放线菌 SL-5 链霉素耐药突变菌株的分离、活性筛选及发酵优化研究

沈 玲,郭正彦,吴文君

(西北农林科技大学 农药研究所,陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 【目的】为新型抗生素的开发研究提供有效途径。【方法】对放线菌 SL-5 在链霉素不同浓度下的耐药突变菌株进行分离和活性筛选,并采用单因素和正交试验对活性菌株进行发酵优化。【结果】从无活性放线菌 SL-5 的耐药菌株中得到 1 株活性突变菌株 str -14,室内生测结果表明,其发酵液对蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)的抑菌圈直径为 17.5 mm。通过单因素和正交试验,确定该菌株的最佳摇瓶发酵培养基配方为:小米 10 g/L,葡萄糖 20 g/L,酵母粉 2 g/L,蛋白胨 7 g/L,混合 V_B 1.5 mg/L,NaCl 2.5 g/L,$CaCO_3$ 2.0 g/L。最佳培养条件为:初始 pH 为 8.0,装液量 70 mL(250 mL 三角瓶),180 r/min 培养 7 d。【结论】通过引入链霉素耐药性突变获得抑菌活性物质,是创制新型抗生素的一条可行之路。

[关键词] 放线菌;链霉素耐药突变菌株;分离;发酵优化

[中图分类号] S859.79+6 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2008)12-0205-07

Studies on the isolation, activity screening and the fermentation optimization of streptomycin-resistance mutants of actinomycete SL-5

SHEN Ling, GUO Zheng-yan, WU Wen-jun

(*Institute of Pesticide, Northwest A&F University, Shaanxi, Yangling* 712100, *China*)

Abstract: 【Objective】 The studies were carried out to provide an efficient way of discovering novel antibiotics. 【Method】 Mutants were isolated at different streptomycin concentrations from wild strain SL-5 and under bioactivity screening, then the fermentation medium optimization of the active mutant was studied by the single-factor and orthogonal test. 【Result】 Strain str -14 was obtained from the streptomycin-resistance mutants of inactive strain SL-5, and the result of bioassay *in vitro* showed that the fermentation broth of str -14 exhibited obvious inhibition circle of 17.5 mm against (*Bacillus cereus*). The results of single-factor and orthogonal test showed that the optimum fermentation of strain str -14 for producing the most effective fermentation product were Millet 10 g/L, Glucose 20 g/L, Yeast extract 2 g/L, Peptone 7 g/L, Compound vitamins B 1.5 mg/L, NaCl 2.5 g/L, $CaCO_3$ 2.0 g/L. The optimum conditions were initial pH of 8.0, media volume 70 mL, shaking at 180 r/min for 7 days. 【Conclusion】 It is a feasible way for the discovery of new antibiotics to find active substance by inducing streptomycin-resistance mutation.

Key words: actinomycete; streptomycin-resistance mutant; isolation; fermentation optimization

在医药行业及农业的病虫草害综合治理中,抗 生素一直发挥着重要作用。然而近些年来,随着抗

* [收稿日期] 2007-12-25
[基金项目] 国家"973"项目"从天然生物源小分子发现农用新作用靶标机制及先导结构"(2003CB114404)
[作者简介] 沈 玲(1980-),女,陕西西安人,博士,主要从事天然产物农药和微生物研究。E-mail:gzysl2005@tom.com
[通讯作者] 吴文君(1945-),男,四川洪雅人,教授,博士生导师,主要从事农药化学和农药毒理学研究。
E-mail:wuwenjun@nwsuaf.edu.cn

生素抗药性问题的日益突出及市场需求的增加，开发一个具有市场价值的抗生素变得愈加困难，成本也不断增加，成为目前新药研发中的一个主要问题。因此，有必要寻找一条开发新型抗生素的有效途径，其热点之一就是从菌种的改良入手。目前，基因工程育种和新型抗生素研究中最有效的一个手段，就是利用抗生素耐药性突变进行工程菌种的改良以及无活性菌株的诱导激活。这项技术最早由日本越智幸三教授带领的研究小组提出[1]，其原理是利用能够作用于核糖体的某些抗生素（如链霉素、庆大霉素等），从而改变微生物核糖体的结构和功能，影响其次生代谢产物[2-3]。这项技术目前已经在许多工程菌种的改良上获得了成功[4-6]，而且在无活性菌株的诱导激活方面也取得了重大成果。Shima 等[1]对不产生放线紫红素 Act 的变铅青链霉菌（*Streptomyces lividans*）进行链霉素抗性诱导，得到的突变株 TK-24 能够合成大量的放线紫红素 Act。路福平等[7]利用四环素等抗生素的抗性突变，使一株拟诺卡氏放线菌产生了抗真菌活性。于志斌等[8]利用链霉素诱导激活 1 株无活性放线菌产生了抑制肿瘤细胞的新物质——bis（2S-ethylhexyl） maleate。由此可见，引入链霉素耐药性突变可能激活放线菌的沉默基因产生抗生素，或者通过促进抗生素的代谢或加快其分泌出细胞外，从而提高抗生素的产量，这项研究丰富了新抗生素的来源途径，为新型抗生素的开发研究提供了一条可行之路。

原始菌株 SL-5 是由西北农林科技大学农药研究所从土壤中分离得到的 1 株放线菌，室内活性生测表明其发酵液对蜡状芽胞杆菌无抑制活性。本研究以 SL-5 菌株为出发菌株，引入链霉素耐药性突变和抑菌活性筛选，对活性菌株的发酵培养基和培养条件优化进行初步研究，以期为新型抗生素的开发研究提供有效途径，并为下一步抗生素的分离纯化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 供试菌株 菌株：土壤放线菌 SL-5 由西北农林科技大学农药研究所分离得到。

抗生素：硫酸链霉素，Sigma 产品，购自北京鼎国生物技术有限责任公司。

供试菌种：蜡状芽孢杆菌 1.1846（*Bacillus cereus*），购自中国科学院普通微生物菌种保藏管理中心。

1.1.2 培养基 分离培养基（改良高氏培养基 Modified Gause No.1）：可溶性淀粉 10 g，蛋白胨 1 g，KNO_3 3 g，$MgSO_4$ 0.5 g，NaCl 2 g，$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g，K_2HPO_4 0.5 g，$CaCO_3$ 0.02 g，琼脂 14 g，蒸馏水 1 000 mL，V_B 混合液（含 V_{B_1}、V_{B_2}、V_{B_3}、V_{B_6}、肌醇和对-氨基苯甲酸各 0.5 mg/mL）1 mL，pH 7.2。

发酵培养基：①种子发酵培养基：每升蒸馏水含小米 10 g，葡萄糖 10 g，蛋白胨 3 g，NaCl 2.5 g，$CaCO_3$ 2 g，$(NH_4)_2SO_4$ 1.0 g，自然 pH；②基础发酵培养基：每升蒸馏水含小米 10 g，葡萄糖 12 g，蛋白胨 3 g，NaCl 2.5 g，$CaCO_3$ 2 g，pH 7.0。

活性测定培养基：牛肉膏蛋白胨培养基。

1.2 放线菌孢子悬浮液的制备

取新鲜培养的放线菌斜面一支，加入 5 mL 无菌生理盐水（10 g/L）反复冲洗，制成孢子悬浮液。在涡旋仪上混匀，再经无菌擦镜纸过滤后，收集单孢子悬液，镜检并调整单孢子的浓度约为 10^6 mL^{-1}。

1.3 链霉素耐药突变菌株的分离

准确称取一定量的链霉素粉末加入到融化的分离培养基中，迅速混匀制成链霉素质量浓度分别为 15，20，25 μg/mL 的培养基平板。取少量 SL-5 放线菌孢子悬浮液涂布于含有不同质量浓度链霉素的培养基平板上，28 ℃培养 5～7 d，根据菌落特征挑取单菌落纯化并于－4℃保存[9]。

1.4 链霉素耐药突变菌株发酵液的制备

将纯化后的耐药菌株，打成直径为 0.6 cm 的菌饼，按照质量分数 10%接种量接入到 40 mL 种子发酵培养基中（250 mL 三角瓶），28 ℃、170 r/min 条件下培养过夜。再以质量分数 10%的接种量接入到基础发酵培养基中，相同条件下振荡培养 5～7 d，过滤发酵液。

1.5 抗菌活性的测定

采用管碟法[10-11]，测定原始菌株和耐药菌株发酵液对供试细菌的抑制活性。底层培养基采用质量分数 2%琼脂培养基，上层培养基采用混入供试细菌的牛肉膏蛋白胨培养基，制成双层平板。将无菌牛津杯轻轻放在平板上，杯中加入发酵液 0.2 mL，置于 37 ℃恒温箱中培养，12 h 后测量抑菌圈直径。

1.6 链霉素耐药突变菌株发酵培养基的筛选

1.6.1 不同氮源对发酵液抑菌活性的影响[12] 在无氮源的基础发酵培养基中，分别用黄豆饼粉、玉米粉、蛋白胨、酵母粉、豆粕、鱼粉、棉籽饼、$(NH_4)_2SO_4$、KNO_3 为替代氮源，以有效含氮量 0.5 g/L 为准，计算各氮源的添加量，以基础发酵培养基作为对照（CK）。

抑菌活性测定方法同1.5。

1.6.2 *不同碳源对发酵液抑菌活性的影响* 在以酵母粉和蛋白胨为氮源、除去小米和葡萄糖的基础发酵培养基中，分别用葡萄糖、蔗糖、小米浸汁、可溶性淀粉、玉米粉、麸皮、米糠为替代碳源，添加量为质量分数2%，以基础发酵培养基为对照(CK)，抑菌活性测定方法同1.5。

1.6.3 *添加无机元素和混合 V_B 对发酵液抑菌活性的影响* 确定以小米为碳源、酵母粉和蛋白胨为氮源的基础培养基中，分别以化合物 K_2HPO_4、$MgSO_4$、$FeSO_4 \cdot 4H_2O$、$ZnSO_4$、$MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 和混合 V_B(成分同1.1.2)代表 P^{5+}、Mg^{2+}、Fe^{2+}、Zn^{2+}、Mn^{2+} 等无机离子和B族维生素添加到培养基中，每种元素化合物的添加量为质量分数0.01%，以基础发酵培养基对照(CK)。振荡培养7 d，抑菌活性测定方法同1.5。

1.6.4 *营养成分最适浓度的正交试验* 选择4因素3水平的 $L_9(3^4)$ 正交表(表1)，对发酵培养基中的主要物质葡萄糖、酵母粉、蛋白胨、混合 V_B 进行正交试验，确定其适宜浓度，试验重复3次，取3次发酵液抑菌活性的平均值作为试验结果，进行方差分析，确定最佳发酵配方。

表1 链霉素耐药突变菌株 str-14 发酵培养基营养成分最适浓度 $L_9(3^4)$ 正交试验的因素与水平

Table 1 Factors and levels of the orthogonal test $L_9(3^4)$ of fermentation medium nutrients of strain str-14

水平 Level	因素 Factors			
	A 葡萄糖/(g·L^{-1}) Glucose	B 酵母粉/(g·L^{-1}) Yeast extract	C 蛋白胨/(g·L^{-1}) Peptone	D 混合 V_B/(mg·L^{-1}) Vitamins B
1	10	1	3	0.5
2	15	2	5	1.0
3	20	3	7	1.5

1.7 链霉素耐药突变菌株发酵培养条件的优化

在确定发酵培养基配方后，进行条件优化[13]。①发酵时间：将装液量为40 mL、pH为7.0的发酵液，置于170 r/min的摇床分别培养3,4,5,6,7,8,9,10 d后，测定抑菌活性，方法同1.5(下同)。②初始pH值：将40 mL发酵液的初始pH值分别调至3.0,4.0,5.0,6.0,7.0,8.0,9.0,10.0，置于170 r/min摇床培养7 d后测定抑菌活性。③转速：将40 mL、pH为8.0的发酵液，分别置于90,110,130,150,170,190,210 r/mim摇床培养7 d后，测定抑菌活性。④装液量：250 mL三角瓶分别装入30,50,70,90,110,130和150 mL发酵培养基(pH为8.0)，接种活性菌株后于25～28 ℃、180 r/min条件下振荡培养7 d，测定抑菌活性。

2 结果与分析

2.1 链霉素耐药突变菌株的分离和活性筛选

在链霉素质量浓度分别为15,20,25 μg/mL的分离平板上，共分离得到47株耐药菌株。以蜡状芽孢杆菌为指示菌，对其发酵产物进行抗菌活性筛选。原始菌株SL-5对供试细菌无抑制活性，而其中的1株str-14具有较高的抑菌活性，其发酵液对蜡状芽孢杆菌的抑菌圈直径为17.5 mm(图1)。

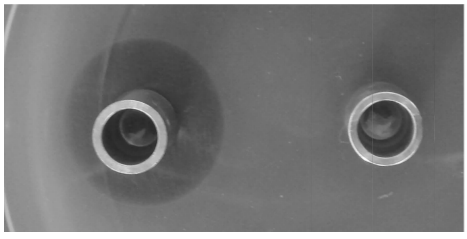

图1 str-14菌株(左)和SL-5菌株(右)发酵液对蜡状芽胞杆菌的抑制活性

Fig. 1 Inhibition activity of fermentation broth of strain str-14(left) and SL-5(right) against *B. cereus*

2.2 原始菌株 SL-5 与链霉素耐药突变菌株 str-14 的形态特征

原始菌株SL-5和链霉素耐药突变菌株str-14在改良高氏培养基上的菌落形态如图2所示。由图2可知，原始菌株SL-5在固体培养基平板上的气生菌丝茂盛，为乳白色，基内菌丝浅黄色。链霉素耐药突变菌株str-14的气生菌丝稀少，为浅黄褐色，基内菌丝浅黄色，与原始菌株SL-5有明显差异。从生

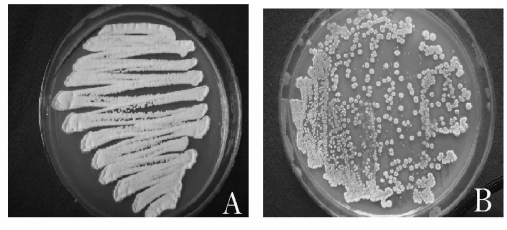

图2 原始菌株SL-5(A)与链霉素耐药突变菌株str-14(B)在改良高氏培养基上的形态特征

Fig. 2 Morphology of strain SL-5(A) and streptomycin-resistance mutant str-14(B) on modified Gause No. 1 medium

长周期看，链霉素耐药突变菌株 str -14 的产孢量少，生长缓慢。

2.3 链霉素耐药突变菌株 str -14 发酵培养基的优化

2.3.1 不同氮源对菌株 str -14 发酵液抑菌活性的影响 从表 2 可以看出，在供试的 9 种氮源中，以酵母粉为氮源时，str-14 发酵液的抑菌活性最好，抑菌圈直径为 17.0 mm；以玉米粉、蛋白胨、$(NH_4)_2SO_4$ 为氮源时，str-14 发酵液的抑菌活性次之；而培养基中含有其他氮源时，str-14 发酵液均无抑菌活性。表明酵母粉中的某些氨基酸和微量元素可能对发酵液中活性成分的产生起促进作用，既提供氮源又能促进菌丝生长。从减少发酵污染和缩短周期等方面考虑，选择酵母粉和蛋白胨作为复合氮源。

表 2 不同氮源对链霉素耐药突变菌株 str -14 发酵液抑菌活性的影响

Table 2 Effect of different nitrogen sources on inhibition activity of fermentation broth of active strain str -14

氮源 Nitrogen source	抑菌圈直径/mm Inhibition diameter	氮源 Nitrogen source	抑菌圈直径/mm Inhibition diameter
黄豆饼粉 Soybean cake powder	0	鱼粉 Fish meal	0
玉米粉 Maize meal	10.5	棉籽饼 Cottonseed cake	0
蛋白胨 Peptone	10.0	$(NH_4)_2SO_4$	11.0
酵母粉 Yeast extract	17.0	KNO_3	0
豆粕 Soybean meal	0	CK	10.5

2.3.2 不同碳源对菌株 str -14 发酵液抑菌活性的影响 由图 3 可见，在供试的 7 种碳源中，str -14 发酵液的抑菌活性依次是玉米粉＞小米浸汁＞麸皮＞葡萄糖、可溶性淀粉、米糠＞蔗糖，其中分别以蔗糖和葡萄糖为碳源时，发酵液的抑菌活性均较低，说明菌株 str -14 对有机碳源的需求较无机碳源更重要。从发酵周期来看，以玉米粉为碳源时，发酵周期较长，发酵培养基也容易污染和混浊，因此选用小米作为有机碳源，以速效碳源葡萄糖为补充，有利于发酵液中菌丝体的形成和活性物质的代谢。

2.3.3 添加无机元素和混合 V_B 对菌株 str -14 发酵液抑菌活性的影响 由图 4 可见，在分别添加有混合 V_B、P^{5+} 的发酵液中，str -14 菌体生物量增加，抑菌活性均明显提高，说明添加一定量的 V_B 混合物或者 P^{5+} 有利于活性物质的代谢。添加 Zn^{2+}、Mg^{2+} 对 str -14 发酵液的抑菌活性基本没有影响，而添加 Fe^{2+} 和 Mn^{2+} 反而不利于 str -14 菌丝体的生长，发酵液抑菌活性均明显降低。这说明 B 族维生素对菌株 str -14 生长代谢具有促进作用。

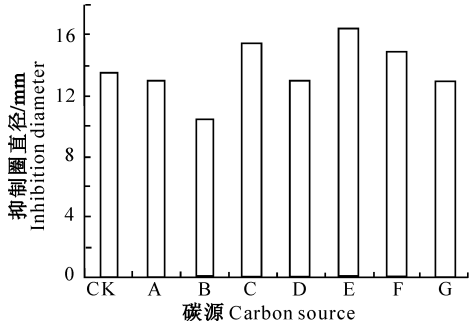

图 3 不同碳源对菌株 str -14 发酵液抑菌活性的影响

A. 葡萄糖；B. 蔗糖；C. 小米浸汁；D. 可溶性淀粉；E. 玉米粉；F. 麸皮；G. 米糠

Fig. 3 Effect of different carbon sources on Inhibition activity of fermentation broth of strain str -14

A. Glucose; B. Sucrose; C. Millet; D. Soluble starch; E. Maize meal; F. Wheat bran; G. Rice bran

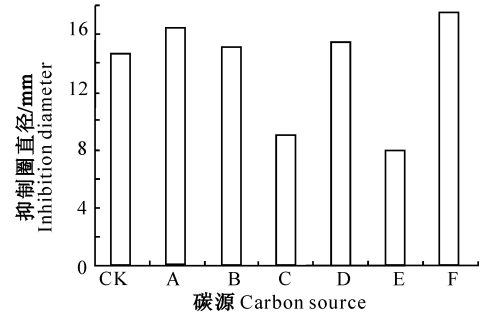

图 4 添加无机元素和混合 V_B 对菌株 str -14 发酵液抑菌活性的影响

A. P^{5+}；B. Mg^{2+}；C. Fe^{2+}；D. Zn^{2+}；E. Mn^{2+}；F. V_B

Fig. 4 Effect of six inorganic elements and VB on inhibition activity of fermentation broth of strain str -14

2.3.4 营养成分最适浓度的正交试验结果 从表 3 可以看出，4 个因素对菌株 str -14 的发酵液抑菌活性的影响程度依次为混合 V_B＞酵母粉＞蛋白胨＞葡萄糖，确定的最佳发酵组合为 $A_3B_2C_3D_3$，即最佳发酵营养成分为：葡萄糖 20 g/L，酵母粉 2 g/L，蛋白胨 7 g/L 和混合 V_B 1.5 mg/L。由表 4 可知，混合 V_B 和酵母粉对菌株 str -14 发酵液的抑菌活性影响分别达到极显著和显著水平。说明酵母粉可以作为氮源和水溶性 B 族维生素的来源，也说明菌株 str -14 的发酵需要 B 族维生素的参与。

表 3　链霉素耐药性突变菌株 str -14 发酵培养基营养成分最适浓度的 $L_9(3^4)$正交试验结果

Table 3　Results of the orthogonal test $L_9(3^4)$ of fermentation medium nutrients of strain str -14

试验编号 Experiment number	因素 Factors A 葡萄糖/(g·L⁻¹) Glucose	B 酵母粉/(g·L⁻¹) Yeast extract	C 蛋白胨/(g·L⁻¹) Peptone	D 混合 V_B/(mg·L⁻¹) Vitamins B	抑菌圈直径/mm Inhibition diameter
1	10	1	3	0.5	10.0
2	10	2	5	1.0	15.5
3	10	3	7	1.5	17.5
4	15	1	5	1.5	15.5
5	15	2	7	0.5	13.0
6	15	3	3	1.0	14.3
7	20	1	7	1.0	14.5
8	20	2	3	1.5	16.5
9	20	3	5	0.5	13.0
K_1	14.333	13.333	13.600	12.000	
K_2	14.267	15.000	14.667	14.767	
K_3	14.667	14.933	15.000	16.500	
R_i	0.400	1.667	1.400	4.500	

表 4　链霉素耐药性突变菌株 str -14 培养基营养成分的 $L_9(3^4)$正交试验方差分析结果

Table 4　Variance analysis of the orthogonal test $L_9(3^4)$ of fermentation medium nutrients of strain str -14

因素 Factor	偏差平方和 *SS*	自由度 *df*	*F*	$F_{0.05}$	$F_{0.01}$	显著水平 Significant level
葡萄糖 Glucose	0.276	2	1.000	19.000	99.00	不显著 No significant
酵母粉 Yeast extract	5.342	2	19.355	19.000	99.00	显著 Significant
蛋白胨 Peptone	3.209	2	11.627	19.000	99.00	不显著 No significant
混合 V_B Vitamins B	30.909	2	111.989	19.000	99.00	极显著 Extremely significant
误差 Error	0.28	2				

2.4　链霉素耐药性突变菌株 str-14 发酵条件的优化

在发酵培养基成分确定的情况下，对菌株 str -14 的发酵条件进行优化。结果(图 5～8)表明，发酵液在初始 pH 为 8.0，装液量 70 mL(250 mL 三角瓶)，180 r/min 培养 7 d 的条件下培养，其抑菌活性最高，达到 18.5 mm。

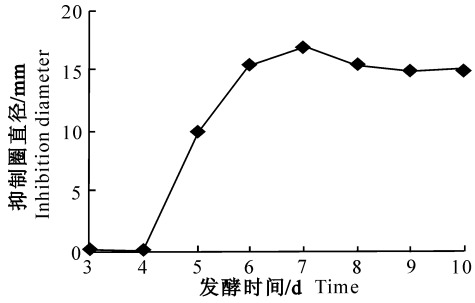

图 5　不同发酵时间对菌株 str -14 发酵液抑菌活性的影响

Fig. 5 Effect of time on inhibition activity of fermentation broth of strain str -14

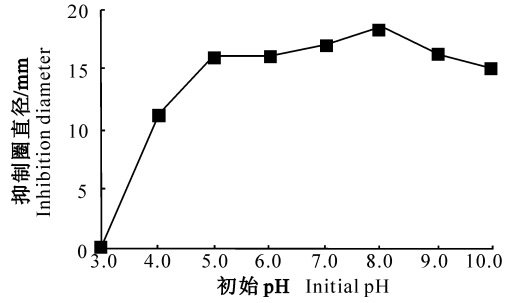

图 6　不同初始 pH 对菌株 str -14 发酵液抑菌活性的影响

Fig. 6　Effect of pH on inhibition activity of fermentation broth of strain str -14

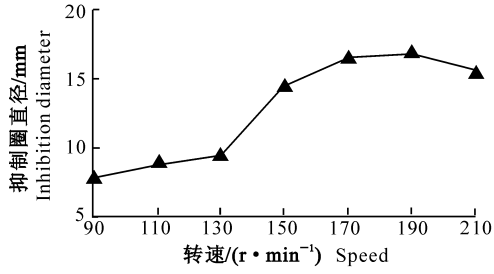

图 7　不同转速对菌株 str -14 发酵液抑菌活性的影响

Fig. 7 Effect of speed on inhibition activity of fermentation broth of strain str -14

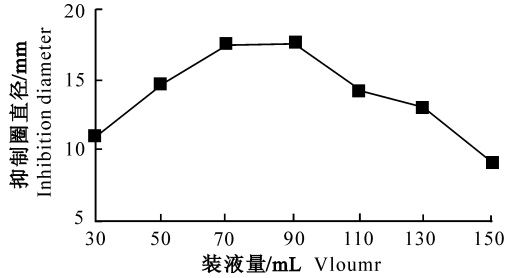

图 8　不同装液量对菌株 str -14 发酵液抑菌活性的影响

Fig. 8　Effect of medium volume on inhibition activity of fermentation broth of strain str -14

3 结论与讨论

本研究对 SL-5 菌株引入了链霉素耐药性突变，并对筛选得到的 1 株活性菌株 str -14 的发酵条件进行优化，抑菌活性测定结果表明，链霉素耐药突变菌株 str-14 发酵液对蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)具有抑菌活性，其抑菌圈直径为 17.5 mm。根据单因素和正交试验，确定菌株 str -14 的最佳摇瓶发酵培养基配方为：小米 10 g/L，葡萄糖 20 g/L，酵母粉 2 g/L，蛋白胨 7 g/L，混合 V_B 1.5 mg/L，NaCl 2.5 g/L，$CaCO_3$ 2.0 g/L。最佳培养条件为：初始 pH 值 8.0，装液量 70 mL(250 mL 三角瓶)，180 r/min培养 7 d。

本研究发现，引入链霉素耐药性突变对菌株的表型影响较大。主要表现在：原始菌株 SL-5 的菌丝茂盛，气生菌丝为乳白色；而链霉素耐药突变菌株 str -14 则表现出菌丝颜色变化、气生菌丝稀少、孢子量少、生长速率延缓等特征。可见，链霉素耐药突变菌株 str -14 在形态和菌落特征上发生了较大变异。这与相关文献中对链霉素耐药突变菌株的描述一致[1]。在生产实践中，菌种形态变异与产量变异有一定的相关性，形态剧烈变化的突变菌株往往是负突变并引起产量降低，而形态产生细微变化的突变菌株多为正突变且产量增加。但是也有例外，如蒽环类抗生素别洛霉素(beromycin)产生菌球团链霉菌(*Streptomyces glomcrolus*)以及道诺霉素(daunomycin，DNM)产生菌淡蓝浅红链霉菌(*S. coeruleorubidus*)的不产孢光秃型菌株，最高增产抗生素分别达 200 倍和 40 倍[11]。本研究中链霉素耐药突变菌株 str -14，在形态上发生了不利于培养和发酵的变异，产生了抑菌活性。由此可见，这类形态上的负突变，对于微生物育种研究是不可忽视的。

本研究在发酵培养基的优化试验中发现，链霉素耐药活性菌株 str-14 在发酵过程中，对 B 族维生素显示出特别的需求，而且对氮源物质的要求较高。与原始菌株 SL-5 相比，链霉素耐药突变菌株 str -14 可能发生了营养缺陷，其生长和抗生素的合成可能需要某种微量元素的参与，结合培养特征和发酵条件的研究结果来看，这种微量元素可能是 B 族维生素。目前尚不能确定菌株 str -14 所产生的活性物质是否只与 B 族维生素有关，亦或只与其中的某一种维生素有关。因此，还需要在后续试验中进一步研究。

发酵优化是分离抗生素和产业化的前期基础，也是抗生素工艺研究的一个重要组成部分。本试验根据菌株 str -14 的特殊营养需求，在发酵培养基中添加了混合 B 族维生素，从而大大促进了活性物质的产生。可见，采取将微生物的生物学特征和发酵优化相结合的方法，不仅可以更加有效地提高发酵产物的效价，而且还可以与已知抗生素的类别进行比较，对发现新型抗生素或新型先导化合物具有重要的意义。

[参考文献]

[1] Shima J, Hesketh A, Okamoto S, et al. Induction of actinorhodin production by rpsL(encoding ribosomal protein S12) mutations that confer streptomycin resistance in *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* A3(2) [J]. J Bacteriol, 1996, 178: 7276-7284.

[2] Hesketh A, Ochi K. A novel method for improving *Streptomyces coelicolor* A3(2) for production of actinorhodin by introduction of rpsL (encoding ribosomal protein S12) mutations conferring resistance to streptomycin [J]. J Antibiot, 1997, 50: 532-536.

[3] Ochi K, Okamoto S, Tozawa Y, et al. Ribosome engineering and secondary metabolite production [J]. Adv Appl Microbiol, 2004, 56: 155-184.

[4] Hu H F, Ochi K. Novel approach for improving the productivity of antibiotic-producing strains by inducing combined resistant mutations [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67: 1885-1902.

[5] Okamoto-Hosoya Y, Sato T, Ochi K. Resistance to paromomycin is conferred by rpsL mutations, accompanied by an enhanced antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2) [J]. J Antibiot, 2000, 53: 1424-1427.

[6] Tamehiro N, Hosaka T, Xu J, et al. Innovative approach for improvement of an antibiotic over-producing industrial strain of *Streptomyces albus* [J]. Appl Environ Microbiol , 2003, 69: 6412-6417.

[7] 路福平，鲍时翔，林炜铁，等. 土壤放线菌分离及无抗菌活性株的激活 [J]. 华南理工大学学报：自然科学版，1997，5(5)：36-41.
Lu F P, Bao S X, Lin W T, et al. Isolation of soil actinomycetes and activation of strains without antibiotic [J]. J South China University of Technology: Natural Science Edition, 1997, 5(5): 36-41. (in Chinese)

[8] 于志斌，朱天骄，崔承彬，等. 用核糖体工程技术二次开发海洋微生物菌株资源的研究 [J]. 高技术通讯，2006，11(11)：1190-1194.
Yu Z B, Zhu T J, Cui C B. A practical approach for exploiting useless microbial strains from marine environment by ribosome-engineering technology [J]. High Technology Letters, 2006, 11(11): 1190-1194. (in Chinese)

[9] 来彩霞，姚新生，越智幸三. 硝吡咯菌素菌种选育 [J]. 沈阳药

科大学学报，2002，19(2)：134-137.
Lai C X，Yao X S，Ochi K. Improving productivity of a pyrrolnitrin producer [J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University，2002，19(2)：134-137. (in Chinese)
[10] 姜　云，黄丽丽，陈长卿，等. 一株拮抗番茄叶霉病菌的放线菌筛选、鉴定及发酵条件研究[J]. 微生物学报，2007，47(4)：622-627.
Jiang Y，Huang L L，Chen C Q，et al. Screen，identification and optimized fermentation condition of an actinomycete strain against pathogenic fungus *Fulvia fulva* [J]. Acta Microbiologica Sinica，2007，47(4)：622-627. (in Chinese)
[11] 张致平. 微生物药物学 [M]. 北京：化学工业出版社，2003.
Zhang Z P. Microbial pharmacy [M]. Beijing：Chemical Industry Press，2003. (in Chinese)
[12] 杨　焱，刘艳芳，张劲松，等. 赤芝 G2 深层发酵优化模式的研究 [J]. 食用菌学报，2004，11(3)：43-49.
Yang Y，Liu Y F，Zhang J S，et al. An investigation on the optimal submerged-culture mode of Ganoderma lucidum G2 [J]. Acta Edulis Fungi，2004，11(3)：43-49. (in Chinese)
[13] 陈　华，洪　葵，庄　令，等. 红树林放线菌 0616167 的生长特性及发酵条件优化 [J]. 微生物学通报，2006，33 (2)：16-20.
Chen H，Hong K，Zhuang L，et al. Growth characteristics and fermentation condition optimization of mangrove actinomycete strain 0616167 [J]. Microbiology，2006，33 (2)：16-20. (in Chinese)

(上接第 204 页)

[14] 许　贤，王永宏，刘　霞，等. 昆虫病原线虫共生菌筛选及其发酵液抑菌活性的初步研究 [J]. 西北农林科技大学学报：自然科学版，2006，34(7)：50-54.
Xu X，Wang Y H，Liu X，et al. Preliminary study on the inhibition activity of fermented liquid and screening of entomopathogenic nematodes symbiotic bacterium [J]. Jour of Northwest A&F University：Nat Sci Ed，2006，34(12)：174-180. (in Chinese)
[15] 李明华，宫春波，王　萍. 嗜线虫致病杆菌 CB6 菌株培养特性的初步研究 [J]. 微生物学杂志，2005，25(4)：43-45.
Li M H，Gong C B，Wang P. Culture property of nematode-pathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophila* CB6 [J]. Journal of Microbiology，2005，25(4)：43-45. (in Chinese)
[16] 刘洪敏，钱海涛，董　辉，等. 昆虫病原线虫共生菌 5-5B 培养特性及杀虫活性研究 [J]. 中国植保导航，2007，27(4)：5-9.
Liu H M，Qian H T，Dong H，et al. Studies on the cultivation characteristics and insecticidal activity of an entomopathogenic nematode symbiotic bacteria strain 5-5B [J]. China Plant Protection，2007，27(4)：5-9. (in Chinese)