

网络优先数字出版时间:2015-01-14

网络优先数字出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/45.1075.N.20150114.1023.003.html>

斜阳岛珊瑚礁区海泥可培养细菌分离鉴定及活性研究*

Diversity and Bioactive of Cultivated Marine Bacteria Isolated from the Sea Bed Mud at Coral Reef Nearby the Xieyang Island

胡丽琴^{1,2}, 高程海^{1**}, 李菲^{1,2}, 杨小梅^{1,2}, 周文红², 张荣灿¹

HU Li-qin^{1,2}, GAO Cheng-hai^{1**}, LI Fei^{1,2}, YANG Xiao-mei^{1,2}, ZHOU Wen-hong², ZHANG Rong-can¹

(1. 广西科学院 广西近海海洋环境科学重点实验室, 广西南宁 530007; 2. 广西大学轻工与食品工程学院, 广西南宁 530004)

(1. Guangxi Key Laboratory of Marine Environmental Science, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China; 2. College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China)

摘要:【目的】研究广西斜阳岛珊瑚礁区海泥可培养细菌多样性及其代谢产物的生物活性。【方法】采用纯培养法和基于16S rRNA基因序列的系统发育分析细菌多样性,利用滤纸片琼脂扩散法和卤虫致死法研究其生物活性。【结果】从海泥中分离获得相关可培养细菌53株,这些菌株代表27个物种,其中20株菌属于厚壁菌门(74%),7株菌为变形菌门(26%)。活性研究发现,X-15(*Erythrobacter citreus*)的抑菌活性和生物毒性都较强,具有开发新型食品防腐剂和抗肿瘤药物的潜力。【结论】广西斜阳岛海泥中的细菌多样性较为丰富。

关键词:海洋细菌 系统发育分析 抗菌活性 卤虫致死

中图分类号:Q939.1 文献标识码:A 文章编号:1002-7378(2015)01-0032-07

Abstract:【Objective】To investigate the diversity and bioactive of culturable bacteria isolated from the sea bed mud at coral reef nearby the Xieyang island. 【Methods】Cultivated marine bacteria were isolated from the sea bed mud at coral reef nearby the Xieyang island by using conventional culture-dependent method and their diversity was investigated by using phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequence comparisons. Activities of the crude extract of isolated strains were tested through filter paper method and Brine shrimp lethality. 【Results】We isolated 53 bacterial strains from the sample on media (2216E, NA and ISP2)

收稿日期:2014-08-10

作者简介:胡丽琴(1988-),女,硕士研究生,主要从事海洋微生物资源的保藏和应用研究。

* 国家自然科学基金项目(81260480),广西科技攻关项目(桂科合 14123001-7)和广西自然科学基金项目(2011GXNSFB018035,2012GXNSFB053068)资助。

** 通讯作者:高程海(1979-),男,副研究员,主要从事海洋微生物资源的保藏和应用研究。

supplement with seawater. On the basis of morphological and biochemical characteristics, we selected 27 strains to perform a phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences. Results showed that 27 isolated strains represented 2 phyla. Activity results showed that the crude extract of 21 isolated strains, using four indicator bacteria as control, showed effective

antibacterial activity, and 10 strains showed significant brine shrimp lethality. The antibacterial activity and toxicology activity of X-15 is better than that of the other strains, which shows it is great potential to be a new natural food preservatives and anti-cancer drug. **【Conclusion】**Bacterial resources in coral reef nearby the Xieyang island was rich.

Key words: marine bacteria, phylogeny, antimicrobial activity, brine shrimp lethality

0 引言

【研究意义】复杂、独特的海洋环境为海洋微生物的物种多样性提供重要支撑,海洋微生物的代谢产物化学和活性多样性是开发新的天然防腐剂和寻求新药的来源。**【前人研究进展】**斜阳岛位于涠洲岛东南方向约9海里处,由火山喷发堆凝形成,是广西纬度最低的地方。方燕等^[1]发现斜阳岛附近海域的可培养柳珊瑚共生菌具有多样性。龙彬等^[2]报道斜阳岛柳珊瑚共生菌 *Bucillus methylotrophicus* 的次生代谢产物研究。**【本研究切入点】**对斜阳岛珊瑚礁区海泥中可培养细菌多样性进行研究,并对其代谢物的活性进行初步筛选。**【拟解决的关键问题】**为广西海洋微生物资源的研究、保护和利用以及新药物资源的开发提供一定的理论依据和实践指导。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验仪器和试剂

GelDoc 2000 凝胶成像系统, LabCycler 温度梯度 PCR 仪, SANYO 超低温冰箱, JY-SPB 水平凝胶电泳装置, HVE-5 高压蒸汽灭菌锅, SYD001 无菌操作台, LRH-250A 生化培养箱, DHG-9140 电热恒温鼓风干燥箱, HH-4 电热恒温水浴锅, ZHWY-2112C 双层恒温培养振荡, N-1100V-W 旋转蒸发器, Mikro200 台式离心机, VCX-500 超声细胞破碎仪, SHZ-CB 循环水式多用真空泵。

TE 缓冲液(pH 值为 8.0)、Premix Taq、PCR 反应试剂、16S rRNA 扩增用 PCR 引物(27F: 5'-AGAGTTTGGATCCTGGCTCAG-3'; 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')购自南宁科迪生物科技有限公司; DNA Marker、Goldview II 型核酸染料购自上海生物工程公司。

1.1.2 培养基和保护剂

2216E 海水培养基: 蛋白胨 5 g, 酵母膏 1 g, 磷酸高铁 0.01 g, 琼脂 18 g, 陈海水定容至 1 L, pH 值范围 7.6~7.8, 121℃ 灭菌 30 min; 液体 2216E 海水培养基: 蛋白胨 5 g, 酵母膏 1 g, 磷酸高铁 0.01 g, 陈

海水定容至 1 L, pH 值范围 7.6~7.8, 121℃ 灭菌 30 min。

固体营养海水培养基(NA): 牛肉膏 3 g, 蛋白胨 10 g, 琼脂 20 g, 陈海水定容至 1 L, pH 值为 7.5, 121℃ 灭菌 30 min; 液体营养海水培养基(NA): 牛肉膏 3 g, 蛋白胨 10 g, 陈海水定容至 1 L, pH 值为 7.5, 121℃ 灭菌 30 min。

固体 ISP2 海水培养基: 蛋白胨 4 g, 酵母膏 4 g, 麦芽糖 5 g, 琼脂 20 g, 陈海水定容至 1 L, pH 值为 7.2, 121℃ 灭菌 30 min; 液体 ISP2 海水培养基: 蛋白胨 4 g, 酵母膏 4 g, 麦芽糖 5 g, 陈海水定容至 1 L, pH 值为 7.2, 121℃ 灭菌 30 min。

保护剂: 20% 分析纯甘油, 121℃ 灭菌 30 min。

1.2 方法

1.2.1 样品的采集

2010年9月,海泥标本采集于广西斜阳岛,去除表层泥样,采样深度为10~20 m,立即装入无菌袋,然后暂存于放有冰块的保温箱内,送回实验室后冷藏保存(-18℃)。

1.2.2 菌体的分离

在超净工作台内称取(10±0.1)g海泥,置于250 mL锥形瓶中,加入带有玻璃珠的80 mL无菌陈海水后,28℃,140 r/min 摇床30 min,充分打散混匀。取混合液依次制备 10^{-1} ~ 10^{-5} 5个不同稀释度,吸取0.4 mL不同稀释倍数的稀释液涂布于3种不同类型的平板培养基(2216E、NA、ISP2)上,每个做3个平行,28℃培养3~5 d。肉眼观察菌落特征(形态、大小、颜色),用双目显微镜进一步观察菌落边缘、表面状态、隆起程度,挑取单菌落,运用四分法重复划线纯化。获得的纯化菌株接种在对应生长最好的液体培养基(液体2216E、液体NA、液体ISP2)中,28℃,140 r/min 摇床5 d,离心去除培养基,然后将菌体与保护剂混匀后分装于冻存管内,使用分段降温法,于-80℃冰箱。

1.2.3 分子鉴定与系统发育分析

菌株基因组DNA的提取参照周双清等^[3]的方法。提取的基因组DNA作为模板,进行PCR扩增:95℃ 5 min;94℃ 1 min,55℃ 5 min,72℃ 1.5

min, 31个循环; 72℃ 10 min。其中, 50 μL 的反应体系含 1 μL DNA 原液, 25 μL 2×Taq PCR Mastermix 溶液, 27F 和 1492R 引物各 1 μL (10 μmol/L), ddH₂O 22 μL。取 2 μL PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统下观察并照相。所得产物委托广州美吉生物科技有限公司进行测序。

将测定的基因序列利用 BLAST 软件在 GenBank/EMBL/DDBJ 数据库以及 EzTaxon 服务器 (<http://www.eztaxon.org/>) 进行在线比对; 选取同源性高的典型菌株的 16S rRNA 基因序列作为参比对象, 采用 Clustal X 软件^[4]进行多序列比对以及相似性分析, 并用 NJ 法通过 MEGA 5.0 软件^[5]进行系统发育树的构建。

1.2.4 菌体粗浸膏的制备

已纯化的菌株分别接种到对应生长最好的海水液体培养基(液体 2216E、液体 NA、液体 ISP2)中进行小规模发酵。用摇床振荡培养 7 d (28℃, 140 r/min) 后, 获得发酵产物。采用超声波破碎菌体细胞, 加入乙酸乙酯溶液萃取发酵液。萃取液真空浓缩后, 转移至安培瓶中挥发至干, 所得固形物即为供试样品。

1.2.5 抗菌试验

采用滤纸片法^[1]测试所有供试样品对 4 种常见食品腐败菌或致病菌: 大肠杆菌 (*Escherichia coli*), 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*), 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 的抑制活性。将供试指示菌制备成菌悬液, 取 100 μL 滴在平板上, 用涂布棒涂布均匀, 制成含指示菌的平板, 将灭过菌的滤纸片 (6 mm) 贴于含指示菌的平板上。供试样品取 5 μL 滴在滤纸片上, 37℃ 培养 24 h 后观察抑菌圈大小判定抑菌活性。粗浸膏浓度为 10 mg/mL, 阴性对照为 5 μL 的 DMSO, 阳性对照为 5 mg/mL 氯霉素。

1.2.6 卤虫致死试验

100 mg 虫卵加入灭菌的 400 mL 海水中, 室温下由气泵缓缓充气, 24 h 后去除虫卵外壳, 再孵化 24 h 备用。依照 Solis^[6~8] 的改良方法, 取 96 孔细胞培养板, 每孔加 195 μL 含 10~15 个海虾幼虫的卤虫孵化液, 制成测试培养板。供试样品 DMSO 溶液的初浓度为 20 mg/mL, 分别按 10 倍稀释成 3 个不同的浓度, 空白对照为 DMSO 溶液。加样体积为

5 μL, 每组试验平行做 3 次。将处理后的卤虫幼虫在 28℃ 培养 24 h, 然后在双目解剖镜下检测计数每孔海虾死亡个体数目。计数完后每孔加入 100 μL 甲醇灭活所有卤虫, 15 min 后计算每孔卤虫总数。

海虾生物致死活性用校正死亡率^[9]表示, 按下列公式计算:

$$\text{校正死亡率} = (\text{对照组存活率} - \text{处理组存活率}) / \text{对照组存活率} \times 100\%$$

将 3 个浓度及其对应的校正死亡率输入计算机, 利用 SPSS19.0 软件^[10]的 Probit 统计分析, 得出 LD₅₀ 和 95% 置信区间。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离与纯化

根据菌株的不同菌落形态, 如颜色(黄色、红色、白色等)、表面(光滑、粗糙等)、形态(圆形、椭圆、不规则等)及边缘(褶皱、光滑等)等, 从斜阳岛海泥样品中共分离得到 53 株菌株, 编号为 X-1, X-2, ..., X-53 (图 1)。

大多数菌株在对应培养基上显示黄白色, 其次为土黄色, 少数为黑色。菌落大多显示为湿润。多数菌株显示为圆形, 部分为无规则形状, 另有少量为椭圆形。多数菌落显示为隆起, 边缘多显整齐。多数菌落不透明, 极少数为透明状。

2.2 菌株的分析鉴定与系统发育分析

通过菌落形态、细胞显微形态及 16S rRNA 基因序列测序结果去冗余, 最终从 53 株菌中选取 27 个代表性菌株进行基于 16S rRNA 基因序列的系统发育多样性分析。结果如图 2 和表 1, 27 株菌属于 2 个大的系统发育类群: 厚壁菌门 (Firmicutes, 74%) 和变形菌门 (Proteobacteria, 26%) 的 11 个属, 芽孢杆菌属 (*Bacillus*, 14 株)、赤杆菌属 (*Erythrobacter*, 2 株)、产微球茎菌属 (*Microbulbifer*, 2 株)、冷杆菌属 (*Psychrobacter*, 2 株)、盐芽孢杆菌属 (*Halobacillus*, 1 株)、鱼露芽孢杆菌属 (*Jeotgalibacillus*, 1 株)、乳杆菌属 (*Lysinibacillus*, 1 株)、臀纹粉蚧属 (*Planococcus*, 1 株)、动性微菌属 (*Planomicrobium*, 1 株)、假单胞菌 (*Pseudomonas*, 1 株) 和葡萄球菌属 (*Staphylococcus*, 1 株)。优势菌属为芽孢杆菌属。

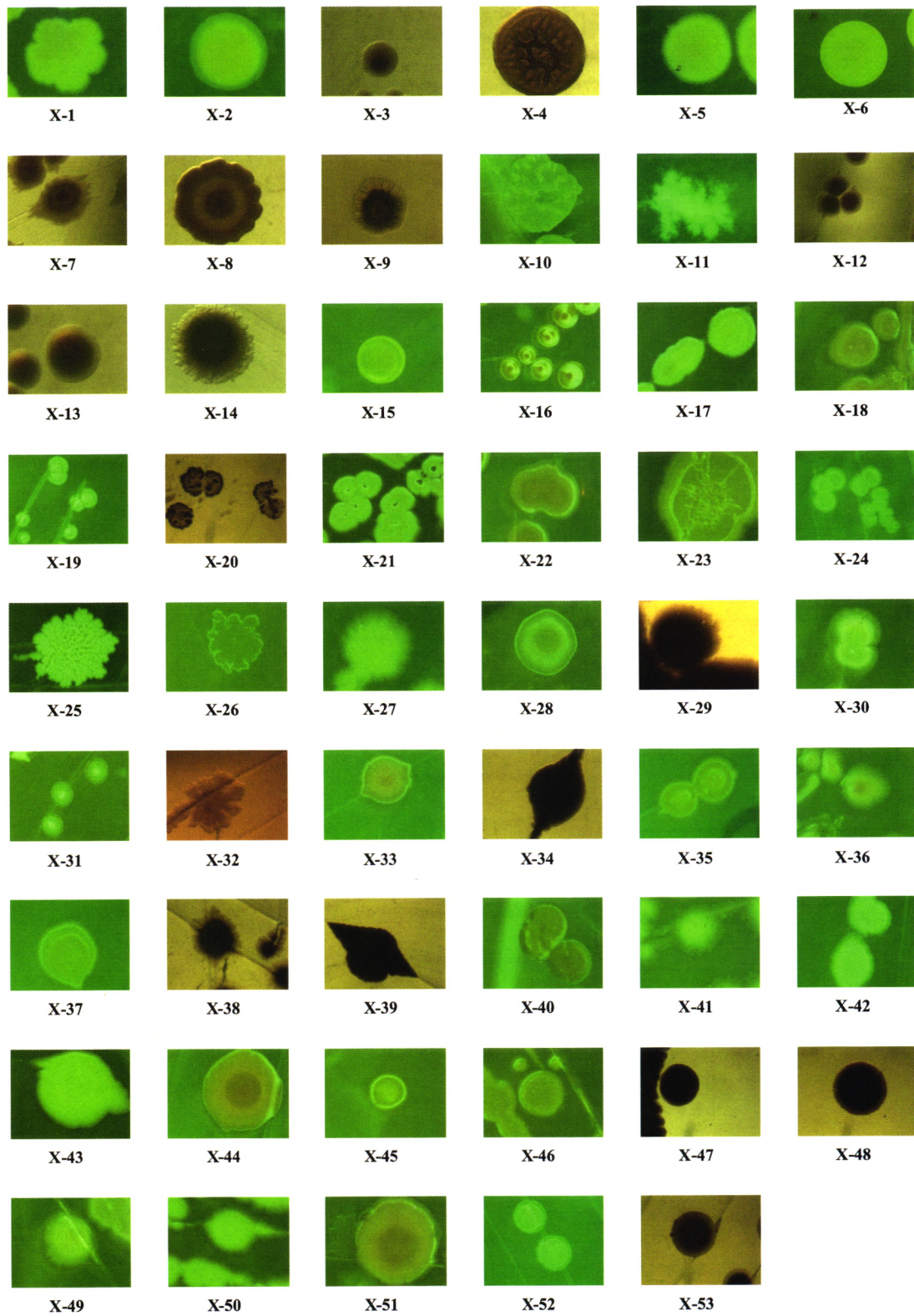


图1 斜阳岛海泥可培养细菌菌落特征

Fig. 1 Characteristics of cultivated marine bacteria isolated from the sea bed mud at the Xieyang Island

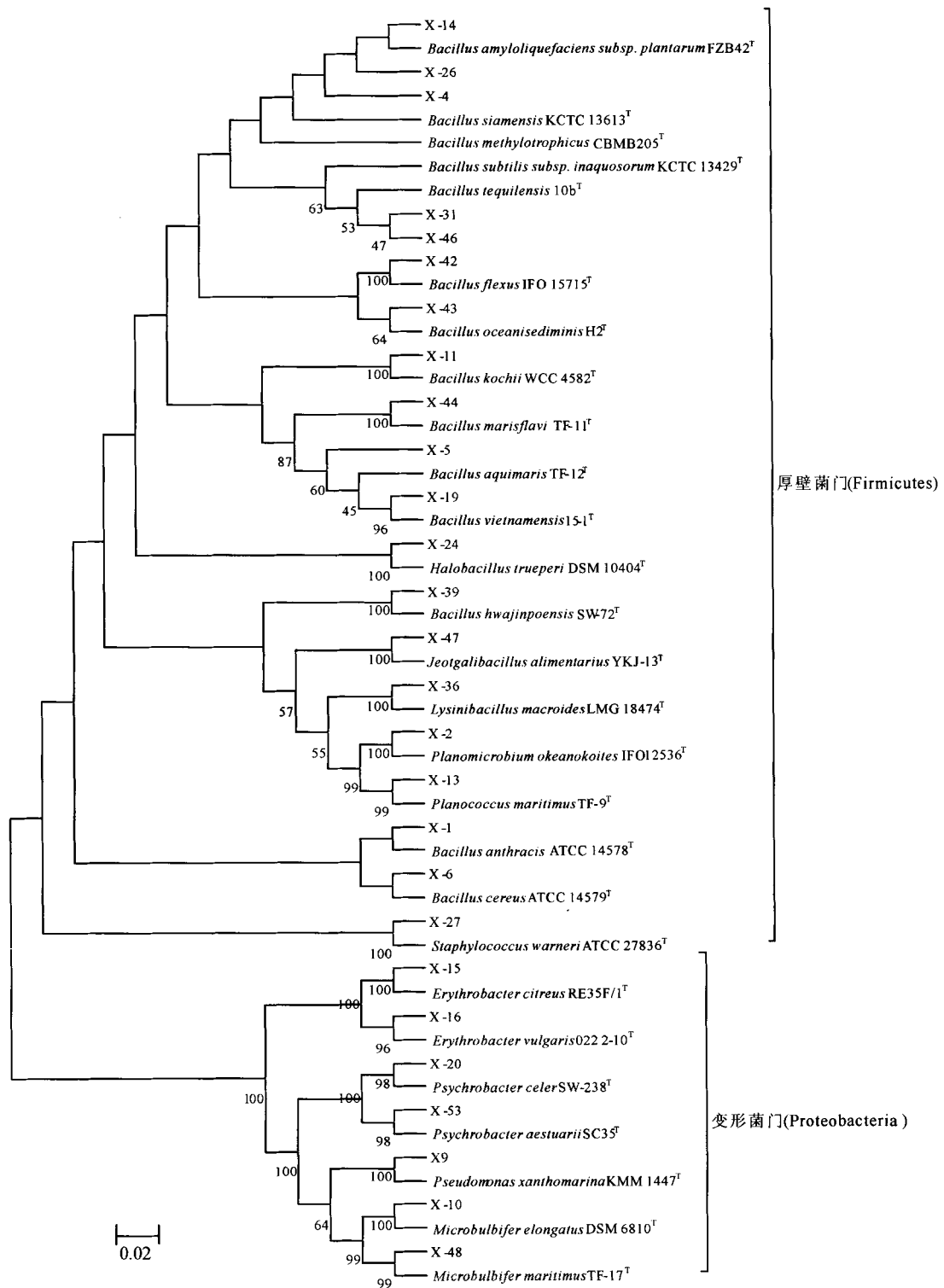


图 2 基于 16S rRNA 基因序列构建的斜阳岛海泥可培养细菌的系统发育树

Fig. 2 Neighbor-Joining tree constructed based on 16S rRNA gene sequence analysis showing the phylogenetic relationships among strains isolated from the sea bed mud at Xieyang Island of Guangxi

2.3 抑菌活性初步筛选

如表 2 所示,21 株菌株对 4 个指示菌都表现出抑制作用,其中菌株 X-15 对大肠杆菌(抑菌圈直径 9 mm)和蜡状芽孢杆菌(抑菌圈直径 8.5 mm)有中等抑制活性,菌株 X-14 对金黄色葡萄球菌有中等抑

制活性(抑菌圈直径 9.2 mm),所有菌株对枯草芽孢杆菌抑制作用较弱(抑菌圈直径小于 8.0 mm)。

2.4 卤虫致死活性研究

从表 3 可知,菌株 X-15 卤虫致死活性较强,LD₅₀ 为 0.172 mg /mL, X-5 和 X-20 次之,分别为

表3 斜阳岛海泥可培养细菌的卤虫致死活性测试结果
Table 3 The brine shrimp lethal activities of cultivated marine bacteria from the sea bed mud at Xieyang Island of Guangxi

序列号 No.	菌株 strains	LD ₅₀ (mg/mL)	95%置信区间 Confidence intervals of 95%	
			下限 Minimum	上限 Maximum
X-5	<i>B. aquimaris</i>	0.545	0.18	1.042
X-15	<i>E. citreus</i>	0.172	0.003	0.414
X-19	<i>B. vietnamensis</i>	0.685	0.267	1.486
X-20	<i>P. celer</i>	0.562	0.24	0.975
X-27	<i>S. warneri</i>	1.2	0.51	2.669
X-44	<i>B. marisflavi</i>	1.19	0.523	2.292
X-46	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>	1.679	0.836	3.136
X-47	<i>J. alimentarius</i>	1.586	0.791	2.851

3 结论

本文对广西斜阳岛海泥可培养细菌进行分离和纯化,共得到53株相关菌株,选取27株代表性菌株进行系统发育多样性分析,发现这些菌属于2大细菌发育类群:厚壁菌门(Firmicutes,74%)和变形菌门(Proteobacteria,26%)。初步探讨了27株菌株的抑菌活性和生物毒活性,发现21株可以抑制4种食品常见腐败菌,8株具有较强的生物毒活性,其中X-15(*E. citreus*)的抑菌活性和生物毒活性都最好,具有开发成新型食品防腐剂和抗肿瘤药物的潜在价值。

参考文献:

[1] 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. Diversity and antifouling activity of culturable bacteria associated with the Beibu gulf gorgonian *Anthogorgia caerulea* [J]. Guangxi Sciences, 2012, 19(3): 253-256.

[2] 龙彬,高程海,胡丽琴,等. 柳珊瑚共生菌 *Bacillus methylotrophicus* 发酵液化学成分研究[J]. 广西科学,2014,21(1):89-92.
Long B, Gao C H, Hu L Q, et al. Study on chemical constituents from marine gorgonian-associated bacteri-

um *Bacillus methylotrophicus* [J]. Guangxi Sciences, 2014, 21(1): 89-92.

[3] 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.

[4] 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.

[5] 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.

[6] Solis P N, Wright C W, Anderson M M, et al. A micro-crowell cytotoxicity assay using artemia salina (brine shrimp) [J]. Planta Medica, 1993, 59(3): 250-252.

[7] Meyer B, Ferrigni N, Putnam J, et al. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents [J]. Planta Medica, 1982, 45(5): 31-34.

[8] 蒋诚,熊本强,邱细敏,等. 鱼藤卤虫致死活性成分的分 离和结构鉴定[J]. 中药材,2012,32(5):719-723.
Jiang C, Xiong B Q, Qiu X M, et al. Isolation and identification of brine shrimp lethal activities from derris trefoliata [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2012, 32(5): 719-723.

[9] 王发左. 海洋真菌抗肿瘤活性次级代谢产物及其生物转化研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2008.
Wang F Z. Studies on the Antitumor Constituents and Biotransformation of Secondary Metabolites Produced by Marine-derived Fungi [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2008.

[10] 周一平. 用 SPSS 软件计算新药的 LD₅₀ [J]. 药学进展,2003,27(5):314-316.
Zhou Y P. The calculation of LD₅₀ in new drugs with software SPSS [J]. Progress in Pharmaceutical Sciences, 2003, 27(5): 314-316.

(责任编辑:竺利波)

0.545 mg/mL 和 0.562 mg/mL, 另外 X-19, X-27, X-44, X-46, X-47 的活性也较好, 其余 19 株菌株的活性较弱或无活性。

表 1 斜阳岛海泥可培养细菌的 16S rRNA 序列比对结果
Table 1 The comparison results of cultured marine bacteria from the sea bed mud at the Xieyang Island of Guangxi

细菌门类 Phylogenetic groups/ family	序列号 (相同种数) Strain number	数据库最近菌株 Closest type strain (accession number)	相似比 Similarity (%)	
厚壁菌门 (Firmicutes)	X-1	<i>Bacillus anthracis</i>	100.00	
	X-2	<i>Planomicrobium okeanoikoites</i>	99.73	
	X-4	<i>Bacillus siamensis</i>	99.87	
	X-5	<i>Bacillus aquimaris</i>	98.53	
	X-6	<i>Bacillus cereus</i>	100.00	
	X-11	<i>Bacillus kochii</i>	100.00	
	X-13	<i>Planococcus maritimus</i>	99.73	
	X-14	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i>	99.87	
	X-19	<i>Bacillus vietnamensis</i>	99.73	
	X-24	<i>Halobacillus trueperi</i>	98.93	
	X-26	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	99.87	
	X-27	<i>Staphylococcus warneri</i>	99.73	
	X-31	<i>Bacillus tequilensis</i>	99.47	
	X-36	<i>Lysinibacillus macrooides</i>	99.06	
	X-39	<i>Bacillus hwajinpoensis</i>	98.93	
	X-42	<i>Bacillus flexus</i>	100.00	
	X-43	<i>Bacillus oceanisediminis</i>	99.04	
	X-44	<i>Bacillus marisflavi</i>	99.87	
	X-46	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>	99.87	
	X-47	<i>Jeotgalibacillus alimentarius</i>	99.87	
	变形菌门 (Proteobacteria)	X-9	<i>Pseudomonas xanthomarina</i>	98.93
		X-10	<i>Microbulbifer elongatus</i>	99.07
		X-20	<i>Psychrobacter celer</i>	99.60
		X-48	<i>Microbulbifer maritimus</i>	99.60
		X-53	<i>Psychrobacter aestuarii</i>	99.06
		X-15	<i>Erythrobacter citreus</i>	100.00
		X-16	<i>Erythrobacter vulgaris</i>	100.00

表 2 斜阳岛海泥中可培养细菌抑菌活性测试结果
Table 2 The antibacterial activities of cultivated marine bacteria from the sea bed mud at Xieyang Island of Guangxi

编号 No.	菌株 strains	抑菌圈直径 Inhibition zone (mm)			
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>
X-1	<i>B. anthracis</i>	7.5	8	7.8	--
X-2	<i>P. okeanoikoites</i>	--	--	--	--
X-4	<i>B. siamensis</i>	7.8	7	6.8	6.6
X-5	<i>B. aquimaris</i>	7	8.5	6.8	7
X-6	<i>B. cereus</i>	8	8	7.8	--
X-9	<i>P. xanthomarina</i>	--	--	--	--
X-10	<i>M. elongatus</i>	--	--	--	--
X-11	<i>B. kochii</i>	6.5	7.5	7	7.5
X-13	<i>P. maritimus</i>	6.9	7.4	6.8	7.2
X-14	<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i>	7.1	9.2	7.5	7.5
X-15	<i>E. citreus</i>	9	7.8	7.3	8.5
X-16	<i>E. vulgaris</i>	--	--	--	--
X-19	<i>B. vietnamensis</i>	7	8.9	7.5	6.7
X-20	<i>P. celer</i>	7	8.6	7.3	6.4
X-24	<i>H. trueperi</i>	7	7.8	7.8	7
X-26	<i>B. methylotrophicus</i>	7	7.9	7.9	7.5
X-27	<i>S. warneri</i>	7.3	6.7	6.9	7.6
X-31	<i>B. tequilensis</i>	6.8	7.6	7.3	8
X-36	<i>L. macrooides</i>	7	6.2	6.9	7
X-39	<i>B. hwajinpoensis</i>	6.7	7.4	7.4	6.9
X-42	<i>B. flexus</i>	7.6	7.8	7.5	8.5
X-43	<i>B. oceanisediminis</i>	7.2	6.4	7.6	7.1
X-44	<i>B. marisflavi</i>	7	6.3	6.8	8.4
X-46	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>	8	8	7.1	7.5
X-47	<i>J. alimentarius</i>	7.4	7.6	7	7.8
X-48	<i>M. maritimus</i>	8.5	8	6.8	7.5
X-53	<i>P. aestuarii</i>	7.6	7.9	7.5	7.1