

大黄鱼病原弧菌拮抗菌筛选

邹文政, 鄢庆枇, 林文雄, 纪荣兴

(集美大学水产学院 厦门 361021)

摘要:用平板涂布法从集美海边分离到 381 株细菌,用平板划线法或点种法检验这些海洋细菌对两株病原弧菌(副溶血弧菌(*Vibrio Parahaemolyticus*)和溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*))的拮抗作用。从中挑选 2 株对海水养殖动物病原弧菌有较好拮抗作用的细菌,编号为 GX75 和 GZ46。对拮抗菌 GX75 和 GZ46 进行了抗菌谱测定,结果表明,GX75 对 9 株指示菌中的副溶血弧菌、河流弧菌和坎普氏弧菌有较好的拮抗作用,GZ46 对副溶血弧菌、溶藻弧菌和坎普氏弧菌有较好的拮抗作用。在营养肉汤中,测定了 GX75 和 GZ46 的抗菌作用,表明 GX75 和 GZ46 对副溶血弧菌拮抗作用很明显。

关键词:抗菌谱;病原性弧菌;溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*);副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*);拮抗作用

中图分类号 S941.42 文献标识码 A 文章编号 1000-3096(2004)03-0005-05

弧菌是危害水产养殖动物的主要病原菌。病原性弧菌的侵袭已经成为经济鱼、虾、蟹、贝类死亡的重要原因。在一般情况下,人们常用各种抗生素药物来抑制疾病的产生与防治。然而,如果抗生素使用不当,往往会破坏水体中的微生态平衡,导致耐药微生物的增加,并使鱼体产生药源性器官损伤^[1]。随着养殖业的迅速发展和我国加入 WTO,人们开始重视用生态方法控制鱼病的发生。近年来,微生物的不断开发和运用,把微生物应用于水产养殖方面越来越受到人们的重视和青睐。例如:用微生物投喂水产养殖动物,微生物用于水产养殖动物疾病的防治,微生物制剂和微生物水质改良剂等。为减少一些抗生素和化学制剂的使用,欧美许多国家也已经开始利用微生物的一些相互作用来控制水产病害的发生。例如:一些细菌和微生物可以在环境中分泌抗生素,能很快地杀死其他的微生物^[2];有的细菌能产生抗菌素^[3-4],杀死与其亲缘关系较近的种;也有的菌在生态系统中是优势种,是营养竞争的胜利者^[5],如酵母菌、光合细菌、乳酸杆菌和假单胞菌。本研究旨在从养殖水体中筛选出对某些病原弧菌具有明显拮抗作用的海洋细菌,为建立有效的养殖动物防病体系提供参考。

1 材料和方法

1.1 菌株

1.1.1 病原弧菌

溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)和副溶血弧菌(*Vibrio Parahaemolyticus*),由本实验室分离于患病大黄鱼。

1.1.2 其它指示菌

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),坎普氏弧菌(*V. campbellii*),河流弧菌(*V. fluvialia*),沙蚕弧菌(*V. neresis*),嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*),大肠杆菌(*Escheria coli*)均购自中科院微生物研究所。

收稿日期 2002-11-18;修回日期 2003-05-18

基金项目:集美大学校基金资助项目;福建省科技资助项目(2000Z080)

作者简介:邹文政(1975-),男,江西乐安人,助理实验师,从事水产养殖动物疾病防治的研究,电话:0592-6180522,13306010828,E-mail:azhzhou@sohu.com

1.1.3 实验菌株

在整个实验过程中,总共分离了 381 株细菌用于拮抗菌的筛选,这些细菌来自厦门集美海边。水样的采集地点附近有一污水处理厂和一些贝类养殖场。

1.2 实验菌株的分离

先用无菌的采样瓶从海边采集水样,采样水深为 10 cm 水层以下。细菌用稀释平板法进行分离,倒置于 30 ℃ 培养箱中培养 24 h 后,把分离出的单个菌落用接种环接种到海水培养基平板上,放于 30 ℃ 培养箱中扩大培养。进行再分离时,平板先用笔画上方格并编号,每一株菌接于一个方格内。

1.3 拮抗菌的筛选

用一定量的无菌生理盐水将活化后的 2 株病原弧菌(溶藻弧菌和副溶血弧菌)菌苔洗下,分别吸取 100 μL 加入海水培养基平板上进行涂布。然后用接种环分别刮取已扩大培养 24 h 的待测菌少量,在平板上点种^[6],每一株菌点种于平板上画线即方格的交叉处,标上相应编号,于 48 h 内观察点种区附近是否出现有明显的抑菌透明区域或覆盖区域。

1.4 拮抗菌的抗菌谱

采用上述方法测定已筛选出的拮抗菌对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、嗜水气单胞菌、沙蚕弧菌、河流弧菌、坎普氏弧菌、副溶血弧菌和溶藻弧菌 9 株指示菌的拮抗作用。

1.5 拮抗菌的抗菌活力测定

先把筛选到的拮抗菌接种到 TCBS 培养基上看是否生长,如不生长,即可以进行以下实验:将病原弧菌和拮抗菌分别制成菌悬液,把副溶血弧菌和溶藻弧菌菌液各取 1 mL 各加入 3 个装有营养肉汤的锥形瓶中,再把拮抗菌菌液加入两个加有副溶血弧菌及两个加有溶藻弧菌的锥形瓶中,每瓶加 1 mL(即两个平行组,一个对照组),放于 30 ℃ 培养箱中培养。分别于 0, 6, 12, 24, 36, 48 h 6 个不同时间段,用平板菌落计数法在 TCBS 培养基平板上测定每个瓶中副溶血弧菌或溶藻弧菌的活菌浓度。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌的筛选结果

共分 5 次从海水中筛选拮抗菌,分别编号为 FX1—FX58, GX1—GX100, HZ1—HZ53, IX1—IX113, IZ1—IZ57, 共 381 株。其中编号为 GX75 和 GZ46 的 2 株菌能够抑制副溶血弧菌的生长,在病原菌周围产生明显的抑菌(图 1)。

2.2 抗菌谱

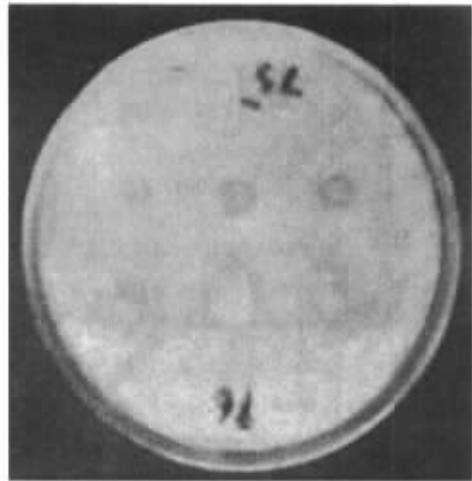


图 1 GX75 和 GZ46 对副溶血弧菌的拮抗作用

Fig.1 The antibiosis of isolates 75 and GX75 and

GZ46 on *Vibrio parahaemolyticus*

GX75 对 9 株菌中的副溶血弧菌、河流弧菌、坎普氏弧菌具有拮抗作用。GZ46 对 9 株弧菌中的溶藻弧菌、副溶血弧菌、坎普氏弧菌具有拮抗作用,而且它们对副溶血弧菌和坎普氏弧菌的拮抗作用都很显著(图 1,图 2)。



图 2 GX75 和 GZ46 对坎普氏弧菌的拮抗作用

Fig.2 The antibiosis of isolates GX75 and GZ46 on *V. campbellii*

2.3 拮抗菌在培养液中抗菌活力的测定结果

6 个时间段 6 瓶培养液中指示菌的浓度检测结果如图 3,4,5,6 所示。

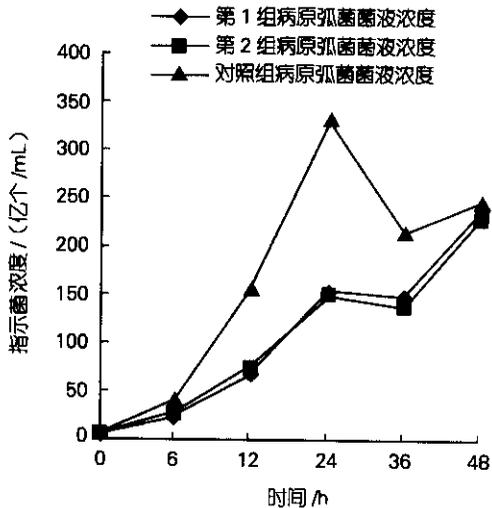


图3 GX75对副溶血弧菌的拮抗作用

Fig.3 The antibiosis of GX75 on *V. parahaemolyticus* in nutrient broth

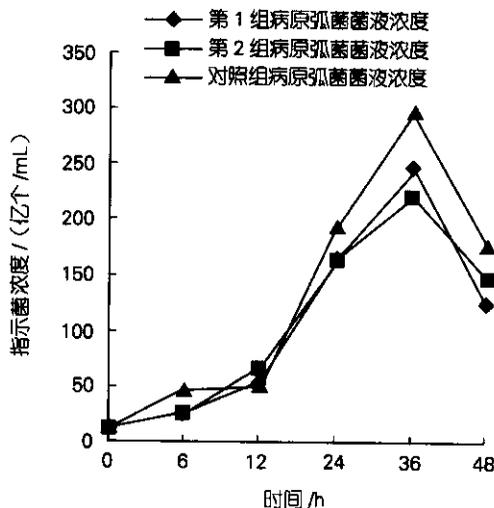


图4 GX75对溶藻弧菌的拮抗作用

Fig.4 The antibiosis of GX75 on *V. alginolyticus* in nutrient broth

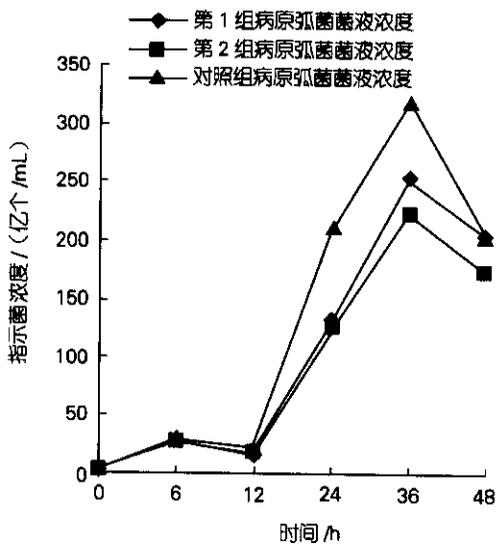


图5 GZ46对副溶血弧菌的拮抗作用

Fig.5 The antibiosis of GZ46 on *V. parahaemolyticus* in nutrient broth

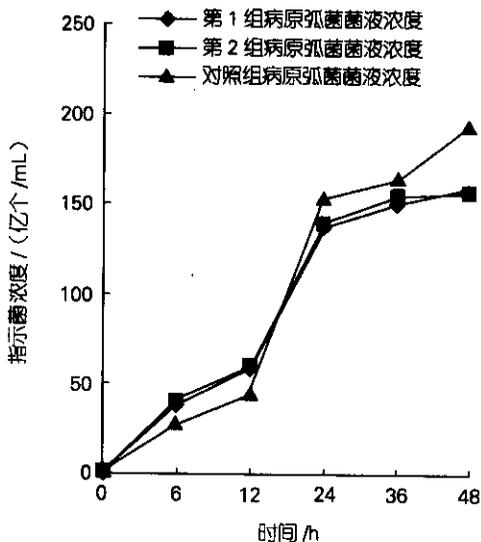


图6 GZ46对溶藻弧菌的拮抗作用

Fig.6 The antibiosis of GZ46 on *V. alginolyticus* in nutrient broth

细菌的生长曲线可以分为4个时期:延滞期、对数期、稳定期和衰亡期^[7]。从图3和图5看,副溶血弧菌的对数生长期为6~24h;而从图4和图6中可看出,溶藻弧菌的对数生长期为12~24h。

图3显示,从第6小时就开始,加有拮抗菌GX75

的副溶血弧菌浓度曲线上升幅度缓慢,而对照组的副溶血弧菌浓度曲线则上升很快,说明GX75的拮抗作用很显著。在第36小时,副溶血弧菌的生长曲线有一个明显的下凹,这可能是由于对照组中细菌浓度过大,培养基营养消耗过多,菌的衰亡较快所引起的。而

加有 GX75 的指示菌生长曲线在第 36 小时也有一个下降,这可能是由于拮抗菌在第 36 小时大量生长分泌拮抗物质,对溶藻弧菌产生较大的抑制而引起的图 4 显示, GX75 对溶藻弧菌生长周期中的各环节的拮抗作用也较为显著,尤其在 12 h 后。

从图 5 中可以看到从第 12 小时起,加有 GZ46 的指示菌浓度曲线上升幅度比对照组小很多。从抗菌谱的实验所得到的数据表明, GZ46 对溶藻弧菌也具有一定的拮抗性。但是我们从图 6 中却看不到这样的结果。GZ46 对溶藻弧菌的拮抗作用在营养肉汤中并没有表现出来。这可能是由于拮抗菌在不同的培养条件下所分泌的拮抗物质或分泌的量的多少有差异,或抑菌物质在菌体内的表达不同而引起的^[8]。此外,也可能是由于刚开始所加入的 GZ46 的菌液浓度相对较稀,因此,在刚开始时, GZ46 的抑菌作用很弱,随着 GZ46 的不断增加,拮抗作用也随着加强。

3 讨论

拮抗作用是微生物中一种常见的种间关系。它是指一种微生物在生长过程中通过某种代谢产物或改变生活环境来抑制其它微生物的生长发育,甚至杀死它们的现象^[7]。微生物间的拮抗机理目前认为是:产生有机酸, 抗生素(菌)素及过氧化氢等物质,对病原细菌的抑制作用,占位作用,对营养,氧气的竞争,从而对病原弧菌的排斥^[9]。生物防治的手段之一就是水体中的拮抗微生物限制病原生物的生长和数量,使有害菌的浓度低于致病浓度,从而达到防治疾病的目的。

作者参考了青岛海洋大学俞勇等人的方法,并对其进行了一定的改良。首先,把从海水中分离的单个菌落接种到画有方格的平板上扩大培养,之后再点种到涂布了指示菌的平板方格交叉处检验它的拮抗性。这样作不但能有效的分离待测菌、减少工作量和药品的使用,而且在方便了操作的同时也可以观察到拮抗菌通过分泌拮抗物质所产生的抑菌圈大小。在对 381 株菌进行检测的过程中,只分离到 2 株有较好拮抗性的菌株。从以往的研究可知道海水中有 11% 的细菌可以分泌不同的拮抗物质^[10]。但是可能由于待测菌的来源、细菌分泌的抗性物质的类型、量的多少和浓度等,细菌所分泌并释放到培养基上的抗性物质对病原菌的抑制作用皆有所差异;就同一株菌而言,在不同的生长条件如:PH 值、盐度、温度、培养基的成分等,产生的抗性物质都有所不同。

本研究完全是在实验室中进行的,这就意味着菌的筛选并非是在海洋细菌原来的生长环境下。前面提

到,细菌在不同的生长条件下,拮抗菌所分泌的拮抗物质或分泌拮抗物质的多少都有所差异^[3]。因此,此次从 381 株菌中所筛选到的 2 株拮抗菌只能说明在实验室条件下,它们具有较好的拮抗性,但在自然条件下,它们对以上 2 株病原弧菌会不会有同样的拮抗作用,有待进一步的探讨研究。

目前,养殖业生产中疾病频发,如何更有效地利用拮抗微生物的抗菌作用来抑制病原微生物的生长,减少抗生素的使用,降低水产品体内药物的残留以及保护生态环境,使得养殖业处于一个良性、健康、稳定的发展,可以说是生物防治手段中的有效措施之一。本实验对大黄鱼病原菌的拮抗微生物进行了较基础的研究,如何进行养殖应用以及拮抗菌的生理生化特征及其生长动力学,在养殖上的定值原理和模式,拮抗物质产生的途径和机理等有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] 潘康成,徐静. 有益芽孢杆菌对 4 株病原细菌的体外拮抗实验[J]. 中国兽医杂志, 1997, 23(11): 13-14.
- [2] Willian D. Antibiotic production by marine microorganisms [J]. **Journal of Biology**, 1947, 54: 393-398.
- [3] Padilla C. Inhibition of the growth of enteropathogenic bacilli by bacteriocins produced by micro-organisms from the sediment of wells[J]. **Journal of Applied Bacteriology**, 1990, 68: 289-295.
- [4] Mathieu F. Mesenterocin 52, a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *Mesenteroides* FR 52[J]. **Journal of Applied Bacteriology**, 1993, 74: 372-379.
- [5] Austin B. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing disease caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii* [J]. **Journal of Disease**, 1995, 18: 93-96.
- [6] 莫照兰,俞勇. 弧菌拮抗菌的筛选[J]. 青岛海洋大学学报, 2001, 33(2): 225-231.
- [7] 周德庆. 微生物学教程[M]. 北京:高等教育出版社, 1993. 273-278.
- [8] 郑爱萍,李平等,王玲霞,等. 水稻纹枯病拮抗细菌的筛选及抗性研究[J]. 西南农业学报, 2001, 14(1): 78-81.
- [9] 鄢庆彬,王军,苏永全,等. 大黄鱼病原弧菌拮抗放线菌的筛选与人工诱变[J]. 台湾海峡, 2002, 21(2): 187-192.
- [10] Austin B, Billaud A C. Inhibition of the fish pathogen, *Serratia liquefaciens*, by an antibiotic-producing isolate of planococcus recovered from sea water[J]. **Journal of Fish Disease**, 1990, 13: 553-556.

Selection of antagonism bacteria on pathogenic *Vibrio*

ZOU Wen – zheng, YAN Qing – pi, LIN Wen – xiong, JI Rong – xing
(Fisheries college, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Received: Nov., 18, 2002

Key words : antibiotic spectrum; pathogeny *Vibrio*; *Vibrio alginolyticus*; *Vibrio parahaemolyticus*; antagonistic

Abstract : 381 strains of bacteria were isolated from Jimei seawater by dilution – plate method. The inhibitory activities of the isolates on two strains of Pathogenic vibrio were measure. Two isolates with strong inhibitories (GX75 and GZ46) were selected for antibiotic spectrum. The results showed that GX75 has strongly antagonistic to *V. Parahaemolyticus*, *V. fluvialia* and *V. campbellii*, GZ46 was strongly antagonistic to *V. Parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* and *V. campbellii*. The inhibitory activities of the two strains was measured when they were cultured in nutrient broth. The experiment showed that two isolates could inhibit *V. Parahaemolyticus* significantly.