

短小芽孢杆菌 X93 及胞外产物抑菌活性的研究

郭 婧¹, 王 娟², 宋增福¹, 贾 亮¹,
张永华¹, 范 斌¹, 张庆华^{1*}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;

2. 阜阳师范学院生命科学学院, 安徽 阜阳 236037)

摘要: 从健康养殖大黄鱼肠道中筛选出对病原弧菌有拮抗作用的潜在益生菌株 X93, 利用细菌快速鉴定系统和 16S rDNA 方法进行细菌种类鉴定; 通过点种法对其抗菌谱进行测定; 采用平板扩散法, 研究了培养时间、温度、盐度、蛋白酶 K 和 Fe^{3+} 等因素对其胞外产物抑菌活性的影响。结果显示: 该菌株为短小芽孢杆菌 (GenBank accession No. HM137033); 对 20 株病原指示菌中的 13 株均产生不同程度的抑制作用, 抗菌谱较广; 菌株培养 48 h 后的胞外产物抑菌作用最强; 在 pH 为 7 时, 抑菌活性最大; 达到最大抑菌活性的温度和盐度分别为 28 °C、5; 蛋白酶 K 和不同浓度的 FeCl_3 均会降低其抑菌活性。该菌对病原弧菌、迟缓爱德华菌和嗜水气单胞菌等水产上常见主要致病菌有良好的拮抗效果, 且具有抑菌作用的胞外产物对温度、盐度和 Fe^{3+} 有一定的适应范围, 适宜作为益生菌株, 有望在实际养殖环境中得到应用。

关键词: 短小芽孢杆菌; 抗菌谱; 胞外产物; 抑菌活性

中图分类号: Q 937.8; S 965

文献标志码: A

弧菌病是世界各地的海水养殖鱼、虾、贝类等水生动物中普遍存在的细菌性疾病之一, 因其流行范围广、危害程度大而备受关注^[1]。目前, 抗生素作为防治弧菌病的主要方法, 虽然发挥了重要的作用, 但由于细菌耐药性及抗生素残留等问题带来的诸多不利影响, 使用受到越来越多的限制。近年来, 为减少抗生素和化学水质净化剂的使用, 很多学者开始重视用生态方法控制鱼病的发生, 多种来源的益生菌也开始应用于水产养殖业, 收到了较好的效果^[2]。侯树宇等^[3]以芽孢杆菌和乳酸菌为主体菌, 并辅以放线菌组成的微生物复合菌制剂用于对虾养殖, 实验结果显示实验池水质各项指标均优于对照池。曹煜成等^[4]及张新明等^[5]研究发现, 不同来源的益生菌其胞外产物成分不同, 特性也不完全相同。徐中波等^[6]也提出, 益生菌在使用前首先必须考虑其来源问

题, 应该针对物种的特异性, 从相应的人或动物体内、外筛选益生菌。因此, 在益生菌的研发和使用过程中, 寻找相同来源的益生菌更加具有明显的优势, 可避免带来二次污染问题。

许多学者认为, 芽孢杆菌大多能分泌高活性的胞外产物 (extracellular products, ECP), 且其中富含各种酶类物质, 如胞外蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶等水解酶以及果胶酶、纤维素酶、葡聚糖酶等分解植物性饵料中非淀粉多糖的酶类^[7-9], 能有效抑制一些肠道致病菌的生长繁殖^[10]。有研究表明, 应用益生菌来防治鱼虾及贝类疾病是可行的^[11-15], 其独特的优点正成为水产动物疾病防治的重要措施。

本实验从健康养殖大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 肠道内分离筛选出 1 株对病原性弧菌具有拮抗作用的益生菌候选菌株, 对其进行种类鉴

收稿日期: 2013-05-19 修回日期: 2013-06-30

资助项目: 上海市教委科研创新项目 (08YZ116); 上海市重点学科建设项目 (Y1101); 阜阳师范学院自然科学一般项目 (2012FSKJ03); 上海高校水产学一流学科建设项目

通信作者: 张庆华, E-mail: qhzhang@shou.edu.cn

定、抗菌谱测定,并进一步研究了多种环境因素对其胞外产物抑菌活性的影响,以期为其应用于水产养殖尤其是为大黄鱼的养殖中拮抗病原弧菌等致病菌提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验菌株的来源及培养

实验菌株:从浙江宁波象山港网箱养殖的健康大黄鱼肠道内分离筛选出的对病原弧菌拮抗作用较强的 1 株细菌,命名为 X93。

病原性指示弧菌:副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) Vp1.2164 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心;溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) Va-Y 为扬州大学付立霞老师惠赠,分离自大黄鱼。

其他指示菌:迟缓爱德华菌 (*Edwardsiella tarda*) Et-1、Et-11、Et-89602 与大肠杆菌 (*Escherichia coli*) Ec-25922 由南京农业大学陆承平教授惠赠;迟缓爱德华菌 Et-105、Et-106、Et-3 由上海海洋大学国家水生动物病原库惠赠;迟缓爱德华菌 Et-Y 由扬州大学付立霞老师惠赠;溶藻弧菌 Va-19,河流弧菌 (*Vibrio fluvialis*) Vf-5,嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) Ah-7、Ah-8、Ah-9、Ah-10,迟缓爱德华菌 Et-32 由上海市动物疫病预防控制中心王建老师惠赠;嗜水气单胞菌 Ah-9052 由江苏水产技术推广站惠赠;金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, Sa) 和嗜水气单胞菌 Ah-1 由本室保藏。

以上菌株均用营养琼脂或营养肉汤培养基常规培养。

1.2 分离菌株 X93 的鉴定

分离菌株 X93 的常规鉴定及 VITEK-32 系统鉴定 细菌形态、生理生化特性实验参照《常见细菌系统鉴定手册》方法进行。快速鉴定按法国生物梅里埃公司的 VITEK-32 细菌鉴定系统说明书进行操作。

分离菌株 X93 的 16S rDNA 测定 提取拮抗菌 X93 的基因组 DNA,使用 16S rDNA 的通用引物 (27 f, 1 492 r) 进行 PCR 扩增,产物交由上海英骏生物技术有限公司 (SIBC) 进行测序。所测序列在 NCBI 网站 BLAST 比对。利用软件 Clustal X 和 Mega 4.0 进行多重比较后通过最大简约法构建系统发育树。

1.3 分离菌株 X93 的抗菌谱

参照王娟等^[16]的方法,分别用灭菌生理盐水将活化后的 20 株指示菌的菌苔洗下,各菌液浓度稀释至 10^7 CFU/mL 再各吸取 100 μ L 加入营养琼脂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 的短小芽孢杆菌 X93 菌株在上述平板上点种,28 $^{\circ}$ C 恒温培养,24 h 后进行抑菌圈的观察和测量。

1.4 分离菌株 X93 的胞外产物制备

参照 Sugita 等^[17]的方法,将菌株 X93 在营养琼脂斜面上活化后接种于肉汤培养基,28 $^{\circ}$ C 恒温振荡培养 48 h,4 $^{\circ}$ C $9\ 600 \times g$ 离心 20 min,弃去细胞沉淀,上清液经 0.22 μ m 微孔滤膜过滤,所得液体即为菌株的粗提胞外产物。置于 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.5 各种因素对分离菌株 X93 胞外产物抑菌活性的影响

抑菌活性的检测方法 采用平板扩散法。指示弧菌 Vp1.2164 和 Va-Y 培养 18~20 h 后用盐度 8.5 的灭菌生理盐水洗下菌苔,调节其菌液浓度为 10^7 CFU/mL,取 0.1 mL 涂布于平板上;滤纸用打孔机打成 $\Phi = 5.5$ mm 的双层圆形纸片,在干燥箱内 140 $^{\circ}$ C 干燥灭菌 1 h,将纸片分别浸于拮抗菌的胞外产物中 30 min,之后在培养箱内 28 $^{\circ}$ C 干燥 15 min,最后将纸片贴于上述涂布病原弧菌的平板上,28 $^{\circ}$ C 培养 24~48 h 观察有无抑菌圈出现并记录直径。

培养时间的影响 将 X93 菌株恒温振荡培养,每隔 12 h 取样,参照分离菌株 X93 的胞外产物制备的方法制备胞外产物,并依照上述方法测定抑菌活性,从而确定拮抗菌的最佳培养时间。

pH 的影响 用 1 mol/L 的 HCl 或 1 mol/L 的 NaOH 调节菌株 X93 胞外产物的 pH 值分别为 3、5、7、9、11,作用 1 h 后将 pH 回调至 7,按上述方法测定抑菌活性。

温度的影响 水浴加热菌株 X93 的胞外产物,分别在 28 $^{\circ}$ C 作用 24 h,40 $^{\circ}$ C 作用 2 h,60 $^{\circ}$ C 作用 1 h,80 $^{\circ}$ C 作用 30 min,100 $^{\circ}$ C 作用 10 min 后迅速置冰块中终止反应,以 4 $^{\circ}$ C 保存的胞外产物做为对照,按上述方法测定温度变化对其抑菌活性的影响。

盐度的影响 参照 Sugita 等^[17]以及张新明等^[5]的方法,通过改变菌株培养基的盐度来间

接改变胞外产物的盐度。分别将 X93 菌株接种于盐度为 0、5、10、20、50、100 的培养基中, 28 °C 恒温振荡培养一定时间, 按上述方法离心后, 上清再经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 制备胞外产物, 并测定抑菌活性。

蛋白酶 K 的影响 将蛋白酶 K 加入到菌株 X93 的胞外产物中, 使其终浓度为 2 mg/mL, 37 °C 作用 1 h 后按上述方法测定抑菌活性, 以不加蛋白酶 K 的拮抗菌的胞外产物做对照。

Fe³⁺ 的影响 参照刘永锋等^[18]的方法, 将 Vp1.2164 和 Va-Y 分别转接斜面培养基培养 20 h 左右, 用盐度 8.5 的生理盐水洗下菌苔, 调节菌液浓度适量; 然后将菌液加入到拮抗菌的胞外产物中, 最后加入 FeCl₃ 溶液, 调节其终浓度分别为 100、200、400 μmol/L, 以不加 FeCl₃ 的拮抗菌

的胞外产物和弧菌的混合液做对照, 28 °C 培养 24 h, 分别取样, 测定 24 h 的抑菌活性。

1.6 数据处理与分析

实验数据用 Excel、DPS 3.01 数据处理软件进行统计分析。

2 结果

2.1 分离菌株 X93 的鉴定

分离菌株 X93 的常规鉴定及 API 系统鉴定对 X93 菌株进行常规生理生化鉴定, 结果为革兰氏阳性、杆状、有芽孢、氧化酶与过氧化氢酶均为阳性, 具运动性; 进一步采用法国生物梅里埃细菌鉴定仪 (VITEK-32) 对其进行生化鉴定, 结果表明, X93 菌株与短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) 的相似性达到 99.0% (表 1)。

表 1 VITEK-32 细菌鉴定仪对菌株 X93 的鉴定报告

Tab.1 Report of VITEK-32 identification system for strain X93

时间		梅里埃 VITEK 生化鉴定仪鉴定报告			
Date: 04/16/2010 08:38:16		bioMerieux Vitek Manual Vitek Lab Report			
WSVTK-R07.01					
Vitek-32 ID:	000000-0 (B1-06) Mesophile				
Type:	Bacillus Card (BACIL)				
Status:	Final				
Elapsed Time:	10hours				
Organism:	<i>Bacillus pumilus</i>				
Bionumber:	63255207350				
NEG -	SUC +	TZR +	TAG +	GLU +	INO -
GAL -	ARA +	XYL -	MAN +	RAF -	SAL +
AGA +	INU -	RIB +	MLT -	TRE +	PLA -
SOR +	NAG +	AMY -	KCN +	NOL +	MEN +
OLD +	NAA +	ARB -	PAS +	NAE -	ESC +
THRM -					
99% <i>Bacillus pumilus</i>					

注: “+”表示阳性; “-”表示阴性

Notes: “+” positive; “-” negative

DNA 测序和进化树分析 16S rDNA 基因的测序结果表明, 菌株 X93 的 16S rDNA 基因序列与短小芽孢杆菌 *Bacillus pumilus* (EU880532) 的 16S rDNA 基因同源性最高, 为 99.0%, 登录 GenBank 获得的序列号为 HM137033。选取与所分析的细菌基因序列同源性较高的已知相关序列 (表 2), 利用软件 Clustal X 和 Mega 4.0 进行进化树分析, 进一步确定了该菌株的分类地位 (图

1)。

2.2 菌株 X93 的抗菌谱测定

菌株 X93 对 2 株病原弧菌指示菌有较强的拮抗作用, 对 Vp1.2164 和 Va-Y 的抑菌直径分别达到 25.8 和 16.8 mm; 而且对其它 18 株病原指示菌中的 11 株均具有拮抗作用, 抗菌谱广, 其中对 Va-19 和 Ah-9 的拮抗作用最强, 抑菌圈直径分别达到 37.6 和 31 mm (表 3)。

表 2 构建系统发育树的菌株及序列号

Tab.2 The stains for phylogenetic dendrogram constructed and their access numbers

登录号 accession number	菌株名称 strain name	菌株号 strain number
EU880532	<i>Bacillus pumilus</i>	PRE14
AB308441	<i>Bacillus pumilus</i>	TUT1346
GQ903423	<i>Bacillus pumilus</i>	XJSL5-4
EU350368	<i>Bacillus pumilus</i>	ST312
AM421974	<i>Bacillus</i> sp.	NJ-9
EU350367	<i>Bacillus pumilus</i>	ST304
EU167544	<i>Bacillus pumilus</i>	M267
EU167543	<i>Bacillus pumilus</i>	ST267
GU290547	<i>Bacillus pumilus</i>	Van35

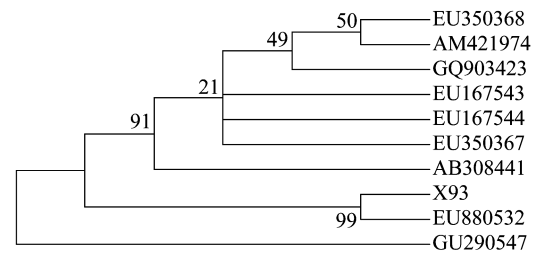


图 1 基于 16S rDNA 基因序列构建的 X93 系统发育树

Fig.1 Neighbor-joining phylogenetic tree showing the 16S rDNA gene sequence of strain X93

表 3 X93 对病原菌的抗菌谱

Tab.3 Antibacterial spectrum of the strain X93

指示菌 indicator bacterium	宿主 host	抑菌圈直径/mm dia. inhibition zone	指示菌 indicator bacterium	宿主 host	抑菌圈直径/mm dia. inhibition zone
Vp1. 2164	鱼 fish	25.8	Et-1	人 human	5.0
Va-Y	大黄鱼 large yellow croaker	16.8	Et-3	大菱鲆 turbot	9.5
Va-19	海水 sea water	37.6	Et-11	人 human	0
Vf-5	南美慈鲷 Jaguar guapote	5.7	Et-32	鱼 fish	8.0
Ah-1	异育银鲫 gibel carp	0	Et-105	大菱鲆 turbot	0
Ah-7	淡水 fresh water	9.4	Et-106	大菱鲆 turbot	9.7
Ah-8	红珍珠关刀鱼 redstriped eartheater	0	Et-Y	斑鳢 Taiwan snakehead	7.4
Ah-9	糠虾 mysid	31.0	Et-89602	人 human	10.8
Ah-10	淡水 fresh water	0	Ec-25922	人 human	0
Ah-9052	甲鱼 turtle	0	Sa	人 human	19.5

2.3 各种因素对拮抗菌胞外产物抑菌活性的影响

X93 菌株的抑菌活性 通过平板扩散法检测 X93 菌株胞外产物的抑菌活性,结果显示,其胞外产物对 Vp1. 2164 和 Va-19 这 2 株病原弧菌均产生明显抑制作用,抑菌圈直径分别为 10.9 和 9.0 mm。

培养时间的影响 随着时间的延长,不同培养时间获得的 X93 菌株的胞外产物,对 2 株弧菌的抑菌活性均有明显增加,且均在培养 48 h 时对 2 株病原弧菌的抑菌活性达到最高值(图 2-a),而当时间超过 48 h 后,其抑菌活性明显降低。

pH 的影响 在 pH 为 3~7 时,X93 菌株的胞外产物对 2 株病原弧菌的抑菌活性随着 pH 的升高而增加,并在 pH 7 时抑菌活性最强,之后,抑菌活性随着 pH 的增加而略微下降;但抑菌活性在 pH 5~9 时变化不大(图 2-b),说明该菌的胞外

产物的抑菌活性对 pH 有一定的适应范围。

温度的影响 不同温度处理过的 X93 菌株的胞外产物,对 2 株弧菌的抑菌活性随着温度的升高呈现出较一致的明显变化趋势。在温度为 4 ℃ 和 28 ℃ 时,胞外产物的抑菌活性变化不大,比较稳定,而且在 28 ℃ 时达到最高值;40 ℃ 作用 2 h 后对 Vp1. 2164 和 Va-Y 的抑菌活性下降了 20.93% 和 19.32%,而在 60 ℃ 处理 1 h 后下降了 29.07% 和 29.55%,80 ℃ 作用 30 min 时,抑菌活性基本消失,当 100 ℃ 作用 10 min 时,抑菌活性全部消失(图 2-c),说明该菌胞外产物对热敏感,不耐高温。

盐度的影响 不同盐度处理的 X93 菌株的胞外产物,对 2 株病原弧菌的抑菌活性随着盐度的增加都呈现出先升高后逐渐降低的趋势。在盐度为 5 时抑菌活性最强,抑菌圈直径分别达到 8.1 和 8.6 mm,而盐度高于 5 时,其抑菌活性随

着盐度的升高均下降(图 2-d)。

蛋白酶 K 的影响 X93 菌株胞外产物对 2 株病原弧菌的抑菌活性均受蛋白酶 K 的影响,添加蛋白酶 K 的实验组抑菌圈明显小于对照组(图 2-e)。表明蛋白酶 K 对该拮抗菌的抑菌作用有较强烈的抑制效果。

Fe³⁺ 浓度的影响 随着铁离子浓度的升高,X93 菌株的胞外产物的抑菌活性均明显低于对照组,当铁离子浓度达到 400 μmol/L 时,其胞外产物虽具有抑菌活性,但很低(图 2-f)。由此可以得出,该菌株的胞外产物的抑菌活性受到铁离子的影响。

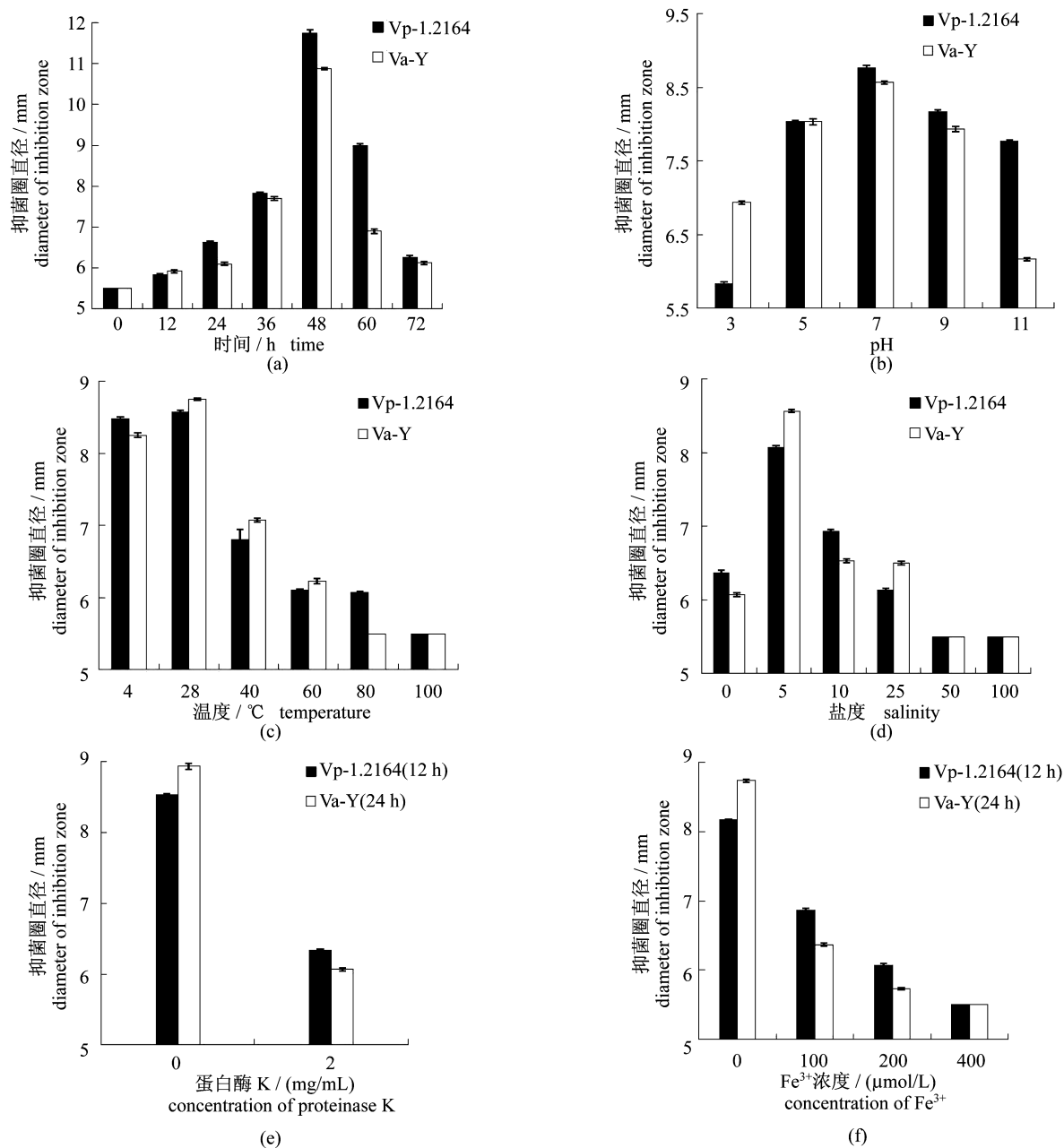


图 2 培养时间 (a)、pH (b)、温度 (c)、盐度 (d)、蛋白酶 K (e) 和 Fe³⁺ (f) 对 X93 菌株胞外产物抑菌活性的影响
图中误差线为标准差

Fig. 2 Influence of culture time, pH, temperature, salinity, proteinase K, and Fe³⁺ ions on the antibacterial activity of the extracellular products from strain X93

Error bars means the standard deviation

3 讨论

近年来芽孢杆菌已广泛应用于水产养殖业中,而应用较广的是地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)^[19]、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)^[20]、纳豆芽孢杆菌 (*Bacillus natto*) 等,短小芽孢杆菌的报道比较少,且主要作为畜禽、水产饲料中的添加剂^[21];而且,目前所使用的芽孢杆菌多从土壤等筛选出来的,海洋来源的较少,而海洋以其特殊的环境:高盐、低温、高压、低光照等极端条件,使海洋微生物的代谢产物化学结构丰富多样,分子结构新颖独特^[22]。本实验的短小芽孢杆菌 X93 是从海水养殖的健康大黄鱼肠道中筛选出来,首次对其抑制病原菌的效果及胞外产物的生物学活性进行报道,为该短小芽孢杆菌在大黄鱼养殖中的使用提供了理论基础。

本实验分离筛选到的短小芽孢杆菌 X93 菌株,其胞外产物对病原弧菌、迟缓爱德华菌和嗜水气单胞菌等水产上常见的主要致病菌具有很好的抑制效果。该菌具有广泛的 pH 适应范围;4 ~ 28 °C 范围内,抑菌活性较稳定,但不耐高温;盐度在 5 ~ 10 时,拮抗菌的抑菌活性保持在最大范围,随着盐度的升高,抑菌活性均下降,其原因可能来自两方面:一方面是,过高的 NaCl 抑制了细菌的生长甚至导致菌体脱水死亡,故而分泌的蛋白酶减少,另一方面是由于胞外产物中高浓度的 NaCl 改变了被试菌细胞外膜的通透性,导致拮抗菌所分泌的抑菌物质不易进入细胞内起作用^[5];在胞外产物中添加蛋白酶 K 后,抑菌活性明显降低,说明该抗菌物质具有蛋白质特性^[18]。不同浓度的 FeCl₃ 作用于芽孢杆菌的胞外产物,对其抑菌活性产生影响,这可能是因为阳离子结合于原生质膜中带负电荷的磷脂上,中和了负电荷,使得磷脂变得紧密,从而增加了原生质膜的刚性^[23-24]。张新明等^[5]的研究结果表明,拮抗菌 J-10 的胞外产物的抑菌成分对热敏感,对酸碱度不敏感,过高的 NaCl 能使其抑菌活性降低,这些与本实验结果相似,而蛋白酶 K 对 J-10 胞外产物的抑菌活性没有影响,与本实验的结果不同,究其原因可能是由于菌株的来源不同导致其抗菌物质不同或具有较大的性质差异。

本实验所用的短小芽孢杆菌及其胞外产物均对病原弧菌及其它常见水产致病菌具有较强的抑

制效果,说明有很好的应用潜力。今后将其应用在水产养殖环境改良剂、水产饲料添加剂以及水产病原菌防治方面,必将具有广阔的前景。然而,本实验对菌株的抑菌作用只做了体外检测,尚未在实验动物体内做保护实验,并且还需对其胞外产物的成分和理化特性及实际应用效果作进一步深入的研究。

参考文献:

- [1] 徐怀恕. 水产养殖动物弧菌病害研究方法 [C] // 对虾苗期细菌病害的诊断与控制. 北京:海洋出版社,1999:166 - 190.
- [2] 邱宏端,陈智伟,袁重桂,等. 耐盐红螺菌对水产养殖病害细菌的拮抗作用 [J]. 水产学报,2003,27(1):69 - 74.
- [3] 侯树宇,张清敏,多森等. 微生态复合菌剂在对虾养殖中的应用研究 [J]. 农业环境科学学报,2004,23(5):904 - 907.
- [4] 曹煜成,李卓佳,冯娟,等. 地衣芽孢杆菌胞外产物消化活性的研究 [J]. 热带海洋学报,2005,24(6):6 - 12.
- [5] 张新明,李健,刘淇. 弧菌拮抗菌的筛选及其效果 [J]. 中国水产科学,2004,11(4):325 - 332.
- [6] 徐中波,任晓明. 益生菌种的生物学特性及选择标准 [J]. 北京农学院学报,2007,22(4):75 - 78.
- [7] Nthangeni M B, Patterton H G, Tonder A V, et al. Over-expression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: a comparative report on *Bacillus* lipase [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2001, 28(7 - 8):705 - 712.
- [8] Calik P, Bilir E, Calik G, et al. Influence of pH conditions on metabolic regulations in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 31(5):685 - 697.
- [9] Maitin V, Kavitha R, Umesh-Kumar S. Properties of an extracellular amylase purified from a *Bacillus* species [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2001, 17(8):823 - 826.
- [10] 金艳玲. 地衣芽孢杆菌对有害微生物的拮抗作用 [J]. 食品科学,2002,23(8):67 - 69.
- [11] Austin B, Billaud A C. Inhibition of the fish pathogen, *Serratia liquefaciens*, by an antibiotic-producing isolate of *Planococcus* recovered from seawater [J]. Journal of Fish Diseases, 1990, 13(6):553 - 556.

- [12] 田黎,李光友. 海洋生境芽孢杆菌(*Bacillus spp.*)的培养条件及产生胞外抗菌蛋白[J]. 海洋学报, 2001,23(4):87-92.
- [13] Gatesoupe F J. Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, against pathogenic vibrio [J]. Aquatic Living Resources, 1994,7(4):277-282.
- [14] 丁贤,李卓佳,陈永青,等. 芽孢杆菌对凡纳对虾生长和消化酶活性的影响[J]. 中国水产科学, 2004, 11(6):580-584.
- [15] 华雪铭,周洪琪,邱小琮,等. 饲料中添加芽孢杆菌和硒酵母对异育银鲫的生长及抗病力的影响[J]. 水产学报, 2001,10(5):448-453.
- [16] 王娟,封永辉,蔡立胜,等. 来自大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)肠道的弧菌拮抗菌的筛选与鉴定[J]. 海洋与湖沼, 2010(5):707-713.
- [17] Sugita H, Matsue N, Hirose Y, et al. *Vibrio sp.* strain NM 10, isolated from the intestine of a Japanese coastal fish, has an inhibitory effect against *Pasteurella piscicida* [J]. Applied and Environment Microbiology, 1997,63(12):4986-4989.
- [18] 刘永锋,陈志谊,周明国,等. 枯草芽孢杆菌 Bs-916的抑菌活性及其抑菌物质初探[J]. 农药学学报, 2007,9(1):92-95.
- [19] 刘波,刘文斌,王恬. 地衣芽孢杆菌对异育银鲫消化机能和生长的影响[J]. 南京农业大学学报, 2005,28(4):80-84.
- [20] 于明超,李卓佳,文国樑. 芽孢杆菌在水产养殖应用中的研究进展[J]. 广东农业科学, 2007(11):78-81.
- [21] 潘康成,杨汉博. 饲用芽孢菌作用机理的研究进展[J]. 饲料工业, 1997,18(9):32-34.
- [22] Carte B K. Biomedical potential of marine natural products [J]. Bioscience, 1996,46(4):271-286.
- [23] Crandall A D, Montville T J. Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype [J]. Applied and Environment Microbiology, 1998,64(1):231-237.
- [24] Abee T, Rombouts F M, Hugenholtz J, et al. Mode of action of Nisin Z against *Listeria monocytogenes* Scott A grown at high and low temperatures [J]. Applied and Environment Microbiology, 1994, 60(6):1962-1968.

The antagonistic effect of *Bacillus pumilus* on pathogenic *Vibrio*

GUO Jing¹, WANG Juan², SONG Zengfu¹, JIA Liang¹, ZHANG Yonghua¹,
FAN Bin¹, ZHANG Qinghua^{1*}

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education,
College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. College of Life Science, Fuyang Teachers College, Fuyang 236037, China)

Abstract: *Vibrio* species are the causative agents for vibriosis, the most serious aquaculture disease worldwide. Probiotics are well known to have the potential for broad use in aquaculture environments. In this study, the aim is to screen the probiotic candidate strain from the intestinal tract of healthy, aquaculture-raised large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) for the aquaculture. We identified the strain by rapid identification system and 16S rDNA gene sequence analysis. Based on the both identification results, strain X93 was identified as *Bacillus pumilus* (GenBank accession No. HM137033). We also checked its antagonistic activities against pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* (Vp-1. 2164) and *Vibrio alginolyticus* (Va-Y) by the dot-inoculating method and tested the effects of temperature, salinity, pH, proteinase K and FeCl₃ on the antibacterial activity of the extracellular products. The results indicated that strain X93 could strongly inhibit indicator bacterial strains, such as *Vibrio parahemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*, *Edwardsiella tarda* and *Aeromonas hydrophila*, exhibiting a very broad antibacterial spectrum. The cell-free antibacterial extracellular products secreted by strain X93 most strongly inhibited *Vibrio parahemolyticus* (Vp1. 2164) and *Vibrio alginolyticus* (Va-Y) when X93 was cultured at 28 °C and 5 salinity for 48 h. Our data suggest that strain X93's antibacterial extracellular products exhibit a fairly broad tolerance to pH, temperature, salinity, and FeCl₃. The antibacterial activity of the extracellular products, however, is proteinase K-sensitive, indicating that the active components are proteinaceous. In summary, the results presented here demonstrate that *Bacillus pumilus* strain X93 can be considered a probiotic since its secreted extracellular products are able to inhibit pathogenic *Vibrio*, which could have useful antibacterial applications. On a broader level, these results point to the potential for isolating bacteria with novel antibacterial activity from cultivated large yellow croaker. Most importantly, these results provide the necessary data for further development of probiotic products that inhibit pathogenic bacteria in aquatic environments.

Key words: *Bacillus pumilus*; antimicrobial spectrum; extracellular products; antagonistic activity

Corresponding author: ZHANG Qinghua. E-mail: qhzhang@shou.edu.cn