

# 盐度和 pH 对红树根际土壤来源的曲霉属真菌 F3 的生长及分泌活性物质的影响

王治维 窦莹颖 祝兴伟 叶波平\*

(中国药科大学生命科学与技术学院 南京 210009)

**摘要:** 本研究考察了一株从中国海南东寨港红树林保护区的红海榄根际土壤中分离得到的曲霉属真菌 F3 在不同盐度和 pH 的 SDA 培养基中的生长和分泌抗菌活性代谢产物的变化。结果显示: 高盐环境(3%~9%) 及偏碱性条件(pH 8~10) 有利于该真菌的生长。在初步优化培养基及培养条件的基础上, 通过发酵和有机溶剂萃取的方法获得了该真菌发酵液的乙酸乙酯浸膏, 得率为 448 mg/L。该浸膏对多种微生物的生长具有明显的抑制作用, 其中对细菌 *Staphylococcus aureus*、*S. epidermidis*、*Sarcina lutea*、*Bacillus subtilis* 和 *Escherichia coli* 的 MIC 分别为 31.3 µg/mL、31.3 µg/mL、7.8 µg/mL、7.8 µg/mL 和 125.0 µg/mL; 对真菌 *Candida albicans* 的 MIC 为 125.0 µg/mL。研究同时表明: 该乙酸乙酯浸膏还具有明显的细胞毒活性, 其对入脐静脉内皮细胞 ECV304、人结肠癌细胞 Lovo 以及肝癌细胞 HepG2 的  $IC_{50}$  分别为 3.45 µg/mL、4.88 µg/mL 和 14.31 µg/mL。

**关键词:** 曲霉属, 盐度, 抑菌活性, 抗肿瘤活性

## Effects of Salinity and pH on the Growth and Active Products-secreting of *Aspergillus* sp. F3 from the Mangrove Rhizosphere

WANG Zhi-Wei DOU Ying-Ying ZHU Xing-Wei YE Bo-Ping\*

(School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009)

**Abstract:** An *Aspergillus* sp. strain F3 was isolated and identified from the rhizosphere soil of mangrove plant, *Rhizophora stylosa* Griff in Dongzhai harbor mangrove forest conservation in China. In this study, the effects of media salinity and pH on the mycelial biomass and the ability of producing antibacterial metabolites from this isolate were carefully analyzed. Results showed that this isolate can grow well on the SDA medium with higher salinity (3%~9%) and higher pH (8~10). Under the modified culturing conditions, this isolate can secrete the antibacterial and antitumor metabolites. The extracts of acetic ether were about 448 mg/L of the fermentation broth. The antibacterial activities of the acetic ether extract were analyzed with bacteria and fungus. Results showed this extract can suppress the growth of *Staphylococcus aureus*, *S. epi-*

*dermidis*、*Sarcina lutea*、*Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* with MIC of 31.3  $\mu\text{g/mL}$ , 31.3  $\mu\text{g/mL}$ , 7.8  $\mu\text{g/mL}$ , 7.8  $\mu\text{g/mL}$  and 125.0  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. It can also suppress the growth of *Candida albicans* with MIC of 125.0  $\mu\text{g/mL}$ . Further studies uncovered the cytotoxicity of this extract against the tumor cells, such as ECV304, Lovo and HepG2 with  $IC_{50}$  of 3.45  $\mu\text{g/mL}$ , 4.88  $\mu\text{g/mL}$  and 14.31  $\mu\text{g/mL}$  respectively.

**Keywords:** *Aspergillus*, Salinity, Antibacteria, Antitumor

红树植物是一类生长在热带亚热带沿海潮间带并受到周期性潮水侵袭的木本植物<sup>[1]</sup>, 在适应盐生和周期性海水浸淹环境的过程中, 该类植物进化出一些适应环境的形态学特征, 如: 气生根、支柱根和板状根等, 这些特化的结构成为很多海洋生物, 尤其是海洋微生物栖息的家园<sup>[1]</sup>。红树根际土壤微生物对红树林生态系统中营养元素的循环、红树的生长发育以及次生代谢产物的形成等具有很大的影响<sup>[1]</sup>, 开展有关这些微生物的研究将不仅有助于对红树植物适应环境特点的认识, 同时还将为相关性产物的研究提供更多的菌种来源。现已鉴定出多种红树植物来源的细菌、真菌和放线菌, 它们分泌的次生代谢产物具有抑菌和抗肿瘤等多种生物活性<sup>[1]</sup>, 从而吸引了很多研究人员的关注, 使得有关红树植物来源微生物的研究成为当今海洋微生物研究领域中的一个热点<sup>[2]</sup>。

在前期研究中, 本实验室从我国海南省海口市东寨港红树林保护区的木榄、红海榄以及秋茄等多种红树植物的根际土壤中分离到 56 种细菌和 10 余种真菌, 其中真菌菌株 F3 的发酵液具有明显的抑菌活性。形态学和 ITS 序列分析结果表明该真菌为曲霉属的一种。曲霉属真菌是一种广泛存在于动植物体内及表面的病原微生物, 常导致动植物发生病害, 引起产量和品质的下降<sup>[3,4]</sup>, 甚至引发一些疾病<sup>[5,6]</sup>。然而, 近年来有不少研究显示该属真菌还可以分泌多种次生代谢产物<sup>[7]</sup>, 如: 从海洋环境中分离到的曲霉属真菌常具有分泌抗肿瘤活性物质的能力<sup>[8-10]</sup>。但迄今为止很少见有来自于海洋环境的该属真菌分泌抗菌活性物质的研究报道<sup>[11]</sup>。基于一些真菌分泌次生代谢产物的能力可能与培养基中的成分<sup>[12]</sup>、盐度<sup>[13,14]</sup>、温度<sup>[15]</sup>、pH<sup>[15,16]</sup>以及培养液中的溶氧量<sup>[17,18]</sup>等有关, 本研究拟考察曲霉属真菌 F3 在不同盐度或 pH 的培养基中的生长状况以及分泌活性代谢产物的能力, 确定适合该真菌分泌抗菌及抗肿瘤活性代谢产物的培养条件, 为后续相关活性物质的分离纯化和

鉴定奠定一个良好的工作基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种和细胞株

供试菌株 *Aspergillus* sp. F3 为从中国海南省海口市东寨港红树林保护区红树根际土壤中分离到的曲霉属真菌, 经鉴定后用盐度为 3% 的 SDA 斜面固体培养基于 4℃ 保存于本实验室。

活性测试菌株金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌 (*S. epidermidis*)、枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*)、藤黄八叠球菌 (*Sarcina lutea*)、绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosus*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、克雷伯氏杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 和白色念珠菌 (*Candida albicans*) 等菌种均由本实验室保存; 人结肠癌细胞 Lovo、肝癌细胞株 HepG2 以及人脐静脉内皮细胞 ECV304 由本实验室保存。

### 1.2 培养基盐度对曲霉属真菌 F3 生长及分泌抑菌活性成分的影响

**1.2.1 培养基盐度对曲霉属真菌 F3 生长的影响:** 在前期研究中已经证明曲霉属真菌 F3 在 SDA 液体培养基中培养至第 8 天时的发酵液具有明显的抑菌活性, 因此, 本研究中重点考察该菌在不同盐度的培养基中培养至第 8 天时的生物量变化。用海水晶盐 (南京佳亚养殖用品开发部) 配制盐度从 0%~19% 的 SDA 液体培养基, 按照 5 mL/瓶分装到 25 mL 三角瓶中, 向每瓶中分别加入 200  $\mu\text{L}$  28℃ 下活化 24 h 的 F3 种子液。28℃、160 r/min 振荡培养 2 周, 并分别在第 4、8 和 12 天离心收集菌体沉淀, 发酵液转移至干净的离心管中供活性检测用, 菌体沉淀 60℃ 烘干 24 h 后称重。以培养基盐度(%)为横坐标, 以菌体干重(g)为纵坐标绘制不同盐度下的真菌生物量变化曲线。

**1.2.2 培养基盐度对曲霉属真菌 F3 发酵液活性的影响:** 将在牛肉膏蛋白胨固体斜面培养基上活化

24 h 的 *S. lutea* 菌苔用相应的液体培养基稀释成  $3 \times 10^8$  个/mL 菌悬液, 取 2 mL 菌悬液加入到 150 mL 未凝固的固体培养基中迅速混匀并制成平板, 用无菌打孔器在平板上制备多个直径为 9 mm 的小孔。将待测发酵液按 50  $\mu$ L/孔加入到小孔中, 以 800  $\mu$ g/mL、400  $\mu$ g/mL、200  $\mu$ g/mL、100  $\mu$ g/mL、50  $\mu$ g/mL、25  $\mu$ g/mL 和 12.5  $\mu$ g/mL 的万古霉素 (Eli Lilly, 日本 KK Seishin Laboratories 生产, 批号为 WM17152) 做抑菌对照<sup>[19]</sup>, 37°C 培养 12 h 后测定抑菌圈的大小, 绘制万古霉素抑菌标准曲线并计算出回归方程。根据回归方程, 将不同盐度的发酵液产生的抑菌圈换算成万古霉素的效价 ( $\mu$ g/mL) 以判断其抑菌活性大小。

### 1.3 培养基 pH 对曲霉属真菌 F3 生长及分泌抑菌活性成分的影响

**1.3.1 培养基 pH 对曲霉属真菌 F3 生长的影响:** 由于在前期的发酵条件初步优化实验中已证明碱性条件下的培养基适合真菌 F3 的生长, 因此重点考察培养基的 pH 为 7.0、8.0、9.0、10.0、11.0 和 12.0 时菌体在培养 4 d、8 d 和 12 d 后的生物量。配制盐度为 7% 的 SDA 液体培养基若干瓶, 用 100 mmol/L 的 NaOH 调节培养基 pH 至 2.0、4.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0 和 12.0, 按照 5 mL/瓶分装到 25 mL 三角瓶中, 并分别加入 200  $\mu$ L 28°C 活化 24 h 的 F3 种子液, 28°C、160 r/min 振荡培养 4 d、8 d 和 12 d 后离心收集菌体沉淀, 发酵液转移至干净的离心管中供活性检测用, 菌体沉淀于 60°C 烘干 24 h 后称重。以 pH 值为横坐标, 以菌体干重 (g) 为纵坐标绘制 pH 7.0、8.0、9.0、10.0、11.0 和 12.0 下的真菌生物量变化曲线。

**1.3.2 培养基 pH 对曲霉属真菌 F3 发酵液活性的影响:** 配制不同 pH (2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 和 12.0) 的 SDA 液体培养基, 按 1.3.1 的方法培养 8 d 后, 离心收集发酵液进行活性检测, 抑菌活性检测方法同 1.2.2。

### 1.4 曲霉属真菌 F3 发酵液乙酸乙酯浸膏的制备及其活性检测

**1.4.1 发酵液乙酸乙酯浸膏的制备:** 配制 25 mL SDA 液体培养基 (盐度为 5%, pH 10), 按 1:100 (V/V) 接种 28°C 下活化 24 h 的 F3 种子液, 28°C 下 160 r/min 振荡培养 8 d 后离心收集发酵液, 并向发酵液中加入等体积的乙酸乙酯萃取 3 次后合并萃取

液, 60°C 旋转蒸发浓缩, 将浓缩液转移至烧杯中, 在通风橱内挥发有机溶剂得到固体浸膏, 将浸膏放入 60°C 烘箱中干燥 24 h, 得到乙酸乙酯浸膏 (11.2 mg), 用 10% 的 DMSO 将浸膏配制成 1 mg/mL 的浸膏母液备用。

**1.4.2 乙酸乙酯浸膏抗菌活性测定:** 用牛肉膏蛋白胨液体培养基 (抗细菌活性筛选) 或 SDA 液体培养基 (抗真菌活性筛选) 按连续稀释法将浸膏母液按 2 倍倍比稀释法稀释成 0  $\mu$ g/mL ~ 1000  $\mu$ g/mL 待测样品。在 96 孔板上依次加入梯度稀释的待测样品和菌液 (细菌为  $1 \times 10^5$  个/mL ~  $10 \times 10^5$  个/mL, 真菌为  $1 \times 10^4$  个/mL ~  $10 \times 10^4$  个/mL) 各 50  $\mu$ L 并混匀, 每个样品做 3 个平行样组; 同时, 设置万古霉素或庆大霉素 (细菌) 以及两性霉素 (真菌) 的阳性对照组和液体培养基阴性对照组。37°C 培养 20 h (细菌) 或 28°C 培养 72 h (真菌) 后, 每孔加入 20  $\mu$ L 显色剂 (0.5% TTC), 37°C 或 28°C 继续培养 1 h ~ 3 h, 观察测试菌株的生长情况。抑菌活性判断标准: 培养孔呈红色为有测试菌生长, 以无肉眼可见细菌或真菌生长的最低药物浓度为供试样对测试菌的最低抑菌浓度 (MIC,  $\mu$ g/mL)<sup>[20]</sup>。

**1.4.3 乙酸乙酯浸膏的抗肿瘤活性分析:** 取处于指数生长期、状态良好的各种肿瘤细胞各 1 瓶, 分别加入 0.25% 胰蛋白酶消化液消化至贴壁细胞脱落并计数, 用 RPMI-1640 培养液将细胞密度稀释至  $2 \times 10^4$  个/mL ~  $4 \times 10^4$  个/mL 细胞悬液。取细胞悬液按 180  $\mu$ L/孔接种于 96 孔板上, 将培养板转入恒温 CO<sub>2</sub> 培养箱中, 5% CO<sub>2</sub>、37°C 培养 24 h 后, 按 20  $\mu$ L/孔加入各种倍比稀释的浸膏溶液, 每个浓度设 3 个复孔, 阳性对照为终浓度 10  $\mu$ g/mL 的丝裂霉素 (协和发酵工业株式会社生产, 批号为 155ADF), 以加同等体积的 RPMI-1640 为阴性对照, 继续培养 48 h, 然后按 20  $\mu$ L/孔加入终浓度 500  $\mu$ g/mL 的 MTT, 置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 4 h。小心吸弃孔内上清液并控干, 按 150  $\mu$ L/孔加入终浓度 1% 的 DMSO, 置平板摇床上振摇 10 min。用 Model 680 酶标仪 (BIO-RAD 公司) 在测定波长为 570 nm, 参比波长 630 nm 处测定每孔的吸光度值, 根据以下公式计算细胞抑制率 (CIR%), 根据结果求出回归方程并以此推算出抑制率为 50% 时的供试样品浓度 (IC<sub>50</sub>)。

$$\text{CIR}\% = \frac{(OD_{\text{阴性对照}} - OD_{\text{待测样品}})}{(OD_{\text{阴性对照}} - OD_{\text{空白}})} \times 100\%$$

## 2 结果

### 2.1 盐度对曲霉属真菌 F3 的生长及发酵液抗菌活性的影响

研究结果表明:不同盐度的 SDA 培养基对曲霉属真菌 F3 培养 4 d 和 8 d 后的生物量积累有着明显的影响(图 1A)。在培养 8 d 的情况下,较低盐度环境下该真菌的生长状况良好,当盐度达 5%时(相当于海水盐度的 1.5 倍),该真菌的生物量最高,其后生物量随着盐度的增加而逐渐减少。

培养基盐度对曲霉属真菌 F3 分泌抗菌活性成分也有显著的影响(图 1B)。随着盐度的升高,培养至 8 d 时的真菌 F3 发酵液抑菌活性逐渐增强,并在培养基盐度为 7%时达到最高,其后逐渐减弱,在培

养基盐度超过 13%时,即使该真菌仍能微弱地生长(图 1A),但已不再分泌抗菌活性物质。

### 2.2 培养基 pH 对曲霉属真菌 F3 的生长及发酵液抗菌活性的影响

培养基 pH 对曲霉属真菌 F3 培养早期阶段(第 4 天前)生物量的积累无显著影响,但对后期阶段(第 8 天和第 12 天)的培养有较为明显的影响(图 2A)。就培养 8 d 的情况来看,随着培养基 pH 的增高,该真菌的生物量逐渐增加,在 pH 9 时达到最高,其后逐渐下降。根据上述结果,推测偏碱性的培养基(pH 8~10)有利于该真菌生物量的积累。本研究同时还显示:碱性环境下有利于曲霉属真菌 F3 分泌抗菌活性成分(图 2B),当培养基的 pH 为 10 时,其发酵液的抗菌活性最强。

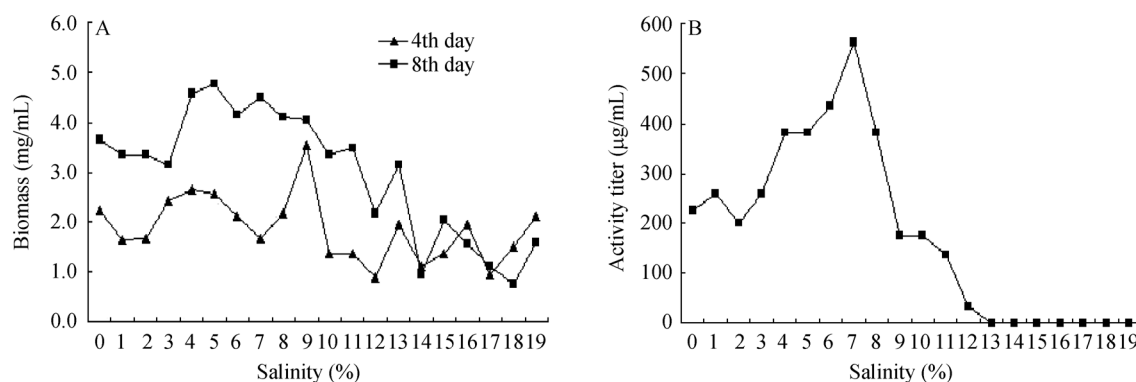


图 1 曲霉属真菌 F3 在 SDA 培养基中培养 8 d 后,盐度对生物量(A)和抑菌活性(B)的影响

Fig. 1 The influence of salinity on the biomass (A) and antibacterial activity (B) of *Aspergillus* sp. F3 cultured on SDA medium for 8 days

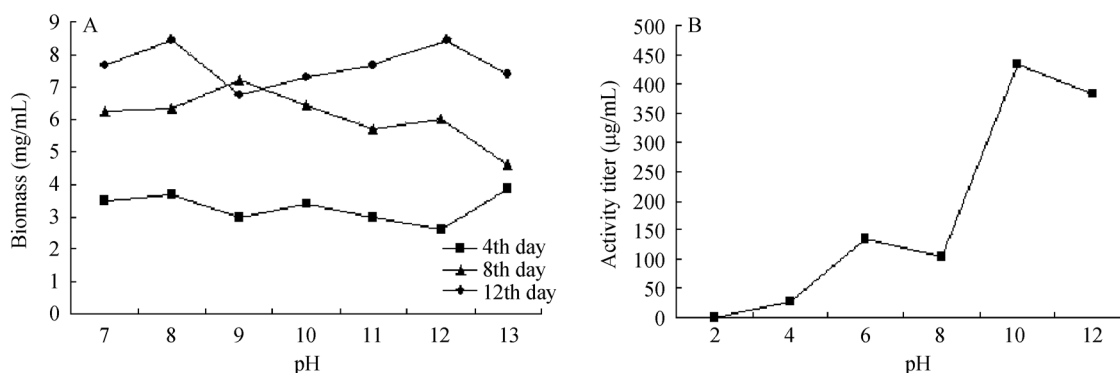


图 2 曲霉属真菌 F3 在 SDA 培养基中培养 8 d 后, pH 对生物量(A)和抑菌活性(B)的影响

Fig. 2 The influence of pH on the biomass (A) and antibacterial activity (B) of *Aspergillus* sp. F3 cultured on SDA medium (7% salinity) for 8 days

### 2.3 曲霉属真菌 F3 发酵液乙酸乙酯浸膏的抑菌活性

根据上述分析结果,确定曲霉属真菌 F3 的发酵

培养基为盐度 5%、pH 10 的 SDA 培养基。在上述培养基中,该真菌在 28°C、160 r/min 振荡培养 8 d 后,利用乙酸乙酯萃取发酵液可获得深黄色乙酸乙

酯浸膏, 其产率为 448 mg/L。

利用多种微生物检测了该浸膏的抑菌活性, 结果显示: 曲霉属真菌 F3 发酵液的乙酸乙酯浸膏对多种细菌的生长都具有明显的抑制作用, 其对 *S. aureus*、*S. epidermidis*、*S. lutea*、*B. subtilis* 和 *E. coli* 的 MIC 分别为 31.3  $\mu\text{g/mL}$ 、31.3  $\mu\text{g/mL}$ 、7.8  $\mu\text{g/mL}$ 、7.8  $\mu\text{g/mL}$  和 125.0  $\mu\text{g/mL}$ 。同时, 该发酵液的浸膏还具有明显的抑制真菌生长的作用, 对 *C. albicans* 的 MIC 为 125.0  $\mu\text{g/mL}$ (表 1)。

表 1 曲霉属真菌 F3 发酵液乙酸乙酯浸膏对细菌和真菌的抑制作用

Table 1 Antibacterial and antifungi activities of ethyl acetate extracts from the fermentation broth of *Aspergillus* sp. F3

指示菌 Microorganism	最低抑菌浓度( $\mu\text{g/mL}$ ) MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>Staphylococcus aureus</i>	31.3
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	31.3
<i>Sarcina lutea</i>	7.8
<i>Bacillus subtilis</i>	7.8
<i>Escherichia coli</i>	125.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>500
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>500
<i>Candida albicans</i>	125.0

## 2.4 曲霉属真菌 F3 发酵液的体外抗肿瘤活性

本研究同时还检测了曲霉属真菌 F3 发酵液的乙酸乙酯浸膏对 3 种肿瘤细胞株增殖的影响, 结果发现该浸膏具有明显的细胞毒活性, 其对入脐静脉内皮细胞 ECV304、人结肠癌细胞 Lovo 以及肝癌细胞 HepG2 的  $IC_{50}$  分别为 3.45  $\mu\text{g/mL}$ 、4.88  $\mu\text{g/mL}$  和 14.31  $\mu\text{g/mL}$  (表 2)。

表 2 曲霉属真菌 F3 发酵液乙酸乙酯浸膏的细胞毒性  
Table 2 Cytotoxicity of ethyl acetate extracts from the fermentation broth of *Aspergillus* sp. F3 against tumor cells

肿瘤细胞 Tumor cell	半数抑制率( $\mu\text{g/mL}$ ) $IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
ECV304	3.45
Lovo	4.88
HepG2	14.31

## 3 讨论

本研究对来自于红树根际土壤中的一种曲霉属真菌 F3 在不同盐度和 pH 条件下的生长状况以及分泌抗菌活性的能力进行了考察, 结果表明高盐度的培养基及碱性环境有利于该真菌生物量的积累和抗菌活性物质的分泌。

与微生物次生代谢产物生物合成有关的途径往往受到多种环境因子的影响<sup>[21,22]</sup>。在过去的几十年中, 研究人员重点考察了微生物与环境中生物因子之间的相互作用<sup>[23,24]</sup>以及培养基成分对微生物生长的影响<sup>[12]</sup>, 但很少关注微生物的生长与盐度和 pH 之间的关系。近年来的研究显示: 盐度<sup>[13,14]</sup>和 pH<sup>[15,16]</sup>在微生物分泌活性代谢产物的过程中发挥着重要的作用, 其原因在于在这些非生物因子的胁迫下, 微生物体内与代谢途径有关酶类的表达将发生相应的改变以适应其生存<sup>[13,14]</sup>。就曲霉属真菌而言, 较高的盐度可促进与 Gliotoxin 有关的生物合成途径, 从而使得发酵液中的 Gliotoxin 含量升高<sup>[17]</sup>, 我们的研究结果也显示出类似的规律, 因为高盐环境中曲霉属真菌 F3 发酵液的抗菌活性明显增强 (图 1B)。有报道显示: 曲霉属中的黑曲霉是一种嗜酸性的真菌, 其在酸性条件下 (pH 3~4) 生长良好<sup>[15,16]</sup>, 但我们前期的研究显示曲霉属真菌 F3 在酸性条件下并不能正常生长, 碱性条件下反而有利于其干物质的积累, 上述不同的结果暗示曲霉属真菌在适应环境的过程中的代谢途径也许出现了分歧。

近年来, 基于从曲霉属真菌体内及其发酵液中发现了一系列活性代谢产物<sup>[7]</sup>的现象, 有关该属真菌活性代谢产物的研究开始受到关注, 已从一些与海洋生物共附生的曲霉属真菌中发现了不少具有细胞毒活性的次生代谢产物<sup>[9,10]</sup>, 本研究结果也显示曲霉属真菌 F3 的代谢产物具有明显的抑制肿瘤细胞株增殖的生物活性。但迄今为止很少见有关于海洋来源的本属真菌分泌抑菌活性成分的研究报道<sup>[11]</sup>, 其原因可能与人类对这些微生物生长和代谢类型的认识相对较少有关。本研究通过对该真菌培养条件的优化, 发现在合适的培养条件下该真菌可同时分泌抑菌和抗肿瘤活性成分, 体现了其活性代谢产物的多样性特点。进一步通过天然药化分析手段开展对该真菌发酵液乙酸乙酯浸膏中有关化合物的分离

纯化和鉴定工作, 将为抗菌和抗肿瘤药物的筛选提供更多的先导物。

总之, 微生物的代谢类型比较复杂, 它们在不同的生长条件下往往分泌不同类型的化合物, 已成为创新药物研究中重要的宝库, 在生物医药研究领域内将具有广阔的开发前景。

## 参 考 文 献

- [1] Kathiresan K, Bingham BL. Biology of mangroves and mangrove ecosystems. *Advances in Marine Biology*, 2001, **40**: 81–251.
- [2] 叶波平, 吴梧桐. 现代生物技术在海洋药用生物资源开发中的应用. *中国天然药物*, 2006, **4**(1): 5–9.
- [3] Wicklow DT, Roth S, Deyrup ST, *et al.* A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. *Mycol Res*, 2005, **109**(5): 610–618.
- [4] Latg'e JP. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol*, 2001, **9**: 382–389.
- [5] Torres HA, Rivero GA, Lewis RE, *et al.* Aspergillosis caused by non-fumigatus *Aspergillus* species: risk factors and *in vitro* susceptibility compared with *Aspergillus fumigatus*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2003, **46**: 25–28.
- [6] Turgut M, Ozsunar Y, Oncu S, *et al.* Invasive fungal granuloma of the brain caused by *Aspergillus fumigatus*: a case report and review of the literature. *Surgical Neurology*, 2008, **69**: 169–174.
- [7] Bok JW, Hoffmeister D, Maggio-Hall LA, *et al.* Genomic mining for *Aspergillus* natural products. *Chemistry & Biology*, 2006, **13**: 31–37.
- [8] Toske SG, Jensen PR, Kauffman CA, *et al.* Aspergillamides A and B: modified cytotoxic tripeptides produced by a marine fungus of the genus *Aspergillus*. *Tetrahedron*, 1998, **54**: 13459–13466.
- [9] 韩小贤, 许晓妍, 崔承彬, 等. 海洋真菌烟曲霉 H1-04 发酵液中的硫代二酮哌嗪类产物及其抗肿瘤活性. *中国药物化学杂志*, 2007, **17**(3): 155–165.
- [10] 韩小贤, 许晓妍, 崔承彬, 等. 海洋真菌烟曲霉 H1-04 生产的生物碱类化合物及其抗肿瘤活性. *中国药物化学杂志*, 2007, **17**(4): 232–237.
- [11] Liu JY, Song YC, Zhang Z, *et al.* *Aspergillus fumigatus* CY018, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon* as a versatile producer of new and bioactive metabolites. *Journal of Biotechnology*, 2004, **114**: 279–287.
- [12] Kang SW, Park CH, Hong SI, *et al.* Production of penicillic acid by *Aspergillus sclerotiorum* CGF. *Bioresource Technology*, 2007, **98**: 191–197.
- [13] Clement DJ, Stanley MS, O'Neil J, *et al.* Complementation cloning of salt tolerance determinants from the marine hyphomycete *Dendryphiella salina* in *Aspergillus nidulans*. *Mycol Res*, 1999, **103**(10): 1252–1258.
- [14] Redkar RJ, Locy RD, Singh NK. Biosynthetic pathways of glycerol accumulation under salt stress in *Aspergillus nidulans*. *Experimental Mycology*, 1995, **19**: 241–246.
- [15] Lopez-Malo A, Alzamora SM, Argaiz A. Effect of vanillin concentration, pH and incubation temperature on *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus parasiticus* growth. *Food Microbiology*, 1997, **14**: 117–124.
- [16] Lopez-Malo A, Alzamora SM, Palou E. *Aspergillus flavus* growth in the presence of chemical preservatives and naturally occurring antimicrobial compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, **99**: 119–128.
- [17] Kerzaon I, Grovel O, Pont TRD, *et al.* Effects of seawater on growth and gliotoxin excretion of marine strains of *Aspergillus fumigatus* Fres. *Toxicon*, 2008, **41**: 398–405.
- [18] Watanabe A, Kamei K, Sekine T, *et al.* Effect of aeration on gliotoxin production by *Aspergillus fumigatus* in its culture filtrate. *Mycopathologia*, 2004, **157**(3): 245–254.
- [19] 刘莹, 杨翔华, 张全, 等. 拮抗菌株的筛选及其发酵滤液的抑菌活性. *西北农业学报*, 2006, **15**(5): 202–205.
- [20] 马绪荣, 苏得模. 药品微生物学检验手段. 北京: 科学出版社, 2001, pp.210–212.
- [21] van Veen JA, van Overbeek LS, van Elsas JD. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1997, **61**: 121–135.
- [22] Goldstein RM, Mallory LM, Alexander M. Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation. *Appl Environ Microbiol*, 1985, **50**: 977–983.
- [23] Viljoen BC. The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, **69**: 37–44.
- [24] Davison J. Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid*, 1999, **42**: 73–91.