

研究报告

新疆达坂城盐湖土壤中可培养放线菌多样性及其活性筛选

秦培钢¹, 冯华玺¹, 魏圆圆¹, 毕心怡², 迪丽孜巴·阿迪力¹, 马文静^{*3}

1 新疆医科大学基础医学院, 新疆 乌鲁木齐 830017

2 新疆医科大学药学院, 新疆 乌鲁木齐 830017

3 新疆医科大学中心实验室, 新疆 乌鲁木齐 830017

秦培钢, 冯华玺, 魏圆圆, 毕心怡, 迪丽孜巴·阿迪力, 马文静. 新疆达坂城盐湖土壤中可培养放线菌多样性及其活性筛选[J]. 微生物学通报, 2024, 51(7): 2353-2367.

QIN Peigang, FENG Huaxi, WEI Yuanyuan, BI Xinyi, Diliziba Adili, MA Wenjing. Biodiversity and antimicrobial activities of culturable actinomycetes isolated from the soil of Dabancheng Salt Lake, Xinjiang, China[J]. Microbiology China, 2024, 51(7): 2353-2367.

摘要:【背景】近年来, 新疆的一些盐湖和盐碱地如艾比湖、七角井盐湖和罗布泊等地不断有新的放线菌菌株被发现, 而达坂城盐湖土壤分离放线菌的相关报道较少。【目的】研究新疆达坂城盐湖土壤中可培养放线菌的多样性并进行酶活性筛选, 以期发现新的药用微生物资源, 为新抗生素的发现奠定基础。【方法】采用纯培养分离技术和基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析研究达坂城盐湖土壤中可培养放线菌的多样性; 采用 PCR 检测分析 *pksI*、*pksII*、*nrps* 和 *aph* 这 4 种抗生素合成相关基因的分布; 利用琼脂块扩散法进行抗菌活性初筛; 以 9 种酶活底物为指示物, 结合琼脂块扩散法对可培养的放线菌进行功能酶活性筛选。【结果】从达坂城盐湖的 14 份土壤中共分离到 65 株放线菌, 隶属于 5 个目 5 个科 9 个属, 其中 2 株放线菌为潜在新种, 优势菌属为链霉菌属(*Streptomyces*)和拟诺卡氏菌属(*Nocardiopsis*); 抗生素功能基因筛选出较为丰富的与抗生素合成相关的基因; 筛选到一株对革兰氏阳性、革兰氏阴性及真菌都有拮抗效果的菌株 D21E05; 达坂城盐湖土壤中含丰富的产蛋白酶、脂酶、过氧化氢酶、纤维素酶和淀粉酶等生物活性酶的菌株。【结论】达坂城盐湖土壤中含有较为丰富的药用放线菌资源, 具有从中发现放线菌新物种和新抗生素的潜力。

关键词: 达坂城盐湖; 放线菌; 多样性; 抗微生物活性

资助项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金(2022D01C182); 大学生创新训练计划(S202210760099)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2022D01C182) and the College Student Innovation Training Program (S202210760099).

*Corresponding author. E-mail: wdwldts@163.com

Received: 2024-01-03; Accepted: 2024-03-18; Published online: 2024-04-25

Biodiversity and antimicrobial activities of culturable actinomycetes isolated from the soil of Dabancheng Salt Lake, Xinjiang, China

QIN Peigang¹, FENG Huaxi¹, WEI Yuanyuan¹, BI Xinyi², Diliziba Adili¹, MA Wenjing^{*3}

1 Basic Medical College of Xinjiang Medical University, Urumqi 830017, Xinjiang, China

2 College of Pharmacy of Xinjiang Medical University, Urumqi 830017, Xinjiang, China

3 Central Laboratory of Xinjiang Medical University, Urumqi 830017, Xinjiang, China

Abstract: [Background] In recent years, new strains of actinomycetes have been discovered in the saline-alkali environments such as Ebinur Lake, Qijiaoing Salt Lake, and Lop Nur in Xinjiang of China. However, there are few reports about the actinomycetes strains isolated from the soil of Dabancheng Salt Lake. **[Objective]** We studied the diversity of culturable actinomycetes in the soil of Dabancheng Salt Lake in Xinjiang and screened out the strains with activities of functional enzymes, aiming to mine new medicinal microbial resources and lay a foundation for the discovery of new antibiotics. **[Methods]** The diversity of culturable actinomycetes in the soil of Dabancheng Salt Lake was investigated by the culture-dependent method and the phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences. PCR was employed to explore the distribution of the genes encoding types I and II polyketide synthase (*pksI* and *pksII*), non-ribosomal peptide synthase (*nrps*), and aminoglycoside phosphotransferase (*aph*) for antibiotic synthesis. The agar diffusion method was employed to screen the strains with antimicrobial activities and the strains capable of producing functional enzymes (with nine substrates as indicators). **[Results]** A total of 65 actinomycetes strains belonging to nine genera, five families of five orders were isolated from fourteen soil samples of Dabancheng Salt Lake. *Streptomyces* and *Nocardiopsis* were the dominant genera and two strains were potential new species. Abundant genes involved in antibiotic synthesis were identified. A strain (D21E05) with antagonistic effects on Gram-positive, Gram-negative, and fungi was screened out. The soil of Dabancheng Salt Lake harbored rich strains producing protease, lipase, catalase, cellulase, and amylase. **[Conclusion]** The soil of Dabancheng Salt Lake harbors rich medicinal actinomycetes resources, from which new actinomycetes species and new antibiotics can be discovered.

Keywords: Dabancheng Salt Lake; actinomycetes; diversity; antimicrobial activity

放线菌是生产微生物药物的重要来源,广泛存在于我们周围的环境中,如河流、海洋、土壤以及动植物体内。放线菌能够产生多种活性次级代谢产物,如吡喃萘醌类、吡喃酮类、环内酯类、肽类、芳香杂环类、含氯芳香类和

三联苯类等多种类型,是发现新型微生物药物的一类重要资源。临床上 50%以上的抗生素都来源于链霉菌属(*Streptomyces*)^[1],它们的特殊代谢物还用作癌症治疗剂、抗真菌化合物、免疫抑制剂和抗寄生虫药物。临床上使用的抗菌

药物有五类来源于稀有放线菌(链霉菌除外),红霉素、万古霉素、替考拉宁、利福霉素、庆大霉素和非达霉素等药物被列入世界卫生组织基本药物目录^[2]。除了已批准的药物之外,有研究证明稀有放线菌产生的肽抗生素作为治疗伪膜性结肠炎(pseudomembranous colitis, PMC)的先导药物非常成功^[3]。

近年来,从普通生境中分离到放线菌资源以及代谢产物的重复率越来越高,而从海洋、高盐碱地和高海拔地区等特殊生境中发现新的放线菌种类概率增加^[4]。放线菌能够产生多种生物活性物质,它可以合成抗癌化合物从而在癌症预防和治疗中发挥重要作用^[5]。此外放线菌还具有抗细菌和抗真菌的潜力以及产酶(纤维素酶、蛋白酶、淀粉酶、几丁质酶等)能力,已经证明它们在农业方面具有为植物提供营养以促进生长、提高产量、应对非生物和生物胁迫以及抵抗植物病原体攻击来制造生物肥料的能力^[6-7]。新疆属于西北盐湖区(II)^[8],境内分布很多的盐湖和盐碱地。近年来,在新疆其他盐湖发现的新种放线菌种类越来越多,七角井盐湖、巴里坤盐湖^[9]、玛纳斯湖^[10]、艾比湖^[11]、硝尔库勒

湖^[12]和罗布泊地区^[13]等盐湖发现了很多的放线菌资源,而关于新疆达坂城盐湖周边土壤中可培养放线菌资源的报道较少,需要进一步挖掘。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

2021 年于新疆达坂城盐湖(88°3'53"–88°12'15"E, 43°21'00"–43°25'25"N)(图 1)周边环境地表下 15 cm 处进行采样,共获得 14 份土壤样本,装于保鲜袋中,带回实验室放 4 °C 冰箱保存备用。1 号:盐场附近渠沟内,有芦苇等其他植物;2 号:盐湖中间路边;3–6 号:盐湖边,挖开有黑色腐殖质;7 号:盐湖南边,有很多芦苇;8 号:盐湖南边,芦苇少,地表有少量水;9、10 号:覆盖白色盐层,盐层下面 3–5 cm 有黑色腐殖质;11 号:有少量芦苇和耐盐碱草生长;12–14 号:湖边小盐池。

大肠杆菌(*Escherichia coli*) CMCC(B) 44102、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 29213、白色念珠菌(*Candida albicans*) ATCC 10231、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*) CMCC(B)



图 1 达坂城盐湖取样地 A: 远景. B: 近景

Figure 1 Dabancheng Salt Lake sampling site. A: Long shot. B: Close shot.

26069 和绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*) CMCC 10104, 由新疆医科大学基础医学院形态中心微生物室提供。

1.1.2 主要试剂和仪器

Chelex 100 树脂, Bio-Rad 公司; 扩增引物、试剂和各种酶等分子实验试剂, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司。生物安全柜, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 恒温振荡培养箱, 江苏省金坛华峰仪器有限公司; 离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; PCR 扩增仪和凝胶成像仪, Bio-Rad 公司。

1.1.3 培养基

分离培养基: 2216E 培养基、腐殖酸培养基(humic acid culture medium, HVA)^[8]、高氏培养基(Gorodkova culture medium, GA)^[8], 青岛高科海博生物技术有限公司; 干酪素-甘露醇培养基(casein-mannitol medium, CMKA)^[8]、MM 培养基^[8]和甘露醇-酸水解酪蛋白培养基(mannitol-acid hydrolyzed casein medium, GW1)^[8]; 分离培养基使用时分别加 0% (加 60 mg/L 重铬酸钾、50 mg/L 放线菌酮、20 mg/L 茶啉酮酸)、5%、10%、20% 等不同浓度的复合盐(NaCl:KCl:MgCl₂:CaCl₂ 为 10:1:1:1)^[13], pH 7.2–7.4。

拮抗菌株培养基: LB 培养基用于细菌培养; 马铃薯葡萄糖培养基(potato dextrose agar medium, PDA)用于真菌培养。

纯化培养基: 高氏培养基(GA)。

酶活性筛选培养基: 淀粉酶筛选培养基参考文献[8]配制, 蛋白酶筛选培养基和纤维素酶筛选培养基参考文献[14]配制, 脂酶筛选培养基参考文献[15]配制, 几丁质酶筛选培养基参考文献[16]配制, 褐藻胶裂解酶和氧化酶筛选培养基参考文献[17]配制, 过氧化氢酶筛选培养基参考文献[18]配制。

1.2 菌株的分离纯化

称取 5 g 土样加入装有 50 mL 灭菌水的三角烧瓶, 并放少许小玻璃珠, 120 r/min 室温振荡 1 h 后静置 10 min, 吸取上清配成 10⁻² 和 10⁻³ 稀释液, 吸取 0.2 mL 均匀涂布于 6 种含有 0%、5%、10%、20% 的复合盐培养基上倒置, 30 °C 培养 20–30 d 后挑取肉眼可见菌落接种到与分离培养基相同盐度的 GA 培养基上 30 °C 培养, 重复 2–3 次, 直到获得纯菌株。记录菌落形态特征后以 40% 甘油 GA 培养基保存在 -80 °C 冰箱中。

1.3 放线菌的分子生物学鉴定

采用 16S rRNA 基因序列测序比对方法进行菌种鉴定。挑取菌株划线到与分离培养基中相同盐度的 GA 培养基上 30 °C 培养 4–7 d, 刮取少量菌丝加入 0.2 mL 10% Chelex 100 溶液封口, 沸水煮 10 min, 其间上下颠倒 2–3 次, 室温 10 000 r/min 离心 10 min 后吸上清于 -20 °C 冰箱保存^[19–20]。参照李小俊等^[8]细菌通用引物序列和扩增条件进行 16S rRNA 基因扩增检测, 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 目的片段使用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收后干冰冻存送上海派森诺试剂公司完成测序。

序列分析及系统发育树的构建: 将 16S rRNA 基因序列在 EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net>) 数据库中完成同源性比对, 获得同源性最近的菌株信息, 并以此为参比对象, 用 ClustalX 2.1 进行多序列比对后, 采用 MEGA 11.0 中邻接(neighbor-joining)法构建系统发育树, 设分支置信值 bootstrap 1 000 次, 对分离菌株及潜在新种的系统发育地位进行分析。

1.4 抗生素功能基因的扩增及检测

对有抗菌活性的菌株开展抗生素生物合成基因的检测, 它们是相应抗生素类代谢产物产生的关键催化物。包括 I 型聚酮合酶(polyketidesynthase I, PKS I)和 II 型聚酮合酶(polyketidesynthase II,

PKS II) KS 域基因序列、非核糖体多肽合成酶(nonribosomal peptide synthetase, NRPS) A 结构域基因序列和氨基糖苷磷酸转移酶(aminoglycoside phosphotransferases, APH)^[8,18,21]序列。PCR 反应体系(25 μ L): 2 \times Taq Master Mix 12.5 μ L, 正、反向引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, DNA 模板(10 ng/ μ L) 1 μ L, 无菌去离子水补足 25 μ L。扩增 4 种基因采用的引物序列分别为: (1) *pksI* 基因引物: *kIf* (5'-TSAAGTCSAACATCGGBCA-3') 和 *m6r* (5'-CGCAGGTTSCSGTACCAGTA-3'); (2) *pksII* 基因引物: *ks α* (5'-TSGRCTACRTCAA CGGSCACGG-3') 和 *ks β* (5'-TACSAGTCSWTC GCCTGGTTC-3'); (3) *nrps* 基因引物: *a3f* (5'-GCSTACSYSATSTACACSTCSGG-3') 和 *a7r* (5'-SASGTCVCCSGTSCGGTAS-3'); (4) *aph* 基因引物: *strf* (5'-CGGCTGCTCGACCACGAC-3') 和 *strr* (5'-GTCCTCGATGTCCCACAG-3'), 扩增 4 种基因的反应条件参考文献[8,18]。扩增产物用 0.9%琼脂糖凝胶进行检测, 4 种功能基因片段大小: *pksI*: 1 200–1 400 bp; *pksII*: 600 bp 左右; *nrps*: 700–800 bp; *aph*: 700–800 bp^[22]。

1.5 拮抗菌株的筛选

参考朱荣贵等^[18]方法选用医学上常见致病菌株大肠杆菌(*Escherichia coli*) CMCC(B) 44102、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 29213、白色念珠菌(*Candida albicans*) ATCC 10231、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*) CMCC(B) 26069 和绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*) CMCC 10104 等作为拮抗菌, 用琼脂块扩散法进行抗菌活性筛选。操作如下: 将拮抗菌株活化、转接新的 GA 培养基平板培养过夜后刮取少量菌株, 用生理盐水稀释到 10^8 CFU/mL, 吸取 200 μ L 均匀涂布于 9 cm 的 LB 平板上静置 30 min 左右; 用 6 mm 打孔器将培养好的放线菌菌株制成菌饼, 灭菌

镊子取菌饼, 将有菌丝体一侧倒扣在涂布的拮抗菌株平板上, 期间菌饼不能移动, 37 $^{\circ}$ C 培养 16 h 后观察拮抗结果。

1.6 放线菌的酶活性筛选检测

以脱脂牛奶、吐温-20、吐温-80、5%过氧化氢、2% N,N-二甲基对苯二胺二盐酸盐溶液、羧甲基纤维素钠、可溶性淀粉、几丁质和褐藻胶等原料作为筛选底物, 利用琼脂块扩散法对菌株产蛋白酶、脂酶、纤维素酶、淀粉酶、几丁质酶和褐藻胶裂解酶等酶能力进行筛选, 观察菌苔周围有无透明圈出现, 如有透明圈为阳性, 无则为阴性^[13-15]。过氧化氢酶检测是通过滴加 5%过氧化氢到菌苔上后观察菌苔上有无气泡出现, 有则为阳性, 反之为阴性; 氧化酶检测是通过滴加 2% N,N-二甲基对苯二胺二盐酸盐溶液到菌苔上, 30 s 内观察菌苔颜色变化, 如有紫红色出现为阳性, 反之为阴性。

2 结果与分析

2.1 达坂城盐湖可分离培养菌的多样性

从 14 份盐湖土壤样本中分离到 115 株放线菌菌株, 通过肉眼对培养基上菌落形态、大小和颜色等形态学特征进行观察, 弃重复后剩余 76 株菌株, 对这些菌株的 16S rRNA 基因序列测序, 在 EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net>) 中对测序结果比对分析。结果表明, 其中 65 株为放线菌菌株, 分布于放线菌纲 5 个目 5 个科 9 个属, 菌株分属结果见表 1。其中, 链霉菌科(*Streptomyetaceae*)链霉菌属(*Streptomyces*) 31 株, 占分离总菌株数量的 47.7%, 是达坂城盐湖土壤中优势放线菌类群; 拟诺卡氏菌科(*Nocardiopsaceae*)拟诺卡氏菌属(*Nocardiopsis*) 21 株, 占分离总数的 32.3%, 是达坂城盐湖土壤中次优势放线菌类群。在分离到的 65 株菌株中, 20 株从 0%的复合盐培养基上分离得到, 主要为

表 1 65 株放线菌的多样性分布

Table 1 Genera distribution of 65 actinobacterial strains

目 Order	科 Family	属 Genus	菌株数量 Number of strains
链霉菌目 <i>Streptomyetales</i>	链霉菌科 <i>Streptomyetaceae</i>	链霉菌属 <i>Streptomyces</i>	31
链孢囊菌目 <i>Streptosporangiales</i>	拟诺卡氏菌科 <i>Nocardiopsaceae</i>	拟诺卡氏菌属 <i>Nocardiopsis</i>	21
假诺卡氏菌目 <i>Pseudonocardiales</i>	假诺卡氏菌科 <i>Pseudonocardiaceae</i>	链单孢菌属 <i>Streptomonospora</i>	1
		布劳氏菌属 <i>Prauserella</i>	1
		嗜盐刺丝菌属 <i>Haloechothrix</i>	4
		拟无枝菌酸菌属 <i>Amycolatopsis</i>	3
姜氏菌目 <i>Jiangellales</i>	姜氏菌科 <i>Jiangellaceae</i>	<i>Haloactinopolyspora</i>	1
纤维单胞菌目 <i>Cellulomonadales</i>	原小单孢菌科 <i>Promicromonosporaceae</i>	原小单孢菌属 <i>Promicromonospora</i>	2
		变异白蚁属 <i>Isoptericola</i>	1

链霉菌属 (*Streptomyces*) 和拟诺卡氏菌属 (*Nocardiopsis*) 菌株; 26 株从 5% 的复合盐培养基上分离得到, 主要为链霉菌属 (*Streptomyces*) 和拟诺卡氏菌属 (*Nocardiopsis*) 菌株; 16 株从 10% 复合盐培养基上分离得到, 分别为 10 株拟诺卡氏菌属 (*Nocardiopsis*)、3 株嗜盐刺丝菌属 (*Haloechothrix*)、2 株链霉菌属 (*Streptomyces*) 和 1 株 *Haloactinopolyspora*; 3 株从 20% 复合盐培养基上分离得到, 布劳氏菌属 (*Prauserella*)、嗜盐刺丝菌属 (*Haloechothrix*) 和链单孢菌属 (*Streptomonospora*) 各 1 株。将测序的 65 株放线菌菌株及同源菌株 16S rRNA 基因序列进行系统发育分析, 构建 neighbour-joining 系统发育树, 见图 2。

不同土样和不同分离培养基上分离到的放线菌菌株数量见图 3。样品分离效果如图 3A 所示, 14 份盐湖土壤样品中, 1、7、11、14 号土样分离获得的菌株较多, 这几份样品中 1 号采自盐场旁边的渠沟内, 有芦苇等其他植物; 7、11、14 号主要为盐湖边芦苇等耐盐植物根际土

壤。不同分离培养基分离结果如图 3B 所示。其中 GA 培养基和 2216E 培养基分离的菌株数量相对较多。

2.2 抗菌活性筛选结果

利用琼脂块扩散法对致病菌株进行拮抗试验, 筛选到 7 株菌具有拮抗活性, 拮抗阳性筛选率为 10.8%, 其中菌株 D111C01 对金黄色葡萄球菌敏感型、耐药型及表皮葡萄球菌有显著的拮抗效果; 菌株 D21E05 对所有指示菌都具有显著的拮抗效果 (表 2)。

2.3 功能基因筛选结果

对 65 株放线菌菌株中编码功能酶的 *pksI* 型、*pksII* 型、*nrps* 和 *aph* 的基因进行 PCR 扩增。结果显示, 65 株菌株中有 19 株检出 *pksI* 基因 (阳性率 29.2%); 30 株检出 *pksII* 基因 (阳性率 46.2%); 45 株检出 *nrps* 基因 (阳性率 69.2%) 以及 31 株检出 *aph* 基因 (阳性率 47.7%); 17 株同时具有 3 种抗生素生物合成基因 (阳性率 26.2%), 有合成多种抗生素的潜力菌株的结果如表 3 所示。



图2 基于达坂城盐湖可培养细菌 16S rRNA 基因序列构建的环形系统发育树 分支点上的数值为 1 000 次 bootstrap 分析所得值, 仅显示大于 50% 的值, 标尺 0.1 为进化距离; 括号内序号为 GenBank 登录号

Figure 2 Circular phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence of cultivable bacteria from Dabancheng Salt Lake. Bootstrap values based on 1 000 replications are shown at branch nodes, only bootstrap values > 50% are displayed, evolutionary distance divergence scale bar is 0.1; GenBank accession number are set in parentheses.

2.4 分离可培养放线菌酶活性检测结果

以脱脂牛奶、吐温-20、吐温-80、5%过氧化氢、2%N,N-二甲基对苯二胺二盐酸盐溶液、羧甲基纤维素钠、可溶性淀粉、几丁质和褐藻

胶等原料作为筛选底物, 对 65 株分离的放线菌进行酶活性筛选。结果表明, 产蛋白酶 17 株、产脂酶 38 株(吐温-20, 15 株; 吐温-80, 23 株)、产过氧化氢酶 27 株、产氧化酶 5 株、产纤维

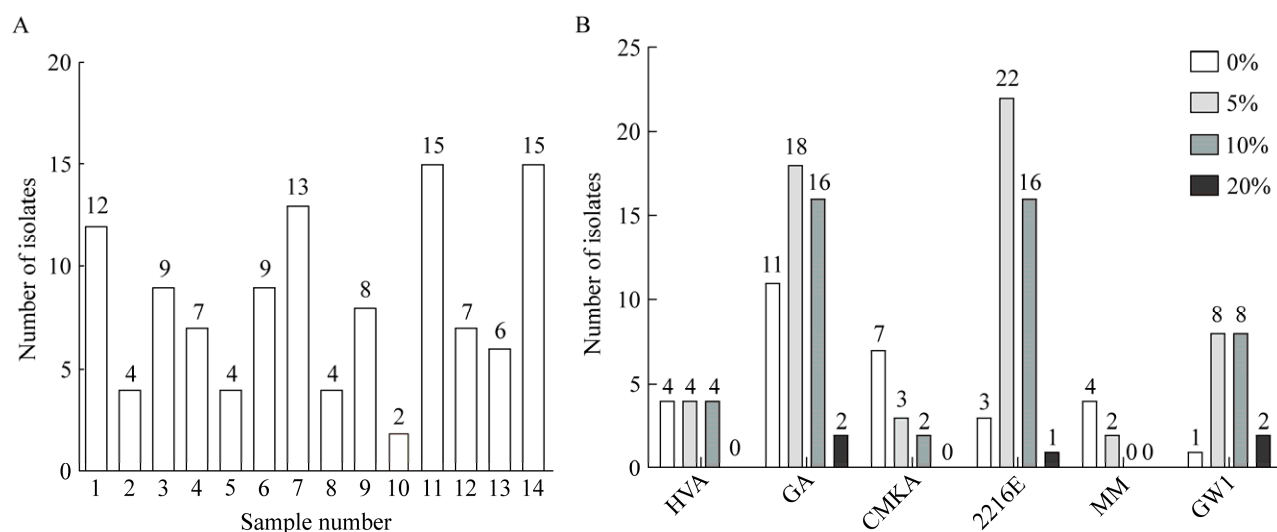


图 3 不同土壤样品(A)和不同培养基(B)中分离的放线菌数量 HVA: 腐殖酸培养基; GA: 高氏培养基; CMKA: 干酪素-甘露醇培养基; 2216E: 2216E 培养基; MM: MM 培养基; GW1: 甘露醇-酸水解酪蛋白培养基; 0%、5%、10%和 20%表示培养基中分别添加 0%、5%、10%和 20%的盐进行分离

Figure 3 Number of actinobacteria strains isolated from different soil samples (A) and different media (B). HVA: Humic acid culture medium; GA: Gorodkova culture medium; CMKA: Casein-mannitol medium; 2216E: 2216E culture medium; MM: MM culture medium; GW1: Mannitol-acid hydrolyzed casein medium; 0%, 5%, 10% and 20% indicated that 0%, 5%, 10% and 20% salt were added to the medium for separation.

表 2 七株活性菌株的抗菌效果

Table 2 Antimicrobial activity of seven actinobacterial strains

指示菌	Strain	Strain	Strain	Strain	Strain	Strain	Strain
Indicator bacteria	D111C01	D111E02	D112H03	D21E05	D214C03	D211G02	D23E01
金黄色葡萄球菌	+++	—	—	+++	+	—	++
<i>Staphylococcus aureus</i>							
金黄色葡萄球菌敏感型	+++	—	—	+++	+	—	++
<i>Staphylococcus aureus</i> S							
金黄色葡萄球菌耐药型	+++	—	—	+++	+	—	++
<i>Staphylococcus aureus</i> RS							
表皮葡萄球菌	+++	+	—	+++	+	—	+++
<i>Staphylococcus epidermidis</i>							
白色念珠菌 <i>Candida albicans</i>	—	—	—	+++	—	++	++
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	—	—	++	+++	—	—	+
绿脓杆菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	—	—	—	+++	—	—	++

+: 拮抗弱阳, 抑菌圈直径 7–10 mm; ++: 有一定的拮抗能力, 抑菌圈直径 10–18 mm; +++: 拮抗能力较强, 抑菌圈直径大于 18 mm; —: 无拮抗

+: Weak antagonism, with an inhibition zone diameter of 7–10 mm; ++: Certain antagonism, with an inhibition zone diameter of 10–18 mm; +++: Strong antagonism, with an inhibition zone diameter greater than 18 mm; —: No antagonism.

表 3 菌株功能基因检测

Table 3 Detection of functional genes of strains

序号 No.	受试菌株 Test strain	<i>pksI</i>	<i>pksII</i>	<i>nrps</i>	<i>aph</i>	序号 No.	受试菌株 Test strain	<i>pksI</i>	<i>pksII</i>	<i>nrps</i>	<i>aph</i>
1	D111G03	—	+	—	+	34	D21G03	+	+	+	—
2	D114H02	+	+	+	+	35	D22E08	—	—	+	+
3	D114M03	+	+	+	+	36	D23E01	+	—	+	—
4	D17H01	—	—	+	—	37	D26G05	—	+	—	—
5	D14G02	—	+	—	+	38	D29H07	—	+	+	—
6	D16G02	+	+	+	—	39	D29H08	—	—	—	+
7	D16G10	—	—	—	—	40	D31G17	—	—	—	—
8	D14M04	+	—	+	—	41	D31W15	+	—	+	+
9	D111C01	—	—	+	+	42	D47G08	—	—	+	+
10	D112C02	—	+	—	—	43	D47G02	—	+	+	—
11	D112C03	—	+	—	—	44	D44W03	—	—	+	+
12	D17C01	—	—	—	+	45	D114G01	—	—	+	—
13	D111E02	+	—	+	—	46	D12G05	—	—	+	+
14	D111E03	—	+	—	—	47	D214C03	+	—	—	+
15	D114E03	—	+	—	—	48	D17H04	+	—	+	+
16	D312C01	—	—	+	+	49	D25G12	—	—	+	+
17	D31E02	—	—	—	+	50	D25G10	—	—	—	—
18	D34E04	—	—	+	+	51	D25G02	—	—	—	+
19	D34E08	—	+	+	+	52	D214C02	—	+	—	—
20	D38E01	—	+	+	—	53	D213E08	+	—	—	+
21	D32G01	—	+	+	+	54	D214E01	—	+	+	—
22	D33G01	—	+	+	+	55	D27E02	+	+	+	—
23	D36G04	—	—	+	+	56	D28E03	+	+	+	—
24	D37G10	—	—	—	—	57	D28G01	+	—	+	+
25	D32G10	—	—	+	—	58	D27G07	—	+	+	+
26	D314H02	—	+	+	+	59	D211H04	—	+	+	—
27	D31W05	+	—	+	+	60	D214H04	+	+	—	—
28	D313W01	—	+	+	+	61	D212M03	—	—	+	—
29	D33W13	—	+	+	—	62	D211G02	+	—	+	+
30	D111H01	+	—	+	—	63	D213G01	—	+	+	—
31	D112H03	—	—	+	—	64	D214W03	—	—	+	+
32	D21E05	—	+	+	—	65	D22G11	—	+	+	—
33	D21G01	+	—	—	—						

+: 检测出目的条带; —: 未检测出目的条带

+: The specific band was detected; —: No specific band was detected.

素酶 18 株以及产淀粉酶 21 株, 分离的菌株均不产生褐藻胶裂解酶和几丁质酶。阳性率分别为 26.2%、23.1%、35.4%、41.5%、7.7%、27.7%和 32.3%。至少产一种酶的菌株有 41 种, 其余 24 株菌株无产酶功能, 其中 D111C01、D111E03 和 D17H01 菌株能产 6 种酶, D111H01 和 D22G11 能产 5 种酶; 在纤维素酶筛选过程中, 菌株 D314H02、D33W13 的纤维素酶活性较强, 形成的透明圈直径通过测量均大于 2 cm, 部分结果如图 4 所示。

2.5 潜在新种信息

当细菌的 16S rRNA 基因序列比对相似度小于 98%^[19]时被认为是潜在新物种。本研究从达坂城盐湖土壤分离到 2 株潜在新种放线菌菌株

D21G01 和 D25G12, 在 <https://www.ezbiocloud.net> 网站上进行 16S rRNA 基因序列比对后发现, 菌株 D21G01 与 *Streptomyces rubrisoli* FXJ1.725^T、*S. purpurascens* NBRC 13077^T 和 *S. asenjonii* KNN 35.1b^T 的相似性分别为 97.63%、97.63% 和 97.61%, 系统发育树分析结果(图 5)显示此菌株与 *S. rubrisoli* FXJ1.725^T 聚在一起, 推断菌株 D21G01 为链霉菌属潜在新种。菌株 D25G02 与 *Nocardiopsis aegyptia* DSM 44442^T、*N. algeriensis* B32^T 和 *N. quinghaiensis* YIM 28A4^T 相似性为 97.91%、97.71%和 97.65%; 系统发育树(图6)分析结果显示此菌株与 *S. rubrisoli* DSM 44442^T 聚在一起, 推断菌株 D25G02 为拟诺卡氏菌属潜在新种。

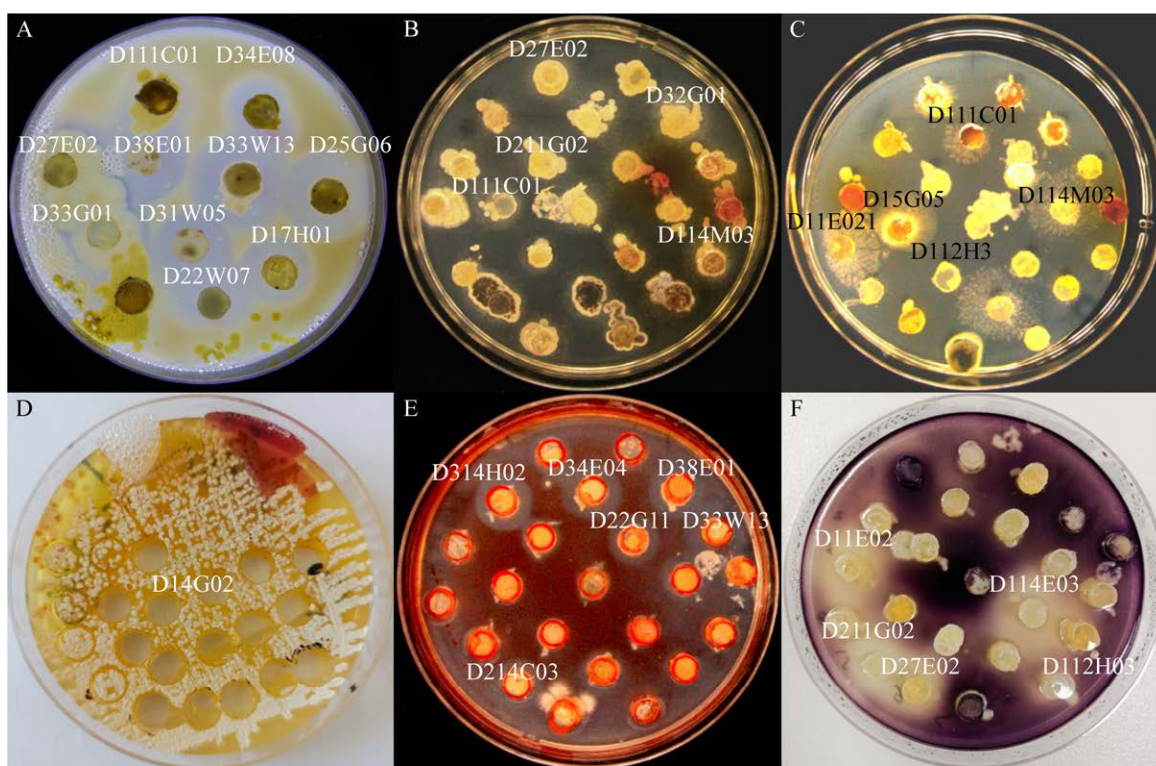


图 4 部分放线菌的酶活检测效果图 A: 蛋白酶. B: 脂酶(吐温-20). C: 脂酶(吐温-80). D: 过氧化氢酶和氧化酶. E: 纤维素酶. F: 淀粉酶

Figure 4 Renderings of enzyme activity in some actinomycete. A: Protease. B: Lipase (Tween-20). C: Lipase (Tween-80). D: Catalase and oxidase. E: Cellulase. F: Amylase.

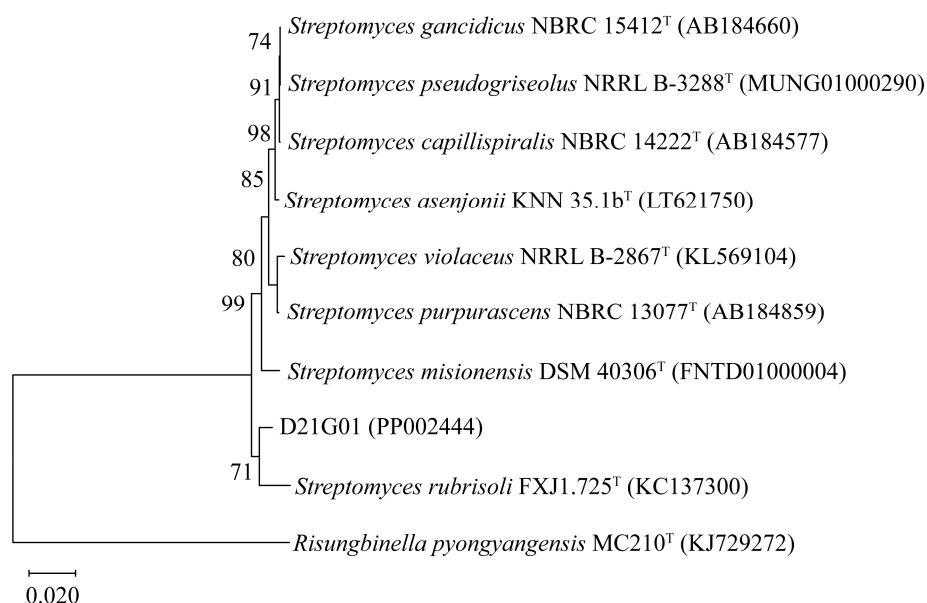


图5 菌株 D21G01 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 分支点上的数值为 1 000 次 bootstrap 分析所得值, 仅显示大于 50% 的值, 标尺 0.020 为进化距离; 括号内序号为 GenBank 登录号

Figure 5 Phylogenetic tree of strain D21G01 based on 16S rRNA gene sequence. Bootstrap values based on 1 000 replications are shown at branch nodes, only bootstrap values >50% are displayed, scale 0.020 represents evolutionary distance divergence; GenBank accession number are set in parentheses.

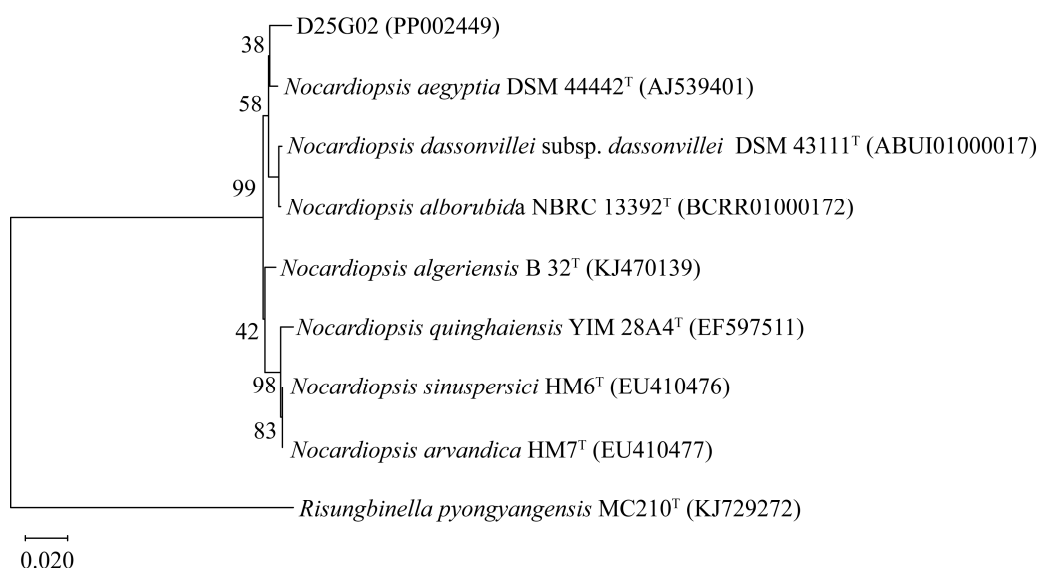


图6 菌株 D25G02 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 分支点上的数值为 1 000 次 bootstrap 分析所得值, 仅显示大于 35% 的值, 标尺 0.020 为进化距离; 括号内序号为 GenBank 登录号

Figure 6 Phylogenetic tree of strain D25G02 based on 16S rRNA gene sequence. Bootstrap values based on 1 000 replications are shown at branch nodes, only bootstrap values >35% are displayed, scale 0.020 represents evolutionary distance divergence; GenBank accession number are set in parentheses.

3 讨论与结论

随着普通生境中分离放线菌重复率的不断升高,发现新种的概率降低,研究的方向开始转向极端环境如极地、高原、海洋、盐湖、盐碱地等。近年来,从新疆的不同盐湖以及盐碱地,如于田盐池、艾比湖、硝尔库勒湖、艾丁湖、七角井盐湖、阜康盐碱地罗布泊、拜城盐山、巴里坤盐湖等高盐环境通过免培养方法和可培养方法分离获得了大量的放线菌菌株^[23]。关于达坂城盐湖放线菌资源方面的基础研究也有部分报道,如朱康康^[24]对新疆地区艾丁湖、达坂城盐碱湖和乌尊布拉克三地中度及极端嗜盐放线菌菌株进行分离,主要采用不同分离培养基中分别添加15%、20%盐度进行嗜盐放线菌株的分离培养;李怡歆等^[25]针对达坂城盐湖嗜盐细菌进行分离鉴定,主要是4种不加盐的培养基进行嗜盐细菌的分离鉴定。他们的研究相对都有各自的侧重点,不能全面地体现达坂城盐湖放线菌资源。而本研究采用6种分离培养基,复合盐按照0%、5%、10%和20%这4个梯度添加到各种分离培养基中,尽可能地将达坂城盐湖中可培养放线菌资源分离出来,体现出达坂城盐湖放线菌资源的多样性。从分离培养基统计数据上看到,2216E培养基分离菌株数量较多,与GA培养基分离菌株有大部分重合,但也有部分是不同的,而2216E培养基是海洋微生物专用分离培养基,在内陆盐湖、盐碱地等高盐环境少有文献报道使用该培养基作为分离培养基。新疆盐湖以及盐碱地有着与海洋相类似的盐环境,今后2216E培养基可以作为分离嗜盐放线菌培养基的选择之一。

通过抗生素相关基因检测,分离的65株放线菌含有较为丰富的*pks*、*nrps*和*aph*基因,其中以*nrps*基因最多,有17株菌株可以扩增3种

基因。*pksI*型基因阳性率为29.2%,*pksII*为46.2%,*nrps*为69.2%,*aph*为47.7%。本研究结果表明达坂城盐湖土壤中发现的放线菌具有合成多种抗生素的潜能。*pksI*合成的抗生素主要有大环内酯类、聚醚类,*pksII*合成芳香族聚酮类化合物^[26]。它们是一类多功能酶,负责生物合成一组具有生物技术和药物领域的聚酮类天然化合物^[27],聚酮类物质是与药物相关的特殊代谢物的主要来源,可以发挥抗菌和抗肿瘤作用,在防治动植物病虫害、保护环境方面具有广泛的应用前景^[26]。*nrps*是一些重要多肽类抗生素的合成系统中起关键作用的酶,天然或后期进行结构修饰的多肽类抗生素均已被用于治疗感染和疾病,如抗菌、抗癌药物、免疫抑制剂^[28]和抗寄生虫。*aph*则是与氨基糖苷类抗生素(aminoglycoside antibiotic, AG)合成密切相关的基因,主要用于临床上细菌感染的治疗,对多种致病菌株都有很强的拮抗作用,对包括需氧革兰阴性杆菌、阳性菌如金黄葡萄球菌、沙门杆菌等致病菌引起的感染都有非常明显的效果^[29]。功能基因产生的抗生素或其他活性物质是菌株为了更好地适应环境所必需的,分离的菌株基因组中同时含有两种及以上的功能基因,而可能合成各种不同种类并且具有拮抗活性的物质。从这方面讲,达坂城盐湖放线菌菌群具有更为复杂的多样性。

在对致病菌株的拮抗筛选上,只筛到7株具有抗菌能力的菌株。推测分析其原因为:首先本研究选择的拮抗菌株种类少,导致拮抗菌株的数量较低;其次是选用GA培养放线菌并用来作拮抗菌饼,可能不能激活分离菌株中沉默基因簇的表达或者表达量很低,后期可以通过优化培养基组分、条件、共培养等提高拮抗菌株数量^[30];筛选到的放线菌D21E05属于链霉菌科链霉菌属放线菌菌株,对临床上常见的

致病菌株如大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌等革兰氏阴性、阳性细菌及真菌等都具有明显的拮抗效果(表 2),说明菌株 D21E05 具有很强的次级代谢产物合成能力和产生新颖抗生素的潜力。后续实验可提取菌株 D21E05 的基因组 DNA 并进行测序,对菌株次级代谢产物进行分离、纯化。结合抗菌活性测定和基因组分析,深入挖掘该菌株中潜在的新结构次级代谢产物,旨在发现具有原创性和自主知识产权的抗菌化合物,以期在医学或农业病原菌的防治中得到广泛应用。

酶筛选检测时很多菌株中都检测到了纤维素酶、脂酶、脲酶、淀粉酶、氧化酶活性等,未检测到含有褐藻胶裂解酶和几丁质酶活性的菌株,主要原因可能是因为内陆环境无贝壳类、紫菜、海带类的生物且不含几丁质、褐藻胶类相关物质,不能为菌株的生长提供碳源,因此菌株中不存在相关酶类基因。在纤维素酶筛选过程中,菌株 D314H02、D33W13 的纤维素酶活性较强,透明圈直径/菌落直径(D/d)大于 $3^{[31]}$ 。由于放线菌产纤维素酶活性相比细菌、真菌稳定性高,pH 值适应更宽泛,编码酶的基因较为简单,更容易进行基因改造,而纤维素酶广泛应用食品、能源、纺织、造纸、饲料等行业^[32-35],后期可对这两个菌株中纤维素酶基因进行 PCR 扩增、转化及表达,进一步检测纤维素酶活性,为今后利用微生物降解纤维素的工业化应用提供参考。

本研究通过对新疆达坂城盐湖土壤中进行菌种的分离鉴定以及抗生素合成相关基因分布的研究,同时对其抗菌活性和酶活性进行了筛选。发现本研究筛选的放线菌具有丰富的与抗生素合成相关的基因,而且筛选到一株具有明显拮抗效果的菌株 D21E05,此外,本研究获得的放线菌菌株含有丰富的产酶功能,同时本研究还获得了 2 个潜在新种,这将成为今后研究

的主要研究对象。在后续的实验,对分离的放线菌进行液体发酵获得次级代谢产物后开展抗菌、抗炎、抗肿瘤活性的研究,以期获得具有抗菌、消炎、抑制肿瘤细胞的次级代谢产物,为后续具有药用活性次级代谢产物的分离、纯化奠定基础。

REFERENCES

- [1] JAGANNATHAN SV, MANEMANN EM, ROWE SE, CALLENDER MC, SOTO W. Marine actinomycetes, new sources of biotechnological products[J]. *Marine Drugs*, 2021, 19(7): 365.
- [2] PARRA J, BEATON A, SEIPKE RF, WILKINSON B, HUTCHINGS MI, DUNCAN KR. Antibiotics from rare actinomycetes, beyond the genus *Streptomyces*[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2023, 76: 102385.
- [3] PETROSILLO N, GRANATA G, CATALDO MA. Novel antimicrobials for the treatment of *Clostridium difficile* infection[J]. *Frontiers in Medicine*, 2018, 5: 96.
- [4] 翟晓旭, 刘迪, 隋丽英, 罗轲轲, 张本印, 张得钧, 薛春梅, 刘少伟, 孙承航. 藏北高原盐湖放线菌 *Nocardiopsis* sp. N85 的活性次级代谢产物研究[J]. *中国抗生素杂志*, 2023, 48(5): 507-517.
ZHAI XX, LIU D, SUI LY, LUO KK, ZHANG BY, ZHANG DJ, XUE CM, LIU SW, SUN CH. Antibacterial secondary metabolites from the strain *Nocardiopsis* sp. N85 isolated from a saline lake on the Northern Tibetan Plateau[J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2023, 48(5): 507-517 (in Chinese).
- [5] PONGEN YL, THIRUMURUGAN D, RAMASUBBURAYAN R, PRAKASH S. Harnessing actinobacteria potential for cancer prevention and treatment[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2023, 183: 106324.
- [6] KAARI M, MANIKKAM R, ANNAMALAI KK, JOSEPH J. Actinobacteria as a source of biofertilizer/biocontrol agents for bio-organic agriculture[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2023, 134(2): 1xac047.
- [7] NAZARI MT, MACHADO BS, MARCHEZI G, CRESTANI L, FERRARI V, COLLA LM, PICCIN JS. Use of soil actinomycetes for pharmaceutical, food, agricultural, and environmental purposes[J]. *3 Biotech*, 2022, 12(9): 232.
- [8] 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).
- [9] 向慧平, 关统伟, 赵顺先, 张习超, 欧梦莹, 林宜锦, 王鹏昊. 新疆巴里坤、七角井和台特玛盐湖沉积物中免培养放线菌群落组成与离子成分分析[J]. 微生物学通报, 2018, 45(6): 1228-1236.
- XIANG HP, GUAN TW, ZHAO SX, ZHANG XC, OU MY, LIN YJ, WANG PH. Actinobacterial community and ionic composition in sediment of Xinjiang saline lakes: Barkol, Qijiaoqing and Taitema[J]. Microbiology China, 2018, 45(6): 1228-1236 (in Chinese).
- [10] 王晓亮, 冯丽, 孙燕飞, 吴梦纤, 章芳, 张亚平. 新疆玛纳斯水库周边湿地土壤中放线菌群落结构的多样性分析[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2015, 33(6): 694-701.
- WANG XL, FENG L, SUN YF, WU MX, ZHANG F, ZHANG YP. Diversity analysis of the soil actinomycetes community structure in the wetland around the manas reservoir in Xinjiang[J]. Journal of Shihezi University (Natural Science Edition), 2015, 33(6): 694-701 (in Chinese).
- [11] 吕杰, 吕光辉, 马媛. 新疆艾比湖沉积物中免培养放线菌的多样性[J]. 微生物学报, 2016, 56(9): 1426-1433.
- LÜ J, LÜ GH, MA Y. Actinobacterial diversity in sediments of Ebinur Lake, Xinjiang, China[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(9): 1426-1433 (in Chinese).
- [12] 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, FENG 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).
- [13] 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 actinobacteria in Lop Nur[J]. Biotechnology, 2014, 24(5): 67-71 (in Chinese).
- [14] 宋朝霞, 范玲, 李鹏, 周庆举. 一株纤维素酶高产细菌的筛选及鉴定[J]. 河南工程学院学报(自然科学版), 2018, 30(4): 76-81.
- SONG ZX, FAN L, LI P, ZHOU QJ. Screening and identification of a cellulase-producing strain[J]. Journal of Henan University of Engineering (Natural Science Edition), 2018, 30(4): 76-81 (in Chinese).
- [15] 李菲, 李喆, 胡文进, 黄庶识, 刘涇涇, 黄媛林, 王巧贞, 潘信利. 广西茅尾海红树林土壤放线菌多样性及功能酶活性研究[J]. 海洋学报, 2021, 43(2): 88-97.
- LI F, LI Z, HU WJ, HUANG SS, LIU JJ, HUANG YL, WANG QZ, PAN XL. Biodiversity and functional enzymes of actinomycetes isolated from mangrove soil in the Maowei Sea, Guangxi[J]. Haiyang Xuebao, 2021, 43(2): 88-97 (in Chinese).
- [16] 王巧贞, 李锋, 易淑琼, 杨玲, 潘信利, 黄媛林, 李喆, 李菲, 廖思明, 黄庶识. 茅尾海桐花树根际土壤来源几丁质降解菌株多样性及抗植物真菌活性的研究[J]. 中国抗生素杂志, 2022, 47(5): 453-462.
- WANG QZ, LI F, YI SQ, YANG L, PAN XL, HUANG YL, LI Z, LI F, LIAO SM, HUANG SS. Diversity and antifungal activity of chitin-degrading bacteria isolated from *Aegiceras corniculatum* rhizosphere mud in Maowei Sea[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2022, 47(5): 453-462 (in Chinese).
- [17] 高荣, 郑志国, 鲍时翔, 莫坤联, 黄惠琴. 产褐藻胶裂解酶菌株筛选与高产酶菌株的 ARTP 诱变选育[J]. 中国酿造, 2022, 41(8): 64-69.
- GAO R, ZHENG ZG, BAO SX, MO KL, HUANG HQ. Screening of alginate lyase-producing bacteria and breeding of high enzyme-producing strain by ARTP mutagenesis[J]. China Brewing, 2022, 41(8): 64-69 (in Chinese).
- [18] 朱荣贵, 关统伟, 姜秀娟. 塔里木盆地 5 个生态小区稀有放线菌分离及合成抗生素基因分布[J]. 生物技术通报, 2018, 34(9): 230-236.
- ZHU RG, GUAN TW, JIANG XJ. Isolation of rare actinobacteria in 5 ecodistricts of Tarim Basin and distribution of the genes synthesizing antibiotics[J]. Biotechnology Bulletin, 2018, 34(9): 230-236 (in Chinese).
- [19] 赵雅慧, 张舒琳, 吴家法, 黄新静, 吴霜, 张政, 杨立芳, 龙寒, 翟金彩, 姜明国. 山口红树林根际土壤可培养细菌多样性及其活性筛选[J]. 海洋学报, 2018, 40(8): 138-151.
- ZHAO YH, ZHANG SL, WU JF, HUANG XJ, WU S, ZHANG Z, YANG LF, LONG H, XUAN JC, JIANG MG. Screening the diversity and activity of culturable bacteria isolated from mangrove rhizosphere soil at Shankou[J]. Haiyang Xuebao, 2018, 40(8): 138-151 (in Chinese).
- [20] 周双清, 黄小龙, 黄东益, 胡新文, 陈吉良. Chelex-100 快速提取放线菌 DNA 作为 PCR 扩增模板[J]. 生物技术通报, 2010(2): 123-125.
- ZHOU SQ, HUANG XL, HUANG DY, HU XW, CHEN JL. A rapid method for extracting DNA from actinomycetes by chelex-100[J]. Biotechnology Bulletin, 2010(2): 123-125 (in Chinese).
- [21] 王春苗, 王聪聪, 张宁宁, 董璐, 王霞, 冯雪梅, 付饶, 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 CM, WANG CC, ZHANG NN, DONG L, WANG X, FENG XM, FU R, LI XJ. Resource exploration and antibacterial activity screening of actinomycetes from Chahan Nur[J]. Microbiology China, 2023, 50(4): 1407-1421 (in Chinese).
- [22] 罗健雅, 黄紫贝, 赵以恒, 郭鑫, 李蒙, 苏思元, 李自盼, 徐昀眺, 王海燕, 刘文博. 抗广谱耐药细菌的放线菌筛选及抗菌活性研究[J]. 中国抗生素杂志, 2023, 48(11): 1229-1241.
- LUO JY, HUANG ZB, ZHAO YH, GUO X, LI M, SU SY, LI ZP, XU YT, WANG HY, LIU WB. Screening and antibacterial activity of actinomycetes against broad-spectrum drug-resistant bacteria[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2023, 48(11): 1229-1241 (in Chinese).
- [23] 夏占峰. 新疆极端环境放线菌多相分类及抑菌活性物质研究[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2015.
- XIA ZF. Polyphasic identification and antifungal metabolite analysis of extreme actinomycetes isolated in Xinjiang[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [24] 朱康康. 新疆3个盐湖放线菌多样性研究[D]. 昆明: 云南大学硕士学位论文, 2021.
- ZHU KK. Diversity of actinomycetes in three salt lakes in Xinjiang[D]. Kunming: Master's Thesis of Yunnan University, 2021 (in Chinese).
- [25] 李怡歆, 陈勇, 刘晓禄, 艾尼江·尔斯满, 徐李娟, 刘倩倩, 包晓玮, 宋素琴. 新疆达坂城盐湖嗜盐细菌分离鉴定及活性分析[J]. 新疆农业科学, 2023, 60(7): 1766-1772.
- LI YX, CHEN Y, LIU XL, Ainijiang Ersiman, XU LJ, LIU QQ, BAO XW, SONG SQ. Isolation, identification and activity of halophilic bacteria from Dabancheng Salt Lake, Xinjiang[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2023, 60(7): 1766-1772 (in Chinese).
- [26] 张华茜, 刘伟, 杜春梅. 聚酮合酶的催化机制及聚酮类化合物的组合生物合成[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2023, 39(3): 400-412.
- ZHANG HQ, LIU W, DU CM. Catalytic mechanisms of polyketide synthases and combinatorial biosynthesis of polyketides[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2023, 39(3): 400-412 (in Chinese).
- [27] BON C, CABANTOUS S, JULIEN S, GUILLET V, CHALUT C, RIMA JL, BRISON Y, MALAGA W, SANCHEZ-DAFUN A, GAVALDA S, QUÉMARD A, MARCOUX J, WALDO GS, GUILHOT C, MOUREY L. Solution structure of the type I polyketide synthase Pks13 from *Mycobacterium tuberculosis*[J]. BMC Biology, 2022, 20(1): 147.
- [28] DHAKAL D, SOHNG JK, PANDEY RP. Engineering actinomycetes for biosynthesis of macrolactone polyketides[J]. Microbial Cell Factories, 2019, 18(1): 137-159.
- [29] 孟飞, 周小华, 袁耀佐. 氨基糖苷类抗生素检测技术的发展[J]. 药学与临床研究, 2022, 30(5): 441-446.
- MENG F, ZHOU XH, YUAN YZ. Development of detection technologies for aminoglycoside antibiotics[J]. Pharmaceutical and Clinical Research, 2022, 30(5): 441-446 (in Chinese).
- [30] 夏焕章, 翟航. 放线菌次级代谢产物研究进展[J]. 微生物学杂志, 2023, 43(4): 1-9.
- XIA HZ, ZHAI H. Advances in secondary metabolites of actinomycetes[J]. Journal of Microbiology, 2023, 43(4): 1-9 (in Chinese).
- [31] 任大明, 赵钰, 白炜琪, 陈红漫, 阚国仕, 俭思涵, 张聪. 一株产纤维素酶放线菌的分离鉴定及酶学性质研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2016, 47(6): 667-672.
- REN DM, ZHAO Y, BAI YQ, CHEN HM, KAN GS, XIAN SH, ZHANG C. Isolation, identification and enzymatic properties of a cellulose-producing actinomycetes[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2016, 47(6): 667-672 (in Chinese).
- [32] 赵鑫, 张红, 门中华, 马勇, 温彤. 纤维素酶的研究与应用进展[J]. 化学与生物工程, 2023, 40(9): 1-9.
- ZHAO X, ZHANG H, MEN ZH, MA Y, WEN T. Research and application progress in cellulase[J]. Chemistry & Bioengineering, 2023, 40(9): 1-9 (in Chinese).
- [33] 张运晖, 赵琰, 张艳萍, 王立光. 一株玉米秸秆纤维素降解放线菌的筛选、鉴定及酶学特性研究[J]. 微生物学杂志, 2023, 43(3): 52-59.
- ZHANG YH, ZHAO Y, ZHANG YP, WANG LG. Isolation, identification and enzymology characteristics of a corn stalk cellulose-degradable actinomycetes strain[J]. Journal of Microbiology, 2023, 43(3): 52-59 (in Chinese).
- [34] 贾若峰, 谷奇, 孙一鸣, 陆鹏飞, 俱世博, 乔海莉. 取食洋白蜡和旱柳光肩星天牛幼虫肠道中的细菌多样性差异及关键纤维素降解细菌筛选[J]. 林业科学, 2023, 59(4): 117-131.
- JIA RF, GU Q, SUN YM, LU PF, JU SB, QIAO HL. Differences in bacterial diversity and key cellulose-degrading bacteria in the intestinal tract of *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae) larvae feeding on *Fraxinus pennsylvanica* and *Salix matsudana*[J]. Scientia Sinicae, 2023, 59(4): 117-131 (in Chinese).
- [35] 张晶, 张浩睿, 曹云, 黄红英, 曲萍, 张志萍. 嗜热纤维素降解菌研究进展[J]. 生物技术通报, 2023, 39(6): 73-87.
- ZHANG J, ZHANG HR, CAO Y, HUANG HY, QU P, ZHANG ZP. Research progress in thermophilic microorganisms for cellulose degradation[J]. Biotechnology Bulletin, 2023, 39(6): 73-87 (in Chinese).