水霉拮抗菌的筛选及其拮抗作用的初步研究

张书俊　杨先乐　李　聃　李　怡　高　鹏
(上海水产大学农业部渔业动植物病原库, 上海　200090)

摘要: 为了获得水产动物水霉病病原菌的拮抗微生物, 以水霉为靶标, 对其拮抗菌进行了筛选, 并研究了拮抗作用最强菌株的拮抗活性。实验结果表明: 从发生过水霉病害的水体中分离得到了 130 株细菌, 能抑制水霉菌落生长的有三株: LD038、LD057 和 LD106, 其中以 LD038 的拮抗作用最强, 经梅里埃 ATB 微生物自动鉴定系统鉴定为黏质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*)。培养基对 LD038 的拮抗活性影响显著, LD038 在 PDA 平板上表现出的拮抗活性最强, 大小依次为 PDA > BHI > GY > CA > Sabouraud。进一步对菌株 LD038 体外拮抗活性进行了研究。平板抑制实验表明, LD038 能抑制水霉菌丝生长和孢子萌发。琼脂扩散法中, LD038 菌落周围产生的抑菌圈直径为 20mm, 而无菌水对照组中水霉菌丝蔓过滤纸纸片并长至平板边缘; D38 菌线间孢子的萌发与孢子距菌线的距离有关, 距 LD038 菌线 22mm 范围内, 孢子的萌发完全被抑制。无菌发酵上清液实验表明, 与对照组相比, LD038 无菌发酵上清液对孢子的萌发和菌丝生长都表现出显著的抑制作用。其中孢子较菌丝对上清液更为敏感, 5 倍稀释上清液下的孢子萌发率仅为 10 %, 且萌发后的菌丝生长也同样受到抑制, 整个实验过程中菌丝均未形成网状, 对照组中萌发形成的菌丝在 16h 后呈网状。无菌上清原液和 2 倍稀释上清液中孢子均未萌发。对菌丝而言, 仅无菌上清原液能彻底抑制菌丝生长, 与对照组相比, 2 倍和 5 倍稀释上清液显著延缓了菌丝的生长。当对照组中的菌丝铺满整孔时, 2 倍和 5 倍稀释上清液中的菌丝长度分别为 0 和 2.6mm。显微观察表明 LD038 的无菌发酵上清液导致水霉菌丝形态发生变化, 较正常菌丝短而粗大, 且出现了黑色原生质聚集。本研究为水霉病害的生物防治提供了一定的理论基础和依据。

关键词: 水霉; 拮抗菌; 生物防治; 黏质沙雷氏菌
中图分类号: S941.43^{+}1　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 1000-3207(2008)03-0301-07

水霉病为淡水养殖种类的常见寄生性疾病, 病原菌为卵菌纲的一些种类, 分类学上, 将此纲生物从原真菌界划分为茸鞭生物界[1]。目前引起水产动物水霉病的常见种类为水霉 (*Saprolegnia*) 和棉霉 (*Achlya*) 两个属中的一些种类[2]。水霉病流行很广[3], 一年四季均可发病[4], 晚冬初春季节尤为严重, 对寄主无严格的选择性, 水产动物及卵都可被感染, 给养殖产业造成了巨大的经济损失[5,6]。对于水霉病的防治主要采用化学治疗方法, 然而孔雀石绿作为经济、有效的水霉病防治药物, 存在着免疫抑制[7]、三致作用 (致癌、致畸、致突)、高残留等毒副作用[8], 从 1992 年起至今包括我国在内的许多国家都已将其列为水产养殖禁用药品[9], 由于缺乏能有效防治水霉病的药物, 更加剧了水霉病害问题的严重性。到目前为止, 可以防治水霉的主要化学药物有氯化钠、福尔马林、过氧化氢、臭氧等, 但是仍缺乏高效的药物[10]。此外, 化学药物的使用容易引起病原菌产生耐药性, 对养殖环境的生态平衡也有一定的破坏作用, 因此, 采用生物控制水产病原菌得到了越来越多的重视。近年来, 利用细菌防治水产病害有一些报道, Gibson, *et al*.[11] 利用中间气单胞菌 (*Aeromonas media*) 能够完全保护攻毒感染塔氏弧菌 (*Vibrio tubiashii*) 的牡蛎 (*Crassostrea gigas*); Lategan, *et al*.[12,13] 利用中间气单胞菌 (*Aeromonas media*) A199 治疗人工感染水霉的澳洲鳗鲡 (*Anguilla australis* Richardson) 及自发感染水霉的银锯眶鲾 (*Bidyanus bidyanus*), 取得了理想的治疗效果。然而在国内水产疾病研究领域, 尚无水霉生物防治的相关报道。本文从水霉病害发生的养殖水体中分离筛选出一株对水霉有较强拮抗作用的拮抗株 LD038, 并对其拮

收稿日期: 2007-07-23; **修订日期**: 2008-01-13
基金项目: "十一五"国家科技支撑计划重点项目 (2006BAD03B04); 上海市教育委员会 E-研究院建设资助项目 (E03009); 上海市重点学科建设项目 (Y1101) 资助
作者简介: 张书俊 (1981—), 男, 汉族, 江苏如东人; 硕士研究生; 主要从事水产动物病害研究。E-mail: shjzhang_1981@yahoo.com.cn
通讯作者: 杨先乐, E-mail: xlyang@shfu.edu.cn

抗活性进行了初步的研究,为水霉病害的生物防治提供了一些理论基础和依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 样品采集 水样采集于东海渔场发生水霉病的养殖池塘;水霉病原菌,从患有水霉病鲟鱼肌肉组织中分离得到,属于水霉属,4 ℃保存。

1.1.2 培养基 普通营养琼脂(NA),用于水样中细菌的分离,购于上海疾病预防控制中心;马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA),玉米粉琼脂培养基(CMA),用于水霉培养及平板抑制实验,购于上海疾病预防控制中心;脑心浸液琼脂培养基(BHI),用于水霉拮抗细菌的筛选,购于北京陆桥技术有限责任公司;GY 培养基:葡萄糖 10g、酵母提取液 2.5g、琼脂 16g、蒸馏水 1000mL,pH 7.0,用于平板抑制实验;沙保劳(Sabouraud)琼脂培养基:蛋白胨 10g,葡萄糖 10g,琼脂 16g,蒸馏水 1000mL,pH 7.0,用于平板抑制实验;马铃薯葡萄糖液体培养基:新鲜去皮马铃薯 200g、葡萄糖 20g、蒸馏水 1000mL,马铃薯先加热煮沸 15min 后,经纱布过滤去渣,加水补足原量,pH 调至 7.0,此液体培养基用于拮抗细菌株的发酵培养。

1.2 拮抗菌株的筛选

1.2.1 细菌分离 按稀释涂布平板法,将水样稀释 10^3 倍后,取 0.1mL 稀释液均匀涂布于普通培养基平板,置于 25 ℃下培养 3d。挑取菌落形态不一样的细菌分离纯化后接种至斜面保存备用。

1.2.2 拮抗菌株的筛选 按照 Hussein, *et al*.[14] 的方法,将分离得到的细菌以划线的方式接种至 BHI 平板上,每个平板接种同一菌株的两条平行菌线,菌线之间的距离约为 3cm,各自与平板边缘的距离也大约为 3cm。将按此方法接有双条菌线的培养皿置于 25 ℃下培养 1d,待菌落长出后,再在菌线之间接种水霉琼脂块(直接从长满水霉的 PDA 平板切取,直径为 3mm)。25 ℃下培养 3d 后,测定水霉菌落大小,以连续两天测定结果相同,即菌落停止生长后的值为最终水霉菌落大小,每组设三个平行。在对照 BHI 平板上(无接种细菌),水霉生长 3d 后铺满整个平板。以水霉菌落边缘至细菌菌线距离作为细菌拮抗作用大小的判断标准。记录有拮抗作用菌株的编号。

1.3 不同培养基对拮抗作用的影响 将筛选出拮抗作用最强菌株 LD038 按 1.2.2 小节中的实验方法,接种至 GY、CA、BHI、PDA、沙保劳琼脂(Sabouraud)5 种培养基上,观察不同培养基上 LD038 对水霉抑制作用。以无划线接种 LD038 的培养基平板作为对照组。

1.4 LD038 无菌上清液的制备 将拮抗菌株 LD038 接种至马铃薯葡萄糖液体培养基中(50mL),25 ℃,150r/min 下摇床培养 24h 后,按 5%接种量将此活化菌液加入 150mL 马铃薯葡萄糖液体培养基继续摇床培养 48h,细菌发酵液经 4 ℃,8000r/min 离心,取上清液,经 0.22μm 孔径滤膜过滤后,收集无菌的发酵上清滤液。

1.5 水霉孢子悬液的制备 参照文献[15],取 PDA 培养基上生长的水霉菌丝,在无菌水中漂洗三次后转移至盛有 20mL 无菌水的培养皿中,20 ℃培养 24h 后,弃去水霉菌丝,用血小球计数板在显微镜下计量孢子数目,用无菌水调整孢子浓度至 2×10^4 cyst/mL,4 ℃保存备用。

1.6 LD038 对水霉菌丝生长的抑制作用 采用琼脂扩散法,在 PDA 平板表面,距离培养皿边缘约 3cm,沿四周等间距处,放入滤纸纸片,在滤纸纸片上滴加 20μL LD038 菌液(1×10^8 cfu/mL),以无菌水作为对照,25 ℃下培养 1d,LD038 以滤纸为中心在平板上形成菌落。在培养皿中央位置接种水霉琼脂块(直径为 3mm),25 ℃下培养 3d,测量 LD038 对水霉抑菌圈的大小,以 LD038 菌落边缘至受抑制的水霉菌落边缘为抑菌圈半径。

1.7 LD038 对水霉孢子萌发的抑制作用 按照 1.2.2 小节中的接种方法,将拮抗菌株 LD038 划线接种至 PDA 平板,25 ℃下培养 1d,待菌落长出后,在拮抗菌菌线间滴加 100μL 水霉孢子悬液(2×10^4 cyst/mL),涂布均匀;对照组中将 100μL 水霉孢子悬液滴加至 PDA 平板上,涂布均匀,2h 后观察孢子萌发的情况。

1.8 LD038 无菌发酵上清液对水霉菌丝及孢子萌发的抑制作用 将 1.4 节中制备的无菌上清液与无菌蒸馏水按照 1∶0、1∶1、1∶4 比例稀释后,加入 24 孔板中,每孔 1mL,每个浓度组设三个平行;对照组中为 5 倍无菌蒸馏水稀释的马铃薯葡萄糖液体。每孔中加入新生水霉琼脂块(直径 2mm)或 30μL 孢子悬浮液(2×10^4 cyst/mL),25 ℃下培养,于 2h、4h、16h、28h、40h,显微镜下观察菌丝生长和孢子萌发情况,并测量菌丝长度。观察计算孢子萌发率时,每个平行组选择 5 个视野,取平均值。孢子萌发率以视野中萌发的孢子占总孢子数的比值计算。

1.9　LD038 细菌鉴定　采用法国生物 - 梅里埃公司生产的 ATB Expression 微生物自动鉴定系统,所用测试卡为 ID 32E,测定结果用随机软件进行分析。

2　结　果

2.1　拮抗菌株的筛选

从水体中共分离到 130 株细菌,其中有拮抗作用的细菌共 3 株,编号为 LD038、LD057、LD106,但其中以 LD038 的拮抗作用最强(表 1)。

表 1　三株拮抗菌株对水霉生长的抑制作用

Tab. 1　The antagonistic effect of three antagonistic bacteria isolated on *saprolegnia* hyphal growth

编号 Number	抑菌距离(mm) Inhibition Zone (mm)
LD038	9
LD057	3
LD106	4

2.2　培养基对 LD038 拮抗作用的影响

结果表明,在不同培养基平板对照组中,水霉在 CA 上生长速度最慢,但 4d 后铺满整个平板;在实验组中,除 Sabouraud 培养基平板上长满水霉外,其他 4 种培养基上的水霉都受到 LD038 不同程度的抑制作用,抑制活性大小依次为:PDA > BHI > GY > CA > Sabouraud (表 2、图 1)。因此选择 PDA 研究拮抗菌 LD038 对水霉的拮抗作用。

表 2　不同培养基对 LD038 拮抗作用的影响

Tab. 2　The effect of the culture media on inhibitory activity of the strain LD038

培养基 Culture media	抑菌距离(mm) Inhibition Zone (mm)
GY	5
CA	3
BHI	9
PDA	12
Sabouraud	0

2.3　LD038 对水霉菌丝的抑制作用

PDA 平板表面上,拮抗菌 LD038 能显著抑制水霉菌丝的生长,接种水霉 3d 后在滤纸周围形成清晰的抑菌圈,直径大小为 20mm。

2.4　LD038 对孢子萌发的影响

在接种有 LD038 的 PDA 平板上水霉孢子萌发受到了抑制,孢子悬浮液涂布于平板 2h 后,倒置显微镜下观察,对照组(无接种拮抗菌)孢子出现萌发,有芽管长出;而接种拮抗菌的 PDA 整个平板表面,孢子均没有萌发,随着培养时间的延长,在两条菌线间中央区域内,孢子开始萌发,并逐渐形成菌丝,最终在平板上形成肉眼可见的白色棉花状菌落;离拮抗菌落较近的区域,孢子虽有萌发,但抑制在芽管状态,没能形成菌丝;在拮抗菌落附近 22mm 直径范围内,孢子没有萌发(图 2)。



图 1　PDA 培养基上 LD038 对水霉生长的抑制

Fig. 1　*Saprolegnia* inoculum (center) inhibited by LD038 bacterial strain on PDA medium

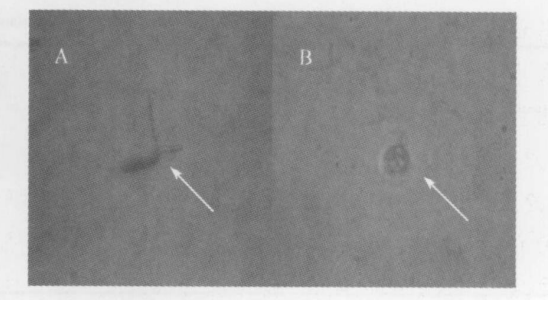


图 2　拮抗菌株 LD038 对孢子萌发的抑制作用(×400)

Fig. 2　Inhibition of cysts germination by the antagonistic bacteria strain LD038 after 3h incubation (×400)

A. 对照组中,PDA 平板上萌发后的孢子;B. LD038 存在时,孢子的萌发受到抑制

A. Germination proceeds on the PDA plate in the absent of the strain LD038; B. Germination is inhibited in the present of the strain LD038

2.5　LD038 无菌发酵上清液对水霉菌丝的抑制

各稀释浓度的 LD038 无菌上清液均对菌丝生长具有一定的抑制作用,与对照组相比,菌丝长度呈现显著差异($p < 0.05$)。1∶0 实验组中,菌丝的生长被完全抑制,7d 后观察菌丝也无生长;1∶1 和 1∶4 实验组中,无论是实验开始阶段还是后阶段,菌丝的生长速度明显慢于对照组,当对照组水霉菌丝铺满整个孔径时,上述两实验组的菌丝长度为 0mm 和 2.6mm;随着培养时间的增加,20h 后,1∶1 实验组中的菌丝也开始长出(图 3)。实验过程中,上述各实

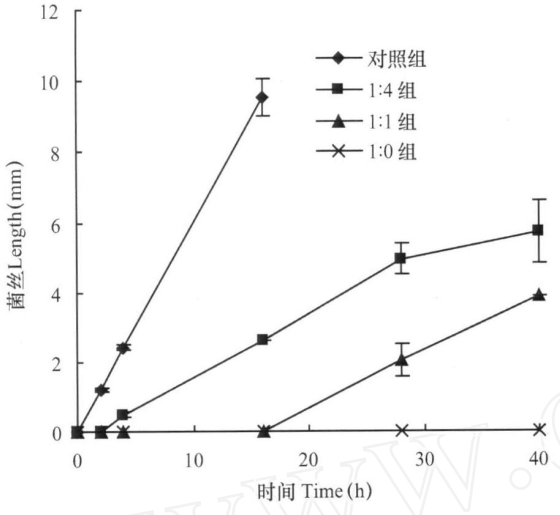


图 3 拮抗菌 LD038 无菌发酵液对水霉菌丝生长的影响

Fig. 3 The effect of cell-free culture supernatants of the strain LD038 on *saprolegnia* hyphal growth

8h 后,对照组菌丝铺满整孔 8h later, wells were full of hypha in the control group

验组中的水霉琼脂块,在实验开始后的一段时间内,倒置显微镜(×400)下观察发现菌丝内有黑色的颗粒状物质,随着时间的延续,1∶1 和 1∶4 实验组中,逐渐有清晰透明的菌丝产生,并伸进上清液中,但菌丝分枝较多,且粗而短小,而对照组中的琼脂块的四周新生的菌丝在倒置显微镜下细长、清晰无杂质。

2.6 LD038 无菌发酵上清液对水霉孢子萌发的影响

在不同稀释倍数的拮抗菌 LD038 无菌上清液中,孢子的萌发均受到抑制,随着稀释倍数的增大,孢子萌发受抑制程度也逐渐减弱。对照组中,孢子在实验开始 1h 后就开始出现芽管,1∶4 实验组在 2.5h 后才开始萌发,而 1∶0 和 1∶1 实验组中水霉孢子则完全被抑制,直至实验结束后仍未萌发。1∶4 实验组中,虽有孢子萌发,但孢子萌发率显著低于对照组($p < 0.05$),萌发率为 10%(表 3)。萌发后菌丝的生长速度也显著低于对照组($p < 0.05$)。16h 后,对照组中萌发后的菌丝结成网状,而 1∶4 实验组中孢子萌发后形成的菌丝还无分枝,至实验结束,也未形成网状(图 4)。

表 3 拮抗菌 LD038 无菌上清液对孢子萌发率的影响

Tab. 3 The effect of cell-free culture supernatants of the strain LD038 on *saprolegnia* cysts germination rate

组别 Group	萌发数 Numbers of cyst germinated	孢子数 Number of cysts	萌发率 Germination rate	均值 Average
对照组	9	9	100	
对照组	8	8	100	96.3%
对照组	8	9	88.9	
1∶4 组	2	10	20	
1∶4 组	0	9	0	10%
1∶4 组	1	10	10	

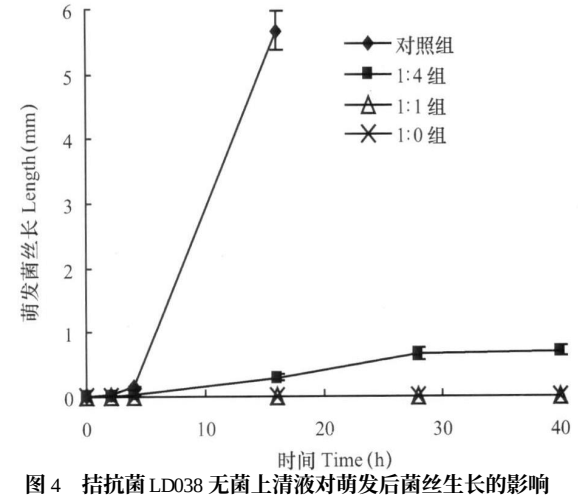


图 4 拮抗菌 LD038 无菌上清液对萌发后菌丝生长的影响

Fig. 4 The effect of cell-free culture supernatants of the strain LD038 on *saprolegnia* hyphal growth from germinated cysts

16h 后,对照组的菌丝已经结成网状,无法测量

16h later, wells were confluent with hypha in the control group and it is unable to be measured

2.7 LD038 拮抗菌株的鉴定

LD038 经自动鉴定系统鉴定结果为黏质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*),鉴定率(id)为 99.9%。

3 讨 论

水产养殖动物生活的水环境中存在着微生态平衡问题,一旦打破这种平衡,就易导致水产养殖疾病的发生。当鱼体有创伤、养殖密度大、水环境恶化时最容易引起水霉病的发生,一方面是因为受伤后的鱼体自身免疫水平降低,抗感染能力下降;另一方面当水体中存在的微生态平衡被破坏后,可能导致水体中的部分微生物对水霉菌的抑制作用丧失。但也有些鱼在感染水霉病后能自行康复,可能是微生物间的相互关系在水霉病的控制中起着至关重要的作用。近年来,微生态制剂在水产养殖动物病害防治中受到越来越多的重视,并发挥着调节养殖环境,控制病害的作用,有望进一步取代化学治疗方法。目

前研究发现一些细菌对水产病原菌有拮抗作用,如:Spanggaard, *et al*.[16]从分离自鱼体的菌株中筛选出45株对弧菌病有拮抗作用的菌株;Das, *et al*.[17]研究发现假单胞菌属的三株细菌在体外对嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)都有抑制作用;Hussein, *et al*.[14]从患水霉病鱼体的损伤处分离出假单胞菌属、气单胞菌属的细菌,发现均能抑制水霉的生长。由此可见,利用生物间的拮抗作用控制水产动物病害是有可能的。但是在分离、筛选拮抗菌的时候,如何增加筛选率是寻找拮抗微生物的一个重点和难点。本文从分离于水霉病害发生后的养殖水体的130株细菌株中筛选出3株对水霉有拮抗作用的细菌菌株,拮抗菌仅占分离细菌总数的2.3%。这与筛选模型有很大的关系,建立一个合适的模型对增加筛选率有很大的帮助。同时筛选培养基的选择也是很重要的,既要适合水霉的生长也要满足细菌的营养,本文中选择以BHI作为筛选培养基,基本上适合所有细菌的生长,重要的是水霉的长势较好,优于NA,特别是BHI含有天然的营养物质。在不同营养成分下,拮抗菌的代谢产物不同,也就会产生不同的拮抗效果。Lategan, *et al*.[18]发现拮抗菌A199在富含色氨酸的胰蛋白胨中和蛋白胨(TNPB)培养基上能产生具有拮抗作用的吲哚物质,但在色氨酸缺乏的SE培养基上则不能表现出拮抗作用。本文中,LD038拮抗菌株同样在不同培养基上表现出不同的抑制作用,其中在PDA上表现出的抑制效果最强。可见培养基的选择也是导致拮抗菌筛选率低下的一个重要原因。

拮抗菌产生拮抗作用的方式有多种,如产生抗菌素[18]、抗菌蛋白[19]等拮抗物质;物种间的营养竞争[20];生态位竞争,即拮抗菌比病原菌更易与生物机体结合,从而排斥病原菌而起到的保护作用[21]等。文中LD038菌株对水霉的拮抗作用,可以排除营养竞争因素。在实验过程中发现,将上清液以无菌水稀释5倍后,水霉菌丝及孢子都能生长、萌发,而无稀释及稀释浓度低的则不生长或生长受抑制。因此,应该是LD038代谢产物起到的拮抗作用。但LD038无菌发酵上清液中拮抗物质对水霉菌丝和孢子的作用机制,尚不清楚,显微镜下观察对水霉的作用表现为菌丝出现原生质聚集、菌丝肿大,孢子出现裂痕,与Bae[22]、Yoshida, *et al*.[23]报道的拮抗菌代谢物质对陆栖真菌作用时的现象相似。

研究表明LD038及其无菌发酵上清液均对水霉有较强的拮抗作用。生长1d的LD038对水霉产生的抑菌圈为20mm,而抗真菌药物咪康唑(10μg/片)的抑菌圈为15mm。低浓度无菌发酵上清液虽然没能彻底地抑制菌丝,但是显著地推迟了菌丝的初生及菌丝的生长速度。相比之下,孢子对上清液要敏感一些,5倍稀释上清液中的孢子萌发率为10%,且萌发后菌丝生长停止在菌丝分枝之前。孢子作为水霉生活史中的一个阶段,同时也是水霉病发生的传播因子[1],因此对孢子清除也是防治水霉的有效途径。然而采用琼脂扩散法研究无菌发酵上清液在PDA平板上对水霉菌丝的抑制作用时,却没有表现出拮抗作用,这与Hussein, *et al*.[14]报道的相似,估计与LD038发酵培养时的发酵条件和产生的拮抗物质的量有关,也有可能是与LD038产生的拮抗物质为几丁质酶有关。

LD038经微生物鉴定系统鉴定为黏质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*),其亦称灵杆菌(*Bacillus prodigiosus*),广泛存在于水、土壤和食品中[24],由于能产生几丁质酶,从而被用于植物病害防治中的生防菌[25,26]。本文研究发现黏质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)对水霉也存在着拮抗作用。从而为水霉病的防治提供了新的思路和一定的理论基础,但是如何利用活菌还存在诸多困难,如水环境对生物防治的影响、细菌有无致病性等等。因此,LD038的动物安全性试验及环境生态安全性还有待于进一步研究,以便对菌株的安全性及应用前景作出科学评价,从而更好地用于水霉的生物防治。

参考文献:

[1] Pieter V W. *Saprolegnia parasitica*, an oomycete pathogen with a fishy appetite: new challenges for an old problem [J]. *Mycologist*, 2006, **20**(3): 99—104

[2] Huang Q Y. Aquatic animal diseases [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press. 1996, 142 [黄琪琰. 水产动物疾病学. 上海:上海科学技术出版社. 1996, 142]

[3] Monica M S, Alan P, Kanak B. *Saprolegnia bulbosa* sp. nov. isolated from an argentine stream: taxonomy and comparison with related species [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, **268**(2): 225—230

[4] Ni D S. Study on control of saprolegniasis in fish [M]. Beijing: Agriculture Press. 1982, 8 [倪达书. 鱼类水霉病的防治研究. 北京:农业出版社. 1982, 8]

[5] Hussein M M A, Hatai K. Pathogenicity of saprolegnia species associated with outbreaks of salmonid saprolegniosis in Japan [J]. *Fisheries Science*, 2002, **68**: 1067—1072

[6] Tampieri M P, Galuppi R, Carelle M S, *et al*. Effect of selected essential oils and pure compounds on *Saprolegnia parasitica* [J]. *Pharmaceutical Biology*, 2003, **41**(8): 584—591

[7] Prost H, Sopinska A. Evaluation of activity of the celluar protective

process in carp with saprolegnia infection and treatment with malachite green and immunostimulant [J]. *Medycyna Weterynaryjna*, 1989, **45**: 603—605

[8] Zhai Y X, Guo Y Y, Geng X, *et al*. Advances in studies on metabolic mechanism and bio-toxicity of malachite green [J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2007, **37**(1): 27—32 [翟毓秀, 郭莹莹, 耿霞, 等. 孔雀石绿的代谢机理及生物毒性研究进展. 中国海洋大学学报, 2007, **37**(1): 27—32]

[9] Xie W, Ding H Y, Xi J Y, *et al*. Detection of residues of malachite green, crystal violet and their metabolites in aquatic animal samples [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2006, **24**(5): 529—530 [谢文, 丁慧瑛, 奚君阳, 等. 水产品中孔雀石绿、结晶紫及其代谢产物残留量的检测. 色谱, 2006, **24**(5): 529—530]

[10] Fornerisa G, Bellardib S, Palmegianoc G B, *et al*. The use of ozone in trout hatchery to reduce saprolegniasis incidence [J]. *Aquaculture*, 2003, **221**(1): 157—166

[11] Gibson L F, Woodworth J, George A M. Probiotic activity of *aeromonas media* on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, when challenged with *Vibrio tubiashii* [J]. *Aquaculture*, 1998, **169**: 111—120

[12] Lategan M J, Torpy F R, Gibson L F. Control of saprolegniosis in the eel *Anguilla australis* Richardson, by *Aeromonas media* strain A199 [J]. *Aquaculture*, 2004, **240**: 19—27

[13] Lategan M J, Torpy F R, Gibson L F. Biocontrol of saprolegniosis in silver perch *Bidyanus bidyanus* (Mitchell) by *Aeromonas media* strain A199 [J]. *Aquaculture*, 2004, **235**: 77—88

[14] Hussein M M A, Hatai K. *In vitro* inhibition of saprolegnia by Bacteria isolated from Lesions of Salmonids with Saprolegniasis [J]. *Fish Pathology*, 2001, **36**(2): 73—78

[15] Li A H, Nie P, Lu Q Z. A primary study of saprolegniasis and its pathogen of *lateolabrax japonicas* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1999, **23**(4): 388—390 [李爱华, 聂品, 卢全章. 花鲈水霉病及其病原的初步研究. 水生生物学报, 1999, **23**(4): 388—390]

[16] Spanggaard B, Huber I, Nielsen J, *et al*. The probiotic potential against vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout [J]. *Environmental Microbilogy*, 2001, **3**(12): 755—765

[17] Das B K, Samal S K, Samantaray B R, *et al*. Antagonistic activity of cellular components of *Pseudomonas* species against *Aeromonas hydrophila* [J]. *Aquaculture*, 2006, **253**: 17—24

[18] Lategan M J, Booth W, Shimmon R, *et al*. An inhibitory substance produced by *Aeromonas media* A199, an aquatic probiotic [J]. *Aquaculture*, 2006, **254**: 115—124

[19] Shen J Y, Yin W L, Cao Z, *et al*. Purification and partial characterization of antagonistic substrance from *Bacillus subtilis* B115 [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, **29**(6): 689—693 [沈锦玉, 尹文林, 曹铮, 等. 枯草芽孢杆菌 B115 抗菌蛋白的分离纯化及部分性质. 水生生物学报, 2005, **29**(6): 689—693]

[20] Smith P, Davey S. Evidence for the competitive exclusion of *Aeromonas salmonicida* from fish with stress-inducible furunculosis by a *fluorescent pseudomonad* [J]. *Journal of Fish Diseases*, 1993, **16**: 521—524

[21] Balcazar J L, Vendrell D, Blas I D, *et al*. *In vitro* competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens [J]. *Veterinary Microbiology*, 2007, **122**(3-4): 373—380

[22] Bae D W, Lee J T, Son D Y, *et al*. Isolation of bacterial strain antagonistic to *pyricularia oryzae* and its mode of antifungal action [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2000, **10**: 811—816

[23] Yoshida S, Hiradate S, Tsukamoto T, *et al*. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves [J]. *Phytopathology*, 2001, **91**: 181—187

[24] Yu H. Medical Microbiology [M]. Beijing: People's Hygienics Press. 1983, 299 [余贺. 医学微生物学. 北京: 人民卫生出版社. 1983, 299]

[25] Chen X W, Fan H, Zhou K, *et al*. Study on the toxicity of *serratia marcesens* to the common vegetable insects [J]. *Tianjin Agricultural Sciences*, 2005, **11**(3): 5—7 [陈秀为, 范寰, 周可, 等. 一株黏质沙雷氏菌对蔬菜常见害虫毒力的研究. 天津农业科学, 2005, **11**(3): 5—7]

[26] Yin H X, Zhang J, Hou R T, *et al*. Isolation and identification of chitinase-producing bacterium and its synergistic effect on locust biocontrol [J]. *Plant Protection*, 2004, **30**(2): 37—41 [尹鸿翔, 张杰, 侯若彤, 等. 一株几丁质酶产生菌的分离鉴定及其灭蝗增效作用. 植物保护, 2004, **30**(2): 37—41]

SCREENING OF ANTAGONISTIC BACTERIUM STRAIN AGAINST SAPROLEGNIOSIS AND THE PRELIMINARY STUDY OF IN VITRO ANTAGONISTIC ACTIVITY

ZHANG Shu-Jun, YANG Xian-Le, LI Dan, LI Yi and GAO Peng

(*Aquatic Pathogen Collection Center of Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai* 200090)

Abstract: Pathogenic members of the genus *Saprolegnia* are the common causative agent of saprolegniosis in aquaculture. In order to find an ideal biological control method for these fungi, the antagonistic bacteria were screened from the pond in which severe outbreak of saprolegniosis occurred. The results showed that 3 out of 130 isolates exhibited *in vitro* inhibition of *Saprolegnia* hyphal growth on BHI agar plate inoculated with two parallel streaks of each bacterium. Three strains showed antagonistic effect were named as LD038, LD057 and LD106, respectively. The strain LD038 identified as *Serratia marcescens* using Automated Microbiology System for the identification of bacteria showed the strongest antagonistc activity among three stains mentioned above. Furthermore, we examined the *in vitro* antagonism of LD038 against *Saprolegnia*. Among five media examined, the LD038 exhibited the strongest antagonism using PDA media on which the inhibition zone was about 12mm. The LD038 on CA, GY and BHI media also exhibited antifungal activity, and the inhibition zones ranged from 3mm to 9mm. However, the LD038 on Sabouraud media could not inhibit the growth of *Saprolegnia* hyphae at all. In addition, the plate assay showed that the LD038 was able to inhibit *Saprolegnia* hyphal growth on PDA plate using agar diffusion method. And the inhibition zone induced around LD038 colony was about 20mm, whereas *Saprolegnia* hyphae reached the edge of plate on the controls without the LD038. Moreover, cyst germination of *Saprolegnia* was also inhibited to a great extent between two parallel streaks of the LD038, and the inhibitory activity was related to the distance from the streak of LD038, the inhibition zone was about 22mm in which cyst germination was completely inhibited. In the broth assay, serial diluted cell-free culture supernatants of the LD038 significantly inhibited *Saprolegnia* hyphal growth and cyst germination compared with the controls, and *Saprolegnia* cysts were more sensitive than *Saprolegnia* hyphal. *Saprolegnia* cysts were able to germinate in the 1/5 diluted cell-free culture supernatant, but the germination rate was only 10 % in comparison to 96.3 % recorded for the controls. The hyphal growth from germinated cysts was also inhibited. And *Saprolegnia* hyphae formed hyphal nets in control wells 16 hours later, while the hyphae in the 1/5 diluted cell-free culture supernatant were halted with no branching over the whole experiment. In contrast, the non-diluted and 1/2 diluted cell-free culture supernatants of LD038 completely inhibited the *Saprolegnia* cyst germination. With respect to *Saprolegnia* hyphal, only the non-diluted cell-free culture supernatant completely inhibited the hyphal growth, while the 1/2 and 1/5 diluted cell-free culture supernatant postponed *Saprolegnia* hyphal growth. When the whole control well was confluent with *Saprolegnia* hyphae, the lengths of hyphae in wells treated with the 1/2 and 1/5 diluted cell-free culture supernatant were 0 and 2.6mm respectively, and *Saprolegnia* vegetative hyphae began to erupt from agar block in the 1/2 diluted supernatant 20 hours later. Phase-contrast microscopic examination showed that the hyphae in treated groups revealed extensive morphological changes including granulation of the cytoplasm, short and enlargement of hyphae. On the contrary, the hyphae in the controls were slender containing a clear and granule-free cytoplasm. Our study will provide theoretical foundation for biocontrol of saprolegniosis in aquaculture in future.

Key words: *Saprolegnia*; Antagonistic bacteria; Biocontrol; *Serratia marcescens*