

文章编号: 1000-0615(2018)07-1124-08

DOI: 10.11964/jfc.20161210661

## 嗜水气单胞菌拮抗菌甲基营养型芽孢杆菌WM-1发酵条件优化

张皎皎<sup>1,2</sup>, 马富平<sup>1,2</sup>, 李艳红<sup>1,2</sup>, 吴正理<sup>1,2,3\*</sup>, 姚维志<sup>1,2,3</sup>

(1. 西南大学动物科技学院, 重庆 400715;

2. 西南大学渔业资源环境研究中心, 重庆 400715;

3. 淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室, 西南大学, 重庆 400715)

**摘要:** 为优化嗜水气单胞菌拮抗菌——甲基营养型芽孢杆菌WM-1的发酵条件, 获得抑菌物质产生的最佳培养基配方和培养条件, 本实验以嗜水气单胞菌为指示菌, 以发酵上清液的抑菌活性为检测指标, 采用单因素和正交实验设计, 对菌株WM-1的发酵条件进行优化。结果显示, 菌株WM-1最适发酵培养基为可溶性淀粉1.0%、牛肉膏1.5%、硫酸镁0.07%、磷酸氢二钾0.05%; 最佳发酵条件为初始pH 7.5、培养温度30 °C、装液量20%、摇床转速210 r/min、培养时间48 h。在最适培养基和最佳发酵条件下, 菌株WM-1发酵液抑菌圈直径达(22.5±0.50) mm, 抑菌活性比优化前提高了40.6%。本研究为嗜水气单胞菌的防治提供了新的材料、为甲基营养型芽孢杆菌应用于嗜水气单胞菌的生物防控提供了理论基础。

**关键词:** 甲基营养型芽孢杆菌; 嗜水气单胞菌; 拮抗菌; 发酵条件; 优化

**中图分类号:** S 917.1

**文献标志码:** A

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)分布于自然界的各种水体, 是水产动物尤其鱼类常见的致病菌, 导致水产动物体表、内脏器官以及组织器官出血症和炎症<sup>[1]</sup>。该病一旦发生就广泛流行, 是一种急性传染病, 患病鱼类死亡率高, 严重危害养殖生产<sup>[2]</sup>。目前对嗜水气单胞菌引起病害的防控主要依赖抗生素、化学药物等, 虽然在短期内起到一定的防治效果, 但随着化学药物和抗生素的大量使用, 易造成环境药物残留、病原菌耐药性增强以及食品安全等问题<sup>[3]</sup>, 使得化学防治受到极大限制。因此, 寻求一种安全、环保和健康的防治方法已成为水产养殖业的当务之急。研究发现, 益生菌具有调节机体正常生理功能、改善养殖环境、维持机体微生态平衡、提高养殖对象产品质量等功能<sup>[4]</sup>。利用益生菌制剂抑制水体中原菌的生长, 预防

养殖动物病害发生, 兼备保护生态和抗病双重功效, 已成为国内外水产养殖病害防治的一个趋势<sup>[5]</sup>。例如, 宋铁英等<sup>[6]</sup>从田边水沟污泥中筛选到15株抗嗜水气单胞菌的菌株, 对嗜水气单胞菌有较强的抑制作用; 单晓枫等<sup>[7]</sup>从养殖水体和水产动物肠胃中筛选到一株粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*), 其发酵上清液能有效抑制嗜水气单胞菌的生长; Das等<sup>[8]</sup>使用假单胞菌有效抑制了12株嗜水气单胞菌的生长。

已报道的嗜水气单胞菌拮抗菌主要有乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)、蛭弧菌属(*Bdellovibrio*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)以及芽孢杆菌属(*Bacillus*)等<sup>[9]</sup>, 但大多数拮抗菌株防治范围较小, 能够真正应用于水产养殖中的种类和数量依然很少。本实验室在前期研究中, 以一株能引起草鱼败血症的病原性嗜水气单胞菌为筛选指示菌, 从

收稿日期: 2016-12-26 修回日期: 2017-05-04

资助项目: 国家自然科学基金(31770965, 31600716); 中央高校基本科研业务费专项(XDJK2015A001, SWU114011, SWU114015)

通信作者: 吴正理, E-mail: zh20140202@swu.edu.cn

养殖池塘水样及底泥中分离筛选到一株具有较高抑菌活性的拮抗菌株WM-1, 经鉴定为甲基营养型芽孢杆菌。甲基营养菌(*Methylotrophs*)也称为甲基利用菌, 研究报道其对临床常见的金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)等都有抑制作用<sup>[10]</sup>, 可以产生抗菌肽、苯胺基甲基乙酸等多种抑菌活性物质<sup>[11]</sup>。目前对甲基营养型芽孢杆菌研究主要集中在植物病害防治方面<sup>[12]</sup>, 然而将其作为水产益生菌应用于养殖实践尚未见报道。

为进一步了解甲基营养型芽孢杆菌WM-1发酵液对嗜水气单胞菌的防治效果, 提高菌株抑菌活性, 本实验在前期研究工作基础上, 对菌株发酵培养基成分及发酵条件进行优化, 以期找到最适发酵条件, 最大限度提高菌株抑菌活性, 为养殖生产过程中嗜水气单胞菌病的生物防治提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**供试菌种** 甲基营养型芽孢杆菌WM-1为本实验室前期从草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)养殖池塘(重庆吉冠水产养殖有限公司)分离筛选得到。嗜水气单胞菌: 由西南大学动物科技学院吴荣华老师提供, 分离于患败血症的草鱼病灶组织, 经形态学和16S *rDNA*分子鉴定, 经攻毒试验发现此菌株具有较强的致病性。

**培养基** LB培养基中胰蛋白胨10 g, 酵母提取物5 g, NaCl 5 g, 水1 000 mL, pH 7.0~7.2; 基础发酵培养基中NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 g, NaCl 0.5 g, 水1 000 mL, pH 7.0。

### 1.2 无 菌 发 酵 上 清 液 的 制 备

**菌种活化** 将低温保存的菌种WM-1划线接种于固体LB平板, 37 °C培养24 h, 即得到活化后的菌种。

**种子液的制备** 挑取活化后的单菌落接种于装有50 mL液体LB培养基的三角瓶中(250 mL), 37 °C、180 r/min条件下培养20 h, 即为种子液。

**无菌发酵液的制备** 取种子液按1%接种到装有20%发酵培养基的三角瓶(250 mL、1 000 mL)

中, 37 °C、180 r/min条件下培养48 h。取发酵液5 mL, 8 000 r/min离心10 min, 将得到的发酵上清液用0.22 μm无茵滤膜过滤除茵, 即得无茵发酵液。

### 1.3 抑 菌 活 性 测 定

菌株WM-1抑菌活性测定参照牛津杯法<sup>[13]</sup>。将1 mL浓度为1×10<sup>8</sup> CFU/mL的嗜水气单胞菌菌液与3 mL冷却到50 °C左右的固体LB培养基均匀混合, 倒入已冷却凝固的LB平板上, 制成双层平板。

随后用无茵镊子取已灭菌牛津杯置于有指示茵的双层平板上, 轻压, 使牛津杯紧贴培养基表面。每个牛津杯加入100 μL无茵发酵液, 于4 °C放置2 h后, 置于37 °C培养24 h, 去掉牛津杯, 测量抑菌圈直径(包括牛津杯直径)。

### 1.4 WM-1菌株发酵培养基优化

**碳源试验** 在基础培养基上, 分别添加1.0%的乳糖、可溶性淀粉、麦芽糖、蔗糖、甘油、葡萄糖做碳源, 37 °C、180 r/min发酵培养48 h, 测定发酵液的抑菌活性。

**氮源试验** 分别以1.0%的酵母粉、牛肉膏、蛋白胨、硫酸铵、硝酸钾、硝酸铵作为氮源代替基础培养基中的氮源, 进行发酵培养测定发酵液的抑菌活性。

**无机盐试验** 在最佳碳氮源基础上, 分别添加0.02%的硫酸锰、硫酸镁、氯化钙、硫酸亚铁、氯化钠、磷酸氢二钾6种无机盐, 进行发酵培养, 测定发酵液的抑菌活性。

**正交试验** 依据前面试验结果, 以筛选出的最佳碳源、氮源、无机盐为考察因素, 以发酵液的抑菌活性为考察指标, 根据正交试验设计, 研究培养基组成对菌株发酵液抑菌活性的影响。

### 1.5 WM-1菌株发酵条件优化

在最适培养基的基础上, 对摇瓶培养的时间、温度、摇床转速、装液量等条件进行优化。每个处理3次重复, 发酵结束后测定无茵发酵液的抑菌活性。

**培养基初始pH值对发酵液抑菌活性的影响** 在其他培养条件不变情况下, 分别设置培养基初始pH值为5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0, 37 °C、180 r/min发酵培养48 h, 测定发酵液的抑菌活性。

**培养温度对发酵液抑菌活性的影响** 在

其他培养条件不变情况下,选择25、30、35、37、40℃,考察培养温度对发酵液抑菌活性的影响。

**摇床转速对发酵液抑菌活性的影响** 在其他培养条件不变情况下,设置摇床转速分别为120、150、180、210和240 r/min,发酵培养测定发酵液的抑菌活性。

**装液量对发酵液抑菌活性的影响** 在其他培养条件不变情况下,设置装液量分别为8%、12%、16%、20%、24%、28%、32%的三角瓶(250 mL、1 000 mL)进行培养,考察其对发酵液抑菌活性的影响。

**培养时间对发酵液抑菌活性的影响** 在其他培养条件不变情况下,分别发酵培养12、24、36、48、60和72 h,测定发酵液抑菌活性随时间变化情况。

## 1.6 数据处理

实验数据通过SPSS 22.0统计软件进行分析处理,采用平均值±标准差(mean±SD)表示; $P<0.05$ 为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 WM-1菌株发酵培养基优化结果

**不同碳源对菌株WM-1发酵液抑菌活性的影响** 利用不同碳源发酵培养,发酵液抑菌活性明显不同。结果发现,当以可溶性淀粉作为碳源时,抑菌圈直径达(16.3±0.57) mm,发酵液抑菌活性最强,显著高于其他各组结果,其次为乳糖;利用蔗糖做碳源时,抑菌活性最低,故选用1.0%的可溶性淀粉作为最佳碳源(图1)。

**不同氮源对菌株WM-1发酵液抑菌活性的影响** 氮源优化实验中,当以牛肉膏作为氮源时,发酵液抑菌圈直径最大,达到(18.3±0.58) mm,抑菌活性最高;以硫酸铵做氮源抑菌活性较弱,故选牛肉膏为最佳氮源(图2)。

**不同无机盐对菌株WM-1发酵液抑菌活性的影响** 无机盐是维持微生物生长必不可少的一类营养物质,为机体生长提供必需的金属元素。无机盐优化实验发现,在培养基中分别添加硫酸锰、硫酸镁、氯化钙、硫酸亚铁、磷酸二氢钾5种无机盐,对发酵液的抑菌活性均有促进作用;其中添加硫酸镁和磷酸氢二钾发酵液抑菌活性明显增强,与基础培养基具有显著差

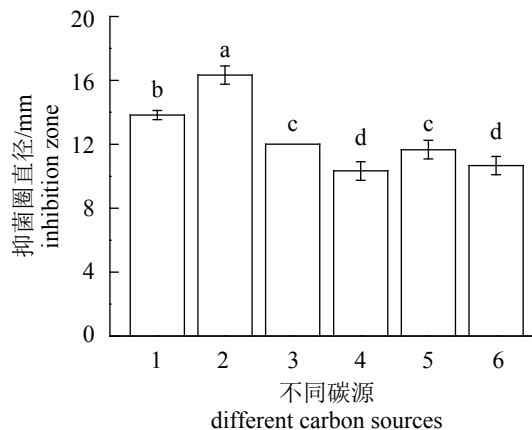


图1 不同碳源对发酵液抑菌活性的影响

1.乳糖,2.可溶性淀粉,3.麦芽糖,4.蔗糖,5.甘油,6.葡萄糖。字母不同代表各组之间差异显著( $P<0.05$ );下同

Fig. 1 Effect of different carbon sources on the antibacterial activity

1. lactose, 2. soluble starch, 3. maltose, 4. glycerol, 5. glucose. Groups with the different letters showed significant difference( $P<0.05$ ); the same below

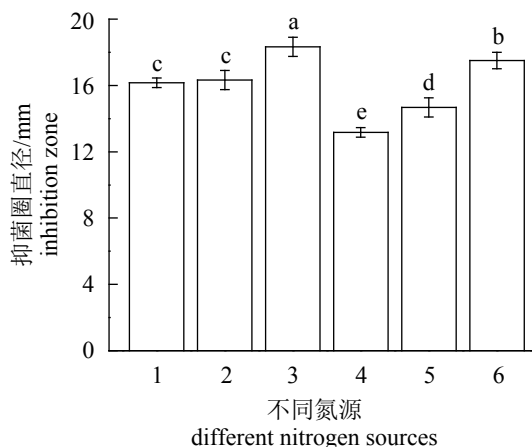


图2 不同氮源对发酵液抑菌活性的影响

1.酵母粉,2.蛋白胨,3.牛肉膏,4.硫酸铵,5.硝酸钾,6.硝酸铵

Fig. 2 Effect of different nitrogen sources on the antibacterial activity

1. yeast extract, 2. tryptone, 3. beef extract, 4. ammonium sulfate, 5. potassium nitrate, 6. ammonium nitrate

异,抑菌圈直径分别达到(20.5±0.50) mm和(20.0±0.57) mm;当添加氯化钠时,发酵液的抑菌活性降低(图3)。因此,选择在培养基中同时添加硫酸镁和磷酸二氢钾2种无机盐离子。

**培养基中各营养成分的优化结果** 根据前面实验结果,选择牛肉膏、可溶性淀粉、硫酸镁和磷酸氢二钾为考察因素,以发酵液抑菌活性为考察指标,按 $L_9(3^4)$ 设计四因素三水平正

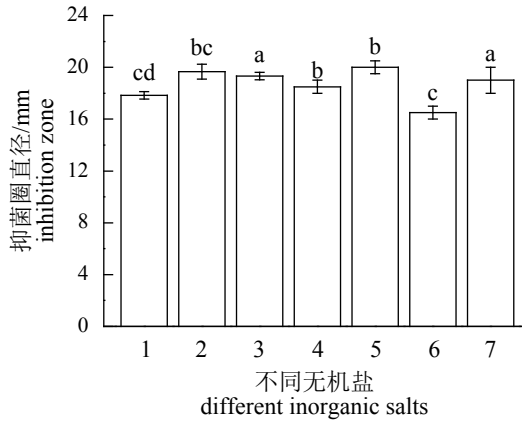


图3 不同无机盐对菌株WM-1发酵液抑菌活性的影响

1.对照组, 2.硫酸镁, 3.氯化钙, 4.硫酸锰, 5.磷酸氢二钾, 6.氯化钠, 7.硫酸亚铁

Fig. 3 Effect of different inorganic salts on the antibacterial activity

1. Control group, 2. magnesium sulfate, 3. calcium chloride, 4. manganese sulfate, 5. potassium dihydrogen phosphate, 6. sodium chloride, 7. ferrous sulfate

交实验方案, 研究培养基各组分对菌株WM-1发酵液抑菌活性的影响。正交试验结果表明, 氮源牛肉膏及碳源淀粉对菌株的发酵液抑菌活性影响显著, 而磷酸氢二钾在一定范围内影响很小(表1)。

极差分析结果显示, 影响发酵液抑菌活性的主次因素为: 牛肉膏>可溶性淀粉>硫酸镁>磷酸氢二钾, 最佳水平组合为A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>D<sub>1</sub>, 即可溶性淀粉(1.0%)、牛肉膏(1.5%)、硫酸镁(0.07%)、磷酸氢二钾(0.05%)。

2.2 菌株WM-1发酵条件的优化

培养基初始pH值对菌株WM-1发酵液抑菌活性的影响 pH值是衡量培养基酸碱度的一个重要指标, 随着培养基初始pH值不断增加, 发酵液抑菌活性呈上升趋势, 当pH为7.5时, 抑菌圈直径达(22.0±0.50) mm, 抑菌活性最强(图4-a)。因此, 确定培养基最适pH值为7.5。

不同培养温度对菌株WM-1发酵液抑菌活性的影响 温度是发酵生产中一个重要指标, 主要影响发酵前期菌株的生长, 以及发酵中后期抑菌产物的合成。实验发现培养温度为30 °C时, 发酵液抑菌活性最强, 抑菌圈直径达(22.5±0.50) mm; 之后, 随着培养温度不断升高, 发酵液抑菌活

表1 培养基正交试验结果 Tab. 1 Result in the orthogonal test of the fermentation medium optimization

试验号 test number	培养基/% medium				抑菌圈/mm zone of inhibition
	A	B	C	D	
1	0.5	0.5	0.03	0.05	18.83±0.76
2	0.5	1.0	0.05	0.07	20.83±0.76
3	0.5	1.5	0.07	0.09	21.67±0.58
4	1.0	0.5	0.05	0.09	20.33±0.29
5	1.0	1.0	0.07	0.05	22.67±0.58
6	1.0	1.5	0.03	0.07	21.50±0.50
7	1.5	0.5	0.07	0.07	19.17±0.29
8	1.5	1.0	0.03	0.09	19.83±0.76
9	1.5	1.5	0.05	0.05	20.83±0.29
K <sub>1</sub>	20.44	19.44	20.05	20.77	
K <sub>2</sub>	21.50	21.11	20.66	20.50	
K <sub>3</sub>	19.94	21.33	21.17	20.61	
R	1.557	1.890	1.117	0.277	

注: A. 可溶性淀粉, B. 牛肉膏, C. 硫酸镁, D. 磷酸氢二钾; K<sub>1-3</sub>代表各因素各水平下对试验指标的影响大小; R. 代表各因素对试验指标的影响主次

Notes: A. soluble starch; B. beef extract; C. magnesium sulfate; D. dipotassium phosphate; K<sub>1-3</sub> the influence of each factor on the test index at various levels; R. the influence of each factor on the test index is reflected

性呈不断下降趋势(图4-b)。因此, 选择30 °C作为菌株最适发酵温度。

不同装液量对菌株WM-1发酵液抑菌活性的影响 摇瓶中装液量直接影响体系溶氧水平, 随着装液量的增加菌株WM-1抑菌活性不断增加, 当装液量为20%时, 抑菌圈直径达到(22.0±1.0) mm, 抑菌活性最强。当装液量超过20%时, 发酵液抑菌活性开始下降(图4-c)。因此, 选择20%的装液量为最佳装液量。

摇床转速对菌株WM-1发酵液抑菌活性的影响 随着摇床转速不断增加, 发酵液抑菌活性逐渐升高, 当转速达到210 r/min时, 抑菌圈直径达到(22.6±0.28) mm, 抑菌活性最强; 继续提高转速, 发酵液抑菌活性反而下降, 所以选择210 r/min为最佳转速(图4-d)。

培养时间对菌株WM-1发酵液抑菌活性的影响 培养时间对发酵液抑菌活性具有显著影响。前48 h以内, 随着发酵时间延长, 发酵液抑

菌活性也随之增强。发酵至48 h时，抑菌圈直径达到(22.0±0.50) mm，抑菌活性最高；随后继续

发酵，抑菌活性开始下降(图4-e)。因此，48 h为最佳发酵时间。

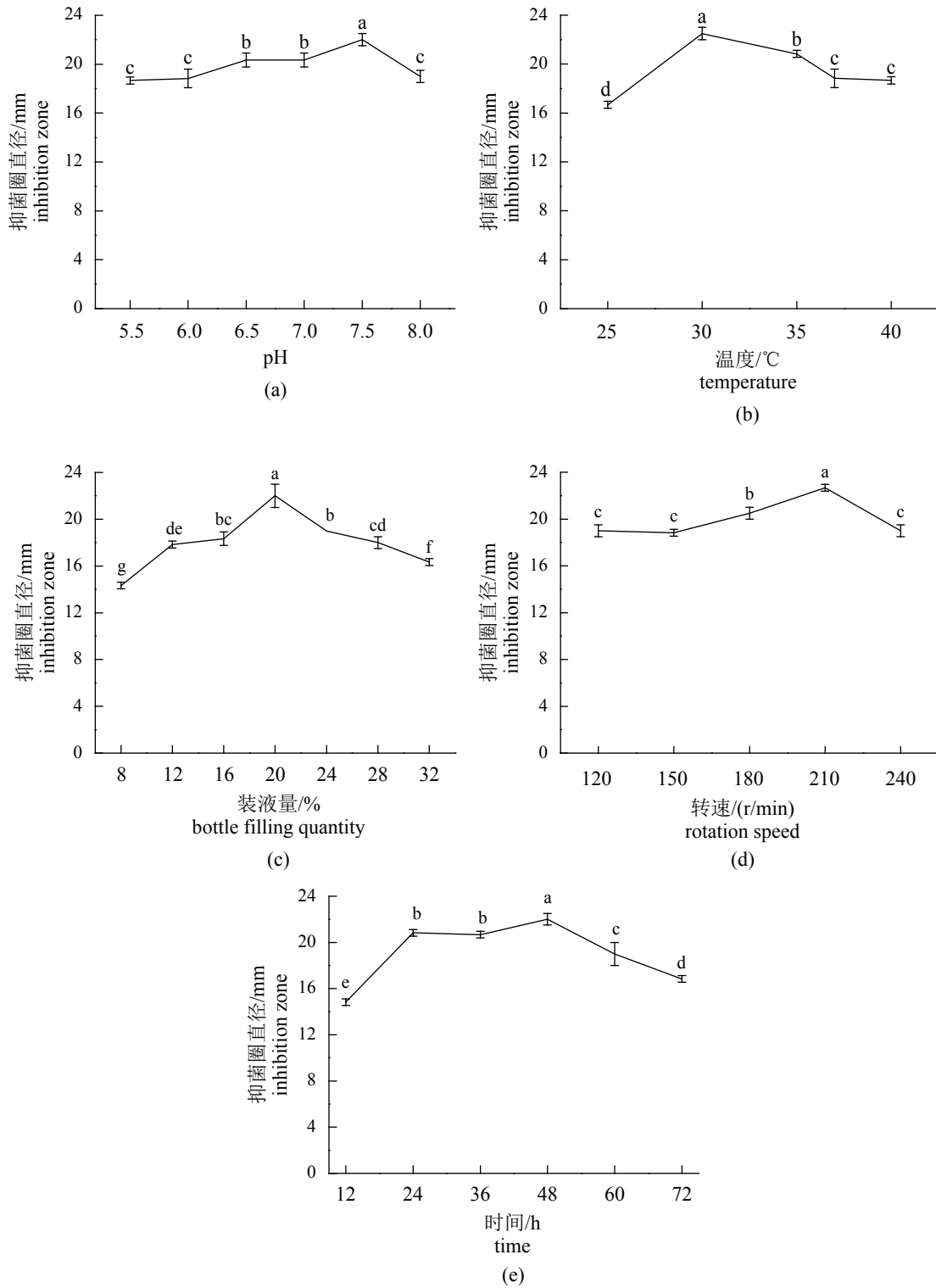


图 4 不同培养条件对菌株WM-1发酵液抑菌活性的影响

(a)-(e)分别表示初始pH值、温度、装液量、转速以及培养时间对抑菌活性的影响

Fig. 4 Effects of different conditions on the antibacterial activity

(a)-(e) mean pH, temperature, bottle filling quantity, rotation speed and incubation time effects on the antibacterial activity

### 2.3 优化前后发酵液抑菌活性变化

为验证发酵条件优化前后菌株WM-1抑菌活性变化情况, 利用优化后的培养基配方及培养条件, 对菌株WM-1进行发酵培养, 收集发酵液并测定抑菌活性, 重复3次。测试发现优化后发酵液的抑菌圈( $22.5\pm 0.50$ ) mm明显大于优化前抑菌圈( $16.2\pm 0.96$ ) mm, 表明此优化条件有利于提高菌株抑菌活性(图5)。

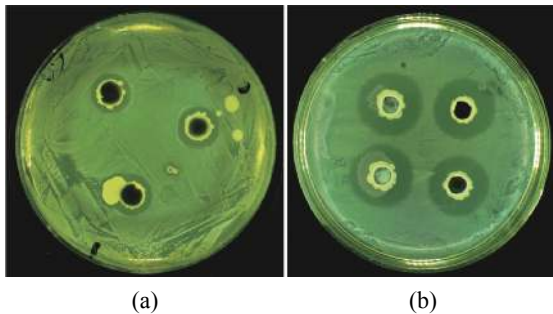


图5 发酵条件优化前后菌株WM-1抑菌圈变化  
(a) 优化前抑菌圈, (b) 优化后抑菌圈  
**Fig. 5 The zone of inhibition of WM-1 before and after fermentation optimization.**  
(a) before fermentation optimization, (b) after fermentation optimization.

### 3 讨论

近年来, 随着生态友好养殖模式不断发展, 微生物制剂已逐渐成为国内外水产病害防治的热点<sup>[14]</sup>。培养基是微生物生长和发挥作用的基础, 不同的培养基成分和发酵条件, 微生物生长及抑菌能力有很大差异。本研究通过单因素试验和正交试验相结合的方法, 对菌株WM-1的抑菌条件进行优化, 从优化培养基成分来看, 氮源对发酵液抑菌活性的影响比碳源更显著, 主要因为微生物合成的抗菌物质多数是由蛋白质和多肽类构成, 氮源主要用来构成菌体细胞以及含氮化合物。其中有机氮源牛肉膏效果最好, 这与黎起秦等<sup>[12]</sup>的研究结论相同, 牛肉膏是多组分氮源, 营养物质丰富, 有维持菌体生长和产物合成的双重作用。无机盐优化试验发现, 在培养基中添加 $Mg^{2+}$ 对发酵液抑菌活性具有明显促进作用, 有相关研究表明,  $Mg^{2+}$ 具有促进甲基营养型芽孢杆菌生长和产酶等作用<sup>[15]</sup>, 可能由于 $Mg^{2+}$ 是微生物代谢酶活性中必不可少的一部分, 能够保证菌体良好生长, 促进抑菌产物的积

累, 从而有效提高菌液抑菌活性<sup>[16]</sup>。

培养条件优化结果发现, 菌株WM-1产抑菌物质具有较宽pH活性范围, 且pH为7.5, 温度 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时抑菌活性最强, 此条件与实际草鱼养殖水体pH(7.5~8.5)及温度范围( $20\sim 35\text{ }^{\circ}\text{C}$ )相符, 间接证明菌株WM-1作为水产益生菌应用于养殖生产的可行性。在各发酵条件优化试验中, 装液量和摇床转速对发酵液抑菌效果影响较大。当装液量为20%, 转速180 r/min时发酵液抑菌活性最强, 增大或减少装液量及转速, 抑菌活性降低, 说明菌株WM-1产抑菌活性物质受通气量的影响很大, 通气量过大或过小, 都不利于菌株发酵液抑菌活性, 这与卢丽俐等<sup>[17]</sup>的研究报道一致。

拮抗菌的抑菌活性一般采用体外测定法, 常见的测定方法主要有牛津杯法<sup>[18]</sup>、纸片法<sup>[3]</sup>、挖沟法<sup>[7]</sup>等, 不同的测定方法测出的同一菌株的抑菌活性不同。本研究采用双层平板结合牛津杯法, 通过测量抑菌圈直径直观反映发酵液抑菌活性。经测试发现, 优化后菌株WM-1发酵液对嗜水气单胞菌抑制活性显著提高, 抑菌圈直径达( $22.5\pm 0.50$ ) mm, 大于曹海鹏等<sup>[19]</sup>报道的解淀粉芽孢杆菌(抑菌圈18.5 mm), 大于周金敏等<sup>[20]</sup>筛选的枯草芽孢杆菌(抑菌圈14 mm)以及刘亚楠等<sup>[21]</sup>从养殖动物肠道筛选的一株解淀粉芽孢杆菌(抑菌圈13 mm), 与以往报道的嗜水气单胞菌拮抗菌相比, 菌株WM-1拮抗效果更强, 在草鱼嗜水气单胞菌败血症防治中具有进一步开发的潜力。

### 参考文献:

- [1] Cantas L, Midtlyng P J, Sørum H. Impact of antibiotic treatments on the expression of the R plasmid *tra* genes and on the host innate immune activity during pRAS<sub>1</sub> bearing *Aeromonas hydrophila* infection in zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *BMC Microbiology*, 2012, 12: 37.
- [2] 陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述[J]. 水产学报, 1992, 16(3): 282-288.  
Lu C P. Pathogenic *Aeromonas hydrophila* and the fish diseases caused by it[J]. *Journal of Fisheries of China*, 1992, 16(3): 282-288(in Chinese).
- [3] Griffiths E. Environmental regulation of bacterial virulence—implications for vaccine design and production[J]. *Trends in Biotechnology*, 1991, 9(1): 309-315.
- [4] Ghosh S, Sinha A, Sahu C. Bioaugmentation in the growth and water quality of livebearing ornamental

- fishes[J]. *Aquaculture International*, 2008, 16(5): 393-403.
- [5] 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.
- Wang J, Feng Y H, Cai L S, *et al.* Screening and identification of vibrio-antagonistic bacteria from the gastrointestinal tract of *Pseudosciaena crocea*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2010, 41(5): 707-713(in Chinese).
- [6] 宋铁英, 周莉娟, 郑伟文. 嗜水气单胞菌拮抗菌的分离及其拮抗物质测定[J]. *台湾海峡*, 1998, 17(S1): 161-164.
- Song T Y, Zhou L J, Zheng W W. Antagonisms of *Aeromonas hydrophila* and determination of antagonists[J]. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 1998, 17(S1): 161-164(in Chinese).
- [7] 单晓枫, 张洪波, 郭伟生, 等. 嗜水气单胞菌拮抗菌的筛选[J]. *淡水渔业*, 2007, 37(6): 45-47.
- Shan X F, Zhang H B, Guo W S, *et al.* Screening of Antergic germ against *Aeromonas hydrophila*[J]. *Freshwater Fisheries*, 2007, 37(6): 45-47(in Chinese).
- [8] Das B K, Samal S K, Samantaray B R, *et al.* Antagonistic activity of cellular components of *Pseudomonas* species against *Aeromonas hydrophila*[J]. *Aquaculture*, 2006, 253(1-4): 17-24.
- [9] 刘亚楠. 团头鲂源嗜水气单胞菌拮抗菌的筛选及拮抗特性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2013.
- Liu Y N. The screening of antagonistic bacteria of *Hydrophila aeromonas* and the study of antagonistic properties from *Megalobrama amblycephala*[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2013 (in Chinese).
- [10] Jeyanthi V, Anbu P, Vairamani M, *et al.* Isolation of hydroquinone (benzene-1, 4-diol) metabolite from halotolerant *Bacillus methylotrophicus* MHC10 and its inhibitory activity towards bacterial pathogens[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2016, 39(3): 429-439.
- [11] 吴燕燕, 张岩, 李来好, 等. 甲基营养型芽孢杆菌抗菌肽对罗非鱼片保鲜效果的研究[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(2): 315-318.
- Wu Y Y, Zhang Y, Li L H, *et al.* Study on fresh-keeping effect of antimicrobial peptides from *Bacillus methylotrophilus* in *Tilapia* fillet preservation[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2013, 34(2): 315-318(in Chinese).
- [12] 黎起泰, 叶云峰, 蒙显英, 等. 内生细菌B<sub>47</sub>菌株的鉴定及其对番茄青枯病的防效测定[J]. *中国生物防治*, 2005, 21(3): 178-182.
- Li Q Q, Ye Y F, Meng X Y, *et al.* Identification of *Endophytic bacterium* strain B<sub>47</sub> and its control effects on tomato bacterial wilt[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2005, 21(3): 178-182(in Chinese).
- [13] 苟小兰, 苏艳秋, 石锐, 等. 鱼源乳酸菌对水产病原菌的抑制作用研究[J]. *水产科学*, 2015, 34(9): 575-579.
- Gou X L, Su Y Q, Shi R, *et al.* Inhibition of aquatic pathogenic bacteria by Lactic acid Bacteria isolated from fish[J]. *Fisheries Science*, 2015, 34(9): 575-579(in Chinese).
- [14] Hai N V. The use of probiotics in aquaculture[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2015, 119(4): 917-935.
- [15] 李润静, 张涛, 江波, 等. 甲基营养芽孢杆菌SK21.002产果聚糖蔗糖酶的发酵条件优化[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(7): 157-161.
- Li R J, Zhang T, Jiang B, *et al.* Optimization of culture conditions for levansucrases by *Bacillus methylotrophicus* SK 21.002[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2013, 34(7): 157-161(in Chinese).
- [16] 向军, 张金虎, 柴海云, 等. 甲基营养型芽孢杆菌产氨基酸酶的发酵优化[J]. *中国酿造*, 2012, 31(5): 45-50.
- Xiang J, Zhang J H, Cai H Y, *et al.* Fermentation optimization for aminopeptidase production of *Bacillus methylotrophilus*[J]. *China Brewing*, 2012, 31(5): 45-50(in Chinese).
- [17] 卢俐俐. 油茶炭疽病拮抗内生细菌的筛选、发酵及抑菌机理研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2009.
- Lu L L. Screening, fermentation conditions and inhibiting mechanisms of antagonistic strains against *Camellia oleifera anthracnose* caused by *Colletotrichum gloeosporioides*[D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology, 2009 (in Chinese).
- [18] 蒋启欢, 叶应旺, 胡王, 等. 银鲫肠道内抑制嗜水气单胞菌的潜在益生菌筛选及其特性研究[J]. *淡水渔业*, 2012, 42(2): 22-26.
- Jiang Q H, Ye Y W, Hu W, *et al.* Selection and characteristic analysis of potential probiotic strains against *Aeromonas hydrophila* from the intestine of *Carassius auratus gibelio*[J]. *Freshwater Fisheries*, 2012, 42(2): 22-26(in Chinese).

- [19] 曹海鹏, 何珊, 刘丽玲, 等. 鲟源病原性嗜水气单胞菌拮抗芽孢杆菌的鉴定及其生物学特性[J]. 微生物学通报, 2011, 38(9): 1377-1384.
- Cao H P, He S, Liu L L, *et al.* Identification and biological characteristics of a *Bacillus* strain antagonistic against pathogenic *Aeromonas hydrophila* of sturgeons[J]. Microbiology China, 2011, 38(9): 1377-1384(in Chinese).
- [20] 周金敏, 吴志新, 曾令兵, 等. 黄颡鱼肠道病原拮抗性芽孢杆菌的筛选与特性研究[J]. 水生生物学报, 2012, 36(1): 78-84.
- Zhou J M, Wu Z X, Zeng L B, *et al.* Selection and characterization of pathogen antagonised probiotics from intestinal tract of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2012, 36(1): 78-84(in Chinese).
- [21] 刘亚楠, 刁丙文, 梁利国, 等. 1株嗜水气单胞菌的拮抗菌鉴定及其特性研究[J]. 水生态学杂志, 2014, 35(3): 82-87.
- Liu Y N, Xi B W, Liang L G, *et al.* Identification and antagonistic properties of an antagonistic bacterial strain against pathogenic *Aeromonas hydrophila*[J]. Journal of Hydroecology, 2014, 35(3): 82-87(in Chinese).

## Fermentation optimization of a strain *Bacillus methylotrophilus* WM-1 against *Aeromonas hydrophila*

ZHANG Jiaojiao<sup>1,2</sup>, MA Fuping<sup>1,2</sup>, LI Yanhong<sup>1,2</sup>, WU Zhengli<sup>1,2,3\*</sup>, YAO Weizhi<sup>1,2,3</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Research Center of Fishery Resources and Environment, Southwest University, Chongqing 400715, China;

3. Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development, Ministry of Education, Southwest University, Chongqing 400715, China)

**Abstract:** To investigate and obtain the best medium formula and fermentation conditions of an antagonistic strain WM-1 against *Aeromonas hydrophila*, we used *A. hydrophila* as the index bacteria of the antibacterial. The activity of strain WM-1 was measured by Oxford cup test. Single factor experiments and orthogonal experiments were employed to optimize the liquid medium compositions and fermentation conditions of WM-1. The data showed that the optimum medium included 1.0% soluble starch, 1.5% beef extract, 0.05%  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  and 0.07%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; and the optimal fermentation conditions were initial pH 7.5, culture temperature 30 °C, fermentation time 48 h, medium volumes 20%, rotating speed 210 r/min. Under the optimum conditions, the inhibition zone of WM-1 reached (22.5±0.50) mm, which was 40.6% higher than that under non-optimized conditions. These results provide a theoretical basis for the biocontrol of *A. hydrophila*.

**Key words:** *Bacillus methylotrophilus*; *Aeromonas hydrophila*; antagonistic bacteria; fermentation condition; optimization

**Corresponding author:** WU Zhengli. E-mail: zh20140202@swu.edu.cn

**Funding projects:** National Natural Science Foundation (31770965, 31600716); Fundamental Research Funds for the Central Universities (NXDJK2015A001, SWU114011, SWU114015)