

梁永增,魏冬梅,王 磊,等. 1 株鱼类水霉病原真菌拮抗菌的发酵条件优化[J]. 江苏农业科学,2017,45(1):141-145.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.01.040

1 株鱼类水霉病原真菌拮抗菌的发酵条件优化

梁永增, 魏冬梅, 王 磊, 王咏星
(新疆大学生命科学与技术学院, 新疆乌鲁木齐 830046)

摘要:采用单因素试验分别探讨温度、pH 值、接种量、碳源、氮源、无机盐对鱼类水霉病原真菌拮抗菌菌株生长的影响,并在单因素试验结果的基础上,利用正交试验设计对培养基组分进行优化。结果显示,JL04 最适培养温度为 32 ℃,最适培养 pH 值为 5,接种量对菌体生长的影响不显著。由正交试验结果得出最佳发酵培养基为胰蛋白胨 6 g/L、葡萄糖 6 g/L、酵母提取物 3.5 g/L、硝酸铵 3.5 g/L、硫酸镁 2 g/L、氯化钙 3 g/L、硫酸锰 1 g/L,最佳培养时间为 18 h。在此优化条件下,该菌株发酵培养达到对数生长末期的时间缩短了 2 h,能较快进入菌体密度最大的时期,为该菌株的高密度生产提供了一定依据。

关键词:鱼病;水霉病;条件优化;发酵;拮抗菌

中图分类号: S941.43⁺¹ **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)01-0141-05

水霉病(*Saprolegniasis*)是严重威胁淡水养殖鱼类的世界性病害。水霉病是继发性感染疾病,流行很广泛^[1],一年四季均可发病^[2],晚冬、初春季节尤为严重,对寄主无严格的选择性,水产动物及卵均可被感染,对养殖产业造成了巨大经济损失^[3-4]。以生物拮抗为核心的生物防治方法具有绿色、环保、安全、高效的优点,近年来水产领域水霉病生物防治研究进展较快^[5],代表了水霉病防控研究的主流方向。生态防治在控制病原菌数量、减少鱼类疾病发生的同时还能改善养殖环境、维护微生态平衡;因此,水霉病生态防治拮抗菌的开发变得尤其重要,拮抗菌的发酵条件也成为重点研究课题。

对水霉病的治疗现已进行了多种尝试,最初采用孔雀石绿、氯化钠、臭氧、福尔马林^[6],其中孔雀石绿的治疗效果最好,但由于孔雀石绿具有相当强的副作用并造成严重的污染,目前已被禁用^[7]。在对水霉病各方面的研究中,一种更为有效的解决途径是利用生物间的相互作用控制水霉。近年来,中外学者对水霉病生物防治的研究已取得了一定成果,张书俊等^[8]、刘莉莉等^[9]、赵春晖等^[10]、Balcázar 等^[11]已筛选出对水霉具有较强抑制作用的拮抗菌,并对其拮抗物质进行了初步的分离鉴定。笔者所在实验室分离得到 1 株水霉病原真菌拮抗菌 JL04,经鉴定为枯草芽孢杆菌,以下简称“JL04 菌株”。以 JL04 菌株为研究对象,对其发酵培养基组分及发酵培养条件进行优化,为今后 JL04 菌株的大规模发酵培养提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种 供试菌种为水霉病原菌拮抗菌中具有广谱抑

菌性的菌株 JL04,由笔者所在实验室前期筛选得到。以 LB 斜面保存于 4 ℃冰箱中。

1.1.2 培养基 马铃薯葡萄糖培养基(合成培养基,pH 值 7.0)用于水霉的培养和保存。牛肉膏蛋白胨培养基(牛肉膏 3.0 g/L、蛋白胨 10 g/L、NaCl 5.0 g/L)用于细菌的分离、培养、保存。LB 培养基(胰蛋白胨 10 g/L、酵母提取物 5 g/L、NaCl 10 g/L,pH 值 7.0)用于细菌的发酵培养。

1.1.3 试剂与仪器 主要试剂见表 1,仪器设备见表 2。

表 1 主要试剂

试剂名称	规格	生产厂家
胰蛋白胨	生物试剂	北京奥博星生物技术有限责任公司
酵母浸粉	生物试剂	北京奥博星生物技术有限责任公司
葡萄糖	分析纯	天津永晟精细化工有限公司
琼脂	生物试剂	北京奥博星生物技术有限责任公司
硝酸铵	分析纯	天津市盛奥化学试剂有限公司
可溶性淀粉	分析纯	天津市福晨化学试剂厂
CaCl ₂	分析纯	天津市盛奥化学试剂有限公司
MnSO ₄	分析纯	北京益利精细化学品有限公司
MgSO ₄ · 7H ₂ O	分析纯	天津市福晨化学试剂厂
NaCl	分析纯	北京益利精细化学品有限公司

表 2 仪器设备

仪器	型号	生产厂家
超净工作台	BHC-1300IIA2 型	苏净集团安泰公司
手提式不锈钢蒸汽消毒器	YX280B 型	上海三申医疗器械有限公司
电子天平	AL104 型	梅特勒-托利多仪器(上海)
光照恒温培养箱	GXZ 型	宁波江南仪器厂
温控摇床	ZHWY-103B 型	上海智城分析仪器制造有限公司
紫外分光光度计	Spectrumlab24 型	上海棱光技术有限公司
pH 计	pHS-25 型	上海精科雷磁
恒温培养箱	HZQ-X100 型	哈尔滨市东联电子技术有限公司

1.2 方法和步骤

1.2.1 水霉菌株及其拮抗菌株的培养 从长满水霉菌丝的平板上切取直径为 1 cm 的水霉琼脂块,接种于水霉培养基平

收稿日期:2015-12-03

基金项目:国家自然科学基金(编号:31160025)。

作者简介:梁永增(1989—),男,硕士研究生,主要从事动物学研究。

E-mail:564416716@qq.com。

通信作者:王咏星,硕士,副教授,主要从事水生生物学研究。

E-mail:wxyxing65@126.com。

板中央,于 25 ℃ 下恒温培养。将保存于 4 ℃ 冰箱中的 JL04 菌株用接种环挑取菌落,在 LB 培养基平板上划线,于 37 ℃ 下恒温活化培养。活化后的 JL04 菌株用于发酵培养。

1.2.2 JL04 菌株拮抗作用广谱性 采用平板对峙培养法,分别对 12 株“1.2.1”节活化完成的水霉菌株进行拮抗广谱性试验。将直径 1 cm 的水霉琼脂块接种于 PDA 培养基平板中央,距水霉琼脂块一侧 25 mm 处,接种 20 μL 发酵培养的拮抗菌 JL04 于灭菌滤纸片上,放置 0.5 h,于 25 ℃ 下恒温倒置培养 72 h,观察拮抗效果。

1.2.3 拮抗菌株 JL04 生长曲线测定 将 JL04 菌株接种于 100 mL LB 液体培养基中,置于 37 ℃、120 r/min 摇床中振荡培养 12 h,用作种子液。取 25 个 250 mL 锥形瓶,每瓶装有 100 mL LB 液体培养基,以 0.5% 的接种量将菌悬液接入 24 个锥形瓶,以无菌 LB 液体培养基作为空白对照,均置于 37 ℃、120 r/min 摇床中振荡培养。分别于 0、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36 h 取样,采用紫外分光光度计测定 D 值($\lambda = 600\text{ nm}$),每份样品测定 3 次取平均值。如果菌悬液浓度过高,适当稀释后再进行测定。以培养时间为横坐标、 $D_{600\text{ nm}}$ 值为纵坐标,绘制拮抗菌 JL04 的生长曲线。

1.2.4 JL04 菌株培养条件的优化

1.2.4.1 JL04 菌株温度条件的优化 将拮抗菌 JL04 种子培养液按照 0.5% 的接种量接种至 100 mL LB 发酵培养基中,均调 pH 值至 7.0,分别置于 27、32、37、42 ℃ 下以 120 r/min 摇床培养 20 h,测定不同温度下 JL04 菌株培养液的 $D_{600\text{ nm}}$ 值。每组试验设 3 个平行。

1.2.4.2 JL04 菌株最适初始 pH 值的确定 采用 1 mol/L HCl 或 NaOH 将 LB 发酵培养基的 pH 值分别调至 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0,按 0.5% 的接种量将 JL04 种子培养液接种至不同 pH 值的培养液中,置于 37 ℃、120 r/min 摇床中振荡培养 20 h,测定不同 pH 值下 JL04 培养液的 $D_{600\text{ nm}}$ 值。每组试验设 3 个平行。

1.2.4.3 JL04 菌株最佳接种量的确定 接种量设置梯度为 1%、2%、3%、4%、5%。将拮抗菌接种于 LB 发酵培养液,在上述优化后的 pH 值和温度下发酵,制成种子菌液,以不同接种量接种于 100 mL 液体培养基中,置于 37 ℃、120 r/min 摇床中振荡培养 20 h,测定不同接种量发酵液的 $D_{600\text{ nm}}$ 值。每组试验设 3 个平行。

1.2.5 JL04 菌株培养基组分优化

1.2.5.1 碳源优化 以 1% 硫酸铵为氮源,选择葡萄糖、蔗糖、可溶性淀粉、果糖、麦芽糖、葡萄糖 + 胰蛋白胨(质量比 1:1)、可溶性淀粉 + 胰蛋白胨(质量比 1:1)替代 LB 基础液体发酵培养基中的胰蛋白胨制成培养基,用量均为 1%,配成 100 mL 培养液,调节 pH 值至 7.0。将 JL04 菌株种子培养液按照 0.5% 的接种量接种至不同碳源的培养液中,置于 37 ℃、120 r/min 摇床中振荡培养 20 h。测定不同碳源 JL04 培养液的 $D_{600\text{ nm}}$ 值。每组试验设 3 个平行。

1.2.5.2 氮源优化 以 1% 蔗糖为碳源,选择酵母提取物、尿素、牛肉膏、硝酸钾、硝酸铵、硫酸铵、硝酸钾 + 酵母提取物(1:1)、硝酸铵 + 酵母提取物(1:1)、硫酸铵 + 酵母提取物(1:1)、硝酸钾 + 硫酸铵(1:1)为氮源,分别以 0.5% 的量配

成 100 mL 培养液,调节 pH 值至 7.0。将 JL04 培养液按照 0.5% 的接种量接种至不同氮源的培养液中,置于 37 ℃、120 r/min 摇床中振荡培养 20 h。测定不同氮源 JL04 培养液的 $D_{600\text{ nm}}$ 值。每组试验设 3 个平行。

1.2.5.3 无机盐优化 以 1% 蔗糖为碳源、0.5% 酵母浸膏为氮源,选择氯化钙、硫酸镁、磷酸氢二钾、硫酸锰、硫酸镁 + 氯化钙 + 硫酸锰(质量比 2:3:1)代替 LB 液体培养基中的氯化钠制成培养基,分别以 1% 的量配成 100 mL 培养液,调节 pH 值至 7.0。将 JL04 种子悬液以 0.5% 的接种量接种至不同无机盐的培养液中,置于 37 ℃、120 r/min 摇床中振荡培养 20 h。测定不同无机盐 JL04 培养液的 $D_{600\text{ nm}}$ 值。每组试验设 3 个平行。

1.2.6 正交试验 正交试验用以优化培养基最佳用量配比。通过单因素试验确定了 JL04 菌株发酵培养的最佳碳源、氮源、无机盐。采用 $L_9(3^3)$ 正交表(表 3)进行试验,以 0.5% 的接种量接菌悬液,每个培养基组合设 3 个平行,共 9 组试验。均置于 37 ℃、120 r/min 摇瓶发酵培养 20 h,测定发酵液的 $D_{600\text{ nm}}$ 值,以确定最佳培养基组合。每组试验设 3 个平行。

表 3 正交试验因素水平

水平	A:胰蛋白胨 + 葡萄糖 (g/L)	B:酵母提取物 + NH_4NO_3 (g/L)	C: $\text{MgSO}_4 + \text{CaCl}_2 + \text{MnSO}_4$ (g/L)
1	8	3	6
2	10	5	8
3	12	7	10

1.2.7 优化后生长曲线的测定 将 JL04 菌株接种于 100 mL 优化后的液体培养基中,置于 37 ℃、120 r/min 摇床中振荡过夜培养,用作种子悬液。取 25 个 250 mL 锥形瓶,每瓶装 100 mL 优化后的液体培养基,以 0.5% 的接种量将菌悬液接入 24 个锥形瓶,以无菌 LB 液体培养基作为空白对照,均置于 37 ℃、120 r/min 摇床中振荡培养。分别于 0、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36 h 取样,采用紫外分光光度计测定 $D_{600\text{ nm}}$ 值,每份样品取样 3 次并取测量结果的平均值。如果菌悬液浓度过高,适当稀释后再进行测定。以培养时间为横坐标、 $D_{600\text{ nm}}$ 值为纵坐标,绘制 JL04 菌株在优化后培养基中的生长曲线。

2 结果与分析

2.1 JL04 菌株对鱼类水霉病病原菌水霉的拮抗效果

采用平板对峙培养法,由试验结果(图 1)可知,JL04 菌株对 12 株水霉病原真菌均有拮抗性,JL04 菌株是生物防治水霉病的 1 株理想菌株,因此对具有广谱抑菌性的 JL04 菌株进行发酵条件优化尤为重要。

2.2 生长曲线测定

拮抗菌 JL04 菌株在 LB 液体培养基中的生长曲线见图 2。该菌株在 LB 培养基中 0~4 h 处于潜伏期,菌体生长量少;4 h 后进入对数生长期,菌体数量急剧增加;于 20 h 达到生长高峰;20~36 h 进入稳定期。试验结果表明,JL04 菌株在液体培养基中的增殖情况符合细菌的一般生长规律,经历了延迟期、对数期、稳定期、衰亡期。在 20 h 后 JL04 菌株生长进入了稳定期,细菌增殖不明显;因此,在 LB 培养基中发

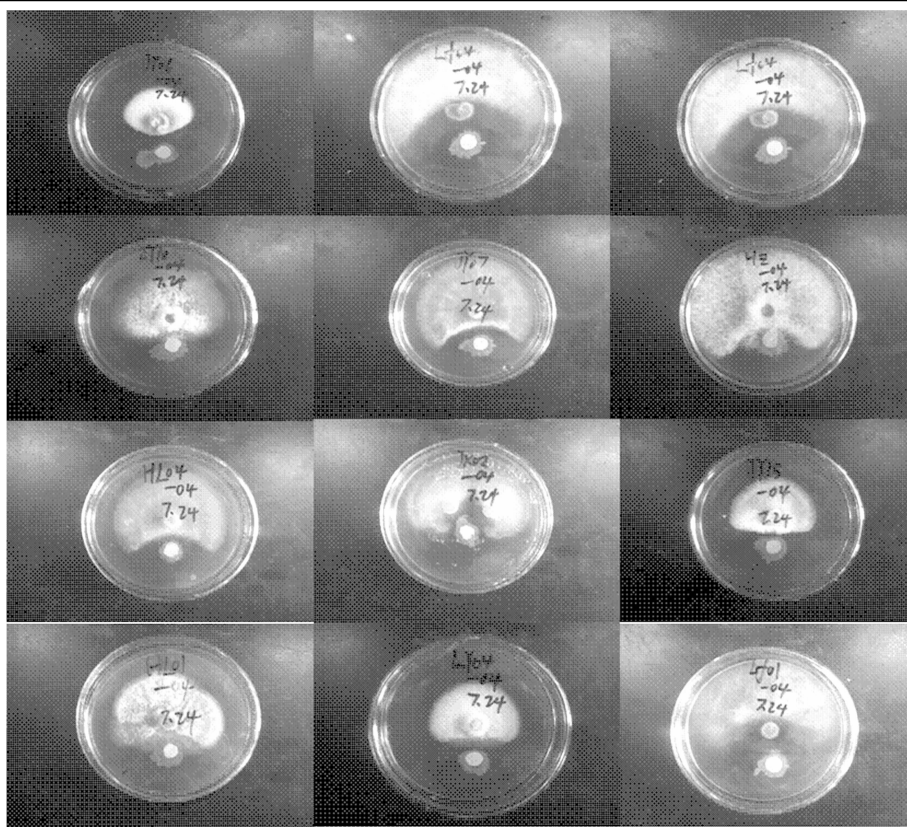


图1 JL04 菌株对12株水霉病原菌的抑制效果

酵 20 h 为拮抗菌 JL04 菌株对数生长的末期,此时期内收集的菌液适合作为种子悬液。

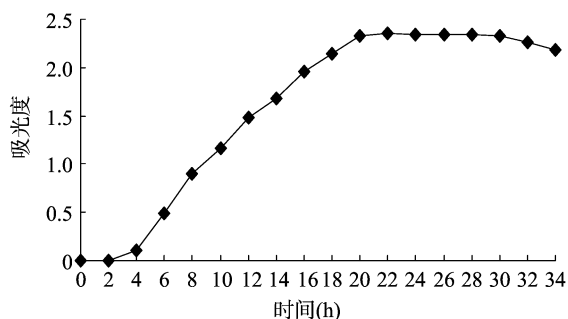
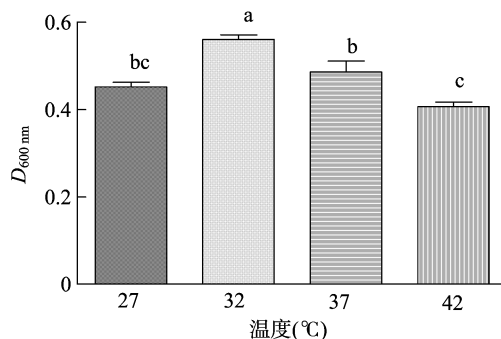


图2 拮抗菌 JL04 菌株在 LB 液体培养基中的生长曲线

2.3 JL04 菌株培养条件的优化

2.3.1 JL04 菌株温度条件的选择 温度对蛋白质及生物酶的活性影响很大,而蛋白质和生物酶又是生物代谢过程中的重要物质,因此温度对于微生物的生长具有很大影响。培养温度过低或过高均会造成微生物生长缓慢,甚至导致微生物死亡。由图 3 可知,32 ℃ 条件下 JL04 菌株长势最好,与其他温度相比差异显著,因此拮抗菌 JL04 的最适生长温度应在 32 ℃ 左右。试验结果表明,JL04 菌株对温度比较敏感,在进行培养时,32 ℃ 是比较理想的温度。

2.3.2 最适初始 pH 值的确定 pH 值能影响微生物细胞膜表面电荷及膜的通透性,进而影响对物质的吸收能力。另外,pH 值还能改变酶活性、酶促反应的速率及代谢途径。过碱性或过酸性的环境会导致微生物生长缓慢,甚至导致细菌死亡。



不同小写字母表示组间具有显著性差异($P < 0.05$)。
图4至图8同

图3 不同温度对拮抗菌 JL04 发酵的影响

细菌在生长过程中所产生的胞外物质会改变发酵液的 pH 值,因此仅能控制其初始 pH 值。由图 4 可知,拮抗菌 JL04 在初始 pH 值为 5~6 时长势最好,与其他组相比差异显著,可见拮抗菌 JL04 更适合在略偏酸性的环境中生长。试验结果表明,培养基的初始 pH 值为 5~6 时更适合 JL04 菌株的生长。

2.3.3 接种量的选择 接种量是与培养基的利用率直接相关的量。接种量太大则菌种吸收不到足够多的营养,菌数不高且造成浪费;接种量太小对营养利用不充分,且细菌发酵周期延长,增加染菌概率。分别以不同接种量(1%、2%、3%、4%、5%)接种于培养基中进行发酵培养,以培养得到的拮抗菌株发酵液的 $D_{600 \text{ nm}}$ 值表示菌量。由图 5 可知,接种量在 3% 时拮抗菌 JL04 的长势最好。单因素方差分析表明,5 个接种

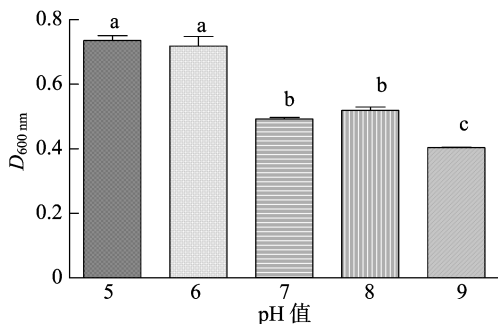


图4 不同初始 pH 值对拮抗菌 JL04 发酵的影响

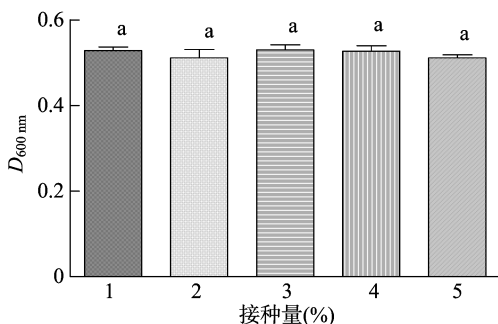


图5 不同接种量对拮抗菌 JL04 发酵的影响

量之间没有显著性差异,因此接种量对拮抗菌 JL04 的发酵生长影响不大。

2.4 JL04 菌株培养基组分优化

2.4.1 碳源优化

根据微生物所能产生的酶系不同,不同微生物可利用不同的碳源。碳源对微生物生长代谢的作用主要是提供细胞的碳架,提供细胞生命活动所需的能量,提供合成产物的碳架。碳源在制作微生物培养基或细胞培养基时具有重要作用,为微生物或细胞的正常生长、分裂提供物质基础。由图 6 可知,以 10 g/L 胰蛋白胨 + 葡萄糖(1 : 1)为碳源的发酵液 $D_{600\text{ nm}}$ 值最高,与其他单一碳源相比差异显著;其次为胰蛋白胨 + 可溶性淀粉(1 : 1),再次分别为葡萄糖、可溶性淀粉;而果糖、麦芽糖、蔗糖作为碳源时发酵液的 $D_{600\text{ nm}}$ 值均低于原培养基,因此选用胰蛋白胨 + 葡萄糖(1 : 1)作为碳源。

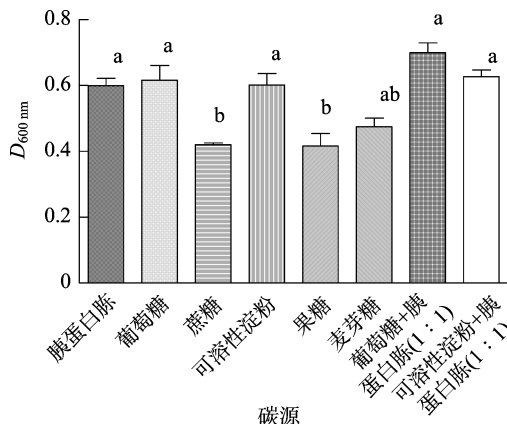


图6 不同碳源对拮抗菌 JL04 发酵的影响

2.4.2 氮源优化

微生物生长和产物合成需要氮源,氮源主要用于菌体细胞物质(氨基酸、蛋白质、核酸等)和含氮代谢物的合成。氮源是微生物必需的营养物质之一,对微生物的

生命活动意义重大。由图 7 可知,JL04 菌株在以酵母提取物 + 硝酸铵(1 : 1)为氮源的培养基中长势最好,其次为酵母提取物 + 硫酸铵(1 : 1),再次分别为酵母提取物 + 硝酸钾(1 : 1)、酵母提取物、牛肉膏、硝酸钾 + 硫酸铵(1 : 1)、硝酸铵、硫酸铵、硝酸钾、尿素。该结果可能的原因是有机氮源与无机氮源相比更易被利用,因此有机氮源对菌体生长更加有利。试验结果表明,选用酵母提取物 + 硝酸铵(1 : 1)作为氮源有利于 JL04 菌株的发酵培养。

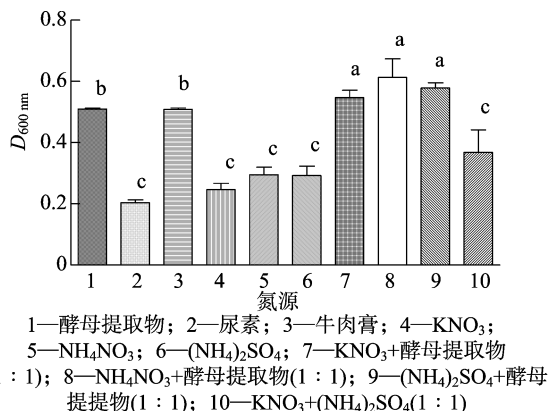


图7 不同氮源对拮抗菌 JL04 发酵的影响

2.4.3 无机盐种类的优化

无机盐是细胞的结构成分,参与并维持生物体的代谢活动,维持生物体内的酸碱平衡及渗透压。对微生物生长的重要性可见一斑。由图 8 可知,以硫酸镁 + 氯化钙 + 硫酸锰(2 : 3 : 1)作为无机盐的培养基发酵液 $D_{600\text{ nm}}$ 值最高;其次分别为氯化钙、硫酸镁、硫酸锰;而磷酸氢二钾作为无机盐时,发酵液的菌量均没有原培养基效果好,因此选用硫酸镁 + 氯化钙 + 硫酸锰(2 : 3 : 1)作为培养基的无机盐。

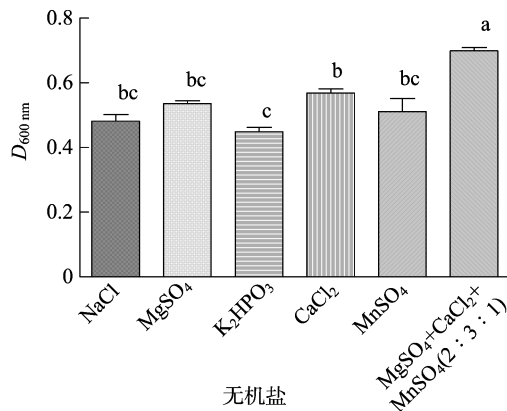


图8 不同无机盐对拮抗菌 JL04 发酵的影响

2.5 正交试验结果

由表 4 可知,发酵培养基组分的最优组合为 $A_3B_3C_1$,即拮抗菌 JL04 菌株的最佳培养基为 6 g/L 胰蛋白胨 + 6 g/L 葡萄糖 + 3.5 g/L 酵母提取物 + 3.5 g/L 硝酸铵 + 2 g/L 硫酸镁 + 3 g/L 氯化钙 + 1 g/L 硫酸锰。极差分析表明, $R_A > R_B > R_C$,即各因子对菌体浓度的影响大小依次为葡萄糖 + 胰蛋白胨 > 硝酸铵 + 酵母提取物 > 硫酸镁 + 氯化钙 + 硫酸锰。由表 5 可知,葡萄糖 + 胰蛋白胨差异显著,而硫酸镁 + 氯化钙 + 硫酸锰在统计学上没有显著性差异。

表 4 发酵培养基正交试验结果

因素	A	B	C	试验结果 (发酵液 $D_{600\text{ nm}}$ 值)
试验 1	1	1	1	0.432
试验 2	1	2	2	0.439
试验 3	1	3	3	0.429
试验 4	2	1	2	0.466
试验 5	2	2	3	0.485
试验 6	2	3	1	0.502
试验 7	3	1	3	0.472
试验 8	3	2	1	0.506
试验 9	3	3	2	0.509
均值 1	0.433	0.457	0.480	
均值 2	0.484	0.477	0.471	
均值 3	0.496	0.480	0.462	
极差	0.063	0.023	0.018	

表 5 正交试验方差分析

组合	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
胰蛋白胨 + 葡萄糖	0.007	2	2.625	5.14	显著
酵母提取物 + 硝酸铵	0.001	2	0.375	5.14	
硫酸镁 + 氯化钙 + 硫酸锰	0.000	2	0.000	5.14	
误差	0.010	6			

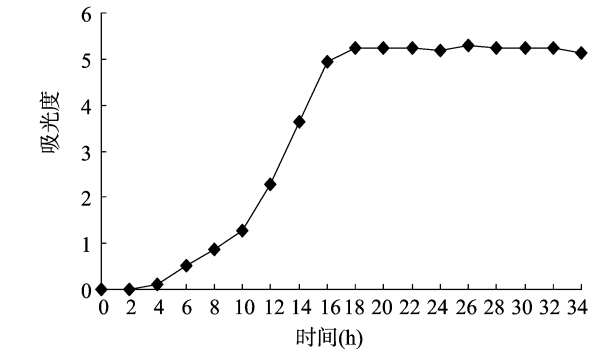


图9 拮抗菌 JL04 在优化后的 LB 液体培养基中的生长曲线

6 g/L 葡萄糖、3.5 g/L 酵母提取物、3.5 g/L 硝酸铵、2 g/L 硫酸镁、3 g/L 氯化钙、1 g/L 硫酸锰。发酵条件的研究结果表明,菌株 JL04 对温度和 pH 值较为敏感,其生长最适温度为 32 ℃,最适 pH 值为 5~6,接种量对菌体生长的影响不显著。筛选后的培养基碳源、氮源、无机盐明确,且菌株 JL04 在优化后的培养基中达到对数生长末期的时间缩短,能较快进入菌体密度最大期,为该菌株的高密度生产提供依据。

本试验仅在实验室条件下对发酵培养基的组成及其培养条件进行了优化,而拮抗菌制剂生防作用的发挥与制备工艺、使用方法以及菌剂使用时的温度、湿度、pH 值等环境因素密切相关。在拮抗菌制剂商业化过程中,一方面要继续加强对拮抗菌活性物质发酵工艺、提取与纯化方法等的研究,另一方面要加强对拮抗菌制剂发挥最佳作用条件的研究,需在发酵罐和水环境下进行验证。本试验对最佳碳源、氮源、无机盐离子和正交试验法优化培养基配比进行了研究,仅以液体发酵培养基中的总菌含量作为指标,并没有其他与之相对应的筛选模型作为依据,因此可能对试验结果造成一定误差,但并不

2.6 拮抗菌 JL04 在发酵培养基中生长曲线的测定

由图 9 可知,该菌株在优化后的培养基中 0~4 h 处于潜伏期,菌体生长量少;4 h 后进入对数生长期,菌体数量急剧增加;18 h 达到生长高峰;18~36 h 进入稳定期。在优化培养基中发酵 18 h 为拮抗菌 JL04 菌株对数生长的末期,此时期内收集的菌液适合作为菌种液,能得到高浓度的菌体。

与优化前的培养基相比,拮抗菌 JL04 在优化后培养基中的对数生长末期提前了 2 h,缩短了菌体发酵培养时得到最高浓度菌量的培养时间;而且优化前后该菌达到对数生长末期时的菌量不同,优化后对数生长末期菌量明显增大,这对于大量产生菌体来抑制水霉病原菌具有一定意义。

3 结论与讨论

通过单因素试验和正交试验,初步得到了实验室条件下 JL04 菌株液体发酵的培养基优化配方,即 6 g/L 胰蛋白胨、

影响本研究所得结果。今后的研究中可设计类似试验方案,以进一步验证本试验的准确性和完整性。

参考文献:

[1] Steciow M M, Paul A, Bala K. *Saprolegnia bulbosa* sp. nov. isolated from an Argentine stream: taxonomy and comparison with related species[J]. FEMS Microbiology Letters, 2007, 268(2): 225-230.

[2] 董亚伦, 梁政远. 几种抗菌菌药物对美洲鲢鱼卵水霉病的防治效果比较[J]. 科学养鱼, 2015(6): 60.

[3] 李 霞, 白利丹, 焦忠凯. 淡水鱼类水霉病防治技术[J]. 渔业致富指南, 2015(16): 49-50.

[4] 孙 琪, 胡 鲲, 杨先乐. 壳聚糖对草鱼人工感染水霉的影响[J]. 水生生物学报, 2014, 38(1): 180-183.

[5] 赵春晖. 水霉拮抗菌拮抗活性及其机理研究[D]. 济南: 山东师范大学, 2013.

[6] 陈 力. 白斑狗鱼规模化全人工繁育及养殖技术研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2013.

[7] 许佳露, 张世奇, 曹海鹏, 等. 生化防腐酸防治水霉病效果总结[J]. 海洋与渔业, 2011(6): 60.

[8] 张书俊, 杨先乐, 李 聃, 等. 水霉拮抗菌的筛选及其拮抗作用的初步研究[J]. 水生生物学报, 2008, 32(3): 302-307.

[9] 刘莉莉, 路福平, 刘 浩, 等. 拮抗水霉菌株的筛选及抑菌蛋白的分离纯化[J]. 天津科技大学学报, 2011, 26(4): 18-21.

[10] 赵春晖, 杨桂文, 秦玉广, 等. 水霉拮抗菌拮抗活性物质的分离鉴定[J]. 科技信息, 2013(7): 1-2.

[11] Balcázar 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.