



研究报告

具有抗哈维氏弧菌活性共生真菌 HLZ-3 菌株的筛选、鉴定及其培养条件

陈慧^{1,2} 曹曦¹ 王鑫彤¹ 张菲¹ 王乐¹ 郭雷^{*1,2}

1 江苏海洋大学海洋生命与水产学院 江苏省海洋生物资源与环境重点实验室 江苏 连云港 222005

2 江苏省海洋资源开发研究院 江苏 连云港 222005

摘要:【背景】目前,海水养殖业中主要利用抗生素来防治哈维氏弧菌等病原菌,但抗生素的长期使用或滥用会对环境和人体健康带来危害,因此既环保又有效的生物防治方法具有广阔的应用前景。

【目的】从海水产品共生微生物中筛选具有抗菌活性的菌株,对活性菌株进行鉴定并确定其合成抗菌活性物质的培养条件。【方法】利用沙氏和 2216E 培养基,以稀释涂布平板法从海水养殖动物中分离真菌和细菌;利用牛津杯法测定微生物发酵液抗水产病原哈维氏弧菌的活性;通过菌株的培养特征、形态特征和 ITS 序列分析对抗菌活性菌株进行鉴定;通过筛选发酵培养基的种类及盐度确定培养条件。

【结果】从海蚌、白虾、海蛎子等 9 种样品中分离出微生物 52 株,其中真菌 30 株、细菌 22 株;筛选得到 2 株具有抗哈维氏弧菌活性的真菌菌株;其中一株活性菌株 HLZ-3 被鉴定为塔宾曲霉;菌株 HLZ-3 合成抗菌活性物质的培养条件为 4% NaCl 的大米培养基,28 °C 静置培养 2 周。【结论】实验结果为进一步分离纯化菌株 HLZ-3 所产抗菌活性次生代谢产物提供了基础。

关键词: 共生微生物, 抗菌活性, 菌种鉴定, 培养条件

Screening, identification and culture conditions of symbiotic fungus HLZ-3 with antibacterial activity against *Vibrio harveyi*CHEN Hui^{1,2} CAO Xi¹ WANG Xin-Tong¹ ZHANG Fei¹ WANG Le¹ GUO Lei^{*1,2}

1 Jiangsu Key Laboratory of Marine Bioresources and Environment, School of Marine Life and Fisheries, Jiangsu Ocean University, Lianyungang, Jiangsu 222005, China

2 Marine Resources Development Institute of Jiangsu, Lianyungang, Jiangsu 222005, China

Abstract: [Background] At present, antibiotics are mainly used to control pathogenic bacteria such as *Vibrio harveyi* in seawater breeding industry. However, the long-term application or abuse of antibiotics may be adverse to the environment protection and human health. Therefore, biological control methods that are both environmentally friendly and effective have broad application prospects. [Objective] Strains with

Foundation items: Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20151283); Lianyungang Technical Plan Project (CG1612); Postgraduate Practice Innovation Program of Jiangsu Province (SJCX19_0955); Lianyungang 521 Talented Project (KKC17001)

*Corresponding author: E-mail: leiguoo@sina.com

Received: 19-10-2018; Accepted: 12-12-2018; Published online: 29-12-2018

基金项目: 江苏省自然科学基金(BK20151283); 连云港市科学计划项目(CG1612); 江苏省研究生实践创新计划项目(SJCX19_0955); 连云港市 521 人才工程项目(KKC17001)

*通信作者: E-mail: leiguoo@sina.com

收稿日期: 2018-10-19; 接受日期: 2018-12-12; 网络首发日期: 2018-12-29

antibacterial activity were screened from the symbiotic microorganisms of seawater products. The active strains were identified and the culture conditions for the synthesis of antibacterial active substances were determined. **[Methods]** Fungi and bacteria were isolated from mariculture animals by the dilution and spreading plate method using the culture medium of Sabouraud and 2216E medium. The antibacterial activity of microbial fermentation broths against *V. harveyi* was determined by Oxford cup method. The active strain was identified by the morphological characteristics and internal transcribed spacer (ITS) analysis. Culture conditions were determined by screening the type and salinity of fermentation medium. **[Results]** A total of 52 microbial strains were isolated from 9 kinds of samples, among them, 30 strains belong to fungi and 22 strains belong to bacteria. Two fungal strains with antibacterial activity against *V. harveyi* were obtained. One active strain, HLZ-3, was identified as *Aspergillus tubingensis*. The culture conditions of HLZ-3 for the synthesis of antibacterial active substances was 4% NaCl in rice culture medium, and stationary incubated at 28 °C for 2 weeks. **[Conclusion]** The results provide a basis for further isolation and purification of antibacterial secondary metabolites produced by the strain HLZ-3.

Keywords: Symbiotic microorganisms, Antibacterial activity, Strain identification, Culture conditions

共生(Symbiosis)一词最早是于 19 世纪由德国的一名外科医生 Anton de Bary 提出,意为两种不同生物之间密切的相互联系^[1],这种联系对生物多样性的产生和维持具有重要作用。共生微生物因其与宿主之间在长期的共同进化中建立了稳定的互惠共生关系,往往拥有特殊的代谢途径,有可能产生对其自身及宿主具有重要作用的次生代谢产物^[2]。

哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*),又称哈氏弧菌,是海水养殖中常见的致病菌之一^[3]。鱼、虾、贝等海水经济养殖动物感染该菌后会引发体表充血、皮肤溃疡、尾鳍烂蚀等,死亡率很高,往往给养殖业造成巨大的经济损失。该菌对虾的危害十分严重,曾引起印度尼西亚、澳大利亚、泰国、印度、台湾及菲律宾的对虾育苗场斑节对虾幼体的大量死亡^[4-5]。目前,海水养殖业中主要利用抗生素来防治哈维氏弧菌等病原菌,但抗生素的长期应用或滥用导致了耐药菌株的产生,使抗生素的疗效愈发不理想,并且变异病原菌往往会引起更为严重的疾病。此外,抗生素在水产品中的残留也直接威胁着人类的健康与安全^[6-7]。因此,除通过调整养殖结构和养殖模式、选择优良水产动物幼苗和重视防病模式等综合防治措施外,开发新的水产用抗菌剂或抗生素的替代品迫在眉睫。

目前抗生素替代品的开发主要有以下方面:精油、植物提取物、噬菌体、益生菌和微生物次生代谢产物等^[8-12]。本研究从海水养殖动物中分离共生

微生物(真菌和细菌),利用水产病原哈维氏弧菌为目标菌株,测定真菌和细菌的发酵液抗哈维氏弧菌的活性,以期筛选得到具有较好抗哈维氏弧菌的活性菌株,鉴定活性菌株的种类并确定其合成抗菌活性物质的培养条件,为进一步分离纯化其抗菌活性成分提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

海蚌、白虾、刀鱼、花蛤、花蚬、海蛎子、牡蛎、虾婆、扇贝等 9 种海水养殖动物,购自连云港当地海鲜市场。

1.1.2 指示菌株

哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi* CGMCC 1.8690),购自中国普通微生物菌株保藏管理中心,由本实验室保存。

1.1.3 培养基

真菌分离培养基为沙氏固体培养基(SDA, g/L): 葡萄糖 40.0, 蛋白胨 10.0, 琼脂 15.0; 细菌分离培养基为 2216E 培养基(g/L): 蛋白胨 5.0, 酵母膏 1.0, 琼脂 15.0; 均用陈海水配制。种子液培养基为沙氏液体培养基; 菌种鉴定培养基为沙氏固体培养基; 指示菌株培养基为牛肉膏蛋白胨培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 牛肉膏 3.0, 琼脂 15.0, 用陈海水配制。

1.1.4 主要试剂和仪器

葡萄糖、蛋白胨、酵母膏、琼脂、甲醇、乙酸乙酯, 国药集团化学试剂有限公司。Shim-Pack CLC-ODS 柱(6.0 mm×150 mm), 岛津公司; 电子分析天平, 北京赛多利斯仪器系统有限公司; 电热恒温鼓风干燥箱, 上海一恒科技有限公司; 全自动立式压力蒸汽灭菌锅, 上海博讯实业有限公司; 旋转蒸发仪, 上海青浦沪西仪器厂; 全温恒温摇床, 上海彦承实业有限公司; 高效液相色谱仪, 赛默飞世尔(中国)有限公司。

1.2 微生物的分离

采取稀释涂布平板法分离微生物。用无菌水将 9 种鱼虾贝类样品的表面冲洗干净, 再用无菌剪刀将其剪碎。将剪碎的样品 1 g 用无菌水稀释 10 倍后分别涂布于沙氏固体和 2216E 培养基平板上, 置于 32 °C 恒温培养箱中培养。每天观察菌落生长情况, 挑取各样品形态各异的菌落进行稀释涂布平板法纯化, 纯化的菌株接种于相应的斜面培养基, 4 °C 保存备用。

1.3 抗菌活性微生物菌株的筛选

将上述 4 °C 保存的真菌菌株接种于沙氏液体培养基, 28 °C、160 r/min 摇床培养 7 d; 细菌菌株接种于 2216E 液体培养基, 于 37 °C、160 r/min 摇床培养 2 d。分别取 5 mL 发酵液 59 kHz 超声破碎 2 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 上清液作为待测样品。以哈维氏弧菌为指示菌株, 利用牛津杯法对上述所得待测液进行抗菌活性测定, 筛选具有抗哈维氏弧菌活性的菌株。

1.4 抗菌活性的测定

将冷却至 50 °C 左右的沙氏固体培养基和 2216E 培养基 15 mL 分别倒入 90 mm 直径的培养皿中, 置于室温 30 min 凝固后, 加入 100 μL 的 $(1-2) \times 10^6$ 个/mL 哈维氏弧菌悬液涂布均匀。放入牛津杯(外径约 8.0 mm), 用移液器分别加入待测样品 200 μL, 每个样品分别做 2 个平行, 32 °C 培养 24 h 后, 用电子卡尺测定抑菌圈的直径, 以抑菌圈直径的平均值作为待测样品的抗菌活性(mm)^[13], 以 0.1 mg/mL 的硫酸链霉素作为阳性对照。

1.5 菌株 HLZ-3 的鉴定

1.5.1 形态特征^[14]

将纯化的 HLZ-3 菌株接种于沙氏固体培养基平板上, 28 °C 培养 3-7 d, 观察并描述菌落的培养特征; 挑取少许健壮的菌体置于干净载玻片上的石炭酸棉兰液滴中染色, 用显微镜观察其分生孢子囊特征; 将菌种在 SDA 固体培养基上进行划线培养, 并将盖玻片以 45° 的角度插入培养基中, 在 28 °C 的条件下培养 7 d, 然后获得带有菌丝体的玻璃盖玻片, 用日立 H-7650 扫描电子显微镜下观察其分生孢子特征。

1.5.2 ITS 序列分析^[15]

将 HLZ-3 菌株接种于沙氏固体培养基平板上, 28 °C 培养 7 d 后, 送交北京三博远志生物科技有限公司进行 ITS 序列分析。将测得的 ITS 序列提交到 GenBank 中, 依次采用 BLAST 软件搜索相似序列、ClustalX (V1.83) 软件对高同源序列进行多序列联配分析、MEGA 4.0 软件中的 Neighbor-Joining (N-J) 法构建系统发育树, 自展次数设置为 1 000 次。

1.6 菌株 HLZ-3 产抗菌活性物质的培养条件

1.6.1 种子液制备

将 HLZ-3 菌株接种于沙氏斜面培养基, 28 °C 培养 3-4 d, 挑取活化的菌株接种于装有 100 mL 沙氏液体培养基的 250 mL 锥形瓶中, 28 °C、160 r/min 摇床培养 24 h 后作为种子液备用。

1.6.2 发酵培养基筛选

按 1% (体积比) 的比例将制备的种子液分别加入到灭菌后的寡营养培养基[SWS (g/L): 淀粉 10.0, 蛋白胨 1.0]、沙氏液体培养基[SD (g/L): 葡萄糖 40.0, 蛋白胨 10.0]、改良沙氏液体培养基[MSD (g/L): 葡萄糖 30.0, 蛋白胨 10.0, CaCl₂ 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.5]、真菌 5 号培养基[(g/L): 葡萄糖 10.0, 麦芽糖 20.0, 味精 10.0, 酵母浸膏 3.0, K₂HPO₄ 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.3]、大米培养基(50 g 大米加入 100 mL 陈海水, 浸泡 5-6 h 后, 将水倒掉, 再加入 100 mL 陈海水)中, 大米培养基在 28 °C 静置培养 2 周, 其他 4 种培养基在 28 °C、160 r/min 摇床培养 7 d。以上培养基均用陈海水配制。发酵产物用

等量乙酸乙酯萃取3次,合并3次乙酸乙酯萃取液,减压浓缩蒸发和冷冻干燥得活性浸膏。将各浸膏以甲醇溶解至10 mg/mL,利用1.4方法测定其对哈维氏弧菌的抑菌活性,平行3次,活性大小以抑菌圈直径的平均值(mm)表示。菌株次生代谢产物的多样性利用高效液相色谱(HPLC)进行分析。

1.6.3 HPLC 分析^[16]

通过HPLC指纹图谱考察菌株次生代谢产物的化学多样性。柱系统: Shim-Pack CLC-ODS 柱,样品浓度为10 mg/mL(甲醇为溶剂),进样量为20 μ L,检测波长254 nm。洗脱方式: 甲醇/水混合溶剂梯度洗脱,在0–20 min内甲醇浓度从10%变化到100%。

1.6.4 培养基盐度的筛选

在确定发酵培养基的基础上,按1% (体积比)的比例将制备的种子液分别加入到用蒸馏水配制的含有0–5% NaCl的培养基中,并用陈海水作为对照,按1.6.2中的方法对菌株HLZ-3进行培养,并对其发酵产物的活性浸膏进行抑菌活性检测。

2 结果

2.1 微生物的分离及筛选

2.1.1 微生物分离

从海蚌、白虾、刀鱼、花蛤、花蚬、海蛎子、牡蛎、虾婆、扇贝等9种鱼虾贝类样品中共分离得到52株微生物,其中真菌30株、细菌22株。

2.1.2 抗菌活性菌株筛选

筛选时选择0.1 mg/mL的硫酸链霉素作为阳性对照,该浓度下硫酸链霉素对哈维氏弧菌的抑菌圈直径为19.80 \pm 0.99 mm,将抑菌圈直径大于或等于20.0 mm的菌株视为活性菌株。22株细菌对哈维氏弧菌抑菌圈的直径均小于10.0 mm,鉴于牛津杯的外径约为8.0 mm,可将这些样品视为基本没活性。具有抗哈维氏弧菌活性的真菌菌株见表1,由表1可知HB-1、HB-2、DY-1、HG-3、HG-4等11株菌株的抑菌圈大于20.0 mm,活性较大,因此将这11株真菌菌株进行复筛。

复筛后,上述11株真菌菌株对哈维氏弧菌的抑菌效果见表2,由表2可知,抑菌圈直径稳定在20.0 mm

表1 来自不同样品的真菌菌株对哈维氏弧菌的抗菌活性
Table 1 The antibacterial activity of fungal strains from different samples against *Vibrio harveyi*

样品来源 Source of sample	菌株编号 Number of strain	抑菌圈 Inhibition zone (X, n=2, mm)
海蚌 Mussels	HB-1	23.65
	HB-2	20.35
白虾 White shrimp	BX-1	19.76
	BX-2	19.19
刀鱼 Coeliaspp	DY-1	22.19
花蛤 Clam	HG-3	25.16
	HG-4	22.02
	HG-5	21.12
花蚬	HG-6	22.93
	HX-2	20.64
<i>Cyrenodonax formosanus</i>	HX-3	19.35
海蛎子 Oyster	HLZ-2	19.03
	HLZ-3	22.14
牡蛎 Shellfish	ML-1	18.35
	ML-3	23.11
虾婆 Mantis shrimp	XP-1	20.69
	XP-2	18.99
扇贝 Scallop	SB-3	19.47

表2 11株真菌菌株对哈维氏弧菌的抗菌活性
Table 2 Antibacterial activity of 11 strains of fungi against *Vibrio harveyi*

样品来源 Source of sample	菌株编号 Number of strain	抑菌圈 Inhibition zone (X \pm SD, n=3, mm)
海蚌 Mussels	HB-1	16.07 \pm 0.53
	HB-2	15.33 \pm 1.26
刀鱼 Coeliaspp	DY	14.50 \pm 0.72
花蛤 Clam	HG-3	16.73 \pm 0.59
	HG-4	16.12 \pm 0.71
	HG-5	16.96 \pm 0.12
花蚬	HG-6	16.64 \pm 0.09
	HX-2	16.73 \pm 0.75
<i>Cyrenodonax formosanus</i>		
海蛎子 Oyster	HLZ-3	22.94 \pm 3.28
牡蛎 Shellfish	ML-3	20.08 \pm 3.69
虾婆 Mantis shrimp	XP-1	14.36 \pm 0.75

以上的菌株有 2 株, 分别为来自海蛎子的 HLZ-3 和牡蛎的 ML-3 菌株。本研究首先对海蛎子共生真菌 HLZ-3 菌株进行了鉴定, 并筛选其合成抗菌活性物质的培养条件(ML-3 菌株有待进一步研究)。

2.2 菌株 HLZ-3 的鉴定

2.2.1 形态学特征

菌株 HLZ-3 在沙氏琼脂培养基上 28 °C 培养 7 d 后, 直径可达 65 mm–70 mm, 质地呈丝绒状; 菌丝初生时为白色, 逐渐变为棕黑色, 菌落反面黄褐色(图 1A、1B); 在光学及扫描电子显微镜下, 分生孢子头呈球形, 顶囊膨大, 顶囊上具有放射状密的两轮小柄, 分生孢子呈球形, 直径约 4 μm, 表面不光滑(图 1C、1D)。参考相关文献[17], 可初步鉴定菌株 HLZ-3 为曲霉属黑色组曲霉。

2.2.2 ITS 序列分析

菌株 HLZ-3 的 ITS 序列全长 595 bp (GenBank

中的序列号为 MH982281), 经 BLASTn 分析, 该序列与曲霉属真菌的 ITS 序列具有很高的相似性, 其中与菌株 *Aspergillus tubingensis* FEC 98 和 *A. tubingensis* F33-01 (序列号分别为 KM386437.1 和 KX664374.1) 的 ITS 序列相似性为 99%, 在以 N-J 法构建的系统发育树上聚为同一簇群(图 2)。结合形态学特征, 将 HLZ-3 菌株鉴定为塔宾曲霉 *Aspergillus tubingensis*。

2.3 菌株 HLZ-3 产抗菌活性物质的培养条件筛选

2.3.1 培养基

塔宾曲霉 HLZ-3 菌株分别在寡营养培养基、沙氏培养基、改良沙氏培养基、真菌 5 号培养基和 大米培养基上培养后, 发酵产物的乙酸乙酯提取物对哈维氏弧菌的抑菌活性见表 3, 可以看出大米培养基的培养效果最好。HPLC 指纹图谱显示大米培养基的培养产物具有系列吸收峰(图 3), 化学多样性丰富, 分离出活性化合物的可能性较大, 因此选择大

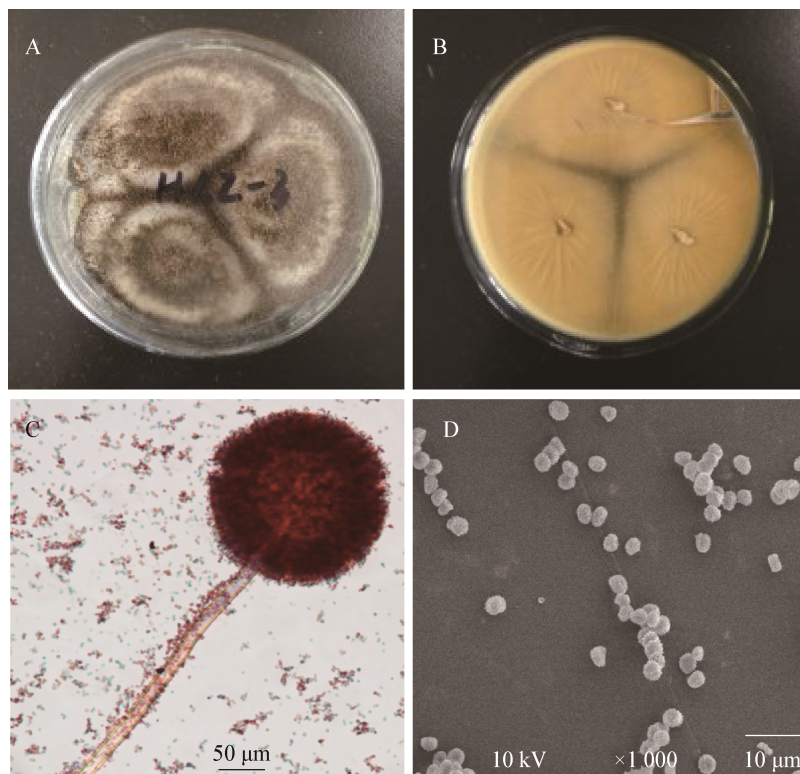


图 1 菌株 HLZ-3 的形态特征

Figure 1 Morphological characters of strain HLZ-3

注: A: 菌落特征(正面); B: 菌落特征(背面); C: 分生孢子梗; D: 分生孢子。

Note: A: Colony (Front); B: Colony (Back); C: Conidiophore; D: Conidia.

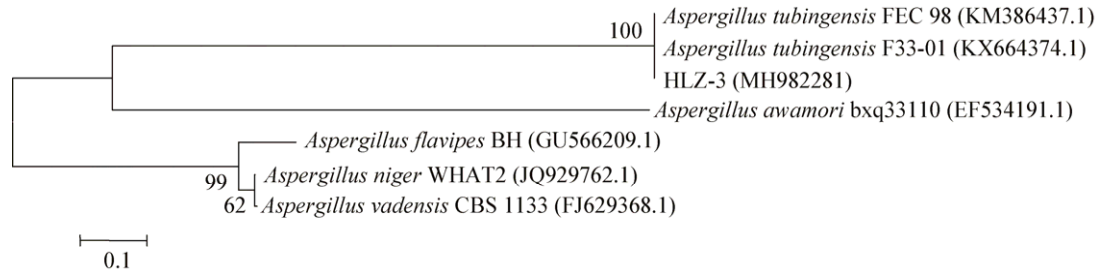


图2 菌株 HLZ-3 基于 ITS 序列的系统发育分析

Figure 2 Polymeric analysis of strain HLZ-3 based on ITS sequence

注：括号中的序号代表菌株的 GenBank 登录号；分支点上的数字代表计算 1 000 次聚类到一起的几率；刻度 0.1 表示序列偏差值。
Note: The sequence number in the bracket means the GenBank accession number of the strain; The number at the node means the percentage of occurrence in 1 000 bootstrap trees; The scale bar represents 0.1 substitutions per nucleotide position.

表 3 不同培养基条件下发酵产物乙酸乙酯提取物的抑菌圈

Table 3 Inhibition zone of ethyl acetate extracts under different media conditions

培养基 Medium type	抑菌圈 Inhibition zone ($X \pm SD$, n=3, mm)
寡营养培养基 Oligotrophic medium	16.99±0.53
沙氏培养基 Sabouraud medium	13.60±0.33
改良沙氏培养基 Modified sabouraud medium	16.53±0.76
真菌 5 号培养基 Fungal No.5 medium	12.11±0.78
大米培养基 Rice medium	19.59±0.32

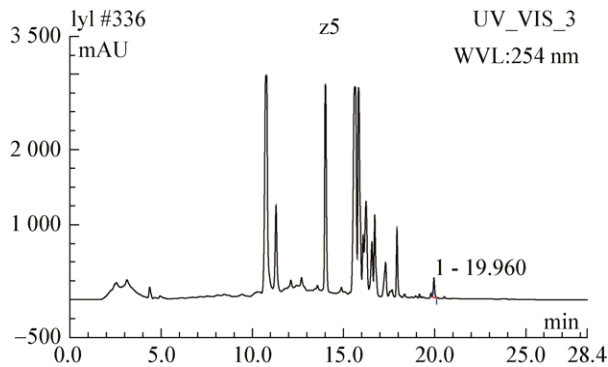


图3 菌株 HLZ-3 大米培养基发酵产物乙酸乙酯提取物的 HPLC 指纹图

Figure 3 HPLC finger-print map of ethyl acetate extracts of strain HLZ-3 in rice medium

米培养基为菌株 HLZ-3 合成抗哈维氏弧菌活性次生代谢产物的培养基。

2.3.2 培养基盐度

盐度筛选的实验结果见表 4，当培养基盐度为 4% NaCl 时，菌株 HLZ-3 发酵产物乙酸乙酯提取物的抗菌活性物质最为明显，HPLC 指纹图谱显示其化学多样性没有改变，所以将陈海水用 4% NaCl 的水溶液取代。因此确定最适合 HLZ-3 菌株产生抗菌活性物质的培养条件为：4% NaCl 的大米培养基，28 °C 静置培养 2 周。

3 讨论与结论

塔宾曲霉是一种黑曲霉属真菌，已有文献报道显示塔宾曲霉能够产生萘并吡喃酮类化合物如 Aurasperone A-E、环五肽、吡啶二萜等次生代谢产物^[18-21]，这些化合物呈现一定的抗烟草花叶病毒及

表 4 不同盐度条件下发酵产物的抑菌圈

Table 4 The inhibition zone of fermentation products under different salinity conditions

NaCl 浓度 Salinity of NaCl (%)	抑菌圈 Inhibition zone ($X \pm SD$, n=3, mm)
0	15.54±1.01
1	14.18±1.03
2	13.65±1.49
3	13.18±1.94
4	22.53±5.46
5	13.64±0.58
Control	13.22±1.99

细胞毒等生物活性, 提示该菌具有合成抗菌活性次生代谢产物的能力。本研究室曾从塔宾曲霉 LWG-42 菌株的发酵产物中以活性追踪的分离方法得到 2 个具有 DPPH 自由基清除活性的化合物 Aurasperone A 和 Aurasperone B^[22]。本研究通过筛选, 从海水养殖动物海蛎子共生微生物中筛选得到一株具有抗水产病原哈维氏弧菌活性的真菌 HLZ-3 菌株, 基于该菌株的形态学特征和 ITS 序列分析, 将其鉴定为塔宾曲霉(*A. tubingensis*), 并确定了菌株 HLZ-3 合成抗哈维氏弧菌活性次生代谢产物的培养条件, 为进一步分离纯化塔宾曲霉 HLZ-3 菌株所产抗菌活性次生代谢产物奠定了一定的基础。

REFERENCES

- [1] Lu H, Zou WX, Meng JC, et al. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*[J]. *Plant Science*, 2000, 151(1): 67-73
- [2] Ge HM, Tan RX. Symbionts, an important source of new bioactive natural products[J]. *Progress in Chemistry*, 2009, 21(1): 30-46 (in Chinese)
戈惠明, 谭仁祥. 共生菌—新活性天然产物的重要来源[J]. *化学进展*, 2009, 21(1): 30-46
- [3] Morya VK, Choi W, Kim EK. Isolation and characterization of *Pseudoalteromonas* sp. from fermented Korean food, as an antagonist to *Vibrio harveyi*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(3): 1389-1395
- [4] Thompson J, Gregory S, Plummer S, et al. An *in vitro* and *in vivo* assessment of the potential of *Vibrio* spp. as probiotics for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 109(4): 1177-1187
- [5] Guo L, Guo JC, Xu FQ. Optimized extraction process and identification of antibacterial substances from Rhubarb against aquatic pathogenic *Vibrio harveyi*[J]. *3 Biotech*, 2017, 7(6): 377
- [6] Cao HP, He S, Wei RP, et al. *Bacillus amyloliquefaciens* G1: a potential antagonistic bacterium against eel-pathogenic *Aeromonas hydrophila*[J]. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 2011: 824104
- [7] Harikrishnan R, Balasundaram C, Heo MS. Effect of probiotics enriched diet on *Paralichthys olivaceus* infected with lymphocystis disease virus (LCDV)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29(5): 868-874
- [8] Kesarcodi-Watson A, Kaspar H, Lategan MJ, et al. Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes[J]. *Aquaculture*, 2008, 274(1): 1-14
- [9] Randrianarivelo R, Danthu P, Benoit C, et al. Novel alternative to antibiotics in shrimp hatchery: effects of the essential oil of *Cinnamosma fragrans* on survival and bacterial concentration of *Penaeus monodon* larvae[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 109(2): 642-650
- [10] Turker H, Yildirim AB. Screening for antibacterial activity of some Turkish plants against fish pathogens: a possible alternative in the treatment of bacterial infections[J]. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2015, 29(2): 281-288
- [11] Xu HM, Rong YJ, Zhao MX, et al. Antibacterial activity of the lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* M1 against multidrug-resistant *Vibrio* spp. isolated from diseased marine animals[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(1): 127-136
- [12] Guo L, Wang C, Zhu WC, et al. Bioassay-guided fractionation and identification of active substances from the fungus *Aspergillus tubingensis* against *Vibrio anguillarum*[J]. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2016, 30(3): 602-606
- [13] Guo L, Wang C. Optimized production and isolation of antibacterial agent from marine *Aspergillus flavipes* against *Vibrio harveyi*[J]. *3 Biotech*, 2017, 7(6): 383
- [14] Ye BP, Jia YY, Xu TT, et al. *Aspergillus* sp. strain F7 from the rhizospheric soil of *Rhizophora stylosa* and its biological activity evaluation[J]. *Mycosystema*, 2010, 29(2): 241-248 (in Chinese)
叶波平, 贾阳阳, 许婷婷, 等. 来自红海榄根际土壤的曲霉属真菌 F7 菌株及其生物活性分析[J]. *菌物学报*, 2010, 29(2): 241-248
- [15] Guo L, Zhu WC, Liu WW, et al. Identification and fermentation optimization of marine fungus HN4-13 with antibacterial activity[J]. *Microbiology China*, 2013, 40(6): 951-958 (in Chinese)
郭雷, 朱文成, 刘玮炜, 等. 抗菌活性海洋真菌 HN4-13 的鉴定及其发酵优化[J]. *微生物学通报*, 2013, 40(6): 951-958
- [16] Zhou YL, Wang Y, Liu PP, et al. Effects of environmental stress on secondary metabolites of *Aspergillus ochraceus* LCJ11-102 associated with the coral *Dichotella gemmacea*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(8): 1023-1029 (in Chinese)
周雅琳, 王义, 刘培培, 等. 环境胁迫对珊瑚共生真菌 *Aspergillus ochraceus* LCJ11-102 次生代谢产物的影响[J]. *微生物学报*, 2010, 50(8): 1023-1029
- [17] Qi ZT. *Flora Fungorum Sinicorum* (Volume 5): *Aspergillus* and Related Sexual Types[M]. Beijing: Science Press, 1997: 92-93 (in Chinese)
齐祖同. 中国真菌志(第五卷): 曲霉属及其相关有性型[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 92-93
- [18] Huang HB, Feng XJ, Liu L, et al. Three dimeric naphtho- γ -pyrones from the mangrove endophytic fungus *Aspergillus tubingensis* isolated from *Pongamia pinnata*[J]. *Planta Medica*, 2010, 76(16): 1888-1891
- [19] Zhan JX, Gunaherath GMKB, Wijeratne EMK, et al. Asperpyrone D and other metabolites of the plant-associated fungal strain *Aspergillus tubingensis*[J]. *Phytochemistry*, 2007, 68(3): 368-372
- [20] Tan QW, Gao FL, Wang FR, et al. Anti-TMV activity of malformin A₁, a cyclic penta-peptide produced by an endophytic fungus *Aspergillus tubingensis* FJB11[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(3): 5750-5761
- [21] Siriwardane AMDA, Kumar NS, Jayasinghe L, et al. Chemical investigation of metabolites produced by an endophytic *Aspergillus* sp. isolated from *Limonia acidissima*[J]. *Natural Product Research*, 2015, 29(14): 1384-1387
- [22] Guo L, Wang C, Guo JC, et al. Identification of marine-derived *Aspergillus tubingensis* LWG-42 and isolation of its antioxidant active compounds[J]. *Journal of Microbiology*, 2017, 37(6): 30-35 (in Chinese)
郭雷, 王聪, 郭家才, 等. 海洋来源塔宾曲霉 LWG-42 菌株的鉴定及其抗氧化活性化合物的分离[J]. *微生物学杂志*, 2017, 37(6): 30-35