

李梦茜,张振旺. 罗非鱼细菌性败血症病原菌嗜水气单胞菌拮抗菌株的筛选和鉴定[J]. 江苏农业科学,2017,45(3):129-131.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.03.036

罗非鱼细菌性败血症病原菌嗜水气单胞菌拮抗菌株的筛选和鉴定

李梦茜¹, 张振旺²

(1. 河池学院化学与生物工程学院/广西高校微生物及植物资源开发利用重点实验室, 广西宜州 546300;

2. 湖南大学, 湖南长沙 410082)

摘要:嗜水气单胞菌是动物和人类的致病菌,会引起水产动物败血症和人类腹泻病等,对我国已造成了巨大的经济损失。采用细菌的分离、纯化和筛选等步骤,获得对嗜水气单胞菌引起罗非鱼败血症有抑制作用的菌株 LFJK-11,并对其形态特征和生理生化特性进行分析。结果显示,该菌株属于链霉菌属。通过对其 16S DNA 比对及其系统进化树构建,该菌株与链霉菌属相似性达到 100%,该结果与其形态特征和生理生化鉴定结果一致。

关键词:罗非鱼;嗜水气单胞菌;败血症;链霉菌;筛选;鉴定;形态特征;生理生化特征

中图分类号: S943.125.42⁺⁹ **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)03-0129-02

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)广泛存在于含水量丰富的土壤、淡水、污水、沼液和粪便中,一部分是动物和人类的致病菌,会引起水产动物败血症和人类腹泻病等^[1-2]。嗜水气单胞菌一直严重危害着水产动物养殖业和人类健康,已造成了巨大的经济损失^[3]。据不完全统计,我国每年水产动物养殖业因疾病造成的经济损失超过 100 亿元^[4],可见水产养殖病害防治的任务十分艰巨。运用生物防治的手段筛选和应用嗜水气单胞菌拮抗菌,应用于水产养殖,减少化学试剂的使用,以减少水产养殖业的经济损失。

1 材料与与方法

1.1 材料

指示菌为嗜水气单胞菌 HCLF-2,由笔者所在实验室从患败血症的罗非鱼中分离得到;以嗜水气单胞菌 HCLF-2 为指示菌,从土壤分离筛选获得拮抗菌株 LFJK-11。

1.2 方法

1.2.1 拮抗菌株的筛选 采用平板稀释培养法^[5]培养菌株,根据微生物菌落特征(大小、形状、边缘形状、表面结构、光泽、透明度和颜色)将单菌落挑出并编号。将所获得的土壤单菌落用 PDA 培养基在 28 ℃ 条件下培养 4 d,采用抑菌圈法,以嗜水气单胞菌 HCLF-2 为指示菌,筛选对嗜水气单胞菌 HCLF-2 抑菌作用的菌株并保存。

1.2.2 拮抗菌株的培养特征 选择拮抗性能最佳的菌株,并将其接种于蔗糖察氏、燕麦、无机淀粉、马铃薯、葡萄糖酵母膏培养基中,在 28 ℃ 下培养 3~7 d,观察并记录待测菌在不同培养基上的生长形态、基内菌丝、气生菌丝及色素。

1.2.3 生理生化特征的鉴定 测定纤维素水解、明胶液化、碳源利用、淀粉水解和 H₂S 产生等试验^[6]。

1.2.4 菌株 16S rDNA 序列的测定及其系统发育树的构建

将菌株 LFJK-11 接种在 LB 培养基上振荡培养 12~18 h,参照文献[7]的方法提取基因组 DNA。以 DNA 组为模板,以 16S rDNA 基因扩增通用引物进行 PCR 扩增,扩增出 16S rDNA,其中引物序列为:27F,5'-AGAGTTTATCTCTGGCTCAG-3';1492R,5'-GGTACCTTGTACGACTT-3'。用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳分离,用 DNA 胶回收试剂盒纯化,然后直接寄至上海生工测序部进行测序。将测序结果在 NCBI 上进行比对分析,筛选出 9 株菌株 16S rDNA 的全序列,使用 ClustalW 软件构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌株筛选结果

经拮抗检测筛选到 1 株对嗜水气单胞菌 HCLF-2 有较强拮抗作用的菌株,编号为 LFJK-11,抑菌圈直径平均为 15.6 mm(图 1)。如表 1 所示,LFJK-11 菌株对苏云金杆菌、金黄色葡萄球菌、黑霉菌、大肠杆菌也有一定的拮抗作用,且该菌株对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌抑菌效果最强,对黑霉菌抑菌效果最弱;发酵液稀释 30~60 倍后对这三种病原菌仍有拮抗作用,可见该菌株发酵性能良好。

2.2 拮抗菌株培养特征观察

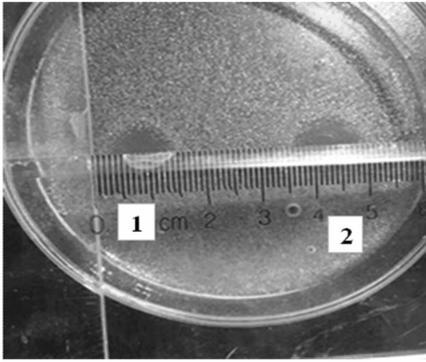
用划线法将菌株分别接种在蔗糖察氏、燕麦、无机淀粉、马铃薯、葡萄糖酵母膏培养基上,于 28 ℃ 下培养 7 d,结果如表 2 所示,葡萄糖酵母膏培养基上的菌株生长最好,生长速度较快,菌落较大,边缘呈放射状向外扩散,表面干燥有突起,孢子呈圆形,具有土腥味。马铃薯培养基菌株生长优良,向外扩

收稿日期:2016-01-28

基金项目:生物化工广西重点学科(河池学院)建设基金(201308);广西高校中青年教师基础能力提升项目(编号:KY2016LX286);河池学院校级重点科研课题(编号:XJ2016ZD001);广西壮族自治区大学生创新创业训练主项项目(编号:201610605079)。

作者简介:李梦茜(1986—),女,河南周口人,硕士,讲师,从事微生物药理学。E-mail:limengxi66@126.com。

通信作者:张振旺,博士研究生,从事生物技术研究。E-mail:zhenwangzhang@126.com。



1、2—发酵液重复号

图1 LFJK-11菌株发酵液对嗜水气单胞菌 HCLF-2 拮抗性检测

表1 LFJK-11 菌株及其发酵液对几种家蚕病原菌的拮抗作用

病原菌	抑菌圈直径 (mm)	菌株发酵液最大稀释倍数
嗜水气单胞菌 HCLF-2	12 ~ 19	50
苏云金杆菌	12 ~ 19	50
金黄色葡萄球菌	16 ~ 30	60
黑霉菌	3 ~ 6	10
大肠杆菌	16 ~ 30	60

散能力较强,且在培养3 d时菌落中出现金黄色疣,孢子呈链状且菌落紧实不易挑取,培养7 d时颜色逐渐变深表面出现粉状。

表2 待测菌在不同培养基上的形态特征

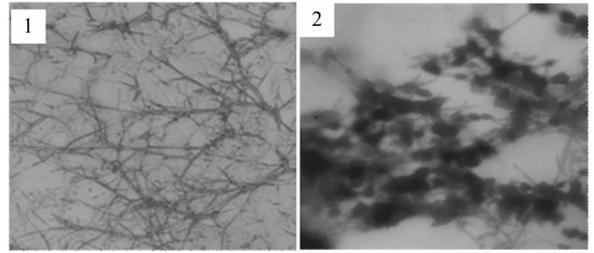
培养基	生长状况	气生菌丝	基内菌丝	色素
燕麦	+	灰色→黑色	象牙白	无
马铃薯	+++	灰色→黑色	象牙黄	无
无机淀粉	+	灰色→黑色	浅奶黄	无
蔗糖察氏	++	灰色→黑色	浅咖色	无
葡萄糖酵母膏	+++	灰色→黑色	浅咖色	无

注: +、++、+++ 分别表示生长状况一般、良好、优良。

2.3 菌丝特征

2.3.1 MS培养基 应用插片法观察菌丝特征,即分别在培养7、25 d后从MS培养基上取出插片,放在载玻片上滴加清水,放入40倍光镜下观察,结果如图2所示,LFJK-11菌株菌丝较细,无隔膜,呈垂直直线状,分枝较多,如树枝般相互紧密交叉。待气生菌丝成熟后,逐渐分化成圆形孢子。菌丝颜色由浅色至深黑色。

2.3.2 种子培养基 洗下MS培养基上的LFJK-11菌株菌落,转接到种子培养基中,于30℃、150 r/min下培养3、7、



1、2—培养7、25 d后的插片光镜观察结果

图2 MS培养基 LFJK-11 菌株菌丝特征

9 d,再分别用结晶紫染色后在40倍光镜下观察,结果如表3所示,菌株菌丝细长,生长旺盛,呈放射状向外生长并逐渐缩短增粗,致密交联在一起,最终菌丝团松散、断裂并向四周扩散。

表3 种子培养基下菌丝形态特征

培养时间 (d)	菌丝颜色	菌丝特征	菌丝长势
3	黑色	细、较长	菌丝致密、呈放射状
7	黑色	缩短,较粗	互相交联,呈团状扩大生长
9	黑色	断裂	团状结构松散,菌丝四周扩散

2.4 LFJK-11 菌株生理生化特性

多种生理生化试验结果如表4所示,LFJK-11菌株产淀粉水解酶、H₂S,可以液化明胶,但不产纤维素酶,葡萄糖是比较理想的可利用的碳源。

表4 LFJK-11 菌株生理生化检测结果

测定项目	结果	碳源利用	结果
淀粉水解	+	D-葡萄糖	+++
H ₂ S	+	蔗糖	++
纤维素分解	-	淀粉	+
明胶液化	+	麦芽糖	+
		D-果糖	-

注: -、+、++、+++ 分别表示不能生长、生长一般、生长良好、生长优良。

2.5 LFJK-11 菌株16S rDNA序列测定及其系统发育树的构建

LFJK-11菌株基因组测序所得16S rDNA碱基序列,于NCBI数据库BLAST上进行比对,选取12株同源性高的菌株,构建系统进化树,结果如图3所示,LFJK-11菌株以100%的同源性属于链霉菌属。

3 结论与讨论

从土壤中分离出1株高效拮抗嗜水气单胞菌HCLF-2

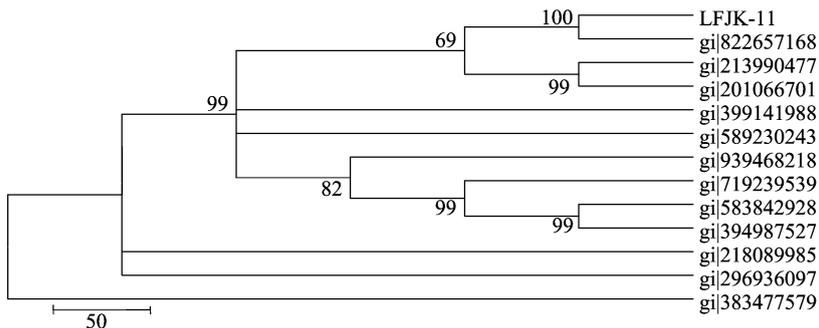


图3 LFJK-11系统发育树的构建

赵万乐,李艳玲,朱松波,等. 稀释液中添加L-半胱氨酸对鸡精液室温保存的影响[J]. 江苏农业科学,2017,45(3):131-133.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.03.037

稀释液中添加L-半胱氨酸对鸡精液室温保存的影响

赵万乐¹,李艳玲¹,朱松波¹,陈二平¹,张兆旺²

(1. 郑州市农林科学研究所,河南郑州 450005;2. 甘肃农业大学动物科学技术学院,甘肃兰州 730070)

摘要:利用安卡红种公鸡新鲜精液,在A、B等2种稀释液稀释后分别添加不同浓度的L-半胱氨酸,测定精子活率和精子畸形率,比较不同浓度的半胱氨酸对鸡精液在常温保存下的效果。结果表明,在常温下保存,在A稀释液中添加1.0 mmol/L L-半胱氨酸的鸡精液的各项指标值均比不添加和添加5.0 mmol/L L-半胱氨酸的好($P < 0.05$),且保存效果较为理想。在B稀释液中添加1.0、5.0 mmol/L L-半胱氨酸的精子有效存活时间极显著高于对照组($P < 0.01$);随着L-半胱氨酸添加量的增多,生存指数值变大,且以添加5.0 mmol/L L-半胱氨酸最高,但与添加1.0 mmol/L L-半胱氨酸间差异不显著($P > 0.05$)。但是,2种稀释液中是否添加L-半胱氨酸对精子畸形率影响不大($P > 0.05$)。

关键词:稀释液;鸡;精液;L-半胱氨酸;室温保存;精子活率;畸形率

中图分类号: S831.3⁺2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)03-0131-03

精液保存会随着时间的推移而使精子活力以及受精能力降低^[1],即使是使用一些比较好的稀释液。精子在呼吸代谢过程中能产生活性氧簇(ROS),携带有氧自由基,造成过氧化损伤,这是受精能力下降的重要原因之一。因此,在精液稀释液中添加抵抗自由基的成分是很有必要的^[2]。近些年,过氧化作用对精子的不良影响得到研究者的普遍重视,但是由于物种和抗氧化剂作用机理的不同,抗氧化剂在精液保存中的添加量和作用效果报道不尽相同。本试验根据鸡精液的氧化原理和L-半胱氨酸的作用机理,在稀释液中添加不同浓度的L-半胱氨酸,观察精液在常温下的保存效果,现报道如下。

1 材料与与方法

1.1 试验动物

收稿日期:2015-12-25

作者简介:赵万乐(1987—),男,山西晋城人,硕士,研究实习员,主要从事动物繁殖技术方面的研究。E-mail:503587578@qq.com。

菌株的拮抗菌,经鉴定为链霉菌。通过抑菌试验发现,LFJK-11菌株发酵液抑菌效果强,可以运用其发酵液来防治水产病原物。本试验对LFJK-11菌株的生长特征、生理生化特征及其菌丝和基质特征进行研究,并对其进行16S rDNA测序比对并构建生物树,最终确定该菌株为链霉菌属菌株,所得结果与常规生理生化鉴定结果一致。

本试验属首次对LFJK-11菌株生长特征进行研究,且其发酵产物对于嗜水气单胞菌HCLF-2菌株拮抗作用显著,是一种较好的拮抗菌,对水产动物病原菌有较强的抑制活性,起抗病能力。此研究对于探寻水产动物及人类肠道病原物的生物防治以及水产业的发展有着十分重要的作用。

参考文献:

[1] 陆承平. 致病性嗜水气单胞菌综述[J]. 水产学报,1992,16(3):

282-286。
选用15羽健康、繁殖性能好的安卡红种公鸡,供采精用。供试验鸡的饲料配方见表1。

表1 供试鸡饲料配方

原料	配比(%)	营养浓度	含量
玉米	60.0	代谢能(MJ/kg)	12.3
豆粕	21.0	粗蛋白(g/kg)	116.8
麦麸	2.0	钙(g/kg)	10
胡麻渣	6.5	总磷(g/kg)	6.5
石粒子	8.0	有效磷(g/kg)	4.2
CaHPO ₄	2.0	可消化赖氨酸(g/kg)	5.8
NaCl	0.3	可消化蛋氨酸(g/kg)	3.1
预混料	1.0		

注:1 t 预混料的成分含量为:维生素A 10.0 kg、维生素D 8.0 kg、维生素E 2.0 kg、维生素K 0.6 kg、CuSO₄·5H₂O 4.8 kg、FeSO₄·7H₂O 35.0 kg、MnSO₄·H₂O 34.8 kg、CoCl₂ 3.6 kg、Na₂SO₄ 150.0 kg、蛋氨酸 150.0 kg、赖氨酸 50.0 kg、氯化胆碱 150.0 kg、植酸酶 10.0 kg、稻壳粉 479.2 kg、牧乐维他 20.0 kg。

282-286。

[2] 陈怀青. 气单胞菌研究进展[J]. 鱼类病害研究,1997,19(3): 18-33.

[3] Hanninen M L. Phenotypic characteristics of the three hybridization groups of *Aeromonas hydrophila* complex isolated from different sources[J]. Journal of Applied Bacteriology,1994,76:455-462

[4] 陈爱平. 2005年中国水产养殖病害监测报告(一)[J]. 科学养鱼,2006(8):48-49.

[5] 朱丽梅,侯建文,罗凤霞,等. 百合灰霉病的诊断及其病原物的分离纯化[J]. 金陵科技学院学报,2009,25(3):59-63.

[6] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001:370-398.

[7] 沈萍,陈向东. 微生物学实验[M]. 4版. 北京:高等教育出版社,2007:149-152.