

刘亚楠, 习丙文, 梁利国, 等. 水产动物病原菌拮抗菌的研究进展[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(5): 208–212.

水产动物病原菌拮抗菌的研究进展

刘亚楠^{1,2}, 习丙文², 梁利国², 谢 骏², 朱 健²

(1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心/农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 江苏无锡 214081)

摘要: 抗生素在水产养殖中的长期使用及滥用, 其弊端日益得到广泛的认识。拮抗菌以其无残留、绿色安全等优点逐渐替代抗生素, 得到越来越多的关注、研究和应用。拮抗菌主要是通过营养或空间竞争, 分泌抑菌物质等方式来杀死或抑制病原菌的生长, 达到控制疫病的发生。本文根据现有的国内外研究报道, 综述了水产动物病原菌拮抗菌的研究方法、作用机理及当前拮抗菌研究与应用中存在的一些问题, 对其研究及应用前景进行了展望。

关键词: 水产动物; 病原菌; 拮抗菌; 拮抗机理

中图分类号: S94 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2013)05–0208–05

随着高密度集约化水产养殖业的发展, 养殖水体富营养化和病害高发成为制约水产养殖业健康发展的重要因素。目前对病原细菌引起的疾病多采用抗生素或化学药物进行防治, 由于药物的不当使用容易引起药物残留、耐药性细菌增加和破坏养殖微生态平衡等问题, 因此, 探寻新型生态环境友好型的病害防治措施势在必行。生物拮抗是微生物群落内普遍存在的自然现象, 在同一生态位中微生物通过营养或空间竞争、分泌抗生素或细菌素等抑制其他微生物的生长。微生物控制技术便是应用这一原理, 将具有某种或某类特异拮抗性的有益菌施入水体或投喂养殖鱼类, 杀死或抑制病原微生物, 达到预防和控制疫病的发生。在水产养殖中微生态制剂如乳酸菌、光合细菌、硝化细菌、芽孢杆菌、酵母菌等已被广泛应用于水质调控和促生长饵料添加剂^[1], 但针对特定病原的益生菌的研究相对匮乏。因此, 加强病原菌拮抗菌的理论研究与应用开发, 扩大其在水产上的应用范围, 生产无公害、无污染的水产品, 对水产养殖业的健康可持续发展具有重要意义。本文对不同病原菌拮抗菌、拮抗菌研究方法、拮抗机制及研究与应用中存在的问题进行了综述, 并对其研究与应用的前景进行了展望。

1 拮抗作用

拮抗作用是细菌或其他微生物相互作用的方式之一。它是指一种微生物在生长过程中通过某种代谢产物或改变生活环境来抑制其他微生物的生长发育, 甚至杀死它们的现象^[2]。生物防治的手段之一就是利用拮抗菌限制病原微生物的生长和繁殖, 使有害菌的浓度低于致病浓度, 从而达到防治疾病的目的^[3]。

2 不同病原菌拮抗菌的研究进展

随着我国海水、淡水养殖业的迅猛发展, 由于对水产品的产量和效益的过分追求, 而忽略了水产品的质量安全。近年来, 在香港、广州、上海等地多有相关案例的报道, 其中, 由病原微生物引发的安全问题占有很大比例。水产品养殖过程中主要的病原菌有弧菌、气单胞菌、链球菌、爱德华氏菌等, 往往给鱼、虾、贝类等造成大量的死亡, 严重制约水产养殖业的发展^[4–5]。同时, 沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、假单胞菌等常见的致病菌和肺炎克雷伯氏菌、阪崎肠杆菌、洋葱伯克霍尔德氏菌等不常见的致病菌也常常危害水产养殖业^[6]。表 1 为不同水产动物病原菌的拮抗菌研究概况^[7–32]。

3 拮抗菌的研究方法

3.1 拮抗细菌的来源

细菌的来源是拮抗菌研究的一个重要环节, 直接关系到拮抗菌的应用效果。从宿主或者其生存环境中筛选到的拮抗菌作用远远优于从异种或者完全不同的环境中分离到的拮抗菌^[18]。众多研究者从鱼体肠道中进行拮抗菌的筛选, 因为鱼类的消化道是病原菌的重要侵染部位, 拮抗菌必须能够适应肠道环境并迅速定殖才能达到抑菌的效果, 所以从肠道内源菌群中筛选往往能得到抑菌活性较好的拮抗菌^[33–35]。

3.2 体外拮抗性能的研究

目前, 对候选拮抗菌进行筛选通常先采用体外拮抗试验。通过病原菌株和待测菌株在琼脂培养基上的共培养来检测是否存在拮抗效果^[36–37]。牛津杯法^[38]、打孔法^[32]、纸片法^[24]是体外试验的常用方法之一, 它不仅有利于观察细菌通过分泌抗菌物质产生的抑菌圈, 而且能观测到具有优势拮抗作用的菌株。

拮抗菌能否在养殖环境中正常生长是发挥其功效最关键的因素。细菌的生长和代谢通常受到环境因素的调控, 因此, 体外拮抗试验通常会对接抗菌的生长特性进行研究, 分析其在不同碳源、氮源、温度、pH 值、盐度、接种量等条件下, 拮抗菌的生长及拮抗性能。同时, 由于多数拮抗菌是以活菌形式发挥作用, 大多要通过消化道途径发挥作用, 所以在对接抗性

收稿日期: 2013–03–25

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金(编号: CARS–46);

国家科技支撑计划(编号: 2012BAD25B07)。

作者简介: 刘亚楠(1987—), 硕士研究生, 主要从事水产动物病害方面的研究。E-mail: liuyanannongda@126.com。

通信作者: 谢 骏。E-mail: xiej@ffrc.cn。

表 1 水产动物不同病原菌的拮抗菌

| 病原菌 | 拮抗菌 | 拮抗菌来源 | 年份 | 文献 |
|----------|-------------|------------|------|------|
| 弧菌 | | | | |
| 鳃弧菌 | 黄杆菌 | 扇贝 | 1989 | [7] |
| 鳃弧菌 | 溶藻胶弧菌 | / | 1995 | [8] |
| 鳃弧菌 | 橙色交替单胞菌 | 斑节对虾及其养殖环境 | 2001 | [9] |
| 溶藻弧菌 | 假单胞菌 | 虹鳟 | 2001 | [10] |
| 哈维氏弧菌 | 橙色交替单胞菌 | 斑节对虾及其养殖环境 | 2001 | [9] |
| 致病性拟态弧菌 | 产碱杆菌 | 健康鱼蟹 | 2005 | [11] |
| 病原性副溶血弧菌 | 溶藻弧菌、荧光假单胞菌 | 大黄鱼 | 2008 | [12] |
| 病原性弧菌 | 海洋菌 BS | 扇贝幼体及扇贝养殖笼 | 1996 | [13] |
| 病原性弧菌 | 气味黄杆菌 | / | 2001 | [14] |
| 病原性弧菌 | 海洋细菌假单胞菌 | / | 2002 | [15] |
| 气单胞菌 | | | | |
| 嗜水气单胞菌 | 乳酸杆菌 K1 | / | 1997 | [16] |
| 嗜水气单胞菌 | / | 田边水沟污泥 | 1998 | [17] |
| 嗜水气单胞菌 | 蛭弧菌 | / | 2000 | [18] |
| 嗜水气单胞菌 | 假单胞菌属 | 攀鲈、金鱼、南亚野鲮 | 2006 | [19] |
| 嗜水气单胞菌 | 嗜冷咸海鲜球菌 | 草鱼 | 2007 | [20] |
| 嗜水气单胞菌 | 粘质沙雷氏菌 | 池塘淤泥 | 2008 | [21] |
| 嗜水气单胞菌 | 地衣芽孢杆菌 | 中华绒螯蟹 | 2009 | [22] |
| 嗜水气单胞菌 | 蛭弧菌 | 鳊鲴 | 2009 | [23] |
| 嗜水气单胞菌 | 解淀粉芽孢杆菌 | 池塘污泥 | 2011 | [24] |
| 嗜水气单胞菌 | 芽孢杆菌属 | 银鲫 | 2012 | [25] |
| 杀鲑气单胞菌 | 荧光假单胞菌 | 鳟 | 1993 | [26] |
| 杀鲑气单胞菌 | 溶藻胶弧菌 | / | 1995 | [8] |
| 动态性气单胞菌 | 枯草芽孢杆菌 | 麦瑞加拉鲮鱼 | 2008 | [27] |
| 温和气单胞菌 | 枯草芽孢杆菌 | 黄颡鱼 | 2012 | [28] |
| 豚鼠气单胞菌 | 粪肠球菌 | 鲤鱼 | 2007 | [29] |
| 其他病原菌 | | | | |
| 巴斯德氏菌 | 弧菌 | 日本沿海的鱼 | 1997 | [30] |
| 水霉 | 假单胞菌属、气单胞菌属 | 鲑鱼 | 2001 | [31] |
| 葡萄球菌 | 嗜冷咸海鲜球菌 | 草鱼 | 2007 | [20] |
| 青春双歧杆菌 | 粪肠球菌 | 鲤鱼 | 2007 | [29] |
| 保加利亚乳杆菌 | 粪肠球菌 | 鲤鱼 | 2007 | [29] |
| 大肠杆菌 | 枯草芽孢杆菌 | 麦瑞加拉鲮鱼 | 2008 | [27] |
| 鼠伤寒沙门氏菌 | 粪肠球菌 | 鲤鱼 | 2008 | [29] |
| 大肠杆菌 | 枯草芽孢杆菌 | 麦瑞加拉鲮鱼 | 2008 | [27] |
| 容壁微球菌 | / | 欧洲鳊鲴 | 2010 | [32] |
| 铜绿假单胞菌 | / | 欧洲鳊鲴 | 2010 | [32] |
| 黄色八叠球菌 | / | 欧洲鳊鲴 | 2010 | [32] |
| 迟缓爱德华氏菌 | 枯草芽孢杆菌 | 黄颡鱼 | 2012 | [28] |
| 柱状嗜纤维菌 | 枯草芽孢杆菌 | 黄颡鱼 | 2012 | [28] |

注：“/”表示菌株未鉴定。

能研究时,常常要考虑其对肠道的黏附性、定殖能力,在肠道中的残留量等^[39],以使其在肠道内快速生长,产生拮抗物质,从而抑制病原菌的生长与繁殖。

3.3 拮抗菌的安全性评价

作为生产用的拮抗菌首先必须确保不产生任何内外毒素,无毒,无害,无副作用。要保证其生物与生态安全性,必须进行相关的毒性检验,保证其对鱼体的无害性^[40]。宋铁英等^[41]将分离的拮抗菌进行小鼠和鳖的安全性试验,结果显示,拮抗菌 LB3、K1、K29、E43 分别对小鼠及鳖无毒无害,且对防治鳖的嗜水气单胞菌感染症有明显的效果,同时小鼠的血

液生理生化指标也说明试验后小鼠的各主要脏器功能基本正常,肌体代谢能力增强,免疫力增强。

3.4 体内试验

鱼体内是一个复杂的环境,受到多种因素的作用。体外试验只能尽量地模拟肠道环境(如温度、酸碱度、各种消化酶等)的一致性,不能完全保证在体外有抑菌作用的菌株在活体内仍能发挥良好的拮抗作用^[19]。因此拮抗菌的作用还需要在活体中得到验证,其中包括向宿主动物体内引入拮抗菌,检测其生长状况、残留量、肠道内菌群的分布及各种免疫指标^[42]等。

4 拮抗菌的作用机制

4.1 竞争氧气、营养物质

当饲用菌种以孢子状态进入动物消化道后迅速生长繁殖,消耗肠内的氧气,使局部的氧分子浓度下降,从而恢复肠内微生物菌群平衡,达到抑制其他病原菌的目的。陈兵等^[43]通过大鼠肠道试验发现纳豆芽孢杆菌在肠道中迅速繁殖,消耗了肠道中的大量氧气,降低了肠内氧浓度,改善了双歧杆菌等厌氧菌的生长环境,同时也使肠道中原本存在的需氧菌肠杆菌和肠球菌等的生长因缺氧而受到抑制。

另外,有些拮抗菌可以通过竞争性消耗潜在致病菌的营养物质,抑制有害菌的生长,从而发挥其拮抗效应。酿酒酵母是通过与大肠杆菌和卷旋菌竞争磷脂受体而起到抗病原作用的^[44]。Verschuere 等报道具有含铁细胞的益生菌和病原性依赖于含铁细胞的病原菌竞争铁离子,从而抑制后者活性^[45]。

4.2 生态位点的竞争

生态位竞争,即拮抗菌比病原菌更易与生物机体结合,从而排斥病原菌而起到保护作用^[46]。同时拮抗菌的黏附还可以防止条件致病菌的易位,防止条件致病菌向周围环境不断扩散而引发其他部位的感染^[47]。Collado 等认为,乳酸杆菌对肠道上皮细胞有很强的亲和性,能优先与肠道受体结合,故对病原菌如大肠杆菌和沙门氏菌的定殖具有竞争性阻碍作用,从而有效保护动物肠道^[48]。Olsson 等从大菱鲆和欧洲黄盖鲽的肠道和表皮分离出 11 株菌,发现其在肠道黏液中比鳃弧菌具有更强的黏附和生长能力,证实这几株菌能有效地同病原菌竞争肠黏膜上的附着位点^[49]。Garcia 等试验表明,乳酸杆菌 K1 在体外能够和嗜水气单胞菌竞争粘附位点^[50]。

4.3 产生抑菌物质抑制病原菌生长

国内外的观点普遍认为,拮抗菌产生某些抑菌物质来抑制病原菌是拮抗菌发挥功效的重要机制之一^[51]。益生菌可产生具有广谱抗菌作用的物质,如细菌素、过氧化氢、亲脂分子、二乙酰、二氧化碳、乙醛等,这些物质对肠道内的沙门氏菌、链球菌等均有抑菌或杀菌作用。不同的抗菌物质对革兰氏阳性和阴性菌有不同的作用^[52]。某些芽孢杆菌等在代谢过程中可产生一些抗菌物质如嗜酸菌素、乳糖菌素、杆菌肽、伊短菌素等,可抑制病原菌在肠道内生长繁殖^[53]。Pridmore 等发现约氏乳酸杆菌 NCC533 (*L. johnsonii* NCC533) 分泌的 H₂O₂ 对体外抑制沙门氏菌发挥重要作用^[54]。Gibson 的研究发现,双歧杆菌能产生一种未知的广谱抗菌物质,具有抑制沙门氏菌、霍乱弧菌等病原菌的活性^[55]。

4.4 免疫调节

4.4.1 体液免疫 体液免疫是以特异性抗体为主的免疫应答反应。IgA 是机体黏膜防御感染的重要成分,主要由黏膜淋巴小结和固有膜淋巴细胞分泌产生。经肠黏膜上皮细胞释放到肠腔内的分泌型 IgA (S-IgA),既可与相应抗原结合,减少致病菌的黏附,抑制细菌增殖,中和毒素,又能抵抗蛋白溶解酶作用,从而保护肠黏膜,维持肠道菌群的平衡^[56]。Vinderola 等用瑞士乳杆菌灌喂小白鼠发现在小肠中 SIgA + 浆细胞的量有所增加,得出益生菌能够通过竞争机理在肠道内定殖,从而刺激肠道淋巴细胞发挥免疫保护作用^[57]。胡帅尔等也通过饲喂小鼠益生菌,然后对小鼠免疫器官的重量、脾

淋巴细胞的转化、脾细胞抗体的生成、肠黏膜 S-IgA 含量等进行测定,发现益生菌能促进机体的体液免疫^[58]。

研究表明,益生菌能缓解 IgE 介导的超敏反应^[59]。芽孢经口服摄入后有部分芽孢能够进入到肠系膜淋巴结的淋巴组织中,能促进抗芽孢的 IgG 和 S-IgA 显著升高^[60]。益生菌还可刺激巨噬细胞产生 IgM,有效抑制病菌的感染^[61]。

4.4.2 细胞免疫 拮抗菌对机体细胞免疫的调节,主要包括激活巨噬细胞、NK 细胞、B 淋巴细胞,促进干扰素 (IFN) 和白介素 (IL) 等细胞因子的产生^[62-63]。很多研究结果表明乳酸菌可以通过提高巨噬细胞和单核细胞的活性促进免疫细胞分泌细胞因子的方式来提高机体的细胞免疫水平^[64]。Paturi 等用 *Lactobacillus acidophilus* LAFTI L10 和 *Lactobacillus paracasei* LAFTI L26 灌喂 BALB/c 小鼠,用酶联免疫方法检测到 IL-10 和 IFN- γ 的量是增多的,因此认为这 2 种菌都能够提高小鼠免疫系统的功能^[65]。Li 等研究报道,经热杀死的益生菌或益生菌的成分如脂磷酸、肽聚糖等,都能够显著增强正常或免疫低下小鼠巨噬细胞分泌的 IL-1、TNF 的活性^[66]。周国勤等通过对鱼类饲喂一定剂量的纳豆芽孢杆菌及其发酵产物后发现,受试鱼类血液中 NBT 阳性细胞 (吞噬细胞、中性粒细胞、巨噬细胞) 的数量有明显增加,而且血清溶血酶活力也有一定上升^[67]。

5 问题与展望

5.1 存在问题

众多研究和试验都表明摄入拮抗菌在保护水产动物免受病原菌侵害方面有显著效果,然而拮抗菌在肠道内定殖所需的剂量、发挥作用的有效剂量等还无法确定,在水产养殖中拮抗菌的使用量也多是基于经验,并没有科学依据。微生物之间的相互作用即拮抗菌的免疫、定殖等机制问题,尚处于探索阶段,有待进一步阐明。同时,拮抗菌在使用时存在不稳定性、易受外界环境影响、对突发流行病防治效果不明显等问题。任何长期的商业应用都必须考虑对环境的影响,因此必须对拮抗菌的安全性、耐药性等问题给予足够重视。

5.2 拮抗菌研究及应用展望

虽然拮抗菌在研究和应用方面存在一些问题,但是随着遗传学、细胞生物学、分子生物学等学科的发展,人们开始将分子克隆、基因重组、基因芯片、蛋白表达等分子生物学技术应用到拮抗菌的筛选及功能构建上。可以采用荧光标记等技术标记拮抗菌,对拮抗菌在水产动物体内的位置及数量进行实时监测及分析,明确拮抗菌在机体内的作用机理。利用基因工程,借以克隆及表达有用的氨基酸合成酶基因或抗原基因等技术开发新型菌种,如黏附定殖力强、耐高温、耐酸等菌种,从根本上解决拮抗菌失活问题。最后,还应该加强应用方面的研究,改善加工工艺,使菌种长时间保持活性,改进菌种的使用条件等,便于拮抗菌进行大规模的生产及使用,让其更快、更好地为水产养殖业服务。

参考文献:

- [1] 潘 娟,李 利,刘丽媛. 益生菌在水产养殖生产中的应用[J]. 畜牧与饲料科学,2012,33(4):90-92.
- [2] 周德庆. 微生物学教程[M]. 北京:高等教育出版社,1993:273-

- 278.
- [3] 邹文政, 鄢庆枇, 林文雄, 等. 大黄鱼病原弧菌拮抗菌筛选[J]. 海洋科学, 2004, 28(3): 5-8.
- [4] 徐怀恕. 水产养殖动物弧菌病害研究方法[C]//欧盟欧洲委员会资助项目论文集. 北京: 海洋出版社, 1999: 166-190.
- [5] 吕爱军, 李任年, 余为一. 嗜温气单胞菌研究进展[J]. 中国动物检疫, 2000(11): 42-43.
- [6] 吴燕燕, 李凤霞, 李好来. 水产品病原菌及其检测与控制技术研究进展[J]. 微生物学通报, 2009, 36(1): 113-119.
- [7] Loderios C, Freitas L, Fernandez E, et al. Antibiotic effect of three marine bacteria in the larvae survival of the infected scallop *Pecten ziczac* with *Vibrio anguillarum*[J]. Bolet del Instituto Oceanografico de Venezuela Cuman, 1989, 28(1/2): 165-169.
- [8] Austin B, Stuckey L F, Robertson P A W, et al. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing disease caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio* or *dalii*[J]. Journal of Fish Diseases, 1995, 18(1): 93-96.
- [9] 李会荣, 俞 勇, 李 筠. 海洋有益菌的筛选与鉴定[J]. 高技术通讯, 2001(9): 18-22.
- [10] Bettina S, Ingrid H, Janne N, et al. The probiotic potential vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout [J]. Environmental Microbiology, 2001, 3(12): 755-765.
- [11] 李槿年, 齐 妤. 致病性拟态弧菌的敏感药物和拮抗菌的筛选[J]. 水利渔业, 2005, 25(5): 100-103.
- [12] 郭国军, 覃映雪, 陈 强, 等. 大黄鱼病原副溶血弧菌拮抗菌的筛选[J]. 海洋学报, 2008, 30(1): 127-134.
- [13] Ruiz C M, Romam G, Sanchez J L. A marine bacterial strain effective in producing antagonisms of other bacteria[J]. Aquaculture International, 1996(4): 289-291.
- [14] 莫照兰, 俞 勇, 李会荣, 等. 弧菌拮抗菌的筛选[J]. 青岛海洋大学学报, 2001, 31(2): 225-231.
- [15] Chythanyal R, Indrani K, Iddya K. Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain[J]. Aquaculture, 2002, 208: 1-10.
- [16] Garcit T, Otto K, Kjelleberg S, et al. Growth of *Vibrio anguillarum* in salmon intestinal mucus[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(3): 1034-1039.
- [17] 宋铁英, 周莉娟, 郑伟文. 嗜水气单胞菌拮抗菌的分离及其拮抗物质测定[J]. 台湾海峡, 1998(17): 161-164.
- [18] 杨 莉, 马志宏, 黄 文, 等. 蛭弧菌对鲤感染嗜水气单胞菌预防效果的观察[J]. 大连水产学院学报, 2000, 15(4): 288-292.
- [19] Das B K, Samal S K, Samantaray B R, et al. Antagonistic activity of cellular components of *Pseudomonas* species against *Aeromonas hydrophila*[J]. Aquaculture, 2006, 253: 17-24.
- [20] 李联泰, 安贤惠. 草鱼体表嗜水气单胞菌拮抗细菌 S190 的分离鉴定及生物学特性研究[J]. 水产科学, 2007, 26(12): 659-664.
- [21] 毛 宁, 王志明, 郑 莺. 嗜水气单胞菌与其拮抗菌 R-15 的生长曲线研究[J]. 福建师范大学学报, 2008, 24(1): 82-85.
- [22] 郝向举, 李 义, 孙 汉, 等. 蟹源益生芽孢杆菌的筛选[J]. 中国饲料, 2009(22): 11-14.
- [23] 张志祥, 宋振荣, 李 丹. 鳊肠道蛭弧菌的分离及其对水产动物细菌性疾病的预防作用研究[J]. 福建水产, 2009(2): 54-58.
- [24] 曹海鹏, 何 珊, 刘丽玲, 等. 鲟源病原性嗜水气单胞菌拮抗芽孢杆菌的鉴定及其生物学特性[J]. 微生物学通报, 2011, 38(9): 1377-1384.
- [25] 蒋启欢, 叶应旺, 胡 王. 银鲫肠道内抑制嗜水气单胞菌的潜在益生菌筛选及其特性研究[J]. 淡水渔业, 2012, 42(2): 22-26.
- [26] Smith P, Davey S. Evidence for the competitive exclusion of *Aeromonas salmonicida* from fish with stress-inducible furunculosis by a fluorescent pseudomonad[J]. Fish Diseases, 1993, 16: 521-524.
- [27] Ghosh S, Sinha A, Sahu C. Bioaugmentation in the growth and water quality of livebearing ornamental fishes[J]. Aquaculture International, 2008, 16(5): 393-403.
- [28] 周金敏, 吴志新, 曾令兵, 等. 黄颡鱼肠道病原拮抗性芽孢杆菌的筛选与特性研究[J]. 水生生物学报, 2012, 36(1): 78-84.
- [29] 单晓枫, 么乃全, 周 宇, 等. 鲤鱼源粪肠球菌的体外抑菌试验研究[J]. 中国兽药杂志, 2008, 42(6): 4-7.
- [30] Sugita H, Matsuo N, Hirose Y, et al. *Vibrio* sp. strain NM10 isolated from the intestine of a Japanese coastal fish, has an inhibitory effect against *Pasteurella piscicida*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1997, 63: 4986-4989.
- [31] Hussein M M A, Hatai K. *In vitro* inhibition of saprolegnia by bacteria isolated from lesions of *Salmonids* with *Saprolegniasis*[J]. Fish Pathology, 2001, 36(2): 73-78.
- [32] 张子华, 鄢庆枇, 邹文政, 等. 鳊肠道中嗜水气单胞菌的拮抗菌筛选[J]. 集美大学学报, 2010, 15(3): 165-171.
- [33] Chabrillon M A, Bordas M A, Morinigo M A, et al. Kinetics of adhesion of *Listonella anguillarum* to the mucus of gilt-head seabream, and the implication of surface components[J]. Aquaculture Research, 2004, 35: 403-409.
- [34] Niall G V, Winston D L, Horst K. *In vitro* growth characteristics of five candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus[J]. FEMD Microbiology Letters, 2004, 231: 145-152.
- [35] Gram L, Melchiorson J, Spanggaard B, et al. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 65: 969-973.
- [36] Kesarcodi W A, Kaspar H, Lategan M J, et al. Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes[J]. Aquaculture, 2008, 274(1): 1-14.
- [37] 王福强. 牙鲆肠道益生菌的分离鉴定及其应用研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2004.
- [38] 吴雅琨, 杨 欣, 陈丽仙, 等. 罗非鱼肠道益生菌的筛选、鉴定及其抑菌性能研究[J]. 水产科学, 2011, 30(10): 613-616.
- [39] 冯 凡, 蒋启欢, 曾 凯, 等. 益生菌作用机制及筛选方法研究进展[J]. 现代农业科技, 2011(22): 52-58.
- [40] Wang Y B, Li J R, Lin J. Probiotics in aquaculture: challenges and outlook[J]. Aquaculture, 2008, 281(1/2/3/4): 1-4.
- [41] 宋铁英, 林 勇, 郑伟文. 嗜水气单胞菌拮抗菌对动物的安全性试验[J]. 福建农业学报, 1999, 14(增刊): 70-74.
- [42] Vine N G, Leukes W D, Kaiser H, et al. Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus[J]. Journal of fish diseases, 2004, 27(6): 319-326.
- [43] 陈 兵, 朱凤香, 陈巧云, 等. 纳豆芽孢杆菌分离纯化及对大白鼠肠道微生态系统的影响[J]. 浙江农业学报, 2003, 15(4): 223-227.

- [44] 王 华, 陈有容. 益生菌和水产动物饲料添加剂[J]. 中国微生物学杂志, 2001, 13(3): 181 – 186.
- [45] Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, et al. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2000, 64(4): 655 – 671.
- [46] Balcazar J L, Vendrell D, Blas I D, et al. In vitro competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens [J]. Veterinary Microbiology, 2007, 122(3/4): 373 – 380.
- [47] 蔡凯凯, 黄占旺, 叶德军, 等. 益生菌调节肠道菌群及免疫调节作用机理[J]. 中国饲料, 2011(18): 34 – 37.
- [48] Collado M C, Surono I S, Meriluoto J, et al. Potential probiotic characteristics of *Lactobacillus* and *Enterococcus* strains isolated from traditional dadih fermented milk against pathogen intestinal colonization [J]. Journal of Food Protection, 2007, 70: 700 – 705.
- [49] Olsson J C, Westerdahl A, Conway P L, et al. Intestinal colonization potential of turbot (*Scophthalmus maximus*) and dab (*Limanda limanda*) associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58(2): 551 – 556.
- [50] Garcit T, Otto K, Kjelleberg S, et al. Growth of *Vibrio anguillarum* in salmon intestinal mucus [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(3): 1034 – 1039.
- [51] Hong H A, Ducle H, Cutting S M. The use of bacterial spore formers as probiotics [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2005, 29: 813 – 835.
- [52] 赵胜娟, 孙文峰, 刘爱萍, 等. 益生菌对肠道微生态影响的研究现状[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(4): 182 – 185.
- [53] Leuschner R G, Bew J, Simpson P J, et al. Enumeration of probiotic pediococci in animal feed; interlaboratory study [J]. Journal of AOAC International, 2003, 86: 791 – 801.
- [54] Primore R D, Pittet A C, Praplan F, et al. Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 and its role in anti-*Salmonella* activity [J]. FEMS Microbiology Letters, 2008, 283: 210 – 215.
- [55] Gibson G R. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria [J]. Journal of Applied Bacteriology, 1994, 77: 412 – 420.
- [56] Brandtzaeg P. Current understanding of gastrointestinal immunoregulation and its relation to food allergy [J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2002, 964: 13 – 45.
- [57] Vinderola G, Matar C, Perdigón G. Milk fermented by *Lactobacillus helveticus* R389 and its non-bacterial fraction confer enhanced protection against *Salmonella enteritidis* serovar Typhimurium infection in mice [J]. Immunobiology, 2007, 212(2): 107 – 118.
- [58] 胡帅尔, 陈壁锋, 李文立, 等. 益生菌对小鼠特异性及非特异性免疫功能的影响 [J]. 公共卫生与预防医学, 2010, 21(4): 11 – 14.
- [59] Isolauri E, Majamaa H, Arvola T, et al. *Lactobacillus casei* strain GG reverses increased intestinal permeability induced by cow milk in suckling rats [J]. Gastroenterology, 1993, 105(6): 1643 – 1650.
- [60] 郭小华, 赵志丹. 饲用益生芽孢杆菌的应用及其作用机理的研究进展 [J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(2): 27 – 31.
- [61] 苗 燕. 益生菌的作用机理及应用前景 [J]. 北京农业, 2007(8): 10 – 13.
- [62] Tuohy K M, Pinart - gilberga M, Jones M, et al. Survivability of a probiotic *Lactobacillus casei* in the gastrointestinal tract of healthy human volunteers and its impact on the faecal microflora [J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 102(4): 1026 – 1032.
- [63] de Moreon de Leblanc A, Chaves S, Carmuega E, et al. Effect of long-term continuous consumption of fermented milk containing probiotic on mucosal immunity and the activity of peritoneal macrophages [J]. Immunobiology, 2008, 213(2): 97 – 108.
- [64] 郑颖辉, 闫素梅. 乳酸菌对畜禽免疫功能的作用机理研究进展 [J]. 饲料与畜牧, 2010(6): 28 – 30.
- [65] Paturi G, Phillips M, Jones M, et al. Immune enhancing effects of *Lactobacillus acidophilus* LAFTI L10 and *Lactobacillus paracasei* LAFTI L26 in mice [J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 115(7): 115 – 118.
- [66] Li Y, Lau P, Lee J H, et al. Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in Biofilms [J]. Journal of bacteriology, 2001, 183(3): 8972 – 9081.
- [67] 周国勤, 杜 宣, 吴 伟. 纳豆芽孢杆菌对鱼类非特异性免疫功能的影响 [J]. 水利渔业, 2006, 26(1): 101 – 103.