

线纹海马鳃弧菌拮抗菌的筛选及鉴定

黄雨欣, 杨子涵, 石念超, 杨燕菁*

天津农学院水产学院, 天津

收稿日期: 2026年5月11日; 录用日期: 2026年6月3日; 发布日期: 2026年6月15日

摘要

鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)是首个被鉴定的鱼类病原弧菌, 宿主广泛, 感染鱼类已超50种, 前期研究显示其可引发线纹海马出现“白化-死亡”综合征。为寻求生态环保的鳃弧菌感染防控方法, 本研究通过点接法和滤纸片扩散法从健康线纹海马肠道内容物中筛选出一株对鳃弧菌具有显著拮抗作用的菌株, 命名Ab, 综合形态学分析及16S rRNA基因系统发育树分析, 将其鉴定为杀鱼假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas piscicida*); 生长特性测定结果表明, 该菌株在20°C~36°C范围内生长速率随温度升高而加快, 最适生长盐度为30‰。本研究为后续线纹海马弧菌病的生物防治提供了候选菌株和理论基础。

关键词

鳃弧菌, 线纹海马, 拮抗菌, 杀鱼假交替单胞菌

Screening and Identification of Antagonistic Bacteria against *Vibrio anguillarum* in *Hippocampus erectus*

Yuxin Huang, Zihan Yang, Nianchao Shi, Yanjing Yang*

College of Fisheries, Tianjin Agricultural University, Tianjin

Received: May 11, 2026; accepted: June 3, 2026; published: June 15, 2026

Abstract

Vibrio anguillarum is the first identified pathogenic vibrio species in fish, exhibiting a broad host range and infecting over 50 fish species. Previous studies have shown that it can cause an “albinism-death” syndrome in the *Hippocampus erectus*. To explore an eco-friendly approach for controlling *V. anguillarum* infection, a strain with significant antagonistic activity against *V. anguillarum* was

*通讯作者。

isolated from the intestinal contents of healthy *Hippocampus erectus* using the spot inoculation method and the disk diffusion method. The strain, designated Ab, was identified as *Pseudoalteromonas piscicida* based on morphological analysis and 16S rRNA gene phylogenetic tree analysis. Growth characteristic assays showed that the strain's growth rate increased with temperature within the range of 20°C~36°C, and its optimal growth salinity was 30‰. This study provides a candidate strain and a theoretical basis for the biocontrol of vibriosis in lined seahorses.

Keywords

Vibrio anguillarum, *Hippocampus erectus*, Antagonistic Bacteria, *Pseudoalteromonas piscicida*

Copyright © 2026 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

线纹海马(*Hippocampus erectus*)隶属海龙目海龙科海龙属, 主要分布于大西洋西岸等地区[1]。21 世纪以来, 过度捕捞和栖息地破坏导致全球野生海马资源持续衰退[2], 在此背景下, 线纹海马养殖规模逐渐扩大, 并凭借其生长迅速、抗病能力突出的特性, 成为了我国海马养殖领域的核心品种之一[1]。

随着养殖规模的扩大和集约化的发展, 病害频发严重影响了经济效益, 其中细菌性疾病尤甚[3]。弧菌是目前海马细菌性疾病中种类最多、流行最广、危害最为显著的一类致病菌属, 通常会引起体表病变和内脏损伤等常见病症。哈维氏弧菌是引发海马暴发性死亡的重要病原, 可致体表出血、白斑及溃烂, 并表现出强毒性与高流行率[4]-[6]; 副溶血弧菌则主要导致海马细菌性肠炎, 典型特征为肛门发白外突、腹部积水及后肠脓肿[7]; 溶藻弧菌常见于海马腐皮病, 常与哈维氏弧菌协同致病, 患病海马皮肤组织细胞变性且不规则排列, 后呈溃烂状[8]; 此外, 亦有报道证实灿烂弧菌、强壮弧菌、创伤弧菌、轮虫弧菌均可对海马养殖业造成重大危害[9]-[12]。尽管鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)是首个被鉴定的鱼类病原弧菌, 然在海马中尚未见相关报道。本实验室在前期研究中从患“白化-死亡”综合症的养殖海马体内分离出一株优势菌株 H-VA, 经鉴定为鳃弧菌属, 患病海马表现为体表颜色变浅、游姿紊乱、呼吸窘迫, 最终死亡。

传统弧菌防治多依赖抗生素与化学消毒剂, 造成环境污染的同时病原菌的耐药性问题亦日趋突出[13]。生物防治利用生物或其代谢产物控制病原, 具有特异性强、环境友好等优点, 其中益生菌制剂在弧菌防控中应用广泛。朱静婷等[14]从池塘底泥和水中分离的枯草芽孢杆菌, 其发酵上清液能有效抑制副溶血弧菌生长; 另一株分离自对虾养殖环境的嗜酸乳杆菌 HS1 则可显著抑制副溶血弧菌、哈维氏弧菌及溶珊瑚弧菌[15]。

本实验以鳃弧菌 H-VA 菌株为指示菌种, 旨在从健康线纹海马的肠道内容物中分离筛选出对其具有高效拮抗作用的潜在益生菌株, 为线纹海马鳃弧菌的生物防控提供技术支撑。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料

实验中所用指示菌鳃弧菌 H-VA 菌株是从海南金玛生物科技有限公司引进的患“白化-死亡”综合症的海马体内分离、纯化获得。

主要试剂 2216E 固体培养基、2216E 液体培养基、MH 固体培养基均购于青岛高科园海博生物技术有限公司, 配置 LB 液体培养基的酵母提取物、胰蛋白胨来自于 Thermo Scientific™ 公司, 药敏纸片购于

杭州微生物试剂有限公司, 2* PCR Master Mix 购于康维世纪生物科技有限公司。

2.2. 拮抗菌的分离及筛选

在超净台中剪取健康海马肠道节段, 连同内容物于无菌生理盐水中匀浆, 划线接种于 2216E 固体培养基, 于 28℃ 培养 24 h。挑取不同形态单菌落, 划线纯化 3 次, 得待筛菌落。初筛: 采用点种法进行拮抗菌筛选, 吸取 100 μL 浓度为 0.5 McF 的 H-VA 菌悬液, 均匀涂布于 2216E 固体培养基, 用无菌枪头挑取纯化后的待筛菌落点种至平板上, 于 28℃ 培养 24 h 后观察, 挑选出现抑菌圈的菌株进行复筛。复筛: 采取滤纸片扩散法, 取需复筛的菌体接种于 200 μL 2216E 液体培养基中, 于 28℃ 摇菌培养 3 h, 分别吸取离心后的菌液上清 5 μL 、原菌液 5 μL 和原菌液 10 μL , 滴加到 6 mm 无菌滤纸片上, 随即迅速将滤纸片贴于上述 H-VA 菌悬液涂布的平板上, 于 28℃ 培养 24 h 后观察抑菌圈的大小, 每组设置 3 个平行。

2.3. 拮抗菌的形态观察

光镜观察: 用一次性接种环蘸取菌液于 2216E 固体培养基上划线, 置于 28℃ 恒温培养 16 h 后在体式显微镜下进行观察。

革兰氏染色: 在超净操作台中于洁净载玻片上滴一小滴生理盐水, 用一次性接种环挑取单菌落溶于生理盐水中均匀涂布, 干燥后经火焰固定 1~2 次。滴加结晶紫染液覆盖菌膜初染 1 min, 用蒸馏水沿载玻片对角线方向冲洗; 滴加碘液媒染 1 min, 水洗; 滴加 95% 乙醇摇动玻片约 45 s 进行脱色处理, 水洗终止反应。最后滴加番红染液复染 1 min, 水洗后晾干, 置于油镜下镜检。

2.4. 拮抗菌的 16SrRNA 序列系统发育分析

接种 10 μL 菌液于 200 μL 2216E 液体培养基的克隆管中, 28℃ 摇菌 3 h, 于 100℃ 高温裂解 10 min 制成扩增模板, 采用通用引物 27F 和 1492R (27F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG; 1492R: GGTTACCTTGTTACGACTT) 对该菌株的 16S rRNA 进行 PCR 扩增。反应体系为: 2* PCR Master Mix 10 μL , 上/下游引物 0.5 μL , 模板 1 μL , 无菌水 8 μL 。反应条件为: 95℃ 3 min; 95℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 2 min, 33 个循环; 72℃ 5 min。将得到的 PCR 产物进行切胶回收送测序。测序的结果于 NCBI 数据库中的进行 blast, 并对相关序列用 MEGA 7.0 NJ (neighbor-joining) 法构建系统发育树, 循环检验次数为 1000 次。

2.5. 拮抗菌的生长特性测定

最适温度: 于超净台取 50 μL 的菌液接种于 80 ml 的 LB 培养基, 混匀后分装至 15 个无菌试管中, 每管 5 mL, 每三支为一组, 分别置于 20℃、24℃、28℃、32℃、36℃ 恒温下培养, 震荡方式为 150 r/min 旋转, 于 4 h、8 h 测定每管菌液的 OD₆₀₀。耐盐性: 于超净台分别取同质的 10 μL 菌液加入 5 ml 不同盐度(0‰, 10‰, 20‰, 30‰, 40‰)的 LB 液体培养基中, 28℃ 恒温条件下 150 r/min 旋转震荡培养, 每组设置三个平行, 于 6 h、12 h、24 h 测定 OD₆₀₀。

3. 结果与分析

3.1. 拮抗菌的筛选

从健康海马肠道中分离获得 23 株菌, 依次编号为 A1~A23。通过点种法进行拮抗菌初筛, 结果显示 A6 和 A7 菌株周围均出现抑菌圈(图 1(A)), 后续测序结果表明两株菌为同一菌种, 将其命名为 Ab。对 Ab 进行复筛, 结果显示离心后上清液 5 μL 、原菌液 5 μL 及原菌液 10 μL 三个处理组均可产生抑菌圈, 直径分别为 1.13 ± 0.06 cm、 1.73 ± 0.13 cm 和 2.44 ± 0.16 cm (图 1(B)), 抑菌圈大小和滴加的 Ab 菌落数量呈明显的剂量依赖关系。

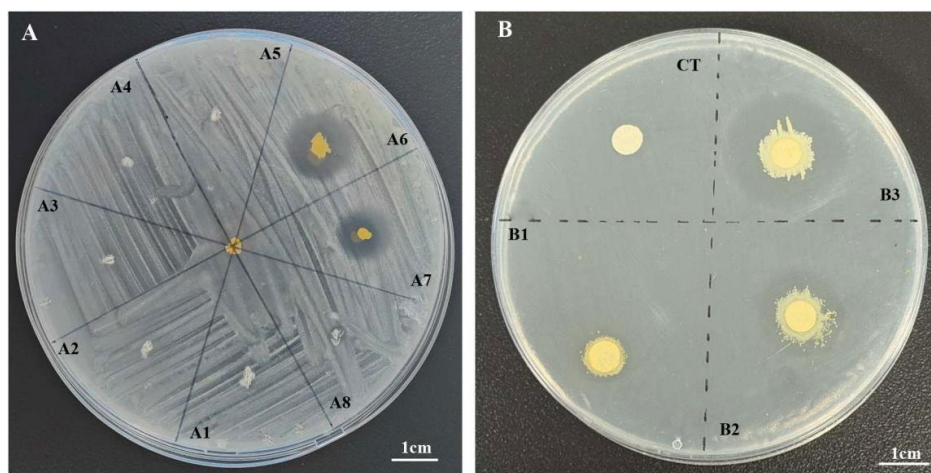


Figure 1. Primary screening (A) and secondary screening (B) of antagonistic bacteria. CT. blank control; B1. 5 μ L supernatant of bacterial solution after centrifugation; B2. 5 μ L original bacterial solution; B3. 10 μ L original bacterial solution

图 1. 拮抗菌的初筛 (A) 和复筛 (B)。CT, 空白对照; B1, 5 μ L 离心后的菌液上清组; B2, 5 μ L 原菌液组; B3, 10 μ L 原菌液组

3.2. 拮抗菌的鉴定

3.2.1. 形态学鉴定

Ab 在 2216E 固体培养基上生长良好, 经 28 $^{\circ}$ C 恒温培养 16 h 后呈黄色圆形菌落, 表面湿润光滑(图 2(A)), 革兰氏染色呈红色杆状, 为革兰氏阴性菌(图 2(B))。

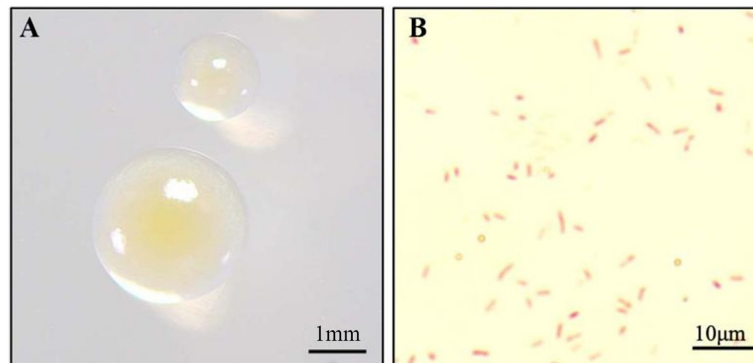


Figure 2. The morphological characteristics of Ab strain. (A). Characteristics of Ab strain on 2216E medium; (B). Gram staining of Ab strain

图 2. Ab 菌株的形态特征。(A), Ab 菌株在 2216E 培养基上的菌落特征; (B), Ab 菌株的革兰氏染色

3.2.2. 分子生物学鉴定

对 Ab 菌株的 16S rRNA 进行扩增测序, 共获得长度为 1495 bp 的序列。将该序列于 NCBI 数据库中 blast 后, 按相似度依次选取 15 条无冗余的序列构建系统发育树, 序列的登录号如下: *Pseudoalteromonas piscicida* strain NBRC 103038, NR_114190.1; *Pseudoalteromonas piscicida* strain IAM 12932, NR_040946.1; *Pseudoalteromonas galathea* strain S4498, NR_178361.1; *Pseudoalteromonas maricaloris* strain NCIMB 2033, NR_025126.1; *Pseudoalteromonas maricaloris* strain KMM636, NR_025009.1; *Pseudoalteromonas peptidolytica* strain NBRC 101021, NR_113971.1; *Pseudoalteromonas peptidolytica* strain F12-50-A1, NR_028676.1; *Pseudoalteromonas rubra* strain ATCC 29570, NR_026223.1; *Pseudoalteromonas luteoviolacea* strain NBRC

103183, NR_114237.1; *Pseudoalteromonas luteoviolacea* strain NCIMB 1893, NR_026221.1; *Pseudoalteromonas caenipelagi* strain JBTF-M23, NR_181150.1; *Pseudoalteromonas phenolica* strain JCM 21460, NR_113299.1; *Pseudoalteromonas tetraodonis* GFC strain NBRC 103034, NR_114187.1; *Pseudoalteromonas tetraodonis* GFC strain KMM 458, NR_114547.1; *Pseudoalteromonas tetraodonis* GFC strain IAM 14160, NR_041787.1。

结果显示, Ab 菌株与杀鱼假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas piscicida*)的 NBRC 103038 株和 IAM 12932 株聚为一支(图 3), 其相似性高达 99.93%和 99.59%, 因此结合形态学特征鉴定 Ab 菌株为杀鱼假交替单胞菌。

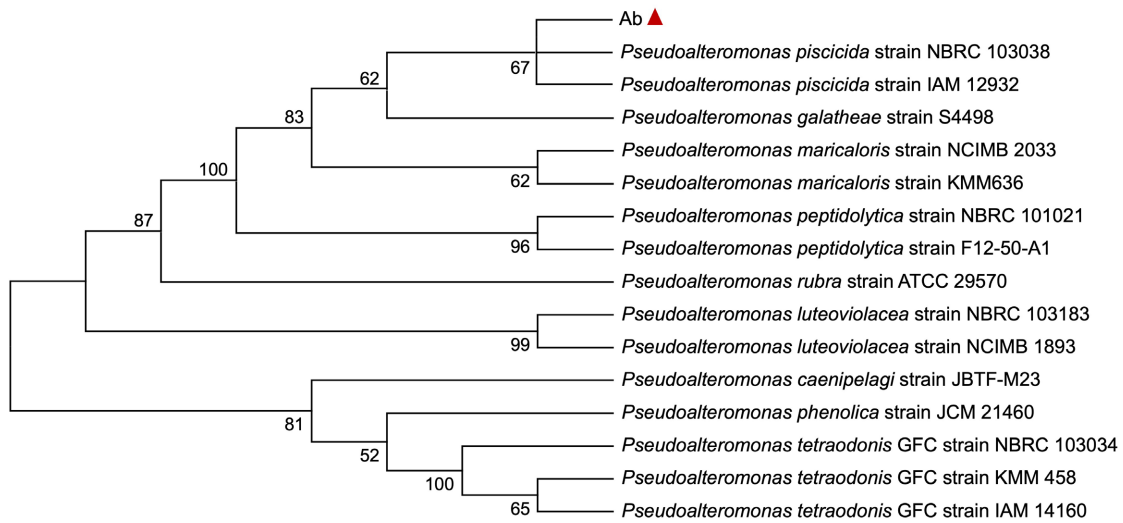


Figure 3. Phylogenetic tree of 16S rRNA sequence of Ab strain
图 3. Ab 菌株 16S rRNA 序列的系统发育树

3.3. 拮抗菌的生长特性

单因素变量分析了 Ab 在不同温度和盐度下的生长情况, 结果显示, 在 20℃~6℃之间, 随着温度的升高, 其生长速度逐步增快; 在耐盐性测定中, 其最适生长盐度为 30‰, 当盐度为 0‰时, 该菌几乎不生长(图 4)。

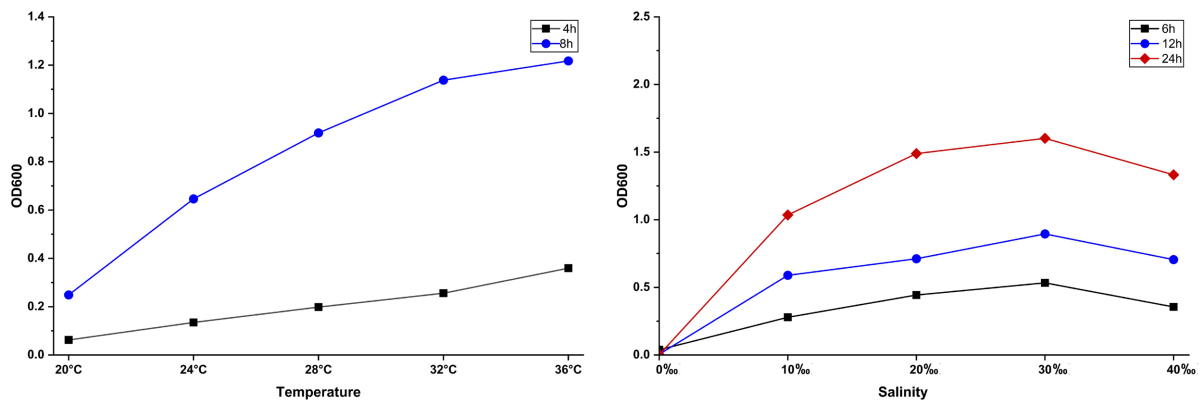


Figure 4. Determination of the optimal growth temperature and salt tolerance of the Ab strain
图 4. Ab 菌株的最适温度及耐盐性测定

4. 讨论

本研究从健康海马肠道菌群中成功筛选到一株对鳗弧菌 H-VA 菌株具有显著拮抗作用的菌株 Ab, 经 16SrRNA 基因序列及生理生化分析鉴定, 该菌株为杀鱼假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas piscicida*)。假交替单胞菌属是海洋环境中常见的拮抗菌, 能有效抑制弧菌[16], Widyaningtyas 等[17]从印度尼西亚红树林沉积物中分离的厦门假交替单胞菌(*P. xiamenensis*) STKMTL.2 对哈维弧菌等多种病原弧菌表现出抑制作用; Uzun Yaylacı 等[18]从水产养殖环境中分离的假交替单胞菌 OS-9 对轮虫弧菌(*Vibrio rotiferianus*)具有强抑菌活性, 在菌体密度最高时抑菌圈直径达 26.42 mm; 唐杨等[19]分离的假交替单胞菌 m8 和 a22, 其胞内外代谢产物均可显著抑制副溶血弧菌。上述结果与本研究相互印证, 说明假交替单胞菌在弧菌防控方面具有应用价值。

研究表明细菌之间拮抗效果与菌量相关[20]-[22]。王枫林[23]等研究发现在混合培养体系中, 杀鱼假交替单胞菌 2515 浓度越高, 对鳗弧菌的抑制效果越强, 其中 10^6 CFU/mL 和 10^7 CFU/mL 两组抑菌作用最为显著, 这与本研究中菌株 Ab 的抑菌圈大小随菌量增大而变大的结果相一致。此外, 本研究中菌株 Ab 上清液的拮抗作用弱于同体积细菌原液的原因, 可能与其作用模式有关。李嘉鑫等[24]研究发现假交替单胞菌 Ps1125 对副溶血弧菌的拮抗作用依赖活菌体。该菌的无细胞上清液和死亡菌体均无拮抗活性, 表明抑菌物质并非稳定分泌至胞外。通过共培养实验进一步证实, 其抑菌作用需要菌体与病原菌直接接触。离心分离后的上清液同样未检测到明显的拮抗效果。这一作用模式与本研究观察到的现象相似, 提示该菌的拮抗作用可能主要依赖活菌体而非胞外代谢产物。

杀鱼假交替单胞菌和鳗弧菌均为嗜盐性细菌, 且高温条件下($>28^{\circ}\text{C}$)均能大量增殖[25] [26], 但刘斌[27]等研究发现鳗弧菌培养的最适盐度低于 20‰, 和菌株 Ab (30‰)存在明显差异。因此, 在夏季高温鳗弧菌病高发期[28] [29], 可以通过调控养殖水体盐度, 在满足线纹海马正常需求(最适盐度为 25~33‰)前提下[30], 将盐度控制在 30‰, 既能保障杀鱼假交替单胞菌处于最适生长环境、充分发挥其拮抗作用, 又能抑制鳗弧菌的增殖, 从而降低弧菌病的发生风险。

基金项目

本研究受天津市市级大学生创新创业训练计划“线纹海马腐皮病病原菌及其拮抗菌的分离筛选”项目(202410061191)资助。

参考文献

- [1] 陈海生. 线纹海马工厂化人工繁育与养殖技术[J]. 中国水产, 2025(1): 27-29.
- [2] Ternes, M.L.F., Gerhardinger, L.C. and Schiavetti, A. (2016) Seahorses in Focus: Local Ecological Knowledge of Seahorse-Watching Operators in a Tropical Estuary. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, **12**, Article No. 52. <https://doi.org/10.1186/s13002-016-0125-8>
- [3] 刘飞龙, 邹文政, 李忠琴, 等. 线纹海马体表溃烂病细菌的分离鉴定及致病性分析[J]. 微生物学报, 2026, 66(2): 850-866.
- [4] Alcaide, E., Gil-Sanz, C., Sanjuán, E., Esteve, D., Amaro, C. and Silveira, L. (2001) *Vibrio harveyi* Causes Disease in Seahorse, *Hippocampus* sp. *Journal of Fish Diseases*, **24**, 311-313. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2001.00297.x>
- [5] Raj, S.T., Lipton, A.P. and Chauhan, G.S. (2010) Characterization and Infectivity Evaluation of *Vibrio harveyi* Causing White Patch Disease among Captive Reared Seahorses, *Hippocampus kuda*. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, **39**, 151-156.
- [6] Qin, G., Wang, X., Tan, S. and Lin, Q. (2017) A Bacterial Infection by *Vibrio harveyi* Causing Heavy Reduction of Cultured Lined Seahorse *Hippocampus erectus*. *Journal of Fish Diseases*, **40**, 601-605. <https://doi.org/10.1111/jfd.12533>
- [7] Lin, T., Zhang, D., Liu, X. and Xiao, D. (2016) Variations of Immune Parameters in the Lined Seahorse *Hippocampus erectus* after Infection with Enteritis Pathogen of *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, **50**, 247-254. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.01.039>

- [8] 卜令飞. 大海马皮肤溃烂病原的分离鉴定及其致病性研究[D]: [硕士学位论文]. 宁波: 宁波大学, 2019.
- [9] Balcázar, J.L., Gallo-Bueno, A., Planas, M. and Pintado, J. (2010) Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from Captive-Bred Seahorses with Disease Symptoms. *Antonie van Leeuwenhoek*, **97**, 207-210. <https://doi.org/10.1007/s10482-009-9398-4>
- [10] Wang, X., Zhang, Y., Qin, G., Luo, W. and Lin, Q. (2016) A Novel Pathogenic Bacteria (*Vibrio fortis*) Causing Enteritis in Cultured Seahorses, *Hippocampus erectus* Perry, 1810. *Journal of Fish Diseases*, **39**, 765-769. <https://doi.org/10.1111/jfd.12411>
- [11] Jiang, F., Yang, N., Huang, H., Feng, H., Li, Y. and Han, B. (2020) Short Communication: Recovery of *Vibrio Vulnificus* from Head Ulceration in Seahorse (*Hippocampus kuda*). *Aquaculture International*, **28**, 653-660. <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00486-z>
- [12] 杨求华, 郑乐云, 黄种持, 等. 线纹海马尾部溃烂病原轮虫弧菌的分离鉴定及特性分析[J]. 中国水产科学, 2017, 24(5): 1131-1140.
- [13] 刘军军. 上海市水产品及其养殖环境中副溶血性弧菌和霍乱弧菌的流行、毒力及抗生素耐药性分析[D]: [硕士学位论文]. 上海: 上海海洋大学, 2022.
- [14] 朱晶婷. 副溶血性弧菌拮抗菌的筛选及其拮抗效果研究[D]: [硕士学位论文]. 舟山: 浙江海洋大学, 2019.
- [15] 刘钢. 两株产酸益生菌对水产常见病原弧菌与 *sul1* 抗性基因的影响[D]: [硕士学位论文]. 上海: 上海海洋大学, 2024.
- [16] Gram, L., Melchiorson, J. and Bruhn, J.B. (2010) Antibacterial Activity of Marine Culturable Bacteria Collected from a Global Sampling of Ocean Surface Waters and Surface Swabs of Marine Organisms. *Marine Biotechnology*, **12**, 439-451. <https://doi.org/10.1007/s10126-009-9233-y>
- [17] Handayani, D.P., Isnansetyo, A., Istiqomah, I. and Jumina, J. (2021) Anti-*Vibrio* Activity of *Pseudoalteromonas xiamenensis* STKMTI.2, a New Potential Vibriosis Biocontrol Bacterium in Marine Aquaculture. *Aquaculture Research*, **53**, 1800-1813. <https://doi.org/10.1111/are.15708>
- [18] Uzun Yaylaci, E. (2022) Characterization of *Pseudoalteromonas* sp. from Aquaculture Environment and Optimization of Fermentation Culture Parameters by RSM-Based Modeling. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **22**, Article ID: TRJFAS21726. <https://doi.org/10.4194/trjfas21726>
- [19] 唐杨. 假交替单胞菌胞外产物的特性分析及其抑菌蛋白的克隆与表达[D]: [硕士学位论文]. 上海: 上海海洋大学, 2017.
- [20] 郭桂萍. 拮抗细菌诱导番茄植株抗灰霉病及其机理研究[D]: [硕士学位论文]. 扬州: 扬州大学, 2003.
- [21] 王静怡, 佐长庚, 牛新湘, 等. 生防菌在棉田土壤中定殖数量与防病作用相关性[J]. 新疆农业科学, 2023, 60(1): 178-184.
- [22] 祖雪, 周瑚, 朱华琚, 等. 枯草芽孢杆菌 K-268 的分离鉴定及对水稻稻瘟病的防病效果[J]. 生物技术通报, 2022, 38(6): 136-146.
- [23] 王枫林, 王秀华, 张宇哲, 等. 杀鱼假交替单胞菌 2515 的抗弧菌效果及在对虾养殖中的应用[J]. 中国水产科学, 2021, 28(07): 903-913.
- [24] 李嘉鑫, 王宝杰, 刘梅, 等. 一株海水来源的弧菌拮抗菌的筛选、应用以及抑菌机制初探[J]. 海洋科学, 2025, 49(3): 93-106.
- [25] 张宇哲, 等. 抗弧菌杀鱼假交替单胞菌 2515 的潜在毒性及热处理脱毒后抗菌效果[J]. 大连海洋大学学报, 2021, 36(3): 399-405.
- [26] 郑国兴, 沈亚林, 李何. 中国对虾病原菌(鳃弧菌)的研究[J]. 水产学报, 1990(1): 1-7.
- [27] 刘斌. 海水养殖鱼类主要细菌病多联疫苗的研制及应用[D]: [硕士学位论文]. 青岛: 中国海洋大学, 2007.
- [28] 谢骏, 徐跑, 殷国俊, 等. 池塘中大肠埃希菌、柱状屈挠杆菌和鳃弧菌的动态演变规律的研究[J]. 中国微生态学杂志, 2004, 16(1): 18-21.
- [29] 向赞, 王刚, 陈兆明, 等. 不同温度条件下鳃弧菌和白斑综合症病毒对凡纳滨对虾的致病性[J]. 热带生物学报, 2015, 6(1): 11-17.
- [30] 中国科学院南海海洋研究所. 一种提高线纹海马幼苗养成率的方法[P]. 中国专利, 201210121704.5. 2014-04-09.