

文章编号: 1674-7054(2022)06-0605-09



养殖池塘 14 株芽孢杆菌的分离鉴定及抑菌效果

陈皓祥^{1,2}, 邓益琴¹, 程长洪¹, 马红玲¹, 郭志勋¹, 冯娟¹

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所/农业农村部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广州 510300;
2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 为了研究芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)的抑菌效果,以 40 株水产病原菌作为指示菌,用平板法分析 14 株芽孢杆菌(来自养殖池塘水体,命名为 SCS-158~SCS-171)的抑菌效果。结果发现:14 株芽孢杆菌的 24 h 培养的全菌液对水产病原菌的抑菌率最高,达 20.00%,其中,芽孢杆菌 SCS-160、SCS-162、SCS-170 对病原菌中的全部维氏气单胞菌(*Aeromonas viridis*)都有抑菌作用。14 株芽孢杆菌中,有 10 株对白葡萄球菌(*Staphylococcus albicans*)18QW206 有抑制效果。以白葡萄球菌(*S. albicans*)18QW206 为指示菌,与 24 h 培养的全菌液相比,芽孢杆菌的 24 h 培养的上清液及 48 h 培养的全菌液的抑菌效果均有所下降。其中,芽孢杆菌 SCS-162 上清液抑菌效果下降最明显,抑菌圈直径下降 28.55%,芽孢杆菌 SCS-164 上清液抑菌圈直径下降幅度最小,为 5.35%;48 h 培养液抑菌效果中,芽孢杆菌 SCS-160 抑菌圈直径下降幅度最大(42.86%),芽孢杆菌 SCS-163 抑菌圈直径下降幅度最小(4.19%)。说明芽孢杆菌对水产病原菌具有抑制效果。

关键词: 芽孢杆菌; 16S rDNA; 水产病原菌; 全菌液; 上清液; 抑菌分析

中图分类号: Q 93-331 **文献标志码:** A

引用格式: 陈皓祥, 邓益琴, 程长洪, 等. 养殖池塘 14 株芽孢杆菌的分离鉴定及抑菌效果 [J]. 热带生物学报, 2022, 13(6): 605-613. DOI: [10.15886/j.cnki.rds wxb.2022.06.010](https://doi.org/10.15886/j.cnki.rds wxb.2022.06.010)

中国水产养殖规模位居世界首位,大规模养殖导致病害的频发。当前广泛采用的病害防控方法是药物防控,即广谱抗生素和化学药物防控,且抗生素被认为是对抗细菌性传染病最有效、最灵活的武器,被广泛用于预防或治疗水产养殖中的细菌性疾病^[1-2]。然而,抗生素的过度使用,一方面造成药物残留,可能积聚在水产动物可食用组织中,导致人体过敏、中毒、肠道菌群紊乱等^[3]。如 2013 年,青岛抽检海参中检出呋喃唑酮和呋喃西林代谢物。人摄入呋喃唑酮,会引起恶心、呕吐、多发性神经炎^[4]。同时,水产动物抗生素的过度使用导致其耐药和多重耐药细菌被选择和积累^[5],如温州地区水产品中哈维弧菌(*Vibrio harveyi*)对磺胺嘧啶和氨苄西林钠的耐药率达到

100%^[6];广东主要水产养殖地区的 1 143 株气单胞菌(*Aeromonas* spp.)对氨苄西林的耐药率高达 97.81%^[7]。为了水产养殖的健康发展,寻找抗生素等药物的替代品尤为重要。目前抗生素替代品的研究热点是益生菌、中草药、噬菌体、免疫糖类等^[8]。益生菌因其健康、安全的优点,拥有广阔的应用前景^[9]。芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)是最早应用于水产养殖的一种益生菌,且无污染、抗菌性强,是理想的微生物制剂^[10]。在养殖水体中添加芽孢杆菌,可以有效降低水体的氨氮、亚硝氮、活性磷和化学需氧量^[11-14]。此外,还可以改善水体中真核生物和细菌群落的结构,有效抑制蓝藻的生长^[15-18]。在饲料中添加一定量的芽孢杆菌可以显著提升养殖动物的生长、免疫状态和抗病能力^[19-22]。

收稿日期: 2021-05-03

修回日期: 2022-04-25

基金项目: 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(2022GH03); 国家自然科学基金项目(31902415); 国家虾蟹体系蟹病害生态防控岗位专家项目(CARS-48); 广东省自然科学基金项目(2019A1515011833)

第一作者: 陈皓祥(1993-),男,中国水产科学研究院/上海海洋大学 2019 级硕士研究生. E-mail: dtdianshi@163.com

通信作者: 冯娟(1973-),女,博士,研究员.研究方向: 鱼类细菌病害防治. E-mail: jannyfeng@163.com

芽孢杆菌还可以减轻嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)对细胞的损伤,抑制副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)的生长^[23-24],对哈维弧菌(*V. harveyi*)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、杀香鱼假气单胞菌(*Pseudomonas plecoglossicida*)、灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)和嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)都有良好的拮抗作用^[22,25-27],对温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*)存在明显的体外抑菌能力,对迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)也有抑制作用^[28-29]。芽孢杆菌的抑菌效果主要来自其产生的细菌素、多糖化合物以及其他代谢产物^[30-31]。

笔者从养殖池塘中分离、鉴定得到14株芽孢杆菌,并以40株水产病原菌为指示菌,研究14株芽孢杆菌对其的抑制作用,同时,也比较不同培养时间的芽孢杆菌上清液和全菌液的抑菌效果,旨在为芽孢杆菌在防治水产动物疫病中的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 LB 固体培养基(1 L): 1 000 mL

纯净水,胰蛋白胨 10 g,酵母提取粉 5 g, NaCl 10 g,琼脂粉 18 g, pH 调至 7.3~7.5。LB 液体培养基(1 L): 1 000 mL 纯净水,胰蛋白胨 10 g,酵母提取粉 5 g, NaCl 10 g, pH 7.3~7.5。

1.2 芽孢杆菌的分离与鉴定 从广州市南沙区的3个拟穴青蟹(*Scylla paramamosai*)养殖池塘采集水样,每个池塘在池塘4个角各采集水样500 mL,共得到12个水样。每个水样取50 mL于50 mL 无菌试管,沸水浴15 min;将沸水处理的养殖水样经灭菌生理盐水10倍比稀释至 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 等6个梯度;取100 μ L 稀释水样分别涂布至LB固体平板(每个稀释度做3个平行);28 $^{\circ}$ C 静置培养48 h后取出平板观察;挑取表面干燥扁平状的单菌落, LB 平板划线纯化2次后用LB液体培养基,28 $^{\circ}$ C、200 $r \cdot \min^{-1}$ 培养过夜,用细菌基因组提取试剂盒提取基因组DNA,利用16S rDNA 通用引物(表1)进行PCR扩增,并进一步测序和 Blast(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)分析鉴定,同时利用MEGA7软件构建系统进化树。对鉴定为芽孢杆菌的菌株进行后续实验。

表1 16S rDNA 引物序列

基因	引物	序列(5'-3')	目的片段/bp	退火温度/ $^{\circ}$ C
16S rDNA	8F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1 485	55
	1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT		

1.3 芽孢杆菌 24 h 全菌液的抑菌效果分析 芽孢杆菌制备:芽孢杆菌于LB平板划线活化,然后挑取单克隆于2 mL LB液体培养基中,28 $^{\circ}$ C、摇床(200 $r \cdot \min^{-1}$)培养24 h。指示菌制备:从实验室菌库中挑选出25种共计40株水产病原菌株作为指示菌(表2),水产病原菌株于LB平板划线活化,然后挑取单克隆于2 mL LB液体培养基中,28 $^{\circ}$ C、摇床(200 $r \cdot \min^{-1}$)培养24 h。正方形LB平板制备:12 cm边长的正方形平板用50 mL LB固体培养基配置;取200 μ L指示菌涂布平板,晾干后用10 μ L枪头倒置钻孔,每个平板14个孔,每孔加入50 μ L芽孢杆菌,每株指示菌3个重复,正置28 $^{\circ}$ C培养24 h,观察抑菌情况,并测量抑菌圈直径。

1.4 芽孢杆菌 24 h 上清液抑菌效果分析 芽孢杆菌上清液制备:将1.3中过夜培养的芽孢杆菌离心2 min (8 000 $r \cdot \min^{-1}$),取上清液。指示菌制备:

选取1株有明显指示效果的菌株挑单克隆于2 mL LB液体培养基中,28 $^{\circ}$ C、摇床(200 $r \cdot \min^{-1}$)培养24 h;取200 μ L过夜指示菌涂布LB平板,晾干后用10 μ L枪头倒置钻孔,每个平板14个孔,每孔加入50 μ L芽孢杆菌上清液,每株指示菌3个重复,正置28 $^{\circ}$ C培养24 h,观察抑菌情况,并测量抑菌圈直径。抑菌率=抑菌数量/总指示菌数量 \times 100%。

1.5 芽孢杆菌 24 h 培养全菌液与 48 h 培养全菌液的抑菌效果对比分析 芽孢杆菌制备:挑取单克隆于2 mL LB液体培养基中,28 $^{\circ}$ C、摇床(200 $r \cdot \min^{-1}$)培养24 h和48 h。指示菌制备:选取1株有明显指示效果的菌株挑单克隆于2 mL LB液体培养基中,28 $^{\circ}$ C、摇床(200 $r \cdot \min^{-1}$)培养24 h;取200 μ L过夜指示菌涂布LB平板,晾干后用10 μ L枪头倒置钻孔,每个平板14个孔,每孔加入50 μ L芽孢杆菌,每株指示菌3个重复,正置28 $^{\circ}$ C培养

表 2 40 株水产病原菌

序号	革兰氏染色	菌属	菌种	菌株实验室编号
1				V11QS8
2			哈维弧菌(<i>V. harvey</i>)	V12YD22
3				V12NA1
4				V11WS5
5			溶藻弧菌(<i>V. alginolyticus</i>)	A31
6				E36
7				V12XW1
8		弧菌属(<i>Vibrio</i>)	创伤弧菌(<i>V. vulnificus</i>)	V13ZJ3
9				V14SZ4
10				V14RP25
11			鳗弧菌(<i>V. anguillarum</i>)	V14RP31
12				V14RP46
13			副溶血性弧菌(<i>V. parahaemolyticus</i>)	B28
14			霍乱弧菌(<i>V. cholerae</i>)	B32
15			轮虫弧菌(<i>V. rotiferianus</i>)	V11QS14
16	阴性(G-)			V12YD19
17		发光杆菌属(<i>Photobacterium</i>)	美人鱼发光杆菌(<i>P. damsela</i>)	V11WS3
18				V13XC18
19				C60
20		柠檬酸杆菌属(<i>Citrobacter</i>)	无丙二酸柠檬酸杆菌(<i>C. amalonaticus</i>)	C7
21		埃希氏菌属(<i>Escherichia</i>)	大肠杆菌(<i>E. coli</i>)	A42
22		爱德华氏菌属(<i>Edwardsiella</i>)	迟缓爱德华菌(<i>E. tarda</i>)	C5
23		假交替单胞菌(<i>Pseudoalteromonas</i>)	假交替单胞菌(<i>Pseudoalteromonas</i> spp.)	B11
24			嗜水气单胞菌(<i>A. hydrophila</i>)	B30
25				18SQW121
26		气单胞菌属(<i>Aeromonas</i>)	维氏气单胞菌(<i>A. viridis</i>)	18BJ181
27				18QW235
28				18QW238
29			气单胞菌(<i>Aeromonas</i> spp.)	18QW286
30		假单胞菌属(<i>Pseudomonas</i>)	假单胞菌(<i>Pseudomonas</i> spp.)	QW198
31		不动杆菌属(<i>Acinetobacter</i>)	不动杆菌(<i>Acinetobacter</i> spp.)	BJ320
32			海豚链球菌(<i>S. iniae</i>)	D30
33		链球菌属(<i>Streptococcus</i>)	无乳链球菌(<i>S. agalactiae</i>)	THN
34				TFJ
35		葡萄球菌属(<i>Staphylococcus</i>)	白葡萄球菌	18QW206
36	阳性(G+)		葡萄球菌(<i>Staphylococcus</i> spp.)	D16
37		芽孢杆菌(<i>Bacillus</i>)	短小芽孢杆菌(<i>B. pumilus</i>)	A40
38		微杆菌属(<i>Microbacterium</i>)	微杆菌(<i>Microbacterium</i> spp.)	D10
39		短状杆菌属(<i>Brachybacterium</i>)	短状杆菌(<i>Brachybacterium</i> spp.)	B60
40		异杆菌属(<i>Heterobacilli</i>)	异杆菌(<i>Heterobacilli</i> spp.)	18QW202

24 h, 观察抑菌情况, 并测量抑菌圈直径。

1.6 统计分析 采用 SPSS 19.0 软件对不同芽孢杆菌的抑菌率进行单因素方差分析 (One-way ANOVA), 对同一芽孢杆菌 24 h 全菌液和 24 h 上清液的抑菌圈直径进行 student's *t* 检验, 对同一芽孢杆菌 24 h 全菌液和 48 h 全菌液的抑菌圈直径进行 student's *t* 检验。P<0.05 被认为差异显著。

2 结果与分析

2.1 分离鉴定得到 14 株芽孢杆菌 从养殖水体水样中共分离得到 14 株芽孢杆菌, 经 16S rDNA 测序以及 Blast 比对分析 (图 1) 发现, SCS-158、

SCS-163、SCS-165 和 SCS-166 为地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*); SCS-159 和 SCS-164 为高地芽孢杆菌 (*Bacillus altitudinis*); SCS-160、SCS-162 和 SCS-170 为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*); SCS-167 为蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*); SCS-161、SCS-168、SCS-169 和 SCS-171 为其他芽孢杆菌。

2.2 14 株芽孢杆菌 24 h 全菌液的抑菌效果 从图 2 可知, SCS-160 和 SCS-162 对 40 株水产病原菌的抑菌率最高(20%), 但 SCS-171 的抑菌率为 0。从表 3 可知, SCS-160、SCS-162 和 SCS-170 对指示菌中的全部维氏气单胞菌 (*A. viridis*) 都有抑

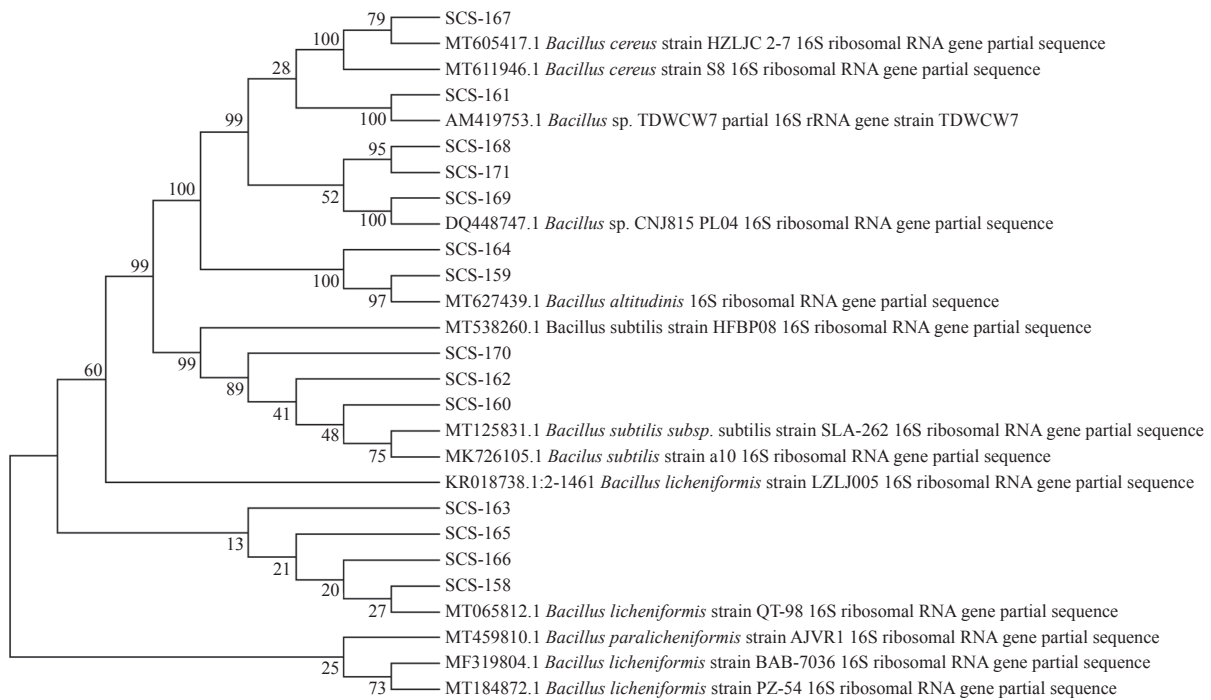


图 1 14 株菌株 16S rDNA 基因系统进化树

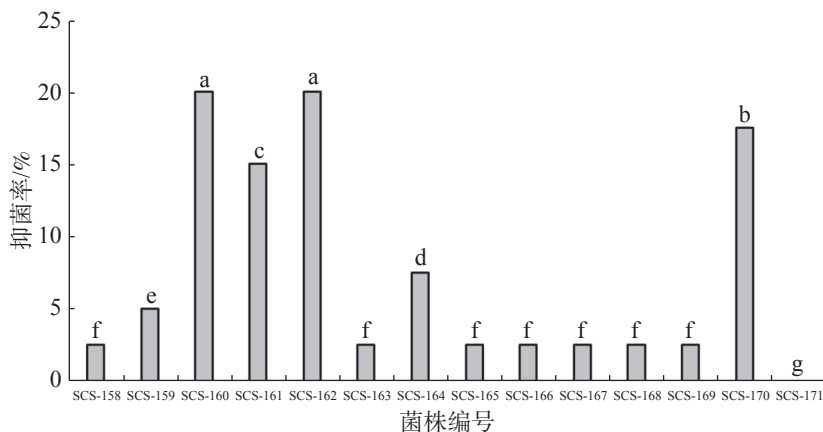


图 2 14 株芽孢杆菌的抑菌率

a、b、c、d、e、f、g 是单因素方差分析结果, 不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。

表 3 14 株芽孢杆菌对 10 株指示菌的抑菌结果

指示菌	芽孢杆菌										抑菌圈直径/mm			
	SCS-158	SCS-159	SCS-160	SCS-161	SCS-162	SCS-163	SCS-164	SCS-165	SCS-166	SCS-167		SCS-168	SCS-169	SCS-170
溶藻弧菌 A31 <i>V. alginolyticus</i> A31	--	--	--	--	--	--	10.67±0.58	--	--	--	--	--	--	--
溶藻弧菌 E36 <i>V. alginolyticus</i> E36	--	9.67±1.53	8.67±1.15	--	8.67±1.15	--	11.33±2.08	--	--	--	--	--	--	--
海豚链球菌 D30 <i>S. iniae</i> D30	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
葡萄球菌 D16 <i>Staphylococcus</i> spp. D16	--	--	15.33±0.58	17.67±0.58	19±1.73	--	--	--	--	--	--	--	17.67±0.58	--
维氏气单胞菌 18SQW121 <i>A. viridis</i> 18SQW121	--	--	10.33±0.58	8.67±0.58	9±1	--	--	--	--	--	--	--	8.67±0.58	--
维氏气单胞菌 18BJ181 <i>A. viridis</i> 18BJ181	--	--	10.33±1.15	8.33±1.15	9±1	--	--	--	--	--	--	--	9±0	--
维氏气单胞菌 18QW235 <i>A. viridis</i> 18QW235	--	--	9.67±0.58	--	9±1	--	--	--	--	--	--	--	9±1	--
异杆菌 18QW202 <i>Heterobacilli</i> spp. 18QW202	--	--	11.67±0.58	10.67±0.58	10.33±0.58	--	--	--	--	10.67±0.58	9.33±0.58	8.33±0.58	10.33±1.15	--
不动杆菌 BJ320 <i>Acinetobacter</i> spp. BJ320	--	--	14.55±1.15	12±1	15.33±0.58	--	--	--	--	--	--	--	13.67±0.58	--
白葡萄球菌 18QW206 <i>S. albicans</i> 18QW206	14.33±0.58	9±1	23.33±1.15	19.33±1.15	23.33±1.52	16±1	12.22±0.57	13±1.73	15.67±1.52	--	--	--	21±1	--

制效果, SCS-161 可以抑制 2 株维氏气单胞菌 (*A. viridis*), 其余芽孢杆菌则对所测试的维氏气单胞菌 (*A. viridis*) 无抑菌效果; SCS-164 对所测试的溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*) (A32, E36) 均有抑制作用, 抑菌圈直径分别为 (10.67 ± 0.58) 和 (11.33 ± 2.08) mm, SCS-159、SCS-160 和 SCS-162 有仅对溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*) E36 有抑制作用, 抑菌圈直径分别为 (9.67 ± 1.53) 、 (8.67 ± 1.15) 和 (8.67 ± 1.15) mm, 其余没有抑菌效果; SCS-160、SCS-161、SCS-162 和 SCS-170 都表现出对葡萄球菌 (*Staphylococcus* spp.)、异杆菌 (*Heterobacilli* spp.) 和不动杆菌 (*Acinetobacter* spp.) 的抑制效果, 而 SCS-167、SCS-168 和 SCS-169 仅对异杆菌 (*Heterobacilli* spp.) 有抑制效果; 14 株芽孢杆菌中有 10 株对白葡萄球菌有抑制效果, 其中, SCS-160 和 SCS-162 的抑菌效果最好, 抑菌圈直径达到 23.33 mm, 其次为 SCS-170, 抑菌圈直径为 21 mm。

2.3 芽孢杆菌 24 h 全菌液与 24 h 上清液的抑菌效果比较 根据前面实验, 白葡萄球菌的指示效果

最好, 14 株芽孢杆菌中有 10 株对白葡萄球菌有抑制效果, 因此选用白葡萄球菌作为指示菌, 进行后续实验。如图 3 所示, SCS-167、SCS-168、SCS-169、SCS-171 芽孢杆菌全菌液和上清液都没有抑菌效果; 与全菌液相比, 芽孢杆菌上清液的抑菌效果有所下降, 抑菌圈有所缩小; SCS-160 和 SCS-162 抑菌圈的缩小幅度最大, 抑菌圈直径分别减少 27.13% 和 28.55%, SCS-159 和 SCS-164 的缩小幅度最小, 抑菌圈直径分别减少 7.44% 和 5.35%。全菌液和上清液中, SCS-160 和 SCS-162 的抑菌效果最好。SCS-160、SCS-163 和 SCS-166 芽孢杆菌 24 h 全液的抑菌效果和 24 h 上清液的抑菌效果差异显著 ($P < 0.05$)。

2.4 芽孢杆菌不同培养时间全菌液抑菌效果比较分析 如图 4 所示, SCS-167、SCS-168、SCS-169、SCS-171 芽孢杆菌全菌液在培养 24 h 和 48 h 后对白葡萄球菌都没有抑菌效果, SCS-160 和 SCS-162 芽孢杆菌全菌液在培养 24 h 时, 抑菌效果最好, 抑菌圈直径均为 23.33 mm; 培养 48 h 后,

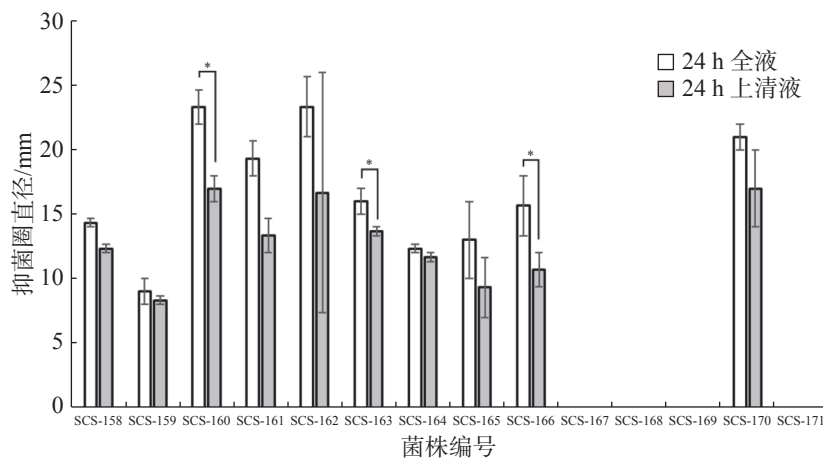


图 3 芽孢杆菌全菌液与上清液对白葡萄球菌的抑菌效果对比

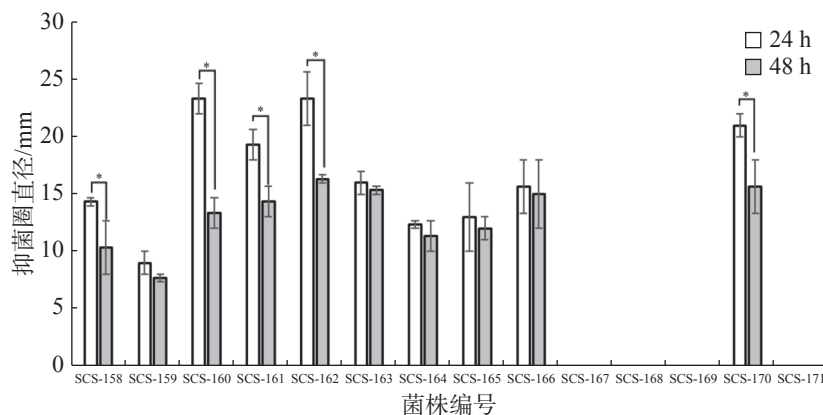


图 4 14 株芽孢杆菌 24 h 培养和 48 h 培养后的全菌液对白葡萄球菌抑菌效果对比

SCS-160 抑菌圈直径较 24 h 时缩小 42.86%, 而 SCS-162 抑菌效果最好, 抑菌圈直径为 16.33 mm, 较 24 h 时下降 30.00%; SCS-163 芽孢杆菌的抑菌效果在 24 h 和 48 h 之间变化幅度最小, 为 4.19%。SCS-158、SCS-160、SCS-161、SCS-162 和 SCS-170 芽孢杆菌的 24 h 和 48 h 抑菌效果差异显著 ($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 芽孢杆菌对水产病原菌的抑制作用 芽孢杆菌是水产养殖中一种常见的微生物制剂, 可以分解养殖过程中残留的各种废物, 并抑制病原菌生长^[32]。杨世平等^[33]在研究产酸芽孢杆菌对对虾养殖水环境影响时发现, 投入芽孢杆菌可以使水体中弧菌的密度显著降低。张皎皎等^[34]从养殖池塘中筛选出对嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)有拮抗作用的甲基营养型芽孢杆菌。张维娜^[35]在异育银鲫体外实验中发现, 凝结芽孢杆菌(*B. coagulans*)对温和气单胞菌(*A. solutes*)和嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)有抑制作用。单金峰^[15]在养殖水体中添加凝结芽孢杆菌(*B. coagulans*)使得青虾体内弧菌数量显著下降。本研究从拟穴青蟹(*S. paramamosai*)养殖池塘水体中分离、鉴定了 14 株芽孢杆菌, 并利用 40 株水产病原菌作为指示菌, 对 14 株芽孢杆菌的抑菌效果进行初步研究, 发现 14 株芽孢杆菌对水产病原的抑菌率最高为 20.00%, 其中, 芽孢杆菌 SCS-160、SCS-162、SCS-170 对病原菌中的全部维氏气单胞菌(*A. viridis*)有抑菌效果。由此可知, 芽孢杆菌在水产病害防控中具有广阔的应用前景。

3.2 不同发酵时间的芽孢杆菌的抑菌效果不同 芽孢杆菌可以产生许多具有抑菌活性的物质, 例如脂肽抗生素、细菌素、拮抗蛋白、抗菌肽等^[36-39]。但芽孢杆菌进入衰亡期, 部分菌体自溶释放的蛋白酶会降解部分抑菌物质, 或者发酵液中有产物积累过多, 导致细菌浓度降低, 抑菌物质活性降低, 抑菌圈直径下降^[40]。这就解释了为什么实验中 24 h 的抑菌效果会好于 48 h 的抑菌效果。此外, 芽孢杆菌在生长和繁殖过程中产生的挥发性物质对病原菌也具有一定的抑制作用^[41], 这也在一定程度上解释了芽孢杆菌 24 h 全菌液的抑菌效果要好于 48 h。韩旭东等^[42]的研究结果表明, 芽孢

杆菌 ZYCHH-01 在发酵时间为 27 h 时, 细菌浓度和抑菌物质活性最高, 发酵时间 27 h 后, 细菌浓度和抑菌物质活性持续下降。这些都与本研究的结果相同。但范永瑞^[43]在研究枯草芽孢杆菌抑菌作用时发现, 抑菌效果先下降再上升, 在 24 h 时最低。其主要原因可能在于抑菌物质的不同所导致的, 这需要进一步研究。

3.3 不同成分的芽孢杆菌培养液抑菌效果不同 本研究发现, 与 24 h 培养的菌液抑菌效果相比, 芽孢杆菌的 24 h 培养的上清液的抑菌效果有所下降, 但不同各芽孢杆菌的抑菌效果不同。芽孢杆菌 SCS-160 和 SCS-162 上清液抑菌效果下降最明显, 芽孢杆菌 SCS-159 下降幅度最小。陈成等^[44]在研究枯草芽孢杆菌对桑椹采后致腐微生物的抑菌作用时发现, 菌悬液的抑菌效果最好。这可能与其中有效成分有关, 因此, 可以对菌液中的有效成分进行进一步分析。

参考文献:

- [1] 蒋昕或, 张超, 李旭东, 等. 鱼用疫苗免疫效果评价的研究进展[J]. 水产科学, 2015, 34(10): 662-666.
- [2] SANTOS L, RAMOS F. Antimicrobial resistance in aquaculture: current knowledge and alternatives to tackle the problem [J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2018, 52(2): 135-143.
- [3] MO W Y, CHEN Z, LEUNG H M, et al. Application of veterinary antibiotics in China's aquaculture industry and their potential human health risks [J]. *Environmental Science & Pollution Research*, 2017, 24(10): 8978-8989.
- [4] 陆波. 青岛海参仅 8 成合格多杀菌剂超标可致神经炎[J]. 广西质量监督导报, 2013, 145(2): 33.
- [5] HE Y, JIN L, SUN F, et al. Antibiotic and heavy-metal resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from fresh shrimps in Shanghai fish markets, China [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23(15): 15033-15040.
- [6] 吴越, 郑伊诺, 陆荣茂, 等. 温州地区水产品中哈维氏弧菌的耐药分析[J]. 水产科学, 2020, 39(6): 837-843.
- [7] 邓玉婷, 谭爱萍, 张瑞泉, 等. 广东主要水产养殖地区气单胞菌耐药状况的调查分析[J]. *南方农业学报*, 2019, 50(11): 2375-2383.
- [8] 王熙涛, 卢燕丹, 王丽丽, 等. 新型抗生素替代品防治水产动物细菌性疾病的研究进展[J]. *饲料与畜牧*, 2015, 12(4): 18-22.
- [9] 田启文, 郭振, 嵇乐乐, 等. 水产养殖中益生菌研究进展[J]. *工业微生物*, 2019, 49(4): 50-55.
- [10] 韦露, 陈偿, 龙云映, 等. 一株短小芽孢杆菌 B1 的筛选鉴定及其抗菌特性研究[J]. 水产科学, 2015, 34(3): 161-168.

- [11] 刘晓燕, 王玲玲, 栾会妮, 等. 一株枯草芽孢杆菌的分离鉴定、生物学特性及其对水质净化的作用[J]. 微生物学通报, 2020, 47(15): 1-15.
- [12] 章文锦, 张皎皎, 李艳红, 等. 蜡状芽孢杆菌 S458-1 对水产养殖系统中水质调节的作用[J]. 微生物学报, 2019, 59(11): 2182-2193.
- [13] 陈锦豪, 郑锦滨, 史天一, 等. 对虾养殖水体中一株降解氨氮芽孢杆菌的分离鉴定及其发酵配方的优化[J]. 渔业研究, 2019, 41(3): 175-186.
- [14] 曹煜成, 李卓佳, 林黑着, 等. 地衣芽孢杆菌 De 在优质草鱼养殖中的应用研究[J]. 南方水产科学, 2008, 4(03): 15-19.
- [15] 单金峰, 吴春, 丁辰龙. 凝结芽孢杆菌对养殖水质及青虾肠道菌群、非特异性免疫指标和抗病力的影响[J]. 大连海洋大学学报, 2019, 34(5): 629-635.
- [16] 陆洋, 郁二蒙, 王广军, 等. 添加芽孢杆菌对草鱼池塘中真核微生物的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2020, 29(2): 218-225.
- [17] 陆家昌, 李活, 黄翔鹤. 枯草芽孢杆菌对水质及凡纳滨对虾幼体免疫指标影响的研究[J]. 南方水产, 2010, 6(1): 19-24.
- [18] 王善龙, 曹煜成, 徐煜, 等. 蜡样芽孢杆菌对对虾养殖水体微藻群落的调控研究[J]. 南方水产科学, 2016, 12(1): 9-16.
- [19] 单洪伟, 于鹏, 刘宽, 等. 饲料中添加芽孢杆菌组分对凡纳滨对虾幼体生长、能量代谢和抗 WSSV 能力的影响[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2020, 50(1): 30-38.
- [20] 樊英, 王晓璐, 于晓清, 等. 地衣芽孢杆菌对大鲮六线鱼生长、肠道消化酶、血清非特异性免疫及抗病力的影响[J]. 渔业科学进展, 2021, 42(1): 63-73.
- [21] 李军亮, 杨奇慧, 谭北平, 等. 低鱼粉饲料添加枯草芽孢杆菌对珍珠龙胆石斑鱼幼体生长、消化酶活性、抗氧化酶活性及其 mRNA 表达的影响[J]. 水产学报, 2019, 43(4): 1126-1137.
- [22] A L V, MARÍA E. MACÍAS-RODRÍGUEZ A, BRUNO GÓMEZ-GIL B, et al. Beneficial effects of four *Bacillus* strains on the larval cultivation of *Litopenaeus vannamei* [J]. *Aquaculture*, 2011, 321(1-2): 136-144.
- [23] 孔维光, 吴志新, 李思思, 等. 益生芽孢杆菌对草鱼肠上皮细胞的黏附及对嗜水气单胞菌的抑制[J]. 华中农业大学学报, 2017, 36(5): 67-73.
- [24] 朱晶婷, 赵波, 蓝志豪, 等. 一种枯草芽孢杆菌对副溶血弧菌的颞颥作用研究[J]. 浙江海洋大学学报(自然科学版), 2018, 37(5): 452-456, 461.
- [25] 傅超英, 王建平, 孙琛, 等. 大黄鱼主要致病菌拮抗菌株的分离鉴定、抑菌谱及安全性分析[J]. 生物技术通报, 2019, 35(1): 67-75.
- [26] HU Z, ZHANG W, LIANG W, et al. *Bacillus cereus* LS2 from *Apostichopus japonicus* antagonizes *Vibrio splendidus* growth [J]. *Aquaculture*, 2021, 531(6): 735983.
- [27] LI X, GAO X, ZHANG S, et al. Characterization of a *Bacillus velezensis* with antibacterial activity and inhibitory effect on common aquatic pathogens [J]. *Aquaculture*, 2020: 523.
- [28] 孙梅, 张维娜, 高亮, 等. 解淀粉芽孢杆菌 JSSW-LA 的分离鉴定及对病原菌拮抗特性[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(4): 275-279.
- [29] 巴翠玉, 张林波, 张培军, 等. 2 株枯草芽孢杆菌的分离鉴定及特性研究[J]. 华南农业大学学报, 2017, 38(3): 46-51.
- [30] 于钊瑞, 赵鑫, 邱峰. 双歧杆菌、乳杆菌和芽孢杆菌产细菌素和多糖研究进展[J]. 食品工业科技, 2021, 42(24): 11.
- [31] HALAMI P M. Subtilin-like lantibiotics of probiotic bacterium *Bacillus licheniformis* MCC 2512T with antibacterial activity [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2018, 128: 139-146.
- [32] 刘波, 刘文斌. 芽孢杆菌对水产养殖环境的净化作用[J]. 渔业现代化, 2004, 3(2): 7-8.
- [33] 杨世平, 周嘉豪, 孙成波, 等. 产乳酸芽孢杆菌对对虾养殖水体水质的影响[J]. 水产科学, 2018, 37(4): 489-493.
- [34] 张皎皎, 马富平, 熊波, 等. 一株新型嗜水气单胞菌拮抗菌的筛选及鉴定[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2017, 39(12): 18-23.
- [35] 张维娜. 凝结芽孢杆菌对病原菌的拮抗作用及对异育银鲫生长、免疫的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2014.
- [36] 李丽, 程煜, 袁建琴. 枯草芽孢杆菌 S6 抗棉花枯萎病菌拮抗蛋白的分离纯化与抑菌活性研究[J]. 天津农业科学, 2020, 26(6): 3-6.
- [37] 王伟, 李津津, 迟海. 解淀粉芽孢杆菌素 *Amylocyclin* W5 的纯化及其抑菌机理[J]. 食品科学, 2020, 1(10): 29-34.
- [38] 高兆建, 王秋芬, 胡鑫强, 等. 凝结芽孢杆菌 XZQ-16 抗菌脂肽分离鉴定及抗菌特性[J]. 食品工业科技, 2021, 42(3): 7.
- [39] 冯蓉, 刘丽, 陈海念, 等. 解淀粉芽孢杆菌 F11 抗真菌活性研究[J]. 农业资源与环境学报, 2020, 12(11): 1-17.
- [40] 陈静, 何连芳, 张玉苍. 嗜酸乳杆菌产细菌素培养基及培养条件的优化[J]. 中国酿造, 2010, 225(12): 75-79.
- [41] 梁艳琼, 唐文, 董文敏, 等. 枯草芽孢杆菌菌株 CzK1 挥发性物质的抑菌活性及其组分分析[J]. 南方农业学报, 2019, 50(11): 2465-2474.
- [42] 韩旭东, 张玉苍, 李瑞松, 等. 芽孢杆菌 ZYCHH-01 发酵条件优化及其抑菌物质的研究[J]. 中国酿造, 2020, 39(2): 38-43.
- [43] 范永瑞. 枯草芽孢杆菌抑菌作用的实验研究[J]. 企业导报, 2009, 1(1): 128-129.
- [44] 陈成, 方银, 金超, 等. 枯草芽孢杆菌对桑椹采后致腐微生物的抑菌作用[J]. 蚕业科学, 2016, 42(1): 118-123.

Isolation and identification of 14 *Bacillus* strains in aquaculture ponds and analysis of their bacteriostatic effect on aquatic pathogens

CHEN Haoxiang^{1,2}, DENG Yiqin¹, CHENG Changhong¹, MA Hongling¹, GUO Zhixun¹, FENG Juan¹

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, and Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Development and Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou, Guangdong 510300, China;

2. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Fourteen strains of *Bacillus* spp, named SCS-158 to SCS-171, were selected to determine their bacteriostatic effect against 40 strains of aquatic pathogens (bacterial indicators) by the streak plate method. The results show that the whole bacterial solutions of 14 *Bacillus* strains cultured for 24h had the highest bacteriostatic rate, up to 20.00%, of which those of the strains SCS-160, SCS-162 and SCS-170 had an inhibitory effect on all the strains of *Aeromonas vickerii* tested. Of the 14 *Bacillus* strains 10 strains had an inhibitory effect on the bacterial indicator *Staphylococcus albicans* 18QW206. The 24 h cultured supernatant and the 48 h cultured whole bacterial solution had a lower inhibitory effect on the bacterial indicator *S. albicans* 18QW206 as compared with the 24 h cultured whole bacterial solution. The inhibitory effect of the 24 h cultured supernatant of the strain SCS-162 decreased most obviously, with the diameter of the inhibition zone dropping by 28.55%, while the diameter of the inhibition zone of the strain SCS-164 dropped the least by 5.35%. In addition, the inhibition zone of the 48 h cultured whole bacterial solution of the strain SCS-160 decreased the most by 42.86%, while that of the strain SCS-163 dropped the least by 4.19%. These results indicate that *Bacillus* spp. had bacteriostatic effect on the aquatic pathogens.

Keywords: *Bacillus*; 16S rDNA; aquatic pathogens; whole bacteria liquid; supernatant; bacteriostatic analysis

(责任编辑:谭正洪 责任编辑:潘学峰)