

一株鲢鱼肠道中嗜水气单胞菌拮抗菌株的 筛选、鉴定及特性

洪 军, 白玉珍, 马肖梦, 韩 莎, 孔 丽

(河南城建学院 生命科学与工程学院, 河南 平顶山 467036)

摘要: 从鲢鱼肠道中筛选嗜水气单胞菌的拮抗菌株, 并对生长培养条件进行研究, 以期鲢鱼养殖过程中嗜水气单胞菌病的生物防治提供理论依据。通过对鲢鱼肠道中嗜水气单胞菌拮抗菌株的分离、筛选, 并对其中拮抗作用较稳定的菌株进行生理生化、分子鉴定以及生长培养特性优化。经过多次筛选得到了 15 株拮抗效果较好的目标菌株, 其中拮抗作用较稳定的 S4 为气单胞菌属, 是偏碱性革兰氏阴性短杆菌; 通过单因素和正交实验表明, S4 最佳生长培养条件为 1.5 g/dL 淀粉, 1.5 g/dL 牛肉膏, 1 g/dL 氯化钙, 32 ℃, pH 8.5, 接种体积分数 3%。研究结果为嗜水气单胞菌的防治及拮抗菌 S4 的应用提供理论依据。

关键词: 嗜水气单胞菌; 鲢鱼; 拮抗作用; 菌株鉴定; S4; 生长培养条件

中图分类号: TQ 920.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2016)12—1285—07

Screening, Identification and Properties of One Antagonistic Strain Against *Aeromonas hydrophila* from *Hypophthalmichthys molitrix* Intestinal Tract

HONG Jun, BAI Yuzhen, MA Xiaomeng, HAN Sha, KONG Li

(College of Life Science and Engineering, Henan University of Urban Construction, Pingdingshan 467036, China)

Abstract: In order to provide the theory basis for prevention and treatment the disease caused by *Aeromonas hydrophila* in the process of *Hypophthalmichthys molitrix* breeding, the strains which have the strong and stable abilities against *A. hydrophila* from *H. molitrix* intestinal tract were screened and their growth and culture conditions were studied. Antagonistic strains against *A. hydrophila* were separated and screened from *H. molitrix* intestinal tract. Then, the physiological and biochemical, molecular identification and the optimization of growth conditions of the stable antagonistic bacterium were determined. After many times of screening, 15 antagonistic strains were got. Among them, the more stable antagonistic bacterium is number S4, which was an alkaline

收稿日期: 2015-02-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(31540060); 2014 年度河南城建学院大学生科技创新基金项目; 河南城建学院博士启动基金项目。

作者简介: 洪 军(1977—), 女, 河南商丘人, 农学博士, 副教授, 主要从事抗微生物菌剂的研发及多肽作用机理方面的研究。

E-mail: hongjun@hncj.edu.cn

Gram-negative bacillus brevis bacteria and belonged to *Aeromonas* genus. Orthogonal test indicated that the optimal growth conditions were 1.5 g/dL starch, 1.5 g/dL beef extract, 1 g/dL CaCl_2 , 32 °C, pH 8.5 and inoculation quantity 3%. The results provide the theoretical basis for the prevention of *A. hydrophila* and the application of antagonistic bacterium S4.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, *Hypophthalmichthys molitrix*, antagonistic effect, strains identification, S4, growth and culture conditions

我国淡水资源丰富,鲢鱼是我国四大淡水鱼之一,产量最高^[1]。嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是淡水养殖鱼类暴发性传染病的主要病原菌之一,它能引发多种水生动物的传染病,导致水产动物的出血症,给养殖业造成严重的经济损失^[2]。治疗该菌引发的疾病主要使用化学药物、抗生素、中草药提取物等^[3-4],如应用大量抗生素,虽然在一定时期内取得了令人满意的效果,但因抗生素易产生耐药、药物残留及毒副作用,长期在动物饲料中添加和滥用抗生素不仅影响动物和人类的健康,而且还导致“超级病菌”的出现,威胁着人类的生存。因此探索利用有益微生物进行生物防治成为必然。目前已有许多关于通过分离筛选拮抗微生物进行防治水产细菌性病害的报道,且取得较好的效果^[5-6]。生物防治作为综合防治水产病害的措施之一正倍受关注,它符合环境保护和有机化食品的要求,对生态平衡和农业的可持续发展具有特别重要的意义。

目前关于从鲢鱼体内分离筛选拮抗嗜水气单胞菌菌株及相关研究未见报道。因此,作者拟以平顶山白龟山水库中野生的鲢鱼为研究对象,从其肠道粘膜中分离菌株进行筛选,以致病性鲢鱼嗜水气单胞菌为指示菌,采用滤纸片法和打孔法等分离拮抗效果好、遗传稳定的菌株进行生理生化和16S rRNA分子鉴定以及生长培养特性优化,旨在为鲢鱼养殖过程中嗜水气单胞菌病的生物防治和将来商品化的拮抗微生物制剂的制备提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验菌:鲢鱼肠道单菌;病原菌:嗜水气单胞菌(XS91-4-1),从患出血性败血症的鲢鱼中分离,购于中科院水生研究所;试验用鱼:来自平顶山白龟

山水库中野生健康鲢鱼;培养基:营养琼脂和营养肉汤,其中营养肉汤在培养条件优化实验中,作为基础培养基使用;指示菌:金黄色葡萄球菌(ATCC25922)、大肠杆菌(ATCC25922)、嗜水气单胞菌(GIM1.172)、绿脓杆菌(CCTCC2620)、巨大芽孢杆菌(CICC0.217)、F41;均由作者所在实验室保存。

1.2 实验方法

1.2.1 鲢鱼肠道中微生物的分离 参照蒋启欢^[7]等的方法,在无菌条件下用解剖刀刮取除肠道内容物后,用无菌生理盐水冲洗3次,然后用解剖剪将肠道剪短,用研磨器研碎,并加无菌生理盐水适量,振荡均匀后静置,取上层液。将上层液按 10^0 、 10^1 、 10^2 倍梯度稀释,取稀释液各100 μL 用涂布棒均匀涂布平板,最后将平板分别倒置,37 °C培养24~36 h。选择合适稀释度的平板,挑取可疑菌落进行平板划线,并经多次划线得到纯化细菌。

1.2.2 拮抗菌株的筛选 采用琼脂平板扩散法^[8],将病原性嗜水气单胞菌培养过夜,调整菌液密度为 10^7 CFU/mL,取100 μL 涂布于营养琼脂平板上,打孔,取疑似拮抗菌株50 μL 加入孔中,再置于28 °C培养24 h,观察孔穴周围是否产生抑菌圈,对产生抑菌圈的菌落进行分离纯化,反复筛选后-80 °C超低温冰箱保存。

1.2.3 拮抗菌株的抗菌谱测定 采用琼脂平板扩散法^[9],将指示菌(大肠杆菌、绿脓杆菌等)培养过夜后,调整菌液密度为 10^7 CFU/mL,取100 μL 涂布于营养琼脂平板上,打孔,分别向各孔中加入培养20 h的拮抗菌液50 μL ,每个样品做3个重复,用空白培养基作对照。分别在37 °C或28 °C下培养24 h,测量孔穴周围抑菌圈直径。

1.2.4 拮抗菌生理生化鉴定及分子鉴定

1)拮抗菌生理生化鉴定:参照《伯杰氏细菌鉴定手册》(第八版)^[9],将筛选到的菌株进行鉴定。鉴

定项目包括形态观察、革兰氏染色、各项生理生化指标等。

2)分子鉴定:从拮抗菌中选取其中一株 S4,对其 16S rDNA 基因序列的测定及系统发育树的构建,测序所需的上游引物 Seq forward (5'-GAGCGGATAACAATTTTCACACAGG-3') 和下游引物 Seq reverse (5'-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3')由生工生物工程(上海)股份有限公司提供,该公司同时协助完成测序工作。所得序列提交到 NCBI 的 RefSeq 数据库中进行 BLAST 分析,搜集相似序列,然后用 MEGA5.1 软件中的 N-J 法(Neighbor-joining)构建系统发育树,设置自展值为 1 000。

1.2.5 拮抗菌株 S4 培养特性研究

1)生长曲线的测定:参照 Niall 等^[10]的方法。待测菌 S4 和嗜水气单胞菌于营养肉汤中培养 20 h 后,取 10 μ L 菌液分别加入含 250 μ L 营养肉汤的 96 孔板各孔中,每个样品做 6 个平行,以空白培养基作对照。将 96 孔板分别置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养,转速 80 r/min,每隔 1 小时用酶标仪测定各孔 OD₆₃₀ 值,连续测定 32 h,根据 OD₆₃₀ 值绘制生长曲线。

2)最佳接种体积分数的确定:将拮抗菌按 1%、2%、3%、4%、5%、6% 的接种体积分数接种于装有 5 mL 营养肉汤的试管中,于 37 $^{\circ}$ C、160 r/min 培养 16 h 后,取 200 μ L 加入 96 孔板各孔中用酶标仪测定各孔 OD₆₃₀ 值,每个处理作 6 个重复。

3)最佳碳源的确定:在基础培养基中,按 1 g/dL 分别添加淀粉、甘露醇、麦芽糖、乳糖、果糖、葡萄糖制成培养基,分别按最佳接种体积分数接种,于 37 $^{\circ}$ C、160 r/min 培养 16 h 后,取 200 μ L 加入 96 孔板各孔中,用酶标仪测定各孔 OD₆₃₀ 值,每个处理作 6 个重复。

4)最佳氮源的确定:添加选出的最佳碳源,分别用 1 g/dL 的酵母浸粉、蛋白胨、牛肉膏、硫酸铵、亚硝酸钠作氮源替换蛋白胨和牛肉膏制成培养基,分别按最佳接种体积分数接种,于 37 $^{\circ}$ C、160 r/min 培养 16 h 后,取 200 μ L 加入 96 孔板各孔中,用酶标仪测定各孔 OD₆₃₀ 值,每个处理作 6 个重复。

5)无机盐的选择:用上述实验获得的最佳碳源和氮源来替换基础培养基中碳源和氮源,选择磷酸氢二钾(K₂HPO₄·3H₂O)、硫酸镁、氯化钙、氯化钠 4 种不同的无机盐替换氯化钠,分别以 1%制成培养

基后,分别按最佳接种体积分数接种,于 37 $^{\circ}$ C、160 r/min 培养 16 h 后,取 200 μ L 加入 96 孔板各孔中用酶标仪测定各孔 OD₆₃₀ 值,每个处理作 6 个重复。

6)最适初始 pH 值的确定:用最佳碳源、氮源、无机盐,制成优化培养基,将拮抗菌分别按最佳接种体积分数分别接种于 pH 值为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.5 的制成优化培养基中,于 37 $^{\circ}$ C、160 r/min 培养 16 h 后,取 200 μ L 加入 96 孔板各孔中用酶标仪测定各孔 OD₆₃₀ 值,每个处理作 6 个重复。

7)最佳培养温度的确定:待测菌 S4 培养 16 h 后,分别按最佳接种体积分数接种于最适 pH 的优化培养基中,分别于 20、28、37、42 $^{\circ}$ C 且转速为 160 r/min 培养 16 h 后,取 200 μ L 加入 96 孔板各孔中用酶标仪测定各孔 OD₆₃₀ 值,每个处理作 6 个重复。

8)优化条件的正交试验:在单因素的基础上选取对拮抗菌 S4 影响较大的温度、氯化钙、淀粉、牛肉膏 4 个因素;按四因素三水平进行正交试验设计进一步优化 S4 的生长培养条件,采用正交软件对试验数据进行单因素方差分析及极差分析。若 $P < 0.05$,则表示有显著差异。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌株的筛选

从表 1 可知,从鲢鱼肠道中分离到 120 多个菌株,从中分离筛选获得 15 株对嗜水气单胞菌具有不同拮抗能力的拮抗菌株。其中 S12、S46 拮抗效果较好,但是在多次筛选的实验过程中 S4、S50 拮抗作用较稳定。

2.2 拮抗菌株的抗菌谱测定

从 15 株菌株中选取 3 株拮抗菌进行抗菌谱的测定,结果见表 2。其中 S4、S50 抗菌谱较窄,S941 抗菌谱较广。

2.3 拮抗菌 S4 生理生化及分子鉴定

菌株 S4 在普通营养琼脂培养基上培养 24 h 后,菌落边缘整齐、圆形、中央凸起、表面光滑、菌落湿润粘稠、呈乳白色。在油镜下观察呈短杆状,革兰氏染色后呈阴性,无芽孢。部分生理生化鉴定,结果见表 3。

经过测序,获得菌株 S4 的 16S rRNA 基因序列为 (1 490 bp): 在 GenBank 序列登录号为 KP340798,在 GenBank 数据库中通过 BLAST 方法比对,菌株 S4 与多株气单胞菌(*Aeromonas*

salmonicida) 的相似性达 99%~100%。采用 MEGA 5.1 软件用 N-J 法构建进化树, 可知 S4 与杀鲑气单胞菌杀鲑亚种 (*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449) 遗传距离最近, 相似度达 95%, 初步判断为此拮抗菌株为气单胞菌属, 见图 1。但是否为同一进化支, 将根据此菌的生长培养特性进一步探讨。

表 1 拮抗菌株对嗜水气单胞菌的抑制效果

Table 1 Inhibitory effect of antagonistic bacterial strains on *Aeromonas hydrophila*

菌株编号	抑菌圈直径/mm	抑菌能力
S4	7.16±0.1	++
S12	20.89±0.21	+++
S16	8.98±0.16	++
S17	3.63±0.17	+
S38	5.34±0.14	++
S46	18.69±0.16	+++
S50	5.42±0.11	++
S55	4.38±0.17	+
S61	9.56±0.15	++
S62	7.62±0.2	++
S66	3.11±0.14	+
S69	4.56±0.11	+
S79	6.04±0.21	++
S89	6.33±0.23	++
S941	2.52±0.15	+

注: 透明圈直径为减去打孔器直径 (6 mm)。抑菌能力: “+++” 表示: (10 mm < 抑菌直径); “++” 表示: (5 mm < 抑菌直径 < 10 mm); “+” 表示: (抑菌直径 < 5 mm)

表 2 抗菌谱的测定

Table 2 Determination of the antibacterial spectrum

指示菌	S4	S50	S941
F41	-	-	+
大肠杆菌	-	-	-
巨大芽孢杆菌	-	-	+
枯草芽孢杆菌	++	+++	-
金色葡萄球菌	-	-	+
嗜水气单胞菌 (GIM1.172)	-	-	+++
嗜水气单胞菌 (XS91-4-1)	+++	++	++

注: 透明圈直径: 为减去打孔器直径的直径。“+++” 表示: 透明圈直径 > 7.0 mm; “++” 表示: 5.0 mm < 透明圈直径 < 7.0 mm; “+” 表示: 1.0 mm < 透明圈直径 < 5.0 mm; “-” 表示: 透明圈直径 < 1.0 mm

表 3 拮抗菌株 S4 的部分生理生化特征

Table 3 Results of physiological and biochemical identification of antagonistic strains S4

实验项目	结果
革兰氏染色	-
乳糖	+
甘露醇	o
蔗糖	o
葡萄糖	o
甲基红试验	+
吲哚试验	+
V.P 试验	+
柠檬酸	+
H ₂ O ₂	+

注: “+” 表示阳性; “-” 代表阴性; “o” 代表产气

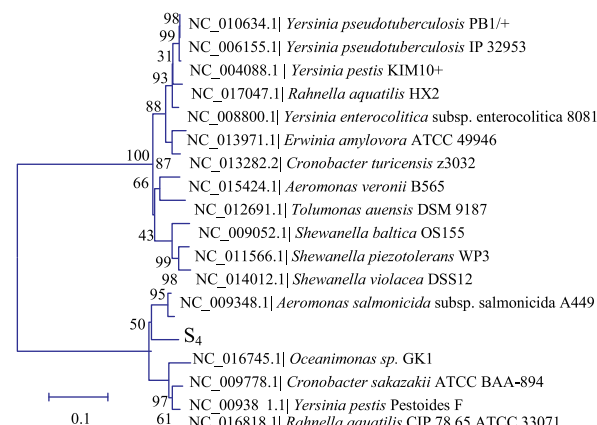


图 1 根据 16S rRNA 基因序列构建的系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences

2.4 S4 培养特性研究

2.4.1 生长曲线的测定 拮抗菌 S4 和嗜水气单胞菌的生长曲线见图 2。由图 2 可知, 此两种菌按 1% 接种体积分数接种于营养肉汤培养基中, 拮抗菌 S4 培养 14 h 后达到了稳定期, 而嗜水气单胞菌在培养 12 h 左右时达到了稳定期, 此后至 32 h 时均为稳定期。后续试验均按达到稳定期时培养 16 h 测定。

2.4.2 最佳接种体积分数的确定 由图 3 接种体积分数对拮抗菌 S4 的生长影响可知, 接种体积分数对 S4 的生长影响比较小, 但总的趋势为随接种体积分数的增加, 拮抗菌 S4 的生长密度先增大后减小, 最佳接种体积分数可以初步定为 3%。

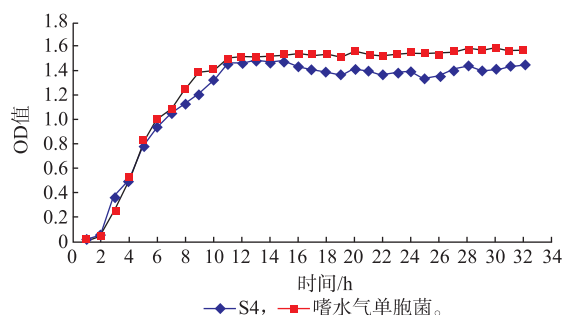


图 2 嗜水气单胞菌和 S4 的生长曲线

Fig. 2 Growth curve of *Aeromonas hydrophila* and S4

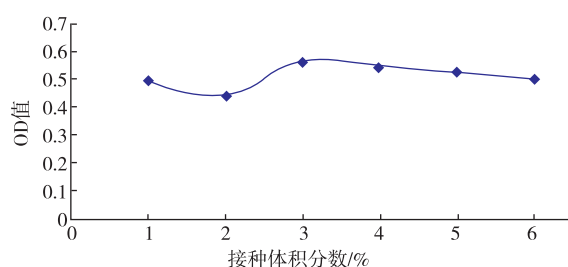


图 3 接种体积分数对拮抗菌 S4 生长的影响

Fig. 3 Effects of inoculum amount on S4 growth

2.4.3 碳源试验 由图 4 不同碳源对拮抗菌 S4 的生长影响可知,不同碳源对拮抗菌 S4 的生长影响差别相对比较小,其中效果较好的有:淀粉、甘露醇、蔗糖,且淀粉>甘露醇>蔗糖,最佳碳源为淀粉。

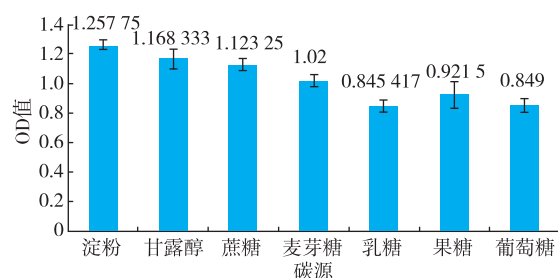


图 4 不同碳源对拮抗菌 S4 生长的影响

Fig. 4 Effects of different carbon sources on S4 growth

2.4.4 氮源试验 不同氮源对拮抗菌 S4 的生长影响见图 5。可知不同氮源对拮抗菌 S4 的生长影响比较大,依次为:牛肉膏>蛋白胨>酵母浸粉>尿素>硫酸铵>亚硝酸钠,其中蛋白胨、酵母浸粉、牛肉膏作为生长氮源较好。

2.4.5 无机盐的选择 不同无机盐对拮抗菌 S4 的生长影响见图 6。可知不同无机盐对拮抗菌 S4 的生长影响差异比较小,依次为:氯化钙>硫酸镁>磷酸氢二钾>氯化钠,最佳无机盐为氯化钙。

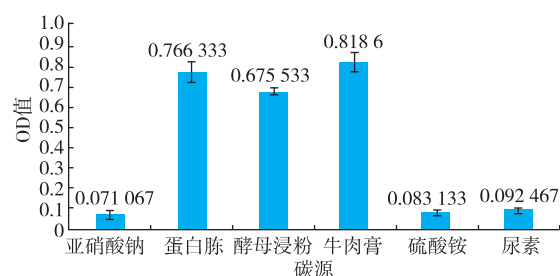


图 5 不同氮源对 S4 生长的影响

Fig. 5 Effects of different nitrogen sources on S4 growth

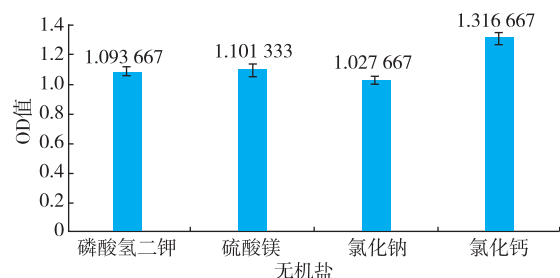


图 6 不同无机盐对拮抗菌 S4 生长的影响

Fig. 6 Effects of different inorganic salts on S4 growth

2.4.6 最适初始 pH 值的确定 用 1 g/dL 淀粉, 1 g/dL 牛肉膏, 1 g/dL 氯化钙分别调节 pH 值为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0 制成的优化培养基中,拮抗菌 S4 按 3%接种体积分数接种培养 16 h,不同 pH 对拮抗菌 S4 的生长影响见图 7。可知 pH 值对拮抗菌 S4 的生长影响比较大,最佳 pH 值为 8.5,表明此菌为嗜碱性细菌。

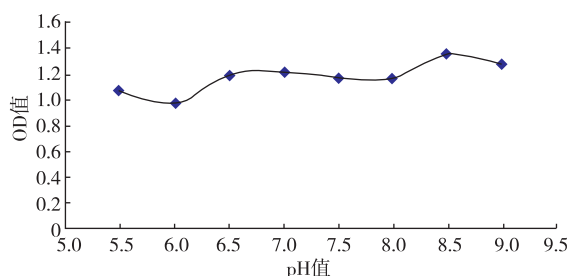


图 7 不同 pH 对拮抗菌 S4 生长的影响

Fig. 7 Effects of different pH on S4 growth

2.4.7 最佳培养温度的确定 不同温度对拮抗菌 S4 的生长影响见图 8。可知温度对拮抗菌 S4 的生长影响比较小,最佳温度为 37 ℃。

2.4.8 优化条件的正交试验 正交实验设计方案及结果见表 4—5。由表 5 可知,按极差大小顺序排列出因素的主次为 $D>C>A>B$,即温度>氯化钙>淀粉>牛肉膏,按直观分析及极差分析最佳组合为 $A_3B_3C_2D_1$ 和 $A_3B_3C_2D_1$ 。经进一步验证,S4 的最佳生长培养条件组合为:淀粉(1.5 g/dL),牛肉膏(1.5 g/dL),

氯化钙(1 g/dL),温度为 32 ℃。由表 6 的方差分析可知,温度对 S4 的生长影响显著。

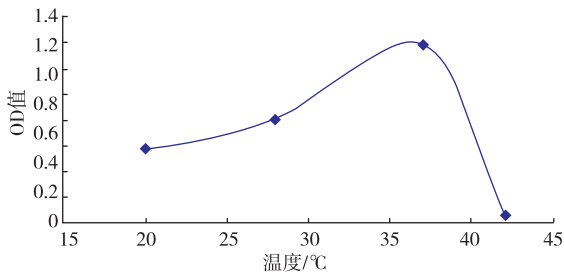


图 8 不同温度对拮抗菌 S4 生长的影响

Fig. 8 Effects of different temperatures on S4 growth

表 4 正交试验因素水平表

Table 4 Level designation of orthogonal test

因素/水平	A 淀粉 质量浓度/ (g/dL)	B 牛肉膏 质量浓度/ (g/dL)	C 氯化钙 质量浓度/ (g/dL)	D 温度/℃
1	0.5	0.5	0.5	32
2	1	1	1	37
3	1.5	1.5	1.5	42

表 5 L₉(3⁴)正交实验设计方案及结果

Table 5 L₉(3⁴) orthogonal experiment design and results

因素	A 淀粉 质量浓度/ (g/dL)	B 牛肉膏 质量浓度/ (g/dL)	C 氯化钙 质量浓度/ (g/dL)	D 温度/ ℃	结果
1	1	1	1	1	0.690 3
2	1	2	2	2	0.525 8
3	1	3	3	3	0.050 6
4	2	1	2	3	0.269 9
5	2	2	3	1	0.949 4
6	2	3	1	2	0.399 3
7	3	1	3	2	0.463 6
8	3	2	1	3	0.205 9
9	3	3	2	1	1.051 7
均值 1	0.422	0.475	0.432	0.897	
均值 2	0.540	0.560	0.616	0.463	
均值 3	0.574	0.501	0.488	0.175	
极差	0.152	0.085	0.184	0.722	

表 6 方差分析表

Table 6 Variance analysis

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
淀粉 质量浓度/(g/dL)	0.038	2	3.167	19.000	
牛肉膏 质量浓度/(g/dL)	0.012	2	1.000	19.000	
氯化钙 质量浓度/(g/dL)	0.053	2	4.417	19.000	
温度/℃	0.079	2	66.000	19.000	*
误差	0.01				

3 结 语

作者以平顶山市白龟山水库中鲢鱼肠道的微生物为研究对象,以抑制病原菌嗜水气单胞菌效果为依据,根据体外拮抗试验筛选出 15 株有明显拮抗活性的菌株。拮抗微生物因具有不易使病原菌产生耐药性,对人畜安全无毒,不污染环境,无残留,能保持生态平衡,工艺较简单以及不少拮抗微生物同时具有提高生命力等特点而引起越来越多人们的关注和重视,在水产动物病害的生物防治中发挥着重要的作用。目前报道较多分离出的拮抗微生物主要有芽孢杆菌类、乳酸菌类、光合细菌类和酵母类等拮抗菌株,有些拮抗菌株已进入商品化。关于鱼类中病原菌拮抗菌株的筛选及应用方面较多,如曹海鹏等^[11]从养殖池污泥中分离筛选了一株优良的鳊源嗜水气单胞菌拮抗芽孢杆菌;蒋启欢等^[12]从养殖的银鲫肠道中分离纯化出一株拮抗嗜水气单胞菌的芽孢杆菌;Hagi 等^[13]从鲤肠道内分离出 10 株益生菌,鉴定后发现来自于 10 个种和 5 个属;Villamil 等^[14]研究了 6 株乳酸杆菌及其产物-乳酸对养殖卤虫的影响,发现加入乳酸杆菌(1×10⁸ 个/mL)和乳酸的实验组,鳃弧菌的数量明显减少,而且体外拮抗实验也表明,乳酸杆菌的胞外产物可以抑制鳃弧菌的生长。

在本研究中,针对 1 株拮抗效果较稳定的拮抗菌 S4 经部分生理生化、16S rDNA 鉴定,初步判断为气单胞菌属,此菌作为致病性嗜水气单胞菌拮抗菌株未见报道。通过分子进化树表明,与杀鲑气单胞菌的遗传距离最近(95%),但是否为同一进化支,此菌的生长培养特性有待进一步研究。为了更好地了解此菌的生长特性和培养条件,利用琼脂平板扩散法和单因素正交实验对此菌的抗菌谱和生长培养条件进行了研究。结果表明,此菌具有较窄的抗菌活性,pH 为 8.5 左右,属嗜碱性细菌,单因素实验时,最佳培养温度为 37 ℃,优化后最适培养温度为 32 ℃,方差分析表明,温度对 S4 的生长影响有显著差异。

与目前报道的典型杀鲑气单胞菌的生长培养条件为 22~25 ℃,生长 pH 为 7 差别较大,优化后的生长温度与大多数气单胞菌的生长温度为 30 ℃接近。这些研究结果表明,S4 可能属于气单胞菌属,但具体的哪个种有待进一步鉴定。作为致病菌的拮抗

菌,在养殖系统使用中如何使其大量繁殖,缩短培养时间至关重要。因此,对 S4 的培养条件进行了优化,结果表明,在培养基为 1.5 g/dL 淀粉,1 g/dL 牛肉膏,1 g/dL 氯化钙中,接种体积分数以 3% 生长最佳。优化之后,对其生长曲线及拮抗效果进行研究。结果表明,菌体生长的延滞期缩短,稳定期延长,并提高了拮抗效果。通过最佳生长和培养条件的研

究,S4 将来作为微生物菌剂使用时,菌种制备可以缩短培养时间,提高产量,降低成本,达到高效目的。

S4 作为一种致病菌的拮抗菌株,能否作为饲料添加剂或抗菌药物应用于水产养殖中,此菌的抑菌机制、安全性检验以及菌株拮抗效果规模化发酵条件优化还有待于进一步的研究。本研究为嗜水气单胞菌的防治及拮抗菌 S4 的应用提供理论依据。

参考文献:

- [1] 崔珏,李超,万健. 鲢鱼皮胶原蛋白酶解工艺的优化及产物抗氧化活性的研究[J]. 农业机械,2012(27):114-116.
CUI Jue,LI Chao,WAN Jian. Proteolytic digestion process optimization of Silver carp skin and its product research on antioxidant activity[J]. **Agricultural Machinery**,2012(27):114-116.(in Chinese)
- [2] 陈爱平. 2004 年中国水产养殖病害监测报告[J]. 科学养鱼,2005(9):48-49.
CHEN Aiping. The monitoring report from Chinese aquaculture disease in 2004[J]. **Scientific Fish Farming**,2005(9):48-49.(in Chinese)
- [3] 艾晓辉,左文功. 淡水养殖鱼类细菌出血性败血病药物防治研究[J]. 中国水产科学,1997,4(3):54-60.
AI Xiaohui,ZUO Wengong. A study on control of the bacterial hemorrhagic septicemia in cultured freshwater fishes by drug administration[J]. **Journal of Fishery Sciences of China**,1997,4(3):54-60.(in Chinese)
- [4] 陈霞,张其中,李春涛. 50 种中草药体外抑杀嗜水气单胞菌的药效研究[J]. 中国预防兽医学报,2011,33(11):862-865.
CHEN Xia,ZHANG Qizhong,LI ChunTao. Bacteriostasis of 50 traditional Chinese medicine herbs against *Aeromonas hydrophila* in vitro[J]. **Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine**,2011,33(11):862-865.(in Chinese)
- [5] 单晓枫,张洪波,郭伟生,等. 嗜水气单胞菌拮抗菌的筛选[J]. 淡水渔业,2007,37(6):45-47.
SHAN Xiaofeng,ZHANG Hongbo,GUO Weisheng,et al. Screening of antergic germ against *Aeromonas hydrophila* [J]. **Freshwater Fisheries**,2007,37(6):45-47.(in Chinese)
- [6] 张新明,李键,刘淇. 弧菌拮抗菌的筛选及其效果[J]. 中国水产科学,2004,11(4):325-332.
ZHANG Xinming,LI Jian,LIU Qi. Selection and effect of vibrios-antagmism bacteria[J]. **Journal of Fishery Sciences of China**,2004,11(4):325-332.(in Chinese)
- [7] 蒋启欢,叶应旺,胡王,等. 银鲫肠道内抑制嗜水气单胞菌的潜在益生菌筛选及其特性研究[J]. 淡水渔业,2012,42(20):23-26.
JIANG Qihuan,YE Yingwang HU Wang,et al. Selection and characteristic analysis of potential probiotic strains against *Aeromonas hydrophila* from the intestine of *Carassius auratus gibelio* [J]. **Freshwater Fisheries**,2012,42(20):23-26.(in Chinese)
- [8] HONG Jun,HU Jianye,LIU Junhong,et al. In vitro antioxidant and antimicrobial activities of flavonoids from *Panax notoginseng* flowers[J]. **Natural Product Research**,2014,28(16):1260-1266.
- [9] 坎布南.《伯杰细菌鉴定手册》(第八版中译本)[M]. 北京:科学出版社,1984.
- [10] NIAL G V,WINSTON D L,HORST K. In vitro growth characteristics of five candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grow in fish intestinal mucus[J]. **Fems Microbiology Letters**,2004,231(1):145-152.
- [11] 曹海鹏,何珊,刘丽玲,等. 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[J]. 微生物学通报,2011,38(9):1377-1384.
CAO Haipeng,HE Shan,LIU Liling,et al. Identification and biological characteristics of a *Bacillus* strain antagonistic against pathogenic *Aeromonas hydrophila* of sturgeons[J]. **Microbiology China**,2011,38(9):1377-1384.(in Chinese)
- [12] HAGI T,HOSHINO T. Screening and characterization of potential probiotic lactic acid bacteria from cultured common carp[J]. **Biosci Biotechnol Biochem**,2009,73(7):1479-1483.
- [13] VILLAMIL L,FIGUERAS A. Control of vibrio alginolyticus in artemia culture by treatment with bacterial probiotics [J]. **Aquaculture**,2003,219(1-4):43-56.