

南麂岛海洋沉积物中抗大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)致病弧菌的放线菌分离和筛选研究*

赵淑江¹ 刘健¹ 杨星星² 王海雁¹ 闫茂仓³ 陈坚²

(1. 温州医学院环境与公共卫生学院 温州 325035; 2. 温州市海洋与渔业局 温州 325035;
3. 浙江省海洋水产养殖研究所 温州 325005)

提要 采用平板涂布法从南麂岛近海海洋沉积物样品中分得 86 株放线菌, 用琼脂块法和杯碟法结合筛选出对副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、哈维氏弧菌(*V. harveyi*)两种大黄鱼病原性弧菌具有不同拮抗作用的海洋放线菌 5 株, 其中编号 NJR0956 的菌株对两种致病菌的抑菌圈直径均>25mm, 表现出较强的抑制作用; 进而测定了 5 株活性菌株的抗菌谱。结果表明, 它们对指示菌中的副溶血弧菌、哈维氏弧菌、鳗弧菌(*V. anguillarum*)、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)四种病原弧菌均具有较好的拮抗作用; 在对 NJR0956 的抑菌效果研究中发现, 该菌株在牛肉膏蛋白胨液体培养基中不仅能够增殖, 而且能够有效地抑制病原菌的生长。

关键词 海洋沉积物, 海洋放线菌, 病原弧菌, 抗菌活性, 抗菌谱

中图分类号 S432.1

近年来, 随着大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)养殖规模的增大和养殖环境的恶化, 大黄鱼弧菌病频繁发生, 其传播速度快, 发病率高, 流行范围广, 给我国的大黄鱼养殖业造成了巨大的危害(林克冰等, 1999; 吴后波等, 2001; 王军等, 2001; 王国良等, 2008; 郭国军等, 2009)。目前, 对大黄鱼疾病的防治主要使用抗生素及化学药物(林星等, 1998; 周维武等, 2003; 杨少丽等, 2005), 而已有抗生素的长期大量应用使病原菌产生抗药性, 寻找能有效防治大黄鱼弧菌病的药物成为目前亟待解决的问题。

海洋放线菌由于其活性代谢产物结构新颖、功能独特, 成为海洋新药开发中重要的微生物资源, 许多代谢产物已在医药及植物保护方面得到了进一步的开发和利用(Watve *et al.*, 2001; Kelecom, 2002; Bull *et al.*, 2005; Jensen *et al.*, 2005; Dobretsov *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2007)。目前, 人们对海洋放线菌代谢产物活性筛选的指标仅局限于抗肿瘤等人类疾病及防治农业病害的研究(He *et al.*, 2001; Bull *et al.*, 2005; El-Shatoury

et al., 2009), 有关海洋渔业致病菌防治方面的研究报道较少(鄢庆彬等, 2002)。对于海洋渔业新药开发而言, 筛选对海洋渔业致病菌具有较强抑制作用的海洋放线菌活性菌株是新药开发工作中的关键一步。

南麂岛地处亚热带, 远离大陆, 优越的海洋自然环境条件, 使其具有丰富的海洋生物多样性, 然而迄今为止对南麂岛海域海洋放线菌的研究鲜有报道。本实验对南麂岛近海海洋沉积物样品中的放线菌进行了分离研究, 并以能拮抗大黄鱼两种常见致病性弧菌为筛选指标, 对所分得的海洋放线菌的抑菌活性进行了研究, 为进一步研究其活性产物及开发海洋渔业新药奠定了基础。

1 材料

1.1 沉积物样品

采集浙江省南麂岛近海水深约 10—15m 不同站位的沉积物样品 15 份, 置于无菌三角烧瓶中并保存于冰盒, 隔天运回实验室进行处理(Kato *et al.*, 1997)。

* 浙江省科技厅面上项目, 2009C33004 号; 温州市科技计划资助项目, Y20080092 号。赵淑江, 博士, E-mail : zsj62@163.com
收稿日期: 2009-12-23, 收修改稿日期: 2010-03-12

1.2 病原菌及指示菌

病原菌: 副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)和哈维氏弧菌(*V. harveyi*)均分离自浙江台州深水网箱养殖患病大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)。

指示菌: 大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、鳃弧菌(*V. anguillarum*)、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)。

以上细菌均由浙江省海洋水产养殖研究所提供。

1.3 培养基

放线菌分离培养基采用添加适量海泥浸出液的高氏一号(GAU)、甘油精氨酸(GAR)改良培养基, 倒平板前加入终浓度为 50 μ g/ml 的重铬酸钾作为抑制剂; 病原菌及指示菌培养基采用牛肉膏蛋白胨培养基; 放线菌发酵培养基: 小米 10.0g、葡萄糖 10.0g、NaCl 25.0g、CaCO₃ 2.0g、75% 陈海水 1000ml。

2 方法

2.1 样品处理

称取取自不同站位的海洋沉积物样品各 1.0g, 加入无菌海水 10ml, 用上述培养基进行普通培养和对样品处理后培养。样品处理是分别进行热处理和羧甲基纤维素钠溶液(CMC)震荡分散处理, 以提高分离效果。热处理分别将样品置于恒温培养箱中在 30、40、50、60 温度条件下培养 10min、20min、30min; 震荡处理是在样品中各加入浓度为 0、1、2、3、4、5g/L 的羧甲基纤维素钠溶液(CMC), 进行震荡分散。处理结束后, 静置 10min, 取上清液逐级稀释至 10⁻²。

2.2 菌株分离纯化

各取 0.15ml 稀释液涂布于用浓度 60%海水配置的 GAU、GAR 分离培养基平板上, 每个稀释度的稀释液设置 3 个重复, 28 倒置培养 5—7d。通过肉眼观察挑取不同形态的放线菌单菌落于对应的培养基上进行划线纯化并斜面保存, 以备活性筛选用。

2.3 海洋拮抗放线菌初筛

采用琼脂块法进行放线菌活性初筛(周德庆, 2006)。将病原菌接种置牛肉膏蛋白胨液体培养基中培养 18h, 参照麦氏比浊管用 0.85%的无菌生理盐水调节其浓度约为 5.0 \times 10⁶ cfu/ml, 取 100 μ l 菌液涂布于牛肉膏蛋白胨固体培养基平板上。用接种环刮取斜面保存的放线菌孢子, 用无菌生理盐水制备成菌悬液, 涂布于高氏一号平板, 28 培养 5d 后, 用自制无菌打孔器(7mm)打下菌饼, 各轻贴于表面涂布有病原菌

的固体培养基平板上, 28 培养 24h 后, 观察并测量放线菌菌株抑菌圈直径。

2.4 海洋拮抗放线菌复筛

采用杯碟法进行放线菌活性复筛(周德庆, 2006)。用无菌打孔器从各放线菌高氏一号平板上打下三个直径 7mm 的菌饼, 接种至装有 100ml 放线菌发酵培养液的 250ml 三角瓶内, 28、180r/min 震荡培养 7d, 将发酵液于 4、8000r/min 的高速冷冻离心机中离心 10min, 取上清液用孔径 0.22 μ m 的细菌过滤器过滤, 制备无菌发酵液。

将牛津杯轻置于涂有病原菌的固体培养基平板上, 每个杯中各滴加 200 μ l 不同的无菌发酵液, 以等量的液体发酵培养基为对照组, 每个菌株设置 3 个重复。滴加完成后将培养皿置于 4 的冰箱中放置 24h, 使发酵液充分扩散, 然后移置 28 恒温培养箱中培养 24h, 观察并测量抑菌圈直径。

2.5 抗菌谱的测定

以大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、恶臭假单胞菌、鳃弧菌、溶藻弧菌等为指示菌, 采用琼脂块法检测 5 株具有较好抗菌效果的拮抗放线菌的抗菌谱。

2.6 拮抗放线菌在液体培养基中的抑菌效果及生长状况的测定

将分离得到的拮抗性最强的放线菌 NJR0956 菌株、副溶血性弧菌和哈维氏弧菌 2 种病原菌分别制备成菌悬液, 各取 1.5ml 接种到装有牛肉膏蛋白胨液体培养基的三角瓶中摇匀, 28、150r/min 于摇床中培养, 于 0、12、24、36、48、60、72h 不同的时间段分别取样 150 μ l, 稀释 10 倍后涂布于牛肉膏蛋白胨固体培养基和高氏一号固体培养基平板上, 采用平板菌落计数法检测拮抗菌及病原菌的活菌浓度。每组实验设置一个对照组, 两个平行实验组。对照组仅将 1.5ml 病原菌菌悬液接种于液体培养基中培养或仅将 1.5ml 放线菌 NJR0956 菌株菌悬液接种于液体培养基中培养, 实验组分别取 1.5ml 的病原菌和 1.5ml NJR0956 放线菌菌悬液混合接种于液体培养基中培养, 以测定分离得到的放线菌 NJR0956 菌株对病原菌的抑菌效果, 检验病原菌对放线菌 NJR0956 菌株生长状况的影响。

3 结果与分析

3.1 海洋放线菌的分离结果

从南麂岛海域沉积物中共分得海洋放线菌 86 株。实验表明, 在 GAU、GAR 培养基中添加海泥浸

出液, 能够有效地增加放线菌的分离率, 其中 GAU 培养基中分得的放线菌数量约占分得放线菌总数的 78%。沉积物样品经 2.0g/L 浓度的 CMC 震荡分散处理后能有效地增加放线菌的分离率(表 1), 经 50 处理 20min 也能增加分得的放线菌数量, 同时对样品中的细菌还起到一定程度的抑制作用(表 2)。

3.2 拮抗放线菌的筛选结果

对分得的 86 株放线菌依次进行体外拮抗作用的首筛、复筛。共筛得对两株病原菌均具有较强拮抗作用的海洋放线菌 5 株, 在病原菌周围均产生明显而清晰的抑菌圈, 编号分别为: NJU0928、NJU0954、NJR0956、NJU0973、NJR0977(表 3)。5 株菌株均对副溶血弧菌的拮抗效果较好; NJU0928、NJR0956、NJU0973 对哈氏弧菌的拮抗效果较好, 而 NJU0954、NJR0977 对哈氏弧菌的拮抗效果较差, 其中 NJR0956 对两株致病菌的抑制作用最为明显。

表 1 不同浓度的 CMC 对放线菌分离效果的影响
Tab.1 Influence of different CMC concentrations on isolating marine actinomycete strains

CMC(g/L)	放线菌总数($\times 10^6$ 个/g)
0.0	3.8
1.0	4.1
2.0	4.5
3.0	3.9
4.0	3.5
5.0	3.1

表 2 热处理对放线菌分离效果的影响
Tab.2 Influence of thermal treatment on isolating marine actinomycete strains

处理方式	时间(min)	放线菌密度($\times 10^6$ 个/g)	细菌密度($\times 10^6$ 个/g)
未加热处理	0	4.3	26.5
30	10	5.2	25.8
	20	5.6	25.3
	30	5.8	24.1
40	10	6.1	21.6
	20	7.1	20.5
	30	7.6	19.7
50	10	8	16.3
	20	8.3	15.1
	30	7.5	14.6
60	10	6.8	13.6
	20	6.2	12.1
	30	5.9	9.7

表 3 5 株海洋放线菌对病原弧菌抑菌圈直径的测定结果
Tab.3 Antibiosis of five strains of marine actinomycetes on pathogenetic *Vibrio*

菌株	副溶血弧菌		哈维氏弧菌	
	琼脂块法	牛津杯法	琼脂块法	牛津杯法
NJU0928	22.3	24.1	23.5	25.5
NJU0954	21.7	23.8	16.7	18.3
NJR0956	30.8	32.5	27.1	30.6
NJU0973	23.5	24.6	25.8	26.5
NJR0977	24.5	25.2	17.5	18.5

注: 表中数据表示抑菌圈直径(mm)

3.3 抗菌谱

为了使拮抗菌株能在大黄鱼弧菌病防治中能更有应用价值, 所以在抗菌谱的测定试验中选择大黄鱼的病原弧菌副溶血性弧菌和哈维氏弧菌为主要的指示菌。其它指示菌中, 溶藻弧菌和鳗弧菌为条件致病菌, 其它指示菌均为水体中正常的菌群, 其中枯草芽孢杆菌为水体中的有益菌, 作为一种生态制剂被应用于水产养殖中(刘波等, 2004)。抗菌谱研究结果表明五种拮抗菌中除 NJU0954 和 NJR0977 两株放线菌对哈维氏弧菌、溶藻弧菌、鳗弧菌三种致病弧菌的抑制作用较弱外, 其余菌株对致病弧菌均具有较强的抑制作用, 而 NJR0956 菌株对四种致病弧菌的抑菌圈直径均大于 25mm, 对嗜水气单胞菌的抑菌圈直径也达到 20.3mm, 表现出较强的拮抗能力。如表 4 所示, 虽然五株放线菌对致病弧菌均表现出不同程度的拮抗作用, 但它们的抗菌谱均较窄, 对大肠杆菌等水体正常菌群及水体中的有益菌枯草芽孢杆菌均没有拮抗作用。

表 4 5 株海洋放线菌的抗菌谱
Tab.4 Antibiotic ranges of five strains of marine actinomycetes

菌株	副溶血弧菌	哈维氏弧菌	溶藻弧菌	鳗弧菌
NJU0928	22.3	23.5	20.5	21.7
NJU0954	21.7	16.7	18.6	14.2
NJR0956	30.8	27.1	25.3	26.7
NJU0973	23.5	25.8	21.7	20.1
NJR0977	24.5	17.5	16.5	14.5

菌株	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	嗜水气单胞菌	枯草芽孢杆菌
NJU0928	0	15.1	0	0
NJU0954	0	0	12.5	0
NJR0956	0	0	20.3	0
NJU0973	0	13.2	11.2	0
NJR0977	0	0	14.6	0

注: 表中数据表示抑菌圈直径(mm)

3.4 液体培养基中 NJR0956 的抑菌效果及生长状况

NJR0956 菌株在牛肉膏蛋白胨液体培养基中对副溶血性弧菌和哈维氏弧菌的抑菌效果如表 5、表 6 所示, 其中对照组为病原菌单独培养时的菌液密度, 实验组为病原菌和放线菌混合培养时病原菌的菌液密度。对照组数据表明两种致病菌的对数生长期均为 12—48h。与对照组比较, 在 12—48h 时间段, 实验组中两种致病菌浓度增大幅度均明显地减缓, 数据表明放线菌 NJR0956 在液体培养基中均能有效地抑制副溶血弧菌、哈维氏弧菌的生长。

NJR0956 菌株在牛肉膏蛋白胨液体培养基中的生长状况如表 7、表 8 所示, 其中对照组为放线菌单独培养时 NJR0956 菌株的菌液密度, 实验组为病原菌副溶血性弧菌、哈维氏弧菌和放线菌混合培养时 NJR0956 菌株的菌液密度。放线菌 NJR0956 在液体培养基中的对数生长期为 24—60h, 衰亡期为 60—72h, 实验组放线菌的浓度大小与对照组相比, 均无明显地变化, 说明副溶血性弧菌、哈维氏弧菌对放线菌 NJR0956 的生长没有明显影响。

表 5 NJR0956 对副溶血弧菌的抑制作用

Tab.5 The inhibitory effect of NJR0956 on *V. parahaemolyticus*

时间(h)	对照组菌液浓度 ($\times 10^7$ cfu/ml)	实验组 1 菌液浓度 ($\times 10^7$ cfu/ml)	实验组 2 菌液浓度 ($\times 10^7$ cfu/ml)
0	5	5	5
12	6.5	6	5.8
24	10	8	7.6
36	13	11	10.5
48	18	15	14.8
60	12	9	8.8
72	9	6	5.7

表 6 NJR0956 对哈维氏弧菌的抑制作用

Tab.6 The inhibitory effect of NJR0956 on *V. harveyi*

时间(h)	对照组菌液浓度 ($\times 10^7$ cfu/ml)	实验组 1 菌液浓度 ($\times 10^7$ cfu/ml)	实验组 2 菌液浓度 ($\times 10^7$ cfu/ml)
0	4.5	4.5	4.5
12	6	5	5.5
24	10	8	8.5
36	15	13	12.5
48	18.5	15	15.5
60	10	8.5	8.8
72	8	6.5	6.3

表 7 副溶血弧菌对放线菌 NJR0956 生长状况的影响
Tab.7 The growth of NJR0956 cultured with *V. parahaemolyticus*

时间(h)	对照组菌液浓度 ($\times 10^7$ cfu/ml)	实验组 1 菌液浓度 ($\times 10^7$ cfu/ml)	实验组 2 菌液浓度 ($\times 10^7$ cfu/ml)
0	4	4	4
12	5.5	5	5
24	7	6.5	6
36	13	11.5	11
48	17.5	17	16.5
60	19	18	17.5
72	15	13.5	13

表 8 哈维氏弧菌对放线菌 NJR0956 生长状况的影响
Tab.8 The growth of NJR0956 cultured with *V. harveyi*

时间(h)	对照组菌液浓度 ($\times 10^7$ cfu/ml)	实验组 1 菌液浓度 ($\times 10^7$ cfu/ml)	实验组 2 菌液浓度 ($\times 10^7$ cfu/ml)
0	4.5	4.5	4.5
12	6	5.5	5
24	7.5	7	7
36	13.5	12.5	13
48	18	17.5	17
60	19	18.5	18
72	15.5	15.5	15

以上实验结果表明, 处于对数生长期的该放线菌抑菌活力最强, 不仅能有效地抑制致病菌的生长, 而且能够利用培养基中的营养进行繁殖。

4 讨论

海洋放线菌通常只占海洋沉积物样品的微生物群体的一小部分(Bull *et al.*, 2005)。由于不同研究者所采用的培养基、培养条件、及样品前处理手段的差异, 造成所得的放线菌数量也有所差异(Weyland, 1981; Takizawa *et al.*, 1993; Pathom-aree *et al.*, 2006; Stach *et al.*, 2003)。海洋放线菌的分离是海洋放线菌代谢产物活性研究的关键一步, 分离方法在放线菌分离研究中起到了重要的作用, 而样品的前处理方法能够影响到所分放线菌的种类和数量(姜怡等, 2004; Pathom-aree *et al.*, 2006)。因此, 实验中将海洋沉积物样品经 40℃ 热处理以促进放线菌孢子的萌发, 并首次采用羧甲基纤维素钠(CMC)作为分散剂对海洋沉积物样品进行分散处理, 获得了较多数量的海洋放线菌。沈会芳等(2007)研究了热处理等样品预处理手段对近海海泥中放线菌分离结果的影响, 结果表明 40℃ 能够有效地增加放线菌的出菌率, 本实验的结果与之相符。

弧菌在海洋中广泛分布, 是一类条件致病菌, 能引起弧菌病的弧菌属细菌种类也较多。众多研究表明, 哈维氏弧菌、副溶血弧菌是对网箱养殖大黄鱼危害最大的致病弧菌(林克冰等, 1999; 鄢庆枇等, 2002; 王军等, 2001; 金珊等, 2002), 故本实验选择了这两种致病弧菌为拮抗放线菌筛选的抑制对象, 在抗菌谱的测定试验中选择的病原菌以大黄鱼致病弧菌为主, 以期筛选出的拮抗放线菌在大黄鱼弧菌病的防治方面具有针对性。

张新明等(2004)在弧菌拮抗菌的筛选研究中发现单一的筛选方法可能会影响到筛选结果。为确保筛选结果的准确性, 本实验将琼脂块法与牛津杯法两种方法相结合进行放线菌抑菌活性筛选, 有效地筛选出 5 株拮抗放线菌。采用牛津杯法测定发酵液抑菌活性时, 因为发酵液加样量的多少直接关系到所含活性物质的量, 从而会造成抑菌圈大小的差异, 所以每个杯中发酵液的加样量为 200 μ l, 既避免因加样量过少造成抑菌效果不明显, 也避免因加样量过多使其从牛津杯中溢出。加样后应将平皿置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱 24h, 以使样液充分扩散, 然后移至恒温培养箱中进行培养。此外, 筛选实验中所涂指示菌的接种量、培养时间及涂布量会影响到筛选结果(张新明等, 2004), 由于本实验所选病原菌的对数生长期为 12—48h, 故用接种环挑取少量指示菌到液体培养基中后仅将其培养 18h, 并在涂布前用无菌生理盐水调整菌液的浓度约为 5.0×10^6 cfu/ml 后进行涂布, 发现涂布效果最佳。

在对液体培养基中 NJR0956 对病原菌的抑菌作用的研究中, 发现培养 60h 后的 NJR0956 对病原菌的抑制作用明显减弱, 分析原因可能是因为随着时间的变化培养基中该放线菌能够利用的营养成分逐渐减少, 而使其不能继续繁殖并产生活性物质, 而已产的有效抑菌物质的活性随着时间的变化及病原菌数量的增加而降低(张新明等, 2004; Ringo *et al.*, 1998)。实验中筛选出来的该株放线菌对大黄鱼常见的几种致病弧菌均具有较为明显的拮抗作用, 而对水体中的有益菌并无拮抗作用, 在大黄鱼弧菌病防治方面具有潜在的应用价值, 其代谢产物的稳定性及其抑菌作用机理、在疾病防治中的实际应用效果及安全有待于进一步的研究。

参 考 文 献

王 军, 苏永全, 张朝霞等, 2001. 闽南地区养殖大黄鱼细菌性疾病的病原生物学研究. 厦门大学学报(自然科学版),

- 40(1): 85—91
- 王国良, 祝璟琳, 金 珊等, 2008. 养殖大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)3 种致病弧菌的分子鉴定及其系统发育学分析研究. 海洋与湖沼, 39(2): 162—167
- 刘 波, 刘文斌, 王 恬, 2004. 芽孢杆菌在水产养殖中的应用. 中国饲料, 21: 22—24
- 杨少丽, 王印庚, 董树刚, 2005. 海水养殖鱼类弧菌病的研究进展. 海洋水产研究, 4(26): 75—80
- 吴后波, 潘金培, 2001. 弧菌属细菌及其所致海水养殖动物疾病. 中国水产科学, 8(1): 89—90
- 沈会芳, 林壁润, 谢双大等, 2007. 近海海泥链霉菌的分离方法. 中国生物防治, 23(增刊): 53—56
- 张新明, 李 健, 刘 淇, 2004. 弧菌拮抗菌的筛选及其效果. 中国水产科学, 11(4): 325—332
- 张晓君, 陈翠珍, 阎斌伦等, 2009. 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)病原副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)的表型及分子特征. 海洋与湖沼, 40(5): 654—662
- 林 星, 肖懿哲, 1998. 大黄鱼弧菌病的诊治. 水产养殖, 4: 29—30
- 林克冰, 周 宸, 刘家富等, 1999. 海水网箱养殖大黄鱼弧菌病的病原菌. 台湾海峡, 18(3): 342—346
- 金 珊, 蔡完其, 王国良等, 2002. 养殖大黄鱼细菌性疾病的病原研究. 浙江海洋学院学报, 21(3): 225—230
- 周维武, 于诗群, 侯洪建, 2003. 海水养殖鱼类弧菌病的防治技术. 科学养鱼, 8: 45
- 周德庆, 2006. 微生物学实验教程. 北京: 高等教育出版社, 199—201, 278—279
- 姜 怡, 李文均, 崔晓龙等, 2004. 链霉菌属一新种的多相分类. 云南大学学报, 26(2): 179
- 郭国军, 鄢庆枇, 邹文政等, 2009. 拮抗菌对病原性溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)粘附大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)表皮粘液的影响. 海洋与湖沼, 40(6): 738—744
- 鄢庆枇, 王 军, 苏永全等, 2002. 大黄鱼病原弧菌拮抗放线菌的筛选与人工诱变. 台湾海峡, 21(2): 11—16
- Bull A T, Stach J E, Ward A C *et al.*, 2005. Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. Antonie van Leeuwenhoek, 87: 65—79
- Dobretsov S, Dahms H U, Qian P Y *et al.*, 2006. Inhibition of biofouling by marine microorganisms and their metabolites. Biofouling, 22(1): 43—54
- El-Shatoury S A, El-Shenawy N S, El-Salam I A, 2009. Antimicrobial, antitumor and *in vivo* cytotoxicity of actinomycetes inhabiting marine shellfish. World J Microbiol Biotechnol, 25: 1547—1555
- He H, Ding W D, Bernan V S *et al.*, 2001. Lomaiviticins A and B, potent antitumor antibiotics from *Micromonospora lomaiviticensis*. J Am Chem Soc, 123: 5362—5363
- Jensen P R, Mincer T J, Williams P G *et al.*, 2005. Marine actinomycete diversity and natural product discovery. Antonievan Leeuwenhoek, 87: 43—48
- Kato C, Li L, Tamaoka J, Horikoshi K, 1997. Molecular analyses

- of the sediment of the 11000-m deep Mariana Trench. *Extremophiles*, 1: 117—123
- Kelecom A, 2002. Secondary metabolites from marine microorganisms. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 74(1): 151—170
- Pathom-aree W, Stach J M, Ward A C *et al*, 2006. Diversity of actinomycetes isolated from Challenger Deep sediment (10,898m) from the Mariana Trench. *Extremophiles*, 10: 181—189
- Ringo E, Gatesoupe F J, 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*, 160: 177—203
- Stach J M, Maldonado L A, Masson D G *et al*, 2003. Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments. *Appl Environ Microbiol*, 69: 6189—6200
- Takizawa M, Colwell E R, Hill R T, 1993. Isolation and diversity of actinomycetes in Chesapeake Bay. *Appl Environ Microbiol*, 59: 997—1002
- Watve M G, Tickoo R, Jog M M *et al*, 2001. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch Microbiol*, 176: 386—390
- Weyland H, 1981. Distribution of actinomycetes on the sea floor. *Actinomycetes Zentbl Bakteriolog*, 11(Suppl): 185—193
- Zhu F, Li X H, Lin Y C, 2007. Recent advances in the bioactive metabolites of marine actinomycetes. *Chinese Journal of Antibiotics*, 32: 129—138

ISOLATION OF MARINE ACTINOMYCETES STRAINS IN SEDIMENTS FROM NANJI ISLAND OFFSHORE AND THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THEIR METABOLITES AGAINST PATHOGENETIC *VIBRIO* FROM *PSEUDOSCIAENA CROCEA*

ZHAO Shu-Jiang¹, LIU Jian¹, YANG Xing-Xing², WANG Hai-Yan¹,
YAN Mao-Cang³, CHEN Jian²

(1. School of Environmental Science and Public Health, Wenzhou Medical College, Wenzhou, 325035;
2. Wenzhou Ocean and Fishery Bureau, Wenzhou, 325035; 3. Zhejiang Mariculture Research Institute,
Wenzhou, 325005)

Abstract Eight-six actinomycetes strains were isolated from the marine sediments near Nanji island, China, by using the plate paint isolation method. Their antimicrobial activities against Pathogenetic *Vibrio* from *Pseudosciaena crocea* were tested by using both agar lump and cup-plate methods. Five actinomycetes strains of them could evidently inhibit the growth of two Pathogenetic *Vibrio*, *V. parahaemolyticus* and *V. harveyi*; and the antimicrobial ability of NJR0956 strain was relatively stronger, with the inhibitory circle of more than 25mm. In addition, the antibiotic ranges of five actinomycetes strains were investigated. Actinomycetes strain NJR0956 could evidently inhibit the growth of four kinds of Pathogen *Vibrio*. In this study, it was also discovered that NJR0956 strain could not only multiply rapidly but also inhibit the growth of Pathogen *Vibrio* effectively in meat broth.

Key words Marine sediments, Marine actinomycetes, Pathogen *Vibrio*, Antimicrobial activity, Antibiotic range