



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.

2 株枯草芽孢杆菌的分离鉴定及特性研究

巴翠玉^{1,2}, 张林波^{1,2}, 张培军³, 赵福广^{1,2}, 李月红^{1,2}

(1 吉林农业大学 动物科学技术学院, 吉林 长春 130118; 2 吉林农业大学 生命科学学院, 吉林 长春 130118;
3 吉林省卫生监测检验中心, 吉林 长春 130000)

摘要:【目的】寻求适合制作水产类生态制剂的益生菌。【方法】从养鱼塘底泥和健康鲫鱼 *Carassius auratus* 肠道中分离芽孢杆菌, 结合细菌形态学、生理生化特征和 16S rRNA 序列分析对其进行鉴定, 对菌株安全性、高温耐受性、酸性耐受性、拮抗性及其产酶情况等特性进行研究。【结果】分离到 2 株芽孢杆菌, 分别命名为 B1 和 B2, 细菌形态学、生理生化特征和 16S rRNA 序列分析的结果显示, B1 和 B2 均为枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*。特性研究结果证实 B1、B2 菌株都具有较好的安全性、高温耐受性和酸性耐受性, 可对致病性大肠埃希菌 *Escherichia coli*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila* 以及温和气单胞菌 *A. sobria* 有良好的体外抑菌能力, 均具有产脂肪酶、淀粉酶、蛋白酶和纤维素酶的能力。【结论】分离到 2 株性能优良的枯草芽孢杆菌, 可将其作为水产生态制剂的候选菌株。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 分离鉴定; 菌株特性; 鲫鱼; 16S rRNA
中图分类号: S917.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2017)03-0046-06

Isolation, identification and characterization of two strains of *Bacillus subtilis*

BA Cuiyu^{1,2}, ZHANG Linbo^{1,2}, ZHANG Peijun³, ZHAO Fuguang^{1,2}, LI Yuehong^{1,2}

(1 Animal Science and Technology College, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;
2 College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;
3 Jilin Province Health Surveillance Inspection Center, Changchun 130000, China)

Abstract:【Objective】To explore potential probiotics in order to develop microecological agents for aquiculture. 【Method】*Bacillus* stains were isolated from the pond sediment and healthy carp (*Carassius auratus*) intestine. The strains were identified by the morphological, physiological and biochemical characteristics and 16S rRNA sequence analysis. The safety, high temperature tolerance, pH tolerance, antagonistic effects and enzyme production of the strains were studied. 【Result】Two *Bacillus* strains were isolated and named B1 and B2. They were identified as *B. subtilis* by morphology, physiological and biochemical characteristics and 16S rRNA sequence analysis. The B1 and B2 strains had good safety, high temperature tolerance and strong tolerance of acid. They had good antibacterial activity against pathogenic *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophila* and *A. sobria* *in vitro*, and had the ability to produce lipase, amylase, protease and cellulase. 【Conclusion】Two *B. subtilis* strains were isolated, and both can be used as candidates for developing microecological agents for aquiculture.

Key words: *Bacillus subtilis*; isolation and identification; strain characteristic; *Carassius auratus*; 16S rRNA

枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 是一类好氧产芽孢的革兰阳性杆状细菌,大小为 $(0.7 \sim 0.8) \mu\text{m} \times (2 \sim 3) \mu\text{m}$,无荚膜,有鞭毛,能运动,广泛存在于土壤、湖泊、海洋和动植物的体表,无致病性。菌落粗糙、不透明、扩张、污白色或微带黄色。在营养缺乏的条件下,枯草芽孢杆菌停止生长,同时加快代谢作用,产生多种大分子的水解酶和抗生素,并诱导自身的能动性和趋化性,从而恢复生长。在极端的条件下,还可以诱导产生抗逆性很强的内源孢子^[1]。由于枯草芽孢杆菌具有生长速度快、营养简单以及耐热、可产抗逆芽孢等突出特征,而使其不仅有利于在微生态制剂生产、加工等环境中的存活、定殖与繁殖,并且其成本较低,施用方便,储存期长,因此现已成为一种理想的微生态制剂菌种,可有效减少或替代抗生素在养殖过程中的使用。我国农业部2003年12月9日在第318号公告中公布了15种可以作为微生物饲料添加剂的菌种,其中就包括枯草芽孢杆菌。本试验对从鲫鱼肠道和养殖池底泥中分离到的2株芽孢杆菌进行菌落形态观察、生理生化特征和16S rRNA序列分析来综合鉴定,并对其安全性、耐受性、拮抗性和产酶情况进行了分析,以期得到高生物活性的益生菌菌株,为进一步研制水产类微生态制剂提供优良的益生菌菌种。

1 材料与方法

1.1 供试菌株及试验材料

指示菌:嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila*、温和气单胞菌 *A. sobria*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 和大肠埃希菌 *Escherichia coli* 均由吉林农业大学水产研究室保存。

试验动物:健康的当年鲫鱼 *Carassius auratus* 200尾,平均体质量 $(55.42 \pm 0.58) \text{g}$,购自吉林省新立城水库。

主要试剂:产淀粉酶筛选培养基、蛋白酶筛选培养基和纤维素酶筛选培养基按赵东等^[2]方法配制,产脂肪酶筛选培养基按李璟等^[3]方法配制,革兰染色试剂盒购自上海铭睿生物科技有限公司、细菌基因组DNA提取试剂盒、*Taq*酶等购自TaKaRa公司。

主要设备:Phoenix™ 100型全自动微生物分析仪(美国BD公司),YXQ-LS-50A立式压力蒸汽灭菌锅(上海博讯实业有限公司医疗设备厂),恒温培养箱(金坛市国旺试验仪器厂),SW-CJ-2FD型超净工作台(上海博讯实业有限公司医疗设备厂),TG-16WS台式高速离心机(长沙湘智离心机仪器有限公

司),LifePro梯度PCR仪(杭州博日科技有限公司),凝胶成像系统(基因有限公司)。

1.2 菌株的分离

无菌条件下分别取养殖池底泥和鲫鱼肠道,加入无菌的生理盐水制成匀浆,将匀浆稀释至合适稀释度,取其中3个最适稀释度的稀释液200 μL 涂布于芽孢杆菌分离培养基上,37℃恒温培养箱中培养24 h。挑取形态一致的优势菌群进行纯培养,待菌落形态生长一致时,挑取单菌落,用体积分数为80%的甘油对其进行菌落的保藏,备用。

1.3 菌株的鉴定

1.3.1 形态学及生理生化鉴定 观察菌落形态及革兰染色效果,并用Phoenix™ 100型全自动微生物分析仪,参考说明书方法对菌落进行生理生化鉴定。

1.3.2 16S rRNA序列分析鉴定 16S rRNA序列扩增参考魏亚松等^[4]设计的特异性引物:正向引物Primer A 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',反向引物Primer B:5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3',由上海生工生物工程有限公司合成。用细菌基因组DNA提取试剂盒提取基因组DNA,以此为模板进行PCR扩增。PCR反应体系(50 μL):TaKaRa LA-*Taq* 0.5 μL , DNA模板2 μL ,10×PCR Buffer 5 μL ,dNTP Mixture 8 μL ,上、下游引物各2 μL ,双蒸水30.5 μL 。PCR程序:94℃预变性5 min,94℃30 s,54℃30 s,72℃1 min,30个循环;72℃延伸7 min。PCR产物纯化后交由上海生工生物工程有限公司进行测序。测序结果通过NCBI数据库进行Blast比对分析,通过MEGA5.0构建系统发育树。

1.4 安全性试验

试验鲫鱼经1周驯化后,选择适应环境、体格健壮的鲫鱼200尾,随机分4组,1组为对照组,其余3组为试验组(试验I、II和III组),每组50尾鱼,采用腹腔注射方法,对照组每尾鱼注射0.1 mL无菌液体LB,3个试验组分别注射0.1 mL含有芽孢杆菌菌悬液 1×10^9 、 1×10^8 和 $1 \times 10^7 \text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的液体LB。23℃水温条件下饲养7 d,观察并记录死亡情况,最后剖检,观察有无病变。

1.5 高温耐受性试验

参照文献[5]的方法,将菌株用液体LB培养基培养48 h后,3500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心30 min,取上清液,无菌操作将其稀释至一定的倍数,将最后2个梯度各分成3组,分别置于80、90和100℃水浴锅中30 min,流水冷却,以室温下未经水浴的菌株培养作为对照,采用平板计数法计算水浴后的存活率,据此

判断其对温度的耐受性,每个试验重复 3 次。

1.6 酸性耐受性试验

参考文献[6],将芽孢杆菌菌悬液分别接种到 pH 为 3.0、4.0、5.0 的液体 LB 培养基中,使芽孢杆菌初始浓度约为 $1 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$,37 ℃ 条件下 $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床中培养,1 h 后取 200 μL 涂布于固体培养基上,进行平板计数,计算存活率,每个试验重复 3 次。

1.7 体外抑菌试验

采用牛津杯法测定各个菌株的抑菌活性^[7]。活化指示菌和芽孢杆菌,调整菌浓度为 $10^6 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$,取指示菌 200 μL 用涂布棒均匀涂布于固体 LB 平板,取无菌牛津杯置于其上,使其紧贴于培养基上,每个牛津杯加入 0.2 mL 芽孢杆菌菌液。将平板置于 30 ℃ 恒温箱培养 24 h 后测抑菌圈直径,计算抑菌圈与菌圈直径的比值。试验重复 3 次。

1.8 产酶试验

1.8.1 平板法胞外酶活性初筛 挑选单菌落点种于纤维素酶筛选培养基、淀粉酶筛选培养基、蛋白酶筛选培养基和脂肪酶筛选培养基,37 ℃ 条件下培养 48 h 后观察,如有透明圈则表示细菌产酶。观察淀

粉酶筛选培养基时需滴加鲁哥氏碘液。计算水解圈与菌落直径的比值,其大小表示初筛酶活性。

1.8.2 发酵液法胞外酶活性测定 选取胞外酶活性初筛结果中 4 种胞外酶均有活性的菌株进行胞外酶活性测定。淀粉酶活性采用碘-淀粉比色法^[8]测定,纤维素酶活性采用羧甲基纤维素钠盐(CMC-Na)酶活性测定方法^[9]测定,蛋白酶活性采用福林酚法^[10]测定。脂肪酶活性采用橄榄油乳化液法^[11]测定。

1.9 数据处理

用 Excel 统计分析数据,试验结果用平均数 ± 标准差表示。

2 结果与分析

2.1 形态学及生理生化鉴定结果

从养殖池底泥和鲫鱼肠道中各分离出 1 株芽孢杆菌,分别命名为 B1 和 B2。2 株菌的菌落形态都呈白色近似圆形,不透明,表面干燥没有光泽,中间褶皱边缘不整齐;革兰染色结果为阳性,在显微镜下观察菌体呈杆状,两端钝圆,孢囊无明显膨胀,无伴孢晶体。用 Phoenix™ 100 型全自动微生物分析仪对菌株 B1 和 B2 进行鉴定,结果见表 1,参照《伯杰细菌

表 1 菌株生化鉴定结果¹⁾

Tab.1 Biochemical identification results of stains

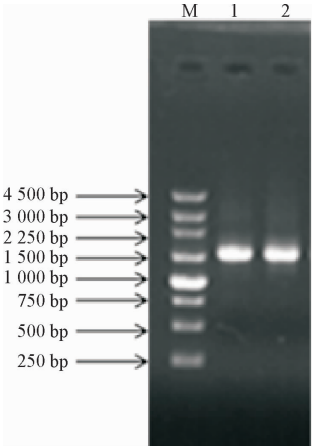
生化特征	菌株 B1	菌株 B2	生化特征	菌株 B1	菌株 B2
精氨酸-精氨酸-AMC	-	-	4MU-BD-葡糖苷酸	-	-
L-精氨酸	-	-	4MU-磷酸盐	+	+
L-亮氨酸-AMC	-	-	L-脯氨酸-PNA	+	+
L-焦谷氨酸-AMC	-	-	PNP-磷酸盐	-	+
3-甲基戊二酸	+	+	D-蔗糖	+	+
D-葡糖酸	+	+	麦芽糖	-	-
α-酮戊二酸	+	+	尿素	-	-
腺嘧啶脱氧核苷	+	+	L-丙氨酸	-	-
4MU-BD-半乳糖苷	-	-	L-异亮氨酸-AMC	-	-
4MU-N-乙酰-BD-氨基葡萄糖	-	-	L-脯氨酸-AMC	-	-
丙氨酸-丙氨酸-PNA	+	-	甲硫氨酸	-	-
4MU-AD-葡糖苷	+	+	D-果糖	+	+
葡萄糖	+	+	亚氨基二乙酸	+	+
D-海藻糖	+	-	多粘菌素 B	-	-
N-乙酰-氨基葡萄糖	-	-	4MU-BD-纤维二糖苷	+	+
甘氨酸-脯氨酸-AMC	-	-	4MU-BD-葡糖苷	+	+
L-组氨酸-AMC	-	-	4MU-磷酸盐	+	+
L-苯丙氨酸-AMC	-	-	缬氨酸	+	-
L-色氨酸-AMC	-	-	β-葡二糖	-	-
黏菌素	-	-	D-塔格糖	-	-
D-甘露醇	+	+	麦芽三糖	-	-
3-甲基己二酸	+	+	七叶苷	+	+
4MU-AD-葡糖苷	-	+			

1)“+”表示生化反应阳性;“-”表示生化反应阴性。

鉴定手册》及仪器分析结果,初步鉴定这 2 株菌均为枯草芽孢杆菌。

2.2 分子生物学鉴定结果

以菌株 B1 和 B2 的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,结果扩增到特异性的 16S rRNA 片段大小为 1 500 bp(图 1)。将 2 株菌的测序结果在 NCBI 中进行 Blast 比对,结果表明:菌株 B1 与菌株 *Bacillus subtilis* BS3902(登录号:EU047884.1)的序列相似性为 99%;菌株 B2 与 *B. subtilis* AER314-2(登录号:KR967391.1)的序列相似性为 99%。通过 MEGA5.0 软件构建系统进化树,结果显示菌株 B1 和 B2 都与枯草芽孢杆菌亲缘关系最近,聚类为一支(图 2)。



M:250 bp DNA marker DI4500;1:菌株 B1;2:菌株 B2。

图 1 菌株 16S rRNA PCR 扩增结果
Fig.1 PCR amplification of 16S rRNA gene in two strains

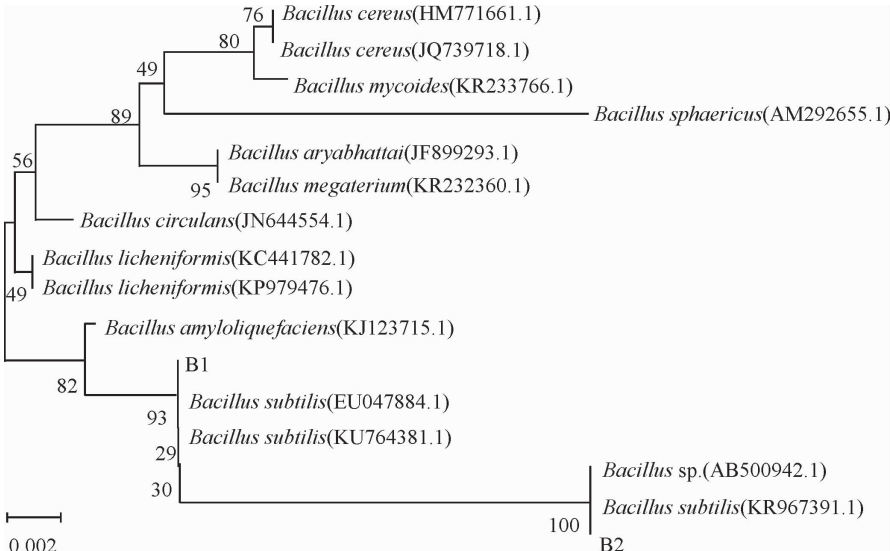


图 2 菌株 16S rRNA 系统发育分析
Fig.2 16S rRNA phylogenetic analysis of strains

2.3 安全性试验结果

注射 0.1 mL 浓度分别为 1×10^9 、 1×10^8 和 1×10^7 cfu · mL⁻¹ 的枯草芽孢杆菌菌悬液后,与对照组相比,鲫鱼未出现死亡,解剖发现对照组和试验组内脏菌正常无变异。说明 2 株枯草芽孢杆菌都有很好的安全性。

2.4 高温耐受性试验结果

高温耐受性试验结果见表 2。由表 2 可知,2 株枯草芽孢杆菌对不同温度的耐受性不同,在相同时间(30 min)内,菌株在 80 ℃ 条件下的存活率明显高于 100 ℃ 条件下的存活率,并随着温度的上升存活率不断下降。表 2 数据显示,菌株 B2 对高温的耐受能力略强于 B1。

表 2 不同水浴温度下枯草芽孢杆菌的存活率			
Tab.2 The livability of <i>Bacillus subtilis</i> strain under different temperatures			
菌株	80 ℃	90 ℃	100 ℃
B1	83.90 ± 0.26	62.20 ± 1.32	3.27 ± 0.21
B2	84.33 ± 0.55	63.37 ± 0.65	3.80 ± 0.20

2.5 酸性耐受性试验结果

由表 3 可知,2 株芽孢杆菌分别在 pH 3.0、4.0、5.0 条件下处理 1 h 后的存活率都在 97% 以上,说明 2 个菌株都有较好的酸性耐受能力。在 pH3.0、4.0 和 5.0 条件下,菌株 B1 的存活率分别为 97.16%、98.43% 和 99.27%,菌株 B2 的存活率分别为 97.37%、98.83% 和 99.43%。

表 3 不同 pH 环境下枯草芽孢杆菌的存活率
Tab.3 The livability of *Bacillus subtilis* strain under different pH %

菌株	pH 3.0	pH 4.0	pH 5.0
B1	97.16 ± 0.67	98.43 ± 0.50	99.27 ± 0.15
B2	97.37 ± 0.45	98.83 ± 0.25	99.43 ± 0.15

表 4 枯草芽孢杆菌对指示菌的拮抗作用
Tab.4 The antagonistic properties of *Bacillus subtilis* strains against pathogens

菌株	抑菌圈直径/菌圈直径			
	大肠埃希菌	金黄色葡萄球菌	嗜水气单胞菌	温和气单胞菌
B1	2.26 ± 0.16	1.89 ± 0.10	0.94 ± 0.25	1.34 ± 0.21
B2	2.52 ± 0.11	2.40 ± 0.20	1.20 ± 0.11	1.52 ± 0.18

2.7 产酶试验结果

2.7.1 平板法胞外酶活性初筛结果 由表 5 可以看出,菌株 B1 和 B2 都可产淀粉酶、脂肪酶、蛋白酶和纤维素酶,不同菌株产酶种类和能力不同。对于 2 株枯草芽孢杆菌,反映其产淀粉酶能力的染色圈直

2.6 体外抑菌试验结果

以大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、嗜水气单胞菌和温和气单胞菌为指示菌,进行抑菌性分析,抑菌圈直径大小可反映这 2 株枯草芽孢杆菌对致病菌体外抑制能力的强弱,结果见表 4,菌株 B2 的抑菌圈/菌圈直径比数值上均大于菌株 B1,说明菌株 B2 比 B1 对这 4 种指示菌可能有较强的抑制作用。

径/菌落直径(H/C)及产蛋白酶能力的 H/C 数值上均为 $B2 > B1$;反映其产纤维素酶能力的 H/C 及产脂肪酶能力的 H/C 数值上均为 $B1 > B2$;说明菌株 B2 较 B1 产淀粉酶和蛋白酶能力水平可能较高,产纤维素酶和脂肪酶能力可能稍弱。

表 5 不同菌株胞外酶活性初筛结果
Tab.5 Initial screening results of extracellular enzyme activity of different strains

菌株	染色圈直径/菌落直径			
	淀粉酶	蛋白酶	纤维素酶	脂肪酶
B1	2.32 ± 0.03	2.55 ± 0.03	4.41 ± 0.09	1.39 ± 0.06
B2	2.54 ± 0.04	2.72 ± 0.14	3.26 ± 0.06	1.38 ± 0.21

2.7.2 发酵液法胞外酶活性测定结果 因发现平板法 H/C 不能完全代表菌株产酶能力,所以对产酶菌株进行发酵液法胞外酶产酶活性测定是非常必要

的。由表 6 可以看出,产蛋白酶、纤维素酶和脂肪酶活力较高的菌株为 B2,产淀粉酶活力较高的菌株为 B1,与初筛结果有所不同。

表 6 不同菌株发酵液的胞外酶活性
Tab.6 Extracellular enzyme activities of fermented liquids of different strains $U \cdot mL^{-1}$

菌株	淀粉酶	蛋白酶	纤维素酶	脂肪酶
B1	39.15 ± 0.05	21.20 ± 0.15	17.68 ± 0.04	14.68 ± 0.04
B2	29.19 ± 0.03	32.14 ± 0.21	19.83 ± 0.01	15.67 ± 0.24

3 讨论与结论

近年来,芽孢杆菌类微生态制剂被广泛应用于水产养殖以替代或减少抗生素的使用,降低其带来的危害,使用的芽孢杆菌类型也是多种多样。枯草芽孢杆菌因在缺乏营养或不良环境时,可以通过生成内生孢子来增强其抗逆性,并且其耐加工、耐储藏、耐胃酸,稳定性较好,也可以通过孢子形式进入到消化道,并且可与肠道上的特异性结合位点结合,形成优势菌群,进行生物夺氧,也可以产生多种代谢物质,抑制病原菌的生长,是较好的微生态制剂菌

种,具有开发为微生态制剂的潜在优势。胡凡光等^[12]选用从健康大菱鲃鱼 *Psetta maxima* 体肠道分离培养的同源枯草芽孢杆菌制成的饲料添加剂对大菱鲃进行促生长影响的研究。结果表明:与对照组相比试验组降低了饲料系数,提高了蛋白质效率和增重率。李卫芬等^[13]将草鱼 *Ctenopharyngodon idellus* 试验组饲喂含枯草芽孢杆菌($10^8\text{ cfu} \cdot \text{kg}^{-1}$)的基础日粮,结果发现:试验组肠道内容物中胰蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶活性比对照组显著提高;肝胰脏中脂肪酶和胰蛋白酶活性也比对照组显著提高。肠道菌群数量分析显示,与对照组相比,试验组肠道芽

孢杆菌和假单胞菌数量极显著提高,而致病性弧菌和大肠埃希菌数量却极显著降低。丁祥力等^[14]从淡水养殖污水和底泥中分离出 1 株枯草芽孢杆菌 WH-5,试验证明其具有改善淡水养殖水体水质的有效作用。

微生态制剂在生产过程中一般把筛选益生菌作为关键的一步,因为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,故一般认为从相应的水产养殖环境分离菌株用于筛选水产微生态制剂更具合理性,所以本试验从养殖池底泥和鲫鱼肠道中进行芽孢杆菌的分离,分离得到 2 株芽孢杆菌,分别命名为 B1 和 B2。运用传统的细菌形态学观察、生理生化试验及 16S rRNA 序列对分离出的 2 株芽孢杆菌进行分析鉴定,结果 B1 和 B2 均为枯草芽孢杆菌。优良的水产微生态制剂应具备安全、耐高温、抗酸腐蚀、抑菌能力强、可产酶等特点^[15],故本试验从这几方面对 B1 和 B2 这 2 株枯草芽孢杆菌的益生特性进行了探究。菌株安全性试验结果表明,这 2 株枯草芽孢杆菌均具有安全性,无致病能力。高温耐受性和 pH 耐受性试验发现,这 2 株枯草芽孢杆菌均具有良好的耐高温和耐酸能力,且 B2 菌株的效果数值上好于 B1 菌株。体外抑菌试验的抑菌能力:B2 > B1,两者均对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、嗜水气单胞菌和温和气单胞菌有抑制效果,对大肠埃希菌的抑制效果最好。产酶试验结果表明:B1 和 B2 菌株都能够分泌淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶和脂肪酶,有望用于鱼虾等的饲料添加剂,促进鱼虾生长及提高饲料利用率;同时,可利用枯草芽孢杆菌分解养殖水体中过剩饵料中的有机物,净化水体及脱氮^[16]。因此,枯草芽孢杆菌 B1 和 B2 适合用于研发水产类微生态制剂,并需进一步研究其功能和机理。本研究为进一步研制水产类微生态制剂提供了优良的益生菌菌种参考。

参考文献:

[1] 沈卫锋,牛宝龙,翁宏飏,等. 枯草芽孢杆菌作为外源基因表达系统的研究进展[J]. 浙江农业学报, 2005, 17(4): 234-238.

[2] 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.

[3] 李璟,兰贵红,张飞伟,等. 产脂肪酶微生物的筛选鉴定及脂肪酶 *lipA* 基因克隆[J]. 广东农业科学, 2012, 39(17): 138-142.

[4] 魏亚松,邹玲,温建新,等. 水貂肠道枯草芽孢杆菌的分离及 16S rRNA 鉴定[J]. 中国动物检疫, 2013, 30(6): 36-39.

[5] 陈海华. 一株益生芽孢杆菌的筛选及其肠道菌群调节作用研究[D]. 重庆:第三军医大学, 2005.

[6] 周金敏,吴志新,曾令兵,等. 黄颡鱼肠道病原拮抗性芽孢杆菌的筛选与特性研究[J]. 水生生物学报, 2012, 36(1): 78-84.

[7] 刘冬梅,李理,杨晓泉,等. 用牛津杯法测定益生菌的抑菌活力[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(3): 110-111.

[8] 白燕,王维新. 刺参肠道蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶与纤维素酶活性的测定方法[J]. 饲料工业, 2012, 33(20): 28-32.

[9] 赵玉萍,杨娟. 四种纤维素酶酶活测定方法的比较[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(3): 116-118.

[10] 中华人民共和国专业标准. 蛋白酶活力测定方法: SB/T10317-1999[S]. 北京:中国标准出版社, 1999.

[11] 郭晓军,郭威,袁洪水,等. 一株饲用产脂肪酶芽孢杆菌的筛选及其紫外诱变育种[J]. 中国饲料, 2015, 15(12): 27-29.

[12] 胡凡光,郭萍萍,麻丹萍. 饲料中添加枯草芽孢杆菌对促进大菱鲆生长及养殖水环境的影响[J]. 渔业现代化, 2014, 41(2): 7-11.

[13] 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.

[14] 丁祥力,王震,陈薇,等. 枯草芽孢杆菌 WH-5 的分离鉴定及净水研究[J]. 湖南农业科学, 2012(1): 15-19.

[15] 邵建军,朱瑞良. 微生态制剂的作用及应用中应注意的问题[J]. 四川畜牧兽医, 2003, 30(9): 45-46.

[16] JOONG K K, KYOUNG J P, KYOUNG S C, et al. Aerobic nitrification-denitrification by heterotrophic *Bacillus* strains[J]. Bioresour Technol, 2005, 96(17): 1897-1906.

【责任编辑 李晓卉】