

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.15095

一株能抑制罗非鱼源无乳链球菌的反硝化芽孢杆菌的筛选鉴定

刘观斌^{1,2}, 王森¹, 卢迈新¹, 可小丽¹, 刘志刚¹, 朱华平¹, 高风英¹, 曹建萌¹

1. 农业部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室, 中国水产科学研究院 珠江水产研究所, 广东 广州 501380;
2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306

摘要: 从尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)肠道内容物中分离筛选出具有反硝化能力并拮抗无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)的芽孢杆菌好氧菌株, 并对其中拮抗性最强的 1 株芽孢杆菌进行形态学、生理生化特性、16S rRNA 基因序列鉴定, 进一步研究其最适生长条件、水解淀粉和蛋白的能力, 并进行菌株药物敏感试验及安全性检测。经鉴定, 筛选出的菌株(命名为 NY 5)为蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)。在反硝化性能检测培养基中接种 1% 的 NY 5 菌液后, 对 50 mg/L 的亚硝酸盐氮 12 h 去除效率达到 100%; 对本实验室保存的 21 株不同来源的无乳链球菌均有拮抗作用, 平均抑菌圈直径为(26.67±3.00) mm。NY 5 在温度为 25~40℃、盐度为 0~40、pH 为 5~9 的环境中生长较好。同时 NY 5 还具有水解酪蛋白和淀粉的功能。NY 5 菌株对多数抗生素敏感, 对少数检测抗生素(青霉素 G、麦迪霉素、头孢唑啉等)耐药。在水体中 NY 5 菌液浓度为 2.0×10^7 CFU/mL, 以及在注射 200 μ L 2.0×10^6 CFU/mL 浓度 NY 5 菌液的条件下, 体重为(6.0±1.1) g 的罗非鱼均未出现死亡及其他异常现象。综合上述结果, 证明筛选出的 NY 5 菌株为蜡样芽孢杆菌。

关键词: 罗非鱼; 无乳链球菌; 芽孢杆菌; 拮抗; 反硝化

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)01-0207-11

罗非鱼是世界性的淡水养殖鱼类品种, 养殖遍及 100 多个国家和地区, 是联合国粮农组织向全世界推广的优良养殖品种之一^[1]。罗非鱼对疾病具有较强的抵抗能力, 但仍然会受到许多病原生物的侵袭, 特别是罗非鱼链球菌病的暴发, 给罗非鱼产业带来巨大的损失^[2]。随着我国水产养殖业的快速发展, 集约化养殖的兴起, 大量的饲料投入、饵料残留、动物排泄物造成水体有机物浓度迅速升高, 导致养殖环境不断恶化, 可能是该病大流行的一个重要因素。

因此, 必须寻求安全、有效防控罗非鱼链球菌病的措施, 要能够在抑制病原菌生长的同时改

善水质, 达到综合防控的目的, 以促进罗非鱼养殖产业的可持续发展。益生菌的高效应用将是安全、有效防控罗非鱼链球菌病的一个重要途径。芽孢杆菌属(*Bacillus*)分布广, 作为饲料添加剂和水质改良剂在水产养殖中已经得到广泛应用^[3-5]。目前水产养殖中应用较为普遍的有枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)、蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*)和地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)等。芽孢杆菌在水产中的使用有多种方法, 可以直接泼洒到养殖水体或作为饲料添加剂, 还可以对水生生物进行注射或浸浴。芽孢杆菌通常能分泌各种胞外酶, 例如淀粉酶、蛋白酶等, 可以降解水体中的有机物大分子

收稿日期: 2015-03-11; 修订日期: 2015-07-07.

基金项目: 现代农业产业技术体系专项资金项目(CARS-49); 广东省海洋渔业科技与产业发展专项科技攻关与研发项目(A201401B04).

作者简介: 刘观斌(1990-), 男, 硕士研究生, 主要从事水产健康养殖研究工作. E-mail: liugb2013@126.com

通信作者: 卢迈新, 研究员, 主要从事水产健康养殖及选育种研究工作. E-mail: mx-lu@163.com

物质, 同时还可以为微生物和藻类提供营养物质^[6-7]。另外也有研究表明, 芽孢杆菌能够抑制病原菌, 提高机体免疫力^[8-9]。芽孢杆菌作为一种益生菌能够在水产养殖中发挥重要的作用。

本研究从尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)肠道中筛选出一株高效拮抗罗非鱼源无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)的反硝化芽孢杆菌菌株, 并对其进行鉴定及生理生化测定, 以期水产养殖提供益生菌菌源, 也为综合防控罗非鱼链球菌病提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 实验所用样品采集于广州市中国水产科学研究院珠江水产研究所池塘养殖的尼罗罗非鱼肠道。将最初分离纯化的初筛菌, 根据来源、形态和生理生化特征, 选出 20 株代表性菌株作为筛选对象, 编号分别为 NY 1~20。病原菌种是由本实验分离保存的不同来源的罗非鱼源无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*), 共 6 株。

1.1.2 培养基 牛肉膏蛋白胨液体(固体)培养基: 蛋白胨 10 g/L, 牛肉膏 5 g/L, NaCl 5 g/L, pH 7.0(固体培养基添加 15 g/L 的琼脂, 高盐培养基添加 NaCl 至 30 g/L)。BTB(溴百里酚蓝)固体培养基: 天冬酰胺酸 1 g/L, KNO₃ 1 g/L, KH₂PO₄ 1 g/L, MgSO₄·7H₂O 1 g/L, FeCl₂·6H₂O 0.05 g/L, CaCl₂·2H₂O 0.2 g/L, 溴百里酚蓝 1 g/L, 琼脂 15 g/L。富集培养基: 蛋白胨 10 g/L, 牛肉膏 5 g/L, KNO₃ 1 g/L。反硝化培养基: 琥珀酸钠 4.72 g/L, KH₂PO₄ 1.5 g/L, NaNO₂ 0.05 g/L, MgSO₄·7H₂O 1 g/L, Na₂HPO₄ 0.42 g/L。淀粉培养基: 牛肉膏 5 g/L, 蛋白胨 10 g/L, NaCl 5 g/L, 可溶性淀粉 2 g/L, 琼脂 15 g/L。酪素培养基: 牛肉膏 3 g/L, 酪素 8 g/L, 琼脂 15 g/L。各培养基需调 pH 至 7.0~7.2, 并高压灭菌。

1.1.3 主要试剂和仪器 革兰氏快速染色液(珠海贝索生物有限公司), 孔雀绿(广州威佳生物有限公司), 番红(广州威佳生物有限公司), API 20E 试剂盒(Biomerieux), API 50CH 试剂盒(Biomerieux), 药敏纸片(杭州天和微生物试剂有限公司), 细菌

DNA 提取试剂盒(Omega), Taq 酶(TaKaRa)、pMD19-T 载体(TaKaRa), 感受态细胞 DH5 α (TaKaRa), BHI 培养基(广州威佳生物有限公司), 电子数显卡尺(广陆数字测控股份有限公司), 光学显微镜(ZEISS), PCR 仪器(SensoQuest), 恒温摇床(华利达实验设备有限公司), 光电比色计 Spectroquant@ NOVA60(德国 Merck 公司)等。

1.2 菌种的分离纯化

1.2.1 好氧反硝化细菌的筛选 采集的罗非鱼肠道用无菌手术剪剪碎, 称取 5 g 样品放入装有 45 mL 无菌水的锥形瓶中, 80℃水浴 15 min, 充分振荡混匀, 静止 5 min, 吸取上层液 1 mL 添加到 9 mL 无菌水中, 按此方法, 稀释得到不同浓度菌悬液。分别取 10⁻² 和 10⁻³ 的菌悬液各 200 μ L 涂布到牛肉膏蛋白胨高盐培养基固体平板上(每种稀释度 3 皿), 将培养基置于 30℃恒温箱培养 1~2 d。选取菌落形态为单个、不规则、表面粗糙的菌落进行反复划线纯化培养, 并选择单菌落进行形态学及革兰氏染色观察。将初筛菌株在 BTB 平板上划线, 30℃下培养, 1~2 d 后挑选使 BTB 平板变成蓝色的菌株为目的初筛菌。将目的初筛菌进行划线纯化, 然后按 1%(体积比)的量吸取 1 mL 目的初筛菌接种到 99 mL 的反硝化培养基中, 在 30℃, 220 r/min 振荡培养 24 h, 采用盐酸萘乙二胺光度法对培养基中的亚硝酸盐氮含量进行测定, 挑选去除亚硝酸盐氮多的菌株为目的复筛菌。

1.2.2 拮抗无乳链球菌菌株的筛选 分别将不同来源的 6 株无乳链球菌菌液(浓度为 1 $\times$ 10⁹ CFU/mL) 1 mL 均匀涂布在 BHI 固体培养基上, 置于 4℃冰箱, 待菌液吸收完全后, 用灭菌的内径为 6 mm 的圆形玻璃管在培养皿上打孔。取 1 $\times$ 10⁹ CFU/mL 的复筛菌培养液 50 μ L 加入小孔中, 在 4℃冰箱中放置过夜, 使菌液充分扩散到培养基中, 然后在 37℃下培养 24 h, 观察并测定抑菌圈直径, 选择具有抑菌效果的菌株, 以恩诺沙星、诺氟沙星作为对照。

1.3 菌种的鉴定

1.3.1 形态学观察与染色 将筛选出的菌株划线接种于牛肉膏蛋白胨平板上, 置于 30℃恒温培养

箱中培养 24 h, 观察菌落形态。挑选单菌落置于滴有生理盐水的载玻片上, 涂布均匀后通过革兰氏染色及芽孢染色法在光学显微镜下观察菌体形态及芽孢的形状、着生位置。

1.3.2 生化鉴定 将纯培养的待测菌株用 API 20E 及 50CH 试剂盒进行生化指标检测, 具体操作方法见试剂盒说明书。同时参照伯杰氏细菌鉴定手册(第八版)^[10]中细菌生理生化指标进行确认。

1.3.3 16S rRNA 基因序列克隆及序列分析 用细菌 DNA 提取试剂盒(Omega)提取待测菌株的细菌基因组 DNA, 具体步骤参照说明书。将提取的细菌基因组 DNA 作为模板, 用通用引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 1492R: 5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3' 来扩增细菌的 16S rRNA 基因片段。PCR 扩增的反应条件为: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 90 s, 30 个循环; 72℃ 10 min。PCR 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 切胶纯化目的片段, 连接 pMD19-T 载体, 转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞, 挑阳性克隆送至上海英潍捷基贸易有限公司进行测序。获得目的序列后, 登录 NCBI 网站, 通过 GenBank 中的 BLAST 程序 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 进行同源性分析, 同时下载相关细菌的 16S rRNA 基因序列, 再通过 Clustal X 软件进行多重比对, 用 MEGA 4 软件中邻接法(neighbor joining, NJ)构建分子系统进化树并通过自检分析(bootstrap)进行置信度检测, 自检数据集为 1000 次。

1.4 胞外酶性能测定

无菌牙签分别接种待测菌株于产淀粉酶和蛋白酶定性培养基固体平板中央, 待测菌株设 3 个重复, 在 30℃ 下倒置培养。24 h 后向淀粉酶定性培养基中加入 2 mL 的碘液, 将碘液均匀覆盖平板, 静置 10 min, 记录碘液染色的蓝紫色平板上出现显色圈情况。同时观察记录蛋白酶定性培养基出现透明圈情况。

1.5 菌株最适生长条件的测定

将待测菌株接种于牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 在 30℃ 及 200 r/min 的恒温摇床中培养 24 h,

取新鲜牛肉膏蛋白胨培养基将培养好的菌液稀释到 1×10^8 CFU/mL。研究待测菌株最适生长温度: 按照 1: 100(V/V) 的稀释比例将浓度为 1×10^8 CFU/mL 的待测菌液重新接种于新鲜的牛肉膏蛋白胨培养基中, 在 200 r/min 转速下, 分别在温度为 25℃、28℃、31℃、34℃、37℃ 和 40℃ 恒温摇床中培养。研究待测菌株最适生长所需 pH: 按照 1: 100(V/V) 的稀释比例将上述待测菌液分别接种到 pH 值为 3、5、7、9、11 的新鲜牛肉膏蛋白胨培养基中, 在 37℃ 及 200 r/min 转速的恒温摇床中培养。研究待测菌株最适生长盐度: 按照 1: 100(V/V) 的体积比将上述稀释好的待测菌液分别接种于盐度为 0、10、20、30、40 的新鲜牛肉膏蛋白胨培养基中, 在 37℃, 200 r/min 转速的恒温摇床中培养。上述不同温度、pH、盐度的试验均设置 3 个重复, 同时每隔 2 h 检测 1 次各组菌液的吸光值(OD₆₀₀), 并绘制出 0~24 h 内待测菌株的生长曲线。

1.6 药敏试验

采用纸片琼脂扩散法(K-B 法)检测待测菌株对抗菌药物的敏感性。挑待测菌株单菌落接种到牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 经过 37℃ 恒温培养 24 h, 将培养结束后的待测菌液用 0.85% 无菌生理盐水稀释成均匀悬液, 与浊度管(0.5 麦氏单位浓度比浊管)比较, 浊度一致。取菌液 200 μ L 均匀稀释涂布于牛肉膏蛋白胨平板上, 待干后, 用灭菌的镊子分别取药敏纸片均匀地贴在培养基表面, 将平板倒置, 在 37℃ 培养 24 h, 用电子数显卡尺测量抑菌圈的直径, 结果参照美国临床标准研究所 CLSI/NCCLS 2012 年颁布的药敏试验要求和标准进行判读, 并记录。

1.7 安全性试验

设待测菌株注射组、待测菌株浸泡组、阴性对照实验组, 每组设 3 个平行, 每个平行随机选取暂养 7 d 的健康尼罗罗非鱼[均重为(6.0 $\pm$ 1.1) g] 15 尾; 每尾注射待测菌株或阴性对照 200 μ L, 阴性对照为生理盐水。设置 2.0×10^9 CFU/mL、 2.0×10^8 CFU/mL、 2.0×10^7 CFU/mL 和 2.0×10^6 CFU/mL 4 个浓度对罗非鱼进行胸腔注射。浸泡组设

2.0×10⁸ CFU/mL、2.0×10⁷ CFU/mL、2.0×10⁶ CFU/mL 和 2.0×10⁵ CFU/mL 4 个水体终浓度, 实验鱼按常规方法饲养, 连续观察 10 d, 每天记录其死亡情况。

2 结果与分析

2.1 菌种的分离与筛选

从罗非鱼肠道中筛选出 20 株耐高温耐高盐的菌株, 革兰氏染色结果显示, 其中 9 株为革兰氏阴性球菌, 11 株为革兰氏阳性杆菌, 经过进一步的芽孢染色发现其中 2 株菌产芽孢。通过 BTB 选择性培养基筛选, 结果表明这 2 株芽孢杆菌均能够使 BTB 平板变蓝(图 1A), 为好氧菌。对这 2 株菌进行反硝化筛选, 结果表明其中 1 株(NY 5)能够高效降解亚硝酸盐氮(图 1B), 12 h 对 50 mg/L 亚硝酸盐氮的清除率达到 100%。因此 NY 5 菌株被筛选用于进一步研究。

2.2 无乳链球菌拮抗试验

通过平板扩散法测定 NY 5 菌株的抑菌效果,

结果表明, 与恩诺沙星和诺氟沙星相比, NY 5 菌株对 6 株无乳链球菌的抑菌效果较好(表 1)。NY5 菌株、恩诺沙星、诺氟沙星的平均抑菌圈直径分别为(26.67±3.00) mm、(18.92±3.81) mm、(13.08± 4.01) mm。

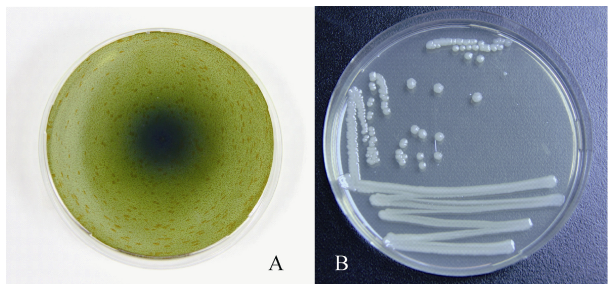


图 1 NY 5 BTB 平板显色结果(A)及其在牛肉膏蛋白胨培养基上的菌落形态(B)
图中培养皿的直径为 90 mm。

Fig.1 The results of BTB color reaction(A) and colony morphology on beef extract peptone medium (B) of NY 5
The diameter of the plates in the figure is 90 mm.

表 1 NY5 菌株和两种抗生素对 6 株无乳链球菌的抑菌圈直径

Tab. 1 Bacteriostatic circle diameter of NY5 strain and two antibiotics against 6 strains of *Streptococcus agalactiae*

无乳链球菌菌株编号 strain number of <i>Streptococcus agalactiae</i>	抑菌圈直径/mm bacteriostatic circle diameter		
	NY5	恩诺沙星 Enrofloxacin	诺氟沙星 Norfloxacin
1	25±4	16	10.5±0.5
2	35±2	16	12±2
3	26±4	16.5±0.5	10.5±0.5
4	24±2	27.5±1.5	15.5±0.5
5	24±5	16.5±0.5	11±1
6	26±3	21	19±1
平均 mean	26.67±3.00	18.92±3.81	13.08±4.01

2.3 NY 5 菌株的分类鉴定

2.3.1 菌体特征与菌落特征 NY 5 菌株在牛肉膏蛋白胨琼脂平板上 30℃ 培养 24 h 后可形成扁平、无规则、圆形或近似圆形、质地软、无色素、稍有光泽的白色菌落(似蜡烛样颜色), 直径 5~7 mm。革兰氏染色结果表明, 该菌为革兰氏阳性杆菌, 大小为 1.0~1.2×3.0~5.0 μm, 两端钝圆, 单个或两个相连(图 2A)。经芽孢染色后, 镜检观察芽孢呈绿色, 椭圆形, 位于菌体中端或外部, 菌体为红色, 可初步判断该株菌属芽孢杆菌科(图 2B)。

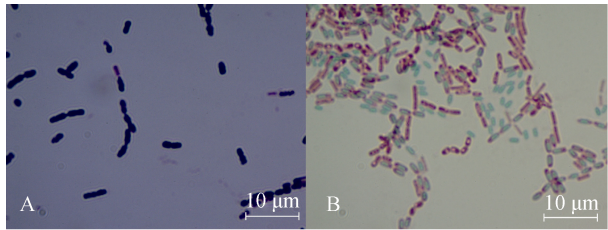


图 2 NY 5 菌株革兰氏染色(A)及芽孢染色(B)结果
(100 倍油镜)

Fig. 2 Results of Gram staining(A) and spore staining(B) of the NY 5 strain (oil lens, 100×)

2.3.2 生理生化特征鉴定 NY 5 菌株的精氨酸双水解酶、赖氨酸脱羧酶、细胞色素氧化酶、鸟氨酸

脱羧酶、脲酶、明胶酶、吡咯烷酮芳胺酶、α-半乳糖甙酶、β-葡萄糖醛酸酶、β-半乳糖甙酶、碱性磷酸酶、亮氨酸芳胺酶试验及马尿酸水解试验、VP 试验检测为阳性，能利用柠檬酸钠、蔗糖、密二糖、阿拉伯糖、D-海藻糖、淀粉，产 β-半乳糖苷酶、色氨酸脱氢酶、β-葡萄糖甙、H₂S 试验、吲哚试验为

阴性，不能利用葡萄糖、甘露醇、肌醇、鼠李糖、山梨醇、苦杏仁苷、D-核糖、D-甘露醇、D-乳糖(牛源)、菊糖、D-棉子糖、糖原。参照伯杰氏细菌鉴定手册(第八版)中细菌生理生化指标确认为芽孢杆菌属。

2.3.3 16S rRNA 基因同源性的鉴定 菌株 NY 5 的 16S rRNA 基因片段大小为 1474 bp，与已报道

表 2 菌株的生化试验结果

Tab. 2 Results of bio-chemical characteristics of the NY 5 strain

生化项目 biochemical item	结果 result	生化项目 biochemical item	结果 result
β-半乳糖苷酶 β-galactosidase	—	葡萄糖 glucose	—
精氨酸双水解酶 arginine dihydrolase	+	甘露醇 mannitol	—
赖氨酸脱羧酶 lysine decarboxylase	+	肌醇 inositol	—
鸟氨酸脱羧酶 ornithine decarboxylase	+	山梨醇 sorbitol	—
柠檬酸钠 sodium citrate	+	鼠李糖 rhamnose	—
H ₂ S 试验 H ₂ S test	—	蔗糖 sucrose	+
脲酶 urease	+	密二糖 D-melibiose	+
色氨酸脱氢酶 tryptophan dehydrogenase	—	苦杏仁苷 amygdalin	—
吲哚试验 indole test	—	阿拉伯糖 arabinose	+
VP 试验 VP test	+	细胞色素氧化酶 Cytochrome oxidase	+
明胶酶 gelatinase	+	D-核糖 D-ribose	—
马尿酸水解试验 hippurate hydrolysis test	+	D-甘露醇 D-mannitol	—
β-葡萄糖甙 β-D-Glucosidase	—	D-乳糖(牛源) D-Lactose	—
吡咯烷酮芳胺酶 pyrrolidonyl aminopeptidase	+	D-海藻糖 D-Trehalose	+
α-半乳糖甙酶 α-Galactosidase	+	菊糖 synanthrin	—
β-葡萄糖醛酸酶 β-Glucuronidase	+	D-棉子糖 D-Raffinose	—
β-半乳糖甙酶 β-Galactosidase	+	淀粉 starch	+
碱性磷酸酶 AKP	+	糖原 glycogen	—
亮氨酸芳胺酶 LAP	+		

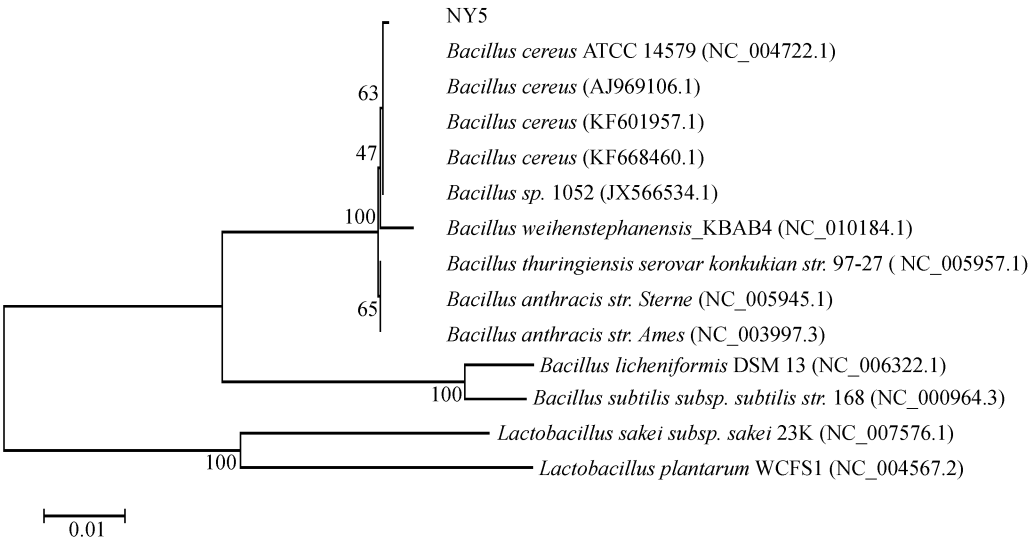


图 3 基于 16S rRNA 基因序列的 NJ 系统进化树

节点处数值为 1000 次 bootstrap 后的置信度。

Fig. 3 NJ phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences

Numbers at the nodes are bootstrap values of 1000 replications.

的蜡样芽孢杆菌 16S rRNA 基因序列(登录号: NC_004722.1)相似性高达 99%, 并与蜡样芽孢杆菌在一个分支。由此证明, 菌株 NY 5 为蜡样芽孢杆菌, 其 GenBank 中序列号为 KT163804。

2.4 NY 5 菌株的胞外酶性能检测

NY 5 菌株通过胞外酶定性培养基测定, 碘液染色的蓝紫色平板上出现显色圈(图 4A), 说明该

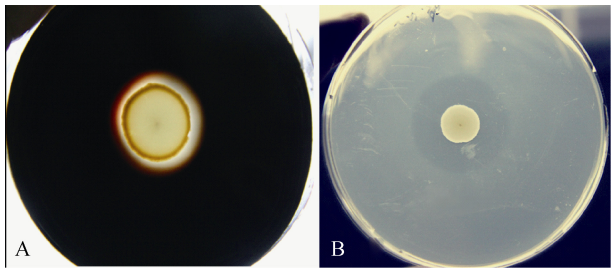


图 4 NY 5 菌株水解淀粉(A)及水解酪蛋白(B)结果
图中培养皿的直径为 90 mm.

Fig. 4 Results of the hydrolysis of starch (A) and casein (B) of the NY5 strain
The diameter of the plates in the figure is 90 mm.

菌株能够有效地水解淀粉。酪素平板上出现透明圈(图 4B), 说明该菌株能够有效地水解酪蛋白。

2.5 生长性能

NY 5 菌株在不同温度下的生长情况表明, 该菌株在 25~40℃范围内都能较好地生长, 在 25~31℃条件下最早达到稳定期, 且到达稳定期时各组菌液的吸光值之间无显著差异(图 5A)。NY 5 菌株在不同盐度(0~40)中生长情况表明, 它在盐度 0~40 下都能较好生长, 其中盐度 0 时生长速率最快, 稳定期 OD₆₀₀ 值最大, 随着盐度增加, 菌株进入对数期时间越长, 但在 12~14 h 均进入稳定期。当盐度 40 时, 最初 2 h 生长受到抑制(图 5B)。NY 5 菌株在不同 pH(3~11)下的生长情况表明, 在 pH 为 3 和 11 时, 其生长受到严重抑制, 菌株不能生长; 其中 pH 值为 7 时生长速率最快(图 5C)。

2.6 药敏试验及安全性试验

2.6.1 药敏试验 本药敏试验主要检测了 NY 5 菌株对 27 种抗生素的敏感性(表 3)。实验结果显

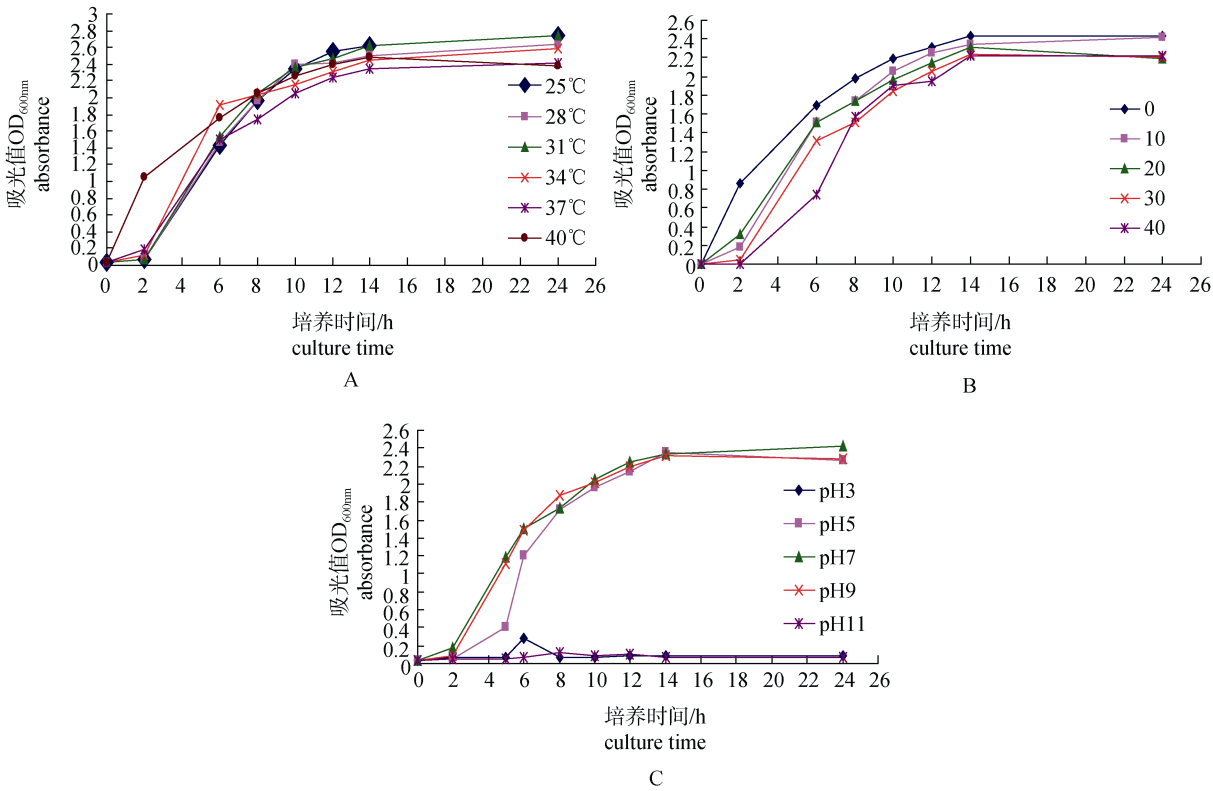


图 5 菌株 NY 5 在不同培养温度(A)、盐度(B)和 pH(C)条件下的生长曲线

Fig.5 The growth curves of the NY 5 strain in different temperatures(A), salinity(B) and pH(C)

表 3 分离菌株药物敏感性实验结果
Tab.3 Results of antibiotic sensitivity test of NY 5 strain

抗生素 antibiotic	含量(μg/片) contents(μg/piece)	抗生素敏感性 antibiotic sensitivity
大环内酯类 Macrolides group	麦迪霉素 Midecamycin	R
	罗红霉素 Roxithromycin	R
β-内酰胺类 β-lactam group	头孢曲松 Ceftriaxone	I
	头孢克洛 Cefaclor	S
	头孢唑啉 Cefazolin	R
	头孢哌酮 Cefoperazone	S
	头孢噻吩 Cephalothin	R
	头孢氨苄 Cefalexin	R
	阿莫西林 Amoxicillin	S
	苯唑西林 Oxacillin	R
	青霉素 Penicillin	R
	氨苄西林 Ampicillin	I
	米诺环素 Minocycline	S
环素类 Tetracyclines group	四环素 Tetracycline	R
	诺氟沙星 Norfloxacin	S
喹诺酮类 Quinolone group	氧氟沙星 Ofloxacin	S
	萘啶酸 Nalidixic acid	S
	洛美沙星 Lomefloxacin	S
	依诺沙星 Enoxacin	S
	氟罗沙星 Fleroxacin	S
	大观霉素 Spectinomycin	I
氨基糖苷类 Aminoglycosides group	链霉素 Streptomycin	S
	新霉素 Neomycin	I
	庆大霉素 Gentamicin	S
	卡那霉素 Kanamycin	S
	克林霉素 Clindamycin	R
	强力霉素 Doxycycline	I

注: S 表示敏感; I 表示中度敏感; R 表示耐受。
Note: S represents sensitive; I represents intermediate; R represents resistant.

示, NY 5 菌株对 13 种抗生素表现为敏感, 对青霉素 G、麦迪霉素、头孢唑啉、头孢噻吩、四环素、罗红霉素、头孢氨苄、克林霉素、苯唑西林 9 种抗生素表现为耐药, 对大观霉素、新霉素、头孢曲松、氨苄西林、强力霉素表现为中度敏感。

2.6.2 安全性试验 通过胸腔注射法和浸泡法来检测 NY 5 菌株对罗非鱼的安全性, 试验结果表明, 在水体中 NY5 浓度为 2×10^7 CFU/mL 和在注射 $200\text{ }\mu\text{L}$ 2×10^6 CFU/mL 浓度 NY 5 菌液条件下, 体重为 $(6.0\pm1.1)\text{ g}$ 罗非鱼均未出现死亡及其他异常现象。

3 讨论

近几年, 罗非鱼链球菌病暴发, 严重影响了罗非鱼产业的发展^[11]。目前防控罗非鱼无乳链球菌病的主要方法包括抗生素及化学药物治疗、中草药治疗、疫苗免疫等, 其中抗生素是水产动物疾病治疗中最为直接有效的方法, 但目前广泛存在的滥用抗生素现象容易导致病原菌产生耐药性, 而化学药物治疗则容易造成残留^[12-14]。中草药具有毒性小、药物残留低, 不易产生耐药性等优势^[15-16], 但中草药的提取工艺较为复杂, 有

效成分含量低, 见效慢, 且基础研究较为匮乏, 应用于罗非鱼链球菌病的防控存在一定的局限性^[17]。疫苗是目前链球菌病预防研究的主流方向^[18-19], 但疫苗的效价会受到养殖环境、鱼体自身、病原变异及疫苗的免疫途径等各种因素的影响, 且成本较高, 暂时难以在生产过程中推广^[20]。因此, 必须寻求安全、有效防控罗非鱼链球菌病的措施, 要能够在抑制病原菌生长的同时改善水质, 达到综合防控的目的, 以促进罗非鱼养殖产业的可持续发展。益生菌具有安全、无药物残留等特点, 在水质改良和疾病防治等方面具有重要作用。目前有部分益生菌已经应用于水产养殖的疾病防治方面, 如乳酸菌(*Lacticacid bacteria*)^[21]、芽孢杆菌属^[22]、假单胞菌属(*Pseudomonas*)^[23]、弧菌属(*Vibrio*)^[24]等, 其中芽孢杆菌能够分泌抗菌谱广且稳定的抗菌物质, 在拮抗病原菌方面得到广泛的应用^[25]。拮抗益生菌作为水产病害防控的微生物手段, 成为了近年来研究的热点之一。

根据体外拮抗试验筛选出具有拮抗特定病原菌活性的菌株, 以抑菌圈或活菌数作为评价指标, 这种拮抗筛选方法已成为益生菌和生物防治菌株筛选的一种模式程序^[26-27]。王娟等^[28]通过点种法筛选到 3 株大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)肠道副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)及溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)的拮抗菌, 抑菌圈直径最大可达 28.5 mm。刘亚楠等^[29]通过纸片法筛选到一株嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)的拮抗菌, 结果表明拮抗菌能明显抑制嗜水气单胞菌的增殖。周金敏等^[30]利用牛津杯法从黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)肠道筛选出 3 株明显抑制嗜水气单胞菌的芽孢杆菌。赵光军^[31]通过径向扩散法从水体和底泥中筛选了 2 株益生菌, 分别为枯草芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌(*B. thuringiensis*), 可通过不同的方式来抑制无乳链球菌对罗非鱼不同部位黏液的黏附作用。以上研究表明, 通过共培养的体外拮抗实验, 可以有效地获得特定菌的拮抗菌。本实验在牛津杯法的基础上, 采用打孔法在培养基上打孔, 有效地简化了操作, 筛选出了 1 株能明显抑制无乳

链球菌生长的益生菌蜡样芽孢杆菌 NY 5, 菌株的平均抑菌圈大小达到 26.67 mm。

蜡样芽孢杆菌在水产领域有着极其广泛的应用^[32], 但部分蜡样芽孢杆菌为能分泌热稳定毒素等毒素的致病株。Taylor 等^[33]研究了包括蜡样芽孢杆菌在内的 11 株芽孢杆菌, 表明其中一些菌株对水生动物可产生热稳定性毒素。谭爱萍等^[34]从患病中华鳖体内分离出 4 株病原菌为蜡样芽孢杆菌。由此可见, 蜡样芽孢杆菌在使用之前须确定其安全性。本研究结果表明, 在水体中 NY 5 浓度为 2×10^7 CFU/mL 和在注射 2×10^6 CFU/mL 浓度的 NY 5 菌液 200 μ L 的条件下, 罗非鱼没有出现死亡及其他异常现象, 说明 NY 5 菌株为安全菌株。

本研究发现 NY 5 为好氧菌株, 并具有高效反硝化特性, 12 h 对 50 mg/L 的亚硝酸盐氮的去除率达到 100%。目前传统的反硝化细菌大多为厌氧菌, 有氧条件会对此类细菌的反硝化功能造成一定的抑制, 而本研究筛选的菌株能够在有氧的环境下, 高效降解亚硝酸盐氮, 同时因为其具有好氧的性质, 理论上可以促进宿主肠道厌氧环境的形成, 有利于乳杆菌等有益厌氧菌的定植和生长。同时 NY 5 菌株是经过高温筛选的芽孢杆菌, 不论是直接投放水体, 还是作为饲料添加剂经过高温制成饲料, 均具有优势。本研究对 NY 5 菌株的特性研究表明, 其能够水解淀粉和酪蛋白, 对青霉素 G、麦迪霉素、头孢唑啉、头孢噻吩、四环素、罗红霉素、头孢氨苄、克林霉素、苯唑西林 9 种抗生素表现为耐药, 意味着其能够有效降解水中的有机物, 另外, 研究发现 NY 5 菌株能够在使用或者残存以上抗生素的情况下良好地生长, 有效地拓宽了 NY 5 菌株的使用范围。蜡样芽孢杆菌 NY 5 兼具多种特性, 可考虑开发成为一种新型微生物制剂。已有研究表明, 芽孢杆菌相对于其他的益生菌例如光合细菌、酵母菌等有更多的优点, 比如能耐高温、耐强酸碱性、耐挤压等特点, 更适合于实际生产应用。在水产养殖中的应用研究也表明芽孢杆菌能够改善养殖生态环境, 提供营养物质, 促进生长, 抑制病原菌, 提高机体免疫力^[35]。

4 结论

本研究结果表明, 筛选出的蜡样芽孢杆菌 NY 5 能有效抑制罗非鱼源无乳链球菌生长, 并能在有氧条件下高效降解亚硝酸盐氮、水解蛋白和淀粉, 在罗非鱼无乳链球菌病综合防控方面具有较大的应用潜力, 其在罗非鱼养殖中的应用效果有待进一步研究。该菌株现保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏号为 CGMCC No 9372。

参考文献:

- [1] Lu M X, Huang Z H. A review of genetics and breeding for tilapia[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2005, 14(2): 186–191.[卢迈新, 黄樟翰. 罗非鱼遗传育种研究[J]. 上海水产大学学报, 2005, 14(2): 186–191.]
- [2] Lu M X, Li J, Ye X, et al. Identification and characterizations of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia cultured in Guangdong and Hainan Provinces[J]. Microbiology China, 2010, 37(5): 766–774.[卢迈新, 黎炯, 叶星, 等. 广东与海南养殖罗非鱼无乳链球菌的分离、鉴定与特性分析[J]. 微生物学通报, 2010, 37(5): 766–774.]
- [3] Lara-Flores M, Olvera-Novoa M A, Guzmán-Méndez B E, et al. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Aquaculture, 2003, 216(1–4): 193–201.
- [4] Pan L, Guo W, Gao F X, et al. Effects of dietary probiotic on intestinal bacteria and immunity of juvenile *Scophthalmus musmaximus*[J]. Marine Sciences, 2012, 36(2): 34–39.[潘雷, 郭文, 高凤祥, 等. 饵料中添加益生菌对大菱鲆幼鱼肠道菌群及部分免疫指标的影响[J]. 海洋科学, 2012, 36(2): 34–39.]
- [5] Zhang Q H, Feng Y H, Wang J, et al. Study on the characteristics of the ammonia-nitrogen and residual feeds degradation in aquatic water by *Bacillus licheniformis*[J]. ACTA Hydrobiologica Sinica, 2011, 35(3): 498–503.[张庆华, 封永辉, 王娟, 等. 地衣芽孢杆菌对养殖水体氨氮、残饵降解特性研究[J]. 水生生物学报, 2011, 35(3): 498–503.]
- [6] Nimrat S, Suksawat S, Boonthai T, et al. Potential *Bacillus* probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)[J]. Vet Microbiol, 2012, 159(3): 443–450.
- [7] Zheng X C, Guo X J, Yao N, et al. Screening and identification of denitrifying bacillus strain and its denitrification characteristics[J]. Chinese Journal of Ecology, 2012, 31(6): 1447–1452.[郑喜春, 郭晓军, 姚娜, 等. 反硝化芽孢杆菌的筛选鉴定及反硝化特性[J]. 生态学杂志, 2012, 31(6): 1447–1452.]
- [8] Geraylou Z, Souffreau C, Rurangwa E, et al. Effects of dietary arabinoxylan-oligosaccharides (AXOS) and endogenous probiotics on the growth performance, non-specific immunity and gut microbiota of juvenile Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*)[J]. Fish Shellfish Immunol, 2013, 35(3): 766–775.
- [9] Zhou X X, Tian Z Q, Wang Y B, et al. Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response[J]. Fish Physiol Biochem, 2010, 36(3): 501–509.
- [10] Buchanan R E, Gibbons N E. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology[M]. Beijing: Science Press, 1984.[布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1984.]
- [11] Huo H H, Ke X L, Lu M X, et al. Serotype and drug resistance of *Streptococcus agalactiae* from tilapia farmed in Hainan province[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2013, 35(5): 350–354.[霍欢欢, 可小丽, 卢迈新, 等. 海南罗非鱼无乳链球菌血清型及耐药性研究[J]. 中国预防兽医学报, 2013, 35(5): 350–354.]
- [12] Liu L. Study of DNA vaccine and screening of effective Chinese medicine herbs against *Streptococcus agalactiae* of tilapia[D]. Guangzhou: Sun Yat-sen University, 2013.[刘亮. 罗非鱼无乳链球菌病 DNA 疫苗的研究及有效中草药的筛选[D]. 广州: 中山大学, 2013.]
- [13] Zhang X Y, Fan H P, Zhong Q F, et al. Isolation, identification and pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* from tilapia[J]. Journal of Fisheries of China, 2008, 32(5): 772–779.[张新艳, 樊海平, 钟全福, 等. 罗非鱼无乳链球菌的分离、鉴定及致病性研究[J]. 水产学报, 2008, 32(5): 772–779.]
- [14] Huo H H. Molecular serotype, drug-resistance and rapid detection of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013.[霍欢欢. 罗非鱼无乳链球菌分子血清型、耐药性以及快速检测方法的建立[D]. 上海: 上海海洋大学, 2013.]
- [15] Wu R Y, Gong Q F, Fang H, et al. The antimicrobial activities of 153 kinds of Chinese herbal medicines against the pathogen of *Streptococcus* from tilapia *in vitro*[J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2013, 41(1): 25–32.[吴颖瑞, 龚庆芳, 方宏, 等. 153 种中草药对罗非鱼无乳链球菌和海豚链球菌的抑制活性研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2013, 41(1): 25–32.]

- [16] Rattanachaikunsopon P, Phumkhachorn P. Prophylactic effect of *Andrographis paniculata* extracts against *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. J Biosci Bioeng, 2009, 107(5): 579–582.
- [17] Wei X S, Lin Y, Yang H Z, et al. Prevalence and control of Guangxi tilapia *Streptococcus* disease [J]. Guangxi Journal of Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2013, 29(1): 57–60. [韦现色, 林勇, 杨慧赞, 等. 广西罗非鱼链球菌病的流行及防治 [J]. 广西畜牧兽医, 2013, 29(1): 57–60.]
- [18] Chen H. Preparation and immunological efficacy on the inactivated vaccine of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia [D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2012. [陈贺. 罗非鱼源无乳链球菌灭活疫苗的研制及其免疫效果的研究 [D]. 湛江: 广东海洋大学, 2012.]
- [19] Chen X, Ke X L, Lu M X, et al. Prokaryotic expression and immunogenicity analysis of LrrG protein of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia [J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(5): 713–721. [陈雪, 可小丽, 卢迈新, 等. 罗非鱼无乳链球菌 LrrG 蛋白的原核表达及免疫原性分析 [J]. 水产学报, 2014, 38(5): 713–721.]
- [20] Wu N, Guo J, Xiong L, et al. Research progress on vaccine of streptococcosis in tilapia [J]. South China Fisheries Science, 2013, 9(6): 90–96. [吴南, 郭佳, 熊丽, 等. 罗非鱼链球菌病疫苗的研究进展 [J]. 南方水产科学, 2013, 9(6): 90–96.]
- [21] Zhou H P, Li Z J, Yang Y Y, et al. Antagonistic action of Lactobacillaceae on pathogen *Vibrio* sp. [J]. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 2006, 25(3): 388–395. [周海平, 李卓佳, 杨莺莺, 等. 乳酸杆菌 LH 对几种水产养殖病原弧菌的抑制作用 [J]. 台湾海峡, 2006, 25(3): 388–395.]
- [22] Cao H P. Antibacterial mechanism study on *Bacillus amylo-liquefaciens* antagonistic against *Aeromonas hydrophila* and safety evaluation on its microcapsules [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013. [曹海鹏. 抗嗜水气单胞菌解淀粉芽孢杆菌的抗菌机理研究及其微胶囊制剂的安全性评价 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2013.]
- [23] Guo G J, Qin Y X, Chen Q, et al. Screening of antagonistic bacteria against pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* of *Pseudosciaena crocea* [J]. ACTA Oceanologica Sinica, 2008, 30(1): 127–134. [郭国军, 覃映雪, 陈强, 等. 大黄鱼病原副溶血弧菌拮抗菌的筛选 [J]. 海洋学报: 中文版, 2008, 30(1): 127–134.]
- [24] Jiang H F, Liu X L, Chang Y Q, et al. Selection of potential probiotics from abalone intestinal and their effects on growth of juvenile small abalone *Haliotis discus hannai* [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2013, 44(2): 482–487. [姜海峰, 刘小林, 常亚青, 等. 皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*) 肠道潜在益生菌的筛选及对幼鲍生长的影响 [J]. 海洋与湖沼, 2013, 44(2): 482–487.]
- [25] Sun L S, Zhang W, Wu Y B, et al. Inhibition of *Aeromonas* growth by two *Bacillus* strains *in vitro* and *in vivo* [J]. Fisheries Science, 2011, 30(5): 265–268. [孙龙生, 张玮, 吴玉波, 等. 两种芽孢杆菌体外体内拮抗气单胞菌的试验 [J]. 水产科学, 2011, 30(5): 265–268.]
- [26] Spanggaard B, Huber I, Nielsen J. The probiotic potential against vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout [J]. Environ Microbiol, 2001, 3(12): 755–765.
- [27] Hjelm M, Bergo Ø, Riaza A, et al. Selection and identification of autochthonous potential probiotic bacteria from turbot larvae (*Scophthalmus maximus*) rearing units [J]. Syst Appl Microbiol, 2004, 27: 360–371.
- [28] Wang J, Feng Y H, Cai L S, et al. Screening and identification of vibrio-antagonistic bacteria from the gastrointestinal tract of *Pseudosciaena crocea* [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2012, 41(5): 707–713. [王娟, 封永辉, 蔡立胜, 等. 来自大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 肠道的弧菌拮抗菌的筛选与鉴定 [J]. 海洋与湖沼, 2012, 41(5): 707–713.]
- [29] Liu Y N, Xi B W, Liang L G, et al. Identification and antagonistic properties of an antagonistic bacterial strain against pathogenic *Aeromonas hydrophila* [J]. Journal of Hydroecology, 2014, 35(3): 82–87. [刘亚楠, 习丙文, 梁利国, 等. 1 株嗜水气单胞菌的拮抗菌鉴定及其特性研究 [J]. 水生生态学杂志, 2014, 35(3): 82–87.]
- [30] Zhou J M, Wu Z Z, Zeng L B, et al. Selection and characterization of pathogen antagonized probiotics from intestinal tract of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) [J]. ACTA Hydrobiologica Sinica, 2012, 36(1): 78–84. [周金敏, 吴志新, 曾令兵, 等. 黄颡鱼肠道病原拮抗性芽孢杆菌的筛选与特性研究 [J]. 水生生物学报, 2012, 36(1): 78–84.]
- [31] Zhao G J. The screening of antagonistic bacteria and its antagonism on the adhesion of *Streptococcus agalactiae* to the mucus of tilapia [D]. Haikou: Hainan University, 2014. [赵光军. 拮抗菌的筛选及其对无乳链球菌黏附罗非鱼黏液的拮抗作用研究 [D]. 海口: 海南大学, 2014.]
- [32] He M Q, Ni X Q. Animal microecological research, development and application in China [J]. Feed China, 2002, (21): 1–8. [何明清, 倪学勤. 我国动物微生态制剂研究、开发和应用动态 [J]. 饲料广角, 2002, (21): 1–8.]
- [33] Taylor J M W, Sutherland A D, Aidoo K E. Heat stable toxin production by strains of *Bacillus cereus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus simplex* and *Bacillus licheniformis* [J]. FEMS Microbiol Lett, 2005, 242(2): 313–317.
- [34] Tan A P, Zhao F, Jiang L, et al. Isolation and identification

- of *Bacillus cereus* from *Trionyx sinensis*[J]. Guangdong Agricultural Science, 2011, 38(20): 115–119.[谭爱萍, 赵飞, 姜兰, 等. 中华鳖致病性蜡样芽孢杆菌的分离鉴定与特性分析[J]. 广东农业科学, 2011, 38(20): 115–119.]
- [35] Cheng Y, Huang K, Huang X Y, et al. Effects of dietary *Bacillus subtilis* on growth performance, immunity and

anti-oxidation function of juvenile genetic improvement of farmed tilapia(GIFT, *Oreochromis niloticus*)[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2014(6): 1503–1512.[程远, 黄凯, 黄秀芸, 等. 饲料中添加枯草芽孢杆菌对吉富罗非鱼幼鱼生长性能、免疫力和抗氧化功能的影响[J]. 动物营养学报, 2014(6): 1503–1512.]

Identification of a denitrifying *Bacillus* strain with an antagonistic effect on *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia

LIU Guanbin^{1,2}, WANG Miao¹, LU Maixin¹, KE Xiaoli¹, LIU Zhigang¹, ZHU Huaping¹, GAO Fengying¹, CAO Jianmeng¹

1. Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fishery Resource Application & Cultivation, Ministry of Agriculture; Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Guangzhou 510380, China;
2. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: We isolated and screened aerobic denitrifying *Bacillus* stains with antagonistic effects on *Streptococcus agalactiae* from the intestinal contents of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Antagonistic ability was detected using morphological, physiological and biochemical characteristics, and 16S rRNA gene sequencing. Optimal growth conditions and the ability to hydrolyze starch and protein were tested, and drug sensitivity and safety tests were performed. We isolated a strain called NY 5 that was identified as *Bacillus cereus*. A total of 50 mg/L nitrite-nitrogen was removed completely within 12 hours after inoculating 1% NY 5 bacterial liquid on denitrification performance testing medium. NY 5 had antagonistic effects on 21 strains of *S. agalactiae* preserved in our laboratory from different sources. The mean diameter of the inhibition zone was (26.67±3.00) mm. NY 5 grew well at temperatures of 25–40°C, salinities of 0–40, and pH values of 5–9. NY 5 hydrolyzed casein and starch. NY 5 was sensitive to most of the antibiotics tested but was resistant to nine antibiotics such as Penicillin G, maddie mycin, and cefazolin, etc. Tilapia with mean body weight of (6.0 ± 1.1) g did not die or show any symptoms after exposure to 2.0×10^7 CFU/mL NY 5 bacteria in the water or after injection with 200 µL of 2.0×10^6 CFU/mL NY 5. These results suggest that the NY 5 strain is *B. cereus*. This study provides a useful probiotic source to effectively inhibit growth of *S. agalactiae* isolated from tilapia.

Key words: tilapia; *Streptococcus agalactiae*; *Bacillus*; antagonistic; denitrification

Corresponding author: LU Maixin. E-mail: mx-lu@163.com