

# 一株铜绿假单胞菌的分离鉴定及其对 VP<sub>AHPND</sub> 拮抗效果的评价

刘学实<sup>1</sup>, 蒋 葛<sup>2</sup>, 沈 辉<sup>2</sup>, 乔 毅<sup>2</sup>, 成 婕<sup>2</sup>, 曹晓慧<sup>2</sup>, 窦雅斌<sup>3</sup>,  
温梦莹<sup>3</sup>, 万夕和<sup>2</sup>, 王李宝<sup>2</sup>, 黎 慧<sup>2</sup>, 史文军<sup>2</sup>

(1. 南京师范大学海洋科学与工程学院, 江苏 南京 210023)

(2. 江苏省海洋水产研究所, 江苏 南通 226007)

(3. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

**[摘要]** 近年来, 急性肝胰腺坏死病 (Acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND) 造成了凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 养殖业巨大的经济损失, 其病原为一类含有致病基因 *PirAB* 的弧菌 (*Vibrio*), 主要为副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, VP<sub>AHPND</sub>)。本研究以 VP<sub>AHPND</sub> 为受试菌株, 从江苏海域捕获的黄姑鱼 (*Nibea albiflora*) 体内分离筛选对 VP<sub>AHPND</sub> 具有抑制作用的拮抗菌株。通过形态学、生理生化及分子生物学方法进行鉴定, 研究了其拮抗效果、拮抗活性物质, 并对生物安全性和被动保护效果进行评估。结果表明, 分离筛选出 1 株具有良好拮抗效果的菌株 JSHY97, 经鉴定该菌株为铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)。该菌株对 3 株具有不同分型的 VP<sub>AHPND</sub> 均具有良好的拮抗效果, 其抑菌圈直径达 19.25 mm~21.80 mm, 初步判断其活性物质来源于胞外产物。口服 JSHY97 的凡纳滨对虾的 7 d 保护率也达到 80%, 拮抗组的凡纳滨对虾体内的毒力基因 *PirA* 拷贝数显著低于对照组 ( $P<0.05$ )。安全性实验表明 JSHY97 对斑马鱼 (*Brachydanio rerio*) 和凡纳滨对虾无毒力。由此表明, 本研究得到的铜绿假单胞菌菌株 JSHY97 对 VP<sub>AHPND</sub> 具有较好的抑制作用, 为 AHPND 的防治提供了新的菌株资源。

**[关键词]** VP<sub>AHPND</sub>, 凡纳滨对虾, 拮抗菌, 铜绿假单胞菌

**[中图分类号]** Q939.9 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2023)01-0073-07

## Isolation, Identification and Evaluation of an Antagonistic Bacteria of VP<sub>AHPND</sub> Strain

Liu Xueshi<sup>1</sup>, Jiang Ge<sup>2</sup>, Shen Hui<sup>2</sup>, Qiao Yi<sup>2</sup>, Chen Jie<sup>2</sup>, Cao Xiaohui<sup>2</sup>, Dou Yabin<sup>3</sup>,  
Wen Mengying<sup>3</sup>, Wan Xihe<sup>2</sup>, Wang Libao<sup>2</sup>, Li Hui<sup>2</sup>, Shen Wenjun<sup>2</sup>

(1. College of Marine Science and Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

(2. Jiangsu Institute of Oceanology & Marine Fisheries, Nantong 226007, China)

(3. College of Fisheries and Life, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** Acute hepatopancreatic necrosis disease causes serious economic losses to the *Litopenaeus Vannamei* shrimp industry in recent years. Studies have shown that the pathogen responsible for this disease is a type of *Vibrio* containing *PirAB* virulence factors, specifically *Vibrio parahaemolyticus* (VP<sub>AHPND</sub>). In this paper, the antagonistic strain of VP<sub>AHPND</sub> was isolated from *Nibea albiflora* in the coastal waters of Jiangsu province, with identified by morphological characteristics, physiological and biochemical characteristics, and 16S rDNA sequence analysis. Its antagonistic effect and antagonistic active substances were preliminarily studied, and the assessment of bio-safety were preliminarily optimized. The results showed that the strain JSHY97 with powerful antagonistic effect was screened and identified as *Pseudomonas aeruginosa*. JSHY97 had an antagonistic effect against 3 strains of VP<sub>AHPND</sub> with a zone of inhibition diameter of 19.25 mm~21.80 mm,

收稿日期: 2022-09-19.

基金项目: 国家农业长期性基础性重大疫病监测项目 (NAES-AH-011)、江苏省农业专项 (2022-SJ-037-02)、中国盐城渔业高质量发展研究课题 (YCSCYJ2021005)、南通市科技计划项目 (JC2021089、JCZ20045、JC2020119、JC2020116)。

通讯作者: 沈辉, 博士, 正高级工程师, 研究方向: 水生动物病害防治. E-mail: darkhui@163.com

and its active substances were preliminarily judged to be extracellular products. After 7 days of diet, protection rates of 80% were also achieved by feeding JSHY97 to *L. vannamei*. The copy number of the virulence gene *PirA* in the JSHY97-fed *L. vannamei* was significantly lower than that in the control group ( $P < 0.05$ ). Safety experiments showed that JSHY97 was non-toxic to *Brachydanio rerio* and *L. vannamei*. *Pseudomonas aeruginosa* strain JSHY97 has a good inhibitory effect on VP<sub>AHPND</sub>, which provides a new strain resource for the prevention and treatment of AHPND.

**Key words:** *Vibrio parahaemolyticus*, *Litopenaeus vannamei*, antagonistic bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*

近年来,致急性肝胰腺坏死病弧菌(Acute hepatopancreatic necrosis disease-causing *Vibrio parahaemolyticus*, VP<sub>AHPND</sub>)作为一种新型病原可引发对虾大量死亡,造成了巨大的经济损失,严重危害了对虾养殖业健康发展<sup>[1]</sup>. 该病原为一类携带 PirA 和 PirB 二元毒力蛋白的弧菌,主要为副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)、哈维氏弧菌(*V. harveyi*)、坎氏弧菌(*V. campbellii*)、欧文斯氏弧菌(*V. owens*)以及溶藻弧菌(*V. alginolyticus*),陆续也有携带毒力蛋白的报道<sup>[2-4]</sup>. 本研究室对江苏 VP<sub>AHPND</sub> 流行病学调查发现,该病原在对虾养殖过程中感染阳性率达到 29.86%(未发表数据),同时发现 VP<sub>AHPND</sub> 具有不同的株型,且具有不同的毒力特征<sup>[5]</sup>. 由此可见,VP<sub>AHPND</sub> 已成为流行范围最广和致病性最强的对虾病原之一,业界亟需建立对该病原的防控方法.

近年来,拮抗菌作为环境友好型的病害防治方法,已成为关注的热点. 研究者们从海洋环境、对虾肠道中筛选拮抗菌,以抑制各类弧菌的侵染. 赵淑江等从南麂岛近海海洋沉积物中筛选出的海洋放线菌对致大黄鱼(*Larimichthys crocea*)发病的副溶血弧菌和哈维氏弧菌具有很强的抑制作用<sup>[6]</sup>. 凡纳滨对虾(*Litopenaeus Vannamei*)养殖池筛选出的假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas nigrifaciens*),对鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*)、哈维氏弧菌及副溶血弧菌均有较强的抑制作用<sup>[7]</sup>. 芽孢杆菌(*Bacillus sp.*)和假单胞菌(*Pseudomonas adaceae*)微生物制剂广泛应用于海水甲壳类养殖池塘中,能够有效地改善养殖池塘中生物群落结构,提高养殖动物的存活率和生长速度<sup>[8]</sup>. 本研究室前期分离得到的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)菌株 H36 对 VP<sub>AHPND</sub> 菌株 SHY1777 具有较好的拮抗效果<sup>[9-10]</sup>.

尽管近年来本研究室及其他学者报道了 VP<sub>AHPND</sub> 拮抗菌株的研究,但针对不同毒力 VP<sub>AHPND</sub> 菌株拮抗菌的筛选和能力评估尚未见报道. 本研究从江苏南黄海海域捕获的黄姑鱼(*Nibea albiflora*)肠道内分离得到了 3 株拮抗菌,比较了拮抗菌对不同毒力 VP<sub>AHPND</sub> 拮抗能力,并测试了拮抗菌对回接感染 VP<sub>AHPND</sub> 凡纳滨对虾的保护效果,为 AHPND 的防治及相关生物制剂的开发奠定基础.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 实验菌株与样品

VP<sub>AHPND</sub> 菌株:SHY1858、SHY1777、SHY1669 由江苏省海洋水产研究所海洋生物技术实验室提供. 试验用黄姑鱼采自江苏沿海海域,捕捞冷藏带回实验室,进行拮抗菌株的筛选、分离和鉴定. 试验用斑马鱼(*Brachydanio rerio*)为野生 AB 型,来自国家斑马鱼资源中心,均为同期受精卵孵化,体长(3.5±0.3)cm. 试验凡纳滨对虾采自江苏省南通市如东县某养殖场,体长(5.2±0.2)cm. 试验凡纳滨对虾苗种采自南通某苗种淡化场,体长(1±0.1)cm.

#### 1.1.2 培养基与耗材

细菌培养基:2216E、高氏一号、LB 培养基购自杭州滨河微生物试剂有限公司. 无菌空白药敏纸片和细菌微量生理生化反应鉴定管购自杭州滨河微生物试剂有限公司;细菌基因组提取试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司;引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;TaqMan 探针由赛默飞世尔科技公司合成.

### 1.2 拮抗菌的分离筛选与鉴定

#### 1.2.1 拮抗菌的分离与筛选

采用无菌操作解剖出黄姑鱼的肠道,将黄姑鱼的肠道剪开在无菌生理盐水中洗去肠道内容物,将肠道组织冷冻研磨至匀浆,采用 LB、2216E、高氏一号 3 种培养基梯度稀释涂布,28℃ 恒温培养 24 h,根据菌落形态、

大小、边缘整齐度以及透明度等方面特征的不同来挑选典型的单菌落进行划线纯化,纯化后-80℃甘油冻存。采用抑菌圈法进行拮抗菌的筛选,具体操作如下:将 VP<sub>AHPND</sub> 菌株复苏调至菌体浓度为  $5.0 \times 10^6$  CFU·mL<sup>-1</sup>,通过无菌涂布珠将 VP<sub>AHPND</sub> 均匀地涂在琼脂培养基平皿表面,待其晾干备用;将无菌药敏纸片贴在涂有 VP<sub>AHPND</sub> 的琼脂培养基表面,将分离得到的菌株于液体培养基培养至对数期,取 5 μL 菌液滴加至无菌空白药敏纸片中,以滴加 5 μL 灭菌生理盐水制作的纸片作为空白对照,28℃培养 24 h 后观测抑菌圈,筛选具有拮抗能力的菌株。

### 1.2.2 细菌形态学特征观察和生理生化鉴定

对筛选后的拮抗菌进行革兰氏染色,显微观察菌体的结构特征。参照《常见细菌系统鉴定手册》和《伯杰氏细菌鉴定手册》对筛选的菌株进行生理生化鉴定。将筛选后的拮抗菌接种至 LB 液体培养基,28℃振荡培养 24 h,离心收集菌体,无菌生理盐水洗涤 3 次,加入戊二醛固定液 4℃固定过夜,委托北京中科百测检测技术有限公司对其形态学进行扫描电镜观察。

### 1.2.3 分子生物学鉴定

采用细菌基因组提取试剂盒提取拮抗菌株基因组 DNA,通过 PCR 扩增其 16S rDNA (27F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG,1492R:GGTTACCTTGTACGACTT),扩增程序为 94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s、54℃复性 30 s、72℃延伸 90 s,循环 35 次;72℃终延伸 10 min。PCR 产物大小约 1.5 kb,扩增产物经 1% 浓度琼脂糖电泳检测无误后,委托上海生工生物有限公司测序,获得的序列进行 Blast 同源性比对分析,并使用 MEGA7.0 构建系统发育树。

## 1.3 拮抗菌的抑菌活性测定

### 1.3.1 拮抗菌的制备

将拮抗菌株按照 3 种不同方式进行培养处理(表 1),处理组 1:拮抗菌株在 LB 培养基中振荡培养 24 h;处理组 2:将拮抗菌株在 LB 液体培养基中振荡培养 24 h 后,将菌液与培养基以 1:100 的比例重新接种至 LB 液体培养基中振荡培养,重复传代 5 次后收集菌液;处理组 3:将 100 μL 重复传代 5 次后的拮抗菌液与 10 μL SHY1858 菌液接种至 5 mL 的 LB 液体培养基中,振荡培养 24 h,并使用无菌生理盐水将以上各处理组菌液在 600 nm 波长处的吸光值(OD<sub>600</sub>)调至为 1.5。各处理组均取 2 mL 菌液,离心取上清液,并通过 0.22 μm 孔径的滤膜除菌,4℃保存。取不同处理组的菌液及上清液开展拮抗抑菌实验,24 h 后观察记录各组对 VP<sub>AHPND</sub> 的拮抗活性。

### 1.3.2 抑菌活性测定

以 VP<sub>AHPND</sub> 菌株 SHY1858、SHY1777 和 SHY1669 作为受试菌,使用药敏试纸扩散法(K-B 法)测定抑菌活性:将其复苏后受试菌液浓度调至  $5.0 \times 10^6$  CFU·mL<sup>-1</sup>,在 LB 琼脂培养基上滴入 100 μL 的菌液,用涂布珠将菌液均匀涂在培养基平皿表面,待其晾干;将制备好的无菌空白药敏纸片贴在涂有 VP<sub>AHPND</sub> 菌株的琼脂培养基表面,分别取 10 μL 拮抗菌液或上清液滴加至药敏纸片中,另滴加 10 μL 灭菌生理盐水制作的纸片作为空白对照,每组均设 3 个生物学重复,28℃培养 24 h 后测量抑菌圈。

### 1.3.3 生长曲线与拮抗能力的关联性

将 JSHY97 接种于 LB 液体培养基,30℃,160 rpm/min,振荡培养 120 h。分别在 6 h、9 h、12 h、24 h、48 h、72 h、96 h、120 h 取菌液,测定其菌株在 600 nm 波长处的吸光值(OD<sub>600</sub>),并按照 1.3.2 方法测定抑菌活性,抑菌活性以抑菌圈直径作为评价指标,每组均设 3 个生物学重复。

## 1.4 安全性实验

生物安全实验分别采用斑马鱼及凡纳滨对虾苗种进行菌液浸浴测试。斑马鱼生物安全测试实验设置 3 组生物学重复,每组 10 只(体长  $3.2 \pm 0.5$  cm);凡纳滨对虾苗种安全测试实验设置 3 组生物学重复,每组 20 只(体长  $1.1 \pm 0.2$  cm)。以上实验组每天以  $1 \times 10^6$  CFU·g<sup>-1</sup> 的终浓度向每组加入拮抗菌,每天换入 1/3 新水,观察记录死亡个体数量。

### 1.5 拮抗保护性实验效果评价

将采自南通某苗种淡化场的凡纳滨对虾苗种随机分成拮抗组、感染组、空白组,每组分别放置在 3 个 10 L 的盐度 10 的水体中,每个水体 20 尾对虾苗种。对虾每天投喂 3 次,饲喂量为对虾体重的 5%。每天换一半水,拮抗菌投喂含 JSHY97 菌液的混合饲料,饲料中拮抗菌终浓度为  $1 \times 10^6$  CFU·g<sup>-1</sup>,空白组及感染组为相

同饲料混合等量的无菌 PBS. 饲喂 7 d 后,拮抗组及感染组同时回接  $VP_{AHPND}$ ,感染回接感染  $VP_{AHPND}$ ,实验步骤如下:将拮抗组和对照组对虾放入  $VP_{AHPND}$  浓度为  $1.0\times10^5$  CFU $\cdot$ mL $^{-1}$  的水体中浸泡 3 h,空白组在等体积的水体中浸泡 3 h. 随后拮抗组继续喂食拮抗菌混合饲料,感染组和空白组喂食商品饲料. 每天记录凡纳滨对虾的存活率,实验进行 7 d,将存活的凡纳滨对虾收集,-80 ℃ 冻存.

取虾肝胰腺组织匀浆 100 mg,参照海洋生物 DNA 提取试剂盒(上海生工生物有限公司)按照说明书提取 DNA. 参照 Han 等<sup>[11]</sup> 提供的 qPCR 方法检测试验对虾体内的 *PirA* 毒力基因. 使用 ABI StepOne Plus 实时荧光定量 PCR 进行扩增,扩增体系含有上下游引物各 0.3  $\mu$ mol/L 和 TaqMan 探针 0.2  $\mu$ mol/L,模板 cDNA 1  $\mu$ L,20  $\mu$ L. 扩增程序:95 ℃ 20 s;95 ℃ 1 s,60 ℃ 20 s,循环 40 次.

1.6 数据处理

试验数据采用 GraphPad Prism 8.3.0 软件、Excel 软件和 Origin 2019 软件统计分析,采用单因素方差分析(ONE-WAY ANVOA)进行统计分析,采用 Duncan 氏新复极差法进行差异性检验分析.

2 结果与讨论

2.1 拮抗菌的分离筛选与鉴定

2.1.1 菌株的形态特征观察及生理生化鉴定

本文从黄姑鱼肠道中分离出多株细菌,通过抑菌圈法筛选出对 3 株  $VP_{AHPND}$  拮抗能力较强的菌株 JSHY97,该菌株在固体 LB 培养基菌落为圆形淡黄色、边缘无褶皱、表面光滑且不透明,并带有乳白色的光环(图 1A、1B). 经革兰氏染色,鉴定为革兰氏阴性短杆菌(图 1C);电子扫描显微镜观察其菌体表面褶皱,呈短杆状,具有菌毛,未见鞭毛及结构(图 1D);在液体培养基中静止培养时无菌膜形成,呈浑浊状态. JSHY97 号拮抗菌生理生化实验结果见表 2.

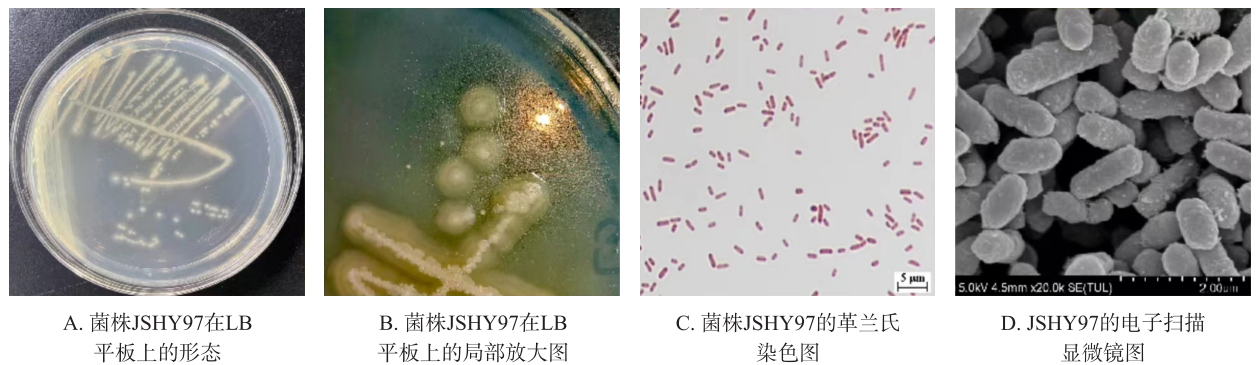


图 1 菌株 JSHY97 号的形态特征观察及革兰氏染色图

Fig. 1 Observation of the morphological characteristics and Gram stain of strain JSHY97

表 2 菌株 JSHY97 的生理生化鉴定

Table 2 Biochemical identification test results of strain JSHY97							
指标	结果	指标	结果	指标	结果	指标	结果
丙氨酸-苯丙氨酸-脯氨酸芳胺酶	+	$\beta$ -N-乙酰葡萄糖苷酶	-	谷氨酸-甘氨酸-精氨酸芳胺酶	+	N-乙酰- $\beta$ -半乳糖氨酶	-
H <sub>2</sub> S 产生	+	侧金盏花醇	-	谷氨酰胺芳胺酶	+	L-乳酸盐同化	-
$\beta$ -葡萄糖苷酶	-	D-麦芽糖	+	D-甘露醇	-	组氨酸同化	-
L-脯氨酸芳胺酶	-	脂酶	-	古老糖	+	COURMARATE	+
蔗糖	+	D-塔格糖	-	D-海藻糖	-	$\beta$ -葡萄糖苷酸酶	-
乳酸盐产碱	+	$\alpha$ -葡萄糖	+	琥珀酸盐产碱	+	ELLMAN	+
氨基乙酸芳胺酶	+	鸟氨酸脱羧酶	-	赖氨酸脱羧酶	-	$\alpha$ -半乳糖苷酶	-
O/129 耐受	+	吡咯烷基芳胺酶	+	L-苹果酸盐同化	-	磷酸酶	+
L-阿拉伯醇	-	D-纤维二糖	-	$\beta$ -半乳糖苷酶	-	柠檬酸盐(钠)	-
D-葡萄糖	+	$\gamma$ -谷氨酰转移酶	+	葡萄糖发酵	+	丙二酸盐	-
D-甘露糖	-	$\beta$ -木糖苷酶	-	$\beta$ -丙氨酸芳胺酶	-	5-酮-葡萄糖苷	-
酪氨酸芳胺酶	+	尿素酶	+	D-山梨醇	-		

注:“+、-”分别代表反应结果为阳性或阴性.

— 76 —

### 2.1.2 分子生物学鉴定

菌株 JSHY97 的 16S rDNA 序列经 BLAST 比对发现,该菌株与铜绿假单胞菌(*Pseudomonas\_aeruginosa*)同源性达 100%,构建系统发育树与铜绿假单胞菌聚为一支(如图 2). 结合该菌的形态、生理生化特性及 16S rDNA 基因序列分析,将拮抗菌 JSHY97 鉴定为铜绿假单胞菌.

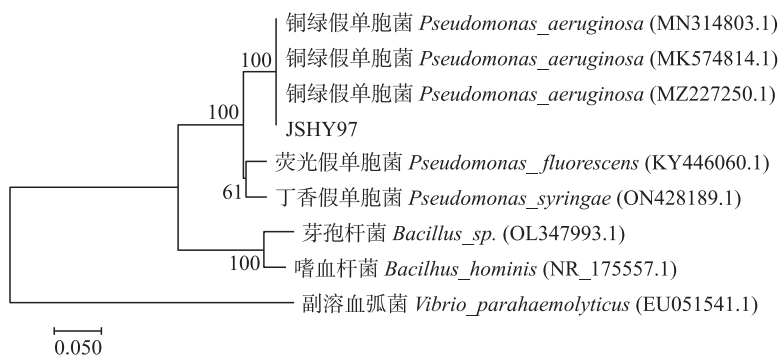
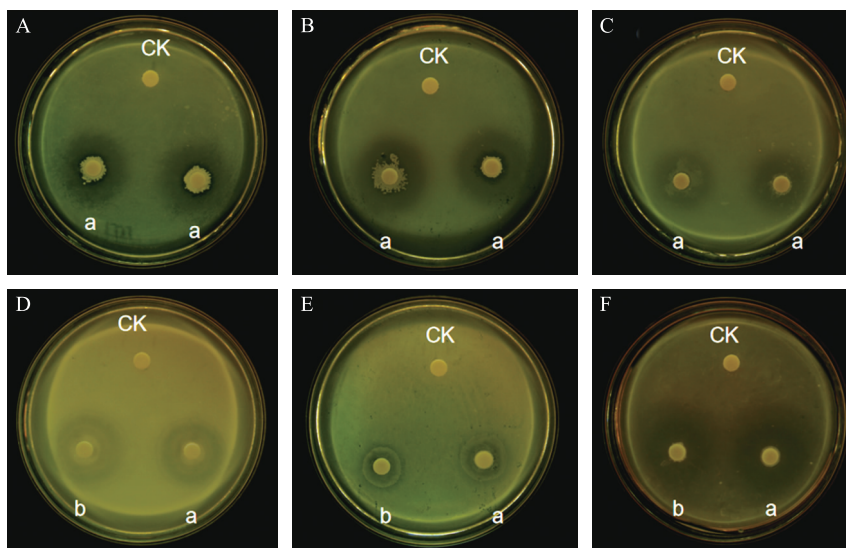


图 2 基于 16S rDNA 序列的菌株 JSHY97 的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain JSHY97 based on 16S rDNA sequence

### 2.2 拮抗菌的抑菌活性测定

本实验发现 JSHY97 菌株对 SHY1858、SHY1776、SHY1669 菌株均具有较好的拮抗效果(图 3A、3B、3C),拮抗圈直径无显著性差异( $P>0.05$ )(图 4A). 处理组 1 和处理组 3 的菌液和上清液对 SHY1858 均有较好的拮抗效果,处理组 2 的菌液和上清的拮抗能力显著弱于处理组 1、处理组 3(图 3D、3E、3F),3 个处理组的拮抗圈直径有显著性差异( $P<0.05$ )(图 4B).



A, B, C 分别为处理组 1 对 SHY1885、SHY1777 和 SHY1669 的抑菌效果;D, E, F 分别为处理组 1, 处理组 2 和处理组 3 的上清以及菌液对 SHY1858 的抑菌效果;CK 为空白, a 为菌液, b 为上清

图 3 不同处理组的 JSHY97 对 VP<sub>AHPND</sub> 的抑菌效果

Fig. 3 The inhibition zone of JSHY97 on VP<sub>AHPND</sub> and the inhibition zone of JSHY97 on VP<sub>AHPND</sub> in different treatment groups

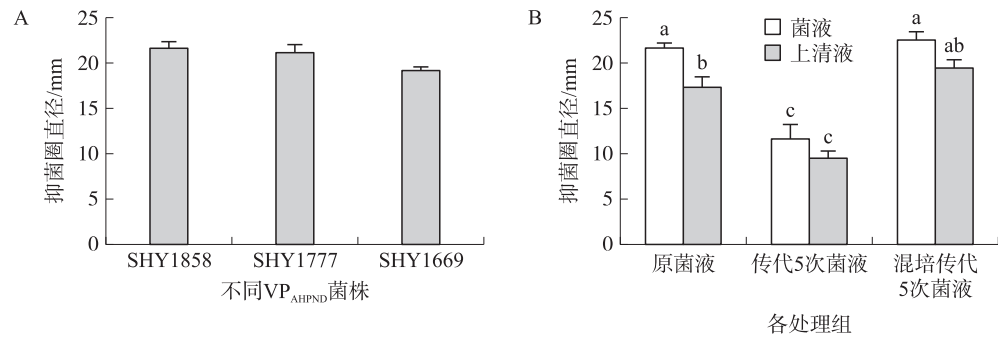
### 2.3 生长曲线与拮抗能力曲线

不同生长期的 JSHY97 菌液抑菌效果不同(图 5). 该菌株经过 4 h 的迟缓期后进入对数生长期,菌株繁殖速度较快,随着培养时间的增加,JSHY97 生长量和抑菌活性也随之增大,抑菌活性在 24 h 到达最大值( $21.91\pm0.121$ )mm. 24 h 后 JSHY97 生长速率减缓,48 h 后生长量趋于稳定;同时菌株 JSHY97 的抑菌活性出现明显下降.

### 2.4 保护性实验

回接感染 VP<sub>AHPND</sub> 实验 7 d 后各实验组的存活率如图 6A 所示. 第一天,对照组和拮抗菌组出现死亡,空白组未出现死亡. 2 d~6 d,感染组死亡数量大幅增加,拮抗菌组有零星死亡,空白组出现个别死亡,拮抗菌组





A.JSHY97 对 SHY1858、SHY1777 以及 SHY1669 的抑菌效果;B.JSHY97 的不同处理组对 SHY1858 的抑菌效果;字母代表有显著性差异 ( $P<0.05$ ).

图 4 JSHY97 对 3 株 VP<sub>AHPND</sub> 的抑菌效果以及不同处理组 JSHY97 对 SHY1858 的抑菌效果

Fig. 4 The antibacterial effect of JSHY97 against three VP<sub>AHPND</sub> strains and the antibacterial effect of JSHY97

的存活率也始终高于感染组,低于空白组. 7 d,空白组存活率近 90%,拮抗组存活率为 80%,对照组拮抗率仅为 46%. 实验过程中,感染组对虾个体活力明显减弱,肝胰腺颜色变淡,部分个体出现萎缩状态,空白组及拮抗组对虾个体较为正常. 实验结束后,将存活对虾个体经 qPCR 检测 VP<sub>AHPND</sub> 毒力基因拷贝发现,拮抗组对虾体内 *PirA* 毒力基因的拷贝量显著低于感染组 ( $P<0.01$ ),空白组内未检出 *PirA* 基因(图 6B).

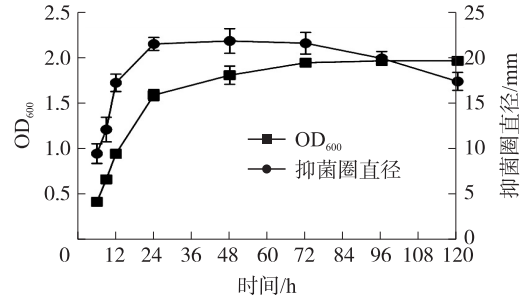
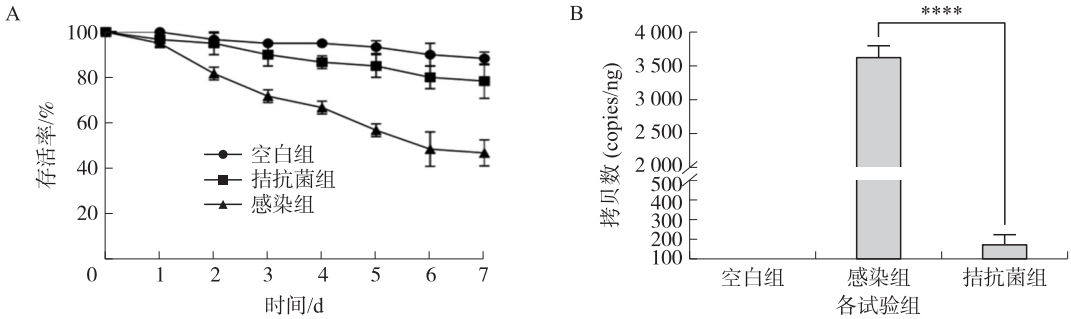


图 5 JSHY97 的生长曲线与拮抗能力曲线

Fig. 5 Growth curve and antagonistic capacity curve of JSHY97



A.空白组,拮抗组和感染组的对虾在 7 d 内的存活率;B.7 d 后空白组,拮抗组和感染组存活对虾 *PirA* 毒力基因的拷贝数;“\*”代表差异性代表有显著性差异 ( $P<0.05$ ),“\*”数量代表显著性差异程度.

图 6 不同试验组对虾在 7 d 内的存活率以及 7 d 后不同试验组存活对虾 *PirA* 毒力基因的拷贝数

Fig. 6 Survival of *L. vannamei* in different test groups at 7 days and copy number of *PirA* virulence gene of shrimps surviving in different test groups after 7 days

2.5 讨论

本文从黄姑鱼体内分离出 3 株具有 VP<sub>AHPND</sub> 拮抗能力的菌株,其中菌株 JSHY97 对不同毒力 VP<sub>AHPND</sub> 均具有明显的拮抗抑制效果. 根据形态学特征、生理生化 and 分子生物学的鉴定结果,菌株 JSHY97 被鉴定为铜绿假单胞菌. 尽管在前期的医学领域研究报道中铜绿假单胞菌被认为是一种条件致病菌<sup>[12]</sup>,但在水产领域中,已有学者将分离出的铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)用于凡纳滨对虾养殖,不仅能够提高对虾的成活率和增重率,还能有效改善水质,稳定水体的酸碱度<sup>[13]</sup>. Priyaja 等<sup>[14]</sup>也发现一株铜绿假单胞菌产生的绿脓杆菌素能够抑制哈维氏弧菌的生长. 在本研究中,通过安全性实验未发现菌株 JSHY97 具有致病性,初步可应用于 VP<sub>AHPND</sub> 的防治. 此外,在前期研究中,报道了普罗威登斯菌(*Providencia. sp*)<sup>[15]</sup>、枯草芽孢杆菌<sup>[16]</sup>、乳酸菌(*Lactobacillus. sp*)<sup>[17]</sup>、假单胞菌<sup>[18]</sup>和假交替单胞菌<sup>[19]</sup>等菌株具有抑制 VP<sub>AHPND</sub> 的能力,而本研究发现的 JSHY97 铜绿假单胞菌拮抗 VP<sub>AHPND</sub> 菌株为首次报道.

本课题组前期通过 MLST 序列分型确定 SHY1669、SHY1777 ST 型为 ST452、ST919,并初步将 SHY1669、

SHY1777 分类为毒力强株,SHY1858 为毒力弱株<sup>[5]</sup>,同时也报道了拮抗菌 H36 对 VP<sub>AHPND</sub> 菌株 SHY1669 具有较强的拮抗能力,但未比较对其他 VP<sub>AHPND</sub> 菌株的拮抗效果<sup>[9]</sup>. 在本研究中,通过纸片法比较了 JSHY97 对不同 VP<sub>AHPND</sub> 菌株的拮抗能力,发现 JSHY97 对 SHY1669、SHY1777 和 SHY1858 菌株均有较好的拮抗效果,表明 JSHY97 对 VP<sub>AHPND</sub> 具有较为广泛的抑制能力,具有较好的商业应用潜力. 此外,通过上清液的拮抗实验,也初步确定了 JSHY97 的抑菌活性物质来源胞外产物.

本研究发现,JSHY97 在多次传代后,其拮抗效果明显减弱,但与 VP<sub>AHPND</sub> 菌株共培养后,其拮抗能力明显增强,推测 JSHY97 的拮抗能力需要在病原菌持续刺激下才会保持较强的抗菌活性. 这一现象与 Wang 等<sup>[20]</sup>的研究结果较为相似,该学者发现链霉菌(*Streptomyces aureofaciens*)与含霉菌酸的细菌共培养可能激活生物活性物质的产生,表明一些共培养物能够表现出额外或增强的抗菌活性. 本实验通过将 SHY1858 与 JSHY97 共培养后,JSHY97 仍然能够表现出较强的抗 VP<sub>AHPND</sub> 活性.

近年来,学者们发现通过在饲料中添加拮抗菌,能够显著降低凡纳滨对虾体内病原菌的含量. Lucio 等<sup>[21]</sup>在墨西哥海洋中分离出一株抗 VP<sub>AHPND</sub> 的坎贝氏弧菌,在添加坎贝氏弧菌后,显著降低了暴露在 VP<sub>AHPND</sub> 的对虾累积死亡率,并且试验组凡纳滨对虾体内 VP<sub>AHPND</sub> 的 DNA 拷贝数降低. Mery 等<sup>[22]</sup>使用魔鬼弧菌(*Vibrio diabolus*)、肝弧菌(*Vibrio hepatarius*)以及蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)混合浸浴凡纳滨对虾后,发现微生物菌群能够在对虾体内定植,经过 16 d 培养后,暴露在 VP<sub>AHPND</sub> 中的凡纳滨对虾体内生存率提高. 本文通过预喂食 JSHY97 进行回感实验后,拮抗组的凡纳滨对虾保护率达到 80%,并通过 qPCR 定量检测验证发现喂食拮抗菌组的凡纳滨对虾体内 PirA 显著低于对照组. 这也表明拮抗菌在凡纳滨对虾体内定植后,能够有效降低凡纳滨对虾体内的 VP<sub>AHPND</sub> 含量.

### 3 结论

本文从黄姑鱼体内分离出多种细菌,并筛选出一株对 VPAHPND 具有显著拮抗作用的铜绿假单胞菌 JSHY97. 初步判断 JSHY97 的抗菌活性物质来源胞外产物,并且 JSHY97 与 VPAHPND 共培养能增强抗菌活性. 预投喂含 JSHY97 的饲料后,发现暴露在 VPAHPND 环境下的凡纳滨对虾相比对照组存活率提高 34%,对虾体内的 VPAHPND 的含量显著降低. 菌株 JSHY97 为 AHPND 的生物防治提供了新的菌株资源,并具有在对虾养殖中应用的潜力.

### [参考文献]

- [1] 唐小千,徐洪森,战文斌. 对虾急性肝胰腺坏死综合症研究进展[J]. 海洋湖沼通报,2016(2):90-93.
- [2] TRAN L,NUNAN L,REDMAN R M,et al. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting *penaeid shrimp*[J]. Diseases of aquatic organisms,2013,105(1):45-55.
- [3] LEE C,CHEN I,YANG Y,et al. The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015,112(34):10798-10803.
- [4] 李吉云,沈辉,孟庆国,等. 对虾急性肝胰腺坏死病(AHPND)流行病学、诊断及防控措施的研究进展[J]. 海洋科学, 2021,45(3):163-172.
- [5] 李吉云. 急性肝胰腺坏死病致病菌 VP<sub>-(AHPND)</sub> 毒力差异的初步研究[D]. 南京:南京师范大学,2021.
- [6] 赵淑江,刘健,杨星星,等. 南麂岛海洋沉积物中抗大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)致病弧菌的放线菌分离和筛选研究[J]. 海洋与湖沼,2010,41(4):571-576.
- [7] 张欢欢,王秀华,李晨,等. 对虾养殖池中一株弧菌拮抗菌的分离鉴定[J]. 渔业科学进展,2016,37(3):85-92.
- [8] 肖国华. 一种复合微生态制剂对养殖水体中生物因子的影响[J]. 微生物学通报,2013,40(7):1154-1162.
- [9] 冯艳琴,沈辉,王兴强,等. VP(AHPND)拮抗菌筛选鉴定及其活性物质的初步研究[J]. 水产学杂志,2022,35(2):35-41.
- [10] XU L L,YUAN J F,CHEN X X,et al. Screening of intestinal probiotics and the effects of feeding probiotics on the digestive enzyme activity,immune,intestinal flora and WSSV resistance of *Procambarus clarkii*[J]. Aquaculture,2021(540):736-748.
- [11] HAN J E,TANG K F J,PANTOJA C R,et al. qPCR assay for detecting and quantifying a virulence plasmid in acute hepatopancreatic necrosis disease(AHPND) due to pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Aquaculture,2012,442:12-15.

(下转第 87 页)

- 36(4):70-76.
- [14] 刘海萍,陆舜华,郑连斌,等. 云南蒙古族舌运动类型的研究[J]. 内蒙古师范大学学报(自然科学汉文版),2007,36(3):354-356.
- [15] 闫春燕,郑连斌,张兴华,等. 四川邛峡汉族舌运动类型的人类学研究[J]. 华中师范大学学报(自然科学版),2011,45(2):290-293.
- [16] 李咏兰,郑连斌,冯晨露,等. 革家人 5 项舌运动类型的群体遗传学研究[J]. 华中师范大学学报(自然科学版),2014,48(3):408-412.
- [17] 席焕久,陈昭. 人体测量方法[M]. 北京:科学出版社,2010.
- [18] STARTEVANT A H. A new inherited character in man[J]. Proc National USA,1940,26:100-102.
- [19] BHASIN M K,SHIL A P,MARDHU B,et al. Biology of the people of Sikkim,India[J]. Anthropologischer anzeiger,1987,45(4):351-360.
- [20] BULLIYYA G. Study on Anthropogenetic traits in a caste group of Andhra Pradesh[J]. Anthropologist,2003,5(3):197-199.
- [21] ODOKUMA E I,EGHWORO O,AVWIORO G,et al. Tongue rolling and tongue folding traits in an African population[J]. International journal of morphology,2008,26(3):533-535.
- [22] FORNACIARI G,MALLEGGNI F. Palaenutritional studies on skeletal remains of ancient populations from the Mediterranean area:an attempt to interpretation[J]. Anthropologischer anzeiger,1987,45(4):361-370.
- [23] GAHRES E E. Tongue rolling and tongue folding and other hereditary movements of the tongue[J]. Journal of heredity,1952,43:221-225.
- [24] LEE J W. Tongue-folding and tongue-rolling[J]. Journal of heredity,1955,56:289-291.
- [25] DATTA U,MITRA M,SINGHROL C S. A study of nine anthroposcopic traits among the three tribes of the bastar district in Madhya Pradesh India[J]. Anthropologischer anzeiger,1989,47(1):57-71.
- [26] 郑连斌,陆舜华,栗淑媛,等. 人类舌运动类型[J]. 天津师范大学学报(自然科学版),2002,22(1):53-56.
- [27] 郑连斌,陆舜华,李晓卉,等. 内蒙古三个族群舌运动类型的遗传学研究[J]. 遗传,1997,19(3):23-25.
- [28] 黄海. 贵州荔波县瑶族民族社会考察[J]. 中南民族学院学报(社会科学版),1987(2):88-94.
- [29] 史继忠. 回顾月亮山瑶族调查[J]. 贵州民族大学学报(哲学社会科学版),2019(2):1-38.

[责任编辑:黄 敏]

(上接第 79 页)

- [12] REYNOLDS D,KOLLEF M,REYNOLDS D,et al. The epidemiology and pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections:an update. [J]. Drugs,2021,81(18):1-15.
- [13] 李连星,陈成勋,张扬,等. 铜绿假单胞菌 YY24 对凡纳滨对虾生长及水质的影响[J]. 水生态学杂志,2018,39(3):87-93.
- [14] PRIYAJA P,JAYESH P,CORREYA N S,et al. Antagonistic effect of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from various ecological niches on *Vibrio* species pathogenic to crustaceans[J]. Journal of coastal life medicine,2014,2(1):76-84.
- [15] 甄晓然,沈辉,万夕和,等. 对虾源副溶血弧菌拮抗菌的筛选与评价[J]. 水产科学,2019,38(6):767-773.
- [16] 冯艳琴. VP<sub>AHPND</sub> 拮抗菌筛选鉴定及其活性物质的初步研究[D]. 连云港:江苏海洋大学,2021.
- [17] TRUC L N T,NGOC A T,HONG T T T,et al. Selection of Lactic Acid Bacteria(LAB) Antagonizing *Vibrio parahaemolyticus*: the Pathogen of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease(AHPND) in Whiteleg Shrimp(*Penaeus vannamei*) [J]. Biology, 2019,8(4):91.
- [18] 杨行,章翔,龙昊,等. 假交替单胞菌对哈维氏弧菌拮抗作用初探[J]. 水产科学,2019,38(6):833-838.
- [19] WANG H,WANG C,TANG Y,et al. *Pseudoalteromonas* probiotics as potential biocontrol agents improve the survival of *Penaeus vannamei* challenged with acute hepatopancreatic necrosis disease(AHPND)—causing *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Aquaculture,2018,494:30-36.
- [20] WANG K R,LIU N,SHANG F,et al. Activation of secondary metabolism in red soil-derived streptomycetes via Co-Culture with mycolic acid-containing bacteria[J]. Microorganisms,2021,9(11):2187-2187.
- [21] LUCIO G,GABRIEL E C,JOSÉ C,et al. Assessment of probiotic bacteria from marine coasts against *Vibrio parahaemolyticus* (AHPND strains) in *Litopenaeus vannamei*[J]. Aquaculture research,2021,52(12):6396-6409.
- [22] MERY R,CRISTOBAL D,LIZETH S,et al. The probiotics *Vibrio diabolus*(Ili),*Vibrio hepatarius*(P62),and *Bacillus cereus sensu stricto*(P64) colonize internal and external surfaces of *Penaeus vannamei* shrimp larvae and protect it against *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Aquaculture,2022,549:737-826.

[责任编辑:黄 敏]