

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2015.14413

工厂化循环水养殖条件下云纹石斑鱼消化道产酶菌的分离鉴定

施兆鸿^{1,2}, 王健建^{1,2}, 高权新¹

1. 中国水产科学研究院 东海水产研究所, 农业部东海与远洋渔业资源开发利用重点实验室, 上海 200090;

2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306

摘要: 采用 16S rDNA-PCR 菌群分离鉴定的方法, 对循环水养殖条件下云纹石斑鱼(*Epinehelus moara*)幼鱼的胃、幽门盲囊、前肠、中肠和后肠的菌群结构进行了鉴定, 用产酶菌筛选培养法对产消化酶的菌株进行了分离鉴定, 并测试了各菌株消化酶的活力。研究发现, 云纹石斑鱼幼鱼消化道内可培养的主要菌群为假单胞菌属(*Pseudomonas*)、微小杆菌属(*Exiguobacterium*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)和葡萄球菌属(*Staphylococcus*), 其中产消化酶的菌株占可培养菌的 55.6%。在产酶菌中, 同一株菌产 3 种酶的有 5 株; 产 2 种酶的有 9 株; 中肠和后肠的菌株数最为丰富, 胃次之, 幽门盲囊和前肠菌群种类较少; 产脂肪酶的菌株都集中在中肠。产消化酶的菌株主要以产蛋白酶和淀粉酶为主, 且产酶量丰富, 产蛋白酶活力最高达(87.732±1.134) U/mL; 淀粉酶活力为(77.176±0.599)~(73.458±0.574) U/mL; 产纤维素酶的菌仅一株, 且酶活力较低。分析得知, 消化道的菌群结构直接影响了外源性消化酶的种类与活性。本研究为工厂化循环水养殖条件下产酶有益菌的筛选提供了理论依据。

关键词: 云纹石斑鱼; 消化道; 菌群结构; 产酶菌; 消化酶

中图分类号: S917, S965

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2015)05-0941-09

自然环境中饵料组成随季节的变更、环境改变以及鱼类自身发育阶段的不同, 都会使鱼类食性产生变化^[1-2]。这说明了鱼类的食性具有可塑性, 导致其可塑的原因除了鱼自身的形态特征、环境变化、食性的更替等因素外, 肠道菌群结构与食性变更也有重要的关联作用^[3]。研究认为, 通过改变肠道内菌群结构可提高不同类型消化酶的活性, 从而改变鱼类对食物中各种营养素消化吸收的比例^[4-5], 达到改变鱼类食性的目的。因此提高外源性消化酶活性是促进营养物质的消化吸收、提高饵料转化率的重要途径, 肠道内菌群结构对不同食物的消化吸收起着至关重要的作用^[6]。近年来, 肠道菌群结构对机体消化功能的影响已经成为国内外研究的热点^[6-7]。良好的肠道菌群结构对鱼类的消化吸收、生长发育、免疫抗病等方面都起着

重要作用^[8]。何敏等^[9]将产酶菌作为添加剂用于重口裂腹鱼(*Schizothorax daridi*)的研究表明, 产酶菌的使用不仅提高了重口裂腹鱼的生长率, 而且提高了其肠道蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶的活性。赖凯昭等^[10]在对奥尼罗非鱼(*Oreochromis niloticus*×*O.aureus*)的研究中也发现, 产酶菌的添加显著提高了奥尼罗非鱼的生长速度及蛋白酶活性。可见, 将鱼类自身肠道内的产酶有益菌作为添加剂用于鱼类的饲料中, 可提高饵料转化率, 降低养殖成本。探讨鱼类肠道菌群结构及产酶菌的研究具有重要的实际应用价值, 对完善鱼类消化与吸收机制也有着理论意义。

云纹石斑鱼(*Epinehelus moara*)俗称真油斑, 隶属于鲈形目、鮨科、石斑鱼属^[11], 是福建、广东等地区主要的石斑鱼类养殖品种。该属中的鱼

收稿日期: 2014-10-05; 修订日期: 2014-11-19.

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2011BAD13B01).

作者简介: 施兆鸿, 研究员. 主要研究方向为水产养殖. E-mail: shizh@eastfishery.ac.cn

类都属于次级肉食性鱼类^[12],即以鱼、虾、贝、蟹等为食。该鱼对食物中营养素的需求随不同生长阶段会有所差异,在工厂化循环水养殖条件下或网箱养殖中,通过饲料配方的调整来满足其对营养的需求;而肠道菌群结构随着环境的改变和食物的变更也会发生相应的变动,其中产酶菌分泌的消化酶可以提高鱼类营养物质的消化,包括一些难以分解的纤维素等物质,促进营养物质的转化和吸收;同时肠道菌群产生的维生素等营养物质可以弥补饲料中营养物质的不足^[6]。本研究旨在通过对工厂化循环水养殖条件下云纹石斑鱼幼鱼的菌群结构组成分析及产酶菌的分离鉴定,为次级肉食性鱼类的益生菌的挑选与应用提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料和养殖条件

实验用云纹石斑鱼选自自行繁育的后代,从循环水养殖池中挑选体表无伤、体色正常的幼鱼作为实验对象。平均全长(11.8 ± 0.3) cm,平均体质量(21.0 ± 2.0) g。自幼鱼阶段起全程采用日本林兼株式会社生产的“鱼宝”牌配合饲料进行饲喂,测得饲料的营养组成为:粗蛋白质 53%、粗脂肪 9%、粗纤维 4%、粗灰分 17%、钙 1%、磷 1%。

1.2 取样方法

实验开始前从循环水养殖池中随机捞出 15 尾幼鱼,放入悬挂在养殖池中直径为 0.8 m 的小网箱中饥饿 24 h。饥饿后将幼鱼取出测量全长和体质量,随后在冰盘上解剖取消化道,取出消化道后用 70% 的乙醇擦拭肠外壁,按胃、幽门盲囊、前肠、中肠、后肠取样,因幼鱼个体较小,本实验采用每 3 尾鱼的组织混合为一个样品。

1.3 16SrDNA-PCR 菌群的分离鉴定

1.3.1 肠道菌群的培养 样品立即用灭菌匀浆机进行捣碎,捣碎样品设为 10^{-1} ,再用 0.85% 的生理盐水将其进行稀释至 10^{-8} 并混匀。取样品液 50 μ L 均匀涂布于 LB 培养基,每个样品设 3 个平行。涂布好的平板倒置于 28℃ 恒温培养箱中,培养 24h。

1.3.2 肠道菌的分离 经恒温培养后,挑取不同大小、不同形状、不同颜色的菌株再用 LB 培养基进行纯化培养 24 h。然后将纯化的菌株接种于 LB 液体培养基中进行扩大培养。经 12 h 培养后将菌液保存于 40% 甘油培养液中,两者混合比例为 1 : 1。

1.3.3 肠道菌群的鉴定 将分离的菌株接种于 LB 固定培养基中,培养 24 h 后,挑取菌落并提取其 DNA 作为模板(DNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司),设计引物分别扩增各菌株的 16S rDNA 基因片段。引物为通用引物 27F/1492R(由上海生工生物工程有限公司合成)。PCR 扩增条件依次如下: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 5 min。PCR 产物送上海生工生物工程有限公司测序。采用 BLAST 分析软件对目的序列进行分析,将测得的序列与 GenBank 中邻近种属的 16S rDNA 序列进行相似性比较,从比对结果中选择分类信息较完整且相似度较高的序列,进行目的序列分类信息的推测,确定其物种。

1.4 产酶菌的筛选

分离鉴定出的菌株原保存液设为 10^{-1} ,再用 0.85% 的生理盐水将其稀释为 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 6 个稀释度,取各浓度样品液各 50 μ L 均匀涂布于各消化酶筛选培养基,每个样品设 3 个平行。将涂布好的平板倒置于 28℃ 恒温培养箱中培养 24 h。各种消化酶筛选培养基配方和产酶菌筛选方法如下:

蛋白酶筛选培养基的配方参见孙佑赫等^[13]的方法。培养完成后蛋白酶的有无以培养基中有无透明菌圈产生为判别标准。

淀粉酶筛选培养基的配方参见刘震等^[14]。培养完成后加入碘液,淀粉酶的有无以观察是否有透明圈产生为标准。

脂肪酶筛选培养基的配方参见赵伟等^[15]。脂肪酶的有无以培养完成后观察有无菌圈产生为标准。

纤维素酶筛选培养基的配方参考胡格华等^[16]的方法。培养完成后加入 0.5% 刚果红,染色 50 min,倒掉刚果红,用 5% NaCl 浸泡 1 h,1 h 后倒掉 NaCl

观察有无透明圈产生来判别是否产生纤维素酶。

1.5 消化酶液制备

将筛选好的菌株接种于 50 mL (250 mL 三角锥形瓶)种子培养基中, 28℃、200 r/min、摇床培养 24 h 后, 按 2%的接种量接种于 100 mL (250 mL 三角锥形瓶)发酵培养基中, 28℃, 200 r/min, 摇床培养 4 d, 5 000 r/min 离心 10 min, 上清液即为酶液。各消化酶的种子培养基和发酵培养基的配方分别参照李忠玲等^[17]、董明奇等^[18]、权淑静等^[19]和李力等^[20]的方法。

1.6 消化酶活力测定

蛋白酶活力测定采用福林酚法。蛋白酶单位定义: pH 7.2, 40℃条件下, 每分钟产生 1 μg 酪氨酸所需要的酶量为 1 个酶活单位, 以 U/mL 表示。脂肪酶活力测定采用酶比色法, 试剂盒由南京建成生物工程研究所提供, 测定方法参见说明书。脂肪酶单位定义: 37℃条件下, 每升酶液在本反应体系中与底物反应 1 min, 每消耗 1 μmol 底物为 1 个酶活力单位, 以 U/L 表示。纤维素酶活力测定采用 DNS 法, 纤维素酶活力定义: 50℃条件下, 每分钟水解 CMC 产生相当于 1 μg 葡萄糖所需的酶量, 作为 1 个酶活力单位, 以 U/mL 表示。淀粉酶活力测定采用淀粉-碘比色法, 试剂盒由南京建成生物工程研究所提供, 测定方法参见说明书。淀粉酶活力单位定义: 100 mL 酶液, 在 37℃于底物作用 30 min, 水解 10 mg 淀粉为 1 个酶活力单位, 以 U/dL 表示。

2 结果与分析

2.1 16S rDNA 基因序列分析结果

对云纹石斑鱼幼鱼消化道各部位挑选出来的菌株经扩增和测序, 得到长度约为 1 300 bp 的 16S rDNA 基因片段。将测定的菌株基因序列提交至 GenBank 中进行 BLAST 同源性分析比对, 其结果显示, 本实验条件下云纹石斑鱼幼鱼消化道内可培养的菌株共 27 株, 相应基因序列的同源性都在 98%以上, 各组织中不同种类细菌的分布见表 1。分别为假单胞菌属(*Pseudomonas*)、微小杆

菌属(*Exiguobacterium*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)和葡萄球菌属(*Staphylococcus*)。其中假单胞菌属 13 株, 占可培养菌株的 48.2%; 微小杆菌属 5 株, 占可培养菌株的 18.5%; 不动杆菌属 7 株, 占可培养菌株的 25.9%, 寡养单胞菌属和葡萄球菌属各 1 株, 各占可培养菌株的 3.7%。

在本实验方法条件下, 胃组织中不动杆菌属有 3 株, 假单胞菌属有 2 株, 微小杆菌属和寡养单胞菌属各 1 株, 共 7 株; 幽门盲囊中假单胞菌属 2 株, 不动杆菌属和葡萄球菌属各 1 株, 共 4 株; 前肠中假单胞菌属和不动杆菌属各 2 株, 共 4 株; 而中肠中假单胞菌属 3 株、微小杆菌属 4 株, 不动杆菌属 3 株, 共 10 株; 后肠中假单胞菌属 8 株, 不动杆菌属 2 株, 与中肠一样也是 10 株。可见, 中肠和后肠的菌株数最为丰富, 胃次之, 幽门盲囊和前肠菌群种类较少。

不同种类细菌在消化道的分布情况: 假单胞菌属在各组织中均有存在, 且后肠中的菌株数多于幽门盲囊、前肠和中肠; 微小杆菌属仅存在于胃和中肠, 并且中肠中菌株数最多; 不动杆菌属存在于各组织中; 寡养单胞菌只存在于胃中; 葡萄球菌仅存在于幽门盲囊内。

2.2 产酶菌的组成特征

在本实验条件下分离得到的可产消化酶的菌株共 15 株(表 2), 占可培养菌的 55.6%。其中假单胞菌属中有 7 株菌产酶, 微小杆菌属中 5 株菌产酶, 不动杆菌属中有 2 株菌产酶, 寡养单胞菌属中只有 1 株菌产酶。这 15 株菌株都产蛋白酶, 其中有 13 株除了产蛋白酶外还产淀粉酶。有 4 株菌株除了产蛋白酶和淀粉酶外还产脂肪酶, 即 1 株菌株中产 3 种消化酶, 分别是微小杆菌属的 *E. arabatum* strain APT13a、*E. profundum* strain SigaKolEp3 和 *E. arabatum* strain GW-601, 不动杆菌属的 *A. johnsonii* strain zzx01; 另有一株假单胞菌属的 *P. hibiscicola* strain SH8 也产 3 种酶, 分别是蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶; 只产 1 种酶(蛋白酶)的菌株是 *P. putida* strain CN015。

表 1 云纹石斑鱼消化道各组织菌群结构
Tab. 1 Microbial community structure in gastrointestinal tract of *Epinehelus moara*

菌属 genus	实验编号 experiment code	菌株 strain	相似度/% similarity	NCBI 序列号		胃 stomach	幽门盲囊 pyloric caeca	前肠 foregut	中肠 midgut	后肠 hindgut
				NCBI 序列号	NCBI serial number					
假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	W12	<i>P. hibiscicola</i> strain SH8	98	KC172017.1		+		+		+
	W6	<i>P. montelii</i> strain JC3	98	KF263567.1		+				
	H4	<i>P. putida</i> strain CN015	99	EU364531.1						+
	H7	<i>P. geniculata</i> strain T291	99	KC764994.1						+
	H1	<i>P. plecoglossicida</i> strain 2-3	99	EU594553.1						+
	H9	<i>P. geniculata</i> strain XJUH-X-18	99	EU239476.1						+
	H5	<i>P. putida</i> strain S16	99	DQ387441.1			+			+
	H44	<i>P. putida</i> strain ZJF-E5	99	KF367464.1						+
	Z4	<i>P. fulva</i> TY16	99	FJ807483.1					+	
	Z2	<i>P. geniculata</i> strain PRRZ5	99	HQ678674.1					+	
	Z44	<i>P. putida</i> strain skd	99	EF538425.1					+	
	Y5	<i>P. hibiscicola</i> strain SSG-6	98	KF973297.1			+			
	H6	<i>P. putida</i> strain W30	98	GQ303714.1						+
微小杆菌属 <i>Exiguobacterium</i>	W8	<i>E. acetylicum</i> strain N5	99	KC189900.1		+				
	Z16	<i>E. arabatum</i> strain APT13a	99	KC519397.1					+	
	Z13	<i>E. profundum</i> strain KP6	98	KF269102.1					+	
	Z10	<i>E. profundum</i> strain SigaKolEp3	99	JX987048.1					+	
	Z3	<i>E. arabatum</i> strain GW-601	99	KJ461696.1					+	
不动杆菌属 <i>Acinetobacter</i>	W7	<i>A. bouvetii</i> strain OAc422	99	KC514127.1		+			+	
	W4	<i>A. johnsonii</i> strain RK15	99	KC790277.1		+				
	W3	<i>A. bouvetii</i> strain ALK054	99	KC456561.1		+	+			
	H11	<i>A. haemolyticus</i> strain Cl-02	99	KC178576.1						+
	Z15	<i>A. johnsonii</i> strain zz01	99	KJ009436.1					+	
	Q5	<i>A. johnsonii</i> strain DE1	99	JQ435689.1				+		
	Q2	<i>A. haemolyticus</i> strain Cl-02	99	KC178576.1				+		+
寡养单胞菌属 <i>Stenotrophomonas</i>	W5	<i>S. maltophilia</i> strain SZH14	98	GU384265.1		+				
葡萄球菌属 <i>Staphylococcus</i>	y3	<i>S. saprophyticus</i> strain NT2512.1	99	JX645214.1			+			

注：“+”表示存在。
Note: “+” denotes presence.

表 2 云纹石斑鱼消化道内产酶菌株种类与分布
Tab. 2 Enzyme-producing bacteria within the digestive tract of *Epinehelus moara*

菌株 strain	编号 serial number	组织分布 tissue distribution	消化酶种类 digestive enzyme
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain SZH14	W5	胃 stomach	蛋白酶, 淀粉酶 protease, amylase
<i>Pseudomonas hibiscicola</i> strain SH8	W12	胃, 前肠, 后肠 stomach, foregu, hindgut	蛋白酶, 淀粉酶, 纤维素酶 protease, amylase, cellulase
<i>Pseudomonas putida</i> strain CN015	H4	后肠 hindgut	蛋白酶 protease
<i>Pseudomonas geniculata</i> strain PRRZ5	Z2	中肠 midgut	蛋白酶, 淀粉酶 protease, amylase
<i>Pseudomonas geniculata</i> strain T291	H7	后肠 hindgut	蛋白酶, 淀粉酶 protease, amylase
<i>Pseudomonas fulva</i> TY16	Z4	中肠 midgut	蛋白酶, 淀粉酶 protease, amylase
<i>Pseudomonas hibiscicola</i> strain SSG-6	Y5	幽门 pyloric caeca	蛋白酶, 淀粉酶 protease, amylase
<i>Pseudomonas putida</i> strain S16	H5	幽门, 前肠, 后肠 pyloric caeca, foregu, hindgut	蛋白酶, 淀粉酶 protease, amylase
<i>Exiguobacterium acetylicum</i> strain N5	W8	胃 stomach	蛋白酶, 淀粉酶 protease, amylase
<i>Exiguobacterium profundum</i> strain SigaKolEp3	Z10	中肠 midgut	蛋白酶, 淀粉酶, 脂肪酶 protease, amylase, lipase
<i>Exiguobacterium arabatum</i> strain APT13a	Z16	中肠 midgut	蛋白酶, 淀粉酶, 脂肪酶 protease, amylase, lipase
<i>Exiguobacterium arabatum</i> strain GW-601	Z3	中肠 midgut	蛋白酶, 淀粉酶, 脂肪酶 protease, amylase, lipase
<i>Exiguobacterium profundum</i> strain KP6	Z13	中肠 midgut	蛋白酶, 脂肪酶 protease, lipase
<i>Acinetobacter johnsonii</i> strain zzx01	Z15	中肠 midgut	蛋白酶, 淀粉酶, 脂肪酶 protease, amylase, lipase
<i>Acinetobacter johnsonii</i> strain DE1	Q5	前肠 foregu	蛋白酶, 淀粉酶 protease, amylase

从分布特点看, 分布在胃中的菌有 3 株, 除了产蛋白酶和淀粉酶外, 还产纤维素酶; 分布在幽门盲囊中的菌仅 2 株, 虽然也产蛋白酶和淀粉酶, 但与分布在胃中的菌株不同; 前肠中的菌也只有 3 株, 产蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶, 产纤维素酶的菌与胃中的属同一株; 中肠中产酶菌株类数量最多, 达 7 株, 主要特点是产脂肪酶的菌株都分布在中肠; 后肠中产酶菌有 4 株, 所产的消化酶包括蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶。

2.3 消化酶活力

在本实验条件下, 测得的消化酶活力见表 3。微小杆菌属的 *E. profundum* strain SigaKolEp3 产蛋白酶活力最高, 达(87.732±1.134) U/mL; 假单胞菌属的 *P. putida* strain CN015 产蛋白酶活力最低, 仅(47.540±1.965) U/mL, 15 株产蛋白酶的菌株的酶活力之间有显著性差异($P<0.05$)。13 株产淀粉酶的菌株测得的淀粉酶活力为(77.176±0.599)~(73.458±0.574) U/mL, 大于 76 U/mL 的有 10 株,

之间无显著性差异($P>0.05$); 小于 74 U/mL 的有 3 株。脂肪酶是由 4 株微小杆菌属和 1 株不动杆菌属的菌株所产。微小杆菌属的 *E. profundum* strain KP6 脂肪酶活力最高, 可达(76.917±1.025) U/I。纤维素酶是由假单胞菌属的 *P. hibiscicola* strain SH8 所产, 也是本实验条件下唯一的一株产纤维素酶的菌株。

3 讨论

3.1 肠道菌群结构的组成和鉴定方法

Munro 等^[21]在大菱鲆(*Psetta maxima*)的研究中发现, 肠道菌群主要来源是所摄取的活饲料而不是养殖水体。本实验中的云纹石斑鱼是在循环水养殖环境中以配合饲料为食的, 笔者认为, 影响鱼肠道菌群结构的因素主要是养殖水体和苗种培育阶段中的鲜活饵料, 如仔稚幼鱼阶段投喂的轮虫、卤虫无节幼体、桡足类等, 在育苗过程中, 由活饵携带的菌在仔鱼消化道开通时随摄入的食

表 3 产酶菌株的消化酶活力
Tab. 3 Digestive enzyme activities of enzyme-producing bacteria

n=5; $\bar{x} \pm SD$

菌株 strain	编号 serial number	蛋白酶活力 /(U·mL ⁻¹) protease activity	淀粉酶活力 /(U·dL ⁻¹) amylase activity	纤维素酶活力 /(U·mL ⁻¹) cellulase activity	脂肪酶活力 /(U·L ⁻¹) lipase activity
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain SZH14	W5	67.52±3.22 ^e	77.02±0.51 ^{ab}		
<i>Pseudomonas hibiscicola</i> strain SH8	W12	69.89±4.41 ^{de}	74.70±0.32 ^c	8.28±0.01	
<i>Pseudomonas putida</i> strain CN015	H4	47.54±1.97 ^h			
<i>Pseudomonas geniculata</i> strain PRRZ5	Z2	72.46±4.36 ^{cd}	73.46±0.57 ^d		
<i>Pseudomonas geniculata</i> strain T291	H7	54.31±5.03 ^{fg}	76.20±0.59 ^b		
<i>Pseudomonas fulva</i> TY16	Z4	74.08±3.94 ^{cd}	76.55±0.86 ^{ab}		
<i>Pseudomonas hibiscicola</i> strain SSG-6	Y5	75.77±2.91 ^c	76.47±0.63 ^{ab}		
<i>Pseudomonas putida</i> strain S16	H5	54.08±2.18 ^{fg}	76.64±0.25 ^{ab}		
<i>Exiguobacterium acetylicum</i> strain N5	W8	72.96±3.51 ^{cd}	77.08±0.40 ^a		
<i>Exiguobacterium profundum</i> strain SigaKolEp3	Z10	87.73±1.13 ^a	76.73±0.74 ^{ab}		70.75±1.03 ^b
<i>Exiguobacterium arabatum</i> strain APT13a	Z16	58.00±4.45 ^f	77.18±0.60 ^a		71.79±0.51 ^b
<i>Exiguobacterium arabatum</i> strain GW-601	Z3	50.96±2.57 ^{gh}	76.91±0.89 ^{ab}		30.77±1.54 ^d
<i>Exiguobacterium profundum</i> strain KP6	Z13	80.23±2.82 ^b			76.92±1.03 ^a
<i>Acinetobacter johnsonii</i> strain zzx01	Z15	56.27±2.92 ^f	74.79±0.37 ^c		56.41±0.00 ^c
<i>Acinetobacter johnsonii</i> strain DE1	Q5	81.00±2.22 ^b	76.91±0.32 ^{ab}		

注：同一列不同上标字母表示有显著性差异($P<0.05$)。
Note: Different superscript letters within each column represent significant differences ($P<0.05$).

物带入，以后进入工厂化循环水养殖系统，并由活饵转到完全投喂配合饲料，此时相对于自然环境，水质和食物种类都比较单一。另外肠道菌群中除了产消化酶外，还可产生有助于代谢、免疫等其他的物质，Sugita 等^[22]从 6 种鱼类肠道里分离出具有产生维生素 B₁₂ 能力的细菌；Kono 等^[23]报道在鱼类肠道菌中可产生或分泌抑菌物质以提高免疫能力。可见弄清鱼类肠道菌群结构很有意义，有必要今后进一步展开。

一般认为，肠道中的菌群结构从培养角度考虑可划分成可培养细菌和不可培养细菌两大类^[24]。本实验条件下共分离鉴定出 27 株菌，都是可培养菌，而消化道中仍然存在着未被分离鉴定的不可培养菌，加之实验条件的限制，如温度、pH、培养基等因素，也可能导致一部分可培养菌不能正常生长。另外，本实验中菌群结构的分离鉴定和产酶菌的筛选是在好氧条件下进行的，而消化道中的环境并非如实验条件，可能还有大量的厌氧菌用本实验的方法未能检测到。因此云纹石斑鱼消化道菌群结构还需进一步研究。目前对菌群结构分

析较为普遍的技术有 16S rDNA、FISH(荧光原位杂交)、随机扩增多肽 DNA、核酸探针、多重 PCR、脉冲凝胶电泳、TGGE(温度梯度变性凝胶电泳)、DGGE(浓度梯度变性凝胶电泳)、高通量技术等^[25]，其中较为准确的是高通量技术，该技术 1 次可对几百万条 DNA 分子进行测序，同时还可对多个样本进行测定。目前较为常见的高通量测序平台为 ABI SOLiD sequencing、454 焦磷酸测序或 Illumina (Solexa) sequencing^[26]。应用高通量测序技术研究菌群结构将成为必然趋势。

3.2 产酶菌在消化吸收中的作用和意义

本实验条件下云纹石斑鱼肠道中的假单胞菌属和微小杆菌属是主要的产酶菌属，也是比较常见的产蛋白酶的菌属^[27]。另外微小杆菌属还是本实验条件下主要的产脂肪酶的菌株；同样不动杆菌属对产酶的贡献也较大。有资料报道不动杆菌在一定条件下可诱发人畜的次生感染^[28]，但本实验分离得到的 2 株不动杆菌除了产蛋白酶和淀粉酶外，还产脂肪酶，可能在工厂化循环水养殖条件下对云纹石斑鱼幼鱼消化吸收起重要的作用。

葡萄球菌属大部分菌株是非致病的, 本实验中分离得到的 *S. saprophyticus* strain NT25I2.1 还需进一步实验确认其属性。综上所述可以推测本研究中分离得到的产酶菌株可以定植于云纹石斑鱼肠道内, 通过产酶对消化、免疫发挥作用。目前, 国内外研制的微生态制剂中主要以芽孢杆菌、乳酸菌、双歧杆菌、酵母菌等为主, 而直接从海水鱼类肠道菌群中挑选益生菌还未见报道, 本研究从云纹石斑鱼消化道内分离出了产消化酶菌, 对于石斑鱼类的产酶益生菌制剂的开发研有积极意义。

鱼类肠道消化菌的种类和分布会随环境和食物的改变而变化, 更多的是随消化程度的不同而改变^[29]。从表2中可知, 各消化道组织中都以蛋白酶、淀粉酶的菌为主, 产纤维素酶的菌存在于胃、前肠和后肠, 且活性不大, 产脂肪酶菌株仅存在于中肠。推测除了与鱼本身的消化道结构有关外, 还与饵料成份有直接的关系。本研究中饲料的蛋白含量较高, 为了使饵料中营养物质充分转化为鱼自身物质, 除了提高内源性消化酶活力, 还可通过提高外源性蛋白酶的活性, 使饵料营养成分充分消化吸收, 这是降低云纹石斑鱼养殖成本、促进健康生长的可靠途径。然而, 消化道各组织内温度和 pH 的变化直接影响了消化酶的活性与分布^[30-31]。因此在后续的研究中还需对产酶菌所需最适 pH 和温度进行摸索。

参考文献:

- [1] Janina S, Linongina M. Microorganism in the digestive tract of fish as indicators of feeding condition and population[J]. *Ices J Mar Sci*, 1999, 56(1): 147-149.
- [2] Olafsen J A. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture[J]. *Aquaculture*, 2001, 200(1-2): 223-247.
- [3] Lei J L. Theory and Technology for the culture of marine fish species[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2005: 87-101.[雷霖. 海水鱼类养殖理论与技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 87-101.]
- [4] Bairagi A, Ghosh K S, Sen S K, et al. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts[J]. *Aquacul Int*, 2002, 10: 109-121.
- [5] Sugita H, Shibuya K, Shimooka H, et al. Antibacterial abilities of intestinal bacteria in freshwater cultured fish[J]. *Aquaculture*, 1996, 145(1): 195-203.
- [6] Song Z F, Wu T X. Review on intestinal normal microflora in fish[J]. *Fisheries Science*, 2007, 26(8): 471-474.[宋增福, 吴天星. 鱼类肠道正常菌群研究进展[J]. 水产科学, 2007, 26(8): 471-474.]
- [7] Nicholson J K, Holmes E, Wilson I D. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2005, 3(5): 431-438.
- [8] Ganguly S, Paul I, Mukhopadhyay S K. Applications and effectiveness of immunostimulants, probiotic, and prebiotics in aquaculture: A review[J]. *Isr J Aquacult-Bamid*, 2010, 62(3): 130-138.
- [9] He M, Wang K Y, Zhang Y, et al. Effects of compound microbiological preparation on growth, activities of digestive enzymes, intestinal microflora of *Schizothorax (Racoma) davidi* (Sauvage) and water quality parameters[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2008, 5(20): 534-539.[何敏, 汪开毓, 张宇, 等. 复合微生物制剂对重口裂腹鱼生长、消化酶活性、肠道菌群及水质指标的影响[J]. 动物营养学报, 2008, 5(20): 534-539.]
- [10] Lai K Z, Lv Y H, Liang M Z, et al. Tilapia growth and intestinal protease activity analysis after compound probiotics addition in diet[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2012, 43(11): 1769-1774.[赖凯昭, 吕逸欢, 梁明振, 等. 饵料中添加益生菌对奥尼罗非鱼生长性能和肠道蛋白酶活性的影响[J]. 南方农业学报, 2012, 43(11): 1769-1774.]
- [11] Liu B Z. Grouper, Grouper farming important point[M]. Keelung: Taiwanese Fishery Economy Develop Association, 2007: 38-47.[刘秉忠. 石斑-石斑鱼养殖要点[M]. 基隆: 台湾渔业经济发展协会, 2007: 38-47.]
- [12] Deng J Y. Ocean Fishery Biology[M]. Beijing: Chinese agriculture publisher, 1991: 111-439.[邓景耀. 海洋渔业生物学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1991: 111-439.]
- [13] Sun Y H, Zhou K Y, Xiong Z. Screening and identification of protease-producing bacterium from intestinal canal of *Dendrolimu* and liquid culture studies[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012, 28(14): 18-21.[孙佑赫, 周开艳, 熊智. 松毛虫肠道产蛋白酶菌株的筛选鉴定及培养条件研究[J]. 中国农业学报, 2012, 28(14): 18-21.]
- [14] Liu Z, Zhang Y G, Zhang W W, et al. Screening of amylase-producing bacteria and optimization of the condition for enzyme production[J]. *Feed Industry*, 2012, 33(23): 27-30.[刘震, 张永根, 张微微, 等. 淀粉分解菌的筛选及产酶条件的优化[J]. 饲料工业, 2012, 33(23): 27-30.]
- [15] Zhao W, Wang L Q, Zheng J, et al. Isolation, identification of lipase production strain and optimization of the fermenta-

- tion condition[J]. Journal of Natural Science of Hunan Normal University, 2010, 33(3): 88–92.[赵伟, 王俐琼, 郑甲, 等. 产脂肪酶菌株的分离、鉴定及其产酶条件优化[J]. 湖南师范大学: 自然科学学报, 2010, 33(3): 88–92.]
- [16] Hu G H, Su X P, Pan H, et al. Study of screening of cellulase-producing strain and its fermentation productions[J]. Journal of China Three Gorges University: Natural Sciences, 2013, 35(4): 99–102.[胡格华, 苏香萍, 潘虹, 等. 纤维素酶产生菌的筛选及产酶条件的研究[J]. 三峡大学学报: 自然科学版, 2013, 35(4): 99–102.]
- [17] Li Z L, Zhang Q, Ma Q, et al. Preliminary study on rejuvenation and production of the protease-producing strain *Bacillus subtilis*[J]. China Brewing, 2009, 205(4): 102–103.[李忠玲, 张强, 马齐, 等. 产蛋白酶枯草芽孢杆菌的复壮及生产初步研究[J]. 中国酿造, 2009, 205(4): 102–103.]
- [18] Dong M Q, Shi Y, Jiang C L, et al. Screening of lipase producing strains and studying on properties of lipase[J]. Journal of Sichuan University: Natural Science, 2008, 45(4): 985–990. [董明奇, 史岩, 姜春雷, 等. 脂肪酶高产菌株的筛选及酶学特性研究[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2008, 45(4): 985–990.]
- [19] Quan S J, Ma H, Xie F H, et al. Screening of amylase high production strains and optimization of production conditions[J]. Hennan Science, 2011, 29(10): 1185–1189.[权淑静, 马焕, 解复红, 等. 淀粉酶高产菌株筛选及发酵条件优化研究[J]. 河南科学, 2011, 29(10): 1185–1189.]
- [20] Li L, Liu D M, Luo S P, et al. Screening and identification of *Bacillus subtilis* strains with high-activity of amylase, protease[J]. Fishery Modernization, 2008, 35(2): 15–18.[李力, 刘冬梅, 罗淑萍, 等. 高淀粉酶蛋白酶活力枯草芽孢杆菌菌株的筛选及鉴定[J]. 渔业现代化, 2008, 35(2): 15–18.]
- [21] Munro P D, Barbour A, Birkbeck T H. Comparison of the gut bacterial flora of start feeding larval turbot reared under different conditions[J]. J Appl Microbiol, 1994, 77: 560–566.
- [22] Sugita H, Miyajima C, Deguchi Y. The vitamin B12-producing ability of the intestinal microflora of freshwater fish[J]. Aquaculture, 1991, 92(3–4): 267–276.
- [23] Kono M, Matsui T, Shimizu C. Chitin-decomposing bacteria in digestive tracts of cultured red sea bream and Japanese eel[J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1987, 53(2): 305–310.
- [24] Joseph S J, Hugenholtz P, Sangwan P, et al. Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(12): 7210–7215.
- [25] Liu G H, Ye Z F, Wu W Z. Culture-dependent and culture-independent approaches to studying soil microbial diversity[J]. Acta Ecologica Sinica, 2012, 32(14): 4421–4433. [刘国华, 叶正芳, 吴为中. 土壤微生物群落多样性解析法: 从培养到非培养[J]. 生态学报, 2012, 32(14): 4421–4433.]
- [26] Ten X K, Xiao H S. Prospect analysis of gene chip and high-throughput DNA sequencing technology[J]. Scientia Sinica Vitae, 2008, 38(10): 891–899.[腾晓坤, 肖华胜. 基因芯片与高通量 DNA 测序技术前景分析[J]. 中国科学 C 辑, 2008, 38(10): 891–899.]
- [27] Zeng Y X, Yu Y, Li H R, et al. Characterization of extracellular proteases produced by one arctic marine bacterium BSw20353[J]. Chinese Journal of Polar Research, 2006, 18(3): 206–214.[曾胤新, 俞勇, 李会荣, 等. 北极海洋细菌 BSw20353 的胞外蛋白酶性质[J]. 极地研究, 2006, 18(3): 206–214.]
- [28] Wang Z G, Yang W J, Liu C L, et al. Isolation and identification of the protease-producing bacteria from gut of silkworm (*Bombyx mori*) and its suitable fermentation condition[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2011, 19(1): 149–156.[王在贵, 杨文静, 刘朝良, 等. 家蚕肠道产蛋白酶菌株的分离与鉴定及其发酵条件[J]. 农业生物技术学报, 2011, 19(1): 149–156.]
- [29] Bitterlich G. Digestive enzyme pattern of two stomachless filter feeders silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix* Val., and bighead carp, *Aristichthys nobilis* Rich[J]. J Fish Biol, 1985, 27(2): 103–112.
- [30] Jiang Y H, Yan S F, Yan Z L. Effect of temperature and pH on the activity of digestive enzymes in *Haliotis diversicolor* Reeve[J]. Marine Sciences, 2012, 36(2): 11–18.[姜永华, 颜素芬, 严正凇. 温度和 pH 对杂色鲍消化酶活力的影响[J]. 海洋科学, 2012, 36(2): 11–18.]
- [31] Zhu A Y, Chu X L. Activity and distribution of two enzymes in different parts of digestive tract of *Pseudosciana crocea*: temperature and pH impacts[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2006, 37(6): 561–567.[朱爱意, 褚学林. 大黄鱼 (*Pseudosciana crocea*) 消化道不同部位两种消化酶的活力分布及其受温度、pH 的影响[J]. 海洋与湖泊, 2006, 37(6): 561–567.]

Isolation and identification of enzyme-producing bacteria from the digestive tract of *Epinehelus moara* in re-circulating aquaculture systems

SHI Zhaohong^{1,2}, WANG Jianjian^{1,2}, GAO Quanxin¹

1. Key Laboratory of East China Sea and Oceanic Fishery Exploitation, Ministry of Agriculture; East Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: The purpose of this research was to study the bacterial community structure in digestive tract and enzyme production capacity of enzyme-producing bacteria, and provide reference for selection and application of probiotics for carnivorous fish culture. In this experiment, samples of juvenile saladfish (*Epinehelus moara*) stomach, pyloric caeca, foregut, midgut, and hindgut were obtained in recirculating aquaculture systems. Bacterial community structure was analyzed using 16S rDNA-PCR. The enzyme-producing bacteria were isolated and identified by isolating and screening enzyme-producing bacteria. Moreover, the enzyme activities were tested. Twenty-seven strains were isolated and cultured under experimental conditions, including 13 strains of *Pseudomonas*, 5 strains of *Exiguobacterium*, 7 strains of *Acinetobacter*, 1 strain of *Stenotrophomonas*, and 1 strain of *Staphylococcus*, which accounted for 48.2%, 18.5%, 25.9%, 3.7%, and 3.7%, respectively, of the isolated bacteria. The sequence homology of corresponding genes was greater than 98%. Fifteen strains produced enzymes and accounted for 55.6% of all bacteria; these bacteria included 7 strains of *Pseudomonas*, 5 strains of *Exiguobacterium*, 2 strains of *Acinetobacter* and 1 strain of *Stenotrophomonas*. Among these bacteria, 13 strains can produce both protease and amylase, whereas 4 strains can produce protease, amylase, and lipase. Among the enzyme-producing bacteria, 5 strains can produce 3 enzymes and 9 strains can produce 2 enzymes. Moreover, the bacteria in the midgut and hindgut were most abundant, and those in the stomach, diverticulum pyloricum and foregut were less abundant; the bacteria that produce lipase were concentrated in the midgut. Protease and amylase were the main enzymes produced by these bacteria; these two enzymes were highly productive, with protease activity up to (87.732 ± 1.134) U/mL and amylase activity between (77.176 ± 0.599) U/mL and (73.458 ± 0.574) U/mL. Only one strain produced cellulase, and the activity was low. Under the experimental conditions, the isolated bacteria were all culturable. However, non-culturable bacteria cannot be isolated. Moreover, some culturable bacteria in the digestive tract could not be isolated because of limited testing conditions such as temperature, pH, culture medium, and other factors that may affect normal bacteria growth. In addition, isolation and identification took place under aerobic conditions, which is not similar to real gut conditions; thus, a large number of anaerobic bacteria were not isolated. Therefore, further investigation is needed to determine the actual bacterial community structure of the *E. moara* digestive tract. Our data showed that the bacterial community structure of the digestive tract directly affected the activity and diversity of exogenous digestive enzymes. This research provides a theoretical basis for selection of enzyme-producing bacteria in recirculating aquaculture conditions.

Key words: *Epinehelus moara*; bacterial community structure; digestive tract; enzyme-producing bacteria; digestive enzyme

Corresponding author: SHI Zhaohong. E-mail: shizh@eastfishery.ac.cn