

文章编号: 1674-7054(2014)04-0312-08

罗非鱼无乳链球菌拮抗菌的分离、鉴定及多样性分析

赵光军^{1,2}, 周永灿^{1,2}, 杨慧², 蔡岩², 张晗², 谢珍玉², 王世锋^{1,2}, 李聪²

(1. 海南大学 海洋学院/热带生物资源可持续利用省部共建国家重点实验室培育基地 海南 海口 570228;

2. 海南大学 海洋学院/海南省水生生物技术重点实验室 海南 海口 570228)

摘 要: 采用径向扩散法筛选对罗非鱼致病性无乳链球菌具有拮抗作用的益生菌, 利用 16S rDNA 对拮抗菌进行鉴定, 构建系统发育树对拮抗菌的多样性进行分析, 并通过腹腔注射法测定其对罗非鱼的安全性。结果表明, 从 8 个采样点共分离细菌 1 759 株, 其中 59 株对无乳链球菌具有较强的拮抗作用, 抑菌圈直径为 10.6 mm~30.8 mm, 平均 21.9 mm; 16S rDNA 分子鉴定及系统进化树分析显示, 59 株拮抗菌分为 5 属 8 个种, 其中芽孢杆菌属(*Bacillus*) 45 株、假单胞菌属(*Pseudomonas*) 5 株、肠球菌属(*Enterococcus*) 2 株、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*) 2 株和葡萄球菌属(*Staphylococcus*) 5 株。鱼体安全性试验显示, 有 22 株拮抗菌对罗非鱼不具有致病性, 可作为防治罗非鱼无乳链球菌病的备选菌株。

关键词: 罗非鱼; 无乳链球菌; 拮抗菌**中图分类号:** Q 93-331 **文献标志码:** A

罗非鱼(*Tilapia*) 是全球热带和亚热带地区的优良养殖鱼类, 具有肉质好、生长快、繁殖能力强、适应性广等优点。我国是全球最大的罗非鱼生产国与出口国。近年来发生的感染无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*) 引起的罗非鱼链球菌病害已成为阻碍我国罗非鱼养殖业可持续发展的最主要因素之一^[1]。目前, 对罗非鱼链球菌病尚缺乏安全高效的防治措施^[1-2], 生产上使用抗生素可一定程度控制该病的暴发, 但该病存在较严重的停药反弹现象, 且抗生素药物的使用存在病原菌耐药性增强和药物残留等缺陷^[3-4], 同时还杀灭水体中存在的病原拮抗菌和水质改良益生菌等有益微生物, 破坏养殖水体微生态平衡, 加剧养殖水环境恶化^[5]。因此, 寻找安全高效的罗非鱼链球菌病防治方法已成为保障我国罗非鱼养殖业可持续健康发展的关键。益生菌是一类来源于宿主内外环境, 通过分解水体有机质及各种有毒有害物质、激活宿主的体液和细胞免疫、分泌拮抗物质以及与病原竞争粘附等作用, 达到改良水质、调节宿主体内外微生物群落、抑制有害菌生长繁殖、提高宿主对病原抵抗力的微生物^[3-5]。使用益生菌进行水产动物疾病防治可有效克服抗生素类药物存在的药物残留和耐药性等缺陷, 目前, 筛选和使用具有分泌拮抗物质和与病原竞争粘附等作用的拮抗菌成了安全高效防治水产动物细菌性疾病的新的研究方向^[3, 5-6]。国内外已有较多针对罗非鱼疾病防治益生菌的研究报道^[7-12], 但未见关于防治罗非鱼链球菌病的拮抗菌研究报道, 为此, 笔者采用径向扩散法筛选对无乳链球菌具有拮抗作用的益生菌, 为罗非鱼链球菌病的安全高效防治奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

 普通淡水培养基: 牛肉膏 3 g, 蛋白胨 5 g, 酵母浸膏 1 g, NaCl 5 g, 1 000 mL 去离子水,

收稿日期: 2014-04-14

基金项目: 海南省重点科技计划项目(ZDXM20120005); 海口市重点科技项目; 海南大学地方服务项目; 海南大学青年基金(qnjj1206); 海南大学研究生实践教学资助项目; 海南大学海南各类资源考察项目海南省产学研一体化专项资金(CXY0130028)

作者简介: 赵光军(1988-), 男, 海南大学2011级硕士研究生, 从事水产动物病害与防治研究。E-mail: zgj0106@163.com

通信作者: 王世锋(1977-), 副教授。E-mail: shifeng_15@163.com

pH7.2, 固体需加 20 g 琼脂粉。脑心浸液培养基(BHI): 购于青岛日水生物技术有限公司, 直接称取 37 g 加 1 000 mL 去离子水, 固体需加 20 g 琼脂粉。水样和泥样: 从海南各主要罗非鱼养殖区不同类型的水域采集水样和泥样, 4 ℃ 冷冻运回实验室进行细菌分离与纯化, 水样和泥样的采集时间和地点见表 1。无乳链球菌: 实验用罗非鱼致病性无乳链球菌, 为本实验室于 2009 年从海南琼海某罗非鱼养殖场采集的患病罗非鱼脑部分离获得, 经生理生化及分子生物学鉴定后, -80 ℃ 保存于本实验室。罗非鱼: 由海南吉富罗非鱼苗场提供, 体长约(15.2 ± 0.8) cm, 体重约 100 g 的健康罗非鱼, 在实验室暂养 7 d 后进行后续试验。

表 1 样品采集时间和地点

Tab. 1 The time and locations for sampling

序号 Code	采集时间 Sampling date	采集地点 Sampling sites	简称 Abbreviation	经纬度 Longitude and latitude
1	2012.07.10	海南大学西池塘	HAINUP	20°03'38"N; 110°19'21"E
2	2012.07.16	琼海潭门罗非鱼养殖池塘	QHTMFP	20°03'05"N; 110°20'07"E
3	2012.07.17	海口三江罗非鱼养殖池塘	HKSJFP	19°59'56"N; 110°37'06"E
4	2012.08.06	定安田文策河	DAWCR	19°40'39"N; 110°23'04"E
5	2012.08.06	文昌竹良水库	WCL	19°37'17"N; 110°45'55"E
6	2012.08.06	文昌城市饮用水河流	WCR	19°37'12"N; 110°46'44"E
7	2012.08.06	定安新吉水产公司养殖池塘	DAXJFP	19°40'05"N; 110°24'05"E
8	2012.08.22	海口桂林洋虾塘	HKSP	19°58'42"N; 110°28'44"E

1.2 细菌的分离与培养 水样的细菌分离: 参照张书俊等^[13]的方法略作修改, 具体步骤如下: 水样充分摇匀后, 取 1 mL 水样, 以无菌生理盐水(0.85% w/v NaCl) 进行 10 倍梯度稀释至 10^{-3} , 吸取稀释 10^{-3} 倍的水样 0.1 mL, 涂布于普通淡水固体培养基, 每个样品涂布 6 个平板, 将平板于 30 ℃ 倒置培养 72 h 后, 挑取具有不同菌落特征的细菌进行纯化和保种。

泥样的细菌分离: 参照 Jurkevitch 等^[14]的方法略作修改, 具体步骤如下: 将 100 g 泥样加 100 mL 无菌生理盐水(0.85% w/v NaCl) 4 ℃ 振荡 30 min, 4 ℃ 静置 30 min, 取上层液体于 4 ℃ 经 8 层无菌纱布过滤后, 4 ℃ $10\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min, 弃上清液, 取沉淀加入 1 mL 无菌生理盐水混匀, 取 0.1 mL 该混合液涂布于普通淡水固体培养基, 30 ℃ 静置培养 72 h 后, 挑取菌落形态不同的细菌进行纯化和保种。

1.3 拮抗菌的筛选 以罗非鱼链球菌病原无乳链球菌为指示菌株, 对分离得到的菌株进行拮抗试验。将待测菌株和指示菌分别利用普通淡水液体培养基和 BHI 液体培养基于 30 ℃ 振荡培养 24 h, 重悬计数后于 4 ℃ 保存备用。依据 Seo 等^[15]的径向扩散法(Radial Diffusion Assay, RDA) 稍作修改, 检测分离菌株对无乳链球菌的拮抗活性。具体步骤如下: 先向平板中倒入 15 mL BHI 固体培养基, 静置至完全凝固, 取适量无乳链球菌与 45 ℃ 左右半固体培养基(BHI) 充分混合, 菌液终浓度为 $1 \times 10^6\text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$, 然后取 10 mL 菌液倒入 BHI 固体培养基表面。待培养基完全凝固后, 用直径 4 mm 的打孔器在该双层培养基上打孔, 每孔加入 20 μL 待测菌液, 以等量无菌生理盐水作对照, 30 ℃ 培养 18 h 后用游标卡尺测量抑菌圈直径。将抑菌效果较好的菌株用 20% 的甘油生理盐水制成菌悬液, -80 ℃ 保存。

1.4 16S rDNA 鉴定 参照梅冰等^[16]的方法对筛选出的具有拮抗无乳链球菌活性的菌种进行 16S rDNA 序列的 PCR 扩增和测序, 上游 Pf: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 下游 Pr: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。PCR 反应体系(25 μL) 为 ddH₂O 18.8 μL , 10 × PCR buffer 2.5 μL , 10 mmol · L⁻¹ dNTP 0.5 μL , 引物各 1 μL , 2.5 U · μL^{-1} 的 *Taq* DNA 聚合酶 0.2 μL , 模板 DNA 1 μL 。PCR 反应条件: 94 ℃ 5 min; 94 ℃ 1 min, 55 ℃ 1 min, 72 ℃ 2 min, 循环扩增 30 次, 72 ℃ 10 min。PCR 产物按照 DNA 凝胶回收试剂盒(Takara) 说明书回收和纯化, 将 PCR 产物连接到 pMD19-T 载体上, 再转化至 DH5 α 感受态细胞中, 筛选阳性克隆送北京六合华大基因科技股份有限公司测序, 将测序结果在 GenBank 数据库(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=MicrobialGenomes) 中进行相似性比对, 获得菌株分子鉴定结果, 利用 MEGA5 软件构建进化树分析菌种同源性。

1.5 拮抗菌的安全性试验 参照 Ei - Rhman 等^[7]的方法略作修改,将暂养的罗非鱼随机分组,每组 15 尾,饲养在 72 cm × 50 cm × 40 cm 规格的水族箱中;将待测菌株接种于普通淡水液体培养基,37 ℃ 扩大培养 18 h,用无菌生理盐水重悬 2 次,浓度调至 1×10^8 cfu · mL⁻¹。对罗非鱼进行腹腔注射,每尾注射量为 0.1 mL,对照组注射等量无菌生理盐水,每株菌设置 2 个平行。实验鱼按常规方法以人工配合饲料养殖,连续观察 10 d,每天记录各组实验鱼的死亡情况。

2 结果与分析

2.1 无乳链球菌拮抗菌的筛选 从海南 8 个不同地点采集的水样和泥样中,共分离获得细菌 1 759 株(见表 2),对无乳链球菌具有明显拮抗作用的菌株共 59 株(见图 1、表 2),其中从水样中分离获得 40 株,占拮抗菌总数的 67.8%,在泥样中分离获得 19 株,占 32.2%。在 59 株对无乳链球菌具有明显拮抗作用的菌株中,从天然水体中分离获得拮抗菌 35 株,从水产养殖池塘分离获得 24 株,占 40.7%(见表 2)。本实验所分离的拮抗菌对无乳链球菌的抑菌圈直径为 10.6 mm ~ 30.8 mm,平均 21.9 mm(见表 3),其中,从定安新吉水产公司养殖池塘底泥中分离的菌株 DAXJFP 78 对无乳链球菌拮抗作用最强,其抑菌圈最大,为 30.8 mm。

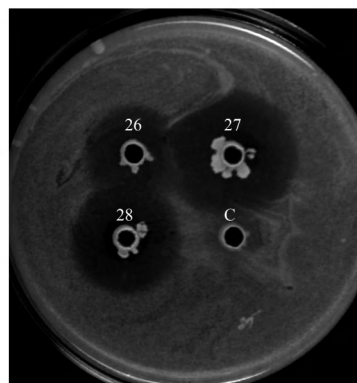


图 1 定安新吉水产公司养殖池塘分离的细菌对无乳链球菌的拮抗效果

26 27 28: 分离获得的待测菌株; C: 对照组(无菌生理盐水)

Fig. 1 The antagonistic effect of bacteria isolated from the ponds of Hainan Xinji Aquatic Science Technology Co., Ltd. against *Streptococcus agalactiae*

26 27 28: antagonism strains; C: physiological saline

表 2 8 个不同采样点样品中分离到的细菌与拮抗菌数量

Tab. 2 The amount of bacteria and antagonistic strains isolated from each sample

采样地点 Sampling locations		单菌落数/个 Single colonies	拮抗菌/个 Antagonism strains	拮抗菌相对含量/% Relative content of antagonistic bacteria /%
HAINUP	水样 Water samples	173	24	13.87
	泥样 Mud samples	82	4	4.88
QHTMFP	水样 Water samples	210	0	0
	泥样 Mud samples	302	3	0.99
HKSJFP	水样 Water samples	72	7	9.72
	泥样 Mud samples	55	0	0
DAWCR	水样 Water samples	54	0	0
	泥样 Mud samples	112	4	3.57
DAXJFP	水样 Water samples	219	7	3.20
	泥样 Mud samples	104	7	6.73
WCL	水样 Water samples	96	0	0
	泥样 Mud samples	0	0	0
WCR	水样 Water samples	77	2	2.60
	泥样 Mud samples	60	1	1.67
HKSP	水样 Water samples	60	0	0
	泥样 Mud samples	83	0	0
共计		1759	59	3.35

2.2 16S rDNA 基因序列分析和系统发育树构建 利用细菌 16S rDNA 通用引物对分离的 59 株拮抗菌进行 PCR 扩增,均可扩增出长约 1 500 bp 目的 DNA 片段,且亮度明显(见图 2)。挑选阳性克隆菌落经华大基因科技有限公司测序,得到长度为 1 513 ~ 1 521 bp DNA 序列;将获得的 16S rDNA 序列在 GenBank

中进行序列比对,结果表明,该 59 株菌株与 NCBI 中最相近菌株的相似性均大于 99%,因此,将这 59 株拮抗菌初步鉴定为分属于 5 个属 8 个种(见表 4);利用 MEGA5 软件构建 59 株拮抗菌的系统发育树,共包括 5 个分支,其中最大的分支由 45 株芽孢杆菌属 *Bacillus* 细菌构成,其余 4 个分支分别由假单胞菌属 *Pseudomonas*(5 株)、肠球菌属 *Enterococcus*(2 株)、类芽孢杆菌属 *Paenibacillus*(2 株)和葡萄球菌属 *Staphylococcus*(5 株)细菌构成(见图 3)。

2.3 拮抗菌对罗非鱼的安全性 以腹腔注射法检测各拮抗菌对罗非鱼的安全性结果表明(见表 4),59 株拮抗菌中有 22 株未造成罗非鱼死亡,具有较好安全性,占所筛选菌株的

37.3%。这 22 株拮抗菌中有 14 株为芽孢杆菌,包括枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)、蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*)、苏云金杆菌(*B. thuringiensis*)和巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*)等;其余 8 株拮抗菌分属葡萄球菌(*S. epidermidis*)、假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)和肠球菌(*E. faecalis*)。剩余 37 株拮抗菌对罗非鱼均有不同程度毒性或致病性,死亡率为 13.3%~100%,其中菌株 HAINUP24、HAINUP75 和 DAWCR 91 对罗非鱼的毒性最强,可导致实验罗非鱼全部死亡。

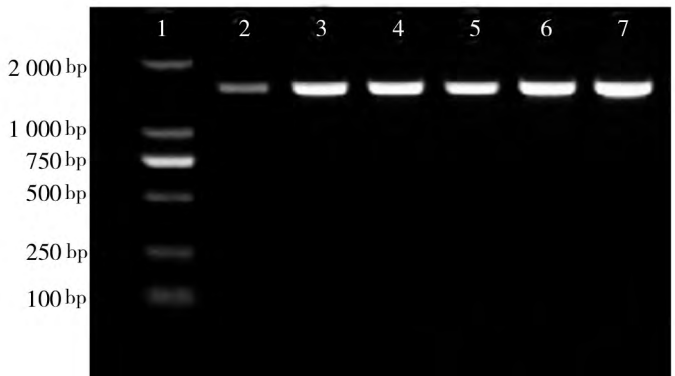


图 2 部分菌株 16S rDNA 基因扩增结果
1: DNA Marker; 2, 3, 4: HAINUP 40 菌株; 5, 6, 7: HAINUP 57 菌株
Fig. 2 Amplification of the 16S rDNA gene of some strains
1: DNA Marker; 2, 3, 4: HAINUP 40; 5, 6, 7: HAINUP 57 strains

表 3 分离菌株对无乳链球菌的拮抗作用

Tab. 3 The antagonistic property of the isolated strains against *Streptococcus agalactiae* ($\bar{X} \pm SD$)

菌株 Strain	抑菌圈直径/mm Diameter of inhibition	菌株 Strain	抑菌圈大小/mm Inhibition zone diameter	菌株 Strain	抑菌圈大小/mm Inhibition zone diameter
HAINUP11	11.9 ± 0.6	HAINUP133	24.1 ± 0.56	DAWCR91	20.8 ± 0.27
HAINUP24	29.6 ± 0.6	HAINUP134	20.5 ± 0.71	DAWCR102	18.6 ± 0.25
HAINUP35	27.0 ± 0.3	HAINUP157	17.3 ± 0.2	DAXJFP26	20.7 ± 0.1
HAINUP40	28.4 ± 0.2	HAINUP169	26.6 ± 0.1	DAXJFP27	27.1 ± 0.2
HAINUP47	27.4 ± 0.2	HAINUP182	15.9 ± 0.2	DAXJFP28	22.6 ± 0.2
HAINUP56	20.0 ± 0.1	HAINUP198	19.2 ± 0.4	DAXJFP78	30.8 ± 0.3
HAINUP57	24.9 ± 0.5	HAINUP234	20.4 ± 0.6	DAXJFP145	15.2 ± 0.3
HAINUP61	12.8 ± 0.2	HAINUP240	26.0 ± 0.2	DAXJFP177	28.0 ± 0.2
HAINUP63	26.1 ± 0.2	QHTMFP329	10.6 ± 0.4	DAXJFP209	24.8 ± 0.2
HAINUP65	28.0 ± 0.3	QHTMFP380	29.9 ± 0.3	DAXJFP250	28.4 ± 0.5
HAINUP70	13.2 ± 0.3	QHTMFP444	26.5 ± 0.3	DAXJFP251	22.6 ± 0.7
HAINUP75	30.1 ± 0.2	HKSJFP1	11.5 ± 0.2	DAXJFP275	30.8 ± 0.4
HAINUP83	14.4 ± 0.2	HKSJFP8	22.1 ± 0.2	DAXJFP284	13.8 ± 0.5
HAINUP86	28.7 ± 0.7	HKSJFP32	25.0 ± 0.2	DAXJFP296	23.6 ± 0.6
HAINUP88	25.7 ± 0.2	HKSJFP35	14.9 ± 0.4	DAXJFP300	22.2 ± 0.5
HAINUP93	29.2 ± 0.4	HKSJFP42	13.8 ± 0.5	DAXJFP311	20.0 ± 0.1
HAINUP96	22.2 ± 0.4	HKSJFP47	19.8 ± 0.3	WCR 37	21.1 ± 0.5
HAINUP104	18.5 ± 0.2	HKSJFP58	22.0 ± 0.3	WCR 58	16.5 ± 0.6
HAINUP109	23.2 ± 0.3	DAWCR67	21.0 ± 0.6	WCR 101	25.1 ± 0.1
HAINUP120	11.6 ± 0.2	DAWCR79	21.6 ± 0.2	生理盐水 Physical saline	0

表 4 拮抗菌 16S rDNA 序列比对鉴定结果及其对罗非鱼的安全性检测结果
Tab. 4 Genus/species identification and biological safety of the antagonistic strains

菌株 Strain	属/种名 Genus/specie	死亡率/% Mortality rate	菌株 Strain	属/种名 Genus/specie	死亡率/% Mortality rate	菌株 Strain	属/种名 Genus/specie	死亡率/% Mortality rate
HAINUP11	<i>B. subtilis</i>	40%	HAINUP133	<i>Bacillus</i> sp.	0	DAWCR91	<i>Pseudomonas</i> sp.	100%
HAINUP24	<i>B. subtilis</i>	100%	HAINUP134	<i>P. hunanensis</i>	20%	DAWCR102	<i>Pseudomonas</i> sp.	0
HAINUP35	<i>S. epidermidis</i>	0	HAINUP157	<i>S. epidermidis</i>	0	DAXJFP26	<i>Bacillus</i> sp.	0
HAINUP40	<i>B. subtilis</i>	0	HAINUP169	<i>B. subtilis</i>	0	DAXJFP27	<i>Bacillus</i> sp.	0
HAINUP47	<i>S. epidermidis</i>	0	HAINUP182	<i>B. thuringiensis</i>	20%	DAXJFP28	<i>B. subtilis</i>	20%
HAINUP56	<i>B. cereus</i>	0	HAINUP198	<i>P. hunanensis</i>	80%	DAXJFP78	<i>B. subtilis</i>	46.7%
HAINUP57	<i>B. thuringiensis</i>	20%	HAINUP234	<i>B. subtilis</i>	46.7%	DAXJFP145	<i>B. subtilis</i>	26.7%
HAINUP61	<i>Bacillus</i> sp.	0	HAINUP240	<i>B. subtilis</i>	26.7%	DAXJFP177	<i>Bacillus</i> sp.	13.3%
HAINUP63	<i>B. thuringiensis</i>	0	QHTMFP329	<i>B. subtilis</i>	73.3%	DAXJFP209	<i>B. subtilis</i>	86.7%
HAINUP65	<i>B. cereus</i>	80%	QHTMFP380	<i>B. megaterium</i>	53.3%	DAXJFP250	<i>B. subtilis</i>	60%
HAINUP70	<i>Bacillus</i> sp.	40%	QHTMFP444	<i>B. subtilis</i>	53.3%	DAXJFP251	<i>B. subtilis</i>	13.3%
HAINUP75	<i>B. cereus</i>	100%	HKSJFP1	<i>Bacillus</i> sp.	20%	DAXJFP275	<i>B. megaterium</i>	26.7%
HAINUP83	<i>Bacillus</i> sp.	40%	HKSJFP8	<i>B. subtilis</i>	66.7%	DAXJFP284	<i>B. thuringiensis</i>	0
HAINUP86	<i>B. thuringiensis</i>	33.3%	HKSJFP32	<i>Pseudomonas</i> sp.	40%	DAXJFP296	<i>Pseudomonas</i> sp.	70%
HAINUP88	<i>B. subtilis</i>	20%	HKSJFP35	<i>B. subtilis</i>	26.7%	DAXJFP300	<i>B. megaterium</i>	50%
HAINUP93	<i>B. cereus</i>	0	HKSJFP42	<i>E. faecalis</i>	0	DAXJFP311	<i>B. subtilis</i>	46.7%
HAINUP96	<i>B. thuringiensis</i>	0	HKSJFP47	<i>Bacillus</i> sp.	70%	WCR 37	<i>S. epidermidis</i>	0
HAINUP104	<i>Pseudomonas</i> sp.	0	HKSJFP58	<i>Pseudomonas</i> sp.	36.7%	WCR 58	<i>E. faecalis</i>	0
HAINUP109	<i>S. epidermidis</i>	20%	DAWCR67	<i>B. megaterium</i>	0	WCR 101	<i>B. cereus</i>	73.3%
HAINUP120	<i>B. cereus</i>	0	DAWCR79	<i>B. thuringiensis</i>	0	生理盐水 Physical saline		0%



图3 基于 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig. 3 The phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence

3 讨 论

拮抗益生菌通过分泌抑菌物质、竞争营养和粘附位点、提高机体免疫力和切断病原菌群体感应系统等方式抑制病原菌和提高宿主免疫力,起到防治疾病、促进生长和提高成活率等作用^[3,5-6]。国内外有关利用拮抗益生菌防治罗非鱼疾病的报道主要集中在防治嗜水气单胞菌病的拮抗菌研究方面。如 Aly 等^[8-9]筛选到对罗非鱼嗜水气单胞菌具有拮抗作用的 2 株芽孢杆菌(*B. subtilis*)、1 株嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)和 1 株弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*),它们均可显著降低嗜水气单胞菌对罗非鱼的致死率;Ei-Rhman 等^[7]分离获得了 1 株对嗜水气单胞菌具有拮抗作用的藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*),使用该菌后可将嗜水气单胞菌感染罗非鱼的成活率从 20% 提高到 75%;Abdel-Rahman 等^[10]发现饲料中添加酿酒酵母,可显著降低嗜水气单胞菌感染罗非鱼的死亡率以及罗非鱼血清中病原菌的数量。有关罗非鱼链球菌拮抗菌方面的研究,迄今只有陈辉^[11]报道了 1 株罗非鱼海豚链球菌的拮抗菌——诺卡氏菌 N0906(*Nocardia* 0906),该菌可显著提高罗非鱼非特异性免疫力,降低罗非鱼养殖水体中海豚链球菌的数量,提高罗非鱼的成活率。

水环境中对病原菌具有拮抗作用的益生菌绝大多数为芽孢杆菌^[17],如 Nair 等^[18]从印度科钦河入海口分离获得的弧菌拮抗菌中,有 81% 为芽孢杆菌。本研究从海南罗非鱼主要养殖区不同水域分离得到的无乳链球菌拮抗菌也是以芽孢杆菌为主,在分离的 59 株无乳链球菌拮抗菌中,有 45 株为芽孢杆菌(包括枯草杆菌、蜡样芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌等),占所分离拮抗菌总数的 79.7%。芽孢杆菌属中的枯草芽孢杆菌因安全性高、效果好,是目前最常用的益生芽孢杆菌^[5-6]。尽管已有研究表明,绝大多数病原拮抗菌为芽孢杆菌,但是水产动物病原拮抗菌仍具有很高的种属多样性,如国内外学者分离获得的罗非鱼细菌性病原拮抗菌除芽孢杆菌外,还包括弗氏柠檬酸杆菌、藤黄微球菌、诺卡氏菌 N0906 等^[7,9,11];分离获得的其他水产动物病原拮抗菌还包括漫游球菌(*Vagococcus*)、链球菌(*Streptococcus*)、弧菌(*Vibrio*)、气单胞菌(*Aeromonas*)、肠杆菌(*Enterobacteriaceae*)和邻单胞菌(*Plesiomonas*)等^[3,19]。本研究分离得到的无乳链球菌拮抗菌除了 45 株芽孢杆菌外,还包含假单胞菌、肠球菌、类芽孢杆菌、葡萄球菌等共 4 大类的 14 个菌株。Verschuere 等^[17]认为,从水生动物及其生存环境中分离获得的拮抗益生菌对水产动物病原的拮抗效果要比陆源等非水环境中分离的益生菌好,但目前用于水产养殖的商业益生菌制剂中,仍有许多是人源或陆源产品^[3,5],为了提高拮抗益生菌在水产病害防治中的使用效果,今后还需要加大相关研究,分离更多适合水产养殖病害防治要求的拮抗益生菌并制备其产品。

在水产病害防治拮抗菌的应用中,不仅要考虑拮抗菌对相关病原的拮抗效果,还需要考虑拮抗菌对养殖生物的安全性。许多细菌虽然对某些水产病原具有良好的拮抗性,但由于它们对水产动物具有较强的毒性或致病性,因此也不适合用作水产病害防治的拮抗菌。Taylor 等^[20]对包括蜡样芽孢杆菌和坚强芽孢杆菌(*B. firmus*)在内的 101 株芽孢杆菌热稳定毒素检测结果表明,其中有些菌株可产生对水产动物具有较强毒性的热稳定性毒素;有研究结果表明,嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)、河流弧菌(*V. fluvialis*)和溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)的某些菌株虽然对鲑鳟鱼病原杀鲑气单胞菌(*A. salmonicida*)具有良好的拮抗作用,但这 3 种细菌的某些菌株也是鱼类甚至人类的致病菌^[21-25]。本实验分离的 59 株无乳链球菌拮抗菌对罗非鱼的安全性检测结果表明,有 37 株(占 62.7%)对罗非鱼存在不同程度的毒性或致病性,不适合作为拮抗益生菌用于罗非鱼链球菌病的防治;有 22 株对罗非鱼安全,可作为防治罗非鱼链球菌病的候选拮抗益生菌株。这 22 株罗非鱼链球菌拮抗菌株在用于养殖罗非鱼疾病防治之前,尚需进一步评估其对罗非鱼生长以及罗非鱼产品质量(包括人体安全)的影响,以确保其使用安全。

参考文献:

- [1] ZHANG D, LI A, GUO Y, et al. Molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* in diseased farmed tilapia in China [J]. *Aquaculture*, 2013, 412: 64-69.
- [2] 郭玉娟, 张德锋, 樊海平, 等. 中国南方地区罗非鱼无乳链球菌的分子流行病学研究 [J]. *水产学报*, 2012, 36(3): 399-406.
- [3] PANDIYAN P, BALARAMAN D, THIRUNAVUKKARASU R, et al. Probiotic in aquaculture [J]. *Drug Invention Today*,

- 2013, 5(1): 55–59.
- [4] WELKER T L, LIM C. Use of probiotics in diets of Tilapia [J]. Journal of Aquaculture Research Development, 2011, S1: 014. doi: 10.4172/2155–9546. S1–014
- [5] QI Z, ZHANG XH, BOON N, et al. Probiotics in aquaculture of China—Current state, problems and prospect [J]. Aquaculture, 2009, 290(1): 15–21.
- [6] CHAUCHEYRAS-DURAND F, DURAND H. Probiotics in animal nutrition and health [J]. Beneficial Microbes, 2010, 1(1): 3–9.
- [7] EI-RHMAN A M A, KHATTAB Y A E, SHALABY A M E. *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 27(2): 175–180.
- [8] ALY S M, AHMED Y A, GHAREEB A A, et al. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 25(2): 128–136.
- [9] ALY S M, ABD-EL-RAHMAN A M, JOHN G, et al. Characterization of some bacteria isolated from *Oreochromis niloticus* and their potential use as probiotics [J]. Aquaculture, 2008, 277(1): 1–6.
- [10] ABDEL-TAWWAB M, ABDEL-RAHMAN A M, ISMAEL N E M. Evaluation of commercial live bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for Fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged in situ with *Aeromonas hydrophila* [J]. Aquaculture, 2008, 280(3): 185–189.
- [11] 陈辉. 海豚链球菌高效拮抗菌的筛选、特性分析及其生态效应研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2008.
- [12] PIRARAT N, KOBAYASHI T, KATAGIRI T, et al. Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2006, 113(3): 339–347.
- [13] 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, (3): 301–307.
- [14] JURKEVITCH E, MINZ D, RAMATI B, et al. Prey range characterization, ribotyping, and diversity of soil and rhizosphere *Bdellovibrio* spp. isolated on phytopathogenic bacteria [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66: 2365–2371.
- [15] SEO J K, CRAWFORD J M, STONE K L, et al. Purification of a novel arthropod defensin from the American oyster, *Crassostrea virginica* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005, 338(4): 1998–2004.
- [16] 梅冰, 周永灿, 徐先栋, 等. 斜带石斑鱼烂尾病病原菌的分离与鉴定[J]. 热带海洋学报, 2010(6): 118–124.
- [17] VERSCHUERE L, ROMBAUT G, SORGELOOS P, et al. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2000, 64(4): 655–671.
- [18] NAIR A V, VIJAYAN K K, CHAKRABORTY K, et al. Diversity and characterization of antagonistic bacteria from tropical estuarine habitats of Cochin, India for fish health management [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 28(7): 2581–2592.
- [19] SORROZA L, PADILLA D, ACOSTA F, et al. Characterization of the probiotic strain *Vagococcus fluvialis* in the protection of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against vibriosis by *Vibrio anguillarum* [J]. Veterinary Microbiology, 2012, 155(2): 369–373.
- [20] TAYLOR J M W, SUTHERLAND A D, AIDOO K E, et al. Heat stable toxin production by strains of *Bacillus cereus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus simplex* and *Bacillus licheniformis* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 242(2): 313–317.
- [21] IRIANTO A, AUSTIN B. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) [J]. Journal of Fish Diseases, 2002, 25(6): 333–342.
- [22] AUSTIN B, STUCKEY L, ROBERTSON P, et al. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii* [J]. Journal of Fish Diseases, 1995, 18(1): 93–96.
- [23] HEO Y J, LEE C H, BAEK M S, et al. Morphological characterization of *Vibrio alginolyticus* specific bacteriophage isolated from fish farms on west coast of Korea [J]. Journal of Fish Pathology, 2012, 25(3): 165–172.

- Colombia [J]. Genetics and Molecular Research, 2012, 11(4): 4552–4563.
- [7]任羽,尹俊梅,杨光穗,等. 鹤蕉种质资源遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 热带作物学报, 2009, 30(11): 1589–1594.
- [8]樊汉明,方坚平,刘念. 观赏植物蝎尾蕉的引种[J]. 广东园林, 2002(1): 43–44.
- [9]禹玉华,唐源江,廖景平,等. 蝎尾蕉的引种栽培研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2006, 14(3): 238–242.

Identification and evaluation of *Heliconia* germplasm with cold resistance and agronomic traits

XU Shisong, YANG Guangsui, HUANG Shaohua, ZHANG Zhiqun, YIN Junmei

(Tropical Crops Genetic Resources Institute, CATAS/Ministry of Agriculture Key Laboratory for Utilization of Tropical Crops Germplasm Resources, Danzhou, Hainan 571737, China)

Abstract: *Heliconia* species originate in the neotropical region. The cold resistance and agronomic traits such as flowering stage, ornamental value, etc of 67 varieties of *Heliconia* species which were introduced to Hainan Island were successively identified for 3 years for comprehensive evaluation in the field nursery. Of the 67 varieties eight varieties were found suitable for cultivation in different locations of Hainan Province, including *H. nicke-riensis*, *H. caribaea* × *H. bihai* ‘Jacquini’, *H. bihai* ‘Lobster Claw Two’, *H. orthotricha* ‘Imperial’, *H. chartacea* ‘Sexy Pink’, *H. psittacorum* ‘Vincent Red’, *H. densiflora* ‘Fire Flash’, *H. stricta* ‘Iris Bannochie’. The evaluations of the 67 varieties of *Heliconia* spp are valuable for genetic improvement, cultivation and exploitation of *Heliconia* germplasm.

Key words: *Heliconia* spp.; germplasm; cold resistance; agronomic trait; evaluation.

(上接第 319 页)

Isolation, Identification and Diversity Analysis of Antagonistic Bacteria Against Tilapia Pathogen *Streptococcus agalactiae*

ZHAO Guangjun^{1,2}, ZHOU Yongcan^{1,2}, YANG Hui², CAI Yan², ZHANG Han²,
XIE Zhenyu², WANG Shifeng^{1,2}, LI Cong²

(1. State Key Laboratory Breeding Base for Sustainable Exploitation of Tropical Bioresources, Hainan University, Haikou 570228; 2. Hainan Provincial Key Laboratory for Tropical Hydrobiology & Biotechnology, College of Marine Sciences, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: Antagonistic bacteria against tilapia *Streptococcus agalactiae* were isolated using Radial Diffusion Assay (RDA) method and identified using 16S rDNA sequencing technique. A phylogenetic tree was also constructed to analyze the diversity of the antagonistic bacteria isolated. Intraperitoneal injection method was used to test the toxicity of the isolated antagonistic bacteria against tilapia fishes. Results showed that 59 of the 1 759 strains of the bacteria isolated from eight freshwater ponds showed strong antagonistic effect against *Streptococcus agalactiae*. The diameter of the inhibition zones ranged from 10.6 mm to 30.8 mm with an average value of 21.9 mm. The 16S rDNA sequencing and phylogenetic tree analysis indicated that these 59 strains of bacteria belong to 5 genus and 8 species, including genus *Bacillus* (45 strains), genus *Pseudomonas* (5 strains), genus *Enterococcus* (2 strains), genus *Paenibacillus* (2 strains) and genus *Staphylococcus* (5 strains). The toxicity tolerance test showed that 22 strains were nontoxic to tilapia fishes. These nontoxic strains can be used as alternative antagonistic bacterial strains to control and prevent from tilapia *Streptococcus* disease in the future.

Key words: tilapia; *Streptococcus agalactiae*; antagonistic probiotics