

斜带石斑鱼稚鱼和早期幼鱼消化道可培养菌群研究

孙云章^{1,2}, 凌泽春^{1,2}, 杨红玲¹, 叶继丹^{1,2}, 林文燕^{1,2}

(1 集美大学 福建省高校水产科学技术与食品安全重点实验室, 福建 厦门 361021;

2 集美大学 厦门市饲料检测与安全评价重点实验室, 福建 厦门 361021)

摘要:利用常规微生物分离鉴定方法结合 16S rRNA 基因序列分析研究斜带石斑鱼 *Epinephelus coioides* 40 d 稚鱼和 70 d 早期幼鱼消化道可培养菌群. 结果表明, 副溶血弧菌 *Vibrio parahaemolyticus*、哈维弧菌 *Vibrio harveyi*、短小芽孢杆菌 *Bacillus pumilus*、鲍氏不动杆菌 *Acinetobacter baumannii*、恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida*、嗜冷杆菌 *Psychrobacter* sp. 和洋葱伯克霍尔德菌 *Burkholderia cepacia* 均从稚鱼和早期幼鱼消化道分离. 系统进化分析结果表明, 斜带石斑鱼消化道细菌可归为 3 类: γ -变形杆菌纲 γ -Proteobacteria、 β -变形杆菌纲 β -Proteobacteria 和芽孢杆菌纲 Bacilli. 稚鱼和早期幼鱼消化道的优势菌相似, 稚鱼消化道的优势菌为芽孢杆菌 *Bacillus*、嗜冷杆菌 *Psychrobacter*、葡萄球菌 *Staphylococcus* 和不动杆菌 *Acinetobacter*, 而早期幼鱼消化道的优势菌为芽孢杆菌、不动杆菌、嗜冷杆菌和假单胞菌 *Pseudomonas*. 芽孢杆菌为稚鱼与早期幼鱼消化道的最优势菌, 分别占可培养细菌总数的 78.6% 和 75.6%, 而弧菌在稚鱼和早期幼鱼消化道中的数量均较低, 分别仅占消化道可培养细菌总数的 2.8% 和 1.1%. 乳酸乳球菌 *Lactococcus lactis*、干酪乳杆菌 *Lactobacillus casei* 和屎肠球菌 *Enterococcus faecium* 等 3 种乳酸菌仅见于早期幼鱼消化道.

关键词:斜带石斑鱼; 消化道菌群; 稚鱼; 早期幼鱼

中图分类号: S917.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2010)03-0065-06

Cultivable Gut Microbiota of Juvenile and Early Young Grouper *Epinephelus coioides*

SUN Yun-zhang^{1,2}, LING Ze-chun^{1,2}, YANG Hong-ling¹, YE Ji-dan^{1,2}, LIN Wen-yan^{1,2}

(1 The Key Laboratory of Science and Technology for Aquaculture and Food Safety, Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2 Xiamen Key Laboratory of Feed Detection and Safety Evaluation, Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: Standard isolation and characterization procedures in combination with 16S rRNA gene sequence analysis were used to study the gut microbiota of 40 d juvenile and 70 d early young grouper. The results showed that seven species existed in the gut of both groups of fish, i. e. *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Bacillus pumilus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas putida*, *Psychrobacter* sp. and *Burkholderia cepacia*. Phylogenetic analysis showed that bacteria in the gut of grouper could be classified into three groups belonging to γ -proteobacteria, β -proteobacteria and Bacilli class. The predominant bacteria in juvenile and early young grouper were similar, *Bacillus*, *Psychrobacter*, *Staphylococcus* and *Acinetobacter* were the predominant bacteria in the gut of juvenile fish, while *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Psychrobacter* and *Staphylococcus* in early young fish. *Bacillus* was the most prevalent bacteria in both groups of fish, comprising 78.6% and 75.6% of the total cultivable gut bacteria respectively, while the number of *Vibrio* was very low in both groups of fish, comprising only 2.8% and 1.1% of the total cultivable gut bacteria respectively. Three species of lactic acid bacteria, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei* and *Enterococcus faecium* existed only in the gut of early young grouper.

Key words: *Epinephelus coioides*; gut microbiota; juvenile grouper; early young grouper

收稿日期: 2009-10-14

作者简介: 孙云章 (1976—), 男, 副教授, 博士, E-mail: sunyunzhang@yahoo.com.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (30600461); 福建省高校水产科学技术与食品安全重点实验室基金 (2009J102); 集美大学科研基金 (ZQ2006012)

鱼类消化道菌群由好氧菌、兼性厌氧菌和绝对厌氧菌组成,对于维持宿主的生长和健康具有重要意义. 现有研究表明,消化道菌群的功能主要有3点:拮抗致病菌在肠道的定植和生长;刺激宿主的免疫功能;分泌一些与宿主生长相关的生物活性物质,如必需脂肪酸、维生素和消化酶等^[1-3]. 鱼类孵化后消化道存在着不同菌群的定植演替过程,仔鱼期形成了最初的不稳定的微生物区系,随后此微生物区系逐渐成熟,幼鱼期通常形成比较稳定的微生物区系^[4]. 因此,鱼类早期发育阶段消化道菌群结构及发展规律的研究,特别是阐明消化道有益菌和致病菌的组成和发展变化,对于益生菌的开发和应用具有重要意义^[1,5]. 斜带石斑鱼 *Epinephelus coioides* 是名贵优良的海水养殖品种,在我国东南沿海及东南亚国家已有较大规模的养殖,但目前有关其消化道菌群结构及其发展变化的研究很少. 为此,本研究以斜带石斑鱼稚鱼和早期幼鱼为研究对象,利用常规微生物分离鉴定方法结合 16S rRNA 基因序列分析探讨稚鱼和早期幼鱼消化道可培养菌群的结构,为益生菌的筛选和应用提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 试验用鱼及饲养管理

试验于 2007 年 8—10 月在福建省漳浦县某水产养殖场进行,斜带石斑鱼卵的孵化和鱼苗培育参照谢仰杰等^[6]的方法. 育苗池为 6.0 m × 4.0 m × 2.0 m 的圆角方形室内水池,海水由沙滤池抽取再经 2 次沙滤、沉淀后使用. 育苗期间水温为 26.0 ~ 31.2 °C,盐度为 30.4‰ ~ 35.2‰. 仔鱼孵化 3 d 后以牡蛎 *Crassostrea gigas* 受精卵为开口饵料,随着鱼体生长,投喂经营养强化的轮虫 *Brachionus calyciflorus*. 开口 4 d 后不再投喂牡蛎受精卵,保持育苗水体的轮虫密度为 (15 ~ 30) mL⁻¹. 15 d 开始投喂经营养强化的卤虫 *Artemia* 无节幼体,21 ~ 40 d 投喂桡足类 (Copepod) 和经营养强化的卤虫无节幼体,40 ~ 70 d 投喂卤虫和冷冻碎鱼肉.

1.2 样品处理和细菌接种培养

孵化后分别于 40 d [稚鱼期,大部分个体体侧出现鳞片,体长 (2.2 ± 0.2) cm] 和 70 d [幼鱼早期,鱼体鳞被形成,体长 (5.1 ± 0.4) cm] 上午投料前采集鱼苗. 以体积分数为 75% 乙醇棉球擦拭鱼体表面进行消毒,无菌条件下分离胃肠道,40 d 稚鱼和 70 d 幼鱼的胃肠道质量分别为 (0.11 ± 0.02) g 和 (0.40 ± 0.05) g. 为减少个体差异,稚鱼和幼鱼各取 5 尾,5

尾鱼的胃肠道分别放置于一匀浆杯,加入 5 mL 灭菌的九盐溶液^[7]匀浆,匀浆液 10 倍梯度稀释至 10⁻⁴. 取原液和 10⁻¹ ~ 10⁻⁴ 稀释液各 100 μL 分别涂布于 2216E、TCBS 和 MRS 平板^[8],每个稀释度 3 个平行,平板于 28 °C 恒温培养. 选取菌落数 20 ~ 100 个的平板观察菌落形态,记录各类型菌落数量,选取同类型的菌落 3 ~ 5 个划线接种于相应的培养基上,多次传代直到纯化,共获得纯化菌株 75 株 (稚鱼 35 株,幼鱼 40 株). 纯化菌株经革兰染色观察后,同类型的细菌进行归类,根据稀释倍数和胃肠道组织的质量计算每克组织的细菌数量,不同类型的细菌进行后续鉴定.

1.3 细菌鉴定

TCBS 培养基上生长的革兰阴性短杆状或短小弧状菌株初步判断为弧菌 *Vibrio*,再利用北京陆桥技术有限责任公司的弧菌专用生化鉴定管进行鉴定^[9],MRS 培养基上生长的革兰阳性杆状或球状菌株初步判断为乳酸菌 (*Lactic acid bacteria*),再按照凌代文等^[10]的方法进行生理生化鉴定. 2216E 琼脂上分离纯化的细菌分别接种于 TCBS 和 MRS 培养基 28 °C 培养 48 h,观察其生长情况,能在 TCBS 或 MRS 生长的菌株则记录菌落形态,革兰染色初步进行判断后按照弧菌或乳酸菌的生理生化鉴定方法进行初步鉴定. 在此基础上,选取 3 种培养基分离的代表性菌株进行 16S rRNA 基因测序^[11].

1.4 系统发育树的构建

斜带石斑鱼消化道细菌序列于 GenBank 网站上进行 BLAST 比对分析,获取相近典型菌株的 16S rRNA 基因序列,斜带石斑鱼消化道细菌序列和获取的相近典型菌株序列利用 Clustal 1.83 进行多重序列比对,然后利用 PHILIP 3.63 软件包的邻接法 (Neighbor-Joining method) 进行聚类分析和系统进化树构建.

2 结果

2.1 稚鱼和早期幼鱼消化道细菌数量

由表 1 可见,斜带石斑鱼稚鱼消化道可培养细菌总数 (1.4 × 10⁷ CFU/g) 与早期幼鱼消化道可培养细菌总数 (9.0 × 10⁶ CFU/g) 相近. 稚鱼消化道弧菌数量比早期幼鱼高 1 个数量级,但未分离到乳酸菌,而早期幼鱼消化道乳酸菌数量可达 6.0 × 10⁴ CFU/g,提示乳酸菌在石斑鱼肠道的定植可能发生在早期幼鱼阶段.

表 1 稚鱼和早期幼鱼消化道可培养细菌总数、弧菌及乳酸菌数量¹⁾

Tab. 1 Number of total cultivable bacteria, *Vibrio* and lactic acid bacteria in gut of juvenile and early young grouper

生长阶段	可培养细菌总数	弧菌数	乳酸菌数
稚鱼	$(1.4 \pm 0.6) \times 10^7$	$(1.1 \pm 0.5) \times 10^6$	0
早期幼鱼	$(9.0 \pm 2.3) \times 10^6$	$(3.4 \pm 1.2) \times 10^5$	$(6.0 \pm 2.65) \times 10^4$

1) 表中数据为平均值 ± 标准差。

2.2 菌株的生化 and 分子鉴定结果

本研究中,我们选择了 3 种培养基对斜带石斑鱼消化道可培养细菌进行研究,2216E 用于总的可培养海生细菌的分离,MRS 和 TCBS 分别为乳酸菌或弧菌的选择性培养基,2 种培养基分离的细菌经革兰染色后可初步判断菌株是否属于乳酸菌或弧菌.因此,乳酸菌或弧菌的后续鉴定我们利用了生化鉴定和 16S rRNA 基因测序鉴定相结合的方法,其余代表性菌株则主要进行了 16S rRNA 基因测序鉴定.由表 2 可知,除克劳芽孢杆菌 *Bacillus clausii*,其余 13 株菌的 16S rRNA 基因与 GenBank 中最相似菌基因的相似度均在 90% 以上,弧菌和乳酸菌的生化鉴定和分子鉴定结果基本一致.

表 2 菌株的生化 and 分子鉴定结果

Tab. 2 Molecular and biochemical characterization of purified isolates

菌株编号	生化鉴定	分子鉴定		
		最相似菌	相似度/%	登录号
ST6	副溶血弧菌	副溶血弧菌	99	EU520337
ST7	哈维氏弧菌	哈维弧菌	94	EU520336
ST3	梅氏弧菌			
SE5		短小芽孢杆菌	99	EU520340
DE5		克劳芽孢杆菌	89	EU520331
ST5		鲍氏不动杆菌	96	EU520338
SE3		恶臭假单胞菌	99	EU520339
SE4		食酸丛毛单胞菌	99	EU520344
SE6		嗜冷杆菌	94	EU520334
ST2		洋葱伯克霍尔德菌	99	EU520342
MM6		胡萝卜软腐欧文菌	94	EU520329
DM1		金黄色葡萄球菌	95	EU520330
SE1		溶血葡萄球菌	99	EU520332
MM1	乳酸乳球菌	乳酸乳球菌	93	EU520326
MM3	干酪乳杆菌			
MM4	肠球菌属	屎肠球菌	90	EU520327

2.3 稚鱼和早期幼鱼消化道菌群组成

由表 3 可见,副溶血弧菌 *Vibrio parahaemolytic-*

us、哈维弧菌 *V. harveyi*、短小芽孢杆菌 *Bacillus pumilus*、鲍氏不动杆菌 *Acinetobacter baumannii*、恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida*、嗜冷杆菌 *Psychrobacter* sp. 和洋葱伯克霍尔德菌 *Burkholderia cepacia* 等均从斜带石斑鱼稚鱼与早期幼鱼消化道分离.但是,梅氏弧菌 *V. metschnikovi*、食酸丛毛单胞菌 *Delftia acidovorans* 和溶血葡萄球菌 *Staphylococcus haemolyticus* 仅从稚鱼消化道分离,而克劳芽孢杆菌、胡萝卜软腐欧文菌 *Erwinia carotovora*、金黄色葡萄球菌 *S. aureus* 以及 3 种乳酸菌:乳酸乳球菌 *Lactococcus lactis*、干酪乳杆菌 *Lactobacillus casei* 和屎肠球菌 *Enterococcus faecium* 则仅见于早期幼鱼消化道.

表 3 稚鱼和早期幼鱼消化道细菌组成¹⁾

Tab. 3 Bacterial composition in the gut of juvenile and early young grouper

菌株	编号	稚鱼	早期幼鱼
副溶血弧菌	ST6	2.1×10^5	3.6×10^4
哈维弧菌	ST7	2.5×10^4	6.0×10^4
梅氏弧菌	ST3	1.5×10^5	0
短小芽孢杆菌	SE5	1.1×10^7	2.6×10^6
克劳芽孢杆菌	DE5	0	4.2×10^6
鲍氏不动杆菌	ST5	6.3×10^5	6.4×10^5
恶臭假单胞菌	SE3	2.0×10^4	5.0×10^5
食酸丛毛单胞菌	SE4	2.5×10^5	0
嗜冷杆菌	SE6	9.0×10^5	6.0×10^5
洋葱伯克霍尔德菌	ST2	7.0×10^4	3.0×10^3
胡萝卜软腐欧文菌	MM6	0	7.5×10^3
金黄色葡萄球菌	DM1	0	1.4×10^4
溶血葡萄球菌	SE1	7.5×10^5	0
乳酸乳球菌	MM1	0	1.0×10^4
干酪乳杆菌	MM3	0	3.9×10^4
屎肠球菌	MM4	0	1.4×10^4

1) 表中数据为 3 个重复的平均值。

石斑鱼消化道菌群中各属和特定类型细菌(如乳酸菌)占可培养细菌总数的比例分别为稚鱼消化道的芽孢杆菌占 78.6%、嗜冷杆菌占 6.4%、葡萄球菌 *Staphylococcus* 占 5.4%、不动杆菌 *Acinetobacter* 占 4.5%、弧菌占 2.8%、丛毛单胞菌占 1.8%、博克霍尔德菌 *Burkholderia* 占 0.5%、假单胞菌占 0.1%,早期幼鱼消化道的芽孢杆菌占 75.6%、不动杆菌占 7.1%、嗜冷杆菌占 6.7%、假单胞菌占 5.6%、弧菌占 1.1%、乳酸菌占 0.7%、葡萄球菌占 0.2%、欧文菌占 0.08%、博克霍尔德菌占 0.03%。稚鱼和早期幼鱼消化道的优势细菌种类相似.稚鱼消化道的优势菌为芽孢杆菌、嗜冷杆菌、葡萄球菌和不动杆菌;而早期

幼鱼消化道的优势菌为芽孢杆菌、不动杆菌、嗜冷杆菌、假单胞菌. 在这些优势细菌中, 芽孢杆菌为稚鱼与早期幼鱼消化道的最优势菌. 稚鱼与早期幼鱼消化道的不动杆菌、嗜冷杆菌比例相近, 而稚鱼消化道的弧菌比例高于早期幼鱼, 稚鱼消化道伯克霍尔德菌比例明显高于早期幼鱼.

2.4 系统进化分析

系统进化分析结果(图 1)表明, 斜带石斑鱼消化道分离的 14 株细菌可归为 3 类: 芽孢杆菌纲 Ba-

cilli、 β -变形杆菌纲 β -Proteobacteria 和 γ -变形杆菌纲 γ -Proteobacteria. 其中, 芽孢杆菌纲和 γ -变形杆菌纲细菌所占比例较大, 各包括 6 株菌. 芽孢杆菌纲中, DM1 和 SE1 分别与葡萄球菌聚为一簇, SE5 和 DE5 分别与芽孢杆菌聚为一簇, MM1 位于乳酸乳球菌的独立进化分支上, 而 MM4 与屎肠球菌的亲缘关系最近. γ -变形杆菌纲中, ST6 和 ST7 分别与弧菌聚为一簇, SE6 位于嗜冷杆菌的独立进化分支上, ST5 位于不动杆菌的独立进化分支上, SE3 和 MM6

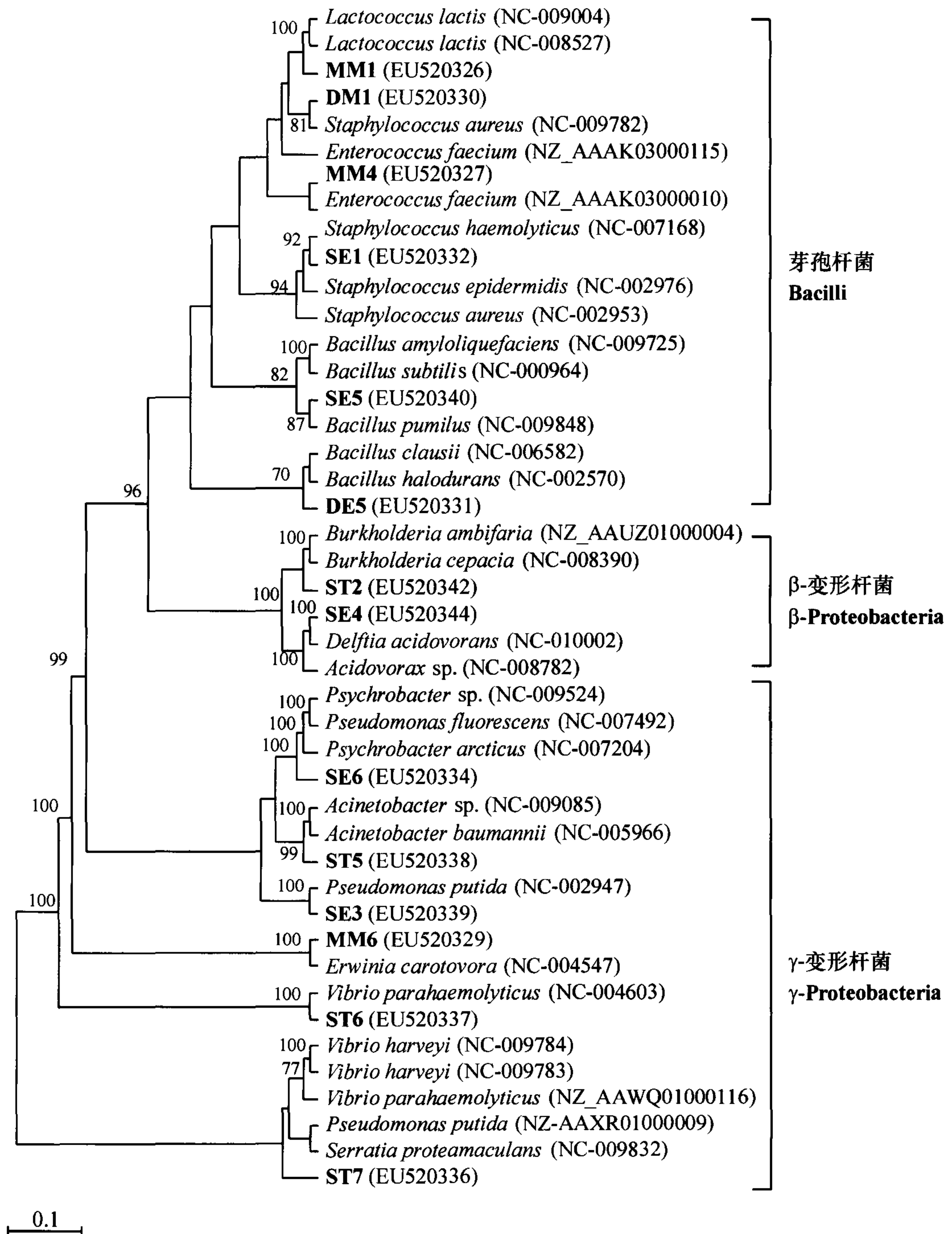


图 1 斜带石斑鱼消化道细菌系统发育分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of bacteria isolated from the gut of grouper

分别与恶臭假单胞菌和胡萝卜软腐欧文菌的亲缘关系最近。 β -变形杆菌纲中,ST2位于洋葱伯克霍尔德菌的独立进化分支上,而SE4与食酸丛毛单胞菌的亲缘关系最近。

3 讨论

海水鱼消化道细菌数量的影响因素有很多,如细菌的宿主特异性、养殖水体菌群的组成和数量、养殖水体的盐度和温度、饵料和药物等^[2,5]。此外,鱼类孵化后消化道存在着不同菌群的定植演替过程,不同发育阶段鱼类的消化道细菌数量也会存在较大差异^[2,5]。本研究表明,40 d 稚鱼和 70 d 早期幼鱼消化道可培养细菌总数相近,分别为 1.4×10^7 和 9.0×10^6 CFU/g,这与前人报道的一些海水鱼类消化道细菌数量相似,如太平洋油鲽 *Solea solea* ($5.2 \times 10^5 \sim 9.8 \times 10^6$ CFU/g)^[12]、牙鲆 *Paralichthys olivaceus* ($3.6 \times 10^5 \sim 6.0 \times 10^7$ CFU/g)^[13]和塞内加尔鲷 *Solea senegalensis* ($2.3 \times 10^5 \sim 6.7 \times 10^6$ CFU/g)^[14],但是高于大西洋鳕鱼 *Gadus morhua* ($7.0 \times 10^3 \sim 3.0 \times 10^5$ CFU/g)^[15]和银鲑 *Oncorhynchus kisutch* (6.0×10^3 CFU/g)^[16]。

淡水鱼和海水鱼消化道均存在特定的固有菌群,且鱼类消化道菌群会随着鱼的年龄、营养状况和环境条件的变化而变化。淡水鱼消化道中常见的细菌主要有气单胞菌 *Aeromonas*、假单胞菌、邻单胞菌 *Plesiomonas* 和肠杆菌 *Enterobacter* 等,而海水鱼消化道中最常见的是弧菌、假单胞菌和不动杆菌等^[12,5]。与前人报道一致,本研究中弧菌、假单胞菌和不动杆菌均从斜带石斑鱼稚鱼和早期幼鱼消化道分离。此外,短小芽孢杆菌、嗜冷杆菌和洋葱伯克霍尔德菌亦从 2 组石斑鱼消化道分离。系统进化分析表明,斜带石斑鱼消化道细菌可归为 3 类: γ -变形杆菌纲、 β -变形杆菌纲和芽孢杆菌纲,且芽孢杆菌纲和 γ -变形杆菌纲细菌所占比例较大。这与塞内加尔鲷^[14]和银鲑^[16]消化道菌群的系统进化结果相似。

斜带石斑鱼稚鱼和早期幼鱼消化道优势菌相似,且芽孢杆菌为二者消化道的最优势菌,分别占可培养细菌总数的 78.6% 和 75.6%。但是,弧菌作为海水鱼消化道常见优势菌,在斜带石斑鱼稚鱼和早期幼鱼消化道的比例却仅分别为 2.8% 和 1.1%,明显低于已报道的其他海水鱼消化道中弧菌比例^[13-14,17]。究其原因,可能是因为本研究中 2 株芽孢杆菌(短小芽孢杆菌和克劳芽孢杆菌)数量很高,且对多株弧菌具有一定的抑制作用,导致了石斑鱼消

化道弧菌数量较低。研究表明,芽孢杆菌是一类常见消化道有益菌,能够抑制潜在致病菌在肠道的定植和生长,维持宿主健康^[1,5]。一些研究者将从海水鱼消化道分离的具有抑菌作用的芽孢杆菌作为益生菌应用于水产养殖,取得了不错的效果^[18-19]。Kennedy 等^[18]从锯盖鱼 *Centropomus undecimalis* 消化道分离的枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 作为益生菌接种于锯盖鱼仔鱼育苗池,结果表明枯草芽孢杆菌能明显降低仔鱼消化道弧菌数量,提高仔鱼的质量和存活率。本研究中短小芽孢杆菌和克劳氏芽孢杆菌是稚鱼和早期幼鱼消化道的优势菌,且对多株潜在致病菌具有一定的抑制作用^[20],提示 2 株菌对于维持石斑鱼健康可能具有一定的作用。目前我们正开展这 2 株芽孢杆菌作为益生菌应用于斜带石斑鱼的试验,相关结果将另外报道。

嗜冷杆菌是海水及海洋生物表面的常见细菌之一,但是最近才从一些低温海水鱼类,如大西洋鳕鱼、南极嘉鱼 *Salvelinus alpinus* 和大西洋鲑 *Salmo salar* 消化道内分离,但其在鱼类消化道的功能尚不清楚^[15,21-20]。本试验中,斜带石斑鱼为分布于热带和亚热带海域的鱼类,其稚鱼和早期幼鱼消化道均分离到同一种嗜冷杆菌,而且数量分别可达 9.0×10^5 和 6.0×10^5 CFU/g,是消化道的优势菌之一。本试验期间的水体温度为 26~31℃,可见该嗜冷杆菌具有较强的高温适应性。抑菌试验结果表明,该嗜冷杆菌对哈维弧菌和梅氏弧菌具有一定抑制作用^[20],这可能是导致石斑鱼稚鱼和早期幼鱼消化道弧菌数量较低的另一个原因,提示嗜冷杆菌可能通过排斥潜在致病菌在消化道的定植和生长,在维持宿主健康方面起着一定作用。

乳酸菌是一类重要的鱼类消化道固有菌群,有利于维持宿主健康。但乳酸菌在消化道的定植发生于鱼类哪个生长阶段尚不清楚^[2,5]。本研究中,40 d 稚鱼消化道没有分离到乳酸菌,而 70 d 早期幼鱼消化道则分离到 3 种乳酸菌:乳酸乳球菌、干酪乳杆菌和屎肠球菌,提示乳酸菌在斜带石斑鱼消化道的定植可能发生在早期幼鱼阶段。大量研究表明,乳酸菌可以通过抑制潜在致病菌在肠道的定植和生长,降低致病菌对宿主的危害,从而维持宿主的健康^[1,23-24]。陈营^[23]研究表明,鼠李糖乳杆菌 *Lactobacillus rhamnosus* P15 对弧菌具有良好的抑制作用,作为益生菌施用 60 d 能促进牙鲆稚鱼的生长,提高存活率,且试验前 30 d 的使用效果好于后 30 d 效果,提示乳酸菌在仔稚鱼阶段应用效果更好。本研究中,

3株乳酸菌对多株潜在致病菌具有抑制作用,具有作为益生菌应用的潜力.此外,3株乳酸菌均仅从幼鱼消化道分离,因此其作为益生菌应用宜在仔稚鱼阶段进行,从而促进仔稚鱼消化道正常菌群的建立,提高仔稚鱼的抗病力和存活率.

参考文献:

- [1] VERSCHUERE L, ROMBOUT G, SORGELOOS P, et al. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2000, 64(4): 655-671.
- [2] OLAFSEN J A. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture [J]. Aquaculture, 2001, 200(1): 223-247.
- [3] GÓMEZ G D, BALCAZAR J L. A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish [J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2008, 52(2): 145-154.
- [4] SUGITA H, ENOMOTO A, DEGUCHI Y. Intestinal microflora in the fry of *Tilapia mossambica* [J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1982, 48(6): 875.
- [5] 孙云章, 杨红玲. 浅谈鱼类消化道微生物的分布及调控 [J]. 水产科学, 2008, 27(5): 257-261.
- [6] 谢仰杰, 翁朝红, 苏永全, 等. 斜带石斑鱼仔稚鱼生长和摄食的研究 [J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2007, 46(1): 123-130.
- [7] OLSSON J C, WESTERDAHL A, CONWAY P, et al. Intestinal colonization potential of Turbot (*Scophthalmus maximus*) and Dab (*Limanda limanda*)-associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum* [J]. Appl Environ Microbiol, 1992, 58(2): 551-556.
- [8] 杨红玲, 孙云章, 叶继丹, 等. 鱼源乳酸菌的抑菌特性研究 [J]. 上海水产大学学报, 2008, 17(3): 344-349.
- [9] BERG D, HOLT J G. Bergey's manual of determinative bacteriology [M]. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.
- [10] 凌代文. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
- [11] 凌泽春, 杨红玲, 孙云章, 等. 斜带石斑鱼幼鱼消化道与养殖水体可培养菌群的研究 [J]. 大连水产学院学报, 2009, 24(6): 497-503.
- [12] MACDONALD N L, STARK J R, AUSTIN B. Bacterial microflora in the gastro-intestinal tract of Dover sole (*Solea solea* L.), with emphasis on the possible role of bacteria in the nutrition of the host [J]. FEMS Microbiol Lett, 1986, 35(1): 107-111.
- [13] SUGITA H, OKANO R, SUZUKI Y, et al. Antibacterial abilities of intestinal bacteria from larval and juvenile Japanese flounder against fish pathogens [J]. Fish Sci, 2002, 68(5): 1004-1011.
- [14] MARTIN-ANTONIO B, MANCHADO M, INFANTE C, et al. Intestinal microbiota variation in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) under different feeding regimes [J]. Aquacult Res, 2007, 38(11): 1213-1222.
- [15] RINGØ E, SPERSTAD S, MYKLEBUST R, et al. Characterisation of the microbiota associated with intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) The effect of fish meal, standard soybean meal and a bioprocessed soybean meal [J]. Aquaculture, 2006, 261(3): 829-841.
- [16] ROMERO J, NAVARRETE P. 16S rDNA-based analysis of dominant bacterial populations associated with early life stages of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) [J]. Microb Ecol, 2006, 51(4): 422-430.
- [17] 覃映雪, 王晓林, 鄢庆枇, 等. 青石斑鱼肠道菌群研究 [J]. 海洋水产研究, 2007, 28(5): 18-23.
- [18] KENNEDY S B, TUCKER J W, NEIDIC C L, et al. Bacterial management strategies for stock enhancement of warm water marine fish: a case study with common snook (*Centropomus undecimalis*) [J]. Bull Mar Sci, 1998, 62(2): 573-588.
- [19] SUGITA H, HIROSE Y, MATSUO N, et al. Production of the antibacterial substance by *Bacillus* sp. strain NM 12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish [J]. Aquaculture, 1998, 165(3): 269-280.
- [20] SUN Yun-zhang, YANG Hong-ling, LING Ze-chun, et al. Gut microbiota of fast and slow growing grouper *Epinephelus coioides* [J]. Afr J Microbiol Res, 2009, 3(11): 713-720.
- [21] RINGØ E, SPERSTAD S, MYKLEBUST R, et al. The effect of dietary inulin on aerobic bacteria associated with hindgut of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) [J]. Aquacult Res, 2006, 37(9): 891-897.
- [22] BAKKE-MCKELP A M, PENN M H, SALAS P M, et al. Effects of dietary soybean meal, inulin and oxytetracycline on intestinal microbiota and epithelial cell stress, apoptosis and proliferation in the teleost Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) [J]. Br J Nutr, 2007, 97(4): 699-713.
- [23] 陈营. 牙鲆肠道益生菌的分离鉴定及其应用研究 [D]. 北京: 中国农业大学: 动物科技学院, 2004: 27-86.
- [24] VINE N G, LEUKES W D, KAISER H. Probiotics in marine larviculture [J]. FEMS Microbiol Rev, 2006, 30(3): 404-427.