

高等农业院校教材

药用微生物资源研究技术

洪葵 谢晴宜等 编著

YAOYONGWEISHENGWU
ZIYUANYANJIUJISHU

中国农业大学出版社

高等农业院校教材

药用微生物资源研究技术

洪 葵 谢晴宜等 编著

中国农业大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

药用微生物资源研究技术/洪葵,谢晴宜等编著. —北京:中国农业大学出版社,2006.12

ISBN 7-81117-133-3

I. 药… II. ①洪… ②谢… III. 药理学;微生物学-资源-研究 IV. R915

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 143000 号

书 名 药用微生物资源研究技术

作 者 洪 葵 谢晴宜等 编著

策划编辑 潘晓丽 司建新

封面设计 郑 川

出版发行 中国农业大学出版社

社 址 北京市海淀区圆明园西路 2 号

电 话 发行部 010-62731190,2620

编辑部 010-62732617,2618

网 址 <http://www.cau.edu.cn/caup>

经 销 新华书店

印 刷 北京鑫丰华彩印有限公司

版 次 2006 年 12 月第 1 版 2006 年 12 月第 1 次印刷

规 格 787×1 092 16 开本 12.25 印张 299 千字

印 数 1~1 050

定 价 22.00 元

责任编辑 董 维

责任校对 王晓凤 陈 莹

邮政编码 100094

读者服务部 010-62732336

出 版 部 010-62733440

e-mail cbsszs @ cau.edu.cn

图书如有质量问题本社发行部负责调换

编著者名单

洪 葵 洪 亮 林海鹏 刘 颖

孙 倩 沈振国 谢晴宜 谢新强

解修超 阎 冰 庄 令 朱义明

内 容 简 介

近年来,药用微生物资源研究在技术上有了较大发展,本书根据国内外现状以及该领域教学与研发工作的需求,力求介绍最新的概念和技术,主要涉及:基于培养水平的微生物资源收集技术;基于非培养水平的微生物资源收集技术;生物信息学、生物芯片技术在药用微生物天然产物研发中的应用;微生物发酵产物的生物活性评价技术;微生物天然产物的分离纯化与鉴定技术等。主要实例和实验内容取材于红树林环境海洋微生物的资源收集与药用天然产物研究。

本书适合高等学校、科研单位和企业等从事药用微生物资源学习和研究的人员使用。

前 言

由于微生物具有种类和代谢方式多样、分布广泛的特点,微生物及其天然产物成为与人类生活和健康相关的重要资源。微生物天然产物包括微生物的初级和次级代谢产物,许多微生物天然产物如抗生素、氨基酸、有机酸、多不饱和脂肪酸等已被广泛应用。

现代药用微生物天然产物的研发与 20 世纪 40~60 年代抗生素研究的黄金时期相比,有以下特点:面对更多新的疾病以及药物抗药性与耐药性;新的分子生物学、生物信息学和各种仪器分析研究技术的应用;从以前被忽略的生态环境如海洋、极端环境、动植物共附生环境等收集微生物菌种;需要解决天然产物研究过程中的重现性问题等。

药用微生物天然产物主要是指由微生物合成的,有抗菌、抗肿瘤细胞等活性,具有药物开发前景的微生物次级代谢产物。药用微生物资源的研究与开发涉及微生物资源的收集,包括在培养和非培养水平上的菌种与基因的分离、鉴定与保存;生物活性评价;微生物发酵与产物分离纯化及鉴定等过程。通过这些过程获得有药物开发价值的菌种和药物先导化合物。

本书根据药用微生物天然产物研究的国内外现状以及该领域教学与研发工作的需求编写。主要涉及:基于培养水平的微生物资源收集技术;基于非培养水平的微生物资源收集技术;生物信息学、生物芯片技术在药用微生物天然产物研发中的应用;微生物发酵产物的生物活性评价技术;微生物天然产物的分离纯化与鉴定技术。主要实例和实验内容取材于红树林环境海洋微生物的资源收集与药用天然产物研究。

本书主要由从事海洋微生物资源收集与天然产物开发的研究人员和研究生等共同编写,是本课题组 5 年多工作的总结和思考,编者仍在学习,所以称为“试用版”,书中不成熟之处,欢迎读者批评指正。

编 者

2006 年 10 月于海口

目 录

第 1 章 现代药用微生物资源研究的技术 (绪论)	(1)
1.1 基于培养水平的药用微生物资源收集技术	(1)
1.2 基于非培养水平的药用微生物资源收集技术	(4)
1.3 生物信息学、芯片技术在药用微生物研发中的应用	(5)
1.4 微生物发酵产物的生物活性评价技术	(5)
1.5 微生物天然产物的分离纯化与鉴定技术	(6)
1.6 小结	(7)
参考文献	(7)
第 2 章 微生物菌株的分离	(9)
2.1 细菌的分离	(9)
2.2 放线菌的分离	(11)
2.3 真菌的分离	(15)
实验 2.1 红树林土壤中可培养细菌的分离	(17)
实验 2.2 红树林土壤中链霉菌的分离	(18)
实验 2.3 红树林土壤中稀有放线菌的分离	(20)
实验 2.4 红树林海洋真菌的分离	(22)
参考文献	(23)
第 3 章 微生物分类与鉴定	(26)
3.1 形态特征	(26)
3.2 生理生化特征	(30)
3.3 分子生物学特征	(34)
实验 3.1 埋片法观察放线菌个体形态特征	(37)
实验 3.2 载片培养法观察霉菌个体形态特征	(37)
实验 3.3 利用 BIOLOG 自动化鉴定系统测定微生物对碳源的利用	(39)
实验 3.4 16S rRNA 序列的获得及分析	(44)
实验 3.5 T_m 法测定(G+C)mol%	(47)
实验 3.6 微孔板 DNA 杂交	(48)
参考文献	(50)
第 4 章 微生物菌种保藏	(53)
4.1 斜面低温保藏法	(53)
4.2 干燥保藏法	(53)
4.3 液氮超低温保藏法	(57)
4.4 蒸馏水保藏法	(58)
4.5 甘油(或二甲基亚砷)保藏法	(58)

4.6 小结	(59)
参考文献	(50)

9.3 微生物天然产物合成相关功能基因注释及预测	(111)
9.4 新型抗生素的开发	(113)

第 1 章 现代药用微生物资源

加拿大药典 (2015)

1.1.2 稀有药用微生物的选择性分离培养技术

一些特殊种属的微生物被证明是大量各种药物化合物的主要来源,比如,在属于细菌的25个可培养的分类门中,只有5个门产生各种生物活性化合物,在这5个门中,单放线菌纲,更准确是放线菌目(俗称放线菌)就产生7 000多种化合物记录在天然产物词典中。即便是在这个目的140个属中,链霉菌这个属所产的天然化合物就占80%,许多人们生活中熟悉的抗生素如链霉素、红霉素、四环素等都是由链霉菌合成的。从表1.1中可以看出放线菌天然产物的发现及应用的数目远超过细菌和真菌。20世纪70年代后,从链霉菌中发现新结构化合物的几率越来越低,而且重现率很高。从小单孢菌中发现庆大霉素等抗生素后,链霉菌以外的其他放线菌,比如小单孢菌、马杜拉菌、游动放线菌、诺卡氏菌、糖多孢菌等生长缓慢、生理特性了解不多,获得的种类少的放线菌(俗称稀有放线菌)被日益关注。从这些菌种中开发了许多新结构的化合物,比如抗耐药性金黄色葡萄球菌感染的万古霉素等。表1.2中列出了一些重要的稀有放线菌产生的活性物质数目。我们看到链霉菌产最多的生物活性物质,其次是小单孢菌、诺卡氏菌、马杜拉放线菌等,这些除链霉菌以外的放线菌虽然在表中活性物质远远少于链霉菌,但它同时也展示了我们一个发现和利用这些稀有放线菌的空间。这些少的数量并不表示它们的能力弱,而是我们得到的菌株还很少,所以称为“稀有”。在某种意义上这些也属于未培养微生物,若我们能够设计让更多这类放线菌培养出来的条件,它们就不会再被称为“稀有”。

表 1.2 一些工业上重要的稀有放线菌产生的生物活性物质

<i>Streptomyces</i>	8 346	<i>Microbispora</i>	54
<i>Micromonospora</i>	740	<i>Actinosynnema</i>	51
<i>Nocardia</i>	357	<i>Streptoalloteichus</i>	48
<i>Actinomadura</i>	345	<i>Nocardopsis</i>	41
<i>Actinoplanes</i>	248	<i>Kitasatospora</i>	37
<i>Saccharopolyspora</i>	131	<i>Kibdelosporangium</i>	34
<i>Saccharothrix</i>	68	<i>Amycolatopsis</i>	31
<i>Streptomyces</i>	8 346	<i>Microtetraspora</i>	26
<i>Micromonospora</i>	740	<i>Nonomuraea</i>	21
<i>Nocardia</i>	357	<i>Arthrobacter</i>	25

From Bérdy 2005 *Journal of Antibiotics*.

其他的稀有药用微生物还包括与动植物共附生的细菌和真菌,如从河豚鱼中分离的可产河豚毒素的细菌与从红豆杉中分离出的可产紫三醇的真菌,他们的稀有主要与生态环境有关。

对于稀有药用微生物的分离,除了采用选择性分离培养条件,比如对样品进行预处理,减少非目的菌;采用选择性培养基,比如特殊的碳源或氮源,添加选择性抗生素抑制非目的菌的生长等。结合分子生态学技术,还发展了生物勘探技术以种群特异的16S rRNA序列标记从不同的环境探测某类稀有类群的方法,以提高采样分离的效率。

1.1.3 微生物的分类鉴定

进行微生物天然产物如抗生素等工业微生物研究,多数只关心微生物的某种产品有没有,

产量高不高,微生物的分类地位如何则放在比较次要的位置。由于很多不同类群的微生物可以合成相同的产物,而同一类群可以合成多种产物(如链霉菌可以合成几千种的抗生素),微生物的分类与产物之间似乎没有特定的关系。但对天蓝色链霉菌 *Streptomyces coelestis* A3 (2) 的全基因组测序以及与大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 序列的比较发现,天蓝色链霉菌基因组中与次级代谢产物合成有关的基因簇远多于大肠杆菌和枯草芽孢杆菌。因此基因组学研究的结果使得人们不得不再次面对微生物分类类群与次级代谢产物的关系。

按照基因决定产物的观念,某种产物的合成与某些基因的存在是有关联的,而基因的存在又与不同的微生物分类地位有关。在植物天然产物的研究中,植物化学家已经广泛应用了这样的观念来从植物中寻找化合物。近年来,随着分子生物学和生物信息学技术,化学分析技术的发展,对于微生物的分类系统,微生物产物与种属之间的关系有了更多的认识,开始提出以“微生物分类作为药用微生物资源发现的地图”的概念。按照这一观念,采用液相色谱技术,16S rRNA 序列分析技术等相结合,发现了链霉菌中种与产物之间的对应关系。这样的观念同时还导致了以生物勘探技术发现药用微生物的策略。新的有活性的微生物种属意味着新活性化合物。因此在药用微生物资源开发的早期能对所得到的菌株进行分类鉴定对于提高药物先导化合物发现的效率有着重要意义。

微生物分类技术从早期的以形态特征为主,随着生物化学、分子生物学、生物信息学等技术的发展,已经有了很大的不同。自20世纪70年代 Wose 等在16S rRNA 序列分析基础上提出生物三域说后,DNA 分子杂交,16S rRNA 序列分析在细菌和古菌的分类以及18S rRNA, ITS 在真菌的分类上就开始起着很重要的作用,将DNA 分子杂交相似率在70%以上,16S rRNA 序列相似率在97%以上定为细菌的同一个种。虽然对微生物种的概念仍然需要重新审视,但分类鉴定技术对于药用微生物的发现的重要性已经不容忽视。一些分类鉴定技术的应用必须从药用微生物的发现开始。目前微生物分类对于细菌、放线菌和真菌的主要特征如表1.3所示。

表1.3 细菌、放线菌和真菌的主要分类鉴定特征

项目	细菌	放线菌	真菌
形态特征	重要,主要	重要,主要	非常重要,主要
rRNA 序列	重要,主要	重要,主要	重要
DNA 分子杂交	重要	重要	重要
生理特征	非常重要,主要特征		辅助特征,在不同种之间鉴别
细胞壁组分	主要用染色法	重要,主要	主要
全细胞组分	非主要特征	重要	基本未涉及

1.1.4 微生物的菌种保藏

有重要特性和应用价值的药用微生物菌种必须被妥善保存,微生物菌种保存的目的是使菌种不死、不杂,保持某种其独特的活性。原理是采取措施使微生物处于休眠或生长不活跃的状态,利用微生物本身一些休眠态如芽孢或繁殖体如孢子等可以提高保存的效率。通常的保存方法是利用低温、干燥、缺氧(对好养菌)或寡营养等措施。如采用甘油管在-20℃或

-70℃ 保存细菌和部分放线菌;采用沙土管保存部分放线菌和真菌孢子。

1.2 基于非培养水平的药用微生物资源收集技术

既然人类已经认识到未能培养微生物占了总的微生物资源的 95% 以上,对这些未能培养微生物的资源的收集就成为一个新的研究领域。一方面是避开培养的问题,直接利用转基因技术将环境中的基因资源通过基因工程技术已经很成熟的一些异源宿主如大肠杆菌、链霉菌和酵母菌系统来收集或表达,即宏基因组技术;另一方面是寻求将未能培养的微生物培养出来的技术,使更多的微生物类群能以它们自己真实的面貌被人们认识和发挥作用。利用分子生态学技术从分子层面可以探测某类微生物或某种有价值的生理过程在某一环境中存在的生态分布与可能性。

1.2.1 生物多样性的分子生态学与生物勘探技术

核酸是最广泛采用的不依赖于微生物分离培养技术的细菌多样性研究的分子标记。其中核糖体 RNA 基因(rDNA)是迄今研究最多的核基因。Pace 等首次利用 rDNA 确定环境样品中的微生物,即通过对 5S rDNA 的序列分析来研究微生物的分类和进化。该方法很快被用于微生物多样性的研究领域。由于 5S rDNA 相对较小(约 120 bp),携带的生物信息较少,因而揭示微生物群落多样性的能力有限。相比之下,16S rDNA 由于大小适中(约 1 500 bp),能提供足够的生物信息体现不同菌属之间的差异,又易于通过 PCR 扩增和测序,目前已被广泛应用于微生物多样性的研究工作。微生物的某些功能基因也被用于多样性的研究。它所用的方法与基于 16S rDNA 的研究类似。如研究与许多抗生素合成有关的聚酮酶基因,非核糖体多肽基因等。

生物勘探(biospecting)是指在生物资源中探测那些具有商业潜在价值的基因(基因簇)、生理生化物质、生物体等资源的行为。目前利用分子生物学手段从微生物资源中探测的方法主要是通过保守引物扩增和保守片段杂交。因此,可根据目的基因保守序列设计“探头”——引物或探针进行勘探,从而避免盲目性,提高针对性,而达到提高效率的目的。

1.2.2 宏基因组技术

宏基因组(metagenome)是指在某一时刻某一环境所有生物基因组的总和。宏基因组学也称为环境基因组学(environmental genomics)或群落基因组学(community genomics)。宏基因组学的基本方法为从环境样品中直接获取宏基因组,再通过 PCR 扩增、构建宏基因组文库等技术了解与开发资源。

宏基因组与其他基因组的主要区别在于它不是某个特定的生物体,而是一群生物体的完整或不完整基因的总和。它的主要技术环节如 PCR、载体构建、转化宿主、文库构建等与其他基因组技术相同。其不同技术点在于总 DNA 的获取以及文库的筛选、利用与评价。已研究过的宏基因组文库的 DNA 来源包括土壤、动植物共附生环境(如含有许多微生物的海绵、动物肠道、动物唾液等)。在 DNA 的获取上需要根据不同的环境采取不同的提取策略,而且对于需要获得未能培养药用微生物的次级代谢产物目的的宏基因组文库,大片段 DNA 的获得尤为重要,因为这些次级代谢产物的基因是成簇存在的。

构建宏基因组可用于环境微生物群落结构的分析,也可以用于重要的基因资源的发掘,后者是在非培养水平上药用微生物基因资源收集的重要方式。已经从宏基因组文库获得了若干具有抗生素活性的基因。从宏基因组文库得到有生物活性的基因,其筛选方法可以利用表达载体和表达宿主,最后通过功能表达产物筛选抗菌、抗肿瘤细胞活性;也可以利用非表达载体及宿主,通过目的基因保守序列杂交筛选目的基因片段,对大量克隆的宏基因组文库,需要用到基因芯片技术。此外,还可以对表达产物进行液相色谱或其他仪器分析,从化学结构水平上筛选新的结构。

1.3 生物信息学、芯片技术在药用微生物研发中的应用

现代药用微生物资源的收集与开发是处在一个高通量筛选技术已经成熟,计算机技术可以用于大量数据处理的时代。微生物的各种分类特征如 rRNA 序列、生理特征、活性特征、产物化学谱图特征等都可以制成数据库,供后续研究的参比,减少重复。这些技术的应用,将大大提高药用微生物资源研发的效率。

1.3.1 生物信息学

生物信息学是用计算机科学、数学和信息学的理论,分析和模拟生物系统特别是遗传物质的一种新型科学。药用微生物资源研发有关的生物信息学,在可培养层面上,主要是一些 rRNA 序列、生理特征等的数据库系统的应用,生态学上的生物统计学分析;在非培养水平上,可用于生物勘探的探针设计、宏基因组序列的功能分析等。

1.3.2 生物芯片技术

生物芯片技术是伴随着“人类基因组计划”而衍生的一项技术,是指包被在硅片、尼龙膜等固相支持物上的高密度的组织、细胞、蛋白质、核酸、糖类以及其他生物组分的微点阵。芯片与标记的样品杂交,通过检测杂交信号可实现对样品的分析。常见的生物芯片主要有基因芯片、蛋白芯片、组织芯片等。利用芯片技术可以分析环境中微生物的群落,尤其对宏基因组所获得的功能基因片段可以进行筛选。

1.4 微生物发酵产物的生物活性评价技术

药用微生物资源研发与其他微生物资源的不同之处,在于要发现和评价某一微生物菌株的生物活性及潜在的药用价值。根据微生物代谢产物的应用领域,抗菌活性和抗肿瘤细胞活性是常被测试的细胞水平的评价方法。虽然已经出现了许多针对某些酶或某一代谢途径的高通量筛选方法,但在活性筛选的初期,细胞水平的筛选可以减少漏筛。

1.4.1 抗菌活性评价

抗菌活性涉及所选用的靶标菌株及检测方法,靶标菌也就是病原菌,通常选用的革兰氏阳性靶标菌株有金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),革兰氏阴性靶标菌株有大肠杆菌(*Escherichia coli*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)

等,由于耐甲氧基青霉素金黄色葡萄球菌的出现,对医治这类病原菌的药物需求量很大,也可以使用这类菌作为靶标菌株。对病原菌的使用要注意安全,尤其是耐药性菌株。

在活性检测方法上,通常采用琼脂平板法,现在已经发展了以96孔板为基础的大量筛选方法。

1.4.2 抗肿瘤细胞活性评价

抗肿瘤细胞活性的评价同样也涉及所用的肿瘤细胞株,可以根据疾病的发生和药物需求来确定主要的瘤株用于初筛。目前抗肿瘤细胞活性筛选采用国际通用的MTT法,对于肿瘤致病机理的研究使有细胞凋亡活性的化合物更有成药前景,因此,也可以结合采用肿瘤凋亡活性来检测。

1.5 微生物天然产物的分离纯化与鉴定技术

药用微生物资源研究很重要的一步是要得到活性代谢产物,这是一种药用微生物是否具有药物开发价值的前提,从所收集到的微生物资源中得到一种新的有活性的化合物,药用微生物资源收集与评价到此才是一个完全的里程。

1.5.1 微生物发酵产物的特点与常用的分离纯化技术

在传统抗生素的研究历史以及当代基因工程产物的生产中已经积累了微生物发酵产物的分离纯化技术,也称为发酵工程的下游技术。微生物天然产物的分离纯化与其他植物和动物的天然产物的分离纯化有共同点,都是从多相介质的混合物中利用不同化合物的物理和化学性质的不同,采用各种离心、过滤、浓缩、吸附、沉淀、层析、结晶等化工过程。与其他天然产物不同的是,微生物发酵产物的活性成分量可能是非常微小,有些还要经过破碎细胞的工艺以获得细胞内的化合物,小分子的化合物还可以采用等电点沉淀或形成复盐沉淀。此外,微生物通常合成的化合物骨架与植物合成的常见骨架也会不同,比如,很少在微生物中发现合成黄酮类化合物。

1.5.2 仪器分析手段在微生物天然产物研究初期的作用

在微生物天然产物研发过程中遇见“老朋友”的事件常发生在菌株分离阶段和化合物分离阶段。为提高效率,在菌株的分离阶段和化合物的分离阶段都需要通过一些技术来排重。仪器分析这一在传统概念中用来对纯化合物进行结构鉴定的手段,已经可以用在化合物分离的初期,在没有得到纯化合物的阶段,甚至在化合物仍在细胞中的阶段,都可以通过仪器分析手段进行鉴别和排重。已经应用的包括红外光谱技术、裂解质谱技术、核磁共振技术在细胞水平的化合物鉴定及指纹谱图鉴别;薄层色谱、液相色谱及核磁共振数据库的建立与化合物排重。一些公司已经建立了上万种微生物天然产物的谱图数据库,与生物信息学类似,可以通过数据库的查询来排重和尽快发现新的化合物。

1.6 小结

目前,药用微生物资源的研究总体上形成了从微生物菌种资源到活性化合物资源的思路。其特点是:微生物资源数量增加,各种微生物和化合物的相关数据增加,重现几率增加;必须借助计算机技术处理大量生物和化学数据;医学研究不断提供新的药物靶标和药物筛选模型;学科间更加互相渗透和依赖。因此,从事微生物资源研究的科学家需要与各领域的专家配合协作,需要不断学习接受新的技术和理念,才能在药用微生物资源的研究中有所发现。

参考文献

- [1] 雷湘兰,洪葵,阮继生.小单孢菌及其海洋药物开发中的前景.生物技术通报(增刊),2006: 87-90.
- [2] 刘志恒.现代微生物学.北京:科学出版社,2002.
- [3] 闫莉萍,洪葵.海洋微生物合成的抗肿瘤活性物质.国外医药抗生素分册,2003,24(5): 213-217.
- [4] 阎冰,洪葵,许云,等.宏基因组克隆-微生物生物活性物质筛选的新途径.微生物学通报, 2005,32(1):113-117.
- [5] Bérdy, J. Bioactive microbial metabolites. J. Antibiot. 2005, (Tokyo) 58: 1-26
- [6] Bull AT and Goodfellow M. eds. Antonie van Leeuwenhoek. 2005, 87: 1-79
- [7] Bull AT ed. Microbial Diversity and Bioprospecting, ASM Press. Washington, DC. 2004, 1-496
- [8] Bull AT, Ward, AC and Goodfellow M. Search and Discovery Strategies for Biotechnology_ the Paradigm Shift. Microbiol Mol Biol Rev. 2002, 64: 573-606
- [9] Edward F. DeLong. Microbial Community Genomics in the Ocean. Nature Rev Microbiol. 2005(3): 459-460
- [10] Edward F. DeLong¹ and David M. Karl. Genomic perspectives in microbial oceanography. Nature. 2005(437):336-342
- [11] Gary Strobel and Bryn Daisy. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. Microbiol Mol Biol Rev. 2003, 67(4): 491-502
- [12] Maldonado LA, Fenical W, Jensen PR, Kaufman CA, Mincer TJ, Ward AC, Bull AT and Goodfellow M. Int J Syst Evol Microbiol 2005(55):1759-1766
- [13] Michael S. Rapp¹ and Stephen J. Giovannoni. The Uncultured Microbial Majority. Annu. Rev. Microbiol. 2003(57):369-394
- [14] Micheal T. Madigan and John M. Martinko. Brock Biology of Microorganisms. 11th edition, Pearson International Edition, 2006
- [15] Mincer TJ, Jensen PR, Kauffman CA and Fenical W. Widespread and Persistent Populations of a Major New Marine Actinomycete Taxon in Ocean Sediments. Appl Environ Microbiol, 2002(68): 5005-5011
- [16] Paul R Graves¹ and Timothy A J Haystead. Molecular Biologist's Guide to Proteomics.

Microbiol Mol Biol Rev. 2002,66(1): 39-63

- [17] Ravenschlag K, Sahm K and Amann R. Quantitative molecular analysis of the microbial community in marine Arctic sediments (Svalbard). *Appl Environ Microbiol*, 2001(67): 387-395
- [18] Stach JEM, Maldonado LA, Masson DG, Ward AC, Goodfellow M & Bull AT. Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments. *Appl Environ Microbiol*. 2003(69):6189-6200
- [19] Venter J C. *et al.* Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 2004(304):66-74
- [20] Zhang L, Demain AL. eds. *Natural Products: Drug Discovery, Therapeutics Medicines*. Humana Press, USA. 2005

(洪葵)