

具有群体感应抑制作用的地衣芽孢杆菌 T-1 的动物安全及生态评价

宋增福^{1,2}, 陈彪¹, 郭婧¹, 徐华东¹,
任建峰^{1,3}, 张庆华^{1,3*}, 董迎辉^{4*}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 国家水生动物病原库, 上海海洋大学, 上海 201306;

3. 上海海洋大学省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;

4. 浙江万里学院浙江省水产种质资源高效利用技术研究重点实验室, 浙江宁波 315100)

摘要: 为了检测具有群体感应抑制作用的地衣芽孢杆菌 T-1 对动物的安全性及对水体生态环境的影响, 实验采用异育银鲫、斑马鱼及小鼠为安全评价的测试动物; 采用小球藻、大型溞及萼花臂尾轮虫为水体生态评价的测试对象, 参照国标的急性毒性实验方法对地衣芽孢杆菌 T-1 进行动物安全性及生态环境评价。结果显示: 异育银鲫腹腔注射浓度为 $11\ 200\ \text{mg/L}$ ($2.6 \times 10^{11}\ \text{CFU/mL}$) 菌株 T-1 菌液后, 连续观察 96 h, 异育银鲫均健康生长, 未出现不良症状或死亡; 将斑马鱼浸泡在浓度为 $2\ 240\ \text{mg/L}$ ($5.2 \times 10^{10}\ \text{CFU/mL}$) 的菌液中, 连续观察 96 h, 斑马鱼健康生长, 未出现不良症状或死亡; SPF 级小鼠 (ICR 品系) 用 $16\ 800\ \text{mg/kg}$ ($3.9 \times 10^{11}\ \text{CFU/mL}$) 剂量的菌液灌胃处理后, 观察 9 d, 小鼠健康生长, 无不良症状或死亡。不同浓度的菌株 T-1 在 96 h 内, 对小球藻无毒且对生长有促进作用, 对大型溞生长无不良影响, 对萼花臂尾轮虫生长无害, 且在高浓度下对萼花臂尾轮虫的生长繁殖有促进作用。结果表明, 具有群体感应抑制作用的地衣芽孢杆菌 T-1 对异育银鲫、斑马鱼及小鼠 3 种实验动物安全、无毒害; 对水体生态环境中的浮游生物也无不良影响, 具有开发成为微生态制剂的潜力。

关键词: 地衣芽孢杆菌; 急性毒性; 动物安全评价; 生态环境评价

中图分类号: Q 938.1; S 917.1

文献标志码: A

近年来, 抗生素等化学药物长期使用造成的耐药性、药物残留以及对生态环境的危害日趋严重^[1], 亟需探索新型的疾病防治手段加以应对。微生态制剂作为近年来发展较快的防治技术, 在生态防治中发挥了重要作用^[2], 但微生态制剂的安全问题却容易被忽视, 如蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 与枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 引起的溶血问题^[3-4], 还有部分微生态制剂不但没有起到防治病害的作用, 反而引起水产动物的败血症^[5]; 而且缺乏微生态制剂对生态安

全风险的系统评估, 因此, 加强对微生态制剂的安全和生态评价, 对微生态制剂的使用具有重要的现实意义, 也是微生态制剂行业健康发展的保障。

群体感应抑制剂一般由细菌或真菌分泌, 能够淬灭病原菌的群体感应信号分子, 进而降低病原菌致病因子的表达, 从而减弱病原菌的致病性, 因此, 具有群体感应抑制作用的细菌在疾病防治中具有广阔的应用前景。但是具有群体感应抑制作用的细菌是否会影响到养殖水体生态平衡以及对水生生物是否安全, 国内外尚无相关报道。本实验以一株

收稿日期: 2015-03-05

修回日期: 2015-04-12

资助项目: 上海教育委员会科研创新项目 (13ZZ127); 水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心 (ZF1206); 浙江省水产种质资源高效利用技术研究重点实验室开放基金 (KL2015-4); 南京市“321”计划; 上海海洋大学博士启动基金 (A-0209-13-0105344)

通信作者: 张庆华, E-mail: qhzhang@shou.edu.cn; 董迎辉, E-mail: dongyinghui118@126.com

具有群体感应抑制作用的地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) T-1 为研究对象,利用异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio* ♀ × *Cyprinus carpio* ♂)、斑马鱼 (*Danio rerio*) 和小鼠 (*Mus musculus*) 进行安全性评价,利用小球藻 (*Chlorella vulgaris*)、大型溞 (*Daphnia magna*) 及萼花臂尾轮虫 (*Brachionus calyciflorus*) 进行生态评价,系统全面地研究了其安全性及对生态环境的影响,为该地衣芽孢杆菌菌株在生产中的安全使用提供了科学依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验动物 异育银鲫, (15 ± 2) g, 购自江苏南通市如东县洋口农场; 斑马鱼 (AB 品系) 购自中科院上海生命科学研究院; SPF 小鼠 (ICR 品系), (30 ± 2) g, 购自上海实验动物研究中心; 大型溞由上海海洋大学生物系水域生态修复实验室张瑞雷副教授馈赠; 萼花臂尾轮虫由上海海洋大学生物系刘志伟老师馈赠。

实验藻类 普通小球藻由上海海洋大学营养饲料实验室黄旭雄教授馈赠。

实验菌株 地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) T-1 (简称菌株 T-1); 嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) Ahjs16 株, 均由本实验室筛选和保存。

实验试剂 营养肉汤及营养琼脂培养基 (上海鼎国生物技术有限公司); BG-11 小球藻培养基 (青岛海博生物技术有限公司); 麻醉剂 (MS-222) (上海生工生物工程股份有限公司); 循环养殖用水参考国家标准《GB/T 13267 91 水质对淡水鱼 (斑马鱼) 急性毒性测定方法》配制。

T-1 菌液处理 参照郭婧等方法^[6], 将菌株 T-1 在营养肉汤中 37 °C, 150 r/min 培养 48 h, 利用细菌平板活菌计数法计算细菌浓度为 2.6×10^{10} CFU/mL, 8 000 r/min 离心 15 min, 弃上清, 用 PBS (pH 7.4) 洗涤 3 次, 备用。

1.2 主要仪器设备

90 L 水族箱 (66 cm × 41 cm × 35 cm); 无菌注射器; 超净工作台 (SW-CJ-IF 型); 高压灭菌锅 (YXQ-LS-18SI); 生化培养箱 (SPX-100B-Z 型); 离心机 (TDL80-2B 型); 振荡培养箱 (THZ-92B); 722 紫外分光光度计; 光照培养箱 (MGC-

250BPY-2); 解剖镜 (OLYMPUS SZ-X7)。

1.3 菌株 T-1 对异育银鲫的急性毒性实验

异育银鲫的饲养 参照《国家渔业水质标准 GB 11607-89》^[7] 确保养殖水质、pH 和溶氧量达到要求, 异育银鲫在温度 25 °C 驯养 7 d 以上, 7 d 内死亡率大于 10%, 舍弃整批鱼, 7 d 内死亡率在 5%~10% 之间继续驯养 7 d, 7 d 内死亡率小于 5% 可以用于实验。

菌株 T-1 对异育银鲫的急性毒性实验 实验分 8 组, 15 尾/组, 每组鱼置于 90 L 的水族箱中, 保持一半的水位。每组重复 3 次, 共 315 尾鱼^[8]。第 1 组, 生理盐水, 作为阴性对照; 第 2~7 组, 受试菌液处理组, 将 T-1 菌液进行 10 倍稀释, 其浓度为 $2.6 \times 10^6 \sim 2.6 \times 10^{11}$ CFU/mL; 第 8 组, 嗜水气单胞菌 Ahjs16 株, 浓度为 11.2 mg/L (1.5×10^8 CFU/mL), 作为阳性对照。实验前异育银鲫空腹 24 h, 鱼体用 MS-222 麻醉后腹腔注射 0.4 mL 生理盐水或菌液; 待鱼体恢复正常游动后开始观察各个时段实验鱼情况, 记录 1~8 组异育银鲫的异常及死亡数目。毒性实验结果用直线内插法求出半数致死浓度 (LC₅₀), 参考卢玲^[9] 等方法对菌株 T-1 进行毒性分级。

1.4 菌株 T-1 对斑马鱼的急性毒性实验

斑马鱼的饲养 斑马鱼来自同一种群, 体长 (20 ± 5) mm, 体质量 (0.3 ± 0.1) g。实验前在常规养殖用水中 28 °C 驯养 7 d, 实验前 24 h 停止喂饲, 驯养期间死亡率不得超过 10%, 斑马鱼无明显疾病和肉眼可见的畸形。

菌株 T-1 对斑马鱼的急性毒性实验 参照谢凤君等^[10] 和周红等^[11] 的静水法进行, 共 7 个实验组, 15 尾/组, 每组重复 3 次。第 1 组: 生理盐水, 作为阴性对照; 第 2~6 组, 养殖用水将受试液进行 10 倍稀释, 其浓度为 $5.2 \times 10^6 \sim 5.2 \times 10^{10}$ CFU/mL; 第 7 组: 嗜水气单胞菌 Ahjs16 菌株, 终浓度 22.4 mg/L (3.0×10^8 CFU/mL), 作为阳性对照。将斑马鱼浸泡在 1~7 组菌液中, 观察 1、2、4、8、16、24、48、72 h 和 96 h 鱼体异常及死亡数目, 根据直线内插法求出半数致死浓度 (LC₅₀)。根据谢凤君等^[10] 及《新化学物质评估导则》^[12] 中的分级标准评定 T-1 对斑马鱼的毒性分级。

1.5 菌株 T-1 对小鼠的急性毒性测定

参考戴寅等^[13] 的最大耐受剂量法 (maximal

tolerance dose, MTD) 进行实验,用最大使用浓度和最大灌胃容量给予受试动物后,连续观察 9 d,未见任何动物死亡,则 MTD 大于该使用浓度。小鼠隔夜空腹,一般禁食 16 h 左右,不限制饮水。将 T-1 菌液制备为终浓度 3.9×10^{11} CFU/mL 的菌悬液,确保小鼠灌胃菌液剂量为 16.8 g/kg;实验小鼠分为 1 号雄、1 号雌、2 号雄、2 号雌,第 2 组为第 1 组的生物学重复;对照组:3 号雄、3 号雌,每组雌雄小鼠各 10 只。小鼠用灌胃针经口一次性给予或 24 h 内多次给予 0.6 mL/只,待小鼠正常后连续观察记录 9 d 内出现的症状,实验结束后解剖观察小鼠各脏器变化。根据结果,参考《GB 15193.3-2003 急性毒性实验》方法对 T-1 给予毒性分级评定^[13]。

1.6 菌株 T-1 对普通小球藻生长的影响

普通小球藻的培养 取 40 mL 的普通小球藻藻液,加入盛有 150 mL 的无菌 BG-11 藻类培养基的三角烧瓶中,均匀光照,温度 (25 ± 1) °C,光照 3 000 lx,每天定时人工摇动 5~6 次,使藻液悬浮,培养 2~4 d。利用血球计数板进行细胞计数,调节细胞密度达到 2.5×10^6 个/mL,备用。

菌株 T-1 对普通小球藻生长的影响 参照周红等^[14]方法,共 7 个实验组,每组重复 3 次。第 1 组:生理盐水,作为阴性对照;第 2~7 组,将 T-1 菌液加入到 100 mL 无菌 BG-11 藻类培养基中,进行 10 倍稀释,其浓度为 $2.6 \times 10^1 \sim 2.6 \times 10^6$ CFU/mL;每组加入 10 mL 初始密度为 2.5×10^4 个/mL 的小球藻液,连续培养 4 d,在 0、24、48、72 和 96 h 取样,利用血球计数板计算出小球藻的密度和 645 nm 处小球藻的光吸收值 (OD_{645})。分别以 OD_{645} 光吸收值和小球藻密度值为纵坐标轴,以时间为横坐标绘制小球藻的生长曲线,观察菌株 T-1 对小球藻生长的影响变化关系。

1.7 菌株 T-1 对大型溞的急性毒性实验

大型溞的培养 参考谢凤君等^[15]方法,将大型溞培养 7 d,培养条件:温度 (20 ± 1) °C, pH 7.0~8.0,溶氧 2.0 mg/L,光照 3 000 lx,每天光照 10 h 左右,在光照培养箱中培养。

菌株 T-1 对大型溞的急性毒性实验 选用实验室条件下培养 3 代以上的、出生 6~24 h 的幼溞进行实验,喂养不含无机培养液的小球藻。

共 8 个实验组,每组重复 3 次。第 1 组为未加菌液的阴性对照组;第 2~6 组,将 T-1 菌液加入到含有 50 mL 的人工稀释水中,进行 10 倍稀释,其浓度为 $2.6 \times 10^3 \sim 2.6 \times 10^7$ CFU/mL;第 7 组和第 8 组分别为 0.5 mg/L 和 1.2 mg/L 的 $K_2Cr_2O_7$ 的溶液,作为阳性对照组,用来检测大型溞对有毒物质的敏感性。实验开始后观察 1、2、4、6、8、16 及 24 h 幼溞的活力,以幼溞不游动为异常,心脏停止跳动为死亡;记录异常情况死亡数目。实验结束后计算出不同浓度组中不活动或者死亡溞数占实验总数的百分比,用概率单位目测法计算 T-1 对大型溞的 24 h- EC_{50} 。

1.8 菌株 T-1 对萼花臂尾轮虫的急性毒性实验

萼花臂尾轮虫的培养 参考席贻龙等^[16]方法,用实验室培养的小球藻培育轮虫;培养温度 (25 ± 1) °C,光照 3 000 lx,每天光照 12 h 左右,定期喂养小球藻藻液。

菌株 T-1 对萼花臂尾轮虫的急性毒性 参考赵含英等^[17]的方法,在解剖镜下挑选培养良好的不携带卵的轮虫作为实验对象,将培养液用移液器吸取得到 6 孔细胞培养板中,每孔 3 mL,加入离心的小球藻藻体,挑选好的不携带卵的轮虫吸入 6 孔细胞培养板中,每孔 10 只。共 8 个实验组,每组重复 6 次,第 1 组为未加菌液的阴性对照组;第 2~6 组,加入 T-1 菌液,进行 10 倍稀释,其浓度为 $2.6 \times 10^3 \sim 2.6 \times 10^7$ CFU/mL,第 1 组为未加菌液的阴性对照组,第 7 组和第 8 组分别为 0.5 mg/L 和 1.2 mg/L 的 $K_2Cr_2O_7$ 溶液,作为阳性对照组,24 h 后在解剖镜下观察萼花臂尾轮虫的存活个数。

菌株 T-1 对萼花臂尾轮虫生长繁殖的影响 参考赵含英等^[17]的方法,制备菌株 T-1 菌悬液,使受试菌液终浓度为 2.6×10^8 CFU/mL 和未加菌液的阴性对照组,用 0.5 mg/L 和 1.2 mg/L 的 $K_2Cr_2O_7$ 溶液作阳性对照,将挑选好的不携带卵的轮虫吸入 6 孔细胞培养板中,每孔 10 只,每组重复 12 次;24、48、72 和 96 h 后,观察、记录各组轮虫的个数及携卵轮虫个数。以时间为横坐标,以轮虫个数和携卵轮虫个数为纵坐标,绘制变化曲线。

1.9 统计分析

应用 SPSS 19.0 软件对实验数据进行统计分析,采用单因素方差分析方法 (One-Way

ANOVA), $\alpha = 0.05$ (95% 置信区间); 利用 GraphPad. Prism. V 5.0 软件进行统计图绘制。

2 结果与分析

2.1 菌株 T-1 对异育银鲫的急性毒性

异育银鲫腹腔注射浓度为 0 ~ 11 200 mg/L 时, 未出现死亡(表 1)、呼吸困难及行动迟缓等症状, 说明菌株 T-1 对异育银鲫 96 h-LC₅₀ 大于 11 200 mg/L; 根据鱼类急性毒性分级标准, 判定该菌株 T-1 对异育银鲫无毒。注射嗜水气单胞菌 Ahjs16 的阳性对照组(组号 8), 平均死亡率在 75.5% 左右, 说明异育银鲫对致病菌非常敏感。

2.2 菌株 T-1 对斑马鱼急性毒性

斑马鱼浸泡在浓度为 0 ~ 2 240 mg/L 的各组 T-1 菌液中生长良好, 未出现死亡(表 2)和行动

迟缓等症状, 说明菌株 T-1 对斑马鱼 96 h-LC₅₀ 大于 2 240 mg/L。根据《GB/T 13267 91 水质 物质对淡水鱼(斑马鱼)急性毒性测定方法》的标准, 判定菌株 T-1 对斑马鱼无毒; 浸泡嗜水气单胞菌 Ahjs16 的阳性对照组(组号 7), 平均死亡率在 64.4% 左右, 说明斑马鱼对致病菌非常敏感。

2.3 小鼠对菌株 T-1 最大耐受剂量

采用最大耐受剂量法, 用菌株 T-1 对小鼠进行灌胃, 结果显示小鼠未出现死亡(表 3)和不良症状, 解剖观察内脏组织与对照组相比未出现显著变化, 说明小鼠对菌株 T-1 的最大耐受剂量大于 16 800 mg/kg 菌液浓度; 根据《GB 15193.3 - 2003 急性毒性实验》对受试物的毒性分级进行评定, 确定菌株 T-1 对小鼠无毒。

表 1 菌株 T-1 对异育银鲫急性毒性结果
Tab. 1 Acute toxicity of the strain T-1 on crucian carp

| 组别 group | 剂量/ (mg/L) dosage | 浓度/ (CFU/mL) concentration | 尾 numbers | 死亡数/尾 death number | | | | | | | | | | 96 h 死亡率/% mortality |
|------------------------------|-------------------------|----------------------------------|-------------------|-----------------------|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|-------|----------------------------|
| | | | | 1 h | 2 h | 4 h | 6 h | 8 h | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h | | |
| 对照组 control group | 1 | 0.85% 生理盐水 normal saline | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| | | | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| 8 | Ah 11.2 | 1.5×10^8 | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 6 | 8 | 11 | 75.50 | |
| | | | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 5 | 8 | 12 | | | |
| | | | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 4 | 7 | 11 | | | |
| 实验组 experimental group | 2 | 0.112 | 2.6×10^6 | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | | | | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| | | | | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| 3 | 1.12 | 2.6×10^7 | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | | | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | |
| | | | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | |
| 4 | 11.2 | 2.6×10^8 | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | | | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | |
| | | | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | |
| 5 | 112 | 2.6×10^9 | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | | | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | |
| | | | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | |
| 6 | 1 120 | 2.6×10^{10} | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | | | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | |
| | | | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | |
| 7 | 11 200 | 2.6×10^{11} | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | | | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | |
| | | | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | |

表 2 菌株 T-1 对斑马鱼急性毒性结果
Tab.2 Acute toxicity of the strain T-1 on zebrafish

| 组别 group | 剂量/ (mg/L) dosage | 浓度/ (CFU/mL) concentration | 尾 numbers | 死亡数/尾 death number | | | | | | | | | 96 h 死亡率/% mortality | |
|------------------------------|-------------------------|----------------------------------|-------------------|-----------------------|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|----------------------------|---|
| | | | | 1 h | 2 h | 4 h | 6 h | 8 h | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h | | |
| 对照组 control group | 1 | 0.85% 生理盐水 normal saline | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | | | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | | | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 实验组 experimental group | 7 | Ah 22.4 | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 6 | 8 | 9 | 64.40 | |
| | | | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 5 | 7 | 10 | | | |
| | | | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 7 | 8 | 10 | | | |
| | | | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| | 2 | 0.224 | 5.2×10^6 | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | | | | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | | | | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 3 | 2.24 | 5.2×10^7 | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | | | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| | | | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| 4 | 22.4 | 5.2×10^8 | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | | | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| | | | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| 5 | 224 | 5.2×10^9 | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | | | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| | | | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| 6 | 2 240 | 5.2×10^{10} | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | | | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| | | | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |

表 3 菌株 T-1 对小鼠最大耐受剂量
Tab.3 MTD of the strain T-1 on mice

| 组号 group | 剂量/ (mg/L) dosage | 浓度/ (CFU/mL) concentration | 性别 sexuality | 数量/个 numbers | 死亡数/个 death number | | | | | | | | | 死亡率/% mortality |
|-------------|-----------------------------|----------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------------------|
| | | | | | 1 d | 2 d | 3 d | 4 d | 5 d | 6 d | 7 d | 8 d | 9 d | |
| 1 | 16 800 | 3.9×10^{11} | 雌 female | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | 雄 male | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 2 | 16 800 | 3.9×10^{11} | 雌 female | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | 雄 male | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 3 | 0.85% 生理盐水 normal saline | | 雌 female | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | 雄 male | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |

2.4 菌株 T-1 对小球藻的生长影响

通过测定不同时间内不同浓度的菌株 T-1 对小球藻的生物量的影响,发现在小球藻初始密度相同的条件下,24 h 后,菌株 T-1 密度为 2.6×10^6 CFU/mL 的实验组,小球藻细胞密度明显高于对照组 ($P < 0.05$);48 h 后,各实验组明显高于对照组 ($P < 0.01$);72 h 后,菌株 T-1 浓度为 2.6×10^1 CFU/mL 的实验组,其生物量显著高于对照组 ($P < 0.05$),其他浓度组中,相比对照组呈明显增

长趋势 ($P < 0.01$);96 h 后,各实验组相比于对照组增长非常明显 ($P < 0.01$) (图 1)。

小球藻的 OD_{645} 值,在 24 h 后,各实验组与对照组相比差异不显著 ($P > 0.05$);在 48 h 后,浓度为 2.6×10^2 、 2.6×10^4 CFU/mL 的实验组与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$);浓度为 2.6×10^5 CFU/mL 的实验组远远高于对照组 ($P < 0.01$);72 h 后,浓度为 2.6×10^1 CFU/mL 的实验组与对照组差异显著 ($P < 0.05$),其他浓度组中,差异极

显著 ($P < 0.01$), 呈明显增长趋势; 96 h 后, 各浓度组与对照组相比, 增长差异极显著 ($P < 0.01$) (图 2), 以上结果表明, T-1 对小球藻的生物量不但无抑制作用, 反而有促进作用。

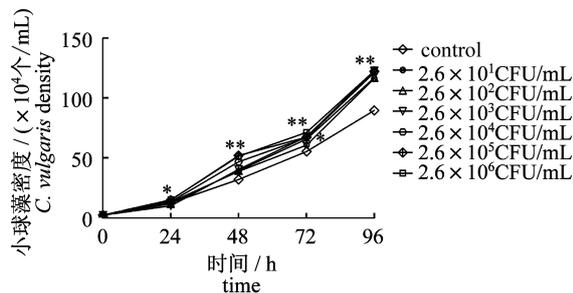


图 1 不同浓度菌株 T-1 对普通小球藻生长的影响 ($n = 3$)

** 表示差异极显著 ($P < 0.01$), * 表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同

Fig. 1 Effect of different concentrations of the strain T-1 on *C. vulgaris* growth

** means the more significant difference ($P < 0.01$); * means the significant difference. The same as the following ($P < 0.05$). The Same as the following.

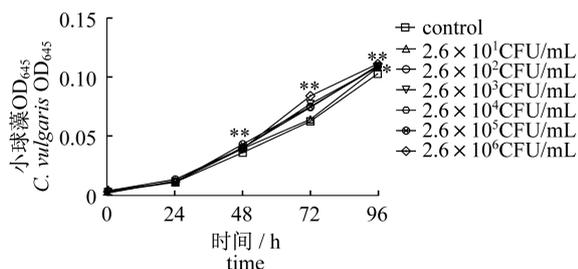


图 2 不同浓度菌株 T-1 对普通小球藻 OD₆₄₅ 值的影响

Fig. 2 Effect of different concentrations of the strain T-1 on *C. vulgaris* OD₆₄₅

2.5 菌株 T-1 对大型溞的急性毒性

不同浓度的菌株 T-1 对大型溞的存活率与对照组相比, 差异不明显 ($P > 0.05$); 用概率单位目测法计算大型溞为 0.5 mg/L 和 1.2 mg/L 的 $K_2Cr_2O_7$ 中的 24 h 存活率分别为 56.67% 和 10%, $K_2Cr_2O_7$ 的 24 h-EC₅₀ 为 0.5 ~ 1.2 mg/L (图 3), 说明 $K_2Cr_2O_7$ 对大型溞有极强的毒性。结果表明, 在 20 °C 时, 菌株 T-1 对大型溞的 24 h-EC₅₀ 大于 2.6×10^7 CFU/mL。因此, 在该浓度条件下菌株 T-1 对大型溞生长无不良影响。

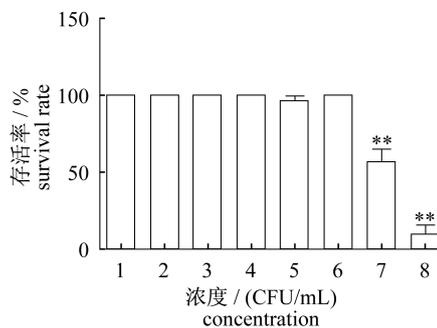


图 3 不同浓度菌株 T-1 对大型溞生长的影响

Fig. 3 Effect of different concentration of the strain T-1 on the growth of *D. magna*

1. control; 2. 2.6×10^3 CFU/mL; 3. 2.6×10^4 CFU/mL; 4. 2.6×10^5 CFU/mL; 5. 2.6×10^6 CFU/mL; 6. 2.6×10^7 CFU/mL; 7. 0.5 mg/L $K_2Cr_2O_7$; 8. 1.2 mg/L $K_2Cr_2O_7$

2.6 菌株 T-1 对萼花臂尾轮虫的急性毒性

菌株 T-1 对萼花臂尾轮虫的急性毒性影响

24 h 后, 浓度为 2.6×10^7 CFU/mL 实验组对萼花臂尾轮虫及其携卵轮虫量的影响与对照组相比差异明显; 而在阳性对照组 0.5 mg/L $K_2Cr_2O_7$ 和 1.2 mg/L $K_2Cr_2O_7$ 溶液中, 萼花臂尾轮虫生长和携卵量明显少于对照组 ($P < 0.01$), 表明 $K_2Cr_2O_7$ 对萼花臂尾轮虫的急性毒性非常强, 而浓度小于 2.6×10^6 CFU/mL 的菌株 T-1 对萼花臂尾轮虫的生长繁殖无影响, 且有促进作用 (图 4)。

菌株 T-1 对萼花臂尾轮虫生长繁殖的影响

24 h 后, 萼花臂尾轮虫在浓度为 2.6×10^8 CFU/mL 实验组中, 轮虫生长个数与对照组相比差异不明显 ($P > 0.05$), 在 48 h、72 h、96 h 后, 实验组轮虫生长个数明显高于对照组 ($P < 0.01$), 说明菌株 T-1 菌液在受试浓度内可促进轮虫的生长; 而 0.5 mg/L $K_2Cr_2O_7$ 和 1.2 mg/L $K_2Cr_2O_7$ 的阳性对照组中轮虫的生长个数明显低于对照组 ($P < 0.01$), 有抑制作用 (图 5), 说明 $K_2Cr_2O_7$ 对萼花臂尾轮虫的生长有极强的抑制作用。综上可知, 菌株 T-1 菌液对萼花臂尾轮虫的生长有明显促进作用。

24 ~ 96 h 后, 2.6×10^8 CFU/mL 高浓度的菌株 T-1 菌液, 携卵萼花臂尾轮虫个数明显高于对照组 ($P < 0.01$), 说明高浓度 T-1 菌液对萼花臂尾轮虫的繁殖有显著促进作用。在 48 h 和 72 h

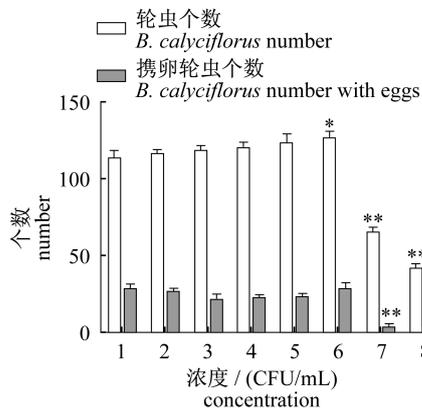


图 4 不同浓度菌株 T-1 对萼花臂尾轮虫个数及携卵的影响 ($n=6$)

Fig. 4 Influence of different concentration of the strain T-1 on the *B. calyciflorus* number and eggs

1. control; 2. 2.6×10^3 CFU/mL; 3. 2.6×10^4 CFU/mL; 4. 2.6×10^5 CFU/mL; 5. 2.6×10^6 CFU/mL; 6. 2.6×10^7 CFU/mL; 7. 0.5 mg/L $K_2Cr_2O_7$; 8. 1.2 mg/L $K_2Cr_2O_7$

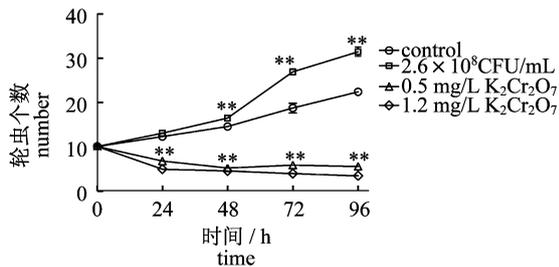


图 5 高浓度菌株 T-1 菌液对萼花臂尾轮虫生长的影响
Fig. 5 Influence of different concentrations of the strain T-1 on the *B. calyciflorus* number

后, 0.5 mg/L $K_2Cr_2O_7$ 组携卵萼花臂尾轮虫个数与对照组相比差异不显著 ($P > 0.05$), 在 24 h 和 96 h 后, 携卵萼花臂尾轮虫个数显著低于对照组 ($P < 0.01$)。24 ~ 96 h 后, 1.2 mg/L $K_2Cr_2O_7$ 组携卵萼花臂尾轮虫个数远远低于对照组 ($P < 0.01$), 说明 $K_2Cr_2O_7$ 对萼花臂尾轮虫的繁殖有极强的抑制作用 (图 6)。综上可知, 高浓度菌株 T-1 菌液对萼花臂尾轮虫的繁殖无影响, 且可促进其繁殖。

3 讨论

微生态制剂也叫微生态调节剂, 是利用微生物学原理制成的一种含有大量有益菌, 促进正常微生物群落生长繁殖及抑制病原菌生长繁殖的活菌制剂^[18]。其菌种来源、活菌数、安全性及生态

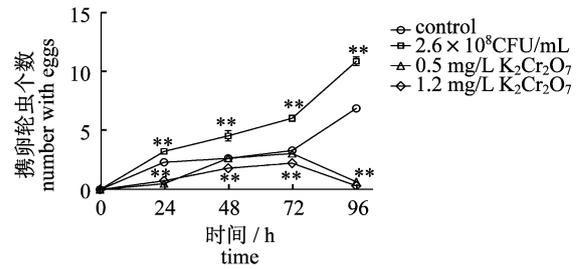


图 6 高浓度菌株 T-1 对携卵萼花臂尾轮虫个数的影响
Fig. 6 Influence of high concentration of the strain T-1 on the *B. calyciflorus* with eggs

效应是微生态制剂生产的必要条件^[19], 而国内对微生态制剂的安全性和生态效应研究极少^[20]。本实验以具有群体感应抑制作用的地衣芽孢杆菌 T-1 为研究对象, 按照国标 (GB) 的标准方法系统评价了该菌株的动物安全性及环境生态效应。结果表明该菌株对实验室常见的 2 种鱼类及小鼠具有良好的动物安全性。对水体生态环境中的藻类、大型溞及轮虫等的生长、繁殖均无不良影响, 具有环境安全性, 因此, 开发前景广阔。

在水体生态环境中, 细菌与藻类之间存在着密切的关系, 既存在互利共生, 又有相互拮抗作用。毕相东等^[21]采用实验生态学方法, 系统研究了群体感应信号分子 N-己酰高丝氨酸内酯 (N-hexanoyl homoserine lactone, C₆-HSL) 对小球藻生长的影响, 表现为低浓度 (C₆-HSL ≤ 200 nmol/L) 促进, 高浓度 (C₆-HSL ≥ 400 nmol/L) 抑制。本研究发现, T-1 菌株对生态系统中的小球藻生长具有一定程度的促进作用, 在水产养殖的水体系统中有利于建立良好的藻相, 从而丰富水产养殖的饵料来源, 由此可见, 该菌株除了具有淬灭病原菌群体感应信号分子的效果外, 比其他的益生菌具有更多的优势。究其原因, 可能是地衣芽孢杆菌 T-1 菌株能够降低小球藻培养液中群体感应信号分子的浓度, 从而使群体信号分子的浓度处于较低水平, 进而促进了小球藻的生长。

由于小球藻、大型溞以及轮虫对于一些毒物极为敏感, 且易培养, 因此, 常常作为生态评价的指示生物。我国已经建立了相应的利用小球藻、大型溞筛选药物及测定水质的相关标准, 并且在污水水质对生物影响检测中, 溞类的毒性实验已经得到广泛认可。早在 1982 年, 国际标准化组织 (ISO) 对于大型溞活性抑制实验已经做了初步规

定^[22];美国材料与实验协会(ASTM)在急性毒性实验中,分别采用萼花臂尾轮虫和褶皱臂尾轮虫作为淡水和海水环境检测的受试生物^[23]。在本实验中,综合采用国内及国际评价水体生态安全的各项指标,全面系统地评价了 T-1 菌株对水体生态环境中主要生物的急性毒性作用,为今后益生菌的开发应用之前的生态安全评价树立了典范。

本实验所选用的地衣芽孢杆菌 T-1 为一株具有群体感应抑制作用的芽孢杆菌,有望成为水产养殖的益生菌。目前利用群体感应淬灭机制达到预防和治疗革兰氏阴性致病菌的目的,成为控制细菌性疾病研究的新热点^[24]。越来越多的研究发现,芽孢杆菌中存在的群体感应淬灭酶通过水解革兰氏阴性菌的群体感应信号分子来减弱其毒力基因的表达,使革兰氏阴性致病菌对宿主的侵袭力减弱,从而更加有利于宿主免疫力的发挥,达到预防和消除致病菌的目的。Chu 等^[25]筛选出一株具有群体感应抑制作用的芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)作为饲料添加剂,能够降低嗜水气单胞菌对鲫的致病力,显著提高其存活率。

综上所述,本实验通过对一株具有群体感应抑制作用的地衣芽孢杆菌 T-1 进行系统而全面的生物毒性研究,为益生菌开发应用之前的安全评价及生态评价奠定了方法学依据,为其后续在水产养殖中大规模规范应用奠定了基础。

上海海洋大学水产与生命学院李伟明教授阅读过论文初稿并提出了宝贵修改建议,在此深表感谢!

参考文献:

- [1] Verner Jeffreys D W, Welch T J, Schwarz T, *et al.* High prevalence of multidrug-tolerant bacteria and associated antimicrobial resistance genes isolated from ornamental fish and their carriage water [J]. PLoS ONE, 2009, 4(12): 1 - 9.
- [2] Chen Q, Zhang X X, Zhao H, *et al.* Advance in research and application of microbial ecological agent in aquaculture [J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2012, 18(3): 524 - 530. [陈谦, 张新雄, 赵海, 等. 用于水产养殖的微生物生态制剂的研究和应用进展. 应用与环境生物学报, 2012, 18(3): 524 - 530.]
- [3] Qin L Y, Lv G P, Guo Y M, *et al.* Survey and hemolysin gene analysis of *Bacillus cereus* in infant food Shijiazhuang market [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2014, 26(4): 388 - 390. [秦丽云, 吕国平, 郭玉梅, 等. 石家庄市市售婴幼儿食品中蜡样芽孢杆菌的监测及溶血素基因的分析. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(4): 388 - 390.]
- [4] Yu J, Fan G Q, Li L, *et al.* Knockout of yplQ in *Bacillus subtilis* 224 and influence on hemolysis [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2010, 41(7): 74 - 78. [喻江, 范国权, 李璐, 等. 枯草芽孢杆菌 224 yplQ 基因敲除及其对溶血性的影响. 东北农业大学学报, 2010, 41(7): 74 - 78.]
- [5] Cho H, Liu L, Liu K, *et al.* Phenotypic characterization and phylogenetic analysis of a virulent *Bacillus cereus* strain from the Tiger frog, *Hoplobatrachus rugulosus* Wiegmann [J]. African Journal of Microbiology Research, 2010, 4(24): 2780 - 2786.
- [6] Guo J, Wang J, Song Z F, *et al.* The bacteriostatic activity of *Bacillus pumilus* X93 and extracellular products on pathogenic *Vibrio* [J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(10): 1564 - 1571. [郭婧, 王娟, 宋增福, 等. 短小芽孢杆菌 X93 及胞外产物抑菌活性的研究 [J]. 水产学报, 2013, 37(10): 1564 - 1571.]
- [7] National Environmental Protection Agency. Water quality standard for fisheries GB 11607 - 89 [S]. Beijing: The Standards Publisher of China, 1989: 25 - 27. [国家环境保护局. GB 11607 - 89 国家渔业水质标准. 北京: 中国标准出版社, 1989: 25 - 27.]
- [8] Bureau of Animal husbandry of Ministry of Agriculture. Fish medicine clinical test specification [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2003, 37(1): 11 - 14. [农业部畜牧兽医局, 渔药临床实验技术规范. 中国兽药杂志, 2003, 37(1): 11 - 14.]
- [9] Lu L, Song F. Fish acute toxicity test [J]. Bulletin of Biology, 2002, 37(7): 52 - 53. [卢玲, 宋福, 鱼类急性毒性实验. 生物学通报, 2002, 37(7): 52 - 53.]
- [10] Xie F J, Chen H Z, Zhao Y Y, *et al.* Water quality-Determination of the acute toxicity of substance to a freshwater fish (*Brachydanio rerio* namilton-Buchanan) GB/T 13267 - 91 [S]. Beijing: The Standards Publisher of China, 1992: 9 - 14. [谢凤君, 陈惠志, 赵幼一, 等. GB/T 13267 - 91 水质 物质对淡水鱼(斑马鱼)急性毒性测定方法. 北京: 中国标准出版社, 1992: 9 - 14.]
- [11] Zhou H, Shen Y W, Liu C, *et al.* Chemicals-Fish acute toxicity test GB/T27861 - 2011 [S]. Beijing:

- The Standards Publisher of China, 2012; 1 - 7. [周红, 沈英娃, 刘纯新, 等. GB/T 27861 - 2011 化学品鱼类急性毒性实验. 北京: 中国标准出版社, 2012; 1 - 7.]
- [12] National Environmental Protection Agency. The guidelines for the hazard evaluation of new chemical substances HJ/T 154 - 2004 [S]. Beijing: China Environmental Science Press, 2004; 6 - 7. [国家环境保护局. HJ/T 154 - 2004 新化学物质危害评估导则. 北京: 中国环境科学出版社, 2004; 6 - 7.]
- [13] Dai Y, Ma F L, Guo S P. Acute toxicity test GB 15193. 3 - 2003 [S]. Beijing: China Environmental Science Press, 2003; 17 - 31. [戴寅, 马凤楼, 郭世萍. GB 15193. 3 - 2003 急性毒性实验. 北京: 中国环境科学出版社. 2004; 17 - 31.]
- [14] Zhou H, Jian X D, Ma X, et al. Chemicals—Alga growth inhibition test GB/T 21805 - 2008 [S]. Beijing: The Standards Publisher of China, 2008; 2 - 8. [周红, 菅小东, 马馨, 等. GB/T 21805 - 2008 化学品藻类生长抑制实验. 北京: 中国标准出版社, 2008; 2 - 8.]
- [15] Xie F J, Qiao P W, Xiang X Y, et al. Water quality—Determination of the acute toxicity of substance to *Daphnia* (*Daphnia magna*) GB/T 13266 - 91 [S]. Beijing: The Standards Publisher of China, 1992; 1 - 4. [谢凤君, 乔佩文, 向刑云, 等. GB/T 13266 - 91 水质 物质对溞类(大型溞)急性毒性测定方法. 北京: 中国标准出版社, 1992; 1 - 4.]
- [16] Xi Y L, Huang X F. Effect of pH on population dynamics and resting egg of *Brachionus calyciflorus* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 1999, 6 (3): 19 - 22. [席贻龙, 黄祥飞. pH 对萼花臂尾轮虫种群动态和休眠卵的影响. 中国水产科学, 1999, 6(3): 19 - 22.]
- [17] Zhao H Y, Yang J X, Lu Z H, et al. The toxic effect of Cu^{2+} on Rotifer *Brachionus calyciflorus* [J]. Journal of Nanjing Normal University: Natural Science, 2002, 25(4): 81 - 85. [赵含英, 杨家新, 陆正和, 等. Cu^{2+} 对萼花臂尾轮虫的毒性影响. 南京师大学报: 自然科学版, 2002, 25(4): 81 - 85.]
- [18] Gatesoupe F J. The use of probiotics in aquaculture [J]. Aquaculture, 1999, 180(1): 147 - 165.
- [19] Cao H P, He S, Ou R J, et al. Progress on *Bdellovibrio bacteriovorus* used in aquaculture [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2013(1): 86 - 90. [曹海鹏, 何珊, 欧仁建, 等. 水产用噬菌蛭弧菌研究进展. 动物医学进展, 2013(1): 86 - 90.]
- [20] Yin W L, Shen J Y, Cao Z, et al. Study on Nitobacteria complex preparation safety to aquatic animals [J]. Journal of Aquaculture, 2010, 31(5): 39 - 41. [尹文林, 沈锦玉, 曹铮, 等. 复合硝化菌制剂的安全性研究. 水产养殖, 2010, 31(5): 39 - 41.]
- [21] Bi X D, Zhou W L, Xing K Z, et al. Effects of AHLs on growth and antioxidant defense system of *Chlorella vulgaris* [J]. Marine Environmental Science, 2012, 31(6): 897 - 900. [毕相东, 周文礼, 邢克智, 等. AHLs 信号分子对小球藻生长及抗氧化酶系统的影响. 海洋环境科学, 2012, 31(6): 897 - 900.]
- [22] Hart P R, Hutchinson W G, Purser G J. Effects of photoperiod, temperature and salinity on hatchery-reared larvae of the greenback flounder (*Rhombosolea tapirina* Günther, 1862) [J]. Aquaculture, 1996, 144 (4): 303 - 311.
- [23] ASTM E1440 - 91. Standard guide for acute toxicity test with the Rotifer *Brachionus* [S]. ASTM International, 2012.
- [24] Defoirdt T, Boon N, Bossier P, et al. Disruption of bacterial quorum sensing: An unexplored strategy to fight infections in aquaculture [J]. Aquaculture, 2004, 240(1): 69 - 88.
- [25] Chu W, Lu F, Zhu W, et al. Isolation and characterization of new potential probiotic bacteria based on quorum sensing system [J]. Journal of Applied Microbiology, 2011, 110(1): 202 - 208.

Animal safety and ecological evaluation of *Bacillus licheniformis* T-1 with quorum sensing inhibitory effect

SONG Zengfu^{1,2}, CHEN Biao¹, GUO Jing¹, XU Huadong¹,
REN Jianfeng^{1,3}, ZHANG Qinghua^{1,3*}, DONG Yinghui^{4*}

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. National Pathogen Collection for Aquatic Animals, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University, Ministry of Education, Shanghai 201306, China; 4. Zhejiang Key Laboratory of Aquatic Germplasm Resources, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China)

Abstract: Quorum sensing (QS) is a cell-cell communication system with population density. QS enables bacteria to synchronize specific gene expression, such as luminescence, virulence, motility, sporulation and biofilm formation. QS inhibitory effect can disrupt signal molecules of pathogens, thereby reducing its virulence factor expression, has broad new opportunities for therapeutic or environmental application. However, very little is known about the animal safety and ecology environment evaluation of the bacteria with QS inhibition effect. The purpose of the present study was to investigate the animal safety and ecology evaluation of *Bacillus licheniformis* T-1 with QS inhibition effect isolated by ourselves and provide a scientific basis for its use in the future. According to the national standard (GB) acute toxicity methods, the animal safety test and ecology environment evaluation of the *Bacillus licheniformis* T-1 was conducted. We use crucian carp, zebrafish and mice as test animal for safety evaluation, and use *Chlorella vulgaris*, *Daphnia magna* and *Brachionus calyciflorus* as test objects for ecological environment evaluation. The results showed that the crucian carp were intraperitoneally injected with the concentration of 11 200 mg/L (2.6×10^{11} CFU/mL), zebrafish were bathed in the concentration of 2 240 mg/L (5.2×10^{10} CFU/mL) and SPF mice (ICR) were gavaged with the 16 800 mg/L (3.9×10^{11} CFU/mL) concentration of *B. licheniformis* T-1 were all healthy and without any diseased symptoms or dead in continuous observation 96 h. Different concentration of *B. licheniformis* T-1 was non-toxic on *Chlorella vulgaris*, whereas promoted them to grow. *B. licheniformis* T-1 was nontoxic to the growth of *Daphnia magna* in continuous observation 24h. *B. licheniformis* T-1 was nontoxic to the *Brachionus calyciflorus* growth in 24 h and could promote their growth in high concentration. To conclude, the results in the present experiments indicated that the *B. licheniformis* T-1 with the inhibitory effect of quorum sensing was nontoxic on crucian carp, zebrafish and mice, and had no adverse effect on plankton in water ecological environment. It has the potential for probiotics in the future.

Key words: *Bacillus licheniformis*; acute toxicity; animal safety evaluation; ecological environment evaluation

Corresponding author: ZHANG Qinghua. E-mail: qhzhang@shou.ed.cn;

DONG Yinghui. E-mail: dongyinghui118@126.com