

# 大口黑鲈肠道源拮抗鳊鱼诺卡氏菌的芽孢杆菌的筛选鉴定及其生物学特性

刘宸源<sup>1</sup>, 毛会丽<sup>1</sup>, 王乾坤<sup>1</sup>, 张荇荇<sup>1</sup>, 申长春<sup>1</sup>, 朱黎星<sup>1</sup>, 关树豪<sup>1</sup>, 孟攀<sup>1</sup>, 楚燕星<sup>1</sup>, 李旭东<sup>2</sup>, 关建义<sup>1\*</sup>

1 河南医药大学 生命科学技术学院, 河南 新乡

2 河南省水产技术推广站, 河南 郑州

刘宸源, 毛会丽, 王乾坤, 张荇荇, 申长春, 朱黎星, 关树豪, 孟攀, 楚燕星, 李旭东, 关建义. 大口黑鲈肠道源拮抗鳊鱼诺卡氏菌的芽孢杆菌的筛选鉴定及其生物学特性[J]. 微生物学报, 2026, 66(3): 1088-1106.

LIU Chenyuan, MAO Huili, WANG Qiankun, ZHANG Xingxing, SHEN Changchun, ZHU Lixing, GUAN Shuhao, MENG Pan, CHU Yanxing, LI Xudong, GUAN Jianyi. Screening, identification, and characterization of *Bacillus* strains antagonistic against *Nocardia seriolae* from the intestine of *Micropterus salmoides*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2026, 66(3): 1088-1106.

**摘要:**【目的】从健康大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)肠道中筛选对鳊鱼诺卡氏菌(*Nocardia seriolae*)具有拮抗作用的潜在益生菌。【方法】采集大口黑鲈肠道样本,经梯度稀释后涂布于 TSA 平板以分离和纯化菌株。采用打孔法筛选对鳊鱼诺卡氏菌具有拮抗效果的菌株作为后续实验菌。通过形态学特征、生理生化特性、16S rRNA 基因序列同源性比对及系统发育树分析鉴定菌株种属,并对实验菌的生长特性、黏附能力、无细胞发酵上清液抑菌活性及生物安全性进行测定和分析。【结果】从 40 株分离菌中筛选出 2 株对鳊鱼诺卡氏菌具有稳定且显著拮抗作用的菌株 XXLC06 和 XXLC08,分别鉴定为拟长杆状赖氨酸芽孢杆菌(*Lysinibacillus macroides*)与纺锤状赖氨酸芽孢杆菌(*Lysinibacillus fusiformis*)。2 菌株在温度 25–37 °C、盐度 5‰–30‰、pH 5.5–9.0 条件下生长良好,在 0.3% 和 0.5% 胆盐浓度下的存活率均高于 53%。自聚集实验显示,8 h 后 XXLC06 与 XXLC08 的自聚集率分别为 68.09% 和 63.16%。在 3 种有机溶剂中,XXLC06 与 XXLC08 的疏水率均高于 50%。2 菌株与鳊鱼诺卡氏菌静置共聚 8 h 后,共聚集率分别达 54.62% 和 52.44%。XXLC06 和 XXLC08 的无细胞发酵上清液对鳊鱼诺卡氏菌的抑菌圈直径分别为(28.15±0.44) mm 和(22.63±0.52) mm。2 菌株均未表现出溶血活性,对 23 种受试抗菌药物敏感;急性攻毒试验证实其对大口黑鲈无致病性。【结论】菌株 XXLC06 和 XXLC08 具有良好的生长适应性、黏附能力、生物安全性及稳定的体外拮抗活性,为防控鳊鱼诺卡氏菌提供了潜在的益生菌资源与实验依据。

资助项目: 河南省科技厅科技攻关项目(202102110261, 212102110383); 河南省现代农业产业技术体系建设专项资金(HARS-23-16-T)

This work was supported by the Science and Technology Agency Program of Henan Province (202102110261, 212102110383) and the Special Fund for Henan Provincial Agriculture Research System (HARS-23-16-T).

\*Corresponding author. E-mail: jianyiguan@163.com

Received: 2025-08-19; Accepted: 2025-11-30; Published online: 2026-01-04

关键词: 肠道益生菌; 拟长杆状赖氨酸芽孢杆菌; 纺锤状赖氨酸芽孢杆菌; 大口黑鲈

## Screening, identification, and characterization of *Bacillus* strains antagonistic against *Nocardia seriolae* from the intestine of *Micropterus salmoides*

LIU Chenyuan<sup>1</sup>, MAO Huili<sup>1</sup>, WANG Qiankun<sup>1</sup>, ZHANG Xingxing<sup>1</sup>, SHEN Changchun<sup>1</sup>, ZHU Lixing<sup>1</sup>, GUAN Shuhao<sup>1</sup>, MENG Pan<sup>1</sup>, CHU Yanxing<sup>1</sup>, LI Xudong<sup>2</sup>, GUAN Jianyi<sup>1\*</sup>

1 School of Life Science and Technology, Henan Medical University, Xinxiang, Henan, China

2 Fisheries Technology Extension Station in Henan Province, Zhengzhou, Henan, China

**Abstract:** [Objective] To screen potential probiotics with antagonistic effects against *Nocardia seriolae* from the intestine of healthy largemouth bass (*Micropterus salmoides*). [Methods] Intestinal samples were collected from healthy largemouth bass, and strains were isolated and purified *via* serial dilution and spreading on TSA plates. The hole-punch method was adopted to select strains with antagonistic effects against *N. seriolae* as test strains for subsequent experiments. The species of the test strains were identified through morphological characterization, physiological and biochemical tests, 16S rRNA gene sequence alignment, and phylogenetic analysis. Additionally, the growth characteristics, adhesion ability, antibacterial activity of cell-free fermentation supernatants, and biosafety of the test strains were determined and analyzed. [Results] Among the 40 bacterial strains isolated from the intestinal samples of healthy largemouth bass, two strains (XXLC06 and XXLC08) with stable and significant antagonistic effects against *N. seriolae* were selected. XXLC06 was identified as *Lysinibacillus macroides* and XXLC08 as *Lysinibacillus fusiformis*. Both strains grew well at 25–37 °C, salinities of 5‰–30‰, and pH 5.5–9.0, with survival rates higher than 53% at 0.3% and 0.5% bile salt concentrations. Auto-aggregation assays showed that the auto-aggregation rates of XXLC06 and XXLC08 after 8 h were 68.09% and 63.16%, respectively. In the three organic solvents, both XXLC06 and XXLC08 exhibited hydrophobicity rates exceeding 50%. After co-incubation with *N. seriolae* for 8 h, the co-aggregation rates of the two strains reached 54.62% and 52.44%, respectively. The diameters of the inhibition zones of cell-free fermentation supernatants of XXLC06 and XXLC08 against *N. seriolae* were (28.15±0.44) mm and (22.63±0.52) mm, respectively. Neither strain showed hemolytic activity, and both were sensitive to 23 tested antibacterial agents. Acute toxicity tests confirmed that they were non-pathogenic to largemouth bass. [Conclusion] Strains XXLC06 and XXLC08 exhibited favorable growth adaptability, adhesion capability, biosafety, and stable antagonistic activity *in vitro*. This study provides potential probiotic resources and experimental evidence for the control of *N. seriolae*.

**Keywords:** intestinal probiotics; *Lysinibacillus macroides*; *Lysinibacillus fusiformis*; *Micropterus salmoides*

大口黑鲈(*Micropterus salmoides*), 也称加州鲈, 隶属于鲈形目(*Perciformes*) 太阳鱼科(*Centrarchidae*)黑鲈属(*Micropterus*), 原产于北美洲, 是一种肉食性淡水养殖鱼类<sup>[1]</sup>。自 1983 年引入中国内陆以来, 大口黑鲈因其食性易于驯化、生长迅速、抗逆性强且营养丰富, 展现出较高的经济价值<sup>[2]</sup>。随着养殖模式的多元化和养殖规模的持续扩大, 大口黑鲈现已发展成为我国重要的特色淡水经济养殖品种<sup>[3]</sup>。然而, 在大口黑鲈养殖产业蓬勃发展的同时, 各类病害问题也日益凸显。其中, 由鳙鱼诺卡氏菌(*Nocardia seriolae*)引起的诺卡氏菌病是当前大口黑鲈养殖中最具破坏性的细菌性疾病之一; 该病具有潜伏期长、传染性强等特点<sup>[4]</sup>, 常导致养殖群体生长迟缓、死亡率上升, 严重制约养殖产量与产品质量, 给产业带来巨大经济损失。因此, 探究鱼类诺卡氏菌病的有效防控策略, 保障大口黑鲈养殖业的健康可持续发展, 已成为当前水产养殖领域的重要研究方向。

近年来, 益生菌在水产养殖领域的应用日益广泛, 作为一种绿色、安全且高效的生物防控手段, 其在维持水生动物肠道微生态平衡、增强机体免疫力以及抑制病原菌生长等方面发挥着重要作用<sup>[5]</sup>。当前水产养殖中普遍应用的益生菌主要包括芽孢杆菌属(*Bacillus*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)以及酵母菌(*Saccharomyces*)等微生物<sup>[6]</sup>。芽孢杆菌与其他益生菌相比, 其显著特征是能够在细胞内形成具有耐热性、耐酸碱性、耐盐性、耐干燥以及抗氧化特性的厚壁芽孢, 即内生孢子<sup>[7]</sup>。这种生物学特性赋予了芽孢杆菌强大的环境适应性, 使其能够在极端条件下维持生存。众多研究表明, 从水生动物肠道中筛选出的芽孢杆菌类益生菌不仅能够有效调节肠道菌群结构, 促进宿主对营养物质的消化吸收, 还能通过产生抗菌物质、竞争黏附位点等机制抑制病原菌在肠道内的定殖与生长<sup>[8-10]</sup>。

在当前国内水产养殖领域的研究中主要涉

及的芽孢杆菌类益生菌包括枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)以及地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)<sup>[10-12]</sup>。相较于其他种类, 赖氨酸芽孢杆菌(*Lysinibacillus*)作为水产养殖益生菌的相关报道较少, 但现有研究表明其具有独特应用潜力。例如, 管立平等<sup>[13]</sup>初步研究表明, 持续添加赖氨酸芽孢杆菌对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)生长及存活具有一定促进作用, 且显著调控养殖水质中铵态氮、亚硝酸盐氮、硝酸盐氮含量及 pH 值; 于珺妃等<sup>[14]</sup>研究发现, 源自鲤(*Cyprinus carpio*)肠道的赖氨酸芽孢杆菌具有良好的产二肽基肽酶-IV (DDP-IV)抑制剂能力, 并具备潜在的降低血糖功能。

本研究从大口黑鲈肠道中筛选出对鳙鱼诺卡氏菌具有拮抗活性的菌株 XXLC06 和 XXLC08, 通过菌落形态特征、生理生化特性及基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树分析, 对 2 株目标菌进行了分类学鉴定。同时, 对菌株 XXLC06 和 XXLC08 的生长特性、黏附能力等进行测定, 有助于掌握其在大口黑鲈养殖环境中的适应能力, 以便更好地发挥其防控病害的功效。此外, 测定 2 株菌的无细胞发酵上清液对鳙鱼诺卡氏菌 XXLX2 的抑菌活性, 并对菌株 XXLC06 和 XXLC08 进行溶血试验、药物敏感性试验及急性攻毒试验, 以探究其作为益生菌候选株的潜力, 从而为大口黑鲈诺卡氏菌病的生物防控奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 材料鱼和试验菌株

本研究所有动物实验均获得新乡医学院动物伦理委员会批准, 编号为 XYLL-2020451。健康大口黑鲈[平均体长为(11.03±0.36) cm, 平均体重为(13.42±0.71) g]购自河南省新乡市银丰养殖场。实验室水循环系统中各水箱采用有效浓

度为 200 mg/L 的福尔马林溶液浸泡 1 h, 之后使用清水冲洗 3-5 次以去除甲醛残留。将采购的大口黑鲈置于有效浓度为 15 mg/L 的福尔马林溶液中浸浴 15 min 进行体表消毒, 随后将其转移至经清洁处理的循环系统水箱内进行适应性暂养, 同时开启循环系统下紫外灭菌灯, 对循环水体进行持续灭菌, 以维持洁净的水体环境。实验前随机选取 10 尾健康大口黑鲈开展细菌、病毒及寄生虫检测, 确保实验鱼无病原微生物感染且未携带寄生虫。鳊鱼诺卡氏菌 (*N. seriolae*) XXLX2、嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) XDMG、枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) XXWC11 保存于本课题组实验室。

### 1.1.2 主要试剂和仪器

胰蛋白胨大豆琼脂 (tryptic soy agar, TSA) 培养基、胰蛋白胨大豆肉汤 (tryptic soy broth, TSB) 培养基、细菌微量生化鉴定试剂盒, 青岛高科技工业园海博生物技术有限公司; 细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒, 宝日医生物技术(北京)有限公司; 2×Taq MasterMix, 江苏康为世纪生物科技股份有限公司; 血琼脂平板, 常德比克曼生物科技股份有限公司; 细菌药敏试纸, 杭州滨和微生物试剂有限公司。

扫描电子显微镜 (SEM), Hitachi 公司; 高速冷冻离心机, 湖南赫西仪器装备有限公司; 紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司。

## 1.2 肠道源拮抗菌的分离与筛选

### 1.2.1 细菌分离

随机选取 8 尾健康大口黑鲈, 置于含有丁香酚 (1:20 000) 的水箱中进行麻醉处理。待鱼体出现明显的麻醉迹象后, 将其捞出并在生物安全柜中进行解剖实验。使用 75% 乙醇棉球对鱼体表面进行消毒, 消毒彻底后, 使用无菌剪刀从泄殖孔处剪开并取出鲈鱼的肠道。利用无菌镊子小心地挤出肠道内的消化物, 再用 PBS 冲洗 3-4 次。将 8 尾鲈鱼的前、中、后肠分别剪

切成 2 cm 肠段, 每尾鱼各肠段分别置于对应的无菌离心管中。每管加入 1 mL PBS 溶液, 并在振荡仪中充分振荡以制备匀浆。将匀浆置于 60 °C 水浴锅中恒温处理 30 min, 以 4 000 r/min 离心 3 min, 收集上层液, 采用 10 倍梯度稀释法进行逐级稀释, 制备成  $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  浓度梯度的稀释液。分别吸取各组稀释液 100  $\mu$ L, 均匀涂布在对应的 TSA 培养基上进行筛选, 每组样本涂布 10 个平板。将培养皿倒置于 28 °C 恒温培养箱中, 在 24-48 h 的培养期间, 根据不同的菌落形态和颜色挑选出单个菌落, 并在 TSA 平板上进行反复划线纯化。将纯化后的单菌落接种于 TSB 培养基中, 按照菌液与甘油 1:1 的体积比加入 50% 的无菌甘油, 并保存于 -80 °C 的冰箱中, 菌株的编号依次为 XXLC01-XXLC40。

### 1.2.2 拮抗菌初筛

通过打孔法对分离的细菌进行初步筛选, 以鳊鱼诺卡氏菌 XXLX2 作为指示菌。将经 121 °C 灭菌的 TSA 培养基冷却至 45-50 °C 时倒平板, 待培养基凝固并降至室温后, 分别吸取 100  $\mu$ L 鳊鱼诺卡氏菌悬液滴加至各培养基平板表面, 使用无菌棉签均匀涂布, 以无菌塑封膜密封, 将培养皿倒置于 28 °C 恒温箱中培养。48 h 后取出平板, 于生物安全柜中开启培养皿盖。以拮抗鳊鱼诺卡氏菌的枯草芽孢杆菌 XXWC11 作为阳性对照, TSB 液体培养基作为阴性对照, 使用无菌打孔器 (直径 7 mm) 在平板上均匀制备 3 个孔位, 每个平板中选取 2 孔, 分别加入 30  $\mu$ L 枯草芽孢杆菌 XXWC11 菌液和 30  $\mu$ L TSB 液体培养基, 剩余孔位分别加入 30  $\mu$ L 上述各分离菌株菌液。随后正置于 28 °C 恒温箱中继续培养, 18 h 后开始每隔 2 h 观察抑菌圈形成情况, 直至抑菌圈显现, 记录产生抑菌圈的菌株。

### 1.2.3 拮抗菌复筛

采用打孔法对产生抑菌圈的菌株进行复筛试验, 指示菌同 1.2.2 节。待无菌 TSA 培养基平

板凝固后, 分别吸取 100  $\mu\text{L}$  鳊鱼诺卡氏菌悬液滴加至各培养基平板表面, 使用无菌棉签涂布均匀, 平板以无菌塑封膜密封, 倒置于 28  $^{\circ}\text{C}$  恒温箱中培养 48 h。培养结束后取出平板, 于生物安全柜中开启培养皿盖, 使用无菌打孔器(直径 7 mm)在平板中央制备孔位, 分别向各孔中加入 30  $\mu\text{L}$  初筛拮抗菌株菌液。每株拮抗菌样本进行 3 次平行实验, 正置于 28  $^{\circ}\text{C}$  恒温条件下继续培养。综合初筛与复筛的数据结果, 筛选出 2 株对鳊鱼诺卡氏菌具有稳定且显著拮抗作用的菌株 XXLC06 和 XXLC08, 并确定其为后续研究的目标菌株。

### 1.3 菌株种属鉴定

#### 1.3.1 形态学观察

吸取分离纯化后的菌株 XXLC06 和 XXLC08 的菌悬液, 经 10 倍梯度稀释法稀释至  $10^{-4}$  稀释度, 分别吸取 100  $\mu\text{L}$  上述稀释菌液均匀涂布于相应的 TSA 培养基上, 28  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h, 观察 2 株菌的外观形态、大小、颜色等。同时, 分别从 2 株菌中挑取单菌落接种于 TSB 培养基中, 于 28  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 摇床培养至指数生长期 ( $OD_{600}$  值为 0.8–1.0), 吸取 2  $\mu\text{L}$  菌液置于无菌载玻片上, 经革兰氏染色后, 在显微镜下观察菌体特征。此外, 分别吸取 2 株菌的培养菌悬液 ( $OD_{600}$  值为 0.8–1.0) 各 1.5 mL 置于 2 mL 无菌离心管中, 以 4  $^{\circ}\text{C}$ 、4 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 沿管壁缓慢加入 1.5 mL 戊二醛固定液 (25 mg/mL) 至含有菌体沉淀的离心管内, 将固定后的样品委托科学指南针测试平台进行扫描电镜观察。

#### 1.3.2 生理生化特性检测

使用细菌生化鉴定试剂盒对菌株 XXLC06 和 XXLC08 进行生化指标检测, 参照《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[15]</sup> 和《伯杰细菌鉴定手册》<sup>[16]</sup> 进行生理生化鉴定, 并以试剂盒说明书为依据, 记录各项生化指标检测结果。

#### 1.3.3 16S rRNA 基因序列测定及系统发育树的构建

采用细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒提取菌株 XXLC06 和 XXLC08 的基因组 DNA, 分别以 2 株菌的基因组 DNA 为模板, 使用 2 $\times$ Taq MasterMix 及 16S rRNA 基因通用引物<sup>[17]</sup>(上游引物 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'、下游引物 5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3') 进行目标基因的 PCR 扩增。PCR 反应体系 (25  $\mu\text{L}$ ): ddH<sub>2</sub>O 9.5  $\mu\text{L}$ , 2 $\times$ Taq MasterMix 12.5  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 各 1  $\mu\text{L}$ , 模板 DNA 1  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 45 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 29 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  终延伸 5 min。经过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后纯化 PCR 产物, 送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。将所得基因序列通过 BLAST 在 GenBank 中进行同源性比对分析, 并使用 MEGA 11.0 软件中邻接(neighbor joining, NJ)法构建系统发育树。

### 1.4 拮抗菌的生长特性分析

#### 1.4.1 温度对拮抗菌生长的影响

参照高艳侠等<sup>[18]</sup>的研究方法, 将终浓度均为  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL 的拮抗菌 XXLC06 和 XXLC08 的培养液, 按照 1% 接种量转接至已灭菌的 TSB 培养基中, 并置于不同温度 (25、28、32、35、37  $^{\circ}\text{C}$ ) 的恒温摇床中 180 r/min 培养。

#### 1.4.2 盐度对拮抗菌生长的影响

将菌株 XXLC06 和 XXLC08 的培养液以 1% 接种量分别转接至盐度梯度为 5%、20%、30%、40% 的无菌 TSB 培养基中, 在最适温度、最适初始 pH 条件下 180 r/min 培养。

#### 1.4.3 酸碱对拮抗菌生长的影响

将菌株 XXLC06 和 XXLC08 的培养液按照 1% 接种量分别转接至已灭菌的初始 pH 值分别为 3.0、5.5、7.0、8.0、9.0、11.0 的 TSB 培养基中, 在最适生长温度条件下 180 r/min 培养。

上述实验均进行 3 次重复, 每隔 2 h 取菌株

培养液, 使用紫外可见分光光度计于 600 nm 波长处测量其光密度( $OD_{600}$ )值, 以此监测细菌生长动态, 并绘制不同条件下的生长曲线。

#### 1.4.4 胆盐对拮抗菌生长的影响

分别取 2 株拮抗菌的新鲜菌液各 5 mL, 接种至含有不同浓度胆盐(0.3%、0.5%)的 100 mL TSB 培养基中, 置于 32 °C、180 r/min 的摇床内, 分别振荡培养 0、1、2、3、5 h 后, 采用稀释涂布法对各组处理后的存活菌落进行计数。实验设置 3 次独立重复, 每次重复包含 3 个平行实验。将起始时刻的数据记为  $T_0$ , 其余时刻的数据记为  $T_n$  ( $n=1、2、3、5$ ), 并按照公式(1)计算存活率。

$$\text{存活率} = T_n / T_0 \times 100\% \quad (1)$$

### 1.5 拮抗菌的黏附能力测定

#### 1.5.1 拮抗菌的自聚集能力测定

参照向鑫玲等<sup>[19]</sup>的研究方法, 将菌株 XXLC06 和 XXLC08 分别接种在 TSB 培养基中, 32 °C、180 r/min 培养 12 h 后, 于 5 mL 离心管中 4 °C、5 000 r/min 离心 5 min 收集菌体沉淀, 使用 PBS 洗涤 2-3 次后, 将每管菌体沉淀重悬于 4 mL PBS 缓冲液中, 振荡 30 s 混匀后静置。同时, 以枯草芽孢杆菌 XXWC11 作为阳性对照, 以 PBS 溶液作为空白对照, 分别于 0、2、4、6、8 h 从每管中吸取 1 mL 上层菌悬液与 2 mL PBS 混合, 测定 3 株菌在波长 600 nm 处的吸光值, 按照公式(2)计算菌株的自聚集率。

$$A = (A_0 - A_t) / A_0 \times 100\% \quad (2)$$

式中:  $A_0$  为在 600 nm 处初始时间 0 h 的吸光值;  $A_t$  为在 600 nm 处对应不同时间的吸光值。

#### 1.5.2 拮抗菌的疏水能力测定

同 1.5.1 节的方法, 待 PBS 缓冲液洗涤 2-3 次后, 将菌体沉淀重悬于 PBS 中。吸取 2 mL 菌悬液, 分别与 3 种有机溶剂(二甲苯、氯仿和乙酸乙酯)各 1 mL 混合, 振荡 30 s 后静置 10 s, 再涡旋 3 min 以充分混匀, 随后静置 60 min 分层。分别取各组水相, 以 PBS 作为空白对照, 测定

各组在波长 600 nm 处的吸光值, 按照公式(3)计算菌株的疏水率。

$$H = (A_0 - A) / A_0 \times 100\% \quad (3)$$

式中:  $A_0$  为与 3 种有机试剂混合前 600 nm 的吸光值;  $A$  为与 3 种有机试剂混合后 600 nm 的吸光值。

#### 1.5.3 拮抗菌的共聚集能力测定

依照 1.5.1 节的方法, 用 PBS 洗涤细胞 2-3 次后, 将沉淀重新悬浮于 PBS 中。同时, 鳟鱼诺卡氏菌 XXLX2 也采用相同方法悬浮于 PBS 缓冲液中。分别吸取 2 mL 菌株 XXLC06 和 XXLC08 的菌悬液, 与等量的菌株 XXLX2 菌悬液混合于 5 mL 的收集管中, 通过涡旋振荡 30 s 以充分混匀。同时, 在 0、2、4、6、8 h 分别测定其在波长 600 nm 处的吸光值, 按照公式(4)计算拮抗菌与致病菌的共聚集率。

$$A = (A_0 - A_{\text{mix}}) / A_0 \times 100\% \quad (4)$$

式中:  $A_0$  为初始时间 0 h 混合菌悬液在 600 nm 处的吸光值;  $A_{\text{mix}}$  为各个时间点的混合菌悬液在 600 nm 处的吸光值。

### 1.6 无细胞发酵上清液对鳟鱼诺卡氏菌的抑菌效果测定

菌株 XXLC06 和 XXLC08 分别接种于 TSB 培养基中, 在 32 °C、180 r/min 条件下培养 48 h 后, 将培养液以 5 000 r/min 离心 10 min, 分别收集 2 株菌的发酵上清液, 经 0.22  $\mu\text{m}$  无菌滤膜过滤 3 次, 转移至无菌收集管, 4 °C 保存备用。吸取 100  $\mu\text{L}$  鳟鱼诺卡氏菌悬液滴加至 TSA 培养基平板上, 使用无菌棉签涂布均匀, 利用无菌打孔器(直径 7 mm)在含菌的 TSA 平板上均匀打 3 个孔, 对照孔中加入 100  $\mu\text{L}$  无菌 TSB 培养基, 而试验孔则加入等量的菌株 XXLC06 和 XXLC08 的无细胞发酵上清液, 进行 3 次平行试验, 将平板正置于 28 °C 恒温培养箱中培养 4 d, 观察并测量抑菌圈的直径。所得数据采用 SPSS 21.0 软件进行分析处理。

## 1.7 安全性评价

### 1.7.1 拮抗菌溶血性测定

将菌株 XXLC06 和 XXLC08 的菌悬液采用打孔法接种于血琼脂平板上, 以具备溶血特性的嗜水气单胞菌 XDMG 作为阳性对照, 以无菌的 TSB 培养基作为阴性对照。在每组的加样孔中均注入 30  $\mu\text{L}$  的相应样品液, 32  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养 24 h, 观察平板上样品孔周围是否出现溶血现象。

### 1.7.2 药敏试验

将 XXLC06 和 XXLC08 的菌悬液浓度均调整至  $1.0 \times 10^8$  CFU/mL, 并依据 (Clinical & Laboratory Standards Institute, CLSI) 的标准进行操作。分别取 2 株菌的菌悬液各 100  $\mu\text{L}$ , 均匀涂布于相应的 TSA 培养基平板表面, 使用无菌镊子将 24 种药敏片分别贴置于各平板中央区域。采用塑封膜密封平板后, 于 32  $^{\circ}\text{C}$  恒温箱中正置培养 24 h, 测量各药敏纸片周围抑菌圈的直径。参照药敏纸片说明书, 评估 2 株受试菌株的药物敏感性。

### 1.7.3 急性攻毒试验

选取健康且规格相近的大口黑鲈进行急性

攻毒试验, 每组设置 3 个平行, 每个平行包含 10 尾鱼, 各组分别腹腔注射 100  $\mu\text{L}$  无菌生理盐水 (NaCl 的质量分数为 0.65%)、 $1.0 \times 10^8$  CFU/mL 的 XXLC06、XXLC08。试验周期为 7 d, 水箱内水温控制在  $(25 \pm 2)$   $^{\circ}\text{C}$ , 其间每天观察并记录各组大口黑鲈的生长和死亡情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 细菌的分离纯化及拮抗菌筛选

基于菌落形态特征与生长时间差异, 从健康大口黑鲈肠道样本中分离获得 40 株细菌。初筛结果表明, 其中 5 株细菌对鳊鱼诺卡氏菌具有拮抗活性 (图 1A–1E)。通过对这 5 株潜在拮抗菌株进行复筛试验, 最终筛选出拮抗性能稳定且抑菌活性较强的菌株 XXLC06 和 XXLC08 (表 1), 并将这 2 株菌作为后续研究的实验菌株。

### 2.2 拮抗菌的鉴定

#### 2.2.1 形态特征观察

在 TSA 培养基平板上, 菌株 XXLC06 和 XXLC08 的菌落形态呈近圆形, 中心部位略微隆起, 质地湿润、黏稠且不透明 (图 2)。其中, XXLC06 菌株形成的菌落呈淡黄色, 而 XXLC08

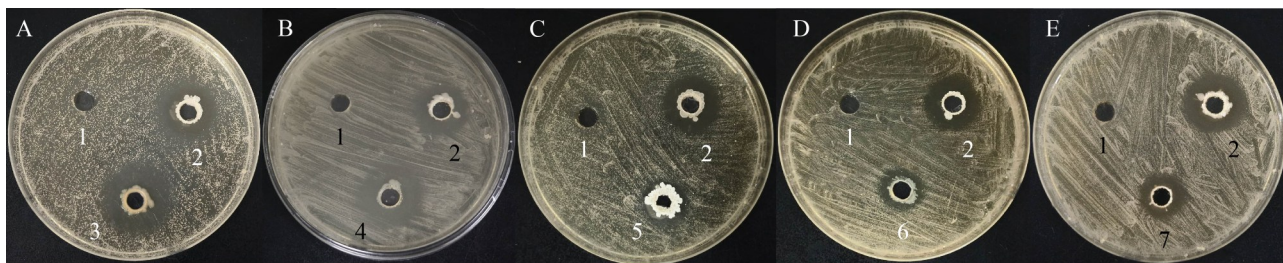


图1 五株分离菌对鳊鱼诺卡氏菌的拮抗效果。A–E: 依次为菌株 XXLC06、XXLC08、XXLC17、XXLC24、XXLC31 对鳊鱼诺卡氏菌的拮抗效果。1: 阴性对照孔 (TSB); 2: 阳性对照孔 (枯草芽孢杆菌 XXWC11); 3: XXLC06 菌株加样孔; 4: XXLC08 菌株加样孔; 5: XXLC17 菌株加样孔; 6: XXLC24 菌株加样孔; 7: XXLC31 菌株加样孔。

Figure 1 Antagonistic effects of five isolated strains against *Nocardia seriolae*. A–E: The antagonistic activity against *N. seriolae* for strains XXLC06, XXLC08, XXLC17, XXLC24, and XXLC31, respectively (from left to right). 1: Negative control well (TSB); 2: Positive control well (*B. subtilis* XXWC11); 3: The sample well with XXLC06 strain added; 4: The sample well with XXLC08 strain added; 5: The sample well with XXLC17 strain added; 6: The sample well with XXLC24 strain added; 7: The sample well with XXLC31 strain added.

表1 五株分离菌对鮰鱼诺卡氏菌拮抗效果的复筛试验

Table 1 Secondary screening of five isolated strains for antagonistic activity against *N. seriolae*

分离菌株 Isolated bacteria	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter (mm)
XXLC06	24.71±0.49
XXLC08	20.01±0.34
XXLC17	11.16±0.53
XXLC24	10.02±0.32
XXLC31	14.11±0.46

菌株在 TSA 培养基平板上的菌落呈米白色。扫描电子显微镜观察显示, 与 XXLC08 菌株相比, XXLC06 菌株呈长杆状; 此外, 这 2 株菌均存在菌体相互聚集的特征。经革兰氏染色法镜检观察, 这 2 株菌均被鉴定为革兰氏阳性菌, 其细胞形态表现为杆状。

### 2.2.2 生理生化特性鉴定

菌株 XXLC06 和 XXLC08 的生理生化指标检测结果如表 2 所示, 2 株菌均能以 D-葡萄糖、阿拉伯糖、山梨醇、甘露醇作为碳源进行生长,

而不能利用菊糖、木糖、半乳糖、海藻糖、蔗糖、柠檬酸盐; 同时, XXLC06 可利用 D-纤维二糖及代谢木糖醇, 而 XXLC08 可利用果糖。酶活性分析显示, 这 2 株菌的过氧化氢酶和赖氨酸脱羧酶活性均为阳性, 而氧化酶、硝酸盐还原、L-精氨酸双水解酶活性及吲哚试验均为阴性; 其中, XXLC06 菌株脂酶检测为阳性, XXLC08 溶菌酶检测呈阳性。此外, 2 株菌均可水解淀粉, 但不水解七叶苷, 不液化明胶, VP 试验结果为阴性。依据《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[15]</sup>及《伯杰细菌鉴定手册》<sup>[16]</sup>所载细菌生理生化指标, 推测 2 株菌可能隶属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)。

### 2.2.3 16S rRNA 基因序列分析与系统发育树构建

测序结果显示, XXLC06 和 XXLC08 的 16S rRNA 基因片段长度分别为 1 461 bp 和 1 449 bp。通过 BLAST 在线比对分析, XXLC06 的 16S rRNA 基因与 NCBI 数据库中的拟长杆状赖氨酸芽孢杆菌(GenBank 登录号为 KR085803.1)的核苷酸序列具有 99.72% 的相似性; 而 XXLC08 的 16S rRNA 基因与 NCBI 数据库中的纺锤状赖

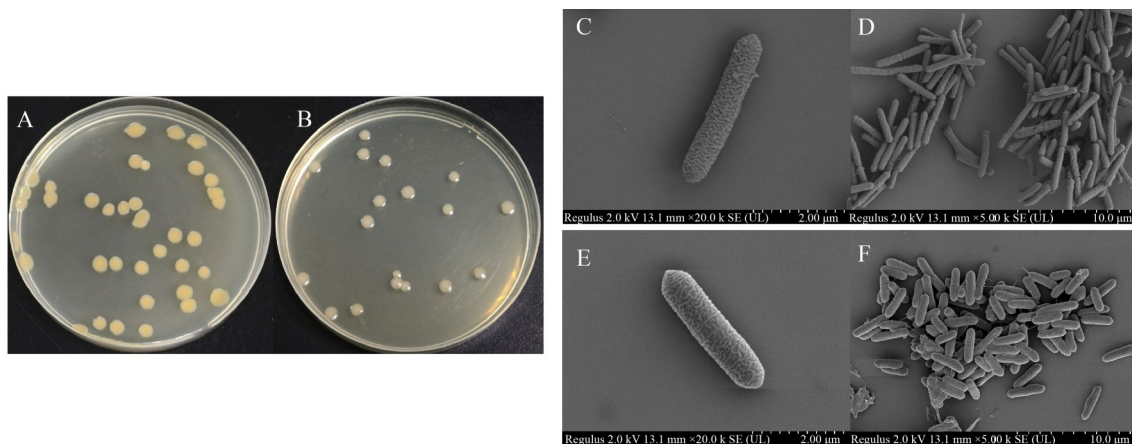


图2 XXLC06和XXLC08的菌落形态及扫描电镜观察。A: XXLC06菌落形态; B: XXLC08菌落形态; C、D: XXLC06菌株在扫描电镜下的形态; E、F: XXLC08菌株在扫描电镜下的形态。

Figure 2 Colony morphology and scanning electron microscope (SEM) observations of XXLC06 and XXLC08  
A: Colony morphology of XXLC06; B: Colony morphology of XXLC08; C, D: Morphology of XXLC06 strain under scanning electron microscope; E, F: Morphology of XXLC08 strain under scanning electron microscope.

表2 菌株XXLC06和XXLC08的生理生化特征

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of strains XXLC06 and XXLC08

生化项目 Biochemical item	XXLC06	XXLC08
VP 试验 Voges-Proskauer test	-	-
碳源利用 Carbon source utilization		
D-葡萄糖 D-glucose	+	+
D-纤维二糖 D-cellobiose	+	-
阿拉伯糖 Arabinose	+	+
菊糖 Inulin	-	-
木糖 Xylose	-	-
果糖 Fructose	-	+
半乳糖 Galactose	-	-
海藻糖 Trehalose	-	-
蔗糖 Sucrose	-	-
山梨醇 Sorbitol	+	+
甘露醇 Mannitol	+	+
木糖醇 Xylitol	+	-
柠檬酸盐 Citrate	-	-
酶活性 Enzymatic activity		
氧化酶 Oxidase	-	-
溶菌酶 Lysozyme	-	+
脂酶 Lipase	+	-
过氧化氢酶 Catalase	+	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	-	-
赖氨酸脱羧酶肉汤 Lysine decarboxylase broth	+	+
L-精氨酸双水解酶 L-arginine dihydrolase	-	-
吲哚试验 Indole test	-	-
水解活性 Hydrolytic activity		
淀粉 Starch	+	+
七叶苷 Esculin	-	-
明胶液化 Gelatin liquefaction	-	-

+: 试验结果阳性; -: 试验结果阴性。

+: Positive test result; -: Negative test result.

氨酸芽孢杆菌(GenBank 登录号为 MK753026.1)的核苷酸序列相似性高达 99.93%。基于 16S rRNA 基因序列,在种属水平上利用 MEGA 11.0 软件,采用邻接(neighbor joining, NJ)法构建系统发育树(图 3)。结果显示,XXLC06 与拟长杆状赖氨酸芽孢杆菌、XXLC08 与纺锤状赖氨酸芽

孢杆菌自然聚类于同一分支。综合菌株形态特征和生理生化特性,鉴定 XXLC06 为拟长杆状赖氨酸芽孢杆菌,XXLC08 为纺锤状赖氨酸芽孢杆菌。

## 2.3 菌株 XXLC06 和 XXLC08 的生长特性研究

研究结果显示,菌株 XXLC06 和 XXLC08 在 25–37 °C 的温度范围内均表现出良好的生长能力,2 株菌的最适生长温度均为 32 °C;在 32–37 °C 的环境中,2 株试验菌能够更早地达到生长稳定期(图 4A、4B)。菌株 XXLC06 和 XXLC08 在不同盐度条件下的生长情况表明,2 株菌在 5‰–30‰ 的盐度范围内可正常生长,在 5‰ 盐度条件下进入稳定期时其  $OD_{600}$  值达到最大;且在盐度为 5‰–30‰ 的情况下,2 株菌均能在 14–18 h 内达到稳定期(图 4C–4D)。菌株 XXLC06 和 XXLC08 在不同 pH 条件下的生长特性表明,2 株菌在环境 pH 值为 5.5–9.0 时能够生长,其最适初始 pH 值均为 7.0;而在 pH 为 3.0 和 11.0 的极端条件下,菌株 XXLC06 和 XXLC08 的生长活性被完全抑制(图 4E–4F)。此外,在不同胆盐浓度(0.3%、0.5%)条件下,菌株 XXLC06 和 XXLC08 的存活率随处理时间延长呈持续降低趋势(图 4G、4H);然而经 5 h 处理后,2 株菌在 2 种胆盐环境中的存活率均高于 53%,表明其对浓度不超过 0.5% 的胆盐均具有较强耐受性。

## 2.4 菌株 XXLC06 和 XXLC08 的黏附能力测定

### 2.4.1 菌株 XXLC06 和 XXLC08 的自聚集能力测定

细菌的自聚集现象是指在一定条件下,细菌通过相互作用自发地聚集形成群体结构,该现象与细菌的黏附能力紧密相关。3 株菌的自聚集结果如图 5A 所示,菌株 XXLC06 和 XXLC08 的自聚集能力均强于阳性对照菌 XXWC11,并且在 8 h 的静置培养过程中,3 株菌的自聚集率

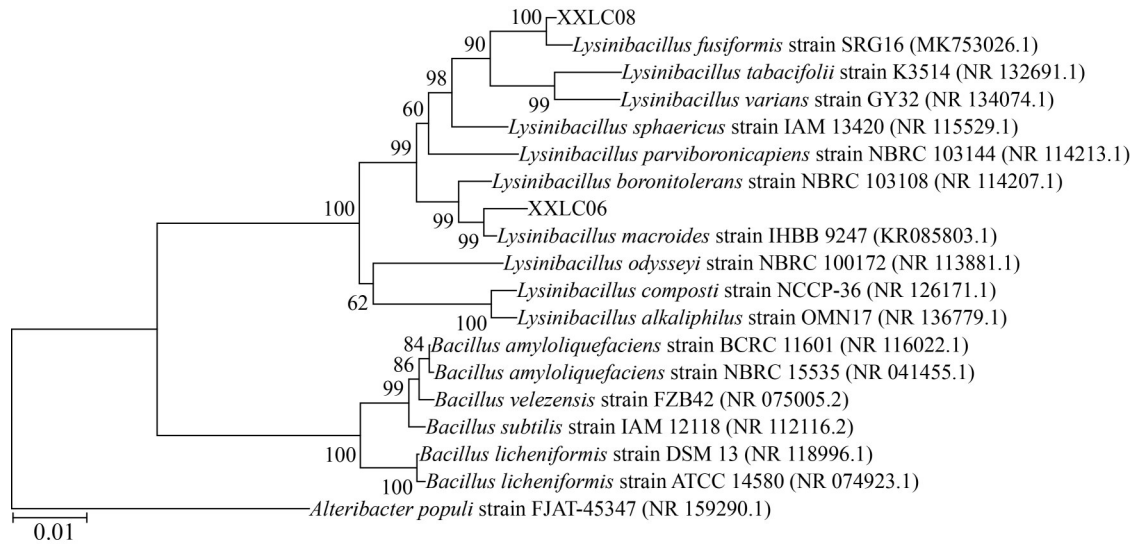


图3 菌株XXLC06和XXLC08基于16S rRNA基因序列的系统发育树。XXLC06和XXLC08表示实验分离菌株。括号内的编号为菌株16S rRNA基因序列的GenBank登录号，分支点处数值代表置信度，标尺表示每位点0.01个核苷酸替换。

Figure 3 Phylogenetic tree of strains XXLC06 and XXLC08 based on 16S rRNA gene sequences. XXLC06 and XXLC08 denote experimentally isolated strains. The numbers in parentheses represent the GenBank accession numbers for 16S rRNA gene sequences of these strains. The values at branch points indicate confidence levels, and the scale bar denotes 0.01 nucleotide substitutions per position.

随着时间的推移均显著升高( $P<0.05$ )。其中，XXLC08菌株在8 h的自聚集率为63.16%，而XXLC06菌株的自聚集能力更为突出，其在8 h的自聚集率达到了68.09%。

#### 2.4.2 菌株XXLC06和XXLC08的疏水能力测定

在本研究中，菌株XXLC06和XXLC08对3种有机溶剂(二甲苯、氯仿和乙酸乙酯)的黏附能力被用作评估菌体表面疏水性的指标。如图5B所示，XXLC06和XXLC08在二甲苯和氯仿2种有机溶剂中的疏水性并无显著差异( $P>0.05$ )，但2株菌在氯仿中的疏水性显著高于在乙酸乙酯中的疏水性( $P<0.05$ )。综合分析显示，菌株XXLC06和XXLC08在3种有机溶剂中均表现出良好的表面疏水性，其疏水率分别超过60%和50%。

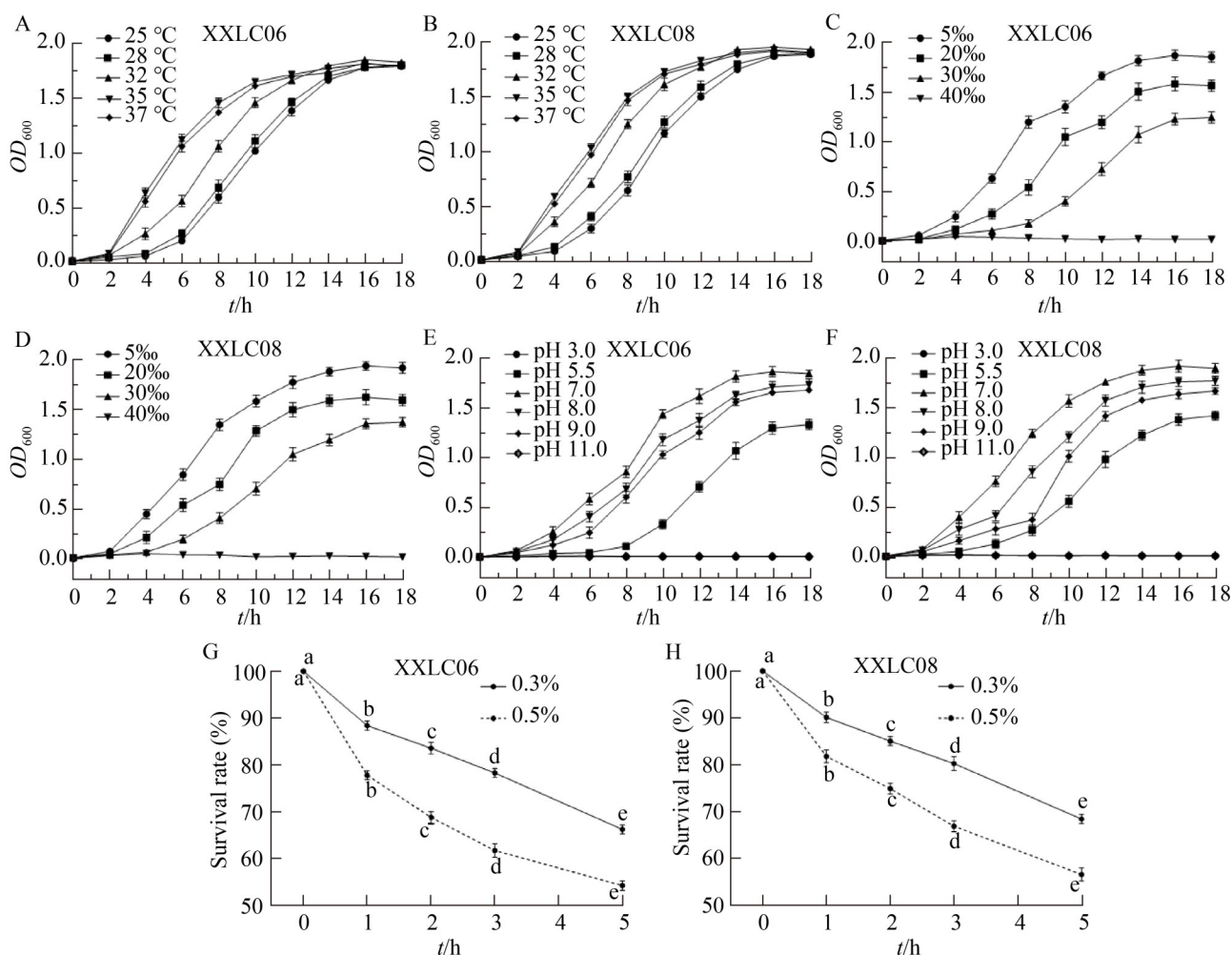
#### 2.4.3 菌株XXLC06和XXLC08的共聚集能力测定

共聚集率反映了不同菌株之间相互结合的

能力，这种能力为益生菌在肠道内的定殖提供了优势。菌株XXLC06和XXLC08分别与鲫鱼诺卡氏菌XXLX2的共聚集结果如图5C所示，在8 h的静置共聚期间，2株拮抗菌与鲫鱼诺卡氏菌XXLX2的共聚集率均随着时间的延长而显著上升( $P<0.05$ )。同时，拮抗菌XXLC06和XXLC08在8 h的共聚集率分别达到54.62%和52.44%，由此可见，2株拮抗菌均表现出与鲫鱼诺卡氏菌XXLX2有良好的共聚集作用。

#### 2.5 无细胞发酵上清液对鲫鱼诺卡氏菌的抑菌实验结果

抑菌实验结果如图6所示，菌株XXLC06和XXLC08的无细胞发酵上清液对鲫鱼诺卡氏菌的抑菌圈直径分别为(28.15±0.44) mm和(22.63±0.52) mm，表明2株菌的抗菌活性物质主要存在于发酵上清液中，且菌株XXLC06对鲫鱼诺卡氏菌可能具有更强的抑菌活性。



**图4** 菌株XXLC06和XXLC08在不同培养温度、盐度、pH条件下的生长曲线以及在不同浓度胆盐中的存活率。A、B：温度对菌株XXLC06和XXLC08生长的影响；C、D：盐度对菌株XXLC06和XXLC08生长的影响；E、F：pH对菌株XXLC06和XXLC08生长的影响；G、H：胆盐对菌株XXLC06和XXLC08生长的影响。不同小写字母表示组内不同时间点间差异显著( $P<0.05$ )。

**Figure 4** Growth curves of strains XXLC06 and XXLC08 under different culture temperatures, salinities, and pH levels, along with survival rates in varying bile salt concentrations. A, B: Effect of temperature on the growth of strains XXLC06 and XXLC08; C, D: Effect of salinity on the growth of strains XXLC06 and XXLC08; E, F: Effect of pH on the growth of strains XXLC06 and XXLC08; G, H: Effect of bile salts on the growth of strains XXLC06 and XXLC08. Different lowercase letters indicate significant differences between different time points within the same group ( $P<0.05$ ).

## 2.6 菌株 XXLC06 和 XXLC08 的安全性

### 2.6.1 菌株 XXLC06 和 XXLC08 的溶血性结果

如图 7 所示，采用打孔法将新鲜培养的

XXLC06 和 XXLC08 菌悬液、阴性对照 TSB 培养基以及阳性对照嗜水气单胞菌 XDMG 分别添加至血琼脂平板中，32 °C 培养 24 h 后，观察到阳性对照嗜水气单胞菌 XDMG 产生了明显的溶血环。相比之下，2 株拮抗菌与阴性对照均未出

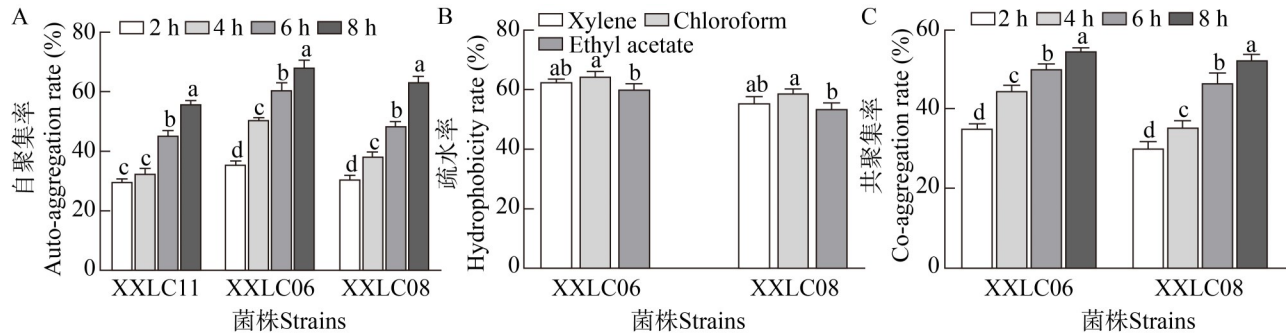


图5 两株菌的自聚集性、疏水性及其与鳊鱼诺卡氏菌的共聚集性。A: 菌株XXLC06和XXLC08的自聚集率; B: 菌株XXLC06和XXLC08的疏水率; C: 菌株XXLC06和XXLC08分别与鳊鱼诺卡氏菌XXLX2的共聚集率。不同小写字母表示组内不同时间点间差异显著( $P < 0.05$ )。

Figure 5 Auto-aggregation, hydrophobicity, and co-aggregation with *Nocardia seriolae* of the two bacterial strains. A: Auto-aggregation rates of strains XXLC06 and XXLC08; B: Hydrophobicity rates of strains XXLC06 and XXLC08; C: Co-aggregation rates of strains XXLC06 and XXLC08 with *N. seriolae* strain XXLX2. Different lowercase letters indicate significant differences among different time points within the same group ( $P < 0.05$ ).

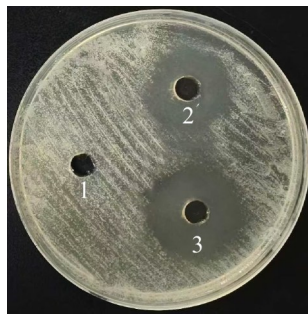


图6 两株拮抗菌的无细胞发酵上清液对鳊鱼诺卡氏菌的抑制效果。1: 阴性对照孔(TSB); 2: 菌株XXLC08的无细胞发酵上清液加样孔; 3: 菌株XXLC06的无细胞发酵上清液加样孔。

Figure 6 Inhibitory effect of cell-free fermentation supernatants from two strains of antagonistic bacteria against *Nocardia seriolae*. 1: Negative control well (TSB); 2: Sample well containing cell-free fermentation supernatant from strain XXLC08; 3: Sample well containing cell-free fermentation supernatant from strain XXLC06.

现溶血圈现象, 即表现为不溶血。

### 2.6.2 菌株 XXLC06 和 XXLC08 的药敏试验结果

药敏试验结果显示(表 3), 菌株 XXLC06 和

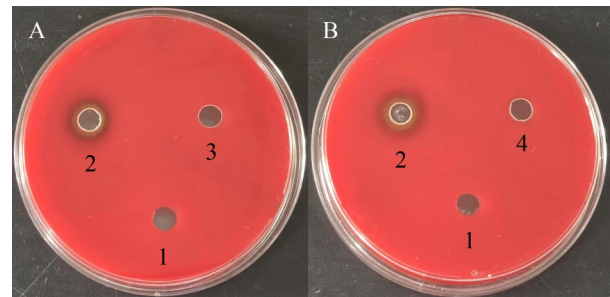


图7 两株拮抗菌的溶血性试验。A: 菌株XXLC06的溶血性结果; B: 菌株XXLC08的溶血性结果。1: 阴性对照孔(TSB); 2: 阳性对照孔(嗜水气单胞菌 XDMG); 3: 菌株XXLC06加样孔; 4: 菌株XXLC08加样孔。

Figure 7 Hemolytic test of two antagonistic bacterial strains. A: Hemolytic results for strain XXLC06; B: Hemolytic results for strain XXLC08. 1: Negative control well (TSB); 2: Positive control well (*A. hydrophila* XDMG); 3: The sample well with XXLC06 strain added; 4: The sample well with XXLC08 strain added.

XXLC08 对包括头孢哌酮、克拉霉素、氯霉素在内的 23 种抗菌药物表现出敏感性, 而对红霉素则呈现中度敏感。

表3 菌株XXLC06和XXLC08的药物敏感性试验结果

Table 3 Drug susceptibility test results of strains XXLC06 and XXLC08

受试药物 Test drug	标准抑菌圈直径			Strain XXLC06		Strain XXLC08	
	Standard inhibition zone diameter (mm)			抑菌圈直径 Inhibition zone diameter (mm)	敏感度 Sensitivity	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter (mm)	敏感度 Sensitivity
	不敏感 Insensitive (R)	中度敏感 Moderately sensitive (I)	敏感 Sensitive (S)				
头孢哌酮 Cefoperazone	≤15	16–20	≥21	28	S	27	S
头孢曲松 Ceftriaxone	≤13	14–20	≥21	27	S	27	S
头孢拉定 Cephadrine	≤14	15–17	≥18	30	S	30	S
头孢噻吩 Cephalothin	≤14	15–17	≥18	25	S	22	S
头孢他啶 Ceftazidime	≤14	15–17	≥18	21	S	19	S
氨苄西林 Ampicillin	≤11	12–14	≥15	32	S	35	S
美罗培南 Meropenem	≤13	14–15	≥16	26	S	23	S
青霉素G Penicillin G	≤19	20–27	≥28	37	S	36	S
红霉素 Erythromycin	≤13	14–22	≥23	18	I	19	I
克拉霉素 Clarithromycin	≤13	14–17	≥18	27	S	26	S
氯霉素 Chloramphenicol	≤12	13–17	≥18	22	S	24	S
克林霉素 Clindamycin	≤14	15–20	≥21	24	S	27	S
链霉素 Streptomycin	≤11	12–14	≥15	23	S	20	S
阿米卡星 Amikacin	≤14	15–16	≥17	25	S	31	S
大观霉素 Spectinomycin	≤14	15–17	≥18	25	S	23	S
万古霉素 Vancomycin	≤14	15–16	≥17	25	S	22	S
复方新诺明 Sulfamethoxazole	≤10	11–15	≥16	35	S	37	S
利福平 Rifampicin	≤16	17–19	≥20	26	S	27	S
氧氟沙星 Ofloxacin	≤12	13–15	≥16	28	S	24	S
诺氟沙星 Norfloxacin	≤12	13–16	≥17	22	S	24	S
环丙沙星 Ciprofloxacin	≤15	16–20	≥21	25	S	24	S
四环素 Tetracycline	≤14	15–18	≥19	27	S	30	S
多西环素 Doxycycline	≤12	13–15	≥16	29	S	31	S
米诺环素 Minocycline	≤14	15–18	≥19	29	S	30	S

### 2.6.3 菌株 XXLC06 和 XXLC08 的急性攻毒试验结果

对各组大口黑鲈分别腹腔注射 100  $\mu\text{L}$  无菌生理盐水 (NaCl 的质量分数为 0.65%)、 $1.0 \times 10^8$  CFU/mL 的 XXLC06、 $1.0 \times 10^8$  CFU/mL 的 XXLC08, 结果显示拮抗菌攻毒实验组大口黑鲈未表现出异常反应, 与对照组相比无明显差异, 生理状态保持健康良好。此外, 实验全程未观察到大口黑鲈发病或死亡现象(表 4)。

## 3 讨论

### 3.1 肠道源潜在益生菌的分离鉴定及环境适应性分析

大口黑鲈作为一种广泛养殖的淡水经济鱼类, 因其肉质鲜美而受到市场青睐。然而, 在养殖过程中由鳊鱼诺卡氏菌引起的慢性肉芽肿病发病率逐渐上升, 对该鱼类的健康养殖构成严重威胁<sup>[20]</sup>。目前该病的防治主要依赖化学药物和抗生素, 但这类方法存在显著局限性, 包括药物残留积累、诱导病原菌产生耐药性, 以及对养殖环境和食品安全带来潜在风险<sup>[20-22]</sup>。因此, 研发更为安全且高效的防治措施显得尤为重要。

在水产养殖中, 向养殖水体和饵料中添加益生菌可有效调节并优化养殖生态环境及养殖生物肠道微生态, 从而增强养殖动物免疫力, 抑制病原微生物增殖, 降低病害发生率<sup>[23-24]</sup>。

水产益生菌的来源主要依据其与养殖动物的关系分为 2 类: 一类是宿主源性菌株, 即从养殖目标动物肠道或其生活的水体环境中分离、筛选出的土著菌种; 另一类是从非目标宿主或土壤、发酵食品等其他非养殖环境中筛选获得, 并经适应性验证后引入养殖系统的非宿主源性菌株<sup>[25]</sup>。鉴于生存环境存在差异, 水生动物肠道菌群组成可能与陆生动物有所不同<sup>[26]</sup>; 因此, 在筛选具有特定功能的潜在益生菌时菌株的来源至关重要; 不恰当使用非水生来源的商业益生菌通常会降低其对水生动物的免疫调节作用及生长促进效果<sup>[18]</sup>。目前, 关于大口黑鲈肠道益生菌的筛选及其在防治鱼类诺卡氏菌病方面的相关研究鲜有报道。因此, 本研究从大口黑鲈肠道中筛选对鳊鱼诺卡氏菌具有拮抗作用的潜在益生菌, 最终获得 2 株拮抗效果较为良好的菌株 XXLC06 和 XXLC08。

通过菌株形态学观察、理化特性试验分析、16S rRNA 基因序列比对以及系统发育树构建对菌株 XXLC06 和 XXLC08 进行鉴定, 确定 2 菌株分别为拟长杆状赖氨酸芽孢杆菌和纺锤状赖氨酸芽孢杆菌。菌株 XXLC06 和 XXLC08 在温度 25–37  $^{\circ}\text{C}$ 、盐度 5‰–30‰ 范围内生长态势良好, 与 Kanbe 等<sup>[27]</sup>的研究结果基本一致。大口黑鲈最适宜生长水温为 28.1–28.6  $^{\circ}\text{C}$ , 其养殖水体盐度通常低于 5‰<sup>[28-29]</sup>。由此可见, 这 2 株拮抗菌在鲈鱼适宜生长的温度区间及养殖水域环境中具备生长优势, 能够在较短时间内实现快

表4 菌株XXLC06和XXLC08的安全性试验

Table 4 Safety tests of strains XXLC06 and XXLC08

注射样本类型 Injection sample type	宿主 Host	含菌量 Bacterial content (CFU/mL)	死亡数 Death count
无菌生理盐水(NaCl的质量分数为0.65%) Sterile saline solution (0.65% NaCl by mass)	大口黑鲈 <i>Micropterus salmoides</i>	0	0
XXLC06	大口黑鲈 <i>Micropterus salmoides</i>	$1.0 \times 10^8$	0
XXLC08	大口黑鲈 <i>Micropterus salmoides</i>	$1.0 \times 10^8$	0

速大量增殖, 进而产生抗菌物质并发挥潜在益生作用。益生菌作为一类有益微生物, 常被添加至鱼类饲料中, 经口服途径在宿主肠道内定殖并对其健康产生积极促进作用<sup>[30]</sup>。大口黑鲈的消化进程涉及不同酸碱度及胆盐环境, 其中胃部环境呈酸性, 肠道环境则相对偏弱碱性<sup>[31]</sup>; 此外, 进食前肠道内胆盐浓度较低; 摄食后, 随着食物在胃部逐渐消化并将食糜送入肠道, 胆囊收缩并分泌胆汁, 导致肠道内胆盐浓度升高<sup>[32]</sup>。因此, 益生菌的酸碱耐受性及其在胆盐环境中的生存能力是影响益生菌能否在到达胃肠环境后发挥益生作用的关键因素。本研究中, 菌株 XXLC06 和 XXLC08 在 pH 5.5–9.0 及胆盐浓度  $\leq 0.5\%$  条件下的生长适应性与姚雨馨<sup>[33]</sup> 从大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 肠道中筛选的赖氨酸芽孢杆菌 (*Lysinibacillus*) 对环境的耐受性特征相似, 表明 2 株拮抗菌具有作为水产益生菌的应用潜力。然而, 鉴于其对酸性环境的耐受性较弱, 如何开发保护机制以确保其顺利通过鲈鱼胃部的酸性屏障仍需进一步研究。

### 3.2 益生菌的黏附性能及抑菌实验分析

益生菌能否在宿主肠道黏膜表面实现稳定附着是其发挥潜在益生功效的关键前提。研究表明, 具备较强黏附能力的益生菌能够更有效地在肠道黏膜表面定殖, 进而形成稳定的菌群<sup>[9,34]</sup>。此外, 益生菌可通过分泌特定抗菌物质抑制有害菌的生长, 同时促进有益菌的增殖, 以维系肠道微生态的平衡<sup>[35]</sup>。Del Re 等<sup>[36]</sup> 研究发现, 菌株的自聚集率和疏水率与其黏附能力密切相关。菌株与病原菌的共聚集效应既能表征菌株的黏附能力, 也能够反映菌株对病原菌的拮抗能力<sup>[19]</sup>。乔硕<sup>[37]</sup> 对筛选的赖氨酸芽孢杆菌 G117 进行细胞表面理化性质测定, 结果表明试验菌株 5 h 后的自聚集率为 87.68%, 其在三氯甲烷和二甲苯中的疏水率分别达到 92.11% 和 90.36%; 本研究 2 株菌的自聚集率及在 3 种有机溶剂中的疏水率虽均低于菌株 G117, 但已处于较高水平。在一定时间内, 2 株菌的自聚集率

以及与病原菌的共聚集率随时间的推移而升高, 这一结果与大多数研究者对菌株黏附能力的测定结果趋于一致<sup>[19,38-39]</sup>。

目前, 针对赖氨酸芽孢杆菌的研究主要集中在其在环境修复与促进植物生长领域的应用, 而该菌属在水生动物致病菌生物防治方面的潜力尚未得到充分探索。已有研究报道, 赖氨酸芽孢杆菌分泌的细菌素具有一定的物理稳定性和广谱抑菌潜力<sup>[40]</sup>。Fang 等<sup>[41]</sup> 从鲤科鱼类肠道中分离得到赖氨酸芽孢杆菌, 经研究验证该菌株的无细胞上清液对嗜水气单胞菌 (*A. hydrophila*) 和迟钝爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 具有较强的抑制作用。此外, 饲喂该菌能够提升养殖鱼类的饲料利用率, 并且有助于维护宿主肠道健康。Zhou 等<sup>[42]</sup> 筛选获得的球形赖氨酸芽孢杆菌 (*Lysinibacillus sphaericus*) 可显著促进杂交鳢 (*Channa maculata* ♀ × *Channa argus* ♂) 的生长, 提高肠道消化酶活性, 并在人工感染鲫鱼诺卡氏菌后降低杂交鳢的死亡率。本研究揭示了拟长杆状赖氨酸芽孢杆菌 XXLC06、纺锤状赖氨酸芽孢杆菌 XXLC08 及其无细胞发酵产物对鲫鱼诺卡氏菌的抑制作用。2 株菌的无细胞发酵上清液对鲫鱼诺卡氏菌的抑菌活性与已报道的拮抗菌 LF01<sup>[18]</sup> 的效果相近 (平均抑菌圈直径 28.3 mm), 这表明 2 株菌同样具有良好的抑菌效果, 具备用于防控鱼类诺卡氏菌病的潜力。

### 3.3 益生菌的生物安全性分析

随着水产养殖集约化程度的不断提高, 合理应用益生菌已成为确保养殖生物健康和改善养殖环境的关键措施。在评估益生菌的生物安全性时, 需要从多个角度进行综合考量, 包括确保益生菌无溶血活性、无抗生素耐药性, 以及对宿主无毒性风险。在血琼脂平板上, 根据细菌对红细胞的溶解作用差异, 可将其分为 3 种溶血类型 ( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ ); 其中,  $\beta$  溶血型细菌能产生强效溶血素, 致使红细胞完全溶解, 通常具有较强的致病性, 不宜作为益生菌候选株;  $\alpha$  溶血型细菌可引起红细胞部分溶解, 虽其溶血活性

相对较弱,但仍可能存在潜在的致病风险;而 $\gamma$ 溶血型细菌不产生溶血素,无红细胞溶解现象,因此更符合潜在益生菌的安全性要求<sup>[43]</sup>。薛媛<sup>[44]</sup>从凡纳滨对虾养殖池塘的水体和底泥中分离获得的菌株 GXW1,经鉴定为不溶血的 $\gamma$ 类型赖氨酸芽孢杆菌;在后续的动物实验研究中发现菌株 GXW1 能够优化对虾的肠道微生物群落结构,提升有益菌的丰度,并且可有效抑制潜在致病菌的数量;这表明不具有溶血性的 GXW1 菌株在对虾养殖领域具备潜在的应用价值。

当细菌具备或演化出能够规避药物作用机制的能力时,即形成抗生素耐药性<sup>[45]</sup>。研究表明,耐药菌株能够通过多种机制传播耐药性,例如借助质粒及其他遗传元件进行水平基因转移<sup>[46]</sup>。因此,在益生菌筛选过程中对候选菌株进行药物敏感性试验是评估其安全性的关键环节。本研究对菌株 XXLC06 和 XXLC08 进行了系统的生物安全性评估。急性攻毒试验中鲈鱼未出现任何异常反应或死亡现象;溶血试验显示 2 株菌均无溶血活性,药敏试验表明其对 23 种受试抗菌药物均敏感,提示 2 株菌不产生溶血素且未携带相关耐药基因,在应用中不存在向其他菌种传播耐药因子的风险。综合表明,菌株 XXLC06 和 XXLC08 具备良好的生物安全性,契合益生菌筛选的基本准则。

## 4 结论

本研究从健康大口黑鲈肠道筛选获得拟长杆状赖氨酸芽孢杆菌 XXLC06 与纺锤状赖氨酸芽孢杆菌 XXLC08; 2 株菌在温度 25–37 °C 范围和盐度 5%–30‰ 条件下生长良好,同时具备耐碱性、胆盐耐受性及较强的黏附能力。此外,2 菌株及其无细胞发酵上清液对鲈鱼诺卡氏菌均具有显著抑制作用。安全性评估显示,2 株菌均无溶血活性且对 23 种受试抗菌药物敏感;急性攻毒试验中试验鱼未见异常反应。综上所述,XXLC06 和 XXLC08 符合益生菌安全性标

准,具备了开发为防控鱼类诺卡氏菌病的益生菌制剂的良好基础。

## 作者贡献声明

刘宸源:提出概念、方案设计、执行实验、数据收集与分析、文章撰写与修改;毛会丽:项目管理、经费支持;王乾坤:提出概念、执行实验、数据分析、稿件润色修改;张苻苻:执行实验、数据收集整理;申长春:执行实验、数据监督;朱黎星:实验进程监督;关树豪:提出概念、数据整理;孟攀:提供实验材料;楚燕星:数据核对;李旭东:项目管理、获取基金;关建议:提出概念、项目管理、论文审阅、获取基金。

## 参考文献

- [1] 赵孟杰,徐鑫,王剑桥,李方希,李澳,董小敬.饥饿胁迫对大口黑鲈肌肉营养成分和肉质的影响[J].淡水渔业,2025,55(3):42-52.  
ZHAO MJ, XU X, WANG JQ, LI FX, LI A, DONG XJ. Effects of starvation stress on nutrient composition and flesh quality of *Micropterus salmoides*[J]. Freshwater Fisheries, 2025, 55(3): 42-52 (in Chinese).
- [2] 陈琛,郝淑贤,岑剑伟,黄卉,赵永强,魏涯,杨少玲.低温暂养对大口黑鲈抗氧化能力及鳃组织结构的影响[J].南方水产科学,2025,21(3):169-179.  
CHEN C, HAO SX, CEN JW, HUANG H, ZHAO YQ, WEI Y, YANG SL. Impact of low-temperature acclimation on antioxidant capacity and gill tissue structure of *Micropterus salmoides*[J]. South China Fisheries Science, 2025, 21(3): 169-179 (in Chinese).
- [3] 朱喜锋,李诗洋,胡俊茹,梁浩辉,黄燕华,周萌,王国霞.大口黑鲈稚鱼赖氨酸需求量研究[J].水产科学,2025,44(2):295-302.  
ZHU XF, LI SY, HU JR, LIANG HH, HUANG YH, ZHOU M, WANG GX. Requirement of largemouth bass juveniles for dietary lysine[J]. Fisheries Science, 2025, 44(2): 295-302 (in Chinese).
- [4] 吕丽丽,梅飞,曹守林,郭佳静,李槿年.加州鲈源鲈鱼诺卡氏菌的分离鉴定及致病性[J].微生物学通报,2021,48(12):4765-4775.  
LÜ LL, MEI F, CAO SL, GUOJIA J, LI JN. Isolation, identification and pathogenicity of *Nocardia seriolae* from *Micropterus salmoides*[J]. Microbiology China, 2021, 48(12): 4765-4775 (in Chinese).
- [5] LIU HT, WANG SF, CAI Y, GUO XH, CAO ZJ, ZHANG YZ, LIU SB, YUAN W, ZHU WW, ZHENG Y, XIE ZY, GUO WL, ZHOU YC. Dietary administration of *Bacillus subtilis* HAINUP40 enhances growth, digestive enzyme

- activities, innate immune responses and disease resistance of tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 60: 326-333.
- [6] AMOAH K, TAN BP, ZHANG S, CHI SY, YANG QH, LIU HY, YANG YZ, ZHANG HT, DONG XH. Host gut-derived *Bacillus* probiotics supplementation improves growth performance, serum and liver immunity, gut health, and resistive capacity against *Vibrio harveyi* infection in hybrid grouper (♀ *Epinephelus fuscoguttatus* × ♂ *Epinephelus lanceolatus*)[J]. *Animal Nutrition*, 2023, 14: 163-184.
- [7] ZHANG DF, XIONG XL, WANG YJ, GAO YX, REN Y, WANG Q, SHI CB. *Bacillus velezensis* WLYS23 strain possesses antagonistic activity against hybrid snakehead bacterial pathogens[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2021, 131(6): 3056-3068.
- [8] SAIDUMOHAMED BE, GANAPATHY BHAT S. Indian oil sardine (*Sardinella longiceps*) gut derived *Bacillus safensis* SDG14 with enhanced probiotic competence for food and feed applications[J]. *Food Research International*, 2021, 150: 110475.
- [9] AMOAH K, DONG XH, TAN BP, ZHANG S, KUEBUTORNYE FKA, CHI SY, YANG QH, LIU HY, ZHANG HT, YANG YZ. *In vitro* assessment of the safety and potential probiotic characteristics of three *Bacillus* strains isolated from the intestine of hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂)[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2021, 8: 675962.
- [10] LIAO JQ, CAI Y, WANG XR, SHANG CX, ZHANG Q, SHI HZ, WANG SF, ZHANG DD, ZHOU YC. Effects of a potential host gut-derived probiotic, *Bacillus subtilis* 6-3-1, on the growth, non-specific immune response and disease resistance of hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂)[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2021, 13(4): 1119-1137.
- [11] XU R, DING FF, ZHOU NN, WANG T, WU HX, QIAO F, CHEN LQ, DU ZY, ZHANG ML. *Bacillus amyloliquefaciens* protects Nile tilapia against *Aeromonas hydrophila* infection and alleviates liver inflammation induced by high-carbohydrate diet[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022, 127: 836-842.
- [12] NIU KM, KOTHARI D, LEE WD, LIM JM, KHOSRAVI S, LEE SM, LEE BJ, KIM KW, HAN HS, KIM SK. Autochthonous *Bacillus licheniformis*: probiotic potential and survival ability in low-fishmeal extruded pellet aquafeed[J]. *MicrobiologyOpen*, 2019, 8(6): e00767.
- [13] 管立平, 谢晶晶, 李伟豪, 陈昊震, 温振中, 孙成波. 一种赖氨酸芽孢杆菌对凡纳滨对虾生长和水质影响[J]. *渔业现代化*, 2022, 49(6): 77-83.
- GUAN LP, XIE JJ, LI WH, CHEN HZ, WEN ZZ, SUN CB. Effects of a *Lysinibacillus* strain on the growth and water quality of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Fishery Modernization*, 2022, 49(6): 77-83 (in Chinese).
- [14] 于珺妃, 夏邦华, 郝其睿, 邹昊博, 王鹏, 陈中祥, 高磊, 吴松, 黄丽, 覃东立, 韩英. 一株鲤源降血糖赖氨酸芽孢杆菌的筛选鉴定及其培养基优化[J]. *大连海洋大学学报*, 2022, 37(4): 611-619.
- YU JF, XIA BH, HAO QR, ZOU HB, WANG P, CHEN ZX, GAO L, WU S, HUANG L, QIN DL, HAN Y. Screening, identification and culture medium optimization of a hypoglycemic *Lysinibacillus fusiformis* strain from common carp[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2022, 37(4): 611-619 (in Chinese).
- [15] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- DONG XZ, CAI MY. Handbook for Identification of Common Bacterial Systems[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese).
- [16] 布坎南 RE, 吉本斯 NE. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组译. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8版. 北京: 科学出版社, 1984.
- [17] 王倩楠, 冯妍, 贾凌晨, 刘有华, 皮乔木, 徐思琪, 李联泰, 蔡月凤, 安贤惠. 泥鳅鳃出血病病原菌及其拮抗菌的分离鉴定[J]. *水产科学*, 2022, 41(5): 778-787.
- WANG QN, FENG Y, JIA LC, LIU YH, PI QM, XU SQ, LI LT, CAI YF, AN XH. Isolation and identification of pathogenic bacteria and antagonistic bacteria in loach gill haemorrhagic disease[J]. *Fisheries Science*, 2022, 41(5): 778-787 (in Chinese).
- [18] 高艳侠, 张德锋, 可小丽, 刘志刚, 衣萌萌, 王森, 韩雪晴, 卢迈新. 罗非鱼源无乳糖链球菌肠道拮抗芽孢杆菌的筛选及其生物学特性[J]. *微生物学报*, 2019, 59(5): 926-938.
- GAO YX, ZHANG DF, KE XL, LIU ZG, YI MM, WANG M, HAN XQ, LU MX. Selection and characterization of intestinal *Bacillus* strain antagonistic against pathogenic *Streptococcus agalactiae* of tilapia[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(5): 926-938 (in Chinese).
- [19] 向鑫玲, 张英春, 马放, 张兰威, 李少慧. 乳酸杆菌的表面特性及其黏附能力的研究[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(7): 126-130, 136.
- XIANG XL, ZHANG YC, MA F, ZHANG LW, LI SH. Surface properties and adhesion ability of *Lactobacillus*[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(7): 126-130, 136 (in Chinese).
- [20] LEI XP, ZHAO RX, GENG Y, WANG KY, YANG PO, CHEN DF, HUANG XL, ZUO ZC, HE CL, CHEN ZL, HUANG C, GUO HR, LAI WM. *Nocardia seriolae*: a serious threat to the largemouth bass *Micropterus salmoides* industry in Southwest China[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2020, 142: 13-21.
- [21] 杨娜, 黄雷, 蔺凌云, 姚嘉赟, 陈静, 刘忆瀚, 陈雪兰, 王亿文, 沈锦玉, 潘晓艺. 大口黑鲈鳃诺卡氏菌传代弱毒株特性及免疫效果评价[J]. *水生生物学报*, 2024, 48(7): 1120-1129.

- YANG N, HUANG L, LIN LY, YAO JY, CHEN J, LIU YH, CHEN XL, WANG YW, SHEN JY, PAN XY. Characteristics and immunoprotective effects of attenuated *Nocardia seriolae* from largemouth bass induced by continuous passaging[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2024, 48(7): 1120-1129 (in Chinese).
- [22] 袁思平, 王国良, 金珊. 养殖鱼类致病诺卡氏菌研究进展[J]. *微生物学通报*, 2006, 33(2): 137-141.
- YUAN SP, WANG GL, JIN S. Review of pathogenic nocardias in cultured fish[J]. *Microbiology China*, 2006, 33(2): 137-141 (in Chinese).
- [23] 张超, 王祥红, 徐涛, 李帅, 钱浩, 李帅, 张增虎. 一株解淀粉芽孢杆菌的分离鉴定及其抑菌条件研究[J]. *生物技术通报*, 2015, 31(9): 170-176.
- ZHANG C, WANG XH, XU T, LI S, QIAN H, LI S, ZHANG ZH. Isolation and identification of *Bacillus amyloliquefaciens* WTD and the optimal conditions of its antimicrobial activity[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2015, 31(9): 170-176 (in Chinese).
- [24] 邓希海, 黄进, 刘哲. 微生物生态制剂对鲈鱼生长性能、血清生化指标、抗氧化能力和免疫力的影响[J]. *中国饲料*, 2022(12): 62-65.
- DENG XH, HUANG J, LIU Z. Effects of microecological agents on growth performance, biochemical indexes, antioxidant capacity and immunity of Perch[J]. *China Feed*, 2022(12): 62-65 (in Chinese).
- [25] WANKA KM, DAMERAU T, COSTAS B, KRUEGER A, SCHULZ C, WUERTZ S. Isolation and characterization of native probiotics for fish farming[J]. *BMC Microbiology*, 2018, 18(1): 119.
- [26] SIMÓN R, DOCANDO F, NUÑEZ-ORTIZ N, TAFALLA C, DÍAZ-ROSALES P. Mechanisms used by probiotics to confer pathogen resistance to teleost fish[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 653025.
- [27] KANBE H, SANO Y, MISE K, KANIE S, USHIJIMA N, KAWANO K, KIHARA M, ITOH H. *Lysinibacillus piscis* sp. nov. isolated from the gut of mottled spinefoot *Siganus fuscescens*[J]. *Archives of Microbiology*, 2024, 206(5): 228.
- [28] 孙永旭, 董宏标, 王文豪, 曹明, 段亚飞, 李华, 刘青松, 张家松. 温度对大口黑鲈幼鱼不同组织抗氧化能力及免疫相关蛋白表达的影响[J]. *生态科学*, 2019, 38(3): 18-25.
- SUN YX, DONG HB, WANG WH, CAO M, DUAN YF, LI H, LIU QS, ZHANG JS. Effects of temperature on antioxidant capacity and immune associated protein expression in different tissues and organs of juvenile *Micropterus salmoides*[J]. *Ecological Science*, 2019, 38(3): 18-25 (in Chinese).
- [29] 王迎伟. 盐度和pH对大口黑鲈幼鱼生长及生理状态和相关基因表达的影响[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2023.
- WANG YW. Effects of salinity and pH on growth, physiological state and related gene expression of large mouth bass larvae[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2023 (in Chinese).
- [30] AKHTER N, WU B, MEMON AM, MOHSIN M. Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: a review[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 45(2): 733-741.
- [31] 迟良. 大菱鲆消化系统及相关蛋白酶发生发育的研究[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2013.
- CHI L. Study on the occurrence and development of digestive system and protease of turbot (*Scophthalmus maximus*)[D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2013 (in Chinese).
- [32] 李静. 基于高分辨质谱技术的鲟鱼胆盐谱分析及摄食后胆盐代谢规律研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2024.
- LI J. Analysis of sturgeon bile salt profile based on high-resolution mass spectrometry and study of bile salt metabolism pattern after feeding[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2024 (in Chinese).
- [33] 姚雨馨. 大黄鱼肠道益生菌的筛选及其益生效果的研究[D]. 厦门: 集美大学, 2025.
- YAO YX. Screening of the intestinal probiotics and beneficial effect of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[D]. Xiamen: Jimei University, 2025 (in Chinese).
- [34] 赵浩航, 汪志文, 温依铭, 夏洪丽, 喻大鹏, 甘楨, 夏立群, 鲁义善. 乌鳢肠道芽孢杆菌的分离鉴定及益生特性评估[J]. *水生生物学报*, 2025, 49(6): 3-13.
- ZHAO HH, WANG ZW, WEN YM, XIA HL, YU DP, GAN Z, XIA LQ, LU YS. Isolation, identification, and evaluation of *Bacillus* properties of intestinal *Bacillus* from *Channa argus*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2025, 49(6): 3-13 (in Chinese).
- [35] DE BC, MEENA DK, BEHERA BK, DAS P, DAS MOHAPATRA PK, SHARMA AP. Probiotics in fish and shellfish culture: immunomodulatory and ecophysiological responses[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2014, 40(3): 921-971.
- [36] Del RE B, SGORBATI B, MIGLIOLI M, PALENZONA D. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2000, 31(6): 438-442.
- [37] 乔硕. 赖氨酸芽孢杆菌 G117 益生作用的初步研究[D]. 烟台: 中国科学院大学(中国科学院烟台海岸带研究所), 2024.
- QIAO S. A preliminary study on the probiotic effects of *Lysinibacillus* sp. G117[D]. Yantai: Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, 2024 (in Chinese).
- [38] 秦振宇, 肖睿铭, 梁书利, 林影. 鳙鱼肠道菌群多样性及潜在益生菌的分离鉴定[J]. *现代食品科技*, 2023, 39(5): 41-52.
- QIN ZN, XIAO RM, LIANG SL, LIN Y. Diversity of gut microbiota in bighead carp and the isolation and identification of potential probiotics[J]. *Modern Food*

- Science and Technology, 2023, 39(5): 41-52 (in Chinese).
- [39] 朱琦琦, 何维, 余东梅, 赵俊梅, 曹阳, 吴任之, 胡欣洁. 产纤溶酶的乳酸菌筛选及其潜在益生特性[J]. 基因组学与应用生物学, 2021, 40(S2): 2626-2634.
- [40] AHMAD V, MUHAMMAD ZAFAR IQBAL AN, HASEEB M, KHAN MS. Antimicrobial potential of bacteriocin producing *Lysinibacillus* jx416856 against foodborne bacterial and fungal pathogens, isolated from fruits and vegetable waste[J]. *Anaerobe*, 2014, 27: 87-95.
- [41] FANG ZX, KUANG XY, LI YH, YU RX, WANG F, LUO SW. Comparative analysis of the probiotic features of *Lysinibacillus* and *Enterobacter* strains isolated from gut tract of triploid cyprinid fish[J]. *Current Microbiology*, 2025, 82(2): 91.
- [42] ZHOU TT, CAI P, LI JW, LI ZS, DAN XM, HUANG XD, ZHANG XY. Whole genome analysis of intestinal source *Bacillus* and its effect on the prevention and control of hybrid snakehead (*Channa maculata* ♀ × *Channa argus* ♂) nocardiosis[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2024, 11: 1254806.
- [43] MOHKAM M, NEZAFAT N, BERENJIAN A, ZAMANI M, DABBAGH F, BIGHARAZ R, GHASEMI Y. Multifaceted toxin profile of *Bacillus* probiotic in newly isolated *Bacillus* spp. from soil rhizosphere[J]. *Biologia*, 2020, 75(2): 309-315.
- [44] 薛媛. 赖氨酸芽孢杆菌属和鼻甲海神单胞菌的分离鉴定及其应用潜力评估[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2023.  
XUE Y. Isolation and identification of *Lysinibacillus* sp. and *Neptunomonas concharum* and evaluation of application potential[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2023 (in Chinese).
- [45] CHRISTAKI E, MARCOU M, TOFARIDES A. Antimicrobial resistance in bacteria: mechanisms, evolution, and persistence[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2020, 88(1): 26-40.
- [46] NOOR UDDIN GM, LARSEN MH, CHRISTENSEN H, AARESTRUP FM, PHU TM, DALSGAARD A. Identification and antimicrobial resistance of bacteria isolated from probiotic products used in shrimp culture[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0132338.