。系统发育树分析表明Y15与*Micromonospora endolithica*亲缘关系最近(图1),该菌种为Hirsch等^[47]发现的小单孢菌属的一个新种,在近海岸并未有过发现*Micromonospora endolithica*菌的报道,且分离的*Micromonospora endolithica*菌种未检测出含有抑菌活性物质,本文得到的菌却具有显著的抑菌活性;Salinosporamide A^[48]是一种很好的抗癌物质,是从小单孢菌的新种*Salinispora*中发现的,这提示我们Y15产生的抑菌活性物质具有研究价值。大多数放线菌产抑菌活性物质是在稳定期,而Y15却在对数期产生(图2),Govindarajan等^[3]分离的链霉菌产生具抑菌活性的物质也是对数期,该物质为一种新型芳香酮类物质,本文的活性物质初步判断为非蛋白类和多肽类物质(图7),这表明本文的抑菌活性物质具有研究意义。综上所述Y15产生的抑菌活性物质具有较高的研究与应用价值,本研究将会继续对Y15抑菌活性物质进行分离、纯化和结构鉴定,并研究其对指示菌的杀菌机理。

参 考 文 献

- [1] Chen MQ, Feng GD, Deng MR, et al. Screening and characterization of a marine actinomycete with antagonist activities against multidrug resistant bacteria[J]. Biotechnology Bulletin, 2013(7): 119-124 (in Chinese)
陈美群, 冯广达, 邓名荣, 等. 一株抗多重耐药菌海洋放线菌的筛选及其活性分析[J]. 生物技术通报, 2013(7): 119-124
- [2] Yu SY, Pan HQ, Hu JC, et al. Characterization of a deep-sea actinomycete 08A4 and its antifungal activity products[J]. Journal of Microbiology, 2012, 32(5): 1-5 (in Chinese)
于素亚, 潘华奇, 胡江春, 等. 深海放线菌 08A4 的鉴定及其抗真菌活性产物研究[J]. 微生物学杂志, 2012, 32(5): 1-5
- [3] Govindarajan G, Santhi VS, Jebakumar SRD. Antimicrobial potential of phylogenetically unique actinomycete, *Streptomyces* sp. JRG-04 from marine origin[J]. Biologicals, 2014, 42(6): 305-311
- [4] Ramesh S, Mathivanan N. Screening of marine actinomycetes isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009, 25(12): 2103-2111
- [5] Zhang H, Jiang CL, Xu LH, et al. Resources of medicinal microorganisms[J]. Microbiology China, 2004, 31(2): 152-153 (in Chinese)
张华, 姜成林, 徐丽华, 等. 药用微生物资源[J]. 微生物学通报, 2004, 31(2): 152-153
- [6] Lee LH, Cheah YK, Sidik SM, et al. Molecular characterization of Antarctic actinobacteria and screening for antimicrobial metabolite production[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 28(5): 2125-2137
- [7] Bull AT, Stach JEM. Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery[J]. Trends in Microbiology, 2007, 15(11): 491-499
- [8] Wang HY, Liu J, Zhao SJ. Isolation of marine actinomycetes strains from sediments in Nanji island offshore[J]. Marine Sciences, 2010, 34(1): 48-51 (in Chinese)
王海雁, 刘健, 赵淑江. 南麂岛海域沉积物中海洋放线菌的分离研究[J]. 海洋科学, 2010, 34(1): 48-51
- [9] Valan AM, Asha KRT, Duraipandiyar V, et al. Characterization and phylogenetic analysis of novel polyene type antimicrobial metabolite producing actinomycetes from marine sediments: bay of Bengal India[J]. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2012, 2(10): 803-810
- [10] Hu P, Wang XQ. The research process in antibiotics from marine microbe[J]. Food Science, 2004, 25(11): 397-401 (in Chinese)
胡萍, 王雪青. 海洋微生物抗菌物质的研究进展[J]. 食品科学, 2004, 25(11): 397-401
- [11] Mincer TJ, Fenical W, Jensen PR. Culture-dependent and culture-independent diversity within the obligate marine actinomycete genus *Salinispora*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(11): 7019-7028
- [12] Tian XP, Zhang S, Li WJ. Advance in marine actinobacterial research-a review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(2): 161-169 (in Chinese)
田新朋, 张偲, 李文均. 海洋放线菌研究进展[J]. 微生物学报, 2011, 51(2): 161-169
- [13] Manivasagan P, Venkatesan J, Sivakumar K, et al. Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria[J]. Microbiological Research, 2014, 169(4): 262-278
- [14] Subramani R, Aalbersberg W. Marine actinomycetes: an ongoing source of novel bioactive metabolites[J]. Microbiological Research, 2012, 167(10): 571-580
- [15] Kock I, Maskey RP, Biabani MAF, et al. 1-Hydroxy-1-norresistomycin and resistoflavin methyl ether: new antibiotics from marine-derived *Streptomyces*[J]. The Journal of Antibiotics, 2005, 58(8): 530-534
- [16] Fiedler HP, Bruntner C, Riedlinger J, et al. Proximicin A, B and C, novel aminofuran antibiotic and anticancer compounds isolated from marine strains of the actinomycete *Verrucosipora*[J]. The Journal of Antibiotics, 2008, 61(3): 158-163
- [17] Asolkar RN, Kirkland TN, Jensen PR, et al. Arenimycin, an antibiotic effective against rifampin- and methicillin-resistant

- Staphylococcus aureus* from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*[J]. The Journal of Antibiotics, 2010, 63(1): 37-39
- [18] Song YX, Huang HB, Chen YC, et al. Cytotoxic and antibacterial marfuraquinocins from the deep south china sea-derived *Streptomyces niveus* SCSIO 3406[J]. Journal of Natural Products, 2013, 76(12): 2263-2268
- [19] Habbu P, Warad V, Shastri R, et al. Antimicrobial metabolites from marine microorganisms[J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2016, 14(2): 101-116
- [20] Goodfellow M, Fiedler HP. A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2010, 98(2): 119-142
- [21] Bredholdt H, Galatenko OA, Engelhardt K, et al. Rare actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the Trondheim fjord, Norway: isolation, diversity and biological activity[J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(11): 2756-2764
- [22] Chang XB, Liu WZ, Yin Q, et al. Comparative study of different methods for isolation of marine actinomycetes[J]. Marine Sciences, 2012, 36(8): 35-39 (in Chinese)
常显波, 刘文正, 尹琦, 等. 海洋放线菌不同分离方法的比较研究[J]. 海洋科学, 2012, 36(8): 35-39
- [23] Yuan Y, He S. Selective isolations of marine rare actinomycetes[J]. Journal of Ningbo University (Nature Science and Engineering Edition), 2014, 27(3): 12-17 (in Chinese)
原野, 何山. 海洋稀有放线菌的选择性分离方法[J]. 宁波大学学报: 理工版, 2014, 27(3): 12-17
- [24] Jiang Y, Tang SK, Wang YX, et al. Method of isolation marine actinomycetes[J]. Microbiology China, 2006, 33(6): 153-155 (in Chinese)
姜怡, 唐蜀昆, 王永霞, 等. 海洋放线菌分离方法[J]. 微生物学通报, 2006, 33(6): 153-155
- [25] Feng YN, Yang RQ. Advance in actinomycetes isolation and screening method[J]. Biotechnology, 2010, 20(4): 95-97 (in Chinese)
冯轶男, 杨润清. 放线菌分离与筛选方法的研究进展[J]. 生物技术, 2010, 20(4): 95-97
- [26] Gu ZQ. Isolation and identification of one antimicrobial marine actinomycete strain and elementary study on its active substance[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2007 (in Chinese)
顾忠旗. 一株抗菌海洋放线菌的分离鉴定及其活性成分的初步研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2007
- [27] Gao P, Xue QH, Chang XB, et al. Study on the media and methods of selecting antimicrobial actinomycetes[J]. Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry (Natural Science Edition), 2005, 33(1): 59-63, 68 (in Chinese)
高鹏, 薛泉宏, 常显波, 等. 拮抗放线菌的筛选培养基与筛选方法研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2005, 33(1): 59-63, 68
- [28] Yuan JL. Isolation and identification of one antimicrobial marine actinomycete and elementary study on its active component[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2008 (in Chinese)
原居林. 一株抗菌海洋放线菌的分离鉴定及其活性成分的初步研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2008
- [29] Cui XL, Mao PH, Zeng M, et al. *Streptimonospora salina* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Nocardioseae*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, 51(2): 357-363
- [30] Zhang HD, Du Q, Zhang ZK, et al. Determination of actinomycin 769 inhibitory spectrum and liquid culture growth curve[J]. China Plant Protection, 2010, 30(7): 5-9 (in Chinese)
张红丹, 杜茜, 张正坤, 等. 放线菌 769 抑菌谱及液体培养生长曲线的测定[J]. 中国植保导刊, 2010, 30(7): 5-9
- [31] Messaoudi S, Kergourlay G, Dalgalarondo M, et al. Purification and characterization of a new bacteriocin active against *Campylobacter* produced by *Lactobacillus salivarius* SMXD51[J]. Food Microbiology, 2012, 32(1): 129-134
- [32] Ni MX, Bi QR, Guo RN, et al. Optimization of active composition production from the Antarctic actinomycete N-1 using response surface methodology[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2013, 32(3): 11-20 (in Chinese)
倪孟祥, 毕启瑞, 郭润妮, 等. 南极放线菌 N-1 产抑菌成分的响应面优化[J]. 中国海洋药物, 2013, 32(3): 11-20
- [33] Todorov SD, Dicks LMT. Bacteriocin production by *Pediococcus pentosaceus* isolated from marula (*Scerocarya birrea*)[J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 132(2/3): 117-126
- [34] Wang YT, Wang LP, Tang C, et al. Screening of bacteriocin-producing *Pediococcus pentosaceus* from Mongolia cheese and study on physicochemical characteristics of bacteriocin[J]. Food and Fermentation Industries, 2015, 41(10): 14-19, 24 (in Chinese)
王艳婷, 汪立平, 唐潮, 等. 蒙古干酪中产细菌素戊糖片球菌的筛选及其细菌素理化特性研究[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(10): 14-19, 24
- [35] Zhao G, Wu YH. Antimicrobial spectrum and stability of the fermentation broth of *Streptomyces*[J]. Agrochemicals, 2006, 45(8): 525-526, 528 (in Chinese)
赵刚, 吴元华. 一株链霉菌发酵液的抗菌谱及稳定性[J]. 农药, 2006, 45(8): 525-526, 528
- [36] Zhang TT. Isolation and identification of actinomycetes from marine shrimp shells and their antifungal extraction[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fujian Agriculture and Forestry University, 2011 (in Chinese)
张婷婷. 海洋虾壳的放线菌分离鉴定筛选及抑菌活性物质提取[D]. 福州: 福建农林大学硕士学位论文, 2011
- [37] Long JY, Ji ZQ, Shi BJ, et al. Studies of antagonistic spectrum and stability of fermentation of No.24 strain producing one antibiotic[J]. Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry (Natural Science Edition), 2004, 32(S1): 61-64 (in Chinese)
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(S1): 61-64
- [38] Fang YW, Wang SJ, Liu S, et al. Identification of an obligate marine actinomycete strain and its antimicrobial characteristics[J]. Agrochemicals, 2014, 53(2): 136-139 (in Chinese)
房耀维, 王淑军, 刘姝, 等. 一株海洋专性放线菌的分类鉴定及其抑菌活性[J]. 农药, 2014, 53(2): 136-139
- [39] Wu GL. Isolation and screening of marine actinomycetes producing antibacterial substances[D]. Qingdao: Master's Thesis of Qingdao University, 2013 (in Chinese)
伍国梁. 分离筛选具有抑菌活性的海洋放线菌[D]. 青岛: 青岛大学硕士学位论文, 2013
- [40] Cheng QY, Ye L, Xing YY, et al. Fermentation conditions and characteristics of anti-bacteria active substance by marine actinomycete WB-F5[J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2007, 5(2): 142-145 (in Chinese)
程沁园, 叶亮, 邢莹莹, 等. 海洋放线菌 WB-F5 发酵条件的优化及抑菌活性产物性质的初步研究[J]. 中国天然药物, 2007, 5(2): 142-145
- [41] Peng WM. Studies on the antibacterial activity of a new nucleoside antibiotic from a strain of *Micromonospora caboracea*[D]. Nanchang: Master's Thesis of Jiangxi Normal University, 2013 (in Chinese)
彭伟梦. 一株炭样小单孢菌产新型核苷类抗生素的抗菌作用

- 研究[D]. 南昌: 江西师范大学硕士学位论文, 2013
- [42] Abrams D, Barbosa J, Albano H, et al. Characterization of bacPPK34 a bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* strain K34 isolated from “Alheira”[J]. Food Control, 2011, 22(6): 940-946
- [43] Anastasiadou S, Papagianni M, Filiouis G, et al. Pediocin SA-1, an antimicrobial peptide from *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627: production conditions, purification and characterization[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(13): 5384-5390
- [44] Zhang XM, Liu Q, Liu X, et al. Isolation and identification of marine *Micromonospora* sp. MN10 with broad-spectrum antimicrobial activity[J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2013, 48(2): 99-104 (in Chinese)
张晓敏, 刘秋, 刘限, 等. 1 株具有广谱抗菌活性的海洋小单孢菌 MN10 的分离及鉴定[J]. 甘肃农业大学学报, 2013, 48(2): 99-104
- [45] Long ZE, Zhu YJ, Huang YH, et al. Isolation and identification of a strain of *Micromonospora* with broad-spectrum antimicrobial activity[J]. Microbiology China, 2008, 35(3): 378-383 (in Chinese)
龙中儿, 朱跃进, 黄运红, 等. 一株具有广谱抗菌活性小单孢菌的分离和鉴定[J]. 微生物学通报, 2008, 35(3): 378-383
- [46] Wu S, Wu QP, Zhang JM, et al. Prevalence, antibiotic resistance and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolated from retail ready-to-eat foods in China[J]. Food Control, 2015, 47: 340-347
- [47] Hirsch P, Mevs U, Kroppenstedt RM, et al. Cryptoendolithic actinomycetes from Antarctic sandstone rock samples: *Micromonospora endolithica* sp. nov. and two isolates related to *Micromonospora coerulea* Jensen 1932[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2004, 27(2): 166-174
- [48] Lei XL, Hong K, Ruan JS. Micromonosporaceae and their important role in marine drug development[J]. Biotechnology Bulletin, 2006(S1): 87-90 (in Chinese)
雷湘兰, 洪葵, 阮继生. 小单孢菌及其在海洋药物开发中的前景[J]. 生物技术通报, 2006(S1): 87-90

征 稿 简 则

1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、微生物蛋白质组学、微生物功能基因组、微生物工程与药物等领域的最新研究成果, 产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究改革等。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、专栏等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依照提示提交稿件, 详见主页“投稿须知”。

3 写作要求

来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

3.1 参考文献

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出, 多于 3 人时列出前 3 人, 后加“等”或“et al.”, 作者姓前、名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整, 不用缩写, 不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

- [1] Marcella C, Claudia E, Pier GR, et al. Oxidation of cystine to cysteic acid in proteins by peroyacids as monitored by immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis, 1991, 12(5): 376-377
- [2] Wang BJ, Liu SJ. Perspectives on the cultivability of environmental microorganisms[J]. Microbiology China, 2013, 40(1): 6-17 (in Chinese)
王保军, 刘双江. 环境微生物培养新技术的研究进展[J]. 微生物学通报, 2013, 40(1): 6-17
- [3] Shen T, Wang JY. Biochemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 1990: 87 (in Chinese)
沈同, 王镜岩. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 87
- [4] Liu X. Diversity and temporal-spatial variability of sediment bacterial communities in Jiaozhou Bay[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010 (in Chinese)
刘欣. 胶州湾沉积物细菌多样性及菌群时空分布规律[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 2010

3.2 脚注(正文首页下方)

Foundation item:

*Corresponding author: Tel: ; Fax: ; E-mail:

Received: January 01, 20xx; Accepted: March 01, 20xx; Published online (www.cnki.net): March 31, 20xx

基金项目: 基金项目(No.)

*通讯作者: Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 20xx-01-01; 接受日期: 20xx-03-01; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 20xx-03-31

(下转 p.553)