

鲤益生菌筛选及部分菌株对鲤前肠黏液的体外黏附作用

曾东¹, 王益平^{1,2}, 倪学勤¹, 汪开毓³, 吴梦¹

(1. 四川农业大学 动物医学院动物微生态研究中心, 四川 雅安 625014; 2. 四川农业大学 动物科技学院水产养殖系, 四川 雅安 625014; 3. 四川农业大学 动物医学院鱼病研究中心, 四川 雅安 625014)

摘要: 从养殖池、水族箱和健康鲤肠道等分离20株细菌,通过耐热和体外拮抗试验筛选出5株细菌,经生化试验和细菌16S rDNA测序鉴定为2株芽孢杆菌(*Bacillus*)、2株肠球菌(*Enterococci*)和1株柠檬酸杆菌(*Citrobacter*)。进一步采用体外固定鲤前肠黏液蛋白,结合同位素³²P标记细菌并示踪的方法,研究来源于鲤肠道的肠球菌和柠檬酸杆菌以及鲤养殖水体中的芽孢杆菌对鲤前肠黏液的体外黏附活性,建立筛选鲤(*Cyprinus carpio*)益生菌的方法。结果表明,5株细菌均能黏附到黏液体外模型,肠球菌的相对黏附率极显著高于芽孢杆菌与柠檬酸杆菌($P<0.01$),柠檬酸杆菌与芽孢杆菌的相对黏附率差异不显著($P>0.05$),而肠球菌L2的相对黏附率极显著高于肠球菌E2($P<0.01$)。研究证明,鱼源的肠球菌对鲤前肠黏液的黏附率高于异源的芽孢杆菌,而且不同种属的肠球菌在黏附能力上也存在差异。[中国水产科学,2009,16(3):427-433]

关键词: 益生菌; 鲤; 黏附作用; 体外

中图分类号: S941

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2009)03-0427-07

随着高密度集约化水产养殖业迅猛发展,化学药物的应用造成养殖水体污染加剧,因此,生态养殖日益受到重视,特别是益生菌在水产养殖中的应用取得显著效果^[1-2]。益生菌(Probiotics)是指来源于宿主内外环境,能改善和调节宿主体内微生物菌群平衡,对宿主健康产生有益作用的活菌制剂^[3]。在益生菌产品研究开发过程中,菌株的筛选尤为重要,其筛选标准主要包括:拮抗病原细菌、竞争营养物质或能源、竞争黏附位点和刺激机体免疫应答等^[4],其中对黏附位点的竞争已成为近几年益生菌研究的一个新热点。菌株能否黏附定植于肠道是益生菌发挥作用的前提,也是益生菌菌种筛选的重要指标^[5]。Laurent等^[1]认为益生菌防止病原菌定植的机理可能是在肠道或者其他组织上与病原菌竞争黏附位点。Garcia等的试验也证实,乳酸杆菌(*Lactobacillus*)K1在体外能够和溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas*

hydrophila)竞争黏附位点^[6-7]。目前,国内对鲤益生菌菌种的筛选主要考查菌株的产酶活性、耐热性及对有害菌的拮抗作用等^[8],还未见鲤益生菌对肠道黏附的研究报道。本研究通过体外拮抗性能和耐热试验,从鲤肠道及养殖水体分离筛选了外源芽孢杆菌(*Bacillus*)以及鲤(*Cyprinus carpio*)肠道原籍细菌肠球菌(*Enterococci*)和柠檬酸杆菌(*Citrobacter*),比较异源和同源细菌对鲤前肠黏液蛋白黏附能力的差异,旨在为益生菌的开发应用提供科学依据和实验材料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 嗜水气单胞菌AH-1、AH-2由四川农业大学水产病理实验室惠赠,大肠杆菌CVCC2060购自中国兽医药品监察所菌种保藏中心,大肠杆菌ATCC25922由四川农业大学动物微生态学实验室保存,其余菌株本实验分离。

收稿日期: 2008-10-12; 修订日期: 2008-12-09.

基金项目: 教育部长江学者和创新团队发展计划(IRT0555); 四川省教委应用基础项目(07ZA065).

作者简介: 曾东(1961-),男,副教授,主要从事水生动物微生态学研究. E-mail: zend@sicau.edu.cn

通讯作者: 汪开毓,教授,博导,主要研究水生动物疾病. E-mail: kywang@sicau.edu.cn

1.1.2 主要仪器、药品 CO₂培养箱(Thermo Forma Series II); PCR仪(BIO-RAD Laboratories, Inc, 美国); FJ-2107P液体闪烁计数器(西安核仪器厂); 96孔细胞培养板(爱思进医药塑料有限公司); 同位素标记物 γ -³²P-ATP购于北京市福瑞生物工程公司; 缓冲液PBS和HEPES购于SIGMA公司; *Taq*酶等购自大连宝生生物工程有限公司; 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。其他常规药品为国产分析纯产品。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离、纯化 分别取四川农业大学教学农场养殖池底泥、池水、健康鲤肠道内容物及四川农业大学动物微生物生态实验室水族箱水体进行菌株的分离培养。参照文献[9],分别用营养琼脂平板和EC培养基分离芽孢杆菌、柠檬酸杆菌和肠球菌,挑取单菌落镜检,划线分纯后斜面保种。所有菌株按1%比例接种液体培养基,37℃摇床培养24h(肠球菌在CO₂培养箱中培养),加入30%甘油,-70℃保存。

1.2.2 拮抗试验 分别挑取芽孢杆菌、柠檬酸杆菌单菌落于营养肉汤中,37℃培养24h; 肠球菌接种于EC培养基后置CO₂培养箱中培养12h; 接种嗜水气单胞菌和大肠杆菌于营养肉汤中,37℃培养2~4h,调整其浓度为10⁵~10⁶ cfu/mL。

参考文献[10],采用双层平板法测定分离菌株对病原菌的拮抗作用。即用微量加样器取待检细菌培养液3μL,点种到相应的培养基平板上,37℃培养24h。将已调整浓度为10⁵~10⁶ cfu/mL的嗜水气单胞菌和大肠杆菌分别按1%比例接种于50℃营养肉汤(含0.5%~0.7%琼脂),混匀后移取8mL至上述待检细菌培养平板,待上层琼脂凝固后,37℃再培养24h,记录抑菌圈直径。每个菌株做3个重复,结果取平均值。

1.2.3 耐热试验 分离菌株培养24h后用无菌生理盐水洗3次,然后配成一定浓度的菌悬液,分装EP管,放入85℃水浴锅中分别处理20min和10min,同时设不进行热处理的对照组。样品10倍递增稀释后进行活菌计数^[11]。耐热试验的结果以各菌株的存活率表示。

存活率=处理组每mL活菌数/对照组每mL活菌数×100%

1.2.4 菌株的分子鉴定 采用反复冻融和加热煮沸的方法提取细菌染色体DNA,然后PCR扩增细菌16S rDNA, PCR反应体系:10×buffer 5μL, dNTP(10mmol/μL)4μL,上下游引物(20μmol/mL)各1μL, *Taq*酶0.25μL, DNA模板2μL, ddH₂O 36.75μL。反应条件:94℃预变性4min,94℃变性30s,55℃复性30s,72℃延伸2min,30个循环,最后72℃延伸10min。引物序列:Bact1492r: ggt tac ctt gtt acg act t, Bact8f: aga gtt tga tcc tgg etc ag。PCR产物送上海生工生物工程技术有限公司测序,应用Chromas 2软件对序列进行编辑,非嵌合体序列在GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 数据库中进行比对分析,寻找亲缘关系最近的细菌或克隆。

1.2.5 鲤前肠黏液蛋白的制备 剖解健康鲤,切取前肠组织并纵向剖开肠管,参照Ouweland等的方法^[12],用含0.01%明胶的PBS冲洗肠道内表面,然后用塑料小铲轻轻刮取内表面,得到黏膜蛋白混合物,转移到10mmol/L pH 7.4的HH buffer中,13000 r/min离心10min,去除细胞和组织碎片,取上清液检测蛋白浓度,并调整质量浓度在1.0mg/mL左右,分装后-70℃保存备用。

1.2.6 体外黏附试验^[12] 将 γ -³²P-ATP按照1μCi/mL添加到细菌培养液中,37℃培养24h后4000 r/min离心10min,移去上清液,然后用PBS洗菌体2~3次,最后混悬于PBS中,调整菌体浓度2.5×10⁸~5×10⁸ cfu/mL,4℃保存备用。

黏液解冻以后,在96孔细胞培养板中加入黏液蛋白100μL/孔,放4℃冰箱中固定20h。用200~250μL HH buffer反复冲洗96孔板,除去未固定的黏液蛋白。然后每孔加入100μL γ -³²P-ATP标记细菌,37℃培养1h后用HH buffer反复冲洗2~3次,除去未黏附的细菌。最后加入200~250μL含1% SDS-0.1mol/L NaOH的裂解液,释放和溶解黏附的细菌。60℃裂解1h后将每孔中的液体完全转移到已经加入5mL蒸馏水的闪烁测定管中,用FJ-2107P液体闪烁计数器检

测放射活性,计算相对黏附率。对照组为100 μL 标记细菌直接裂解处理。每个样品做3个重复。

$$\text{CPM (相对黏附率)} = \text{CPM}_a / \text{CPM}_0 \times 100\%$$

式中, CPM_a —黏附固定的细菌放射计数;
 CPM_0 —对照组细菌放射计数

1.3 数据分析

采用SPSS 11.5对数据进行分析,结果采用平均值 \pm 标准误差的方式表示。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离

共分离了20株细菌,根据菌株的形态特征及生理生化特性实验,参照《伯杰氏细菌鉴定手册》(第8版)^[13],初步鉴定为:芽孢杆菌10株,肠球菌6株,革兰氏阴性杆菌4株。其中,CM2、CI1、C3、Z2等4株芽孢杆菌,WP1、WP2、WP3等3株芽孢杆菌,GL1和GL2等2株芽孢杆菌,WL1分别分离于四川农业大学教

学农场水产养殖基地养殖池底泥、水体、健康鲤肠道内容物和四川农业大学动物微生物生态实验室水族箱水体;革兰氏阴性杆菌D1、D2、D3、D4等4株和肠球菌E1、E2、E3、L1、L2、L3等6株分离于四川农业大学教学农场水产养殖基地健康鲤肠道。

2.2 对病原菌的拮抗作用

通过拮抗试验发现,芽孢杆菌CM2、WP1、WP3、C3、Z2对嗜水气单胞菌AH1、AH2和大肠杆菌ATCC25922、CVCC2060都具有拮抗作用(表1)。其中,CM2、WP1、C3、Z2对病原菌的拮抗作用较强且抗菌谱广。此外,来源于养殖池底泥和水体的芽孢杆菌CM2、C3、Z2、WP1、WP3的拮抗作用显著高于来源鲤肠道的芽孢杆菌GL1、GL2($P < 0.05$)。此外,分离自鲤肠道的肠球菌对4株病原菌均具有较强的拮抗作用。其他分离菌株对病原菌的抑制作用不明显或无抑制作用。

表1 分离细菌体外抑菌直径
Tab. 1 Inhibition diameter of isolated bacteria to pathogens in vitro

菌株 Strain	嗜水气单胞菌 AH1 <i>A. hydrophila</i> AH1	嗜水气单胞菌 AH2 <i>A. hydrophila</i> AH2	大肠杆菌 ATCC25922 <i>E. coli</i> ATCC25922	大肠杆菌 CVCC2060 <i>E. coli</i> CVCC2060
CM2	14.7 \pm 0.7 ^{bc}	17.6 \pm 6.5 ^{bc}	16.3 \pm 1.6 ^c	13.9 \pm 0.6 ^c
WP1	14.6 \pm 0.4 ^{bc}	18.8 \pm 2.2 ^{bc}	12.4 \pm 1.6 ^{bc}	13.6 \pm 1.6 ^c
WP2	11.4 \pm 0.8 ^b	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
WP3	5.3 \pm 9.2 ^b	9.4 \pm 0.7 ^{ab}	8.9 \pm 0.9 ^b	7.8 \pm 0.3 ^{ab}
GL1	0.00 ^a	7.1 \pm 1.6 ^{ab}	0.00 ^a	0.00 ^a
GL2	0.00 ^a	0.00 ^a	6.0 \pm 5.1 ^{ab}	0.00 ^a
CI1	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
WL1	0.00 ^a	0.0000 ^a	0.00 ^a	13.2 \pm 0.2 ^c
C3	18.5 \pm 1.5 ^c	9.9 \pm 8.6 ^{ab}	14.3 \pm 0.1 ^{bc}	15.7 \pm 0.9 ^d
Z2	12.3 \pm 0.6 ^b	23.9 \pm 0.5 ^c	29.2 \pm 0.7 ^{cd}	16.0 \pm 2.5 ^d
D1	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
D2	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
D3	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
D4	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
E1	15.0 \pm 0.2 ^c	7.1 \pm 0.3 ^{ab}	8.7 \pm 0.2 ^b	7.7 \pm 0.2 ^{ab}
E2	19.4 \pm 0.8 ^d	10.0 \pm 0.5 ^{ab}	13.0 \pm 0.4 ^{bc}	11.1 \pm 0.4 ^b
E3	18.7 \pm 1.0 ^c	9.3 \pm 0.7 ^{ab}	11.9 \pm 0.5 ^{bc}	8.2 \pm 0.2 ^{ab}
L1	13.8 \pm 0.3 ^b	10.5 \pm 0.4 ^{ab}	8.1 \pm 0.1 ^b	10.4 \pm 0.1 ^b
L2	19.4 \pm 0.9 ^d	13.6 \pm 0.4 ^b	11.4 \pm 0.3 ^{bc}	16.2 \pm 0.3 ^d
L3	11.6 \pm 0.4 ^b	9.2 \pm 0.4 ^{ab}	7.2 \pm 0.3 ^{ab}	9.0 \pm 0.2 ^b

注:表中同列数据右上角不同上标字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Note: In the same column, values with different superscripts mean significant difference ($P < 0.05$).

2.3 耐热试验结果

从菌株对致病菌的拮抗试验结果中,筛选抑菌作用较强的6株菌和1株革兰氏阴性杆菌D2做对照,进行耐热试验。从表2看出,4株芽孢杆菌对热处理均表现一定的耐受能力,其中C3和Z2对高温的耐

受能力显著高于其他试验菌株 ($P<0.05$),这与菌株的种类有一定关系。但是随着热处理时间的增加,所有芽孢杆菌均出现耐热能力降低的情况。相对芽孢杆菌,从鲤肠道分离的D2、E2和L2在85℃处理以后全部灭活,这与细菌的结构有一定关系。

表2 分离细菌热处理后的存活率
Tab.2 Survival rate of isolate bacteria after heat treatment

$n=3; \bar{x} \pm SE; \%$

菌株 Strain	处理组1 (85℃ 10 min) Treatment 1	处理组2 (85℃ 20 min) Treatment 2
CM2	44.31 ± 2.15 ^c	34.82 ± 2.03 ^c
WP1	45.63 ± 3.11 ^c	24.59 ± 2.76 ^{bc}
C3	63.58 ± 1.98 ^d	59.57 ± 2.53 ^d
Z2	62.94 ± 3.43 ^d	48.12 ± 4.12 ^{cd}
D2	0 ^a	0 ^a
E2	0 ^a	0 ^a
L2	0 ^a	0 ^a

注:表中同列数据右上角不同上标字母示差异显著 ($P<0.05$)。

Note: In the same column, values with different superscripts mean significant difference ($P<0.05$).

2.4 菌株种属鉴定结果

综合分离菌株拮抗与耐热试验结果,选择Z2、C3、E2、D2和L2等5株菌进行分子鉴定,结果见表3。根据16S rDNA测序结果,在GenBank数据库中进行比对分析表明,Z2为枯草芽孢杆菌,C3为短小芽孢

杆菌,E2为肠球菌属粪肠球菌,D2为费氏柠檬酸杆菌。但L2与数据库中与之同源性最高的肠球菌属细菌的相似性仅为93%,该菌株有可能为新的种,其序列已提交到GenBank中,登录号为EU661816。

表3 细菌种属鉴定结果
Tab.3 Genus identification of bacteria

菌株 Strain	菌株来源 Source	序列长度/bp Sequence size	GenBank数据库中最相近的菌种名称 Closest relatives found in GenBank	登录号 Access number	相似性/% Similarity
Z2	养殖水体	1459	<i>Bacillus subtilis</i> strain Pab02	EU346662.1	97
C3	养殖水体	1452	<i>Bacillus pumilus</i> isolate strain KER	EF055450.1	96
L2	鲤肠道	1459	<i>Enterococcus</i> sp. 4	AY946282.1	93
E2	鲤肠道	1459	<i>Enterococcus faecium</i> strain IDCC 2103	EU003447.1	98
D2	鲤肠道	1444	<i>Citrobacter freundii</i> strain DSM30039	AJ233408.1	97

2.5 细菌对黏液蛋白的黏附结果

本实验所用的芽孢杆菌、肠球菌和柠檬酸杆菌经 γ -³²P-ATP标记后,分别在体外直接黏附肠道黏液蛋白。从图1可以看出,5株细菌均能黏附到鲤前肠黏液,肠球菌的相对黏附数量极显著地高于芽孢杆菌和柠檬酸杆菌 ($P<0.01$),柠檬酸杆菌比芽孢杆菌的相对黏附率高,但是差异不显著 ($P>0.05$),而肠球菌

L2的相对黏附数量极显著高于肠球菌E2 ($P<0.01$),说明鱼源的肠球菌对鲤前肠黏液的黏附率高于异源的芽孢杆菌,但是,不同种属的肠球菌在黏附能力上面也存在差异。尽管柠檬酸杆菌也来源于鲤肠道,但其黏附数量极显著低于肠球菌 ($P<0.01$),这可能与它们在鲤肠道菌群的构成比例上存在差异有一定的关系。

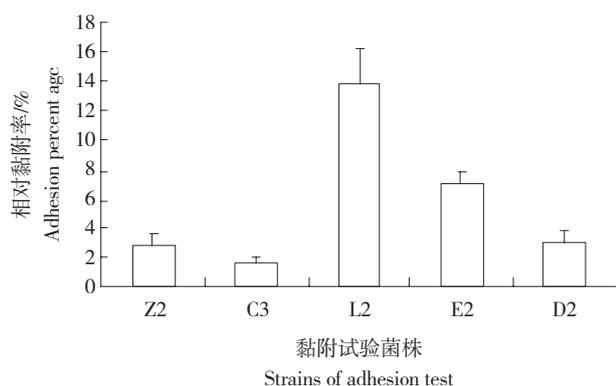


图1 细菌对固定化黏液蛋白的相对黏附率

Fig. 1 Relative adhesion of bacteria to immobilized carp intestinal mucus

3 讨论

对于益生菌的初步筛选,常常采用对酸、胆盐和热的耐受性,以及对病原菌的拮抗作用和对肠道的黏附作用等作为筛选指标。但是作为无胃的鲤科鱼类,肠道pH值通常在6.2~7.0,因此,本实验只采用体外拮抗试验和耐热试验作为菌株的初筛指标。益生菌的抑菌活性,尤其是对病原菌和条件性病原菌的抑制作用,可以提高益生菌的竞争力,达到在胃肠道定植的目的。在体外拮抗试验中,参照文献采用双层平板法更好地模拟了鲤肠道相对厌氧的环境^[10],检测益生菌对鲤常见病原菌嗜水气单胞菌及标准质控细菌大肠杆菌的拮抗作用。在耐热试验中,尽管肠球菌和柠檬酸杆菌完全不耐热,但是考虑到它们作为鲤内源性细菌,对于黏附特性的研究具有特殊的作用,所以仍然作为候选菌株用于后续研究。芽孢杆菌能改善水质^[14]、调节动物消化道微生态平衡^[15]、改善动物免疫功能、增强抗病力,可分泌胞外酶以及产生维生素、有机酸等营养物质,促进营养物质的消化吸收^[16]。肠球菌为人和动物胃肠道正常菌群之一^[17],具有改善宿主肠道菌群组成^[18]、抑制病原菌等作用^[19]。因此,选择芽孢杆菌和肠球菌进行黏附试验,为进一步提高益生菌在水产养殖的应用效果,具有现实意义。

Ouwehand等^[12]在体外黏附试验中采用³H-Tdr对细菌进行标记,取得了较好的检测效果。但是

³H-Tdr对仪器设备的灵敏度要求较高,所以一些研究者采用了其他的标记物,如高巍等采用³⁵S-蛋氨酸标记细菌^[20]。郝一文等^[21]成功地利用 γ -³²P-ATP示踪法研究了蛋白激酶C对人脐静脉血管内皮的黏附作用。作为细菌细胞中几种重要的元素,磷的含量占细菌细胞干重的3%左右,因此在细菌的生长过程中, γ -³²P-ATP能有效地进入细胞,从而达到标记的目的^[22]。本实验采用 γ -³²P-ATP标记细菌,生长试验表明 γ -³²P-ATP不会显著($P>0.05$)影响细菌的生长(数据未列出)。

为了发挥益生菌对宿主健康的促进作用,益生菌在胃肠道中必须保持一定的数量,以防止因为消化道收缩而被快速排除。因此,益生菌对黏膜的黏附能力是其在肠道定植并发挥作用的前提条件。动物肠道内表面被黏膜上皮细胞所覆盖,而上皮细胞外面又具有一层黏液。黏液是胃肠道细胞分泌的一种弹性胶体物质,主要成分是黏蛋白^[23]。因为黏液封闭了上皮细胞表面的受体,所以肠道内的大多数微生物是直接和黏液发生联系,而不是接触上皮细胞。因此,黏液成为病原菌侵袭动物机体的第一道屏障^[24],也是有益细菌在宿主体内直接定植的环境。大量的体外黏附试验表明,益生菌对黏液具有一定的黏附作用,并能与病原菌相互作用,以达到抑制后者对肠道黏液的黏附作用,从而保护机体免受危害^[1,25-27]。本实验中,尽管柠檬酸杆菌分离于鲤肠道,但是鱼源肠球菌的相对黏附数量极显著地高于柠檬酸杆菌($P<0.01$),同时肠球菌的相对黏附数量极显著地高于异源的芽孢杆菌($P<0.01$),证明分离自鲤肠道的肠球菌对肠道黏膜的定植能力最强;其次是柠檬酸杆菌;黏附性能较弱的是芽孢杆菌。表明同源细菌相对黏附数量高于异源细菌,与Casini等^[28]结果一致。但是肠球菌L2和E2的黏附数量差异极显著($P<0.01$),说明细菌的黏附性还具有菌株特异性。郭本恒^[29]指出,细菌的表面黏附呈高度菌种专一性,与本实验结果一致。芽孢杆菌并不是鲤前肠的优势菌群^[30],本研究中分离于养殖池底泥的芽孢杆菌C3和Z2黏附能力极显著地低于肠球菌,说明外源细菌在

宿主体内较难定植,在益生菌菌种的选择中要考虑宿主的特异性,首选内源细菌,从而保证其在宿主体内能够长期大量定植,发挥有益的作用。柠檬酸杆菌为条件致病菌,在健康鲤肠道中不是优势菌群,仅有少数文献报道其导致水生动物发病^[31],本研究也证明柠檬酸杆菌的黏附率极显著地低于肠球菌。

有关细菌选择性黏附机理方面的研究已有较多报道。孟庆翔等^[32]对大肠杆菌、乳酸杆菌和双歧杆菌凝集素活性影响因素的研究,证明生长猪消化道细胞表面具有糖蛋白样性质的凝集素,介导细菌对细胞的黏附作用。Casini等^[28]也证明细菌的黏附可能与宿主特异性受体的存在有关。本研究中5株细菌的黏附作用是否与鲤前肠表面凝集素性质有关,它们的黏附受体是否不同,其黏附机理等都还有待进一步研究。

4 结论

本研究采用体外固定鲤前肠黏液蛋白,结合同位素³²P标记细菌并示踪的方法,研究不同来源的细菌对鲤前肠黏液的体外黏附活性,并经耐热和体外拮抗试验,筛选了5株鲤益生菌。结果表明,同源的肠球菌、柠檬酸杆菌及异源的芽孢杆菌都能有效黏附鲤前肠黏液蛋白,并且鱼源的肠球菌黏附率极显著地高于异源的芽孢杆菌,但鱼源柠檬酸杆菌与异源芽孢杆菌的相对黏附数量差异不显著;证明益生菌黏附性具有菌株特异性。

参考文献:

- [1] Laurent V, Geert R, Patrick S, et al. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture [J]. *Microbiol Mol Biol R*, 2000, 64(4): 655-671.
- [2] Irianto A, Austin B. Use of dead probiotic cells to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) [J]. *J Fish Dis*, 2003, 26: 59-62.
- [3] Balc ̃zar J L, Blas I de, Ruiz-Zarzuela I, et al. Review: the role of probiotics in aquaculture [J]. *Vet Microbiol*, 2006, 114: 173-186.
- [4] 郭本恒. 益生菌[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 37-39.
- [5] 潘晓东, 吴天星, 陈斌. 益生菌在水产动物肠道内黏附机制的研究进展[J]. *水产科学*, 2005, 24(11): 53-54.
- [6] Garcia T, Otto K, Kjelleberg S, et al. Growth of *Vibrio anguillarum* in salmon intestinal mucus [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63: 1 034-1 039.
- [7] Krovacek K, Faris A, Ahne W, et al. Adhesion of *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio anguillarum* to fish cells and to mucus-coated glass slides [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1987, 42: 85-89.
- [8] 温崇庆, 赖心田, 何红, 等. 两株对虾育苗用益生芽孢杆菌的筛选和鉴定[J]. *水生生物学报*, 2007, 31(4): 453-459.
- [9] 李影林. 培养基手册[M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 1991.
- [10] Chabrillon 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]. *J Fish Dis*, 2005, 28: 229-237.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 附录98.
- [12] Ouwehand A C, Kirjavainen M M, Grok N, et al. Adhesion of probiotic micro-organisms to intestinal mucus [J]. *Intern Dairy J*, 1999, 9: 623-630.
- [13] Buchanan R E, Gibbons N E. *Bergey's manual of determinative bacteriology: Eighth edition* [M]. Baltimore: The Williams & Wilkins Company, 1974: 729-758.
- [14] 古长庆, 李君文, 晁福寰, 等. 微生物制剂在水产养殖中应用的研究[J]. *水产科学*, 2004, 23(3): 21-25.
- [15] 张克强, 李野, 李军幸. 芽孢杆菌菌剂在水产养殖中的应用初探[J]. *海洋科学*, 2006, 30(9): 88-91.
- [16] 刘克琳, 何明清. 益生菌对鲤免疫功能影响的研究[J]. *饲料工业*, 2000, 21(6): 24-25.
- [17] 李金钟. 肠球菌分类与鉴定新进展[J]. *临床检验杂志*, 2006, 24(3): 228-230.
- [18] 田永波, 葛一飞, 潘春玲. 妈咪爱辅助治疗母源性黄疸疗效观察[J]. *黔南民族医学高等专科学校学报*, 2005, 18(4): 205-206.
- [19] 贺银凤, 王锂韞, 李少英, 等. 酸马奶酒中一株粪肠球菌抑菌物质的粗提及特性研究[J]. *农业工程学报*, 2007, 23(1): 264-267.
- [20] 高巍, 孟庆翔. 乳杆菌、双歧杆菌和大肠杆菌附着固定化猪小肠黏液蛋白的研究[J]. *中国农业科学*, 2004, 37(4): 609-613.
- [21] 郝一文, 周文玲, 李亚明. 利用 γ -³²P-ATP、³¹Cr研究蛋白激酶C对血管内皮细胞CD44表达及内皮黏附功能的影响[J]. *同位素*, 2006, 19(3): 156-160.
- [22] 沈萍. 微生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 75-76.
- [23] Meng Q, Kerley M S, Russel T J, et al. Lectin-like activity of *Escherichia coli* K88, *Salmonella choleraesuis*, and *Bifidobacteria*

- pseudolongum* of porcine gastrointestinal origin [J]. *J Anim Sci*, 1998, 76: 551–556.
- [24] Walker R I, Owen R L. Intestinal barriers to bacteria and their toxins [J]. *Ann Rev Med*, 1990, 41: 393–400.
- [25] Bojana B, Matijacic, Mojca N, et al. Ability of *Lactobacillus gasseri* K7 to inhibit *Escherichia coli* adhesion in vitro on caco-2 cells and ex vivo on pigs' jejunal tissue [J]. *Intern J Food Microbiol*, 2006, 107: 92–96.
- [26] Niall G V, Winston D L, Horst K. In vitro growth characteristics of five candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus [J]. *Microbiol Lett*, 2004, 231: 145–152.
- [27] Zarate G, Nader-Macias M E. Influence of probiotic vaginal lactobacilli on in vitro adhesion of urogenital pathogens to vaginal epithelial cells [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2006, 42: 174–180.
- [28] Casini L. Interference of the humoral immune response against resident and nonresident intestinal commensal strains in weaning pigs [J]. *Livest Sci*, 2007, 108: 226–228.
- [29] 郭本恒. 益生菌[M]. 北京: 中国化工出版社, 2003: 68–74.
- [30] 杨雨辉, 佟恒敏, 卢彤岩, 等. 乳酸环丙沙星对鲤肠道菌群的影响 [J]. *中国兽医杂志*, 2003, 39(10): 38–39.
- [31] 沈锦玉, 顾志敏, 潘晓艺, 等. 红螯螯虾弗氏柠檬酸杆菌病原的分离与鉴定 [J]. *中国水产科学*, 2005, 12(2): 197–199.
- [32] 孟庆翔, 高巍. 生长猪消化道大肠杆菌、乳杆菌和双歧杆菌凝集素活性及其化学性质 [J]. *中国农业科学*, 2002, 35: 1119–1124.

Screening of carp probiotic bacteria and adhesion to carp foregut mucus in vitro

ZENG Dong¹, WANG Yi-ping^{1,2}, NI Xue-qin¹, WANG Kai-yu³, WU Meng¹

(1. Animal Microecology Research Center in Veterinary College, Sichuan Agricultural University, Yaan 625014, China; 2. Aquaculture Department in College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Yaan 625014, China; 3. The Fish Disease Research Center, Sichuan Agricultural University, Yaan 625014, China)

Abstract: Twenty bacteria strains were isolated from the cultivation pool, aquarium and gut of healthy carps. Five strains were selected by inhibition to pathogens in vitro and heat treatment and identified as *Bacillus*, *Enterococci* and *Citrobacter*. To establish an efficacious screening method of carp probiotics, immobilized mucosal model was used in vitro, combined with the isotope ³²P tracing method, the adhesion characteristics of *Enterococci*, *Citrobacter* isolated from carp intestine and *Bacillus* isolated from mud to the carp foregut mucus were investigated after adhesion treatment in vitro. Results showed that all of the bacteria had the ability to adhere to carp foregut mucus immobilized on the cell culture plates. The relative adhesion population of *Enterococci* was higher than that of *Bacillus* and *Citrobacter* ($P < 0.01$), the adhesion percent of *Citrobacter* and *Bacillus* differed without notable effect ($P > 0.05$), the relative adhesion population of *Enterococci* L2 was higher than that of *Enterococci* E2 ($P < 0.01$). These results prove that the adhesion rate of homologous *Enterococci* is higher than that of heterogenous *Bacillus*, and the adhesion abilities of *Enterococci* are different because of their genus and species. [Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16(3): 427–433]

Key words: protiotics; carp; adhesion; in vitro

Corresponding author: WANG Kai-yu. E-mail: Kywang@sicau.edu.cn