

鳙鱼肠道菌群多样性及潜在益生菌的分离鉴定

秦振宁, 肖睿铭, 梁书利, 林影*

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东省发酵与酶工程重点实验室, 广东广州 510006)

摘要: 该研究利用三代 16S rRNA 扩增子测序技术分析天然池塘生境鳙鱼肠道菌群特征, 并从中分离潜在益生菌。该生境鳙鱼肠道菌群以厚壁菌门 (Firmicutes, 10.28%) 和变形菌门 (Proteobacteria, 21.47%) 为主。在属水平上, 以未命名菌属 ZOR006 (21.63%)、严格梭菌属 (*Clostridium_sensu_stricto_1*, 10.84%)、罗姆布茨菌属 (*Romboutsia*, 10.34%)、类梭菌属 (*Paeniclostridium*, 9.63%)、甲基孢囊菌属 (*Methylocystis*, 8.74%) 为主。为分离到既有利于营养物质的吸收又能抑制病原微生物的鳙鱼源芽孢杆菌 (*Bacillus*), 对从该生境鳙鱼肠道中分离的菌株进行产酶、抑菌等功能相关益生特性试验。试验共分离出 3 株细菌, YB6、YB42 和 YB56, 通过菌落形态观察及 16S rRNA 序列分析, 鉴定结果显示其分别为贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis* strain)、暹罗芽孢杆菌 (*Bacillus siamensis* strain) 和解淀粉酶芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens* strain)。试验结果表明, 3 株菌均具有良好的产胞外蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶及抑制病原菌的能力, 可以作为促消化和病原拮抗益生菌做进一步的研究。

关键词: 鳙鱼; 肠道菌群; 益生菌; 芽孢杆菌; 分离

文章编号: 1673-9078(2023)05-41-52

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.5.0744

Diversity of Gut Microbiota in Bighead Carp and the Isolation and Identification of Potential Probiotics

QIN Zhenning, XIAO Ruiming, LIANG Shuli, LIN Ying*

(Guangdong Key Laboratory of Fermentation and Enzyme Engineering, School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Using third-generation 16S rRNA amplicon sequencing, characteristics of the gut microbiota of bighead carp in natural pond habitats was analyzed and potential probiotics were isolated from the microbiota. The gut microbiota of bighead carp in natural ponds is dominated by Firmicutes (10.28%) and Proteobacteria (21.47%) at the phylum level. At the genus level, unnamed genera ZOR006 (21.63%), *Clostridium_sensu_stricto_1* (10.84%), *Romboutsia* (10.34%), *Paeniclostridium* (9.63%), and *Methylocystis* (8.74%) were dominant. To isolate *Bacillus* from bighead carp, which is beneficial to the absorption of nutrients and inhibition of pathogenic microorganisms, the probiotic properties of strains isolated from the gut of bighead carps in natural ponds were tested for enzyme production and antibacterial functions. Three strains of bacteria, namely YB6, YB42, and YB56, were isolated in the experiment. Through colony morphology observations and 16S rRNA sequence analysis, these strains were identified as *Bacillus velezensis*, *Bacillus siamensis*, and *Bacillus amyloliquefaciens*, respectively. These three strains exhibited excellent ability to produce extracellular protease, amylase, and cellulase and inhibit pathogenic bacteria; therefore, they may be used as probiotics to promote digestion and antagonize pathogens in further research.

Key words: bighead carp; gut microbiota; probiotics; *Bacillus*; isolation

引文格式:

秦振宁, 肖睿铭, 梁书利, 等. 鳙鱼肠道菌群多样性及潜在益生菌的分离鉴定[J]. 现代食品科技, 2023, 39(5): 41-52.

QIN Zhenning, XIAO Ruiming, LIANG Shuli, et al. Diversity of gut microbiota in bighead carp and the isolation and identification of potential probiotics [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(5): 41-52.

收稿日期: 2022-06-13

基金项目: 广东省重点领域研发计划项目 (2018B020205002)

作者简介: 秦振宁 (1994-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 益生菌在水产养殖上的应用, E-mail: 1768818310@qq.com

通讯作者: 林影 (1964-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 微生物分子改造及酶工程应用, E-mail: feylin@scut.edu.cn

鳙鱼 (*Hypophthalmichthys nobilis*), 又名花鲢、胖头鱼, 属脊索动物门 (Chordata) 硬骨鱼纲 (Osteichthyes) 鲤科 (Cyprinidae), 是我国的重要经济鱼类, 在我国各大水系均有分布。鳙鱼是淡水养殖渔业中产量最高的经济鱼种之一; 2019 年, 我国的鳙鱼产量达到了 310.16 万 t, 可见其经济效益巨大^[1]。

随着集约化养殖模式的推广,抗病药物的普遍使用,使得鱼类养殖环境迅速恶化,鱼类自身免疫力下降,伴随而来的慢性疾病,已成为鱼类养殖行业迫切需要解决的问题^[2]。

肠道菌群是宿主鱼类的重要组成成分,肠道菌群与其宿主及所处的栖息环境之间形成相互依存、相互制约、又相对平衡的微生态系统,鱼类宿主为肠道菌群提供庇护,肠道菌群对宿主的生长发育、营养吸收、免疫能力都起着重要的作用^[3]。鱼类肠道菌群的多样性和丰富度主要受养殖环境、营养类型/饮食方式、宿主种类等三个方面的影响^[4]。因此,对鱼类肠道菌群的研究,有利于鱼类养殖业的健康和可持续发展。

益生菌是一类有益于宿主健康的微生态制剂,具有调节水质、拮抗病原菌、帮助宿主鱼类利用营养物质的功能,对促进鱼类生长、改善养殖环境等具有重要意义,是抗生素等化学药物的重要替代品^[5]。水产行业常见的饲用益生菌包括芽孢杆菌、乳酸菌、丁酸梭菌、酵母菌等^[6]。芽孢杆菌为水产养殖业最常使用的饲用益生菌,产芽孢,可耐受不利环境;其次,多数芽孢杆菌具有分泌胞外蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶、脂肪酶等水解酶的功能,可帮助水产动物利用饲料中的营养物质;此外,部分芽孢杆菌具有抑制病原菌的生长繁殖,提升水产动物自身免疫的能力,是一种优质的活菌类饲用添加剂^[7]。乳酸菌能够通过产酸或细菌素抑制有害菌生长,对鱼类肠道菌群平衡具有重要作用^[8]。丁酸梭菌能促进有益菌群的繁殖,抑制有害菌,可修复受损的肠道粘膜,减少炎症的发生,同时具有增强宿主免疫力的作用^[9]。由于对陆生动物肠道微生物的研究更为深入,获得的益生菌性状稳定,水产行业至今仍主要使用陆生动物源的益生菌^[10]。当前对益生菌的报道显示,宿主源的益生菌更有利于宿主健康^[11]。然而,鱼源益生菌应用于水产养殖却鲜有报道,说明鱼源益生菌的应用还存在不足,有待进一步地探索。

本论文以自然池塘生境鳙鱼为研究对象,在对其肠道菌群进行初步分析的基础上,对候选菌株产蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶活力进行探索,并测定其抑菌能力,分离同时具有产酶和抗菌功能的潜在益生菌。随后探究菌株的生理特性,为鱼源益生菌制剂的开发奠定基础,进而对鳙鱼养殖行业安全、绿色和可持续发展提供保障。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

广州市从化区某天然池塘生境鳙鱼,未人工投喂。鱼塘为梯形,上下底分别为20 m和30 m,两底直线距离15 m,平均深度为2.2 m。

1.1.2 实验材料与试剂

TGuide S96 磁珠法粪便基因组DNA提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;建库试剂盒(SMRTbell Template Prep Kit),PacBio公司;KOD One TM PCR Master Mix, KOD FX Neo (TOYOBO),北京百灵克生物科技有限责任公司;Monarch DNA Gel Extraction,北京鸿跃创新科技有限公司;TE 缓冲液,北京博美富鑫科技有限公司;EB 染料,青岛拓邦生物科技有限公司;DNA Ladder Marker,北京六合通经贸有限公司;ExKubit dsDNA HS Assay Kit,上海吉泰依科赛生物科技有限公司。副溶血弧菌 ATCC17802、牛肉浸膏、营养肉汤培养基(NB)购自广东环凯微生物科技有限公司;L-酪氨酸、多粘菌素 B、干酪素购自上海阿拉丁公司;可溶性淀粉、羧甲基纤维素钠、三氯乙酸购自天津市大茂化学试剂厂。

促芽孢杆菌培养基(CB, *m/V*): 2%胰蛋白胨、3%葡萄糖、0.4% K_2HPO_4 、0.4% NaH_2PO_4 、0.1% $MgSO_4$ 、0.5% $(NH_4)_2SO_4$ 、0.05% $MnSO_4$ 、0.02% $CaCl_2$ 、0.8%酵母提取物, pH 值 7.2;

胰酪大豆胨培养基(TBS, *m/V*): 1.7%胰蛋白胨、0.3%大豆蛋白胨、0.25%无水葡萄糖、0.5% $NaCl$ 、0.25% K_2HPO_4 ;

蛋白酶筛选固体培养基(SP, *m/V*): 1%胰蛋白胨、1%牛肉浸膏、0.5% $NaCl$ 、1%干酪素、2%琼脂;
淀粉酶筛选固体培养基(SA, *m/V*): 1%胰蛋白胨、0.3%牛肉浸膏、0.5% $NaCl$ 、0.2%可溶性淀粉、2%琼脂;

纤维素酶筛选固体培养基(SC, *m/V*): 0.2%羧甲基纤维素钠、0.5%胰蛋白胨、0.5%无水葡萄糖、0.5%牛肉浸膏、0.1% K_2HPO_4 、0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.02%刚果红、2%琼脂;

蛋白酶发酵培养基(FP, *m/V*): 8%麦芽糖、8%胰蛋白胨、0.8%无水氯化钙, pH 值 7.0;

淀粉酶发酵培养基(FA, *m/V*): 1%胰蛋白胨、0.5%酵母提取物、0.1%葡萄糖、0.2% K_2HPO_4 、0.5%可溶性淀粉、0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.02%无水氯化钙, pH 值 7.0;

纤维素酶发酵培养基(FC, *m/V*): 1%胰蛋白胨、1%酵母提取物、1%羧甲基纤维素钠、0.5% $NaCl$ 、0.1% K_2HPO_4 。

1.1.3 样品采集

从池塘捕获鳙鱼,活体带到实验室。解剖取出肠道,迅速转移至超净工作台,去除肠道表面油脂,放置于无菌手术盘,用无菌解剖剪剪开肠道,取出肠道内容物,在液氮中冻存 2 h 后转移到-80 °C 冰箱保存。

1.2 DNA 提取和序列建库

使用 TGuide S96 粪便基因组 DNA 试剂盒提取鳙鱼肠道微生物基因组,采用 synergy HTX 型酶标仪对提取的基因组 DNA 进行浓度检测。

使用 PacBio 公司提供的建库试剂盒 (SMRTbell Template Prep Kit) 对混合产物进行损伤修复、末端修复及连接接头,用 AMPure PB 型磁珠纯化回收从而得到上机文库,经 AMPure PB Beads (Pacbio, USA) 纯化后置于 Sequel II (Pacbio, USA) 测序仪上进行上机测序。

1.3 16S rRNA 全长扩增子测序

对 16S rRNA 全长区段进行扩增,基于 PacBio 测序平台,利用单分子实时测序 (SMRT Cell) 的方法对 marker 基因进行测序,并对获得的结果进行生物信息学统计分析。测序由北京百迈克生物技术有限公司完成。

1.4 测序数据分析

利用 Usearch 软件^[12]对 Reads 进行相似度水平聚类分析,将相似度大于或等于 97% 的 Reads 聚类成一个 OTUs; 以 SILVA 为参考数据库对获得的 OTUs 进行分类学注释,得到注释结果并分析各样本的群落组成,之后利用 R 软件绘制物种聚类图,进行可视化描述。

1.5 鱼肠道内源益生菌的分离及功能实验

1.5.1 芽孢杆菌的分离纯化

采用无菌方法,取淡水鱼肠道内容物于含有预冷 PBS pH 值 7.2 溶液的离心管中,用无菌玻璃棒充分研磨,在震荡仪上震荡 1 min,制得原液。将原液接种于 CB 培养基中,在 37 °C, 200 r/min 条件下培养 24 h。培养结束后将发酵液于 80 °C 水浴 20 min,随后将发酵液进行梯度稀释 (10^{-1} ~ 10^{-6}) 并涂布到 NB 平板上,于 37 °C 培养 24 h; 分离纯化菌株。将获得的纯化菌株与 $\varphi=40\%$ 的无菌甘油等体积混合加入 2 mL 冻存管,于-80 °C 保存。

1.5.2 菌株产水解酶能力鉴定

1.5.2.1 水解酶定性

参照陈小敏^[13]和廖秀冬^[14]报道的方法对候选菌

株进行产酶能力测定 (略作修改); 将 1.5.1 分离到的菌株分别点种于 SP 固体培养基、SA 固体培养基和 SC 固体培养基,于 37 °C 条件下静置培养 24 h,培养后的具体操作如下:

(1) 产淀粉酶细菌筛选: 往筛选平板中滴加适量碘液,染色 1 min,弃碘液;

(2) 产蛋白酶细菌筛选: 往平板中滴加适量 $\varphi=10\%$ 的三氯乙酸溶液,静置 15 min 后倒去;

(3) 产纤维素酶细菌筛选: 直接观察是否存在透明圈;

观察并记录菌落直径 (C , mm) 和水解圈直径 (H , mm), 算出 H/C 值, 以此定性表征菌株的产酶能力。

1.5.2.2 水解酶定量

将 1.5.1 分离到的菌株接种于 NB 液体培养基, 37 °C、200 r/min 条件下培养 24 h 得种子液。测定种子液 $OD_{600\text{nm}}$ 值,经换算,按 0.1 $OD_{600\text{nm}}$ 的浓度分别接种于 FP 培养基、FA 培养基和 FC 培养基,于 37 °C、200 r/min 发酵培养 48 h; 发酵液于 4 °C 经 7 000 r/min 离心 5 min 后获得粗酶液。

参考 GB/T 23527 的方法测定粗酶液的蛋白酶酶活,参考 DNS 法分别测定粗酶液的淀粉酶酶活^[15]和纤维素酶酶活^[16]; 具体实验操作及方法略作调整。

蛋白酶活力单位 (U): 1 mL 粗酶液在 40 °C 条件下,每分钟从浓度为 1.0% (m/V) 的干酪素溶液中产生 1 μg 酪氨酸为 1 个酶活力单位。

淀粉酶活力单位 (U): 1 mL 粗酶液在 37 °C 条件下,每分钟从浓度为 1.0% (m/V) 的可溶性淀粉溶液中产生 1 μmol 还原糖 (以葡萄糖表征) 为 1 个酶活力单位。

纤维素酶活力单位 (U): 1 mL 粗酶液在 50 °C 条件下,每分钟从浓度为 0.8 mg/mL 的羧甲基纤维素钠溶液中产生 1 μmol 还原糖 (以葡萄糖表征) 为 1 个酶活力单位。

$$X_1 = \frac{C_1}{t} \times n \times k \times \frac{V_1}{V_0} \quad (1)$$

$$X_2 = \frac{C_2}{M \times t} \times n \times k \times \frac{V_1}{V_0} \times 1000 \quad (2)$$

式中:

X_1 ——蛋白酶活力;

X_2 ——淀粉酶活力/纤维素酶活力;

C_1 ——反应体系中产生的酪氨酸的量, $\mu\text{g/mL}$;

C_2 ——反应体系中产生的葡萄糖的量, mg/mL ;

t ——反应时间, min;

n ——酶液稀释倍数;

k ——反应体系加入的酶液转化为 1 mL 的系数;

V_1 —反应体系的体积, mL;

V_0 —加入的酶液体积, mL;

1 000—转化因子, 1 mmol=1 000 μ mol;

M —葡萄糖的相对分子质量, 180.2 g/mol。

1.5.3 抑菌能力测定

参考梁东梅等^[17]的报道, 采用琼脂扩散法测定候选菌的抑菌能力。芽孢杆菌接种于 NB 液体培养基, 37 °C 摇瓶发酵 48 h 后, 经 4 °C 7 000 r/min 离心 5 min 制得发酵上清液。先将琼脂水倾注于培养皿中, 待凝固后将 4 个牛津杯均匀地放在培养皿上; 取 0.1 mL 1.0 OD_{600 nm} 的副溶血弧菌 ATCC17802 或嗜水气单胞菌 PQ2 与 100 mL TSB 固体培养基混匀后注入平板, 待培养基凝固后, 用镊子拔出牛津杯。取 100 μ L 发酵上清液加入其中 2 个小孔中, 同时用 100 μ L 的 NB 液体培养基做空白对照, 以 100 μ L 1 mg/mL 的多粘菌素 B 作为阳性对照, 每株菌做 3 个孔的重复试验。将培养皿放 4 °C 冰箱 3 h, 待孔内液体完全扩散后转移至 37 °C 培养箱倒置培养 24 h, 测量各孔抑菌圈直径。候选菌株的相对抑菌率 I (%) 用以下公式表示:

$$I = \frac{H_1}{H_2} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

I —候选菌株的相对抑菌率, %;

H_1 —实验组抑菌圈直径, mm;

H_2 —阳性对照抑菌圈直径, mm。

1.5.4 候选菌株粘附能力测定

益生菌的粘附能力是发挥其益生功能的一个重要指标; 根据以往的报道, 菌株的疏水作用、自聚集、候选菌株同病原菌的共聚集作用等与益生菌的高粘附性能相关^[18]。因此本研究采用疏水性、自聚集率、同副溶血弧菌 ATCC17802 的共聚集三个指标表征候选菌株的粘附能力。

本研究采用微生物粘附碳氢化合物法测定菌株表面疏水特性, 以二甲苯为有机相; 疏水特性、自聚集和共聚集的测定均参照向鑫玲等^[19]的报道, 测定菌液与二甲苯充分混匀后静置 1 h 的疏水率, 测定菌液室温下分别静置 2、4、6 和 8 h 的自聚集率, 测定菌液同副溶血弧菌 ATCC17802 充分混匀后于室温下分别静置 2、4、6 和 8 h 的共聚集率。具体疏水率、自聚集率和共聚集率均采用公式 (4) 计算。

$$A = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100\% \quad (4)$$

式中:

A —疏水率、自聚集率或与病原菌 ATCC17802 共聚集得到对应时间的共聚集率, %;

A_0 —初始时间 0 h 处 OD_{600 nm}, 或者候选菌株与病原菌混合后的初始 OD_{600 nm};

A_t —相应时间点的 OD_{600 nm}。

1.5.5 生长曲线的测定

将候选菌株按 0.1 OD_{600 nm} 浓度接种于 NB 液体培养基, 37 °C、200 r/min 恒温培养 36 h, 前 16 h 每隔 2 h 测定一次 OD_{600 nm} 值, 之后在 20、24 和 36 h 分别测定一次菌株培养液的 OD_{600 nm} 值, 记录数据并绘制生长曲线。

1.5.6 菌株形态及种属鉴定

参照东秀珠^[20]等编撰的《常见细菌系统鉴定手册》观察菌落形态并记录。测定菌株 16S rRNA 全长序列, 提交至 NCBI 数据库进行序列比对, 利用 MEGA-X 构建系统发育树, 确定种属地位。

1.6 数据统计与分析

实验数据用 Excel 2019 和 Graphpad Prism 7.0 软件进行处理, 各数据使用单因素方差 (One-Way ANOVA) 分析, 显著性 t 检验 $P < 0.05$ 表示差异显著; 每个实验设置三个平行, 即平均值 \pm 标准偏差 (mean \pm SD) 表示。

2 结果与讨论

2.1 鳙鱼肠道菌群多样性

2.1.1 测序数据注释结果和 Alpha 多样性组成

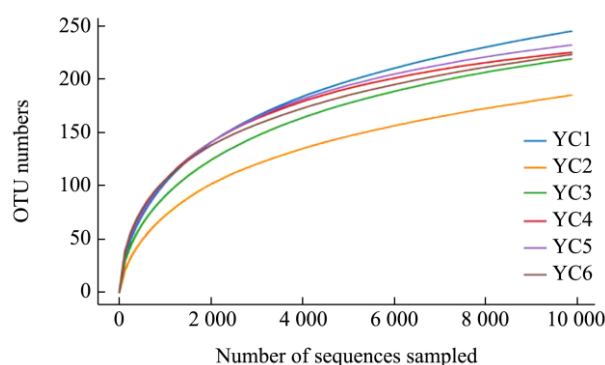


图1 鳙鱼肠道菌群 OUT 稀释曲线

Fig.1 OUT rarefaction curve of the bacterial communities in the intestinal flora of bighead carp

注: YC 表示鳙鱼肠道样品 (1~6 分别代表 6 个样品), 图 2 同。

对获得的 3 条鳙鱼按照 1.1.3 的方法采集肠道内容物样品, 每条鱼采集 2 个重复共 6 个样品, 经三代 16S rRNA 扩增子测序, 对得到的序列进行预处理, 共得到 77 708 条细菌序列, 进一步去除嵌合体得到 76 885 条有效序列 (98.94%), 有效序列长度分布在

1 320~1 650 bp 之间, 平均序列长度为 1 456.67 bp。使用 Usearch 软件以序列相似度为 97% 进行 OTU 聚类, 共获得 327 个 OTUs。如图 1 所示, 在本次实验的测序深度下, 鳙鱼肠道内容物样本的稀释曲线趋于平缓, 说明本实验的测序深度足够, 测序的数据量合理。鳙鱼肠道 6 个样品的花瓣图如图 2 所示, 所有样品中共有的 OTUs 数量有 115 个; 表明所测数据结果的平行性良好, 数据可靠。

根据鳙鱼肠道微生物的 OTUs 数量, 对其进行 Alpha 多样性分析。Chao1 和 ACE 指数表征物种丰富度; 以 Shannon 和 Simpson 指数表征物种多样性。如表 1 所示, 6 个样品的平均 Coverage 达到了 99.43%,

表 1 鳙鱼肠道样品中检测到的 OTU 数及 Alpha 多样性指数

Table 1 The OTUs number and Alpha diversity index of intestinal flora in bighead carp

Groups	OTUs	Chao1	ACE	Shannon	Simpson	Coverage/%
YC	221.50±8.33	275.52±31.25	273.08±21.10	4.45±0.65	0.88±0.07	99.43±0.09

注: 表中数据均为平均值±标准差 (n=6); YC 表示鳙鱼肠道样品。

2.1.2 鳙鱼肠道菌群分类组成

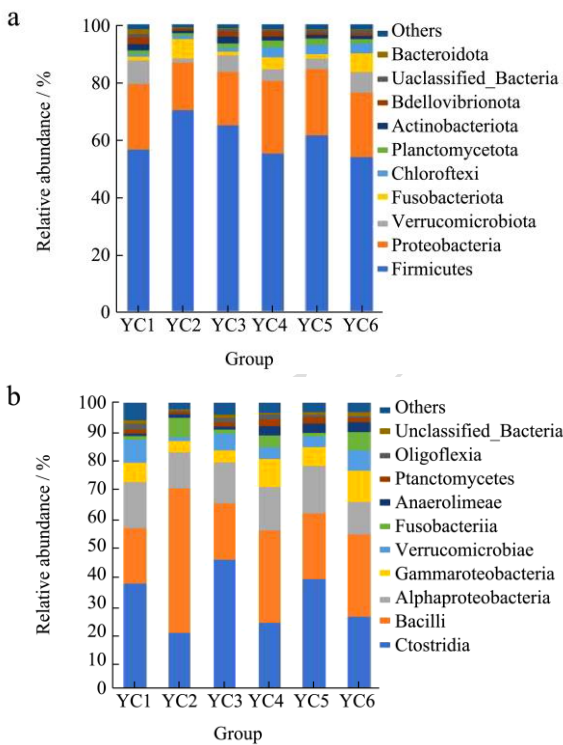


图 3 鳙鱼肠道菌群在门、纲水平上的相对丰度

Fig.3 Relative abundance of microorganisms bighead carp intestinal flora on the phylum/class level

注: a、b 分别为门和纲水平上的相对丰度, YC 为鳙鱼肠道组 (1~6 分别代表 6 个样品)。

基于 97% 的序列相似度进行 OTU 聚类分析, 图 3a 为门水平相对丰度图。在本研究中, 鳙鱼肠道菌群共富集到 18 个门, 选取丰度前 10 的门做柱状图, 其他丰度较低的门分类到 Others。从图中结果可以看

此结果表明本次测序的数据基本可以反映鳙鱼肠道内容物中绝大多数细菌种类的组成情况。

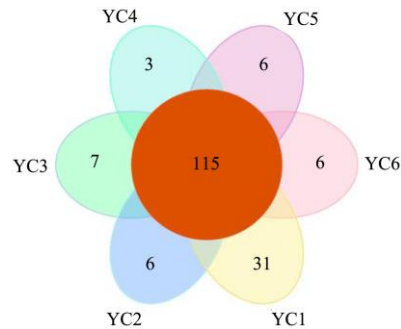


图 2 鳙鱼肠道样品的花瓣图

Fig.2 Flower diagram of OTUs in bighead carp intestine

出, 鳙鱼肠道中占比最高的为厚壁菌门 (Firmicutes, 60.28%); 其次为变形菌门 (Proteobacteria, 21.47%); 还包括一定丰度的疣微菌门 (Verrucomicrobia, 5.08%)、梭杆菌门 (Fusobacteria, 3.54%)、绿弯菌门 (Chloroflexi, 2.23%)、浮霉菌门 (Planctomycetes, 1.63%)、放线菌门 (Actinobacteria, 1.52%)。

鳙鱼为滤食性鱼类, 主要摄食水环境中的浮游动物、浮游植物和腐殖质^[21]。根据以往报道, 绝大多数淡水鱼肠道菌群以变形菌门和厚壁菌门为主, 本研究与该结果一致。胡蓓娟的研究表明, 三种不同养殖环境的鳙鱼, 其肠道优势菌群均以变形菌门、梭杆菌门、拟杆菌门、放线菌门和厚壁菌门为主^[22]。Li 等^[23]在对鲤鱼、草鱼、鳙鱼、鲢鱼四类传统淡水鱼的研究中发现, 在相同的养殖环境下, 四类鱼的肠道菌群丰度的相似性较高, 优势细菌为变形菌门、厚壁菌门和梭杆菌门。

从纲水平上看, 鳙鱼肠道菌群共富集到 32 个纲, 选取丰度前 10 的纲做柱状图, 其他分类到 Others, 图 3b 为纲水平上的相对丰度图。梭菌纲 (Clostridia, 31.20%)、芽孢杆菌纲 (Bacilli, 29.03%)、 α -变形菌纲 (Alphaproteobacteria, 14.44%)、 γ -变形菌纲 (Gammaproteobacteria, 7.03%) 和疣微菌纲 (Verrucomicrobiae, 5.02%) 主导了鳙鱼肠道菌群。根据以往的报道, 水产养殖上经常使用的益生菌主要为光合细菌、芽孢杆菌, 乳酸菌、硝化细菌和反硝化细菌^[24]。其中芽孢杆菌和乳酸菌都属于厚壁菌门的芽孢杆菌纲, 而光合细菌、硝化细菌和反硝化细菌一般都属于 α -变形菌纲和 γ -变形菌纲^[25,26]。本研究测序结

果发现鳙鱼肠道富集高丰度的芽孢杆菌纲、 α -变形菌纲和 γ -变形菌纲,说明该生境鳙鱼肠道中可能具有丰度较高的有益菌属。

在属水平上,严格梭菌属(*Clostridium_sensu_stricto_1*, 10.84%)、罗姆布茨菌属(*Romboutsia*, 10.34%)、类梭菌属(*Paeniclostridium*, 9.63%)、甲基孢囊菌属(*Methylocystis*, 8.74%)、*Breznakia*, 6.14%、鲸杆菌属(*Cetobacterium*, 5.73%)、嗜热杆菌属(*Chthoniobacter*, 3.70%)以及丰度最高的未命名菌属 ZOR0006(21.63%)为主要的优势菌属,属水平部分物种丰度结果见图4。

从测定的结果来看,鳙鱼肠道富集到一定丰度的鲸杆菌属(*Cetobacterium*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*),这几类菌属中含有潜在益生菌,可以在水产养殖中发挥有益功能。Hao等^[27]的研究表明,鲸杆菌属与蛋白质消化呈正相关,在肠道中具有协助消化蛋白质的功能。此外,有研究表明,*Cetobacteriumsomerae*能够产生维生素B₁₂,其在肠道中的丰度与宿主鱼类对维生素B₁₂的需求有关^[28]。有报道显示,将草鱼饲料从鱼粉更换成苏丹草后,草鱼后肠中拟杆菌的丰度显著上升,说明拟杆菌可能能够分泌与植物纤维多糖降解相关的酶,分解植物纤维为宿主鱼类供能^[29]。在淡水鱼养殖过程中,由于芽孢杆菌具有良好的益生功能,经常被作为功能饲料添加剂应用到水产养殖中^[30]。综上所述,从天然未投料池塘中获得的鳙鱼,其肠道中可能含有丰度较高的潜在益生菌,有利于鳙鱼宿主源肠道有益菌株的分离。下文将探讨从鳙鱼肠道样品中分离的芽孢杆菌,对其益生特性进行初步探索,以期分离到可用于鱼类养殖的饲用益生菌。

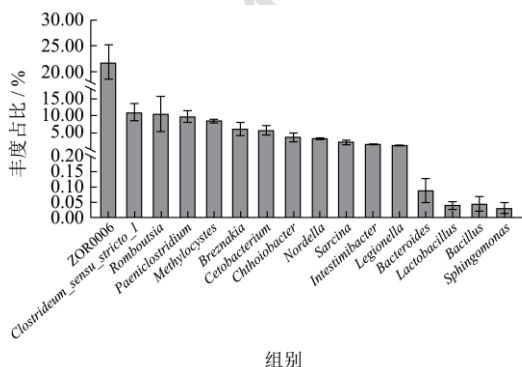


图4 鳙鱼肠道菌群属水平上的相对丰度

Fig.4 Relative abundance of microorganisms in bighead carp intestinal flora on the genus level

2.2 鳙鱼肠道芽孢杆菌的分离鉴定及功能分析

2.2.1 鳙鱼肠道芽孢杆菌分离

根据1.5.1的方法,从鳙鱼肠道内容物中分离得到118个纯培养,分别命名为YB1-YB118,全部保存于本实验室。以产水解酶和抑菌功能为主要评价指标,对获得的118株菌进行功能测定。

2.2.2 芽孢杆菌水解酶定性分析

表2 候选芽孢杆菌产蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶定性测定

Table 2 Qualitative determination of protease, amylase and cellulase of isolated bacillus

序号	菌株	蛋白酶 H/C	淀粉酶 H/C	纤维素酶 H/C
1	YB2	2.09±0.04	2.18±0.10	1.66±0.02
2	YB6	2.20±0.03	2.79±0.18	2.10±0.08
3	YB11	2.05±0.13	2.18±0.24	ND
4	YB22	1.71±0.06	1.53±0.18	1.80±0.05
5	YB24	1.84±0.06	2.10±0.06	1.89±0.03
6	YB25	2.15±0.15	2.44±0.10	ND
7	YB42	2.13±0.11	2.47±0.05	2.13±0.05
8	YB43	1.89±0.03	1.75±0.17	1.68±0.05
9	YB55	1.35±0.11	1.66±0.15	ND
10	YB56	2.45±0.16	2.01±0.15	ND
11	YB60	2.69±0.23	2.37±0.08	1.61±0.05
12	YB61	1.47±0.11	1.31±0.02	1.32±0.07
13	YB64	2.01±0.18	1.88±0.11	1.55±0.01
14	YB75	1.41±0.15	1.42±0.06	1.28±0.08
15	YB81	1.17±0.07	1.21±0.03	1.18±0.04
16	YB85	1.67±0.13	1.71±0.14	2.09±0.02
17	YB86	1.78±0.16	1.62±0.06	1.55±0.09
18	YB91	1.39±0.07	1.52±0.05	1.31±0.05
19	YB97	1.39±0.13	1.52±0.06	1.48±0.05
20	YB103	1.41±0.07	1.61±0.06	ND
21	YB108	1.46±0.07	1.43±0.12	1.43±0.08
22	YB109	1.42±0.12	1.56±0.07	1.41±0.04
23	YB110	1.42±0.07	1.34±0.01	1.67±0.09
24	YB111	1.46±0.11	1.52±0.06	1.40±0.02

注:数据全部使用平均值±标准差(mean±SD)表示,只要H/C值大于1,则表示存在水解圈,该菌株产酶;若未生长或者不产酶,则用“ND”表示。

根据1.5.2.1的方法,定性测定118株菌的蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶活力;选出24株产酶活力较高的菌株,具体测定结果如表2所示。在这24株菌中,发现YB2、YB6、YB11、YB24、YB25、YB42、YB56、YB60、YB64、YB85共10株菌的酶活力较高,至少有一种酶的H/C值大于2。其中YB6、YB42产蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶的H/C值均大于2;YB2、YB11、YB25、YB56、YB60的蛋白酶和淀粉酶的H/C值均大于2,剩余的YB24、YB64和YB85分别对应只有

淀粉酶、蛋白酶和纤维素酶的 H/C 值大于 2; 10 株菌中 YB11、YB25、YB56 不具有纤维素酶活力。后续对这 10 株菌进行蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶定量测定; 选定已报道具有高酶活性的枯草芽孢杆菌 B9^[31]作为阳性对照, 以不产蛋白酶和淀粉酶的 YB98 及不产纤维素酶的 YB25 作为阴性对照。

2.2.3 菌株的产酶能力

按照 1.5.2.2 的方法定量测定 B9、YB2、YB6、YB11、YB24、YB25、YB42、YB56、YB60、YB64、YB85 共 11 株菌的蛋白酶和淀粉酶; 测定除 YB11 和 YB56 以外的 9 株菌的纤维素酶酶活, 具体测定结果如图 5 所示。

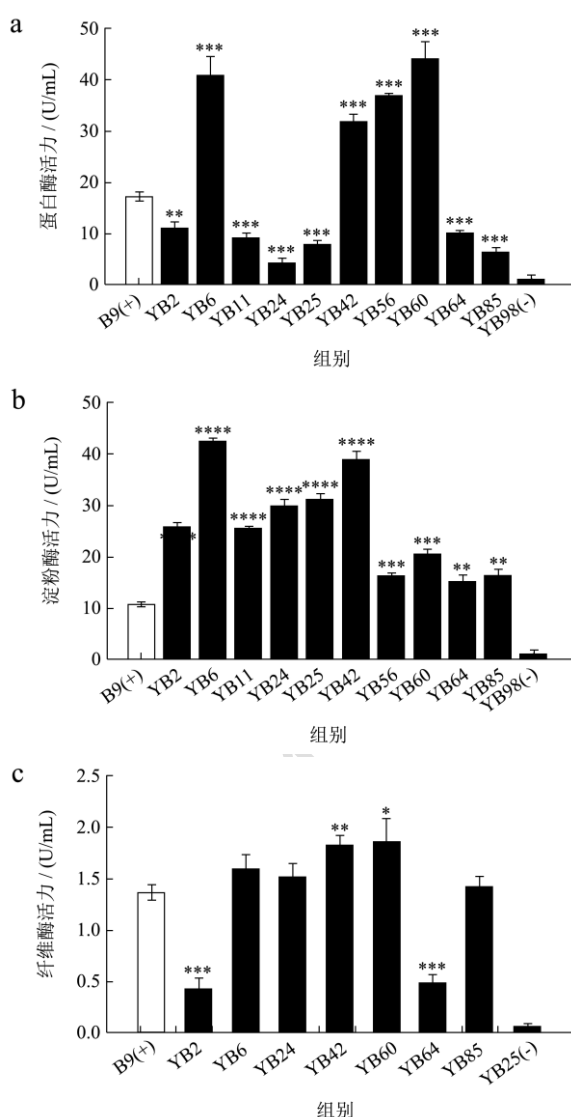


图 5 候选菌株水解酶活力对比

Fig.5 Hydrolase activities of different isolated *Bacillus*

注: a: 蛋白酶酶活; b: 淀粉酶酶活; c: 纤维素酶酶活。

与阳性对照菌株 B9 相比: *表示 $P < 0.05$; **表示 $P < 0.01$; ***表示 $P < 0.001$; ****表示 $P < 0.0001$ 。

根据测定结果, 发现 YB6 和 YB42 表现出良好产

酶能力, 其蛋白酶活力分别达到了 40.73 U/mL 和 31.93 U/mL, 均高于阳性对照菌 B9 的 17.08 U/mL; 其淀粉酶活力分别达到了 42.31 U/mL 和 38.79 U/mL, 同时高于阳性对照菌 B9 的 10.59 U/mL; 其纤维素酶活力分别达到了 1.58 U/mL 和 1.81 U/mL, 仍高于阳性对照菌 B9 的 1.35 U/mL; 据此结果, 说明 YB6 和 YB42 具有良好的产酶能力。此外, YB56 和 YB60 具有较高的产蛋白酶; 其蛋白酶产生能力分别达到了 36.85 U/mL 和 43.71 U/mL。在淀粉酶的产生方面; YB2、YB11、YB24、YB25、YB56、YB60、YB64 和 YB85 均有不俗的表现, 其淀粉酶活力分别达到了 25.58、25.18、29.81、30.90、16.14、20.31、15.16 和 16.08 U/mL。在纤维素酶产生方面除 YB2 和 YB64 外, 其他五株菌的纤维素酶活力均不低; YB2、YB24、YB60、YB64 和 YB85, 其纤维素酶活力分别对应为 0.42、1.52、1.85、0.47 和 1.41 U/mL。

根据刘晓艳等^[32]的报道, 其分离出一株高产中性蛋白酶的芽孢杆菌, 中性蛋白酶活力在优化前达到 28.99 U/mL, 本研究中所测定的蛋白酶为中性蛋白酶, 有 YB6、YB42、YB56、YB60 共四株菌的蛋白酶活力超过 31 U/mL, 可认为是高产中性蛋白酶的菌株。根据刘延波^[33]报道, 其分离出一株高产淀粉酶的菌株, 优化前的淀粉酶活力达到 37.13 U/mL, 本研究所测定的所有菌株的淀粉酶活力与该报道的差距不大, 其中 YB6 和 YB42 两株菌的淀粉酶活力均超过 38 U/mL, 表现出高产淀粉酶活力。陈龙等^[34]报道显示, 其分离出一株高产纤维素酶的芽孢杆菌, 其纤维素酶活力达到 1.106 U/mL, 本研究测定的 7 株候选菌, 其中有四株与阳性对照菌株 B9 具有显著差异, 除 YB2 和 YB64 以外, 其他 5 株候选菌的纤维素酶都达到或超过 1.41 U/mL, 表现出良好的纤维素酶活力。

根据以往的报道, 将芽孢杆菌添加到鱼类饲料中能够显著提升鱼类的生长性能^[35]。鱼类生长性能的提升主要依靠两个方面, 其一为提升鱼肠道内消化酶活力, 高效利用食物中的营养物质, 促进机体的生长。第二个方面为提升鱼类自身免疫力, 增加抵抗病原菌感染的能力, 降低发病率^[36]。从这两个方面来看, 若饲料中补充的芽孢杆菌能够增加鱼肠道内消化酶的活力, 并协助宿主抵抗病原微生物, 便有益于养殖鱼类的健康, 可促进养殖产量的提升。为分离出既高产酶又具有抗菌功能的益生菌, 根据上述的分析, 发现 YB6、YB42、YB60 的三种酶活力均较高, YB56 高产蛋白酶和淀粉酶, YB24 和 YB85 高产淀粉酶和纤维素酶, 选定此 6 株菌和对照菌株 B9, 测定这 7 株菌对水产养殖常见的病原菌, 副溶血弧菌 ATCC17802

和嗜水气单胞菌 PQ2 的抑制作用。

2.2.4 候选菌株的抑菌能力

根据 1.5.3 的方法,测定 B9、YB6、YB24、YB42、YB56、YB60、YB85 对副溶血弧菌 ATCC17802 和本实验室保藏的鱼源嗜水气单胞菌 PQ2 的抑制功能。根据测定结果,发现仅 YB6 和 YB42 对两种病原菌均具

有抑制功能,其他 5 株菌仅对副溶血弧菌 ATCC17802 具有抑制功能;除 B9 外,所有菌株对副溶血弧菌 ATCC17802 的抑制效率均达到了 60% 以上,其中 YB56 的相对抑菌率最高,达到了 91.87%;YB6 和 YB42 对两种病原菌的抑制效率都达到了 70% 以上,具体结果如表 3 所示。

表 3 候选芽孢杆菌对两株病原菌的抑制能力比较

Table 3 Inhibitory ability of different isolated *Bacillus* against two pathogens

序号	菌株	嗜水气单胞菌 PQ2		副溶血弧菌 ATCC17802	
		抑菌圈直径 H/mm	相对抑菌率/%	抑菌圈直径 H/mm	相对抑菌率/%
1	B9	0	ND	9.82±0.27	59.13
2	YB6	14.91±0.28	78.93	12.05±0.14	72.51
3	YB24	0	ND	11.23±0.12	67.58
4	YB42	13.32±0.14	70.54	13.35±0.23	80.34
5	YB56	0	ND	15.26±0.17	91.87
6	YB60	0	ND	11.69±0.23	70.39
7	YB85	0	ND	13.10±0.14	78.87
8	多粘菌素 B	18.89±1.11	100	16.61±0.32	100

注: 抑菌圈直径全部使用平均值±标准差 (mean±SD) 表示,其中多粘菌素 B 为阳性对照;若不产生抑菌圈,抑菌圈直径为 0 mm,相对抑菌率用“ND”表示。

2.2.5 菌株的粘附能力

菌株的粘附性能是其能够发挥益生功能的一个重要的影响因素,为分离出高粘附特性的菌株,本部分选定具有抑制两种病原菌的候选菌株 YB6 和 YB42,以及具有高抑菌功能的 YB56,测定此三株菌的粘附性能。仍选用枯草芽孢杆菌 B9 为对照,根据 1.5.4 的方法测定候选菌株的疏水作用、自聚集率、同副溶血弧菌 ATCC17802 的共聚集作用。

疏水能力测定结果如图 6 所示,根据测定结果发现,YB6 和 YB42 具有较高的疏水性能,YB56 疏水性能相对较低;B9、YB6、YB42、YB56 的疏水率分别达到了 30.72%、44.93%、68.75% 和 14.74%。

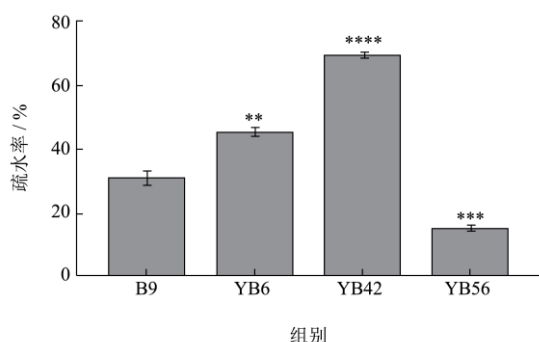


图 6 候选菌株疏水能力测定结果

Fig.6 Cell surface hydrophobicity of different isolated *Bacillus*

注: 与对照菌株 B9 相比: *为 $P<0.05$; **为 $P<0.01$; ***为 $P<0.001$; ****为 $P<0.0001$ 。

食物经鲮鱼摄食后在其肠道内大体经 5 h 消化后排出体外,未粘附或者未定植的肠道细菌在此过程中也随食物残渣排出体外,为确保试验的可靠性,选定自聚集和共聚集测定时间为 8 h,每隔 2 h 测定一次。菌株的自凝聚是指细胞间相互聚集形成多细胞簇并最终沉降下来的过程,自聚集率的测定结果如图 7 所示。根据测定结果,三株菌均具有一定的自凝聚能力,其中 YB6 和 YB42 自聚集性能较好,在 8 h 的自凝聚率分别达到了 49.27% 和 57.07%,其自聚集均高于对照菌株 B9, B9 在 8 h 的自凝聚率为 34.52%;正好可以对应 YB6 和 YB42 良好的益生功能。此外, YB56 在 8 h 的自聚集率和 B9 近似,在 8 h 的自聚集率为 36.20%;说明其具有一定的自聚集能力。

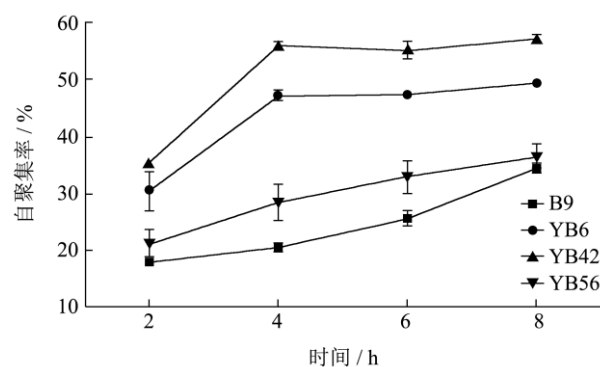


图 7 候选菌株自凝聚率

Fig.7 The auto-aggregation ability of different isolated *Bacillus*

候选菌株与副溶血弧菌 ATCC 17802 的共聚集结果如图 8 所示, 根据测定结果, 发现所有菌株与 ATCC17802 的共凝聚率都是随着时间的延长而上升。YB6 和 YB42 的共凝聚率较高, 在 8 h 的共凝聚率分别为 55.16% 和 64.49%; B9 和 YB56 在 8 h 的共凝聚率分别为 36.14% 和 46.68%, 由此可见, 三株候选菌和对照菌 B9 均表现出与副溶血弧菌 ATCC17802 有良好的共聚集作用。

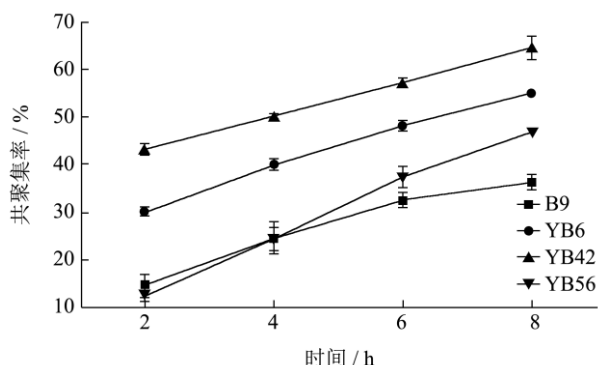


图 8 候选菌株对副溶血弧菌 ATCC17802 的共聚集率

Fig.8 Copolymerization rate of different isolated *Bacillus* with *Vibrio parahaemolyticus* ATCC17802

根据对菌株的疏水性能, 自聚集率, 同副溶血弧菌 ATCC17802 的共凝聚率的测定, 发现菌株的三种性能具有一定的正向相关性, 疏水率高的 YB6 和 YB42 同时表现出良好的自聚集性和共聚集特性; 这与张文晓等^[37]的报道一致, 说明用疏水性能、自聚集率和共聚集率表征菌株的粘附性能是相对可靠的。此外, 自聚集率和共聚集率都表现出一定的时间依赖性, 随着时间的延长, 自聚集率和共聚集率均表现出上升趋势。另外, 候选菌株与副溶血弧菌 ATCC17802 的共凝聚作用不仅仅与菌株的疏水率和自聚集率相关, 可能还与菌株的抑菌功能相关。

2.2.6 菌株的生长曲线测定

菌株的生长曲线是定性描述菌株生长繁殖变化的曲线, 在严格控制培养基成分及培养条件的情况下, 通过测定菌株培养液在 600 nm 下的 OD 值可以了解培养菌液生物量的变化, 生长能力强的菌株可以在发酵初期占据数量优势, 并确定自身的在该培养环境中的优势地位^[38]。候选菌株 YB6、YB42、YB56 和对照菌株 B9 的生长曲线如图 9 所示。

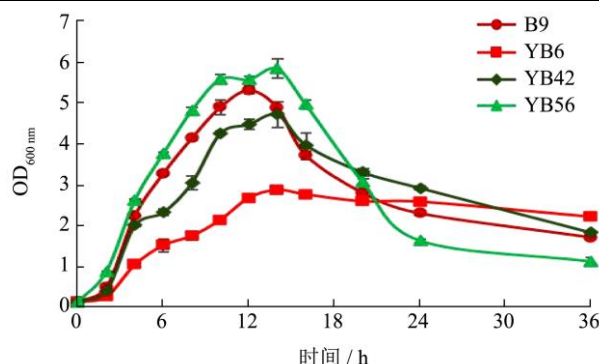


图 9 候选菌株的生长曲线

Fig.9 Growth curves of different isolated *Bacillus*

结果发现高产水解酶且具有抑菌功能的候选菌株 YB6 在 NB 液体培养基中不能迅速生长形成优势菌属, 其对营养物质的利用能力不如其他候选菌株, 但由于其具有产生多种水解酶的功能, 其在复杂培养基中的生长性能也许会较其他菌株更具有优势, 此方面的还有待进一步探究。而 YB42 和 YB56 在 NB 液体培养基中能生长迅速, 与对照菌株 B9 的生长趋势基本一致。

2.2.7 菌株种属鉴定

2.2.7.1 菌株形态特征及革兰氏染色

将纯化的候选菌株 YB6、YB42 和 YB56 接种到 NB 液体培养基上, 培养 24 h 之后, 取菌液经系列稀释后涂布于 NB 固体培养基上, 培养 12~24 h, 观察菌落形态; 同时取菌液, 适当稀释后经革兰氏染色于光学显微镜下镜检, 候选菌株的菌落形态和镜检结果如图 10 所示。菌落形态具体描述结果如表 4 所示。

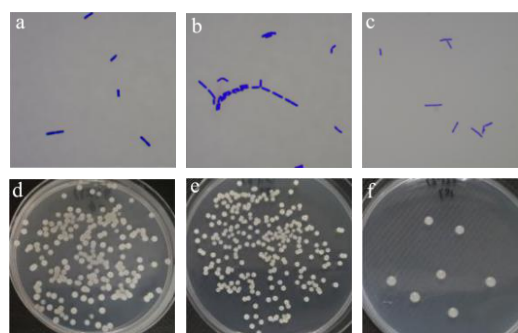


图 10 候选菌株的镜检图和菌落形态

Fig.10 Microscopy images and colony morphology of different isolated *Bacillus*

注: a、b、c 分别为 YB6、YB42 和 YB56 的镜检图, d、e、f 分别为 YB6、YB42 和 YB56 的菌落形态图。

表 4 YB6、YB42 和 YB56 菌落形态特征及革兰氏染色

Table 4 Bacterial colony morphological characteristics and Gram staining of YB6, YB42, and YB56

序号	菌株号	形态	隆起度	颜色	光泽度	透明度	菌落大小/mm	革兰氏染色
1	YB6	水珠状	中间凸起	乳白色	有光泽	半透明	1~3	紫色
2	YB42	圆形	中间凸起	白色	无光泽	半透明	1~2	紫色
3	YB56	水珠状	中间凸起	乳白色	有光泽	半透明	2~3	紫色

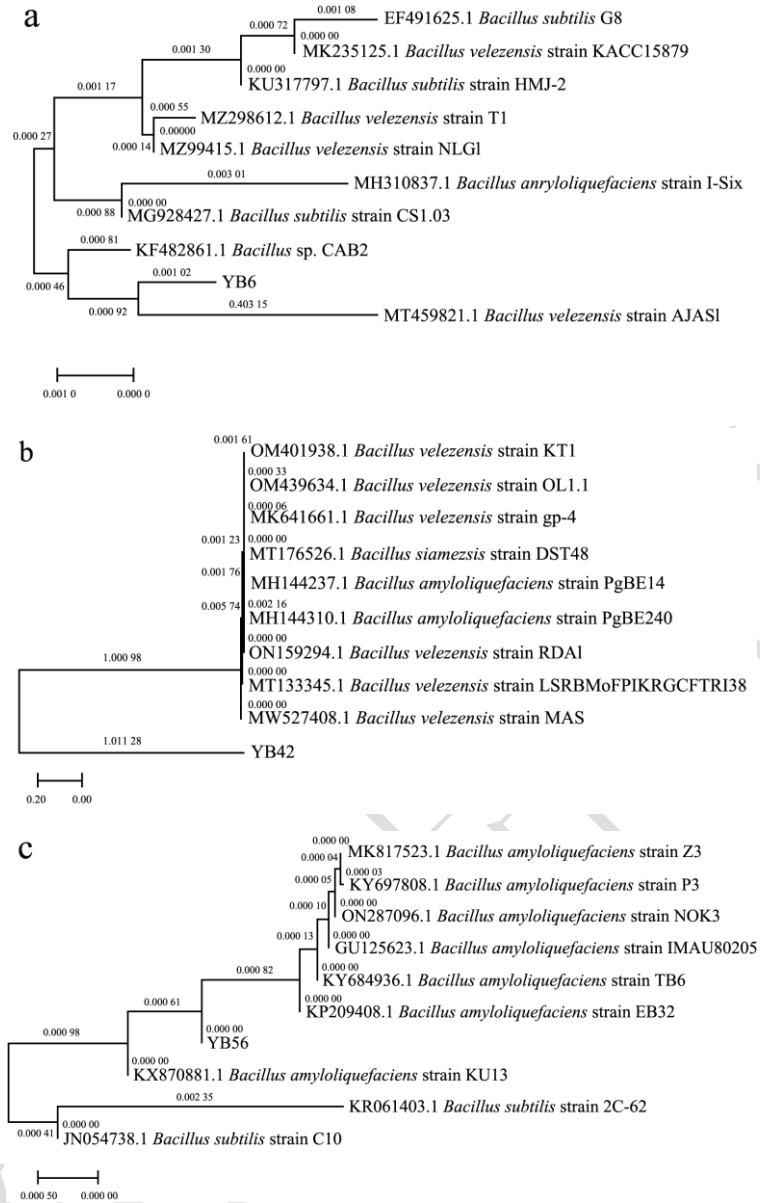


图 11 候选菌株系统发育树

Fig.11 Phylogenetic tree of different isolated *Bacillus*

注: a、b、c 分别为 YB6、YB42 和 YB56 的系统进化树。

2.2.7.2 菌株的分子生物学鉴定

据报道,芽孢杆菌在水产养殖上的应用主要为三个方面,其一为可产蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶等多种酶类,可以提高饲料的利用率;其次为能产生酯肽类、肽类和磷脂类等抑菌物质,可维持水生动物肠道菌群的平衡;此外,芽孢杆菌还能快速分解残余饲料、排泄物等有机物,还能够直接利用水环境中的硝酸盐和亚硝酸盐,起到改善水质的作用^[39]。根据上述功能探究结果,已验证 YB6、YB42、YB56 具有良好的益生功能,可用于饲用益生菌制剂的开发。经 16S rRNA 的鉴定结果显示,YB6、YB42 和 YB56 均为芽孢杆菌。根据比对结果,YB6 与 *Bacillus velezensis* strain AJAS1 在系统进化树上的距离最为接近,其序列同源性达到

99%以上,因此确定 YB6 为贝莱斯芽孢杆菌;YB42 在 NCBI 数据库中与 *Bacillus siamensis* strain DST48 比对的同源性达到 100%,但在系统进化树上却未明显聚到一起,可能是与其他菌株的序列过于相近导致的,因此仍暂时认定 YB42 为暹罗芽孢杆菌;YB56 与 *Bacillus amyloliquefaciens* strain KU13 在系统进化树上的距离最近,其序列同源性达到 100%,因此确定 YB56 为解淀粉酶芽孢杆菌。系统发育树分析的具体结果如图 11 所示。

3 结论

本研究利用三代 16S rRNA 扩增子测序技术对自然池塘生境鳙鱼肠道菌群进行分析,探索该生境中鳙

鱼肠道菌群结构。根据测定结果,发现在门水平上由厚壁菌门和变形菌门主导;纲水平上主要包括梭菌纲,与有益菌属联系紧密的芽孢杆菌纲,以及 α -变形菌纲和 γ -变形菌纲。在属水平上的优势菌为ZOR0006、罗姆布茨菌属、严格梭菌属、类梭菌属等;此外还包括潜在的益生菌,鲸杆菌属、拟杆菌属、乳杆菌属和芽孢杆菌属等。

通过对鳙鱼肠道候选益生菌的分离,得到YB6、YB42和YB56三株候选菌,分别鉴定为贝莱斯芽孢杆菌、暹罗芽孢杆菌和解淀粉酶芽孢杆菌。此三株芽孢杆菌高产蛋白酶、淀粉酶;其蛋白酶活力分别达到40.73、31.93和36.85 U/mL,淀粉酶活力分别达到42.31、38.79和16.14 U/mL;此外,YB6和YB42的纤维素酶活力较高,分别达到1.58 U/mL和1.81 U/mL。在抑菌能力方面,YB6和YB42能够抑制副溶血弧菌ATCC17802和嗜水气单胞菌PQ2,对ATCC17802的相对抑菌率分别达到72.51%和80.34%,对PQ2的相对抑菌率分别达到78.93%和70.54%;而YB56仅抑制ATCC17802,但其相对抑菌率最高,达到91.87%。此外,三株菌均具有良好的疏水特性、自聚集功能和与病原菌ATCC17802的共凝聚功能,具有开发成饲用益生菌的潜力。

参考文献

- [1] 农业农村部渔业渔政管理局,全国水产推广总站,中国水产学会.2020 中国渔业统计年鉴[M].北京:中国农业出版社,2020.
- [2] Yuan J, Wang Z, Wang B, et al. Non-specific immunity associated gut microbiome in *Aristichthys nobilis* under different rearing strategies [J]. *Genes (Basel)*, 2021, 12(6).
- [3] Youngblut N D, Reischer G H, Walters W, et al. Host diet and evolutionary history explain different aspects of gut microbiome diversity among vertebrate clades [J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 2200.
- [4] Talwar C, Nagar S, Lal R, et al. Fish gut microbiome: current approaches and future perspectives [J]. *Indian J Microbiol*, 2018, 58(4): 397-414.
- [5] Yi Y L, Zhang Z H, Zhao F, et al. Probiotic potential of *Bacillus velezensis* JW: Antimicrobial activity against fish pathogenic bacteria and immune enhancement effects on *Carassius auratus* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2018, 78: 322-330.
- [6] 曹艳子,翟秀艳,顾艳丽,等.浅谈饲用益生菌在养殖业中的应用[J].*饲料研究*,2021,44(7):149-52.
- [7] 孙承文,巩华,赖迎迢,等.水产源芽孢杆菌的分离鉴定及生物学功能分析[J].*微生物学杂志*,2020,40(6):30-35.
- [8] Gatesoupe F-J. Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: Natural occurrence and probiotic treatments [J]. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2008, 14(1-3): 107-14.
- [9] Zhang M, Dong B, Lai X, et al. Effects of *Clostridium butyricum* on growth, digestive enzyme activity, antioxidant capacity and gut microbiota in farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Aquaculture Research*, 2020, 52(4): 1573-1584.
- [10] Banerjee G, Ray A K. The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries [J]. *Research in Veterinary Science*, 2017, 115: 66-77.
- [11] 孙冬岩.宿主相关益生菌在水产养殖业中的研究进展[J].*饲料研究*,2021,44(20):93-95.
- [12] Edgar R C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads [J]. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 996.
- [13] 陈小敏.晾晒烟表面可培养微生物的鉴定及其在烟草加工上的应用[D].广州:华南理工大学,2016.
- [14] 廖秀冬.丁酸梭菌的筛选及其对动物抗氧化能力和肉鸡肉品质影响的研究[D].北京:中国农业大学,2015.
- [15] 朱成坤.罗氏沼虾饲料生物添加剂的开发[D].广州:华南理工大学,2020.
- [16] 李玲.内切纤维素酶与甾醇酯酶在毕赤酵母中的高效表达[D].广州:华南理工大学,2018.
- [17] 梁东梅,李玉鹏,杜艳芬,等.三株乳酸杆菌的分离鉴定与益生特性研究[J].*中国饲料*,2018,607(11):24-29.
- [18] Collado M C, Meriluoto J, Salminen S. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains [J]. *Eur Food Res Technol*, 2008, 226(5): 1065-1073.
- [19] 向鑫玲,张英春,马放,等.乳酸杆菌的表面特性及其黏附能力的研究[J].*食品工业科技*,2016,37(7):126-130,36.
- [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] Zhang X, Xie P, Huang X. A review of nontraditional biomaniipulation [J]. *Scientific World Journal*, 2008, 8: 1184-1196.
- [22] 胡蓓娟.三种养殖环境下鳙鱼肠道微生物群落结构及其对宿主品质影响的研究[D].南昌:南昌大学,2019.
- [23] Li X, Yu Y, Li C, et al. Comparative study on the gut microbiotas of four economically important Asian carp species [J]. *Science China Life Sciences*, 2018, 61(6): 696-705.
- [24] 曲木,暴雨梅,赵子续,等.微生态制剂在水产养殖中的应用[J].*生物化工*,2019,5(6):102-106,19.

- [25] Ferla M P, Thrash J C, Giovannoni S J, et al. New rRNA gene-based phylogenies of the *Alphaproteobacteria* provide perspective on major groups, mitochondrial ancestry and phylogenetic instability [J]. PLoS One, 2013, 8(12): e83383.
- [26] Gao B, Mohan R, Gupta R S. Phylogenomics and protein signatures elucidating the evolutionary relationships among the Gammaproteobacteria [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59: 234-247.
- [27] Hao Y T, Wu S G, Jakovlic I, et al. Impacts of diet on hindgut microbiota and short-chain fatty acids in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. Aquaculture Research, 2017, 48(11): 5595-5605.
- [28] Tsuchiya C, Sakata T, Sugita H. Novel ecological niche of *Cetobacterium somerae*, an anaerobic bacterium in the intestinal tracts of freshwater fish [J]. Lett Appl Microbiol, 2008, 46(1): 43-48.
- [29] Hao Y T, Wu S G, Xiong F, et al. Succession and fermentation products of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) hindgut microbiota in response to an extreme dietary shift [J]. Front Microbiol, 2017, 8: 1585.
- [30] 于梦楠,陈玉珂,张宇柔,等.微生物发酵饲料在水产养殖中的应用[J].中国饲料,2021,2:70-73.
- [31] 朱成坤,秦振宁,韩双艳,等.坚忍肠球菌 6-24 和枯草芽孢杆菌 B9 对罗氏沼虾免疫水平与肠道环境的改善作用[J].现代食品科技,2021,37(3):23-31,153.
- [32] 刘晓艳,封健,韩傲,等.高产中/碱性蛋白酶的枯草芽孢杆菌 W1 菌株的筛选及条件优化[J].现代食品科技,2020,36(4): 157-163.
- [33] 刘延波,张世凯,赵志军,等.高产淀粉酶细菌的分离鉴定及产酶条件优化[J].食品与机械,2020,36(1):65-71.
- [34] 陈龙,王春风,钱爱东.一株鹿源纤维素降解菌 Lu14 的分离与鉴定[J].吉林农业大学学报,2016,38(5):523-526,532.
- [35] Gao X, Ke C, Zhang M, et al. Effects of the probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* on the growth, immunity, and disease resistance of *Halotis discus hannai* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2019, 94: 617-627.
- [36] Lauridsen C. From oxidative stress to inflammation: redox balance and immune system [J]. Poultry Science, 2019, 98(10): 4240-4206.
- [37] 张文晓,白筱翠,王楠,等.呼吸道潜在益生菌 D-19 表面疏水性及自动聚集能力的研究[J].中国微生态学杂志,2022,34(3):278-283,288.
- [38] Yang Y, Deng Y, Jin Y, et al. Dynamics of microbial community during the extremely long-term fermentation process of a traditional soy sauce [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2017, 97(10): 3220-3227.
- [39] 田启文,郭振,嵇乐乐,等.水产养殖中益生菌研究进展[J].工业微生物,2019,49(4):50-55.