

一株许氏平鲉(*Sebastes schlegelii*)肠道 乳酸菌的分离鉴定及特性分析*

王腾腾^{1,2} 韦秀梅² 常 城^{1,2} 韩慧宗² 姜海滨²

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 山东省海洋资源与环境研究院山东省海洋生态修复重点实验室
烟台 264006)

摘要 为筛选具有广谱抑菌活性的乳酸菌用于微生态制剂开发,本研究自野生许氏平鲉肠道内共分离出 35 株细菌,从中筛选出 1 株乳酸菌 YH1,其革兰氏染色呈阳性,且可发酵脱脂乳产生凝固、无气泡、呈酸性现象,基于形态学观察、生理生化及 16S rDNA 序列鉴定乳酸菌 YH1 为食窦魏斯氏菌。分析了酸碱度、温度和 NaCl 含量对食窦魏斯氏菌 YH1 生长的影响;选取金黄色葡萄球菌、嗜水气单胞菌、溶藻弧菌、副溶血弧菌、迟钝爱德华氏菌、鳗弧菌、假交替单胞菌和哈维氏弧菌等多种病原指示菌,以琼脂扩散法测定 YH1 培养 12h 产物的抑菌活性;并采用肌肉注射和腹腔注射两种方式对 YH1 的动物安全性进行检测。实验结果显示,食窦魏斯氏菌 YH1 适宜的生长条件为 pH5.7—8.8、温度 20—40℃,最适生长条件为 pH7.2—8.4,温度 35℃,在 MRS 培养基中添加 NaCl 会抑制 YH1 的生长;食窦魏斯氏菌 YH1 的无菌培养产物可显著抑制金黄色葡萄球菌、嗜水气单胞菌、溶藻弧菌、副溶血弧菌、迟钝爱德华氏菌、鳗弧菌、假交替单胞菌、哈维氏弧菌等病原指示菌的生长;食窦魏斯氏菌 YH1 在 10⁸CFU/mL 及以下浓度对许氏平鲉是相对安全的。以上研究表明了食窦魏斯氏菌 YH1 具有广谱抑菌性和动物安全性,为其应用于水产养殖业奠定了理论基础。

关键词 乳酸菌 YH1; 食窦魏斯氏菌; 许氏平鲉; 鉴定; 特性

中图分类号 S917.1 **doi:** 10.11693/hyhz20160700163

乳酸菌(*Lactic acid bacteria*)是一类不运动、无芽孢、能利用碳水化合物发酵并产生大量乳酸的革兰氏阳性细菌的统称(张刚, 2007)。因其具有绿色安全、无毒副作用、无残留的特点,在海水鱼养殖业中具有广阔的应用前景。章蔚(2012)发现用分离获得的明串珠菌属乳酸菌投喂黑鲷幼鱼,可以提高幼鱼肠道菌群多样性、促进幼体肠道的生长发育; Gatesoupe 等(1994)以乳杆菌强化的活体轮虫作为大菱鲆幼体的食物,证实了乳酸菌的使用可以提高幼鱼成活率;王福强(2005)用鼠李糖乳杆菌 P15 投喂牙鲆稚鱼,达到了降低水中和牙鲆消化道中弧菌数量、提高成活率、促进生长的效果。以上研究证明,乳酸菌可以促进海水

鱼类生长、提高成活率,在海水鱼养殖业的应用有望减少抗生素使用,促进海水鱼养殖业健康和可持续发展。

许氏平鲉(*Sebastes schlegelii*)是我国黄渤海区域习见的鱼类之一,因其肉质鲜美、营养丰富、抗逆性强、生长迅速,已成为北方沿海网箱养殖和人工放流的重要经济鱼类。随着养殖规模的扩大,病害问题日益突出,许氏平鲉养殖业的发展受到制约。从许氏平鲉肠道中分离乳酸菌等益生菌,对于研制有效的微生态添加剂,提高许氏平鲉抗病能力具有重要的现实意义。目前国内外对许氏平鲉的研究主要集中在繁殖生物学(冯东岳等, 2003)、发育生物学(杨艳萍等, 2012; 蔺玉珍等, 2014; 马丽曼, 2014)等方面,对其

* 山东省良种工程项目“优质抗病速生鱼类良种选育”, 2014—2017; 国家现代农业产业技术体系项目, CARS-50-Z09 号。王腾腾, 硕士研究生, E-mail: wtt_0127@hotmail.com

通讯作者: 姜海滨, 研究员, E-mail: haibinjiang326@163.com

收稿日期: 2016-07-28, 收修改稿日期: 2016-09-21

肠道微生物的研究非常有限,肠道乳酸菌分离鉴定和特性分析的研究更未见报道。本研究首次从野生许氏平鲉肠道内分离获得了一株乳酸菌,采用 16S rDNA 基因序列分析法对其进行了分类鉴定,并对其生长特性、抑菌特性及动物安全性进行了研究,旨在为筛选能够提高许氏平鲉免疫力和抗病能力、促进其生长的乳酸菌提供理论依据,从而为研发适用于许氏平鲉养殖业的微生态制剂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

海捕野生许氏平鲉体长 17.51cm,购于烟台市迟家农贸市场,用于乳酸菌的分离。健康许氏平鲉体长 9.87 ± 1.73 cm,由烟台泰华海珍品有限公司提供,用于乳酸菌的安全性检测实验。

1.2 细菌分离纯化

用 70% 的酒精擦拭鱼体腹部表面,在无菌条件下解剖,剪下中肠段;去除肠道内容物,以无菌生理盐水冲洗 2 次后,用解剖刀刮取肠道内壁的黏液,加入到无菌生理盐水中,涡旋振荡摇匀后均匀涂布于 MRS 固体培养基。30℃ 无氧条件下培养至出现菌落,再重复平板划线分离出单菌落。挑取单菌落 30℃ 扩繁后保种于甘油中。

1.3 细菌鉴定

1.3.1 菌落形态观察及生理生化特征鉴定 将保种的菌株接种于 MRS 培养基中,培养 24h 后观察菌落形态、颜色等。挑取菌落进行革兰氏染色和脱脂乳试管凝固试验。将培养到指数期的菌株经戊二醛(2.5%)固定、磷酸缓冲液(pH7.4)漂洗、酒精梯度脱水和叔丁醇重悬后制作玻片,通过扫描电镜观察其形态特征;以梅里埃 API 50CHL 试剂条进行生理生化测试,对分离获得的细菌进行初步鉴定。

1.3.2 细菌 16S rDNA 基因序列分析 采用 16S rDNA 基因序列分析的方法对初步鉴定的细菌进行分子鉴定。扩增引物序列为:8F-5'AGAGTTTGATCCTG GCTCAG3',1492R-5'GGCTACCTTGTTACGACTT3'。反应体系为 50μL,其中包括:正、反向引物(10mmol/L)各 2μL,2μL 分离菌液,0.4μL Taq 酶,5μL 10×PCR Buffer (Mg^{2+}),4μL dNTPs,34.6μL ddH₂O。序列扩增反应条件为:94℃ 5min;94℃ 30s,55℃ 30s,72℃ 2min,30 个循环;72℃ 10min。PCR 产物经 10g/L 琼脂糖凝胶电泳检测后,送至英潍捷基(上海)贸易有限公司北京测序实验室进行测序。测序

结果用 BLAST 软件与 GenBank 核酸数据库中所收集的相关种属的 16S rDNA 序列进行同源性分析。

1.4 生长特性分析

1.4.1 pH 对生长的影响 取 100μL 培养至指数期的菌悬液接种于终 pH 值分别为 3.2、4.2、4.9、5.7、6.5、7.2、8.4、8.8、9.1、9.4、9.6、10.3 的 MRS 培养基中,30℃ 培养 24h 后检测 600nm 的光密度,并测定培养基的最终 pH 值。每个实验组设三个平行。采用 SPSS 软件包单因素方差分析法(one-way ANOVA)中的 Duncan 多重比较检验法进行数据分析,再利用 Origin 8.0 软件作图。

1.4.2 温度对生长的影响 取 100μL 培养至指数期的菌悬液接种到 MRS 培养基中,分别置于 5、10、15、20、25、30、35、40、45 和 50℃ 下培养 24h,检测 600nm 的光密度。每个实验组设三个平行。数据分析和作图方法同上。

1.4.3 NaCl 含量对生长的影响 取 100μL 培养至指数期的菌悬液接种于 NaCl 含量(w/v%)为 0、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、6、7、8、9、10 的 MRS 培养基中,30℃ 培养 24h 后检测 600nm 的光密度。每个实验组设三个平行。数据分析和作图方法同上。

1.5 抑菌作用分析

采用平板扩散法检测乳酸菌产物的抑菌作用。选取金黄色葡萄球菌、嗜水气单胞菌、大肠杆菌、溶藻弧菌、副溶血弧菌、迟钝爱德华氏菌、鳃弧菌、假交替单胞菌和哈维氏弧菌作为指示菌。指示菌培养至指数期后加入到未冷凝的固体培养基中,待培养基凝固后制作直径 5mm 的加样孔。乳酸菌置于 37℃、200r/min 振荡培养 12h 至指数期后,10000r/min 离心 5min,取 200μL 上清液加入指示菌平板的加样孔中,对照组加等量的 MRS 液体培养基,30℃ 培养 24—48h 后观察和测量抑菌圈大小。每种指示菌设三个平行。

1.6 安全性检测

安全性检测实验参照 El-Rhman 等(2009)、Aly 等(2008)的方法设计。选取健康许氏平鲉 40 尾,分 4 组,每组 10 尾,暂养于 70L 玻璃缸内,水温 15 ± 1 ℃。日换水 1 次,每次换水 1/5;连续充气,不投喂食物,及时清理粪便;暂养一周后用于实验。乳酸菌在 37℃、200r/min 条件下振荡培养 12h 至指数期后,10000r/min 离心 5min,用 0.65% 的无菌生理盐水重悬至 10^8 CFU/mL。

第 1 组许氏平鲉每尾肌肉注射 100μL 菌悬液, 第 2 组每尾肌肉注射 100μL 0.65% 无菌生理盐水为对照; 第 3 组每尾腹腔注射 1000μL 菌悬液, 第 4 组每尾腹腔注射相同剂量的 0.65% 无菌生理盐水为对照。每组设三个平行。注射后连续观察 10 天, 统计各组许氏平鲉的生长和死亡状况。

2 结果与分析

2.1 细菌的鉴定结果

2.1.1 初步鉴定结果 实验共分离纯化出 35 株肠道菌, 通过细菌生化测试实验, 选取革兰氏染色呈阳性, 脱脂乳试管凝固试验中牛乳出现凝固、无气泡、呈酸性现象的一株细菌初步鉴定为乳酸菌, 命名为 YH1。该菌株的菌落呈白色、圆形、表面光滑、边缘圆润。扫描电镜结果如图 1 所示, 乳酸菌 YH1 细胞形状规则, 呈杆状, 无鞭毛, 表面较光滑, 长度约为 1.87μm、宽度约为 0.69μm。菌株 YH1 的生理生化特征描述如表 1 所示。

2.1.2 16S rDNA 序列分析结果 采用 PCR 仪扩增细菌 YH1 的 16S rDNA 基因获得大小为 1456bp 的片段, 将该序列提交到 GenBank 核苷酸序列数据库, 登陆号为 KX440974.1。16S rDNA 序列比对结果显示: 菌株 YH1 与食窦魏斯氏菌(*Weissella cibaria*)CH2 (CP012873.1) 的相识度为 99%, 与食窦魏斯氏菌 JCM7777(AB911503.1) 的相识度为 99%, 与食窦魏斯氏菌 CAG13(AB572036.1) 的相识度为 99%, 属魏斯氏菌属成员; 结合其形态学和生理生化特征, 确定菌株 YH1 为食窦魏斯氏菌 YH1。

2.2 YH1 的生长特性研究结果

2.2.1 不同 pH 值下 YH1 的生长情况 食窦魏斯氏菌 YH1 在初始 pH 为 4.2—8.8 的培养基下均能生长, 但生长情况存在明显差异。在初始 pH 为 4.2—8.4 的

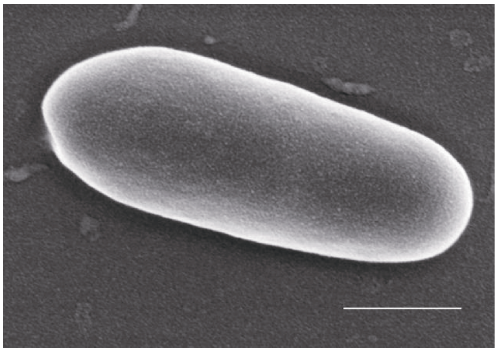


图 1 YH1 的扫描电镜图(标尺=500nm)
Fig.1 Scanning electron micrograph of Strain YH1

表 1 YH1 的生理生化特征鉴定结果表
Tab.1 Physiological and biochemical characteristics of strain YH1

项目	YH1	项目	YH1
甘露醇	—	水杨苷	—
赤藻糖醇	—	D-纤维二糖	+
D-阿拉伯糖	—	D-麦芽糖	—
L-阿拉伯糖	+	D-乳糖	—
D-核糖	+	D-蜜二糖	—
D-木糖	—	D-蔗糖	+
L-木糖	—	D-海藻糖	—
D-侧金盏花醇 1	—	菊粉	—
甲基-βD 吡喃木糖苷	—	D-松三糖	—
D-半乳糖	—	D-棉子糖	—
D-葡萄糖	+	淀粉	—
D-果糖	+	糖原	—
D-甘露糖	+	木糖醇	—
L-山梨糖	—	D-龙胆二糖	—
L-鼠李糖	—	D-十伦糖	—
卫矛醇	—	D-来苏糖	—
肌醇	—	D-塔格糖	—
甘露醇	—	D-岩藻糖	—
山梨醇	—	L-岩藻糖	—
甲基-αD-吡喃甘露糖苷	—	D-阿拉伯醇	—
甲基-αD-吡喃葡萄糖苷	—	L-阿拉伯醇	—
N-乙酰葡萄糖胺	+	葡萄糖酸钾	—
苦杏仁苷	+	2 酮基葡萄糖酸钾	—
ARBμIN	—	5 酮基葡萄糖酸钾	—
七叶灵柠檬酸铁	+	革兰氏染色	+

注: +代表阳性, —代表阴性

培养基中, 随着初始 pH 的升高, 培养液在实验终止与初始时的 OD₆₀₀ 差值不断增加, 在初始 pH 为 7.2—8.4 处达到最大, 说明在该 pH 范围下 YH1 生长情况最好; 在 8.4—8.8 内, 培养液的 OD₆₀₀ 差值有所下降。当培养基初始 pH 过低(pH=3.2)或者过高(pH=9.1、9.4、9.6、10.3), YH1 几乎不生长(图 2)。不同 pH 条件下 YH1 生长 24h 后, 培养基 pH 的变化结果如图 3 所示, 初始 pH4.9—8.8 的培养液发酵 24h 后的 pH 均发生了明显变化, 且随着初始 pH 的不断增大, 24h 后的 pH 降幅越大; 初始 pH 过低(pH=3.2)或者过高(pH=9.1、9.4、9.6、10.3), 培养基的 pH 无变化(图 3)。

2.2.2 不同温度下 YH1 的生长情况 食窦魏斯氏菌 YH1 在 15—45℃ 均能生长, 其中最适生长温度 35℃, 且各温度下 YH1 的生长情况存在显著差异。在

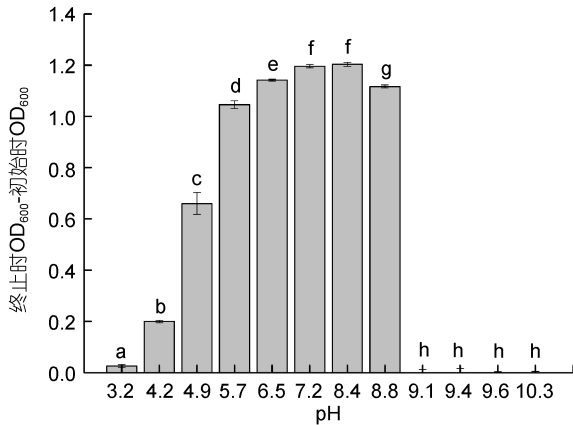


图2 不同 pH 条件下 YH1 的生长情况

Fig.2 The growth of YH1 in various pH

注: 所有数据按照平均值±标准差($n=3$)表示。不同字母表示两组间 YH1 生长情况差异显著($P<0.05$)。

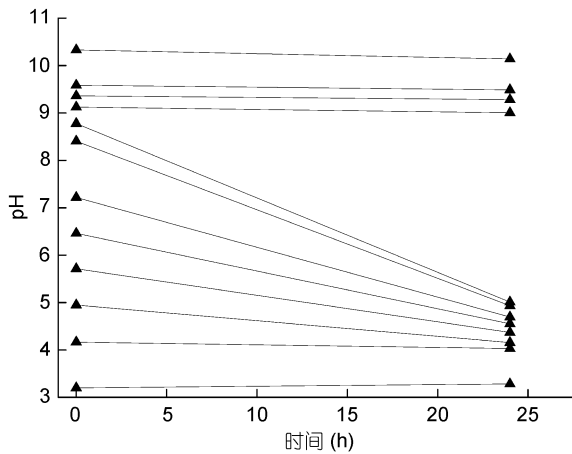


图3 不同 pH 条件下 YH1 生长 24h 培养基 pH 的变化

Fig.3 The variations of medium pH after 24h culture under different initial pH

15—35℃, 随着培养温度的升高, YH1 培养液在实验终止与初始时的 OD₆₀₀ 差值逐渐增大, 在 35℃ 时达到最大值, 为 0.979。当培养温度大于 35℃ 时, YH1 培养液在实验终止与初始时的 OD₆₀₀ 差值逐渐降低。当培养温度过低($T=5^{\circ}\text{C}$ 、 10°C)或温度过高(50°C)时, YH1 培养液在实验终止与初始时的 OD₆₀₀ 差值最低, YH1 几乎不生长(图 4)。

2.2.3 不同 NaCl 含量下 YH1 的生长情况 食窦魏斯氏菌 YH1 在 NaCl 含量(w/v%)为 0—10 的 MRS 培养基中均能生长。随着 NaCl 含量的升高, YH1 培养液在实验终止与初始时的 OD₆₀₀ 差值逐渐降低, 说明向 MRS 培养基中添加 NaCl 会抑制 YH1 的生长。不同 NaCl 含量条件下 YH1 生长情况的差异性如图 5 所示。

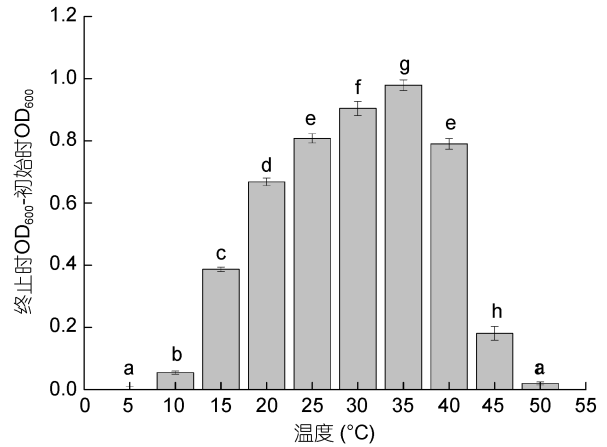


图4 不同温度下 YH1 的生长情况

Fig.4 The growth of YH1 in various temperatures

注: 所有数据按照平均值±标准差($n=3$)表示。不同字母表示两组间 YH1 生长情况差异显著($P<0.05$)。

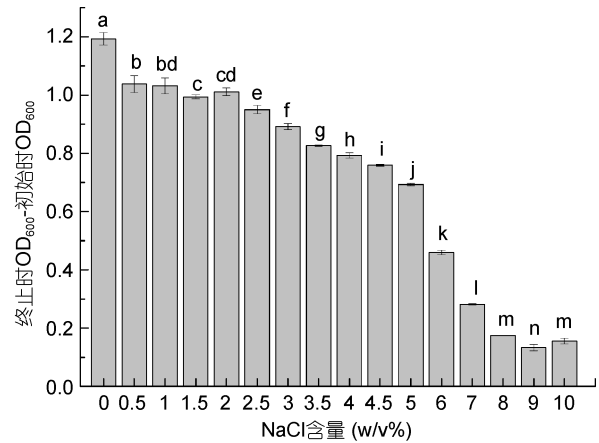


图5 不同 NaCl 含量下 YH1 的生长情况

Fig.5 The growth of YH1 vs. concentration of NaCl

注: 所有数据按照平均值±标准差($n=3$)表示。不同字母表示两组间 YH1 生长情况差异显著($P<0.05$)。

2.3 YH1 产物的抑菌活性

分析 YH1 产物的抑菌活性发现, 该产物对金黄色葡萄球菌、嗜水气单胞菌、溶藻弧菌、副溶血弧菌、迟钝爱德华氏菌、鳃弧菌、假交替单胞菌、哈维氏弧菌等指示菌均有抑制作用, 可形成直径为 11—21mm 的抑菌圈(表 2)。其中 YH1 的产物对假交替单胞菌和鳃弧菌的抑菌效果如图 6 所示。YH1 的产物具有广谱抑菌性。

2.4 YH1 对许氏平鲷的安全性

以 10^8CFU/mL 浓度向许氏平鲷体内注射 YH1 并未引发鱼体发病或死亡, 表明 YH1 在 10^8CFU/mL 及以下浓度对许氏平鲷是相对安全的(表 3)。

表 2 YH1 产物对指示菌的抑菌活性
Tab.2 Antimicrobial activity of YH1's supernatant on indicator bacteria

指示菌	抑菌圈直径(mm)
金黄色葡萄球菌	15.4±0.8
嗜水气单胞菌	13.8±0.3
大肠杆菌	13.2±0.6
溶藻弧菌	13.9±0.3
副溶血弧菌	13.0±0.1
迟钝爱德华氏菌	11.7±0.5
鳗弧菌	14.7±0.5
假交替单胞菌	19.7±0.5
哈维氏弧菌	20.8±0.6

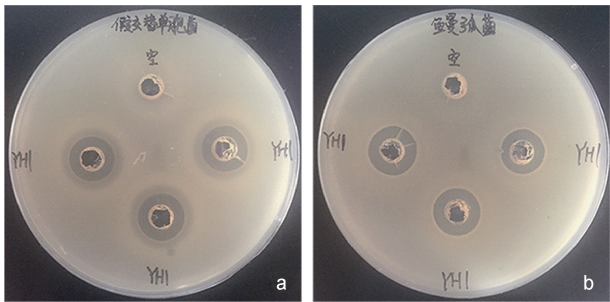


图 6 YH1 产物对假交替单胞菌和鳗弧菌的抑菌效果图
Fig.6 Antibacterial effect of YH1 supernatant on *Pseudoalteromonas* and *Vibrio anguillarum*
注: 子图 a: 假交替单胞菌; 子图 b: 鳗弧菌

表 3 YH1 对许氏平鲈的安全性
Tab.3 Safety test on YH1 to *S. schlegelii*

菌种/生理盐水	注射方式	注射量(mL)	死亡量(尾)	死亡率(%)
YH1	IP	1.0	0	0
	IM	0.1	0	0
0.65%生理盐水	IP	1.0	0	0
	IM	0.1	0	0

注: IM 表示肌肉注射, IP 表示腹腔注射

3 讨论

近年来,对于鼠李糖乳杆菌(王福强, 2005)、明串珠球菌(章蔚, 2012)等常见乳酸菌的研究发现,乳酸菌可以改善养殖水域环境、提高养殖鱼类免疫力。这些研究为从海水鱼类肠道分离的乳酸菌进一步应用于海水鱼类养殖奠定了基础。魏斯氏菌作为一种不常见乳酸菌,对其的研究相对较少。本研究从野生海捕的许氏平鲈肠道内分离获得了一株特征明显的乳酸菌菌株。通过革兰氏染色、形态观察、脱脂乳试管凝固试验、生理生化指标检测和 16S rDNA 基因序列分

析,发现该株细菌为魏斯氏菌属成员,确定为食窦魏斯氏菌 YH1。

pH、温度和 NaCl 含量是影响细菌生长的重要因素,探究细菌的生长特性对掌握其最适培养条件具有重要意义。食窦魏斯氏菌 YH1 的生长特性研究表明,其最适培养条件为: pH 7.2—8.4、温度 35℃。向 MRS 培养基中添加 NaCl, YH1 的生长受到抑制,这一结果与王福强(2005)对于鼠李糖乳杆菌 P15 的研究结论相同。在探究不同 pH 值条件下生长情况的实验中,食窦魏斯氏菌 YH1 在初始 pH 值为 4.6—8.8 条件下均能生长,在 7.2—8.4 条件下生长最好,且通过测定培养 24h 后各培养基的酸碱度发现, YH1 生长使培养基的 pH 值明显下降,并趋于 4.0。YH1 在碱性条件下生长的过程中产酸降低了培养基的 pH 值,形成了有利的生长环境,从而促进了自身的生长;同时 YH1 生长的产物又降低了环境的 pH 值,形成了良性循环。因此在不同初始 pH 环境下, YH1 的生长情况趋向一致。

乳酸菌通过竞争营养、附着位点或分泌细菌素等毒素的方式杀死或抑制病原微生物,有效调节鱼类胃肠中的菌群平衡,增强鱼体抗感染能力,提高免疫力和存活率(张艳婷等, 2012)。杨莺莺等(2005)以溶藻弧菌和鲎弧菌为指示菌探究了乳酸杆菌的抑菌性,结果表明乳酸杆菌及其代谢物质对弧菌具有协同抑制作用。本研究结果显示,食窦魏斯氏菌 YH1 的产物不仅能抑制溶藻弧菌、副溶血弧菌、鳗弧菌、哈维氏弧菌、假交替单胞菌、迟钝爱德华氏菌、嗜水气单胞菌等革兰氏阴性病原菌的生长,也对金黄色葡萄球菌等革兰氏阳性病原菌的生长有抑制效果。YH1 表现出广谱抑菌活性,暗示其能在许氏平鲈抵御多种病原菌的过程中发挥作用,作为益生菌添加可能提高许氏平鲈对抗病原菌侵染的能力。乳酸菌 YH1 的广谱抑菌作用为其在海水养殖中的应用提供了前提。

乳酸菌的抑菌作用机理一直都是研究热点。杨勇(2006)探究了抑制鳗弧菌生长的乳酸菌产物,推测乳酸菌代谢产物对鳗弧菌的抑制作用是由其中的乳酸或乙酸等有机酸造成的,而不是乳酸菌素类物质。陈营等(2002)的研究认为乳酸菌的抑菌机制主要是分解糖类产生乳酸,降低环境中的 pH 值,抑制其他细菌的生长。本研究在分析食窦魏斯氏菌 YH1 在不同 pH 环境下的生长情况时发现, YH1 可显著降低环境 pH 值,推测 YH1 产酸降低环境 pH 值可能是其抑制病原

指示菌生长的方式之一,但其抑菌机制还需要进一步的研究。

益生菌是一类对机体健康有益且无致病性的微生物。益生菌的安全性检测是其投入生产应用前确保其对机体无致病性的必要测试。El-Rhman 等(2009)在探究藤黄微球菌和假单胞菌对尼罗罗非鱼生长性能和健康的促进作用前先验证了这两株细菌在罗非鱼机体内的安全性。吕利群等(2010)在检测解淀粉芽孢杆菌 Sh1 的动物安全性试验中指出,腹腔注射 1×10^8 CFU/mL 的 Sh1 对草鱼的生长没有任何不良影响。Kim 等(2006)将从虹鳟肠道分离出的 *Carnobacterium maltaromaticum* B26 菌株和广布肉杆菌 *Carnobacterium divergens* B33 菌株腹腔或肌肉注射鱼体或者投喂含二菌株的饲料均无毒性。本研究中对动物安全性检测实验表明,腹腔或肌肉注射 1×10^8 CFU/mL 的食窦魏斯氏菌 YH1 对许氏平鲷无毒。本研究为下一步探究食窦魏斯氏菌 YH1 对许氏平鲷生长和免疫的影响提供了理论依据,为其应用于生产提供了可能性。

4 结论

本研究分析了食窦魏斯氏菌 YH1 的生长条件,证实了其广谱抑菌性和动物安全性,显示了该菌作为有益菌用于水产养殖的潜力,为乳酸菌微生态制剂的开发及其在许氏平鲷养殖业的应用奠定了理论基础。

参 考 文 献

马丽曼, 2014. 许氏平鲷性别相关基因 Sox3、Sox9 和 Dmrt1 的研究. 青岛: 中国海洋大学博士学位论文
王福强, 2005. 牙鲆肠道益生菌的分离鉴定及其应用研究. 北

京: 中国农业大学博士学位论文
冯东岳, 2003. 许氏平(鲷)繁殖生物学及人工养殖技术的研究. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文
吕利群, 刘丽玲, 刘浩等, 2010. 一株芽孢杆菌用作水霉病防治的研究. 渔业现代化, 37(4): 31—34
杨勇, 2006. 乳酸菌及其代谢产物对鳗弧菌生长的抑制作用. 中国水产, (10): 73—75
杨艳萍, 温海深, 史丹等, 2012. 许氏平鲷(*Sebastes schlegelii*)CYP19B 基因 cDNA 克隆及在生殖周期中的表达分析. 海洋与湖沼, 43(2): 370—375
杨莺莺, 李卓佳, 陈永青等, 2005. 乳酸杆菌 L1 对致病弧菌的抑制作用. 南方水产, 1(1): 62—65
张刚, 2007. 乳酸细菌: 基础、技术和应用. 北京: 化学工业出版社
张艳婷, 任同军, 孙永欣, 2012. 乳酸菌在水产养殖中的应用及其应用于海参养殖的可行性. 中国饲料, (3): 31—35
陈营, 王福强, 蒲红宇等, 2002. 牙鲆肠道乳酸菌的分离和鉴定. 中国微生物杂志, 14(2): 70—72
章蔚, 2012. 一株益生乳酸菌的分离鉴定、生物学特性及其对黑鲷肠道、血清的影响. 杭州: 中国计量学院硕士学位论文
蔺玉珍, 于道德, 温海深等, 2014. 卵胎生许氏平鲷仔鱼与稚鱼发育形态学特征观察. 海洋湖沼通报, (2): 51—58
Aly S M, El-Rahman A M A, John G *et al*, 2008. Characterization of Some Bacteria Isolated from *Oreochromis niloticus* and their Potential Use as Probiotics. Aquaculture, 2008, 277(1—2): 1—6
El-Rhman A M A, Khattab Y A E, Shalaby A M E, 2009. *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Fish & Shellfish Immunology, 27(2): 175—180
Gatesoupe F J, 1994. Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, against pathogenic *Vibrio*. Aquatic Living Resources, 7(4): 277—282
Kim D H, Austin B, 2006. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. Fish & Shellfish Immunology, 21(5): 513—524

IDENTIFICATION AND CHARACTERISTICS OF A LACTIC ACID BACTERIA ASSOCIATED FROM INTESTINE OF BLACK ROCKFISH *SEBASTES SCHLEGELII*

WANG Teng-Teng^{1,2}, WEI Xiu-Mei², CHANG Cheng^{1,2}, HAN Hui-Zong², JIANG Hai-Bin²

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shandong Provincial Key Laboratory of Restoration for Marine Ecology, Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Yantai 264006, China)

Abstract To screen wide-spectrum bacteriostatic activity for probiotics application, a lactic acid bacteria strain *Weissella cibaria* YH1 was recognized among 35 bacterial strains isolated from the intestine of wild *Sebastes schlegelii*. Morphological observation, physiological and biochemical characteristic analyses, and 16S rDNA sequencing were applied. Skim milk was fermented into coagulation with this gram-positive YH1 without bubbling, and the supernatant was acidic. The effects of pH, temperature, and NaCl content on the growth of strain YH1 were analyzed. Some indicator pathogens (*Staphylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio Parahaemolyticus*, *Edwardsiella tarda*, *Vibrio anguillarum*, *Pseudoalteromonas* sp, and *Vibrio harveyi*) were used to measure the bacteriostatic activity of the strain product in agar diffusion method. Meanwhile, animal safety of strain YH1 was tested by intramuscular and intraperitoneal injections to *S. schlegelii*. Results show that YH1 can survive in range of pH 5.7—8.8 and 20—40°C, and best at 7.2—8.4 and 35°C. The growth of YH1 was inhibited by adding NaCl to MRS medium. The agar diffusion assay revealed that the product of YH1 inhibited the growth of all the indicator pathogens mentioned above. YH1 was safe to *S. schlegelii* as the survival rate post-injection reached 100%. Therefore, YH1 could inhibit the growth of wide-spectrum bacteria, and shall be developed for more applications in aquaculture.

Key words lactic acid bacteria strain YH1; *Weissella cibaria*; *Sebastes schlegelii*; identification; characterization