

一株海洋生境芽孢杆菌 FA08 的筛选、鉴定及其酶学特性和抗菌性能分析*

方卫东^{1,2} 唐旭³ 刘源森³ 林凌³ 黄仕新³ 高培丽³ 徐长安³

(1. 集美大学水产学院 厦门 361021; 2. 福建省海新集团有限公司 漳州 363102; 3. 国家海洋局第三海洋研究所 厦门 361005)

摘要 利用生防细菌拮抗病原菌,是水产疾病防治的有效措施之一。本研究从福建省宁德市海水养殖区底泥筛选到一株既能产纤维素酶又具有拮抗水产病原菌功能的芽孢杆菌 FA08,通过传统的形态学、生理生化鉴定手段,并结合 16S rDNA 序列分析,鉴定功能菌 FA08 为地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*, GenBank 登录号: KM892857)。进一步考察功能菌 FA08 菌株所产的纤维素酶对 pH 值、温度和紫外线的敏感性发现,功能菌 FA08 所产纤维素酶对酸碱度具有很强的耐受力, pH 3 至 pH 10 范围内保持稳定,对温度也有较好的稳定性,在 30—80°C 范围内,其酶活仍达到 70%,对紫外线不敏感。对 FA08 的抗菌性能进行分析,结果发现,功能菌 FA08 发酵上清对嗜水气单胞菌、哈维氏弧菌、溶藻弧菌、副溶血弧菌及金黄色葡萄球菌有拮抗效果。因此,该菌对未来水产业具有良好的开发应用价值。

关键词 地衣芽孢杆菌; 纤维素酶; 筛选鉴定; 酶活特性; 抗菌活性

中图分类号 Q93-331 **doi:** 10.11693/hyhz20150300072

随着健康养殖业的发展,有益微生物的应用越来越广泛,如在水产养殖过程中,使用光合细菌、枯草芽孢杆菌等微生物制剂改善养殖环境,降低疾病的发生,取得了较好的效果(Vanittanakom *et al*, 1986; Burgess *et al*, 1993; Barsby *et al*, 2001; Vaseeharan *et al*, 2003; 顾继锐等, 2011; 张庆华等, 2011; 高存川等, 2012; 潘娟等, 2012; 张峰峰等, 2012); 通过筛选生防细菌,利用生防细菌对水产病原菌的抑制作用,寻找替代抗生素的新途径,如从高度污染的海滩污泥中,分离得到一株枯草芽孢杆菌 LHB02 对三种弧菌包括哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)和鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)都有很强的抑制作用(徐长安等, 2011); 从不同生长阶段的对虾肠道中分离对病原菌(鳃弧菌、副溶血弧菌、哈维氏弧菌)有拮抗作用的细菌(李海兵等, 2008)。另外专家学者也开展了利用益生菌、酶制剂促进水产养殖动

物的健康和提高饲料利用率方面的研究(Tamehiro *et al*, 2002; Liu *et al*, 2010), 并取得了很好的试验效果,如芽孢杆菌、低聚木糖、复合酶制剂及它们的配伍物可以促进异育银鲫的生长,提高饲料利用率,促进肠道有益微生物的生长和抑制有害微生物,并且能提高肝脏蛋白酶 mRNA 表达量和肠道酶活性(刘文斌等, 2007); 在饲料中添加粪肠球菌能够促进罗非鱼生长,提高饲料利用率,降低血清胆固醇和甘油三酯含量以及谷丙转氨酶活性,同时增加肠道乳酸菌数量,改善肠道微环境(周晓波等, 2014); 纤维素酶可降低动物胃肠内容物的粘稠度,促进内源酶的扩散,提高养分的消化吸收(胡喜峰等, 2004); 饲料中添加纤维素酶,草鱼增重率提高,饵料系数降低,干物质、粗蛋白、粗脂肪和粗纤维消化率都提高,体成分没有显著变化(高春生等, 2006)。

目前,同时具有产酶和抗菌性能的功能菌株筛

*福建省科技计划项目, 2013Y0063 号; 厦门南方海洋研究中心项目, 13GZP002NF08 号。方卫东, 高级工程师, E-mail: fangweidong@tio.org.cn

通讯作者: 徐长安, 教授级高工, 博士生导师, E-mail: xuchangan@tio.org.cn

收稿日期: 2015-03-10, 收修改稿日期: 2015-04-26

选报道较少, 本实验室在前期的功能菌筛选中, 筛选到一株既产纤维素酶又具有拮抗水产病原菌的芽孢杆菌, 本研究报道了该功能菌的筛选、鉴定, 及对功能菌产生的纤维素酶进行耐温、耐酸碱和对紫外线的稳定性进行考察, 并开展功能菌对水产常见病原菌的拮抗效果分析, 初步评估该功能菌株的价值, 为以后开发该菌株提供依据。

1 材料与方法

1.1 样品来源

用于筛菌的样品采自福建省宁德市养殖池底泥。

1.2 培养基

LB 培养基: 蛋白胨 10g, 酵母提取物 5g, 氯化钠 10g, 水 1000 mL, pH 7.2—7.4。

SLB 培养基: 蛋白胨 10g, 酵母提取物 5g, 氯化钠 10g, 琼脂 20g, 水 1000 mL, pH 7.2—7.4。

产纤维素酶培养基: 蛋白胨 9.0 g, 酵母膏 10.0 g, 羧甲基纤维素钠 5.0 g, 水 1000 mL。

CMC-Na 平板: 羧甲基纤维素钠 15.0 g、硫酸铵 1.0 g、酵母膏 1.0 g、硫酸镁 1.0 g、磷酸二氢钾 1.0 g、琼脂 20.0 g、水 1000 mL, pH 为自然值。

1.3 测试菌

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*), 爱德华氏菌(*Edwardsiella*), 哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*), 溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*), 副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*), 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)。

1.4 仪器设备

常规玻璃器皿、电子天平、超净工作台、打孔器、移液枪、台式摇床、高压蒸汽灭菌锅、恒温培养箱、PCR 仪、核酸电泳仪、凝胶成像仪、多功能酶标仪和手提式紫外反射仪等。

1.5 功能菌的筛选

1.5.1 目标菌的分离 取 10g 污泥样品, 加入 100mL 0.85% NaCl 中, 搅拌后取上层浊液置于 LB 培养基, 37°C, 180 r/min, 富集培养 30h 后, 菌液置于 75°C 水浴 20min。水浴后的菌液进行梯度稀释及平板涂布法进行分离。

1.5.2 功能菌产纤维素酶检测 分别挑取初筛得到的目标菌, 标示为: FA01、FA02、FA03、FA04、FA05、FA06、FA07、FA08、FA09、FA10 等以此类推, 将这些目标菌置于 LB 培养基中, 37°C, 180 r/min, 活化 6 h, 活化好的菌液按 10%接种至产纤维素酶培

培养基, 37°C, 180 r/min, 发酵 48h 后, 10000 r/min, 离心 6min, 弃去沉淀, 得上清液, 为粗酶液; 采用 CMC-Na 平板, 打孔后, 孔内添加 50 μ L 所得的上清液, 之后置于 37°C 过夜; 反应后的平板用刚果红染色 1h, 接着用 0.85% NaCl 脱色, 观察是否出现水解圈, 出现水解圈的即定为功能菌。每株菌做三个重复。

1.6 功能菌的鉴定

参照《常见细菌系统鉴定手册》(东秀珠等, 2001) 进行功能菌生物学特征观察和生理生化试验, 并结合 16S rDNA 序列分析方法进行鉴定。

1.6.1 生物学特征观察 将功能菌接种至 SLB 培养基的培养皿平板, 放入温度设置为 37°C 的恒温箱中, 培养 24 h, 观察菌落形态特征。

1.6.2 生理生化试验 进行功能菌部分生理生化试验, 包括 D-葡萄糖、L-阿拉伯糖、D-木糖、D-甘露醇的产酸试验; 接触酶、苯丙氨酸脱氨酶试验、明胶、淀粉、酪氨酸水解试验; V-P 测定、吲哚产生试验、利用柠檬酸盐试验。

1.6.3 16S rDNA 序列分析 参照文献(徐长安等, 2011), 采用磁珠法基因组 DNA 抽提试剂盒提取功能菌全基因组。以全 DNA 为模板, 使用细菌 16S rDNA 通用引物, 27F: 5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3' 和 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。用 Taq DNA 聚合酶进行 PCR 扩增, PCR 程序为: 94°C 预变性 4min; 94°C 45s, 55°C 45s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 10 min 修复延伸; 4°C ∞ 终止反应。使用 SanPreP 柱式 DNA 胶回收试剂盒纯化 PCR 产物。纯化后的 PCR 产物送至上海生工测序。将测得的 16S rDNA 序列输入 www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast 进行同源性搜索, 选取其中与之同源性较高的菌株, 用 MEGA 软件进行系统发育树分析, 构建进化树。

1.7 酶活特性分析

接种功能菌株至 LB 培养基中, 37°C, 180 r/min, 活化 6h, 活化好的菌液按 10% 接种至产纤维素酶培养基, 37°C, 180 r/min, 发酵 24h 后, 10000 r/min, 离心 6min, 弃去沉淀, 得上清液, 为粗酶液。参照文献(韩铭等, 2012; 于岚等, 2013), 采用 3, 5-二硝基水杨酸比色定糖法(DNS)进行酶活测定, 分别考察功能菌株所产的纤维素酶对温度、pH 值和紫外线的耐受能力。

1.7.1 酶对 pH 值的耐受能力检测 粗酶液在不同 pH 缓冲液(3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0)混合均匀, 置于 37°C, 处理 1h, 测定残存酶活, 以最高酶活为 100%。

1.7.2 酶对温度的耐受能力检测 粗酶液分别在温度为 30、40、50、60、70、80°C 的水浴锅中处理 1h 后, 测定残存酶活, 以最高酶活为 100%。

1.7.3 紫外线对酶活性的影响 粗酶液分别在紫外线波长 365nm, 距离 10cm 下照射 10、20、30、40、50、60 min 后, 测定残存酶活, 以最高酶活为 100%。

1.8 拮抗性能检测

1.8.1 抑菌板的制作 选择嗜水气单胞菌、爱德华氏菌、哈维氏弧菌、溶藻弧菌、副溶血弧菌、金黄色葡萄球菌, 用接种环刮下菌体接种至装有 5mL LB 培养基的试管中, 放入温度设置为 37°C, 转速为 180 r/min 的摇床中培养 16h 后, 取 1 mL 的培养液至 100 mL 的 45—50°C 的 SLB 培养基中, 迅速摇匀倒板, 待凝固后用打孔器打孔。

1.8.2 发酵上清的制备 功能菌 FA08 斜面接种至装有 5mL LB 培养基的试管中, 放入温度设置为 37°C, 转速为 180 r/min 的摇床中活化 6 h 后, 按 10% 的接种量至装有 50 mL LB 培养基的三角瓶中, 放入温度设置为 37°C, 转速为 180 r/min 的摇床中发酵 17 h, 10000 r/min 离心 6 min, 得发酵上清。

1.8.3 采用琼脂扩散法(agar diffusion method)进行测定(Tagg *et al.*, 1971)。通过测量圆形的透明带(抑菌圈)直径的大小来表示发酵上清液抑菌活性的强弱。

2 结果与分析

2.1 目标菌筛选结果

经实验发现, 标识为 FA08 的菌株, 三个重复均出现水解圈, 如图 1 所示, 而其它菌株未出现水解圈, 因此 FA08 为目标功能菌。

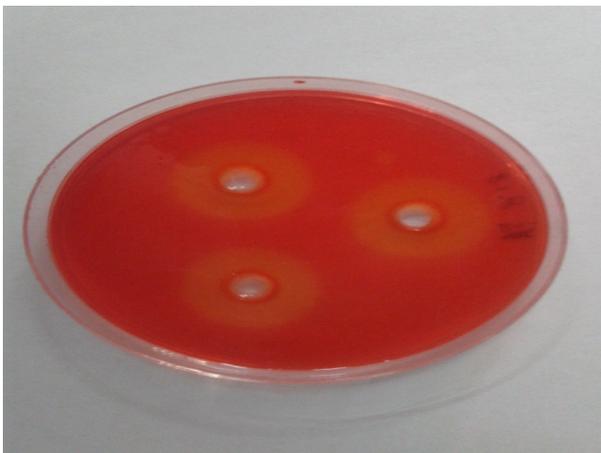


图 1 功能菌 FA08 水解圈

Fig.1 The hydrolysis circle of strain FA08

2.2 功能菌 FA08 生物学特征观察

将功能菌 FA08 接种至 SLB 培养基的培养皿平板, 37°C 培养 24h, 发现菌落白色微黄, 中间凸起, 表面光滑, 边缘不规则, 革兰氏染色为阳性, 产芽孢。

2.3 生理生化试验

功能菌 FA08 的部分生理生化实验结果如表 1 所示。

表 1 功能菌 FA08 的生理生化检测结果
Tab.1 Physiological and biochemical characteristics of strain FA08

试验项目	结果
D-葡萄糖	+
L-阿拉伯糖	+
D-木糖	+
D-甘露糖	+
接触酶	+
苯丙氨酸脱氨酶	-
明胶水解	+
淀粉水解	+
酪氨酸水解	-
V-P 测定	+
吲哚试验	-
利用柠檬酸盐	+

“+”为阳性, “-”为阴性

2.4 16S rDNA 鉴定结果

16S rDNA 测序结果显示, 菌株 FA08 的 16S rDNA 序列全长为 1407bp。全序列见图 2。将测得的序列输入国际核酸数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 用 Blast 进行同源序列搜索, 在搜索结果中, 选出同源性较高的菌株系列(表 2), 用 MEGA 软件进行系统发育分析, 并构建系统进化树, 结果如图 3 所示, 通过比较可以明显看出, FA08 在遗传位置上与 *Bacillus licheniformis* (X68416)和 *Bacillus licheniformis* (NR118959)两株地衣芽孢杆菌最近, 且与 *Bacillus licheniformis* (X68416)同源性最高达 99%。结合其形态学及生理、生化特征, 鉴定功能菌 FA08 为地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*), 登录号为 KM892857。

2.5 酶学特性分析结果

2.5.1 pH 值对 FA08 所产生的纤维素酶稳定性的影响 如图 4 所示, FA08 所产纤维素酶在 pH 4 下稳定性最好, 且 pH 3 和 pH 5—10 下保持较好的稳定性, 相对酶活保持在 85%以上, 因此该酶对酸碱的耐受能力较强。

2.5.2 温度对 FA08 所产生的纤维素酶稳定性的影响

如图 5 所示, FA08 所产纤维素酶在 30—40°C 保持较好的稳定性, 50—70°C 相对酶活保持在 75% 以上, 80°C 下相对酶活仍能保持在 70% 以上, 因此该酶对温度具有较好的耐受能力。

2.5.3 紫外线对 FA08 所产生的纤维素酶稳定性的影响 从图 6 可以看出在紫外线照射的条件下 FA08 所产生的纤维素酶保持稳定性, 酶活均接近 100%, 因此该纤维素酶对紫外线具有很强的耐受性。

GGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAATTCCGGGAAACCGGGG
CTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGTTCAATCATAAAAGGTGGCTTTAGCTACCACTTACA
GATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCG
ACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
AGGGAATCTTCCGAATGGACGAAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGG
ATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCC
GGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTAAC
CGGGGAGGGTCAATTGGAAGTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATCCACGTGTAGC
GGTAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACG
CTGAGGCGCGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATG
AGTGCTAAGTGTAGAGGGTTCCGCCCTTATGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGG
GAGTACGGTGCAGAACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTG
GTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCTAGAGATAGG
GCTTCCCTTCGGGGGCGAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTG
GGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGT
GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGG
GCTACACAGTGTACAATGGGCAGAAACAAAGGGCAGCGAAGCCGCGAGGTAAGCCAATCCCACA
AATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGC
GGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTT
TGTAACACCCGAAGTCCGTGAGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGG
GGGAAGTCGAT

图 2 功能菌 FA08 16S rDNA 测序结果

Fig.2 The 16S rDNA sequence of strain FA08

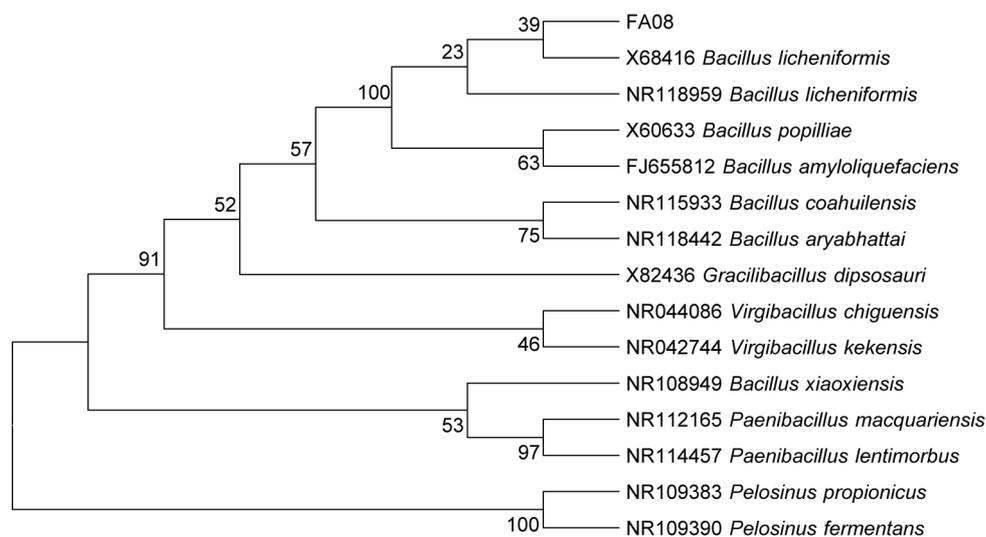


图 3 基于 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic dendrogram based on 16S rDNA sequence

表 2 选自基因库中用于构建系统发育树的菌株及其录入号
Tab.2 The strains and the accession numbers in GenBank for phylogenetic dendrogram construction

基因库录入编号	菌株名称
X68416	<i>Bacillus licheniformis</i>
NR118959	<i>Bacillus licheniformis</i>
X60633	<i>Bacillus popilliae</i>
NR115933	<i>Bacillus coahuilensis</i>
NR044086	<i>Virgibacillus chiguensis</i>
NR042744	<i>Virgibacillus kekensis</i>
X82436	<i>Gracilibacillus dipsosauri</i>
NR118442	<i>Bacillus aryabhatai</i>
NR108949	<i>Bacillus xiaoxiensis</i>
NR112165	<i>Paenibacillus macquariensis</i>
NR114457	<i>Paenibacillus lentimorbus</i>
NR109383	<i>Pelosinus propionicus</i>
NR 109390	<i>Pelosinus fermentans</i>
FJ655812	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>

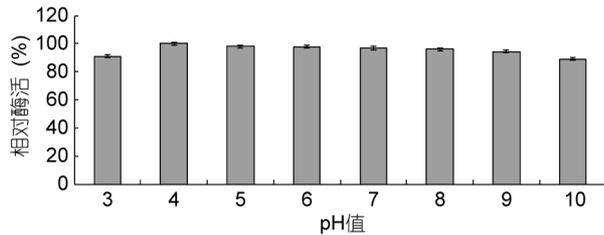


图 4 pH 值对 FA08 所产生的纤维素酶稳定性的影响
Fig.4 The effect of pH on the stability of cellulase produced by strain FA08

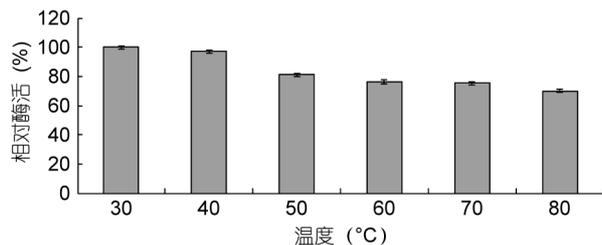


图 5 温度对 FA08 所产生的纤维素酶稳定性的影响
Fig.5 The effect of temperature on the stability of cellulase produced by strain FA08

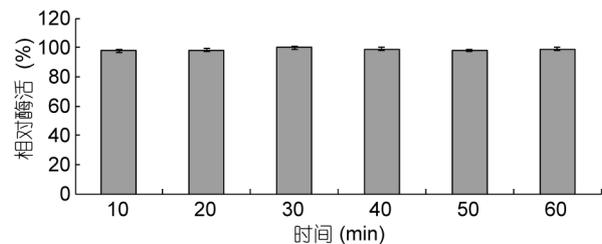


图 6 紫外线对 FA08 所产生的纤维素酶稳定性的影响
Fig.6 The effect of UV on the stability of cellulase produced by strain FA08

2.6 功能菌 FA08 发酵上清对水产病原菌的拮抗性能
拮抗试验结果表明: 如表 3 所示, 功能菌 FA08 对水产养殖常见致病菌: 嗜水气单胞菌、哈维氏弧菌、溶藻弧菌、副溶血弧菌和金黄色葡萄球菌均有较强的抑制作用, 其中对嗜水气单胞菌抑制作用最强。

表 3 功能菌 FA08 发酵上清对病原菌的拮抗性能
Tab.3 Antimicrobial activity of FA08's supernatant on selected pathogens

病原菌	抑菌圈直径(mm)
嗜水气单胞菌(<i>Aeromonas hydrophila</i>)	20.54 ± 0.34
爱德华氏菌(<i>Edwardsiella</i>)	10.31 ± 0.25
哈维氏弧菌(<i>Vibrio harveyi</i>)	18.12 ± 0.46
溶藻弧菌(<i>Vibrio alginolyticus</i>)	17.16 ± 0.18
副溶血弧菌(<i>Vibrio parahaemolyticus</i>)	17.46 ± 0.22
金黄色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>)	17.95 ± 0.31

3 讨论

地衣芽孢杆菌作为生防细菌广泛应用于植物病害防治、饲料加工、医药开发、环境污染治理等方面(唐娟等, 2008)。1989 年, 美国 FDA 和美国饲料控制官员协会公布了地衣芽孢杆菌是安全的微生物物种, 可以直接饲用; 我国农业部也把地衣芽孢杆菌列入饲料添加剂目录(马鑫等, 2011), 允许在饲料中直接添加。另外, 地衣芽孢杆菌在水产养殖方面也有很好的应用价值, 如地衣芽孢杆菌作为鱼饲料添加剂, 不仅可以促进鱼体生长, 而且益于养殖水体的保护(葛文霞等, 2014); 地衣芽孢杆菌和低聚木糖, 可提高鱼体中消化酶的活性, 有助于维持肠道内的微生态平衡, 促进动物生长(刘波等, 2006); 地衣芽孢杆菌增加了肠道消化酶活性, 促进了鱼体生长(刘波等, 2005)。另有研究表明, 地衣芽孢杆菌具有耐高温、耐酸碱的特性, 并能产生蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶和纤维素酶等, 有助于降解植物性饲料中某些复杂的碳水化合物, 消除抗营养因子(董尚智等, 2009)。本实验所筛选的功能菌 FA08 鉴定为地衣芽孢杆菌, 且可产生纤维素酶, 预示着该菌具有较好的开发与应用前景。

通过考察地衣芽孢杆菌 FA08 产生的纤维素酶对酸碱稳定性的影响, 发现 FA08 产生的纤维素酶对酸碱均能保持较好的稳定性, pH3 和 pH 5—10 下相对酶活保持在 85% 以上, 与杨丽娜等(2012)筛选到的芽孢杆菌属(*Bacillus*)微生物所产的纤维素酶相比, 在酸性条件下的耐受能力强, 具有相似性, 而在中性、碱性条件下地衣芽孢杆菌 FA08 产生的纤维素酶更具耐

受能力。水产动物大多数无胃, 消化道呈中性(鲤科鱼类)或偏碱性(王仁华等, 2011), 因此地衣芽孢杆菌 FA08 产生的纤维素酶不仅适合于有胃的动物, 而且也适合应用于水产动物。另外, 地衣芽孢杆菌生长条件要求低, 繁殖快, 能迅速定植在肠黏膜上, 在短时间内成为肠道的优势菌群(张菊等, 2012), 并在肠道中发挥作用, 有利于开发成为内服的微生物制剂。

实验发现, 地衣芽孢杆菌 FA08 产生的纤维素酶对温度有较好的耐受能力, 耐受 80°C 下相对酶活仍能保持在 70%以上, 与葛春辉(2009)筛选到的蜡质芽孢杆菌所产的纤维素酶相比, 更具有耐温特性。在饲料原料中, 杂粕类的原料粗纤维含量高, 存在抗营养因子, 大大限制了其在饲料中的使用量, 目前发酵技术的应用, 可提高杂粕类原料的使用价值, 降解杂粕原料中水产动物难以消化的纤维素, 消除抗营养因子, 提高杂粕原料的利用率。一般饲料原料的发酵温度可达 60—80°C, 而地衣芽孢杆菌 FA08 产生的纤维素酶可较好耐受发酵温度, 可应用于杂粕的发酵, 提高杂粕的营养价值。

地衣芽孢杆菌对有害微生物具有拮抗作用: 如地衣芽孢杆菌 W10 能产生抗菌蛋白, 对多种植物病原菌有较好的抑制效果(纪兆林等, 2013); 又如地衣芽孢杆菌 c-4 具有较广的抑菌范围, 对番茄枯萎病菌、玉米弯孢叶斑病菌、胶孢炭疽病菌、棉花枯萎病菌、棉花黄萎病菌、小麦赤霉病菌和西瓜枯萎病菌等均有抑制作用(孙正祥等, 2009)。然而地衣芽孢杆菌对水产养殖病原菌的拮抗特性报道较少。本实验也探讨了地衣芽孢杆菌 FA08 发酵上清对水产常见病原菌的拮抗效果, 发现地衣芽孢杆菌 FA08 对水产病原菌: 嗜水气单胞菌、爱德华氏菌、哈维氏弧菌、溶藻弧菌、副溶血弧菌和金黄色葡萄球菌均有较强的拮抗作用。由于地衣芽孢杆菌具有在水产动物肠道定植的特性, 这意味着地衣芽孢杆菌 FA08 进入水产动物肠道后, 在肠道内可产生拮抗物质, 对病原菌进行抑制或杀灭作用, 促进水产动物肠道健康, 有着重要的意义, 另外, 也可利用 FA08 的拮抗性能, 制备微生物杀菌剂。

本研究开展了地衣芽孢杆菌 FA08 的筛选与鉴定, 考察了该菌的酶学性质和抗菌特性, 初步评估该菌的开发与应用价值, 下一步将进行其作为养殖动物肠道定植菌、杂粕饲料发酵菌及制备微生物杀菌剂的研究与开发, 实现 FA08 在水产养殖中的应用价值。

参 考 文 献

- 于 岚, 程 芳, 邵文琦等, 2013. 一株嗜热纤维素酶生产菌的分离、鉴定及酶学研究. 安徽农业科学, 41(17): 7413—7417
- 马 鑫, 郭 宏, 张宝国等, 2011. 地衣芽孢杆菌作为饲料添加剂的研究进展. 中国饲料添加剂, (2): 10—13
- 王仁华, 刘晓兰, 王珍韡, 2011. 水产动物纤维素酶的应用研究. 饲料研究, (12): 62—64
- 东秀珠, 蔡妙英, 2001. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 43—65
- 刘 波, 刘文斌, 王 恬, 2005. 地衣芽孢杆菌对异育银鲫消化机能和生长的影响. 南京农业大学学报, 28(4): 80—84
- 刘 波, 谢 骏, 刘文斌等, 2006. 地衣芽孢杆菌与低聚木糖对异育银鲫消化酶活性、肠道菌群及生长的影响. 大连水产学院学报, 21(4): 336—340
- 刘文斌, 尹 君, 方星星等, 2007. 3 种益生菌配伍对异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 生长、消化及肠道菌群组成的影响. 海洋与湖沼, 38(1): 29—35
- 孙正祥, 王振中, 2009. 生防细菌 C-4 的特性鉴定及其对香蕉枯萎病的防治效果. 植物保护学报, 36(5): 392—396
- 纪兆林, 宋 浩, 徐敬友等, 2013. 地衣芽孢杆菌 W10 发酵产生抗菌蛋白的研究. 中国生物防治学报, 29(4): 579—585
- 李海兵, 宋晓玲, 韦 嵩等, 2008. 4 株对虾肠道益生菌的筛选及鉴定. 海洋与湖沼, 39(4): 374—380
- 杨丽娜, 杨明明, 龚月生, 2012. 产耐热性纤维素酶菌株的分离·鉴定及其酶学性质研究. 安徽农业科学, 40(14): 8103—8105
- 张 菊, 李金敏, 张志焱等, 2012. 地衣芽孢杆菌的研究进展. 中国饲料, (17): 9—11
- 张庆华, 封永辉, 王 娟等, 2011. 地衣芽孢杆菌对养殖水体氨氮、残饵降解特性研究. 水生生物学报, 35(3): 498—503
- 张峰峰, 谢凤行, 周 可等, 2012. 利用复合微生物降解养殖水体中亚硝酸盐的初步研究. 水产科学, 31(10): 593—596
- 周晓波, 黄燕华, 曹俊明等, 2014. 5 种乳酸菌对罗非鱼生长性能、体成分、血清生化指标及肠道菌群的影响. 动物营养学报, 26(7): 2009—2017
- 胡喜峰, 王成章, 张春梅等, 2004. 纤维素酶在水产中的应用及展望. 中国水产, (4): 73—74
- 顾继锐, 苏艳秋, 伍翠芳等, 2011. 一株嗜盐光合菌的分离及对养殖污水的处理效果. 淡水渔业, 41(5): 45—51
- 徐长安, 罗秀针, 俞超超, 2011. 海洋源生防细菌 LHB02 的筛选、鉴定及其抑菌谱检测. 海洋与湖沼, 42(2): 284—288
- 高存川, 徐春厚, 2012. 微生态制剂在水产养殖水质改良中的应用. 湖北农业科学, 51(7): 1419—1422
- 高春生, 范光丽, 李建华等, 2006. 纤维素酶对草鱼生长性能和饲料消化率及体成分的影响. 中国农学通报, 22(10): 473—475
- 唐 娟, 张 毅, 李雷雷等, 2008. 地衣芽孢杆菌应用研究进

- 展. 湖北农业科学, 47(3): 351—354
- 葛文霞, 柳旭伟, 2014. 地衣芽孢杆菌在养殖业中的应用研究进展. 上海畜牧兽医通讯, (1): 17—19
- 葛春辉, 徐万里, 邵华伟等, 2009. 一株产纤维素酶细菌的筛选、鉴定及其纤维素酶的部分特性. 生物技术, 19(1): 36—40
- 董尚智, 王国霞, 陈远凤等, 2009. 饲用地衣芽孢杆菌的生物学特性研究. 饲料研究, (7) 14—18
- 韩 铭, 袁月祥, 闫志英等, 2012. 一株产耐热纤维素酶菌株的筛选及酶学性质. 应用与环境生物学报, 18(1): 75—79
- 潘 娟, 李 利, 刘丽媛, 2012. 益生菌在水产养殖生产中的应用. 畜牧与饲料科学, 33(4): 90—92
- Barsby T, Kelly M T, Gagne S M *et al*, 2001. Bogorol a produced in culture by a marine *Bacillus* sp. reveals a novel template for cationic peptide antibiotics. *Org Lett*, 3(3): 437—440
- Burgess J G, Miyashita H, Sudo H *et al*, 1993. Gene transfer in *Chromatium purpuratum*, a marine photosynthetic bacterium producing antibiotics. *J Mar Biotechnol*, 1(2): 101
- Liu K-F, Chiu C-H, Shiu Y-L *et al*, 2010. Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. *Fish Shellfish Immunol*, 28(5—6): 837—844
- Tagg J R, McGiven A R, 1971. Assay system for bacteriocins. *Appl Microbiol*, 21(5): 943
- Tamehiro N, Okamoto-Hosoya Y, Okamoto S *et al*, 2002. Bacilysocin, a novel phospholipid antibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(2): 315—320
- Vanittanakom N, Loeffler W, Koch U *et al*, 1986. Fengycin-A novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. *J Antibiotics*, 39(7): 888—901
- Vaseeharan B, Ramasamy P, 2003. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Lett App Microbiol*, 36(2): 83—87

SCREENING AND IDENTIFICATION, ENZYME CHARACTERISTICS, AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF A MARINE BACILLUS STRAIN FA08

FANG Wei-Dong^{1,2}, TANG Xu³, LIU Yuan-Sen³, LIN Ling³,
HUANG Shi-Xin³, GAO Pei-Li³, XU Chang-An³

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Fujian Provincial Haixin Group Co., Ltd., Zhangzhou 363102, China; 3. Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China)

Abstract To develop biocontrol technology with bacterium against pathogens for prevention from aquatic diseases, we screened a bacillus strain FA08 from mud in an aquaculture area in Ningde, Fujian, China. The strain could produce with cellulase and showed antimicrobial activity, and has been identified as *Bacillus licheniformis* (GenBank Accession number KM892857), based on its 16S rDNA sequence homology, together with the morphological, physiological and biochemical characteristics. Analysis of its enzyme characteristic showed that the cellulase could stand in a wide pH range from 3 to 10 and remain thermally stable in 30—80°C with relative cellulase activity up to 70%. Moreover, the cellulase was insensitive to UV. In addition, we tested the antimicrobial activity of FA08 against selected aquatic pathogens. The results revealed that supernatant of the strain could inhibit strongly against *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Staphylococcus aureus*. Therefore, strain FA08 and its cellulase product shall have promising values of development and application for aquaculture.

Key words *Bacillus licheniformis*; cellulase; screening and identification; enzymatic character; antimicrobial activity