研究论文|Research Article
海洋牧场与现代渔业|Marine Ranching and Modern Fisheries

Open Access

引用格式:叶绵权, 王欣怡, 池梓榕, 等. 水产病原弧菌拮抗菌的筛选及其抗菌物质分离 [J]. 海南大学学报(自然科学版中英文), 2026, 44(2): 161−173.

Citation: YE Mianquan, WANG Xinyi, CHI Zirong, et al. Screening of antagonistic bacteria against aquatic pathogenic Vibrio and isolation of their antibacterial substances[J]. Natural Science of Hainan University, 2026, 44(2): 161−173.

水产病原弧菌拮抗菌的筛选及其抗菌物质分离

叶绵权[1,2], 王欣怡[2], 池梓榕[1,2], 蔡晓霓[1,2], 龙　昊[1,2],
谢珍玉[1,2], 任　伟[1,2] ✉

(1. 海南大学 海洋生物与水产学院, 海南 海口 570228;
2. 南海海洋资源国家重点实验室, 海南 海口 570228)

摘　要: 为了探索上清液天然抑菌物质最适宜的发酵条件及其稳定性, 采用了平板对峙法, 筛选对哈维氏弧菌有显著拮抗效果的拮抗菌, 通过不同硫酸铵饱和度盐析出抗菌粗蛋白。结果表明: 贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis* BS2-7)对水产病原—哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi* GDH11385)拮抗效果最显著; 发酵贝莱斯芽孢杆菌培养基和发酵温度对抑菌活性无显著影响, 发酵时长对抑菌活性具有显著影响(P<0.05); 上清液抗菌谱较广, 对哈维氏弧菌、欧文氏弧菌、副溶血弧菌和高地芽孢杆菌具有拮抗活性; 温度、酸碱度和紫外照射对上清液抑菌物质的抑菌活性具有显著性影响(P<0.05); 向上清液中添加饱和度达到 10% 和 20% 的硫酸铵药品时, 所析出的粗蛋白对哈维氏弧菌、欧文氏弧菌具有抑菌活性。研究结果可为生物防治弧菌病原抗菌蛋白药物的开发提供样本支撑和理论依据。

关键词: 哈维氏弧菌; 欧文氏弧菌; 贝莱斯芽孢杆菌; 抗菌蛋白

中图分类号: G232　　**文献标志码:** A　　**文章编号:** 1004-1729(2026)02-0161-13

DOI: 10.65658/j.hndk.2025052202　　CSTR: 32403.14.hndk.2025052202

Screening of antagonistic bacteria against aquatic pathogenic Vibrio and isolation of their antibacterial substances

YE Mianquan[1,2], WANG Xinyi[2], CHI Zirong[1,2], CAI Xiaoni[1,2], LONG Hao[1,2],
XIE Zhenyu[1,2], REN Wei[1,2] ✉

(1. School of Marine Biology and Fisheries, Hainan University, Haikou 570228,China;
2. State Key Laboratory of Marine Resources Utilization in South China Sea, Haikou 570228,China)

Abstract: In order to explore the optimal fermentation conditions and stability of the antibacterial substances in the supernatant, the plate confrontation method was used to screen antagonistic bacteria with the significant antagonistic effects against *Vibrio harveyi*, and the salting method with the different ammonium sulfate saturation was performed to extract the crude antibacterial proteins. The results showed that *Bacillus velezensis* BS2-7 had the most significant antagonistic effects against the aquaculture pathogen *Vibrio harveyi*

Received: 2025−05−22; **Revised:** 2025−07−01; **Accepted:** 2025−07−02.
✉ **Corresponding author(s):** REN Wei, renwei@hainanu.edu.cn.

GDH11385, the fermentation medium for *Bacillus velezensis* and fermentation temperature had no significant effects on the antibacterial activity, while the fermentation duration had a significant effect (P<0.05); the supernatant had a wide antibacterial spectrum and showed the antagonistic activity against *Vibrio harveyi*, *Vibrio owensii*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Bacillus altitudinis*; the temperature, pH, and ultraviolet irradiation had significant effects (P<0.05); when the ammonium sulfate with 10% saturation and 20% saturation were added into the supernatant, the crude proteins separated from the fractions had the antibacterial activity against *Vibrio harveyi* and *Vibrio owensii*. Our findings provide the sample support and the theoretical basis for the development of antibacterial protein drugs against Vibrio pathogens.

Keywords: *Vibrio harveyi*; *Vibrio owensii*; *Bacillus velezensis*; antibacterial protein

0 引 言

近年来,随着水产养殖技术的不断提升,中国水产品生产模式逐步向“以养为主”转变,深远海、工厂化、陆基循环水养殖以及鱼菜共生等新型设施渔业发展迅速,推动水产养殖产量不断增长。但是,密集的养殖模式造成排泄物底部堆积和养殖水体底部氧气贫瘠,为病原微生物生长提供了适宜环境。病原微生物快速生长是暴发水产病害的直接因素。

哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)[1]是一种生长在河口区域的革兰氏阴性细菌,是水产养殖业最主要的病原菌,在其生长过程中分泌的物质可致水生生物患病死亡,哈维氏弧菌感染的水产种类[2]有凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、石斑鱼(*Epinephelus coioides*)、大黄鱼(*Larimichthy scrocea*)、尖吻鲈(*Lates calcarifer*)、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)和紫扇贝(*Argopecten purpuratus*)。患病水生动物会出现眼部病变/失明、皮肤溃疡、胃肠炎、肌肉坏死和尾腐病等一系列症状。

在水产养殖领域中治疗细菌感染的方式,从20世纪至今常使用抗生素来治疗[3]。由于抗生素的广泛使用甚至滥用,细菌为了适应环境逐渐对抗菌药物产生抵抗性,据刘军军[4]研究报道,从上海市水产品中的238份南美白对虾样品中总共分离出118株副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)和214株霍乱弧菌,其中,副溶血弧菌对抗生素的耐药性达到了78.4%,霍乱弧菌对抗生素耐药性达到了81.8%。据报道,采用生物拮抗的方式,拮抗菌可以在同一生态位中,利用不同微生物间出现生长抑制的现象与病原菌相互制约、相互排斥、相互抵抗,既可拮抗病原菌还可降低病原菌的耐药性。例如,Ongena等[5]研究发现,拮抗菌可以通过分泌多种抑菌物质,如抗菌肽、抗菌蛋白和脂肽类等物质拮抗病原微生物,刘晓铃[6]研究报道,假交替单胞菌J-13的发酵液和菌体对溶藻弧菌、副溶血性弧菌以及灿烂弧菌均呈现出抑制效果,并且当假交替单胞菌菌体参与其中时,抑菌活性更为显著。郝彦利[7]研究发现,从东海海水中分离筛选到的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的发酵液在抑制副溶血弧菌方面有良好的效果。付欢等[8]和王青华等[9]研究表明,从海洋中分离得到的贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)的枯草杆菌素可以抑制金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、溶藻弧菌和副溶血弧菌等多种病原菌。Ren等[10]研究表明,假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas piscicida*)发酵液可以有效抑制哈维氏弧菌对石斑鱼器官的损害。张营[11]从土壤中分离得到的枯草芽孢杆菌的抗菌蛋白可以抑制橡胶树褐根病菌生长。然而,贝莱斯芽孢杆菌分泌的抗菌蛋白对哈维氏弧菌预防和治疗的相关研究较少。亟待挖掘海洋微生物资源,用来缓解海水养殖业面临的病害问题。

为了水产养殖的绿色健康发展,有必要从海水中筛选具有显著拮抗水产病原菌—哈维氏弧菌的贝莱斯芽孢杆菌,并分离出贝莱斯芽孢杆菌的抑菌物质。为此,本研究从海南省三亚蜈支洲岛的海水中筛选出1株对哈维氏弧菌拮抗效果显著的拮抗菌BS2-7,探究其抗菌物质生产的最适条件(如发酵温度、发酵时间和发酵培养基),研究拮抗菌密度、紫外线照射时长、孵育温度和孵育酸碱度对抑菌物质抑菌活性的影响,探讨不同梯度的硫酸铵药品盐析出粗蛋白对哈维氏弧菌和欧文氏弧菌抑菌活性影响。以期为治疗

哈维氏弧菌和欧文氏弧菌引发的疾病，以及研发益生菌制剂提供样本支撑和理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验菌株和试剂 供试菌株：从海南省三亚市蜈支洲岛海水中初步筛选出 14 株备选菌株，储存于海南大学微生物资源开发与利用课题组的−80 ℃ 冰箱中。

指示菌株：哈维氏弧菌（*Vibrio harveyi*）、欧文氏弧菌（*Vibrio owensii*）、溶藻弧菌（*Vibrio alginolyticus*）、副溶血弧菌（*Vibrio parahaemolyticus*）、坎贝氏弧菌（*Vibrio campbellii*）、肺炎克雷伯菌（*Klebsiella pneumoniae*）、大肠杆菌（*Escherichia coli*）、金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）、高地芽孢杆菌（*Bacillus altitudinis*）、短芽孢杆菌（*Bacillus pumilus*）和无乳链球菌（*Streptococcus agalactiae*）等 11 种指示菌株被储存于海南大学微生物资源开发与利用课题组 −80 ℃ 冰箱中。

供试培养基：2216E 液体培养基、2216E 固体培养基、LB 液体培养基、LB 固体培养基。

供试试剂：PBS 缓冲液、硫酸铵药品、细菌 DNA 提取试剂盒、BCA 总蛋白测定试剂盒（南京建成，A045-4）、雅酶一步法 PAGE 凝胶快速制备试剂盒。

1.2 实验方法

1.2.1 哈维氏弧菌拮抗菌的筛选 菌株的活化：取−80 ℃ 超低温冰箱保存的 14 株备选菌株和哈维氏弧菌保种液，使用接种棒在 2216E 固体培养基上划线，倒置在恒温培养箱中 30 ℃ 培养 24 h，待长出单菌落。挑取单菌落接种至装有 2216E 液体培养基的三角瓶中，180 r · min^{-1}、30 ℃ 活化 24 h，稀释至 1×10^8 CFU · mL^{-1} 后，用于后续实验。

拮抗菌的筛选：活化分离出的 14 株备选菌株菌液使用超低温离心机，10 000 r · min^{-1}、4 ℃ 离心 20 min，取其上清液用无菌 0.22 μm 滤膜过滤，得到 14 株备选菌株的无细胞发酵上清液。以哈维氏弧菌为指示菌，取 100 μL 哈维氏弧菌菌液在 2216E 固体培养基上涂布，菌密度为 1×10^8 CFU · mL^{-1}，通过打孔扩散法（100 μL · $孔^{-1}$）测量抑菌圈直径进行筛选。每个实验做 3 个重复。根据抑菌圈直径挑选拮抗哈维氏弧菌效果优异的菌株进行后续实验，打孔法参考安相茹等[12]的方法。

1.2.2 哈维氏弧菌拮抗菌 BS2-7 鉴定 菌落形态观察：挑取对哈维氏弧菌具有显著拮抗作用的拮抗菌，在 2216E 培养基上划线分离培养 24 h，观察菌落形态，包括菌落大小、形态、颜色、透明度、边缘结构、表面光滑度和菌落表面状态。通过扫描电镜（Verios G4 UC，赛默飞）观察拮抗菌微观结构。分子生物学鉴定：挑取单菌落接种于 2216E 培养基中，在摇床中 180 r · min^{-1}、30 ℃ 培养 10 h，菌株 OD_{600} 值为 0.18，10 000 r · min^{-1} 离心 20 min，收集 BS2-7 菌株菌体送至美吉生物公司进行全基因组测序。将拮抗菌的全基因组基因序列与 GenBank 中已知的核酸序列进行 Blast 分析，挑选同源性较高的序列在 ClusterX 软件中完成序列比对，比对结束后使用 MEGA7.0 软件进行系统发育树分析，采用邻接法构建系统发育树。

1.2.3 BS2-7 无细胞上清液的抗菌谱实验 将 11 种指示菌菌株和 BS2-7 拮抗菌通过平板划线活化，挑取单菌落接种于 2216E 液体培养基中培养 24 h，使用低温高速离心机（10 000 r · min^{-1}、20 min、4 ℃）去除 BS2-7 菌株菌体，使用 0.22 μm 滤膜过滤残留菌体，保留上清液，使用移液枪移取 11 种指示菌株 100 μL 原菌液（1×10^8 CFU · mL^{-1}）到 2216E 固体平板上，使用涂布棒将 2216E 固体平板上的指示菌菌液涂布，使用打孔器在培养基上进行打孔，向孔中加入 100 μL BS2-7 无细胞发酵上清液与 11 种指示菌进行平板对峙，通过测量抑菌直径验证 BS2-7 菌株对 11 种指示菌的抑菌活性，挑选拮抗活性最强的指示菌进行后续实验。

1.2.4 上清液对哈维氏弧菌、欧文氏弧菌不同密度抑菌测定 按照上述方法获得 BS2-7 菌株无细胞发酵上清液，以哈维氏弧菌、欧文氏弧菌为指示菌，向孔中加入 100 μL 无细胞发酵上清液，拮抗菌菌株密度为 1×10^8 CFU · mL^{-1}，与 1×10^4、1×10^5、1×10^6、1×10^7 和 1×10^8 CFU · mL^{-1} 的欧文氏弧菌和哈维氏弧菌进行平板对峙实验，通过打孔法测量抑菌直径比较上清液对不同密度的哈维氏弧菌和欧文氏弧菌的抑菌活性，每个实验做 3 个重复。

1.2.5 上清液抗菌物质的稳定生产条件实验 不同发酵时间对上清液中抑菌物质拮抗效果的影响实验：

将BS2-7菌株的单菌落接种到装有2216E液体培养基的100 mL离心管中,在摇床中培养时间设置为8、10、16、18、21和24 h(30 ℃、180 r·min^{-1}),每个时间段拿出3管离心管,待到24 h全部拿出,使用离心机去除菌体,保留上清液,通过打孔法测量抑菌直径大小比较不同发酵时间的上清液对哈维氏弧菌和欧文氏弧菌的抑菌活性,每个实验做3个重复。

不同培养基对上清液中抑菌物质拮抗效果的影响实验:培养基为2216E液体培养基、LB液体培养基,将BS2-7菌株单菌落接种于2种培养基中,在摇床中培养24 h,第二天去除菌体,通过打孔法测量抑菌直径比较不同培养基发酵的上清液对哈维氏弧菌和欧文氏弧菌的抑菌活性,每个实验做3个重复。

不同发酵温度对上清液中抑菌物质拮抗效果的影响实验:温度设置为28、30、35和37 ℃,将BS2-7菌株的单菌落接种到装有2216E液体培养基的100 mL离心管中,在摇床中培养24 h,第二天通过离心机将4个温度的菌液去除菌体后获得上清液,通过打孔法测量抑菌直径比较不同发酵温度对哈维氏弧菌和欧文氏弧菌的抑菌活性,每个实验做3个重复。

1.2.6 上清液抗菌物质不同条件处理下稳定拮抗实验 不同紫外线照射时长对上清液中抑菌物质拮抗效果的影响实验:按照上述方法获得BS2-7菌株无细胞发酵上清液,将无细胞发酵上清液分装到10 mL离心管中,将全部的离心管放在30 W紫外灯垂直距离30 cm处分别照射1、2和3 h,以哈维氏弧菌和欧文氏弧菌为指示菌,以未处理的上清液作为对照,通过打孔法测量抑菌直径对比上清液在不同紫外线照射时间下对哈维氏弧菌和欧文氏弧菌的抑菌活性,每个实验做3个重复。

不同pH孵育对上清液中抑菌物质拮抗效果的影响实验:按照上述方法获得BS2-7菌株无细胞发酵上清液,将无细胞发酵上清液分装到9个100 mL的锥形瓶中,每个锥形瓶装有40 mL上清液,用浓度为1 mol·L^{-1}的NaOH溶液和浓度为1 mol·L^{-1}的HCI溶液调节上清液的pH,使上清液的pH值分别在3.00、4.00、5.00、6.00、7.00、8.00、9.00和10.00条件下孵育1 h,未处理的对照样品则25 ℃保存1 h,1 h后将上清液的pH调回其初始pH 6.10,通过打孔法测量抑菌直径对比上清液在不同酸碱度孵育下对哈维氏弧菌和欧文氏弧菌的抑菌活性,每个实验做3个重复。参考郝彦利[7]的方法。

不同温度孵育对发酵上清液中抑菌物质拮抗效果的影响实验:按照上述方法获得BS2-7菌株无细胞发酵上清液,将无细胞发酵上清液分装到9个10 mL的离心管中,将离心管置于10、20、30、40、50、60、70和80 ℃的水浴锅中水浴1 h,常温放置1 h的上清液为对照,通过打孔法测量抑菌直径对比上清液在不同温度孵育下对哈维氏弧菌、欧文氏弧菌的抑菌活性,每个实验做3个重复。

1.2.7 上清液抗菌物质初步鉴定 在500 mL的无细胞发酵上清液中缓慢加入硫酸铵药品至终饱和度为70%,用磁力搅拌器在常温下缓慢搅拌至全部溶解后,通过低温高速离心机(20 min、10 000 r·min^{-1}、4 ℃)将蛋白质沉淀与上清液分离,向沉淀中加入10 mL纯水将蛋白沉淀溶解,将溶解后蛋白溶液全部转移到10 kDa透析袋中,将透析袋放入装有PBS缓冲液的500 mL烧杯中,最后转移到−4 ℃冰箱中透析18 h,以哈维氏弧菌和欧文氏弧菌为指示菌,通过打孔法测量抑菌直径对比发酵上清液、粗蛋白、BS2-7菌体、PBS缓冲液、2216E液体培养基对哈维氏弧菌和欧文氏弧菌的抑菌活性,每个实验做3个重复。

1.2.8 上清液抗菌物质硫酸铵梯度粗分离 按照上述方法收集无细胞发酵上清液,向无细胞发酵上清液中依次添加硫酸铵饱和度为10%、20%、30%、40%、50%、60%和70%所需要的硫酸铵药品提取发酵液中的粗蛋白,每个梯度的上清液都需要在超低温高速离心机中10 000 r·min^{-1}离心20 min将沉淀和上清液分离,向沉淀中加入1 mL超纯水溶解后转移到10 kDa透析袋中,分离的上清液继续添加硫酸铵药品,按照梯度依次分离出粗蛋白。最后,将不同梯度获得的粗蛋白溶液分别移入到10 kDa透析袋中,在PBS缓冲液透析18 h过夜。通过打孔法测量抑菌直径对比不同饱和度硫酸铵盐析出的粗蛋白对哈维氏弧菌和欧文氏弧菌的抑菌活性。使用BCA试剂盒检测蛋白密度。将具有活性的抗菌蛋白进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE)检测。将样本置于振荡器(30 r·min^{-1})上,染色1 h后,用脱色液脱色过夜至条带清晰。粗蛋白样品制备参考徐晓裕等[13]的方法。

运用Excel软件对实验记录数据进行处理,所有数据均用(平均值±方差)表示,通过SPSS(25.0)进行单因素方差分析,使用Graphpad prism 8作图软件作出抑菌物质与抑菌圈大小关系的柱状图、折线图。

2 结果与分析

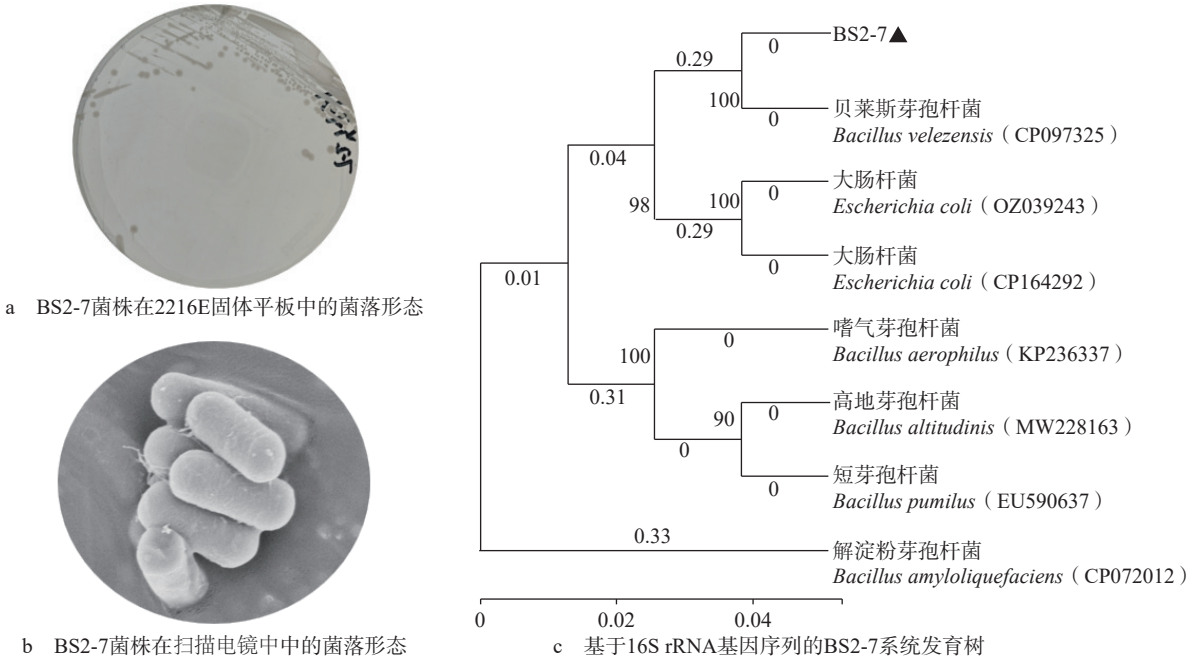
2.1 拮抗菌的筛选结果 拮抗菌的筛选结果如表 1 所示。从 14 株备选菌株中，筛选到 7 株具有拮抗效果的菌株，分别为 BS2-2、BS2-3、BS2-7、BS2-10、BS2-11、BS2-13 和 BS2-14，抑菌直径分别为（5.18±0.06）、（6.10±0.54）、（16.39±2.68）、（6.74±0.62）、（7.21±0.33）、（9.91±1.67）和（13.27±6.36）mm。实验结果表明，14 株拮抗菌中，BS2-7 发酵上清液拮抗哈维氏弧菌的效果最强，因此，选用 BS2-7 菌株进行后续实验。

表 1 拮抗菌筛选结果

备选菌株	抑菌圈直径/mm	备选菌株	抑菌圈直径/mm
BS2-1	—	BS2-8	—
BS2-2	5.18±0.06	BS2-9	—
BS2-3	6.10±0.54	BS2-10	6.74±0.62
BS2-4	—	BS2-11	7.21±0.33
BS2-5	—	BS2-12	—
BS2-6	—	BS2-13	9.91±1.67
BS2-7	16.39±2.68	BS2-14	13.27±6.36

注：“—”表示无抑菌圈。

2.2 哈维氏弧菌拮抗菌的鉴定结果 对 BS2-7 菌株进行形态学鉴定，其在 2216E 固体平板中的菌落形态见图 1a，菌落隆起中间凹陷，边缘不规则，表面褶皱偏湿润，白色至浅黄色不透明；对 BS2-7 菌株进行扫描电镜观察，其菌落形态见图 1b，菌株呈柱状；对 BS2-7 菌株进行分子生物学鉴定，结果见图 1c，全基因组测序结果鉴定表明 BS2-7 菌株为贝莱斯芽孢杆菌，其全基因组结果上传至 NCBI 基因库（登录号：CP170168）。与已登录的该属的其他标准菌株序列进行 Blast 分析并构建系统发育树，BS2-7 和贝莱斯芽孢杆菌亲缘关系最近。



a BS2-7菌株在2216E固体平板中的菌落形态

b BS2-7菌株在扫描电镜中中的菌落形态

c 基于16S rRNA基因序列的BS2-7系统发育树

图 1 BS2-7 菌株的菌落形态和系统发育树

2.3 BS2-7 无细胞上清液的抗菌谱实验结果 BS2-7 菌株无菌发酵上清液的抗菌谱实验结果见表 2。BS2-7 菌株无菌发酵上清液对 11 株指示菌中的哈维氏弧菌和欧文氏弧菌拮抗作用较强，对副溶血弧菌和高地芽孢杆菌拮抗效果较弱，对哈维氏弧菌原菌液（1×10^8 CFU · mL^{-1}）的抑菌直径为（15.94±1.41）mm，

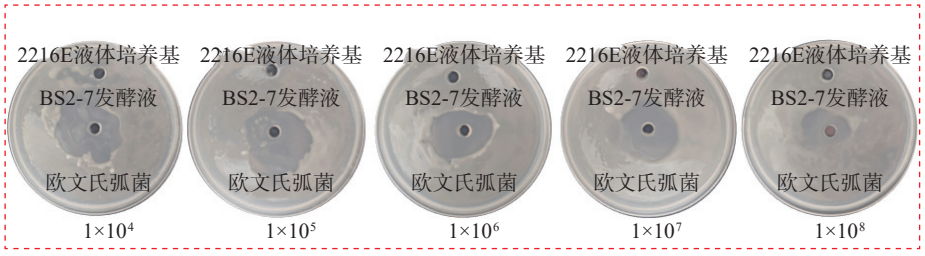
对欧文氏弧菌原菌液(1×10^8 CFU·mL^{-1})的抑菌直径为(21.49±8.82) mm,对副溶血弧菌原菌液(1×10^8 CFU·mL^{-1})的抑菌直径为(6.28±0.53) mm,对高地芽孢杆菌原菌液(1×10^8 CFU·mL^{-1})的抑菌直径为(11.85±1.25) mm,对其余7种指示菌无拮抗作用。

表2 上清液的抗菌谱结果

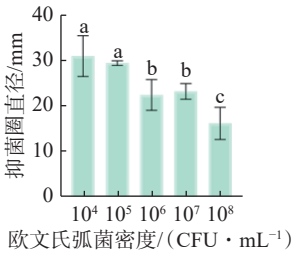
指示菌	抑菌圈直径/mm	指示菌	抑菌圈直径/mm
哈维氏弧菌	15.94±1.41	金黄色葡萄球菌	—
欧文氏弧菌	21.49±8.82	短芽孢杆菌属	—
高地芽孢杆菌	11.85±1.25	肺炎克雷伯菌	—
副溶血弧菌	6.28±0.53	无乳链球菌	—
溶藻弧菌	—	坎贝斯弧菌	—
大肠杆菌	—		

注:"—"表示无抑菌圈。

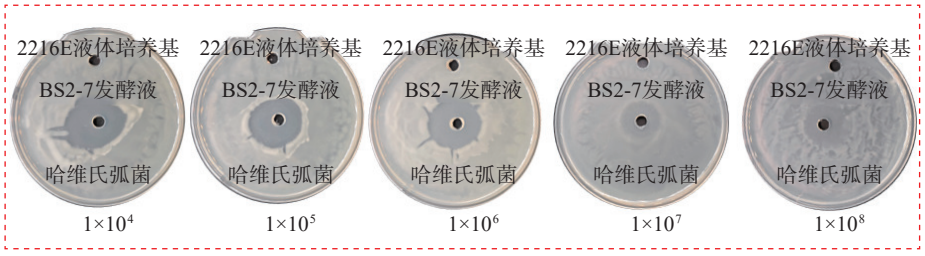
2.4 上清液对哈维氏弧菌和欧文氏弧菌不同密度抑菌结果 上清液对不同密度的哈维氏弧菌和欧文氏弧菌进行平板对峙及抑菌,结果如图2所示。当欧文氏弧菌的密度为1×10^4 CFU·mL^{-1}时,抑菌物质活性最高,抑菌直径为(31.13±4.46) mm;当欧文氏弧菌的密度为1×10^5、1×10^6、1×10^{7}和1×10^8 CFU·mL^{-1}时,抑菌直径分别为(29.59±0.50)、(22.59±3.37)、(23.37±1.71)和(16.35±3.54) mm。当哈维氏弧菌的密度为1×10^4 CFU·mL^{-1}时,抑菌物质活性最高,抑菌直径为(23.49±1.79) mm;当哈维氏弧菌的密度为1×10^5、1×10^6、1×10^{7}和1×10^8 CFU·mL^{-1}时,抑菌直径分别为(22.94±2.87)、(24.83±4.21)、(18.77±0.38)和(15.83±0.59) mm。实验结果表明,哈维氏弧菌密度与欧文氏弧菌的密度对上清液中抑菌物质的抑菌活性具有显著性影响(P<0.05)。无菌上清液中抑菌物质的抑菌活性随着欧文氏弧菌和哈维氏弧菌的密度降低,呈现出上升趋势。



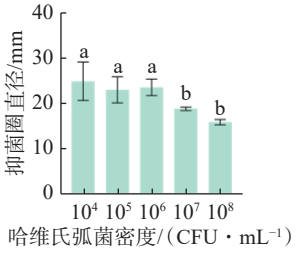
a BS2-7菌株发酵上清液与不同密度的欧文氏弧菌平板对峙结果(单位:CFU·mL^{-1})



b 不同欧文氏弧菌密度抑菌结果



c BS2-7菌株发酵上清液与不同密度的哈维氏弧菌平板对峙结果(单位:CFU·mL^{-1})



d 不同哈维氏弧菌密度抑菌结果

图2 上清液对不同密度的哈维氏弧菌和欧文氏弧菌的平板对峙及抑菌结果

注:图中标有不同字母者表示组间有显著性差异(P<0.05)。

2.5 上清液抗菌物质的稳定生产条件实验结果 不同发酵时间下的上清液抑菌物质对哈维氏弧菌、欧文氏弧菌的抑菌活性实验结果,如图3a和图3b所示。BS2-7菌株发酵时间为18、21和24 h,上清液抑菌物质对哈维氏弧菌(1×10^5 CFU·mL^{-1})具有较强的抑菌活性,抑菌直径分别为(29.11±3.72)、(19.92±1.79)和(20.88±2.11) mm。发酵时间为8、10和16 h时,抑菌物质对哈维氏弧菌没有抑菌活性;BS2-7菌株发酵时间为21和24 h,上清液抑菌物质对欧文氏弧菌(1×10^5 CFU·mL^{-1})具有较强的抑菌活性,抑菌直径分别

为(23.43±1.62)和(28.09±2.25) mm。发酵时间为 8、10、16 和 18 h 时, 上清液对欧文氏弧菌没有抑菌活性。实验结果说明, 不同发酵时间下, 抑菌物质对哈维氏弧菌和欧文氏弧菌的抑菌活性具有显著性影响(P<0.05)。拮抗菌发酵时间在 18 h 前, 上清液中抑菌物质对哈维氏弧菌无拮抗作用。拮抗菌发酵时间在 21 h 前, 上清液中抑菌物质对欧文氏弧菌无拮抗作用。

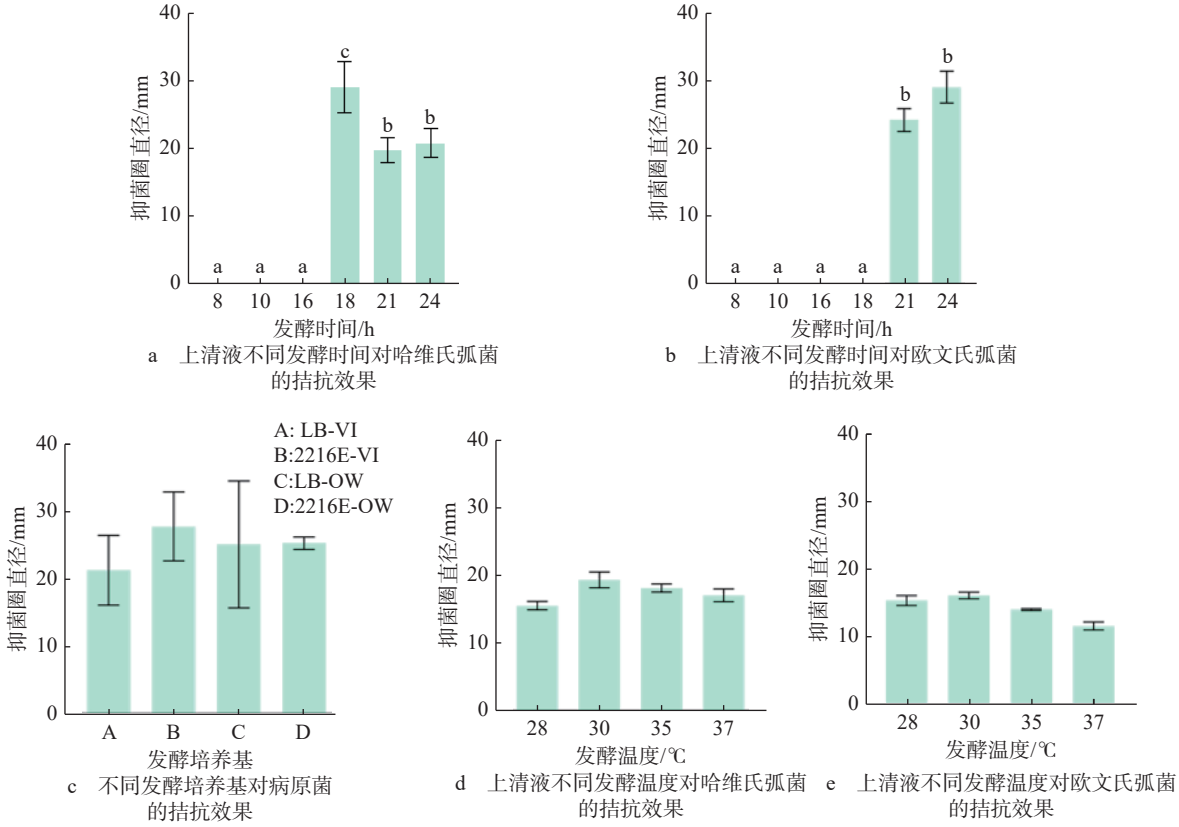


图 3 不同发酵条件下 BS2-7 菌株上清液抑菌物质对哈维氏弧菌和欧文氏弧菌的拮抗效果

注: 图中标有不同字母者表示组间有显著性差异(P < 0.05); “LB”表示 LB 培养基; “2216E”表示 2216E 培养基; “OW”表示拮抗欧文氏弧菌; “VI”表示拮抗哈维氏弧菌。

不同培养基发酵下的上清液中抑菌物质对哈维氏弧菌和欧文氏弧菌的抑菌活性实验结果见图 3c。2216E 培养基发酵的上清液抑菌物质对哈维氏弧菌和欧文氏弧菌(1×10^5 CFU · mL^{-1})的抑菌直径分别为(27.69±4.15)和(25.24±0.74) mm。LB 培养基发酵的上清液抑菌物质对哈维氏弧菌和欧文氏弧菌的抑菌直径分别为(21.23±4.20)和(25.04±7.64) mm。实验结果说明, 不同培养基发酵产生的抑菌物质对哈维氏弧菌和欧文氏弧菌的抑菌活性无显著性影响(P>0.05)。

不同发酵温度下的上清液抑菌物质对哈维氏弧菌和欧文氏弧菌抑菌活性实验结果见图 3d 和图 3e。发酵温度为 30 ℃ 时, 抑菌物质对哈维氏弧菌和欧文氏弧菌(1×10^5 CFU · mL^{-1})的拮抗效果最强, 抑菌直径分别为(19.32±0.95)和(16.17±0.48) mm, 发酵温度为 35、37 ℃ 时的抑菌物质对哈维氏弧菌抑菌直径分别为(18.11±0.49)和(17.04±0.75) mm, 发酵温度为 28 ℃ 时, 抑菌效果最弱, 抑菌直径为(15.52±0.50) mm。发酵温度为 28 和 35℃ 时的抑菌物质对欧文氏弧菌的抑菌直径分别为(15.40±0.73)和(14.07±0.13) mm, 发酵温度为 37 ℃ 时, 抑菌效果最弱, 抑菌直径为(11.66±0.58) mm。实验结果表明, 不同发酵温度生产的抑菌物质对哈维氏弧菌和欧文氏弧菌抑菌活性无显著性影响(P>0.05)。

2.6 上清液抗菌物质稳定性实验结果 不同 pH 环境孵育下, 上清液中抑菌物质对哈维氏弧菌和欧文氏弧菌的抑菌活性的影响实验结果见图 4a 和图 4b。将上清液 pH 值调节为 3.00、4.00、9.00 和 10.00 的环境中孵育 1 h, 实验组中的抑菌物质丧失了对哈维氏弧菌的抑菌活性。上清液 pH 值调节为 5.00、6.00、7.00 和 8.00 的环境中孵育 1 h, 上清液中抑菌物质对哈维氏弧菌的抑菌活性低于对照组的抑菌活性。对

照组的抑菌直径为(20.73±0.31) mm,实验组中的抑菌直径分别为(13.21±0.65)、(15.57±0.62)、(12.57±0.86)和(11.48±0.61) mm。将上清液pH值调节为3.00、4.00和10.00的环境中孵育1 h,上清液中抑菌物质丧失了对欧文氏弧菌的抑菌活性。将上清液pH值调节为5.00、6.00、7.00、8.00和9.00的环境中孵育1 h,上清液中抑菌物质对欧文氏弧菌的抑菌活性低于对照组的抑菌活性。对照组的抑菌直径为(16.25±0.36) mm,实验组中的抑菌直径分别为(12.35±0.33)、(11.04±0.55)、(13.77±0.11)、(12.2±0.65)和(12.32±0.30) mm。实验结果表明,不同pH孵育显著影响上清液中抑菌物质对哈维氏弧菌、欧文氏弧菌的抑菌活性(P<0.05)。

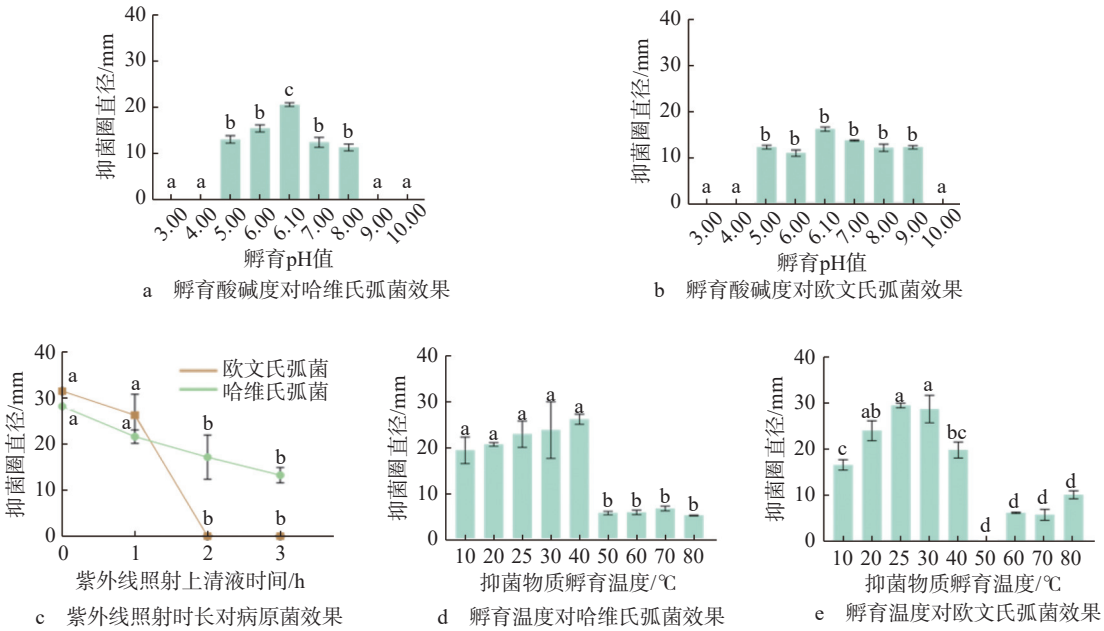


图4 不同条件处理上清液对哈维氏弧菌和欧文氏弧菌的抑菌活性结果

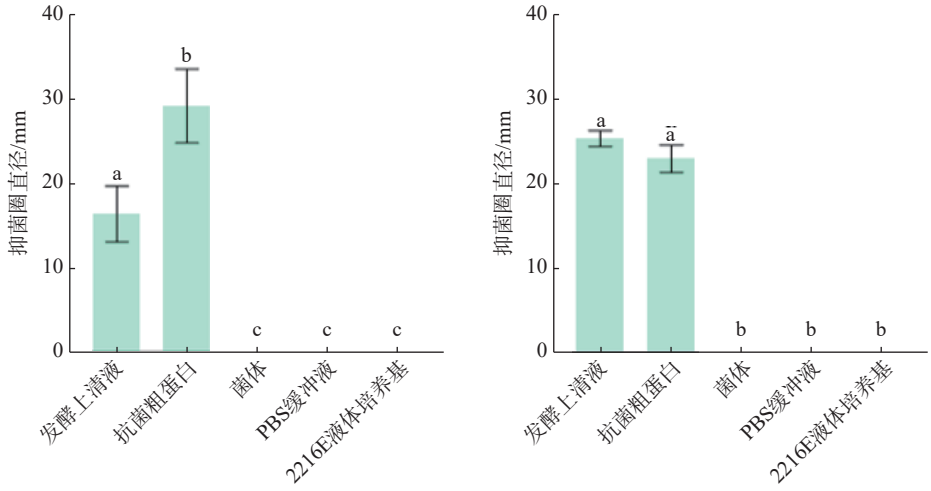
注:图中标有不同字母者表示组间有显著性差异(P<0.05)。

不同时长的紫外线照射下,上清液中抑菌物质对哈维氏弧菌和欧文氏弧菌的抑菌活性结果见图4c。随着紫外线照射上清液的时间延长,上清液中抑菌物质对哈维氏弧菌的抑菌活性呈下降趋势,未紫外处理过的上清液的抑菌活性高于紫外处理组的上清液的抑菌活性,实验组中紫外照射时间短的上清液抑菌活性高于紫外照射时间长的抑菌活性,对照组的抑菌直径为(28.46±1.28) mm,实验组的抑菌直径分别为(21.83±1.48)、(13.37±1.66)和(17.32±4.84) mm;随着紫外线照射上清液时间延长,上清液中抑菌物质对欧文氏弧菌的抑菌活性呈下降后丧失的趋势,未紫外处理过的上清液的抑菌活性高于紫外处理过的上清液的抑菌活性,实验组中紫外照射时间短的上清液的抑菌活性高于紫外照射时间长的抑菌活性,对照组的抑菌直径为(31.80±6.47) mm,实验组的抑菌直径为(26.51±4.56) mm。实验结果表明,不同时长的紫外线照射下,上清液中抑菌物质对哈维氏弧菌和欧文氏弧菌的抑菌活性具有显著性影响(P<0.05)。

不同孵育温度下,上清液中抑菌物质对哈维氏弧菌和欧文氏弧菌的抑菌活性结果见图4d和图4e。上清液在10、20、30和40 ℃的温度下孵育1 h后,上清液中抑菌物质对哈维氏弧菌仍具有很高的抑菌活性,抑菌直径分别为(19.43±2.88)、(20.73±0.37)、(23.85±6.16)和(26.19±1.11) mm。上清液在50、60、70和80 ℃的温度下孵育1 h,抑菌活性较弱,抑菌直径分别为(5.78±0.36)、(5.92±0.48)、(6.77±0.49)和(5.24±0.08) mm。常温放置的上清液抑菌直径为(22.94±2.87) mm。上清液在10、20、30和40 ℃的温度下孵育1 h后,上清液中抑菌物质对欧文氏弧菌仍具有很高的抑菌活性,抑菌直径分别为(16.65±1.12)、(24.08±2.17)、(28.8±2.98)和(19.88±1.72) mm。上清液在50 ℃下孵育1 h后,抑菌活性基本丧失。上清液在60、70、80 ℃的温度下孵育1 h后,抑菌活性较弱,抑菌直径分别为(6.21±0.13)、(5.78±1.20)和(10.14±0.87) mm。常温放置的上清液抑菌直径为(29.59±0.50) mm。实验结果表明,不同孵育温度下,上清液抑菌物质对哈维氏弧菌和欧文氏弧菌的抑菌活性具有显著性影响(P<0.05)。

2.7 上清液中抗菌物质的初步鉴定结果 对BS2-7菌株上清液抑菌物质进行初步鉴定,如图5所示。向

发酵上清液添加硫酸铵药品盐析获得的抗菌粗蛋白对哈维氏弧菌和欧文氏弧菌均具有抑菌活性，抑菌直径分别为（16.39±3.28）、（29.09±4.35）、（25.24±0.92）和（22.88±1.58）mm。BS2-7 菌体、PBS 缓冲液和 2216E 液体培养基对哈维氏弧菌和欧文氏弧菌均没有抑菌活性。实验结果表明：2216E 培养基、PBS 缓冲液和拮抗菌菌体对哈维氏弧菌和欧文氏弧菌没有抑菌效果，上清液中由细胞内分泌到细胞外蛋白产物才是主要抑菌物质。

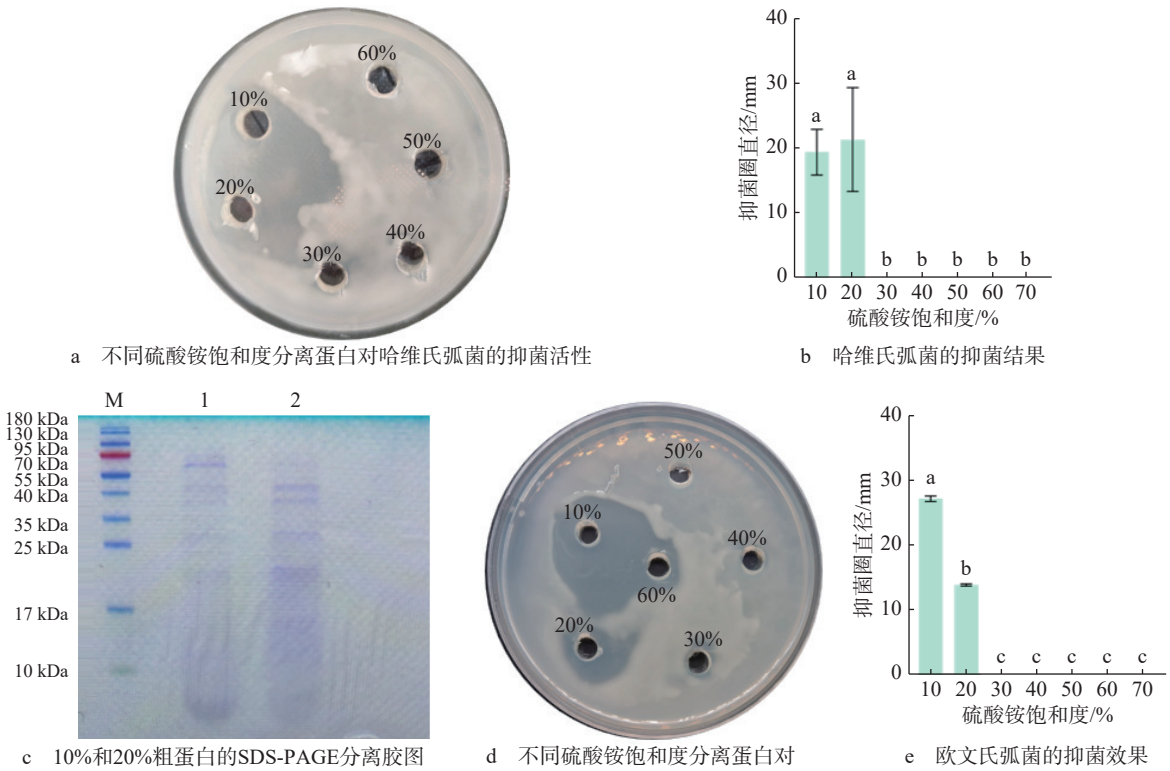


a 不同物质对哈维氏弧菌的抑菌结果　　b 不同物质对哈欧文弧菌的抑菌结果

图 5 BS2-7 菌株上清液抗菌物质的初步鉴定结果

注：图中标有不同字母者表示组间有显著性差异（P<0.05）。

2.8 上清液抗菌蛋白硫酸铵粗分离结果 不同硫酸铵梯度盐析出的粗蛋白对哈维氏弧菌、欧文氏弧菌的抑菌活性见图 6。



a 不同硫酸铵饱和度分离蛋白对哈维氏弧菌的抑菌活性　　b 哈维氏弧菌的抑菌结果

c 10%和20%粗蛋白的SDS-PAGE分离胶图　　d 不同硫酸铵饱和度分离蛋白对欧文氏弧菌的抑菌活性　　e 欧文氏弧菌的抑菌效果

图 6 不同硫酸铵饱和度粗蛋白对哈维氏弧菌和欧文氏弧菌的抑菌结果和粗蛋白分离结果

注：“M”表示 marker；“1”表示 10% 组分；“2”表示 20% 组分；图中标有不同字母者表示组间有显著性差异（P<0.05）。

7个梯度的粗蛋白组分中,其中只有饱和度为10%和20%的粗蛋白对哈维氏弧菌和欧文氏弧菌具有抑菌活性。10%和20%组分中的粗蛋白对哈维氏弧菌的抑菌直径分别为(21.29±0.90)和(18.03±3.84) mm。10%和20%粗蛋白对欧文氏弧菌的抑菌直径分别为(27.20±0.33)和(13.97±0.14) mm。其余5个梯度的粗蛋白对哈维氏弧菌和欧文氏弧菌均没有抑菌活性。实验结果表明,不同梯度的粗蛋白对哈维氏弧菌和欧文氏弧菌的抑菌活性具有显著性影响($P<0.05$)。

SDS-PAGE分离结果如图6c所示,泳道1可观察到10%粗蛋白能分离出1个较明亮蛋白条带,分子量在55~70 kDa之间。泳道2可观察到20%粗蛋白能分离出3个较明亮蛋白条带,分子量分别在40~55 kDa、35~40 kDa和25~35 kDa之间。

3 讨 论

抗生素在水生生物疾病防治过程中大量使用和滥用,病原微生物为了适应环境,不仅对抗生素产生耐药性,而且会对环境以及人类的健康造成巨大威胁。贝莱斯芽孢杆菌[14]通过分泌酶、抗菌蛋白等活性物质改变病原菌的细胞质膜的结构,引起细胞死亡的作用机制,降低了病原菌的耐药性,从而被作为一种新型生防微生物因子广泛研究。

关于贝莱斯芽孢杆菌的病害防治研究,大量学者聚焦于植物病原菌,而防治水产病原菌的研究相对匮乏。已有研究报道中,安相茹[15]研究表明贝莱斯芽孢杆菌C2-1对大口黑鲈维氏气单胞菌(*Aeromonas Veronii*)具有显著的拮抗作用。李张蝉等[16]从健康大黄鱼肠道中分离出2株贝莱斯芽孢杆菌P1-17和P2-33,对杀香鱼假单胞菌(*Pseudomonas plecoglossicid*)、溶藻弧菌、哈维氏弧菌和美人鱼发光杆菌(*Photobacterium damselae*)等多种水产病原菌均有拮抗作用。周一凡[17]研究表明贝莱斯芽孢杆菌CPA1-1能够有效提高罗氏沼虾抗病原非O1/O139群霍乱弧菌的感染,提高罗氏沼虾成活率。任竹玲[18]从罗非鱼肠道中分离出的贝莱斯芽孢杆菌G45,在拌料连续投喂罗非鱼10周后,罗非鱼感染舒伯特气单胞菌(*Aeromonas schubertii*)的死亡率显著降低。这些研究都说明贝莱斯芽孢杆菌是水产养殖中病害防控的潜在益生菌和生防菌。

野生菌株分泌的天然抗菌物质含量较低,本研究通过发酵温度、发酵时间和发酵培养基分析天然抗菌物质的高效生产条件。实验结果表明,拮抗菌发酵温度为30 ℃,在2216E培养基中发酵时间超过21 h,分泌到胞外的拮抗物质对哈维氏弧菌和欧文氏弧菌的抑菌活性较好。

病原菌的密度1×10^5 CFU·mL^{-1}比1×10^8 CFU·mL^{-1}更能直观地观察到抑菌圈的大小变化来分析抑菌物质的稳定性。因此,本研究通过不同孵育温度、不同孵育酸碱度和不同紫外照射时间,分析贝莱斯芽孢杆菌BS2-7抑菌物质的稳定性,病原菌密度均为1×10^5 CFU·mL^{-1}。实验数据表明,抑菌物质应用到水体温度10~40 ℃,pH值5~8的酸碱度范围,紫外照射时间为1 h的养殖水体中,对哈维氏弧菌和欧文氏弧菌均具有较高的抑菌活性。与王青华等[19]筛选到的贝莱斯芽孢杆菌DH82孵育温度达到80、100 ℃时,粗酶液对迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)仍然保持较高抑菌活性结论不一致,与粗酶液在弱酸或弱碱下对病原菌抑菌效果相对减弱相一致,与刘妮等[20]筛选出的枯草芽孢杆菌斯氏亚种Bspi2104,随着紫外照射时间的增加Bspi2104对病原菌的抑菌活性无影响不一致。Cho等[21]研究表明紫外照射会破坏蛋白质分子的天然状态,会造成多肽链的初始断裂以及蛋白质分子交联和聚集。紫外照射可能改变了抗菌蛋白对哈维氏弧菌和欧文氏弧菌结合位点的氨基酸序列,以至于抑菌活性降低和丧失。

BS2-7菌株的抗菌物质鉴定实验中,由于BS2-7无细胞上清液中连续添加硫酸铵至饱和度为80%时,硫酸铵固体溶解速率较慢,因此,最终添加硫酸铵药品饱和度达到70%。实验结果表明,由于硫酸铵−蛋白沉淀对哈维氏弧菌和欧文氏弧菌具有抑菌活性,抑菌物质可能为胞外蛋白,进一步的活性追踪显示饱和度为10%、20%的硫酸铵沉淀具有抑菌活性。杨胜清等[22]同样从贝莱斯芽孢杆菌中,通过添加硫酸铵药品,成功从饱和度为80%的组分中分离纯化出分子量为20.1 kDa的蛋白。廖富蘋等[23]研究说明了抗菌蛋白其独特的杀菌机制,不易引起病原菌产生耐药性,是一种会自行降解的水产病原体拮抗剂。

本文的研究结果为降低使用抗生素药品防治弧菌病提供了样本支持和理论参考。但是，对哈维氏弧菌和欧文氏弧菌具有拮抗作用的蛋白种类还待进一步研究。

4 结 论

本文筛选出一株对哈维氏弧菌和欧文氏弧菌拮抗效果较好的菌株 BS2-7，通过全基因组基因比对结果鉴定为贝莱斯芽孢杆菌。BS2-7 抗菌物质活性高，其活性物质耐弱酸和弱碱，在 40 ℃ 以下稳定；BS2-7 对水产病原菌哈维氏弧菌和欧文氏弧菌表现出拮抗活性，抑菌能力强，通过抑菌物质确认以及硫酸铵粗分离初步鉴定该物质可能为抗菌蛋白，BS2-7 分泌的抑菌物质可在哈维氏弧菌病暴发阶段，提前发酵该菌株，将该菌株的上清液拌料投喂，可合理降低哈维氏弧菌和欧文氏弧菌的密度，提高水产养殖动物的存活率，有望开发成微生态制剂产品。

参考文献：

[1] 林桂香. 哈维氏弧菌核酸疫苗 *flgJ* 制备及黄芪多糖和灵芝多糖作为佐剂的免疫增强效果评价 [D]. 湛江：广东海洋大学, 2023.
LIN G X. The preparation of *Vibrio harveyi flgJ* DNA vaccine and the evaluation of immune-enhancing effects of *Astragalus* polysaccharides and *Ganoderma lucidum* polysaccharides as adjuvant[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2023.

[2] 张林鹏, 杨诗燚, 白艳韩, 等. 抗哈维氏弧菌、溶藻弧菌与副溶血性弧菌三联卵黄抗体的制备及体外作用效果评估 [J]. 水产学报, 2024, 48(5)：059421.
ZHANG L P, YANG S Y, BAI Y H, et al. Preparation of anti-*Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus*, and *V. parahaemolyticus* triple egg yolk antibody and evaluation of its effect *in vitro*[J]. Journal of Fisheries of China, 2024, 48(5)：059421.

[3] 曹飞飞. 西沙海域弧菌拮抗菌的筛选及其分布特征和抑菌效果研究 [D]. 海口：海南大学, 2023.
CAO F F. Screening of theantagonist strains against *Vibrio* and their distribution antagonistic capability in Xisha sea[D]. Haikou: Hainan University, 2023.

[4] 刘军军. 上海市水产品及其养殖环境中副溶血性弧菌和霍乱弧菌的流行、毒力及抗生素耐药性分析 [D]. 上海：上海海洋大学, 2022.
LIU J J. Prevalence, virulence and antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* in aquatic products and aquaculture environment in Shanghai[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2022.

[5] ONGENA M, JACQUES P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol[J]. Trends in Microbiology, 2008, 16(3)：115−125.

[6] 刘晓铃. 许氏平鲉弧菌的分离鉴定及拮抗菌筛选 [D]. 烟台：烟台大学, 2023.
LIU X L. Isolation and identification of *Sebastes schlegeli Vibrio* and screening of antagonistic bacteria[D]. Yantai: Yantai University, 2023.

[7] 郝彦利. 副溶血性弧菌拮抗菌的筛选鉴定、抗菌肽的分离纯化及生物信息学分析 [D]. 上海：上海海洋大学, 2019.
HAO Y L. Screening and identification of antagonistic bacteria against *Vibrio parahaemolyticus*, purification of antimicrobial peptides and bioinformatics analysis[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2019.

[8] 付欢, 李亚婷, 肖贵谦, 等. 贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)MCCC 1A15695 抑菌蛋白分离纯化及应用研究 [J]. 应用海洋学学报, 2024, 43(2)：217−224.
FU H, LI Y T, XIAO G Q, et al. Isolation and purification of bacteriostatic protein from *Bacillus velezensis* MCCC 1A15695 and its application[J]. Journal of Applied Oceanography, 2024, 43(2)：217−224.

[9] 王青华, 唐旭, 孙晓晖, 等. 深海贝莱斯芽孢杆菌 DH82 的抑菌活性物质初步分离纯化及其抑菌谱检测 [J]. 应用海洋学学报, 2020, 39(1)：20−26.
WANG Q H, TANG X, SUN X H, et al. Purification of antimicrobial substance produced by deep sea *Bacillus velezensis* strain DH82 and its inhibition spectrum[J]. Journal of Applied Oceanography, 2020, 39(1)：20−26.

[10] REN W, XUE B Q, CAO F F, et al. Multi-costimulatory pathways drive the antagonistic *Pseudoalteromonas piscicida* against the dominant pathogenic *Vibrio harveyi* in mariculture: insights from proteomics and metabolomics[J]. Microbiology

Spectrum, 2022, 10(6): e02444-22.

[11] 张营. 枯草芽孢杆菌 Czk1 抗菌蛋白分离纯化及抑菌作用研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2023.
ZHANG Y. Isolation, purification and antifungal activity of antifungal protein from *Bacillus subtilis* Czk1[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2023.

[12] 安相茹, 苏应兵, 周燚. 加州鲈维氏气单胞菌拮抗菌的筛选 [J]. 安徽农学通报, 2024, 30(13): 42-48.
AN X R, SU Y B, ZHOU Y. Screening of antagonistic bacteria against *Aeromonas veronii* in Micropterus salmoides[J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2024, 30(13): 42-48.

[13] 徐晓裕, 李甜, 王欢, 等. 暹罗芽孢杆菌 X7 抗菌肽的分离纯化及抑菌特性分析 [J]. 山东农业科学, 2022, 54(5): 139-145.
XU X Y, LI T, WANG H, et al. Separation and purification of antibacterial peptides from *Bacillus siamese* X7 and analysis of its antibacterial properties[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2022, 54(5): 139-145.

[14] 梁静娴, 刘唤明, 邓楚津, 等. 贝莱斯芽孢杆菌 K3 抗尖孢镰孢菌的特征及其作用机理 [J]. 微生物学报, 2025, 65(6): 2576-2589.
LIANG J X, LIU H M, DENG C J, et al. Antagonistic characteristics and mechanism of *Bacillus velezensis* K3 against *Fusarium oxysporum*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(6): 2576-2589.

[15] 安相茹. 大口黑鲈病原菌维氏气单胞菌拮抗菌的筛选、鉴定及其活性评价研究 [D]. 荆州: 长江大学, 2024.
AN X R. Screening, identification, and activity evaluation of the antagonistic bacterium *Aeromonas veronii*, a pathogen of *Micropterus salmoides*[D]. Jingzhou: Yangtze University, 2024.

[16] 李张婵, 施慧, 许文军, 等. 大黄鱼内脏白点病病原拮抗菌的分离鉴定及生物学特性研究 [J]. 南方水产科学, 2023, 19(3): 78-87.
LI Z C, SHI H, XU W J, et al. Screening of antagonistic bacteria against visceral white-spots disease of *Larimichthys crocea* and preliminary study on its biological characteristics[J]. South China Fisheries Science, 2023, 19(3): 78-87.

[17] 周一凡. 罗氏沼虾病原非 O1/O139 群霍乱弧菌基因组特征及贝莱斯芽孢杆菌抑菌机理初探 [D]. 扬州: 扬州大学, 2023.
ZHOU Y F. Genomic characterization of the pathogenic non-O1 /O139 *Vibrio cholerae* from *Macrobrachium rosenbergii* and the bacteriostatic mechanism of the *Bacillus velezensis*[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2023.

[18] 任竹玲. 罗非鱼舒伯特气单胞菌疾病及其益生菌防治研究 [D]. 海口: 海南大学, 2020.
REN Z L. Study on the disease of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* infected with *Aeromonas schubertii* and its prevention of probiotics[D]. Haikou: Hainan University, 2020.

[19] 王青华, 孙晓晖, 唐旭, 等. 深海贝莱斯芽孢杆菌 DH82 的筛选、鉴定及其抗菌粗蛋白性质分析 [J]. 海洋通报, 2019, 38(1): 63-69.
WANG Q H, SUN X H, TANG X, et al. Screening and identification of *Bacillus velezensis* strain DH82 and the characterization of the crude antimicrobial protein[J]. Marine Science Bulletin, 2019, 38(1): 63-69.

[20] 刘妮, 王印庚, 于永翔, 等. 枯草芽孢杆菌斯氏亚种胞外产物的抑菌活性及其特性分析 [J]. 微生物学报, 2024, 64(8): 2967-2985.
LIU N, WANG Y G, YU Y X, et al. Antibacterial activity and characterization of extracellular products of *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(8): 2967-2985.

[21] CHO Y S, SONG K B, YAMADA K, et al. Effect of ultraviolet irradiation on molecular properties of ovalbumin[J]. Applied Biological Chemistry, 2008, 51(4): 276-280.

[22] 杨胜清, 张帆, 马贵龙. 贝莱斯芽孢杆菌 S6 拮抗物质分离纯化及抑菌机理 [J]. 农药, 2017, 56(9): 645-648, 660.
YANG S Q, ZHANG F, MA G L. Purification and inhibitive mechanism of antagonist substances from *Bacillus velezensis* S6 strain[J]. Agrochemicals, 2017, 56(9): 645-648, 660.

[23] 廖富蕤, 林健荣, 赵亚华, 等. CP7 菌不同类型抗菌蛋白的分离与鉴定 [C]//2008 年全国生物化学与分子生物学学术大会论文摘要. 贵阳: 中国生物化学与分子生物学会, 2008: 106.
LIAO F P, LIN J R, ZHAO Y H, et al. Isolation and identification of different types of antibacterial proteins from strain CP7[C]// . Guiyang: The Chinese Society of Biochemistry and Molecular Biology, 2008: 106.

作者贡献声明

本声明旨在明确各作者对本论文的具体贡献，确保学术成果署名的规范性和公平性，各作者贡献如下：叶绵权负责论文初稿撰写、初稿修订、经费支持。王欣怡参与初稿修订。池梓榕参与数据整理。任伟参与数据整理。谢珍玉参与论文格式调整和核对英文部分。全体作者均参与结果讨论。

利益冲突声明

作者声明，其不存在已知的可能影响本论文所报告工作的竞争性经济利益或个人关系。

AI 使用声明

本文未使用人工智能（AI）协助撰写。

伦理声明

本文不涉及人类或动物研究。

电子补充材料

补充材料可在本文的在线版本 https://doi.org/10.65658/j.hndk.2025052202 中获取。

数据可用性

支持论文结论所需的所有数据均已包含在稿件和/或电子补充材料中。如需获取与本文相关的其他数据，可向通信作者提出申请。

致谢/Acknowledgements

本文得到国家自然科学基金项目（42306140）、海南省科技人才创新项目（KJRC2023C40）和海南省虾产业技术体系专项资金项目（HNARS-10-ZJ03）的支持。

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China(42306140), the Hainan Province Science and Technology Talent Innovation Project(KJRC2023C40), and the Special Fund Project of the Hainan Province Shrimp Industry Technology System(HNARS-10-ZJ03).

作者简介

叶绵权（2001—），男，海南定安人，海南大学水产专业 2023 级硕士研究生。E-mail: 1178482415@qq.com。

王欣怡（1996—），女，江西景德镇人，海南大学生物学专业，2023 级博士研究生。E-mail: 834872194@qq.com。

池梓榕（1997—），广东揭阳人，海南大学渔业发展专业，2022 级硕士研究生。E-mail: 965585895@qq.com。

蔡晓霓（1988—），女，湖北武汉人，副教授，博士生导师，研究方向：水产活体生物饵料开发与苗种培育技术。E-mail: caixiaoni1245@163.com。

龙　昊（1981—），男，山东青岛人，副研究员，博士生导师，研究方向：水产养殖病原菌致病机制和益生菌筛选应用等研究。E-mail: longhao@hainanu.edu.cn。

谢珍玉（1974—），男，江西吉水人，教授，博士生导师，研究方向：海洋微生物资源挖掘和基于微生物组操纵的水产动物健康养殖与养殖新模式开发工作。E-mail: xiezyscuta@163.com。

任　伟（1988—），男，内蒙古商都人，副教授，博士生导师，研究方向：海洋微生物功能蛋白结构与功能以及功能机制解析。E-mail: renwei@hainanu.edu.cn。

（责任编辑：张秀梅，英文校对：王凤阳）

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

© The Author(s) 2026. Published by Journal Editorial Department of Hainan University.