



## 摘 要

对厦门周边海域采集的不同样品（包括海水、海沙、海贝等），采用稀释平板法分离、纯化、保藏各种海洋微生物，共分离到细菌 57 株，放线菌 17 株和霉菌 128 株。采用滤纸片法以金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、啤酒酵母、黑曲霉为测试菌，进行抗菌活性菌种筛选，结果表明从海水和海贝分离出具有抗菌活性的细菌占该类样品分离总细菌数比例较高，分别为 69.2%和 45.5%；从海水、海沙和海贝中分离出具有抗菌活性的放线菌占从该类样品分离总放线菌数比率高，分别占 75.0%、80.0%和 80.0%；从海沙和海贝中分离出具有抗菌活性的真菌占从该类样品分离总真菌数比率高，分别为 54.5%和 57.1%。海洋细菌和放线菌抗两种细菌比率高于其它类型测试菌，而海洋真菌对各测试菌的抗菌比率相对平均。

对一株分离自厦门大屿岛海域潮间带海洋软体动物的放线菌进行研究。经过形态特征、培养特征及生理生化特征可以初步鉴定为链霉菌属 (*Streptomyces* sp.) 黄色类群 (*Flavus*)，16S rDNA 序列与 GeneBank 比对和系统发育树构建表明其与 *Streptomyces parvus* strain NRRL B-1455T 的序列同源性达 99%。

为了提高抗菌物质的产量，对菌株发酵培养基组分和发酵条件进行优化。采用管碟法测发酵液的活性，筛选出最适碳源为可溶性淀粉，最适氮源为氯化铵。通过响应面设计 Box-Behnken 中心组合实验确定培养基最佳组成为可溶性淀粉 2.035%，氯化铵 0.4425%、氯化钠 2.000%；发酵条件优化结果表明最适起始 pH 7.0，最适接种菌龄 48h，最适接种量为 6%，最适装液量为 250mL，最适三角瓶装量 70mL，最适培养温度为 28℃，最适培养时间 5d。

菌株 DY2741 抗菌物质稳定性实验表明：该抗菌物质对 pH、UV 具有较好的稳定性，高于 100℃处理抗菌物质部分失活。

通过对该菌发酵液中抗菌物质的溶解性质测定，可推知该物质极性中等。葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱分离后，经抗菌活性检测发现两个活性峰，其中第 2 个峰对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌活性较强。将第 2 个峰的洗脱液各组份进行薄层色谱分析，选取斑点清晰且单一的组份进行气相色谱-质谱联用分析，总离子流图表明该组份成分单一，根据质谱图与标准谱库比对以及红外光谱分析，初步判断该组份为邻苯二甲酸二丁酯(DBP)。

关键词：海洋微生物分离，抗菌物质，鉴定，发酵条件，分离纯化

## Abstract

In this study, many kinds of samples including seawater, sea sand and seashells etc, were collected from Xiamen sea area. Fifty seven strains marine-derived bacteria, seventeen strains marine-derived actinomycetes and 128 strains fungi were isolated from the above samples. Their antibacterial activities against four microorganisms (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus niger*) were assayed by paper diffusion method. It was found that the rate of marine bacteria producing antibacterial substances isolated from seawater and seashells to the total of bacteria isolated from different samples was higher, respectively 69.2% and 45.5%. The rate of marine actinomycetes producing antibacterial substances isolated from seawater, sea sand and seashells was higher, respectively 75.0%, 80.0% and 80.0% and that the rate of marine fungi producing antibacterial substances isolated from sea sand and seashells was higher, respectively 54.5% and 57.1%. The rate of the bacteria and actinomycetes against two kinds of bacteria was more than that against the other indication strains and the rate of the fungi against all these indication strains was on average.

A marine-derived actinomycete DY2741 isolated from sea invertebrata collected from Xiamen intertidal zone was studied. According to morphological, cultural characteristics and physiology and biochemistry, this strain belonged to *Flavus* of the genus *Streptomyces* sp. 16S rDNA compared with the genebank and its phylogenetic tree showed that homology of gene order between DY2741 and *Streptomyces parvus* strain NRRL B-1455T was 99%.

In order to increase yield of antibacterial substances, the compositions of medium and fermentation conditions were optimized. It showed the optimized carbon source was starch; the optimized nitrogen source was ammonium chloride. According to the design of Box-Behnken central composite, the optimum medium composition: starch 2.035%, ammonium chloride 0.4425% and NaCl 2.000%. Optimization of fermentation showed that initial pH was 7.0, seed age was 48h, inoculation quantity was 6%, the optimum volume of medium in 250mL flask was 70mL, the optimum temperature was 28°C and fermentation time was 5d.

The antibacterial substances in the fermented broth was stable to the pH and ultraviolet. The antibacterial activity started to decline at 100°C.

By determination, it was deduced that the antibacterial substances in DY2741 broth had lipid solubility property with middle polarity. On the basis of separation of the

Sephadex LH-20, two peaks with antibacterial activity appeared, and the second peak showed the stronger inhibition activity against *S.aureus* and *E.coli*. In order to analyze the fraction, TLC was analyzed to choose the tube which had a clear and single spot. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis was performed to this tube. While TIC showed it was relatively pure. According to comparison of MS spectrum and the standard spectral library and FTIR analysis, it was preliminarily inferred as dibutyl phthalate (DBP).

**Key words:** isolation of marine microorganisms, antibacterial substances, identification, fermentation parameters, separation and purification



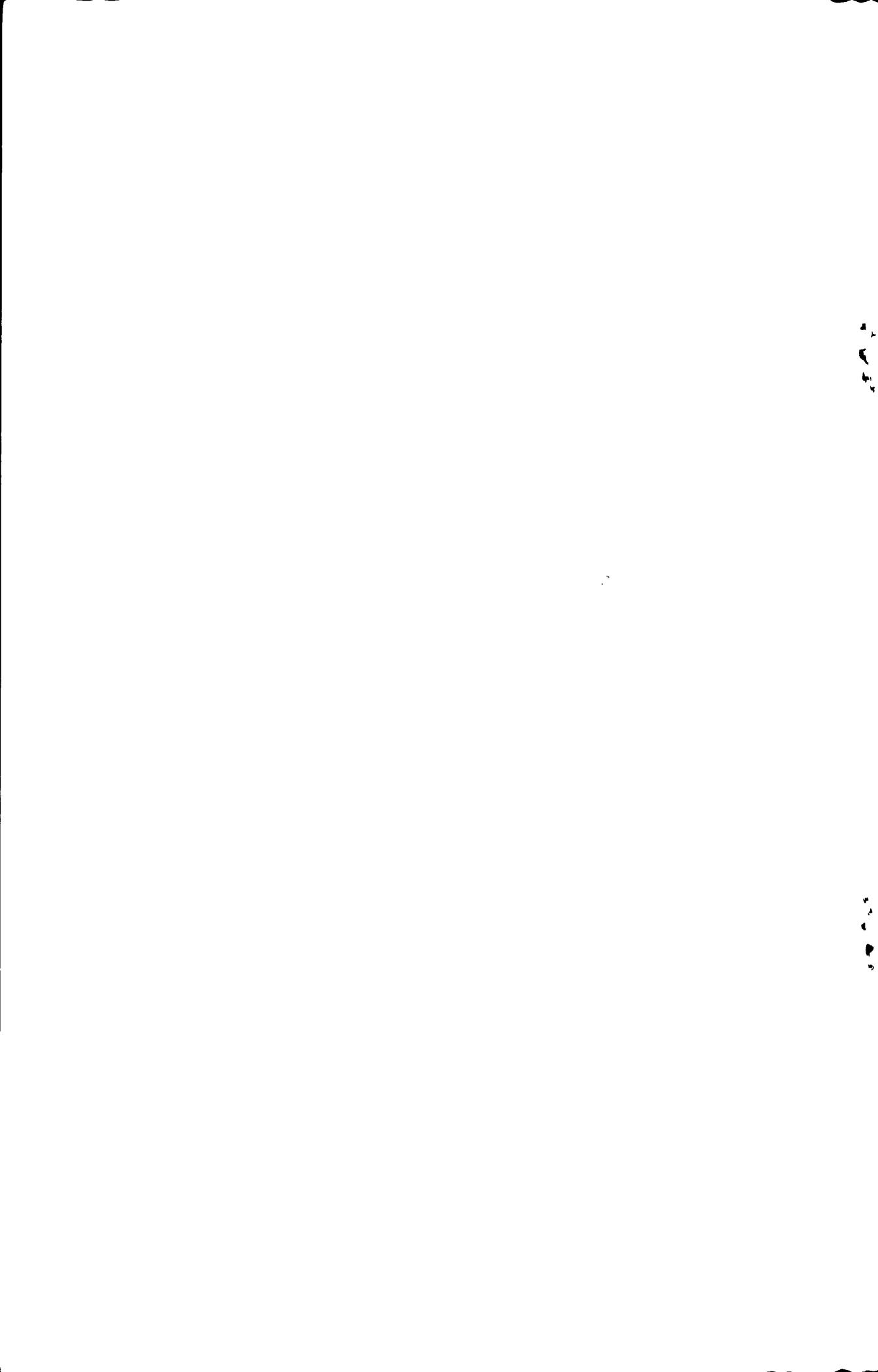
# 目 录

文献综述.....	1
1 引言.....	7
1.1 研究意义与理论依据.....	7
1.2 本研究拟解决的问题.....	7
2 材料与方法.....	8
2.1 材料.....	8
2.1.1 仪器设备与试剂.....	8
2.1.2 样品来源.....	8
2.1.3 菌种.....	8
2.1.4 培养基.....	9
2.2 方法.....	11
2.2.1 海洋微生物分离方法.....	11
2.2.2 具抗菌活性菌种初筛.....	11
2.2.3 抗菌活性测定.....	11
2.2.4 放线菌 DY2741 的鉴定.....	12
2.2.5 放线菌 DY2741 分子鉴定.....	13
2.2.6 小链霉菌 DY2741 发酵培养基优化.....	14
2.2.7 小链霉菌 DY2741 发酵条件优化.....	14
2.2.8 抗菌物质稳定性研究.....	15
2.2.9 抗菌谱测定.....	15
2.2.10 抗菌物质的溶解性质以及分离、纯化和鉴定.....	16
3 结果与分析.....	18
3.1 海洋微生物分离与具抗菌活性菌种筛选.....	18
3.1.1 细菌分离与抗菌活性菌种初筛计分析.....	18
3.1.2 放线菌分离与抗菌活性菌种筛选统计分析.....	19
3.1.3 真菌分离与抗菌活性菌种筛选统计分析.....	19
3.2 放线菌 DY2741 鉴定.....	20
3.2.1 菌株 DY2741 形态观察.....	20
3.2.2 菌株 DY2741 培养特征.....	20
3.2.3 生理生化特性.....	21
3.2.3 菌株 DY2741 16S rDNA 分子鉴定.....	22

3.3 菌株 DY2741 发酵培养基优化 .....	24
3.3.1 培养介质对抗菌物质抑菌效果的影响 .....	24
3.3.2 碳源对抗菌物质抑菌效果的影响 .....	25
3.3.3 氮源对抗菌物质抑菌效果的影响 .....	26
3.3.4 响应面设计培养基组成 .....	27
3.5 菌株 DY2741 发酵条件优化 .....	32
3.5.1 起始 pH 对抗菌物质抑菌效果的影响 .....	32
3.5.2 接种菌龄对抗菌物质产量的影响 .....	32
3.5.3 接种量对抗菌物质产量的影响 .....	33
3.5.4 装液量对抗菌物质产量的影响 .....	33
3.5.5 发酵温度对抗菌物质产量的影响 .....	34
3.5.6 抗菌物质产生的时间 .....	35
3.5.7 发酵条件优化前后比较 .....	35
3.6 抗菌谱测定 .....	36
3.7 发酵液抗菌物质稳定性实验 .....	36
3.7.1 UV 稳定性 .....	36
3.7.2 pH 稳定性 .....	36
3.7.3 热稳定性 .....	37
3.8 抗菌物质的溶解性质以及分离、纯化和鉴定 .....	37
3.8.1 抗菌物质的溶解性测定 .....	37
3.8.2 葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱分离各组分的抑菌活性 .....	39
3.8.3 活性成分分析结果 .....	39
4 讨论 .....	43
4.1 海洋微生物分离与具抗菌活性菌种筛选 .....	43
4.2 放线菌 DY2741 菌种鉴定 .....	43
4.3 菌株 DY2741 的发酵条件优化 .....	43
4.4 菌株 DY2741 抗菌物质稳定性研究 .....	43
4.5 活性成分的研究 .....	44
5 结论 .....	45
参考文献 .....	46
致 谢 .....	51
作者简介 .....	52
在读期间发表的学术论文 .....	52

## 缩略词附表

缩略词	英文全名	中文名
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
TLC	Thin layer chromatograph	薄层层析色谱
min	Minute	分钟
h	Hour	小时
d	Day	天
UV	Ultraviolet	紫外线
MS	Mass spectrum	质谱
IR	Infrared spectrum	红外光谱



## 文献综述

海洋占地球表面积的 71%，生物量约占地球生物总量的 80%，其中除了人类熟知的鱼、虾、贝类等生物外，仅较低等的生物种类约 20 多万种，是地球上最大的资源能源宝库，丰富的资源有待于人们研究利用。目前人们对海洋生物的认识仍相当有限，利用率仅 1% 左右。海洋生物的特殊生境意味着海洋生物的新陈代谢和生存繁殖方式的特殊性，从而产生许多结构特殊的生命活性物质和代谢产物<sup>[1,2,3]</sup>。

美国是较早注意开发海洋生物资源的国家之一。上世纪六十年代初 Burkholder PR 利用哥伦比亚大学的 Lamont 地质观察站建立了海洋生物学计划<sup>[4]</sup>。从南极洲和地处加勒比海热带波多黎各岛邻近海域采样分离到 151 株微生物<sup>[5]</sup>。其中一株假单胞菌 *Pseudomonas bromoutilis* 产生一种新的吡咯化合物抗生物质，对 G<sup>+</sup> 菌有很强的抑制作用<sup>[6]</sup>。这一报导标志着从海洋微生物寻找新的抗生物质的可能性。近年来的研究发现，由于海洋与陆地生态环境的极大差异，使得海洋生物天然产物与陆地生物相比更加多样和丰富。海洋微生物来源新化合物数量以令人难以置信的速度被发现，并且不断有新骨架的化合物被报道<sup>[3]</sup>。

### 1 海洋微生物活性产物的研究进展

刘晶晶等对 2000 年前后已报导的海洋微生物产生的重要活性物质进行综述<sup>[7]</sup>。现将 2000-2004 年报导的细菌和放线菌产生新抗生物质的简况如表 1.1 所示。

表 1.1 2000-2004 年报道的由细菌或放线菌产生抗生物质简况

Tab. 1 Some new found antibiotics produced by bacteria or actinomycetes during 2000-2004

海洋微生物名称	附生物或栖息地	产生的化合物	功能或抑制菌	论文作者, 发表年份
假单胞菌 AMSN <i>Pseudomonas sp.</i>	海藻	2,4-diacetylphloroglucinol	耐万古霉素的金黄葡萄球菌, 耐二甲氧笨青霉素的金黄葡萄球菌、枯草杆菌	Isnansetyo A. et al. 2001, 2002 kamei Y. et al. 2003
枯草杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	微藻	Macrolactins G-M	金黄色葡萄球菌、枯草杆菌	Nagao T. et al 2001
侧孢芽孢杆菌 <i>B. laterosporus</i>	海滨水	Tupuseleiamides Basliliskamide A and B	白色念珠菌 <i>Candida albicans</i>	Barsby T. et al 2002
PNG276 红平红球菌 <i>Rhodococcus</i>	海绵	活性物质	金黄色葡萄球菌, 其他 G <sup>+</sup> 菌	Chelossie Metal 2004

<i>erythropolis</i>				
蓝细菌	海水	Cyanovirin-N	HIV, 埃博拉病毒(Ebola virus)	Barrientos LG et al 2003
<i>Cyanobacterium</i>				
链霉菌AP77	紫菜或河口	160KD蛋白质SAP	抑制引起紫菜红腐病的紫菜腐霉( <i>Pythium porphyrae</i> )	Woo JH et al 2002
<i>Streptomyces sp.</i>				
链霉菌B7064	湾海水	Chalcomycin A and B	金黄色葡萄球菌、枯草杆菌	Asolkar RN et al 2002
<i>Actinomyces sp.</i>				
放线菌	澳大利亚南海岸	Lormeamides A and B	枯草杆菌	Capon RT et al 2002
MST-MA190				
<i>Actinomyces sp.</i>				
小单胞菌		Diazepinomicin	具抗菌活性	Charan RD et al 2004
<i>Micromonospora sp.</i>				
马杜拉放线菌		Chandranaimycin A	抗肿瘤	Maskey RP et al 2003
M048				
<i>Actinomadura sp.</i>				

国内很早就使用海洋生物治疗疾病,一些中医经典书籍(《黄帝内经》,《神农本草经》,《本草纲目》等)都记载了大量的生物药,如牡蛎,珊瑚,海藻等。但从海洋微生物中寻找抗生物质的研究则起步较晚,黄维真等报导<sup>[8]</sup>,在福建鼓浪屿沿海的海泥中分离到一株海洋放线菌——鲁特格链霉菌鼓浪屿亚种(*Str.rutgersensis subsp.gulangyunensis*),它产生广谱、低毒性的抗生物质Minobiosamine和肌醇胺霉素等,对绿脓杆菌和一些耐药性G<sup>-</sup>菌具有较强的抗性。王书锦等<sup>[9]</sup>在黄海、渤海、辽宁近海地区采样,分离到5608株海洋细菌,测定表明,约有25%的菌株具有不同程度的抗病原真菌、病原细菌的能力。刘全永等<sup>[10]</sup>从海洋细菌LUB02中分离到广谱抗真菌活性物质,对人和动物条件病原菌白色念珠菌(*Candida albicans*)有较强的抑制作用。2006年谷俊等<sup>[11]</sup>从连云港沿海海泥中分离到的一株放线菌M324,其代谢产物对金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌等具有抗菌活性。同年崔洪霞等<sup>[12]</sup>从胶州湾采集256株链霉菌,对其进行抗菌活性的筛选,发现有22%的海洋链霉菌具有不同的抗性,并对M095的代谢产物进行分离,得到全霉素,对金黄色葡萄球菌和丝状真菌毛霉均有显著的抑制作用。王莹、吴根福报导<sup>[13]</sup>从东海温州海域采样,分离到195株海洋细菌,筛选出22株菌具有抗菌活性。

2002年Woo等<sup>[14]</sup>从海洋链霉菌A477发酵液中得到一种160kD的蛋白质SAP,对真菌具有强烈的抑制作用。2003年Robert等<sup>[15]</sup>从夏威夷浅海淤泥中分离出一株链霉菌BD21-2,分离出一新化合物Bonactin,对G<sup>-</sup>、G<sup>+</sup>和真菌具有抑制作用。2004年Reidinger

等<sup>[16]</sup>从日本深海的海泥中分离出小单胞菌AB-18-032菌株，并从代谢物中分离出新抗生素Abyssomicins，对耐药的MRSA具有抑制活性。2005年Irma等<sup>[17]</sup>从海泥中分离到一株链霉菌MAR4，从代谢产物中分离出3种新的萜类化合物对耐药性的MRSA和肠杆菌都有抑制作用。2007年Venkat等<sup>[18]</sup>从关岛海泥中筛选一株放线菌NPS008920，经鉴定属于新属Marinispora，产生3种新化合物Lipoxazolidinone A, B 和C，对葡萄球菌等多种致病菌均有抑制活性。2008年Katherine等<sup>[19]</sup>从加利福尼亚州圣地亚哥的海泥中分离出一株新放线菌NPS12745，从代谢产物中分离出一组吡咯类化合物lynamicins A-E，对G<sup>+</sup>和G<sup>-</sup>均具有抗菌活性，尤其对耐药性的MRSA和肠杆菌活性较好。

相对于海洋细菌和放线菌，海洋真菌活性成分的发现相对稍晚，到了上世纪80年代中期才开始有少量报道，第一个报道的海洋真菌抗生素是Leptosphaerin。2002年Daferner<sup>[20]</sup>从真菌*Zopfiella latipes* CBS61197中得到两个化合物Zopfiellamides A、B，其中前者对G<sup>+</sup>具有较强的抑制作用。同年Jadulco等<sup>[21]</sup>从海绵*Niphates olemda*分离到一株真菌*Curvularia lunata*，从代谢产物中得到3个化合物：cytoskyrin A, abscisic acid 和lunatin，它们对多种细菌均有抑制作用。2009年E. Dilip de Silva<sup>[22]</sup>从新泽西海域分离的真菌*Penicillium sp.* 的代谢产物中分离到化合物PF1140和Akanthomycin，前者对枯草杆菌和白色念珠菌有抗性，后者对金黄色葡萄球菌具有活性。同年Kongkiat Trisuwan等<sup>[23]</sup>从海洋真菌*Nigrospora sp.* PSU-F18中分离出Pyrone，对金黄色葡萄球菌具有抑制作用。

近年来我国对海洋真菌生物活性物质报道逐渐增多。2005年赵玲玲等<sup>[24]</sup>从3株9F系列海洋真菌中分离得到4个化合物，分别是transdehydrocurvularin, terrein, paxilline 和citreopyrone，对稻瘟病菌P22b均有不同程度的抑制活性。2007年郭江等<sup>[25]</sup>发现海洋真菌菌株M-401代谢物对藤黄八叠球菌具有较强的拮抗作用，对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、弗氏志贺氏菌和黑曲霉也有不同程度的拮抗作用。2008年谭倪等<sup>[26]</sup>从南海红树林内源真菌*Fusarium sp.* #ZZF51分离得到一金属铜络合物，该络合物对多种细菌和癌细胞均有抑制活性。邵长伦等<sup>[27]</sup>从红树林分离到一株内生真菌B77。首次从海洋真菌中分离得到的化合物3-O-methylfusarubin和Fusarubin，体外实验表明化合物对金黄色葡萄球菌具有较好抑制活性。

我国已将开发海洋生物资源列入国家自然科学基金和863计划项目。还有沿海省区和有关机构及高等院校也投入相当的资金。本实验室从厦门海域采样，筛选具有抗菌活性的海洋微生物，分离到一株具有抗菌活性的海洋小链霉菌。

## 2 海洋微生物活性产物研究意义

目前已发现的抗生素有三分之二来自于放线菌<sup>[28]</sup>,因此在海洋放线菌中寻找新型抗菌活性物质成为目前研究的热点<sup>[29,30]</sup>。海洋的特殊环境如高压、高盐、低温、贫营养或无光照等,这些造就了海洋微生物菌群的特异性,使其能够产生不同于陆生微生物的活性物质。在近年的研究中,已有近万种新的海洋天然产物被发现,这些海洋天然产物具有抗菌、抗氧化、细胞毒活性、免疫调节等作用,已成为当今世界新药研发的热点。有的药物已进入临床实验阶段或已进入临床,并取得了丰硕的成果<sup>[31]</sup>。各国学者正夜以继日的从海洋微生物中分离具有抗菌抗肿瘤等的活性物质,近年国内海洋微生物代谢产物研究取得了长足进步。国内发现新颖结构和新活性化合物的研究报道也明显增多<sup>[32,33,34]</sup>。21世纪,海洋必将成为寻找新药的重要药库。

与此同时,细菌对抗生素的耐药性是自然界的生物现象,每一种抗生素进入临床后往往伴随着耐药性产生。正常的敏感菌株也可通过变异或者基因转移而获得耐药性<sup>[35]</sup>。长期用药,乱用和不合理的用药可能导致细菌产生耐药性。多重耐药菌的出现,如耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌、耐甲氧西林的表皮葡萄球菌、耐青霉素的肺炎链球菌、耐万古霉素的肠球菌等,给人类健康带来极大的威胁。在我国,2001年住院感染耐甲氧西林金黄色葡萄球菌和耐甲氧西林表皮葡萄球菌的检出率高达37.4%和33.8%<sup>[36]</sup>。目前严重的耐药情况除了应该规范合理用药以外,还应加快新的抗生素研发。由于全球化一体化进程和城市化进程,带来人口流动加剧,更容易导致感染性疾病的全球蔓延。近来非典型性肺炎和H5N1流感病毒就是两个典型的例子。由于近年来从海洋微生物筛选出新的活性化合物的几率相对较高,因此致力于研究海洋微生物活性产物显得意义重大。

## 3 海洋微生物活性产物的研究方法

### 3.1 海洋微生物活性物质分离筛选方法

#### 3.1.1 高通量筛选法

从不同海域采集的大量生物和非生物样品,必须经过分离才能得到各种微生物菌株,对这些微生物菌株需要进行大通量的活性筛选以得到产生次生代谢产物的活性菌株。这需要耗费大量的时间和精力才有可能得到有价值的菌株,因此需要建立一套行之有效的快速分离筛选方法,目前常用快速有效的自动化高通量药物筛选方法(HTS)或快速分子筛选方法进行筛选。高通量筛选是目前药物筛选的主流技术,它是以多孔板为载体,用高密度、微量自动化加样的方法,快速和平行地测试标靶对化合物的结合能力或生物学活性。将高通量筛选技术运用于放线菌次生代谢产物的筛选,可极大地

提高筛选效率,加速发现新先导化合物的进程.所以可利用HTS技术研究先导化合物和衍生物的转运、代谢、毒性和作用机理,很快确定治疗药物的候选物,提高药物研制和开发的效益<sup>[37,38]</sup>.HTS常用筛选模型有抗氧化模型<sup>[39]</sup>,乙酰胆碱脂酶(AchE)抑制剂模型<sup>[40]</sup>,一氧化氮合酶(NOS)抑制剂实验模型<sup>[41]</sup>,晚期糖基化终产物(AGEs)模型等.

### 3.1.2 宏基因组筛选新活性物质<sup>[42,43]</sup>

由Davies等所创导的宏基因组工程技术<sup>[44]</sup>,为Handelsman等<sup>[45]</sup>系统归纳后,提出了宏基因组(metagenome)的概念,泛指某一自然环境中全部微生物的基因组群.其研究策略克服了绝大多数环境微生物难于通过一般实验室分离培养的现实.宏基因组药物研究平台,是将海洋某个小的生态系统中的全部基因组,通过基因工程的方法克隆到可培养的宿主细胞中,建立宏基因组文库.文库中包含该小生态系统中微生物(可培养的和不可培养的微生物)全部基因,从而在该文库中筛选活性物质和以及相关基因,克服了微生物培养的难题,扩展了微生物资源的利用空间,增加了获得新的生物活性物质的机会<sup>[46]</sup>.

### 3.1.3 其他筛选方法

随着对研究的深入,不断出现新的筛选方法.定向筛选可以筛选到高度选择性的低毒性的抗生素,克服病原菌的耐药性.杨隽等人以脂磷壁酸为靶点的新抗筛选模型筛选与糖肽类抗生素无交叉耐药性的新抗生素<sup>[47]</sup>,依此模型,从1200株放线菌中筛选出2株阳性菌株.还有以几丁质酶为靶标筛选其抑制剂来筛选抗真菌药物,以支原体模型来筛选作用于细菌细胞壁的抗生素.而化学筛选<sup>[48]</sup>是基于这样的一个假说:新结构的化合物必然有令人感兴趣的生物活性.对大量化合物通过薄层色谱建立数据库,然后对未知的化合物的薄层色谱(TLC)输入数据库予以分析.

## 3.2 海洋微生物天然活性物质走向产业化的难题<sup>[49]</sup>

一种新化合物的发现需要付出大量的前期工作积累,而一种新化合物要从实验室,走向产业化更需要付出几年甚至几十年的不懈努力.仅临床前研究,实验室研究阶段就面临着产活性新化合物的各种海洋微生物不易培养和有效成分含量偏低,活性成分不易萃取分离纯化等一系列的难题.根据相关报道,目前可培养的海洋微生物仅占全部海洋微生物的1%,这些可培养的海洋微生物又面临着菌种退化,基因突变等一系列难题.在人工培养条件下,生物的生长环境与海洋源生态环境差异巨大,经过若干代继代培养或长时间菌种保存,某些活性菌株可能不再产生的活性化合物.海洋微生物次生代谢产物的含量偏低,这不利于今后工业化生产.再者,微生物发酵产物成分相当复杂,如何从复杂体系中高效大批量的萃取、分离、纯化目标活性化合物也是目前面临的难题.这些都直接影响到新的活性化合物的应用前景和工业化道路.目前,可采用一系列生物技术和化学合成方法如基因工程、发酵工程,有机合成等来解决新药研发过程临床前研究中所面临的问题,从而缩短从实验室到产业化的过程.

## 4 海洋微生物活性产物的开发和应用展望

随着经济社会的发展和科学技术的进步,人类在医学方面的研究已经深入到分子领域,然而新的感染性疾病的发生及耐药菌株的大量的出现,成为严重威胁人类健康的杀手。人类目前的最后一道应对严重感染新疾病的抗生素——万古霉素也受到了耐药菌株的挑战。面临此种境地,人类不得不寻求新的抗生素来以应对不断产生的耐药菌株。然而,传统抗生素来源——陆地土壤中的放线菌,已经被人类利用殆尽。人类不得不寻找新的药物来源,20世纪60年代来自海洋的新发现,打开了寻找新的活性化合物的的大门,人们将目光着眼于广袤的海洋,“下海”成为各国学者热衷的研究议题。虽然最近几十年从海洋中发现了很多天然活性物质,然而这仅仅是冰山一角。海洋中存在着令人难以估量的生物资源和药用资源。据统计,目前可被培养的海洋微生物仅占全部海洋微生物总数的1%,绝大多数的海洋微生物仍然不被人们所了解。他们是否产生新的活性物质?是否产生的次生代谢产物对人类疾病特别是目前医学难题的疾病存在着特效?带着这些疑问和美好憧憬,全球各国的研究人员正夜以继日的研究、开发和利用海洋微生物资源,以期获得对人类进步和健康事业具有深远影响的新化合物。令人欣慰的是各国政府对海洋微生物资源的研究和开发经费支持正在逐年增加,全球医药巨头也“虎视眈眈”投入巨资进行研发,加快新化合物的发现和新药的研发。海洋的独特生态环境造就了许多结构新颖的天然产物并包含了新的活性功能。未来,研究的方向将趋向于对目前不可培养的微生物领域;人工条件下模拟海洋原生态环境;活性产物的大通量筛选模型的建立和全天候自动化的筛选等领域。形成多学科相互渗透,联合攻关,并促进产学研一体化,使得海洋微生物天然产物的开发、应用进入新天地。

# 1 引言

## 1.1 研究意义与理论依据

目前, 许许多多的来自链霉菌的抗生素被发现, 而且这些发现被认为仅仅是冰山一角<sup>[50]</sup>。这说明在今后需要继续进行深入研究。对于抗生素的研究, 最重要的是探索可能发现潜在有用生物新领域<sup>[51]</sup>。在发展中国家, 感染性疾病仍然是导致高发病率和死亡率的健康问题<sup>[52,53]</sup>。放线菌, 尤其是链霉菌属被广泛报道产生这些用于治疗 of 的抗生素<sup>[54-56]</sup>。约有70%的已知药品来源于放线菌, 这其中约有75%和60%分别用于医药和农业。从陆地上发现放线菌产生的新化合物几率逐渐减小, 而已知化合物的重复发现率在逐渐增加<sup>[57]</sup>。因此, 把来源于原始栖息地新的放线菌群体作为探索新颖具有生物活性次生代谢产物的来源变的至关重要。从20世纪60年代开始, 人们的视线逐渐从陆地转向海洋。

海洋微生物已经为研究天然产物新的专题。由于海洋环境条件与陆地环境极不相同, 加之海洋环境的极端性特点。因而, 可能会产生不同类型生物活性化合物。海洋放线菌成为日益受到重视的新生物活性次生代谢产物的潜在来源。近年来不断有新的海洋菌种及其产生新的抗菌物质的报道<sup>[58,59,60]</sup>。海洋生物资源正在成为一个正在开发的重要资源<sup>[61]</sup>。仅在过去10年间, 就有近5000种新的海洋天然产物被发现, 而大多数都分离自海洋微生物。美国、俄罗斯、日本、中国及欧洲等国家均致力于海洋资源的开发, 并发现多种结构新颖、抗菌效果显著的抗菌物质。在此背景下, 本研究主要探讨作为新型抗生素可持续来源的海洋放线菌的分离纯化, 鉴定, 培养条件优化, 抗菌物质的分离纯化和鉴定。

## 1.2 本研究拟解决的问题

采用稀释平板离法对从厦门海域采集的各种生物及非生物样品进行分离、纯化和保藏各种海洋微生物。对分离出的海洋微生物进行抗菌活性筛选, 并对各类样品中分离出的活性菌株进行统计, 分析不同样品(不同生态位点)的活性菌株分布特点。为今后进一步研究和开发利用海洋微生物资源提供第一手资料。

对筛选出的一株具有广谱抗菌活性的海洋放线菌进行菌种鉴定, 优化培养基组分和发酵条件, 并对其产生的抗菌物质理化性质进行研究, 通过发酵培养, 提取、分离、纯化、鉴定其抗菌活性物质的成分。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

#### 2.1.1 仪器设备与试剂

##### (1) 仪器设备

超净工作台	上海智城分析仪器制造有限公司
TDL-4ZA 台式低速自动平衡离心机	上海安亭科学仪器厂
TDL-LS-SOSII 立式压力蒸汽灭菌器	上海博迅实业有限公司医疗设备厂
数显培养箱	上海智城分析仪器制造有限公司
分析天平	德国赛多利斯 Sartorius
涡旋仪	林其贝尔
PHS-3C 型 PH 计	上海雷磁仪器厂
PCR 扩增仪	ABI
电泳仪	北京六一仪器厂
凝胶成像系统	上海山富科学仪器
紫外分析仪	上海精科实业有限公司
RE-52C 旋转蒸发仪	上海青浦沪西仪器厂
NAS-12 氮吹仪	合肥艾本森科学仪器有限公司
QP5050 气相色谱质谱联用仪	日本岛津公司
Nicolet 8700 傅里叶红外光谱仪	美国热电仪器公司

##### (2) 主要试剂

牛肉膏、蛋白胨、胰胨、蔗糖、葡萄糖、麦芽糖、果糖、阿拉伯糖、鼠李糖、棉子糖、甘露醇、肌醇、麦芽糖、柠檬酸三钠、酒石酸钾钠、甘油、乳糖、醋酸钠、酵母浸膏、酵母粉、可溶性淀粉、天门冬素、柠檬酸铁、脯氨酸、海藻糖、琼脂、羧甲基纤维素钠、NaCl、MgCl<sub>2</sub>、KCl、MgSO<sub>4</sub>、CaCl<sub>2</sub>、KNO<sub>3</sub>、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、FeSO<sub>4</sub>、CuSO<sub>4</sub>、ZnSO<sub>4</sub>、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NaNO<sub>3</sub>、MnCl<sub>2</sub>、NaCl、重铬酸钾、青霉素、链霉素、制霉菌素、萘啶酮酸、甲醇、乙酸乙酯、石油醚等。以上试剂均为国产或进口分装分析纯。

薄层色谱板：德国 Merck Silica gel 60 F<sub>254</sub>

葡聚糖凝胶 LH-20：美国 GE

#### 2.1.2 样品来源

本课题组从厦门及其周边岛屿于 2008.10.28 至 2008.11.3 采集各种类型的样品，共 170 个。

#### 2.1.3 菌种

抗菌活性检测指示菌：啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、大肠杆菌

(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 来源于合肥学院生物与环境工程系菌种保藏中心。

供试菌：从采集的样品中分离纯化出的细菌、放线菌和真菌。

菌株 DY2741：小链霉菌 DY2741 自厦门大屿岛海域潮间带海洋软体动物中分离。

#### 2.1.4 培养基

##### (1) 分离海洋微生物培养基

①海洋细菌：Zobell 2216E 培养基<sup>[13]</sup>：蛋白胨 5g，酵母粉 1g，磷酸高铁 0.01g，琼脂 15g，ASW (或陈海水) 定容至 1000mL，pH 7.2~7.4，加入 50 mg/mL 制霉菌素 1mL 抑制真菌生长；

##### ②海洋放线菌<sup>[62,63]</sup>：

A：改良高氏I号培养基：KNO<sub>3</sub> 1g，可溶性淀粉 20g，ASW 1000 mL，琼脂 15g，pH7.2~7.4。加入50mg/mL制霉菌素和50mg/mL的萘啶酮酸1mL抑制真菌细菌生长；

B：改良酪素培养基：水解酪蛋白 4g，KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.36g，Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 1.3g，琼脂 15g，ASW 1000mL，pH 7.2~7.4。加入0.005%的重铬酸钾抑制真菌细菌生长；

C：脯氨酸培养基：脯氨酸 5g，琼脂 15g，ASW 1000 mL pH 7.2~7.4加入50 mg/mL 制霉菌素和50mg/mL的萘啶酮酸1mL抑制真菌细菌生长；

D：改良高氏II号改良培养基：葡萄糖 1g，蛋白胨 0.5g，胰胨 0.3g，复合B族维生素 1片，琼脂 15g，pH 7.2~7.4。加入50mg/mL制霉菌素和50mg/mL的萘啶酮酸1mL抑制真菌细菌生长；

E：改良脯氨酸-海藻糖培养基：海藻糖 5g，脯氨酸1g，(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1g，复合B族维生素 1片，琼脂 15g，ASW 1000 mL pH 7.2~7.4。加入50mg/mL制霉菌素和50 mg/mL的萘啶酮酸1mL抑制真菌细菌生长；

③海洋真菌：PDA 培养基：马铃薯 200g (煮汁)，葡萄糖 20g，琼脂 15g，ASW 1000 mL，pH 自然，加入 50mg/mL 链霉素和 50mg/mL 青霉素各 1 mL。

##### (2) 测试菌培养基

①大肠杆菌、金黄色葡萄球菌：牛肉膏 3g，蛋白胨 10g，琼脂 15g，蒸馏水 1000mL，pH 7.0~7.2；

②啤酒酵母：葡萄糖 1g，KCl 1.8g，酵母浸膏 2.5g，醋酸钠 8.2g，琼脂 15g，蒸馏水 1000mL，113℃灭菌 20min；

③黑曲霉：马铃薯 200g (煮汁)，葡萄糖 20g，琼脂 15g，蒸馏水 1000mL，pH 自然。

##### (3) 发酵培养基

①海洋细菌：牛肉膏 3g，蛋白胨 10g，ASW 1000mL，pH 7.0~7.4；

②海洋放线菌(高氏 I 号液体培养基)：KNO<sub>3</sub> 1g，可溶性淀粉 20g，K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g，

MgSO<sub>4</sub> 0.5g, NaCl 0.5g, FeSO<sub>4</sub> 0.01g, ASW 1000mL, pH 7.2~7.4;

③海洋真菌(沙氏液体培养基): 蛋白胨 10g, 葡萄糖 40g, ASW 1000mL, 115℃ 灭菌 20min。

#### (4) 人工海水 (ASW)

人工海水 (ASW) 配方: NaCl 29.5g, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 2.0g, KCl 0.5g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 3.5g, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.5g, 海水微量元素 I (柠檬酸 0.6g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3.2g/L, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10.4g/L, 柠檬酸铁 1.0g/L, EDTA 0.15g/L) 5mL, 海水微量元素 II (H<sub>2</sub>BO<sub>4</sub> 2.86g/L, Na<sub>2</sub>MnO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.3g/L, MnCl<sub>2</sub> 1.81g/L, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.22g/L, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.079g/L, Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.0499g/L) 1mL, 蒸馏水 1000mL。

#### (5) 菌株 DY2741 鉴定培养基<sup>[64]</sup>

高氏I号培养基: 可溶性淀粉 20g, KNO<sub>3</sub> 1g, MgSO<sub>4</sub> 0.5g, NaCl 0.5g, FeSO<sub>4</sub> 0.01g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g, 琼脂 15g, 蒸馏水 1000mL, pH 7.2~7.4;

葡萄糖酵母膏培养基: 葡萄糖 10g, 酵母膏 10g, 琼脂 15g, 蒸馏水 1000mL, pH 7.2;

甘油天门冬素培养基: 甘油 10g, 天门冬素 0.5g, 琼脂 15g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1g, 琼脂 15g, 蒸馏水 1000mL;

葡萄糖天冬氨酸琼脂培养基: 葡萄糖 10g, 天门冬素 0.5g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g, 琼脂 15g;

克氏培养基: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1g, CaCO<sub>3</sub> 0.5g, MgCO<sub>3</sub> 0.3g, 葡萄糖 20g, NaCl 0.2g, KNO<sub>3</sub> 1g, FeSO<sub>4</sub> 0.01g, 蒸馏水 1000mL, 琼脂 15g, pH 7.2~7.4;

察氏培养基: 蔗糖 30g, NaNO<sub>3</sub> 2g, FeSO<sub>4</sub> 0.01g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g, KCl 0.5g, 琼脂 15g, 蒸馏水 1000mL, pH 7.2~7.4;

淀粉琼脂: 可溶性淀粉 10g, NaNO<sub>3</sub> 1g, MgCO<sub>3</sub> 1g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3g, NaCl 0.5g, 琼脂 15g, 蒸馏水 1000mL;

淀粉铵琼脂: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2g, 可溶性淀粉 20g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1g, 琼脂 15g, MgSO<sub>4</sub> 1g, NaCl 1g, CaCO<sub>3</sub> 3g, 蒸馏水 1000mL;

伊莫松 (Emerson) 培养基: 葡萄糖 10g, 酵母膏 10g, 牛肉膏 4g, 蛋白胨 4g, NaCl 2.5g, 蒸馏水 1000mL;

马铃薯浸汁培养基: 马铃薯浸出汁 1000mL, 葡萄糖 10g, 琼脂 15g, pH 7.2~7.4;

马铃薯块: 马铃薯去皮, 洗净, 切成长条状, 于试管中 115℃, 灭菌 30min; 明胶培养基: 蛋白胨 5g, 葡萄糖 20g, 明胶 200g, 蒸馏水 1000mL;

牛奶培养基: 脱脂牛奶 1000mL, CaCO<sub>3</sub> 0.02g, 间歇灭菌三次, 每次 30min;

淀粉水解培养基: 淀粉 10g, KNO<sub>3</sub> 1g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3g, MgCO<sub>3</sub> 1g, NaCl 0.5g, 琼脂 15g, 蒸馏水 1000mL, pH 7.2~7.4;

纤维素分解培养基: KNO<sub>3</sub> 0.5g, 滤纸, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g, MgSO<sub>4</sub> 0.5g, NaCl 0.5g,

蒸馏水 1000mL;

柴斯纳 (Tresner) 培养基: 蛋白胨 10g, 柠檬酸铁 0.5g, 琼脂 15g, 蒸馏水 1000mL, pH 7.2;

硝酸盐还原培养基: 蔗糖 20g,  $\text{KNO}_3$  1g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5g,  $\text{MgSO}_4$  0.5g,  $\text{NaCl}$  0.5g, 琼脂 15g, 蒸馏水 1000mL;

普戈二氏 (Pridham&Gottlieb) 培养基:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2.64g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.38g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  5.65g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1g,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.0064g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.0011g,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.008g,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.0015g, 琼脂糖 15g, 蒸馏水 1000mL。

## 2.2 方法

### 2.2.1 海洋微生物分离方法

取海沙、海泥1g, 放入5mL Eppendorf管, 加入3mL无菌水, 涡旋震荡1min, 再用无菌水按十倍稀释法稀释成两个梯度。

海蟹, 海贝, 海洋软体动物等用玻璃棒在试管中捣碎, 挑取约1g, 放于无菌的5mL Eppendorf管, 加3 mL无菌水涡旋振荡1min, 再用无菌水按十倍稀释法稀释成两个梯度。

海水样品, 将1片滤纸放入5mL Eppendorf管, 加3mL无菌水涡旋振荡1min依照上述方法稀释成两个梯度。

分别吸取不同浓度的样品200 $\mu\text{L}$ , 涂布于相应的平板, 细菌于37 $^\circ\text{C}$ 培养3 d, 放线菌28 $^\circ\text{C}$ 培养7d~10d, 真菌28 $^\circ\text{C}$ 培养5d。从第二天起观察菌落, 用灭菌牙签挑取形态、颜色等不同的菌落进行3次划线纯化培养, 并斜面保种。细菌做革兰氏染色, 放线菌和真菌用插片法观察菌丝和孢子形态<sup>[71]</sup>。

### 2.2.2 具抗菌活性菌种初筛

#### (1) 海洋微生物发酵

①海洋细菌: 在12mL培养管装5mL牛肉膏蛋白胨液体培养基, 接种后于37 $^\circ\text{C}$ , 180r/min倾斜45 $^\circ$ 放置, 摇床培养3d;

②海洋放线菌: 在装5mL高氏I号液体培养基, 接种后于28 $^\circ\text{C}$ , 180 r/min, 倾斜45 $^\circ$ 放置, 摇床培养5d;

③海洋真菌: 在12mL培养管中装5 mL沙氏液体培养基, 接种后于28 $^\circ\text{C}$ , 180 r/min, 倾斜 45 $^\circ$  放置, 摇床培养5d。

#### (2) 发酵液抗菌活性筛选方法: 滤纸片法。

### 2.2.3 抗菌活性测定<sup>[65]</sup>

#### (1) 指示菌平板的制备

将测试菌接种于相应的斜面培养基上, 37 $^\circ\text{C}$ 培养 24h。取新鲜培养的指示菌斜面用 0.85%的生理盐水洗下, 并将其稀释至  $10^9/\text{mL}$  的菌悬液 (使用分光光度计, 波长

650nm, 控制透光率为 20%)。取 5mL 经调整到合适浓度的指示菌悬液, 同 100mL 冷却至 60℃的相应的指示菌培养基充分混合, 倾注于平皿中。

### (2) 滤纸片法

滤纸片法是将抗菌药物吸收到特定的滤纸片中, 然后置于已接种待测定菌的固体培养基上, 抗菌药物通过向平板四周扩散, 抑制敏感菌株的生长, 从而出现抑菌圈。由于药物扩散的距离越远, 达到该距离的药物浓度越低, 故可以根据抑菌环的大小。

用蘸取发酵液的滤纸片 (直径 7mm, 灭菌) 贴在指示菌平板上, 每个平板贴六个。倒置放置于培养箱培养, 细菌 37℃培养 24h, 黑曲霉、酵母 28℃培养 48h, 用游标卡尺量取抑菌圈直径, 并记录。

### (3) 管碟法

测定时, 将规格完全一致的不锈钢小管 (牛津杯) 放置于指示菌平板上, 并在牛津杯中加入发酵液或萃取液。于是, 抗菌物质就自牛津杯处向平板四周扩散, 在抑菌浓度所达范围内的指示菌生长被抑制而出现抑菌圈。在一定范围内, 抗菌物质的浓度与抑菌圈直径呈线性关系。将制作好的平板放入相应温度下培养一定时间, 观察并记录结果。

## 2.2.4 放线菌 DY2741 的鉴定

### (1) 放线菌DY2741的形态观察

取28℃插片培养7~14d的菌株DY2741, 在光学显微镜下参考《链霉菌鉴定手册》和《伯杰细菌鉴定手册》的鉴定流程进行<sup>[64,66]</sup>, 观察并记录气生菌丝、基内菌丝、孢子丝的形态特征。

### (2) 放线菌DY2741培养特征

将菌株DY2741分别接种在11种链霉菌鉴定培养基上28℃培养7~14d, 观察记录生长情况, 基内菌丝、气生菌丝和可溶性色素的颜色。颜色记录参考《链霉菌鉴定手册》<sup>[64]</sup>。

### (3) 放线菌DY2741生理生化特征<sup>[64,66]</sup>

**明胶液化:** 将菌株穿刺接种在明胶中, 置28℃培养, 于5、10、20、30天, 分别观察并记录明胶液化程度。在观察前, 将菌种试管放置于冰箱30min后取出, 如明胶呈固体状则说明菌株不能液化明胶; 若有液体出现则说明菌株液化明胶。

**牛奶凝固与冻化:** 将菌种接在脱脂的牛奶中。置于28℃下培养, 经3、6、10、20、30天观察一次, 如有凝块形成则为凝固现象, 同时观察酪蛋白被水解成透明或半透明的液体即为冻化现象。

**淀粉水解:** 主要是测定淀粉酶的活性大小。将菌株接在淀粉琼脂平板上。10天后测定其淀粉酶的活性。将碘液滴在淀粉琼脂平板上。如菌落的周围呈现透明圈时则表明菌种产生淀粉酶。透明圈的大小表示淀粉酶活性的强弱。若菌落周围染为蓝色, 不

出现透明圈时，说明菌种未产生淀粉酶。

纤维素上生长：将菌种接在试管中一半浸在无碳源合成溶液内的滤纸条上，28℃培养。生长30天时观察结果，如菌株在纸条上能生长和分解纸条时，表明菌种产生纤维素酶，若菌株在纸条上不能生长则证明菌株不产生纤维素酶。

H<sub>2</sub>S产生：将菌种接在柴斯纳（Tresner）培养基上，一周左右观察结果，如培养基产生黑色素。则表示菌种产H<sub>2</sub>S。

碳源利用：在无碳源的普戈二氏（Pridham&Gottlieb）基础培养基上分别加入葡萄糖、蔗糖、果糖、阿拉伯糖、木糖、棉子糖、甘露醇、肌醇、鼠李糖国际链霉菌计划规定的9种碳源以及实验室常用的麦芽糖、柠檬酸三钠、酒石酸钾钠、甘油、醋酸钠、乳糖6种碳源，将菌种分别点接在上述15种碳源利用培养基中，28℃培养，7~14d观察生长情况。

### 2.2.5 放线菌 DY2741 分子鉴定

#### (1) 基因组 DNA 的提取：

自新鲜的斜面培养基中挑取菌体于 10μL 灭菌水中裂解（条件：99℃，10min）10000r/min 离心取上清作为 DNA 模板

#### (2) 16S rDNA 的 PCR 扩增：

引物的序列如下：

引物 1：5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

引物 2：5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'

50μL PCR 反应体系中含有：

灭菌 ddH <sub>2</sub> O	23μL
*PCR Premix	25μL
引物 1 (20pmol/μL)	0.5μL
引物 2 (20pmol/μL)	0.5μL
DNA 模板	1μL

\*PCR Premix 中含有 TaKaRa Ex Taq、反应用 Buffer、dNTP Mixture 等。

PCR 反应参数：

94℃ 预变性	5 min	} 30 个循环
94℃ 变性	1 min	
55℃ 复性	1 min	
72℃ 延伸	1.5min	
72℃ 延伸	5 min	

PCR 反应结束后，使用 1%琼脂糖制凝胶(含 EB 0.5μg/mL)，取 5μL PCR 产物与 1μL 上样缓冲液混匀后上样，用 1×TAE 电泳缓冲液，90V 电泳 30~40min。在 254nm

紫外灯下观察结果。

### (3) 16S rDNA 测序

PCR产物纯化后由Takara公司测序。

### (4) 系统进化树的构建

将所测得的16S rDNA序列与GenBank数据库中的已有序列进行Blast分析,根据序列同源性从高到低的次序选取模式菌株的序列,采用ClustalX进行序列分析并用MegAlign软件中Neighbor-Joining算法构建系统发育树,以确定该菌株的分类地位。

## 2.2.6 菌株 DY2741 发酵培养基优化

### (1) 培养介质对抗菌物质抑菌效果影响

分别选用陈海水、ASW、超纯水、自来水、2% NaCl、4% NaCl、6% NaCl、8% NaCl、10% NaCl、12% NaCl、14% NaCl配制高氏I号液体培养基。摇床发酵后,采用管碟法以金黄色葡萄球菌为指示菌测量抑菌活性,以确定不同培养介质对小链霉菌DY2741产抗菌物质的影响。

### (2) 碳源对抗菌物质抑菌效果的影响

在选用2%的NaCl配制高氏I号液体培养基基础上,分别选用质量浓度1%的可溶性淀粉、蔗糖、麦芽糖、乳糖、葡萄糖、酒石酸钾钠,柠檬酸钠作为碳源,取代高氏I号液体培养基中的碳源,摇床发酵,采用管碟法以金黄色葡萄球菌为指示菌测量发酵液的抑菌活性。确定最佳碳源。

通过碳源筛选实验确定可溶性淀粉为最佳碳源。在高氏I号液体培养基中添加不同浓度的可溶性淀粉,摇床发酵,采用管碟法测活,以确定可溶性淀粉的最适浓度。

### (3) 氮源对抗菌物质抑菌效果的影响

为了确定不同氮源对小链霉菌DY2741产抗菌物质的影响,在优化后培养基上分别用1%的KNO<sub>3</sub>、NaNO<sub>3</sub>、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、酵母粉、蛋白胨、牛肉膏、黄豆粉取代高氏I号培养基中氮源,摇床发酵,采用管碟法以金黄色葡萄球菌为指示菌测量发酵液的抑菌活性。

通过上述实验确定NH<sub>4</sub>Cl为最佳氮源,以质量浓度1%的可溶性淀粉为标准,改变氮源NH<sub>4</sub>Cl的浓度,摇床发酵,管碟法测定活性,以确定NH<sub>4</sub>Cl的最适浓度。

### (4) 响应面设计确定培养基组成

在上述实验的基础上,为了获得菌株DY2741液体发酵培养基的最适组成,根据Box-Behnken中心组合试验设计原理,以抑菌圈直径为响应值,对可溶性淀粉浓度、氯化铵浓度、NaCl浓度进行三因素三水平的响应面实验分析。

## 2.2.7 菌株 DY2741 发酵条件优化

### (1) 起始 pH 对抗菌物质抑菌效果的影响

将优化后培养中用1mol/L NaOH和1mol/L HCl分别调节初始pH至3.0, 5.0, 7.0,

9.0, 11.0, 摇瓶发酵, 采用管碟法以金黄色葡萄球菌为指示菌测量发酵液的抑菌活性。

(2) 接种菌龄对抗菌物质产量的影响

取培养 12h、24h、36h、48h、72h 的种子培养基, 按 5% 的接种量接种于发酵培养基中进行发酵, 采用管碟法以金黄色葡萄球菌为指示菌测量发酵液的抑菌活性。

(3) 接种量对抗菌物质抑菌效果的影响

将培养48h种子培养基, 分别按2%, 4%, 5%, 8%, 10%接种量接种到发酵培养基中, 采用管碟法以金黄色葡萄球菌为指示菌测量发酵液的抑菌活性。

(4) 装液量对抗菌物质抑菌效果的影响

在250mL三角瓶中分别装入体积为30mL, 50mL, 70mL, 90mL, 100mL液体发酵培养基, 摇床发酵后, 采用管碟法以金黄色葡萄球菌为指示菌测量发酵液的抑菌活性。

(5) 发酵温度对抗菌物质抑菌效果的影响

将接种后发酵液于22℃, 25℃, 28℃, 31℃, 34℃, 37℃, 摇床培养, 采用管碟法以金黄色葡萄球菌为指示菌测量发酵液的抑菌活性。

(6) 抗菌物质产生的时间研究

为了研究菌株DY2741抗菌物质产生时间, 以优化后的培养基, 初始pH 7.0, 6%的接种量, 28℃, 180r/min摇床培养2~6d, 采用管碟法以金黄色葡萄球菌为指示菌测量发酵液的抑菌活性。

## 2.2.8 抗菌物质稳定性研究

(1) UV稳定性

取5mL菌株DY2741的发酵上清液5份, 加入无菌平皿中, 铺成约5mm薄膜, 无菌条件下用紫外灯分别照射1、6、12、24 h, 以未经紫外线照射的发酵液为对照。采用管碟法以金黄色葡萄球菌为指示菌测其抑菌活性。

(2) pH稳定性

取5mL菌株DY2741的发酵上清液8份用1mol/L NaOH溶液和1mol/L HCl溶液调节发酵液的pH分别为4、5、6、7、8、9、10、11, 用管碟法以金黄色葡萄球菌测定不同pH处理的发酵液的抑菌活性。

(3) 热稳定性

取5mL菌株DY2741的发酵上清液分别放置于40℃, 60℃, 80℃, 100℃, 121℃烘箱处理30min, 以室温放置做对照。用管碟法以金黄色葡萄球菌为指示菌测其抑菌活性。

## 2.2.9 抗菌谱测定

选择金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、啤酒酵母、白假丝酵母、黑曲霉作为测试菌。分别将上述测试菌制成菌悬液(菌悬液制备见 2.2.3 节), 涂布在相应

平皿。以管碟法分别测其抑菌活性。黑曲霉在 PDA 平板中点接，在距离其 1cm 处用牛津杯测发酵液对其抑制作用。

#### 2.2.10 抗菌物质的溶解性质以及分离、纯化和鉴定

##### (1) 抗菌物质在不同溶剂中的溶解性测定

取发酵上清液 16 份，每份 10mL，经真空冷冻干燥成粉后，分别加入无菌水、甲醇、正丁醇、乙酸乙酯、二氯甲烷、石油醚各 1mL 萃取 24h，以各个纯溶剂为对照。按 2.2.3 制备指示菌平板，采用管碟法以金黄色葡萄球菌和大肠杆菌为指示菌测定抑菌活性并记录抑菌结果，所有实验重复 3 次。

##### (2) 不同 pH 值下不同萃取剂的萃取实验

取发酵上清液 14 份，每份 20mL，分别调节发酵液 pH 至 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0，加入等量的乙酸乙酯，充分混匀，静置萃取过夜。采用管碟法以金黄色葡萄球菌和大肠杆菌为指示菌分别检测有机相和下层水相 (pH 调回 7.0) 的抑菌活性，设纯溶剂为对照组。用游标卡尺测量抑菌圈直径并记录抑菌结果，所有实验重复 3 次。

##### (3) 发酵液的萃取实验

取发酵液上清，调整 pH 至 7.0，用等体积的乙酸乙酯萃取三次，合并萃取液以旋转蒸发仪浓缩、氮吹仪吹干，加入少量甲醇溶解后用 0.22 $\mu$ m 的尼龙微孔滤膜过滤备用。

##### (4) 葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱分离

将经萃取处理的浓缩液进行葡聚糖凝胶色谱分离，所用色谱分离介质为 Sephadex LH-20(柱床  $\Phi$  2.6cm $\times$ 100cm)，以 4% 上样体积进行凝胶柱层析。洗脱液组成为甲醇:水(6:4, V/V)，流速为 1mL/min，每管收集 7mL。通过薄层色谱法 (TLC) 分析，合并相同组分并减压浓缩，冻干，适量甲醇溶解。采用管碟法以金黄色葡萄球菌和大肠杆菌为指示菌检测洗脱液的抗菌活性。

##### (5) 活性成分分析

薄层色谱分析：展开剂为石油醚:乙酸乙酯:甲醇=3:1:0.5，UV254<sub>nm</sub> 显影、荧光显影和茴香醛显色。

GC-MS 分析：毛细管色谱柱型号为 Rtx-5ms(长度 30m， $\Phi$ 0.25mm，固定液厚度 0.25 $\mu$ m)，柱温程序：初始升温 150 $^{\circ}$ C，保持 4min，以 4 $^{\circ}$ C/min 升温到 250 $^{\circ}$ C，保持 10min<sup>[67]</sup>，进样量 5 $\mu$ L，全扫描(SCAN)测定方式的扫描范围 40-400m/z。样品分析前经 0.22 $\mu$ m 尼龙微孔滤膜过滤。

傅里叶红外变换光谱分析：将 1mg 样品加入到干燥的 KBr 晶体粉末中，压片后再转移至窗片中央直接测定。样品测定前先用 KBr 晶体粉末做空白实验测定，样品实测的 FTIR 均需扣去空白峰，以消除空气中水汽影响。分辨率：4cm<sup>-1</sup>，扫描次数：

32 次, 增强因子: 1.8, 半峰宽:  $20.2\text{cm}^{-1}$ 。

### 3 结果与分析

#### 3.1 海洋微生物分离与具抗菌活性菌种筛选

##### 3.1.1 细菌分离与抗菌活性菌种初筛统计分析

按照菌落形态学上的差异共分离出了57株细菌；其中G<sup>-</sup>细菌约占65%，G<sup>+</sup>细菌约占35%，其中G<sup>-</sup>细菌以球菌和杆菌为主。林永成等人<sup>[68]</sup>报道从近海采集的样品分离出的细菌以G<sup>-</sup>为主，而从深海域分离的细菌则以G<sup>+</sup>为主，这与本实验的结果基本一致。

各类样品分离的细菌和抗菌活性初筛统计结果见表3-1。共计筛选出具有抗菌活性的细菌17株，占总细菌株数的29.8%。从不同类型样品中分离细菌株数差异大，从海水样本中分离到的细菌株数较多；海贝样品中分离的细菌数次之，其他样品中分离到的细菌数相对较少。对各类样品中分离到的具有抗菌活性的细菌进行比较，从海水、海贝中分离得到的具有抗菌活性细菌株数的比例较高分别达69.2%和45.5%。

表 3-1 海洋细菌抗菌活性初筛结果统计

Tab.3-1 Isolation results of antibacterial activity of marine bacteria

样品类型	分离细菌数	具有抗菌活性的细菌	
		数量	具抗菌活性细菌所占比例
海水	13	9	69.2%
海沙	6	0	0
礁石	5	1	20.0%
海蟹	4	1	25.0%
海螺	3	1	33.3%
海藤	3	0	0
海贝	11	5	45.5%
合计	57	17	29.8%

表3-2是按抗菌谱的类型进行统计，多数细菌表现出金黄色葡萄球菌的抗菌活性，其抗菌活性菌株数占活性菌种总数比例分别64.7%，其次为大肠杆菌，具有对啤酒酵母和黑曲霉具有抗菌活性的菌株则相对较少，为17.6%。

表 3-2 具有抗菌活性的细菌菌株抗菌特异性

Tab.3-2 Antimicrobial specificity of bacteria with antibacterial activity

测试菌	啤酒酵母	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	黑曲霉
抗菌活性细菌株数	3	11	8	3
占活性菌株数比例	17.6%	64.7%	47%	17.6%

### 3.1.2 放线菌分离与抗菌活性菌种筛选统计分析

分离和具抗菌活性放线菌初筛结果统计见表3-3、表3-4，共分离出17株海洋放线菌。17株放线菌中具有抗菌活性的有12株，约占70.5%；形态学鉴定，约60%的菌株为链霉属，另有诺卡氏菌属等稀有放线菌属。活性初筛结果显示具有对大肠杆菌抗菌活性比例较高，且活性较强；且有58.3%的比例的放线菌对黑曲霉具有抗性，但抗性偏弱。

表 3-3 海洋放线菌抗菌活性初筛结果统计

Tab.3-3 Isolation results of antibacterial activity of marine actinomycetes

样品类型	分离放线菌数	具有抗菌活性的放线菌	
		菌数量	所占比例
海水	4	3	75.5%
海沙	5	4	80.0%
海蟹	1	0	0
海螺	2	1	50.0%
海贝	5	4	80.0%
共计	17	12	70.5%

表 3-4 具有抗菌活性的放线菌抗菌特异性

Tab.3-4 Antimicrobial specificity of actinomycetes with antibacterial activity

测试菌	酿酒酵母	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	黑曲霉
抗菌活性放线菌数	3	9	8	7
占活性菌株数比例	25%	75%	66.7%	58.3%

### 3.1.3 真菌分离与抗菌活性菌种筛选统计分析

共分离出128株海洋真菌，经过初步鉴定筛选出41株形态学不同的真菌进行抗菌活性筛选。初步鉴定结果发现青霉属占优势，其次为曲霉属<sup>[69]</sup>，这与青霉属和曲霉属有很强的耐渗透压能力有密切的关系<sup>[70]</sup>。海水，海沙等样品中分离分离的株数明显多于其他类型（表3-5），产抗菌物质的菌株具有竞争优势。从抗不同的测试菌统计比例数来看（表3-6），抗金黄色葡萄球菌，啤酒酵母，黑曲霉的比例相当，均达35%，且活性强。抗大肠杆菌菌株数相对较少，仅占15%。

表 3-5 海洋真菌抗菌活性初筛结果统计

Tab.3-5 Isolation results of antibacterial activity of marine fungi

样品类型	分离真菌数	具有抗菌活性的真菌	
		菌数量	具抗菌活性真菌所占比例
海水	16	7	43.8%
海沙	11	6	54.5%
海贝	7	4	57.1%
朽木	3	1	33.3%
海蟹	3	1	33.3%
共计	41	20	48.8%

表 3-6 具有抗菌活性的真菌菌株抗菌特异性

Tab.3-6 Antimicrobial specificity of fungi with antibacterial activity

测试菌	啤酒酵母	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	黑曲霉
拮抗真菌株数	7	7	3	7
拮抗真菌所占比例	35%	35%	15%	35%

### 3.2 放线菌 DY2741 鉴定

#### 3.2.1 菌株 DY2741 形态观察

放线菌接种于高氏 I 号培养基，28℃ 培养 7 天，500 倍光学显微镜观察。气丝粉白色，基丝褐黄色，孢子丝呈典型柔曲。（见图 3-1）。

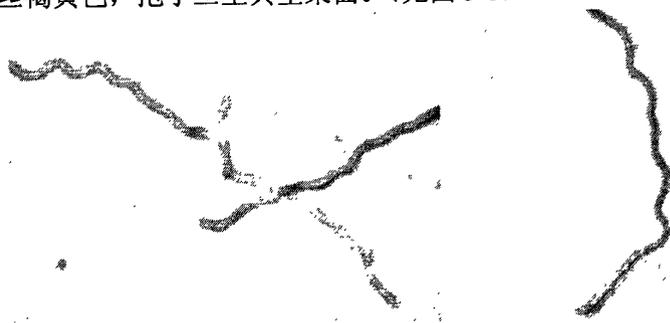


图 3-1 孢子丝形态

Fig. 3-1 Spore chain structure of strain DY2741

#### 3.2.2 菌株 DY2741 培养特征

在这些培养特征培养基上菌株气生菌丝多为黄灰至粉白，基内菌丝褐黄至红色，部分产生粉红色素；该菌株在高氏 I 号合成培养基、马铃薯块培养基、马铃薯浸汁培养基、艾默森培养基、淀粉铵琼脂、克氏培养基、淀粉琼脂上生长良好，气生菌丝茂盛，在葡萄糖酵母膏培养基、察氏培养基上生长适中，在葡萄糖天门冬培养基、甘油

天门冬素培养基上生长差。在各种培养基上基丝、气丝颜色及产可溶性色素情况见表3-7。

表 3-7 菌株 DY2741 的培养特征

Tab.3-7 Culture characteristics of strain DY2741

培养基	生长情况	颜色		
		基丝	气丝	可溶性色素
高氏I号合成培养基	+++	褐黄	粉白	绛红
葡萄糖酵母膏培养基	++	金黄	灰白	-
葡萄糖天门冬培养基	+	黄	浅黄	鲜黄
甘油天门冬素培养基	+	白黄	灰白	-
马铃薯块培养基	+++	褐黄	灰白	-
马铃薯浸汁培养基	+++	土黄	黄灰	-
艾默森培养基	+++	淡黄	灰白	-
淀粉铵琼脂	+++	微褐黄	灰白	绛红
克氏培养基	+++	白黄	灰白	酒红
淀粉琼脂培养基	+++	粉色	黄灰	-
察氏培养基	++	浅黄	玫瑰白	玫瑰红

注：“+++”：生长良好；“++”：生长适中；“+”生长差

### 3.2.3 生理生化特性

从表3-8可见，菌株DY2741可以在15~42℃下，pH4~10范围内生长，能耐受 $120\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl，能水解淀粉，不能水解纤维素，液化明胶，产生黑色素，产生硫化氢，凝固和胨化牛奶，还原硝酸盐和亚硝酸盐，能利用葡萄糖、果糖、蔗糖、阿拉伯糖、鼠李糖、棉子糖、甘露醇、肌醇、麦芽糖、柠檬酸三钠、酒石酸钾钠、甘油和乳糖，不利用木糖、醋酸钠。结合形态特征、培养特征和生理生化特性，将菌株DY2741初步归类为链霉菌属(*Streptomyces* sp.) 黄色类群 (*Flavus*)。

表3-8 菌株DY2741的生理生化特性

Tab.3-8 Physiobgicaland biochem icalproperties of strain DY2741

项目	结果	碳源利用	结果
生长盐度/g/L	0-120	D-葡萄糖	+
生长温度/℃	15-42	D-果糖	+
生长pH	4-10	蔗糖	+
淀粉水	+	L-阿拉伯糖	+
黑色素产生	+	D-木糖	-
硫化氢产生	+	鼠李糖	+
亚硝酸盐还原	+	棉子糖	+
硝酸盐还原	+	D-甘露醇	+
牛奶胨化	+	肌醇	+
牛奶凝固	+	麦芽糖	+
明胶液化	+	柠檬酸三钠	+
纤维素分解	-	酒石酸钾钠	+
		甘油	+
		醋酸钠	-
		乳糖	+

注：“+”：阳性结果；“-”：阴性结果

### 3.2.3 菌株 DY2741 16S rDNA 分子鉴定

#### (1) 16S rDNA PCR 扩增

如图 3-2 所示 PCR 扩增产物约为 1500bp 的片断。

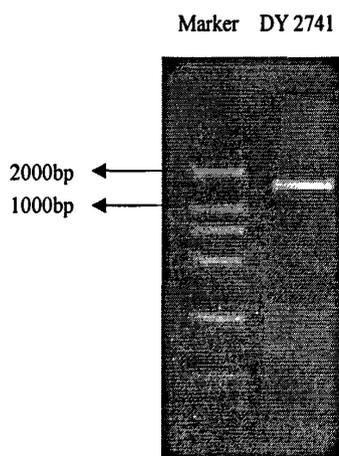


图 3-2 PCR 扩增产物电泳图

Fig.3-2 The result of PCR analysis

(2) 16S rDNA 序列测定:

使用两条通用保守引物 (27F, 1492R) 对菌株 DY2741 的 16S rDNA PCR 产物直接测序, 所得 16S rDNA 全序列如下:

```
CTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAA 48
CGATGAAACCGCTTCGGTGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACA 96
CGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTC 144
TAATACCGGATAAACTCTGTCCCGCATGGGACGGGGTTGAAAGCTCC 192
GGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAAT 240
GGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCC 288
AACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG 336
GGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAG 384
GGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGA 432
AAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAG 480
CCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTA 528
AAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTT 576
AACCCCGGGTCTGCATTTCGATACGGGCTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGA 624
GATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGTGGAA 672
CACCGGTGGCGAAAGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGC 720
GAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCG 768
TAAACGTTGGGAACTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCG 816
CAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTA 864
AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCAGCGGAGCATGTGG 912
CTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGGCTTGACATATAAC 960
GGAAAGCATCAGAGATGGTGCCCCCTTGTGGTTCGGTATACAGGTGGT 1008
GCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGC 1056
AACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGA 1104
TGGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGA 1152
CGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTA 1200
CAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATGCCGCGAGGCGGAGCGAATCTC 1248
AAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGA 1296
AGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACG 1344
TCCCCGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAAC 1392
ACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCTTGTGGGAGGGAGCTGTCGAAGGT 1440
GGGACTGGCGATTGGGGCGAAGTCGTAACAAGGTAG 1476
```

### (3) 菌株 DY2741 的全序列分析与系统进化树绘制

菌株 DY2741 的 16S rDNA 序列有 1476 个碱基, 将此 16S rDNA 序列与 GeneBank 中相关序列进行对比, 其与 *Streptomyces parvus* strain NRRL B-1455T 的序列同源性达 99%, 并构建了系统发育树。

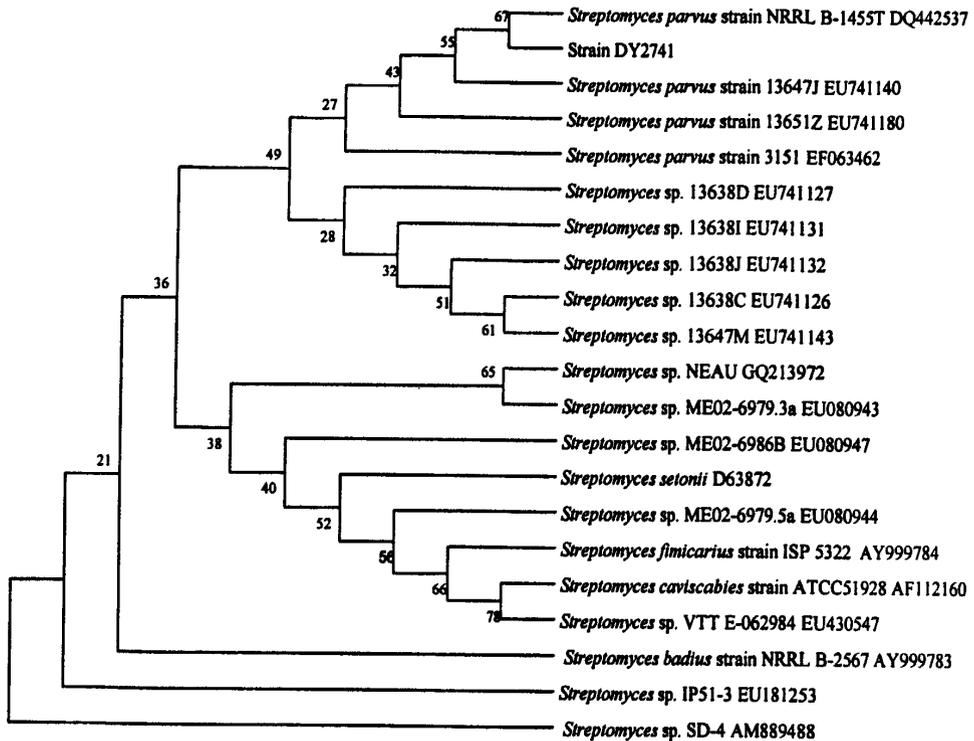


图 3-3 菌株 DY2741 的系统进化发育树

Fig. 3-3 Rooted Phylogenetic tree of Strain DY2741

据 Waksman&Henrici<sup>[66]</sup>报道, *Streptomyces parvus* 产生放线菌素 (actinomycin C) 的复合物; 显示轻度抗真菌活性; 孢子丝柔曲; 在有些培养基上形成鲜黄色基丝和扩散性色素; 耐 NaCl 能力  $\geq 10\%$ , 但  $< 13\%$ 。与菌株 DY2741 基本相符, 但部分培养特征和生化存在较大差异。因而将菌株 DY2741 初步鉴定为小链霉菌 *Streptomyces parvus* 的一株变种。

### 3.3 菌株 DY2741 发酵培养基优化

#### 3.3.1 培养介质对抗菌物质抑菌效果的影响

以陈海水、人工海水、超纯水, 自来水及不同浓度 NaCl 配置发酵培养基, 考察培养介质对抑菌效果的影响, 结果 (见图 3-4) 表明当培养介质为 2% NaCl 抑菌圈直径最高, 高于 12% NaCl 菌体停止生长, 说明菌株 DY2741 最大可耐受 12% NaCl。而培养介质为陈海水和自来水时抑菌圈直径相对较小。自来水抑菌直径最小, 从侧面证明了菌株 DY2741 的海洋特征, 与某些学者报道类似<sup>[71]</sup>。人工海水在提高菌株

DY2741 抗菌活性上比陈海水更有优势, 这可能由于陈海水中存在某些抑制成分<sup>[72]</sup>。

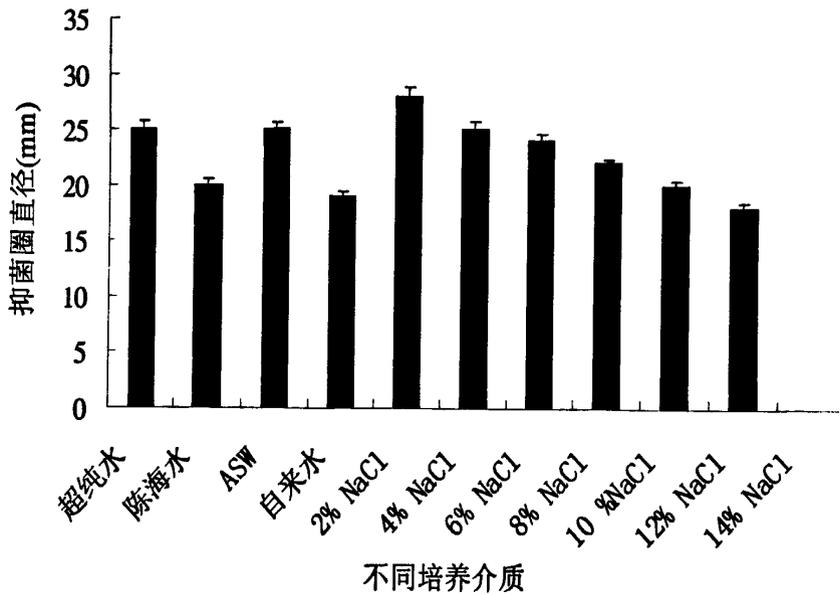


图 3-4 培养介质对菌株 DY2741 产抗菌物质的影响

Fig.3-4 Effect of different cultivate medium on antibacterial activities of strain DY2741

### 3.3.2 碳源对抗菌物质抑菌效果的影响

碳源不仅是构成细胞的基本成分, 而且还参与了很多初级和次级代谢。对实验选取的 7 种碳源进行研究, 从实验结果分析 (图 3-5) 与多糖相比单糖如葡萄糖抑菌圈直径相对偏小, 原因可能为单糖影响菌体的生长曲线以及葡萄糖分解参与次级代谢的调控。而可溶性淀粉抑菌圈直径最大, 因此选为最佳碳源。

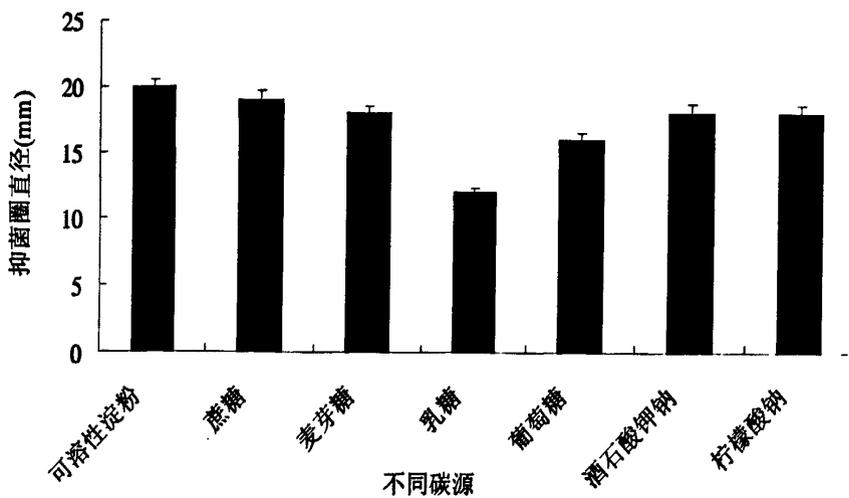


图 3-5 碳源对菌株 DY2741 产抗菌物质的影响

Fig.3-5 Effect of different carbon source on antibacterial activities of strain DY2741

碳源筛选确定可溶性淀粉为最适碳源，为了确定最适碳源的浓度，分别添加 1%，2%，3%，4%，5%可溶性淀粉，摇床发酵，测定抑菌活性。实验结果见图 3-6：添加 2%可溶性淀粉的发酵培养基抑菌圈直径最高。而高浓度的可溶性淀粉（大于 4%），则抑制抗菌物质的产生和活性。

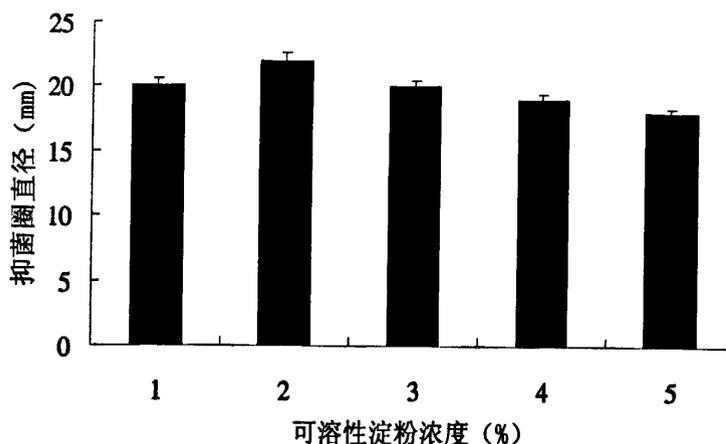


图 3-6 可溶性淀粉浓度对菌株产抗菌物质的影响

Fig.3-6 Effect of the concentration of soluble starch on antibacterial activities of strain DY2741

### 3.3.3 氮源对抗菌物质抑菌效果的影响

实验选取了常用的 4 种有机氮源和 4 种无机氮源，实验结果见图 3-7：无机氮源对抗菌物质的产生效果显著好于有机氮，这可能与有机氮源营养丰富使菌体生长长期滞留对数生长期，而不进入稳定期，不利于次生代谢产物的合成。而两种铵盐对提高菌株 DY2741 抗菌物质的产量最佳。综合考虑，选取氯化铵为最适氮源。

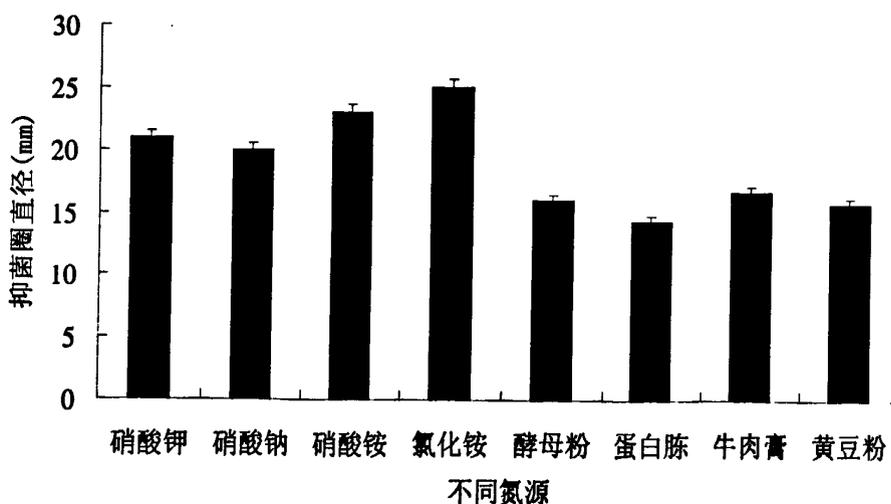


图 3-7 氮源对菌株 DY2741 产抗菌物质的影响

Fig.3-7 Effect of different nitrogen source on antibacterial activities of strain DY2741

氮源筛选确定氯化铵为最适氮源后，分别添加 0.1%，0.5%，1%，2%，3%，4%，5%氯化铵，摇床发酵，测定抑菌活性。实验结果见图 3-8：添加 0.5%的氯化铵的发酵培养基抑菌圈直径最大。而高浓度的氯化铵抑制抗菌物质的产生。

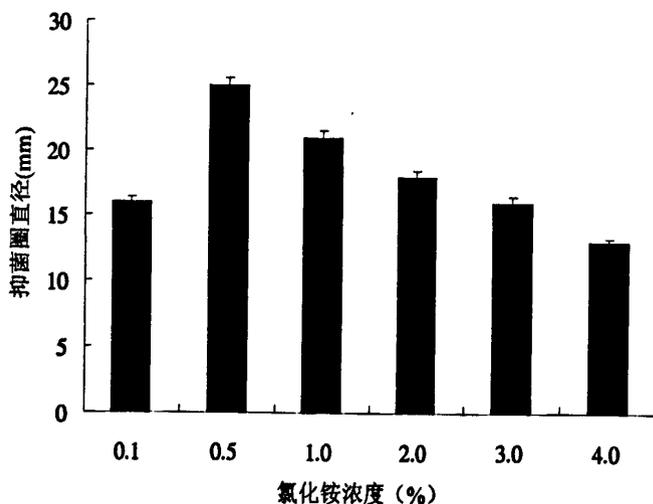


图 3-8 氯化铵浓度对菌株 DY2741 产抗菌物质抑菌效果的影响

Fig.3-8 Effect of the concentration of ammonium chloride antibiotic activities of strain DY2741

### 3.3.4 响应面设计培养基组成

响应面设计(Response surface methology, RSM)作用一种统计优化方法已成功应用于微生物培养基优化<sup>[73]</sup>。Box-Behnken设计法在先逼近最大响应区域后建立连续变量曲面模型和回归方程，并能对影响因变量的各因子水平及其交互作用进行优化与评价，可快速有效地确定多因素系统的最佳条件<sup>[74,75]</sup>。

表 3-9 Box-Behnken 设计因素及水平表

Tab. 3-12 Factors and levels in Box-Behnken central composite design

因素	编码	水平		
		-1	0	1
氯化钠 (%)	X <sub>1</sub>	1.5	2	2.5
可溶性淀粉 (%)	X <sub>2</sub>	1.5	2	2.5
氯化铵 (%)	X <sub>3</sub>	0.25	0.5	0.75

表 3-10 Box-Behnken 实验设计及结果

Tab. 3-10 Design and results of Box-Behnken central composite

Run	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Y <sub>1</sub> (mm)
1	-1	-1	0	24
2	1	-1	0	21
3	-1	1	0	21
4	1	1	0	24.5
5	-1	0	-1	24
6	1	0	-1	23.5
7	-1	0	1	22
8	1	0	1	20.5
9	0	-1	-1	22
10	0	1	-1	23.5
11	0	-1	1	21
12	0	1	1	21
13	0	0	0	27
14	0	0	0	26.5
15	0	0	0	26

表 3-10 中 X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub> 分别为氯化钠、可溶性淀粉、氯化铵的编码，Y<sub>1</sub> 为抑菌圈直径。

利用 SAS 运行表 3-10 中的实验数据，得到拟合方程：

$$Y_1 = 26.5 - 0.1875 \times X_1 + 0.25 \times X_2 - 1.0625 \times X_3 - 1.625 \times X_1 \times X_1 + 1.625 \times X_1 \times X_2 - 0.25 \times X_1 \times X_3 - 2.25 \times X_2 \times X_2 - 0.375 \times X_2 \times X_3 - 2.375 \times X_3 \times X_3$$

表 3-11 方差分析结果

Tab. 3-11 results of variance analysis

Source	DF	Master Model				Predictive Model				
		SS	MS	F	Pr > F	DF	SS	MS	F	Pr > F
X1	1	0.28125	0.28125	0.833333	0.40318	1	0.28125	0.28125	0.833333	0.40318
X2	1	0.5	0.5	1.481481	0.277852	1	0.5	0.5	1.481481	0.277852
X3	1	9.03125	9.03125	26.75926	0.003546	1	9.03125	9.03125	26.75926	0.003546
X1*X1	1	9.75	9.75	28.88889	0.003003	1	9.75	9.75	28.88889	0.003003
X1*X2	1	10.5625	10.5625	31.2963	0.002519	1	10.5625	10.5625	31.2963	0.002519
X1*X3	1	0.25	0.25	0.740741	0.428754	1	0.25	0.25	0.740741	0.428754
X2*X2	1	18.69231	18.69231	55.38462	0.000691	1	18.69231	18.69231	55.38462	0.000691
X2*X3	1	0.5625	0.5625	1.666667	0.25317	1	0.5625	0.5625	1.666667	0.25317
X3*X3	1	20.82692	20.82692	61.7094	0.000537	1	20.82692	20.82692	61.7094	0.000537
Model	9	64.14583	7.127315	21.11797	0.001837	9	64.14583	7.127315	21.11797	0.001837
Error	5	1.6875	0.3375			5	1.6875	0.3375		
Total	14	65.83333				14	65.83333			

表 3-12 回归方程偏回归系数估计值:

Tab. 3-12 Estimate value of partial regression coefficient of regression equation

Term	Master Model				Predictive Model			
	Estimate	Std Err	t	Pr >  t	Estimate	Std Err	t	Pr >  t
X1	-0.1875	0.205396	-0.91287	0.40318	-0.1875	0.205396	-0.91287	0.40318
X2	0.25	0.205396	1.217161	0.277852	0.25	0.205396	1.217161	0.277852
X3	-1.0625	0.205396	-5.17294	0.003546	-1.0625	0.205396	-5.17294	0.003546
X1*X1	-1.625	0.302335	-5.37484	0.003003	-1.625	0.302335	-5.37484	0.003003
X1*X2	1.625	0.290474	5.594309	0.002519	1.625	0.290474	5.594309	0.002519
X1*X3	-0.25	0.290474	-0.86066	0.428754	-0.25	0.290474	-0.86066	0.428754
X2*X2	-2.25	0.302335	-7.44208	0.000691	-2.25	0.302335	-7.44208	0.000691
X2*X3	-0.375	0.290474	-1.29099	0.25317	-0.375	0.290474	-1.29099	0.25317
X3*X3	-2.375	0.302335	-7.85553	0.000537	-2.375	0.302335	-7.85553	0.000537

回归方程系数差异显著性检验结果见表 3-12。表 3-12 数据显示参数 X3(P=0.003546)、X1<sup>2</sup>(P=0.003003)、X2<sup>2</sup>(P=0.000691)、X3<sup>2</sup>(P=0.000537)影响极其显著, X1与X2之间的交互作用(P=0.002519)对菌株DY2741产抗菌物质的影响极其

显著，X1、X2、X1与X3之间的交互作用、X2与X3之间的交互作用对菌株DY2741产抗菌物质的影响不显著。

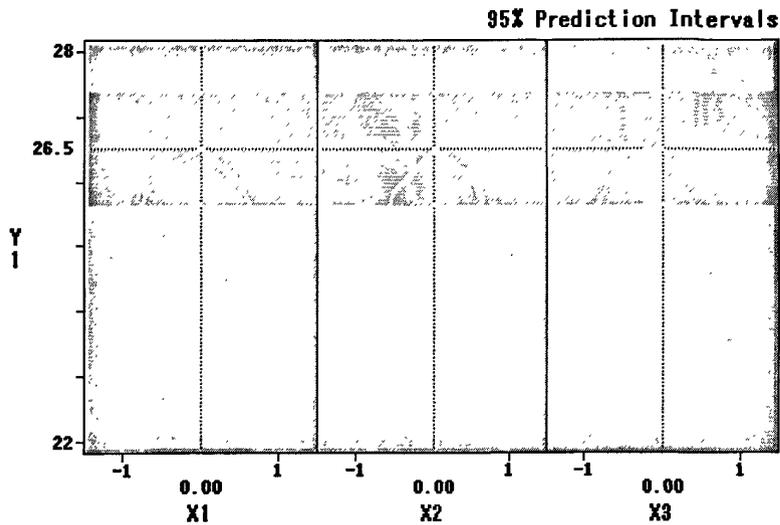


图 3-9 三个因素的试验结果预测曲线

Fig.3-9 The Forecasting the result curve of the three factors

从上图（图 3-9）中看出，此试验数据可信度达 95%。

应用 SAS 软件绘制响应曲面图（如图 3-10，3-11，3-12 所示），可以直观的反映出各因素对响应值影响的变化趋势，图示表明在所选因素水平范围内，均有最大响应值出现。

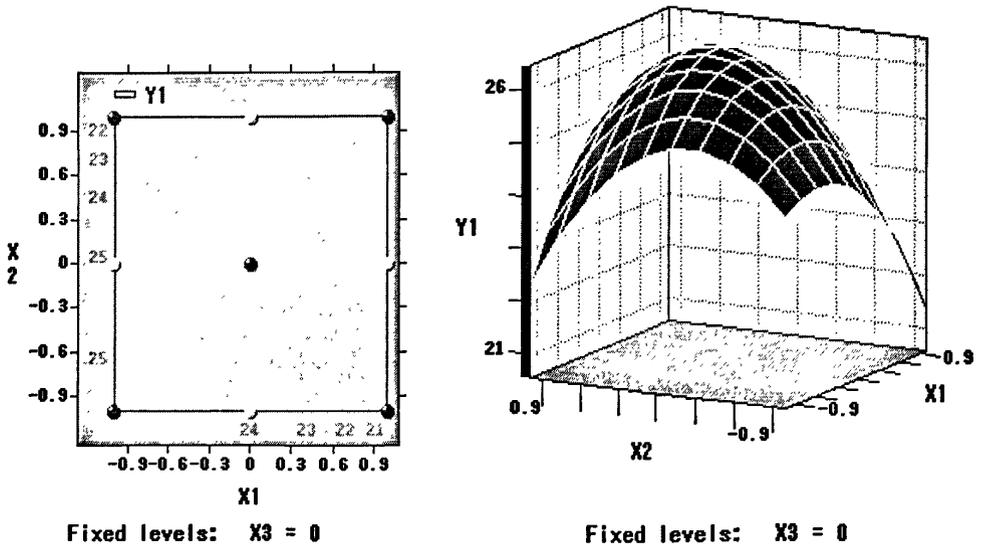


图 3-10 氯化钠和可溶性淀粉交互影响等高线图

Fig.3-10 Corresponding contour plot of NaCl and starch

如图 3-10，在本试验水平范围内，当氯化铵浓度处于中心水平时，当氯化钠编码

-0.9~0 之间时抗菌物质产量随浓度增加而增加，抑菌圈有最大值达到 26mm 以上。可溶性淀粉浓度过高，培养基中含碳源过高，放线菌产抗菌物质水平降低，其编码值在 -0.4~0.3 之间时，抑菌圈直径最大值可达到 26mm 以上。

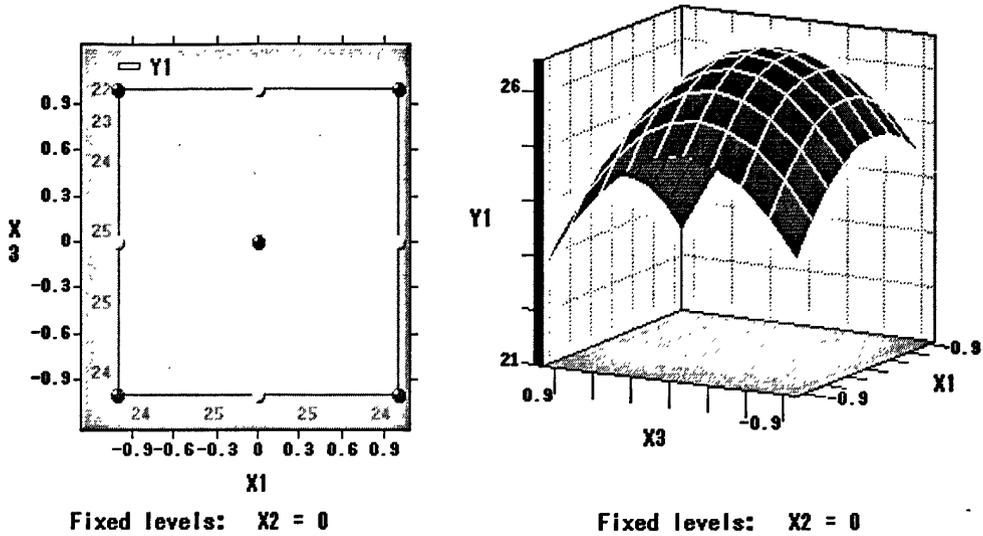


图 3-11 氯化钠和氯化铵交互影响等高线图

Fig.3-11 Corresponding contour plot of ammonium chloride and NaCl

如图 3-11，在本试验水平范围内，当可溶性淀粉浓度处于中心水平时，当氯化钠编码值-0.9~0 之间时，抗菌物质产量随着 NaCl 浓度增加而增加，抑菌圈有最大值达到 26mm 以上。氯化铵浓度过高，培养基中含氮源过高，放线菌产抗菌物质水平降低，其编码值在 -0.7~0.1 之间时，抑菌圈直径最大值也能达到 26mm 以上。

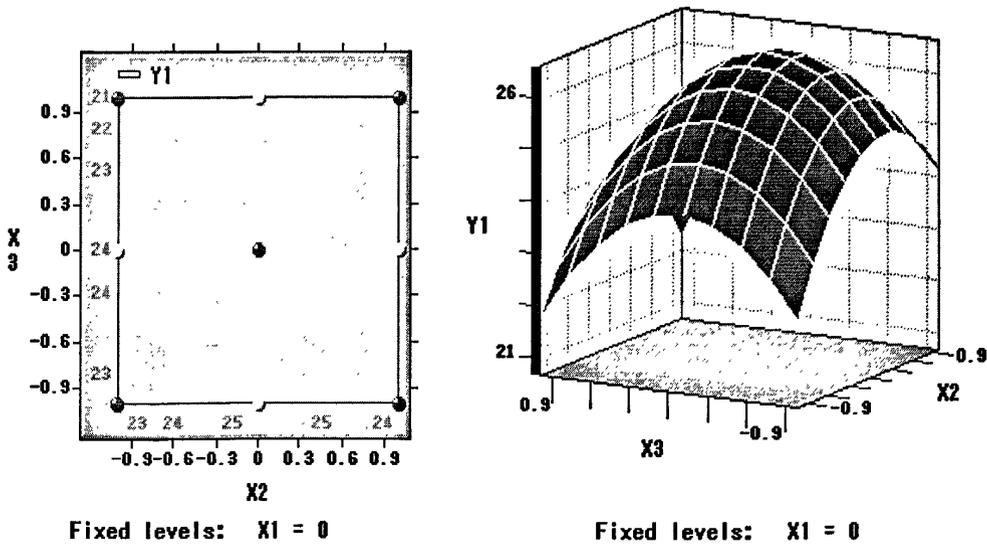


图 3-12 可溶性淀粉和氯化铵的交互影响等高线图

Fig.3-12 Corresponding contour plot of starch and ammonium chloride

如图 3-12 在本试验水平范围内, 当氯化钠浓度处于中心水平时, 当可溶性淀粉编码-0.9~0 之间时, 抗菌物质产量随着可溶性淀粉浓度增加而增加, 抑菌圈有最大值达到 26mm 以上。氯化铵浓度过高, 放线菌产抗菌物质水平降低, 其编码值在-0.8~0.2 抑菌圈最大值能达到 26mm 以上。

为了求解Y1极值, 分别对X1, X2, X3取一阶偏导, 解方程得X1=0, X2=0.07, X3=-0.23。Y1=26.6313mm, 对应的培养基成分为氯化钠2.000%,可溶性淀粉2.035%, 氯化铵0.4425%。为了验证预测值, 用以上得到的最优培养基配方重复试验3次, 结果为: 27.5 mm, 27.0 mm, 27.0 mm, 平均值为27.2 mm, 与预测值有较好的拟合性, 证明了模型的可行性。

### 3.5 菌株 DY2741 发酵条件优化

#### 3.5.1 起始 pH 对抗菌物质抑菌效果的影响

发酵液的起始 pH 影响微生物的发酵以及次生代谢产物具有显著的影响。同时也影响发酵过程中代谢酶的酶活和某些代谢途径。将发酵培养基的 pH 分别 3.0, 5.0, 7.0, 9.0, 11.0, 摇床发酵, 测定抑菌活性。实验结果见图 3-13: 当起始 pH 偏酸和偏碱时, 对抗菌物质的产生均有不利影响, 而 pH 为 7.0 对抗菌物质的产生最佳。

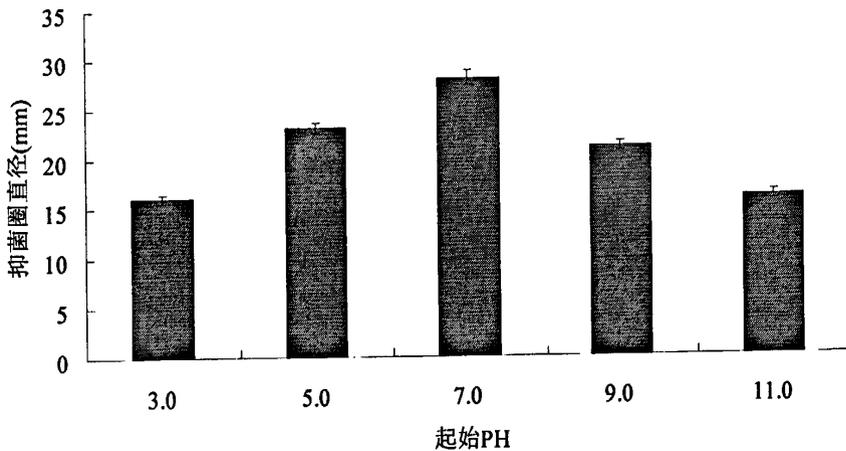


图 3-13 起始 pH 对菌株 DY2741 产抗菌物质的影响

Fig.3-13 Effect of initial pH on antibacterial activities of strain DY2741

#### 3.5.2 接种菌龄对抗菌物质产量的影响

取培养 12h、24h、36h、48h、72h 的种子培养基, 按 5% 的接种量接种于发酵培养基中进行发酵, 结果表见图 3-14: 接种菌龄在 48h 时对抗菌物质的产量最有利。

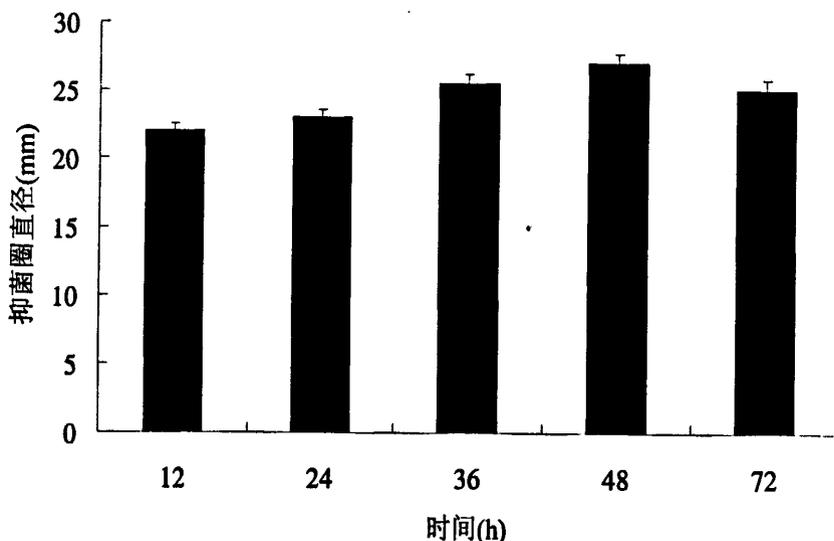


图 3-14 接种菌龄对菌株 DY2741 产抗菌物质的影响

Fig.3-14 Effects of seed age on antibacterial activities of strain DY2741

### 3.5.3 接种量对抗菌物质产量的影响

发酵液的接种量影响菌体 S 型生长曲线中延迟期的时间,对发酵产物也有着重要的影响。接种量过高过低都不利于发酵产物的积累。在发酵培养基中接种不同浓度的种子液,实验结果见图 3-15:实验表明接种量为 6%时对抗菌物质的产生最佳。

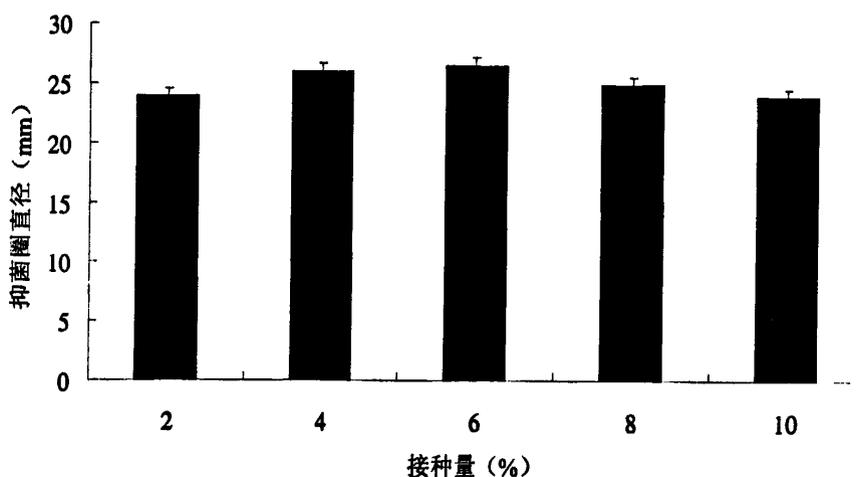


图 3-15 接种量对抗菌物质产量的影响

Fig.3-15 Effect of inoculation volume on antibacterial activities of strain DY2741

### 3.5.4 装液量对抗菌物质产量的影响

与溶解氧密切相关的是摇瓶的装液量。溶氧不足影响菌体的生长,溶氧过足会导致菌体大量增殖,影响次生代谢产物的生成。因此装液量影响抗菌物质的最终产量。

实验结果见图 3-16, 实验表明 70mL 的装液量 (250mL 三角瓶) 对菌株 DY2741 抗菌物质的产量最有利。

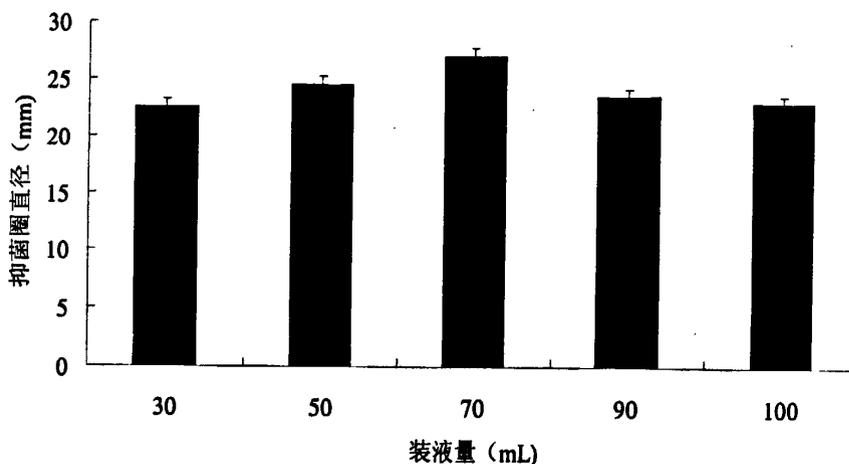


图 3-16 装液量对菌株 DY2741 产抗菌物质的影响

Fig3-16 Effect of broth volume on antibacterial activities of strain DY2741

### 3.5.5 发酵温度对抗菌物质产量的影响

微生物的发酵需要在一定适宜温度下进行的, 温度不仅影响菌体的生长而且影响次级代谢产物的生成。温度过低不利于菌体生长增殖和代谢酶酶活; 温度过高会导致菌体增殖过快, 菌体提前衰老, 自溶, 代谢酶的失活, 发酵时间缩短, 容易污染杂菌等。因为温度直接影响菌株发酵产物的最终产量。实验结果见图 3-17: 实验表明菌株 DY2741 最适发酵温度为 28℃。

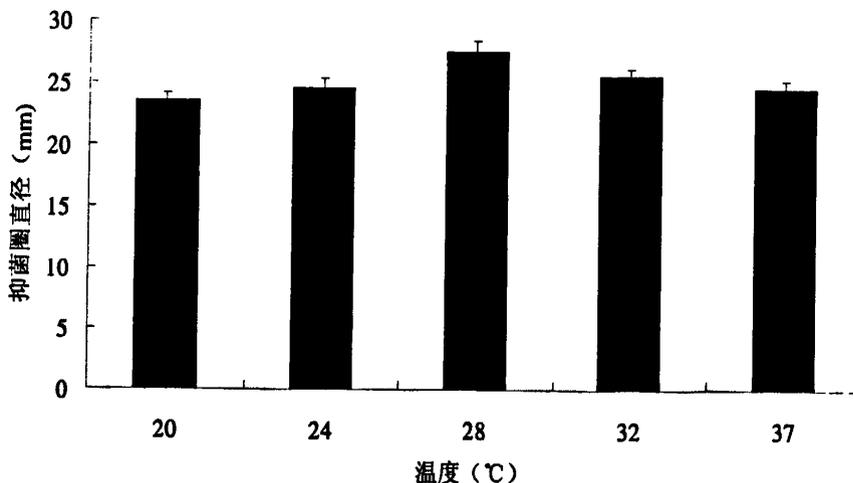


图 3-17 温度对菌株 DY2741 产抗菌物质产量的影响

Fig. 3-17 Effect of temperature on antibacterial activities of strain DY2741

### 3.5.6 抗菌物质产生的时间

微生物发酵发酵终点的判断，对提高产物的回收率很重要。随着发酵后期，菌体的分泌能力下降，次生代谢产物量也会随之下降，随着菌体的自溶和胞内酶的释放，可能会破坏已分泌的次生代谢产物。因此有必要对抗菌物质产生时间进行考察，及时回收产物。实验结果（见图 3-18）表明，抗菌物质产量及活性在 5d 时达到极大值。因此，可将菌株 DY2741 发酵终点设定在 5d。

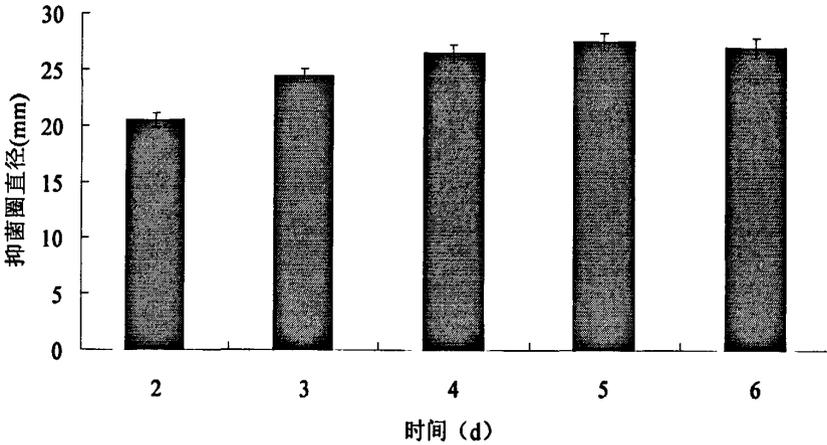


图 3-18 菌株 DY2741 抗菌物质产生时间

Fig.3-18 The time of strain DY2741 produced antibacterial substances

### 3.5.7 发酵条件优化前后比较

采用原始培养基发酵液和条件优化后的发酵液进行抗菌活性对比。采用管碟法以金黄色葡萄球菌为指示菌测抑菌圈直径。图 3-19 为发酵条件优化前后的效果图。通测量，原始发酵液抑菌圈直径为 23.5mm，而优化后的抑菌圈直径上升到 32.5mm，增加约 38%，优化效果显著。

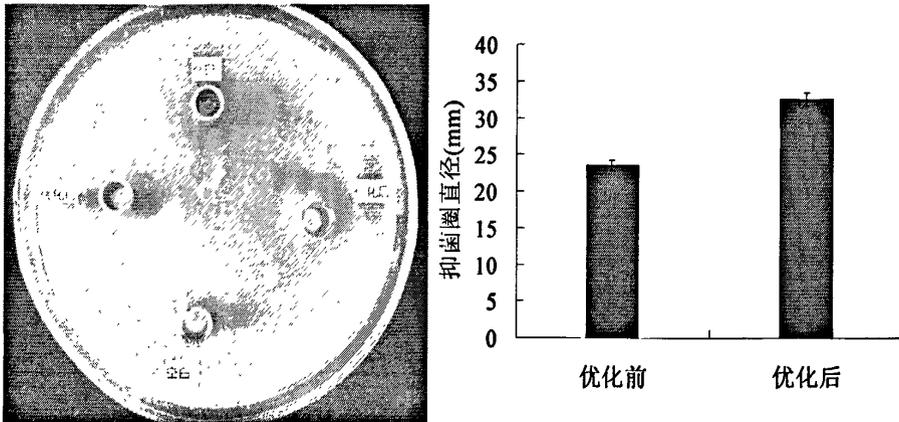


图 3-19 菌株 DY2741 发酵条件优化前后抑菌效果

Fig. 3-19 Antibacterial activitis of original fermentation broth and optimized fermentation broth

### 3.6 抗菌谱测定

选用三种细菌，两种酵母菌和黑曲霉做抗菌谱测定。实验结果表明（见表 3-13）发酵液对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌抗性较强，对枯草芽孢杆菌的抗性次之，对啤酒酵母、假丝酵母抗性较弱，对黑曲霉具有抑制菌丝扩展能力。

表 3-13 菌株 DY2741 抗菌谱

Tab.3-13 The antibiogram of strain DY2741

测试菌	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>
抑菌活性强弱	++++	+++	+++	++	++	++

注：“++++”：抑菌圈直径 $\geq 28$ ；“+++”： $22 \leq$ 抑菌圈直径 $< 28$ ；“++”： $16 \leq$ 抑菌圈直径 $< 22$ ；

### 3.7 发酵液抗菌物质稳定性实验

#### 3.7.1 UV 稳定性

图 3-20 表明，抗菌物质经过不同时间紫外灯照射后，抗菌能力未发生明显变化。可见，抗菌物质对紫外线照射稳定性较好。

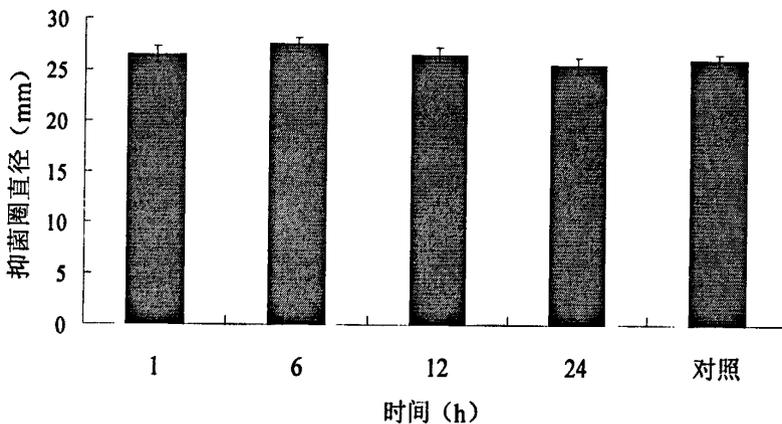


图 3-20 紫外线照射时间对抗菌物质的稳定性影响

Fig.3-20 Effect of irradiation time of UV on the stability of antibacterial

#### 3.7.2 pH 稳定性

发酵液经过不同的 pH 处理后，其抑菌圈直径没有显著差异（图 3-21），说明抗菌物质的 pH 稳定性较好。

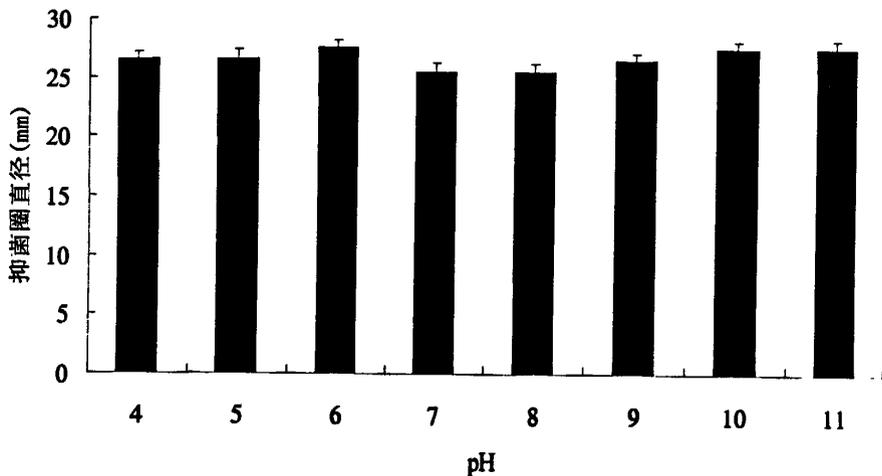


图 3-21 pH 对抗菌物质稳定性的影响

Fig.3-21 Effect of pH on the stability of antibacterial

### 3.7.3 热稳定性

了解抗菌物质的热稳定性对后续实验萃取液的真空浓缩提供温度参考。实验结果表明（见图 3-22）活性物质在 80℃ 热处理后活性依然稳定，但在经过 100℃ 以上高温处理后开始部分失活。

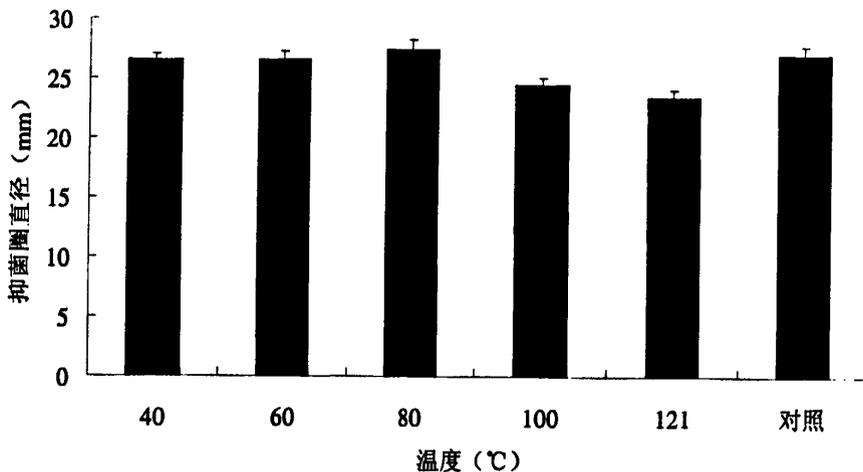


图 3-22 温度对抗菌物质稳定性的影响

Fig.3-22 Effect of temperature on the stability of antibacterial

## 3.8 抗菌物质的溶解性质以及分离、纯化和鉴定

### 3.8.1 抗菌物质的溶解性测定

#### (1) 抗菌物质在不同溶剂中的溶解性质

发酵液冻干粉在各种溶剂中溶解萃取后，通过考察萃取液抗菌活性的强弱，可以确定抗菌物质在不同溶剂中的溶解性质，结果见表 3-13。由表可见，乙酸乙酯萃取液

对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌圈直径最大，其次是正丁醇、二氯甲烷。其他抑菌活性相对较低。由此可推知该抗菌物质可能是一种中等极性的脂溶性物质。抗菌物质在乙酸乙酯溶解性最好，也可溶于正丁醇、氯仿和甲醇，微溶于石油醚和水，抗菌物质溶解性质的研究结果为进一步分离纯化提供了理论基础。

表3-13 抗菌物质在不同溶剂中的溶解情况

Tab.3-13 Solubility of antibacterial substance in different solvents

溶剂	抑菌圈直径 (mm)			
	<i>S.aureus</i>		<i>E.coli</i>	
	纯溶剂	萃取液	纯溶剂	萃取液
无菌水	0	15.11±0.11	0	22.65±0.18
甲醇	0	25.88±0.26	0	27.45±0.26
正丁醇	0	27.75±0.36	0	28.36±0.41
乙酸乙酯	0	30.55±0.38	0	31.93±0.37
二氯甲烷	0	29.31±0.41	0	30.11±0.39
石油醚	0	18.37±0.23	0	19.51±0.20

## (2) 不同 pH 值下不同萃取物的抑菌效果

为了进一步分离纯化小链霉菌 DY2741 的抗菌物质，应研究其极性，因此对发酵液不同 pH 条件下抗菌物质的萃取效果进行了研究。萃取剂与不同 pH 的发酵上清液的体积比为 1:1。萃取相（有机相）及水相的抑菌活性如表 3-14 所示。在不同 pH 值条件下乙酸乙酯的水相均表现为抑菌圈为 0mm，无抑菌活性；而有机相的抑菌圈大小与 pH 存在相关性。在接近 pH 中性条件下有机相的抑菌圈直径最大。对照组（纯溶剂）均无抑菌活性。由此判断该抗菌物质极性中等。

表3-14 在不同pH条件下萃取物的抗菌活性

Tab.3-14 Antibacterial activity of different extracts at different pH

指示菌		抑菌圈直径 (mm)						
		pH3.0	pH4.0	pH5.0	pH6.0	pH7.0	pH8.0	pH9.0
<i>S.aureus</i>	有机相	25.31±0.32	27.46±0.28	28.11±0.43	29.79±0.39	31.28±0.45	30.51±0.22	27.76±0.33
	水相	0	0	0	0	0	0	0
	纯溶剂	0	0	0	0	0	0	0
<i>E.coli</i>	有机相	27.44±0.27	28.87±0.33	29.51±0.36	30.95±0.35	32.89±0.41	30.07±0.22	28.55±0.42
	水相	0	0	0	0	0	0	0
	纯溶剂	0	0	0	0	0	0	0

### 3.8.2 葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱分离各组分的抑菌活性

为了分离纯化经乙酸乙酯萃取的粗提物，使用 Sephadex LH-20 柱色谱进行分离，共收集洗脱液 182 管。以金黄色葡萄球菌和大肠杆菌为指示菌检测洗脱液的抑菌活性，结果见图 3-23。洗脱液经检测出现了两个抑菌活性峰，B 峰对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌均有显著的抑菌活性，故选取此峰进行进一步研究。

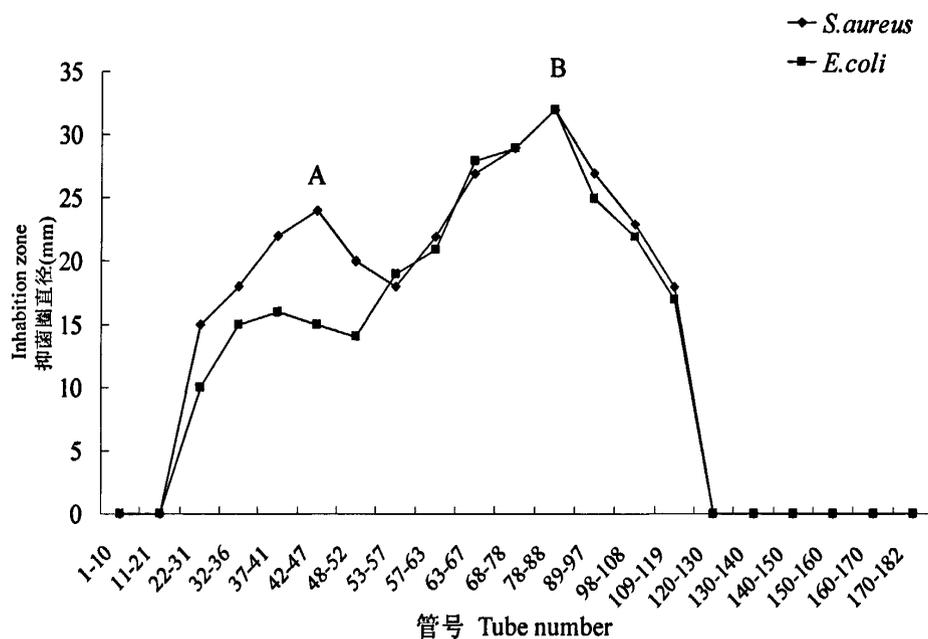


图3-23 Sephadex LH-20柱色谱后洗脱液的抑菌活性

Fig.3-23 Antibacterial activity of eluent isolated from Sephadex LH-20 chromatogram

### 3.8.3 活性成分分析结果

对 B 峰中各组分进行薄层色谱 (TLC) 分析，其中 89-97 管样品  $R_f=0.25$ ，紫外显影和茴香醛染色显示其斑点单一且清晰，提示该样品组分单一。如图 3-24 所示。

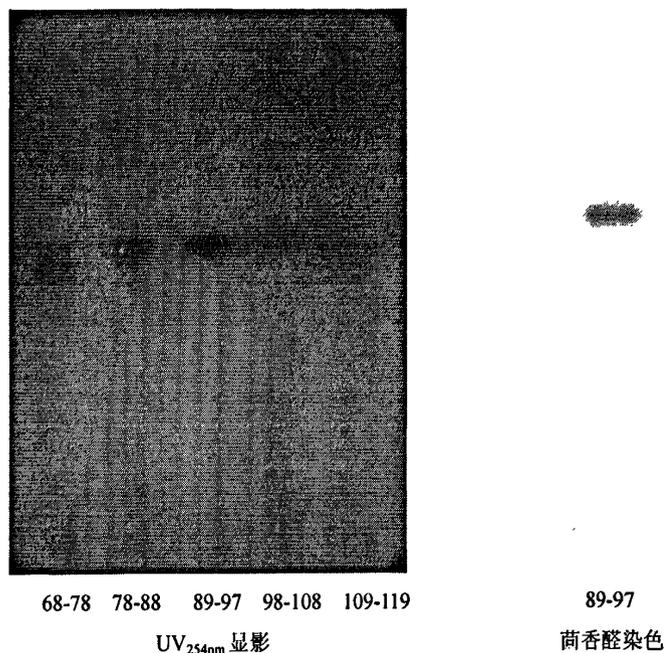


图3-24 B峰各管样品薄层色谱图

Fig.3-24 TLC of each tube of the active compound B

对 89-97 管样品进行气质联用 (GC-MS) 分析, 总离子流图 (TIC) 为单一峰 (图 3-25); MS 信息提示该成分分子量为 278, 分子式为  $C_{16}H_{22}O_4$ 。通过 MS 图谱 (图 3-26) 与标准谱库 WILEY7 (图 3-27) 进行比对, 该组分与邻苯二甲酸二丁酯 (DBP) 相似度达 87%。

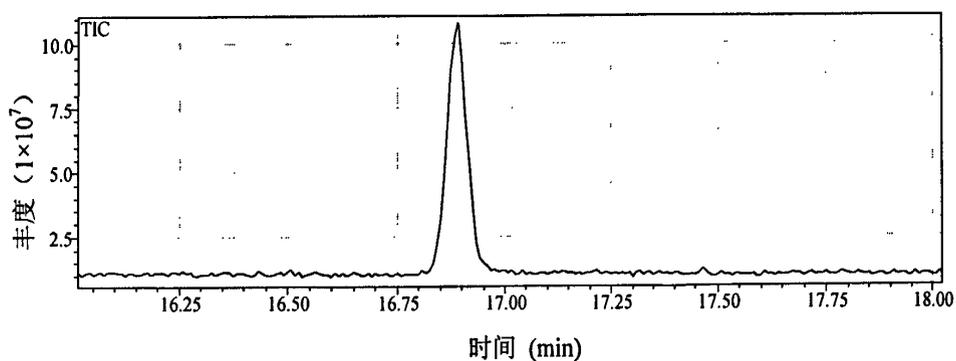


图3-25 89-97管样品总离子流图 (TIC)

Fig.3-25 Total Ion chromatogram (TIC) of the Tube 89-97

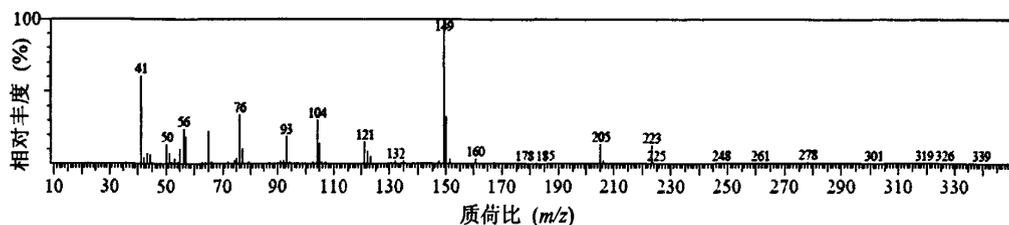
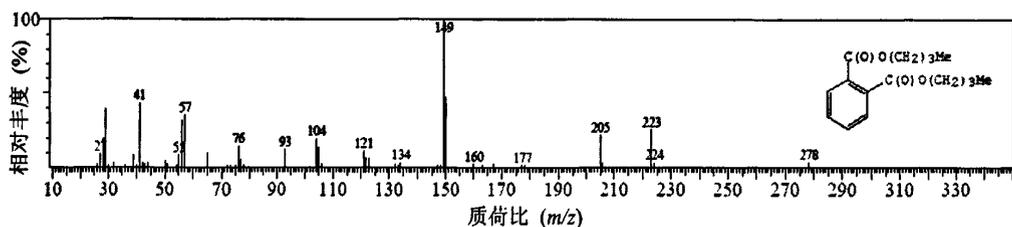


图3-26 89-97管样品的质谱图

Fig.3-26 Mass spectrum of Tube 89-97



标准谱库:WILEY7 与89-97管样品相似度:87% 分子式: $C_{16}H_{22}O_4$  分子量:278

图3-27 标准谱库中邻苯二甲酸二丁酯 (DBP) 质谱图

Fig.3-27 Standard Mass spectrum of DBP

89-97 管样品的红外光谱如图 3-28 所示:  $1706\text{cm}^{-1}$  对应于羰基  $\text{C}=\text{O}$  的伸缩振动,  $1289\text{cm}^{-1}$  和  $1136\text{cm}^{-1}$  对应于  $\text{C}-\text{O}$  的伸缩振动, 推测该化合物结构中有酯键。  $3063\text{cm}^{-1}$  对应于芳环上  $\text{C}-\text{H}$  的伸缩振动,  $1600\text{cm}^{-1}$  处的组合峰对应于芳环上  $\text{C}-\text{C}$  的的伸缩振动, 推测该化合物结构中有苯环。  $2958\text{cm}^{-1}$  对应于甲基- $\text{CH}_3$  的  $\text{C}-\text{H}$  的伸缩振动,  $2930\text{cm}^{-1}$  和  $2856\text{cm}^{-1}$  对应于亚甲基- $\text{CH}_2$ -的  $\text{C}-\text{H}$  的伸缩振动,  $1456\text{cm}^{-1}$  对应于甲基- $\text{CH}_3$  的不对称变形振动或是亚甲基- $\text{CH}_2$ -的对称变形振动。综上所述, 该物质红外光谱具有明显的芳香酯类的特征。

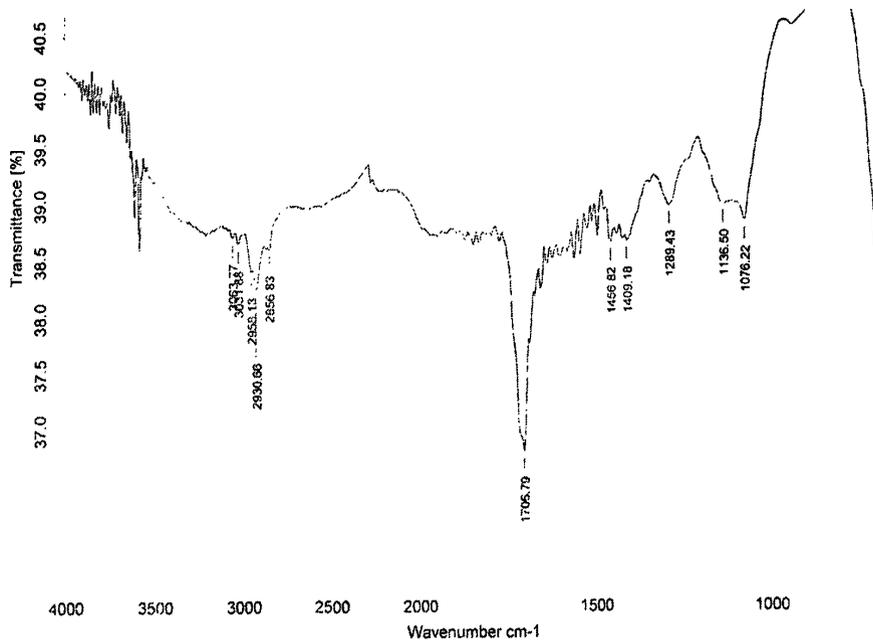


图 3-28 89-97 管样品的红外色谱图

Fig.3-28 IR spectrum of Tube 89-97

通过上述实验，结合相关文献信息，将 89-97 管样品成分初步鉴定为邻苯二甲酸二丁酯 (DBP)，其结构需要进一步通过核磁共振 (NMR) 进行解析。本实验为进一步研究和确定小链霉菌 DY2741 代谢产物提供了重要实验参考。

## 4 讨论

### 4.1 海洋微生物分离与具抗菌活性菌种筛选

本研究采取多种培养基并模拟海洋原生态条件,从样品中分离出多种可培养的海洋微生物。不同样品来源的海洋微生物菌株中抗菌活性菌株的比率有较大的差别。研究初期,出菌率不高,更换不同培养基后,发现培养基的不同对海洋微生物菌种多样性及活性菌株的发现几率有很大关系,提示我们要增加培养基的多样性来提高活性菌的发现几率。但是放线菌出菌率依然较少。尤其是稀有放线菌出菌率依然偏低<sup>[76]</sup>。这可能与样品的采集地以及样品的种类存在较大关系。相关文献描述,海洋放线菌大部分来源于海泥等样品,而本次采样几乎没有海泥样品,可能是问题的关键。另外样品采集之后没有及时的进行样品处理和分离,也可能是原因之一。

活性菌种的筛选采用滤纸片法,该方法优点是速度较快,便于大批量筛选,缺点也显而易见,由于滤纸的载样量偏低,可能会对一部分活性偏弱的菌种造成漏筛。但总体活性筛选结果显示活性菌株尤其是活性放线菌比率相对较高,为后期深入研究提供了良好的材料。

### 4.2 放线菌 DY2741 菌种鉴定

通过形态特征,培养特征,生理生化特征和分子生物学多种手段鉴定,放线菌 DY2741 应为一株小链霉菌,与 *Streptomyces parvus* strain NRRL B-1455T 同源性达 99%。但描述小链霉菌的相关文献极为有限。仅在伯杰细菌鉴定手册中有部分描述。未发现小链霉菌有产 DBP 的相关报道,目前对该菌的研究资料仍相对匮乏,值得进一步研究该菌的活性产物及其作用机理。

### 4.3 菌株 DY2741 的发酵条件优化

通过单因素实验寻找出最佳碳源、氮源及氯化钠浓度,通过响应面设计寻找出最佳培养基组成。通过发酵条件优化,寻找到该菌的最适发酵条件。条件优化采用 250mL 摇瓶发酵,具有一定局限性,但对以后大规模罐发酵提供了重要参考。实验中发现,多糖以及无机氮源对抗菌物质产量有利,而单糖和营养丰富的有机氮源则普遍对抗菌物质产生不利。推断菌株 DY2741 的源生态环境为海洋贫营养环境,营养丰富的培养基反而不利于其产生次生代谢产物。另外也与菌株的 S 型生长曲线密切相关,贫营养环境利于菌株迅速从对数生长期过渡到稳定期,而营养丰富条件下菌株生长则有可能长期停滞在对数生长期,导致次生代谢产物量降低。

### 4.4 菌株 DY2741 抗菌物质稳定性研究

通过对菌株 DY2741 抗菌物质稳定性研究发现,该菌产生的抗菌物质对 pH 和 UV 稳定性均较好,高于 100℃ 热处理,抗菌物质开始部分失活。该研究为下一步萃取,浓缩,分离,纯化等实验提供了有价值的信息。

#### 4.5 活性成分的研究

1997年 El-Naggar<sup>[77]</sup>报道了链霉菌 *Streptomyces nasri submutant* H35 产生的邻苯二甲酸二丁酯 (DBP) 具有抗菌活性。不久, Lee<sup>[78]</sup>报道链霉菌 *Str. melanosporofaciens* 也产 DBP, 证明它是葡萄糖苷酶的抑制剂。Roy 等<sup>[67]</sup>试验表明链霉菌 *Str. albidoflavus* 产生的 DBP 对 G<sup>+</sup>细菌 G<sup>-</sup>细菌及单细胞的和丝状真菌都有较强的活性; 动物试验未观察到急性毒性。Foster 等<sup>[79]</sup>报道 DBP 对 SD 大鼠的最小可见损害作用水平 (LOAEL) 为 66mg/kg/day。Mylchreest 等<sup>[80]</sup>报道大剂量给药 (650mg/kg/day) 会导致繁殖力下降, 精子数量减少和精子畸形。Watanuki 等<sup>[81]</sup>报道 DBP 对吞噬细胞功能有调节作用。因此, DBP 的药理及毒理作用有待进一步研究。目前, 未发现有小链霉菌产生 DBP 的报道。因此, 其生物合成和药物作用机理等方面值得进一步研究。

## 5 结论

对厦门周边海域采集的不同样品(包括海水、海沙、海贝等),采用稀释平板法分离、纯化、保藏各种海洋微生物,共分离到细菌 57 株,放线菌 17 株和真菌 128 株。采用滤纸片法以金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、啤酒酵母、黑曲霉为测试菌,进行抗菌活性菌种筛选,结果表明从海水和海贝分离出具有抗菌活性的细菌占该类样品分离总细菌数比例较高,分别为 69.2%和 45.5%;从海水、海沙和海贝中分离出具有抗菌活性的放线菌占从该类样品分离总放线菌株数比例较高,分别占 75.0%、80.0%和 80.0%;从海沙和海贝中分离出具有抗菌活性的真菌占从该类样品分离总真菌株数比例较高,分别为 54.5%和 57.1%。海洋细菌和放线菌抗两种细菌比率高于其它类型测试菌,而海洋真菌对各测试菌的抗菌比率相对平均。

对一株分离自厦门大屿岛海域潮间带海洋软体动物的放线菌进行研究。经过形态特征、培养特征及生理生化特征可以初步鉴定为链霉菌属(*Streptomyces* sp.)黄色类群(*Flavus*),16S rDNA 序列与 GeneBank 比对和系统发育树构建表明其与 *Streptomyces parvus* strain NRRL B-1455T 的序列同源性达 99%,查阅文献,菌株 DY2741 与该菌基本相符,但部分培养特征和生理生化特征存在较大差异。因而将菌株 DY2741 初步鉴定为小链霉菌 *Streptomyces parvus* 的一株变种。

为了提高抗菌物质的产量,对菌株 DY2741 培养基组分和发酵条件进行优化。采用管碟法测发酵液的活性,筛选出最适碳源为可溶性淀粉,最适氮源为氯化铵。通过响应面设计 Box-Behnken 中心组合实验拟合  $Y_1 = 26.5 - 0.1875 \times X_1 + 0.25 \times X_2 - 1.0625 \times X_3 - 1.625 \times X_1 \times X_1 + 1.625 \times X_1 \times X_2 - 0.25 \times X_1 \times X_3 - 2.25 \times X_2 \times X_2 - 0.375 \times X_2 \times X_3 - 2.375 \times X_3 \times X_3$ ,解方程得到对应的培养基最佳组成为可溶性淀粉 2.035%,氯化铵 0.4425%、氯化钠 2.000%;发酵条件优化结果表明最适起始 pH 7.0,最适接种菌龄 48h,最适接种量为 6%,最适装液量为 250mL 三角瓶装量 70mL,最适培养温度为 28℃,最适发酵时间 5d。通过优化,抑菌圈直径由原来的 23.5mm 增加到 32.5mm,直径增加了约 38%,提升明显。

菌株 DY271 抗菌物质稳定性实验表明:该抗菌物质对 pH、UV 具有较好的稳定性,高于 100℃ 处理抗菌物质部分失活。

通过对该菌发酵液中抗菌物质的溶解性质测定,可推知该物质极性中等。Sephadex LH-20 柱色谱分离后,经抗菌活性检测发现两个活性峰,其中第 2 个峰对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌活性较强。将第 2 个峰的洗脱液各组分进行薄层色谱分析,选取斑点清晰且单一的组分进行气相色谱-质谱联用分析,总离子流图表明该组分成分单一,根据 MS 图谱与标准谱库比对以及 FTIR 光谱分析,初步判断该组分为邻苯二甲酸二丁酯(DBP)。

## 参考文献

- [1] 徐亲民编译. 日本近年来新抗生素筛选研究动态[J]. 国外医药. 抗生素分册, 1996, 17(4): 256~273
- [2] 许实波主编. 海洋生物制药第二版<M>. 北京: 化学工业出版社, 2007
- [3] 郭跃伟. 海洋天然产物和海洋药物研究的历史、现状和未来[J]. 自然杂志, 2008, 31(1): 27~32
- [4] Burkholder P R. Lamont geological observatory of Columbia university[J]. Integrative and comparative Biology, 1963, 3(3): 286~287
- [5] Pfister R M, Burkholder P R. Numerical taxonomy of some bacteria isolated from Antarctic and tropical seawaters[J]. Bacterial, 1965, 90(4): 863~872
- [6] Burkholder P R, Pfister R M, Leitg F H. Production of a parole antibiotic by a marine bacterium [J]. Appl. Microbiol, 1966, 14(4): 649~653
- [7] 刘晶晶, 陈全震, 曾江宁等. 海洋微生物活性物质的研究进展[J]. 海洋学研究, 2007, 25(1): 55~65
- [8] 黄维真, 方金瑞. 福建沿海底栖放线菌及其产生的抗菌物质[J]. 中国海洋药物, 1991, 10(3): 1~6
- [9] 王书锦, 胡江春, 薛德林等. 中国黄、渤海、辽宁近海地区海洋微生物资源的研究[J]. 锦州师范学院学报, 2001, 22(1): 1~5
- [10] 刘全永, 胡江春, 薛德林等. 海洋微生物生物活性物质研究[J]. 应用生态学报, 2002, 13(7): 901~905
- [11] 谷俊, 林亲雄. 海洋放线菌M324抗菌物质的发酵优化与性质的初步研究[J]. 药物生物技术, 2006, 13(5): 347~350
- [12] 崔洪霞, 李富超, 阎斌伦等. 一株产抑制真菌活性全霉素的胶州湾海洋链霉菌[J]. 中国海洋药物, 2006, 25(1): 11~15
- [13] 王莹, 吴根福. 东海海洋有抗菌活性细菌的筛选及系统发育分析[J]. 农机化研究, 2007, (5): 34~38
- [14] Woo J H, Kitamurae, Myouga H et al. An antifungal protein from the marine bacterium *streptomyces* sp. Strain AP77 is specific for *Pythium orphyrae*, a causative agent of redrot disease in *Porphyra* spp [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68 (6): 2666~2675
- [15] Robert W, Schumacher, Stephanie C et al. Isolation and Structure Determination of an Antimicrobial Ester from a Marine Sediment-Derived Bacterium[J]. J. Nat. Prod, 2003, 66(9): 1291~1293
- [16] Reidinger J et al. J. Antibiot[J], 2004, 57: 271~279
- [17] Irma E, Soria-Mercado, Alejandra Prieto-Davo et al. Antibiotic Terpenoid Chloro-Dihydroquinones from a New Marine Actinomycete[J]. J. Nat. Prod, 2005, 68(6): 904~910
- [18] Venkat R, Macherla, Jehnan Liu et al. Lipoxazolidinones A, B, and C: Antibacterial 4-Oxazolidinones from a Marine Actinomycete Isolated from a Guam Marine Sediment[J]. J. Nat. Prod,

2007,70(9):1454~1457

- [19] Katherine A, McArthur Scott S et al. Lynamycin A&E, Chlorinated Bisindole Pyrrole Antibiotics from a Novel Marine Actinomycete[J]. *J. Nat. Prod.*,2008,71(10):1732~1737
- [20] Dafemer M, Anke T, Sterner O et al. Zopfiellamides A and B, antimicrobial pyrrolidinone derivatives from the marine fungus *Zopfiella latipes*[J]. *Tetrahedron*,2002,58(39): 7781~7784
- [21] Jadulco R, Brauers G, Edrada R A et al. New metabolites from sponge derived fungi *Curvularia lunata* and *Claosporium herbarum*[J]. *J Nat Prod*,2002,65(5):730~733
- [22] E. Dilip de Silva, Anna-Skrollan Geiermann et al. Isolation of 2-Pyridone Alkaloids from a New Zealand Marine-Derived *Penicillium* species[J]. *J Nat Prod*,2009,72:477~479
- [23] Kongkiat Trisuwana, Vatcharin Rukachaisirikul. Pyrone derivatives from the marine-derived fungus *Nigrospora* sp. PSU-F18[J]. *Phytochemistry*,2009,70(4):554~555
- [24] 赵玲玲,张惠平. 9F系列海洋真菌代谢产物分离纯化及稻瘟霉活性研究[J]. *天然产物研究与开发*,2005,17(6):677~680
- [25] 郭江,祖国仁. 一株海洋真菌菌株M2401产抑菌物质发酵条件研究[J]. *微生物学杂志*, 2007,27(1):77~79
- [26] 谭倪,陶李明,邵长伦等. 海洋真菌 *Fusarium* sp.#ZZF51的次级代谢产物二(5-丁基-2-吡啶甲酸-N1,O2)合铜(II)的抑菌抗癌活性研究[J]. *南华大学学报(自然科版)*,2008,22(3):1-4,20.
- [27] 邵长伦,胡谷平,杨瑞云等. 南海红树林内生真菌B77次级代谢产物研究[J]. *中山大学学报(自然科学版)*,2008,47(1):56~58
- [28] Liu S, Lu Y J, Lu Z X et al. Antibacterial activity and property of the fermentation product of marine *Streptomyces* sp. GB-2[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*,2007,23(6):1077~1081
- [29] Singh S B, Zink D L, Herath K B et al. Discovery and antibacterial activity of lucensimycin C from *Streptomyces lucensis*[J]. *Tetrahedron Letters*,2008,49(16):2616-2619
- [30] Singh S B, Ondeyk J G, Herath K B et al. Isolation enzymebound structure and antibacterial activity of platencin A1 from *Streptomyces platensis*[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*,2009,19(16):4756~4759
- [31] 张起辉,王彦,裴月湖. 海洋微生物活性物质的研究进展[J]. *沈阳药科大学学报*,2009, 26(8):670~678
- [32] Liu W, Gu Q, Zhu W et al. Penicillones A and B, two novel polyketideswith tricyclo[5.3.1.0<sup>3,8</sup>] undecane skeleton,from a marine-derived fungus *Penicillium terrestre* [J]. *Tetrahed Lett*,2005,46 (30): 4993~4996
- [33] Li D H, Zhu T J, Liu H B et al. Four butenolides are novel cyto-toxic compounds isolated from the marine-derived bacterium, *Streptoverticillium luteoverticillatum* 11014 [J]. *Arch Pharm Res*, 2006,29(8):624~626

- [34] Liu R, Cui C B, Duan L et al. Potent in vitro anticancer activity of metacycloprodiginin and undecylprodiginin from a sponge-derived actinomycete *Saccharopolyspora* sp. nov. [J]. Arch Pharm Res, 2005, 28(12):1341~1344
- [35] 陈鸿波, 马越. 遏制细菌耐药性的全球战略[J]. 中国药事, 2002, 1:48
- [36] 肖春玲, 姚天爵. 细菌耐药性与新抗菌药物的研究[J]. 中国医学科学院学报, 2004, 26(4): 351~353
- [37] 杜冠华. 高通量药物筛选[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002
- [38] 杜冠华, 胡娟娟, 夏利娟等. 药物筛选的发展与现状[J]. 药学学报, 1998, 33(11):876~880
- [39] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1995
- [40] Zhang J T. Modern experimental in pharmacology[M]. Beijing : Peking Union Medical College and Beijing Medical University Press, 1997
- [41] Sun M E , Chen Y H , Du G H. High throughput screening method of nitric oxide synthase inhibitors and enhancers[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2002, 37(3):161~164
- [42] 陆娟, 任莉萍. 宏基因组技术在环境微生物资源开发中应用的探索[J]. 阜阳师范学院学报(自然科学版), 2005, 22(3):35~37, 42
- [43] 阎冰, 洪葵, 许云等. 宏基因组技术在开拓天然产物新资源中的应用[J]. 微生物学通报, 2005, 32(1):113~120
- [44] Gewin V. Genomics : Discovery in the dirt. Nature, 2006, 439(7075):384~386
- [45] DeLong E F. Marine microbial diversity: the tip of the iceberg. Trends Biotechnol, 1997, 15(6):203~207
- [46] Li X, Qin L. Metagenomics based drug discovery and marine microbial diversity. Trends Biotechnol, 2005, 23(11):539~543
- [47] 杨隽, 岑山, 张月琴. 以脂磷壁酸为靶点的新抗筛选模型的建立和应用[J]. 中国新药杂志, 2002, 11(8): 605~609
- [48] 刘祝祥, 李铭刚, 孙秋等. 化学筛选在微生物天然产物研究中的应用[J]. 云南化工, 2004, 31(4):44~46
- [49] 周世水, 姚汝华. 海洋微生物天然活性物质的开发应用进展[J]. 微生物学杂志, 2002, 22(2):42~43
- [50] Watve M G, Tickoo R, Jog M M et al. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces* Arch. Microbiol, 2001, 176(5), 386~390
- [51] Umezawa H. Low-molecular-weight enzyme inhibitors of microbial origin. Ann. Rev. Microbiol, 1982, 36, 75~99
- [52] Black R E, Brown K H, Becker S et al. Longitudinal Studies of infectious diseases and physical growth of children in rural Bangladesh. Am J Epidemiol, 1982, 115(3):305~314

- [53] Walsh J A, Warren K S. Selective primary healthcare: an interim strategy for disease control in developing countries. *Social Science & Medicine*,1980,14(2):145~163
- [54] Argoudelis A, Baczyneky D L, Duo M T et al. In vitro studies of arginomycin and its biodegradation products. *J Antibio*,1987,40:750~760
- [55] Dienstag J, Nue H C. In vitro studies of tobramycin and aminoglycoside antibiotic. *J Antimicrob Ag Chem*,1972,1(1):41~45
- [56] Waksman S A, Woodruff H B. Bacteriostatic and bactericidal substance produced by a soil Actinomycetes. *Proc Soc Ex Biol Med*,1940,45:609~614
- [57] Fenical W, Baden D, Burg M et al. Marine-derived pharmaceuticals and related bioactive compounds. In: Fenical W (ed) *From Monsoons to Microbes:Understanding the Oceans' Role in Human Health*. National Academic Press, Washington DC,1999
- [58] Xie C X, Wen L M, You X C et al. A new degraded sesquiterpene from marine actinomycete *Streptomyces* sp. 0616208[J]. *Chin Chem Lett*,2006,17 (11):1463~1465
- [59] Cho K W, Lee H S, Rho J R et al. New lactone-containing metabolites from a marine-derived bacterium of the genus *Streptomyces*[J]. *Journal of Natural Products*,2001,64(5):664~667
- [60] Mukku V J, Speitling M, Laatsch H et al. New butenolides from two marine *Streptomyces*[J]. *Journal of Natural Products*,2000,63(11):1570~1572
- [61] 张骁英,赵权宇,薛松等. 海绵生物活性物质及海绵细胞离体培养[J]. *生物工程学报*,2002,18(1):10~15
- [62] 姜怡,段淑蓉,唐蜀昆等. 稀有放线菌分离方法[J]. *微生物学通报*,2006,33(1):181~183
- [63] 彭云霞,姜怡,段淑蓉等. 稀有放线菌的选择性分离方法[J]. *云南大学学报(自然科学版)*,2007,29(1):86~89
- [64] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组. 链霉菌鉴定手册. 北京:科学出版社,1975
- [65] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1986
- [66] 布坎南R E,吉本斯N E. 伯杰细菌鉴定手册[M].8版. 中国科学院生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组,译. 北京:科学出版社,1984
- [67] Roy R N, Laskar S, Sen S K. Dibutyl phthalate the bioactive compound produced by *S. albidoflavus* 321.2. [J]. *Microbiol Res*,2006,161(2):121~126
- [68] 林永成. 海洋微生物及其代谢产物. 北京:化学工业出版社,2003,33
- [69] 邵力平等. 真菌分类学.北京:中国林业出版社,1983
- [70] Tresner H D,Hayes J A. Sodium chloride tolerance of terrestrial fungi. *Applied Microbiology*,1971,22(2):210~213
- [71] Pathirana C,Tapiolas D M,Jensen P R et al. Structure determination of maduralide: a new 24-membered ring macrolide glycoside produced by a marine bacterium (*Actinomycet ales*).

Tetrahedron Lett,1991, 32(21)2323~2326

[72] Zeng W. Screening of marine actinomycetes with antitumor activity and isolation and identification of the cytotoxic compounds produced by strain N3501. Xiamen:Xiamen University,2001,pp.34

[73] 郝学财,余晓斌,刘志钰等. 响应面方法在优化微生物培养基中的应用. 食品研究与开发,2006,27(1):38~41

[74] MONTGOMERY D C. Design and analysis of experiments[M]. 3rd ed.New York: John Wiley and Sons,1991

[75] 褚以文. 微生物培养基优化方法及其OPTI优化软件[J]. 国外医药:抗生素分册,1999,20(2): 58~61

[76] 李文均,张忠泽,姜成林. 国外医药抗生素分册,2002,23:18~221

[77] El-Naggar M Y M. Dibutyl phthalate and the antitumor agent F5A1, two metabolites produced by *Streptomyces nasri submutant* H35[J]. Biomed. Lett,1997,55:125~131

[78] Lee D S. Dibutyl phthalate, an  $\alpha$ -glucosidase inhibitor from *Streptomyces melanosporofaciens*[J]. Biosci. Bioeng,2000,89(3):271~273

[79] Foster P M,Cattley R C,Mylchreest E. Effects of di-n-butyl phthalate (DBP) on male reproductive development in rat: implications for human risk assessment[J]. Food Chem. Toxicol,2000, 38(Suppl 1):97~99

[80] Mylchreest E,Sar M,Cattley R C et al. Disruption of androgen-regulated male reproductive development by di(n-butyl) phthalate during late gestation in rats is different from flutamide[J]. Toxicol. Appl. Pharmacol,1999,156(2):81~95

[81] Watanuki H,Gushiken Y,Sakai M. In vitro modulation of common carp (*Cyprinus carpio* L.)phagocytic cells by di-n-butyl phthalate and di-2-ethylhexyl phthalate[J]. Aquat. Toxicol,2003,63(2): 119~126

## 致 谢

本论文的完成是在我的导师蔡敬民教授悉心指导下完成的，从立题、实验方法和论文撰写等各方面都凝聚着导师的心血。

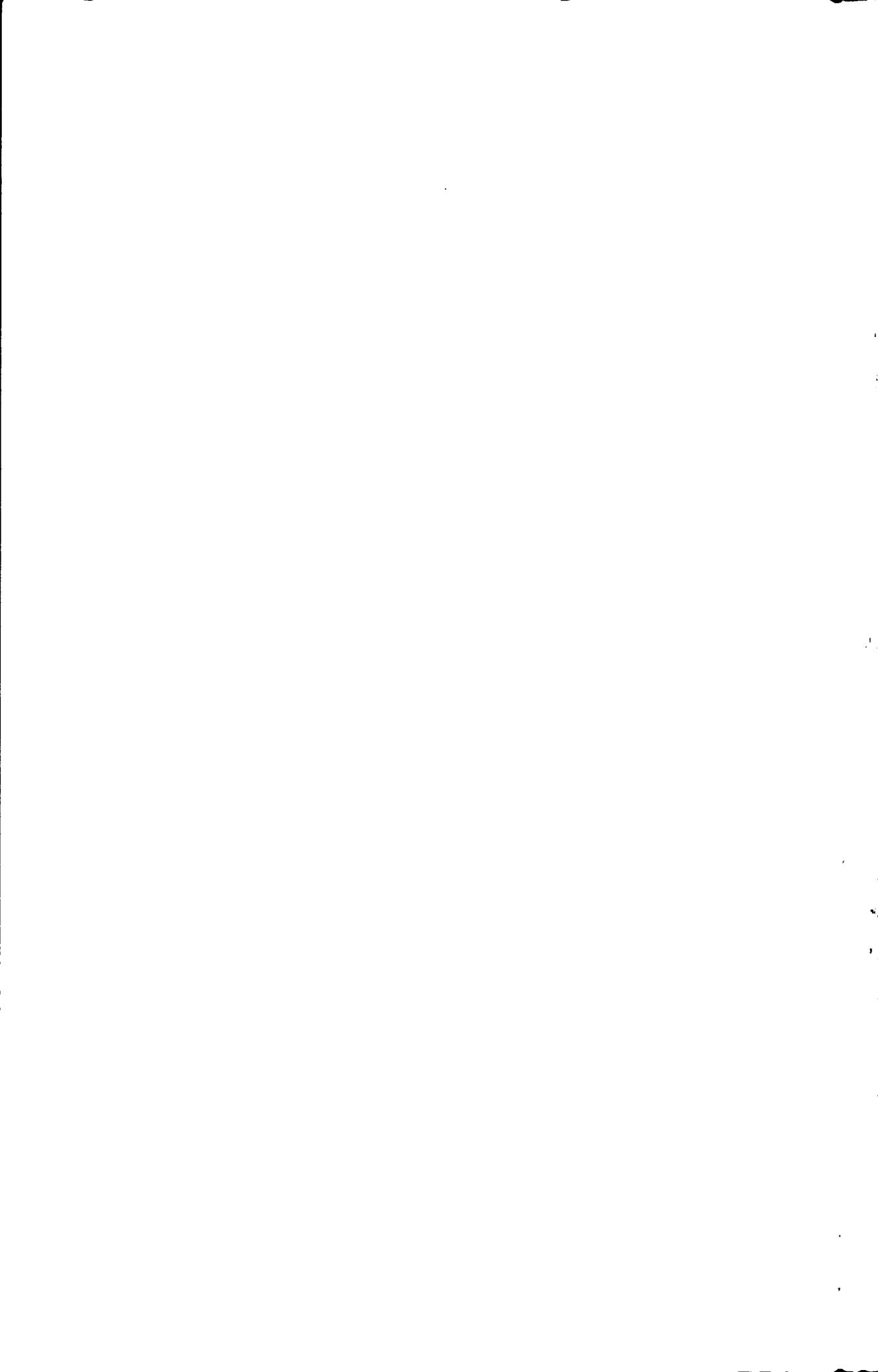
本研究工作是在合肥学院生物与环境工程系完成的。在这期间有许多老师给予热心帮助，保证了论文的顺利完成。首先衷心感谢中国科技大学的潘仁瑞教授和合肥学院徐涛副教授、吴纓教授、吴茜茜副教授在实验上无私指导，感谢沈寿国、阚劲松、李玉晖、张敏老师在实验上支持。

还特别感谢张袁同学在菌种分离上给予的帮助。感谢安徽省优秀青年科技基金项目(04043051)，国家自然科学基金项目(30270321)和合肥学院（引进）人才科研启动基金项目 (08RC12)以及合肥学院生物与环境工程系为本实验研究提供经费支持；安徽农业大学研究生院和生命科学学院为我完成学业提供了多方面的帮助，在此一并向他们表示深深的谢意。

感谢评阅老师和参加答辩的专家对本文的审核和提出修改意见。

刘 伟

2010.6



## 作者简介

刘伟, 男, 1982年2月生, 安徽蚌埠人。2003.9~2007.7 就读安徽农业大学中药资源与开发专业, 获医学学士, 2007.9~2010.7 就读安徽农业大学微生物学专业, 研究方向为微生物生理学, 主要从事海洋微生物天然产物研究。曾参加安徽省优秀青年科技基金项目(04043051), 国家自然科学基金项目(30270321)和合肥学院(引进)人才科研启动基金计划项目(08RC12)等项目。发表学术论文2篇。

## 在读期间发表的学术论文

- 1、海洋小链霉菌 DY2741 抗菌物质的溶解性质及分离纯化。《食品科学》已录用。
- 2、海洋微生物抗菌活性产物研究进展。《包装与食品机械》已录用。

