

研究论文

海洋放线菌 Y18 的分子鉴定、生物活性 及其抗菌物质发酵条件优化

苑孟^{1,2} 俞勇² 李会荣² 董宁^{1,2} 张晓华¹

(¹ 中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003;

² 国家海洋局极地科学重点实验室, 中国极地研究中心, 上海 200136)

摘要 从北冰洋楚科奇海海洋沉积物中分离到一株放线菌 Y18, 其良好生长需要海水。经 16S rRNA 基因序列分析确定该菌株属于拟诺卡氏菌属(*Nocardiopsis*)。次级代谢产物合成酶基因及抗菌活性筛选发现, 它含有聚酮类 II 型(PKS II) 和非核糖体含硫多肽类(non ribosome-bound sulfur-containing peptides, NRPS) 化合物合成酶基因, 并且对枯草芽孢杆菌和白色念珠菌有抑制作用。以枯草芽孢杆菌为指示菌对 Y18 的发酵条件进行了初步优化, 适合的发酵条件为: 发酵培养基(蛋白胨 2 g, 酪素水解物 2 g, 酵母膏 2 g, 葡萄糖 1 g, 海水 1 L), 种子液接种量 4%, 发酵温度 28℃, 发酵培养基初始 pH 值 8.0, 培养时间 6 天, 1 000 mL 三角瓶装液量 20%。并对 Y18 发酵液稳定性进行了测定, 结果显示: 发酵液对酸碱、热的稳定性都较强, 4℃ 下贮藏发酵液的抗菌活性保留时间较长。

关键词 海洋放线菌 分子鉴定 抗菌活性 发酵条件 北冰洋

doi: 10.13679/j.jdyj.2014.3.292

0 引言

放线菌是非常重要的生物活性物质来源, 目前为止大约三分之二的天然抗生素分离自放线菌^[1], 且绝大多数来自于链霉菌属和小单孢菌属。近年来, 人们在筛选活性物质的过程中, 发现从陆地来源放线菌中获取新型天然活性物质的几率越来越小, 于是, 人们开始探索其他生境来源的放线菌, 希望从中筛选出新型生物活性物质。海洋占地球表面积的 70% 以上, 它的高盐、高压、寡营养的特点, 使海洋放线菌进化出来与陆地放线菌所不同的代谢途径, 可能产生大量的新颖的生物活性物质^[2]。近年来, 人

们从海洋环境中分离出大量不同种类的放线菌^[3], 同时, 也从这些海洋放线菌中发现了许多结构新颖的生物活性次级代谢产物^[4-5]。北冰洋气候寒冷, 水温大部分时间在 0℃ 以下, 环境十分恶劣, 面对如此极端环境, 放线菌必须产生与之相适应的生理生化特征及代谢途径。因而北冰洋的放线菌可能会产生结构新颖, 生物活性特殊的生物活性物质。

菌株 Y18 是一株分离自北冰洋楚科奇海沉积物具有较高抗菌活性的稀有放线菌, 其良好生长需要海水。本文对该菌株的分子鉴定、抗菌活性、活性物质发酵条件及其发酵产物的稳定性进行了初步研究, 为 Y18 菌株的进一步开发利用提供了理论和实践基础。

[收稿日期] 2013 年 9 月收到来稿, 2013 年 10 月收到来稿

[基金项目] 国家自然科学基金项目(41276175) 和上海市自然科学基金项目(11ZR1441000) 资助

[作者简介] 苑孟, 女, 1989 年生, 硕士研究生, 主要从事极地微生物研究

[联系作者] 俞勇, E-mail: yuyong@pric.gov.cn

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

放线菌 Y18 分离自 2010 年中国第 4 次北极科学考察队采集于北冰洋楚科奇海的海洋沉积物 (70°45.60'N, 164°43.70'W; 水深 26m)。

供试菌株: 金黄葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 以及白色念珠菌 (*Candida albicans*) 由中国极地研究中心微生物实验室保存。

1.1.2 培养基

ISP II 培养基^[6] (用于 Y18 的基本培养): 酵母浸出粉 4 g, 麦芽浸出物 10 g, 葡萄糖 4 g, 琼脂 15 g, 无菌楚科奇海水 (天然海水, 盐度 3%) 1 L, pH 7.0;

PM3 培养基^[7] (用于 Y18 的固体发酵): 燕麦粉 20 g, 甘油 2.5 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.1 mg, MnCl₂ · 4H₂O 0.1 mg, ZnSO₄ · 7H₂O 0.1 mg, 琼脂 15 g, 无菌天然海水 1 L;

沙氏培养基 (用于供试菌白色念珠菌的培养): 蛋白胨 10 g, 葡萄糖 40 g, 琼脂 15 g, 无菌水 1 L, pH 5.6;

营养琼脂培养基 (用于供试菌枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、大肠杆菌、金黄葡萄球菌的培养): 牛肉膏 1 g, 酵母膏 2 g, 蛋白胨 5 g, NaCl 5 g, 琼脂 15 g, 无菌水 1 L;

LB 培养基 (用于 DH5 α 感受态培养): 胰蛋白胨 10 g, 酵母膏 5 g, NaCl 10 g, 琼脂 15 g, 无菌水 1 L;

发酵培养基^[7-11]: M1 (大豆粉 20 g, 蛋白胨 2 g, 葡萄糖 20 g, 淀粉 5 g, 酵母膏 2 g, 海水 1 L, pH 7.5); M2 (淀粉 10 g, 蔗糖 10 g, 黄豆粉 6 g, MgSO₄ 0.5 g, 海水 1 L); M3 (蛋白胨 2 g, 酪素水解物 2 g, 酵母膏 2 g, 葡萄糖 1 g, 海水 1 L); M4 (蔗糖 20 g, 黄豆粉 15 g, 酵母膏 1.5 g, 甘油 2 g, 海水 1 L); M5 (PM3 液体) (燕麦粉 20 g, 甘油 2.5 g, FeSO₄ · 7H₂O

0.1 mg, MnCl₂ · 4H₂O 0.1 mg, ZnSO₄ · 7H₂O 0.1 mg, 海水 1 L)。

1.2 菌株分子鉴定

Y18 基因组 DNA 的提取采用细菌基因组 DNA 抽提试剂盒 (天根生化科技有限公司, 北京)。用细菌 16S rDNA 通用引物^[12] 27F (5'-AGAGTTTGATC-CTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGT-TACGACTT-3') 进行扩增。PCR 反应体系为 50 μ l: 模板 DNA 2 μ l, 10 \times buffer 5 μ l, BSA (1 mg/ml) 4 μ l, dNTP (2.5 mM) 1 μ l, 引物 (10 μ M) 各 1 μ l, Taq DNA 聚合酶 3.5 U。扩增程序为 6 min at 94 $^{\circ}$ C 预变性 6 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 共 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。取两次 PCR 后产物 100 μ l 用 GeneClean 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (上海捷瑞生物工程有限公司) 进行 16S rDNA 的回收纯化, 纯化后的 DNA 片段用 TaKaRa (大连宝生物工程有限公司) 的 pMD18-T Vector 试剂盒进行连接, 将连接产物转化进大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞 (天根生化科技有限公司, 北京), 于含有 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 固体培养基上进行蓝白斑筛选。挑取白色菌落用 T 载体通用引物 M13+、M13- 进行菌落 PCR, 获得阳性克隆, 送往上海美吉生物医药科技有限公司测序, 并提交 GenBank 注册。将所测序列与 GenBank 数据库进行 Blast 相似性比较, 选取与选定菌株亲缘关系较近的菌株用 Mega4 软件^[13] 采用邻接法 (neighbor-joining method) 进行系统发育树的构建。

1.3 需海水及耐盐性试验

挑取 Y18 单菌落分别点种在 ISP II 天然海水培养基、ISP II 人工海水培养基 (3% 的海盐, Sigma)、及含有 0%、3%、6%、10%、15% NaCl 的 ISP II 去离子水培养基的平板上, 培养 1—4 周, 观察菌落的生长情况。

1.4 抗菌活性研究

1.4.1 次级代谢产物合成酶基因的筛选

次级代谢产物合成酶基因的引物^[14-17]: PKS I: KSMA-F (5'-TSGCSATGGACCCSCAGCAG-3'), KSMB-R (5'-CCSGTSCCGTSGCCTCSAC-3'); PKS II: 540F (5'-GGITGCACSTCIGGIMTSGAC-3'), 1100R (5'-CC-

GATSGCICCSAGIGAGTG-3'); NRPS: A3F(5'-GCST-ACSYSATSTACACSTCSGG-3'), A7R(5'-SASGTCV-CCSGTSCGGTAS-3'); CYP: PEH-1(5'-TGGATCGG-CGACGACCGSVYCGT-3'), PEH-2(5'-CCGWASAG-SAYSCCGTCGTACTION-3')。引物由上海英潍捷基生物技术有限公司合成。四种基因的 PCR 反应体系都为 50 μ l, 扩增条件分别按照文献 7、文献 15、文献 16、文献 17 进行。取 5 μ l PCR 扩增产物用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 电压为 120 V。

1.4.2 抗菌活性检测

将 Y18 的单菌落接种于 PM3 固体培养基中, 培养一周以上, 将含有菌的直径 8 mm 的琼脂块转移到涂有 100 μ l 供试菌枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌的培养基上, 28 $^{\circ}$ C, 16 h 后观察抑菌圈。以不含菌的琼脂块作为对照。

1.5 Y18 发酵条件的研究

挑取 Y18 单菌落接种于 5 ml ISP II 天然海水培养基中, 180 rpm, 28 $^{\circ}$ C 条件下培养 5 天, 按 1% 的接种量接到 100 ml ISP II 海水培养基中, 加入 10 颗左右玻璃珠, 180 rpm, 28 $^{\circ}$ C 条件下培养 6 天作为种子液进行后续试验。

对 Y18 抗菌物质发酵条件进行了初步研究, 分别测定发酵培养基、发酵温度、发酵时间、种子液接种量、培养基的初始 pH 值、培养基的装液量对发酵液抗菌活性的影响, 从而选择合适的发酵条件。采用牛津杯法通过测定抑菌圈大小来判断其对枯草芽孢杆菌的抗菌活性, 以高温灭活的发酵液作为对照。每组试验设三个重复。

1.6 发酵液的稳定性试验

菌株 Y18 在优化后的条件下发酵, 发酵液进行室温和低温贮藏稳定性、热稳定性和酸碱稳定性试验, 每组实验设三个重复。

1.6.1 发酵液贮藏稳定性测试

取发酵液 30 ml 分成两份, 分别放置在室温和 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存, 在保存的第 1、3、5、7、15、30 天使用牛津杯法检测其抑菌活性, 与初始的抑菌活性做比较。以高温失活的发酵液作为对照。

1.6.2 发酵液热稳定性测试

取发酵上清液分装到 2 ml 离心管中, 每管 1 ml, 分别置于 50 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C、70 $^{\circ}$ C、80 $^{\circ}$ C、100 $^{\circ}$ C、121 $^{\circ}$ C 中处理 30 分钟, 冷却到室温后, 以未处理的发酵液做对照, 采用牛津杯法检测其抗菌活性的变化。

1.6.3 发酵液酸碱稳定性测试

取发酵上清液分装到 5 ml 离心管中, 每管 3 ml, 用 1 mol/L 的 HCl 或 1 mol/L 的 NaOH 溶液将 pH 分别调至 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0, 室温放置 2 小时后, 将 pH 调回初始 pH, 以相同条件处理的高温失活发酵液和未处理的发酵液做对照, 采用牛津杯法检测其抗菌活性的变化。

2 结果与分析

2.1 Y18 菌株的分子鉴定

将菌株 Y18 的 16S rDNA 基因片段进行克隆测序后, 获得 1 491 bp 的 16S rDNA 序列, 提交 GenBank 注册后, 获得登录号 KF306354。将序列与 GenBank 数据库进行 blast 比对后, 选取与 Y18 相近的模式菌株构建系统发育树(图 1)。结果表明菌株 Y18 归属于拟诺卡氏菌属(*Nocardiopsis*), 与模式菌株 *Nocardiopsis dassonvillei* subsp. *dassonvillei* DSM 43111^T 同属一个进化分支, 其相似度高达 99.8%, 1 491 个碱基中只有 3 个碱基的差异。因此, 将该菌株暂命名为 *Nocardiopsis* sp. Y18。

2.2 需海水及耐盐性

Y18 在 ISP II 海水培养基(SW)和 ISP II 人工海水培养基(ASW)上生长良好; 在含有 0% 和 6% NaCl 的培养基中可以生长, 但生长速度较慢, 且气生菌丝体与生长良好状态下相比不够发达。在 10%、15% NaCl 的 ISP II 去离子水培养基的平板上不能生长。

2.3 生物活性研究结果

对 Y18 的次级代谢产物合成酶基因及抗菌活性筛选结果见表 1。从结果可以看出 Y18 含有两种次级代谢产物合成酶基因: PKS II 和 NRPS; 可以抑制枯草芽孢杆菌和白色念珠菌的生长, 其抑菌圈大小分别为: 20 mm 和 15 mm, 这说明 Y18 具有较好的抗菌活性。

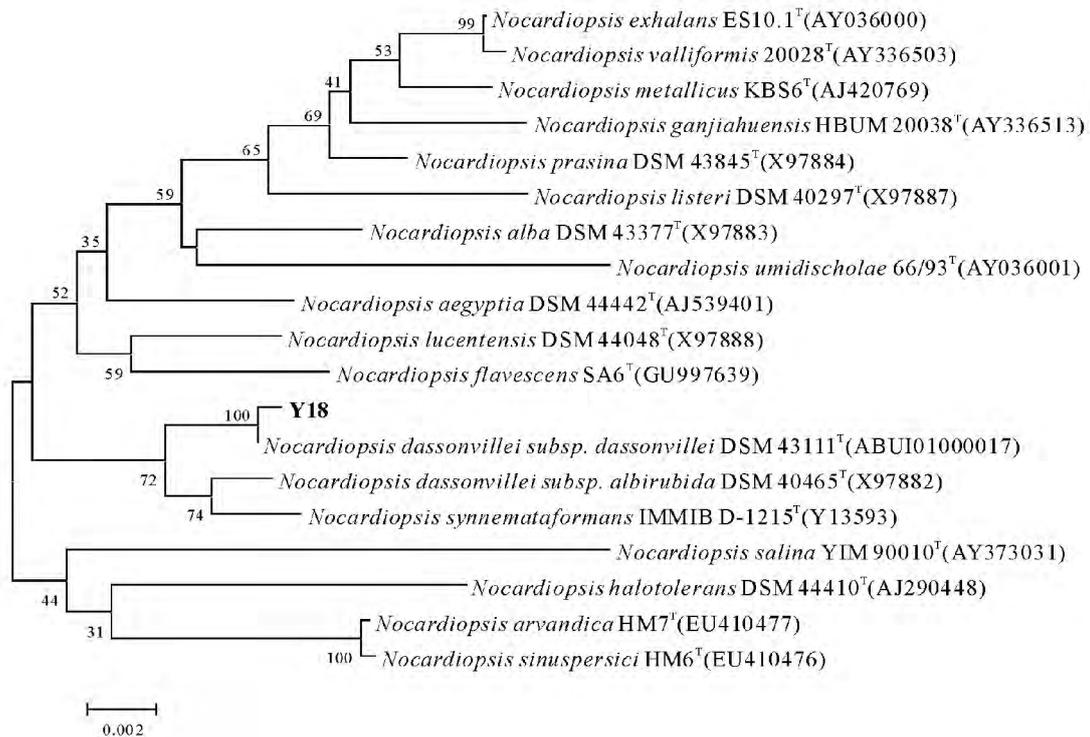


图 1 根据 16S rDNA 基因序列构建的系统进化树

Fig. 1. Neighbor-joining tree based on 16S rDNA gene sequences showing bootstrap values (1 000 replications). Bar: 0.02 substitutions per nucleotide position

表 1 次级代谢产物合成基因和抗菌活性筛选
Table 1. Biosynthetic genes and antimicrobial activities

筛选项目	PKSI	PKSII	NRPS	CYP	枯草芽孢杆菌	白色念珠菌	大肠杆菌	金黄葡萄球菌	铜绿假单胞菌
筛选结果	-	+	+	-	+	+	-	-	-

2.4 Y18 发酵条件研究结果

2.4.1 发酵培养基的选择结果

将 Y18 按 1% 的接种量接到选定的 5 种培养基中 28℃, 180 rpm 的条件下发酵 6 天, 用牛津杯法检测各自的抑菌活性。M1、M2、M4、M5 都没有检测出抑菌活性, M3 号培养基的抑菌圈直径平均为 18 mm 因此选用 M3 号培养基作为 Y18 的发酵培养基。

2.4.2 发酵时间及种子液接种量的确定

将种子液分别按 1%、4% 和 8% 的接种量接于 100 ml 发酵培养基中, 每天同一时间检测抑菌活性 (图 2)。可以看出 1% 接种量的抗菌活性较低, 4% 和 8% 接种量都在第六天表现出了最大的抑菌活

性, 抑菌圈直径达到 22.5 mm。第六天之后抗菌活性开始下降, 因此将发酵天数定为 6 天。8% 接种量虽然表现出抗菌活性的时间比较早, 但第六天后其抑菌活性下降较快, 因此将种子液的接种量定为 4%。

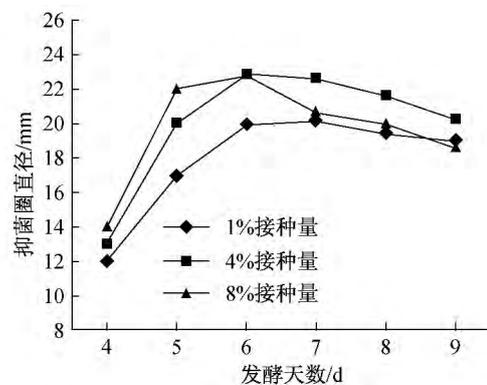


图 2 不同接种量及不同发酵时间对发酵产物抑菌活性的影响

Fig. 2. Effect of inoculation dose and fermentation time on antibiotic activity

2.4.3 培养基装液量的确定

用 1 000 ml 的锥形瓶分别测定 20%、30%、40%、50% 装液量的抑菌活性,将种子液以 4% 的接种量接入发酵培养基中,28℃,180 rpm 的条件下发酵 6 天。结果表明 20% 装液量的抑菌活性较好,抑菌圈直径平均为 23 mm,30% 装液量的抑菌圈直径平均为 16 mm,40% 的装液量抑菌效果较差,为 13 mm,50% 的装液量几乎没有抑菌效果,因此将 1 000 ml 锥形瓶的装液量定为 20%。

2.4.4 发酵温度的确定

将种子液以 4% 的接种量接入发酵培养基中,分别置于 15℃、28℃、37℃ 培养 6 天,发现当发酵温度为 28℃ 时,抑菌效果最好,抑菌圈直径平均为 21 mm;当发酵温度为 15℃ 时,菌体生长缓慢,代谢产物量很少,没有观察到抑菌圈;当发酵温度为 37℃ 时,抑菌效果比较差,抑菌圈直径仅为 12 mm。因此确定发酵温度为 28℃。

2.4.5 发酵培养基初始 pH 值的确定

分别将发酵培养基的初始 pH 值调至 6.0、7.0、8.0 和 9.0,培养 7 天后检测其抑菌效果得到图 3。可以看出初始 pH 在 7—8 之间时,发酵液的抑菌效果都比较好,当初始 pH 值为 8.0 时,效果最好,抑菌圈直径平均为 20.5 mm。因此将初始 pH 值定为 8.0。

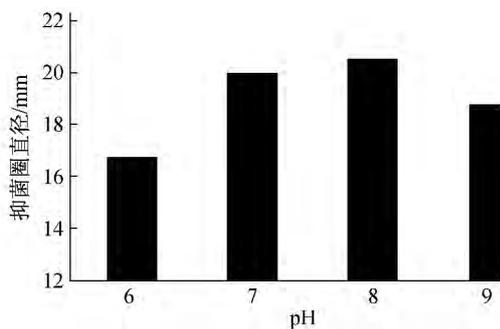


图 3 发酵液初始 pH 值对菌株抑菌活性的影响
Fig. 3. Effect of initial pH value on antibiotic activity

2.5 发酵液稳定性研究结果

2.5.1 发酵液贮藏稳定性

发酵液的随时间变化的抗菌活性如图 4 所示,可以看出发酵液在 4℃ 中贮藏更有利于维持高的抗菌活性。在贮藏的第 30 天,4℃ 的活性仅下降了 10%,而室温条件下贮藏活性下降了 38%,因此该

菌株产生的活性物质在低温储藏效果较好。

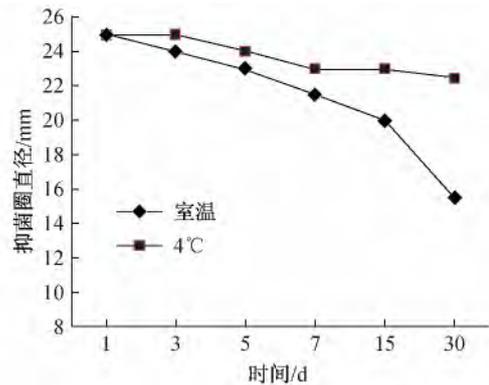


图 4 不同贮藏条件对菌株抗菌活性的影响
Fig. 4. Effect of different storage conditions on antibiotic activity

2.5.2 发酵液酸碱稳定性

发酵液酸碱稳定性如图 5 所示,以相同 pH 条件处理的高温失活发酵液无抗菌活性。从图中可以看出发酵液在碱性条件下有较好的抑菌活性,在 pH11 的强碱环境下仍保持对照发酵液的 94% 的活性。在酸性条件下抑菌活性也较高,在 pH3 的强酸条件下其抑菌活性为对照的 92%。因此可以看出 Y18 菌株发酵液有较宽的酸碱适合范围,在 pH8—9 条件下活性最好,随着 pH 升高或降低,其抑菌活性均有下降,所以在对 Y18 菌株处理时,尽量控制 pH 值,减少抑菌活性物质的损失。

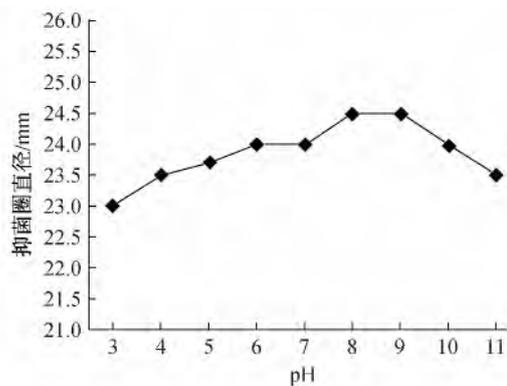


图 5 pH 对抗菌活性的影响
Fig. 5. Stability of fermentation liquid against different pH

2.5.3 发酵液热稳定性

由图 6 可以看出 Y18 发酵液具有较高的热稳定性,在 50℃ 中处理 30 min,其抑菌活性没有变化;发酵液在 80℃ 中处理 30 min 后,抑菌活性为对照的 80%,下降了 20%;在 100℃ 和 121℃ 处理 30 min

后,发酵液丧失了抗菌活性。该结果说明,发酵液在低于 80℃ 时,热稳定性较好,但高于 80℃ 热稳定性下降较快。

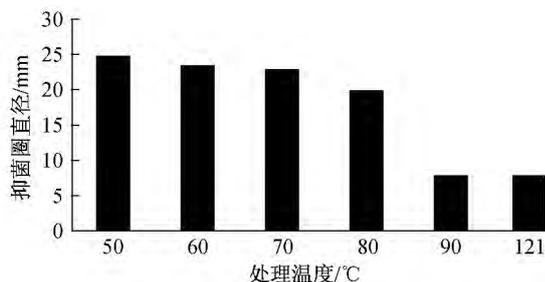


图6 温度对抑菌活性的影响

Fig. 6. Stability of fermentation liquid against different temperature

3 讨论

北冰洋气候寒冷,水温大部分时间在 0℃ 以下 2/3 的洋面常年被海冰覆盖,因此其海洋环境样品采集相对困难,涉及北冰洋海洋放线菌的研究工作也相对较少。近几年来随着对海洋及极端环境微生物的关注度的提升,研究工作取得了很大的进展。2007 年 Bredholt 等^[7]从挪威海特隆赫姆峡湾力道 3 200 多株海洋放线菌,除了链霉菌属和小单孢菌属外还有很多的稀有放线菌,且分离到的链霉菌中有 80% 的菌株具有抗菌活性。俞勇等^[18]从楚科奇海和加拿大海盆分离到 61 株放线菌,其中的 28 株菌分别属于迪茨氏菌属、红球菌属等 6 个属。上述结果表明北冰洋放线菌物种多样性丰富,是微生物资源的重要新来源。同时,面对严酷的环境条件,放线菌必须进化出相应的生理、生化特征才能在其中生存。挪威海特隆赫姆峡湾海洋放线菌的研究证明了这一点。2010 年, Jørgensen 等从峡湾的 450 m 水深海底沉积物中分离到的一株链霉菌中分得一个大环内脂酰胺类化合物,该化合物对白色念珠菌、光滑念珠菌和藤黄微球菌都有抑制作用^[19]。Engelhardt 等从峡湾 24.6 m 水深的海洋沉积物来源的拟诺卡氏菌菌株中发现一个含硫多肽类化合物,可以抑制革兰氏阳性细菌的生长^[20]。本文对一株来自北冰洋楚科

奇海海洋沉积物的海洋放线菌 Y18 进行了一系列的研究,包括其分类鉴定、抗菌活性,并对其活性物质的发酵条件进行了优化,同时也研究了其发酵液的稳定性。

通过 16S rDNA 序列分析,发现与其亲缘关系最近的种为 *Nocardiopsis dassonvillei* subsp. *dassonvillei* DSM 43111^T,相似性高达 99.8%。其 NaCl 耐受范围为 0%—6%,对盐度的耐受范围比较广泛。该菌株可以在不含盐的培养基中生长,但其在海水培养基中生长得更好,因此,该菌株可能是由陆地进入海洋并已开始适应海洋环境。

海洋微生物次级代谢产物主要以聚酮类化合物和非核糖体肽类化合物为主,负责合成这两类化合物的酶分别属于多聚酮合酶 (Polyketidesynthetase, PKS) 和非核糖体肽合成酶 (Non-ribosomal peptide synthetase, NRPS)^[16]。聚酮类化合物又分为芳香环聚酮类化合物(四环素、阿霉素)和大环内酯类化合物(雷帕霉素、阿维霉素),分别由 PKS II 和 PKS I 途径合成。细胞色素 P450 羟化酶基因 (CYP) 可以合成多烯类物质,对真菌有抑制效果^[21]。从基因筛选的结果看该菌株可能会产芳香环聚酮类化合物和非核糖体肽类化合物。抗菌活性筛选的结果为该菌株可以抑制枯草芽孢杆菌和白色念珠菌的生长,尤其对枯草芽孢杆菌有很好的抑制作用,因此有较高的研究价值。

本研究表明,适合 Y18 发酵产抗芽孢杆菌活性产物的培养基配方为:蛋白胨 2 g,酪素水解物 2 g,酵母膏 2 g,葡萄糖 1 g,海水 1 L;发酵条件为:发酵培养基初始 pH 值 8.0,种子液接种量 4%,发酵温度 28℃,发酵时间 6 天,1 000 mL 三角瓶装液量 20%。经优化后该菌株发酵液对枯草芽孢杆菌的抑菌圈直径从最初的 18 mm 上升到了 25 mm,在发酵条件优化后抗菌活性大大提高,抑菌圈直径增加了 38.9%。

对发酵液的稳定性研究表明,发酵液对温度具有较好的稳定性,对酸碱环境适应性较强,低温贮藏性较好。这为 Y18 菌株发酵液抗菌活性成分进一步分离纯化提供了理论依据,为该菌株进一步研究开发奠定了基础。

参考文献

- 1 Kin S L. Discovery of novel metabolites from marine actinomycete. *Curr Opin Microbiol* ,2006 ,9: 245—251.
- 2 方金瑞. 海洋微生物: 开发海洋药物的重要资源. *中国海洋药物* ,1998 ,17(3) : 53—56.
- 3 Goodfellow M , Fiedler H P. A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematic. *Antonie van Leeuwenhoek* ,2010 ,98(2) : 119—142.
- 4 Olano C , Méndez C , Salas J A. Antitumor Compounds from Marine Actinomycetes. *Mar Drugs* ,2009 ,7(2) : 210—248.
- 5 Rahman H , Austin B , Mitchell W J , et al. Novel anti-infective compounds from marine bacteria. *Mar Drugs* ,2010 ,8(3) : 498—518.
- 6 Shirling E B , Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J SystBacteriol* ,1996 ,16: 317—327.
- 7 Bredholdt H , Galatenko O A , Engelhardt K , et al. Rare actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the Trondheim fjord , Norway: isolation , diversity and biological activity. *Environ Microbiol* ,2007 ,9(11) : 2756—2764.
- 8 杨晓军. 拟诺卡氏菌次级代谢产物的研究. *安徽农业科学* ,2011 ,39(13) : 7672—7673.
- 9 吴少杰 朱丽华 杨志娟. 不同培养基对海洋放线菌抗微生物活性的影响. *华北煤炭医学院学报* ,2006 ,8(5) : 600—602.
- 10 詹萍. 产抗菌活性物质海洋细菌的研究. 广西大学: 硕士学位论文 ,2006.
- 11 廖文彬 鲍时翔. 红树林放线菌产抗菌活性物质的分离纯化研究. *药物生物技术* ,2004 ,11(6) : 376—380.
- 12 Heuer H , Krsek M , Baker P , et al. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl Environ Microbiol* ,1997 ,63: 3233—3241.
- 13 Tamura K , Dudley J , Nei M , et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evolut* ,2007 ,24: 1596—1599.
- 14 Izumikawa M , Murata M , Tachibana K , et al. Cloning of modular type I polyketide synthase genes from salinomycin producing strain of *Streptomyces albus*. *Bioorg Med Chem* ,2003 ,11: 3401—3405.
- 15 Wawrik B , Kerkhof L , Zylstra G J , et al. Identification of unique type II polyketide synthase genes in soil. *Appl Environ Microbiol* ,2005 ,71: 2232—2238.
- 16 Ayuso-Sacido A , Genilloud O. New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes: detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. *Microb Ecol* ,2005 ,49: 10—24.
- 17 Lee M Y , Myeong J S , Park H J , et al. Isolation and partial characterization of a cryptic polyene gene cluster in *Pseudonocardia autotrophica*. *J Ind Microbiol Biotechnol* ,2006 ,33: 84—87.
- 18 Yu Y , Li H R , Zeng Y X , et al. Isolation and phylogenetic assignation of actinomycetes in the marine sediments from the Arctic Ocean. *Acta Oceanologica Sinica* ,2005 ,24(6) : 135—142.
- 19 Jørgensen H , Degnes K F , Dikiy A , et al. Insights into the evolution of macrolactam through cloning and comparative analysis of the biosynthetic gene cluster for a novel macrocyclic lactam , ML-449. *Appl Environ Microbiol* ,2010 ,76(1) : 283—293.
- 20 Engelhardt K , Degnes K F , Kemmler M , et al. Production of a new thiopeptide antibiotic ,TP-I161 , by a marine *Nocardopsis* species. *Appl Environ Microbiol* ,2010 ,76(15) : 4969—4976.
- 21 曹艳茹 姜怡 陈义光 等. 武陵山放线菌多样性. *微生物学报* ,2008 ,48(7) : 952—958.

MOLECULAR IDENTIFICATION , ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND FERMENTATION CONDITIONS OF ANTIBIOTIC SUBSTANCES OF MARINE ACTINOBACTERIA *NOCARDIOPSIS* SP. Y18

Yuan Meng^{1 2} , Yu Yong² , Li Huirong² , Dong Ning^{1 2} , Zhang Xiaohua¹

(¹Department of Marine Biology , Ocean University of China , Qingdao 266003 , China

²SOA Key Laboratory for Polar Science , Polar Research Institute of China , Shanghai 200136 , China)

Abstract

The actinomycete strain Y18 was isolated from ocean sediments collected from the Chukchi Sea , Arctic Ocean.

Its good growth needs sea water. It belongs to genus *Nocardiopsis* according to 16S rRNA sequence analysis. The results of secondary-metabolite biosynthesis genes screening show it contains Polyethylene ketone type II (PKS II) and non ribosome-bound sulfur-containing peptides (NRPS) genes. It has activities against both *Bacillus subtilis* and *Candida albicans*. The optimal fermentation conditions of Y18 against *Bacillus subtilis* are as follows: the fermentation medium containing peptone 2 g , casein hydrolysate 2 g , yeast extract 2 g , glucose 1 g , sea water 1 L , the seed liquid inoculum for 4% , medium initial pH8.0 , the culture temperature of 28℃ , liquid volume 20% in 1 000 ml flask , and fermentation time 6 days. Through the research of stability of heat , acid , alkali and storage we found that it had a stable activity to heat , acid , alkali and storage at 4℃ .

Key words marine actinomycetes , molecular identification , antibacterial activity , fermentation conditions , Arctic Ocean