

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 21620071151943

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

土壤稀有放线菌选择分离及
系统分类研究

Study on Selective Isolation and Phylogenetic Taxonomy
of Rare Actinomycetes in Soil

刘 最

指导教师姓名: 黄耀坚 教授

专业名称: 微生物学

论文提交日期: 2010年05月

论文答辩时间: 2010年06月

学位授予日期: 2010年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2010年06月

厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

另外，该学位论文为()课题(组)的研究成果，获得()课题(组)经费或实验室的资助，在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

目 录

中文摘要	I
英文摘要	III
1. 前 言	1
1.1 放线菌研究进展及分类地位	1
1.2 稀有放线菌资源研究进展	2
1.2.1 稀有放线菌在微生物系统中的地位	2
1.2.2 稀有放线菌研究意义	3
1.3 稀有放线菌分离方法研究进展	7
1.3.1 分离源的选择	7
1.3.2 分离培养基的选择	8
1.3.3 预处理技术	12
1.3.4 抑制剂的选择	15
1.3.5 分离培养温度和时间	15
1.4 放线菌分类学研究进展及发展趋势	16
1.5 本课题研究的目的是、意义及内容	17
2. 材料与方 法	18
2.1 材 料	18
2.1.1 土样来源和碳源的选择	18
2.1.2 菌株来源	19
2.1.3 常用培养基	19
2.1.4 常用试剂	22
2.1.5 主要试剂及耗材	24
2.1.6 主要仪器	25
2.2 方 法	25
2.2.1 稀有放线菌的分离、培养和发酵粗提物的制备	26
2.2.2 生物活性的测定	28

2.2.3 多相分类研究	29
3. 结果分析	44
3.1 稀有放线菌的分离	44
3.2 稀有放线菌的分类	54
3.2.1 属的鉴定和分布	54
3.2.2 系统发育树的构建	56
3.3 菌株 XMU15 多相分类鉴定	61
3.3.1 形态特征	62
3.3.2 培养特征	62
3.3.3 生理生化特征	63
3.3.4 细胞化学组分	65
3.3.5 分子分类结果	67
3.3.6 菌株 XMU15 描述	71
3.4 稀有放线菌活性测定	72
3.4.1 抗菌活性测定	72
3.4.2 抗肿瘤活性测定	74
4. 讨论与结论	76
4.1 聚乳酸 PLA 和丝蛋白粉作为稀有放线菌分离的选择碳源	76
4.2 六种培养基选择分离效果的比较	77
4.3 分离稀有放线菌的多样性	79
4.4 菌株 XMU15 多相分类鉴定结果	79
4.5 多相分类鉴定技术	81
4.6 稀有放线菌抗菌和抗肿瘤活性测定	82
5. 结论与展望	83
参 考 文 献	85
致 谢	93
附 录	94

Catalogue

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
1.Introduction	1
1.1 Progress in the taxonomy of actinomycetes	1
1.2 Study on the resources of rare actinomycetes	2
1.2.1 The system status of rare actinomycetes	2
1.2.2 The prospect of study on rare actinomycetes	3
1.3 Progress in the isolation of rare actinomycetes	7
1.3.1 The choice of separation source	7
1.3.2 The choice of isolation culture medium	8
1.3.3 Pretreatment technique	12
1.3.4 The choice of inhibitors	15
1.3.5 Separation of culture temperature and time.....	15
1.4 Research development and future trend on the taxonomy of actinomycete	16
1.5 Purpose,contents and significance of this thesis	17
2. Materials and Methods	18
2.1 Materials	18
2.1.1 Samples and the choice of carban source	18
2.1.2 The source of strain.....	19
2.1.3 Culture medium for microbes	19
2.1.4 Reagents	22
2.1.5 Reagents and other materials	24
2.1.6 Apparatus.....	25
2.2 Methods	25
2.2.1 Isolation of rare actinomycetes,fermentation and extraction of strains	26
2.2.2 Biological activity test	28
2.2.3 Study on polyphasic taxonomy	29
3. Results	44

3.1 Isolation of rare actinomycetes	44
3.2 The diversity of rare actinomycetes	54
3.2.1 Identification and distribution	54
3.2.2 Neighbour-joining phylogenetic tree	56
3.3 Polyphasic taxonomy of strain XMU15	61
3.3.1 Morphological characteristics	62
3.3.2 Culture characteristics	62
3.3.3 Physiological characteristics	63
3.3.4 Chemical characteristics	65
3.3.5 Molecular classification characteristics	67
3.3.6 Description of strain XMU15	71
3.4 Biological activity test of rare actinomycetes	72
3.4.1 The analysis for antimicrobial activity	72
3.4.2 The analysis for antitumor activity	74
4. Discussion and Conclusion	76
4.1 PLA and silk as the carbon source for isolation of rare actinomycetes	76
4.2 The isolation effect of six culture medium	77
4.3 The analysis of the diversity of rare actinomycetes	79
4.4 Strain XMU15 identification	79
4.5 Polyphasic taxonomy	81
4.6 Antimicrobial test and antitumor test	82
5. Conclusion and Prospect	83
Reference	85
Acknowledgements	93
Appendix	94

摘要

天然产物是药物的重要来源。许多常用的临床药物均来自微生物次级代谢产物。放线菌是一类有重要价值的微生物资源,约 75%左右的抗生素都是由其产生的,因此,从放线菌中可以分离到许多结构新颖,生物活性多样的化合物。近年来,由于链霉菌中大量的抗生素不断被重复发现,继而人们把研究的重点转移到稀有放线菌上,它是发现新药的有效发展途径。

本论文对采集自厦门,云南,安徽,重庆等地的土样作为实验材料,采用选择性分离方法,进行稀有放线菌的分离。分别比较研究了 6 种不同的培养基对稀有放线菌分离的效果。实验结果发现这 6 种营养贫乏的培养基对稀有放线菌的分离均有一定效果,其中分离效果最理想的是聚乳酸(PLA)培养基。去重复后对分离到的 104 菌株进行分子鉴定,通过 16SrDNA 的序列分析,结果表明菌株分属于 11 个稀有放线菌属中,分别是马杜拉菌属(*Actinomadura*),拟无枝酸菌属(*Amycolatopsis*),野野村氏菌属(*Nonomuraea*),诺卡氏菌属(*Nocardia*),糖霉菌属(*Glycomyces*),链孢囊菌属(*Streptosporangium*),假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*),韩国生工菌属(*Kribbella*),拟诺卡氏菌属(*Nocardiopsis*),糖单孢菌属(*Saccharomonospora*)和姜氏菌属(*Jiangella*)。PLA 培养基中马杜拉菌属(平均分离率 16.5%),拟无枝酸菌属(平均分离率 9.3%),野野村氏菌属(平均分离率 12.7%),韩国生工菌属(平均分离率 9.0%),拟诺卡氏菌属(平均分离率 32.5%)和糖单孢菌属(平均分离率 45.7%)占绝对优势。迄今,尚未见有利用 PLA 培养基分离稀有放线菌的研究。本文利用 PLA 和丝蛋白粉作为选择性碳源分离韩国生工菌属,野野村菌属,诺卡氏属,姜氏菌属,糖霉菌属和拟诺卡氏菌属也是首次报道,进一步证实这两种稀有碳源在稀有放线菌分离上有着很大的研究开发潜力。

对分离到的一株稀有放线菌通过形态特征、培养特征,生理生化测定,细胞化学组份分析, DNA G+Cmol%测定,16SrDNA 全序列分析以及系统发育学分析等相结合的多相分类技术进行了系统分类研究。从表型、基因型和系统发育三个层次比较分析,最终确定实验菌株的分类地位。菌株 XMU15 为糖单孢菌属内的一个新物种,命名为海洋单孢菌(*Saccharomonospora marina*),已经在线发表于国

际系统与进化细菌学杂志(International Journal of Systematic Bacteriology, 2009, 10.1099/ijb.0.017038-0)上。

对分离的 133 株稀有放线菌以枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*), 大肠杆菌(*Escherichia coli*), 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*), 短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*), 藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*), 耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*), 白色假丝酵母(*Candida albicans*)和黑曲霉(*Aspergillus niger*)为指示菌, 采用滤纸片法对这些菌株进行抗菌活性检测, 有 117 株对 8 种指示菌显示出一种或者几种抗菌活性, 占供测菌株的 88.0%, 其中主要是抗革兰氏阳性细菌的活性。采用 MTT 法测试菌株对 HeLa 和 HepG2 细胞的抗肿瘤活性, 结果显示 88 株对 HeLa, HepG2 细胞具有抑制作用, 占供测菌株的 66.2%。

关键词: 稀有放线菌; 分离; 聚乳酸; 活性筛选; 多相分类

Abstract

Nature products are the important source of medicine. Many important clinical medicine are microbial secondary metabolites. Actinomycetes have a considerable value as a prolific producer of antibiotics and other therapeutic compounds. About 75% of antibiotics are produced by actinomycetes. So actinomycetes was a kind of important resource looking for many types of novel bioactive metabolites. Recently many repeated antibiotics are found from *Streptomyces*, so researches are concentrated on exploiting rare actinomycetes, which is an effective method of finding new medicine.

In this study, the selective isolation methods which based on soil samples collected from Xiamen, Chongqing cities and Yunnan, Anhui provinces of China were investigated to isolate rare actinomycetes. Using six types of culture medium, we studied their influence on effect of isolation of rare actinomycetes. The result revealed that all of them produced some effects on the isolation of rare actinomycetes, and PLA culture medium was the best for the isolation. By eliminating the same strains from one genus and, then comparing their 16S rDNA sequence online, the 104 strains were classified into 11 genera, including *Actinomadura*, *Amycolatopsis*, *Nonomuraea*, *Nocardia*, *Glycomyces*, *Streptosporangium*, *Pseudonocardia*, *Kribbella*, *Saccharomonospora*, *Jiangella* and *Nocardiopsis*. And *Actinomadura*(16.5%), *Amycolatopsis*(9.3%), *Nonomuraea*(12.7%), *Kribbella*(9.0%), *Saccharomonospora* (45.7%) and *Nocardiopsis*(32.5%) were of predominant genera under our isolation strategy. Until now, there have not been reports using PLA medium for isolating rare actinomycetes yet. Meanwhile our study is the first report to use PLA or silk protein as a selective carbon for isolation of rare actinomycetes, such as *Nonomuraea*, *Kribbella*, *Nocardia*, *Glycomyces*, *Jiangella*, *Nocardiopsis*. They are worth further researches.

One actinomycete isolate had been identified systematically by using polyphasic taxonomic approaches, including morphological and cultural characteristics, physiological and biochemic tests, analysis of chemotaxonomy, G+C contents, analysis of 16S rDNA phylogenetic analysis etc. The taxonomy status of the isolate was finally determined from three levels including phenotypic, genetic and

phylogenetic characteristics. The strain XMU15 which was named as *Saccharomonospora marina* sp. nov is a novel species of genus *Saccharomonospora*. The similarity value between strain XMU15 and *Saccharomonospora xinjiangensis* was 96.7%. This discovery has been published in the International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology online (2009,10.1099/ijs.0.017038-0).

Through detection of bioactivities on the 133 rare actinomycetes isolates by eight indicator organisms including *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* were tested, 117 strains (88.0%) displayed anti-microbial activities on one or more than one of 8 indicator organisms. Most of them were against gram-positive bacteria. In antitumor activity test, 88 strains(66.2%)showed activity against HeLa and HepG2 cells.

Key words: rare actinomycetes; isolation; polylactide; bioactivity screening; polyphasic taxonomy

1. 前言

1.1 放线菌研究进展及分类地位

由于抗生素的广泛应用, 致病菌对现有药物的抗药性不断增强。同时, 新的人类疾病相继出现, 地球人口持续增加等因素也促使人们不断去寻求开发新药。而处于环境保护的考虑, 人们也需要寻找更为高效而低毒的方式来控制农业病虫害。微生物来源的天然产物筛选是新药开发的重要措施, 也是研究生物合成机制的有效工具, 放线菌是目前开发微生物药物潜力最大的一类微生物资源^[1, 2]。

放线菌是一类数量大, 种类多, 具有分枝状菌丝体的高G+Cmol%的革兰氏阳性细菌(图1.1)。其生长比一般细菌缓慢, 在筛选当中它的生长常会受到快速生长菌的抑制。大多放线菌为离体腐生型微生物, 极少是人和动植物致病菌^[3]。它们广泛分布于不同的自然生态环境中, 其特有的形态和生物学特性是研究生物形态发育和分化的良好材料。土壤是它们的主要习居场所, 对于土壤的结构和组成, 放线菌扮演了重要的角色。最早是由Cohn(1875)自人泪腺感染病灶中分离到一株丝状病原菌—链丝菌(*Streptothrix*)而被发现。直到本世纪40年代初期, 放线菌还是一类未被人们熟悉的微生物, 当时仅报道了含义不很明确的四五个属, 而且大部分科学工作者都把放线菌当做真菌。直到在1989年出版的《伯杰氏系统细菌学手册》(Bergey's Manual of Systematic Bacteriology)中放线菌被划分在原核生物界, 厚壁菌门, 分枝菌纲(Thallobacteria), 放线菌目(Actinomycetales)。1987年Woese通过对400多种生物的16S rRNA序列的系统发育学分析, 提出了著名的生命三域学说, 即真细菌域(Eubacteria)、古细菌域(Archaeobacteria)和真核生物(Eucaryota)^[4-7]。

Stackebrandt 和 Woese 根据 16SrRNA 序列相性、DNA-DNA 杂交和 DNA-rRNA 杂交等的结果构建了放线菌与其它生物之间的系统发育树。结果表明放线菌作为 G⁺细菌的一个分枝与芽孢杆菌属、乳杆菌属、链球菌属、梭菌属构成的梭状菌分枝有着共同的起源。研究表明物种的核酸分子结构和序列比表型特征更能揭示生命的进化关系。1997 年 Stackebrandt 等通过对几百株放线菌及其相近细菌的 16S rRNA/rDNA 序列分析, 提出了新的分类系统, 建立了放线菌纲(*Actinobacteria*)这一新的分类等级。并将放线菌纲分为 5 个亚纲。《伯杰氏系统细

菌学手册》第二版采纳了这一分类观点。迄今，各国系统学专家综合各种证据，已将放线菌提升为放线菌门。目前放线菌在微生物系统学中的分类地位为细菌域，放线菌门，放线菌纲，放线菌亚纲，放线菌目^[8-15]。

1.2 稀有放线菌资源研究进展

1.2.1 稀有放线菌在微生物系统中的地位

迄今，放线菌目包括 11 个亚目、48 个科、约 200 多个属。链霉菌属是土壤放线菌中数量最多的一个属^[16]。20 世纪 60 年代 Lechevalier 等人曾用 3 种培养基及常规的稀释平板涂布法对 16 种不同来源的土样进行放线菌的分离，其结果是 95% 的放线菌属于链霉菌属，游动放线菌及小单孢放线菌等十多个属的放线菌仅占 5% 左右^[17]。J.L.You 等对海底沉积淤泥放线菌的研究中分离到的放线菌中 87.2% 属于链霉菌，其余的是小单孢等非链霉菌放线菌^[18]。根据 Lechevalier 最早的概念，稀有放线菌(rare actinomycetes)是指这些用常规的分离程序和分离手段进行样品分离时，一些出现频率要比链霉菌低得多的类群，也有些学者们把所有的非链霉菌(no-streptomycetes)称为稀有放线菌。因而，它不是一个分类单元^[19]。紧接着，学者们对这些稀有放线菌的来源、生理机能、生态及次生分子代谢调控方面的研究也日益丰富起来^[20]。然而，分子生物学研究结果表明，尽管新的属、种不断被发现，环境中只有极少一部分微生物包括放线菌为我们发现且得到纯培养，目前人们分离到的放线菌不到自然界放线菌总量的 10% 而已^[17]。放线菌是一类具有分枝菌丝的特殊细菌，其生长比一般细菌缓慢，在筛选当中它的生长常会受到快速生长菌的抑制，导致放线菌的分离筛选比较困难。因此，放线菌还有极其丰富多样的未知世界等待人们去发现。然而，之所以绝大多数包括放线菌在内的微生物未被发现，主要还是受分离条件和技术的限制，而这些未被分离到的放线菌对于我们来说大部分都属于稀有放线菌的范畴，是我们极大的挑战。新物种潜在着新代谢产物，这也是以后在菌种筛选过程中，扩大菌种来源亟需解决的问题^[17]。

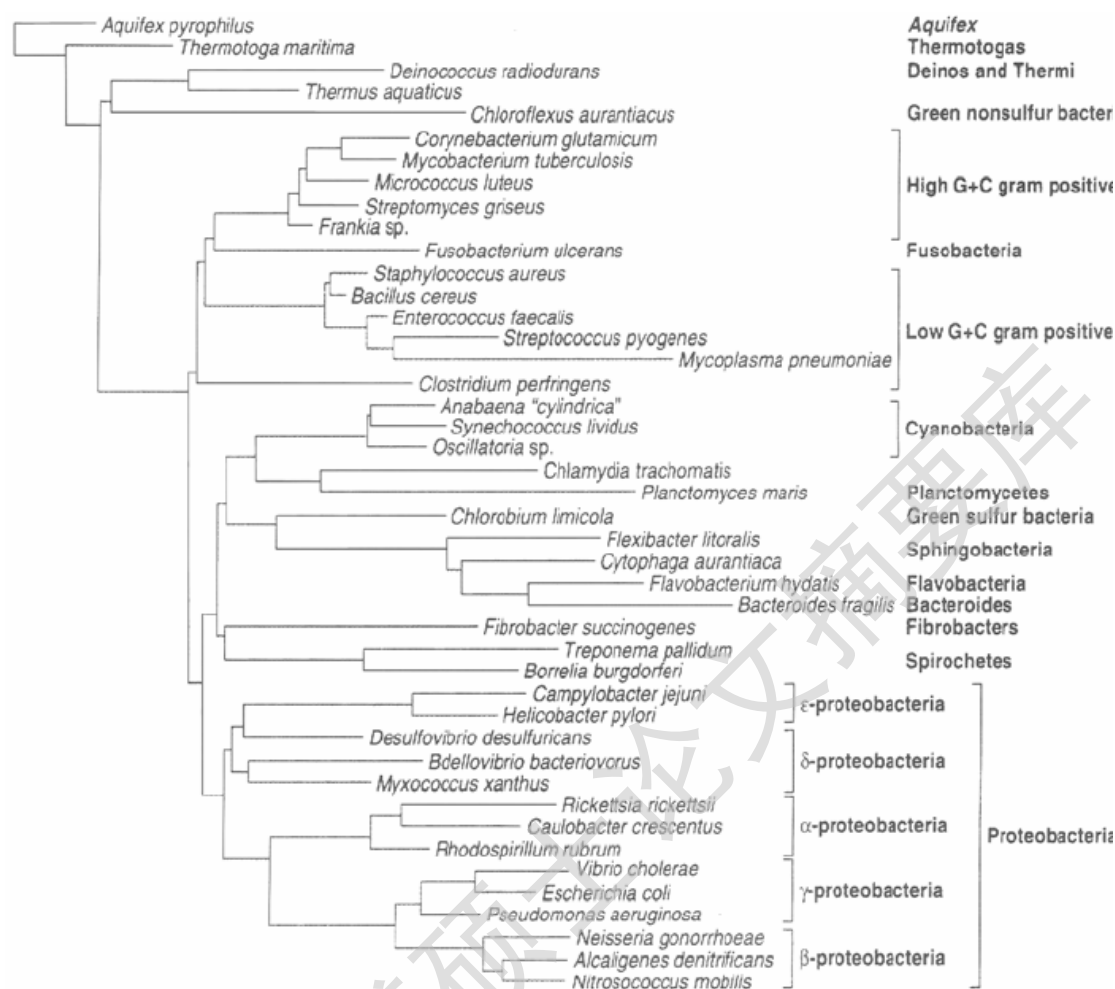


图 1.1 根据 16S rRNA 序列生成的细菌系统进化树

Fig.1.1 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence

资料来源: Woese C R, Kandler O, Wheelis M. Towards a natural system of organisms: Proposal of the domains Archa, Bacteria and Eucarya. Proc[J]. Natl Acad Sci, 1990, 87: 4576-4579.

1.2.2 稀有放线菌研究意义

放线菌是一类比其他微生物更为丰富的生物活性物质资源, 其种类繁多, 代谢功能各异。许多放线菌都能产生生物活性物质, 是一类具有广泛实际用途和巨大经济价值的生物资源, 已为人类做出了巨大贡献。它产生的多种代谢产物中能降解大量的和不同种类的有机化合物, 对有机物的矿化有着重要功能; 如抗生素、有机酸、氨基酸、蛋白质、淀粉酶、脂肪酶、酶制剂等在工业、农业、医疗、食品、以及国防等领域上产生了巨大的经济效益; 此外, 在甾体转化、石油脱蜡、烃类发酵、污水处理、生物固氮等方面也有应用。目前已经发现的数万种微生物来源的生物活性物质中, 约有 70% 是由放线菌所合成的各种次生代谢产物, 这是

其他生物难以比拟的。下面简要列出一些已经广泛应用的放线菌次级代谢产物(表 1.1)。其中, 仅聚酮类次生代谢产物就有近 1 万种。放线菌所产生的生物活性代谢产物中, 抗生素最引人注目, 迄今发现的上万种天然抗生素中, 约有 2/3 是有放线菌产生的。其中许多具有重要的医用价值而应用于临床, 例如, 氨基糖苷类、蒽环类、氯霉素类、大环内酯类和四环素类抗生素^[17]。

表 1.1 目前已经大规模应用的放线菌次生代谢产物

Table 1.1 The widely used metabolites from actinobacteria

功用	抗生素
抗细菌类	链霉素(streptomycin), 四环素(tetracycline)
抗真菌类	制霉菌素(nystatin)
抗寄生类	阿维菌素(ivermectin)
免疫调节	雷帕霉素(rapamycin)
抗肿瘤类	放射菌素(actinomycin), 丝裂霉素 C(mitomycin C)
酶抑制剂	克拉维酸(clavulanic acid)
糖尿病药	灰色霉素(bafilomycin), 链脲佐菌素(streptozotocin)

然而, 自从 1944 年美国放线菌学家 Walksman 发现链霉素以后^[21], 大量抗生素中又以链霉菌属的菌株产生的最多, 如放线菌素、四环霉素、保米霉素(Blasticidin-S)、维利霉素(Validamycin)及康霉素(Kanamycin)等, 其占总数的 52%。而其他非链霉菌, 如小单孢菌属、游动放线菌属、拟无枝菌酸菌属、链孢囊菌属等, 占总数的 15%(图 1.2)。放线菌也产生除抗生素外的其他多种活性物质, 如酶及酶抑制剂、有机酸、氨基酸、维生素、生物碱及免疫调节剂等, 其中, 链霉菌来源的占 31%, 其他非链霉菌来源的占 9%(图 1.3)^[17]。

当前从链霉菌中筛选抗生素日益困难, 从中找到新的生物活性物质的概率越来越低, 已知化合物的重复分离率越来越高, 这表明在非链霉菌放线菌中发现新的生物活性物质的几率也越来越大, 其更具有产生新抗生素的潜力。继而人们把目光投向稀有放线菌^[22], 进而提高并改进选择分离稀有和极罕见的链霉菌群, 去寻找那些未知的活性化合物, 这项工作也变得日益重要起来^[23]。廖昌珑^[24]根据发表在《Japan Kokai Patent》(1983~1992)的数据, 在种、属水平上对产生新抗生素的放线菌进行了分类, 发现产抗生素的稀有放线菌占据 1/3(表 1.2), 马杜拉放

线菌就是其中之一。其产生的抗生素具有抗细菌、真菌、肿瘤等活性^[25]。例如：近年来发现的抗细菌抗生素 IB-00208 对革兰阳性细菌及肿瘤细胞有体外抑制作用^[26]。由海洋马杜拉放线菌 M048 菌株产生的抗生素 chandrananimycinsA-C,都具有抗结肠癌、黑瘤、肺癌及乳腺癌等肿瘤细胞的活性,并且 chandrananimycinsC 还具有强抗细菌、真菌及藻类活性^[27]。此外,小单孢菌科、诺卡氏菌科和假诺卡氏菌科等的许多成员也能产生重要的生物活性物质,包括抗生素、酶类、维生素、藻类促生长因子、纤维素降解促进因子等。例如:拟无枝菌酸菌属产生的万古霉素和利福平具有很强的抗细菌活性,已成功应用于临床。近年来从拟无枝菌酸菌 ML630-mF1 菌株中产生的 kigamicin D 能在较低浓度下抑制各种鼠肿瘤细胞生长的 IC_{50} 约为 $1\mu\text{g/ml}$ ^[28]。指孢囊菌属菌株 YIM31333 和一株链孢囊菌属菌株 YIM31355, 其发酵液对粘虫的致死率分别为 72%和 82%^[29]。韩国生工菌属的 1 个新种抗菌高丽菌(*Kribbella antibiotica* sp. nov.), 对灰霉病、稻纹枯病、稻瘟病等病害有较强防治作用^[30]。游动放线菌能产生抗真菌的 Sch56036, 抗癌抗生素, 黄色霉素和木糖异构酶等。糖多孢菌能产生大环内脂类杀虫剂—多杀菌素。诺卡氏菌能产生 30 多种抗生素, 如对结核分枝杆菌和麻疯分枝菌有特效的利福霉素, 对引起植物白叶枯病的细菌, 以及原虫、病毒有作用的间型霉素, 对革兰氏阳性细菌有作用的瑞斯托菌素等, 另外诺卡氏菌还可用于石油脱蜡、烃类发酵以及污水处理中分解腈类化合物^[31, 32]。

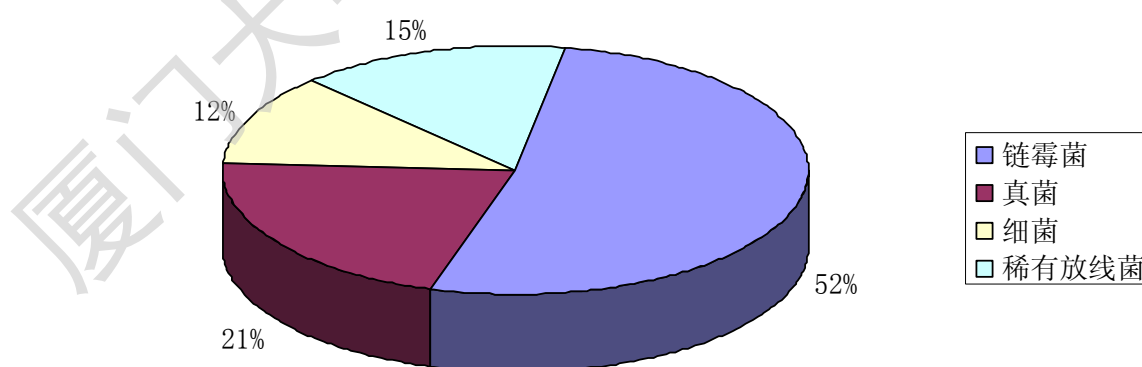


图 1.2 抗生素的来源

Fig.1.2 The source of antibiotics

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库