

黄鳝肠道益生菌 HY-136 的鉴定与系统发育分析*

贺中华 陈昌福** 高宇 孟小亮 田甜

(华中农业大学水产学院, 武汉 430070)

摘要 对分离自健康黄鳝肠道 118 株菌进行点种法病原菌拮抗试验, 结合产酶能力分析试验结果, 得到了对病原菌拮抗作用显著和产酶能力较强的拟选菌株 HY-136。通过对该菌株进行形态观察, 常规生理生化鉴定和应用 API 50 CHB 鉴定盒鉴定, 结果表明该菌与枯草芽孢杆菌属的形态及生理生化特征相似; 进一步利用 PCR 技术对该菌株 16S rRNA 序列作测定与分析, 序列结果在 GenBank 中进行 Blast 同源序列检索, 并用 MEGA 4.0 软件与芽孢杆菌属的其它菌种进行序列分析比对, 结果表明其与已报道的枯草芽孢杆菌序列(登录号为 EU346662)具有 99.8% 的同源性, 且二者在所构建的系统发育树上处于同一个分支。确定菌株 HY-136 为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

关键词 黄鳝; 枯草芽孢杆菌; 鉴定; 系统发育分析

中图分类号 Q 939.124; Q 959.482 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2009)06-0715-04

随着水产养殖业的迅速发展, 细菌性病害频繁发生, 抗生素在疾病防治过程中产生显著效果, 但同时导致细菌的耐药性产生以及药物残留等负面效应^[1-2]。所以, 随着益生菌在水产养殖中的广泛应用, 将其作为抗生素的替代品日益受到重视。

微生物学研究认为, 水环境和水产动物中存在大量的有益微生物, 它们能直接或间接影响水体和养殖对象。有研究表明, 乳酸菌、芽孢杆菌等已成功应用到水产养殖中, 它们对改善水体条件, 促进饲料消化吸收, 增强疾病抵抗力等效果显著^[3-5]。

通过对健康黄鳝肠道中分离出的 118 株菌株进行产酶分析试验, 筛选出 5 株产酶能力较强的菌株, 编号分别为 HY-102, HY-113, HY-136, HY-201, HY-222。笔者在此基础上, 进一步对分离菌株进行点种法病原菌拮抗试验, 得到了产酶能力较强和对病原菌拮抗作用显著的拟选菌株 HY-136。采用传统生理生化鉴定方法和 API 50 CHB 鉴定盒对 HY-136 进行分类鉴定, 并进一步通过测定其 16S rRNA 基因序列, 对该菌的系统发育进行了分析。

1 材料与方法

1.1 供试菌株与培养基

118 株供试菌均分离自健康黄鳝肠道(2008 年

10 月分离, 鱼样采自湖北省石首市上津湖渔场), 病原菌指示菌: 嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*), 温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*), 鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*), 溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*), 迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*), 由笔者所在实验室保存。

牛脑心浸液培养基(BHI, brain heart infusion), 由英国 OXOID 公司生产。

1.2 点种法病原菌拮抗试验

按照 Smith 等^[6]的方法进行, 将所保存的指示菌在牛脑心浸液培养液中培养 12 h, 用无菌生理盐水调节至适当浓度后, 吸取 0.1 mL 涂布于新鲜的牛脑心浸液培养基上, 然后用接种棒点种活化 24 h 的 118 株供试菌, 28 ℃ 条件下培养 24 h 后, 观察点种区周围是否产生抑菌圈并测量抑菌圈直径大小。

1.3 拟选菌株 HY-136 的形态特征和生理生化鉴定

1) 形态观察。将适当浓度的菌株 HY-136 菌悬液涂布在 BHI 平板上, 静置 30 min, 28 ℃ 培养 24 h, 观察菌落形态特征。挑取少量 HY-136 菌体进行革兰氏染色, 显微镜下观察其菌体形态。

2) 生理生化鉴定。依据参考文献^[7-9]进行, 对菌株 HY-136 进行初步鉴定和常规分类。

收稿日期: 2009-07-18; 修回日期: 2009-10-27

* 农业公益性行业科研专项(200803013)和国家“973”项目(2009CB118700)资助

** 通讯作者. E-mail: chenchangfu@mail.hzau.edu.cn

贺中华, 男, 1984 年生, 华中农业大学水产学院硕士研究生, 武汉 430070. E-mail: 272577958@qq.com

1.4 拟选菌株 HY-136 的 API50 CHB 鉴定盒鉴定

利用法国 BioMerieux 公司生产的 API50 CHB 细菌鉴定盒对拟选菌株 HY-136 进行生理生化指标鉴定,操作步骤按其说明书进行。

1.5 拟选菌株 HY-136 的 16S rRNA 基因序列分析

1) 模板 DNA 的制备。将拟选菌株 HY-136 接种在 BHI 培养液中,28 ℃ 震荡培养 24 h,取菌液 1 mL 用北京百泰克生物技术有限公司生产的 DNA 提取试剂盒制备 DNA,作为 PCR 反应的模板。

2) 16S rRNA 基因的 PCR 扩增、克隆与测序。采用 TD-PCR 扩增 16S rRNA 引物,其上下游引物的序列分别为:5'-AGAGTTTGACCTGGCTCA G-3' 和 5'-AAGGAGGTGATCCA GCCGCA-3'。PCR 反应体系(100 μL):10 μL 10 × PCR 缓冲液(含 Mg²⁺),2 μL 10 mmol/L 4 × dNTP,10 μL 10 mol/L 正向和反向引物各 5 μL,1 μL Taq DNA 聚合酶(5 U),10 μL 模板。PCR 反应条件为:94 ℃ 5 min;94 ℃ 1 min,54 ℃ 1 min,72 ℃ 2 min,30 个循环后:72 ℃ 10 min。PCR 产物按 Axygen Biosciences 公司的 DNA 凝胶回收试剂盒说明书回收和纯化 PCR 产物,将 PCR 产物的连接到 Promega 公

司的 pGEM-T easy 载体上,然后转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞,在含有 Amp/IPTG/X-Gal 的平板上进行蓝白斑筛选。挑取白斑,扩大培养后将菌液送往北京奥科生物技术有限责任公司进行测序。

3) 系统发育树的构建。将菌株 HY-136 的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中进行 Blast 搜索和分析,选用 Clustal W 法与已知的芽孢杆菌属 16S rRNA 基因序列进行同源序列分析比对,并用 Mega 4.0 软件中邻接法(NJ)构建 11 个菌种系统发育树,用自展法(Bootstrap)进行 1 050 次重复,并用一致性指数(consistency index,CI)来衡量分析结果。

2 结果与分析

2.1 病原菌的拮抗效果

点种法拮抗试验表明,118 株肠道菌株中只有 4 株对指示菌有拮抗作用。从表 1 可以看出,菌株 HY-136 对嗜水气单胞菌、温和气单胞菌、鳃弧菌、迟钝爱德华氏菌的拮抗效果明显,同时,该菌具有较强的产蛋白酶、脂肪酶及淀粉酶能力,所以,将 HY-136 作为拟选益生菌菌株并进行鉴定分析。

表 1 点种法对病原菌拮抗试验结果¹⁾

Table 1 Results of antagonistic disease bacteria by dot inoculating

菌株 Strain	抑菌圈直径 Diameter of inhibition/mm				
	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	温和气单胞菌 <i>A. sobria</i>	鳃弧菌 <i>V. anguillarum</i>	溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	迟钝爱德华氏菌 <i>E. tarda</i>
HY-118	10.0	-	-	-	-
HY-136	12.2	10.4	12.8	-	8.2
HY-201	-	-	9.8	5.6	-
HY-212	6.4	-	-	-	5.2

1)“-”表示没有拮抗作用“-”means no antagonism

2.2 菌株 HY-136 的形态特征和传统生理生化鉴

菌株 HY-136 在 BHI 培养基上 28 ℃ 培养 24 h 后,生长态势良好,形态特征主要表现为:菌落圆形,边缘不整齐,乳白色,干燥,无光泽。革兰氏染色阳性,单细胞,杆状,有时成链状。

传统生理生化测定结果表明,该菌接触酶、甲基红试验、V-P 反应、吲哚反应、硝酸盐还原反应、明胶液化酶等均呈阳性,而氧化酶、柠檬酸盐利用为阴性。具有运动性,能利用葡萄糖、阿拉伯糖、木糖等产酸和水解酪素,可在含 0%~7% NaCl 的 BHI 培养基上生长。根据上述特征,该菌可鉴定为芽孢杆菌属。

2.3 菌株 HY-136 的 API 50 CHB 鉴定结果

通过 API 50 CHB 鉴定试验,获得了菌株 HY-

136 的相关生理生化特征(表 2),应用 BioMerieux 公司提供的鉴定软件和档案资料进行比对分析,结果表明,菌株 HY-136 为枯草芽孢杆菌的鉴定 ID (indentification) 为 95.9%,可初步鉴定该菌为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

2.4 菌株 HY-136 的 16S rRNA 基因序列分析

通过对菌株 HY-136 的基因组 DNA 进行 PCR 反应,得到 1 条长度序列大约为 1 500 bp 的 PCR 扩增产物(图 1)。

将菌株 HY-136 的 16S rRNA 基因序列提交到 GenBank,在 GenBank 中进行 Blast 搜索并根据菌株 HY-136 的 16S rRNA 序列与已报道的芽孢杆菌属的 16S rRNA 基因序列进行比较分析,并构建系统发育树(图 2)。

表 2 菌株 HY-136 的 API 50 CHB 生化试验结果¹⁾

Table 2 Results of biochemical characteristics of strain HY-136 by API 50 CHB

测定项目 Items	结果 Results	测定项目 Items	结果 Results
对照 Control	-	七叶灵柠檬酸铁 Esculina citrato	+
甘露醇 Glycerol	+	水杨苷 Salicina	+
赤藻糖醇 Eritritol	-	D-纤维二糖 D-Celobiosa	+
D-阿拉伯糖 D-Arabinosa	-	D-麦芽糖 D-Maltosa	+
L-阿拉伯糖 L-Arabinosa	+	D-乳糖 D-Lactosa	-
D-核糖 D-Ribosa	+	D-密二糖 D-Melibiosa	+
D-木糖 D-Xyloza	+	D-蔗糖 D-Sacaroza	+
L-木糖 L-Xyloza	-	D-海藻糖 D-Trehalosa	+
D-核糖醇 D-Adonitol	-	菊粉 Inulina	+
甲基-D-吡喃木糖苷 Methyl-D-Xilopiranosida	-	D-松三糖 D-Melezitosa	-
D-半乳糖 D-Galactosa	-	D-棉子糖 D-Rafinosa	+
D-葡萄糖 D-Glucosa	+	淀粉 Almidon	+
D-果糖 D-Fructosa	+	糖原 Glogeno	+
D-甘露糖 D-Mannosa	+	木糖醇 Xilitol	-
L-山梨糖 L-Sorbosa	-	D-龙胆二糖 D-Gentibiosa	-
L-鼠李糖 L-Rhamnosa	+	D-土伦糖 D-Turanosa	-
卫茂醇 Dulcitol	-	D-来苏糖 D-Lixosa	-
肌醇 Inositol	+	D-塔格糖 D-Tagatosa	-
甘露醇 D-Manitol	+	D-岩藻糖 D-Fucosa	-
山梨醇 D-Sorbitol	+	L-岩藻糖 L-Fucosa	-
甲基-D-吡喃甘露糖苷 Methyl-D-Manopiranosida	-	D-阿拉伯醇 D-Arabitol	-
甲基-D-吡喃葡萄糖苷 Methyl-D-Gluopiranosida	+	L-阿拉伯醇 L-Arabitol	-
N-乙酰葡萄糖胺 N-Acetil Glucosamina	+	葡萄糖酸钾 Gluconato potasico	-
苦杏仁苷 Amlgdalina	+	2-酮基葡萄糖酸钾 2-Cetogluconato potasico	-
杨梅苷 Arbutin	+	5-酮基葡萄糖酸钾 5-Cetogluconato potasico	-

1) + :阳性; - :阴性 + :positive; - :negative

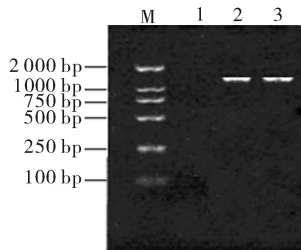


图 1 菌株 HY-136 的 PCR 扩增产物图谱

Fig. 1 Electrophoresis picture of HY-136 after PCR amplification

M. DL 2 000 DNA marker; 1. 对照 Control; 2, 3. HY-136

从图 2 可以看出,菌株 HY-136 与枯草芽孢杆菌(登录号为 EU346662、EF472262)聚为同一个族群,并与枯草芽孢杆菌(登录号为 EU346662)自然

构成一个分支,经同源性比较发现两者的同源性高达 99.8%,说明菌株 HY-136 与枯草芽孢杆菌亲缘关系最近。结合形态、生理生化特征以及 API 50 CHB 系统鉴定结果,可将菌株 HY-136 鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

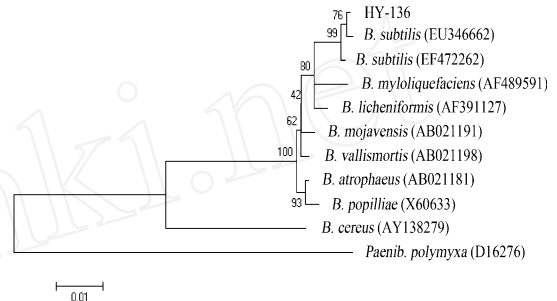


图 2 基于 16S rRNA 序列的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on 16S ribosomal RNA sequences

3 讨论

传统的细菌鉴定方法由于菌株经常出现表型表达不稳定、敏感性低,并且存在人为主观影响等问题,尤其在芽孢杆菌属的鉴定中,对于培养形态和生理生化特征极为相似的菌株难以区分,所以需要其他鉴定方法进行辅助。API 试剂盒缺乏针对性,存在一定比例的错误鉴定率,如果鉴定菌不在鉴定谱内,结果便只能作为一个参考^[10]。虽然 16S rRNA 系统发育分析已成为目前细菌分类和鉴定的重要手段之一,但是截止到 1996 年只有 3 500 余种细菌的完整的 16S rRNA 序列被测定,给鉴定结果产生一定影响,若没有生化鉴定结果作为佐证,便可能无法得出正确的结论^[11]。所以需要多种鉴定方法相结合才能获得准确、科学的细菌鉴定结果。

本研究中通过形态学、生理生化试验和 API50 CHB 系统鉴定盒将拟选菌株 HY-136 初步鉴定为枯草芽孢杆菌,为进一步验证,利用了 16S rRNA 系统发育分析方法,通过测定比较,发现菌株 HY-136 在系统发育树上与枯草芽孢杆菌聚为一簇,并与枯草芽孢杆菌(登录号为 EU346662)同源性最高,达 99.8%。因此,将菌株 HY-136 鉴定为枯草芽孢杆菌的结果应该是很可靠的。

枯草芽孢杆菌是国内外允许使用的优良饲料微生物菌种之一,具有菌种单一、耐酸碱、抗菌性较强以及对水生动物益生作用明显等特性,作为饲料添加剂和水质改良剂,对增强肠道消化酶活性,提高机

体免疫力,改善水体环境等成效显著,现已广泛应用到水产养殖领域^[12-14]。不过,枯草芽孢杆菌在黄鳝养殖中的开发应用的研究报道还很少,笔者从黄鳝肠道中筛选并鉴定出 1 株枯草芽孢杆菌的报道尚属首次。

黄鳝虽属肉食性鱼类,但已有研究指出人工配合饲料饲养黄鳝是可行的。本研究所筛选的菌株 HY-136 具有产蛋白酶、脂肪酶等能力较强,对嗜水气单胞菌、温和气单胞菌等拮抗作用明显的特点。所以,可通过进一步研究该菌的生长特性,发酵培养条件等,开发为饲料添加剂应用到黄鳝的人工配合饲料中,以提高养殖黄鳝的消化吸收能力,增强抗病力,促进黄鳝养殖业的健康可持续发展。

参 考 文 献

- [1] HUNTER P A, REEVES D S. The Current status of resistance to antimicrobial agents: report on a meeting [J]. *J Antimicrob Chem*, 2002, 49: 17.
- [2] 耿毅,汪开毓. 抗生素在水产养殖中应用的负面效应及对策 [J]. *河北渔业*, 2004, 134(2): 4-7.
- [3] 刘敏,韩英,马旭洲,等. 益生菌制剂在水产动物疾病防治应用的研究进展 [J]. *水产学杂志*, 2003, 16(1): 73-79.
- [4] 李维炯. 微生态制剂的应用研究 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2008: 101-106.
- [5] 陈孝煊,吴志新,周文豪. 鱼类消化道菌群的作用与影响因素研究进展 [J]. *华中农业大学学报*, 2005, 24(5): 523-528.
- [6] SMITH P, DABEY S. Evidence for the competitive exclusion of *Aeromonas salmonicida* from fish with a tress inducible furunculosis by a fluorescent pseudomonad [J]. *J Fish Dis*, 1993, 16: 521-524.
- [7] 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法 [M]. 北京: 科学出版社, 1978.
- [8] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 62-65.
- [9] HOLT J G, KRIEGER R, SNEATH P H A, et al. *Bergey's manual of determinative bacteriology* [M]. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.
- [10] 程池,刘光全,李金霞,等. 55 株芽孢杆菌 16S rRNA 基因序列测定与系统发育学分析 [J]. *食品与发酵工业*, 2006, 32(10): 20-24.
- [11] SALLEEN B, RAJOHARISON A, DESVARENNE S. Comparative analysis of 16S and 23S rRNA sequences of listeria species [J]. *Jut J Sys Bacterilo*, 1996, 46(3): 669-674.
- [12] 丁贤,李卓佳,陈永青,等. 芽孢杆菌对凡纳对虾生长和消化酶活性的影响 [J]. *中国水产科学*, 2004, 11(6): 580-584.
- [13] RENGIPAT S, RUKPRATANPOM S, PIYATIRATIVORAKUL S, et al. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11) [J]. *Aquaculture*, 2000, 191(4): 271-288.
- [14] 胡咏梅,葛向阳,梁运祥. 枯草芽孢杆菌 FY99-01 菌株的净水作用 [J]. *华中农业大学学报*, 2006, 25(4): 404-407.

Phylogenetic Analysis and Identification of Probiotics HY-136 from Ricfield Eel (*Monopterus Albus*) Intestine

HE Zhong-hua CHEN Chang-fu GAO Yu MENG Xiao-liang TIAN Tian

(College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract One hundred and eighteen bacterial strains isolated from healthy ricefield eel (*Monopterus albus*) intestine were used for screening probiotics. The results of antagonistic disease bacteria by dot inoculating and the amount of extra-cellular amylase produced showed that HY-136 could strongly inhibit pathogenic bacteriums and produced more amylase. According to its morphological, physiological and biochemical characteristics, and the results detected by API 50 CHB system, we found that some characteristics of strain HY-136 were similar to *Bacillus subtilis*. Sequence analysis of 16S rRNA showed that strain HY-136 shared 99.8% homology with published sequence of *Bacillus subtilis* (accession number: EU346662). In the phylogenetic tree, both of them were on the same branch, which showed that strain HY-136 was closely related with *Bacillus subtilis*. Therefore, strain HY-136 was identified as *Bacillus subtilis*.

Key words ricefield eel (*Monopterus albus*); *Bacillus subtilis*; identification; phylogenetic analysis

(责任编辑:边书京)