

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.6.02

水产养殖用复合微生物粉剂中菌种的分子生物学鉴定

郭婉萍, 赵 晶*, 栾春雨, 郭 湾, 权春善

(大连民族大学生命科学学院, 大连民族大学生物技术与资源利用教育部重点实验室, 大连 116600)

[收稿日期] 2016-12-07 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 06-0009-10 [中图分类号] S942.3; Q939

[摘 要] 对两种市售水产养殖用复合微生物粉剂中微生物菌种进行鉴定。利用平板分离技术对粉剂中的微生物进行分离纯化, 进行了形态学观察、16S rDNA 和 26S rDNA 序列分析, 并构建系统发育树。结果表明, 两种微生物粉剂中菌群结构存在一定差异, S1 粉剂中鉴定出 5 株芽孢杆菌和 2 株酵母菌, 分别为枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌或索诺拉沙漠芽孢杆菌、葡萄牙棒孢酵母和库德里阿兹威毕赤酵母; S2 粉剂中鉴定出 3 株芽孢杆菌、1 株放线菌、2 株酵母菌和 3 株肠球菌, 分别为解木糖赖氨酸芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌或索诺拉沙漠芽孢杆菌、芬氏纤维微菌、酿酒酵母、库德里阿兹威毕赤酵母、鹌鸡肠球菌、屎肠球菌或乳酸肠球菌。明确水产养殖用复合微生物粉剂的菌群结构, 为同类产品的安全性及有效性评估提供理论基础。

[关键词] 水产养殖; 复合微生物粉剂; 菌群结构; 鉴定; 16S rDNA; 26S rDNA

Molecular Identification of Strains Isolated from Composite Microbial Powders for Aquaculture

GUO Wan-ping, ZHAO Jing*, LUAN Chun-yu, GUO Wan, QUAN Chun-shan

(College of Life Science, Dalian Minzu University, Key Laboratory of Biotechnology and Bioresources Utilization(Dalian Minzu University),

Ministry of Education, Dalian 116600, China)

Corresponding author: ZHAO Jing, E-mail: zhaojing@dlnu.edu.cn

Abstract: In order to identify microbial strains in two commercial composite microbial powders for aquaculture, plate separation method was used to isolate and purify the microorganisms, morphological characteristics was observed, 16S rDNA/26S rDNA gene sequences analysis was conducted and phylogenetic trees were constructed. Variation in microflora structure existed between two microbial powders. Five *Bacillus* strains and two yeast strains were identified in S1 powder, including *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* or *Bacillus sonorensis*, *Clavispora lusitaniae* and *Pichia kudriavzevii*; Three *Bacillus* strains, one *Actinomycete* strain, two yeast strains and three *Enterococcus* were identified in S2 powder, including *Lysinibacillus xylanilyticus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus*

基金项目: 大连民族大学 2016 年大学生创新创业训练计划项目 (G201612026012, XA201603072); 中央高校基本科研业务费项目 (DC201502020407)

作者简介: 郭婉萍, 从事生物化工方向研究。

通讯作者: 赵 晶。E-mail: zhaojing@dlnu.edu.cn

licheniformis or *Bacillus sonorensis*, *Cellulosimicrobium funkei*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kudriavzevii*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus faecium* or *Enterococcus lactis*. Determination of the microflora structure of composite microbial powders for aquaculture would provide theoretical basis for evaluation of safety and effectiveness of similar products.

Key words: aquaculture, composite microbial powder, microflora structure, identification, 16S rDNA, 26S rDNA

随着水产养殖业集约化程度的提高,养殖水体污染严重、水产养殖动物病害发生率增加等问题不断凸显,严重制约了水产养殖业的可持续发展。水产养殖病害防治的传统方法主要是使用抗生素及化学药物,然而,该方法会导致病原微生物的耐药性提高、养殖对象体内药物残留甚至药害事故,具有一定的局限性,不利于水产品的质量安全。近年来,微生物制剂作为一类新型的水产养殖用药,由于其廉价、安全高效、无污染、有效改善水体环境、防治病害及促进养殖对象生长等特点,已在国内外得到广泛重视^[1-3]。按照菌种组成,微生物制剂分为单一菌种制剂和复合菌种制剂,其中市售的多为复合微生物制剂,不同品牌存在微生物菌种及配比的差异。目前,我国对于水产养殖用微生物制剂缺乏有效管理,尤其是对于用于水质改良的微生物制剂菌种,缺乏明确规定。目前市售复合微生物制剂存在菌种种类标注不完整,产品说明存在夸大效果等问题,产品质量良莠不齐,是否适合水产养殖环境有待考察^[4]。对水产养殖复合微生物制剂的有效性和安全性进行评价,是确保产品质量和使用效果的必要手段,而菌种组成是评价的重要指标之一。目前仅有少数研究对农业及环保领域使用的复合微生物制剂进行了菌种鉴定^[5-7],对于水产养殖用复合微生物制剂尚无菌种组成分析的研究。

微生物制剂主要有固体、半固体和液体制剂三种剂型,其中固体制剂以粉剂剂型为主,具有便于运输和保存、菌种数量较为稳定的特点^[4]。本研究选择两种市售水产养殖复合微生物粉剂为研究对象,利用分子生物学鉴定方法,鉴定其中的菌种多样性,为该类产品的质量检测和所含菌种的安全性评估奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 水产养殖用复合微生物粉剂 市售 EM 菌剂(下文中用 S1 表示),产地河北,标注菌群包括乳酸杆菌、芽孢杆菌、放线菌等,活菌总数未注明。市售复合菌剂(下文中用 S2 表示),产地河南,标注菌群包括放线菌、乳酸菌、芽孢杆菌、酵母菌等,活菌总数 ≥ 500 亿/克。

1.1.2 主要试剂及仪器 2×Taq 预混 PCR 反应体系购自北京康润诚业生物科技有限公司,DL2000 DNA Marker、 λ -Hind III digest DNA Marker、细菌基因组 DNA 提取试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、DNA 纯化试剂盒等均购自宝生物(Takara)工程(大连)有限公司,酵母基因组 DNA 快速抽提试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司。HVE-50 高压灭菌器购自日本 Hirayama 公司,DH500A 电热恒温培养箱购自天津泰斯特仪器有限公司,ZWY-240 恒温摇床购自上海智城分析仪器制造有限公司,ABI Veriti PCR 仪购自美国 ABI 公司,Mupid-2plus 核酸电泳仪购自日本 Mupid 公司,GelDoc-It™ 300 凝胶成像系统购自美国 UVP 公司。

1.2 方法

1.2.1 菌种筛选培养基的配置 菌种筛选培养基的配置按文献^[8]进行。

1.2.2 菌种分离培养及形态学观察 以无菌药匙称取固体菌剂 10 g 至盛有 90 mL 灭菌蒸馏水的锥形瓶中,振摇 30 min,制成 10^{-1} 的菌悬液并进行梯度稀释。采用平板稀释涂布法对酵母菌、放线菌、乳酸菌、芽孢杆菌分别进行分离,其中乳酸菌采用双层平板法培养。酵母菌培养条件为 28 ℃ 恒温培养 3~5 d,放线菌培养条件为 28 ℃ 恒温培养 5~7 d,芽孢杆菌培养条件为 30 ℃ 恒温培养 2~3 d,乳酸菌培养条件为 36 ℃ 恒温培养 2~3 d。挑取单菌落划

线分离获得纯种,观察菌落特征,并于光学显微镜下观察细胞形态。纯化后的菌种接种于未加琼脂的菌种筛选培养基,180 r/min 振荡培养。

1.2.3 菌种分子生物学鉴定

1.2.3.1 基因组提取 酵母基因组提取按照酵母基因组 DNA 快速抽提试剂盒说明书进行,放线菌、乳酸菌、芽孢杆菌基因组 DNA 提取按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 的完整性。

1.2.3.2 16S rDNA和26S rDNA的PCR扩增 以提取的放线菌、乳酸菌、芽孢杆菌基因组 DNA 为模板,利用通用引物 16S-27f 和 16S-1541r 进行 16S rDNA PCR 扩增,正向 27f 引物序列为 5'-AGAGTTTGATC-CTGGCTCAG-3',反向 1541r 引物序列为 5'-AAG-GAGGTGATCCAGCC-3';以提取的酵母菌基因组 DNA 为模板,利用通用引物 NL1 和 NL4 进行 26S rDNA D1/D2 区 PCR 扩增,正向NL-1引物序列为:5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3',反向NL-4引物序列为 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3',由生工生物工程(上海)公司合成。PCR反应条件为:95 ℃预变性2 min;94 ℃变性30 s,50 ℃退火30 s,72 ℃延伸1 min,30个循环;72 ℃延伸5 min。取5 μL PCR 产物于 1%琼脂糖凝胶中进行电泳,100 V 恒压 30 min,UVF 凝胶成像系统观察并成像分析。扩增产物经纯化后送生工生物工程(上海)公司测序。

1.2.3.3 PCR 产物鉴定及系统发育进化树的构建 采用BLAST检索GenBank数据库,对测序结果进行同源性分析,确定其种属。利用MEGA 5.0软件对测序结果进行16S rDNA和26S rDNA序列比对分析,并采用邻接法(Neighbor-joining method)构建系统发育树,通过1000次的自举分析(bootstrap)进行置信度检测。序列提交 GenBank 数据库获取登录号。

2 结果与分析

2.1 筛选菌株的形态学观察 利用菌种筛选培养基对S1和S2两种粉剂中的菌株进行分离培养,从S1粉剂中筛选得到的5株芽孢杆菌分别编号为S1-B1、S1-B2、S1-B3、S1-B4 和 S1-B5;2 株酵母菌分别编号为 S1-Y1 和 S1-Y2。从 S2 粉剂中筛选得到的 3 株芽孢杆菌分别编号为 S2-B1、S2-B2 和 S2-B3;1 株放线菌编号为 S2-A1;2 株酵母菌分别编号为 S2-Y1 和 S2-Y2;3 株肠球菌分别编号为 S2-L1、S2-L2 和 S2-L3。对各菌株的菌落及细胞形态特征进行观察,结果见表 1。其中 3 株肠球菌均能使溴甲酚绿变为黄色。

2.2 16S rDNA 和 26S rDNA 基因序列 PCR 扩增 以提取的各筛选菌株基因组DNA为模板进行PCR扩增,电泳结果显示(图 1),扩增的目的片段电泳条带清晰,芽孢杆菌、放线菌及肠球菌16S rDNA PCR扩增产物大小约为1500 bp左右;酵母菌26S rDNA D1/D2 区 PCR 扩增产物大小约为 500~650 bp 左右。

表 1 菌落及细胞形态特征观察结果

Tab 1 The morphological characteristics of cells and colonies

菌株编号 Strain number	菌落形状 Colony shape	菌落边缘 Colony edge	菌落隆起 Colony swelling	菌落颜色 Colony color	菌落表面 Colony surface	细胞形态 Cell morphology
S1-B1	圆形	整齐	凸起	白色	干燥	杆状
S1-B2	圆形	整齐	不凸起	淡黄色	干燥	杆状
S1-B3	不规则	不整齐	凸起	红褐色	干燥	杆状
S1-B4	圆形	整齐	不凸起	乳白色	光滑湿润	杆状
S1-B5	圆形	不整齐	不凸起	黄色	干燥	杆状
S1-Y1	圆形	整齐	凸起	乳白色	光滑湿润	椭圆形
S1-Y2	圆形	整齐	凸起	乳白色	干燥	椭圆形,可形成假菌丝
S2-B1	圆形	整齐	不凸起	黄褐色	干燥	杆状
S2-B2	圆形	不整齐	不凸起	乳白色	干燥	杆状

续表

菌株编号 Strain number	菌落形状 Colony shape	菌落边缘 Colony edge	菌落隆起 Colony swelling	菌落颜色 Colony color	菌落表面 Colony surface	细胞形态 Cell morphology
S2-B3	圆形	整齐	不凸起	淡黄色	干燥	杆状
S2-A1	不规则	不整齐	不凸起	白色	干燥	杆状
S2-Y1	圆形	整齐	凸起	乳白色	光滑湿润	椭圆形
S2-Y2	圆形	整齐	凸起	乳白色	干燥	椭圆形,可形成假菌丝
S2-L1	圆形	整齐	-	乳白色	光滑	球形
S2-L2	圆形	整齐	-	深绿色	光滑	球形
S2-L3	圆形	整齐	-	浅绿色	光滑	球形

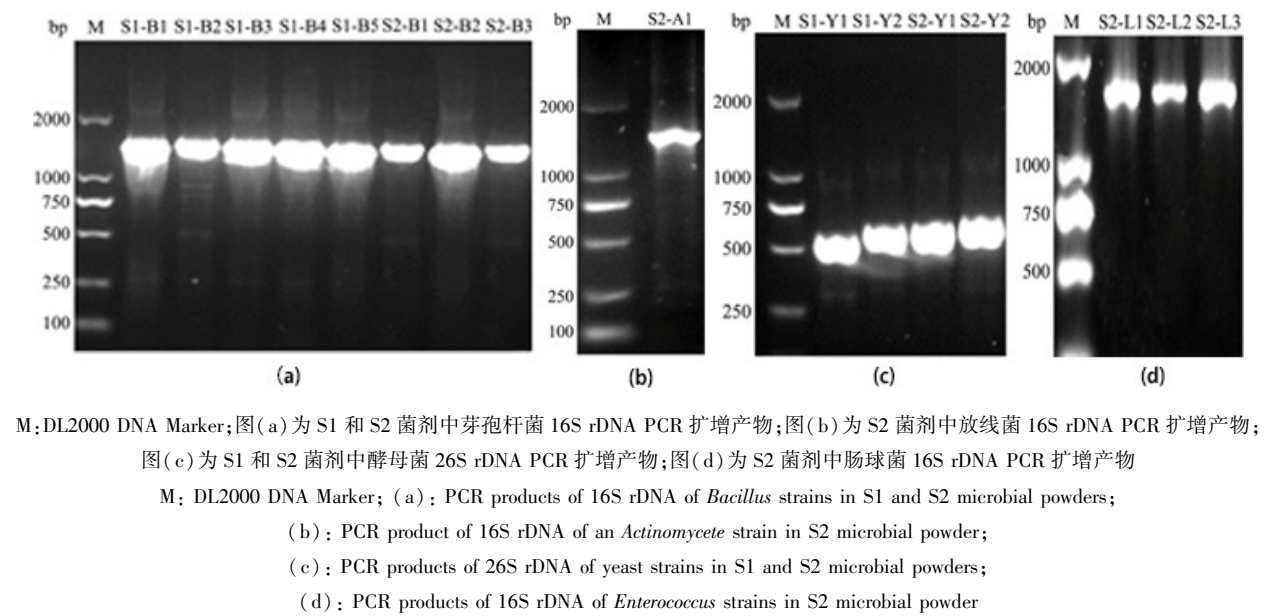


图 1 16S rDNA 和 26S rDNA PCR 扩增产物电泳图

Fig 1 Electrophoresis of 16S rDNA and 26S rDNA PCR products

2.3 同源性比对及系统发育分析

2.3.1 芽孢杆菌同源性比对及系统发育分析 将S1和S2菌剂中筛选得到的8株芽孢杆菌与Gene Bank数据库中已收录菌株的16S rDNA序列进行比对,并构建系统发育树(图2)。

结果表明,S1菌剂中5株芽孢杆菌均为芽孢杆菌属,其中S1-B1和S1-B5与*Bacillus subtilis*(枯草芽孢杆菌)相似性在99%-100%之间,系统发育树中处于同一分支,亲缘关系最近,因此将两株菌鉴定为枯草芽孢杆菌;S1-B2、S1-B3和S1-B4与*Bacillus licheniformis*(地衣芽孢杆菌)和*Bacillus sonorensis*(索诺拉沙漠芽孢杆菌)相似性在99%~100%之间,系统发育树显示这三株菌与*Bacillus licheniformis*及*Bacillus sonorensis*处于同一分支,亲缘关系最近,因此这三株

菌为地衣芽孢杆菌或索诺拉沙漠芽孢杆菌。

S2菌剂中,S2-B1与赖氨酸芽孢杆菌属菌株相似性在99%~100%之间,系统发育树显示其与*Lysinibacillus xylanilyticus*(解木糖赖氨酸芽孢杆菌)处于同一分支,亲缘关系最近,因此将S2-B1鉴定为解木糖赖氨酸芽孢杆菌。S2-B2与S2-B3为芽孢杆菌属,其中S2-B2与*Bacillus circulans*(环状芽孢杆菌)相似性在99%~100%之间,系统发育树中处于同一分支,亲缘关系最近,因此将S2-B2鉴定为环状芽孢杆菌;S2-B3与*Bacillus licheniformis*(地衣芽孢杆菌)和*Bacillus sonorensis*(索诺拉沙漠芽孢杆菌)相似性在99%~100%之间,系统发育树中处于同一分支,亲缘关系最近,因此S2-B3为地衣芽孢杆菌或索诺拉沙漠芽孢杆菌。

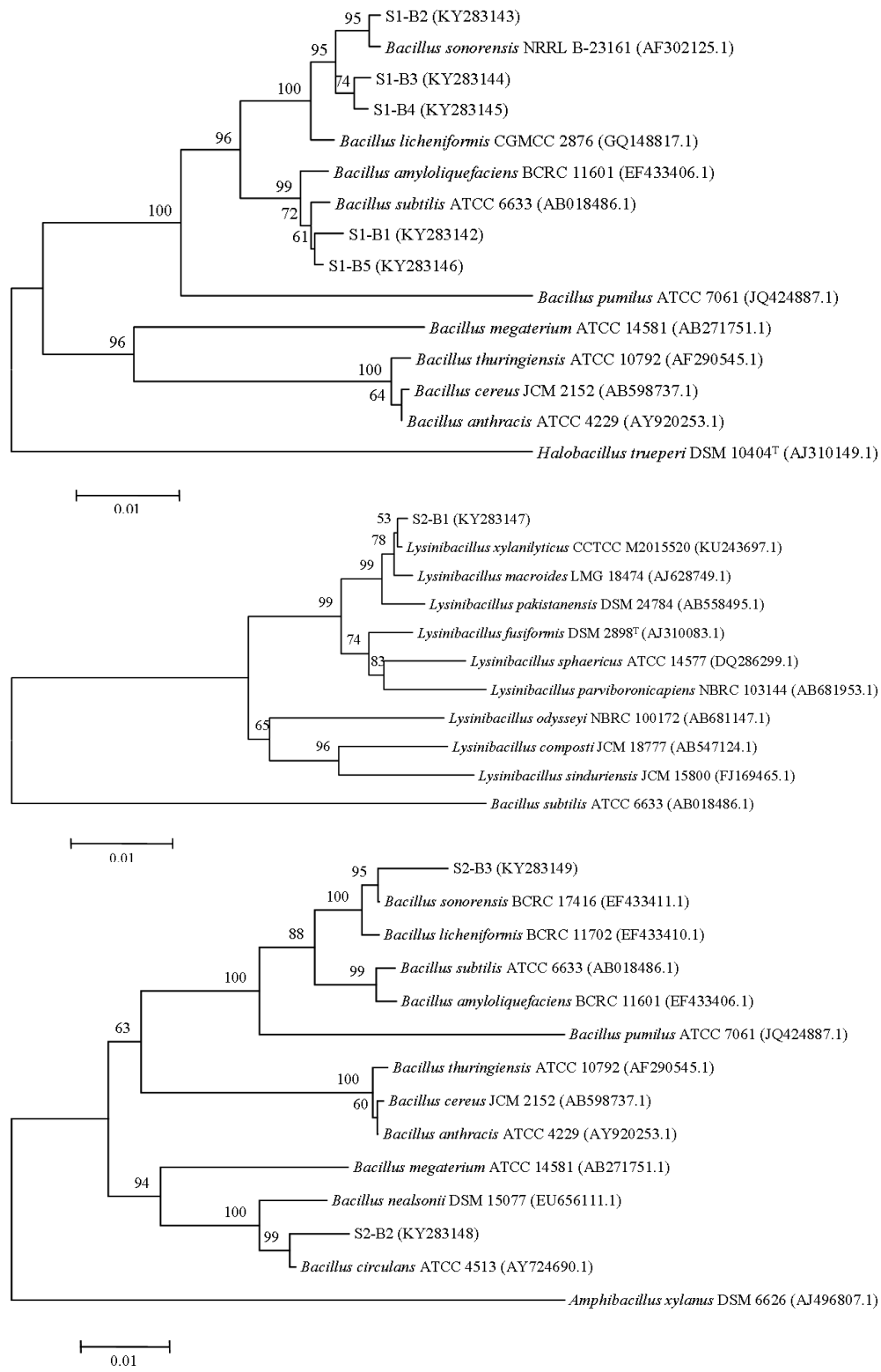


图 2 芽孢杆菌系统发育树

Fig 2 Phylogenetic trees of *Bacillus* strains

2.3.2 放线菌同源性比对及系统发育分析 将 S2 菌剂中筛选得到的 1 株放线菌与 Gene Bank 数据库中已收录菌株的 16S rDNA 序列进行比对,并构建系统发育树(图 3)。结果表明,S2-A1 与 *Cellulo-*

simicrobium funkei(芬氏纤维微菌)相似性在 99% ~ 100%之间,系统发育树中处于同一分支,亲缘关系

最近,因此将 S2-A1 鉴定为芬氏纤维微菌。

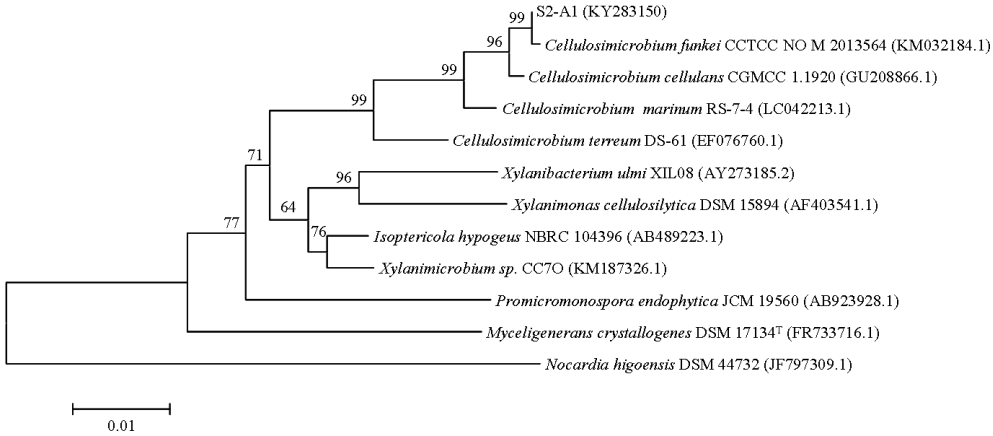
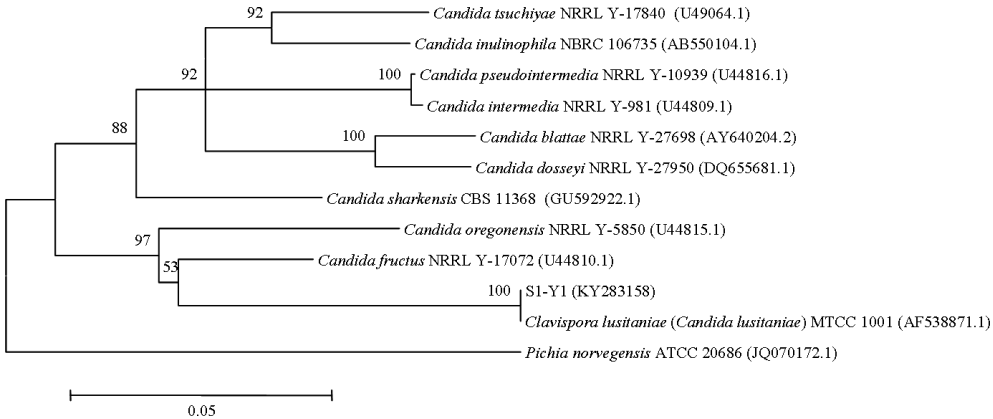


图 3 放线菌系统发育树
Fig 3 Phylogenetic tree of an Actinomycete strain

2.3.3 酵母菌同源性比对及系统发育分析 将 S1 和 S2 菌剂中筛选得到的 4 株酵母菌与 Gene Bank 数据库中已收录菌株的 26S rDNA 序列进行比对,并构建系统发育树(图 4)。结果表明,S1-Y1 与 *Clavispora lusitaniae*(*Candida lusitaniae*)(葡萄牙棒孢酵母)相似性在 99% ~ 100%之间,系统发育树中处于同一分支,亲缘关系最近,因此将 S1-Y1 鉴定为葡萄牙棒孢酵母。S1-Y2 与 *Pichia kudriavzevii*(库德里阿兹威毕赤酵母)相似性在 99% ~ 100%之间,系统发育树中处于同一分支,亲缘关系最近,因此将 S1-Y2 鉴定为库德里阿兹威毕赤酵母。S2-Y1 与 *Saccharomyces cerevisiae*(酿酒酵母)相似性在 99% ~ 100%之间,系统发育树中处于同一分支,亲缘关系最近,因此将 S2-Y1 鉴定为酿酒酵母。S2-Y2 与 *Pichia kudriavzevii*(库德里阿兹威毕赤酵母)

相似性在 99% ~ 100%之间,系统发育树中处于同一分支,亲缘关系最近,因此将 S2-Y2 鉴定为库德里阿兹威毕赤酵母。

2.3.4 乳酸菌同源性比对及系统发育分析 将 S2 菌剂中筛选得到的 3 株肠球菌与 Gene Bank 数据库中已收录菌株的 16S rDNA 序列进行比对,并构建系统发育树(图 5)。结果表明,S2-L1 和 S2-L3 与 *Enterococcus faecium*(屎肠球菌)或 *Enterococcus lactis*(乳酸肠球菌)相似性在 99% ~ 100%之间,系统发育树中处于同一分支,亲缘关系最近,因此这两株菌为屎肠球菌或乳酸肠球菌。S2-L2 与 *Enterococcus gallinarum*(鹌鸡肠球菌)相似性在 99% ~ 100%之间,系统发育树中处于同一分支,亲缘关系最近,因此将 S2-L2 鉴定为鹌鸡肠球菌。三株菌均为乳酸菌。



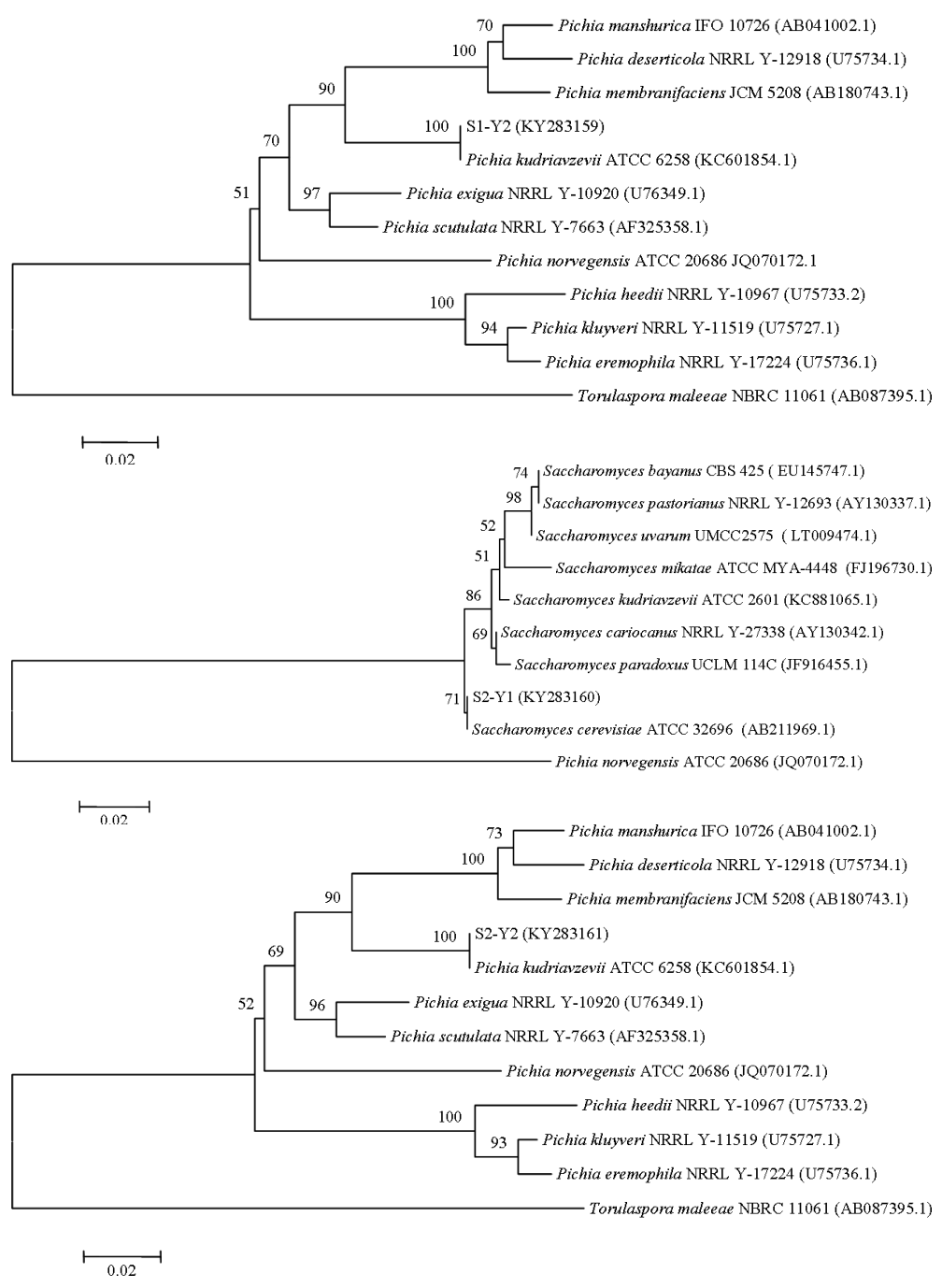


图 4 酵母菌系统发育树
Fig 4 Phylogenetic trees of yeast strains

3 讨论

本研究对两种市售水产养殖复合微生物粉剂中分离纯化的微生物菌株进行形态学及分子生物学鉴定,S1 粉剂中鉴定出 5 株芽孢杆菌,2 株酵母菌;S2 粉剂中鉴定出 3 株芽孢杆菌,1 株放线菌,2

株酵母菌,3 株肠球菌。

芽孢杆菌在水产养殖中既可以作为饲料微生物添加剂,也可以作为水质改良微生物生态调节剂使用。在两种微生物粉剂中均鉴定出芽孢杆菌。其中,枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌为我国农业部

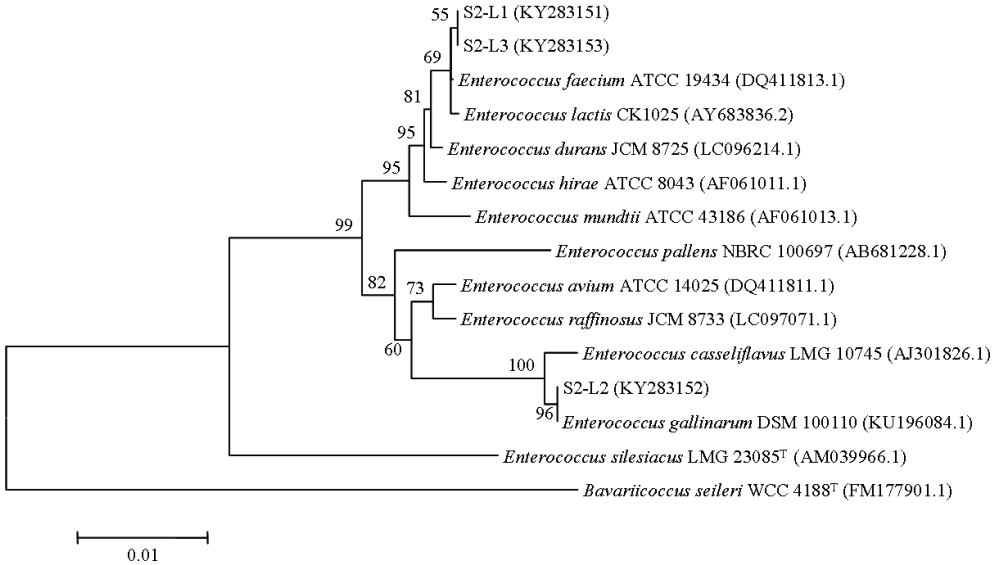


图 5 肠球菌系统发育树

Fig 5 Phylogenetic tree of *Enterococcus* strains

2013 年公布的可作为饲料添加剂的微生物菌种^[4]。索诺拉沙漠芽孢杆菌与地衣芽孢杆菌有很近的亲缘关系^[9],两者的区分还需进一步鉴定。解木糖赖氨酸芽孢杆菌目前相关的研究较少,该菌可作为抗黄曲霉素的生防菌株,具有纤维蛋白分解酶活性^[10-12],用于水产养殖的有效性和安全性仍有待进一步评价。环状芽孢杆菌能够有效修复水产养殖环境,也可以作为水产饲用菌种,研究表明,其能够提高鲤鱼苗和虹鳟鱼生长速率和免疫力^[13-14]。

放线菌仅在 S2 粉剂中鉴定出。有研究显示芬氏纤维微菌能够降解纤维素和黄曲霉毒素,可用于畜禽饲料的降解处理以及受污染饲料中黄曲霉毒素的去除,对于促进畜禽类的生长繁殖具有重要作用^[15-16]。然而,目前并无芬氏纤维微菌应用于水产养殖业的研究报道,其有效性和安全性仍有待评估。

酵母菌是水生动物消化道的常见优势菌群之一,在两种微生物粉剂中均鉴定出酵母菌。其中,酿酒酵母为我国农业部 2013 年公布的可作为饲料添加剂的微生物菌种^[4],在促进水产动物生长、提高水产饲料利用效率及增强水产动物免疫能力等方面具有重要作用^[17]。*Clavispora lusitaniae* 是

Candida lusitaniae 的有性型,可能是白酒、陈醋等食品酿造大曲中的功能菌,然而,也有报道认为其为条件性致病菌^[18-20],目前并无研究表明葡萄牙棒孢酵母用于水产养殖。库德里阿兹威毕赤酵母在健康凡纳滨对虾和印度鲑消化道和养殖水体中是优势菌株,该酵母菌具有多种胞外酶和单宁酶活性,可能对水生动物具有较好的益生效果^[21-23];另有研究表明,库德里阿兹威毕赤酵母 RY55 菌株能够合成杀伤毒素,对多种病原菌有显著抗菌活性,有望成为新型生物防治菌株^[24]。

乳酸菌仅在 S2 粉剂中鉴定出,包括屎肠球菌或乳酸肠球菌和鸪鸡肠球菌。其中,屎肠球菌和乳酸肠球菌为我国农业部 2013 年公布的可作为饲料添加剂的微生物菌种^[4],由于亲缘关系较近,两者的区分还需进一步鉴定。目前并无乳酸肠球菌应用于水产养殖业的研究报道,其有效性和安全性仍有待评估。多项研究认为屎肠球菌可以作为水产动物养殖中的益生菌使用。Bogut 等^[25]研究表明,饲料中添加屎肠球菌能够提高六须鲢鱼的生长速率,降低肠道中有害菌如金黄色葡萄球菌、大肠杆菌等的数量。Gopalakannan 等^[26]发现,屎肠球菌能够有效控制鲤鱼的嗜水气单胞菌感染。Avella 等^[27]研究显示,屎肠球菌能显著降低鲟鱼肠道中

弧菌数量,促进其生长性能。然而,屎肠球菌也可能存在安全隐患,Sun 等^[28]认为,饲料中添加屎肠球菌能够使斜带石斑鱼血清溶菌酶活性显著降低,可能会影响其免疫功能,此外,屎肠球菌对多种抗生素的耐药性和致病性屎肠球菌的使用也会危害水产养殖安全^[29]。鸬鹚肠球菌在水产养殖中应用的研究较少,有研究表明其对鳗弧菌有强抑制作用,对鲈鱼无致病性,可作为益生菌使用^[30]。然而,一些鸬鹚肠球菌菌株也能引起多种感染及疾病,对多种抗生素有耐药性^[31]。综上所述,在水产养殖中使用肠球菌的安全性仍有待深入研究。

菌种组成和菌种特性是微生物制剂的关键指标,对于水产养殖业具有重要影响。本研究发现,微生物制剂存在着实际菌群种类与标注不符的问题,其中部分菌种并不属于国家规定的饲用微生物菌种,对于水产养殖的水质改良能力亦不明确,可能对水生动物健康与水产品质量安全造成一定隐患。因此,当前水产养殖微生物制剂的生产工艺、质量检测与监控力度有待加强。

参考文献:

- [1] 俞爱萍. 微生态制剂及在水产养殖上应用研究[J]. 中国水产, 2015, (12): 76-78.
Yu A P. Study on Microecological Agents and Their Application in Aquaculture[J]. China Fisheries, 2015, (12): 76-78.
- [2] 王亚敏, 王印庚. 微生态制剂在水产养殖中的作用机理及应用研究进展[J]. 动物医学进展, 2008, 29(6): 72-75.
Wang Y M, Wang Y G. Advance in the Mechanisms and Application of Microecologies in Aquaculture[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2008, 29(6): 72-75.
- [3] 刘文珍. 水产养殖中微生物的应用及研究进展[J]. 水产科学, 2010, 29(1): 57-62.
Liu W Z. Application and Research Advances of Microorganisms in Aquaculture[J]. Fisheries Science, 2010, 29(1): 57-62.
- [4] 吕永辉, 李明爽. 我国水产养殖用微生态制剂行业现状与发展策略[J]. 中国水产, 2015, (8): 34-36.
Lv Y H, Li M S. Current Situation of Industry and Development Strategy of Microecological Agents in Aquaculture of Our Country [J]. China Fisheries, 2015, (8): 34-36.
- [5] 陈艳玲. 一种 EM 菌的组成鉴定及应用初探[D]. 舟山: 浙江

海洋学院, 2014.

- Chen Y L. Study on the Identification and Preliminary Application of an Effective Microorganisms [D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2014.
- [6] 彭铁成, 陈俊, 谢俊, 等. 农业微生物制剂的活性菌分离与鉴定[J]. 广东农业科学, 2012, (1): 82-84.
Peng T C, Chen J, Xie J, et al. Isolation and Identification of Active Bacteria from Agricultural Microbial Agents[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2012, (1): 82-84.
- [7] 曹旸. 不同工艺条件下 BM 复合微生物制剂区系分析[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2013.
Cao Y. The Floristic Analysis of BM Microorganism Composite under Different Process Conditions[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2013.
- [8] 韦成相, 雷奇, 张福蓉, 等. 水产养殖复合微生物制剂中菌群数量的分析[J]. 天津农业科学, 2016, 22(5): 41-45.
Wei C X, Lei Q, Zhang F R, et al. Analysis of Microbial Flora Quantity of Compound Microbial Preparations for Aquaculture [J]. Tianjin Agricultural Sciences, 2016, 22(5): 41-45.
- [9] Palmisano M M, Nakamura L K, Duncan K E, et al. *Bacillus sonorensis* sp. nov., a close relative of *Bacillus licheniformis*, isolated from soil in the Sonoran Desert, Arizona[J]. Int J Syst Evol Microbiol. 2001, 51(5): 1671-1679.
- [10] Lee C S, Jung Y T, Park S, et al. *Lysinibacillus xylanilyticus* sp. nov., a xylan-degrading bacterium isolated from forest humus [J]. Int J Syst Evol Microbiol. 2010, 60(2): 281-286.
- [11] Wang K, Yan P S, Cao L X. Plackett-Burman Design for Media Nutrients of Biocontrol *Lysinibacillus xylanilyticus* BPM1 against Aflatoxin[J]. Applied Mechanics&Materials, 2014, 522-524: 295-298.
- [12] Reshma C V, Fathimathu Z K. *Lysinibacillus Xylanilyticus*, a novel bacterial strain isolated from soil with fibrinolytic activity[J]. International Journal of Pharma&Bio Sciences, 2013, 4(4): 1030-1037.
- [13] Jafaryan H, Taati M M, Jafarzadeh M. The enhancement of growth parameters in common carp (*Cyprinus carpio*) larvae using probiotic in rearing tanks and feeding by various *Artemia nauplii* [J]. AACL Bioflux, 2011, 4(4): 511-518.
- [14] 李秋芬, 袁有宪, 辛福言, 等. 利用环状芽孢杆菌的水产养殖环境生物修复方法: 中国, 1340463[P]. 2002-03-20.
Li Q F, Yuan Y X, Xin F Y, et al. Method for bioremediation of aquaculture environment using *Bacillus circulans*; China, 1340463 [P]. 2002-03-20.
- [15] 吴翔, 甘炳成, 黄忠乾, 等. 纤维素降解细菌 DBJ 的筛选鉴

- 定及其特性研究[J]. 西南农业学报, 2016, 29(1): 81-84.
- Wu X, Gan B C, Huang Z Q, *et al.* Characteristics and Identification of Cellulase-decomposing Strain DBJ[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2016, 29(1): 81-84.
- [16] Sun L H, Zhang N Y, Sun R R, *et al.* A novel strain of *Cellulosimicrobium funkei* can biologically detoxify aflatoxin B1 in ducklings[J]. Microbial Biotechnology, 2015, 8(3): 490-498.
- [17] 朱志明, 朱旺明, 蓝汉冰, 等. 酿酒酵母营养调控功能及其在水产饲料中的应用研究进展[J]. 动物营养学报, 2014, 26(12): 3550-3560.
- Zhu Z M, Zhu W M, Lan H B, *et al.* Research Development of *Saccharomyces cerevisiae*: Nutritional Manipulation and Application in Aqua Feed[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2014, 26(12): 3550-3560.
- [18] Gargeya I B, Pruitt W R, Simmons R B, *et al.* Occurrence of *Clavispora lusitanae*, the Teleomorph of *Candida lusitanae*, among Clinical Isolates[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1990, 28(10): 2224-2227.
- [19] 董凯锋, 安娜, 李东乐, 等. 水塔老陈醋大曲酵母的分离鉴定及产乙醇和乙酸乙酯特性[J]. 食品工业科技, 2016, 37(10): 213-216.
- Dong K F, An N, Li D L, *et al.* Isolation and identification of yeasts in Daqu for aged vinegar production and their capacity for producing ethly alcohol and ethly acetate[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(10): 213-216.
- [20] 卫春会, 杨晓东, 黄治国, 等. 浓香型大曲中两株酵母菌的分离及其 Biolog 微生物鉴定[J]. 酿酒科技, 2013(4): 30-32.
- Wei C H, Yang X D, Huang Z G, *et al.* Isolation and Biolog Identification of Two Yeast Strains from Nong-flavor Daqu[J]. Liquor-making Science & Technology, 2013(4): 30-32.
- [21] 林治宇, 虾塘酵母菌优势菌株的分离筛选及应用研究[D]. 海口: 海南大学, 2015.
- Lin Z Y, Study in Screening and Application of Yeast in Shrimp Pond[D]. Haikou: Hainan University, 2015.
- [22] Banerjee S, Ghosh K. Enumeration of gut associated extracellular enzyme-producing yeasts in some freshwater fishes[J]. Journal of Applied Ichthyology, 2014, 30(5): 986-993.
- [23] Mandal S, Ghosh K. Isolation of tannase-producing microbiota from the gastrointestinal tracts of some freshwater fish[J]. Journal of Applied Ichthyology, 2013, 29(1): 145 - 153.
- [24] Bajaj B K, Raina S, Singh S. Killer toxin from a novel killer yeast *Pichia kudriavzevii* RY55 with idiosyncratic antibacterial activity[J]. Journal of Basic Microbiology, 2012, 52, 1-11.
- [25] Bogut I, Milakovic Z, Brkic S, *et al.* Effects of *Enterococcus faecium* on the growth rate and content of intestinal microflora in sheat fish (*Silurus glanis*) [J]. Veterinárni Medicina, 2000, 45(4): 107-109.
- [26] Gopalakannan A, Arul V. Inhibitory activity of probiotic *Enterococcus faecium* MC13 against *Aeromonas hydrophila* confers protection against hemorrhagic septicemia in common carp *Cyprinus carpio*[J]. Aquaculture International, 2011, 19(5): 973-985.
- [27] Avella M A, Olivotto I, Silvi S, *et al.* Use of *Enterococcus faecium* to improve common sole (*Solea solea*) larviculture[J]. Aquaculture, 2011, 315(3-4): 384-393.
- [28] Sun Y Z, Yang H L, MA R L, *et al.* Effect of *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecium* on growth performance, digestive enzymes and immune response of grouper *Epinephelus coioides*[J]. Aquaculture Nutrition. 2011, 18(3): 281-289.
- [29] 葛龙, 李波. 屎肠球菌在饲用微生态制剂中的研究与应用[J]. 饲料与畜牧: 新饲料, 2013(6): 57-59.
- Ge L, Li B. Study and Application of *Enterococcus faecium* in Feed Microecological Agents [J]. Feed and Husbandry: New Feed, 2013(6): 57-59.
- [30] Sorroza L, Real F, Acosta F, *et al.* A Probiotic Potential of *Enterococcus gallinarum* against *Vibrio anguillarum* infection[J]. Fish Pathology, 2013, 48(1): 9 - 12.
- [31] 王怡婷, 金东, 杨晶, 等. 喜马拉雅旱獭源鸡肠球菌的分离及其耐药性检测[J]. 疾病监测, 2016, 31(5): 380-386.
- Wang Y T, Jin D, Yang J, *et al.* Isolation and antibiotic resistance detection of *Enterococcus gallinarum* from *Marmota himalayana*[J]. Disease Surveillance, 2016, 31(5): 380-386.

(编辑:陈希)