

桉树根际放线菌的分离、初步鉴定及酶活筛选

樊炳君¹, 曹艳茹^{1,2*}, 纪开娟³, 段 娇¹, 罗昆艳¹, 姚 丽¹, 朱海莹⁴, 侯秀丽¹

(1. 昆明学院 农学与生命科学学院, 云南 昆明 650214; 2. 云南省高校生物炭工程研究中心, 云南 昆明 650214; 3. 临沧市第一中学 天有实验学校, 云南 临沧 677000; 4. 楚雄州禄丰县恐龙山镇人民政府, 云南 禄丰 651212)

摘要: 为了解桉树根际放线菌多样性和功能, 采用稀释涂布法和 16S rRNA 基因测序法对所采样品进行放线菌分离和鉴定. 经分离获得 73 株放线菌, 选出 21 株菌进行测序及酶活筛选. 结果显示, 16 株为链霉菌, 2 株为小单孢菌, 微球菌、考克氏菌和野野村菌各有 1 株. 蛋白酶活性、脂肪酶活性、纤维素酶活性、淀粉酶活性的菌株数分别为 5, 4, 6, 7. 试验表明, 桉树根际放线菌酶活性较丰富, 但类群组成单一, 主要为链霉菌.

关键词: 桉树根际; 放线菌; 多样性; 酶活性

中图分类号: S792.39 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-5639 (2020) 03-0064-07

DOI: 10.14091/j.cnki.kmxyxb.2020.03.014

Isolation and Identification of Actinobacteria from Eucalyptus Rhizosphere for Screening of Enzymatic-producing Actinomycetes

FAN Bingjun¹, CAO Yanru^{1,2*}, JI Kaijuan³, DUAN Jiao¹, LUO Kunyan¹, YAO Li¹, ZHU Haiying⁴, HOU Xiuli¹

(1. College of Agriculture and Life Sciences, Kunming University, Kunming, Yunnan, China 650214;

2. Engineering Research Center for Biochar of High Education in Yunnan Province, Kunming, Yunnan, China 650214;

3. Tumyu Experimental Middle School of Lincang No 1 Middle School, Lincang, Yunnan, China 677000;

4. Chuxiong State Lufeng County Dinosaur Mountain Town People's Government, Lufeng, Yunnan, China 651212)

Abstract: In order to understand the Actinobacteria diversity and function of Eucalyptus rhizosphere, we isolated and identified Actinobacteria of Eucalyptus rhizosphere soil by dilution plating and 16S rRNA gene analysis. 73 strains were acquired among which 21 representative strains were tested. The results showed 16 strains belonged to *Streptomyces* and 2 strains belonged to *Micromonospora*, 1 belongs to *Micrococcus*, *Kocuria*, *Nonomurae* fungus respectively. Enzymes activity screening showed that strain number positive for protease, lipase, cellulose and amylase were 5, 4, 6 and 7, respectively. The test showed that many strains had enzymes activities, but the Actinobacteria diversity of Eucalyptus rhizosphere is poor, mainly with *Streptomyces*.

Key words: Eucalyptus rhizosphere; actinobacteria; diversity; enzyme activity

桉树 (*Eucalyptus robusta* Smith.) 为桃金娘科桉属重要种, 主要分布区在澳大利亚和其附近的各岛屿^[1]. 如今, 桉树是世界三大造林树种 (杨树、桉树、松树) 之一, 也是中国南方最重要的造林

树种. 据统计, 至 2005 年云南有多达 109 个县 (市、区) 种植桉树, 种植面积高达 23.6 万 hm². 桉树不仅被用作经济林树种, 还可作为大面积的防护林、用材林和薪炭林^[2]. 但是种植桉树给人们

收稿日期: 2019-12-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31660002); 省部共建云南生物资源保护与利用国家重点实验室开放课题 (2019KF005); 云南省地方本科高校 (部分) 基础研究联合专项资金项目 (2018FH001-003); 云南省“万人计划”青年拔尖人才资助项目.

作者简介: 樊炳君 (1996—), 女, 云南昆明人, 硕士研究生, 主要从事微生物资源利用及植物病害研究.

*通讯作者: 曹艳茹 (1983—), 女, 内蒙古乌海人, 副教授, 博士, 主要从事微生物研究, E-mail: yanrucao3@aliyun.com.

带来经济价值的同时,也给生态环境带来了一些问题.众所周知,桉树常被人们称为树木界的抽肥机和抽水机,长期种植桉树不仅会改变土壤的理化性质,同时对土壤中的微生物种类和数量也会产生一定影响.李佳雨等^[3]研究发现,桉树林土壤中的pH、有机碳和全氮含量均显著降低,土壤中丛枝菌根真菌的丰度也随桉树种植时间的增加而减少.李立文^[4]在研究桉树对生态环境的影响时发现,桉树的根系分泌物和凋落物对其他物种的生长有一定的抑制作用,从而影响周围环境的生物多样性,造成桉树林地表面光秃、生物种类单一.陈法霖等^[5]发现,桉树凋落物提供土壤微生物群落生境和食物的能力较弱,致使土壤中的微生物群落生物量、多样性和代谢活性均降低.目前国内外关于桉树人工林生态系统的报道^[6-9]大多是基于植物和土壤养分的角度,而对于桉树根际土壤中放线菌的研究尚不多见.

土壤是植物赖以生存的物质基础,而土壤中的微生物是土壤生态系统的重要组成部分,其数量、种类及活性都会影响土壤生态系统的结构和功能,对环境也起着天然的“过滤”和“净化”作用^[10].放线菌是土壤微生物中的一个主要类群,它们的存在反映了生态多样性,对自然界物质循环起着重要作用,同时还是很好的生防菌资源.黄冰纷等^[11]从土壤中筛选出对松材线虫有较高杀灭活性的放线菌.龙云川等^[12]在综述贵州省的放线菌资源时分析总结出17株活性放线菌,功能主要集中在产生活性物质、拮抗植物病原菌及具生物防治潜力等方面.此外,放线菌还可以合成多种有用的代谢产物,例如维生素、淀粉酶、纤维素酶和氨基酸等,与人类的生产生活关系紧密^[13].

虽然近几年我国有很多学者已对桉树人工林土壤微生物、土壤动物和病虫害防治进行研究,但针对云南桉树人工林根际土壤中的放线菌研究却很少.因此,本试验采集云南省牟定县桉树人工林的根际土壤,分离其中的放线菌,在分析该地桉树根际土壤中放线菌的多样性的基础上检测菌株酶活,以期从根际微生物生态的角度来探讨桉树人工林的生态效益和生物多样性问题.并通过分析桉树根际土壤放线菌的数量和种类,阐明桉树人工林地土壤放线菌的生态分布规律,为全面评估云南桉树的生态效应,以及后期的桉树引种、扩大栽培面积提供

一些理论依据,同时获取一批有价值的放线菌资源.

1 材料与方法

1.1 采样区域概况和材料

试验材料采自云南省楚雄州牟定县(101°35'~101°47' N, 25°30'~25°40' E),境内最低海拔1140 m,最高海拔2897 m,属于亚热带季风气候区,年平均气温为15.8℃,年平均降雨量为872 mm,日照充足,气候温和.

桉树林根际土壤的采集在上述试验区域内进行.在坡向相同、海拔相差在110~120 m的范围内设置样方,样方大小为10 m × 10 m,以“S”型取样法在每个样地随机选取3个点,除去表层土,取深度为10 cm左右的土样混合为1个样品.海拔间隔200 m按上述方法再采集1个样品,共计8份桉树根际土样,将土样装入无菌袋中,带回实验室置于4℃以待分离.

1.2 分离纯化

1.2.1 土样预处理

将8份样品进行风干(无菌条件下),过筛(孔径2 mm)后,取2 g土样于100℃的烘箱中干热处理1 h.将上述样品加入装有18 mL无菌水的锥形瓶,室温振荡30 min,以待涂布分离.

1.2.2 分离培养基

本研究放线菌分离的培养基参照Taechowisan, Khamna, Lece valier和段淑蓉等的方法配制HV培养基^[14]、海藻糖-脯氨酸培养基^[15]、甘油精氨酸琼脂^[16]、棉籽糖组氨酸培养基^[16]、海藻糖-天门冬酰胺培养基^[17]、土壤浸汁培养基^[17],并结合杨宇容等^[18]的方法在前5个分离培养基中加入75 μg/mL重铬酸钾,在第6个分离培养基中加入0.06 g/L制霉菌素,用以抑制细菌和真菌的生长.

1.2.3 放线菌分离培养及保藏

将上述预处理好的样品进行梯度稀释,取200 μL质量浓度为10⁻³倍的土壤稀释液置于培养基上并涂布均匀,静置0.5 h后倒置恒温培养箱中,温度为28℃.7~21 d后,观察并统计出菌情况,将放线菌单菌落挑取出来,以平板进行划线纯化,将纯化好的菌株接种于牛奶管、斜面、甘油管,置于低温保藏.

1.3 放线菌的初步鉴定

根据形态特征选取代表菌株,按宫强等人^[19]

的方法对代表菌株的总 DNA 进行提取, 采用 Marchesi 等^[20] 设计的引物 (PA: 5'-CAGAGTTT-GATCCTGGCT-3' 和 PB: 5'-AGGAGGTGATCCAGC-CGCA-3') 进行 16S rRNA 基因的特异扩增, 随后送到美吉测序公司进行测序. 将获得的 16S rRNA 基因序列提交到 ezbiocloud (<https://www.ezbiocloud.net/identify>) 进行比对^[21], 调取相似性较高的菌株序列, 利用 MEGA 7 软件以邻接法 (Neighbor-Joining) 对其进行系统发育树的构建, 最终确定放线菌种属.

1.4 放线菌酶活检测

对选取的进行初步鉴定的 21 株代表性菌株进行淀粉酶、纤维素酶、蛋白酶和脂肪酶活性检测.

1.4.1 菌株活化

将 21 株放线菌转接到 ISP 2 培养基上活化, 培养 5 d 后备用.

1.4.2 酶活性检测

1) 培养基的制备. 按照张万芹等^[22] 的方法配制基础培养基、淀粉酶活检测培养基、纤维素酶活检测培养基、蛋白酶活检测培养基和脂肪酶活检测培养基. 并根据不同的水解酶活性检测方法, 将不同的底物加入基础培养基中, 同时平板下层加入水琼脂层, 以便观察.

2) 接种培养. 将 21 株放线菌分别接种到 4 种酶活性检测培养基上, 置于 28 ℃ 培养箱中培养 1 周, 每株菌每种酶接种两次, 即两个重复.

3) 酶活检测. 纤维素酶活检测^[23]: 在菌株已长好的平板上倒入配置好的刚果红溶液, 待其染色 1 h 后, 将染色液倒出, 再用 NaCl 溶液脱色 20 min 后观察菌落周围是否有透明圈出现, 记录菌落边缘与透明圈边缘的距离, 距离越大则酶活越好.

淀粉酶活检测: 在菌株已长好的平板上倒入适量碘液, 若变蓝则表明无酶活; 若不变蓝, 记录菌落边缘与透明圈边缘的距离, 距离越大则酶活越好.

脂肪酶活和蛋白酶活检测: 如有酶活, 菌落边缘有透明圈形成, 记录其大小.

2 结果与分析

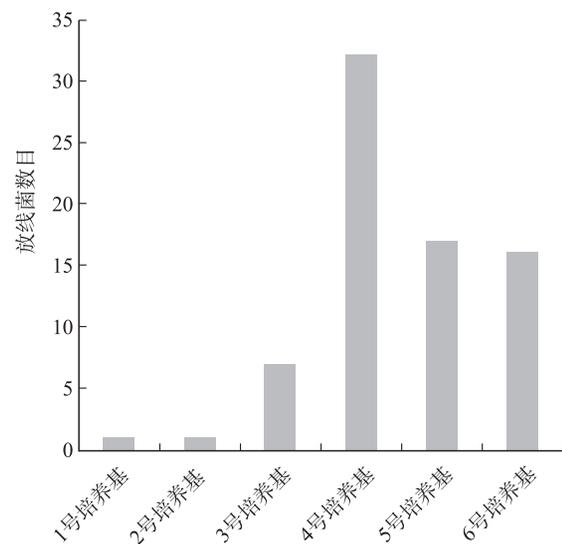
经分离纯化后共获得 73 株菌, 将其分别保存于牛奶管、甘油管和斜面以进行后续的工作. 根据形态差异选取了 21 株代表放线菌进行系统进化分

析及酶活检测.

2.1 放线菌在 6 种培养基上的出菌情况

放线菌的生长数量统计如图 1 所示. 在采用的 6 个培养基上, 放线菌的数量呈现 HV 培养基 ≈ 海藻糖 - 脯氨酸培养基 < 海藻糖 - 天门冬酰胺培养 < 棉籽糖 - 组氨酸培养基 < 甘油 - 精氨酸琼脂 < 土壤浸汁培养基的趋势. 其中: 以采样地土壤制成的土壤浸汁培养基放线菌出菌率最高, 最适合该样品放线菌的分离; 富含有机质的 HV 培养基和海藻糖 - 脯氨酸培养基分离效果最差. 这可能和该地营养被桉树强势吸收而使得适应寡营养的放线菌类群大量存在有关.

最终, 分离纯化后共得到 73 株菌, 根据形态特征可知其中 52 株均为链霉菌属菌株. 由此可知, 桉树根际土壤放线菌优势类群是链霉菌属菌株. 另选取形态差异较大的 21 株代表菌株进行 16S rRNA 基因测序以及系统进化分析.



1号.HV培养基; 2号.海藻糖-脯氨酸培养基; 3号.海藻糖-天门冬酰胺培养基; 4号.土壤浸汁培养基; 5号.甘油-精氨酸琼脂; 6号.棉籽糖-组氨酸培养基.

图1 各个培养基上的放线菌数量

2.2 分离放线菌的初步鉴定结果

对筛选出的 21 株放线菌进行 16S rRNA 基因测序, 测序结果如表 1 所示. 其中 16 株属于链霉菌属; 2 株属小单孢菌属, 其中一株是 *Micromonospora chayaphumensis*, 另一株是 *M. schwarzwaldensis*; 1 株属微球菌属的 *Micrococcus aloeverae*; 1 株属考克氏菌属的 *Kocuria gwangalliensis*; 1 株为野野村菌属的 *Nonomuraea jabiensis*.

表1 21株菌株的测序结果

菌株编号	相似种	与相似种相似性/%
A3	<i>Streptomyces decoyicus</i>	99.56
A5	<i>Streptomyces decoyicus</i>	99.85
A9	<i>Streptomyces sioyaensis</i>	99.68
A18	<i>Streptomyces geldanamycininus</i>	98.97
A19-2	<i>Streptomyces aureus</i>	100.00
A22	<i>Micromonospora citrea</i>	99.26
A23-1	<i>Streptomyces decoyicus</i>	99.56
A23-2	<i>Streptomyces decoyicus</i>	99.85
A24	<i>Streptomyces mauvecolor</i>	99.85
A31	<i>Streptomyces scopuliridis</i>	99.42
A39	<i>Micromonospora schwarzwaldensis</i>	99.05
A45	<i>Streptomyces fuscichromogenes</i>	97.44
A48	<i>Micrococcus aloeverae</i>	99.56
A52-2	<i>Streptomyces decoyicus</i>	99.41
A53	<i>Streptomyces niveus</i>	99.66
A60	<i>Streptomyces mirabilis</i>	99.71
A63	<i>Kocuria gwangalliensis</i>	99.29
A66-2	<i>Streptomyces violascens</i>	99.83
A67-1	<i>Streptomyces olivochromogenes</i>	99.42
A69	<i>Streptomyces decoyicus</i>	99.85
267	<i>Nonomuraea jabiensis</i>	88.19

测序的21株放线菌共分布于5个属, 每个种选取1个有效代表菌株进行系统发育树的构建. 如图2所示, 基于16S rRNA基因序列构建了Neighbour-joining进化树. 该系统进化树显示测序的21株放线菌中有16株聚在一个大支上, 为链霉菌属菌株. 其中, A24和A66-2为同一株菌; 而A9, A52-2, A3, A5, A23-1, A69, A23-2都为*Streptomyces decoyicus*, 且为此次分离菌株的优势菌株, 该菌株可产德夸菌素(decocoyin)和阿洛酮糖素(psicofuranine), 分别可以抑制部分革兰氏阴性、阳性细菌, 这也是此次分离到该菌株较多的原因. 另外, 其可以抑制分枝杆菌和某些肿瘤细胞^[24]. 因此, 该菌株还可以作为次级代谢产物研究的菌株材料.

根据此次桉树根际土壤分离的73株放线菌的形态和测序结果可知, 68株都为链霉菌属菌株, 占到了分离菌株的93%, 且在每份样品中、每种分离培养基上数量都较多, 可见链霉菌类群为桉树根际土的绝对优势放线菌, 而仅有7%的分离菌株为其他稀有类群. 由此可知, 桉树根际土的放线菌类群组成比较单一.

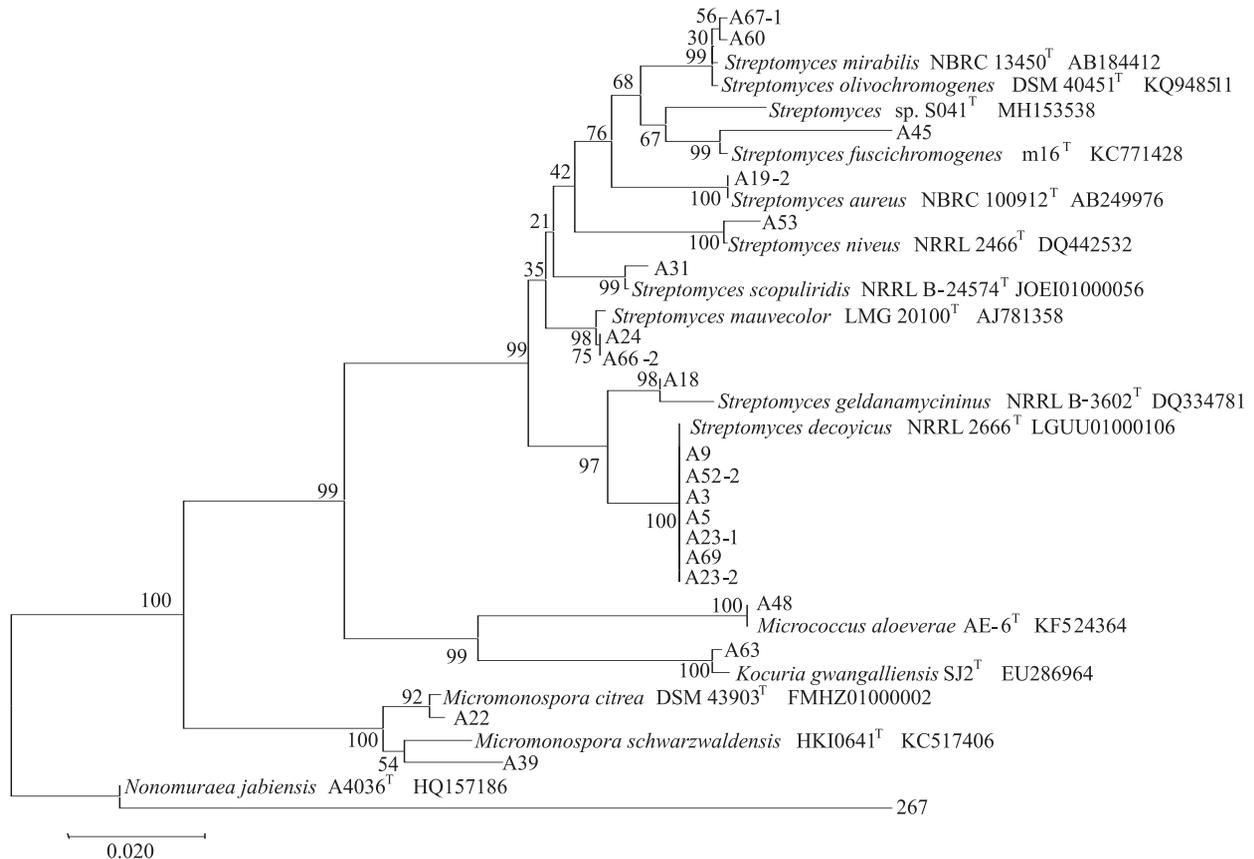


图2 21株测序菌株基于16S rRNA基因序列构建的Neighbour-joining进化树

2.3 潜在新放线菌菌株的分析

分类学工作者 Kim 等人^[25]于 2014 年提出 16S rRNA 基因序列相似度小于 98.65%，可以认定为可能的新种或新属。由测序结果表 1 可知，本次分离到的菌株 A45 与正式发表的菌株 *Streptomyces fuscichromogenes* 的 16S rRNA 基因序列相似度为 97.44%，可能为潜在的新菌株；而菌株 267 与正式发表的菌株 *Nonomuraea jabiensis* 的 16S rRNA 基因序列相似度为 88.19%，可能为潜在的新属或更高级别的分类单元。但相关工作需通过后期的多相分类学方法来验证。

2.4 酶活筛选结果

通过点接法将 21 株代表菌株接种至淀粉、羧甲基纤维素钠、脱脂牛奶和三丁酸甘油酯为底物的培养基上筛选其酶活。图 3 为试验中筛选到的部分阳性结果，根据菌落周围形成的透明圈来判断酶活是否产生。

21 株菌在上述 4 种底物培养基上生长 7 d 之

后，酶活筛选结果如表 2 所示。有 4 株菌（占筛选菌株总数的 19.0%）脂肪酶活性呈阳性；有 7 株菌（占筛选菌株总数的 33.3%）淀粉酶活性呈阳性；有 6 株菌（占筛选菌株总数的 28.6%）纤维素酶活性呈阳性；有 5 株菌（占筛选菌株总数的 23.8%）蛋白酶活性呈阳性；有 7 株菌（占筛选菌株总数的 33.3%）的 4 种酶活都为阴性，即 66.7% 的菌株都有至少一种酶活。其中，菌株 A18 (*Streptomyces geldanamycininus*) 和菌株 267 (*Nonomuraea jabiensis*) 具有 3 种酶活；而 A9 (*Streptomyces sioyaensis*)、A24 (*Streptomyces mauvecolor*)、A31 (*Streptomyces scopuliridis*)、A63 (*Kocuria gwangalliensis*) 这 4 株菌都具有两种酶活，这些活性菌株对于淀粉酶、纤维素酶、脂肪酶、蛋白酶的开发应用提供了更多研究材料。在供试的 16 株链霉菌中，有高达 75% 的菌株（12 株菌）至少有 1 种酶活，由此说明桉树根际土壤蕴藏着酶活较多的链霉菌资源。

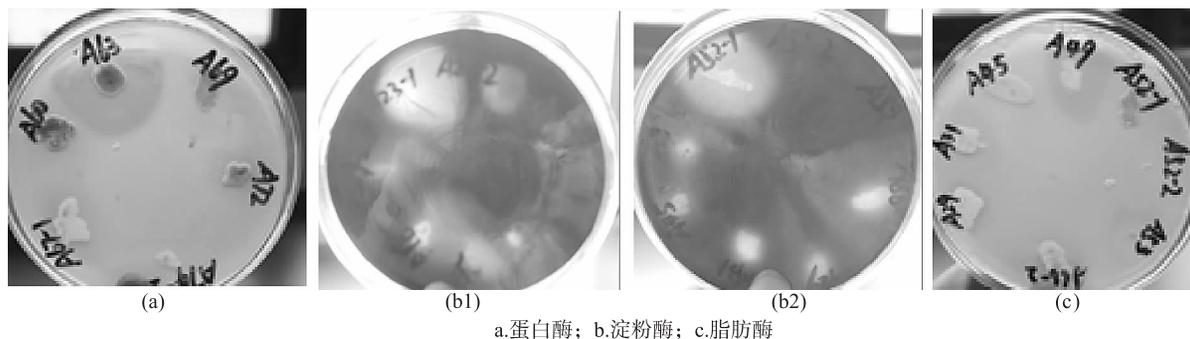


图3 酶活筛选结果

表 2 21 株代表菌株酶活筛选结果

菌株编号	脂肪酶	淀粉酶	纤维素酶	蛋白酶	阳性酶活数量
A3					0
A5					0
A9		+	+		2
A18	+	+	+		3
A19-2			+		1
A22					0
A23-1		+			1
A23-2					0
A24	+			+	2
A31			+	+	2
A39					0
A45					0
A48					0

续表 2

菌株编号	脂肪酶	淀粉酶	纤维素酶	蛋白酶	阳性酶活数量
A52-2		+			1
A53				+	1
A60			+		1
A63		+		+	2
A66-2	+				1
A67-1	+				1
A69		+			1
267		+	+	+	3

3 讨论

本试验对云南省楚雄州牟定县桉树根际土壤放线菌进行了分离, 同时分析了该样品放线菌的数量及类群组成, 在此基础上筛选了分离菌株的4种酶活性. 通过稀释平板法从8份桉树根际土壤样品中共分离获得73株放线菌. 分离结果显示, 8份样品在不同培养基上放线菌的生长情况和数量差异很大. 其中, 以采样地土壤制成的土壤浸汁培养基放线菌出菌率最高, 因此土壤浸汁培养基较适合桉树根际土壤样品放线菌的分离, 推测可能是由于桉树大量吸收养分而形成的贫营养环境的选择作用使得适应寡营养的放线菌类群占据了绝对优势的原因. 由此提示, 今后在选择放线菌分离培养基时要充分调查考虑采样地的背景组成特点来设计分离培养基, 才能得到较为理想的分离效果.

在分离得到的73株菌中, 根据形态特征可知其中52株均为链霉菌属菌株. 另选取形态差异较大的进行16S rRNA基因测序以及系统进化分析的21株代表菌株中有16株也为链霉菌属菌株, 一共68株菌(占分离菌株总数的93.15%)为链霉菌的不同种及亚种, 说明牟定县桉树林根际土中的放线菌优势类群是链霉菌. 根据目前的研究表明, 放线菌中数量最大、应用最广的一类是链霉菌. Yu等^[26]从来源于厦门红树林的1株链霉菌中获得具有抗真菌及抗肿瘤作用的物质. 谢玉琴等^[27]发现娄彻氏链霉菌对小麦幼苗有很好的促生作用. 在本试验中获得的链霉菌属菌株为后期放线菌的综合利用及生理活性物质的定向筛选提供了较好的物质资源. 与此同时, 本试验发现, 楚雄州牟定县桉树林根系土壤中的微生物种类单一, 物种丰富度不高. 生物多样性会直接影响一个地区甚至一个生态系统

的稳定性. 若生物种类单一, 则会导致生态系统十分脆弱. 此外, 桉树种植会干扰林下动植物的多样性^[28]. 而且, 本研究也表明, 桉树的根际土壤放线菌类群较单一, 这对于当地的生态系统稳定性很不利.

本研究在分离桉树根际土壤放线菌的基础上利用平板点接法对分离放线菌进行了酶活检测. 在筛选的21株放线菌中, 有4株菌产脂肪酶, 7株菌产淀粉酶, 6株菌产纤维素酶, 5株菌产蛋白酶, 66.7%的筛选菌株至少有一种酶活. 可见, 桉树根际土壤放线菌的酶活性比较好, 后期可进一步详细研究酶活阳性菌株的产酶条件等相关酶学性质, 也可利用核糖体工程等更为先进的方法对其进行处理改造提高酶的活力和产量, 一方面可以提高桉树根际土壤微生物资源的利用率, 另一方面为酶工业生产提供更多生物资源.

[参考文献]

- [1] 中国科学院中国植物志委员会. 中国植物志: 第53卷 [M]. 北京: 科学出版社, 1974.
- [2] 张荣贵, 李思广, 蒋云东. 云南桉树引种历史、发展现状及展望 [J]. 桉树科技, 2007 (2): 18-23.
- [3] 李佳雨, 林家怡, 裴晨羽, 等. 桉树种植对林地土壤丛枝菌根真菌群落结构及多样性的影响 [J]. 生态学报, 2019, 39 (8): 2723-2731.
- [4] 李立文. 桉树对生态环境的影响 [J]. 现代园艺, 2019 (4): 158-159.
- [5] 陈法霖, 张凯, 向丹, 等. 桉树凋落物对土壤微生物群落的影响: 基于控制实验研究 [J]. 土壤学报, 2019, 56 (2): 432-442.
- [6] AHLAM H, AMAL B, YEDIR O, et al. Phosphate solubilizing and PCR activities of ericaceous shrubs microorganisms isolated from Mediterranean forest soil [J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2019, 19: 145

- 156.
- [7] 李勇, 顾焱俊, 刘益军, 等. 缙云山森林土壤微生物数量与群落特征 [J]. 植物营养与肥料学报, 2012, 18 (5): 1161 - 1167.
- [8] 冯书华, 李红梅, 吴炯, 等. 元阳梯田两种森林群落土壤微生物数量与养分特征 [J]. 西部林业科学, 2018, 47 (4): 111 - 117.
- [9] KERSTIN H, WERNER B, TOBIAS Z, et al. Effects of soil frost on nitrogen net mineralization, soil solution chemistry and seepage losses in a temperate forest soil [J]. *Global Change Biology*, 2010, 15 (4): 825 - 836.
- [10] 姚拓, 龙瑞军. 天祝高寒草地不同扰动生境土壤三大类微生物数量动态研究 [J]. 草业学报, 2006, 15 (2): 93 - 99.
- [11] 黄冰纷, 陈俊梅, 李文鹏, 等. 松材线虫生防放线菌的筛选、鉴定及其毒性因子初步研究 [J]. 北京林业大学学报, 2019, 41 (4): 99 - 106.
- [12] 龙云川, 蒋娟, 周娟, 等. 贵州省放线菌资源及多样性研究现状 [J]. 贵州科学, 2018, 36 (5): 4 - 9.
- [13] 吴铁航, 李振高. 土壤微生物在持续农业中的作用与应有前景 [J]. 土壤学进展, 1995, 23 (4): 29 - 36.
- [14] TAECHOWISAN T, PEBERDY J F, LUMYONG S. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2003, 19 (4): 381 - 385.
- [15] KHAMNA S, YOKOTA A, LUMYONG S. Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production [J]. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 2009, 25 (4): 649 - 655.
- [16] LECEVALIER H A, LECHEVALIER M P. Biology of actinomycetes [J]. *Annual Review of Microbiology*, 1967, 21 (1): 71 - 100.
- [17] 段淑蓉, 苏芸芸, 张玉琴. 利用噬菌体有效分离稀有放线菌的初步研究 [J]. 云南大学学报 (自然科学版), 2006, 28 (4): 354 - 357.
- [18] 杨宇容, 徐丽华, 李启任, 等. 放线菌分离方法的研究I. 抑制剂的选择 [J]. 微生物学通报, 1995 (2): 88 - 91, 85.
- [19] 官强, 关道明, 王耀兵, 等. 大肠杆菌总 DNA 快速提取方法的比较研究 [J]. 海洋环境科学, 2005, 24 (4): 63 - 66.
- [20] MARCHESI J R, TAKUICHI S, WEIGHTMAN A J, et al. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64 (2): 795 - 799.
- [21] YOON S, HA S, KWON S, et al. Introducing EzBio-Cloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, 67: 1613 - 1617.
- [22] 张万芹, 张永光, 房保柱, 等. 贵州兴义喀斯特洞穴土可培养细菌多样性及其产蛋白酶、淀粉酶活性筛选 [J]. 微生物学通报, 2016, 43 (5): 955 - 964.
- [23] 郭杰炎, 蔡武城. 微生物酶 [M]. 北京: 科学出版社, 1986: 76 - 84.
- [24] YASHAWANT K, MICHAEL G. Reclassification of *Streptomyces hygrosopicus* strains as *Streptomyces aldersonianae* sp. nov., *Streptomyces angustmyceticus* sp. nov., comb. nov., *Streptomyces ascomycinicus* sp. nov., *Streptomyces decoyicus* sp. nov., comb. nov., *Streptomyces millbemycinicus* [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60 (4): 769 - 775.
- [25] MINCHEOL K, HYUN-SEOK O, SANG-CHEOL P, et al. 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 (2): 346 - 351.
- [26] YU H L, JIANG S H, BU X L, et al. Structural diversity of anti-pancreatic cancer capsimycins identified in mangrove-derived *Streptomyces xiamenensis* 318 and post-modification via a novel cytochrome P450 monooxygenase [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 1 - 14.
- [27] 谢玉琴, 马丹丹, 杨树, 等. 娄彻氏链霉菌 ZZ-9 菌株发酵液对小麦幼苗的促生作用 [J]. 西北农业学报, 2019, 28 (8): 335 - 1343.
- [28] 于福科, 黄新会, 王克勤, 等. 桉树人工林生态退化与恢复研究进展 [J]. 中国生态农业学报, 2009, 17 (2): 393 - 398.