

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*

张欢欢^{1,2} 王秀华^{1①} 李晨¹ 黄健^{1,3}

(1. 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;

2. 中国海洋大学海洋生命学院 青岛 266003; 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 266237)

摘要 从对虾养殖池中分离到 1 株细菌(编号 2013042402, 简称菌株 02), 分别用 16S rDNA 序列比对法和细菌全细胞脂肪酸气相色谱法对该菌进行鉴定。结果显示, 菌株 02 为芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)。为探讨该芽孢杆菌在生物絮团对虾养殖中的使用效果, 实验分别设置加菌加糖组(菌株 02 的量为 2.0×10^4 CFU/ml, 蔗糖量为饵料的 70%)、加菌组、加糖组(生物絮团组)及空白对照组, 研究了菌株 02 对养殖水质(温度、盐度、溶氧、pH、氨氮及亚硝酸氮)、对虾存活率及水体中主要菌群组成等指标的影响。结果显示, 加菌加糖组能显著降低养殖水体中的氨氮和亚硝酸氮浓度, 提高对虾存活率。生物絮团对虾养殖系统中添加菌株 02, 能够改善菌群结构, 抑制弧菌生长。研究结果可为生物絮团对虾养殖中定向培养有益微生物提供技术支持。

关键词 芽孢杆菌; 凡纳滨对虾; 生物絮团技术; 氨氮; 亚硝酸氮; 存活率; 弧菌

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)02-0111-08

对虾是重要的水产养殖品种, 近年来受病毒性及细菌性病原感染导致的偷死病及早期死亡症发生频繁(Zhang *et al.*, 2014; Joshi *et al.*, 2014)。有研究表明, 在养殖水体中添加有益菌, 可以有效控制病原微生物, 优化养殖生态环境, 减少虾病发生(Gatesoupe, 1999; Ziaei-Nejad *et al.*, 2006)。将有益菌加入饵料中投喂对虾, 能够显著增强对虾的消化吸收和抗逆水平, 促进对虾的生长(Wang, 2007; Verschuere *et al.*, 2000)。地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)作为水产养殖有益菌用于水产养殖, 可提高养殖动物生长速度与成活率(刘波等, 2005), 还能有效降解水体中残余饵料中的蛋白和淀粉(谢航等, 2008)。

对虾疾病发生与养殖环境存在密切关系, 优良的水质理化条件及健康的微生物群落有助于对虾的生长, 减少疾病发生(Gatesoupe, 1999; Samocha *et al.*, 2004), 但随着集约化对虾养殖业的发展, 由大量残

饵、粪便导致的养殖水体富营养化及有害氮源积累问题日渐突出, 降低了对虾的免疫力(Crab *et al.*, 2012)。生物絮团技术在对虾工厂化养殖中有良好的应用效果, 该技术通过调节养殖水体中的碳氮比, 促进脱氮微生物繁殖, 具有降低水体中氮源浓度、提高饲料利用率及减少换水量的效果。生物絮团对虾养殖中, 微生物的组成存在多样性(Zhao *et al.*, 2012), 但目前尚没有通过向生物絮团养殖系统中添加有益微生物来实现定向培养有益微生物的研究报道。

本研究在实验室规模条件下, 利用从对虾养殖池中分离出的芽孢杆菌作为有益菌, 添加到生物絮团对虾养殖系统中, 研究了芽孢杆菌联合生物絮团对虾养殖技术对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)养殖水质指标(pH、氨氮、亚硝酸氮)、对虾生长、存活及微生物群落的影响, 以期对生物絮团对虾养殖技术升级提供理论支撑。

* 公益性行业(农业)科研专项经费项目(201103034)资助。张欢欢, E-mail: zhanghh12141202@163.com

① 通讯作者: 王秀华, 研究员, E-mail: wangxh@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-04-16, 收修改稿日期: 2015-04-29

1 材料与方法

1.1 实验材料

凡纳滨对虾购自山东日照市某对虾育苗场,平均体长为 (1.52 ± 0.36) cm,平均体重为 (0.049 ± 0.003) g。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株采集与分离纯化 从山东省潍坊市某对虾养殖场的工厂化对虾养殖池中,用无菌采样瓶采集水样,低温保存带回实验室。在无菌条件下,于 2216E 平板上划线分离纯化,对不同菌株编号并进行鉴定。

1.2.2 菌株鉴定 16S rDNA 序列比对法参照范文辉等(2005)。扩增产物由上海桑尼生物工程有限公司测序,所得序列在 GenBank 数据库中利用 BLAST 进行同源性比对;细菌全细胞脂肪酸分析鉴定法参照 MIDI 公司(美国)提供的标准方法进行,气相色谱系统应用美国 Agilent6850 型气相色谱仪,分析软件应用 MIDI 公司开发的细菌全细胞脂肪酸鉴定及分析系统(MIS)。

1.2.3 菌株 02 发酵 将菌株 02 接种于 2216E 液体培养基,于 28℃ 摇床振荡培养 24 h,发酵产物经离心后,PBS 重悬沉淀备用,细菌浓度采用涂布平板计数法确定。

1.2.4 实验分组及养殖管理 随机取暂养的对虾 360 尾,分别置于 12 个有效水体为 7 L 的实验水桶内,每个水桶 30 尾。实验设加菌加糖组(菌株 02 联合生物絮团组)、加菌组、加糖组(生物絮团组)和空白对照组,各组设 3 个平行。菌株 02 的量在养殖水体中达到 2.0×10^4 CFU/ml,仅在实验开始时一次性接种,加糖量(蔗糖)为每次饵料投喂量的 70% (邓应能等, 2012), 投饵 30 min 后添加。实验对虾每天投喂 4 次(08:00、12:00、16:00 和 20:00),投喂量为对虾体重的 3%。养殖实验为期 51 d,实验用水为砂滤海水,整个养殖过程不换水,连续充气,每天早、中、晚检查对虾摄食及存活情况,对死亡对虾及时取出,记录体长、体重。

1.2.5 水质指标测定 使用 YSI556 便携式水质测定仪每日 09:00 对养殖水体的温度、盐度、溶氧和 pH 值进行测量。同时,取各组水样用 $0.45\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤后,分别采用次溴酸盐氧化法和盐酸萘乙二胺分光光度法测定养殖水体的氨氮和亚硝酸氮浓度(GB 17378.4-2007, 2007)。养殖结束时,使用 Nalgene 沉淀漏斗测定养殖水体内生物絮团的沉积量,取样静置 20 min 后读数。每次实验均设置 3 个平行,取平

均值进行分析。

1.2.6 对虾生长及存活率测定 实验进行到 22 d、44 d、51 d 时,统计各组对虾的存活率;实验结束时,统计各组对虾的生物学体长,计算对虾体长增长率。

存活率(%)=终末尾数/初始尾数 $\times 100$;

体长增长率(%)=(终末平均体长-初始平均体长)/
初始平均体长 $\times 100$

1.2.7 养殖水体中主要可培养菌群组成分析 实验结束时,采用 2216E 平板划线分离法,对养殖水体中的细菌进行分离,采用细菌 16S rDNA 序列分析比对法对所分离的细菌进行初步分类鉴定。根据菌落形态、颜色等特征,统计不同处理组主要可培养细菌的种类及所占比例。

1.3 数据统计分析

水体 pH、氨氮及亚硝酸氮的组间差异性,采用 SPSS 18.0 软件的两因素方差分析法进行分析;絮团沉积量、对虾存活率、体长增长率的组间差异采用单因素方差分析,设显著水平 $\alpha=0.05$ ($P<0.05$ 为差异显著)。实验结果用平均数 \pm 标准方差($X\pm SD$, $n=3$)表示。

2 结果

2.1 菌株的分离与鉴定

从对虾养殖水体中分离得到可培养细菌 7 株,编号分别为 2013042401-2013042407,将各菌株 16S rDNA 的序列进行比对,结果显示,7 株菌分别与海洋屈挠杆菌(*Tenacibaculum maritimum*)、地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)、假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas* sp.)、微小杆菌(*Exiguobacterium* sp.)、鲁杰氏菌(*Ruegeria conchae*)、中国黄海菌(*Gilvmarinus chinensis*)和溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)相似度最高,相似度分别为 95.5%、99.9%、96.9%、99.8%、97.9%、97.0%和 99.8%。选取芽孢杆菌 2013042402 (简称菌株 02)作为目标菌株,用于后续实验。

对菌株 02 全细胞脂肪酸进行气相色谱分析,结果见图 1,与 MIDI 细菌脂肪酸数据库 TSBA6 (6.10) 比对,结果见表 1。该菌与浸麻芽孢杆菌(*B. macerans*)和萎缩芽孢杆菌(*B. atropheus*)的相似度分别为 0.542 和 0.533,均大于 0.5,表明该菌为芽孢杆菌属。结合 16S rDNA 分子鉴定结果,综合判定菌株 02 为芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)。

2.2 养殖水环境常规理化因子

对虾养殖过程中,各组水体中溶解氧均 >5.5 mg/L,

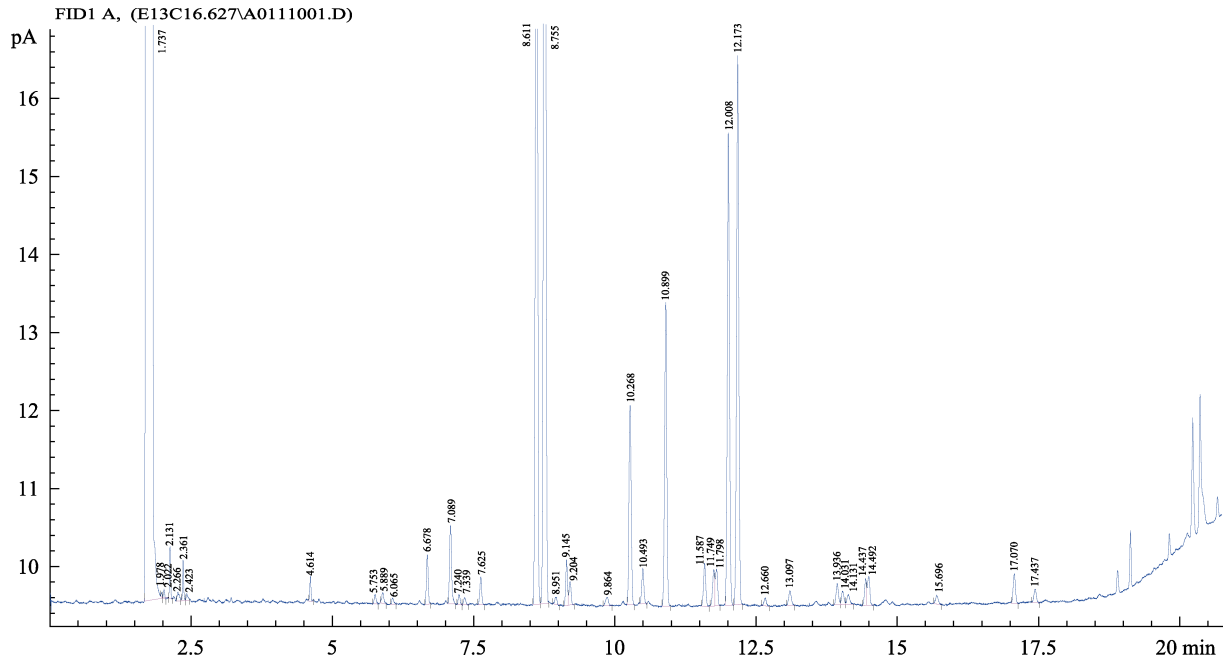


图 1 菌株 02 全细胞脂肪酸气相色谱
Fig.1 Gas chromatographic chart of whole cell fatty acid of Strain 02

表 1 菌株脂肪酸鉴定结果

Tab.1 Analysis of whole cell fatty acid of the strain 02 using gas chromatography

菌株编号 Strain number	数据库 Database	相似度 Similarity index	登录名称 Entry name
2013042402	TSBA6 6.10	0.542	<i>Paenibacillus macerans (Bacillus)</i>
2013042402	TSBA6 6.10	0.533	<i>Bacillus atrophaeus</i>

各组间温度、盐度变化均趋于一致，变化曲线分别见图 2 和图 3。各组水体 pH 变化曲线见图 4，随着养殖时间延长，各组水体 pH 均呈现下降趋势，统计分析显示，相同检测时间点各组 pH 差异不显著($P>0.05$)。

2.3 生物絮团对虾养殖水体中氨氮与亚硝酸氮变化

水体中氨氮变化趋势如图 5 所示，在养殖 1-7 d 内，各组水体中的氨氮浓度呈缓慢上升趋势，至 7 d 时各组中的氨氮浓度差异不显著($P>0.05$)，7-14 d 各

组水体中的氨氮浓度均呈快速上升趋势，至 14 d 时加菌加糖组中的氨氮水平显著低于加菌组与对照组 ($P<0.05$)；在养殖至 14-28 d，各组氨氮含量均呈逐渐降低趋势，且加菌加糖组与其他组相比仍保持较低水平 ($P<0.05$)；28 d 之后，各组开始呈现上升态势，仅有加菌加糖组的氨氮浓度在 42 d 时又出现一定程度下降，而其他 3 组随着养殖时间的延长，氨氮浓度持续升高。至第 49 天时，对照组氨氮达到 9.6 mg/L，

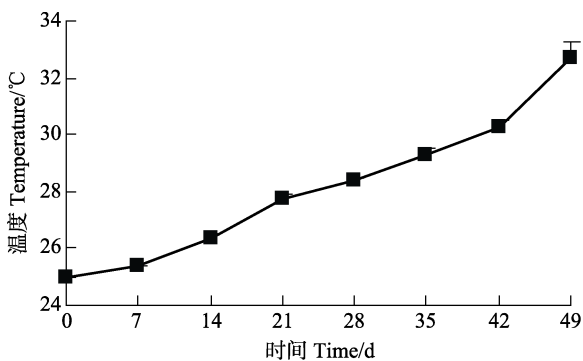


图 2 养殖水体的温度变化
Fig.2 Variation of water temperature

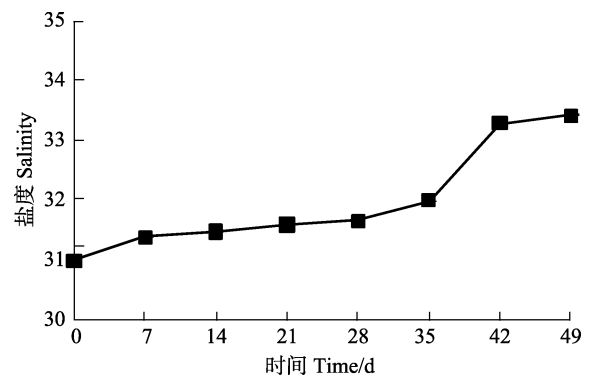


图 3 养殖水体的盐度变化
Fig.3 Variation of water salinity

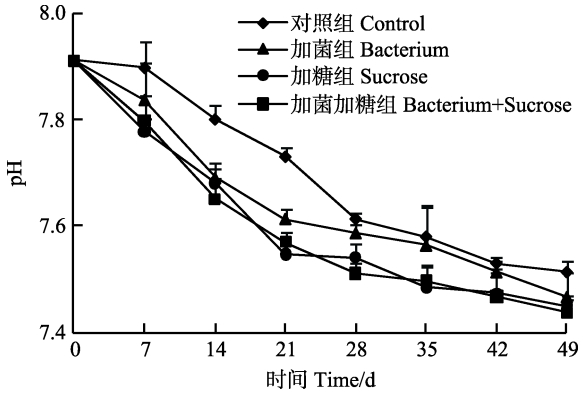


图4 各组养殖水体的 pH 变化
Fig.4 Variation of water pH in each group

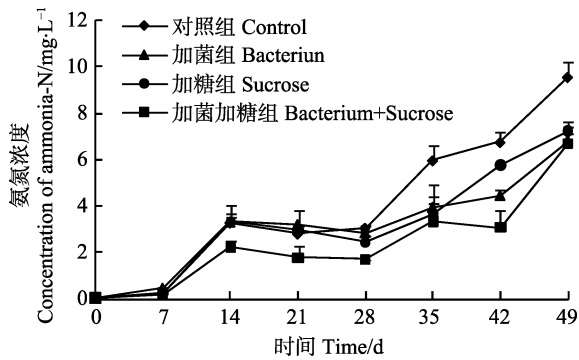


图5 各组养殖水体中氨氮的变化
Fig.5 Variation of ammonia-N in each group

显著高于加糖加菌组、加菌组及加糖组。在 49 d 的检测时间内, 各组氨氮浓度的变化趋势呈现升高、降低、升高的变化趋势。结果显示, 加菌加糖组氨氮显著低于其他各组($P < 0.05$), 而对对照组氨氮显著高于其他各组($P < 0.05$)。

水体中亚硝酸氮变化情况见图 6, 在养殖实验的前 14 d, 各组的亚硝酸氮含量均处于较低水平, 相同检测时间点各组间的差异不显著($P > 0.05$), 14~35 d 各组的亚硝酸氮含量开始快速上升, 该时间段内相同检测时间点, 加菌加糖组亚硝酸氮浓度显著低于其他

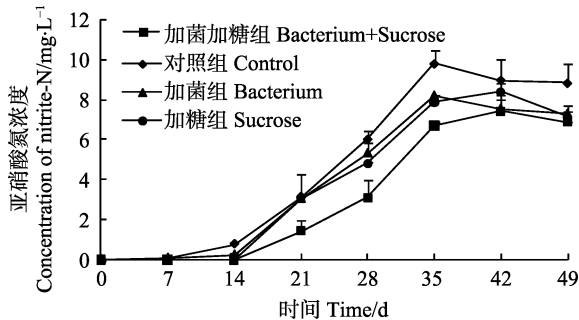


图6 各组养殖水体中亚硝酸氮的变化
Fig.6 Variation of nitrite-N in each group

组($P < 0.05$); 之后加菌加糖组与加糖组缓慢上升, 至 42 d 达到高峰, 而其他两组在 35 d 之后已开始呈现下降。对整个检测时段的变化进行统计分析, 加菌加糖组、加菌组和加糖组水体亚硝酸氮含量总体显著低于对照组($P < 0.05$)。

2.4 养殖水体中絮团沉积量

养殖结束时, 对各组水体中絮团量进行测定, 结果见图 7。统计结果显示, 加菌加糖组絮团量显著高于其他各组($P < 0.05$), 对照组中絮团量显著低于其他各组($P < 0.05$), 加菌组与加糖组差异不显著($P > 0.05$)。

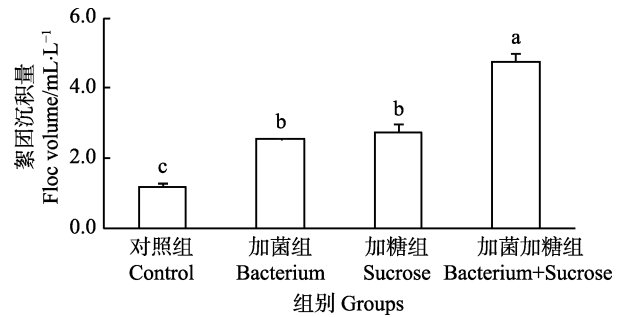


图7 不同处理组的絮团沉积量
Fig.7 Floc volume in different group

2.5 对虾存活率

在养殖 22 d、44 d、51 d 时, 统计各时间段对虾的存活率, 结果见图 8。在养殖 22 d 时, 加菌加糖组对虾存活率为 $89.00\% \pm 1.57\%$, 显著高于其他组($P < 0.05$), 加菌组与加糖组的存活率差异不显著($P > 0.05$); 养殖至 44 d 时, 加菌加糖组存活率为 $64.00\% \pm 6.29\%$, 显著高于其他各组($P < 0.05$), 且加糖组存活率显著高于加菌组($P < 0.05$), 加菌组与对照组差异不显著($P > 0.05$); 养殖至 51 d 时, 加菌加糖组存活率降低至 $42.00\% \pm 5.67\%$, 与加糖组存活率($38.00\% \pm 4.16\%$)差异不显著($P > 0.05$)。而加菌组与对照组存活率仅为 $17.00\% \pm 2.72\%$

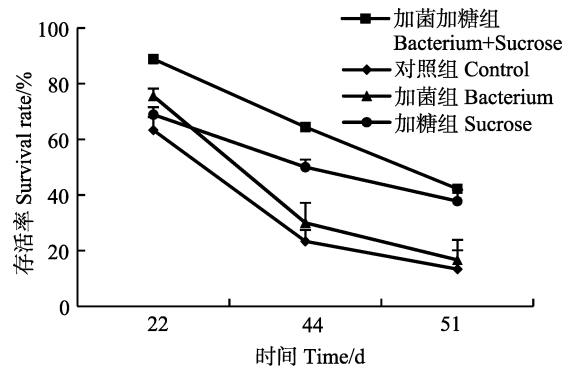


图8 各组对虾存活率
Fig.8 Survival rate of shrimp in different group

和 13.00%±2.72%，二者无显著差异($P>0.05$)，但显著低于加菌加糖组与加糖组($P<0.05$)。

2.6 对虾体长增长率

实验结束时，统计各组对虾的生物学体长，计算体长增长率，结果见图 9。加菌加糖组、加菌组、加糖组及对照组的对虾体长增长率分别为 55.00%±3.34%、48.00%±4.67%、45.00%±4.35%及 40.00%±5.63%。统计分析显示，加菌加糖组、加菌组及加糖组间的体长增长率差异不显著($P>0.05$)，但加菌加糖组高于对照组($P<0.05$)。

2.7 养殖水体中主要可培养菌群组成分析

对实验水体中的可培养细菌进行分类及初步鉴

定，结果见表 2。不同实验组中主要菌群组成存在差异，对照组中主要细菌有 4 种，其中，色盐杆菌属 (*Chromohalobacter* sp.)为优势菌，占 49%±1%；加菌组

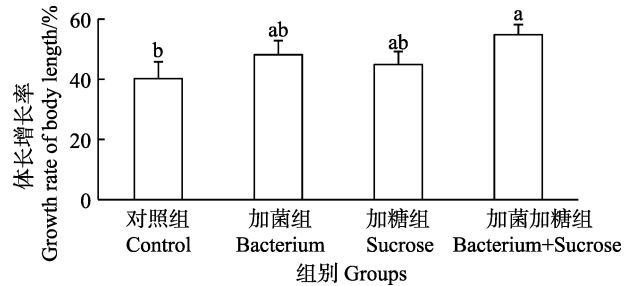


图 9 各实验组对虾体长增长率
Fig.9 Growth rate of shrimp body length in different group

表 2 各实验组中主要菌群组成
Tab.2 The composition of dominant bacterial communities in different groups

组别 Group	菌株编号 Strain number	鉴定结果 Identification results	属名 Genus	各属比例 Ratio of each genus/%
对照组 Control	C1	需盐色盐杆菌 <i>Chromohalobacter salexigens</i> (100%)	色盐杆菌属 <i>Chromohalobacter</i>	49±1
	C2	溶藻胶弧菌 <i>V. alginolyticus</i> (99.9%)	弧菌属 <i>Vibrio</i>	22±2
	C3	热液海源菌 <i>Idiomarina loihiensis</i> (96.4%)	海源菌属 <i>Idiomarina</i>	14±1
	C4	独岛极地杆菌 <i>Polaribacter dokdonensis</i> (94.2%)	极地杆菌属 <i>Polaribacter</i>	11±1
	其他 Others	—	—	4
加菌组 Bacterium	B1	溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i> (99.9%)	弧菌属 <i>Vibrio</i>	63±3
	B2	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i> (99.7%)	弧菌属 <i>Vibrio</i>	31±4
	B3	假交替单胞菌 <i>Pseudoalteromonas</i> sp. (96.9%)	假交替单胞菌属 <i>Pseudoalteromonas</i>	6
	其他 Others	—	—	6
加糖组 Sucrose	S1	贝壳状鲁杰氏菌 <i>R. conchae</i> (98.5%)	鲁杰氏菌属 <i>Ruegeria</i>	66±2
	S2	假交替单胞菌 <i>Pseudoalteromonas</i> sp. (96.9%)	假交替单胞菌属 <i>Pseudoalteromonas</i>	10±1
	S3	魔鬼弧菌 <i>V. diabolicus</i> (99.3%)	弧菌属 <i>Vibrio</i>	10±1
	S4	麦氏交替单胞菌 <i>Alteromonas macleodii</i> (97.4%)	单胞菌属 <i>Alteromonas</i>	7±1
	其他 Others	—	—	7
加菌加糖组 Bacterium+sucrose	BS1	地衣芽孢杆菌 <i>B. licheniformis</i> (99.2%)	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	49±1
	BS2	巨大芽孢杆菌 <i>B. megaterium</i> (96.5%)	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	43±2
	BS3	贝壳状鲁杰氏菌 <i>R. conchae</i> (98.5%)	鲁杰氏菌属 <i>Ruegeria</i>	8
其他 Others	—	—	8	

注：菌种名后百分数为细菌 16S rDNA 序列比对最大相似度，“—”代表未鉴定细菌

Note: The percentage in the bracket behind the name of bacteria represented the maximum similarity index of 16S rDNA sequencing, and "—" denoted unidentified bacteria

中主要细菌有 3 种,其中,弧菌属(*Vibrio* sp.)为优势菌,占 63%±3%;加糖组中主要有 4 种细菌,其中,鲁杰氏菌属(*Ruegeria* sp.)为优势菌,占 66%±2%;加菌加糖组中主要有 3 种细菌,其中,芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)为优势菌,占 49%±1%,没有检出弧菌。

3 讨论

地衣芽孢杆菌作为益生菌已被用于家畜及水产养殖动物疾病防治及饲料添加剂等领域(吴莹雯等, 2014; Larsen *et al.*, 2014; 刘文斌等, 2007)。在水产养殖中,地衣芽孢杆菌可用于抑制养殖环境中有害藻类的生长(李卓佳等, 2009),降解对虾粪便中的有机物(曹煜成等, 2010),鱼类口服地衣芽孢杆菌后可增强其吞噬细胞活力,提高对细菌的抵抗力(Cha *et al.*, 2013)。地衣芽孢杆菌产生的抗菌肽对革兰氏阳性、阴性细菌及真菌均有较好的抗菌效果(樊陈等, 2013)。本研究将从对虾养殖池中分离出的 1 株芽孢杆菌应用于生物絮团对虾养殖中,在零换水条件下,通过分析不同实验组对虾的生长、存活参数、养殖水环境的理化及微生物因子差异,证实在生物絮团对虾养殖系统中添加芽孢杆菌,可改善养殖水质,提高对虾存活率及生长速度,且养殖环境中微生物组成结构良好,未检出病原菌,研究结果为在生物絮团对虾养殖系统中联合应用有益菌奠定了理论基础。

在零换水生物絮团对虾养殖系统中,随着养殖时间增长,残饵及粪便积累增多,分解后导致氨氮浓度快速上升。本研究结果表明,零换水生物絮团养殖系统中氨氮及亚硝酸盐浓度存在一定的变化规律(图 5、图 6),在养殖前 14 d 水体中的有害氮化合物以氨氮为主,亚硝酸盐浓度较低。在养殖至 14–28 d,系统内发生亚硝化反应,亚硝酸盐浓度快速升高,氨氮浓度出现一定降低,35 d 后亚硝酸盐浓度出现下降,表明系统发生硝化作用。本研究发现,在加菌加糖组中,氨氮及亚硝酸盐浓度低于其他组,但仍然保持较高浓度,表明菌株 02 及所分离其他菌均不具有高效脱氮能力。有研究发现,不同地衣芽孢杆菌的脱氮效果存在差异,聂欢欢等(2013)从南美白对虾养殖池中分离得到 1 株高效去除亚硝酸盐的地衣芽孢杆菌 FP6,对硝酸盐和氨氮都有较强的去除能力。而曹煜成等(2010)报道的 1 株地衣芽孢杆菌脱氮效果较差。研究结果提示,在生物絮团养殖系统中,有必要分析菌群功能,如脱氮菌群缺少需及时添加。

采用生物絮团技术养殖对虾,可以提高对虾的养殖存活率及生长速度(Zhao *et al.*, 2012),本研究结果

也显示,在对虾养殖系统中添加一定浓度的碳源,可显著提高养殖中、后期对虾的存活率(图 8),而在生物絮团养殖系统中添加芽孢杆菌后养殖效果比单一絮团养殖技术更具优越性。实验也发现,在养殖后期,各组对虾的养殖存活率均较低,作者认为该结果与实验养殖密度过高(每立方水体 4285 尾)及养殖中、后期水体中氨氮及亚硝酸盐浓度过高有关,尽管统计分析显示加菌加糖组中的氨氮及亚硝酸盐在养殖 42 d 前均显著低于其他各组,但其浓度仍然分别达到 6.7 mg/L 与 7.4 mg/L。Barbieri(2010)研究表明,对虾在盐度为 35、pH 为 8 时,氨(离子与非离子氨总和)的 96h LC_{50} 为 38.88 mg/L,对幼虾的相对安全浓度仅为 3.95 mg/L (Lin *et al.*, 2001)。

生物絮团除了能够改善养殖水质、提高饲料利用率外,还可降低水体弧菌群体感应,对病原体具有生物控制活性(Crab *et al.*, 2010)。在生物絮团养殖水体中添加碳水化合物,不仅可以促进絮团的形成,还可促进絮团菌群中益生菌繁殖,而益生菌对病原菌也具有一定的抑制作用(Defoirdt *et al.*, 2007)。本研究结果也表明,在养殖水体中添加碳源对芽孢杆菌生长繁殖具有促进效果,对弧菌具有良好抑菌效果。Vinoj 等(2013)研究发现,地衣芽孢杆菌提取物对副溶血弧菌具有显著的抑制效果,且该菌产生的 N 酰化丝氨酸内酯酶,能抑制副溶血弧菌的生物膜形成,降低养殖动物因感染副溶血弧菌导致的死亡(Vinoj *et al.*, 2014)。本研究结果表明,在生物絮团对虾养殖中,添加芽孢杆菌或其他有益菌是提升生物絮团技术的方法之一。

参 考 文 献

- GB 17378.4-2007 海洋监测规范(中华人民共和国国家标准). 北京:海洋出版社, 2007, 111-115
- 邓应能, 赵培, 孙运忠, 等. 生物絮团在凡纳滨对虾封闭养殖试验中的形成条件及作用效果. 渔业科学进展, 2012, 33(2): 69-75
- 刘文斌, 尹君, 方星星, 等. 3 种益生菌配伍对异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 生长、消化及肠道菌群组成的影响. 海洋与湖沼, 2007, 38(1): 29-35
- 刘波, 刘文斌, 王恬. 地衣芽孢杆菌在异育银鲫日粮中的应用. 湛江海洋大学学报, 2005, 25(6): 31-35
- 李卓佳, 王少沛, 曹煜成, 等. 地衣芽孢杆菌与 3 种微藻生长的相互影响. 农业环境科学学报, 2009, 28(4): 839-844
- 吴莹雯, 姜宏伟. 地衣芽孢杆菌活菌胶囊对肝炎后肝硬化患者血清内毒素、超敏 C 反应蛋白及前降钙素水平的影响. 中国微生态学杂志, 2014, 26(9): 1046-1048

- 范文辉, 黄捷, 王秀华, 等. 养殖大菱鲆溃疡症病原菌的分离鉴定及系统发育分析. 微生物学报, 2005, 45(5): 665–670
- 聂欢欢, 赵群芬, 李长红, 等. 一株高效去除亚硝酸氮细菌的分离鉴定及其脱氮特性研究. 微生物学通报, 2013, 40(11): 2146–2155
- 曹煜成, 李卓佳, 林小涛, 等. 地衣芽孢杆菌 De 株对凡纳滨对虾粪便的降解效果. 热带海洋学报, 2010, 29(4): 125–131
- 谢航, 邱宏端, 王秀彬, 等. 地衣芽孢杆菌降解水产养殖中残余饲料的特性研究. 福建水产, 2008, 26(3): 31–35
- 樊陈, 高兆建, 张桂英, 等. 地衣芽孢杆菌抗菌肽的纯化及抗菌特性分析. 中国农学通报, 2013, 29(33): 313–318
- Barbieri E. Acute toxicity of ammonia in white shrimp (*Litopenaeus schmitti*) (Burkenroad, 1936, Crustacea) at different salinity levels. Aquaculture, 2010, 306(1–4): 329–333
- Cha JH, Rahimnejad S, Yang SY, et al. Evaluations of *Bacillus* spp. as dietary additives on growth performance, innate immunity and disease resistance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) against *Streptococcus iniae* and as water additives. Aquaculture, 2013, 402–403: 50–57
- Crab R, Defoirdt T, Bossier P, et al. Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. Aquaculture, 2012, 356(4): 351–356
- Crab R, Lambert A, Defoirdt T, et al. The application of bioflocs technology to protect brine shrimp (*Artemia franciscana*) from pathogenic *Vibrio harveyi*. J Appl Microbiol, 2010, 109(5): 1643–1649
- Defoirdt T, Boon N, Sorgeloos P, et al. Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. Trends Biotechnol, 2007, 25(10): 472–479
- Gatesoupe FJ. The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture, 1999, 180(1–2): 147–165
- Joshi J, Srisala J, Truong VH, et al. Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). Aquaculture, 2014, 428–429: 297–302
- Larsen N, Thorsen L, Kpikpi EN, et al. Characterization of *Bacillus* spp. strains for use as probiotic additives in pig feed. Appl Microbiol Biotechnol, 2014, 98(3): 1105–1118
- Lin YC, Chen JC. Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* Boone juveniles at different salinity levels. J Exp Mar Biol Ecol, 2001, 259(1): 109–119
- Samocha TM, Lawrence AL, Collins CA, et al. Production of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in high-density greenhouse-enclosed raceways using low salinity groundwater. J Appl Aquacult, 2004, 15(3–4): 1–19
- Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, et al. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiol Mol Biol Rev, 2000, 64(4): 655–671
- Vinoj G, Vaseeharan B, Jayaseelan DB, et al. Inhibitory effects of *Bacillus licheniformis*(DAB1) and *Pseudomonas aeruginosa* (DAP1) against *Vibrio parahaemolyticus* isolated from *Fenneropenaeus indicus*. Aquacult Int, 2013, 21(5): 1121–1135
- Vinoj G, Vaseeharan B, Thomas S, et al. Quorum-quenching activity of the AHL-lactonase from *Bacillus licheniformis* DAHB1 inhibits vibrio biofilm formation *in vitro* and reduces shrimp intestinal colonisation and mortality. Mar Biotechnol, 2014, 16(6): 707–715
- Wang YB. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. Aquaculture, 2007, 269(1–4): 259–264
- Zhang QL, Liu Q, Liu S, et al. A new nodavirus is associated with covert mortality disease of shrimp. J Gen Virol, 2014, 95(12): 2700–2709
- Zhao P, Huang J, Wang XH, et al. The application of bioflocs technology in high-intensive, zero exchange farming systems of *Marsupenaeus japonicus*. Aquaculture, 2012, 354–355(2): 97–106
- Ziaei-Nejad S, Rezaei MH, Takami GA, et al. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. Aquaculture, 2006, 252(2–4): 516–524

Isolation and Identification of a *Bacillus* sp. Strain and Its Role in Bioflocs for the Shrimp Culture System

ZHANG Huanhuan^{1,2}, WANG Xiuhua^{1①}, LI Chen¹, HUANG Jie^{1,3}

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;

2. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003; 3. Function Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266200)

Abstract In recent years there have been a number of outbreaks of lethal shrimp diseases caused by viral and bacterial infections in many countries, which hinders the development of shrimp culture industry. To protect shrimp from diseases, a lot have been done to improve the shrimp germplasm against disease, the shrimp culture technology, as well as the aquaculture environment. One example is the bioflocs technology (BFT) that helps eliminate harmful nitrogen sources, reduce water exchange rate, and increase the feed utilization rate. Probiotics such as *Bacillus* sp. could also improve water quality in the shrimp culture pond. In this study, we isolated a strain named 2013042402 (Strain 02) from a shrimp pond. Strain 02 was identified as *Bacillus* sp. using 16S rDNA sequencing and gas chromatographic analysis of the whole cell fatty acids. To investigate the function of Strain 02 in bioflocs for the shrimp culture system, we added three groups into the culture system that were Strain 02(2.0×10^4 CFU/ml) combined with sucrose (70% of feed), strain 02 alone, and sucrose alone. Then we measured a series of physicochemical parameters of the culture system including temperature, salinity, dissolved oxygen, pH, floc volume, ammonia-N and nitrite-N. We also examined the growth rate and the survival rate of shrimps, and the compositions of dominant bacterial communities in the water body. We found that the Strain 02-sucrose combination significantly reduced the concentrations of ammonia-N and nitrite-N in the water and improved the survival rate and growth rate of shrimps. This suggested that Strain 02 added to the bioflocs could improve the aquaculture water quality, optimize the structure of bacterial communities, and inhibit the growth of vibrio, therefore elevate the survival rate and growth rate of shrimps. Our study implied that the bioflocs technology could be highly improved by the addition of probiotics.

Key words *Bacillus* sp.; *Litopenaeus vannamei*; Biofloc technology; Ammonia-N; Nitrite-N; Survival rate; *Vibrio*

① Corresponding author: WANG Xiuhua. E-mail: wangxh@ysfri.ac.cn