

两株对虾育苗用益生芽孢杆菌的筛选和鉴定

温崇庆^{1,2} 赖心田² 何红³ 薛明¹ 周世宁²

(1. 广东海洋大学水产学院, 湛江 524088; 2. 中山大学生命科学学院, 广州 510275; 3. 广东海洋大学农学院, 湛江 524088)

摘要:从土壤和虾池中分离到22株具有不同特征的芽孢杆菌,分别将各菌株对数期约 5×10^8 个细胞添加到500mL预先加有凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)无节期幼体的水体中,各菌株在初始水体中含量均约为 10^6 个细胞/mL,根据各菌株对无节期到蚤状期幼体变态成活率的影响,从中初步筛选出10株对幼体变态成活有极显著($p < 0.01$)效果的芽孢杆菌。进一步又从初筛到的10个菌株中复筛到2株对幼体变态成活最为明显的芽孢杆菌,菌株zou4和zou8。两菌株与复筛的其他8株芽孢杆菌相比,均显著($p < 0.05$)促进幼体变态存活率。根据形态和生理生化特征,菌株zou4和zou8分别初步鉴定为坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*)和蜡状芽孢杆菌(*B. cereus*)。为进一步确定zou4和zou8的分类地位,测定了两菌株的16S rRNA基因序列,分析了相关细菌16S rDNA序列的同源性,构建了系统发育树。结果表明菌株zou4和zou8分别与坚强芽孢杆菌和蜡状芽孢杆菌的同源性最高,相似值均为99%以上。系统发育树上zou4和zou8也分别与坚强芽孢杆菌和蜡状芽孢杆菌聚为一类。综合上述结果,芽孢杆菌zou4和zou8菌株分别被鉴定为坚强芽孢杆菌和蜡状芽孢杆菌。

关键词: 益生菌;芽孢杆菌;筛选;鉴定;凡纳滨对虾;幼体

中图分类号: S917.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2007)04-0453-07

随着高密度集约化水产养殖业迅猛发展,养殖水体自身和外源污染加剧,使用化学药物产生负面作用。因此,目前生态养殖日益受到重视,特别是益生菌在水产养殖中的应用取得显著效果^[1,2]。育苗是水产养殖中的重要环节,其成败涉及到病害、水质、营养等诸多环境因素。最近十几年,在水产动物育苗中选择和应用益生菌促进幼体存活的研究已有不少报道,且多集中于特定病害防治上^[3,4]。芽孢杆菌属(*Bacillus*)细菌在自然界中普遍存在,极少有对水产动物致病性菌株,是广泛用于水产养殖特别是对虾养殖的益生菌种^[5-10]。凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*),又称南美白对虾,属十足目,对虾属,是迄今世界养殖产量最高的三大优质虾种之一,也是目前我国对虾养殖的最主要品种。本文从促进幼体变态存活角度报道两株凡纳滨对虾育苗用于益生芽孢杆菌的筛选和鉴定,以为水产益生菌的筛选和应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验菌株及培养基 编号分别为 zou1-zou22

的22株芽孢杆菌,是从湛江市广东海洋大学附近肥沃农田土壤和东海岛凡纳滨对虾海水养殖池底泥中最初分离纯化的芽孢杆菌,根据来源、形态和生理生化特征选择具有不同特征的代表性菌株作为筛选对象,其中zou1-zou7来自虾池底泥,zou8-zou22来自农田土壤。

以上菌株的分离或培养除特殊说明外均采用海水营养肉汤培养基(牛肉膏3g,蛋白胨10g,陈海水1000mL,pH 8.0,固体加琼脂粉12g)。

1.2 对虾幼体及海水 试验用凡纳滨对虾幼体,取自湛江东海岛对虾育苗场,选择同一池,同一批受精卵,趋光性强,刚发育至无节期(N₃)幼体(不同变态期幼体表示方法:N表示无节幼体,Z表示蚤状幼体,下标数字表示变态期分期,以下同)。试验用海水为天然海水,经沉淀、过滤,盐度28.8‰—30.6‰,pH 8.0—8.2。

1.3 益生芽孢杆菌初筛 分别将各待筛选菌株培养至对数中后期,4000r/min离心10min,弃上清,无菌海水离心漂洗两次,制备较高浓度菌悬液,根据血

收稿日期:2006-01-06;修订日期:2007-01-25

基金项目:国家“863”项目(2003AA624010);广东海洋大学校团队项目(0412111)资助

作者简介:温崇庆(1974—),男,安徽郎溪人;讲师,在职博士研究生;主要从事海洋和水产微生物学研究。E-mail:wencq@gdou.edu.cn

通讯作者:周世宁,E-mail:lsszsl@mail.sysu.edu.cn

球计数板计数结果,调整菌悬液含量约为 5×10^8 个细胞/mL,4 保存,6h 内使用。试验用容器为 1L 烧杯,经 0.1% KMnO_4 消毒后用海水润洗数遍。凡纳滨对虾 N_3 幼体投放前经海水漂洗三次,用胶头滴管吸取 30 只趋光性强的幼体加入盛有 500mL 海水的烧杯中,加入待筛选菌悬液 1mL,使其在初始水体中含量约为 10^6 个细胞/mL,每个样两个平行,对照组不加菌,保持水温 $28(\pm 1)$,蚤状幼体期(Z_1)开始每 8h 定量投喂螺旋藻粉。整个试验过程不换水,不用药物。根据 N_3 幼体变态到 Z_2 时(约 100h 左右,下同)幼体存活情况,选择对幼体变态效果显著的菌株用于复筛。

1.4 益生芽孢杆菌复筛 幼体和细胞悬液的准备同 1.3 方法,每个烧杯中初始 N_3 幼体数为 50 只,并根据预试验中吸光值(A_{600})对应的稀释混合平板计数结果,分别调整初筛到的 10 株芽孢杆菌细胞悬液数量均为 5×10^8 CFU/mL,加入 1mL,使其在水体中最初含量为 10^6 CFU/mL,每个样三个平行。根据幼体 N_3 变态到 Z_2 后的存活率为标准,选择出对幼体变态效果最显著的菌株。

1.5 菌株常规鉴定 根据形态和生化指标^[11] 对筛选得到的编号 zou4 和 zou8 的两株芽孢杆菌(以下分别简称 zou4、zou8)进行常规鉴定。

1.6 16S rDNA 序列分析 采用 E. Z. N. A Bacterial DNA Kit (D3450-01, Omega) 提取 zou4 和 zou8 基因组。以总 DNA 为模板,引物为一对细菌 16S rDNA 通用引物,27F: 5'-AGAGTTTGATCTCTGGCTCAG-3' 和 1492R: 5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3'。以 Taq DNA 聚合酶进行 PCR 扩增,PCR 程序为 94 5min; 94 40s, 50 40s, 72 90s, 29 个循环; 72 10min。

PCR 产物纯化采用 E. Z. N. A Cycle-Pure Kit (D6493-01, Omega)。将纯化后的产物连接 pMD18-T Vector (TaKaRa),转化 *E. coli* DH5 感受态细胞,选择阳性转化子,由上海生工公司完成测序。

将测得 16S rDNA 序列与 GenBank 中核酸数据进行 BLAST 分析,选取已正式发表同源性最高的比对序列,并从 Ribosomal Database Project-II 中获得几种最常用益生芽孢杆菌^[12,13] (枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)、地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*)、凝结芽孢杆菌 (*B. coagulans*)、克劳氏芽孢杆菌 (*B. clausii*) 和巨大芽孢杆菌 (*B. megaterium*)) 模式菌株 16S rDNA 序列,以干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*, GenBank 登录号为 X61135) 为外类群,采用 Clustalx 1.8 进行序列比对,Phylip 3.65 进行统计和聚类分析,Neighbor joining 法构建系统发育树,并通过 Bootstrap 1000 次重复检验。

1.7 数据处理 对变态成活率数据先进行反正弦转换,作单因素方差分析 (ANOVA),处理间若差异显著,则作 Duncan's 多重比较, $p < 0.05$ 表示差异显著, $p < 0.01$ 表示差异极显著。实验分析软件是 SPSS Version 11.0。

2 结果

2.1 初筛结果

从 N_3 变态到 Z_1 时(约 32h 左右),实验组 22 株芽孢杆菌间和对照组对凡纳滨对虾幼体存活率均无明显影响,都在 90% 以上,且幼体活力均较强。但到 Z_2 时,各组存活率差异表现明显,结果(见图 1)。对照组 Z_2 幼体只有个别存活,且其活力已很弱,体表粘污严重,接近垂死状态;而实验组中除 zou3、16、21

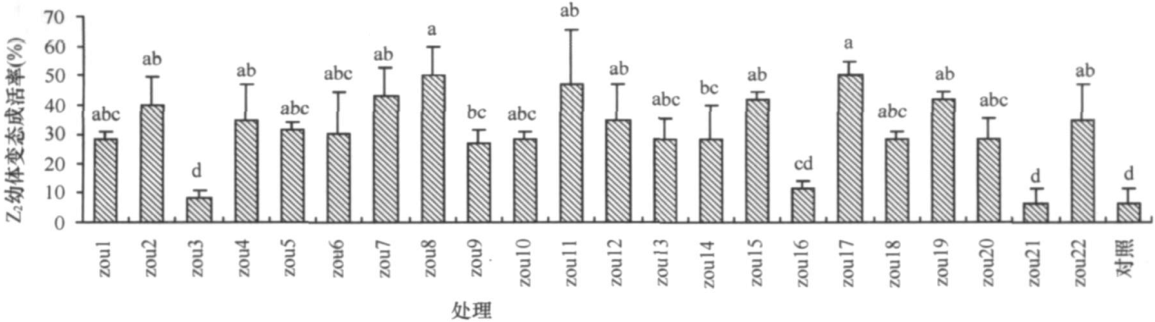


图 1 初筛芽孢杆菌对凡纳滨对虾幼体无节 期到蚤状 期存活率的影响

Fig. 1 The effects of *Bacillus* spp. used for initial screening on the survival rate of *Litopenaeus vannamei* larvae from nauplius to zoea
柱状图上不同字母表示差异显著, $p < 0.05$

The different letters above the column indicate significant difference, $p < 0.05$

组 Z_2 幼体活力情况与对照组表现相似外 ($p > 0.05$),其余各实验组幼体活力均较好,存活率与对照组相比,均表现显著提高 ($p < 0.05$);其中 zou2、4、7、8、11、12、15、17、19、22 组不仅与对照组相比表现极显著差异 ($p < 0.01$),且与其他实验组相比也表现显著差异 ($p < 0.05$),存活幼体活力强,体表很少粘污,游动迅速,摄食和拖便现象明显,因此选择此 10 株芽孢杆菌作为进一步筛选对象。

2.2 复筛结果

复筛 10 株芽孢杆菌对 N_3 变态到 Z_2 时的存活率影响见图 2。与初筛结果相似,同对照相比,这 10

株芽孢杆菌对 Z_2 幼体变态存活率均表现极显著促进作用 ($p < 0.01$),幼体活力明显,特别是 zou4 和 zou8 组效果最好, Z_2 幼体存活率分别为 50 % 左右,均显著高于其他 8 株芽孢杆菌 ($p < 0.05$)。因此,最后选择 zou4 和 zou8 作为两株潜在的凡纳滨对虾育苗用益生芽孢杆菌。

2.3 形态和生理生化特征

根据形态(表 1)和生理生化特征(表 2),zou4 和 zou8 分别与坚强芽孢杆菌 (*B. firmus*) 和蜡状芽孢杆菌 (*B. cereus*) 最相近,因此菌株 zou4 和 zou8 分别初步鉴定为 *B. firmus* 和 *B. cereus*。

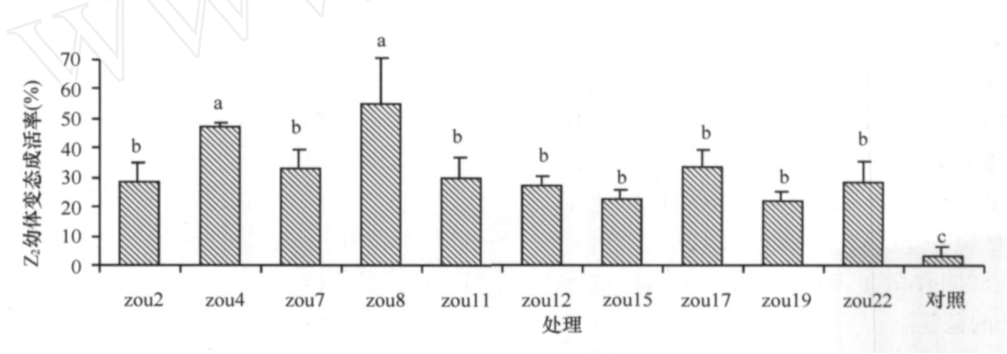


图 2 复筛芽孢杆菌对凡纳滨对虾幼体无节 期到蚤状 期存活率的影响

Fig. 2 The effects of *Bacillus* spp. used for second screening on the survival rate of *Litopenaeus vannamei* larvae from nauplius to zoea stage. The different letters above the column indicate significant difference, $p < 0.05$

The different letters above the column indicate significant difference, $p < 0.05$

表 1 菌株 zou4 和 zou8 的形态特征

Tab. 1 The morphological characteristics of strains zou4 and zou8

菌株	来源	菌落特征(普通营养平板 37℃, 24h)	细胞特征	芽孢特征
Strain	Source	Colony characters (common nutrient plate 37℃, 24h)	Cell characters	Spore characters
zou4	虾池	近圆形,较平坦,直径 1—2mm,淡灰黄色,半透明,表面较湿润、较光滑,边缘裂片状。	革兰氏阳性,杆状,两端稍钝圆,分散排列,无荚膜,大小为 $(0.7-0.85)\mu\text{m} \times (1.8-3.5)\mu\text{m}$,周生鞭毛,无伴孢晶体	卵圆形,近中生,孢囊不膨大
zou8	农田	圆形,稍隆起,直径 3—5mm,淡乳白色,不透明,表面较粗糙,蜡油状,边缘细波状。	革兰氏阳性,杆状,两端稍钝圆,链状排列,无荚膜,大小为 $(1.0-1.1)\mu\text{m} \times (2.6-5.0)\mu\text{m}$,周生鞭毛,无伴孢晶体	

表 2 菌株 zou4 和 zou8 的生理生化特征

Tab. 2 The physiological characteristics of strains zou4 and zou8

项目	Items	zou4	<i>B. firmus</i> ^[11]	zou8	<i>B. cereus</i> ^[11]
接触酶	Catalase	+	+	+	+
厌氧生长	Anaerobic growth	-	-	+	+
VP 测定	VP determination	-	-	+	+
VP 培养物终 pH < 6	End pH of VP culture < 6	-	-	+	+
VP 培养物终 pH > 7	End pH of VP culture > 7	-	-	-	-

续表

项目 Items	zou4	<i>B. firmus</i> ^[11]	zou8	<i>B. cereus</i> ^[11]
D-葡萄糖产酸 Acid production of D-glucose	+	+	+	+
L-阿拉伯糖产酸 Acid production of L-arabinose	-	-	-	-
D-木糖产酸 Acid production of D-xylose	-	-	-	-
D-甘露醇产酸 Acid production of D-mannitol	+	+	-	-
葡萄糖产气 Gas production of glucose	-	-	-	-
酪朊水解 Casein hydrolysis	+	+	+	+
明胶水解 Gelatin hydrolysis	+	+	+	+
淀粉水解 Starch hydrolysis	+	+	-	+
柠檬酸盐利用 Citrate utilization	-	-	-	+
丙酸盐利用 Propionate utilization	-	-	+	ND
酪氨酸水解 Tyrosine hydrolysis	+	d	+	+
苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanine deaminase	-	d	-	-
卵黄卵磷脂酶 Yolk lecithinase	-	-	+	+
硝酸盐还原到亚硝酸盐 Nitrate reduced to nitrite	+	+	+	+
形成吲哚 Indole production	-	-	-	+
生长 pH :6.8 营养肉汤 Growth under pH 6.8 nutrient soup	+	+	+	+
生长 pH :5.7 营养肉汤 Growth under pH 5.7 nutrient soup	-	-	+	+
2 %NaCl 生长 Growth under 2 % NaCl	+	+	+	ND
5 %NaCl 生长 Growth under 5 % NaCl	+	+	+	ND
7 %NaCl 生长 Growth under 7 % NaCl	+	+	+	d
10 % NaCl 生长 Growth under 10 % NaCl	+	ND	+	ND
5 生长 Growth at 5	-	-	-	-
30 生长 Growth at 30	+	+	+	+
40 生长 Growth at 40	+	+	+	ND
45 生长 Growth at 45	+	ND	+	ND
50 生长 Growth at 50	-	d	-	-
-溶血 -haemolysis	-	ND	+	ND

注：“+”：阳性；“-”：阴性；“ND”：未测定；“d”：11 %—89 %的菌株为阳性

Note：“+”：Positive；“-”：Negative；“ND”：Not determined；“d”：11 %—89 % positive strains

2.4 16S rDNA 序列分析

测序所得 zou4 和 zou8 16S rDNA 序列长度分别为 1511bp 和 1512bp ,接近于全长 ,GenBank 登录号分别为 DQ173158 和 DQ173159。通过 NCBI BLAST 分析 ,结果显示 zou4 和 zou8 的 16S rDNA 序列分别与 *B. firmus* 和 *B. cereus* 最相似 ,与正式发表的最前几位序列同源性均在 99 % 以上。从系统发育树上 (图 3) 也明显看出 zou4 和 zou8 分别与 *B. firmus* 和 *B. cereus* 亲缘关系最近。

3 讨 论

3.1 水产益生菌的筛选

绝大多数水产益生菌的筛选都以水产养殖环境

包括宿主自身环境来源菌株为对象 ,以抑制特定病原菌效果为依据 ,即先根据体外拮抗试验初筛出若干有明显拮抗活性菌株 ,再通过体内试验效果进一步获得目的菌株。这种以抑制特定病原菌为目的的拮抗筛选方法已成为益生菌和生物防治菌株筛选的一种模式程序^[14,15] ,一般只要待筛选菌株数量足够大时 ,最终总能获得若干株有一定抑菌活性的目的菌株 ,在实践中对防治相应的病原菌也有较好效果。本试验对凡纳滨对虾育苗用益生芽孢杆菌筛选过程中并不以抑制特定病原菌为标准 ,而是直接以不同特征芽孢杆菌对凡纳滨对虾幼体 Z₂ 变态存活效果为选择依据 ,主要是基于以下几点考虑：芽孢杆菌属细菌对水产动物极少有致病性 ,且目前已广泛用

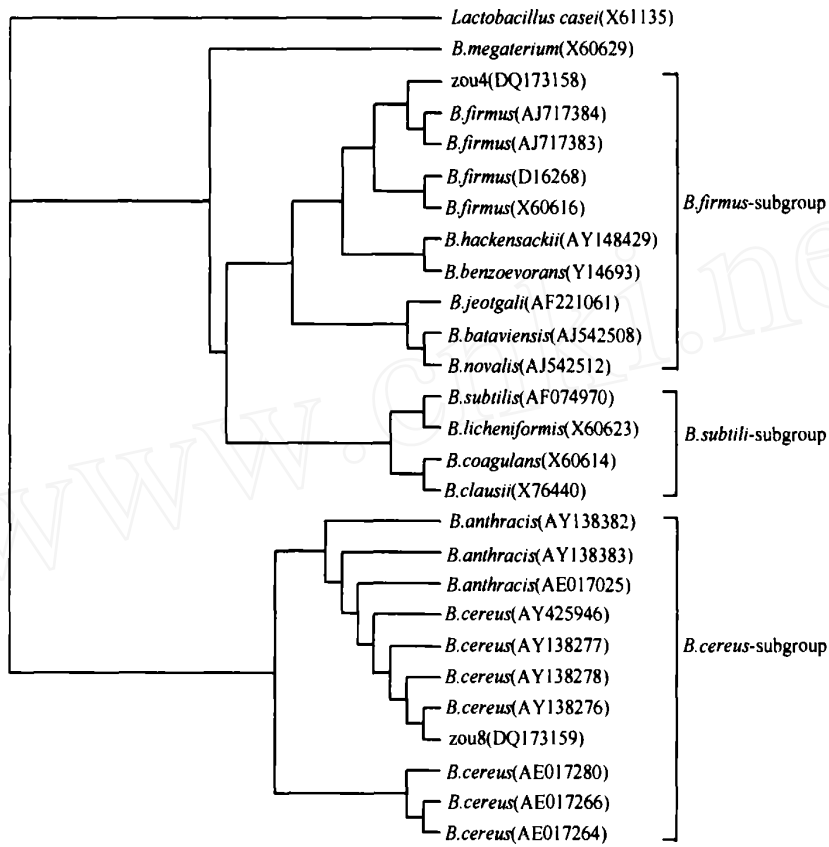


图3 菌株 zou4 和 zou8 的 16S rDNA 系统发育树 (括号内为序列登录号)

Fig. 3 Phylogenetic tree of strains zou4 and zou8 based on the 16S rDNA sequence (accession numbers in parentheses)

作对虾养殖益生菌^[5-10]; 由于水产育苗过程中的一些特点,如高密度的幼体,幼体免疫系统不成熟,大量残饵、排泄物,以及一定时期内不换水或低换水等因素,很容易引起机会病原物感染而引起病原不明的幼体大量甚至全部死亡^[4],特别在幼体变态期更易出现,如凡纳滨对虾从 Z_1 变态到 Z_2 期间。因此以幼体变态最终效果为依据在实践上更有意义,这也与 Hjelm 等^[15]强调益生菌株筛选早期就进行体内试验更有意义的观点相一致; 体外(拮抗)试验结果用于体内试验时常不表现出相应效果,且并不能因菌株缺少体外活性而排除其作为益生菌的潜在性^[14,16]; 避免同一特征菌株的重复试验,提高筛选效率。本试验结果表明被筛选的绝大多数芽孢杆菌(19/22)对幼体变态效果显著高于对照组,只有3株与对照组相比无明显差异,但也不表现负效应(图1),说明绝大多数芽孢杆菌有利于对虾幼体变态。为减少初筛工作量,每组试验设两个平行,幼体数只有30只,根据血球计数板计数加入的对数期细胞数量也只较近似实际值,因此并不能完全反映这些菌株的真实效果,但却能较高效甄别出效果明显的菌

株。由于绝大多数菌株效果均显著,从中进一步选择10株与对照组相比差异极显著,并与其他芽孢杆菌差异显著的菌株作为复筛对象。为更准确反映筛选效果,复筛试验中每组设三个平行,幼体数50只,并根据吸光值对应的稀释混合平板计数更准确确定添加细胞数量。复筛结果基本与初筛的一致,10株芽孢杆菌的效果与对照组相比仍极显著,但在初筛中与其他8株无明显差异的 zou4 和 zou8 这两株芽孢杆菌,在复筛中显著性差异得以表现出来(图2)。这说明筛选条件的设定对筛选结果有重要影响。初筛目的主要是从大量待选菌株中快速遴选出有潜在效应的菌株,排除有负效应和效果不明显的菌株,复筛目的是进一步从中选择出最佳目标。初筛试验强调的是“量”,要在合理的前提下要尽可能简化,复筛突出的是“质”,要尽可能准确。具体的“量”和“质”要根据实验条件和目的进行选择 and 设计。

一般认为从相应的水产养殖环境分离菌株用于筛选更具合理性^[2],主要是考虑到益生菌在特定环境的生存和(或)定殖能力及其发挥效应的环境条件,但这并不能否定其他环境来源菌株在特定环境

的生存和(或)定殖能力,更不能排除其最终作用效果。实际上,目前用于水产养殖包括海水养殖的商业化芽孢杆菌制剂绝大多数菌种源自农田而非养殖环境。本试验中来自陆地土壤的绝大多数菌株如 *zou8* 等与虾池来源菌株同样有明显效果。因此,菌株的来源环境不必成为主要考虑因素,关键是要尽可能多的获得相关背景信息^[2,3],有的放矢,提高效率。

3.2 益生菌的鉴定及其安全性

菌种鉴定是益生菌研究和生产中的最重要环节之一。益生菌在生产和应用之前必须进行可靠的菌种鉴定,给出确切的分类地位,一方面可更有效利用相关菌种已有信息为生产应用服务,另一方面可对其安全性和可能作用机制给出评估或解释。由于芽孢杆菌属中的枯草芽孢杆菌安全性高,应用范围广,研究背景也最为清楚,因此是最常用的益生芽孢杆菌菌种。但事实上一些标为 *B. subtilis* 的益生菌产品包括人用的,经菌种鉴定后却是其他芽孢杆菌^[17,18]。本试验结合表型特征和 16S rDNA 序列信息对 *zou4* 和 *zou8* 两株潜在的益生芽孢杆菌进行了鉴定,结果分别与 *B. firmus* 和 *B. cereus* 最为相似。系统发育分析(图 3)表明,几种常用益生芽孢杆菌除 *B. megaterium* 外均聚为 *B. subtilis* 类群,*B. megaterium* 和聚为 *B. firmus* 类群的 *zou4* 等与此类群亲缘关系较近;*zou8* 则与它们亲缘关系相对较远,而与人畜致病菌 *B. anthracis* 亲缘关系很近,共聚为 *B. cereus* 类群。*B. cereus* 一方面因某些产毒素菌株成为食物中毒等引起腹泄或呕吐症状的致病菌^[19],另一方面一些非致病株也是人和其他动物常用的益生芽孢杆菌^[12,13]。最近 Janice 等^[19]对包括 *B. cereus*、*B. firmus* 等在内的 101 株芽孢杆菌热稳定毒素的检测表明,这些芽孢杆菌某些菌株均有不同程度热稳定性毒素产生能力。因此对益生菌在生产前须尽可能了解其安全性。尽管水产养殖用益生菌的安全性要求远低于人用的,其本身又有利于宿主动物健康,但相关菌株在生产和应用过程中对人类健康及环境可能造成的负面影响必须充分考虑。因此,如对上述两株益生芽孢杆菌菌株进行生产和应用前,仍需要其他水产动物及小白鼠实验等对其安全性作进一步评估。

3.3 水产益生菌的作用机制

由于水体环境不同于陆生环境,因此水产益生菌的可能作用机制也必然与人和其他陆生动物的有所不同。目前对益生菌的作用机制还不完全了解,

不同菌株及其对养殖品种的作用方式也各有差异和侧重, Verschueren 等^[2]将其总结为:产生抑菌物质,竞争化学物质、能量和宿主粘附位点,增强宿主免疫反应,改善水质以及与浮游生物相互作用等。根据较权威的益生菌定义,“活的微生物,添加足够数量时,有助于宿主健康”^[20],我们认为提供营养、产生促进生长发育物质如类似激素物质等也是水产益生菌可能作用机制之一。通过与常见几株对虾养殖病原菌的拮抗试验、共培养试验以及攻击保护等试验(另文报道),表明本实验筛选的两株益生芽孢杆菌 *zou4* 和 *zou8* 促进幼体变态作用的发挥并非通过直接抑制病原菌,而是通过其他有待研究的机制。只有深入了解益生菌作用的确切机制,才能够更充分发挥其作用,开发更有效产品。

参考文献:

- [1] Gatesoupe F G. The use of probiotics in aquaculture [J]. *Aquaculture*, 1999, **180**: 147—165
- [2] Verschueren L, Romaut G, Sorgeloos P, et al. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture [J]. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 2000, **64**(4): 655—671
- [3] Gomez GI B, Roque A, Turnbull J F. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms [J]. *Aquaculture*, 2000, **191**: 259—270
- [4] Skjermo J, Vadstein O. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae [J]. *Aquaculture*, 1999, **177**: 333—343
- [5] Moriarty DJ W. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds [J]. *Aquaculture*, 1998, **164**: 351—358
- [6] Rengpipat S, Phianphak W, Piyatiratitivorakul S, et al. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth [J]. *Aquaculture*, 1998, **167**: 301—313
- [7] Devaraja TN, Yusoff FM, Shariff M. Changes in bacterial populations and shrimp production in ponds treated with commercial microbial products [J]. *Aquaculture*, 2002, **206**: 245—256
- [8] Vaseeharan B, Ramasamy P. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2003, **36**(2): 83—87
- [9] Liu F, Han W Y. Reuse strategy of wastewater in prawn nursery by microbial remediation [J]. *Aquaculture*, 2004, **230**: 281—296
- [10] Gullian M, Thompson F, Rodriguez J. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei* [J]. *Aquaculture*, 2004, **233**: 1—14
- [11] Dong X Z, Chai M Y, et al. Manual of systematic determination of familiar bacteria [M]. Beijing: Science Press. 2001, 62—65, 353—391 [东秀珠, 蔡妙英, 等. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社. 2001, 62—65, 353—391]
- [12] Oggioni MR, Ciabattini A, Cuppone AM, et al. *Bacillus* spores for

- vaccine delivery [J]. *Vaccine*, 2003, **21**: 96—101
- [13] Sanders M E, Morelli L, Tompkins T A. Sporeformers as human probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, and *Brevibacillus* [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2003, **2**: 101—110
- [14] Spanggaard B, Huber I, Nielsen J, et al. The probiotic potential against vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout [J]. *Environmental Microbiology*, 2001, **3**(12): 755—765
- [15] Hjelm M, Bergø, Riaz A, et al. Selection and identification of autochthonous potential probiotic bacteria from turbot larvae (*Scophthalmus maximus*) rearing units [J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2004, **27**: 360—371
- [16] Gram L, Løvold T, Nielsen J, et al. In vitro antagonism of the probiotic *Pseudomonas fluorescens* strain AH2 against *Aeromonas salmonicida* does not confer protection of salmon against furunculosis [J]. *Aquaculture*, 2001, **199**: 1—11
- [17] Green D H, Wakeley P R, Page A, et al. Characterization of two *Bacillus* probiotics [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, **65**(9): 4288—4291
- [18] Hoa N T, Baccigalupi L, Uxham, H, et al. Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacteriophylaxis of gastrointestinal disorders [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**(12): 5241—5247
- [19] Taylor J M W, Sutherland A D, Aido K E, et al. Heat-stable toxin production by strains of *Bacillus cereus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus simplex* and *Bacillus licheniformis* [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, **242**: 313—317
- [20] Health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria, 1-4 October 2001, Córdoba, Argentina [C]. 2001, 5—7

SCREENING AND IDENTIFICATION OF TWO PROBIOTIC BACILLUS STRAINS FOR SHRIMP LARVICULTURE

WEN Chong-Qing^{1,2}, LAI Xin-Tian², HE Hong³, XUE Ming¹ and ZHOU Shi-Ning²

(1. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088; 2. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275;

3. Agricultural College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088)

Abstract: 22 strains of *Bacillus* with different characters were isolated from soil and shrimp ponds. Approximately 5×10^8 logarithmic phase cells of every strain were administered into 500 mL seawater culturing *Litopenaeus vannamei* nauplius larvae respectively. Based on the effect of *Bacillus* on the survival rate of *L. vannamei* larvae metamorphosis from nauplius to zoea, 10 strains which had very significant ($p < 0.01$) effects on larval metamorphosis were screened initially. Then from the 10 strains screened, two strains, zou4 and zou8 which had more significant ($p < 0.05$) effects on larval metamorphosis than other strains were selected as potential probiotic *Bacillus* for *L. vannamei* larviculture. Combining phenotypic and physiological characteristics, zou4 and zou8 were identified initially as *B. firmus* and *B. cereus* respectively. To investigate the phylogenetic position of strains zou4 and zou8, about 1.5 kb 16S rRNA genes were sequenced and compared with that of related strains, which revealed that strains zou4 and zou8 exhibited the highest levels of similarity to *B. firmus* and *B. cereus* respectively, similarity value were all above 99%. Phylogenetic tree was constructed based on genetic distance analysis, which also showed that strains zou4 and zou8 clustered as *B. firmus* and *B. cereus* respectively. Based on the results obtained, strains zou4 and zou8 were identified as *B. firmus* and *B. cereus* respectively.

Key words: Probiotic; *Bacillus*; Screening; Identification; *Litopenaeus vannamei*; Larvae