

杀灭水产病原菌的放线菌筛选及防治试验研究

王高学, 顾忠旗, 原居林, 王霞, 黄海洪, 袁明 (西北农林科技大学动物科技学院, 陕西杨凌 712100)

摘要 从辽宁、山东、浙江、福建、广西、海南、陕西7个省份的近海海域或淡水水体中采集的污泥样品中, 分离到86株淡水放线菌和77株海洋放线菌。以鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)、肠型点状产气单胞菌(*Aeromonas punctata* f. *intestinalis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*) 和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) 为指示菌, 进行抗菌活性筛选, 初筛采用琼脂扩散法, 复筛采用挖孔法, 获得6株杀菌作用强的放线菌。对这6株菌进行形态特征、培养特征观察以及生理生化试验, 初步确定6株菌均属于链霉菌属。选择编号为F1-F12的放线菌进行鲫鱼防治试验, 结果显示, 治疗组鲫鱼体内气单胞菌数量与对照组相比明显减少且差异显著($P < 0.05$), 可见杀菌放线菌对水产病原菌有较好的杀灭作用, 可用于新型微生物渔药的开发。

关键词 水产病原菌; 放线菌; 筛选; 防治

中图分类号 Q936 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)09-02613-02

Isolation and Identification of Aquatic Antibacterial Actinomycete and the Experiment in Animal Prevention and Cure

WANG Gao-xue et al (College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract 86 freshwater actinomycetes strains and 77 marine strains were isolated from sea sediment and freshwater sediment samples, collected from Liaoning, Shandong, Zhejiang, Fujian, Guangxi, Hainan and Shaanxi province. To screen the strains producing antibacterial activities, agar diffusion method was used to screen strains producing antibacterial activities against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas punctata* f. *intestinalis* at primary screening phase. Excavating aperture bioassay test was used at examination phase. 6 strains of high activity were obtained. By morphological characteristic and cultural characteristic observation and physiological and biochemical test, all 6 strains were confirmed as streptomycetes. Strain F1-F12 was chosen in the research on animal prevention and cure. The result indicated that the quantity of aeromonas in the extermination crucian carp of the treated group was reduced compared with control group, and the difference of two was significant. It was obvious that the effect of killing aquacultural pathogenic bacteria of Antibacterial Actinomycete was good. So Antibacterial Actinomycete can be used as micro-ecological agents.

Key words Aquatic pathogenic bacteria; Actinomycetes; Screening; Prevention and cure

微生态制剂在水产养殖过程中可有效改善水体的生态环境, 抑制水体中的病原微生物, 维持动物肠道的正常菌群, 提高养殖动物的防病抗病能力^[1], 是当今水产领域研究的热点。放线菌是水体微生物种群的重要组成部分, 由于其能够产生抗生素等强杀菌作用的抗菌物质, 因而如果开发成微生物渔药, 来抑制养殖水体中和水产动物体内的病原微生物, 将具有广阔的应用前景。从海洋和淡水水体的污泥中分离水生放线菌, 以鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*) 和肠型点状气单胞菌(*Aeromonas punctata* f. *intestinalis*) 这2种典型的水产病害菌为指示菌, 来筛选杀菌放线菌, 并对筛选的放线菌进行初步分类鉴定。选择1株效果好的菌株进行鲫鱼防治试验, 以期为进一步开发新的生物渔药奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 指示菌株和试验动物 鳃弧菌、肠型点状产气单胞菌由中国科学院水生生物研究所提供, 大肠杆菌(*Escherichia coli*) 和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) 由西北农林科技大学动物科技学院水产实验室保存。鲫鱼由陕西省水产研究所渔场提供。

1.2 放线菌株的分离纯化 从辽宁、山东、浙江、福建、广西、海南、陕西7个省份的近海海域或淡水水体中采集污泥样品, 每份样品取3 g, 分别加入30 ml 灭菌的去离子水, 用磁力搅拌器搅拌20 min, 即成 10^{-1} g/ml 浓度的悬液, 然后用灭菌去离子水依次稀释至 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} g/ml, 分别取各稀释度上清液0.1 ml^[2], 涂抹到高氏1号平板上(培养基中含0.007 5%的重铬酸钾, 以抑制细菌和真菌的生长^[3]), 放入28℃的培养箱中培养7 d, 挑取不同形态的菌落到高氏1号斜面上培养, 将菌落在平板上反复划线纯化, 得到纯培养物,

4 保存备用。

1.3 杀菌放线菌的筛选

1.3.1 初筛。将分离纯化的放线菌菌株接种到改良黄豆粉琼脂培养基上^[4], 在28℃条件下培养8 d, 用打孔器打成直径为5 mm的琼脂块。取指示菌菌液100 μl 涂布于普通琼脂平板上, 待涂布均匀后, 挑取打好的琼脂块反贴到已涂抹有指示菌的平板上, 鳃弧菌和肠型点状气单胞菌在28℃条件下培养, 大肠杆菌和金黄色葡萄球菌在37℃条件下培养, 24 h后进行抑菌圈的观察和测量。

1.3.2 复筛。将初筛得到的有较强抗菌作用的放线菌接种到改良黄豆粉液体培养基中, 28℃、140 r/min、摇床发酵8 d。取指示菌菌液50 μl 涂布于普通琼脂平板上, 待涂布均匀后, 用灭菌的打孔器在培养基上打孔, 取放线菌发酵液50 μl 注入孔中, 培养24 h后进行抑菌圈的观察和测量。

1.4 6株杀菌放线菌的初步鉴定

1.4.1 形态特征和培养特征观察。将6株杀菌效果好的放线菌接种到高氏1号培养基上, 插片, 28℃培养, 于3、7、15、30 d取出插片, 观察气丝、基丝以及是否产生横隔、断裂等特征, 并观察它们的生长情况, 气丝、基丝的颜色, 是否产生色素等培养特征^[5], 取成熟期的特征作为分类的依据^[6]。

1.4.2 生理生化试验。将未知放线菌进行明胶液化, 牛奶凝固和胨化, 硝酸盐还原, 淀粉水解及H₂S产生等试验^[6]。

1.5 杀菌放线菌F1-F12菌株的鲫鱼防治试验

1.5.1 鲫鱼分组及处理方法。将体质健康、规格基本一致的鲫鱼随机分成3组, 每组3尾。预防组: 先投喂添加放线菌F1-F12发酵液的饲料(含菌量 4×10^7 cfu/g), 连续投喂2 d, 第3天开始投喂添加肠型点状气单胞菌的饲料(含菌量 10^9 cfu/g), 连续投喂5 d。治疗组: 先投喂添加肠型点状气单胞菌的饲料, 连续投喂2 d, 第3天开始投喂添加放线菌发酵液的饲料, 连续投喂5 d。对照组: 投喂基础饲料, 连续投喂7

作者简介 王高学(1965-), 男, 陕西富平人, 在读博士, 副教授, 从事生物工程制药研究。

收稿日期 2006-09-08

d. 每组每天的投喂量为鱼体重的2%~3%。

1.5.2 放线菌对鲫鱼肠道气单胞菌数量的影响。将饲喂7 d后的鲫鱼解剖,无菌条件下取肠道内容物0.5 g左右放入预先称重的青霉素瓶内,准确称出肠道内容物的重量,按1:10的比例加入无菌水,充分混匀,并用无菌水稀释至一定浓度后,涂抹到R-S选择培养基上(气单胞菌在此培养基上呈黄色),在37℃条件下培养24 h,选择黄色菌落进行计数^[7],并计算出1g肠道内容物中所含的气单胞菌数。记录每尾鲫鱼肠道内容物中的气单胞菌数,采用生物统计方法比较各组差异。

2 结果与分析

2.1 杀菌放线菌的分离纯化及筛选 从7个省份的近海海域或淡水水体中共分离到86株淡水放线菌和77株海洋放线菌。用琼脂扩散法进行抑菌试验表明,19株淡水放线菌具有抑菌活性,占分离的淡水放线菌的22.1%;32株海洋放线菌具有抑菌活性,占分离的海洋放线菌的41.6%,可见海洋放线菌产生抗菌物质的比例明显大于淡水放线菌。对初筛得

到的活性强的7株海洋放线菌和4株淡水放线菌进行液体发酵,采用挖孔法测定发酵液抑菌活性,获得效果好的海洋放线菌4株,淡水放线菌2株,其抗菌活性测定结果见表1。

表1 6株放线菌的抗菌活性测定结果(抑菌圈直径 mm)

菌株	指示菌			
	鳗弧菌	肠型点状产气单胞菌	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌
FA-F5	18	17	15.5	19.5
DL2-F5	18	18	16	18
DL3-F9	15	15	16	18
GF-7	10	8	-	16
HK1-F7	13	14	-	14.5
FL-F12	15	15	-	18

注:“-”表示无抗菌作用。

2.2 6株杀菌放线菌的初步鉴定

2.2.1 形态特征观察。在光学显微镜下的菌丝形态特征及在高氏合成1号琼脂培养基上的培养特征见表2。

表2 6株放线菌的形态特征

菌株	形态特征	培养特征
FA-F5	气生菌丝发达,顶端弯曲成钩状或螺旋状,基内菌丝发达,多分枝,梗上着生有孢子	生长良好,气丝砖红色,基丝淡黄色,有淡红褐色的色素产生
DL2-F5	气生菌丝较少,孢子丝呈螺旋或曲线状,基内菌丝发达,呈分枝状	生长良好,气丝浅砖红色,基丝黄色,有淡红褐色的色素产生
DL3-F9	孢子丝发达,呈螺旋状,成簇生长,基内菌丝发达	生长良好,气丝灰色,基丝淡褐黄色,无色素产生
GF-7	孢子丝发达,多数断裂形成短链状孢子丝或形成单个游离的孢子,基内菌丝上有孢子着生	生长良好,气丝浅灰色,基丝无色,无色素产生
HK1-F7	气生菌丝发达,孢子丝多呈直线型,少数弯曲,基内菌丝发达	生长良好,气丝灰白色,基丝淡黄色,有黄绿色的色素产生
FL-F12	气生菌丝发达,交织在一起,孢子丝多呈直线型,基内菌丝发达,有孢子着生	生长较好,气丝白色,基丝黄色,有黄绿色的色素产生

2.2.2 生理生化试验结果。见表3。

表3 6株放线菌的部分生理生化特性

菌株	明胶	牛奶	牛奶	硝酸盐	淀粉	H ₂ S
	液化	凝固	胨化	还原	水解	产生
FA-F5	+	+	+	+	-	-
DL2-F5	+	+	-	-	+	-
DL3-F9	+	+	-	+	+	-
GF-7	+	-	+	-	+	-
HK1-F7	+	-	-	+	+	+
FL-F12	+	-	-	+	+	+

注:“+”表示正反应,“-”表示负反应。

2.2.3 初步分类。根据以上结果,以放线菌的形态特征和培养特征为主要依据,结合生理生化特征,初步将6株放线菌确定为链霉菌属,并进一步鉴定到类群^[8],鉴定结果见表4。

表4 6株放线菌的初步分类

菌株	类群	菌株	类群
FA-F5	粉红孢类群 Roseosporus	GF-7	焯灰类群 Gnerus
DL2-F5	粉红孢类群 Roseosporus	HK1-F7	球孢类群 Gobosporus
DL3-F9	金色类群 Aureus	FL-F12	球孢类群 Gobosporus

2.3 杀菌放线菌 FL-F12 菌株的鲫鱼防治试验 投喂7 d后各组鲫鱼肠道内气单胞菌数量测定结果见表5。

表5显示:治疗组鲫鱼肠道内气单胞菌数量与对照组相比明显降低(P<0.05),而预防组鲫鱼肠道内气单胞菌数量减少不明显(P>0.05),但从数据上看也有所下降。因此将

杀菌放线菌应用到水产养殖上,能够在一定程度上杀灭养殖动物体内的病原菌,减少暴发性疾病的发生。

表5 鲫鱼肠道内容物中气单胞菌数量测定结果

分组	气单胞菌数量 lgx/g 后肠内容物			均±S	t 检验
	X ₁	X ₂	X ₃		
预防组	11.29	10.83	11.11	11.08 ±0.16	P>0.05
治疗组	10.70	10.11	10.57	10.46 ±0.23	P<0.05
对照组	10.82	11.39	11.73	11.31 ±0.33	-

3 结论与讨论

(1) 在杀菌放线菌的初筛过程中,主要以鳗弧菌和肠型点状气单胞菌为指示菌,采用琼脂扩散法进行拮抗性试验,这种方法简单易行,可在短时间内对大量菌株进行筛选,但是由于指示菌数量有限,也可能会漏选对指示菌之外的其他水产病原菌有杀灭作用的菌株。因此淘汰的菌株未必就是无效菌株,仍应该保存,以备后用。

(2) 对6株杀菌放线菌采用经典的分类方法进行了鉴定。但随着生物化学和分子生物学的迅速发展,当代微生物的分类已不只限于形态特征、培养特征和生理生化特性的描述,而较广泛地利用细胞壁化学组分、16S rDNA 序列测定及DNA-DNA 杂交等方法作为分类指标,这些方法不但验证了经典分类结果,同时也解决了用经典分类方法无法解决的问题。该试验由于条件限制,进行分子鉴定工作量很大,故所得放线菌鉴定结果还有待于进一步验证。

(上接第2614页)

(3) 对杀菌放线菌 F1-F12 进行动物试验,结果显示治疗组与对照组差异显著($P < 0.05$),表明杀菌放线菌 F1-F12 有一定治疗效果;预防组经 t 检验差异不显著($P > 0.05$),但从数据上看病原菌数量也有所下降。因此将杀菌放线菌开发成微生态制剂或生物渔药应用于水产养殖业来防病治病,具有一定的实际应用价值。

参考文献

[1] 侯树宇,张清敏,多森,等.微生态复合菌制剂在对虾养殖中的应用研

究[J].农业环境科学学报,2004,23(5):904-907.

- [2] NAIR S, SIMDU U. Distribution and significance of heterotrophic marine bacteria with antibacterial activity[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1987, 53(12):2957-2962.
- [3] 杨宇蓉,徐丽华,李启任,等.放线菌分离方法的研究[J].微生物学通报,1995,22(2):88-91.
- [4] 蔡艳,薛泉宏,陈占全,等.青海省保护地辣椒根际土壤和根表放线菌研究[J].应用与环境生物学报,2003,9(1):92-96.
- [5] SHRIMP E B, GOTTIEB D. Methods for characterization of *Streptomyces* species[J]. *Int J Syst Bacteriol*, 1966, 16:313-340.
- [6] 张继忠.微生物分类学[M].上海:复旦大学出版社,1990.
- [7] 黄琪琰.水产动物疾病学[M].上海:上海科技情报出版社,1996:113.
- [8] 阎逊初.放线菌的分类和鉴定[M].北京:科学出版社,1992.