

弗氏柠檬酸杆菌与迟钝爱德华氏菌拮抗菌的筛选与鉴定

林 威, 李登峰*, 孙智同, 周永强

(宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: 鉴于弗氏柠檬酸杆菌和迟钝爱德华氏菌是“人-兽-鱼”共患性条件致病菌, 因此利用微生物拮抗原理研发微生态制剂进行细菌病害的防治对环境具有友好性. 分别以从患病中华鳖分离的弗氏柠檬酸杆菌和迟钝爱德华氏菌作为指示菌, 初步筛选获得对这 2 种菌具有拮抗作用的菌株 6-1-1M 和 7-1-1M. 用点种法和纸片法进一步验证了其拮抗活性, 测定了 2 株菌 930 bp 的 16S rDNA 基因片段序列, 发现二者序列完全一致, 系统进化分析表明其属于希瓦氏菌属(*Shewanella* sp.). 安全性验证实验结果表明其无致病性, 具有开发应用前景.

关键词: 弗氏柠檬酸杆菌; 迟钝爱德华氏菌; 拮抗菌; 希瓦氏菌; 筛选

中图分类号: S941.4

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2019) 01-0014-06

弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)和迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)分别是肠杆菌科(Enterobacteriaceae), 枸橼酸杆菌属(*Citrobacter*)和爱德华氏菌属(*Edwardsiella*)的代表菌^[1]. 2 种菌均为革兰氏阴性、兼性厌氧菌, 分布非常广泛, 且都是“人-兽-鱼”共患性条件致病菌, 能够引起各类哺乳动物以及鱼、虾、蟹、鳖等感染发病^[2], 可导致腹泻、败血症、腰大肌与硬膜外脓肿等, 甚至可引起死亡^[3-10]. 在水产养殖当中, 由弗氏柠檬酸杆菌和迟钝爱德华氏菌引发的病害曾在全国多省份暴发性流行, 给养殖户造成了巨大的经济损失.

目前, 弗氏柠檬酸杆菌和迟钝爱德华氏菌的研究主要集中在分离、鉴定和药敏试验等方面. 治疗其引发疾病的传统方式是使用抗生素, 但抗生素滥用会导致抗药超级细菌不断涌现, 给治疗造成巨大难题. 此外, 抗生素会使养殖水体、治疗对象的正常菌群遭到破坏, 还存在药物残留、环境污染等一系列环境及食品安全性的问题^[11-12]. 随着科学界对菌间相互关系研究的不断深入, 友好型生物疗法逐渐受到重视. 采用拮抗菌来对付感染的特定病原, 不对宿主、环境的菌群结构以及治疗对

象本身造成破坏, 具有巨大的研发前景. 利用微生物拮抗致病菌生长原理研制的产品应运而生^[13], 并已应用于许多水产动物的养殖当中^[14]. 然而, 迄今仅有一篇报道: 来自一处牛蛙孵化场的乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)产生的细菌素 Nisin Z 能够抑制弗氏柠檬酸杆菌生长^[15].

笔者从中华鳖胃肠道中分离筛选获得 1 株对弗氏柠檬酸杆菌与迟钝爱德华氏菌都具有拮抗效果的拮抗菌, 对该菌种进行 16S rDNA 序列测定, 并以此为基础构建系统进化树, 鉴定其分类地位.

1 材料与方法

1.1 实验样品来源及处理

样品包括水、底泥及水产动物的胃肠道. 水: 用无菌采样瓶从宁波大学校区池塘、河边采集水样, 采样水深为 10 cm 水层以下. 底泥: 用无菌采样瓶从宁波大学校区池塘、河边采集底泥. 底泥用 0.9% 的灭菌生理盐水进行悬浮, 3 000 g 离心 3 min, 弃沉淀, 上清液备用. 内脏: 分别采集宁波大学南门菜场的各种淡水鱼和养殖场的健康中华鳖, 解剖后取胃肠道. 将胃肠道用 0.9% 的灭菌生理盐水进行

收稿日期: 2018-04-23.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journalg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 国家海洋局开放基金(HY201602); 宁波大学王宽诚幸福基金.

第一作者: 林威(1995-), 男, 浙江平阳县人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 水产动物病害防治. E-mail: 362145838@qq.com

*通信作者: 李登峰(1976-), 女, 湖南双峰人, 博士/副教授, 主要研究方向: 水产动物病害防治. E-mail: lidengfeng@nbu.edu.cn

匀浆, 3 000 g 离心 3 min. 弃沉淀, 留上清液备用.

1.2 病原性指示菌及指示菌母板制备

弗氏柠檬酸杆菌、迟钝爱德华氏菌分离自自然发病的系统性败血症发病中华鳖^[16], 保存于本实验室 -70 °C 超低温冰箱.

指示菌母板制备原则: 以 28 °C, 18 h 整个平板长满菌苔为准.

制备方法: 取储于 -70 °C 冰箱的迟钝爱德华氏菌菌种、弗氏柠檬酸杆菌菌种, 划线复壮, 于 28 °C 恒温培养箱中培养 18 h 后, 挑取单菌落接种于含 5 mL 牛肉汤(牛肉膏 3 g、蛋白胨 10 g、NaCl 5 g, 定容至 1 L, 调 pH 至 7.2, 高压灭菌)的试管中, 28 °C, 140 r·min⁻¹ 振荡培养过夜. 取培养液按 1:100 扩大培养 6~7 h. 将菌液于 4 °C, 5 000 g 离心 5 min, 沉淀用少许新鲜培养基重新悬浮, 得到菌悬液. 取牛肉琼脂培养基(牛肉肉汤培养基中添加 1.5% 的琼脂糖)融化, 待其冷却但未凝固时加入上述菌悬液, 充分混匀后倒平板.

1.3 拮抗菌的筛选

母板凝固以后, 取 1.1 节所述的各样品 100 μ L 分别涂布平板, 28 °C 倒置培养 18 h, 在未长满指示菌菌苔的区域挑取单菌落, 划线传代至纯化. 挑取单菌落于 5 mL 牛肉汤, 28 °C, 140 r·min⁻¹ 振荡培养过夜, 加入 15% 灭菌甘油, 混匀后 -70 °C 保存.

1.4 拮抗力研究

参考张新民等^[17]方法, 取母板, 放入 $\Phi = 7$ mm 无菌滤纸片, 以 5 μ L 拮抗菌菌液润湿滤纸片, 28 °C 倒置培养 18 h, 观察抑菌圈, 测量直径.

1.5 拮抗菌 16S rDNA 鉴定

1.5.1 DNA 模板制备

取拮抗菌菌种划线, 28 °C 培养 18 h, 用灭菌牙签沾取单菌落, 置于装有 10 μ L 灭菌双蒸水的 PCR 管中, 洗涤数次, 然后于 100 °C 煮沸 10 min. 12 000 g 离心 3 min, 上清即为 DNA 模板.

1.5.2 16S rDNA 基因 PCR 扩增

PCR 引物为细菌 16S rDNA 通用引物: 16SF (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 16SR (5'-CCGTC AATTCCTTTRAGTTT-3'). PCR 采用 25 μ L 反应体系: 10 $\times$ PCR Buffer (Mg²⁺ free) 2.5 μ L、MgCl₂ (25 mmol·L⁻¹) 1.5 μ L、模板 1.5 μ L、dNTP Mixture (2.5 mmol·L⁻¹) 2.5 μ L、16SR (10 μ mol·L⁻¹) 0.25 μ L、

16SF (10 μ mol·L⁻¹) 0.25 μ L、TaKaRa Taq (5 U· μ L⁻¹) 0.2 μ L, 灭菌双蒸水补足 25 μ L. 反应条件: 95 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 45 s, 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min.

1.5.3 PCR 产物检测及回收

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, UVP 凝胶成像仪拍照, 大小约 930 bp 的目的条带用 Biospin 胶回收试剂盒回收.

1.5.4 连接、转化克隆

回收产物连接 pMD18-T 载体, 连接体系: pMD18-T 0.5 μ L、PCR 回收产物 4.5 μ L、Solution I 5 μ L. 于 16 °C 连接 2~3 h.

取 5 μ L 连接产物加入 100 μ L DH5 α 感受态细胞中, 冰中放置 30 min. 42 °C 水浴中热激 90 s, 立即于冰上放置 3 min. 加入 890 μ L LB 液体培养基(酵母提取物 5 g、蛋白胨 10 g、NaCl 10 g, 定容至 1 L, 调 pH 至 7.2, 高压灭菌), 混匀. 37 °C, 140 r·min⁻¹ 振荡培养 1 h. 5 000 g 离心 3 min, 弃上清液 890 μ L, 将菌沉淀轻轻吹打悬浮. 吸取 100 μ L 的菌液均匀涂布含 100 μ g·mL⁻¹ 氨苄的 LB 平板(平板提前涂布了 40 μ L X-gal, 4 μ L IPTG), 于 37 °C 倒置培养 12~18 h.

1.5.5 阳性克隆鉴定及序列测定

挑取白斑克隆进行 PCR 验证, 所用引物为 pMD18-T 侧翼引物, 体系、反应条件同 1.5.2 章节. 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 大小约 1 100 bp 克隆为阳性, 交由上海英俊生物公司测序.

1.5.6 构建系统进化树

测得的拮抗菌 16S rDNA 序列用 Blastn 软件与 GenBank 数据库中已登录的 16S rDNA 序列进行多序列比对, 并用 MEGA-6 软件构建系统进化树. 进化树构建所用 16S rDNA 序列来源菌及序列登录号见表 1.

1.6 拮抗菌致病性试验

取拮抗菌菌种划平板活化, 挑取单菌落于 5 mL 牛肉汤, 28 °C, 140 r·min⁻¹ 振荡培养过夜. 稀释平板计数, 调整菌量为 1 $\times$ 10⁷ CFU·mL⁻¹. 将 6-1-1M 和 7-1-1M 菌液等体积混合, 5 000 g, 离心 5 min 去除培养基, 用 0.9% 无菌生理盐水重悬. 取健康中华鳖 10 只, 随机分为 2 组, 实验组腹腔注射 1 $\times$ 10⁷ CFU·mL⁻¹ 拮抗菌 0.3 mL, 对照组注射 0.9% 无菌

表 1 进化树构建所用 16S rDNA 序列来源及其登录号

菌株名称	GenBank (NCBI 登录号)
<i>Edwardsiella tarda</i> ATCC15947	AB050827
<i>Streptococcus agalactiae</i> JCM5671	AB023574
<i>Citrobacter freundii</i> DSM30039	AJ233408
<i>Shewanella xiamenensis</i> (T)S4	FJ589031
<i>Shewanella benthica</i> ATCC 43992	X82131
<i>Shewanella putrefaciens</i> LMG 26268(T)	X81623
<i>Shewanella denitrificans</i> OS-217	AJ311964
<i>Shewanella schlegeliana</i> HRKA1	AB081760
<i>Shewanella algae</i> ATCC 51192	AF005249
<i>Shewanella baltica</i> BA175	CP002767
<i>Shewanella baltica</i> OS155	AJ000215
<i>Shewanella baltica</i> OS117	CP002811
<i>Shewanella baltica</i> OS185	CP002811
<i>Shewanella baltica</i> OS223	CP001252
<i>Shewanella haliotis</i> DW01	EF178282
<i>Psychromonas profunda</i> 2825	AJ416756
<i>Psychromonas marina</i> 4-22	AB023378
<i>Moritella marina</i> ATCC15381	AB038033
<i>Moritella abyssi</i> 2693	AJ252022
<i>Teredinibacter turnerae</i> T7902	AY028398

生理盐水 0.3 mL. 常规饲养, 观察 10 d 内发病、死亡情况.

2 结果与分析

2.1 平板筛选

从水和底泥中未获得具有拮抗活性的菌. 经过筛选, 由健康中华鳖内脏得到对迟钝爱德华氏菌有拮抗效果的菌株 6-1-1M、对弗氏柠檬酸杆菌有拮抗效果的菌株 7-1-1M. 2 株菌对指示菌拮抗效果明显(图 1 和图 2), 其中, 6-1-1M 对迟钝爱德华氏菌的抑菌圈半径 3~4 mm, 7-1-1M 对弗氏柠檬酸杆菌的抑菌圈半径 2~3 mm.

2.2 16S rDNA 基因扩增及测序

2 株拮抗菌经 16S rDNA 基因 PCR 扩增获得约 930 bp 序列(图 3), 该片段连接 T 载体后, 用载体通用引物 PCR 鉴定阳性克隆得到大小约 1 100 bp 的产物. 经上海英俊生物公司测得菌株 6-1-1M 与 7-1-1M 序列相同, 为同一种菌, GenBank 登录号为 MH193384.

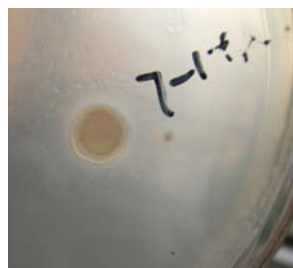
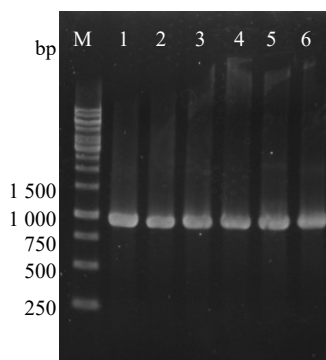


图 1 拮抗菌 7-1-1M 对弗氏柠檬酸杆菌的拮抗作用



图 2 拮抗菌 6-1-1M 对迟钝爱德华氏菌的拮抗作用



M: marker; 泳道 1、2、3 为 6-1-1M; 4、5、6 为 7-1-1M.

图 3 PCR 扩增菌株 6-1-1M、7-1-1M 16S rDNA 琼脂糖凝胶电泳

2.3 构建系统进化树

所得序列运用 Blastn 软件与 GenBank 中的核苷酸序列进行比对, 搜索到菌株 6-1-1M(7-1-1M)和希瓦氏菌 *Shewanella baltica* OS155 同源性高达 98%, 系统进化树中与希瓦氏菌属聚为一簇(图 4), 该菌属希瓦氏菌.

2.4 致病性试验

拮抗菌致病性验证实验发现注射拮抗菌 6-1-1M(7-1-1M)的健康中华鳖并无死亡或者发病现象.

3 讨论

如前所述, 弗氏柠檬酸杆菌和迟钝爱德华氏菌对水产动物、两栖动物、哺乳动物及人均有致病性^[2-10]. 郑善坚报道^[18], 加州鲈鱼和棘胸蛙养殖中

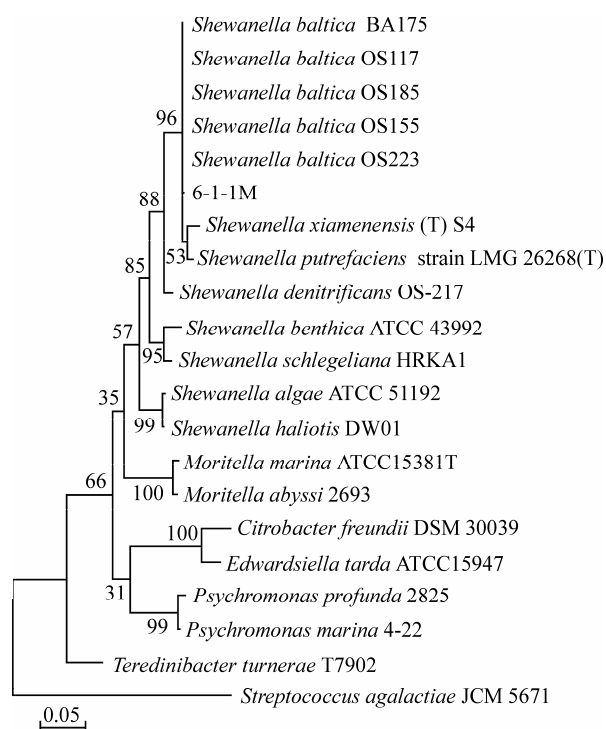


图4 基于16S rDNA序列的系统进化树

出现致死性弗氏柠檬酸杆菌感染。鲈鱼症状为鳃黏液增多, 尾鳍现较大溃烂斑, 肝脏呈现土黄色; 棘胸蛙症状为头部、四肢表皮发白, 色素消退, 严重的表皮溃烂, 露出肌肉, 肝脏肿大, 并有点状充血; 该病传染性强、发病快、感染率高(超过50%)。Bae等^[19]报道弗氏柠檬酸杆菌感染使韩国4名新生儿在82 min内相继死亡。2017年, 我国某绵羊养殖场因弗氏柠檬酸杆菌感染暴发败血症、脑炎, 6只成年羊在感染6 d内即死亡^[20]。迟钝爱德华氏菌感染亦常有报道, 可感染包括人在内的哺乳动物, 引发腰大肌与硬膜外脓肿、败血症等^[7,21-22]。倪春山^[21]建立了迟钝爱德华氏菌感染小鼠及相关细胞的模型, 该菌使小鼠感染发病、死亡。摄食迟钝爱德华氏菌污染的水产品可能造成严重的食源性感染^[7]。迟钝爱德华氏菌引发的鱼类病害屡见不鲜^[8-11,23-24]。2013年, 某养殖场杂交鲟出现大量死亡现象, 病鱼腹部可见血点, 肛门红肿, 鳃丝白化, 肝肾肿大, 后经鉴定为迟钝爱德华氏菌感染。在养殖大菱鲈(*Scophthalmus maximus*)腹水病^[24]和中华鳖系统性败血症^[16]病原多样性的研究当中也发现迟钝爱德华氏菌的存在。

传统筛选分离拮抗菌采用含菌平板抑菌圈测

定法^[25], 即在冷却的平板上平铺指示菌液, 随后在平板上点接待测菌, 观察抑菌圈的有无及大小。传统方法操作繁琐, 而且先纯化分离待测菌, 再进行拮抗筛选的做法直接排除了有些细菌靠菌落之间相互关系产生拮抗作用的可能性。与传统方法有别, 本实验采用先涂布, 观察抑菌透明区域或覆盖区域, 再对有抑菌效果的菌落进行划线分离纯化, 然后重复点种法实验验证, 直至获得有拮抗作用的纯培养物, 因此有利于更全面、更准确地筛选出拮抗菌。弗氏柠檬酸杆菌和迟钝爱德华氏菌常出现于包括水、底泥和养殖动物的养殖环境中, 为了最大可能地获得拮抗菌, 本研究最初广泛地采用水、底泥和水产动物的内脏作为筛选源。结果从健康中华鳖内脏成功获得拮抗菌, 也说明可能该拮抗菌在维持中华鳖体内菌群结构稳定、维护鳖的健康方面起着重要作用。

拮抗菌的研究、应用日益受到广泛关注, 尤其是在果蔬保鲜以及水稻、玉米等植物病害的防治方面已取得了不错的成效^[26-27]。李敏等^[28]利用龙眼果皮中分离的拮抗酵母菌对香蕉采后炭疽病进行控制, 相对防效达68.9%。在水产病害防治中, 张书俊等^[29]发现3株能够抑制水霉菌丝生长及孢子萌发的拮抗菌, 为水产动物的水霉病防治提供一种解决方法。Riquelme等^[30]发现将1株弧菌应用于扇贝育苗, 能通过抑制水体鳃弧菌和其他病原菌从而提高扇贝幼苗的成活率。本文针对水产动物系统性败血症主要细菌性病原分离得到的拮抗菌6-1-1M(7-1-1M)对迟钝爱德华氏菌和弗氏柠檬酸杆菌具有明显的抑制活性, 有望用于系统性败血症的防治。拮抗菌拮抗作用及作用机理大致分为两种: 一种是抗菌作用, 即由细菌的同化作用产生抗菌物质, 进而对病原菌生长繁殖产生抑制作用; 另一种为溶菌作用, 许多*B. subtilis*类拮抗体产生的次生性代谢物质对病原菌的菌丝或孢子的细胞壁具有溶解作用, 致使病菌细胞壁穿孔、畸形、菌丝断裂、原生质消解、外溢而丧失活力^[31]。Quintana等分离到的乳酸乳球菌对弗氏柠檬酸杆菌的拮抗机理属于前者。而本实验分离到的6-1-1M(7-1-1M)的拮抗机理及具体应用方法有待进一步研究。

本文使用16S rDNA基因测序分析方法对分离的拮抗菌进行鉴定, 测定了部分序列并构建系统

发育进化树。进化树显示, 6-1-1M(7-1-1M)与 *S. baltica* 聚在一簇, 属希瓦氏菌。希瓦氏菌 (*Shewanella* sp.) 属于希瓦氏菌科(Shewanellaceae), 为革兰氏阴性杆菌, 兼性厌氧, 在生物修复及生物降解领域具有潜在的研究价值^[32-33]。其模式种腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*)凭借其一定的染料脱色能力以及作为水产品新鲜度检测的指示菌而为人所熟知^[34], 还被认为是海产品低温贮藏的主要腐败菌, 对欧洲鳗(*Anguilla anguilla*)具有很强的毒力^[35]。而与 6-1-1M 聚在一簇的 *S. baltica* OS155 和其他 2 个亚种 *S. baltica* OS678、*S. baltica* 6-42 均被证实保存有参与合成 EPA(Eicosapentamethic Acid)的 PKS 基因簇^[36]。EPA 是鱼油的主要成分, 是人体自身不能合成但又不可缺少的重要的必需脂肪酸。*S. baltica* 是海洋中生产多不饱和脂肪酸的菌种之一^[37], *S. baltica* OS155 拥有很高的亚硝酸盐抗性^[38]。*S. baltica* 还具有一定的产电能力, 可作为优质微生物燃料电池的原料^[39]。与 *S. baltica* 具有高度同源性的 6-1-1M 是否具有这些特性还需进一步研究。

本试验筛选获得的拮抗菌 *Shewanella* sp. 6-1-1M 对迟钝爱德华氏菌和弗氏柠檬酸杆菌均有拮抗作用, 安全无毒, 以 1×10^7 CFU·mL⁻¹ 注射中华鳖, 不引起中华鳖发病或死亡, 该菌具有很好的潜在研发前景。

参考文献:

- [1] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001:96.
- [2] 薛巧, 赵战勤, 刘会胜, 等. 弗氏柠檬酸杆菌对动物和人致病性研究进展[J]. 动物医学进展, 2015, 36(7):81-85.
- [3] Barnes L A, Cherry W B. A group of paracolon organisms having apparent pathogenicity[J]. American Journal of Public Health, 1946, 36(5):481-483.
- [4] Austkettis A, Habte D, Holmgren J, et al. Enterotoxin-producing bacteria and parasites in stools of Ethiopian children with diarrhoeal disease[J]. Archives of Disease in Childhood, 1976, 51(11):865-870.
- [5] Guarino A, Capano G, Malamisura B, et al. Production of *Escherichia coli* STa-like heat-stable enterotoxin by *Citrobacter freundii* isolated from humans[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1987, 25(1):110-114.
- [6] Ortega J, Corpa J M, Orden J A, et al. Acute death associated with *Citrobacter freundii* infection in an African elephant (*Loxodonta africana*)[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2015, 27(5):632-636.
- [7] Suzuki K, Yanai M, Hayashi Y, et al. *Edwardsiella tarda* bacteremia with psoas and epidural abscess as a food-borne infection: A case report and literature review[J]. Internal Medicine, 2018, 57(6):893-897.
- [8] 刘双凤. 迟钝爱德华氏菌在水产动物中致病性及致病因子的若干研究[J]. 黑龙江水产, 2014(1):35-37.
- [9] 陈言峰, 卓孝磊, 王超, 等. 鲢鱼致病性迟钝爱德华氏菌的鉴定及药敏分析[J]. 水产科学, 2017, 36(1):48-53.
- [10] 王斌. 迟钝爱德华氏菌粘附及侵袭特性研究[C]//中国科学技术协会学会, 福建省人民政府. 经济发展方式转变与自主创新——第十二届中国科学技术协会年会(第三卷), 2010:8.
- [11] 杜迎春, 杨菊凤, 时晓, 等. 迟钝爱德华氏菌的分离鉴定及体外抑菌效果研究[J]. 河南农业, 2017(8):51-52.
- [12] 傅松哲. 弧菌拮抗菌的筛选及其对凡纳滨对虾的抑菌防病作用[J]. 中国环境科学, 2009, 29(8):867-872.
- [13] 王娟, 封永辉, 蔡立胜, 等. 来自大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)肠道的弧菌拮抗菌的筛选与鉴定[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(5):707-713.
- [14] 李海兵, 宋晓玲, 李赟, 等. 水产动物益生菌研究进展[J]. 动物医学进展, 2008(5):94-99.
- [15] Quintana G, Niederle M V, Minahk C J, et al. Nisin Z produced by *Lactococcus lactis* from bullfrog hatchery is active against *Citrobacter freundii*, a red-leg syndrome related pathogen[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2017, 33(10):186.
- [16] 胡广洲, 李登峰, 苏秀榕, 等. 患暴发性败血症中华鳖体内细菌的分离与鉴定[J]. 中国水产科学, 2010, 17(4):859-868.
- [17] 张新明, 李健, 刘淇. 弧菌拮抗菌的筛选及其效果[J]. 中国水产科学, 2004, 11(4):325-332.
- [18] 郑善坚. 弗氏柠檬酸杆菌引起鱼、蛙溃烂病的防治案例[J]. 科学养鱼, 2017(2):68-69.
- [19] Bae J Y, Kang C K, Choi S J, et al. Sudden deaths of neonates receiving intravenous infusion of lipid emulsion contaminated with *Citrobacter freundii*[J]. Journal of Korean Medical Science, 2018, 33(10):e97.
- [20] Liu H, Zhao Z, Xue Y, et al. Fatal cases of *Citrobacter freundii* septicemia and encephalitis in sheep[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2018, 30(2):245-248.
- [21] 倪春山. 重要海洋病原细菌迟钝爱德华氏菌感染小鼠及细胞的研究模型建立[D]. 上海: 华东理工大学, 2015.
- [22] 唐德荣, 陈晓于. 迟钝爱德华氏菌败血症 1 例[J]. 湛江

- 医学院学报, 1993(S1):64.
- [23] 孔杰, 李小义, 周洲, 等. 鲟源迟钝爱德华氏菌的分离鉴定与药敏特性研究[J]. 水产科学, 2018(2):187-192.
- [24] 王岚, 王印庚, 张正, 等. 养殖大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)腹水病的病原多样性及其耐药性分析[J]. 渔业科学进展, 2017, 38(4):17-24.
- [25] 赵健, 兰成忠, 陈庆河, 等. 抗番茄青枯病内生拮抗细菌的筛选及室内防效测定[J]. 武夷科学, 2006, 22(1):49-54.
- [26] 周晓梅, 刘强, 王瑛璐. 拮抗菌生物防治农作物病害的研究进展[J]. 吉林师范大学学报(自然科学版), 2010, 31(4):36-39.
- [27] 王静, 郑永华. 拮抗菌在果蔬采后病害生物防治中的应用[J]. 生物技术进展, 2013, 3(6):393-398.
- [28] 李敏, 胡美姣, 高兆银, 等. 5株拮抗菌抑菌能力及其对香蕉采后病害的防治效果[J]. 浙江农业科学, 2010(1):130-132.
- [29] 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.
- [30] Riquelme C, Araya R, Vergara N, et al. Potential probiotic strains in the culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus*, (Lamarck, 1819)[J]. Aquaculture, 1997, 154(1):17-26.
- [31] 于淑池, 徐亚茹. 拮抗细菌产生的活性物质及拮抗机理研究进展[J]. 承德职业学院学报, 2006(1):67-69.
- [32] 许志诚, 洪义国, 罗微, 等. 厌氧条件下希瓦氏菌腐殖质还原对偶氮还原的影响[J]. 微生物学报, 2006, 46(4):591-597.
- [33] 许玫英, 郭俊, 钟小燕, 等. 一个降解染料的希瓦氏菌新种——中国希瓦氏菌[J]. 微生物学报, 2004, 44(5):561-566.
- [34] 商宝娣, 杨星, 李正友, 等. 希瓦氏菌的研究进展[J]. 福建农业, 2015(7):152-154.
- [35] Esteve C, Merchán R, Alcaide E. An outbreak of *Shewanella putrefaciens* group in wild eels *Anguilla anguilla* L. favoured by hypoxic aquatic environments[J]. Journal of Fish Diseases, 2017, 40(7):929-939.
- [36] 肖康, 彭云峰, 罗玲, 等. 产 EPA 海洋细菌 *Shewanella baltica* 6-42 全基因组测序及比较基因组分析[J]. 中国油料作物学报, 2017, 39(3):404-413.
- [37] Dailey F E, McGraw J E, Jensen B J, et al. The microbiota of freshwater fish and freshwater niches contain Omega-3 fatty acid-producing *Shewanella* species[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 82(1):218-231.
- [38] Valdivia-González M A, Díaz-Vásquez W A, Ruiz-León D, et al. A comparative analysis of tellurite detoxification by members of the genus *Shewanella*[J]. Archives of Microbiology, 2017, 200(2):1-7.
- [39] 陈慧, 郑平, 谢作甫, 等. *Shewanella* 燃料电池的原理、组成和性能[J]. 环境科学与技术, 2014(10):37-41.

Screening and identification of antagonistic bacteria against *Citrobacter freundii* and *Edwardsiella tarda*

LIN Wei, LI Deng-feng*, SUN Zhi-tong, ZHOU Yong-qiang

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology of Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: *Citrobacter freundii* and *Edwardsiella tarda* are the pathogens of human, Terrestrial animals and fish. The use of microbial antagonistic to develop microecological agents for the prevention and control of bacterial diseases is environmentally friendly. In this study, *Citrobacter freundii* and *Edwardsiella tarda* isolated from diseased *Trionyx sinensis* were used as indicator bacterial to screen antagonistic bacteria. Antagonistic bacteria strains 6-1-1M and 7-1-1M from healthy *T. Sinensis* were found to produce inhibitory effects on the two pathogens respectively. Further study verified the antagonistic activity of the two strains by point method and paper method. A total of 930 bp 16S rDNA genes of the two bacteria strains were amplified by PCR and sequenced. The two strains were identical. Phylogenetic tree based on 16S rDNA illustrated that 6-1-1M (7-1-1M) belongs to *Shewanella* sp. Safety verification results showed that 6-1-1M and 7-1-1M have no pathogenicity, which shows a great potential of application.

Key words: *Citrobacter freundii*; *Edwardsiella tarda*; antagonistic bacteria; *Shewanella* sp.; screening

(责任编辑 章踐立)