

凡隆气单胞菌(*Aeromonas veronii*)拮抗菌 4-1-3 的筛选鉴定及其活性物质初探*

凡 飞¹ 张生武¹ 李联泰¹ 李 燕¹ 苏晓烽¹ 安贤惠^{1,2}①

(1. 淮海工学院 江苏省海洋生物技术重点实验室 连云港 222005;

2. 上海交通大学 微生物代谢国家重点实验室 上海 200240)

摘要 凡隆气单胞菌是泥鳅养殖中容易发生而且致死率较高的病原菌之一。为筛选凡隆气单胞菌拮抗菌、研发防治此病害的生物制剂,采集泥鳅养殖池底泥样品,通过滤纸抑菌圈法筛选凡隆气单胞菌拮抗细菌,结合形态观察、生理生化实验和 16S rRNA 基因序列分析进行菌株鉴定。采用硫酸铵沉淀和离子交换层析方法分离纯化抑菌物质,电泳检测其分子量。结果显示,从样品中分离到 17 株细菌,其中筛选出的拮抗菌 4-1-3,能够高效抑制凡隆气单胞菌,抑菌圈直径达到 15.2 mm。经菌株鉴定后命名为 *Pseudomonas fluorescens* 4-1-3。该菌产生的抑菌物质为胞外蛋白,分子量约为 100 kDa,推测该物质是荧光假单胞菌产生拮抗物质的一种新类型,有望进一步研制成防治水产病害的生物制剂。

关键词 凡隆气单胞菌;拮抗菌;荧光假单胞菌;活性物质;胞外蛋白

中图分类号 Q93 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)02-0146-07

近 30 年来,我国渔业取得了长足发展,渔业已经成为我国大农业中发展最快的产业之一。然而随着城市化和工业化进程的日益推进,导致养殖生态环境质量逐年下降,养殖病害也日益严重,由局部养殖区发展到几乎所有的养殖区,由阶段性发病发展到养殖全过程发病,因此有效控制病害的发生和蔓延十分迫切和重要。

凡隆气单胞菌(*Aeromonas veronii*),又名维氏气单胞菌,发现于 20 世纪 80 年代后期,该细菌可引起人体腹泻(Hickman-Brenner *et al*, 1987)、伤口感染、肺炎、慢性支气管炎、败血症及坏死性筋膜炎等疾病(马子行等, 1992; 侯天文等, 2000; Morinaga *et al*, 2011; Sreedharan *et al*, 2011)。凡隆气单胞菌在水产养殖中逐渐成为危害性较大的病原菌,曾引发孟加拉国

鱼类的流行性溃疡综合征(Rahman *et al*, 2002)。在国内,该菌感染能使丁鲷(林启存等, 2005)及中华绒螯蟹(房海等, 2008)等水产动物患病,给养殖业者带来较大的经济损失。2007 年 9 月和 2012 年 8 月,在江苏东海、灌云两地的泥鳅养殖场先后突发病害,损失惨重。经鉴定,发现该病害是由凡隆气单胞菌导致(秦蕾等, 2008)。龚新勇等(2010)发现引发瓯江彩鲤发病的病原菌也是凡隆气单胞菌。

益生菌是通过改善内源性微生物,对动物或人类施加有益影响的单一或混合的活微生物,最初主要用于人体保健作用(方立超等, 2007; 张灼阳等, 2008; 李桂英等, 2013),近年来广泛应用于水产动物病害防治(Balcázar *et al*, 2006)。针对泥鳅病害,已有拮抗凡隆气单胞菌的菌株报道(朱明等, 2012),但尚未见对

* 中央财政支持地方高校发展专项资金—应用海洋生物学科科研创新团队项目(CXTD02)、上海交通大学微生物代谢国家重点实验室开放课题(MMLKF13-04)、江苏省海洋生物技术重点建设实验室开放课题(2012HS005)、江苏省高校优势学科建设资助项目、江苏省农业自主创新资金项目[CX(13)2041]、江苏省科技厅前瞻性研究项目(BE2014335)和江苏省“十二五”高等学校水产类重点专业项目共同资助。凡 飞, E-mail: 42386092@qq.com

① 通讯作者: 安贤惠, 教授, E-mail: anxh@hhit.edu.cn

收稿日期: 2014-07-10, 收修改稿日期: 2014-09-12

其活性成分进行深入研究或推广应用的报道。本研究旨在针对泥鳅养殖中出现的病害问题,分离筛选具有较强抑菌活性的益生菌,分离并研究其活性物质的特性,为研究开发防治泥鳅病害的微生物制剂提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

凡隆气单胞菌由淮海工学院秦蕾老师提供。拮抗菌菌株由本研究组分离筛选获得。

1.2 培养基

LB 培养基(1000 ml): 胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, NaCl 10 g, 琼脂 20 g (液体培养基不加), 蒸馏水定容至 1000 ml, pH 自然, 121℃灭菌 30 min。

1.3 主要试剂和药品

胰蛋白胨、酵母提取物为 Oxoid 产品, 引物由生工生物工程(上海)有限公司合成, *Taq* 酶为宝生物工程(大连)有限公司产品, DNA 回收试剂盒为天根生化科技(北京)有限公司产品。

1.4 方法

1.4.1 菌株分离 采集连云港市某泥鳅养殖池塘水体和底泥样品, 带回实验室, 用无菌水梯度稀释, 然后涂布平板。28℃培养 24 h 后, 根据菌落颜色、形态、大小、边缘整齐度以及透明度等特征的不同, 挑取单菌落划线分离, 直至得到纯培养物。

1.4.2 抑菌活性检测 采用抑菌圈法(沈萍等, 1999)检测拮抗菌抑菌活性。接种凡隆气单胞菌于 LB 液体培养基中, 28℃培养 24 h。取 3 μl 培养液, 用无菌水稀释至 100 μl, 均匀涂布于 LB 固体平板上。待其稍干后, 将直径为 6 mm 的小圆纸片先放置于培养皿中, 再将 50 μl 待筛选菌液分次滴加于滤纸片上, 28℃培养 24 h 后观测抑菌圈有无及直径大小。

1.4.3 拮抗菌筛选 将分离得到的纯培养物, 分别接种到 LB 培养基。28℃培养 24 h, 分别取 50 μl 进行抑菌活性检测, 保留有抑菌圈的菌株作为初筛菌株。用同样方法将初筛菌株进行进一步复筛, 选择抑菌圈最大的菌株作为目标拮抗菌, 进行进一步的研究。

1.4.4 拮抗菌的鉴定

(1) 形态观察: 将复筛得到的拮抗菌接种于 LB 平板上, 28℃培养 24 h 后观察菌落形态, 从颜色、形态、透明度、菌落与培养基结合程度等方面进行描述。随后进行革兰氏染色, 显微镜观察。

(2) 16S rRNA 基因序列分析: 参照大肠杆菌基因

组 DNA 的提取方法(魏群, 2007)提取拮抗菌总 DNA。参照东秀珠(2001)提供的方法进行 16S rRNA 基因序列扩增。16S rDNA 通用引物 27F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 和 1492R: TACCTTGTTACGACTT。扩增反应 50 μl 体系: DNA 模板(10 ng/μl) 1 μl, dNTP (2.5 mmol/L) 4 μl, 引物(1 mmol/L)各 1 μl, 10× Buffer 5 μl, MgCl₂ (25 mmol/L) 3 μl, *Taq* 酶(5 U/μl) 0.5 μl, 超纯水 35.5 μl。PCR 反应条件: 94℃预变性 2 min, 进入热循环: 94℃变性 30 s、52℃退火 30 s、72℃延伸 90 s, 共 30 个循环, 循环结束后再 72℃延伸 5 min。取 PCR 产物在 0.75%的琼脂糖凝胶上进行电泳检测。PCR 产物直接送生工生物工程(上海)有限公司测序。根据 16S rRNA 的测序结果, 在 <http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/>在线查询分析, 选择同源性较高的分离的模式菌株序列, 用 MEGA V 5.1 软件构建 4-1-3 的 16S rRNA 基因序列系统进化树, 确定菌株的系统发育地位。

(3) 生理生化实验验证: 根据 16S rRNA 基因序列建树结果, 查找与 4-1-3 遗传距离相近菌株的生理生化特性, 确定实验项目, 参照东秀珠(2001)提供的方法进行实验, 观察记载结果。

1.4.5 拮抗菌活性物质在细胞中位置的确定 取过夜培养的拮抗菌 4-1-3 菌液 1 ml, 于 12000 r/min 离心 5 min, 上清液用直径为 0.45 μm 的无菌滤膜过滤, 滤液即上清液; 沉淀用等体积液体 LB 重悬、超声波破碎 3 min (工作 5 s, 间歇 25 s, 至均匀透明), 即为沉淀重悬液。分别取上清液、沉淀重悬液及过夜培养的 4-1-3 菌液各 50 μl, 用滤纸抑菌圈法测定其抑菌活性。

1.4.6 拮抗菌活性成分的确定 分 3 组处理进行实验: 处理 1, 取拮抗菌过夜发酵菌液 200 μl, 95℃水煮 10 min; 处理 2, 取拮抗菌过夜发酵菌液 200 μl, 按终浓度 0.1 mg/ml 添加蛋白酶 K, 55℃水浴 4 h; 处理 3, 取拮抗菌过夜发酵菌液 200 μl, 未作任何处理作为对照。每处理重复 3 次。取各处理样品 50 μl 分别测定其抑菌活性。

1.4.7 拮抗菌活性物质的分离纯化

(1) 硫酸铵沉淀: 参照李建武等(1994)的方法, 稍作改进。将过夜培养的拮抗菌发酵液在 12000 r/min、4℃离心 30 min, 取上清液, 离心, 至不再有沉淀为止, 上清液备用。按硫酸铵饱和浓度表依次制备硫酸铵终浓度为 20%、40%、60%和 80%的沉淀物。每次添加硫酸铵后静置 20 min, 4℃ 8000 r/min 离心 5 min, 用无菌水以刚好能溶解沉淀的量将沉淀重悬, 分别检测各硫酸铵浓度下沉淀物的抑菌活性, 确定可选用的最适硫酸铵浓度。

(2) 离子交换法: 参照李建武等(2005)方法, 介质

采用 DEAE Sepharose Fast Flow(以下简称 DEAE FF)。用 Buffer A(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0)装柱、平衡,用 Buffer B(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 0.8 mol/L NaCl)洗脱。洗脱程序:在层析柱上,加入硫酸铵沉淀得到的样品,接着用 Buffer A 平衡 5 倍柱体积(5×V),然后用 Buffer B 由 0–100%梯度洗脱 10×V,再用 Buffer B 洗脱 5×V,最后用 Buffer A 平衡 5×V。流速 1.0 ml/min,每 1.0 ml 收集 1 管。用峰值最大时的收集液进行抑菌活性检测和蛋白质电泳。

1.4.8 拮抗菌抑菌物质分子量大小的测定 参照汪家政等(2000)的方法,进行 SDS-PAGE 电泳,根据标准蛋白条带判断拮抗菌抑菌物质分子量的大小。

2 结果

2.1 凡隆气单胞菌拮抗菌的分离筛选

按 1.4.1 中的方法,从泥鳅养殖池水体和底泥样品中共分离纯化菌株 17 株,其中来自水体的菌株编号分别为 3-1-1、3-1-2、3-1-3、3-1-5、3-1-6、3-2-1、3-2-2、3-2-3、3-2-4,来自底泥的菌株编号分别为 4-1-1、4-1-3、4-1-7、4-1-9、4-2-3、4-2-4、4-2-5、4-2-6。

经 1.4.3 中的方法筛选,初筛出 3-1-5、3-1-6、4-1-3 和 4-2-3 共 4 个菌株,对这 4 株菌进行进一步复筛,菌株 4-1-3 表现抑菌圈最大,直径达 15.2 mm,表明其对凡隆气单胞菌有较强的抑菌活性(图 1),因此确定菌株 4-1-3 为目标拮抗菌进行后续实验。

2.2 拮抗菌 4-1-3 的菌株鉴定

2.2.1 拮抗菌 4-1-3 的形态鉴定 拮抗菌 4-1-3 的菌落形态观察表明,在 LB 平板上菌落呈白色,圆形,



图 1 不同菌株对凡隆气单胞菌的抑制作用
Fig.1 The effects of different strains to *Aeromonas veronii*

不透明,中心稍凸起,较湿润,边缘有皱褶,与培养基结合不紧密(图 2-a)。前期菌落表面光滑,易被接种环挑起,后期表面覆一层膜。显微镜下观察结果,该菌为革兰氏阴性,杆状,大小为(1.5–4) μm×(0.5–1) μm(图 2-b)。

2.2.2 拮抗菌 4-1-3 的分子鉴定 按 1.4.4(2)的方法进行操作,获得 PCR 扩增产物,经琼脂糖凝胶电泳检测,分子量约 1500 bp,测序结果为 1525 bp, DDBJ 登录号为 AB968092。递交 RDP 网站比对,选择同源性较高的模式菌株序列,用 MEGA V5.1 软件作图,结果显示拮抗菌 4-1-3 与荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*) (T) ICMP 13622 遗传距离最近,结果见图 3。

2.2.3 拮抗菌 4-1-3 的生理生化实验验证 生理生化实验表明,拮抗菌 4-1-3 在 4℃下生长,41℃下不生长,明胶酶和细胞色素氧化酶、葡萄糖和果糖利用呈阳性,淀粉水解、柠檬酸盐利用、β-半乳糖苷酶、

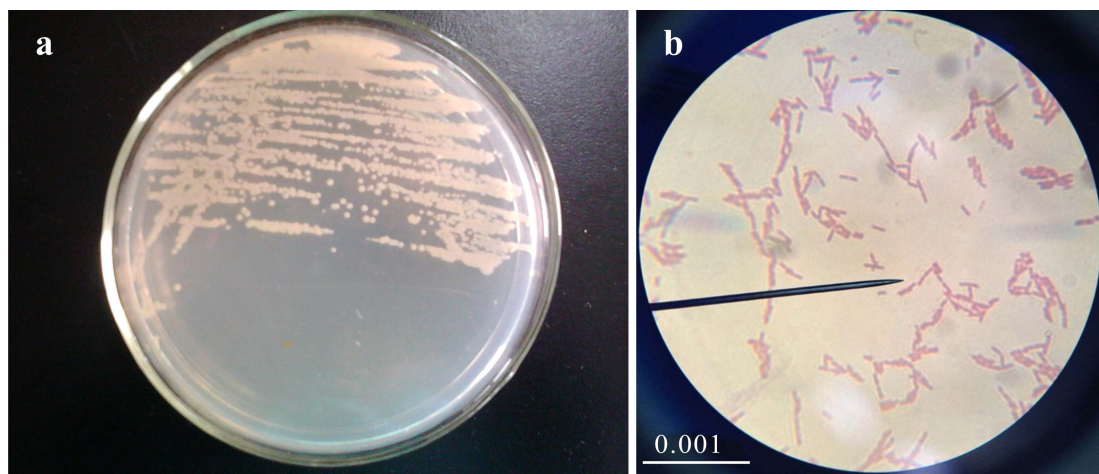


图 2 菌株 4-1-3 的菌落形态(a)及革兰氏染色结果(b)
Fig.2 The colony morphology of strain 4-1-3 (a) and Gram stain (b)

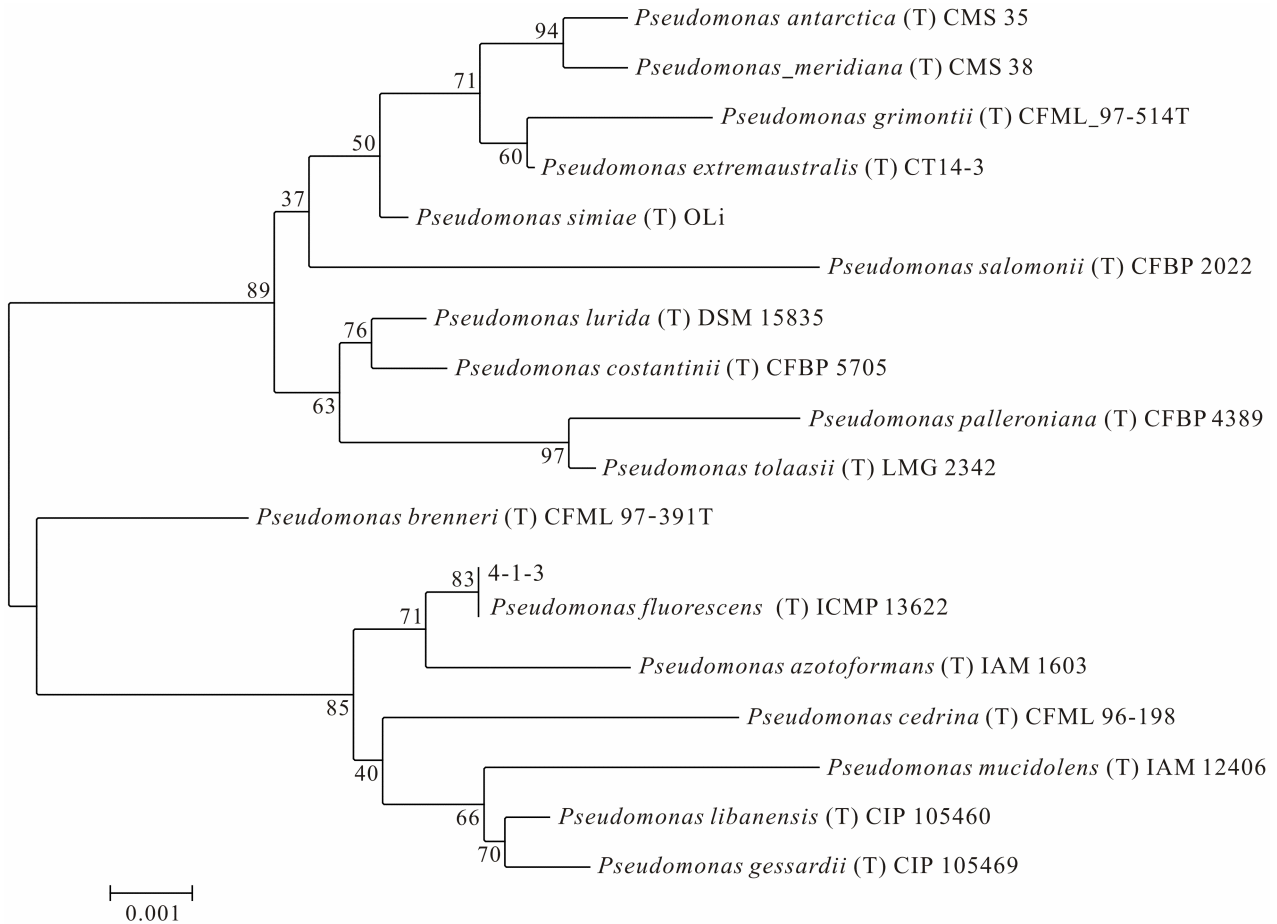


图 3 基于 16S rRNA 序列同源性构建的系统发育树

Fig.3 The phylogenetic tree based on 16S rRNA sequence homology

(Evolutionary distances showed in figure were calculated by MEGA 5.1; Bootstrap=1000. Bar, 0.001 substitution per nucleotide)

赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶、尿素酶、色氨酸脱氨酶反应均为阴性。

结合形态特征观察、生理生化实验及 16S rRNA 基因序列分析, 初步确定该菌株为荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*), 命名为 *Pseudomonas fluorescens* 4-1-3。

2.3 拮抗菌 4-1-3 抑菌物质存在的部位及活性成分的初步判断

按 1.4.5、1.4.6 中的方法进行操作, 结果见图 4。从图 4 看出, 拮抗菌 4-1-3 发酵菌液有抑菌活性, 将菌液离心后的沉淀无活性, 而上清液有活性, 说明抑菌物质被分泌到胞外。将菌液高温水煮和蛋白酶 K 处理后, 均丧失抑菌活性, 可以判断该抑菌物质是一种蛋白质。

2.4 拮抗菌活性物质的粗分级分离

按 1.4.7 中的方法, 将拮抗菌 4-1-3 发酵液上清液进行不同浓度的硫酸铵沉淀, 其抑菌活性表现见图 5。

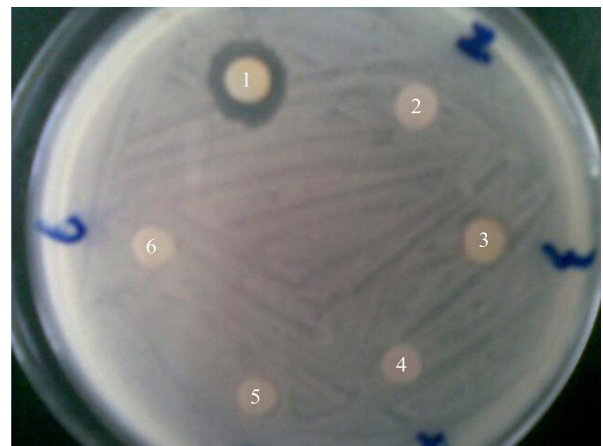


图 4 拮抗菌 4-1-3 菌液不同处理对凡隆气单胞菌的抑制作用
Fig.4 The effects of different treatments of strain 4-1-3 broth to *A. veronii*

1. 菌液; 2. 沉淀; 3. 上清液; 4. 水煮;
5. 蛋白酶 K 处理; 6. 无菌 LB
1. Fermentation broth; 2. Precipitation; 3. Supernatant;
4. Boiled; 5. Degradation of Protein K; 6. Sterile LB



图5 拮抗菌4-1-3发酵液上清液用不同浓度硫酸铵沉淀后对凡隆气单胞菌的抑制作用

Fig.5 Effects of strain 4-1-3 broth supernatant precipitated by different concentrations of ammonium sulfate to *A. veronii*

图中数字为沉淀发酵液上清的硫酸铵浓度(% w/v)

ck₁. 发酵液上清; ck₂. 80%硫酸铵; ck₃. 无菌水

The numbers mean different concentrations of ammonium sulfate (% w/v)

ck₁. Supernatant; ck₂. 80% ammonium sulfate; ck₃. Sterile water

从图5可以看出,60%的硫酸铵沉淀出的活性成分抑菌活性最强。因此后续实验大量制备活性成分时选用60%的硫酸铵进行沉淀。

2.5 拮抗菌抑菌物质的细分离纯化

按60%硫酸铵沉淀拮抗菌4-1-3发酵上清液,获得粗提物。按1.4.7中的方法进行离子交换层析法操

作,得到如图6的梯度洗脱峰。在Buffer B浓度提高到75%时,即NaCl浓度达到600 mmol/L时出现洗脱峰,并且峰型单一。收集该峰洗脱液,抑菌活性检测发现该峰具有抑菌活性(图7-a),证明分离到的物质为目标抑菌物质。

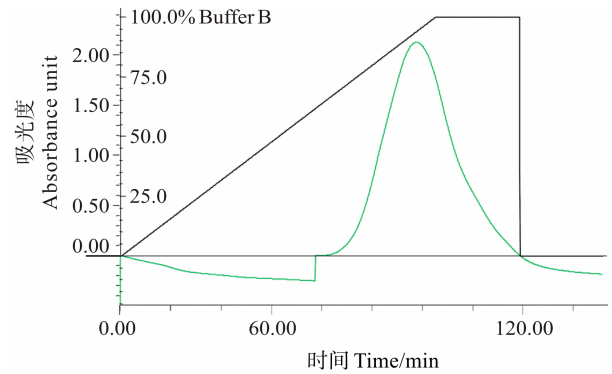


图6 拮抗菌4-1-3活性物质的离子交换分离图谱

Fig.6 The separating chromatography of antagonistic substance from strain 4-1-3 and separated using Sepharose DEAE Fast Flow

2.6 拮抗菌抑菌活性成分分子量大小的测定

按常规SDS-PAGE技术规程操作,得到电泳图谱(图7-b)。拮抗菌4-1-3的抑菌活性成分分子量大小在100 kDa左右,其准确分子量有待进一步研究。

3 讨论

荧光假单胞菌可产生2,4-diacetylphloroglucinol

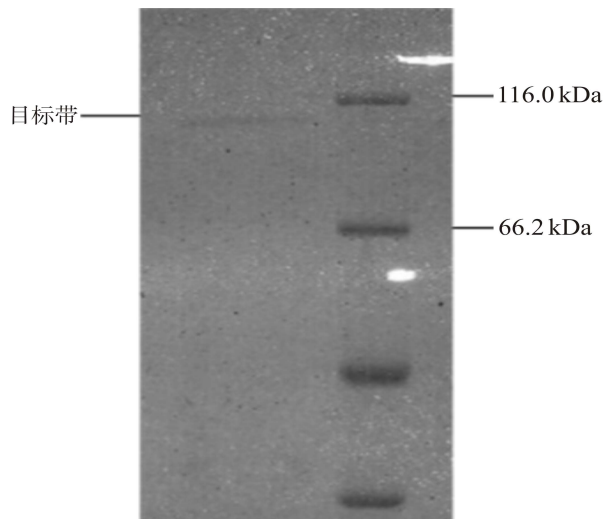
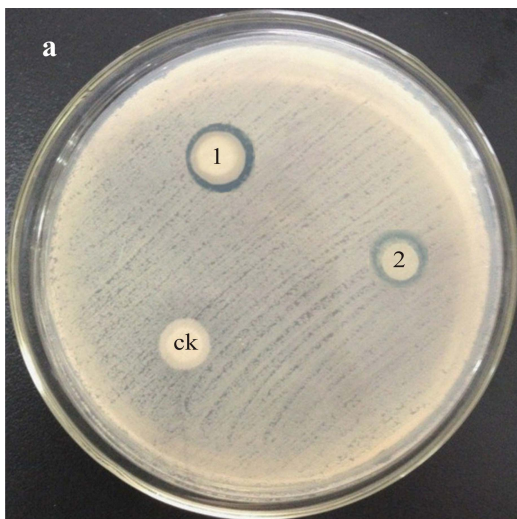


图7 分离得到的菌株4-1-3抗菌物质对凡隆气单胞菌的抑制作用(a)及其SDS-PAGE电泳图(b)

Fig.7 Inhibition of antibiotic substance from strain 4-1-3 to *A. veronii* (a) and SDS-PAGE of the substance (b)

1. 洗脱液; 2. 透析液; ck. 无菌透析缓冲液

1. Eluent; 2. Dialyzate; ck. Sterile dialysis buffer

(Bangera *et al.*, 1999)和 Phenazine 抗生素(Thomashow *et al.*, 1988)等, 对小麦全蚀病菌(*Gaeumannomyces graminis*)有抑制作用。目前, 在拮抗菌的应用方面, 荧光假单胞菌主要用于防治农作物病害, 如辣椒青枯病(王艳辉等, 2013)、烟草黑胫病(董国菊等, 2012)¹⁾、油菜菌核病(王平等, 2010)等。用于防治水产病害的报道很少, 郭国军等(2008)从大黄鱼肠道优势菌群中筛选的荧光假单胞菌 J312 拮抗副溶血弧菌, 之后未见其活性物质的进一步报道。本研究分离筛选的荧光假单胞菌 4-1-3 对凡隆气单胞菌具有较强的拮抗作用, 因此拓宽了荧光假单胞菌在病害防治中的应用范围。但由于荧光假单胞菌也是水产病原菌之一, *P. fluorescens* 4-1-3 是否有致病性, 需要进一步证实。如本身有致病性, 则可以通过分子生物学手段, 克隆活性蛋白的基因, 以工程菌或分离表达产物等手段探讨其应用途径。

另外, 关于荧光假单胞菌产生的拮抗物质, 现有的报道主要集中在次级代谢产物方面(张伟琼等, 2007), 这些代谢物包括黄绿脓菌素、硝吡咯菌素、羧基吩嗪、2,4-二乙酰基藤黄酚、嗜铁素、卵菌素 A、氢氰酸、生物表面活性剂、邻氨基苯甲酸等。此外也有报道荧光假单胞菌可产生具有清除自由基、抗氧化、解毒和提高免疫等重要生物学功能的谷胱甘肽等(李方方等, 2013)。本研究获得的荧光假单胞菌 4-1-3 所产生的活性物质, 初步判断是分子量约为 100 kDa、能够分泌到胞外的一种蛋白质。该结果丰富了荧光假单胞菌产生的拮抗物质的种类, 同时为该蛋白的进一步研究, 如高纯度产品的获得、物化特性和分子结构的研究以及作用机理、基因克隆和通量表达等提供了理论依据。

致谢: 作者感谢淮海工学院朱明老师为本研究提供的部分分离菌株。

参 考 文 献

马子行, 余传霖. 从临床标本中分离的几个气单胞菌新种. 国外医学微生物分册, 1992, 5(1): 29
王平, 李慧, 邱译萱, 等. 荧光假单胞菌株 P13 分泌铁载体抑制油菜菌核病菌. 上海师范大学学报(自然科学版), 2010, 39(2): 200-203
王艳辉, 陈小燕, 肖艳. 荧光假单胞菌对辣椒青枯病防效田间试验初报. 西北园艺, 2013(4): 52-53
方立超, 魏泓. 益生菌的研究进展. 中国生物制品学杂志,

2007, 20(6): 463-466
东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, 409-412
朱明, 晏维龙, 张涛, 等. 泥鳅体内凡隆气单胞菌拮抗细菌 CAM-1 的分离筛选及其抑菌活性. 渔业科学进展, 2012, 33(6): 29-34
李方方, 易弋, 左跃, 等. 一株谷胱甘肽高产荧光假单胞菌的分离与鉴定. 中国调味品, 2013, 7(38): 35-39
李建武, 萧能, 余瑞元, 等. 生物化学实验原理和方法. 第四版. 北京: 北京大学出版社, 2005, 30-46
李桂英, 孙艳, 宋晓玲, 等. 饲料中添加潜在益生菌对凡纳滨对虾肠道消化酶活性和菌群组成的影响. 渔业科学进展, 2013, 34(4): 84-90
汪家政, 范明. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 2000, 77-100
沈萍, 范秀荣, 李广武. 微生物学实验. 第三版. 北京: 高等教育出版社, 1999, 101-102
张伟琼, 聂明, 肖明. 荧光假单胞菌生防机理的研究进展. 生物学杂志, 2007, 24(3): 9-11
张灼阳, 刘畅, 郭晓奎. 益生菌的安全性. 微生物学报, 2008, 48(2): 257-261
林启存, 蔡丽娟, 杨仲景, 等. 丁鲷溃疡病的病原菌分离、鉴定与人工感染试验. 水产科学, 2005, 24(11): 21-22
房海, 陈翠珍, 张晓君, 等. 中华绒螯蟹病原维氏气单胞菌的检验. 中国人兽共患病学报, 2008, 24(1): 45-49
侯天文, 尹晓琳, 李焯, 等. 维隆气单胞菌引起老年肺炎 1 例. 中国人兽共患病杂志, 2000, 16(4): 58
秦蕾, 徐静, 张晓君. 泥鳅的凡隆气单胞菌感染. 中国人兽共患病学报, 2008, 24(12): 1100-1102
郭国军, 覃映雪, 陈强, 等. 大黄鱼病原副溶血弧菌拮抗菌的筛选. 海洋学报, 2008, 30(1): 127-134
龚新勇, 温贵兰, 程振涛, 等. 致病性凡隆气单胞菌的分离鉴定与生物特性. 贵州农业科学, 2010, 38(9): 99-102
魏群. 分子生物学实验指导. 第二版. 北京: 高等教育出版社, 2007, 115-116
Balcázar JL, Blas ID, Ruiz-Zarzuola I, *et al.* Review: The role of probiotics in aquaculture. Vet Microbiol, 2006, 114: 173-186
Bangera MG, Thomashow SL. Identification and characterization of a gene cluster for synthesis of the polyketide antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol from *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. J Bacteriol, 1999, 181(10): 3155-3163
Hickman-Brenner FW, MacDonald KL, Steigerwalt AG, *et al.* *Aeromonas veronii*, a new omithine decarboxylase-positive species that may cause diarrhea. J Clin Microbiol, 1987, 25(5): 900-906
Morinaga Y, Yanagihara K, Araki N, *et al.* Clinical characteristics of seven patients with *Aeromonas* septicemia in a Japanese hospital. J Exp Med, 2011, 225(2): 81-84

1) 董国菊. 荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* P-72-10 菌株对烟草黑胫病的生防机理研究. 江南大学博士学位论文, 2012, 79-86

Rahman M, Colque-Navarro P, Kühn I, *et al.* Identification and characterization of pathogenic *Aeromonas veronii* biovar *sobria* associated with epizootic ulcerative syndrome in fish in Bangladesh. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(2): 650–655

Sreedharan K, Philip R, Singh IS. Isolation and characterization of virulent *Aeromonas veronii* from ascitic fluid of oscar

Astronotus ocellatus showing signs of infectious dropsy. *Dis Aquat Organ*, 2011, 94(1): 29–39

Thomashow SL, Weller MD. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *J Bacteriol*, 1988, 170(8): 3499–3508

(编辑 冯小花)

Screening and Characterization of a Bacterium Named 4-1-3 Antagonizing *Aeromonas veronii*

FAN Fei¹, ZHANG Shengwu¹, LI Liantai¹, LI Yan¹, SU Xiaofeng¹, AN Xianhui^{1,2}⊙

(1. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005;
2. State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240)

Abstract *Aeromonas veronii* is a highly mortal pathogenic microorganism in the loach aquaculture. To screen the antagonistic bacteria and to develop microbial preparation against the pathogens, the samples were collected from loach breeding pond and the bacteria strains were isolated and screened for the ability to inhibit the size of the zone of the strains. The active substances were separated and purified with the ammonium sulfate precipitation and ion exchange chromatography, and the molecular weights were revealed with the sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. A strain named 4-1-3 was isolated and screened from the samples collected from the bottom sediments of a loach breeding pond in the Lianyungang city, and it identified as *Pseudomonas fluorescens* based on its morphology and the analysis of 16S rRNA gene sequence, designated as *P. fluorescens* 4-1-3. The strain strongly inhibited the growth of *A. veronii*, with 15.2 mm inhibition zone diameter. The antibacterial substance produced by the strain *P. fluorescens* 4-1-3 is an extracellular protein which can be precipitated using 60% ammonium sulfate and eluted by 600 mmol/L NaCl through Sepharose DEAE Fast Flow. The molecular weight of *P. fluorescens* 4-1-3 is around 100 kDa determined by SDS-PAGE. In this study, we obtained a strain that can inhibit the growth of *A. veronii* and we found a new bacteria antagonistic substance produced by *P. fluorescens*. The present study provides evidence to the improve disease control in loach breeding and other aquaculture.

Key words *Aeromonas veronii*; Antagonistic bacterium; *Pseudomonas fluorescens*; Active substance; Extracellular protein

⊙ Corresponding author: AN Xianhui, E-mail: anxh@hhit.edu.cn