

文章编号: 1000-0615(2003)01-0069-06

耐盐红螺菌对水产养殖病害细菌的拮抗作用

邱宏端¹, 陈智伟¹, 袁重桂¹, 林娟¹, 高敏珠²

(1. 福州大学生物与食品科学工程系, 福建 福州 350002);

2. 福州市科技馆, 福建 福州 350004)

摘要: 为探明光合细菌对水产养殖动物病害的生物防治功能, 对病鳖、鳗及南美白对虾动物体上的病原菌进行分离、纯化与鉴定, 人工感染健康动物检测致病性; 探讨耐盐红螺菌对病害细菌分离株的抑菌效能, 和有效抑菌作用时细胞所处的生长期。试验结果表明, 水产动物病害细菌分离株为弧菌属, 气单胞菌属和假单胞菌属菌株; 耐盐红螺菌的代谢产物对病害细菌分离株均有抑制作用, 其平板抑菌圈为 1.2~1.4cm, 最低抑菌浓度多为 4~8 倍稀释液; 耐盐红螺菌的拮抗物质随细胞对数生长过程中生成, 至细胞衰亡期达到最大值。

关键词: 耐盐红螺菌; 水产养殖; 病害细菌; 拮抗作用

中图分类号: S94 文献标识码: A

The antagonistic action of salt-resistant Rhodospirillaceae bacteria on aquacultural pathogens

QIU Hong-duan¹, CHEN Zhi-wei¹, YUAN Chong-gui¹, LIN Juan¹, GAO Min-zhu²

(1. Department of Biotechnology and Food Science, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China);

(2. Science Technology Museum of Fuzhou, Fuzhou 350004, China)

Abstract: The pathogens from ill turtles, eels and *Ictiobus cyrinellus* were separated, purified and identified to prove up the biocontrol function of Photosynthetic bacteria (PSB) on diseases of aquatic animals. The pathogenicity of pathogens is examined by artificially infecting the healthy animals. And the antibacterial abilities of salt-resistant Rhodospirillaceae bacteria against those separated pathogens were studied. At the same time, the phases that PSB produces effective antibacterial action were determined. The results show that the separated pathogens from aquatic animals are *Vibrio*, *Aeromonas*, and *Pseudomonas*. The metabolic products of salt-resistant Rhodospirillaceae bacteria show the bacteriostatic activity to those separated pathogens: the diameter of antibacterial zone is 1.2-1.4cm, the minimal inhibitory concentrations (MIC) are mostly at the diluted times 4-8. The antagonistic substances of salt-resistant Rhodospirillaceae bacteria are produced in the exponential phase initially and reached maximal concentration in the contabescence phase.

Key Words: salt-resistant Rhodospirillaceae bacteria; aquaculture; pathogen; antagonistic action

光合细菌在水产养殖中具有防治病害的作用, 其细胞富含蛋白质和生物活性物质, 及具有降低养殖水体氨氮、亚硝基氮和硫化氢等物质, 因而, 促进了养殖生态的改善, 提高了鱼虾的生长速率与防病抗病

收稿日期: 2002-07-23

资助项目: 福建省自然科学基金项目(B0210004); 福建省教育厅项目(JB00074); 福州大学科技发展基金项目(XKJ(QD)0133)

作者简介: 邱宏端(1955-), 女, 福建连江人, 副教授, 主要从事微生物菌种选育及应用等研究。Tel: 0591-7893046; E-mail: hongduan_

qiu@sina.com

能力;并认为光合细菌细胞可能分泌出抗菌物质,从而抑制病原细菌的生长^[1,2]。光合细菌对病害细菌的防治作用有两个方面,一是改善水质,促进鱼虾生长等间接作用,二是可能存在的直接拮抗功能。目前,光合细菌在水产养殖中的净化水质,促进鱼虾生长方面的作用为人们所熟知,而对于拮抗作用还未有文献报道。本文对光合细菌的拮抗功能进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 主要试验材料

光合细菌:采用荚膜红假单胞菌(*Rps. capsulata*)耐盐菌株,为本实验室选育保存菌种。

病害细菌:气单胞菌_y为本单位研究所提供;气单胞菌_{b、x}、弧菌和假单胞菌等菌株为水产动物病灶部位分离获得。光合细菌基础培养基和应用型培养基参照文献[3,4]。细菌基础及鉴定培养基参照文献[5]。

仪器设备:细菌微孔膜过滤器(膜孔径0.22 μm,上海亚东核级树脂有限公司);高速离心机(TGL-16C,上海安亭科学仪器厂);高压蒸汽灭菌锅(YXQ,上海医用核子仪器厂);培养箱(上海市跃进医疗器械一厂);721分光光度计(上海第三分析仪器厂);光照培养装置(自制,光照强度为1 000~1 200 lx,温度为25~30 ℃)。

1.2 研究方法

1.2.1 水产动物病害细菌的分离

病鳖(莆田养鳖场),病灶特征为颈部、腿部等长满疥疮样斑点;病鳗(福清养殖场),病灶特征为疯游病;南美白对虾为死亡成虾,体表发红(漳州诏安高密度养虾场)。

水产动物病原菌分离时首先将病鳖、鳗及南美白对虾用清水冲洗干净,并用75%的酒精棉球将动物体表反复擦洗消毒,后用灭菌医用剪刀剪取病鳖病灶组织、病鳗下颚溃疡处皮肤、死虾体表发红和形成斑点的部位,置于装有少量无菌水的小三角瓶中,振荡充分,用细菌基础培养基以划线和平板涂布法分离,37 ℃培养1~2 d后观察菌落特征和选取优势单菌落于斜面培养。

1.2.2 水产动物病害细菌的初步鉴定

对水产动物病害细菌分离菌株进行革兰氏染色与形态观察,并结合细菌生理生化试验鉴定到属^[5,6]。

1.2.3 病害细菌分离株感染健康动物试验

南美白对虾(平均体长10 cm,体重7.0 g),彭泽鲫(平均体长7 cm,体重5.0 g)放养于玻璃水缸中,增氧常规饲养后备用。病害细菌接种于肉汤培养液中,37 ℃震荡培养1 d,后用微量注射器吸取0.2 mL注入南美白对虾与彭泽鲫腹部(实验组),对照组注射0.2 mL生理盐水。从注射感染日始采用不喂料增氧饲养,观察感染动物的发病与死亡情况,并对死亡动物的病原菌进行再分离与鉴定。

1.2.4 光合细菌代谢产物制备(无菌培养液)

光合细菌斜面种活化后接种于液体培养液中,光照培养一定时间,将培养液离心(10 000 r·min⁻¹, 20 min),后吸取上清液用微孔滤膜过滤,最后收集滤液无菌检验后备用。

1.2.5 光合细菌的拮抗作用

方法1:病原细菌接种于肉汤培养液中,37 ℃培养1 d,用无菌水稀释至10⁻⁴浓度,吸取0.2 mL涂布于细菌平板上,取经灭菌的滤纸片(直径1 cm)蘸取光合细菌代谢产物,干燥后贴于平板表面,37 ℃培养1~2 d,观察并测量抑菌圈大小。

方法2:细菌经肉汤培养液培养后,以培养液为稀释剂,依次稀释成10⁻¹~10⁻¹⁰浓度,后在细菌稀释管中分别加入1 mL光合细菌代谢产物,37 ℃培养2~3 d,以目测法观察细菌培养液中出现澄清现象的试验管数与细菌稀释浓度。

1.2.6 光合细菌拮抗作用与细胞生长的关系

300 mL 三角瓶分装 200 mL 光合细菌培养液,灭菌后接种 5~10% 光合细菌种子,光照培养过程中取样测定光合细菌细胞生长量(OD_{660nm}),同时制备代谢产物,按方法 2 进行光合细菌的抑菌实验,绘制光合细菌的生长与抑制病害细菌的曲线。

1.2.7 光合细菌代谢产物最低抑菌浓度试验

光合细菌代谢产物按两倍稀释法稀释成不同浓度,后分别吸取 1 mL 于一定稀释度的细菌培养液中,37℃培养 2~3 d,以细菌培养管中出现澄清的最低产物浓度为光合细菌代谢产物的最低抑菌浓度(MIC)。

2 结果与分析

2.1 水产动物病原菌的分离和初步鉴定

病鳖、鳗及南美白对虾动物体上分离到较多细菌,通过平板划线纯化,比较各菌株的菌落特征,筛选后选取 5 株进行细菌属的鉴定,通过革兰氏染色、过氧化氢酶与不同碳源等生理生化鉴定,结果为 5 株分离菌中,弧菌属(*Vibrio*) 1 株,气单胞菌属(*Aeromonas*) 2 株,假单胞菌属(*Pseudomonas*) 2 株。

2.2 病原细菌分离株的致病性

5 株病害细菌分离株与 1 株标准气单胞菌 y 培养液,通过平板菌落计数细胞数量,测得细胞浓度为 $8.0 \times 10^{10} \sim 6.4 \times 10^{11} \text{ ind} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。健康动物每 3 尾为 1 组感染 1 种菌液(每尾注射感染 0.2 mL)。结果显示,不同病原菌株感染南美白对虾后,3 尾虾 1 d 内全部死亡,而感染彭泽鲫观察 8 d,2 株假单胞菌感染的分别死亡 1 尾与 2 尾,3 株气单胞菌感染的分别死亡 1 尾(死亡时间不同),而弧菌感染的未发现死亡,注射生理盐水的对照组动物均存活。观察死亡虾体,弧菌感染的死虾足部、尾肢及表壳呈现鲜红色,气单胞菌感染的死虾壳软,虾体表附着物及虾尾部、腹部发黑,假单胞菌感染的死虾背部有黑褐色斑块,而死亡彭泽鲫多为腹部肿胀,肛门发红等。从不同菌株感染的死亡动物病灶部位分离病原菌,获得各分离株与原菌株相同的结果。该结果表明,病害细菌分离株对虾的致病性更强。弧菌属、气单胞菌属与假单胞菌属均为水产动物病害的主要病原菌,并且具有暴发传染病的鱼龄及流行区域广、和引起水产动物疾病种类多等危害特征,对水产养殖业造成的损失巨大^[7-9]。目前,对于鱼虾类等水产动物细菌性疾病,控制的主要手段是抗菌药物治疗法,但随着药物的使用,提高了细菌的耐药性,致使抗菌药物控制病害的能力不断下降。因而,寻找生物防治与生态调控技术具有重要的意义。

2.3 耐盐红螺菌的拮抗作用基础实验

验证光合细菌具有拮抗作用的实验设计:(1)光合细菌培养液点接种于病原菌平板上;(2)细菌平板先涂布光合细菌代谢产物,后点接种病原细菌;(3)细菌培养于 pH 7.5~9.5 的培养基上生长实验。试验结果为:(1)细菌平板出现不完全透明且较大的抑菌圈(光合细菌培养液点接处);(2)接种的细菌不生长;(3)细菌在 pH 7.5、8.5 与 9.5 碱性条件下生长良好。分析以上结果,表明光合细菌对水产分离病害细菌具有拮抗作用。另外,在本实验中探讨碱性 pH 对细菌生长的影响,这是由于光合细菌大量生长后,其培养液中 pH 会达到 9.0 左右,因此,设计 pH 对细菌生长的影响,将可排除光合细菌培养液中较高的 pH 对病害细菌可能存在的抑菌作用。

2.4 耐盐红螺菌的拮抗作用

光合细菌接种后光照培养 4 d(OD 为 0.4 左右)制备代谢产物。病原菌培养液的初始细胞数量为 $10^{10} \sim 10^{11} \text{ ind} \cdot \text{mL}^{-1}$ (平板菌落计数法), 采用药敏纸片法(自制)与病原菌液体稀释法进行抑菌试验。其中药敏平板抑菌试验中病原菌培养液稀释成 10^{-4} 浓度, 病原菌稀释法抑菌试验中病原菌培养液稀释至 10^{-10} 浓度。由试验结果(表 1、2)可以看出, 荚膜红假单胞菌对病原细菌的抑菌圈直径为 1.2~1.4 cm, 对病原细菌的抑菌浓度为 $10^{-6} \sim 10^{-10}$ 稀释管。

表 1 光合细菌代谢产物在药敏纸片法中的抑菌作用

Tab. 1 The antibacterial action of metabolic product of PSB in antimicrobial susceptibility

批次 no	弧菌属 <i>Vibrio</i>	抑菌圈直径 (cm) diameter of antibacterial zone				
		气单胞菌属 <i>Aeromonas</i>			假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	
		y	b	x	m1	m2
1	1.2	1.3	1.2	1.3	1.2	1.3
2	1.3	1.4	1.2	1.4	1.2	1.4

表 2 光合细菌代谢产物在细菌稀释管中的抑菌作用

Tab. 2 The antibacterial action of metabolic product of PSB on diluted bacteria in testing tubes

病原细菌 pathogens	细菌稀释管 dilution times of bacteria									
	1 10^{-1}	2 10^{-2}	3 10^{-3}	4 10^{-4}	5 10^{-5}	6 10^{-6}	7 10^{-7}	8 10^{-8}	9 10^{-9}	10 10^{-10}
弧菌 <i>Vibrio</i>	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-
气单胞菌 y <i>Aeromonas y</i>	+++	+++	+++	+++	+	-	-	-	-	-
气单胞菌 b <i>Aeromonas b</i>	+++	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-
气单胞菌 x <i>Aeromonas x</i>	+++	+++	+++	++	++	+	-	-	-	-
假单胞菌 m1 <i>Pseudomonas m1</i>	+++	+++	+++	++	++	+	-	-	-	-
假单胞菌 m2 <i>Pseudomonas m2</i>	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-

注: 目测法。“+++、++、+”分别表示高度、中度和轻度浑浊,“-”表示不浑浊

Notes: eyeballing method. “+++、++、+” denotes highly turbid, moderately turbid and lightly turbid respectively; “-” denotes not turbid

2.5 光合细菌拮抗物质的生成与细胞生长的关系

荚膜红假单胞菌接种于应用培养液中, 测定其生长过程对气单胞菌 y 的拮抗作用。结果(图 1)显示, 光合细菌生长初期不具有抑菌表征, 对数生长至细胞达到较高浓度时出现抑菌, 当细胞衰亡时达到最大的抑菌作用。这表明光合细菌的拮抗物质随细胞生长过程生成; 在细胞衰亡时由于细胞通透性加大和细胞自溶等作用, 使细胞内的抑菌物质更好的分泌, 从而抑菌作用加强。

2.6 培养基与光合细菌拮抗作用的关系

光合细菌基础培养基成分多, 适用于富集、分离等科学研究; 应用培养基成分较为简单, 适用于生产培养与应用, 具有培养成本低、培养条件粗放和易于操作等特点。为探讨两种培养基的拮抗作用差异, 将荚膜红假单胞菌分别接种于基础培养液与应用培养液中, 测定光照培养过程细胞的生长曲线与细胞生长过程对气单胞菌 y 的抑菌作用, 结果见图 2。由图 2 看出, 光合细菌在基础培养液中先于应用培养进入对数生长期; 但从细胞数量和抑菌作用看, 呈现出不管是基础培养基还是应用培养基, 光合细菌细胞生长达到较大量(基础培养液中细胞数量高于应用培养基)时才产生抑菌作用, 且抑菌效果相近。分析该结果认为, 基础培养基有利于光合细菌的快速生长, 但拮抗物质分泌较慢; 应用培养基, 初期细胞生长较慢, 但快速生长后拮抗物质分泌较快, 因而在细胞量较少情况下具有抑菌表征, 这可能由于应用培养液中渗透压较低或培养基成分中具有促进拮抗物质分泌的因子。另外图 2 中 2.4 曲线与图 1 比较, 可看出光合细菌在应用培养液中的生长与抑菌曲线有差异, 这可能由于两试验中接种后初始 OD 不同所

致(图 1 试验:初始 OD 为 0.048,图 2 试验;初始 OD 为 0.022)。初始细胞数量大,菌体快速繁殖的生物量大,拮抗物质分泌在较短时间内达到抑菌浓度,因而图 1 实验抑菌表征的培养时间短。本试验的另一结果与 2.5 相似,光合细菌的拮抗物质在细胞衰亡期达到最强的抑菌作用。

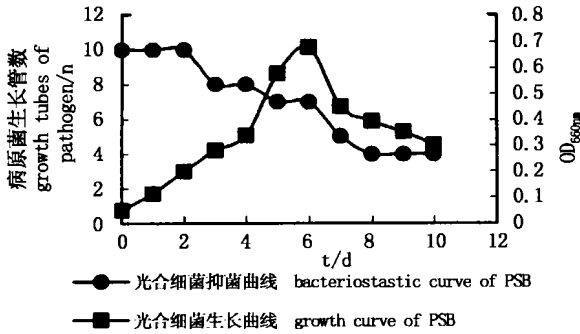


图 1 光合细菌拮抗作用与细胞生长的关系
Fig.1 The relation between the antagonistic activity of PSB and microbial growth

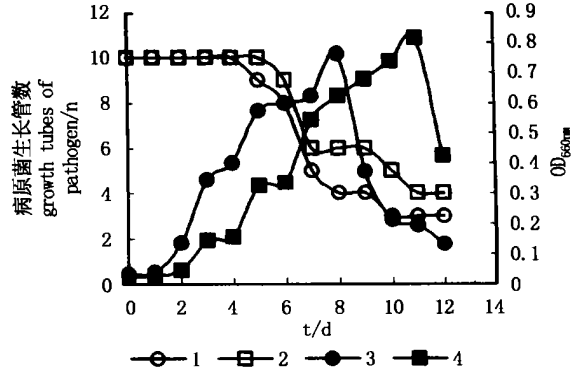


图 2 培养基类型与光合细菌的生长及拮抗作用
Fig.2 Relations among the types of medium, growth of PSB and the antagonistic action
注: 1, 2 光合细菌抑菌曲线; 3, 4 光合细菌生长曲线
(1, 3 基础培养基; 2, 4 应用培养基)

Notes: 1, 2 The bacteriostatic curve of PSB; 3, 4 The growth curve of PSB (1, 3 basic culture medium; 2, 4 applied culture medium)

2.7 光合细菌代谢产物的最低抑菌浓度

光合细菌培养 7d 后(细胞接种后初始 OD 为 0.042)制备代谢产物,以两倍稀释法依次稀释成 2、4、8、16 倍等,病原细菌用细菌培养液稀释至 10^{-4} ,探讨光合细菌代谢产物对水产动物病害分离菌的最低抑菌浓度。结果(表 3)显示,光合细菌的代谢产物对弧菌的抑菌作用较小(MIC 为 4 倍稀释液);对气单胞菌的抑菌作用较强(MIC 为 8 倍稀释液);对假单胞菌属菌株的抑菌作用差异较大(MIC 为 4~16 倍稀释液)。这表明光合细菌代谢产物对病害细菌的最低抑菌浓度多为 4~8 倍稀释液,光合细菌分泌的拮抗物质对不同病原菌的抑菌效能存在较大差异。

表 3 光合细菌代谢产物对水产病害分离细菌的最低抑菌浓度(MIC)

Tab.3 MIC of metabolic products of PSB against separated aquicultural pathogens

病原细菌 pathogens	代谢产物稀释倍数 dilution times of metabolic products				
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
弧菌 <i>Vibrio</i>	-	-	+	+	+
气单胞菌 y <i>Aeromonas y</i>	-	-	-	+	+
气单胞菌 b <i>Aeromonas b</i>	-	-	-	+	+
气单胞菌 x <i>Aeromonas x</i>	-	-	-	+	+
假单胞菌 m1 <i>Pseudomonas m1</i>	-	-	-	-	+
假单胞菌 m2 <i>Pseudomonas m2</i>	-	-	+	+	+

3 结论

(1) 水产养殖动物病害分离细菌(弧菌属 1 株,气单胞菌属 2 株,假单胞菌属 2 株),人工感染健康动物试验具有致病性,从感染动物体上分离的病原菌鉴定结果与原感染菌株相同。试验分离菌为水产养殖动物病害的病原菌属^[2,7,8]。

(2) 荚膜红假单胞菌耐盐菌株的代谢产物(无菌培养液)对水产病害细菌—弧菌属、气单胞菌属和假

单胞菌属均有抑制作用,其最低抑菌浓度多为4~8倍稀释液;荚膜红假单胞菌的拮抗物质似是生长代谢产物,当细胞大量生长时出现拮抗表征,但在细胞衰亡期分泌出更大量,表明收获光合细菌拮抗物质的较佳时间不是细胞对数生长期,而是细胞衰亡期。

(3) 本研究表明光合细菌具有拮抗功能,这为光合细菌的拮抗功能研究打下基础。目前,在水产养殖业中,预防比发病后的用药治疗和恢复更为重要^[7],因而,光合细菌的生物防治功能应作为重点内容加以研究,并更要注重对红螺菌科光合细菌的拮抗功能开发与应用。

参考文献:

- [1] Li Q S, Wang Y Q. Aquiculture and microorganism[M]. Wuhan: Wuhan Press, 2000. 53- 133. [李勤生, 王业勤. 水产养殖与微生物[M]. 武汉: 武汉出版社, 2000. 53- 133.]
- [2] Wang X J. Progress of *Aeromonas* and their significance[J]. J Xinyang Normal Coll, 1997, 10(4): 89- 91. [王小君. 关于气单胞菌的研究进展及意义[J]. 信阳师范学院学报, 1997, 10(4): 89- 91.]
- [3] Qiu H D, Teng R, Chen X M, et al. Optimizing test of a scale-up medium of *Rhodospirillum rubrum* capsulate[J]. J Dalian Fish Univ, 2001, 16(1): 29- 33. [邱宏端, 滕蓉, 陈雷鸣, 等. 荚膜红假单胞菌应用型扩大培养液的优化实验[J]. 大连水产学院学报, 2001, 16(1): 29- 33.]
- [4] Qiu H D, Xu S N, Zhu H, et al. The influence of salt-resistant *Rhodospirillaceae* bacteria on the water quality and bacterial population in the freshwater fish ponds[J]. J Fish China, 2002, 26(3): 231- 236. [邱宏端, 徐姗姗, 朱航, 等. 耐盐红螺菌科细菌对淡水鱼池水质及细菌类群的影响[J]. 水产学报, 2002, 26(3): 231- 236.]
- [5] Dong X Z, Cai M Y. Manual of systematic identification to familiar bacteria [M]. Beijing: Science Press, 1999. 106- 120, 162- 171. [东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1999. 106- 120, 162- 171.]
- [6] Mo Z L, Wang X H, Yu Y, et al. Selection of organic-pollutants-degrading bacteria in shrimp ponds[J]. J Fish China, 2000, 24(4): 334- 338. [莫照兰, 王祥红, 于勇, 等. 虾池有机污染物降解细菌的筛选[J]. 水产学报, 2000, 24(4): 334- 338.]
- [7] Yin z, Xu B H. Studies on the bacteriosis of fishes[J]. Acta Hydrobiol Sin, 1995, 19(1): 76- 83. [殷战, 徐伯亥. 鱼类细菌性疾病的研究[J]. 水生生物学报, 1995, 19(1): 76- 83.]
- [8] Egidius E. *Vibrio salmonicida* sp. nov, a new fish pathogen interm[J]. S System Bacteriol, 1986, 36: 518- 520.
- [9] Austin B, Austin D A. Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish[M]. Ellis Horwood, Chichester, U K. 1987. 265- 307.