

牙鲆肠道内弧菌拮抗菌的分离与筛选^{*}

陈 营¹ 王福强² 王 凡²

(¹ 烟台大学化学生物理工学院 烟台 264005)

(² 大连水产学院养殖系 大连 116023)

摘要 根据微生态学原理,用普通培养基和选择性培养基相结合的方法,分离健康牙鲆肠道内的固有菌群。对获得的菌株进行弧菌的抑制试验,以筛选弧菌拮抗菌。用点种法初步筛选出6株对致病性弧菌有不同抑制作用的拮抗细菌(GI 2, GI 3, GI 4, GI 5, GI 6, YI-13)。进一步研究它们的抑菌活性,在上清液抑菌试验中,GI 2, GI 3, GI 4, GI 5, GI 6这5株菌均未表现出抑菌作用,表明它们的抑菌活性较弱,而且受环境条件的影响。在YI-13和弧菌的混合培养实验中,弧菌的数量均明显低于对照组弧菌的数量,表明YI-13对弧菌具有较强的抑制作用,有望通过生物学和鱼体保护等方面的研究,将其制成微生态制剂应用于牙鲆的养殖。

关键词 牙鲆,拮抗菌,肠道菌群

中图分类号 Q93 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003)03-0043-04

弧菌是海水养殖动物的主要病原菌,由致病性弧菌侵袭造成养殖动物的大批死亡已成为制约海水养殖业发展的关键。传统的方法是应用抗生素等化学药物控制病原菌的生长繁殖,但易导致细菌耐药性的发生与转移,同时造成环境的污染。因此,近年来国内外许多学者都在研究生物防治和生态防治方法。益生菌是一类具有巨大实用价值的生物工程产品,它是由从宿主体内分离出的正常菌群成分制成的活菌制剂,再通过适当途径作用于养殖动物,可以抑制病原菌的生长,提高苗种的成活率和鱼类的生长速度^[1]。目前国内外报道的益生菌主要有乳酸菌(包括乳杆菌和肉杆菌)^[2-4]、芽孢杆菌^[5-6]、假单胞菌^[7-8]等,根据益生菌拮抗致病菌生长这一原理而研制的技术和产品已有许多应用于水产动物的养殖^[1-9]。

本研究的目的是从健康牙鲆肠道内分离筛选对病原性弧菌具有拮抗作用的益生菌,为进一步在养殖生产中应用益生菌控制水体和鱼体内的致病菌生长,提高养殖动物的存活率和生长速度提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 牙鲆肠道细菌的分离

1.1.1 实验鱼 实验所用的牙鲆来自大连湾海珍品养殖场,健康无病,没有投喂过抗生素和其它药物。每尾体长约20 cm,体质量300 g左右,实验前放置于0.48 m³的水族箱内暂养10 d,水温15℃,暂养

期间不投喂食物,每天换水1次。

1.1.2 培养基和培养条件 用于分离肠道细菌的培养基分别为海水琼脂培养基^[10], VNSS培养基^[10],需氧芽孢杆菌培养基^[11]和豆芽汁酵母培养基^[12],各培养基均用NSS液(九盐溶液)^[10]配制。

1.1.3 肠道细菌的分离 参照文献[10]的方法进行。在无菌条件下对实验鱼进行活体解剖,使其内脏暴露,剪下肠道,提起一端挤出肠道内容物,将肠道分成两部分,即一段约4 cm长的中肠段和幽门盲囊部。每一部分用无菌注射器将灭菌的九盐溶液注入并冲洗3次,然后分别放入玻璃匀浆器中,各加1 mL灭菌的九盐溶液后进行匀浆。以匀浆后的样品为原液并依次稀释到10⁻¹和10⁻²,分别取0.1 mL原液、10⁻¹和10⁻²稀释液涂布海水琼脂平板、VNSS平板、需氧芽孢杆菌平板和豆芽汁酵母平板,置25℃培养1~2 d。

1.2 弧菌拮抗菌株的筛选

1.2.1 菌落的形态观察 经48 h培养后观察

^{*} 辽宁省教育厅基础科研项目 20101515 号。

第一作者:陈营,出生于1964年,烟台大学化学生物理工学院,副教授,在研项目:辽宁省科技基金项目“乳酸菌在鱼类肠道内定植和人工重建的机理”,山东省烟台市莱山区清泉路32号264005, E-mail: chen728@sina.com

收稿日期:2002-03-22;修回日期:2002-08-28

各个平板的菌落数量,菌落形态,菌落颜色,菌落大小等特征。

1.2.2 菌体的形态观察 挑取各平板上的单个菌落,进行传代培养。对纯化的细菌进行革兰氏染色和芽孢染色,观察细菌的菌体形态。

1.2.3 抑菌实验指示菌 此实验中指示菌为分离自患病牙鲆的弧菌(*Vibrio* sp.),经牙鲆回归感染实验确定为致病性弧菌。

分离菌株对弧菌的抑制实验 点种法:参照文献[13]的方法进行。取致病性弧菌的过夜培养物,用NSS液进行适当稀释后,吸取0.1 mL加到海水琼脂培养基上,用涂布棒进行涂布。两小时后用接种棒点种全部分离的菌株,在25℃培养箱中培养24 h后,观察菌落周围有无抑菌圈和覆盖现象出现。上清液法:参照文献[7]的方法进行。根据点种法抑菌试验结果,对出现抑菌圈的G12,G13,G14,G15,G16 5株菌,分别取它们过夜培养物的离心液,无菌过滤($\varphi=0.2\mu\text{m}$)。再将各菌株的无菌上清液加到海水肉汤中,使滤液分别被稀释成2,4,8倍,用等量的无滤液的培养

基作对照。每管分别接种等量的弧菌,在试验的12,24,48,72h分别测定其光密度,检测其抑菌情况。共培养法:对在点种法抑菌试验中呈覆盖现象的Y1-13,参照文献[7,14]的方法进行共培养法抑菌试验。取一定比例的Y1-13与弧菌的混合物接入试验组海水肉汤培养基中,以接入等量的单一弧菌培养物作对照。在25℃的培养箱中进行培养,并在试验的0,24,48,72,96h用TCBS平板进行弧菌的活菌计数。

2 结果

2.1 分离菌株的初步鉴定

用普通培养基和选择性培养基对牙鲆肠道的菌群进行分离,总计获得141株菌,96株来自海水琼脂培养基,16株来自VNSS培养基,22株来自芽孢杆菌培养基,另有7株来自豆芽汁酵母培养基。其中只获得6株对弧菌有不同抑制作用的细菌,它们分别是G12,G13,G14,G15,G16,Y1-13,菌落和菌体的特征见表1。

2.2 分离菌株对弧菌的抑制实验

表1 牙鲆肠道分离菌株的特征

Tab.1 Characterization of isolated strains from flounder intestine

菌号	分离部位	培养基	与氧关系	生长情况	菌落特征	菌体特征
G12	小肠	VNSS	好氧	+	黄色,凸起,边缘整齐	G ⁻ ,短杆状,无芽孢
G13	小肠	VNSS	好氧	+	黄色,凸起,边缘整齐	G ⁻ ,短杆状,无芽孢
G14	小肠	VNSS	好氧	+	黄色,凸起,边缘整齐	G ⁻ ,短杆状,无芽孢
G15	小肠	VNSS	好氧	+	黄色,凸起,边缘整齐	G ⁻ ,短杆状,无芽孢
G16	小肠	VNSS	好氧	+	黄色,凸起,边缘整齐	G ⁻ ,短杆状,无芽孢
菌落较大,灰白色,不透明,扁平,边缘						
Y1-13	小肠	芽孢	好氧	++	整齐,质地不均匀,边缘与中央颜色不一致	G ⁺ ,杆状,有芽孢

2.2.1 点种法抑菌实验 在点种法抑菌实验中共筛选出6株拮抗性菌株,其中的G12,G13,G14,G15,G16这5株菌在菌落周围有不明显的抑菌圈,直径在6~8 mm。而Y1-13在两次试验中分别呈现不同的抑菌现象,初次分离时对弧菌的抑制作用呈现大而清晰的抑菌圈,直径达18 mm。再次试验时则表现覆盖作用,该菌极度生长抑制并覆盖了弧菌的生长。

2.2.2 上清液抑菌实验 通过测定各试验管的光密度数值,检测弧菌的生长情况。可以看出:G12,G13,G14,G15,G16的上清液均没有抑菌作用,在试验的12 h至72 h均未检测出抑菌活性,结果见表2。

2.2.3 混合培养抑菌实验 在接种之前,拮抗菌Y1-13和弧菌的数量分别为 1.4×10^4 CFU/mL和

6.3×10^4 CFU/mL,两者比例为1:4.5,试验组与对照组中弧菌的数量相等。在接种后的24 h,试验组与对照组中弧菌的数量均达到最大值,随后,弧菌的数量均降低。整个实验过程中,通过活菌计数发现,混合培养中弧菌的数量均低于对照组中弧菌的数量。结果见图1。

3 讨论

鱼类肠道菌群是一个复杂的微生物群落,其构成不但与鱼的种类和大小有关,还受外界环境因素及水和饲料中微生物的影响。一般认为鱼类肠道的优势菌群为革兰氏阴性杆菌,如弧菌、假单胞菌、气单胞菌等,而阳性杆菌量虽少但也是肠道菌群的组成部分

表 2 分离菌株上清液抑菌实验

Tab.2 Inhibitory assays of supernatants of isolated strains

菌株	无菌上清 稀释倍数	细菌浊度(OD 值)			
		12 h	24 h	48 h	72 h
G12	2	0.09	0.84	0.858	0.833
	4	0.05	0.78	0.806	0.765
	8	0.05	0.86	0.858	0.731
G13	2	0.12	0.87	0.910	0.788
	4	0.11	0.81	0.884	0.844
	8	0.08	0.86	0.858	0.855
G14	2	0.10	0.89	0.728	0.923
	4	0.08	0.74	0.624	0.743
	8	0.06	0.79	0.624	0.853
G15	2	0.05	0.77	0.754	0.878
	4	0.08	0.79	0.806	0.788
	8	0.09	0.80	0.858	0.810
G16	2	0.05	0.77	0.708	0.765
	4	0.07	0.94	0.702	0.833
	8	0.11	0.81	0.728	0.878
对照	-	0.08	0.79	0.884	0.878

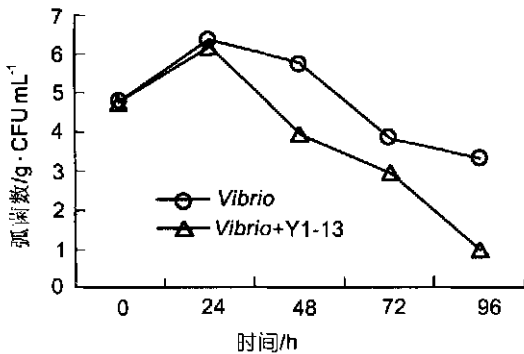


图 1 弧菌拮抗菌 Y1-13 与弧菌的混合培养

Fig.1 Coculture of *Vibrio*- antagonistic bacteria Y1-13 and *Vibrio* sp.

分^[15,16]。肠道菌群在长期的进化过程中,逐渐在肠道内定植并繁殖,形成一固有菌群,通过分泌抗菌物质抑制其它细菌在肠道内的定植和生长。本文从鱼的肠道菌群分离弧菌拮抗菌,拓宽了细菌的来源,提高了阳性菌的检出率,而且应用普通培养基和选择性培养基相结合的方法,增加了对非优势种群的检出。本实验结果证实了这一点,从海水琼脂未获得一株拮抗菌,而 6 株阳性菌均来自 VNSS 和芽孢杆菌培养基。除细菌的来源和分离方法外,拮抗菌的筛选方法也是影响实验的重要因素,筛选拮抗菌的方法应根据细菌

的抑菌机理不同而改变。一般先用点种法初步筛选出具有拮抗作用的菌株,然后再用牛津杯法或上清液抑菌法、混合培养法进一步研究细菌的抗菌活力。

点种法抑菌实验方法简单,易操作。用此方法不仅可观察到拮抗菌通过分泌抗性物质产生的抑菌区,还可观察到具有生长优势的细菌的拮抗作用。本文先用点种法初步筛选牙鲆肠道的分离菌株,从 141 株细菌中只筛选出 6 株对弧菌生长有抑制作用的细菌。用此方法筛选出的拮抗菌比率较低,除上述因素外,还与细菌分泌抗性物质的类型、数量、浓度及培养基的成分和培养条件有关^[13]。

上清液法主要是检测细菌分泌到培养液中的抗菌物质。针对 5 株在点种法中出现抑菌圈的细菌,进一步用上清液抑菌实验均未检出其抗菌。其原因一方面可能是由于上清液中抗菌物质的量少或浓度太低的缘故,另一方面可能是源于抗菌活性的产生条件。国外学者的研究证实,出现抑制现象的条件是拮抗菌与指示菌之间的接触,拮抗菌通过接受指示菌生长的“信号”,反应性地分泌抗性物质而抑制指示菌的生长^[8]。Gram 等的研究发现假单胞菌的抗菌活性只有在缺铁的条件下产生,拮抗菌通过与致病菌竞争环境中的铁离子,从而抑制致病菌的生长。如果营养物质中的铁离子大量存在,拮抗菌就不能表现对致病菌的抑制作用^[7]。

Y1-13 在点种法和共培养法中都检测到对弧菌的强烈抑制作用,是很有应用前景的益生菌候选菌株。在混合培养中,Y1-13 与弧菌的比例在 1:4.5 仍有作用,而文献报道出现抑菌现象的比例一般在 2~10:1 以上^[7,14]。在先后两次点种法实验中出现的不同现象,说明该菌可能至少具有两种较强的抗菌机制。最初分离时,除生长快速外,对弧菌的生长呈现大而清晰的抑菌圈,这可能代表该菌在鱼肠道内的实际抗菌活性。随着生长条件的改变,细菌自身可能关闭了某种分泌抗性物质的机制,转而代偿性地加大了生长速度,产生一种营养和生态竞争效应,从而抑制其它细菌的生长,故在后面的点种抑菌试验中对弧菌生长表现覆盖现象。鉴于 Y1-13 的快速生长速度、多种的抑菌机制和强力的抗菌作用,可以作为微生态制剂的候选菌种,有望通过进一步的研究来制成微生态制剂应用于海水鱼类的生产实践中。

参考文献

- 1 Gatesoupe F J. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 1999, 180(1-2): 147-165
- 2 Byun J W, Park S Ch, Benno Y, et al. Probiotic effect of *Lactobacillus* sp. DS12 in flounder (*Pamlichthys olivaceus*).

- J Gen Appl Microbiol, 1997, 43(5): 305-308
- 3 Gildberg A, Mikkelsen H, Sandaker E, et al. Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*). Hydrobiologia, 1997, 352 (1-3): 279-285
- 4 Gildberg A, Mikkelsen H. Effects of supplementing the feed to Atlantic cod (*Gadus morhua*) fry with lactic acid bacteria and immunostimulating peptides during a challenge trial with *Vibrio anguillarum*. Aquaculture, 1998, 167 (1/2): 103-113
- 5 Rengpipat S, Phianphak W, Piyaratitivorakul S, et al. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. Aquaculture, 1998, 167 (3-4): 301-313
- 6 Moriarty DJ W. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. Aquaculture, 1998, 164(1-4): 351-358
- 7 Gram L, Melchiorson J, Spanggaard B, et al. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(3): 969-973
- 8 Bly J E, Quiniou S MA, Lawson L A, et al. Inhibition of *Saprolegnia* pathogenic for fish by *Pseudomonas fluorescens*. J Fish Dis, 1997(20): 35-90
- 9 Skjermo J, Vadstein O. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. Aquaculture, 1999, 177(1-4): 333-343
- 10 Olsson C, Westerdahl A, Conway P L, et al. Intestinal colonization potential of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) and dab (*Limanda limanda*)- associated bacteria with inhibition effects against *Vibrio anguillarum*. Appl Environ Micro, 1992, 58(2): 551-556
- 11 陈天寿. 微生物培养基的制造与应用. 北京: 中国农业出版社, 1995.
- 12 钱存柔, 黄仪秀. 微生物学实验教程. 北京: 北京大学出版社, 1999.
- 13 莫照兰, 俞勇, 李会荣, 等. 弧菌拮抗菌的筛选. 青岛海洋大学学报, 2001, 31(2): 225-230
- 14 Nakamura A, Takahashi K G, Mori K. Vibriostatic bacteria isolated from rearing sea water of oyster brood stock: Potentiality as biocontrol agents for vibriosis in oyster larvae. 鱼病研究, 1999, 34(3): 139-144
- 15 Ringo E, Birkbeck T H. Intestinal microflora of fish larvae and fry. Aquac Res, 1995, 30: 73-93
- 16 Ringoe E, Strom E, Tabachek J A. Intestinal microflora of salmonids; a review. Aquac Res, 1995(26): 773-789

ISOLATION AND SCREEN OF *Vibrio*- ANTAGONISTIC BACTERIA FROM GASTROINTESTINAL TRACT OF FLOUNDER

CHEN Ying¹ WANG Fu Qiang² WANG Fan²

(¹ College of Chemistry & Biology, Yantai University, Yantai, 264005)

(² Dalian Fisheries College, Dalian, 116023)

Received: Mar., 22, 2002

Key Words: Flounder, Antagonistic bacteria, Intestinal flora

Abstract

Based on the microecological principles, some bacterial strains were isolated and screened from the autochthonous flora of flounders' intestine with the common medium and selective medium for the screen of antagonistic bacteria against *Vibrio* sp.. In dot-inoculation assays, 6 strains (Gl 2, Gl 3, Gl 4, Gl 5, Gl 6 and Yl-13) were screened to inhibit the growth of pathogenic *Vibrio* to marine fish. In their further study, no antibacterial activities were shown in supernatant inhibition assay with these strains except Yl-13. It was indicated that the antibacterial activities were weaker and were affected by some conditions. In coculture assay, the number of *Vibrio* in tests was smaller than that of the contract *Vibrio* group throughout the experiments. It was demonstrated that the Yl-13 was strong antagonistic to *Vibrio* and it would be used in flounder as ecological preparation by means of its biological characterization and protection against diseases.

(本文编辑:刘珊珊)