

白雪松, 张晓君, 毕可然, 等. 1 株假交替单胞菌的分离与鉴定[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(10): 211–216.

# 1 株假交替单胞菌的分离与鉴定

白雪松<sup>1,2</sup>, 张晓君<sup>1</sup>, 毕可然<sup>1</sup>, 樊 星<sup>1</sup>, 阎斌伦<sup>1</sup>, 秦国民<sup>1</sup>

(1. 淮海工学院海洋学院江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏连云港 222005; 2. 中国矿业大学, 江苏徐州 221116)

**摘要:**2012 年 5 月江苏连云港某育苗场日本对虾(*Penaeus japonicus*)蚤状幼体发生群体死亡, 自幼体中分离到优势菌株 XS-1。对菌株 XS-1 进行了形态特征、理化特性等表观生物学特性检验, 并进行了 16S rRNA 基因的同源性检索与系统发育学分析。结果表明菌株 XS-1 具有假交替单胞菌属的特征, 在系统发育树中与 *Pseudoalteromonas lipolytica* 聚为一个分支, 自举值达 100%。毒力试验表明, 该菌对日本对虾蚤状幼体和仔虾的半数致死量(LD<sub>50</sub>)分别为  $1.3 \times 10^6$  CFU/mL 和  $2.0 \times 10^6$  CFU/mL。综合菌株 XS-1 的形态特征、理化特性及 16S rRNA 基因的同源性检索与系统发育学分析, 鉴定 XS-1 为 *P. lipolytica*, 且对日本对虾蚤状幼体及仔虾均具有毒力。药敏试验表明, 该菌对阿奇霉素、环丙氟哌酸、头孢曲松、复方新诺明等 11 种药物敏感(S), 对卡那霉素、苯唑青霉素、新生霉素耐药。

**关键词:**日本对虾(*Penaeus japonicus*); *Pseudoalteromonas lipolytica*; 16S rRNA

**中图分类号:** S945.4<sup>+</sup>5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)10-0211-05

假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)是 Gauthier 等根据 16S rRNA 序列建立起来的有别于假单胞菌属(*Pseudomonas*)和交替单胞菌属(*Alteromonas*)的新属<sup>[1]</sup>, 已经鉴定到种的有南极洲假交替单胞菌(*P. antarctica*)、柠檬假交替单胞菌(*P. citrea*)、杀鱼假交替单胞菌(*P. piscicida*)和河豚毒素假交替单胞菌(*P. tetraodonis*)等 30 多种, 国外学者已分离鉴定出了多株假交替单胞菌<sup>[2-6]</sup>。该菌广泛分布于海洋中, 能产生毒素、胞外多糖、胞外酶和病毒活性物质等与其致病性有关的多种物质, 是一类条件致病菌。假交替单胞菌可引发皱纹盘鲍溃烂病、大黄鱼体表溃烂病、中华绒螯蟹颤抖病等<sup>[7]</sup>。王印庚等报道, 该菌可引起养殖刺参(*Apostichopus japonicus*)暴发腐皮综合征<sup>[8]</sup>; 孟国庆等报道, 假交替单胞菌可引起养殖刺参发生溃疡病<sup>[9]</sup>; 张春云<sup>[10]</sup>、谢建军<sup>[11]</sup>、方波<sup>[12]</sup>报道, 假交替单胞菌属细菌 *P. nigri faciens* 可引发刺参腐皮综合征; 孙素凤报道, 假交替单胞菌是刺参苗期幼体“烂胃病”3 株主要致病菌之一<sup>[13]</sup>; 乔迁等报道, 假交替单胞菌可引起七带石斑(*Epinephelus septemfasciatus*)鳞片脱落、皮肤发黄溃烂, 直至死亡<sup>[14]</sup>; 闫咏等和陈丽等报道, 假交替单胞菌可引起条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)发生绿斑病<sup>[15-16]</sup>。2012 年 4—6 月, 江苏省连云港市某对虾育苗场的日本对虾(*P. japonicus*)蚤状幼体出现群体性死亡, 幼体主要表现为行动迟缓、上浮、摄食减少。从发病幼体养殖用水中分离到优势菌株(编号为 XS-1), 该菌对日本对虾蚤状幼体及仔虾均具有毒力, 通过形态特征、理化特性及 16S rRNA 基因的同源性检索与系统发育学分析, 初步鉴定该菌为假交替单胞菌属的 *P. lipolytica*。

## 1 材料与方法

### 1.1 发病幼体

患病日本对虾蚤状幼体取自江苏省连云港市某对虾育苗场, 症状为摄食减少、反应迟缓、部分上浮水面, 部分幼体可见体色发红或发白、刚毛断裂、附肢不健全。试验用健康日本对虾蚤状幼体及仔虾均取自另一对虾育苗场。试验期间, 每日以人工饵料喂食 1 次, 养殖用水为曝气 3 d 的海水, pH 值为 7.2, 水温( $22 \pm 2.5$ )℃。

### 1.2 病原菌的分离与纯化

将患病蚤状幼体养殖用水涂布于 2216E、普通琼脂平板培养基上, 28℃培养 18 h, 挑取优势菌落划线接种于 2216E、普通琼脂平板上, 28℃培养 24 h, 选取形态一致的菌落进行纯化培养后, 置于甘油管-40℃保存备用。

### 1.3 病原菌人工感染试验

将纯化的优势菌(XS-1)28℃培养 24 h, 用 0.85% 无菌生理盐水调制成浓度为  $4 \times 10^8$  CFU/mL 的菌悬液, 并用 10 倍系列法稀释菌悬液至浓度为  $4 \times 10^7$ 、 $4 \times 10^6$ 、 $4 \times 10^5$ 、 $4 \times 10^4$  CFU/mL。浸浴感染: 选用暂养 3 d 的健康日本对虾蚤状幼体及仔虾。每试验组分别放入来自同一养殖池的大小、日龄及活力状况基本一致的蚤状幼体及仔虾各 30 尾, 同时设立无菌营养肉汤作对照。每 2 h 观察并记录蚤状幼体及仔虾的死亡情况, 计算分离菌对蚤状幼体及仔虾的半数致死量 LD<sub>50</sub>值<sup>[17]</sup>。

### 1.4 病原菌的鉴定

将分离纯化的细菌划线接种于 2216E 平板培养基上, 28℃培养 18 h 后观察菌落特征, 同时进行革兰氏染色观察。参照《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[18]</sup>和《Bergey's Manual of Determinative Bacteriology》<sup>[19]</sup>进行菌株的生理生化特征试验。

### 1.5 16S rRNA 基因序列测定与系统发育学分析

全基因组 DNA 制备: 将供试纯培养细菌接种于营养肉汤中 28℃过夜培养。取 2 mL 菌悬液按细菌基因组 DNA 提取试剂盒(上海赛百盛生物工程有限公司)说明书规定的方法

收稿日期: 2013-03-12

基金项目: 江苏省水产三项工程(编号: PJ2010-58、DY2012-3); 江苏省连云港市科技项目(编号: CG1134)。

作者简介: 白雪松(1989—), 男, 山西兴县人, 硕士研究生, 从事水产动物疾病与防治研究。E-mail: xuesong6330066@163.com。

通讯作者: 张晓君, 教授, 从事水产动物疾病与防治研究。E-mail: zxxj9307@163.com。

提取 DNA 作为 PCR 模板, -20 ℃ 保存备用。16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增与测序:16S rRNA 基因 PCR 扩增的 2 个引物分别为 27F(正向引物):5′ - AGAGTTTGATC( C/A) TG-GCTCAG -3′(对应于 *E. coli* 16S rRNA 基因的第 8 ~ 27 个碱基位置);1492R(反向引物):5′ - GGTACCTTGTTACGACTT -3′(对应于 *E. coli* 16S rRNA 基因的第 1492 ~ 1510 个碱基位置)<sup>[20]</sup>。20 μL 反应体系中含有: 无菌蒸馏水 14. 4 μL, 10 ×PCR 缓冲液 2 μL, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1. 6 μL, 10 mmol/L dNTP 混合物 0. 4 μL, 10 μmol/L 引物各 0. 2 μL, 5 U/μL *Taq* DNA 聚合酶 0. 2 μL, 模板 DNA 2 μL。PCR 反应条件为: 95 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 1 min, 55 ℃ 复性 1 min, 72 ℃ 延伸 2 min, 30 个循环; 72 ℃ 温育 6 min。PCR 产物经琼脂糖电泳确定特异条带后, 由上海生物工程技术公司进行基因序列测定。

系统发育树的构建: 对分离菌的 16S rRNA 基因序列通过 NCBI 的 Blast 检索系统( <http://www. ncbi. nlm. nih. gov/Blast/>) 进行序列同源性分析, 并使用 ClustalX2. 0 软件与从 GenBank 数据库中获得的序列相似性较高的菌株的序列进行多序列比对( multiple alignments), 并对 16S rRNA 基因采用

MEGA4( molecular evolutionary genetics analysis, MEGA ) 软件构建系统发生树, 采用邻接( neighbor joining method) 建树方法, 并通过 Bootstrap 法( 1 000 次重复) 检验。

1.6 病原菌药物敏感性测定

取供试分离菌, 移接于普通营养肉汤管 28 ℃ 培养 18 h 后, 分别以无菌棉拭子蘸取菌液均匀涂布接种于直径为 90 mm 的 2216E 培养基平板, 待自然干燥后平贴各药敏纸片, 每个平板均匀分布贴 6 张, 28 ℃ 下培养 24 h 后观察并记录结果, 以抑菌圈直径大小作为敏感与耐药的判定指标<sup>[21]</sup>。

2 结果与分析

2.1 病原菌的分离和人工感染试验

由表 1 可知, 浸浴感染蚤状幼体及仔虾死亡前游动迟缓, 对外界刺激反应慢或无反应, 外观见体色发暗, 虾体较混浊。高浓度组死亡率较高, 死亡速度较快; 低浓度组陆续发病死亡; 对照组蚤状幼体在 48 h、仔虾在 7 d 观察期内均正常。分离菌对蚤状幼体及仔虾的半致死量分别为 1. 3 × 10<sup>6</sup> CFU/mL 和 2. 0 × 10<sup>6</sup> CFU/mL。证明分离菌对蚤状幼体及仔虾具有毒性。

表 1 分离菌(XS-1)的毒性

菌液浓度 (CFU/mL)	30 尾蚤状幼体死亡数(尾)								死亡率 (%)
	2 h	4 h	6 h	12 h	18 h	24 h	48 h	合计	
4 × 10 <sup>8</sup>	5	8	13	4	0	0	0	30	100
4 × 10 <sup>7</sup>	3	4	8	5	6	4	0	30	100
4 × 10 <sup>6</sup>	0	2	3	4	6	2	1	21	70
4 × 10 <sup>5</sup>	0	0	0	1	3	2	0	9	30
4 × 10 <sup>4</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0

菌液浓度 (CFU/mL)	30 尾仔虾死亡数(尾)								死亡率 (%)
	2 h	4 h	6 h	12 h	18 h	24 h	48 h	合计	
4 × 10 <sup>8</sup>	0	2	10	12	6	0	0	30	100
4 × 10 <sup>7</sup>	0	1	6	10	12	1	0	30	100
4 × 10 <sup>6</sup>	0	1	4	8	4	4	0	18	60
4 × 10 <sup>5</sup>	0	0	1	4	2	2	0	6	20
4 × 10 <sup>4</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0(对照)	0	0	0	0	0	0	0	0	0

2.2 病原菌菌落形态特征及理化特性

病原菌在 Zobell2216E 海水营养琼脂平板上表现为圆形光滑、边缘整齐、中央隆起、不透明、灰白色、表面较湿, 培养 24 h 观察直径多在 1 mm 左右。革兰氏染色结果显示, 被检细菌为革兰氏阴性、杆状、散在或成双排列、细菌大小多在 (0. 5 ~ 0. 8) μm × (1. 0 ~ 2. 0) μm; 在普通营养肉汤中 28 ℃

培养 24 h, 病原菌呈均匀浑浊生长, 有絮状菌体沉淀, 有很轻微的菌环, 摇动后易脱落消散, 生长需 Na<sup>+</sup> 和 O<sub>2</sub>, 低于 4 ℃ 或高于 42 ℃ 不生长。分离菌 XS-1 对氧化酶、接触酶、酪蛋白酶、DAN 酶、淀粉酶、明胶酶呈阳性; 能够利用葡萄糖、麦芽糖、谷氨酸盐、葡萄糖铵, 还原硝酸盐, 其理化特性与 *P. lipolytica* 最为接近(表 2)。

表 2 分离菌 XS-1 与假交替单胞菌属部分种的生理生化特征比较

特性	分离菌 XS-1	<i>P. lipolytica</i> <sup>[22]</sup>	假交替单胞菌 <i>Pseudoalteromonas</i> sp.					
			<i>P. aurantia</i>	<i>P. citrea</i>	<i>P. denitrificans</i>	<i>P. luteoviolacea</i>	<i>P. piscicida</i>	<i>P. pyridensis</i>
形态	杆状	杆状	杆状	杆状	杆状	杆状	杆状	杆状
革兰氏染色	-	-	-	-	-	-	-	-
氧化酶	+	+	+	+	+	+	+	+
酪蛋白酶	+	+	+	+	+	+	+	+
V-P	+	+	-	-	ND	ND	-	-
动力	+	+	+	+	+	+	+	+
赖氨酸脱羧酶	-	-	-	-	ND	d	ND	ND
木糖	-	-	-	-	ND	-	-	ND

续表 1

特性	分离菌 XS-1	<i>P. lipolytica</i> <sup>[22]</sup>	假交替单胞菌 <i>Pseudoalteromonas</i> sp.					
			<i>P. aurantia</i>	<i>P. citrea</i>	<i>P. denitrificans</i>	<i>P. luteoviolacea</i>	<i>P. piscicida</i>	<i>P. prydzensis</i>
鸟氨酸脱酸酶	—	—	ND	ND	ND	ND	ND	ND
氰化钾生长	—	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
甘露糖	—	—	—	ND	ND	—	ND	+
半乳糖	—	—	ND	ND	ND	ND	ND	—
甘露醇	—	—	ND	ND	ND	—	—	—
硝酸盐还原	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND
丙二酸盐	—	ND	—	ND	ND	—	—	d
酒石酸盐	—	ND	—	ND	ND	d	—	ND
肌醇	—	—	—	—	ND	—	—	ND
硫化氢	—	ND	—	—	ND	—	d	—
山梨糖	—	—	—	ND	ND	ND	—	ND
水杨素	+	+	—	d	ND	—	—	ND
侧金盏花醇	—	ND	—	+	ND	—	—	—
胆汁七叶苷	—	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
纤维二糖	—	ND	ND	ND	ND	ND	ND	d
黏液酸	—	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
木糖醇	—	—	—	ND	ND	ND	—	ND
淀粉酶	+	+	+	+	+	+	+	+
阿拉伯醇	—	ND	—	ND	ND	ND	—	—
葡萄糖铵	+	+	+	ND	ND	+	+	ND
尿素酶	—	—	ND	ND	ND	—	ND	ND
山梨糖	—	—	—	ND	ND	ND	—	ND
DNAase	+	+	+	+	+	+	+	+
谷氨酸盐	+	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND
糊精	—	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
枸橼酸盐	—	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
乳糖	—	—	—	—	—	—	—	—
松二糖	—	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
丙酸盐	+	ND	ND	+	+	ND	ND	+
鼠李糖	—	ND	—	+	ND	—	—	—
苯丙氨酸	—	ND	—	—	ND	d	d	—
赤藓糖	—	ND	ND	ND	ND	—	ND	ND
苦杏仁苷	—	ND	—	ND	ND	—	—	—
葡萄糖酸盐	—	—	—	ND	ND	ND	—	ND
卫茅醇	—	ND	ND	ND	ND	—	ND	ND
棉子糖	—	—	—	—	ND	—	—	—
精氨酸	—	—	+	+	+	d	+	ND
葡萄糖	+	+	+	d	+	d	+	+
蜜二糖	—	ND	—	ND	ND	—	ND	—
麦芽糖	+	+	ND	ND	ND	+	+	+
α-甲基-D-葡萄糖苷	—	ND	—	ND	ND	ND	—	ND
蔗糖	—	—	ND	ND	ND	—	+	+
明胶酶	+	+	+	+	+	+	+	+
葡萄糖产酸	—	—	ND	ND	ND	ND	ND	ND
葡萄糖产气	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 0%	—	—	—	—	—	—	—	—
NaCl 1%	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 3%	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 6%	+	+	+	—	—	—	+	—
4 ℃生长	—	—	—	—	+	—	—	+
28 ℃生长	+	+	+	+	+	+	+	+
37 ℃生长	+	+	—	—	—	—	+	—
42 ℃生长	—	—	—	—	—	—	—	—

注：“+”表示阳性；“d”表示 26% ~75% 阳性；“—”表示阴性；“ND”表示无数据。

2.3 16S rRNA 基因序列及系统发育树构建

以全基因组 DNA 为模板,经通用引物 27F 和 1492R 扩增到的 16S rRNA 基因序列条带约为 1 500 bp,测序所扩增的 16S rRNA 基因序列长度为 1 447 bp(不包括引物结合区),如图 1 所示,在 GenBank 的登录号为:KC166147。将基因序列在 NCBI 上通过 Blast 进行同源性检索,结果表明,分离菌的 16S rRNA 基因序列与假交替单胞菌属细菌的 16S rRNA 基因序列自然聚类,且相似性均在 95% 以上,从中选取 23 个相关菌株的 16S rRNA 基因序列进行系统学分析。从图 2 可以看出,菌株 XS-1 与 *P. lipolytica* 聚为一分支,并具有 100% 的自举值。

综合该菌的形态、生理生化特性及 16S rRNA 基因序列系统学分析,将病原菌 XS-1 鉴定为假交替单胞属的 *Pseudoalteromonas lipolytica*。

2.4 病原菌药物敏感性试验

28 种抗生素对分离菌 XS-1 的平板抑菌试验结果见表 3。XS-1 对奥复星、美满霉素、阿奇霉素、环丙氟哌酸、头孢曲松、头孢哌酮、恩诺沙星、克拉霉素、复达欣、复方新诺明等药物敏感(S),抑菌圈直径均超过 20 mm;对呋喃唑酮、阿莫

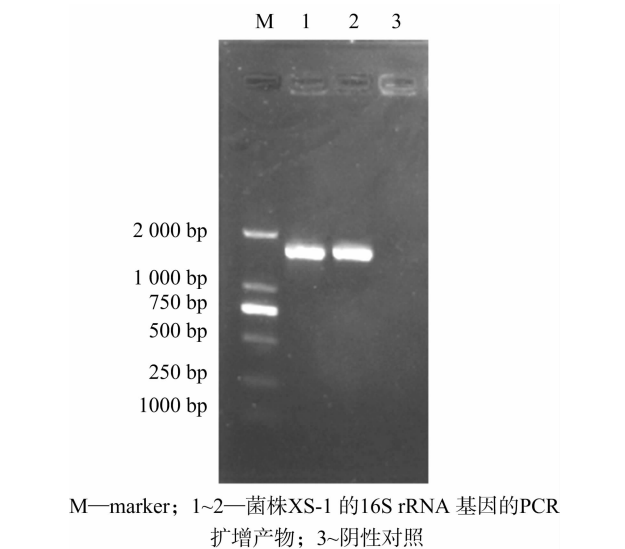


图1 XS-1菌株 16S rRNA 基因的PCR 扩增产物

西林、氯霉素、麦迪霉素等药物中度敏感(I);对卡那霉素、苯唑青霉素、新生霉素等药物表现耐药性(R)。

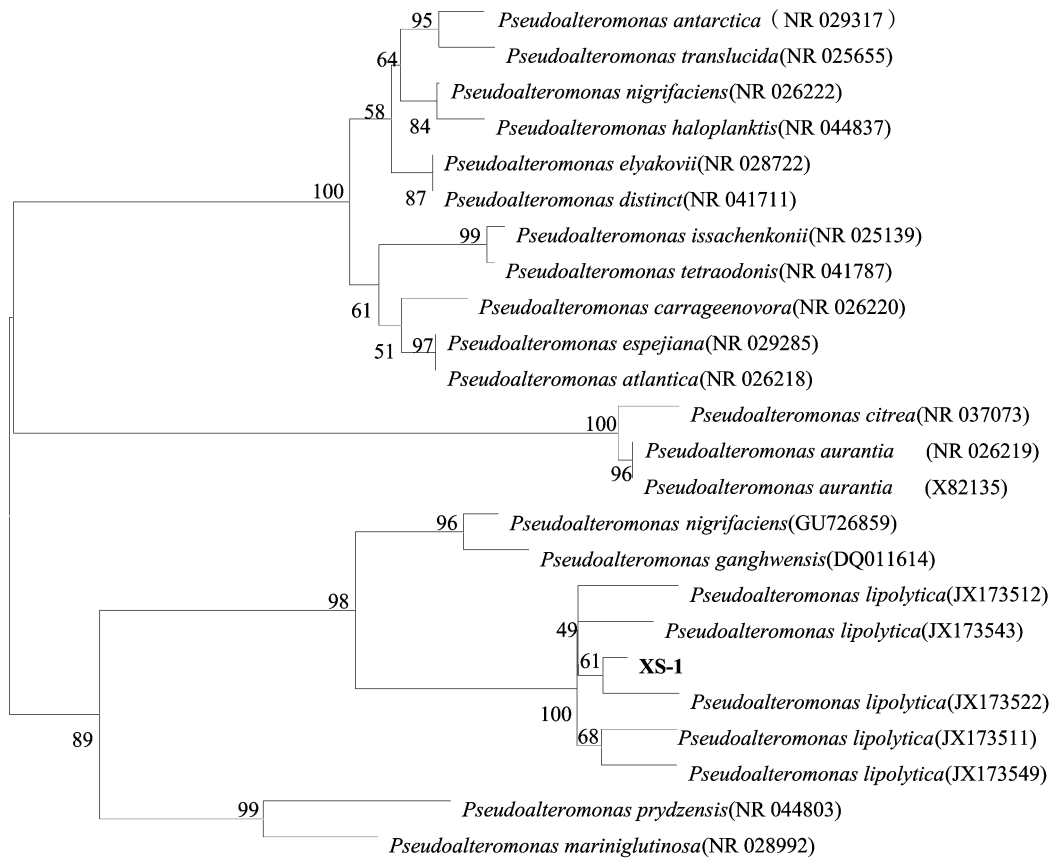


图2 XS-1菌株16S rRNA 基因序列NJ 系统发育树

3 结论与讨论

假交替单胞菌属包括 *P. haloplanktis*、*P. Antarctica*、*P. atlantica*、*P. aurantia*、*P. bacteriolytica*、*P. carrageenovora*、*P. citrea*、*P. denitrificans*、*P. distinct*、*P. elyakovii*、*P. espejiana*、*P. luteoviolacea*、*P. nigrifaciens*、*P. peptidolytica*、*P. piscicida*、

*P. prydzensis*、*P. rubra*、*P. tetraodonis*、*P. tunicate*、*P. undina* 共 20 种,近几年在《International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology》等外文期刊上有效发表的还有 *P. ulvae*、*P. agarivorans*、*P. phenolica*、*P. issachenkonii*、*P. maricaloris*、*P. phenolica*、*P. lipolytica*、*P. ganghwensis* 等 15 个种。*P. lipolytica*是 Xu 等首次 在长江入海口检出并于 2010 年在

表 3 菌株 XS-1 药敏试验

药物(药量) ( $\mu\text{g}/\text{片}$ )	抑菌圈直径 (mm)	敏感性
奥复星(5)	24.25 $\pm$ 0.62	S
呋喃唑酮(30)	15.05 $\pm$ 1.02	I
苯唑青霉素(1)	0	R
麦迪霉素(30)	12.58 $\pm$ 0.32	I
阿莫西林(10)	14.95 $\pm$ 0.42	I
氯霉素(30)	16.24 $\pm$ 0.85	I
卡那霉素(30)	8.74 $\pm$ 0.35	R
红霉素(15)	18.65 $\pm$ 1.02	I
庆大霉素(10)	15.32 $\pm$ 0.84	I
头孢曲松(30)	26.87 $\pm$ 0.81	S
呋喃妥因(300)	15.74 $\pm$ 0.24	I
恩诺沙星(5)	21.05 $\pm$ 1.05	S
诺氟沙星(10)	18.04 $\pm$ 0.35	I
丁胺卡那(30)	14.38 $\pm$ 1.21	I
环丙氟哌酸(5)	22.95 $\pm$ 0.54	S
氨苄西林(10)	10.27 $\pm$ 0.85	I
强力霉素(30)	18.84 $\pm$ 0.62	I
先锋霉素 VI(30)	11.63 $\pm$ 0.75	I
克拉霉素(15)	20.75 $\pm$ 1.20	S
阿奇霉素(15)	24.96 $\pm$ 0.85	S
青霉素 G(10)	14.51 $\pm$ 1.05	I
新生霉素(30)	6.00 $\pm$ 0.65	R
美满霉素(30)	27.52 $\pm$ 0.95	S
复达欣(30)	22.64 $\pm$ 0.62	S
链霉素(10)	16.83 $\pm$ 0.74	I
四环素(30)	15.76 $\pm$ 0.86	I
复方新诺明(30)	20.00 $\pm$ 0.71	S
头孢哌酮(75)	23.27 $\pm$ 0.64	S

注:抑菌圈直径 0 ~ 9 mm 为耐药(R), 10 ~ 19 mm 为中度敏感(I), 20 mm 及以上为敏感(S)。

《International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology》上有效发表<sup>[22]</sup>。笔者从患病日本对虾养殖水中分离到的 1 株优势生长菌 XS-1, 为革兰氏阴性杆菌、生长需要  $\text{Na}^+$ 、严格需氧、接触酶阳性、有动力、低于 4  $^{\circ}\text{C}$  或高于 42  $^{\circ}\text{C}$  不生长、葡萄糖产气不产酸等理化特性符合《Bergey's Manual of Determinative Bacteriology》对假交替单胞菌属的描述, 所测项目中分离菌 XS-1 与 Xu 等报道的 *P. lipolytica* LMEB 39<sup>T</sup> 菌株的主要鉴定指标基本一致。根据生理生化表型特征, 菌株 XS-1 与假交替单胞菌属的 *P. lipolytica* 最接近, 而与其他假交替单胞菌差别较大。同时, 菌株 XS-1 的 16S rRNA 基因序列在 NCBI 上通过 BLAST 同源性检索, 基因序列与假交替单胞菌具有较高的同源性, 相似性均在 95% 以上; 从 16S rRNA 基因系统发育树来看, 菌株 XS-1 与 *P. lipolytica* 聚为 1 个分支, 并具有 100% 的自举值。综合菌株 XS-1 的人工感染试验结果、形态特征、理化特性及 16S rRNA 基因的同源性检索与系统发育学分析, 菌株 XS-1 鉴定为 *P. lipolytica*, 且为引起此次日本对虾虾苗大量死亡的病原菌。

可以引发日本对虾感染发病的病原细菌主要有杀虾微杆菌(*Microbacterium shrimpcida* sp.)<sup>[23]</sup>、杀对虾弧菌(*V. penaeicida*)<sup>[24]</sup>、鳗弧菌(*V. anguillarum*)<sup>[25]</sup>、哈氏弧菌(*V. har-*

*veyi*)<sup>[26]</sup>、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)<sup>[27]</sup>、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)、创伤弧菌(*V. vulnificus*)和美人鱼弧菌(*V. damsela*)<sup>[28-30]</sup>等。笔者从养殖日本对虾虾苗中分离到致病性的 *P. lipolytica* 病原菌对奥复星、美满霉素、阿奇霉素、环丙氟哌酸、头孢曲松、头孢哌酮、恩诺沙星、克拉霉素、复达欣、复方新诺明等药物高度敏感, 抑菌圈直径均超过 20 mm; 对呋喃唑酮、阿莫西林、氯霉素、麦迪霉素等药物中度敏感; 对卡那霉素、苯唑青霉素、新生霉素等药物表现出耐药性, 相对于其他水产动物致病菌, 本研究分离到的病原菌耐药性不强, 这可能与病原菌耐药基因的表达有关, 有待于进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Gauthier G, Gauthier M, Christen R. Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small - subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twelve new species combinations [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1995, 45 (4): 755 - 761.
- [2] Holmstrom C, Kjellberg S. Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents [J]. FEMS Microbiology Ecology, 1999, 30 (4): 285 - 293.
- [3] Holmstrom C, Egan S, Franks A, et al. Antifouling activities expressed by Marine surface associated *Pseudoalteromonas* species [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2002, 41 (1): 47 - 58.
- [4] Isnansetyo A, Kamei Y S. *Pseudoalteromonas phenolica* sp. nov. a novel Marine bacterium that produces phenolic anti - methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* substances [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, 53: 583 - 588.
- [5] Carolina C R, Rowley A F. Effect of extracellular products of *Pseudoalteromonas atlantica* on the edible crab *Cancer pagurus* [J]. Applied and Environment Microbiology, 2004, 70 (2): 729 - 735.
- [6] Park Y D, Baik K S, Yi H, et al. *Pseudoalteromonas byunsanensis* sp. nov., isolated from tidal flat sediment in Korea [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55 (Pt 6): 2519 - 2523.
- [7] 谢建军, 王印庚, 张正, 等. 养殖刺参腐皮综合征两种致病菌 Dot - ELISA 快速检测 [J]. 海洋科学, 2007, 31 (8): 59 - 64.
- [8] 王印庚, 方波, 张春云, 等. 养殖刺参苗期重大疾病“腐皮综合征”病原及其感染源分析 [J]. 中国水产科学, 2006, 13 (4): 610 - 616.
- [9] 孟庆国, 吴刘记, 吴信忠, 等. 养殖刺参溃疡病病原学研究 [J]. 水产科学, 2006, 25 (12): 635 - 639.
- [10] 张春云. 养殖刺参 (*Apostichopus japonicus*) 主要细菌性疾病的病原学研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2004.
- [11] 谢建军. 养殖刺参 (*Apostichopus japonicus*) 腐皮综合症主要致病菌快速检测技术研究 [D]. 上海: 上海水产大学, 2007.
- [12] 方波. 养殖刺参 (*Apostichopus japonicus*) “腐皮综合征”病原学及其感染源的研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2006.
- [13] 孙素凤. 养殖刺参 (*Apostichopus japonicus*) 苗期细菌性疾病及其病原学初步研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2006.
- [14] 乔迁, 韩娜娜, 陈超, 等. 致病性假交替单胞菌的分离鉴定及药敏特性研究 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38 (26): 14224 - 14226, 14232.

邓加聪,郑虹,陈美铤. 1 株章鱼肠道黏细菌的筛选及发酵工艺优化[J]. 江苏农业科学,2013,41(10):216-218.

# 1 株章鱼肠道黏细菌的筛选及发酵工艺优化

邓加聪,郑虹,陈美铤

(福建师范大学福清分校,福建福清 350300)

**摘要:**从章鱼肠道菌落中分离纯化得到 1 株海洋黏细菌,采用传统微生物纯培养技术,对其进行了细菌分类学鉴定、摇瓶培养发酵等。结果表明:该海洋黏细菌的最佳发酵工艺条件为:葡萄糖 15 g/L,蛋白胨 1.0 g/L,酵母膏 1.5 g/L,NaCl 溶液浓度 4 g/L,pH 值 7.0,接种量 7%,发酵时间 46 h。

**关键词:**章鱼肠道菌;筛选;培养基优化

**中图分类号:** S917.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)10-0216-03

海洋表面积占地球表面积的近 3/4,是地球生命的发源地,海水具有高盐、高压、高辐射、低温、低营养等特点<sup>[1]</sup>。一般认为,海洋微生物可产生不同于陆地微生物的新型生物活性物质<sup>[2]</sup>,特别是海洋生物附生微生物,由于空间、营养、光照等方面的竞争关系,能产生多种具有工业和药用价值的天然产物<sup>[3-4]</sup>。章鱼别称石居、八爪鱼、坐蛸、石吸、望潮、死牛,属于软体动物门、头足纲、八腕目(Octopoda)。章鱼有 8 个腕足,腕足上有许多吸盘;有时会喷出黑色墨汁,帮助其逃跑。有些章鱼的大脑相当发达,可以分辨镜中的自己,也可以走出

研究者设计的迷宫<sup>[5-6]</sup>。目前对章鱼肠道中细菌的研究相对较少。本研究对章鱼肠道细菌进行分离纯化以及发酵培养基的优化,旨在为其活性研究开辟更广阔的研究领域。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试章鱼 供试章鱼购自福建省福清市东壁岛。

1.1.2 培养基 分离培养基:牛肉膏 3 g,蛋白胨 10 g,NaCl 5 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 L,pH 值 7.0~7.2。试管斜面培养基<sup>[7]</sup>:牛肉膏 3 g,蛋白胨 10 g,葡萄糖 10 g,NaCl 5 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 L,pH 值 7.0~7.2。种子培养基:同试管斜面培养基,不加琼脂。发酵基础培养基<sup>[8]</sup>:葡萄糖 15 g,蛋白胨 1 g,酵母膏 1.5 g,蒸馏水 1 L。

1.1.3 仪器 THZ-25 大容量恒温振荡器:江苏省太仓市华美生化仪器厂;BCD-201B/HC 容声冰箱:海信容声(广东)

收稿日期:2013-04-02

基金项目:福建师范大学福清分校校级重点学科建设基金(编号:20110346);福建省教育厅 A 类项目(编号:JA12358)。

作者简介:邓加聪(1981—),男,福建安溪人,硕士,讲师,主要从事微生物菌种筛选分离纯化等工作。E-mail: dengjiacong@hotmail.com。

[15] 闫咏,马家海,许璞,等. 1 株引起条斑紫菜绿斑病的柠檬假交替单胞菌[J]. 中国水产科学,2002,9(4):353-358.

[16] 陈丽,张晓君,秦蕾,等. 条斑紫菜褐斑病原褐藻酸降解菌的筛选与鉴定[J]. 湖北农业科学,2012(13):2728-2731.

[17] 张庆萍,黄晓辉,谢海棠. 计算 LD<sub>50</sub> 的查表法和经验估算法[J]. 中国临床药理学和治疗学,2000,5(2):162-163.

[18] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001:370-399.

[19] Brenner D J, Krieg N R, Staley J T. Bergeys manual of systematic bacteriology[M]. Williams & Wolkins,2008:467-477.

[20] Polz M F, Cavanaugh C M. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR[J]. Applied and Environment Microbiology, 1998,64(10):3724-3730.

[21] 叶应妩,王毓三. 全国临床检验操作规程[M]. 2 版. 南京:东南大学出版社,1997:553-562.

[22] Xu X W, Wu Y H, Wang C S, et al. *Pseudoalteromonas lipolytica* sp. nov., isolated from the Yangtze River estuary[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010,60(9):2176-2181.

[23] 房海,陈翠珍,张晓君,等. 日本对虾(*Penaeus japonicus*) 虾苗杀虾微杆菌(*Microbacterium shrimpcida* sp. nov.) 感染及病原菌检验[J]. 海洋与湖沼,2007,38(2):151-156.

[24] Saulnier D, Avarre J C, Le Moullac G, et al. Rapid and sensitive PCR detection of *Vibrio penaeicida*, the putative etiological agent of syndrome 93 in New Caledonia[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2000,40(2):109-115.

[25] 邓欢,王年斌,安育新. 日本对虾 *Penaeus japonicus* 受弧菌感染的发病情况与感染剂量、温度条件的关系[J]. 水产科学, 1998,17(2):4-8.

[26] Liu P C, Lee K K, Yii K C, et al. Isolation of *Vibrio harveyi* from diseased kuruma prawns *Penaeus japonicus*[J]. Current Microbiology, 1996,33(2):129-132.

[27] Lee K K, Yu S R, Chen F R, et al. Virulence of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased tiger prawn, *Penaeus monodon*[J]. Current Microbiology, 1996,32(4):229-231.

[28] Anderson I G, Shamsudin M N, Shariff M, et al. Bacterial septicemia in juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*, cultured in Malaysian brackish-water ponds[J]. Asian Fisheries Science, 1988,2(1):93-108.

[29] Alapide - Tendencia E V, Dureza L A. Isolation of *Vibrio* spp. from *Penaeus monodon* Fabricius with red disease syndrome[J]. Aquaculture, 1997,154(2):107-114.

[30] De L P, D L, Takahiro T, et al. Characteristics of the causative bacterium of *Vibrio* spp. in the Kuruma prawn *Penaeus japonicus*[J]. Aquaculture, 1993,115(1/2):1-12.