

# 刺参(*Apostichopus japonicus*)大水面养殖池塘 环境中优势益生菌筛选及其特性分析\*

杜 佗<sup>1,2</sup> 李 彬<sup>2,3</sup> 王印庚<sup>2,3①</sup> 廖梅杰<sup>2,3</sup>  
王金燕<sup>1,2</sup> 刘志轩<sup>1,2</sup> 王诗欢<sup>4</sup>

(1. 上海海洋大学 上海 201306; 2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 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 青岛 266071; 4. 大连壹桥海参股份有限公司 瓦房店 116312)

**摘要** 2014年12月–2015年12月,在大连地区刺参(*Apostichopus japonicus*)大水面养殖池塘进行了春、夏、秋、冬四季有益菌分离筛选,从其水体和底泥中共分离得到66株细菌。以刺参“腐皮综合征”主要病原菌——灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)和假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas nigrifaciens*)为指示菌进行拮抗作用实验,利用选择培养基对菌株产淀粉酶和蛋白酶的能力进行测定,最后通过安全性实验得到潜在益生菌株YQ-2。结果显示,该菌株对灿烂弧菌和假交替单胞菌有较强的抑制作用,抑菌圈分别达到22 mm和24 mm;对淀粉和蛋白选择培养基水解圈的直径达到22 mm和36 mm。安全性实验显示,该菌株无论是在 $10^8$  CFU/ml浸浴还是投喂 $10^8$  CFU/g的粉末饲料感染,30 d内供试刺参没有发病和死亡现象,健康程度好,且相对于对照组的体重明显增长, $10^8$  CFU/g粉末饲料投喂组的相对增长率达到39.31%。此外,本研究对YQ-2菌株的生理生化指标、16S rDNA序列进行了分析,其同源性与枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* strain KLP2015相似度达99%,故将该菌株鉴定为枯草芽孢杆菌。该株枯草芽孢杆菌在大水面刺参池塘四季水体中数量为140–280 CFU/ml,高于其他菌株;同时,该菌株在水体中还具有较高的优势度,优势度分别为4.2%、3.5%、2.6%、4.6%,冬、春季节的优势度明显高于夏、秋季节;它属于土著分离菌株,对引起刺参腐皮综合征的2株病原菌具有较强的抑制作用,这对刺参大水面生态养殖具有较大的应用潜力。

**关键词** 刺参;大水面池塘;腐皮综合征;益生菌;枯草芽孢杆菌;拮抗菌

**中图分类号** S966 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)03-0180-08

近年来,刺参(*Apostichopus japonicus*)养殖业迅猛发展,形成了池塘养殖、工厂化养殖、浅海底播增养殖、围堰养殖、浮筏吊笼养殖、浅海沉箱养殖等多元化增养殖模式(王印庚等,2014),其中,池塘养殖是刺参的主要养殖模式。传统刺参养殖池塘的大小为

0.67–4.67 hm<sup>2</sup>,水体较小,水深较浅,便于人工管理和水质条件控制,但存在水体稳定性差、环境易恶化、养殖刺参易产生应激或病害等缺点。刺参大水面养殖是随着刺参养殖业的发展出现的一种新型养殖模式,在辽宁、河北、山东和江苏地区均有试点应用,池塘

\* 中央级科研院所基本科研业务费专项资金项目(20603022015015)、山东省自主创新成果转化专项(2013ZHZX2A0801)和青岛市海洋经济创新发展区域示范项目(海水健康养殖专用微生态制剂的开发应用与产业化项目)共同资助 [This work was supported by Special Fund for Basic Scientific Research Business of Central Public Research Institutes (20603022015015), Independent Innovation and Achievements Transformation of Shandong Province (2013ZHZX2A0801), and Regional Demonstration Project of Marine Economy Innovation and Development in Qingdao City (Development and Application of Micro Ecological Agent Special for Sea Water Health Cultivation and Industrialization Project)]. 杜 佗, E-mail: dutuo1990@163.com

① 通讯作者:王印庚,研究员, E-mail: wangygf@ysfri.ac.cn

收稿日期:2016-05-05,收修改稿日期:2016-05-17

面积一般为 66.7–333.3 hm<sup>2</sup>, 具有面积大、水体稳定性好、人为干扰小等特点。目前, 大水面刺参池塘存在人工水质调控弱、清淤困难等缺点, 长期养殖易造成底部有机物堆积、池底腐败并导致刺参疾病的发生, 尤其是“腐皮综合征”。该病是刺参冬、春季养殖过程中的常见疾病, 此病传染性强, 波及面积广, 死亡率高, 严重影响刺参养殖业的稳定发展。有研究表明, 灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)和假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas nigrifaciens*)是该病的主要病原菌(王印庚等, 2006; 张春云等, 2006)。刺参大水面池塘养殖发生疾病, 多数是由池塘生态环境遭到破坏引发的, 菌群和藻相失衡, 同时养殖池塘面积较大, 难以施用药物防控。因此, 利用益生菌剂改良池塘养殖环境、拮抗病原菌是刺参大水面池塘养殖病害防控的最佳途径。

益生菌剂是基于微生物学原理发展起来的, 自 Kozasa(1986)将益生菌剂应用到水产养殖以来, 微生物制剂在水产中的应用越来越广泛, 并成为生态养殖模式的研究热点。水产养殖中有关益生菌的研究起初集中在幼鱼养殖, 后慢慢应用到虾、贝、甲壳类、活饵料生物、海参等养殖动物, 其中, 益生菌的筛选和应用在刺参养殖中起步较晚, 部分益生菌剂沿用了其他水产养殖动物环境调控的益生菌菌种, 但难以适应刺参养殖环境, 无法达到抑制刺参病原的效果。刺参益生菌的研究多集中在对养殖水环境的净化、产酶能力、改善免疫力等研究, 如赵留群等(2014)研究了3种微生物制剂对幼刺参养殖水体水质的影响, 董春光等(2015)研究了枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)在刺参养殖中的作用, 田良(2015)<sup>1)</sup>筛选鉴定了肠道产酶益生菌并在饲料中进行了应用。关于益生菌在池塘养殖环境中病害防控的研究较少。本研究从刺参大水面池塘养殖环境中筛选产酶能力强、拮抗病原菌的益生菌株, 通过土著益生菌在池塘中快速繁殖生长、拮抗病原菌达到病害防控的效果, 降低养殖成本, 为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 材料与方法

### 1.1 池塘条件

实验在大连瓦房店某大型刺参养殖场进行, 大水面池塘有3个, 每个池塘面积约333.3 hm<sup>2</sup>, 水深5–7 m; 水源来自近海海水, 池塘无闸门设置, 仅靠池坝里外透水功能, 利用潮汐的潮差进水和排水。池内附着基由石块堆砌而成, 放养刺参密度为4.5万头/hm<sup>2</sup>, 规

格约100头/kg; 全年不投喂饲料、不投放益生菌, 保证刺参在自然条件下生长。

### 1.2 样品采集

分别在2014年12月24日、2015年4月16日、2015年8月10日、2015年10月25日4个时间点采集池塘水样和泥样。利用调查船驶到池塘中预先标记好的采样点, 按照《国家海洋调查规范》海洋生物调查中规定的方法进行采样, 使用击开式采水器(2.5 L)采集水体底层(距底表5 cm)水样。用采泥器采集池塘底部表层底泥, 每个池塘设置3个采样点。

### 1.3 培养基的配制

TSB培养基: 胰蛋白胨大豆肉汤(TSB) 30 g, NaCl 15 g, 琼脂 15 g, H<sub>2</sub>O 1000 ml, pH 为7.4–7.6。

淀粉培养基: 营养琼脂 33 g, 淀粉 2 g, NaCl 15 g, H<sub>2</sub>O 1000 ml。

酪蛋白琼脂培养基: 酪蛋白琼脂 35 g, NaCl 15 g, H<sub>2</sub>O 1000 ml。培养基经121℃、20 min 灭菌。

### 1.4 细菌的分离与培养

将采集的样品用1.5%灭菌生理盐水稀释至10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>, 每个浓度取100 μl, 涂布于TSB平板上, 每个浓度2个平行, 28℃倒置培养24–48 h, 选择合适的稀释浓度(30–300 CFU/平板)进行细菌分离、计数, 计算细菌优势度:

细菌优势度=某一特定类型菌落数量/总菌落数量

根据菌落大小、颜色、边缘光滑程度等形态学特征进行划线分离, 分离纯化3次。纯化后的菌株置于20%甘油生理盐水制备的保种液中, -80℃保存。

### 1.5 拮抗菌的筛选

实验以假交替单胞菌和灿烂弧菌为指示菌。首先, 将指示菌接种于TSB平板上, 28℃培养24 h, 再进行一次转接以确保得到纯菌株。用接种环刮取少量指示菌, 将指示菌用灭菌的1.5%生理盐水稀释, 然后将指示菌均匀涂布于牛津杯打孔的TSB平板上。用接种环刮取活化24 h的供试菌株, 同样用生理盐水稀释后吸取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并测量抑菌圈的直径。

### 1.6 细菌产酶能力测定

选取抑菌作用较好的菌株进行实验。用淀粉培养基和酪蛋白琼脂培养基制作牛津杯平板。将筛选得到

1) Tian L. To select strains with higher enzyme activity from the distinguishment of *Apostichopus japonicus* and its application in feed. Master's Thesis of Jimei University, 2015 [田良. 仿刺参消化道中产酶菌株的筛选鉴定及其在仿刺参饲料中的应用. 集美大学硕士研究生学位论文, 2015]

的菌株用灭菌 1.5%生理盐水稀释后,取 100  $\mu\text{l}$  置于牛津杯培养基的小孔内,在 28 $^{\circ}\text{C}$  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。

### 1.7 候选菌株对刺参生长及安全性评价

实验用刺参来自山东青岛黄岛区某养殖场,规格约为 10 g/头,室内暂养 3 d 后随机分组,每组 15 头,各设 2 个平行。实验分为浸浴组和投喂组,浸浴组利用麦氏比浊法将筛选的菌株分为 3 个浸浴浓度,分别为  $1\times 10^9$ 、 $1\times 10^8$ 、 $1\times 10^7$  CFU/ml。投喂组中将菌液与粉状饲料混合,饲料中菌液浓度配置为  $1\times 10^{10}$ 、 $10^9$ 、 $10^8$  CFU/g。同时设立空白对照组,只投喂基础饲料(豆粕 10%,鱼粉 8%,马尾藻 25%,脱胶海带粉 30%,麦饭石 10%,贝壳粉 16.5%,多维预混料 0.5%)。

实验共进行 30 d,实验水槽为长方形,有效容积为 15 L。实验期间,水温为 12–14 $^{\circ}\text{C}$ 、盐度为 29,保持充气,每天投喂 1 次,投喂量为刺参体重的 4%,每天利用虹吸法去除实验槽内的残饵和粪便,日换水量为 1/5,换水后浸浴组补充相应浓度的菌液。实验期间每天观察并记录刺参的活动、摄食、排便、死亡等情况。

分别在实验开始和结束时,按照廖梅杰等(2010)的方法测定 15 头刺参的总重,分别记为  $W_0$  和  $W_T$ ,计算实验开始时刺参个体平均体重( $w_0=W_0/15$ ),和实验结束时刺参个体平均体重( $w_T=W_T/15$ ),各数据以平均数 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)表示,计算相对增重率:

相对增重率(%)=(终末体重-初始体重)/初始体重 $\times 100$

### 1.8 细菌的生理生化鉴定

参照麦氏比浊法制备浓度约为  $1\times 10^5$  CFU/ml 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《Bergey's manual of determinative bacteriology》(Williams *et al.*, 1994)和《常见细菌系统鉴定手册》(东秀珠等, 2002)进行归类判定。

### 1.9 细菌的 16S rDNA 测序分析

**1.9.1 PCR 模板的制备** 利用无菌去离子水将纯培养的细菌制成菌悬液,采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生物)提取所纯化细菌的 DNA。

**1.9.2 16S rDNA 序列的 PCR 扩增和序列测定** 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,引物为 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGGCTACCTTGT-TACGACTT-3')。25  $\mu\text{l}$  的 PCR 扩增反应体系,扩增程序:94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min, 30 个循环,94 $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$  温育 10 min, 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检验后,送至测序公司测序。

**1.9.3 序列分析和系统发育树构建** 将测序结果在 NCBI 基因库中序列比对,并通过 MEGA 5.1 软件构建系统发育树。

## 2 结果

### 2.1 拮抗菌的筛选

经过分离纯化从刺参大水面养殖池塘中获得 66 株细菌,筛选出具有拮抗作用的 6 株菌株,如表 1 所示,

表 1 拮抗菌的筛选  
Tab.1 Selection of antagonistic bacteria

菌株编号 Strain No.	季节 Season	温度 Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	细菌数量 Bacterial population (CFU/ml)	细菌总数 Total Plate Count (CFU/ml)	优势度 Dominance (%)	抑菌圈直径	
						假交替单胞菌 <i>P. nigrificiens</i>	灿烂弧菌 <i>V. splendidus</i>
YQ-1	春季 Spring	9.48 $\pm$ 0.15	80	$5.0\times 10^3$	1.6	22	22
YQ-2*	春季 Spring	9.48 $\pm$ 0.15	210	$5.0\times 10^3$	4.2	24	22
	夏季 Summer	27.77 $\pm$ 0.33	280	$8.0\times 10^3$	3.5	24	22
	秋季 Autumn	12.33 $\pm$ 0.07	170	$6.5\times 10^3$	2.6	24	22
	冬季 Winter	0.23 $\pm$ 0.03	140	$3.0\times 10^3$	4.6	24	22
YQ-3	夏季 Summer	27.77 $\pm$ 0.33	90	$8.0\times 10^3$	1.1	25	12
YQ-4	秋季 Autumn	12.33 $\pm$ 0.07	80	$6.5\times 10^3$	1.2	25	12
YQ-5	冬季 Winter	0.23 $\pm$ 0.03	170	$3.0\times 10^3$	5.7	24	28
YQ-6	冬季 Winter	0.23 $\pm$ 0.03	110	$3.0\times 10^3$	3.7	0	12

\*: YQ-2 菌株是通过病原菌拮抗实验、产酶能力实验以及安全性实验综合评价筛选出的潜在益生菌,因此,对该菌在大水面刺参池塘四季变化进行分析

\*: YQ-2 is a potential probiotic bacterium screened through the methods of pathogen antagonism, enzyme production ability and safety testing, so its seasonal changes of the bacteria in the large water pond for *A. japonicus* farming was analyzed

其中,春季和冬季分别获得2株,夏季和秋季分别获得1株。冬季获得的YQ-5菌株和春季获得的YQ-1、YQ-2菌株对2株指示菌均具有较强的抑制性,而冬季获得的YQ-6对假交替单胞菌无拮抗作用。夏季和秋季获得的YQ-3、YQ-4对假交替单胞菌有较好的拮抗作用,而对灿烂弧菌拮抗作用较弱。

获得拮抗菌在环境中的优势度如表1所示,春季和冬季所获得的拮抗菌在环境中所占的优势较高,优势度分别为1.6%、4.2%、5.7%、3.7%,而夏季和秋季获得拮抗菌的优势度较低,优势度分别为1.1%和1.2%。YQ-2菌株在大水面刺参池塘四季水体中数量为140~280 CFU/ml,高于其他菌株,同时,该菌株在水体中还具有较高的优势度,优势度分别为4.2%、3.5%、2.6%、4.6%,冬、春季节,该菌株的优势度明显高于夏、秋季节。

## 2.2 产酶能力实验

实验对有拮抗作用6株菌进行产酶能力测试,结果见表2。从表2可以看出,菌株YQ-1、YQ-2、YQ-3、YQ-4和YQ-5菌株均具有产蛋白酶和淀粉酶的能力,不同的菌株产酶能力差异较大,其中,YQ-2产蛋白酶的能力最强,YQ-3产蛋白酶和淀粉酶能力均较强,冬季筛选的菌株YQ-6只产蛋白酶,YQ-5产蛋白酶

能力较弱。

表2 候选菌株的产酶能力比较  
Tab.2 Comparison of the ectoenzyme-producing ability of the candidate strains

细菌编号 Strain No.	产酶水解圈直径 Diameter of enzymatic hydrolysis (mm)	
	蛋白酶 Protease	淀粉酶 Amylase
YQ-1	28	28
YQ-2	36	22
YQ-3	32	32
YQ-4	28	22
YQ-5	14	22
YQ-6	24	0

## 2.3 安全性实验

综合以上实验结果,选取YQ-1、YQ-2和YQ-3菌株对刺参进行安全性实验,结果见表3。由表3可以看出,刺参在YQ-1高浓度( $10^9$  CFU/ml)浸浴组出现了死亡现象,其他实验组没有出现死亡,在高浓度浸浴组和投喂组不同程度出现吐肠情况,整个实验过程中刺参状态较差。YQ-3在 $10^7$  CFU/ml浓度下浸浴,没有发生排脏和死亡现象,相对增重率达到了33.19%,说明 $10^7$  CFU/ml浓度浸浴对刺参相对安全。YQ-2菌株

表3 候选菌株的安全性实验结果  
Tab.3 Results of the safety tests of the candidate strains

菌株编号 Strain No.	浓度 Concentration	方式 Method	初始体重 Initial weight (g)	终末体重 Final weight (g)	相对增重率 Relative growth rate (%)	排脏数量(头) Evisceration number	死亡数量(头) Mortality
YQ-1	$10^7$ CFU/ml	浸浴 Dipping bath	10.53±0.17	13.83±0.07	31.39±2.2	0	0
	$10^8$ CFU/ml	浸浴 Dipping bath	10.77±0.12	12.77±0.09	18.51±1.3	0	0
	$10^9$ CFU/ml	浸浴 Dipping bath	10.53±0.14	12.66±0.21	15.04±1.0	0	1
	$10^8$ CFU/g	投喂 Feeding	10.67±0.36	12.68±0.52	18.86±0.9	0	0
	$10^9$ CFU/g	投喂 Feeding	10.97±0.22	12.56±0.09	14.48±1.5	3	0
	$10^{10}$ CFU/g	投喂 Feeding	10.48±0.11	11.53±0.20	10.00±2.9	2	0
YQ-2	$10^7$ CFU/ml	浸浴 Dipping bath	10.39±0.21	14.40±0.17	38.53±1.1	0	0
	$10^8$ CFU/ml	浸浴 Dipping bath	10.38±0.15	13.42±0.19	29.28±1.2	0	0
	$10^9$ CFU/ml	浸浴 Dipping bath	10.37±0.09	12.66±0.10	22.08±0.8	2	0
	$10^8$ CFU/g	投喂 Feeding	10.45±0.14	14.55±0.20	39.31±0.7	0	0
	$10^9$ CFU/g	投喂 Feeding	10.44±0.07	13.35±0.12	27.83±0.8	0	0
	$10^{10}$ CFU/g	投喂 Feeding	10.57±0.11	11.82±0.04	11.83±0.8	0	0
YQ-3	$10^7$ CFU/ml	浸浴 Dipping bath	10.41±0.11	13.86±0.07	33.19±1.1	0	0
	$10^8$ CFU/ml	浸浴 Dipping bath	10.33±0.10	12.87±0.10	24.60±2.1	1	0
	$10^9$ CFU/ml	浸浴 Dipping bath	10.40±0.06	12.25±0.09	17.80±1.3	1	0
	$10^8$ CFU/g	投喂 Feeding	10.48±0.14	13.18±0.03	25.82±1.8	3	0
	$10^9$ CFU/g	投喂 Feeding	10.45±0.07	12.56±0.09	20.12±0.7	2	0
	$10^{10}$ CFU/g	投喂 Feeding	10.55±0.06	11.49±0.13	8.88±0.9	2	0

在  $10^8$  CFU/ml 浸浴和投喂  $10^8$  CFU/g 粉末饲料, 养殖 30 d 内刺参无发病和死亡现象, 整个过程刺参状态良好, 而且随着菌株浓度的降低, 刺参的相对增重率升高,  $10^8$  CFU/g 粉末饲料投喂组相对增重率达到 39.31%。

#### 2.4 生理生化鉴定

对候选菌株 YQ-2 进行后期的生理生化鉴定 (表 4)。从表 4 可知, 菌株 YQ-2 在低盐度的胰胨水中可以正常生长, 10% NaCl 胰胨水中该菌株不能生长, 能够分解葡萄糖, 不能分解蔗糖、甘露醇、肌醇、阿拉伯糖、乳糖、山梨醇、鼠李糖、蜜二糖、木糖; 苦杏仁苷、丙二酸盐、3% NaCl 鸟氨酸脱羧酶、3% NaCl 赖氨酸脱羧酶、3% NaCl 精氨酸双水解酶、3% NaCl 明胶、西蒙氏枸橼酸盐呈阳性; 3% NaCl ONPG、3% NaCl 尿素酶、Kovacs 试剂、3% NaCl MR-VP、3% NaCl 硫化氢、氧化酶呈阴性。依据《Bergey's manual of determinative bacteriology》(Williams *et al.*, 1994)和 Gordon(1983)《芽孢杆菌属》中芽孢杆菌属的特征对上述菌株进行分类地位的鉴定, 它们均属于芽孢杆菌科(Bacillaceae)的芽孢杆菌属(*Bacillus*)。通过比较该菌株在不同温度下的生长情况, 结果显示, 该菌株在 10–40℃ 都能生长, 对温度的适应性较强。

#### 2.5 16S rDNA 序列测定分析以及系统发育树的构建

采用通用引物对菌株 YQ-2 的 16S rDNA PCR 扩增, 产物的长度为 1420 bp, 采用 Blast 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 1 所示。结果表明, 本研究分离所获得的菌株均属于芽孢杆菌科(Bacillaceae)的芽孢杆菌属(*Bacillus*)。YQ-2 与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* strain KLP2015)相似性为 99%。

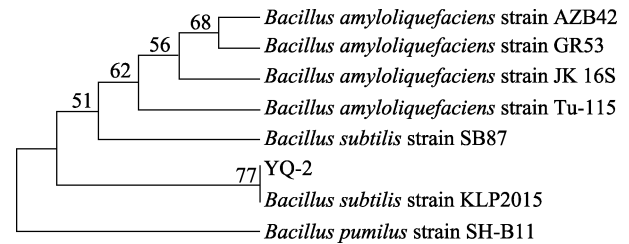


图 1 菌株 YQ-2 16S rDNA 序列的系统发育树  
Fig.1 The 16S rDNA gene sequence clustering results of the strain YQ-2

### 3 讨论

本研究利用细菌的形态学特征, 从不同季节的大水面刺参养殖池塘环境中分离获得 66 株细菌, 通过对病原菌的拮抗实验, 初步筛选出 6 株对刺参病原菌

表 4 候选菌株 YQ-2 的生理生化特征

Tab.4 Physiological and biochemical characteristics of the candidate strain YQ-2

项目 Items	YQ-2	项目 Items	YQ-2
5℃	-	3% NaCl 葡萄糖 3% NaCl Glucose	+
10℃	+	3% NaCl 蔗糖 3% NaCl Sucrose	-
15℃	+	3% NaCl 甘露醇 3% NaCl Mannitol	-
20℃	+	3% NaCl 阿拉伯糖 3% NaCl Arabionse	-
25℃	+	蜜二糖 Melibiose	-
30℃	+	3% NaCl ONPG	-
35℃	+	3% NaCl 尿素酶 3% NaCl Urease	-
40℃	+	木糖 Xylose	-
无盐胰胨水 No salt tryptone water	+	3% NaCl 鸟氨酸脱羧酶 3% NaCl Ornithine decarboxylase	+
3% NaCl 胰胨水 3% NaCl Tryptone water	+	3% NaCl 赖氨酸脱羧酶 3% NaCl Lysine decarboxylase	+
6% NaCl 胰胨水 6% NaCl Tryptone water	+	3% NaCl 精氨酸双水解酶 3% NaCl Arginine dihydrolase	+
10% NaCl 胰胨水 10% NaCl Tryptone water	-	Kovacs 试剂 Kovacs reagent	-
3% NaCl 乳糖 3% NaCl Lactose	-	3% NaCl MR-VP	-
山梨醇 Sorbitol	-	3% NaCl 明胶 3% NaCl Gelatine	+
苦杏仁苷 Amygdalin	+	西蒙氏枸橼酸盐 Simmons Citrate	+
肌醇 Inositol	-	3% NaCl 硫化氢产生 3% NaCl Hydrothion produce	-
丙二酸盐 Malonate	+	氧化酶试纸 Oxidase Strips	-
鼠李糖 Rhamnose	-	半固体琼脂 Semi-solid agar	-

注: +表示阳性, -表示阴性

Note: +: Positive; -: Negative

具有较强抑制作用的拮抗菌。从获得的拮抗菌种类和优势度可以看出,春季和冬季具有优势的拮抗菌种类较多,且呈现较高的优势度,春季 YQ-1、YQ-2 菌株的优势度分别为 1.6%和 4.2%;冬季 YQ-5、YQ-6 菌株的优势度分别为 5.7%和 3.7%,均高于夏季和秋季。张春云等(2006)报道冬、春季节是刺参“腐皮综合征”的多发季节;李彬等(2012)发现,冬、春季弧菌(*Vibrio*)的比例较高,这与冬、春刺参疾病发生相关。本研究中,春季和冬季拮抗菌种类和优势度均较高,推测这些益生菌与冬、春季节致病弧菌相互制衡形成了生态系统的稳定。

本研究筛选出的拮抗病原菌、产酶能力强、且对刺参安全的菌株 YQ-2,经过生理生化和分子鉴定,确定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。该菌在大水面刺参池塘四季水体中数量在 140–280 CFU/ml 之间,具有较高的优势度,而且冬、春的优势度明显高于夏、秋,说明该菌能够适应低温环境,这对低温期刺参疾病的防控有重要意义。有报道枯草芽孢杆菌还具有提高养殖动物免疫力、净化水质的作用,如刘克琳等(2000)研究发现,枯草芽孢杆菌投喂鲤鱼(*Cyprinus carpio*)能显著提高鲤鱼的巨噬细胞呼吸爆发活力和抗嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)的能力,促进鲤鱼免疫器官的成熟;Salinas 等(2005)研究发现,枯草芽孢杆菌和乳酸菌单独或复合投喂能提高金头海鲷(*Sparus aurata*)非特异性免疫力;王月霞等(2016)研究表明,适量投放枯草芽孢杆菌可以降低水体中氨氮和亚硝酸氮的含量;杭小英等(2008)研究表明,使用枯草芽孢杆菌后可以显著降低罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)池塘 COD、氨氮和亚硝酸盐的含量。

芽孢杆菌属细菌是一类好氧或兼性厌氧细菌,在肠道中能分泌蛋白酶、淀粉酶、维生素等,能够提高动物消化机能,促进营养物质的消化和吸收(吴秀红等, 2007),张涛等(2009)研究表明,饲料中添加芽孢杆菌可以显著提高刺参肠道蛋白酶、淀粉酶、溶菌酶的活性;袁成玉等(2006)研究表明,微生态制剂对刺参肠道淀粉酶和蛋白酶活性有显著促进作用;沈斌乾等(2013)研究表明,饲料中添加枯草芽孢杆菌可以显著提高青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)的生长率。本研究获得的枯草芽孢杆菌具有较好的产淀粉酶和蛋白酶能力,说明该菌株可以高效分解食物中的淀粉和蛋白质,应用在刺参养殖中将提高刺参肠道淀粉酶和蛋白酶的活力,增加刺参对营养物质的吸收作用,从而促进刺参的生长。本研究中筛选菌株以  $10^8$  CFU/ml 浸浴和投喂  $10^8$  CFU/g 粉末饲料感染刺参,供试刺参均未发病和死亡现象,整个过程刺参健康、活力较好,

说明该菌株对刺参是安全的,且粉末饲料投喂组刺参增长效果较好。田相利等(2015)研究表明,水体中泼洒  $10^6$  CFU/m<sup>3</sup> 和拌饵投喂  $10^9$  CFU/kg 的芽孢杆菌可显著促进刺参生长,与本研究结果一致。本研究还发现,在细菌浓度较高时,刺参有不同程度的吐肠现象,可能是刺参在高浓度细菌侵染下的应激反应,因此,刺参养殖过程中益生菌的投放量不宜过大。

刺参大水面池塘养殖过程的生态环境较为稳定,很难人为操控,一旦生态平衡破坏,不仅难以通过清淤等方法恢复,而且也难以利用药物进行疾病控制,因此,利用益生菌改良池塘养殖环境、拮抗病原菌的过度繁殖是维持养殖生态平衡以及病害防控的最佳途径。本研究在冬、春低温季节筛选得到优势度较大的枯草芽孢杆菌,属于土著分离菌株,不仅能够抑制病原菌生长,并具有较强的产酶能力,它对低温季节水域生态的维护、菌群构成、防治疾病发生具有重要的作用。今后将深入研究该菌在养殖水域中的四季数量变化规律、相关菌群结构特征、在刺参肠道中定植特点以及对刺参生长的影响等。

## 参 考 文 献

- Dong CG, Yang AG, Sun XJ, *et al.* The health-promoting effects of *Bacillus subtilis* in the culture of sea cucumber. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(3): 109–115 [董春光, 杨爱国, 孙秀俊, 等. 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)在刺参养殖中的益生作用. *渔业科学进展*, 2015, 36(3): 109–115]
- Dong XZ, Cai MY. *Common bacterial system identification manual*. Beijing: Science Press, 2002 [东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2002]
- Gordon RE, Haynes WC, *et al.* *Bacillus* genus. *Agricultural press*, 1983
- Hang XY, Ye XP, Shi WD, *et al.* Effect of the biological preparation on the shrimp (*Macrobrachium rosenbergii*) pond's water quality. *Journal of Zhejiang Institute of Ocean (Natural Science Edition)*, 2008, 27(2): 197–200 [杭小英, 叶雪平, 施伟达, 等. 枯草芽孢杆菌制剂对罗氏沼虾养殖池塘水质的影响. *浙江海洋学院学报(自然科学版)*, 2008, 27(2): 197–200]
- Holt JG, Krieg NR, Pha S, *et al.* *Bergey's manual of determinative bacteriology* 9<sup>th</sup> Ed. Williams & Wilkins Company, 1994: 520–521
- Kozasa M. Toyocerin (*Bacillus toyoi*) as growth promotor for animal feeding. *Microbiologie Aliment Nutrition*, 1986(4): 121–135
- Li B, Rong XJ, Liao MJ, *et al.* Annual changes of total heterotrophic bacteria and *Vibrios* in the intestine of *Apostichopus japonicus* and its culture pond. *Marine Sciences*, 2012(4): 63–67 [李彬, 荣小军, 廖梅杰, 等. 刺

- 参肠道与养殖池塘环境中异养细菌和弧菌数量周年变化. 海洋科学, 2012(4): 63–67]
- Liao MJ, Wang YG, Hao ZK, *et al.* Method for measuring body weight of live *Apostichopus japonicus*. ZL 201010100781. 3, 2010 [廖梅杰, 王印庚, 郝志凯, 等. 活体刺参体重测量方法. 专利号: ZL 201010100781. 3, 2010]
- Liu KL, He MQ. Research on the effects of probiotics on the immune function of carp. Feed Industry, 2000, 21(6): 24–25 [刘克林, 何明清. 益生菌对鲤鱼免疫功能影响的研究. 饲料工业, 2000, 21(6): 24–25]
- Liu XY, Zhang Y, Qi Q, *et al.* Effect of *Bacillus subtilis* on growth, digestive enzyme activity, and non-specific immunity in hybrid sturgeon (*Acipenser baeri*♂×*Acipenser schrenkii*♀) juveniles. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(6): 1315–1320 [刘晓勇, 张颖, 齐茜, 等. 枯草芽孢杆菌对杂交鲟幼鱼生长性能、消化酶活性及非特异性免疫的影响. 中国水产科学, 2011, 18(6): 1315–1320]
- Salinas I, Cuesta A, Esteban MÁ, *et al.* Dietary administration of *Lactobacillus delbrückii* and *Bacillus subtilis*, single or combined, on gilthead seabream cellular innate immune responses. Fish & Shellfish Immunology, 2005, 19(1): 67–77
- Shen BQ, Chen JM, Guo JL, *et al.* Effect of adding *Bacillus subtilis* to diets on growth performance, digestive enzymes activity and body composition of fingerling black carp (*Mylopharyngodon piceus*). Acta Hydrobiologica Sinica, 2013, 37(1): 48–53 [沈斌乾, 陈建明, 郭建林, 等. 饲料中添加枯草芽孢杆菌对青鱼生长、消化酶活性和鱼体组成的影响. 水生生物学学报, 2013, 37(1): 48–53]
- Wang YG, Fang B, Zhang CY, *et al.* Etiology of skin ulcer syndrome in cultured juveniles of *Apostichopus japonicus* and analysis of reservoir of the pathogens. Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(4): 610–616 [王印庚, 方波, 张春云, 等. 养殖刺参保苗期重大疾病“腐皮综合征”病原及其感染源分析. 中国水产科学, 2006, 13(4): 610–616]
- Wang YG, Rong XJ, Liao MJ. Sea cucumber culture and disease control technology. Beijing: China Agriculture Press, 2014 [王印庚, 荣小军, 廖梅杰. 刺参健康养殖与病害防控技术丛解. 北京: 农业出版社, 2014]
- Wang YX, Yang XL, Du RB, *et al.* Effect of *Bacillus subtilis* on the ecological factors in marine fish pond. Fishery Modernization, 2016, 43(1): 1–6 [王月霞, 杨秀兰, 杜荣斌, 等. 枯草芽孢杆菌对海水鱼塘生态因子的影响. 渔业现代化, 2016, 43(1): 1–6]
- Wu XH, Zhang XZ, Zhou YC, *et al.* Outline of related *Bacillus* spp. Modern Fisheries Information, 2007, 22(7): 16–18 [吴秀红, 张新中, 周永灿, 等. 关于芽孢杆菌(*Bacillus*)应用概述. 现代渔业信息, 2007, 22(7): 16–18]
- Yuan CY, Zhang H, Wu Y, *et al.* Effect of microecological preparation on growth and activities of digestive enzymes of sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Fisheries Science, 2006, 25(12): 612–615 [袁成玉, 张洪, 吴垠, 等. 微生态制剂对幼刺参生长及消化酶活性的影响. 水产科学, 2006, 25(12): 612–615]
- Zhang CY, Wang YG, Rong XJ. Isolation and identification of causative pathogen for skin ulcerative syndrome in *Apostichopus japonicus*. Journal of Fisheries of China, 2006, 30(1): 118–123 [张春云, 王印庚, 荣小军. 养殖刺参腐皮综合征病原菌的分离与鉴定. 水产学报, 2006, 30(1): 118–123]
- Zhang T, Bai L, Li L, *et al.* Effect of different combinations of probiotics on digestibility and immunity index in sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Journal of Dalian Fisheries University, 2009(S1): 64–68 [张涛, 白岚, 李蕾, 等. 不同添加量的益生菌组合对仿刺参消化和免疫指标的影响. 大连水产学院学报, 2009(S1): 64–68]
- Zhao LQ, Xiao S, Liu T, *et al.* Effect of three probiotics on cultured water quality for sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Journal of Dalian University of Technology, 2014(6): 391–394 [赵留群, 肖珊, 刘彤, 等. 3种微生态制剂对幼刺参养殖水体水质的影响. 大连工业大学学报, 2014(6): 391–394]

(编辑 冯小花)

## Screening and Characteristic Analysis of Potential Probiotics from Large Water Ponds Used for Sea Cucumber (*Apostichopus japonicus*) Farming

DU Tuo<sup>1,2</sup>, LI Bin<sup>2,3</sup>, WANG Yingeng<sup>2,3①</sup>, LIAO Meijie<sup>2,3</sup>, WANG Jinyan<sup>1,2</sup>,  
LIU Zhixuan<sup>1,2</sup>, WANG Shihuan<sup>4</sup>

(1. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;  
3. Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao 266071; 4. Dalian Keybridge Marine Seeds Co., Ltd. Wafangdian 116312)

**Abstract** From December 2014 to December 2015, the flora population structural analysis and beneficial bacteria isolation and screening were carried out in large water ponds of a sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) farm. Sixty-six bacterial strains were isolated from the water body and pond sediment. Two bacterial strains *Pseudoalteromonas nigrifaciens* and *Vibrio splendidus* associated with the “skin ulcerative syndrome” disease were used as indicators in the antagonistic effect trials. Based on the bacterial extracellular amylase, protease activities and challenge tests, one potential probiotic bacterium YQ-2 was obtained. The results showed that this strain had good ability to inhibit the proliferation of *P. nigrifaciens* and *V. splendidus*, evident by the diameter of inhibition zones, 22 mm and 24 mm, respectively; while the diameter of amylase and protease hydrolysis was 22 mm and 36 mm; In addition, the challenge tests revealed that the strain YQ-2 was safe to sea cucumber when it was challenged by bathing the bacterial strain at the concentration of  $10^8$  CFU/ml, or fed the food inoculated with the bacterial cells at the concentration of  $10^8$  CFU/g once daily for one month. The present study also found that among the sea cucumbers fed the food containing  $10^8$  CFU/g bacterial cells, the body weight increased significantly compared with the control group, with the relative growth rate as high as 39.31%. Homogenous analysis using 16S rDNA sequences indicated that the strain YQ-2 had 99% similarity with the *Bacillus subtilis* strain KLP2015. Thus, the strain YQ-2 was tentatively identified as *Bacillus subtilis*. The number of *B. subtilis* in the rearing water was counted in all four seasons and the year-round concentration was about 140–280 CFU/ml, which was higher than other strains. Meanwhile the dominance of YQ-2 was 4.2%, 3.5%, 2.6%, and 4.6% corresponding to Spring, Summer, Autumn and Winter. Furthermore, the dominance of YQ-2 was higher in Spring and Winter compared to Summer and Autumn. Nevertheless, the strain YQ-2 exhibited a strong antibacterial effect on the pathogens *P. nigrifaciens* and *V. splendidus* which were the main pathogenic agents causing the “skin ulcer syndrome” disease. Hence, the strain YQ-2 has great application for farming *A. japonicus* in large water ponds.

**Key words** *Apostichopus japonicus*; Large water pond; Skin ulcerative syndrome; Probiotic bacterium; *Bacillus subtilis*; Antagonistic bacteria

① Corresponding author: WANG Yingeng, E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn