

## 2 株海马肠道益生菌的筛选与初步鉴定

周治东<sup>1,2</sup>, 张跃平<sup>1,2</sup>, 骆巧琦<sup>1,2</sup>, 李海平<sup>1,3</sup>, 连张飞<sup>1</sup>, 张丽艳<sup>1,3</sup>,  
郭炳坚<sup>4</sup>, 林荣光<sup>4</sup>, 李纪忠<sup>4</sup>

(1. 福建海洋研究所, 福建 厦门 361013; 2. 福建省海陆界面生态环境联合重点实验室, 福建 厦门 361005;  
3. 福建省海岛与海岸带管理技术研究重点实验室, 福建 厦门 361013; 4. 福建港德水产有限公司, 福建 福州 350000)

**摘要:**从正常养殖的健康线纹海马 (*Hippocampus erectus*) 肠道中分离纯化到 52 株细菌, 通过溶血性实验对肠道菌群进行初筛, 结果发现 52 株肠道细菌均不产生溶血素, 不具有潜在的致病性. 以纸片扩散法在胞外蛋白酶选择培养基上对菌株产蛋白酶的能力进行测试, 筛选出 2 种能够分泌胞外蛋白酶的菌株. 动物安全性实验证实 2 株实验菌对海马无明显的毒害作用. 海马生长参数测定实验显示投喂菌株的实验组体长、体重的日平均增长率均高于不投喂菌株的对照组, 证明所筛选菌株具有一定的生长促进作用, 有望对其进行海马养殖微生物制剂的开发. 随后测定了 2 株细菌的 16S rRNA 基因序列, 分析相应细菌序列的同源性, 构建系统发育树, 结合菌株生理生化特性及其表型特征, 分别将 Hm7 与 Hm28 鉴定为 *Bacillus horikoshii* 和 *Pseudoalteromonas carrageenovora*.

**关键词:**海洋生物学; 海马; 肠道益生菌; 蛋白酶; 水产养殖; 菌种鉴定

DOI: 10.3969/J. ISSN. 2095-4972. 2018. 02. 011

中图分类号: P735

文献标识码: A

文章编号: 2095-4972(2018)02-0241-07

众所周知, 中国水产养殖产业在现阶段发展势头迅猛. 但是随着养殖规模不断扩大, 为了防治养殖作业中水产病害的爆发, 存在着大量使用抗生素的现象. 抗生素极易产生耐药性并残留在水产动物体内, 通过食物链影响到人类健康. 因此, 寻找环保无害的新型水产养殖添加剂成为了当下的研究热点<sup>[1-4]</sup>. 益生菌是对宿主健康有促进作用的活性微生物, 具有促进饵料的消化吸收, 增强养殖动物免疫力, 改善养殖水体生态的作用. 益生菌本身无毒无害, 不残留, 不产生抗药性, 是水产养殖行业的未来趋势<sup>[5-9]</sup>.

海马是海马属 (*Hippocampus*) 鱼类的通称, 隶属于海龙目海龙科, 具有温肾壮阳、活血化瘀等功效. 临床上主要用于治疗阳痿早泄、肾虚作喘、疔疮肿毒等症, 是我国名贵的传统中药材之一<sup>[10-11]</sup>. 随着海马市场需求量日益增大, 海马资源供不应求, 发展人工海马养殖产业势在必行. 目前海马的遗传育种、养

殖技术等方面的研究成果较为丰富<sup>[12-17]</sup>, 但关于海马肠道内源性益生菌的筛选鉴定工作还鲜见报道. 本研究从健康养殖海马肠道中分离纯化出 52 株肠道菌株, 从中筛选出 2 株具有分泌胞外蛋白酶能力的细菌 Hm7 和 Hm28. 随后进行了安全性及生长参数测定实验, 并完成了初步鉴定工作, 以期能为开发海马养殖微生物制剂提供基础研究材料.

### 1 材料与amp;方法

#### 1.1 材料

1.1.1 菌株及其来源 供试菌株为笔者于健康线纹海马 (*Hippocampus erectus*) 肠道中分离纯化到的 52 株细菌. 溶血实验对照菌株副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 为笔者所在实验室保存菌株.

1.1.2 供试线纹海马 供试线纹海马健康无病, 没有投喂过抗生素和其他药物, 购自东山绅蓝生物科技有限公司. 实验前先将海马于 50 dm<sup>3</sup> 白色方形桶

收稿日期: 2017-08-20

基金项目: 福建省公益类科研院所专项资助项目 (2014R1006-7); 福建省海洋经济创新发展区域示范资助项目 (2014FJ-16); “十三五”厦门市海洋经济创新发展示范资助项目 (16PZY002SF-18)

作者简介: 周治东 (1985 ~), 男, 助理研究员, 硕士; E-mail: nirvananan@163.com

通讯作者: 张跃平, 研究员; E-mail: 529244377@qq.com

内暂养 1 个星期,每天换水 1 次.选择无外伤,状态正常的海马用于本实验.

1.1.3 培养基 实验所用溶血性测试培养基,2216E 海水培养基,酪蛋白筛选培养基配方均参照文献<sup>[18-19]</sup>.

## 1.2 方法

1.2.1 细菌的分离与纯化 对海马进行无菌活体解剖操作,剪下肠道并挤出内容物,利用无菌生理盐水对其冲洗 3 次,加 1 cm<sup>3</sup> 无菌生理盐水在匀浆器中研磨匀浆.以匀浆后的样品为原液依次稀释 6 个梯度,分别取原液与各梯度稀释液 0.1 cm<sup>3</sup> 涂布 2216E 平板,置 28℃ 培养 1~2 d.经培养后观察各个平板培养基上的菌落数量,菌落形态大小等特征,挑取密度适合单菌落进行划线培养,纯化出 52 株待筛选海马肠道细菌,用含有 15% 甘油的 2216E 液体培养基保存于 -80℃.

1.2.2 溶血性实验初筛 配制血平板培养基,将经过 2216E 液体培养基过夜活化的阳性对照副溶血弧菌与待测菌株涂布于血平板上,28℃ 下培养 24 h,根据血平板上透明圈的形成情况判断待测菌株是否有溶血反应.

1.2.3 菌株胞外蛋白酶分泌筛选 配制酪蛋白胞外蛋白酶筛选培养基,采用纸片扩散法,将经过 2216E 液体培养基过夜活化的待测菌株梯度稀释到  $1 \times 10^{-4}$ ,吸取 50 mm<sup>3</sup> 滴于贴在培养基表面的无菌滤纸上.28℃ 培养 48 h 后观察滴有菌液的纸片周围是否形成透明的蛋白酶水解圈,并测量计算水解圈直径与菌落直径( $H/D$ )之比.

1.2.4 安全性试验 实验设不投喂菌株对照组,待测菌株 Hm7 实验组和待测菌株 Hm28 实验组,每组 3 个平行.每个平行取暂养 7 d 的健康线纹海马 10 尾,饲养于容量为 50 dm<sup>3</sup> 塑料养殖桶内,加海水至桶的三分之二.对照组每天早晚正常投喂饲料;Hm7 实验组与 Hm28 实验组每天除正常投喂饲料外,还在早上同饲料一起加投入 5 cm<sup>3</sup> 含量为  $1 \times 10^9$  cfu/cm<sup>3</sup> 的 Hm7 和 Hm28 菌液.实验期间每天早上投饵前换水 1 次,及时吸底去除残饵及粪便,确保水质良好无杂质.观察和记录海马 1 个月的发病及死亡情况.实验周期结束后,随机选取实验组海马解剖观察有无病变.

1.2.5 生长参数测定实验 实验设不投喂菌株对照组,待测菌株 Hm7 实验组和待测菌株 Hm28 实验组,每组 3 个平行.每个平行取暂养 7 d 的健康线纹海马 10 尾,饲养于容量为 50 dm<sup>3</sup> 塑料养殖桶内,加海水至桶的三分之二.对照组每天早晚正常

投喂饲料;Hm7 实验组与 Hm28 实验组每天除正常投喂饲料外,还在早上同饲料一起加投 5 cm<sup>3</sup> 浓度为  $1 \times 10^9$  cfu/cm<sup>3</sup> 的 Hm7 和 Hm28 菌液.实验周期为 5 周,实验期间每天早上投饵前换水 1 次,及时吸底去除残饵及粪便,确保水质良好无杂质.观察记录海马生长情况,于实验开始时测量计算各组海马的初始平均体长体重,并后续每周测量 1 次,持续 5 周.

1.2.6 益生菌的鉴定 参考《常见细菌系统鉴定手册》对所筛益生菌进行鉴定<sup>[20]</sup>.鉴定项目包括革兰氏染色实验、扫描电镜下观察细胞、菌落特征验证等.用于 16S rRNA 鉴定的扩增引物为一对通用引物<sup>[21]</sup>,正向引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3';反向引物 1492R: 5'-TACGGCTACTTGTACGACTT-3'.对益生菌进行 16S rRNA 的 PCR 扩增后进行测序.于数据库中对相关序列进行比对,构建系统发育树,分析同源性以确认菌株种类.

## 2 结果与讨论

### 2.1 海马肠道产蛋白酶菌株的筛选

以产生溶血素的副溶血弧菌为阳性对照,生理盐水为阴性对照,将分离自健康养殖线纹海马肠道的 52 株细菌稀释涂布于血平板进行初步筛选.阳性对照组产生了溶血现象,而待测菌株均未观察到产生溶血现象.将 52 株细菌采用纸片扩散法点种到蛋白酶筛选培养基上,若菌株具有分泌胞外蛋白酶的能力,会在纸片周围形成透明的蛋白酶水解圈.通过培养观察,筛选到 Hm7 和 Hm28 2 株能够分泌胞外蛋白酶的细菌(图 1).测量并计算蛋白酶水解圈直径与菌落直径之比( $H/D$ )的平均值,得出 Hm7 的  $H/D$  平均值为 2.33, Hm28 的  $H/D$  平均值为 2.63.

### 2.2 安全性实验

将 90 尾线纹海马分成 3 组,每组设 3 个平行.1 组为对照组,不投喂菌株.另外 2 组分别每天投喂 Hm7 与 Hm28 菌株,每天记录其死亡数,计算累积死亡率.经过 1 个月的投喂实验,结果显示不投喂菌株的实验组海马平均死亡率为 20.0%,投喂菌株 Hm7 与 Hm28 的实验组死亡率分别为 20.0% 与 16.7%(表 1),实验组死亡率没有高于对照组,解剖未见任何消化道病变,各组死亡时间分布较为平均,属养殖过程中的正常损失,没有出现集中死亡的现象.实验结果说明 Hm7 与 Hm28 菌株对海马无明显毒害作用.

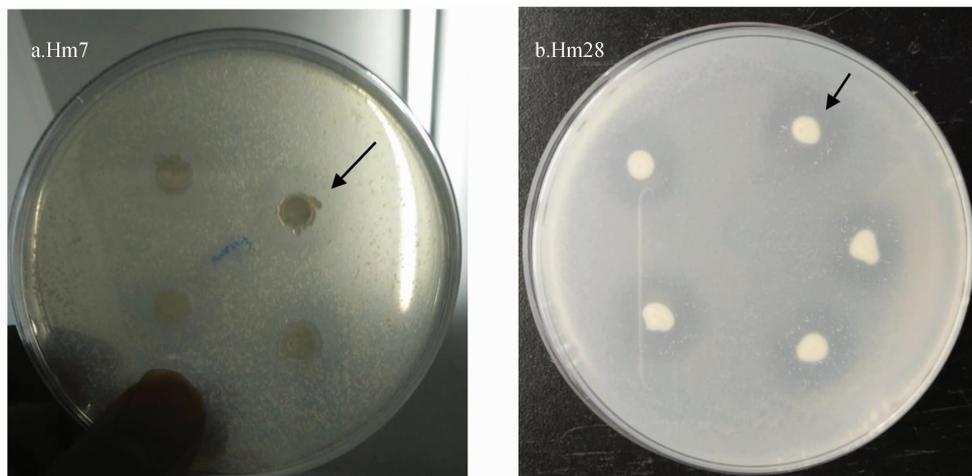


图1 Hm7菌株与Hm28菌株于酪蛋白筛选培养基上产生的水解圈  
Fig. 1 Dissolution circle of strain Hm7 and strain Hm28 on casein medium  
箭头指向水解圈外沿

表1 安全性实验各组线纹海马平均死亡率统计

Tab. 1 Average mortality rate of each group of *Hippocampus erectus* from safety test

组别	初始数/尾	死亡数/尾	死亡率/%
对照组	30	6	20.0
Hm7 实验组	30	6	20.0
Hm28 实验组	30	5	16.7

### 2.3 生长参数测定实验

实验中每周测量各组海马体长体重参数(表2、3)。不投喂菌株的对照组海马初始平均体重为0.750 g,平均体长为4.71 cm。投喂Hm7与Hm28的2个实验组初始平均体重分别为0.771 g和0.733 g,初始平均体长分别为4.83 cm和4.53 cm。观察记录生长情况,实验结束时测量计算可知对照组最终平均体重为1.744 g,平均体长为5.62 cm,平均日增长率分别为3.87%与0.55%;Hm7实验组最终平均体重为1.829 g,平均体长为5.84 cm,平均日增长率分别为3.92%与0.60%;Hm28实验组最终

平均体重为1.773 g,平均体长为5.52 cm,平均日增长率分别为4.06%与0.62%。计算每组体长体重各个实验周期的日均增长率并绘制柱形图(图2、3),通过单因素方差分析法统计对照组与实验组之间的差异性。分析结果显示,Hm28实验组与对照组存在显著差异( $F > F\text{-crit}$ 且 $p < 0.05$ ),说明Hm28菌株的投放对海马成长效果影响较为明显;Hm7实验组与对照组的统计结果虽然显示差异不显著,但是观察柱形图可知,Hm7组的生长参数日均增长率基本上在每个测量周期均大于对照组,说明Hm7菌株具有一定的益生潜力,可作为后续工作的研究对象。

表2 线纹海马体重生长参数实验结果(g)

Tab. 2 Results of body weight experiment for *Hippocampus erectus*

组别	初始平均值	第一周	第二周	第三周	第四周	第五周
对照组	0.753	0.903	1.049	1.133	1.487	1.774
Hm7	0.771	0.934	1.079	1.293	1.531	1.829
Hm28	0.733	0.879	1.046	1.246	1.503	1.773

表3 线纹海马体长生长参数实验结果(cm)

Tab. 3 Results of body length experiment for *Hippocampus erectus*

组别	初始平均值	第一周	第二周	第三周	第四周	第五周
对照组	4.71	4.89	5.07	5.26	5.44	5.62
Hm7	4.83	5.03	5.23	5.44	5.64	5.84
Hm28	4.53	4.73	4.93	5.12	5.32	5.52

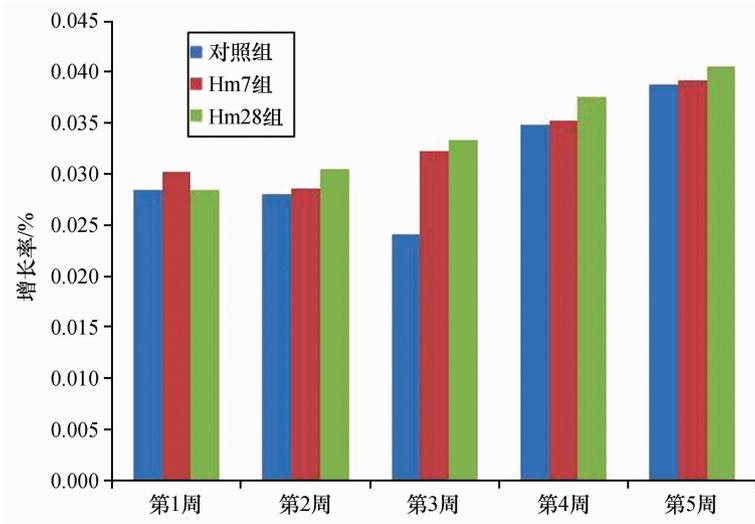


图2 对照组与2个实验组体重各测量周期平均增长率对比

Fig. 2 Comparison of average growth rate for weight between the control group and the two experimental groups

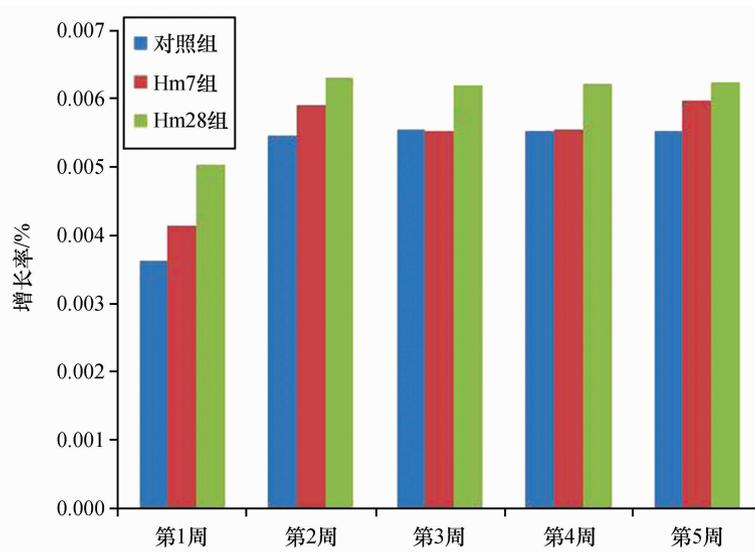


图3 对照组与2个实验组体长各测量周期平均增长率对比

Fig. 3 Comparison of average growth rate for body length between the control group and the two experimental groups

### 2.4 菌株的鉴定

2.4.1 菌落形态特征及菌株扫描电镜观察 将培养基上的菌落置于解剖镜下,观察可知:Hm7 菌落呈圆形、较为平坦、黄白色、不透明、表面较滑润有光泽,革兰氏染色实验显示呈阳性.扫描电镜下观察细胞,呈杆状,两端较钝圆,周生鞭毛(图4a). Hm28 菌落菌落呈圆形、灰白色、中央隆起、边缘整齐光滑、不透明、有异味,革兰氏染色实验显示阴性.扫描电镜下观察细胞形态,呈短杆状,两端钝圆,极生单鞭毛(图4b).

2.4.2 16S rRNA 序列分析 经通用引物对 Hm7 进行 16S rRNA 的 PCR 扩增后测序,所得基因序列长度为 1 277bp. 通过数据库检索筛选出 9 株同源性

高的序列来创建系统发育树,结果如图 5 所示. 通过比较发现,与 Hm7 相似性最高的是 *Bacillus horikoshii* (X76443),相似度高达 99.77%. 结合细菌生理生化及形态特征,将 Hm7 初步鉴定为 *Bacillus horikoshii*.

利用通用引物对 Hm28 进行 16S rRNA 的 PCR 扩增后测序,结果显示所得的基因序列长度为 1 295bp. 通过数据库检索筛选出 12 株同源性高的序列进行系统发育树的构建,结果如图 6 所示. 通过比较发现,与 Hm28 相似性最高的是 *Pseudoalteromonas carrageenovora* (X82136),相似度高达 99.85%. 结合细菌生理生化及形态特征,将 Hm28 初步鉴定为 *Pseudoalteromonas carrageenovora*.

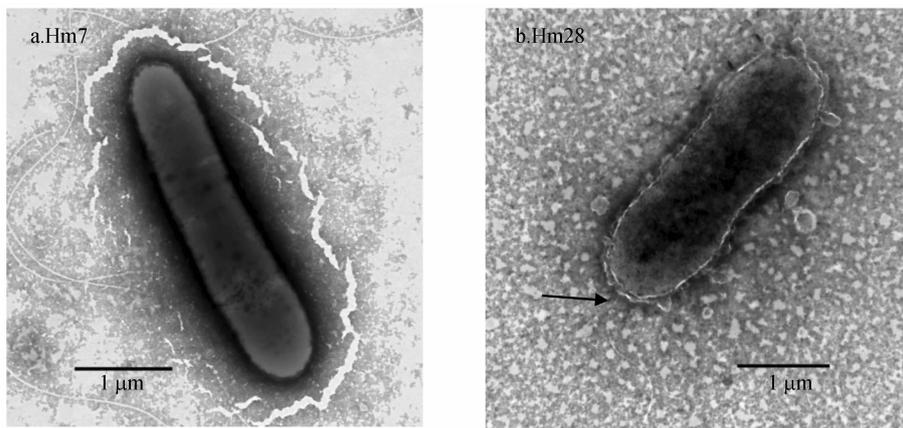


图4 扫描电镜下 Hm7 和 Hm28 的菌株形态

Fig. 4 Morphology of Hm7 and Hm28 strains under scanning electron microscope  
箭头所指为极生鞭毛

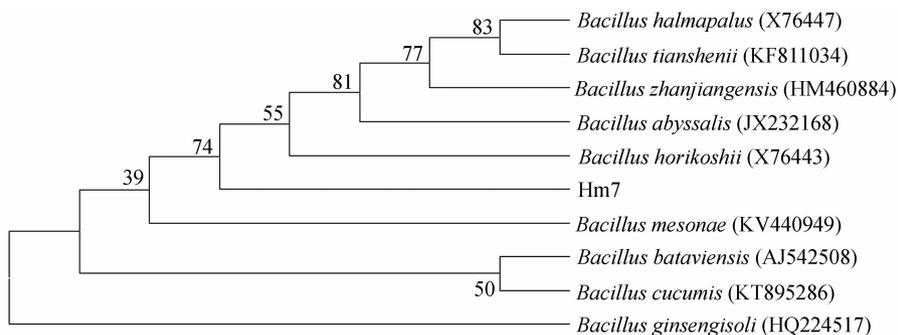


图5 基于菌株 Hm7 16S rRNA 序列的系统发育树构建

Fig. 5 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA sequence of strain Hm7

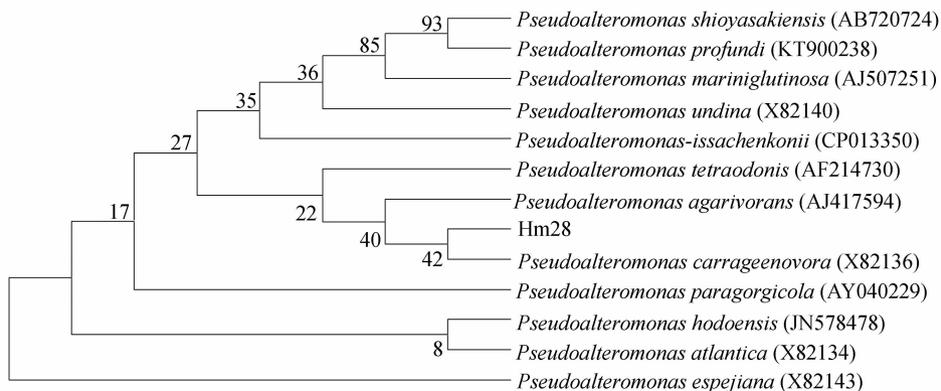


图6 基于菌株 Hm28 16S rRNA 序列的系统发育树构建

Fig. 6 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA sequence of strain Hm28

## 2.5 讨论

水产养殖上使用的益生菌筛选来源一直是个争议较多的问题,一般认为从水产养殖环境和养殖对象的肠胃分离获得的菌株更为适宜作为益生菌进行开发.但考虑到实际养殖过程中水体每日都会更换,养殖水体的菌落结构环境随着换水清池等日常操作并不稳定.本实验筛选到的产生胞外蛋白酶的益生

菌,来源于海马肠胃本身,具有更好的定植性、稳定性和适应性,为今后在海马养殖中开发微生物制剂提供了较大的可能性.

益生菌的筛选工作中,安全性测试是极为重要的环节.本研究通过溶血性测试实验证明了所筛菌株在生化层面上的安全性,又通过投喂实验证明了其在实际饲养中生理方面的安全性,将体内测试与

体外实验相结合,较为全面地评价了菌株的安全性.

国内外学者研究证明,水生动物肠道中普遍存在产酶细菌,Bairagi 等(2004)在南亚野鲮(*labeo rohita*)饲料中添加芽孢杆菌(*Bacillus*),发现鱼的生长、食物转化率和蛋白质利用效率增加<sup>[22]</sup>,ten Doeschate 等(2008)报道了南非鲍(*Haliotis midae*)分离出的交替假单胞菌能够显著提高南非鲍的生长.芽孢杆菌甚至已经在生产中得到应用,成为复合微生物制剂的主要成分<sup>[23]</sup>.本实验所筛选出的2株海马内源性益生菌分别属芽孢杆菌和交替假单胞菌,与前人的研究成果相对应.可以期待在目前进展的基础上,进一步就所筛选益生菌对海马的作用效果及作用机理进行更加深入的探索,最终发展开发微生物制剂,为海马人工养殖产业做出贡献.

### 3 结论

本研究从健康线纹海马肠道中分离纯化到 52

株细菌,以纸片扩散法在胞外蛋白酶选择培养基上对菌株产蛋白酶的能力进行测试,筛选出2种能够分泌胞外蛋白酶的菌株 Hm7 与 Hm28.测定2株细菌的16S rRNA 基因序列后,通过检索分析数据库筛选出高同源性序列构建了系统发育树,结合生理生化特性实验和菌株表型特征分别将 Hm7 与 Hm28 鉴定为 *Bacillus horikoshii* 和 *Pseudoalteromonas carrageenovora*.动物安全性实验证实2株实验菌对海马无毒害作用.海马生长参数测定实验显示投喂菌株的实验组体长体重的日平均增长率均高于不投喂菌株的对照组,证明所筛选菌株具有一定的生长促进作用,有望对其进行海马养殖微生物制剂的开发.

### 参考文献:

- [1] 王艳池,王宇.有益微生物在水产养殖中的应用[J].河北渔业,2011(10):60-61.
- [2] 孟小亮,陈昌福,高宇,等.一株黄颡鱼肠道益生菌的筛选与鉴定[J].华中农业大学学报:自然科学版,2010,29(2):208-212.
- [3] 杨志平,孙飞雪,刘志明,等.刺参肠道潜在产酶益生菌的筛选与鉴定[J].大连海洋大学学报,2013,28(1):17-20.
- [4] 韩士群,刘海琴,周建农,等.有益微生物饲料添加剂对水体生态和鱼生长的影响[J].江苏农业科学,2005(2):91-94.
- [5] 彭运平,何小雄.益生菌与益生元[J].食品工业,2003(2):40-41.
- [6] 邵虎.不同分类鉴定方法在益生菌菌株研究中的应用[J].农业科技与装备,2010(7):27-30.
- [7] 文国樑,袁翠霖,李卓佳,等.罗非鱼养殖系统中蛋白酶产生菌株的筛选与鉴定[J].中国渔业质量与标准,2014,4(1):38-42.
- [8] 张磊,赵志刚.益生菌在水产养殖中的应用[J].北京水产,2006(2):52-56.
- [9] 周国勤,陈树桥,茆建强,等.益生菌在水产养殖方面的研究进展[J].安徽农业科学,2006,34(11):2 421-2 425.
- [10] 刘明生,艾朝辉,邢福桑,等.海马的研究概况[J].时珍国医国药,2010,12(10):948-949.
- [11] 刘国信,茹贺军.海马的人工养殖技术[J].水产科技情报,2006,33(6):254-256.
- [12] 魏祥东,陈东红,叶长明.海马的养殖现状及前景[J].中山大学学报论丛,2002,22(3):236-239.
- [13] 姜松,叶乐,刘宝锁,等.海马人工养殖现状与模式[J].海洋与渔业,2015(7):63-65.
- [14] 席寅峰,尹飞.海马人工养殖技术研究进展[J].渔业信息与战略,2011(10):9-16.
- [15] 戴光谱,徐永健,孙彬.大海马幼苗人工养殖条件的研究[J].渔业科学进展,2011,32(4):62-66.
- [16] 杜庆红,陈栩,朱长寿,等.大海马人工繁殖和育苗技术研究[J].应用海洋学学报,2004,23(2):186-191.
- [17] 骆大鹏,刘庆明,邱名毅,等.三斑海马的驯化与苗种培育研究[J].安徽农业科学,2016,44(31):147-149.
- [18] 王志,蔡俊鹏,徐丽.九孔鲍肠道中产酶菌株的筛选及其与深圳湾菌株的比较[J].粮食与饲料工业,2004(5):34-36.
- [19] 蒋庆茹,柯才焕,虞晋晋,等.杂色鲍肠道益生菌的分离和鉴定[J].厦门大学学报:自然科学版,2012,51(4):782-788.
- [20] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001.
- [21] DeLong E F. Archaea in coastal marine environments[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992,89:5 685-5 689.
- [22] Bairagi A, Sarkar Ghosh K, Sen S K, et al. Evaluation of the nutritive value of *Leucaena leucocephala* leaf meal, inoculated with fishintestinal *Bacillus subtilis* and *Bacillus circulans* in formulated diets forrohu, *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings[J]. Aquaculture Research,2004,35:436-446.
- [23] ten Doeschate K I, Coyne V E. Improved growth rate in farmed *Haliotis midae* through probiotic treatment[J]. Aqua-culture, 2008,284: 174-179.

## Screening and identification of two probiotics strains from sea horse intestine

ZHOU Zhi-dong<sup>1,2</sup>, ZHANG Yue-ping<sup>1,2</sup>, LUO Qiao-qi<sup>1,2</sup>, LI Hai-ping<sup>1,3</sup>, LIAN Zhang-fei<sup>1</sup>,  
ZHANG Li-yan<sup>1,3</sup>, GUO Bing-jian<sup>4</sup>, LIN Rong-guang<sup>4</sup>, LI Ji-zhong<sup>4</sup>

(1. Fujian Institute of Oceanology, Xiamen 361013, China; 2. Fujian Provincial Key Laboratory of Coastal Ecology and Environmental Studies, Xiamen 361005, China 3. Fujian Provincial Key Laboratory of Coast and Island Management Technology Study, Xiamen 361013, China; 4. Fujian Gang De Aquatic Products Limited Company, Fuzhou 350000, China)

**Abstract:** A total of 52 bacterium strains were isolated from healthy sea horse (*Hippocampus erectus*). The hemolysis test was carried out to show that all the bacteria did not product hemolysin, so they were not pathogenic. The ability of producing protease was tested by the method of disk diffusion on the extracellular proteinase selective medium, and 2 strains secreting extracellular protease had been screened out. Safety experiments showed that 2 strains of experimental bacteria were not toxic to sea horse. The growth parameters experiment showed that the daily growth rate of body length and body weight from experimental groups were higher than the control group that fed no probiotics. It's proved that the screening strains have certain growth promoting effect, were expected to be used on aquaculture microbial preparation. Then the 16S rRNA gene sequences of 2 strains were determined. The homology of related strain sequences was analyzed for the phylogenetic tree. Combined with the biochemical phenotype and physiological characteristics, Hm7 and Hm28 were identified as *Bacillus horikoshii* and *Pseudoalteromonas carrageenovora*.

**Key words:** marine biology; sea horse; intestinal probiotics; protease; aquaculture; strain identification

DOI:10.3969/J. ISSN.2095-4972.2018.02.011

(责任编辑:杜俊民)