

# 鲟源病原性嗜水气单胞菌拮抗芽孢杆菌的 鉴定及其生物学特性

曹海鹏<sup>1△</sup> 何珊<sup>2△</sup> 刘丽玲<sup>1</sup> 吕利群<sup>1\*</sup>

(1. 上海海洋大学 国家水生动物病原库 上海 201306)

(2. 上海师范大学 上海 200234)

**摘要:** 从养殖池污泥中分离筛选了1株优良的鲟源嗜水气单胞菌拮抗芽孢杆菌 G1, 其对鲟源嗜水气单胞菌 S1 产生的抑菌圈直径为 18.50 mm。通过 API50CH 细菌鉴定系统以及 16S rRNA 序列分析法, 菌株 G1 被鉴定为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*), GenBank 登录号 HM245965.1, 其 16S rRNA 序列与基因库中芽孢杆菌属菌株的 16S rRNA 序列有 99%–100% 的同源性, 而且与解淀粉芽孢杆菌 Ba-74501 (GenBank 登录号: DQ422953.1) 的亲缘关系最近。菌株 G1 的最适生长 pH 值为 7, 最适生长温度为 30 °C, 其在 30 °C、200 r/min 条件下的生长曲线为: 0–6 h 为生长延迟期, 6–54 h 为对数生长期, 54–90 h 为稳定期, 90 h 以后为衰亡期。此外, 菌株 G1 对其他实验选用的病原性嗜水气单胞菌也表现出良好的拮抗活性。本实验结果有利于填补嗜水气单胞菌拮抗菌在分类地位、生物学特性等方面的不足, 为鲟鱼嗜水气单胞菌病的生物防控提供科学资料。

**关键词:** 嗜水气单胞菌, 解淀粉芽孢杆菌, 鉴定, 生物学特性

## Identification and biological characteristics of a *Bacillus* strain antagonistic against pathogenic *Aeromonas hydrophila* of sturgeons

CAO Hai-Peng<sup>1△</sup> HE Shan<sup>2△</sup> LIU Li-Ling<sup>1</sup> LU Li-Qun<sup>1\*</sup>

(1. National Collection Center for Aquatic Pathogens, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

(2. Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China)

**Abstract:** A good *Bacillus* strain G1 antagonistic against pathogenic *Aeromonas hydrophila* of sturgeons was isolated and screened from the sediment of aquaculture ponds, which produced the inhibition

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金项目(No. CARS-46-12)

\*通讯作者: Tel: 86-21-61900454; 信箱: lqlv@shou.edu.cn

△共同第一作者

收稿日期: 2011-02-24; 接受日期: 2011-05-03

zone of 18.50 mm in diameter against *A. hydrophila* strain S1. Strain G1 (GenBank accession number: HM245965.1) was identified as *Bacillus amyloliquefaciens* through APICH50 bacterial identification system and 16S rRNA sequence analysis. Its 16S rRNA sequence had homology of 99%–100% with those of *Bacillus* sp. strains submitted to GenBank, and showed the most close relative to *Bacillus amyloliquefaciens* strain Ba-74501 (GenBank accession number: DQ422953.1). The best growth pH and temperature of strain G1 were 7 and 30 °C, its growth curve in the condition of 30 °C and 200 r/min was as follows: the lag phase was 0–6 h, the log phase was 6–54 h, the stationary phase was 54–90 h, the decline phase was after 90 h. In addition, strain G1 also exhibited good antagonistic activity against other tested *A. hydrophila* strains. The experimental results were conducive to fill in the data gaps about the taxonomic position of antagonists against *A. hydrophila*, and provide scientific data to the biocontrol on sturgeon aeromoniasis.

**Keywords:** *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus amyloliquefaciens*, Identification, Biological characteristics

鲟鱼是地球上生存最古老的鱼种之一,其肉味鲜美,营养丰富,具有较高的经济价值。近年来,我国湖北宜昌、仙桃、大连瓦房店、北京小汤山等地先后建立了鲟鱼繁育基地,黑龙江、北京、大连、湖北、广东等许多省市也成功开展了鲟鱼的人工养殖<sup>[1]</sup>。然而,由于集约化程度过高、日常管理不严密等诸多原因,鲟鱼嗜水气单胞菌病的爆发日趋严重,给鲟鱼养殖业造成了巨大的经济损失。目前,抗菌药使用是控制鲟鱼嗜水气单胞菌病的主要手段,但抗菌药的普遍应用已经引起了嗜水气单胞菌日益严重的耐药性问题,导致鲟鱼嗜水气单胞菌病的有效防治难度加大,因而寻求抗生素的理想替代品迫在眉睫。芽孢杆菌广泛存在于自然界中,能够形成内生孢子,具有很强的抗逆性,不仅能够防病治病,促进动物生长,而且具有无副作用、无残留、无污染、不产生耐药性等特点,是替代抗生素的理想微生物制剂<sup>[2]</sup>。然而,我国关于病原性嗜水气单胞菌拮抗芽孢杆菌的研究却鲜有报道。鉴此,本实验以 1 株鲟源病原性嗜水气单胞菌作为筛选指示菌,从养殖池污泥中分离筛选了 1 株嗜水气单胞菌拮抗芽孢杆菌,对其进行了生理生化鉴定和 16S rRNA 系统发育分析,并对其生长特性和对其他病原性嗜水气单胞菌的拮抗活性进行了初步研究,以期丰富病原性嗜水气单胞菌拮抗微生物的资源,为鲟鱼养殖过程中嗜水气单胞菌病的生物防治提供理论资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

养殖池污泥,采集于上海青浦现代农业园区;病原性嗜水气单胞菌 S1 (*Aeromonas hydrophila* strain S1),分离于患细菌性败血症的西伯利亚鲟肝脏<sup>[3]</sup>;大肠杆菌 DH5 $\alpha$  及其他病原性嗜水气单胞菌菌株均由国家水生动物病原库提供。

### 1.2 嗜水气单胞菌悬液的制备

将实验选用的各嗜水气单胞菌菌株接种到 100 mL 无菌营养肉汤中,在 200 r/min、30 °C 条件下摇床振荡培养 18–24 h,然后于 3 600 r/min 离心 20 min,用无菌生理盐水洗涤 3 次后制成菌悬液,并调节其终浓度为  $1.0 \times 10^9$  CFU/mL,于 4 °C 冰箱保藏备用。

### 1.3 嗜水气单胞菌拮抗芽孢杆菌的分离与筛选

**1.3.1 芽孢杆菌的分离:**参照 Cho 等<sup>[4]</sup>的方法进行芽孢杆菌的分离,并将芽孢杆菌分离株分别接种至无菌营养肉汤后,在 30 °C、200 r/min 条件下摇床振荡培养 18–24 h 后制成终浓度为  $1.0 \times 10^6$  CFU/mL 的培养液,于 4 °C 冰箱保藏备用。

**1.3.2 嗜水气单胞菌拮抗芽孢杆菌优良菌株的筛选:**根据 Lategan 等<sup>[5]</sup>对拮抗菌优良菌株的判定方法,采用纸片法<sup>[6]</sup>对芽孢杆菌分离株进行抗菌活性测定。即无菌操作取 2.5  $\mu$ L 芽孢杆菌分离株的菌悬液于直径为 6 mm 的无菌滤纸片上,并将滤纸片贴于涂布 200  $\mu$ L 嗜水气单胞菌 S1 菌悬液的普通营养

琼脂平板上, 然后于 30 °C 恒温培养 48 h 后观察抑菌圈的产生, 并将抑菌圈直径(>12 mm)最大的芽孢杆菌分离株作为优良菌株, 以大肠杆菌作为拮抗阴性对照菌。

#### 1.4 嗜水气单胞菌拮抗芽孢杆菌优良菌株的鉴定

**1.4.1 嗜水气单胞菌拮抗芽孢杆菌优良菌株的生理生化鉴定:** 参照李增社等<sup>[7]</sup>的方法, 用 API50CH 细菌鉴定系统对嗜水气单胞菌拮抗芽孢杆菌优良菌株进行生理生化鉴定。

**1.4.2 嗜水气单胞菌拮抗芽孢杆菌优良菌株的系统发育分析:** 以嗜水气单胞菌拮抗芽孢杆菌优良菌株的基因组 DNA 为模板, 对其 16S rRNA 进行 PCR 扩增, 其中正向引物为 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGG CTCAG-3', 反向引物为 1492R: 5'-GGTACCTT GTTACGACTT-3'。PCR 的扩增条件为: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 60 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物的纯化与测序由上海生工生物工程有限公司完成。将测得序列用 DNAMAN 软件编辑后, 在美国国立生物技术信息中心(NCBI)中利用 BLASTn 软件与 GenBank 基因库中已知的 16S rRNA 序列进行同源性比较, 选取同源性较高的序列并利用软件 BioEdit 7.0 和 MEGA 4.0 进行多重比较后通过邻接法构建系统发育树。

#### 1.5 嗜水气单胞菌拮抗芽孢杆菌优良菌株的生长特性分析

**1.5.1 pH 对嗜水气单胞菌拮抗芽孢杆菌优良菌株生长的影响:** 将终浓度为  $1.0 \times 10^6$  CFU/mL 的嗜水气单胞菌拮抗芽孢杆菌优良菌株培养液以 1% 的接种量接种于初始 pH 分别为 5、6、7、8、9 的无菌营养肉汤中, 于 30 °C、200 r/min 条件下振荡培养 12 h 后取样测定各 pH 下嗜水气单胞菌拮抗芽孢杆菌优良菌株培养液的  $OD_{660}$  值, 以无菌营养肉汤作空白对照。以初始 pH 为横坐标,  $OD_{660}$  值为纵坐标绘制曲线<sup>[8]</sup>。

**1.5.2 温度对嗜水气单胞菌拮抗芽孢杆菌优良菌株生长的影响:** 将终浓度为  $1.0 \times 10^6$  CFU/mL 的嗜水气单胞菌拮抗芽孢杆菌优良菌株培养液以 1% 的接种量接种于最佳初始 pH 的无菌营养肉汤中, 分别于 20 °C、25 °C、30 °C、35 °C、40 °C 条件下, 以

200 r/min 振荡培养 12 h 后取样测定各培养温度下嗜水气单胞菌拮抗芽孢杆菌优良菌株培养液的  $OD_{660}$  值, 以无菌营养肉汤作空白对照。以培养温度为横坐标,  $OD_{660}$  值为纵坐标绘制曲线<sup>[8]</sup>。

**1.5.3 嗜水气单胞菌拮抗芽孢杆菌优良菌株生长曲线的测定:** 将终浓度为  $1.0 \times 10^6$  CFU/mL 的嗜水气单胞菌拮抗芽孢杆菌优良菌株培养液以 1% 的接种量接种于最佳初始 pH 的无菌营养肉汤中, 然后于最佳培养温度条件下, 以 200 r/min 振荡培养, 分别在振荡培养后的 0、6、12、18、24、30、36、42、48、54、60、66、72、78、84、90、96、102、108、114、120 h 取样测定嗜水气单胞菌拮抗芽孢杆菌优良菌株培养液的  $OD_{660}$  值, 以无菌营养肉汤作空白对照。以培养时间为横坐标,  $OD_{660}$  值为纵坐标绘制曲线<sup>[8]</sup>。

#### 1.6 嗜水气单胞菌拮抗芽孢杆菌优良菌株对其他病原性嗜水气单胞菌拮抗活性分析

采用纸片法<sup>[6]</sup>测定嗜水气单胞菌拮抗芽孢杆菌优良菌株对病原性嗜水气单胞菌菌株(ATCC7966、X1、ZN1、T3、R402L、RK1119、706C)的抗菌活性, 分别观察并记录抑菌圈的产生情况, 以嗜水气单胞菌 S1 作为病原性嗜水气单胞菌的对照指示菌株。

## 2 结果与分析

### 2.1 嗜水气单胞菌拮抗芽孢杆菌优良菌株的分离与鉴定

从养殖池污泥中分离了 28 株芽孢杆菌, 通过进一步分别测定比较了其对于嗜水气单胞菌 S1 的拮抗活性, 最终筛选出 1 株对嗜水气单胞菌 S1 具有良好拮抗活性的芽孢杆菌菌株, 暂命名为 G1, 其产生的抑菌圈直径为 18.50 mm。API50CH 细菌鉴定系统对菌株 G1 的生理生化鉴定结果表明(表 1), 菌株 G1 为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*), 鉴定结果的可信度为 94.0%。此外, 通过对菌株 G1 的 16S rDNA 进行 PCR 扩增, 获得了 1 500 bp 大小的片段, 其在 GenBank 上的登录号为: HM245965.1。通过 NCBI 网站中的 BLASTn 软件对菌株 G1 的

表1 API50CH 细菌鉴定系统鉴定的菌株 G1 的生理生化特征  
Table 1 Physiological and biological characteristics of strain G1 by API50CH bacterial identification system

鉴定项目 Identification item	结果 Result	鉴定项目 Identification item	结果 Result	鉴定项目 Identification item	结果 Result
过氧化氢酶 Catalase	+	甘油 Glycerol	+	赤藓糖醇 Erythritol	-
D-阿拉伯糖 D-Arabinose	-	L-阿拉伯糖 L-Arabinose	+	D-核糖 D-Ribose	+
D-木糖 D-Xylose	+	L-木糖 L-Xylose	-	D-戊五醇 D-Pentitol	-
甲基-βD-吡喃木糖苷 Methyl beta D-pyranoid wood indican	-	D-半乳糖 D-Galactose	+	D-葡萄糖 D-Glucose	+
D-果糖 D-Fructose	+	D-甘露糖 D-Mannose	+	L-山梨糖 L-Sorbose	-
L-鼠李糖 L-Rhamnose	-	半乳糖醇 Galactitol	-	肌醇 Inositol	+
D-甘露醇 D-Mannitol	+	D-山梨醇 D-Sorbitol	+	甲基-αD-吡喃甘露糖苷 Methyl alpha D-pyranoid nectar indican	-
甲基-αD-吡喃葡萄糖苷 Methyl alpha D-pyranoid rkatsiteli grapes	+	N-乙酰氨基葡萄糖 N-Acetyl glucosamine	-	苦杏仁苷 Amarogentin	+
熊果苷 Arbutin	+	七叶苷 Esculin	+	水杨苷 Salicin	+
D-纤维二糖 D-Cellobiose	+	D-麦芽糖 D-Maltose	+	D-乳糖 D-Lactose	+
D-蜜二糖 D-Melibiose	+	D-蔗糖 D-Sucrose	+	D-海藻糖 D-Trehalose	+
菊糖 Inulin	-	D-松三糖 D-Melicitose	+	D-棉子糖 D-Melitose	+
美沙酮 Adanon	+	肝糖 Glycogen	+	木糖醇 Xylitol	-
龙胆二糖 Gentiobiose	+	D-松二糖 D-Turanose	-	D-来苏糖 D-Lyxose	-
D-塔格糖 D-Tagatose	-	D-岩藻糖 D-Fucose	-	L-岩藻糖 L-Fucose	-
D-阿拉伯醇 D-Arabite	-	L-阿拉伯醇 L-Arabite	-	葡糖酸盐 Gluconate	-
2-酮基葡萄糖酸盐 2-Keto gluconate	-	5-酮基葡萄糖酸盐 5-Keto gluconate	-		

注: +: 阳性, -: 阴性.

Note: +: Positivity, -: Negativity.

16S rRNA 序列与基因库中已知菌株的 16S rRNA 序列进行了同源性比较, 结果表明菌株 G1 的 16S rRNA 序列与 GenBank 数据库中芽孢杆菌属菌株的 16S rRNA 序列有 99%–100% 的同源性(表 2), 通过邻接法构建的基于菌株 G1 16S rRNA 序列的系统发育树结果(图 1)进一步可以看出, 菌株 G1 与解淀粉芽孢杆菌 Ba-74501(登录号: DQ422953.1)的亲缘关系最近。结合传统的生理生化鉴定以及 16S rRNA 序列系统发育分析结果判定, 菌株 G1 为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。

## 2.2 pH 对嗜水气单胞菌拮抗芽孢杆菌优良菌株生长的影响

实验结果表明(图 2), 菌株 G1 的最适生长初始 pH 为 7。在培养基初始 pH 范围为 5–7 时, 菌株 G1 培养液的  $OD_{660}$  值随着 pH 的升高而增加, 当培养基

初始 pH 为 7 时, 菌株 G1 培养液的  $OD_{660}$  值达到最大值 1.248; 当培养基初始 pH 大于 7 时, 菌株 G1 培养液的  $OD_{660}$  值逐渐降低, 当培养基初始 pH 为 9 时, 菌株 G1 培养液的  $OD_{660}$  值仅为初始 pH 为 7 时的 66.03%。

## 2.3 温度对嗜水气单胞菌拮抗芽孢杆菌优良菌株生长的影响

实验结果表明(图 3), 菌株 G1 在温度范围 20 °C–40 °C 内均能生长, 其中菌株 G1 的最适生长温度为 30 °C。在 20 °C–30 °C 范围内, 随着培养温度的升高, 菌株 G1 培养液的  $OD_{660}$  值逐渐增大, 在 30 °C 时达到最大值; 当培养温度大于 30 °C 时, 菌株 G1 培养液的  $OD_{660}$  值逐渐降低, 当培养温度为 40 °C 时, 菌株 G1 培养液的  $OD_{660}$  值最低, 仅为 30 °C 时的 68.35%。

表 2 菌株 G1 的 16S rRNA 序列与 GenBank 基因库中已知细菌菌株 16S rRNA 序列同源性的比较  
Table 2 Homology comparison of 16S rRNA sequence of strain G1 with those of other strains in GenBank

菌种名 Species	菌株编号 Strain number	登陆号 Accession number	分值 Score	同源性 Homology (%)
解淀粉芽孢杆菌 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	19E2	FJ705346.1	2 660	99
芽孢杆菌 <i>Bacillus</i> sp.	TC16	HQ698267	2 654	99
解淀粉芽孢杆菌 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Ba-74501	DQ422953.1	2 652	99
解淀粉芽孢杆菌 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	SD1b	HM055610.1	2 649	99
芽孢杆菌 <i>Bacillus</i> sp.	DYJL-H	HQ317199.1	2 651	99
解淀粉芽孢杆菌 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	14	HM107807.1	2 645	99
解淀粉芽孢杆菌 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	GBSW11	GU568203.1	2 645	99
解淀粉芽孢杆菌 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	HS10	GU323370.1	2 643	99
解淀粉芽孢杆菌 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	IMAU80229	GU125644.1	2 643	99
解淀粉芽孢杆菌 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	WSM-KSU301	HM753630.1	2 641	99
解淀粉芽孢杆菌 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	BFE5322	GU250445.1	2 639	99
解淀粉芽孢杆菌 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	BCRC14193	EF433408.1	2 639	99
解淀粉芽孢杆菌 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	AG1	HM989844.1	2 638	99
解淀粉芽孢杆菌 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	JS	HM055608.1	2 638	99
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	MH25	EF488103.1	2 641	99
死谷芽孢杆菌 <i>Bacillus vallismortis</i>	ST47	FJ386541.1	2 638	99
芽孢杆菌 <i>Bacillus</i> sp.	HNR03	EU373340.1	2 638	99

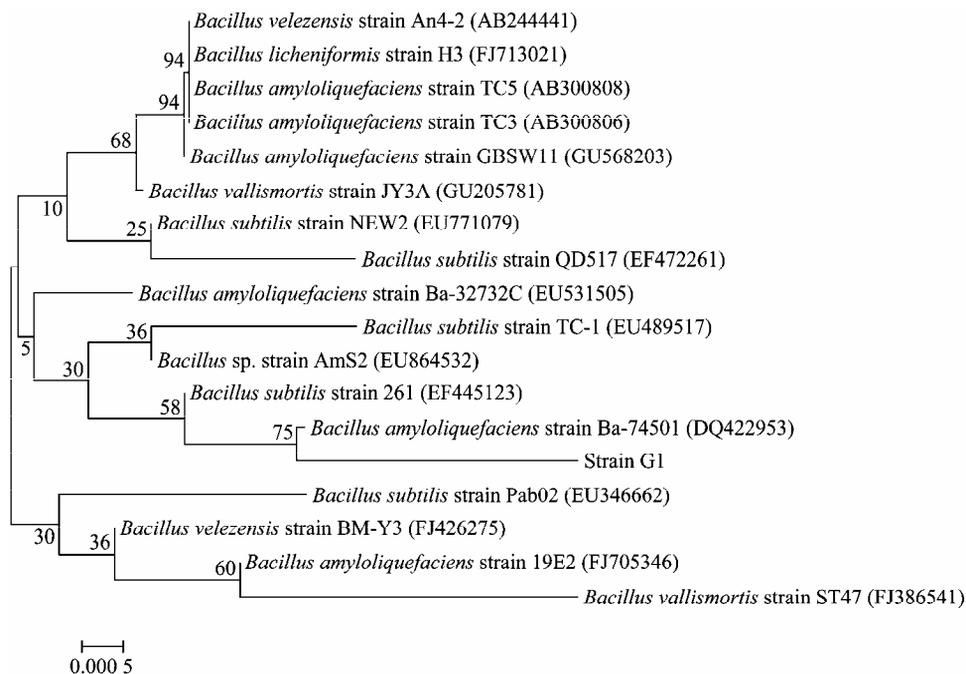


图 1 通过邻接法构建的基于菌株 G1 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of strain G1, constructed by Neighbor-joining method

注: 括号中的序号代表菌株的 GenBank 登录号; 分支点上的数字代表计算 1 000 次聚类到一起的几率; 标尺刻度代表 0.05% 的序列差异。  
Note: The sequence number in the bracket means the GenBank accession number of the strain; the number at the node means the percentage of occurrence in 1 000 boot-strapped trees; the scale bar means 0.05% sequence difference.

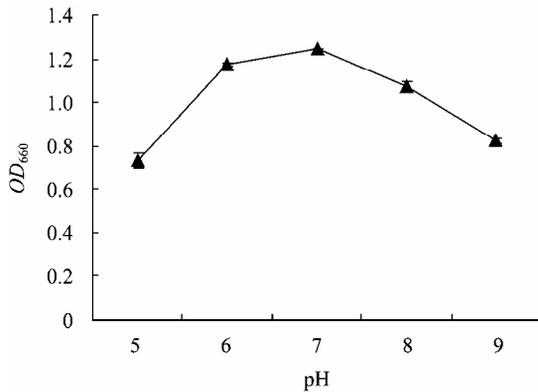


图2 pH对菌株G1生长的影响  
Fig. 2 Effect of pH on the growth of strain G1

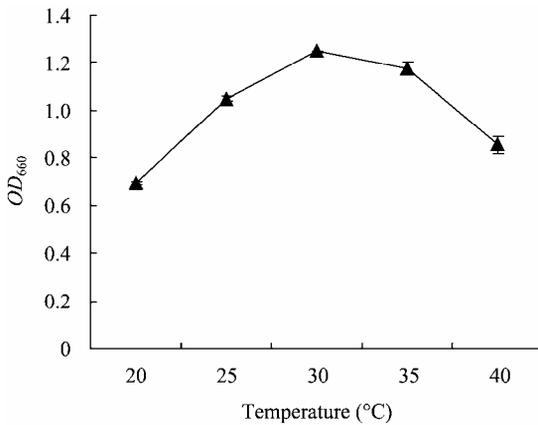


图3 温度对菌株G1生长的影响  
Fig. 3 Effect of temperature on the growth of strain G1

#### 2.4 嗜水气单胞菌拮抗芽孢杆菌优良菌株的生长曲线

实验结果表明(图4), 菌株G1的生长曲线为: 0-6 h为生长延迟期, 6-54 h为对数生长期, 54-90 h为稳定期, 90 h以后为衰亡期。

#### 2.5 嗜水气单胞菌拮抗芽孢杆菌优良菌株对其他病原性嗜水气单胞菌的拮抗活性

实验结果表明(图5), 菌株G1对实验选用的8株病原性嗜水气单胞菌均有良好的拮抗活性, 其产生的抑菌圈直径均在11.0 mm-18.5 mm之间。然而, 菌株G1对不同嗜水气单胞菌菌株的拮抗活性有所不同, 其对嗜水气单胞菌X1、嗜水气单胞菌R402L的拮抗活性与对嗜水气单胞菌S1的拮抗活性相当, 而对嗜水气单胞菌ATCC7966、嗜水气单胞菌ZNI、

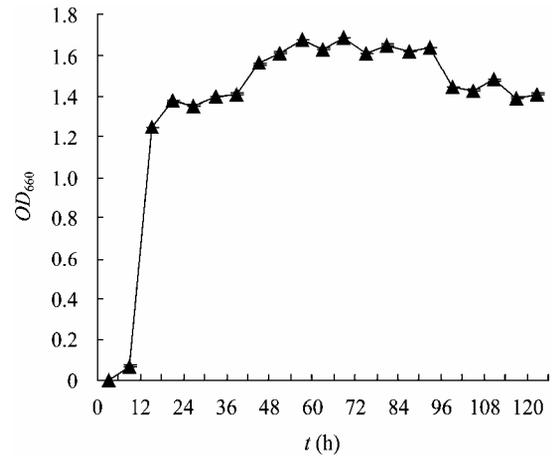


图4 菌株G1的生长曲线  
Fig. 4 The growth curve of strain G1

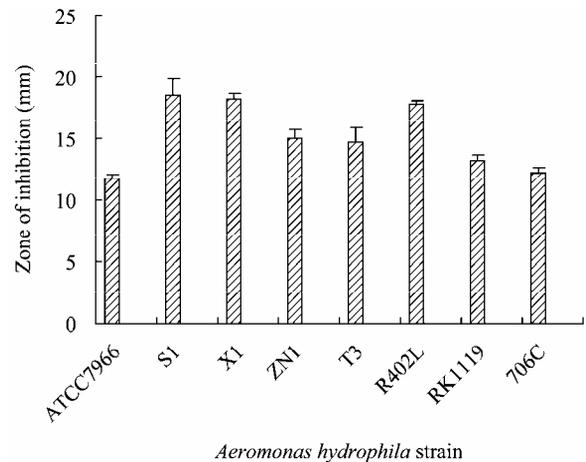


图5 菌株G1对不同嗜水气单胞菌菌株的拮抗活性  
Fig. 5 The antagonistic activity of g strain G1 against *Aeromonas hydrophila* strains

嗜水气单胞菌T3、嗜水气单胞菌RK1119和嗜水气单胞菌706C的拮抗活性显著低于其对嗜水气单胞菌S1的拮抗活性。

### 3 讨论

利用拮抗微生物抑制水体中病原菌的生长, 使病原菌的浓度低于其致病浓度, 是进行病害防治的有效手段, 已经成为国内外水产养殖病害控制的热点<sup>[9]</sup>。例如, 王娟等<sup>[9]</sup>、莫照兰等<sup>[10]</sup>已经对水产病原性弧菌拮抗菌进行了研究, 并成功筛选出气味黄杆菌(*Flavobacterium odoratum*)、类产碱假单胞菌

(*Pseudomonas pseudoalcaligenes*)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)等一些对病原性弧菌具有良好拮抗活性的菌株,但目前国内关于水产病原性嗜水气单胞菌拮抗菌的研究极少,仅宋铁英等<sup>[11]</sup>、李联泰等<sup>[12]</sup>对嗜水气单胞菌拮抗菌的筛选及其拮抗物质、生长条件做过相关研究,而且均未对嗜水气单胞菌拮抗菌进行分类鉴定。鉴此,本实验以1株鲟源嗜水气单胞菌作为筛选指示菌,从养殖池污泥中分离筛选了1株嗜水气单胞菌拮抗芽孢杆菌优良菌株——解淀粉芽孢杆菌G1,并进一步对其生理生化特性、生长特性以及系统发育等做了研究,不仅有利于填补国内嗜水气单胞菌拮抗菌在分类地位、生物学特性等方面的不足,而且也为我国鲟鱼养殖过程中嗜水气单胞菌病的生物防控提供科学资料。

纸片法是筛选和研究拮抗微生物的常用方法之一<sup>[13]</sup>,它不仅有利于观察拮抗菌通过分泌抗菌物质产生的抑菌区,而且还可以观察到具有生长优势细菌的拮抗作用。因此,本实验选用纸片法筛选出了嗜水气单胞菌拮抗芽孢杆菌优良菌株——解淀粉芽孢杆菌G1。众多研究表明,解淀粉芽孢杆菌能够产生表面活性素、伊枯草菌素、芬芥素等一系列抗菌脂肽,具有广泛的抑制真菌与细菌的能力。已经被证实其对藤黄微球菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌、葡枝根霉、白色念珠菌、黄曲霉等多种微生物具有显著的拮抗作用,是最有开发潜力的微生物之一<sup>[14-15]</sup>。这些研究结果不仅在一定程度上说明了解淀粉芽孢杆菌抑制嗜水气单胞菌的机理,也间接证实了解淀粉芽孢杆菌作为嗜水气单胞菌拮抗菌应用于鲟鱼健康养殖的可行性。然而,解淀粉芽孢杆菌G1能够产生何种抗菌物质,其通过拌饲口服后在鲟鱼体内的定殖能力、对肠道菌群的调节作用以及实际抑菌与应用效果如何,还有待于进一步深入研究阐明。

目前在细菌分类鉴定方法上,16S rRNA序列分析方法和API细菌鉴定系统均是细菌分类鉴定的有效参照系统,已被国内外微生物学家以及FDA、NASA、TIGR、NIAID等多个国际权威机构认可,但

这两种方法尚存在不足。因此,细菌分类鉴定必须将16S rRNA序列分析和API细菌鉴定系统两种方法相结合,以使鉴定方法更科学,鉴定结果更可靠、更准确<sup>[16]</sup>。本实验在对菌株G1进行分类鉴定时,结合了API细菌鉴定系统对菌株G1的生理生化鉴定结果以及菌株G1的16S rRNA序列分析结果,最终确定菌株G1为解淀粉芽孢杆菌。然而,菌株G1与权春善等分离的解淀粉芽孢杆菌Q-12在甘油、D-阿拉伯糖、D-核糖等方面的生理生化特性有所不同<sup>[17]</sup>,而且与GenBank中同源性较高的解淀粉芽孢杆菌菌株之间也存在一定的种间差异,这可能与解淀粉芽孢杆菌菌株之间巨大的地理差异以及生长环境条件不同有关<sup>[18]</sup>。

一般来说,细菌产生并释放到培养基中的抗菌物质的浓度与其生长条件密切相关,如pH值、培养温度、培养时间等<sup>[10]</sup>。因此,本实验研究了菌株G1的生长特性。目前关于解淀粉芽孢杆菌的生长特性国内外学者已经作了相关研究。例如,朱丽梅等<sup>[19]</sup>对具杀松材线虫活性的解淀粉芽孢杆菌JK-JS3的培养条件研究后发现,分离自马尾松林的解淀粉芽孢杆菌JK-JS3的最适培养温度为37℃,最适初始pH为7,最适培养时间为10d;车晓曦等<sup>[20]</sup>对1株解淀粉芽孢杆菌发酵条件进行优化后表明,解淀粉芽孢杆菌SAB-1的最适生长温度为31℃,最适生长初始pH为6,最适培养时间为26h。而本实验分离得到的解淀粉芽孢杆菌G1的最适生长温度为30℃,最适生长初始pH为7,最适培养时间为54h,与解淀粉芽孢杆菌JK-JS3在最适生长温度和培养时间有所不同,与解淀粉芽孢杆菌SAB-1在最适初始pH和培养时间也有所不同,这可能与菌株差异及实验室的培养条件不同有关。此外,本实验还发现,菌株G1对不同嗜水气单胞菌菌株的拮抗活性不同,这与宋铁英等<sup>[11]</sup>实验结果相同,可能与嗜水气单胞菌菌株的不同来源有关<sup>[10]</sup>。

## 参 考 文 献

- [1] 卢迈新,黄樟翰,肖学铮,等. 主要养殖鲟鱼的生物学及养殖前景[J]. 大连水产学院学报, 2000, 15(4):

- 280-288.
- [2] 王晓丽, 朱小翠, 王永山, 等. 八株芽孢杆菌的分离鉴定及其抗逆性比较[J]. 中国兽医科学, 2010, 40(10): 1017-1022.
- [3] Cao HP, He S, Lu LQ, et al. Characterization and phylogenetic analysis of the bitrichous pathogenic *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*)[J]. The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh, 2010, 62(3): 182-189.
- [4] Cho HP, Liu LL, Liu K, et al. Phenotypic characterization and phylogenetic analysis of a virulent *Bacillus cereus* strain from the Tiger frog, *Hoplobatrachus rugulosus* Wiegmann[J]. African Journal of Microbiology Research, 2010, 4(24): 2780-2786.
- [5] Lategan MJ, Torpy FR, Gibson LF. Control of saprolegniosis in the eel *Anguilla australis* Richardson, by *Aeromonas media* strain A199[J]. Aquaculture, 2006, 240(1/4): 19-27.
- [6] 唐建中, 戴求仲, 周旺平. 两种益生芽孢杆菌体外抑菌活性及其耐药性研究[J]. 兽药与饲料添加剂, 2009, 14(5): 8-10.
- [7] 李增社, 卢秀云, 马平, 等. 防治棉花黄萎病的生防细菌 NCD-2 的田间效果评价及其鉴定[J]. 植物病理学报, 2005, 35(5): 451-455.
- [8] 曹海鹏, 杨先乐, 王玉洁, 等. 鲟源致病性豚鼠气单胞菌的分离及其生长特性[J]. 动物学杂志, 2007, 42(6): 1-6.
- [9] 王娟, 封永辉, 蔡立胜, 等. 来自大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 肠道的弧菌拮抗菌的筛选与鉴定[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(5): 707-713.
- [10] 莫照兰, 俞勇, 李会荣, 等. 弧菌拮抗菌的筛选[J]. 青岛海洋大学学报, 2001, 31(2): 225-231.
- [11] 宋铁英, 郑伟文. 嗜水气单胞菌的拮抗菌及其拮抗物质测定[J]. 福建农业科技, 1999(5): 14-15.
- [12] 李联泰, 安贤惠. 拮抗嗜水气单胞菌菌株的筛选及生长条件的优化研究[J]. 淮海工学院学报: 自然科学版, 2007, 16(4): 54-57.
- [13] 管晓冉, 张德纯, 席青. 双歧杆菌发酵果蔬汁的体外生物拮抗作用研究[J]. 中国微生态学杂志, 2010, 22(3): 202-205.
- [14] 车晓曦, 李校堃. 解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 的研究进展[J]. 北京农业, 2010(3): 7-10.
- [15] 杨胜远, 韦锦, 李云, 等. 一株产抗菌活性物质解淀粉芽孢杆菌的筛选及鉴定[J]. 食品科学, 2010, 31(21): 208-212.
- [16] 李琳, 李瑾年, 余为一. 细菌分类鉴定方法的研究概况[J]. 安徽农业科学, 2004, 32(3): 549-551.
- [17] 权春善, 王军华, 徐洪涛, 等. 一株抗真菌解淀粉芽孢杆菌的分离鉴定及其发酵条件的初步研究[J]. 微生物学报, 2006, 46(1): 7-12.
- [18] 周素明, 李安兴, 马跃, 等. 养殖鱼类链球菌病原的分离鉴定及其 16S rDNA 分析[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2007, 46(2): 68-71.
- [19] 朱丽梅, 吴小芹, 徐旭凌. 具杀松材线虫活性的解淀粉芽孢杆菌 JK-JS3 的培养条件[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2010, 34(5): 55-58.
- [20] 车晓曦, 李社增, 李校. 一株解淀粉芽孢杆菌发酵培养基的设计及发酵条件的优化[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(18): 9402-9405.