

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2017.12.003

一株新型嗜水气单胞菌拮抗菌的筛选及鉴定^①

张皎皎^{1,2}, 马富平^{1,2}, 熊波^{1,2,3},
苏胜齐^{1,2,3}, 吴正理^{1,2,3}, 姚维志^{1,2,3}

1. 西南大学 动物科技学院, 重庆 400715; 2. 西南大学 渔业资源环境研究中心, 重庆 400715;
3. 淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室, 重庆 400715

摘要: 从草鱼养殖池塘的水样及底泥样品中筛选对嗜水气单胞菌有拮抗作用的菌株, 初步研究其抑菌效果, 为水产养殖过程中嗜水气单胞菌的生物防治提供菌株资源. 以嗜水气单胞菌为指示菌, 采用点喷法进行拮抗性菌株初筛, 采用牛津杯法进行复筛; 通过细菌形态观察、生理生化特性试验、16S rDNA 基因测序和系统发育分析, 对筛选菌株进行分类鉴定. 得到 1 株对嗜水气单胞菌有明显抑制作用的拮抗菌株 WM-1, 抑菌圈直径达 21.8 mm, 经鉴定为甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*). 该菌筛选得到的拮抗菌 WM-1, 对嗜水气单胞菌抑制效果显著, 为进一步研究其抑菌机理提供了菌种资源.

关键词: 拮抗菌; 嗜水气单胞菌; 甲基营养型芽孢杆菌

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2017)12-0018-06

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)属于弧菌科气单胞菌属, 是水产动物尤其鱼类常见的致病菌^[1-2], 导致水产动物体表、内脏器官以及组织器官出血和炎症, 并引起大量死亡^[3-5], 给水产养殖业造成严重的经济损失, 已引起人们的广泛关注^[6].

目前, 对嗜水气单胞菌引起病害的防治方法主要有抗生素法、中草药防治法、疫苗法以及益生菌防控法^[7], 其中以抗生素法为主. 然而大量、频繁的用药导致细菌耐药性和环境污染等问题^[8-9], 致使防治效果逐年下降, 使得抗生素的使用量越来越大. 因此, 从生态友好的角度出发, 拮抗菌凭借防治病害、增进健康、无抗药性、无残留等优点^[10], 正受到国内外研究学者越来越多的关注. 微生物制剂在水产养殖上的应用始于 1986 年, 由于其广阔的应用前景, 已取得了广泛应用, 许多革兰氏阳性菌(如: 芽孢杆菌属、节杆菌属、肠球菌、乳酸菌、乳球菌、小球菌)和革兰氏阴性菌(如: 气单胞菌属、肠杆菌属、弧菌属、假单胞菌属、伯克氏菌属)都作为益生菌应用于水产养殖过程中, 来促进水产动物的生长及健康水平, 其中芽孢杆菌属应用最广^[11], 如短小芽孢杆菌 B1 能抑制副溶血弧菌^[12]; 来自黄颡鱼肠道的枯草芽孢杆菌对温和气单胞菌、嗜水气单胞菌、大肠杆菌、迟缓爱德华氏菌及柱状嗜纤维菌都有很强的拮抗作用^[13]; 地衣芽孢杆菌能有效抑制中华绒螯蟹致病性嗜水气单胞菌等^[14].

目前已研究报道的对嗜水气单胞菌具有拮抗作用的菌株主要有乳酸杆菌、蛭弧菌、假单胞菌属以及芽孢杆菌属等^[15], 但大多数拮抗菌株防治范围较小, 并且存在定殖能力弱、拮抗能力退化快、效果不稳定等问题. 鉴此, 本试验从草鱼养殖池塘中分离、筛选出对病原性嗜水气单胞菌有较强拮抗作用的潜在益生菌, 并对其进行菌株鉴定, 以期在水产养殖过程中嗜水气单胞菌的生物防治提供微生物资源.

① 收稿日期: 2017-01-05

基金项目: 全国优秀博士学位论文作者专项基金(201473); 中央高校基本科研业务费专项资金项目(XDJK2015A001, SWU114011, XDJK2015C012, XDJK2017D036).

作者简介: 张皎皎(1993-), 女, 甘肃庆阳人, 硕士研究生, 主要从事水产微生物学的研究.

通信作者: 吴正理, 教授.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 指示菌

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)由西南大学动物科技学院吴荣华老师提供。

1.1.2 样品

水样和池塘底泥取自重庆市吉冠水产养殖有限公司草鱼养殖池塘。

1.1.3 培养基

LB培养基(g/L): 胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, 氯化钠 5 g, pH 值为 7.0~7.2。

1.2 嗜水气单胞菌拮抗菌的分离与筛选

1.2.1 样品稀释

水样: 无菌条件下, 用灭菌生理盐水将水样进行梯度稀释, 取 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} 稀释倍数的水样, 分别装入 20 mL 已灭菌喷壶内, 存于 4 °C 冰箱待用。

底泥: 无菌条件下, 称取约 1 g 底泥, 用灭菌生理盐水稀释, 取稀释梯度为 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} 上清液, 分别装入 20 mL 已灭菌喷壶内, 存于 4 °C 冰箱待用。

1.2.2 拮抗菌株的筛选

初筛采用点喷法: 取 1×10^8 cfu/mL 的指示菌菌液 100 μ L, 涂布于 LB 培养平板上, 置于 37 °C 培养 2 h; 然后用 1.2.1 中的喷壶将稀释样品点喷于涂有指示菌的 LB 平板上, 倒置于 37 °C 恒温培养 24 h, 观察点喷菌落周围是否产生抑菌圈。对周围产生抑菌圈的菌落进一步分离纯化, 反复筛选, 直至获得纯种培养物, 存于 4 °C 冰箱备用。

复筛采用牛津杯法: 用无菌镊子取灭菌后的牛津杯置于涂有指示菌的 LB 平板上, 轻压, 使杯底紧贴于培养基上; 每个牛津杯加入 100 μ L 初筛纯培养物无菌发酵液, 置于 37 °C 恒温培养 24 h, 去掉牛津杯, 测量抑菌圈直径(包括牛津杯直径)。试验重复 3 次, 结果用“平均值 \pm SD”表示。

1.3 拮抗菌的鉴定

1.3.1 菌落形态观察

用梯度稀释法对复筛得到的菌株进行涂板分离, 于 37 °C 培养 24 h 观察菌落形态、大小、颜色、质地、边缘等。同时进行革兰氏染色和芽孢染色, 油镜观察($\times 100$)菌体形态。

1.3.2 生理生化鉴定

参照《伯杰氏细菌鉴定手册》^[16]和《现代微生物学实验技术》^[17]对菌种进行生理生化鉴定。

1.3.3 生长曲线测定

将种子液接种到 100 mL LB 培养基中, 终浓度为 1×10^7 cfu/mL。定期取样测定 OD_{600} , 并稀释涂板计数, 得到拮抗菌的生长曲线。

1.3.4 16S rDNA 扩增及序列测定

采用 CTAB-SDS 法提取分离菌株基因组, 利用原核生物 16S rDNA 通用引物进行目的基因扩增。16S rDNA 基因的通用引物: 27F 正向引物: 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1392R 反向引物: 5'-ACGGGCGGTGTGTRC-3'。在 25 μ L 反应体系中含有: 无菌蒸馏水 17.25 μ L, 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ L, 4 \times dNTP 混合物 2.0 μ L, 引物各 1.0 μ L, 0.5 U/ μ L 的 Taq DNA 聚合酶 0.25 μ L, 模板 DNA 1.0 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s; 55 °C 复性 30 s; 72 °C 延伸 1 min; 30 个循环; 72 °C 温育 4 min。扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测, 由上海生工生物工程股份有限公司完成 16S rDNA 基因序列测定。

1.3.5 构建 16S rDNA 基因序列系统发育树

对分离菌株的 16S rDNA 基因序列通过 NCBI 的 Blast 检索系统进行序列同源性分析, 选取同源性较高的序列在 ClusterX 软件完成序列比对, 使用 MEGA4.0 软件, 采用最大简约法构建系统进化树, 并通过 Bootstrap 法检验, 1 000 次重复。

1.4 数据处理

用 Excel 中统计软件对试验数据进行处理, 描述性统计值使用“平均值 \pm SD”表示, $n=3$ 。

2 结果与分析

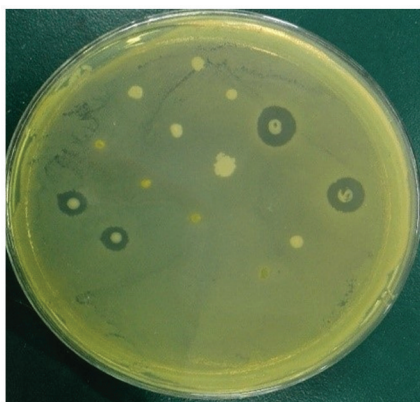
2.1 嗜水气单胞菌拮抗菌的分离与鉴定

从池塘底泥及水样分离筛选得到 8 株嗜水气单胞菌拮抗菌(表 1). 通过进一步测定, 比较其对嗜水气单胞菌的拮抗活性, 最终筛选出 1 株对嗜水气单胞菌具有良好拮抗活性的菌株, 命名为 WM-1, LB 平板培养 24 h 后, 其抑菌圈直径达 21.8 ± 0.763 mm(图 1).

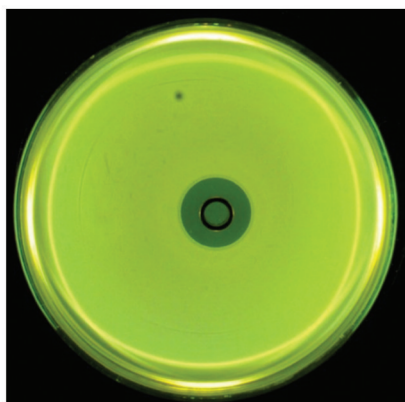
表 1 不同细菌的拮抗活性

菌株编号	抑菌圈/mm	菌株来源	菌株编号	抑菌圈/mm	菌株来源
WM-1	21.8 ± 0.763	底泥	SM-1	11.1 ± 0.577	水样
WM-2	11.3 ± 0.577	底泥	SM-2	11.8 ± 0.288	水样
WM-3	19.5 ± 0.500	底泥	SM-3	15.0 ± 0.500	水样
WM-4	19.1 ± 0.763	底泥	SM-4	12.0 ± 0.500	水样

注: 表中数据为平均值±标准差, $n=3$.



(a) 初筛



(b) WM-1复筛

图 1 拮抗菌的筛选

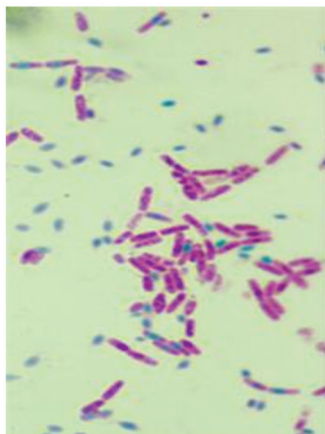
2.2 细菌的鉴定

2.2.1 形态学特征

37 °C 培养 24 h 后观察, 其菌落呈圆形, 乳白色, 表面有褶皱状突起, 边缘锯齿状, 不透明, 粘质, 不易乳化; 培养 48 h 后, 菌落表面变得干燥, 呈煎蛋状; 在液体培养基中, 静置时表面容易形成白色粘质膜. 革兰氏染色呈阳性, 短杆状, 芽孢中生. 具体菌落形态见图 2.



(a) LB 培养基上的 WM-1 菌落形态



(b) WM-1 菌体芽孢染色(B, $\times 100$)

图 2 WM-1 形态观察

2.2.2 生理生化特征

菌株生理生化试验结果(表 2)表明, WM-1 菌株接触酶、葡萄糖产酸、硝酸盐还原反应呈阳性; 柠檬酸盐分解、丙二酸盐试验、H₂S 产生呈阴性, 不能在 7% NaCl 培养基上生长。

表 2 WM-1 菌株的生理生化特征

测定项目	结果	测定项目	结果
接触酶	+	氧化酶	+
V-P 测定	+	蔗糖	+
甲基红	+	麦芽糖	+
运动性	+	乳糖	+
甘露糖	+	果糖	+
酪素水解	+	半乳糖	-
明胶水解	+	D-葡萄糖	+
淀粉水解	+	纤维素	+
吲哚	+	丙二酸盐	-
H ₂ S 产生	-	pH 值为 4	-
硝酸盐还原	+	尿素	-

注: “+”表示阳性; “-”表示阴性。

2.2.3 生长曲线

菌株生长曲线如图 3。0~8 h 为迟缓期, 8~25 h 为生长对数期, 25~90 h 为生长稳定期, 之后为衰亡期。细菌发酵培养后最高浓度可达到 3.5×10^9 cfu/mL, 且能长时间保持稳定, 表明该拮抗菌具有良好的生长能力和活性保持能力, 具有良好的应用前景。

2.2.4 16S rDNA 基因序列与系统发育树

分离菌株 WM-1 所扩增的 16S rDNA 基因序列长度为 1 350 bp, 将序列相关信息提交到 GenBank, 获得登录号 KY235674,

利用 NCBI 上 Blast 程序进行同源性检索, 发现分离菌株的 16S rDNA 序列与甲基营养型芽孢杆菌亲缘关系最近, 同源性高达 99%, 其系统发育树见图 4。最后, 综合形态与生理生化特征, 以及 16S rDNA 序列分析结果, 鉴定菌株 WM-1 为甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*)。

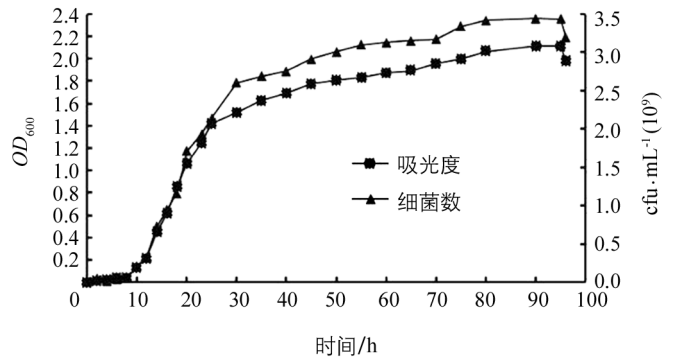


图 3 菌株 WM-1 在 LB 培养基上的生长曲线

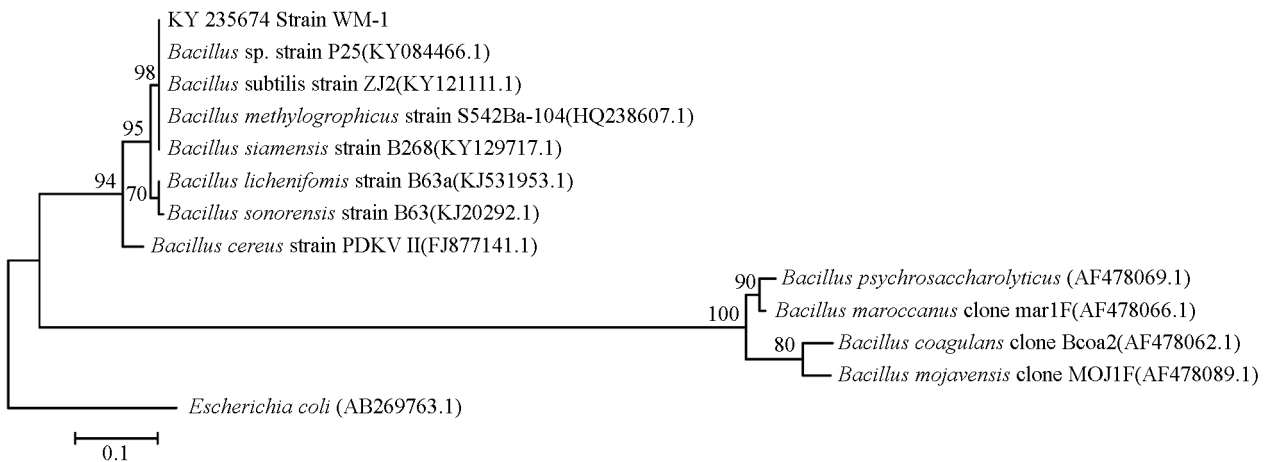


图 4 菌株 WM-1 基于 16S rDNA 序列的系统分类树

3 讨 论

在抗生素滥用的今天, 积极寻找微生态制剂已成为国内外水产疾病防治的热点^[11], 从健康养殖环境或动物体内获取拮抗菌是公认的方法^[18]. 本研究从健康养殖池塘中筛选到 1 株对致病性嗜水气单胞菌有良好拮抗活性的甲基营养型芽孢杆菌, 从现有文献报道来看, 其主要应用于植物病害防治方面^[19-21], 目前国内尚无关于甲基营养型芽孢杆菌作为水产益生菌的报道, 本试验拓展了其功能.

点种法是筛选和研究拮抗微生物的常用方法之一, 但其操作复杂, 需先将待测样品中的微生物进行分离纯化, 而本试验对 Smith 等^[22]的点种法稍作修改, 采用点喷法, 即将待测样品直接点喷在涂有病原菌的平板上, 此方法不仅可以直接观察到拮抗菌产生的抑菌圈, 通过抑菌圈的大小, 清楚地比较菌株抑菌活性的强弱, 还能简化操作, 节约筛选时间. 但使用此方法需将待测样品稀释到适宜浓度, 使细菌在平板上呈单菌落, 以便观察具有生长优势细菌的拮抗作用.

本试验对分离得到的拮抗菌株进行了生理生化鉴定及 16S rDNA 序列分析, 最终鉴定为甲基营养型芽孢杆菌, 其抑菌圈直径达 21.8 mm, 优于刘亚楠等^[23]从养殖团头鲂肠道筛选的 1 株解淀粉芽孢杆菌(抑菌圈 13 mm), 也好于蒋启欢等^[24]从银鲫肠道筛选的潜在益生菌(抑菌圈 15 mm), 以及周金敏等^[13]从黄颡鱼肠道分离出的 3 株对嗜水气单胞菌有很强抑菌活性的枯草芽孢杆菌(抑菌圈 14 mm), 因此与以往报道的嗜水气单胞菌拮抗菌相比, 其拮抗效果更强.

由于同一菌株在不同的生长条件如: pH 值、盐度、温度、培养基的成分等产生的抗性物质或抗性物质的多少都有所差异^[25]. 本试验完全是在实验室条件下进行, 因此筛选到的 1 株拮抗菌只能说明在实验室条件下, 具有较好的拮抗活性, 但在自然养殖条件下, 它们对嗜水气单胞菌会不会有同样的拮抗作用, 有待进一步的探讨研究. 另外, 拮抗菌在实际应用中受到很多因素影响, 例如在宿主体内的定殖模式、对肠道菌群的调节机制以及抑菌机理等^[26]. 因此, 对本试验筛选到的拮抗芽孢杆菌, 需要进一步研究其拮抗特性及安全性, 并对其实际抑菌与应用效果进行评估, 使其成为真正实用的益生菌, 应用于养殖生产实践中.

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] JANDA J M, ABBOTT S L. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2010, 23(1): 35-73.
- [3] SAHUL HAMEED A S, BALASUBRAMANIAN G. Antibiotic Resistance in Bacteria Isolated from *Artemia nauplii* and Efficacy of Formaldehyde to Control Bacterial Load [J]. *Aquaculture*, 2000, 183(3): 195-205.
- [4] CANTAS L, MIDTLING P J, S RUM H. Impact of Antibiotic Treatments on the Expression of the R Plasmid *Tra* Genes and on the Host Innate Immune Activity During *pRAS1* Bearing *Aeromonas hydrophila* Infection in Zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Bmc Microbiology*, 2012, 12(1): 37.
- [5] 叶 华, 何丽君, 程辉辉, 等. 注射嗜水气单胞菌灭活菌的齐口裂腹鱼外周血免疫指标的变化 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2014, 36(5): 28-35.
- [6] GRIM C J, KOZLOVA E V, SHA J, et al. Characterization of *Aeromonas hydrophila* Wound Pathotypes by Comparative Genomic and Functional Analyses of Virulence Genes [J]. *MBIO*, 2013, 4(2): e00064.
- [7] 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.
- [8] DEL CASTILLO C S, HIKIMA J I, JANG H B, et al. Comparative Sequence Analysis of A Multidrug-Resistant Plasmid from *Aeromonas hydrophila* [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013, 57(1): 120-129.
- [9] HANSEN G H, STROM E, OLAFSEN J A. Effect of Different Holding Regimens on the Intestinal Microflora of Herring (*Clupea harengus*) Larvae [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58(2): 461-470.
- [10] GHOSH S, SINHA A, SAHU C. Bioaugmentation in the Growth and Water Quality of Livebearing Ornamental Fishes [J]. *Aquaculture International*, 2008, 16(5): 393-403.
- [11] HAI N V. The Use of Probiotics in Aquaculture [J]. *J Appl Microbiol*, 2015, 119(4): 917-935.
- [12] 韦 露, 陈 偿, 龙云映, 等. 一株短小芽孢杆菌 B1 的筛选鉴定及其抗菌特性研究 [J]. 水产科学, 2015, 34(3): 161-168.
- [13] 周金敏, 吴志新, 曾令兵, 等. 黄颡鱼肠道病原拮抗性芽孢杆菌的筛选与特性研究 [J]. 水生生物学报, 2012(1):

78-84.

- [14] 郝向举, 李 义, 孙 汉, 等. 蟹源益生芽孢杆菌的筛选 [J]. 中国饲料, 2009(22): 11-14.
- [15] 刘亚楠. 团头鲂源嗜水气单胞菌拮抗菌的筛选及拮抗特性研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2013.
- [16] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 419.
- [17] 朱旭芬. 现代微生物学实验技术 [M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2011: 302.
- [18] KESARCODI-WATSON A, KASPAR H, LATEGAN M J, et al. Probiotics in Aquaculture: The Need, Principles and Mechanisms of Action and Screening Processes [J]. Aquaculture, 2008, 274(1): 1-14.
- [19] 谢学文, 董瑞利, 石延霞, 等. 黄瓜炭疽病拮抗细菌的筛选及其抑制效果 [J]. 中国生物防治学报, 2016, 32(2): 215-220.
- [20] 康兴娇, 申红妙, 贾招闪, 等. 葡萄霜霉病生防菌甲基营养型芽孢杆菌 T3 的鉴定及其防治效果 [J]. 中国生物防治学报, 2016, 32(6): 775-782.
- [21] 庄 春, 李红阳. 甲基营养型芽孢杆菌制剂防治水稻细菌性条斑病田间药效试验 [J]. 现代农业科技, 2017(5): 105.
- [22] SMITH P R, 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(5): 521-524.
- [23] 刘亚楠, 习丙文, 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.
- [24] 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, 2012, 42(2): 22-26, 39.
- [25] PADILLA C, BREVIS P, SAID A, et al. Inhibition of the Growth of Enteropathogenic Bacilli by Bacteriocins Produced by Micro-Organisms from the Sediment of Wells [J]. J Appl Bacteriol, 1990, 68(3): 289-295.
- [26] 王 娟, 封永辉, 蔡立胜, 等. 来自大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 肠道的弧菌拮抗菌的筛选与鉴定 [J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(5): 707-713.

Screening and Identification of a New Antagonistic Bacteria Against *Aeromonas hydrophila*

ZHANG Jiao-jiao^{1,2}, MA Fu-ping^{1,2}, XIONG Bo^{1,2,3},
SU Sheng-qi^{1,2,3}, WU Zheng-li^{1,2,3}, YAO Wei-zhi^{1,2,3}

1. School of Animal Science and Technology, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Research Center of Fishery Resources and Environment, Southwest University, Chongqing 400715, China;

3. Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development, Ministry of Education, Chongqing 400715, China

Abstract: The objective of this study was to screen and characterize an antagonistic strain against *Aeromonas hydrophila* from the water and sediment samples of a grass carp culture pond. In the present study, we use *A. hydrophila* as the index bacteria, use the point spraying method and the Oxford cup method for the antagonistic bacteria primary screening and second screening, respectively. The isolated antagonistic bacteria were identified by morphological characteristics, physiological and biochemical characteristics, 16S rDNA sequence and phylogenetic analysis. From the water and sediment samples of the grass carp culture pond, an antagonistic strain WM-1 against *A. hydrophila* was selected, whose antibacterial circle diameter to the pathogens was 21.8 mm. Strain WM-1 was identified as *Bacillus methylotrophicus*. A strain (WM-1) with high antagonistic activity against *A. hydrophila* has been selected. This research provides a new microorganism resource to further study the antibacterial mechanism against *A. hydrophila*.

Key words: antagonistic bacterial strain; *Aeromonas hydrophila*; *Bacillus methylotrophicus*

