

嗜酸乳杆菌对 3 种弧菌的拮抗效果及对凡纳滨对虾肠道菌群结构的影响

刘 钢^{1,2}, 胡晓娟^{2,3}, 苏浩昌^{2,3}, 徐武杰^{2,3}, 徐 煜², 文国樑², 曹煜成^{1,2,3}

1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306

2. 中国水产科学研究院南海水产研究所/农业农村部南海渔业资源开发利用重点实验室/广东省渔业生态环境重点实验室, 广东广州 510300

3. 南方海洋科学与工程广东省实验室(珠海), 广东 珠海 519000

摘要: 使用益生菌是预防和控制水产养殖细菌感染非抗生素方法之一。嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) 可在机体内分泌抗菌物质, 具有抑制有害菌生长、调节肠道微生态平衡和增强抗毒抗病能力等功能。研究了不同氧环境和不同培养基条件下嗜酸乳杆菌、副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)、哈维氏弧菌 (*V. harveyi*)、溶珊瑚弧菌 (*V. coralliilyticus*) 的生长情况, 并通过牛津杯法和液体培养法结合 PCR 荧光定量技术、高通量测序技术, 系统评价了嗜酸乳杆菌对上述弧菌的拮抗效果及对凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 肠道菌群的组成和变化的影响。结果显示, 在厌氧条件下, 哈维氏弧菌的菌量显著高于在好氧环境培养后的菌量 ($P<0.05$)。不同培养基配比对 4 种细菌的生长均具有显著性影响 ($P<0.05$)。嗜酸乳杆菌对 3 种弧菌的生长均有良好的抑制效果。在对虾肠道菌群背景下, 嗜酸乳杆菌对副溶血弧菌的生长有显著抑制作用 ($P<0.05$)。处理组的弧菌属比例较对照组显著减少, 高菌量组的有益菌属均显著增加。研究表明, 嗜酸乳杆菌对上述 3 种弧菌的生长有良好的抑制效果, 在对虾肠道菌群背景下对副溶血弧菌的生长也有良好的抑制效果, 且能够优化菌群结构。

关键词: 嗜酸乳杆菌; 弧菌; 拮抗; 凡纳滨对虾; 肠道菌群结构

中图分类号: S 945

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Antagonism of *Lactobacillus acidophilus* against three *Vibrio* species and its influence on gut microbiota of *Litopenaeus vannamei*

LIU Gang^{1,2}, HU Xiaojuan^{2,3}, SU Haochang^{2,3}, XU Wujie^{2,3}, XU Yu², WEN Guoliang², CAO Yucheng^{1,2,3}

1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

2. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences/Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Guangdong Provincial Key Laboratory of Fishery Ecology and Environment, Guangzhou 510300, China

3. Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Zhuhai), Zhuhai 519000, China

Abstract: The use of probiotics is one of the non-antibiotic methods of preventing and controlling bacterial infections in aquaculture. *Lactobacillus acidophilus* can secrete antimicrobial substances in the body, which can inhibit the growth of harmful

收稿日期: 2023-10-07; 修回日期: 2023-12-19

基金项目: 广东省重点领域研发计划项目(2021B0202040001); 国家自然科学基金面上项目(32373135); 广东省农业科技发展及资源环境保护项目(2023KJ149); 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助(2023TD57); 国家虾蟹产业技术体系(CARS-48); 中国水产科学研究院南海水产研究所中央级科研院所基本科研业务费专项资金资助(2021SD08)

作者简介: 刘 钢(1999—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产养殖病害防治。E-mail: 15615551898@163.com

通信作者: 曹煜成(1979—), 男, 研究员, 博士, 研究方向为水产健康养殖和养殖生态环境调控与修复。E-mail: cyc_715@163.com

bacteria, regulate the micro-ecological balance of intestinal tract, and enhance the resistance to toxicity and disease. We analyzed the growth of *L. acidophilus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *V. harveyi* and *V. coralliilyticus* under different oxygen environments and different media conditions, and systematically evaluated the antagonistic effect of *L. acidophilus* on the above mentioned *Vibrio* species, as well as the composition and changes of the intestinal flora of *Litopenaeus vannamei*, by using Oxford cup method and liquid culture method in addition with PCR fluorescence quantification and high throughput sequencing technology. The results show that anaero bic environment promoted the growth of *V. harveyi* significantly ($P<0.05$). Different ratios of media had a significant effect on the growth of all the four bacteria. *L. acidophilus* inhibited the growth of all the three *Vibrio* species effectively ($P<0.05$). In the background of intestinal flora of prawns, *L. acidophilus* inhibited the growth of *V. parahaemolyticus* significantly ($P<0.05$). The proportion of *Vibrio* spp. decreased significantly in the bacterial solution and supernatant groups compared with the control group. Beneficial genera of bacteria increased significantly in the high bacterial concentration group. The results indicate that *L. acidophilus* inhibits the growth of the above three *Vibrio* species in plate and liquid cultures, and inhibits the growth of *V. parahaemolyticus* in the background of prawn intestinal microbiota, being able to optimize the structure of microbiota.

Keywords: *Lactobacillus acidophilus*; *Vibrio*; Antagonism; *Litopenaeus vannamei*; Intestinal flora structure

水产养殖业发展迅速, 根据 2022 年世界渔业和水产养殖状况^[1] 报告, 2020 年世界水产养殖总产量 (不包括 4 类藻类) 为 88×10^6 t, 其中甲壳类养殖产量为 $1\,123\times 10^4$ t, 凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 占 51%, 达 581×10^4 t。目前, 世界人均水生动物食品消费量为 20.2 kg, 其中 56% 来自于水产养殖, 可见水产品已成为人类摄取优质动物蛋白质的重要来源之一。然而, 在水产养殖过程中, 养殖对象可能会受到各种疾病的影响。弧菌感染是最常见的细菌性疾病之一, 已给许多国家的水产养殖业造成了严重经济损失。常见的弧菌种类有造成对虾养殖重大损失的急性肝胰腺坏死病 (Acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND)^[2-4]、副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)、哈维氏弧菌 (*V. harveyi*)^[5] 等。其中副溶血弧菌被认为是引起凡纳滨对虾 AHPND 的主要病原体^[6]。抗生素是目前最常见的预防和治疗弧菌感染的手段之一^[5], 但随着抗生素残留^[7] 及抗生素耐药性问题的层出不穷^[8-9], 亟需减少抗生素的使用并寻找非抗生素方法来预防和治疗弧菌感染^[10]。

使用益生菌是预防和控制水产养殖细菌感染的非抗生素方法之一^[11-12]。益生菌能进入宿主胃肠道中定殖并保持活性, 且能改善宿主健康状况^[13]。有研究表明, 嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) 可在机体内分泌抗菌物质, 抑制有害菌生长、调节肠道微生态平衡、调节机体免疫功能、维持肠道环境和增强抗毒抗病能力^[14]。目前有关嗜酸乳杆菌在水产养殖中的应用多集中于拌料投喂后对养殖生物的影响^[15-16], 且在研究其对病原菌的拮抗作用时多采用单菌种拮抗固体培养法^[17], 未充分考虑养

殖生物肠道环境特征等对菌株拮抗效果的影响。

为系统评价嗜酸乳杆菌对哈维氏弧菌、副溶血弧菌、溶珊瑚弧菌 (*V. coralliilyticus*) 等常见致病弧菌的拮抗效果, 本研究探究了 4 种细菌在不同氧环境和不同培养基条件下的生长情况, 并在厌氧条件下使用牛津杯法和液体培养法测定了嗜酸乳杆菌对 3 种弧菌的拮抗效果, 最后模拟对虾肠道环境, 综合评价嗜酸乳杆菌对副溶血弧菌的拮抗效果及其对凡纳滨对虾肠道菌群结构的影响, 以期嗜酸乳杆菌在水产养殖弧菌病害防治中的应用提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验菌株

菌株嗜酸乳杆菌 HS1、副溶血弧菌 FRX1、哈维氏弧菌 HW1 和溶珊瑚弧菌 RS1 均取自中国水产科学研究院海水池塘养殖生态环境调控创新团队。

1.1.2 实验试剂

MRS 肉汤培养基、2216E 液体培养基、TCBS 琼脂培养基、脑心浸液培养基和琼脂粉购自广东环凯微生物科技有限公司; 用于弧菌定量检测的弧菌荧光定量 PCR 检测试剂盒、用于副溶血弧菌定量检测 AHPND 荧光定量 PCR 检测试剂盒购自厦门智汇联丰生物科技有限公司。

1.2 不同培养条件下嗜酸乳杆菌和 3 种弧菌的生长情况比较

1.2.1 好氧、厌氧环境对嗜酸乳杆菌和 3 种弧菌生长的影响

将 HS1 和 3 种弧菌 (HW1、FRX1、RS1) 分别

接种于 100 mL 的 MRS 肉汤培养基和 2216E 液体培养基中,初始菌落数均为 10^5 CFU·mL⁻¹。实验设置好氧组和厌氧组。好氧组在生化培养箱中 34 ℃ 静置培养 12 h;厌氧组在厌氧培养箱中 34 ℃ 静置培养 12 h。每组 3 个平行,使用稀释涂布平板法涂布 MRS 和 TCBS 平板测定菌落数。

1.2.2 不同组配型培养基对嗜酸乳杆菌和 3 种弧菌生长的影响

将 MRS 肉汤和 2216E 液体培养基分别按照体积比 1:1、1:3、1:5、1:7 的比例配制成组配培养基,并分别命名为 M1、M3、M5、M7;同时,选用 MRS 肉汤培养基和 2216E 液体培养基,并分别命名为 MRS、2216E。实验设置 MRS 组、M1、M3、M5、M7、2216E 组共 6 组,每组 3 个平行。

将 HS1 和 3 种弧菌(HW1、FRX1、RS1)分别接种至上述 6 组培养基中,培养液盐度为 20‰、pH 7.8、初始接种菌落数为 10^5 CFU·mL⁻¹,每种培养基 3 个重复。于厌氧培养箱中 34 ℃ 培养 24 h,使用稀释涂布平板法涂布 MRS 和 TCBS 平板测定菌落数。

1.3 厌氧条件下嗜酸乳杆菌对 3 种弧菌的拮抗效果

1.3.1 牛津杯法

用无菌生理盐水将培养 24 h 的 3 种弧菌稀释至 10^6 CFU·mL⁻¹ 备用。准确吸取 0.1 mL 弧菌生理盐水稀释液于 2216E 固体培养基上,用无菌涂布棒均匀涂布,然后用无菌镊子将 3 枚牛津杯置于培养基表面,每个牛津杯中分别加入 0.1 mL HS1 培养液。将所有平板正置放入厌氧培养箱中 34 ℃ 恒温培养,24 h 后测定抑菌圈直径并计算平均值。

参照王文君^[18]的报道,抑菌圈直径 ≥ 20 mm 为极敏感“+++”; $15\text{mm} \leq$ 抑菌圈直径 < 20 mm 为高敏“++”; $10\text{mm} \leq$ 抑菌圈直径 < 15 mm 为中敏“+”;抑菌圈直径 < 10 mm 为低敏或无效“-”。

1.3.2 液体混合培养法

取 HS1 菌液分别与 HW1、FRX1、RS1 菌液至 1.2.2 中筛选的生长最优组配培养基中进行混合培养,其中弧菌初始菌落数为 10^5 CFU·mL⁻¹;嗜酸乳杆菌的初始菌落数设置低、中、高 3 个菌量梯度组,分别为 10^4 、 10^6 、 10^8 CFU·mL⁻¹。以弧菌的纯培养组为对照组,每组 3 个平行。于厌氧培养箱中 34 ℃ 培养 24 h。采用稀释涂布平板法涂布 MRS 和 TCBS 平板测定菌落数,并采用荧光定量

PCR 测定弧菌拷贝数。

1.4 嗜酸乳杆菌对副溶血弧菌的拮抗效果及对肠道菌群结构的影响

1.4.1 实验设计与样品采集

配制盐度为 20‰、pH 7.8 的脑心浸液培养基,灭菌备用。将 HS1 接种于 MRS 肉汤培养基中、FRX1 接种于 2216E 液体培养基中,于厌氧培养箱中 34 ℃ 静置培养 24 h。

在冰袋上解剖对虾 50 尾,取虾肠道,转至研磨器中,加入少量保种液研磨,研磨后的对虾肠道转移至保种管中并加入 20 mL 保种液,用涡旋匀浆器匀浆后, -20 ℃ 保存备用。

实验设置空白对照组、阴性对照组、阳性对照组和处理组,每组 3 个平行。空白对照组:取 0.5 mL 肠道匀浆液至 pH 7.8 的脑心浸液培养基中;阴性对照组:在空白对照组的基础上添加副溶血弧菌菌液,初始菌落数为 10^5 CFU·mL⁻¹;阳性对照组:使用 pH 4 的脑心浸液培养基,其余条件与阴性对照组一致;菌液处理组:在阴性对照组的基础上加入嗜酸乳杆菌菌液,设置低菌量菌液组和高菌量菌液组,嗜酸乳杆菌初始菌落数分别为 10^3 和 10^5 CFU·mL⁻¹;上清液处理组:在阴性对照组的基础上加入嗜酸乳杆菌除菌上清液,以菌落数为 10^8 CFU·mL⁻¹ 的菌液进行制备。

厌氧培养箱中 34 ℃ 培养 72 h,分别于第 0 和第 72 小时取 100 μ L 在 MRS、TCBS 平板上涂布,观察 HS1 和 FRX1 的存活状态;于第 0、第 24、第 48 和第 72 小时测定 pH 并取样 15 mL,使用厦门智汇联丰生物科技有限公司的 AHPND 荧光定量 PCR 检测试剂盒,采用荧光定量 PCR 技术测定弧菌数量;采用 16S rRNA 基因扩增子测序技术测定细菌群落组成。其中 qPCR 分析参照 AHPND 荧光定量 PCR 检测试剂盒说明书,所用 qPCR 体系 20 μ L: 2 $\times$ qPCR Mix 10 μ L, 荧光探针 8 μ L, 待测样本 2 μ L, 设置阴性对照(超纯水)。DNA 标准系列(即 5×10^1 、 5×10^3 、 5×10^5 、 5×10^7 拷贝· μ L⁻¹)作为样本模板进行上述 qPCR 实验以进行标准曲线绘制,并检测其 $R^2 > 0.99$,扩增效率介于 90%~110%。

1.4.2 样品测序分析

委托深圳微科盟科技集团有限公司提取样本微生物基因组 DNA,针对细菌 16S rDNA V3-V4 区片段设计通用引物,PCR 扩增后进行产物回收纯化;进行文库构建,使用 NovaSeq 6000 测序,测

序后序列数据进行质控、修剪、去噪、拼接、去除嵌合体，得到特征序列表格^[19]；使用 GREEN-GENES 数据库进行代表序列 (Operational taxonomic unit, OTU) 的物种鉴定对比。

1.5 数据分析

采用 SPSS 20.0 软件对不同组别的数据进行独立样本 *t*-检验分析、单因素方差分析，显著性水平 α 为 0.05。

2 结果

2.1 不同培养条件下嗜酸乳杆菌和 3 种弧菌的生长情况

在好氧和厌氧环境下，HS1、FRX1 和 RS1 的生长无显著性差异 ($P>0.05$)，培养 12 h 后其菌落数均可达 $1.97\times10^8\sim3.26\times10^8$ CFU·mL⁻¹。厌氧环境下，HW1 培养 12 h 后菌落数可达 2.92×10^8 CFU·mL⁻¹，显著高于好氧环境下的 1.61×10^8 CFU·mL⁻¹ ($P<0.05$) (图 1)。

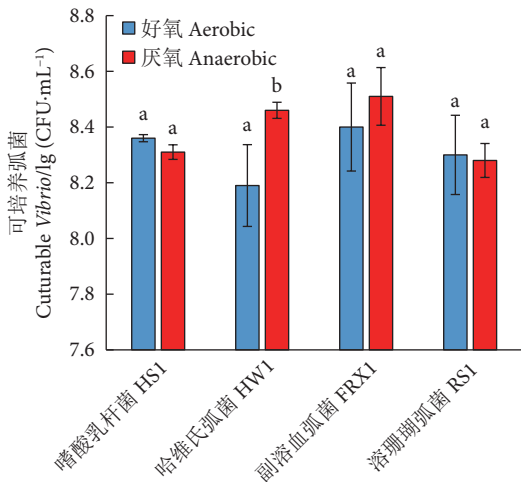


图1 好氧、厌氧环境下 4 种细菌的生长情况
注：不同字母代表该菌株不同组间存在显著性差异 ($P<0.05$)；后图同此。

Fig. 1 Growth of four bacterial species in aerobic and anaerobic environments

Note: Different letters represent significant differences between groups for the same strain ($P<0.05$). The same case in the following figures.

从不同组配型培养基对菌株生长的影响来看 (图 2)，随着 2216E 培养基占比的增加，哈维氏弧菌菌落数呈上升趋势 (增至 1.02×10^8 CFU·mL⁻¹)；副溶血弧菌菌落数呈先上升后下降再上升的趋势，在 MRS、M5、M1、2216E 培养基生长的菌落数分别为 7.67×10^2 、 4.60×10^6 、 9.57×10^6 、 1.48×10^8 CFU·

mL⁻¹；溶珊瑚弧菌菌落数呈先上升后下降再上升的趋势，在 MRS、M3、M1、2216E 培养基生长的菌落数分别为 1.85×10^3 、 3.27×10^6 、 5.13×10^7 、 1.90×10^8 CFU·mL⁻¹；嗜酸乳杆菌最终菌落数呈下降趋势，从 2.32×10^9 降至 1.02×10^7 CFU·mL⁻¹。

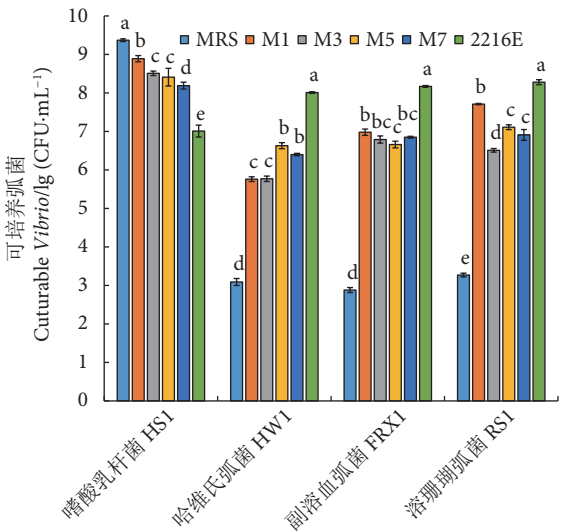


图2 4 种细菌在不同组配型培养基中的生长情况
Fig. 2 Growth of four types of bacteria in different combinations of culture media

可见，在厌氧环境评价 HS1、HW1、FRX1、RS1 的生长和功能特性更佳。综合比较后，选定 M5 培养基为后续液体混合培养法拮抗实验的培养基。

2.2 嗜酸乳杆菌对 3 种弧菌的拮抗效果

牛津杯测定结果显示，HS1 对 HW1、FRX1、RS1 均具有抑制效果，抑菌圈平均直径分别为 10.67 (中敏)、19.67 (高敏)、12.67 mm (中敏) (表 1)。其中，对 FRX1 的抑制效果最为显著。

稀释涂布法结果反映了混合培养后弧菌活菌的数量变化情况，而荧光定量 PCR 测定结果则反映了混合培养后弧菌拷贝数的变化情况。HW1、

表1 牛津杯法测嗜酸乳杆菌对 3 种弧菌的拮抗效果		
Table 1 Antagonistic effect of <i>L. acidophilus</i> on three <i>Vibrio</i> species measured by Oxford cup method		
菌株 Strain	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone/mm	敏感度 ^[16] Sensitivity
HW1	10.67±0.47	+
FRX1	19.67±0.47	++
RS1	12.67±1.25	+

注：++，高敏；+，中敏。
Note: ++, High sensitivity; +, Medium sensitivity.

FRX1、RS1 对照组培养 24 h 的菌落数分别为 4.21×10^6 、 1.20×10^6 、 1.00×10^6 CFU·mL⁻¹。3 种初始

菌量条件下, HS1 对 HW1、FRX1、RS1 均有显著的抑制效果 ($P < 0.05$) (图 3)。

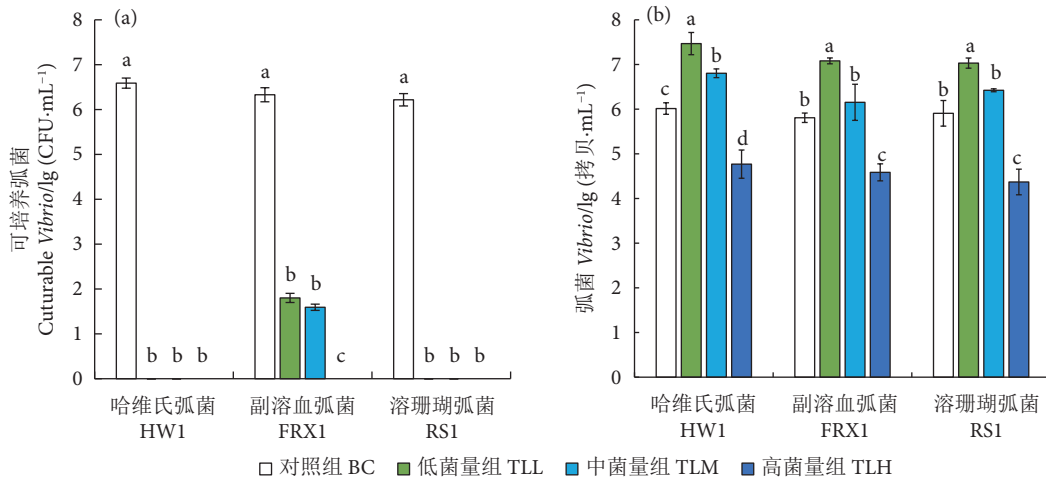


图3 不同嗜酸乳杆菌初始菌浓度培养下的弧菌菌量 (a) 与拷贝数 (b)

Fig. 3 *Vibrio* count (a) and copy number (b) with different initial bacterial concentrations of *L. acidophilus*

其中, HW1 的稀释涂布法计数结果均为 0 lg (CFU·mL⁻¹), 而其低、中、高菌量组的荧光定量 PCR 测定结果分别为 7.47、6.80、4.77 lg (拷贝·mL⁻¹); FRX1 的稀释涂布法计数结果分别为 1.8、1.6、0 lg (CFU·mL⁻¹), 而其低、中、高菌量组的荧光定量 PCR 的测定结果分别为 7.08、6.15、4.59 lg (拷贝·mL⁻¹); RS1 的稀释涂布法计数结果均为 0 lg (CFU·mL⁻¹), 而其低、中、高菌量组的荧光定量 PCR 的测定结果分别为 7.03、6.42、4.37 lg (拷贝·mL⁻¹) (图 3)。从上述结果发现, 稀释涂布法的计数结果能够反映弧菌活菌的数量变化, 而荧光定量 PCR 的统计结果则为弧菌的死菌与活菌的总和。

2.3 嗜酸乳杆菌对副溶血弧菌的拮抗效果及对肠道菌群结构的影响

由图 4 可知, 在第 24 小时, 阴性对照组的荧光定量 PCR 测定结果为 5.85 lg (拷贝·mL⁻¹), 与其相比, 阳性对照组与各处理组对副溶血弧菌的生长具有不同程度的抑制作用 ($P < 0.05$)。其中, 阳性对照组的荧光定量 PCR 测定结果为 2.47 lg (拷贝·mL⁻¹), 嗜酸乳杆菌的上清液处理组、低剂量组和高菌量组均未检出副溶血弧菌。上清液处理组荧光定量 PCR 的测定结果显著低于阳性对照组, 表明嗜酸乳杆菌拮抗效果可能主要由胞外分泌物引起, 而较低的酸度虽具有一定的抑菌能力, 但不是主要原因; 在第 24—第 48 小时, 随着 pH 的升高, 阳性对照组和上清液处理组的荧光定量 PCR

测定结果呈上升趋势; 在第 48 小时后, 阳性对照组的荧光定量 PCR 测定结果随 pH 降低而减少, 上清液处理组的则随 pH 升高而增加, 这表明酸度会影响嗜酸乳杆菌对副溶血弧菌的拮抗效果 (图 4 和图 5)。

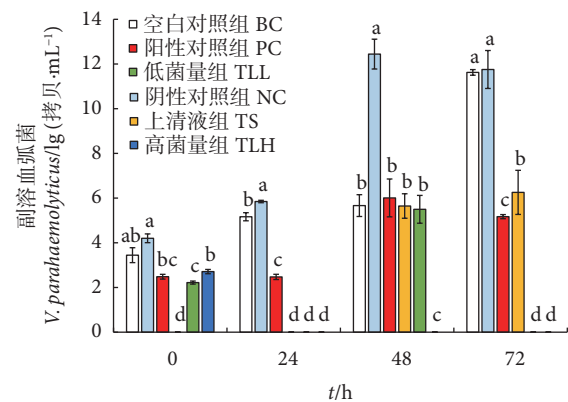


图4 拟肠道环境中各组的副溶血弧菌拷贝数

Fig. 4 Copy number of *V. parahaemolyticus* in each group in simulated intestinal environment

16S rRNA 基因扩增子测序结果表明, 细菌群落组成在门分类水平中各组菌群初始时均以厚壁菌门和变形菌门为优势菌群。在第 72 小时, 上清液处理组、低剂量组和高菌量组中的厚壁菌门较阴性对照组有所减少, 以低菌量组的减少最为明显。而变形菌门的相对丰度则较阴性对照组有所增加, 以低菌量组的增幅最为明显 (图 6)。

在科分类水平上, 上清液处理组、低菌量组、高菌量组和阴性对照组的菌群初始时均以微小杆菌

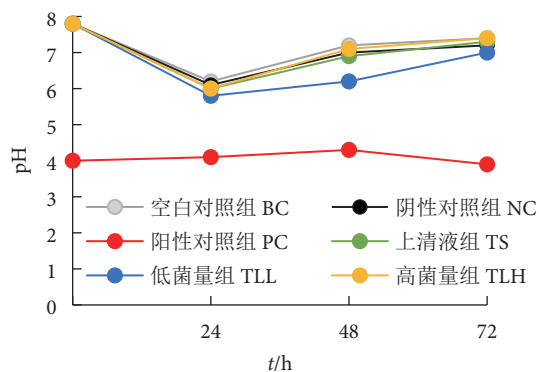


图5 实验期间各组 pH 的动态变化

Fig. 5 Dynamics of pH in each group during experiment

科、链球菌科和交替单胞菌科为优势菌群。培养 72 h 后, 各组上述菌科相对丰度均减少, 以微小菌科的减少最为明显, 且仅存链球菌科为共有优势菌群。相较于阴性对照组的乳杆菌科 (0.4%) 和芽孢杆菌科 (13.1%), 低菌量组的乳杆菌科 (0.9%) 和高菌量组的乳杆菌科 (4.5%) 比例明显增加, 而上清液处理组的乳杆菌科 (0.1%) 比例则明显减少; 高菌量组的芽孢杆菌科 (25.3%) 比例明显增加, 低菌量组的芽孢杆菌科 (4.9%) 和上清液处理组的芽孢杆菌科 (2.4%) 比例则明显减少 (图 7)。

在属分类水平上, 上清液处理组、低菌量组、高菌量组和阴性对照组初始时均以微小杆菌属 (*Exiguobacterium*) 和乳球菌属 (*Lactococcus*) 为优势菌属。培养 72 h 后, 阴性对照组的弧菌属相对丰

度为 1.10%, 乳球菌属、乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 和芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 的相对丰度分别为 16.2%、0.4% 和 13.1%; 相较于阴性对照组, 各处理组的弧菌属比例均显著下降 ($P<0.05$), 高菌量组下降最为明显 (0.03%); 高菌量组的乳球菌属 (20.3%)、乳杆菌属 (4.5%)、芽孢杆菌属 (25.3%) 均显著增加 ($P<0.05$), 低菌量组的乳杆菌属 (4.5%) 显著增加 ($P<0.05$), 乳球菌属 (5.5%)、芽孢杆菌属 (4.9%) 均显著减少 ($P<0.05$), 上清液处理组的乳球菌属 (13.5%)、乳杆菌属 (0.1%)、芽孢杆菌属 (2.4%) 均显著下降 ($P<0.05$) (图 8)。

3 讨论

本研究选取哈维氏弧菌、副溶血弧菌和溶珊瑚弧菌作为病原指示菌, 研究了嗜酸乳杆菌在厌氧条件下对其的拮抗效果。嗜酸乳杆菌对弧菌的拮抗实验结果显示, 嗜酸乳杆菌对这 3 种弧菌均具有良好的拮抗活性, 其中副溶血弧菌对嗜酸乳杆菌最为敏感。这与窦晓明等^[20]、Yang 等^[21] 的研究结果相似。除弧菌外, 嗜酸乳杆菌对大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 和沙门氏菌 (*Salmonella*) 等致病菌^[22-23] 的生长也具有良好的抑制作用, 有较好的应用前景。

嗜酸乳杆菌对病原菌的拮抗效果可能受多种因素的影响。以往的研究在评价嗜酸乳杆菌对病原菌

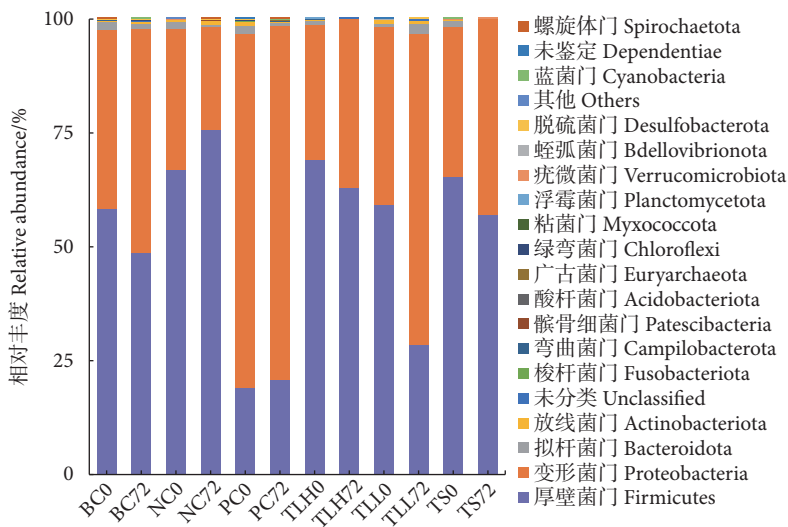


图6 肠道菌群在门分类水平上的相对丰度

注: BC. 空白对照组; NC. 阴性对照组; PC. 阳性对照组; TS. 上清液组; TLL. 低菌量组; TLH. 高菌量组; 0.0 h; 72. 72 h; 后图同此。

Fig. 6 Relative abundance of intestinal flora at phyla level in each group

Note: Blank control group; NC. Negative control group; PC. Positive control group; TS. Supernatant group; TLL. Low concentration group; TLH. High concentration group; 0.0 h; 72. 72 h. The same case in the following figures.

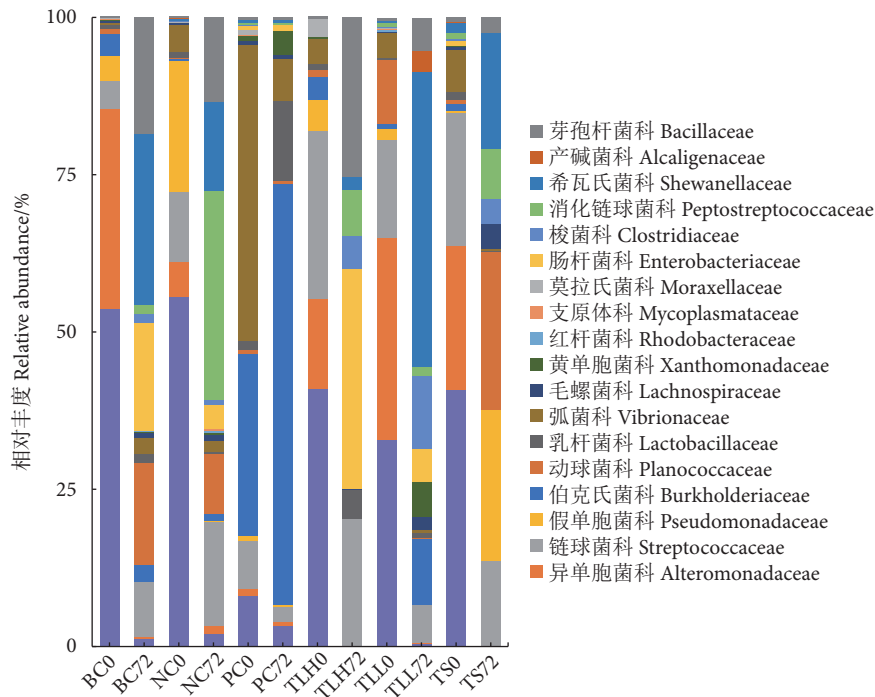


图7 肠道菌群在科分类水平上的相对丰度

Fig. 7 Relative abundance of intestinal flora at family level in each group

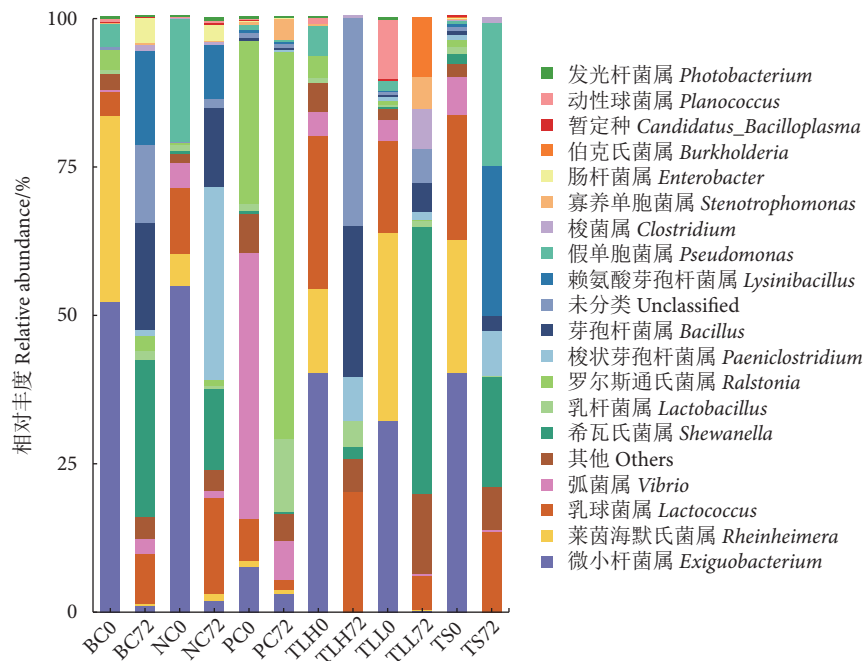


图8 肠道菌群在属分类水平上的相对丰度

Fig. 8 Relative abundance of intestinal flora at genus level in each group

的拮抗效果时,多采取在好氧条件下使用牛津杯法、双层平板法等固体培养法^[24]进行拮抗实验,其中弧菌使用的固体培养基多为 2216E 培养基,嗜酸乳杆菌则使用 MRS 培养基。在实际生产中,益生菌与病害菌均处于相同的生长环境即养殖生物的肠道,这忽略了肠道环境特征对其的影响,如厌氧

环境、肠道菌群等。为更真实地模拟肠道环境中嗜酸乳杆菌对弧菌的拮抗效果,本研究首先探索了不同氧环境、培养基对 4 种细菌生长的影响,结果表明,厌氧环境对哈维氏弧菌的生长具有显著促进作用,不同的培养基对嗜酸乳杆菌和弧菌的生长均存在影响,间接影响嗜酸乳杆菌对弧菌的拮抗效果。

其次结合牛津杯法、液体混合培养法、荧光定量PCR技术进行嗜酸乳杆菌对3种弧菌的拮抗效果评价。牛津杯法实验结果显示副溶血弧菌对嗜酸乳杆菌最为敏感,而液体培养法实验结果显示嗜酸乳杆菌对3种弧菌的拮抗效果没有较大差异;稀释涂布平板法和荧光定量PCR结果也存在差异,涂布结果表明3种初始菌落数条件下,嗜酸乳杆菌对哈维氏弧菌、副溶血弧菌、溶珊瑚弧菌均有显著的抑制效果($P<0.05$);荧光定量PCR结果显示,3种弧菌的拷贝数与嗜酸乳杆菌初始菌落数呈负相关关系,但仅高菌量组弧菌拷贝数低于对照组,这与梁晓明等^[25]报道的抑菌活性随乳酸菌的菌量增加而增强的结果相似,表明不同的抑菌实验方法^[26]和菌量测定方法会影响拮抗效果的评价。

此外,嗜酸乳杆菌在肠道菌群背景下对副溶血弧菌的拮抗实验结果表明,低pH环境具有一定的抑菌效果,但菌液组和上清液组却具有更为显著的抑菌效果,说明HS1主要是通过分泌胞外产物抑制副溶血弧菌的生长。同时,实验期间pH下降说明嗜酸乳杆菌的胞外产物可能含有有机酸且pH对嗜酸乳杆菌除菌上清液的抑菌能力强弱有影响,这说明pH较低的环境或有机酸的产生能够增强其他抑菌物质的作用,这与郭风茹^[27]报道的乳酸菌抑菌物质的抑菌效果受环境pH影响较大、抑菌活性物质在酸性条件下才可以发挥较好的抑菌效果类似。此外,有研究表明乳酸除了使pH降低从而产生抗菌作用外,还具有革兰氏阴性菌外膜渗透剂的作用,能够增强其他抗菌物质的作用^[28-31]。

嗜酸乳杆菌能够增强宿主的抗病能力,调节宿主肠道微生物平衡。李佳徽等^[32]研究表明,添加嗜酸乳杆菌能够增加凡纳滨对虾肠道菌群中芽孢杆菌科和乳杆菌科的占比,显著提高对虾对副溶血弧菌的抗病力。Li等^[33]研究表明,在喂食嗜酸乳杆菌的大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)体内,肠道细菌群落发生了显著变化,增强了免疫相关酶的活性。Wang等^[34]则发现饲料中添加嗜酸乳杆菌能优化海参(*Apostichopus japonicus*)肠道微生物菌群的组成,降低了潜在病原体,如弧菌属、假单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)的比例;增加了有益微生物,如乳杆菌属、梭菌属(*Clostridium*)的比例。本研究与上述结果相似,嗜酸乳杆菌菌液组和除菌上清液组的弧菌属相对丰度较阴性对照组显著减少;菌液

组的乳杆菌属相对丰度显著增加,高菌量组的芽孢杆菌属和乳球菌属的相对丰度也显著增加。说明嗜酸乳杆菌能够改善凡纳滨对虾肠道菌群结构,提高有益菌相对丰度,抑制弧菌生长。此外,结合AHPND荧光定量PCR与菌群结构结果可以看出,与嗜酸乳杆菌除菌上清液相比,嗜酸乳杆菌菌液具有更稳定的抑菌效果和更强的菌群优化能力,其中初始菌落数为 10^5 CFU·mL⁻¹的高菌量组效果最好。

综上所述,本研究采用的嗜酸乳杆菌HS1对哈维氏弧菌、副溶血弧菌、溶珊瑚弧菌均具有良好的拮抗活性,在凡纳滨对虾肠道菌群背景下同样可以抑制副溶血弧菌的生长,同时优化菌群结构,在水产养殖中具有潜在应用价值。此外,水产养殖环境是一个复杂的系统,该菌株对弧菌的拮抗效果和对凡纳滨对虾肠道菌群结构的影响,可能会受到水质和其中的微生物菌群及养殖对象不同的生长阶段等因素影响,HS1在实际养殖中对养殖对象的影响还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022[M]. Rome: FAO, 2022: 5-6.
- [2] 冯艳琴, 万夕和, 沈辉, 等. 水产动物副溶血性弧菌的拮抗菌研究进展[J]. 微生物学杂志, 2021, 41(1): 99-106.
- [3] YILMAZ S, YILMAZ E, DAWOOD M, et al. Probiotics, prebiotics, and synbiotics used to control vibriosis in fish: a review[J]. Aquaculture, 2022, 547: 737514.
- [4] INA-SALWANY M Y, AL-SAARI N, MOHAMAD A, et al. Vibriosis in fish: a review on disease development and prevention[J]. J Aquat Anim Health, 2019, 31(1): 3-22.
- [5] MOHAMAD N, AMAL M N A, YASIN I S M, et al. Vibriosis in cultured marine fishes: a review[J]. Aquaculture, 2019, 512: 734289.
- [6] GALAVIZ-SILVA L, CÁZARES-JARAMILLO G E, IBARRA-GÁMEZ J C, et al. Assessment of probiotic bacteria from marine coasts against *Vibrio parahaemolyticus* (AHPND strains) in *Litopenaeus vannamei*[J]. Aquac Res, 2021, 52(12): 6396-6409.
- [7] YANG Y Y, SONG W J, LIN H, et al. Antibiotics and antibiotic resistance genes in global lakes: a review and meta-analysis[J]. Environ Int, 2018, 116: 60-73.
- [8] 李十盛, 高会, 赵富强, 等. 水产养殖环境中抗生素抗性基因的研究进展[J]. 中国环境科学, 2021, 41(11): 5314-5325.
- [9] 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.
- [10] BONDAD-REANTASO M G, MACKINNON B, KARUNASA-

- GAR I, et al. Review of alternatives to antibiotic use in aquaculture[J]. Rev Aquac, 2023, 15(4): 1421-1451.
- [11] PEREZ-SANCHEZ T, MORA-SANCHEZ B, BALCAZAR J L. Biological approaches for disease control in aquaculture: advantages, limitations and challenges[J]. Trends Microbiol, 2018, 26(11): 896-903.
- [12] DAWOOD M A O, KOSHIO S, ABDEL-DAIM M M, et al. Probiotic application for sustainable aquaculture[J]. Rev Aquac, 2019, 11(3): 907-924.
- [13] GATESOUBE F J. The use of probiotics in aquaculture[J]. Aquaculture, 1999, 180(1): 147-165.
- [14] 李军亮, 杨奇慧, 谭北平, 等. 嗜酸乳杆菌对斜带石斑鱼幼鱼生长、消化性能和抗病力的影响[J]. 水生生物学报, 2019, 43(5): 992-1000.
- [15] 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.
- [16] ABIDIN Z, HUANG H T, HU Y F, et al. Effect of dietary supplementation with *Moringa oleifera* leaf extract and *Lactobacillus acidophilus* on growth performance, intestinal microbiota, immune response, and disease resistance in whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei*)[J]. Fish Shellfish Immunol, 2022, 127: 876-890.
- [17] 陆晓岑. 三种海水病原菌的拮抗菌筛选及其作用机制研究[D]. 大连: 大连海洋大学, 2022: 15-16.
- [18] 王文君. 一株弧菌拮抗菌的鉴定、抑菌特性及应用效果的初步研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2015: 19-20.
- [19] BOKULICH N A, KAEHLER B D, RIDEOUT J R, et al. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin[J]. Microbiome, 2018, 6(1): 90.
- [20] 窦晓明, 孙高英, 单虎. 乳酸菌胞外产物对副溶血弧菌抑制作用的研究[J]. 海洋科学, 2007(8): 11-14.
- [21] YANG Z Q, JIN C J, GAO L, et al. Alleviating effects of *Lactobacillus* strains on pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*-induced intestinal fluid accumulation in the mouse model[J]. FEMS Microbiol Lett, 2013, 339(1): 30-38.
- [22] AMIRI S, REZAEI MOKARRAM R, SOWTI KHIABANI M, et al. Characterization of antimicrobial peptides produced by *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium lactis* BB-12 and their inhibitory effect against foodborne pathogens[J]. LWT, 2022, 153: 112449.
- [23] EVANGELISTA A G, CORREA J A F, dos SANTOS J V G, et al. Cell-free supernatants produced by lactic acid bacteria reduce *Salmonella* population *in vitro*[J]. Microbiology, 2021, 167(11): 001102.
- [24] 洪梅, 刘样珍, 史宝军. 一株嗜酸乳杆菌的抑菌效果及相关特性分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017(18): 122-124.
- [25] 梁晓明, 曾嘉颖, 王安利, 等. 1株副干酪乳酸菌 S-4 对致病弧菌的抑制特性研究[J]. 华南师范大学学报(自然科学版), 2019(5): 1-9.
- [26] 熊骏, 韩瑞娜, 张忠华, 等. 豆豉中高效抑菌活性乳酸菌的筛选及其抑菌研究[J]. 中国微生态学杂志, 2011, 23(6): 485-489.
- [27] 郭凤茹. 罗非鱼肠道乳酸菌的益生特性研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2019: 6-24.
- [28] ZHANG Z W, LYU J L, PAN L, et al. Roles and applications of probiotic *Lactobacillus* strains[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2018, 102(19): 8135-8143.
- [29] 崔磊, 郭伟国. 乳酸菌产生的抑菌物质及其作用机制[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(11): 2578-2584.
- [30] 王洋, 王竞儒, 罗云龙, 等. 乳酸链球菌素与乳酸对维氏气单胞菌的协同抑制和损伤作用[J]. 大连海洋大学学报, 2020, 35(6): 830-837.
- [31] SERVIN A L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens[J]. FEMS Microbiol Rev, 2004, 28(4): 405-440.
- [32] 李佳徽, 王明阳, 田相利, 等. 三种不同乳酸菌对凡纳滨对虾生长、抗病力及肠道菌群结构的影响[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2021, 51(4): 44-54.
- [33] LI C Q, TIAN Y, WANG L, et al. Effects of replacing fishmeal by raw or *Lactobacillus acidophilus*-fermented soybean meal on growth, intestinal digestive and immune-related enzyme activities, morphology, and microbiota in turbot (*Scophthalmus maximus* L.)[J]. Aquac Nutr, 2022: 2643235. <https://doi.org/10.1155/2022/2643235>.
- [34] WANG X D, ZHOU Z C, GUAN X Y, et al. Effects of dietary *Lactobacillus acidophilus* and tussah immunoreactive substances supplementation on physiological and immune characteristics of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*)[J]. Aquaculture, 2021, 542: 736897.