

Zhu X, Yang Z Y, Liu Y T, et al. Antagonistic activity of *Epicoccum nigrum* against *Saprolegnia ferax* and its anti-saprolegnia infection mechanism [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2025, 49(12): 122508. [朱霞, 杨自阳, 刘永涛, 等. 黑附球菌对多子水霉的拮抗活性与抗水霉感染机制 [J]. 水生生物学报, 2025, 49(12): 122508.]

黑附球菌对多子水霉的拮抗活性与抗水霉感染机制

朱霞¹ 杨自阳^{1,2} 刘永涛¹ 董靖¹ 周顺¹ 杨秋红¹ 艾晓辉^{1#} 杨移斌^{1#}

(1. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 武汉 430223; 2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 为评估黑附球菌Z01发酵液对水霉的抑制效果及防治应用潜力, 本研究从草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)眼部分离获得一株丝状真菌, 并在培养平板上分离到一株对水霉具有拮抗作用的真菌。经形态学和分子生物学鉴定后, 分别确认为多子水霉(*Saprolegnia ferax*)和黑附球菌Z01 (*Epicoccum nigrum*)。采用平板对峙法、琼脂稀释法和液体稀释法评估了黑附球菌Z01发酵液对多子水霉的抑制效果, 并通过观察组织病理学、测定血液学参数、统计浸泡鱼体后的存活率评估发酵液的安全性。此外, 评估了注射、浸泡、灌胃3种方式下该发酵液对草鱼感染水霉前的预防效果, 以及感染后的治疗效果。结果证实, 黑附球菌对水霉抑制效果显著且稳定, 琼脂稀释法中当发酵液和PDA混合比例大于3:7时水霉无法生长, 在PDB中添加发酵液大于0.1 mL时未观察到水霉孢子萌发。发酵液浸泡草鱼后血细胞形态正常, 存活率高于空白组; 采用浸泡、注射、灌胃方式处理草鱼后水霉感染率显著降低了60%、50%和40%。总之, 黑附球菌Z01能显著抑制水霉生长且对草鱼肝脏、脾脏、中肾和肠无任何损伤, 其发酵液可降低水霉感染率, 并促进草鱼色素层增厚以及肠绒毛固有层细胞数量增加。研究结果可为生物手段防控水霉提供重要参考依据。

关键词: 多子水霉; 黑附球菌; 拮抗作用; 生物防控

中图分类号: S941.42 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2025)12-122508-10

doi: 10.3724/1000-3207.2025.2025.0233 **CSTR:** 32229.14.SSSWXB.2025.0233



草鱼作为我国“四大家鱼”中养殖范围最广的品种, 拥有1700余年养殖历史的草鱼, 目前年产值位居全球淡水养殖业首位。作为有鳞鱼的代表, 草鱼常被用于研究水霉。

水霉(*Saprolegnia*)隶属于茸鞭生物界(Stramenopila)、卵菌门(Oomycota)、卵菌纲(Oomycetes)、水霉目(Saprolegniales)、水霉科(Saprolegniaceae)、水霉属(*Saprolegnia*)是淡水养殖中常见的卵菌性疾病。常见的病原菌有多子水霉(*Saprolegnia ferax*)、棒形水霉(*Saprolegnia longicaulis*)、球形水霉(*Saprolegnia bulbosa*)、多形水霉(*Saprolegnia mixta*)等。低温时期常通过游动孢子附着于水产动物伤口处或黏液分泌异常处形成内、外菌丝侵袭宿主

组织后呈现灰白色絮状物, 可感染各发育阶段的水生动物导致高死亡率。感染鱼种包括草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)^[1]、鲤(*Cyprinus carpio*)^[2]、大西洋鲑(*Salmo salar*)^[3]和虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[4]等。其致病机制在于卵菌通过酪氨酸-O-硫酸盐结合效应蛋白转运途径^[5], 将效应蛋白分泌至宿主细胞内破坏防御系统, 致使宿主表皮细胞受损, 最终引发组织病变。该病的发生与环境胁迫密切相关, 常作为继发性病原侵袭感染病毒、细菌、寄生虫或发生机械损伤的鱼类^[6]。不同鱼类易感性存在差异, 但水霉主要聚集于病鱼受损组织, 引发局部炎症腐烂、皮肤溃疡、游动迟缓及活力下降^[7]。

自高效化学药剂孔雀石绿被禁用后^[8], 水霉病

收稿日期: 2025-07-07; **修订日期:** 2025-08-13

基金项目: 国家重点研发计划(2023YFD2400705); 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2023TD47)资助 [Supported by the National Key Research and Development Program of China (2023YFD2400705); Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, Chinese Academy of Fishery Sciences (2023TD47)]

作者简介: 朱霞(1996—), 女, 研究实习生; 主要从事淡水鱼病害与免疫研究。E-mail: xzhu0917@163.com

通信作者: 艾晓辉, 研究员; E-mail: aixh@yfi.ac.cn 杨移斌, 副研究员; E-mail: yangyb1988@126.com [#]共同通信作者

防治新方法的探索备受关注。近期研究揭示了拮抗微生物在生物防治中的应用价值,如水体中分离出的黏质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)^[9]对水霉菌丝生长与孢子萌发抑制作用显著;健康虹鳟皮肤及水霉病病灶处获得的气单胞菌,荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)^[10]对水霉表现出显著抑制活性,可通过口服或泼洒使用;池塘周围土壤中获得了解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)^[11]能够使水霉菌丝生长畸形从而丧失侵袭能力,拮抗效果强且对水产动物安全;放线菌(*Streptomyces polychromogenes*)^[12]对供试稚鱼无毒,传代稳定,10—70℃内持续拮抗。这些微生物因无残留、拮抗作用显著、安全环保等特性受到青睐,应用研究日益增多。通过生物防控技术实现病害防治与宿主健康促进的融合,正成为水产养殖领域的重要发展趋势。然而现有应用效果仍不理想,亟需进一步分离筛选出具有优良拮抗特性的菌株。

本研究通过对分离获得的水霉及其拮抗真菌进行纯化鉴定,结合浸泡实验、病理切片分析、观察感染率,评估了其对于草鱼的安全性及抑制水霉的效果。以期能为生物防治水霉的研究提供基础理论,为找到合适的水霉拮抗真菌进行产业化应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验鱼与饲养条件

实验用草鱼[平均体重(50±5.2) g]购自湖北省荆州市沙市区。运输至实验室后,在自然光照条件下,置于(25±1)℃的水体中驯养14d,溶解氧保持在6.9—7.1 mg/L。

1.2 病原菌与拮抗菌的分离纯化及鉴定

从湖北省荆州市沙市区养殖池采集濒死草鱼,在实验室无菌条件下选取10尾病鱼,体表经乙醇消毒后,摘取眼球。采用无菌镊子刺破晶状体,将内容物接种于PDA培养基(成分:20%马铃薯浸出液,2% D-葡萄糖,2%琼脂),25℃培养48h。待菌丝萌发后,用手术刀切取矩形菌块转接至新鲜PDA平板,经连续纯化获得单一菌株。在培养该真菌平板上长出一株拮抗菌,采用同样的方法对其进行纯化。

使用真菌基因组DNA提取试剂盒(生工生物,上海)按说明书流程提取DNA。选用通用引物ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')进行PCR扩增,反应程序:95℃预变性3min,95℃变性30s,55℃退火30s,72℃延伸1min,共35个循环,72℃终延伸10min。取5 μL PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳

检测。扩增产物交由天一辉远生物科技有限公司(武汉)进行测序。将PCR产物测序获得的ITS序列分别提交NCBI数据库进行BLAST分析,并采用MEGA 5.0软件使用邻接法(Neighbour-joining)构建系统发育树。

1.3 拮抗真菌的抑菌活性及传代稳定性分析

采用平板对峙法评估Z01菌株对水霉原始分离株的抑制效应。取直径约6 mm的琼脂块置于PDA平板中央(菌丝面朝培养基),在距水霉菌块15 mm处接种拮抗菌株,25℃恒温培养,以未接种拮抗菌的水霉平板为对照,根据抑菌圈大小评价抑菌效果,每组设置3个重复。为检测拮抗菌的传代稳定性,将分离菌株于25℃ PDA平板上培养72h获得第一代,切取约6 mm菌丝块转接至新鲜PDA平板培养第二代,依次连续传代培养至第10代,通过测定抑菌圈直径评估其在传代过程中的稳定性。

1.4 拮抗真菌发酵液的制备及抑制作用

为评估拮抗真菌对水霉的抑制潜力,本研究将纯化培养的拮抗真菌琼脂块接种至含200 mL PDB液体培养基(成分:20%马铃薯浸出液,2% D-葡萄糖)的无菌锥形瓶中,25℃恒温培养5d。在培养结束后,采用灭菌滤布过滤分离菌丝体与发酵液。将滤液于10000 r/min离心10min去除残留固体杂质,用0.22 μm微孔滤膜(Millipore)过滤上清液,获得终发酵液。

琼脂稀释法:采用 A_{430} 值为0.268的真菌发酵液,按1:9、2:8、3:7、4:6和5:5 (v/v)比例与冷却至40—50℃的PDA培养基充分混匀后倒平板,以未处理PDA平板为对照,每组设3个重复。将水霉琼脂块用手术刀切割成6 mm×6 mm的方块接种于含不同浓度真菌发酵液的平板上,25℃培养约3d观察水霉菌丝生长情况。

液体稀释法:将长满水霉菌丝的琼脂块接种于PDA平板,20℃培养4d至菌丝完全覆盖平板。将平板分割成6 mm×6 mm小块置于24孔板中,分别加入2、1、0.5、0.25和0.1 mL真菌发酵液,用PDB培养基补足至2 mL。以未处理PDB为对照,每组3个重复,25℃恒温培养48h后,于光学显微镜下观察菌丝生长状况。

1.5 发酵液对草鱼的安全性评价

实验前对草鱼进行14d适应性暂养。随机选取120尾健康草鱼分配至6个水族箱(每箱20尾),其中3箱作为空白组(不进行处理),另外3箱为安全性评价组。通过7d连续浸泡试验评估发酵液安全性,实验组添加发酵液至终浓度为 2.0×10^8 孢子/mL,空白对照组添加无菌PDB培养基持续观察7d,

每日记录不良反应及死亡情况,统计存活率。取肝脏、脾脏、中肾和肠做石蜡切片。采集血液进行白细胞计数及血红蛋白值检测,采血后制作血涂片,经吉姆萨染液(Solarbio, 中国)染色后观察细胞形态。

1.6 发酵液对草鱼水霉感染的预防作用

选取180尾规格一致的草鱼随机均分至12个水族箱(每组3个重复)。实验前人工刮除体表相同部位的鳞片,并用手术刀刮擦至渗血状态以制造等面积创伤,同时擦除体表黏液便于感染水霉。随后向所有水族箱中加入终浓度为 1×10^8 孢子/L的水霉孢子进行感染。实验设置空白组(添加PDB培养基)、浸泡组、注射组和灌胃组,后3组均使用拮抗真菌发酵液处理:浸泡组添加终浓度为 1×10^8 孢子/mL的发酵液;注射组按200 μ L/尾的剂量注射等浓度发酵液;灌胃组浓度与剂量同注射组。养殖水温维持在18℃,以肉眼可见体表出现菌丝作为感染判定依据,统计水霉感染率。尾静脉采血后经吉姆萨染液(Solarbio, 中国)染色后观察血细胞形态变化。

1.7 发酵液对水霉感染草鱼的初步治疗作用

选取90尾经肉眼观察创伤部位出现菌丝、已成功感染水霉的草鱼,随机均分为感染组和治疗组,每组3个重复。健康草鱼为空白组。治疗组添加终浓度为 2.0×10^8 孢子/mL的拮抗真菌发酵液,1次/d,连续浸泡3d。随后继续观察7d,实验结束后每组随机选取5尾鱼采集肠道、皮肤、肌肉及肝脏组织样本,经Bouin氏固定液固定后制作石蜡切片以评估组织病理学变化。

1.8 血液指标分析

按标准操作制备厚度适宜、分布均匀的血涂片,自然晾干后用无水甲醇固定3min,随后使用适宜浓度的吉姆萨染液(Solarbio, 中国)室温染色15min。染色后的涂片用蒸馏水从玻片一端轻柔冲洗,晾干后镜检。采血后2h内完成白细胞计数($n=5$),计算公式:白细胞数/mL= $A/4 \times 20 \times 10 \times 10^3$ (A 为4个大方格内白细胞总数)。

1.9 苏木精-伊红(HE)染色

将采集的草鱼皮肤、肝脏、脾脏、中肾、肠道及肌肉组织,立即置于Bouin氏固定液中固定12h,经酒精梯度脱水、石蜡包埋切片后,进行HE染色并用中性树胶封片,最后在光学显微镜(Olympus BX51)下观察并拍照记录。

1.10 统计分析

实验数据以均值 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示,采用单因素方差分析(ANOVA)结合Duncan检验进行组间差异显著性分析($P<0.05$),各组数据标注不同上

标字母表示存在统计学差异。

2 结果

2.1 分离、纯化和鉴定

如图1A所示,患病鱼眼部及腹鳍基部出现充血症状,体表伴有局部鳞片脱落。从草鱼病灶部位采集眼球组织进行病原菌分离(图1A-a)与纯化(图1A-b)。在实验室培养水霉平板上发现黄色菌落(图1B-a),经分离纯化获得拮抗菌株(图1B-b)。水霉菌株在PDA平板上呈现白色绒毛状,电子显微镜下可观察到菌丝。基于ITS rDNA序列的系统进化树分析表明,该菌株与多子水霉(*Saprolegnia ferax*) (GenBank登录号: GQ119935.1)聚为一个独立分支, BLAST比对显示99%的序列相似度,结合菌株形态特征与ITS rDNA序列分析结果,判定该菌株为水霉(图1A-c)。

拮抗真菌Z01菌落初期呈点状或棉絮状生长,后期呈淡红色或灰褐色(图1B-b)。系统进化树显示该菌株与黑附球菌(*Epicoccum nigrum*, GenBank登录号: OQ555113.1)聚为一支,序列相似度达100%,结合形态学与分子生物学特征,鉴定为黑附球菌Z01(图1B-c)。本研究报道的水霉(*S. ferax*)和黑附球菌Z01(*E. nigrum*)的ITS rDNA序列已存入GenBank数据库,登录号分别为OR923337和OR923338。

2.2 拮抗真菌发酵液对水霉的拮抗作用

黑附球菌Z01和水霉对峙培养时抑菌圈明显(图2A)。添加了黑附球菌Z01发酵液的混合平板都显著抑制了多子水霉CY01的生长。当黑附球菌Z01发酵液与PDA培养基的混合比例大于3:7后,观察到水霉菌丝未生长(图2B)。未添加拮抗菌液的水霉菌丝粗壮,孢子状态活跃持续萌发,相同培养环境下长满整个平板。加入0.1 mL拮抗菌发酵液后,光学显微镜下仍能发现极少数水霉孢子萌发,其余实验组中均未观察到萌发的水霉孢子,且菌丝更加纤细(图2C)。

2.3 黑附球菌Z01传代稳定性

经过10次传代培养后,抑菌带的宽度略微变窄,意味着拮抗活性略微减弱。可能是实验室最优培养条件下促使其缺乏自然竞争力。拮抗真菌Z01继代培养菌株与出发菌株之间抑菌效果差异不显著($P<0.05$)。总之,拮抗活性总体比较稳定,并不会随着传代而消失(表1)。

2.4 Z01发酵液对草鱼的安全性评估

研究表明,空白组与安全性评价组的存活率均随时间发展呈下降趋势(图3A)。1—2d时,两组存

活率无显著差异($P>0.05$);至第7天,安全性评价组存活率较空白组高10%。如图3B所示,安全性评价组白细胞数显著高于空白组($P<0.05$)。发酵液浸泡后,鱼类血红蛋白水平亦显著升高($P<0.05$;图3C)。吉姆萨染色显示血细胞形态完整、大小适中,未发生病理改变(图3D)。对发酵液浸泡后草鱼肝脏、脾脏、中肾及肠道的组织病理学观察显示(图3E):在肝脏组织中,肝板以中央静脉为中心呈放射状分布,肝细胞为不规则的多边形,胞质含量少,呈空泡状(炭黑色箭头)。脾脏主要由密集的红细胞构成,可见多量的棕褐色颗粒样物(深灰色箭头);中肾组织肾小管结构清晰,可见少量棕褐色颗粒样物(黑

色箭头),未见明显的炎性细胞浸润;肠绒毛上皮增生(浅灰色箭头),细胞排列不规则,偶见上皮点状坏死,未见明显的炎性细胞浸润(中灰色箭头)。这说明拮抗菌发酵液浸泡7d后草鱼安全无损伤。

2.5 发酵液对草鱼感染水霉的预防作用

如图4所示,空白组感染率显著高于3个实验处理组($P<0.05$)。7d累计感染率分别为空白组80%、注射组30%、浸泡组20%、灌胃组40%(图4A)。浸泡组、注射组与灌胃组的血细胞形态与健康草鱼相比未发生改变(图4B)。水霉感染前后白细胞计数波动较小(图4C),且与其他浸泡组相比差异显著($P<0.05$)。所有处理组在感染水霉后血红蛋白值

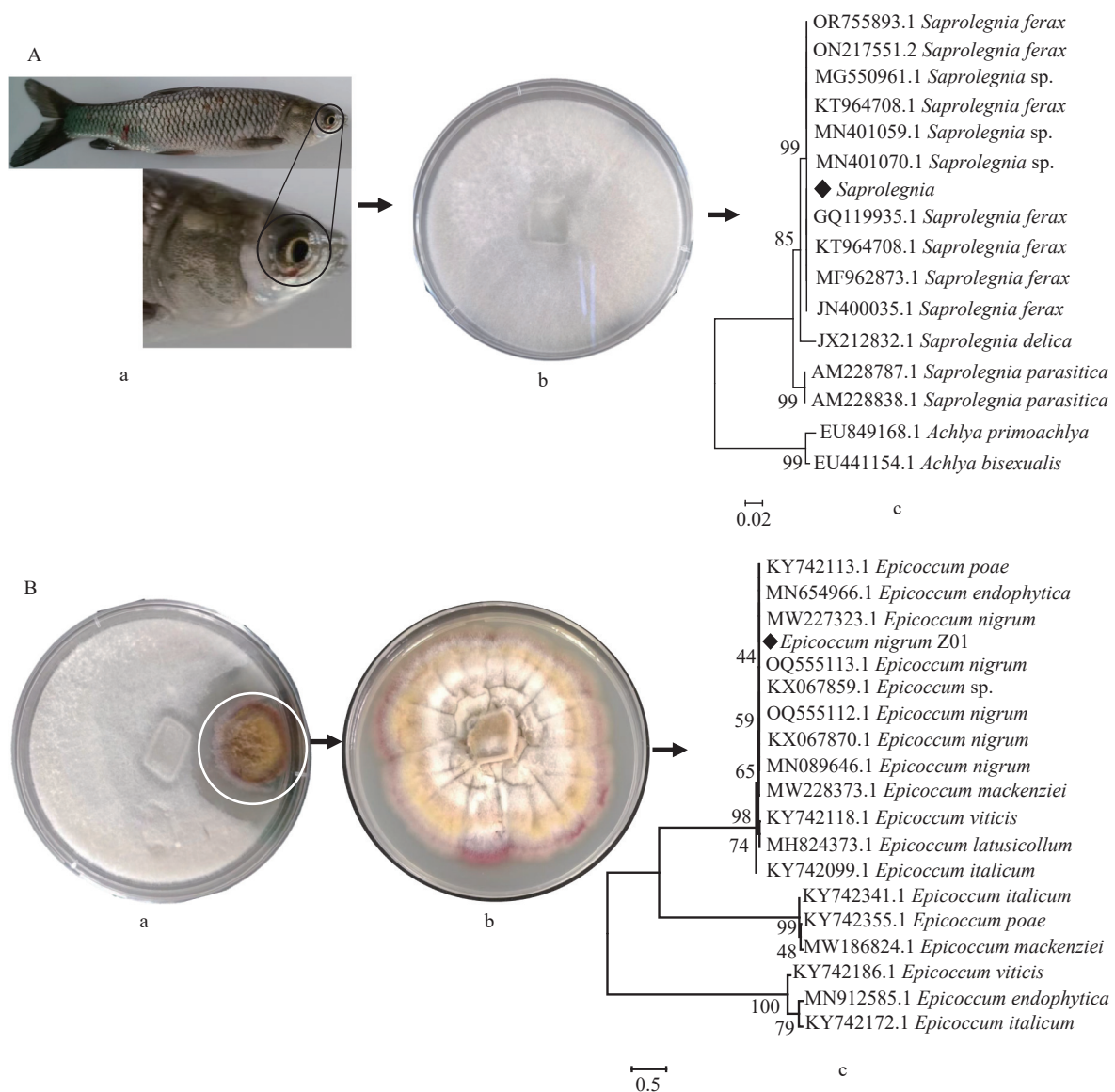


图1 水霉(*S. ferax*)及拮抗真菌的分离鉴定

Fig. 1 Isolation and identification of *S. ferax* and antagonistic fungi

A. 水霉的分离来源(a)、纯化菌株(b)及系统进化树(c); B. 拮抗真菌的分离来源(a)、纯化后菌株形态(b)及系统进化树(c)

A. Source of *S. ferax* (a), strain purification (b) and phylogenetic tree of *S. ferax* (c); B. Isolation sources of antagonistic fungi (a), morphology of purified strains (b), and phylogenetic tree (c)

均显著降低($P<0.05$; 图 4D)。

2.6 发酵液对感染水霉后草鱼的初步治疗作用

从图 5 可以明显看出, 与空白组相比, 感染水霉后的草鱼皮肤、肌肉、肝脏和肠道均出现不同程度的病变。在感染组中, 草鱼表皮轻微变薄(黑色箭头), 色素层着色显著减弱(中灰色箭头); 肌肉组织可见大量坏死成肌细胞, 胞质碎裂且细胞排列紊

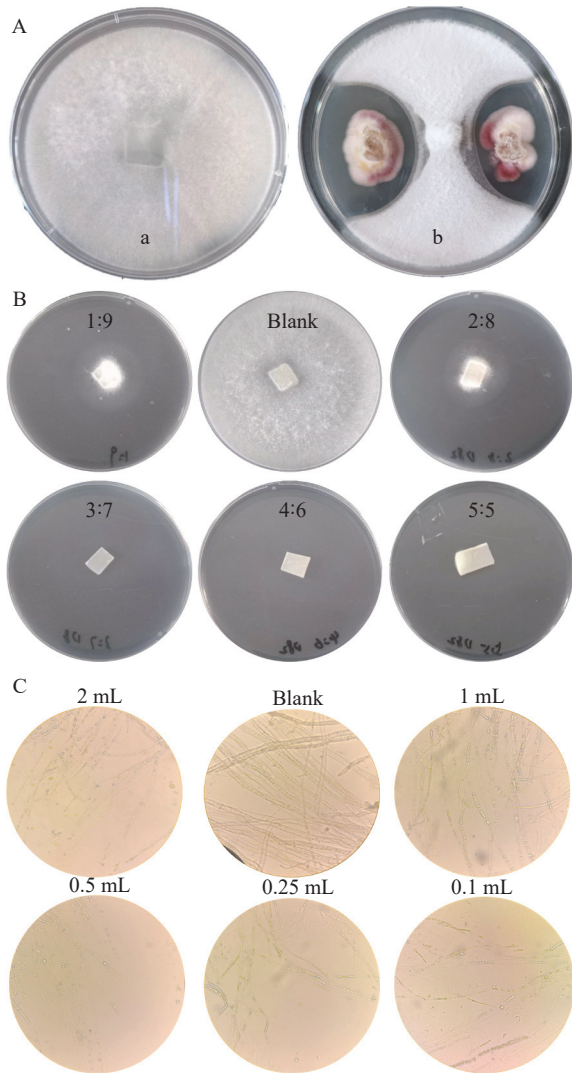


图 2 黑附球菌 Z01 对水霉的抑制作用

Fig. 2 Inhibition of *S. ferax* by the *E. nigrum* Z01

A. 水霉空白平板(a)与 Z01-水霉对峙培养平板(b); B. 不同比例发酵液平板对水霉生长的抑制情况(平板标注为拮抗菌液与 PDA 的混合比例); C. 添加不同浓度发酵液恒温培养后水霉菌丝及孢子的形态变化

A. A blank *S. ferax* plate (a) and confrontation growth between *E. nigrum* Z01 and *S. ferax* plate (b); B. The inhibition of growth of *Saprolegnia* by plates made with different proportions of fermentation broth (The markings on the plate represent the mixing ratio of antagonist solution and PDA); C. The changes in hyphal and spores after addition of different concentrations of fermentation broth for constant temperature cultivation of *S. ferax*

表 1 黑附球菌 Z01 及其继代培养菌株对 CY01 水霉的抑制作用

Tab. 1 The inhibitory effect of *E. nigrum* Z01 and its subcultured strains on *S. ferax* CY01

菌株代数 Strain generation	抑菌圈 Bactericidal zone (mm)
出发菌株 Original strain	28.3±0.3 ^a
2代 Generation 2	28.0±0.1 ^a
4代 Generation 4	27.9±0.2 ^a
6代 Generation 6	27.5±0.3 ^a
8代 Generation 8	27.1±0.3 ^a
10代 Generation 10	26.9±0.4 ^a

注: 表中数据为 3 个重复的平均值; 同一行相同右上角含有相同英文上标字母或无上标表示无显著差异 ($P\geq 0.05$)

Note: Data are means of triplicates; means in each bar sharing the same superscript letter or absence of superscripts are not significantly different determined by Tukey's test ($P\geq 0.05$)

乱(灰色箭头); 肝组织呈现弥漫性肝细胞水样变性, 表现为胞质稀疏、染色浅淡(炭灰色箭头), 这是细胞损伤最早期的改变之一; 肠道绒毛形态偶见不规则(深灰色箭头), 黏膜上皮虽保持完整, 但固有层细胞数量明显减少, 导致黏膜上皮与固有层分离(银灰色箭头)。

治疗组的草鱼表皮与空白组相比无显著差异, 色素层着色轻度减弱且分布不均(中灰色箭头), 肠绒毛固有层细胞数量偶见减少(银灰色箭头)。肝组织可见弥漫性肝细胞气球样变性, 伴有水肿和胞质空泡化, 严重处(炭灰色箭头)细胞膨大如气球。

图 5 结果显示, 与空白组相比, 水霉感染时草鱼皮肤色素层大量色素减少, 而经发酵液处理后色素层着色显著增加。人工创伤造成的肌肉组织破坏程度在水霉感染情况下更为严重, 肌细胞发生严重坏死; 发酵液处理组则呈现相反趋势, 肠绒毛固有层细胞数量有所增加。肝组织与空白组相比未观察到显著变化。

3 讨论

3.1 黑附球菌作为水霉病生物防治剂的潜力

当前水霉病防治研究领域, 除已被禁用的药物孔雀石绿外, 尚无特效药。生物间的拮抗作用为生态平衡维护提供了新思路, 生物农药“Protecto”(苏云金芽孢杆菌)的成功应用即为典型案例^[13]。研究表明, 中间气单胞菌 A199 菌株可通过抑制病灶区菌丝生长及游动孢子囊萌发, 有效延缓澳洲银鲈 (*Bidyanus bidyanus*) 感染水霉的进程^[14]; 将澳洲鳗鲡 (*Anguilla australis*) 浸泡于该菌悬液可显著降低水霉感染率^[15], 其作用机制包括促使感染部位菌丝脱落至水体中, 从而加速创面愈合。本研究成功分离获得一株具有显著水霉拮抗活性的生防真菌——

黑附球菌(*E. nigrum*), 该菌不仅能抑制水霉菌丝萌发, 还可通过产生分生孢子^[16]或分泌抗真菌代谢物^[17]发挥抑菌效能。黑附球菌是半知菌亚门附球菌属 *Epicoccum* 的真菌。该菌种具有突出的种内形态与遗传多样性^[18], 能通过调节细胞壁厚度适应盐度、pH及温度等环境变化^[19]。黑附球菌广泛分布于环境和植物组织中, 报道显示, 该菌可从小麦^[20], 半夏(*Pinellia ternate*)^[21]及深海沉积物^[22]等多种生境中分离获得。在以往研究中常被作为生防真菌用于真菌病害的生物防治, 其抗真菌活性主要依赖于抗菌代谢产物, 如黄曲素(Flavipin)、大环内酯类物质 *Epicoccolides*、环肽类物质 *Epicorazines*^[23–25]或通过产生大量糖基水解酶参与真菌细胞的降解实现拮抗作用^[26]。虽然其同属菌株常引发丁香叶斑病^[27], 但从西太平洋橘色双冠丽鱼(*Amphilophus*)鳃中分离的HDN17-88菌株不仅具有抗HSV-2病毒活性, 还对枯草芽孢杆菌表现出抑制效应^[28]。本研究首次证实黑附球菌Z01对水霉的拮抗作用, 为其作为水产有益菌防控水霉病提供了理论依据。

3.2 给药方式对防治效果的影响

水产中疫苗或药物的使用方式是发挥效果的

决定性因素。在水产养殖实践中, 注射法效果通常较好, 但操作复杂的特点限制了其大规模应用^[29]; 灌胃法虽效果显著, 但对操作技术要求较高且易导致鱼类应激反应, 相比之下浸泡法更适用于幼鱼及其他鱼种^[30]且对鱼体机械损伤最小。因此, 浸泡法常被用于鱼类疾病预防或治疗的方式之一^[31]。草鱼作为终生用鳃呼吸的水生生物, 通过浸泡给药可促进发酵液中活性成分经鳃部和皮肤吸收, 从而激发机体生理响应。在本实验中, 采用拮抗真菌发酵液浸泡处理的草鱼水霉感染率最低, 证实该方式具有较大的应用潜力。

3.3 水霉感染机制与发酵液安全性验证

水霉菌通常从受损组织中分离获得, 但本研究发现, 尽管草鱼眼部仅存在局部出血且无明显外伤, 但仍可从其眼部分离培养出水霉。这一发现与以往在组织损伤处分离出水霉不一致, 本实验室在前期工作中发现, 在水霉培养基中加入草鱼血清能加速菌丝和孢子的生长(文章未发表)。在人眼部内源真菌的感染中发现, 真菌可通过血液进入眼内^[26]。推测水霉也可通过此方式感染草鱼眼。先前研究表明, 水霉菌丝能侵入感染鱼的表皮组织导致细胞

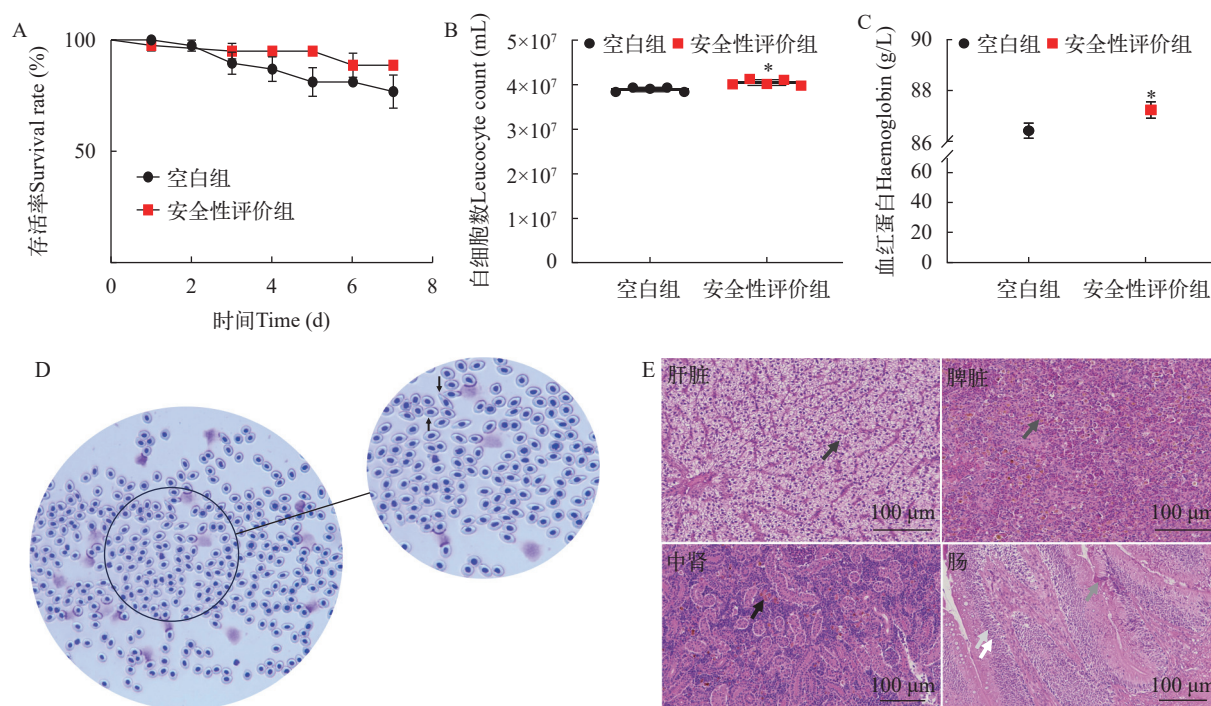


图3 黑附球菌Z01发酵液对草鱼安全性评价

Fig. 3 Evaluation of the safety of *E. nigrum* Z01 fermentation solution on grass carp

A. 草鱼7日存活率; B. 采血后白细胞计数; C. 发酵液浸泡前后草鱼血红蛋白变化; D. 吉姆萨染色后草鱼血涂片(↓ 血栓细胞, ↑ 红细胞); E. 拮抗真菌发酵液浸泡后鱼体肝脏、脾脏、中肾及肠道组织切片

A. Survival rate of grass carp over 7 days; B. leukocyte count immediately after blood collection; C. represents the change in haemoglobin of grass carp before and after soaking in fermentation solution; D. Giemsa-stained blood smear of grass carp (↓ indicates thrombocytes, ↑ represents erythrocyte); E. Histological sections of liver, spleen, trunk kidney and gut of fish after immersion in antagonistic fungal fermentation solution

死亡, 严重时可深入肌肉引起肌纤维坏死^[7]。水霉会诱导三磷酸腺苷(ATP)大量释放至细胞外环境, 引发强烈炎症反应和脾脏局部坏死^[32]。然而在褐鳟感染水霉时发现, 白细胞浸润是诱发炎症反应的前提条件^[33]。与本研究发现一致的是, 草鱼人工感染水霉后创伤部位出现棉絮状菌丝、皮肤及肌肉细胞坏死、鱼体活力显著下降及免疫力低下等症状^[34]。这些研究结果共同证实了水霉在不同鱼类中的感染部位和感染后症状高度一致。

生物防治效果需进行全面的安全性评估, 尤其需关注对宿主的潜在危害。死亡率、血液学指标和组织病理切片是评估微生物菌株生物安全性的关键可视化指标。对草鱼腹腔注射伯克霍尔德菌 HD05 后, 未观察到死亡现象^[35]。在本研究中, 将草鱼浸泡于黑附球菌 Z01 发酵液 7d 后, 其死亡率较空白组显著降低, 进一步证实了该菌株的生物安全

性。血液学指标作为重要的生理参数, 常被用于评估机体生理状态^[36]。白细胞作为免疫功能的关键执行者, 通过吞噬有害物质调节机体免疫^[37]。当机体启动针对病原体入侵的免疫调节时, 常伴随白细胞数量的显著升高, 这在感染病毒的大鲵(*Andrias davidianus*)^[38]和非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)^[39]中均有体现。本研究也发现, 鱼类经拮抗真菌发酵液浸泡后白细胞数量显著增加, 猜想该处理参与了机体的免疫调节过程从而降低感染率。此外, 组织病理切片可直观呈现组织损伤状况。值得注意的是, 拮抗菌浸泡后未观察到炎性细胞浸润等典型病理反应, 表明该发酵液在推荐使用浓度下具有较好的安全性。

4 结论

本研究首次系统评估黑附球菌发酵液对草鱼

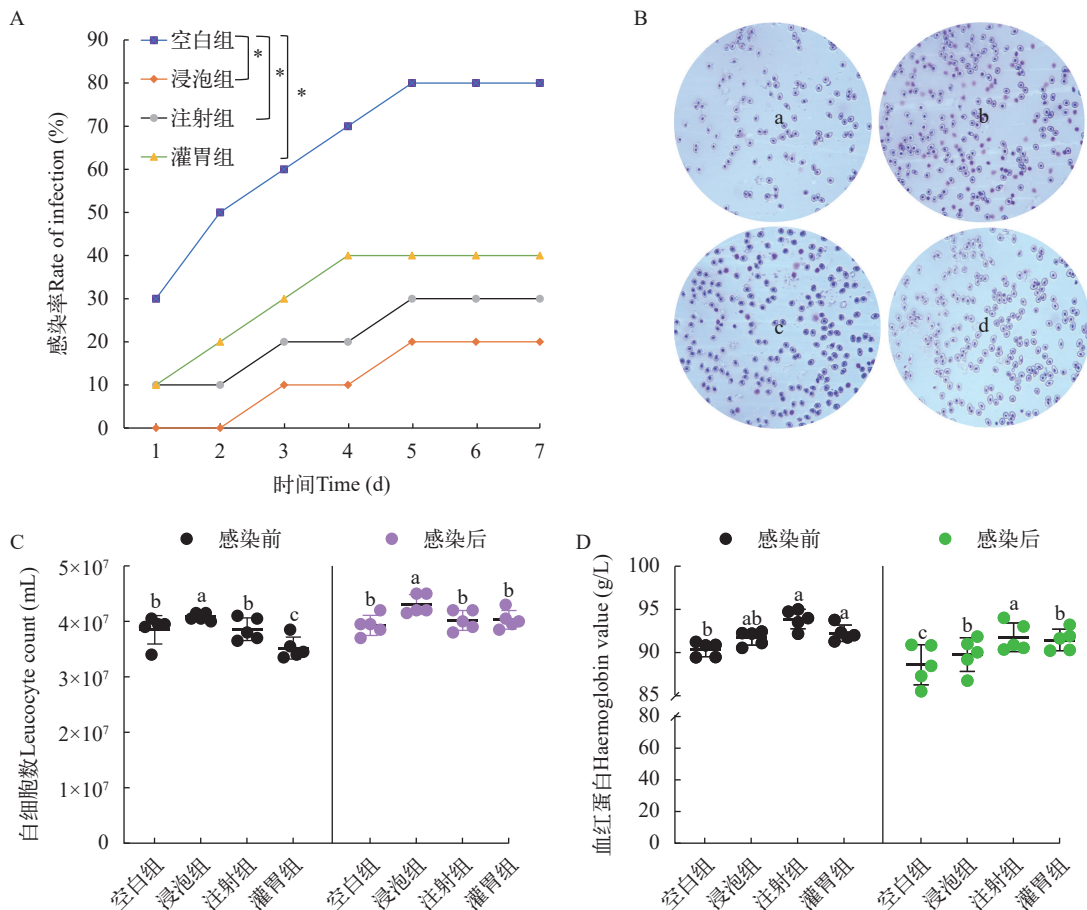


图4 不同处理下发酵液对水霉的预防效果评价

Fig. 4 Evaluation of the preventive effect of fermentation broth against *S. ferax* under different treatments

A. 不同处理组草鱼感染率; B. a—d分别代表空白组、注射组、浸泡组与灌胃组的血细胞形态; C. 水霉感染前后草鱼白细胞计数; D. 水霉感染前后血红蛋白含量的变化

A. The infection rate of grass carp under different treatments; B. a—d represent the blood cell morphology of the blank group, injection group, immersion group and gavage group, respectively; C. Changes in leucocytes counts of grass carp before and after challenged by *S. ferax*; D. haemoglobin values of grass carp before and after challenged by *S. ferax*

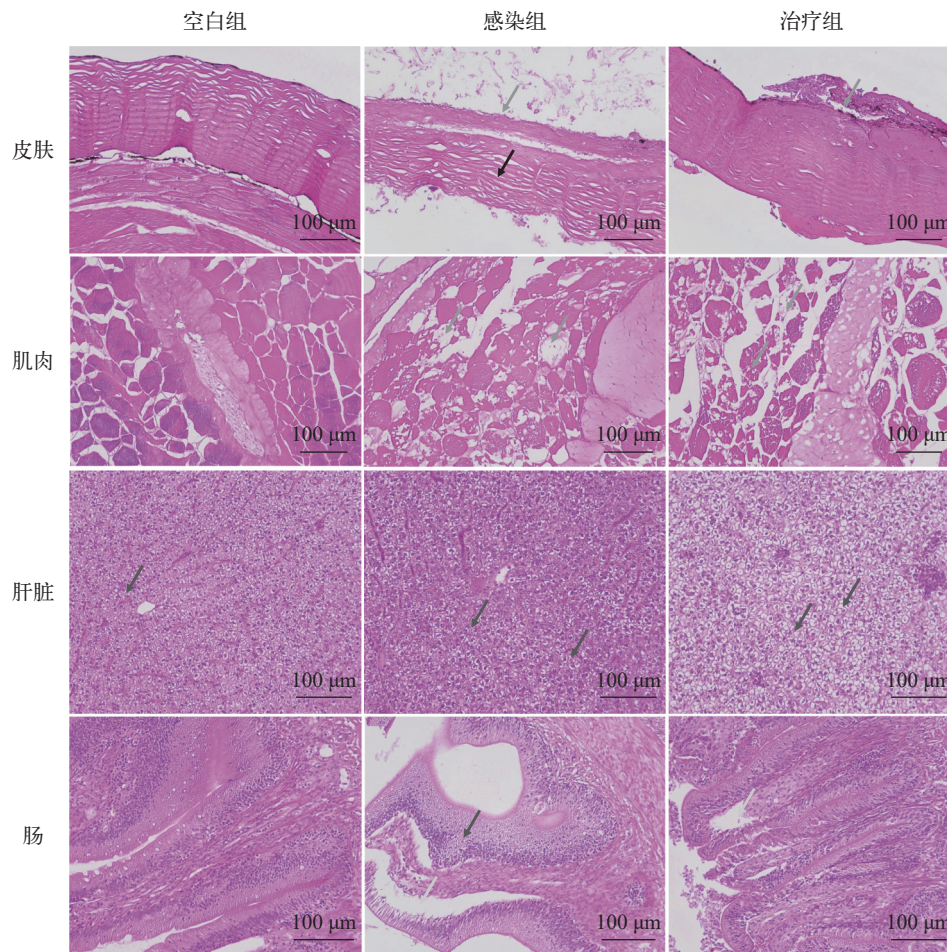


图5 不同处理下草鱼皮肤、肌肉、肝脏及肠组织病理变化

Fig. 5 Histopathological changes in the skin, muscle, liver, and gut of grass carp under different treatments

水霉的预防效果、早期感染阶段的治疗作用及其对草鱼的安全性。感染率是预防效果最直接的体现, 本研究中黑附球菌Z01发酵液浸泡处理显著降低了草鱼水霉感染率。组织病理学分析显示, 与感染前相比, 处理组表皮色素沉积增加, 肠绒毛固有层细胞数量增多, 表明受损组织处于修复状态, 证实了发酵液的疗效。这些发现不仅揭示了黑附球菌Z01发酵液抑制水霉的潜力, 更为其开发为水产益生菌提供了重要依据。

(作者声明本文符合出版伦理要求)

参考文献:

- [1] Hu K, Ma R R, Cheng J M, *et al.* Analysis of *Saprolegnia parasitica* transcriptome following treatment with copper sulfate [J]. *PLoS One*, 2016, **11**(2): e0147445.
- [2] Rahman H S, Choi T J. The efficacy of Virkon-S for the control of saprolegniasis in common carp, *Cyprinus carpio* L [J]. *PeerJ*, 2018(6): e5706.
- [3] Belmonte R, Wang T, Duncan G J, *et al.* Role of pathogen-derived cell wall carbohydrates and prostaglandin E2 in immune response and suppression of fish immunity by the oomycete *Saprolegnia parasitica* [J]. *Infection and Immunity*, 2014, **82**(11): 4518-4529.
- [4] Mehrabi Z, Firouzbakhsh F, Rahimi-Mianji G, *et al.* Immunostimulatory effect of *Aloe vera* (*Aloe barbadensis*) on non-specific immune response, immune gene expression, and experimental challenge with *Saprolegnia parasitica* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Aquaculture*, 2019(503): 330-338.
- [5] Wawra S, Bain J, Durward E, *et al.* Host-targeting protein 1 (SpHtp1) from the oomycete *Saprolegnia parasitica* translocates specifically into fish cells in a tyrosine-O-sulphate-dependent manner [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, **109**(6): 2096-2101.
- [6] Zaki M S, Fawzi O M, Jackey J. Pathological and biochemical studies in *Tilapia nilotica* infected with *Saprolegnia parasitica* and treated with potassium permanganate [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2008, **3**(5): 677-680.
- [7] Shin S, Kulatunga D C M, Dananjaya S H S, *et al.* *Saprolegnia parasitica* isolated from rainbow trout in Korea: characterization, anti-*Saprolegnia* activity and host pathogen interaction in zebrafish disease model [J].

- Mycobiology*, 2017, **45**(4): 297-311.
- [8] van West P. *Saprolegnia parasitica*, an oomycete pathogen with a fishy appetite: new challenges for an old problem [J]. *Mycologist*, 2006, **20**(3): 99-104.
- [9] Zhang S J, Yang X L, Li D, *et al.* Screening of antagonistic bacterium strain against saprolegniosis and the preliminary study of *in vitro* antagonistic activity [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, **32**(3): 301-307. [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, **32**(3): 301-307.]
- [10] Carbajal-González M T, Fregeneda-Grandes J M, Suárez-Ramos S, *et al.* Bacterial skin flora variation and *in vitro* inhibitory activity against *Saprolegnia parasitica* in brown and rainbow trout [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2011, **96**(2): 125-135.
- [11] Lü L Q, Liu L L, Liu H, *et al.* The potential of a *Bacillus* strain as the biological source of pharmaceutical compound against Saprolegniasis [J]. *Fishery Modernization*, 2010, **37**(4): 31-34. [吕利群, 刘丽玲, 刘浩, 等. 一株芽孢杆菌用作水霉病防治的研究 [J]. *渔业现代化*, 2010, **37**(4): 31-34.]
- [12] Wang X, Wang D S, Luo Y C. Screening and identification of antagonistic actinomycete FX11 against *Saprolegnia* and its safety and antibacterial stability [J]. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)*, 2019, **38**(6): 481-486. [王旭, 王丹生, 罗永成. 一株水霉拮抗放线菌FX11的筛选鉴定及其安全性和抑菌稳定性 [J]. *浙江海洋大学学报(自然科学版)*, 2019, **38**(6): 481-486.]
- [13] Gaber O A, Asran A E A, Khider F K, *et al.* Efficacy of biopesticide Protecto (*Bacillus thuringiensis*) (BT) on certain biochemical activities and histological structures of land snail *Monacha cartusiana* (Muller, 1774) [J]. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 2022, **32**(1): 36.
- [14] Lategan M J, Torpy F R, Gibson L F. Biocontrol of saprolegniosis in silver perch *Bidyanus bidyanus* (Mitchell) by *Aeromonas media* strain A199 [J]. *Aquaculture*, 2004, **235**(1/2/3/4): 77-88.
- [15] Lategan M J, Gibson L F. Antagonistic activity of *Aeromonas media* strain A199 against *Saprolegnia* sp., an opportunistic pathogen of the eel, *Anguilla australis* Richardson [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2003, **26**(3): 147-153.
- [16] Brown A E, Finlay R, Ward J S. Antifungal compounds produced by *Epicoccum purpurascens* against soil-borne plant pathogenic fungi [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1987, **19**(6): 657-664.
- [17] Lee A J, Cadelis M M, Kim S H, *et al.* Epipyron A, a broad-spectrum antifungal compound produced by *Epicoccum nigrum* ICMP 19927 [J]. *Molecules*, 2020, **25**(24): 5997.
- [18] Arenal F, Platas G, Martín J, *et al.* Evaluation of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for assessing the genetic variability of isolates of the fungus *Epicoccum nigrum* [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 1999, **87**(6): 898-906.
- [19] Ahumada-Rudolph R, Novoa V, Becerra J. Morphological response to salinity, temperature, and pH changes by marine fungus *Epicoccum nigrum* [J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2018, **191**(1): 35.
- [20] El-Sharkawy H H A, Rashad Y M, Elazab N T. Biocontrol potential of the endophytic *Epicoccum nigrum* HE20 against stripe rust of wheat [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2023(194): 105517.
- [21] Cao P R, Zheng Y L, Zhao Y Q, *et al.* Beetleane A and epicane A: two carbon skeletons produced by *Epicoccum nigrum* [J]. *Organic Letters*, 2021, **23**(9): 3274-3277.
- [22] Chi L P, Li X M, Li L, *et al.* Cytotoxic thiodiketopiperazine derivatives from the deep sea-derived fungus *Epicoccum nigrum* SD-388 [J]. *Marine Drugs*, 2020, **18**(3): 160.
- [23] Braga R M, Padilla G, Araújo W L. The biotechnological potential of *Epicoccum* spp. diversity of secondary metabolites [J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2018, **44**(6): 759-778.
- [24] Talontsi F M, Dittrich B, Schöffler A, *et al.* Epicoccolides: antimicrobial and antifungal polyketides from an endophytic fungus *Epicoccum* sp. associated with *Theobroma cacao* [J]. *European Journal of Organic Chemistry*, 2013, **2013**(15): 3174-3180.
- [25] Harwoko H, Daletos G, Stuhldreier F, *et al.* Dithiodiketopiperazine derivatives from endophytic fungi *Trichoderma harzianum* and *Epicoccum nigrum* [J]. *Natural Product Research*, 2021, **35**(2): 257-265.
- [26] Lin L, Guan Y, Xue C D, *et al.* Antifungal activity characterization of biocontrol fungus *Epicoccum nigrum* En13 [J/OL]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2025: 1-11. [林龙, 管芸, 薛畅达, 等. 生防黑附球菌 En13 的抗真菌活性分析 [J/OL]. *中国生物防治学报*, 2025: 1-11.]
- [27] Bernardi C, Rey M S, Júnior A W, *et al.* First report of *Epicoccum nigrum* causing leaf spot of *Eugenia involucrata* in Brazil [J]. *Plant Disease*, 2023, **107**(1): 230.
- [28] Wang Q, Zhang K, Wang W, *et al.* Amphiepilococcins A-J: epipolythiodioxopiperazines from the fish-gill-derived fungus *Epicoccum nigrum* HDN17-88 [J]. *Journal of Natural Products*, 2020, **83**(2): 524-531.
- [29] Zhu B, Zhang C, Zhao Z, *et al.* Targeted delivery of mannosylated nanoparticles improve prophylactic efficacy of immersion vaccine against fish viral disease [J]. *Vaccines*, 2020, **8**(1): 87.
- [30] Kim S J, Oh M J. Potentiality to natural immunization inducement against VHS in olive flounder by live VHSV immersion vaccination at temperature controlled culture condition [J]. *Virus Research*, 2020(288): 198140.
- [31] Tattiyapong P, Kitiyodom S, Yata T, *et al.* Chitosan nanoparticle immersion vaccine offers protection against

- tilapia lake virus in laboratory and field studies [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022(131): 972-979.
- [32] de Freitas Souza C, Baldissera M D, Abbad L B, *et al.* Purinergic signaling creates an anti-inflammatory profile in spleens of grass carp *Ctenopharyngodon idella* naturally infected by *Saprolegnia parasitica*: an attempt to prevent ATP pro-inflammatory effects [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2019(135): 103649.
- [33] Alvarez F, Razquin B, Villena A, *et al.* Alterations in the peripheral lymphoid organs and differential leukocyte counts in *Saprolegnia*-infected brown trout, *Salmo trutta* fario [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1988, **18**(2): 181-193.
- [34] Álvarez F, Villena A, Zapata A, *et al.* Histopathology of the thymus in *Saprolegnia*-infected wild brown trout, *Salmo trutta* L [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1995, **47**(1/2): 163-172.
- [35] Zhang L, Xu D, Wang F, *et al.* Antifungal activity of *Burkholderia* sp. HD05 against *Saprolegnia* sp. by 2-pyrrolidone-5-carboxylic acid [J]. *Aquaculture*, 2019(511): 634198.
- [36] Garcia F, Pilarski F, Onaka E M, *et al.* Hematology of *Piaractus mesopotamicus* fed diets supplemented with vitamins C and E, challenged by *Aeromonas hydrophila* [J]. *Aquaculture*, 2007, **271**(1-4): 39-46.
- [37] Xin G Y, Zhao L Y, Bei Y J, *et al.* Microstructure of peripheral blood cells in *Theloderma corticale* [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2020, **55**(3): 371-378. [辛桂瑜, 赵玲玉, 贝永建, 等. 北部湾棱皮树蛙外周血细胞显微结构观察 [J]. 动物学杂志, 2020, **55**(3): 371-378.]
- [38] Zhou Y, Fan Y, LaPatra S E, *et al.* Protective immunity of a *Pichia pastoris* expressed recombinant iridovirus major capsid protein in the Chinese giant salamander, *Andrias davidianus* [J]. *Vaccine*, 2015, **33**(42): 5662-5669.
- [39] Morales H D, Abramowitz L, Gertz J, *et al.* Innate immune responses and permissiveness to ranavirus infection of peritoneal leukocytes in the frog *Xenopus laevis* [J]. *Journal of Virology*, 2010, **84**(10): 4912-4922.

ANTAGONISTIC ACTIVITY OF *EPICOCIMUM NIGRUM* AGAINST *SAPROLEGNIA FERAX* AND ITS ANTI-*SAPROLEGNIA* INFECTION MECHANISM

ZHU Xia¹, YANG Zi-Yang^{1,2}, LIU Yong-Tao¹, DONG Jing¹, ZHOU Shun¹, YANG Qiu-Hong¹,
AI Xiao-Hui¹ and YANG Yi-Bin¹

(1. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: To evaluate the inhibitory effect and application potential of *Epicoccum nigrum* Z01 fermentation broth against *Saprolegnia*, this study isolated a filamentous fungus from the eyes of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and obtained an antagonistic fungus against *Saprolegnia* from culture plates. After morphological and molecular biological identification, the strains were confirmed as *Saprolegnia ferax* and *Epicoccum nigrum* Z01, respectively. The inhibitory effect of the fermentation broth on *S. ferax* was assessed using plate confrontation, agar dilution, and broth dilution assays. Safety was evaluated through histopathological observation, hematological parameter analysis, and survival rate statistics after fish immersion. Furthermore, the preventive efficacy of the fermentation broth was assessed in grass carp infected with *Saprolegnia* via injection, immersion, and oral administration, while its therapeutic effect was investigated through post-infection immersion. Results demonstrated that *E. nigrum* Z01 exerted a significant and stable inhibitory effect on *Saprolegnia* growth. In the agar dilution assay, no *Saprolegnia* growth occurred when the fermentation broth-to-PDA ratio exceeded 3:7, and no spore germination was observed in PDB supplemented with more than 0.1 mL of fermentation broth. Immersed fish exhibited normal blood cell morphology and higher survival rates than the control group. The prevalence of *S. ferax* infections in grass carp treated by immersion, injection, and oral administration was significantly reduced by 60%, 50%, and 40%, respectively. Importantly, *E. nigrum* Z01 markedly suppressed *Saprolegnia* growth without causing damage to the liver, spleen, trunk kidney, and gut of grass carp. The fermentation broth also reduced infection rates while promoting choroid thickening and increasing lamina propria cell counts in intestinal villi. These findings provide crucial insights for the biological control of *Saprolegnia*.

Key words: *Saprolegnia ferax*; *Epicoccum nigrum*; Antagonism; Biological control