

陈 静,夏艳秋,朱 强.拈抗凡隆气单胞菌的海洋放线菌 AC08F5 的鉴定及活性物质初步研究[J].江苏农业科学,2020,48(5):175-180.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.05.037

拈抗凡隆气单胞菌的海洋放线菌 AC08F5 的 鉴定及活性物质初步研究

陈 静,夏艳秋,朱 强

(江苏海洋大学海洋生命与水学院/江苏省海洋生物技术重点实验室,江苏连云港 222005)

摘要:从 21 株分离自海洋环境的放线菌中筛选出 1 株放线菌菌株 AC08F5,该菌株对凡隆气单胞菌温 and 生物型 (*Aeromonas veronii* biovar *sobria*) NQ 菌株有明显抑制作用;通过显微形态和培养特征观察、生理生化反应和 16S rDNA 分子鉴定,将其鉴定为链霉菌属。试验对该菌株的活性物质对热、pH 和紫外照射的稳定性进行了初步研究,结果显示,在 70 ℃ 以下、pH 值 4~10 条件下抑菌活性相对稳定,并具有很强的抗紫外线照射能力。

关键词:海洋放线菌;鉴定;凡隆气单胞菌;稳定性

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)05-0175-06

水产病原微生物中出现大量抗生素耐药类型主要是由于在水产养殖中大量使用合成抗生素和药物导致的^[1]。利用微生物代谢产物来有效防治水产动物疾病,已经成为当前水产养殖工作的重要方向。在水产养殖领域,随着研究的深入发展,人们越来越重视来源于海洋的有益微生物资源及其代谢产物的开发和应用。目前,海洋细菌及其代谢产物用于水产抗病和水环境保护等方面的研究比较多。

海洋放线菌是新化学结构物质丰富的来源,在海洋放线菌研究方面,一是以筛选抗病毒、抗肿瘤活性产物为主要研究目标,二是以筛选抗菌、抑菌菌株应用于农作物病害的研究较多^[2-6]。而海洋放线菌应用于防治水产病原菌病害研究相对较少,但已有诸多研究者将海洋放线菌应用于水产养殖致病菌引起病害的预防。中山大学游建岚等报道了利用海洋放线菌治疗和预防由致病性弧菌引起的虾病害,具有抑制弧菌菌膜的形成,在养殖水体可以降解淀粉、蛋白等大分子,产抗菌类物质以及形

成耐热耐干燥的孢子的优点,海洋放线菌具有成为益生菌的潜力^[7-8]。Das 等将海洋链霉菌作为益生菌应用于斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 养殖,发现具有促进虾生长的作用^[9]。Kumar 等研究人员则将从海洋放线菌中提取的抗菌物质与食物一同喂养凡纳滨对虾,对虾产生具白斑综合征病毒的抗病毒效应^[10]。随着研究深入,人们发现海洋放线菌及其次级代谢产物已成为寻找新抗生素的重要来源^[11],而直接使用放线菌作为益生菌,相对来说其出现抗性基因横向转移机会低,值得在水产养殖中推广应用^[12],且具有重要的应用价值。

凡隆气单胞菌是近些年确定的气单胞菌科的新种,在水产养殖上逐渐成为危害性较大的病原菌。由于该菌的感染,曾引发孟加拉国鱼类的流行性溃疡综合症,国内丁鲷、罗非鱼、中华绒螯蟹及泥鳅、瓯江彩鲤等水产动物也因此患病,给养殖业带来较大的经济损失^[13]。本研究对凡隆气单胞菌有较好抑制作用的海洋放线菌菌株 AC08F5 进行了鉴定并对其抑菌活性物质的稳定性进行了初步研究,以期开发水产微生物活性制剂提供理论和技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 出发菌株:笔者所在课题组从连云港海域海泥、蛤池泥、日照多岛海海泥等样品中分离 21 株放线菌,并保存于淮海工学院微生物实验室。

收稿日期:2019-01-29

基金项目:江苏省连云港市科技局农业攻关项目(编号:CN1407);江苏省连云港市科技局农业支撑项目(编号:KK15007);江苏省海洋生物资源与环境重点实验室科研创新项目(编号: CXKT20180118)。

作者简介:陈 静(1973—),女,江苏宿迁人,硕士,高级实验师,主要从事海洋微生物及其活性物质研究。E-mail: chenjing@hhit.edu.cn。

病原指示菌: 凡隆气单胞菌温和生物型 (*Aeromonas veronii* biovar *sobria*) NQ 菌株 (由江苏海洋大学海洋生命与水产学院秦蕾博士提供)。

1.1.2 培养基 病原指示菌培养基 (TSA 培养基): 胰蛋白胨 17.0 g, 大豆蛋白胨 3.0 g, NaCl 5.0 g, 葡萄糖 2.5 g, 琼脂粉 15.0 ~ 20.0 g, K_2HPO_4 2.5 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 值 7.0 ~ 7.2。

放线菌斜面培养基 (海水高氏 1 号): 可溶性淀粉 20.0 g, KNO_3 1.0 g, NaCl 0.5 g, K_2HPO_4 0.5 g, $FeSO_4$ 0.01 g, $MgSO_4$ 0.5 g, 琼脂粉 15.0 ~ 20.0 g, 陈海水 1 000 mL, pH 值 7.2 ~ 7.4。

放线菌发酵培养基: 葡萄糖 20.0 g, 黄豆粉 20.0 g, 淀粉 10.0 g, $(NH_4)_2SO_4$ 2.5 g, 蛋白胨 5.0 g, 玉米浆 2.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25 g, K_2HPO_4 0.02 g, NaCl 4.0 g, $CaCO_3$ 6.0 g, 陈海水 1 000 mL, pH 值自然。

1.2 方法

1.2.1 拮抗凡隆气单胞菌 NQ 菌株的放线菌株筛选 (1) 试验菌无菌滤液制备: 在容量 100 mL 三角烧瓶内装量 30 mL 的放线菌发酵培养基中, 无菌操作接入活化斜面菌种 1 ~ 2 环, 20 °C、180 r/min 振荡培养 96 h, 得发酵液; 将发酵液经 10 000 r/min、5 min 离心, 上清液再经 0.22 μm 无菌滤膜过滤, 得无菌滤液备用。

(2) 病原指示菌的制备: 用无菌生理盐水配制浓度为 10^7 CFU/mL 的指示菌菌悬液备用。

(3) 双层平板牛津杯筛选法: 制备底层为 10 mL 2% 的水琼脂培养基, 上层为 7 mL TSA 培养基的双层平板, 取病原指示菌悬液 100 μL 涂布, 然后在平板上放入牛津杯; 在牛津杯中加入 10 μL 试验菌无菌滤液, 每菌做 3 个平行, 28 °C 培养 24 h, 测抑菌圈直径。

1.2.2 菌株 AC08F5 的初步鉴定

1.2.2.1 形态特征观察^[14] 用扞片法培养, 并在显微镜下观察菌丝、孢子丝和孢子等的形态。

1.2.2.2 培养特征 采用蒸馏水和陈海水分别配制葡萄糖天门冬素琼脂、高氏一号、察氏培养基、淀粉琼脂、葡萄糖酵母膏琼脂、马铃薯葡萄糖琼脂 6 种培养基制成平板。将菌株 AC08F5 三区划线接种上述 6 种不同的鉴定培养基上。然后在 20 °C 恒温培养箱中培养 7、14、30 d, 对气生菌丝的颜色、基内菌丝的颜色、生长状况、有无可溶性色素产生及产生可溶性色素的颜色进行观察记录。

1.2.2.3 部分生理生化反应 采用细菌微量生化

反应管 (购自北京陆桥生物), 每管中接入 50 μL 对数期菌株悬液, 置于 20 °C 恒温培养箱培养, 对照说明书观察并记录和判断结果。

1.2.3 菌株 AC08F5 的 16S rRNA PCR 扩增与测序

按照文献 [15 - 16] 提取菌株基因组, 然后用细菌 16S rDNA 通用引物, 正向引物 5' - AGAGTTTGATCC TGGCTCAG - 3' (*E. coli* 8 to 27), 反向引物 5' - TAC CTTGTTACGACTT - 3' (*E. coli* 1507 to 1492) 进行 PCR 扩增; PCR 产物用 UNIQ - 10 柱式微量琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (购自上海生工) 提纯后送上海生物工程技术服务公司双向测序; 将所测定序列通过 NCBI 中 Nucleotide - nucleotide BLAST 程序比对, 并下载与试验菌株亲缘关系较近并已经确证的序列, 用 Clustal X 软件进行比对分析和 MEGA 4 软件构建系统进化树。

1.2.4 菌株 AC08F5 发酵清液中抑菌活性物质的稳定性研究

1.2.4.1 发酵清液的制备 将放线菌新鲜成熟孢子接种于发酵培养基中, 20 °C 180 r/min 恒温振荡培养 96 h。在冷冻离心机将发酵液在 4 °C、10 000 r/min, 离心 5 min, 离心上清液再经 0.22 μm 无菌滤膜过滤, 得到发酵上清液备用。

1.2.4.2 热稳定性 各取发酵上清液 3 mL 于 24 个试管内, 每组 3 支试管分别置于 20、30、40、50、60、70、80、90 °C 水浴 60 min, 然后冰水中迅速冷却, 采用双层平板牛津杯法测定各处理样的抑菌活性, 以 20 °C 下的抑菌活性作为 100% 进行相对活性比较。

1.2.4.3 pH 稳定性 取发酵上清液 5 mL 于 21 个 25 mL 小烧杯中, 采用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 将各烧杯中发酵液 pH 值分别调节至 2、4、6、7、8、10、12, 每个 pH 值设 3 个平行, 室温下放置 24 h, 期间定时混匀几次, 再全部调回中性。用双层平板牛津杯法测抑菌活性, 并以 pH 值为 7 时的抑菌活性作为 100%。

1.2.4.4 紫外照射稳定性 分别取 5 mL 发酵上清液于 21 个直径 90 mm 平皿里, 在超净工作台内, 敞口放置于紫外灯 (20 W) 下, 距离 30 cm 处照射 0、5、10、15、30、45、60 min 后取出, 采用双层平板牛津杯法测抑菌活性, 以照射 0 min 的抑菌活性作为 100%。

2 结果与分析

2.1 21 株海洋放线菌对凡隆气单胞菌抑制效果

由表 1 可知, 有 18 株海洋放线菌对凡隆气单胞

表 1 21 株菌对凡隆气单胞菌的抑菌圈

菌编号	抑菌圈 (mm)	菌编号	抑菌圈 (mm)
AC08F5	18	AC08C3	8
AC08F2	9	AC08E5	3
AC08T1	15	AC08E3	10
AC08T2	9	AC08E4	0
AC08S1	10	AC08D1	0
AC08A1	11	AC08D4	10
AC08A7	9	AC08H3	5
AC08B1	3	AC08H5	10
AC08B2	0	AC08R3	6
AC08F3	7	AC08R4	7
AC08B5	5		

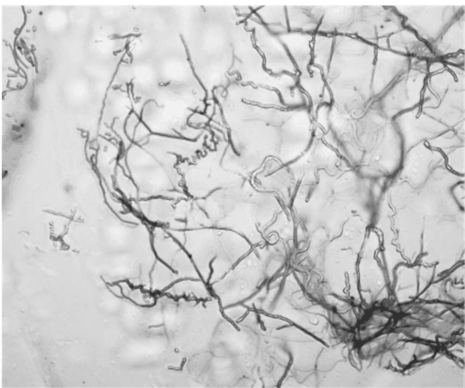
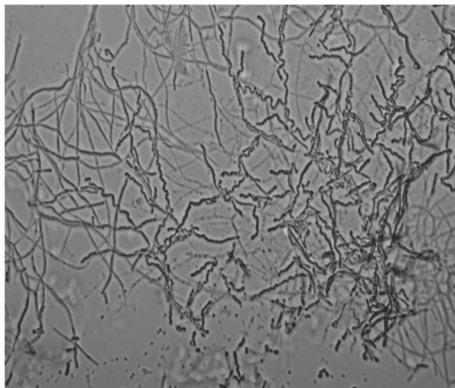


图1 菌株 AC08F5 显微照片(1 000倍油镜)

2.2.2.2 培养特征 放线菌菌株在不同的菌种鉴定培养基上会表现出不同的培养特征,其气生菌丝、基内菌丝、有无可溶性色素产生及生长状况均有一定差异。由表 2 可见,菌株 AC08F5 在蒸馏水培养基上培养和在陈海水培养基上培养的气生菌丝、基内菌丝和可溶性色素有一定的差别,而且海水培养

菌有抑菌效果,其中以 AC08F5 抑菌圈最大,其抑菌直径达(18±0.4) mm,表明菌株 AC08F5 的胞外代谢产物对病原指示菌凡隆气单胞菌 NQ 菌株有较强的抑制作用。

2.2 AC08F5 菌株分类地位的鉴定

2.2.1 形态特征 菌株 AC08F5 用扞片法培养后,观察其气生菌丝、孢子和孢子丝形态,在 1 000 倍油镜下,气丝呈现如树枝直或者弯曲状、孢子丝短、孢子链生成串(图 1),这些是链霉菌属^[17-18]的一些典型特点,因此,通过显微观察可以初步判断菌株 AC08F5 属链霉菌。

基上的生长状况总体上也稍好,说明海水中所含的矿物质对菌株 AC08F5 的菌丝生长和可溶性色素有一定的影响。而且菌株 AC08F5 在高氏一号培养基上生长良好,菌丝呈细粉状,结合“2.2.1”节显微观察结果,也符合链霉菌属的特点。

表 2 放线菌菌株 AC08F5 的培养特征

培养基	蒸馏水培养基				陈海水培养基			
	气生菌丝	基内菌丝	可溶性色素	生长状况	气生菌丝	基内菌丝	可溶性色素	生长状况
1	象牙黄	无色	无	+	榴萼黄	杏黄色	无	+++
2	白色	无色	无	+++	蛛网灰	褐色	无	+++
3	粉白色	象牙黄	无	+	蛛网灰	淡黄色	无	+
4	蛛网灰	酱棕色	苏木紫	+++	蛛网灰	淡黄色	无	+++
5	粉白色	无色	无	+++	无色	杏黄色	无	+++
6	粉白色	酱棕色	淡黄色	++	无色	杏黄色	无	+++

注:表中的 1、2、3、4、5、6 分别代表葡萄糖天门冬素琼脂、高氏一号培养基、察氏培养基、淀粉琼脂、葡萄糖酵母膏琼脂、马铃薯葡萄糖琼脂;+、++、+++ 分别代表生长状况差、较好、好;颜色的名称均取自文献[17-18]。

2.2.3 生理生化反应 由表 3 可知,菌株 AC08F5 能够产生蛋白酶液化明胶,能使淀粉水解,能够产生硫化氢,不产生纤维素酶。同时,试验考虑到菌株来源于海洋,所以还添加了无盐胰胨水和 3.5%

NaCl 胰胨水反应,以考察菌株是否严格需盐菌,结果显示菌株在无盐和 3.5% NaCl 下都生长。这说明菌株 AC08F5 并非严格意义的专性海洋菌,为将来的菌种应用于淡水养殖也提供了可能。

表 3 菌株的生理生化反应结果

反应管	结果	反应管	结果
D - 阿拉伯糖	+	明胶液化	+
D - 果糖	+	淀粉水解	+
D - 木糖	-	产生 H ₂ S	+
葡萄糖	+	纤维素	-
蔗糖	+	无盐胰胨水	+
甘露醇	+	3.5% NaCl 胰胨水	+
肌醇	+		

2.2.4 AC08F5 菌株的 DNA 测序 将菌株 AC08F5

的 16S rDNA 双向测通后拼装得序列共 1 396 bp,提交 GenBank,检索号为 MK 396649,并进行序列比对分析,采用 ClustalX 和 MEGA 软件对菌株测序结果进行系统进化分析并作进化树,由图 2 可知,菌株归属链霉菌属,最近缘的为 *Streptomyces griseoplanus* (strain M42)、*Streptomyces cavourensis* subsp. (strain NBRC15391)、*Streptomyces nitrosporeus* (strain 126186),难以确切的分类到具体的种,所以目前将其命名为 *Streptomyces* sp. strain AC08F5。

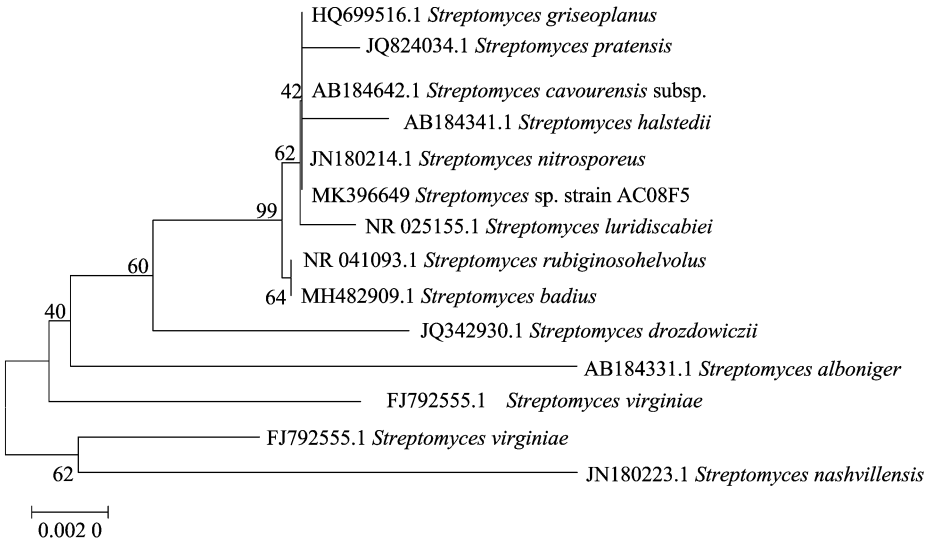


图2 菌株 AC08F5 系统进化树

2.3 菌株 AC08F5 发酵清液中抑菌活性物质稳定性

当温度超过 80 ℃ 处理,抑菌活性受温度影响较大,90 ℃ 处理的相对活性仅有 40%,说明温度在 70 ℃ 以下条件,抗菌活性物质是相对稳定的,而高温易导致发酵液抑菌活性丧失。

2.3.1 热稳定性 由图 3 可知,在 70 ℃ 以下处理后菌株 AC08F5 所产生的抑菌活性受温度影响变化不大,70 ℃ 处理 60 min 可保留抑菌活性约 77%,但

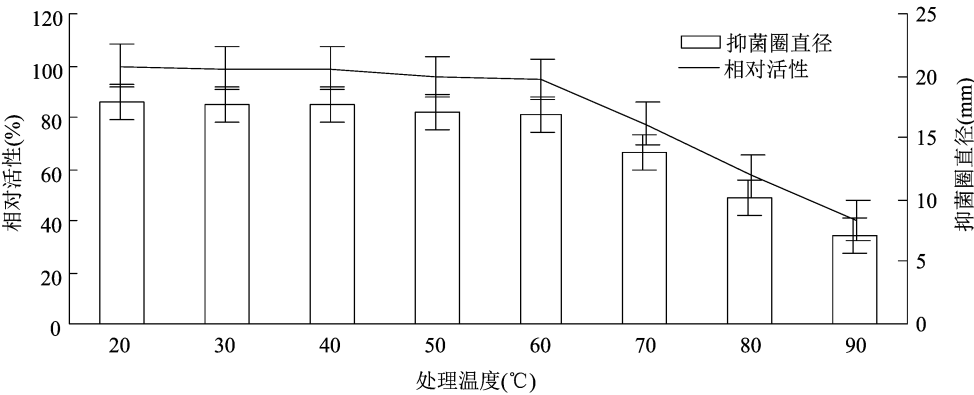


图3 抑菌物活性物质热稳定性

2.3.2 酸碱稳定性分析 由图 4 可知,发酵液清液在 pH 值为 4 和 10 时,其相对抑菌相对活性分别为 66.6% 和 72.1%,而当 pH 值为 2 ~ <4 和 pH 值为

10 ~ <12 时,发酵液中的活性物质的活性下降迅速,在 pH = 2、pH = 12 时,其相对活性只保存约 20% ~ 30%,结果说明强酸强碱容易导致发酵液抑

菌活性物质失活。

2.3.3 紫外照射稳定性 由图 5 可知,菌株 AC08F5 代谢产生的抑菌活性物质在试验设定的紫

外灯照射条件下,保持 60 min,其相对抑菌活性仍能保持 80% 以上,初步说明该菌株所产生的抑菌活性物质在紫外灯照射下有较强的稳定性。

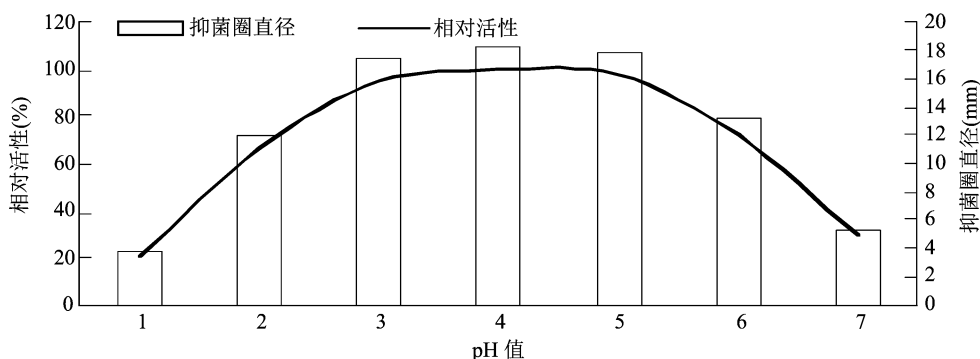


图4 抑菌活性物质 pH 值稳定性

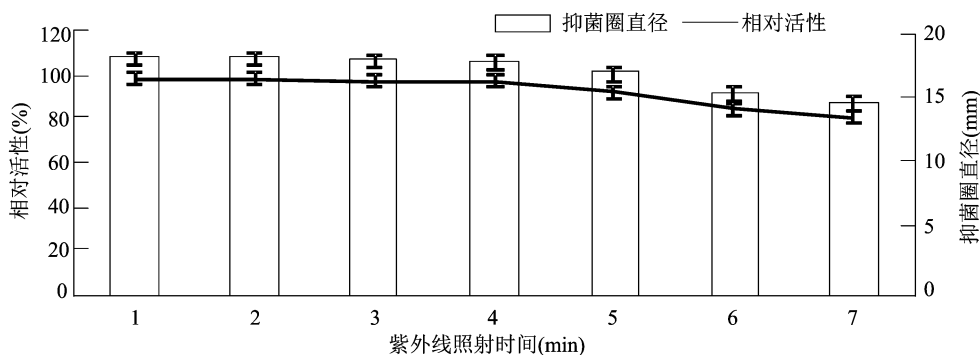


图5 抑菌活性物质的紫外照射稳定性

3 讨论

通过筛选试验从 21 株海洋放线菌菌株中,发现 18 株对病原指示菌凡隆气单胞菌 NQ 菌株有抑菌效果,其中以菌株 AC08F5 抑菌活性最强,而且同课题组的研究发现该菌株对嗜水气单胞菌、金黄色葡萄球菌和鳃弧菌均有一定的抑制作用,所以本试验对菌株 AC08F5 作进一步的鉴定。放线菌的鉴定一般以《放线菌的分类和鉴定》为指导,综合菌株的培养特征、显微形态特征、生理生化反应以及 16S rDNA 基因序列来进行鉴定。本试验中菌株 AC08F5 经鉴定属链霉菌属但未归结到具体的种。Zheng 等研究从台湾海峡的海洋动植物表面、皮层以及肠道等分离的具有抗菌活性的放线菌的种属分布情况,发现大多数具有抗菌活性的海洋放线菌为链霉菌属^[6]。事实上,更多研究报道也表明,研究的产生活性产物的海洋放线菌中链霉菌占多数^[19]。

海洋环境的独特性,使得海洋微生物能够产生丰富的、结构新颖的活性天然产物,海洋放线菌虽不是海洋微生物中主要的区系,却广泛分布在海洋各种环境中,随着研究的逐渐深入,海洋放线菌及其次级代谢产物已成为寻找新抗生素的重要来源^[11],具有非常重要的价值。而随着科学的发展,分离纯化方法的先进和鉴定技术的精准,从海洋放线菌分离得到的结构新颖的化合物越来越多,这些新化合物在抗菌、抗疟、抗肿瘤和杀虫等方面具有很好的活性^[19]。本试验对于菌株 AC08F5 代谢产物仅作了初步研究,表明发酵清液在 70 ℃ 以下、pH 值为 4 ~ 10 条件下,拮抗病原凡隆气单胞菌的活性相对稳定,并对紫外灯照射稳定。但具体的拮抗病原凡隆气单胞菌的活性物质为哪一类或哪几类,以及该菌株的次级代谢产物的具体化学成分有待研究。

目前,考虑到放线菌应用与水产养殖业的主要作用机制是放线菌代谢所产生的各类抗生素抑菌

和抗病,将海洋放线菌应用于防治水产病害研究相对还是较少,但已有诸多成功的先例,如 You 等^[7-8]、Das 等^[9]、Kumer 等^[10]成功地将海洋放线菌应用到水产养殖中,分别用于治疗 and 预防致病性弧菌引起的虾病害^[7-8]、作为益生菌应用于促进斑节对虾(*Penaeus monodon*)的生长^[9]和从海洋放线菌提取的抗菌物质混合饲料喂养凡纳滨对虾促进产生抗病毒效应^[10];王勇分离获得 1 株抗菌谱广、活性较强的拮抗水产病原菌的海洋放线菌弗氏链霉菌 DL-4 菌株并对其抑菌活性物质进一步研究,为进一步应用于水产病害防治提供基础^[11]。水产微生物中出现大量抗生素耐药类型是因为在水产养殖中大量使用合成的抗生素和药物所造成的^[1],而直接使用放线菌作为益生菌,相对出现抗性基因横向转移机会低,值得在水产养殖中推广应用^[12]。目前,尚未见有将海洋放线菌用于防治凡隆气单胞菌引起的病害的报道,对于笔者所在课题组分离自连云港海域高公岛海底泥的放线菌菌株 AC08F5 能否真正在水产养殖中起到抗病防病的作用,以及是否会造成凡隆气单胞菌等水产病原菌出现耐药性等还有待研究。

参考文献:

- [1] Dang H Y, Ren J, Song L S, et al. Dominant chloramphenicol-resistant bacteria and resistance gene in coastal marine waters of Jiaozhou Bay, China [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(2): 209-217.
- [2] Subramani R, Aalbersberg W. Marine actinomycetes: an ongoing source of novel bioactive metabolites[J]. Microbiological Research, 2012, 167(10): 571-580.
- [3] Shaik M, Girija Sankar G, Iswarya M, et al. Isolation and characterization of bioactive metabolites producing marine *Streptomyces parvulus* strain sankarensis - A10 [J]. Journal, Genetic Engineering & Biotechnology, 2017, 15(1): 87-94.
- [4] Mohamed S A, Mohamed I Y E, Usama W H, et al. Isolation and characterization of marine-derived actinomycetes with cytotoxic activity from the Red Sea coast [J]. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2016, 6(8): 651-657.
- [5] 赵婷婷, 常一民, 王俊潇, 等. 海洋放线菌次级代谢产物及其抗菌、抗病毒、抗肿瘤活性研究进展 [J]. 中国海洋药物, 2018, 37(4): 57-72.
- [6] Zheng Z, Zeng W, Huang Y, et al. Detection of antitumor and antimicrobial activities in marine organism associated actinomycetes isolated from the Taiwan Strait, China [J]. FEMS Microbiology Letters, 2000, 188(1): 87-91.
- [7] You J L, Cao L X, Liu G F, et al. Isolation and characterization of actinomycetes antagonistic to pathogenic *Vibrio* spp. from nearshore marine Sediments [J]. World Ju Microbiol and Biotechnology, 2005, 21(5): 679-682.
- [8] You J, Xue X, Cao L, et al. Inhibition of *Vibrio* biofilm formation by a marine actinomycete strain a66 [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 76(5): 1137-1144.
- [9] Das S, Lyla P S, Ajmal K S. Application of streptomyces as a probiotic in the laboratory culture of *Penaeus monodon* (Fabricius) [J]. The Israeli Journal of Aquaculture, 2006, 58(3): 198-204.
- [10] Kuma R S, Philip R, Achuthankutty C T. Antiviral property of marine actinomycetes against white spot syndrome virus in penaeid shrimps [J]. Current Science, 2006, 91(6): 807-811.
- [11] 王 勇. 抗水产病原菌海洋放线菌菌株 DL-4 的鉴定、发酵优化及其生物学特性研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2011.
- [12] 王 蓉, 何晓娜, 刘 维, 等. 海洋放线菌作为益生菌在水产养殖中的潜在应用 [J]. 安徽农业科学, 2013, 41(24): 10007-10009.
- [13] 陈 静, 夏艳秋, 顾冬莹, 等. 一株拮抗凡隆气单胞菌的海洋芽孢杆菌 chenj-1 分离、鉴定 [J]. 江苏农业科学, 2018, 46(16): 132-135.
- [14] 沈 萍, 范秀荣, 李广武. 微生物学实验 [M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 1999.
- [15] Nikodinovic J, Barrow K D, Chuck J A. High yield preparation of genomic DNA from *Streptomyces* [J]. BioTechniques, 2003, 35(5): 932-934, 936.
- [16] Kauffmann I M, Schmitt J, Schmid R D. DNA isolation from soil samples for cloning in different hosts [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 64(5): 665-670.
- [17] 阎逊初. 放线菌的分类和鉴定 [M]. 北京: 科学出版社, 1992.
- [18] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组. 链霉菌鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 1975.
- [19] 李先盛. 一株海洋放线菌 H41-55 的菌种鉴定和化学成分研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2017: 2-11.