



研究报告

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

刘晓燕^{1,2} 王玲玲^{1,2} 栾会妮^{1,2} 郑伟^{3,4} 侯仕营^{1,2} 刘振华^{*1,2} 张世浩⁵

1 威海海洋职业学院 山东 荣成 264300

2 山东省海洋经济藻类资源开发与利用工程技术协同创新中心 山东 荣成 264300

3 日照职业技术学院 山东 日照 276800

4 日照市生态环境研究所 山东 日照 276800

5 威海微百苏生物科技有限公司 山东 荣成 264300

摘要:【背景】随着水产养殖业的发展和养殖集约化程度的提高,养殖水环境日趋恶化,养殖动物病害频发,而水产益生菌因其环境友好、安全而被广泛应用于水产养殖中。【目的】从南美白对虾养殖池底泥分离枯草芽孢杆菌,探究其体外生物学特性及对水质的净化作用,以期扩充微生态制剂的种质资源。【方法】采用稀释涂布平板法分离菌株,通过形态学观察、生理生化特征、微生物鉴定系统表型测定以及 16S rRNA 基因序列分析对分离菌株鉴定分类;采用单因素控制法研究体外生物学特性;采用 N-(1-萘基)-乙二胺分光光度法测定养殖水体中亚硝酸盐(NO_2^- -N)含量,纳氏试剂分光光度法测定氨氮(NH_3 -N)含量,碱性高锰酸钾法测定化学需氧量(Chemical Oxygen Demand, COD)。【结果】通过表型鉴定和 16S rRNA 基因序列分析,从南美白对虾养殖池底泥中筛选了一株枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) WH1。体外生物特性研究表明,菌株 WH1 比模式菌具有更强的耐高温、耐人工胃液、耐胆盐、抑制金黄色葡萄球菌和副溶血性弧菌能力,而且对欧洲食品安全局规定的用作饲料添加剂的芽孢杆菌必检的 8 种抗生素敏感,符合水产益生菌用作饲料添加剂的体外评价标准。此外,水质净化研究表明菌株 WH1 能显著降低水体中的 NO_2^- -N、 NH_3 -N 含量及 COD 值($P<0.05$)。【结论】筛选的枯草芽孢杆菌 WH1 可用作水质调控剂,同时具有用作饲料添加剂的体外生物学特性优势,有效扩充了微生态制剂的种质资源。

关键词: 枯草芽孢杆菌, 菌株鉴定, 生物学特性, 水质净化

Foundation items: Marine Economic Algae Resources Development and Utilization Engineering Technology Collaborative Innovation Center Program of Shandong Province (MADU202003); Vocational Education LUAN Hui-Ni Famous Teacher's Studio of Shandong Province (2019); Higher Educational Science and Research Program of Shandong Province (J18KB062); Higher Educational Young Creative Talents Introduction and Cultivation Program of Shandong Province (2019)

***Corresponding author:** Tel: 86-631-7697571; E-mail: liu2hua@163.com

Received: 03-03-2020; **Accepted:** 09-07-2020; **Published online:** 09-09-2020

基金项目: 山东省海洋经济藻类资源开发与利用工程技术协同创新中心专项资金项目(MADU202003); 山东省职业教育栾会妮名师工作室资助(2019); 山东省高校科研计划(J18KB062); 山东省高等学校青创人才引育计划(2019)

***通信作者:** Tel: 0631-7697571; E-mail: liu2hua@163.com

收稿日期: 2020-03-03; **接受日期:** 2020-07-09; **网络首发日期:** 2020-09-09

Isolation and identification of a *Bacillus subtilis* strain for water purification

LIU Xiaoyan^{1,2} WANG Lingling^{1,2} LUAN Huini^{1,2} ZHENG Wei^{3,4}
HOU Shiying^{1,2} LIU Zhenhua^{*1,2} ZHANG Shihao⁵

1 Weihai Ocean Vocational College, Rongcheng, Shandong 264300, China

2 Marine Economic Algae Resources Development and Utilization Engineering Technology Collaborative Innovation Center of Shandong Province, Rongcheng, Shandong 264300, China

3 Rizhao Polytechnic, Rizhao, Shandong 276800, China

4 Ecological Environment Institute of Rizhao, Rizhao, Shandong 276800, China

5 Weihai Weibaisu Biological Technology Company Limited, Rongcheng, Shandong 264300, China

Abstract: [Background] With the development of the aquaculture industry and the improvement of intensive aquaculture, the aquaculture environment deteriorates seriously and the aquatic animal diseases take place frequently. Aquatic probiotics are widely used in aquaculture for their environmental friendliness and safety. [Objective] *Bacillus subtilis* was isolated from the bottom mud of *Litopenaeus vannamei* breeding pond. The *in vitro* biological characteristics and water purification effect were then explored to expand the germplasm resources of microecological preparations. [Methods] Firstly, the strains were isolated by the dilution spread plate method and its identification and classification were determined successively by morphological observation, physiological and biochemical assays, phenotypic test by microbial identification system, and 16S rRNA gene sequence analysis. Secondly, biological characteristics *in vitro* were studied by a single factor control method. Lastly, the contents of nitrite (NO_2^- -N), ammonia nitrogen (NH_3 -N), and chemical oxygen demand (COD) of the aquaculture water were separately measured by N-(1-naphthyl)-ethylenediamine spectrophotometry method, Nessler's reagent method, and alkaline potassium permanganate method. [Results] The isolated strains were identified as *Bacillus subtilis* WH1 by the phenotypic identification and 16S rRNA gene sequence analysis. During a series of *in vitro* biological characteristics test studies, WH1, compared with the model bacteria, had better performances in resistance of high temperature, artificial gastric juice, and bile salts, as well as the inhibitory ability of *Staphylococcus aureus* and *Vibrio parahaemolyticus*. Especially, it was sensitive to 8 kinds of antibiotics that must be checked for *Bacillus* used as a feed additive according to the European Food Safety Agency rules. This also met the *in vitro* evaluation standard of aquatic probiotics used as feed additives. Additionally, the water purification studies showed that the strain WH1 could significantly reduce the contents of NO_2^- -N, NH_3 -N, and COD in water ($P < 0.05$). [Conclusion] The screened *Bacillus subtilis* WH1 can be used as a water quality regulator and has the advantage of *in vitro* biological characteristics used as a feed additive, which can effectively expand the germplasm resources of microecological preparations.

Keywords: *Bacillus subtilis*, strain identification, biological characteristics, water purification

近年来,水产养殖行业发展迅速,在满足全球蛋白质营养需求方面发挥着重要作用^[1],但集约化养殖导致水体中的残饵、排泄物富集,氨氮、亚硝酸氮、硫化物等有害物质积累,水质恶化,水产动物病害频发^[2-4]。抗生素和化学药物在改善水质、控制病害方面虽见效快,却容易导致药物残留、环境污染和耐药性^[5-9]。水产益生菌因其具

有环境友好^[10-11]、促进养殖动物生长^[4,12]、净化水质^[4,13]、增强免疫应答^[14-15]等诸多功效,已成为水产病害防治的另一选择^[3,16]。在众多的微生态制剂中,枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)为常用的一种水质调控剂及饲料添加剂^[17-18],其优点是:(1)枯草芽孢杆菌常以芽孢形式存在,抗逆性强、稳定性高,便于储存运输^[2,17];(2)枯草芽孢杆菌能分泌蛋白

酶^[19]、淀粉酶、脂肪酶等多种胞外酶,快速有效分解水体中的有机物,提供单胞藻生长繁殖的营养素,藻类又通过光合作用产生溶解氧,供有机物分解和水中微生物及养殖动物呼吸消耗所用,形成一种良好的微生态环境平衡^[20-21]; (3) 枯草芽孢杆菌也能直接分泌细菌素、伊枯草菌素、芬枯草菌素等多种抗菌活性物质,抑制病原菌的生长,达到净化水质的目的^[22]; (4) 枯草芽孢杆菌还能改变养殖动物肠道菌群结构,提高营养物质的消化吸收,强化免疫能力^[23-24]。

本课题组从南美白对虾养殖池底泥分离了一株枯草芽孢杆菌 WH1, 研究其体外生物学特性及对水质的净化作用, 以期为饲料添加剂及水质改良剂的研制奠定基础, 同时为枯草芽孢杆菌相关微生物制剂产品的开发提供种质资源。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器及培养基

胰蛋白胨、酵母浸粉、琼脂粉, 北京奥博星生物技术有限责任公司; 细菌微量生化鉴定管, 青岛海博生物技术有限公司; BUG 固体培养基, Biolog 公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、PCR 试剂, 天根生化科技(北京)有限公司; 万古霉素、庆大霉素、卡那霉素等抗生素, 北京沃凯生物科技有限公司; 磺胺、二盐酸-1-萘乙二胺、碘化钾、酒石酸钾钠、硫代硫酸钠等, 国药集团化学试剂有限公司。

人工胃液: 向 0.9% 生理盐水中加入浓盐酸, 调节 pH 为 1.8。1 g 胃蛋白酶加于 100 mL 溶液中, 混匀后经 0.22 μm 无菌滤膜过滤, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

胆盐溶液: 取 10 g 牛胆盐溶于 100 mL 去离子水中, 配制成 10% 的牛胆盐母液, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。分别向盛有 5 mL 0.9% 无菌生理盐水的试管中加入 15、50、100、150、200、250 μL 的牛胆盐母液, 使其浓度分别为 0.03%、0.10%、0.20%、0.30%、0.40%、0.50%。

人工肠液: 取 5.59 g 的 K_2HPO_4 和 0.41 g 的 KH_2PO_4 溶于 1 000 mL 的去离子水中, pH 8.0。1 g 胰蛋白酶加于 100 mL 溶液中, 混匀后经 0.22 μm

无菌滤膜过滤, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

生物安全柜, 苏州安泰空气技术有限公司; PCR 仪, 杭州博日科技股份有限公司; 电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; 凝胶成像系统, 北京赛智创业科技有限公司; 微生物鉴定系统, Biolog 公司。

产芽孢液体培养基参照邹高溪等^[25]配制。副溶血性弧菌用固体培养基参照格林等^[26] LB 培养基的配方配制, 但其中 NaCl 含量为 30.00 g/L。

1.2 采样及菌株分离培养

从山东省荣成市鑫滩海珍品育苗场南美白对虾养殖池中取底泥置于无菌的试剂瓶中, 冰浴送往实验室。

无菌条件下, 取 50 g 底泥置于 200 mL LB 液体培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养过夜。然后将富集菌液置于 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中 20 min, 冷却后取 1 mL 菌液加入到含 9 mL LB 液体培养基的试管中, 依次 10 倍比稀释获得系列梯度的混悬液。吸取 100 μL 混悬液涂布于 LB 固体培养基上, 置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 48 h。根据菌落形态, 挑取较大菌落平板划线, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h, 如此反复操作 3 次, 得到纯菌株, 命名为 WH1。将纯菌株的 LB 菌液与无菌的 50% 甘油 4:1 混匀, 制成菌悬液, -80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存备用。

1.3 菌株鉴定

1.3.1 菌株形态观察及生理生化试验

通过平板划线法观察菌落形态。取活化的菌株进行革兰氏染色, 通过光学显微镜观察菌体及芽孢形态。参照东秀珠等编写的《常见细菌系统鉴定手册》^[27]上的方法, 利用细菌微量生化鉴定管对菌株进行生理生化鉴定。

1.3.2 Biolog GenIII 微生物鉴定系统表型测定

将纯化分离的菌株 WH1 在 BUG 固体培养基上传代 2 次, 长纤维棉签蘸取单菌落接种于 IF-B 接种液中, 调整菌悬液透光率为 90%–98%, 然后按照每孔 100 μL 接种于 GenIII 鉴定板中, 33 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h 后于 Biolog GenIII Microstation 检测器读取显色结果。

1.3.3 16S rRNA 基因分子鉴定

利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株基因组 DNA。采用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')扩增保守序列。PCR 反应体系(30 μ L): 10 \times Buffer 3 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μ L, 正、反向引物(5 μ mol/L) 各 3 μ L, 模板 DNA 1 μ L, 酶(5 U/ μ L) 0.2 μ L, ddH₂O 17.8 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 将目的条带切胶回收送至北京六合华大基因科技有限公司测序。将返回的拼接序列提交至 GenBank, 获得登录号。然后通过 BLAST 序列比对功能选取高相似性的模式菌序列, 利用 MEGA 5.0 中的邻接法(Neighbor-Joining Method)构建系统进化树, 推测菌株的种属关系。

1.4 菌株的生物学特性

1.4.1 安全性试验

参照巴翠玉等^[28]的安全性试验方法。选实验室暂养一周的质量为 160 \pm 5 g 的健壮鲫鱼 100 尾, 随机分成 4 组, 每组 25 尾。向对照组鲫鱼腹腔注射 100 μ L 灭菌 LB 培养基; 向 3 个试验组个体腹腔分别注射 100 μ L 含 1×10^9 、 1×10^8 、 1×10^7 CFU/mL 菌株 WH1 的 LB 培养基。26 $^{\circ}$ C 水温养殖 5 d, 观察鲫鱼死亡情况; 同时解剖各鲫鱼, 与对照组相比观察各脏器有无病变。

1.4.2 高温耐受试验

参照杨锋等^[29]、刘秀侠等^[30]的试验方法。分别取 1 mL 芽孢率为 85%以上的 WH1 和枯草芽孢杆菌模式菌(CGMCC 1.3358)菌液, 置 85、90、95、100 $^{\circ}$ C 的水浴中孵育 10 min, 取出后冷却。每个温度 3 个平行, 以不作温度处理的菌液为对照, 采用平板菌落计数方法测出活菌数, 计算每个处理温度下的存活率。

1.4.3 人工胃液耐受试验

参照李晶晶等^[31]的试验方法。分别向 pH 1.8

的人工胃液中接种 2%芽孢率为 85%以上的 WH1 和枯草芽孢杆菌模式菌(CGMCC 1.3358)菌液, 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养 1、4、6 h 后取样。每个处理条件 3 个平行, 以 0 h 的活菌数作对照, 采用平板菌落计数法测定活菌数, 计算每个处理条件下的存活率。

1.4.4 胆盐耐受试验

参照张在^[32]的试验方法。分别向浓度为 0.03%、0.10%、0.20%、0.30%、0.40%、0.50%的胆盐溶液中接种 2%芽孢率为 85%以上的 WH1 和枯草芽孢杆菌模式菌(CGMCC 1.3358)菌液, 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养 4 h 后取样。每个浓度 3 个平行, 以 0 h 的活菌数作对照, 采用平板菌落计数法测定活菌数, 计算不同胆盐浓度处理下的存活率。

1.4.5 人工肠液耐受试验

分别向 pH 8.0 的人工肠液中接种 2%芽孢率为 85%以上的 WH1 和枯草芽孢杆菌模式菌(CGMCC 1.3358)菌液, 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养 1、4、6 h 后取样。每个处理条件 3 个平行, 以 0 h 的活菌数作对照, 采用平板菌落计数法测定活菌数, 计算每个处理条件下的存活率。

1.4.6 抑菌试验

参照刘冬梅等^[33]的试验方法。首先将培养 16 h 的 WH1 菌悬液 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。然后分别将培养 24 h 的大肠杆菌、嗜水气单胞菌、迟钝爱德华氏菌、金黄色葡萄球菌和副溶血性弧菌的菌悬液系列梯度稀释, 调整菌浓度为 10^5 CFU/mL, 取 100 μ L 调整后的指示菌悬液涂布于 LB 固体培养基上。15 min 后待菌悬液被培养基完全吸收后, 无菌镊子取灭菌的牛津杯轻置于培养基上。取 250 μ L 上清液加入牛津杯中, 4 $^{\circ}$ C 冰箱扩散 24 h 后, 置 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后测量抑菌环直径。试验平行 3 次。

1.4.7 耐药试验

参照美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)的微量肉汤稀释法操作标准^[34], 测定菌株 WH1 对抗菌药物的敏

感性。采用 2 倍系列梯度稀释法对欧洲食品安全局规定的芽孢杆菌属必检的 8 种抗生素的最小抑制浓度(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)进行测定^[35]。试验所用的 8 种抗生素的浓度范围为 (mg/L)^[36-37]: 万古霉素 (0.25–16.00); 庆大霉素 (0.25–32.00); 卡那霉素 (1.00–64.00); 链霉素 (0.25–32.00); 红霉素 (0.25–16.00); 克林霉素 (0.25–8.00); 四环素 (0.5–32.00); 氯霉素 (1.00–64.00)。接种菌液的微孔板置于 35 °C, 培养 20 h 后判定 MIC 值, 根据欧洲食品安全局规定的用作饲料添加剂的活菌成分对抗生素敏感标准进行结果判断^[35]。

1.5 WH1 的水质净化作用

2019 年 4 月初, 选含 20 m³ 水体的南美白对虾 (体长 6.01±0.70 cm) 工厂化养殖池 (位于山东省日照市鸿源水产科技有限公司) 进行试验, 养殖温度为 29±1 °C, 日换水量为 30%。试验组养殖池中 WH1 菌株的浓度维持在 5×10⁵ CFU/mL, 对照组不添加 WH1, 每组设置 3 个重复。连续 15 d, 每天换水前从养殖池中层取水样 50 mL, 采用 N-(1-萘基)-乙二胺分光光度法测定养殖水体中亚硝酸盐(NO₂⁻-N)含量、纳氏试剂法测定氨氮(NH₃-N)含量、碱性高锰酸钾法测定化学需氧量(Chemical Oxygen Demand, COD)。

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定

2.1.1 菌株形态学及生理生化鉴定结果

菌株 WH1 菌落乳白色, 近圆形, 边缘不规则, 菌落粗糙, 有褶皱。革兰氏染色紫色, 呈阳性, 菌体杆状, 两端钝圆, 有芽孢, 如图 1 所示。生理生化鉴定结果见表 1, 根据《常见细菌系统鉴定手册》检索, 初步鉴定为枯草芽孢杆菌。

2.1.2 Biolog GenIII 微生物鉴定系统表型测定

菌株 WH1 的 Biolog GenIII MicroPlate 鉴定结果见表 2。Biolog 数据库给出了 4 种亲缘关系最相近的菌株, 其中分离菌株与枯草芽孢杆菌的相似度最高, SIM 为 0.682。但是没有从数据库中比出

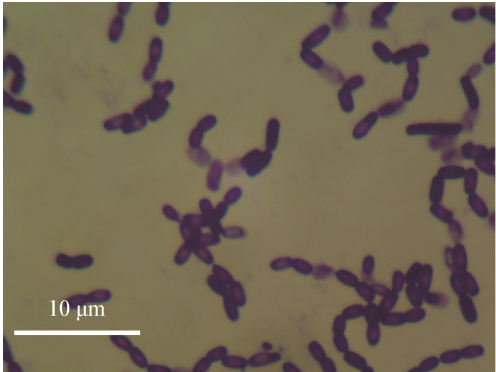


图 1 菌株 WH1 的革兰氏染色
Figure 1 Gram stain of WH1

表 1 菌株 WH1 的生理生化鉴定结果
Table 1 Physiological and biochemical identification results of WH1

生理生化反应 Physiological and biochemical reaction	反应特征 Reaction characteristics
接触酶 Catalase test	+
发酵阿拉伯糖产酸 Arabinose fermentation test	+
发酵葡萄糖产酸 Glucose fermentation test	+
发酵木糖产酸 Xylose fermentation test	+
发酵甘露糖产酸 Mannose fermentation test	+
V-P 测定 V-P test	+
吲哚试验 Indole test	-
水解酪 Casein hydrolysis test	+
水解淀粉 Starch hydrolysis test	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction test	+
利用柠檬酸盐 Citrate test	+
利用丙酸盐 Propionate test	-

注: +: 阳性; -: 阴性
Note: Positive; -: Negative

SIM 为 1 的菌株。这可能一方面是由于 Biolog GenIII MicroPlate 通过显色反应吸光值检测表型, 温度、环境等因素的变化都可能导致吸光值波动; 另一方面是 Biolog 数据库更新延迟^[38]。鉴于此, 我们又进行了分子鉴定。

表 2 菌株 WH1 的 GenIII 板鉴定结果

Table 2 GenIII MicroPlate identification results of WH1

Item	1	2	3	4
PROB	0.682	0.174	0.139	0.109
SIM	0.682	0.174	0.139	0.109
DIST	4.544	4.753	4.891	5.041
Organism type	GP-RodSB	GP-RodSB	GP-RodSB	GP-RodSB
Species	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus mojavensis/subtilis</i> B	<i>Bacillus subtilis ss subtilis</i>	<i>Bacillus atrophaeus/subtilis</i> A

2.1.3 菌株的分子鉴定结果

利用细菌基因组 DNA 为模板,以 16S rRNA 基因通用引物 27F/1492R 扩增目的条带,PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后回收送测序,测得序列提交至 GenBank,获得登录号为 MT125883。BLAST 程序比对结果表明,菌株 WH1 与 *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (GenBank 登录号为 NR104873) 相似性为 99.17%。选择高相似性的模式菌株,以短短芽孢杆菌(*Brevibacillus brevis*)为外群,利用 MEGA 5.0 中 Neighbor-Joining 法构建系统进化树,如图 2 所示,可以看出菌株 WH1 为芽孢杆菌属(*Bacillus*)成员。同时,结合菌株的形态学观察、生理生化鉴定结果及 Biolog GenIII 微生物鉴定系统表型测定结果,综合分析 WH1 为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

2.2 菌株的生物学特性

2.2.1 安全性试验结果

与对照组相比,注射 100 μ L 浓度分别为 1×10^9 、 1×10^8 、 1×10^7 CFU/mL 的 WH1 菌悬液的 3 个试验组的鲫鱼未出现死亡,内部器官无变异,这初步表明分离的枯草芽孢杆菌是相对安全的。

2.2.2 高温耐受试验结果

WH1 和模式菌耐高温对比试验结果如图 3 所示。随着温度上升,WH1 和模式菌的存活率都逐渐下降。在 85 $^{\circ}$ C 处理下,85%芽孢率的 WH1 和模式菌的存活率分别为 90.13%和 79.97%,表明在 85 $^{\circ}$ C 处理条件下,WH1 中有大约 5%的营养细胞存活,而模式菌中无营养细胞存活,而且有大体 5%的芽孢灭活。同时,统计学分析表明,在 85、90 $^{\circ}$ C 处理下,WH1 的存活率显著高于模式菌($P < 0.05$),而 95、100 $^{\circ}$ C 条

件下二者存活率无差异($P > 0.05$)。通过耐高温试验表明,相比于模式菌,WH1 更具有良好的耐高温特性。

2.2.3 人工胃液耐受试验结果

菌株 WH1 和模式菌人工胃液耐受试验结果如图 4 所示。当经过人工胃液处理 1 h 后,模式菌和菌株 WH1 的存活率分别为 121.26%和 100.58%,模式菌的存活率显著高于菌株 WH1 ($P < 0.05$);当经过 4 h 的处理后,模式菌的存活率略微降低,为 120.65%,而菌株 WH1 的存活率显著提高($P < 0.05$),上升为 139.77%,并且还明显高于同处理条件下的模式菌的存活率($P < 0.05$);当经过 6 h 的处理后,模式菌的存活率显著降低($P < 0.05$),下降为 89.33%,而菌株 WH1 的存活率略微降低($P > 0.05$),为 135.35%,并且菌株 WH1 的存活率显著高于同处理时间的模式菌的存活率($P < 0.05$)。通过上述实验结果分析可以看出,与模式菌相比,菌株 WH1 具有更强的人工胃液耐受性。同时,相较于 0 h,菌株 WH1 在人工胃液中有所增殖,这与刘秀侠等^[30]的研究结果相似。这可能是由于人工胃液酸环境诱导部分芽孢萌发形成营养细胞,营养细胞增殖^[39],进而存活率高于 0 h。当营养细胞长时间处于酸环境时,部分营养细胞又被杀灭^[29,39],存活率下降,所以菌株 WH1 存活率呈现出先增后降的趋势。

2.2.4 胆盐耐受试验结果

菌株 WH1 和模式菌胆盐耐受试验结果如图 5 所示。当胆盐浓度分别为 0.03%、0.10%时,菌株 WH1 存活率显著高于模式菌($P < 0.05$);当胆盐浓度为 0.20%时,二者的存活率都达到最大值,分别为 101.79%和 76.94%,而且菌株 WH1 存活率显著高于模式菌($P < 0.05$);当胆盐浓度大于 0.30%时,菌株

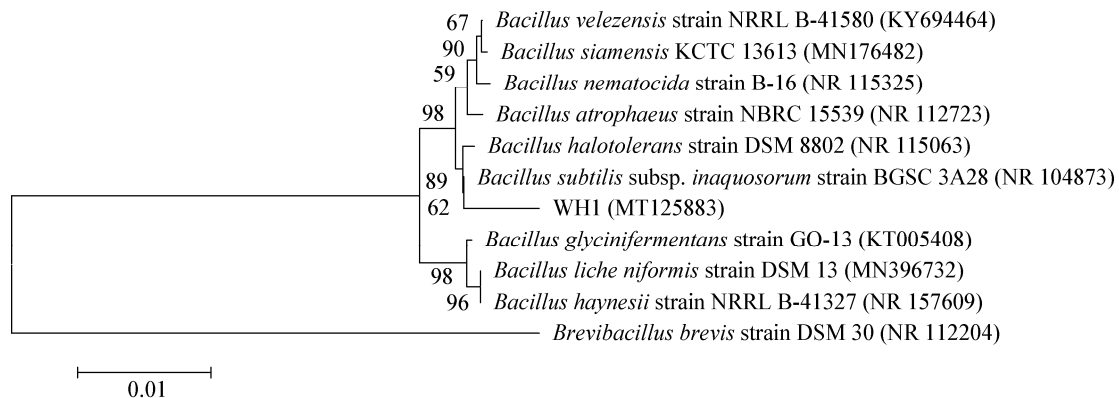


图2 基于16S rRNA基因序列构建的WH1系统发育进化树

Figure 2 Phylogenetic tree of strain WH1 based on 16S rRNA gene sequence

注: 括号中的序号为序列 GenBank 登录号; 分支点处数值表示 Bootstrap 值; 0.01 标尺表示序列间分歧度

Note: The GenBank accession number of aligned sequences are shown in the brackets; Numbers at branch nodes present bootstrap value; Bar: Nucleotide divergence

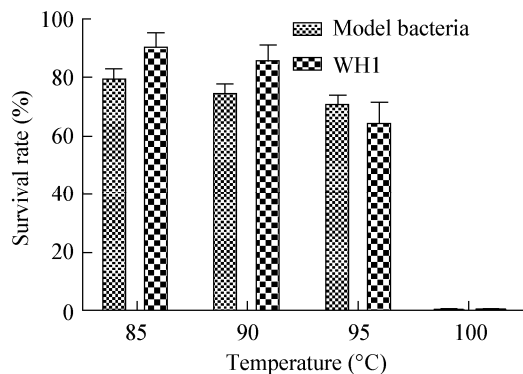


图3 不同温度处理下的WH1和模式菌存活率对比

Figure 3 Comparison of survival rate of WH1 and model bacteria under different temperature treatments

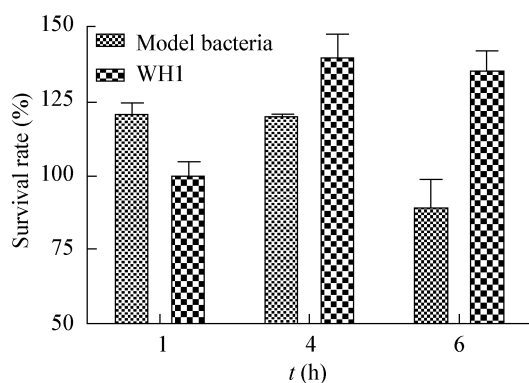


图4 人工胃液不同处理时间下的菌株WH1和模式菌存活率对比

Figure 4 Comparison of survival rate of WH1 and model bacteria under different treatment time of artificial gastric juice

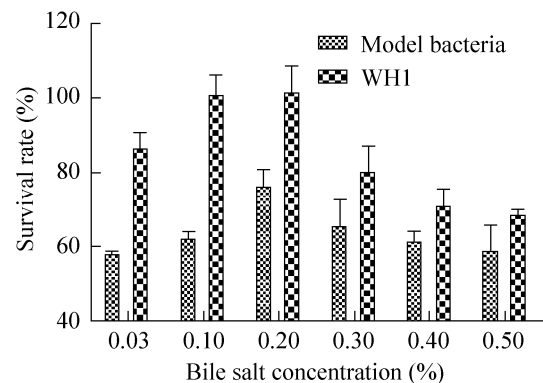


图5 不同胆盐浓度处理下的菌株WH1和模式菌存活率对比

Figure 5 Comparison of survival rate of WH1 and model bacteria under different bile salt concentrations

WH1 和模式菌的存活率没有显著差别($P>0.05$)。通过上述实验结果分析可以看出, 与模式菌相比, 菌株 WH1 具有更强的胆盐耐受性。

2.2.5 人工肠液耐受试验结果

菌株 WH1 和模式菌人工肠液耐受试验结果如图 6 所示。经过人工肠液处理 1 h 后, 菌株 WH1 和模式菌存活率没有显著差异($P>0.05$); 处理 4 h 后, 菌株 WH1 和模式菌存活率分别为 54.71%和 123.36%, 菌株 WH1 存活率显著低于模式菌($P<0.05$); 处理 6 h 后, 菌株 WH1 和模式菌存活率没有显著差异($P>0.05$)。通过人工肠液耐受试验结果分析可以看出, 模式菌具有更强的人工肠液耐受性。

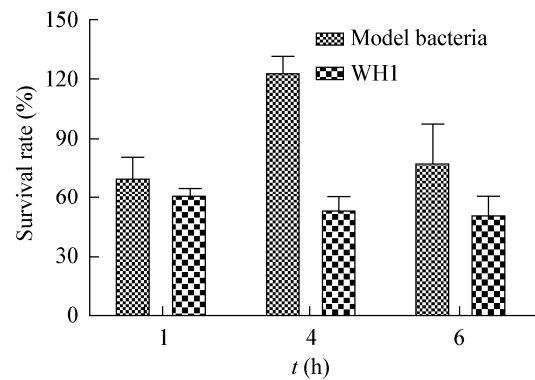


图 6 人工肠液不同处理时间下的菌株 WH1 和模式菌存活率对比

Figure 6 Comparison of survival rate of strain WH1 and model bacteria under different treatment time of artificial intestinal juice

2.2.6 抑菌试验结果

以大肠杆菌、嗜水气单胞菌、迟钝爱德华氏菌、金黄色葡萄球菌和副溶血性弧菌为指示菌，以其没有明显生长为界限，测量抑菌圈直径，分析菌株 WH1 和枯草芽孢杆菌模式菌(CGMCC 1.3358)的抑菌作用。试验结果如表 3 和图 7 所示，与模式菌相比，菌株 WH1 分泌的抗菌物质对金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌的抑菌环直径极显著($P<0.01$)，而二者对大肠杆菌、嗜水气单胞菌、迟钝爱德华氏菌均

无抑制作用。

2.2.7 耐药试验结果

对拟用作饲料添加剂的菌产品，必须要检查其活菌组分对人和兽类重要抗菌药物的敏感性。原则上要选用对抗菌药物敏感的微生物作为饲料添加剂，以防止在肠道菌群中发生耐药性基因转移的风险^[35]。菌株 WH1 药敏试验结果如表 4 所示。从表 4 中可以看出，对菌株 WH1 来说，欧洲食品安全局规定的用作饲用活菌添加剂的芽孢杆菌必检的 8 种抗生素其 MIC 值均低于该局限定值，为相应抗生素

表 3 菌株 WH1 和模式菌的抑菌效果对比

Table 3 Comparison of antibacterial effect of WH1 and model bacteria

指示菌 Indicator	抑菌圈直径 Inhibition diameter (mm)	
	WH1	Model bacteria
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	0	0
嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	0	0
迟钝爱德华氏菌 <i>Edwardsiella tarda</i>	0	0
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	37.61±0.40	10.25±0.83
副溶血性弧菌 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	15.19±1.05	0

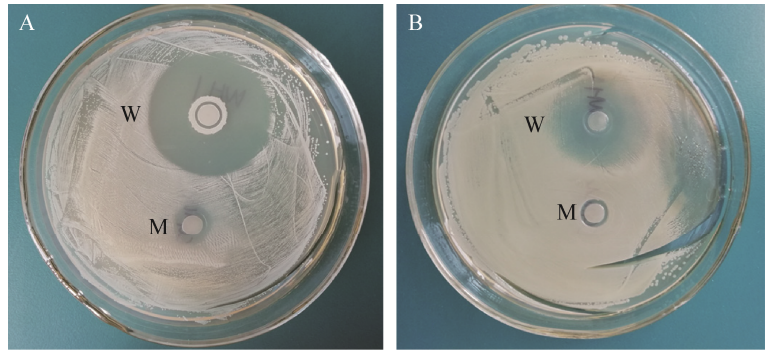


图 7 菌株 WH1 和模式菌(CGMCC 1.3358)的抑菌效果

Figure 7 The antibacterial effect of WH1 and model bacteria (CGMCC 1.3358)

注：A：金黄色葡萄球菌；B：副溶血性弧菌。W：WH1；M：枯草芽孢杆菌模式菌(CGMCC 1.3358)

Note: A: *Staphylococcus aureus*; B: *Vibrio parahaemolyticus*. W: WH1; M: *Bacillus subtilis* model bacteria (CGMCC 1.3358)

表 4 菌株 WH1 的药敏试验结果

Table 4 Antibiotics sensitivity test of WH1

抗菌药物名称 Antimicrobial agents	最小抑菌浓度 MIC (mg/L)	MIC 判断标准 Criterion (mg/L)	敏感程度 Susceptibility
万古霉素 Vancomycin	0.5	≤4	S
庆大霉素 Gentamicin	1	≤4	S
卡那霉素 Kanamycin	4	≤8	S
链霉素 Streptomycin	2	≤8	S
红霉素 Erythromycin	0.25	≤4	S
克林霉素 Clindamycin	0.25	≤4	S
四环素 Tetracycline	1	≤8	S
氯霉素 Chloramphenicol	4	≤8	S

注: S: 敏感
Note: S: Susceptible

的敏感菌株,符合欧洲食品安全局对拟用作饲料添加剂活菌成分的药物敏感性判断标准。

2.3 菌株 WH1 的水质净化试验结果

2.3.1 菌株 WH1 对养殖水体中 NO₂⁻-N 含量的影响

菌株 WH1 对南美白对虾养殖水体 NO₂⁻-N 含量变化的影响如图 8 所示。与养殖池中未添加菌株 WH1 的对照组相比,试验组在维持养殖池中 WH1 菌株浓度 5×10⁵ CFU/mL 的第 4 天,水体中的 NO₂⁻-N 含量显著降低(P<0.05)。随着时间的增加,水体中

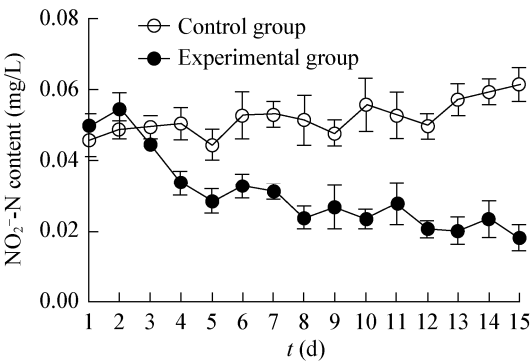


图 8 菌株 WH1 对养殖水体中 NO₂⁻-N 含量的影响
Figure 8 Effect of WH1 on NO₂⁻-N content in aquaculture water

的 NO₂⁻-N 含量总体为下降趋势,并且都显著低于对应时间点的对照组 NO₂⁻-N 含量(P<0.05)。这表明菌株 WH1 能有效降低养殖水体中 NO₂⁻-N 含量。

2.3.2 菌株 WH1 对养殖水体中 NH₃-N 含量的影响

菌株 WH1 对南美白对虾养殖水体 NH₃-N 含量变化的影响如图 9 所示。与养殖池中未添加菌株 WH1 的对照组相比,试验组在维持养殖池中 WH1 菌株浓度 5×10⁵ CFU/mL 的第 6 天,水体中的 NH₃-N 含量显著降低(P<0.05)。从第 10 天开始经过连续 6 天的测量观察,水体中的 NH₃-N 含量一直维持在较低水平,特别是在第 14 天,水体中的 NH₃-N 含量降低了 77.63%。这表明菌株 WH1 能有效降低养殖水体中 NH₃-N 含量。

2.3.3 菌株 WH1 对养殖水体中 COD 值的影响

菌株 WH1 对南美白对虾养殖水体 COD 值的影响如图 10 所示。与养殖池中未添加菌株 WH1 的对

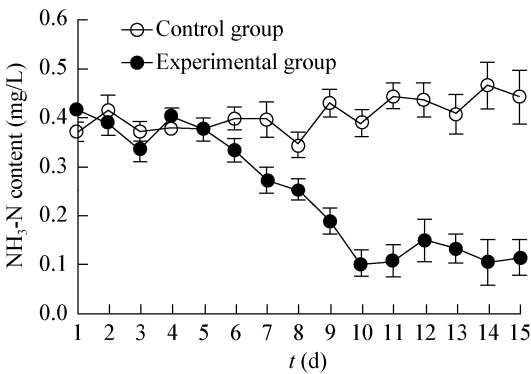


图 9 菌株 WH1 对养殖水体中 NH₃-N 含量的影响
Figure 9 Effect of WH1 on NH₃-N content in aquaculture water

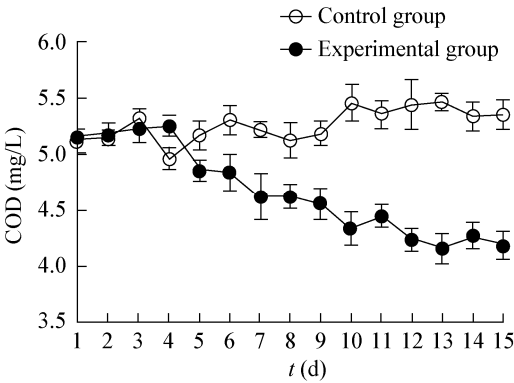


图 10 菌株 WH1 对养殖水体中 COD 值的影响
Figure 10 Effect of WH1 on COD in aquaculture water

照组相比, 试验组在维持养殖池中 WH1 菌株浓度 5×10^5 CFU/mL 的第 5 天, 水体中的 COD 值显著降低($P<0.05$)。随着时间的增加, 试验组水体中的 COD 值总体为下降趋势, 并且都显著低于对应时间点的对照组 COD 值($P<0.05$)。从第 12 天开始, 连续 4 d, 试验组水体中 COD 值为 4.211 ± 0.050 mg/L, 处于较平稳的低水平。以上分析表明菌株 WH1 能有效降低养殖水体中 COD 值。

3 讨论与结论

本课题组利用从南美白对虾养殖池底泥中采集的样品, 通过平板划线分离菌株并对其进行形态学观察、生理生化鉴定和 Biolog GenIII 微生物鉴定系统表型测定, 证实所分离的菌株 WH1 为枯草芽孢杆菌。16S rRNA 基因序列分析显示菌株 WH1 与 *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* 相似性为 99.17%。综合考虑各种鉴定方法的结果, 初步鉴定菌株 WH1 为枯草芽孢杆菌。

枯草芽孢杆菌是水产养殖中最常用的益生菌^[40]。该菌在水产上主要有两个方面的作用, 一是作为饲料添加剂, 二是作为水质调控剂^[17]。要利用枯草芽孢杆菌开发饲料添加剂, 需要对相应的菌株进行耐药性、抑菌性、耐酸、耐胆盐等生物学特性体外评价^[41]。巴翠玉等^[28]、杨锋等^[29]、袁林等^[42]

众多的学者对枯草芽孢杆菌的耐高温、耐酸、耐胆盐等耐受性进行了研究, 并取得了一定的研究成果, 但是他们在开展相关试验时都未考虑测试菌液中的芽孢含量。截至目前, 国内仅刘秀侠等^[30]考虑到该因素的影响, 并在指定的芽孢率(90%以上)下研究了 11 株枯草芽孢杆菌的耐受性。枯草芽孢杆菌因能形成芽孢而具有较强的抗逆性^[43], 因此明确芽孢含量将成为耐受性试验的必要条件。本文在明确的芽孢率(85%以上)基础上, 探究了分离菌株 WH1 与模式菌(CGMCC 1.3358)的耐受性差异。结果表明, 菌株 WH1 比模式菌具有更强的耐高温、耐人工胃液和耐胆盐特性, 而在耐人工肠液方面稍逊于模式菌。

同时, 将本文分离菌株 WH1 与刘秀侠等研究的耐受性较好的 7 株菌(BLCC1-1、BLCC1-2、BLCC1-4、BLCC1-6、BLCC1-8、BLCC1-9 和 BLCC1-10)的实验结果进行对比, 结果如表 5 所示。在耐高温方面, 经过 85 °C 处理 10 min 后, 菌株 WH1 存活率明显高于刘秀侠等研究的其他 7 株菌, 经过 100 °C 处理 10 min 后, 刘秀侠等研究的 BLCC1-1 和 BLCC1-2 存活率明显高于菌株 WH1; 在耐人工胃液方面, 除了 BLCC1-9 外, 菌株 WH1 的耐受性明显高于其他 6 株菌; 在耐胆盐方面, 菌株 WH1

表 5 耐受性试验结果对比

Table 5 Comparison of tolerance test results

耐受性试验 Tolerance test	试验条件 Condition	WH1 (%)	刘秀侠等(以下数据来自条形柱读出的近似值) ^[30] Liu XX, et al. (The following data comes from the approximate values read by the bar) ^[30]						
			BLCC1-1 (%)	BLCC1-2 (%)	BLCC1-4 (%)	BLCC1-6 (%)	BLCC1-8 (%)	BLCC1-9 (%)	BLCC1-10 (%)
高温 High temperature	85 °C	90.13	64	34	77	71	44	55	86
	100 °C	<3	24	15	<3	<3	<3	<3	<3
人工胃液 Artificial gastric juice	1 h	100.58	131	95	103	110	85	208	88
	4 h	139.77	126	44	34	99	21	216	13
胆盐 Bile salt	0.10%	100.92	15	31	46	77.7	33	45	13
	0.30%	80.46	14	32	37	35	33	48	9
	0.50%	68.97	10	24	42	74	38	46	7
人工肠液 Artificial intestinal fluid	1 h	61.63	93	115	75	115	115	100	125
	4 h	54.71	77	185	27	200	50	295	45

的耐受性明显高于其他 7 株菌;在耐人工肠液方面,经过 1 h 处理后,刘秀侠等研究的其他 7 株菌其存活率明显高于菌株 WH1, 经过 4 h 处理后, BLCC1-1、BLCC1-2、BLCC1-6 和 BLCC1-9 的存活率明显高于菌株 WH1。总体来说,与刘秀侠等研究出的 7 株耐受性能较好的菌株相比,菌株 WH1 在耐高温(除了 BLCC1-1 和 BLCC1-2)、耐人工胃液(除了 BLCC1-9)、耐胆盐方面具有更强的耐受性能,而在耐人工肠液方面具有中等耐受水平。

除此之外,菌株 WH1 对金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌的抑菌作用极显著高于模式菌的抑菌作用($P<0.01$),而且对欧洲食品安全局规定的用作饲料添加剂的芽孢杆菌必检的 8 种抗生素(万古霉素、庆大霉素、卡那霉素、链霉素、红霉素、克林霉素、四环素、氯霉素)均敏感。从以上较全面的生物学特性试验结果可以看出,分离菌株 WH1 符合水产益生菌用作饲料添加剂的体外评价标准^[4,41,44-47]。

本文除了研究枯草芽孢菌用作饲料添加剂的作用之外,还同时研究了其用于净化养殖水质的作用。目前国内对枯草芽孢杆菌同时进行这 2 个方面研究的报道比较少见。本文通过开展的一系列水质净化实验发现,在维持养殖池中 WH1 菌株浓度 5×10^5 CFU/mL 的第 4 天,水体中的 NO_2^- -N 含量显著降低($P<0.05$),第 15 天时 NO_2^- -N 含量降低了 70.49%;第 5 天水体中的 COD 值显著降低($P<0.05$);第 6 天水体中的 NH_3 -N 含量显著降低($P<0.05$),第 14 天水体中的 NH_3 -N 含量降低了 77.63%。上述这些指标的变化充分表明,枯草芽孢杆菌能显著地降低 NO_2^- -N、 NH_3 -N 含量及 COD 值,从而起到净化养殖水质的效果。

本课题组通过表型鉴定和 16S rRNA 基因序列分析,从南美白对虾养殖池底泥中筛选了一株枯草芽孢杆菌 WH1。体外生物学特性研究表明,菌株 WH1 比模式菌具有更强的耐高温、耐人工胃液、耐胆盐、抑制金黄色葡萄球菌和副溶血性弧菌能力,而且对欧洲食品安全局规定的用作饲料添加剂的芽孢杆菌必检的 8 种抗生素敏感,符合水产益生菌

用作饲料添加剂的体外评价标准。此外,水质净化研究表明菌株 WH1 能显著降低水体中的 NO_2^- -N、 NH_3 -N 含量及 COD 值。本课题组后续将针对该菌株 WH1 与市售光合细菌、乳酸菌、硝化细菌等具有净化水质作用的菌剂进行净水效果的对比试验及相关复配菌剂的研究,以期开发出一种广泛应用于水产养殖中,同时具有优良生物学特性和较强净化水质作用的微生态制剂。

REFERENCES

- [1] Abareethan M, Amsath A. Characterization and evaluation of probiotic fish feed[J]. International Journal of Pure and Applied Zoology, 2015, 3(2): 148-153
- [2] Liu SB, Wang XR, Lin ZQ, Cai Y, Wu Y, Liu X, Zhou YC, Wang SF. Purification of aquaculture effluent by *Bacillus subtilis* HAINUP40[J]. Fisheries Science, 2018, 37(2): 159-166 (in Chinese)
刘树彬, 王新锐, 林壮其, 蔡岩, 吴越, 刘象, 周永灿, 王世锋. 枯草芽孢杆菌 HAINUP40 水质净化作用的研究[J]. 水产科学, 2018, 37(2): 159-166
- [3] Dawood MAO, Koshio S. Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture: A review[J]. Aquaculture, 2016, 454: 243-251
- [4] Chauhan A, Singh R. Probiotics in aquaculture: a promising emerging alternative approach[J]. Symbiosis, 2019, 77(2): 99-113
- [5] Cai Y, Yuan W, Wang SF, Guo WL, Li A, Wu Y, Chen X, Ren ZL, Zhou YC. *In vitro* screening of putative probiotics and their dual beneficial effects: To white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae and to the rearing water[J]. Aquaculture, 2019, 498: 61-71
- [6] Mo WY, Chen ZT, Leung HM, Leung AOW. Application of veterinary antibiotics in China's aquaculture industry and their potential human health risks[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2017, 24(10): 8978-8989
- [7] Chen SH, Chen Q, Chang YS, Zhou W, Wang QH, Ding Y. Research advance on application mechanisms of multispecies probiotic in aquaculture[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2016, 45(4): 12-18 (in Chinese)
陈树河, 陈秋, 常云胜, 周维, 王青华, 丁燊. 复合益生菌在水产养殖中的作用机制研究进展[J]. 河南农业科学, 2016, 45(4): 12-18
- [8] Muñoz-Atienza E, Gómez-Sala B, Araújo C, Campanero C, Campo RD, Hernández PE, Herranz C, Cintas LM. Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility and virulence factors of lactic acid bacteria of aquatic origin intended for use as probiotics in aquaculture[J]. BMC

- Microbiology, 2013, 13(1): 15
- [9] De Azevedo RV, Filho JCF, Cardoso LD, Mattos DDC, Júnior MVV, De Andrade DR. Economic evaluation of prebiotics, probiotics and symbiotics in juvenile Nile tilapia[J]. *Revista Ciência Agronômica*, 2015, 46(1): 72-79
- [10] Dawood MAO, Koshio S, Abdel-Daim MM, Van Doan H. Probiotic application for sustainable aquaculture[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2019, 11(3): 907-924
- [11] Sonia V, Rajagopalsamy CBT, Ahilan B, Francis T. Probiotics: an environmental friendly approach for sustainable aquaculture[J]. *Biochemical and Cellular Archives*, 2016, 16(2): 239-242
- [12] Zorriehzahra MJ, Delshad ST, Adel M, Tiwari R, Karthik K, Dhama K, Lazado CC. Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action: a review[J]. *Veterinary Quarterly*, 2016, 36(4): 228-241
- [13] Deng M, Chen JY, Gou JW, Hou J, Li DP, He XG. The effect of different carbon sources on water quality, microbial community and structure of biofloc systems[J]. *Aquaculture*, 2018, 482: 103-110
- [14] Ramesh D, Souissi S. Effects of potential probiotic *Bacillus subtilis* KADR1 and its subcellular components on immune responses and disease resistance in *Labeo rohita*[J]. *Aquaculture Research*, 2018, 49(1): 367-377
- [15] Chien CC, Lin TY, Chi CC, Liu CH. Probiotic, *Bacillus subtilis* E20 alters the immunity of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* via glutamine metabolism and hexosamine biosynthetic pathway[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 98: 176-185
- [16] Banerjee G, Ray AK. The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries[J]. *Research in Veterinary Science*, 2017, 115: 66-77
- [17] Su YL, Sun SM, Zhu J, Xie J, Ge XP. Advances of *Bacillus subtilis* application in aquaculture[J]. *Chinese Fishery Quality and Standards*, 2016, 6(6): 32-39 (in Chinese)
苏艳莉, 孙盛明, 朱健, 谢骏, 戈贤平. 枯草芽孢杆菌在水产养殖中的研究进展[J]. *中国渔业质量与标准*, 2016, 6(6): 32-39
- [18] Cai Y, Cao GF, Ye S, Xu Y. Application of *Bacillus subtilis* instead of antibiotics in aquaculture[J]. *Shanxi Agricultural Economy*, 2018(19): 75 (in Chinese)
蔡艳, 曹根凤, 叶盛, 许彦. 枯草芽孢杆菌代替抗生素在水产养殖上的应用[J]. *山西农经*, 2018(19): 75
- [19] Zhang XY, Guo LD, Liu XY. Research advances in the neutral protease of *Bacillus subtilis*[J]. *China Brewing*, 2018, 37(4): 12-15 (in Chinese)
张晓燕, 国立东, 刘晓艳. 枯草芽孢杆菌中性蛋白酶的研究进展[J]. *中国酿造*, 2018, 37(4): 12-15
- [20] Zhang XP. Effects of *Bacillus subtilis* SC02 and *Pseudomonas stutzeri* F1M on water quality in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) culture and its mechanism[D]. Hangzhou: Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2014 (in Chinese)
张小平. 枯草芽孢杆菌 SC02 和施氏假单胞菌 F1M 对草鱼养殖水体水质的影响及机理研究[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2014
- [21] Zhang NH. Development of new type of *Bacillus* probiotics and its application in eutrophic water[D]. Guangzhou: Master's Thesis of Jinan University, 2011 (in Chinese)
张念海. 新型芽孢杆菌益生菌的富营养化水体改良作用[D]. 广州: 暨南大学硕士学位论文, 2011
- [22] Wang XT, Jin LM, Gong XM, Hao M, Quan CS, Zhao J, Hou XY. Research progress on antibacterial substances produced by *Bacillus subtilis*[J]. *Light Industry Science and Technology*, 2018, 34(11): 14-15 (in Chinese)
王晓彤, 金黎明, 宫小明, 郝苗, 权春善, 赵晶, 候熙彦. 枯草芽孢杆菌产生的抗菌物质的研究进展[J]. *轻工科技*, 2018, 34(11): 14-15
- [23] Elshaghabee FMF, Rokana N, Gulhane RD, Sharma C, Panwar H. *Bacillus* as potential probiotics: status, concerns, and future perspectives[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1490
- [24] Jayaraman S, Das PP, Saini PC, Roy B, Chatterjee PN. Use of *Bacillus Subtilis* PB6 as a potential antibiotic growth promoter replacement in improving performance of broiler birds[J]. *Poultry Science*, 2017, 96(8): 2614-2622
- [25] Zou GX, Zhao CT, Qiu JP. Optimization of fermentation technology of biocontrol bacterium *Bacillus subtilis* 210 by response surface analysis[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2017, 29(5): 799-805 (in Chinese)
邹高溪, 赵春田, 裘娟萍. 生防枯草芽孢杆菌 210 发酵工艺优化[J]. *浙江农业学报*, 2017, 29(5): 799-805
- [26] Green MR, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*[M]. 4th ed. Translated by He FC, trans. Beijing: Science Press, 2017: 1513 (in Chinese)
格林 MR, 萨姆布鲁克 J. 分子克隆实验指南[M]. 4 版. 贺福初, 译. 北京: 科学出版社, 2017: 1513
- [27] Dong XZ, Cai MY. *Manual for Identification of Common Bacterial Systems*[M]. Beijing: Science Press, 2001: 62-63 (in Chinese)
东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 62-63
- [28] Ba CY, Zhang LB, Zhang PJ, Zhao FG, Li YH. Isolation, identification and characterization of two strains of *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2017, 38(3): 46-51 (in Chinese)
巴翠玉, 张林波, 张培军, 赵福广, 李月红. 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
- [29] Yang F, Zhang TZ. Study on biological characteristics of

- Bacillus subtilis*[J]. Feed Research, 2011(3): 34-36 (in Chinese)
杨锋, 章亭洲. 枯草芽孢杆菌生物学特性的研究[J]. 饲料研究, 2011(3): 34-36
- [30] Liu XX, Xu HY, Xin GQ, Li JM, Zhao Y, Sun XS, Gu W. Study on probiotic characteristics of eleven *Bacillus subtilis* strains[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2017, 44(8): 2333-2341 (in Chinese)
刘秀侠, 徐海燕, 辛国芹, 李金敏, 赵影, 孙学森, 谷巍. 11 株枯草芽孢杆菌益生特性研究[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(8): 2333-2341
- [31] Li JJ, Ji QZ, Zhu HM, Liu QC, Shan CQ, Xiu LY, Jiang GT. Study on screening, biological characteristics and fermentation technology of *Bacillus subtilis* YB-6[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2017(6): 49-54, 293-294 (in Chinese)
李晶晶, 汲全柱, 朱海明, 刘秋晨, 单春乔, 修立颖, 江国托. 一株枯草芽孢杆菌 YB-6 的筛选、生物学特性及发酵工艺的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017(6): 49-54, 293-294
- [32] Zhang Z. Isolation, identification and biological characteristics of probiotic from swine[D]. Nanning: Master's Thesis of Guangxi University, 2017 (in Chinese)
张在. 猪源益生菌的分离鉴定与生物学特性的研究[D]. 南宁: 广西大学硕士学位论文, 2017
- [33] Liu DM, Li L, Yang XQ, Liang SZ. Determination of the antimicrobial activity of probiotic by Oxford plate assay system[J]. Food Research and Development, 2006, 27(3): 110-111 (in Chinese)
刘冬梅, 李理, 杨晓泉, 梁世中. 用牛津杯法测定益生菌的抑菌活力[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(3): 110-111
- [34] CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically[M]. 11th ed. CLSI standard M07. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018: 25-29
- [35] EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance[J]. EFSA Journal, 2012, 10(6): 2740
- [36] Prieto ML, O'Sullivan L, Tan SP, McLoughlin P, Hughes H, Gutierrez M, Lane JA, Hickey RM, Lawlor PG, Gardiner GE. *In vitro* assessment of marine *Bacillus* for use as livestock probiotics[J]. Marine Drugs, 2014, 12(5): 2422-2445
- [37] CLSI. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria[M]. 3rd ed. CLSI guideline M45. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016: 20-21
- [38] Xie MJ, He XL, Du J, Liu X, Li K, Li JG, Bai YH. Identification of two dominant spoilage bacteria isolated from chilled chicken breast[J]. Food Science and Technology, 2018, 43(8): 330-335 (in Chinese)
谢美娟, 何向丽, 杜娟, 刘骁, 李可, 栗俊广, 白艳红. 冷鲜鸡胸肉中 2 种优势腐败菌的分离鉴定[J]. 食品科技, 2018, 43(8): 330-335
- [39] Hong HA, Duc LH, Cutting SM. The use of bacterial spore formers as probiotics[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2005, 29(4): 813-835
- [40] Tong HF, Wu MF, Leng XD, Ma JJ. Application and research status of *Bacillus subtilis* in aquaculture[J]. Jiangxi Fishery Sciences and Technology, 2016(3): 37-38 (in Chinese)
仝慧芳, 吴明芳, 凌晓东, 马洁洁. 枯草芽孢杆菌在水产养殖中的应用及研究现状[J]. 江西水产科技, 2016(3): 37-38
- [41] Lan T, Chu Q, Liu W, Yang L, Wang HY, Xi XJ. A preliminary study on the *in vitro* evaluation methods and standards for the quality of microbial feed additives[J]. Standard Science, 2017(8): 95-99 (in Chinese)
兰韬, 初侨, 刘文, 杨丽, 王鹤妍, 席兴军. 微生物饲料添加剂质量体外评价方法与标准初探[J]. 标准科学, 2017(8): 95-99
- [42] Yuan L, Tu YK, Zeng J, Guo JJ. Isolation and identification of a swine origin *Bacillus subtilis* and study of biological characteristic[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2019, 55(5): 9-13 (in Chinese)
袁林, 涂熠坤, 曾静, 郭建军. 猪源枯草芽孢杆菌的分离鉴定及其生物特性研究[J]. 中国兽医杂志, 2019, 55(5): 9-13
- [43] Xu SR, Chen X, Wu YP. Application of the mechanism of sporulation in production of pharmaceutical probiotics[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2007, 26(4): 121-126 (in Chinese)
徐世荣, 陈骧, 吴云鹏. 细菌芽孢形成机制在微生态制剂生产中的应用[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(4): 121-126
- [44] Merrifield DL, Dimitroglou A, Foey A, Davies SJ, Baker RTM, Bogwald J, Castex M, Ringø E. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids[J]. Aquaculture, 2010, 302(1/2): 1-18
- [45] Pandya D. Benefits of probiotics in oral cavity: a detailed review[J]. Annals of International Medical and Dental Research, 2016, 2(5): 10-17
- [46] Holzapfel WH, Schillinger U. Introduction to pre- and probiotics[J]. Food Research International, 2002, 35(2/3): 109-116
- [47] Gatesoupe FJ. The use of probiotics in aquaculture[J]. Aquaculture, 1999, 180(1/2): 147-165