

# 罗非鱼源肠道益生菌的分离鉴定及其体外益生特性分析

李秋月<sup>1</sup>, 杨雪娇<sup>1</sup>, 谭春艳<sup>1</sup>, 陈家裕<sup>1</sup>, 林连兵<sup>1,2</sup>, 邓先余<sup>\*1,2</sup>

(1. 昆明理工大学 生命科学与技术学院, 云南 昆明 650500; 2. 云南省高校饲用抗生素替代技术工程研究中心, 云南 昆明 650500)

**摘要:** 为了筛选出优良的鱼源益生菌, 作者以吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)为实验材料, 进行肠道芽孢杆菌和乳酸菌的分离、鉴定, 并对分离得到的菌株进行抑菌活性、耐酸性、耐胆盐、人工胃肠液耐受、溶血活性和抗生素敏感性等体外益生特性分析。结果表明, 从罗非鱼肠道中共分离得到 109 株菌, 其中包括 79 株乳酸菌和 30 株芽孢杆菌, 经过一系列的实验最终筛选出 3 株乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)。生物学特性研究表明, 3 株菌均无溶血活性, 对抗生素具有一定的敏感性, 对强酸、胆盐和人工胃肠液具有一定的耐受性, 对水产病原菌具有不同的抑菌活性。筛选得到的 3 株菌丰富了鱼源益生菌资源, 它们均可作为优良的鱼源益生菌候选菌株。其中, 菌株 R1 对强酸和人工胃肠液耐受性最强, 菌株 R29 耐胆盐能力最强, 可进行进一步的益生特性研究, 挖掘其作为食品源益生菌的益生效果。

**关键词:** 罗非鱼; 益生菌; 筛选; 益生特性

中图分类号: Q 935 文章编号: 1673-1689(2023)12-0001-09 DOI: 10.12441/spyswjs.20210812003

## Isolation and Identification of Intestinal Probiotics from Tilapia Fish (*Oreochromis niloticus*) and *in vitro* Probiotic Characteristics Assessment

LI Qiuyue<sup>1</sup>, YANG Xuejiao<sup>1</sup>, TAN Chunyan<sup>1</sup>, CHEN Jiayu<sup>1</sup>, LIN Lianbing<sup>1,2</sup>, DENG Xianyu<sup>\*1,2</sup>

(1. Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China; 2. Engineering Research Center for Replacement Technology of Feed Antibiotics of Yunnan College, Kunming 650500, China)

**Abstract:** To select excellent probiotics of fish origin, tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) was used as the experimental material to isolate and identify intestinal bacillus and lactic acid bacteria. The isolated strains were subjected to *in vitro* probiotic characteristics analysis, including antibacterial activity, acid tolerance, bile salts tolerance, artificial gastrointestinal fluid tolerance, hemolytic activity, and antibiotic susceptibility. The results showed that a total of 109 strains were isolated from tilapia fish intestine, including 79 strains of *Lactobacillus* and 30 strains of *Bacillus*. After a series of experiments, three strains of *Lactococcus lactis* were finally screened out. Biological characteristic studies indicated that all three strains exhibited no hemolytic activity. They showed a certain level of

收稿日期: 2021-08-12 修回日期: 2021-10-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(31640079)。

\* 通信作者: 邓先余(1972—), 男, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事畜禽水产动物绿色养殖技术与生物治污等研究。

E-mail: dengxy1008@126.com

sensitivity to antibiotics and displayed tolerance to strong acids, bile salts, and artificial gastrointestinal fluids. Moreover, they demonstrated different antibacterial activities against aquatic pathogens. The three selected strains enriched the probiotic resources derived from fish, making them excellent candidates for fish-derived probiotics. Among them, strain R1 exhibited the highest tolerance to strong acids and artificial gastrointestinal juices, while strain R29 displayed the strongest bile salt tolerance. Further studies on their probiotic properties can be conducted to explore their probiotic effects as food-source probiotics.

**Keywords:** tilapia, probiotics, screening, probiotic properties

自 1929 年青霉素的抗感染功效被发现后, 抗生素就作为重要的药物被广泛应用在医药、农业、畜牧业及水产养殖等领域中。抗生素一方面可作为抗菌药物防治动物细菌性疾病<sup>[1]</sup>, 另一方面可作为饲料添加剂, 提升养殖动物的生长速度、饲料转化率和抗病性能<sup>[2]</sup>。但近年来, 抗生素的不合理使用导致耐药性菌株的产生、交叉感染和药物残留<sup>[3-5]</sup>等问题逐渐严重。抗生素不仅会在肉制品及粪便中残留, 且会影响动物生产及生态环境<sup>[3,6]</sup>。此外, 抗生素可在食物链中传递, 造成人体过敏、致癌、致突变、致畸、骨髓抑制和肠道菌群失衡的影响<sup>[7-8]</sup>, 严重威胁人类健康。因此, 减抗和替抗成为全球性的关注热点和研究趋势。由于益生菌可在宿主体内发挥健康有益作用<sup>[9]</sup>, 且不存在耐药性和药物残留问题, 具有代替抗生素的潜能。

目前, 使用的益生菌多分离自环境或动物胃肠道, 而肠道微生物区系是一个动态的微生态系统, 其中生存着细菌、真菌和病毒等微生物<sup>[10]</sup>。肠道益生菌可通过竞争氧气、养分和定植位点, 产生代谢物等方式来抑制有害菌的生长繁殖, 起到内源性防御屏障作用<sup>[11]</sup>, 同时, 益生菌可提高生物利用度和降解污染物毒性<sup>[12]</sup>, 并参与免疫系统的发育和控制、肠道屏障完整性的维持<sup>[13]</sup>等过程。目前, 益生菌已被用于医药保健、食品生产、农业、养殖业和饲料工业等领域, 如发酵乳和酸奶(含益生菌的乳制品)以其独特的风味和功能占据市场<sup>[14]</sup>; 益生菌发酵黄芪、党参、当归等复方中草药作为饲料添加剂, 可提高热应激环境中奶牛的产奶性能和免疫功能<sup>[15]</sup>。因此, 挖掘更多的益生菌资源对益生菌的研究与开发利用具有极其重要的作用。

目前的水产养殖更规模化和集约化, 而水产养

殖动物的肠道菌群易被养殖水体或环境中的微生物影响<sup>[16]</sup>。因此, 高密度的水产养殖会增加鱼体感染和患病的风险, 降低产量和鱼肉品质, 造成巨大的经济损失<sup>[17]</sup>。益生菌用于水产养殖, 可通过促进动物生长、调节肠道菌群、改善免疫性能、改善水质、防治疾病、提升饲料利用率等途径来提高水产动物的健康水平<sup>[18]</sup>。据报道, 益生菌在水产养殖中的应用始于 20 世纪 80 年代中期, 时至今日益生菌用于水产养殖中的优势日益凸显, 且具有代替抗生素的潜能<sup>[19]</sup>。目前水产养殖所用的益生菌, 多分离自环境或其他动物肠道, 忽略了物种、食性以及水生环境特性等方面的差异<sup>[20]</sup>, 导致其他宿主源益生菌不能定植于鱼类肠道或益生效果不明显, 而通常原生微生物往往比非原生微生物更易定植且益生效果更持久, 在水产养殖中鱼源益生菌的表现要优于其他宿主源益生菌<sup>[21-22]</sup>。Lazado 等从大西洋鲑鱼中分离得到菌株 GP21 和 GP12, 在不同的物理条件下, 对两种关键的鱼类病原菌 *Vibrio anguillarum* NCIMB 2133 和 *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* NCIMB 1102 均具有拮抗作用, 对鱼不具有致病性和致死性, 说明这两株菌具有潜在的益生特性<sup>[23]</sup>。高艳侠等从罗非鱼肠道中分离到一株贝莱斯芽孢杆菌, 通过菌株生长特性、水解淀粉和酪蛋白能力、药物敏感特性、抗菌活性和生物安全性实验, 表明该菌株具有良好的安全性, 在水产养殖的疾病防控方面具有较好的潜能<sup>[5]</sup>。且鱼源益生菌在水产动物的人工饲养和管理中更便于使用, 因此, 水产养殖中使用益生菌的最佳来源应为水产动物, 作者对罗非鱼肠道微生物进行了分离纯化, 然后进行了抑菌活性菌株的筛选和体外益生特性分析, 以期鱼源益生菌的应用提供材料支撑和科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株的分离纯化

实验用罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)购自昆明市呈贡区吴家营菜市场,共3尾健康成年鱼。首先用体积分数75%的乙醇进行鱼体消毒,在无菌操作台内解剖取出肠道,多次按压挤出肠道内容物,用任氏生理盐水反复冲洗肠道,将肠道内容物和肠道冲洗液放入任氏生理盐水中匀浆作为原液备用。分别取原液50 mL于芽孢杆菌富集培养液和乳酸菌富集培养液(MRS)中,将芽孢杆菌富集培养液放在80℃的恒温水浴锅中水浴15 min,再将两种富集培养液在150 r/min、37℃的恒温摇床中富集24 h,将富集培养液进行梯度稀释,按 $1 \times 10^{-3} \sim 1 \times 10^{-7}$ 稀释后,取培养液各100 μL涂布于芽孢杆菌和乳酸菌选择培养基上,37℃静置培养24 h,挑取单菌落多次划线纯培养。

### 1.2 抑菌活性菌株的筛选

采用双层平板法进行抑菌实验,将纯化后的乳酸菌和芽孢杆菌培养至对数生长期,在4℃下以6 000 r/min离心10 min,取上清液过0.22 μm滤膜,备用<sup>[24]</sup>。采用7株水产常见病原菌进行抑菌活性检测,菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC6538、大肠杆菌 CMCC(B)44102、无乳链球菌 SAM 12、副溶血弧菌 BNCC195687、弗氏柠檬酸杆菌 GDMCC 800974、嗜水气单胞菌 GDMCC 801075、假单胞菌 GDMCC 1.1743,均为作者所在实验室保藏。取100 μL病原菌液和4 mL LB半固体培养基混匀后倒入LB固体培养基上层,将已灭菌牛津杯(内径6 mm,外径8 mm)放置在双层平板上,加入200 μL待测菌株上清液,以Kanamycin(100 mg/L)和PBS分别作为阳性对照和阴性对照,每组设3个平行,将平板置于4℃冰箱中静置4 h,37℃恒温培养24 h,测量抑菌圈直径。

### 1.3 强酸耐受性菌株的筛选

选取1.2中筛选出的菌株培养至对数生长期,取5 mL菌液8 000 r/min离心10 min,弃上清液,使用pH 4.0的MRS培养液和芽孢杆菌培养液重悬沉淀,150 r/min、37℃恒温摇床中培养3 h,进行平板稀释涂布并计数,以培养0 h的活菌数作为对照,每组设3个平行。按照公式(1)计算存活率。

$$F = C_1 / C_2 \times 100\% \quad (1)$$

式中: $F$ 为存活率,%; $C_1$ 为实验组活菌浓度,CFU/mL; $C_2$ 为对照组活菌浓度,CFU/mL。

### 1.4 菌株胆盐耐受性检测

选取1.3中筛选出的菌株培养至对数生长期,取100 μL菌液到胆盐质量分数为0.3%的MRS液体培养基和芽孢杆菌液体培养基中,150 r/min、37℃恒温摇床中培养8 h,每隔2 h在600 nm波长下测定菌液吸光度,以0 h的吸光度作为对照,每组设3个平行。

### 1.5 人工胃肠液耐受性菌株的筛选

人工胃液的制备:使用已灭菌的PBS(pH 4.0)配制质量浓度为1 g/dL的胃蛋白酶溶液,过0.22 μm滤膜后备用。

人工肠液的制备:使用已灭菌的PBS(pH 6.8)配制质量浓度为1 g/dL的胰酶溶液,过0.22 μm滤膜后备用。

选取1.3中筛选出的菌株培养至对数生长期,取菌液8 000 r/min离心10 min,弃上清液,使用4 mL人工胃液重悬沉淀,150 r/min、37℃恒温摇床中培养3 h;每隔1 h在600 nm波长下测定菌液吸光度,取0、3 h的培养液进行平板稀释涂布并计数,每组设3个平行,按照公式(1)计算菌株在人工胃液中的存活率。

在人工肠液中加入100 μL人工胃液中培养3 h的菌液,150 r/min、37℃恒温培养4 h,每隔1 h在600 nm波长下测定菌液吸光度,每组设3个平行,按照公式(2)计算菌株从人工胃液开始到人工肠液的最终存活率。

$$M = A_1 / A_2 \times 100\% \quad (2)$$

式中: $M$ 为最终存活率,%; $A_1$ 为菌株在人工肠液中培养4 h的吸光度; $A_2$ 为菌株在人工胃液中培养3 h的吸光度。

### 1.6 菌株溶血活性检测

首先配制哥伦比亚血琼脂,灭菌冷却至50℃,向其中加入质量分数5%的脱纤维羊血,混匀后倒平板备用。选取1.3中筛选出的菌株培养至对数生长期,将菌液划线接种到哥伦比亚血琼脂平板上,用金黄色葡萄球菌作阳性对照,37℃恒温培养24 h,观察菌株溶血圈情况,每组设3个平行。若菌落周围形成草绿色环,则是红细胞的不完全破裂,表现为 $\alpha$ 溶血;若菌落周围形成界限分明、完全透明的溶血环,则是红细胞的完全破裂,表现为 $\beta$ 溶血;若



菌落周围的培养基无变化,则表现为 $\gamma$ 溶血,即不溶血<sup>[25]</sup>。

### 1.7 菌株药敏实验

选取 1.3 中筛选出的菌株涂布于 MRS 固体培养基和芽孢杆菌培养基上,使用纸片扩散法进行药敏实验。实验时轻轻将药敏纸片贴到平板上,每种纸片设 3 个平行;贴好纸片后将平板放在 4℃条件下扩散 2 h,37℃恒温培养 24 h,测量透明圈直径,参照 WHO 提供的 NCCLS 标准,判定菌株药敏活性。药敏纸片包括:氨苄西林、头孢噻肟、头孢曲松、头孢他啶、氨曲南、庆大霉素、阿米卡星、链霉素、四环素、环丙沙星、磺胺甲噁唑、氯霉素、阿莫西林、甲氧苄啶、萘啶酸、复方新诺明。

### 1.8 菌株形态及分子生物学鉴定

使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株的总 DNA,采用通用引物 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R(5'-GGTACCTTGTTAGGACTT-3')进行 PCR 扩增。PCR 的反应程序如下:94℃预变性 4 min;94℃保持 30 s,50℃退火 1 min,72℃延伸 2 min,30 个循环;72℃延伸 10 min。PCR 产物经 1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳检测验证后,送至上海生工生物工程股份有限公司进行 16S rDNA 测序。测序结果在美国国立生物技术信息中心 GenBank 数据库 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)中进行 Blast 序列比对,使用 MAGA 5 构建系统发育树,确定种名及同源关系。

### 1.9 数据分析

实验数据使用 Office Excel、SPSS 16.0 和 GraphPad Prism 8 进行处理。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的分离纯化

挑取单菌落划线纯培养,共分离出 109 株菌,其中包括 79 株乳酸菌和 30 株芽孢杆菌。使用体积

分数 50%甘油作为菌种保护剂,将菌种置于-80℃冰箱冷冻保存。

### 2.2 菌株抑菌活性分析

采用 7 株水产常见病原菌进行抑菌活性实验。结果显示,30 株芽孢杆菌对上述病原菌抑菌效果较差,79 株乳酸菌对上述病原菌有不同程度的抑菌作用,抑菌效果优于芽孢杆菌。乳酸菌中具有两种病原菌抑菌活性的菌株有 9 株,分别是 R2、R4、R5、R12、R16、R24、R29、R30、R49;具有 3 种病原菌抑菌活性的菌株有 5 株,分别是 R1、R45、R46、R48、R50(见表 1)。其中,对无乳链球菌、假单胞菌和副溶血弧菌 3 种病原菌具有抑菌活性的菌较多。吴雅琨等从罗非鱼肠道中分离出两株乳酸菌 LF3-1、LF3-2,分别对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌具有较好抑菌效果,可以作为生态养鱼的潜在发酵菌种<sup>[26]</sup>。杨媛媛等从鲫鱼肠道中分离出 38 株乳酸菌,其中 6 株乳酸菌对无乳链球菌和副溶血弧菌具有较强的抑菌活性<sup>[27]</sup>,与本实验研究结果较为相似。乳酸菌抑菌作用的发挥,主要是由于乳酸菌在生长过程中能产生有机酸、乳酸、细菌素、过氧化氢及小分子肽类等代谢产物来抑制或杀灭病原菌,陈凯等以嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)作为指示菌,分析两株乳酸菌 S60 和 S72 的抑菌物质,结果表明菌株抑菌活性与其代谢过程中产生的有机酸类相关,且不同的乳酸菌产生的抑菌物质不尽相同<sup>[28]</sup>。作者分离出的菌株产生抑菌活性的作用机制尚不清楚,需要进一步研究。

### 2.3 菌株强酸耐受性分析

选取 2.2 中筛选出的 14 株菌进行强酸耐受性分析,结果显示 14 株菌中只有 R1、R16、R29、R46、R48 这 5 株菌能在 pH 4.0 的强酸溶液中存活 3 h。存活率由高到低的菌株依次是 R1 (54.945%)>R48 (38.037%)>R29 (18.730%)>R16 (5.236%)>R46 (0.604%)(见表 2)。陈凯等对两株乳酸菌 S60 和

表 1 菌株抑菌活性

Table 1 Bacteriostatic activity of the strains

菌株	抑菌圈直径/mm						
	副溶血弧菌	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	无乳链球菌	弗氏柠檬酸杆菌	假单胞菌	嗜水气单胞菌
R1	11	—	—	—	—	10	10
R2	10	—	—	—	—	10	—
R4	11	—	—	9	—	—	—
R5	12	—	—	10	—	—	—

续表 1

菌株	抑菌圈直径/mm						
	副溶血弧菌	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	无乳链球菌	弗氏柠檬酸杆菌	假单胞菌	嗜水气单胞菌
R12	—	—	—	11	12	—	—
R16	—	—	—	12	—	12	—
R24	—	—	—	11	—	9	—
R29	—	—	—	10	—	10	—
R30	—	—	—	12	—	12	—
R45	—	—	11	—	10	13	—
R46	10	11	10	—	—	—	—
R48	12	—	12	10	—	—	—
R49	11	—	13	—	—	—	—
R50	9	—	12	12	—	—	—
阳性对照	8	15	14	8	—	12	16
阴性对照	—	—	—	—	—	—	—

S72 进行强酸耐受性检测,发现两株菌在 pH 4.5 的 PBS 中处理 2 h 后均能成活<sup>[28]</sup>,与本研究结果类似。

表 2 菌株强酸耐受性

Table 2 Strong acid tolerance of the strains

菌株	菌落浓度/(CFU/mL)		存活率/%
	0 h	3 h	
R1	4.55×10 <sup>8</sup>	2.50×10 <sup>8</sup>	54.945
R16	1.97×10 <sup>8</sup>	0.10×10 <sup>8</sup>	5.236
R29	6.30×10 <sup>8</sup>	1.18×10 <sup>8</sup>	18.730
R46	8.28×10 <sup>8</sup>	0.05×10 <sup>8</sup>	0.604
R48	3.26×10 <sup>8</sup>	1.24×10 <sup>8</sup>	38.037

2.4 菌株胆盐耐受性分析

选取 2.3 中筛选出的 3 株菌进行质量分数 0.3%的胆盐耐受性分析。结果显示 3 株菌均能在胆盐中存活 8 h,其中 R1 和 R48 在 4 h 内均无明显变化,4 h 后开始缓慢增长,R29 增长相对较大,表明其对质量分数 0.3%的胆盐具有较强耐受性和适应性(见图 1)。

2.5 菌株人工胃肠液耐受性分析

针对 2.4 中筛选出的菌株进行人工胃肠液耐受性及存活率检测。结果显示 3 株菌在 1 g/mL 的人工胃液和人工肠液中均能存活,在人工胃肠液中存活率最高的是 R1,在人工胃液和人工肠液中的存活率分别为 54.00%和 236.00%,最低的是 R48(见表 3)。3 株菌在人工胃液中 3 h 内吸光度均保持稳定。3 株菌在人工肠液中前 4 h 内吸光度均无明显变化,4 h 后 3 株菌的吸光度均有明显增长(见图 2、图 3)。

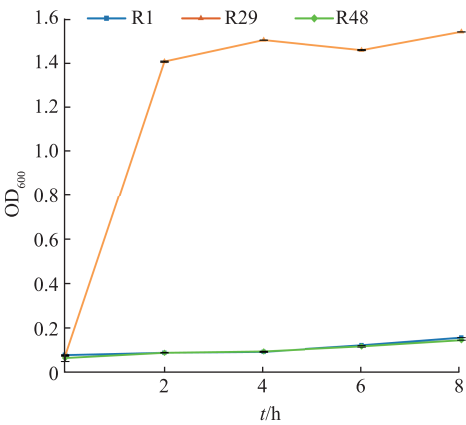


图 1 菌株胆盐耐受性

Fig. 1 Bile salt tolerance of the strains

表 3 人工胃肠液中菌株存活率

Table 3 Strains survival in artificial gastric and artificial intestinal fluids

菌株	存活率/%	
	人工胃液	人工肠液
R1	54.00	236.00
R29	51.19	39.28
R48	31.50	10.95

2.6 菌株溶血活性分析

溶血活性是筛选益生菌的重要因素,因为溶血素是病原菌致病的重要毒力因子,研究表明溶血素不仅可以溶解红细胞,且能损伤多种细胞,诱发细胞的凋亡甚至裂解死亡<sup>[28]</sup>,不具有溶血活性才能将其认为是安全的益生菌。作者针对 3 株菌进行溶血活性测定,结果表明除了阳性对照的金黄色葡萄球

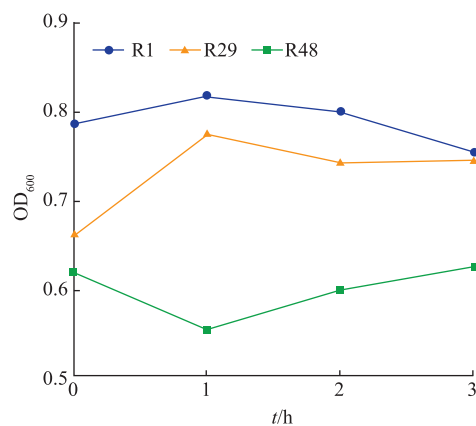


图2 人工胃液中菌株生长率

Fig. 2 Strains growth rates in artificial gastric fluids

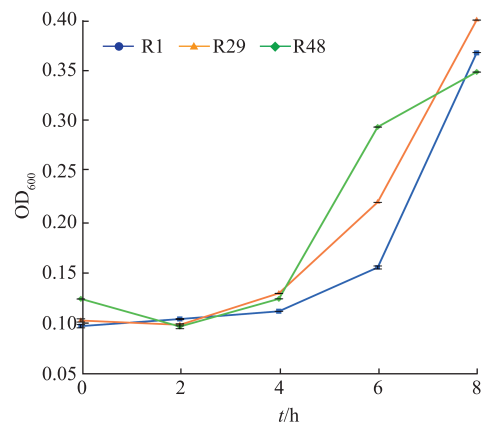


图3 人工肠液中菌株生长率

Fig. 3 Strains growth rates in artificial intestinal fluids

菌有明显的 $\beta$ 溶血现象外,3株菌均无溶血现象(见图4)。

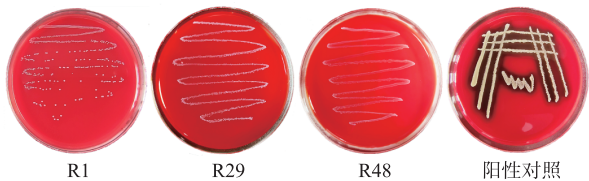


图4 菌株溶血活性

Fig. 4 Hemolytic activity of the strains

2.7 菌株药敏性分析

针对3株菌进行药敏实验,结果表明R1对氨曲南、庆大霉素、阿米卡星、环丙沙星、萘啶酸具有耐药性;R29对氨曲南、庆大霉素、阿米卡星、环丙沙星、甲氧苄啶、萘啶酸表现为耐药;R48对氨曲南和萘啶酸具有耐药性,3株菌对氨曲南和萘啶酸均具有耐药性(见表4)。

窦春萌等从凡纳滨对虾肠道中筛选出11株菌进行溶血活性检测和抗生素敏感性实验,结果显示7株菌不释放溶血毒素,其余菌株具有潜在的致病性;7株菌抗生素抗性较强,不考虑作为益生菌,最终筛选出4株候选益生菌,分别是芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌和荚膜红细菌<sup>[29]</sup>,与本研究结果相似。

表4 菌株药敏实验结果

Table 4 Results of strains in drug sensitivity experiments

抗生素	含量/( $\mu\text{g}/\text{片}$ )	透明圈直径/mm		
		R1	R29	R48
氨苄西林	10	30+/S	30+/S	30+/S
头孢噻肟	30	30+/S	30+/S	30+/S
头孢曲松	30	30+/S	30/S	30+/S
头孢他啶	30	27/S	26/S	24/S
氨曲南	30	6/R	6/R	6/R
庆大霉素	10	8/R	9/R	14/I
阿米卡星	30	7/R	7/R	12/I
链霉素	300	19/I	19/I	20/I
四环素	30	17/I	34/S	17/I
环丙沙星	5	10/R	9/R	11/I
磺胺甲噁唑	300	21/S	20/I	32/S
氯霉素	30	30/S	35/S	32/S
阿莫西林	10	30+/S	30+/S	30+/S
甲氧苄啶	1.25	24/S	6/R	30/S
萘啶酸	30	6/R	6/R	6/R
复方新诺明	25	19/I	16/I	32/S

注:S表示强烈敏感性(直径 $\geq 20\text{ mm}$ );I表示中等敏感性( $15\text{ mm}\leq\text{直径}\leq 19\text{ mm}$ );R表示耐药(直径 $\leq 14\text{ mm}$ )。

## 2.8 菌株形态及分子生物学鉴定结果

针对3株菌进行菌株形态和分子生物学鉴定,结果显示3株菌的菌落形态特征均为乳白色,不透明,表面湿润,边缘规整。革兰氏染色结果显示,3株菌株均为革兰氏阳性菌,菌体呈球形。菌株测序所

获序列经Blast序列比对,这3株菌与已知种类细菌的16S RNA序列相似性均达到99%以上,根据序列比对结果与系统发育树(见图5)可以判断3株菌均为乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)。

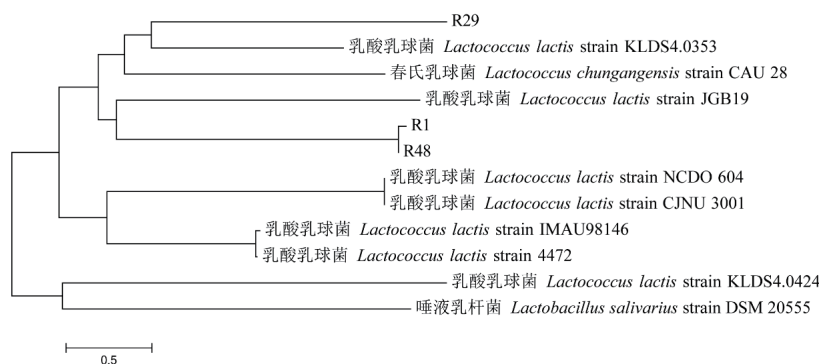


图5 菌株系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree of the strains

## 3 结 语

益生菌具有替代抗生素的潜力,其生物安全性在益生菌的筛选和研究中是不可忽视的重要部分。已有研究表明,少部分益生乳酸菌具有在体外和啮齿动物模型中向其他细菌转移抗生素耐药基因的风险<sup>[30-31]</sup>,鼠李糖乳杆菌作为益生菌用于抵御病原体感染造成的肠道损伤时,会对斑马鱼的黏膜造成损害<sup>[32]</sup>。因此,益生菌菌株需要具有一些特性:1)适应性,指益生菌对胃肠道环境,如胃液、肠液和胆盐的耐受性,益生菌的存活率和益生功效持久性等;2)安全性,指益生菌是否具有溶血活性、抗生素敏感性、致死性等;3)抑菌特性,指益生菌对病原菌的抵抗和抑制活性;4)便利性,指益生菌在使用过程中易于生长和使用<sup>[17,33-34]</sup>。目前,用于提高养殖动物生长和免疫力的益生菌种主要包括芽孢杆菌、肠球菌、乳酸菌、酵母菌、微球菌、片球菌、弧菌、梭菌、假单胞菌、气单胞菌和希瓦氏菌等<sup>[8,35-36]</sup>。其中,乳酸菌是一类能利用碳水化合物发酵产酸的菌,研究显示,乳酸菌发酵羊乳不仅可减轻羊奶的膻味,并且

具有提高羊乳产品营养物质含量和抗氧化性的能力<sup>[37]</sup>。将其添加在饲料中,可抑制食源性腐败和致病性微生物生长,具有促进动物生长、改善胃肠道功能、提高食物消化率和免疫性能等功效<sup>[38]</sup>,可作为动物和鱼类饲料中优质安全的天然原料,因此乳酸菌的分离尤为重要。

作者从罗非鱼肠道中分离出109株菌,并进行强酸、胆盐、人工胃肠液耐受性等实验,最终筛选出3株乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)。其中,强酸和人工胃肠液中存活率最高的是R1,R29耐胆盐能力最强,3株菌均无溶血活性且都对氨曲南和萘啶酸具有耐药性。菌株具有抑菌活性,提示可以从水产养殖水质改善剂、病原菌抑制剂和治疗菌剂等替抗产品方面进行研究与开发。由于3株菌均为鱼源分离菌,并且具有良好的体外益生特性,为鱼源益生菌的研究与开发奠定了基础。在后续的研究中可以考虑从菌株对鱼类肠道菌群的影响和作用机制等方面入手,挖掘它们作为食品用微生物、微生态制剂、饲料添加剂和鱼类疾病防治药物方面的潜能。

## 参考文献:

- [1] PARKER-GRAHAM C A, EETEMADI A, YAZDI Z, et al. Effect of oxytetracycline treatment on the gastrointestinal microbiome of critically endangered white abalone (*Haliotis sorenseni*) treated for withering syndrome[J]. *Aquaculture*, 2020, 526: 735411.
- [2] GUO S W, MA J X, XING Y Y, et al. *Artemisia annua* L. aqueous extract as an alternative to antibiotics improving growth performance and antioxidant function in broilers[J]. *Italian Journal of Animal Science*, 2020, 19(1): 399-409.



- [ 3 ] ZHANG L, GU J, WANG X J, et al. Fate of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements during anaerobic co-digestion of Chinese medicinal herbal residues and swine manure[J]. **Bioresource Technology**, 2018, 250: 799-805.
- [ 4 ] 傅玲琳, 励建荣, 李学鹏. 水产益生菌的筛选鉴定及其对罗非鱼肠道特定微生物菌群的影响[C]// 中国工程院第 77 场工程科技论坛·2008 水产科技论坛. 渔业现代化与可持续发展论文集. 上海: 海洋出版社, 2008: 295-301.
- [ 5 ] 高艳侠, 张德锋, 可小丽, 等. 罗非鱼源无乳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 Y X, ZHANG D F, KE X L, et al. 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)
- [ 6 ] AKINSANYA B, OLALERU F, SAMUEL O B, et al. Bioaccumulation of organochlorine pesticides, *Procamallanus* sp. (Baylis, 1923) infections, and microbial colonization in African snakehead fish sampled from Lekki Lagoon, Lagos, Nigeria[J]. **Revista Brasileira de Biologia**, 2021, 81(4): 1095-1105.
- [ 7 ] OKOCHA R C, OLATOYE I O, ADEDEJI O B. Food safety impacts of antimicrobial use and their residues in aquaculture[J]. **Public Health Reviews**, 2018, 39: 1-23.
- [ 8 ] YI Y L, ZHANG Z H, ZHAO F, et al. Probiotic potential of *Bacillus velezensis* JW: antimicrobial activity against fish pathogenic bacteria and immune enhancement effects on *Carassius auratus*[J]. **Fish and Shellfish Immunology**, 2018, 78: 322-330.
- [ 9 ] DARGENIO V, SARNATARO D. Probiotics, prebiotics and their role in Alzheimer's disease[J]. **Neural Regeneration Research**, 2021, 16(9): 1768-1769.
- [10] SEHRAWAT N, YADAV M, SINGH M, et al. Probiotics in microbiome ecological balance providing a therapeutic window against cancer[J]. **Seminars in Cancer Biology**, 2021, 70: 24-36.
- [11] MOREIRA T R, LEONHARDT D, CONDE S R. Influence of drinking a probiotic fermented milk beverage containing *Bifidobacterium animalis* on the symptoms of constipation[J]. **Arquivos de Gastroenterologia**, 2017, 54(3): 206-210.
- [12] IANIRO G, BRUNO G, LOPETUSO L, et al. Role of yeasts in healthy and impaired gut microbiota: the gut mycome[J]. **Current Pharmaceutical Design**, 2014, 20(28): 4565-4569.
- [13] GRYLLS A, SEIDLER K, NEIL J. Link between microbiota and hypertension: focus on LPS/TLR4 pathway in endothelial dysfunction and vascular inflammation, and therapeutic implication of probiotics[J]. **Biomedicine and Pharmacotherapie**, 2021, 137: 111334.
- [14] YANG J J, YU D X, XIANG Y B, et al. Association of dietary fiber and yogurt consumption with lung cancer risk: a pooled analysis[J]. **JAMA Oncology**, 2020, 6(2): 194107.
- [15] SHAN C H, GUO J J, SUN X S, et al. Effects of fermented Chinese herbal medicines on milk performance and immune function in late-lactation cows under heat stress conditions[J]. **Journal of Animal Science**, 2018, 96(10): 4444-4457.
- [16] ABAKARI G, LUO G Z, SHAO L N, et al. Effects of biochar on microbial community in bioflocs and gut of *Oreochromis niloticus* reared in a biofloc system[J]. **Aquaculture International**, 2021, 29(3): 1295-1315.
- [17] WANG A R, RAN C, WANG Y B, et al. Use of probiotics in aquaculture of China—a review of the past decade[J]. **Fish and Shellfish Immunology**, 2019, 86: 734-755.
- [18] KUEBUTORNYE F K A, ABARIKE E D, LU Y S. A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture[J]. **Fish and Shellfish Immunology**, 2019, 87: 820-828.
- [19] BANERJEE G, RAY A K. The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries[J]. **Research in Veterinary Science**, 2017, 115: 66-77.
- [20] WANKA K M, DAMERAU T, COSTAS B, et al. Isolation and characterization of native probiotics for fish farming[J]. **BMC Microbiology**, 2018, 18(1): 1-14.
- [21] VAN DOAN H, HOSEINIFAR S H, KHANONGNUCH C, et al. Host-associated probiotics boosted mucosal and serum immunity, disease resistance and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. **Aquaculture**, 2018, 491: 94-100.
- [22] SERRA C R, ALMEIDA E M, GUERREIRO I, et al. Selection of carbohydrate-active probiotics from the gut of carnivorous fish fed plant-based diets[J]. **Scientific Reports**, 2019, 9(1): 6384.
- [23] LAZADO C C, CAIPANG C M, RAJAN B, et al. Characterization of GP21 and GP12: two potential probiotic bacteria isolated from the gastrointestinal tract of Atlantic cod[J]. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, 2010, 2(2): 126-134.



- [24] ZHANG H, HUANGFU H P, WANG X, et al. Antibacterial activity of lactic acid producing *Leuconostoc mesenteroides* QZ1178 against pathogenic *Gallibacterium anatis*[J]. **Frontiers in Veterinary Science**, 2021, 8:630294.
- [25] LEE J, YUN H S, CHO K W, et al. Evaluation of probiotic characteristics of newly isolated *Lactobacillus* spp.: immune modulation and longevity[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2011, 148(2):80-86.
- [26] 吴雅琨, 杨欣, 陈丽仙, 等. 罗非鱼肠道益生菌的筛选、鉴定及其抑菌性能研究[J]. 水产科学, 2011, 30(10):613-616.  
WU Y K, YANG X, CHEN L X, et al. Isolation, identification and characteristics of probiotics in tilapia intestine[J]. **Fisheries Science**, 2011, 30(10):613-616. (in Chinese)
- [27] 杨媛媛, 王楠楠, 曹青, 等. 鲫肠道乳酸菌的分离及益生特性[J]. 水产学报, 2018, 42(10):1596-1605.  
YANG Y Y, WANG N N, CAO Q, et al. Isolation and probiotic properties of lactic acid bacteria from the gut of crucian carp (*Carassius auratus*)[J]. **Journal of Fisheries of China**, 2018, 42(10):1596-1605. (in Chinese)
- [28] 陈凯, 朱璐丹, 谭宏亮, 等. 2株乳酸菌抑菌作用研究及安全性评价[J]. 南方水产科学, 2019, 15(5):118-125.  
CHEN K, ZHU L D, TAN H L, et al. Bacteriostasis and safety evaluation of two lactic acid bacteria[J]. **South China Fisheries Science**, 2019, 15(5):118-125. (in Chinese)
- [29] 窦春萌, 左志晗, 刘逸尘, 等. 凡纳滨对虾肠道内产消化酶益生菌的分离与筛选[J]. 水产学报, 2016, 40(4):537-546.  
DOU C M, ZUO Z H, LIU Y C, et al. Isolation and screening of digestive enzyme producing probiotics from intestine of *Litopenaeus vannamei*[J]. **Journal of Fisheries of China**, 2016, 40(4):537-546. (in Chinese)
- [30] COHEN P A. Probiotic safety-no guarantees[J]. **JAMA Internal Medicine**, 2018, 178(12):1577-1578.
- [31] EGERVÄRN M, LINDMARK H, OLSSON J, et al. Transferability of a tetracycline resistance gene from probiotic *Lactobacillus reuteri* to bacteria in the gastrointestinal tract of humans[J]. **Antonie van Leeuwenhoek**, 2010, 97(2):189-200.
- [32] HE S X, RAN C, QIN C B, et al. Anti-infective effect of adhesive probiotic *Lactobacillus* in fish is correlated with their spatial distribution in the intestinal tissue[J]. **Scientific Reports**, 2017, 7(1):13195.
- [33] ALKALBANI N S, TURNER M S, AYYASH M M. Isolation, identification, and potential probiotic characterization of isolated lactic acid bacteria and *in vitro* investigation of the cytotoxicity, antioxidant, and antidiabetic activities in fermented sausage[J]. **Microbial Cell Factories**, 2019, 18(1):188.
- [34] AFRC R F. Probiotics in man and animals[J]. **Journal of Applied Bacteriology**, 1989, 66(5):365-378.
- [35] NAYAK S K. Probiotics and immunity: a fish perspective[J]. **Fish and Shellfish Immunology**, 2010, 29(1):2-14.
- [36] HAI N V. Research findings from the use of probiotics in tilapia aquaculture: a review[J]. **Fish and Shellfish Immunology**, 2015, 45(2):592-597.
- [37] 张艾青. 苹果酵素复合型羊乳的制备及抗氧化活性研究[J]. 食品与生物技术学报, 2021, 40(6):106-111.  
ZHANG A Q. Preparation of apple-ferment-fortified goat milk and its antioxidant activity investigation[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2021, 40(6):106-111. (in Chinese)
- [38] KULEY E, ÖZYURT G, ÖZGÜL I, et al. The role of selected lactic acid bacteria on organic acid accumulation during wet and spray-dried fish-based silages. contributions to the winning combination of microbial food safety and environmental sustainability [J]. **Microorganisms**, 2020, 8(2):1-17.