

研究报告

察汗淖放线菌资源探查及抗菌活性筛选

王春苗¹, 王聪聪¹, 张宁宁¹, 董璐¹, 王霞¹, 冯雪梅¹, 付娆², 李小俊^{*1}

1 河北北方学院医学检验学院, 河北 张家口 075000

2 河北北方学院基础医学院, 河北 张家口 075000

王春苗, 王聪聪, 张宁宁, 董璐, 王霞, 冯雪梅, 付娆, 李小俊. 察汗淖放线菌资源探查及抗菌活性筛选[J]. 微生物学通报, 2023, 50(4): 1407-1421.

WANG Chunmiao, WANG Congcong, ZHANG Ningning, DONG Lu, WANG Xia, FENG Xuemei, FU Rao, LI Xiaojun. Resource exploration and antibacterial activity screening of actinomycetes from Chahan Nur[J]. Microbiology China, 2023, 50(4): 1407-1421.

摘要:【背景】细菌耐药形势严峻, 寻找新型抗生素迫在眉睫。放线菌是生产抗生素的重要药物资源。盐湖是一种高盐度的内陆水体, 既往研究表明其中的放线菌物种多样、新资源丰富、生物活性广泛, 极具开发潜力。【目的】探究察汗淖盐湖土壤中放线菌菌种的组成, 并筛选抗菌活性菌株, 为发现新颖的抗菌化合物储备菌种资源。【方法】采用 19 种选择培养基, 以涂布平板法分离放线菌。基于 16S rRNA 基因的相似度鉴定菌株, 并分析其多样性和新颖性。根据菌属类别及其新颖性, 选择代表菌株进行 I 型、II 型聚酮合酶(polyketide synthases, PKS)和非核糖体肽合成酶(non-ribosomal polypeptide synthases, NRPS)抗生素生物合成基因的 PCR 扩增; 代表菌株的发酵液上清和菌体分别经乙酸乙酯和丙酮提取后, 采用纸片扩散法进行抗菌活性检测。【结果】从 9 个土壤样品中分离获得 250 株放线菌, 隶属于放线菌纲的 9 个目 16 个科 28 个属, 链霉菌属(88 株, 占比 35.2%)和拟诺卡氏菌属(68 株, 占比 27.2%)为优势菌属。15 株链霉菌与近缘菌株 16S rRNA 基因的最高相似度低于 98.65%, 推测其归属于 4 个链霉菌属新种, 同时还发现了拟诺卡氏菌属和类诺卡氏菌属新种。75 株代表菌株中, 66 株放线菌至少检出 1 种抗生素生物合成基因, 20 株同时检出 3 种功能基因。筛选出 7 株抗菌活性较强的放线菌, 包括 5 株链霉菌、1 株拟诺卡氏菌和 1 株原小单孢菌。【结论】察汗淖盐湖土壤中可培养放线菌资源较丰富, 部分菌株产生的活性物质抗菌活性强, 值得进一步开展次级代谢产物的研究。

关键词: 盐湖; 放线菌; 多样性; 抗菌活性

资助项目: 河北省省属高校基本科研业务费研究项目(JYT2020001, JYT2021010); 河北省自然科学基金(C2017405031)
This work was supported by the Fundamental Research Funds for Provincial Colleges and Universities of Hebei Province (JYT2020001, JYT2021010) and the Natural Science Foundation of Hebei Province (C2017405031).

*Corresponding author. E-mail: xiaojunsw@hebeinu.edu.cn

Received: 2022-12-14; Accepted: 2023-02-01; Published online: 2023-02-14

Resource exploration and antibacterial activity screening of actinomycetes from Chahan Nur

WANG Chunmiao¹, WANG Congcong¹, ZHANG Ningning¹, DONG Lu¹, WANG Xia¹, FENG Xuemei¹, FU Rao², LI Xiaojun^{*1}

1 College of Lab Medicine, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei, China

2 Basic Medical College, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei, China

Abstract: **[Background]** Due to the wide spread of drug-resistant bacteria, new antibiotics are urgently needed. Actinomycetes are major antibiotic-producing pharmaceutical resources. Saline lakes are special water bodies with high concentrations of dissolved salts. Studies have demonstrated that actinomycetes with high diversity, rich novel metabolites, and a wide range of biological activities from saline lakes are potential resource for drug discovery. **[Objective]** This study aims to reveal the composition of actinomycete species in the soil samples collected from Chahan Nur and identify the strains with antibacterial activities, which will accumulate strains for the discovery of novel antibacterial compounds. **[Methods]** The actinomycetes were isolated by dilution coating method in 19 selective culture media. The diversity and novelty of the isolates were analyzed by comparison of 16S rRNA genes. According to the taxa and novelty, representative isolates were selected for detection of the genes involved in the biosynthesis of type I, type II polyketide synthases (PKS) and non-ribosomal polypeptide synthases (NRPS) by PCR. The fermented broths and mycelia of representative isolates were extracted with ethyl acetate and acetone, respectively, and then antibacterial tests were carried out with the disk diffusion method. **[Results]** A total of 250 actinomycete strains were isolated from nine soil samples, belonging to 28 genera, 16 families of 9 orders, and *Streptomyces* (88 isolates, 35.2%) and *Nocardiosis* (68 isolates, 27.2%) were the dominant genera. Fifteen *Streptomyces* isolates showed the highest 16S rRNA gene similarities below 98.65% to relative strains, which implied they might belong to four novel *Streptomyces* species. Meanwhile, novel species of *Nocardiosis* and *Nocardioidea* were discovered. Among the 75 tested strains, 66 strains were detected with at least one gene involved in antibiotic biosynthesis, and 20 strains carried all the three functional genes. Seven actinomycete strains with strong antibacterial activities were screened out, including five isolates of *Streptomyces*, one isolate of *Nocardiosis*, and one isolate of *Promicromonospora*. **[Conclusion]** Soil samples from Chahan Nur have abundant culturable actinomycetes, and the active substances from some strains have strong antibacterial activities. Therefore, the secondary metabolites of these strains are worthy of further study.

Keywords: saline lake; actinomycete; diversity; antibacterial activity

近年来, 不断增加和扩散的耐药菌已成为威胁人类健康的一个危险因素, 因此, 研发新型抗生素显得尤为重要。目前临床使用的抗生素约三分之二来自放线菌^[1]。放线菌具有丰富的天然产物生物合成基因簇, 是公认的“生物合成工厂”, 能够产生结构类型多样、生物活性广泛的次级代谢产物, 是抗生素、免疫抑制剂和酶抑制剂等的重要来源^[2]。然而, 随着人们的反复开发利用, 很多放线菌被重复筛选, 所以近年来本领域学者对以往研究较少或极少的特殊生境来源放线菌加大了关注^[3], 以期从中发现结构独特、生物活性广泛的先导化合物。

盐湖是一种高盐生境, 广泛分布在干旱及半干旱地区, 其中蕴藏着丰富的耐(嗜)盐微生物资源。由于特殊的生境, 耐(嗜)盐放线菌具有独特的生理特性和遗传特征, 因而从中获得新的抗菌活性物质的潜力也大大超过普通放线菌^[4]。关统伟等^[5]在硝尔库勒湖中分离到的链霉菌 XHU5011 具有抗金黄葡萄球菌、耻垢分枝杆菌和荧光假单胞菌的能力。Borrelidins C-D 是从拟诺卡氏菌 HYJ128 中提取的 18 元大环内酯类抗生素, 它们对沙门菌具有抗菌活性^[6]。艾丁拟无枝酸菌 (*Amycolatopsis aidingensis*) YIM 96748^T 是分离自新疆艾丁湖的放线菌新种, 从该菌株分离到 2 个新的乙酸苯丙酯化合物 amycoletates A 和 amycoletates B^[7]。鉴于不断发现丰富的放线菌资源及活性次级代谢产物, 盐湖极具从中发现放线菌新资源及活性次级代谢产物产生菌的潜力。

河北省境内分布着 2 个内陆盐湖——九莲城淖尔和察汗淖, 二者与内蒙古锡林郭勒盟高原盐湖均隶属于我国中北盐湖区内蒙古东部盐湖亚区(III₂ 亚区)^[8], 课题组前期已对九莲城淖尔和锡林郭勒盟盐湖的放线菌资源进行了探查, 结果显示这些盐湖中放线菌资源丰富、新

颖性好^[9-10]。因此, 加快完成河北省内陆盐湖放线菌资源的调查, 对其中药用放线菌资源进行深入挖掘应用意义深远。察汗淖, 又名碱水湖淖, 该盐湖位于河北省尚义县大营盘乡境内, 湖水面积 40.75 km², 湖面海拔 1 274 m; 湖区气候寒冷而干旱, 年平均气温 3.5 °C 左右, 年降水量不足 100 mm, 西北风盛行, 属干旱大陆性气候区, 气候条件特殊^[11]。本研究以察汗淖盐湖土壤样品作为研究对象, 对其中的可培养药用放线菌资源及放线菌新资源进行研究, 并选择临床常见致病及条件致病菌作为指示菌进行抗菌活性筛选, 以期了解该盐湖中放线菌资源的多样性, 筛选具有优良抗菌活性的药用放线菌菌株, 为发现结构新颖、生物活性广泛的先导化合物和开展微生物新药的研发奠定资源基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器

2×EasyTaq SuperMix、pEASY-T1 Cloning Kit 等细菌 16S rRNA 基因 PCR 扩增及克隆相关试剂, 北京全式金生物技术有限公司; Chelex-100 树脂, Bio-Rad 公司; 放线菌酮, Aladin 公司; 羰基二咪唑, Alfa Aesar 公司。PCR 仪, Life Technologies 公司; 生物安全柜, Thermo 公司; 高压蒸汽灭菌器, 致微(厦门)仪器有限公司。

1.1.2 培养基

M1: peptone yeast extract glycerol agar (PYG 琼脂)参照文献[12]配制; M2: 高氏一号培养基(Gauze's medium No. 1, GA), 北京奥博星生物技术有限责任公司; M3: 1/10 营养琼脂参照文献[13]配制; M4: 改良酵母粉麦芽浸粉琼脂(international *Streptomyces* project medium 2, ISP 2)参照文献[9]配制; M5: 改良纤维素酪

素培养基(cellulose-casein-multisalts, CCMS)参照文献[14]配制; M6: 棉籽糖组氨酸培养基参照文献[13]配制; M7: R2A 培养基, 北京奥博星生物技术有限责任公司; M8: 参照文献[15]配制; M9: CMKA 培养基参照文献[16]配制, 调整复合盐浓度为 5% NaCl、2% KCl 和 1% $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; M10: GA 加 5% NaCl; M11: 改良甘油-精氨酸培养基参照文献[9]配制; M12: 改良 ISP 2 培养基加 5% NaCl; M13: GW1 培养基参照文献[17]配制, 加 5% NaCl; M14: 改良淀粉酪素培养基参照文献[18]配制, 复合盐浓度为 10% NaCl、2% KCl 和 1% $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; M15: 1/10 Gibbson 培养基参照文献[19]配制, 加 8% NaCl; M16 (g/L): 酪蛋白 0.2, 谷氨酰胺 0.5, 酵母粉 1.0, 葡萄糖 0.5, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0, NaCl 50.0, 复合微量盐 1 mL, 复合维生素 1 mL; M17: MM 培养基参照文献[17]配制, 加 5% NaCl; M18: GL3 培养基参照文献[17]配制, 加 10% NaCl; M19: AGG 培养基参照文献[17]配制, 加 5% NaCl; Mueller-Hinton (M-H)培养基, Oxoid 公司。

1.1.3 指示菌

革兰氏阳性菌: 金黄色葡萄球菌 ATCC

25923, 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 18060304; 粪肠球菌 ATCC 29212, 耐药粪肠球菌 19030640。革兰氏阴性菌: 大肠埃希菌 ATCC 25922, 耐药大肠埃希菌 19031919; 肺炎克雷伯菌 ATCC 10031, 耐药肺炎克雷伯菌 18060312; 铜绿假单胞菌 ATCC 27853, 耐药铜绿假单胞菌 19031218; 鲍曼不动杆菌 ATCC 19606, 耐药鲍曼不动杆菌 18060517。耐药菌株均由河北北方学院附属第一医院微生物科提供, 耐药菌株的编号代表分离的年+月+日+当日的序号。

1.1.4 引物

实验所用引物信息见表 1。

1.2 方法

1.2.1 样品的采集和处理

从察汗淖干涸湖盆及水滩边缘采集 15 份土壤样品, 2、4、6、8、11 号为盐碱土层, 3、7、9、10、12、14、15 采集自盐蒿根际, 1、5 号为沙性土壤(未用于放线菌分离), 13 号为盐碱土层下土壤, 样品信息见表 2。样品置于 50 mL 离心管, 运抵实验室后, 分别倒入无菌平板自然风干。无菌研钵研磨样品至粉面状, 装入无菌离心管备用。将 2 号、4 号和 6 号合并为 S1,

表 1 基因扩增引物序列

Table 1 Primers sequence for genes amplification

基因名称 Name of genes	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')
I型聚酮合酶酮基合成酶域基因 ^[20] Ketosynthase genes (KS) of type I polyketide synthases (PKS I) ^[20]	K1F M6R	TSAAGTCSAACATCGGBCA CGCAGGTTSCSGTACCAGTA
II型聚酮合酶酮基合成酶域基因 ^[21] Ketosynthase genes (KS _a) of type II polyketide synthases (PKS II) ^[21]	540F 1100R	GGITGCACSTCIGGIMTSGAC CCGATSGCICCSAGIGAGTG
非核糖体肽合成酶腺苷酰化结构域(A 结构域)基因 ^[20] Adenylation domain of non-ribosomal polypeptide synthases (NRPS) ^[20]	A3F A7R	GCSTACSYSATSTACACSTCSGG SASGTCVCCSGTSCGGTAS
16S rRNA 基因 ^[9] 16S rRNA genes ^[9]	27F 1492R	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG GGTTACCTTGTTACGACTT

表 2 察汗淖采集的样品信息

Table 2 Samples information collected from Chahan Nur

样品编号 Sample No.	样品特点 Characteristics of samples	经纬度 Latitude and longitude
1	沙土 Sandy soil	N 41°28.422', E 113°57.417'
2	盐碱土层 Saline-alkali soil layer	N 41°28.450', E 113°57.394'
3	盐蒿根际 Rhizosphere of <i>Suaeda salsa</i>	N 41°28.445', E 113°57.372'
4	盐碱土层 Saline-alkali soil layer	N 41°28.409', E 113°57.357'
5	黄沙土 Yellow sandy soil	N 41°28.403', E 113°57.385'
6	盐碱土层 Saline-alkali soil layer	N 41°28.351', E 113°56.618'
7	盐蒿根际 Rhizosphere of <i>Suaeda salsa</i>	N 41°28.413', E 113°56.621'
8	盐碱土层 Saline-alkali soil layer	N 41°28.467', E 113°56.626'
9	盐蒿根际 Rhizosphere of <i>Suaeda salsa</i>	N 41°28.470', E 113°56.431'
10	盐蒿根际 Rhizosphere of <i>Suaeda salsa</i>	N 41°28.543', E 113°56.667'
11	盐碱土层 Saline-alkali soil layer	N 41°28.544', E 113°56.677'
12	盐蒿根际 Rhizosphere of <i>Suaeda salsa</i>	N 41°28.548', E 113°57.694'
13	盐碱土层下 Under saline-alkali soil layer	N 41°28.709', E 113°55.360'
14	盐蒿根际 Rhizosphere of <i>Suaeda salsa</i>	N 41°28.726', E 113°55.484'
15	盐蒿根际 Rhizosphere of <i>Suaeda salsa</i>	N 41°28.733', E 113°56.484'

3 号和 7 号样品合并为 S2, 8 号样品为 S3, 9 号样品为 S4, 10 号和 12 号样品合并为 S5, 11 号样品为 S6, 13 号样品为 S7, 14 号样品为 S8, 15 号样品为 S9, S1-S9 用于放线菌的分离。

1.2.2 放线菌的分离

称取 2 g 样品加入到 18 mL 溶液 A^[9]中, 180 r/min 摇床振荡 1 h 后, 将土壤悬液进行梯度稀释, 分别取 10^{-2} g/mL 和 10^{-3} g/mL 稀释度的悬浊液 0.2 mL 涂布于选择培养基, 28 °C 恒温培养, 每隔 3 d 观察单菌落的长出情况, 分离平板用封口膜密封至少放置 3 个月。根据本课题组前期盐湖放线菌分离的经验, 选用常用放线菌分离培养基(M1-M8)及含盐分离培养基(M9-M19)进行放线菌的分离。

1.2.3 放线菌的纯化

根据菌落形态初步排重, 挑取分离平板上疑似放线菌单菌落于斜面划线保存菌种, 并于琼脂平板上分区划线进行纯培养, 纯培养物按照分离获得的时间先后编号, 因采集自察汗淖, 编号为 ChNu-。疑似放线菌纯培养物均拍摄照片存档。

1.2.4 放线菌分类地位的确定

纯培养物根据菌落特征进行再次排重, 选取疑似放线菌的纯培养物进行分子鉴定。采用 Chelex-100 法提取模板 DNA, PCR 扩增 16S rRNA 基因的引物(表 1)、反应体系和反应条件参照文献[9]。经琼脂糖凝胶电泳检测, 对约在 1 500 bp 处出现目的条带的样品进行测序。所得基因序列应用在线服务器 EzTaxon (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>)进行相似性比对, 确定菌株的种属类别, 实现对放线菌的识别。应用 MAGA 6.0 对放线菌分离株构建基于 16S rRNA 基因的系统发育树。

1.2.5 功能基因的检测

根据菌属类别和新颖性, 筛选代表菌株进行抗生素生物合成基因的检测, 包括 I 型聚酮合酶(type I polyketide synthases, PKS I)和 PKS II 的 KS 域基因及非核糖体肽合成酶(non-ribosomal polypeptide synthases, NRPS)的 A 结构域基因, PCR 引物(表 1)、反应体系及反应条件参照文献[9]。

1.2.6 菌株的发酵及抗菌活性测定

根据菌属类别和颖性, 选择代表菌株进行摇瓶发酵、次级代谢产物的提取和抗菌活性测定。根据代表菌株的生长特点, 选择改良 ISP 2 或改良 ISP 2+5% NaCl 作为摇瓶发酵培养基。每株放线菌留存 3 类样品: 发酵液离心后留存的上清样品, 即发酵原液样品; 发酵液上清乙酸乙酯萃取后的甲醇浓缩物样品; 菌体的丙酮浸提浓缩物样品。采用 K-B 法药敏试验进行抗菌活性检测, 操作均在生物安全二级实验室中进行。菌株具体的发酵过程及抗菌活性检测方法参考前期研究^[10]进行。

2 结果与分析

2.1 察汗淖可培养放线菌的多样性

菌株分离过程中共获得了 457 个纯培养物, 从中选取了 277 株疑似放线菌进行了 16S rRNA 基因的扩增, 测序获得了 261 个序列, 经比对发现其中 250 个为放线菌。这些放线菌分布于 9 个目 16 个科 28 个属(图 1)。28 个属包括: 链霉菌科的链霉菌属(*Streptomyces*), 拟诺卡氏菌科的拟诺卡氏菌属(*Nocardiopsis*), 小单孢菌科的疣孢菌属(*Verrucosispora*)和小单孢菌属(*Micromonospora*), 地嗜皮菌科的纯洁杆菌属(*Modestobacter*), 假诺卡氏菌科的糖单孢菌属(*Saccharomonospora*)和拟无枝酸菌属(*Amycolatopsis*), 类诺卡氏菌科的类诺卡氏菌属(*Nocardioideis*), 戈登氏菌科的戈登氏菌属(*Gordonia*), 迪茨氏菌科的迪茨氏菌属(*Dietzia*), 诺卡氏菌科的诺卡氏菌属(*Nocardia*), 原小单孢菌科的栖白蚁菌属(*Isoptericola*)和原小单孢菌属(*Promicromonospora*), 琼斯氏菌科的血杆菌属(*Sanguibacter*), 纤维单胞菌科的放线纤维菌属(*Actinotalea*)和纤维单胞菌属(*Cellulomonas*), 微杆菌科的棍状杆菌属(*Clavibacter*)、壤球菌属

(*Agrococcus*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、拉贝达氏菌属(*Labeledella*)和冷杆菌属(*Frigoribacterium*), 短杆菌科的短杆菌属(*Brevibacterium*), 微球菌科的涅斯捷连科氏菌属(*Nesterenkonia*)、考克氏菌属(*Kocuria*)、志恒刘氏菌属(*Zhihengliuella*)、微球菌属(*Micrococcus*)和节杆菌属(*Arthrobacter*), 伞生杆菌科的伞生杆菌属(*Patulibacter*)。

链霉菌属和拟诺卡氏菌属为优势菌属, 分别分离获得 88 株和 68 株, 占分离菌株总数的 35.2%和 27.2%。19 种分离培养基中, M1 (PYG 培养基)和 M5 (CCMS 培养基)分离获得的菌株数量较多, 而且分离获得的放线菌的菌属种类多(图 2A), 分别分离出 13 个属(27 株)和 12 个属(30 株)的放线菌; 其次为 M11 (改良甘油-精氨酸培养基)和 M12 (改良 ISP 2+5% NaCl); 棉籽糖组氨酸培养基、CMKA、GW1 和改良淀粉酪素培养基分离效果较差。9 份样品中, S1、S4 和 S6 号样品中分离菌株较多, 从中分别获得了 13 个属(39 株)、10 个属(47 株)和 11 个属(41 株)的放线菌; 而 S7 和 S9 中分离到的菌株相对较少(图 2B)。250 株放线菌中分离自含盐培养基的放线菌有 119 株, 其中拟诺卡氏菌 50 株、链霉菌 35 株, 其次为栖白蚁菌属、考克氏菌属和志恒刘氏菌属等(图 3)。

2.2 可培养放线菌的颖性

本研究获得的 88 株链霉菌中, 15 株与近缘菌株 16S rRNA 基因的最高相似度低于 98.65% (依据 16S rRNA 基因相似值判定细菌新物种的临界值)^[22], 初步判断隶属于链霉菌属的 4 个新种(表 3), 如链霉菌 ChNu-2、ChNu-44、ChNu-64、ChNu-73、ChNu-156 和 ChNu-198 的最近缘菌株均为 *Streptomyces bikiniensis* NRRL B-1049^T, 推测这 6 株链霉菌同属于一个链霉菌属新种。4 株拟诺卡氏菌 ChNu-121、ChNu-122、ChNu-134 和 ChNu-249 与近缘菌株

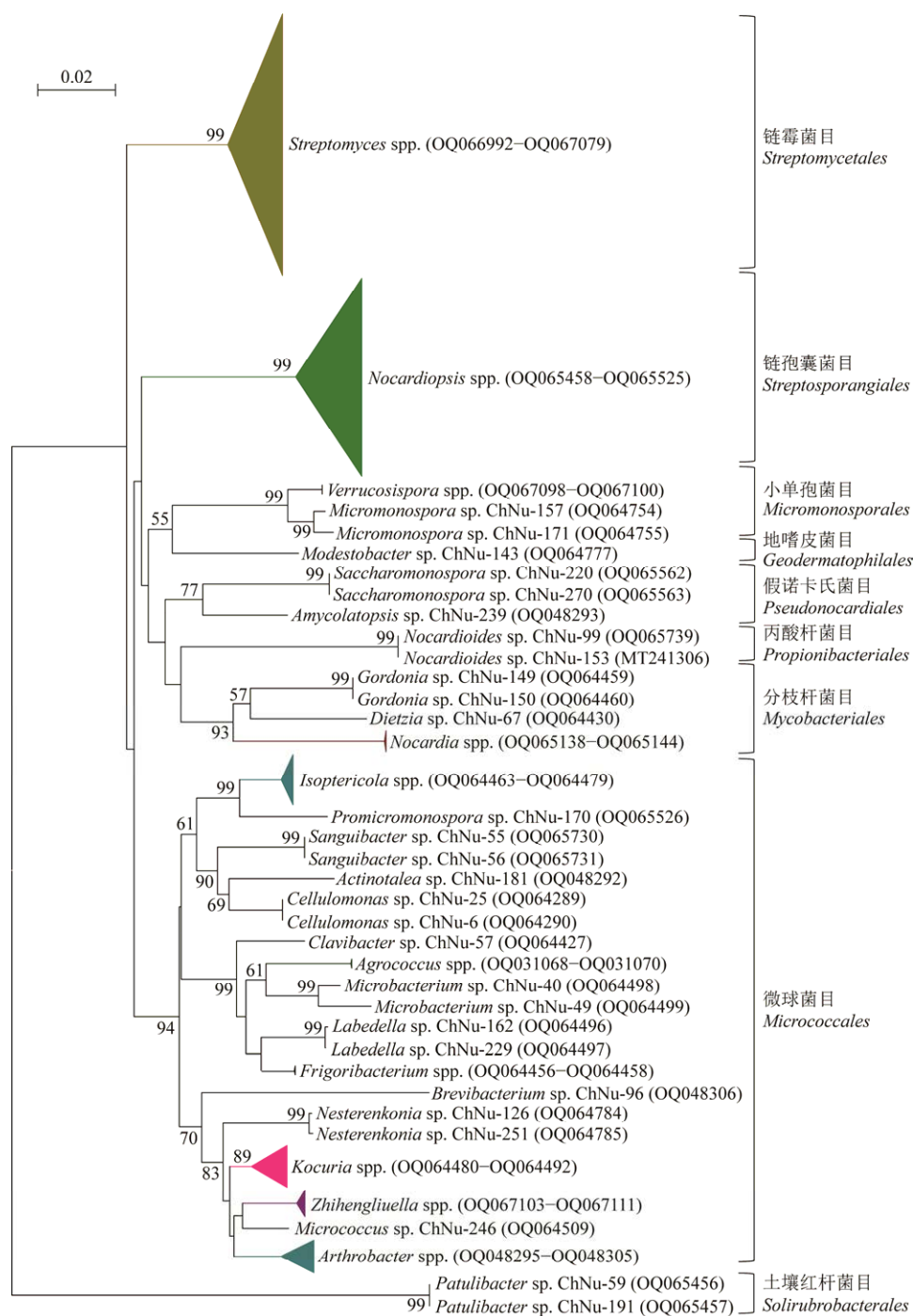


图1 250株放线菌基于16S rRNA基因序列构建的系统发育树 分支点上的数值为1 000次bootstrap分析所得百分比, 仅显示大于50%的值; 标尺表示每个核苷酸位点上的0.02差异值; 括号中的序列号为分离菌株16S rRNA基因的GenBank登录号; 三角代表该进化支是由多个菌株的单进化支压缩而成

Figure 1 Phylogenetic tree of 250 actinomycetes based on 16S rRNA gene sequence. Numbers at branch nodes refer to bootstrap values (%) of 1 000 replications, only values >50% are shown; The scale bar represent 0.02 substitutions per nucleotide position; The sequence numbers in brackets means the GenBank accession numbers of the isolates; The triangle represents a compressed clade from many single clade of the isolates.

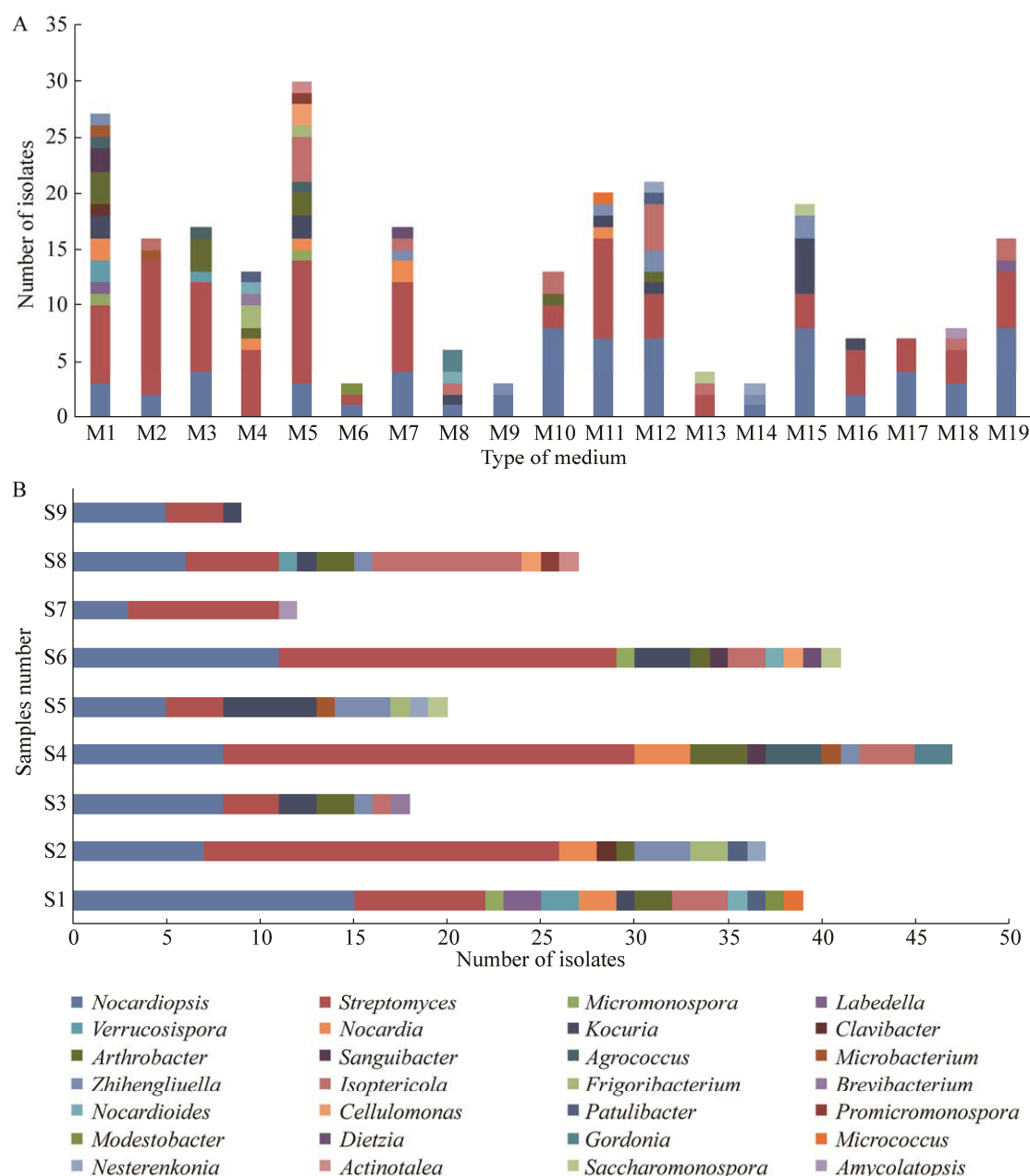


图2 不同培养基(A)和样品(B)分离所得放线菌的数量及菌属分布

Figure 2 The quantity and genera distribution of actinomycete isolates from different media (A) and samples (B).

Nocardiopsis sinuspersici HM6^T 间 16S rRNA 基因的相似性最高为 98.6%，初步判断其同属于一个拟诺卡氏菌属的新种。此外还发现一个类诺卡氏菌属新种。

2.3 抗生素合成功能基因检测结果

通过 PCR 扩增对 75 株分离菌进行 PKS I、

PKS II 和 NRPS 功能基因检测，结果显示，至少有 66 株放线菌携带 3 种功能基因中的 1 种；38 株检出 PKS I 基因，40 株检出 PKS II 基因，46 株检出 NRPS 基因，其中 20 株检出 3 种功能基因；30 株链霉菌中，19 株检测出 PKS I 基因，19 株检出 PKS II 基因，19 株检出 NRPS 基因，9 株

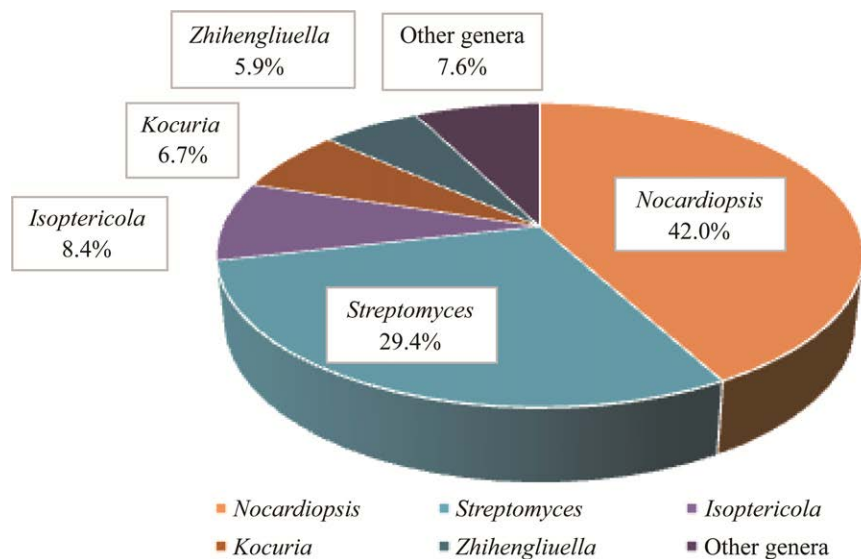


图 3 119 株分离自含盐培养基放线菌的菌属分布
Figure 3 The genera distribution of 119 actinomycetes isolated from culture media with salts.

表 3 察汗淖分离获得的新颖菌株
Table 3 The novel strains isolated from Chahan Nur

菌株编号	近缘菌株	16S rRNA 基因相似度	潜在新种
Strains No.	Relative type strains	16S rRNA gene similarities (%)	Potential novel species
ChNu-2, ChNu-44, ChNu-64, ChNu-73, ChNu-156, ChNu-198	<i>Streptomyces bikiniensis</i> NRRL B-1049 ^T	98.3–98.4	<i>Streptomyces</i> sp. nov.
ChNu-132, ChNu-175	<i>Streptomyces gibsonii</i> NRRL B-1335 ^T	98.3	<i>Streptomyces</i> sp. nov.
ChNu-189, ChNu-218, ChNu-241, ChNu-244, ChNu-248, ChNu-262	<i>Streptomyces rimosus</i> subsp. <i>rimosus</i> ATCC 10970 ^T	98.4–98.5	<i>Streptomyces</i> sp. nov.
ChNu-145	<i>Streptomyces sodiiphilus</i> YIM 80305 ^T	98.2	<i>Streptomyces</i> sp. nov.
ChNu-121, ChNu-122, ChNu-134, ChNu-249	<i>Nocardioopsis sinuspersici</i> HM6 ^T	98.6	<i>Nocardioopsis</i> sp. nov.
ChNu-99, ChNu-153	<i>Nocardioides zeae</i> JM 1068 ^T	98.5	<i>Nocardioides</i> sp. nov.

检出 3 种功能基因；18 株拟诺卡氏菌中，12 株检测出 PKS I 基因，11 株检出 PKS II 基因，14 株检出 NRPS 基因，8 株检出 3 种功能基因，详细结果见表 4。

2.4 抗菌活性检测结果

共筛选了 30 株链霉菌、23 株拟诺卡氏菌和 15 株其他稀有放线菌进行了抗菌活性检测。综合每一株测试菌的发酵液原液、乙酸乙酯浸

提浓缩物、菌体丙酮浸提物 3 类样品的抗菌活性来判断菌株的活性。结果显示，18 株链霉菌 (ChNu-24、ChNu-31、ChNu-37、ChNu-43、ChNu-63、ChNu-65、ChNu-77、ChNu-116、ChNu-124、ChNu-130、ChNu-132、ChNu-140、ChNu-145、ChNu-175、ChNu-189、ChNu-218、ChNu-223 和 ChNu-224)、6 株拟诺卡氏菌 (ChNu-28、ChNu-121、ChNu-141、ChNu-147、

表 4 PKS I、PKS II和 NRPS 基因筛选阳性结果

Table 4 Positive results of screening on PKS I, PKS II and NRPS genes

受试菌株 Test strain	PKS I	PKS II	NRPS	受试菌株 Test strain	PKS I	PKS II	NRPS	受试菌株 Test strain	PKS I	PKS II	NRPS
链霉菌 <i>Streptomyces</i> sp.				拟诺卡氏菌 <i>Nocardiopsis</i> sp.				其他稀有放线菌 <i>Other rare actinomycetes</i>			
ChNu-13	+	+	+	ChNu-19	-	-	+	ChNu-7	-	+	-
ChNu-14	+	+	-	ChNu-28	-	+	+	ChNu-22	+	-	+
ChNu-17	+	-	-	ChNu-46	+	+	+	ChNu-40	-	-	+
ChNu-24	+	+	+	ChNu-88	+	-	+	ChNu-67	-	-	+
ChNu-31	+	+	+	ChNu-90	+	+	+	ChNu-96	+	+	-
ChNu-37	-	+	+	ChNu-92	-	-	+	ChNu-119	+	+	-
ChNu-42	+	+	+	ChNu-103	+	-	-	ChNu-148	-	+	-
ChNu-43	-	-	+	ChNu-105	+	+	+	ChNu-150	+	-	+
ChNu-63	+	+	+	ChNu-113	-	+	+	ChNu-153	-	+	-
ChNu-64	+	+	-	ChNu-121	+	+	+	ChNu-157	+	+	+
ChNu-65	-	+	+	ChNu-125	+	+	+	ChNu-158	-	+	+
ChNu-66	+	+	+	ChNu-141	+	-	-	ChNu-170	-	-	+
ChNu-74	-	+	-	ChNu-142	-	+	-	ChNu-171	-	+	+
ChNu-77	-	-	+	ChNu-147	+	+	+	ChNu-190	+	+	+
ChNu-87	+	+	-	ChNu-164	-	-	+	ChNu-192	-	-	+
ChNu-111	+	+	+	ChNu-188	+	+	+	ChNu-209	-	-	+
ChNu-116	-	-	+	ChNu-207	+	+	+	ChNu-212	-	-	+
ChNu-124	+	-	-	ChNu-225	+	-	-	ChNu-220	+	+	+
ChNu-130	-	-	+								
ChNu-132	-	+	-								
ChNu-135	+	-	+								
ChNu-140	+	+	+								
ChNu-145	-	-	+								
ChNu-156	+	+	-								
ChNu-178	-	+	+								
ChNu-185	-	+	+								
ChNu-189	+	-	-								
ChNu-218	+	-	-								
ChNu-223	+	+	+								
ChNu-224	+	-	-								

+: 检测出目的条带; -: 未检测出目的条带

+: The destination strip is detected; -: Not detected.

ChNu-225 和 ChNu-266)、1 株短杆菌(ChNu-96)、1 株原小单孢菌(ChNu-170)和 1 株节杆菌(ChNu-212)表现出抗菌活性。活性菌株尤其表现出对革兰氏阳性的金黄色葡萄球菌和粪肠球菌较强的抗菌活性,抑菌圈直径较大,但是部分

活性菌株仅对革兰氏阳性指示菌有抗菌活性,对革兰氏阴性指示菌抗菌活性弱或无抗菌活性。活性检测共筛选出 7 株抗菌活性较强、抗菌谱较广的放线菌(表 5)。其中,菌株 ChNu-189 和 ChNu-218 与近缘菌株 *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus*

ATCC 10970^T 的 16S rRNA 基因相似度最高, 但仅为 98.5%, 推测其为链霉菌属潜在新种。这 7 株放线菌可用于后期抗菌活性产物的研究。部分菌株抗菌活性检测结果见图 4。

3 讨论与结论

近年来, 盐湖放线菌资源的科研实践表明盐湖放线菌资源丰富, 很多学者从盐湖样品中

筛选出了多株具有抗菌^[23]、抗肿瘤^[24]、抗植物病原真菌^[25]等广泛生物活性的菌株, 新的次级代谢产物也被陆续发现^[7,26], 成为微生物新药的重要来源。

为了能够分离获得更多种属的可培养放线菌, 结合本课题组前期盐湖放线菌分离的经验, 本研究选用了 8 种无盐培养基和 11 种含盐的选择培养基进行放线菌的分离, 结果显示 PYG 和

表 5 察汗淖盐湖筛选出的供后续化学研究的 7 株抗菌活性菌株

Table 5 Seven antibacterial strains from Chahan Nur for chemical study

Item	ChNu-28	ChNu-170	ChNu-65	ChNu-116	ChNu-130	ChNu-189	ChNu-218
Taxa	<i>Nocardiosis</i>	<i>Promicromonospora</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>
PSK I	—	—	—	—	—	+	+
PSK II	+	—	+	—	—	—	—
NRPS	+	+	+	+	+	—	—
<i>Sa</i> ATCC 25923	AC	B	ABC	ABC	BC	C	AC
18060304	AC	—	ABC	BC	BC	C	AC
<i>Ef</i> ATCC 29212	C	B	BC	B	BC	C	—
19030640	—	—	—	—	—	—	—
<i>Ec</i> ATCC 25922	AC	B	BC	B	C	C	AC
19031919	—	—	—	—	—	—	—
<i>Pa</i> ATCC 27853	C	—	C	B	—	C	—
19031218	—	—	—	—	—	—	—
<i>Kp</i> ATCC 10031	AC	B	—	B	—	C	A
18060312	AC	B	—	B	—	C	—
<i>Ab</i> ATCC 19606	C	B	BC	B	—	—	—
18060517	C	—	C	—	—	C	—

—: 无活性; A: 发酵原液抗菌活性阳性; B: 乙酸乙酯浸提液浓缩物抗菌活性阳性; C: 丙酮浸提物抗菌活性阳性; *Sa*: 金黄色葡萄球菌; *Ef*: 粪肠球菌; *Ec*: 大肠埃希菌; *Pa*: 铜绿假单胞菌; *Kp*: 肺炎克雷伯菌; *Ab*: 鲍曼不动杆菌

—: Negative; A: The antibacterial activity positive of fermentation liquid; B: The antibacterial activity positive of ethyl acetate extract concentrate; C: The antibacterial activity positive of acetone extract; *Sa*: *Staphylococcus aureus*; *Ef*: *Enterococcus faecalis*; *Ec*: *Escherichia coli*; *Pa*: *Pseudomonas aeruginosa*; *Kp*: *Klebsiella pneumonia*; *Ab*: *Acinetobacter baumannii*.

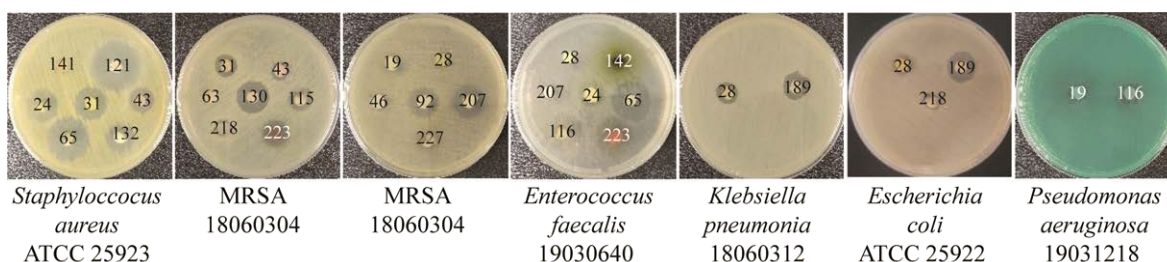


图 4 部分放线菌菌株 K-B 法抗菌活性结果

Figure 4 The antibacterial activities of partial actinomycetal strains in disk diffusion tests.

CCMS 培养基分菌效果较好,其次,改良 ISP 2 (无盐和含 5% NaCl)、含 5% NaCl 的改良甘油-精氨酸、含 8% NaCl 的十分之一 Gibbison、十分之一营养琼脂、R2A 和含 5% NaCl 的 AGG 培养基也分离得到了较多的菌属类别和菌株数目,这些培养基主要为放线菌培养经典培养基、寡营养培养基和添加了细胞渗透调节物质的培养基^[10]。值得注意的是, PYG 培养基的分离效果较好,并且一些用改良 ISP 2 难以纯培养的菌株在含有蛋白胨、酵母提取物和甘油等组分的 PYG 培养基中生长良好。CMKA 和 GW1 是盐碱环境放线菌分离的培养基^[16-17],但在本研究中分离效果欠佳,可能由于这两种培养基选用的盐浓度比例不适用于该区域采集的样品。此外,改良淀粉酪素培养基在本研究中配制的盐浓度较高,分离效果不佳。棉籽糖组氨酸培养基经本研究验证不适用于盐碱土壤样品放线菌的分离。

本研究从察汗淖干涸湖盆及水滩边缘的 9 个样品中分离获得了隶属于 28 个属的 250 株放线菌,充分说明察汗淖盐湖土壤放线菌资源丰富。优势菌属为链霉菌属和拟诺卡氏菌属,这一点与本课题组九莲城淖尔^[9]和锡林郭勒盟盐湖^[10]放线菌资源研究的结果一致。本研究还分离到栖白蚁菌属、考克氏菌属、节杆菌属、志恒刘氏菌属和诺卡氏菌属等菌属的多株放线菌。对比九莲淖尔和锡林郭勒盟盐湖可培养放线菌的研究结果(图 5)发现,3 个区域盐湖含有 11 个相同的属。除链霉菌和拟诺卡氏菌外,锡林郭勒盟盐湖还分离到较多的小单孢菌和考克氏菌(365 株分离菌株中含 30 株小单孢菌和 25 株考克氏菌)^[10];九莲城淖尔还分离到较多的节杆菌和涅斯捷连科氏菌(251 株分离菌株中含 21 株节杆菌和 15 株涅斯捷连科氏菌)^[9];本研究从察汗淖获得了较多的栖白蚁菌(17 株)和考克氏菌

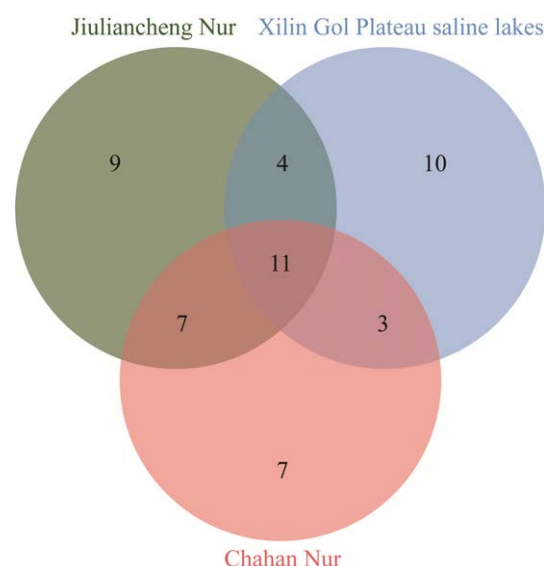


图 5 九莲城淖尔、察汗淖和锡林郭勒盟盐湖放线菌资源菌属类别比较

Figure 5 Comparison of genera of actinomycetes from Jiuliancheng Nur, Chahan Nur and Xilin Gol Plateau saline lakes.

(13 株)。对比菌株的新颖性,锡林郭勒盟盐湖放线菌分离株的新颖性更加突出,而本研究 and 九莲城淖尔获得的新颖菌株相对较少,可能与锡林郭勒盟盐湖生境比河北盐湖更极端、盐碱程度更高、当地气候条件更加特殊和开发活动少有关系。

我国盐湖放线菌资源的研究中关于新疆地区盐湖(隶属于我国Ⅱ区盐湖)的报道较多,该区域多数盐湖可培养放线菌优势物种也多为链霉菌或拟诺卡氏菌^[5,24,27],但相较于该区域盐湖,本课题组从我国Ⅲ₂亚区 2 个河北内陆盐湖和内蒙古锡林郭勒盟盐湖未分离到放线多孢菌属(*Actinopolyspora*),而且分离获得的链单孢菌属(*Streptomonospora*)、糖单孢菌属、糖多孢菌属(*Saccharopolyspora*)和糖霉菌属(*Glycomyces*)菌株数目较少,这说明地理距离可能对盐湖放线菌菌群的组成有一定影响。

本研究共筛选到 7 株抗菌活性较强、抗菌谱较广的放线菌, 主要为 5 株链霉菌、1 株拟诺卡氏菌和 1 株原小单孢菌, 这也体现了链霉菌强大的生物合成能力。拟诺卡氏菌作为盐碱生境中的优势菌群, 近年来已经有多个化合物从中分离获得^[28], 但关于原小单孢菌次级代谢产物的研究很少。其中, 链霉菌 ChNu-189 和 ChNu-218 不仅对 MRSA、大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌均具有抗性, 而且新颖性好, 为潜在的链霉菌新种, 后期将对这 2 个潜在新种进行多相分类鉴定。本研究获得的这几株有药用潜力的放线菌, 后期有待通过基因组信息分析、质谱分子网络技术^[29]分析菌株次级代谢产物的产生能力, 以进行进一步的次级代谢产物化学研究。

本研究探究了察汗淖可培养放线菌资源的多样性和新颖性, 掌握了河北省内陆盐湖的放线菌菌种资源, 研究结果将有助于更深入地了解盐湖生境放线菌群落的组成, 同时丰富了河北内陆盐湖的放线菌资源库。另外, 本研究通过抗菌活性和抗生素生物合成基因的测定, 筛选了多株优质的药用放线菌资源, 这为发现结构新颖、生物活性广泛的先导化合物积累了菌种资源, 对解决当前耐药菌株的问题具有重大意义。

REFERENCES

- [1] BARKA EA, VATSA P, SANCHEZ L, GAVEAU-VAILLANT N, JACQUARD C, MEIER-KOLTHOFF JP, KLENK HP, CLÉMENT C, OUHDOUCH Y, van WEZEL GP. Taxonomy, physiology, and natural products of *Actinobacteria*[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2016, 80(1): 1-43.
- [2] JOSE PA, MAHARSHI A, JHA B. *Actinobacteria* in natural products research: progress and prospects[J]. *Microbiological Research*, 2021, 246: 126708.
- [3] TORRES M, DESSAUX Y, LLAMAS I. Saline environments as a source of potential quorum sensing disruptors to control bacterial infections: a review[J]. *Marine Drugs*, 2019, 17(3): 191.
- [4] 吕玲玲. 罗布泊嗜(耐)盐放线菌的物种多样性、抗生素合成基因以及盐胁迫响应机理初探[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2018.
- LV LL. A preliminary investigation of species diversity of halophilic actinomycetes, biosynthetic genes of antibiotics, and responses of salinity stresses[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [5] 关统伟, 向慧平, 冯栩, 杨阳, 焦士蓉, 赵辉平. 硝尔库勒湖可培养放线菌多样性及其功能酶和抗菌活性[J]. *微生物学报*, 2018, 58(10): 1864-1874.
- GUAN TW, XIANG HP, FANG X, YANG Y, JIAO SR, ZHAO HP. Diversity and antibacterial activity of culturable actinobacteria from Xiaoerkule Lake[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(10): 1864-1874 (in Chinese).
- [6] KIM J, SHIN D, KIM SH, PARK W, SHIN Y, KIM WK, LEE SK, OH KB, SHIN J, OH DC. Borrelidins C-E: new antibacterial macrolides from a saltern-derived halophilic *Nocardiopsis* sp.[J]. *Marine Drugs*, 2017, 15(6): 166.
- [7] LI R, WANG M, REN Z, JI Y, YIN M, ZHOU H, TANG SK. *Amycolatopsis aidingensis* sp. nov., a halotolerant actinobacterium, produces new secondary metabolites[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 743116.
- [8] ZHENG MP. Saline Lakes and Salt Basin Deposits in China: Selected Works of Zheng Mianping[M]. Beijing: Science Press, 2014.
- [9] 李小俊, 吴越, 张伟铭, 李静, 刘少伟, 蒋忠科, 黄大林, 孙承航. 河北九莲城淖尔可培养放线菌多样性及抗菌活性筛选[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(7): 1473-1484.
- LI XJ, WU Y, ZHANG WM, LI J, LIU SW, JIANG ZK, HUANG DL, SUN CH. Biodiversity and antimicrobial activity of culturable actinobacteria isolated from Jiuliancheng Nur in Hebei Province[J]. *Microbiology China*, 2016, 43(7): 1473-1484 (in Chinese).
- [10] 赵思捷, 王春苗, 王聪聪, 李甲, 郑文, 张璐, 岳泽惠, 李小俊. 锡林郭勒盟高原盐湖放线菌资源勘探及抗菌活性筛选[J]. *中国抗生素杂志*, 2022, 47(5): 443-452.
- ZHAO SJ, WANG CM, WANG CC, LI J, ZHENG W, ZHANG L, YUE ZH, LI XJ. Exploration and antibacterial activity of actinomycetes isolated from saline lakes in Xilin Gol Plateau[J]. *Chinese Journal of*

- Antibiotics, 2022, 47(5): 443-452 (in Chinese).
- [11] 郑喜玉, 张明刚, 徐昶, 李秉孝. 中国盐湖志[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- ZHENG XY, ZHANG MG, XU C, LI BX. Records of China Salt Lake[M]. Beijing: Science Press, 2002 (in Chinese).
- [12] SUN HM, ZHANG T, WEI YZ, LIU HY, YU LY, ZHANG YQ. *Tenggerimyces mesophilus* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Nocardioidaceae*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65(10): 3359-3364.
- [13] 董艳萍, 郭琳, 旭格拉·哈布丁, 刘佳萌, 陈川, 蒋忠科, 李昕, 朱霞琳, 曹存巍, 张玉彬, 孙承航. 塔克拉玛干沙漠南麓土壤放线菌资源勘探及抗菌活性筛选[J]. 中国抗生素杂志, 2013, 38(4): 241-247.
- DONG YP, GUO L, XUGELA H, LIU JM, CHEN C, JIANG ZK, LI X, ZHU XL, CAO CW, ZHANG YB, SUN CH. Study on diversity and bioactivity of actinomycetes isolated from the south edge of the Taklamakan Desert[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2013, 38(4): 241-247 (in Chinese).
- [14] TANG SK, TIAN XP, ZHI XY, CAI M, WU JY, YANG LL, XU LH, LI WJ. *Haloactinospora alba* gen. nov., sp. nov., a halophilic filamentous actinomycete of the family *Nocardiopsaceae*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58(Pt 9): 2075-2080.
- [15] YUAN LJ, ZHANG YQ, YU LY, SUN CH, WEI YZ, LIU HY, LI WJ, ZHANG YQ. *Actinopolymorpha cephalotaxi* sp. nov., a novel actinomycete isolated from rhizosphere soil of the plant *Cephalotaxus fortunei*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010, 60(1): 51-54.
- [16] 关统伟, 赵珂, 夏占峰, 吕玲玲, 张小平, 张利莉. 新疆高盐环境土壤放线菌分离培养基比较[J]. 应用与环境生物学报, 2010, 16(3): 429-431.
- GUAN TW, ZHAO K, XIA ZF, LV LL, ZHANG XP, ZHANG LL. Comparison of isolation media for actinobacteria from different saline environments in Xinjiang, China[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2010, 16(3): 429-431 (in Chinese).
- [17] 关统伟, 腾芸, 车振明, 张丽珠, 张小平, 邢亚阁, 刘平, 张利莉. 罗布泊盐湖放线菌分离培养基比较研究[J]. 生物技术, 2013, 23(3): 56-60.
- GUAN TW, TENG Y, CHE ZM, ZHANG LZ, ZHANG XP, XING YG, LIU P, ZHANG LL. Comparison of isolation media for actinobacteria from LopNur Salt Lake[J]. Biotechnology, 2013, 23(3): 56-60 (in Chinese).
- [18] 唐蜀昆, 姜怡, 职晓阳, 姜恺, 李文均, 徐丽华. 嗜盐放线菌分离方法[J]. 微生物学通报, 2007, 34(2): 390-392.
- TANG SK, JIANG Y, ZHI XY, LOU K, LI WJ, XU LH. Method for separate halophilic actinomycetes[J]. Microbiology China, 2007, 34(2): 390-392 (in Chinese).
- [19] 贺江舟, 张莉利, 王建明, 刘新建, 马健. 塔里木盆地嗜盐及耐盐菌的初步研究[J]. 塔里木大学学报, 2007, 19(2): 53-56, 70.
- HE JZ, ZHANG LL, WANG JM, LIU XJ, MA J. The preliminary investigation of halophilic and halotolerant bacteria in Tarim Basin[J]. Journal of Tarim University, 2007, 19(2): 53-56, 70 (in Chinese).
- [20] AYUSO-SACIDO A, GENILLOU 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[J]. Microbial Ecology, 2005, 49(1): 10-24.
- [21] WAWRIK B, KERKHOF L, ZYLSTRA GJ, KUKOR JJ. Identification of unique type II polyketide synthase genes in soil[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(5): 2232-2238.
- [22] KIM M, OH HS, PARK SC, CHUN J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64(Pt 2): 346-351.
- [23] BENHADJ M, GACEMI-KIRANE D, TOUSSAINT M, HOTEL L, BONTEMPS C, DUVAL RE, AIGLE B, LEBLOND P. Diversity and antimicrobial activities of *Streptomyces* isolates from Fetzara Lake, north eastern Algeria[J]. Annales De Biologie Clinique, 2018, 76(1): 81-95.
- [24] 王俊, 付建红, 王玉苗, 阮文伟, 聂慧林, 崔凤真. 一株罗布泊盐湖链霉菌的鉴定及其代谢产物对酪氨酸酶活性、黑色素生成的抑制效应[J]. 天然产物研究与开发, 2022, 34(9): 1548-1556.
- WANG J, FU JH, WANG YM, RUAN WW, NIE HL, CUI FZ. Identification of a *Streptomyces setonii* from Lop Nur and inhibition effects of its metabolites on tyrosinase activity and melanin synthesis[J]. Natural Product Research and Development, 2022, 34(9): 1548-1556 (in Chinese).
- [25] 田蕾, 李恩源, 关统伟, 唐蜀昆, 刘晓飞, 张小平.

- 艾丁湖可培养嗜盐菌多样性及功能酶、抗菌活性筛选[J]. 微生物学通报, 2017, 44(11): 2575-2587.
- TIAN L, LI EY, GUAN TW, TANG SK, LIU XF, ZHANG XP. Diversity and functional enzymes, antimicrobial activity screening of culturable halophilic bacteria from Aiding Lake[J]. Microbiology China, 2017, 44(11): 2575-2587 (in Chinese).
- [26] MESSAOUDI O, SUDARMAN E, BENDAHOU M, JANSEN R, STADLER M, WINK J. Kenalactams A-E, polyene macrolactams isolated from *Nocardiopsis* CG3[J]. Journal of Natural Products, 2019, 82(5): 1081-1088.
- [27] 关统伟, 滕芸, 任丹, 刘松青, 江华明, 赵辉平, 董丹, 张小平. 罗布泊盐湖可培养放线菌多样性及 PKS II 功能基因筛选[J]. 生物技术, 2014, 24(5): 67-71.
- GUAN TW, TENG Y, REN D, LIU SQ, JIANG HM, ZHAO HP, DONG D, ZHANG XP. Diversity and PKS II genes on the cultured actinobacterial in Lop Nur[J]. Biotechnology, 2014, 24(5): 67-71 (in Chinese).
- [28] 高春燕, 庾利, 刘少伟, 蒋忠科, 邬钢, 肖建辉, 孙承航. 拟诺卡菌及其次级代谢产物[J]. 中国抗生素杂志, 2016, 41(2): 81-97.
- GAO CY, TUO L, LIU SW, JIANG ZK, WU G, XIAO JH, SUN CH. *Nocardiopsis* spp. and their secondary metabolites[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2016, 41(2): 81-97 (in Chinese).
- [29] QUINN RA, NOTHIAS LF, VINING O, MEEHAN M, ESQUENAZI E, DORRESTEIN PC. Molecular networking as a drug discovery, drug metabolism, and precision medicine strategy[J]. Trends in Pharmacological Sciences, 2017, 38(2): 143-154.