

海洋动物共附生放线菌分离及拮抗菌筛选

田云方, 傅泽钦, 叶莹莹* (浙江海洋大学海洋科学与技术学院国家海洋设施养殖工程中心, 浙江舟山 316022)

摘要 [目的]从舟山常见潮间带海洋动物中分离筛选得到具有产抗菌活性物质的共附生放线菌,采用不同方法测定其抗菌活性和抗菌谱,同时鉴定拮抗菌的分类地位,为研究海洋来源产抗菌物质的菌源提供基础资料。[方法]通过分离纯化技术,从舟山几个潮间带海洋动物中获得放线菌菌株。点种法初筛后获得对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)有一定抑菌作用的菌株;酶标仪法定量测定抑菌活性;滤纸片扩散法复筛获得高效拮抗菌株;采用大肠杆菌(*Escherichia coli*)、白色念珠菌(*Monilia albican*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)作为指示菌测定其抗菌谱。[结果]对典型菌株 GP57 和 GT16 进行生理生化、形态学观察及 16S rDNA 分子鉴定,其均为链霉菌属(*Streptomyces*),相似度分别为 99% 和 100%,其中 GT16 鉴定为灰平链霉菌(*Streptomyces griseoplanus*)。[结论]海洋共附生微生物中,海洋放线菌可能是一类很好的产抗菌活性物的菌源,值得更进一步的研究。

关键词 潮间带;海洋动物;共附生微生物;抗菌活性;筛选

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)21-0001-04

Separation of Marine Actinomycetes and Screening of Antagonistic Bacteria

TIAN Yun-fang, FU Ze-qin, YE Ying-ying (National Engineering Research Center for Marine Aquaculture, Marine Science and Technology College, Zhejiang Ocean University, Zhoushan, Zhejiang 316022)

Abstract [Objective] Symbiotic or epiphytic actinomycetes with antibacterial active substances were isolated and screened from common intertidal zone marine animals in Zhoushan. Different methods were used for determining the antimicrobial activity and antimicrobial spectrum, the classification status of antagonistic bacteria was also identified for providing basic data for studying the source of marine antibacterial substances. [Method] Through separation and purification technology, strains were obtained from several intertidal zone marine animals in Zhoushan. Strains with certain bacteriostatic effects on *Staphylococcus aureus* were obtained after initial screening by spot inoculation. Antimicrobial activity was quantitatively determined by enzyme assay. The high-efficiency antagonistic bacteria strains were obtained by filter paper diffusion method. *Escherichia coli*, *Monilia albican* and *Bacillus subtilis* were used as indicators to determine their antimicrobial spectrum. [Result] The typical strains GP57 and GT16 were identified by physiological, morphological and 16S rDNA molecular identification. All of them were *Streptomyces* with a similarity of 99% and 100% respectively, GT16 was identified as a *Streptomyces griseoplanus*. [Conclusion] Among marine symbiotic or epiphytic microbes, marine actinomycetes may be a very good source of bacteria producing antibacterial actives and deserve further study.

Key words Intertidal zone; Marine animals; Symbiotic or epiphytic microbe; Antimicrobial activity; Screening

海洋放线菌生活在海洋极端环境中,其特殊的产生抗菌活性物质的能力以及代谢途径,有助于其在极端环境中生存下来,也为人们提供大量新的天然来源抗生素。海洋环境是放线菌产次生代谢物的重要来源^[1]。海洋微生物的多样性依赖于海洋环境的独特性,有的在海水里自由生活,有的在海底沉淀物或海泥的表面依附着,还有一部分与海洋环境中的动植物处于共生、共栖、寄生或附生的关系,此类微生物称为共附生微生物^[2]。共附生指的是 2 种或 2 种以上生物在空间上紧密生活在一起,包括共生和附生 2 种。这些类型的共附生微生物很多栖息于海洋无脊椎动物的组织细胞内和组织细胞外,数量非常大。至今发现海洋无脊椎动物和藻类能和许多细菌、放线菌、真菌等共附生,且很多具有产生生物活性的次级代谢产物^[3-5]的能力。海洋共附生微生物是海洋微生物的重要类群,具有产生生物活性物质的巨大潜力^[6]。

近年来,人们对海绵、珊瑚等海洋环境动植物共附生微生物的研究颇多,研究表明这些动植物所携带的微生物种类最多,其微生物代谢产生的活性物质也成为众多科学家研究的热点。目前已从海洋共附生微生物中分离到多种具有较强生物活性的物质,包括维生素、毒素、抗生素、不饱和脂肪酸、酶类及酶抑制剂、抗肿瘤活性物质、色素等。这些天然活

性物质具有高效、副作用少、易被人体吸收等特性。此外,从微生物中提取到的代谢活性物质,相较于动植物,来源更广,且生产过程简单,不仅不会破坏生态环境,而且易于工业化生产。

目前发现的一些海洋生物活性物质就是由与动植物宿主共生的微生物所产生的^[7-10]。共附生微生物的组成和生物活性不仅与宿主有关,而且与其所处的地理环境有密切关系,但目前从地理环境角度研究其对微生物分布与生物活性等方面影响的报道甚少^[2]。越来越多的研究表明:海洋放线菌具有产生各种各样特殊的生物活性代谢物和酶的潜力,而这些具有很大的科学研究和实际应用的意义。伴随着分子生物学方法的广泛兴起和应用,新的培养策略和培养手段不断发展,生物、化学、制药等相互交叉和渗透学科的发展,为海洋放线菌产生的活性代谢产物的研究和开发提供了强有力的技术支持。由于目前对海洋放线菌的采集和培养仍存在很多技术上的困难,因此仍然有很大数量的海洋放线菌未能培养利用。笔者以舟山等地潮间带海洋动物为研究对象,采用不同培养基分离纯化筛选得到 152 株具有抗菌活性的菌株,获得具有高效抑菌活性的菌株,最后分子鉴定有抑菌作用的菌株,以期研究潮间带海洋动物共附生微生物提供基础。

1 材料及方法

1.1 材料

1.1.1 样品。四齿大额蟹(*Metopograpsus quadridentatus*)、近

作者简介 田云方(1990—),女,河南上蔡人,硕士研究生,研究方向:海洋生物学。*通讯作者,助理研究员,博士,从事分子遗传育种研究。

收稿日期 2018-04-02

江牡蛎 (*Ostrea rivularis* Gould)、褐菖鲉 (*Sebastiscus marmoratus*)、鳞笠藤壶 (*Tetracita squamosa*) 和日本菊花螺 (*Siphonaria japonica*), 均采集于舟山等地潮间带岩滩。

1.1.2 指示菌 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和白色念珠菌 (*Monilia albican*)。

1.2 培养基 放线菌分离培养基: 高氏一号改良培养基^[11]。

1.3 潮间带共附生微生物的分离纯化 样品匀浆处理, 梯度稀释, 用涂布法将稀释度为 $10^{-2} \sim 10^{-4}$ 的稀释液涂布于高氏一号改良培养基上, 重复 3 个平板, 30 ℃ 培养, 对菌株进行统计、编号, 利用平板划线分离法挑取单菌落, 多次划线分离纯化。设置 3 个对照组, 对照组培养基不涂布。

1.4 拮抗菌株的初筛 金黄色葡萄球菌作为指示菌, 用点种法对样品进行初筛。将分离纯化单菌株点种于混合指示菌的培养基上, 3 个平行。30 ℃ 培养, 3、5、7 d 各观察 1 次, 筛选有抑菌圈的菌株并进行保种。

1.5 酶标法定量测定 以 630 nm 处吸光度为 0.01 的金黄色葡萄球菌指示菌培养液为对照, 用酶标仪法^[12] 每隔 2 h 定量测定菌株的吸光度, 以得到菌株的抑菌效果。

1.6 抑菌圈测量 将复筛菌株发酵培养 6 d, 发酵液低速离心, 用滤纸片扩散法将发酵液和发酵上清液贴于金黄色葡萄球菌混匀板上, 3 个平行, 30 ℃ 培养, 测量并记录抑菌圈

大小。

1.7 高效抗菌活性菌株抗菌谱检测 以大肠杆菌、白色念珠菌和枯草芽孢杆菌为指示菌, 将待测菌株发酵液和发酵上清液用滤纸片扩散法和打孔法检测, 30 ℃ 培养, 观察记录。

1.8 抗菌活性菌株的鉴定

1.8.1 形态学观察。 根据《微生物学实验》^[13] 中的插片法和载片培养法观察 4 株高效拮抗菌株的菌丝、孢子丝和孢子形态特征, 并进行生理生化鉴定。

1.8.2 分子鉴定。 用 MP 试剂盒提取 4 株待测菌株总 DNA, 然后通过 16S rDNA 序列分析, 采用上游引物 341F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和下游引物 907r (5'-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3') 进行 PCR 扩增, 用感受态细胞连接、转化、挑克隆, 经质粒提取验证有正确外源插入片段的转化子, 以载体上的通用引物作为测序引物序列, 委托上海美吉生物测序。根据测序结果用 Blast 软件与 GenBank 数据库中的 16S rDNA 序列比对, 用 MEGA 5.0 软件进行序列分析并构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 涂布菌落生长状况 据观察, 高氏涂布情况良好, 虽然平板中有一些水蒸气影响了单菌落的生长, 导致大片菌落形成菌苔, 但菌落的总体生长情况较好, 便于挑选 (表 1)。

表 1 涂布培养基菌落生长情况
Table 1 Colony growth on coat culture medium

样品 Sample	稀释度 Dilution	菌落数 The number of colony//株		
近江牡蛎 <i>Ostrea rivularis</i> Gould	10^{-2}	8	26	8(+2 菌苔)
	10^{-3}	0	0	0
	10^{-4}	1	0	0
褐菖鲉 <i>Sebastiscus marmoratus</i>	10^{-2}	38(+14 菌苔)	38(+13 菌苔)	64(+13 菌苔)
	10^{-3}	2(+7 菌苔)	1	3
	10^{-4}	0	0	0
日本菊花螺 <i>Siphonaria japonica</i>	10^{-2}	52(+3 菌苔)	20(+9 菌苔)	39(+6 菌苔)
	10^{-3}	8	3	1
	10^{-4}	0	0	1
四齿大额蟹 <i>Metopograpsus quadridentatus</i>	10^{-2}	81(+14 菌苔)	103(+11 菌苔)	64(+13 菌苔)
	10^{-3}	58	24	31
	10^{-4}	1	0	0
鳞笠藤壶 <i>Tetracita squamosa</i>	10^{-2}	49(+15 菌苔)	24(+大片菌苔)	116(+10 菌苔)
	10^{-3}	10	13	5(+2 菌苔)
	10^{-4}	无 0	0	2
对照 Control			0	

注: 以肉眼可观察到的单株菌落为 1 株菌落
Note: A single colony observed with theeyes is one colony

2.2 分离菌株初步筛选及纯化培养 经分离纯化, 从样品中共获得海洋放线菌 152 株, 其中样品四齿大额蟹含有的放线菌数量最多 (77 株), 样品褐菖鲉和日本菊花螺中获得的放线菌相对较少, 近江牡蛎中获得的最少 (4 株)。将菌株进行标号, G 表示高氏一号改良培养基; P 表示四齿大额蟹; H 表示褐菖鲉; M 表示近江牡蛎; T 表示鳞笠藤壶; J 表示日本菊花螺, 数字代表菌株号。

2.3 酶标仪法对初筛菌株复筛 酶标仪法定量测定菌株在添加指示菌后生长一段时间的吸光度, 结果表明菌株吸光度

均在 0.2 左右, 具有较强的抑菌作用, 对金黄色葡萄球菌的生长有较强的抑制作用 (图 1)。经过筛选, 选出菌株 GY11、GP17、GM2、GY7、GP48、GP6、GP57、GP71、GT16 共 9 株吸光度在 0.1 左右的菌株。

2.4 复筛菌株抗菌活性检测 将复筛后的菌株用点种法接种于混匀指示菌的培养基上, 检测其抑菌圈直径, 结果表明其中 4 株均有较强的抑菌作用。测量发现 GY11 菌株抑菌圈直径为 (9.590 ± 0.001) mm, 其余 3 株放线菌均为 9 mm 以下, 不同菌株之间的抑菌效果不同 (图 2)。

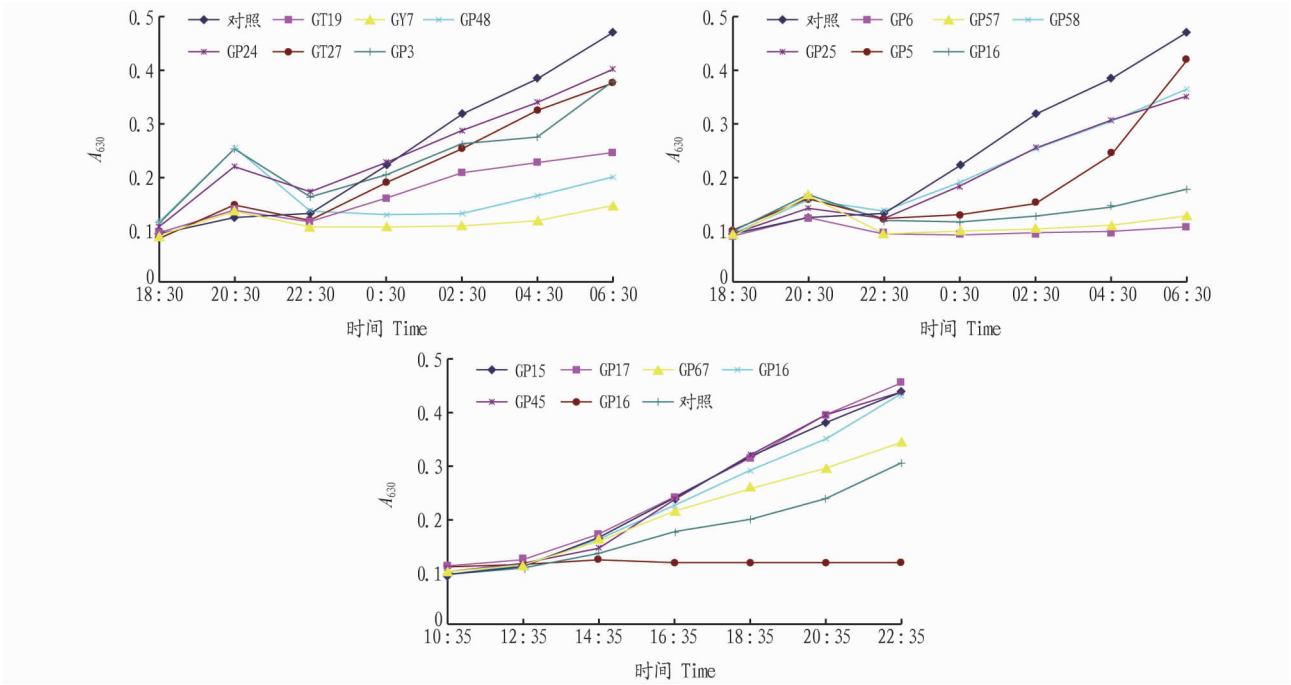


图 1 波长 630 nm 处菌株的吸光度

Fig.1 Absorbance of strains at the wavelength of 630 nm

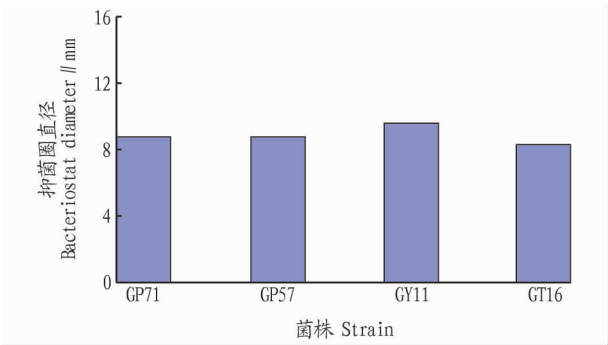


图 2 不同菌株对金黄色葡萄球菌的抑菌效果

Fig.2 The bacteriostatic effect of different strains on *Staphylococcus aureus*

2.5 拮抗菌抗菌谱测定 抗菌谱测定结果发现菌株 GP57 对 3 种指示菌均有抗性, 菌株 GP71、GT16 对白色念珠球菌和大肠杆菌具有抗性, GY11 对白色念珠球菌和枯草芽孢杆菌具有抗性(表 2)。

表 2 4 株共附生放线菌的抗菌活性

菌株 Strain	白色念珠球菌 <i>Monilia albican</i>	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>
GP71	++	+	-
GP57	+	++	+
GY11	+	-	++
GT16	+	++	-

注: +表示有抗性; ++表示有较强的抗性; -表示无抗性
Note: +indicated resistance; ++indicated strong resistance; -indicated no resistance

2.6 分类地位鉴定

2.6.1 菌株孢子鉴定。以 GP57 及 GT16 为例分析典型菌株

的孢子形态特征, 孢子形态呈链状(图 3)。

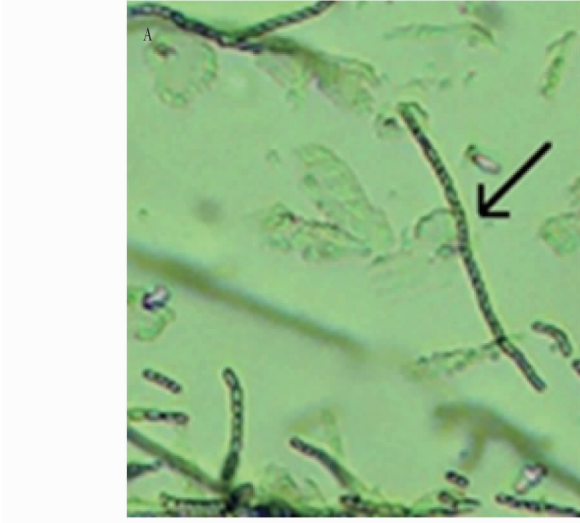


图 3 菌株孢子显微形态

Fig.3 Microscopic morphological characteristics of strains spore

2.6.2 生理生化鉴定。明胶液化: 4 株菌均能使明胶发生缓慢液化现象。

API 试验结果: API 试验中发现菌株 GT16、GY11 均能利用 19 种碳源, 碳源利用率较好。

显微下观察气生菌丝和基内菌丝形态及其颜色, 结果发现 4 株菌均显示典型的放线菌菌落特征(表 3)。

2.6.3 分子鉴定。根据系统发育树, GP57 和 GT16 均与链霉菌属同源性较高, 其中菌株 GT16 与灰平链霉菌同源性最为相近, 为 100%。因此, 将菌株 GT16 鉴定为灰平链霉菌(*Streptomyces griseoplanus*); 而菌株 GP57 游离于树外, 但距离较近, 结合形态学特征和生理生化结果, 鉴定为链霉菌属

(*Streptomyces*)。

表 3 4 株拮抗菌株的培养特征

菌株 Strain	菌落形态 Colonial morphology	气生菌丝 Aerial mycelium	基内菌丝 Substrate mycelium
GP71	干燥,边缘不规则	灰绿色,粉状	浅棕色
GP57	干燥,边缘不规则	白色,粉状	黄色
GY11	干燥,边缘不规则	白色	黄色
GT16	干燥,边缘不规则	白色	棕色

3 结论与讨论

笔者采集舟山岩滩潮间带上 5 种样品,分离纯化出 152 株菌株,试验样品全部来源于岩滩。在对宿主样品的选择上

可以更加丰富,不仅可在岩滩上采样,而且可在泥滩和沙滩上采样,以期获得更丰富的共附生微生物资源。

在筛选拮抗菌株的过程中运用点种法、滤纸片法和酶标法,发现相同菌株在不同筛选方法下所显示的抑菌作用不同,最后选出 9 株抑菌效果相对较好的菌株。而后用滤纸片法复筛时,原本有抑菌作用的菌株 GP48、GP16、GY7、GP6 和 GM2 没有抑菌圈产生,最终筛选出 4 株抑菌效果较好的菌株为目的菌株。近年来,朱林江等^[14]研究发现环境胁迫会诱导细胞发生适应性突变,如病原菌的抗药性、工业菌株的适应性和人体细胞的癌变等。因此,在对拮抗菌株进行筛选时,要采用不同的方法进行多次筛选,尽量减少 CO₂ 等对微生物的影响。

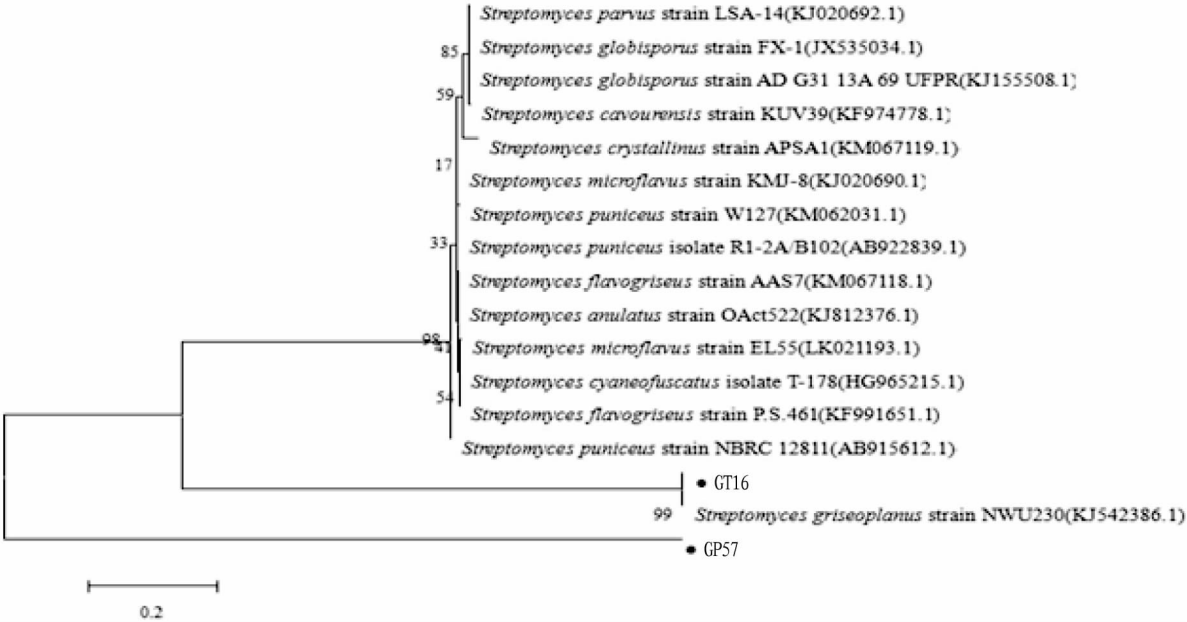


图 4 菌株系统发育树基于 16S rDNA 基因序列

Fig. 4 Phylogenetic analysis of *Streptomyces* based on the 16S rDNA gene sequences

试验发现不同菌株的抗菌谱是不同的,其中菌株 GP57 对白色念珠球菌、大肠杆菌和枯草芽孢杆菌都有一定的抗性;而 GY11 对白色念珠球菌和枯草芽孢杆菌有抗性;GP71 和 GT16 对白色念珠球菌和大肠杆菌有抗性,而对枯草芽孢杆菌无抗性。郑忠辉等^[15]早在 1998 年就提出微生物的抗菌活性表达与否与菌株的培养基成分和培养条件(如 pH、温度、盐度等)有关。所以猜测,菌株抗菌效果不同可能与培养条件也有一定关系。据报道,Taechowisan 等^[16]从姜中分离到内生放线菌,其中 3 种菌株能强烈抑制刺盘孢(*Colletotrichum musae*),5 种能够抑制尖芽孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*),而有 2 种能抑制这 2 种供试真菌。由此可以得出不同菌株的抗菌范围存在一定差异。

4 株菌菌落形态有所不同,但是不能简单地从菌落形态判断菌株的分类地位^[17]。经过形态学观察、生理生化鉴定和 16S rDNA 分子鉴定,确定菌株 GT16 为灰平链霉菌;菌株 GP57 为链霉菌属。Sun 等^[18]从海绵中分离得到多种共附生海洋放线菌,其中就包括链霉菌属。Nithyanand 等^[19-20]还从

珊瑚的黏液中分离到多种活性放线菌,包括短小杆菌属(*Curtobacterium*)、链霉菌属等。2010 年,Goodfellow 等^[21]统计了目前已从海洋环境中分离的放线菌有 50 个属,可见海洋放线菌是一类具有很大开发潜力的微生物资源。海洋共附生微生物中,海洋放线菌可能是一类很好的产抗菌活性物的菌源,值得更进一步的研究。

参考文献

[1] 蔡超靖. 海洋放线菌的研究概况[J]. 国外医药(抗生素分册),2011,32(5):219-222.
[2] 周颖. 共附生海洋微生物抗菌活性物质的研究[J]. 农机化研究,2008(2):227-230.
[3] HOLMSTRÖM C, KJELLEBERG S. Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents[J]. FEMS Microbiology Ecology, 1999,30(4):285-293.
[4] EL AMRAOUI B, EL AMRAOUI M, COHEN N, et al. Antifungal and antibacterial activity of marine microorganisms[J]. Annales pharmaceutiques francaises, 2014,72(2):107-111.
[5] SCOPEL M, DOS SANTOS O, FRASSON A P, et al. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of marine-associated fungi from the South Brazilian Coast[J]. Experimental parasitology, 2013,133(2):211-216.

(下转第 17 页)

表 2 正交试验设计及结果

Table 2 Orthogonal experiment design and result

序号 No.	马铃薯 Potato (A)	酵母粉 Yeast powder (B)	硫酸镁 Magnesium sulfate (C)	磷酸氢二钾 Dipotassium phosphate (D)	菌丝干重 Mycelial dry weight g/L
1	1	1	1	1	8.76
2	1	2	2	2	7.64
3	1	3	3	3	5.34
4	2	1	2	3	5.89
5	2	2	3	1	10.37
6	2	3	1	2	7.37
7	3	1	3	2	7.15
8	3	2	1	3	8.18
9	3	3	2	1	7.45
k ₁	7.247	7.267	8.103	8.860	
k ₂	7.877	8.730	6.993	7.387	
k ₃	7.593	6.720	7.620	6.470	
R	0.630	2.010	1.110	2.390	

3 结论

培养基的组成成分以及各成分的浓度是影响平菇菌丝转化率的重要因素,直接影响着菌丝干重的大小。该研究以平菇为试材,以菌丝干重为检测指标,通过对常用碳源、氮源进行筛选,确定了发酵培养基的最佳碳源和氮源,马铃薯淀粉为最佳碳源,酵母粉为最佳氮源,通过单因素试验和正交试验,研究了供试平菇菌株的最优发酵培养基配方:马铃薯淀粉 4%、酵母粉 0.100%、硫酸镁 0.15%、磷酸氢二钾 0.2%。该试验获得的培养基配方具有配制简单、产菌丝量多的优

点,可作为工厂化菌种生产的主要配方进行推广。

参考文献

[1] 盛春鸽,王延锋,潘春磊,等. 糙皮侧耳杂交后代遗传多样性分析[J]. 北方园艺,2015(4):149-151.

[2] 吴雪君,安琪,戴玉成. 糙皮侧耳(平菇)菌株 CCEF89 的生理生化研究[J]. 菌物学报,2015,34(4):621-631.

[3] 邹亚杰,张美敬,仇志恒,等. 侧耳属真菌菌经济利用的研究进展[J]. 菌物学报,2015,34(4):541-552.

[4] RADZKI W,ZIAJA-SOŁTYS M,NOWAK J,et al. Effect of processing on the content and biological activity of polysaccharides from *Pleurotus ostreatus* mushroom[J]. LWT-Food Science and Technology,2016,66:27-33.

[5] 刘焯潼,陈秋生,刘连强,等. 平菇对重金属铅和镉吸收富集规律研究[J]. 食品工业,2015,36(10):223-226.

[6] 许佳妮,张剑飞,袁娅,等. 不同培养基对平菇香气成分的影响[J]. 食品科学,2015,36(4):86-91.

[7] 刘西周. 一株野生灰树花菌丝体液体培养基正交方法筛选[J]. 北方园艺,2015(21):152-154.

[8] OOI V E C,LIU F. A review of pharmacological activities of mushroom polysaccharides[J]. International journal of medicinal mushrooms,1999,1(3):195-206.

[9] ZHANG J J,MENG G Y,ZHAI G Y,et al. Extraction,characterization and antioxidant activity of polysaccharides of spent mushroom compost of *Ganoderma lucidum* [J]. International journal of biological macromolecules,2016,82:432-439.

[10] 王永立,谷志想. 响应面分析法优化平菇液体菌种培养基的研究[J]. 周口师范学院学报,2015,32(5):129-133.

[11] 陈今朝,戴玄,谭永忠,等. 平菇液体种子培养基优化[J]. 江西农业大学学报,2008,30(5):915-918.

[12] 陆建明,张锡凤. 食用菌液体菌种制备的研究进展[J]. 中国食用菌,2003,22(6):15-17.

[13] 刘碧容,温海祥. 不同培养基对平菇菌丝体生长的影响研究[J]. 佛山科学技术学院学报(自然科学版),2006,24(1):74-76.

[14] 安琪,吴雪君,吴冰,等. 不同碳源和氮源对金针菇降解木质纤维素酶活性的影响[J]. 菌物学报,2015,34(4):761-771.

[15] 王琴,黄嘉玲,黎奋欣,等. 酵母抽提物的生产技术进展[J]. 现代食品科技,2013,29(7):1747-1750,1701.

(上接第 4 页)

[6] JARUCHOKTAWEECHAI C,SUWANBORIRUX K,TANASUPAWATT S, et al. New macrolactins from a marine *Bacillus* sp. Sc026[J]. J Nat Prod,2000,63(12):984-986.

[7] HEINDL H,WIESE J,THIEL V,et al. Phylogenetic diversity and antimicrobial activities of bryozoan-associated bacteria isolated from Mediterranean and Baltic Sea habitats[J]. Systematic and applied microbiology,2010,33(2):94-104.

[8] ROMANENKO L A,UCHINO M,KALINOVSKAYA N I,et al. Isolation phylogenetic analysis and screening of marine mollusc-associated bacteria for antimicrobial,hemolytic and surface activities[J]. Microbiological research,2008,163(3):633-644.

[9] SANTOS O C S,PONTES P V M L,SANTOS J F M,et al. Isolation,characterization and phylogeny of sponge-associated bacteria with antimicrobial activities from Brazil[J]. Research in microbiology,2010,161(7):604-612.

[10] 李越中,陈琦. 海洋微生物资源及其产生生物活性代谢产物的研究[J]. 生物工程进展,2000,20(5):28-31.

[11] 李影林. 培养基手册[M]. 长春:吉林科学技术出版社,1991:370.

[12] 孟庆龙,陈晓琳,张明. 一种使用酶标仪快速测定细菌素效价的方法[J]. 中国微生态学杂志,2009,21(8):685-687.

[13] 袁丽红. 微生物学实验[M]. 北京:化学工业出版社,2010:77-86.

[14] 朱林江,李崎. 环境胁迫诱导的细胞适应性突变[J]. 遗传,2014,36

(4):327-335.

[15] 郑忠辉,陈连兴,黄耀坚,等. 厦门海区潮间带海洋动植物共附生微生物的抗菌活性[J]. 台湾海峡,1998,17(4):439-444.

[16] TAECHOWISAN T,PEBERDY J F,LUNYONG S. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity[J]. World journal of microbiology and biotechnology,2003,19(4):381-385.

[17] BRASIER C M. Fungal species in practice:Identifying species units in fungi[M]//CLARIDGE M F,DAWAH H A,WILSON M R,et al. Species:The units of biodiversity. London:Chapman & Hall,1997:135.

[18] SUN W,DAI S K,JIANG S M,et al. Culture-dependent and culture-independent diversity of Actinobacteria associated with the marine sponge *Hymeniacidon perlele* from the South China Sea[J]. Antonie van leeuwenhoek,2010,98(1):65-75.

[19] NITHYANAND P,INDHUMATHI T,RAVI A V,et al. Culture independent characterization of bacteria associated with the mucus of the coral *Acropora digitifera* from the Gulf of Mannar[J]. World journal of microbiology and biotechnology,2011,27(6):1399-1406.

[20] NITHYANAND P,MANJU S,PANDIAN S K. Phylogenetic characterization of culturable Actinomycetes associated with the mucus of the coral *Acropora digitifera* from Gulf of Mannar[J]. FEMS Microbiology Letters,2011,314(2):112-118.

[21] GOODFELLOW M,FIEDLER H P. A guide to successful bioprospecting: Informed by actinobacterial systematics[J]. Antonie van leeuwenhoek,2010,98(2):119-142.