

孙云贵,姚海静,张力元,等.水产源芽孢杆菌抑菌活性、对抗菌药物和消毒剂耐受性的研究[J].江苏农业科学,2024,52(15):187-195.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2024.15.024

# 水产源芽孢杆菌抑菌活性、对抗菌药物和消毒剂耐受性的研究

孙云贵<sup>1</sup>,姚海静<sup>1</sup>,张力元<sup>1</sup>,谈瑞明<sup>1</sup>,王兴强<sup>1,2</sup>,高迎莉<sup>1,2</sup>

(1.江苏海洋大学海洋科学与水产学院,江苏连云港 222005;2.江苏省海洋生物技术重点实验室,江苏连云港 222005)

**摘要:**为筛选出具有抑菌性,且对抗菌药物和水体消毒剂具有耐受性的优良益生菌,通过牛津杯法测定了 24 株水产源芽孢杆菌对常见 6 株水产病原菌[溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*) VA1 株和 VA2 株,副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*, VP)、哈维氏弧菌(*V. harveyi*, VH)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, AH)和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)]的抑菌活性;运用 K-B 纸片法探究了 24 株芽孢杆菌对 6 种常用水产抗菌药物(多西环素、氟苯尼考、新霉素、环丙沙星、恩诺沙星和复方新诺明)的敏感性;并采用稀释涂布法测试了 24 株芽孢杆菌对 8 种常用水产消毒剂(聚维酮碘溶液、戊二醛苯扎溴铵溶液、复合碘溶液、苯扎溴铵溶液、浓戊二醛溶液、过硫酸氢钾、漂白粉和高锰酸钾)的耐受性。结果表明:体外抑菌试验中,贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*) BV1、BV2、BV3 对 6 种致病菌均表现出显著的抑制作用;药敏试验中,10 株芽孢杆菌(BV1、BT1、BS2、BS4、BS6、BS9、BS10、BH3、BC1 和 BA1)均对新霉素耐药;消毒剂耐受性试验中,大多数的菌株对特效改底王、漂白粉以及高锰酸钾的常规消毒剂量显示出耐受性,但是聚维酮碘、戊二醛苯扎溴铵、复合碘、苯扎溴铵以及浓戊二醛的常规消毒剂量对菌株都有一定的抑制效果。综合以上试验结果,选取 BV1 作为 5 种具有抑制效果的消毒产品的定量试验菌株,结果显示,高浓度的消毒剂会严重影响芽孢杆菌的活性,对于贝莱斯芽孢杆菌 BV1 来说,聚维酮碘、戊二醛和苯扎溴铵和浓戊二醛的消毒浓度不超过 2 mg/L;复合碘和苯扎溴铵的消毒浓度不超过 1 mg/L。水产源的贝莱斯芽孢杆菌 BV1 有较强的抗病原菌能力,对抗菌药物有一定耐药性,对常见的消毒产品抗性较好,可以作为潜在益生菌株用于后续水产益生菌制剂的开发利用。此外,常用消毒剂用于水体泼洒的剂量最好不要超过建议使用剂量,以防影响益生菌的活性。

**关键词:**水产动物;芽孢杆菌;病原菌;抗菌药物;消毒产品;抗性

**中图分类号:**S917.1;S182 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2024)15-0187-08

我国的水产养殖业在过去几十年里取得了惊人的发展。1978—2021 年间,中国的人工养殖水产品总产量从 332.3 万 t 增长至 5 394.1 万 t,增长幅度巨大;2021 年的养殖水产品总产量更是占据了全球水产品养殖总产量的 60% 以上,对全球水产养殖产业作出了巨大贡献<sup>[1-2]</sup>。然而,随着产量的增加,疾病防控和环保等方面也面临着诸多挑战。

目前,我国水产养殖主要通过抗生素来预防和

治疗水产疾病。但抗生素的大量使用,会导致抗生素耐药菌株的产生,这些抗生素耐药菌还可能将耐药质粒水平转移给有益菌和其他细菌,使其携带抗生素耐药质粒,致使抗生素抑菌和杀菌效果越来越弱的同时,还会对人类健康和环境安全产生不利的影响<sup>[3]</sup>。近年来,为了防止抗生素的滥用,我国对水产抗生素的使用要求变得愈发严格。2022 年 3 月,农业农村部发布的《农业农村部办公厅关于做好 2023 年水产绿色健康养殖技术推广“五大行动”工作的通知》中提到“骨干基地要实现用药量、特别是抗生素使用量同比持续降低”。翌年 6 月,我国农业农村部又发布《夏季水产技术指引》,规定“不得向池塘泼洒抗生素,不得低剂量内服抗生素预防疾病,不得使用违禁药物;严格遵循《水产养殖用药明白纸 2022 年 1 号、2 号》中规定水产养殖药物。”因此,为了践行发展环境友好型水产养殖,寻找高效且绿色的抗生素替代品迫在眉睫。

收稿日期:2023-08-23

基金项目:江苏省政策引导类计划(苏北科技专项)(编号:SZ-LYG202133);江苏省高等学校基础科学(自然科学)研究面上项目(编号:22KJB240001);江苏省生物技术重点实验室开放基金(编号:HS2020003);江苏省优势学科建设项目。

作者简介:孙云贵(1998—),男,山西晋中人,硕士研究生,从事水产动物病害与免疫研究。E-mail:Sunyungui@outlook.com。

通信作者:高迎莉,博士,讲师,从事水产动物病害与免疫研究。E-mail:yingli.gao@jou.edu.cn。

益生菌作为水产病害防控管理中抗生素替代的策略之一,在水产养殖应用中备受关注<sup>[4]</sup>。20 世纪 80 年代,芽孢杆菌(*Bacillus toyoi*)始用于日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)的养殖中,降低病原菌引起的死亡,开启了益生菌应用于水产养殖的新局面<sup>[5]</sup>。益生菌能抑制病原菌、促进宿主生长,其环境友好、安全有效等优点在水产养殖行业中已引起广泛关注。然而,益生菌在水产养殖过程中的实际使用状况、存在的问题(如同时使用抗生素及化学消毒剂等)、面临的挑战以及今后的发展方向仍需要深入探究<sup>[6]</sup>。在生产中,养殖户使用益生菌的方法主要依赖于经销商提供的指导或自身在养殖中积累的经验。有些养殖户基于节约成本,减量使用益生菌,或担心效力不足,同时使用抗生素及化学消毒剂,致使益生菌的施用效果不佳<sup>[7]</sup>。因此,测定益生菌对常用的养殖水体消毒剂以及已批准使用的用于病害防治的水产养殖兽药(如多西环素、氟苯尼考、新霉素、环丙沙星、恩诺沙星和复方新诺明等)的耐受性,是选用益生菌菌株、水体消毒剂及抗菌药物的重要参考。本试验选取前期从养殖虾塘中分离的芽孢杆菌菌株,以期筛选出具有较强抑菌性、对抗菌药物和水体消毒剂耐受较好的优良益生菌,为养殖过程中的益生菌的选择和使用,以及开发水产动物益生菌制剂提供理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 芽孢杆菌菌株

2021 年 5—8 月,笔者所在

实验室从江苏连云港养殖虾塘的虾体、底泥和水体中分离并鉴定 24 株芽孢杆菌(表 1)。

表 1 芽孢杆菌菌株

编号	菌株名称
BV1	贝莱斯芽孢杆菌( <i>B. velezensis</i> )
BV2	贝莱斯芽孢杆菌
BV3	贝莱斯芽孢杆菌
BS1	枯草芽孢杆菌( <i>B. subtilis</i> )
BS2	枯草芽孢杆菌
BS3	枯草芽孢杆菌
BS4	枯草芽孢杆菌
BS5	枯草芽孢杆菌
BS6	枯草芽孢杆菌
BS7	枯草芽孢杆菌
BS8	枯草芽孢杆菌
BS9	枯草芽孢杆菌
BS10	枯草芽孢杆菌
BL1	地衣芽孢杆菌( <i>B. licheniformis</i> )
BL2	地衣芽孢杆菌
BL3	地衣芽孢杆菌
BL4	地衣芽孢杆菌
BC1	蜡样芽孢杆菌( <i>B. cereus</i> )
BT1	东洋芽孢杆菌( <i>B. toyonensis</i> )
BH1	海内氏芽孢杆菌( <i>B. haynesii</i> )
BH2	海内氏芽孢杆菌
BH3	海口芽孢杆菌( <i>B. haikouensis</i> )
BA1	海水芽孢杆菌( <i>B. aquimaris</i> )
BA2	海水芽孢杆菌

#### 1.1.2 病原菌菌株

实验室保存的 6 株水产常见致病菌,见表 2。

表 2 病原菌菌株

编号	分离时间(年-月)	来源	菌株名称
VA1	2020-08	中国对虾( <i>Fenneropenaeus chinensis</i> )	溶藻弧菌( <i>V. alginolyticus</i> )
VA2	2020-08	中国对虾	溶藻弧菌
VP	2021-06	许氏平鲉( <i>Sebastods schlegelii</i> )	副溶血弧菌( <i>V. parahaemolyticus</i> )
VH	2020-08	牙鲆( <i>Paralichthys olivaceus</i> )	哈维氏弧菌( <i>V. harveyi</i> )
AH	2019-04	鲫鱼( <i>Carassius auratus</i> )	嗜水气单胞菌( <i>A. hydrophila</i> )
PA	2019-04	鲫鱼	铜绿假单胞菌( <i>P. aeruginosa</i> )

#### 1.1.3 药敏纸片

药敏纸片购自杭州微生物试剂有限公司,其含量以及药物敏感性判断标准见表 3。根据《水产养殖用药明白纸 2020 年 2 号》名单,氟苯尼考粉(水产用)、恩诺沙星粉(水产用)、盐酸多西环素粉(水产用)、硫酸新霉素粉(水产用)以及维生素 C 磷酸酯镁盐酸环丙沙星预混剂是已批准的水产养殖用的抗菌药物。

#### 1.1.4 消毒剂

本试验所用水产养殖常用消毒剂分别是聚维酮碘溶液、戊二醛苯扎溴铵溶液、复合碘溶液、苯扎溴铵溶液、浓戊二醛溶液、过硫酸氢钾、漂白粉和高锰酸钾,详见表 4。根据《水产养殖用药明白纸 2020 年 2 号》名单,戊二醛苯扎溴铵溶液(水产用)、浓戊二醛溶液(水产用)、含氯石灰(水产用)、苯扎溴铵溶液(水产用)、复合碘溶液(水产

表3 药敏纸片判定标准

抗菌药物	含量 (μg/片)	抑菌圈直径(mm)		
		耐药(R)	中度敏感(M)	敏感(S)
多西环素(DX)	30	≤10	11~13	≥14
氟苯尼考(FON)	30	≤12	13~17	≥18
新霉素(N)	30	≤17	18~22	≥23
环丙沙星(CIP)	5	≤15	16~20	≥21
恩诺沙星(ENR)	10	≤15	16~18	≥19
复方新诺明(SXT)	23.75	≤10	11~15	≥16

表4 消毒剂详情

名称	主要成分	生产厂家
聚维酮碘	聚维酮碘(10%)	广州市汇邦动物药业有限公司
戊二醛苯扎溴铵	戊二醛(10%),苯扎溴铵(10%)	山西九安生物科技有限公司
复合碘	活性碘(1.9%)	山西昌泰动物药业有限责任公司
苯扎溴铵	苯扎溴铵(45%)	山西昌泰动物药业有限责任公司
浓戊二醛	戊二醛(20%)	广州市汇邦动物药业有限公司
特效改底王	过硫酸氢钾复合盐、无水硫酸钠等	福斯特生物科技(泰州)有限公司
漂白粉	次氯酸钙、氧化钙和氢氧化钙的混合物	天棣亿兴源化工有限公司
高锰酸钾	高锰酸钾	潍坊华凯生物科技有限公司

1.2.2 抗菌药物耐受性试验 采用纸片扩散法(K-B法)<sup>[8]</sup>确定芽孢杆菌对药物的敏感性,根据药敏纸片抑菌直径范围进行药物敏感性判定。待测芽孢杆菌活化后,制备10<sup>8</sup> CFU/mL菌悬液,吸取100 μL菌液涂布于平板上,每个平板贴附4个药敏纸片,重复3次,28℃培养24 h,测定抑菌圈直径。

1.2.3 消毒剂耐受性试验 通过不同消毒剂对芽孢杆菌的抑菌作用,判断芽孢杆菌对消毒剂的耐受性。芽孢杆菌活化后,分别制备10<sup>6</sup> CFU/mL菌悬液,在TSB平板上均匀涂布;在牛津杯孔中加入40 μL消毒剂(聚维酮碘溶液20 mg/L、戊二醛苯扎溴铵溶液20 mg/L、复合碘溶液20 mg/L、苯扎溴铵溶液20 mg/L、浓戊二醛溶液20 mg/L、过硫酸氢钾20 mg/L、漂白粉20 mg/L、高锰酸钾20 mg/L),28℃培养12~18 h,观察芽孢杆菌对消毒剂的耐受性,重复3次。试验结果判定标准:抑菌圈直径在8 mm以下无抑菌作用,在8~10 mm之间为低敏感,>10~15 mm为中度敏感,在15 mm以上为高敏感度。进一步探究不同浓度的敏感的消毒剂对芽孢杆菌存活的影响。芽孢杆菌活化后,制备10<sup>6</sup> CFU/mL菌悬液,不同消毒剂浓度设为0(对照组,未添加消毒剂)、1、2、4、8、16 mg/L,分别添加到制备好的菌悬液中,重复3次。28℃60 r/min振荡培养;并分

用)、聚维酮碘溶液(水产用)、过硫酸氢钾复合物粉是已批准的水产养殖用的消毒剂。

1.2 试验方法

1.2.1 体外抑菌试验 采用牛津杯法<sup>[7]</sup>鉴定24株芽孢杆菌对水产常见致病菌的抑制效果,病原菌100 μL菌悬液(10<sup>6</sup> CFU/mL)涂布于TSB平板,牛津杯孔中加入40 μL的待测芽孢杆菌菌液,重复3次,28℃培养24 h,测量抑菌圈直径(mm),观察抑菌效果。

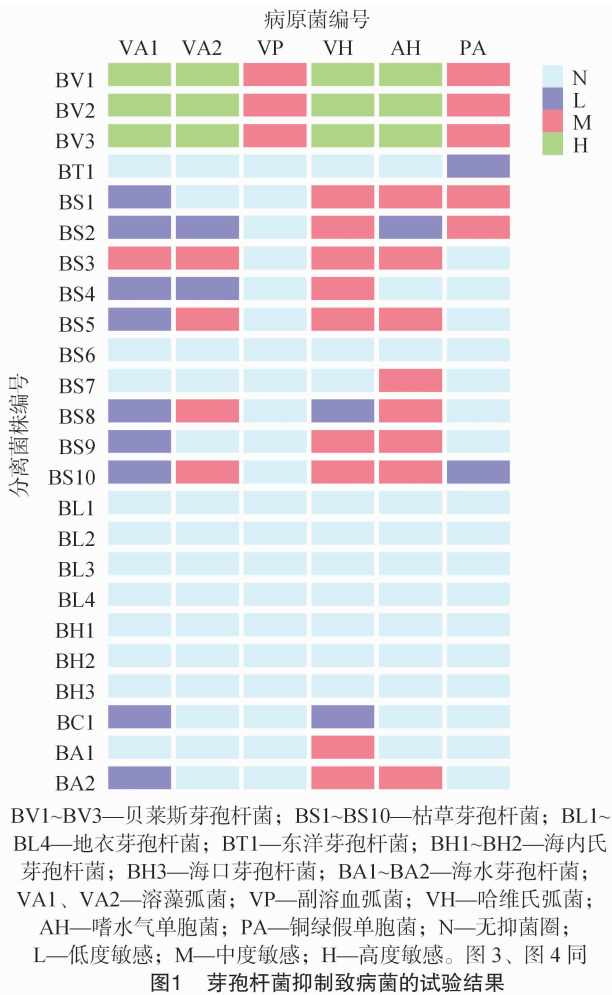
别在0、1、2、4、6、8、12、24 h取100 μL培养液于TSB平板涂布,每个时间点重复3次,28℃培养24 h,计数单菌落数量。

1.2.4 数据处理 所得数据用Excel、SPSS 19.0进行图表绘制及分析,所得数据均以平均值±标准差表示。

2 结果与分析

2.1 体外抑菌试验结果

在体外抑菌试验中,不同芽孢杆菌对不同病原菌的抑制效果不同(图1)。贝莱斯芽孢杆菌BV1、BV2和BV3对6种水产常见致病菌均具有明显的抑制作用(图2);东洋芽孢杆菌BT1对6株常见的病原菌无抑制效果,仅对铜绿假单胞菌具有不明显的抑制效果;不同的枯草芽孢杆菌对病原菌的抑制效果不一样,其中BS3株的抑菌效果较好,可以抑制溶藻弧菌、哈维氏弧菌和嗜水气单胞菌的生长,而BS6株无法抑制6株病原菌的生长;4株地衣芽孢杆菌BL1~BL4、2株海内氏芽孢杆菌BH1和BH2以及海口芽孢杆菌BH3均对6株病原菌无抑制效果;蜡样芽孢杆菌BC1仅对1株溶藻弧菌和哈维氏弧菌具有不明显的抑制效果;2株海水芽孢杆菌BA1和BA2的抑菌效果不如枯草芽孢杆菌和贝莱斯芽孢杆菌。



2.2 抗菌药物耐受性试验结果

由图 3 可知,24 株芽孢杆菌对多西环素与氟苯尼考均具有高度或中度敏感性;新霉素药敏结果显示,有 10 株芽孢杆菌 (BV3、BT1、BS2、BS4、BS6、BS9、BS10、BH3、BC1 和 BA1) 具有耐药性,其他 14 株均具有中度敏感性;环丙沙星与恩诺沙星的药敏结果表明,枯草芽孢杆菌 BS6 对这 2 种药显示耐药性,海口芽孢杆菌 BH3 对环丙沙星具有中度敏感性,其他菌株都显示出对环丙沙星的高度药物敏感性;复方新诺明药敏试验表明,除了东洋芽孢杆菌 BT1 与蜡样芽孢杆菌 BC1 菌株显示耐药性外,其他菌株对该药都具有高度敏感性。

2.3 消毒剂耐受性试验结果

2.3.1 24 株菌对消毒剂耐受结果 由图 4 可知,过硫酸氢钾、漂白粉以及高锰酸钾对大多数的芽孢杆菌无抑制作用,除了漂白粉对东洋芽孢杆菌 BT1、地衣芽孢杆菌 BL2 和 BL4 的抑制作用明显,过硫酸氢钾对 3 种贝莱斯芽孢杆菌 BV1 ~ BV3 有中度的抑

制作用。但是聚维酮碘、戊二醛苯扎溴铵、复合碘、苯扎溴铵以及浓戊二醛的高消毒剂量对芽孢杆菌都有一定的抑制效果。

2.3.2 菌株 BV1 对 5 种消毒剂耐受结果 挑选抑菌效果、耐药性以及消毒剂耐受性较好的菌株 BV1 进一步探究不同浓度的聚维酮碘、戊二醛苯扎溴铵、复合碘、苯扎溴铵以及浓戊二醛对存活率的影响。由图 5 - a 可知 BV1 在未添加聚维酮碘消毒液的对照组 (0 mg/L) 中有自然消亡的过程,24 h 活菌数量下降 2 个数量级。添加不同浓度的聚维酮碘后,试验组 BV1 菌数随着时间推移均呈先线性减少而后再略回升趋势,其中在 1 h 除 16 mg/L 试验组 BV1 数量表现出急剧下降趋势外,其他各浓度组的活菌数下降趋势均较缓,但下降程度大体高于对照组。4 mg/L 试验组 BV1 数量介于 8 mg/L 和 16 mg/L 试验组间。12 h 后,对照组和各试验组的活菌数量有所升高。

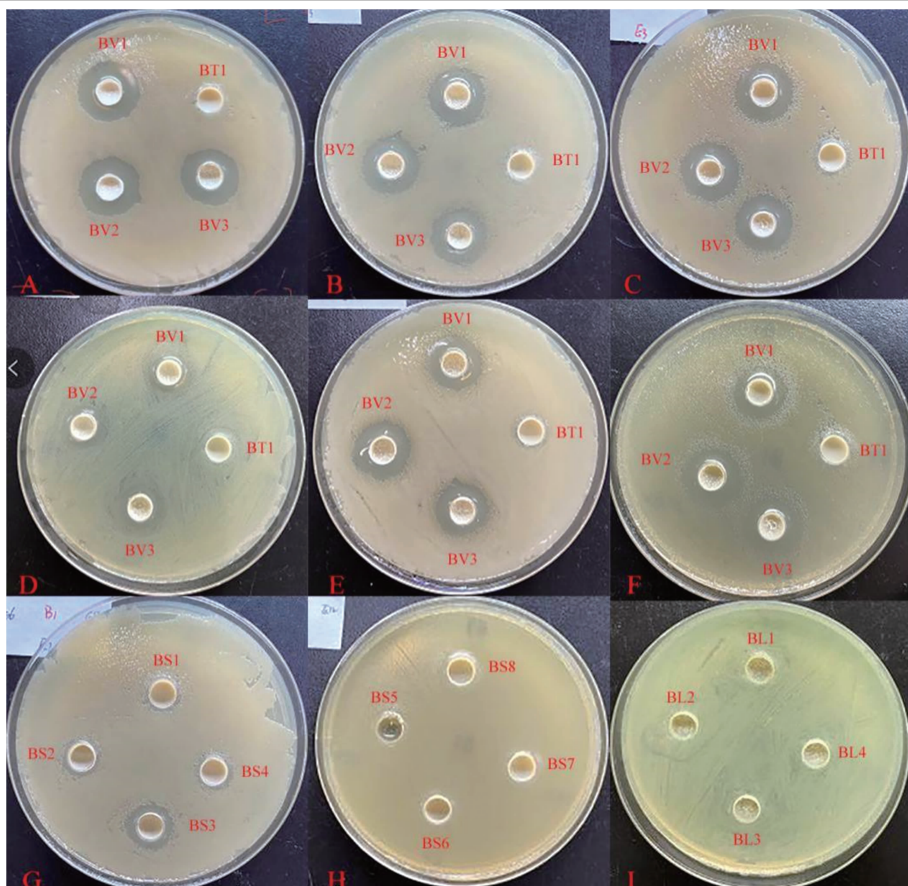
BV1 对不同浓度戊二醛苯扎溴铵的耐受性试验结果 (图 5 - b) 表明,在各个时间点,未添加消毒剂的对照组 (0 mg/L) 活菌数均大于添加消毒剂组;不同消毒剂浓度试验组的 BV1 活菌数随着时间推移均呈线性减少,且戊二醛苯扎溴铵的浓度越高, BV1 活菌数量下降越快,其中 4、8、16 mg/L 试验组的活菌数量分别在 24、8、1 h 降为 0。

BV1 对不同浓度复合碘的耐受性试验结果见图 5 - c,在各个时间点未添加消毒剂组 (0 mg/L) 活菌数均大于添加消毒剂组;不同消毒剂浓度试验组的 BV1 活菌数随着时间推移均减少,其中,前 6 h 内,1 mg/L 与 2 mg/L 试验组的活菌数降低趋势一致,且各个时间点活菌计数差异较小;4 mg/L 试验组的活菌数在前 2 h 时间点内活菌数无差异,且无降低趋势,但在 2 h 后活菌数急剧降低。8 mg/L 与 16 mg/L 试验组的活菌数下降较快。

BV1 对不同浓度苯扎溴铵的耐受性结果如图 5 - d 所示,在各个时间点,未添加消毒剂对照组 (0 mg/L) 活菌数均大于添加消毒剂组,不同消毒剂浓度试验组的 BV1 活菌数随着时间推移均减少,且苯扎溴铵的浓度越高, BV1 活菌数量下降越快。4、8、16 mg/L 试验组的 BV1 活菌数量均在 1 h 内迅速下降 2 个数量级。

BV1 对不同浓度浓戊二醛的耐受性试验结果见图 5 - e,在各个时间点,未添加消毒剂对照组 (0 mg/L) 活菌数均大于添加消毒剂组,不同消毒剂





A—F—BV1~BV3 分别对嗜水气单胞菌 AH、溶藻弧菌 VA1、溶藻弧菌 VA2、副溶血弧菌 VP、哈维氏弧菌 VH 和铜绿假单胞菌 PA 具有明显的抑菌效果,然而 BT1 无抑菌效果;G—BS3 对溶藻弧菌 2 具有明显的抑菌效果,然而 BS1、BS2 和 BS4 无抑菌效果;H—BS5~BS8 对副溶血弧菌无抑菌效果;I—BL1~BL4 对铜绿假单胞菌无抑菌效果

图2 部分芽孢杆菌对 6 种致病菌的体外抑菌效果

浓度试验组的 BV1 活菌数随着时间推移均减少,且浓戊二醛的浓度越高,活菌数量下降越快。8 mg/L 和 16 mg/L 试验组的活菌数量均在 12 h 迅速下降 2 个数量级。

### 3 讨论与结论

本试验比较了水产源芽孢杆菌对常见病原菌的抑菌能力,并进一步检测了芽孢杆菌对抗菌药物和消毒剂的耐受性,将抑菌能力强、对抗菌药物以及对常见消毒剂耐受性好的芽孢杆菌菌株筛选出来作为潜在益生菌,进而筛选出最适合实际应用的潜在益生菌菌株。

#### 3.1 芽孢杆菌抑菌株的筛选

芽孢杆菌作为益生菌应用于水产养殖中由来已久。芽孢杆菌广泛存在于水生环境中,常作为益生菌制剂的主要成分改善水体和维持养殖水环境微生物稳态,抑制病原菌的生长<sup>[8]</sup>;芽孢杆菌还可以刺激免疫系统产生信号分子,使宿主免疫系统产

生具有杀菌活性的有效分子,上调宿主免疫系统的活性,增强其对病原体的杀菌能力<sup>[9]</sup>。

对病原体的拮抗作用是益生菌筛选的一项重要指标<sup>[10]</sup>。在益生菌初筛过程中,由于时限或效益的考虑,往往以单种或少量细菌作为指示菌进行筛选<sup>[11-13]</sup>。然而,水产养殖中的细菌病原体种类繁多,诸如弧菌 (*Vibrio* spp.)、气单胞菌 (*Aeromonas* spp.)、爱德华氏菌 (*Edwardsiella* spp.)、黄杆菌 (*Flavobacterium* spp.)、假单胞菌 (*Pseudomonas* spp.) 和微球菌 (*Pseudomonas* spp.) 等<sup>[14]</sup>。其中,弧菌和气单胞菌较为常见。

贝莱斯芽孢杆菌对养殖水体、鱼类的生长性能以及减少动物疾病方面具有良好的效果<sup>[15]</sup>。Li 等的研究表明,从健康的日本沼虾体内分离出的贝莱斯芽孢杆菌 CPA1-1,在浓度达到  $10^4$  CFU/mL 时,对维氏气单胞菌、嗜水气单胞菌、副溶血弧菌等具有良好的抑菌效果<sup>[16]</sup>。本研究中,贝莱斯芽孢杆菌 BV1、BV2 和 BV3 对选定的 6 种病原菌均具有中等

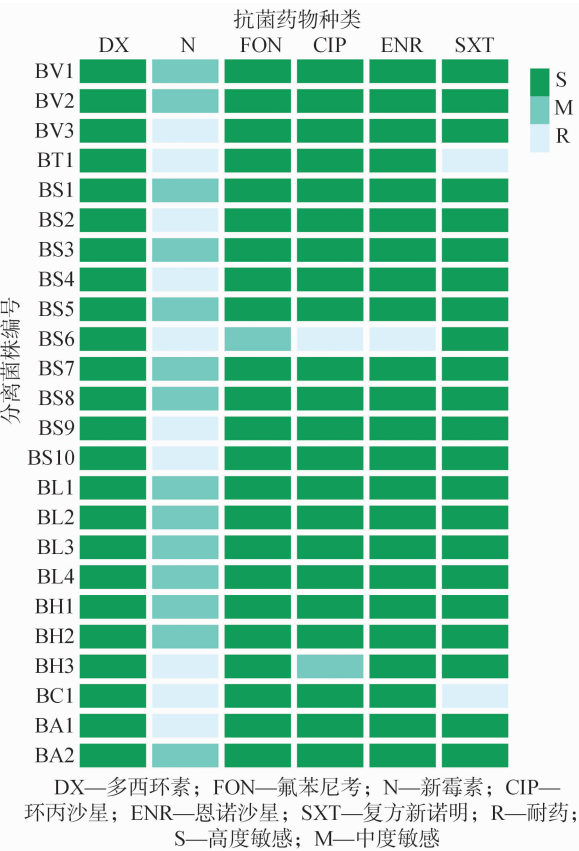


图3 芽孢杆菌药敏试验结果

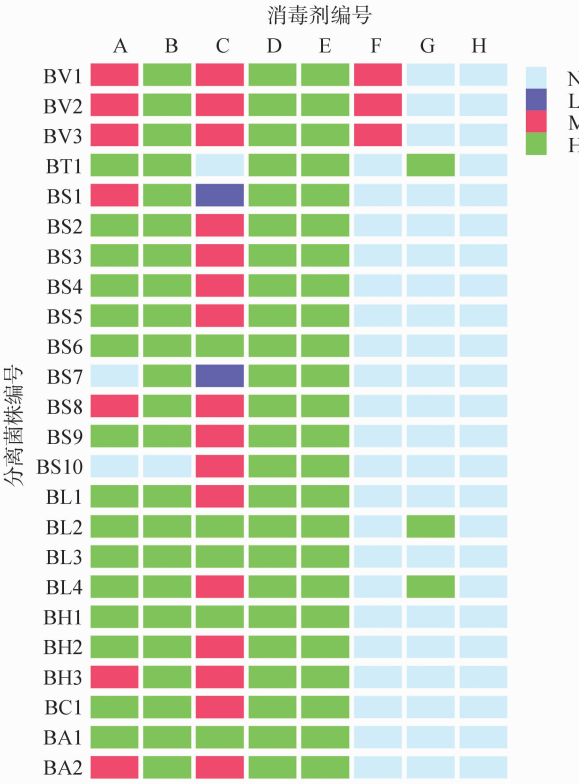


图4 芽孢杆菌对各类消毒剂耐受性试验结果

表 5 消毒剂推荐使用浓度与贝莱斯芽孢杆菌 BV1

耐受性浓度对比表		
产品	产品建议使用浓 (mg/L)	耐受性浓度 (mg/L)
聚维酮碘	0.45 ~ 0.75	2
戊二醛苯扎溴铵	1.5	2
复合碘	0.1	1
苯扎溴铵	0.22 ~ 0.33	1
浓戊二醛	0.2	2

程度以上的抑菌效果,与 Li 等的结果<sup>[16]</sup>相似,进一步证明了贝莱斯芽孢杆菌对弧菌属和气单胞菌属细菌具有良好的抑制效果。

枯草芽孢杆菌是水产养殖中研究最多且应用最广泛的益生菌,在改善水生动物的生长、营养、免疫和抗病能力等方面有显著的效果<sup>[17]</sup>。研究发现,随着接种枯草芽孢杆菌浓度的提高,枯草芽孢杆菌对温和气单胞菌、嗜水气单胞菌和豚鼠气单胞菌的拮抗作用越明显<sup>[18]</sup>。赵倩等的研究表明,枯草芽孢杆菌发酵液对嗜水气单胞菌、哈维氏弧菌、溶藻弧菌、副溶血弧菌、维氏气单胞菌均具有较强抑菌作用<sup>[19]</sup>。本研究中,枯草芽孢杆菌 BS1、BS2、BS10 对溶藻弧菌、哈维氏弧菌、嗜水气单胞菌和铜绿假单胞菌均具有一定程度的抑菌效果,抑菌效果比贝莱斯芽孢杆菌稍差。

3.2 芽孢杆菌耐药菌株的筛选

芽孢杆菌对大多数的抗生素是敏感的<sup>[20]</sup>,为了避免使用抗生素时将水体或鱼体中的益生菌杀死,所以在使用抗生素前进行抗菌药物敏感性测试非常必要。本次抗菌药物耐药试验中,所有芽孢杆菌对多西环素和氟苯尼考均具敏感性,敏感率比较高的还有环丙沙星、复方新诺明和恩诺沙星,这与目前已有关于枯草杆菌药敏结果<sup>[21]</sup>类似。本试验的所有菌株对新霉素表现出耐药或者中度敏感,这与猪源肠道益生菌的筛选试验中的新霉素耐药研究结果<sup>[22]</sup>表现一致。

迄今为止,对于各种致病细菌引起的水产动物的传染性疾病的控制,抗菌药物无疑仍然是首选药物<sup>[23]</sup>,但是还未对这些菌是否具有新霉素抗性基因进行鉴定,并且该基因是否存在于质粒上仍有待于后续研究。就目前结果来看,如果这些潜在益生菌的耐药基因是内在的,不可转移的,那么在使用芽孢杆菌抑制细菌的同时,配合新霉素可能会达到更好的抑菌效果。

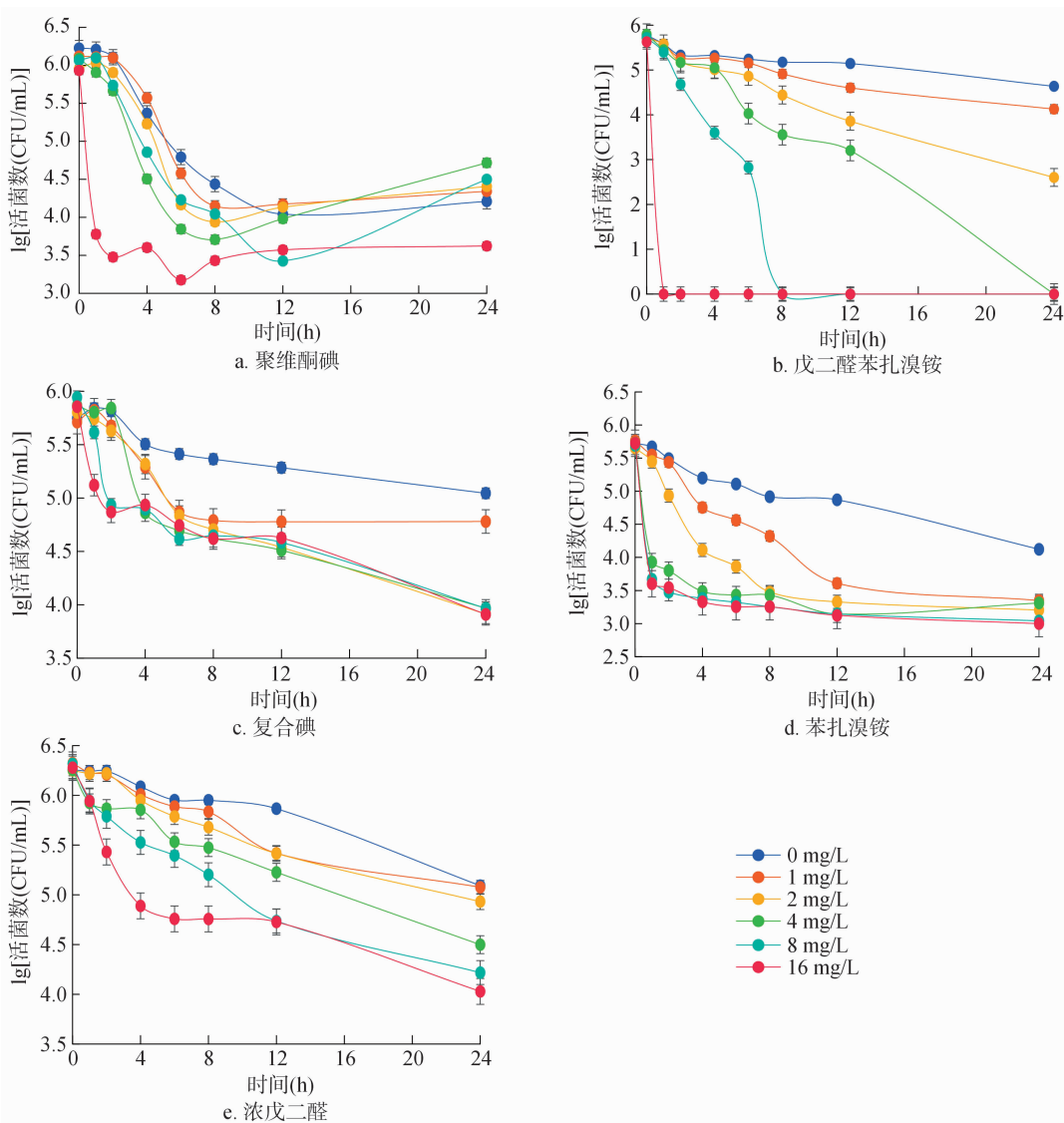


图5 贝莱斯芽孢杆菌 BV1 对不同消毒剂耐受性试验

### 3.3 芽孢杆菌消毒剂耐受株的筛选

芽孢杆菌消毒剂耐受性试验结果显示,硫酸氢钾、漂白粉以及高锰酸钾对大多数的芽孢杆菌无抑制作用,但是聚维酮碘、戊二醛苯扎溴铵、复合碘、苯扎溴铵以及浓戊二醛对芽孢杆菌都有一定的抑制作用。因此,结合病原菌的抑菌结果、抗菌药物的药敏结果以及消毒剂的定性耐受性结果,选取贝莱斯芽孢杆菌 BV1 进一步研究对聚维酮碘、戊二醛苯扎溴铵、复合碘、苯扎溴铵以及浓戊二醛 5 种不同浓度消毒剂的耐受性。

聚维酮碘又名乙烯吡咯烷酮碘,为广谱、高效消毒剂,对细菌、真菌、病毒等都具有抑制或杀灭作用<sup>[24]</sup>。高晓华等的研究表明,水产用聚维酮碘对解淀粉芽孢杆菌 G1 (*Bacillus amyloliquefaciens*

strain G1)、凝结芽孢杆菌 92 (*Bacillus coagulans* strain 92)、短小芽孢杆菌 95 (*Bacillus pumilus* strain 95) 和乳酸芽孢杆菌 H3 (*Lactobacillus* sp. strain H3) 的最小抑菌浓度为 128 ~ 512 mg/L<sup>[25]</sup>。本试验结果显示,贝莱斯芽孢杆菌 BV1 对聚维酮碘的耐受性具有一定的浓度相关性,当聚维酮碘使用浓度达到 16 mg/L 时,会严重影响贝莱斯芽孢杆菌 BV1 的活性。与高晓华等的研究结果相比较,推测贝莱斯芽孢杆菌对聚维酮碘的耐受性可能更差,因此,如果使用聚维酮碘消毒水体,浓度不应大于 2 mg/L。

浓戊二醛是新一代醛类消毒剂,具有很强的广谱杀菌能力,是当前醛类消毒剂中应用较广的一种消毒剂。张峰峰等的研究表明,戊二醛的浓度在低于 0.5 mg/L 时,对芽孢杆菌的生长和亚硝酸盐的去

除率无显著影响<sup>[26]</sup>。本试验结果表明,贝莱斯芽孢杆菌 BV1 对浓戊二醛的抗性具有浓度相关性,混合液浓度升高时,BV1 活菌数量减少,因此平时如果使用浓戊二醛消毒水体,浓度不应大于 2 mg/L,这样不会影响 BV1 的活性,与张峰峰的试验结果一致。

戊二醛和苯扎溴铵均可作为水产养殖用杀菌消毒制剂,是水产动物病害防治生产中的常用渔药,被用来防治车轮虫、聚缩虫等纤毛虫病及细菌性疾病等,苯扎溴铵和戊二醛配合使用效果更加显著,生产中常将二者合用<sup>[27-28]</sup>。贝莱斯芽孢杆菌 BV1 对戊二醛和苯扎溴铵的抗性具有浓度相关性,混合液浓度升高时,BV1 活菌数量减少。因此,建议使用戊二醛和苯扎溴铵混合液消毒水体,浓度不应大于 2 mg/L,这样不会影响 BV1 的活性。

水产养殖中常用的复合碘为碘酸混合液,是将碘、碘化物、盐酸及磷酸混合制成的水溶液,具有更好的消毒效果;苯扎溴铵别名新洁尔灭,是一种季铵盐类阳离子表面活性消毒剂,可高浓度聚集于菌体表面,影响细菌的新陈代谢,由此其抑菌浓度较低,效果较好<sup>[27]</sup>。贝莱斯芽孢杆菌 BV1 对复合碘和苯扎溴铵的抗性较差,当两者使用浓度超过 2 mg/L 时,BV1 的活菌数量会随着时间迅速减少,因此为了达到水体消毒效果,同时不影响 BV1 的活性,复合碘和苯扎溴铵的浓度不应超过 1 mg/L。

养殖过程中不可避免地会使用消毒产品,从本试验可知,如果水体中残留超过阈值浓度的消毒剂会对益生菌的活性产生影响,因此合理选择消毒产品的浓度对保持益生菌的活性非常重要。其次,益生菌对生态环境的安全性研究也需要进一步深入。

综上所述,贝莱斯芽孢杆菌 BV1 可以作为潜在益生菌株用于后续水产益生菌制剂的开发利用;同时,在益生菌的筛选过程中发现,枯草芽孢杆菌 BS10 除抑菌效果较差外,在抗菌药物耐药性试验和消毒剂耐受性试验中均表现良好,可以考虑作为复合益生菌的备选。

### 3.4 结论

通过体外抑菌试验、药敏试验和消毒剂耐受性试验,从 24 株芽孢杆菌中筛选出 1 株具有强抑菌性、对抗菌药物和消毒剂耐受性较好的贝莱斯芽孢杆菌(BV1),并且本试验探究出的适配抗菌药物和消毒剂浓度可作为实际养殖或科研的参考,以期在水产疫病的防控作出贡献。

### 参考文献:

- [1] 中华人民共和国统计局. 中国统计年鉴[M]. 北京:中国统计出版社,2022.
- [2] 农业农村部渔业渔政管理局. 第四届全球水产养殖大会讨论通过《上海宣言》[J]. 水产科技情报,2021,48(6):355.
- [3] 朱利霞,王洪彬,史秋梅,等. 细菌耐药质粒消除方法研究进展[J]. 动物医学进展,2019,40(5):90-93.
- [4] Wang A R,Ran C,Wang Y B,et al. Use of probiotics in aquaculture of China - a review of the past decade [J]. Fish & Shellfish Immunology,2019,86:734-755.
- [5] Kozasa M. Toyocerin (*Bacillus toyoi*) as growth promotor for animal feeding[J]. Microbiol Aliment Nutrition,1986(4):121-135.
- [6] 张美玲,单承杰,杜震宇. 益生菌与鱼类肠道健康研究进展[J]. 水产学报,2021,45(1):147-157.
- [7] 俞 勇,李会荣,李 筠,等. 益生菌制剂在水产养殖中的应用[J]. 中国水产科学,2001,8(2):92-96.
- [8] Olmos J,Acosta M,Mendoza G,et al. *Bacillus subtilis*, an ideal probiotic bacterium to shrimp and fish aquaculture that increase feed digestibility, prevent microbial diseases, and avoid water pollution [J]. Archives of Microbiology,2020,202(3):427-435.
- [9] Ofir G,Herbst E,Baroz M,et al. Antiviral activity of bacterial TIR domains via immune signalling molecules [J]. Nature,2021,600(7887):116-120.
- [10] Chauhan A, Singh R. Probiotics in aquaculture: a promising emerging alternative approach [J]. Symbiosis,2019,77(2):99-113.
- [11] Foyosal M J,Lisa A K. Isolation and characterization of *Bacillus* sp. strain BC01 from soil displaying potent antagonistic activity against plant and fish pathogenic fungi and bacteria[J]. Journal, Genetic Engineering & Biotechnology,2018,16(2):387-392.
- [12] Wang X H,Onchari M M,Yang X T,et al. Genome analysis of *Bacillus subtilis* JCL16 and the synergistic relationship among its metabolites reveal its potential for biocontrol of *Nocardia seriolae* [J]. Biological Control,2022,167:104855.
- [13] Feng Z F,Song X J,Zhao L T,et al. Isolation of probiotics and their effects on growth, antioxidant and non-specific immunity of sea cucumber *Apostichopus japonicus* [J]. Fish & Shellfish Immunology,2020,106:1087-1094.
- [14] Guo S Y,Zhang Z Y,Guo L. Antibacterial molecules from marine microorganisms against aquatic pathogens: a concise review [J]. Marine Drugs,2022,20(4):230.
- [15] 江宇琪,李仲玄,温雪瓶,等. 贝莱斯芽孢杆菌在畜禽养殖中的应用研究进展[J]. 饲料研究,2022(24):142-146.
- [16] Li X X,Gao X J,Zhang S M,et al. Characterization of a *Bacillus velezensis* with antibacterial activity and inhibitory effect on common aquatic pathogens[J]. Aquaculture,2020,523:735165.
- [17] Nayak S K. Multifaceted applications of probiotic *Bacillus* species in aquaculture with special reference to *Bacillus subtilis* [J]. Reviews in Aquaculture,2021,13(2):862-906.
- [18] 罗 璋,贾文平,白晓慧,等. 枯草芽孢杆菌对三种水产动物病



孙卓雅,王梦翔,宋金星,等. 非洲猪瘟病毒 p10 蛋白和 p49 蛋白的生物信息学分析及表位预测[J]. 江苏农业科学,2024,52(15):195-202.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2024.15.025

# 非洲猪瘟病毒 p10 蛋白和 p49 蛋白 的生物信息学分析及表位预测

孙卓雅<sup>1,2</sup>, 王梦翔<sup>1,2</sup>, 宋金星<sup>1,2</sup>, 秦晓东<sup>1,2</sup>, 孙俊如<sup>1,2</sup>, 周 蕾<sup>1,2</sup>, 吴亚楠<sup>1,2</sup>, 张改平<sup>1,2,3</sup>

(1. 河南农业大学动物医学院/国家动物免疫学国际联合研究中心,河南郑州 450046;

2. 河南农业大学动物医学院/动物病原与生物安全教育部重点实验室,河南郑州 450046; 3. 龙湖现代免疫实验室,河南郑州 450046)

**摘要:**运用多种生物信息技术对非洲猪瘟病毒 (ASFV) Georgia 2007/1 株 p10 蛋白和 p49 蛋白的理化性质、二级及三级空间结构、抗原性、抗原决定簇进行初步分析,并预测其 B、T 淋巴细胞优势表位。结果表明,p10 是亲水性蛋白,含有 2 个抗原决定簇,该蛋白  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -转角、无规则卷曲和延伸链的比例为 32.05%、11.54%、52.56% 和 3.85%; p49 同样是亲水性蛋白,含有 17 个抗原决定簇,其  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -转角、无规则卷曲和延伸链的比例依次为 29.91%、7.53%、55.94% 和 6.62%。基于以上分析,p10 不适合用于 ASF 疫苗制备的候选蛋白;而 p49 作为亲水性衣壳蛋白,具有一定免疫原性,有望成为疫苗研制的备选蛋白,为 ASFV 蛋白研究和疫苗研发提供一定参考。

**关键词:**非洲猪瘟;生物信息学;表位预测

**中图分类号:**S855.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2024)15-0195-08

非洲猪瘟 (African swine fever, ASF) 是由非洲猪瘟病毒 (African swine fever virus, ASFV) 感染猪而引起的一种急性接触性、广泛出血性、烈性传染病,各年龄段的猪均易感。ASF 的临床症状很难和猪瘟区

别,根据毒力和感染途径不同 ASF 可表现为最急性型 (强毒株)、急性型 (中等毒力毒株)、亚急性型和慢性型 (弱毒株);死亡率分别为 100%、90% ~ 100%、30% ~ 70% 和 <30%。有研究测算,2018 年 8 月至 2019 年 7 月中国非洲猪瘟疫情总经济损失约占 2019 年中国 GDP 的 0.78%,ASF 疫情不仅直接冲击养猪业,且通过产业关联,几乎波及到所有经济部门<sup>[1]</sup>,对我国经济危害极大。

ASFV 基因组大小为 170 ~ 190 kb,编码超过 200 种蛋白质,其中,超过 50 种为结构蛋白,其中,p10 蛋白是由 K78R 基因编码的一个亲核结构蛋白,位于 ASFV 最内侧的拟核内,具有核定位信号。已有研究表明,p10 能与单链或双链 DNA 结合,推测其可能在含 DNA 类核的组装中发挥作用。同时,有

收稿日期:2023-09-05

基金项目:国家自然科学基金 (编号:32002292),河南省重大科技专项 (编号:221100110600)。

作者简介:孙卓雅 (1999—),女,硕士研究生,研究方向为分子免疫和亚单位疫苗等,E-mail:792474123@qq.com;共同第一作者:王梦翔 (1998—),男,硕士研究生,研究方向为亚单位疫苗和蛋白质谱分析等,E-mail:1834768483@qq.com。

通信作者:吴亚楠,博士,副教授,研究方向为动物免疫分子的蛋白质结构及功能解析,E-mail:wlyananjiayou@yeah.net;张改平,中国工程院院士,博士,教授,研究方向为动物病毒分子致病机制和食品安全检测,E-mail:zhanggaip@126.com。

原菌体外拮抗作用的研究[J]. 中国饲料,2010(14):18-19.

[19] 赵 倩,高绪娜,徐海燕,等. 1 株水产用抑菌菌株的筛选鉴定及性质研究[J]. 饲料研究,2022,45(10):66-70.

[20] 瞿 彬,徐文昌,宋雪琳,等. 益生菌制剂在水产养殖中的应用[J]. 饲料工业,2023,44(16):62-70.

[21] 杨坤明,任 航,苏雅婷,等. 几种商用益生菌芽孢杆菌特性的比较研究[J]. 中国畜牧兽医,2018,45(5):1241-1250.

[22] 朱佳文,刘瀚扬,肖 冉,等. 乳酸菌 LE-Z 的筛选鉴定及其益生性的初步评价[J]. 黑龙江畜牧兽医,2021(11):109-113,154.

[23] Pandiyan P, Balaraman D, Thirunavukkarasu R, et al. Probiotics in

aquaculture[J]. Drug Invention Today, 2013, 5: 55-59.

[24] 戴瑜来,王宇希,潘彬斌,等. 几种常用水产药物对大鳞副泥鳅苗种的急性毒性试验[J]. 淡水渔业,2015,45(4):104-107.

[25] 高晓华,曹海鹏,侯三玲,等. 水产用聚维酮碘对异育银鲫养殖的安全性评价[J]. 动物学杂志,2013,48(2):261-268.

[26] 张峰谢,谢凤行,周 可,等. 常见水产药物对两种水产益生菌活性的影响[J]. 水产科学,2013,32(10):567-572.

[27] 农业部《新编渔药手册》委员会. 新编渔药手册[M]. 北京:中国农业出版社,2005:428-430.

[28] 聂绍发,朱桂宝,林天晖,等. 新洁尔灭与戊二醛协同杀菌作用的实验研究[J]. 同济医科大学学报,2001(1):50-52.