

鲫肠道乳酸菌的分离及益生特性

杨媛媛, 王楠楠, 曹青, 陆承平, 刘永杰*

(南京农业大学动物医学院, 江苏南京 210095)

摘要: 为获得鱼源益生乳酸菌, 本研究从健康鲫肠道内分离鉴定得到38株乳酸菌, 并选择其中8株乳酸菌进行体外益生特性分析。结果显示, 8株乳酸菌均能在pH=4.5和10%胆汁环境中存活, 对嗜水气单胞菌、豚鼠气单胞菌、无乳链球菌和副溶血弧菌均有较强的抑菌能力, 但菌体表面疏水性和自凝集能力具有菌株特异性。选择5株疏水性较高(63%~89%)、自凝集能力强(37%~45%)的乳酸乳球菌进行体外黏附能力测定, 结果显示, 黏附能力在菌株间具有差异性(4.5%~7.9%), 但均能显著降低嗜水气单胞菌NJ-35的体外黏附率, 黏附抑制率达30%~35%; 最后对筛选出的3株高黏附力的乳酸乳球菌进行安全性评价, 发现3株菌对鲫均无致病力。鱼源乳酸菌的筛选, 为鲫养殖生产中益生菌的实际应用提供了理论依据。

关键词: 鲫; 乳酸菌; 分离; 益生特性

中图分类号: S 917.1

文献标志码: A

近年来, 随着水产养殖业的迅速发展, 疾病的频繁暴发成为限制水产业发展的主要因素之一。抗生素的过度使用导致细菌耐药性产生, 越来越多的学者提倡用益生菌替代抗生素^[1-3]。

乳酸菌(*Lactobacillus* sp.)是一类发酵产生乳酸、过氧化氢酶阴性的革兰氏阳性菌, 其中多个菌种属于益生菌^[4]。乳酸菌对人和动物具有广泛的益生作用, 目前, 在医学和食品等领域已有大量研究, 近年来鱼类消化道乳酸菌的研究也开始受到关注^[5]。虽然有陆生动物使用的乳酸菌应用于水产动物的报道, 但一般认为从宿主体内或养殖环境中筛选出的乳酸菌能更好地适应环境并在宿主体内定殖, 已有研究证实使用宿主特异性乳酸菌的重要性^[6]。

鲫(*Carassius auratus*)是我国重要的大宗淡水养殖品种之一, 在我国淡水养殖业中具有重要地位。随着养殖集约化程度的增高、养殖密度的增大以及养殖水环境的恶化, 鲫的病害问题也日益突出, 本研究从鲫肠道内分离乳酸菌并分析其益生特性, 旨在筛选出合适的益生菌,

为其后续的实际应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验菌株 嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)NJ-35、嗜水气单胞菌NJ-34、豚鼠气单胞菌(*A. caviae*)LK-18、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)GD201008-001株均由本实验室保存, 副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)VP 118由上海兽医研究所蒋蔚惠赠。

实验对象 鲫由江苏省水产养殖技术推广中心提供, 体长10~12 cm, 体质量约为25 g。

主要试剂 细菌基因组DNA提取试剂盒、PCR产物回收试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司; PCR Mix液购自Vazyme公司; 荧光探针cFDA-SE购自Sigma公司; 其余试剂为进口或国产分析纯。

培养基 MRS培养基用于乳酸菌的分离培养及明串株菌(*Leuconostoc* sp.)的培养; GM17培

收稿日期: 2017-10-30 修回日期: 2018-04-02

资助项目: 江苏省农业科技自主创新项目[CX(17)2027]; 江苏省水产三新工程(D2015-13)

通信作者: 刘永杰, E-mail: liuyongjie@njau.edu.cn

培养基用于乳球菌(*Lactococcus* sp.)的培养; THB培养基用于无乳链球菌的培养; LB培养基用于气单胞菌的培养; 含3% NaCl的LB培养基用于副溶血弧菌培养。

1.2 鲫肠道内乳酸菌的分离鉴定

乳酸菌的分离 健康鲫用MS-222麻醉后剪鳃放血处死, 再用碘酊和75%乙醇消毒体表, 在无菌超净台内取出肠道。纵向剪开肠道, 用PBS缓冲液冲洗除去肠道内粪便。将肠道样品匀浆, 匀浆液梯度稀释后取0.1 mL涂布含1% CaCO₃的MRS固体培养基, 28 °C静置培养48 h。挑取有溶钙环的单菌落, 再次划线接种MRS固体培养基进一步纯化。取经2次纯化后的单一菌落, 进行革兰氏染色。

生化特性鉴定 挑取革兰氏阳性分离株接种于MRS液体培养基, 28 °C培养24 h, 进行过氧化氢酶、氧化酶、硝酸盐还原实验。

分子生物学鉴定 按试剂盒说明书提取细菌基因组。使用16S *rRNA* 基因的通用引物 27 F、1492 R进行PCR扩增。反应体系为15 μL, 包括基因组模板2 μL, 上下游引物各1 μL, PCR Mix为7.5 μL, ddH₂O为3.5 μL。反应程序: 94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 55 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min 15 s, 30个循环; 72 °C终延伸10 min。产物克隆至pMD-19T载体上, 送苏州金唯智生物科技有限公司测序。测序结果在NCBI数据库中进行BLAST比对。

1.3 生长曲线及产酸能力检测

乳酸乳球菌在GM 17培养基、明串珠菌在MRS培养基中28 °C静置培养过夜, 再用相应的培养基调整菌浓度为OD₆₀₀=1.0, 按1%的比例接种相应的液体培养基。混匀后以1 mL/管的体积分装到1.5 mL EP管中, 28 °C静置培养。从第3小时开始, 每隔1 h取出3支EP管测其OD₆₀₀, 记录数据。实验独立重复3次。

在测定生长曲线的同时, 在12、24、48和72 h使用pH计分别测各分离株培养液的pH值, 以测定各分离菌株的产酸能力。实验独立重复3次。

1.4 压力耐受性实验

参照Muñoz-Atienza等^[7]的方法进行压力耐受实验。

耐酸能力检测 新鲜过夜培养的乳酸菌,

5 000 r/min离心10 min收集菌体细胞, PBS缓冲液洗涤2次。以PBS缓冲液为空白对照, 调整菌浓度OD₆₀₀=0.2, 以1:10的比例接种至pH为3.0、4.5、5.5、7.4的PBS缓冲液中。28 °C静置2 h后, 样品用PBS缓冲液梯度稀释后涂GM 17平板, 28 °C培养36 h后进行菌落计数并计算相对存活率。相对存活率(%)=CFU_x/CFU_{7.4}×100, CFU_x为在不同pH的PBS缓冲液中静置2 h后的细菌数; CFU_{7.4}为在pH=7.4的PBS缓冲液中静置2 h后的细菌数。实验独立重复3次。

耐鲫胆汁能力检测 按照上述方法制备菌悬液。鲫胆汁抽取自鲫胆囊并分装保存于-20 °C备用^[7]。将待测菌株以1:10的比例接种至含有10%鲫胆汁的PBS缓冲液中, 28 °C静置2 h。样品用PBS缓冲液梯度稀释后涂GM 17平板, 28 °C培养36 h后进行菌落计数并计算相对存活率。相对存活率(%)=CFU_{10%}/CFU_{7.4}×100, CFU_{10%}为在含有10%鲫胆汁的PBS缓冲液中静置2 h后的细菌数; CFU_{7.4}为在pH=7.4的PBS缓冲液中静置2 h后的细菌数。实验独立重复3次。

1.5 抑菌活性实验

选择常见的水产病原菌——嗜水气单胞菌NJ-35、嗜水气单胞菌NJ-34、豚鼠气单胞菌LK-18、无乳链球菌GD201008-001、副溶血弧菌VP 118作为指示菌, 进行双层平板抑菌实验^[8]。

过夜培养的乳酸菌, 以培养基为空白对照, 调整菌浓度OD₆₀₀=1.0。取3 μL上述菌液滴在相应的固体培养基(含1.5%琼脂)表面, 每株菌做3个重复, 点种一个平板, 室温静置10 min, 待菌液干后将培养基放入28 °C温箱中培养10 h, 直至长出圆形菌斑。在上面倾倒覆盖一层约8 mL的含有1.0×10⁶ CFU/mL指示菌的软琼脂(含0.8%琼脂), 室温静置10 min, 待琼脂凝固后移入适合指示菌生长的相应的温度(气单胞菌在28 °C、无乳链球菌和弧菌在37 °C)中培养24 h, 测量记录抑菌圈直径。实验独立重复3次。

1.6 菌体表面疏水性

采用微生物黏附碳氢化合物法(microbial adhesion to hydrocarbons, MATH), 通过菌株对碳氢化合物的亲和力来反映菌体表面的疏水性^[9]。

过夜培养的乳酸菌, 5 000 r/min离心10 min收集菌体, PBS缓冲液洗涤2次。以PBS缓冲液为空白对照, 调节菌浓度为OD₆₀₀=0.6。取3 mL

上述菌悬液加入1 mL二甲苯, 涡旋混匀100 s, 室温静置40 min, 待两相分离后, 取水相, 以PBS缓冲液为空白对照, 测定OD₆₀₀。每株菌做3管重复。菌体表面疏水性(%)=(A₀-A₁)/A₀×100, A₀为菌悬液混匀后静置0 min在600 nm处测得的吸光值; A₁为菌悬液混匀后静置40 min在600 nm处测得的吸光值。实验独立重复3次。

结果根据Santos等^[10]提出的标准来评估细菌表面的疏水性: CSH%>50%为高度疏水, CSH%介于20%和50%为中度疏水, CSH%<20%为非疏水。

1.7 凝集能力检测

细菌凝集能力的检测参照已有方法^[11]。

自凝集实验 用“菌体表面疏水性”部分的方法制备乳酸菌的菌悬液。取1.8 mL调整好浓度的菌悬液于2 mL EP管中, 室温静置2 h后, 取上层溶液测OD₆₀₀。每株菌做3管重复。

自凝集率(%)=(A₀-A₂)/A₀×100

共凝集实验 选择嗜水气单胞菌NJ-35、无乳链球菌GD201008-001作为指示菌, 分别在LB培养基和THB培养基中生长。用“菌体表面疏水性”部分的方法制备乳酸菌和指示菌的菌悬液, 分别取乳酸菌菌悬液0.9 mL、指示菌菌悬液0.9 mL于2 mL EP管中, 涡旋混匀60 s后室温静置, 2 h后取上层溶液测OD₆₀₀。每株菌做3管重复。共凝集率(%)=(A₀-A₂)/A₀×100, A₂: 菌悬液混匀后静置2 h在600 nm处测得的吸光值。实验独立重复3次。

1.8 体外黏附与黏附抑制实验

实验参照Muñoz-Atienza等^[7]的方法。

鲫前肠黏液蛋白的制备 剖取健康鲫前肠, 纵向剖开肠管, 用生理盐水冲洗肠道内表面, 再用细胞刮轻轻刮取肠道表面黏液, 用生理盐水冲洗稀释黏膜蛋白样品。4 °C 11 304×g离心5 min以除去细胞和组织碎片。取上清液检测蛋白浓度, 并调整浓度为0.5 mg/mL, 分装后-20 °C保存备用。

细菌标记 细菌培养至OD₆₀₀=1.0, 4 °C 4 000 r/min离心10 min, 生理盐水洗2遍后调整细菌浓度为1.0×10⁹ CFU/mL, 加入cFDA-SE至终浓度25 μmol/L, 37 °C水浴30 min。标记结束后用生理盐水洗涤至上清液无色, 再用生理盐水重悬细菌,

调整细菌浓度。

乳酸菌的体外黏附 取100 μL黏液蛋白样品加入96孔黑色聚苯乙烯微量滴定板中, 4 °C包被过夜后每孔加200 μL生理盐水洗2次以除去未黏附的黏液。每孔加入100 μL cFDA-SE标记的乳酸菌(1.0×10⁸ CFU/mL), 每株菌3个重复, 28 °C孵育1 h。用生理盐水洗去未黏附的细菌, 每孔加入200 μL 1% SDS-0.1 mol/L NaOH溶液, 60 °C孵育1 h以洗脱黏附的乳酸菌。最后设立阴性和阳性对照: 阴性对照每孔加100 μL未标记的乳酸菌(1.0×10⁸ CFU/mL); 阳性对照每孔加100 μL cFDA-SE标记的乳酸菌(1.0×10⁸ CFU/mL)。使用荧光酶标仪测定结果, 激发波长为485 nm, 荧光发射波长为620 nm。黏附率(%)=(实验组荧光强度-阴性对照荧光强度)/(阳性对照荧光强度-阴性对照荧光强度)×100。实验重复3次。

乳酸菌对致病菌的体外黏附抑制 在包被好黏液蛋白的滴定板中, 每孔加100 μL cFDA-SE标记的NJ-35(1.0×10⁸ CFU/mL)和100 μL未标记的乳酸菌(1.0×10⁹ CFU/mL), 每株菌3个重复, 阳性对照孔加100 μL cFDA-SE标记的NJ-35(1.0×10⁸ CFU/mL), 28 °C孵育1 h。用生理盐水洗去未黏附的细菌后, 每孔加入200 μL 1% SDS-0.1 mol/L NaOH溶液, 60 °C孵育1 h以洗脱黏附的细菌。最后设立阴性对照, 阴性对照每孔加100 μL未标记的乳酸菌(1.0×10⁹ CFU/mL)和100 μL未标记的NJ-35(1.0×10⁸ CFU/mL)。荧光酶标仪测定结果。黏附抑制率(%)=(阳性对照荧光强度-实验组荧光强度)/(阳性对照荧光强度-阴性对照荧光强度)×100。实验重复3次。

1.9 安全性评估

过夜培养的乳酸菌, 5 000 r/min离心10 min收集菌体, PBS缓冲液洗涤2次。以PBS缓冲液为空白对照, 调节菌浓度为5.5×10⁹ CFU/mL。7尾鲫为一组, 共3个实验组, 1个对照组。实验组每尾鲫腹腔注射0.1 mL菌液, 阴性对照组腹腔注射0.1 mL PBS缓冲液。每天定时观察鲫的健康状态, 持续观察7 d。第8天剖检存活的鲫, 观察内脏器官有无病变。

1.10 统计学分析

数据采用Microsoft Excel 2015 和SPSS Statistics v20.0软件进行分析处理。P<0.05表示差异显著。

2 结果

2.1 乳酸菌的分离鉴定

从健康鲫肠道内共分离获得38株乳酸菌, 分离株均有溶钙环, 并且过氧化氢酶、氧化酶、硝酸盐还原实验均为阴性。16S *rRNA*基因测序结果显示, 上述38株乳酸菌分别属于4个属: 乳球菌属、明串珠菌属、肉食杆菌属(*Carnobacterium*)、肠球菌属(*Enterococcus*)(表1)。

表1 鲫肠道乳酸菌的鉴定结果

Tab. 1 The molecular identification of *Lactobacillus* sp. isolated from *C. auratus* gut

菌属 bacterial genus	菌种 bacterial strains	数量 number
乳球菌属 <i>Lactococcus</i>	乳酸乳球菌 <i>L. lactis</i>	9
	棉子糖乳球菌 <i>L. raffinolactis</i>	3
	格氏乳球菌 <i>L. garvieae</i>	10
	明串珠菌属 <i>Leuconostoc</i>	4
肉食杆菌属 <i>Carnobacterium</i>	麦芽糖肉食杆菌 <i>C. maltaromaticum</i>	9
肠球菌属 <i>Enterococcus</i>	屎肠球菌 <i>E. faecium</i>	1

2.2 乳酸菌生长曲线及产酸能力

选择6株乳酸乳球菌(16-6、16-7、16-18、16-19、16-21、16-24)和2株柠檬色明串珠菌(16-3、16-4), 采用最适培养基测定生长曲线。乳酸乳球菌在GM 17培养基、柠檬明串珠菌在MRS培养基中的生长曲线结果显示, 乳酸乳球菌各菌株

4 h开始进入对数生长期, 9 h后进入平台期, 其中16-18能达到的最大生长密度比其他几株乳酸乳球菌低; 而柠檬色明串珠菌相对生长速率较慢, 5 h进入对数生长期, 11 h后进入平台期, 且能达到的最大生长密度也比较低(图1)。

各分离株在培养24 h左右达到产酸最大值(图1-b), 柠檬明串珠菌的培养基pH在4.2左右, 而乳酸乳球菌的产酸能力相对较弱, pH在4.7左右。

2.3 乳酸菌压力耐受性

各分离株在pH=4.5的PBS缓冲液中静置2 h后均能存活(图2-a), 其中16-24的相对存活率较低, 为71.66%, 其余菌株的相对存活率高于80%; 而各分离菌在pH=3.0的PBS缓冲液中处理2 h后, 相对存活率均低于0.1%。各分离株在含10% 鲫胆汁的PBS缓冲液中静置2 h后均能存活(图2-b), 其中16-18的相对存活率为47.60%, 16-21的相对存活率为68.11%, 其余菌株的相对存活率高于77%。

2.4 乳酸菌抑菌活性

抑菌实验结果显示, 各分离株均能不同程度地抑制5株指示菌的生长(图3)。其中, 对于无乳链球菌GD201008-001和副溶血弧菌VP 118, 各分离株的抑菌作用无显著差异($P>0.05$); 对于豚鼠气单胞菌LK-18, 除16-19的抑菌能力显著高于16-3之外($P<0.05$), 其余分离株间无显著差异($P>0.05$); 对于嗜水气单胞菌NJ-34, 除16-7的抑菌能力显著高于16-18之外($P<0.05$), 其余分离株间无显著差异($P>0.05$); 对于嗜水气单胞菌NJ-

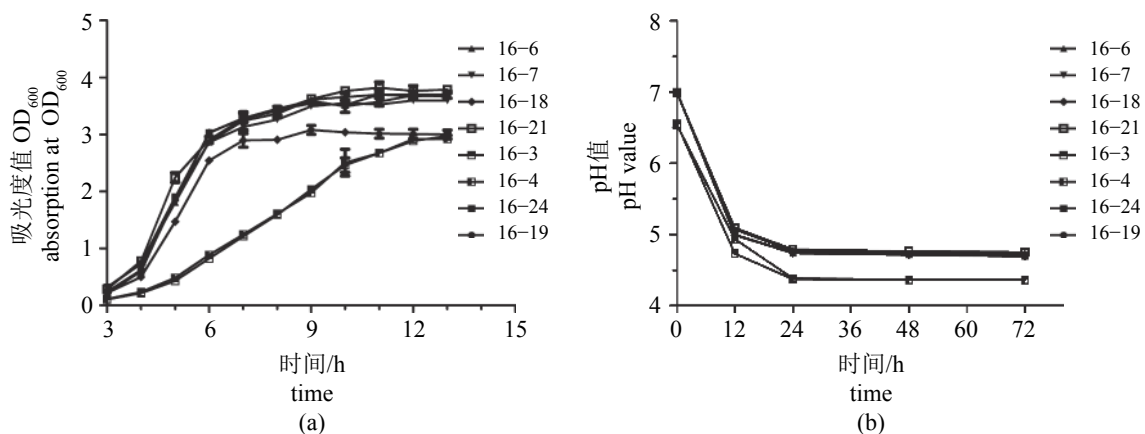


图1 乳酸菌生长曲线及产酸

(a)乳酸菌的生长曲线; (b) 乳酸菌的产酸能力检测

Fig. 1 Growth curve and acid production of *Lactobacillus* sp.

(a) growth curve of *Lactobacillus* sp.; (b) acid production of *Lactobacillus* sp.

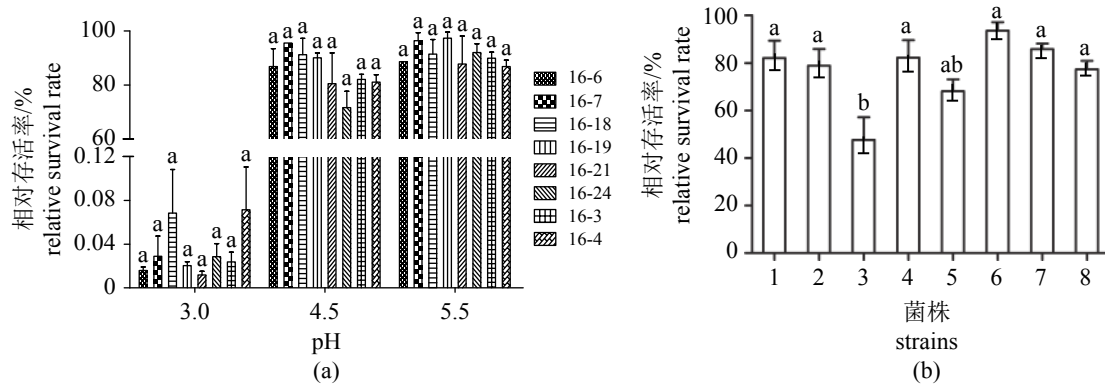


图 2 乳酸菌对酸和鲫胆汁的耐受性

(a) 乳酸菌在不同pH条件下的存活情况, (b) 乳酸菌在胆汁中的存活情况; 1. 16-6, 2. 16-7, 3. 16-18, 4. 16-19, 5. 16-21, 6. 16-24, 7. 16-3, 8. 16-4; 不同分离株间比较, 字母不同表示差异显著($P < 0.05$); 下同

Fig. 2 Acid and bile tolerance of *Lactobacillus* sp.

(a) survival of lactic acid bacteria at different pH, (b) survival of lactic acid bacteria in *C. carassius* bile; 1. 16-6, 2. 16-7, 3. 16-18, 4. 16-19, 5. 16-21, 6. 16-24, 7. 16-3, 8. 16-4; significant differences at $P < 0.05$ among different groups are indicated by different letters; the same below

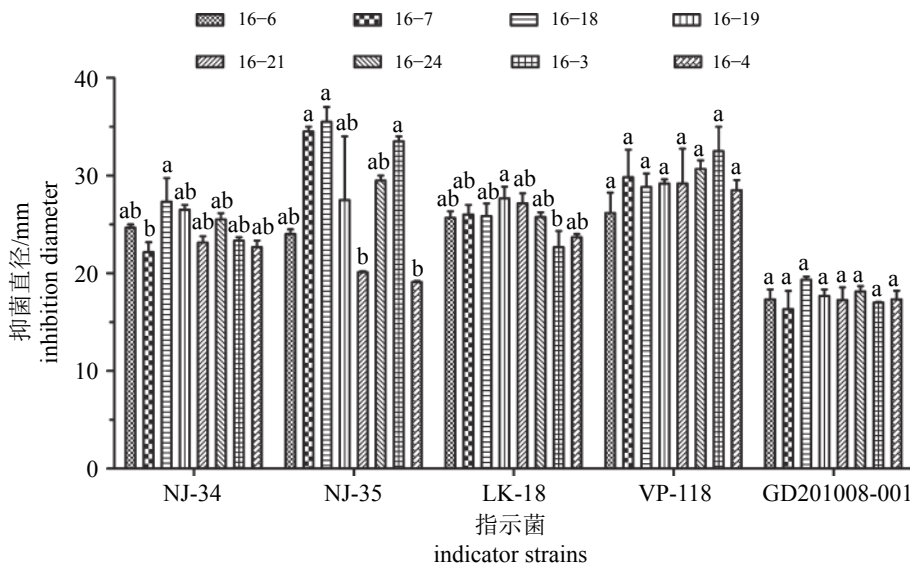


图 3 乳酸菌对鱼源致病菌的抑菌活性

Fig. 3 Antimicrobial activity of *Lactobacillus* sp. against five fish pathogens

35, 16-7、16-18、16-3的抑菌能力显著高于16-21和16-4($P < 0.05$), 其余3株间无显著性差异($P > 0.05$)。

2.5 菌体表面疏水性

菌体表面疏水性检测结果显示, 16-6(19%)、16-4(7%)属于非疏水性; 16-3(40%)属于低疏水性; 其余5株乳酸菌属于高疏水性(63%~89%)(图4)。

2.6 凝集能力检测

凝集实验结果显示, 各分离株的自凝集能力为27%~45%(图5-a), 其中16-7、16-18、16-

19、16-21、16-24分离株的自凝集能力显著高于16-6、16-3和16-4($P < 0.05$), 与菌体表面疏水性的实验结果一致。各分离株与嗜水气单胞菌NJ-35的共凝集能力为30%~50%, 其中分离株16-7、16-19、16-21、16-24对NJ-35的共凝集能力显著高于其余分离株($P < 0.05$); 而各分离株对无乳链球菌GD201008-001的共凝集能力为30%~40%, 无显著差异($P > 0.05$, 图5-b)。

2.7 体外黏附与黏附抑制实验

根据分离株的菌体表面疏水性及凝集能力, 选取了分离株16-7、16-18、16-19、16-21、16-24

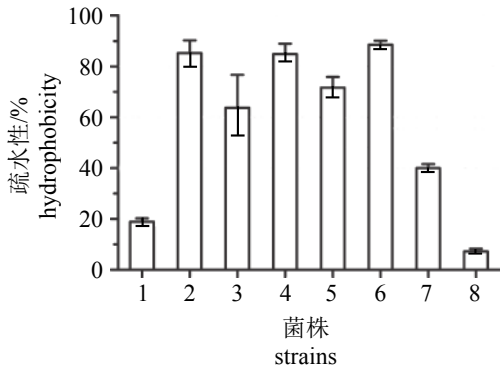


图4 乳酸菌菌体表面疏水性

Fig. 4 Cell surface hydrophobicity of *Lactobacillus* sp.

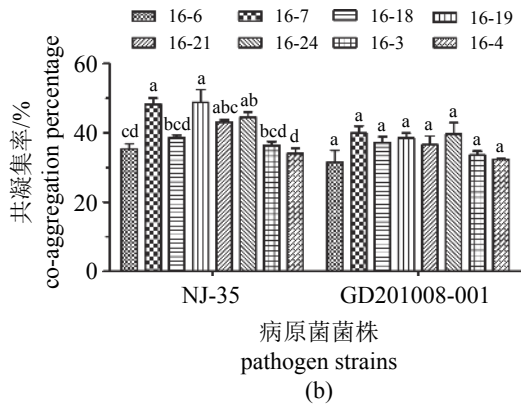
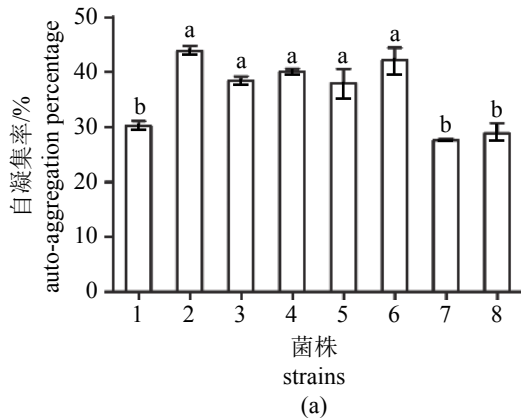


图5 乳酸菌的凝集能力

(a)乳酸菌的自凝集率; (b)乳酸菌对致病菌的共凝集率

Fig. 5 Aggregation ability of *Lactobacillus* sp.

(a) autoaggregation percentage of *Lactobacillus* sp. ; (b) coaggregation percentage of *Lactobacillus* sp. with two fish pathogens

进行体外黏附和黏附抑制实验。各分离株的体外黏附能力具有菌株特异性(图6-a), 其中16-7、16-19、16-24的黏附能力较高, 分别为7.8%、7.3%、7.4%, 但无显著性差异($P>0.05$); 这与菌体表面疏水性及分离株凝集能力一致。各分离

株抑制嗜水气单胞菌NJ-35黏附的能力为30%~35%(图6-b), 无显著差异($P>0.05$)。

2.8 安全性检测

根据体外黏附与黏附抑制实验的结果, 选取16-7、16-19、16-24三株菌进行安全性检测。各分离株腹腔注射鲫后连续观察7 d, 发现各组鲫摄食及精神状态均正常, 无一死亡。第8天剖检鲫, 实验组和对照组的内脏器官均正常, 无坏死、出血等病理变化。初步验证了分离株的安全性。

3 讨论

迄今为止, 已有许多分离自淡水鱼肠道的益生菌得到了鉴定, 如藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)A1-6分离自虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[12], 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)分离自印鲢(*Cirrhina mrigala*)^[13], 但极少有分离自鲫肠道益生菌的报道。本实验从健康鲫肠道内分离获得38株乳酸菌, 考虑到格氏乳球菌(*L. garvieae*)和肉食杆菌(*Camobacterium* sp.)可能是条件致病菌^[14-16], 本实验选择6株乳酸乳球菌和2株柠檬色明串珠菌进行益生特性分析。

作为益生菌, 最重要的特性之一即能够在动物消化道内存活。Muñoz-Atienza等^[7]对来源于鱼类或海产品的8株乳酸菌进行耐酸特性检测, 结果发现在pH=3.0的PBS缓冲液中处理1.5 h后, 所有菌株的存活率均高于50%。本研究发现鲫肠道来源的8株乳酸菌均能很好地耐受pH=4.5以上的酸度, 除16-24分离株外, 其余菌株的相对存活率均高于80%。鲫作为无胃的鲤科鱼类, 肠道pH值通常在6.2~7.0^[17]。因此, 本实验分离的乳酸菌虽然不能耐受pH=3.0以下的酸度, 但也足以耐受鲫肠道的pH环境。另外, 参考Muñoz-Atienza等^[7]的方法采用10%的鲫胆汁浓度作为筛选益生菌的标准, 结果显示所有分离株均能耐受10%鲫胆汁的环境, 除16-18、16-21外, 其余分离株的相对存活率均在77%以上。这些结果提示, 所有分离株均能在鲫肠道内存活, 也与已报道的一些益生菌的压力耐受能力一致^[18]。

很多研究表明, 益生菌能通过产生乳酸、过氧化氢、细菌素等多种物质来发挥对致病菌的广泛抑菌作用^[19-20]。Sahoo等^[21]采用打孔法检测从南亚野鲮(*Labeo rohita*)和真卡特拉鲃(*Catla*

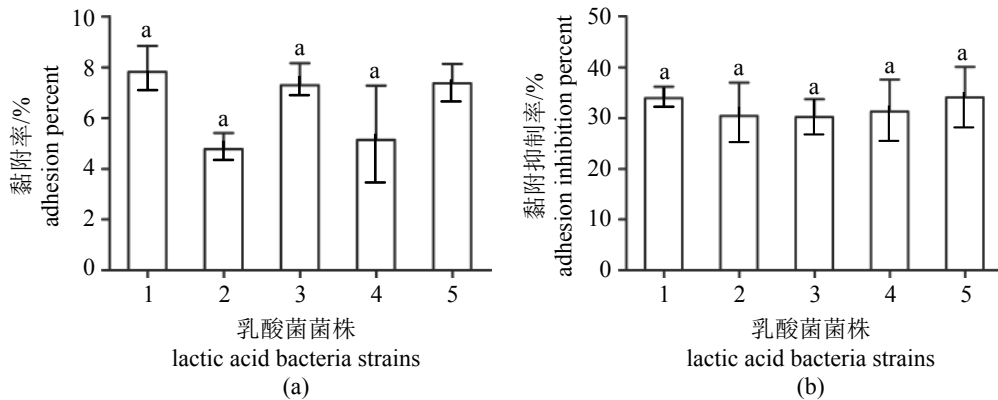


图6 乳酸菌的体外黏附及其对嗜水气单胞菌NJ-35的黏附抑制能力

(a)分离株对鲫肠道黏液的黏附能力, (b)分离株抑制嗜水气单胞菌NJ-35对鲫肠道黏液黏附的能力; 1. 16-7, 2. 16-18, 3. 16-19, 4. 16-21, 5. 16-24

Fig. 6 The *in vitro* adhesion of *Lactobacillus* sp. to *C. auratus* intestinal mucus and their inhibition effect on *A. hydrophila* NJ-35 adhesion

(a) adhesion of the isolates to *C. auratus* intestinal mucus, (b) inhibition of the adhesion of *A. hydrophila* NJ-35 to *C. auratus* intestinal mucus

catla)肠道分离获得的5株乳酸菌的抑菌能力, 发现其对大肠杆菌(*Escherichia coli*)、嗜水气单胞菌等8株指示菌均有很强的抑制作用, 但抑菌物质不是酸。本实验采用双层平板抑菌法来模拟鲫肠道内相对厌氧的环境, 发现各分离株对常见的水产病原菌如嗜水气单胞菌、豚鼠气单胞菌、副溶血弧菌、无乳链球菌均有不同程度的抑菌作用。其中, 分离株16-7、16-18、16-3对嗜水气单胞菌流行菌株NJ-35的抑菌能力最强, 提示这3株菌可用于控制淡水鱼类嗜水气单胞菌感染。至于具体哪种物质具有抑菌活性, 目前尚不清楚, 值得进一步研究。

已有研究证实, 菌体表面疏水性与细菌的自凝集能力直接相关, 疏水性是细菌自凝集能力高低的决定因素之一^[10]。而细菌的凝集能力对于细菌在肠道的生态龕中的生存有着重要意义: 一方面益生菌能够通过自凝集达到一定的数量以形成生物被膜或黏附到宿主黏膜表面来发挥生物学功能^[22]; 另一方面益生菌通过与病原菌的共凝集, 形成一道屏障阻止病原菌的黏附入侵^[23]。在本研究中, 分离株16-7、16-18、16-19、16-21和16-24属于高疏水性, 自凝集率>35%, 其菌体疏水性与自凝集能力呈正相关, 与已有文献研究结果一致^[24]; 所有分离株均能与两株病原菌发生共凝集, 其中16-7、16-19、16-21和16-24分离株对嗜水气单胞菌NJ-35的共凝集能力相对较高; 而各分离株对无乳链球菌GD201008-001则无显著差异。

益生菌发挥益生作用的前提是必须能在宿主肠道内定殖, 而黏附则是细菌在肠道内定殖的先决条件。细菌的黏附能力与其菌体的表面特性密切相关^[25-27], Del Re等^[11]提出可以通过MATH法检测菌体表面的疏水性和细菌的自凝集能力来初步筛选高黏附力的菌株。靳彩娟^[27]选择10株对小鼠(*Mus musculus*)巨噬细胞、脾细胞、肠上皮细胞和肠黏液黏附能力不同的乳酸菌, 分析其细胞表面疏水性、自凝集能力以及与致病菌的共凝集能力, 发现3株黏附能力强的乳酸菌表面疏水性大于90%, 同时也显示出较高的自凝集以及对致病菌的共凝集能力; 而4株黏附能力弱的乳酸菌其表面疏水性、自凝集和共凝集能力均相对较低。本研究筛选出具有高疏水性和自凝集能力的5株乳酸菌, 检测其体外黏附及对病原菌的黏附抑制能力。研究发现, 各分离株的体外黏附能力具有菌株特异性, 其中16-7、16-19、16-24的黏附能力稍高, 结果与分离株的菌体表面疏水性及凝集能力正相关。益生菌对病原菌的黏附抑制主要是通过竞争相同的黏附受体、与病原菌共凝集以减少病原菌的黏附量以及与益生菌和病原菌本身的黏附特性有关^[28-29]。本实验中, 各分离株能显著降低嗜水气单胞菌NJ-35的体外黏附率, 黏附抑制率达30%~35%。

综上所述, 本实验从鲫肠道内分离筛选出3株能在鲫肠道环境中存活、具有广泛抑菌能力、体外黏附性较高的乳酸菌。由于是鱼源分离株, 且有着良好的体外益生特性, 提示其在

水产养殖中作为候选益生菌的良好应用前景。后续研究会进一步评估这3株鱼源乳酸菌在鲫体内的定殖能力及其对鲫的免疫调节作用, 为其实际应用提供理论依据。

参考文献:

- [1] Angulo F. Antimicrobial agents in aquaculture: potential impact on public health[J]. *APUA Newsletter*, 2000, 18(1): 1-6.
- [2] Balcázar J L, De Blas I, Ruiz-Zarzuela I, *et al.* The role of probiotics in aquaculture[J]. *Veterinary Microbiology*, 2006, 114(3-4): 173-186.
- [3] Lee H I, Kim M H, Kim K Y, *et al.* Screening and selection of stress resistant *Lactobacillus* spp. isolated from the marine oyster (*Crassostrea gigas*)[J]. *Anaerobe*, 2010, 16(5): 522-526.
- [4] Merrifield D L, Dimitroglou A, Foey A, *et al.* The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids[J]. *Aquaculture*, 2010, 302(1-2): 1-18.
- [5] Ringø E, Bendiksen H R, Wesmajervi M S, *et al.* Lactic acid bacteria associated with the digestive tract of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, 89(2): 317-322.
- [6] Mathur S, Singh R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 105(3): 281-295.
- [7] Muñoz-Atienza E, Araújo C, Magadán S, *et al.* *In vitro* and *in vivo* evaluation of lactic acid bacteria of aquatic origin as probiotics for turbot (*Scophthalmus maximus* L.) farming[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 41(2): 570-580.
- [8] Touré R, Kheadr E, Lacroix C, *et al.* Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, 95(5): 1058-1069.
- [9] Won K M, Park S I. Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to cultured marine fishes in Korea[J]. *Aquaculture*, 2008, 285(1-4): 8-13.
- [10] Santos Y, Bandin I, Nieto T P, *et al.* Comparison of the cell surface hydrophobicity of bacterial fish pathogens by different procedures[M]//Perkins F O, Cheng T C. *Pathology in Marine Science*. Amsterdam: Elsevier, 1990: 101-115.
- [11] Del Re B, Sgorbati B, Miglioli M, *et al.* Adhesion, auto-aggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2000, 31(6): 438-442.
- [12] Irianto A, Austin B. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2002, 25(6): 333-342.
- [13] Ghosh S, Sinha A, Sahu C. Isolation of putative probiotics from the intestines of Indian major carps[J]. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 2007, 59(3): 127-132.
- [14] 房海, 陈翠珍, 张晓君. 牙鲈格氏乳球菌感染症及其病原[J]. *中国水产科学*, 2006, 13(3): 403-409.
- Fang H, Chen C Z, Zhang X J. *Lactococcus garvieae* as a pathogen in flounder (*Paralichthys olivaceus* Temminck et Schlegel)[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(3): 403-409(in Chinese).
- [15] Ugajin M. Studies on *Streptococcus* sp. as a causative agent of an epizootic among the cultured ayu (*Plecoglossus altivelis*) in Tochigi Prefecture, Japan, 1980[J]. *Fish Pathology*, 1981, 16(3): 119-127.
- [16] Leisner J J, Laursen B G, Prévost H, *et al.* *Carnobacterium*: positive and negative effects in the environment and in foods[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2007, 31(5): 592-613.
- [17] 曾东, 王益平, 倪学勤, 等. 鲤益生菌筛选及部分菌株对鲤肠道黏液的体外黏附作用[J]. *中国水产科学*, 2009, 16(3): 427-433.
- Zeng D, Wang Y P, Ni X Q, *et al.* Screening of carp probiotic bacteria and adhesion to carp foregut mucus *in vitro*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2009, 16(3): 427-433(in Chinese).
- [18] Balcázar J L, Vendrell D, de Blas I, *et al.* Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish[J]. *Aquaculture*, 2008, 278(1-4): 188-191.
- [19] Cebeci A, Gürakan C. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains[J]. *Food Microbiology*, 2003, 20(5): 511-518.
- [20] Kumar R V J, Seo B J, Mun M R, *et al.* Putative probiotic *Lactobacillus* spp. from porcine gastrointestinal tract inhibit transmissible gastroenteritis coronavirus and en-

- teric bacterial pathogens[J]. *Tropical Animal Health and Production*, 2010, 42(8): 1855-1860.
- [21] Sahoo T K, Jena P K, Nagar N, *et al.* *In vitro* evaluation of probiotic properties of lactic acid bacteria from the gut of *Labeo rohita* and *Catla catla*[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2015, 7(2): 126-136.
- [22] Grzeškowiak Ł, Collado M C, Salminen S. Evaluation of aggregation abilities between commensal fish bacteria and pathogens[J]. *Aquaculture*, 2012, 356-357: 412-414.
- [23] Collado M C, Meriluoto J, Salminen S. Measurement of aggregation properties between probiotics and pathogens: *in vitro* evaluation of different methods[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 71(1): 71-74.
- [24] Naito Y, Tohda H, Okuda K, *et al.* Adherence and hydrophobicity of invasive and noninvasive strains of *Porphyromonas gingivalis*[J]. *Molecular Oral Microbiology*, 1993, 8(4): 195-202.
- [25] Pérez P F, Minnaard Y, Disalvo E A, *et al.* Surface properties of bifidobacterial strains of human origin[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(1): 21-26.
- [26] Wadstrom T, Andersson K, Sydow M, *et al.* Surface properties of lactobacilli isolated from the small intestine of pigs[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 1987, 62(6): 513-520.
- [27] 靳彩娟. 高粘附性乳酸菌的筛选、鉴定及其表面疏水特性研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2013.
- Jin C J. Screening, identification and surface hydrophobic properties of high adhesive lactic acid bacteria[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2013(in Chinese).
- [28] Chabrilón M, Rico R M, Balebona M C, *et al.* Adhesion to sole, *Solea senegalensis* Kaup, mucus of microorganisms isolated from farmed fish, and their interaction with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2005, 28(4): 229-237.
- [29] Gueimonde M, Jalonen L, He F, *et al.* Adhesion and competitive inhibition and displacement of human enteropathogens by selected lactobacilli[J]. *Food Research International*, 2006, 39(4): 467-471.

Isolation and probiotic properties of lactic acid bacteria from the gut of crucian carp (*Carassius auratus*)

YANG Yuanyuan, WANG Nannan, CAO Qing, LU Chengping, LIU Yongjie*

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: As an important freshwater aquaculture species in China, *Carassius auratus* culture is currently suffering from serious losses due to infectious diseases. The use of antibiotics in preventing and controlling the bacterial diseases has caused the evolution of resistant strains of aquatic pathogens. This is a serious constraint on aquaculture development. Therefore, some alternative measures need to be developed to improve the quality and sustainability of aquaculture production. Probiotics can be a substitute for antibiotics. *Lactobacillus* sp. from the host or the culture environment have shown to have ability to better adapt to the culture environment and colonize in the host gut, which help them exhibit their probiotic effects better. This study intends to screen probiotic candidates from *C. auratus* according to their *in vitro* probiotic properties, which include acid and bile tolerance ability, antimicrobial activity, cell surface hydrophobicity, aggregation ability, *in vitro* adhesive ability and pathogenicity in crucian carp. Based on biochemical tests and 16S *rRNA* gene sequence analysis, thirty-eight strains of *Lactobacillus* sp. were isolated from the gut of *C. auratus*, which belonged to *Lactococcus*, *Leuconostos*, *Carnobacterium* and *Enterococcus faecium*, respectively, and eight of them were selected to evaluate the *in vitro* probiotic properties. The results showed that all eight strains of *Lactobacillus* sp. bacteria could tolerate acid (pH 4.6) and bile (10% bile of *C. auratus*), and exhibit good antibacterial activities against four pathogens including *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae*, *Streptococcus agalactiae* and *Vibrio parahaemolyticus*. Five of eight strains showed high cell surface properties, i.e. hydrophobicity (63%-89%) and autoaggregation (37%-45%), and their adhesive rates to *C. auratus* intestinal mucus were ranged from 4.5% to 7.9%. These five isolates differed in coaggregation ability, but exhibited good adhesion inhibition rates for the binding of *A. hydrophila* to *C. auratus* intestinal mucus, with the inhibition rates of 30% to 35%. Three *L. lactis* isolates 16-7, 16-19 and 16-24 with a higher adhesive ability showed no pathogenicity when administered by intraperitoneal injection to *C. auratus*. Based on our data, the three *L. lactis* isolates could be considered as potential probiotic candidates for *C. auratus* farming. Further *in vivo* evaluation needs to be performed in the future study.

Key words: *Carassius auratus*; *Lactobacillus* sp. ; isolation; probiotic properties

Corresponding author: LIU Yongjie. E-mail: liuyongjie@njau.edu.cn

Funding projects: Independent Innovation Fund of Agricultural Science and Technology in Jiangsu Province [CX(17)2027]; Aquatic Three New Projects in Jiangsu Province (D2015-13)