

广西钦州湾红树林抗菌活性菌株 *Erwinia* sp. 5-8 的筛选及发酵条件的优化^{*}

孟令洋^{1,2}, 姜伟^{2,3*}, 张培玉¹, 林学政^{2,3}

(1. 青岛大学 环境科学与工程学院, 山东 青岛 266071; 2. 国家海洋局 第一海洋研究所, 山东 青岛 266061; 3. 国家海洋局 海洋生物活性物质重点实验室, 山东 青岛 266061)

摘 要:以金黄色葡萄球菌为指示菌,采用琼脂扩散法从国家海洋局海洋生物活性物质重点实验室广西钦州湾红树林微生物资源库中筛选获得一株具有明显抑菌效果的菌株 5-8,对该菌株进行了分子鉴定与系统发育分析。结果表明,此菌为欧文氏菌属(*Erwinia*)。通过单因子试验对其发酵条件进行了优化,优化后发酵条件为:最佳氮源为蛋白胨,最佳碳源为葡萄糖,发酵培养基初始 pH 值为 8.0,发酵温度为 25 ℃,盐度为 1.5,摇瓶装液量 30%,接种量为 1%($V_{\text{种子液}}:V_{\text{培养基}}=1:100$)。

关键词:红树林;欧文氏菌;抗菌活性;系统发育分析;发酵条件优化

中图分类号:Q939.9

文献标识码:A

文章编号:1671-6647(2015)02-0270-09

随着陆源微生物资源的日益贫乏,海洋尤其是特殊生境的微生物资源已引起人们的高度重视。处于“海洋—陆地”界面潮间带湿地生态系统的微生物资源因其所处生境的独特性,激起了科学家对之进行研究的浓厚兴趣。世界各地红树林土壤中新的微生物物种不断被揭示。如 Takenchi 和 Hatano^[1]、Lyimo 等^[2]、Arunasri 等^[3]、Tamura 和 Sakane^[4]均相继从各地红树林土壤中分离出新的细菌。同时,由于红树林区的微生物所处耐盐、厌氧等特殊生境,遗传及生理特性与其他生境中的微生物相比具有特异性,具有产生新型活性物质的潜力,是开发新药的重要资源^[5-8]。目前,已经从红树林土壤微生物中筛选出多种活性物质^[9-11]。

本研究以金黄色葡萄球菌为指示菌,对分离自广西钦州湾红树林根系泥样品中 467 株菌株进行了抑菌活性筛选,筛选出一株对金黄色葡萄球菌有明显抑菌作用的活性菌株 5-8,对其进行了抗菌活性的测定及其系统发育分析,并对其发酵培养基进行了优化,研究了温度、盐度、初始 pH 值、装液量和接种量对其生长和抑菌活性的影响,为该活性菌株活性物质的开发提供了基础资料。

1 材料和方法

1.1 指示菌和供试菌

供试菌:来自国家海洋局海洋生物活性物质重点实验室微生物资源库,分离自广西钦州湾红树林根系泥的 467 株菌株。

指示菌:金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ACCC 01331),由实验室保存。

1.2 培养基

指示菌培养基:蛋白胨 10 g,酵母粉 5 g,氯化钠 10 g,琼脂 15 g,用蒸馏水定容至 1 L,1×10⁵ Pa 下湿热

^{*} 收稿日期:2014-06-13

资助项目:海洋公益性行业科研专项经费项目——海洋微生物小分子化合物资源库构建及药源活性物质的筛选应用(201005022-6)

作者简介:孟令洋(1990-),男,山东泰安人,硕士研究生,主要从事海洋微生物方面研究. E-mail: menglingyang1990@163.com

^{*} 通讯作者:姜伟(1976-),女,山东平度人,副研究员,博士,主要从事海洋生物方面研究. E-mail: jiangwei@fio.org.cn

(王佳实 编辑)

灭菌 20 min。

测试菌培养基(Zobell 2216E):蛋白胨 5 g,酵母粉 1 g,用过滤海水和自来水按 2:1 的体积比例配制的溶液定容至 1 L,121 °C 下湿热灭菌 20 min。

初始发酵培养基:葡萄糖 5 g,蛋白胨 3 g,用蒸馏水定容至 1 L,pH 调至 7.0,1×10⁵ Pa 下湿热灭菌 20 min。

1.3 抗菌活性菌株的筛选

接种环挑取甘油管中保存的菌株,在 Zobell 2216E 培养基平板上划线,置于 25 °C 培养箱中培养 2 d;挑取单菌落于装有 5 mL Zobell 2216E 培养基的试管(规格为 15 mm×150 mm)中,振荡培养箱中培养(25 °C,135 r/min) 4 d;取 1 mL 发酵液,12 000 r/min 离心 15 min,留上清液备用。

以金黄色葡萄球菌为指示菌,用琼脂扩散法筛选抗菌活性菌株。将经过夜培养的指示菌用灭菌生理盐水稀释 1 000 倍,取 200 μL 加入指示菌培养基平板中,涂布均匀;然后将牛津杯放入平板中,每平板放 5 个;取上述上清液 150 μL 加入牛津杯孔内,37 °C 培养 15 h 后观察并记录抑菌圈直径。将具有抑菌作用的菌株进一步复筛和纯化,测定抑菌圈的直径,重复 3 次,计算平均值。

1.4 活性菌株 5-8 抗菌活性研究

分别以金黄色葡萄球菌、尖刀镰孢菌、辣椒疫霉菌、大丽轮枝菌、瓜亡革菌、大肠杆菌为指示菌,采用琼脂扩散法对 5-8 的抗菌活性进行测定,方法同 1.3。以金黄色葡萄球菌为指示菌,以庆大霉素(100 mg/L)、氨苄青霉素(100 mg/L)为阳性对照,初始发酵培养基作为阴性对照,根据抑菌圈直径大小确定活性强度。

1.5 活性菌株的分子鉴定与系统发育分析

菌株 16S rDNA 基因的 PCR 扩增按照文献[12]进行。测序工作由金斯瑞生物科技有限公司完成,将测序结果与 GenBank 数据库进行相似性比较分析,选取与实验菌株亲缘关系较近者用 BioEdit 软件进行序列比对,使用 MEGA5.0 软件采用邻接法(Neighbor-joining Method)进行系统发育分析,构建系统发育树。

1.6 培养条件对菌株 5-8 生长及抑菌活性影响的测定

以金黄色葡萄球菌为指示菌,分别测定了培养基的不同氮源(酵母粉、牛肉膏、豆饼粉、硝酸钾、硝酸铵、氯化铵、硫酸铵),不同碳源(蔗糖、麦芽糖、果糖、半乳糖、乳糖、木糖、可溶性淀粉),不同盐度(0.0,1.5,3.0,4.5,6.0,9.0),不同培养温度(15,20,25,30,35,40 °C),不同初始 pH 值(4.0,5.0,7.0,8.0,9.0,11.0),不同装液量(100 mL 的三角瓶中装液量为 10,20,30,40,50,60,70,80 mL)和不同接种量(0.25%,0.50%,0.75%,1.00%,1.50%,2.00%,4.00%,8.00%)对菌株 5-8 的生长与抑菌活性的影响。

2 结果与讨论

2.1 抗菌活性菌株筛选结果

以金黄色葡萄球菌为指示菌,采用平板扩散法,对 467 株红树林菌株发酵液进行了抑菌活性研究,经多次筛选、分离纯化和活性验证,筛选到了 12 株抗菌活性菌株,总抗菌活性菌株阳性率约为 2.6%,其结果由表 1 所示。由表 1 可知,菌株 5-8 对金黄色葡萄球菌具有明显的抑菌活性,该菌具有广阔的开发前景。

表 1 12 种活性菌株的抗菌效果

Table 1 Antibacterial effect of twelve antimicrobial bacteria and their survival environments

序 列	菌株编号	抑菌直径/mm	经 度	纬 度	样品来源
1	1-2-3	17.6±0.26	108°33′57″E	21°45′51″N	广西钦州湾红树林根系土壤
2	1-3-1	17.8±0.34	108°33′57″E	21°45′51″N	广西钦州湾红树林根系土壤
3	2-2	22.5±0.43	108°35′52″E	21°46′09″N	广西钦州湾红树林根系土壤
4	2-3	20.7±0.33	108°35′52″E	21°46′09″N	广西钦州湾红树林根系土壤
5	3-4-1	22.0±0.25	108°34′43″E	21°45′42″N	广西钦州湾红树林根系土壤
6	4-4-1	22.3±0.86	108°35′26″E	21°44′51″N	广西钦州湾红树林根系土壤
7	5-2	17.4±0.83	108°35′24″E	21°51′06″N	广西钦州湾红树林根系土壤
8	5-8	24.5±0.83	108°35′24″E	21°51′06″N	广西钦州湾红树林根系土壤
9	6-4-2	20.3±0.74	108°35′23″E	21°51′36″N	广西钦州湾红树林根系土壤
10	6-9	16.7±0.38	108°35′23″E	21°51′36″N	广西钦州湾红树林根系土壤
11	7-3-1	21.7±0.60	108°36′32″E	21°51′06″N	广西钦州湾红树林根系土壤
12	8-3-21	21.9±0.33	108°36′24″E	21°51′11″N	广西钦州湾红树林根系土壤

2.2 菌株 5-8 抗菌活性研究

菌株 5-8 发酵上清液对几种常见真菌和细菌的抑制作用,如表 2 所示,对金黄色葡萄球菌、尖刀镰孢菌、辣椒疫霉菌、大丽轮枝菌、瓜亡革菌、大肠杆菌均有较强的抑制作用。

表 2 菌株 5-8 发酵上清液对常见真菌和细菌的抑菌范围

Table 2 Inhibition scope of fermentation supernatant of the strain 5-8 to common fungi and bacteria

指示菌	尖刀镰孢菌	辣椒疫霉菌	大丽轮枝菌	大肠杆菌	瓜亡革菌	金黄色葡萄球菌
抑菌直径/mm	19.1±0.35	17.9±0.41	18.1±0.26	16.1±0.46	20.3±0.51	24.6±0.64

如图 1 所示,菌株 5-8 的抑菌圈直径明显大于庆大霉素(100 mg/L)、氨苄青霉素(100 mg/L)的抑菌圈直径,因此菌株 5-8 的抑菌活性强度大于庆大霉素、氨苄青霉素的抑菌活性强度,由此可得,菌株 5-8 的抑菌活性比较大,具有很好的研究前景。



注:“5-8”为菌株 5-8;“对照”为培养液

图 1 抗菌效果

Fig. 1 Antibacteria effect

2.3 活性菌株的分子鉴定与系统发育分析

利用细菌 16S rDNA 通用引物对菌株 5-8 细菌基因组 DNA 进行扩增,获得了长度约为 1.4 kb 的 16S rDNA 序列,经比对分析后将其提交 GenBank 数据库,获得注册号为 JX867759(表 3)。本研究中筛选的活性菌株与 GenBank 数据库中已有菌株 *Erwinia piriiflorinigrans* 的 16S rRNA 序列存在着很高的相似性,相似性在 98%以上。

表 3 抗菌活性物质产生菌株的分子鉴定

Table 3 Identification of antimicrobial bacterium based on their partial 16S rRNA sequences

菌 株	长度/bp	相似性最高菌株	相似度/%	注册号
5-8	1 448	<i>Erwinia piriiflorinigrans</i> (GQ405202)	98.52	JX867759

将菌株 5-8 的 16S rDNA 基因序列与 GenBank 数据库中相似性较高的菌株 *Erwinia piriiflorinigrans* 的 16S rDNA 序列进行比对,利用 MEGA5.0 软件进行了分析并构建了系统发育树,如图 2 所示。结果表明,筛选出的红树林活性菌株 5-8 为细菌域(Bacteria)的变形菌门(Proteobacteria)变形菌纲(Gammaproteobacteria)的欧文氏菌属(*Erwinia*)。

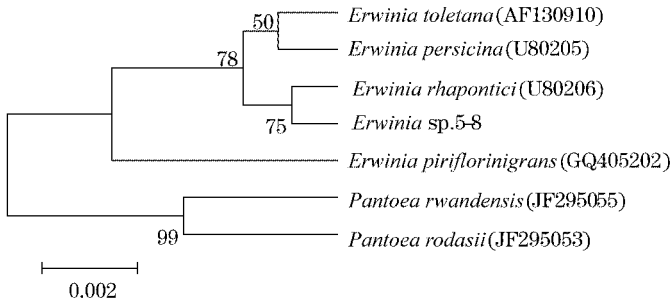


图 2 抗菌活性菌株 *Erwinia* sp. 5-8 的 16S rRNA 序列系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *Erwinia* sp. 5-8 based on partial 16S rRNA gene sequences

2.4 培养条件对 *Erwinia* sp. 5-8 生长及抑菌活性影响的测定

2.4.1 最佳氮源筛选

不同氮源对 *Erwinia* sp. 5-8 的生长及发酵液抑菌活性的影响如图 3 所示。结果表明,菌株 *Erwinia* sp. 5-8 均能利用所试验的有机氮源和无机氮源生长并产生抗菌活性物质。与对照氮源(蛋白胨)相比,所选其他氮源菌株生长量均明显降低。以蛋白胨为氮源时,发酵液的抗菌活性最强,豆饼次之,其余氮源抗菌活性大小依次为牛肉膏>酵母粉>氯化铵>硝酸钾>硝酸铵>硫酸铵,因此确定蛋白胨为最佳氮源。

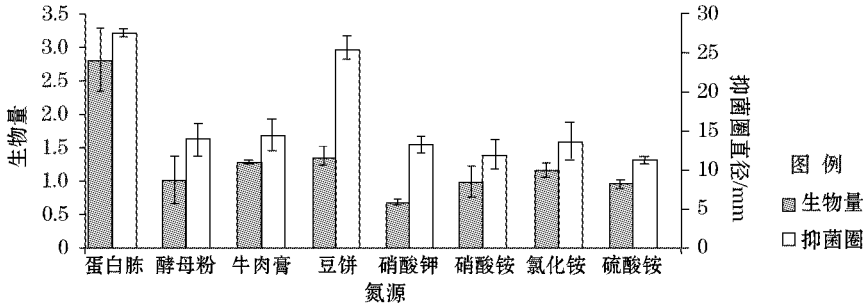


图 3 氮源对 *Erwinia* sp. 5-8 生长及抗菌活性的影响

Fig. 3 Effect of nitrogen sources on the growth and antimicrobial activity of *Erwinia* sp. 5-8

2.4.2 最佳碳源筛选

不同碳源对 *Erwinia* sp. 5-8 的生长及发酵液抗菌活性的影响如图 4 所示。结果表明,菌株 *Erwinia* sp. 5-8 对单糖、双糖、多糖均能较好地利用并产生抗菌活性物质。以葡萄糖为碳源时,抗菌活性最强,其后抗菌活性大小依次为可溶性淀粉>半乳糖>木糖>蔗糖>乳糖>果糖>半乳糖。

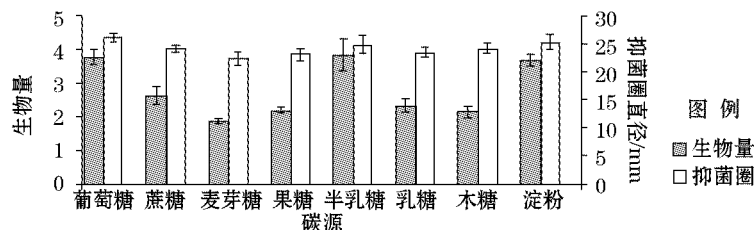


图 4 碳源对 *Erwinia* sp. 5-8 生长及抗菌活性的影响

Fig. 4 Effect of carbohydrates on the growth and antimicrobial activity of *Erwinia* sp. 5-8

2.4.3 培养温度对 *Erwinia* sp. 5-8 及抑菌活性影响

培养温度对 *Erwinia* sp. 5-8 生长及抑菌活性的影响如图 5 所示。结果表明,*Erwinia* sp. 5-8 在 15~40 °C 均能生长并产活性物质。在温度为 15 °C 的条件下,菌体生长极其缓慢;但能产生微量抑菌物质;在 25 °C 时,菌株抑菌活性达到最高。

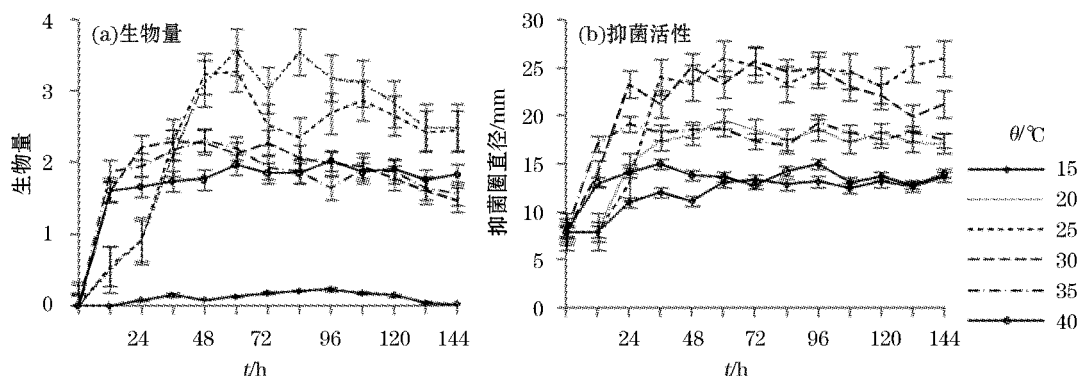


图 5 不同培养温度对 *Erwinia* sp. 5-8 生长及抑菌活性的影响

Fig. 5 Effect of culture temperature on the growth and antimicrobial activity of *Erwinia* sp. 5-8

2.4.4 盐度对 *Erwinia* sp. 5-8 生长及抑菌活性影响

在 25 °C 培养温度下,不同盐度对 *Erwinia* sp. 5-8 生长及抑菌活性影响如图 6 所示。结果表明,*Erwinia* sp. 5-8 在盐度为 0~9 下均能生长并产活性物质;在盐度为 0~3 时,*Erwinia* sp. 5-8 生长和产生的抑菌物质相差不大,但随着盐度的继续增加菌体生长量和抑菌活性均呈下降趋势。

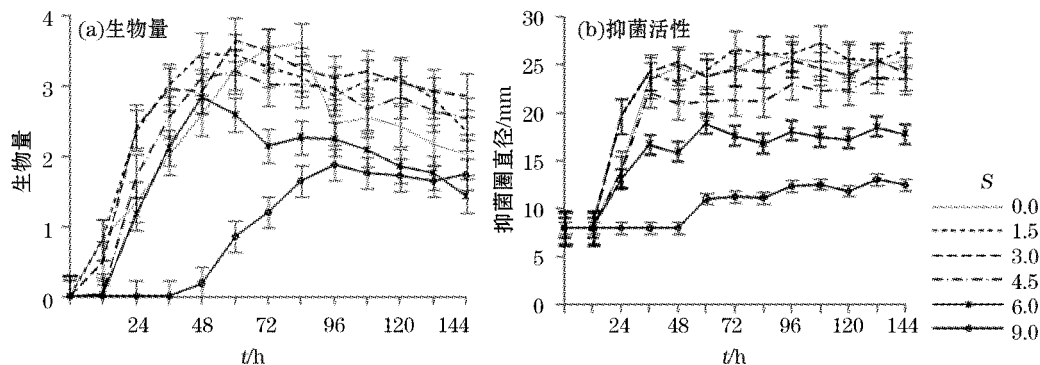


图 6 不同盐度对 *Erwinia* sp. 5-8 生长及抑菌活性的影响

Fig. 6 Effect of salinity on the growth and antimicrobial activity of *Erwinia* sp. 5-8

2.4.5 初始 pH 值对 *Erwinia* sp. 5-8 生长及抑菌活性影响

25 ℃ 和无盐培养条件下,不同初始 pH 值对 *Erwinia* sp. 5-8 生长及抑菌活性的影响如图 7 所示。结果表明,*Erwinia* sp. 5-8 在初始 pH 值为 5.0~11.0 时均能生长并产生活性物质;在 pH=4.0 时菌体几乎不能生长;pH=5.0 时生物量达最大值;pH=8.0 时,抑菌活性达最大值。由此可见,pH=4.0 的偏酸环境下不适于菌体生长及抑菌物质的产生,pH=11.0 的偏碱环境下菌体生长缓慢,抑菌活性也较小。

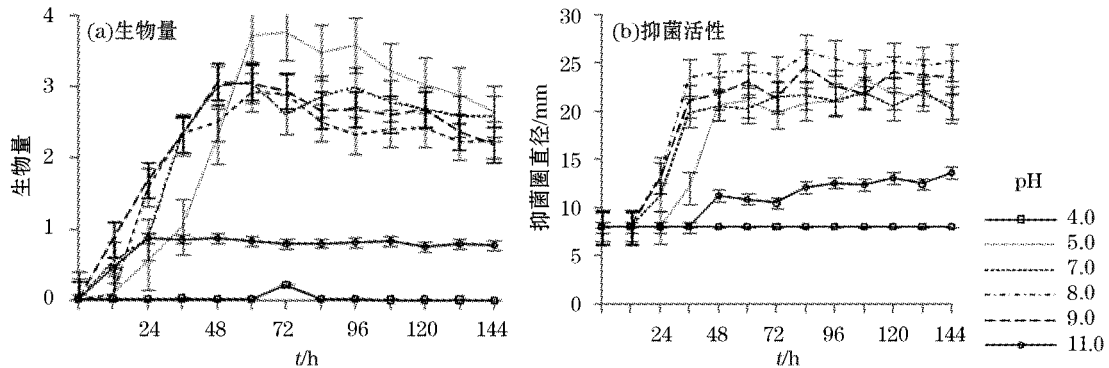


图 7 初始 pH 值对 *Erwinia* sp. 5-8 生长及抑菌活性的影响
Fig. 7 Effect of initial pH on the growth and antimicrobial activity of *Erwinia* sp. 5-8

2.4.6 装液量对 *Erwinia* sp. 5-8 生长及抑菌活性影响

不同装液量对菌株 *Erwinia* sp. 5-8 的生长和发酵液抗菌活性的影响如图 8 所示。结果表明,当 100 mL 三角瓶装液量为 30 mL、即装液量为 30% 时,发酵液的抗菌活性最大,菌株的生长量也最大。当装液量大于 30 mL 时,随着装液量的增加,发酵过程中溶解氧减少,不利于菌株的生长,从而影响了抗菌活性物质的产生。

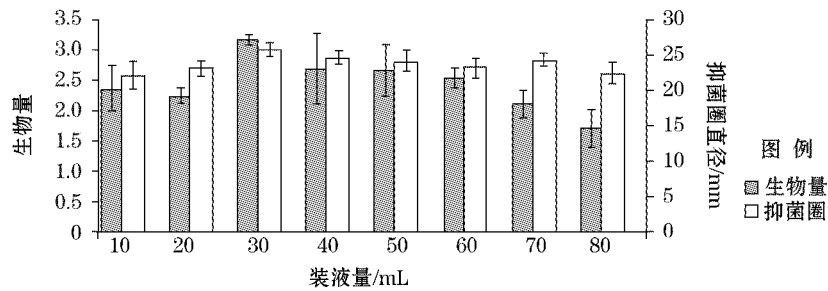


图 8 装液量对 *Erwinia* sp. 5-8 生长及抗菌活性的影响
Fig. 8 Effect of liquid filling quantity on the growth and antimicrobial activity of *Erwinia*

2.4.7 接种量对 *Erwinia* sp. 5-8 生长与抑菌活性的影响

不同接种量对菌株 *Erwinia* sp. 5-8 的生长和发酵液抗菌活性的影响如图 9 所示。结果表明,当接种量小于 1% 时($V_{\text{种子液}}/V_{\text{培养液}}$),菌株 *Erwinia* sp. 5-8 的生长量和发酵液抗菌活性随着接种量的增加而增大;当接种量大于 1% 时,抗菌活性和菌株生长量都随着接种量的增加呈逐渐下降的趋势;接种量为 1% 时,菌株的生长量和发酵液的抗菌活性最大,因此,最佳接种量为 1%。

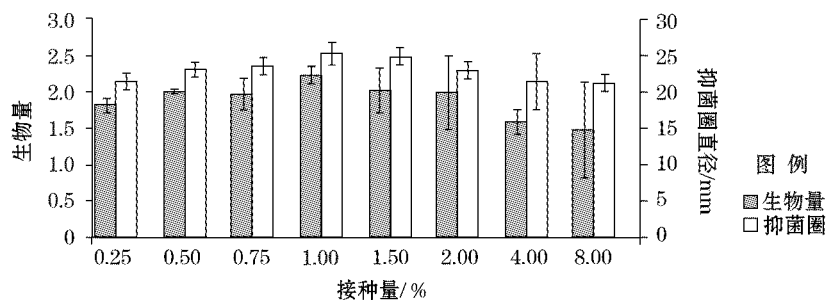


图9 接种量对 *Erwinia* sp. 5-8 生长及抗菌活性的影响

Fig. 9 Effect of inoculation amount on the growth and antimicrobial activity of *Erwinia*

3 讨论

红树林独特的地理及气候特征,赋予了红树林微生物独特的分子生物学机制与生理生化特性,为从微生物中寻找新的活性物质提供了广阔的前景。目前,红树林微生物次级代谢产物的研究和开发仍处于起步阶段,大多集中在红树植物叶片的内生真菌^[14-16]和放线菌^[17-19],对土壤中细菌的报道还很少。随着国内、外研究的深入,从红树林微生物中获得结构新颖、功能独特的生物活性物质和开发次级代谢产物有待系统地研究。本研究以金黄色葡萄球菌为指示菌,对分离自广西钦州湾红树林采集的根系泥中的 476 株菌株进行活性初筛,得到 12 株具有抗菌活性的菌株,其中 *Erwinia* sp. 5-8 抑菌作用明显,具有开发抗菌药物的潜力。

不同微生物由于遗传特性的不同以及环境条件的变化,最佳发酵条件也会有所不同,本研究利用单因素试验方法对 *Erwinia* sp. 5-8 的发酵条件进行了初步研究,结果表明 *Erwinia* sp. 5-8 产活性代谢产物的最佳培养条件为:最佳氮源为蛋白胨,最佳碳源为葡萄糖,最适发酵温度为 25 ℃,初始发酵 pH 值为 8.0,最佳盐度为 1.5,最佳接种量 1%,最佳装液量 30%。*Erwinia* sp. 5-8 具有较广的适应范围,在 20~40 ℃,盐度 0~9,初始 pH 值在 5.0~11.0 范围内,均能生长并产抑菌物质。在盐度为 0~4.5 时,随着盐度的变化菌体生长量及抑菌活性均无明显变化,但是随着盐度的升高,菌体生长量与抑菌活性均逐渐降低,这可能是培养基渗透压的逐渐升高影响到菌体的内部渗透压的平衡,从而影响菌体的正常生长。低盐需求也可使发酵设备免受侵蚀,有利于中试生产。该菌具有很好的研究前景,其活性物质的分离纯化和结构鉴定将有待于进一步研究,以为该菌的开发利用提供依据,为新型抗菌药物的开发提供资源支持。

参考文献 (References):

- [1] TAKENCHI M, HATANO K. *Gordonia rhizosphaera* sp. nov., isolated from the mangrove rhizosphere[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1998, 48(3): 907-912.
- [2] LYIMO T J, POL A, OPDEN CAMP H O, et al. *Methanosarcina semesiae* sp. nov., a dimethylsulfide-utilizing methanogen from mangrove sediment[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000, 50(1): 171-178.
- [3] ARUNASRI K, SASIKALA C, ROMAN C V, et al. *Marichromatium indicum* sp. nov., a novel purple sulfur gammaproteobacterium from mangrove soil of Goa[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55(2): 673-679.
- [4] TAMURA T, SAKANE T. *Asanoa iriomotensis* sp. nov., isolated from mangrove soil[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 155(2): 725-727.
- [5] RUSSO P, CESARIO A. New anticancer drugs from marine cyanobacteria[J]. Current Drug Targets, 2012, 13(8): 1048-1053.
- [6] JAVED F, QADIR M I, JANBAZ K H, et al. Novel drugs from marine microorganisms[J]. Critical Reviews Microbiology, 2011, 37(3): 245-249.
- [7] ZHU L, HE W, XU S N, et al. The marine microorganisms screening of antitumor[J]. Journal of Dalian Nationalities University, 2011, 13(5): 524-525. 朱兰,何伟,许书宁,等. 抗肿瘤的海洋微生物筛选[J]. 大连民族学院学报, 2011, 13(5): 524-525.

- [8] CAO X, YANG R L. Discovery of antitumor bioactive substances from marine microorganisms[J]. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2007, 14(4): 302-305. 曹雪,杨瑞丽. 源于海洋微生物抗肿瘤活性物质的研究[J]. *药物生物技术*, 2007, 14(4): 302-305.
- [9] JIANG Y X, ZHENG T L, TIAN Y. Research on mangrove soil microorganisms: past, present and future[J]. *Journal of Microbiology*, 2006, 46(5): 848-851. 蒋云霞,郑天凌,田蕴. 红树林土壤微生物的研究:过去、现在、未来[J]. *微生物学报*, 2006, 46(5): 848-851.
- [10] XU J. Biomolecules produced by mangrove-associated microbes[J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2011, 18(34): 5224-5266.
- [11] CHENG Z S, XU S L, CHEN Q J, et al. Optimum fermentation conditions for mangrove fungus 1893 with insecticidal activity[J]. *Natural Enemies of Insects*, 2008, 30(2): 120-126. 程中山,徐树兰,陈其津,等. 代谢产物具杀虫活性的红树林真菌 1893 菌株培养条件的研究[J]. *环境昆虫学报*, 2008, 30(2): 120-126.
- [12] LIN X Z, CHEN K S, HE P Q, et al. The effects of *Suaeda salsa* L. planting on the soil microflora in coastal saline soil[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(3): 801-807. 林学政,陈韡山,何培青,等. 种植盐地碱蓬改良滨海盐渍土对土壤微生物区系的影响[J]. *生态学报*, 2006, 26(3): 801-807.
- [13] WANG Q F, MIAO X L, LI G Y, et al. Characterization, screening and molecular classification of low-temperature-protease strains from antarctic microorganism[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2005, 12(4): 437-444. 王全富,缪锦来,李光友,等. 南极微生物产低温蛋白酶菌株的筛选、分子鉴定及部分酶活特性[J]. *中国水产科学*, 2005, 12(4): 437-444.
- [14] YANG J X, QIU S X, SHE Z G, et al. Metabolites of mangrove endophytic fungus 5094 from the South China Sea[J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2013, 24(5): 1059-1061. 杨建香,邱声祥,余志刚,等. 南海红树林内生真菌 5094 代谢产物研究[J]. *时珍国医国药*, 2013, 24(5): 1059-1061.
- [15] YANG J X, QIU S X, YU Z G, et al. Research on metabolites of mangrove endophytic fungus Gx-3c from the South China Sea[J]. *Journal of Guangxi Agriculture*, 2013, 28(2): 16-18. 杨建香,邱声祥,余志刚,等. 南海红树林内生真菌 GX-3c 代谢产物研究[J]. *广西农学报*, 2013, 28(2): 16-18.
- [16] DING W J, CHEN J Y, WANG J H, et al. Isolation and identification of sterols produced by two mangrove endophytic fungi in competing co-culture[J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2013, 24(22): 267-27. 丁唯嘉,陈洁怡,王锦华,等. 2 株红树内生真菌共培养产生的甾醇类化合物的分离鉴定[J]. *华南农业大学学报*, 2013, 24(22): 267-271.
- [17] LIAO W B, BAO S X. Study on isolation and extraction of antibacterial substances of mangrove actinomycete strain[J]. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2004, 11(6): 376-380. 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[J]. *药物生物技术*, 2004, 11(6): 376-380.
- [18] LIANG B, LU Y, WANG J, et al. Isolation and screening of actinomycetes against *Mycobacterium* in Guangdong intact mangrove[J]. *Marine Science Bulletin*, 2012, 31(3): 314-319. 梁碧,陆羽,王军,等. 广东沿海原生态红树林环境放线菌分离及抗分枝杆菌活性评价[J]. *海洋通报*, 2012, 31(3): 314-319.
- [19] XIANG L L, LIANG B, ZHU C B, et al. Metabolites of the marine actinomycetes *Streptomyces* sp. Strain V65 from the soil sample from Yangjiang intact mangrove[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2012, 51(3): 143-146. 向玲丽,梁碧怡,朱成波,等. 阳江原生态红树林土壤放线菌 *Streptomyces* sp, strain V65 的次级代谢产物[J]. *中山大学学报:自然科学版*, 2012, 51(3): 143-146.

Screening the Antimicrobial Bacterium Strain of *Erwinia* sp. 5-8 From Guangxi Mangrove and Optimizing its Fermentation Conditions

MENG Ling-yang^{1,2}, JIANG Wei^{2,3}, ZHANG Pei-yu¹, LIN Xue-zheng^{2,3}

(1. *Environmental Science and Engineering, Qingdao University, Qingdao 266071, China*

2. *The First Institute of Oceanography, SOA, Qingdao 266061, China*

3. *Key Laboratory of Marine Bioactive Substances, SOA, Qingdao 266061, China*)

Abstract: In this study, an antimicrobial bacterium strain, named 5-8, was screened and isolated from mangrove of Guang Xi by the method of agar diffusion using *Staphylococcus aureus* as the indicator strain. The results of molecular identification and phylogenetic analysis showed that this strain belonged to genera of *Erwinia*. The single factor experiments on the fermentation conditions were conducted and the optimized parameters were as follows: the best nitrogen source is peptone, the best carbon source is glucose, the starting pH of medium was 8.0, fermentation temperature was 25°C, salinity was 1.5‰, liquid volume in erlenmeyer flask was 30% and inoculation amount was 1% ($V_{\text{seed liquid}}/V_{\text{nutrient solution}} = 1:100$).

Key words: mangrove; *Erwinia*; antimicrobial activity; phylogenetic analysis; optimization of fermentation conditions

Received: June 13, 2014