

田照辉,徐绍刚,董颖,等. 6 株芽孢杆菌的分离鉴定和生物学特性[J]. 江苏农业科学,2021,49(13):157-161.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.13.031

6 株芽孢杆菌的分离鉴定和生物学特性

田照辉,徐绍刚,董颖,胡红霞,王巍,东天,孙爱

[北京市水产科学研究所暨国家淡水渔业工程技术研究中心(北京)/渔业生物技术北京市重点实验室,北京 100068]

摘要:为了筛选适合渔用微生态制剂的益生菌,从池塘边发酵鱼肉汤中分离芽孢杆菌,结合形态学、生理生化特征、16S rRNA 及 *gyrA*、*gyrB*、*rpoB* 和 *purH* 基因序列比对分析对其进行鉴定,并对其产淀粉酶、产蛋白酶能力及生长情况进行研究。结果表明,分离筛选的 6 株芽孢杆菌分属于 4 个种,1 株为蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*),1 株为阿氏芽孢杆菌(*B. aryabhattai*),2 株为贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*),2 株为解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*),6 株菌在 LB 液体培养基中生长良好,均具有产蛋白酶能力,其中 4 株具有产淀粉酶能力。

关键词:芽孢杆菌;分离鉴定;生物学特性;产淀粉酶能力;产蛋白酶能力

中图分类号:S917.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2021)13-0157-05

一直以来,抗生素和药物残留是食品安全的重要威胁,2018 年农业农村部组织制定了《兽用抗菌药使用减量化行动试点工作方案》,推行减抗行动。微生态制剂能够提高动物的免疫力和生产性能,为绿色饲料添加剂,在水产养殖中,微生态制剂还能有效调控水质,是实现高效绿色养殖模式的有效措施之一^[1]。

芽孢杆菌是一类重要的微生态制剂,可以形成芽孢,耐高温,具有较强的生存能力。在缺乏营养或不良环境时,芽孢杆菌可以生成芽孢来增强抗逆

性进入消化道,调节肠道菌群,抑制病原菌生长。芽孢杆菌还能促进机体免疫器官及组织的成熟,可以促进淋巴细胞数量增加,从而提高机体的体液免疫、细胞免疫水平,芽孢杆菌在动物、人体的微生态调节中得到了高度重视和广泛应用,是较好的微生态制剂菌种^[2]。刘文亮等在饲料中添加蜡样芽孢杆菌投喂凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*),发现可以改变凡纳滨对虾的肠道微生物组成,提高其生长速度,增强其抗病能力^[3],将蜡样芽孢杆菌添加到凡纳滨对虾养殖水体中,可以提高凡纳滨对虾抗白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)和感染能力^[4]。孙盛明等在饲料中添加枯草芽孢杆菌,发现能够提高团头鲂幼鱼的生长性能、抗氧化能力并改变其肠道菌群结构^[5]。张欢欢等在生

收稿日期:2020-10-16

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项(编号:CARS-45-32)。

作者简介:田照辉(1973—),女,河北保定人,硕士,副研究员,从事水产健康养殖研究。E-mail:tzahui@126.com。

[J]. Vaccine,2007,25(20):3980-3986.

[8]Hansen L, Daoussi R, Vervaeke C, et al. Freeze-drying of live virus vaccines: a review[J]. Vaccine,2015,33(42):5507-5519.

[9]沈咏舟,郑新勇,潘鑫. 我国家禽耐热型弱毒活疫苗的研究进展[J]. 安徽农业科学,2003,31(4):593-595,601.

[10]朱云飞,胡信霞,林华,等. 影响兽用疫苗接种效果因素分析与对策[J]. 上海畜牧兽医通讯,2015(6):72-74.

[11]钟声. 兽用疫苗冻干质量缺陷成因及其控制[J]. 江苏农业科学,2001(5):57-59.

[12]Wang T T, Bournazos S, Ravetch J V. Immunological responses to influenza vaccination: lessons for improving vaccine efficacy[J]. Current Opinion in Immunology,2018,53:124-129.

[13]Amanna J J, Slifka M K. Contributions of humoral and cellular immunity to vaccine-induced protection in humans[J]. Virology, 2011,411(2):206-215.

[14]Chhabra R, Forrester A, Lemiere S, et al. Mucosal, cellular, and humoral immune responses induced by different live infectious bronchitis virus vaccination regimes and protection conferred against infectious bronchitis virus Q1 strain[J]. Clinical and Vaccine Immunology,2015,22(9):1050-1059.

[15]Raj G D, Jones R C. Cross-reactive cellular immune responses in chickens vaccinated with live infectious bronchitis virus vaccine[J]. Avian Pathology,1997,26(3):641-649.

[16]Winterfield R W, Seadale E H. Newcastle disease immunization studies I. Viability of Newcastle disease virus administered as a vaccine in the drinking water[J]. American Journal of Veterinary Research,1956,17(62):5-11.

[17]Papparella V, Modugno G, Quadri E. Immunization by aerosol with La Sota strain of Newcastle disease virus[J]. Avian Pathology, 1973,2(3):231-233.

物絮团对虾养殖系统中添加其分离到的芽孢杆菌,发现能够改善菌群结构,抑制弧菌生长^[6]。芽孢杆菌、乳酸菌益生菌在卡他扇贝 (*Argopecten ventricosus*) 早期发育过程中能够促进卡他扇贝生长、抵抗溶藻弧菌病^[7]。在饲料中添加枯草芽孢杆菌后,草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 肠道和肝胰脏消化酶的活性显著提高,肠道芽孢杆菌、假单胞菌数量极显著提高,致病性弧菌、大肠杆菌数量极显著减少^[8]。芽孢杆菌能产生胞外酶,如高蛋白酶、高淀粉酶活性,可以高效降解养殖残饵中的蛋白和淀粉,改善修复养殖环境。将芽孢杆菌类应用于水产养殖,进行水质调控,还可作为有害菌的拮抗菌替代或减少抗生素的使用。枯草芽孢杆菌 HAINUP40 可显著降低水体中的亚硝酸盐、氨氮和化学需氧量,不仅可以作为水质改良剂改善水体环境,还可作为饲料添加剂提高罗非鱼的疾病抵抗力,预防无乳链球菌疾病的发生^[9]。短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) 能够抑制多种水产病原菌,对水体环境的耐受能力强,具有防治水产养殖病原菌的应用潜力^[10]。高艳侠等筛选的贝莱斯芽孢杆菌具有较强的广谱拮抗水产常见病原菌功能,能有效抑制水产养殖鱼类常见病原菌如无乳链球菌、海豚链球菌等^[11]。张皎皎等筛选的甲基营养型芽孢杆菌 (*B. methylophilus*) 对嗜水气单胞菌的抑制效果显著^[12]。

有益微生物在水产养殖中能有效改善水质,其应用越来越广泛,但仍存在一些问题,如有些菌种的效果不高,稳定性差,不能快速成为优势菌群等^[13],微生物制剂菌种还具有种属特异性和地域性,一般从微生物生活的环境中分离和筛选特定功能益生菌,因此从相应的水产养殖环境分离菌株,用于筛选水产微生物生态制剂菌种更具有合理性^[14-16]。

1 材料与方法

1.1 样品的采集

2018 年夏将池塘中零星死亡的鱼收集起来,在塘边煮成肉糜,任其自然发酵,待发酵肉汤无色无臭后,取回至北京市水产科学研究所实验室进行菌种分离。

1.2 培养基

1.2.1 营养琼脂培养基 10 g/L 蛋白胨、3 g/L 牛肉膏、5 g/L 氯化钠、2% 琼脂粉,121 ℃ 高压灭菌 15 min,倒平板上备用^[17]。

1.2.2 产蛋白酶菌株筛选培养基 12 g/L 脱脂奶粉、20 g/L 营养琼脂,113 ℃ 高压灭菌 15 min,倒平板上备用。

1.2.3 产淀粉酶菌株筛选培养基 可溶性淀粉 5 g/L、氯化钠 5 g/L、pH 值 7.2,将除琼脂外的各成分溶解于蒸馏水中,校正 pH 值,加入 2% 琼脂粉,于 115 ℃ 高压灭菌 15 min,倒平板备用。

1.3 菌种分离

在无菌条件下,于灭菌后的三角瓶中加入 90 mL 无菌水和 10 mL 发酵肉汤,混匀后取 10 mL 悬浮液置于无菌试管中,在 80 ℃ 保温 15 min 杀死非芽孢菌体,之后取 1 mL 进行梯度稀释制成悬液,浓度依次为发酵肉汤原液的 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 。分别取 50 μ L 各稀释液涂布于营养琼脂培养基,37 ℃ 恒温培养 24 h 后,挑选单菌落,传代 3 次以上,待菌落稳定后,挑取单菌落用营养琼脂液体培养基在 37 ℃、150 r/min 下培养 24 h,进行革兰氏染色、芽孢染色,在显微镜下观察,选取有芽孢的 G^{+} 菌,灭菌甘油保存于 -80 ℃。

1.4 生理生化鉴定

利用 HIBacillus™ Identification Kit 和参照微生物试验中的糖酵解试验进行鉴定。

1.5 分离纯化芽孢菌株产蛋白酶活力和产淀粉酶活力测定

挑选单菌落点种于“1.2.2”节所述培养基,于 30 ℃ 恒温培养 17 h,取出后 4 ℃ 放置 6 h,以芽孢杆菌利用底物产生透明圈直径和菌体直径的比值表示产酶活性。

挑选单菌落点种于“1.2.3”节所述培养基,于 30 ℃ 恒温培养 17 h,取出后 4 ℃ 放置 6 h,滴加鲁哥氏碘液显色,以芽孢杆菌利用底物产生透明圈直径和菌体直径的比值表示产酶活性。

1.6 分子生物学鉴定

挑选纯化的菌株参照曹凤明等的方法^[17-18]设计引物,将纯化的菌株送北京擎科生物技术有限责任公司进行 16S rRNA、*gyrA*、*gyrB*、*rpoB*、*purH* 基因测序,测序引物序列见表 1。

1.7 生长曲线的测定

将保存的芽孢杆菌在营养琼脂培养基平板上复苏,挑单克隆在 LB 培养基中于 37 ℃、150 r/min 过夜培养,将过夜培养的芽孢杆菌按 1% 的量接种于 100 mL LB 液体培养基中,于 37 ℃、150 r/min 振荡培养,每隔 2 h 使用伯乐 (Bio-Rad) 公司的 Smart

表 1 分子生物学鉴定测序引物

基因	引物序列(5′→3′)
16S rRNA	27F:AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
	1492R:GGTTACCTTCTTACGACTT
<i>gyrB</i>	UP1S:GAAGTCATCATGACCGTTCTGGA
	UP2Rs:AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCC
<i>gyrA</i>	42F:CAGTCAGGAAATGCGTACGTCCTT
	1066R:CAAGGTAATGCTCCAGGATTGCT
<i>rpoB</i>	2292F:AGGTCAACTAGTTCACTATGGAC
	3354R:AAGAACCGTAACCGGCAACTT
<i>purH</i>	70F:ACAGAGCTTGCGCTTGAAGT
	1013R:GCTTCTTGGCTGAATGAAGG

Spec Plus 分光光度计检测菌液 $D_{600\text{ nm}}$,以测定 $D_{600\text{ nm}}$ 为纵坐标、以时间为横坐标绘制生长曲线。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离纯化

经过初筛、复筛,选取 6 株分离得到的菌株,将其编号为 2019B1~2019B6,各菌株的菌落形态、革兰氏染色和芽孢产生情况见表 2。

表 2 菌落分离纯化结果

菌株编号	菌株形态	革兰氏染色情况	产芽孢情况
2019B1	乳白色,菌落表面有细纹	G ⁺	有,近中生
2019B2	乳黄色,菌落表面光滑	G ⁺	有,近中生
2019B3	乳白色,菌落表面干燥有泡状凸起	G ⁺	有,近中生
2019B4	乳白色,菌落表面粗糙,有褶皱,有泡状凸起	G ⁺	有,近中生
2019B5	乳白色,菌落表面不光滑,有细纹无褶皱	G ⁺	有,近中生
2019B6	乳黄色,菌落表面光滑湿润	G ⁺	有,近中生

2.2 生理生化反应的鉴定

利用芽孢杆菌鉴定试剂盒 HIBacillusTM Identification Kit 的检测结果见表 3,糖酵解试验结果见表 4。

2.3 产淀粉酶、蛋白酶活性

用透明圈直径/菌落直径的值表示产酶能力^[19]。由表 5 可以看出,6 株菌株均具有产蛋白酶能力,其中 2019B1 和 2019B6 产蛋白酶能力最强;2019B2、2019B6 无产淀粉酶能力,其他 4 株具有产淀粉酶能力,其中 2019B5 产淀粉酶能力最强。

2.4 分子生物学鉴定结果和系统发育树

将各菌株的 16S rRNA 核苷酸序列在 GenBank

表 3 芽孢杆菌鉴定试剂盒检测结果

检测项目	检测结果					
	2019B1	2019B2	2019B3	2019B4	2019B5	2019B6
丙二酸盐	-	-	-	-	-	-
伏-普(V-P)试验	+	+	+	+	+	+
柠檬酸盐	+	-	+	+	+	+
半乳糖苷	-	-	-	-	-	-
硝酸盐	+	+	+	+	+	+
过氧化氢	+	+	+	+	+	+
精氨酸	D	-	+	+	+	+
蔗糖	+	+	-	+	-	-
甘露醇	-	-	-	-	-	-
葡萄糖	+	+	-	-	-	-
阿拉伯糖	-	-	-	-	-	-
海藻糖	+	+	+	-	-	-

注:D 表示延迟;+ 表示阳性;- 表示阴性。

表 4 糖发酵试验结果

试验菌种	发酵特性	各供试糖检测结果		
		乳糖	葡萄糖	蔗糖
大肠杆菌对照	产酸	-	-	++
	产气	-	-	++
2019B1	产酸	-	+++	+++
	产气	-	-	-
2019B2	产酸	-(生长 5 d: +)	+(生长 5 d: +++)	+++
	产气	-	-	-
2019B3	产酸	-	+++	-
	产气	-	-	-
2019B4	产酸	-	+	+
	产气	-	-	-
2019B5	产酸	-	+	+
	产气	-	-	-
2019B6	产酸	-	-	-
	产气	-	-	-
阴性对照	产酸、产气	-	-	-

注:- 表示不生长;+ 表示生长差;++ 表示生长一般;+++ 表示生长良好。

中进行 BLAST 比对,发现每株都有多个与其同源性达 99% 以上的种,选取 GenBank 中与 6 株菌株同源性高的菌株的模式菌株的 16S rRNA 序列,用 MEGA 6 软件进行同源性比对并构建邻接(NJ)树,自展次数为 1 000 次(图 1)。由系统发育树可见,2019B1 与蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*)聚为一支,2019B2 与阿氏芽孢杆菌(*B. aryabhattai*)聚为一支,2019B3、

表 5 分离菌株产蛋白酶、淀粉酶活性的测定结果

菌株号	产蛋白酶活性	产淀粉酶活性
2019B1	1.50	1.67
2019B2	1.40	
2019B3	1.32	1.60
2019B4	1.30	1.60
2019B5	1.29	1.69
2019B6	1.50	

注:以芽孢杆菌利用底物产生透明圈直径和菌体直径的比值表示产酶活性。

2019B4 与贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*)聚为一支,

2019B5、2019B6 与解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)聚为一支。

除利用 16S rRNA 序列进行测序比对外,还对各菌株进行 *gyrA*、*gyrB*、*rpoB* 和 *purH* 基因的测序,并在 GenBank 中进行 BLAST 比对,发现 2019B1 的 *purH* 基因序列比对结果为蜡样芽孢杆菌,2019B3、2019B4 的 *gyrA*、*purH* 基因序列的比对结果分别为贝莱斯芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌,*rpoB* 基因序列的比对结果均为贝莱斯芽孢杆菌,2019B5 的 *gyrA* 基因序列比对结果为解淀粉芽孢杆菌,2019B6 的 *rpoB*、*purH* 基因序列比对结果为解淀粉芽孢杆菌。

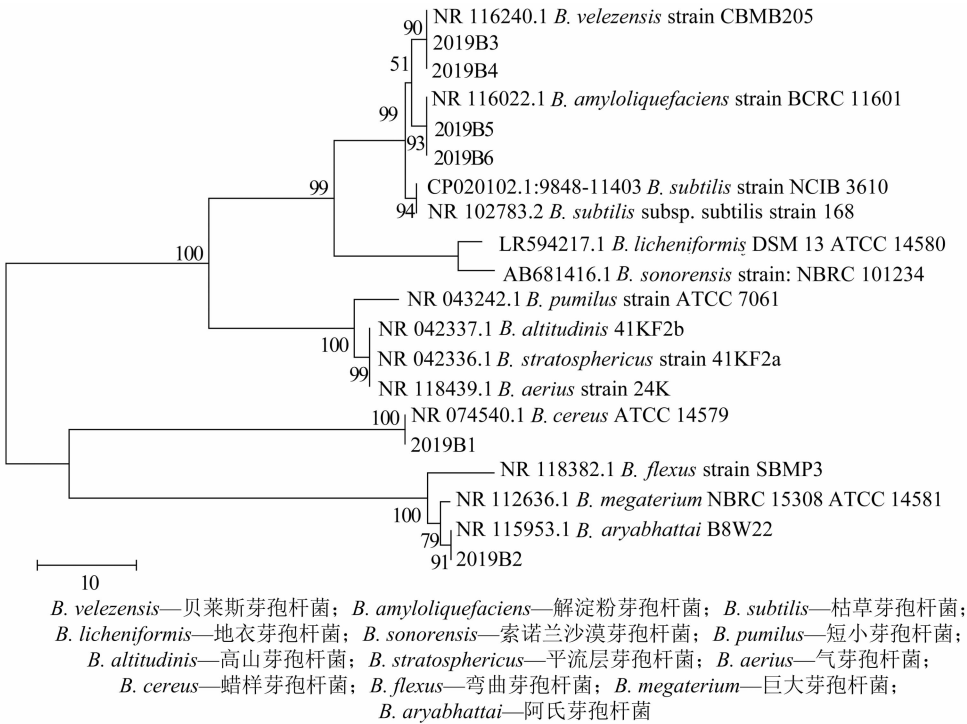


图1 菌株的16S rRNA系统发育树

2.5 菌株鉴定结果

结合形态学、生理生化和分子生物学检测结果可知,2019B1 为蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*),2019B2 为阿氏芽孢杆菌(*B. aryabhattai*),2019B3、2019B4 为贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*),2019B5 和 2019B6 为解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)。

2.6 生长曲线

由图 2 可以看出,6 株芽孢杆菌均能在 37 ℃ 的 LB 液体培养基中正常生长,达到较高浓度。其中,2019B2 长势最好,培养 13 h 时已接近稳定期;2019B1、2019B2 在培养 2 h 时就开始进入快速增长期,在培养 6.3 h 后浓度增长放缓,2019B1 尤其明

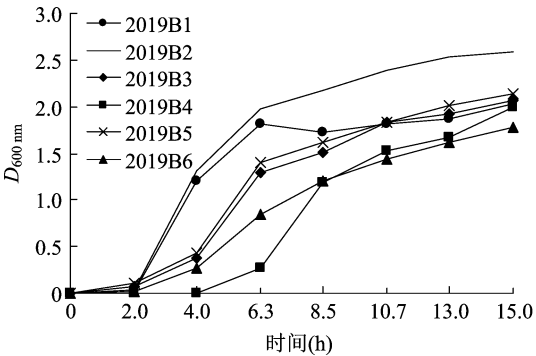


图2 菌株在 37℃ LB 培养基中的生长曲线

显;2019B4 在培养 4 h 才开始生长,并逐渐结束迟缓期,在培养 6.3 h 进入快速生长期;2019B6 的生

长情况比较平稳,2019B3、2019B5 的生长曲线比较一致,在培养 4 h 内和 2019B6 的长势相似,培养 2 h 内为迟缓期,培养 2~4 h 时生长开始增快,培养 4 h 后 2019B3、2019B5 快速增长,远远超过 2019B6。

3 讨论与结论

枯草芽孢杆菌于 1835 年被正式命名,随着研究技术的进步,人们发现枯草芽孢杆菌是一个表型相似近缘种群(简称枯草群),其形态特征和生理生化特征是早期进行各种种群分类与鉴定的基础,16S rRNA 基因含有丰富的信息量,已经成为细菌系统发育和分类鉴定的标准,但是将分离筛选的菌株进行 16S rRNA 基因序列同源性检索时发现,多数菌株与 GenBank 数据库中几种芽孢杆菌的同源性达 99% 以上,这是因为枯草芽孢杆菌是一个表型相似近缘种群(简称枯草群),枯草群多个种类的 16S rRNA 基因序列相似性均在 99.5% 以上,目前 NCBI (美国国家生物技术信息中心)核酸数据库中,16S rRNA、*gyrB*、*gyrA*、*rpoB*、*purH* 等基因已涵盖了枯草群的各个种,可利用这些基因进行相关菌株的鉴定和鉴别^[18],因此本研究在分离筛选芽孢杆菌时,不仅进行了生理生化鉴定,还进行了分子生物学鉴定,在进行分子生物学鉴定时除进行 16S rRNA 测序建树,各菌株还进行了 *gyrA*、*gyrB*、*rpoB* 和 *purH* 基因的测序同源比对,将传统方法与分子生物学方法相结合,互为补充和验证。

在生产过程中微生态制剂对于筛选益生菌尤其关键,种属特异性是筛选合适益生菌的一个先决条件,不同来源的芽孢杆菌在不同动物胃肠道内的黏附繁殖能力及相关生理功能有所不同^[16]。水产养殖户在池边将零星死亡的鱼煮成肉糜自然发酵,待其无臭无味后泼洒使用,能有效地改善水质,池塘养殖鱼未出现不良反应,说明发酵后的鱼肉汤是安全的,可能含有能有效净化水质的微生物,从这种发酵的鱼肉汤中分离的菌株,可能来源于鱼体或周边环境,更适合在本区域池塘养殖使用。

本研究分离鉴定得到了 6 株芽孢杆菌,分属于 4 种,即 1 株蜡样芽孢杆菌,1 株阿氏芽孢杆菌,2 株解淀粉芽孢杆菌,2 株贝莱斯芽孢杆菌,均具有产蛋白酶能力,其中 4 株具有产淀粉酶能力,6 株菌在 LB 液体培养基中生长良好,为之后进一步研究其环境耐受性、体外抑菌试验、水质净化作用及对鱼类的免疫作用研究奠定了基础。

参考文献:

- [1]王秋菊,崔一喆.微生态制剂及其应用[M].北京:科学工业出版社,2014:1-37.
- [2]石水琴,蒋雯,袁林,等.4株芽孢杆菌的分离鉴定与生物学特性分析[J].江苏农业科学,2018,46(2):112-115.
- [3]刘文亮,许华,唐杨,等.饲料中补充蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)生物膜对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)生长、抗病力及其肠道微生物组成的影响[J].渔业科学进展,2017,38(4):90-98.
- [4]王春迪,宋晓玲,张晓静,等.养殖水体中添加蜡样芽孢杆菌 PC465 对凡纳滨对虾抗病力的影响[J].中国水产科学,2016,23(1):146-155.
- [5]孙盛明,苏艳莉,张武肖,等.饲料中添加枯草芽孢杆菌对团头鲂幼鱼生长性能、肝脏抗氧化指标、肠道菌群结构和抗病力的影响[J].动物营养学报,2016,28(2):507-514.
- [6]张欢欢,王秀华,李晨,等.一株芽孢杆菌的分离鉴定及在生物絮团对虾养殖中的应用[J].渔业科学进展,2016,37(2):111-118.
- [7]Abasolo-Pacheco F, Campa-Córdova Á I, Mazón-Suástegui J M, et al. Enhancing growth and resistance to *Vibrio alginolyticus* disease in catarina scallop (*Argopecten ventricosus*) with *Bacillus* and *Lactobacillus* probiotic strains during early development[J]. Aquaculture Research, 2017, 48(9):1-11.
- [8]李卫芬,沈涛,陈南南,等.饲料中添加枯草芽孢杆菌对草鱼消化酶活性和肠道菌群的影响[J].大连海洋大学学报,2012,27(3):221-225.
- [9]张峰峰,谢凤行,赵玉洁,等.枯草芽孢杆菌水质净化作用的研究[J].华北农学报,2009,24(4):218-221.
- [10]赵彩春,陈国明,张家学.短小芽孢杆菌 HLK8-1 的分离鉴定及抑菌特性分析[J].微生物学杂志,2016,36(2):33-38.
- [11]高艳艳,张德锋,可小丽,等.罗非鱼源无乳链球菌肠道拮抗芽孢杆菌的筛选及其生物学特性[J].微生物学报,2019,59(5):926-938.
- [12]张皎皎,马富平,熊波,等.一株新型嗜水气单胞菌拮抗菌的筛选及鉴定[J].西南大学学报(自然科学版),2017,39(12):18-23.
- [13]李步先.虾蟹养殖池塘益生菌的分离筛选及降解特性初步研究[D].青岛:中国海洋大学,2015:7.
- [14]李洪鹏,李秋芬,张艳,等.浅海养殖环境复合生态净化菌群的筛选及其净化功能研究[J].渔业科学进展,2009,30(2):46-53.
- [15]巴翠玉,张林波,张培军,等.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.
- [16]赵东,牛广杰,彭志云,等.包包曲中 5 株枯草芽孢杆菌的分离与初步鉴定[J].中国酿造,2010(8):65-68.
- [17]曹凤明,杨小红,马鸣超,等.枯草芽孢杆菌近缘种群鉴定方法研究进展[J].微生物学通报,2014,41(5):968-974.
- [18]王佩,武亚方,卢江丽,等.不同位置土壤中枯草芽孢杆菌产蛋白酶活力的比较[J].湖北畜牧兽医,2014,35(3):12-13.