

红树林内生真菌的分离及 代谢产物生物活性的初步研究*

邓祖军^{1,2}, 曹理想², 周世宁²

(1. 广东药学院基础学院, 广东 广州 510006;
2. 中山大学生命科学学院//有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广东 广州 510275)

摘要: 从8种红树林植物中共分离出85株内生真菌, 经鉴定发现其主要类群为无孢类群(Mycelia sterilia), 短梗霉属 *Aureobasidium* spp. 和盘长孢属 *Gloeosporium* spp., 分别占菌株总数的50.6%、18.0%、14.6%。对这85株内生真菌的代谢产物生物活性研究发现: 其菌丝和发酵液提取物对试验细菌表现出较好的抗性: 对大肠杆菌有抗性的菌株比例分别为22.4%、21.2%、金黄色葡萄球菌为12.9%、14.1%, 枯草芽孢杆菌为20.0%、36.5%; 其发酵液提取物对酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、白色念珠菌 *Candida albicans*、新月弯孢霉 *Curvularia lunata* 等试验真菌均有较好的抗性, 抗性菌株占菌株总数的比例分别为25.9%、23.5%、28.2%, 而菌丝提取物均未表现出抗性; 有8株(占菌株总数的9.0%)可产生抑制小麦发芽和芽生长的代谢物, 具有除草剂活性; 通过本实验建立的全细胞定向筛选模型发现: 有14个菌株的代谢产物对耐药性大肠杆菌具有拮抗活性, 占菌株总数的16.5%。以上结果表明: 红树林内生真菌蕴含丰富的生物活性物质, 在新型药物先导物和除草剂的开发方面都表现出潜在的应用前景。

关键词: 红树林; 内生真菌; 代谢产物; 生物活性

中图分类号: Q939.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579(2010)02-0100-05

Isolation and Metabolite Bioactivities of Mangrove Fungal Endophytes

DENG Zujun^{1,2}, CAO Lixiang², ZHOU Shining²

(1. School of Basic Courses, Guang Dong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;
2. School of Life Sciences//State Key Laboratory of Biocontrol,
Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Eighty-five endophytic fungi strains were isolated from eight kinds of mangrove plants. The main taxa are mycelia sterilia, *Aureobasidium* spp. and *Gloeosporium* spp., accounting for 18.0%, 14.6% of the total strains respectively. Their metabolite bioactivities were primarily studied. Results indicated that the extract of hypha and fermentation liquor have good inhibition activity to test bacteria, the active strains proportion to *Escherichia coli* is 22.4%, 21.2% respectively, to *Staphylococcus aureus* is 12.9%, 14.1%, to *Bacillus subtilis* is 20.0%, 36.5%; fermentation liquor also has good inhibition activity to *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Curvularia lunata*, accounting for 25.9%, 23.5%, 28.2% of the total strains respectively, but their hypha extract has no inhibition activity to test fungi. Metabolites of eight strains (occupying 9.0% of the total strains) can inhibit germination and bud growth of wheat and have herbicidal activity. Metabolites of fourteen strains (occupying 16.5% of the total strains) can inhibit antibiotic-resistance *E. coli* by whole-cell targeted screening model. These results showed mangrove fungal endophytes would be a rich resource pool for new drug and herbicide.

Key words: mangrove plants; fungal endophytes; metabolites; bioactivity

* 收稿日期: 2009-03-17

基金项目: 国家高科技研究与发展(863)基金资助项目(2007AA09Z448, 2008AA09Z402)

作者简介: 邓祖军(1979年生), 男, 讲师; 通讯作者: 周世宁; E-mail: sszsl@mail.sysu.edu.cn

内生真菌 (endophyte) 指生活于健康植物组织内部、不引发植物产生明显病症的一类真菌。这类真菌在全部或部分生活周期生活在植物体内, 与植物形成互惠共生的关系: 一方面, 植物为内生真菌提供光合产物和矿物质; 另一方面, 内生真菌产生的代谢物, 或能刺激植物的生长发育, 或能提高宿主植物对生物胁迫或非生物胁迫的抵抗能力^[1-2]。关于内生真菌代谢产物生物活性的研究已成为微生物资源开发的一个热点, 目前已从植物内生真菌中发现多种具有抗肿瘤、抗病毒、降血糖、抗菌、杀虫、免疫抑制、酶抑制剂或激活剂等活性代谢产物, 在医药业、农业的生物防治方面都显示出重要的应用价值^[2-6]。

红树林作为自然生长在热带和亚热带海湾河口潮间带的一种特殊的木本植物群落, 一直处于高盐、频繁的潮汐、强风、高温、强紫外辐射和缺氧污泥的特殊环境^[7]。这类植物不仅在自然生态平衡中起着特殊的作用, 而且其化学成分也具有广泛的药理活性^[8-9]。由于红树林生境独特且具有广泛的药理活性, 其内生菌可能蕴含着生物活性多样, 结构新颖的代谢物, 因而红树林内生真菌引起了人们的广泛关注。近年来关于红树林内生真菌类群和代谢产物的抗肿瘤活性及抗氧化活性^[10-11], 抑制乙酰胆碱酯酶活性研究已报道^[1,12-14], 但对其抗菌活性, 特别是对耐药菌的抑制活性和除草剂活性的研究很少有报道。本研究对深圳福田红树林自然保护区的 8 种红树林植物的内生真菌进行了较为系统的分离和类群分析, 并对分离到的内生真菌进行体外抗菌活性, 除草剂活性的筛选, 同时使用本实验建立的全细胞定向筛选模型对红树林内生真菌拮抗耐药菌的活性进行了研究, 以期为保护红树林资源、开发新型药物先导化合物和除草剂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物来源 桐花树 *Aegiceras corniculatum*、海漆 *Excoecaria agallocha*、秋茄 *Kandelia candel*、木榄 *Bruguiera gymnorhiza*、白骨壤 *Avicennia mariana*、银叶树 *Heritiera littoralis*、老鼠簕 *Acanthus ilicifolius*、无瓣海桑 *Sonneratia acida* 采集于深圳福田红树林保护区。红树植物采集叶、根皮、气根、茎皮。样品采集后放于冰盒中保存, 在 4 h 内处理样品。

1.1.2 培养基 ①PDA 培养基: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 15 g, $w = 50\%$ 人工海水 1 000 mL。②玉米培养基 (供发酵用): 黄玉米粉 50 g, 蔗糖

10 克, 酵母粉 1.0 g, 水 1 000 mL。③促孢培养基: KH_2PO_4 1.0 g, KNO_3 1.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, KCl 0.5 g, 淀粉 0.2 g, 葡萄糖 0.2 g, 蔗糖 0.2 g, 琼脂 15 g, 水 1 000 mL。

1.1.3 试验菌及来源 金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* NICPBP 26112, 屎肠球菌 *Enterococcus faecium* NICPBP 32223, 铜绿色假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* NICPBP 10104, 白色念珠菌 *Candida albicans* ATCC 10231, 酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* MIG2.34, 大肠杆菌 *Escherichia coli* ATCC 8739, 枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* MIG1.22 购自广东省微生物研究所或中国药品生物制品检定所。*E. coli* DH5 α 和卡那霉素抗性 *E. coli* M15 (pREP4) 均为中山大学生科院有害生物控制与资源利用国家重点实验室惠赠; pBR322 质粒 (AprTcr) 购自华美公司, 新月弯孢霉 *Curvularia lunata* 为本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 内生真菌的分离 参考文献 [2] 中方法对红树林内生真菌进行分离和纯化。

1.2.2 表面消毒效果检查 参考文献 [15] 方法观察表面消毒效果。

1.2.3 内生真菌的鉴定 使用 PDA 培养基, 采用载玻片法培养内生真菌, 根据《真菌鉴定手册》^[16] 中描述的真菌形态特征进行鉴定。不产孢子的菌株, 需使用促孢培养基或紫外线照射来诱导孢子的产生, 如还不产孢子将其归为无孢类群。

1.2.4 内生真菌代谢物的提取 每种活化后的内生真菌斜面培养物分别接种至 100 mL 玉米粉培养基, 室温静置培养 28 d 后, 用纱布过滤分开菌丝体与发酵液, 菌丝体用适量丙酮浸泡 (没过菌丝体) 抽提菌丝体代谢物, 将丙酮减压蒸干后, 用 2.0 mL 甲醇溶解代谢物; 发酵液用等体积乙酸乙酯萃取, 取乙酸乙酯层分别低温干燥后, 用 2.0 mL 甲醇溶解代谢物。

1.2.5 内生真菌代谢物抗细菌、抗真菌活性检测 采用滤纸片法进行抗菌活性检测: 活化后的大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌与青枯菌培养液用无菌水稀释至 10^{-4} , 取 0.1 mL 菌悬液 (约 10^5 cfu/mL) 涂布于 LB 平板上。用滤纸片 (直径 5 mm) 吸取内生真菌代谢物粗提物溶液, 放置于平板上, 37 °C 培养 1~2 d, 观察抑菌圈的大小及有无。白假丝酵母菌除取 10^{-3} 稀释液 200 μL 涂布 PDA 平板外, 其余均与细菌相同, 并用空白滤纸片吸取甲醇溶液作为空白对照; 将丝状病原真菌

接种于 PDA 培养基平板中央, 在病原菌周围放置用粗提物浸过的滤纸片, 培养 3~5 d 后观察病原菌菌落生长情况, 并用空白滤纸片吸取甲醇溶液作为空白对照。

1.2.6 除草剂活性检测 取 10 粒小麦或绿豆种子放于铺有吸水纸的培养皿中, 将 0.3 mL 提取液混入 5.0 mL 无菌水中, 滴加至种子周围吸水纸上, 0.3 mL 甲醇作为对照。26 °C 避光培养, 观察并记录发芽率及幼苗长度, 发芽率低于 50% 并且幼苗最长长度低于对照长度 50% 的记为有除草剂活性。

1.2.7 全细胞定向筛选耐药菌耐药酶抑制物的筛选模型 按照《分子克隆》介绍的方法, 用 pBR322 质粒转化 *E. coli* DH5 α , 转化子具有在含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素或 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 盐酸四环素的 LB 平板上生长的能力。将 *E. coli* DH5 α (Apr^rTc^r)、*E. coli* M15 (Km^r) 分别相应涂布于含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 盐酸四环素或 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硫酸卡那霉素的 LB 平板上, 另用野生型大肠杆菌涂布于不含抗生素的该型平板上, 用滤纸片吸取提取液放于含菌平板表面, 26 °C 培养, 若出现下表中的情况表明可能含有对大肠杆菌耐药酶基因表达或酶活性有抑制作用的代谢产物 (表 1)。

表 1 筛选中可能出现的情况与酶活的关系¹⁾

Table 1 The supposed results of target-specific screening *E. coli* strains.

<i>E. coli</i> DH5 α		<i>E. coli</i> M15		<i>E. coli</i>	可能作用基因或酶
Ap ^r	Tc ^r	Km ^r			
+	—	—	—	—	β -内酰胺酶
—	+	—	—	—	四环素外运蛋白
—	—	+	—	—	抗生素修饰酶

1) “+”表示有抑菌活性; “—”表示无抑菌活性

2 结果

2.1 红树林植物内生真菌类群分布

从红树林植物海漆、桐花树、秋茄、木榄、老鼠簕、银叶树、白骨壤、无瓣海桑中分离出 85 株内生真菌。经鉴定发现其主要类群为: 无孢类群 (占 50.6%)、短梗霉属 (占 18.0%) 和盘长孢属 (占 14.6%)。另外还有少量的曲霉属 *Aspergillus* spp. (占 5.6%), 头孢霉属 *Cephalosporium* spp. (占 5.6%) 和镰刀菌属 *Fusarium* spp. (占 3.3%) (表 2)。

表 2 红树林内生真菌的主要类群及所占比例

Table 2 Proportion of taxa of endophytic fungi isolated from mangrove plants.

主要类群	所占比例/%
短梗霉属 <i>Aureobasidium</i>	18.0
盘长孢属 <i>Gloeosporium</i>	14.6
曲霉属 <i>Aspergillus</i>	5.6
芽枝霉属 <i>Cladosporium</i>	1.1
头孢霉属 <i>Cephalosporium</i>	5.6
镰刀菌属 <i>Fusarium</i>	3.3
根霉属 <i>Rhizopus</i>	1.1
无孢类群 (sterile mycelium)	50.6

2.2 红树林植物内生真菌代谢物生物活性研究

2.2.1 内生真菌代谢物对细菌、真菌的拮抗活性 对分离到的 85 株内生真菌发酵后, 提取代谢物进行抗菌活性测定, 结果发现其菌丝和发酵液提取物对试验细菌都表现出较好的抗性: 对大肠杆菌有抗性的菌株比例分别为 22.4%, 21.2%、金黄色葡萄球菌为 12.9%, 14.1%, 枯草芽胞杆菌为 20.0%, 36.5%; 内生真菌发酵液提取物对酿酒酵母、白色念珠菌、新月弯孢霉等试验真菌均有较好的抗性, 抗性菌株比例分别为 25.9%, 23.5%, 28.2%, 而菌丝提取物均未表现出抗性 (表 3)。以上结果表明: 在真菌发酵液中具有抗真菌活性的菌株比例与抗细菌活性的菌株比例无明显区别, 但菌丝提取物中, 产生抗细菌代谢物的菌株比例明显高于具抗真菌活性的菌株比例。

表 3 红树林内生真菌代谢物对细菌、真菌的拮抗活性

Table 3 Proportion of endophytic fungi producing antimicrobial metabolites isolated from mangrove plants.

测试菌种	活性菌株比例/%	
	菌丝提取物	培养液提取物
细菌		
大肠杆菌	22.4	21.2
铜绿假单胞菌	2.4	8.2
金黄色葡萄球菌	12.9	14.1
枯草芽胞杆菌	20.0	36.5
屎肠球菌	1.2	8.2
真菌		
酿酒酵母	0	25.9
白色念珠菌	0	23.5
新月弯孢霉	0	28.2

2.2.2 内生真菌提取物对小麦幼苗的影响 筛选结果发现有 8 个菌株（占菌株总数的 9.0%）可产生抑制小麦幼苗生长的代谢物，具有除草剂活性（表 4）。其中 7 个菌株的除草剂活性物质存在于菌丝提取物中，仅有一个菌株（B82）的发酵液表现出除草剂活性。内生真菌的这个功能与其适应植物组织内的生活有关，内生真菌利用这个功能与植物组织的防御反应相平衡，当植物衰老或应激条件下，具有此活性的菌株可能发展为该宿主的条件致病菌。

表 4 红树林内生真菌提取物对小麦幼苗的影响
Table 4 Effect of mangrove endophytic fungal extracts on wheat seedlings

菌株编号	真菌种类	宿主植物	小麦幼苗生长抑制活性 ¹⁾	
			菌丝提取物	菌丝提取物
B41	盘长孢属	老鼠筋	++	-
B44	短梗霉属	老鼠筋	+	-
B49	无孢类群	银叶树	+	-
B50	无孢类群	白骨壤	+	-
B60	曲霉属	老鼠筋	++	-
B63	无孢类群	秋茄	+	-
B67	无孢类群	桐花树	+	-
B82	盘长孢属	白骨壤	-	+

1) “++”表示幼苗长度小于对照幼苗长度的 25%；“+”表示幼苗长度介于对照幼苗长度的 25%~50%；“-”表示无活性（与对照无区别）

2.2.3 内生真菌代谢物对耐药性大肠杆菌的作用及机制 内生真菌代谢物对耐药性大肠杆菌的拮抗实验表明：有 14 株内生真菌（占菌株总数的 16.5%）的代谢物对耐药性大肠杆菌显示拮抗活性；内生真菌 B2、B12、B20、B63 产生的代谢产物对耐氨苄青霉素、四环素的菌株有抑制作用，但对耐卡那霉素与对照菌株无活性（表 5）。由于氨苄青霉素、四环素抗性基因均位于同一质粒 pBR322 上，所以推测这些代谢物的作用机制是消除质粒 pBR322。B16 的代谢物对耐四环素活性、耐卡那霉素活性有影响，可能这两株真菌产生的代谢物影响到四环素外运蛋白与卡那霉素修饰酶的功能或消除 pREP4 质粒。B27、B39、B47、B49 的代谢物对耐氨苄青霉素活性、耐卡那霉素活性及对照菌株没有明显影响，仅对耐四环素活性有抑制作用，该代谢物影响到四环素外运蛋白的功能；同样原因，B27 的菌丝提取物中有影响耐卡那霉素活性的代谢物；B48 菌株对三种耐药活性均有影响但对

对照菌株无影响，因此该代谢物作用方式为消除两种耐药质粒；B20 的菌丝提取物仅对耐卡那霉素活性无影响，推测该物质被卡那霉素修饰酶失活，因而不具此活性的其他菌株有拮抗活性。从以上结果可以看出，一些红树林内生真菌可产生影响大肠杆菌耐药酶（基因）的物质，并且抗性机制多样。

表 5 红树林内生真菌代谢物对耐药性大肠杆菌的作用¹⁾

Table 5 Effect on antibiotic-resistant *E. coli* strains of mangrove endophytic fungal extracts

菌株编号	真菌种类	测试菌株				
		耐药菌株			<i>E. coli</i> ATCC8739	
		Tcr <i>E. coli</i> DH5 α	Apr <i>E. coli</i> DH5 α	Kmr <i>E. coli</i> M15	<i>E. coli</i> ATCC8739	
B2	无孢类群	+	+	-	-	
B12	无孢类群	+	+	-	-	
B16	无孢类群	+	-	+	-	
B20	无孢类群	+	+	-	-	
B27	无孢类群	+	-	-	-	
B37	无孢类群	+	-	-	-	
B39	无孢类群	+	-	-	-	
B47	无孢类群	+	-	-	-	
B48	无孢类群	+	+	+	-	
B49	无孢类群	+	-	-	-	
B63	无孢类群	+	+	-	-	
B20*	无孢类群	+	+	-	+	
B27*	无孢类群	-	-	+	-	

1) * 菌丝提取物；+ 显示抑菌活性；- 无抑菌活性

3 讨论

在目前耐药性菌株造成的感染日益严重的情况下，寻找新的抗生素资源十分必要。目前关于寻找新的抗生素的主要方法有两种：一种是建立新的筛选模型以在已知的资源库中筛选以前尚未发现的活性物质；另一种是寻找新的资源库。过去筛选产生抗菌物质微生物的重点一直是土壤微生物，特别是链霉菌。但自 20 世纪 60 年代以来，从链霉菌中被重复发现的抗生素高达 95%，筛选得到的有价值的抗生素比率逐年下降^[2]。于是人们将筛选抗菌物质的注意力逐渐集中于其他生态系统的微生物，尤其是那些特殊生境的微生物如海洋微生物、植物内生菌等^[17]。红树林内生真菌由于其特殊生境，同时具有海洋微生物和内生菌的特点，其代谢产物

已成为寻找新药源的重要资源库。我们的研究发现:红树林内生真菌的发酵液对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌,枯草芽胞杆菌,酿酒酵母、白色念珠菌、新月弯孢霉等试验菌均有较好的抗性,抗性菌株比例分别为21.2%,14.1%,36.5%,25.9%,23.5%,28.2%;16.5%菌株的代谢物对耐药性大肠杆菌显示较好的拮抗活性。这表明红树林内生真菌蕴含丰富多样的生物活性物质,值得深入研究和开发。红树林内生真菌发酵液提取物对试验真菌都有较好的抗性,而其菌丝提取物均未表现出抗性,菌株B20、B27的菌丝与培养液中代谢物的对耐药大肠杆菌的活性明显不同,这都表明红树林内生真菌功能具有多样性,在其活性产物筛选的时候值得注意。

本研究设计的氨基青霉素、卡那霉素、四环素抗性酶抑制剂筛选模型将传统的全细胞筛选与定向靶位点筛选方法的优点结合起来,可避免采用单一方法带来的缺点,同时,这三种抗生素抗性酶实际上代表了细菌耐药的三种机制:即抗生素水解酶、抗生素修饰酶与药物外运蛋白。在筛选出具有抑制耐药菌株的活性物质的同时,对其抑制的机制也能一目了然。并且我们的目标靶位点并不是正常情况下微生物生长所必需的酶而是在特殊情况下(有抗生素存在时)微生物生长所必需的酶,因此很可能筛选到以前被忽略的化合物。同时,对于病原菌来说,其毒力因子是病原菌进入并生活于宿主体内所必需的,如果以病原菌毒力因子作为靶位点,筛选到的抗生素将对自由生活的微生物影响较小,这种“定向”抗生素可影响侵入人体内的病原菌的生长,对于病原菌在其他环境中的生长则影响较少,因此可以缓解现在严重的耐药性问题^[18]。因此通过该模型筛选出来的抗性菌株在针对耐药性菌种的治疗具有良好和广泛的应用前景,目前正在对这些抗性菌株中具体的活性成分做进一步的研究。

参考文献:

- [1] 赵云涛,李倩茹,陈绍红,等. 红树林内生真菌的抗氧化作用[J]. 湛江海洋大学学报, 2005, 25(6): 93 - 96.
- [2] 邓祖军,曹理想,谭红铭,等. 红树林内生真菌抗细菌和抗真菌活性的初步研究[J]. 广东药学院学报, 2007, 23(5): 563 - 568.
- [3] 任安芝,高玉葆. 植物内生真菌 - 一类应用前景广阔

- 的资源微生物[J]. 微生物学通报, 2001, 28(6): 90 - 93.
- [4] STROBEL G A. Endophytes as sources of bioactive products [J]. Microbes and infection, 2003 (5): 535 - 544.
- [5] STROBEL G A, DAISY B, CASTILLO U, et al. Natural products from endophytic microorganisms [J]. J Nat Prod, 2004, 67: 257 - 268.
- [6] STROBEL G A, MILLER R V, MARTINEZ-MILLER C, et al. Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis cf. quercina* [J]. Microbiology, 1999, 145: 1919 - 1926.
- [7] 林鹏. 中国红树林研究进展[J]. 厦门大学学报:自然科学版, 2001, 40(2): 592 - 603.
- [8] 王友绍,何磊,王清吉,等. 药用红树植物的化学成分及其药理研究进展[J]. 中国海洋药物, 2004, 98(2): 26 - 31.
- [9] 赵亚,郭跃伟. 真红树林植物化学成分及生物活性研究概况[J]. 中国天然药物, 2004, 2(3): 135 - 140.
- [10] SARMA V V, HYDE K D, VITTAL B P R. Frequency of occurrence of mangrove fungi from the east coast of India [J]. Hydrobiologia, 2001, 455: 41 - 53.
- [11] ANANDA K, SRIDHAR K R. Diversity of endophytic fungi in the roots of mangrove species on the west coast of India [J]. Can J Microbiol, 2002, 48(10): 871 - 878.
- [12] 郑忠辉,缪莉,黄耀坚,等. 红树林内生真菌的抗肿瘤活性[J]. 厦门大学学报:自然科学版, 2003, 42(4): 513 - 516.
- [13] 吴雄宇,李曼玲,胡谷平,等. 南海红树林内生真菌2508代谢物研究[J]. 中山大学学报:自然科学版, 2002, 41(3): 34 - 36.
- [14] 罗景慧,杨迎暴,林永成,等. 中国南海海岸红树真菌 *Xylaria* sp. 代谢产物在体外对乙酰胆碱酯酶活性的影响[J]. 中药材, 2004, 27(4): 261 - 264.
- [15] CAO L X, YOU J L, ZHOU S N. Endophytic fungi from *Musa acuminata* leaves and roots in South China [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2002, 18: 169 - 171.
- [16] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1979: 5 - 201.
- [17] 林永成,周世宁. 海洋微生物及其代谢产物[M]. 北京:化学工业出版社, 2003: 49 - 427.
- [18] 曹理想. 植物体内与海洋环境微生物的类群和功能多样性研究[D]. 广州:中山大学生命科学学院, 2003: 22 - 62.