

凡纳滨对虾肠道内产消化酶益生菌的分离与筛选

窦春萌¹, 左志晗^{1*}, 刘逸尘¹, 张亦陈¹, 耿绪云², 孙金生^{1, 2}

(1. 天津师范大学生命科学学院, 天津市动植物抗性重点实验室, 天津 300387;

2. 天津市水生动物市场疫病预防控制中心, 天津 300221)

摘要: 为获得具有消化酶活性且安全的益生菌, 从凡纳滨对虾肠道中初步分离得到576株细菌, 对菌株进行产蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶能力的定性及定量测试, 筛选出产酶种类多且产酶能力强的菌株11株。对筛选出的11株菌进行了幼虾浸浴实验、药敏性实验和溶血性实验, 以评价其生物安全性。将11株菌的菌悬液添加到凡纳滨对虾幼虾的养殖水体中进行浸浴实验, 浸浴结束后用鳃弧菌进行刺激, 测定不同浸浴组幼虾相关免疫基因的相对表达量, 以确定其对幼虾的保护效果。综合消化酶活性、菌株对幼虾的保护效果及生物安全性, 筛选得到4株效果较好的菌株。菌株的16S rDNA分子鉴定结果表明, 细菌1号、2号和4号分别与芽孢杆菌(*Bacillus* sp. PCSAS2-38, GQ284495.1)、蜡样芽孢杆菌(*B. cereus* strain N419, JN400121.1)及苏云金芽孢杆菌(*B. thuringiensis* strain EA26.1, KC758847.1)的相似性均为100%, 9号菌株与荚膜红细菌(*Rhodobacter capsulatus* strain PSB-03, FJ866782.1)相似性达到99%, 为后续益生菌制剂的开发奠定了前期基础。

关键词: 凡纳滨对虾; 益生菌; 肠道; 鉴定

中图分类号: S 917.1

文献标志码: A

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)原产于太平洋东部沿岸水域秘鲁北部至墨西哥桑诺拉一带, 1988年由张伟权教授引进中国, 1994年批量育苗成功。由于其在盐度上具有广适性, 在许多内陆地区也试养成功, 从而在我国的水产养殖产业中占有很大的比重, 是目前水产养殖的主要经济支柱之一。

伴随着对虾养殖业在全球的迅猛发展, 对虾养殖业的病害也日益突出, 同时日益严重的环境问题也一直威胁着对虾的养殖和安全^[1]。研究表明, 大量抗生素的使用不仅扰乱了对虾肠道的正常菌群, 使病原菌产生抗药性, 而且药物在环境以及对虾体内残留最终威胁人类的健康和安全, 这些已引起人们的广泛关注^[2]。鉴于细菌在自然界生物类群中的地位和作用^[3], 许多学者开始相关的研究, 将细菌作为活的微生物添

加剂即益生菌添加到饲料中, 通过改善肠道菌群平衡而对动物产生有益影响^[4]。益生菌在动物体内既不会产生残留也不会出现耐药性, 益生菌替代抗生素已经成为研究热点。这也引起了国内外水产学家的普遍关注, 掀起了益生菌在水产养殖中应用研究的热潮, 并有望替代抗生素成为一个重要的研究方向^[5]。许多研究表明, 补充益生菌不仅能够提高水生动物的存活率和生长速度, 而且能够通过改善鱼虾的免疫系统来减少疾病的暴发^[6-9]。益生菌已经作为控制疾病、提高免疫力、提供营养、促进消化能力和控制水质的有效途径在水产养殖业中广泛使用。

益生菌的作用机制包括建立宿主肠道微生物群系, 调节宿主免疫反应, 提高宿主消化吸收水平^[2-3]。鉴于益生菌的作用机制, 益生菌的初

收稿日期: 2015-03-04 修回日期: 2015-04-24

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划(2012 AA 092205; 2012 AA 10 A 401); 国家“九七三”重点基础研究项目(2012 CB 114405)

通信作者: 左志晗, E-mail: zhihanzuo@163.com

步筛选主要集中在抑菌能力和产酶性能上,从健康动物肠道内分离出具有产各种消化酶活性的菌株已经成为筛选益生菌的有效途径之一^[10-11]。有研究表明将筛选出的益生菌应用到对虾体内,不仅能提高对虾对饲料的利用率,促进对虾的生长,而且部分益生菌还能促进对虾免疫系统对病毒和致病菌的抵抗能力,减少虾病的暴发^[3, 9]。

本实验从健康凡纳滨对虾肠道中筛选能够产生多种水解酶的细菌,根据对虾生长所需要的营养成分,产酶能力主要针对蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶进行筛选。通过对筛选出的候选菌株进行幼虾的浸浴、药敏性和溶血性实验,进一步筛选和分类鉴定,为后期凡纳滨对虾亲虾饲喂提供数据支持,同时对对虾益生菌制剂的研发与应用提供科学依据,促进对虾养殖业的发展。

1 材料与方法

1.1 实验材料

来源 健康凡纳滨对虾肠道(对虾购于天津市汉沽区鑫永丰对虾养殖场,体质量20~23 g,体长14~16 cm)。

培养基 实验中所用的培养基2216E、VNSS配制参照Furniss等^[12]的方法,九盐溶液(NSS)的配制参照Olsson等^[13]的方法,淀粉培养基配制参照Castro等^[14]的方法,脱脂牛乳琼脂培养基、脂肪培养基、芽孢杆菌分离培养基、芽孢杆菌富集培养基的配制方法参照实验技术手册^[22],LBS、MRS培养基均购于北京陆桥技术有限责任公司。

1.2 实验方法

凡纳滨对虾肠道细菌的分离 参照Kongnum等^[15]的方法并稍加改良:无菌条件下取对虾的全肠于匀浆器中,冰浴研磨,用九盐溶液对研磨液进行 10^{-1} ~ 10^{-8} 的梯度稀释;选取梯度为 10^{-3} ~ 10^{-7} 的稀释液各0.1 mL分别涂布在MRS培养基、LBS培养基、VNSS培养基和2216E培养基上;芽孢杆菌的分离采用先在芽孢杆菌富集培养基中28℃培养18~24 h,再置于80℃水浴中加热15 min,取加热之后的 10^{-3} ~ 10^{-7} 的梯度稀释菌悬液0.1 mL涂布在芽孢杆菌分离培养基上,28℃恒温培养24~48 h;取单菌落在相应的培养基上进行划线纯化,28℃恒温培养24 h并将纯化后的

菌株分别在4℃及-80℃下进行短期及长期保存。

具有产酶活性菌株的筛选 将上述分离得到的各菌株分别点种于脂肪培养基、脱脂牛乳琼脂培养基和淀粉培养基上,28℃恒温培养24 h,根据菌落能否产生红斑、蛋白水解圈以及淀粉水解圈筛选能分泌脂肪酶、蛋白酶及淀粉酶的菌株。

菌株产酶能力的测定 将上述筛选出的菌株分别接种于相应的培养基中,28℃培养18~24 h。4000 r/min离心30 min,取上清液用蛋白酶试剂盒、淀粉酶试剂盒和脂肪酶试剂盒测定其相应酶活,试剂盒购于苏州科铭生物技术有限公司。

幼虾浸浴实验 对虾幼体的浸浴实验参照Hadi等^[16]的方法略有改动:将筛选出的11株菌逐级扩大培养,用OD₆₀₀测定菌液的浓度,4℃4000 r/min离心15 min制备菌泥。将制备好的菌泥分别加入到11个实验组中,保证每组中菌液的浓度为 10^5 CFU/mL^[19],同时设置一个空白组。每天按每组幼虾体质量的5%分2次进行饲喂^[19],为保证水质需要换水并重新添加益生菌以保证益生菌的浓度,浸浴实验持续时间为1周,期间观察幼虾的生活状态。浸浴实验结束后将30尾幼虾转入新的养殖水中进行攻毒实验,空白组和实验组均接种鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)使菌液浓度为 10^7 CFU/mL^[16-20],攻毒5 h,将幼虾移到新的养殖水体中,攻毒实验结束后24 h时进行取样,取幼虾迅速放入液氮中,研磨全虾,提取总RNA。用实时荧光定量PCR对酚氧化酶原基因、超氧化物歧化酶基因、溶菌酶基因、抗菌肽基因、脂多糖葡聚糖结合蛋白基因、细胞黏附因子基因进行定量测定,观察各组基因的表达变化。

菌株溶血活性的测定 细菌溶血活性的测定参考Williams等^[21]的方法。取家兔的动脉血,加柠檬酸钠抗凝,1000×g离心10 min(4℃),去上清液,下层液体加生理盐水,制成1%的兔红细胞悬液。将过夜培养的待测菌株和鳃弧菌制成初始吸光值(OD₅₅₀)相同的菌悬液。取兔红细胞悬液和菌悬液各0.5 mL加入到1.5 mL的无菌离心管中,混匀于28℃恒温振荡培养3 h,1000×g离心5 min(4℃),取上清液,测定被释放的血红蛋白的吸光值(OD₅₅₀)。阴性对照组和阳性对照组分别用等体积的生理盐水和蒸馏水代替菌悬

液, 每组设置3个重复。溶血百分数(%)=(OD_样-OD_阴)/(OD_阳-OD_阴)×100%, 将溶血百分数≤10%的样品判为不具溶血活性。

菌株药敏性实验 药敏实验采用纸片琼脂扩散法^[22]。每种抗菌药物纸片(购于杭州微生物试剂有限公司)均设3个重复, 培养结束后测量并记录抑菌圈的直径。用2株已知抗生素耐药性的标准菌株, *St. aureus* ATCC25923和*E. coli* ATCC25922作为阳性质控菌。受试菌株对16种抗生素的药敏性参照WHO提供的NCCLS的标准进行^[23]。

菌株的分子生物学鉴定 最终筛选出的菌株提取总DNA, 采用通用引物扩增其16S rDNA片段, 正向引物为27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 反向引物为1492R: 5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3'。循环条件: 94 °C 4 min; 94 °C 30 s, 50 °C 1 min, 72 °C 2 min, 30个循环; 72 °C 10 min。将扩增产物(1.5 kp左右)进行测序(测序委托华大基因科技有限公司), 将测序后的16S rDNA序列在GenBank数据库中进行比对鉴定(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)。

2 结果

2.1 分离菌株的初步鉴定

采用MRS培养基、LBS培养基、VNSS培养基、2216E培养基、芽孢杆菌分离培养基从凡纳滨对虾肠道共计分离出576株菌株。其中, 57株来自MRS培养基, 127株来自LBS培养基, 169株

来自VNSS培养基, 157株来自2216E培养基, 66株来自芽孢杆菌分离培养基。利用脱脂牛乳琼脂培养基、淀粉培养基和脂肪培养基对这些菌株进行初步筛选, 共筛选出具有产蛋白酶能力的菌株202株, 产淀粉酶能力的菌株214株, 产脂肪酶能力的菌株194株, 其中有11株菌兼具分解蛋白质、淀粉和脂肪的能力, 其分解的蛋白质、淀粉和脂肪产生了透明圈与红斑(图1)。

2.2 分离菌株的酶活力测定

11株菌在筛选时出现的透明圈均较大且清晰, 测定其消化酶活性后发现产生的透明圈大小与酶活力并不出现很强的相关性。其中1号、2号、4号、9号菌株3种酶的活力均较高; 6号、8号、10号菌株的淀粉酶活力和脂肪酶活力次之; 3号、5号、7号、11号菌株的3种酶活相对较低。在3种酶活中, 各个菌株淀粉酶活性均最高(图2)。

2.3 浸浴

用鳃弧菌进行攻毒, 攻毒结束后24 h时测定6种免疫相关基因的相对表达量, 1、2、4、6、9、10、11组的6种基因表达量较空白组有显著($P<0.05$)的上调(图3)。其中2、9组的基因表达上调极显著($P<0.01$), 1、4、6、10、11除超氧化物歧化酶基因表达上调显著外, 其余基因的表达上调均为极显著(图4)。在实验过程中发现5、6、10、11组加入候选菌株后幼虾死亡明显增多, 而其他组没有出现此种现象, 因此必须结合候选益生菌的安全实验对菌株进行进一步的筛选。

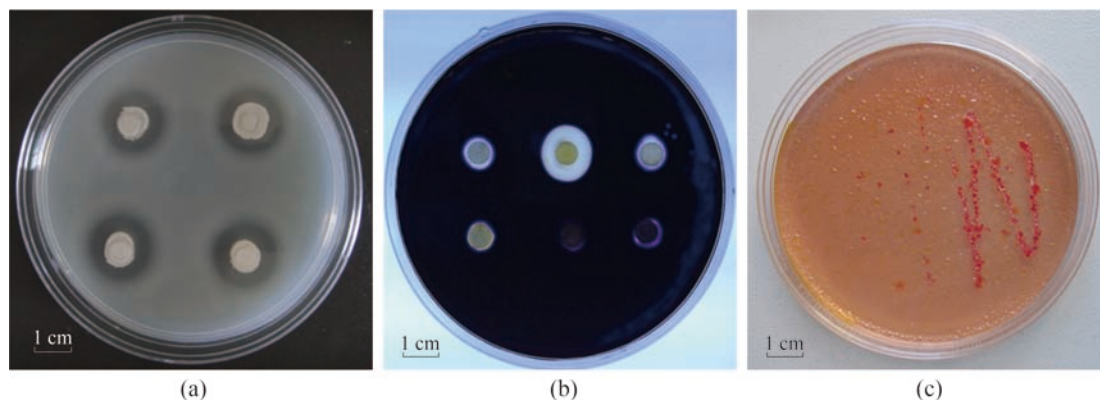


图1 分离到的凡纳滨对虾肠道菌株3种消化酶的阳性图片

(a) 蛋白酶阳性; (b) 淀粉酶阳性; (c) 脂肪酶阳性

Fig. 1 Strains positive pictures of three digestive enzymes

(a) protease positive; (b) amylase positive; (c) lipase positive

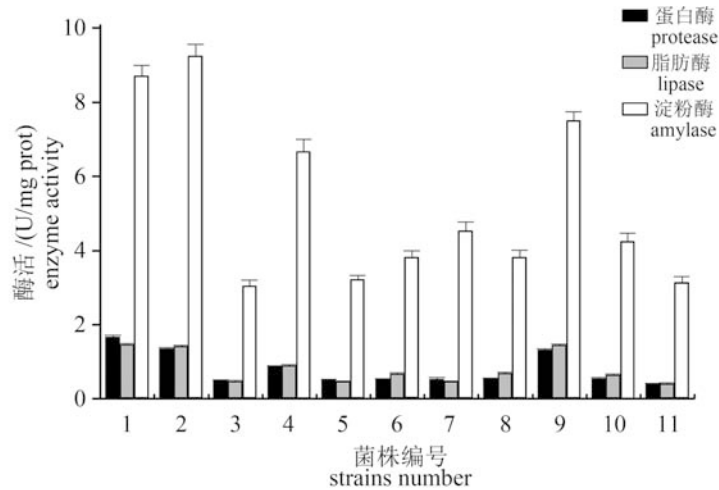


图 2 各菌株蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶活力

Fig. 2 Three enzymes activity of different strains

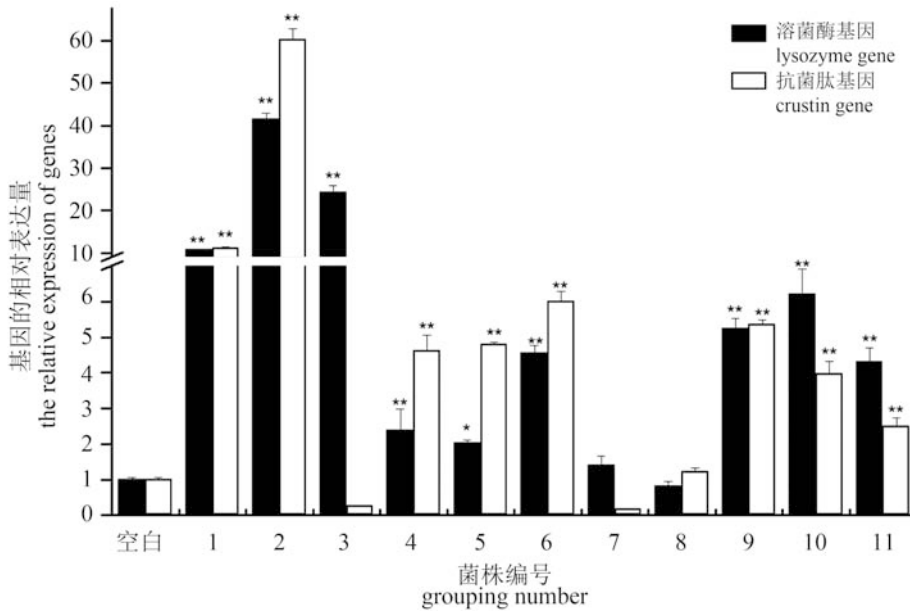


图 3 浸浴实验攻毒结束24 h后不同菌株溶菌酶基因和抗菌肽基因的相对表达量

*. 差异显著($P < 0.05$); **. 差异极显著($P < 0.01$); 下同

Fig. 3 The relative expression of different genes in different groups after challenge test

*. significant difference ($P < 0.05$); **. highly significant difference ($P < 0.01$); the same below

2.4 菌株的溶血性

在进行幼虾浸浴实验的同时对11株菌株进行了溶血活性的测定，其中1号、2号、3号、4号、7号、8号、9号的溶血百分数显著低于鳗弧菌，说明这些菌株不释放溶血毒素，是相对安全的候选益生菌(表1)。而5号、6号、10号、11号的溶血性显著高于鳗弧菌，具有潜在的致病性，该结果与幼虾浸浴实验结果相吻合，即溶血活性高的菌株浸浴组幼虾死亡率明显增高，也进一步印证了溶血活性高的菌株具有潜在致病性，

因此可作为判断菌株安全性的重要指标之一。

2.5 菌株的药敏性

对分离出的11株菌进行抗生素的敏感性实验，根据WHO提供的NCCLS最新版本对敏感或耐药的判断标准，得出各菌株对常用抗生素如青霉素表现出明显的抗药性，可能与对虾养殖过程中抗生素的使用有关(表2)。研究表明，摄入到养殖动物体内的抗生素大约会有80%以上以母体化合物的形式排放到周围的环境中，可诱

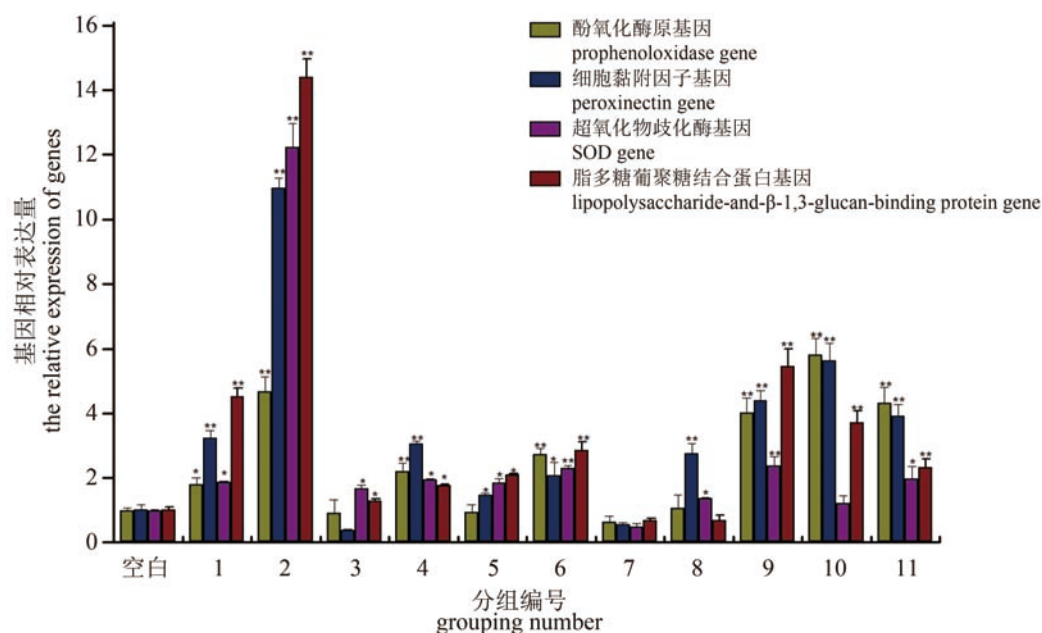


图 4 浸浴实验攻毒后不同菌株不同基因的相对表达量

Fig. 4 The relative expression of different genes in different groups after challenge test

表 1 菌株溶血活性实验结果

Tab. 1 Hemolysin activity of different strains

样品 sample	OD ₅₅₀	溶血百分数/% percentage in hemolysis
阴性对照 negative control	0.055 ± 0.002	0
阳性对照 positive control	0.145 ± 0.003	100
1	0.064 ± 0.003	8.85
2	0.062 ± 0.002	7.33
3	0.067 ± 0.005	9.40
4	0.065 ± 0.005	8.90
5	0.154 ± 0.006	108.80
6	0.158 ± 0.006	113.19
7	0.064 ± 0.002	8.43
8	0.064 ± 0.004	13.20
9	0.062 ± 0.003	6.05
10	0.132 ± 0.003	87.18
11	0.164 ± 0.002	119.78
鳃弧菌 <i>V. anguillarum</i>	0.171 ± 0.005	131.14

导水生生物体内和环境介质中产生耐药菌株^[24]。目前,在我国地表水中已检测出68种抗生素^[25],有超过16种抗生素在世界各地水体及沉积物中被高频次、高含量地检出^[26-27],从而使环境中的微生物产生了选择性压力,在微生物体内诱导产生

抗生素抗性基因,并且这种抗性能通过例如质粒交换等水平转移基因进行传播,随着抗生素的过度使用,细菌对抗生素的抗药性正由单一抗药逐渐发展为多重抗药^[28]。因此,本研究将所筛选菌株的药敏性实验作为衡量其安全性的一个重要指标,将对抗生素抗性较强的3号、5号、6号、7号、8号、10号和11号菌株予以排除,不考虑作为候选益生菌,选择1号、2号、4号、9号对抗生素敏感性高,尤其是对糖肽类、大环内酯类、头孢类抗生素的敏感性显著高于其他菌株的4株菌进行后续实验。

2.6 菌株的分子鉴定

综合浸浴实验、溶血性实验及药敏实验结果,最终确定1号、2号、4号、9号菌株为候选益生菌,并对其进行16S rDNA分子鉴定。将测得菌株的16S rDNA序列在GenBank(www.ncbi.nlm.nih.gov)中进行blast序列比对,比对结果显示1号、2号、4号、9号菌株分别与芽孢杆菌 [*Bacillus* sp. PCSAS2-38(GQ 284495.1)]、蜡样芽孢杆菌 [*B. cereus* strain N 419(JN400121.1)]、苏云金芽孢杆菌 [*B. thuringiensis* strain EA26.1(KC758847.1)]和荚膜红细菌 [*Rhodobacter capsulatus* strain PSB-03(FJ866782.1)]相似性最高,其中1号、2号、4号的相似度为100%,9号的相似度为99%。

表2 菌株药敏性实验结果

Tab. 2 The results on the antibiotic susceptibility of different strains

抗生素 antibiotics		菌株 strain										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
青霉素类 penicilinas	青霉素 penicillin	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	美洛西林 mezlocillin	S	I	R	I	I	I	R	S	S	S	R
	阿洛西林 azlocillin	S	S	I	S	R	I	S	R	S	S	R
β -内酰胺 inhibitor of -lactamase	氨苄西林 ampicillin	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
头孢类 cefens	头孢噻肟 cefotaxime	I	I	I	I	I	I	I	R	I	I	I
	头孢吡肟 cefepime	S	S	R	S	R	R	I	R	S	R	R
糖肽类 glycopeptides	杆菌肽 bacitracin	S	S	R	S	R	R	R	R	S	R	S
氨基糖苷类 aminoglicosideos	庆大霉素 gentamicin	S	S	I	S	I	I	S	R	S	S	R
	卡那霉素 kanamycin	R	I	I	I	R	R	I	I	R	S	I
大环内酯类 macrolideos	红霉素 erythromycin	S	S	R	I	I	S	S	S	R	S	S
	麦迪霉素 midecamycin	S	S	S	S	I	S	S	S	R	S	S
四环素类 tetraciclins	四环素 tetracycline	I	I	R	I	I	I	I	I	S	I	I
喹诺酮类 fluoroquinolonas	罗美沙星 lomefloxacin	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	R
其他 others	氯霉素 chloramphenicol	S	I	S	S	I	I	S	S	S	S	S
	呋喃妥因 nitrofurantoin	I	S	S	S	I	S	S	S	I	S	S
	利福平 rifampin	R	R	R	R	R	R	I	I	S	I	R

注: R.耐药; I.中度敏感; S.敏感

Notes: R. resistant; I. intermediate; S. sensitive

3 讨论

益生菌通常作为疾病控制剂的辅助剂甚至替代抗生素应用于水产养殖动物疾病防治中, 微藻(*Tetraselmis*)、酵母(*Debaryomyces*, *Phaffia*和*Saccharomyces*)、革兰氏阳性细菌(*Bacillus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Weissella*)和革兰氏阴性细菌(*Aeromonas*, *Alteromonas*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*, *Vibrio*)已经作为益生菌被广泛应用于鱼类和甲壳类的养殖中^[20]。根据益生菌的作用机制^[29-31], 从养殖环境或是健康的动物体内分离拮抗病原菌的菌株是筛选益生菌的有效途径之一^[32], 此外, 益生菌在提高动物对饲料的消化吸收方面也具有重要的作用^[31], 分离具有产酶能力的菌株是筛选此类益生菌的主要方式, 这类菌株在动物肠道内定殖后可以产生各种消化酶以协同动物本身的消化酶降解饲料中的蛋白质、

淀粉、脂肪等, 这些益生菌的使用可以促进水产动物的健康生长, 改善水质条件, 有望提高动物的非特异性免疫能力, 进而减少抗生素的使用, 促进水产动物养殖的良性循环。目前对于此方面的研究主要集中在鱼类和贝类中^[33], 在对虾方面的研究则较少。本实验旨在通过分离对虾肠道中具有分解蛋白质、脂肪及淀粉能力的菌株, 并通过产酶能力比较、安全性实验及其对幼虾的保护实验, 最终筛选能够提高水产动物的消化能力, 促进其对营养物质吸收进而提高其抗病能力的益生菌候选菌株。本实验初筛并筛选出 576 株菌株, 但是在产酶菌的复筛过程中则有较多的菌株不具有产酶能力, 具有产蛋白酶能力的有 202 株, 具有产淀粉酶能力的有 214 株, 具有产脂肪酶能力的有 194 株, 选取 3 种能力均具有且产生的透明圈较明显的菌株 11 株, 并进一步对筛选出的 11 株菌种测定产酶能力, 发现透明圈的大小与菌株产酶能力的大小并不具有很强的相关性, 产酶能力的高低须经具体测

定酶活方可确定。

益生菌通常是通过添加到饲料中从而将其体内的活细胞引入到水产动物肠道内, 从而在宿主体内平衡肠道微生物菌群、提高消化功能进而提高对虾的免疫能力, 使对虾在受到外界病原菌入侵时免疫系统迅速启动^[18]。益生菌可以通过提供消化酶显著提高养殖水产动物的饲料利用率, 促进水产动物的生长, 并提高动物的免疫力^[17]。培育健康的对虾苗种是凡纳滨对虾养殖成功的第一步, 而且已有研究表明筛选出的候选益生菌通过浸浴实验可以显著提高幼虾的免疫反应并增强幼苗对疾病的抵抗力^[16]。当病原菌入侵对虾时, 对虾会启动非特异性免疫系统, 表达免疫相关物质如酚氧化酶、超氧化物歧化酶、溶菌酶等, 以抗病原菌保护对虾, 但是对虾没有特异性免疫, 仅靠非特异性免疫往往不能有效地抑制病原菌。已有研究表明当对虾受到病原菌入侵时相比未用益生菌的对虾免疫相关基因的表达量显著增多, 从而产生更多的免疫相关物质来保护对虾^[16-18, 20]。本实验中将筛选出的11株候选菌添加到养殖水中进行浸浴实验, 并在浸浴结束后进行攻毒实验测定免疫相关基因的表达, 发现7株菌的基因在受到鳃弧菌的刺激时表达较空白组显著上调, 但是在浸浴实验的过程中观察发现有部分候选菌添加到水体中会导致幼虾大量死亡, 而且死亡持续在整个浸浴实验的过程中, 这表明安全问题是筛选益生菌必须考虑的一个因素。

从益生菌的筛选到实际应用存在的最大障碍就是安全隐患, 候选菌株是否具有较强的抗药性, 是否产生溶血毒素都是必须要考虑的问题。本实验在浸浴实验的同时进行了菌株药敏性实验和溶血实验。在实验中发现部分菌株具有很强的耐药性, 尤其是对常见的抗生素, 这可能与对虾在养殖过程中的抗生素频繁使用有关。抗生素在水产养殖业中滥用的直接后果是导致养殖动物体内抗性菌株的产生, 对环境及人体健康构成潜在威胁。黄志坚等^[34]对194株(62个属)分离自水产养殖生物和养殖环境中的革兰氏阴性菌和阳性菌进行了5种常用抗生素的抗性检测, 结果表明水产养殖生物和养殖环境中均存在不同程度的抗生素污染。Kerry^[35]等对美国东南部的水产养殖池塘及未使用抗生素的河流中的细菌进行分析比较, 得出使用过抗生素

的池塘中抗四环素、氯霉素、氨比西林和呋喃妥英的抗性细菌数量明显增多。对分离到的候选益生菌株的药敏性实验结果表明, 水产动物肠道分离菌株确实具有不同程度的抗药性, 也从一个方面印证了上述结果。此外, 部分菌株在进行溶血实验时表现出较强的溶血活性, 在对虾浸浴的过程中5、6、10、11组在浸浴过程中幼虾大量死亡, 死亡幼虾的尾数远远大于其他各组, 并且在溶血实验中这4株菌表现出极强的溶血性, 溶血百分数远远高于其他各组并且接近鳃弧菌的溶血百分数, 表明这些菌株会产生溶血毒素, 是潜在的致病菌, 应排除在候选益生菌之外。

本研究通过综合产酶能力、浸浴实验及安全性方面的因素最终筛选出4株候选益生菌并进行了分子生物学鉴定, 经鉴定4株菌分别为芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌和荚膜红细菌。为后续益生菌制剂的开发奠定了基础, 并为产消化酶活性益生菌的开发建立了有效的筛选方法。

参考文献:

- [1] Kesarcodi W A, Kaspar H, Lategan M J, *et al.* Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes[J]. *Aquaculture*, 2008, 274(1): 1-14.
- [2] Esiobu N, Armenta L, Ike J. Antibiotic resistance in soil and water environments[J]. *International Journal of Environmental Health Research*, 2002, 12(2): 133-144.
- [3] Wang Y B, Xu Z R, Zhou X X, *et al.* Bacteria attached to suspended particles in northern white shrimp (*Penaeus vannamei* L.) ponds[J]. *Aquaculture*, 2005, 249(1-4): 285-290.
- [4] Fuller R. Probiotics in man and animals[J]. *Journal of Applied Bacteriology*, 1989, 66(5): 365-378.
- [5] Balcázar J L, de Blas I, Ruiz Z I, *et al.* The role of probiotics in aquaculture[J]. *Veterinary Microbiology*, 2006, 114(3-4): 173-186.
- [6] Harikrishnan R, Balasundaram C, Heo M S. Effect of probiotics enriched diet on *Paralichthys olivaceus* infected with lymphocystis disease virus (LCDV)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29(5): 868-874.
- [7] Soundarapandian P, Ramanan V, Dinakaran G K.

- Effect of probiotics on the growth and survival of *Penaeus monodon* (Fabricius)[J]. Current Research Journal of Social Sciences, 2010, 2(2): 51-57.
- [8] Peterson B C, Booth N J, Manning B B. Replacement of fish meal in juvenile channel catfish, *Ictalurus punctatus*, diets using a yeast-derived protein source: the effects on weight gain, food conversion ratio, body composition and survival of catfish challenged with *Edwardsiella ictaluri*[J]. Aquaculture Nutrition, 2012, 18(2): 132-137.
- [9] Wang Y B, Gu Q. Effect of probiotics on white shrimp (*Penaeus vannamei*) growth performance and immune response[J]. Marine Biology Research, 2010, 6(3): 327-332.
- [10] Macey B M, Coyne V E. Improved growth rate and disease resistance in farmed *Haliotis midae* through probiotic treatment[J]. Aquaculture, 2005, 245(1-4): 249-261.
- [11] Bairagi A, Ghosh K S, Sen S K, et al. Evaluation of the nutritive value of *Leucaena leucocephala* leaf meal, inoculated with fish intestinal bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus circulans* in formulated diets for rohu, *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings[J]. Aquaculture Research, 2004, 35(5): 436-446.
- [12] Furniss A L, Lee J V, Donovan T J. The Vibrios[M]//Howells C H L, Path F R C, Meers P D, et al. Public Health Laboratory Service, Monograph Series No.11. London: Her Majesty's Stationery Office, 1978: 4-5.
- [13] Olsson C, Wesetdrall A, Cownya P L, et al. Intestinal colonization potential of turbot (*Scophthalmus maximus*)-and dab (*Limanda limanda*)-associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58(2): 551-556.
- [14] Castro G R, Ferrero M A, Méndez B S, et al. Screening and selection of bacteria with high amyolytic activity[J]. Acta Biotechnologica, 1993, 13(2): 197-201.
- [15] Kongnum K, Hongpattarakere T. Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 32(1): 170-177.
- [16] Hadi Z, Nahid B, Che R S, et al. Administration of *Bacillus subtilis* strains in the rearing water enhances the water quality, growth performance, immune response and resistance against *Vibrio harveyi* infection in juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 36(1): 68-74.
- [17] Liu H Y, Li Z, Tan B P, et al. Isolation of a putative probiotic strain S12 and its effect on growth performance, non-specific immunity and disease-resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 41(2): 300-307.
- [18] Gómez R G D, Shen M A. Influence of probiotics on the growth and digestive enzyme activity of white Pacific shrimp (*Litopenaeus vannamei*)[J]. Journal of Ocean University of China, 2008, 7(2): 215-218.
- [19] 刘慧, 张红星. 现代食品微生物学实验技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2011.
- Liu H, Zhang H X. Modern food microbiology experimental techniques[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2011 (in Chinese).
- [20] 张玲, 谭北平, 麦康森, 等. 中国对虾体内1株益生菌的筛选与初步鉴定[J]. 中国海洋大学学报, 2008, 38(2): 225-231.
- Zhang L, Tan B P, Mai K S, et al. Screening and identification of a potential probiotic in shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Periodical of Ocean University of China, 2008, 38(2): 225-231 (in Chinese).
- [21] Williams M L, Lawrence M L. Identification and characterization of a two-component hemolysin from *Edwardsiella ictaluri*[J]. Veterinary Microbiology, 2005, 108(3-4): 281-289.
- [22] Bauer A W, Kirby W M M, Sherris J C, et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method[J]. American Journal of Clinical Pathology, 1966, 45(4): 493-496.
- [23] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Analysis and presentation of cumulative antimicrobial susceptibility test data; proposed guideline, M39-P.[M]. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002.
- [24] 高盼盼, 罗义, 周启星, 等. 水产养殖环境中抗生素抗性基因(ARGs)的研究及进展[J]. 生态毒理学报,

- 2009, 4(6): 770-779.
- Gao P P, Luo Y, Zhou Q X, *et al.* Research advancement of antibiotics resistance genes (ARGs) in aquaculture environment[J]. *Asian Journal of Ecotoxicolog*, 2009, 4(6): 770-779 (in Chinese).
- [25] 王丹, 隋倩, 赵文涛, 等. 中国地表水环境中药物和个人护理品的研究进展[J]. *科学通报*, 2014, 59(9): 743-751.
- Wang D, Sui Q, Zhao W T, *et al.* Pharmaceutical and personal care products in the surface water of China: a review[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2014, 59(9): 743-751 (in Chinese).
- [26] Kümmerer K. Significance of antibiotics in the environment[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003, 52(1): 5-7.
- [27] Ternes T A, Joss A, Siegrist H. Peer reviewed: scrutinizing pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment[J]. *Environmental Science & Technology*, 2004, 38(20): 392-399.
- [28] 王瑞旋, 冯娟, 耿玉静, 等. 水产细菌耐药性的最新研究概况[J]. *海洋环境科学*, 2010, 29(5): 770-776.
- Wang R X, Feng J, Geng Y J, *et al.* Studies on the drug resistance of aquatic bacteria[J]. *Marine Environmental Science*, 2010, 29(5): 770-776 (in Chinese).
- [29] 李继秋, 谭北平, 麦康森, 等. 一株水产益生菌的鉴定[J]. *中国海洋大学学报*, 2006, 36(3): 434-438.
- Li J Q, Tan B P, Mai K S, *et al.* Identification of one probiotic bacterium used in aquaculture[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2006, 36(3): 434-438 (in Chinese).
- [30] 申玉春, 熊邦喜, 王辉, 等. 虾-鱼-贝-藻养殖结构优化实验研究[J]. *水生生物学报*, 2007, 31(1): 30-38.
- Shen Y C, Xiong B X, Wang H, *et al.* A case study on optimal culture structure of prawn-fish-shellfish-algae[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, 31(1): 30-38 (in Chinese).
- [31] 刘娜娜, 刘长军, 李红军, 等. 益生菌在水产动物饲料中的应用及作用机制研究进展[J]. *饲料工业*, 2014, 35(14): 53-56.
- Liu N N, Liu C J, Li H J, *et al.* Research progresses and related action mechanism of probiotics applied in aquatic animal feed[J]. *Feed Industry*, 2014, 35(14): 53-56 (in Chinese).
- [32] 李海兵, 宋晓玲, 韦嵩, 等. 4株对虾肠道益生菌的筛选及鉴定[J]. *海洋与湖沼*, 2008, 39(4): 374-380.
- Li H B, Song X L, Wei S, *et al.* Screening and identification of four probiotic bacteria isolated from intestine of shrimp[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2008, 39(4): 374-380 (in Chinese).
- [33] 杨志平, 孙飞雪, 刘志明, 等. 刺参肠道潜在产酶益生菌的筛选和鉴定[J]. *大连海洋大学学报*, 2013, 28(1): 17-20.
- Yang Z P, Sun F X, Liu Z M, *et al.* Screening and identification of potential enzyme producing probiotics from gut of sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2013, 28(1): 17-20 (in Chinese).
- [34] 黄志坚, 陈旭凌, 路晓峰, 等. 水产养殖生物和养殖环境细菌鉴定及抗生素抗性基因检测[J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 2012, 51(6): 92-96.
- Huang Z J, Chen X L, Lu X F, *et al.* Identification and antibiotic resistance genes detection of bacteria in aquaculture organisms and aquatic environment[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2012, 51(6): 92-96 (in Chinese).
- [35] Kerry J, Coyne R, Gilroy D, *et al.* Spatial distribution of oxytetracycline and elevated frequencies of oxytetracycline resistance in sediments beneath a marine salmon farm following oxytetracycline therapy[J]. *Aquaculture*, 1996, 145(1-4): 31-39.

Isolation and screening of digestive enzyme producing probiotics from intestine of *Litopenaeus vannamei*

DOU Chunmeng¹, ZUO Zhihan^{1*}, LIU Yichen¹, ZHANG Yichen¹, GENG Xuyun², SUN Jinsheng^{1,2}

(1. Tianjin Key Laboratory of Animal and Plant Resistance, College of Life Science,
Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China;

2. Tianjin Center for Control and Prevention of Aquatic Animal Infections Disease, Tianjin 300221, China)

Abstract: To get safe digestive enzyme producing probiotics from intestine of healthy *Litopenaeus vannamei*, 576 bacteria strains were isolated. Those bacteria strains, extracellular protease, amylase, and lipase activities were detected through qualitative assay and quantitative assay. 11 bacteria strains with three kinds of digestive enzyme and high capacity of enzyme production were screened. Secondly, susceptibility and hemolysis of the 11 strains were tested to identify their security. In this study, vegetative cell suspensions of 11 strains in equal proportions were added in the rearing water of juvenile shrimp (*L. vannamei*). Then shrimps were challenged with *Vibrio anguillarum*. After the challenge test, real-time RT-PCR was employed to determine the relative expression of several immune genes. Through the difference of the relative expression we could determine the protective effect of these strains on juvenile shrimp. Considering digestive enzyme activity, biological safety and protective effect, 4 strains were selected. Similarity analysis of 16S rDNA sequences indicated that NO.1, 2 and 4 showed 100% similarity to *Bacillus* sp. PCSAS 2-38, *B. cereus* strain N419 and *B. thuringiensis* strain EA26.1, respectively, and NO.9 showed 99% similarity to *Rhodobacter capsulatus* strain PSB-03. This laid the foundation for the probiotic development.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; probiotics; intestinal tract; identification

Corresponding author: ZUO Zhihan. E-mail: zhihanzuo@163.com

Funding projects: National Key Technology R & D Program of China (2012 AA 092205, 2012 AA 10 A 401); National Basic Research Program of China (2012 CB 114405)