

海洋细菌 *Phaeobacter* DL2 的鉴定及其对致病弧菌抑制作用

董秀娟^{2,3}, 李筠¹, 张晓华², 刘佳琳², 胡宗云², 陈吉祥²

(1. 中国海洋大学 医药学院, 山东 青岛 266003; 2. 中国海洋大学, 海洋生命学院, 山东 青岛 266003; 3. 青岛市城阳第二高级中学, 山东 青岛 266107)

摘要:从海水养殖水体中防腐钢片的微生物黏膜上分离筛选到一株细菌, 命名为 DL2。采用琼脂扩散法进行体外抑菌实验, 测定其抑菌谱, 发现菌株 DL2 具有较广泛的抑菌谱, 并且对致病性弧菌表现出较强的抑菌作用。通过常规生理生化研究和细菌鉴定系统测试, 发现菌株 DL2 属于革兰氏阴性菌, 短杆状, 具极生单鞭毛, 菌落呈褐色, 能产生浅褐色扩散性色素, 测试结果表明, 菌株 DL2 与 *Phaeobacter* 属细菌的特征非常相似。为了进一步确定菌株 DL2 的分类学地位, 测定了其 16S rRNA 基因序列, 与相关细菌种属相应序列的同源性进行比较并构建了系统关系树, 结果显示, 菌株 DL2 与 *Phaeobacter inhibens* 的亲缘关系最近, 相似性达 99.8%, 与 *Phaeobacter gallaeciensis* 相似性达 99.1%。综合上述结果, 菌株 DL2 可鉴定为 *Phaeobacter inhibens*, 同时可以将其作为潜在的海洋有益菌应用于水产养殖中。[中国水产科学, 2007, 14(6): 996-1003]

关键词: *Phaeobacter inhibens*; 抑菌作用; 16S rRNA 基因; 系统关系分析

中图分类号: Q93-331

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2007)06-0996-08

近年来, 随着水产养殖业的大规模发展, 有益菌在水产养殖中的应用越来越广泛^[1-5]。目前从养殖环境、养殖动物体表或体内筛选分离土著菌, 作为潜在的有益菌应用于水产养殖中已成为健康养殖的研究热点。Rengpipat 等^[1]从斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 养殖环境中分离到 1 株芽孢杆菌, 它能促进对虾生长, 提高其存活率, 并且能抑制弧菌的生长。Robertson 等^[2]从大西洋鲑鱼 (*Salmo salar*) 的肠道内分离到有拮抗作用的肉杆菌 (*Carnobacterium*), 可以减少由杀鲑气单胞菌 (*Aeromonas salmonicida*) 等引起的病害。Smith 等^[3]从鳟鱼体表黏液和鳃上分离到一株荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*), 可竞争性地吸收铁离子, 减少由杀鲑气单胞菌引起的病害。Vine 等^[4]从二线小丑鱼 (*Amphiprion clarkii*) 的幼鱼体内分离到 1 株有抑菌作用的海洋细菌, 对弧菌和气单胞菌有较强的抑菌作用。Planas 等^[5]从大菱鲆养殖池壁上分离了 1 株玫瑰杆菌 (*Roseobacter* sp.), 对鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 有较强的抑制作用。这些有益菌是养殖动物生长环境中的正常菌群, 不仅不会对养殖动物或养殖环境造成危害, 而且还在调节和改善

养殖生态环境、提高养殖动物的免疫力、抑制病原微生物以及控制和减少养殖动物病害的发生等方面发挥着积极作用, 因此合理利用有益菌日趋成为养殖病害防治的一种有效途径。

本研究从海水养殖水体中防腐钢片的微生物黏膜上筛选分离得到 1 株有抑菌作用的海洋细菌 DL2, 对该细菌的抑菌特性、形态学及生理生化特征进行了研究; 对该菌株的 16S rRNA 基因序列进行了扩增与测序, 并分析了这一菌株与部分相关细菌之间的系统关系; 旨在为菌株 DL2 能否应用于水产养殖中提供理论依据, 以丰富海洋有益菌的开发研究。

1 材料和方法

1.1 实验菌株

待测菌株 DL2 分离自海水养殖水体中防腐钢片上的微生物黏膜, 抑菌试验指示菌株为中国海洋大学海洋生命学院微生物实验室分离保存及英国 Heriot-Watt 大学生物系惠赠, 指示菌株大部分为水产养殖动物的致病菌。

1.2 培养基

2216E 海水培养基: 酵母粉 1.0 g, 蛋白胨 5.0

收稿日期: 2006-12-08; 修订日期: 2007-04-15.

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 项目 (2004AA626090); 国家自然科学基金项目 (30200209).

作者简介: 董秀娟 (1979-), 女, 硕士研究生, 主要从事海洋微生物学方面的研究. E-mail: dongxj08@163.com

通讯作者: 李筠 (1967-), 女, 教授. Tel: 0532-82032957; E-mail: yunlisun@ouc.edu.cn

g, FePO₄ 0.1 g, 用陈海水定容至 1 000 mL, pH 7.6~7.8, 琼脂 2.0% (以上药品均购自上海国药), 121 ℃ 灭菌 20 min。

TCBS 培养基(北京路桥有限公司): 使用时 1 L 蒸馏水中加入 10 g NaCl, 89.1 g TCBS, 煮沸冷却后倒平板备用。

1.3 菌株 DL2 抑菌谱的测定

用琼脂扩散法对待测菌株 DL2 的抑菌谱进行测定。将待测菌株 DL2 和指示菌株于 2216E 斜面 28 ℃ 过夜培养, 分别接种于 2216E 液体培养基, 28 ℃ 培养 16 h。取 0.1 mL 指示菌的菌悬液涂布于 2216E 固体平板上, 然后用接种环将待测菌株的菌悬液点在涂布有指示菌的平板上, 28 ℃ 恒温培养, 于 24~48 h 进行抑菌圈的观察和测量。

1.4 菌株 DL2 对鳗弧菌的抑菌作用

用混合液体培养法测定菌株 DL2 对鳗弧菌的抑菌作用。将待测菌株 DL2 与指示菌株鳗弧菌 CW1 分别接种于 2216E 斜面培养基 (28 ℃) 过夜培养后, 每只斜面中加入 4.5 mL 生理盐水振荡冲洗菌苔, 制成菌悬液, 将菌株 DL2 与 CW1 分别进行系列稀释, 取待测菌和指示菌浓度均为 10⁷ CFU/mL 的菌悬液各 1 mL, 同时接种于 100 mL 灭菌的陈海水 (含 0.1% 蛋白胨, 0.05% 酵母粉) 中, 使这两种菌的初始浓度均为 10⁵ CFU/mL, 以单一培养的待测菌株和指示菌株作对照。28 ℃ 120 r/min 于摇床培养箱中培养, 于 1 d、2 d、3 d、4 d 和 5 d 后取样进行 10 倍梯度系列稀释, 取 0.1 mL 稀释液涂布 2216E 或 TCBS 平板进行平板活菌计数, 每个稀释度涂布 2 个平板。

1.5 形态观察及生理生化实验

将 DL2 菌划线接种于 2216E 平板, 28 ℃ 培养 24 h, 观察单个菌落的形态及色素的产生。用普通光学显微镜和扫描电子显微镜结合观察细菌个体形态、大小和鞭毛。参照伯杰氏细菌手册^[6]对细菌进行常规分类。用法国生物梅里埃公司 API20E 试纸条结合细菌微量生化鉴定管 (北京陆桥公司) 进行唯一碳氮源利用和酶反应等测定。

1.6 16S rRNA 序列测定和分析

1.6.1 模板 DNA 的提取 采用稍加改进的酚氯仿法^[7]提取菌株 DL2 的基因组 DNA。

1.6.2 16S rRNA 基因序列的扩增、克隆与测序 扩增 16S rRNA 基因的正向引物为 27F: 5'-A-GAGTTTGATC(C/A) TGGCTCAG-3', 反向引物为

1492R: 5'-GG (C/T) TACCTTGTTACGACTT-3'^[8]。50 μL 的 PCR 反应体系中含有: 10×PCR 缓冲液 5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 3 μL, 2.5 mmol/L dNTP 4 μL, 50 mmol/L 正、反向引物各 0.5 μL, 5 U/μL Taq DNA 聚合酶 0.25 μL, DNA 模板 0.5 μL (约含 1 μg)。PCR 反应条件为: 94 ℃ 预变性 5 min, 94 ℃ 变性 1 min, 46 ℃ 复性 1 min, 72 ℃ 延伸 2 min, 30 个循环, 最后 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 扩增产物经 DNA 纯化试剂盒纯化后与 pUCM-T 载体连接, 连接产物转化到大肠杆菌 JM109 中, 在含有 X-gal (40 μg/mL)、IPTG (40 μg/mL)、氨苄青霉素 (50 μg/mL) 的 LA 平板上筛选含有重组子的白色克隆。经 Pst I 单酶切检测后, 挑取一个阳性克隆, 交由上海生物工程技术公司进行测序, 并人工校对, 以上试剂均为上海生工有限公司产品。

1.6.3 16S rRNA 基因序列分析及数据处理 将菌株 DL2 的 16S rRNA 基因序列进行 BLAST 搜索, 获得与其同源性最高的 18 株细菌的 16S rRNA 基因序列 (GenBank 存取号见表 1), 用 Clustalw1.8 软件对所有序列进行多序列匹配排列 (Multiple Alignments), 利用 Mega3.1 软件采用 NJ (Neighbor-joining) 法构建系统关系树, 并通过自举分析 (Bootstrap) 进行置信度检测, 自举数据集为 1 000 次。

表 1 用于构建系统发育树的 16S rRNA 基因序列及其 GenBank 存取号

Tab.1 Strains for phylogenetic dendrogram constructed and their accession numbers from GenBank

菌株 Strain	菌株名称 Strain Species	存取号 Access No.
LMG 22475T	<i>Phaeobacter inhibens</i>	AY177712
ATCC 700781T	<i>Roseobacter gallaeciensis</i>	Y13244
ATCC 49566	<i>Roseobacter litoralis</i>	X78312
OCh 114	<i>Roseobacter denitrificans</i>	M96746
DSS-3	<i>Silicibacter pomeroyi</i>	AF098491
CHLG 16	<i>Citricella thiooxidans</i>	AY639888
/	<i>Rhodobacter veldkampii</i>	D16421
/	<i>Rhodobacter blasticus</i>	D16429
/	<i>Agrobacterium ferrugineum</i>	D88522
N5Ⅲ	<i>Ruegeria atlantica</i>	AJ968649
NF18	<i>Hydrothermal vent</i>	AF254107
JCM 9220	<i>Rhodovulum strictum</i> Mb-G2	D16419
JCM 7686	<i>Paracoccus aminophilus</i>	D32239
ATCC15262T	<i>Brevundimonas intermedia</i>	AJ227786
CB81	<i>Brevundimonas subvibrioides</i>	AJ227784
Ch05	<i>Paracoccus koreensis</i>	AB187584
ATCC15253T	<i>Caulobacter henricii</i>	AJ227758
ATCC15257T	<i>Caulobacter fusiformis</i>	AJ227759

2 结果与分析

2.1 菌株 DL2 的抑菌作用

采用琼脂扩散法对菌株 DL2 进行体外抑菌实验,结果表明菌株 DL2 对 43 株指示菌均表现出不同程度的抑制作用(表 2),对部分致病性哈维氏弧菌 VIBM3G3、VIB645、VIB647 等和鳃弧菌的抑菌活性较为明显,菌株 DL2 对鳃弧菌 CW1 的抑菌作用见图 1。为了进一步研究菌株 DL2 的抑菌作用,选择鳃弧菌 CW1 作为指示菌与菌株 DL2 进行混合液体培养。

由于菌株 DL2 在 TCBS 平板上不生长,因此可以通过采用 TCBS 进行选择培养,检测混合培养中指示菌株鳃弧菌 CW1 的数量变化。液体混合培养中,鳃弧菌 CW1 的数量变化如图 2 所示,在 DL2-CW1 混合培养体系中,鳃弧菌 CW1 在 24 h 内数量由初始的 10^5 CFU/mL 增加至 10^7 CFU/mL,随即开始下降,第 3 天时鳃弧菌的数量降为最低,比第 1 天下降了近 3 个数量级,之后鳃弧菌又有一定数量的增长。对照组鳃弧菌和 DL2 菌的数量在第 2~5 天基本维持第 1 天的数量,表明菌株 DL2 对鳃弧菌具有较强的抑制作用。

表 2 菌株 DL2 的抑菌谱

Tab.2 Inhibitory spectrum of bacterium DL2 against tested indicator strains

指示菌 Indicator strains	来源 Source	DL2 抑菌圈直径/mm Diameter of inhibitory spectrum
哈维氏弧菌 VIB286 (<i>V. harveyi</i>)	USA	12
哈维氏弧菌 VIB295 (<i>V. harveyi</i>)	USA	8
哈维氏弧菌 VIB391 (<i>V. harveyi</i>)	Shrimp	6
哈维氏弧菌 VIB571 (<i>V. harveyi</i>)	<i>Dicentrarchus labrax</i>	8
哈维氏弧菌 VIB572 (<i>V. harveyi</i>)	<i>Sparus aurata</i>	12
哈维氏弧菌 VIB631 (<i>V. harveyi</i>)	U K	11
哈维氏弧菌 VIB645 (<i>V. harveyi</i>)	<i>D. labrax</i>	9
哈维氏弧菌 VIB646 (<i>V. harveyi</i>)	Shark	12
哈维氏弧菌 VIB647 (<i>V. harveyi</i>)	<i>Sparus aurata</i>	12
哈维氏弧菌 VIB648 (<i>V. harveyi</i>)	Shark liver	13
哈维氏弧菌 VIB649 (<i>V. harveyi</i>)	<i>Sparus aurata</i>	8
哈维氏弧菌 VIB652 (<i>V. harveyi</i>)	<i>D. labrax</i>	13
哈维氏弧菌 VIB653 (<i>V. harveyi</i>)	<i>D. labrax</i>	11
哈维氏弧菌 VIB658 (<i>V. harveyi</i>)	U K	8
哈维氏弧菌 VIB659 (<i>V. harveyi</i>)	<i>D. labrax</i>	7
哈维氏弧菌 VIB661 (<i>V. harveyi</i>)	<i>D. labrax</i>	9
哈维氏弧菌 VIBM3G3 (<i>V. harveyi</i>)	<i>Penaeus chinensis</i>	15
哈维氏弧菌 TNPR198 (<i>V. harveyi</i>)	U K	7
哈维氏弧菌 D1040 (<i>V. harveyi</i>)	Fish	9
哈维氏弧菌 D1048 (<i>V. harveyi</i>)	Fish	6
哈维氏弧菌 D1063 (<i>V. harveyi</i>)	Sea water	6
哈维氏弧菌 E022 (<i>V. harveyi</i>)	Belgium	13
哈维氏弧菌 SF1 (<i>V. harveyi</i>)	<i>Lateolabrax japonicus</i>	12
哈维氏弧菌 Z3G2 (<i>V. harveyi</i>)	<i>Penaeus chinensis</i>	8
鳃弧菌 CW1 (<i>V. anguillarum</i>)	<i>Lateolabrax japonicus</i>	17
鳃弧菌 VIB1 (<i>V. anguillarum</i>)	UK	13
鳃弧菌 VIB2 (<i>V. anguillarum</i>)	UK	12
鳃弧菌 VIB3 (<i>V. anguillarum</i>)	UK	11
鳃弧菌 VIB4 (<i>V. anguillarum</i>)	UK	15
鳃弧菌 VIB5 (<i>V. anguillarum</i>)	UK	14
鳃弧菌 VIB6 (<i>V. anguillarum</i>)	UK	13
鳃弧菌 VIB7 (<i>V. anguillarum</i>)	UK	16
鳃弧菌 VIB8 (<i>V. anguillarum</i>)	UK	16
鳃弧菌 VIB9 (<i>V. anguillarum</i>)	UK	14
鳃弧菌 VIB10 (<i>V. anguillarum</i>)	UK	19

续表		
指示菌 Indicator strains	来源 Source	DL2 抑菌圈直径 /mm Diameter of inhibitory spectrum
鳎弧菌 VIB72 (<i>V. anguillarum</i>)	UK	16
鳎弧菌 TL01 (<i>V. anguillarum</i>)	<i>Scophthalmus maximus</i>	19
副溶血弧菌 799 (<i>V. parahaemolyticus</i>)	Thailand	14
副溶血弧菌 25-C (<i>V. parahaemolyticus</i>)	<i>Penaeus chinensis</i>	9
溶藻胶弧菌 D1058 (<i>V. alginolyticus</i>)	Sea water	5
产气肠杆菌 HK3 (<i>Enterobacter aerogenes</i>)	UK	6
芽孢杆菌属 SY2 (<i>Bacillus</i> sp.)	UK	15
芽孢杆菌属 DSM10 (<i>Bacillus</i> sp.)	UK	21

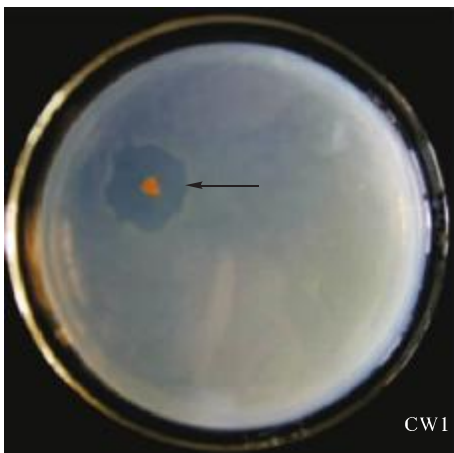


图 1 菌株 DL2 对鳎弧菌 CW1 的抑菌作用
注:箭头所指为抑菌环.

Fig.1 Inhibition of bacterium DL2 against *V. anguillarum* CW1
Note: The arrow points to the antibacterium circle.

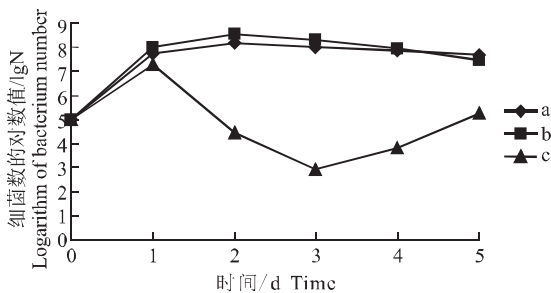


图 2 混合培养中鳎弧菌 CW1 的数量变化
a. 对照中指示菌株 CW1 细菌数;b. 对照中待测菌株 DL2 的细菌数;c. 混合培养中指示菌株 CW1 存活数.
Fig.2 The change of bacterial number of *V. anguillarum* CW1 in mixed culture
a.Bacterium number of indicator strain CW1 in control;
b.Bacterium number of strain DL2 in control; c.Viable bacterium number of indicator strain CW1 in mixed culture.

2.3 形态特征、革兰氏染色及运动性

菌株 DL2 在 2216E 培养基上 28 ℃ 培养 24 h 的菌落呈圆形、中间略微凸起,半透明,表面光滑,呈浅褐色,边缘整齐,直径约为 0.5 mm,产生浅褐色扩散性的色素,培养 72 h 后菌落颜色变为褐色。菌体革兰氏染色阴性,短杆状,可运动,有较长的极生单鞭毛,菌体大小 (1.3~1.6) μm × (0.4~0.6) μm (图 3)。

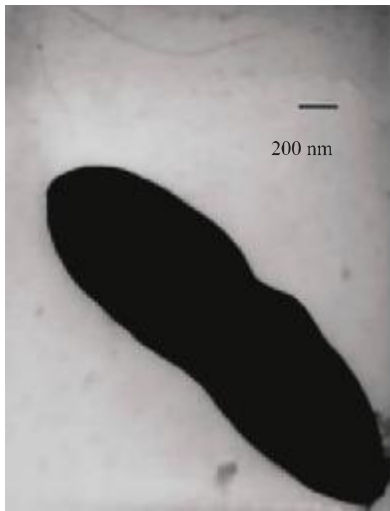


图 3 菌株 DL2 经负染后的电镜照片
Fig.3 The electron micrograph of bacterium DL2 under negative strain

2.4 生长条件

菌株 DL2 生长需要 NaCl,在 NaCl 质量分数为 0.85%~4% 时均生长良好,NaCl 质量分数为 1.55%~3.5% 范围内生长较快。温度生长实验表明,该菌株可以在 4~37 ℃ 温度范围内生长,在 25~28 ℃ 范围内生长较快。在 pH 6.0~10.0 范围内均能生长,低于 6.0 时不生长,10.0 时生长微弱。

2.5 生理生化特征

常规生理生化鉴定结果表明,菌株 DL2 为葡萄糖发酵型,接触酶、氧化酶阳性,明胶酶、脲酶、色氨酸脱氨酶、精氨酸双水解酶、赖氨酸脱羧酶、尿氨酸脱羧酶为阴性。可利用葡萄糖、麦芽糖、木糖、蔗糖、纤维二糖、乳糖、甘露醇、山梨醇、β-半乳糖苷;不能

利用木糖、阿拉伯糖、鼠李糖、棉子糖、蕈糖、甘油。依据 API20E 试纸条和细菌微量生化鉴定管所获得的该细菌的主要生理生化特征如表 3 所示。根据其菌落形态、生长特性及生理生化特征,菌株 DL2 可初步鉴定为 *Phaeobacter inhibens*。

表 3 菌株 DL2 与 *Phaeobacter* 属内成员生理生化特征的比较

Tab.3 Comparison of physiological and biochemical properties of bacterium DL2 and the membres of geneus *Phaeobacter*

鉴定项目 Identification items	DL2	<i>Phaeobacter inhibens</i> LMG22475T	<i>Phaeobacter gallaeciensis</i> BS107 ^T
4 ℃ 生长 Growth at 4 ℃	+	+	—
37 ℃ 生长 Growth at 37 ℃	+	+	+
生长需 Na ⁺ Sodium requirement	+	+	+
色素产生 Pigment production	+	+	+
硝酸盐还原 NO ₃ ⁻ Reduced to NO ₂ ⁻	—	—	—
明胶液化 Gelatinase	—	—	—
吲哚产生 Indole production	+	d	d
氧化酶 Oxidase	+	+	+
过氧化氢酶 Catalase	+	+	+
脲酶 Urease	+	d	d
精氨酸双水解酶 Arginine Dihydrolase	+	d	d
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine Decarboxylase	—	d	d
赖氨酸脱羧酶 Lysine Decarboxylase	—	d	d
色氨酸脱氨酶 Tryptophan Deaminase	—	d	d
H ₂ S 产生 H ₂ S production	—	—	—
优-普试验 V.P	+	+	+
甲基红试验 MR	—	d	d
碳源利用 Carbon sources			
葡萄糖 Glucose	+	+	+
鼠李糖 Rhamnose	—	—	—
木糖 Xylose	+	+	+
纤维二糖 Cellobiose	+	+	+
蜜二糖 Melibiose	—	d	d
乳糖 Lactose	+	+	+
麦芽糖 Maltose	+	+	+
蔗糖 Sucrose	+	+	+
阿拉伯糖 Arabinose	—	—	—
蕈糖 Trehalose	—	d	d
甘油 Glycerol	—	+	+
甘露醇 Mannitol	+	+	+
山梨醇 Sorbitol	+	+	+
β-半乳糖苷 β-galactoside	+	d	d
柠檬酸盐 Citrate	—	+	—

注:“+”表示阳性,“—”表示阴性,d 表示未描述.

Note: “+” positive reaction results; “—” negetive reaction results; “d” no describing results.

2.6 16S rRNA 基因序列分析和系统关系研究

所扩增的 16S rRNA 基因序列长度为 1 425 bp, 其中包括引物结合区。将菌株 DL2 的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中进行同源性检索, 结果发现菌株 DL2 与 Rhodobacteraceae 科 *Phaeobacter* 属细菌的 16S rRNA 序列相似性最高。其中与 *Phaeobacter inhibens* 序列相似性达到 99.8%, 与 *Phaeobacter gallaeciensis* 序列相似性达到 99.1%。从检索结果中选择 18 个相似性较高的细菌的 16S

rRNA 基因序列进行系统关系分析, 用 Mega3.1 软件构建系统树, 结果如图 3 所示。从图中可以看出, DL2 与 *Phaeobacter* 属的 *P. inhibens* (LMG 22475T) 和 *P. gallaeciensis* (BS107T) 聚成一群, 置信度达 100%, 与 *P. inhibens* (LMG 22475T) 聚成一个分支, 置信度达 99%。结果表明菌株 DL2 与 *Phaeobacter inhibens* 亲缘关系最为接近。综合形态、生理生化特征和 16S rRNA 基因序列的分析结果, 将海洋细菌 DL2 鉴定为 *P. inhibens*。

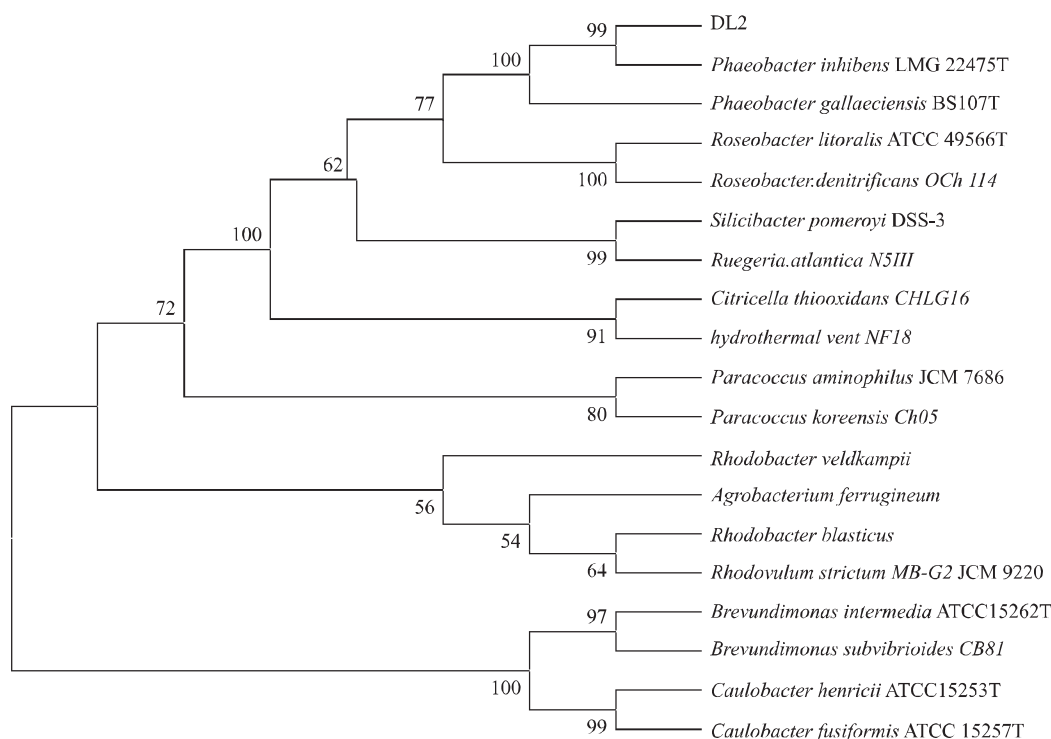


图 4 NJ 法构建 16S rRNA 系统关系树

Fig.4 16S rRNA Phylogenetic dendrogram analyzed by neighbor-joining method

3 讨论

Phaeobacter 属是由 Martens 等^[9]2006 年命名的新属, 属内包含 *P. gallaeciensis* 和 *P. inhibens* 2 个种。其中 *Phaeobacter gallaeciensis* 是 Ruiz-Ponte 等^[10]1998 年从扇贝幼虫培育系统中分离得到的, 鉴定并命名为玫瑰杆菌属的 *Roseobacter gallaeciensis*。但是在 16S rRNA 基因序列分析、菌落颜色、是否含有叶绿素 a 等方面, *R. gallaeciensis* 与玫瑰杆菌属的海滨玫瑰杆菌 (*Roseobacter litoralis*) 和反硝化玫瑰杆菌 (*Roseobacter denitrificans*) 均存在较大

的差异。基于这些差异, Martens 等重新对其进行了鉴定, 明确了该菌株的分类地位, 并正式命名为 *P. gallaeciensis*; 属内另一种 *P. inhibens* 是 Martens 等^[9]把从德国瓦登海海水里分离得到的菌株 T5^T 进行鉴定并命名的一个新种。*Phaeobacter* 属细菌分布在海水和海洋环境中, 是一类革兰氏阴性的卵杆形菌。在 2216E 海洋培养基上, 菌落颜色为浅褐色到深褐色, 能产生扩散性的褐色色素。细胞具有抑菌活性, 并且能产生具有抗性的化合物^[11]。目前国内还没有有关该属细菌的报道。

本研究中, 菌株 DL2 在形态、生长条件和生理

生化等基本特征上都具备了 *Phaeobacter* 属细菌特有的生物学特征。16S rRNA 系统关系分析结果表明,菌株 DL2 与 *P. inhibens* 的 16S rRNA 基因序列相似性达 99.8%,从系统关系树中可以看出,菌株 DL2 与 *Phaeobacter* 属细菌聚为一类,与 *P. inhibens* 位于同一个分支上,距离非常近,置信度为 99%。据此可以确定菌株 DL2 与 *P. inhibens* 为同一个种。这是国内首次报道分离到 *Phaeobacter* 属细菌,并发现其具有较广泛的抑菌作用。

自从 1966 年第一株有抑菌作用的海洋细菌被发现以来,越来越多的具有抑菌性的细菌被分离出来。目前已报道的这类海洋细菌主要有假单胞菌 (*Pseudomonas*),交替单胞菌 (*Alteromonas*),弧菌 (*Vibrio*),肉杆菌 (*Carnobacterium*),玫瑰杆菌 (*Roseobacter*),光合细菌 (*Photosynthetic bacteria*),藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*),烟草节杆菌 (*Arthrobacter nicotiana*) 等。近年来,在海水养殖中有很多关于有益菌的抑菌特性的研究报道。李继秋等^[12]将烟草节杆菌 (*Arthrobacter nicotiana*) 应用于中国对虾仔虾培育系统中,发现该菌能抑制弧菌的生长,保护对虾幼苗免受弧菌感染。王祥红等^[13]将橙色交替单胞菌 A18 (*Alteromonas aurantia*) 应用于海湾扇贝育苗系统中,降低了水体的弧菌数量,提高了扇贝幼苗的变态率和成活率。Gibson 等^[14]将中间气单胞菌 (*Aeromonas media*) 应用于太平洋牡蛎养殖中,发现该菌能增强牡蛎幼苗对塔式弧菌 (*Vibrio tubiashii*) 的抵抗力。Gram 等^[15]将荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 应用到虹鳟鱼养殖中,发现该菌对鳃弧菌有较强的抑菌作用,能降低虹鳟鱼的死亡率。Planas 等^[5]将对鳃弧菌有较强抑制作用的玫瑰杆菌 (*Roseobacter*) 应用到注射鳃弧菌的大菱鲆幼鱼中,发现该菌能较强地抑制鳃弧菌的生长,保护幼鱼。由于 *Phaeobacter* 属细菌是新近被命名的新属细菌,有关该属细菌在海水养殖中的应用报道较少。随着研究的不断深入,将有越来越多的功能菌株被发现并得到广泛应用。

通过抑菌作用的测定,发现菌株 DL2 对致病性的弧菌具有较强的抑菌特性。在与鳃弧菌 CW1 混合液体培养试验中,菌株 DL2 在培养 24h 后才表现出对鳃弧菌的抑制作用,其原因可能是菌株 DL2 不具有与弧菌竞争营养的生长优势,而是通过产生代谢活性物质来抑制弧菌的生长^[3-4]。指示菌鳃弧菌 CW1 数量达到最低值后又有增加的趋势,说明

菌株 DL2 的抑菌时间是有限的,在实际应用中应通过定期不断的添加来维持其抑菌活性,以达到最佳效果。菌株 DL2 作为潜在的有益菌应用到水产养殖中,其使用方法及应用效果有待于进一步的研究。

参考文献:

- [1] Rengpipat S, Piyatirativorakul S, Phianphak W, et al. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth[J]. *Aquaculture*, 1998, 167: 301–313.
- [2] Robertson P A W, O'Dowd C, Burrells C, et al. Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) [J]. *Aquaculture*, 2000, 185: 235–243.
- [3] Smith P, Davey S. Evidence for the competitive exclusion of *Aeromonas salmonicida* from fish with stress-inducible furunculosis by a *fluorescens* *Pseudomonas* [J]. *J Fish Dis*, 1993, 16: 521–524.
- [4] Vine N G, Leukes W D, Kaiser H. In vitro growth characteristics of five candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus [J]. *FEMS Microbiol Letters*, 2004, 231: 145–152.
- [5] Planas M, Pérez-Lorenzo M, Hjelm M. Probiotic effect in vivo of *Roseobacter* strain 27-4 against *Vibrio* (*Listonella*) *anguillarum* infections in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae [J]. *Aquaculture*, 2006, 255: 323–333.
- [6] John G H, Noel R K, Peter H A S, et al. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* [M]. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins Press, 1994.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: a laboratory manual* [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 672–691.
- [8] Polz M F, Cavanaugh C M. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64 (10): 3724–3730.
- [9] Martens T, Heidorn T, Pukall R, et al. Reclassification of *Roseobacter gallaeciensis* Ruiz-Ponte et al. 1998 as *Phaeobacter gallaeciensis* gen. nov., comb. nov., description of *Phaeobacter inhibens* sp. nov., reclassification of *Ruegeria algicola* (Lafay et al. 1995) Uchino et al. 1999 as *Marinovum algicola* gen. nov., comb. nov., and emended descriptions of the genera *Roseobacter*, *Ruegeria* and *Leisingera* [J]. *Internat J System Evol Microbiol*, 2006, 56: 1293–1304.
- [10] Ruiz-Ponte C, Cilia V, Lambert C, et al. *Roseobacter gallaeciensis* sp. nov., a new marine bacterium isolated from rearings and collectors of the scallop *Pecten maximus* [J]. *Int J System Bacteriol*, 1998, 48: 537–542.
- [11] Brinkhoff T, Bach G, Heidorn T, et al. Antibiotic production by a *Roseobacter* clade-affiliated species from the German Wadden Sea and its antagonistic effects on indigenous isolates [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70: 2560–2565.
- [12] Li J Q, Tan B P, Mai K S, et al. Comparative study between pro-

- biotic bacterium *Arthrobacter* XE-7 and chloramphenicol on protection of *Penaeus chinensis* post-larvae from pathogenic vibrios [J]. *Aquaculture*, 2006, 253: 140 – 147.
- [13] 王祥红, 李筠, 杜宗军, 等. 有益细菌 A18 在海湾扇贝 (*Argopecten irradians*) 育苗中的应用 [J]. 高技术通讯, 2002, 12 (8): 84 – 88.
- [14] Gibson L F, Woodworth J, George A M. Probiotic activity of *Aeromonas media* on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, when challenged with *Vibrio tubiashii* [J]. *Aquaculture*, 1998, 169: 111 – 120.
- [15] Gram L, Melchiorson J, Spanggaard B, et al. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65: 969 – 973.

Identification and inhibitory activity to pathogenic *Vibrio* sp. of a marine bacterium *Phaeobacter* DL2

DONG Xiu-juan^{2,3}, LI Yun¹, ZHANG Xiao-hua², LIU Jia-lin², HU Zong-yun², CHEN Ji-xiang²

(1. School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Shandong Qingdao 266003, China; 2. College of Marine Science, Ocean University of China, Shandong Qingdao 266003, China; 3. Chengyang No. 2 Middle School in Qingdao, Qingdao 266003, China)

Abstract: A bacterium DL2 was isolated from microbial biofilms of antiseptic steel pieces in aquatic water. The inhibitory activity of DL2 was tested by using agar diffusion method on 2216E plates. Bacterium DL2 showed wide inhibitory spectrum, especially for pathogenic *Vibrio* sp. . To identify DL2, its morphological, physiological and biochemical properties were tested, and API 20E system was applied in the bacterial identification. Morphological observation results showed that the colonies of strain DL2 on 2216E agar became brown after 48 h. The bacterium was gram-negative which had single polar flagellum and had the capability to produce brownish diffusible pigment. The organism was found to be catalase-positive, oxidase-positive, but negative for amylase, gelatinase and tweenase. It could not reduce nitrate and could not utilize citrate as sole carbon source. The results showed that the strain DL2 was similar to *Phaeobacter inhibens* in most of the phenotypes. To investigate the phylogenetic position of this bacterium 16S rRNA gene of strain DL2 was sequenced and compared with those of related strains. The homology of 16S rRNA gene between strain DL2 and *Phaeobacter inhibens* was 99.8%. Phylogenetic tree was constructed by using neighbour-joining method. Strain DL2 and the strain *Phaeobacter inhibens* LMG 22475T (access no. AY177712) consistently formed a monophyletic clade, which revealed that strain DL2 shared the most similarity to *Phaeobacter inhibens*. Base on the inhibitory activity, morphological, physiological and phylogenetic analysis, DL2 was identified as *Phaeobacter inhibens*. It can be used in aquaculture as a potential probiotics based on its inhibitory activity. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (6): 996 – 1 003]

Key words: *Phaeobacter inhibens*; inhibitory activity; 16S rRNA gene; phylogenetic analysis

Corresponding author: LI Yun. E-mail: yunlisun@ouc.edu.cn