

研究报告

添加抗生素对新疆特殊生境微生物分离培养的影响

文凤, 宋迎, 张珍, 李丽霞, 罗晓霞, 万传星, 夏占峰*

塔里木大学生命科学与技术学院 新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室,
新疆 阿拉尔 843300

文凤, 宋迎, 张珍, 李丽霞, 罗晓霞, 万传星, 夏占峰. 添加抗生素对新疆特殊生境微生物分离培养的影响[J]. 微生物学通报, 2023, 50(8): 3314-3329.

WEN Feng, SONG Ying, ZHANG Zhen, LI Lixia, LUO Xiaoxia, WAN Chuanxing, XIA Zhanfeng. Effects of antibiotics on isolation and culture of microorganisms from special habitats in Xinjiang of China[J]. Microbiology China, 2023, 50(8): 3314-3329.

摘要:【背景】新疆特殊生境罗布泊及温宿峡谷凭借其特殊的地理位置、极端的周边自然生态环境及较少的人为活动影响, 促成了其独特的微生物优质资源。【目的】为探索添加抗生素对微生物选择性分离培养的作用, 优化改良新疆特殊生境微生物选择性分离培养, 以减少对菌株的重复分离, 还可以选择性培养更多耐受此类抗生素的微生物, 发现更多生物活性产物。【方法】以高氏一号培养基为基础, 添加不同浓度的 β -内酰胺类抗生素阿莫西林(amoxicillin)、氨基糖苷类抗生素卡那霉素(kanamycin)、安莎大环内酯类抗生素利福平(rifampicin)、喹诺酮类抗生素诺氟沙星(norfloxacin)、酰胺醇类抗生素氯霉素(chloramphenicol)、氨基糖苷类抗生素链霉素(streptomycin), 分离新疆特殊生境罗布泊及温宿峡谷土壤样品中的微生物。【结果】添加诺氟沙星分离获得的微生物种类和数量最多, 其次是卡那霉素和阿莫西林, 再次是利福平和氯霉素。所选用的大多数抗生素在1/10 MIC和1/15 MIC浓度时分离效果最好。罗布泊土样共分离到19株菌, 分布在8个属。其中芽孢杆菌属6株、链霉菌属5株、类芽孢杆菌属3株、根瘤菌属1株、副芽孢杆菌属1株、原小单胞菌属1株、海洋杆菌属1株、野野村氏菌属1株, 分离获得了5株新物种。温宿峡谷土样共分离获得73个菌株, 分布在27个属。其中链霉菌属33株、鞘氨醇单胞菌属1株、假黄单胞菌属2株、假诺卡氏菌5株、假节杆菌1株、原小单胞菌2株、普里斯特氏菌属1株、植物放线菌属1株、副球菌属1株、类芽孢杆菌属2株、类节杆菌属2株、诺卡氏菌属1株、小单胞菌属1株、红色甲基杆菌属1株、甲基杆菌属1株、副芽孢杆菌属5株、伦茨氏菌属1株、克里布所菌属2株、耐盐白蚁菌属1株、剑菌属1株、博斯氏菌属1株、节杆菌属1株、壤霉菌属2株、土壤球菌属1株、放线动孢菌属1株、异壁放线菌属1株、芽孢杆菌属1株, 分离获得了14株新物种。

资助项目: 兵团财政科技计划(2021BC009); 塔里木大学校长基金重大项目培育专项(TDZKZD202202); 塔里木大学自治区研究生科研创新项目(TDGRI202202)

This work was supported by the Bingtuan Science and Technology Program (2021BC009), the Special Cultivation Project of Tarim University President's Fund (TDZKZD202202), and the Tarim University Autonomous Region Postgraduate Research and Innovation Project (TDGRI202202).

*Corresponding author. E-mail: fenge3721@163.com

Received: 2022-10-25; Accepted: 2022-12-12; Published online: 2023-02-14

【结论】添加诺氟沙星和卡那霉素有利于微生物的选择性分离培养, 有利于发掘新菌种, 本研究的开展为选择性分离培养特殊环境中的稀有微生物提供了指导。

关键词: 抗生素; 特殊生境; 选择性分离

Effects of antibiotics on isolation and culture of microorganisms from special habitats in Xinjiang of China

WEN Feng, SONG Ying, ZHANG Zhen, LI Lixia, LUO Xiaoxia, WAN Chuanxing, XIA Zhanfeng*

Key Laboratory of Protection and Utilization of Biological Resources in Tarim Basin, Xinjiang Production & Construction Corps, College of Life Sciences and Technology, Tarim University, Alar 843300, Xinjiang, China

Abstract: [Background] The special habitats of Lop Nur and Wensu Canyon in Xinjiang of China, with their special geographical location, extreme surrounding natural ecological environment, and less influence of human activities, promote their unique high-quality microbial resources. [Objective] To explore the effect of adding antibiotics on the selective isolation and culture of microorganisms and optimize the selective isolation and culture of microorganisms in special habitats of Xinjiang to reduce the repeated isolation of strains. In addition, more microorganisms tolerant to such antibiotics could be selectively cultured to discover more bioactive products. [Methods] With Gauze's No.1 medium as the foundation medium, different concentrations of β -lactam antibiotic amoxicillin, aminoglycoside antibiotic kanamycin, ansa macrolide antibiotic rifampin, quinolone antibiotic norfloxacin, aminool antibiotic chloramphenicol, and aminoglycoside antibiotic streptomycin were added. Microorganisms from soil samples of Lop Nur and Wensu Canyon in Xinjiang were isolated. [Results] The species and number of microorganisms isolated by norfloxacin were the highest, followed by kanamycin, amoxicillin, rifampicin, and chloramphenicol. Most antibiotics were best separated by 1/10 MIC and 1/15 MIC concentration. Nineteen strains were isolated and distributed in 8 genera. Among them, 6 strains belonged to *Bacillus*, 5 strains belonged to *Streptomyces*, 3 strains belonged to *Paenibacillus*, 1 strain belonged to *Rhizobium*, 1 strain belonged to *Metabacillus*, 1 strain belonged to *Promicromonospora*, 1 strain belonged to *Pontibacter*, and 1 strain belonged to *Nonomuraea*. Five new species were isolated. Seventy-three strains were isolated from the soil samples of Wensu Canyon and distributed in 27 genera. Among them, 33 strains belonged to *Streptomyces*, 1 strain belonged to *Sphingomonas*, 2 strains belonged to *Pseudoxanthomonas*, 5 strains belonged to *Pseudonocardia*, 1 strain belonged to *Pseudarthrobacter*, 2 strains belonged to *Promicromonospora*, 1 strain belonged to *Priestia*, 1 strain belonged to *Plantactinospora*, 1 strain belonged to *Paracoccus*, 2 strains belonged to *Paenibacillus*, 2 strains belonged to *Paenarthrobacter*, 1 strain belonged to *Nocardia*, 1 strain belonged to *Micromonospora*, 1 strain belonged to *Methylorubrum*, 1 strain belonged to *Methylobacterium*, 5 strains belonged to

Metabacillus, 1 strain belonged to *Lentzea*, 2 strains belonged to *Kribbella*, 1 strain belonged to *Isoptericola*, 1 strain belonged to *Ensifer*, 1 strain belonged to *Bosea*, 1 strain belonged to *Arthrobacter*, 2 strains belonged to *Agromyces*, 1 strain belonged to *Agrococcus*, 1 strain belonged to *Actinokineospora*, 1 strain belonged to *Actinoalloteichus*, and 1 strain belonged to *Bacillus*. Fourteen new species were isolated. **[Conclusion]** The addition of norfloxacin and kanamycin is beneficial to the selective isolation and culture of microorganisms and the discovery of new strains. This study provides guidance for the selective isolation and culture of rare microorganisms in special environments.

Keywords: antibiotics; special habitats; selective isolation

抗生素大多数是由微生物在其生长代谢过程中产生,能够在较低浓度下影响其他生物的生长和繁殖。抗生素的化学结构类型和作用机制多种多样。根据作用机制可以分为细胞壁合成抑制剂、蛋白质合成抑制剂、DNA合成抑制剂、代谢物抑制剂等类型^[1]。细胞壁抑制剂通过阻碍细胞壁粘肽合成使细菌胞壁缺损,导致菌体膨胀裂解,如氨苄西林^[2]。蛋白质生物合成抑制剂能够阻止氨基酸的插入和肽链的延长,如金霉素^[3]。核酸合成抑制剂通过阻碍DNA复制和转录从而影响遗传信息的传递,如利福平^[4]。代谢抑制剂能够阻止叶酸等必需营养物的摄取,使生物体失去自我繁殖的能力,如复方新诺明^[5]。

微生物种类繁多、数目庞大,自然环境中仅有极小部分微生物可以通过分离的方法进行培养,是微生物资源有效利用和探索其生命活动规律的最大障碍^[6]。为了获得更多的微生物菌种资源,需进行选择性的分离培养,即促使特定种类的微生物成为优势菌种而抑制其他微生物的生长繁殖。通常在现有分离培养基基础上进行优化改进,或采用非传统分离培养手段进行特殊种类微生物的选择性分离培养^[7]。近些年来,国内外研究学者综合应用不同的选择性分离手段及多种类型的分离培养基对微生物进行选择性的分离培养,显著提高了分离效果。刘文祥在土壤样品中加入阿米卡星,并用苯酚对样

品预处理,分离获得较多具有潜在抑菌活性的小单孢菌^[8]。鞠守勇比较3种经典的苏云金芽孢杆菌分离方法,发现醋酸钠-抗生素法分离效果最好^[9]。杨自文等在醋酸钠分离方法的基础上添加抗生素,能显著提高从土壤中分离苏云金杆菌的效率^[10]。王相晶等证实了利用链霉素、庆大霉素及利福平三重抗生素筛选可以获得具有更好生物活性的菌株^[11]。Hopwood等为了消除细菌和真菌污染,向培养基中添加了萘啶酸、甲氧苄啶、衣霉素、亮氨酸、法立霉素、卡那霉素、金霉素等复合抗生素,取得了良好的分离效果^[12]。野野村·英夫等发现向培养基中添加衣霉素和萘啶酸有利于小单孢菌的分离。伴随着新型高效的选择性分离培养方法的开发,微生物的分离培养更具有方向性^[13]。

本研究以罗布泊和温宿峡谷独特的生态环境样品为研究对象,探索添加不同种类和不同浓度的抗生素对微生物分离培养的影响,以期特殊环境微生物资源的开发和利用提供数据支撑。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样 品

于2021年9月从新疆罗布泊和温宿峡谷采集土壤样品,放置于4℃冰箱保存。

1.1.2 主要试剂和仪器

Taq DNA 聚合酶, 北京全式金生物技术有限公司; 引物 27F、1492R, 生工生物工程(上海)股份有限公司。

高速冷冻离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; 电泳仪、凝胶成像分析仪、水平摇床, 北京六一生物科技有限公司; PCR 仪, 杭州朗基科学仪器有限公司; 超微量分光光度计, 北京凯奥科技发展有限公司; 分析天平, 奥豪斯仪器(上海)有限公司。

1.1.3 培养基

以高氏一号琼脂培养基^[14]为基础, 分离培养基中分别加入浓度为 1 MIC、1/2 MIC、1/5 MIC、1/10 MIC、1/15 MIC 和 1/20 MIC 的阿莫西林、卡那霉素、诺氟沙星、链霉素、利福平、氯霉素, 纯化培养基不添加抗生素。

1.2 抗生素母液的制备

根据不同抗生素对典型靶标菌的 MIC 值, 分别称取阿莫西林 0.04 g、卡那霉素 0.062 5 g、诺氟沙星 0.001 5 g、链霉素 0.8 g、利福平 0.01 g、氯霉素 0.13 g, 加入 10 mL 无菌水充分溶解, 制备成 1 000 倍 MIC 母液。

1.3 微生物的分离培养

配制高氏一号培养基, 100 kPa 高压蒸汽灭菌后冷却至 45 °C, 分别加入不同量的抗生素母液, 终浓度分别为 1 MIC、1/2 MIC、1/5 MIC、1/10 MIC、1/15 MIC 和 1/20 MIC, 摇匀后倒入无菌平皿中, 每个浓度设置 3 个重复。将罗布泊和温宿峡谷土壤样品中的砂石去除, 用无菌研钵充分研磨, 用无菌生理盐水稀释 10 倍。分别吸取罗布泊及温宿峡谷土壤样品稀释液 0.1 mL, 均匀涂布在分别添加了阿莫西林、卡那霉素、诺氟沙星、链霉素、利福平、氯霉素的高氏一号培养基上, 30 °C 恒温倒置培养

12–15 d, 观察并记录形成菌落的种类和数量, 挑取单菌落采用三区划线法纯化培养。

1.4 微生物种类的鉴定

参考刘虎虎等^[15] CTAB-SDS 法提取菌株的基因组 DNA, 以通用引物 27F (5'-AGAGTTTG ATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGACTT AACCCCAATCGC-3') 进行 PCR 扩增 16S rRNA 基因^[16]。将片段大小合适、条带明亮清晰的 PCR 扩增产物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。序列采用 SeqMan Pro V7.1.0 软件进行拼接, 用 EzBioCloud 数据库进行相似度比对^[17], 判断微生物的种类。对于相似度较低的序列, 使用 MEGA X 软件对菌株 16S rRNA 基因序列和相近序列共同构建系统发育树。根据菌株在系统进化树中的位置、与近缘菌株的关系判断出菌株的系统发育地位, 确定其种类。

2 结果与分析

2.1 抗生素对微生物选择分离培养的影响

采用罗布泊样品探索不同种类和浓度的抗生素对分离培养的影响, 向高氏一号培养基中分别添加阿莫西林、诺氟沙星、利福平、卡那霉素、氯霉素和链霉素, 终浓度为 1、1/2、1/5、1/10、1/15、1/20 MIC 浓度。根据形成菌落的种类和数量, 判断添加抗生素对选择性分离的影响。添加不同种类和不同浓度抗生素的培养基形成的菌落平均数目见表 1。

通过比较可以看出添加诺氟沙星的培养基出菌情况最好, 菌落形态更为丰富多样。其次是卡那霉素和阿莫西林, 再次是利福平和氯霉素, 在添加链霉素的培养基中未形成菌落, 未添加抗生素的培养基中杂菌较多且种类较少, 易形成菌苔, 不利于后期进行分离纯化培养。

表 1 添加抗生素对分离培养的影响

Table 1 Effects of antibiotics on isolation and culture

| 抗生素 Antibiotics | 菌落总数 Colonies number | | |
|--------------------------|-------------------------|----------------|-------------|
| | 放线菌 Actinomycetes | 细菌 Bacteria | 真菌 Fungi |
| | Amoxicillin (1 MIC) | 0 | 0 |
| Amoxicillin (1/2 MIC) | 0 | 0 | 0 |
| Amoxicillin (1/5 MIC) | 3 | 4 | 0 |
| Amoxicillin (1/10 MIC) | 13 | 9 | 1 |
| Amoxicillin (1/15 MIC) | 16 | 14 | 3 |
| Amoxicillin (1/20 MIC) | 11 | 10 | 3 |
| Norfloxacin (1 MIC) | 0 | 0 | 0 |
| Norfloxacin (1/2 MIC) | 0 | 0 | 0 |
| Norfloxacin (1/5 MIC) | 6 | 3 | 0 |
| Norfloxacin (1/10 MIC) | 14 | 5 | 1 |
| Norfloxacin (1/15 MIC) | 19 | 16 | 2 |
| Norfloxacin (1/20 MIC) | 20 | 18 | 4 |
| Rifampicin (1 MIC) | 0 | 0 | 0 |
| Rifampicin (1/2 MIC) | 0 | 0 | 0 |
| Rifampicin (1/5 MIC) | 1 | 8 | 1 |
| Rifampicin (1/10 MIC) | 1 | 8 | 1 |
| Rifampicin (1/15 MIC) | 3 | 2 | 2 |
| Rifampicin (1/20 MIC) | 3 | 2 | 1 |
| Kanamycin (1 MIC) | 0 | 0 | 0 |
| Kanamycin (1/2 MIC) | 0 | 0 | 0 |
| Kanamycin (1/5 MIC) | 5 | 3 | 0 |
| Kanamycin (1/10 MIC) | 16 | 4 | 0 |
| Kanamycin (1/15 MIC) | 24 | 4 | 1 |
| Kanamycin (1/20 MIC) | 2 | 4 | 0 |
| Chloromycetin (1 MIC) | 0 | 0 | 0 |
| Chloromycetin (1/2 MIC) | 0 | 0 | 0 |
| Chloromycetin (1/5 MIC) | 6 | 6 | 0 |
| Chloromycetin (1/10 MIC) | 9 | 6 | 1 |
| Chloromycetin (1/15 MIC) | 12 | 4 | 0 |
| Chloromycetin (1/20 MIC) | 14 | 9 | 1 |
| Streptomycin (1 MIC) | 0 | 0 | 0 |
| Streptomycin (1/2 MIC) | 0 | 0 | 0 |
| Streptomycin (1/5 MIC) | 0 | 0 | 0 |
| Streptomycin (1/10 MIC) | 0 | 0 | 0 |
| Streptomycin (1/15 MIC) | 0 | 0 | 0 |
| Streptomycin (1/20 MIC) | 0 | 0 | 0 |
| No antibiotics added | 8 | 35 | 5 |

比较抗生素浓度对分离的影响, 结果表明大多数抗生素采用 1/10 MIC 和 1/15 MIC 浓度时分离效果最好。添加 MIC 和 1/2 MIC 浓度抗生素时, 培养基未出现菌落; 添加 1/5 MIC 浓度抗生素, 培养基形成菌落数量较少; 添加 1/20 MIC 浓度抗生素, 培养基表面易形成大片的细菌和霉菌菌苔, 将形成的菌落覆盖, 难以获得纯培养。

向培养基中添加不同种类和不同浓度的抗生素分离罗布泊、温宿峡谷土壤样品微生物, 添加抗生素的种类对微生物生长影响显著。添加 1/15 MIC 不同抗生素的培养基表面形成菌落情况见图 1。

以温宿峡谷土样验证添加诺氟沙星和卡那霉素对选择性分离培养的效果, 向培养基中添加 1/15 MIC 的诺氟沙星和卡那霉素, 培养基表面形成菌落情况见图 2。

2.2 不同菌属纯培养菌株的形态

向培养基中添加不同种类抗生素进行分离培养, 挑取形态、大小、颜色不同的单菌落进行纯化。罗布泊土样共分离得到 8 个属, 代表属种纯化后的菌株形成的菌落见图 3。温宿峡谷土样共分离得到 27 个属, 代表属种纯化后的菌株形成的菌落见图 4。

2.3 菌株的鉴定

从罗布泊和温宿峡谷土壤分离获得的菌株经过纯化培养, 提取基因组 DNA, PCR 扩增 16S rRNA 基因送测序公司测序(表 2), 采用 EzBioCloud 数据库进行序列比对, 判断菌株的种类。

2.4 微生物系统发育分析

罗布泊土壤中分离所得的菌株经 16S rRNA 基因序列鉴定后, 用 MEGA X 软件构建系统发育树, 见图 5。

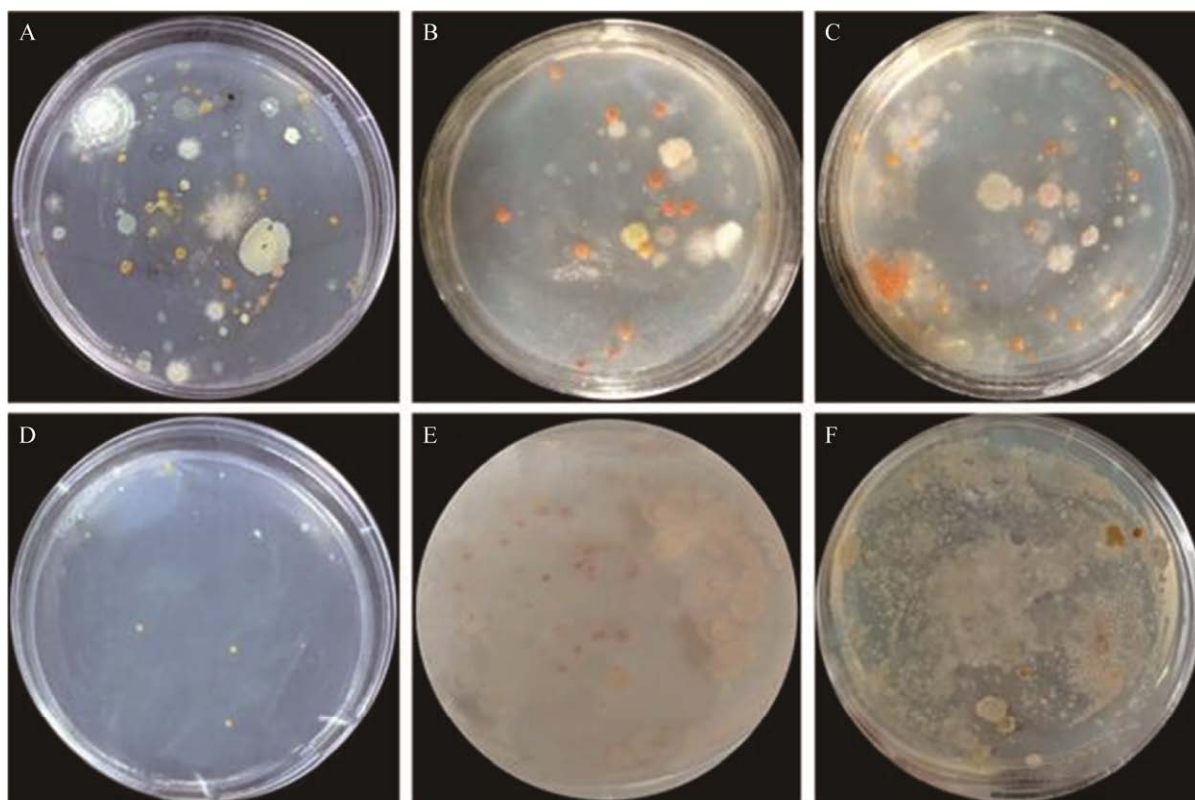


图1 罗布泊土样添加 1/15 MIC 不同抗生素的出菌情况 A: 诺氟沙星. B: 阿莫西林. C: 卡那霉素. D: 氯霉素. E: 利福平. F: 不添加抗生素

Figure 1 Bacterial emergence of Lop Nur supplemented with 1/15 MIC different antibiotics. A: Norfloxacin. B: Amoxicillin. C: Kanamycin. D: Chloromycetin. E: Rifampicin. F: No antibiotics added.

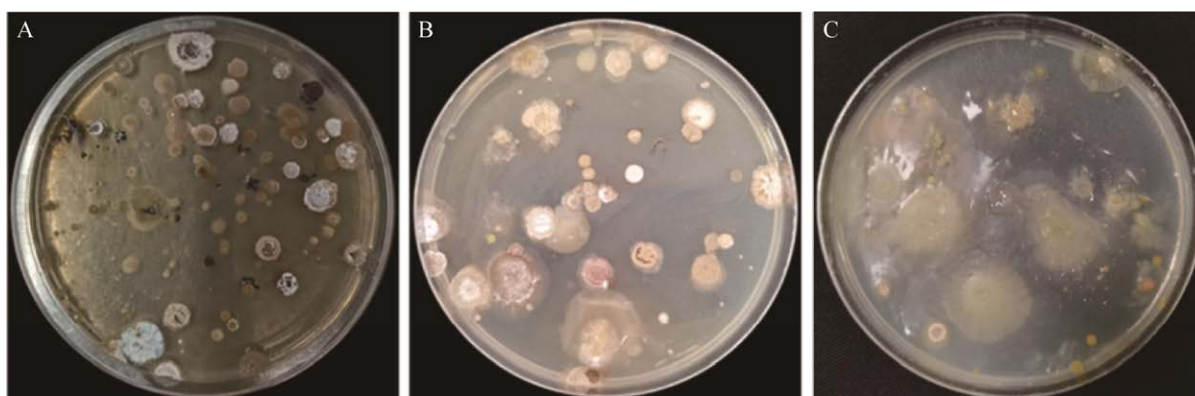


图2 温宿峡谷土样添加 1/15 MIC 诺氟沙星和卡那霉素的形成菌落情况 A: 诺氟沙星. B: 卡那霉素. C: 未添加抗生素

Figure 2 Colony-forming conditions of soil samples supplemented with 1/15 MIC norfloxacin and kanamycin in Wensu Canyon. A: Norfloxacin. B: Kanamycin. C: No antibiotics added.

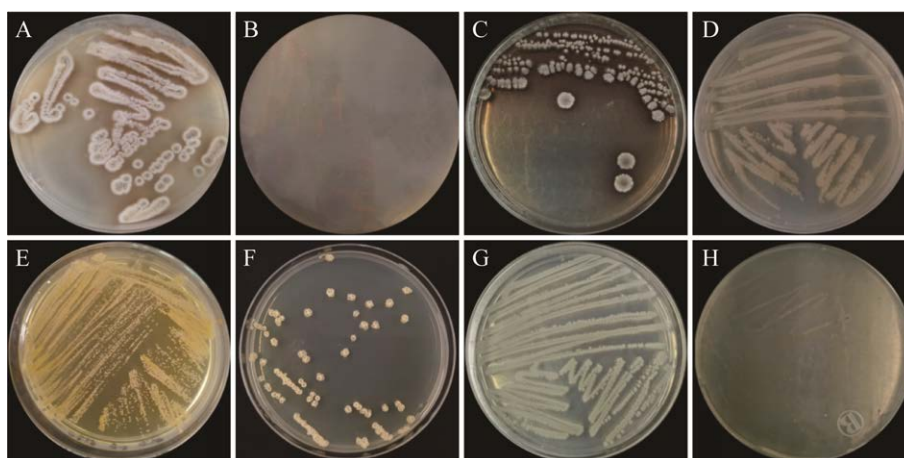


图3 罗布泊土样分离获得的各菌属菌落形态 A: 根瘤菌属. B: 海洋杆菌属. C: 链霉菌属. D: 副芽孢杆菌属. E: 原小单孢菌属. F: 类芽孢杆菌属. G: 芽孢杆菌属. H: 野野村氏菌属

Figure 3 Colonial morphology of strains isolated from Lop Nur soil samples. A: *Rhizobium*. B: *Pontibacter*. C: *Streptomyces*. D: *Metabacillus*. E: *Promicromonospora*. F: *Paenibacillus*. G: *Bacillus*. H: *Nonomuraea*.

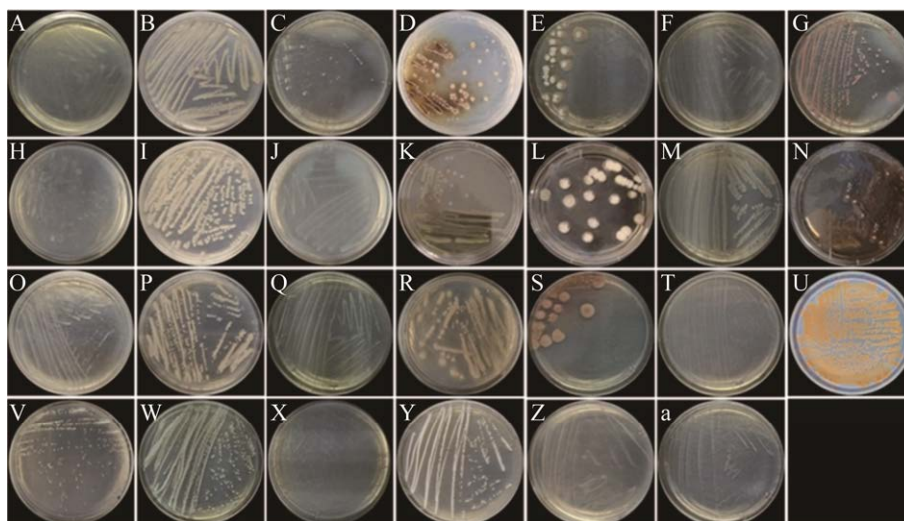


图4 温宿峡谷土样分离获得的各菌属菌落形态 A: 剑菌属. B: 链霉菌属. C: 鞘氨醇单胞菌属. D: 假节杆菌属. E: 小单孢菌属. F: 异壁放线菌属. G: 红色甲基杆菌属. H: 类芽孢杆菌属. I: 原小单孢菌属. J: 类节杆菌属. K: 土壤球菌属. L: 副芽孢杆菌属. M: 耐盐白蚁菌属. N: 假黄单胞菌属. O: 节杆菌属. P: 伦茨氏菌属. Q: 副球菌属. R: 普里斯特氏菌属. S: 芽孢杆菌属. T: 壤霉菌属. U: 放线动孢菌属. V: 假诺卡氏菌. W: 诺卡氏菌属. X: 植物放线孢菌属. Y: 克里布所菌属. Z: 甲基杆菌属. a: 博斯氏属

Figure 4 Colonial morphology of strains isolated from the Wensu Canyon samples. A: *Ensifer*. B: *Streptomyces*. C: *Sphingomonas*. D: *Pseudarthrobacter*. E: *Micromonospora*. F: *Actinoalloteichus*. G: *Methylobacterium*. H: *Paenibacillus*. I: *Promicromonospora*. J: *Paenarthrobacter*. K: *Agrococcus*. L: *Metabacillus*. M: *Isoptericola*. N: *Pseudoxanthomonas*. O: *Arthrobacter*. P: *Lentzea*. Q: *Paracoccus*. R: *Priestia*. S: *Bacillus*. T: *Agromyces*. U: *Actinokineospora*. V: *Pseudonocardia*. W: *Nocardia*. X: *Plantactinospira*. Y: *Kribbella*. Z: *Methylobacterium*. a: *Bosea*.

表 2 罗布泊和温宿峡谷土样分离的菌株信息

Table 2 Information of strains from Lop Nur and Wensu Canyon

| 序号 No. | 菌株 编号 Strain No. | 相似菌株 Similar strains | 最大相似度 Maximum degree of similarity (%) | 土壤样品 Soil sample | 抗生素 Antibiotics |
|-----------|---------------------------|--|--|---------------------|---------------------------------|
| 1 | Kong6 | <i>Bacillus altitudinis</i> 41KF2b ^T (ASJC01000029) | 99.79 | Lop Nur | No antibiotics added |
| 2 | N19 | <i>Bacillus cheonanensis</i> PFS-5 ^T (JQ966280) | 97.38 | Lop Nur | Norfloxacin |
| 3 | K4 | <i>Bacillus coreaensis</i> MS5 ^T (JN578481) | 99.82 | Lop Nur | Kanamycin |
| 4 | N48 | <i>Bacillus nakamurai</i> NRRL B-41091 ^T (NR151897) | 99.71 | Lop Nur | Norfloxacin |
| 5 | Kong9 | <i>Bacillus swezeyi</i> NRRL B-41294 ^T (NR157608) | 99.65 | Lop Nur | Norfloxacin |
| 6 | N51 | <i>Bacillus vallismortis</i> DV1-F-3 ^T (JH600273) | 99.70 | Lop Nur | Norfloxacin; Chloramphenicol |
| 7 | K5 | <i>Metabacillus endolithicus</i> JC267 ^T (LM994040) | 98.85 | Lop Nur | Kanamycin |
| 8 | N72 | <i>Nonomuraea harbinensis</i> NEAU-yn31 ^T (KC306503) | 99.64 | Lop Nur | Norfloxacin |
| 9 | N25 | <i>Paenibacillus antri</i> SYSU K30003 ^T (MK943674) | 96.64 | Lop Nur | Norfloxacin |
| 10 | N57 | <i>Paenibacillus translucens</i> CJ11 ^T (MF619925) | 99.28 | Lop Nur | Norfloxacin |
| 11 | K2-2 | <i>Paenibacillus tyrfis</i> MSt1 ^T (KT216503) | 97.93 | Lop Nur | Kanamycin |
| 12 | N15 | <i>Pontibacter akesuensis</i> DSM 18820 ^T (NR043930) | 96.43 | Lop Nur | Norfloxacin |
| 13 | Li1 | <i>Promicromonospora umidemergens</i> 09-Be-007 ^T (FN293378) | 99.38 | Lop Nur | Norfloxacin; Rifampicin |
| 14 | Li3 | <i>Streptomyces marokkonensis</i> Ap1 ^T (AJ965470) | 99.21 | Lop Nur | Rifampicin |
| 15 | A8 | <i>Streptomyces fenghuangensis</i> GIMN4.003 ^T (GU356598) | 99.14 | Lop Nur | Amoxicillin |
| 16 | N2 | <i>Rhizobium tarimense</i> PL-41 ^T (HM371420) | 98.95 | Lop Nur | Norfloxacin |
| 17 | KA2 | <i>Streptomyces burgazadensis</i> Z1R7 ^T (KF793919) | 96.23 | Lop Nur | Kanamycin |
| 18 | N1 | <i>Streptomyces radiopugnans</i> R97 ^T (DQ912930) | 99.71 | Lop Nur | Amoxicillin; Norfloxacin |
| 19 | K2-W | <i>Streptomyces polymachus</i> T258 ^T (KM229363) | 98.99 | Lop Nur | Kanamycin; Norfloxacin |
| 20 | XG2 | <i>Metabacillus sediminilitoris</i> DSL-17 ^T (MN067806) | 96.85 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 21 | XG3 | <i>Streptomyces azureus</i> ATCC 14921 ^T (DF968281) | 99.93 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 22 | XG4 | <i>Streptomyces burgazadensis</i> Z1R7 ^T (KF793919) | 95.78 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 23 | XG6 | <i>Streptomyces phaeoluteigriseus</i> DSM 41896 ^T (NR042097) | 99.14 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 24 | XG8 | <i>Streptomyces capparidis</i> EGI 6500195 ^T (KX119420) | 99.57 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 25 | XG9 | <i>Metabacillus halosaccharovorans</i> E33 ^T (HQ433447) | 98.86 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 26 | XG10 | <i>Streptomyces seymenliensis</i> B1041 ^T (KC560729) | 99.57 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 27 | XG11 | <i>Streptomyces coeruleorubidus</i> ISP 5145 ^T (AJ306622) | 99.71 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 28 | XG18 | <i>Streptomyces plumbiresistens</i> CCNWHX 13-160 ^T (EU526954) | 99.78 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 29 | XG19 | <i>Pseudoxanthomonas wuyuanensis</i> CGMCC 1.10978 ^T (NR126229) | 99.01 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 30 | XG22 | <i>Streptomyces spiroverticillatus</i> NBRC 12821 ^T (AB249921) | 98.78 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 31 | XG29 | <i>Streptomyces europaeiscabiei</i> KACC 20186 ^T (AY207598) | 99.28 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 32 | XG45 | <i>Metabacillus sediminilitoris</i> DSL-17 ^T (MN067806) | 97.45 | Wensu Canyon | Norfloxacin |

(待续)

(续表 2)

| 序号 No. | 菌株 编号 Strain No. | 相似菌株 Similar strains | 最大相似度 Maximum degree of similarity (%) | 土壤样品 Soil sample | 抗生素 Antibiotics |
|-----------|---------------------------|--|--|---------------------|---------------------------|
| 33 | XG45-1 | <i>Bacillus tequilensis</i> KCTC 13622 ^T (MN598645) | 99.93 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 34 | XG46 | <i>Pseudarthrobacter siccitolerans</i> 4J27 ^T (NR108849) | 99.43 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 35 | XG47 | <i>Streptomyces boluensis</i> YC537 ^T (KU323813) | 98.49 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 36 | XG48 | <i>Streptomyces geranii</i> A301 ^T (MF100124) | 96.75 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 37 | XG51 | <i>Agrococcus lahaulensis</i> DSM 17612 ^T (NR043587) | 99.42 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 38 | XG54 | <i>Streptomyces aquilus</i> GGCR-6 ^T (MH718844) | 99.28 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 39 | XG71 | <i>Streptomyces badius</i> NRRL B-2567 ^T (AY999783) | 100 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 40 | XG72 | <i>Streptomyces polymachus</i> T258 ^T (KM229363) | 98.70 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 41 | XGK12 | <i>Streptomyces violaceochromogenes</i> NBRC 13100 ^T (AB184312) | 99.86 | Wensu Canyon | Kanamycin; Norfloxacin |
| 42 | XG84 | <i>Methylobacterium oryzae</i> CBMB20 ^T (CP003811) | 99.18 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 43 | XGK23 | <i>Streptomyces xantholiticus</i> NBRC 1335 ^T (AB184349) | 99.79 | Wensu Canyon | Kanamycin; Norfloxacin |
| 44 | XG95 | <i>Streptomyces tailanensis</i> TRM68348 ^T (MK795707) | 98.70 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 45 | XG96 | <i>Streptomyces afghaniensis</i> NBRC 12831 ^T (AB184847) | 99.42 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 46 | XG100 | <i>Streptomyces xantholiticus</i> NBRC 13354 ^T (AB184349) | 99.14 | Wensu Canyon | Kanamycin; Norfloxacin |
| 47 | XG101 | <i>Streptomyces europaescabiei</i> KACC 20186 ^T (AY207598) | 98.70 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 48 | XG102 | <i>Bosea caraganae</i> RCAM04680 ^T (MH633716) | 99.63 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 49 | XG109 | <i>Streptomyces polymachus</i> T258 ^T (KM229363) | 98.99 | Wensu Canyon | Kanamycin; Norfloxacin |
| 50 | XG115 | <i>Streptomyces canus</i> DSM 40017 ^T (KQ948708) | 100 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 51 | XG117 | <i>Pseudonocardia cyprica</i> KT2142 ^T (HQ157191) | 99.78 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 52 | XG123 | <i>Streptomyces arboris</i> TRM 68085 ^T (MN263070) | 98.78 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 53 | XG128 | <i>Lentzea flaviverrucosa</i> AS4.0578 ^T (AF183957) | 98.98 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 54 | XG131 | <i>Promicromonospora alba</i> 1C-HV12 ^T (KP784765) | 99.34 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 55 | XG159 | <i>Sphingomonas pituitosa</i> EDIV ^T (AJ243751) | 97.72 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 56 | XG160 | <i>Agromyces cerinus</i> subsp. <i>nitratus</i> ATCC 51763 ^T (AY277619) | 98.85 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 57 | XG162 | <i>Streptomyces umbrinus</i> NBRC 13091 ^T (AB184305) | 99.07 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 58 | XG164 | <i>Priestia endophytica</i> 2D ^T (TAF295302) | 99.93 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 59 | XG181 | <i>Streptomyces exfoliatus</i> NRRL B-2924 ^T (NR041117) | 99.93 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 60 | XG182 | <i>Paracoccus haematequi</i> M1-83 ^T (MH665405) | 99.92 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 61 | XG183 | <i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i> G2-1 ^T (AJ512504) | 100 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 62 | XG184 | <i>Streptomyces sioyaensis</i> NRRL B-5408 ^T (DQ026654) | 99.71 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 63 | XG189 | <i>Pseudoxanthomonas wuyuanensis</i> CGMCC 1.10978 ^T (NR126229) | 99.36 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 64 | XG193 | <i>Streptomyces xantholiticus</i> NBRC 13354 ^T (AB184349) | 99.64 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 65 | XG199 | <i>Streptomyces zinciresistens</i> K42 ^T (GU225938) | 98.91 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 66 | XG200 | <i>Methylobacterium pseudosasa</i> BL44 ^T (EU912442) | 99.93 | Wensu Canyon | Norfloxacin |

(待续)

(续表 2)

| 序号 No. | 菌株 编号 Strain No. | 相似菌株 Similar strains | 最大相似度 Maximum degree of similarity (%) | 土壤样品 Soil sample | 抗生素 Antibiotics |
|-----------|---------------------------|---|--|---------------------|---------------------------|
| 67 | XG203 | <i>Micromonospora echinospora</i> DSM 43816 ^T (LT607413) | 99.35 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 68 | XG227 | <i>Streptomyces turgidiscabies</i> ATCC 700248 ^T (AB026221) | 98.70 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 69 | XG228 | <i>Metabacillus idriensis</i> SMC 4352-2 ^T (AY904033) | 99.50 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 70 | XG229 | <i>Pseudonocardia cypriaca</i> KT2142 ^T (HQ157191) | 99.50 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 71 | XG230 | <i>Metabacillus litoralis</i> SW-211 ^T (AY608605) | 98.66 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 72 | XG232 | <i>Arthrobacter tumbae</i> LMG 19501 ^T (AJ315069) | 99.21 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 73 | XG246 | <i>Promicromonospora alba</i> 1C-HV12 ^T (KP784765) | 99.43 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 74 | XG253 | <i>Plantactinospora mayteni</i> YIM 61359 ^T (FJ214343) | 99.20 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 75 | XG254 | <i>Paenibacillus lautus</i> NBRC 15380 ^T (NR040882) | 97.56 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 76 | XGK2 | <i>Isoptericola halalbus</i> CFH 91151 ^T (MN795759) | 99.35 | Wensu Canyon | Kanamycin |
| 77 | XGK3 | <i>Actinoalloteichus cyanogriseus</i> DSM 43889 ^T (AB006178) | 99.78 | Wensu Canyon | Kanamycin |
| 78 | XGK4 | <i>Nocardia suismassiliense</i> S-137 ^T (LT984490) | 99.20 | Wensu Canyon | Kanamycin; Norfloxacin |
| 79 | XGK5 | <i>Kribbella pittospori</i> PIP 158 ^T (GU434268) | 99.93 | Wensu Canyon | Kanamycin |
| 80 | XGK12 | <i>Streptomyces azureus</i> ATCC 14921 ^T (DF968281) | 99.35 | Wensu Canyon | Kanamycin; Norfloxacin |
| 81 | XGK14 | <i>Streptomyces pseudovenezuelae</i> DSM 40212 ^T (KQ948163) | 99.35 | Wensu Canyon | Kanamycin; Norfloxacin |
| 82 | XGK19 | <i>Pseudonocardia hierapolitana</i> PM2084 ^T (JN989288) | 98.11 | Wensu Canyon | Kanamycin |
| 83 | XGK21 | <i>Kribbella italica</i> BC637 ^T (KJ875927) | 99.42 | Wensu Canyon | Kanamycin |
| 84 | XGK22 | <i>Agromyces ramosus</i> DSM 43045 ^T (X77447) | 99.42 | Wensu Canyon | Kanamycin |
| 85 | XGK25 | <i>Pseudonocardia cypriaca</i> KT2142 ^T (HQ157191) | 99.85 | Wensu Canyon | Kanamycin; Norfloxacin |
| 86 | XGK26 | <i>Actinokineospora alba</i> CICC 201030 ^T (EU438907) | 99.42 | Wensu Canyon | Kanamycin |
| 87 | XG195 | <i>Pseudonocardia kunmingensis</i> YIM 63158 ^T (FJ817377) | 98.40 | Wensu Canyon | Kanamycin; Norfloxacin |
| 88 | XGK36 | <i>Ensifer meliloti</i> LMG 6133 ^T (X67222) | 99.93 | Wensu Canyon | Kanamycin |
| 89 | XGW5 | <i>Streptomyces ginkgonis</i> KM-1-2 ^T (KU758899) | 99.71 | Wensu Canyon | Norfloxacin |
| 90 | XGN15 | <i>Metabacillus halosaccharovorans</i> E33 ^T (HQ433447) | 98.15 | Wensu Canyon | Norfloxacin |

罗布泊土壤分离获得的菌株分布在 8 个属, 其中芽孢杆菌属 6 株、链霉菌属 5 株、类芽孢杆菌属 3 株、根瘤菌属 1 株、副芽孢杆菌属 1 株、原小单孢菌属 1 株、海洋杆菌属 1 株、野野村氏菌属 1 株。其中 5 株菌的 16S rRNA 基因序列相似度低于 98.5%, 为疑似新物种。

温宿峡谷土壤分离获得的菌株经 16S

rRNA 基因序列鉴定后, 用 MEGA X 软件构建系统发育树, 见图 6。

根据温宿峡谷土壤分离的菌株基于 16S rRNA 基因序列构建的进化树, 可知从温宿峡谷土壤所分离的菌株分布在 27 个属, 其中大多分布在链霉菌属达 33 株、假诺卡氏菌 5 株、副芽孢杆菌属 5 株、假黄单胞菌属 2 株、类芽孢

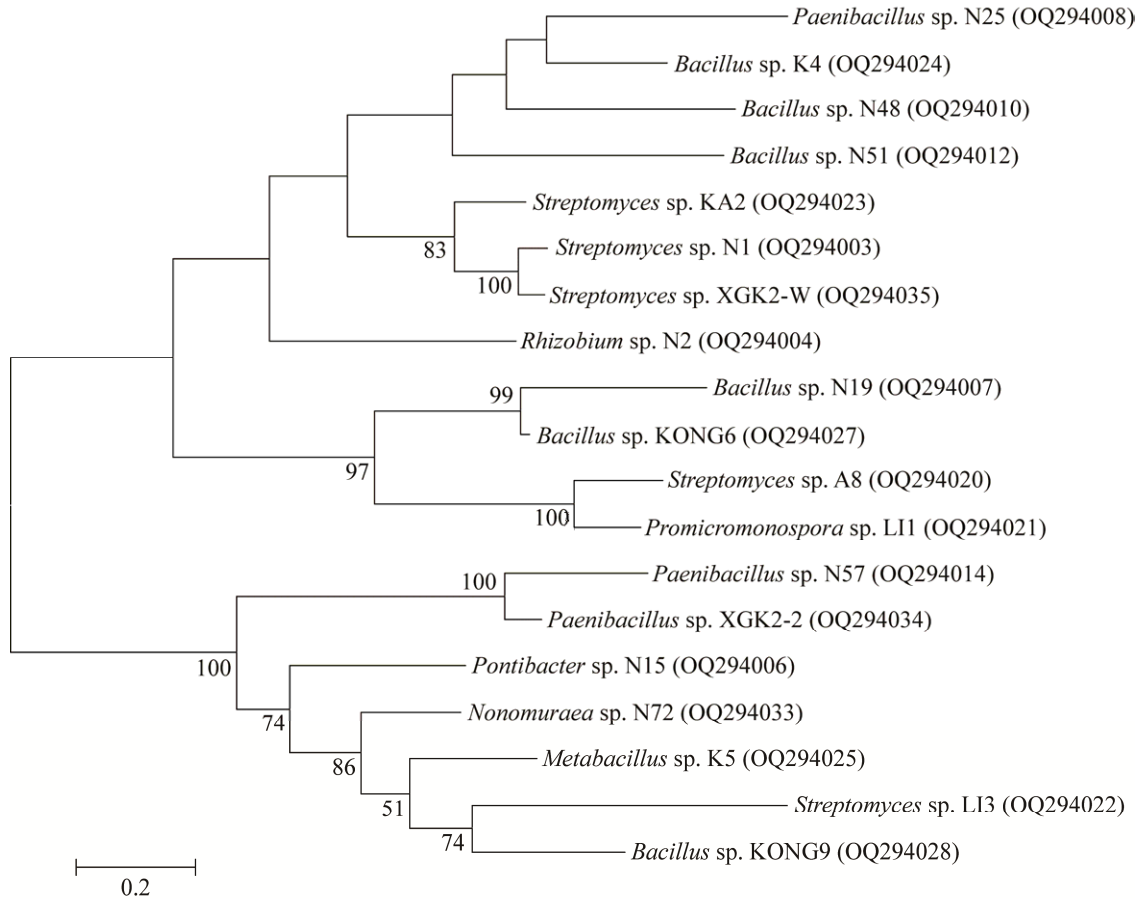


图5 罗布泊土壤分离的菌株基于16S rRNA基因序列构建的系统发育树 标尺为序列差异的分支长度；节点处的数字为bootstrap值；括号内的数字为GenBank登录号

Figure 5 Phylogenetic tree of strains isolated from Lop Nur soil based on 16S rRNA gene sequence. Bars indicate nucleotide; Numbers at the branch points indicated the bootstrap values; Numbers in parenthesis represent GenBank accession number.

杆菌属 2 株、类节杆菌属 2 株、克里布所菌 2 株、原小单孢菌 2 株、壤霉菌属 2 株、鞘氨醇单孢菌属 1 株、假节杆菌 1 株、普里斯特氏菌属 1 株、植物放线孢菌 1 株、副球菌属 1 株、诺卡氏菌属 1 株、小单孢菌属 1 株、红色甲基杆菌属 1 株、甲基杆菌属 1 株、伦茨氏菌属菌种 1 株、耐盐白蚁菌 1 株、剑菌属 1 株、博斯氏属 1 株、节杆菌属 1 株、土壤球菌属 1 株、放线动孢菌属 1 株、异壁放线菌属 1 株、芽孢杆菌属 1 株，其中有 14 株 16S rRNA 基因序列

相似度较低，为疑似新物种。

3 讨论与结论

经分离培养，罗布泊、温宿峡谷土壤分离得到菌株的分布菌属详见图 7。罗布泊土样分离获得的菌株分布于 8 个属，温宿峡谷土样共分离获得的菌株分布于 27 个属。虽然罗布泊和温宿峡谷都是新疆极端特殊生境，但由于罗布泊炎热缺水、极端高盐、无植被生长、UV 辐射强，相较于温宿峡谷环境更加恶劣，更加不适

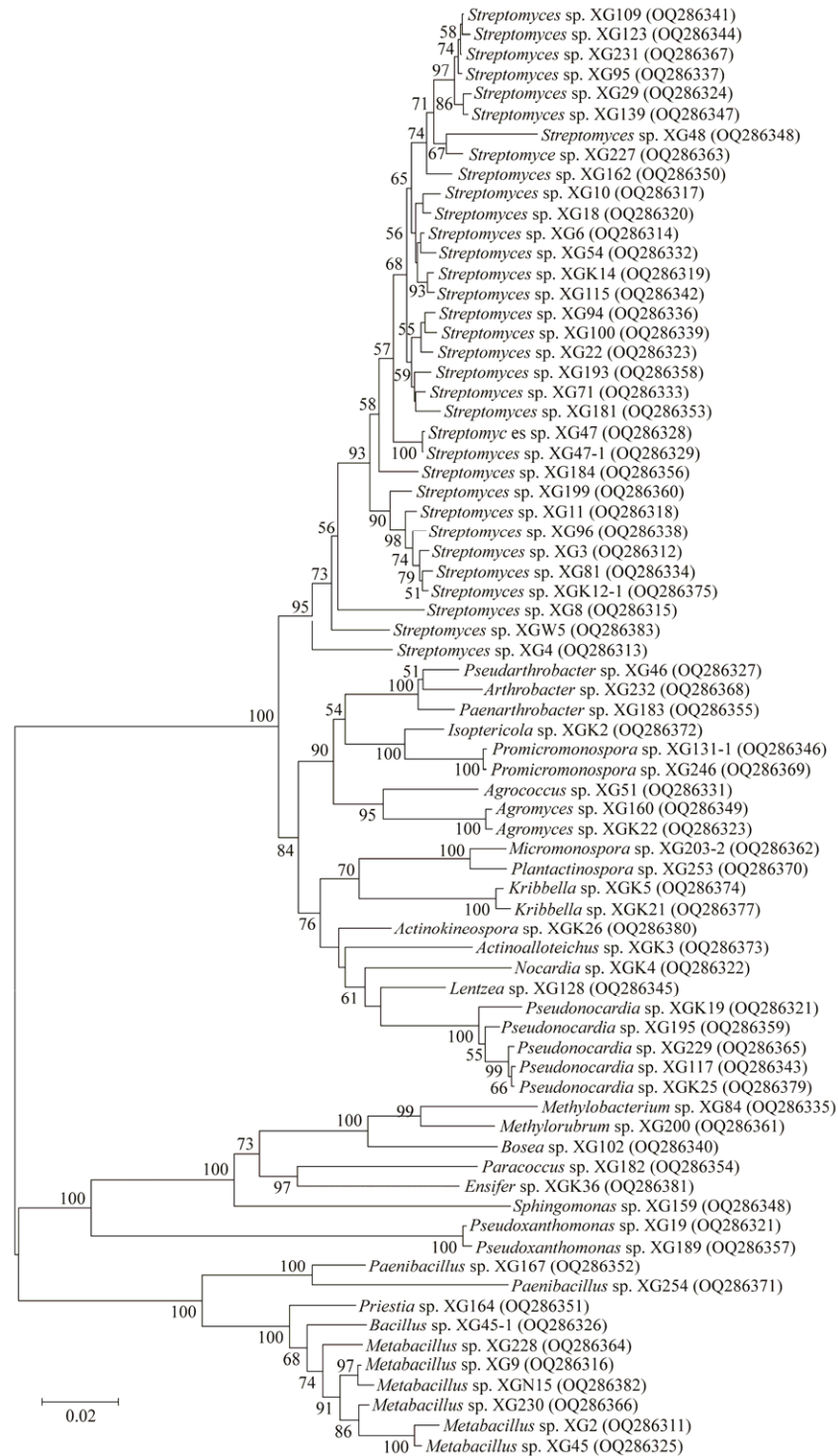


图 6 温宿峡谷土壤分离的菌株基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 标尺为序列差异的分支长度; 节点处的数字为 bootstrap 值; 括号内的数字为 GenBank 登录号

Figure 6 Phylogenetic tree of strains isolated from Wensu Canyon soil based on 16S rRNA gene sequence. Bars indicate nucleotide; Numbers at the branch points indicated the bootstrap values; Numbers in parenthesis represent GenBank accession number.

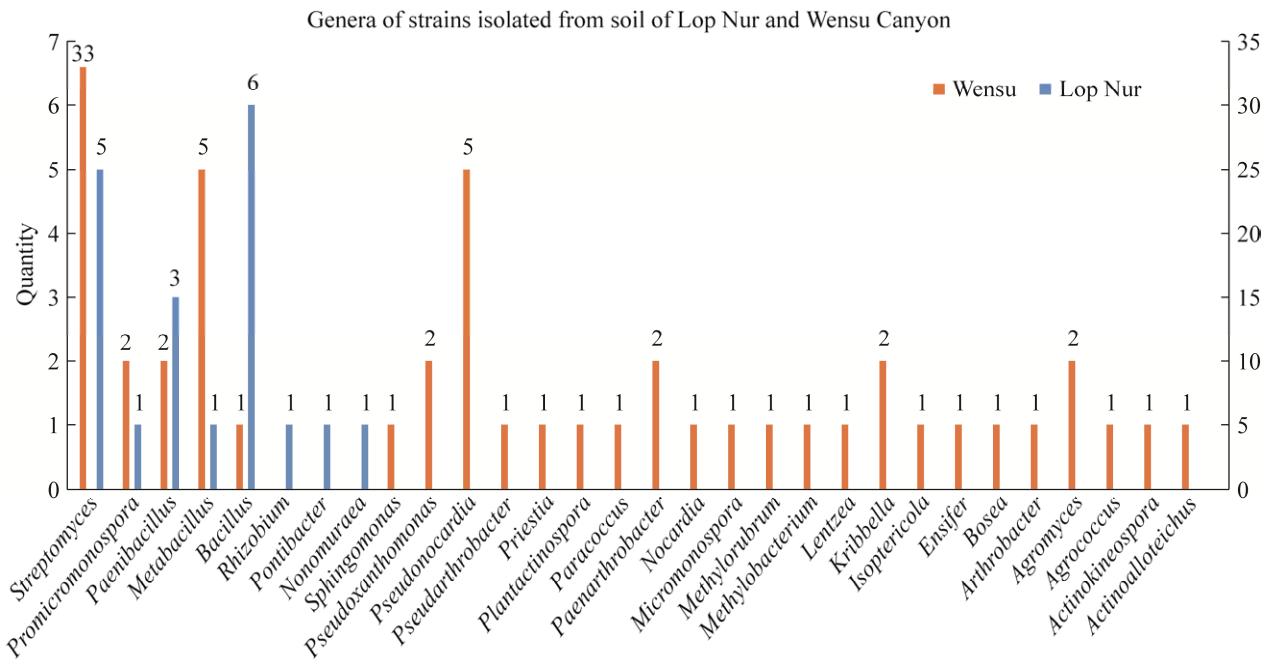


图 7 罗布泊、温宿峡谷土壤分离得到菌株的菌属

Figure 7 Genera of strains isolated from soil of Lop Nur and Wensu Canyon.

于生物的生长、繁殖，因此罗布泊分离到的微生物要少于温宿峡谷。罗布泊分离到 8 个菌属，而温宿峡谷分离到了 27 个菌属，其中有 5 个菌属在罗布泊及温宿峡谷土壤中均被分离发现，即链霉菌属、芽孢杆菌属、类芽孢杆菌属、副芽孢杆菌属及原小单孢菌属。

在选择性分离培养基中添加抗生素可使细菌和真菌数量显著减少，在抑制杂菌的过程中起到了较好的效果，本实验中添加诺氟沙星和阿莫西林分离菌株的效果较好，证明了添加抗生素作为抑制剂有利于微生物选择性分离培养，能够提高获得潜在活性菌株的几率。添加卡那霉素、诺氟沙星分离得到菌株的分布菌属详见图 8。在添加诺氟沙星的选择性分离培养基中，分离获得了 25 个不同菌属，在添加卡那霉素的选择性分离培养基中，分离获得了 13 个不同菌属，其中有 9 个属在添加诺氟沙星、卡那霉素的选择性分离培养基中均被分离发现。

诺氟沙星通过作用于细菌 DNA 螺旋酶的 A 亚单位，阻碍 DNA 复制和转录的过程，从而杀灭细菌。卡那霉素通过与 30 S 核糖体结合，错读 mRNA 密码，阻碍蛋白质合成，而导致细菌死亡。由于诺氟沙星作为一种广谱高效的抗微生物药物，且诺氟沙星化学性质稳定^[18]，对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均有明显的抗菌作用，而卡那霉素仅对需氧的革兰氏阴性菌有抑菌作用，因此添加诺氟沙星的培养基分离效果更好，不易产生杂菌，分离到的微生物种类更为丰富。

添加不同种类和浓度的抗生素于罗布泊土样的分离培养基中，在分离过程中，发现添加诺氟沙星与卡那霉素的分离效果较好。分离罗布泊土壤微生物获得 5 株疑似新菌种 N15、N19、N25、KA2、K2-2，其中在分离培养基中添加诺氟沙星，分离获得 3 株，海洋杆菌属的 N15、芽孢杆菌属的 N19、类芽孢杆菌属的 N25 为疑似新种；在分离培养基中添加卡那霉素分

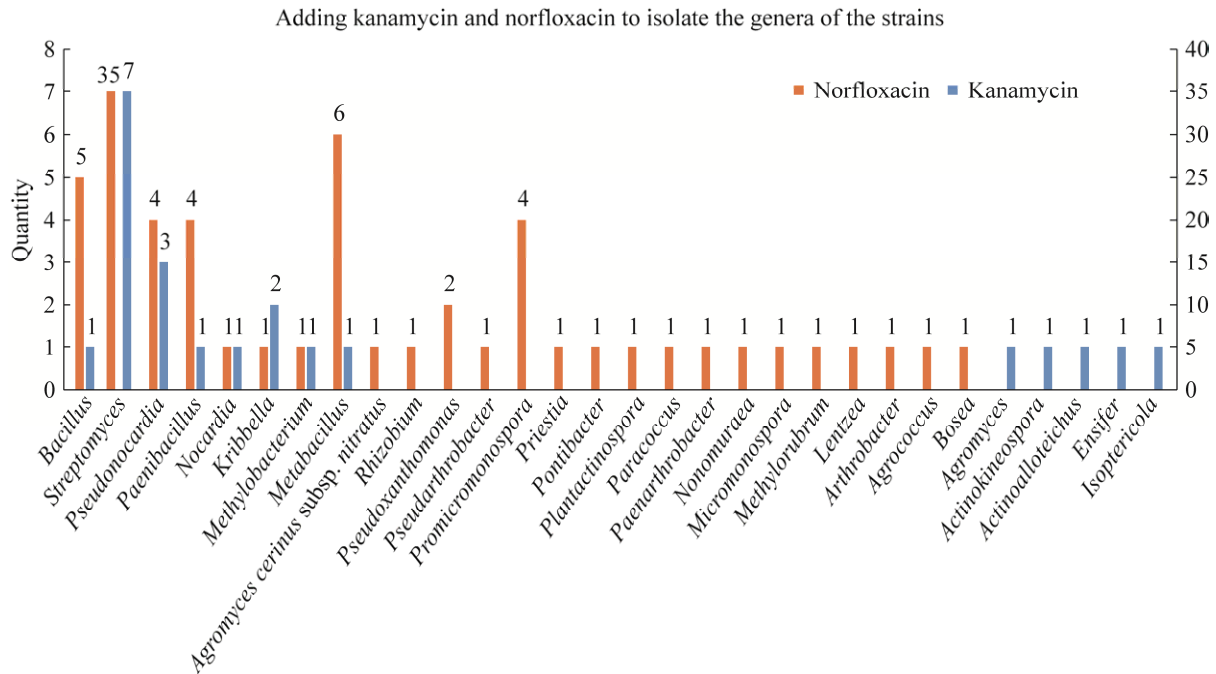


图 8 添加卡那霉素、诺氟沙星分离到的菌属

Figure 8 Adding kanamycin and norfloxacin to isolate the genera of the strain.

离获得 2 株, 链霉菌属的 KA2 和类芽孢杆菌属的 K2-2 为疑似新种, 且类芽孢杆菌属的潜在新种在添加诺氟沙星及卡那霉素的分离培养基中均被发现, 表明在分离培养基中添加诺氟沙星和卡那霉素有助于发现新菌种。为了验证诺氟沙星和卡那霉素对微生物选择性分离培养的作用, 向高氏一号培养基中添加不同浓度的诺氟沙星和卡那霉素分离温宿峡谷土样微生物, 在分离温宿峡谷土壤微生物过程中, 共分离得到 14 株疑似新菌种, 其中在分离培养基中添加诺氟沙星分离获得 12 株疑似新种, 包括 3 株副芽孢杆菌属的 XG2、XG45、XG230, 7 株链霉菌属的 XG4、XG47、XG48、XG72、XG95、XG101、XG227, 1 株鞘脂单胞菌属的 XG159, 1 株类芽孢杆菌属的 XG254; 在分离培养基中添加卡那霉素分离获得 2 株疑似新种, 包括副芽孢杆菌属的 K19、假诺卡氏菌属的 K30; 假诺卡氏菌属的 K30 在添加诺氟沙星及卡那霉素的分离培

养基中均被发现, 且副芽孢杆菌属的潜在新种在添加诺氟沙星及卡那霉素的分离培养基中均被发现, 表明添加诺氟沙星和卡那霉素有助于分离获得新菌种。

添加抗生素的目的是对土壤微生物有一定的选择性抑制作用, 但并未全部杀灭。邹汉玄等在放线菌分离时, 加入 30 mg/L 链霉素可抑制杂菌生长, 并对放线菌无影响^[19]。但闫建芳等使用常见几种抑制剂进行试验, 结果发现链霉素不适合作为放线菌分离过程中的杂菌抑制剂, 而 1 mg/L 青霉素抑制杂菌效果相对明显^[20]。司美茹等在分离筛选和杂菌抑制研究过程中添加链霉素未见菌株生长^[21]。本研究与闫建芳、司美茹等研究结果一致, 表明链霉素不适合用作选择性分离培养的抑制剂。

能够在含有某种抗生素的培养基中正常生长的微生物, 通常会携带该抗生素的抗性基因。例如某些分离到的菌株在添加卡那霉素和诺氟

沙星的培养基中均能正常生长,说明其耐受两种抗生素,携带两种抗生素的抗性基因。抗生素的发现是人类抗感染史上伟大的里程碑,但由于近年来人们对抗生素使用的认知不足,导致抗生素滥用情况严重,可利用具有抗性基因的微生物进行吸收、降解、转化抗生素污染物,例如可以使用抗生素耐受菌处理含有抗生素的废水^[22]。抗生素作为饲料添加剂取得过巨大的经济效益,但其具有残留性,且在长期使用中会造成病原体的突变、产生抗药和耐药性问题。使用具有抗生素耐受性的益生菌能克服使用抗生素所产生的副作用,可部分或全部代替抗生素^[23]。该方法可为高效筛选活性菌株资源潜能、抗生素环境污染的降解和抗菌新药的研发策略提供新的思路和途径。

适当地使用抗生素能够抑制非目标微生物的生长繁殖,过量使用和滥用抗生素将会加剧细菌的耐药性和产生不良反应^[24]。罗布泊炎热缺水、极端高盐、UV辐射强,而温宿峡谷地质构造复杂、土壤营养水平低,虽然其生存环境极其恶劣,但微生物资源尤其是稀有微生物资源较为丰富。这些极端环境含有大量的稀有微生物甚至新物种,具有独特的基因类型、生理机制和代谢产物。开展极端环境微生物研究,有利于微生物资源的保护与开发利用,为研究生命与环境的关系提供新的材料。

REFERENCES

- [1] 张健,徐海华. 抗生素类药物临床应用现状及作用机制分析[J]. 中国药物滥用防治杂志, 2023, 29(6): 999-1001, 1011.
ZHANG J, XU HH. Analysis of clinical application and mechanism of action of antibiotics[J]. Chinese Journal of Drug Abuse Prevention and Control, 2023, 29(6): 999-1001, 1011 (in Chinese).
- [2] 张韬,倪孟祥,邵雷,陈代杰. β -内酰胺抗生素作用机制的研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2015, 40(10): 785-790.
ZHANG T, NI MX, SHAO L, CHEN DJ. Research progress in mechanism of β -lactam antibiotics[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2015, 40(10): 785-790 (in Chinese).
- [3] 刘海燕,殷瑜. 氨基糖苷类抗生素作用机制研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2019, 44(11): 1283-1287.
LIU HY, YIN Y. Advances in research on the mechanism of aminoglycoside antibiotics[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2019, 44(11): 1283-1287 (in Chinese).
- [4] ANNA F, SERGI M, ERNEST G, JORDI V. Mechanism of action of and resistance to quinolones[J]. Microbial Biotechnology, 2009, 2(1): 40-61.
- [5] SI LZ, GU J, WEN M, WANG RQ, FLEMING J, LI JY, XU JT, BI LJ, DENG JY. *relA* inactivation converts sulfonamides into bactericidal compounds[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 698468.
- [6] 罗明典. 高适应性微生物资源的研究现状及其开发前景[J]. 生物工程进展, 1987, 7(1): 1-12.
LUO MD. Research status and development prospect of highly adaptable microbial resources[J]. Progress in Biotechnology, 1987, 7(1): 1-12 (in Chinese).
- [7] 姚万春,唐玉明,任道群,易彬,卢中明,沈小娟. 白酒曲药微生物分离培养基的选择研究[J]. 酿酒, 2011, 38(3): 39-41.
YAO WC, TANG YM, REN DQ, YI B, LU ZM, SHEN XJ. Selection of isolation media of microbes in starter-making of liquors[J]. Liquor Making, 2011, 38(3): 39-41 (in Chinese).
- [8] 刘文祥. 小单孢菌选择性分离鉴定及其次级代谢产物挖掘[D]. 阿拉尔:塔里木大学硕士学位论文, 2020.
LIU WX. Selective separation and identification of *Micromonospora* and mining of their secondary metabolites[D]. Alar: Master's Thesis of Tarim University, 2020 (in Chinese).
- [9] 鞠守勇. 土壤分离苏云金芽胞杆菌的方法比较[J]. 武汉职业技术学院学报, 2014, 13(3): 88-90.
JU SY. The comparison of methods isolated *Bacillus thuringiensis* from soil[J]. Journal of Wuhan Polytechnic, 2014, 13(3): 88-90 (in Chinese).
- [10] 杨自文,吴宏文,王开梅,谢天健,钟连胜,岳书奎. 从土壤中高效分离苏云金杆菌的方法[J]. 中国生物防治, 2000, 16(1): 26-30.
YANG ZW, WU HW, WANG KM, XIE TJ, ZHONG LS, YUE SK. Method for highly efficient isolation of *Bacillus thuringiensis* from soil[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2000, 16(1): 26-30 (in Chinese).
- [11] 王相晶,王晓舟,张继,朱兆香,向文胜,张匀华.

- 土壤多重抗生素抗性放线菌的筛选及其发酵产物的初步研究[J]. 东北农业大学学报, 2011, 42(2): 84-91.
- WANG XJ, WANG XZ, ZHANG J, ZHU ZX, XIANG WS, ZHANG YH. Screening of multi-antibiotic resistances actinomycetes and analysis of their metabolites[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2011, 42(2): 84-91 (in Chinese).
- [12] HOPWOOD DA, MALPARTIDA F, KIESER HM, IKEDA H, DUNCAN J, FUJII I, RUDD BAM, FLOSS HG, ŌMURA S. Production of 'hybrid' antibiotics by genetic engineering[J]. Nature, 1985, 314(6012): 642-644.
- [13] 野野村·英夫, 徐丽华. 选择性分离土壤放线菌的新方法[J]. 国外医药(抗生素分册), 1989, 10(5): 326-329.
- YEYECUN YF, XU LH. A new method for selective isolation of soil actinomycetes[J]. World Notes on Antibiotics, 1989, 10(5): 326-329 (in Chinese).
- [14] 龙建友. 新型农用抗生素的筛选研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2003.
- LONG JY. Studies on screening of new agricultural antibiotics[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest Agriculture and Forestry University, 2003 (in Chinese).
- [15] 刘虎虎, 李亚丹, 薛高尚, 陈东明, 田云, 卢向阳. 牛粪便微生物总 DNA 提取方法的优化[J]. 怀化学院学报, 2011, 30(5): 38-41.
- LIU HH, LI YD, XUE GS, CHEN DM, TIAN Y, LU XY. The optimization of methods for DNA extraction of total microorganisms from cow's feces[J]. Journal of Huaihua University, 2011, 30(5): 38-41 (in Chinese).
- [16] 张哲瑄. 塔克拉玛干沙漠东缘土壤细菌多样性分析[D]. 阿拉尔: 塔里木大学硕士学位论文, 2021.
- ZHANG ZX. Diversity of Soil bacterial communities in the Eastern Margin of the Taklimakan Desert[D]. Alar: Master's Thesis of Tarim University, 2021 (in Chinese).
- [17] 马尔仑. BLAST 序列比对脱机移植研究[J]. 内蒙古师范大学学报(自然科学汉文版), 2020, 49(4): 327-332.
- MA EL. Research on offline environment of BLAST sequence alignment[J]. Journal of Inner Mongolia Normal University (Natural Science Edition), 2020, 49(4): 327-332 (in Chinese).
- [18] 邵义萍, 莫测辉, 李彦文, 吴小莲, 邹星, 高鹏, 黄显东. 长期施用粪肥土壤中喹诺酮类抗生素的含量与分布特征[J]. 中国环境科学, 2010, 30(6): 816-821.
- TAI YP, MO CH, LI YW, WU XL, ZOU X, GAO P, HUANG XD. Concentration and distribution of quinolone antibiotics in long-term manure-amended soils[J]. China Environmental Science, 2010, 30(6): 816-821 (in Chinese).
- [19] 邹汉玄, 杨先跃, 曹斌, 李静波, 丁华, 孙定国, 叶文明, 陈汉初. 土壤微生物对柑桔生长及产量的影响[J]. 果树科学, 1994, 11(1): 19-22.
- ZOU HX, YANG XY, CAO B, LI JB, DING H, SUN DG, YE WM, CHEN HC. Effect of soil microbe on growth and production of *Citrus* fruits[J]. Journal of Fruit Science, 1994, 11(1): 19-22 (in Chinese).
- [20] 闫建芳, 刘秋, 刘志恒, 胡树仁, 屈蕾蕾, 樊慧梅, 王福妹. 瓜类枯萎病菌拮抗放线菌分离方法的研究[J]. 河南农业科学, 2006, 35(4): 81-83.
- YAN JF, LIU Q, LIU ZH, HU SR, QU LL, FAN HM, WANG FM. Screening of actinomycetes against *Fusarium oxysporum*[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2006, 35(4): 81-83 (in Chinese).
- [21] 司美茹, 薛泉宏, 来航线. 放线菌分离培养基筛选及杂菌抑制方法研究[J]. 微生物学通报, 2004, 31(2): 61-65.
- SI MR, XUE QH, LAI HX. Studies on selection of the isolation medium for actinomycetes and inhibition methods to miscellaneous microorganism[J]. Microbiology China, 2004, 31(2): 61-65 (in Chinese).
- [22] 罗子健. 抗生素耐受菌的固定及其降解抗生素废水中 COD 的研究[D]. 南宁: 广西大学硕士学位论文, 2021.
- LUO ZJ. Study on immobilization of antibiotic-resistant bacteria and its degradation of COD in antibiotic wastewater[D]. Nanning: Master's Thesis of Guangxi University, 2021 (in Chinese).
- [23] 刘超齐, 王平, 常娟, 尹清强, 卢富山, 王潇. 益生菌对温度、pH 及抗生素耐受性的研究[J]. 饲料研究, 2016(12): 19-25.
- LIU CQ, WANG P, CHANG J, YIN QQ, LU FS, WANG X. Study on temperature, pH and antibiotic tolerance of probiotics[J]. Feed Research, 2016(12): 19-25 (in Chinese).
- [24] 柴霜, 赵文卓, 杨芳, 王小清, 于正森. 细菌耐药性及抗菌新药研发策略[J]. 国外医药(抗生素分册), 2021, 42(4): 204-208.
- CHAI S, ZHAO WZ, YANG F, WANG XQ, YU ZS. Bacterial resistance and strategies for new antimicrobial drugs development[J]. World Notes on Antibiotics, 2021, 42(4): 204-208 (in Chinese).