

红树内生细菌 CIII-1 菌株鉴定及其胞外 抗菌蛋白性质

张兴锋 柳凤 何红* 陈振明 胡汉桥
(广东海洋大学农学院 广东 湛江 524088)

摘要: 用对峙生长法从 422 株红树内生细菌中筛选到 1 株对青枯雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、辣椒疫霉菌(*Phytophthora capsici*)、香蕉枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*)等动植物病原细菌和真菌均具有较强的拮抗作用的海洋细菌 CIII-1 菌株, 经形态和生理生化特性及 16S rRNA 序列分析, 鉴定该菌株为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。用 33% 硫酸铵从菌株的培养滤液中盐析获得对供试病原菌均具有较强拮抗作用的抗菌活性蛋白, 性质测定发现, 该抗菌活性蛋白对热不稳定, 60°C 和 100°C 下处理 10 min, 其抗菌活性分别下降了 62.5% 和完全丧失, 在 pH 5.0–10.0 范围内均具有抑菌作用, 以 pH 7.0 时抗菌活性最强。

关键词: 红树, 内生细菌, 鉴定, 抗菌蛋白, 分离

Identification of Endophytic Bacterium CIII-1 Strain from Mangrove and Isolation of Its Antimicrobial Proteins

ZHANG Xing-Feng LIU Feng HE Hong* CHEN Zhen-Ming HU Han-Qiao

(College of Agriculture, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524088, China)

Abstract: The CIII-1 strain, a marine bacterium screened out from 422 endophytic bacteria isolated from mangroves by the method of plate test, strongly inhibited the growth of *Ralstonia solanacearum*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio alginolyticus*, *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, etc.. It was identified as *Bacillus amyloliquefaciens* based on the characters of morphology, physiology and biochemistry and 16S rRNA. Antimicrobial protein which produced by CIII-1 was the main antibacterial substance. The crude protein in culture filtrate could be precipitated with 33% ammonium sulfate and obtained by dialysis of the precipitate. The protein was found to be thermal-unstable, when treated at 60°C and 100°C for 10 minutes, its inhibitive activity would lost 62.5% and 100% respectively. The inhibitory activity of the protein was observed in the range of pH value from 5.0 to 10.0, and the strongest one was at pH 7.0.

Keywords: Mangrove, Endophytic marine bacteria, Identification, Antimicrobial protein, Isolation

基金项目: 广东省科技计划项目(No. 2009B020310015, 2009B030803055)

* 通讯作者: Tel: 86-759-2382084; ✉: hehong893@163.com

收稿日期: 2009-09-03; 接受日期: 2009-12-03

红树是一种生长在热带、亚热带海岸潮间带、具有海陆两大生态系统特性、可海陆两栖的特殊植物群落, 它们不仅在海岸防护、净化沿海环境、维护沿海湿地生物多样性等方面具有重大作用, 同时还具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、鱼毒、降血压、昆虫拒食等药用功效。近年来研究表明, 红树林内外含有大量共附(内)生海洋微生物, 其中以红树植物内生海洋真菌研究较多, 并从内生海洋真菌中分离到大量具有抗菌、抗肿瘤等生物学活性的新型化合物^[1-4], 但关于红树植物内生海洋细菌目前报道尚不多^[5]。CIII-1 菌株为本实验室从红树植物木榄叶片内分离获得, 该菌株对辣椒青枯病菌等多种植物病原菌具有较强的抑制作用, 同时通过抗利福平 CIII-1 突变菌株回接再分离证明, CIII-1 菌株可通过叶部和根系侵入, 具有沿维管束进行转运的能力, 且菌株对辣椒青枯病具有较好防治效果, 对辣椒具有促生增产作用^[6-7]。了解该菌株的分类学地位及其产生的抗菌活性物质, 可为菌株的进一步利用奠定基础, 因此本文对菌株进行了鉴定, 并研究了其胞外抗菌活性物质的性质。

1 材料与方 法

1.1 供试菌株

供试 422 株细菌分别为本实验室从秋茄(*Kandelia candel*)、红海榄(*Rhizophora stylosa*)、木榄(*Bruguiera gymnorrhiza*)、桐花树(*Aegiceras corniculatum*)、白骨壤(*Auicennia marina*)等海陆两栖的红树植物体内分离获得的海洋细菌, 其中桐花树内 39 株、秋茄 299 株、木榄 48 株、红海榄 23 株、白骨壤 13 株, 具体分离方法参考陈振明等^[5]。

1.2 供试病原菌

青枯病菌(*Ralstonia solanacearum*)由南京农业大学郭坚华教授赠送, 大肠埃希氏杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、猪链球菌(*Streptococcus suis*)由广东海洋大学农学院谢为天老师赠送, 溶壁微球菌(*Micrococcus lysolei*)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)由广东海洋大学水产学院温崇庆老师赠送, 辣椒疫霉菌(*Phytophthora capsici*)、香蕉枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*)、黄瓜枯萎病菌(*F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)、香蕉炭疽病菌(*Colletotrichum musae*)、水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia*

solani)、辣椒疮痂病菌(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)均为本实验室分离保存。

1.3 拮抗青枯菌的海洋细菌筛选

用对峙生长法测定, 取 28°C NB 培养液中培养 24 h 的青枯菌, 用淡水 NA 培养基制成带菌平板, 在平板上接入一小环待测细菌菌落(28°C 海水 NA 培养基上培养 24 h), 28°C 黑暗培养 24-48 h, 分别测量抑制圈半径。

1.4 CIII-1 菌株鉴定

1.4.1 常规鉴定: 方法参见文献[8]。

1.4.2 分子生物学(16S rRNA)鉴定: CTAB 法提取细菌基因组 DNA 为模板, 以 F8 (5'-GAGAGTTTGA TCCTGGCTCAG-3')和 R1492 (5'-CGGCTACCTTGT TACGAC-3')为上下游引物扩增菌株的 16S rDNA。PCR 体系为(25 μ L): 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ L, dNTPs (2.5 mmol) 2.5 μ L, 引物 F8/R1492 (10 μ mol/L) 2 μ L, 模板 DNA (约 50 mg/mL) 2 μ L, *Taq* 酶 0.5 μ L, 重蒸水 15.5 μ L。PCR 扩增条件: 94°C 5 min; 94°C 1 min, 50°C 1 min, 72°C 2 min, 30 个循环; 72°C 10 min。琼脂糖凝胶电泳并回收目标 DNA 片段, 由宝生物工程(大连)有限公司完成测序, 测序结果用 BLAST 软件在 GenBank 进行同源性比较, 以 ClustalX 进行多序列比对后, 用 MEGA4.0 的 Neighbor-joining 法构建系统发育树, 并进行 1000 次 Bootstraps 检验。

1.5 CIII-1 菌株胞外抗菌蛋白分离提取

为了解 CIII-1 菌株抗菌物质性质, 我们分别用各种有机溶剂萃取法和硫酸铵盐析法对其胞外分泌物进行了提取, 结果仅用硫酸铵盐析法获得的沉淀物具有抗菌活性, 并在 280 nm 处有最大吸收峰, 表明 CIII-1 菌株胞外抗菌活性物质是一种蛋白类物质。为此, 用硫酸铵分级沉淀法对菌株的胞外抗菌蛋白进行提取。

菌株培养液 4°C 下 12000 r/min 离心 20 min, 除菌体并过滤后得上清液, 先在上清液中慢慢加入硫酸铵至饱和度为 20%, 离心后, 其沉淀用 10 mmol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 6.8)洗下并透析, 得蛋白样品, 并在其上清液中再慢慢加入硫酸铵至饱和度为 30%, 再离心; 按上述方法每次在上一次离心后的上清液中慢慢加入硫酸铵, 依次使其饱和度为 40%、50%、60%、70%、80%、90%, 分别离心, 沉淀用 10 mmol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 6.8)洗下并透析, 所得蛋白样品于 -20°C 保存备用。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

1.6 CIII-1 蛋白样品抑菌活性测定

采用打孔法测定蛋白对病原菌的抑菌活性。

1.6.1 抑制病原细菌活性测定: 将培养的青枯病菌等动植物病原细菌, 用 NA 培养基制成带菌平板, 在平板中央用内径 8 mm 的打孔器打一小孔, 每孔注入 100 μ L 蛋白样品, 以无菌水、10 mmol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 6.8)以及空白 PSB 培养基按 1.4 方法的提取物为对照。28 $^{\circ}$ C 下黑暗培养 24–48 h, 测量抑菌半径。

1.6.2 抑制病原真菌活性测定: 在直径 9 cm 的 PDA 平板中央接入直径为 8 mm 的病原真菌菌饼, 同时在菌饼四周呈十字形均匀打 4 个直径 8 mm 的小孔, 每孔注入 100 μ L 蛋白样品, 对照同上, 28 $^{\circ}$ C 下黑暗培养 48–96 h, 测量抑菌半径。

1.7 CIII-1 抗菌蛋白稳定性测定

1.7.1 热稳定性测定: 抗菌蛋白样品在 60 $^{\circ}$ C、100 $^{\circ}$ C、121 $^{\circ}$ C 下分别处理 10 min 后, 按 1.6.1 方法测定其抗菌活性。

1.7.2 酸碱稳定性测定: 抗菌蛋白样品用 10 mmol/L 的磷酸氢二钠–柠檬酸缓冲液(pH 2.2–8.0)和 10 mmol/L 的甘氨酸–氢氧化钠缓冲液(pH 8.6–10.6)分别调节其为 pH 值为 2.2、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0, 按 1.6.1 方法测定其抗菌活性。

2 结果与分析

2.1 拮抗动植物病原菌的菌株筛选

以植物青枯病菌为筛选对象, 用对峙生长法从 422 株候选菌株中获得 9 株(2.13%)表现有拮抗作用海洋细菌, 其抑菌圈见表 1, 可见分离自木榄叶片内的 CIII-1 菌株对青枯病菌的拮抗作用最强, 抑菌圈半径达 0.70 cm。进一步测定其抗菌谱发现, CIII-1 菌株对 12 种被测动植物病原细菌和真菌均有较强的抑制作用(表 2)。表明 CIII-1 菌株可分泌产生具有广谱抗菌作用的活性物质。

2.2 CIII-1 菌株的鉴定

2.2.1 常规鉴定: 形态观察发现, CIII-1 菌株在 NA 培养基上菌落为圆形, 黄色不透明, 边缘锯齿状, 有褶皱状突起; 菌体直杆状, 周生鞭毛, 革兰氏染色阳性, 产芽孢, 芽孢卵圆形, 在菌体中央或一端形成。生理生化特性测定结果见表 3, 参照东秀珠^[8]等文献, CIII-1 菌株可能属于枯草芽孢杆菌或解淀粉芽孢杆菌。

表 1 不同红树内生细菌对青枯雷尔氏菌的抑制圈半径
Table 1 Inhibition zone of strains from mangroves to *R. solanacearum*

菌株 Strains	来源 Origin	抑菌圈半径 Radius of Inhibition zone (cm)
CIII-1	木榄	0.70
Bg-12	<i>B. gymnorrhiza</i>	0.10
Rs-13	红海榄	0.15
Rs-34	<i>R. stylosa</i>	0.12
Kc-26		0.45
Kc-75	桐花树	0.11
Kc-95	<i>K. candel</i>	0.10
Kc-182		0.22

表 2 分离自木榄叶片内的 CIII-1 菌株的抑菌谱
Table 2 Antimicrobial spectrum of CIII-1 isolated from leaf of *B. gymnorrhiza*

病原菌 Indicative Bacteria	抑菌圈半径 Radius of Inhibition zone (cm)
青枯病菌 <i>R. solanacearum</i>	0.70
辣椒疮痂病菌 <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	0.52
大肠埃希氏杆菌 <i>E. coli</i>	0.64
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	0.72
猪链球菌 <i>S. suis</i>	0.32
溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	0.27
香蕉炭疽病菌 <i>C. musae</i>	1.35
黄瓜枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	1.25
香蕉枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i> f. p. <i>cubense</i>	1.32
水稻纹枯病菌 <i>R. solani</i>	1.22
辣椒疫霉 <i>P. capsici</i>	1.53
溶壁微球菌 <i>M. lysolei</i>	0.55

2.2.2 分子生物学鉴定: 提取菌株 CIII-1 基因组 DNA, 通过 PCR 得到菌株 1.5 kb 左右的 16S rRNA。委托宝生物工程(大连)有限公司测得 CIII-1 的 16S rRNA 部分序列, 长度为 1494 bp, GenBank 登录号为 EF488979。BLAST 比较发现 CIII-1 的 16S rRNA 序列与芽孢杆菌属细菌的 16S rRNA 相似, 调出其中已鉴定菌株的 16S rRNA, 用 ClustalW 进行多重序列对比, 用软件 MEGA4.0 按 Neighbor-joining 法构建系统发育树。如图 1 所示, 菌株与解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)关系最紧密, 位于同一分支中, 同源性达 99%以上, 并与 *B. subtilis* 也有着较近的亲缘关系。结合 CIII-1 形态特征、培养特征及生理生化指标测定等表型鉴定结果, 初步将 CIII-1 菌株鉴定为解淀粉芽孢杆菌。

表 3 CIII-1 菌株生理生化特性
Table 3 Physical and Biochemical characteristics of CIII-1 strains

测定指标 Index	菌株特性 Characteristics	测定指标 Index	菌株特性 Characteristics
苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanine deaminase	-	色氨酸脱氨酶 Tryptophane deaminase	-
柠檬酸盐利用 Usage of citrate	+	碳源利用 Usage of Carbon source	
H ₂ S 产生 Production of H ₂ S	-	葡糖糖 D-Glucose	+
吲哚产生 Indole production	+	蔗糖 Sucrose	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	-	果糖 Fructose	+
V-P 测定 V-P reaction	+	麦芽糖 Maltose	+
淀粉水解 Amylohydrolysis	+	D-半乳糖 D-Galactose	-
纤维素水解 Hydrolysis of cellulose	-	D-甘露糖 D-Mannose	+
七叶灵水解 Hydrolysis of esculine	+	D(+)-木糖 D-Xylose	-
明胶液化 Gelatin liquefaction	+	L-山梨糖 L-Sorbose	+
厌氧生长 Anaerobic growth	+	L-阿拉伯糖 L-Arabinose	-
接触酶 Contact enzyme	+	棉子糖 Raffinose	+
氧化酶 Oxidase	-	肌醇 Inositol	+
甲基红 Methyl red	-	淀粉 Starch soluble	+
葡萄糖产酸 Glucose acid production	+	肌酸 Creatine	-
生长 Growth at: pH 6.8	+	山梨酸 Sorbic acid	-
5.7	+	甘油 Glycerol	+
生长 Growth at: NaCl 2%	+	氮源利用 Usage of Nitrogen	
5%	+	氯化铵 Ammonium chloride	+
7%	+	硫酸铵 Ammonium sulfate	+
10%	-	磷酸氢二铵 Diammonium hydragen phosphate	+
生长 Growth at: 10°C	-	硝酸铵 Ammonium nitrate	+
30°C	+	硝酸钠 Sodium nitrate	+
40°C	+	尿素 Urea	+
50°C	-	DL-天冬氨酸 DL-Aspartic acid	+

注: +: 阳性或生长; -: 阴性或不生长.

Note: +: Denote positive reaction; -: Denote negative reaction.

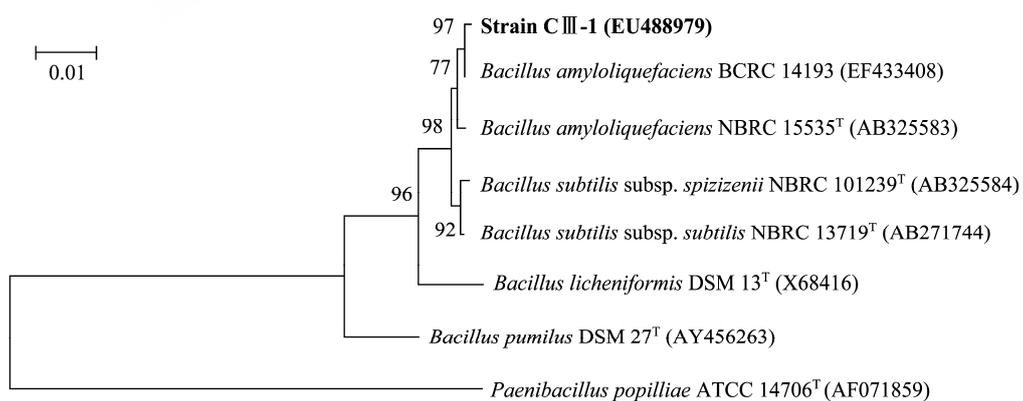


图 1 邻接法构建的 CIII-1 16S rRNA 序列系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences of selected strains

Note: Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch point is the percentage supported by bootstrap. Bar, 1% sequence divergence.

2.3 CIII-1 菌株胞外抗菌蛋白及其抗菌活性

不同硫酸铵饱和度分段盐析结果表明, 30%–40%的硫酸铵饱和度下提取的蛋白的抗青枯病活性较强(图 2), 进一步测定发现, 33%硫酸铵饱和度下沉淀的蛋白抗菌活性最强。抑菌谱测定结果表明(表 4), 该抗菌蛋白对植物青枯病菌(*R. solanacearum*)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、炭疽菌(*C. musae*)、辣椒疫霉(*P. capsici*)等 12 种供试动植物病原菌均有较强的抑制作用。表明 CIII-1 菌株胞外分泌的抗菌物质主要是抗菌蛋白, 且该抗菌蛋白不仅抗菌活性强, 抗菌谱也较广。

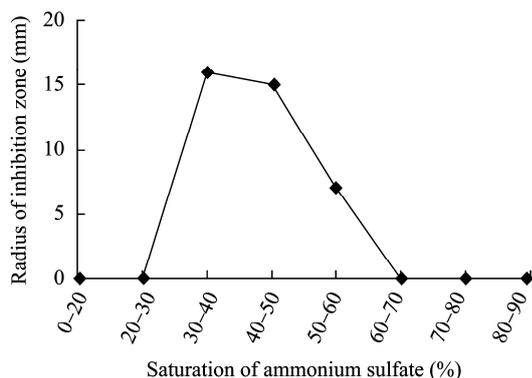


图2 不同硫酸铵饱和度下提取的蛋白对青枯雷尔氏菌的抑制作用

Fig. 2 Inhibition of proteins precipitated at different saturations of ammonium sulfate to *R. solanacearum*

表4 CIII-1 菌株抗菌蛋白的抑菌谱
Table 4 Antimicrobial spectrum of antimicrobial protein from CIII-1 strain

病原菌 Indicative Bacteria	抑菌圈半径 Radius of Inhibition zone (cm)
青枯病菌 <i>R. solanacearum</i>	1.60
辣椒疮痂病菌 <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	1.30
大肠埃希氏杆菌 <i>E. coli</i>	1.70
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	1.75
猪链球菌 <i>S. suis</i>	1.60
溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	1.40
香蕉炭疽病菌 <i>C. musae</i>	1.60
香蕉枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i> f. p. <i>cubense</i>	1.30
黄瓜枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	1.25
水稻纹枯病菌 <i>R. solani</i>	1.30
辣椒疫霉 <i>P. capsici</i>	1.10
溶壁微球菌 <i>M. lysolei</i>	1.05

2.4 抗菌蛋白的稳定性

2.4.1 热稳定性: 如表 5 所示, 实验发现该抗菌蛋白在 4°C 下其抗菌活性会不断下降, 保存 5 d, 其抗菌活性下降了 12.5%, 保存 10 d, 抗菌活性下降了 18.75%, 保存 20 d 已无抗菌活性。进一步测定发现, 25°C 放置 24 h, 其抗菌活性下降了 15.6%, 72 h 后即无抗菌活性; 60°C 下处理 10 min, 抗菌活性下降了 62.5%, 100°C 和 121°C 处理 10 min, 已完全失去了抗菌活性。表明该抗菌蛋白对热不稳定。

表5 热处理对 CIII-1 菌株抗菌蛋白抗菌活性的影响
Table 5 Effect of temperature on antimicrobial activity of antibacterial protein

温度 (°C) Temperature (°C)	抑菌圈半径 (cm) Radius of Inhibition zone (cm)				
	10 min	24 h	72 h	5 d	10 d
4	1.60±0.09	1.60±0.10	1.53±0.21	1.40±0.23	1.28±0.12
25	1.52±0.08	1.36±0.21	0.32±0.14	—	—
60	0.64±0.07	—	—	—	—

注: —: 无活性。

Note: —: No antimicrobial activity.

2.4.2 pH 稳定性: 测定结果表明(图 3), pH 值对 CIII-1 菌株抗菌蛋白的抗菌活性有较大影响, pH 为 5.0–10.0 范围内均有一定的抗菌活性, 以 pH 7.0 时抗菌活性最大; 当 pH 4.0 或 11.0 时, 无抗菌活性, 其中 pH 4.0 时有絮状沉淀出现。表明该抗菌蛋白在 pH 中性时活性较强, 偏碱性时对其抗菌作用有较大影响。

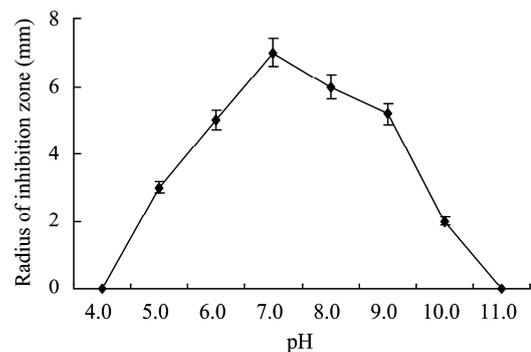


图3 pH对CIII-1菌株抗菌蛋白抗菌活性的影响

Fig. 3 Effect of pH values on antimicrobial activity of antibacterial protein

3 讨论

本研究结果表明, 来自木榄叶片内的 CIII-1 菌株不仅对青枯雷尔氏菌具有较强的拮抗作用, 还对金黄色葡萄球菌、溶藻弧菌、辣椒疫霉菌、香蕉枯

萎病菌等多种动植物病原细菌和真菌均具有较强的拮抗作用。这进一步证明, 红树林内生海洋细菌是动植物病害生物防治及抗菌活性物质的良好资源菌, 具有一定的开发应用价值, 值得进一步加强研究。

芽孢杆菌因其抗逆性强、并可产生对多种病原体具有较强的拮抗作用活性物质, 而成为植物病害生物防治的主要目标菌。关于陆源芽孢杆菌的抗菌作用及其抗菌蛋白已有许多研究报道。如: Liu^[9]从枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)B-916 菌株中分离获得 41.9 kD 的新型抗菌蛋白 Bacisubin, 并测定了其 N 端序列; 何红等^[10]从辣椒内生枯草芽孢杆菌(*B. subtilis* subsp. *Endophyticus*) BS-2 菌株中分离获得对植物炭疽病菌和蕃茄青枯病菌等多种植物病原真菌和细菌有强烈的抑制作用的多肽类抗菌物质; 姚乌兰等^[11]从多粘类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*) WY110 菌株中分离纯化到一种对稻瘟病菌具有拮抗活性分子量约 26 kD 的抗菌蛋白, 并克隆了其基因; 纪兆林等^[12]从地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*) W10 菌株中分离获得对灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)等多种植物病原菌具有拮抗作用分子量为 46049.2 D 的糖蛋白; Yoshida 等^[13]从解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*) RC22 菌株中获得可拮抗桑炭疽病菌的包含环状多肽 iturin A2 在内的多种抗真菌物质。但有关海洋生境芽孢杆菌抗植物病原菌作用及产生的抗菌物质, 目前研究报道尚不多, 何培青^[14]、田黎^[15]等从海洋细菌中筛选到一株对 *Alternaria solani*、*Verticillium dahliae*、*Cladosporium fulrum*、*Fusarium oxysporium*、*Bremia loctucae* 和 *Rhizoctonia solani* 等多种植物病原真菌具有显著抑制或溶菌作用的芽孢杆菌 B-9987, 并对其胞外分泌的抗菌物质等进行了纯化, 获得一种酚类抗菌物质; 田黎等^[16]从海洋生境芽孢杆菌中分离到蛋白类拮抗植物病原真菌和细菌物质。本研究结果表明, 分离自海陆两栖特殊植物——红树植物(木榄)体内的解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*) CIII-1 菌株对多种病原菌具有较强的抑制作用, 该菌产生的抗菌蛋白液不仅对植物青枯病菌、枯萎病菌、疫霉菌等植物病原菌具有较强的拮抗作用, 同时对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌等多种动物病原菌也有较强的拮抗作用, 同时发现该抗菌蛋白对热不稳定。目前从芽孢杆菌中分离报道的抗菌蛋白大多为对热稳定蛋白。因此, 有关该抗菌蛋白结构特征和实际应用等, 尚有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 赵亚, 郭跃伟. 真红树林植物化学成分及生物活性研究概况. 中国天然药物, 2004, 2(3): 135-140.
- [2] 王友绍, 何磊, 王清吉, 等. 药用红树植物的化学成分及其药理研究进展. 中国海洋药物杂志, 2004(2): 26-31.
- [3] Premanathan M, Nakashima H, Kathiresan K, et al. *In vitro* anti-human immuno-deficiency virus activity of mangrove plants. *Indian Journal of Medical Research*, 1996(103): 278.
- [4] 龙寒, 向伟, 庄铁城, 等. 红树林区微生物资源. 生态学杂志, 2005, 24(6): 696-702.
- [5] 陈振明, 何进坚, 何红, 等. 红树林内生细菌的分离及拮抗菌筛选. 微生物学通报, 2006, 33(3): 18-23.
- [6] 张兴锋, 陈振明, 何红, 等. 红树植物内生海洋细菌 CIII-1 在植物体内及根际土壤中的定殖测定. 中国农学通报, 2007, 23(2): 384-388.
- [7] 何红, 欧雄常, 王立才, 等. 红树内生海洋细菌 CIII-1 菌株对辣椒青枯病的防治效果. 植物保护学报, 2008, 35(6): 497-500.
- [8] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [9] LIU YongFeng, CHEN ZhiYi, NG TB, et al. Bacisubin, an antifungal protein with ribonuclease and hemagglutinating activities from *Bacillus subtilis* strain B-916. *Pepptides*, 2007(28): 553-559.
- [10] 何红, 蔡学清, 关雄, 等. 内生菌 BS-2 菌株的抗菌蛋白及其防病作用. 植物病理学报, 2003, 33(4): 373-378.
- [11] 姚乌兰, 王云山, 韩继刚, 等. 水稻生防菌株多粘类芽孢杆菌 WY110 抗菌蛋白的纯化及其基因克隆. 遗传学报, 2004, 31(9): 878-887.
- [12] 纪兆林, 唐丽娟, 张清霞, 等. 地衣芽孢杆菌 W10 抗菌蛋白的分类纯化及其理化性质研究. 植物病理学报, 2007, 37(3): 260-264.
- [13] Yoshida S, Hiradate S, Tsukamoto T, et al. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC22 isolated from mulberry leaves. *Phytopathology*, 2001, 91(2): 181-187.
- [14] 何培青, 田黎, 李光友, 等. 海洋细菌 B-9987 胞外代谢产物的纯化及抑菌机理初探. 海洋与湖沼, 2002, 33(5): 492-498.
- [15] 田黎, 顾振芳, 陈杰, 等. 海洋细菌 B-9987 菌株产生的抑菌物质及对几种植物病原真菌的作用, 胞外代谢产物的纯化及抑菌机理初探. 植物病理学报, 2003, 33(1): 77-80.
- [16] 田黎, 李光友. 海洋生境芽孢杆菌(*Bacillus* spp.) 的培养条件及产生的胞外抗菌蛋白. 海洋学报, 2001, 23(4): 87-92.