

张 静,陈红莲,鲍俊杰,等.水产养殖中嗜水气单胞菌拮抗菌的研究进展[J].江苏农业科学,2020,48(17):21-33.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.17.005

水产养殖中嗜水气单胞菌拮抗菌的研究进展

张 静,陈红莲,鲍俊杰,汪 翔,王永杰

(安徽省农业科学院水产研究所/水产增养殖安徽省重点实验室,安徽合肥 230031)

摘要:水产养殖密度的增加,加大了疾病暴发的风险。嗜水气单胞菌感染的宿主多种多样,毒力因子复杂,为疾病的治疗和防控带来困难。目前水产上对嗜水气单胞菌的防控主要依赖抗生素、化学药物等,容易导致环境中药物残留、病原菌耐药性增加等问题。本文着重对水产养殖中嗜水气单胞菌及其拮抗菌的体外筛选方法、拮抗作用研究方法和拮抗机制(产生抑菌物质、竞争性黏附、群体感应猝灭、竞争营养物质、增强机体免疫功能和抗氧化功能)进行重点归纳阐述,并对拮抗菌在水产养殖中的应用和安全性方面的相关研究进行概述,旨在为嗜水气单胞菌拮抗菌的研发以及水产动物的疾病防控研究提供参考依据。

关键词:拮抗菌;嗜水气单胞菌;拮抗机制;疾病防控;水产养殖

中图分类号: S941.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)17-0021-12

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, Ah)隶属气单胞菌科(Aeromonadaceae)气单胞菌属(*Aeromonas*),该菌呈世界性分布,广泛分布于水体环境,主要出现在淡水、海洋,特别是河口环境的水生环境,是引起鱼类运动性气单胞菌败血症(motile *Aeromonas* septicemia, MAS)的主要病原体,同时也是两栖类、爬行类以及哺乳类动物的重要病原体,是我国流行最广泛的一种典型人-畜-水生动物共患的病原菌。20 世纪 80 年代以来,我国南方各省份淡水养殖鱼类流行暴发性传染病,很多报道系为嗜水气单胞菌所致败血症^[1-4]。2009 年 MAS 的暴发也发生在美国东南部,造成斑点叉尾鲟的全行业亏损^[5-6]。MSA 已成为水产养殖业快速发展的一个日益突出的问题。

水产养殖密度的增加加大了疾病暴发的风险,使之成为水产品生产和贸易的重大制约性因素,不仅因为疾病暴发加大了水产养殖的风险,同时养殖商品药物残留问题还制约着对内对外贸易,严重影响国家水产行业经济发展。与药物控制相比,益生菌凭借其无毒高效的优点,正受到国内外学者越来越

多的关注^[4]。世界粮农组织(FAO)和世界卫生组织(WHO)将益生菌定义为“当以足够量施用时可以赋予宿主健康益处的活性微生物”。在水产养殖中施用益生菌的好处包括增强鱼类生长、控制疾病、改善免疫反应、调节水环境^[7-12]。拮抗作用是细菌或其他微生物相互作用的方式之一,是指一种微生物在生长过程中通过某种代谢产物或改变生活环境来抑制其他微生物的生长发育,甚至杀死它们的现象。利用拮抗性能强的菌株抑制病原菌的生长、繁殖或致病性是生物防治的手段之一^[13]。疾病的重点管理应该是预防,拮抗菌更重要的功能作为抑制病原菌的生物控制剂,会减少对化学品(抗生素、消毒剂等)的使用和依赖,很可能比治疗更具经济效益^[14]。本研究着重通过对水产养殖中嗜水气单胞菌及其拮抗菌的体外筛选方法、拮抗作用研究方法和拮抗机制进行重点归纳阐述,并对拮抗菌在水产养殖中的应用和安全性方面相关研究及其发展趋势进行了概述,旨在为嗜水气单胞菌拮抗菌的研发以及水产动物的疾病防控研究提供参考依据。

1 介绍

1.1 嗜水气单胞菌流行情况

嗜水气单胞菌感染淡水鱼类引起暴发性出血病,死亡率极高,主要症状表现为头部、鳍条、腹部等部位充血,严重的眼球突出,在水面上漫游,无食欲,不久即死亡。嗜水气单胞菌的分离鉴定试验也

收稿日期:2019-09-29

基金项目:安徽省农业科学院科技创新团队项目(编号:18C0513);
安徽省科技重大专项(编号:18030701169)。

作者简介:张 静(1980—),女,安徽合肥人,硕士,副研究员,主要从事水产病害防控技术研究。E-mail:18056064966@163.com。

通信作者:王永杰,博士,研究员,主要从事水产病害防控技术研究。
E-mail:hfwangyongjie@163.com。

证实患病鱼体内鳃、肝、肾、肠等部位及养殖水环境均能检测到该菌,因此引起了国内外学者对该菌的高度关注^[1,3]。

有研究者对我国华东、豫北、南方等地区嗜水气单胞菌进行了流行病学调查。2016—2017 年,金承玲等在江苏省主要养殖品种草鱼、鲫鱼、鲢鱼、甲鱼、斑点叉尾鮰品种中均有检出嗜水气单胞菌,发现 25℃ 以上由其引起的细菌性疾病的发病率为 73%,发病后病死率为 5%~60%,平均病死率为 20%~30%^[15]。2011 年,王春瑞等对华东地区的嗜水气单胞菌流行情况进行调查,发现浙江省、安徽省、江苏省均有嗜水气单胞菌分布,危害鱼类包括鲤科鱼类的常见品种如团头鲂、鲫鱼、鲢鱼等,相关疾病于 6 月份开始出现且随水温的升高有逐渐加重的趋势,7—9 月为发病高峰期,对鲤科鱼类中团头鲂的危害最为严重,其次是鲫鱼、鲢鳙鱼、草鱼,而相邻池塘或同池塘的非鲤科鱼类则基本不发病^[16]。2009—2010 年,贺文旭等对豫北地区嗜水气单胞菌引起的细菌性败血症进行流行病学调查,发现养殖场感染的鱼类主要为鲢鱼、鲫鱼、草鱼、麦穗鱼和鲤鱼等,致病性嗜水气单胞菌在这些鱼中的分离率分别为 43.8%、28.1%、12.5%、12.5% 和 3.1%^[17]。张德锋等调查了南方地区鱼源气单胞菌不同种类的流行特征,发现嗜水气单胞菌也是我国南方地区鱼类气单胞菌败血症的主要流行菌株之一,可以和维氏气单胞菌混合感染,虽然其遗传多样性不如维氏气单胞菌,但在常见水生动物中嗜水气单胞菌的致病性比维氏气单胞菌强,其毒力基因也比维氏气单胞菌多,常见感染宿主为鲫鱼、鳊鱼、鳊鱼和鲢鱼等鲤科鱼类,仍然是疾病防控的重点对象^[18]。2009 年美国阿拉巴马州西部鲶鱼养殖区暴发了由致病性嗜水气单胞菌引起的 MAS^[6],之后疫情蔓延到相邻的密西西比州和阿肯色州。MAS 暴发导致美国东南部超过 1 000 万磅的鲶鱼死亡,产业损失超过约 1 200 万美元^[5-6]。Hossain 等比较了中国患病草鱼和美国鲇鱼分离出的嗜水气单胞菌株,发现它们具有高度相似的基因组,且嗜水气单胞菌美国鲇鱼分离株对斑点叉尾鮰和草鱼的毒力显著高于中国草鱼分离株^[6]。

上述调查研究显示,我国嗜水气单胞菌的常见感染宿主为鲤科鱼类,美国主要养殖品种斑点叉尾鮰也是致病性嗜水气单胞菌感染的主要对象。鲤科鱼类是我国淡水养殖的主要品种,2017 年中国渔

业统计年鉴显示,我国主要鲤科鱼类养殖总产量超过 2 000 万 t,养殖产业规模巨大。由于嗜水气单胞菌感染宿主多样,毒力因子复杂,血清型众多,达 96 个^[16],为嗜水气单胞菌引起疾病的治疗和防控带来困难。目前水产上对嗜水气单胞菌的防控主要依赖抗生素、化学药物等,虽然在短期内能起到一定的效果,但容易导致环境中药物残留、病原菌耐药性增加等问题^[19-20],给人们带来长期的困扰。有针对性地筛选开发不同的嗜水气单胞菌拮抗菌是一种安全、环保、可靠的途径。

1.2 拮抗菌种类和筛选来源

益生菌对病原菌的抑制作用最早出现在人类和农业的应用中,荧光假单胞菌对植物根部病原菌的抑制作用已得到详细验证。在水产养殖业中,早在 1980 年益生菌就被发现既可用作食物,也可作为水产养殖中鱼类疾病的生物防治剂和营养物质再生的激活剂^[21]。拮抗菌由于具有拮抗病原菌、调节机体正常生理功能、改善养殖环境、无抗药性等优点,是进一步研究水产养殖疾病控制的主要领域,将有助于减少水产养殖中的化学和药物使用,使水产养殖产品更容易被消费者所接受^[22-23]。应用于水产养殖中的具有病原拮抗作用的有益微生物,包括一些革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌以及部分非细菌类微生物。近年来水产界也加强了对拮抗菌的研究力度,针对各种水产动物病原菌都相继筛选出具有拮抗作用的微生物。已发现包括细菌、真菌、放线菌、微藻在内的多种微生物,研究较多的为芽孢杆菌、乳杆菌、酵母菌等。芽孢杆菌种类繁多,迄今为止在芽孢杆菌中仅枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、克劳氏芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌等一些菌种被证实具有拮抗病原菌的活性,与抗菌活性物质合成有关的基因至少达到 55 种,能够分泌多种低分子量的抗菌肽和细菌素类等抗菌活性物质,并具有刺激宿主免疫应答功能,同时具有耐热、耐极端环境、易保存等特性,因此芽孢杆菌是作为水产饲料添加剂的首选拮抗菌^[24]。放线菌中的链霉菌也被发现对病原菌有抑制效果,李梦茜等分离的链霉菌 LFJK-11 发酵液对引起罗非鱼败血症的嗜水气单胞菌 HCLF-2 有较强的抑制作用^[25]。真菌通常通过发酵产生次级代谢产物达到抑菌目的,包括萜类化合物、酚类和氮化物等。Zhao 等利用南极真菌 B-7 发酵产生的次生代谢产物可以直接抑制细菌^[26]。郭雷等从近

岸海域沉积物中分离出能够分泌抗菌活性代谢产物的黄柄曲霉(*Aspergillus flavipes* HN4-13),其发酵液抑菌活性在 9 d 时达到最大,对鳗弧菌和嗜水气单胞菌的抑菌圈直径分别为 15.65、12.75 mm^[27]。酵母菌是目前用于抑制这些水生病原菌的主要真菌,其提取物如酿酒酵母中的 β -葡聚糖具有协同抑制和免疫作用^[28],如来自印度 Himedia 公司的酵母提取物用于 *Labeo rohita* 可提高宿主免疫力和对嗜水气单胞菌的抵抗力^[29]。

拮抗菌主要获得途径为鱼类肠道、周边水环境、海洋微生物和极端环境微生物等。它的来源在拮抗菌的筛选和应用上是一个非常重要的环节,直接影响到拮抗菌的实际应用效果。拮抗菌能够在宿主肠道中定植,这是其发挥拮抗作用的前提。所以来源于宿主本身的拮抗菌不论在安全性还是在作用效果上都远远优于从异种和其他环境中筛选得到的拮抗菌,而且有些不合适的拮抗菌进入宿主肠道中可能会对宿主肠道造成意想不到的伤害。海洋微生物因其数量庞大和其特殊的生活环境、生态系统使其代谢产物具有很多意想不到的生物活性,也是目前热门的筛选来源。

2 拮抗菌体外筛选方法

细菌拮抗是自然界的常见现象,筛选候选拮抗菌的常用方法是进行体外拮抗试验,将体外拮抗试验作为筛选的第一步有其重要意义。体外抑菌试验主要采用的传统方法有固体培养法和液体培养法,纸片扩散法和菌落重叠法为固体平板筛选方法,在初步批量筛选有抑制性微生物上使用最为广泛,而上清液提取培养法和菌株共培养液体培养方法适用于进一步筛选验证。固体平板筛选法可以初步确定拮抗菌对病原菌的抑制效果,其中使用最为广泛的为纸片扩散法。Olsson 等比较了上述 2 种固体平板筛选方法,发现纸片扩散法数据的重现性一般较低,而使用菌落重叠法在 3 次抑菌重复试验中没有发现明显差异^[30]。通过拮抗菌和病原菌、拮抗菌发酵液与病原菌液体共培养试验也可以推断菌株拮抗的作用方式。例如,Fuente 等研究发现,在菌株共培养测定中,拮抗菌的抑菌活性比其无细胞上清液共培养时的抑菌活性更高,经试验推断是因为可产铁载体有抑菌活性的菌株由于铁载体附着在细胞膜上而不会脱落到上清液中^[31]。Ren 等将枯草芽孢杆菌 CH9 与嗜水气单胞菌 SC2005 共培养

6 h 后,SC2005 的种群密度显著降低,并且在 8 ~ 12 h 内保持稳定在低水平,通过 RT-qPCR 检测共培养时某些毒力基因和 *luxS* 基因的表达均显著下调,而与群体感应(quorum sensing, QS)系统相关的 *luxS* 基因的表达下调可能意味着嗜水气单胞菌 SC2005 的毒力表达与其群体感应有关^[32]。对于是否由抑菌物质如细菌素产生抑制效果,在培养过程中还需排除由 H₂O₂ 含量、pH 值等变化产生的抑制。Meidong 等用菌落重叠法初步筛选可抑制嗜水气单胞菌 FW52 和无乳链球菌 F3s 的菌株,将发酵滤液中和至 pH 值为 7.0 并进行过氧化氢酶处理,然后通过琼脂孔扩散试验对指示性鱼病原菌进行抗菌评价^[33]。

张皎皎等初筛采用点喷法,复筛采用牛津杯法从草鱼养殖池塘的水样及底泥样品筛选得到 1 株甲基营养型芽孢杆菌,以 1 亿 CFU/mL 嗜水气单胞菌为指示菌,其抑菌圈直径可达 21.8 mm^[34]。蒋启欢等从银鲫肠道筛选出 1 株芽孢杆菌属菌株 YJ-9,其对嗜水气单胞菌的抑菌圈可达 15 mm^[35]。刘亚楠等从团头鲂肠道中分离得到 1 株解淀粉芽孢杆菌,对病原性嗜水气单胞菌 43 的抑菌圈直径为 13 mm^[36]。Zhou 等从江苏南黄海沿岸沉积物中筛选出 1 株对嗜水气单胞菌 YJ-1 有抗性的芽孢杆菌属菌株 YB 1701,在指示菌终浓度为 10 万 CFU/mL 时,抑菌圈达到 12.0 mm,该菌不仅能抑制嗜水气单胞菌,同时对副溶血性弧菌 DX-1 表现出强耐酸和高浓度胆汁^[12]。Zhao 等研究发现,南极真菌 B-7 对 3 种病原菌(嗜水气单胞菌 ATCC7966、无乳链球菌、副溶血弧菌)均有抑制作用,其对嗜水气单胞菌抑菌圈达 19 mm^[26]。张德锋等筛选出的贝莱斯芽孢杆菌能有效抑制包括嗜水气单胞菌在内的多种病原菌的生长^[37]。以上报道中对嗜水气单胞菌的抑菌圈最大能达到 21.8 mm,最小不低于 11 mm。早期微生物拮抗菌的筛选中通常只针对一种病原菌筛选单抗微生物抑制剂,近期研究中越来越多的拮抗菌筛选目标将针对多种水产病原微生物都有抑菌活性,一般还包括无乳链球菌、副溶血弧菌、爱德华氏菌、点状气单胞菌等,这就需要在筛选中权衡找出满足试验需要的菌株。通过比较体外拮抗试验结果可以发现,筛选的试验条件并不一致,所用指示菌菌株、指示菌的浓度、所选培养基不尽相同,所以无法直接根据抑菌圈大小比较不同研究中的拮抗菌的抑菌能力,只能以此方法作为筛选的初

步试验。

3 拮抗机制研究

病原菌的数量、毒力(致病力)和侵入门径是决定侵染宿主结果的主要因素^[38],其作用方式有很多,主要作用机制包括产生消化酶、产生抑菌物质、产生免疫刺激、竞争黏附位点^[7]、群体感应的干扰^[39]等。目前对病原微生物产生拮抗作用的拮抗菌大都具有以下特征:(1)在体外试验中能产生抑制或杀灭病原菌的成分,如广谱性的抑菌物质细菌素、有机酸、过氧化氢等;(2)和病原菌产生生态位竞争或营养竞争,如肠道黏附位点竞争、铁离子竞争等;(3)分泌群体猝灭酶干扰病原菌群体感应,如对宿主的侵染和定植、毒力因子的表达、逃避宿主防御系统等;(4)刺激宿主的免疫功能和抗氧化功能抵抗病原菌,主要检测手段包括宿主各项免疫指标和抗氧化指标的测定,包括血清总蛋白、白蛋白和球蛋白水平,替代补体通路活性,细胞因子表达,以及吞噬活性、溶菌酶活性、抗氧化酶活性、丙二醛含量等。

3.1 产生抑菌物质

微生物可以直接产生具有抑制周围细菌生长能力的代谢物质,这种抑制可以是特异性的,也可以是非特异性的。特异性抑制代谢物是由细菌产生的目标特异性的抗菌肽,根据合成途径可分为核糖体[细菌素(bacteriocins)]和非核糖体[非核糖体肽合成酶(nonribosomal peptide synthetase, NRPS)],杀死细菌的能力取决于它们与细菌膜和细胞壁的相互作用,部分取决于膜或细胞壁的组成,从而诱导细胞的凋亡。非特异性抑制物如过氧化氢具有对细菌细胞及其分子结构的氧化作用介导的抗菌特性,乳酸和其他有机酸的作用是以未离解的形式穿过脂质膜并随后在 pH 值为中性时解离,从而产生导致细胞应激的离子^[40]。乳酸是由乳酸菌的碳水化合物化合物代谢产生,而另一些短链脂肪酸如甲酸、乙酸、丙酸和丁酸,是由细菌发酵淀粉、膳食纤维、糖、蛋白质和氨基酸产生的,其抗菌活性是由环境的酸化导致^[41-42]。

上文介绍了关于有拮抗性能拮抗菌的传统筛选方法,这些方法应用较为广泛,其缺点在于操作繁琐、工作量大,体外培养条件的局限性会影响抗菌素的生物合成。利用分子生物学和生物信息学手段可以从细菌基因组中鉴定出新的细菌素、聚酮

合成酶(polyketide synthase, PKS)和 NRPS 基因簇^[43],而新近开发的微生物质谱分子网络将肽基因组信息与其表型信息结合起来方便了抗菌素的筛选鉴定(例如 Pub - Chem 和 AntiMarin)^[44-45]。有研究显示,革兰氏阳性细菌枯草芽孢杆菌模式株有 4% ~ 5% 的基因簇用于抗菌素的生产^[46]。Walsh 等对人类微生物基因组数据库进行了分析,在不同的系统中鉴定了 74 个细菌素编码基因簇^[47]。

针对鱼类嗜水气单胞菌拮抗菌的研究较为广泛,但大多停留于初步筛选有抑制活性的菌株,以及拮抗菌是否产生抑制活性物质的分析,少部分从拮抗菌中分离纯化出抗菌活性物质。Chen 等研究了从罗非鱼养殖池中分离出的 *Paenibacillus ehimensis* NPUST1 菌株,该菌具有针对嗜水气单胞菌的细菌素样活性针对抗菌活性物质 peocin,粗提取物的理化性质显示出低 pH 值和高耐热性^[48],之后用纯化的 peocin 处理经嗜水气单胞菌感染的斑马鱼,能显著提高其存活率^[49]。杨丽莉等的试验表明,枯草芽孢杆菌 fmbJ 抗菌脂肽对嗜水气单胞菌的最小抑菌浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$,最小杀菌浓度为 32 $\mu\text{g/mL}$,还发现该抗菌脂肽能够导致嗜水气单胞菌细胞壁缺失、鞭毛散失、细胞膜通透性增加,使细胞内一些离子和大分子蛋白质、核酸泄露到胞外^[50]。曹海鹏对抗嗜水气单胞菌的解淀粉芽孢杆菌 G1 的抗菌素相关基因进行研究,发现仅含有伊枯草菌素合成必需基因,其编码产物的氨基酸序列与 GenBank 中芽孢杆菌属其他细菌的伊枯草菌素、伊枯草菌素 A、脂肽类化合物(bacillorin)等抗菌物质的氨基酸序列有高度同源性^[24]。Yi 等发现的拮抗菌 *Bacillus velezensis* JW 含有大量参与抗微生物合成的基因簇,包括 4 种细菌素、3 种 PKS 和 5 种 NRPS 基因簇^[51]。合成抗菌活性物质的相关基因的研究对深入探索其生物合成机制具有重要的意义。

一些细菌素为广谱抗菌活性而另一些则显示窄谱抗菌活性,前者有可能被用作传统的治疗类抗菌素,而窄谱抗菌素更适合在不改变自然种群的情况下针对特定的有害微生物^[52],有助于维持微生物种群的平衡。相对于传统的抗生素,细菌素由于它的低毒性、不易产生耐药性^[40]更易为人们所接受,但也不能忽略了病原菌可能会对其产生获得性耐受性,在应用过程中应合理、有效地使用^[53]。一般说来,革兰氏阳性菌产生的细菌素对革兰氏阳性病原体有较好的活性,革兰氏阴性菌素对革兰氏阴性

病原体的作用效果更好,有的活性可以通过其他物质(如乳酸)增强细胞膜渗透性来增强。但用纯化的细菌素和生物工程制品可以跨越这一障碍,还可提高其比活性、稳定性和宿主范围等特性。因此可产生抗菌素的拮抗菌不管是直接应用还是利用抗菌素的纯化或生物工程制品,在水产养殖疾病防控中都具有良好的应用前景。

3.2 竞争性黏附

黏附是病原体引起肠道感染所必需的,在致病性感染的初始阶段拮抗菌的第一效应可能是与病原体竞争组织表面的黏附受体^[54]。这种宿主-微生物相互作用可被拮抗菌有效抑制^[55]。选择潜在的拮抗菌菌株的另一个重要标准是与肠道或其他组织表面的黏附能力,该研究假设一般从微生物在黏液或者组织表面的定植和生长速度来判断^[20,30,56]。黏附可以是非特异性的,也可以是特异性的,包括黏附细菌表面的黏附分子和上皮细胞上的受体分子^[57]。通常认为在健康的鱼类中,消化道内病原体的生长可能会受到土著微生物群落的抑制,与病原体和皮肤黏液分离株相比,从肠道分离出的菌株在鱼肠黏附和生长能力更大^[30]。因此可首先考虑从鱼类肠道筛选可靠的拮抗菌。

通常通过体外检测拮抗菌和病原菌对肠上皮细胞和黏液的竞争黏附能力选择和评估拮抗菌。就肠黏液层的黏附性而言,细菌自聚集力、凝聚能力和表面疏水性是评价黏附能力的重要表型特征,可作为选择潜在拮抗菌的初步标准^[58],同时体外试验中与黏蛋白的结合能力也被认为是一个切实可行的筛选方法。Dhanani 等利用 Caco-2 细胞和肠黏液模型和对黏蛋白的黏附能力 2 种不同方法比较菌株 *Lactococcus rhamnosus* GG 和 *Lactococcus delbrueckii* M 的体外黏附试验发现,这 2 种菌对黏附肠上皮细胞和黏液的黏附能力试验不同,在肠上皮细胞黏附试验中 *Lact. delbrueckii* M 比 *Lact. rhamnosus* GG 的黏附能力弱,在和黏蛋白黏附试验中这 2 种菌的黏附能力却相似^[59-60],而这与 Guo 等利用同样方法获得的试验结论相同。Guo 等利用 Caco-2 细胞(人克隆结肠腺癌细胞)和草鱼肠黏液构建体外模型和黏蛋白黏附试验相比较,发现 4 种枯草芽孢杆菌对肠上皮细胞的黏附能力和对黏蛋白的黏附能力不同^[61]。因此需要研究的是细菌对不同体外模型的黏附效果,以获得菌株对肠黏膜层的不同组分和上皮细胞上潜在受体的总体黏附能

力的数据。检测菌株的聚集性和疏水性也是体外测定拮抗菌对肠黏膜黏附能力的间接方法^[62]。细菌共聚集在宿主肠道中具有相当大的意义,拮抗菌的共聚能力可能干扰病原菌感染宿主的能力并且可以防止病原体的定植^[55]。Meidong 等通过对 *Bacillus aerius* B81e 菌株检测发现,其具有较高的自聚集性和疏水性,对嗜水气单胞菌 FW52 的有效共聚集为 70.5%,同时对黏蛋白结合率也较高(92.5%),进一步证实了这一点^[33]。Caruffo 等还利用荧光酵母探索酵母在斑马鱼幼鱼中的定植情况,喂食 5 d 后可在胃肠道发现荧光酵母^[63]。Feng 等从鲤鱼肠道中分离出的 18 种乳酸菌(*lactic acid bacteria*, LAB)菌株中有 9 种有较高体外免疫调节性,并抑制 4 种病原菌的生长,其中 Q-9 和 Z-2 显示出最强的黏附能力和抑制病原体与黏蛋白的黏附^[64],说明不同菌株对病原体的黏附抑制能力和拮抗作用方式是不同的。

3.3 群体感应淬灭

群体感应(QS)是一种微生物之间的交流机制,通过产生、释放和识别被称为自诱导物的信号分子来调控基因的表达和协调微生物的群体性行为^[65-66]。QS 被证明可调节促使病原菌发病的多种表型,如生物膜形成^[67-70]、生物发光^[71-74]、毒力因子^[69-70,75-76]和集群效应^[77-78]。密度感应淬灭(quorum-quenching, QQ)是通过干扰信号分子的产生、释放、积累或应答从而达到阻抑密度感应通路的作用,能够在不杀死细菌的情况下特异性阻断致病菌毒力基因的表达,从而有效控制病原菌的致病性。该技术可降低环境中的选择压力和出现细菌抗药性的概率,因此密度感应淬灭技术是一种极具开发前景的细菌性病害的控制手段^[79-80]。相关研究表明,海洋中蕴含着丰富的 QQ 酶资源,而目前发现的 QQ 活性物质特别是 QQ 酶主要来源于陆地微生物。2006 年,首次报道了 AhyI/AhyR 群体感应系统与嗜水气单胞菌毒力因子相关的Ⅲ型分泌系统(TTSS)和Ⅱ型分泌系统(Aet)的关系^[81]。之后有研究发现,嗜水气单胞菌产生 AHL 类信号分子,通过 AhyI/R 系统调控胞外蛋白酶、溶血素等毒力因子的分泌^[82]。据报道嗜水气单胞菌有 3 套独立的 QS 调控通路,第 1 套信号系统受酰基高丝氨酸环内酯类化合物(acyl homoserine lactone, AHL)调控,属自体诱导物 1,即 AI-1 型;第 2 套信号系统受呋喃酰硼酸二酯(AI-2)调控;第 3 套信号系统

是 QseB/QseC 双组分调控系统,受类肾上腺素信号分子 (AI-3) 调控^[83]。目前根据碳链长度和 C3 位的取代基不同可将 AHL 信号分子分为 40 多种^[84],但这些信号分子都具有相同的高丝氨酸内酯环和相似的调控机制,其中信号分子达到特定的浓度是引发病原菌表达致病因子的关键^[76],因此降解信号分子、抑制信号分子的积累是阻断细菌密度感应的另一种直接而有效的方式。目前研究主要发现了 3 种 AHL 降解酶:AHL 内酯酶、AHL 酰基转移酶和 AHL 氧化还原酶^[85]。

QQ 菌株的筛选方法有很多种,根据其不同的筛选原理基本上分为 3 类:基本培养基唯一碳源筛选法、平板抑制法和检测反应剩余的 AHL 量^[80]。传统的筛选方法多以平板抑制法为主。汤开浩建立了 QQ 菌株高通量筛选方法,利用对 AHL 分子具有高灵敏度的报告菌根瘤农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 建立的工程菌株快速鉴定了具强 QQ 活性的 3 株菌株,能够提高斑马鱼抗嗜水气单胞菌感染的能力,利用胶内 QQ 活性检测、蛋白质谱检测以及全基因组测序技术发现,菌株 *Muricauda olearia* Th120 的 5 个蛋白具 AHL 降解活性,QQ 酶 MomL 代表一类新型海洋 AHL 内酯酶,其同源蛋白可能普遍存在于海洋黄杆菌科细菌中^[80]。何凤旭等采用 HPLC-MS/MS 技术,在质谱多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 模式下,可在 μg 级别浓度范围快速、定性和定量分析嗜水气单胞菌产生的信号分子,将嗜水气单胞菌 NJ-1 与芽孢杆菌 R1 共培养时,NJ-1 的生长并未受到 R1 的抑制,丝氨酸蛋白酶 *ser*、肠毒素 *act*、溶血素 *hem*、气溶素 *aer* 等毒力基因的表达水平均显著下降^[83]。Chu 等研究了产 QQ 酶拮抗菌对鱼体内微生物群落的影响及其和潜在病原菌嗜水气单胞菌的关系,发现从健康鲫鱼的肠道中分离出来芽孢杆菌 QSI-1 可抑制嗜水气单胞菌 YJ-1 中的 AHL,从而抑制 AHL 诱导紫色色杆菌 *Chromobacterium violaceum* 产紫色素,通过抑制毒力因子如胞外蛋白酶、溶血素产生以及生物膜的形成降低嗜水气单胞菌 YJ-1 的毒性。通过口服给予群体淬灭拮抗菌 QSI-1 能够改变肠道微生物群结构,并可降解 AHL 降低嗜水气单胞菌水平,对调节肠道微生物群结构有积极作用^[75,86]。张美超等通过克隆 *Ochrobactrum* sp. M231 来源 N-乙酰高丝氨酸内酯酶基因 *aiiO*-A106 并对其进行原核表达,发现该酶对嗜水气单胞菌致病基因具有一定的下

调作用,可以降低其致病性毒力因子的表达量^[76]。Chen 等研究发现,芽孢杆菌来源的 N-乙酰高丝氨酸内酯酶 AiiA-B546 可延缓嗜水气单胞菌 ATCC 7966 对锦鲤的侵染^[87]。林洋等利用传统方法分离得到了可抑制嗜水气单胞菌群体感应的乳酸菌菌株 SCT-2,扫描电镜结果显示,其代谢粗提物不仅降低了嗜水气单胞菌生物膜的生成量,而且使其生物膜断裂^[88]。Li 等从池塘沉积物中分离出 7 株可降解 AHL 菌株,其中 2 株肠杆菌 (*Enterobacter* sp. f003) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus* sp. sw120) 含 AHL 内酯酶基因 *aiiA*,并且不产生溶血反应^[89]。彭孟凡等从淡水环境中分离出的地衣芽孢杆菌菌株 T-1 具有群体淬灭功能,含有可编码 AHL 内酯酶的群体淬灭基因 *ytnP*,通过构建重组质粒 pEASY-Blunt E1-*ytnP* 表达纯化得到的 YtnP 蛋白可抑制嗜水气单胞菌生物膜形成,并可显著下调细胞肠毒素基因 *ast*、溶血素基因 *hem*、肠毒素基因 *aerA*、弹性蛋白酶基因 *ahyB* 等毒力基因的表达,且添加 YtnP 蛋白后嗜水气单胞菌对异育银鲫攻毒试验显示,在 96 h 内其累计死亡率由 78% 降低至 27%^[90-91]。

从上述该研究可知,目前从各种环境中已分离出针对嗜水气单胞菌有 AHL 降解活性的拮抗菌并获得相关酶的基因,通过克隆分析其相应的 AHL 降解酶主要为 AHL 内酯酶。QS 的抗细菌病害策略作为一种新型细菌性病害的防治手段,已受到大家越来越多的关注。通过淬灭密度感应以阻断微生物的群体性行为,此过程不会影响细菌的生存,又可调控毒力因子的表达。因此密度感应淬灭技术在水产养殖业细菌病害防治中的潜力巨大,具有非常开阔的开发应用前景。该些研究为找出可控制嗜水气单胞菌 AHL 降解的密度感应淬灭拮抗菌、QQ 酶和水产养殖中嗜水气单胞菌病害防控以及拮抗菌的筛选提供了新思路和解决办法。

3.4 竞争营养物质

精养池塘大量的营养输入势必改变系统中已有的群落结构,除了功能性环境微生物群落以外,一些致病菌 (特别是条件致病菌) 种群规模有可能快速变大,与养殖生物接触后,造成细菌性疾病的发生^[92]。拮抗菌产生不同的拮抗策略从而获得比肠道中其他细菌更多的生态优势,其中一些是直接竞争,如竞争营养物质、积累 D-氨基酸、降低氧化还原潜力等^[40]。营养物质的竞争已被认为是拮抗

菌抑制病原菌的机制^[11],但相关研究显示的是添加营养物质可导致益生菌的促生作用和病原菌的抑制生长作用,并没有直接证据证明是由于竞争获得营养物质抑制病原菌还是因益生菌本身发挥的抑制作用。例如,Yang 等研究了日粮中添加维生素 C 对 *Cyprinus carpio* 的影响,发现肠道中的乳酸杆菌和芽孢杆菌属水平随饮食中维生素 C 的增加而增加,而嗜水气单胞菌和大肠杆菌的水平随之降低^[93]。Jiang 等评估了肌醇对 Jian carp 肠道菌群的影响,随着膳食肌醇补充量的增加,肠道乳酸杆菌的种群增加而嗜水气单胞菌和大肠杆菌下降^[94]。

几乎所有的微生物都需要铁,铁载体是一种低分子量且结构多样的铁螯合剂,由细菌进化出能从环境和宿主体内摄取铁的多种复杂的机制,其生态学意义在于它们从环境中清除必需营养物质剥夺竞争者的生存能力^[95]。病原菌能够在宿主组织和体液的高铁环境中成功竞争铁^[96],而可产生铁载体的无害细菌可用作拮抗菌,与可产生铁载体的致病性病原菌竞争铁。铁载体被认为是嗜水气单胞菌的毒力因子之一^[97],因此拮抗菌与嗜水气单胞菌竞争铁也是拮抗作用的一种机制。可产生铁载体是假单胞菌属菌株表现出的最常见的拮抗机制。有研究发现,大多数假单胞菌属拮抗菌株可产生铁载体,Fuente 等的研究结果^[31,98-99]一致,他们发现产生铁载体的假单胞菌菌株有抑制 *Flavobacterium psychrophilum* 和 *Aeromonas hydrophila* 生长的能力,这表明铁竞争至少是拮抗菌拮抗作用的一个方面。林洋等的研究表明,8 mg/mL 的乳酸菌菌株 SCT-2 的粗提物可使嗜水气单胞菌蛋白酶和铁载体的分泌量分别减少 27.18% 和 22.11%^[88]。

3.5 增强机体免疫功能和抗氧化功能

除了对病原菌产生拮抗作用外,拮抗菌对机体细胞免疫的调节功能也是评价拮抗菌功能的主要指标,主要考察宿主的非特异性免疫,对鱼类检测指标主要包括呼吸爆发活性,吞噬活性,血清总蛋白、白蛋白和球蛋白水平,补体 C3,血清溶菌酶,白细胞介素(IL)、肿瘤坏死因子(TNF)、干扰素等细胞因子的^[33,51,61,100-101] mRNA 表达等。吞噬细胞产生的呼吸爆发在吞噬作用过程中可以攻击入侵的病原体,作为鱼类细胞免疫机制的重要指标;吞噬活性受吞噬细胞控制,是先天免疫和细胞一线防御的关键部分,在抗体产生之前,炎症反应的早期激活依赖于它;补体是先天免疫反应的主要体液成

分,在使宿主免疫系统升温至潜在病原体的入侵及其清除方面发挥着不可或缺的作用;血清蛋白、白蛋白和球蛋白水平的增加被认为与鱼类中较强的先天免疫反应有关;溶菌酶是另一种重要的抗菌效应机制,通过水解细菌细胞壁导致细胞裂解,也被视为可激活吞噬细胞和补体系统的调理素^[51,101]。鱼类细胞因子在发育和造血过程中起着重要作用,它们将白细胞吸引到感染部位,并激活其抗菌机制以杀死任何入侵者^[102]。

大量研究表明,在给鱼喂食添加益生菌的饲料后能不同程度地提高机体的免疫能力和对病原菌的抗病力。Meidong 等在饲料中添加 10 万 CFU/g 的 *B. aerius* B81e,显著增加了 *Pangasius bocourti* 的生长性能、免疫应答和对嗜水气单胞菌的抗病性^[33]。Chi 等分离的肠道内生菌 *Aeromonas veronii* BA-1 和 *F. sasangense* BA-3 混入饲料中喂食鲤鱼,发现宿主的多项先天免疫指标数值显著增加,血液中 3 种免疫相关基因的表达上调,并可显著增强嗜水气单胞菌感染后的抗病力,其细胞外产物也可刺激免疫系统,但使用效果不如具有活性的菌类制剂。在其研究中还发现,益生菌对机体的血清蛋白、白蛋白和球蛋白水平的刺激是短期现象,在投喂 7、14 d 时,其数值显著增加,而喂食后 21、28 d 时未发现明显增加^[101]。通过给虹鳟鱼口服益生菌发现,益生菌可刺激细胞例如单核细胞比例的增加,增强吞噬活性^[103]。Kumar 等的试验结果显示,投喂含有枯草芽孢杆菌的饲料,鱼类的粒细胞和单核细胞增加了褶皱,呼吸爆发活性显著增加^[104],这证明了用含枯草芽孢杆菌的饲料喂养鱼类,会使鱼类自身的非特异性免疫增强。Zhang 等研究了 *Lactobacillus delbrueckii* 对黄河鲤嗜水气单胞菌的抗病性,发现鲤鱼肠道中的免疫参数均得到提高,TNF- α 、IL-8、IL-1 β 和 NF- κ B p65 的 mRNA 水平下调,IL-10 和 TGF- β 的 mRNA 水平上调^[105]。这与 Devi 等喂食 *Labeo rohita* 后检测的免疫指标结果相似,在经人工嗜水气单胞菌感染后,死亡率仅为 10%^[106]。Guo 等在饲料中添加枯草芽孢杆菌 GC-21 和 GC-22 喂食草鱼,IL-1 β 的表达下调,但 IL-10 和 TGF- β 的表达上调^[61]。该研究与 Zhang 等的研究结果^[105] 类似。Yi 等通过喂食添加 *B. velezensis* JW 的饲料调节宿主的免疫功能,发现 IFN- γ 、TNF- α 、IL-4 和 IL-10 细胞因子的 mRNA 表达上调,而 IL-12 的 mRNA 表达水平下

调^[51]。Feng 等研究发现,在感染嗜水气单胞菌前,补充乳酸乳球菌组的促炎细胞因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-12)表达上调,而感染后这些细胞因子的阴性组显著低于阳性组,无论是否感染,Q-8、Q-9 和 Z-2 处理组的抗炎细胞因子(IL-10、TGF- β)的表达均显著增加^[64]。以上研究结果显示,喂食添加益生菌的饲料可以显著提高宿主的非特异性免疫相关指标,以及对嗜水气单胞菌的抗病力,有所不同的是,添加不同益生菌可影响不同细胞因子在宿主体内的表达水平。不同细胞因子对鱼类免疫反应作用不同,有研究显示,促炎细胞因子(如 TNF- α 和 IL-1 β)在感染后可介导鱼类的炎症反应^[107],而抗炎细胞因子如 TGF- β 和 IL-10 则发挥有效的免疫抑制作用^[61]。

同时拮抗菌也可刺激鱼的抗氧化防御系统起到协同抑制的作用。机体受到外源异物刺激后,其血细胞会产生典型的呼吸爆发现象,同时产生具有杀菌作用的活性氧(ROS)^[108]。呼吸爆发产生的 ROS 可以对细菌等外来异物进行杀灭,在抗菌、抗病过程中起着关键作用^[109]。因此,产生的大量 ROS 会引起机体内各种抗氧化酶活力的变化,平衡体内自由基。其主要检测指标包括谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)、总抗氧化能力(T-AOC)、超氧化物歧化酶(SOD)、髓过氧化物酶(MPO)、过氧化氢酶(CAT)等。Zhang 等研究发现,用含有 100 万 CFU/g *Lactobacillus delbrueckii* 饲料喂养黄河鲤显示出更高的 SOD、CAT、GPX 和 T-AOC 活性,同时丙二醛(MDA)浓度较低^[105]。Reyes-Becerril 等通过喂食 *Mycteroperca rosacea* 幼鱼含酵母菌 BBS 8339 的饲料,发现其 SOD 和 CAT 活性显著升高^[110]。

4 拮抗菌在水产养殖中的应用研究

4.1 拮抗菌的施用效果评价

目前,水产养殖中拮抗菌可以通过 4 种方式添加到宿主或其周围环境中:添加至人工饲料中、添加至养殖水体中、浸泡、添加至生物活饵料中。

水体中水产养殖活动对于自然环境有显著影响,随着测序技术的发展,人们对养殖环境中的细菌组成有更进一步的了解。郑侠飞通过比对不同研究结果发现,不同的养殖环境中细菌的优势种群在门水平上基本相似,氮、磷的积累以及季节变化引起的温度差异是影响水产养殖环境中细菌群落

的重要影响因素,而疾病暴发也和环境因子有密切关系^[111]。由于拮抗菌制剂是活菌制品,不同的环境条件下微生物的生长状态和生理活动相差较大,这将直接决定其生产应用过程中的作用效果,如芽孢杆菌制剂在 pH 值和亚硝酸盐浓度较高的环境下效果不好。因此在施用过程中对施用环境须有正确的评估。使用拮抗菌制剂时,菌的活力和数量会直接影响其效果,施用之前对其活力和数量的检测也是必要的。

由于包括温度、pH 值、水活度和气体组成波动在内的各种参数的变化,肠道微生物群的组成在整个消化道内是不均匀的。摄取的菌株需要在胃酸和小肠中存活,对酸性、胆汁、肠液、胃蛋白酶、胰蛋白酶、蛋白酶 K 等的耐受性检测也是筛选拮抗菌的主要标准。在养殖动物肠道、养殖水体中的定植和增殖能力是拮抗菌是否能发挥效用的另一重要评判标准,拮抗菌进入宿主肠道后数量会先递增至高峰然后递减,因此拮抗菌制剂须要定期投喂维持其在宿主肠道中形成优势菌群状态。拮抗菌在肠道内的检测,目前主要有体外平板培养法、实时荧光定量 PCR 法、体外构建模型法、荧光标记法、无菌动物法等^[112]。也有研究表明,拮抗菌生物膜的形成将有益于其在肠道内的定植^[61]。

鱼苗、虾的免疫系统不如成鱼发达,主要依靠非特异性免疫反应来抵抗感染。水产动物在幼体时期其肠道内的菌群未完全建立,对疾病的抵抗力也较弱,所以幼体时期时使用拮抗菌能使拮抗菌快速形成优势菌群,达到最好的抗病效果^[113]。Ringø 等的研究表明,体外试验的阳性和阴性都不能预测体内的实际效果^[113],拮抗菌的实际作用需要通过投喂试验进一步验证其在体保护率、对肠道菌群的影响、对宿主免疫功能的影响、对宿主生长性能的影响等。在投喂试验中还要比较拮抗菌在饲料中的添加量保证最优的作用效果。Yu 等在饲料中添加 100~1 000 mg/kg 凝结芽孢杆菌,发现 500 mg/kg 添加量能显著降低异育银鲫幼鱼的进食速率、饲料转化率和血浆丙二醛含量,并能显著增加体质量增加率、蛋白质效率比、免疫指标参数和对嗜水气单胞菌感染的抵抗力^[100]。Mohapatra 等比较了多种益生菌复合投喂方式,发现投喂枯草芽孢杆菌、乳酸乳球菌、酿酒酵母 3 种有活性益生菌能显著提高 *Labeo rohita* 鱼种的免疫力和嗜水气单胞菌感染后的存活率^[114]。因此,拮抗菌的添加数量和活性、配

伍方式皆对宿主的抗病能力有影响,同时使拮抗菌对机体免疫刺激达到稳定水平的时间也有所不同。Chi 等研究发现,在喂食 2 种肠道原生细菌 *Aeromonas veronii* BA-1 和 *F. sasangense* BA-3 达 7~28 d 时,鱼的各种免疫指标均有不同程度的增加,血液中 3 种免疫相关基因的表达显著上调^[101]。这些参数指标的检测对拮抗菌在渔业生产中的实际应用具有指导意义。

4.2 拮抗菌的安全性评价

在拮抗菌的应用中,不仅要考虑拮抗菌对相关病原菌的拮抗效果,还需要考虑拮抗菌对养殖生物的安全性。因此在将培养物用作拮抗菌之前,必须确认宿主中不存在致病作用。在正常或胁迫条件下,应用候选拮抗菌进行急性和慢性攻毒试验,其添加方式可以通过注射、悬液培养、添加在饲料中^[21]以检测对宿主的致病性。体内攻毒试验应同时研究其长期影响,以确定拮抗菌对病原菌是如何作用的以及病原菌在体内的变化过程。拮抗菌在使用上不仅对鱼类是安全的,而且应不具备可获得或可转移抗生素抗性的特性^[115],可依据美国 NCCLS 颁布的药敏试验要求和标准检测拮抗菌株对抗菌药物的敏感特性,排除其携带相关耐药基因的可能性,确保在应用过程中不会传播耐药因子。由于水产动物生存在水体中,拮抗菌在使用过程中会首先进入水体,所以拮抗菌对水环境的安全性也需要充分考虑,需要验证其对水体中其他生物如藻类的生长是否有影响^[116]。而且有的拮抗菌进入宿主肠道中可能会改变宿主肠道菌群结构,带来其他安全风险,因此在使用过程中要长期观察其对宿主体内微生物多样性的影响。

5 结束语

对以上文献的回顾表明,拮抗菌在鱼类抗嗜水气单胞菌感染中有显著效果。对其深入研究还将促进拮抗菌效应物的发现,诸如代谢产物、酶、功能蛋白等,同时拮抗菌拮抗机制的研究也有助于揭示嗜水气单胞菌对宿主的致病机制。目前拮抗菌与病原菌之间相互作用的分子机制、拮抗菌与宿主之间相互作用的分子机制以及拮抗菌对免疫系统影响的作用方式的研究还非常有限。借助分子生物学技术诸如分子克隆、荧光标记、蛋白表达等将大大加快拮抗菌的筛选和相关功能基因(如细菌素、群体猝灭酶等)的应用,以及对拮抗菌在水产动物

体内的位置及数量进行实时监测及分析。

然而,由于拮抗菌制剂是活菌制品,不同的环境条件下微生物的生长状态和生理活动相差较大,存在易受外界环境影响、对突发流行病防治效果不明显等问题。针对特异性病原菌侵染时拮抗菌应用的研究,还需明确拮抗菌针对不同水产动物以及同一水产动物不同生长阶段的专用微生物制剂,进一步加强具有更广谱抑制作用和不同来源的拮抗菌的分离,不断丰富水生动物拮抗菌资源;应同时加强生产和应用方面的研究,改善发酵工艺,保证菌种活性,改进菌种的使用条件,确定拮抗菌在肠道内发挥作用的有效剂量和施用时间、有效的安全性评价体系和方法。

参考文献:

- [1] 陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述[J]. 水产学报,1992,16(3):282-288.
- [2] 杨守明,王民生. 嗜水气单胞菌及其对人的致病性[J]. 中华疾病控制杂志,2006,10(5):511-514.
- [3] 沈锦玉. 嗜水气单胞菌的研究进展[J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版),2008,27(1):78-86.
- [4] 周宇,周秋白. 嗜水气单胞菌防控技术研究进展[J]. 生物灾害科学,2012,35(2):126-133,141.
- [5] Pridgeon J W, Klesius P H. Molecular identification and virulence of three *Aeromonas hydrophila* isolates cultured from infected channel catfish during a disease outbreak in West Alabama (USA) in 2009 [J]. Diseases of Aquatic Organisms,2011,94(3):249-253.
- [6] Hossain M J, Sun D, McGarey D J, et al. An Asian origin of virulent *Aeromonas hydrophila* responsible for disease epidemics in United States - farmed catfish [J]. Mbio,2014,5(3):e00848.
- [7] Wang A, Ran C, Wang Y, et al. Use of probiotics in aquaculture of China—A review of the past decade [J]. Fish & Shellfish Immunology,2019,86:734-755.
- [8] 马富平. 主养草鱼池塘微生物群落结构分析及嗜水气单胞菌拮抗菌筛选[D]. 重庆:西南大学,2017.
- [9] Dawood M A O, Koshio S, Abde - Daim M M, et al. Probiotic application for sustainable aquaculture[J]. Reviews in Aquaculture, 2019,11(3):907-924.
- [10] Newaj - fyzul A, Al - harbi A H, Austin B. Review; developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture [J]. Aquaculture,2014,431:1-11.
- [11] Hoseinifar S H, Sun Y, Wang A, et al. Probiotics as means of diseases control in aquaculture, a review of current knowledge and future perspectives[J]. Frontiers in Microbiology,2018,9:2429.
- [12] Zhou S, Xia Y, Zhu C, et al. Isolation of marine *Bacillus* sp. with antagonistic and organic - substances - degrading activities and its potential application as a fish probiotic [J]. Marine Drugs,2018,16:196.

- [13] 刘亚楠, 刁丙文. 水产动物病原菌拮抗菌的研究进展[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(5): 208–212.
- [14] 陈楠楠, 秦平伟, 尹珊伊, 等. 解淀粉芽孢杆菌抗菌机制研究进展[J]. 中国微生物学杂志, 2018, 30(12): 106–111.
- [15] 金承玲, 方 苹. 江苏省嗜水气单胞菌流行病学调查[J]. 水产养殖, 2018(6): 51–52.
- [16] 王春瑞. 嗜水气单胞菌的分子流行病学调查及其两种分型方法的研究[D]. 宁波: 宁波大学, 2011.
- [17] 贺文旭, 毛会丽, 杨利敏, 等. 豫北地区主要淡水鱼类感染嗜水气单胞菌的流行病学调查[J]. 水产科学, 2016, 35(3): 278–283.
- [18] 张德锋, 刘礼辉, 李宁求, 等. 我国南方地区鱼源气单胞菌不同种类的流行特征[J]. 水产科学, 2015, 34(11): 673–682.
- [19] 任亚林, 李 耘, 韩 刚. 水产品中嗜水气单胞菌耐药性研究进展[J]. 生物工程学报, 2019, 35(5): 759–765.
- [20] Livermore D M. The need for new antibiotics[J]. Clin Microbiol Infect, 2004, 10: 1–9.
- [21] Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, et al. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture [J]. Microbiology & Molecular Biology Reviews, 2000, 64(4): 655–671.
- [22] Hossain M I, Sadekuzzaman M, Ha S D. Probiotics as potential alternative biocontrol agents in the agriculture and food industries: a review[J]. Food Research International, 2017, 100(1): 63–73.
- [23] Hai N V. The use of probiotics in aquaculture [J]. Journal of Applied Microbiology, 2015, 119(4): 917–935.
- [24] 曹海鹏. 抗嗜水气单胞菌解淀粉芽孢杆菌的抗菌机理研究及其微胶囊制剂的安全性评价[D]. 上海: 上海海洋大学, 2013.
- [25] 李梦茜, 张振旺. 罗非鱼细菌性败血症病原菌嗜水气单胞菌拮抗菌株的筛选和鉴定[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(3): 129–131.
- [26] Zhao H, Cai C, Liu X. Secondary metabolites of Antarctic fungi antagonistic to aquatic pathogenic bacteria [J]. Open Life Sci, 2018, 13: 11–21.
- [27] 郭 雷, 朱文成, 刘玮玮, 等. 抗菌活性海洋真菌 HN4–13 的鉴定及其发酵优化[J]. 微生物学通报, 2013, 40(6): 951–958.
- [28] Soares M P, Oliveira F C, Cardoso I L, et al. Glucan – MOS[®] improved growth and innate immunity in pacu stressed and experimentally infected with *Aeromonas hydrophila* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 73: 133–140.
- [29] Andrews S R, Sahu N P, Pal A K, et al. Yeast extract, brewer's yeast and spirulina in diets for *Labeo rohita* fingerlings affect haemato – immunological responses and survival following *Aeromonas hydrophila* challenge[J]. Research in Veterinary Science, 2011, 91(1): 103–109.
- [30] Olsson J C, Westerdahl A, Conway P L, et al. Intestinal colonization potential of turbot (*Scophthalmus maximus*) – and dab (*Limanda limanda*) – associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum* [J]. Applied & Environmental Microbiology, 1992, 58(2): 551–556.
- [31] Fuente M D L, Miranda C D, Jopia P, et al. Growth inhibition of bacterial fish pathogens and quorum – sensing blocking by bacteria recovered from Chilean salmonid farms [J]. Journal of Aquatic Animal Health, 2015, 27(2): 112–122.
- [32] Ren Y, Li S, Wu Z, et al. The influences of *Bacillus subtilis* on the virulence of *Aeromonas hydrophila* and expression of *luxS* gene of both bacteria under Co – cultivation [J]. Current Microbiology, 2017, 74(6): 718–724.
- [33] Meidong R, Khotchanalekha K, Doolindachaporn S, et al. Evaluation of probiotic *Bacillus aerius* B81e isolated from healthy hybrid catfish on growth, disease resistance and innate immunity of Pla – mong *Pangasius bocourti* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 73: 1–10.
- [34] 张皎皎, 马富平, 熊 波, 等. 一株新型嗜水气单胞菌拮抗菌的筛选及鉴定[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2018, 39(12): 18–23.
- [35] 蒋启欢, 叶应旺, 胡 王, 等. 银鲫肠道内抑制嗜水气单胞菌的潜在益生菌筛选及其特性研究[J]. 淡水渔业, 2016, 42(2): 22–26.
- [36] 刘亚楠, 刁丙文, 梁利国, 等. 1 株嗜水气单胞菌的拮抗菌鉴定及其特性研究[J]. 水生态学杂志, 2014, 35(3): 82–87.
- [37] 张德锋, 高艳侠, 卢进新, 等. 贝莱斯芽孢杆菌及其作为水产病原菌抑制剂的应用: CN201810565029. 2 [P]. 2019–06–14.
- [38] 毛 宁, 王志明, 郑 莺, 等. 嗜水气单胞菌与其拮抗菌 R – 15 的生长曲线研究[J]. 福建师大学报(自然科学版), 2008, 24(1): 82–85.
- [39] 陈瑞东. N – 酰基高丝氨酸内酯酶基因克隆、表达、性质研究与水产养殖应用[D]. 北京: 中国农业科学院, 2010.
- [40] Garcia – Gutierrez E, Mayer M J, Cotter P D, et al. Gut microbiota as a source of novel antimicrobials [J]. Gut Microbes, 2019, 10(1): 1–21.
- [41] Morrison D J, Preston T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism [J]. Gut Microbes, 2016, 7(3): 189–200.
- [42] Besten G D, Eunen K V, Groen A K, et al. The role of short – chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism [J]. Journal of Lipid Research, 2013, 54(9): 2325–2340.
- [43] Liu L, Hao T, Xie Z, et al. Genome mining unveils widespread natural product biosynthetic capacity in human oral microbe *Streptococcus mutans* [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 37479.
- [44] Watrous J, Roach P, Alexandrov T, et al. Mass spectral molecular networking of living microbial colonies [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012, 109(26): 10150–10151.
- [45] Edlund A, Garg N, Mohimani H, et al. Metabolic fingerprints from the human oral microbiome reveal a vast knowledge gap of secreted small peptidic molecules [J]. Msystems, 2017, 2(4): e00058–17.
- [46] Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions [J]. Mol Microbiol, 2005, 56(4): 845–857.
- [47] Walsh C J, Guinane C M, Hill C, et al. In silico identification of bacteriocin gene clusters in the gastrointestinal tract, based on the Human Microbiome Project's reference genome database [J]. BMC Microbiol, 2015, 15: 183.

- [48] Chen S, Liu C, Hu S. Dietary administration of probiotic *Paenibacillus ehimensis* NPUST1 with bacteriocin-like activity improves growth performance and immunity against *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus iniae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 84: 695–703.
- [49] Tseng C, Murni L, Han T, et al. Molecular characterization and heterologous production of the bacteriocin peocin, a DNA starvation/stationary phase protection protein, from *Paenibacillus ehimensis* NPUST1 [J]. Molecules, 2019, 24: 2516.
- [50] 杨丽莉, 吕凤霞, 别小妹, 等. 枯草芽孢杆菌抗菌脂肽对嗜水气单胞菌抑菌效果 [J]. 食品科学, 2011, 32(1): 193–198.
- [51] Yi Y, Zhang Z, Zhao F, et al. Probiotic potential of *Bacillus velezensis* JW: antimicrobial activity against fish pathogenic bacteria and immune enhancement effects on *Carassius auratus* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2018, 78: 322–330.
- [52] Langdon A, Crook N, Dantas G. The effects of antibiotics on the microbiome throughout development and alternative approaches for therapeutic modulation [J]. Genome Medicine, 2016, 8: 39.
- [53] 唐馨, 毛新芳, 马彬云, 等. 抗菌肽的研究现状和挑战 [J]. 中国生物工程杂志, 2019, 39(8): 86–94.
- [54] Montes A J, Pugh D G. The use of probiotics in food – animal practice [J]. Veterinary Medicine, 1993, 88(3): 282–288.
- [55] Spencer R J, Chesson A. The effect of *Lactobacillus* spp. on the attachment of enterotoxigenic *Escherichia coli* to isolated porcine enterocytes [J]. Journal of Applied Bacteriology, 1994, 77: 215–220.
- [56] Westerdahl A, Olsson J C, Kjelleberg S, et al. Isolation and characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*) – associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum* [J]. Appl Environ Microbiol, 1991, 57(8): 2223–2228.
- [57] Salminen S, Isolauri E, Salminen E, et al. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 1996, 70: 347–358.
- [58] Li X, Ringø E, Hoseinifar H S, et al. The adherence and colonization of microorganisms in fish gastrointestinal tract [J]. Reviews in Aquaculture, 2019, 11: 603–618.
- [59] Dhanani A S, Bagchi T. The expression of adhesin EF – Tu in response to mucin and its role in *Lactobacillus* adhesion and competitive inhibition of enteropathogens to mucin [J]. Journal of Applied Microbiology, 2013, 115: 546–554.
- [60] Gaudana S B, Dhanani A S, Bagchi T. Probiotic attributes of *Lactobacillus* strains isolated from food and of human origin [J]. British Journal of Nutrition, 2010, 103: 1620–1628.
- [61] Guo X, Chen D, Peng K, et al. Identification and characterization of *Bacillus subtilis* from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) for use as probiotic additives in aquatic feed [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 52: 74–84.
- [62] Collado M C, Meriluoto J, Salminen S. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains [J]. European Food Research and Technology, 2008, 226(5): 1065–1073.
- [63] Caruffo M, Navarrete N, Salgado O, et al. Potential probiotic yeasts isolated from the fish gut protect zebrafish (*Danio rerio*) from a *Vibrio anguillarum* challenge [J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 1093.
- [64] Feng J, Chang X, Zhang Y, et al. Effects of *Lactococcus lactis* from *Cyprinus carpio* L. as probiotics on growth performance, innate immune response and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 93: 73–81.
- [65] Defoirdt T, Boona N, Bossier P, et al. Disruption of bacterial quorum sensing: an unexplored strategy to fight infections in aquaculture [J]. Aquaculture, 2004, 240: 69–88.
- [66] Suga H, Smith K M. Molecular mechanisms of bacterial quorum sensing as a new drug target [J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2003, 7(5): 586–591.
- [67] Chu W H, Jiang Y, Liu Y W, et al. Role of the quorum – sensing system in biofilm formation and virulence of *Aeromonas hydrophila* [J]. African Journal of Microbiology Research, 2011, 5(32): 5819–5825.
- [68] Kocielek, Martin. Quorum – sensing inhibitors and biofilms [J]. Anti – Infective Agents in Medicinal Chemistry, 2009, 8(4): 315–326.
- [69] Luo J, Dong B, Wang K, et al. Baicalin inhibits biofilm formation, attenuates the quorum sensing – controlled virulence and enhances *Pseudomonas aeruginosa* clearance in a mouse peritoneal implant infection model [J]. PLoS one, 2017, 12(4): e0176883.
- [70] Ramanathan S, Ravindran D, Arunachalam K, et al. Inhibition of quorum sensing – dependent biofilm and virulence genes expression in environmental pathogen *Serratia marcescens* by petroselinic acid [J]. Anton Leeuw Int J G, 2018, 111(4): 501–515.
- [71] Miller M B, Bassler B L. Quorum sensing in bacteria [J]. Annual Review of Microbiology, 2000, 55(1): 165–199.
- [72] Waters C M, Bassler B L. Quorum sensing: cell – to – cell communication in bacteria [J]. Annu Rev Cell Dev Bi, 2005, 21: 319–346.
- [73] Bodman S B V, Willey J M, Diggle S P. Cell – cell communication in bacteria: united we stand [J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(13): 4377–4391.
- [74] Federle M J, Bassler B L. Interspecies communication in bacteria [J]. Journal of Clinical Investigation, 2003, 112(9): 1291–1299.
- [75] Chu W, Zhou S, Zhu W, et al. Quorum quenching bacteria *Bacillus* sp. QSI – 1 protect zebrafish (*Danio rerio*) from *Aeromonas hydrophila* infection [J]. Scientific Reports, 2014, 4: 5446.
- [76] 张美超, 曹雅男, 姚斌, 等. 淬灭酶 AiiO – AI06 酶学性质及对嗜水气单胞菌毒力因子的表达调控 [J]. 水产学报, 2011, 35(11): 1720–1728.
- [77] Shrout J D, Chopp D L, Just C L, et al. The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional [J]. Molecular Microbiology, 2006, 62(5): 1264–1277.
- [78] Tremblay J, Richardson A, Lepine P, et al. Self – produced extracellular stimuli modulate the *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility behaviour [J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(10):

- 2622 – 2630.
- [79] Williams P. Quorum sensing: an emerging target for antibacterial chemotherapy? [J]. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2002, 6(3): 257 – 274.
- [80] 汤开浩. 利用密度感应抑制技术控制水产养殖细菌性病害的基础研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
- [81] Sha J, Pillai L, Fadl A A, et al. The type III secretion system and cytotoxic enterotoxin alter the virulence of *Aeromonas hydrophila* [J]. Infection & Immunity, 2005, 73(10): 6446 – 6457.
- [82] Chu W H, Liu Y W, Jiang Y, et al. Production of N – acyl homoserine lactones and virulence factors of waterborne *Aeromonas hydrophila* [J]. Indian Journal of Microbiology, 2013, 53(3): 264 – 268.
- [83] 何凤旭, 王全民, 黄路, 等. 芽孢杆菌 R1 共培养对嗜水气单胞菌 NJ – 1 毒力基因表达的影响[J]. 水产学报, 2016, 40(3): 299 – 307.
- [84] Williams P, Winzer K, Chan W C, et al. Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2007, 362(1483): 1119 – 1134.
- [85] 于敏, 刘娜, 赵友彬, 等. 海洋细菌密度感应淬灭酶及在水产养殖中的应用[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2018, 48(增刊1): 34 – 43.
- [86] Zhou S, Zhang A, Yin H, et al. *Bacillus* sp. QSI – 1 modulate quorum sensing signals reduce *Aeromonas hydrophila* level and alter gut microbial community structure in fish [J]. Frontiers in Cellular & Infection Microbiology, 2016, 6: 184.
- [87] Chen R, Zhou Z, Cao Y, et al. High yield expression of an AHL – lactonase from *Bacillus* sp. B546 in *Pichia pastoris* and its application to reduce *Aeromonas hydrophila* mortality in aquaculture [J]. Microbial Cell Factories, 2010, 9(1): 39.
- [88] 林洋, 孙梦桐, 吕欣然, 等. 滤纸片法筛选抑制嗜水气单胞菌群体感应的乳酸菌及抑制作用分析[J]. 食品科学, 2018, 39(14): 125 – 131.
- [89] Li M, Xi B, Qin T, et al. Isolation and characterization of AHL – degrading bacteria from fish and pond sediment [J]. Journal of Oceanology and Limnology, 2019, 37(4): 1460 – 1467.
- [90] 彭孟凡. 地衣芽孢杆菌 T – 1 群体感应淬灭基因 *ytnP* 的克隆表达及其功能研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2018.
- [91] Chen B, Peng M, Tong W, et al. The quorum quenching bacterium *Bacillus licheniformis* T – 1 protects zebrafish against *Aeromonas hydrophila* infection [J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2020, 12(1): 160 – 171.
- [92] 秦玉广, 陈秀丽, 朱永安, 等. 细菌性鱼病研究现状与展望[J]. 井冈山大学学报(自然科学版), 2010, 31(3): 49 – 57.
- [93] Yang L, Lei C, Lin F, et al. Effects of graded levels of dietary vitamin C on the growth, digestive capacity and intestinal microflora of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. *Jian*) [J]. Aquaculture Research, 2011, 42(4): 534 – 548.
- [94] Jiang W D, Feng L, Liu Y, et al. Growth, digestive capacity and intestinal microflora of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. *Jian*) fed graded levels of dietary inositol [J]. Aquaculture Research, 2009, 40(8): 955 – 962.
- [95] Balado M, Souto A, Vences A, et al. Two catechol siderophores, acinetobactin and amonabactin, are simultaneously produced by *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* sharing part of the biosynthetic pathway [J]. ACS Chemical Biology, 2015, 10(12): 2850 – 2860.
- [96] Braun V. Iron uptake mechanisms and their regulation in pathogenic bacteria [J]. International Journal of Medical Microbiology, 2001, 291(2): 67 – 79.
- [97] 冯宇晴, 张倩倩, 章晋勇, 等. AmoA、AmoE 和 AmoF 蛋白在嗜水气单胞菌铁载体合成中的作用研究[J]. 水生生物学报, 2019, 43(3): 34 – 41.
- [98] Korkeaaho T, Heikkinen J, Thompson K, et al. *Pseudomonas* sp. M174 inhibits the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum* [J]. Journal of Applied Microbiology, 2011, 111(2): 266 – 277.
- [99] Ström – Bestor M, Wiklund T. Inhibitory activity of *Pseudomonas* sp. on *Flavobacterium psychrophilum*, *in vitro* [J]. Journal of Fish Diseases, 2011, 34(4): 255 – 264.
- [100] Yu Y, Lv F, Wang C, et al. Effects of *Bacillus coagulans* on growth performance, disease resistance, and HSP70 gene expression in juvenile gibel carp, *Carassius auratus gibelio* [J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2016, 47(5): 729 – 740.
- [101] Chi C, Jiang B, Yu X B, et al. Effects of three strains of intestinal autochthonous bacteria and their extracellular products on the immune response and disease resistance of common carp, *Cyprinus carpio* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 36(1): 9 – 18.
- [102] Zou J, Christopher J. Secombes. The Function of Fish Cytokines [J]. Biology, 2016, 5: 23.
- [103] Irianto A, Austin B. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum [J]. Journal of Fish Diseases, 2002, 25(6): 333 – 342.
- [104] Kumar R, Mukherjee S C, Ranjan R, et al. Enhanced innate immune parameters in *Labeo rohita* (Ham.) following oral administration of *Bacillus subtilis* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 24(2): 168 – 172.
- [105] Zhang C N, Zhang J L, Guan W C, et al. Effects of *Lactobacillus delbrueckii* on immune response, disease resistance against *Aeromonas hydrophila*, antioxidant capability and growth performance of *Cyprinus carpio* Huanghe var [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2017, 68(4): 84 – 91.
- [106] Devi G, Harikrishnan R, Paray B A. Effect of symbiotic supplemented diet on innate – adaptive immune response, cytokine gene regulation and antioxidant property in *Labeo rohita* against *Aeromonas hydrophila* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 89: 687 – 700.
- [107] Plazadiaz J, Gomezlloriente C, Fontana L, et al. Modulation of immunity and inflammatory gene expression in the gut, in inflammatory diseases of the gut and in the liver by probiotics [J]. World Journal of Gastroenterology, 2014, 20(42): 15632 – 15649.
- [108] 张峰, 李光友. 皱纹盘鲍血细胞吞噬发光的研究[J]. 海洋与湖沼, 2000, 31(4): 386 – 391.

胡永兴,宿虎,张斌,等.土壤重金属污染及其评价方法概述[J].江苏农业科学,2020,48(17):33-39.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.17.006

土壤重金属污染及其评价方法概述

胡永兴^{1,2},宿虎¹,张斌¹,张兵兵¹,张元¹,欧扬剑¹

(1. 甘肃省地质调查院,甘肃兰州 730030; 2. 兰州大学,甘肃兰州 730030)

摘要:土壤是生态系统的基本要素之一,重金属是土壤环境中一类具有潜在危害的污染物,重金属长期累积将改变农用地土壤的功能。我国土壤污染情况日益严重,为了保证农畜产品安全和人类健康,开展土壤污染状况调查及治理刻不容缓。在分析大量的相关文献和前人工作的基础上,简要总结了我国部分地区土壤重金属污染的来源、危害及污染现状,并简要分析总结了目前常用的 5 种土壤重金属污染评价方法(单项污染指数法、综合污染指数法、地累积指数法、潜在生态风险指数法、主成分分析法)的特点,以期对土壤污染调查和治理提供一定参考。

关键词:土壤;重金属污染;单项污染指数法;综合污染指数;地累积指数法;潜在生态风险指数法;主成分分析法

中图分类号: X53 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)17-0033-07

土壤是生态系统的基本要素之一,与国家粮食、生态安全、居民的身体健康直接相关,是推进经济社会可持续发展的重要保障^[1]。重金属是土壤环境中一类具有潜在危害的污染物,重金属长期累积将改变农用地土壤的功能,影响农作物的质量,并经过食物链危及人类健康^[2-4]。我国在经济发展、工业化和城市化建设过程中,逐步实现了农业现代化并发展了乡镇企业,但也带来了严重的环境问题^[5]。在我国,环境污染出现了城市向农村扩散和转移的趋势^[6]。因此,为了保证农畜产品的安全和人类健康,开展农用地土壤污染状况详查刻不容缓。

工矿企业和乡镇企业分布较密集的地区,选矿、冶炼等活动产生的尾矿、废水中重金属含量往往较高,进入土壤后将影响区域生态环境和人类健康^[7-8]。如甘肃省兰州市五区三县蔬菜基地土壤重金属污染,从单因子污染指数看,兰州市蔬菜基地表层土壤主要是砷(As)污染,其中城关区土壤 As 含量达到中度污染水平,七里河区和皋兰县土壤 As 含量为轻度污染水平,表层土壤中重金属铬(Cr)、锌(Zn)、铜(Cu)、铅(Pb)的单因子污染指数均小于 1,未被污染;以 GB 15618—1995《土壤环境质量标准》为评价体系,兰州市永登县农田土壤单因子污染情况表现为 As > Cu > Pb > Zn,污染水平为安全级^[9-10]。

收稿日期:2019-11-06

基金项目:甘肃省科技重大专项(编号:18ZD2GF019)。

作者简介:胡永兴(1987—),男,宁夏固原人,硕士,工程师,主要从事基础地质调查、能源矿产勘查、土壤重金属污染调查及研究等工作。E-mail:306762203@qq.com。

1 土壤重金属污染概述

土壤重金属污染是指人类活动将重金属引入到土壤中,使土壤重金属含量明显高于背景值并超

[109] 吴丹,李琰,胡宝庆,等.嗜水气单胞菌感染后褶纹冠蚌抗氧化因子的变化[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2011,37(5):531-536.

[110] Reyes-Becerril M, Tovar-Ramírez D, Ascencio-Valle F, et al. Effects of dietary supplementation with probiotic live yeast *Debaryomyces hansenii* on the immune and antioxidant systems of leopard grouper *Mycteroperca rosacea* infected with *Aeromonas hydrophila* [J]. Aquaculture Research, 2011, 42(11): 1676-1686.

[111] 郑侠飞.微生物制剂和碳源对水产养殖环境的影响及作用机制[D].杭州:浙江大学,2017.

[112] 薛明洋.草鱼肠道微生物拮抗嗜水气单胞菌研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2018.

[113] Ringø E, Gatesoupe F J. Lactic acid bacteria in fish: a review [J]. Aquaculture, 1998, 160(3): 177-203.

[114] Mohapatra S, Chakraborty T, Prusty A K, et al. Dietary multispecies probiotic supplementation enhances the immunohematological responses and reduces mortality by *Aeromonas hydrophila* in *Labeo rohita* fingerlings [J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2014, 45(5): 532-544.

[115] Pinto M G V, Franz C M A P, Schillinger U, et al. *Lactobacillus* spp. with *in vitro* probiotic properties from human faeces and traditional fermented products [J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 109(3): 205-214.

[116] 冯凡,蒋启欢,曾凯,等.益生菌作用机制及筛选方法研究进展[J].现代农业科技,2011(22):52-54.