

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201604019

引文格式: 李家怡,周文红,李菲,等. 红海榄内生细菌多样性及其抑制鱼类致病菌活性研究[J]. 广西植物, 2017, 37(3):308-314

LI JY, ZHOU WH, LI F, et al. Diversity of cultivated marine bacteria and antibacterial activity of endophytic bacterial in *Rhizophora stylosa* [J]. Guihaia, 2017, 37(3):308-314

红海榄内生细菌多样性及其抑制鱼类致病菌活性研究

李家怡^{1,2,3}, 周文红¹, 李菲², 高程海², 易湘茜^{3,4*}

(1. 广西大学轻工与食品工程学院, 南宁 530004; 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培育基地, 南宁 530007; 3. 广西中医药大学药学院, 南宁 530001; 4. 广西北部湾海洋中药应用技术与产品研发实验室, 南宁 530001)

摘要: 红海榄为红树科红海属植物,广泛分布于热带海岸的红树林中,为真红树植物的典型代表。该研究以广西山口红树林国家级自然保护区红海榄为对象,应用稀释涂布法和三线法从红海榄各组织中分离出17株内生细菌,通过各菌株形态特征观察及利用16S rRNA序列基因和韦恩图分析其内生细菌多样性。结果表明:17株内生细菌分属3个门5科7属8种,*Micromonospora*和*Mangroviabacter*属为其优势类群。进一步分析发现红海榄根茎叶等组织的内生细菌类群差别较大,仅有1个相同菌属,17株菌中有3株菌与已有细菌物种典型菌株的全长16S rRNA基因相似性低于97%,代表着潜在的新属或新种。运用纸片法研究8株内生细菌发酵液的乙酸乙酯提取物对鱼类致病菌副溶血弧菌活性抑制效果,发现3株内生细菌(H003、H013、H009,浓度 $5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)的代谢产物对副溶血弧菌具有较强的抑菌活性,其抑菌圈直径分别达到 (8.4 ± 0.07) 、 (8.2 ± 0.07) 、 (8.3 ± 0.14) mm。该研究结果表明红海榄中具有较好的内生细菌多样性和抑菌活性,为今后研究其内生细菌的化学多样性及其应用提供了重要的物质基础。

关键词: 红海榄, 内生细菌, 物种多样性, 副溶血弧菌, 抑菌活性

中图分类号: Q946, Q939.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2017)03-0308-07

Diversity of cultivated marine bacteria and antibacterial activity of endophytic bacterial in *Rhizophora stylosa*

LI Jia-Yi^{1,2,3}, ZHOU Wen-Hong¹, LI Fei², GAO Cheng-Hai², YI Xiang-Xi^{3,4*}

(1. College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Marine Natural Products and Combinatorial Biosynthesis Chemistry, Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530007, China; 3. College of Pharmaceutical Sciences, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China; 4. Guangxi Beibu Gulf Laboratory on Applied Techniques and Product Development of Marine Chinese Materia Medica, Nanning 530001, China)

Abstract: *Rhizophora stylosa* is an evergreen tree with prop roots, and a common tree found in tropical coastal mangrove forests, widely distributed in tropical coastal mudflats. As a typical representative of the mangrove, *R. stylosa* has rich endophytic diversity with little research. The study objects of *R. stylosa* were collected from Shankou National Nature Re-

收稿日期: 2016-07-21 修回日期: 2016-08-23

基金项目: 广西自然科学基金(2015GXNSFBA139195, 2015GXNSFBB139001); 广西高校科学技术研究项目(KY2015YB146); 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科合 15104001-11); 广西中药药效研究重点实验室项目(16-380-29) [Supported by Guangxi Natural Science Foundation (2015GXNSFBA139195, 2015GXNSFBB139001); Guangxi University of Science and Technology Research Program (KY2015YB146); Key Program of Science and Technology Development Program of Guangxi (15104001-11); Guangxi Key Laboratory of Generic Technology Research and Development of TCM Preparation (16-380-29)].

作者简介: 李家怡(1991-),女,广西玉林人,硕士研究生,主要从事海洋微生物种质资源研究, (E-mail) 1257316587@qq.com。

*通信作者: 易湘茜,博士,副教授,硕士生导师,主要从事海洋生物资源开发与利用研究, (E-mail) 42672960@qq.com。

serve, Guangxi, China. From stem, root, leaf and other tissues, seventeen endophytes were isolated with the dilution coating method and the three-wire method. We observed their morphological characteristics, 16S rRNA and Venny Chart were utilized to analyze the diversity of their endogenous bacterial. Depending on the results of diversity analysis, we could find that these strains have different morphological characteristics and they could be classified into three doors, seven genera, five families and eight species. Further analysis showed that endophytic bacteria groups of *R. stylosa* root, stem, leaf and other organizations vary different, only one same genus was *Mangrovibacter plantisponsor*. *Micromonospora* and *Mangrovibacter* genus were its dominant bacteria, the proportion was 29.4% and 17.6%, respectively. Among them, the most endophytic bacteria within the root, the proportion was 47.1%. Seventeen strains belong to three doors, wherein the most number of bacteria were *Proteobacteria*, accounting for 52.9%, then *Actinomycetes* door accounted for 41.2%. In those isolated strains, three strains of bacterial species with the full-length 16S rRNA gene similarity less than 97%, may be possible new genera or new genus and had potential research value. *Vibrio parahaemolyticus* was a zoonotic bacteria caused some damage to human health, severe cases even death. To test anti *Vibrio parahaemolyticus* activity of the crude extract of strains isolated, we used filter paper method, and the results indicated that three strains (H003, H009, H013, $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) had a strong antibacterial activity against *Vibrio parahaemolyticus*, their inhibition zone could reach (8.4 ± 0.07), (8.2 ± 0.07), and (8.3 ± 0.14) mm, respectively. Endophytic bacteria of *Rhizophora stylosa* were genetically diverse and most of them showed strong inhibition effect against *Vibrio parahaemolyticus*. The results provides the essential material basis for the further study of its chemical diversity and utilization of resources.

Key words: *Rhizophora stylosa*, endophytic bacterial, diversity, *Vibrio parahaemolyticus*, antibacterial activity

副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 是一种人畜共患病原菌。副溶血弧菌为革兰氏阴性嗜盐菌, 主要分布在沿海地区的鱼虾、贝类海产品中, 人们食用被该菌污染的海产品, 轻者引起腹泻、呕吐和恶心等肠胃炎反应, 重者可引起败血症 (高磊等, 2014; 叶灵琼等, 2011; 林强等, 2011)。近年来, 由副溶血弧菌引起的食物中毒事件已得到广泛关注, 是世界范围严重食源性公共卫生问题之一 (林强等, 2012)。抗生素是治疗该菌所引起疾病的药物, 但随着抗生素使用量的增加, 耐药株也不断增加, 因此研究其他有效的抑制药物显得尤其重要 (叶灵琼等, 2011)。海洋低等生物海洋微生物的提取物对副溶血弧菌在内的弧菌具有显著的抑制活性 (张全忠等, 2011; 韦露等 2015)。从海洋生物中找出有效抑制药物是研究开发新的生物防治药物的研究热点。

红海榄 (*Rhizophora stylosa*) 属于红树科 (Rhizophoraceae) 红海属 (*Rhizophora*), 是生长在热带、亚热带海岸潮间的一种特殊植物群体 (郭先霞等, 2006)。红海榄内生菌的研究仅有内生真菌多样性和抑菌的研究 (许婷婷等, 2009; 吴尚英等, 2010), 内生细菌尚未见有报道。本研究以红海榄为对象, 对其各部位的内生细菌进行分离纯化, 结合 16S rRNA 基因序列信息和韦恩图分析研究其物种多样性。同时, 对内生细菌的代谢产物进行抑菌活性研

究, 以期获得具有抑菌活性较强的菌株, 为后期筛选相关活性化合物提供良好的研究基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 实验仪器与设备 TGradient 多功能梯度 PCR 仪, GelDOC 2000 凝胶成像系统, JY-SPB 水平凝胶电泳装置, SW-CJ-2F 洁净工作台, HVE-5 高压蒸汽灭菌锅, IS-RDS3 恒温震荡器, SHZ-CB 循环水式多用真空泵, HH. B11-BS-II 电热恒温培养箱, VCX-500 超声细胞破碎仪。

1.2.2 供试细菌 副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 由广东海洋大学庞欢瑛副教授馈赠。

1.2 方法

1.2.1 样本来源及采集方法 菌株载体采集于广西山口国家级自然保护区, 经广西北部湾海洋研究中心许铭本工程师鉴定为红海榄。采集的菌株载体在 24 h 内完成菌株分离。

1.2.2 菌株的分离纯化 菌株的分离纯化参照李菲等 (2015) 的方法进行。用无菌海水分别清洗红海榄的根、茎、叶等各组织器官, 切取一部分组织器官进行后续处理。用 5% 次氯酸钠将各部分组织浸泡 1 min, 无菌海水冲洗干净, 75% 的酒精溶液浸泡 1 min, 无菌海水冲洗 3 遍去除酒精。取 $3 \times 3 \text{ cm}$ 的样

品进行研磨,加入 1 mL 无菌水,混匀后,得到 10^1 植物悬液,依次用无菌水稀释制成 10^2 、 10^3 的样液,分别取各梯度稀释样液 0.2 mL,接种于 ISP2、M4、M5、M7、M9、M10、AGG 等 7 种海水培养基中进行涂布培养,每个做 3 个平行,28 °C 培养 2~5 d 后观察菌落,按照菌株的菌落特征(颜色、大小、形态)进行区分。利用三线法对典型的菌落进行划线纯化,纯化后的菌株保藏在 20%(W/V)甘油管保藏管中,保藏温度为 -80 °C,同时制成冻干牛奶管保藏于 4 °C。

1.2.3 菌株的 16S rRNA 基因序列分析 DNA 提取和 16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增参照周发林等(2004)的方法进行。利用 GenBank BLAST 对红海榄的内生菌线粒体 DNA 16S rRNA 与库中细菌进行同源性比对。扩增和测序引物为 27F (5'-AGAGTTTGATCTGGCTCA-3') 和 1492R (5'-GGT-TACCTTGTACGACTT-3'),PCR 反应条件:94 °C 预变性 5 min,后进行 30 个循环(94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 90 s),循环结束后,72 °C 延伸 10 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测合格后,将所得产物进行测序,并将纯化目的片段进行切割回收。测序结果在 GenBank 中进行 BLAST 同源性搜索,获得同源性相近的菌种序列,取同源性高 16S rRNA 基因序列为参考对象,采用 Clustal X 进行多重比对,在此基础上运用 MEGA 5.0 软件的“Neighbor-Joining”法构建分子系统树,自展数(Bootstrap)为 1 000 检测各分支的置信值,对各菌株的系统发育地位进行分析(何建瑜等,2013;周煜等,2000)。通过 venny 在线分析网站,在属级水平上对红海榄根、茎、叶来源细菌类群分布进行韦恩图分析(Tap et al,2009)。

1.2.4 菌株代谢粗产物的获取 从 ISP2 固体培养基上挑取菌丝接种到装有 50 mL ISP2 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中,放入恒温振荡培养箱中于 28 °C、180 r·min⁻¹ 条件下发酵培养 7 d;使用超声波细胞破碎仪进行细胞破碎,破碎时间 15 min,等体积乙酸乙酯萃取 3 次,真空浓缩干燥后得代谢粗产物。将粗产物溶于 200 μL DMSO 中,用 PBS 缓冲溶液将其稀释到浓度为 5 mg·mL⁻¹、0.22 μm 的过滤头进行过滤,装于已灭菌样品瓶中,即得所需药剂。

1.2.5 抑菌活性测定 使用纸片法测试所得细菌代谢粗产物对鱼类致病菌—副溶血弧菌的抑制活性。将副溶血弧菌接种到 TSB 液体培养基中恒温震荡(28 °C、180 r·min⁻¹)培养 12 h 制备菌悬液,吸取

200 μL 菌悬液滴在 TSB 固体培养基上进行涂布,制成含弧菌的平板。将灭菌后的滤纸片(φ6.0 mm)用镊子将其平贴在培养基上,吸取 5 μL 药剂于滤纸片上,28 °C 温度下培养 1 d,观察抑菌圈的大小判断其抑菌活性。其中,阳性对照为 5 mg·mL⁻¹ 卡那霉素,阴性对照为 5 μL DMSO。每组 3 个平行。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离纯化及其多样性

根据内生细菌菌落的不同表现特征(颜色、大小、形态)和出现时间的不同,从红海榄各组织器官中共分离出 17 株内生细菌,依次编号为 H001、H002……H017,各菌株形态详见图 1。从图 1 可以看出,17 株内生菌颜色多为白色和黄色,表面光滑不透明。经送美吉公司进行测序后得到各菌株的种和属,详见表 1。表 1 显示,17 株内生菌中,从红海榄叶子中分离出 5 株内生细菌,茎中分离出 4 株,根中分离出 6 株,其中根茎叶中含有相同菌,如 H001、H004、H005 同为 *Pantoea Dispersa* (泛菌属);H008、H002、H017 同为 *Mangrovibacter plantisponsor* (红树杆菌属)等。由表 1 可知,此次分离出的 17 株内生菌隶属 5 科 7 属 8 种,对 17 株内生细菌去重合并后得到 8 株内生细菌。

2.2 红海榄可培养的内生细菌群类比较

在属级水平上对红海榄的根、茎、叶来源细菌进行 venny 分析,韦恩图(图 2)显示,不同部位中的可培养细菌虽有差异,但也含有相同的菌属和菌株。其中,从根部样品中分离获得的属有 5 个,茎中分离的属有 4 个,叶中分离到的属有 3 个。根、茎、叶样品中有一个共有菌属为 *Micromonospora*,占 12.5%。根和茎有 2 个相同菌株分别为 *Mangrovibacter plantisponsor* 和 *Paracoccus limosus*,根与叶也有 2 个相同菌,茎叶有 1 个相同菌。

2.3 菌株系统发育分析

通过比对 16S rRNA 基因测序结果,将 17 株内生菌进行基于 16S rRNA 基因序列的系统发育多样性分析(图 3)。图 3 结果显示,从红海榄中共分离的 17 株内生菌分别属于 3 个类群,即变形菌门、厚壁菌门和放线菌门。其中,变形菌门菌株数量最多,占 52.9%;而变形菌门内生细菌又分属两个纲,即 γ -变形菌纲和 α -变形菌纲;其次是放线菌门,占 41.2%。

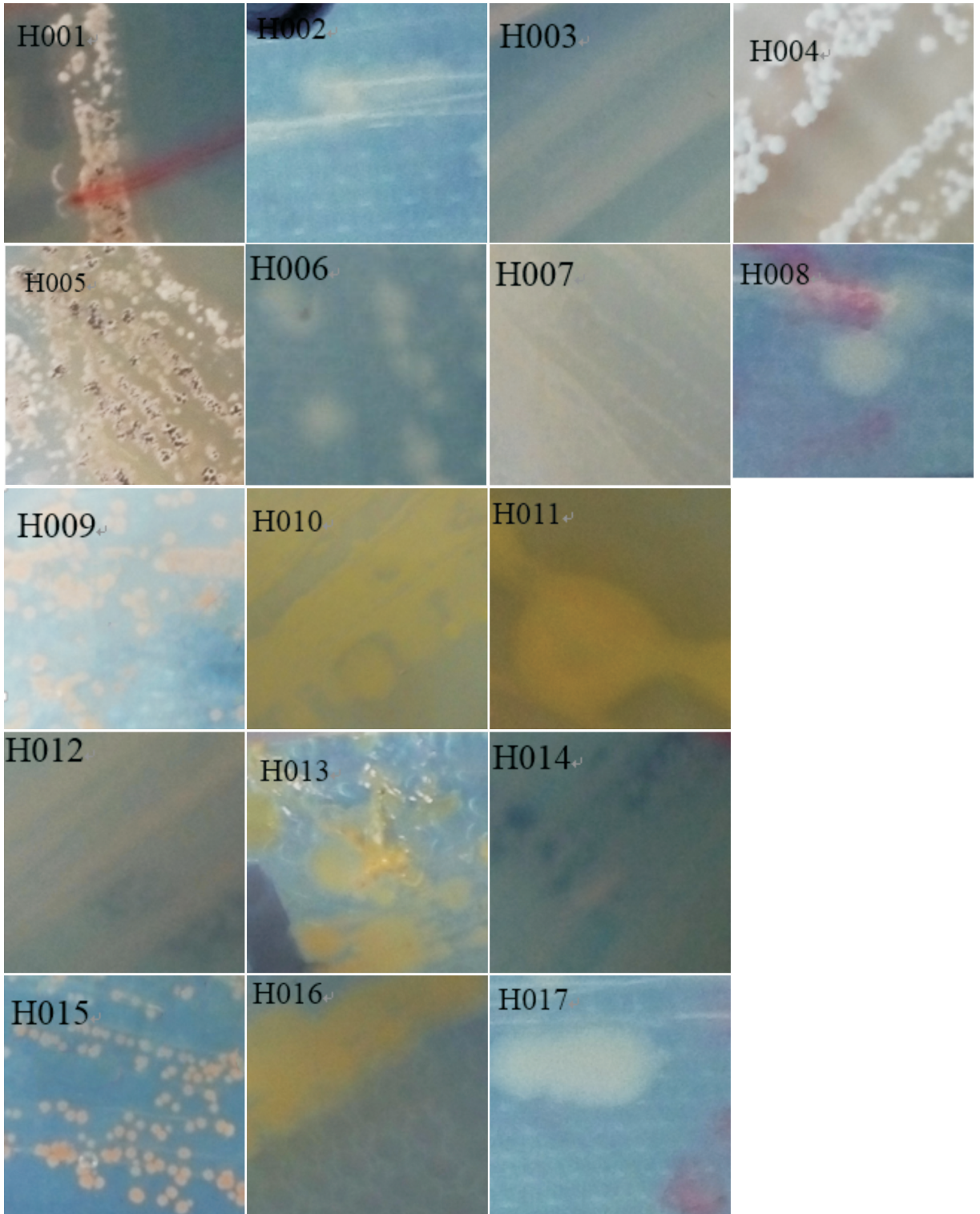


图 1 红海榄内生细菌形态图

Fig. 1 Morphology of *Rhizophora stylosa* endophytic bacteria

从属的分类水平上看,分离得到的 17 株菌中,小单孢菌属有 5 株,占 29.4%;其次是泛菌属和红树

杆菌属,占 17.6%;副球菌属和芽孢杆菌属在红海榄中分布较少,分别分离出 2 株和 1 株。

表 1 红海榄内生细菌的多样性

Table 1 Diversity of endophytic bacterial in *Rhizophora stylosa*

菌株编号 Strain code	来源 Origin	属 Genus	菌株名称 Strain name	相似性 Identity (%)
H001	叶 Leaf	Enterobacteriaceae	<i>Pantoea dispersa</i>	99
H002		Enterobacteriaceae	<i>Mangrovibacter plantisponsor</i>	99
H003		Micromonosporaceae	<i>Micromonospora tulbaghiaie</i>	100
H004		Enterobacteriaceae	<i>Pantoea dispersa</i>	99
H005		Enterobacteriaceae	<i>Pantoea dispersa</i>	99
H006	茎 Stem	Bacillaceae	<i>Bacillus marina</i>	99
H007		Rhodobacteraceae	<i>Oceanicola antarcticus</i>	95
H008		Enterobacteriaceae	<i>Mangrovibacter plantisponsor</i>	99
H009		Enterobacteriaceae	<i>Mangrovibacter plantisponsor</i>	99
H010	根 Root	Micrococcaceae	<i>Demequina salsinemoris</i>	97
H011		Micrococcaceae	<i>Demequina salsinemoris</i>	97
H012		Micromonosporaceae	<i>Micromonospora tulbaghiaie</i>	100
H013		Micromonosporaceae	<i>Micromonospora haikouensis</i>	99
H014		Micromonosporaceae	<i>Micromonospora tulbaghiaie</i>	100
H015		Rhodobacteraceae	<i>Paracoccus Limosus</i>	98
H016		Micromonosporaceae	<i>Micromonospora haikouensis</i>	99
H017		Enterobacteriaceae	<i>Mangrovibacter plantisponsor</i>	99

2.4 红海榄内生细菌的抑制海洋鱼类致病菌活性

以副溶血弧菌为指示菌,采用纸片法对其进行抑菌实验,选取 8 株菌株进行发酵后,采用乙酸乙酯溶液萃取其发酵液,最终获得其代谢粗产物,抑菌实验结果如表 2 所示。由表 2 和图 4 看出, H003、H013、H009 对副溶血弧菌表现出了较明显的抑菌作用,其抑菌圈直径都在 8.0 mm 以上,其中 H003 的抑制最强,达到了 8.4 mm。

表 2 红海榄内生细菌的抑菌活性测试结果

Table 2 Antimicrobial activities of endophytic bacteria in *Rhizophora stylosa*

菌株编号 Strain code	副溶血弧菌 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	
	浓度 Concentration (mg · mL ⁻¹)	抑菌圈直径 Bacteriostatic circle diameter (mm)
H001	5	7.2±0.07
H003	5	8.4±0.07
H006	5	6.9±0.07
H007	5	7.1±0.00
H008	5	7.4±0.07
H009	5	8.3±0.14
H010	5	6.7±0.28
H013	5	8.2±0.07
空白对照 Blank control (DMSO)	—	6.0±0.00
阳性对照 Positive control (卡那霉素 Kanamycin)	5	14.9±0.77

注:滤纸片直径为 6.0 mm,抑菌圈直径越大表明抑菌效果越好。

Note: Filter paper's diameter is 6.0 mm, the larger the diameter of inhibition zone showed the better antibacterial effects.

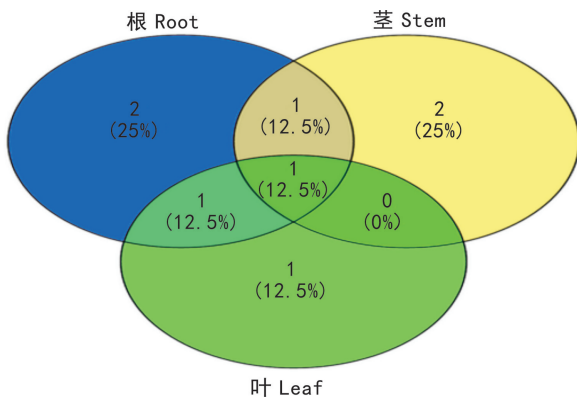


图 2 红海榄内生菌分布韦恩图分析
Fig. 2 Venny of endophytic bacteria genera in *Rhizophora stylosa*

3 讨论与结论

本研究以广西山口国家级红树林自然保护区的红海榄为研究对象,对其根、茎、叶进行采样,利用 7 种培养基对其内生细菌进行分离纯化。研究表明,从红海榄的根茎叶中共分离出 17 株内生细菌,隶属 5 科 7 属,多样性较为丰富。在分离出的内生细菌中发现,不同的部位分离出菌株数量不同,其中从根部中分离出菌株最多,为 8 株,其次是茎,叶子最少。根据内生细菌数量和属类上的差异可以推断,细菌的多样性从根部向上是逐步减少的,土壤是内生细

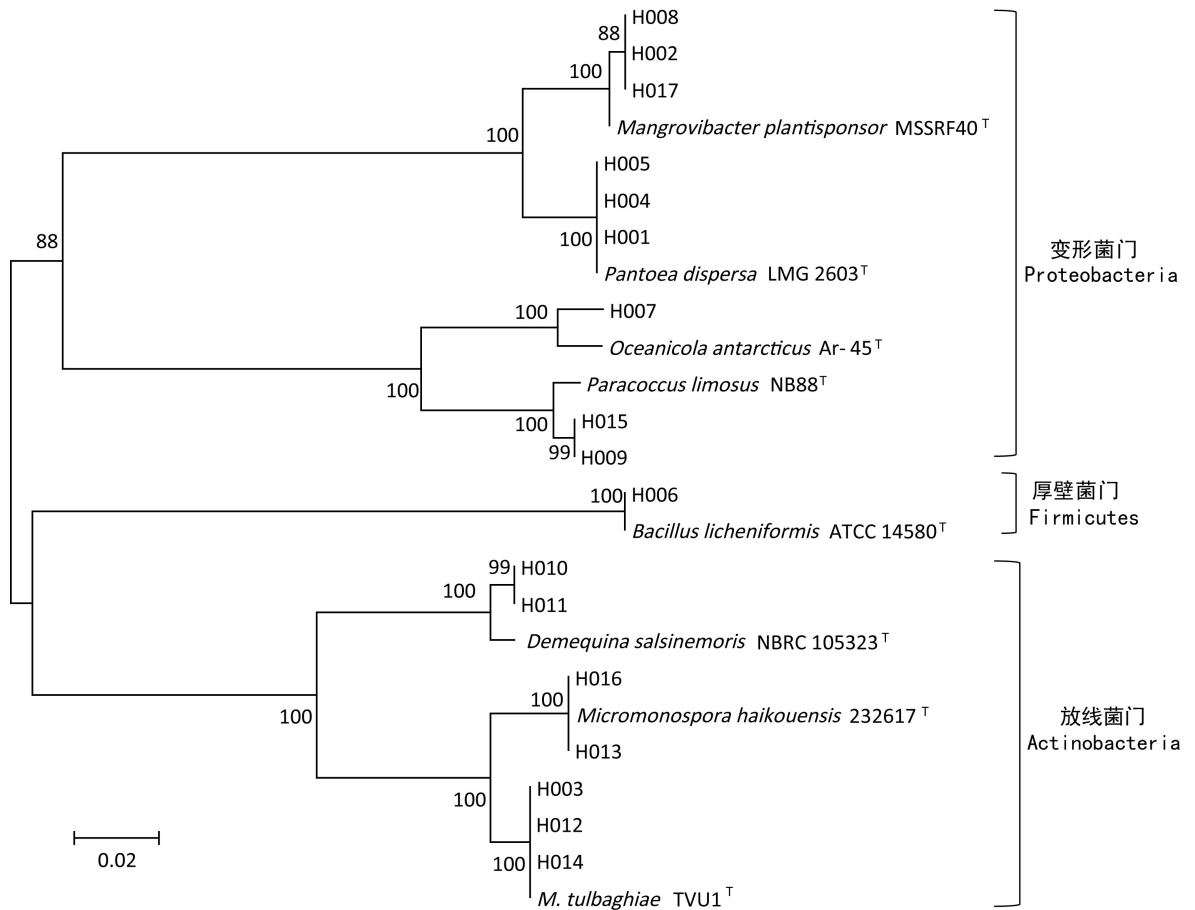


图3 红海榄内生细菌 16S rRNA 的菌株系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic analysis of endophytic bacteria 16S rRNA in *Rhizophora stylosa*

菌的主要来源,植物组织维管束的蒸腾作用使得土壤内微生物进入宿主后由地下部分随着水分、营养物质逐渐向地上部位扩增,因而各组织内部分内生菌有相同菌属,且地下部位内生菌的数量多于地上部位(Hollis, 1951)。

本研究通过研究红海榄内生菌次生代谢产物对副溶血弧菌进行抑菌试验,结果发现有 3 株内生菌对其有明显的抑菌效果,抑菌圈直径均在 8.0 mm 以上,这对开发新的预防药物有一定的指导意义。有效菌中有两株菌(H003、H013)同属于小单孢菌属,已有研究表明,小单孢菌属产生的广谱抗生素,在抗肿瘤方面具有广泛的应用,抗菌方面已研究表明其对金黄色葡萄球菌、弯曲假单孢菌、谷草芽孢杆菌、尖刀镰孢菌均具有抑制效果(张晓敏等,2013);其次生代谢产物是新的生物活性物质的重要来源(程元荣和郑卫,2006;张学武和张建丽,2006)。小单孢菌属在抑制鱼类致病菌方面还未见有详细报

道,作用物质及其作用机理还需进一步的深入研究。

参考文献:

- CHENG YR, ZHENG W, 2006. *Micromonospora* spp. and their secondary bioactive metabolites [J]. *Chin J Antibiot*, 31(6): 321-327. [程元荣, 郑卫, 2006. 小单孢菌及其产生的次级生物活性代谢产物 [J]. *中国抗生素杂志*, 31(6): 321-327.]
- GAO L, DENG YQ, LIU ZH, et al, 2014. Virulence of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood [J]. *Oceanol Limnol Sin*, 45(6): 1280-1287. [高磊, 邓益琴, 刘助红, 等, 2014. 石斑鱼及暂养环境中副溶血弧菌分离鉴定与毒力评价 [J]. *海洋与湖沼*, 45(6): 1280-1287.]
- GUO XX, ZHAO ZJ, SONG WD, et al, 2006. Determination of amino acids and trace elements in the endogenous bacterium secondary metabolite of the rhizophora stylosa griff [J]. *Food Sci Technol*, (5): 103-105. [郭先霞, 赵子杰, 宋文东, 等, 2006. 红海榄内生细菌次生代谢物中氨基酸与微量元素的测定 [J]. *食品科技*, (5): 103-105.]
- HE JY, LIU XZ, ZHAO RT, et al, 2013. Diversity of cultured and uncultured bacteria in surface layer sediment from the East China Sea [J]. *Biodivers Sci*, 21(1): 28-37. [何建瑜, 刘雪珠, 赵荣涛, 等, 2013. 东海表层沉积物纯培养与非培养细菌

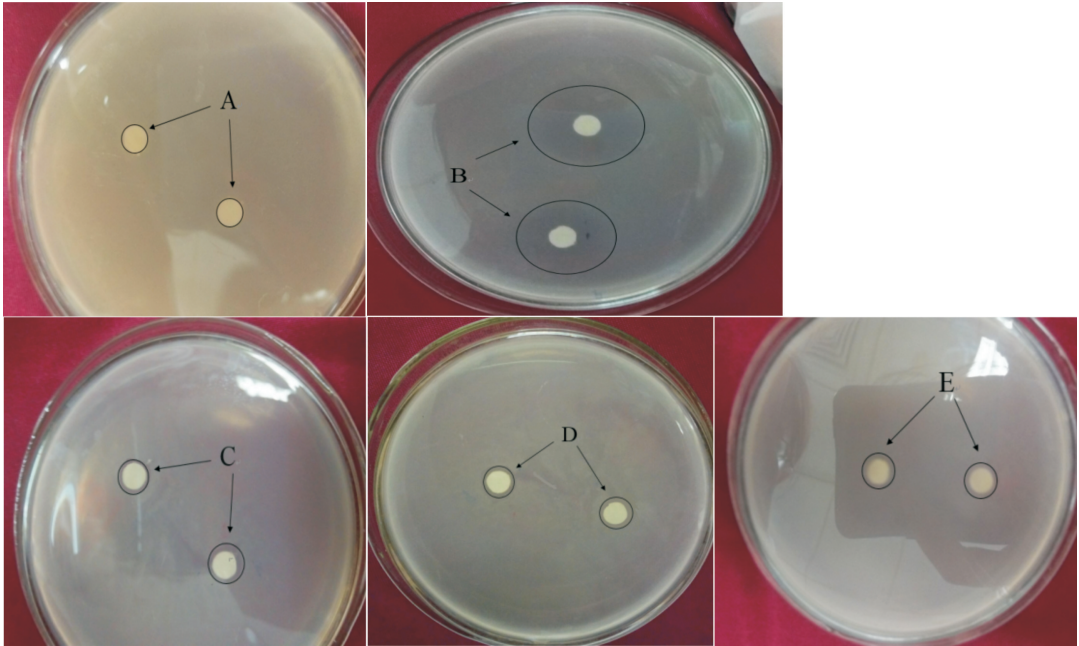


图 4 抑菌圈图片 A. 空白对照; B. 阳性对照; C. H003; D. H009; E. H013。

Fig. 4 Inhibition zone picture A. Blank Control; B. Positive Control; C. H003; D. H009; E. H013.

多样性 [J]. 生物多样性, 21 (1): 28-37.]

HOLLIS JP, 1951. Bacteria in the healthy potato tissue [J]. Phytopathology, 41(3): 350-366.

LIN Q, LI NQ, FU XZ, et al, 2012. The relationship of *Vibrio parahaemolyticus* densities and water quality factor during oyster culture [J]. Fish Chin, 36(3): 415-421. [林强, 李宁求, 付小哲, 等, 2012. 牡蛎养殖过程中副溶血弧菌与水质因子间的关系 [J]. 水产学报, 36(3): 415-421.]

TAP J, MONDOT S, LEVENEZ F, et al, 2009. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core [J]. Environ Microbiol, 11(10): 2574-2584.

WEI L, CHEN C, LONG YY, et al, 2015. Isolation, identification and antimicrobial activity of *Bacillus pumilus* B1. [J]. Fish Sci, 34(3): 161-168. [韦露, 陈偿, 龙云映, 等, 2015. 一株短小芽孢杆菌 B1 的筛选鉴定及其抗菌特性研究 [J]. 水产科学, 34(3): 161-168.]

WU SY, ZHANG Y, LIU AR, et al, 2010. Diversity of endophytic fungi in *Rhizophora stylosa* and *Kandelia candel* [J]. J Zhejiang For Coll, 27(4): 489-493. [吴尚英, 张洋, 刘爱荣, 等, 2010. 红树林植物红海榄和秋茄的内生真菌多样性 [J]. 浙江林学院学报, 27(4): 489-493.]

XU TT, WU Y, JIA YY, et al, 2009. A *Penicillium* sp. XGH2321 isolated from the rhizospheric soil of *Rhizophora stylosa* Griff and its antibacterial activity [J]. Microbiology, 36(11): 1682-1687. [许婷婷, 吴垠, 贾阳阳, 等, 2009. 红海榄根际土壤来源的青霉属真菌 XGH2321 及其抑菌活性 [J]. 微生物学通报, 36(11): 1682-1687.]

ZHANG QZ, HUANG GZ, SHI YS, 2011. Study on antibacterial activity of marine organisms against bacteria like *Vibrio vulnificus*

[J]. Chin J Nosocomiol, 21(22): 4680-4683. [张全忠, 童国忠, 石亚素, 2011. 舟山海洋生物对创伤弧菌等抑菌活性研究 [J]. 中华医院感染学杂志, 21(22): 4680-4683.]

ZHANG XM, LIU Q, LIU X, et al, 2013. Isolation and identification of marine *Micromonospora* sp. MN10 with broad-spectrum antimicrobial activity [J]. J Gansu Agric Univ, 48(2): 99-104. [张晓敏, 刘秋, 刘限, 等, 2013. 1 株具有广谱抗菌活性的海洋小单孢菌 MN10 的分离及鉴定 [J]. 甘肃农业大学学报, 48(2): 99-104.]

ZHANG XM, LIU Q, LIU X, et al, 2013. Research progress on the *Micromonosporaceae* family [J]. J NW A & F Univ (Nat Sci Ed), 41(9): 175-185. [张晓敏, 刘秋, 刘限, 等, 2013. 小单孢菌科研究进展 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 41(9): 175-185.]

ZHANG XW, ZHANG JL, 2006. Taxonomy and application of *micromonospora* [J]. Microbiology, 33(5): 117-121. [张学武, 张建丽, 2006. 小单孢菌属的分类及应用研究 [J]. 微生物学通报, 33(5): 117-121.]

ZHOU FL, JIANG SG, SU TF, et al, 2004. Comparative study of mtDNA 16S *rRNA* gene fragments among six *Lutjanus* fishes [J]. J Fish Sci Chin, 11(2): 99-103. [周发林, 江世贵, 苏天凤, 等, 2004. 6 种笛鲷鱼类线粒体 16S *rRNA* 基因片段的序列比较 [J]. 中国水产科学, 11(2): 99-103.]

ZHOU Y, CHEN M L, JIANG L, et al, 2000. Application of 16S *rRNA* sequence analysis for the study of atmospheric bacteria [J]. Letters Biotechnol, 11(2): 111-114. [周煜, 陈梅玲, 姜黎, 等, 2000. 16S *rRNA* 序列分析法在大气微生物检测中的应用 [J]. 生物技术通讯, 11(2): 111-114.]