

3种新型鱼源真菌的分离鉴定与孔雀石绿替代药物筛选

彭开松¹, 鲁子怡¹, 董昭然¹, 樊慧敏¹, 唐庆权¹, 许晓牧¹, 鲍传和¹, 朱若林¹, 熊大华²

(1. 安徽农业大学动物科技学院水生健康与公共卫生实验室, 安徽合肥 230036; 2. 嘉兴绿望生物科技有限公司, 浙江嘉兴 314000)

摘要 [目的]从患病鱼类体内和体表分离鉴定出新型鱼源真菌,并用于抗真菌药物的体外药效评价。[方法]通过选择性固体培养基分离纯化鱼源真菌,经形态学和真菌 ITS 序列分子鉴定,采用微量肉汤稀释法测定 10 种渔用抗真菌药物的最小抑菌浓度(MIC)。[结果]黑鱼体表分离的真菌 ZJLD001 株为烟管菌(*Bjerkandera adusta*),鲫鱼体表分离的真菌 ZJLD002 株为白囊耙齿菌(*Irpex lacteus*),虹鳟内脏分离的真菌 ZJLD003 株和 ZJLD004 株均为毛栓菌(*Trametes hirsuta*)。水霉一泼净、优力克、菌霉净、美净推荐的使用剂量大于或等于测定的 MIC;海富水霉灵、水霉菌毒净、美婷、亚甲基蓝、孔雀石绿和甲霜灵的推荐剂量低于测定的 MIC 值。[结论]该研究首次分离到 3 种新型鱼源真菌;具有促进创伤愈合功能的优力克和美净等新型壳寡糖类抗真菌剂的性能和安全性最高,可以替代孔雀石绿用于鱼类真菌病防治。

关键词 鱼源真菌;ITS 序列;药敏试验;优力克;美净

中图分类号 S941.43 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2019)23-0115-03

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2019.23.032



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Isolation and Identification of Three New Fish-derived Fungi and Alternative Drugs Screening of Malachite Green

PENG Kai-song, LU Zi-yi, DONG Zhao-ran et al (Laboratory of Aquatic Health and Public Health, College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036)

Abstract [Objective] To isolate and identify new fish-derived fungi from the body and surface of diseased fish, and evaluate the efficacy of antifungal drugs *in vitro*. [Method] The fish-derived fungi were isolated and purified by selective solid medium. The morphological and fungal ITS sequence molecular identification was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of 10 kinds of fish anti-fungal drugs by micro-broth dilution method. [Result] The fungus ZJLD001 strain from the surface of snakehead fish was *Bjerkandera adusta*, the fungus ZJLD002 strain isolated from the surface of crucian carp was *Irpex lacteus*, the visceral fungus ZJLD003 strain and ZJLD004 strain isolated from the internal organs of rainbow trout were *Trametes hirsuta*. The recommended doses of Shuimeiyipojing, Youlike, Junmeijing and Meijing were greater than or equal to the measured MIC value. The recommended doses of Haifushuimeiling, Shuimeijundujing, Meiting, methylene blue, malachite green and metalaxyl were far below the measured MIC values. [Conclusion] Three new species of fish-derived fungi were isolated for the first time in this study. New chitosan-oligosaccharide antifungal agents, such as Youlike and Meijing, which can promote wound healing, have the highest cost-effectiveness and safety, which can be used as alternative drugs to malachite green in the prevention and treatment of fish mycosis.

Key words Fish-derived fungi; ITS sequence; Drug sensitivity test; Youlike; Meijing

水霉病是鱼类最常见的外寄生真菌性疾病,其病原是多种水霉属(*Saprolegnia*)和绵霉属(*Achlya*)的成员^[1]。水霉病的防控仍然是水产养殖的一大难题。孔雀石绿曾经是治疗水霉病最有效的药物,但因其致癌作用被我国列为禁用渔药。目前,养殖户一旦发现鱼类患水霉病,就盲目使用各种杀水霉药物。由于临床上缺乏对水霉治疗药物的客观评价,更加剧了临床用药的混乱。因此,筛选安全、有效的抗真菌药物对水产养殖具有重要意义。笔者从体表长白毛的鲫、黑鱼和虹鳟上分离、纯化、鉴定出 3 种真菌,并采用体外试验分析了市场上常见抗真菌药物对这 3 种真菌的药效,以期为鱼源真菌感染的防控提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 病料 黑鱼和鲫取自安徽省怀远县,虹鳟取自青海省龙羊峡。患鱼皮肤溃烂处长出白毛。

1.2 真菌的分离与纯化 将黑鱼或鲫体表的白色菌丝或虹鳟内脏(肝、脾、肾)长有菌丝的部位,移至含氯霉素的马铃薯

葡萄糖琼脂上,25℃下培养直至菌丝长出。多次纯化菌落,直至无杂菌生长。最后,对纯化菌株进行形态学观察。

1.3 真菌的分子鉴定 用 Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒(上海生工)分别纯化各株纯化真菌的基因组 DNA 作为 PCR 扩增模板^[2]。以 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCT-GCCG-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATIGATATGC-3')为引物,扩增核糖体 RNA 内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)^[3]。PCR 扩增反应体系(20 μL)如下:DNA 模板 2 μL,上下游引物各 1 μL, ddH₂O 6 μL, 2×ES Taq PCR Master Mix 10 μL。PCR 反应程序如下:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s, 52℃退火 30 s, 72℃延伸 1 min, 共 35 个循环;72℃终延伸 7 min。利用 1%琼脂糖凝胶电泳纯化鉴定目的片段,并将其回收后送交上海生工测序。将测序结果经 Blast 比对和使用 Mega 7.0 软件构建系统发生树分析后,提交 NCBI 网站获得登录号。

1.4 抗真菌药物对分离株的最小抑菌浓度(MIC) 海富水霉灵(广东海富药业有限公司);水霉一泼净(山西昌泰动物药业有限公司);水霉菌毒净(乌鲁木齐吉发渔药有限公司);优力克(嘉兴绿望生物科技有限公司);菌霉净(武汉华扬天乐动物保健品有限公司);美净(嘉兴绿望生物科技有限公司);复方甲霜灵粉(美婷,由上海海洋大学研制);亚甲基蓝、

基金项目 安徽省现代农业产业技术体系项目(皖农科[2016]84号);安徽农业大学大学生创新基金项目(XJDC2017042)。

作者简介 彭开松(1973—),男,湖北潜江人,副教授,博士,从事养殖健康与公共卫生研究。鲁子怡(1998—),女,江西九江人,从事水产养殖学研究。彭开松和鲁子怡为共同第一作者。

收稿日期 2019-05-16

孔雀石绿和甲霜灵由安徽农业大学动物科技学院水生健康与公共卫生实验室提供。除甲霜灵用无水乙醇助溶后用蒸馏水溶解外,其他药物均用蒸馏水溶解,过滤除菌后4℃条件下贮存备用。

参考李爱华等^[4]的方法,用0.85%无菌生理盐水将真菌孢子浓度调整至OD₅₆₀值为0.08~0.13(相当于1×10⁶~5×10⁶ CFU/mL),使用前用RPMI-1640(含2%葡萄糖)进行50倍稀释。参考WS/T 411—2013方法用微量肉汤稀释法测定常见10种药物对分离株的敏感性^[5]。

2 结果与分析

2.1 鱼源真菌的分离 从黑鱼体表白毛分离到ZJLD001株,3~5 d菌落长满平板,呈均一白色棉絮状,菌丝干燥、长约0.5~1.0 cm;从鲫鱼体表白毛分离到ZJLD002株,5~7 d菌落长满平板,菌丝呈辐射状、比较均一、米白色、干燥;从虹鳟肝脾和肾脏分别分离到ZJLD003和ZJLD004株,7~10 d才可生长成型,菌落正中心生长出直径1.0~1.5 cm、厚度0.8~1.0 cm的白色菌苔,菌落外周有少许干燥菌丝(图1)。



注:ZJLD001为烟管菌(*Bjerkandera adusta*);ZJLD002为白囊耙齿菌(*Irpex lacteus*);ZJLD003为毛栓菌(*Trametes hirsuta*);ZJLD004为毛栓菌(*Trametes hirsuta*)

Note:ZJLD001. *Bjerkandera adusta*;ZJLD002. *Irpex lacteus*;ZJLD003.

Trametes hirsuta;ZJLD004. *Trametes hirsuta*

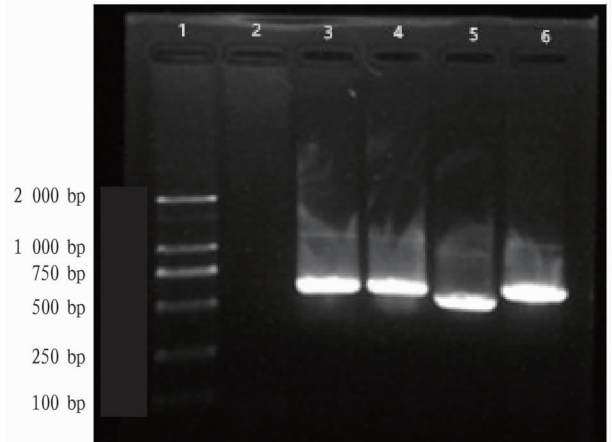
图1 分离菌株的菌落形态

Fig.1 The colony morphology of isolated strains

2.2 分离菌的分子生物学鉴定 4株真菌的rRNA-ITS区基因扩增得到500~750 bp的目的片段(图2)。序列Blast比对和进化分析表明,ZJLD001株(GenBank登录号为MK829590)与烟管菌(*Bjerkandera adusta*)参考株(GenBank登录号为AB733157.1)同源性达99.5%,置信度为93%;ZJLD002株(GenBank登录号为MK829156)鉴定为白囊耙齿菌(*Irpex lacteus*)参考株(登录号为MF101391.1)同源性达99.8%,置信度为95%;ZJLD003株(GenBank登录号为MK830073)和ZJLD004株(GenBank登录号为MK830074)鉴

定为毛栓菌(*Trametes hirsuta*)参考株(登录号为FJ537088.1)同源性达100%,置信度为100%(图3)。

除水霉一泼净、优力克、菌霉净、美净的推荐使用剂量大于或等于测定的MIC值外,海富水霉灵、水霉菌毒净、美婷、亚甲基蓝、孔雀石绿和甲霜灵的推荐剂量均远远低于测定的MIC值(表1)。



注:1. DL2000 DNA Marker; 2. 阴性空白对照; 3. ZJLD003; 4. ZJLD004; 5. ZJLD001; 6. ZJLD002

Note:1. DL2000 DNA Marker; 2. Negative blank control; 3. ZJLD003; 4. ZJLD004; 5. ZJLD001; 6. ZJLD002

图2 4株分离菌株PCR扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig.2 Agarose gel electrophoretic maps of PCR amplified products of 4 isolated strains

3 结论与讨论

分离株的菌落形态分别与前人报道的烟管菌(*Bjerkandera adusta*)^[6]、白囊耙齿菌(*Irpex lacteus*)^[7]和毛栓菌(*Trametes hirsuta*)^[8]相似。采用ITS序列对分离株的分子鉴定结果与形态学鉴定结果可相互印证。黑鱼中分离出的烟管菌(*Bjerkandera adusta*)属于烟管菌属,鲫鱼中分离出的白囊耙齿菌(*Irpex lacteus*)属于耙齿菌属,虹鳟肝脾和脾脏分离出的毛栓菌(*Trametes hirsuta*)属于栓菌属。该研究中分离的4株菌均属于担子菌纲多孔菌目多孔菌科,且均可分泌漆酶,能降解木材中的纤维素、木质素和半纤维素^[8],其中烟管菌还可以降解孔雀石绿^[9],毛栓菌(*Trametes hirsuta*)还可以降解有机磷农药^[10]。

该研究首次从鱼类分离到的3种新型真菌,但并不是渔源常见致病真菌。连续进行了3次穿刺注射攻毒试验,每次每个分离株的每个剂量组均注射5尾泥鳅,结果显示白囊耙齿菌(*Irpex lacteus*)组和毛栓菌(*Trametes hirsuta*)组未见死亡,烟管菌(*Bjerkandera adusta*)组泥鳅死亡1条。攻毒期间,泥鳅体表会出现小的腐皮现象和菌丝生长。这表明这4株真菌有弱致病性或无致病性。但这并不影响其可以用于评价渔用抗真菌药的药效。药敏试验结果显示,水霉一泼净、优力克、菌霉净和美净的抗真菌能力要优于其他6种药物,其中壳聚糖类新型渔用保健品(优力克和美净)使用浓度低且杀真菌效果好,还具有促进创伤愈合的功效,是具有开发前景的渔用抗真菌剂。

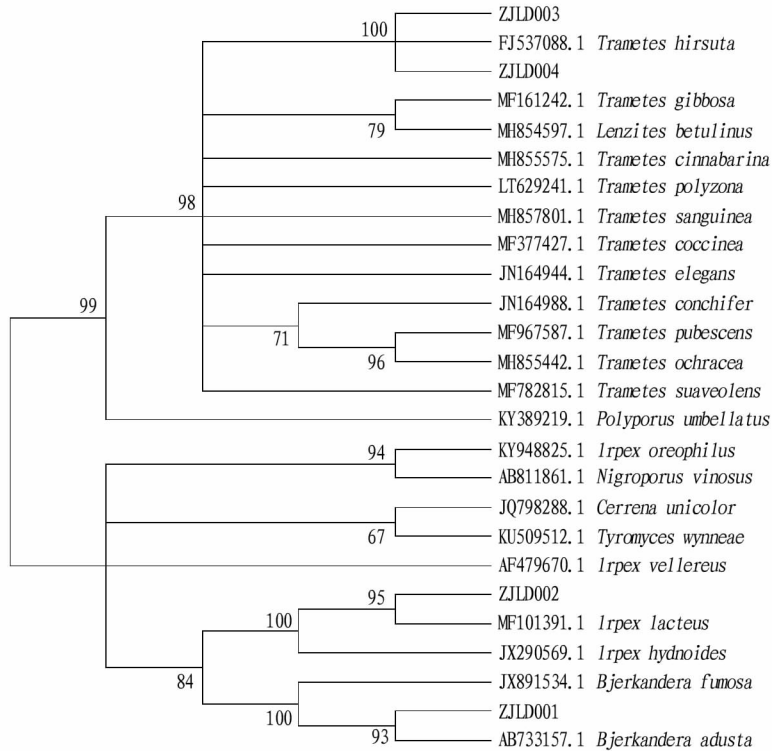


图 3 ITS 序列系统进化树分析

Fig. 3 The phylogenetic tree analysis based on ITS sequence

表 1 渔用抗真菌药对分离株的最小抑菌浓度

Table 1 Minimum inhibitory concentration of fishery antifungal drugs on isolated strains

药物 Drugs	标注成分 Labeling component	全池泼洒推荐浓度 Recommended concentration for spraying in the whole pond g/m ³	最小抑菌浓度 Minimum inhibitory concentration//g/m ³			
			ZJLD001	ZJLD002	ZJLD003	ZJLD004
海富水霉灵 Haifushuimeiling	丙烯基二硫醚等	0.30~0.60	2.50	1.25	1.25	1.25
水霉一泼净 Shuimeiyipojing	二硫氨基甲烷等	0.08	0.08	0.01	0.01	0.01
水霉菌毒净 Shuimeijundujing	水杨酸等	0.05	6.25	6.25	6.25	6.25
优力克 Youlike	壳寡糖等	0.30~0.50	0.16	0.13	0.13	0.13
菌霉净 Junmeijing	植物提取物等	0.08	0.03	0.03	0.03	0.03
美净 Meijing	壳寡糖等	0.30~0.50	0.40	0.40	0.40	0.40
美婷 Meiting	甲霜灵等	0.60	62.50	31.25	31.25	31.25
亚甲基蓝 Methylene blue	亚甲基蓝	0.50~1.00	781.00	3 125.00	3 125.00	3 125.00
孔雀石绿 Malachite green	孔雀石绿	0.10~0.30	7.81	3.13	3.13	3.13
甲霜灵 Metalaxyl	甲霜灵	0.20~0.30	6 250	6 250	6 250	6 250

注:ZJLD001 在 25 ℃ 培养 2 d 观察结果;ZJLD002~ZJLD004 在 25 ℃ 培养 3 d 观察结果。ZJLD001 为烟管菌(*Bjerkandera adusta*);ZJLD002 为白囊耙齿菌(*Irpex lacteus*);ZJLD003 为毛栓菌(*Trametes hirsuta*);ZJLD004 为毛栓菌(*Trametes hirsuta*)

Note:The data about ZJLD001 in the table was observed at 25 ℃ for 2 days;The data about ZJLD002~ZJLD004 were observed at 25 ℃ for 3 days. ZJLD001. *Bjerkandera adusta*;ZJLD002. *Irpex lacteus*;ZJLD003. *Trametes hirsuta*;ZJLD004. *Trametes hirsuta*

参考文献

- [1] 孟思好,孟长明,陈昌福. 鱼类真菌和藻类病的诊断与防控(上)[J]. 渔业致富指南,2016(13):60-61.
- [2] 可小丽,汪建国,顾泽茂,等. 水霉菌总 DNA 提取方法研究[J]. 水生生物学报,2008,32(1):68-73.
- [3] 夏继宁,张能华,范建国,等. rDNA-ITS 序列分析鉴定皮肤癣菌的应用评价[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2018,38(11):1648-1650.
- [4] 李爱华,岳思君,马海滨. 真菌孢子三种计数方法相关性的探讨[J]. 微生物学杂志,2006,26(2):107-110.
- [5] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 抗丝状真菌药物敏感性试验肉汤稀释法:WS/T 411—2013[S]. 北京:中国标准出版社,2013.
- [6] 王剑峰,王璋,饶军,等. 烟管菌漆酶的分离纯化及部分酶学性质研究[J]. 菌物学报,2008,27(2):297-308.
- [7] 孟凡娟,刘欣,闫绍鹏,等. 白囊耙齿菌腐朽木材相关 cDNA 片段的序列克隆与分析[J]. 应用与环境生物学报,2011,17(6):860-863.
- [8] 李江,袁月祥,闫志英,等. 毛栓菌原生质体制备和再生及单核菌株产漆酶特性[J]. 菌物学报,2012,31(1):102-109.
- [9] 陈亮,林永慧,何兴兵,等. 烟管菌降解孔雀石绿染料的多因素优化分析[J]. 湖南农业科学,2011(16):36-37.
- [10] 靖德军,黄剑波,杨洲平,等. 粗毛栓菌漆酶的诱导及其对中性染料和有机磷农药的降解[J]. 应用生态学报,2011,22(12):3300-3306.