

海芒果可培养细菌的分离鉴定及其抑制海洋鱼类致病菌活性研究*

Identification and Inhibition Activity Inhibit Fish Pathogens of Cultivated Bacteria Isolated from *Cerbera manghas*

李小群^{1,2}, 李菲¹, 李家怡^{1,2}, 颜栋美², 苏志维¹, 高程海^{1,3**}

LI Xiaoqun^{1,2}, LI Fei¹, LI Jiayi^{1,2}, YAN Dongmei², SU Zhiwei¹, GAO Chenghai^{1,3}

(1. 广西科学院, 广西海洋天然产物与组合生物合成化学重点实验室培育基地, 广西南宁 530007; 2. 广西大学轻工与食品工程学院, 广西南宁 530004; 3. 广西海洋研究所广西海洋生物技术重点实验室, 广西北海 536000)

(1. Guangxi Key Laboratory of Marine Natural Products and Combinatorial Biosynthesis Chemistry, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China; 2. College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China; 3. Guangxi Key Laboratory of Marine Biotechnology, Guangxi Institute of Oceanology, Beihai, Guangxi, 536000, China)

摘要:【目的】研究红树植物海芒果 *Cerbera manghas* L. 及其根际土壤可培养细菌多样性及其代谢产物抑制鱼类致病菌的生物活性。【方法】采用纯培养法分离并基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析法对分离得到的细菌进行多样性研究, 采用滤纸片法研究其抑制海洋鱼类致病菌的生物活性。【结果】从海芒果及其根际土壤中共分离得到 15 株可培养细菌, 采用 16S rRNA 基因序列的系统发育分析后发现, 这些菌分属于 2 个大的细菌发育类群: 厚壁菌门(Firmicutes, 占比为 53%)和放线菌门(Actinobacteria, 占比为 47%), 其中 4 株为芽孢杆菌属, 6 株为链霉菌属。活性研究发现, 所有测试菌株对 3 种海洋鱼类致病弧菌均有一定的抑制作用, 其中 VT86 (*Kitasatospora paranensis*), V139-2 (*Streptomyces luteireticuli*), V140-2 (*Streptomyces jiujiangensis*), VT19 (*Streptomyces orinoci*), VT113 (*Streptomyces niveiscabiei*) 这 5 株菌的抑菌效果较好, 以 VT86 (*K. paranensis*) 抑菌活性最好。【结论】红树植物海芒果及其根际土壤中的细菌丰富多样, 部分细菌具有抑制海洋鱼类致病菌生长的生物活性, 具有开发成新型抑制鱼类致病菌药物的潜力。

关键词: 海芒果 可培养细菌 系统发育分析 抑菌活性

中图分类号: Q939.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-7378(2017)02-0108-06

收稿日期: 2016-04-18

作者简介: 李小群(1992-), 女, 硕士研究生, 主要从事海洋食品天然产物的提取及其活性研究。

* 国家自然科学基金项目(41566004), 广西自然科学基金项目(2015GXNSFBB139001)和广西海洋生物技术重点实验室开放基金资助课题(GLMBT-201603)资助。

** 通信作者: 高程海(1979-), 男, 研究员, 主要从事北部湾海洋微生物资源及其应用研究, E-mail: 1178740043@qq.com。

Abstract: 【Objective】To study the bioactivity of *Cerbera manghas* and its rhizosphere soil to cultivate bacterial diversity and its metabolites to inhibit fish pathogens. 【Methods】The diversity of isolated bacteria was studied by the method of pure culture and the phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequence using the filter paper method, the isolated bacteria were tested to inhibit the activity of marine fish pathogenic bac-

teria. **【Results】**We isolated 15 bacterial strains from *Cerbera manghas* and its rhizosphere soil through conventional culture dependent method, identified the strains according to morphological observation, physiological, biochemical characteristics, and the homologous analysis of 16S rRNA sequences of nucleotides. Results showed that these strains belonged to two major bacterial development groups: Firmicutes (53%) and Actinobacteria (47%), of which 4 were *Bacillus* sp., 6 were *Streptomyces*. Activity showed that the VT86 had the best antibacterial activity, which might have potential value for developing new inhibition of sea fish pathogens drugs. **【Conclusion】***Cerbera manghas* and its rhizosphere soil were rich in bacteria resources, and biological activity of those strains could improve the prevention and treatment of sea fish diseases.

Key words: *Cerbera manghas*, cultured bacteria, phylogeny, antimicrobial activity

0 引言

【研究意义】海芒果 *Cerbera manghas* L., 又名海檬果, 为夹竹桃科 Apocynaceae 海芒果属 *Cerbera* 红树植物, 常绿小乔木, 分布于日本、印度、中国、澳大利亚的热带地区, 在我国主产于广西、广东、海南、台湾等地^[1]。海芒果是《全国中草药汇编》中收录记载的 3 种药用红树植物之一, 具有独特的生态适应性和生态功能^[2]。作为一种具有特殊药用价值的红树植物, 海芒果的内生细菌及其根际土壤的细菌可作为寻找新型抗生素的重要源泉。随着我国水产品养殖业的迅速发展, 水产品产量跃居世界首位, 但各种鱼类疾病也随之涌现^[3], 且新的疾病及致病菌耐药性等问题也层出不穷。对养殖海洋鱼类的致病菌株的流行病学调查发现, 弧菌病是鱼类养殖中危害极大的病症, 可危及鱼苗和成鱼^[4]。哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*)、副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 和溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 是海水养殖鱼类的常见致病菌, 这 3 种弧菌引起的大范围发病率给养殖业带来严重的经济损失。同时, 误食这些被弧菌污染的海产品可引起食物中毒, 严重者会出现休克, 甚至死亡, 给人们生命健康带来严重威胁。因此, 对这些弧菌引起的海洋鱼类疾病的治疗显得尤为重要。**【前人研究进展】**海芒果作为一种具有特殊药用价值的半红树植物, 其果实有剧毒, 而树皮、叶子和乳汁均可以用药, 有催吐、下泻、堕胎等作用^[5]。曹雷雷等^[6]首次从海芒果果实中分离得到苯甲酸 (benzoic acid), 香草酸 (vanillic acid), 香草醛 (vanillin), 对羟基苯甲醛 (p-hydroxybenzaldehyde) 以及间醛基苯甲酸 (isophthalaldehydic acid) 等 15 个化合物。胡世伟等^[7]发现还芒果树叶的挥发油和脂肪酸中, 2,6-二

叔丁基-4-甲基苯酚为挥发油主要成分, 十六酸 (棕榈酸) 和 9,12-十八碳二烯酸 (亚油酸) 的含量在脂肪酸中比较高。林爱玉等^[8]报道了 4 种半红树植物内生真菌的抗菌活性。夏丽娟等^[9]研究发现药用红树植物根际土壤真菌和内生真菌次级代谢产物中存在着丰富的天然活性物质。**【本研究切入点】**通过多种技术手段, 深入研究红树植物海芒果及其根际土壤可培养细菌的多样性及其对 3 种海水养殖鱼类致病弧菌的抑菌活性。**【拟解决的关键问题】**为广西红树植物资源的研究、保护和利用提供参考依据, 为海洋鱼类养殖中弧菌病的有效防治提供新的思路和方法。

1 材料与方 法

1.1 材 料

红树植物海芒果 (全株) 及其根际土壤于 2015 年 5 月采集于广西北仑河口国家级自然保护区。

哈维氏弧菌分离自北部湾的红笛鲷, 溶藻弧菌来源于斜带石斑鱼, 副溶血弧菌分离自养殖区海水。

1.2 仪 器 和 试 剂

Carestream GelLogic 2200Pro 冷 CCD 凝胶成像分析系统 (美国 Carestream 公司), Tgradient 多功能梯度 PCR 仪 (德国 Bimetra), EXF24086V 超低温冰箱 (Thermo scientific), MINI B-100 恒温金属浴 (杭州米欧仪器有限公司), VB55 高压蒸汽灭菌锅 (Systec), SW-CJ-2F 洁净工作台 (苏州佳宝净化工程设备有限公司), HH. B11-BS-II 电热恒温培养箱 (上海跃进医疗器械公司), DHG-9140A 电热恒温鼓风干燥箱 (上海精宏实验设备有限公司), IS-RDS3 恒温振荡器 (苏州精骐有限公司), Mini-6K 微型离心机 (珠海黑马医学仪器有限公司), VCX-500 超声波细胞破碎仪 (南京新辰生物科技有限公

司),SHB-B₉₅循环水式多用真空泵(河南省予华仪器有限公司)。

16S rRNA PCR 扩增引物(27F:5'-AGAGTT-TGATCCTGGCTCAG-3'; 1492R: 5'-GGTTAC-CTTGTTACGACTT-3')购自南宁科迪生物科技有限公司。

1.3 培养基及保藏剂

M4 培养基:1 g L-天门冬酰胺,5 g 海藻糖,1 000 mL 去离子水,15%琼脂,pH 值 7.2~7.4,121℃灭菌 20 min。

M5 培养基:5 g 海藻糖,1 g 脯氨酸,10 mL 复合盐母液,1 mL 维生素母液,13%琼脂,pH 值 7.2~7.4,121℃灭菌 20 min。

M9 培养基:1 g 精氨酸,6 mL 丙三醇,10 mL 复合盐母液,15%琼脂,1 000 mL 去离子水,pH 值 7.2~7.4,121℃灭菌 20 min。

M10 培养基:10 g 葡萄糖,0.5 g 水解酵素,10 mL 复合盐母液,15%琼脂,1 000 mL 去离子水,pH 值 7.2~7.4,121℃灭菌 20 min。

AGG 培养基:10 g 淀粉,1 g 葡萄糖,5 mL 丙三醇,10 mL 复合盐母液,15%琼脂,1 000 mL 去离子水,121℃灭菌 15 min。

R2A 培养基:0.5 g 酵母粉,0.5 g 蛋白胨,0.5 g 酪蛋白氨基酸,0.5 g 葡萄糖,0.5 g 可溶性淀粉,0.3 g 磷酸二氢钾,0.05 g 七水硫酸镁,0.3 g 丙酮酸钠,15%琼脂,pH 值 7.2~7.4,121℃灭菌 15 min。

固体 ISP2 培养基:2.0 g 酵母粉,2.0 g 麦芽提取粉,2.0 g 葡萄糖,1 000 mL 陈海水,15%琼脂,121℃灭菌 20 min。

液体 ISP2 培养基:2.0 g 酵母粉,2.0 g 麦芽提取粉,2.0 g 葡萄糖,陈海水定容至 1 L,121℃灭菌 20 min。

保藏剂:20%的甘油冻存管,121℃灭菌 30 min。

1.4 方法

1.4.1 菌株载体采集与处理

海芒果植株去除表层泥样,立即装入无菌袋,根际土壤暂存于放有冰块的保温箱内,送回实验室后冷藏保存(-20℃)。

1.4.2 菌株的分离、纯化和保藏

称取 0.2 g 土壤,置于 50 mL 锥形瓶中,加入 10 mL 带有玻璃珠的无菌陈海水后,放入摇床(28℃,140 r/min)富集 2 h。取土壤悬液依次制备

10^{-1} ~ 10^{-4} 4 个不同的稀释度,吸取 100 μ L 不同稀释度的稀释液涂布于 7 种不同类型的固体培养基(M4、M5、M9、M10、AGG、R2A、ISP2)上,每个平板培养基设置 4 个平行样,置于 28℃ 恒温培养箱中,培养 3~5 d。

海芒果的根、茎、叶、果实经前处理后,根、茎、叶分别切碎,果实切开取出果核,分别放入研磨器中充分研磨,加入 1 mL 无菌水混匀,吸取 1 mL 混合液至离心管中。取混合液稀释至 10^{-3} 浓度,吸取 100 μ L 稀释液涂布于 7 种不同培养基上,每个平板培养基设置 4 个平行样,置 28℃ 恒温培养箱中培养 3~4 d,直到长出可辨认的菌落。

观察已经涂布平板上长出的菌落特征,以及每个平板上菌落的总数、种类和数量。根据菌落的大小、颜色及表面形态(透明度、外观形状、干燥程度、突起程度)等特征,挑取单菌落进行纯化。将纯化菌株接种在 ISP2 培养基上,用含 20% 甘油管保存纯化的菌株,每株菌株保存 10 管,使用分段降温法,最后保存于超低温冰箱(-80℃),所有步骤均按常规无菌方法操作。

1.4.3 菌株的 16S rRNA 基因鉴定及系统发育分析

将菌株活化后,按照周双清等^[10]的方法,提取菌株总 DNA。以此作为模板,采用 27F/1492R 引物进行 PCR 扩增。PCR 反应条件:95℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 1 min,55℃ 复性 5 min,72℃ 延伸 15 min,共 31 个循环;72℃ 延伸 10 min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,电压 110 V,点样量为 2.5 μ L,最后在凝胶成像系统下观察并照相。根据细菌的特殊形态特征和颜色差异,选取 15 株代表菌株提取 DNA 及 16S rRNA 的扩增。所得产物委托广州美吉生物科技有限公司测序。

将测定的基因序列,在 NCBI 数据库和韩国标准菌株数据库中采用 BLAST 程序进行在线比对分析。经 BLAST 比对后,选取每个菌种相似度最高的 16S rRNA 基因序列作为标准株,通过 Clustal X 软件^[11]进行多序列比对及相似性分析,并用 MEGA5.0 软件^[12]以 Neighbor-Joining 法构建系统进化树。

1.4.4 活性供试样品的制备

将纯化的菌株按 2% 的接种量,接种到装有 50 mL 液体 ISP2 培养液的 250 mL 锥形瓶中,进行小规模发酵,置 28℃、180 r/min 的摇床上,振荡培养 10 d,然后提取发酵产物。菌体细胞采用超声波细

胞破碎仪破碎,以等体积比(V:V=1:1)加入乙酸乙酯溶液,萃取发酵液。收集萃取液,进行真空浓缩至少量,转移至已称重西林瓶中至完全干燥,制得所需活性供试样品。

1.4.5 抑菌试验

采用滤纸片法^[13]测试供试样品对3种常见鱼类致病菌:哈维氏弧菌、溶藻弧菌和副溶血弧菌的抑制活性,将供试指示菌分别制成菌悬液,各取25 μL滴在平板上,涂布棒均匀涂布,制成含指示菌的平板,用镊子将灭菌的滤纸片(6 mm)贴于平板上。取5 μL供试样品滴在滤纸片上,恒温(28℃)培养24 h,通过测量抑菌圈直径来判定抑菌活性。供试样

表1 海芒果及其根际土壤可培养细菌菌落特征

Table 1 The colony characteristics of cultivated bacteria from *Cerbera manghas* and its rhizosphere soil

编号 No.	颜色 Color	形状 Shape	高度 Height	表面 Surface	干湿度 Humidity	透明 Transparency
VT86	灰白色 Gray white	无规则 Random	扁平 Flat	不平整 Unfairness	偏干 Dry	不透明 Opacity
VT88A	乳白色 Milky white	无规则 Random	微凸 Dimpling	褶皱 Wrinkle	偏干 Dry	不透明 Opacity
V67	黄色 Yellow	圆形 Roundness	扁平 Flat	光滑 Smooth	湿润 Humid	半透明 Translucent
V140-2	灰黑色 Dark gray	无规则 Random	凸起 Embossment	不平整 Unfairness	偏中 Middle	不透明 Opacity
V139-2	黄白色 Yellowish white	无规则 Random	微凸 Dimpling	褶皱 Wrinkle	偏干 Dry	不透明 Opacity
V141	黄色 Yellow	圆形 Roundness	扁平 Flat	平整 Level	偏湿 Wet	半透明 Translucent
V74	黄白色 Yellowish white	圆形 Roundness	微凸 Dimpling	不平整 Unfairness	湿润 Humid	半透明 Translucent
VT19	牙白色 Cream white	无规则 Random	内凹 Indent	褶皱 Wrinkle	偏干 Dry	不透明 Opacity
V77	黄白色 Yellowish white	椭圆形 Oval	扁平 Flat	光滑 Smooth	偏湿 Wet	半透明 Translucent
VT40	牙白色 Cream white	圆形 Roundness	微凸 Dimpling	不平整 Unfairness	偏干 Dry	不透明 Opacity
VT111	灰白色 Gray white	椭圆形 Oval	微凸 Dimpling	不平整 Unfairness	偏干 Dry	不透明 Opacity
V104	黑色 Dark	圆形 Roundness	凸起 Embossment	不平整 Unfairness	偏中 Middle	不透明 Opacity
V64	黄白色 Yellowish white	圆形 Roundness	扁平 Flat	不平整 Unfairness	偏湿 Wet	半透明 Translucent
VT113	白色 White	椭圆形 Oval	微凸 Dimpling	不平整 Unfairness	偏干 Dry	不透明 Opacity
V105	红色 Red	无规则 Random	扁平 Flat	光滑 Smooth	湿润 Humid	半透明 Translucent

品浓度为5 mg/mL,5 μL的DMSO作为阴性对照,5 mg/mL的卡那霉素为阳性对照。

2 结果与分析

2.1 菌落形态特征鉴定

从海芒果全株及其根际土壤中共分离得到15株可培养细菌,其形态特征见表1,多数菌落为黄白色,极少数为红色,且表面均呈光滑、湿润。少数菌落,由于孢子产生色素,使菌落两面呈现不同颜色,呈灰黑色,表面干燥,有皱褶。大多菌落为不透明状,少数呈半透明状。

2.2 序列比对与系统发育分析

根据16S rRNA基因序列比对结果(表2),15株代表菌株分属于2个大的细菌发育类群:厚壁菌门(Firmicutes)和放线菌门(Actinobacteria),所占

比例分别为53%和47%,其中4株为芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.),6株为链霉菌属(*Streptomyces*)。构建的系统进化树见图1。

表 2 海芒果及其根际土壤可培养细菌的 16S rRNA 基因序列比对结果

Table 2 The comparison results of cultivated bacteria from *Cerbera manghas* and its rhizosphere soil

细菌门类 Phylogenetic groups/family	序列号 Strain number	数据库最相近菌株 Closest type strain	相似比 Similarity (%)
<i>Streptomyces</i>	VT111	<i>Streptomyces niveiscabiei</i>	99.45
	V104	<i>Streptomyces yanii</i>	99.26
	VT113	<i>Streptomyces niveiscabiei</i>	99.07
	V139-2	<i>Streptomyces luteireticuli</i>	99.73
	V140-2	<i>Streptomyces jiujiangensis</i>	98.81
	VT19	<i>Streptomyces orinoci</i>	99.18
<i>Bacillus</i>	V141	<i>Paenibacillus lactis</i>	99.36
	V64	<i>Brevibacillus borstelensis</i>	100.00
	V77	<i>Bacillus licheniformis</i>	99.39
	V117	<i>Methylobacterium hispanicum</i>	99.47
<i>Gordonia</i>	V105	<i>Gordonia lacunae</i>	99.60
<i>Pantoea</i>	V67	<i>Pantoea dispersa</i>	100.00
<i>Burkholderia</i>	V138	<i>Burkholderia ubonensis</i>	99.58
<i>Lysinibacillus</i>	VT88A	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	99.85
<i>Kitasatospora</i>	VT40	<i>Kitasatospora arboriphila</i>	99.59

2(*S. luteireticuli*, 抑菌圈直径为 9.3 mm)和菌株 VT113(*S. niveiscabiei*, 抑菌圈直径为 9.0 mm)有中等抑制活性。VT19(抑菌圈直径为 9.5 mm)和 V140-2(抑菌圈直径为 9.0 mm)对溶藻弧菌有中等抑制作用。所有菌株对哈维氏弧菌抑制作用都较弱(抑菌圈直径小于 8.0 mm)。

表 3 海芒果及其根际土壤可培养细菌抑菌活性结果

Table 3 The antibacterial activities of cultivated bacteria from *Cerbera manghas* and its rhizosphere soil

编号 No.	菌株 Strains	抑菌圈直径 Inhibition zone (mm)		
		哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	溶藻弧菌 <i>V. alginoliticus</i>	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>
VT86	<i>K. paranensis</i>	6.5	8.1	9.8
VT88A	<i>L. xylanilyticus</i>	6.3	7.4	8.1
V67	<i>P. dispersa</i>	7.5	8.2	8.6
V140-2	<i>S. jiujiangensis</i>	6.2	9.0	8.5
V139-2	<i>S. luteireticuli</i>	6.3	8.3	9.3
V141	<i>P. lactis</i>	7.6	6.3	8.8
V74	<i>B. territorii</i>	6.2	7.5	8.9
VT19	<i>S. orinoci</i>	6.8	9.5	8.7
V77	<i>B. licheniformis</i>	7.2	8.4	8.6
VT40	<i>K. arboriphila</i>	6.3	6.6	8.5
VT111	<i>S. niveiscabiei</i>	7.4	8.8	8.7
V104	<i>S. yanii</i>	6.2	6.6	8.1
V64	<i>B. borstelensis</i>	6.2	6.7	8.4
VT113	<i>S. niveiscabiei</i>	7.5	6.5	9.0
V105	<i>G. lacunae</i>	6.2	7.2	8.0

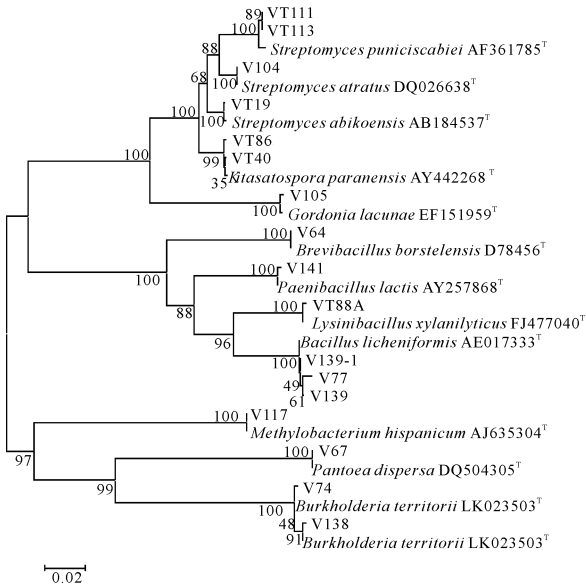


图 1 海芒果及其根际土壤可培养细菌的系统进化树

Fig. 1 Neighbor-joining tree showing the phylogenetic relationship among strains isolated from *Cerbera manghas* and rhizosphere soil of *C. manghas*

2.3 抑菌活性分析

如表 3 所示,15 株菌对副溶血弧菌均表现出抑制作用,其中菌株 VT86(*K. paranensis*)有明显的抑制活性(抑菌圈直径为 9.8 mm),菌株 V139-

3 结论

本研究对海芒果及其根际土壤中可培养细菌进行分离、纯化,选取了 15 株具有代表性的细菌进行 16S rRNA 序列检测,发现这些菌分属于 2 个大的细菌发育类群:厚壁菌门(占比为 53%)和放线菌门(占比为 47%),其中 4 株为芽孢杆菌属,6 株为链霉菌属。初步抑菌活性测试发现,15 株菌对 3 种海洋鱼类致病弧菌均有抑制作用,5 株抑菌效果较好,其中抑菌活性最好的是 VT86(*K. paranensis*),抑菌圈直径为 9.8 mm,对挖掘新型防治鱼类致病弧菌药物具有潜在研究价值。

参考文献:

[1] 李巧连,李可,谢明杰,等.海洋放线菌次级代谢产物及其活性研究进展[J].中国海洋药物,2010,29(5):57-65.
LI Q L, LI K, XIE M J, et al. Study progress on the secondary metabolites of marine actinomycetes and their activities[J]. Chinese Journal of Marine Drugs,

- 2010,29(5):57-65.
- [2] 范航清. 红树林:海岸环保卫士[M]. 南宁:广西科学技术出版社,2000:18-23.
FAN H Q. Mangrove: Coast guardian[M]. Nanning: Guangxi Science and Technology Press,2000:18-23.
- [3] 张明,王建华,赵毅,等. 20 味中药对鳗弧菌的药敏试验[J]. 动物医学进展,2005,26(8):77-79.
ZHANG M, WANG J H, ZHAO Y, et al. Study on the inhibition for *Vibriosis anguillarum* of fish disease with Chinese herb medicine[J]. Progress in Veterinary Medicine,2005,26(8):77-79.
- [4] 杨少丽,王印庚,董树刚. 海水养殖鱼类弧菌病的研究进展[J]. 海洋水产研究,2005,26(4):75-83.
YANG S L, WANG Y G, DONG S G. Progress of research on vibriosis in marine cultured fish[J]. Marine Fisheries Research,2005,26(4):75-83.
- [5] 杜士杰,朱文. 海芒果的毒性研究及其开发利用[J]. 亚热带植物科学,2006,35(4):79-81.
DU S J, ZHU W. Progress in study on toxicity of *Cerbera manghas* and its exploitation[J]. Subtropical Plant Science,2006,35(4):79-81.
- [6] 曹雷雷,田海妍,王友绍,等. 红树植物海芒果果实的化学成分研究[J]. 中国药学杂志,2013,48(13):1052-1056.
CAO L L, TIAN H Y, WANG Y S, et al. Chemical constituents in fruits of mangrove plant *Cerbera manghas* L. [J]. Chinese Pharmaceutical Journal,2013,48(13):1052-1056.
- [7] 胡世伟,宋文东,王浩,等. 红树植物海芒果树叶中的挥发油和脂肪酸研究[J]. 福建林业科技,2010,37(2):46-50.
HU S W, SONG W D, WANG H, et al. Study on the volatile oil and fatty acids of the leaves of the mangrove plants *Cerbera manghas* [J]. Journal of Fujian Forestry Science and Technology,2010,37(2):46-50.
- [8] 林爱玉,邢晓科,郭顺星,等. 4 种药用半红树植物内生真菌的分离及其抗菌活性研究[J]. 中国药学杂志,2006,41(12):892-894.
LIN A Y, XING X K, GUO S X, et al. Study on isolation of endophytic fungi from four medicinal semi-mangrove plants and its antimicrobial activity[J]. Chinese Pharmaceutical Journal,2006,41(12):892-894.
- [9] 夏丽娟,张焜,黄华容,等. 5 种红树根际土壤真菌和内生真菌的分离及抑菌活性的研究[J]. 中国农学通报,2014,30(4):259-263.
XIA L J, ZHANG K, HUANG H R, et al. The antimicrobial activity of 5 kinds of mangrove fungi in rhizosphere soil and endophytic fungi[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin,2014,30(4):259-263.
- [10] 周双清,黄小龙,黄东益,等. Chelex-100 快速提取放线菌 DNA 作为 PCR 扩增模板[J]. 生物技术通报,2010(2):123-125.
ZHOU S Q, HUANG X L, HUANG D Y, et al. A rapid method for extracting DNA from actinomycetes by Chelex-100[J]. Biotechnology Bulletin,2010(2):123-125.
- [11] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAK F, et al. The Clustal_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment: aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Research,1997,25(24):4876-4882.
- [12] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Molecular Biology and Evolution,2007,24(8):1596-1599.
- [13] 方燕,潘丽霞,易湘茜,等. 柳珊瑚 *Anthogorgia caerulea* 相关可培养细菌抗污活性筛选[J]. 广西科学,2012,19(3):253-256.
FANG Y, PAN L X, YI X X, et al. Antifouling activity of culturable bacteria associated with the gorgonian *Anthogorgia caerulea* [J]. Guangxi Sciences,2012,19(3):253-256.

(责任编辑:陆雁)