

株黄颡鱼肠道益生菌的筛选与鉴定

孟小亮 陈昌福** 高宇 贺中华 田甜 刘振兴

华中农业大学水产学院, 武汉 430070

摘要 从正常养殖的黄颡鱼肠道中分离得到 218 株细菌, 通过产酶能力测试, 对常见病原菌体外拮抗作用以及对抗生素敏感性试验筛选出 1 株益生菌 HS140 菌株。通过测定 HS140 菌株对黄颡鱼的致病性, 并结合形态观察、生理生化试验和 16S rRNA 部分序列分析, 对 HS140 菌株进行了分类鉴定。结果显示: HS140 菌株具有很强的分泌蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶的能力, 能够抑制温和气单胞菌、迟缓爱德华菌和鳃弧菌的生长。HS140 菌株对氨苄青霉素、磺胺异恶唑、先锋霉素 VI 等 3 种抗生素产生耐药性, 对另外 13 种抗生素均敏感或中度敏感。急性毒性试验表明, 浓度为 1.0×10^8 cfu/mL 的 HS140 菌悬液对黄颡鱼没有致病性。HS140 菌株为革兰氏阳性可动杆菌, 16S rRNA 的部分序列分析显示 HS140 菌株与地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 具有 99.3% 的相似性, 系统发育树上 HS140 菌株与地衣芽孢杆菌 (FJ435674) 聚为同一分支, 结合形态观察和生理生化试验结果最终鉴定 HS140 菌株为 *B. licheniformis*。

关键词 黄颡鱼; 地衣芽孢杆菌; 筛选; 鉴定

中图分类号 Q 959.46 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)02-0208-05

黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*) 因其含肉率高、营养丰富而深受广大消费者的青睐, 市场需求量不断增加。尽管黄颡鱼抗病力较强, 但随着养殖产量大幅度提高, 其病害发生也日趋严重, 各种病原体的侵袭严重影响了黄颡鱼的产量和效益。而在水产动物疾病防治过程中, 抗生素类药物作用显著, 但是它们可导致耐药性的产生以及耐药因子的传递, 残留的药物会通过食物链影响人类的健康等^[1-4], 所以, 寻求抗生素的替代品就愈加重要, 益生菌的出现给人们带来了新的希望。

目前, 在黄颡鱼养殖技术、遗传育种等方面^[5-6]的研究成果较多, 但关于其肠道益生菌筛选及应用还未见报道。笔者首先利用从黄颡鱼消化道中分离的大量菌株, 通过对菌株的产酶能力、对鱼类常见病原菌体外拮抗作用以及对抗生素敏感性试验, 筛选出 1 株益生菌 HS140 菌株。进一步通过对该菌株形态观察、生理生化特性试验和 16S rRNA 序列分析等进行了分类鉴定, 以期为黄颡鱼的健康养殖奠定基础。

材料与方法

菌株及其来源

供试菌株为 2008 年 10 月从湖北大明水产科技有限公司池塘养殖的正常黄颡鱼肠道中分离的 218 株细菌。

鱼类致病菌, 迟钝爱德华菌 (*Edwardsiella tarda*)、鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*)、嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)、溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*)、温和气单胞菌 (*Aeromonas sobria*), 均为笔者所在实验室保存菌株。

供试鱼

供试黄颡鱼购自武汉市集贸市场。在华中农业大学水产基地室内水族箱中饲养 7 d 后, 选择活泼、无外伤、体形正常, 体重为 (41.5 ± 1.0) g 的健康黄颡鱼用于本试验。试验期间不投饵, 连续充气, 饲养水温保持在 (28 ± 1) 。

培养基

营养琼脂培养基、营养肉汤培养液、蛋白酶实验

收稿日期: 2009-11-02; 修回日期: 2010-01-06

* 国家“973”项目 (2009CB118700) 和农业公益性行业科研专项经费项目 (200803013)、农业部疫情监测项目 (2130108) 资助

** 通讯作者。E-mail: chenchangfu@mail.hzau.edu.cn

孟小亮, 男, 1984 年生, 硕士研究生。研究方向: 水产养殖和渔业生态。E-mail: mengxiaoliang@webmail.hzau.edu.cn

培养基、脂肪酶实验培养基、淀粉酶实验培养基。培养基配方参考文献[7]方法进行。

产酶试验

参照王世荣等的方法^[8]进行。将供试菌株划线接种于3种实验培养基中,每个菌株重复做3次。将接种好的上述平板置恒温培养箱中28℃培养48h,保证每个平板上出现3个以上的单菌落,测量菌落的直径和透明圈的直径,取菌落和透明圈直径的平均值,然后计算出水解圈直径与菌落直径之比,筛选出产酶能力较强的菌株。

病原菌的拮抗试验

根据1.4的结果,按照Smith等的方法^[9]进行。将指示菌接种于营养肉汤培养液中,28℃摇床培养12h,取菌悬液0.1mL均匀涂布于营养琼脂培养基平板上,然后用接种环刮取活化24h的供试菌株,在上述平板上点种。观察48h内点种区周围是否出现明显的抑菌透明区或覆盖区并测量抑菌透明区的大小。

药敏试验结果

将筛选出的HS140菌株和HS226菌株接种于营养肉汤培养液中,28℃摇床培养12h,取菌悬液0.1mL均匀涂布于营养琼脂培养基平板上,将16种药敏纸片贴于平皿培养基表面。置28℃恒温培养箱培养18~24h,观察结果。根据临床和实验室标准化研究所(CLSI,以前称NCCLS)2009年提供的抗菌药物敏感性试验执行标准进行结果判断。

致病力测试结果

将HS140菌株接种在营养琼脂培养基上,28℃培养24h后,用0.75%无菌生理盐水洗脱得菌悬液,10倍系列稀释菌悬液至浓度为 1.0×10^8 、 1.0×10^7 、 1.0×10^6 和 1.0×10^5 cfu/mL。将不同稀释度的菌悬液用无菌注射器对每尾黄颡鱼注射0.3mL,每组注射20尾作为试验组。对照组则注射同体积的无菌生理盐水。注射后的黄颡鱼放回水族箱中继续饲养,每日记录死亡情况,连续观察7d。

菌株的鉴定

1)形态及生化指标。依据文献[10-11]对菌株HS140菌株进行鉴定。

2)DNA模板的制备。将HS140菌株接种在BHI平板上,28℃培养过夜。取单一菌落接种在

BHI培养液中,28℃震荡培养24h。取菌悬液1mL用DNA提取试剂盒(离心柱型)(北京百泰克生物技术有限公司生产)制备DNA,并作为PCR反应的模板。

3)16S rRNA的PCR扩增、克隆与测序。采用PCR扩增16S rRNA,其上下引物的序列分别为5'-AGA GTTTGA TCCTGGCTCAG-3'和5'-AAG-GA GGTGA TCCA GCCGCA-3'。PCR反应体系(100 μL):10 μL 10×PCR缓冲液(含 Mg^{2+}),2 μL 10 mmol/L 4×dNTP,10 μL 10 mol/L正向和反向引物各5 μL,1 μL *Taq* DNA聚合酶(5 U),10 μL模板。按Axygen Biosciences公司的DNA凝胶回收试剂盒说明书回收和纯化PCR产物,将纯化产物连接到Promega公司的pGEM-T easy载体上,然后转化大肠杆菌TOP10感受态细胞,在含有Amp/IPTG/X-Gal的平板上进行蓝白斑筛选。挑取白斑,扩大培养后将菌液送往北京奥科生物技术有限责任公司进行测序。

4)16S rRNA的序列分析及系统发育树的构建。将测定的菌株HS140的16S rRNA序列在GenBank中进行Blast搜索和分析,选用Clustal W方法与已知的芽孢杆菌属16S rRNA序列进行同源序列分析比对,并用MEGA4.0软件中邻接法(NJ)构建10个菌种系统发育树,用自展法(Bootstrap)进行1000次重复,并用一致性指数(consistency index, CI)来衡量分析结果的可靠性。

结果与分析

产酶能力比较

菌株产酶能力的测定结果如表1所示。共筛选出能够同时分泌蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶的19个菌株,但是,不同菌株的产酶能力差异很大。分泌蛋白酶能力最强的菌株为HS131菌株,其水解圈直径与菌落平均直径的比值(H/D)达到4.79;分泌脂肪酶能力最强的菌株为HS140菌株, H/D 为3.15;分泌淀粉酶能力最强的菌株为HS226菌株, H/D 为3.94。

对病原菌的拮抗作用

根据分离菌株对致病菌株产生拮抗作用的强弱,共筛选出6个菌株,其特性如表2所示。

药敏试验结果

由表3可以看出,HS226菌株对丙氟哌酸、氨

表 1 分离菌株的产酶能力比较

菌株编号 Strain No.	产酶水解圈直径与菌落直径比 Ratio of diameter of enzymatic hydrolysis and colonies (H/D)		
	蛋白酶 Protease	脂肪酶 Lipase	淀粉酶 Amylase
HS105	2.98	2.69	3.63
HS108	1.72	1.81	1.92
HS118	2.04	2.24	2.10
HS125	2.36	1.65	1.86
HS127	1.28	1.74	1.42
HS131	4.79	3.02	3.47
HS137	1.54	1.98	1.32
HS140	3.95	3.15	3.21
HS162	1.97	2.35	1.34
HS226	4.45	2.93	3.94
HS237	2.46	2.00	1.84
HS246	3.01	2.20	1.82
HS307	1.88	1.86	1.30
HS317	2.55	2.34	2.04
HS321	1.23	2.08	2.22
HS331	3.28	1.24	2.23
HS337	2.22	2.55	1.24
HS339	1.78	1.39	1.95
HS351	1.92	2.41	2.15

表 2 点种法对拮抗菌的筛选¹⁾

菌株 Strain	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone/ mm				
	迟钝爱德 氏菌 <i>E. tarda</i>	温和气 单胞菌 <i>A. sobria</i>	鳗弧菌 <i>V. anguilla</i>	嗜水气 单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	溶藻弧菌 <i>V. alginor</i>
HS105	5	-	-	11	-
HS131	-	-	-	10	-
HS140	21	16	9	-	-
HS226	6	14	-	-	15
HS237	-	-	-	-	9
HS317	-	-	8	-	-

1)“-”表示没有拮抗作用。“-”means not antagonistic action.

苜青霉素、利福平、磺胺异恶唑、强力霉素和链霉素等 6 种抗生素产生耐药,HS140 菌株只对氨苄青霉素、磺胺异恶唑和先锋霉素 VI 等 3 种抗生素产生耐药,对另外的 13 种抗生素均敏感或中度敏感。

致病力测试结果

试验结果显示,注射 0.3 mL 浓度分别为 1.0×10^5 、 1.0×10^6 、 1.0×10^7 、 1.0×10^8 cfu/mL 的 HS140 菌液后,与注射 0.3 mL 0.75% 无菌生理盐水的对照组相比,黄颡鱼未表现异常。说明 HS140 菌株对黄颡鱼毒性低。

表 3 HS140 菌株和 HS226 菌株药敏试验结果¹⁾

Table 3 Results of antibiotic sensitivity test of the isolated bacteria

药品 Antibiotics	每片含量/ μ g Content of per tile	菌株 Strain			
		HS140		HS140	
		抑菌圈大小 Inhibitory ring/ mm	结果 Results	抑菌圈大小 Inhibitory ring/ mm	结果 Results
氟哌酸 Fulgram	10	21	S	37	S
新霉素 Neomycin	30	23	S	24	S
卡那霉素 Kanamycin	30	28	S	22	S
丙氟哌酸 Ciprofloxacin	5	25	S	-	R
氨苄青霉素 Ampicillin	10	-	R	-	R
利福平 Rifampicin	5	18	M	14	R
磺胺异恶唑 Sulfamethoxazole	30	-	R	11	R
先锋霉素 VI Cefradine VI	30	13	R	29	S
恩诺沙星 Enrofloxacin	5	24	S	29	S
吡哌酸 Pipemidic acid	30	21	S	36	S
四环素 Tetracycline	30	23	S	20	S
强力霉素 Doxycycline	30	24	S	-	R
奥复星 Ofloxacin	5	23	S	32	S
氟苯尼考 Florfenicol	75	36	S	36	S
链霉素 Streptomycin	10	13	M	11	R
庆大霉素 Gentamicin	10	26	S	26	S

1)“-”表示无抑菌圈;“S”表示高度敏感,“M”表示中介,“R”表示耐药。“-”means haven't inhibitory ring,“S”means highly sensitivity,“M”means inhibition,“R”means drug tolerance.

形态及生理生化特征

通过革兰氏染色镜检,确定 HS140 菌株为革兰氏阳性可动杆菌,芽孢中生。在营养琼脂培养基上生长 24 h 后,菌落扁平,表面粗糙,边缘不整齐,呈

白色。常规生理生化分析试验表明,HS140 菌株在厌氧条件下可以生长,有运动性,氧化酶和接触酶阳性,可还原硝酸盐和水解淀粉;能利用葡萄糖、果糖、甘露糖、乳糖、半乳糖、鼠李糖、L-阿拉伯糖、核糖、

D-木糖、蔗糖类产酸,但不能利用山梨糖、D-阿拉伯糖、L-木糖;能利用甘露醇和山梨醇,不能利用木糖醇和 D-阿拉伯糖醇,同时对七叶苷有分解能力。

菌株 序列系统发育树的构建

将菌株 HS140 的 16S rRNA 基因序列提交到 NCBI/ GenBank,在 GenBank 中进行 Blast 搜索并根据菌株 HS140 的 16S rRNA 序列与已报道的芽孢杆菌属 16S rRNA 基因序列进行比较分析,其中与地衣芽孢杆菌同源性最高,达 99.3%,说明菌株 HS140 与地衣芽孢杆菌亲缘关系最近。将 10 个菌种 16S rRNA 核苷酸序列对齐后,以核苷酸序列为分子标记,用 MEGA4.0 软件包中的邻接法(NJ)构建了 10 个菌种的系统发育树(图 1),从图中可以看出,菌株 HS140 与地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*) (FJ435674)聚为同一分支。结合形态、生理生化特征以及 16S rRNA 序列鉴定结果,可将菌株 HS140 鉴定为 *B. licheniformis*。

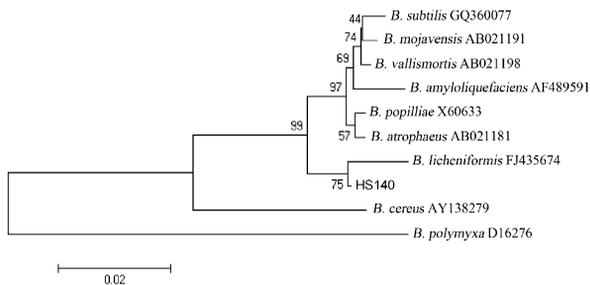


图 1 用邻接法(NJ)构建的 10 个菌种 16S rRNA 核苷酸序列系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA nucleotide sequences using NJ method

讨 论

养殖动物体内正常的菌群对维持其机体的健康有着重要的影响^[12]。它们与宿主间的微生态平衡保证了宿主动物的正常代谢,为宿主的生长发育提供丰富维生素等营养物质,同时还能提高宿主的免疫抗病力。因此以改善动物肠道菌群、促进动物健康的益生菌制成的饲料添加剂,在国内外得到普遍重视。从养殖环境包括宿主自身环境中分离菌株是筛选益生菌的有效途径,绝大多数水产益生菌的筛选都以抑制特定病原菌效果为依据,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^[13-14]。笔者在筛选益生菌时,在研究了菌株对常见病原菌的拮抗作用的基础上,还比较了各菌株分泌蛋白酶、脂肪酶和淀

粉酶的能力,并将产酶能力强的菌株筛选为益生菌,这是因为本试验是以筛选出黄颡鱼饲料添加剂型的益生菌为目的的。

另外,益生菌的筛选还应该考虑到菌株是否携带耐药因子。选用不带耐药因子、或者所带抗药因子甚少的有益菌株作为微生态制剂的生产用菌株,应作为一个重要指标^[15]。本研究检测了最终筛选得到的 HS140 菌株和 HS226 菌株对常见抗生素的敏感性,发现 HS226 菌株对丙氟哌酸、氨苄青霉素、利福平、磺胺异恶唑、强力霉素和链霉素等 6 种抗生素都产生耐药;而 HS140 菌株只对氨苄青霉素、磺胺异恶唑、先锋霉素 VI 等 3 种抗生素产生耐药,由此说明 HS140 菌株携带耐药因子较少。此外,Taylor 等^[16]在 2005 年对包括 *B. cereus*、*B. firmus* 等在内的 101 株芽孢杆菌热稳定毒素的检测结果表明,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。在本研究中,虽然 HS140 菌株对黄颡鱼试验未显示毒性,但因本试验为急性毒性试验,因此长期使用是否会对黄颡鱼产生毒性还未知,有待于进一步深入研究。

我国农业部 2003 年公布了 *B. licheniformis* 可作为微生物菌种添加到饲料中。刘文斌等^[17]通过将 *B. licheniformis* 分别与复合酶制剂、低聚木糖适量混合后加入异育银鲫饲料中,不仅可以提高饲料的利用效率,促进肠道有益微生物的生长和抑制有害微生物,并且能提高肝脏脏蛋白酶 mRNA 的表达量和肠道酶活性。本试验结合形态观察、生理生化指标分析和 16S rRNA 系统发育分析对 HS140 菌株进行了分类鉴定,结果与 *B. licheniformis* 最为相似,结合系统发育分析结果,最终鉴定 HS140 菌株为 *B. licheniformis*。在本研究的基础上,本课题组将进一步就益生菌株 HS140 对黄颡鱼的作用效果和对肠道菌群的影响进行探讨。

参 考 文 献

- [1] 陈昌福,王敏,罗宇良.柱状嗜纤维菌对抗生素的敏感性测定[J].华中农业大学学报,1997,16(1):74-79.
- [2] 熊伟,梁运祥,戴经元,等.枯草芽孢杆菌对斑节对虾饲养池水净化作用的初步研究[J].华中农业大学学报,2003,22(3):247-250.
- [3] BYUN J Y. Probiotic effect of *Lactobacillus* sp Ds-12 in flounder[J]. J Gen Appl Microbiol, 1997, 43:305-308.

- [4] 冯雪. 草鱼和银鲫肠道产消化酶细菌的研究[D]. 武汉: 华中农业大学图书馆, 2008.
- [5] 董俊锋, 樊启学, 张磊, 等. 早期分级养殖对黄颡鱼生长、成活及性比的影响[J]. 华中农业大学学报, 2008, 27(3): 400-404.
- [6] 宋立民, 袁立来, 刘肖莲, 等. 2种鉴定黄颡鱼三倍体个体方法的比较[J]. 华中农业大学学报, 2009, 28(2): 207-209.
- [7] 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法[M]. 北京: 科学出版社, 1978.
- [8] 王世荣, 徐龙, 张树华, 等. 常见几种芽孢杆菌产淀粉酶的比较[J]. 饲料博览, 2005, 2(2): 32-33.
- [9] SMITH P, DABEY S. Evidence for the competitive exclusion of *Aeromonas salmonicida* from fish with a tress inducible furunculosis by a fluorescent pseudomonad[J]. J Fish Dis, 1993, 16: 521-524.
- [10] HOLT J G, KRIEG N R, SNEATH P H A, et al. Bergey's manual of determinative bacteriology [M]. 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994.
- [11] 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.
- [12] 陈孝焯, 吴志新, 周文豪, 等. 鱼类消化道菌群的作用与影响因素研究进展[J]. 华中农业大学学报, 2005, 24(5): 523-528.
- [13] 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.
- [14] HJELM M, BERG, RIAZA 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.
- [15] SALMINEN S, WRIGHT A, MORELLI L, et al. Demonstration of safety of probiotics a review [J]. Int J Food Microbiol, 1998, 44: 93-106.
- [16] TAYLOR J M W, SUTHERLAND A D, AIDOO 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.
- [17] 刘文斌, 尹君, 方星星, 等. 3种益生菌配伍对异育银鲫生长、消化及肠道菌群组成的影响[J]. 海洋与湖沼, 2007, 38(1): 29-35.

Screening and Identification of a Potential Probiotic from *Pelteobagrus fulvidraco* Intestine

MENG Xiao-liang CHEN Chang-fu GAO Yu HE Zhong-hua TIAN Tian LIU Zhen-xing
College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Two hundred and eighteen bacteria strains isolated from intestinal tract of cultured *Pelteobagrus fulvidraco* were used for testing the producing zymogenicities of protease, lipase and amylase, the antagonistic against five common pathogenic bacterias and the antibiotic sensitivity. The toxicity of strain HS140 screened as potential probiotic for *Pelteobagrus fulvidraco* was evaluated. HS140 was identified according to its morphological, physiological and biochemical characteristics as well as homology analysis of 16S rRNA sequences. The results indicated that HS140 had high ectoenzyme-producing ability and could produce chemical substances inhibitor to *Edwardsiella tarda*, *Aeromonas sobria* and *Vibrio anguillarum*. HS140 was resistant to ampicillin, sulfamethoxazole, VI cefradine, but sensitive or medium sensitive to the other 13 kinds of antibiotics. It was safe for *Pelteobagrus fulvidraco* when they were challenged by a high immersion concentration of HS140 at 10^8 cfu/mL. Morphology observation showed that HS140 was gram-positive, rod, motile. The results revealed that strain HS140 comprised sequences more related to *Bacillus licheniformis* (99.3%) from partial 16S rRNA sequences. The identification showed that strain HS140 was *Bacillus licheniformis* by the way of morphology, biochemistry characteristic and 16S rRNA sequence homology analysis.

Key words *Pelteobagrus fulvidraco*; *Bacillus licheniformis*; screening; identification

(责任编辑:边书京)