

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201909018

李菲, 黄庶识, 胡文进, 等. 桐花树内生和根际细菌多样性及抗血栓活性研究 [J]. 广西植物, 2020, 40(3): 335–344.

LI F, HUANG SS, HU WJ, et al. Diversity and anti-thrombotic activity of endophytic and rhizospheric bacteria isolated from *Aegiceras corniculatum* [J]. *Guihaia*, 2020, 40(3): 335–344.

桐花树内生和根际细菌多样性及抗血栓活性研究

李 菲¹, 黄庶识², 胡文进³, 李 喆², 黄媛林², 王巧贞², 潘信利^{2*}

(1. 广西科学院 广西近海海洋环境科学重点实验室, 南宁 530007; 2. 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, 南宁 530007; 3. 广西科学院, 国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 非粮生物质酶解国家重点实验室, 广西生物炼制重点实验室, 广西生物质工程技术研究中心, 南宁 530007)

摘 要: 红树植物内生菌在红树共生体的物质循环、能量传递和健康维护等方面起着重要作用。为探究红树植物内生菌的多样性, 进一步揭示内生菌在红树共生体的功能多样性提供菌种资源, 该研究选择 6 种分离培养基和采用传统稀释涂布法对从广西北海滩涂上采集的桐花树组织和根际土壤样品进行分离, 对获得的可培养细菌进行多样性分析, 并通过体外溶栓实验筛选出具有抗血栓活性的菌株。结果表明: (1) 基于 16S rRNA 基因序列系统进化分析, 从桐花树组织和根际土壤中共获得 125 株细菌; 分布于变形菌门 (Proteobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria) 和厚壁菌门 (Firmicutes) 3 个门 27 个科 39 个属 74 个种中, 芽孢杆菌属为优势菌属, 菌株数量占 13.5%。(2) 抗血栓活性实验表明, 初筛获得 18 株具有抗血栓活性细菌, 总阳性率为 24.32%; 将初筛有活性的菌株进行复筛和重复验证实验, 进一步验证其活性, 结果复筛出 3 株细菌 B1850、B1989 和 B2632 具有很强抗血栓活性。综上所述, 广西北海滩涂上红树植物桐花树中存在丰富的可培养细菌资源, 具有从中挖掘新的纤溶酶和开发溶血栓药物的潜力。

关键词: 桐花树, 内生细菌, 根际细菌, 多样性, 抗血栓活性

中图分类号: Q939.1 文献标识码: A

文章编号: 1000-3142(2020)03-0335-10

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Diversity and anti-thrombotic activity of endophytic and rhizospheric bacteria isolated from *Aegiceras corniculatum*

LI Fei¹, HUANG Shushi², HU Wenjin³, LI Zhe², HUANG Yuanlin²,
WANG Qiaozhen², PAN Xinli^{2*}

收稿日期: 2020-01-03

基金项目: 国家自然科学基金(31560017); 广西自然科学基金重点项目(2014GXNSFDA118012); 广西科技计划重点研发项目(桂科 AB16380071); 广西科技计划科技基地和人才专项项目(桂科 AD17129019); 广西科学院基本业务费项目(2017YJJ23020); 广西海洋天然产物与组合生物合成化学重点实验室运行费项目(17-259-74) [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31560017); Key Program of National Natural Science Foundation of Guangxi (2014GXNSFDA118012); Key Research and Development Program of Guangxi (AB16380071); Special Program for the Base of Guangxi Science and Technology and Talents (AD17129019); Fundamental Research Fund for Guangxi Academy of Sciences (2017YJJ23020); Guangxi Key Laboratory of Marine Natural Products and Combinatorial Biosynthesis Chemistry (17-259-74)]。

作者简介: 李菲(1988-), 女, 广西南宁人, 硕士, 助理研究员, 主要从事广西北部湾海洋微生物研究, (E-mail) finylee@yeah.net。

***通信作者:** 潘信利, 博士, 助理研究员, 主要从事海洋微生物资源开发与利用研究, (E-mail) pxl@gxas.cn。

(1. Guangxi Key Laboratory of Marine Environmental Science, Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530007, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Marine Natural Products and Combinatorial Biosynthesis Chemistry, Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530007, China; 3. National Engineering Research Center for Non-Food Biorefinery, State Key Laboratory of Non-Food Biomass and Enzyme Technology, Guangxi Key Laboratory of Bio-refinery, Guangxi Biomass Engineering Technology Research Center, Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530007, China)

Abstract: Mangrove endophytes play an important role in the material cycle, energy transfer and health maintenance of mangrove plants. In order to enrich microbiological resources for further revealing the functional diversity of the endophytes microorganism in mangrove plants, in this study, we investigated the distribution and diversity of endophytic and rhizospheric bacteria of *Aegiceras corniculatum* collected from Beihai City, and studied the anti-thrombotic activities of those strains. The endophytic and rhizospheric bacteria were isolated from *A. corniculatum* by using six different isolation media. The anti-thrombotic activities of all species were screened out by thrombolysis experiment *in vitro*. The results were as follows: (1) Based on the phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequence, a total of 125 strains were obtained from the tissue and rhizosphere soil of *A. corniculatum*. They were classified into 74 species, 39 genera, 27 families and 3 phylas of Proteobacteria, Actinobacteria and Firmicutes. *Bacillus* sp. was the dominant genus, and the total rate was 13.5%. (2) The results of anti-thrombotic activity test showed that 18 strains with anti-thrombotic activity were screened out, and the total positive rate reached to 24.32%. The activity of the strains was further verified by the re-screening and re-verification test. The strains of B1850, B1989 and B2632 with strong anti-thrombotic activity were obtained. To sum up, there are abundant culturable bacterial resources in *Aegiceras corniculatum* in Beihai of Guangxi, which could be a potential source for the discovery of new plasminogen and thrombolytic drugs.

Key words: *Aegiceras corniculatum*, endophytic bacteria, rhizospheric bacteria, diversity, anti-thrombotic activity

血栓性疾病是一类严重威胁人类健康的常见病、多发病,常表现为心绞痛、心肌梗死、脑栓塞和脑梗死等,多以中老年人为主要发病群体,现发病人群逐渐趋于年轻化,且发病率与死亡率在不断上升(乔德水等,2009;Järemo et al., 2013)。血栓性疾病的起因主要是血管腔中形成血栓使其变得狭窄或闭塞,导致主要器官缺血或梗死。而血栓是人体内血液组成成分在血管或心脏内形成的凝块,可脱落凝块随血液流至远端,从而堵塞血管腔(Sun et al., 2008)。目前临床上主要有三大类治疗血栓性疾病的药物,即抗血小板类、抗凝血类和溶血栓药物。传统的溶血栓药物在临床上虽具有确切的疗效和良好的安全性,但其存在的半衰期短、纤维蛋白特异性低和价格贵等缺点也不容忽视(翁郁华等,2010)。因此,寻找能解决上述问题的溶血栓药物具有广泛的应用前景。

近年来,海洋微生物是新型纤溶酶的重要来源之一。Lakshmi et al.(2013)从海洋沙雷菌(*Serratia* sp. RSPB11)分离到一种具有纤维蛋白水解活性和高热稳定的碱性金属蛋白酶。李占强等(2009)从南海沉积物中分离到的短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus* B5815),其纤溶酶活性好且产酶量高。Huang et al.(2013)从海洋枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* HAS-3)分离到一种纤维蛋白水解

酶。刘晨光等(2001)分离到一株海洋假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)可产生较强的直接溶解纤维蛋白和具有抗血栓活性的碱性蛋白酶 MPAP。这些为从海洋微生物来源寻找抗血栓的药物提供了很好的依据。桐花树系红树林中广布种之一,广泛分布于亚洲至大洋洲热带海岸,在我国的广东、广西、福建和海南等省(区)均有分布(缪绅裕等,2007)。我国的桐花树由于受到常年全日潮水的浸淹,使之生长状况、营养发育、生物量分配、激素水平和相关酶系等方面的生理生态性质表现出梯度性反应(何斌源等,2007),其内生菌长期生活于植物体内的特殊环境中并与之协同进化。植物体为其提供生长所必需的能量和营养的同时,内生菌又会通过自身的代谢、信号传导对植物体产生响应(文才艺等,2004)。本研究以广西北海滩涂的桐花树中分离、培养和鉴定出的植物内生和根际细菌为样本,旨在筛选出具有高效抗血栓活性的菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本来源 桐花树于2018年8月在广西北海滩涂(108°50'42" E、21°55'25" N)采集。样品装于密封袋,4℃低温保藏带回实验室,尽快完成

前处理和分离工作。

1.1.2 羊血实验试剂 无菌脱纤维羊血(初筛羊血)和抗凝羊血(复筛羊血),均购买于南宁茂接微生物科技有限公司。

阳性对照药物:血塞通片(云南维和药业股份有限公司),购买于一心药业。

1.1.3 培养基 (1) 分离培养基: AGG、M5、P7、M10、M4 和 P3,详情信息见表 1。

表 1 细菌分离培养基配方
Table 1 Components of culture media for bacterial isolation

分离培养基 Isolated culture medium	主要成分 Main component	其他成分 Other components	
AGG	可溶性淀粉 10.0 g, 葡萄糖 1.0 g, 甘油 10 mL Soluble starch 10.0 g, glucose anhydrous 1.0 g, glycerol 10 mL	琼脂 14.0 g Agar 14.0 g	复合盐母液 10 mL Compound ion
M5	海藻糖 5.0 g, 脯氨酸 1.0 g, 土壤浸出液 20 mL Trehalose 5.0 g, proline 1.0 g, soil extract 20 mL	去离子水 1 000 mL Deionized-water 1 000 mL	concentrate 10 mL
P7	L-天门冬酰胺 1.0 g, 酪氨酸 0.5 g, 甘油 10 mL L-Asparagine 1.0 g, tyrosine 0.5 g, glycerol 10 mL	pH 7.2~7.4	
M10	可溶性淀粉 10.0 g, 水解酪素 0.5 g Soluble starch 10.0 g, hydrolyzed casein 0.5 g		
M4	L-天门冬酰胺 1.0 g, 海藻糖 5.0 g, 甘油 10 mL L-Asparagine 1.0 g, trehalose 5.0 g, glycerol 10 mL		
P3	粗燕麦粉 20.0 g Crude oat 20.0 g		

注: 复合盐母液 KNO₃ 1.0 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, NaCl 0.5 g, NH₄NO₃ 0.1 g, FeSO₄ 0.01 g, ZnSO₄ · 7H₂O 0.001 g, MnCl₂ · H₂O 0.001 g, 去离子水 10 mL。

Note: Compound ion concentrate KNO₃ 1.0 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, NaCl 0.5 g, NH₄NO₃ 0.1 g, FeSO₄ 0.01 g, ZnSO₄ · 7H₂O 0.001 g, MnCl₂ · H₂O 0.001 g, deionized-water 10 mL。

(2) 纯化培养基(改良 ISP2): 麦芽提取物 2.0 g, 葡萄糖 2.0 g, 酵母提取物 2.0 g, 琼脂 15.0 g, 去离子水 1 000 mL。

(3) 发酵培养基: 改良 ISP2 液体培养基。

1.2 菌株的分离纯化

1.2.1 样品预处理 参照李菲等(2018)预处理方法, 代表性地选择桐花树各组织进行细菌的分离实验。首先, 用 5% 次氯酸钠溶液浸泡 3~5 min, 用无菌水冲洗多次; 其次, 用 0.2% 吐温 20 溶液浸泡 10 min, 用无菌水冲洗多次; 最后, 用 75% 的酒精溶液浸泡 5 min, 用无菌水冲洗多次。消毒后的组织样品, 分别用无菌手术刀进行切碎; 取约 1 g 的样品进行充分研磨, 加入 9 mL 无菌水与样品混匀, 即为初始的组织悬液, 再依次稀释到 10⁻³ 和 10⁻⁴ 的组织悬液, 待用。

桐花树根际样品的收集, 轻轻刮下根须表面附着的土壤, 平铺于无菌平皿中, 经 65 ℃ 热风干燥 30 min。称取 2.0 g 样品装于 20 mL 无菌水中摇匀; 制成 10⁻² 和 10⁻³ 稀释度的样液, 待涂布处理。

1.2.2 细菌的分离纯化 取 200 μL 梯度稀释的样液接种于 6 种复合营养培养基中, 28 ℃ 培养数周,

并及时观察菌株的生长情况, 挑取肉眼可见菌落进行纯化培养, 记录其形态特征和相同菌落数, 以 30% (V/V) 甘油-ISP2 混合液作为保护剂, 将纯化好的菌株制成冻存管保藏于 -70 ℃。

1.3 16S rRNA 系统发育分析

采用 Chelex-100 树脂(周双清等, 2010) 快速提取细菌的 DNA 作为 PCR 模板, 并根据 Walsh (1991) 的方法对其进行 PCR 扩增。引物为 27F 和 1522R, 参照李菲等(2018)的方法设定 PCR 反应条件。扩增产物经 1% 琼脂糖-TAE 凝胶电泳检测合格后, 委托北京擎科新业生物技术有限公司进行测序分析。序列经 BioEdit Sequence Alignment Editor 软件整理后, 利用 EzTaxon 服务器进行在线比对 (Kim et al., 2009); 以同源性最高菌株的有效序列作为参比对象, 构建 Neighbor-Joining 系统发育树, 各分支置信值检测设为 Bootstrap 1 000 次, 对各菌株的系统发育地位进行分析 (Li et al., 2017)。

1.4 细菌对抗血栓活性的筛选

1.4.1 羊血培养基制备 以改良 ISP2 固体培养基为基础培养基, 121 ℃ 高温蒸汽灭菌 20 min。待培养基冷却至 55 ℃, 添加 10% 脱纤维无菌羊血, 摇匀后

倒入无菌平皿中,待平皿静置冷却 2 h 后,待用。

1.4.2 初筛 首先将排重后的 74 株细菌,分别接种至 ISP2 固体培养基上,取生长对数后期的细菌划线至羊血培养基上,每板划 4 株细菌,置于 28 ℃ 的恒温培养箱培养。然后于 24 h 后观察平板上微生物的生长情况,观察是否有透明圈,颜色变化等。再将产生明显透明圈的菌落划线至 ISP2 固体培养基上,供复筛用。

1.4.3 复筛 参考辛宏等(2018)的方法制备人工血栓,取 300 μL 脱纤维无菌羊血,至于灭菌西林瓶底部,加入 9 μL 1 mol $\cdot$ L⁻¹ 的 CaCl₃ 溶液,放置 10 min,待血液凝固使用。

将初筛结果良好的 16 株细菌,分别接种于 50 mL 改良的 ISP2 液体培养基上,28 ℃,180 r $\cdot$ min⁻¹ 摇床培养 7 d;取出发酵液,8 000 r $\cdot$ min⁻¹ 离心 10 min,收集上清液,用 0.22 μm 微孔滤膜除菌,获得抗血栓活性待测液;取 2 mL 待测液沿壁缓慢加入凝固的人工血栓中,以 2 mL ISP2 液体培养基和 2 mL 0.7%生理盐水作阴性对照,以 2 mL 0.173 g $\cdot$ mL⁻¹ 血栓通片(含三七总皂苷含量为 100 mg)为阳性对照。放入 28 ℃ 培养,每隔 24 h 观察一次血凝块溶解情况,并轻微晃动,记录结果。

2 结果与分析

2.1 桐花树中内生及根际细菌多样性分析

根据菌落的形态、颜色和大小等特征进行排重,选取 125 株细菌进行测序对比分析,获得 74 种细菌,其中桐花树各组织中获得 34 种内生细菌,隶属于 18 科 22 属;根际细菌 44 种,隶属于 20 科 27 属。分别对桐花树的内生细菌和根际细菌构建 N-J 系统进化树(图 1 和图 2)。

2.2 不同培养基对内生和根际细菌的分离效果

采用 6 种培养基,从桐花树中分别获得内生和根际细菌 71 株和 64 株;经形态法和 16S rRNA 基因序列对比排重后,获得 74 株细菌在 6 种培养基上分离效果(图 3)。根据其分离效果分析:P3 和 P7 培养基分离到细菌种类最多,均有 17 个菌属;AGG 培养基分离的细菌种类最少,包含 4 个菌属,究其原因可能是 AGG 培养基主要成分为淀粉,较适合优势放线菌群(链霉菌属)。由菌落数统计结果可知,M10、M5、AGG、M4、P7 和 P3 培养基上菌落数分别为 4.3/3.1、1.2、7.3 和 7.2($\times 10^5$ cfu $\cdot$

mL⁻¹)。P3 和 P7 培养基分离效果相近,获得的细菌均隶属于 17 属,其菌种数和多样性均较高;而 AGG 培养基获得的细菌均隶属于 5 属,故其获得较少的细菌数和多样性。

2.3 内生及根际细菌的属级水平上的韦恩图分析

在属级水平上对桐花树各组织和其根际来源细菌进行 venn 分析,结果显示,从桐花树各组织和根际中获得细菌种类存在较大的差异,桐花树内生细菌和根际细菌共有 10 个相同的菌属,分别为 *Novosphingobium* sp.、*Sphingomonas* sp.、*Gordonia* sp.、*Micrococcus* sp.、*Streptomyces* sp.、*Pseudomonas* sp.、*Mycobacterium* sp.、*Bacillus* sp. 和 *Microbacterium* sp.。对桐花树各组织与根际来源的细菌分别进行 venn 分析,仅有一个共同的芽孢杆菌属(图 4:A);根部分离的细菌与根际细菌有 8 个共同菌属(图 4:B),其他各组织分离的细菌与根际细菌的种属相差较大。

2.4 细菌抗血栓活性初筛

将初筛的羊血平板放置 28 ℃ 培养 24 h 后,观察细菌生长和晕圈情况。结果显示,筛选 74 种细菌的抗血栓活性,有 18 种细菌显示出良好的抗血栓活性,总阳性为 24.32%;分别隶属于 *Bacillus* sp.、*Curtobacterium* sp.、*Demequina* sp.、*Kineococcus* sp.、*Pseudomonas* sp. 和 *Sphingomonas* sp.。图 5 显示,B2061、B2635 和 B1820 显示无晕圈,即判定为无溶血活性;B1502、B1500 和 B1850 显示出深色晕圈,B1989、B2634 和 B2632 表现为透明圈,两者均判定为具有溶血活性。

2.5 细菌上清液对体外血栓的影响

根据上述抗血栓活性初筛结果,对 18 株有活性菌株进行抗血栓活性复筛。图 6 结果显示,24 h 后,B1850、B1989 和 B2632 的上清发酵液将凝血块全部溶解。其余细菌的上清液与凝血块均有明显分层,凝血块较空白对照组的均有变小,上层溶液呈现出红色,故展示出微弱的溶血活性,ISP2 培养基和生理盐水空白组中凝血块均维持原样,下层为凝血块,固液分界线清晰。

3 讨论与结论

红树植物是生长在热带和亚热带潮间带河口地带的耐盐植物,分布在 30° S 与 30° N 之间。面对高度盐渍化、土壤缺氧、高光辐射、高矿物组成、

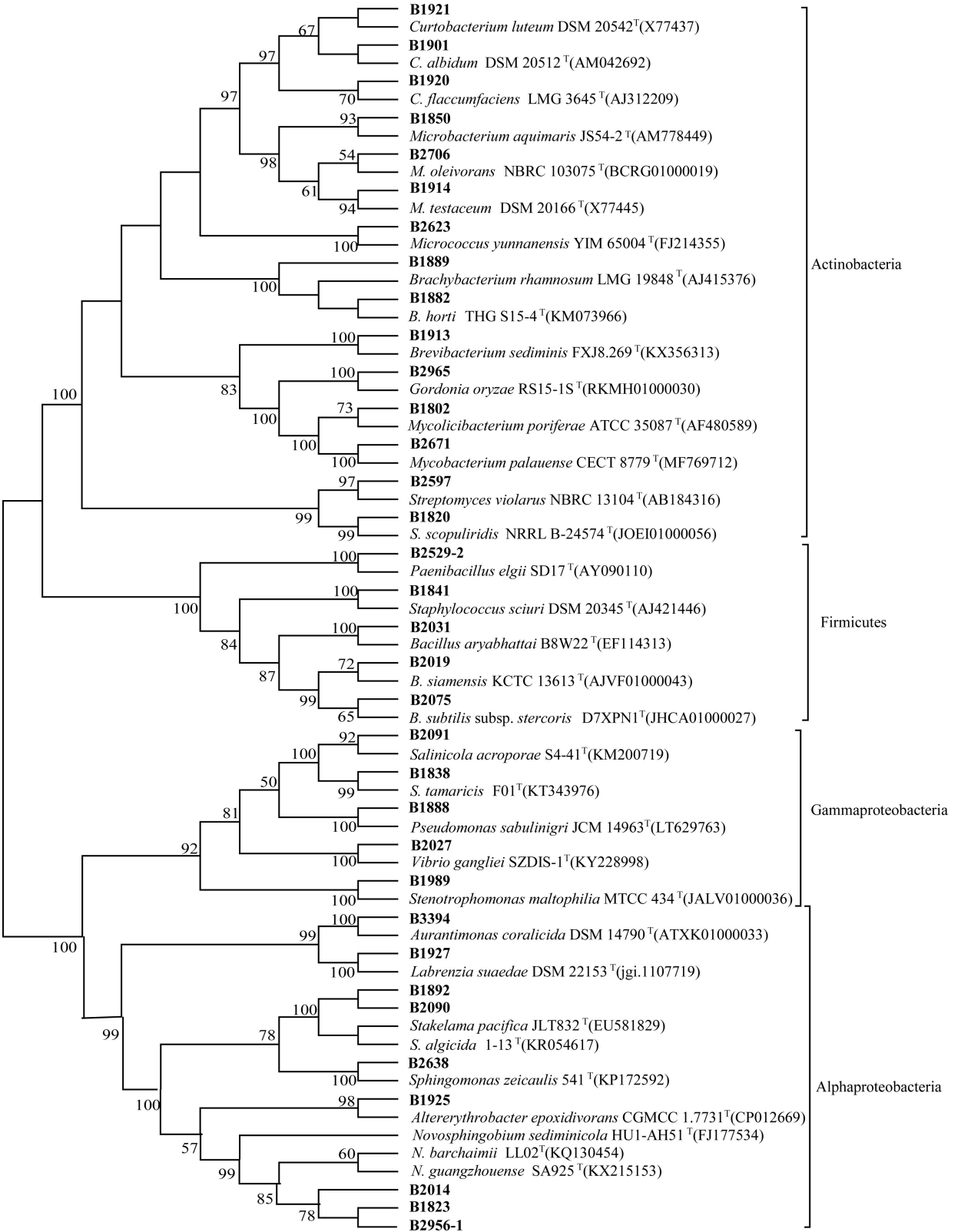


图 1 桐花树内生细菌的 16S rRNA 基因序列 N-J 系统发育树

Fig. 1 N-J phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences of endophytic bacteria in *Aegiceras corniculatum*

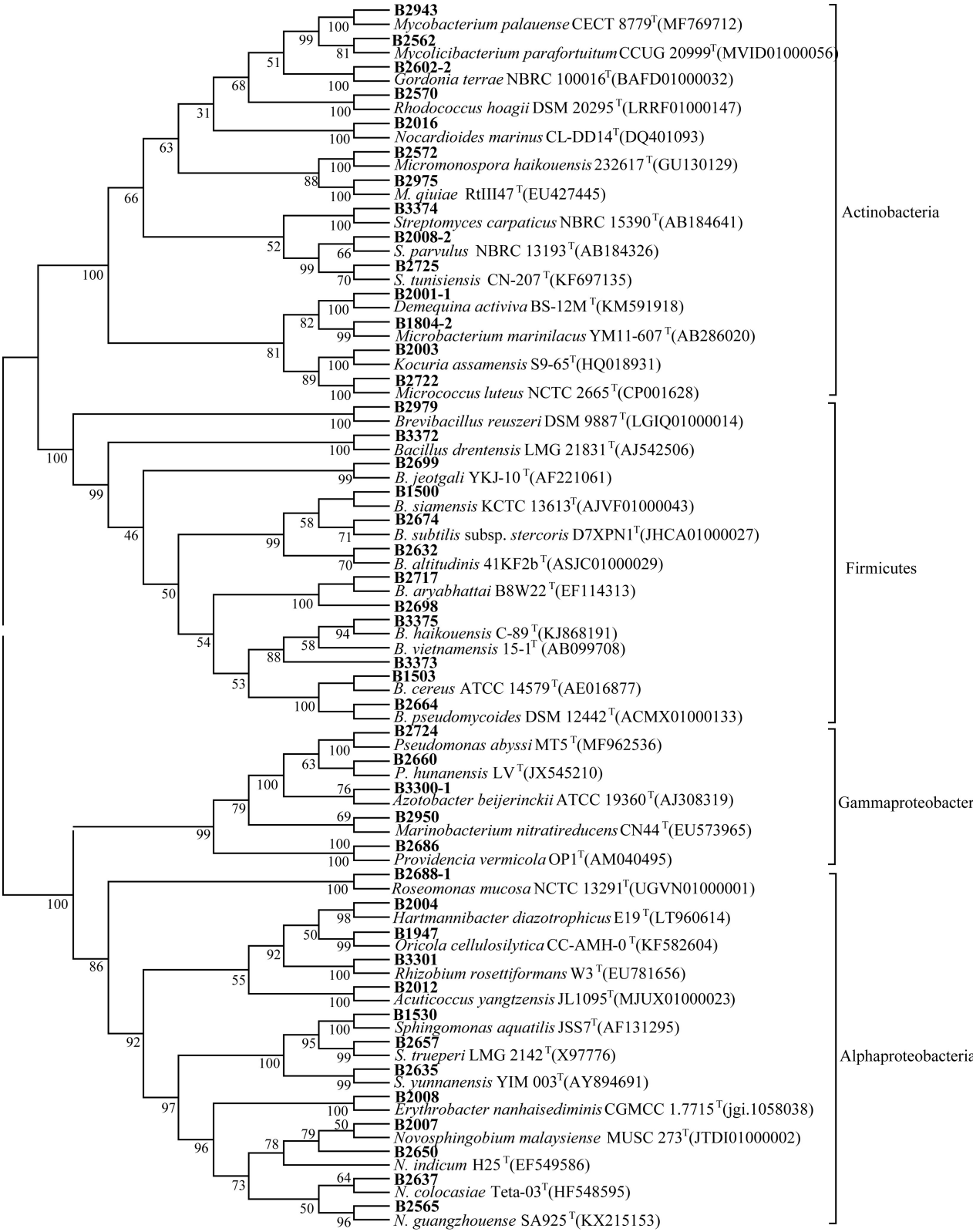


图 2 桐花树根际细菌的 16S rRNA 基因序列 N-J 系统发育树

Fig. 2 N-J phylogenetic tree 16S rRNA gene sequences of rhizospheric bacteria in *Aegiceras corniculatum*

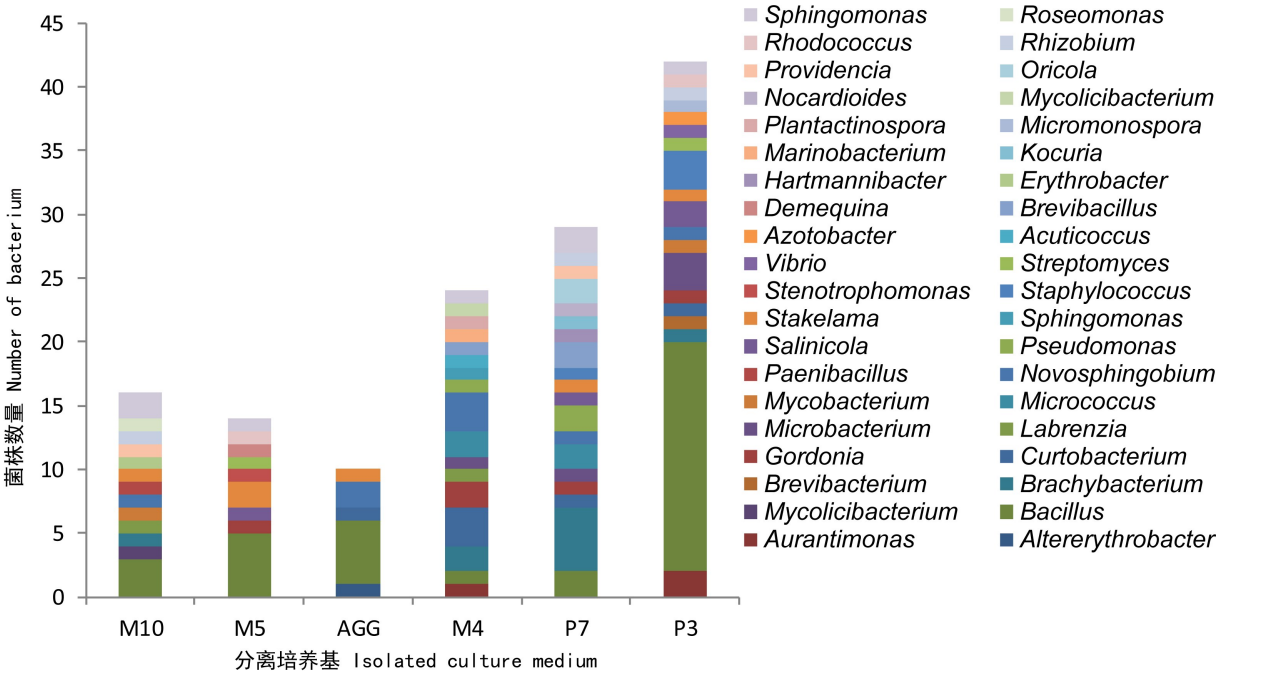


图3 不同培养基分离得到的细菌种、属数量
Fig. 3 Quantities of species and genera from different media

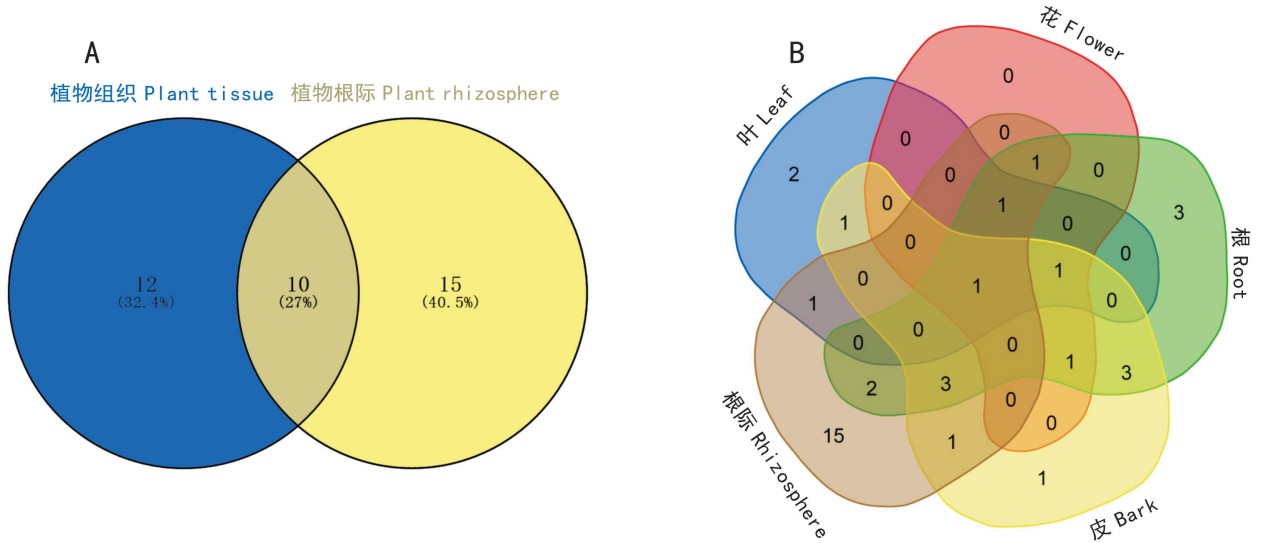


图4 桐花树组织中内生及根际来源细菌属级群类分布韦恩图
Fig. 4 Venn of genera in endophytic and rhizospheric bacteria isolated from *Aegiceras corniculatum*

强还原性和频繁的潮汐等生境特征,红树植物对生长所需营养和空间的竞争变得十分激烈,这一特殊生境丰富了红树林植物内生菌多样性,也必然能代谢出区别于其他生态系统的良好生物活性物质(周婧等,2019)。据报道,红树植物内生菌具有良好的抑菌、杀虫、细胞毒、胞外酶活、抗肿瘤、抗病毒和抗氧化等生物活性(刘伟等,2012;魏华等,2012;李菲等,2016)。桐花树作为传统的中药,其树皮和树叶均有治疗哮喘、糖尿病和风湿等疾病功效,现代药理研究发现其具有明显的抗植

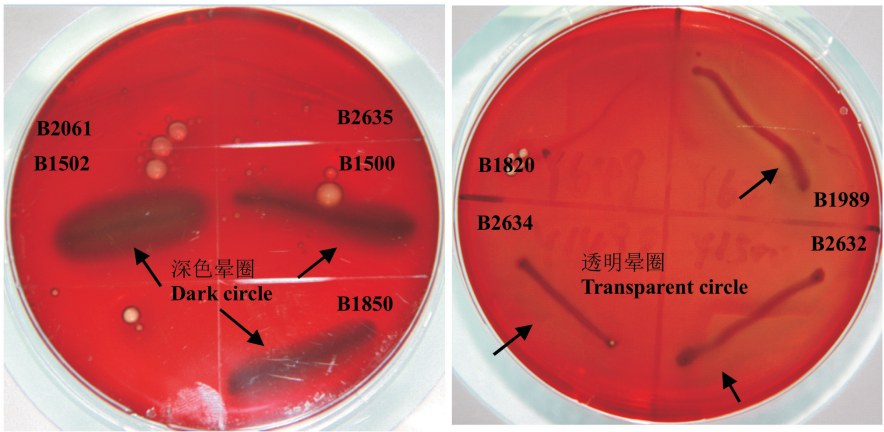


图 5 细菌抗血栓活性的初筛效果

Fig. 5 Primary screening effects of anti-thrombotic activity of bacteria

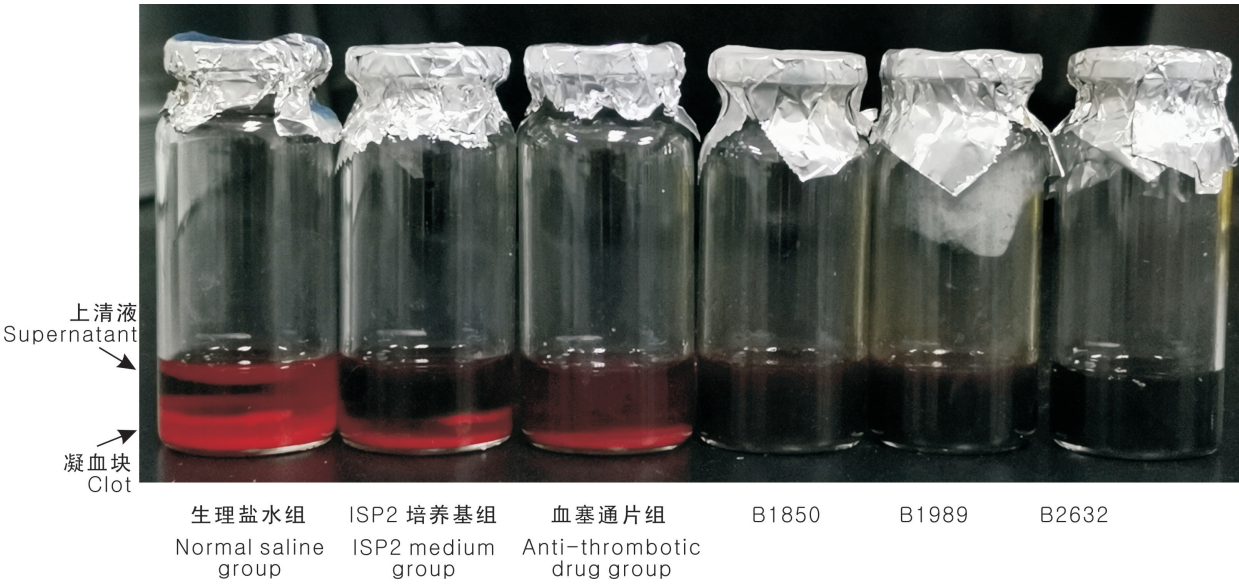


图 6 3 株细菌抗血栓活性的复筛

Fig. 6 Secondary screening results of anti-thrombotic activity of three strains

物病原菌和细胞毒活性等作用(徐佳佳等,2006),故研究桐花树内生菌的多样性和生物活性获得不少科研工作者的青睐。为了完善桐花树中内生细菌分布情况、物种多样性及其生物活性等信息,本研究选择广西北海滩涂上红树植物桐花树各组织和根际进行细菌多样性分析。采用 6 种分离培养基,对桐花树组织中获得的内生细菌进行定量分析,共获得 34 种细菌,隶属于 18 科 22 属;从根际中分离可培养细菌 44 种,隶属于 20 科 27 属。从桐花树各组织中获得内生细菌在种类和数量均有

明显差异,其中,根部和皮部中分离的细菌种类和数量最多,花和叶中分离到的细菌均较少;而根部来源的内生细菌与根际细菌存在较多相同属。研究发现,根际微生物的分布与沿根的可溶性碳的分布距离有关,其生物量的积累有赖于根系分泌物的释放,从而影响着根际微生物的代谢和生长发育(朱丽霞等,2003)。

采用无菌脱纤维羊血,通过体外溶栓实验筛选出具有抗血栓活性菌株。结果显示,初筛得到 18 种具有抗血栓活性的菌株,总阳性为 24.32%;

通过抗血栓活性复筛, 从中获得 3 株具有良好抗血栓活性菌株。该 3 株强抗血栓活性菌株 B1850、B1989 和 B2632 分别隶属于 *Microbacterium* sp.、*Stenotrophomonas* sp. 和 *Bacillus* sp.。据报道, 目前已从芽孢杆菌属、链霉菌属、链球菌属、单胞菌属及葡萄球菌属等细菌中分离出抗血栓活性物质 (Lack, 1948; 张艳等, 2000), 但对海洋来源的微生物在抗血栓活性研究领域上的报道寥寥可数, 本文开展海洋来源细菌中抗血栓活性研究, 发现两个未见报道的具有良好抗血栓活性菌株 *Microbacterium* sp. B1850 和 *Stenotrophomonas* sp. B1989, 这丰富了海洋微生物在抗血栓活性研究上的认识, 也为寻找新的纤溶酶和研发抗血栓活性药物等下游工作奠定了基础。

参考文献:

HUANG S, PAN S, CHEN G, et al., 2013. Biochemical characteristics of a fibrinolytic enzyme purified from a marine bacterium, *Bacillus subtilis* HQS-3 [J]. *Int J Biol Macromol*, 62:124–130.

HE BY, LAI TH, CHEN JF, et al., 2007. Studies of the tolerance of *Avicennia marina* and *Aegiceras corniculatum* to seawater immersion in Guangxi, China [J]. *Acta Ecol Sin*, 27(3): 1130–1138. [何斌源, 赖廷和, 陈剑锋, 等, 2007. 两种红树植物白骨壤 (*Avicennia marina*) 和桐花树 (*Aegiceras corniculatum*) 的耐淹性 [J]. *生态学报*, 27(3):1130–1138.]

JAREMO P, ERIKSSON M, LINDAHL TL, et al., 2013. Platelets and acute cerebral infarction [J]. *Platelets*, 24(5):407.

KIM KH, ROH SW, CHANG HW, et al., 2009. *Nocardioides basaltis* sp. nov., isolated from Black Beach Sand [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 59:42–47.

LACK CH, 1948. Staphylokinase, an activator of plasma protease [J]. *Nature*, 161(4093):559.

LAKSHMI BP, PRAKASHAM RS, 2013. A fibrinolytic, alkaline and thermostable metalloprotease from the newly isolated *Serratia* sp. RSPB11 [J]. *Int J Biol Macromol*, 61: 479–486.

LI F, GAO CH, YU L, et al., 2018. Diversity and antifungal activity of endophytic and rhizospheric bacteria isolated from *Ruppia maritima* [J]. *Guizhou*, 38(7):924–933. [李菲, 高程海, 余炼, 等, 2018. 川蔓藻内生及根际细菌多样性与抑菌活性研究 [J]. *广西植物*, 38(7):924–933.]

LI F, GAO CH, ZHU LB, et al., 2016. Diversity and cytotoxic

activity of endophytic bacteria isolated from *Sonneratia apetala* of Maowei Sea [J]. *J Microbiol Sin*, 56(4):689–697. [李菲, 高程海, 竺利波, 等, 2016. 茅尾海无瓣海桑内生细菌多样性及其细胞毒活性 [J]. *微生物学报*, 56(4):689–697.]

LI F, TUO L, SU ZW, et al., 2017. *Nocardioides sonneratae* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from branch of *Sonneratia apetala* [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 67: 2592–2597.

LI ZQ, HU JC, PAN HQ, et al., 2009. Screening and identification of fibrinolytic enzyme producing marine bacterium B5815 [J]. *J Microbiol*, 29(6):41–44. [李占强, 胡江春, 潘华奇, 等, 2009. 产纤溶酶海洋微生物 B5815 菌株的筛选及鉴定 [J]. *微生物杂志*, 29(6):41–44.]

LIU CG, WEI X, LIU WS, 2001. Study on characteristics of fibrinolytic enzyme from marine *Pseudomonas* [J]. *J Ocean Univ Qingdao*, 31(5): 730–734. [刘晨光, 魏香, 刘万顺, 2001. 海洋假单胞菌纤溶酶的酶学性质的研究 [J]. *青岛海洋大学学报*, 31(5): 730–734.]

LIU W, NI H, HUANG GL, et al., 2012. Screening of endophytic fungi with antibacterial, antioxidant and antitumor activities from Mangrove plants [J]. *Acta Laser Biol Sin*, 21(6):569–574. [刘伟, 倪辉, 黄高凌, 等, 2012. 从红树植物中筛选具有抗菌、抗氧化和抗肿瘤活性的内生真菌 [J]. *激光生物学报*, 21(6):569–574.]

MIU SY, CHEN GZ, LI HS, 2007. Wetland systems of mangrove plants *Aegiceras corniculatum* and *Avicennia marina* [M]. Guangzhou: Sun Yat-Sen University Press. [缪绅裕, 陈桂珠, 李海生, 2007. 红树林植物桐花树和白骨壤及其湿地系统 [M]. 广州: 中山大学出版社.]

WALSH PS, METZGER DA, HIGUCHI R, 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of dna for pcr-based typing from forensic material [J]. *Biotechniques*, 10(4):506–513.

QIAO DS, HUO JL, YANG TY, et al., 2009. Advances in the studies of biochemical antithrombotics [J]. *Pharmaceut Biotechnol*, 16(5):477–480. [乔德水, 霍建丽, 杨天雨, 等, 2009. 抗血栓生化药物的研究进展 [J]. *药物生物技术*, 16(5): 477–480.]

SUN Y, JIANG J, ZHANG Z, et al., 2008. Antioxidative and thrombolytic TMP nitron for treatment of ischemic stroke [J]. *Bioorg Med Chem*, 16(19):8868–8874.

WANG YH, YANG XT, YANG MJ, et al., 2010. Diversity and application of microbial fibrinolytic enzymes [J]. *Prog Mod Biol*, 10(8):1562–1565. [翁郁华, 杨晓彤, 杨明俊, 等, 2010. 微生物纤溶酶的多样性及应用前景 [J]. *现代生物医学进展*, 10(8):1562–1565.]

WEI H, LIU M, BAO SX, et al., 2012. Screening and characterization of anti-root-knot nematode actinomycetes strain from mud under mangrove (*Rhizophora*) forest [J]. *J Micro-*

- biol, 32(4):13-16. [魏华, 刘敏, 鲍时翔, 等, 2012. 1株抗根结线虫红树林放线菌的筛选与鉴定 [J]. 微生物学杂志, 32(4):13-16.]
- WEN CY, WU YH, TIAN XL, 2004. Recent advances and issues on the endophyte [J]. Chin J Ecol, 23(2):86-91. [文才艺, 吴元华, 田秀玲, 2004. 植物内生菌研究进展及其存在的问题 [J]. 生态学杂志, 23(2):86-91.]
- XIN H, XUE SS, JIANG LM, et al., 2018. Screening of marine microbial antithrombotic strains from Naozhou island in South China Sea and its effect on blood coagulation characteristics [J]. J Bengbu Med Coll, 43(7):850-853. [辛宏, 薛珊珊, 江黎明, 等, 2018. 中国南海涠洲岛海洋微生物抗血栓菌株的筛选及其对血液凝固特性的影响 [J]. 蚌埠医学院学报, 43(7):850-853.]
- XU JJ, LONG SJ, 2006. Research overview of chemical constituents and biological activity of the *Aegiceras corniculatum* [J]. Lishizhen Med Mat Med Res, 17(12):2393-2395. [徐佳佳, 龙盛京, 2006. 桐花树化学成分及其生物活性作用的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 17(12):2393-2395.]
- ZHANG Y, LI WP, MING L, et al., 2000. Effects of r-Sak on thrombolysis in rabbits and rats [J]. Chin Pharm Bull, 16(2):187-189. [张艳, 李卫平, 明亮, 等, 2000. 重组葡激酶溶栓作用的研究 [J]. 中国药理学通报, 16(2):187-189.]
- ZHOU J, YANG Q, LI G, et al., 2019. Advances in endophytic fungi diversity and secondary metabolites in *Rhizophora* plants [J]. Sci Silv Sin, 55(1):92-105. [周婧, 杨琦, 李钢, 等, 2019. 红树属植物内生真菌多样性及其代谢产物研究进展 [J]. 林业科学, 55(1):92-105.]
- ZHOU SQ, HUANG XL, HUANG DY, et al., 2010. A rapid method for extracting DNA from actinomycetes by Chelex-100 [J]. Biotechnol Bull, 26(2):123-125. [周双清, 黄小龙, 黄东益, 等, 2010. Chelex-100 快速提取放线菌 DNA 作为 PCR 扩增模板 [J]. 生物技术通报, 26(2):123-125.]
- ZHU LX, ZHANG JE, LIU WG, 2003. Review of studies on interactions between root exudates and rhizospheric microorganisms [J]. Ecol Environ, 12(1):102-105. [朱丽霞, 章家恩, 刘文高, 2003. 根系分泌物与根际微生物相互作用研究综述 [J]. 生态环境, 12(1):102-105.]

(责任编辑 周翠鸣)