

# 放线菌 JSD-1 抑菌活性初探及 影响其抑菌活性的发酵条件优化

赵里京, 支月娥, 刘焕然, 张丹, 周培

(上海交通大学农业与生物学院, 农业部都市农业重点实验室, 上海 201100)

**摘要:** 本文初步研究了放线菌 JSD-1 的抑菌活性, 并优化了影响其抑菌活性的发酵条件, 从而增强抑菌效果。本研究以致病性大肠杆菌和金黄色葡萄球菌为指示菌, 通过稀释涂布、琼脂打孔法和液态共培养法探究菌株 JSD-1 抑菌活性, 并采用单因素试验及正交试验设计对影响 JSD-1 抑菌活性的发酵培养基及发酵条件进行优化。最终得出影响 JSD-1 抑菌活性的最适培养基为葡萄糖 10.00 g/L, 尿素 2.50 g/L, 最佳发酵条件组合为温度 35 ℃, pH 7.0, 接种量 5%, 培养时间 7 d。通过发酵条件优化可明显增强放线菌 JSD-1 的抑菌活性, 抑菌圈直径由优化前的 10.08 mm 增长至 18.63 mm, 有利于菌株 JSD-1 作为拮抗菌的进一步开发利用。研究发现 JSD-1 在病原细菌的对数生长期、稳定期及衰亡期持续抑制其生长增殖, 这表明菌株 JSD-1 具有很大的抗菌潜力, 可作为生防制剂的候选菌株。

**关键词:** 致病性大肠杆菌; 金黄色葡萄球菌; 放线菌; 抑菌活性; 发酵条件

文章编号: 1673-9078(2019)12-176-181

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.12.023

## Preliminary Study on Antibacterial Activity of Actinomycete JSD-1 and Optimization of Fermentation Conditions Affecting the Antibacterial Activity of JSD-1

ZHAO Li-jing, ZHI Yue-e, LIU Huan-ran, ZHANG Dan, ZHOU Pei

(School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 201100, China)

**Abstract:** The antibacterial activity of actinomycete JSD-1 was preliminarily investigated in this work, and the fermentation conditions that affected its antibacterial activity were optimized to enhance the antibacterial effect. Using pathogenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* as indicator bacteria, the antibacterial activity of strain JSD-1 was investigated by dilution coating, agar diffusion method and liquid co-culture method. The fermentation conditions of JSD-1 were optimized by single factor experiment and orthogonal experiment design. The optimized culture medium to affect the antibacterial activity of JSD-1 was composed of glucose 10 g/L, urea 2.5 g/L. The optimal fermentation condition was as follow: culture temperature of 35 ℃ pH 7.0, inoculation amount 3%, culture time 7 d. The antibacterial activity of JSD-1 was significantly improved. The inhibitory zone diameter increased from 10.08 mm to 18.63 mm, which was beneficial to the further development and utilization of JSD-1 as an antagonist. It was found that the growth and proliferation of pathogenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were inhibited by JSD-1 in their logarithmic phase, stable phase and decline phase continuously, indicating that JSD-1 had great antibacterial potential and could be used as a candidate strain for biocontrol preparation.

**Key words:** pathogenic *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; actinomycete; antibacterial activity; fermentation conditions

致病性大肠杆菌和金黄色葡萄球菌可引起许多严重感染。近年来利用生防菌拮抗病原菌被认为具有很大的潜力。1924 年, Gratia 和 Dath 对抗生素进行了第一次系统的研究, 结果从放线菌中分离出了放线菌素。

收稿日期: 2019-08-01

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2016YFD05014042); 上海市科技兴农项目 [沪农科推字 (2018) 第 4-13 号; 沪农科推字 (2017) 第 2-1 号]

作者简介: 赵里京 (1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 环境微生物

通讯作者: 支月娥 (1961-), 女, 副教授, 研究方向: 农业微生物

目前已知的药物中, 约有 70% 是从放线菌中分离得到的, 其中 75% 和 60% 分别用于医药和农业<sup>[1]</sup>。尽管新的种、属不断被发现, 但目前分离到的放线菌种类, 仅为实际存在种类的 0.1%~1%<sup>[2,3]</sup>。土壤是放线菌栖居的重要场所, 一般来说, 放线菌主要存在于中性偏碱土壤中, 尤其是温带及亚热带富含腐殖质的土壤层<sup>[4,5]</sup>。从土壤中分离到的放线菌以链霉菌属最为常见<sup>[6]</sup>。放线菌, 特别是放线菌的链霉菌属被广泛报道用于生产各种用于治疗抗生素。放线菌产生的抗生素中,

80%的活性物质都是由土壤中的链霉菌产生的,如链霉素、新生霉素<sup>[7]</sup>等。因此,从土壤中分离具有杀菌抑菌活性的链霉菌,并通过发酵使其产生活性代谢产物是目前微生物农药开发的一个重要途径<sup>[8]</sup>。

灰略红链霉菌(*Streptomyces griseorubens*) JSD-1, 编号为 CGMCC No.5706, 由本实验室从土壤中分离筛选并保藏<sup>[9]</sup>。本文通过稀释涂布、琼脂打孔法和液态混菌共培养探究了放线菌 JSD-1 的抑菌活性。经初步研究, JSD-1 对致病性大肠杆菌和金黄色葡萄球菌等病原菌生长具有较强抑制作用, 且菌株的抑菌活性不来源于表面活性化合物。为了进一步开发利用该菌株, 本研究采用单因素试验和正交试验方法探究不同培养基成分及发酵条件对放线菌 JSD-1 抑菌活性的影响, 为后期分离纯化放线菌 JSD-1 产生的抑菌活性成分及抑菌应用提供科学依据, 也为进一步阐释 JSD-1 的抑菌机理及明确其抑菌活性物质奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

供试病原菌: 大肠杆菌、沙门氏菌、志贺氏菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌, 均由上海交通大学农业与生物学院分析测试平台提供, 上海交通大学资源与环境系生态学实验室保存。

供试拮抗菌: 灰略红链霉菌(*Streptomyces griseorubens*) JSD-1, 编号为 CGMCC No.5706, 由课题组前期从土壤中分离并保藏。

供试培养基: 高氏一号液体培养基, 每升配方: 可溶性淀粉 20 g、KNO<sub>3</sub> 1 g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g、NaCl 0.5 g、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01 g、蒸馏水 1000 mL、pH 7.2~7.4。高氏一号固体培养基则每升添加琼脂 20 g。LB 液体培养基, 每升配方: 胰蛋白胨 10 g、酵母粉 5 g、NaCl 10 g、蒸馏水 1000 mL、pH 7.2~7.4。LB 固体培养基则每升添加琼脂 15~20 g。上述培养基灭菌条件均为 0.1 MPa, 20 min。

主要试剂和仪器: 氯化钠、硝酸钾、葡萄糖等试剂, 国药集团化学试剂有限公司; 大肠杆菌显色培养基、金黄色葡萄球菌显色培养基, 青岛海博生物技术有限公司; 电子分析天平, 赛多利斯科学仪器北京有限公司; 超净工作台、双层恒温摇床, 上海智城分析仪器制造有限公司; 压力蒸汽灭菌锅、恒温培养箱, 日本 SANYO Electric Co. LTD。

### 1.2 发酵液的制备与 JSD-1 抑菌活性初探

#### 1.2.1 发酵液的制备

将甘油管保存的放线菌 JSD-1 接种到高氏一号固体培养基上, 放入 32 ℃ 培养箱中培养 7 d。挑取单菌落接种于装有 50 mL 高氏一号液体培养基的 150 mL 三角瓶中, 于 32 ℃、200 r/min 摇床振荡培养 3 d, 即得种子液(期间可不断接种以获取新的种子液)。按 5% 的接种量将种子液接种于装有 150 mL 高氏一号液体培养基的 500 mL 三角瓶中, 于 32 ℃、200 r/min 摇床振荡培养 7 d, 收集发酵液。

#### 1.2.2 抑菌活性测定

将甘油管保存的致病性大肠杆菌、沙门氏菌、志贺氏菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌分别接入装有 50 mL LB 液体培养基的 150 mL 三角瓶中, 于 37 ℃、150 r/min 摇床振荡培养 24 h, 按 1% 的接种量将大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等转接到装有 150 mL LB 液体培养基的 500 mL 三角瓶中, 于 37 ℃、150 r/min 摇床振荡培养 12 h。

测量上述培养 12 h 的致病性大肠杆菌、沙门氏菌、志贺氏菌、金黄色葡萄球菌与枯草芽孢杆菌在紫外分光光度计上的 OD<sub>600</sub> 值后, 将其分别稀释至 10<sup>5</sup> cfu/mL。采用琼脂打孔法<sup>[10]</sup>, 取 100 μL 稀释后的病原菌滴加在 LB 固体平板上, 并涂布均匀。用灭菌后的 5 mm 打孔器在指示平板上打孔, 每个指示平板上的 3 个圆孔间距离相等, 圆孔直径为 5 mm。向圆孔中注入 80 μL JSD-1 发酵液, 以相同条件下无菌水为对照, 各设 3 个重复。置于 37 ℃ 恒温培养箱中培养 24 h, 观察圆孔周围有无抑菌圈产生。

#### 1.2.3 液态混菌共培养

以革兰氏阴性细菌致病性大肠杆菌和革兰氏阳性细菌金黄色葡萄球菌为指示菌, 用高氏一号液体培养基将放线菌 JSD-1 稀释至 10<sup>7</sup> cfu/mL, 将致病性大肠杆菌和金黄色葡萄球菌稀释至 10<sup>5</sup>~10<sup>6</sup> cfu/mL, 然后将放线菌 JSD-1 和致病菌各按 1% 接种量接入同一装有 100 mL 高氏一号液体培养基的三角瓶中(1 mL+1 mL) 构成处理组, 分别以放线菌 JSD-1 和致病菌单独培养为对照组 1 和对照组 2。处理组和对照组均置于 37 ℃ 恒温培养箱中静置培养, 每组实验设置 3 个平行。

#### 1.2.4 活菌计数方法

将上述处理组和对照组培养 2、4、8、12、20、28、36 h 时各取样 100 μL, 按 10 倍系列梯度稀释至不同浓度, 选择 3~4 个适当梯度点, 分别取 100 μL 稀释后的菌液滴加在特异性显色固体平板上, 并涂布均匀, 每个稀释度做 3 个平行, 37 ℃ 培养 24 h, 分别对处理组和对照组的放线菌 JSD-1、致病性大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的菌落数进行计数。



### 1.2.5 抑菌活性物质的提取

取 JSD-1 发酵液, 于 4℃、8000 r/min 离心 20 min, 取上清液用无菌的 0.22 μm 微孔滤膜过滤。滤液用乙酸乙酯萃取两次, 得粗提液, 采用旋转真空蒸发器将粗提液浓缩至无溶剂状态, 得到的残留物在真空干燥器中干燥并溶解在乙酸乙酯中<sup>[11,12]</sup>。

### 1.2.6 抑菌活性物质的乳化特性研究

取 4 mL 上述乙酸乙酯提取物, 加入 4 mL 正十六烷, 高速涡旋 2 min 后将混合物静置 24 h。E<sub>24</sub> 定义为乳液层的高度除以总高度, 用百分比表示<sup>[12]</sup>。

## 1.3 影响 JSD-1 抑菌活性的发酵条件优化

### 1.3.1 单因素试验法筛选最适培养条件

以致病性大肠杆菌和金黄色葡萄球菌为指示菌, 以高氏一号培养基为对照, 采用单因素试验法分别研究不同碳源 (淀粉、葡萄糖、乳糖、半乳糖、麦芽糖、果糖、蔗糖、木糖), 不同氮源 (硝酸钾、胰蛋白胨、酵母粉、氯化铵、硝酸钠、硫酸铵、尿素、玉米面、花生饼粉), 不同初始 pH (4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0), 不同接种量 (1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%), 不同温度 (28℃、32℃、35℃、38℃、42℃) 和不同培养时间 (2 d、4 d、7 d、10 d、14 d) 对放线菌 JSD-1 抑菌活性的影响。采用琼脂打孔法, 用游标卡尺测定孔周围的抑菌圈大小。每组实验设置 3 个平行, 以抑菌圈直径平均值作为抑菌活性的评价指标。

### 1.3.2 正交试验设计确定最优组合

根据单因素试验结果, 从中选择对拮抗菌 JSD-1 抑菌活性影响较为显著的因子 (碳源、氮源、pH 和接种量), 使用正交设计助手 II 软件, 选择 L<sub>9</sub> (3<sup>4</sup>) 正交表, 设计 4 因素 3 水平的正交试验, 从而进一步确定发酵过程中影响 JSD-1 抑菌活性的最优组合。

## 1.4 数据处理

使用 Microsoft Excel 2007 和 SPSS 19.0 统计软件进行数据处理与分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 JSD-1 抑菌活性初探

#### 2.1.1 抑菌活性测定

放线菌 JSD-1 对革兰氏阴性细菌致病性大肠杆菌、沙门氏菌、志贺氏菌和革兰氏阳性细菌金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌均有拮抗作用, 抑菌效果如图 1 所示。其中大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、

枯草芽孢杆菌和志贺氏菌的抑菌圈直径分别为 10.08 mm、11.01 mm、8.52 mm、12.98 mm、7.63 mm。对照组无抑菌圈产生。

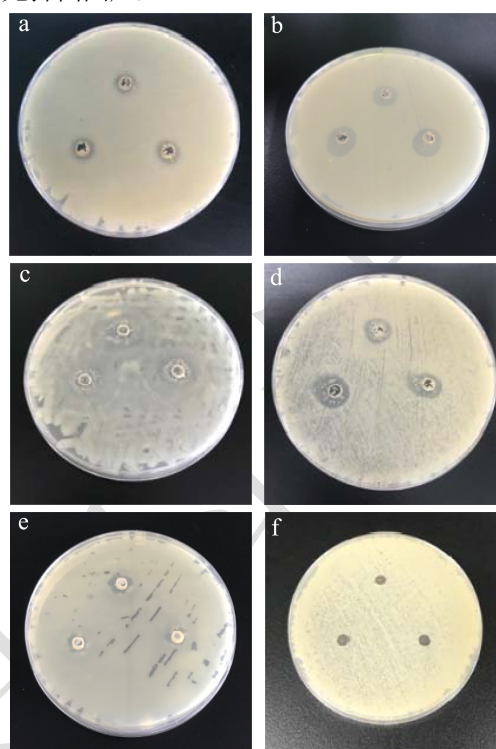


图 1 JSD-1 菌株的拮抗效果

Fig.1 Antagonistic effect of strain JSD-1

注: a: 对大肠杆菌的拮抗效果; b: 对金黄色葡萄球菌的拮抗效果; c: 对沙门氏菌的拮抗效果; d: 对枯草芽孢杆菌的拮抗效果; e: 对志贺氏菌的拮抗效果; f: 对照。

### 2.1.2 液态混菌共培养

#### 2.1.2.1 JSD-1 对大肠杆菌的拮抗作用

JSD-1 与大肠杆菌共培养, 其生长状况如图 2 所示。

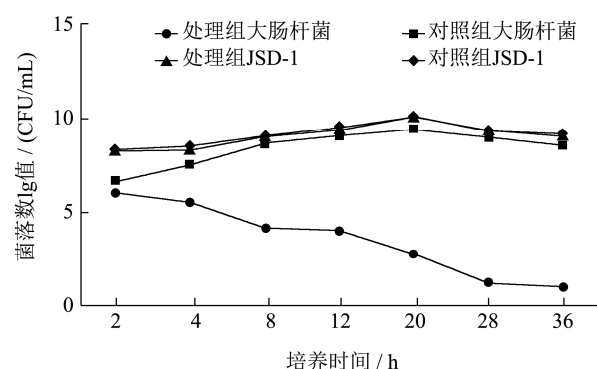


图 2 JSD-1 与大肠杆菌共培养的生长曲线

Fig.2 Growth curve of co-culture of JSD-1 with *Escherichia coli*

由图 2 可知, 对照组的大肠杆菌在前 8 h 处于增殖期, 8 h 后进入稳定期, 20 h 后进入衰亡期。而处理组的大肠杆菌从与放线菌 JSD-1 混合培养的 2 h 起, 就已不再增殖, 从 12 h 时  $1.2 \times 10^4$  cfu/mL 起菌落数开

始急剧下降,至 36 h 时大肠杆菌数已减少到 10 cfu/mL,与对照组的大肠杆菌数  $3 \times 10^8$  cfu/mL 相差 7 个数量级,这说明放线菌 JSD-1 对大肠杆菌具有显著的拮抗作用。菌株 JSD-1 在大肠杆菌的对数生长期、稳定期及衰亡期对其均有抑制作用,稳定期和衰亡期内作用尤其明显。而对照组与处理组的 JSD-1 生长曲线几乎完全重叠,这说明大肠杆菌不影响放线菌 JSD-1 的正常生长。

### 2.1.2.2 JSD-1 对金黄色葡萄球菌的拮抗作用

JSD-1 与金黄色葡萄球菌共培养,其生长状况如图 3 所示。

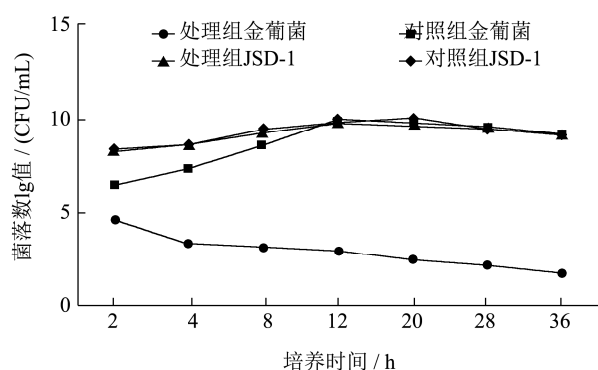


图3 JSD-1 与金葡菌共培养的生长曲线

Fig.3 Growth curve of co-culture of JSD-1 with *Staphylococcus aureus*

由图 3 可知,对照组的金黄色葡萄球菌在前 12 h 处于增殖期,12 h 后进入稳定期,保持在约  $8 \times 10^9$  cfu/mL,20 h 后进入衰亡期;处理组的金黄色葡萄球菌数从 2 h 时  $2.76 \times 10^4$  cfu/mL 起就先后出现不同程度的大幅下降,到 36 h 时处理组的金黄色葡萄球菌减少至 50 cfu/mL,与对照组的金黄色葡萄球菌数  $1.46 \times 10^9$  cfu/mL 相差 8 个数量级,这说明放线菌 JSD-1 显著抑制金黄色葡萄球菌的生长。菌株 JSD-1 在金黄色葡萄球菌的对数生长期、稳定期及衰亡期持续抑制其生长增殖,使其活菌数呈逐渐减少的趋势。同时对照组与处理组的 JSD-1 生长曲线几乎完全重合,无明显差异,这说明金黄色葡萄球菌不会限制放线菌 JSD-1 的正常增殖。

### 2.1.3 抑菌活性物质的乳化特性

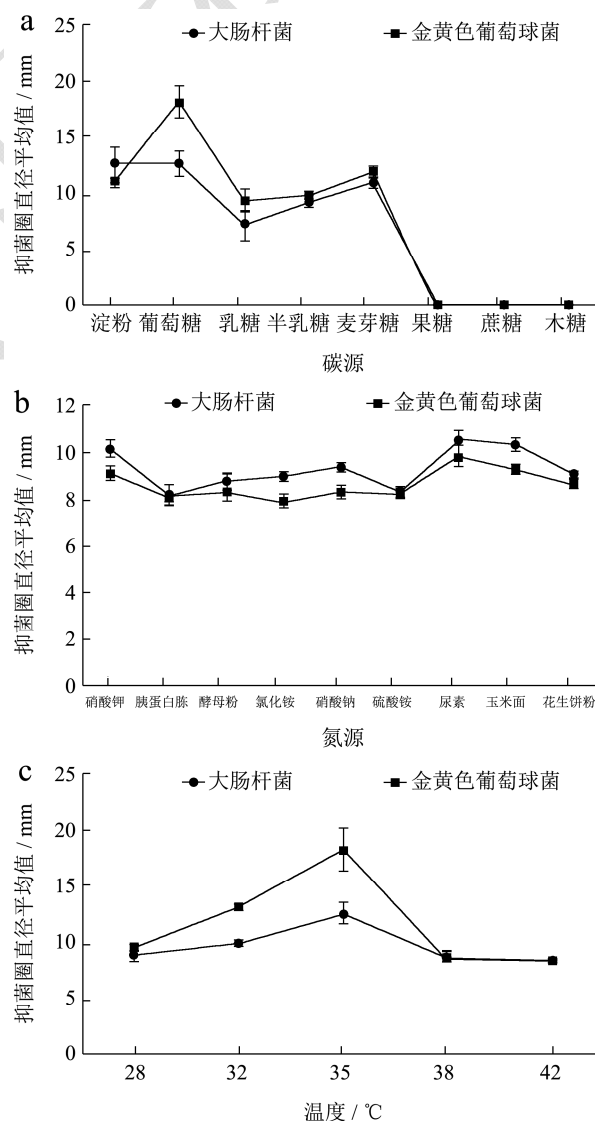
活性物质(乙酸乙酯提取物)不具有乳化活性,其  $E_{24}$  值为 0,表明其抑菌活性不来源于表面活性化合物。

## 2.2 影响 JSD-1 抑菌活性的发酵条件优化

### 2.2.1 单因素试验法筛选最适培养条件

单因素试验结果显示不同培养基组分及培养条件

对 JSD-1 菌株抑菌效果均有不同程度的影响(图 4)。其中,对比抑菌圈直径,可知 JSD-1 产抑菌物质的最适培养基为:碳源选择葡萄糖,氮源选择尿素。最优培养条件:温度 35 °C, pH 7.0, 接种量为 3% (体积比),培养时间为 7 d。JSD-1 菌株在 28~42 °C 都能正常生长,在 28~35 °C 温度区间内其抑菌活性随温度升高而增强,在 35 °C 下大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径达到最大值,分别为 12.51 mm 和 18.05 mm。高于 35 °C 时其抑菌活性明显减弱,抑菌圈直径分别减小至 8.22 mm 和 8.28 mm。JSD-1 菌株适合在中性(pH=7.0)环境下培养,该条件下大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径可达到最大值 10.95 mm 和 13.97 mm,过酸过碱均会限制菌株的抑菌活性。最佳接种量为 3% (体积比),低于或高于该接种量都会使菌株抑菌活性减弱。培养时间为 2~4 d 时, JSD-1 菌株抑菌活性较弱,培养 7 d,其抑菌活性达到峰值,此后逐渐减弱。



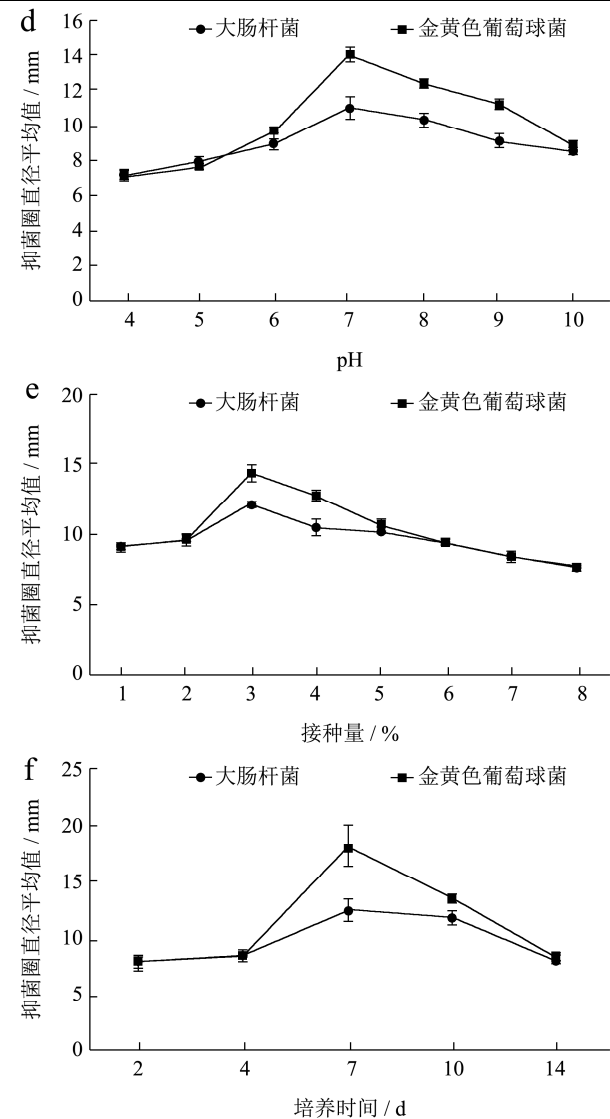


图4 不同培养条件对JSD-1抑菌圈直径的影响

Fig.4 Effects of different culture conditions on inhibition zone diameter of JSD-1

注: a: 不同碳源; b: 不同氮源; c: 不同温度; d: 不同pH; e: 不同接种量; f: 不同培养时间。

2.2.2 正交试验设计确定最优组合

根据上述单因素试验结果,各因素对JSD-1抑菌活性均有影响,选择影响较为显著的因子碳源(A)、氮源(B)、pH(C)和接种量(D)进行正交试验设计。采用 $L_9(3^4)$ 正交表,设计4因素3水平的正交试验,从而进一步确定影响JSD-1抑菌活性的各因子的最佳配比(表1)。以大肠杆菌抑菌圈直径作为评价指标。

R值(极差)的大小顺序表明,影响菌株JSD-1发酵液抑菌活性的因子强度由强到弱依次为 $A>C>D>B$ 。K值大小反应了每个因素在3个不同水平中抑菌能力的差异。从4个因素各自的 $K_1$ 、 $K_2$ 、 $K_3$ 中,选择最大值,可以获得每个因素的最优水平;每个因素的最优水平组合在一起即是4因素的最优组

合。因此,结合K值,适合JSD-1发挥抑菌作用的最优组合为碳源浓度10.00 g/L、氮源浓度2.50 g/L、pH 7、接种量5%。该组合下的K值为52.38,抑菌圈直径为18.63 mm,相比组合2中的抑菌圈直径提高了约0.94倍。

表1 正交试验 $L_9(3^4)$ 结果及极差分析

Table 1 The analysis of range and result of orthogonal

| 编<br>号 | 因素               |                  |       |             | 抑菌圈<br>直径/mm |
|--------|------------------|------------------|-------|-------------|--------------|
|        | A 碳源<br>浓度/(g/L) | B 氮源<br>浓度/(g/L) | C pH  | D 接<br>种量/% |              |
| 1      | 1(2.5)           | 1(1)             | 1(7)  | 1(3)        | 10.87        |
| 2      | 1(2.5)           | 2(2.5)           | 2(8)  | 2(4)        | 9.59         |
| 3      | 1(2.5)           | 3(5)             | 3(9)  | 3(5)        | 10.55        |
| 4      | 2(5)             | 1(1)             | 2(8)  | 3(5)        | 13.02        |
| 5      | 2(5)             | 2(2.5)           | 3(9)  | 1(3)        | 12.76        |
| 6      | 2(5)             | 3(5)             | 1(7)  | 2(4)        | 13.48        |
| 7      | 3(10)            | 1(1)             | 3(9)  | 2(4)        | 17.82        |
| 8      | 3(10)            | 2(2.5)           | 1(7)  | 3(5)        | 18.63        |
| 9      | 3(10)            | 3(5)             | 2(8)  | 1(3)        | 15.93        |
| K1     | 31.01            | 41.71            | 42.98 | 39.56       | M=122.65     |
| K2     | 39.26            | 40.98            | 38.54 | 40.89       |              |
| K3     | 52.38            | 39.96            | 41.13 | 42.2        |              |
| R      | 21.37            | 1.75             | 4.44  | 2.64        |              |

3 结论

3.1 菌株JSD-1是由本实验室从土壤中分离筛选并命名的一株拮抗菌,通过形态学特征、生理生化指标检测及16S rRNA基因序列分析将其初步鉴定为Streptomyces griseorubens。关于JSD-1作为生防菌拮抗病原细菌还未有报道。本文探究了灰略红链霉菌JSD-1对致病性大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等病原菌的抑菌活性,优化了影响菌株JSD-1抑菌活性的培养基和发酵条件,抑菌圈直径相较于优化前增长了85%,这表明了放线菌JSD-1作为拮抗菌的抗菌潜力,也为菌株的进一步开发利用奠定了理论基础。

3.2 大量研究和报道表明,对拮抗菌培养基组分及培养条件进行优化能够增强菌株的抗菌效果<sup>[13]</sup>。Liu等通过优化培养基中 $Mg^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$ 和 $Zn^{2+}$ 三种金属离子的浓度,使拮抗酵母Candida diversa的生防效果显著增强<sup>[14]</sup>。吉玉玉等采用响应面法对拮抗菌巨大芽孢杆菌L2的发酵条件进行优化,抑菌圈直径相较于优化前增加了140.48%<sup>[15]</sup>。方翔等通过优化一株桑树内生拮抗菌的发酵条件,抑菌效果提高了78.18%<sup>[16]</sup>。本研究通过对放线菌JSD-1的发酵培养基及培养条件进行优

化, 确定了最优组合, 抑菌效果提高了 85%。

3.3 本研究选取革兰氏阴性细菌大肠杆菌和革兰氏阳性细菌金黄色葡萄球菌作为指示菌, 以 JSD-1 的抑菌活性(抑菌圈直径)为考量指标, 对菌株的培养基成分及发酵条件进行优化。由单因素试验的结果可以看出, 碳源、氮源、pH、接种量等因子对菌株 JSD-1 抑菌活性的影响较大, 此结果为后续探究最优发酵条件组合乃至推广应用奠定了理论基础。

3.4 正交试验设计是研究多因素、多水平的一种高效率、快速、经济的试验设计方法, 它根据正交性从全面试验中挑选出部分有代表性的点进行试验, 可用于研究因素间的交互作用。依据单因素试验结果, 本研究选取对菌株 JSD-1 抑菌活性影响较大的因素设计了 4 因素 3 水平的正交试验。试验结果表明, 最佳条件组合为葡萄糖 10.00 g/L, 尿素 2.50 g/L, 温度 35 ℃, pH 7.0, 接种量 5%, 培养时间 7 d。与优化前相比, 选用优化所得最佳条件组合培养 JSD-1 菌株可明显增强其抑菌活性, JSD-1 对致病性大肠杆菌的抑菌圈直径由优化前的 10.08 mm 增长至 18.63 mm, 增长了约 0.85 倍, 这为抑菌活性物质的后续分离鉴定以及实际应用提供了理论参考。

3.5 液态混菌共培养结果显示放线菌 JSD-1 对致病性大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均具有显著的拮抗作用, 且持续作用于病原细菌的对数生长期、稳定期及衰亡期。而致病性大肠杆菌和金黄色葡萄球菌并不影响菌株 JSD-1 的生长增殖。这说明灰略红链霉菌 JSD-1 具有被开发成生防菌并应用于拮抗病原细菌的潜力。且乳化特性研究表明 JSD-1 的抑菌活性物质不具有乳化性能, 这为进一步阐释 JSD-1 的抑菌机理及明确其抑菌活性物质提供了参考。

## 参考文献

- [1] Selvin J, Shanmughapriya S, Gandhimathi R, et al. Optimization and production of novel antimicrobial agents from sponge associated marine *Actinomycetes* *Nocardiopsis dassonvillei* MAD08 [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 83(3): 435
- [2] 刘红艳, 张亚莲, 包小村, 等. 茶园土壤拮抗放线菌的分离和筛选[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2008, 6: 701-703  
LIU Hong-yan, ZHANG Ya-lian, BAO Xiao-cun, et al. Isolation and screening of antagonistic *Actinomycetes* in tea plantation soil [J]. *Journal of Hunan Agricultural University (Science Edition)*, 2008, 6: 701-703
- [3] 张炳火, 方亮, 李汉全, 等. 微生物资源研究开发进展[J]. 国外医药: 抗生素分册, 2006, 27(5): 233-235  
ZHANG Bing-huo, FANG Liang, LI Han-quan, et al. Advances in research and development of microbial resources [J]. *Foreign Medicine: Antibiotics*. 2006, 27(5): 233-235
- [4] 朱红建. 土壤放线菌次生代谢产物生防活性的初步研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2005  
ZHU Hong-jian. Preliminary study on bioactivity of soil *Actinomycetes* secondary metabolites [D]. Changsha: Master's Thesis of Hunan Agricultural University, 2005
- [5] 郝永丽. 拮抗放线菌的分离筛选与鉴定[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2007  
HAO Yong-li. Isolation, screening and identification of antagonistic *Actinomycetes* [D]. Xianyang: Northwest Agriculture and Forestry University, 2007
- [6] 张武岗. 放线菌 19G-317 菌株及其代谢产物抑菌活性研究[D]. 咸宁: 西北农林科技大学, 2009  
ZHANG Wu-gang. Antimicrobial activity of *Actinomycetes* 19G-317 and its metabolites [D]. Xianning: Northwest Agriculture and Forestry University, 2009
- [7] 安德荣. 生物制药的原理及方法-抗生素的制备[M]. 北京: 中国科学文化出版社, 2002, 8  
AN De-rong. Principles and Methods of Biopharmaceutical-preparation of Antibiotics [M]. Beijing: China science and culture press, 2002, 8
- [8] 龙建友, 胡兆农, 刘京宏, 等. 秦岭山区链霉菌发酵产物杀菌活性的测定[J]. 中国生物防治, 2005, 21(3): 187-191  
LONG Jian-you, HU Zhao-nong, LIU Jing hong, et al. Determination of bactericidal activity of *Streptomyces* fermentation products in Qinling mountains [J]. *China biological control*, 2005, 21(3): 187-191
- [9] 罗艳青. 灰色链霉菌 JSD-1 发酵工艺及代谢产物研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2015  
LUO Yan-qing. Study on fermentation technology and metabolites of *Streptomyces griseorubens* JSD-1 [D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2015
- [10] 邱建, 张德纯, 穆小萍. 双歧啤酒对常见病原菌的拮抗作用[J]. 中国微生物生态学杂志, 2008, 20(3): 222-223  
QIU Jian, ZHANG De-chun, MU Xiao-ping. Antagonistic effect of bifidum beer on common pathogenic bacteria [J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2008, 20(3): 222-223

(下转第 121 页)