

我国水产拮抗芽孢杆菌的研究进展

曹海鹏¹, 何珊², 王会聪¹, 刘丽玲¹, 吕利群^{1,*}

(1.上海海洋大学国家水生动物病原库, 上海 201306; 2.上海师范大学教育学院, 上海 200234)

摘要: 拮抗芽孢杆菌是最有发展前景、可替代饲料抗生素添加剂的优良益生菌之一。如何促进拮抗芽孢杆菌在水产养殖中的应用是缓解抗生素滥用的一项重要课题。鉴于此, 本文在介绍我国水产拮抗芽孢杆菌研究与应用现状的基础上, 对我国水产拮抗芽孢杆菌研究与应用中存在的问题进行剖析, 并提出加强水产拮抗芽孢杆菌研究的建议。

关键词: 拮抗芽孢杆菌; 研究进展; 应用前景

Research Progress of Antagonistic *Bacillus* sp. in Aquaculture in China

CAO Hai-peng¹, HE Shan², WANG Hui-cong¹, LIU Li-ling¹, LÜ Li-qun^{1,*}

(1. National Pathogen Collection Centre for Aquatic Animals, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. College of Education, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China)

Abstract: Antagonistic *Bacillus* species is one of the most promising probiotics which can be used as a substitute for antibiotic feed additives. It is important to facilitate the application of antagonistic *Bacillus* species in aquaculture to reduce the abuse of antibiotics. In this article, the current research and application situations of antagonistic *Bacillus* species in China are introduced. Meanwhile, current problems are discussed. Moreover, we suggest that the study of antagonistic *Bacillus* species in aquaculture should be strengthened.

Key words: antagonistic *Bacillus* sp.; research progress; application prospect

中图分类号: Q939.97

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)09-0314-05

随着我国规模化、集约化水产养殖业的迅速发展, 各种水产养殖病害频发、并发, 致使各种广谱抗生素被大量使用, 不仅导致病原菌耐药性不断增强, 破坏和干扰了养殖环境微生物的生态平衡, 而且使水产品中抗生素残留日益严重, 对人类健康产生巨大的危害^[1]。近年来, 国内外学者已经充分证实使用微生物制剂能够通过增强养殖动物免疫力和抑制肠道病原微生物的生长而减少疾病的发生, 并且可以创造巨大的经济效益^[2]。其中, 拮抗芽孢杆菌具有耐高温、耐挤压、耐酸碱、耐干燥以及分泌多种抗菌活性物质等特性, 不仅能够满足饲料加工制粒对高温、高压的要求, 而且不会消耗饲料的营养成分而影响饲料品质, 并能够顺利进入养殖动物肠道起到抑制肠道病原菌生长的作用, 有望成为最有发展前景的、可以替代饲料抗生素添加剂优良益生菌之一^[3]。目前, 国外自

Kozasa^[4]首次将东洋芽孢杆菌(*Bacillus toyoi*)应用于水产养殖以来, 已经在拮抗芽孢杆菌的作用方式、作用机理等理论研究取得了长足发展, 并在发酵工艺技术、菌体浓缩稳定技术、应用技术等方面也有了深入研究, 尤其在菌种的发酵工艺方面具有领先优势^[5-9]。例如, 日本和欧盟等国大多采取先进的液体深层发酵工艺和自动化控制, 且在发酵后处理方面采用喷雾干燥、低温真空干燥和微囊包被等多种菌体稳定保护技术, 不仅活菌数高, 且产品性能稳定、货架期长^[10]。然而, 我国关于拮抗芽孢杆菌制剂的研制与应用现状与国外相比却具有较大的差距。鉴于此, 本文在概括了我国水产拮抗芽孢杆菌研究与应用现状的基础上, 剖析了目前我国水产拮抗芽孢杆菌研究中存在的问题, 并对其在饲料中的应用前景进行了展望, 以期推动拮抗芽孢杆菌在水产养殖中的应用进程。

收稿日期: 2011-05-12

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-46-12); 国家“863”计划项目(2011AA10A216);

国家公益性行业(农业)科研专项(201203085); 连云港市科技计划项目(CG1137)

作者简介: 曹海鹏(1981—), 男, 实验师, 博士研究生, 研究方向为水产微生态制剂与病害生态防控。E-mail: hpcao@shou.edu.cn

*通信作者: 吕利群(1971—), 男, 教授, 博士, 研究方向为水产动物病毒分子生物学。E-mail: lqlv@shou.edu.cn

1 我国水产拮抗芽孢杆菌的研究与应用现状

1.1 拮抗芽孢杆菌的筛选

目前,我国水产养殖允许使用的芽孢杆菌菌种有枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、纳豆芽孢杆菌(*Bacillus natto*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)、缓慢芽孢杆菌(*Bacillus lentus*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)、环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans*)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megeterium*)、坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*)、东洋芽孢杆菌(*Bacillus toyoi*)、芽孢乳杆菌(*Lactobacillus sporogens*)等^[11]。然而,这些芽孢杆菌菌种并非均具有拮抗病原菌的活性。迄今为止,仅枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌等一些菌种被证实具有拮抗病原菌的活性^[12-23](表1),而且在水产养殖中已经得到广泛应用。此外,马如龙^[20]、吕利群^[24]等也分离了克劳氏芽孢杆菌(*Bacillus clausii*)、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)等一些具有拮抗病原菌的作用的芽孢杆菌新菌种。这些拮抗芽孢杆菌菌种的获得极大地丰富了拮抗芽孢杆菌作为水产饲料添加剂的微生物资源,而且为水产饲料抗生素替代添加剂的开发奠定了基础。

表1 国内报道的部分拮抗芽孢杆菌
Table 1 Antagonistic *Bacillus* strains reported in China

菌种	菌株	分离源	报道者	保藏单位
枯草芽孢杆菌	H1	牙鲆肠道	黄剑飞等 ^[12]	黄海水产研究所
枯草芽孢杆菌	B115	养殖池淤泥	沈智华等 ^[13]	浙江淡水研究所
枯草芽孢杆菌	Bs-1	海水	黄汝添等 ^[14]	中山大学
枯草芽孢杆菌	BH344	ND	罗璋等 ^[15]	华中农业大学
枯草芽孢杆菌	TYTG-1	大菱鲆肠道	樊瑞峰等 ^[16]	黄海水产研究所
枯草芽孢杆菌	HY-136	黄鳝肠道	贺中华等 ^[17]	华中农业大学
地衣芽孢杆菌	ESB3	中华绒螯蟹肠道	郝向举等 ^[18]	苏州大学
地衣芽孢杆菌	H4	海洋沉积物	傅松哲等 ^[19]	中国科学院微生物研究所
克劳氏芽孢杆菌	DE5	斜带石斑鱼肠道	马如龙等 ^[20]	集美大学
短小芽孢杆菌	SE5	斜带石斑鱼肠道	马如龙等 ^[20]	集美大学
短小芽孢杆菌	H2	海洋沉积物	傅松哲等 ^[19]	中国科学院微生物研究所
巨大芽孢杆菌	OJ	凡纳滨对虾肠道	Li Jiqui 等 ^[21]	中国海洋大学
芽孢杆菌	CM2	养殖池水	曾东等 ^[22]	四川农业大学
芽孢杆菌	WP1	养殖池底泥	曾东等 ^[22]	四川农业大学
芽孢杆菌	WP1	养殖池底泥	曾东等 ^[22]	四川农业大学
芽孢杆菌	C3	养殖池水	曾东等 ^[22]	四川农业大学
芽孢杆菌	Z2	养殖池水	曾东等 ^[22]	四川农业大学
芽孢杆菌	Z2	养殖池水	曾东等 ^[22]	四川农业大学
芽孢杆菌	B09	养殖池淤泥	徐长安等 ^[23]	国家海洋局 第三海洋研究所

注: ND, 不确定。

1.2 拮抗芽孢杆菌作用机理的研究

近年来,随着基因工程技术与现代生物化学技术的广泛应用,拮抗芽孢杆菌越来越多的抗菌基因及抗菌活性物质逐渐被发现。据报道^[25],拮抗芽孢杆菌与抗菌

活性物质合成有关的基因至少达到了55种,能够分泌多种低分子质量的抗菌肽和细菌素类等抗菌活性物质,如 Surfactin、Iturin、Fengycin、Corynebactin、Bacilysin、Chlorotetain、Bacillaene、Rhizocticin、Mycobacillin、TasA、Subtilin、Ericin、Mersacidin、Sublancin 和 Subtilosin A 等^[18]。这些抗菌活性物质主要通过胞膜攻击作用、诱导细胞凋亡、线粒体攻击作用、抑制蛋白质及细胞壁合成等作用方式^[26-27],表现出良好的抗菌活性^[28]。如杨丽莉等^[29]研究表明枯草芽孢杆菌 fmbJ 抗菌脂肽对嗜水气单胞菌的最小抑菌质量浓度为 20 μg/mL,最小杀菌质量浓度为 32 μg/mL,而且发现该抗菌脂肽能够导致嗜水气单胞菌细胞壁缺失、鞭毛散失、细胞膜通透性增加,使细胞内一些离子和大分子蛋白质、核酸泄露到胞外。这些抗菌活性物质的发现填补了拮抗芽孢杆菌抗菌机理研究的空白,将拮抗芽孢杆菌在水产饲料中的应用研究推向纵深。

1.3 拮抗芽孢杆菌的抗逆性研究

作为饲料添加剂,拮抗芽孢杆菌必须能够抵抗消化道生境(低 pH 值、高胆盐),从而可以定植于消化道表面^[30]。因此,拮抗芽孢杆菌的抗逆性无疑成为评价菌种性能优劣的研究焦点。马如龙等^[20]体外研究了克劳氏芽孢杆菌 DE5 对模拟胃肠道环境的耐受能力后表明,克劳氏芽孢杆菌 DE5 对人工胃液(不同 pH 值、胃蛋白酶)和人工肠液(不同浓度的胆盐、胰蛋白酶)的耐受能力较强,pH3.0、4.0 的人工胃液和含质量分数 0.1%~0.7% 胆盐的人工肠液对克劳氏芽孢杆菌 DE5 的生长几乎没有影响;傅松哲等^[19]也研究了短小芽孢杆菌 H2 对人工肠液和人工胃液的耐受性,发现短小芽孢杆菌 H2 在含质量分数 0.3% 胆酸盐的模拟肠液中能够萌发并可以良好的生长繁殖,在模拟胃液中的数量也没有发生明显减少。这些研究结果充分说明了拮抗芽孢杆菌具有生长速度快,对消化道环境耐受能力强的特点,从而在一定程度上也证实了拮抗芽孢杆菌作为饲料添加剂的可行性。

1.4 拮抗芽孢杆菌的发酵研究

众所周知,获得大量菌体和抗逆性高的芽孢是芽孢杆菌发酵研究的目标,芽孢杆菌的发酵工艺不存在复杂的代谢调控和次级代谢。然而,对于拮抗芽孢杆菌的发酵工艺研究,除了利用价廉易得的培养基获得高密度的菌体和提高芽孢形成率这两个目的外,获得最大的抗菌物质产量也是拮抗芽孢杆菌发酵工艺研究的重要目标。目前,关于拮抗芽孢杆菌的发酵工艺已经取得了一定的研究进展。例如,王妹等^[31]对枯草芽孢杆菌发酵培养基进行了优化,发现当培养基组分为葡萄糖 3.50g/L、蛋白胨 0.83g/L、酵母膏 0.50g/L、磷酸二氢钾 0.35g/L 和碳酸钙 0.25g/L 时,枯草芽孢杆菌 ATCC6051 在 34℃ 培养 16h 即可达到 3.31 × 10⁸CFU/mL;卢耀俊等^[32]利用葡

葡萄糖、玉米粉、豆粕粉和无机盐等作为枯草芽孢杆菌工业化发酵的培养基组分,在 pH7.0 和 30℃ 条件下培养 27.5h,使枯草芽孢杆菌的菌体浓度达到了 7.19×10^9 CFU/mL,芽孢形成率达到了 92%,大幅度提高了菌体浓度和芽孢形成率;徐长安等^[23]对一株具有较强抗菌活性的芽孢杆菌 B09 的发酵工艺进行了优化,证实当培养基配方为蛋白胨 20g/L、甘油 10mL、磷酸氢二钾 1.50g/L、七水硫酸镁 1.50g/L 时,芽孢杆菌 B09 以 1% 接种量在 32℃ 培养 48h 即可使抗菌物质达到最大量。这些发酵工艺的研究成果对拮抗芽孢杆菌的扩培、储存、生产及应用均具有重要的指导意义。

1.5 拮抗芽孢杆菌的安全性研究

自乳杆菌、双歧杆菌等益生菌被报道能够引起菌血症以来,人们对益生菌的安全性认识也开始发生了变化^[33]。我国大多数水产用益生菌的安全使用时期较短,如应用时间最长的光合细菌也只流行了 50~60 年^[34]。因此,很多传统益生菌的安全性均需要重新评价。目前,评价益生菌安全性一个最直接的方法是确定半数致死剂量(LD₅₀),以此得到关于益生菌潜在毒素的基本信息。目前,我国已经开始关注拮抗芽孢杆菌的安全性问题。尹文林等^[35]研究了枯草芽孢杆菌 B115 对鲫鱼、淡水青虾和小白鼠的安全性,结果表明枯草芽孢杆菌 B115 对鲫鱼的 96h LD₅₀ > 4000mg/L,对淡水青虾的 96h LD₅₀ 值为 1350mg/L,以 5×10^{10} CFU/g 剂量口灌和拌饲投喂小白鼠 30d,小白鼠均未出现死亡和任何病理症状。这些研究结果为拮抗芽孢杆菌的安全性应用提供了重要的科学依据。

1.6 拮抗芽孢杆菌的应用研究

大量研究证实,投喂拮抗芽孢杆菌能够显著促进鱼类生长,增强鱼体的非特异性免疫活性,进而提高其对疾病的抵抗力。袁丰华等^[36]将凝结芽孢杆菌以 5.0×10^7 CFU/g 的剂量添加到基础饲料中连续投喂尖吻鲈 50d 后发现,尖吻鲈的增重率提高了 9.54%;殷海成等^[37]将苏云金芽孢杆菌以 5.0×10^8 CFU/g 的剂量添加到基础饲料中连续投喂黄河鲤 40d 后证实,黄河鲤血液中白细胞吞噬活性和血清溶菌酶活性均明显提高,其抗嗜水气单胞菌感染的能力也增强了 75%;Wang Gaoxue 等^[38]也表明口服巨大芽孢杆菌能够显著增强鲤鱼血细胞吞噬活性及其血清超氧化物歧化酶、溶菌酶、杀菌活性。此外,拮抗芽孢杆菌对虾蟹等甲壳动物的良好效果也得到了证实。王玲等^[39]将枯草芽孢杆菌 CGMCC3755 添加到基础饲料中连续 8 周投喂凡纳滨对虾,证实枯草芽孢杆菌 CGMCC3755 在添加剂量为 1.2×10^6 CFU/g 时可以使凡纳滨对虾的增重率提高 9.08%,使凡纳滨对虾的血清酸性磷酸酶活性、过氧化物酶活性和酚氧化酶活性分别提高 28.91%、7.21% 和 11.32%;Tseng 等^[40]实验表明投喂 $10^6 \sim$

10^8 CFU/kg 的枯草芽孢杆菌 E20 能够使凡纳滨对虾血细胞的吞噬活性提高 60.80%~63.40%,使凡纳滨对虾抗溶藻弧菌的抵抗力提高 13.3%~20%。郝向举等^[41]研究发现地衣芽孢杆菌 ESB3 也能够显著增强中华绒螯蟹的增重率和抗病力,其在添加剂量为 1.4×10^8 CFU/g 时可以使中华绒螯蟹的增重率显著提高 42.83%,使中华绒螯蟹的血清酚氧化酶活性、溶菌酶活性、超氧化物歧化酶活性分别提高 32.73%、48.03% 和 9.04%,使中华绒螯蟹对嗜水气单胞菌的抵抗力提高 87.5%。这些研究结果在很大程度上推动了拮抗芽孢杆菌在水产饲料中的应用。

2 我国水产拮抗芽孢杆菌研究与应用中存在的问题

目前,我国对拮抗芽孢杆菌的研究已经取得了一定的成果,并且在实验室条件下证实了其作为饲料添加剂可以促进养殖动物生长和增强养殖动物免疫力及抗病力等显著功效,但若将拮抗芽孢杆菌作为饲料添加剂在养殖动物病害防控中进行临床应用,尚存在很多问题需要解决。

2.1 拮抗芽孢杆菌菌种缺乏有效控制变异的方法

菌种是微生态制剂生产最重要的微生物资源,也是微生态制剂生产成败的关键。一个优良的菌种被选育出来以后,必须保持其优良性状不变或慢变。只有这样,菌种才能在生产中长期使用而不至于降低生产性能和功效。一般来说,菌种不同,其生理生化特性就有所不同^[42]。因此,必须针对不同菌种,建立长期高效的保藏方法,使菌种不死、不衰、不变异。目前,噬菌体弧菌、硝化菌等益生菌均建立其长期有效的保藏方法^[43-44],而关于拮抗芽孢杆菌保藏方法的研究却鲜有报道,而且研究证实由于菌株生长的差异及其代谢产物的拮抗作用,复合拮抗芽孢杆菌制剂的各个菌种在一定营养基质上经过反复传代或接种后能够导致整个菌群组成发生变化,从而影响制剂的质量和效果^[45]。可想而知,在没有长期有效的菌种保藏方法的情况下,拮抗芽孢杆菌制剂的质量与效果也只能是“空中楼阁”,很难得到保障。

2.2 拮抗芽孢杆菌抗菌机制的研究缺乏扎实的研究基础与有效的安全性评价体系和方法

抗菌功能基因检测、抗菌活性物质及相关功能蛋白的纯化鉴定与特性分析、抗菌活性物质作用机理等抗菌机制的研究已经成为拮抗芽孢杆菌基础研究的一个前卫方向。例如,Sugita 等^[46]从芽孢杆菌 NM12 中分离了 1 种小于 5kD 的铁载体,发现其能够对 227 株肠道细菌产生抑制活性;Bhaskar 等^[47]从解蛋白芽孢杆菌(*Bacillus proteolyticus*)CFR3001 中分离纯化了 1 种分子质量大小为 29kD 的碱性蛋白酶,并证实该蛋白酶在 40~60℃ 均具有抗菌活性,而且能够裂解病原菌的细胞壁;Anthony 等^[48]

也从地衣芽孢杆菌 AnBa9 中发现了细菌素。然而, 由于拮抗芽孢杆菌各种抗菌活性物质的分子质量、作用模式、遗传来源、生化性质、抗菌谱等各有不同, 尚未建立成熟的抗菌活性物质纯化与鉴定的基本理论和鉴定技术, 后续研究难获理想结果。

此外, 芽孢杆菌引起水产动物腐皮病、败血症等病害^[49-50]以及益生菌引起人菌血症、内膜炎、肝脓肿等病例的报道^[51-52], 再加上拮抗芽孢杆菌作为饲料添加剂具有一定的特殊性, 必须通过被机体直接摄入而发挥作用, 使拮抗芽孢杆菌潜在的安全性评价成为一个不容忽视的问题。然而, 我国关于拮抗芽孢杆菌安全性研究的报道却寥寥无几, 其主要原因是至今尚未建立有效的安全性评价的体系与方法。目前, 我国关于拮抗芽孢杆菌安全性评价的方法主要以 LD₅₀ 作为直接评价依据, 而至于拮抗芽孢杆菌是否具有致病性和感染力, 是否能够产生有害代谢产物(溶血素、透明质酸酶、白明胶酶等), 是否携带耐药基因, 是否能够引起超敏反应, 是否引起肠道微生物菌群失调等一系列问题^[53]均没有得到系统地阐明。因此, 我国拮抗芽孢杆菌的安全性还有待于大量的研究进行考证。

2.3 拮抗芽孢杆菌开发的剂型比较单一

剂型是拮抗芽孢杆菌制剂加工形成的外观或形状, 是拮抗芽孢杆菌制剂的应用形式, 是连接拮抗芽孢杆菌与生产实践的桥梁, 决定了拮抗芽孢杆菌制剂的稳定性, 对拮抗芽孢杆菌制剂的效果起着极其重要的作用。目前, 液态型制剂加工工艺简单, 只需进行高密度发酵或将菌体发酵液浓缩, 而且成本低, 尤其是近年来, 国内学者对拮抗芽孢杆菌高密度发酵工艺进行了较多的研究, 为液态型制剂的加工工艺提供了切实有效的技术保障, 从而使液态型制剂成为拮抗芽孢杆菌制剂开发的主体。然而, 目前拮抗芽孢杆菌制剂的剂型种类还远远不能满足水产养殖的多样化要求, 而且液态型芽孢杆菌制剂也存在很多缺陷, 如活菌数下降快, 贮藏期短, 运输不便, 容易受到消化道内高酸、高酶环境的影响而死亡。因此, 液态型制剂的质量常常参差不齐, 其营养保健与治疗的功效也往往差强人意。

2.4 较多因素制约拮抗芽孢杆菌制剂的应用效果

近年来, 关于拮抗芽孢杆菌在实验室条件下对养殖动物的应用效果研究已有较多的报道。然而, 我国水产养殖品种繁多, 除了鱼类之外, 还有甲壳类、两栖类和爬行类等, 而且养殖品种在不同的生长阶段, 其肠道环境也各有特点, 对菌种的要求也有所不同。因此, 如果在时间和对象上盲目使用, 拮抗芽孢杆菌就不能充分发挥预期效果。此外, 其他因素也会影响拮抗芽孢杆菌的实际应用效果, 如拮抗芽孢杆菌制剂本身(贮藏、运输、剂量和次数等)、机体状况(营养状况、

生理状态、群体效应等)以及影响机体状况的环境因素(水温、水质等)等。目前研究者较多强调了拮抗芽孢杆菌的实验室应用效果, 却忽略了它们在“大田”、在生产上的临床应用研究, 因此, 我国拮抗芽孢杆菌在实际生产中的应用技术与熟化还有待于进一步加强。

3 结 语

在严格防止抗生素滥用的今天, 微生态制剂在水产养殖中的应用日益广泛, 无论学术界、产业部门还是国家行政机关, 都十分重视微生态科学技术的发展。在这一背景下, 拮抗芽孢杆菌制剂孕育着良好的发展前景。目前我国拮抗芽孢杆菌研究在菌种选育、发酵工艺、应用效果评价等方面得到了突飞猛进的发展, 其在水产养殖中的应用优势也得到了证实, 但在抗菌机理、安全性等方面尚处在初级探索阶段, 距离实际生产还有很长的路要走。因此, 针对现有微生态制剂在实际应用中普遍存在的菌种易变异、保存期短、效果不稳定等难题, 应当借鉴人和畜禽益生菌研究的新技术与新成果, 开拓思路, 加强以下几个方面的基础与应用研究: 1) 高效、抗逆性强的拮抗芽孢杆菌菌种的选育与菌种简易、长期、高效保藏方法的建立; 2) 拮抗芽孢杆菌菌种的安全性及其评价体系的建立和完善; 3) 拮抗芽孢杆菌抗菌机理研究, 如抗菌功能基因检测、抗菌物质及相关抗菌蛋白鉴定; 4) 拮抗芽孢杆菌制剂的生产、加工工艺的优化; 5) 针对养殖动物品种、规格、以及养殖环境等方面的差异性, 分别确定拮抗芽孢杆菌制剂的用量, 建立针对性强的拮抗芽孢杆菌制剂安全使用技术。只有这样, 才能使拮抗芽孢杆菌这类产品更早地应用于生产实际, 更好地为水产养殖业服务。

参 考 文 献:

- [1] BOYD C E, MASSAUT L. Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture[J]. *Aquacultural Engineering*, 1999, 20: 113-132.
- [2] 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.
- [3] 于明超, 李卓佳, 文国樑. 芽孢杆菌在水产养殖应用中的研究进展[J]. *广东农业科学*, 2007(11): 78-81.
- [4] KOZASA M. Toyocerin *Bacillus toyoi* as growth promoter for animal feeding[J]. *Microbiologia Aliments Nutrition*, 1986, 4: 121-135.
- [5] AVELLA M A, GIOACCHINI G, DECAMP O, et al. Application of multi-species of *Bacillus* in sea bream larviculture[J]. *Aquaculture*, 2010, 305: 12-19.
- [6] KESARCODI-WATSON A, KASPAR H, LATEGAN M, et al. Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes[J]. *Aquaculture*, 2008, 274: 1-14.
- [7] ALY S M, AHMED Y A, GHAREEB A A, et al. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 25: 128-136.

- [8] SUN Yunzhang, YANG Hongling, MA Rulong, et al. Probiotic application of two dominant gut *Bacillus* strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune response of grouper *Epinephelus coioides*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29: 803-809.
- [9] LIU Kuanfu, CHIU Chiuhsia, SHIU Yali, et al. Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 28: 837-844.
- [10] 杨欣, 陈丽仙, 吴雅琨, 等. 动物微生态制剂的发展现状及应用前景[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(7): 4030-4031.
- [11] 丁丽, 周维仁, 章世元, 等. 益生菌在水产上的应用及其对鱼类肠道菌群的影响[J]. *饲料工业*, 2009, 30(20): 27-30.
- [12] 黄剑飞, 李健, 刘淇, 等. 一株芽孢杆菌的分离、鉴定及其抗菌效果研究[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(6): 2321-2322; 2326.
- [13] 单胞菌的抗菌效果的研究[J]. *微生物学通报*, 2005, 32(4): 79-84.
- [14] 黄汝添, 谢海平, 陆勇军, 等. 枯草芽孢杆菌 Bs-1 拮抗溶藻弧菌的特性[J]. *热带海洋学报*, 2006, 25(4): 51-55.
- [15] 罗璋, 贾文平, 白晓慧, 等. 枯草芽孢杆菌对三种水产动物病原菌体外拮抗作用的研究[J]. *中国饲料*, 2010(14): 18-19.
- [16] 樊瑞峰, 王印庚, 梁友, 等. 一株广温性大菱鲆肠道益生菌的筛选与鉴定[J]. *渔业科学进展*, 2011, 32(1): 40-46.
- [17] 贺中华, 陈昌福, 高宇, 等. 黄鳍鲷肠道益生菌 HY-136 的鉴定与系统发育分析[J]. *华中农业大学学报*, 2009, 28(6): 715-718.
- [18] 郝向举, 李义, 孙汉, 等. 蟹源益生菌芽孢杆菌的筛选[J]. *中国饲料*, 2009(22): 11-14.
- [19] 傅松哲, 宋奔奔, 刘鹰, 等. 弧菌拮抗菌的筛选及其对凡纳滨对虾的抑菌防病作用[J]. *中国环境科学*, 2009, 29(8): 867-872.
- [20] 马如龙, 杨红玲, 孙云章, 等. 2 株鱼源芽孢杆菌的生物学特性研究[J]. *水产科学*, 2010, 29(9): 505-509.
- [21] LI Jiqui, TAN Beiping, MAI Kangsen. Dietary probiotic *Bacillus* OJ and isomaltooligosaccharides influence the intestine microbial populations, immune responses and resistance to white spot syndrome virus in shrimp (*Litopenaeus vannamei*)[J]. *Aquaculture*, 2009, 291: 35-40.
- [22] 曾东, 王益平, 倪雪勤, 等. 鲤益生菌筛选及部分菌株对鲤前肠黏液的体外黏附作用[J]. *中国水产科学*, 2009, 16(3): 427-433.
- [23] 徐长安, 罗秀针, 张怡评, 等. 一株海洋芽孢杆菌 B09 的筛选及其发酵条件优化研究[J]. *海洋通报*, 2009, 28(5): 74-78.
- [24] 吕利群, 刘丽玲, 刘浩, 等. 一株芽孢杆菌用作水霉病防治的研究[J]. *渔业现代化*, 2010, 37(4): 31-34.
- [25] 赵朋超, 王建华, 权春善, 等. 枯草芽孢杆菌抗菌肽生物合成的研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2010, 30(10): 108-113.
- [26] 申吉泓, 杨宇如, 唐孝达. 抗菌肽作用机制研究现状[J]. *国外医学: 肿瘤学分册*, 2003, 30(5): 347-350.
- [27] 李雄彪, 马庆英, 崔云龙. 凝结芽孢杆菌抗菌作用机制[J]. *中国微生物学杂志*, 2006, 18(1): 78-79.
- [28] 侯红漫, 靳艳, 金美芳, 等. 环酯肽类生物表面活性剂结构、功能及生物合成[J]. *微生物学通报*, 2006, 33(5): 122-128.
- [29] 杨丽莉, 吕凤霞, 别小妹, 等. 枯草芽孢杆菌抗菌脂肽对嗜水气单胞菌抑菌效果[J]. *食品科学*, 2011, 32(1): 193-198.
- [30] 王丽芳, 满达虎. 2 株地衣芽孢杆菌抗逆性及益生性的研究[J]. *饲料研究*, 2009(4): 18-21.
- [31] 王妹, 陈有光, 段平, 等. 枯草芽孢杆菌培养基配方优化的研究[J]. *渔业现代化*, 2008, 35(6): 44-47.
- [32] 卢耀俊, 周世水, 朱明军. 一株水产用益生枯草芽孢杆菌液体发酵初步研究[J]. *内陆水产*, 2007(12): 30-32.
- [33] 贡汉生, 孟祥晨. 益生菌的安全性评价[J]. *现代食品科技*, 2005, 21(4): 76-79.
- [34] 丁雷, 赵德炳. 光合细菌在水产养殖上的应用研究与进展[J]. *水利渔业*, 2001(1): 23-25.
- [35] 尹文林, 潘晓义, 曹铮, 等. 枯草芽孢杆菌 B115 株的毒性研究[J]. *中国水产*, 2006(11): 84-86.
- [36] 袁丰华, 林黑着, 李卓佳, 等. 凝结芽孢杆菌对尖吻鲈的生长、消化酶及非特异性免疫酶的影响[J]. *上海海洋大学学报*, 2010, 19(6): 792-797.
- [37] 殷海成, 赵红月. 苏云金芽孢杆菌对黄河鲤鱼血液免疫效果研究[J]. *水产科学*, 2009, 28(11): 648-652.
- [38] WANG Gaoxue, LIU Youtao, LI Fuyuan, et al. Immunostimulatory activities of *Bacillus simplex* DR-834 to carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29: 378-387.
- [39] 王玲, 张春晓, 孙鸣, 等. 饲料中添加枯草芽孢杆菌(CGMCC No.3755)对凡纳滨对虾生长性能和非特异性免疫力的影响[J]. *饲料工业*, 2011, 32(4): 47-52.
- [40] TSENG Dengyu, HO Peilin, HUANG Sungyan, et al. Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 26: 339-344.
- [41] 郝向举, 李义. 蟹源地衣芽孢杆菌 ESB3 对中华绒螯蟹生长及部分免疫指标的影响研究[J]. *饲料工业*, 2011, 32(2): 23-27.
- [42] 吕红线, 郭利美. 工业微生物菌种的保藏方法[J]. *山东轻工业学院学报*, 2007, 21(1): 52-55.
- [43] 邓璐, 杨先乐, 李圆圆, 等. 噬菌体弧菌 BDF-H16 长期简易保藏方法研究[J]. *上海水产大学学报*, 2008, 17(6): 714-720.
- [44] 任杰, 林炜铁, 罗小春, 等. 硝化菌保藏特性及衰减动力学研究[J]. *中国生物工程杂志*, 2007, 27(12): 61-65.
- [45] 马俊孝, 孔健, 季明杰. 利用 PCR-DGGE 技术分析微生态制剂在传代过程中的菌群变化[J]. *山东大学学报: 理学版*, 2008, 43(7): 56-60.
- [46] SUGITA H, HIROSE Y, MATSUO N, et al. Production of the antibacterial substance by *Bacillus* sp. strain NM12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish[J]. *Aquaculture*, 1998, 165: 269-280.
- [47] BHASKAR N, SUDEEPA E S, RASHMI H N, et al. Partial purification and characterization of protease of *Bacillus proteolyticus* CFR3001 isolated from fish processing waste and its antibacterial activities[J]. *Bioresource Technology*, 2007, 98: 2758-2764.
- [48] ANTHONY T, RAJESH T, KAYALVIZHI N, et al. Influence of medium components and fermentation conditions on the production of bacteriocin(s) by *Bacillus licheniformis* AnBa9[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100: 872-877.
- [49] 骆艺文, 郝志凯, 王印庚, 等. 一株引起刺参“腐皮综合征”的蜡样芽孢杆菌[J]. *水产科技情报*, 2009(2): 60-63.
- [50] CHO Hoipang, LIU Liling, LIU Kai, et al. Phenotypic characterization and phylogenetic analysis of a virulent *Bacillus cereus* strain from the Tiger frog, *Hoplobatrachus rugulosus* Wiegmann[J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2010, 4(24): 2780-2786.
- [51] 陈玉梅, 程茜. 益生菌的安全性[J]. *中国微生物学杂志*, 2010, 22(9): 851-853.
- [52] 解傲, 袁杰利. 食品用乳酸菌安全性评价方法研究进展[J]. *中国微生态学杂志*, 2010, 22(8): 754-756.
- [53] 郭晓奎, 袁杰利. 益生菌安全性的现状与对策[J]. *中国微生态学杂志*, 2009, 21(6): 56-57.