

湖光岩拮抗菌的研究*

丁 燊 简纪常 吴灶和 柏莉莉 刘剑峰 林 丹 余 军

(广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室 广东海洋大学水产学院 湛江 524025)

提要 采用涂布法、划线分离法以及形态学和生理生化特性分析,对湛江湖光岩微生物进行了分离纯化及部分性质研究;同时用平板菌落计数法对其异养细菌、真菌和弧菌等的数量进行初步统计。采用牛津杯法,对拮抗细菌进行筛选和培养特性研究。结果表明,微生物数量与种类在水平分布上具有显著差异。底泥异养菌总量为 $(1.3-8.6) \times 10^8$ cfu/g,真菌总量为 $(0.1-5.7) \times 10^7$ cfu/g。而水体细菌总量为 $(0.5-6.7) \times 10^5$ cfu/ml,真菌总量为 $(0.4-1.1) \times 10^3$ cfu/ml。共分离纯化到 148 株细菌,经筛选发现 16 株细菌对溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)具有明显的抑制作用,占细菌总数的 10.8%,其中菌株 DH078 和 DH113 对溶藻弧菌的拮抗作用最明显。结果还表明,细菌 DH078 在营养肉汤中培养 4d 抑菌活性最强,其产生抗菌活性物质的最佳条件是稀释 2 倍的营养肉汤、蛋白胨 0.6%、牛肉膏 0.6%、酵母膏 0.2%、盐度 0 和 pH 7.0。可见湖光岩微生物资源较为丰富,本研究可为保护和充分开发利用湖光岩微生物提供科学依据。

关键词 湖光岩(玛珥湖),微生物,拮抗菌,培养条件,筛选

中图分类号 Q935, Q939.9

湖光岩是世界罕见的两个玛珥湖之一(另一个在德国玛珥地区),位于广东省雷州半岛湛江市西南部(110°17' E, 21°9' N),是国家 4A 级旅游风景区。玛珥湖是由一种封闭式特殊类型火山口形成的火山湖,具有极高的科学价值。自 1996 年以来,湖光岩已列入国家自然科学基金(49772173)和国际“欧亚玛珥湖”研究计划等项目,并已取得重大的科研成果。地质学家从其沉积物了解到整个地球的环境变化(吕厚远等, 2003),为目前地球环境保护提供了重要的科学依据。不仅如此,湖光岩在生物学角度的研究也应该引起足够的重视。众所周知,各种环境中微生物资源的开发利用促进了社会的发展与人类的进步,微生物及其代谢物已占据食品、农牧、环保、养殖、医药等行业的制高点,带来了巨大的社会效益和经济效益(刘志鸿等, 1998)。而新微生物资源的开发与应用,是推动微生物应用及微生物学技术进一步发展的有力保证,也是微生物资源研究逐步深入的必然要求。湖光岩具有其特殊性,如无外源污染,可以尽可能保留土

著物种;地质年代久远,可能存在古老生物,尤其是微生物;湖光岩水质清澈,且具有神奇的自我净化功能(廖乃钦, 2002)。正因其生态环境较为特殊,在其湖水和底泥中理应存在一定独特的微生物类型,具有较好的研究前景和研究价值。

对湛江湖光岩(玛珥湖)的微生物进行分析和探讨,加强其独特微生物类群的研究,如高效拮抗菌或能够产生特殊代谢产物的细菌等,其开发前景十分可观;同时,还可以从微生态角度解释其水质净化之迷,对水产养殖业水环境的处理与恢复具有极大的借鉴意义。目前,不同来源拮抗菌的筛选与利用已受到各国科学工作者的广泛关注,尽管其他来源(包括海洋环境)的拮抗菌筛选已进行了较多的工作,并取得了较大的进展(陈营等, 2003; 邹文政等, 2004; 李槿年等, 2005),但对于湖光岩微生物资源的研究与开发,在国内外尚属空白,湖光岩拮抗细菌的研究更是未见相关报道。本研究中拟对湖光岩微生物进行初步分析,并对其拮抗菌进行筛选与特性研究,以期能够

* 广东省科技计划资助项目, 2006A20301003 号; 广东海洋大学自然科学基金资助项目, 0612050 号、0612190 号。丁 燊, 博士, 副教授, E-mail: dingy@gdou.edu.cn、dingyudd@163.com

收稿日期: 2008-03-29, 收修改稿日期: 2008-05-30

应用于水产养殖病害的生物防治,为后续的深入研究与开发利用打下良好的基础。

1 材料与方法

1.1 样品的采集

2005年11月2日,在湖光岩沿湖用采泥器与采水器分别取泥样与水样,装于无菌广口瓶中,送回实验室立即处理,剩下样品冷藏(-20℃)备用。采样点具体为:A.东大门点,呈泥质;B.滑水比赛点,呈沙泥质;C.楞严寺点,呈沙质。

1.2 菌种与培养基

溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*),广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室保存;营养肉汤培养基、高氏1号培养基、马铃薯培养基(PDA)、TCBS培养基、2216E培养基、TSA培养基等,购于北京陆桥医学生物技术中心。

1.3 方法

1.3.1 微生物数量测定 采用稀释涂布法分别测定总异养菌(培养基为TSA)、真菌(培养基为PDA)、放线菌(培养基为高氏1号)、弧菌(培养基为TCBS)等的数量。

1.3.2 细菌的分离纯化 采用平板划线分离法,培养基为牛肉膏蛋白胨培养基(王镇等,1995)。对1.3.1中得到的细菌菌落,根据其特征挑取不同的单菌落反复划线纯化,得到纯培养物。并对各纯培养物的菌落进行观察;对纯培养物进行革兰氏染色。

1.3.3 拮抗菌的筛选 将各菌种分别接种于营养肉汤培养基发酵培养1周后,取发酵液用牛津杯法测定各菌种的拮抗能力,并以溶藻弧菌作为指示菌(刘冬梅等,2006)。

1.3.4 拮抗菌DH078的特性

(1) 不同培养基对拮抗活性的影响 取抑菌活性最强的细菌DH078分别接种于营养肉汤培养基和2216E培养基,于30℃振荡培养(100—120r/min)。

每天取1次样,用分光光度计于480nm测定吸光值(钱存柔等,1999),一共测7次;每2天取样,用1.3.3的方法测定培养液对溶藻弧菌的抑菌效果,一共测4次。

(2) 培养基不同组分对拮抗活性的影响 设定牛肉膏分别为0%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%;蛋白胨分别为0%、0.2%、0.6%、1.0%、1.4%、1.8%;酵母膏分别为0%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%。分别接种培养4天后,取发酵液用1.3.3的方法测定培养液对溶藻弧菌的抑菌效果。

(3) 不同培养基稀释度对拮抗活性的影响 配制6种不同稀释度的营养肉汤培养基,稀释倍数分别为1.0、1.2、1.5、2.0、3.0和4.0倍,同样培养后测定抑菌效果。

(4) pH值对拮抗活性的影响 将营养肉汤培养基的pH分别设定为6.4、6.7、7.0、7.2、7.5、8.0,接种培养后,取发酵液用1.3.3的方法测定培养液对溶藻弧菌的抑菌效果。

(5) 盐度变化对拮抗菌抑菌活性的影响 用盐度分别为0.0、2.0、3.5、5.0、6.5、8.0的营养肉汤培养基,接种培养4天后,取发酵液同1.3.3的方法测定培养液对溶藻弧菌的抑菌效果。

(6) 细菌DH078对碳源的利用能力 将培养24h的细菌DH078进行革兰氏染色、氧化酶和过氧化氢酶试验后,用Biolog细菌自动鉴定系统测定细菌对GP板中的碳源利用情况(程池等,2006)。

2 结果

2.1 微生物数量

湖光岩微生物量测定结果见表1。由表1可知,湖光岩底泥和水中生存有大量异养菌。底泥中异养菌总量为 $(1.3—8.6) \times 10^8$ cfu/g,真菌总量达 $(0.1—5.7) \times 10^7$ cfu/g。C点微生物量最大;A点弧菌数最高,达到 3.3×10^3 cfu/g;B点弧菌最少,而放线菌最多。水

表1 湖光岩微生物量
Tab.1 Microbe biomass in Huguangyan Lake

微生物类别	水样(cfu/ml)			泥样(cfu/g)		
	A点	B点	C点	A点	B点	C点
总异养菌	5.1×10^4	6.7×10^5	1.5×10^5	5.9×10^8	1.3×10^8	8.6×10^8
真菌	9.0×10^2	4.1×10^2	1.1×10^3	5.7×10^7	1.5×10^6	4.3×10^7
弧菌	10	30	20	3.3×10^3	0.1×10^3	0.3×10^3
放线菌	0	0	0	3.3×10^3	9.6×10^3	1.0×10^3

体中异养细菌总量为 $(0.5-6.7) \times 10^5$ cfu/ml, 真菌总量为 $(0.4-1.1) \times 10^3$ cfu/ml, A点微生物量最小, B点微生物量最大; 放线菌生物量为零, 弧菌生物量极少(10—30 cfu/ml)。该结果与底质相关, A点属泥质, 有机质丰富, B点属于沙泥质, C点虽属沙质, 但位于码头边, 人为污染大。

2.2 微生物的基本构成

经分离纯化, 从湖光岩得到 148 株细菌的纯培养。细菌种类较多, 经染色发现, 52%为革兰氏阴性菌, 48%为革兰氏阳性菌, 革兰氏阴性菌稍多。从细菌形态上来看, 杆菌占 77%(包括短杆菌), 球菌占 23%。细菌大小较为均匀。从菌落特征来看, 湿润菌落占 62%, 较湿润菌落占 36%, 干菌落占 2%; 不透明菌落占 66%, 半透明菌落占 27%, 透明菌落占 7%; 颜色有白色、乳白色、红色、淡黄色、黑色、绿色、橙色、灰色等。初步发现 B 点细菌种类较多, 而 A 点种类最少。此外, 真菌种类较为单一, 以霉菌居多。

2.3 拮抗菌的筛选结果

从 148 株细菌中筛选得到 16 株具有抑菌活性的细菌, 占总数的 10.8%, 其中细菌 DH078、DH113 和 DH085 对溶藻弧菌有较强的拮抗作用, 能明显抑制溶藻弧菌的生长, 且细菌 DH078 对溶藻弧菌的拮抗作用最强。

2.4 拮抗菌 DH078 的生长规律与拮抗活性

拮抗菌的生长规律与拮抗活性随时间的变化结果见图 1。由初步实验结果表明, 细菌 DH078 在营养肉汤中比其他培养基生长快, 故后续实验均以营养肉汤来培养该拮抗菌。由图 1 可知, 细菌生长规律为: 1—3 天细菌数量逐渐增多, 第 5 天达到最高峰, 之后逐渐下降, 进入衰退期。从细菌 DH078 拮抗活性来看, 第 2 天抑菌不明显, 在第 4 天抑菌活性最强, 抑菌圈平均值为 1.36 cm, 4 天后抑菌活性变化不大。因

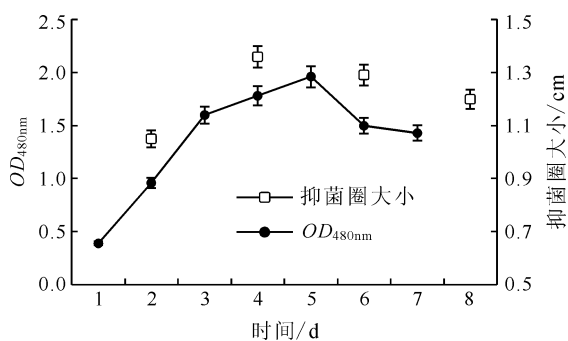


图 1 拮抗菌 DH078 的生长与拮抗活性

Fig.1 The growth and antagonistic activity of bacteria DH078

此, 在以后的抑菌试验测定中, 采取拮抗菌发酵培养 4 天后再进行测定。

牛肉膏、蛋白胨和酵母膏对细菌 DH078 产抗菌活性物质的影响见图 2。由图 2 可见, 牛肉膏对细菌 DH078 抑菌活性影响小, 抑菌活性最大时, 抑菌圈为 1.57 cm; 抑菌活性最小时, 抑菌圈为 1.28 cm, 仅相差 0.29 cm。结果还表明: 培养基中牛肉膏含量越高, 抑菌活性就越大(除牛肉膏 0.5%外)。可见, 牛肉膏 0.6%有利于细菌 DH078 抗菌活性物质的产生。蛋白胨含量对细菌 DH078 抑菌活性的影响较大, 曲线呈倒钟形, 当其浓度为 0.6%时, 抑菌活性最大, 抑菌圈

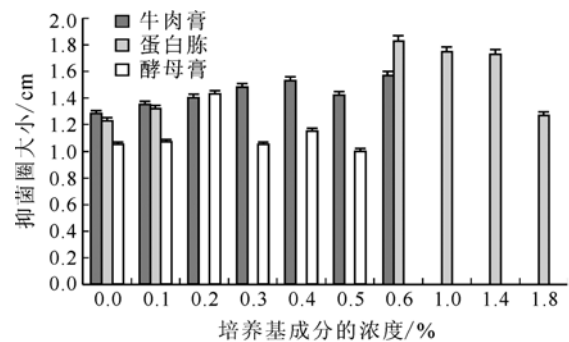


图 2 培养基成分对 DH078 拮抗活性的影响

Fig.2 The influence of medium composition on antagonistic activity of bacteria DH078

为 1.83 cm。而培养基中不含蛋白胨时, 抑菌活性最小, 抑菌圈仅为 1.23 cm。可见, 0.6%的蛋白胨有利于细菌 DH078 抗菌活性物质的产生。实验结果还显示, 酵母膏为 0.2%时, 抑菌活性最大, 抑菌圈为 1.43 cm; 抑菌活性最小时抑菌圈为 1.00 cm。可见, 0.2%的酵母膏有利于细菌 DH078 抗菌活性物质的产生。

培养基稀释度对细菌 DH078 产抗菌活性物质的影响见图 3。由图 3 可见, 稀释度为 2 倍时, 抑菌活性最大; 当稀释度高于或低于 2 倍时, 细菌 DH078 抑

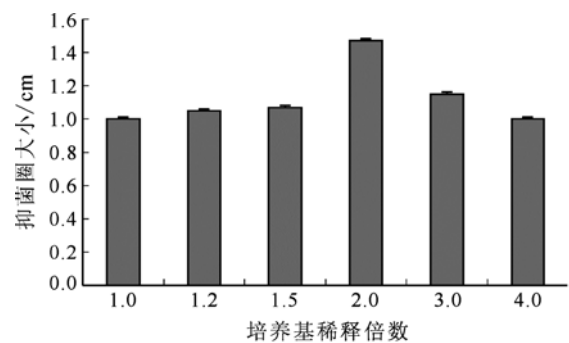


图 3 培养基稀释度对 DH078 拮抗活性的影响

Fig.3 The influence of medium concentration on antagonistic activities of bacteria DH078

菌活性逐渐减小; 稀释倍数为 4 倍时, 抑菌圈最小 (1.00 cm)。可见, 当常规营养肉汤培养基稀释 2 倍时, 有利于细菌 DH078 产生抗菌活性物质。

pH 对细菌 DH078 产抗菌活性物质的影响见图 4。由图 4 可见, 在 pH 7.0, 细菌 DH078 抑菌活性最大, 抑菌圈为 1.08 cm; 当偏离 pH 7.0 时抑菌活性越来越小, 抑菌圈最小值为 0.90 cm。可见, pH 7.0 有利于细菌 DH078 抗菌活性物质的产生。

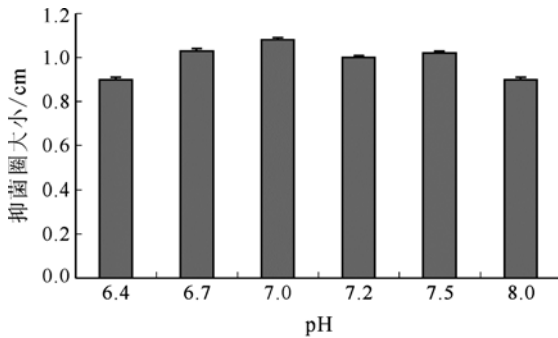


图 4 pH 对 DH078 拮抗活力的影响

Fig.4 The influence of pH on antagonistic activity of bacteria DH078

盐度对细菌 DH078 产抗菌活性物质的影响见图 5。由图 5 可见, 随着盐度的增加, 拮抗菌 DH078 的抑菌活性逐渐降低, 当盐度为 0.0—2.0 时抑菌活性较强, 其中最适盐度为 0。可见, 低盐度有利于细菌 DH078 抗菌活性物质的产生。

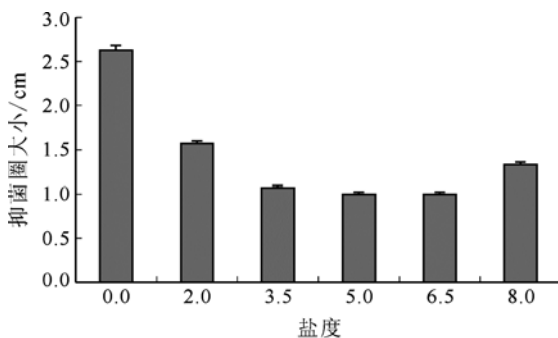


图 5 盐度对 DH078 拮抗活力的影响

Fig.5 The influence of salinity on antagonistic activity of bacteria DH078

经氧化酶试验及革兰氏染色表明, 细菌 DH078 呈氧化酶阳性, 革兰氏染色阳性。经 Biolog 细菌鉴定系统测定细菌 DH078 对 GP 板中碳源的利用情况表明, 培养 6h 后, 细菌仅能够利用 13 种碳源。但培养 24h 后, 则可以利用其中的 21 种碳源(结果未列出), 但大部分碳源还是不能利用。

3 讨论

拮抗作用是指某种微生物在生长过程中特异或非特异地抑制其他微生物的生长发育, 甚至致死现象, 是微生物之间一种普遍的生态关系。其拮抗机理可能是: 通过产生有机酸、抗(生)菌素、过氧化氢及其他有效成分等物质(Fudou *et al*, 2001), 起到对其他微生物如病原细菌的抑制作用、及对营养、空间与氧气等的竞争作用, 从而对其进行有效的排斥和杀灭。本实验中拮抗菌 DH078 在培养 2 天后开始表现出对溶藻弧菌的拮抗作用, 4 天时拮抗活性最强, 但是该胞外物质是抗生素、细菌素, 还是蛋白酶类, 以及它们的作用机理尚有待于进一步深入研究。

有研究表明, 大约有 9%—11% 的细菌可以分泌不同的抗菌活性物质(张新明等, 2004; Austin *et al*, 1990), 这与本文中的实验结果非常接近, 即湖光岩细菌中的拮抗菌占 10.8%, 但作者使用的指示菌还很有限, 实际比例可能还要高出较多。细菌拮抗物质的产生, 与各种培养条件息息相关, 如 pH、盐度、温度、培养基等。本实验结果显示, 盐度和蛋白胨对细菌 DH078 产抗菌活性物质的影响较大。由盐度影响曲线(图 5)可以看出, 过高的 NaCl 将使该菌株的抑菌活性显著降低, 这与张新明等(2004)的研究结果一致。盐度主要影响渗透压等, 对营养吸收、物质合成、代谢物的分泌与活性等有着重要的影响, 湖光岩细菌属于淡水细菌, 它的生长与代谢更适合于淡水环境, 这与前述培养基的选择结果是一致的。蛋白胨主要为培养基提供氮源, 可见氮源对该菌活性物质的产生影响较大, 故该代谢产物极可能是一种含氮化合物。对细菌 DH078 产抗菌活性物质影响最小的是 pH, 可能本文选取的 pH 范围较窄, 均属于适宜 pH 范围, 因此抑菌活性差别并不悬殊; 其次是牛肉膏, 抑菌活性随牛肉膏含量升高稍有增加(图 2), 可见牛肉膏并不是抗菌活性物产生的决定因子。培养基的稀释有利于寡营养条件生存菌的培养及其活性物质的产生(戴欣等, 2005), 作者的研究结果也证实了这一点, 湖光岩本身属于寡营养环境, 湖光岩细菌在较稀的培养基中更易进入稳定期, 对活性物质的产生非常有利。本文中仅探讨了培养条件对该细菌拮抗活性的影响, 但这些条件对拮抗物种类或拮抗机理是否有影响, 还需进一步深入探讨。

目前海洋鱼虾贝病害主要致病菌是各类弧菌(叶孝经等, 1986), 因此弧菌的控制成为有效阻止疾病大

面积流行的关键点。本研究中的湖光岩拮抗菌对海洋溶藻弧菌的抑制效果非常明显, 因此其在海洋水产养殖病害的生物防治中具有较大的应用前景(于淑池等, 2004), 它可以作为抗生素等药物的有效替代品, 从而有效解决残留、毒副作用、环境污染等系列问题(莫照兰等, 2001)。本项研究成果可为保护和开发利用湖光岩微生物资源, 以及活性代谢产物的筛选与分离等研究打下基础, 丰富了应用于水产养殖病害中生物防菌的来源。

参 考 文 献

- 于淑池, 张利平, 王立安, 2004. 拮抗菌作为生物防治手段的研究进展. 河北农业科学, 3(1): 62—65
- 王 镇, 王孔星, 谢裕敏, 1995. 几株微生物絮凝剂产生菌的特性研究. 微生物学报, 35(2): 121—129
- 叶孝经, 王文兴, 1986. 中国对虾流行性弧菌病的研究. 海洋水产研究丛刊, 30: 11—18
- 吕厚远, 刘嘉麒, 储国强等, 2003. 末次冰期以来湛江湖光岩玛珉湖孢粉记录及古环境变化. 古生物学报, 42(2): 284—291
- 刘冬梅, 李 理, 杨晓泉, 2006. 用牛津杯法测定益生菌的抑菌活力. 食品研究与开发, 27(3): 110—111
- 刘志鸿, 程 力, 牟海津, 1998. 海洋微生物活性物质的研究概况. 中国水产科学, 6(4): 99—103
- 李耀年, 齐 好, 2005. 致病性拟态弧菌的敏感药物和拮抗菌的筛选. 水利渔业, 25(5): 100—103
- 邹文政, 鄢庆彬, 林文雄等, 2004. 大黄鱼病原弧菌拮抗菌筛选. 海洋科学, 28(3): 5—8
- 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—331
- 陈 营, 王福强, 金 珊, 2003. 牙鲆肠道内弧菌拮抗菌的分离与筛选. 海洋科学, 27(3): 43—45
- 莫照兰, 俞 勇, 王祥红等, 2001. 细菌 QJ2 对对虾病原性哈维氏弧菌的拮抗作用. 水产学报, 25(5): 432—437
- 钱存柔, 黄仪秀, 1999. 微生物实验教程. 北京: 北京大学出版社, 103—109
- 程 池, 杨 梅, 李金霞等, 2006. Biolog 微生物自动分析系统——细菌鉴定操作规程的研究. 食品与发酵工业, 32(5): 50—54
- 廖乃钦, 2002. 神奇的中国玛珉湖——湖光岩. 风景名胜, 3: 46—47
- 戴 欣, 王保军, 黄 燕等, 2005. 普通和稀释培养基研究太湖沉积物可培养细菌的多样性. 微生物学报, 45(2): 161—165
- Austin B, Billaud A C, 1990. Inhibition of the fish pathogen, *Serratia liquefaciens*, by an antibiotic-producing isolate of planococcus recovered from sea water. J Fish Dis, 13: 553—556
- Fudou F, Iizuka T, Yamanaka S, 2001. Haliangicin, a novel antifungal metabolite produced by a marine myxobacterium. J Antibiotics, 54(2): 149—153

THE ANTAGONISTIC BACTERIA FROM HUGUANGYAN MAAR LAKE

DING Yu, JIAN Ji-Chang, WU Zao-He, BAI Li-Li, LIU Jian-Feng, LIN Dan, YU Jun
(Guangdong Provincial Key Lab of Pathogenic Biology and Epidemiology for Aquatic Economic Animals,
Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, 524025)

Abstract Samples of bacterium taken from Huguangyan Maar Lake are isolated and purified using spread plate method and streak plate technique. The partial characteristics is analyzed morphologically and physiologically. The heterotrophic bacteria, fungi, and vibrio are assessed in plate colony-counting method. Antagonistic bacteria to vibrio are screened and their antagonistic ability studied using cup method. The results show a prominent difference in the quantity and species of microorganisms in different sites. The total numbers of heterotrophic bacteria and fungi are $(1.3—8.6) \times 10^8$ and $(0.1—5.7) \times 10^7$ cfu/g in sediment, while $(0.5—6.7) \times 10^5$ and $(0.4—1.1) \times 10^3$ cfu/ml in water, respectively. It was found that 16 bacteria strains, which account for 10.8% of the total (148), are obviously inhibitive to *Vibrio alginolyticus*, and bacteria DH078 and DH113 have a significant inhibitive zone. The results also show that antibiotic activity of DH078 is the strongest after being cultured for four days in nutrient broth medium. The optimal cultural conditions for their antibiotic ability are: broth medium of 2-time dilution, 0.6% peptone, 0.2% yeast extract, 0.6% beef extract, 0 salinity, and pH 7.0. It is obvious that the microorganism resources in Huguangyan Maar Lake are quite abundant and valuable. The scientific foundation for protection and sufficient utilization of these microorganism resources are also provided in this paper.

Key words Huguangyan Maar Lake, Microorganism, Antagonistic bacterium, Cultural condition, Screening