



3株抗弧菌解淀粉芽孢杆菌的筛选和鉴定以及生物学特性研究



梅仁卉¹, 胡迪¹, 赵蓓蓓^{1*}

1.浙江海洋大学水产学院, 浙江, 舟山, 316022

前言

三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*), 简称为梭子蟹, 隶属于甲壳纲、十足目、梭子蟹科 (*Portunidae*)、梭子蟹属, 是我国重要的经济蟹类, 大多分布在渤海、东海和黄海海域。近些年, 为了追求经济效益的同时也忽略了科学养殖的管理, 在集约化养殖的推动下, 梭子蟹养殖环境中弧菌病频繁爆发。本研究从三疣梭子蟹养殖池的底泥中筛选出3株益生菌, 并对形态和分子生物学特征、抑菌能力、耐受性和安全性方面做了研究, 以便后期为三疣梭子蟹感染弧菌的保护效果的提供理论依据。

材料与方方法

实验所用的样品是来自于西轩岛养殖三疣梭子蟹养殖基地的底泥, 且底泥的初始重量为 (208.04 ± 32.19) g。用于人工感染的斑马鱼初始体重(3.5 ± 0.24)g, 养殖温度 (19 ± 0.76) °C, 投喂时间为8:00 am和6:00 pm, 暂养7d。用的溶藻弧菌和副溶血弧菌等菌株是本养殖实验室鉴定保存的菌株。对分离的菌株进行菌落形态和显微镜下芽孢形态的观察, 生理生化检测、16s rRNA基因鉴定及同源性比对分析、不同盐度下的生长情况、体外抑菌实验分析、安全性实验检测和净水实验, 有效的说明3株解淀粉芽孢杆菌生物学特性之间的差异, 从而选择较为合适的菌株进行后续的耐受性实验和对溶藻弧菌或者副溶血弧菌感染的三疣梭子蟹的保护效果。



结果

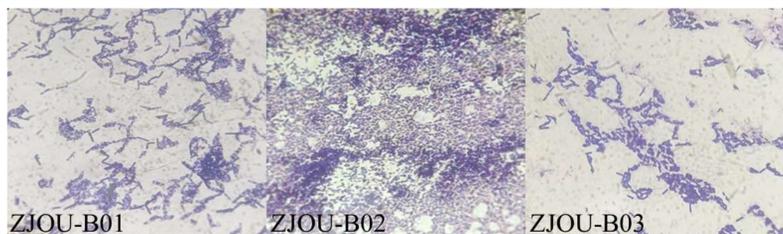


图1 三株菌株的形态观察(革兰氏染色)

3株菌落在NB固体培养基上呈现乳白色、粗糙不透明, 边缘不光滑伴有褶皱突起。革兰氏染色后在×100倍的油镜下是紫色短杆菌, 是革兰氏阳性菌; 菌体中间出现白色原形或者椭圆形的芽孢。

表1 菌株ZJOU-B01、ZJOU-B02和ZJOU-B03生理生化鉴定结果

项目/菌种	ZJOU-B01	ZJOU-B02	ZJOU-B03
V-P	+	+	+
柠檬酸盐	+	+	+
丙酸盐	-	+	+
D-木糖	+	-	-
L-阿拉伯糖	-	-	+
D-甘露醇	-	-	-
明胶液化	+	+	+
7%NaCl生长	+	+	+
PH7.5生长	+	+	+
硝酸盐还原	-	-	-
淀粉水解	+	+	+
厌氧生长	+	+	+

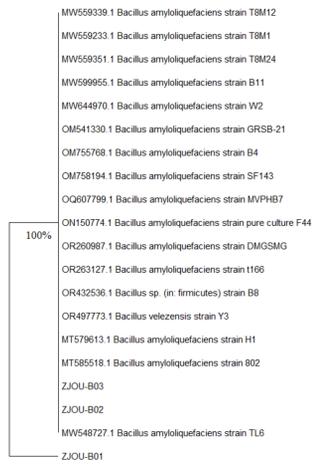
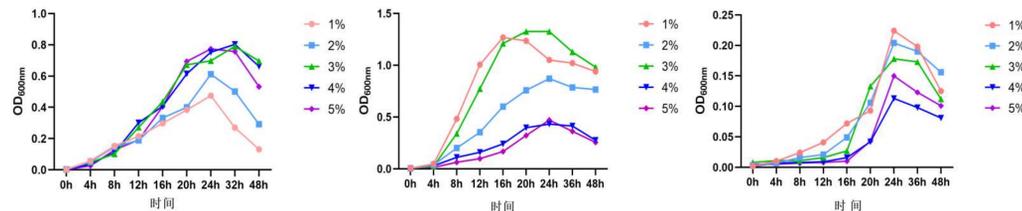


图2 菌株ZJOU-B01、ZJOU-B02和ZJOU-B03的系统进化树

除了丙酸盐、D-木糖、L-阿拉伯糖的鉴定结果不同以外, 其他结果均一致。

ZJOU-B02和ZJOU-B03属于同一分支上, 而ZJOU-B01在100%临近关系的另一分支上。



ZJOU-B01、ZJOU-B02和ZJOU-B03三株菌在不同盐度下的生长曲线

菌株ZJOU-B01在12-24 h生长速度达到最快, 1%盐度下生长量最小, 在4%盐度下生长最适宜; 菌株ZJOU-B02在1%和3%盐度下生长状态最好, 但是下降趋势较为平缓; 菌株ZJOU-B03各个盐度下生长速率和生长期趋势较为接近, 下降速度较快, 适宜1%~3%盐度下生长, 相比于菌株ZJOU-B01和ZJOU-B02, 生长的量上较少, 说明盐度对它的生长有一定影响。

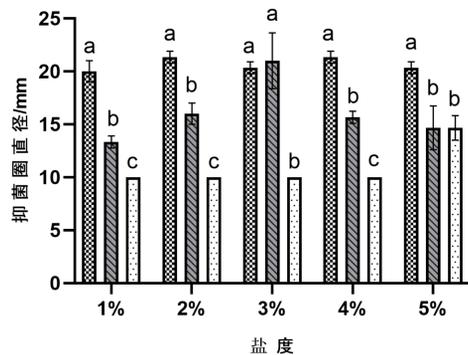


图3 不同盐度下对三株解淀粉芽孢杆菌抑制溶藻弧菌效果的影响

发现1%、2%和4%盐度下3株菌的抑菌能力有显著性差异(P<0.01), 菌株ZJOU-B01的抑菌能力最强; 在3%盐度下菌株ZJOU-B01、ZJOU-B02与ZJOU-B03的抑菌能力有显著差异(P<0.05), 菌株ZJOU-B01抑菌能力最弱; 在5%盐度下菌株ZJOU-B01与ZJOU-B02、ZJOU-B03的抑菌能力有显著差异(P<0.05)。

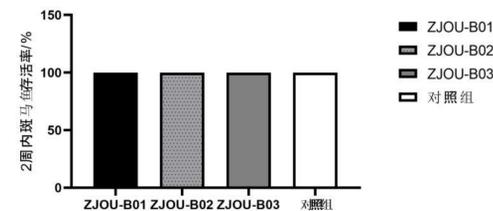


图4 左: 溶血实验 右: 斑马鱼感染实验

未出现溶血现象; 斑马鱼在浸泡过30min后连续观察7 d, 与对照组的斑马鱼无明显差异, 鱼体菌特征无变化, 呼吸、摄食、活力正常, 且存活率100%。

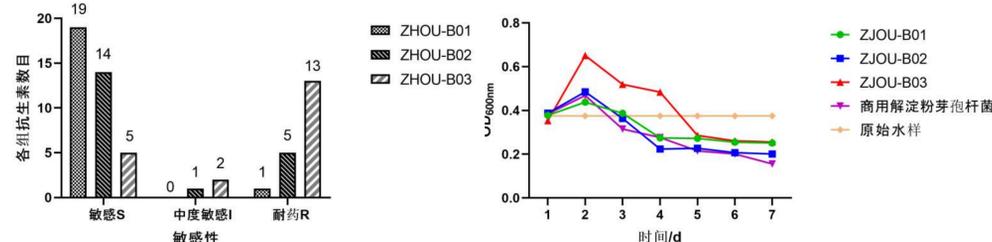


图5 20种抗生素药敏片敏感程度的数量

ZJOU-B01的敏感性最强; ZJOU-B03耐药性最强, 不适合用来做后续实验。

图6 7d的净水实验结果

商用解淀粉芽孢杆菌的净水能力最好, 筛选的3株解淀粉芽孢杆菌中ZJOU-B02净水能力最好, 整体的净水能力相差不大。

结论及后续实验计划

本试验结果表明, 从生长实验、体外抑菌实验抑菌效果、安全性实验的结果、药敏实验和净水实验中可以看出ZJOU-B01最适合作为益生菌的备选菌株; 对菌株ZJOU-B01在不同PH以及不同温度下的生长情况以及检测菌株ZJOU-B01对溶藻弧菌或副溶血弧菌感染的三疣梭子蟹的保护效果。