

# 泥鳅体内凡隆气单胞菌拮抗细菌 CMA-1 的分离筛选及其抑菌活性

朱明<sup>1</sup> 晏维龙<sup>1</sup> 张涛<sup>2</sup> 秦蕾<sup>1</sup> 马树峰<sup>1</sup> 李联泰<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>淮海工学院, 连云港 222005)

(<sup>2</sup>赣榆县墩尚镇农业技术服务中心, 连云港 222142)

**摘要** 本研究从泥鳅养殖水体、底泥、健康泥鳅和患病泥鳅肠道等环境中采集样品, 从中分离纯化出对凡隆气单胞菌具有拮抗作用的细菌 57 株。在 TSB 平板上采用牛津杯法进行体外拮抗实验, 筛选出一株对凡隆气单胞菌具有明显拮抗作用的菌株 CMA-1, 经形态观察、生理生化鉴定和 16S rDNA 序列系统发育分析, 将该菌鉴定并命名为 *Bacillus methylotrophicus* CMA-1。菌株 CMA-1 生长 24 h 后进入稳定期, 36 h 时发酵上清液抑菌活性达到最大。对菌株 CMA-1 的发酵上清液采用硫酸铵分级沉淀, 测得 75% 硫酸铵饱和度下的沉淀粗提物抑菌活性最高。

**关键词** 泥鳅 益生菌 凡隆气单胞菌 拮抗作用 抑菌活性

**中图分类号** S917.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2012)06-0029-06

## Isolation and characterization of an *Aeromonas veronii* antagonistic bacteria, CMA-1, from *Misgurnus anguillicaudatus*

ZHU Ming<sup>1</sup> YAN Wei-long<sup>1</sup> ZHANG Tao<sup>2</sup> QIN Lei<sup>1</sup>

MA Shu-feng<sup>1</sup> LI Lian-tai<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005)

(<sup>2</sup>Dunshang Town Agricultural Technology Service Center of Ganyu County, Lianyungang 222142)

**ABSTRACT** *Aeromonas veronii* is a kind of pathogenic microorganisms found in the intestinal tract of loach *Misgurnus anguillicaudatus*, and may result in 60% high mortality. Here, 57 antagonistic bacteria strains against *A. veronii* were isolated from the samples collected from aquaculture water, sludge and intestine of healthy and sick loaches. Their antibacterial activities were examined by cylinder-plate method with TSB medium. A bacterial strain, named CMA-1, was screened from them and identified as *Bacillus methylotrophicus* CMA-1 by morphological observation, physiological characteristics tests, and 16S rDNA sequence analysis. The growth of CMA-1 entered into the stationary phase after being cultured for 24h, and its antibacterial activity was up to the maximum at 36h. The crude metabolites were separated from fermentation

江苏省科技厅苏北科技发展计划(科技帮扶)项目(BE2010460)、苏北科技发展计划(科技富民强县)项目(BN2011027)和江苏省高校科研成果产业化推进工程项目(JH10-50)共同资助

\* 通讯作者。E-mail: l\_l\_t2003@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-05-01; 接受日期: 2012-09-24

作者简介: 朱明(1967-), 男, 博士研究生, 副教授, 主要从事海洋生物学研究。E-mail: zhuming2382@yahoo.com.cn, Tel: (0518)85895427

broth through ammonium sulfate precipitation, and their antibacterial activities were examined. The results showed that the antibacterial activity of precipitate at 75%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturation was significantly higher. CMA-1 would be a useful probiotics in the prevention and control of fish disease caused by *A. veronii*.

**KEY WORDS** *Misgurnus anguillicaudatus* Probiotic bacteria *Aeromonas veronii*  
Antagonism Antibacterial activity

泥鳅 *Misgurnus anguillicaudatus*, 英文名 Oriental weatherfish, 属鲤形目、鳅科、花鳅亚科、泥鳅属。其肉质细嫩鲜美、性平味甘, 富含蛋白质、脂肪、碳水化合物和无机盐(包括钙、磷、铁), 具有补中益气、祛风利湿的功效, 有较高的食疗药用价值(徐国栋 2011)。仅连云港市已有超过 1 000 hm<sup>2</sup> 的养殖水面, 年产泥鳅 8 万余 t (姚东瑞等 2011)。近年来, 随着人工集约化养殖的发展, 各种病害也随之暴发或流行。目前所发现的泥鳅疾病主要是由温和气单胞菌(萧克宇等 1992)、创伤弧菌(杨鸢劫等 2004)和泥鳅气单胞菌(房海等 2006)等感染引起的细菌性疾病。秦蕾等(2008)首次从泥鳅体内分离出致病菌凡隆气单胞菌 *Aeromonas veronii*, 在医学上称维罗纳气单胞菌、维氏气单胞菌或维隆气单胞菌, 兽医上常译作凡隆气单胞菌。该菌侵染泥鳅后, 病体外观表现为身体发红, 体表有出血点, 严重者皮肤出现溃疡灶, 其死亡率高达 60%, 因此有效控制病害的发生和蔓延显得十分迫切和重要。使用化学合成药物和抗生素等传统方法不仅使细菌耐药性增加, 导致微生物的生态失调, 产生二重感染(莫照兰等 1998), 而且还使抗生素在生物体内残留, 人体长期摄入会导致慢性中毒。益生菌作为抗生素的替代品日益受到广泛的重视(Gatesoupe 1999; Gómez 2000), 它可通过刺激水生动物机体的免疫系统或抑制致病菌的生长来提高水产动物免疫力和抗病力(Rengpipat *et al.* 1998; Niko-skelainen *et al.* 2003)。益生菌多数来自养殖水体、养殖动物体表或体内的正常细菌区系, 不会对养殖动物造成危害, 并且日趋成为生物控制疾病的一种途径(李会荣等 2001)。本研究拟从泥鳅养殖池水体、底泥、健康和患病泥鳅体内, 分离拮抗凡隆气单胞菌的细菌, 为生物防治凡隆气单胞菌引起的水产疾病提供有益资源。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料来源及培养基

水样、泥样和泥鳅样品于 2011 年 4 月取自连云港赣榆县墩尚泥鳅养殖场。致病菌凡隆气单胞菌由秦蕾老师提供。

牛肉膏蛋白胨培养基(g/L): 牛肉膏 3, 蛋白胨 10, 氯化钠 5, 琼脂 20(液体培养基不加), 蒸馏水 1 000 ml, pH 7.0~7.2; 胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB, g/L): 胰蛋白胨 15, 大豆蛋白胨 5, 氯化钠 5, 蒸馏水 1 000 ml, pH 7.0~7.2; 四环素溶液(100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ): 取四环素粉末溶于乙醇, 经 0.45  $\mu\text{m}$  的滤膜无菌过滤后备用。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 菌株的分离纯化

在连云港市赣榆县墩尚泥鳅养殖场采集水样、底泥和泥鳅样品。将样品预处理(底泥样品用无菌生理盐水稀释 10 倍, 泥鳅样品取其肠道, 冷冻研磨后纱布过滤取滤液)后, 梯度稀释涂平板培养, 根据菌落形态、大小、边缘整齐度以及透明度等方面特征的不同, 挑选典型的单菌落划线分离, 直到纯化后保存。

#### 1.2.2 TSB 双层平板的制作

配制 TSB 培养基分装试管, 每管 7 ml; 配制 20% 的琼脂分装试管, 每管 10 ml, 灭菌后先在平板上倒 10 ml 的琼脂, 待凝固后上面再倒 7 ml 的 TSB 培养基, 凝固后即成为双层平板。

### 1.2.3 拮抗菌筛选

将分离出来的待测菌株点接到涂布有凡隆气单胞菌的 TSB 双层平板上,28℃ 培养 24h,记录抑菌圈的大小,得到初筛菌。对初筛菌进行摇瓶培养,在 TSB 双层平板上利用牛津杯法观察初筛菌对凡隆气单胞菌的抑菌作用,测定抑菌圈直径,筛选出抑菌圈直径最大的一株拮抗菌进行下一步实验。

### 1.2.4 菌株的生理生化反应

参照彭合田(1978)文献,采用细菌微量生化反应管法,接种后培养 18~24h,根据判断表观察并记录结果。

### 1.2.5 16S rDNA 的序列测定

菌株的总 DNA 提取及 16S rDNA 全序列克隆、序列测定与比较参照东秀珠等(2001):以 CMA-1 总 DNA 作模板,利用 16S rDNA 的通用引物进行 PCR。正向引物:5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3';反向引物:5'-TAC CTT GTT ACG ACTT-3'。50 $\mu$ l 的反应体系:DNA 模板 1 $\mu$ l,dNTP(2.5mmol/L)4 $\mu$ l,引物(1mmol/L)各 1 $\mu$ l,10 $\times$ Buffer 5 $\mu$ l,MgCl<sub>2</sub>(25 mmol/L)3 $\mu$ l,Taq 酶(5U/ $\mu$ l)0.5 $\mu$ l,超纯水 35.5 $\mu$ l。PCR 反应条件:94℃ 预变性 2min,进入热循环:94℃ 变性 30 s,52℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1min,共 30 个循环。取 PCR 产物用 0.75% 的琼脂糖凝胶电泳检测。切胶回收 1 500 bp 的 PCR 产物,送上海生工生物技术公司测序。序列提交 GenBank,得到登录号,根据 16S rDNA 的测序结果,在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 在线查询分析,利用 Blast 软件在 GenBank 中与其他 16S rDNA 序列进行同源性比较,选择相近的序列和分离菌株的序列用 MEGA v 3 软件构建降解菌株的 16S rDNA 系统进化树。

### 1.2.6 拮抗菌株的生长曲线及不同时间段发酵产物抑菌活性的测定

将拮抗菌株摇瓶培养过夜作为种子液,以 3% 接种量接种到装有 250ml 液体牛肉膏蛋白胨培养基的 1 000 ml 摇瓶中,28℃、160 r/min 发酵培养,取 12、24、36、48、60h 发酵液样品 2 ml,其中 1ml 稀释 10 倍用于测定 OD<sub>600</sub> 值,绘制生长曲线;另外 1ml 在室温 6 000 r/min 下离心 10 min,取上清液冰冻保藏。实验时取不同时段的上清液,以四环素(Tetracycline, Tet)为对照,于同一双层平板上用牛津杯法实验,牛津杯中的加量为 50 $\mu$ l,每处理重复 3 次,28℃ 培养 24 h 后测定抑菌圈直径。

### 1.2.7 拮抗菌活性物质的初步分离

#### 1.2.7.1 硫酸铵沉淀上清液及透析液的制备

按 30%、40%、50%、60%、70%、80% 硫酸铵饱和梯度,冰水浴下,分别加入 7 支装有 10ml 发酵液的离心管中,慢慢添加,不停搅拌,低温静置数小时,6 000 r/min 离心 10 min,上清液用滤膜过滤,收集于 EP 管中低温保存备用。沉淀用 0.2 mol/L 磷酸缓冲液(pH 6.5)1 ml 溶解,移入透析袋中,留一定空间封口,置于大体积缓冲液中低温透析 24 h,期间更换缓冲液 2~3 次。用无菌针管抽取各透析液定容到同一体积,滤膜过滤,收集于 EP 管中低温保存备用。

#### 1.2.7.2 最佳硫酸铵饱和度的确定

将不同浓度硫酸铵沉淀得到的上清液在同一平板上做牛津杯实验,设两个平行,透析液也同法进行。根据抑菌圈大小选择最佳的硫酸铵饱和度。

#### 1.2.7.3 小批量发酵液测定

按 1.2.6 的方法发酵拮抗菌液 2L,按照上一步确定的硫酸铵饱和度进行盐析,分别收集上清液和透析液,将上清液和透析液在同一平板上做牛津杯实验,比较上清液和透析液的抑菌性能。

## 2 结果与分析

### 2.1 拮抗菌 CMA-1 的分离筛选

样品经分离纯化,共得到 57 株凡隆气单胞菌拮抗菌,其中水样、底泥和健康泥鳅和患病泥鳅样品中分别分离出 11、17、14 和 15 株。其中来自健康泥鳅内脏,编号为 CMA-1 的菌株,抑菌圈直径最大,达到 16~17mm,因此确定该菌株为后续实验菌株。

## 2.2 拮抗菌 CMA-1 的菌株鉴定

### 2.2.1 CMA-1 的菌落形态特征观察及生理生化反应

在牛肉膏蛋白胨培养基固体平板上,菌落呈乳白色、圆形、边缘整齐光滑;普通光学显微镜下观察:革兰氏染色阳性,杆状,端生鞭毛,有运动性。用细菌微量生化反应管法,观测 CMA-1 的生理生化反应,结果见表 1。

表 1 CMA-1 的生理生化反应  
Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain CMA-1

项目 Items	结果 Result	项目 Items	结果 Result
氧化酶 Oxidase	+	葡萄糖(产气) Gas of glucose	+
V-P	+	D-甘露醇 D-mannitol	-
MR	-	肌醇 Inositol	-
D-葡萄糖 D-Glucose	+	淀粉水解 Starch hydrolysis	+
D-果糖 D-Fructose	-	明胶液化 Gelatin hydrolysis	+
D-乳糖 D-Lactose	-	硝酸盐还原 Nitrate recovery	+
D-半乳糖 D-Galactose	+	精氨酸脱羧酶 Arginine dehydrolyase	-
D-木糖 D-Xylose	-	赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	-
D-核糖 D-Ribose	+	鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	-
D-阿拉伯糖 D-Arabinose	-	H <sub>2</sub> S 产生 Production of H <sub>2</sub> S	-
D-甘露糖 D-Mannose	-	6.5%NaCl	-
D-麦芽糖 D-Maltose	-	吲哚产生 Production of indole	-

### 2.2.2 16S rDNA 鉴定

经 16S rDNA 序列测定,结果提交至 NCBI 数据库,获得 GenBank 登录号为 JQ900624。将该 16S rDNA 序列在 GenBank 中进行 Blast,选择所获得的同源性 99% 的序列中的 14 株菌的 16S rDNA 序列用于系统发育学分析,用 MEGA v3 软件包中的 Kimura-Parameter Distance 模型计算进化距离,用 Neighbor-Joining 2 构建系统发育树(图 1)。从图 1 看出,CMA-1 与 *Bacillus methylotrophicus* 的发育最为接近。

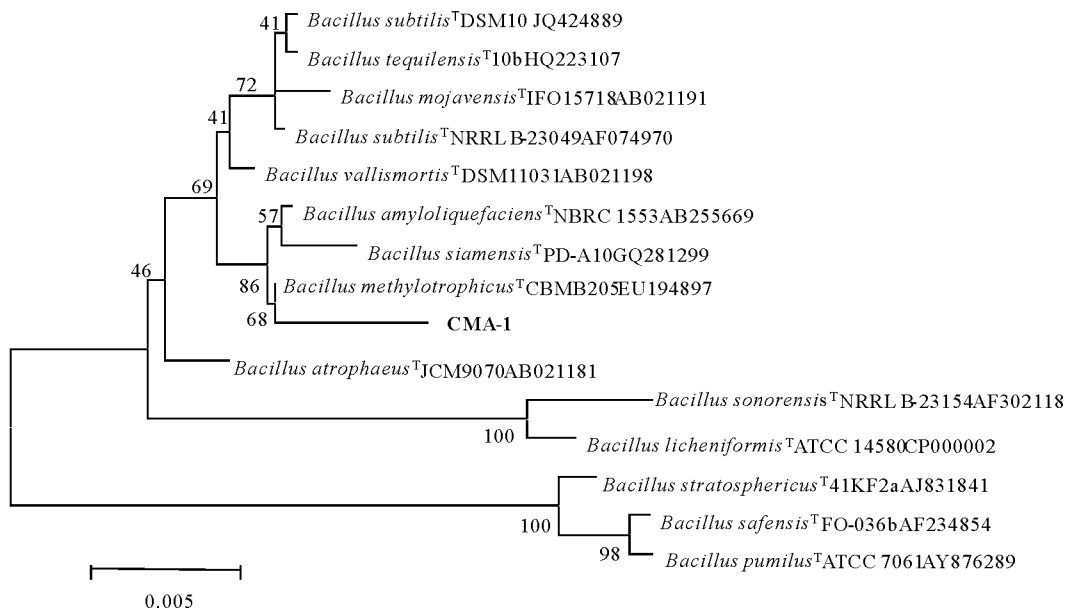


图 1 CMA-1 与 14 株有效发表的细菌构建的 16S rDNA 系统发育树

Fig. 1 The 16S rDNA phylogenetic tree of CMA-1 and 14 bacterial strains in GenBank

结合 CMA-1 的形态特征观察、生理生化反应及 16S rDNA 系统发育分析,将其定名为 *Bacillus methylotrophicus* CMA-1。

### 2.3 生长曲线与抑菌物质的积累

按 1.2.6 方法测定 CMA-1 的生长曲线及不同时间段发酵产物的抑菌圈直径,结果见图 2 和图 3。

从图 2 和图 3 可以看出:菌株 CMA-1 生长在 24 h 后进入稳定期,36 h 时发酵液离心得到的上清液抑菌活性最高,说明抑菌活性物质在稳定期后大量产生并在稳定中后期积累。

### 2.4 CMA-1 抑菌物质的初步分离及抑菌活性

采用硫酸铵分级盐析法,实验得出硫酸铵的饱和度在 70%~80%时,沉淀物最多。选择 75%硫酸铵的饱和度将剩余的发酵液进行沉淀和透析,对比透析液与发酵上清液的抑菌效果,结果见图 4。

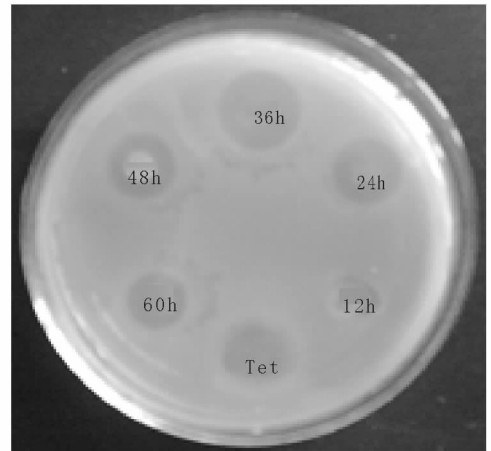


图 2 CMA-1 不同时间的发酵产物对凡隆气单胞菌的抑菌圈(Tet, 四环素)

Fig. 2 The inhibitory zone against *A. veronii* by fermentation products at different culture time (Tet, tetracycline)

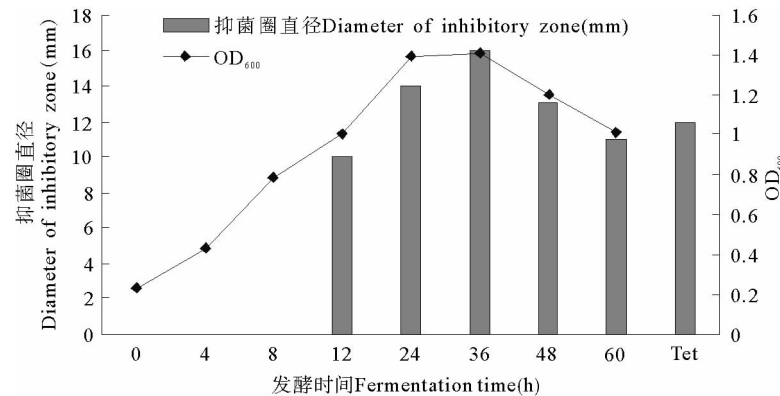


图 3 CMA-1 的生长曲线及不同时间发酵产物的抑菌活性

Fig. 3 Growth curve of strain CMA-1 and antibiosis of fermentation products at different culture time

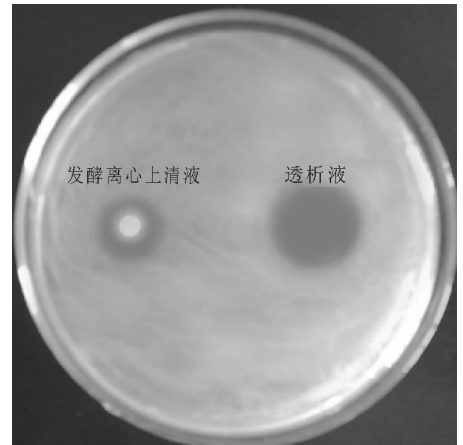


图 4 CMA-1 发酵上清液与硫酸铵沉淀透析液的抑菌圈

Fig. 4 The inhibitory zone of fermentation supernatant and dialysate of precipitate by  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

由图 4 看出,发酵液离心后的上清液和透析液都有抑菌活性,而后的抑菌活性明显要高于前者,说明经过 75%硫酸铵沉淀后上清液中的活性成分大部分已被分离出来,透析后浓度较高因此抑菌活性增强。

## 3 讨论

CMA-1 是一株从泥鳅肠道分离的对凡隆气单胞菌具有较强抑菌作用的益生菌。益生菌多数来自养殖水体、养殖动物体表或体内的正常细菌区系,不会对养殖动物造成危害,可通过刺激水生动物机体的免疫系统或抑制致病菌的生长来提高水产动物免疫力和抗病力(Rengpipat *et al.* 1998; Nikoskelainen *et al.* 2003),并日趋成为生物控制的一种途径(李会荣等 2001)。CMA-1 的获得,为防治凡隆气单胞菌对水产动物的危害提供了新的资源。

经过形态观察、生理生化反应和 16S rDNA 序列分析, CMA-1 被鉴定为 *Bacillus methylotrophicus* CMA-1。饲用芽孢菌是需氧芽孢菌中的非致病菌, 以孢子的形式存在于消化道内, 可耐酸、耐碱、耐高温和挤压, 是所有益生菌中稳定性最强的一种, 芽孢菌在生长过程中能产生乙酸、丙酸、丁酸等挥发性脂肪酸, 可降低消化道内 pH 和氨的浓度, 同时还能产生大量的维生素 B 和维生素 C (邱宝生等 2004)。近年来 *Bacillus* 属中分离出了不少益生菌, 并成功应用于水产养殖中。例如 *Bacillus* S11 (Rengpipat *et al.* 1998, 2000)、*Bacillus licheniformis* A9 (谢航等 2008)、*Bacillus licheniformis* X3914 (张庆华等 2011)、*Bacillus cereus* zou8 (温崇庆等 2007) 等, *Bacillus methylotrophicus* CMA-1 的分离, 为 *Bacillus* 属的益生菌增加了新的成员。

CMA-1 摇瓶培养 36 h 菌液中抑菌物质含量达到最大, 而且抑菌物质主要分泌在上清液中, 通过简单的  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  和透析, 即可得到活性较强的抑菌物质, 无需菌体破碎等复杂程序, 这为抑菌物质的分离纯化提供了较为简便的途径, 对于 CMA-1 的扩大生产和抑菌物质分离具有一定的指导意义。这种抑菌物质的化学成分, 初步判断为蛋白或者多肽, 其具体成分、结构、性质和作用机理还有待进一步的研究。

## 参 考 文 献

- 东秀珠, 蔡妙英. 2001. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社
- 张庆华, 封永辉, 王娟, 郭婧, 张永华, 高建忠, 宋增福. 2011. 地衣芽孢杆菌对养殖水体氨氮、残饵降解特性研究. 水生生物学报, 35(3): 498~503
- 李会荣, 俞勇, 李筠, 陈刚, 纪伟尚, 徐怀恕. 2001. 海洋有益菌的筛选与鉴定. 高技术通讯, 9: 18~22
- 杨鸾劫, 陈辉, 金日奉, 段金荣. 2004. 泥鳅溃疡病的病原菌分离和组织病理学观察. 集美大学学报(自然科学版), 9(1): 22~25
- 邱宝生, 林炜铁, 杨继国, 吴军林. 2004. 益生菌在水产养殖中的应用. 水产科学, 23(7): 39~41
- 房海, 陈翠珍, 张晓君, 巩元芳, 王秀云. 2006. 泥鳅气单胞菌感染的检验与分析. 中国人兽共患病杂志, 22(11): 1 065~1 069
- 姚东瑞, 盘赛昆, 周鸣谦, 葛荣荣. 2011. 泥鳅血清凝集素的研究. 渔业科学进展, 32(6): 43~49
- 徐国栋. 2011. 泥鳅的人工养殖与管理技术. 广西水产科技, (3): 38~40
- 秦蕾, 徐静, 张晓君. 2008. 泥鳅的凡隆气单胞菌感染. 中国人兽共患病学报, 24(12): 1 100~1 102
- 莫照兰, 徐怀恕. 1998. 益生菌在水产养殖中的应用. 海洋科学, (6): 6~9
- 萧克宇, 蒋武成, 李年文, 胡石亮. 1992. 泥鳅腐皮病的病原与防治的研究. 湖南农学院学报, 18(S3): 707~711
- 彭合田. 1978. 细菌的微量生化反应试验. 重庆医学, (3): 45~48
- 温崇庆, 薛明, 何红, 刘慧玲, 周世宁. 2007. 蜡样芽孢杆菌对凡纳滨对虾幼体变态的影响. 水产科学, 26(8): 440~444
- 谢航, 邱宏端, 王秀彬, 陈冬花. 2008. 地衣芽孢杆菌降解水产养殖中残余饲料的特性研究. 福建水产, (3): 31~35
- Direkbusarakom, S., Yoshimizu, M., Ezura, Y., Ruangpan, L., and Danayadol, Y. 1998. *Vibrio* spp., the dominant flora in shrimp hatchery against some fish pathogenic viruses. J. Mar. Biotechnol. 6: 266~267
- Gatesoupe, F. J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture, 180(1-2): 147~165
- Gómez, G. B., Roque, A., and Turnbull, J. F. 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. Aquaculture, 191(1-3): 259~270
- Nikoskelainen, S., Ouwehand, A. C., Bylund, G., Salminen, S., and Lilius, E. M. 2003. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). Fish and Shellfish Immunology, 15(5): 443~452
- Nogami, K., and Maeda, M. 1992. Bacterial as biocontrol agents for rearing larvae of the crab *Portunus trituberculatus*. Can. J. Fish. Aqua. Sci. 49(11): 2 373~2 376
- Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S., and Menasveta, P. 1998. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. Aquaculture, 167(3-4): 301~313
- Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S., and Menasavetal, P. 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp *Penaeus monodon* by a probiont bacterium *Bacillus* S11. Aquaculture, 191(4): 271~288
- Tanasomwang, V., and Muroga, K. 1989. Intestinal microflora of rockfish *Sebastes schlegeli*, tiger puffer *Takifugu rubripes* and red grouper *Epinephelus akaara* at their larval and juvenile stages. Nippon Suisan Gakkaishi, 55(8): 1 371~1 377