

文章编号: 1004 - 7271(2008)05 - 0591 - 07

一株抗多种水产病原菌放线菌的 鉴定、发酵优化及其应用

王高学, 段 星, 原居林, 顾忠旗, 高鸿涛

(西北农林科技大学动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要: 对一株抗多种水产病原菌的海洋放线菌进行细胞壁化学组分和 16S rDNA 序列分析, 初步鉴定为弗氏链霉菌 (*Streptomyces fradiae*)。通过正交试验确定其最佳发酵培养基为: 葡萄糖 1.5%、牛肉膏 2%、海盐 1.5%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%、 K_2HPO_4 0.05%、 $CaCO_3$ 0.1%。最佳发酵条件为: 温度 33 °C、初始 pH 6.0、接种量 10%、种子液菌龄 48 h。生物活性检测显示原始发酵液的生物效价相当于硫酸卡那霉素为 550.81 $\mu g/mL$, 对嗜水气单胞菌的 MIC 值和 MBC 值分别为 13.67 $\mu g/mL$ 和 27.35 $\mu g/mL$ 。对由嗜水气单胞菌引起的鱼病的最佳治疗剂量为 3 050 $\mu g/(kg \cdot d)$, 且无急性毒性。通过稳定性试验, 发酵液中的抗菌活性成分对热、pH、光和贮藏时间都很稳定。

关键词: 海洋放线菌; 菌种鉴定; 发酵条件优化; 药效试验; 毒性试验

中图分类号: S 917.1 文献标识码: A

Identification, fermental optimization and exploratory development of an actinomycete strain against diverse aquatic zymad

WANG Gao-xue, DUAN Xing, YUAN Ju-lin, GU Zhong-qi, GAO Hong-tao

(College of Animal Science and Techonology, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract: A marine actinomycete strain having antibacterial activity to aquatic pathogens was initially identified as *Streptomyces fradiae* by cytoderm chemi-component and 16S rDNA sequence analysis. The optimal fermentation conditions were as follows glucose 1.5%, beef extract 2%, sea salt 1.5%, K_2HPO_4 0.05%, $CaCO_3$ 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, temperature 33 °C, primary pH 6.0, inoculum 10%, strain age 48h by orthogonal design. It was ascertained the valence of primary broth was as same as Kanamycin sulfate which was 550.81 $\mu g/mL$ by bioactivity detection. Its MIC and MBC to *Aeromonas hydrophila* was respectively 13.67 $\mu g/mL$ and 27.35 $\mu g/mL$. The optimal therapeutic dosage was 3 050 $\mu g/(kg \cdot d)$ to the fish illness resulted from *Aeromonas hydrophila*. The antibiotic compound in broth was stable to heat, pH, light and storage time by stability test.

Key words: marine actinomycete; strain identification; fermental condition optimization; pharmacodynamic test; toxicity test

收稿日期: 2007-08-27

基金项目: 陕西省农业攻关项目 (2006K02 - G14 - 03)

作者简介: 王高学 (1965 -), 男, 陕西富平人, 副教授, 博士, 主要从事水产动物病害防治与生物工程制药方面的研究。E-mail:

wanggaoxue@126.com

目前,由于水产养殖中大量使用传统化学药物,导致病原耐药性增强,给病害防治带来了很大的难度,同时也引起一系列食品安全问题。所以,利用细菌及其代谢产物防治水产病害的生物渔药研究成为该领域的热点之一^[1-4]。杨先乐等^[5]将噬菌蛭弧菌应用于水产动物病害的防治具有很好的效果。然而,目前直接利用放线菌及其代谢产物专门防治水产动物病害的研究报道较少。王高等^[6]利用放线菌及代谢产物对水产动物常见病原菌进行抑菌实验,并进行鲫鱼肠炎病防治研究取得了良好的效果。

为了减少一些医用药物在水产养殖中的使用,保护人用原料药,研究开发水产专用药物非常必要。前期研究发现,从大连海域分离获得的一株放线菌 DL2 - F - 5 对水产病原菌:嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)、肠型点状气单胞菌(*Aeromonas punctata* f. *intestinalis*)、哈维弧菌(*Vibrio harveii*)、杀鲑气单胞菌史氏亚种(*Aeromonas salmonicida* subsp. *smithia*)和杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)等具有抑制杀灭作用^[6]。本研究对其进行了分子生物学鉴定、发酵条件优化和对由嗜水气单胞菌引起的水产动物疾病的防治试验,以期为进一步开发水产专用生物渔药提供科学依据。

1 材料

菌株 DL2 - F - 5,分离自大连近海海域的海泥;嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)由中国科学院水生生物研究所提供;试验动物为鲤(*Cyprinus carpio* Linnaeus),体重为 86 ± 10 g,购自陕西省水产所鱼种场。病原菌培养基为普通肉汤琼脂培养基;DL2 - F - 5 培养基为高氏 I 号培养基;发酵培养基为改良黄豆粉培养基^[7]。GUJS - 7B 型发酵罐(镇江东方生物工程设备技术公司);离心柱型细菌基因组 DNA 提取试剂盒(上海生工生物工程技术有限公司)。

2 方法

2.1 菌种鉴定

按照快速薄层层析法(TLC)^[8,9]对放线菌 DL2 - F - 5 进行全细胞水解液 L,L - DAP(二氨基庚二酸)、氨基酸及糖型分析。采用离心柱型细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取此放线菌的基因组,进行 16S rDNA 的扩增,上游引物为 Primer A:5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3'(对应于 *E. coli* 16S rDNA 5' 43 - 63f),下游引物为 Primer B:3'-GGGCGGWGTGTACAAGGC-5'(对应于 *E. coli* 16S rDNA 3' 1405 - 1387r)^[10],由上海生工生物工程技术有限公司合成。将所得的基因序列提交 NCBI 数据库,应用 Blast 程序与数据库中已有的放线菌 16S rDNA 序列进行相似性比较分析。序列的比较及系统发育分析采用 Clustalx1.81 软件。

2.2 发酵条件优化

因嗜水气单胞菌是引起水产动物发病的主要病原菌,故以下试验均以嗜水气单胞菌为指示菌。分别用 1% 的葡萄糖、麦芽糖、甘露糖、淀粉代替改良黄豆粉培养基中的碳源,将菌株以 5% 的接种量接入装有 30 mL 培养液的 150 mL 三角瓶中,28 °C,140 r/min 条件下摇床发酵 6 d,用平板孔径法^[11]测定各发酵液对嗜水气单胞菌的抑菌活性。分别用 1% 的黄豆粉、鱼粉、酵母膏、牛肉膏、蛋白胨、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 KNO_3 代替改良黄豆粉培养基中的氮源,方法同上测定各发酵液对嗜水气单胞菌的抑菌活性。以盐度和上步确定的最佳碳氮源作为试验因子,采用正交设计 $L_9(3^3)$ 确定最佳发酵培养基。再以上步确定的最佳发酵培养基,采用正交设计 $L_9(3^4)$ 试验对发酵温度、初始 pH、接种量和菌龄 4 个因素进行优化。

2.3 生物活性测定

将菌株 DL2 - F - 5 以 5% 接种量接种到最佳发酵培养基中,28 °C、140 r/min、振荡培养 6 d,备用。根据一剂量法的原理^[12],以硫酸卡那霉素为标准抗生素绘制标准曲线。测量发酵液的抑菌圈直径,在标准曲线上查出对应的标准抗生素浓度,即为该发酵液相当于标准抗生素的效价。采用连续倍比稀释

法^[13]测定发酵液 MIC(最小抑菌浓度)和 MBC(最小杀菌浓度)。

2.4 发酵液的动物治疗试验

每进行以下试验前,将鲤随机分成试验组和对照组,每组 30 尾,水温 25 ℃,日投饵率为 2%。对鲤腹腔注射 10^8 cfu/mL 的嗜水气单胞菌菌悬液 0.1 mL。

2.4.1 发酵液的药效试验

根据发酵液原始效价和配料最大加液量计算出可添加的最大剂量为 330.5 mg/kg,将发酵液添加到基础饲料制成颗粒饲料投喂,用药最大剂量为 $6\ 609.7\ \mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 。试验组投喂药饵,对照组投喂基础饲料,试验重复 3 次。7 d 后,观察记录发病情况和死亡率。再进行体内检测(将全部鲤解剖,取腹腔水、肝脏组织、肾脏组织涂平板,检测有无病原菌)。

2.4.2 发酵液治疗剂量的确定

根据药效试验结果,用药剂量在 $6\ 609.7\ \mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 时能达到完全治疗效果,故在此最大剂量基础上,以公比为 2 设定 6 个剂量梯度,确定有效剂量界限。并在其界限内,采用等差数列设定 6 个剂量梯度,确定最佳治疗剂量,方法同上。

2.5 发酵液毒性试验

试验组按每天发酵液正常使用量的 10 倍,即 $66\ 097\ \mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$,添加到饲料中投喂,连续投喂 7 d,观察并解剖,确定致毒性,设对照组。

2.6 发酵液稳定性研究

取 6 份发酵液置 60 ℃、70 ℃、80 ℃、90 ℃、100 ℃ 和 121 ℃ 下分别处理 30 min;取 12 份等量的发酵液(30 mL)用盐酸或氢氧化钠调 pH 分别为 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0 和 12.0,放置 24 h 后,再用盐酸或氢氧化钠调回原 pH 值;取 8 份等量的发酵液在太阳光下分别处理 1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h、7 h 和 8 h;取 2 份等量的发酵液分别置于 4 ℃ 的冰箱中和室温条件下,放置 30 d、60 d、90 d、120 d、150 d 和 180 d。将上述处理过的各个样品按照文献[11]方法测定抑菌圈直径。

3 结果

3.1 菌种鉴定

TLC 法结果显示,DL2-F-5 细胞壁含有 L, L-DAP(二氨基庚二酸)和甘氨酸,无特征性糖(糖型 C),细胞壁化学组分属于 I 型。

由图 1 可知,DL2-F-5 菌株 16S rDNA 扩增产物大小约 1 300 bp。将 DL2-F-5 菌株的 16S rDNA 序列的测序结果同 GenBank 数据库中的相关物种进行比对,建立系统进化树(如图 2)。由图 2 可知,此菌株同弗氏链霉菌(*Streptomyces fradiae*)的相似率达到 99.6%,表明二者之间的进化距离很近。

综合上述结果,将其确定为弗氏链霉菌(*Streptomyces fradiae*)。

3.2 发酵条件优化

分别以葡萄糖、麦芽糖、甘露糖和可溶性淀粉作碳源的发酵液,其抑菌圈直径分别为 20 mm、15 mm、17 mm 和 16 mm;分别以黄豆粉、鱼粉、酵母膏、牛肉膏、蛋白胨、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 KNO_3 作氮源的发酵液,其抑菌圈直径分别为 14.5 mm、16 mm、8.5 mm、21 mm、15 mm、0 mm 和 0 mm。

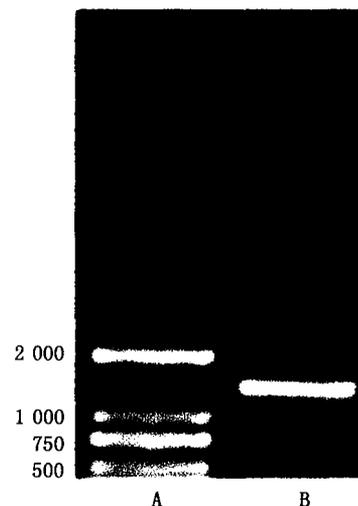


图 1 16S rDNA PCR 产物电泳图像

Fig.1 The electrophoresis image of 16S rDNA PCR products

由此可知,以葡萄糖作碳源、牛肉膏作氮源时,发酵液抗菌活性最强。因此将葡萄糖和牛肉膏作为进一步优化发酵条件的最佳碳氮源。表1、表2结果经方差分析可得,试验因子按对产抗生素量的影响大小顺序为:盐度 > 葡萄糖 > 牛肉膏;菌龄 > 温度 > 初始 pH 值 > 接种量。最佳发酵条件为葡萄糖 1.5%、牛肉膏 2%、海盐 1.5%、温度 33 ℃、初始 pH 值 6.0、接种量 10%、菌龄 48 h。

3.3 生物活性检测

一剂量法得,硫酸卡那霉素标准曲线的回归方程为 $y = 7.77x - 1.3$, x 表示硫酸卡那霉素浓度对数值 ($\lg \cdot \mu\text{g/mL}$), y 表示抑菌圈直径 (mm), 相关系数 $R^2 = 0.9983$ 。

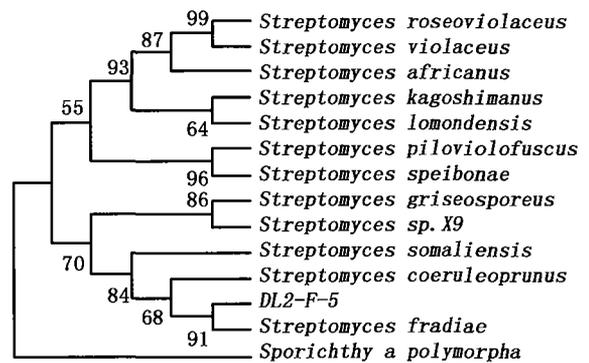


图2 以16S rDNA序列为基础的系统进化树
Fig.2 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences

表1 培养基优化试验设计方案及结果
Tab.1 The design and result of experiment optimum medium

处理	葡萄糖 (%)	牛肉膏 (%)	海盐 盐度 (%)	抑菌圈直径 (mm)	
				X ₁	X ₂
1	1(1)	1(1)	1(0.5)	12.3	13.0
2	1	2(1.5)	2(1.5)	20.3	20.7
3	1	3(2)	3(2.5)	19.0	19.7
4	2(1.5)	1	2	21.3	20.7
5	2	2	3	20.7	20.7
6	2	3	1	16.7	17.3
7	3(2)	1	3	18.0	18.3
8	3	2	1	14.3	14.3
9	3	3	2	21.0	21.7
k ₁	17.5	17.3	14.7		
k ₂	19.6		18.5	21.0	
k ₃	17.9	19.2	19.4		
R	2.1	1.9	6.3		

表2 发酵条件优化试验设计方案及结果
Tab.2 The design and result of experiment on optimization of fermentation conditions

处理	温度 (°C)	初始 pH	接种量 (%)	菌龄 (h)	抑菌圈直径 (mm)	
					X ₁	X ₂
1	1(23)	1(6)	1(5)	1(24)	18.3	18.3
2	1	2(7)	2(10)	2(48)	20.3	20.0
3	1	3(8)	3(15)	3(72)	18.7	19.3
4	2(28)	1	2	3	21.7	21.0
5	2	2	3	1	19.3	19.7
6	2	3	1	2	21.3	20.7
7	3(33)	1	3	2	22.7	22.3
8	3	2	1	3	20.7	20.0
9	3	3	2	1	20.0	20.0
k ₁	19.2	20.7	19.9	19.3		
k ₂	20.6	20.0	20.5	21.2		
k ₃	21.0	20.0	20.3	20.2		
R	1.8	0.7	0.6	1.9		

试验测得原始发酵液抑菌圈直径为 20 mm,由回归方程得,海洋放线菌 DL2-F-5 的原始发酵液相当于硫酸卡那霉素的效价为 550.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。经测定,发酵液对嗜水气单胞菌的 MIC 值和 MBC 值分别为 17.93 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 35.32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

3.4 发酵液的动物治疗试验

3.4.1 发酵液的药效试验

由表 3 可知,放线菌 DL2-F-5 的原始发酵液在可添加的最大剂量时能达到完全治疗效果,试验组鲤体表无任何症状,腹腔水、肝脏组织、肾脏组织检测无病原菌。对照组鲤第 3 天开始陆续死亡,死亡率达到 100%。

表 3 发酵液对鱼嗜水气单胞菌病的治疗效果

Tab.3 Curative effect of fermented broth to *Aeromonas hydrophila* for fish

分组	平均死亡尾数	平均死亡率(%)	体表症状	体内检测
试验组	0	0	-	-
对照组	30	100	+	+

注:“+”表示体表有症状或体内检测有病原菌;“-”表示体表无症状或体内未检测出病原菌(下同)

3.4.2 最佳治疗剂量的确定

由表 4、表 5 可得,当剂量为 3 050 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 时,试验鱼体表无任何症状,腹腔水、肝脏组织、肾脏组织未检测出病原菌,说明能达到完全治疗效果。因此,推荐最佳治疗剂量为 3 050 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 。

表 4 发酵液生物治疗有效剂量范围

Tab.4 Dosage range of biological cure of fermented broth

检测项目	剂量 ($\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$)						CK
	206	413	826	1 653	3 305	6 610	
均死亡尾数	30	30	30	22	0	0	10
平均死亡率(%)	100	100	100	73.3	0	0	100
体表症状	+	+	+	+	-	-	+
体内检测	+	+	+	+	-	-	+

表 5 发酵液生物治疗最佳剂量

Tab.5 Optimal biological cure dosage of fermented broth

检测项目	剂量 ($\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$)						CK
	1 650	2 000	2 350	2 700	3 050	3 400	
平均死亡尾数	26	17.3	9	0	0	0	10
平均死亡率(%)	86.7	57.7	30	0	0	0	100
体表症状	+	+	+	-	-	-	+
体内检测	+	+	+	+	-	-	+

3.5 发酵液急性毒性试验

试验结果显示,试验组鱼和对照组鱼均未出现死亡。试验组鱼摄食能力和活动情况均正常,体表无中毒或病变症状,解剖后观察内脏也无病理症状,与对照组无差异。说明放线菌发酵液对鲤无急性毒性。

3.6 发酵液中抗菌活性成分的稳定性

由表 6~9 可得,发酵液中的抗菌活性成分对热、pH、光和贮藏时间都很稳定。

表 6 温度(°C)对发酵液抑菌活性的影响

Tab. 6 Effect of temperature on bacteriostasis activity of ferment broth

温度/°C	抑菌圈直径/mm	温度/°C	抑菌圈直径/mm
60	23.0	100	23.0
70	23.1	121	21.7
80	23.0	CK	23.0
90	22.9		

表 7 pH对发酵液抑菌活性的影响

Tab. 7 Effect of pH on bacteriostasis activity of ferment broth

pH	抑菌圈直径/mm	pH	抑菌圈直径/mm
1	23.0	8	23.1
2	22.8	9	23.0
3	22.9	10	23.0
4	22.8	11	22.9
5	23.0	12	22.7
6	22.9	CK	23.0
7	23.1		

表 8 光对发酵液抑菌活性的影响

Tab. 8 Effect of light on bacteriostasis activity of ferment broth

光照时间/h	抑菌圈直径/mm	光照时间/h	抑菌圈直径/mm
1	23.1	6	23.0
2	23.0	7	23.0
3	23.2	8	22.7
4	23.0	CK	23.0
5	22.9		

表 9 贮藏时间对发酵液抑菌活性的影响

Tab. 9 Effect of storage time on bacteriostasis activity of ferment broth

贮藏时间/d	抑菌圈直径/mm	
	4°C	室温
30	23.0	23.1
60	22.9	23.0
90	23.1	23.0
120	23.0	22.9
150	23.0	23.0
180	22.9	22.7
CK	23.0	

4 讨论

细菌分类学家普遍认为,16S rDNA 序列同源性大于 97 % 即为同种成员。此放线菌 DL2 - F - 5 的 16S rDNA 序列与弗氏链霉菌的 16S rDNA 序列同源性达到 99.6 %, 故初步将其归为弗氏链霉菌 (*Streptomyces fradiae*)。由于仅细胞壁化学组分分析和 16S rDNA 的序列比对还不够, 对于菌株 DL2 - F - 5 具体分类地位尚需进一步通过 DNA - DNA 杂交等其它方法来验证。

发酵条件优化结果显示, 容易被分解利用的葡萄糖对抗菌活性物质的合成效果较好, 而不易利用的麦芽糖、甘露糖和淀粉, 对抗菌活性物质的合成效果并不理想, 这与彭海萍等^[14]利用弗氏链霉菌以淀粉作为碳源生产泰乐菌素的报道有一定的差异性。在选择最佳氮源时, 以牛肉膏最为理想, 这与管玉霞^[15]报道的利用酵母膏和蛋白胨作为弗氏链霉菌发酵的氮源来产生新霉素的报道是一致的。确定的最佳海盐浓度为 1.5 %, 推测这是由于此菌从浅海分离, 故最佳盐度高于淡水中的盐度又低于深海的盐度。装样量直接与液体发酵过程中的供氧问题息息相关。供氧不足抗菌活性成分的产量会明显下降, 甚至根本就不产生; 但是如果供氧过多, 抗菌活性物质的产量也会下降甚至不产生, 因此控制好装样量对于抗生素的产生也是至关重要的。

嗜水气单胞菌可以引起多种鱼类的败血症, 给水产养殖业造成巨大的经济损失。本研究发现, 此菌产生的抗菌活性物质不但能够有效的抑制、杀灭嗜水气单胞菌, 而且能够较好地防治由该病原菌导致的鱼类败血症。众所周知, 药物作用是药物与动物机体间相互作用的综合表现, 药物在动物体内需经吸收、分布、生物转化和排泄, 其治疗效果要受到给药方式、药物进入体内后的化学结构变化和生物代谢、药物在生物体和组织中的分布等多种因素的影响。动物治疗试验表明, 该菌发酵液能够有效杀灭腹腔感染的病原菌, 并且进一步说明该菌产生的抗菌活性物质在鱼类代谢中不会失去抗菌活性, 能够用于鱼类内服抗菌药物的开发研究。毒性试验证实, 该抗菌物质在试验剂量范围内对鱼没有毒理作用, 说明该

抗菌活性物质对鱼类比较安全。且稳定性试验显示,该抗菌活性物质对热、pH 和光都具有很强的稳定性,且贮藏稳定性也较强。因此,此抗菌活性物质具有很大的研究和应用价值。本研究进一步的工作将对海洋放线菌 DL2 - F - 5 产生的抗菌活性物质进行纯化及鉴定。

参考文献:

- [1] 薛恒平. 浅析水产养殖中的有益菌与生态防治[J]. 畜牧与兽医,2006,38(2):19-21.
- [2] 齐欣,张峻. 益生菌在对虾养殖中的应用[J]. 中国饲料,2006,14:32-34.
- [3] 许志强,杨启银,吴向华,等. 沼泽红假单胞菌在暗纹东方鱼屯育苗上的应用[J]. 南京师大学报(自然科学版),2004,27(4):85-88.
- [4] 刘波,刘文斌,王恬. 芽孢杆菌在水产养殖中的应用[J]. 中国饲料,2004,21:22-24.
- [5] 杨先乐,曹海鹏,钱云云,等. 噬菌蛭弧菌——水产动物病害生物防治的新工具[J]. 淡水渔业,2006,36(2):56-60.
- [6] 王高学,顾忠旗,原居林,等. 杀灭水产病原菌筛选及防治试验研究[J]. 安徽农业科学,2007,35(9):2613-2614.
- [7] 来航线,盛敏,杨保伟,等. 盐碱土中放线菌分离方法研究[J]. 西北农林科技大学(自然科学版),2006,34(10):113-117.
- [8] Lechevalier, H A. The development of applied microbiology at rutgers[M]. Waksman Institute of Microbiol, NY, 1982:29.
- [9] 王平. 测定放线菌菌体中氨基酸和单糖的快速方法—薄层层析法[J]. 微生物学通报,1986,13(5):2-8.
- [10] Marchesi J R, Sato T, Weightman A J, *et al.* Design and evaluation of useful bacterium - specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA[J]. Applied Environmental Microbiology, 1998, 64(2):795-799.
- [11] MURRY P R. Manual of Clinical Microbiology[M]. 8th ed. Washington DC: ASM Press, 2003: 1037-1178.
- [12] 蔡圣友. 标准曲线法测定乙酰螺旋霉素胶囊的抗生素效价[J]. 海峡药学,2004,16(5):69-71.
- [13] 曲彩红,席云,陶玲,等. 几种抗感冒制剂的体外抑菌作用对比研究[J]. 中国现代应用药学杂志,2005,22(5):420-421.
- [14] 彭海萍,王兰,曹健,等. 培养基成分对泰乐菌素产量的影响[J]. 粮食与饲料工业,2002,4(3):27.
- [15] 管玉霞. 增加新霉素产量的研究[J]. 郑州大学学报理学版,2006,38(2):109-112.