KHẢO SÁT SƠ BỘ HOẠT TÍNH KHÁNG VI SINH VẬT CỦA MỘT SỐ CHỦNG NẤM PHÂN LẬP TỪ MẪU SINH VẬT BIỂN VIỆT NAM

Nguyễn Đình Luyện[1], Trần Thị Hồng Hà[1], Trần Thị Như Hằng[1], Lê Hữu Cường[1], Vũ Đình Giáp[1], Đỗ Hữu Nghị[1], Phạm Quốc Long[1], Nguyễn Hoài Nam[2], Lê Mai Hương[1,*]

[1]Viện Hóa học các Hợp chất Thiên nhiên, 18 Hoàng Quốc Việt, Hà Nội
[2]Viện Hóa Sinh biển, 18 Hoàng Quốc Việt, Hà Nội
Viện Hàn lâm KH và CN Việt Nam
*. Email: lehuong@inpc.vast.vn

Tóm tắt: Người ta biết rằng vi sinh vật biển rất đa dạng và việc khai thác chúng còn hạn chế. Vi sinh vật biển chứa nhiều sản phẩm tự nhiên có tiềm năng lớn trong lĩnh vực y dược. Gần đây, môi trường biển được biết chứa nguồn tài nguyên vi sinh vật vô tận cho khai thác các hoạt chất sinh học. Với sự hợp tác với các nhà khoa học Nga nhằm tìm kiếm các chủng vi sinh vật sản sinh chất kháng sinh, 38 chủng nấm biển được phân lập từ các nguồn khác nhau như trầm tích và các sinh vật biển. Kết quả cho thấy, 23 trong số 38 chủng có khả năng ức chế sự phát triển của các vi sinh vật kiểm định bao gồm 4 chủng có hoạt tính ức chế mạnh lên ít nhất 5 vi sinh vật kiểm định bao gồm cả vi khuẩn, nấm mốc và nấm men. Đáng chú ý là cả 9 chủng nấm phân lập từ bọt biển đều có hoạt tính kháng vi sinh vật, và 6 trong số 11 chủng từ mẫu trầm tích biểu hiện hoạt tính. Kết quả bước đầu cho thấy nấm biển có khả năng cho khai thác các chất có hoạt tính kháng vi sinh vật, vốn thường được sử dụng từ vi sinh vật đất liền.

Key words: *Chủng nấm, Hoạt tính kháng vi sinh vật, Môi trường biển, Sinh vật biển.*

PRELIMINARY INVESTIGATION OF ANTI-MICROBIAL ACTIVITY OF SOME FUNGAL STRAINS ISOLATED FROM MARINE ORGANISMS

Nguyen Dinh Luyen[1], Tran Thi Hong Ha[1], Tran Thi Nhu Hang[1], Le Huu Cuong[1], Vũ Đình Giáp[1], Do Huu Nghi[1], Pham Quoc Long[1], Nguyen Hoai Nam[2], Le Mai Huong[1,*]

[1]Institute of Natural Products Chemistry, 18 Hoang Quoc Viet, Hanoi, Vietnam
[2]Institute of Marine Biochemistry, 18 Hoang Quoc Viet, Hanoi, Vietnam
(VAST)
*. Email: lehuong@inpc.vast.vn

Abstract: It is known that a diverse and less exploited repertoire of microbes is essential to obtain a variety of natural products as medicinally potential agents. In this context, marine environment was recently recognized as a prolific resource of microorganisms for the discovery of new bioactive

compounds. In collaboration with Russian scientists searching for antibiotic-producing microorganisms, thirty-eight of fungal strains were isolated from marine sediments and organisms. As the result, 23 out of 38 marine fungal strains isolates inhibited the growth of test microorganisms including 04 strains exhibited strong activity on at least 05 test microorganisms including bacteria, molds and yeasts. Significantly, all of 9 fungal strains isolated from sponges showed antimicrobial activity against test microorganisms, following was fungal strains isolated marine sludge (6 out of 11 positive strains). Our initial results indicate that marine fungi may be a potentially additional reservoir for exploitation of antimicrobial compounds that mainly derived from terrestrial microorganisms.

Key words: *Fungal strains, Anti-microbial activity, Marine Environment, Marine organisms.*

I. MỞ ĐẦU

Trong số các vi sinh vật sống trong môi trường biển và đại dương thì nấm biển là nhóm vi sinh vật được nghiên cứu nhiều trên thế giới. Tuy nhiên ở Việt Nam, việc nghiên cứu, khai thác lợi ích nấm từ biển vẫn còn mới mẻ, chưa thực sự được chú ý. Theo các tác giả như Pietra (1997), Rodrigues và cs. (2000), Raghukumar và cs (1994), nấm biển là nguồn sinh vật có tiềm năng trong việc chuyển hóa các hợp chất thứ cấp, chứa một lượng lớn các enzyme, đặc biệt là một lượng lớn các chất kháng sinh (Mayer và cs., 1998; Rodrigues và cs., 2000). Điều này mở ra những hướng nghiên cứu ứng dụng trong y học (Rainer, 2010; Wu và cs., 2008; Zhan-bo và cs., 2004) và trong ngành công nghiệp thực phẩm (Vander và cs., 1991). Trong chuyến tham gia khảo sát và thu thập mẫu trên biển của tàu Oparin, hàng trăm chủng vi sinh vật biển đã được phân lập và lưu giữ tại viện Hóa học các Hợp chất thiên nhiên và từng bước được nghiên cứu khai thác sử dụng. Ở đây chúng tôi công bố một số kết quả phân lập và sàng lọc hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của 38 chủng nấm phân lập từ nguồn sinh vật biển Việt Nam, định tên chủng có hoạt tính cao nhất bằng phương pháp sinh học phân tử.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Nguyên liệu

1.1. Mẫu phân lập

Các mẫu sinh vật biển: san hô mềm, bùn biển, rong biển padina, bọt biển được thu thập từ các nơi như đảo Cát bà, Côn Đảo, Thổ Chu, Nam Du, Phú Quốc, Vịnh Vân Phong, trong chuyến khảo sát bằng con tàu Oparin-Nga vào năm 2010.

1.2. Môi trường

Môi trường phân lập nấm từ bùn biển

200 ml dịch bùn biển; 800ml nước biển tự nhiên; 18-20 g agar; 1,5 g penicillin; 1,5 g streptomycin. Kháng sinh được bổ sung sau khử trùng. Trong đó, dịch bùn

biển được điều chế bằng cách thêm bùn biển với nước biển và đun sôi 30 phút rồi lọc lấy dịch.

Môi trường phân lập nấm biển từ nguồn bọt biển, san hô mềm và rong

Môi trường thạch Malt (đối với rong biển)**:** 200 ml men bia**;** 800 ml nước biển**;** 20 g agar**;** pH 7,0-7,2**;** 1,5 g penicillin**;** 1,5 g streptomycin. Kháng sinh được bổ sung sau khử trùng.

Môi trường Sabouraud (đối với bọt biển, san hô mềm): Pepton: 10g; Glucose: 40 g; Agar: 18-20 g; nước biển: 1 lít; pH 6.0-7.0; 1,5 g penicillin; 1,5 g streptomycin. Kháng sinh được bổ sung sau khử trùng.

Môi trường dịch nuôi cấy nấm agar: 2g; Pepton: 1g; KH_2PO_4: 1 g; Chất chiết nấm men: 0,5 g; $MgSO_4.7H_2O$: 0,5 g; $FeSO_4$: 0,02 g. Pha trong 1 lít nước biển, pH 7,0. Môi trường được lên men lắc trong 1 tuần, thu dịch chiết để thử nghiệm hoạt tính.

1.3. Các chủng vi sinh vật kiểm định (VSVKĐ)

Các chủng VSVKĐ được sử dụng gồm*:*

Vi khuẩn Gr(+):	*Bacillus subtilis* ATCC 27212.
	Staphylococcus aureus ATCC 12222
Vi khuẩn Gr(-):	*Escherichia coli* ATCC 25922
	Pseudomonas aeruginosa ATCC 25923
Nấm men:	*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754
	Candida albicans SH 20
Nấm mốc:	*Aspergillus niger* 439.
	Fusarium oxysporum M42

2. Phương pháp

2. 1. Phương pháp phân lập nấm từ mẫu sinh vật biển

Các mẫu sau khi thu nhận được rửa sạch bằng nước biển, sau đó cắt nhỏ mẫu với kích thước 0,5 – 0,7 mm , sau đó rửa lại 4-5 lần bằng nước biển vô trùng.

Các mẫu cắt nhỏ được để ráo nước, đặt lên đĩa thạch chứa môi trường phân lập đã vô trùng, đặt vào tủ ấm 30 C cho sợi nấm sinh trưởng. Lựa chọn và lưu giữ các chủng nấm theo Xiong và cs (2009), Petrini và cs (1986).

2.2. Phương pháp thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định

Phương pháp đục lỗ thạch

Các chủng nấm được nuôi trong môi trường dịch thể phù hợp theo nguồn gốc của chúng. Dịch nuôi cấy nấm biển sau 7 ngày được nhỏ vào lỗ thạch trên đĩa petri đã có sự phát triển của vi sinh vật kiểm định. Các đĩa peptri này sau đó được để trong tủ lạnh ở 4 C trong 4-5 giờ cho chất kháng sinh khuyếch tán rồi ủ ở 37 C/24 h đối với vi khuẩn; 30 C/48 h đối với nấm. Hoạt tính kháng được đánh giá định tính bằng đo đường kính (D-d, mm) vòng kháng khuẩn trên đĩa thạch.

Phương pháp pha loãng liên tục

Dịch lên men của các chủng nấm biểu hiện hoạt tính sau sàng lọc trên đĩa thạch được tách chiết bằng dung môi etyl axetat, cô cất chân không thu cặn chiết và hoạt tính kháng vi sinh vật của các mẫu chiết được thực hiện trên các phiến vi lượng 96 giếng theo phương pháp pha loãng liên tục của Vanden và Vlietlinck (1986).

2.3. Phân loại nấm bằng phương pháp sinh học phân tử

Việc phân loại nấm được thực hiện tại Viện Vi sinh vật – Trường Đại học Quốc gia Hà Nội, gồm các bước:

Tách ADN bằng cách nghiền nhỏ các sợi nấm.

Bảo quản ADN ở - 20 C trước khi sử dụng.

Kiểm tra ADN theo phương pháp điện di.

Thực hiện PCR (polymerase chain reaction), với mồi đoạn ADNr 28S, kiểm tra sản phẩm PCR bằng điện di gel agaroza sau đó kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch sản phẩm trên máy quang phổ.

Đọc trình tự ADN trên máy giải trình tự động ABI 3100 Avant (Applied biosystem, Mỹ) trình tự nucleotit được so sánh với trình tự trong GenBank.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Phân lập các chủng nấm

Từ các mẫu khác nhau của sinh vật biển (bọt biển, san hô mềm, rong biển và bùn biển), chúng tôi đã phân lập được 38 chủng nấm với các đặc điểm hình thái khác nhau như sau: từ bọt biển 9 chủng (ký hiệu từ BB0 đến BB9); san hô mềm 8 chủng (SHM1-SHM8); rong biển 9 chủng (RB1-RB9); bùn biển 11 chủng (SB1 - SB11).

2. Sàng lọc hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của các chủng nấm biển được phân lập

Các chủng nấm được phân lập từ các mẫu sinh vật biển khác nhau được khảo sát sơ bộ hoạt tính kháng 8 chủng VSVKĐ. Kết quả được trình bày ở Bảng 1 như sau:

+ Tất cả 09 chủng phân lập từ bọt biển (100%) có hoạt tính kháng VSVKĐ, bao gồm 3 chủng (33,3%) kháng từ 5 VSVKĐ trở lên, 6 chủng (66,7%) kháng từ 3-4 VSVKĐ.

+ 3 trong 8 chủng phân lập từ san hô mềm (SHM), có biểu hiện hoạt tính kháng VSVKĐ, bao gồm 2 chủng kháng từ 3-4 VSVKĐ (25%), 1 chủng kháng 2 VSVKĐ (12,5%) còn lại 5 trong 8 chủng (62,5%) không biểu hiện hoạt tính.

+ 4 chủng có nguồn gốc từ rong biển (RB) có biểu hiện hoạt tính, bao gồm 2 chủng kháng 3 VSVKĐ (22,2%), 2 chủng kháng 2 VSVKĐ (22,2%) còn lại 5 chủng không biểu hiện có hoạt tính (55,5%).

+ 6 trong số 11 chủng phân lập từ bùn biển (SB) có hoạt tính kháng VSV KĐ bao gồm 1 chủng kháng 5 VSVKĐ (9%), 3 chủng kháng 3-4 VSVKĐ (27,2%), 2 chủng kháng 1-2 VSVKĐ (18,1%) còn lại 5 chủng không biểu hiện có hoạt tính.

Qua kết quả sàng lọc hoạt tính Bảng 1 cho thấy các chủng nấm phân lập được từ các mẫu sinh vật biển có tỷ lệ kháng VSV với phần trăm cao có phổ kháng khuẩn và kháng nấm tương đối rộng. Cụ thể là, trong số 38 chủng nấm phân lập được có 23 chủng biểu hiện có hoạt tính, trong đó 4 chủng kháng từ 5 VSVKĐ trở lên (chiếm 10,5%), 14 chủng kháng từ 3-4 VSVKĐ (36,8%), 5 chủng kháng 1-2 VSVKĐ (13,1%), 15 chủng không biểu hiện có hoạt tính (39,8%).

Trong số các chủng có hoạt tính là vòng kháng khuẩn kháng nấm lớn thì hai chủng BB8 và BB9 biểu hiện hoạt tính nổi trội kháng 6 trong 8 loại VSVKĐ, chúng tôi tiến hành lên men, chiết trong etylaxetat, cất quay thu cặn chiết 2 chủng này để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo.

Bảng 1. Hoạt tính kháng VSVKĐ của các chủng nấm được phân lập
Chú thích: Bs: *Bacillus subtilis; Sa: Staphylococcus aureus; Ec: Escherichia coli; Pa: seudomonas aeruginosa; An: Aspergillus niger; Fo: Fusarium oxysporum; Ca: Candida albicans; Sc: Saccharomyces cerevisiae*

STT	KH chủng	Hoạt tính VSV kiểm định (D-d, mm)							
		Vi khuẩn Gr(+)		Vi khuẩn Gr(-)		Nấm mốc		Nấm men	
		Bs	*Sa*	*Ec*	*Pa*	*An*	*Fo*	*Ca*	*Sc*
1	BB0	0	**8**	**9**	**11**	0	**8**	0	0
2	BB1	**5**	**0**	**7**	0	0	**9**	0	10
3	BB2	**6**	0	**6**	**5**	0	0	**11**	0
4	BB3	0	**7**	**7**	**10**	0	0	0	0
5	BB4	0	**4**	0	**8**	0	**9**	0	0
6	BB5	**8**	**12**	0	**6**	0	**11**	0	**18**
7	BB6	**6**	0	0	0		**7**	0	**5**
8	BB7	0	**13**	0	0	**5**	0	**8**	0
9	BB8	**12**	**14**	**20**	**18**	**16**	**10**	0	**17**
10	BB9	**9**	**19**	**25**	**10**	**19**	0	**0**	**10**
11	SHM1	0	**12**	0	0	0	**10**	0	0
12	SHM2	0	0	0	0	0	0	0	0
13	SHM3	0	**8**	0	**6**	**7**	0	**9**	0
14	SHM4	0	0	0	0	0	0	0	0
15	SHM5	0	0	0	0	0	0	0	0
16	SHM6	0	**11**	0	0	**10**	0	**5**	0
17	SHM7	0	0	0	0	0	0	0	0
18	SHM8	0	0	0	0	0	0	0	0
19	RB1	0	0	0	0	0	0	0	0
20	RB2	0	0	0	0	**7**	0	0	**9**
21	RB3	0	0	0	0	0	0	0	0
22	RB4	**12**	**8**	0	0	0	**6**	0	0
23	RB5	0	0	0	0	0	0	0	0
24	RB6	0	0	0	0	0	0	0	0
25	RB7	0	0	0	0	0	0	**7**	**9**
26	RB8	0	0	0	0	0	0	0	0

STT	KH chủng	Hoạt tính VSV kiểm định (D-d, mm)							
		Vi khuẩn Gr(+)		Vi khuẩn Gr(-)		Nấm mốc		Nấm men	
		Bs	*Sa*	*Ec*	*Pa*	*An*	*Fo*	*Ca*	*Sc*
27	RB9	0	0	**5**	0	0	**12**	0	**8**
28	SB1	0	0	0	0	0	0	0	0
29	SB2	**6**	0	0	0	**9**	0	0	0
30	SB3	0	0	0	0	0	0	0	0
31	SB4	0	0	0	0	0	0	0	0
32	SB5	0	0	0	0	**10**	0	**9**	**11**
33	SB6	0	0	0	0	0	0	0	0
34	SB7	**12**	0	**6**	0	**11**	0	**15**	0
35	SB8	0	**10**	**6**	**8**	**7**	0	0	**6**
36	SB9	**10**	**5**	**4**	0	0	0	0	0
37	SB10	0	0	0	0	0	0	0	0
38	SB11	0	**7**	0	0	0	0	0	0

Ghi chú: D=đường kính vòng vô khuẩn; d=đường kính lỗ thạch

3. Hoạt tính kháng vi sinh vật của các cặn chiết etylaxetat

Hai chủng BB8 và BB9 được lên men, sau đó dịch lên men được chiết bằng etylaxetat, cặn chiết etylaxetat được thử hoạt tính kháng 08 loại VSVKĐ trên các phiến vi lượng 96 giếng theo phương pháp của Vanden và Vlietlinck (1991).

Bảng 2. Hoạt tính kháng VSVKĐ của cặn chiết etylaxetat từ 2 chủng nấm BB8 và BB9.
Chú thích: Bs: *Bacillus subtilis; Sa: Staphylococcus aureus; Ec: Escherichia coli; Pa: seudomonas aeruginosa; An: Aspergillus niger; Fo: Fusarium oxysporum; Ca: Candida albicans; Sc: Saccharomyces cerevisiae*

STT	Kí hiệu mẫu	Khả năng kháng VSVKĐ, MIC (g /ml)							
		Vi khuẩn Gr(-)		Vi khuẩn Gr(+)		Nấm mốc		Nấm men	
		Ec	*Pa*	*Bs*	*Sa*	*An*	*Fo*	*Ca*	*Sc*
1	BB8	100	200	200	200	400	(-)	200	200
2	BB9	200	(-)	400	200	200	(-)	(-)	400

Kết quả thu được ở Bảng 2 cho thấy:

- Cặn chiết của chủng BB8 kháng rất tốt 7/8 loại VSVKĐ bao gồm các chủng vi khuẩn Gram (+), Gram (-), nấm mốc và nấm men thử nghiệm với các giá trị minimum inhibitory concentration (MIC) từ 100 đến 400µg/ml.
- Chủng BB9 biểu hiện hoạt tính kháng 5/8 loại VSVKĐ, đặc biệt là với vi khuẩn và nấm mốc nhưng không biểu hiện hoạt tính đối với nấm men. Các kết quả này phù hợp với kết quả sàng lọc hoạt tính kháng VSVKĐ bằng phương pháp đục lỗ thạch.

4. Kết quả phân loại nấm bằng sinh học phân tử

Trong 2 chủng BB8 và BB9 đều biểu hiện hoạt tính kháng VSVKĐ tạo vòng phân giải lớn. Chủng ký hiệu BB8 được chọn để định tên loài bằng phương pháp xác định trình tự rARN 28S. Trình tự đoạn D1D2 của rARN 28S từ chủng BB8 như sau**:**

GAAACCAACCGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAGAG
CTCAAATTTGAAAGCTGGCCCCCTCGGGGTCCGCATTGTAATTTGCAG
AGGATGCTTCGGGAACGGCCCCCATCTAAGTGCCCTGGAACGGGCCGT
CATAGAGGGTGAGAATCCCGTCTGGGATGGGGTGGCCGCGCCCGTGTG
AAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAATTGGG
TGGTAAATTTCATCTAAAGCTAAATATTGGCCGGAGACCGATAGCGCA
CAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAA
ACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGCGACCAGACTCGC
CCGCGGGGTTCAGCCGGCACTCGTGCCGGTGTACTTCCCCGCGGGCGG
GCCAGCGTCGGTTTGGGCGGCCGGTCAAAGGCCTCTGGAAGGTAACGC
CTCTCGGGGCGTCTTATAGCCAGGGGTGCCATGCGGCCTGCCCGGACC
GAGGAACGCGCTTCGGCTCGGAC.

Trình tự rARN 28S của chủng BB8 tương đồng 100 % (550/550 bp) với đoạn rARN 28S (vùng D1/D2) của *Penicillium citrinum*.

IV. KẾT LUẬN

Từ các mẫu san hô mềm, rong biển padina, bùn biển, bọt biển đã phân lập được 38 chủng nấm khác nhau. Tỷ lệ kháng VSV kiểm định của 38 chủng phân lập là khá cao, 23 chủng có hoạt tính kháng VSVKĐ (chiếm 60,2 %), bao gồm 4 chủng kháng từ 5 VSVKĐ trở lên (chiếm 10,5%); 14 chủng kháng từ 3-4 VSVKĐ (36,8%); 5 chủng kháng 1-2 VSVKĐ (13,1%). Đặc biệt là tất cả các chủng phân lập từ bọt biển có biểu hiện hoạt tính VSVKĐ (100%), tiếp theo là các chủng phân lập từ bùn (54,5%); từ rong biển (44,4%) và từ san hô mềm (37,5%).

Đã lên men tách chiết và xác định hoạt tính kháng VSVKĐ của cặn chiết etylaxetat từ 2 chủng có hoạt tính cao nhất được phân lập từ bọt biển. Cặn chiết chủng BB8 kháng 7 trong 8 loại VSVKĐ với giá trị MIC dao động từ 100 đến 400 µg/ml. Cặn chiết BB9 kháng 5 trong loại VSVKĐ với MIC dao động từ 200-400 µg/ml. Đã định tên phân loại chủng kí hiệu BB8 có tên là *Penicillium citrinum*

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện bởi sự hỗ trợ của tiểu dự án số 1 thuộc dự án số 19 – Đề án 47 "Hợp tác Việt Nam – CHLB Nga về điều tra, khảo sát nguồn hoạt chất và đa dạng sinh học biển Việt Nam" (MOST) và hướng nghiên cứu các hợp chất có hoạt tính sinh học (VAST giai đoạn 2013-2014).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Mayer A.M. and V.K.B. Lehmann. 1998. Marine pharmacology: marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal antiinflammatory, anthelmintic, antiplatelet, antiprotozoal, and antiviral activities; with actions

on the cardiovascular, endocrine, immune, and nervous systems; and other miscellaneous mechanisms of Action. *The Pharmacologist* 42:62–69.

2. Petrini O., N.J Fokkema and J. Van-den Hueve. 1986. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In: Microbiology of the Phyllo-sphere, Cambridge University Press, Cambridge: 175 187.
3. Pietra F. 1997. Secondary metabolites from marine microorganisms: bacteria, protozoa, algae and fungi.Achievements and prospects. *Natural Product Report* 14:453–464.
4. Raghukumar C., S. Raghukumar, A. Chinnaraj, D. Chandramohan, T.M. D'Souza and C.A. Reddy. 1994. Laccase and other lignocellulose modifying enzymes of marine fungi isolated from the coast of India. *Botanica Marina* 37: 515 523.
5. Rainer E. 2010. Terpenes from Marine-Derived Fungi. *Marine Drugs* 8(8): 2340 2368.
6. Rodrigues K.F., M. Hesse, and C. Werner. 2000. Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from *Spondias mombin*. *Journal of Basic Microbiology* 40: 261 267.
7. Vande B.D.A. and A.J. Vlietlinck. 1991. Methods in plant Biochemistry: Screening Methods for Antibacterial and Antiviral Agents from Higher Plants. Academic Press, London. In: Dey. P.Mp. Harbone. J.B.,(Eds) 47-69.
8. Wu L., Fang le-kun, Liu jia-wei, Cheng wei-qi., Yun miao Yang Hui-ling. 2008. Effect of marine fungal metabolites from the South China Sea on prostate cancer cell line DU-145. *International Journal of Internal Medicine*: 35 (10): 577-644.
9. Xiong H., Q. Shuhua, X. Ying, M. Li, Q. Pei-Yuan. 2009. Antibiotic and antifouling compound production by the marine-derived fungus Cladosporium sp. F14. *Journal of Hydro-environment Research 2: 264 2.*
10. Zhan-bo W., Y. Pei, L. Tian 2004. Advance in study of pharmaceutical active substances from marine fungus. *Advances in Marine Science*. 03
11. Zhang C., and S.K. Kim. 2012. Application of marine microbial enzymes in the food and pharmaceutical industries. In: Advances in Food and Nutrition Research 65: 423 435.