

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.17383

刺参养殖池塘一株贝莱斯芽孢杆菌的分离及其生理特性

王金燕^{1,2}, 李彬², 王印庚², 廖梅杰², 荣小军², 张正², 牛盈盈³, 宁鲁光³

1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266071;

3. 山东海跃水产科技有限公司, 山东 东营 257500

摘要: 2014 年 5 月, 在东营的刺参(*Apostichopus japonicus*)养殖池塘环境中对水样和底泥样品进行了细菌分离和益生菌的筛选, 共获得 66 株可培养细菌。以刺参“腐皮综合征”主要致病菌为指示菌进行拮抗作用实验, 使用选择培养基对菌株的产淀粉酶和蛋白酶能力进行测定, 筛选获得一株潜在益生菌株——DY-6, 并进行了生理生化实验、16S rDNA 基因序列分析、菌株生长特性及其对刺参的安全性研究。结果表明, DY-6 对其指示菌假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas nigrifaciens*)、灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)和溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)均有良好的抑制作用, 抑菌圈直径分别达到 24 mm、22 mm、27 mm 和 37 mm, 对淀粉和蛋白培养基的水解直径分别为 28 mm 和 20 mm。利用该菌对刺参进行高浓度胁迫实验测试其安全性, 实验期间浸浴组和投喂组刺参状态良好, 没有发病和死亡现象。利用细菌生理生化和 16S rDNA 基因序列分析表明, DY-6 与贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis* CP015911)的相似性为 99%。因此, 初步鉴定该菌株为贝莱斯芽孢杆菌。同时, 将该菌株与商品化微生态制剂产品中分离的 4 株益生菌进行了比较, DY-6 在温度 20~35℃、盐度 0~35 范围内生长较快, 优于上述 4 株菌, 4 h 进入对数生长期, 10 h 达到生长高峰。筛选的贝莱斯芽孢杆菌具有良好的抑菌能力, 生长速度快, 并且具有广温广盐的优点, 不仅能够降低疾病发生率, 还可更好地适应黄河口地区夏季水温偏高、盐度波动大的特点, 由此具有良好的益生菌商业化开发潜力。

关键词: 黄河口; 刺参; 贝莱斯芽孢杆菌; 抑菌; 生理特性; 安全性

中图分类号: S947

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2018)03-0567-09

仿刺参(刺参)(*Apostichopus japonicus*)属棘皮动物门(Echinodermata), 海参纲(Holothuroidea), 楯手目(Aspidochirotida), 刺参科(Stichopodidae), 仿刺参属, 因其显著的营养价值和保健作用, 备受青睐, 是中国海水养殖业中单品种产值最高的种类之一。黄河口地区属黄河入海口, 该地域近海海域盐度受黄河淡水径流影响大, 而且夏季高温、雨水较多, 海水水温和盐度波动较大, 海域没有刺参的自然分布。自 2003 年, 研究人员利用沿岸的盐碱地进行了刺参池塘养殖试验, 并于 2004

年获得成功^[1-2]。随后, 刺参养殖在该地区迅速发展, 并在黄河口盐碱地区域修建了大量刺参标准化养殖池塘, 实现了“东参西养”。目前, 仅东营市刺参养殖面积就达 1.7 万 hm², 养殖产量 1.2 万 t^[3], 对黄河口地区刺参养殖起到了示范带动作用。

池塘养殖过程中, 由于刺参放养密度大、养殖工艺落后、池塘清淤周期长等问题, 导致池塘中的生态环境失衡, 一些病原菌会借机迅速繁殖, 造成刺参疾病频发。刺参主要的疾病为“腐皮综合征”, 研究表明, 该病的主要致病菌为假交替单胞

收稿日期: 2017-10-17; 修订日期: 2017-12-06.

基金项目: 山东省农业良种工程重大课题; 山东省自主创新与成果转化专项(2014ZZCX06205); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(20603022016008).

作者简介: 王金燕(1991-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为微生物生态学. E-mail: hileon12@163.com

通信作者: 王印庚, 研究员. E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn

菌(*Pseudoalteromonas nigrifaciens*)及灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)等弧菌^[4-8]。目前,常用的处理办法是使用抗生素和消毒剂。然而,池塘养殖过程中使用抗生素不仅增加养殖成本,而且会带来池塘生态环境破坏、海域污染、细菌耐药、食品安全等一系列问题^[9-14]。水产养殖动物病害发生与生态环境恶化或环境剧烈变化也密切相关,据统计,85%以上的养殖病害是因水环境条件恶化引起^[15-20]。益生菌能够改善水质,抑制有害菌的生长,保持微生态平衡,利用益生菌剂改良池塘养殖环境、拮抗病原菌是池塘病害防控行之有效的有效手段之一^[21-25]。

目前,黄河口地区使用的多数益生菌菌种来源于其他地域环境或动物肠道内,无法适应该地区低盐、温度变化大等特殊养殖环境,生长效果差,使用不当还有可能破坏本地域环境中的菌群结构,并且市场缺少拮抗刺参重要病原菌的微生态制剂。故筛选适宜黄河口地区的益生菌对该地域刺参养殖有重要的意义。本研究根据黄海口地区环境特点,从池塘养殖环境中筛选产酶能力强、拮抗病原菌、生长特性良好的益生菌株,为黄河口地区刺参池塘健康养殖提供优良的益生菌株和应用技术参数。

1 材料和方法

1.1 池塘条件及样品的采集和预处理

本实验在山东省东营市某刺参养殖场进行,池塘面积约 4.7 hm²,水深 1~1.8 m。池内附着基由遮阳网造礁而成,刺参密度为 21 万头/hm²,规格 1~2 g/头。

采样时间为 2014 年 5 月,水温 22℃,盐度 30;利用调查船驶到池塘中预先标记好的采样点,用采泥器分别采集两个池塘表层底泥混合,4℃保存。

1.2 培养基

TSB 培养基:胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)30 g, NaCl 15 g,琼脂 15 g, H₂O 1000 mL, pH7.4~7.6。

淀粉培养基:营养琼脂 33 g,淀粉 2 g, NaCl 15 g, H₂O 1000 mL。

酪蛋白琼脂培养基:酪蛋白琼脂 35 g, NaCl

15 g, H₂O 1000 mL。

培养基在 121℃, 20 min 灭菌。

1.3 细菌培养与分离

称取底泥样品 1 g,使用无菌海水进行稀释,混合均匀,收集上清液,弃去沉淀。用无菌海水将上清液体进行梯度稀释,每个浓度梯度取 100 μL 液体涂布 3 个平行平板,28℃倒置培养 24~48 h,选择合适的稀释浓度的平板进行细菌计数,并根据菌落大小、颜色、边缘光滑程度等形态学特征对细菌进行分离、纯化。纯化后的菌株置于保种液中,-80℃保存。

1.4 拮抗菌的筛选

以刺参“腐皮综合征”主要致病菌假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas nigrifaciens*)及灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)为指示菌。用接种环刮取少量指示菌,使用灭菌的 1.5%生理盐水稀释后涂布于牛津杯打孔的平板上。取活化 24 h 的分离菌株,稀释后吸取 100 μL 置于小孔内,在 28℃培养 24~48 h 后,观察小孔周围是否出现明显的抑菌圈,测量抑菌圈的直径。

1.5 产酶能力实验

选取抑菌作用较好的菌株进行试验。用淀粉培养基和酪蛋白琼脂培养基制作牛津杯平板。将菌株活化 24 h,稀释后吸取 100 μL 置于小孔内,在 28℃培养 24~48 h 后观察小孔周围是否出现明显的水解圈,并测量水解圈的直径。

1.6 菌株对刺参生长的影响及安全性评价

实验用刺参来自青岛某养殖场,刺参规格平均 20 g/头。刺参在暂养 3 d 后随机分组,每组 20 头,试验水槽有效容积为 35 L,每个水槽定量加水 30 L。实验分浸浴组和投喂组以及空白对照组,其中浸浴组利用麦氏比浊法将浓度梯度设置为 1×10⁹ CFU/mL、1×10⁸ CFU/mL 和 1×10⁷ CFU/mL,投喂组将所筛选菌株与刺参饲料混合将菌株浓度控制为 1×10¹⁰ CFU/g、1×10⁹ CFU/g 和 1×10⁸ CFU/g;每个浓度梯度设置 3 个平行组,同时设置空白对照组。

实验进行 30 d,实验期间水温 14~18℃,盐度 30,每天饵料按照刺参重量的 1%投喂。保持适量

充气, 每天吸底换水, 日换水量为总水量的 1/5, 换水后在水槽中添加相应浓度菌液。记录 30 d 试验中刺参的发病症状和死亡等情况。

1.7 菌株的生理生化鉴定

参照麦氏比浊法制备 0.5 麦氏比浊的菌悬液, 以细菌微量检定管进行生理生化指标的测定。参照《伯杰氏细菌学鉴定手册》^[26]和《常见细菌系统鉴定手册》^[27]进行归类判定。

1.8 菌株的 16S rDNA 基因序列分析

采用北京天根生物细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取所纯化细菌的 DNA, 利用细菌 16S rDNA 基因通用引物对细菌总 DNA 的相应序列进行扩增, 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检验后, 送至上海生物工程有限公司测序。应用 BLAST 软件将所得序列与 GenBank 中的有关序列进行同源性分析, 构建其系统发育树。

1.9 菌株的生长特性研究

本研究对比分析了筛选菌株与商品化微生态制剂产品中分离的 4 株菌株的生长特性, 分别为地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。

1.9.1 菌株的生长温度 将筛选菌株与其他 4 株菌株接种于已灭菌的 200 mL TSB 液体培养基中, 置于 5℃、10℃、15℃、20℃、25℃、30℃、35℃、40℃、45℃细菌摇床培养箱中, 180 r/min 条件下恒温培养 24 h。取菌悬液用灭菌生理盐水进行梯度稀释涂布, 培养计数。

1.9.2 初始 pH 对细菌生长的影响 调节液体培

养基 pH 为 3~9。将筛选菌株与其他 4 株菌株接种于不同 pH 的 200 mL TSB 液体培养基中。180 r/min 条件下恒温培养 24 h。取菌悬液用灭菌生理盐水进行梯度稀释涂布, 培养计数。

1.9.3 盐度对细菌生长的影响 分别配制盐度 0、5、10、15……65、70 的 200 mL TSB 液体培养基, 将筛选菌株与其他 4 株菌株接种于已灭菌的液体培养基中。180 r/min 条件下恒温培养 24 h。取菌悬液用灭菌生理盐水进行梯度稀释涂布, 培养计数。

1.9.4 绘制菌株生长曲线 将所筛菌株与其他 4 株菌株接种于已灭菌的液体培养基中, 根据其最适培养温度 180 r/min 条件下恒温培养。培养过程中每隔 2 h, 取菌悬液用灭菌生理盐水进行梯度稀释涂布, 培养计数, 测定其生长曲线。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌的筛选

对底泥样品中细菌进行培养、分离和纯化, 共获得 66 株菌, 分别编号为 DY-1、DY-2、DY-3……DY-66。通过对病原菌的拮抗实验筛选出 1 株具有拮抗作用的菌株 DY-6, 该菌株对假交替单孢菌、灿烂弧菌、副溶血弧菌、溶藻弧菌均有抑制作用, 抑菌直径分别为 24 mm, 22 mm, 27 mm, 37 mm(图 1, 表 1)。细菌在显微镜下呈直杆状, 两端呈三角形突起, 单个细胞 0.7~0.8×2~2.5 μm, 革兰氏染色阳性, 着色均匀, 周生鞭毛(图 2、图 3)。菌落粗糙有褶皱, 不透明, 扩张, 污白色或淡黄色。

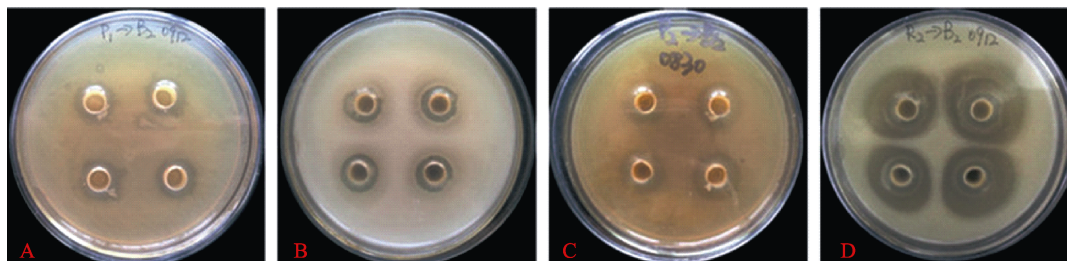


图 1 候选菌株 DY-6 对病原菌的抑制作用

A, B, C, D 指示菌分别为假交替单孢菌、灿烂弧菌、副溶血弧菌和溶藻弧菌。

Fig. 1 The antagonistic activities of candidate strain DY-6

A, B, C, D are *Pseudoalteromonas nigrifaciens*, *Vibrio splendidus*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus*, respectively.

表 1 菌株 DY-6 对病原菌的抑制作用
Tab. 1 The antagonistic activities of candidate strain DY-6

菌株名称 strain name	抑菌圈直径/mm diameter of inhibition zone			
	假交替单胞菌 <i>Pseudoalteromonas nigrifaciens</i>	灿烂弧菌 <i>Vibrio splendidus</i>	副溶血弧菌 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	溶藻弧菌 <i>Vibrio alginolyticus</i>
DY-6	24	22	27	37

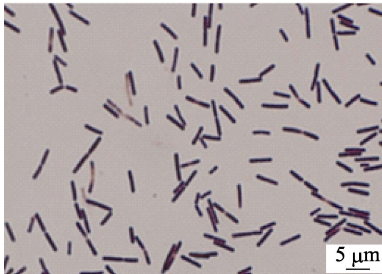


图 2 候选菌株 DY-6 的革兰氏染色
Fig. 2 The Gram's staining of candidate strain DY-6

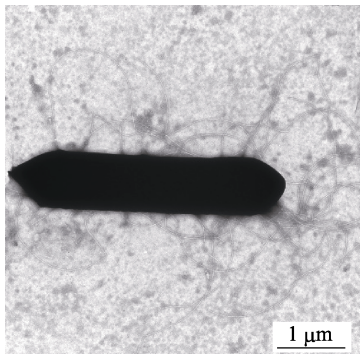


图 3 候选菌株 DY-6 的透射电镜
Fig. 3 The TEM photograph of candidate strain DY-6

2.2 产酶能力实验

试验对菌株 DY-6 进行了产蛋白酶和淀粉酶

能力进行测试,产蛋白酶、淀粉酶的产酶水解圈直径分别为 28 mm、20 mm,表明菌株 DY-6 均具有较好的产蛋白酶和淀粉酶能力。

2.3 安全性实验

通过细菌高浓度胁迫实验测试筛选菌株 DY-6 对刺参的安全性,浸浴浓度为 1.0×10^7 CFU/mL、 1.0×10^8 CFU/mL 条件下,在整个实验过程中刺参健康,摄食正常,活力良好,无排脏和死亡现象;浸浴组 1.0×10^9 CFU/mL 在胁迫 1 d 后有 1 头刺参出现排脏。投喂细菌浓度 1×10^8 CFU/g 的饲料组,在整个实验过程中刺参健康,摄食正常,活力良好,无排脏和死亡现象,投喂细菌浓度 1×10^9 CFU/g、 1×10^{10} CFU/g 的饲料组,在胁迫 1 d 后出现排脏现象,排脏数量分别为 1 头、2 头,无死亡现象,其他刺参均健康(表 2)。

2.4 生理生化鉴定

经过对菌株 DY-6 进行生理生化特征检测,结果显示,该菌能分解利用葡萄糖、甘露醇、阿拉伯糖;水解鸟氨酸脱羧酶、赖氨酸脱羧酶、精氨酸脱羧酶、明胶;利用西蒙氏枸橼酸盐;主要生理生化特征见表 3。参照《伯杰氏细菌学鉴定手册》

表 2 菌株 DY-6 的安全性试验结果
Tab. 2 Safety testing results of the strain DY-6

组别 group	浓度/(CFU/mL) concentration	胁迫方式 mode of coercion	排脏数量/头 evisceration number	死亡数量/头 dead number
DY-6	10^7	浸浴 dipping bath	0	0
	10^8	浸浴 dipping bath	0	0
	10^9	浸浴 dipping bath	1	0
对照组 control	0	—	0	0

组别 group	浓度/(CFU/g) concentration	胁迫方式 mode of coercion	排脏数量/头 evisceration number	死亡数量/头 dead number
DY-6	10^8	投喂 feeding	0	0
	10^9	投喂 feeding	1	0
	10^{10}	投喂 feeding	2	0
对照组 control	0	—	0	0

表 3 菌株 DY-6 的生理生化特征
Tab. 3 Physiological and biochemical characteristics of strain DY-6

生化项目 biochemical item	结果 result	生化项目 biochemical item	结果 result
肌醇 inositol	—	蜜二糖 melibiose	—
硫化氢产生 hydrothion produce	—	ONPG	—
氧化酶试纸 oxidase strips	—	尿素酶 urease	—
丙二酸盐 malonate	—	木糖 xylose	—
葡萄糖 glucose	+	鸟氨酸脱羧酶 ornithine decarboxylase	+
蔗糖 sucrose	—	赖氨酸脱羧酶 lysine decarboxylase	+
甘露醇 mannitol	+	精氨酸双水解酶 arginine dihydrolase	+
阿拉伯糖 arabionse	+	kovacs 试剂 kovacs reagent	—
乳糖 lactose	—	3%NaCl MR-VP	—
山梨醇 sorbitol	—	明胶 3%NaCl gelatine	+
苦杏仁苷 amygdalin	—	西蒙氏枸橼酸盐 Simmons citrate	+
鼠李糖 rhamnose	—	半固体琼脂 semi-solid agar	—

注: +表示阳性, —表示阴性.
Note: + represents positive, —represents feminine

和《常见细菌系统鉴定手册》进行归类判定,初步鉴定筛选菌株属于芽孢杆菌科。

2.5 16SrDNA 基因序列分析以及系统发育树的构建

采用通用引物对菌株 DY-6 的 PCR 扩增产物进行序列测定, 对所获得的测序结果在 NCBI 数据库进行序列相似性比对分析, 系统发育树如图 4 所示。结果表明, 本研究筛选的菌株 DY-6 属于芽孢杆菌科(Bacillaceae)的芽孢杆菌属(Bacillus), 其与贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis* CP015911)的相似性为 99%。

2.6 菌株的生长特性

2.6.1 菌株最适生长温度 分析对比了菌株 DY-6 与商品化微生态制剂产品中分离的 4 株菌在不同温度下的生长情况。如图 5 所示, 5 株菌在 0~45℃ 温度范围内均可生长, 在 0~15℃ 范围内生长速度

较慢, 生长差异较小, DY-6 在 15℃ 以后表现出了明显的生长优势, 30℃ 时生长速度最快, 在 20~35℃ 范围内其生长优于其他 4 株菌。

2.6.2 不同 pH 条件对细菌生长的影响 菌株 DY-6 与商品化微生态制剂产品中分离的 4 株菌在不同 pH 下的生长情况如图 6 所示。5 株菌在 pH 3 时不能生长, pH 4~9 范围内均能生长, 其生长情况差异不显著, pH 7 时生长速度最快。

2.6.3 盐度对细菌生长的影响 筛选菌株 DY-6 与商品化微生态制剂产品中分离的 4 株菌在不同盐度下的生长情况如图 7 所示。5 株菌在盐度为 0~70 范围内均能生长, 盐度高于 35 时生长速度趋向缓慢。菌株 DY-6 在盐度 5~20 时生长速度呈上升趋势, 生长速度优于其他 4 个菌株; DY-6 在 20~35 时生长速度呈下降趋势, 但与其他 4 株菌相比仍表现出较好的生长优势。

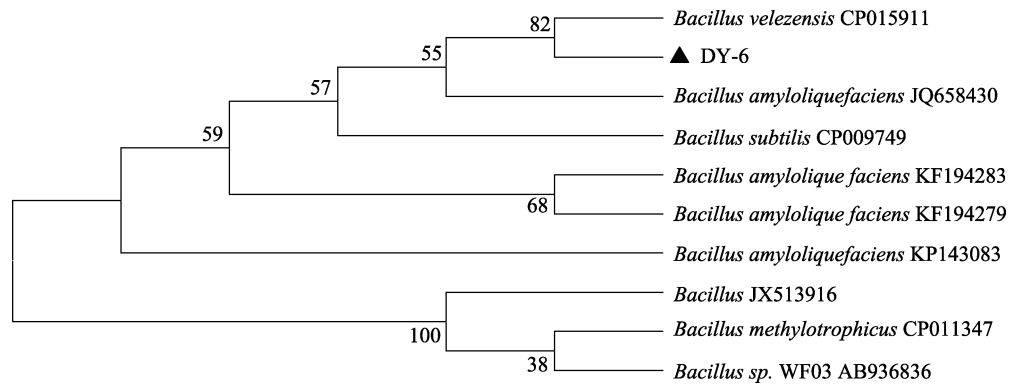


图 4 基于 16S rDNA 序列的菌株 DY-6 系统发育树
Fig. 4 The clustering results of the strain DY-6 based on 16S rDNA gene sequence

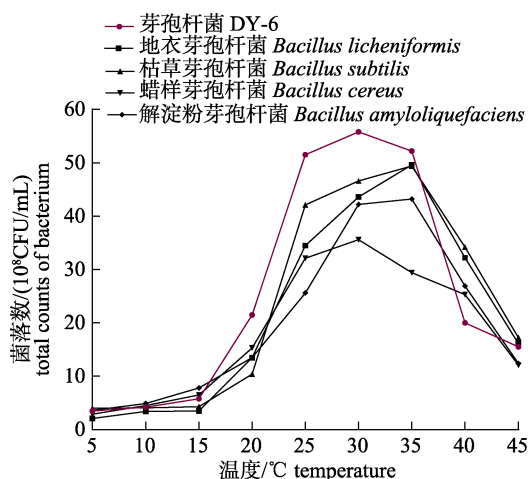


图 5 不同温度下菌株 DY-6 与 4 株芽孢杆菌的生长情况

Fig. 5 Growth of DY-6 and other 4 *Bacillus* bacteria strains under different temperature

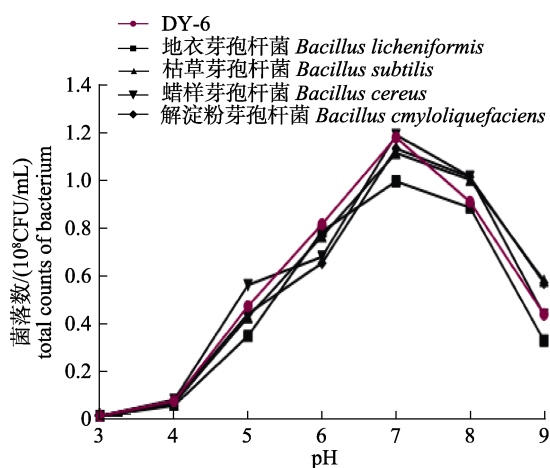


图 6 不同 pH 对菌株 DY-6 与 4 株芽孢杆菌生长的影响

Fig. 6 Effect of different pH on DY-6 and other 4 *Bacillus* bacteria strains

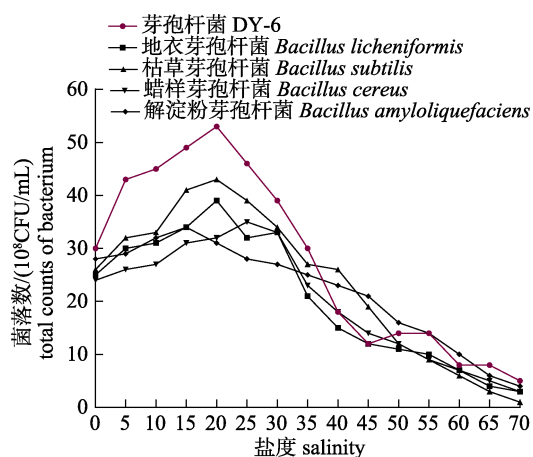


图 7 不同盐度下菌株 DY-6 与 4 株芽孢杆菌的生长情况

Fig. 7 Growth of DY-6 and other 4 *Bacillus* bacteria strains under different salinity

2.6.4 生长曲线 菌株 DY-6 与其他 4 株菌的生长曲线如图 8 所示。结果显示, DY-6 培养 4 h 后进入对数生长期, 分别在 10~12 h 时达到生长高峰, 经过一段时间生长速度下降, 到 18 h 时进入稳定期。DY-6 的对数增长期(4~10 h)生长速度均高于其他 4 株菌, 10 h 时达到生长高峰期, 比其他 4 株菌提前了 2 h, 且高峰期生长速度高于其他 4 株菌。

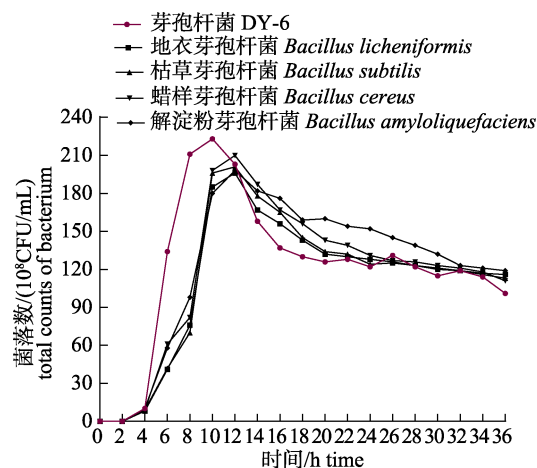


图 8 不同时间菌株 DY-6 与 4 株芽孢杆菌的生长曲线

Fig. 8 Growth curve of the DY-6 and other 4 *Bacillus* bacteria strains

3 讨论

本实验在黄河口地区刺参养殖池塘中筛选获得的一株菌株 DY-6, 初步确定为贝莱斯芽孢杆菌。贝莱斯芽孢杆菌是 2005 年由 Ruiz-García 等^[28]新命名的芽孢杆菌种, 目前在植物及哺乳动物细菌、真菌病害防控中均有报道。柴玉龙等^[29]从兔盲肠中筛选得到一株贝莱斯芽孢杆菌 Tu-569 (*Bacillus velezensis* Tu-569), 其胞外产物能够抑制大肠埃希菌活性, 在畜牧业、养殖业及食品领域具有一定的应用价值; Fernandez 等^[30]发现, 贝莱斯芽孢杆菌 AH2(*Bacillus velezensis* AH2)菌株对稻瘟病菌、腐霉菌、疫霉菌、丝核菌、核盘菌、青霉菌、链格孢菌等均有很强抑制作用。然而贝莱斯芽孢杆菌在水产养殖中鲜有报道, 本研究实验结果表明, 筛选的贝莱斯芽孢杆菌对刺参主要致病菌具有较好的拮抗作用, 有助于降低池塘养殖刺参疾病的发生率, 在水产养殖中防控病害

方面具有较大的应用潜力。该菌在温度 20~35℃、盐度 0~35 范围内其生长较快, 优于商品化微生态制剂产品中分离的 4 株菌, 4 h 进入对数生长期, 10 h 达到生长高峰, 具有生长速度快、广温广盐的优点, 且属黄河口地区的土著分离菌株, 更适于黄河口地区气候特点和池塘环境。

动物肠道内的益生菌可以通过分泌胞外酶参与宿主的消化和免疫过程, 德黑兰大学 Ziaei-Nijad 等^[31]在对虾池中直接添加芽孢杆菌或者用芽孢杆菌强化卤虫投喂对虾, 结果发现对虾肠道的淀粉酶、总蛋白酶、脂肪酶相对于对照组均有显著提高, 张德强等^[32]在饲料中添加不同浓度的菌液, 7 d 后发现刺参的免疫酶活性和消化酶活性得到有效提高, 侯超等^[33]在刺参基础饲料中添加枯草芽孢杆菌微生态制剂, 试验结束时刺参肠道内酶活性均高于对照组, 表明饲料中添加微生态制剂可以提高肠道酶活力。本研究所筛选菌株具有较好的产淀粉酶和蛋白酶能力, 说明该菌株具有提高刺参肠道中淀粉酶和蛋白酶活力的潜力, 能够促进刺参对营养物质的吸收效率, 从而有益于刺参生长。

尽管微生态制剂在水产上具有良好的应用, 但是 Wang 等^[34]提出, 马来西亚发现的对虾细菌性白斑病是由枯草芽孢杆菌引起的, 而 Velmurugan 等^[35]发现, 印度地区的细菌性白斑病病原是蜡样芽孢杆菌。因此, 本研究通过高浓度胁迫实验确定了贝莱斯芽孢杆菌的安全性。整个实验过程中, 10⁸ CFU/mL 浸浴组和 10⁸ CFU/g 投喂组, 刺参健康, 活力良好, 未发现病症和死亡现象, 说明该菌株在常规用量内对刺参是安全的。

综上所述, 贝莱斯芽孢杆菌 DY-6 具有对外界适应能力强、生长速度快、抑菌能力强, 且该菌株对刺参是安全的。另外, 笔者近期相继的研究表明, 该菌株对养殖池水具有良好的净化作用(另文报道); 综合考虑该菌的生长特性及安全性, 说明 DY-6 可作为潜在益生菌, 有望发展成为微生态制剂产品。

参考文献:

[1] Liu Q. Characteristics and controlling of water quality during sea cucumber cultivation in the Yellow River delta[J]. Hebei

- Fisheries, 2015(3): 11-13. [刘强. 黄河三角洲地区刺参养殖水质变化特点与调控[J]. 河北渔业, 2015(3): 11-13.]
- [2] Zuo M, Zhang S H, Sui K G, et al. *Penaeus japonicus* experiment in the Yellow River delta region of the artificial ginseng breeding pond[J]. Fisheries Science & Technology Information, 2014, 41(5): 219-222. [左明, 张士华, 隋凯港, 等. 黄河三角洲地区仿刺参养殖池中混养日本对虾的试验[J]. 水产科技情报, 2014, 41(5): 219-222.]
- [3] China Fishery Statistical Yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2016: 28-62. [中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2016: 28-62.]
- [4] Su M X. Microbiological study and quorum sensing research of reared *Stichopus japonicus* suffers from a kind of skin ulceration disease[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2008. [苏明霞. 养殖刺参腐皮综合症病灶处七株优势菌生理生化特性及其群体感应信号分子活性检测[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008.]
- [5] Zhao Y C, Zhang W, Xu W, et al. Effects of potential probiotic *Bacillus subtilis* T13 on growth, immunity and disease resistance against *Vibrio splendidus* infection in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 32(5): 750-755.
- [6] Deng H, He C, Zhou Z, et al. Isolation and pathogenicity of pathogens from skin ulceration disease and viscera ejection syndrome of the sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. Aquaculture, 2009, 287(1-2): 18-27.
- [7] Fang B. Epidemiological and antibiological studies on the skin ulcerative syndrome of cultured sea cucumber *Apostichopus japonicus* and analysis of the pathogens reservoir[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2006. [方波. 养殖刺参(*Apostichopus japonicus*)“腐皮综合征”病原学及其感染源的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2006.]
- [8] Samueisen O B. Degradation of oxytetracycline in seawater at two different temperatures and light intensities, and persistence of oxyteracycline in the sediment from a fish farm[J]. Aquaculture, 1989, 83(1-2): 7-16.
- [9] Bogaard A E V D. Antimicrobial resistance—relation to human and animal exposure to antibiotics[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1997, 40(3): 453.
- [10] Pflumm M. Persistence may pay off for antibiotics innovators[J]. Nature Medicine, 2011, 17(6): 652.
- [11] Luzhetskyy A, Pelzer S, Bechthold A. The future of natural products as a source of new antibiotics[J]. Current Opinion in Investigational Drugs, 2007, 8(8): 608-613.
- [12] Ye B X, Zhang L. Analysis of the pollution status and health risk of antibiotics in water environment and drinking water[J]. Journal of Environment and Health, 2015, 32(2): 173-178. [叶必雄, 张岚. 环境水体及饮用水中抗生素污染现状与健康影响分析[J]. 环境与健康杂志, 2015, 32(2): 173-178.]
- [13] Keen P L, Montforts M H M. Antimicrobial Resistance in

- the Environment[M]. John Wiley & Sons, Inc. 2011: 325-335.
- [14] Zou J B, Gao G B, Jiang H L, et al. Causes and prevention of sea cucumber diseases: sustainable aquaculture[J]. Fisheries Science, 2006, 25(1): 56-57. [邹积波, 高广斌, 姜洪亮, 等. 分析刺参养殖发病原因、研讨对策, 走可持续发展之路[J]. 水产科学, 2006, 25(1): 56-57.]
- [15] Wang Y G, Rong X J, Zhang C Y, et al. Main diseases of cultured *Apostichopus japonicus*: prevention and treatment[J]. Marine Sciences, 2005, 29(3): 1-7. [王印庚, 荣小军, 张春云, 等. 养殖海参主要疾病及防治技术[J]. 海洋科学, 2005, 29(3): 1-7.]
- [16] Zhao Y C, Yuan L, Wan J, et al. Effects of potential probiotic *Bacillus cereus* EN25 on growth, immunity and disease resistance of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 49: 237-242.
- [17] Sun S F. Study on the major bacterial diseases of cultured sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) during larval stages[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2006. [孙素凤. 养殖刺参(*Apostichopus japonicus*)苗期细菌性疾病及其病原学初步研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2006.]
- [18] Rong X J. Epidemiological and histopathological studies of main diseases of cultured sea cucumber and its parasitic etiology[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2005. [荣小军. 养殖刺参(*Apostichopus japonicus*)主要疾病的流行病学和组织病理学研究以及寄生虫病原学初探[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2005.]
- [19] Wang Y G, Rong X J, Zhang C Y, et al. The preliminary study and prevention of the “skin ulcer syndrome” in sea cucumber[J]. Shandong Fisheries, 2004, 21(5): 44-47. [王印庚, 荣小军, 张春云, 等. 养殖刺参暴发性疾病——“腐皮综合症”的初步研究与防治[J]. 齐鲁渔业, 2004, 21(5): 44-47.]
- [20] Fang C, Ma M Y, Ji H, et al. Alterations of digestive enzyme activities, intestinal morphology and microbiological in juvenile paddlefish, *Polyodon spathula*, fed dietary probiotics[J]. Fish Physiology & Biochemistry, 2015, 41(1): 91-105.
- [21] Liu W D, Su H, Deng L K. Applications of microorganisms in aquaculture[J]. Fisheries Science, 2001, 20(2): 28-31. [刘卫东, 苏浩, 邓立康. 微生物在水产养殖中的应用[J]. 水产科学, 2001, 20(2): 28-31.]
- [22] Hai N V. The use of probiotics in aquaculture[J]. Journal of Applied Microbiology, 2015, 119(4): 917-935.
- [23] Aguilar-Macías O, Ojeda-Ramírez J, Campa-Córdova A, et al. Evaluation of natural and commercial probiotics for improving growth and survival of the pearl oyster, *Pinctada mazatlanica*, during late hatchery and early field culturing[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2010, 41(3): 447-454.
- [24] Irianto A, Austin B. Probiotics in aquaculture[J]. Journal of Fish Diseases, 2002, 25(11): 633-642.
- [25] Tuohy K M, Probert H M, Smejkal C W, et al. Using probiotics and prebiotics to improve gut health[J]. Drug Discovery Today, 2003, 8(15): 692-700.
- [26] Buchanan R E, Gibbons N E. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology[M]. Beijing: Science Press, 1984: 729-731. [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: 729-731.]
- [27] Dong X Z, Cai M Y. Common Bacteria System Identification Manual[M]. Beijing: Science Press, 2001: 45-65. [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: 45-65.]
- [28] Ruiz-García C, Béjar V, Martínez-Checa F, et al. *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, southern Spain[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55(1): 191-195.
- [29] Chai Y L, Shang W, Jiang J P, et al. Identification of probiotics strain Tu-569 from rabbit cecum and property analysis of its extracellular antibacterial product[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2012, 37(11): 821-826, 836. [柴玉龙, 尚伟, 姜军坡, 等. 兔源益生菌 Tu-569 菌株鉴定与其胞外产抑菌物质性质分析[J]. 中国抗生素杂志, 2012, 37(11): 821-826, 836.]
- [30] Fernandez M A I, Villaverde F M J, Casanova R J A, et al. A pure culture of strain AH2 of the *Bacillus velezensis* species and a product for the biological control of phytopathogenic fungi[P]. Europe, 2008, EP2138044A1.
- [31] Ziaei-Nejad S, Rezaei M H, Takami G A, et al. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*[J]. Aquaculture, 2006, 252(2-4): 516-524.
- [32] Zhang D Q, Guan X Y. Growth and probiotic characteristics of *Bacillus subtilis* B2 in sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. Fisheries Science, 2016, 35(3): 234-238. [张德强, 关晓燕. 枯草芽孢杆菌 B2 的生长及其对仿刺参的益生特性[J]. 水产科学, 2016, 35(3): 234-238.]
- [33] Hou C, SIRI G L, Wang Y H, et al. Preparation of *Bacillus subtilis* microbial ecological agent and its application to sea cucumber culture[J]. Industrial Microbiology, 2014, 44(5): 14-18. [侯超, 斯日古楞, 王红英, 等. 枯草芽孢杆菌微生物生态制剂制备及在仿刺参养殖中的应用[J]. 工业微生物, 2014, 44(5): 14-18.]
- [34] Wang Y G, Lee K L, Najiah M, et al. A new bacterial white spot syndrome (BWSS) in cultured tiger shrimp *Penaeus monodon* and its comparison with white spot syndrome (WSS) caused by virus[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2000, 41(1): 9-18.
- [35] Velmurugan S, Palanikumar P, Velayuthani P, et al. Bacterial white patch disease caused by *Bacillus cereus*, a new emerging disease in semi-intensive culture of *Litopenaeus vannamei*[J]. Aquaculture, 2015, 444: 49-54.

Screening and characteristic analysis of *Bacillus velezensis* from sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) ponds

WANG Jinyan^{1,2}, LI Bin², WANG Yingeng², LIAO Meijie², RONG Xiaojun², ZHANG Zheng², NIU Yingying³, NING Luguang³

1. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao 266071, China;

3. Shandong Haiyue Aquatic Science and Technology Co., Ltd, Dongying 257500, China

Abstract: To screen local probiotic strains, 66 cultivable bacterial strains were isolated from water and sediment samples from cultured ponds of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) in Dongying in May 2014. Bacterial antagonistic experiments were conducted using *Pseudoalteromonas nigrifaciens*, *Vibrio splendidus*, *V. parahaemolyticus* and *V. alginolyticus*, which are main pathogenic bacteria of ‘skin ulcer syndrome’ for *A. japonicus*. In addition, selective medium was used to test the amylase production and protease activities of the isolated strains and to isolate a potential probiotic strain, DY-6. Then, its physiological-biochemical experiments and similarity analysis of 16s rDNA sequences as well as the growth characteristics of DY-6 experiments have been conducted. The safety experiment for the sea cucumber was also proceed. The DY-6 strain was successful in inhibiting *P. nigrifaciens*, *V. splendidus*, *V. parahaemolyticus*, and *V. alginolyticus*, as indicated by inhibition zone diameters of 24, 22, 27, and 37 mm, respectively. Meanwhile, the hydrolysis zone diameters of amylase and protease were 28 and 20 mm, respectively. A safety experiment was designed to test the safety of DY-6 for sea cucumber. During the experiment, all sea cucumbers were in good conditions without falling ill. Based on physiological and biochemical experiments and 16s rDNA sequence analysis, strain DY-6 was determined to be 99% similar to *Bacillus velezensis* CP015911 and, therefore, preliminarily identified as *B. velezensis*. When compared to four bacterial strains isolated from commercial probiotic products, DY-6 exhibited superior growth at 20–35 °C and under salinities of 0 to 35. Moreover, DY-6 came into the logarithmic growth phase after 4 h of cultivation and reached growth peak after 10 h. In summary, strain DY-6 exhibited superb inhibition of sea cucumber pathogens, rapid growth, and both euryhalinous and euryhaline features. Therefore, DY-6 could be used to reduce the occurrence of sea cucumber disease and is also suitable for use at high temperatures during summer and in fluctuation salinity levels, as in the Yellow River Estuary. Thus, strain DY-6 has potential for commercial development.

Key words: Yellow River Estuary; *Apostichopus japonicus*; *Bacillus velezensis*; antagonistic experiment; physiological characteristics; biochemical characteristic; safety

Corresponding author: WANG Yingeng. E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn