

海洋放线菌对大黄鱼病原弧菌的拮抗作用和抗菌谱*

王 军¹ 鄢庆枇² 苏永全¹ 梁桂洪² 麦添成²

(¹ 厦门大学海洋学系、厦门大学亚热带海洋研究所 361005)

(² 集美大学水产生物技术研究所、水产学院 361021)

摘要 在大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 病原弧菌的拮抗放线菌筛选和人工诱变基础上, 选择出对溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 和副溶血弧菌 (*V. parahaemolyticus*) 同时具有较强拮抗作用的 4 株放线菌。采用琼脂块法测定 4 株放线菌的抗菌谱, 并检测 4 株放线菌分别在固体和液体培养液中的拮抗作用。结果表明: 4 株放线菌的抗菌谱均较窄, 在固体和液体培养基中对 2 种病原弧菌都有较强的拮抗作用。

关键词 大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*), 病原弧菌, 放线菌, 拮抗作用, 抗菌谱

放线菌是自然环境中常见的一类丝状原核微生物, 能产生多种抗生素。在医药和农业领域中利用放线菌进行病害防治已有报道^[1, 2], 但国内在筛选海洋放线菌进行水产养殖疾病的防治方面尚未见报道, 本文在大黄鱼病原弧菌的拮抗放线菌筛选和人工诱变基础上^[1], 进一步对溶藻弧菌和副溶血弧菌同时具有较强拮抗作用的 4 株放线菌进行抗菌谱和拮抗作用的深入研究, 以期为大黄鱼养殖病害探索一条生物防治的新路。

1 材料与方法

1.1 试验菌株

1.1.1 病原菌 溶藻弧菌和副溶血弧菌从福建省连江县厦宫乡新辉养殖渔排的患病大黄鱼分离, 并经回归感染确认为大黄鱼弧菌病原^[4]。

1.1.2 拮抗放线菌 在大黄鱼病原弧菌拮抗放线菌的筛选和人工诱变^[1]的基础上, 挑取对溶藻弧菌和副溶血弧菌同时具较强拮抗作用的 4 株放线菌, 编号分别为: 002, 00210, 018070405 和 018070709。

1.2 指示菌

大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*)、嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)、沙蚕弧菌 (*Vibrio nereis*)、坎普氏弧菌 (*V. campbellii*)、河流弧菌 I (*V. fluvialis biotype I*) 和河流弧菌 II (*V. fluvialis biotype II*) 等购自中国科学院微生物研究所。

1.3 培养基

高氏一号、营养肉汤和 TCBS 琼脂配制^[1]。

1.4 固体培养基中放线菌抗菌活性测定

用琼脂块法^[4]测定放线菌对 2 株供试病原弧菌的抗菌活性: 将被测放线菌菌株制成菌悬液, 稀释至适当的浓度后涂布高氏一号平板, 培养 3~5 d 后用打孔器将各小菌落取下并移至培养箱中 28℃ 培养成熟, 然后再移至涂布有病原弧菌的营养琼脂平板上培养 18~24 h, 测定抑菌圈大小。

1.5 液体培养基中放线菌抗菌活性测定

将 2 种病原弧菌各自与 4 株拮抗放线菌分别制成菌悬液, 取每种菌悬液 0.5 ml 分别接入装有肉汤的三角瓶中, 28℃ 水浴振荡培养, 并从培养 0, 12, 24 和 48 h 等 4 个不同时间的三角瓶中各取出少量菌液分别涂布于 TCBS 和高氏一号培养基上, 在 28℃ 下培养 24 h 后, 用平板菌落计数法测定病原弧菌和放线菌的浓度, 以不加拮抗放线菌的病原弧菌培养液为对照。

1.6 抗菌谱的测定

以大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、嗜水气单胞菌、沙蚕弧菌、坎普氏弧菌、河流弧菌 I 和河流弧菌 II 作为指示菌, 用琼脂块法检测放线菌的抗菌谱^[4]。

* 国家高技术研究发展计划资助项目 863-819-02-12 号。
第一作者: 王军, 出生于 1953 年, 硕士, 副教授, 目前主要从事海水养殖病害及种质资源研究。通信地址: 福建省厦门市厦门大学海洋与环境学院, E-mail: xmsyq@public.xm.fj.cn

收稿日期: 2002-02-27; 修回日期: 2002-04-08

2 结果

2.1 拮抗放线菌的抗菌谱

为检测所选 4 株放线菌对其它菌株的拮抗效果,采用大肠杆菌等 8 株指示菌进行抗菌谱试验。由于筛选拮抗菌的主要目的是为了抑制病原弧菌的生长,所以在抗菌谱试验中选择的菌株以弧菌最多。在其它菌株中,大肠杆菌是 G⁻肠道菌的代表,金黄色葡萄球菌代表 G⁺球菌,枯草杆菌代表 G⁺杆菌,而嗜水气单胞菌则是水产养殖中极为常见的病原菌。表 1 可以看出,4 株放线菌的抗菌谱都比较窄,所有放线菌株都对坎普氏弧菌具有拮抗作用,此外,018070405 和 018070709 菌株对沙蚕弧菌、002 和 00210 菌株对金黄色葡萄球菌和嗜水气单胞菌也产生拮抗作用,而 018070709 和 00210 菌株还分别对生物 1 型河流弧菌和枯草杆菌的生长产生抑制作用,可见在 4 株放线菌中 018070405 菌株抗菌谱是最窄的。

表 1 4 株放线菌的抗菌谱

Tab.1 The antibiotic range of 4 strains of actinomycetes

指示菌株	抑菌圈直径(mm)			
	002	00210	018070405	018070709
大肠杆菌	0	0	0	0
金黄色葡萄球菌	13.5	15.3	0	0
枯草杆菌	0	16.7	0	0
嗜水气单胞菌	16.2	18.2	0	0
沙蚕弧菌	0	0	17.9	16.5
坎普氏弧菌	14.5	20.7	13.1	18.7
河流弧菌(生物 1 型)	0	0	0	13.2
河流弧菌(生物 2 型)	0	0	0	0

2.2 放线菌在固体培养基中对病原弧菌的拮抗作用

表 2 可见,在大黄鱼病原弧菌拮抗放线菌的筛选和人工诱变的基础上所选择的 4 株放线菌在琼脂培养基中对供试验的 2 株大黄鱼病原弧菌均有明显的拮抗作用,但它们都有各自的抑菌特点,其中菌株 002 对溶藻弧菌拮抗效果较好,对副溶血弧菌的拮抗作用稍差。而菌株 018070709 则相反,对副溶血弧菌的拮抗效果较好,对溶藻弧菌拮抗效果稍差。菌株 00210 和菌株 018070405 对两种病原弧菌的拮抗效果都比较明显。

2.3 放线菌在液体培养基中对病原弧菌的拮抗作用

虽然所选的 4 株放线菌在固体培养基试验中对

表 2 4 株放线菌在固体培养基中对病原弧菌的拮抗效果

Tab.2 The antibiosis of 4 strains of actinomycetes on pathogenic vibrio

放线菌	抑菌圈直径(mm)	
	副溶血弧菌	溶藻弧菌
002	26.4	39.2
00210	30.2	30.8
018070405	30.5	39.7
018070709	45.3	23.5

病原弧菌的拮抗作用很明显,但为了更贴近实际生产,使本试验结果更具有应用价值,故选用了肉汤作为液体培养基,分别检测了 4 株放线菌在液体培养基中对 2 株病原弧菌的拮抗作用。

2.3.1 对溶藻弧菌的拮抗作用 图 1、图 2 分别为菌悬液在肉汤培养液中溶藻弧菌和 4 株放线菌的生长情况。从图 1 可见:与对照组溶藻弧菌的生长速度相比,4 个试验组中溶藻弧菌的生长均受到明显的抑制,其中对溶藻弧菌生长的抑制效果最强的是菌株 002 和 00210,菌株 018070709 和 018070405 分别次之,这与固体培养基的试验结果有所不同。在琼脂试验中抑菌作用最好的 018070405 号菌株在液体培养基中的抑菌效果较弱,而在琼脂试验中抑菌作用较弱的 00210 号在液体培养基中表现出较强的抑菌效果,导致这种差异的主要原因可能与不同菌株的拮抗菌在营养肉汤中生长速率不同有关。菌株 002 在固体培养基上对溶藻弧菌的拮抗作用较强,其在营养肉汤中的生长速率也最快,因此在液体培养基中菌株 002 对溶藻弧菌表现出的拮抗作用也最强;菌株 018070405 虽然在固体培养基上对溶藻弧菌的拮抗作用最强,但其在营养肉汤中的生长速率较慢,故其在液体培养基中对溶藻弧菌的拮抗效果也较弱(图 1、图 2)。

2.3.2 对副溶血弧菌的拮抗作用 图 3 可看出:和溶藻弧菌的结果一样,各混合菌悬液试验组中副溶血弧菌的生长均受到放线菌明显的抑制,而原本对溶藻弧菌抑制作用较弱的菌株 018070405 和 018070709 对副溶血弧菌的抑菌作用强于菌株 002 和菌株 00210,这与用琼脂块法测得的 4 株放线菌对副溶血弧菌的拮抗作用完全吻合(表 2)。与溶藻弧菌拮抗试验不同的是,混合菌悬液中 4 株放线菌在肉汤培养液中的生长速度相近,菌株 002 和菌株 00210 在液体培养基中略快的生长速度并没有使得它们对副溶血弧菌的拮抗作用强于菌株 018070405 和菌株 018070709(图 3、图 4)。

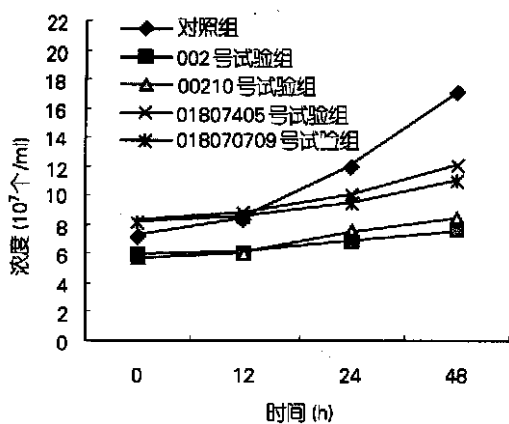


图1 营养肉汤中放线菌对溶藻弧菌的抑制效果——溶藻弧菌的生长

Fig.1 The inhibitory effect of actinomycetes on *V.alginolyticus* in meat culture solution——The growth curve of *V.alginolyticus* (legend below as the same)

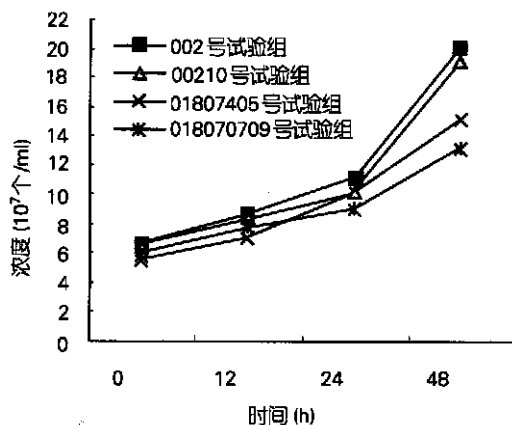


图2 营养肉汤中放线菌对溶藻弧菌的抑制效果——放线菌的生长

Fig.2 The inhibitory effect of actinomycetes on *V.alginolyticus* in meat culture solution——The growth curve of actinomycetes

3 讨论

弧菌是海水环境中的正常菌群,广泛分布在自然海区中^[4,6],一般情况下不会引起养殖动物发生病害。溶藻弧菌和副溶血弧菌是海洋弧菌中的优势菌^[7],数量较大,而且有的菌株具有相当强的毒性^[7]。因此,由溶藻弧菌和副溶血弧菌引起的水产养殖动物疾病屡见不鲜。如果能抑制致病菌的生长繁殖,限制其数量,就可以有效降低由条件致病菌引发

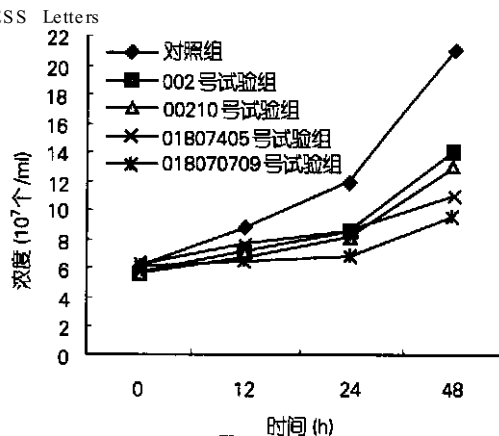


图3 营养肉汤中放线菌对副溶血弧菌的抑制效果——副溶血弧菌的生长

Fig.3 The inhibitory effect of actinomycetes on *V.Parahae molyticus* in meat culture solution——The growth curve of *V.Parahae molyticus*

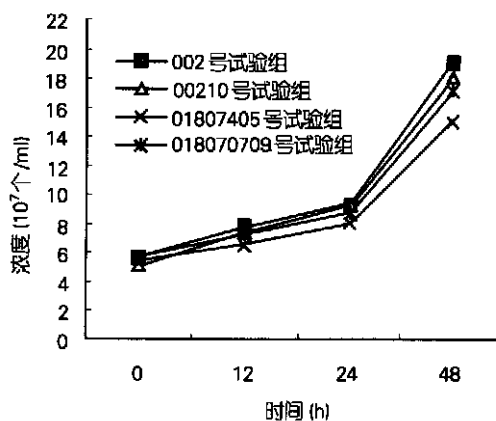


图4 营养肉汤中放线菌对副溶血弧菌的抑制效果——放线菌的生长

Fig.4 The inhibitory effect of actinomycetes on *V.Parahae molyticus* in meat culture solution——The growth curve of actinomycetes

疾病的发病率。

放线菌是一类很常见的拮抗微生物,利用放线菌进行农作物的病害防治时有报道^[3],而国内尚未见到将拮抗性放线菌用于海水养殖弧菌病防治的研究报道。本课题组系统地对取自厦门地区浅海滩涂海泥中的放线菌进行分离、诱变^[1]、固体和液体培养液中拮抗作用检测以及抗菌谱测定等多项试验,证实了经筛选和诱变后一些试验放线菌对溶藻弧菌和副溶血弧菌同时具有了较好的拮抗作用,特别是在液体培养基

中拮抗菌所表现出对病原菌显著抑菌作用的试验结果表明,利用拮抗放线菌进行水产养殖弧菌病害的生物防治可能实现。

本试验所取得的另一个重要试验结果为:所分离、诱变得到拮抗效果较好的4株放线菌的抗菌谱都很窄,也即是它们对病原性溶藻弧菌和副溶血弧菌同时具有较强的拮抗作用,对其他供试菌没有拮抗作用或拮抗效果较弱,其中,菌株018070405和018070709的抗菌谱非常窄,仅对部分弧菌有拮抗作用。拮抗菌抗菌谱的宽窄直接关系到其在养殖生产上的应用性,理想的拮抗微生物应该只对病原微生物起作用,而对养殖水体中其他有益菌没有拮抗作用。本试验筛选出的4株放线菌基本满足海水养殖弧菌病防治的要求,可以进一步进行其对养殖动物的安全性以及拮抗菌在养殖生产中的应用效果等方面的研究。

参考文献

- 1 鄢庆枇,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,台湾海峡,2002,21(2):11~16
- 2 杨智源,郑忠辉. 海洋放线菌细胞毒抗肿瘤活性物质的初筛选,中国海洋药物,1999,18(2):52~55
- 3 吴连举,杨依军. 利用土壤拮抗性微生物防治人参锈腐病,中国生物防治,1999,15(4):166~168
- 4 鄢庆枇,苏永全,王 军等. 网箱养殖大黄鱼弧菌病研究,集美大学学报(自然科学版),2001,6(3):191~196
- 5 祖若夫,胡宝龙,周德庆. 微生物实验教程. 上海:复旦大学出版社,1993. 273~278
- 6 高尚德,陈旭仁,吴以平. 中国对虾养成期间虾池水体和底质中细菌含量的变化,水产学报,1994,18(2):138~142
- 7 Lopez-Torres M. A. and Lizarraga-Partida M. L. . Bacteria isolated on TCBS media associated with hatched *Ateia* cysts of commercial brands, *Aquaculture*, 2001,194(1~2):11~20
- 8 Liu P. C., Chen Y. C., Huang C. Y. *et al.* . Virulence of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from cultured small abalone, *Haliotis diversicolor supertexta*, with withering syndrome, *Letters in Applied Microbiology*, 2000,31(6):433~437

THE ANTIBIOTIC RANGES OF ANTAGNISM ACTINOMYCETES FOR PATHOGENIC *Vibrio* FROM *Pseudosciaena crocea* AND THEIR INHIBITORY ACTIVITIES

WANG Jun¹ YAN Qing-pi² SU Yongquan¹ LIANG Gui-hong² MAI Tian-cheng²

(¹ Department of Oceanography & Institute of subtropical Oceanography, Xiamen University, 361005)

(² Institute of Aquaculture Biotechnology & Fisheries College, Jinan University, 361021)

Received: Feb., 27, 2002

Key Words: *Pseudosciaena crocea*, *Vibrio alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, Actinomycetes, Antagonism, Antibiotic range

Abstract

On the base of the selection and artificial mutagenesis for some antagonism actinomycetes to pathogens *Vibrio alginolyticus* and *V. parahaemolyticus* of large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*, four actinomycetes 002, 00210, 018070405 and 018070409 were chosen to investigate their antibiotic range and antagonism to above the two *Vibrio* by both agar lump and meat solution method. The results showed that all the 4 selected actinomycetes could evidently inhibit the growth of the two pathogenic *Vibrios*, their antibiotic ranges seemed narrow on agar lump, and the antagonism, i.e. inhibitory activities, to these pathogenic strains in meat solution displayed relatively stronger.

(本文编辑:刘珊珊)