

## 水霉拮抗菌的筛选及其拮抗活性物质稳定性初步研究

贺凤 许德麟 张其中\*

(暨南大学水生生物研究所 广东省高校水体富营养化与赤潮防治重点实验室 广东 广州 510632)

**摘要:**【目的】从海底沉积物中分离、筛选水霉拮抗放线菌菌株, 鉴定目标菌株及其无菌发酵液对水霉生长的抑制效果, 并初步分析拮抗活性物质的稳定性。【方法】用稀释涂布法从采集的海底沉积物中分离得到海洋放线菌, 以水霉为靶菌, 通过平板对峙法在 PDA 平板上筛选出对水霉有拮抗作用的菌株; 利用其发酵液对水霉菌丝和孢子进行初步拮抗效果研究; 通过 16S rRNA 基因序列分析对目标菌株的种属进行初步鉴定。【结果】从分离到的数十株海洋放线菌中筛选到 5 株水霉拮抗菌, 其中拮抗效果最强的为 S26 菌株, 16S rRNA 基因序列分析结果显示其为链霉菌, 并与紫色链霉菌具有较近的亲缘关系; S26 马铃薯葡萄糖液体培养基发酵液在平板抑菌圈实验中, 对水霉孢子萌发的抑菌圈直径达  $32.00\text{ mm} \pm 0.81\text{ mm}$ , 其 5 倍浓缩无菌发酵液对水霉菌丝的抑菌圈直径达  $39.75\text{ mm} \pm 0.50\text{ mm}$ ; 5 倍浓缩无菌发酵液抑菌活性的 3.125% 即能完全抑制水霉孢子的萌发; 5 倍浓缩液对温度具有较强耐受性, 经  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  高温 30 min 处理后平板抑菌圈直径为  $25.50\text{ mm} \pm 0.58\text{ mm}$ ; 经不同 pH 值处理 12 h 后, pH 5.0–9.0 之间仍保持较好的拮抗活性; 在  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  下蛋白酶处理 2 h 后实验组与对照组存在显著性差异, 但平板抑菌圈直径仍可达 33.25 mm 以上, 推测拮抗物质活性成分由多肽和非多肽类代谢物共同组成。【结论】海洋链霉菌株 S26 产生的活性物质对病原水霉真菌有较强的抑制作用, 并对外界环境变化有较强的适应能力, 因而在水霉病的生物防治中具有潜在的应用价值。研究结果同时也显示海洋链霉菌在水产病害生物防治应用领域有较好的发展前景和更广阔的挖掘空间。

**关键词:** 水霉, 海洋放线菌, 拮抗作用, 生物防治

## Screening of antagonistic bacterium strain against *Saprolegnia* sp. and characterization of the antifungal stability of culture broth from the target strain

HE Feng XU De-Lin ZHANG Qi-Zhong\*

(Key Laboratory of Eutrophication and Red Tide Prevention of Guangdong Higher Education Institutes, Institute of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China)

**Abstract:** [Objective] Isolation of marine actinobacteria with antagonistic activity against

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(No. 31300046); 农业部南海渔业资源开发利用重点实验室开放基金项目(No. LSF2013-07); 广东省自然科学基金项目(No. S2013010013705); 广东省科技计划项目(No. 2014A020208024)

\*通讯作者: ✉: zhangqzdr@126.com

收稿日期: 2015-03-06; 接受日期: 2015-04-14; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-04-15

pathogenic *Saprolegnia* sp., and the antifungal stability of culture broth from the target strain. **[Methods]** Serial dilution and plating method was employed to isolate actinobacteria from marine sediments. The antagonistic strains were screened by confrontation assay on PDA plates. The anti-*Saprolegnia* effects were characterized using cell-free culture broth as references. The stability of antagonistic activity was analyzed upon physical and chemical factors changes including temperature, pH, and proteinase treatments. Phylogenetic tree was constructed using the Neighbor-Joining method based on the 16S rRNA gene sequences. **[Results]** Dozens of actinobacteria strains were isolated, and five of them presented antagonistic activity against *Saprolegnia* sp. The strain of S26, which showed the strongest activity, was found closely related to *Streptomyces violaceus* NBRC 13103<sup>T</sup> (98.6% similarity) based on the 16S rRNA gene sequence analysis. This showed that S26 should be assigned to genus *Streptomyces*. The inhibition zones were 32.00 mm±0.81 mm for S26 fermented broth against germination of *Saprolegnia* spores and 39.75 mm±0.50 mm for five times concentrated cell-free culture against growth of *Saprolegnia* hypha. The minimum to inhibit *Saprolegnia* spores germination was 3.125% of the total activity of the five times concentrated cell-free culture. The substance responsible for antagonism showed strong resistance to high temperatures and a clear inhibition zone (25.50 mm±0.58 mm in diameter) was still obtained by the fermented broth even after intense heating treatment of 100 °C for 30 min. The antifungal activity of fermented broth was sensitive to extreme acid or alkaline condition (pH<5.0 or pH>9.0), but it was sustained throughout the pH range between 5.0 and 9.0. The active substance was partially sensitive to proteinase treatments. These suggested that it was highly possible for the antagonistic substances to be both proteinaceous and non-proteinaceous molecules. **[Conclusion]** The marine actinobacterium strain of S26 isolated in this study showed strong inhibitory effects to the spores germination and hypha growth of *Saprolegnia* sp., and the compounds with the antagonistic activity were resistant to some extent against temperature, pH and proteinase treatments. These suggested that S26 was a promising microbial strain to control saprolegniasis occurred in aquatic animals. The study implies marine actinobacteria will play an important role in biocontrol of aquatic animal diseases.

**Keywords:** *Saprolegnia* sp., Marine actinobacteria, Antagonistic activity, Biological control

水霉病是淡水水产养殖动物及其卵孵化过程中一种常见疾病, 常见病原有水霉属(*Saprolegnia*)和绵霉属(*Achlya*)中的一些种类<sup>[1]</sup>。水霉病流行地域广, 一年四季都可发病, 但主要集中在晚冬和初春, 水温在 13–18 °C 时最易发病, 可导致受感染的鱼死亡, 死亡鱼卵染水霉后可影响周围正常卵的孵化<sup>[2]</sup>, 导致正常鱼卵大面积死亡, 给水产养殖业造成重大经济损失。

一直以来, 主要用化学药物防治水霉病, 其中, 使用最频繁的是孔雀石绿。大量使用化学药物导致水体污染、生态失衡、耐药性、高残留、食品安全等一系列问题, 孔雀石绿具有“三致”(致癌、致畸、致突变)作用<sup>[3]</sup>, 已被禁用。因此, 迫切需要寻找安全、环保、有效的防治水霉病的新型药物。生物

防治对水产动物无毒害, 对环境友好, 可长期使用, 具有安全、高效和环保的特点。研究者已报道了一些水霉拮抗菌, 用其防治水霉病有成功例子, 如: Hussein 等<sup>[4]</sup>从感染水霉病的病鱼伤口处分离出假单胞菌属(*Pseudomonas*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)的细菌, 对水霉均有抑制作用; Lategan 等<sup>[5-6]</sup>利用中间气单胞菌(*Aeromonas media*) A199 治疗人工感染水霉病的澳洲鳗鲡(*Anguilla australis* Richardson)和自发感染水霉的银锯眶鲷(*Bidyanus bidyanus*)取得比较理想的效果。国内相关研究报道有: 雷翠霞等<sup>[7]</sup>从池塘的水样和底泥中分离出水霉拮抗菌株 SZK15, 其发酵液对水霉有明显的抑制效果; 刘俊等<sup>[8]</sup>从患水霉病的河鲈肌肉中分离获得一株水霉拮抗菌 HJ010。另外有研究报道筛选

出的水霉拮抗菌株有黏质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)<sup>[9]</sup>、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)<sup>[10]</sup>、芽孢杆菌属的枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)<sup>[11]</sup>、蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*)<sup>[12]</sup>等。说明自然水体确实存在水霉拮抗菌,其中抗水霉效果好的菌株有开发成水霉生物防治剂的前景。因此,需要从自然界筛选大量水霉拮抗菌,研究其抗水霉机制,为找到合适的水霉拮抗菌进行产业化应用奠定基础。

海洋环境有别于陆地环境的一些特点,如低温、变换的盐度、光线及水压等,决定了其能够开发出生产新生物活性物质的稀有放线菌资源的潜力。本研究从数十株海洋放线菌中筛选到5株对水霉具有明显拮抗作用的菌株,并对效果最强的S26菌株的拮抗水霉效果及活性物质稳定性等做了初步的研究,为进一步研究生物防治水霉病提供备选菌株和相关依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

**1.1.1 供试菌株:**水霉菌由本实验室分离保存菌种;S26菌株分离自珠海淇澳岛沿海岸海底沉积物中(22°23'58.4"N, 113°36'56.7"E)。

**1.1.2 培养基:**马铃薯葡萄糖固体培养基(PDA)参照文献[7],马铃薯葡萄糖液体培养基参照文献[9],MS培养基参照文献[13],TSB固体培养基参照文献[14],Bennett培养基参照文献[15]。

### 1.2 拮抗放线菌的筛选

**1.2.1 海洋放线菌的分离及保存:**从珠海淇澳岛沿海岸采集海底沉积物后用冰袋保存,送回实验室后立即进行分离。用稀释涂布法将样品稀释10个梯度并均匀涂布在Bennett培养基上,在28℃培养7d,挑单菌落于TSB固体培养基中进行培养,20%甘油中-20℃保存。

**1.2.2 拮抗放线菌的筛选:**参照Hussein等<sup>[4]</sup>的平板对峙法,将分离得到的放线菌以平行划线的方式接种至PDA平板上,两菌线之间的距离约为5cm,

28℃培养1d,待菌落长出后,再在菌线中间位置接种水霉琼脂块(直径8mm),28℃培养3d后,测定水霉菌落与双菌线之间的最短距离,以连续2d测定的距离接近时为最终抑制距离,每组设3个平行。在对照组PDA平板中间接种水霉琼脂块,28℃培养4d,水霉铺满整个平板。记录有拮抗作用的菌株的编号及最终抑制距离。

### 1.3 S26发酵液无菌上清制备

将筛选出的拮抗作用最强的菌株S26接种至马铃薯葡萄糖液体培养基中(50mL),28℃、160r/min摇床培养1d后,按5%接种量将活化的S26菌液加入到150mL的马铃薯葡萄糖液体培养基中继续摇床培养2d。将发酵液于4℃、12000r/min离心15min,收集上清液,用0.22μm孔径的无菌滤膜过滤并收集无菌的发酵上清液。

### 1.4 水霉孢子悬液制备

从长满水霉的PDA平板中夹取适量的水霉菌丝于无菌水中,20℃培养1d,无菌纱布过滤除去菌丝,平板稀释法涂布后计数,再用无菌水将孢子浓度调至 $2 \times 10^3$ 个/mL,4℃保存备用。

### 1.5 S26发酵液对水霉孢子萌发的抑制作用

采用平板扩散法<sup>[16]</sup>,在PDA平板中央打一孔(孔径8mm),孔中加200μL S26发酵液,28℃培养1d后在孔四周均匀涂布水霉孢子液,对照组中加200μL无菌PDA液体培养基,28℃培养并观察水霉生长情况,当对照板中水霉长满整个平板时,测量记录实验平板中抑菌圈的大小。

### 1.6 浓缩液对水霉菌丝的抑制作用及其稳定性测定

**1.6.1 5倍无菌浓缩液制备:**取1.3中收集到的S26发酵液无菌上清20mL,经真空冷冻干燥机浓缩后,无菌水调至原始体积的1/5,再经0.22μm孔径的无菌滤膜过滤,收集备用。

**1.6.2 5倍浓缩液对水霉菌丝的抑制作用:**采用1.5中的平板扩散法,在中央空穴中加入200μL 5倍浓缩液,在四周接种4块水霉琼脂块,对照板中加入200μL浓缩5倍的无菌培养基,3个平行,28℃

培养并观察水霉生长情况。另外,设置阳性实验组,阳性实验组中加入经 2 倍梯度稀释后不同浓度的孔雀石绿 200  $\mu\text{L}$ , 每组 3 个平行, 28  $^{\circ}\text{C}$  培养并观察水霉生长情况。

**1.6.3 5 倍浓缩液热稳定性测定:** 取 5 倍浓缩液 1 mL 加入 1.5 mL 的 EP 管中, 分别在 40、60、80 和 100  $^{\circ}\text{C}$  温度下处理 30 min, 对照组为 5 倍浓缩液不做处理, 平板扩散法测量其对水霉菌丝生长的抑制效果, 每个温度重复 3 次。

**1.6.4 蛋白酶稳定性测定:** 取 5 倍浓缩液 1 mL 加入 1.5 mL 的 EP 管中, 向 EP 管中加入蛋白酶 K (PK) 或者胰蛋白酶 (Trypsin, 终浓度为 30 U/mL), 37  $^{\circ}\text{C}$  处理 1 h, 对照组为 5 倍浓缩液不做处理, 平板扩散法检测其对水霉菌丝生长的抑制效果, 重复 3 次。

**1.6.5 酸碱稳定性测定:** 将 5 倍浓缩液分装在 5 mL EP 管中, 用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 分别调整 pH 值至 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 和 11.0, 25  $^{\circ}\text{C}$  静置 12 h, 再分别将各管中的 pH 值缓慢调回至初试 pH 值 (初试 pH 值为 7.2), 对照组为 5 倍浓缩液不做处理。平板扩散法检测处理和未处理浓缩液对水霉菌丝生长的抑制效果, 每个 pH 值重复 3 次。

## 1.7 S26 发酵液无菌上清对水霉孢子萌发的影响

采用 96 孔板法<sup>[17]</sup>进行实验。以 S26 无菌发酵液 5 倍浓缩液作为原液, 对其进行 2 倍梯度稀释, 得到浓度分别为 50%、25%、12.5%、6.25%、3.125%、1.562 5% 和 0.781 25% 的稀释液。而后, 向 96 孔板中加入 100  $\mu\text{L}$  不同稀释倍数的无菌发酵液, 空白对照组加入 100  $\mu\text{L}$  无菌水, 另外每孔再加入 100  $\mu\text{L}$  PDA 液体培养基和 100  $\mu\text{L}$  水霉孢子 (孢子浓度为  $2 \times 10^3$  个/mL), 3 个平行组。28  $^{\circ}\text{C}$  培养并观察水霉孢子萌发情况。

## 1.8 S26 分子生物学鉴定

提取 S26 菌株 DNA, PCR 通用引物<sup>[18]</sup>: 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1492R: 5'-TACGTTACCTTGTTACGACTT-3'。反应体系

(25  $\mu\text{L}$ ): ddH<sub>2</sub>O 16.75  $\mu\text{L}$ , 10 $\times$ Ex-buffer 2.5  $\mu\text{L}$ , dNTP mix (2.5 mmol/L) 2  $\mu\text{L}$ , Ex-Taq 酶 (5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ , 引物 27F (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ , 引物 1492R (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ , 模板 1.0  $\mu\text{L}$ , DMSO (5%) 1.25  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  40 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  40 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  2 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。所得 PCR 产物经纯化后通过 T/A 克隆到 pMD18 载体, 而后转入 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞, 蓝白斑筛选鉴定阳性克隆, 菌液送至深圳华大基因科技有限公司完成 DNA 测序。将测得的 16S rRNA 基因序列在 Eztaxon 专业数据库 (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>)<sup>[19]</sup> 中进行同源比对, 再通过邻接法 (Neighbor-Joining, N-J 法) 构建系统进化树, 并自举分析 (Bootstrap) 进行置信度检测, 自举数据集 1 000 次, 初步确定拮抗菌可能的属和种。

## 2 结果与分析

### 2.1 拮抗菌株筛选

采用稀释涂布法从海底沉积物中共分离得到数十株放线菌, 而后通过平板对峙法从中初筛到 5 株水霉拮抗放线菌, 其中, S26 菌株拮抗作用最强, 最终的平板对峙抑制距离为 19.75 mm $\pm$ 0.28 mm (图 1)。

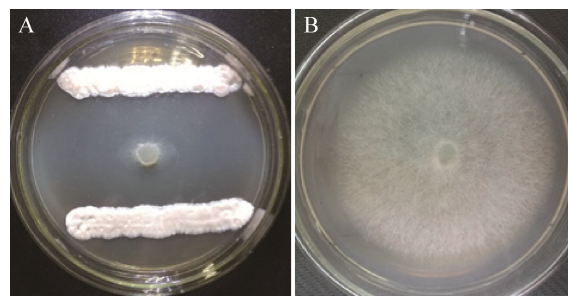


图 1 S26 对水霉的拮抗作用

Figure 1 The antagonistic effect of S26 on *Saprolegnia* sp. hyphal growth

注: A: S26 对水霉有明显抑制作用; B: 对照组水霉正常生长。

Note: A: *Saprolegnia* sp. hyphal growth was inhibited by S26; B: The hyphal grew well in the control group.

## 2.2 海洋放线菌 S26 发酵液对水霉孢子萌发生长的抑制作用

采用平板扩散法鉴定 S26 发酵液对水霉孢子萌发的抑制作用。如图 2 所示, 在 PDA 平板空穴中加入 200  $\mu\text{L}$  S26 发酵原液, 即在空穴周围形成直径为  $32.00\text{ mm}\pm 0.81\text{ mm}$  的抑菌圈(孔径 8 mm), 该结果说明 S26 发酵液对水霉孢子萌发生长具有较强的抑制作用, 对照平板长满了水霉菌。

## 2.3 海洋放线菌 S26 浓缩无菌发酵液对水霉菌丝的抑制作用分析

**2.3.1 5 倍浓缩无菌发酵液对水霉菌丝的抑制效果:** 在 PDA 平板上, S26 无菌发酵液的 5 倍浓缩液对水霉菌丝生长的抑制效果显著, 在中央孔穴周围形成直径为  $39.75\text{ mm}\pm 0.5\text{ mm}$  的抑菌圈(孔径 8 mm), 对照已长满菌丝(图 3)。阳性实验组中孔雀石绿浓度为 100 mg/L 时其平板抑菌圈直径为  $36.16\text{ mm}\pm 0.28\text{ mm}$  (孔径 8 mm, 结果未列出)。实验结果说明, S26 菌株对水霉生长的抑制作用来源于 S26 生长过程中分泌到胞外的活性代谢产物, 该抑制作用与营养竞争无关。采用未经浓缩的无菌发酵液进行该实验仅得到直径小于 11 mm 的抑菌圈, 抑菌圈过小将影响测量及分析的准确性, 因此本研究中凡涉及无菌发酵液的实验均采用 5 倍浓缩液进行。

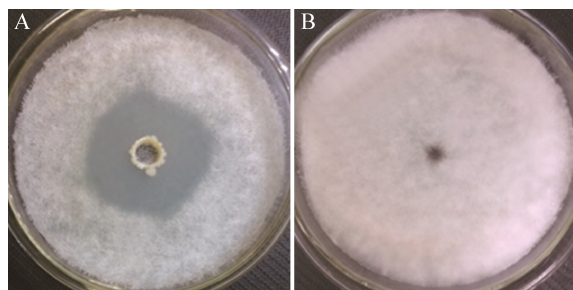


图 2 S26 发酵液对水霉孢子萌发生长的抑制效果

**Figure 2 Inhibitory effect of S26 fermentation broth on *Saprolegnia* spores germination**

注: A: 菌孔周围孢子萌发受到抑制; B: 对照组中水霉孢子正常萌发生长。

Note: A: Inhibition zone of S26 fermentation broth against *Saprolegnia* spores germination; B: Spores germinated and grew well in the control group.

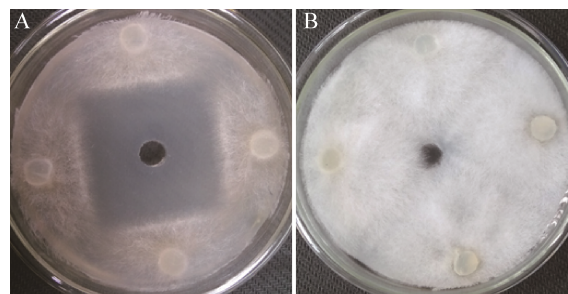


图 3 5 倍浓缩无菌发酵液对水霉菌丝的抑制效果

**Figure 3 Inhibitory effect of the 5 times concentrated S26 cell-free culture broth on *Saprolegnia* sp. hyphal growth**

注: A: 5 倍浓缩液对水霉菌丝有明显抑制作用; B: 对照组水霉正常生长。

Note: A: Hyphal growth inhibited by 5 times concentrated S26 cell-free culture broth; B: The hyphal grew well in the control group.

**2.3.2 水霉拮抗活性物质的热稳定性研究:** 为鉴定 S26 菌株所产拮抗水霉活性物质的热稳定性, 本研究将 S26 发酵 5 倍浓缩液经不同温度处理后, 检测其抑菌活性。如图 4 所示, 40  $^{\circ}\text{C}$  处理样品与对照相比在拮抗水霉活性上无显著性差异。而经 60、80 和 100  $^{\circ}\text{C}$  处理后, 样品的抑菌活性显著降低, 而且, 与对照相比的活性差异随着温度的升高而逐渐增大。尽管 100  $^{\circ}\text{C}$  的高温处理使拮抗物质的活性降低了近 35.85%, 但是在平板抑菌实验中仍出

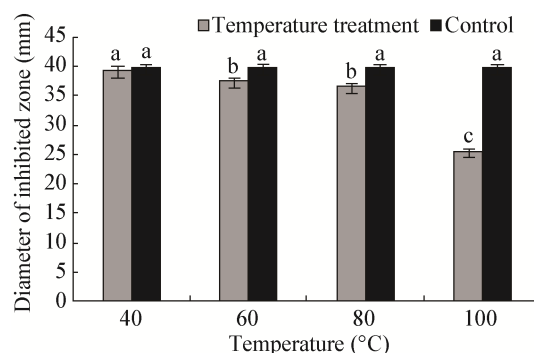


图 4 温度对抑菌活性的影响

**Figure 4 Temperature-sensitivity test of the antifungal molecule(s)**

注: 标有相同字母的表示差异不显著, 标有不同字母的表示差异显著( $P<0.05$ ).

Note: The lower-case letters above the bars indicate significant differences ( $P<0.05$ ) between different letters or no significant differences ( $P>0.05$ ) between the same letters.



现了直径为  $25.50 \text{ mm} \pm 0.05 \text{ mm}$  的抑菌圈, 即仍保有很强的抑菌活性, 该实验结果说明水霉拮抗活性物质对高温有较强的耐受性。

**2.3.3 蛋白酶稳定性测定:** 5 倍浓缩发酵液经蛋白酶 K (PK) 及胰蛋白酶 (Trypsin) 处理后, 对水霉抑制效果分别有 16.35% 及 4.40% 的减弱 (图 5), 说明水霉拮抗活性成分对蛋白酶部分敏感。

**2.3.4 酸碱稳定性测定:** 由图 6 可知, 经平板扩散法检测 (孔径 8 mm), 5 倍浓缩发酵液在 pH 为 7.0

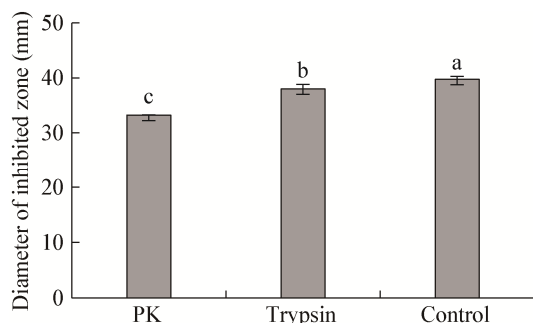


图 5 蛋白酶对抑菌活性的影响

Figure 5 Effect of proteases on antimicrobial activity

注: 标有相同字母的表示差异不显著, 标有不同字母的表示差异显著 ( $P < 0.05$ ).

Note: The lower-case letters above the bars indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between different letters or no significant differences ( $P > 0.05$ ) between the same letters.

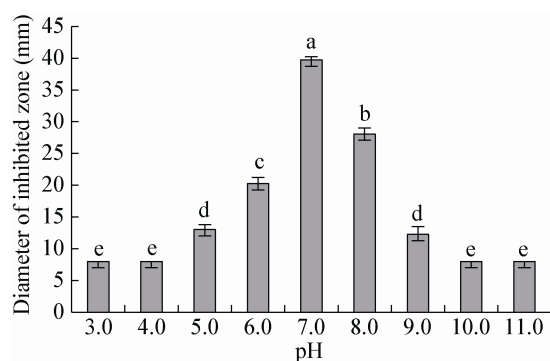


图 6 pH 值对抑菌活性的影响

Figure 6 Effect of pH on antifungal activity

注: 标有相同字母的表示差异不显著, 标有不同字母的表示差异显著 ( $P < 0.05$ ).

Note: The lower-case letters above the bars indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between different letters or no significant differences ( $P > 0.05$ ) between the same letters.

时, 表现出最强的抑菌活性, 说明中性环境最有利于该物质发挥水霉拮抗作用。然而在其他酸性或碱性条件下, 抑菌活性均明显降低, 尤其当 pH 值小于 5.0 或者大于 9.0 时, 水霉拮抗活性完全消失, 说明活性物质对极端酸碱条件较为敏感。

## 2.4 S26 发酵液无菌上清对水霉孢子萌发的影响

将 5 倍浓缩无菌上清液做 2 倍梯度稀释, 检测抑制水霉孢子萌发的最低稀释百分比。将无菌上清液稀释至原活性的 3.125% (Lane 6) 仍能有效抑制水霉孢子的萌发, 而继续稀释则无抑制效果 (图 7)。所以, 3.125% 被认为是 5 倍浓缩无菌上清对孢子萌发抑制的最低稀释百分数。

## 2.5 16S rRNA 基因序列分析

测序得到长度为 1 446 bp 的 16S rRNA 基因序列 (GenBank 登录号为 KP792283)。将其在 Eztaxon 专业数据库中进行同源比对, 结果显示 S26 菌株与链霉菌属 (*Streptomyces*) 菌株高度相关, 即 S26 属于放线菌门中的链霉菌属 (*Streptomyces*)。采用邻接法 (Neighbor-Joining, N-J 法) 构建系统发育树, S26 菌株与紫色链霉菌 (*S. violaceus*) 聚为一支, 显示出较近的亲缘关系 (图 8)。

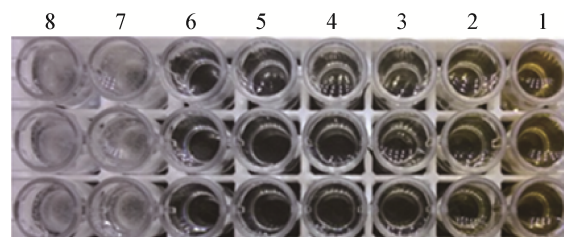


图 7 不同浓度发酵液无菌上清对水霉孢子萌发的影响

Figure 7 Inhibitory effects of double diluted S26 cell-free culture supernatants on the germination of *Saprolegnia* spores

注: 1、2、3、4、5、6、7 和 8 分别代表抑菌活性为原 5 倍浓缩液活性的 100%、50%、25%、12.5%、6.25%、3.125%、1.562 5% 和 0.781 25% 的稀释液。

Note: 1–8 was added with the diluted S26 cell-free culture supernatants, covering 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125%, 1.562 5% and 0.781 25% of the inhibitory activities of the 5 times concentrated supernatants, respectively.

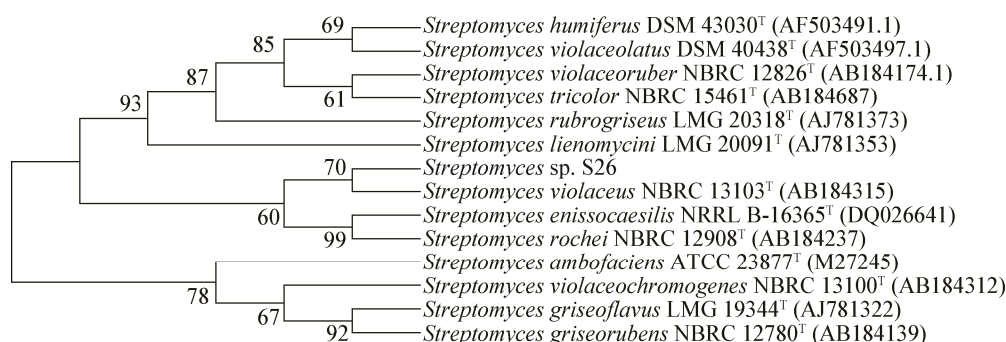


图 8 基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株 S26 系统发育树

Figure 8 Phylogenetic Neighbour-Joining tree based on the 16S rRNA gene sequences

注: 分支点上的数字表示构建系统树时 1 000 次计算时形成该节点的百分比; 括号内为菌株的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中的登录号。

Note: Numbers at the branch nodes are bootstrap values, expressed as percentages of 1 000 replicates. Numbers in parentheses represent the accession numbers in the GenBank for the 16S rRNA gene sequences of those type strains.

### 3 讨论

本研究从海洋放线菌中筛选水霉拮抗菌株。海洋放线菌代谢产物结构多样, 功能独特, 近几年来一直是研究的热点, 越来越多的结构新颖、功能多样的活性物质被发现, 但大部分代谢产物的活性评价指标仅局限于抗肿瘤活性的研究上, 相对忽略了其他活性指标的研究<sup>[20]</sup>。海洋放线菌对水霉拮抗作用的研究还没有相关报道, 但在海洋放线菌拮抗真菌方向有相关研究报道, 如: Ambavane 等<sup>[21]</sup>研究了一种分离自海洋放线菌的抗真菌化合物浅蓝霉素 A (Caerulomycin A), 该化合物对真菌有很强的抗性; Arasu 等<sup>[22]</sup>研究了海洋放线菌 AP-123 代谢产物中聚酮化合物抗真菌的活性。这些研究报道都说明了海洋放线菌在抗真菌方面有很好的活性, 本文也证实了这一点。

本研究分离的 S26 菌株对水霉生长有很好的抑制效果(图 1-3)。其 5 倍浓缩发酵液对水霉菌丝生长的抑制作用与 100 mg/L 孔雀石绿产生的抑制效果相当, 在实际应用过程中孔雀石绿的有效用药浓度为 0.1-0.2 mg/L<sup>[3]</sup>, 由此推测低浓度的 S26 菌株发酵液在生产中也有良好的防治水霉病效果, 应用前景广阔。经 16S rRNA 基因序列比对实验可知 S26 属于链霉菌属(*Streptomyces*, 图 8), 而该属菌

株以善产活性次级代谢产物著称, 全基因组序列分析结果显示, 几乎每一株链霉菌都有生产少至数种、多至数十种活性代谢物的潜力<sup>[23-24]</sup>, 而且一种链霉菌可针对某类病原菌生产多种不同的拮抗活性物质。如 Seipke 等曾报道一株蚁类共生链霉菌可生产杀念菌素(Candicidin)、抗霉素(Antimycin)等多种抗真菌类活性物质<sup>[25]</sup>。本研究选用的链霉菌株 S26 的发酵液活性成分对温度有较强的耐受性, 而对蛋白酶部分敏感(图 4-5), 以上特点说明 S26 所产水霉拮抗活性物质至少由多肽和非多肽两类不同代谢物组成。除耐温度变化的特点外, 拮抗活性物质在 pH 6.0-8.0 区间范围内保有良好的抑菌效果(图 6)。有研究数据显示, 淡水养殖的温度变化区间为 0-34.6 °C<sup>[26]</sup>, pH 变化区间为 6.8-8.5<sup>[27]</sup>。S26 无菌发酵液在温度和 pH 稳定性方面的特点能较好适应水产养殖的环境变化, 实际应用前景乐观。另外, S26 发酵液无菌上清对水霉孢子有明显的抑制效果(图 2), 说明水霉孢子对该活性物质比较敏感, 可以考虑利用抑制水霉孢子萌发达到防治水霉病的目的。为验证 S26 菌株在水产养殖业中的应用性, 本研究将继续进行水霉病防治效果的在体试验及活性物质的分离、提纯和结构鉴定。

## 参考文献

- [1] Huang QY. Aquatic Animal Diseases[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2004: 142 (in Chinese)  
黄琪琰. 水产动物疾病学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2004: 142
- [2] Wang XY. The preventive and treatments of the saprolegniasis in fish[J]. Hebei Fishery, 2010(6): 29-30 (in Chinese)  
王新叶. 鱼类水霉病的防治与治疗[J]. 河北渔业, 2010(6): 29-30
- [3] Zhai YX, Guo YY, Geng X, et al. Advances in studies on metabolic mechanism and bio-toxicity of malachite green[J]. Periodical of Ocean University of China, 2007, 37(1): 27-32 (in Chinese)  
翟毓秀, 郭莹莹, 耿霞, 等. 孔雀石绿的代谢机理及生物毒性研究进展[J]. 中国海洋大学学报, 2007, 37(1): 27-32
- [4] Hussein MMA, Hatai K. *In vitro* inhibition of *Saprolegnia* by bacteria isolated from lesions of salmonids with saprolegniasis[J]. Fish Pathology, 2001, 36(2): 73-78
- [5] Lategan MJ, Torpy FR, Gibson LF. Control of saprolegniosis in the eel *Anguilla australis* Richardson, by *Aeromonas media* strain A199[J]. Aquaculture, 2004, 240(1): 19-27
- [6] Lategan MJ, Torpy FR, Gibson LF. Biocontrol of saprolegniosis in silver perch *Bidyanus bidyanus* (Mitchell) by *Aeromonas media* strain A199[J]. Aquaculture, 2004, 235(1): 77-88
- [7] Lei CX, Xu DL, Zhang QZ. Screening of antagonistic bacterium strain against *Saprolegnia* sp. and the preliminary study of the antagonistic substance[J]. Ecological Science, 2013, 32(2): 190-194 (in Chinese)  
雷翠霞, 许德麟, 张其中. 水霉拮抗菌的筛选与拮抗物特点初步分析[J]. 生态科学, 2013, 32(2): 190-194
- [8] Liu J, Xiang C, Yuan XL, et al. Analysis of metabolic antagonists *Saprolegnia* by antagonistic bacteria HJ010[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(4): 234-236, 240 (in Chinese)  
刘俊, 向葱, 袁雪林, 等. 水霉拮抗菌 HJ010拮抗物质代谢分析[J]. 食品工业科技, 2012, 33(4): 234-236, 240
- [9] Zhang SJ, Yang XL, Li D, et al. Screening of antagonistic bacterium strain against saprolegniosis and the preliminary study of *in vitro* antagonistic activity[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2008, 32(3): 301-307 (in Chinese)  
张书俊, 杨先乐, 李聃, 等. 水霉拮抗菌的筛选及其拮抗作用的初步研究[J]. 水生生物学报, 2008, 32(3): 301-307
- [10] Lü LQ, Liu LL, Wang H, et al. The potential of a *Bacillus* strain as the biological source of pharmaceutical compound against saprolegniasis[J]. Fishery Modernization, 2010, 38(4): 31-34 (in Chinese)  
吕利群, 刘丽玲, 王浩, 等. 一株芽孢杆菌用作水霉病防治的研究[J]. 渔业现代化, 2010, 38(4): 31-34
- [11] Liu LL, Lu FP, Liu H, et al. Selection of antagonistic bacteria for *Saprolegnia parasitica* and isolation of its antibiotic protein[J]. Journal of Tianjin University of Science and Technology, 2011, 26(4): 18-21 (in Chinese)  
刘莉莉, 路福平, 刘浩, 等. 拮抗水霉菌株的筛选及抑菌蛋白的分离纯化[J]. 天津科技大学学报, 2011, 26(4): 18-21
- [12] Song ZF, Fan B, Tang L, et al. Selection and molecular biological identification of a *Bacillus* sp. strain to inhibit the growth of *Saprolegnia ferax*[J]. Freshwater Fisheries, 2012, 42(3): 28-31 (in Chinese)  
宋增福, 范斌, 唐磊, 等. 一株具水霉抑制特性的芽孢杆菌筛选及其分子生物学鉴定[J]. 淡水渔业, 2012, 42(3): 28-31
- [13] Hobbs G, Frazer CM, Gardner DCJ, et al. Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1989, 31(3): 272-277
- [14] Kuster E, Williams ST. Selection of media for isolation of streptomycetes[J]. Nature, 1964, 202: 928-929
- [15] Zhao PJ, Fan LM, Li GH, et al. Antibacterial and antitumor macrolides from *Streptomyces* sp. Is9131[J]. Archives of Pharmacal Research, 2005, 28(11): 1228-1232
- [16] Brantner A, Pfeiffer KP, Brantner H. Applicability of diffusion methods required by the pharmacopoeias for testing antibacterial activity of natural compounds[J]. Die Pharmazie, 1994, 49(7): 512-516
- [17] Balhara M, Ruhil S, Kumar M, et al. An anti-*Aspergillus* protein from *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ : putative inhibitor of siderophore biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*[J]. Mycoses, 2014, 57(3): 153-162
- [18] Jiang H, Dong H, Zhang G, et al. Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athalassohaline lake in northwestern China[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(6): 3832-3845
- [19] Kim OS, Cho YJ, Lee K, et al. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012, 62(3): 716-721
- [20] Wang HY, Liu J, Zhao SJ. Research progress in biodiversity and metabolites of marine actinomycetes[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2010, 29(1): 67-74 (in Chinese)  
王海雁, 刘健, 赵淑江. 海洋放线菌多样性及其代谢产物研究进展[J]. 中国海洋药物杂志, 2010, 29(1): 67-74
- [21] Ambavane V, Tokdar P, Parab R, et al. Caerulomycin A-an antifungal compound isolated from marine actinomycetes[J]. Advances in Microbiology, 2014, 4(9): 567-578
- [22] Arasu MV, Duraipandiyan V, Ignacimuthu S. Antibacterial and antifungal activities of polyketide metabolite from marine *Streptomyces* sp. AP-123 and its cytotoxic effect[J]. Chemosphere, 2013, 90(2): 479-487
- [23] Tang J, Liu X, Peng J, et al. Genome sequence and genome mining of a marine-derived antifungal bacterium *Streptomyces* sp. M10[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(6): 2763-2772
- [24] Zhang H, Wang H, Wang Y, et al. Genomic sequence-based discovery of novel angucyclinone antibiotics from marine *Streptomyces* sp. W007[J]. FEMS Microbiology Letters, 2012, 332(2): 105-112
- [25] Seipke RF, Barke J, Brearley C, et al. A single *Streptomyces* symbiont makes multiple antifungals to support the fungus farming ant *Acromyrmex octospinosus*[J]. PLoS One, 2011, 6(8): e22028
- [26] Liu HL. Biology on Aquaculture[M]. Beijing: Science Press, 2014: 36-37 (in Chinese)  
刘焕亮. 水产养殖生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2014: 36-37
- [27] Yang H, Shao Q, Li HQ, et al. Regulation and Management of Water Quality in Freshwater[M]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences Press, 2005: 98 (in Chinese)  
杨洪, 邵强, 李好琴, 等. 淡水养殖水体水质的调控和管理[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2005: 98