

海洋原生防细菌 LHB02 的筛选、鉴定 及其抑菌谱检测*

徐长安¹ 罗秀针² 俞超超³

(1. 国家海洋局第三海洋研究所 厦门 361005; 2. 漳州卫生职业技术学院 漳州 363000;
3. 厦门大学海洋与环境学院 厦门 361005)

提要 从高度污染的海滩污泥中, 分离得到一株对部分水产病原菌有很强拮抗作用的生防细菌 LHB02。采用细菌的通用引物进行 LHB02 的 16S rRNA 基因片段扩增, 得到 1511bp 的 DNA 片段, 其序列与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)在进化位置上最为接近, 结合传统的形态学、生理生化鉴定手段, 鉴定该菌株为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。LHB02 的无菌发酵液经硫酸铵沉淀, 沉淀物透析除盐后所得的活性物质初提物初步鉴定为一种抗菌蛋白质。与水产主要病原菌进行拮抗试验, 结果表明, LHB02 对三种弧菌包括哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)和鳃弧菌(*V. anguillarum*)有很强的抑制作用。

关键词 芽孢杆菌, 筛选, 鉴定, 抑制作用

中图分类号 Q936

芽孢杆菌(*Bacillus*)广泛存在于自然界中, 是一类好氧生长、可形成芽孢的革兰氏阳性菌, 在其生长过程中能产生许多有抗菌活性的代谢物质(王文夕等, 1994; 彭广茜等, 1999), 这些物质对病原真菌、细菌、病毒和寄生虫都有一定抑制效果(Tamehiro *et al.*, 2002)。同时, 多数芽孢杆菌还是有益菌, 对人和动植物及环境有益无害, 是组成生态制剂的主要益生菌及各种环境中的有益菌。随着化学药物在畜牧及水产养殖病害防治上的药效和作用的局限性越来越明显(Shen *et al.*, 1993), 以及化学药残对食品安全构成越来越严重的威胁(Sambasivam *et al.*, 2003), 芽孢杆菌因其兼有代替化学抗生素、用以防治疾病和改良环境的双重功效而受到重视, 并迅速成为研究热点。

国内外都把芽孢杆菌作为重要的一种生防细菌及益生菌加以研究, 其研究范围和研究方向包括特性菌株筛选、活性产物分离纯化及应用研发等(王娟等, 2010)。但目前见诸于报道的主要是筛选自陆源的芽孢杆菌及其在陆生动植物病害防治方面的应用, 特别是植物的真菌病防治以及养殖动物肠道保健、环

境改良等方面的应用研发(邢介帅等, 2008; Melentev *et al.*, 2001), 而筛选自海洋生境的芽孢杆菌类生防细菌为数不多(Moriarty, 1998), 其用于水生动物如水产养殖动物的病害防治研究也相对较少。本实验室近年来一直致力于从海洋环境中针对性地筛选对水产养殖致病菌有拮抗作用的芽孢杆菌, 并分离得到一批活性菌株, 本文报道了其中一株筛选自海洋特殊环境、对水产常见致病菌弧菌有较强拮抗作用的芽孢杆菌类生防细菌 LHB02 的鉴定及其抑菌谱, 为该菌株将来在水产养殖病害防治方面的应用提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 样品来源

用于分离目标菌株 LHB02 的污泥样品采自福建漳浦养殖区附近的海边滩涂, 养殖区大量的养殖废水从这里排放, 造成滩涂的局部高度污染。

1.2 目标菌 LHB02 的分离、筛选及抑菌活性测试

1.2.1 培养基 分离采用 LB 培养基, 富集采用 KB 培养基。

* 海洋公益性行业科研专项, 201005032 号。徐长安, 高级工程师, E-mail: changan_xu@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-05-31, 收修改稿日期: 2010-07-29

LB 培养基: 蛋白胨 10g, 酵母提取物 5g, NaCl 10g, 水 1000ml。

KB 培养基: 蛋白胨 20g, 甘油 10ml, K_2HPO_4 1.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.5g, 水 1000ml。

1.2.2 分离、富集 从上述滩涂挑取污泥样品, 按照梯度稀释法和涂布平板法进行分离操作。挑取单菌落至上述培养基, 置于 37 台式摇床中 180r/min 振荡培养 32h 后, 离心去菌体, 检测发酵上清液是否有抑菌活性。

1.2.3 抑菌活性检测 抑菌活性采用改进后琼脂扩散法(agar diffusion method)进行测定(Taggs *et al.*, 1971)。

筛选用的测试菌选择金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)及鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)。以上测试菌来自于本实验室。

1.3 菌株的鉴定

菌株的鉴定主要参照《常见细菌系统鉴定手册》(东秀珠等, 2001)结合 16S rDNA 序列分析方法进行。

1.3.1 生物学特征观察 将 LHB02 接种到 LB 培养基的培养皿平板和试管斜面上, 生化培养箱 37 培养, 观察生长情况及菌落形态等生物学特征, 同时接种于 KB 液体培养基中, 摇床振荡 180r/min, 37 培养发酵, 观察氧气需求情况及生理生化表现现象。

1.3.2 生理生化性状测定 检测细菌生长对温度、盐度的需求, 测定细菌生长的好氧性和厌氧性, 以及进行一些特征性的生理生化试验包括: 产酸试验(D-葡萄糖、L-阿拉伯糖、D-甘露糖、D-木糖)、柠檬酸盐的利用、淀粉水解、甲基红和 V.P.(Voges Proskauer)试验、吲哚产生试验、明胶液化试验、接触酶、过氧化物酶、苯丙氨酸脱氢酶试验和丙酸盐利用试验等。

1.3.3 16S rDNA 序列测定和分析 挑起培养皿中业已纯化确认的单菌落, 置于 50 μ l 无菌蒸馏水中进行悬浮, 水浴(100) 5min 后离心, 以上清液中的细菌 DNA 作为模版, 参考文献(任世英等, 2006), 以通用引物对 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增, 正向引物 Primer A: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG3', 反向引物 Primer B: 5'-ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3'。纯化后的 16S rRNA 基因的 PCR 产物, 送交上海生工生物有限公司, 委托其进行 DNA 序列测定。

1.4 抑菌物质的初步分离、鉴定和抑菌谱测定

1.4.1 抑菌物质的初步分离和鉴定 LHB02 以 KB 培养基于 37 、180r/min 条件下发酵 48h, 离心去菌体, 上清液用饱和度为 60%的硫酸铵溶液沉淀,

离心后得沉淀物和离心液, 对沉淀物进行透析除盐, 所得透析液与发酵上清液、离心液用 1.2.3 的方法进行抑菌活性检测并比对抑菌能力。

1.4.2 抑菌谱测定 选择水产疾病常见致病菌包括溶藻弧菌(*V. alginolyticus*); 嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*); 荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*); 副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)、哈维氏弧菌(*V. harveyi*)以及鳃弧菌(*V. anguillarum*)等作为测试菌, 用上述 1.2.3 的方法, 检测透析液对这些病原菌的抑制作用。以上测试菌中的哈维氏弧菌和鳃弧菌来自于本实验室, 其余来自于福建师范大学教育部工业微生物重点实验室。

2 结果与分析

2.1 生物学观察

LHB02 在 LB 培养基平板及斜面上, 生长迅速, 菌落呈扁圆状, 不透明, 培养初期呈乳白色, 表面湿润, 培养中后期, 菌落颜色逐渐变为灰黄, 表明干燥。细胞呈短杆状, 革兰氏染色阳性。在 KB 液体培养基中, 生长旺盛, 好氧, 菌液呈黄白色, 培养 36h 后菌液的表层出现菌膜, 静置后容器底部有少量沉淀。

2.2 生理生化性状

对 LHB02 菌株进行选择性的生理生化检测, 所得结果见表 1。

表 1 菌株 LHB02 的生理生化检测结果
Tab.1 Results of physiological and biochemical characteristics of the strain LHB02

鉴定项目	结果	鉴定项目	结果
接触酶	+	淀粉水解	+
D-葡萄糖	+	吲哚实验	-
L-阿拉伯糖	+	丙酸盐	-
D-木糖	+	柠檬酸盐	+
D-甘露糖	+	甲基红	+
苯丙氨酸脱氢酶	+	3% NaCl	+
过氧化物酶	+	厌氧条件	-
明胶液化	+	供氧条件	+
V-P 测定	+		

注: “+”为阳性, “-”为阴性

实验结果表明, LHB02 生长对温度要求范围较广, 10—50 下均可生长, 好氧, 在厌氧条件下不能生长, 3% NaCl 条件下生长良好。能利用 D-葡萄糖、L-阿拉伯糖、D-甘露糖、D-木糖和柠檬酸盐, 能水解淀粉, 能液化明胶, V-P 反应和甲基红反应阳性, 接触酶以及

过氧化物酶、苯丙氨酸脱氢酶试验阳性, 不产生吲哚, 不能利用丙酸盐。根据典型的生理生化特征基本可以确定 LHB02 为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

2.3 16S rDNA 序列分析

测序结果显示, 菌株 LHB02 的 16S rDNA 序列全长为 1511bp。全序列见图 1。

将测得的序列输入国际核酸数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 用 Blast 进行同源序列搜索, 在搜索结果中, 选出 26 株同源性较高的菌株系列(表 2), 用 MEGA 软件进行系统发育分析, 并构建系统进化树, 结果如图 2 所示, 通过比较可以明显看出, LHB02 在遗传位置上与 *B. subtilis* EF488974、*B. subtilis* AY995572、*B. subtilis* AY995568、*B. subtilis* HM587993、*B. subtilis* AB188212 及 *B. subtilis* EU660321 等六株枯草芽孢杆菌通属一个分支, 且同源性高达 97%, 因此基本可以判断它为枯草芽孢杆菌, 结合其形态学及生理、生化特征, 最后鉴定它为海洋源枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

2.4 抑菌物质的初步鉴定结果

发酵液经离心去菌体、盐析、透析后依次得到发

酵上清液、离心液和透析液, 测量三种液体的 pH 值, 分别为 6.87、6.93 及 6.95。按 1.2.3 的方法, 以金黄色葡萄球菌为测试菌, 在同一个培养皿中进行这三种液体的抑菌活性检测, 离心液、发酵上清液和透析液的加样顺序为自左向右, 培养皿中的加样孔分上下两排, 上排各加样 30 μ l, 下排各加样 20 μ l, 得到抑菌结果如图 3 所示。由图 3 可以明显看出, 透析液的抑菌圈最大, 且明显大于离心液的抑菌圈, 基于硫酸铵对蛋白质的特异性沉淀性质, 可以判断, 活性物质隶属蛋白类。至于离心液加样孔仍可得到较小的抑菌圈, 那是因为所选择的 60%硫酸铵饱和浓度, 没能完全沉淀发酵液中的抗菌蛋白, 使得离心液中仍有少量抗菌蛋白残留, 因而还有一定的抑菌活性。

2.5 菌株 LHB02 的抑菌谱

菌株 LHB02 的透析液对所选择的主要水产致病细菌的拮抗试验结果如表 3 所示。

拮抗试验结果表明, 除荧光假单胞菌外, LHB02 对其余六种水产病原菌都有较强的抑制作用, 表明其抑菌谱相对较广, 其中对三种弧菌包括哈维氏弧菌(*V. harveyi*)、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)和鳃弧菌(*V. anguillarum*)的抑制作用

```
AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGA
GCTTGCTCCCTGATGTTAGCGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACT
CCGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTTGGCTA
CCACTTGCAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAG
CCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG
GGAATCTTCCGAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTCCGGATCGTAAA
GCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCA
CGGTAACACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAG
GGCTCGCAGGCGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGAGGGTCATTGAAAAGTGGG
GAACCTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACA
CCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATT
AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAG
CTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCTTGTACATCCTCTGA
CAATCTAGAGATAGGACGTCCCTTCCGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGTTGTCGTCAGCTCGTGTG
GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCCTTATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCT
AAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATGCCCCCTTATGACCTGGG
CTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGGAGGTTAAGCCAATCCCAAAATCTGT
TCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCC
GCGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACCGGAAGTCGG
TGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACC
```

图 1 菌株 LHB02 全序列

Fig.1 Whole sequence of strain LHB02

最强, 抑菌圈直径均超过 20mm, 明显大于嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)、温和气单胞菌(*A. sobria*)和另一种弧菌副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*), 体现了 LHB02 对上述三种弧菌的特异性拮抗作用。

3 讨论

菌株 LHB02 筛选自福建漳浦海水养殖区排污口处的海滩污泥, 该养殖区已有近 20 年历史, 常年养殖各种水产动物包括鱼、虾、贝、蟹等, 由于环境容量限制和管理疏漏等原因, 各种水产病害经常发生, 排污口处的海滩受到各种有机质、水产病原菌、化学

表 2 选自基因库中用于构建系统发育树的菌株及其录入号
Tab.2 The strains and their access numbers (from GenBank)
used for phylogenetic dendrogram construction

菌株名称	录入号	菌株名称	录入号
<i>B. subtilis</i>	EU660321	<i>B. indicus</i>	AJ583158
<i>B. subtilis</i>	EF488974	<i>B. safensis</i>	AF234854
<i>B. subtilis</i>	AY995572	<i>B. subtilis</i> subsp.	GU191904
<i>B. subtilis</i>	AY995568	<i>B. subtilis</i>	AB065370
<i>B. subtilis</i>	HM587993	<i>B. subtilis</i>	AB201120
<i>B. subtilis</i>	AB188212	<i>B. subtilis</i> subsp.	GU191916
<i>B. subtilis</i>	AB110598	<i>B. subtilis</i>	HQ236066
<i>B. subtilis</i>	DQ993674	<i>B. sp.</i>	EU168188
<i>B. subtilis</i>	DQ401073	<i>B. sp.</i>	AB055848
<i>B. subtilis</i>	EF517122	<i>B. atrophaeus</i>	NR_024689
<i>B. mojavensis</i>	NR_024693	<i>B. subtilis</i>	AB269766
<i>B. subtilis</i>	EU081774	<i>B. subtilis</i>	EF530208
<i>B. subtilis</i>	HM214542	<i>B. subtilis</i>	EU780682

抗生素等的严重污染, 其生态环境也属于一种极端环境。微生物在极端的生态环境中易于形成特殊的生理结构和代谢机制, 同时还产生许多具有特殊性质的生物活性物质(Brown *et al.*, 1997), LHB02 系该极端环境中相互拮抗的微生物菌群中的一员, 其形态特征、生理生化表型和系统发育位置, 都与枯草芽孢杆菌极为相似, 因此鉴定其为来自海洋生境的一株枯草芽孢杆菌。由于 LHB02 所处环境受各种水产病原菌的长期污染, 衍生形成了 LHB02 对某些病原菌的拮抗作用, 本研究体现的是 LHB02 对三种弧菌即哈维氏弧菌(*V. harveyi*)、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)和鳃弧菌(*V. anguillarum*)的强抑制作用, 以及对嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)和温和气单胞菌(*A. sobria*)的弱抑制作用, 其产生的抗菌物质经初步鉴定为蛋白类。抗菌蛋白(包括抗菌肽)是芽孢杆菌分泌产生的主要生物活性物质之一, 有些抗菌蛋白含有脂成分, 称为脂蛋白或脂肽, 有些则含有糖成分, 称为糖蛋白(Maget-Dana *et al.*, 1994; 谢栋等, 1998), 因此 LHB02 的抗菌蛋白具体成分还有待进一步研究确认。

弧菌对海水鱼、虾、贝、蟹都有较强的致病性(Austin *et al.*, 1993), 而哈维氏弧菌和溶藻弧菌是我国南方地区海水鱼类主要致病性弧菌种类, 每年给养殖业造成极大的经济损失(金珊等, 2005)。本实验室近几年在跟踪、调查菌株 LHB02 筛选地养殖区几次

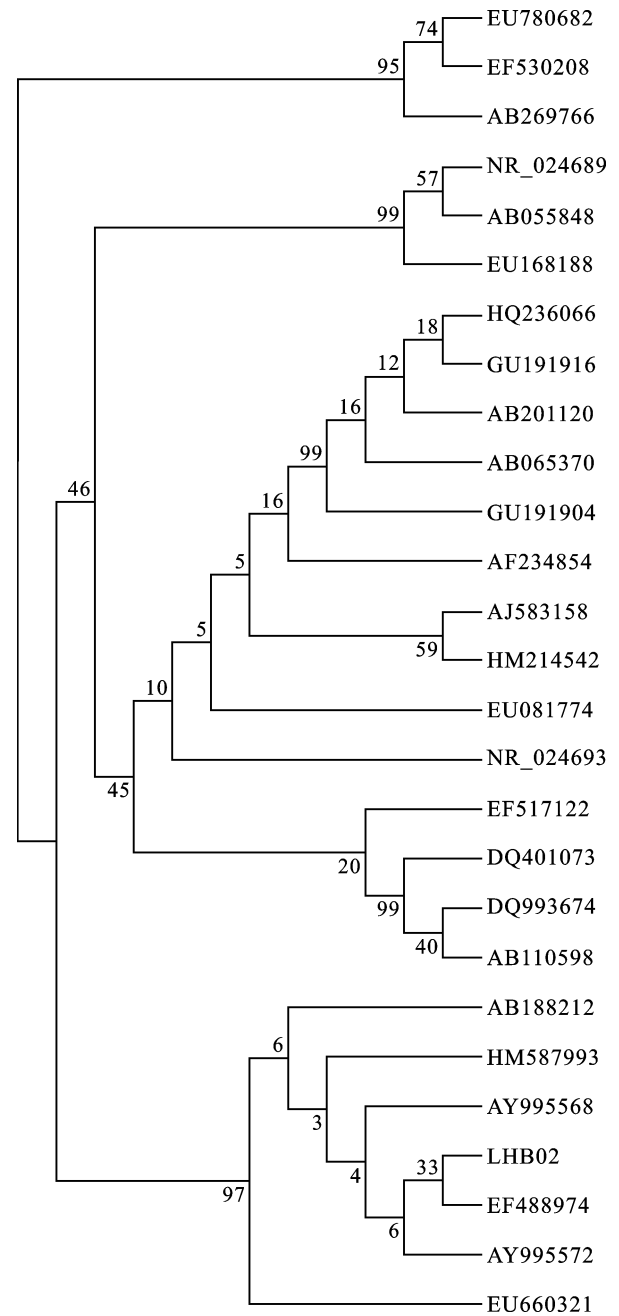


图 2 基于 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic dendrogram based on 16S rDNA sequence

大范围爆发的海水鱼病害时, 发现弧菌也是该养殖区主要致病菌种类。目前养殖户通常应用抗生素来治疗弧菌病, 但因抗药性导致治疗效果越来越差, 而且往往因为药残而大大降低鱼产品的品质。LHB02 的抗菌谱显示了该菌株对多种弧菌有很强的抑制作用, 又因为该菌株筛选自同一环境, 为“土著”拮抗菌, 因此它的拮抗作用针对性更强, 拮抗性能更好。枯草芽孢杆菌又是农业部公布的安全菌株入选菌种(袁佩娜,

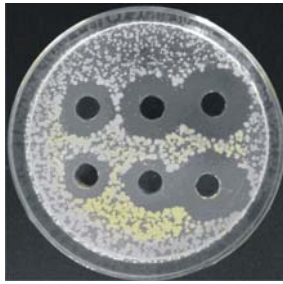


图3 透析液的抑菌圈

Fig.3 The inhibitory zone of the dialyzate separated from the bacterium strain LHB02

2002), 可以作为益生菌用于生产提高养殖动物免疫力和促生长的微生态制剂, 这就预示着筛选自海洋生境的 LHB02 有望作为生防细菌或功能性益生菌, 在我国南方地区海水鱼养殖的弧菌病防治中发挥重要作用, 具有良好的开发前景。

表3 透析液对选择的水产病原菌的抑制作用

Tab.3 Inhibitory effect of the dialyzate to three aquatic vibrios (*V. harveyi*, *V. alginolyticus* and *V. anguillarum*)

病原菌	透析液抑菌圈直径(mm)
溶藻弧菌(<i>V. alginolyticus</i>)	24.525±1.21
嗜水气单胞菌(<i>A. hydrophila</i>)	17.375±0.59
温和气单胞菌(<i>A. sobria</i>)	12.53±0.61
荧光假单胞菌(<i>P. fluorescens</i>)	10.64±0.5
副溶血弧菌(<i>V. parahaemolyticus</i>)	16.312±1.12
哈维氏弧菌(<i>V. harveyi</i>)	22.73±0.6
鳃弧菌(<i>V. anguillarum</i>)	25.57±0.5

参 考 文 献

- 王 娟, 封永辉, 蔡立胜等, 2010. 来自大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)肠道的弧菌拮抗菌的筛选与鉴定. 海洋与湖沼, 41(5): 707—713
- 王文夕, 孔 建, 赵白鸽等, 1994. 枯草芽孢杆菌 B-903 抗菌物质产生条件及部分特性的研究. 华北农学报, 9(2): 98—103
- 东秀珠, 蔡妙英编著, 2001. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 43—65
- 任世英, 王子峰, 肖 天等, 2006. 一株海洋聚磷菌 YSR-3 的分离与鉴定. 海洋与湖沼, 37: 437—443
- 金 珊, 王国良, 赵青松等, 2005. 海水网箱养殖大黄鱼弧菌病的流行病学研究. 水产科学, 24(1): 17—19
- 袁佩娜, 2002. 微生态制剂的质量控制要求. 中国微生物学杂志, 14(4): 187—188
- 彭广茜, 张学君, 1999. 枯草芽孢杆菌生防菌株 Bp 产生抗菌物质的条件. 贵州农业大学学报, 27(1): 6—9
- 谢 栋, 彭 憬, 王津红等, 1998. 枯草芽孢杆菌抗菌蛋白 X98 的纯化与性质. 微生物学报, 38(1): 13—19
- Austin B, Austin D A, 1993. Bacterial fish pathogens. Diseases in farmed and wild fish. 2nd ed. Chichester, UK: Ellis Horwood Ltd, 265—314
- Brown J R, Doolittle W F, 1997. Archaea and the prokaryote-to-eukaryote transition. Microbiol Mol Biol Rev, 61(4): 456—502
- Maget-Dana R, Peypoux F, 1994. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. Toxicology, 87: 151—174
- Melentev A I, Aktuganov G E, Galimzyanova N F, 2001. The role of chitinase in the activity of *Bacillus* sp. 739. Microbiology, 70(5): 548—552
- Moriarty D J W, 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. Aquaculture, 164: 351—358
- Sambasivam S, Chandran R, Khan S A, 2003. Role of probiotics on the environment of shrimp pond. J Environ Biol, 24(1): 103—106
- Shen J Y, Chen Y Y, Shen Z H *et al*, 1993. Study on pathogens of outbreaks of infectious diseases of fishes in Zhejiang province: Isolation, pathogenesis, physiological and biochemical characteristics of *Aeromonas hydrophila*. Bulletin of Science and Technology, (6): 397—401
- Tagg J R, McGiven A R, 1971. Assay systems for bacteriocins. Applied Microbio, 121—125
- Tamehiro N, Okamoto Y, Okamoto S *et al*, 2002. Bacilysoicin, a novel phospholipid antibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 46(2): 315—320

SCREENING, IDENTIFICATION, AND ANTIMICROBIAL SPECTRUM OF A MARINE BIOCONTROL BACTERIUM STRAIN LHB02

XU Chang-An¹, LUO Xiu-Zhen², YU Chao-Chao³

(1. The Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen, 361005; 2. Zhangzhou Health Vocational College, Zhangzhou, 363000; 3. College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen, 361005)

Abstract The bacterium strain LHB02, which exhibited high inhibitory effects against a number of aquatic pathogens, was separated from marine sediments heavily polluted by aquaculture. Using a pair of universal primers, a fragment of LHB02's 16S rRNA gene was amplified and a 1511bp of its DNA sequence was obtained. Based on its morphological, physiological and biochemical characteristics, LHB02 was identified as *Bacillus subtilis*. The active substance purified using ammonium sulfate precipitation and subsequent dialysis was identified as a crude antibacterial protein. In the following antimicrobial test, LHB02 showed strong antagonistic effects against three types of vibrios: *Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus* and *V. anguillarum*.

Key words *Bacillus*, Screening, Identification, Inhibitory activity