

一株稀有链霉菌 FSG-003 鉴定方法的研究

乌拉木别克·对谢喀德尔, 吴恒, 刘斯汝, 陈士恩*, 丁功涛*

西北民族大学生物医学研究中心中国-马来西亚国家联合实验室生命科学与工程学院, 兰州 730030

摘要:利用 PCR 扩增 16S rDNA 的方法对链霉菌菌株 FSG-003 进行系统发育分析, 并对其进行生理、生化特性的鉴定。基于已发表链霉菌 16S rDNA 基因序列, 寻找设计特异性引物。根据扩增得到的 16S rDNA 序列建立系统发育树, 用于分析链霉菌 FSG-003 与花青蓝链霉菌的亲缘性。结果: 生理生化特性鉴定显示: 菌株 FSG-003 与花青蓝链霉菌的生理、生化特性较为接近。基于 16S rDNA 的系统发育分析显示: 通过菌株 FSG-003 的 16S rDNA 基因测序, 利用 MEGA 7.0 进行系统发育分析, 发现与 FSG-003 与 *Streptomyces* sp. strain SN0280 处于同一分枝, 亲缘关系最近。

关键词:链霉菌; PCR-SSCP; 16S rDNA; 系统发育分析

中图分类号: Q939.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019) Suppl-0051-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.S.007

Study on the identification method of a rare *Streptomyces* sp. FSG-003

WULAMUBEK Duiduixiekadeer, WU Heng, LIU Si-ru, CHEN Shi-en*, DING Gong-tao*

China-Malaysia National Joint Laboratory, Biomedical Research Center, College of Life Science and Engineering, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, China

Abstract: The phylogenetic analysis of *Streptomyces* strain FSG-003 was carried out by PCR amplification of 16S rDNA, and its physiological and biochemical characteristics were identified. Based on the published sequence of the *Streptomyces* 16S rDNA gene, we designed amplification primers. A phylogenetic tree was constructed based on the amplified 16S rDNA sequence of FSG-003 for analysis of the genetic relationship between *Streptomyces* sp. FSG-003 and *Streptomyces cyanus*. In addition, the physiological and biochemical characterization showed that strain FSG-003 and *Streptomyces sphaeroides* were close. Phylogenetic analysis using MEGA 7.0 by 16S rDNA sequencing of strain FSG-003 and other *Streptomyces* showed that FSG-003 and *Streptomyces* sp. strain SN0280 were in the same branch. These results demonstrated that FSG-003 was similar to SN0280 both in genetic composition and function.

Key words: *Streptomyces*; PCR-SSCP; 16S rDNA; phylogenetic analysis

用于治疗人类疾病的天然产物的药理学筛选和使用历史悠久, 从传统医学到现代药物。据报道, 大多数现代药物主要来自天然产物^[1]。在四川凉山采得种植 10 年所结木本植物“佛手”果实, 烘干箱中 121 °C 干燥完全, 在无菌条件下研磨成粉末, 使用无菌水浸泡, 等梯度稀释原液, 于改良高氏 I 号培养基进行涂布接种, 分离得到产一蓝色素菌株, 编号命名为链霉菌 FSG-003, 该菌株对多种细菌如肺炎

双球菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、绿脓杆菌等有较强的抑制作用, 且其次级代谢产物对 HeLa 细胞和肝癌细胞等癌细胞有抑制生长和凋亡作用, 本文主要对链霉菌 FSG-003 进行生理、生化特性对比, 结合多重聚合酶链式反应 (PCR) 的技术^[2]进行 16S rDNA 的系统发育分析^[3]得出该菌株亲缘关系。多重聚合酶链反应 (PCR) 的技术是描述此类病毒谱的有用工具^[4]。PCR 是一种敏感的诊断工具^[5]目前在大多数微生物学实验室中常规使用基于 PCR 的测定法^[6]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

从佛手中分离得到一株产蓝色素链霉菌放线

收稿日期: 2019-01-02 接受日期: 2019-04-25

基金项目: 中国-马来西亚清真食品国家联合实验室; 科技部对发展中国家科技援助项目 (KY201501005); 中国-马来西亚在清真食品生物技术、检测及标准体系的合作研究, 甘肃省国际科技合作项目 (17YF1W166)

* 通信作者 E-mail: chshien@163.com, dinggongtao@outlook.com

菌,标准菌株链霉菌 FSG-003。革兰氏染色实验中,显现阳性,结合其他生理生化特征,鉴定该菌株为链霉菌属^[7],论文中对此放线菌,命名为链霉菌 FSG-003。

1.1.2 试剂

营养琼脂培养基(蛋白胨)由天津市化学试剂一厂生产。细菌、组织基因 DNA 抽提试剂盒(DNeasy TissueKit)为北京索莱宝科技有限公司产品;PCR 引物设计合成由华大基因研究中心完成。

1.2 方法

1.2.1 培养基

基础培养基:用于倒平板,融化并冷却到 50 °C,可溶性淀粉 20 g, K₂HPO₄ · 3H₂O 0.5 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.01 g, KNO₃, 1 g, NaCl 0.5 g, Distilled water 1 000 mL, 琼脂 18 g。按照配方称取,121 °C 灭菌 30 min。

1.2.2 形态学观察

在光镜下和在 20 kV 电子显微镜下对该菌的形态,菌丝结构,孢子生长情况,以及基内菌丝和气生菌丝分布^[8]。

1.2.3 菌种生理、生化鉴定

a. 淀粉水解试验:淀粉水解试验的作用,测定菌株是否可以产生淀粉酶^[9]。

b. 纤维素分解试验:测定菌株是否可以产生纤维素酶。

c. 明胶液化试验:是否可以产生蛋白酶^[10]。

d. 牛奶凝固和胨化试验:牛奶凝固和胨化试验用于测定菌株是否可以产生蛋白酶。

e. 硫化氢(H₂S)产生试验:产生 H₂S,是否需要 CO₂。

根据生理生化实验结果,对比已知的产蓝色素放线菌的生理生化特性,对菌株进行初步鉴定。

1.2.4 菌种的分子生物学鉴定

引物设计:由菌株的生物学特性和生理生化实验,初步鉴定该菌株为链霉菌菌属菌株,依据链霉菌菌属的属特征设计引物:

F:GGTCTGAGAGGATGATCACT

R:TTAGCTCCACCTCGCGGC

引物设计合成由华大基因研究中心完成。

1.2.5 基因组 DNA 提取

取适量菌丝用液氮研磨移入 1.5 mL 离心管标记,加入 0.6 mL pH 为 8 的 TE,用枪头吹打均匀,使菌体充分悬浮;取 250 μL 10% SDS,加入 20 ng/μL 的蛋白酶 3 μL,轻摇混匀,在 37 °C 水浴锅中,放置

1 h,加入 150 μL 5 mol/L NaCl 溶液,加入 150 μL 2% 的 CTAB,65 °C 恒温水浴 20 min^[11];将经处理的悬液,在常温下离心 20 min,离心时转速 12 000 rpm,再取 1.5 mL 无菌离心管标记,吸取等体积的异丙醇,加入离心管,静置 30 min,下离心 10 min,(12 000 rpm,4 °C),弃去上清,取 1.5 mL 无菌离心管标记,加入控干后的样品,再加入 750 μL 70% 的乙醇,使沉淀充分悬浮并反复颠倒,离心 2 min (12 000 rpm,4 °C)^[12];加入 30 μL 纯水溶解沉淀,在 4 °C 保存。

1.2.6 DNA 电泳检测

以稀释的电极缓冲液为溶剂,配制 1% 的琼脂糖凝胶,微波炉加热到完全沸腾,冷却至 45 °C 左右待用。点样 DNA 提取物和 PCR 扩增产物分别取 7 μL,与 3 μL 的溴酚兰混合均匀,用移液枪全部吸取后点到电泳槽的孔中。同时 Marker(DL2000)进行点样^[13]。成像常用荧光染料溴乙锭(EB)染色^[14],观察 DNA 条带拍照。

1.2.7 PCR 扩增及检测

表 1 PCR 反应体系

Table 1 PCR reaction system

组成成分 Composition	体积 Volume (μL)
H ₂ O	22.5
Buffer	4
dNTP(2.0 mmol/L)	4
引物 F Primer F(5 pmol/L)	4
引物 R Primer R(5 pmol/L)	4
DNA 模板 DNA template	4
酶 Enzyme(10 mg/mL)	0.5
总体积 Total capacity	43

表 2 PCR 扩增条件

Table 2 PCR amplification conditions

温度 Temperature(°C)	时间 Time(min)
预变性 Pre-denaturation 95	5
变性 Transsexual 94	1
退火 Annealing 48	1
延伸 Extend 72	2
进行 36 个循环 36 cycles	
延伸 Extend 72	10
保存 Save 4	forever

1.2.8 电泳

将扩增的产物再次跑电泳,对比前次的结果进行分析。

1.2.9 16S rDNA 基因测序

基于形态学和生物化学表征以及 16S rDNA 序列分析。我们的结果将它们分配给与链霉菌属相关的菌株^[15],将经过上面步骤处理后的样品封装,送至上海华大基因研究中心,由该公司代为完成 16S rDNA 基因测序。

1.2.10 基于 16S rDNA 的系统发育分析

将所得基因序列,在 GenBank 中 Blast 搜寻相似序列,选取合适的序列再经过 MAFFT 同源性比对,选取与链霉菌 FSG-003 同源性较高的菌株序列,使用 MEGA 7.0 软件,分离株与其最近的系统发育邻接^[16],采用邻接法(Neighbor-Joining Method)构建系统进化发育树。并且利用 DNAMAN 软件计算出菌株与其余各菌株的相似性百分比^[17]。

1.2.11 拮抗实验

进行测定链霉菌 FSG-003 对多种指示菌的抑菌圈数据^[18]和拮抗活性标记^[19]见表 3。

表 3 拮抗实验记录

Table 3 Antagonistic experimental records

菌株名称 Strain name	直径圈 Diameter circle (mm)	拮抗活性 Antagonistic activity
肺炎双球菌 <i>Pneumococcal</i>	12.3	++
酿酒酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9.2	+
四链球菌 <i>Streptococcus</i>	8.2	+
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	11.7	++
枯草杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	13.4	++
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	7.7	+
绿脓杆菌 <i>Pseudomonas</i>	13	++
腐生葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	9.7	+

注:“+++”代表抑菌圈直径大于 15 mm,“++”代表抑菌圈直径在 10 mm~15 mm 之间,“+”代表抑菌圈直径小于 10 mm。

Note:“+++” means the diameter of the inhibition zone is larger than 15 mm,“++” means the diameter of the inhibition zone is between 10 mm-15 mm,and “+” means the diameter of the inhibition zone is less than 10 mm.

链霉菌 FSG-003 对肺炎双球菌、金黄色葡萄球菌、枯草杆菌和绿脓杆菌有良好的抑菌效果,但实验过程中病原菌的涂布浓度没有控制,抑菌圈也不是规整的圆形,大小值存在一误差,抑菌圈直径大小,还不能准确判定抑菌活性的强弱,只能初步判断是否具有抑菌活性。

2 结果与分析

2.1 菌种的形态学特征

2.1.1 经划线培养的菌株

生长缓慢,培养到 4 天时就可以看到平板上长出白色的菌落,7 天可见蓝色的菌丝,继续培养 15 天后就可看到菌落上中央呈蓝色,周围呈白色,且整个培养基呈蓝色,说明菌株生长过程中产生蓝色素。质地较硬,不易挑取,15 天的菌落如图 1 所示。

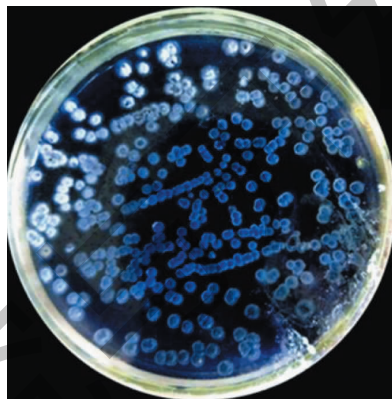


图 1 链霉菌 FSG-003 菌落形态(15 天)

Fig. 1 Colony morphology of *Streptomyces* FSG-003 (15days)

2.1.2 在光学显微镜下

菌种的菌丝比较丰富,交织紧密,有大量分支,但是菌丝不断裂。显微镜下的图片如图 2 所示。经过革兰氏染色,该菌株为革兰氏阳性菌。

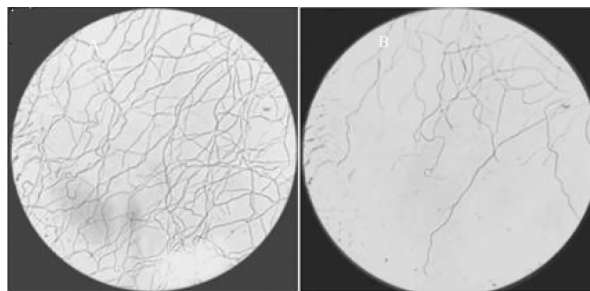


图 2 光学显微镜下的链霉菌 FSG-003(A×40,B×100)

Fig. 2 The optical microscope image of *Streptomyces* FSG-003 (A×40,B×100)

2.1.3 在 20 kV 扫描电镜下

可以清楚地看到,基内菌丝和气生菌丝都比较丰富,结果见图 3。菌丝的侧枝末端有孢子,孢子为椭圆形,表面光滑。

2.2 菌种的生理生化特性

通过链霉菌 FSG-003 的生理生化特性试验^[20],所得结果见表 4。可知,链霉菌 FSG-003 可以使淀

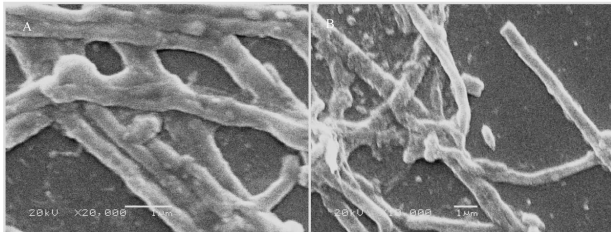


图3 扫描电镜下的链霉菌 FSG-003 (SEM A × 20 000, B × 10 000)

Fig. 3 The SEM image of streptomyces

FSG-003 (SEM A × 20 000, B × 10 000)

粉水解,可以产生纤维素酶,可以使明胶液化,可以产生 H₂S。

目前已知的产蓝色素的链霉菌的生理生化特

性,见表 5。可知,链霉菌 FSG-003 的生理生化特性与花青蓝链霉菌十分接近。

表 4 链霉菌 FSG-003 生理生化试验结果

Table 4 Streptomyces-HT003 physiological and biochemical experimental results

试验名称 Test name	结果 Result
淀粉水解试验 Starch hydrolysis test	+
纤维素分解试验 Cellulose decomposition test	+
明胶液化试验 Gelatin liquefaction test	+
牛奶凝固 Milk coagulation	-
豚化试验 Sputum test	+
硫化氢产生试验 Hydrogen sulfide production test	+

注：“+”代表阳性，“-”代表阴性。

Note：“+” stands for positive and “-” stands for negative.

表 5 链霉菌生理生化特性对比

Table 5 Comparison of Physiological and Biochemical Characteristics of Streptomyces

名称 Name	纤维素 Cellulose	硫化氢 Hydrogensulfide	豚化 Suihua	凝固 solidification	明胶 gelatin	淀粉 starch
深蓝链霉菌 <i>Streptomyces cerevisiae</i>	-	/	+	-	+	+
天蓝色链霉菌 <i>Streptomyces coelicolor</i>	-	+	+	-	+	+
蓝黄链霉菌 <i>Streptomyces</i>	/	/	-	+	+	-
橄榄链霉菌 <i>Streptomyces olivaceus</i>	+	-	+	+	+	+
灰色链霉菌 <i>Streptomyces griseus</i>	+	-	-	-	+	+
石蕊杀菌素链霉菌 <i>Streptomyces</i>	+	+	+	-	-	+
青蓝链霉菌 <i>Streptomyces cyanosis</i>	+	/	-	+	+	+
紫红链霉菌 <i>Streptomyces erythraea</i>	+	-	+	-	+	+
花青蓝链霉菌 <i>Streptomyces griseus</i>	+	/	+	-	+	+
链霉菌 FSG-003 <i>Streptomyces FSG-003</i>	+	+	+	-	+	+

注：“+”代表阳性，“-”代表阴性，“/”未知。

Note：“+” stands for positive,“-” stands for negative,“/” is unknown.

2.3 基于 16S rDNA 的系统发育分析

2.3.1 DNA 电泳检测并 PCR 扩增

2.3.1.1 DNA 提取电泳检测结果

基因组 DNA 提取后进行电泳,得图 4,由电泳结果图可知,试验中 DNA 产物提取成功。

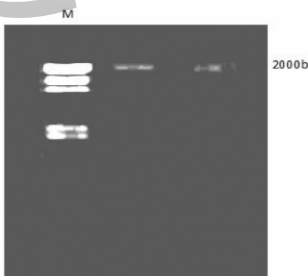


图 4 DNA 提取电泳图

Fig. 4 DNA extraction electrophoresis

2.3.1.2 PCR 扩增电泳结果 DNA

测序结果见表 6,链霉菌 FGR-003 的 16S rDNA 序列总长为 1 372 bp。

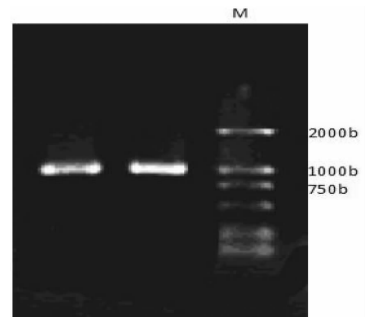


图 5 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 5 Electropherogram of PCR amplification product

2.3.2 链霉菌 FSG-003 的 16S rDNA 序列 BLAST 结果

SG-003 基因长度为 1 372 bp。

2.3.3 链霉菌 FSG-003 的 16S rDNA 测序结果

将链霉菌 FSG-003 的 16S rDNA 序列经过 BLAST 程序进行同源序列进行搜索,选取如下 25 条相似序列,相似度均达 99%,最相似的是 *Streptomyces* sp. strain SN0280 见表 7。

2.3.4 构建系统发育树

根据 blast 结果,选取与链霉菌 FSG-003 序列相近的 23 条菌株的序列,选取 *Escherichia coli* 为外群,通过 MAFFT 进行序列比对,运用 MEGA 7.0 软件建立系统发育树,结果如图 6,链霉菌 FSG-003 与

Streptomyces sp. strain SN0280 处于同一分枝,与 BLAST 结果吻合。

结合链霉菌 FSG-003 菌丝、菌落形态学特征及生理生化特征,符合链霉菌的属性,但与 *Streptomyces* sp. strain SN0280 不完全一致。

3 结论

本研究从佛手瓜中筛得一株链霉菌 FSG-003 为革兰氏阳性菌,生长缓慢,较硬、难以挑取,产生白色椭圆形孢子,菌丝发达无断隔,产生蓝色素;通过对菌种生理生化特性研究,链霉菌 FSG-003 在淀粉水解、牛奶陈化、纤维素生长、生成硫化氢、明胶液化试验表现为阳性,牛奶凝固试验表现为阴性。其生理生化特征试验结果,与花青蓝链霉菌十分接近;完

表 6 链霉菌 FSG-003 的 16S rDNA 序列
Table 6 The 16S rDNA sequence of strain FSG-003

序列编号 Serial No.	菌株序列 Strain sequence
1-50	TCGAACGATGAAGCCGCTTCGGTGGTATTAGTGGCGAACGGCTGAGTA
51-100	ACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGAAAACGGGGT
101-150	CTAATACCGGATATGACCTGCTGAGGCATCTTACCGGCTGAAAAGCTCCG
151-200	GCGGTGCAGGATGAGCCCGGCCATATCAGCTTGTGGTGGGGTGATGCC
201-250	CTACCAAGCGCAGCAGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGCCACACT
251-300	GGGACTGAGACACGGCCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATAT
301-350	TGCACAATGGGGCAAGCCCTGATGCAGGACGCCCGCTGAGGGATGACGG
351-400	CCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGCAAGTGACGGTA
401-450	CCTGCAGAAGAAGCGCCGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACG
451-500	TAGGCCCGGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCC
501-550	GCTTGTCCGCTCGGATGTGAAAGCCCGGGCTTAACCCCGGCTCTGCATT
551-600	CGATACGGCAGGCTAGAGTTCCGTTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGT
601-650	GCGGTGAAATGCCGAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGCGGGATC
651-700	TCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCCGTGGGGAGCGAACAGGA
701-750	TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGTTGGAACTAGGTGTGGGC
751-800	GACATTCCACGTTGTCCGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTTCCCCCGCTG
801-850	GGGAGTACGGCCCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCA
851-900	CAAGCGGGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACCGGAAGAACCTTACC
901-950	AAGGCTTGACATACATCGGAAACATCCAGAGATGGGTGCCCCCTTGTGGT
951-1 000	CGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCCTGTCTGAGATGTTC
1 001-1 050	GGTTAACTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCTGTGTGCCAGCATGCC
1 051-1 100	CTTCGGGGTGATGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGTCAAACCTGGAGGA
1 101-1 150	AGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGCTTGGGCTGCACA
1 151-1 200	CGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCCGATACCGCGAGGTGGAGCGA
1 201-1 250	ATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCA
1 251-1 300	TGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATAC
1 301-1 350	GTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACGTCACGAAAAGTCGGTAACA
1 351-1 372	CCCGAAGCCGGTGGCCCAACCC

表 7 链霉菌 FSG-003 16S rDNA 序列 BLAST 的结果
Table 7 The 16S rDNA sequence BLAST of strain FSG-003

序号 Serial No.	菌株 Strain	相似度 Similarity	登录号 Login ID
1	<i>Streptomyces</i> sp. strain SN0280	99%	KX982505.1
2	<i>Streptomyces</i> sp. FXJ1.264	99%	HQ537067.1
3	<i>Streptomyces</i> sp. Spr07_1	99%	LC373196.1
4	<i>Streptomyces</i> sp. S85	99%	KF772647.1
5	<i>Streptomyces ribosidificus</i> gene, strain: NBRC 13796	99%	AB184487.1
6	<i>Streptomyces cuspidosporus</i> gene, strain: NBRC 12379	99%	AB184091.1
7	<i>Streptomyces cuspidosporus</i> strain NBRC 12378	99%	NR_041059.1
8	<i>Streptomyces cuspidosporus</i> strain IFO 12378	99%	NR_115278.1
9	<i>Streptomyces sparsogenes</i> strain 2539	99%	JN180218.1
10	<i>Streptomyces cuspidosporus</i> strain 14441	99%	EF371439.1
11	<i>Streptomyces cuspidosporus</i> strain B200	99%	DQ462661.1
12	<i>Streptomyces sparsogenes</i> strain NBRC 13086	99%	NR_041111.1
13	<i>Streptomyces</i> sp. Spr07_2	99%	LC373197.1
14	<i>Streptomyces</i> sp. RAI 364	99%	LC057380.1
15	<i>Streptomyces huangiae</i> strain NRRL 8180	99%	EU170122.1
16	<i>Streptomyces</i> sp. 172633	99%	HQ992750.1
17	<i>Streptomyces</i> sp. FXJ1.068	99%	HQ537069.1
18	<i>Streptomyces</i> sp. FXJ1.121	99%	HQ596490.1
19	<i>Streptomyces zihengliuui</i> strain NRRL 11180	99%	EU170125.1
20	<i>Streptomyces</i> sp. 1A01554	99%	F012088.1
21	<i>Streptomyces</i> sp. strain MJM15682	99%	MF344802.1
22	<i>Streptomyces</i> sp. YIM 30823	99%	AY237555.1
23	<i>Streptomyces</i> sp. strain NBS_14-10	99%	EU170122.1
24	<i>Actinomycete</i> LQ141	99%	JQ638425.1
25	<i>Streptomyces aldersoniae</i> strain NRRL 18513	99%	NR_116223.1

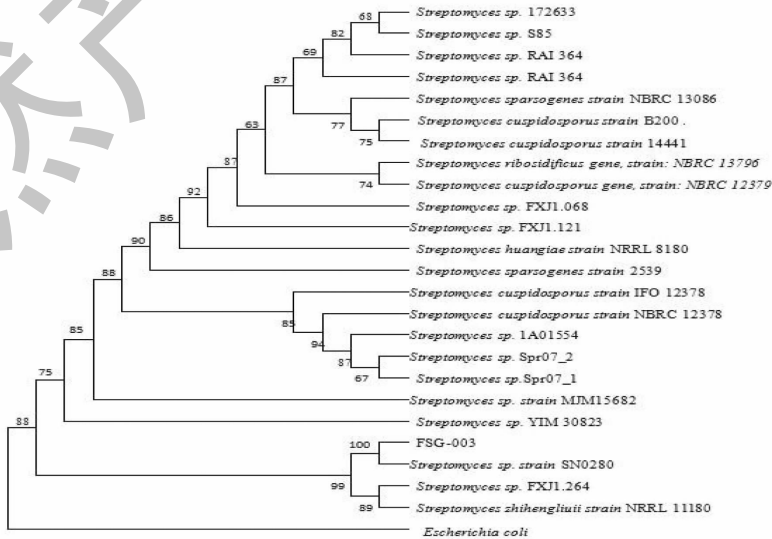


图 6 基于 16S rDNA 基因序列构建的链霉菌 FSG-003 与相近种之间的系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree between *actinomycetes* FSG-003 and similar species based on 16S rDNA gene sequence

成了链霉菌 FSG-003 16S rDNA 基因测序,利用 MEGA 7.0 进行系统发育分析,发现与链霉菌 FSG-003 与 *Streptomyces* sp. strain SN0280 处于同一分枝,亲源关系最近;拮抗实验表明,链霉菌 FSG-003 肺炎双球菌、金黄色葡萄球菌、枯草杆菌和绿脓杆菌有良好的抑菌效果,链霉菌 HT-003 具有抑菌活性。

参考文献

- Doellinger J, Schroeder K, Witt N, et al. Comparison of real-time PCR and MassTag PCR for the multiplex detection of highly pathogenic agents [J]. *Mol Ce Pro*, 2012, 26: 177-181.
- Praveen P, Kumar R, Sagaya JP, et al. Optimization of biosynthesis parameters, partial purification and characterization of extracellular lipase from soil derived *Streptomyces* sp. *Loyola Lipase-1* [J]. *Bioc Agr Biot*, 2017, 12: 241-247
- Bian LH, Lang YJ. Application of PCR-SSCP technology in microorganism detection [J]. *Ad Mat Res*, 2014: 716-719.
- Bai L, Liu C, Guo L, et al. *Streptomyces formicae* sp. nov. a novel actinomycete isolated from the head of *Camponotus japonicus* Mayr [J]. *Ant Va Lee*, 2016, 109: 253-261.
- Zamfir O, Yera H, Bourcier T, et al. Diagnostic par PCR des k ratites   *Acanthamoeba* spp. [J]. *J Fra Dop*, 2006, 29: 1034-1040.
- Chen HY. Study on real-time quantitative immunoassay for detection of polychlorinated biphenyl environmental hormones [D]. Shanghai: Donghua University(东华大学), 2009.
- Liu L H. Classification and identification of 26 strains of marine actinomycetes with cytotoxic activity [D]. Guangzhou: South China Agriculture University(华南农业大学), 2006.
- Hastuti RD, Lestari Y, Suwanto A, et al. Endophytic *Streptomyces* spp. as *Biocontrol Agents of Rice Bacterial Leaf Blight Pathogen(Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae)* [J]. *Hay Jou Bios*, 2012, 19: 155-162.
- Guo JB. Application of heat treatment and ionic liquid extraction in food processing and analysis [D]. Linfen: Shanxi Normal University(山西师范大学), 2017.
- Li Y, Li L, Jiang P. Screening and preliminary identification of a strain producing blue pigment [J]. *Brewing*, 2016, 43 (2): 68-71.
- Zuo Y, Jiang P, Ye BX et al. Optimization of fermentation conditions for a strain of *Streptomyces pallidum* [J]. *Jia Agr Sci(江苏农业科学)*, 2016, 44: 455-458.
- Wu H, Che MN et al. Comparison of high temperature ashing method and wet digestion method for detecting a heavy metal residue in blue pigment [J]. *J Northwest Univ(西北民族大学学报)*, 2017, 38(3): 57-61
- Liu J, Ou YJ. A Review of two-dimensional electrophoresis detection technology [J]. *J Cap Nor Univ: Nat Sci(首都师范大学学报: 自科版)*, 2007, 6: 42-46.
- Wang XQ, Duan XM, Liu LH, et al. Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester fluorescent dye for cell labeling. [J]. *Act Bio Biop Sin*, 2005, 37: 379-385
- Amini J, Agapoor Z, Ashengroph M. Evaluation of *Streptomyces* spp. against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* for the management of chickpea wilt [J]. *J Plant Prot Res*, 2016, 56: 257-264
- Pereira PN, Inokoshi S, Yamada T, et al. Microhardness of *in vitro* caries inhibition zone adjacent to conventional and resin-modified glass ionomer cements [J]. *Dent Mater*, 1998, 14: 179-185
- Hu JL. Study on the diversity of cultivable actinomycetes in saline soil in winter in Shule River Basin [D]. Lanzhou: Northwest Normal University(西北师范大学), 2014.
- Kumar SK. *In vitro* activity of 5-(2,4-dimethylbenzyl) pyrrolidin-2-one extracted from marine *Streptomyces* VITSVK5 spp. against fungal and bacterial human pathogens [J]. *Rev Ibe Mic*, 2012, 29(1): 29-33
- Dai Y, Wang JH. et al. Advances in the application of antagonistic yeast composite preservation technology in fruit and vegetable preservation [J]. *J Food Saf Qual(食品安全质量检学报)*, 2015, 6: 742-746.
- Ates A, Ozcan K, Ilkit M. Diagnostic value of morphological, physiological and biochemical tests in distinguishing *Trichophyton rubrum* from *Trichophyton mentagrophytes* complex [J]. *Med Myc*, 2008, 46: 811-822.

(上接第 208 页)

- Liu YJ, et al. Nematicidal activity of *Paecilomyces* spp. and isolation of a novel active compound [J]. *J Microbiol*, 2009, 47: 248-252.
- Khambay BPS, et al. A nematicidal metabolite from *Verticillium chlamyosporium* [J]. *Pest Manag Sci*, 2000, 56: 1098-1099.
- Liu JH, et al. Nematicidal activity of *Gymnoascus reesii* against *Meloidogyne incognita* [J]. *Afr J Microbiol Res*, 2011, 5: 2715-2719.
- Kimura Y, et al. Nematicidal activity of 5-hydroxymethyl-2-furoic acid against plant-parasitic nematodes [J]. *Z Naturforsch C*, 2007, 62: 234-238.
- Pandit R, et al. RNA-Seq reveals the molecular mechanism of trapping and killing of root-knot nematodes by nematode-trapping fungi [J]. *World J Microb Biot*, 2017, 33(4): 65.
- Yao T. A preliminary study on nematode-eating paecilomyces and its related species [D]. Gzu, 2006.