

弧菌拮抗菌的筛选及其效果

张新明^{1,2}, 李健¹, 刘淇¹

(1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛, 266071; 2. 中国海洋大学 水产学院, 山东 青岛, 266003)

摘要:从健康的鱼虾体内以及养殖水体中分离得到219株海洋细菌,以鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、沙蚕弧菌(*Vibrio neresis*)、飘浮弧菌(*Vibrio natriegen*)等病原性弧菌为指示菌,在2216E平板上采用十字交叉划线法、点种法和平板扩散法进行体外拮抗实验,从中筛选到6株有拮抗作用的海洋细菌。用平板活菌计数法研究拮抗菌J-10及其胞外产物对鳃弧菌的抑菌作用;采用平板扩散法研究拮抗菌J-10胞外产物抑菌效果的影响因子。结果显示,拮抗菌J-10在混合体系中,24 h之后表现出拮抗作用,在第3天使鳃弧菌的数量降为最低,比第1天的鳃弧菌数量下降了2个数量级,之后鳃弧菌的数量开始上升,而对照组鳃弧菌的数量在第2~5天基本维持第1天的水平,表明拮抗菌J-10在混合体系中具有较强的拮抗作用。拮抗菌J-10的胞外产物能较好地抑制鳃弧菌的生长,使实验组的弧菌数量在3 h降为最低,之后呈缓慢上升的趋势,而对照组则一直呈上升的趋势;拮抗菌J-10的胞外产物对热敏感,对pH的变化不敏感,对蛋白酶K不敏感,Fe³⁺的添加会减弱其抑菌活性。根据形态特征和常规生理生化反应进行鉴定,J-10为藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)。

关键词:拮抗菌;筛选;藤黄微球菌;抑菌活性;胞外产物

中图分类号:Q939.92;Q938.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2004)04-0325-08

近年来,一些益生菌开始应用于水产养殖业,实践证明应用益生菌来防治鱼虾疾病是可行的^[1-3]。Gatesoupe^[4]研究发现,将乳酸菌应用于大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)幼苗培育中能增强幼苗对病原性弧菌的抵抗力。Austin等^[1]报道了1株溶藻弧菌对杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)和鳃弧菌(*V. anguillarum*)均有较强的抑制作用。Riquelme等^[5]研究发现,将1株弧菌属细菌(*Vibrio* sp.)应用于扇贝育苗,通过抑制水体鳃弧菌和其他病原菌,提高了扇贝幼苗的成活率,并且认为具有拮抗活性的细菌在生物控制方面均有潜在的应用价值。Smith等^[6]报道,用1株假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)浸浴减少了大西洋鲑疔疮病的发生,并使其死亡率降低。

本研究从养殖环境及鱼虾体内分离筛选出对病原性弧菌有拮抗作用的海洋细菌,对其进行了菌种鉴定,并对拮抗菌J-10的胞外产物对鳃弧菌的抑菌作用及其影响因子进行了研究,以期为细菌J-10应用于水产养殖中拮抗病原菌提供基础理论依

据。

1 材料和方法

1.1 实验菌株的来源及培养

1.1.1 实验菌株 从健康的养殖鱼虾体和养殖环境中共分离到219株菌作为体外拮抗实验的实验菌株。

1.1.2 病原性指示菌 实验所用4株病原性指示菌分别为:飘浮弧菌1594(*Vibrio natriegen*)和沙蚕弧菌1623(*Vibrio neresis*)来源于中国海洋大学;副溶血弧菌1614(*Vibrio parahaemolyticus*)来源于中国科学院水生生物研究所。鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*) H-2由本实验室从山东海阳海珍品养殖场发病牙鲆中分离筛选并鉴定,经人工攻毒试验证明其具有较强的毒性。

以上菌株均用2216E海水琼脂培养基常规培养。

1.2 拮抗菌的筛选

1.2.1 十字交叉划线法 将实验菌株和指示菌株

收稿日期:2003-10-16; 修订日期:2003-12-29.

基金项目:国家高技术研究发展计划(2001AA620206);青岛市科技发展计划(03-2-HH-6).

作者简介:张新明(1978-),男,硕士,从事微生物及免疫学方面的研究. E-mail: zhixinming66@163.com

通讯作者:李健. E-mail: lijian@ysfri.ac.cn

培养24 h后相互垂直地交叉划线接种于2216E海水培养基平板上,然后置于培养箱中28℃恒温培养,24~48 h之内观察有无抑菌区出现。

1.2.2 点种法 将实验菌株和指示菌株分别于2216E试管斜面培养基上培养24 h,指示菌株用0.85%的灭菌生理盐水洗下,取0.1 mL菌悬液涂布于新鲜的2216E固体平板上,然后用接种环刮取实验菌株在上述平板上点种,28℃恒温培养,24~48 h进行抑菌圈的观察和测量。

1.2.3 平板扩散法 将指示菌培养18~20 h后用0.85%的生理盐水洗下菌苔,参照麦氏比浊管调节其菌液浓度为 10^7 CFU/mL,取0.1 mL涂布于2216E平板上;滤纸用打孔机打成 $\Phi=7$ mm的双层圆形纸片,在干燥箱内140℃干燥1 h,将纸片贴于上述平板上,将培养好的实验菌株配成一定浓度的菌悬液,取10 μ L点于纸片上,28℃培养24~48 h后进行抑菌圈的观察和测量。

1.3 拮抗菌的分类和鉴定

参照文献[7~9]将筛选到的拮抗菌进行分类和鉴定。鉴定项目包括:形态观察、革兰氏染色、鞭毛染色、芽孢染色、运动性试验、氧化酶和过氧化氢酶反应、生长需要NaCl试验、葡萄糖氧化发酵、色素产生、酶的产生、唯一碳源的利用等。

1.4 拮抗菌J-10对鳗弧菌的抑菌作用

将抑菌能力较强的拮抗菌株J-10与鳗弧菌在2216E斜面上培养24 h左右,用0.85%的灭菌生理盐水洗下菌苔,4 000 r/min离心20 min,弃上清,指示菌株和拮抗菌株稀释后取适量接种于100 mL灭菌陈海水(含0.1%蛋白胨,0.05%酵母粉)中,使拮抗菌株J-10的初始浓度为 10^5 CFU/mL,指示菌株的初始浓度为 10^5 CFU/mL,以没有拮抗性的菌株和鳗弧菌的混合培养液做对照,28℃80~100 r/min于摇床培养箱中分别培养1 d,2 d,3 d,4 d和5 d后,取样进行10倍系列稀释,0.1 mL涂布2216E或TCBS平板进行活菌计数。

1.5 拮抗菌J-10的胞外产物对鳗弧菌的抑菌作用

1.5.1 拮抗菌J-10的胞外产物的制备 参照Sugita等^[10]的方法,将筛选到的拮抗菌J-10在2216E斜面上活化后接种于2216E液体培养基,28℃恒温振荡培养一定时间,4℃9 600 r/min离心20 min,弃去细胞沉淀,上层物质经0.22 μ m微孔滤膜过滤,所得液体为拮抗菌J-10的胞外产物。置于

4℃保存备用。

1.5.2 拮抗菌J-10的胞外产物对鳗弧菌的抑菌作用 鳗弧菌于2216E液体培养基培养过夜,4 000 r/min离心20 min,弃上清,菌体以灭菌生理盐水悬浮后取适量加到拮抗菌J-10的胞外产物中,调节细菌浓度为 10^6 CFU/mL左右,以没有拮抗作用的菌株的胞外产物作对照,置28℃80~100 r/min恒温振荡培养,分别于1 h,3 h,6 h,10 h,24 h取样涂布2216E平板,进行活菌计数。

1.6 拮抗菌J-10的胞外产物的抑菌活性影响因素研究

1.6.1 抑菌活性的检测方法 采用平板扩散法。鳗弧菌培养18~20 h后用0.85%的灭菌生理盐水洗下菌苔,参照麦氏比浊管调节其菌液浓度为 10^7 CFU/mL,取0.1 mL涂布于2216E平板上;滤纸用打孔机打成 $\Phi=7$ mm的双层圆形纸片,在干燥箱内140℃干燥1 h,将纸片浸于拮抗菌J-10的胞外产物中,之后在培养箱中28℃干燥15 min,将纸片贴于上述平板上,28℃培养24~48 h观察有无抑菌圈出现。

1.6.2 培养时间对拮抗菌J-10的胞外产物抑菌活性的影响 拮抗菌J-10恒温振荡培养,每隔12 h取样,离心,除菌,依照上述方法测定抑菌活性,从而确定其最佳培养时间。

1.6.3 pH变化对拮抗菌J-10的胞外产物抑菌活性的影响 拮抗菌J-10培养一定时间后制备胞外产物,用1 mol/L的HCL或1 mol/L的NaOH调节胞外产物的pH值分别为3、5、7、9、11,作用1 h后将pH回调至8.5,按上述方法测定抑菌活性。

1.6.4 温度变化对拮抗菌J-10的胞外产物抑菌活性的影响 拮抗菌J-10培养一定时间后制备胞外产物,水浴加热,分别在28℃作用24 h,40℃作用2 h,60℃作用1 h,80℃作用30 min,100℃作用10 min后迅速置冰块中终止反应,以4℃保存的胞外产物做为对照,以按上述方法测定抑菌活性。

1.6.5 盐度变化对拮抗菌J-10的胞外产物抑菌活性的影响 用蒸馏水代替2216E培养基中的陈海水,用NaCl调节其盐度,配制盐度分别0、10、20、30、40、50的使用培养基,将拮抗菌J-10分别接种于上述培养基中,28℃恒温振荡培养一定时间,制备胞外产物,按上述方法测定抑菌活性。

1.6.6 蛋白酶K对拮抗菌J-10的胞外产物抑菌活性的影响 将蛋白酶K加入到拮抗菌J-10的胞

外产物中,使其终浓度为2 mg/mL,37 ℃作用1 h后按上述方法测定抑菌活性,以不加蛋白酶K的拮抗菌J-10的胞外产物做对照。

1.6.7 Fe^{3+} 对拮抗菌J-10的胞外产物抑菌活性的影响 将鳗弧菌在2216E液体培养基中培养20 h左右,离心,弃上清,再用0.85%的生理盐水悬浮,取适量加入到拮抗菌的J-10的胞外产物中,之后加入 FeCl_3 溶液,调节其终浓度分别为100 $\mu\text{mol/L}$ 、200 $\mu\text{mol/L}$ 、300 $\mu\text{mol/L}$,以不加 FeCl_3 的拮抗菌J-10的胞外产物和鳗弧菌的混合液做对照,28 ℃培养24 h,分别取样,用酶标仪测定0时刻和24 h的 OD_{655} 。

1.7 拮抗菌J-10胞外产物的性质研究

1.7.1 拮抗菌J-10胞外产物的提取 将制备好的拮抗菌J-10的胞外产物加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至80%的饱和度,4 ℃放置12 h后10 000 r/min离心

20 min,沉淀溶于10 mmol/L的Tris-HCl(pH 7.8)缓冲液中,并对相同缓冲液透析。

1.7.2 SDS-PAGE 采用Tris-甘氨酸缓冲系统,银染。

2 结果

2.1 拮抗菌的筛选

对分离到的219株细菌用3种方法逐一进行体外拮抗试验,用十字交叉划线法和点种法筛选到6株对病原菌具有拮抗作用的菌株,编号分别为:X-B、RB2、J-d、J-f、J-7、J-10。用平板扩散法筛选到4株,编号分别为:X-B、J-f、J-7、J-10。其中有3株细菌J-f、J-7、J-10对4株病原性指示菌均有较强的拮抗作用,能明显地抑制病原菌的生长,在病原菌周围产生明显而清晰的抑菌圈,从表1可以看出J-10对病原菌的拮抗作用最强。

表1 3种方法的筛选结果

Table 1 Result of selection by three methods

拮抗菌 Antagonistic strain	十字交叉法 Cross-streaking method				点种法 Dot-inoculation method				平板扩散法 Plate diffusion method			
	V1	V2	V3	V4	V1	V2	V3	V4	V1	V2	V3	V4
X-B	+	+	-	-	4	5	-	-	13.5	11.5	-	-
J-d	+	+	+	-	6	5	4	-	-	-	-	-
RB2	+	+	-	-	4	5	5	-	-	-	-	-
J-f	+	+	+	+	6	8	9	9	12.5	12.5	11.5	12
J-7	+	+	+	+	7	7	9	8	13	12	12.5	11
J-10	+	+	+	+	8	9	10	9	13.5	14	15	12.5

注:1)“+”代表有抑菌作用;“-”代表无抑菌作用;数字代表抑菌圈直径(mm)。

2) V1、V2、V3、V4 分别代表鳗浮弧菌、沙蚕弧菌、鳗弧菌、副溶血弧菌。

Note:1)“+”denotes having inhibitory activity;“-”denotes no inhibitory activity; number denotes diameter of inhibition(mm)。

2) V1, V2, V3 and V4 denote separately *Vibrio natriegen*, *Vibrio neresis*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio parahaemolyticus*。

2.2 拮抗菌的分类和鉴定

对6株拮抗菌进行常规生理生化鉴定,J-f、J-7、J-10为革兰氏阳性菌,球形,无鞭毛,过氧化氢酶阳性,发酵葡萄糖或发酵作用不明显,在2216E培养基上分泌黄色色素,属于微球菌(*Micrococcus*);J-d和RB2均为杆状,革兰氏阳性,其中J-d有芽孢,属于芽孢杆菌(*Bacillus*),RB2属于乳杆菌(*Lactobacillus*);X-B为革兰氏阴性菌,氧化酶阳性,属于假单胞菌(*Pseudomonas*);参照文献[7]对J-10进行进一步鉴定,初步定为藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*),鉴定项目见表2。

2.3 拮抗菌J-10的抑菌作用

2.3.1 拮抗菌J-10对鳗弧菌的抑菌作用 从图1可以看出,拮抗菌J-10在第3天使鳗弧菌的数量降为最低,比第1天的鳗弧菌数量下降了2个数量级,之后鳗弧菌的数量开始上升,而对照组鳗弧菌的数量在第2~5天基本维持第1天的数量,表明拮抗菌J-10在混合体系中具有较强的拮抗作用。

2.3.2 拮抗菌J-10的胞外产物对鳗弧菌的抑菌作用 从图2可以看出,试验组鳗弧菌的细菌数量在3 h降为最低,为最初细菌数的90%左右,在3~10 h细菌数几乎没有增长,一直稳定在较低的水平,10 h后细菌数开始上升并且超过了最初的数值,而对照组细菌数则一直呈上升趋势,上述结果表

拮抗菌 J-10 的胞外产物至少在最初的 10 h 内 能很好地抑制甚至能杀死一部分病原菌。

表 2 拮抗菌 J-10 的主要生理生化特征与藤黄微球菌的比较
Table 2 Characteristics of antagonistic bacterium J-10 and *M. luteus*

项目 Item	J-10 菌 J-10 strain	藤黄微球菌 <i>M. luteus</i>	项目 Item	J-10 菌 J-10 strain	藤黄微球菌 <i>M. luteus</i>	项目 Item	J-10 菌 J-10 strain	藤黄微球菌 <i>M. luteus</i>
β-半乳糖苷酶 ONPG	+	+	过氧化氢酶 (Catalase)	+	+	山梨醇产酸 (Acid producing from sorbitol)	-	-
精氨酸双水解酶 (Arginine hydrolase)	+	+	氧化酶 (Oxidase)	-	-	棉籽糖产酸 (Acid producing from raffinose)	-	-
赖氨酸脱羧酶 (Lysine decarboxylase)	-	-	葡萄糖产酸 (Acid producing from glucose)	-	-	甘露醇产酸 (Acid producing from mannitol)	-	-
精氨酸脱羧酶 (Arginine decarboxylase)	-	-	鼠李糖产酸 (Acid reducing from rhamnose)	-	-	蔗糖产酸 (Acid producing from sucrose)	-	-
脲酶 (Urease)	+	+	丙二酸盐利用 (Malonate using)	+	+	阿拉伯糖产酸 (Acid producing from arabinose)	-	-
硝酸盐还原 (Nitrate deoxidization)	+	+	明胶酶 (Colleganase)	+	+	肌醇产酸 (Acid producing from inositol)	-	-
H ₂ S (Sulfide hydrogen)	-	-	柠檬酸盐利用 (Citrate using)	+	+	运动性 (Motility)	-	-
酪素水解 (Casein hydrolyze)	+	+	吲哚 (Indole)	-	-	葡萄糖氧化/发酵 (Glucose oxidation /fermentation)	-	-
甲基红 M. R.	-	-	V. P.	-	-	淀粉酶 (Amylase)	+	+

2.4 环境因子对拮抗菌 J-10 的胞外产物抑菌活性的影响

2.4.1 培养时间 从图 3 可以看出该菌株在培养 48 h 之后抑菌活性开始上升,在 72 h 抑菌活性达到最大值,之后抑菌活性开始下降,到 108 h 时抑菌活性消失,因此,该菌株的最佳培养时间以 72 h 为最好。

2.4.2 pH 从图 4 可以看出,在 pH 3~9 时,拮抗菌 J-10 的胞外产物的抑菌活性随着 pH 的升高而增加,在 pH 9 时抑菌活性最强,之后抑菌活性稍微有所降低,在 pH 11 时仍然保持较高的抑菌活性,抑菌活性在 pH 5~11 时变化不大,说明拮抗菌 J-10 的胞外产物的抑菌活性对 pH 值的变化不敏感。

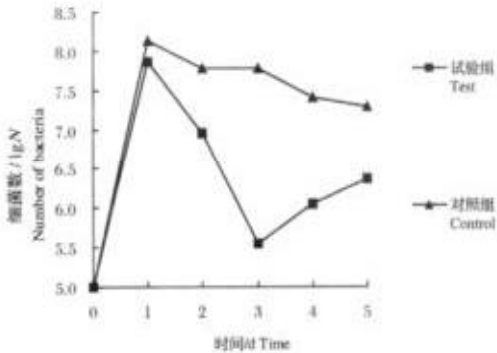


图 1 拮抗菌 J-10 对鳃弧菌的抑菌作用
Fig. 1 Antagonistic activities of antagonistic bacterium J-10 against *V. anguillarum*

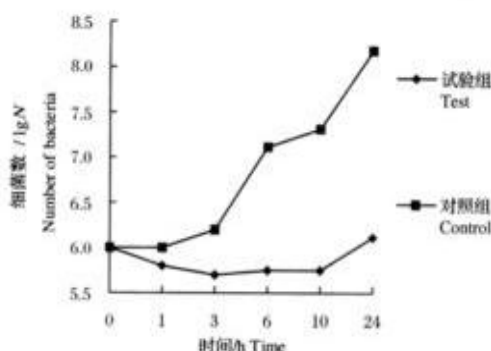


图2 拮抗菌J-10的胞外产物对鳃弧菌的抑菌作用曲线

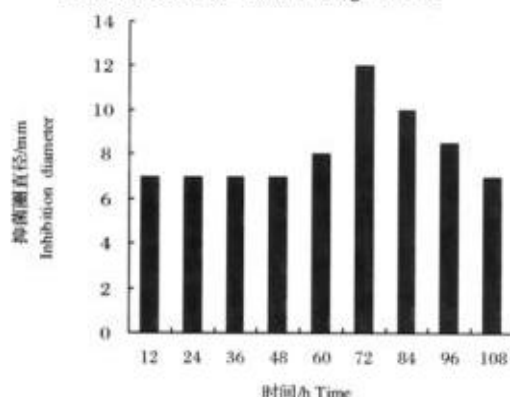
Fig.2 Inhibitory curve of extracellular products of antagonistic bacterium J-10 on *V. anguillarum*

图3 培养时间对拮抗菌J-10的胞外产物抑菌活性的影响

Fig.3 Effect of cultural time on inhibitory activity of extracellular products of antagonistic bacterium J-10

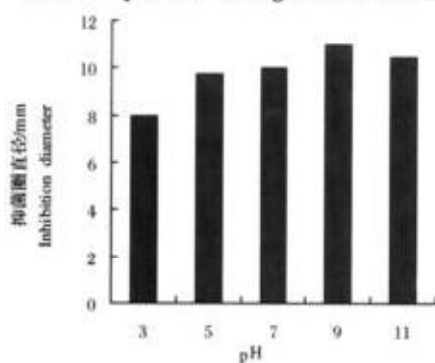


图4 pH对拮抗菌J-10的胞外产物抑菌活性的影响

Fig.4 Effect of various pH on inhibitory activity of extracellular products of antagonistic bacterium J-10

2.4.3 温度 由图5可以看出,拮抗菌J-10的胞外产物的抑菌活性在4~28℃比较稳定,抑菌活性

几乎没有变化,而且较高,40℃作用2h抑菌活性略微有所降低,而在60℃作用1h,80℃作用30min,100℃作用10min均能使其抑菌活性消失,说明该菌株的胞外产物对热敏感。

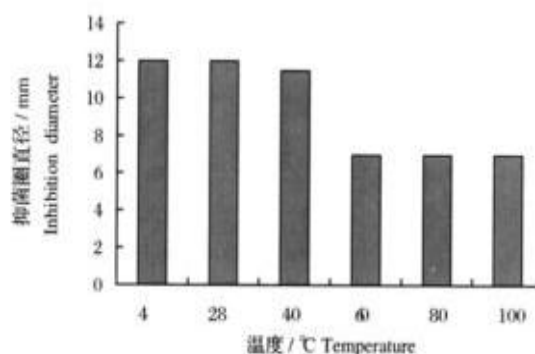


图5 温度对拮抗菌J-10的胞外产物抑菌活性的影响

Fig.5 Effect of temperature on inhibitory activity of extracellular products of antagonistic bacterium J-10

2.4.4 盐度 从图6可以看出,随着盐度的增加,拮抗菌J-10的胞外产物的抑菌活性逐渐降低,在盐度为0~30时抑菌活性较强,之后下降较快,但是在盐度为50时仍然具有抑菌活性,其作用机制可能是NaCl改变了细胞外膜的通透性,使抑菌物质不易进入细胞内起作用。

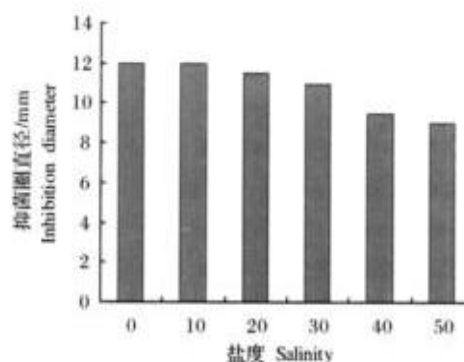


图6 盐度对拮抗菌J-10的胞外产物抑菌活性的影响

Fig.6 Effect of various salinity on inhibitory activity of extracellular products of antagonistic bacterium J-10

2.4.5 Fe^{3+} 浓度 由图7可以看出,在0~200 $\mu\text{mol/L}$ 时铁离子浓度的增加明显地促进了鳃弧菌的生长,但是增加到300 $\mu\text{mol/L}$ 时生长反而下降,说明过量的铁离子会抑制鳃弧菌的生长,上述情况

也表明铁离子会使拮抗菌 J-10 的胞外产物的抑菌活性受到抑制。

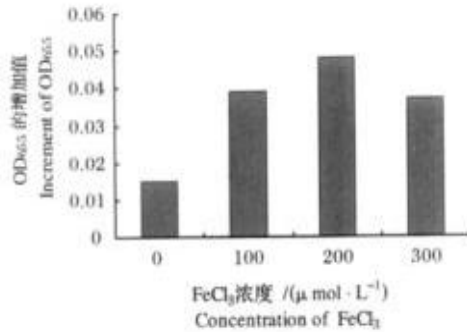


图7 铁离子对拮抗菌 J-10 的胞外产物抑菌活性的影响

Fig. 7 Effect of various concentration of FeCl₃ on inhibitory activity of extracellular products of antagonistic bacterium J-10

2.4.6 蛋白酶 K 结果显示,对照组抑菌圈直径的平均值为 12 mm,试验组抑菌圈直径的平均值为 11.9 mm,经检验,两者没有显著差异 ($P > 0.05$, t 检验),说明蛋白酶 K 对拮抗菌 J-10 的胞外产物的抑菌活性没有影响,拮抗菌 J-10 产生的抑菌物质对该酶不敏感。

2.5 拮抗菌 J-10 胞外产物的性质分析

从图 8 可以看出,拮抗菌 J-10 的胞外产物为一组蛋白质,分子量分别为 46 kD 和 53 kD。

3 讨论

目前已经报道的具有抑菌作用的海洋细菌主要有交替单胞菌 (*Alteromonas*)、弧菌 (*Vibrio*)、假单胞菌 (*Pseudomonas*)、气单胞菌 (*Aeromonas*)、芽孢杆菌 (*Bacillus*)、黄杆菌 (*Flavobacterium*) 等。王祥红^[11]等筛选出 1 株橙色交替单胞菌 A18 (*Alteromonas aurantia*) 应用于海湾扇贝育苗,降低了水体的弧菌数量,扇贝幼苗的变态率和成活率均比对照组有所提高。Sugita^[12]等分离出 1 株弧菌 (*Vibrio* sp.) 能抑制杀鱼巴斯德氏菌的生长。Chythanyal 等^[13]报道了 1 株海洋细菌假单胞菌 *Pseudomonas* 1-2 对 5 株对虾的病原性弧菌 (*Vibrio harveyi*, *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus*, *V. damsela* and *V. vulnificus*) 的抑菌作用。Sugita 等^[12]从鱼体分离出 1 株芽孢杆菌 (*Bacillus* spp.) 能抑制该鱼体肠道中 63% 的细菌生长。Gibson^[13]等将 1 株中间气单胞菌 (*Aeromonas media*) 应

用于太平洋牡蛎养殖中控制弧菌 (*Vibrio tubiashii*) 的生长。本试验筛选到的菌株 J-10 归属于微球菌属,由于水产微生态制剂的研究时间还比较短,相信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。

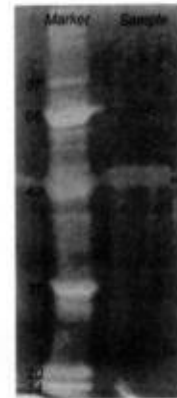


图8 拮抗菌 J-10 胞外产物的 SDS-PAGE

Marker 为标准蛋白;Sample 为拮抗菌 J-10 的胞外产物

Fig. 8 SDS-PAGE of extracellular products of antagonistic bacterium J-10

Marker is standard protein. Sample is extracellular products of antagonistic bacterium J-10.

本实验用十字交叉法与点种法相结合的方法筛选筛选出 6 株具有拮抗活性的菌株,用平板扩散法筛选出 4 株具有拮抗活性的菌株,说明筛选方法会影响筛选结果。筛选和研究微生物胞外的抗菌性物质的方法很多,一般用十字划线法先筛选出可能具有抗性作用的菌株,然后再用扩散法,如牛津杯法或打孔方法进一步研究抗菌物质的活力。莫照兰等^[14]采用点种法筛选拮抗菌,证实该方法不仅可观察到拮抗菌通过分泌抗性物质产生的抑菌区,还可观察到具有生长优势的细菌的拮抗作用。本实验也证明了这一点。用平板扩散法只筛选出 4 株拮抗菌,其原因可能是菌液的点样量少,产生的抑菌物质少,不足以抑制病原菌的生长。但是,该方法可以定量比较拮抗菌抑菌活性的强弱,而且操作简便。因此,在筛选和研究微生物时应根据研究目的采用适当的方法。另外,在研究中发现,细菌的培养时间、病原菌在平板上的涂布量对筛选结果均有影响。由于实验菌株的生长速度不同,一般的细菌应培养 18~24 h,生长慢的细菌应培养 48 h 再测试,病原菌在平板上的涂布量应尽量薄,菌液浓度以 $5 \times 10^6 \sim$

5×10^7 CFU/mL 为好。

本实验中拮抗菌 J-10 在培养 24 h 后才表现出对鳃弧菌的拮抗作用,其原因可能是拮抗菌 J-10 与鳃弧菌相比不具备生长竞争优势,或者是其产生的抑菌物质少,还不足以抑制鳃弧菌的生长,之后随着积累的抑菌物质的增加使鳃弧菌的数量开始下降,说明起抑菌作用的是胞外活性物质。由于拮抗菌的作用机理比较复杂,目前研究报道集中于产生细菌素、抗生素、蛋白酶类或改变环境 pH 等方面,因此有关拮抗菌的抑菌动态还需进一步研究。

拮抗菌 J-10 的胞外产物在最初的 10 h 能抑制甚至杀灭一部分细菌,24 h 后鳃弧菌的细菌数开始增加,这种现象可能是因为作用于敏感细胞的抑菌物质减少,或是抑菌物质的活力随时间和环境的变化而降低,这两者直接或间接地减弱了抗性物质对病原菌的作用,最终使病原菌生长繁殖起来^[15]。通过研究拮抗菌 J-10 胞外产物抑菌活性的影响因子发现,该菌株的抑菌成分对热敏感,对酸碱不敏感,过高的 NaCl 能使其抑菌活性降低,蛋白酶 K 对其抑菌活性没有影响,经 SDS-PAGE 分析,该菌株产生的抑菌物质是蛋白质。 Fe^{3+} 能使其抑菌活性受到抑制,其作用机制可能是阳离子结合于原生质膜中带负电荷的磷脂上,中和其负电荷,使得磷脂紧密,从而增加了原生质膜的刚性^[16-17]。细菌产生的具有蛋白质特性的杀菌作用的物质称作“细菌素”(bacteriocin)。莫照兰等^[18]的研究结果表明拮抗菌 QJ2 的胞外物质对热不敏感,具有较好的热稳定性,与本研究结果不同,其原因可能是菌株的来源不同导致其抗菌物质的性质差异。

Smith 等^[16]报道 1 株荧光假单胞菌能减少由杀鲑气单胞菌引起的疾病;Austin 等^[1]也有类似发现,溶藻弧菌能抑制鳃弧菌和杀鲑气单胞菌的生长。拮抗菌 J-10 对许多病原性弧菌都有很好的拮抗作用,运用微生物之间的相互作用可以有效地控制养殖环境中的病原菌^[6]。因此,该菌株在控制鱼虾的病原性弧菌有潜在的应用价值。有关拮抗菌 J-10 在养殖对虾中的应用效果及使用方法正在研究之中。

参考文献:

- [1] Austin B, Stuckey L F, Robertson P A W, et al. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing disease caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii* [J]. J Fish Dis, 1995, 18(1): 93-96.
- [2] Gatesoupe F J. The use of probiotics in aquaculture [J]. Aquaculture, 1999, 180: 147-165.
- [3] 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.
- [4] Gatesoupe F J. Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae *Scophthalmus maximus*, against pathogenic vibrio [J]. Aquat Living Resour, 1994, 7: 227-282.
- [5] Riquelme C, Araya R, Vergara N, et al. Potential probiotic strains in culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819) [J]. Aquaculture, 1997, 154: 17-26.
- [6] Smith P, Davey S. Evidence for competitive exclusion of *Aeromonas salmonicida* from fish with stress induced furunculosis by a fluorescent pseudomonad [J]. J Fish Dis, 1993, 16(6): 521-524.
- [7] 布坎南 R E, 基本斯 N E, Cowan S T, 等. 伯杰细菌鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 1984.
- [8] 张纪忠. 微生物分类学 [M]. 上海: 复旦大学出版社, 1990.
- [9] 范秀荣, 李广武, 沈 萍. 微生物学实验 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1980.
- [10] Sugita H, Hirose Y, Matsue N, et al. *Vibrio* sp. strain NM 10, isolated from the intestine of a Japanese coastal fish, has an inhibitory effect against *Pasteurella piscicida* [J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64: 231-237.
- [11] 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.
- [12] Sugita H, Hirose Y, Matsue N, et al. Production of antibacterial substance by *Bacillus* spp. Strain NM12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish [J]. Aquaculture, 1998, 165: 269-280.
- [13] 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.
- [13] Chythanyal R, Indrani K, Iddya K. Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine pseudomonas 1-2 strain [J]. Aquaculture, 2002, 208: 1-10.
- [14] 莫照兰, 俞 勇, 李会荣, 等. 弧菌拮抗菌的筛选 [J]. 青岛海洋大学学报, 2001, 31(2): 225-231.
- [15] Ringo E, Gatesoupe F J. Lactic acid bacteria in fish: a review [J]. Aquaculture, 1998, 160: 177-203.
- [16] Abee T, Rombouts F M, Hugenholtz J, et al. Model of action of Nisin Z against *Listeria monocytogenes* Scott A grown at high and low temperatures [J]. Appl Environ Microbiol, 1994, 60: 1962-1968.
- [17] Grandall A D, Montville T J, Nisin. Existence in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype [J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64: 231-237.

[1] Austin B, Stuckey L F, Robertson P A W, et al. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing disease caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii* [J]. J

Selection and effect of vibrios-antagonism bacteria

ZHANG Xin-ming^{1,2}, LI Jian¹, LIU Qi¹

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Fishery College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: A total of 219 marine bacterial strains isolated from the intestine of healthy fish, shrimp and aquatic environment were examined for their inhibitory activities by using cross-streaking method, dot-inoculating method and scrip diffusion assay on 2216E plates. Four pathogenic vibrios *Vibrio anguillarum*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio campbelli* and *Vibrio natriegen* were used as indicating strains. Six strains were selected by using cross-streaking method, dot-inoculating method by their inhibitory activities to four indicating strains, while four strains were selected by using scrip diffusion assay. This showed that selecting methods could affect selecting results, and we should accept appropriate method according with different selecting purpose. Antagonistic bacterium J-10 showed the highest inhibitory activity in the six selected strains, and the evident clear zones were observed around the pathogenic bacteria, so it was chosen as an active strain. Inhibitory activities of antagonistic bacterium J-10 and its extracellular products (ECP) against pathogenic *Vibrio anguillarum* were tested by viable bacteria counts, and the influence factors were studied by plate diffusion assay. The results showed that J-10 indicated antagonistic action against *Vibrio anguillarum* after 24 h in the mixture culturing system. The bacterial counts of the test group decreased to a minimum at day 3, the number of *Vibrio anguillarum* reducing by 2 logarithm (lg) orders of magnitude than the first day, while the number of the control group kept the number of the first day in day 2 to day 5. This indicated that antagonistic bacterium J-10 could strongly inhibit the growth of *Vibrio* in the mixture culturing system. The ECP of bacterium J-10 could well inhibit the growth of *Vibrio anguillarum*. The bacteria counts of *Vibrio anguillarum* of the test group began to decrease in 1 h, decreasing to a minimum in 3 h, keeping invariableness in 3-10 h, and the numbers of bacteria began to increase 10 h later, while the bacterial number of the control group kept increasing trend all the while. The selecting results could be influenced by incubating time of the test strains and the inoculating dose of the pathogenic vibrios. It was proper to incubate 18-24 h for common test bacteria and for growing slowly strains, which should be incubated for 48 h, and $5 \times 10^6 - 5 \times 10^7$ CFU/mL is the appropriate dose for the pathogenic vibrios inoculating on 2216E plates. This bacterium J-10 efficiently produced an antibacterial substance when incubated for 72 h. The ECP was sensitive to heat, and the inhibitory activity did not exist after treated at 100 °C for 10 min or 80 °C for 30 min; it was not sensitive to various pH that the inhibitory activity had no remarkable difference from pH 5 to pH 11; it was not sensitive to proteinase K; the adding of Fe^{3+} could weaken the inhibitory activity of the ECP and promote the growth of *Vibrio anguillarum*, which indicated that the growth of *Vibrio anguillarum* need Fe^{3+} . The ECP had higher inhibitory activity at salinity 0-30. The results showed that the extracellular products of antagonistic bacterium J-10 was a protein-like substance. And strain J-10 was identified as *Micrococcus luteus* by morphological character, traditional physiological and biochemical method. This marine bacteria J-10 could antagonism the growth of many vibrios, so it has potential applications for control of pathogenic vibrios in aquaculture systems.

Key words: antagonistic bacterium; selection; *Micrococcus luteus*; inhibitory activity; extracellular products

Corresponding author: LI Jian. E-mail: lijian@ysfri.ac.cn