

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2019.19065

地衣芽孢杆菌 A1 在斑点叉尾鲷肠道的定植

张洪玉^{1, 2, 3, 4}, 王海波⁵, 赵明军², 焦丽亭⁵, 胡鲲^{1, 3, 4}, 杨先乐^{1, 3, 4}, 夏磊^{2, 5}

1. 上海海洋大学, 国家水生动物病原库, 上海 201306;
2. 中国水产科学研究院, 北京 100141;
3. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306;
4. 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306;
5. 北京鑫洋水产高新技术有限公司, 北京 102488

摘要: 为研究地衣芽孢杆菌 A1(*Bacillus Licheniformis*, Bli)在斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)肠道的定植规律, 通过每周更换 100%的循环水量以减少水体中的芽孢杆菌对实验的干扰, 通过 Co⁶⁰ 辐照灭菌杀灭饲料中的芽孢杆菌以消除其对实验的干扰。采用 52℃ 高温选择性培养肠道 Bli, 研究外源 Bli 在肠道内的消长规律。使用嗜热脂肪地芽孢杆菌(*Geobacillus stearothermophilus*)的芽孢作为惰性对照, 通过洗涤肠壁去除非黏附菌, 研究 Bli 对肠粘膜的黏附。使用灭菌处理的肠内容物体外培养 Bli, 研究其在肠道的增殖潜能。结果显示, 每周 100%换水量使水体 Bli 含量 < 1 cfu/mL。辐照灭菌使饲料 Bli 含量由 1.4×10^4 cfu/g 降至检出限以下。停止外源 Bli 摄入后, 在持续投喂无菌饲料的情况下, Bli 在斑点叉尾鲷肠内容物中的含量可维持 3.3×10^2 cfu/g 左右至少 42 天; 在禁食情况下, 14 天后肠内容物中便无 Bli 检出。Bli 对肠粘膜的黏附能力弱于惰性对照, 但 Bli 可以在肠内容物中生长至 2.0×10^7 cfu/g。以上结果提示: 在持续喂食情况下, 地衣芽孢杆菌可以在斑点叉尾鲷肠道内长期定植, 而禁食情况不能定植。其原因是由于地衣芽孢杆菌不能有效黏附于肠粘膜, 但可以在肠内容物中增殖。

关键词: 地衣芽孢杆菌; 斑点叉尾鲷; 定植; 细胞黏附; 肠道微生物; 嗜热脂肪地芽孢杆菌; Co⁶⁰ 辐照灭菌

中图分类号: S947

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2019)06-1136-08

定植能力是益生菌筛选的重要标准之一^[1-3]。地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*, Bli)作为常用的益生菌菌种, 其促进鱼类生长^[4-7]和提高抗病能力^[6-9]的研究已多有报道。但对其黏附定植相关的研究数据却很少。Merrifield 等^[4-5]研究发现, 给虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)投喂 Bli 和枯草芽孢杆菌后, 通过洗涤肠道去除非黏附菌, 培养出的芽孢菌占总菌量的 36~75%, 提示其可以黏附于肠道粘膜。而之后的电镜研究则出现了相反的结果, 在肠粘膜上皮没有发现这两种芽孢菌的黏附^[10]。

Bli 定植相关研究多存在以下问题: (1)未有效监测和控制水体和饲料中存在的 Bli; (2)停止外源

补充后的观察期短, 缺乏长期监测数据; (3)检测肠道 Bli 的方法灵敏度和特异度不理想。

鉴于上述既往研究存在的诸多问题, 本文通过控制水体和饲料中的 Bli 数量, 并采用高温选择性培养长期监测, 开展了 Bli 在斑点叉尾鲷(*Ictaluru punctaty*)肠道定植规律的研究工作。以期进一步了解 Bli 在鱼类肠道中的定植规律, 从而更好的理解其益生机制。

1 材料与方法

1.1 实验鱼管理

斑点叉尾鲷购自北京龙池养殖场, 选择体重

收稿日期: 2019-03-04; 修订日期: 2019-07-02.

基金项目: 上海市科学技术委员会基金(18391901500); 中国水产科学研究院基本科研业务费(2017HY-ZD0503).

作者简介: 张洪玉(1981-), 男, 博士研究生, 副研究员, 研究方向为无公害渔药研发与推广. E-mail: zhanghy@cafs.ac.cn

通信作者: 杨先乐, 教授. E-mail: xlyang@shou.edu.cn; 夏磊, 副研究员. E-mail: xialei666@126.com

为 30~50 g 的健康叉尾鲴作为实验鱼, 饲养于 300 L 循环水水族缸。所有实验均维持水温 24~26℃, 溶氧>5 mg/L; 每周更换循环水量的 100%, 市政自来水使用前平衡温度至 24~26℃, 曝气 48 h 以上; 鱼缸每周使用氯制剂消毒 1 次, 清洗过滤棉并高压蒸汽灭菌后使用; 实验前禁食 2 周, 基础投喂饲料为无菌饲料, 按体重 1% 计算, 每日一次。

1.2 肠内容物和肠壁匀浆液的制备

参考 Merrifield 等^[4]的方法并加以改动, 具体为: 解剖针毁脑处死实验鱼, 75% 乙醇清洗消毒鱼体后超净台内取出肠道, 上至幽门下 1 cm, 下至肛门上 1 cm。剪开肠管, 刮下内容物, 20 倍体积冷生理盐水洗涤肠壁 3 次以去除非黏附菌, 洗涤液离心的沉淀合并到内容物中。加入冷生理盐水, 玻璃匀浆器制备 20% (w/w) 肠内容物和肠壁匀浆液。

1.3 地衣芽孢杆菌和嗜热脂肪地芽孢杆菌的选择性培养

Bli-A1 菌种(以下简称为 Bli)分离自北京鑫洋水产高新技术有限公司利生素商品制剂, 形态学、生理学结合 16S 测序鉴定后保存。Bli 最高生长温度 50~55℃^[11], 营养肉汤 37℃ 培养过夜, 生理盐水洗涤 2 次, 4℃ 保存备用。嗜热脂肪地芽孢杆菌(*Geobacillus stearothermophilus*, Gs) ATCC7953, 可生长温度 40~70℃^[12], 使用含 18 mmol/L 硫酸锰的营养琼脂 52℃ 培养 5 d 后刮取菌苔, 生理盐水洗涤 2 次, 90℃ 水浴 30 min 灭活营养体, 生理盐水洗涤 2 次, 4℃ 保存备用。调整 Bli 和 Gs 菌悬液至合适浓度, 按 1% 接种量(v/v)分别接种至 20% 肠内容物匀浆液、20% 肠壁匀浆液和生理盐水中, 使菌含量在 1.0×10^3 cfu/mL 左右。取 100 μ L 涂布于营养琼脂平板。Bli 生理盐水对照分别培养于 37℃ 和 52℃, 余均培养于 52℃。培养 48 h 后计数菌落, 统计生长率。实验重复 4 次。

1.4 水体中地衣芽孢杆菌含量的监测

实验期间每 3 天取鱼缸水 1 mL, 涂布于 2 个营养琼脂平板, 每个平板 500 μ L, 52℃ 培养 48 h 后统计菌落数, 16S rDNA 测序, 使用 NCBI 的 BLAST 工具进行序列比对, 鉴定细菌种属。检出限为 1 cfu/mL。

1.5 饲料 Co^{60} 辐照灭菌和菌含量检测

商品配合颗粒饲料购自北京康特奇饲料有限公司, 委托北京鸿仪四方辐照技术有限公司进行 Co^{60} 辐照灭菌, 最小吸收剂量为 26.0 kGy。取灭菌前后的饲料, 制备 10% 匀浆液, 梯度稀释后涂布营养琼脂平板, 25℃ 培养 72 h 后计数。16S rDNA 测序鉴定同 1.4。

1.6 地衣芽孢杆菌在斑点叉尾鲴肠道的定植规律

设置喂食组和禁食组。投喂灭菌饲料驯养 1 周后开始在水体中添加过夜培养的地衣芽孢杆菌, 使水体菌含量在 1.0×10^5 cfu/mL 左右。每天喂食前加菌 1 次, 连续 7 d。最后 1 次添加的次日作为第 0 天, 此日起, 喂食组继续投喂灭菌饲料, 禁食组不再投喂饲料。每周解剖 3 条鱼, 取肠道制备 20% 肠内容物匀浆液, 禁食组第 14 天和第 21 天额外制备 20% 肠壁匀浆液, 将所有匀浆液涂布于营养琼脂平板, 每个平板涂布 100 μ L, 使检出限接近 1 cfu/肠。52℃ 培养 48 h 后, 统计菌落数, 所有平板菌落数之和即肠道内的 Bli 总数。

1.7 含菌饲料的制备

Bli 芽孢制备: 使用营养肉汤培养, 37℃, 150 rpm 震荡培养 3 天, 离心, 生理盐水洗涤 2 次, 80℃ 水浴 20 min, 生理盐水洗涤 2 次, 4℃ 保存备用。Gs 芽孢制备参见 1.3。调整 Bli 和 Gs 芽孢悬液至合适浓度, 均匀喷涂在饲料表面, 使饲料最终菌含量在 1.0×10^7 cfu/g 左右, 室温风干后, 4℃ 保存。实验前后检测菌含量无明显衰减, Bli 为 1.1×10^7 cfu/g, Gs 为 5.9×10^6 cfu/g。

1.8 地衣芽孢杆菌对肠粘膜的黏附

斑点叉尾鲴投喂灭菌饲料驯养 1 周后改为含 Bli 和 Gs 芽孢的饲料, 连续投喂 7 d。最后 1 次喂食含菌饲料的次日为第 0 天, 于第 0 天恢复投喂无菌饲料。每周解剖 3 条鱼, 制备 20% 肠内容物和肠壁匀浆液。除第 0 天的匀浆液 10 倍梯度稀释涂板计数外, 其余时间点将所有匀浆液原液涂布于营养琼脂平板, 每个平板涂布 100 μ L。52℃ 培养 48 h, 统计菌落数。其中, 第 0 天肠壁匀浆液涂板后于 25℃ 培养 72 h 统计肠壁黏附相关总活菌数。Gs 作为黏附定植实验的惰性对照^[13-14], 以其含量为参照, 定义 Bli 的相对丰度=Bli 菌含量/Gs 菌含量 $\times 100\%$ 。统

计饲料、肠内容物和肠壁 Bli 的相对丰度。

1.9 地衣芽孢杆菌在肠内容物中的生长

取 6 条斑点叉尾鲴, 制备 3 份 20% 肠内容物匀浆液和 3 份肠内容物原液, 密封后高压蒸汽灭菌。调整生理盐水洗涤的 Bli 至适宜浓度, 按 1% (v/v 或 v/w) 接种到营养肉汤、20% 内容物匀浆液和内容物原液中, 使菌含量在 1.0×10^2 cfu/mL(g) 左右。营养肉汤和 20% 匀浆液于 25℃, 150 rpm 震荡培养 72 h; 内容物原液于 25℃ 静置培养 72 h。稀释平板法检测菌含量。

1.10 统计分析

数据以平均值±标准差表示, 用 SPSS 21 软件进行统计分析, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 检验, 差异显著度为 0.05。

2 结果与分析

2.1 水体中地衣芽孢杆菌含量的监测

实验前 2 周禁食期和 1 周无菌饲料驯养期均未检测到 Bli (<1 cfu/mL); 外泼和拌饵投喂 Bli 期间, 水体中可分别检测到 $3\times10^4\sim6\times10^4$ cfu/mL 和 $0.6\times10^2\sim3.8\times10^2$ cfu/mL 的 Bli; 完全换水 1 次, 即停止外源添加 Bli 后, 直至实验结束水体中未检测到 Bli (<1 cfu/mL)。

2.2 饲料 Co⁶⁰ 辐照灭菌和菌含量检测

Co⁶⁰ 辐照灭菌饲料, 最小吸收剂量为 26.0 kGy。取灭菌前后的饲料, 检测菌含量。辐照前, 饲料含 5.5×10^4 cfu/g 的芽孢菌属细菌, 包括 1.4×10^4 cfu/g 的 Bli; 辐照后, 无活菌检出(表 1)。

表 1 饲料 Co⁶⁰ 辐照灭菌前后菌含量
Tab. 1 Bacteria concentration of feed before and after Co⁶⁰ irradiation

饲料 feed	Lg 含菌量 cell concentration		
	地衣芽孢杆菌 <i>bacillus licheniformis</i>	其它芽孢杆菌属 other bacillus	其它 others
辐照前 before irradiation	4.2±0.3	4.6±0.1	4.1±0.2
辐照后 after irradiation	N.D.	N.D.	N.D.

注: N.D. 表示未检出。

Note: N.D. means not dectected.

2.3 地衣芽孢杆菌和嗜热脂肪地芽孢杆菌的选择性培养

采用 52℃ 高温选择性培养 Bli 和 Gs。实验期间使用该培养方法仅偶尔能在水体样品中检测到 *Anoxybacillus flavithermus* (≤ 5 cfu/mL), 肠道样品中未检测到 Bli 和 Gs 以外的菌种。Bli 生长率以悬浮于生理盐水时 37℃ 平板计数的结果为对照; Bli 在 52℃ 的生长率为 91.5%, 仅略低于 37℃; 悬浮于 20% 肠内容物和肠壁匀浆时, 52℃ 生长率分别为 65.9% ($P<0.05$) 和 72.5% (图 1)。结果说明 52℃ 高温培养法可以选择性的培养 Bli, 但在肠内容物和肠壁匀浆液中生长率略低, 特别是在肠内容物匀浆液中。

Gs 重悬于 20% 肠内容物匀浆和肠壁匀浆时, 生长率分别为 77.2% ($P<0.05$) 和 98.2% (图 2)。结果说明 52℃ 高温培养法可以选择性的培养 Gs, 但在肠内容物中生长率略低。

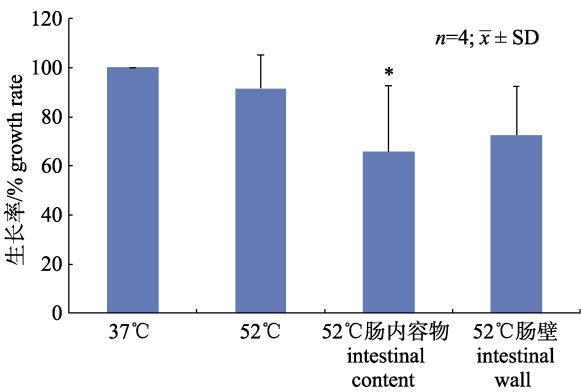


图 1 地衣芽孢杆菌在 52℃ 培养条件下的生长率
*与 37℃ 组比较 $P<0.05$.

Fig. 1 Growth rate of *Bacillus licheniformis* under 52℃
*compared with 37℃ group $P<0.05$.

2.4 地衣芽孢杆菌在斑点叉尾鲴肠道的定植规律

实验前无菌饲料驯养期肠道内容物未检测到 Bli (<1 cfu/g)。水体中每日添加 Bli 菌液 7 d 后为第 0 天, 肠道内容物 Bli 含量约 2.4×10^4 cfu/g。停止外源添加 Bli 的 14 天后, 持续喂食组 Bli 含量降至 1.7×10^2 cfu/g, 此后维持这一数量级水平至 42 d, 提示 Bli 在叉尾鲴持续进食条件下可以长期定植于肠道; 而禁食组在第 7 天检测的 3 条鱼肠内容物中, 仅 1 条鱼有 Bli 检出, 14 d 之后所有鱼

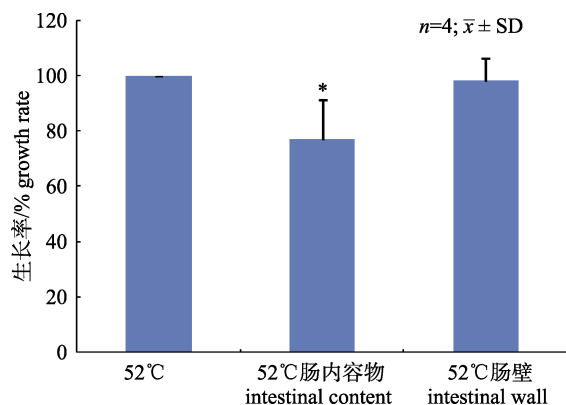


图 2 嗜热脂肪地芽孢杆菌在 52°C 培养条件下的生长率

*与 52°C 组比较 $P<0.05$.

Fig. 2 Growth rate of *Geobacillus stearothermophilus* under 52°C
*compared with 52°C group $P<0.05$.

的肠内容物均无 Bli 检出(<1 cfu/g) (图 3)。此外, 禁食组第 14 天和第 21 天的肠壁匀浆液也没有 Bli 检出(<1 cfu/g), 提示 Bli 在斑点叉尾鲴禁食条件下不能长期定植于肠道。

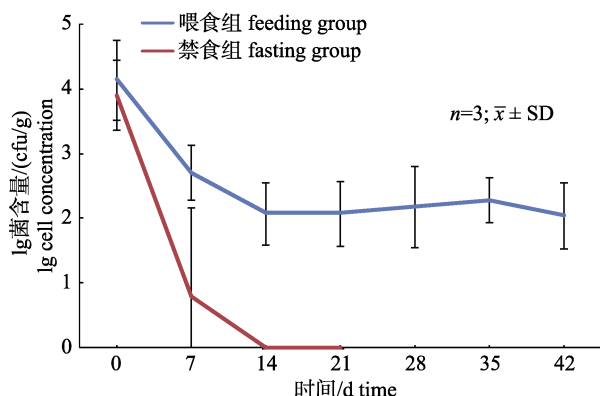


图 3 地衣芽孢杆菌在肠道内容物的消长规律

在第 7 天, 禁食组 3 条鱼仅 1 条鱼有 Bli 检出。

Fig. 3 Dynamics of *Bacillus licheniformis* in intestine
At day 7, Bli was only detected in 1/3 intestinal content preparations of fasting group.

拌饵投喂 Bli 和 Gs 芽孢的实验中, Bli 在肠内容物中的含量在第 7 天之后同样维持在约 1.3×10^2 cfu/g 左右至 28 d, 提示 Bli 可以长期定植于肠道; 而惰性对照 Gs 在第 7 天, 3 条鱼中仅 2 条鱼的肠内容物中有检出, 在第 14 天, 3 条鱼中仅 1 条鱼检测到 Gs, 在第 21 天及之后无 Gs 检出(<1 cfu/g) (图 4), 提示肠道需要 21 d 才能完全排空惰性对照。

2.5 地衣芽孢杆菌对肠粘膜的黏附

实验前无菌饲料驯养期肠道内容物未检测到

Bli 和 Gs (<1 cfu/g)。拌饵投喂含 Bli 和 Gs 芽孢的饲料 7 天后为第 0 天, 恢复投喂无菌饲料。每周检测肠内容物和肠壁上的 Bli 和 Gs (图 4)。在第 0 天, 肠道内容物 Bli 含量高达 3.5×10^7 cfu/g, 而在肠壁上黏附相关 Bli 含量仅 4.7×10^2 cfu/g。在第 7 天之后, Bli 在内容物中含量维持在约 1.3×10^2 cfu/g, 而肠壁上已无 Bli 检出(<1 cfu/g), 提示 Bli 存在于肠内容物中而不能有效黏附于肠粘膜。

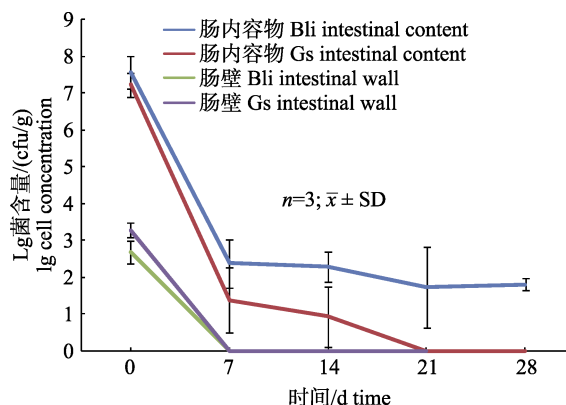


图 4 地衣芽孢杆菌和嗜热脂肪地芽孢杆菌在肠道内容物和肠壁的消长规律

在第 7 天, 3 条鱼中仅 2 条鱼的内容物检测到 Gs;

在第 14 天, 3 条鱼中仅 1 条鱼的内容物检测到 Gs。

Fig. 4 Dynamics of *Bacillus licheniformis* and *Geobacillus stearothermophilus* in intestinal content and wall
At day 7, Gs was detected in 2/3 intestinal content preparations; at day 14, Gs was detected in 1/3 intestinal content preparations.

进一步分析第 0 天肠内容物和肠壁中 Bli 和 Gs 的比例(图 5)。以 Gs 的数量为内参, 肠内容物

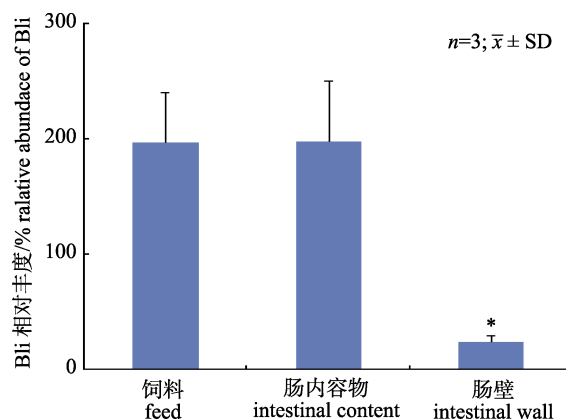


图 5 地衣芽孢杆菌在肠内容物和肠壁上的相对丰度

*与饲料组比较 $P<0.05$.

Fig. 5 Relative abundance of *Bacillus licheniformis* in intestinal content and wall

* compared with feed group $P<0.05$.

中 Bli 的相对丰度为 197.9%, 略高于饲料中的 186.4%; 而肠壁上 Bli 相对丰度仅为 23.7% ($P < 0.05$), 明显低于饲料和肠内容物中的丰度。即便考虑到 Bli 在 20% 肠壁匀浆的生长率小于 Gs (72.5% Vs 98.2%, $P < 0.05$) (图 1, 图 2), 肠壁上的 Bli 相对丰度也远低于饲料。此外, 分析肠壁上黏附相关细菌的组成, Bli 占总活菌数的比例仅为 $0.6 \pm 0.4\%$ ($n=3$; $\bar{x} \pm SD$)。提示 Bli 不能有效黏附于肠粘膜。

2.6 地衣芽孢杆菌在肠内容物中的生长

使用肠内容物为培养基在试管中培养 Bli, 初始接种量约 1.0×10^2 cfu/mL。Bli 在 20% 肠内容物匀浆液中可生长至 1.9×10^9 cfu/mL, 略高于营养肉汤的 4.9×10^8 cfu/mL; 在肠内容物原液中可生长至 2.0×10^7 cfu/g (图 6)。提示 Bli 在肠内容物中具有很强的增殖潜能。

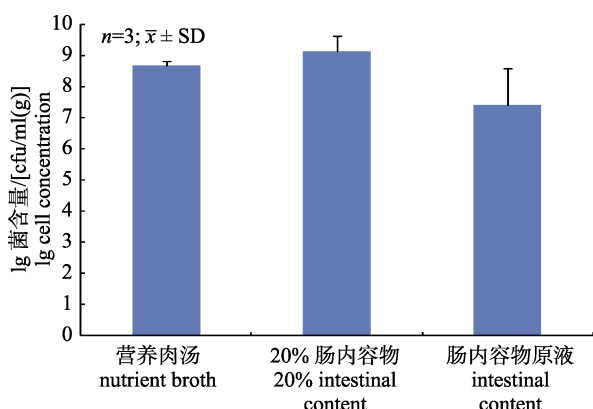


图 6 地衣芽孢杆菌在肠内容物中的生长

Fig. 6 Growth of *Bacillus licheniformis* in intestinal content

3 讨论

3.1 每周完全换水可有效控制水体中地衣芽孢杆菌含量

相比陆生动物, 鱼类肠道菌群更容易受环境影响^[2, 15]。Merrifield 等^[4-5]在研究拌饵投喂 Bli 和枯草芽孢杆菌时发现, 72 h 换水 15% 的循环水系统中仍含有 7.4×10^3 cfu/mL 芽孢菌, 并建议应提高换水量以减少背景影响。通过每周 100% 换水, 可以将水体中 Bli 含量减少至低于检出限 (< 1 cfu/mL)。当然, 完全换水必然会增加环境应激, 其对微生

物定植的影响有待进一步研究。

3.2 Co^{60} 辐照灭菌能够消除饲料中芽孢杆菌对实验的干扰

食物中的微生物是鱼类肠道微生物的重要来源, 特别是对严苛自然环境和鱼类胃肠环境均有较强耐受性的芽孢菌属。我国饲料卫生标准规定饲料菌含量 $< 2 \times 10^6$ cfu/g 即合格^[16], 而实验中所用饲料含 5.5×10^4 cfu/g 的芽孢菌属细菌, 包括 1.4×10^4 cfu/g 的 Bli。Merrifield 等^[4-5]研究拌饵投喂芽孢菌和尿肠球菌对虹鳟肠道菌群的影响, 发现投喂了对照饲料的鱼肠道也检出了芽孢菌和尿肠球菌。Balcázar 等^[17]研究外源添加乳酸菌在鱼肠道的动态变化时, 发现未添加乳酸菌的对照组鱼肠道也偶有乳酸菌检出。Merrifield 等^[5]认为对照组肠道内分离到的芽孢菌和乳酸菌有可能是鱼的内源性定植菌, 但我们认为不能排除是经饲料摄入的过路菌。所以, 益生菌定植研究最好使用 Co^{60} 辐照灭菌处理的饲料, 从而减少实验的干扰因素。

3.3 52℃ 高温选择性培养地衣芽孢杆菌的方法具有较高的灵敏度和特异性

52℃ 高温培养法可以有效抑制 Bli 以外的肠道和水体细菌的生长, 实验期间仅偶尔能在水体中检测到 *Anoxybacillus flavithermus*; 以 37℃ 菌落数为对照, 52℃ 生长率达 91.5%, 在 20% 内容物和肠壁匀浆液中也能达到 65.9% 和 72.5%, 说明此方法可以灵敏而特异的检测肠道和水体中 Bli。这样一来, 1 g 肠道样品制备成约 5 mL 的 20% 匀浆液, 100 μL 涂板 50 个, 检出限就可以接近 1 cfu/g, 只要控制实验鱼规格以控制肠道样品的重量, 肠道中存在 1 个活菌, 就可以被检出。Almeida 等^[18]报道了一种基于 qPCR 监测鱼肠道 Bli 数量的方法, 检出限为 2.5×10^2 cfu/reaction。其它方法如 PCR 变性梯度凝胶电泳 (PCR denaturing gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE)^[19]、荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 和高通量测序^[20]用于检测鱼类肠道中细菌数量的灵敏度能达到何种程度仍是个疑问, 尚未见资料给出明确的检出限。且也有研究提示 PCR-DGGE 的灵敏度尚不及传统培养法^[19]。

3.4 喂食/禁食条件下地衣芽孢杆菌定植性的区别在于其不能黏附于肠粘膜但可以在肠内容物中增殖

Marteau 和 Vesa^[13]指出, 研究益生菌在肠道的定植能力有必要使用惰性对照, 益生菌在肠道内的维持时间需要比惰性对照长才能认为是可以定植的。Gs 芽孢是惰性对照的优秀候选, 因其在肠道内既不会萌发生长也不会被破坏, 且可以很容易地通过 50~70℃ 高温选择性培养进行平板计数^[13-14]。在持续进食无菌饲料的条件下, 经水体外源添加的 Bli 可以在叉尾鲴肠道内维持至少 42 d; 拌饵投喂的 Bli 同样在叉尾鲴肠道内维持至少 28 d, 而一同拌饵投喂的惰性对照 Gs 芽孢则 21 d 后就从肠道彻底消失了。这些数据提示 Bli 可以长期定植于肠道。但是在禁食状态下, 经水体外源添加的 Bli 在 14 d 后就被彻底从肠道内清除了, 又提示 Bli 不能定植于叉尾鲴肠道。

微生物能否定植于肠道取决于两个因素——黏附能力和繁殖能力, 其增殖速度不低于肠道排泄速度就可以长期定植于肠道^[2]。Merrifield 等^[4-5]拌饵投喂 Bli 和枯草芽孢杆菌后, 培养法检测虹鳟肠粘膜上黏附的芽孢杆菌, 含量为 $5.5\sim 7.1\times 10^3$ cfu/g, 占粘膜总菌量的 36~75%, 提示其可以有效黏附于肠粘膜。但这很可能是肠壁粘膜洗涤不充分造成的假象。因为 Merrifield 等^[10]使用透射电镜并未在肠道上皮细胞表面观察到 Bli 的黏附。且我们的实验数据也显示肠粘膜上的 Bli 仅占粘膜总菌量的(0.6±0.4)%。此外, 在以 Gs 为惰性对照的拌饵投喂实验中, Bli 在内容物中相对丰度为 197.9%, 略高于饲料中的 186.4%, 而在肠壁粘膜上 Bli 相对丰度仅为 23.7%, 同样说明 Bli 不能有效黏附于肠粘膜。但是, 这一数据也提示了惰性对照 Gs 在斑点叉尾鲴肠道并非完全“惰性”, 可能存在一定本底黏附力。最后, 长期监测数据显示 7 天后仅能在内容物中检出 Bli, 而肠壁上无 Bli 检出, 也说明 Bli 只存在于内容物而不能有效黏附于肠粘膜。Merrifield 等^[10]提出假说认为不能黏附于上皮细胞的 Bli 可能通过在粘液层中快速增殖以维持稳定的种群数量。我们发现经灭菌的肠内容物原液可以有效支持 Bli 由 1.0×10^2 cfu/g

生长至 2.0×10^7 cfu/g, 提示 Bli 在肠内容物中有很强增殖潜能。这一数据支持 Merrifield 提出的假说。今后使用非灭菌肠内容物体外培养 Bli, 或是更进一步直接观察 Bli 在体内的增殖情况将为这一假说提供更有说服力的证据。需要指出的是, 在肠道上皮和内容物之间尚有一层厚度不一的黏液层, 是肠道微生物定植的重要位置。我们制备的肠道内容物很可能包含了大部分的黏液层物质, 也就是说, 在进食状态下, Bli 究竟定植于粘液层还是内容物仍有待进一步的研究。

综上所述, 因为 Bli 不能有效黏附于肠粘膜但可以在肠内容物中增殖, 所以在进食条件下, Bli 利用丰富的食糜通过较强的繁殖能力弥补黏附能力的不足, 最终定植于肠道; 而在禁食条件下, 本就缺乏黏附能力的 Bli 又缺乏用于增殖的营养, 最终不能定植于肠道。

参考文献:

- [1] Gatesoupe F J. The use of probiotics in aquaculture[J]. Aquaculture, 1999, 180(1-2): 147-165.
- [2] Li X M, Ringø E, Hoseinifar S H, et al. The adherence and colonization of microorganisms in fish gastrointestinal tract[J]. Reviews in Aquaculture. (2018-03-25) [2019-03-07]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/raq.12248>.
- [3] Merrifield D L, Dimitroglou A, Foey A, et al. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids[J]. Aquaculture, 2010, 302(1-2): 1-18.
- [4] Merrifield D L, Bradley G, Baker R T M, et al. Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) II. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria postantibiotic treatment[J]. Aquaculture Nutrition, 2010, 16(5): 496-503.
- [5] Merrifield D L, Dimitroglou A, Bradley G, et al. Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum): I. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria[J]. Aquaculture Nutrition, 2010, 16(5): 504-510.
- [6] Gobi N, Vaseeharan B, Chen J C, et al. Dietary supplementation of probiotic *Bacillus licheniformis* Dahb1 improves growth performance, mucus and serum immune parameters, antioxidant enzyme activity as well as resistance against *Aeromonas hydrophila* in tilapia *Oreochromis mossambicus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 74: 501-508.

- [7] Gobi N, Malaikozhundan B, Sekar V, et al. GFP tagged *Vibrio parahaemolyticus* Dahv2 infection and the protective effects of the probiotic *Bacillus licheniformis* Dahb1 on the growth, immune and antioxidant responses in *Pangasius hypophthalmus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 52: 230-238.
- [8] Raida M K, Larsen J L, Nielsen M E, et al. Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* (BioPlus2B)[J]. Journal of Fish Diseases, 2003, 26(8): 495-498.
- [9] El-Haroun E R, Goda A M A S, Kabir Chowdhury M A. Effect of dietary probiotic Biogen®; supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.)(J). Aquaculture Research, 2006, 37(14): 1473-1480.
- [10] Merrifield D L, Harper G M, Dimitroglou A, et al. Possible influence of probiotic adhesion to intestinal mucosa on the activity and morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) enterocytes[J]. Aquaculture Research, 2010, 41(8): 1268-1272.
- [11] Vos D P, Garrity M G, Jones D, et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology[M]. 2nd edition. New York: Springer Science/Business Media, 2009, 3: 108.
- [12] Vos D P, Garrity M G, Jones D, et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology[M]. 2nd edition. New York: Springer Science/Business Media, 2009, 3: 154.
- [13] Marteau P, Vesa T. Pharmacokinetics of probiotics and biotherapeutic agents in humans[J]. Bioscience and Microflora, 1998, 17(1): 1-6.
- [14] Vesa T, Pochart P, Marteau P. Pharmacokinetics of *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826, *Lactobacillus fermentum* KLD, and *Lactococcus lactis* MG 1363 in the human gastrointestinal tract[J]. Alimentary Pharmacology and Therapeutics, 2000, 14(6): 823-828.
- [15] Ringø E, Zhou Z, Vecino J L G, et al. Effect of dietary components on the gut microbiota of aquatic animals. A never ending story?[J]. Aquaculture Nutrition, 2016, 22(2): 219-282.
- [16] General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Hygienical Standard for Feeds: GB 13078-2017[S]. Beijing: Standards Press of China, 2018: 5. [中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 饲料卫生标准: GB 13078-2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018: 5.]
- [17] Balcázar J L, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, et al. Changes in intestinal microbiota and humoral immune response following probiotic administration in brown trout (*Salmo trutta*)[J]. British Journal of Nutrition, 2007, 97(3): 522-527.
- [18] Almeida E, Serra C R, Albuquerque P, et al. Multiplex PCR identification and culture-independent quantification of, *Bacillus licheniformis*, by qPCR using specific DNA markers[J]. Food Microbiology, 2018, 74: 1-10.
- [19] Ferguson R M W, Merrifield D L, Harper G M, et al. The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of on-growing red tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 109(3): 851-862.
- [20] Xia Y, Lu M X, Chen G, et al. Effects of dietary *Lactobacillus rhamnosus* JCM1136 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM5805 on the growth, intestinal microbiota, morphology, immune response and disease resistance of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 76: 368-379.

Colonization of *Bacillus licheniformis* A1 in intestine of *Ictalurus punctatus*

ZHANG Hongyu^{1,2,3,4}, WANG Haibo⁵, ZHAO Mingjun², JIAO Liting⁵, HU Kun^{1,3,4}, YANG Xianle^{1,3,4}, XIA Lei^{2,5}

1. National Pathogen Collection Center for Aquatic Animals, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100141, China;
3. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
4. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 201306, China;
5. Beijing Season Aquaculture BioTech. Co. Ltd., Beijing 102488, China

Abstract: *Bacillus licheniformis* (Bli) has been widely used as a probiotic and has positive effects on host health of different fish species. The ability to colonize the gastrointestinal tract is an important criterion for probiotic screening, but little attention has been paid to this character. To investigate the colonization characteristics of Bli-A1, full water exchange and feed sterilization with Co⁶⁰ irradiation were employed to avoid their influence on the gastrointestinal microbiome of *Ictalurus punctatus*. A high temperature selective culture method for Bli was assessed for its sensitivity and specificity, and then it was employed to investigate the dynamic characters of exogenous Bli-A1 in the intestine for 42 days with or without fasting. The spores of *Geobacillus stearothermophilus* were used as an inert control to investigate the adhesion ability of Bli-A1 to mucosa in a feeding trial with Bli/Gs=186.4% in feed, and non-adhesion bacteria were removed by washing the intestinal wall. Then, Bli-A1/Gs on the intestinal content and wall were calculated. At last, the potential of Bli-A1 multiplying in the intestine was assessed with a sterile intestinal content culturing assay *in vitro*. With a full water exchange and feed sterilization, the concentration of Bli was reduced to <1 cfu/mL in water and not detected in feed (1.4×10^4 cfu/g before irradiation). Selective culture for Bli-A1 was successful at 52°C with a growth rate at $91.5 \pm 13.7\%$ in water, $65.9 \pm 26.7\%$ in 20% intestinal content homogenate, and $72.5 \pm 19.7\%$ in 20% intestinal wall homogenate. It took 21 days for the inert Gs control to be completely excreted from the intestine after withdrawing exogenous supplement ($n=3$, <1 cfu/intestine). When exogenous Bli-A1 supplement was withdrawn, the concentration of Bli-A1 in the intestinal content was sustained at $\sim 3.3 \times 10^2$ cfu/g for at least 42 days with continuous sterile feed supplement, whereas no Bli-A1 was detected at 14 days under fasting conditions. In the Bli-A1/Gs feeding trial, Bli-A1 in intestinal content was detectable to at least 28 days after exogenous Bli-A1 withdrawal. Adhesion-related Bli-A1 on the intestinal wall was undetectable at 7 days. At day 0, Bli-A1/Gs was equal to 197.9% in intestinal content, which was similar with the 186.4% in feed. Bli-A1/Gs was equal to 23.7% on the intestinal wall. Although Bli-A1 failed to adhere to mucosa and its adhesion ability was even weaker than that of the inert control, it grew well in intestinal content and reached a concentration of 2.0×10^7 cfu/g *in vitro*. In conclusion, Bli-A1 can colonize the intestine of *Ictalurus punctatus* long-term, unless the fish are fasted. That is because Bli-A1 possessed the ability to grow in intestinal content but fails to effectively adhere to mucosa.

Key words: *Bacillus licheniformis*; *Ictalurus punctatus*; colonization; cell adhesion; gastrointestinal microbiome; *Geobacillus stearothermophilus*; Co⁶⁰ irradiation sterilization

Corresponding author: YANG Xianle. E-mail: xlyang@shou.edu.cn; XIA Lei. E-mail: xialei666@126.com