第 15 卷第 5 期
2019 年 10 月

南 方 水 产 科 学
South China Fisheries Science

Vol.15，No.5
Oct.，2019

doi: 10.12131/20190012

文章编号：2095－0780－（2019）05－0118－08

• 研究简报 •

2 株乳酸菌抑菌作用研究及安全性评价

陈　凯[1]，朱璐丹[1,2]，谭宏亮[1,3]，黄东宇[1,3]，习丙文[1,3]，潘良坤[1]，谢　骏[1,2,3]

（1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心，农业农村部淡水渔业与种质资源利用重点实验室，江苏 无锡 214081；
2. 上海海洋大学水产与生命学院，上海 201306；3. 南京农业大学无锡渔业学院，江苏 无锡 204182）

摘要：该研究利用无菌操作技术对 2 株乳酸菌 [乳酸菌 S60 (干酪乳杆菌 *Lactobacillus casei*) 和 S72 (植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum*)] 开展了常规生化检测、药敏实验、体外抑菌实验和动物实验，验证了其作为渔用益生菌的可行性和安全性。结果显示，2 株乳酸菌均能在 pH 为 4.5 和 0.1% 的胆盐环境中存活，对水产动物常见病原菌嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 等均有一定的抑制作用，且抑菌物质分析结果显示，其有效抑菌物质与其代谢过程中产生的有机酸类相关。安全性评价实验结果显示 2 株乳酸菌无分解明胶和溶血的能力。死亡统计和血液生化指标结果显示，高达 $1.0{\times}10^9$ CFU·mL^{-1} 的活菌腹腔注射攻毒并未引起实验鱼类 [异育银鲫 (*Carassius auratus*)] 的严重死亡和机体损伤。可见 2 株乳酸菌作为口服益生菌具有较高的安全性。此外，耐药特性研究表明，2 株乳酸菌对所用药物中的氨基糖苷类和磺胺甲噁唑耐受能力强，对氨苄青霉素、恩诺沙星、氟苯尼考和多西环素敏感。因此，2 株乳酸菌的应用需要注意管理过程中药物的选择。

关键词：乳酸菌；益生特性；安全性；药敏实验

中图分类号：S 917.1　　**文献标志码：**A　　**开放科学（资源服务）标识码（OSID）：**

Bacteriostasis and safety evaluation of two lactic acid bacteria

CHEN Kai[1], ZHU Ludan[1,2], TAN Hongliang[1,3], HUANG Dongyu[1,3], XI Bingwen[1,3], PAN Liangkun[1], XIE Jun[1,2,3]

(1. *Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization*, *Ministry of Agriculture and Rural Affairs*; *Freshwater Fisheries Research Center*, *Chinese Academy of Fishery Sciences*, *Wuxi* 214081, *China*; 2. *College of Fisheries and Life Science*, *Shanghai Ocean University*, *Shanghai* 201306, *China*; 3. *Wuxi Fisheries College*, *Nanjing Agricultural University*, *Wuxi* 214081, *China*)

Abstract: In this study, two strains of lactic acid bacteria [*Lactobacillus casei* (S60) and *L. plantarum* (S72)] were tested by aseptic technique, including routine biochemical detection, susceptibility test, *in vitro* bacteriostasis test and animal experiment. Their feasibility and safety as probiotics for fishing were also verified. Results show that the two lactic acid bacteria could tolerate acid (pH 4.0) and bile salt (0.1%), and exhibit different antibacterial activities against six pathogens including *Aeromonas hydrophila*. The results of antimicrobial substances analysis shows that the effective antimicrobial substances were related to the organic acids produced in metabolic process. The results of safety evaluation shows that the two strains of lactic acid bacteria had no ability to decompose gelatin and hemolysis. The results of death statistics and blood biochemical indicators show that the intraperitoneal injection of live bacteria as high as $1.0{\times}10^9$ CFU·mL^{-1} did not cause serious death and body injury in experimental fish. It is included that the two

收稿日期：2019-01-14；**修回日期：**2019-04-10

资助项目：中国水产科学研究院基本科研业务费专项资金 (2017HY-ZD0506)；现代农业产业技术体系建设专项资金 (CARS-45)；江苏省农业科技自主创新项目 [X (17) 2027]

作者简介：陈　凯 (1990—)，男，硕士研究生，从事水产动物病害学研究。E-mail: kaiaitg2009@163.com

通信作者：谢　骏 (1966—)，男，研究员，从事水产动物疾病研究。E-mail: xiej@ffrc.cn

strains of lactic acid bacteria have high safety as oral probiotics. Drug resistance studies show that the two strains of lactic acid bacteria had strong tolerance to aminoglycosides and sulfamethoxazole, and were sensitive to ampicillin, enrofloxacin, florfenicol and doxycycline. Therefore, the application of the two strains of lactic acid bacteria should pay attention to the selection of drugs in management process.

Key words: lactic acid bacteria; probiotic properties; safety; drug susceptibility test

细菌性疾病会对水产养殖业造成重大经济损失，目前水产动物细菌性疾病的治疗仍以抗生素为主，但由于不科学的药物使用，目前水产病原菌的耐药问题十分严重[1-2]。乳酸菌作为一类普遍认同的益生菌，其生长过程中能产生细菌素、过氧化氢和有机酸等代谢产物，这些代谢产物能抑制病原菌的繁殖和生长[3]。因此，作为一种抗生素替代物的乳酸菌受到越来越多的关注。

乳酸菌应用于水产行业以来，研究多集中于促进水产动物生长、提高动物免疫力等方面，而其益生特性的研究则多集中于水产动物肠道定植、体外抑菌[4] 以及对消化道低 pH[5] 和胆盐[6] 环境的适应性方面。但乳酸菌是一类能利用可发酵糖产生大量乳酸的细菌统称，现有研究显示这类细菌中包含能分解明胶、导致溶血的致病菌[7]；此外，细菌耐药基因转移的情况普遍存在[8]，且已有研究指出大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和乳链球菌 (*Streptococcus lactis*) 之间能转移卡那霉素抗性[9]。因此，以具有溶血、分解明胶能力或耐药特性未知的乳酸菌菌株作为口服益生菌对机体有严重的安全隐患。目前对于水产领域应用乳酸菌的安全性评估相对薄弱，尤其是相关菌株耐药性的研究鲜有报道。故本研究对实验室保存的 2 株乳酸菌 [乳酸菌 S60 (干酪乳杆菌 *Lactobacillus casei*) 和 S72 (植物乳杆菌 *L. plantarum*)] 开展益生特性和安全性研究，评价其作为鱼类口服益生菌的可行性，为其后续的实际应用提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　主要材料和仪器

实验中所用乳酸菌 S60、S72 和指示菌嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)、维氏气单胞菌 (*A. veronii*)、无乳链球菌 (*S. agalactiae*)、迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*)、创伤弧菌 (*Vibrio vulnificus*)、副溶血弧菌 (*V. parahemolyticus*) 均由本实验室分离保存，且经 16S rDNA 和常规细菌学鉴定。

1.1.1　试剂　LB 培养基、MRS 培养基、BHI 培养基均购于青岛高科技工业园海博生物科技有限公司，明胶培养基 (杭州滨和微生物试剂有限公司)，血平板 (广东环凯微生物科技有限公司)，牛胆盐 (胆酸质量分数≥60%，叶源生物)，5% 脱纤维绵羊血 (南京森贝伽生物科技有限公司)，氨苄青霉素 (USP 级)、硫酸卡那霉素 (USP 级)、链霉素 (720 IU·mg^{-1})、恩诺沙星 (质量分数 98%)、氟苯尼考 (质量分数 98%) 和盐酸多西环素 (质量分数≥98%) 均购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司，磺胺甲噁唑 (质量分数 98%，上海麦克林生化科技有限公司)。血液生化试剂盒 [(谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、乳酸脱氢酶 (LDH)] 均购于上海执诚生物科技有限公司。

1.1.2　仪器　全波长酶标仪 (Multiskan G，Thermo Scientific)，高速冷冻离心机 (赛默飞世尔科技有限公司)，细菌浊度仪 SGZ-6AXJ (上海悦丰仪器仪表有限公司)，全自动生化分析仪 BS-400 (深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司)，智能生化培养箱 (无锡华泽科技有限公司)，震荡培养箱 ZQL-180S (上海知楚仪器有限公司)。

实验鱼为异育银鲫 (*Carassius auratus*)，由中国水产科学研究院淡水渔业研究中心南泉基地提供，鱼体健康无伤，体质量为 (150±12) g，体长为 (17±3) cm (n=100)。实验前，异育银鲫于循环养殖系统中暂养 2 周，水温为 (26±1) ℃，持续充氧，光周期同自然光，使用商品化颗粒饲料饲喂，日投饵量按体质量的 3% 计算，一天 3 次。

1.2　生长曲线与产酸能力

取乳酸菌菌种于 MRS 培养基中过夜培养活化 (30 ℃、180 r·min^{-1})，次日将活化好的培养物 100 μL 接入 5 mL 新鲜 MRS 培养基 (30 ℃、180 r·min^{-1}) 培养 18 h，然后按 1∶100 稀释作为菌种，再以 20 μL·mL^{-1} 接种，设置 3 个平行。分别在接种后的第 0、第 3、第 6、第 9、第 12、第 15、第 24、第 27、第 30、第 33 和第 36 小时取菌液，使用酶标仪测定光密度 (OD_{600})。以时间为横坐标，OD_{600} 为纵坐标，绘制生长曲线。同时在接种后的第 0、第 12、第 24、第 36、第 48、第 60 和第 72 小时检测发酵液 pH，评价其产酸能力。

1.3　压力耐受能力

参照杨媛媛等[10] 方法检测耐酸能力；参照任世英等[11] 方法制备含乳酸菌的 MRS 平板以检测菌株胆盐耐受能力。

1.4　抑菌活性

1.4.1　抑菌能力评价　选择常见的水产病原菌——嗜水气单胞菌、维氏气单胞菌、无乳链球菌、迟缓爱德华氏菌、创伤弧菌、副溶血弧菌作为指示菌，参照杨媛媛等[10] 方

法，检测实验菌株的抑菌能力。最终将数据统一调整至菌斑直径为 5 mm 时的抑菌直径。计算公式为抑菌直径=(抑菌圈直径$_1$/菌斑直径$_1$+抑菌圈直径$_2$/菌斑直径$_2$+抑菌圈直径$_3$/菌斑直径$_3$)/3×5。

1.4.2 抑菌物质检测 参照任世英等[11] 方法制备含指示菌的 LB 琼脂平板，对发酵液进行预处理以分析其所含抑菌物质特性。

1.5 安全性评价

1.5.1 明胶实验 将含实验菌的菌液接种于明胶培养基，30 ℃ 培养 48 h，取出置于 4 ℃ 30 min。取出检查明胶培养基的状态；同时设置阴性对照组 (以无菌生理盐水代替实验菌) 和阳性对照组 (以嗜水气单胞菌代替实验菌)。接种实验菌的明胶培养基与阴性对照一样为完全凝固的状态，表示实验菌不分解明胶，若同阳性对照一样完全呈液态则表明实验菌能分解明胶，介于两者之间呈半固体则表明实验菌有较弱的分解明胶的能力。

1.5.2 溶血实验 将活化的菌株划线接种于含有体积分数为 5% 脱纤维绵羊血的血琼脂平板上，30 ℃ 倒置培养 24~48 h，观察记录菌落周围是否有溶血的透明圈。为避免实验菌产酸引起的溶血对血平板结果造成干扰，参照 Mao 等[12] 的方法同时开展体外溶血实验。

1.5.3 药敏实验 同 1.4.2 制备含实验菌的 MRS 平板，打孔备用 (每个平板打孔 5 个)。以生理盐水配置抗生素质量浓度为 256 μg·mL^{-1}、128 μg·mL^{-1}、64 μg·mL^{-1}、32 μg·mL^{-1}和 16 μg·mL^{-1} 的药液，按 150 μL 每孔加入到之前准备好的含实验菌的 MRS 平板，每个浓度重复 3 次。4 ℃ 扩散 4 h后，转入培养箱 30 ℃ 培养 48 h 后，测量记录抑菌圈直径，判读其抗生素耐受能力。

1.5.4 动物实验 将过夜培养的乳酸菌和嗜水气单胞菌，以 5 000 r·min^{-1} 离心 10 min 收集菌体，PBS 缓冲液洗涤 3 次。以 PBS 缓冲液调节乳酸菌浓度为 1.0×10^9 CFU·mL^{-1}，嗜水气单胞菌浓度为 5.0×10^6 CFU·mL^{-1}。设置 4 个处理组，每组 3 个平行，每个平行 10 尾鱼 [空白对照组、S60 组、S72 组和嗜水气单胞菌 (A.h) 组]。对实验组每尾银鲫腹腔注射 0.5 mL 菌液，阴性对照组腹腔注射 0.5 mL PBS 缓冲液。每天定时检查实验鱼的死亡情况，持续观察 96 h。96 h 后将实验鱼捞出，麻醉 (MS-222 100 mg·mL^{-1}) 检查鱼体，尾椎静脉取血，4 ℃、5 000 r·min^{-1} 离心 10 min 收集血浆供血液生化检测 (ALT、AST 和 LDH)，剖检成活的实验鱼，观察内脏器官有无病变。

1.6 数据统计

实验数据差异性分析使用 SPSS 24.0 统计软件中的单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 和独立样本 *t*-检验分析，显著性水平设置为 P<0.05。

2 结果

2.1 生长曲线

乳酸菌 S60 和 S72 的生长曲线呈典型的“S”形，可以观察到明显的迟缓期、对数生长期和稳定期 (图 1)。从 S72 生长曲线上可以发现其迟缓期约为 6 h，S60 的迟缓期约为 9 h，明显长于 S72。表明在相同培养条件下，S72 具有更快的生长速度，这与菌落形态方面的结果一致。

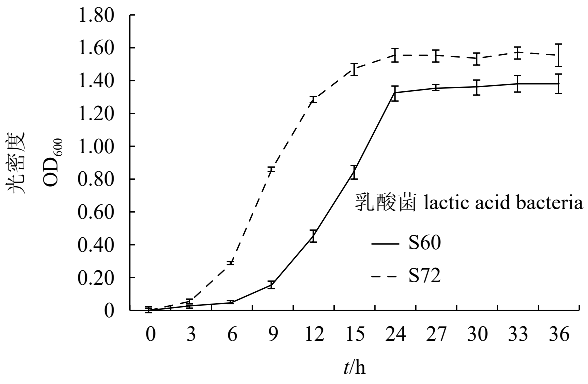

图1 生长曲线

Fig.1 Growth curve

2.2 产酸能力

发酵液 pH 检测结果显示，乳酸菌 S60 和 S72 这 2 株的产酸最大值均出现在培养第 24 小时附近，2 株乳酸菌的产酸能力基本一致，最低 pH 均约 4.0 (图 2)。

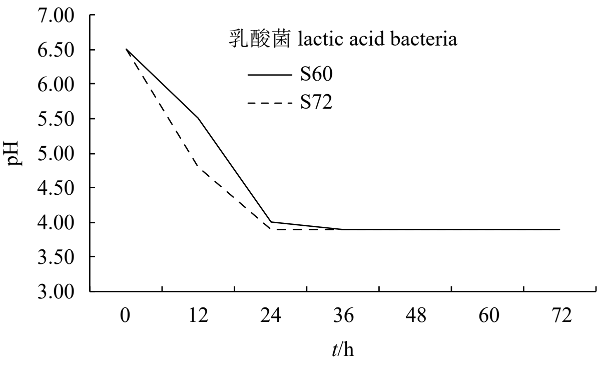

图2 2株乳酸菌的产酸能力

Fig.2 Acid production of two strains of lactic acid bacteria

2.3 压力耐受能力

耐酸实验结果显示乳酸菌 S60 和 S72 经 pH 为 4.5 的 PBS 处理 2 h 后均能成活，由此显示 2 株乳酸菌能耐受 pH

为 4.5 的酸性环境。胆盐耐受实验结果显示，乳酸菌 S60 和 S72 能完全耐受 0.1% 的胆盐浓度，而在胆盐浓度>0.2% 时，其生长受到了一定程度的抑制，可以观察到明显的抑菌圈 (表 1)。

表1　乳酸菌对酸、胆盐的耐受能力

Tab.1　Acid and bile tolerance of two strains of lactic acid bacteria　　***n*=3**

pH	乳酸菌 lactic acid bacteria		胆盐/% bile salt	抑菌圈直径/mm inhibition zone diameter	
	S60	S72		S60	S72
3.5	−	−	0	8	8
4.5	+	+	0.1	8	8
5.5	+	+	0.2	12	12
7.4	+	+	0.3	15	16
			0.5	19	19

注：−. 无菌生长；+. 有菌生长

Note: −. bacteria can not grow; +. bacteria can grow

2.4　抑菌物质检测

用嗜水气单胞菌作为指示菌，以 1 mol·L^{-1} 氢氧化钠 (NaOH) 加热、胰蛋白酶和蛋白酶 K 分别处理发酵液上清作为实验组，未处理的发酵上清液为对照组，测定抑菌圈大小。结果显示，对照组有明显的抑菌圈，而实验组无。说明 2 株乳酸菌主要通过发酵过程中产生的有机酸 (低 pH) 实现了对嗜水气单胞菌的抑制作用。

2.5　抑菌活性

抑菌实验结果显示，2 株乳酸菌均能不同程度地抑制 6 株指示菌的生长 (表 2)，其中对嗜水气单胞菌、维氏气单胞菌和创伤弧菌的抑菌能力最强，对副溶血弧菌的抑菌效果次之，对无乳链球菌和迟缓爱德华氏菌的抑菌能力最弱。2 株乳酸菌在同一种病原菌中的抑菌效果差异不显著 (P>0.05)，而同一乳酸菌菌株对不同病原菌的抑菌效果差异显著 (P<0.05)。

2.6　安全性评价

划线接种血平板 24 h 后，2 株乳酸菌形成的菌落周围无明显变化，阳性对照组 (嗜水气单胞菌) 菌落周围出现了明显的透明圈。第 48 小时菌落周围颜色变淡，无明显透明圈出现，阳性对照组的透明圈进一步增大 (图 3)。体外溶血实验显示，2 株乳酸菌发酵液的溶血率与对照组无显著差异，溶血率约 5.0%，而嗜水气单胞菌发酵液引起的溶血率显著高于对照组 (P<0.05)，溶血率约 72.0% (图 4)。由此可见 2 株乳酸菌不存在溶血相关的毒力因子，也不存在溶血方面的隐患。

2 株乳酸菌接入明胶培养基培养 48 h 后，经 4 ℃ 处理，与阴性对照组一样仍然保持凝固状态，而接种指示菌 (嗜水气单胞菌) 的阳性对照组呈液态 (图 5)。由此显示 2 株乳酸菌均无降解明胶的能力，不存在相关风险。

药敏实验结果显示，2 株乳酸菌总体上对硫酸卡那霉

表2　乳酸菌对鱼源致病菌的抑菌活性

Tab.2　Antimicrobial activity of two strains of lactic acid bacteria against six fish pathogens　　**$\overline{X}$±SD, *n*= 5**

致病菌 pathogens	抑菌圈直径/mm inhibition zone diameter	
	S60	S72
嗜水气单胞菌 *A. hydrophila*	26.88±2.43^{b}	24.9±1.48^{C}
维氏气单胞菌 *A. veronii*	28.85±2.45^{b}	28.25±2.46^{B}
创伤弧菌 *V. vulnificus*	33.87±1.96^{a}	35.6±1.07^{A}
无乳链球菌 *S. agalactiae*	8.33±2.38^{d}	9.7±0.96^{E}
副溶血弧菌 *V. parahemolyticus*	15.23±0.78^{c}	13.1±1.82^{D*}
迟缓爱德华氏菌 *E. tarda*	9.23±2.42^{d}	13.05±1.92^{D*}

注：不同大小写字母表示 2 株乳酸菌分别针对不同病原菌的抑菌能力的差异显著 (P<0.05)；*.　2 株乳酸菌对同一病原菌的抑菌能力差异显著 (P<0.05)

Note: Different letters indicate statistical difference in bacteriostatic ability of the same lactobacillus strain among different pathogenic bacteria (P<0.05); *. statistical difference in bacteriostatic ability of different lactobacillus strains on the same pathogenic bacteria (P<0.05)

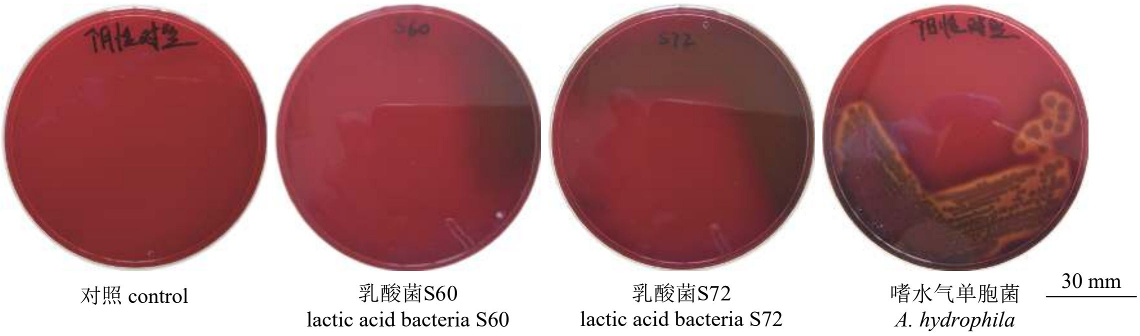

图3 2株乳酸菌在血平板上的溶血表现

Fig.3 Hemolysis activity of two strains of lactic acid bacteria on blood plate

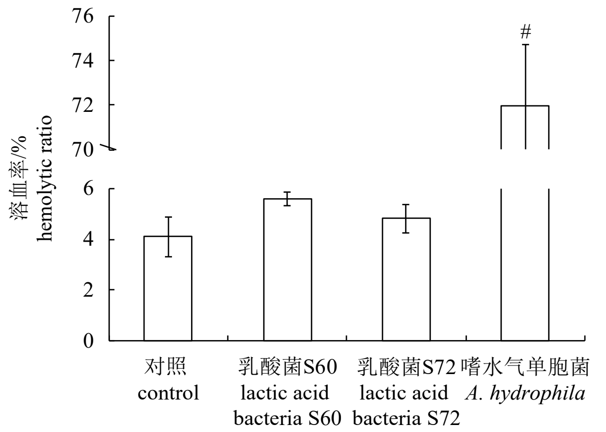

图4 2株乳酸菌的溶血能力

Fig.4 Hemolytic activity of two strains of lactic acid bacteria

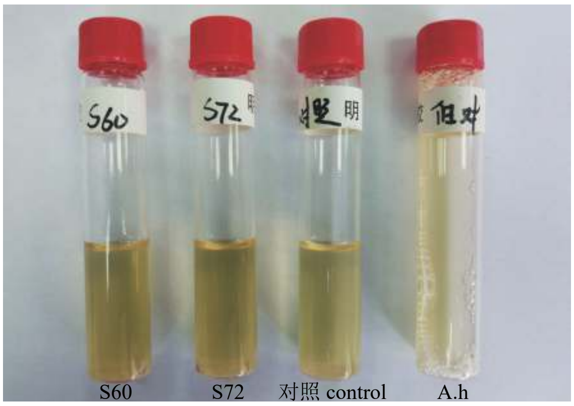

图5 2株乳酸菌分解明胶的能力

Fig.5 Gelatinolytic activity of two strains of lactic acid bacteria

素、链霉素和磺胺甲噁唑耐药，对氨苄青霉素、恩诺沙星、氟苯尼考和多西环素敏感。然而通过进一步的比较分析则发现 2 株乳酸菌对 2 种氨基糖胺类抗生素耐药；但 S72 对 2 种氨基糖胺类抗生素的高浓度剂量仍有一定的敏感性，对恩诺沙星低浓度剂量则表现出完全耐受 (表 3)。

鱼体攻毒后，S72 组仅在第 72 小时出现了 1 尾死鱼，死

表3 2株乳酸菌的耐药特性

Tab.3 Results of antibiotic susceptibility test of two strains of lactic acid bacteria

菌株 bacterial strain	药物质量浓度/μg·mL^{-1} drug concentration									
	S60					S72				
抑菌圈直径/mm inhibition zone diameter	256	128	64	32	16	256	128	64	32	16
氨苄青霉素 ampicillin	30	26	24	20	17	40	35	32	30	28
硫酸卡那霉素 kanamycin	8	8	8	8	8	11	8	8	8	8
链霉素 streptomycin	8	8	8	8	8	12	9	8	8	8
恩诺沙星 enoxacin	26	21	19	17	10	19	16	13	8	8
氟苯尼考 flufenicol	32	29	26	20	15	34	29	25	24	18
盐酸多西环素 doxycycline	37	34	28	24	21	34	28	24	21	16
磺胺甲噁唑 sulfamethoxazole	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
生理盐水 physiological saline	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8

亡鱼类注射部位有炎症和出血症状，体表其他部分也有广泛的出血现象。其他时间点并未出现死鱼现象。对照组和 S60 组在整个实验期间均无死鱼出现。阳性对照组在攻毒 24 h 后陆续出现死鱼的情况，在实验结束时的累计死亡率达 46.67% (图 6)，且死亡鱼类在注射部位有炎症和出血现象，鱼体其他部位也有严重的出血现象。96 h 后对存活的实验鱼进行检查，结果显示 S60 和 S72 组剩余的实验鱼体表在注射部位均有轻微的炎症迹象，而进一步解剖检查显示，鱼体腹腔无腹水存在，体内脏器无明显病变情况。

攻毒实验 96 h 后，鱼类血液生化检测结果显示 S60 和 S72 组鱼类血液 ALT、AST 和 LDH 的水平和对照组无显著差异 (P>0.05，表 4)。说明 S60 和 S72 攻毒并未造成鱼类组织损伤。而高达 1.0×10^9 CFU·mL^{-1} 的细菌腹腔注射仅出现了 1 尾实验鱼的死亡，且第 96 小时血液生化检查结果显示剩余鱼类并未出现明显的组织损伤；与此同时嗜水气单胞菌以 5.0×10^6 CFU·mL^{-1} 的浓度攻毒，却导致近 50% 的实验鱼死亡。由此可见，2 株乳酸菌仍具有较高的安全性。

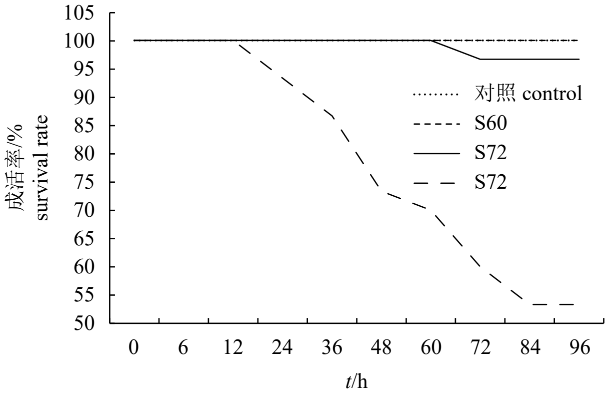

图6　细菌感染实验

Fig.6　Artificial infection experiment

表4　2株乳酸菌对银鲫血液生化指标的影响

Tab.4　Effects of two strains of lactic acid bacteria on blood biochemical index of *C. auratus* challenged with two lactic acid bacteria

U·L^{-1}；*n*=5

项目 index	对照组 control	乳酸菌 lactic acid bacteria S60	乳酸菌 lactic acid bacteria S72	嗜水气单胞菌组 A.h
谷丙转氨酶 ALT	6.39±1.94	6.19±3.24	4.96±1.84	4.21±1.19
谷草转氨酶 AST	323.52±65.91	321.44±105.27	391±133.81	330.55±118.34
乳酸脱氢酶 LDH	116.53±38.97	88.54±43.39	65.14±37.26	73.35±31.90

3　讨论

3.1　乳酸菌对鱼类肠道环境的适应性

消化道中的 pH 和胆盐对细菌繁殖生长具有抑制作用，因此益生菌在消化道中的益生作用与其对消化道环境的耐受能力密切相关。人类医学研究表明消化道 pH 受饮食组成影响，食物的存在能提高益生菌在胃内的成活率[13]。此外，将壳聚糖等生物高分子与菌剂混合应用也能显著提高益生菌在低 pH 条件下的成活率[14]。而现有资料显示有胃鱼类的胃内 pH 最低能达 2[15]，因此本研究中的 2 株乳酸菌需要辅以饵料、生物高分子或经过一段时间的耐酸驯化[13] 才能更好地应用于有胃鱼类。而无胃鱼类，如鲤科鱼类，其消化道内 pH 近中性[10]，因此本研究中的 2 株乳酸菌能适应其消化道 pH。

胆汁能阻止细菌黏附到肠道黏膜的顶端，避免细胞损伤[6]，但也对乳酸菌的生存产生了胁迫。本研究中的 2 株乳酸菌能耐受 0.1% 的胆盐，而参考海水鱼类数据，胆囊内胆盐含量在 0.2%~1.0%，进入肠道会被进一步稀释[15]。并且胆盐质量浓度在 0.03%~0.3% 范围内波动的肠道环境，尚能分离到不耐受 0.1% 胆盐浓度的乳酸菌[13]。因此认为 2 株乳酸菌能耐受鱼类肠道中的胆盐环境。

3.2　乳酸菌的生长特性、产酸能力和抑菌活性物质

乳酸菌是目前公认的肠道有益微生物，大量研究显示乳酸菌对于肠道微生物群落稳定[14]、与人类[16] 和水产养殖动物[4] 的健康密切相关。虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)[17]、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)[18] 和海参 (*Apostichopus japonicus*)[19] 等养殖实验均显示在日粮中添加乳酸菌能促进养殖动物的生长，提高抗病力和肠道内有害菌产生竞争，发挥保护肠道的作用[20]。本研究结果显示乳酸菌 S72 比 S60 的繁殖速度快，更易取得竞争优势，和其他细菌竞争肠道上皮细胞的黏附位点[4,21]、营养物质[8] 以及减少病原菌的定植[22]；此外，乳酸菌能通过产生乳酸[23-24]、细菌素、过氧化氢及小分子肽类等[20,25] 代谢产物对肠道致病菌产生抑菌或杀菌作用，而快速繁殖的能力也意味着更多活性物质的产生，从而发挥更强的抑菌或杀菌效果。本研究结果显示 2 株乳酸菌产生的抑菌物质均为代谢过程中产生的有机酸类，与其他关于乳酸菌抑菌物质的研究结果[3,23] 类似，并非每一株乳酸菌都能产生所有类型的抑菌物质，可见乳酸菌产生的抑菌物质种类和菌株、菌种有关。而 Kiymaci

等[23] 发现乳酸菌所产生的有机酸对病原菌不仅有抑制效果，而且能削弱病原菌的毒力。此外，胞外的一些成分如多糖、蛋白等也具有改善机体免疫[26] 和吸附肠道内有害物质[27] 的能力，但这些潜在功能有待研究论证。

3.3 乳酸菌在水产动物中应用的安全性问题

溶血素是病原菌致病的重要毒力因子，研究表明溶血素不仅表现为溶解红细胞，其具备的穿孔能力、酯酶活性或表面活性作用能损伤多种细胞，诱发细胞凋亡甚至造成细胞裂解死亡[28]。而乳酸菌是一类能利用糖产生乳酸的细菌统称，其中某些种属具有溶血能力，如闫肃等[7] 研究发现，所检视的48株乳酸菌中有9株具有溶血活性。因此，需要对候选益生菌的溶血能力进行检测，从而避免相关毒力的风险。本研究中2株乳酸菌溶血活性的检测结果显示，在血平板实验培养后期 (48 h) 乳酸菌菌落周围有颜色变淡的情况出现，与闫肃等[7] 研究中将近68.75%的乳酸菌菌株 (检视菌株总数48株) 的溶血表型一致，因此认为这一现象与低pH相关，且在进一步的体外溶血实验中得到证实。由此可见，2株乳酸菌不产生溶血活性物质。

抗菌药物在保证人类和动物健康的同时[8]，也带来了严重的耐药问题，现有资料显示，水产养殖动物主要细菌性病原的耐药现象普遍存在[1,29]。恩诺沙星、氟苯尼考、多西环素和磺胺甲噁唑是目前用于水产养殖动物细菌性疾病防治的主要药物[30]。鉴于乳酸菌可能涉及的青霉素类[31]、氨基糖苷类[32] 和四环素类[33] 的耐药基因及其耐药基因可转移的风险。本文结合药敏实验结果，首先排除了本研究中2株乳酸菌在恩诺沙星、氟苯尼考和多西环素耐药性转移方面的风险。而磺胺类药物的耐药现象是否和获得外源性耐药基因 (*sul*1、*sul*2 和 *sul*3)[33-34] 相关需进一步研究。尤其是确认是否携带 *sul*1 耐药基因，因为该耐药基因的扩散传播与整合子相关，不仅水平转移概率高，而且拥有更广泛的宿主范围[35]。本研究明确了候选益生菌的耐药特性不仅能有效的规避耐药转移风险，且为科学用药提供指导意见。

在肠道菌群稳态失衡时，常常会出现细菌位移，出现非致病菌感染致病的结果[36]。虽然鲜有哺乳动物食源性乳酸菌引起疾病的报道[8]，但应用到水产养殖动物中的一些菌株却暴露出一些安全隐患，如一株植物乳杆菌[37] 在应用过程中对达氏鳇 (*Huso huso*)[37] 引起了组织损伤。因此，为评估2株乳酸菌潜在的条件致病风险，本研究采取腹腔注射的形式，以高达 1.0×10^9 CFU·mL^{-1} 的浓度进行了动物攻毒实验。结果表明乳酸菌S60在整个养殖实验过程中未引起实验鱼的死亡；而乳酸菌S72仅导致了1尾实验鱼死亡 (死亡率3.33%)，相较于浓度仅为 5.0×10^6 CFU·mL^{-1} 的嗜水气单胞菌 (典型条件致病菌) 所造成将近50%的实验鱼死亡，2株乳酸菌的安全性仍然很高。并且在攻毒处理后96 h的血液生化分析结果表明，实验组鱼类和对照组鱼类在组织损伤方面并未表现出显著差异，由此可见，在第96小时实验鱼基本已恢复到正常状态。综上，2株乳酸菌具备抑制常见鱼类病原菌的能力，对银鲫无明显致病性，可作为银鲫口服益生菌开发的资源储备。

参考文献:

[1] 李绍戊, 王荻, 刘红柏, 等. 鱼源嗜水气单胞菌多重耐药菌株整合子的分子特征 [J]. 中国水产科学, 2013, 20(5): 1015-1022.

[2] 曾德乾, 冯娟, 徐力文, 等. 海水养殖鱼哈维弧菌分离株的耐药谱型分析 [J]. 中国水产科学, 2015, 22(1): 129-138.

[3] 杨莺莺, 李卓佳, 陈永青, 等. 乳酸杆菌 L1 对致病弧菌的抑菌作用 [J]. 南方水产, 2005, 1(1): 62-65.

[4] NEWAJ F A, AL-HARBI A H, AUSTIN B. Review: developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture[J]. Aquaculture, 2014, 431: 1-11.

[5] 赵小茜, 魏旭丹, 陈戴玲, 等. 乳酸菌耐酸耐胆盐机制研究进展 [J]. 乳业科学与技术, 2017, 40(3): 33-36.

[6] 赵元辰, 崔乃强. 胆汁酸与肠道菌群相关性研究进展 [J]. 中国中西医结合外科杂志, 2018, 24(5): 666-671.

[7] 闫肃, 李慧敏, 张晓冬, 等. 不同食物来源乳酸细菌的安全性评价 [J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(5): 82-89.

[8] FRAQUEZA M J. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from dry-fermented sausages[J]. Int J Food Microbiol, 2015, 212(SI): 76-88.

[9] TRIEU-CUOT P, CARLIER C, MARTIN P, et al. Plasmid transfer by conjugation from *Escherichia coli* to gram-positive bacteria[J]. FEMS Microbiol Lett, 1987, 48(1/2): 289-294.

[10] 杨媛媛, 王楠楠, 曹青, 等. 鲫肠道乳酸菌的分离及益生特性 [J]. 水产学报, 2018, 42(10): 1596-1605.

[11] 任世英, 丁沈利, 王玲, 等. 产蛋白质类抑菌物质乳酸菌的分离鉴定与抑菌特性研究 [J]. 生物学杂志, 2017, 35(3): 1-6.

[12] MAO Y, NIU S F, XU X, et al. The effect of an adding histidine on biological activity and stability of Pc-pis from *Pseudosciaena crocea*[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e83268.

[13] 赵芳,李艳琴,李彬春.模拟人体胃肠道环境筛选益生乳杆菌 [J]. 微生物学通报, 2016, 43(6): 1396-1403.

[14] KAKELAR H M, BARZEGARI A, HANIFIAN S, et al. Isolation and molecular identification of Lactobacillus with probiotic potential from abomasums driven rennet[J]. Food Chem, 2019, 272: 709-714.

[15] 杨红玲, 孙云章, 叶继丹, 等. 2株鱼源乳酸菌的生物学特性研究 [J]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2008, 36(8): 25-30.

[16] GHOLIZADEH P, MAHALLEI M, PORMOHAMMAD A A, et al. Microbial balance in the intestinal microbiota and its association with diabetes, obesity and allergic disease[J]. Microb Patho-

genesis, 2019, 127: 48-55.

[17] MOHAMMADIAN T, NASIRPOUR M, TABANDEH M R, et al. Administrations of autochthonous probiotics altered juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* health status, growth performance and resistance to *Lactococcus garvieae*, an experimental infection[J]. Fish Shellfish Immunol, 2019, 86: 269-279.

[18] SHA Y J, WANG L, LIU M, et al. Effects of lactic acid bacteria and the corresponding supernatant on the survival, growth performance, immune response and disease resistance of *Litopenaeus vannamei*[J]. Aquaculture, 2016, 452: 28-36.

[19] LI C, REN Y C, JIANG S H, et al. Effects of dietary supplementation of four strains of lactic acid bacteria on growth, immune-related response and genes expression of the juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka[J]. Fish Shellfish Immunol, 2018, 74: 69-75.

[20] De MELO P V, de OLIVEIRA C B, JÚNIOR A M, et al. How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria[J]. Biotechnol Adv, 2018, 36(8): 2060-2076.

[21] CANDELA M, PERNA F, CARNEVALI P, et al. Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production[J]. Int J Food Microbiol, 2008, 125(3): 286-292.

[22] 阚刘刚, 赵丽杰, 李秀业, 等. 鸡沙门氏菌病的生物预防和控制研究进展 [J]. 动物营养学报, 2018, 30(9): 3432-3443.

[23] KIYMACI M E, ALTANLAR N, GUMUSTAS M A, et al. Quorum sensing signals and related virulence inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* by a potential probiotic strain's organic acid[J]. Microb Pathogenesis, 2018, 121: 190-197.

[24] VAZQUEZ J A, GONZALEZ M P, MURADO M A. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish[J]. Aquaculture, 2005, 245(1/2/3/4): 149-161.

[25] WANG A R, RAN C, WANG Y B, et al. Use of probiotics in aquaculture of China: a review of the past decade[J]. Fish Shellfish Immunol, 2019, 86: 734-755.

[26] NÁCHER-VÁZQUEZA M, BALLESTEROS N, CANALES Á, et al. Dextrans produced by lactic acid bacteria exhibit antiviral and immunomodulatory activity against salmonid viruses[J]. Carbohyd Polym, 2015, 124: 292-301.

[27] GE N, XU J J, PENG B Z, et al. Adsorption mechanism of tenuazonic acid using inactivated lactic acid bacteria[J]. Food Control, 2017, 82: 274-282.

[28] 马碧书, 马丽娜, 林旭瑗, 等. 细菌溶血素毒性和致病机制研究进展 [J]. 中国人兽共患病学报, 2018, 34(2): 1-11.

[29] 蒋魁, 徐力文, 苏友禄, 等. 2012 年~2014 年南海海水养殖鱼类病原菌哈维弧菌分离株的耐药性分析 [J]. 南方水产科学, 2016, 12(6): 99-107.

[30] 乔毅. 江苏省沿海地区水产养殖主要致病菌耐药性研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2015: 1-96

[31] AQUILANTI L, GAROFALO C, OSIMANI A A, et al. Isolation and molecular characterization of anti biotic-resistant lactic acid bacteria from poultry and swine meat products[J]. J Food Protect, 2007, 70(3): 557-565.

[32] ROJO-BEZARES B, SAENZ Y, POETA P A, et al. Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine[J]. Int J Food Microbiol, 2006, 111(3): 234-240.

[33] GEVERS D, HUYS G, SWINGS J. *In vitro* conjugal transfer of tetracycline resistance from *Lactobacillus* isolates to other gram-positive bacteria[J]. FEMS Microbiol Lett, 2003, 225(1): 125-130.

[34] SKOLD O. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends[J]. Drug Resist Update, 2000, 3(3): 155-160.

[35] 汪涛, 杨再福, 陈勇航, 等. 磺胺类抗性基因的产生及演变研究进展 [J]. 环境污染与防治, 2017, 39(11): 1251-1255.

[36] 刘建强. 胆汁酸对肝硬化大鼠肠道细菌过度生长、细菌移位及内毒素血症的作用 [D]. 广州: 第一军医大学南方医科大学, 2005: 16.

[37] SALMA W, ZHOU Z G, WANG W W, et al. Histological and bacteriological changes in intestine of beluga (*Huso huso*) following *ex vivo* exposure to bacterial strains[J]. Aquaculture, 2011, 314(1/2/3/4): 24-33.