

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2012.00078

黄颡鱼肠道病原拮抗性芽孢杆菌的筛选与特性研究

周金敏^{1,2} 吴志新^{1,2} 曾令兵¹ 陈孝煊² 杨丽² 赵杨²

(1. 中国水产科学研究院淡水生态与健康养殖重点开放实验室/中国水产科学研究院长江水产研究所, 武汉 430223;

2. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070)

摘要: 采用 80℃ 水浴法从黄颡鱼肠道分离到 65 株芽孢杆菌, 牛津杯法拮抗试验筛选到 3 株抑菌活性很强的菌株, API 50CHB 试剂盒鉴定它们为枯草芽孢杆菌。选取抑菌活性最强的 F14 进行特性研究。结果显示: F14 在 80℃、90℃ 和沸水浴中处理 5min 后的存活率分别为 96.7%、95.3%、52.9%。随时间的延长, F14 在 90℃ 和沸水浴中的存活率均出现了较大幅度的下降。沸水浴处理 10min 时, 其存活率减少至 8.3%。在 pH 3.0—5.0 的范围内, 处理 F14 1h、2h 后的存活率分别在 98%、87% 以上。F14 代谢粗提物具有较强的抑菌作用, 病原性嗜水气单胞菌在粗提物中培养 2h, 细菌数量就开始急剧下降, 至 24h 时已检测不到活的细菌。此外, 喷洒在饲料中的 F14 在室温、4℃ 和 -20℃ 条件下储存, 细菌数量在 4℃ 和 -20℃ 存储 20d 均无显著变化, 仅在室温下存储至第 20 天时显著减少。研究表明, F14 抗菌谱较广, 抑菌作用强, 耐高温和酸性环境, 在饲料中稳定性好, 具有作为水产益生菌应用的潜力。

关键词: 芽孢杆菌; 拮抗菌; 筛选; 特性; 黄颡鱼

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2012)01-0078-07

芽孢杆菌是一类好氧微生物, 通过生物夺氧, 降低氧化还原电势, 利于厌氧微生物的生长, 从而保持肠道微生态系统平衡^[1]。芽孢杆菌不仅能改善养殖水质^[2], 而且能在肠道中产生多种消化酶^[3]和抗生素(肽类抗生素、脂肽类抗生素、磷脂类抗生素、聚酮化合物、氨基糖等, 其中尤为重要是具有极高生物工程利用价值的脂肽类和肽类抗生素), 改善动物生长性能^[4,5], 抑制有害菌繁殖, 保证宿主健康^[6]。同时, 芽孢杆菌繁殖快、抗逆性强、培养简单、在饲料加工储存及消化道中稳定性好, 因此具有开发成为微生态菌剂的潜在优势^[7]。

黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)是我国重要的淡水经济鱼类, 但近年来疾病问题日益突出, 柱状黄杆菌(*Flavobacterium columnare*)、气单胞菌(*Aeromonas*)、爱德华氏菌(*Edwardsiella*)等细菌性病原在生产中常造成严重的经济损失^[8]。目前, 抗生素等药物的使用是减少其病害损失的主要方法。但药物的长期使用和滥用不仅会使耐药性细菌增加, 而

且还会影响动物的健康; 药物残留还会威胁环境安全, 并产生严重的社会问题^[9]。芽孢杆菌分泌的抗菌物质抗菌谱广、性质稳定, 既可以对病原菌的核酸、蛋白质、细胞膜、细胞壁等直接起作用, 也可以干扰它们的生物合成系统, 而且能克服病原菌对现有抗生素的耐药性问题, 对人畜无害, 不污染环境^[10]。因此, 对病原拮抗性芽孢杆菌的研究将具有广泛应用前景和不可低估的开发潜力。本实验从黄颡鱼肠道中筛选出能够对淡水鱼类常见致病菌有较强拮抗作用的益生性芽孢杆菌, 并对其特性进行研究, 以期为鱼类的健康养殖和生产安全的水产品提供新的思路, 为益生菌在黄颡鱼配合饲料中的应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

材料鱼: 健康的黄颡鱼于 2009 年 5 月采自华中

收稿日期: 2011-01-20; 修订日期: 2011-10-15

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2007BAD37B02); 湖北省“十一五”科技攻关项目(2006AA203A02、2007AA203A01);

中国水产科学研究院淡水生态与健康养殖重点开放实验室开放课题(2010FE03013)资助

作者简介: 周金敏(1984—), 女, 湖北襄阳人; 硕士研究生; 主要研究方向为水产微生物学。E-mail: zhibitiangao@163.com

通讯作者: 吴志新, E-mail: wuzhixin@mail.hzau.edu.cn; 曾令兵, E-mail: zenglingbing@gmail.com

农业大学水产基地, 体重 30—50 g, 剖检时体表、体内无充血、出血现象, 肠道健康无明显食糜。

培养基: 脑心浸液(BHI)培养基购自青岛高科园海博生物技术有限公司。

指示菌(实验病原菌): 分离自草鱼的柱状嗜纤维菌(*Cytophaga columnaris*)CCAM 050077、分离自鳊鲌养殖水体的迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)CCAM 050086、分离自草鱼的嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)CCAM 050096、分离自罗非鱼的温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*)CCAM 050111 均由农业微生物学国家重点实验室菌种保藏中心提供; 大肠杆菌(*Escherichia coli*)由本实验室保存。

1.2 芽孢杆菌的分离与纯化

无菌方法取黄颡鱼肠道, 准确称取 0.5 g 肠段组织, 匀浆, 加 4.5 mL 无菌生理盐水, 制成原液, 稀释 10 倍后待用。将稀释后的细菌悬液于 80℃ 水浴中处理 15min, 然后接种于 BHI 液体培养基中, 37℃ 增菌培养 24h。梯度稀释后取 0.1 mL 菌液在 BHI 平板上涂布培养(37℃)。随机挑取菌落, 纯化后接种斜面, 37℃ 培养后保存备用。对每株菌进行氧化酶试验和革兰氏染色, 保留两项反应均为阳性的菌株(芽孢杆菌)。

1.3 病原拮抗菌的筛选

采用牛津杯法^[11]。将芽孢杆菌和指示菌活化 24h, 离心洗涤后调整浓度为 10^6 cfu/mL。吸取 0.1 mL 指示菌菌液涂布于 BHI 平板上, 用无菌镊子取灭菌后的牛津杯(外径 6 mm)置于其上, 轻压, 使杯底紧贴于培养基上。每个牛津杯加入 0.2 mL 芽孢杆菌菌液。然后将平皿置 30℃ 恒温培养 24h, 测抑菌圈直径(包括牛津杯直径)。实验重复 3 次。

1.4 芽孢杆菌的鉴定

将细菌活化培养 24h, 观察菌落形态, 再对其进行革兰氏染色, 镜检芽孢形成率和形态。采用法国生物梅里埃公司的 API 50 CHB 试剂盒进行鉴定。

1.5 菌株 F14 的特性研究

选择对病原菌拮抗能力最强的菌株 F14 进行部分生物学特性研究。

高温耐受性 参考文献[12]的方法进行。挑取培养 4d 的 F14 斜面培养物(芽孢形成率大于 95%), 用无菌生理盐水制成浓度约 1×10^6 cfu/mL 的菌悬液, 按一定倍数稀释后吸取 0.1 mL 平皿涂布培养(对照组), 再将菌悬液分别于 100℃ 下水浴 2、5、10min,

90℃ 下水浴 5、20min, 80℃ 下水浴 5、20、40min, 冷却、稀释后各取 0.1 mL 处理后的菌悬液平皿涂布培养, 与对照组比较, 分别计算各处理组细菌的存活率。实验重复 3 次。

低 pH 耐受性 参考文献[13], 将 F14 菌悬液(芽孢状态)接种到 pH 分别为 3.0、4.0、5.0 的 BHI 液体培养基中, 使细菌初始浓度约为 1×10^6 cfu/mL, 放置 30℃ 恒温摇床(120 r/min)中培养。分别于培养 1h、2h 后取 0.1 mL 涂布于固体培养基上进行平板计数。实验重复 3 次。

代谢粗提物的抑菌作用 参考文献[14], 将 F14 接种于 BHI 液体培养基中, 37℃ 培养 48h 后 4℃、5000 r/min 离心 20min, 上清液经 0.22 μ m 微孔滤膜过滤, 所得液体即为代谢粗提物。

将活化好的嗜水气单胞菌稀释成一定浓度(约 2×10^7 cfu/mL), 以 5% 的接种量(体积比)接种到芽孢杆菌代谢粗提物中, 使嗜水气单胞菌的初始浓度约为 1×10^6 cfu/mL, 30℃ 恒温培养。分别于 1、2、6、12、24h 取样, 以平板菌落计数法测定培养物中嗜水气单胞菌的数量。同时将嗜水气单胞菌接种到 BHI 原液和稀释液(BHI 原液: 无菌生理盐水=1:1)中(对照), 按上述方法做相同处理。实验重复 3 次。

在饲料中的存活率 用液体 BHI 37℃ 培养 F14 96h 后, 4000 r/min 离心 10min 集菌, 用无菌生理盐水离心洗涤 3 次后稀释成 3×10^8 cfu/mL。将菌悬液(100 mL)用喷雾器均匀地喷洒在商品饲料(500 g)表面, 40℃ 烘干。分别在室温(25—30℃)、4℃ 和 -20℃ 条件下密封保存制备的饲料, 于第 0、第 10 和第 20 天取样检测芽孢杆菌的存活率(称取 1 g 饲料, 添加 9 mL 无菌生理盐水, 匀浆制成原液, 再倍比稀释, 选择几个浓度的菌悬液在 BHI 平板上涂布培养)。以喷洒无菌生理盐水的饲料作为对照。实验重复 3 次。

1.6 数据的统计和处理

对实验所得数据采用 SPSS16.0 软件进行统计分析, 结果以平均值 $\pm$ 标准差的形式表示, 差异显著时进行 Duncan 多重比较, 差异显著水平为 0.05。

2 结果

2.1 芽孢杆菌分离株对病原菌的抑制作用

从黄颡鱼肠道共分离得到芽孢杆菌 65 株。其中, 菌株 M1、M4、M5、M8 和 F17 对病原菌有较强的抑制作用, 菌株 F13、F14 和 F15 具有很强的抑菌活性(表 1)。

表 1 分离株对指示菌株的拮抗作用
Tab. 1 The antagonistic property of isolated strains against pathogens (X±SD)

菌株 Strain	抑菌圈直径 Diameter of inhibition (mm)				
	温和气单胞菌 <i>A. sobria</i>	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	迟缓爱德华氏菌 <i>E. tarda</i>	柱状嗜纤维菌 <i>C. columnaris</i>
M1	— ^[1]	8.5±0.21	—	9.7±0.35	—
M4	—	10.5±0.28	11.4±0.09	—	—
M5	9.3±0.30	—	8.7±0.29	—	—
M8	—	8.4±0.35	—	8.6±0.26	—
F13	10.5±0.29	12.1±0.40	12.3±0.23	9.1±0.17	9.6±0.39
F14	12.5±0.34	14.1±0.29	12.4±0.16	11.6±0.37	9.6±0.20
F15	11.1±0.25	13.3±0.44	10.7±0.32	11.3±0.21	9.9±0.47
F17	—	9.9±0.44	—	—	—

注: “—”表示分离株对病原菌没有抑制作用

Note: “—” means isolated strains have no inhibiting effect on pathogen

2.2 F13、F14 和 F15 的形态特征及鉴定结果

将抑菌作用最强的菌株 F13、F14 和 F15 进行鉴定。在 BHIA 培养基上, 菌株 F13、F14 和 F15 菌落平坦, 呈白色, 无光泽, 表面有皱褶且干燥, 边缘波状。革兰氏染色和胞色素氧化酶试验均为阳性。菌体杆状, 两端钝圆, 芽孢中生, 孢囊稍膨大, 脱落芽孢呈卵圆形。应用法国生物梅里埃公司 API 50CHB 试剂盒进行鉴定, 3 个菌株的反应结果均与数据库中的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)一致(表 2)。选取抑菌活性最强的 F14 进行特性研究。

2.3 菌株 F14 的特性

菌株 F14 对温度的耐受力 由表 3 可以看出, F14 对不同温度及处理时间的耐受性不同。在同是处理 5min 的情况下, 菌株在 80℃、90℃和沸水浴中的存活率分别为 96.7%、95.3%、52.9%。随着处理时间的进一步延长, 菌株在 80℃水浴中仍旧保持了较高的存活率, 而在 90℃水浴和沸水浴中的存活率均出现了较大幅度的下降。沸水浴处理 10min 时, 其存活率减少至 8.3%。

菌株 F14 对低 pH 环境的耐受力 表 4 显示, 菌株 F14 对低 pH 环境有较好的适应性。在 pH 3.0—5.0 的范围内, 1h 后的存活率都可以达到 98%以上; 2h 后的存活率也可以达到 87%以上。

F14 代谢粗提物对嗜水气单胞菌的抑菌作用 菌株 F14 的代谢粗提物可以抑制嗜水气单胞菌的生长。嗜水气单胞菌在 F14 代谢粗提物中培养 2h, 细菌数量就开始急剧下降, 并随着时间的推移活菌数越来越少, 到 24h 已检测不到活的嗜水气单胞菌。而 2 个对照组的病原菌经过短暂的停滞期后细菌数快速增加(图 1)。

菌株 F14 在饲料中的存活率 饲料中 F14 在室温下存储至第 10 天和第 20 天时, 存活率分别为 75.26%和 57.73%; 在 4℃下存储至第 10 天和第 20 天时, 存活率分别为 87.42%和 77.53%; 在-20℃下存储至第 10 天和第 20 天时, 存活率分别为 94.23%和 87.63%。统计结果显示, 细菌数量在 4℃和-20℃存储 20d 均无显著变化, 仅在室温下存储至第 20 天时显著减少($P<0.05$)(表 5)。

3 讨论

芽孢杆菌是一类重要的微生物资源, 其中的某些菌株已成为应用广泛的益生菌。大量的研究表明, 饲用芽孢杆菌具有拮抗肠道病原菌、提高防病能力的作用。潘康成等^[15]报道, 在水体中泼洒枯草芽孢杆菌能显著提高南美白对虾(*Penaeus vannamei*)育苗成活率, 降低病死率, 试验组的平均成活率比对照组提高了 31.05%。Newaj-Fyzul, *et al.*^[16]将筛选的一株枯草芽孢杆菌 AB1 以 10^7 cfu/g 的浓度拌饲投喂虹鳟, 结果表明, 实验组的虹鳟能够有效抵抗强致病性气单胞菌的侵染, 死亡率(0%—35%)相比对照组(85%—95%)显著下降。同时, 芽孢杆菌能产生多种酶和维生素, 具有很好的助消化、促生长的作用。其芽孢对热、压力、酸、碱、酶等不良环境具有很强的耐受性, 因此具有开发成为微生态菌剂的潜在优势。

菌种的来源是益生菌研究的一个重要环节, 直接关系到益生菌的应用效果。从宿主或周围环境中分离的益生菌的作用优于从异种或从完全不同的生境中分离的益生菌, 正是从健康虹鳟肠道中分离枯

表 2 三株菌的生理生化特性
Tab. 2 Physiological and biochemical characterization of three strains

底物 Substrate	反应结果 Results				底物 Substrate	反应结果 Results			
	F13	F14	F15	<i>B. subtilis</i> *		F13	F14	F15	<i>B. subtilis</i> *
D-阿拉伯糖 D-arabinose	—	—	—	—	D-阿拉伯糖醇 D-Arabitol	—	—	—	—
L-阿拉伯糖 L-arabinose	+	+	+	+	L-阿拉伯糖醇 L-Arabitol	—	—	—	—
核糖 Ribose	+	+	+	+	葡萄糖酸盐 Gluconates	—	—	—	—
D-木糖 D -xylose	+	+	+	+	肝糖 Glycogen	+	+	+	+
L-木糖 L-xylose	—	—	—	—	精氨酸 Arginine	—	—	—	—
阿东醇 Adonite	—	—	—	—	麦芽糖 Maltose	+	+	+	+
半乳糖 Galactose	+	+	+	+	乳糖 Lactose	—	—	—	—
果糖 Fructose	+	+	+	+	蜜二糖 Melibiose	+	+	+	+
甘露糖 Mannose	+	+	+	+	蔗糖 Sucrose	+	+	+	+
山梨糖 Sorbose	—	—	—	—	海藻糖 Fucose	+	+	+	+
鼠李糖 Rhamnose	—	—	—	—	色氨酸 Tryptophan	—	—	—	—
肌醇 Inositol	+	+	+	+	Kohn 明胶 Glutin	+	+	+	+
甘露醇 Mannitol	+	+	+	+	棉子糖 Raffinose	+	+	+	+
山梨醇 Sorbitol	+	+	+	+	淀粉 Amylum	+	+	+	+
α-甲基-D-甘露糖甙	—	—	—	—	2-酮基-葡萄糖酸盐	—	—	—	—
α-D-mannopyranoside	—	—	—	—	2-keto-D-gluconic acid	—	—	—	—
α-甲基-D-葡萄糖甙	+	+	+	+	5-酮基-葡萄糖酸盐	—	—	—	—
α-D-Methylglucoside	+	+	+	+	5-keto-D-gluconic acid	—	—	—	—
N-乙酰-葡萄糖胺	—	—	—	—	邻硝基苯-半乳糖苷	+	+	+	+
N-acetylglucosamine	—	—	—	—	2-Nitrophenyl -galactopyranoside	—	—	—	—
熊果甙 Arbutin	+	+	+	+	木糖醇 Xylitol	—	—	—	—
七叶灵 Esculin	+	+	+	+	赖氨酸 Lysine	—	—	—	—
柳醇 Salicin	+	+	+	+	鸟氨酸 Ornithine	—	—	—	—
纤维二糖 Cellobiose	+	+	+	+	柠檬酸钠 Sodium citrate	+	+	+	+
葡萄糖 Glucose	+	+	+	+	丙酮酸盐 Pyruvate	+	+	+	+

注: *数据来自法国生物梅里埃公司数据库; +表示结果阳性; —表示结果阴性
Note: *Data from Biomerieux company database; + indicate positive results; — indicate negative results

表 3 不同水浴温度和处理时间下 F14 的存活率
Tab. 3 The livability of F14 under different temperatures and times

时间 Time	温度/存活率 Temperature / Livability (%)		
	80℃	90℃	100℃
2min	—	—	77.9(2.91)
5min	96.7(1.76)	95.3(2.23)	52.9(2.58)
10min	—	—	8.3(1.60)
20min	95.6(2.43)	68.8(3.88)	—
40min	80.2(4.02)	—	—

注: 数据以平均值(标准差)表示。“—”表示没有试验
Note: Data are presented as mean (standard deviations). “—”
Not tested

草芽孢杆菌才确保了其在保护宿主健康方面发挥的作用^[17]。Sugita, et al.^[18]从 7 种淡水鱼类肠道内分离

出 304 株肠道细菌, 研究了它们对 18 种病原菌的体外抗菌能力, 结果有 3.2%表现出对病原菌的抗菌活性, 尤其是嗜水气单胞菌、假单胞菌、梭状芽孢杆菌属的几株菌可以抑制 7—12 个靶菌株。目前, 对候选益生菌进行筛选的通常做法是进行体外拮抗实验, 寻找具有抑菌活性的细菌^[19]。指标是候选益生菌能够在琼脂培养基中对指示菌产生生长抑制现象^[20]。许多研究都将这种方法作为筛选益生菌的第一步^[21, 22]。本实验采用牛津杯法筛选的芽孢杆菌 F14 抑菌谱较广且抑菌活性显著, 具有作为益生菌开发的潜力。

益生菌是活的微生物, 在饲料混合或加工过程中其存活力和稳定性易受到破坏, 从而造成产品在

表 4 不同酸性环境和处理时间下 F14 的存活率
Tab. 4 The livability of F14 under different pH and times

时间 Time	pH/存活率 Livability (%)		
	5.0	4.0	3.0
1h	99.6(0.46)	99.0(1.55)	98.6(1.72)
2h	92.7(1.90)	89.2(0.79)	87.3(1.06)

注: 数据以平均值(标准差)表示

Note: Data are presented as mean (standard deviations)

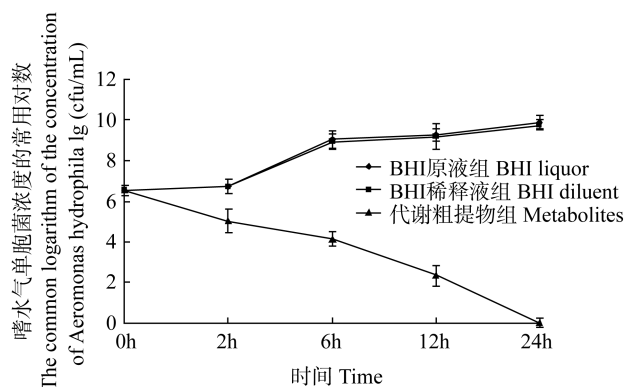


图 1 F14 代谢粗提物对嗜水气单胞菌的抑制作用

Fig. 1 The inhibitory activities of F14 metabolites against *A. hydrophila*

表 5 不同储存条件下 F14 在饲料中的数量变化
Tab. 5 Viability of the F14 added to diets after storage at room temperature, 4 and -20°C

储存时间 Time	储存温度/饲料中细菌数量 Storage temperature /Quantity of F14 added to the diets (log cfu/g of diet)		
	室温 Room temperature	4°C	-20°C
0d	7.68 (0.083) ^a	7.68 (0.083) ^a	7.68 (0.083) ^a
10d	7.56 (0.098) ^{ab}	7.63 (0.013) ^a	7.66 (0.074) ^a
20d	7.44 (0.124) ^b	7.57 (0.080) ^a	7.63 (0.065) ^a

注: 数据以平均值(标准差)表示; 同列上标字母不同者表示差异显著($P<0.05$)

Note: Data are presented as mean (standard deviations). Data in the same column with the different superscripts are significantly different ($P<0.05$)

实际应用中效果不佳或不稳定。与双歧杆菌和乳酸菌相比, 芽胞杆菌的芽胞具有耐高温、耐干燥的特点, 易于保存和运输。将 F14 在 90°C 水浴中处理 5min, 存活率为 95.3%; 在沸水浴中处理 5min, 仍还有 52.9% 左右的存活率, 表明这株菌对温度的耐受性较强。陈海华[12]筛选了一株具有优良益生特性的安全的地衣芽胞杆菌 CO1。其在 93°C 和 98°C 水浴处理 5min 后的存活率分别为 95% 和 55%, 本实验结果与之相似。

经口进入机体的益生菌, 必须要耐受上消化道的各种不利环境, 才能抵达肠道的特定部位定植并

发挥有益作用。上消化道中的强酸性胃液构成了影响益生菌功效的主要障碍之一。因此, 可通过检测菌株在酸性环境中的存活能力来选择耐受性较好的菌株。冼琼珍等[13]从健康小猪肠道中筛选出两株乳酸杆菌 G1、G2 和两株芽胞杆菌 Y1、Y2, 它们在 pH 3.0 条件下作用 120min 后, 存活率分别为 11%、19%、84%、40%, 表明芽胞杆菌耐胃液能力明显优于乳酸杆菌、双歧杆菌等其他益生菌。本实验结果显示, F14 在 pH 3.0—5.0 的范围内, 处理 1h 后的存活率达到 98% 以上; 处理 2h 后的存活率也可以达到 87% 以上。黄颡鱼胃、前肠、中肠、后肠和胆汁的 pH 分别为 3.8—4.6、6.5—7.8、8.2—8.5、7.6—7.9、4.8—5.4[23], 因此, F14 应能耐受黄颡鱼胃中的强酸环境, 并在肠道内存活。

枯草芽胞杆菌能产生多种抗菌物质[24]。有些存在于菌体, 有些存在于发酵液中。方敦煌[25]研究了从健康烟草根际分离的一株枯草芽胞杆菌 B75 的抗菌活性。实验显示, B75 液体发酵的无菌滤液、菌体中均存在抗菌物质。这些抗菌物质对许多危害严重的病原菌都表现出很强的抑菌活性, 在农牧业中有很好的应用前景。另外抗菌肽能够在细菌质膜上形成离子通道, 破坏膜势, 引起胞内物质泄漏, 从而杀死细菌, 一般不易产生耐药性和交叉抗性[14]。本实验结果表明, F14 代谢粗提物具有较强的抑菌作用, 说明产生抗菌物质是其具有防病作用的原因之一。有关 F14 所产生的抗菌物质的性质、作用机理等有待进一步研究。

菌种在饲料中的存活率也是影响其作用效果的一个重要因素。在 Aly, et al.[26]的研究中, 喷洒在饲料中的芽胞杆菌 5 周后仍然有活性, 但数量极显著下降, 且 4°C 和室温下的存活率没有差异。本研究中随时间的延长, 喷洒在饲料中的 F14 的存活率虽然下降, 但仍然保持较高的数量, 有利于保证应用的效果。

参考文献:

- [1] Li H B, Song X L, Li Y. Progress on probiotic bacteria in aquiculture [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2008, 29(5): 94—99 [李海兵, 宋晓玲, 李赟. 水产动物益生菌研究进展. *动物医学进展*, 2008, 29(5): 94—99]
- [2] Dalmin G, Kathiresan K, Purushothaman A. Effect of probiotics on bacterial population and health status of shrimp in culture pond ecosystem [J]. *Indian Journal of Experimental Biology*, 2001, 39(9): 939—942

- [3] Liu C H, Chiu C S, Ho P L, *et al.* Improvement in the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by a protease-producing probiotic, *Bacillus subtilis* E20, from natto [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, **107**(3): 1031—1041
- [4] Wang S, Gao S F, Gao X W, *et al.* Fermentation optimization in lipopeptide productivity of *Bacillus subtilis* [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2007, **23**(4): 342—347 [王帅, 高圣风, 高学文, 等. 枯草芽孢杆菌脂肽类抗生素发酵和提取条件. 中国生物防治, 2007, **23**(4): 342—347]
- [5] Hua X M, Zhou H Q, Zhang Y F, *et al.* Effect of dietary supplemental chitosan and probiotics on growth and some digestive enzyme activities in juvenile *Fugu obscurus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, **29**(3): 299—305 [华雪铭, 周洪琪, 张宇峰, 等. 饲料中添加壳聚糖和益生菌对暗纹东方鲀幼鱼生长及部分消化酶活性的影响. 水生生物学报, 2005, **29**(3): 299—305]
- [6] Capkin E, Altinok I. Effects of dietary probiotic supplementations on prevention / treatment of yersiniosis disease [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, **106**(4): 1147—1153
- [7] Zhang J L. Screening of probiotic *Bacillus* strains for fishing industry and preliminary studies on solid state fermentation of candidate [D]. Thesis for Master of Science. Third Military Medical University, Chongqing. 2005 [张锦亮. 水产用益生芽孢杆菌的筛选及菌株固体发酵的初步研究. 硕士学位论文, 第三军医大学, 重庆. 2005]
- [8] Zhou D R, Ye X P, Luo Y Z, *et al.* Identification and biological characteristics of *Edwardsiella ictaluri* isolated from *Pelteobagrus fulvidraco* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, **34**(4): 862—865 [周冬仁, 叶雪平, 罗毅志, 等. 黄颡鱼鲢鱼爱德华氏菌的鉴定及生物学特性研究. 水生生物学报, 2010, **34**(4): 862—865]
- [9] MacNeil J D. The joint food and agriculture organization of the United Nations / World Health Organization Expert Committee on food additives and its role in the evaluation of the safety of veterinary drug residues in foods [J]. *The AAPS Journal*, 2005, **7**(2): E274—E280
- [10] Parisot J, Carey S, Breukink E, *et al.* Molecular mechanism of target recognition by subtilin, a class I lanthionine antibiotic [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2008, **52**(2): 612—618
- [11] Hjelm M, Bergh O, Riaza A, *et al.* Selection and identification of autochthonous potential probiotic bacteria from turbot larvae (*Scophthalmus maximus*) rearing units [J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2004, **27**(3): 360—371
- [12] Chen H H. Screening of bacillus licheniformis for probiotics and research on its application of modulating intestinal flora [D]. Thesis for Master of Science. Third Military Medical University, Chongqing. 2005 [陈海华. 一株益生芽孢杆菌的筛选及其肠道菌群调节作用研究. 硕士学位论文, 第三军医大学, 重庆. 2005]
- [13] Xian Q Z, Ma C Q, Liang L M. Isolation and selection of probiotics from swine and study on part of its biological characteristics [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2006, **27**(2): 86—89 [冼琼珍, 马春全, 梁丽敏. 猪源益生菌的分离筛选及部分生物学特性研究. 动物医学进展, 2006, **27**(2): 86—89]
- [14] Liu J, Wang J, Yao J M, *et al.* Properties of the crude extract of *Bacillus subtilis* and purification of antimicrobial peptides [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2004, **44**(4): 511—514 [刘静, 王军, 姚建铭, 等. 枯草芽孢杆菌 JA 抗菌物特性的研究及抗菌肽的分离纯化. 微生物学报, 2004, **44**(4): 511—514]
- [15] Pan K C, Yang J L, Wang Z H, *et al.* The use of *Bacillus subtilis* in the culture of larval white-leg shrimp [J]. *Feed Research*, 2004, (12): 33—34 [潘康成, 杨金龙, 王振华, 等. 枯草芽孢杆菌制剂在南美白对虾育苗上的应用. 饲料研究, 2004, (12): 33—34]
- [16] Newaj-Fyzul A, Adesiyun A A, Mutani A, *et al.* *Bacillus subtilis* AB1 controls *Aeromonas* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, **103**(5): 1699—1706
- [17] Cunningham-Rundles S, Lin D H. Nutrition and the immune system of the gut [J]. *Nutrition*, 1998, **14**(7—8): 573—579
- [18] Sugita H, Shibuya K, Shimooka H, *et al.* Antibacterial abilities of intestinal bacteria in freshwater cultured fish [J]. *Aquaculture*, 1996, **145**(1): 195—203
- [19] Wang F Q. Isolation and identification of probiotics from gut of flounder and its use in aquaculture [D]. Ph.D. Thesis. China Agricultural University, Beijing. 2004 [王福强. 牙鲆肠道益生菌的分离鉴定及其应用研究. 博士学位论文, 中国农业大学, 北京. 2004]
- [20] Kesarcodi-Watson A, Kaspar H, Lategan M J, *et al.* Probiotics in aquaculture The need, principles and mechanisms of action and screening processes [J]. *Aquaculture*, 2008, **274**(1): 1—14
- [21] Zhang S J, Yang X L, Li D, *et al.* Screening of antagonistic bacterium strain against saprolegniosis and the preliminary study of in vitro antagonistic activity [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, **32**(3): 301—307 [张书俊, 杨先乐, 李聃, 等. 水霉拮抗菌的筛选及其拮抗作用的初步研究. 水生生物学报, 2008, **32**(3): 301—307]
- [22] Cui H X, Hou Z M, Qin S. Isolation of strains of actinomycetes from Jiaozhou Bay and their activities against pathogenic microorganisms [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, **31**(5): 649—654 [崔洪霞, 侯竹美, 秦松. 胶州湾放线菌的分离及其抗病原微生物的活性检测. 水生生物学报, 2007, **31**(5): 649—654]
- [23] Ye Y T, Lin S M, Luo L, *et al.* Study on the digestive ability and nutritive value of *Pelteobagrus fulvidraco* from the Jialing River [J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 1997, **12**(2): 23—30 [叶元土, 林仕梅, 罗莉, 等. 黄颡鱼消化能力与营养价值的研究. 大连水产学院学报, 1997, **12**(2): 23—30]
- [24] Kajimura Y, Sugiyama M, Kaneda M. Bacillopeptins, new

- cyclic lipopeptide antibiotics from *Bacillus subtilis* FR-2 [J]. *Journal of Antibiotics*, 1995, **48**(10): 1095—1103
- [25] Fang D H. Antagonistic substances and screening of rhizospheric spore-producing Bacilli against Tobacco Brown Spot [D]. Ph.D. Thesis. Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou. 2007 [方敦煌. 防治烟草赤星病根际芽孢杆菌的筛选及其抗菌物质研究. 博士学位论文, 福建农林大学, 福州. 2007]
- [26] Aly S M, Abd-El-Rahman A M, John G, *et al.* Characterization of some bacteria isolated from *Oreochromis niloticus* and their potential use as probiotics [J]. *Aquaculture*, 2008, **277**(1—2): 1—6

SELECTION AND CHARACTERIZATION OF PATHOGEN ANTAGONISED PROBIOTICS FROM INTESTINAL TRACT OF YELLOW CATFISH (*PELTEOBAGRUS FULVIDRACO*)

ZHOU Jin-Min^{1,2}, WU Zhi-Xin^{1,2}, ZENG Ling-Bing¹, CHEN Xiao-Xuan², YANG Li² and ZHAO Yang²

(1. Key Laboratory of Freshwater Ecology and Aquaculture / Yangtze River Fisheries Research Institute; Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China;

2. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Bacterial infections are considered to be a major cause of mortality in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) culture. Using probiotic bacteria to control potential pathogens has been developed and accepted as a good approach in aquaculture. *Bacillus* has potential advantages as probiotics because it can antagonize intestinal pathogenic bacteria, improve the ability of disease prevention, produce enzymes and vitamins, and its spores has strong tolerance to heat, pressure, acid, alkali, enzymes and other adverse environments. This paper focused on selection and characterization of *Bacillus* which would be used as potential probiotics in aquaculture. Sixty five spore-producing bacterial strains were got from intestinal tract of *Pelteobagrus fulvidraco* by using water bath kettle at 80°C. Among of them, three strains (F13, F14 and F15) which had better antagonistic activity against commonly pathogenic bacteria of fish (*Cytophaga columnaris*, *Edwardsiella tarda*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria* and *Escherichia coli*) were obtained by Oxford-cup tests. The diameter of inhibition zone was up to 9.1—14.1 mm (Oxford-cup diameter was 6 mm). The three strains were identified as *Bacillus subtilis* based on physiological and biochemical (API 50CHB) tests referring to data bank of Biomerieux. The strain F14 which had the strongest inhibiting activity was chosen and measured temperature and acid tolerance, antibacterial activity of metabolites, viability in feed after keeping in different conditions. The results showed that survival of F14 were 96.7%, 95.3% and 52.97% after cells were heated in 80°C, 90°C and 100°C for 5 minutes respectively. The cell number declined rapidly in 90°C and 100°C with time. When being heated in 100°C for 10 minutes, survival was 8.3% only. From pH values 3.0 to 5.0, its viability was more than 98% and 87% after being treated for 1 or 2 hours. It was suggested that the viability and stability of F14 would not be destroyed by feed mixing and pelletizing, and strong acid gastric juice. The metabolites of F14 filtered by porous membrane showed high antibacterial activities against fish pathogen (*A. hydrophila*). The number of *A. hydrophila* declined rapidly in metabolites of F14 after 2 hours, and none survived cells were detected after 24 hours. One of the reason was antimicrobial substances in spent culture supernatant secreted by F14 inhibit pathogenic bacteria. The livability of probiotics in feed was very important for saving and applying. The viability of the bacteria in the diets was assessed following storage of the diet at room temperature, 4 and -20°C for 20 days. F14 viability showed no significantly difference in the feed stored at either 4 or -20°C after 20 days of storage. In conclusion, F14 had credible stability and wider activity against pathogens of fish. It might be used as potential probiotics in aquaculture.

Key words: *Bacillus subtilis*; Antagonistic strain; Select; Characterization; *Pelteobagrus fulvidraco*