

蒋 溥,王竞儒,王庆奎,等. 抗肉桂醛益生菌的筛选、鉴定和益生特性评价[J]. 江苏农业科学,2019,47(15):200-205.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.15.047

抗肉桂醛益生菌的筛选、鉴定和益生特性评价

蒋 溥,王竞儒,王庆奎,谢体彪,刘 桐,朱鹏锦,王 洋

(天津农学院水产学院/天津市水产生态及养殖重点实验室,天津 300384)

摘要:为了筛选适合添加于含肉桂醛饲料的水产益生菌,从饲喂肉桂醛的半滑舌鲷肠道中筛选 5 株芽孢杆菌,同时选用笔者所在实验室保存的 35 株潜在益生菌,以定性定量法筛选具有高水解酶活性且抗肉桂醛的菌株并鉴定。通过福林-酚法、3,5-二硝基水杨酸法定量测定各菌株的蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶活性;进一步以生长抑制法确定各菌株耐受肉桂醛的能力,以 16S rDNA 序列鉴定优势菌株。结果表明,9 种芽孢杆菌具有较强的益生特性,其中菌株 1-D 的蛋白酶活性最强,为 (10.137 ± 0.046) U/mL,菌株 8-D 的淀粉酶活性最强,为 (5.739 ± 0.018) U/mL,菌株 9-D 的纤维素酶活性最强,为 (63.436 ± 0.006) U/mL,且这 9 株菌分别属于枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌,最高能够耐受浓度为 $2.5 \mu\text{mol/mL}$ 的肉桂醛。研究筛选的菌株,有作为益生菌应用于含肉桂醛饲料的潜力。

关键词:肉桂醛;芽孢杆菌;筛选鉴定;益生菌;益生特性

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)15-0200-05

肉桂醛(三苯基丙稀醛)具有防腐杀菌^[1-2]、抗炎^[3]、抗癌^[4]等作用,作为抗生素替代物,已被广泛应用于畜禽养殖中^[5]。近年来,肉桂醛在水产饲料中的应用也取得了理想的效果。然而,由于肉桂醛对各类微生物具有广谱抑制能力^[6],在对抗病原菌的同时,也会降低益生菌的数量^[7],因此可能影响肠道菌群平衡。但也有报道认为,肉桂醛可促进有益菌的增殖,改善肠道形态结构,提高营养物质消化率及肉鸡的免疫力^[8]。笔者所在实验室前期研究发现,饲料中添加了肉桂醛后改变了半滑舌鲷的肠道菌群结构,降低了部分益生菌的比例。

水产益生菌是通过人为筛选扩增,添加于水产饲料或水体中,以改善水产品健康状态的微生态制剂。目前,已知的水产益生菌主要有乳酸菌^[7]、芽孢杆菌^[9]、酵母菌^[10]、光合细菌、放线菌等。芽孢杆菌作为目前应用范围最广的益生菌,其作用机制多种多样,包括分泌消化酶类、产生抗菌物质、与病原菌竞争营养和位点、影响免疫系统、调节过敏反应等。尤其是芽孢杆菌能够提高水产动物对饲料中碳水化合物^[11]、蛋白质和脂肪^[12]的利用率,显著改善水产动物的生长性能^[13]。本研究拟从益生芽孢杆菌中筛选出具有高产消化酶活性,且对低浓度肉桂醛具有一定抗性的益生菌,为益生菌与肉桂醛的联合应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 芽孢杆菌菌种 芽孢杆菌菌株 40 株(其中 5 株分离自饲喂肉桂醛饲料的半滑舌鲷肠道,其余分离自各种生境),保藏于天津农学院水产学院天津市水产生态及养殖重点实验室。

1.1.2 试验试剂 肉桂醛[含量 $\geq 95\%$,酸值 ≤ 3 mg/g(以 KOH 计),相对密度 1.047~1.051,折光率 1.618~1.623],购于上海润捷化学试剂有限公司。

吐温 80、乙酸乙酯、无水乙醇、酪氨酸、麦芽糖、葡萄糖均为分析纯,由国药集团化学试剂有限公司提供。

LB 培养基配方(1 L 溶液中):胰蛋白胨 10 g,酵母提取物 5 g,氯化钠 10 g。

1.1.3 主要仪器设备 SHP-250 型微生物生化培养箱,上海三发科学仪器有限公司;SW-CJ-1D 型净化工作台,苏州净化设备有限公司;MLS-3780 高压蒸汽灭菌锅,日本 Sanyo 公司;HZQ-F160 全温摇床,哈尔滨东联电子科技开发有限公司;UV-3000 双光束分光光度计,日本岛津公司。

1.2 芽孢杆菌产酶活性的定性定量测定

1.2.1 酶活性的定性检测 (1)蛋白酶活性定性测定。配制产蛋白酶培养基(1 L):蛋白胨 5.0 g,酵母浸粉 25.0 g,磷酸氢二钾 0.3 g,七水合硫酸镁 0.5 g,氯化钠 1.0 g,琼脂 20.0 g,加水 800 mL,pH 值 6.8~7.2,121 ℃ 15 min;脱脂乳 200 mL(按 8.4 g 定容至 100 mL 的比例配制,氮含量相当于原奶,代替酪蛋白)110 ℃ 20 min。以产蛋白酶培养基制备平板,在平板上点种 0.5 μL 芽孢杆菌菌液,37 ℃ 倒置培养 48 h 后,以游标卡尺测定透明圈直径和菌落直径。

(2)淀粉酶活性定性测定。配制产淀粉酶培养基(1 L):可溶性淀粉 10 g,酵母浸粉 25 g,磷酸氢二钾 0.3 g,七水合硫酸镁 0.5 g,氯化钠 1 g,琼脂 20 g,pH 值自然。操作方法:以产蛋白酶培养基制备平板,在平板上点种 0.5 μL 芽孢杆菌菌

收稿日期:2018-04-24

基金项目:国家级大学生创新创业训练计划(编号:01710061005);天津市应用基础与前沿技术研究计划(编号:15JCZDJC33600);天津市水产产业技术体系创新团队(编号:ITTFRS2017003、ITTFRS2017004);天津市高等学校“创新团队培养计划”(编号:TD13-5089)。

作者简介:蒋 溥(1996—),男,天津人,从事水产养殖研究。
E-mail:2212555102@qq.com。

通信作者:王 洋,博士,讲师,主要从事水产益生菌的教学和科研工作。
E-mail:474221161@qq.com。

液,37 ℃倒置培养 48 h 后加入稀释 100 倍的卢戈氏碘液,以游标卡尺测定透明圈直径和菌落直径。

(3)纤维素酶活性定性测定。配制产纤维素酶培养基(1 L):蛋白胨 10 g,酵母浸粉 10 g,羧甲基纤维素钠 10 g,氯化钠 5 g,磷酸氢二钾 1 g,琼脂 20 g,pH 值自然。以产蛋白酶培养基制备平板,在平板上点种 0.5 μL 芽孢杆菌菌液,37 ℃倒置培养 36~48 h 后倒入 1 mg/mL 刚果红染色剂染色 1 h,之后用 1 mol/L 氯化钠溶液浸泡 15 min,以游标卡尺测定透明圈直径和菌落直径。

1.2.2 酶活性的定量检测 菌株在 LB 培养基中(37 ℃)培养 12 h 后,对培养液进行离心(8 000 r/min,1 min),取其上清液,通过福林-酚法^[14]对蛋白酶进行定量检测,通过 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法^[15]对淀粉酶进行定量检测。通过 DNS 法^[16]对纤维素酶进行定量检测。

1.3 高产酶活芽孢杆菌抗肉桂醛特性

收集各菌株的对数期菌体(培养 8 h 为对数期菌体),分别接种至 LB 液体培养基中摇匀,使得最初活菌数约为 10⁷ CFU/mL(1%接种量)。

配制 1 mmol/mL 肉桂醛(摩尔质量为 132.16 g/mol)溶液:称取纯度为 100%的肉桂醛 1.321 6 g,加入 10 mL 吐温的乳化体系^[17](吐温 80、乙酸乙酯、无水乙醇质量分别为 1.321 6、0.660 8、0.660 8 g),乳化均匀。配制系列肉桂醛稀释溶液,浓度分别为 1、10、25、50 μmol/mL。同时以相同方法制备不含肉桂醛的溶液,作为溶剂对照。

将上述菌液用 LB 培养基使活菌数稀释到约为 10⁶ CFU/mL,无菌操作下(全程在超净台中)加入 96 孔细胞培养板,每孔 90 μL。加入浓度分别为 1、10、25、50 μmol/mL 的肉桂醛溶液 10 μL,使菌液中肉桂醛的浓度分别为 0.1、1、2.5、5 μmol/mL,另外设置阴性对照组(仅菌液+不含肉桂醛的溶液)、阳性对照组(仅 LB 培养基+含有肉桂醛的溶液),每株菌设置 3 个平行。

将 96 孔板小心平放至 37 ℃培养箱中。培养 12 h,取出用酶标仪测定 $D_{600\text{ nm}}$ 。根据 $D_{600\text{ nm}}$ 下降情况,判断菌株对肉桂醛的耐受浓度。

1.4 高产酶活芽孢杆菌的鉴定

通过筛选获得高酶活菌株,测定 16S rDNA 的序列,确定其分类地位。

2 结果与分析

2.1 酶活性的定性测定

从实验室保存的益生菌资源中,筛选蛋白酶活性高的芽孢杆菌菌株。由表 1 可知,所测试的 40 株芽孢杆菌中,22 株菌在蛋白酶培养基上产生了明显的溶解圈,其中 6 株菌的蛋白酶溶解圈直径与菌落直径比值达到了 1.5~2.5,其余 16 株菌的蛋白酶溶解圈直径与菌落直径比值为 1.0~1.5。蛋白酶活性最高的 3 株芽孢杆菌编号分别为 3-D、34-D 和 14-D。菌株 3-D 的溶解圈直径与菌落直径比值最大,达 2.30±0.20。据报道,芽孢杆菌蛋白酶溶解圈直径与菌落直径比值达到 2.00~3.00^[18],即表明菌株产蛋白酶的能力较强,提示菌株 3-D 属于高蛋白酶活性菌株。在应用于水产养殖时,芽孢杆菌可直接分泌蛋白酶,提高饲料的降解和吸

收,并起到净水肥水的功效^[19]。因此,本研究筛选得到的高蛋白酶活性菌株,应用于水产养殖可能有利于降低饵料系数,改善养殖水质。

表 1 潜在益生菌的蛋白酶活性定性测定结果

菌株编号	蛋白溶解圈直径(mm)	菌落直径(mm)	溶解圈直径/菌落直径
3-D	38.50±0.70	17.00±0.00	2.30±0.20
34-D	19.50±0.70	11.50±0.71	1.70±0.10
14-D	42.70±1.15	26.00±0.00	1.60±0.10
19-D	43.67±4.73	27.67±3.79	1.58±0.08
30-D	13.00±4.24	8.50±2.12	1.53±0.12
2-D	33.67±17.04	22.33±13.28	1.51±0.32
27-D	44.67±15.62	30.33±13.29	1.47±0.20
4-D	29.00±9.54	20.33±1.53	1.43±0.36
7-D	8.50±0.71	6.00±0.00	1.42±0.12
8-D	43.67±8.33	31.00±5.20	1.41±0.19
22-D	26.67±10.60	19.33±8.08	1.38±0.03
18-D	21.75±13.72	16.00±8.45	1.36±0.22
1-D	20.67±5.51	15.33±3.21	1.35±0.11
39-D	8.00±1.41	6.00±1.41	1.33±0.08
13-D	10.50±0.71	8.00±0.00	1.31±0.09
29-D	22.50±2.12	18.00±1.41	1.25±0.22
35-D	25.00±4.24	20.50±2.12	1.22±0.08
15-D	32.67±7.37	27.00±6.24	1.21±0.01
40-D	29.33±2.39	24.33±21.39	1.21±0.47
31-D	23.00±3.61	20.33±4.04	1.13±0.05
37-D	54.67±5.51	51.67±5.69	1.06±0.04
36-D	45.67±16.73	44.00±16.46	1.04±0.03

淀粉是水产饲料中重要的能量物质之一,因此具有高淀粉酶活性的菌株,有利于提高水产动物对饲料中淀粉的利用效率。由表 2 可知 38 株潜在益生菌芽孢杆菌的淀粉酶活性,其中 13 株菌的淀粉酶溶解圈直径与菌落直径比值为 1.5~2.5,其余 25 株菌的淀粉酶溶解圈直径与菌落直径比值为 0.9~1.5。淀粉酶活性最高的 3 株编号分别为 7-D、8-D 和 5-D。菌株 7-D 的溶解圈直径与菌落直径比值最大,为 2.05。与其他文献中报道的高产淀粉酶芽孢杆菌活性相似^[20]。产淀粉酶益生菌对中华绒螯蟹生长性能和肠道消化酶活性有不同程度的促进作用,中、低剂量活菌不仅能显著提高水产动物的增质量率、肠道淀粉酶和蛋白酶活性,还能提高水产动物的免疫力和抗病力,这可能与菌株所发挥的其他益生功能有关^[21]。

表 3 中列出了所有芽孢杆菌中纤维素酶活性较高的 32 株菌,其中 15 株菌的纤维素酶溶解圈直径与菌落直径比值在 2~4 间,17 株菌的纤维素酶溶解圈直径与菌落直径比值在 1~2 间。纤维素酶活性最高的 3 株芽孢杆菌分别为 6-D、1-D 和 9-D。菌株 6-D 的溶解圈直径与菌落直径比值达到了 3.88±0.30,显著高于其他文献中报道的数值 2.277±0.109 8^[22],表明本研究的菌株属于高产纤维素的菌株。纤维素酶可特异性地降解纤维素,从而提高禽类对饲料中粗纤维的消化率^[23]。在基础日粮中添加 0.05%、0.10%、0.20% 纤维素酶,鲤鱼的增质量率较对照组分别提高了 32.97%、39.11% 和 37.70%,饵料系数分别降低了 8.28%、8.88% 和 8.88%,与对照组差异显著($P<0.05$)^[24],说明纤维素酶能

表 2 潜在益生菌的淀粉酶活性定性测定结果

菌株编号	淀粉溶解圈直径 (mm)	菌落直径 (mm)	溶解圈直径/菌落直径
7-D	23.40 ± 1.01	11.40 ± 0.26	2.050 ± 0.050
8-D	24.70 ± 1.59	12.47 ± 1.82	1.981 ± 0.206
5-D	23.13 ± 2.41	11.97 ± 1.68	1.933 ± 0.066
10-D	24.50 ± 1.80	13.00 ± 1.13	1.885 ± 0.056
11-D	25.30 ± 3.50	13.80 ± 0.26	1.833 ± 0.247
12-D	26.20 ± 2.05	15.67 ± 2.99	1.672 ± 0.184
13-D	25.13 ± 4.90	15.10 ± 1.65	1.664 ± 0.193
14-D	24.33 ± 2.64	15.03 ± 2.66	1.619 ± 0.130
15-D	13.73 ± 0.78	8.63 ± 0.21	1.591 ± 0.077
16-D	20.17 ± 1.04	12.90 ± 0.53	1.563 ± 0.138
6-D	12.67 ± 1.53	8.23 ± 1.31	1.538 ± 0.330
17-D	21.77 ± 0.86	14.43 ± 2.58	1.508 ± 0.251
18-D	24.45 ± 0.64	16.30 ± 0.28	1.500 ± 0.013
19-D	27.63 ± 0.93	20.30 ± 0.61	1.361 ± 0.010
20-D	18.07 ± 0.06	13.33 ± 1.07	1.355 ± 0.110
21-D	28.47 ± 0.55	21.67 ± 2.01	1.314 ± 0.140
22-D	24.83 ± 2.08	19.37 ± 1.78	1.282 ± 0.108
23-D	26.57 ± 1.90	20.98 ± 3.74	1.267 ± 0.695
24-D	23.90 ± 4.25	18.90 ± 4.50	1.265 ± 0.093
25-D	27.40 ± 0.70	22.00 ± 2.10	1.245 ± 0.092
1-D	6.03 ± 0.50	4.88 ± 0.58	1.238 ± 0.672
26-D	19.50 ± 6.60	15.83 ± 5.48	1.232 ± 0.142
2-D	25.20 ± 4.10	20.50 ± 1.32	1.229 ± 0.250
27-D	28.10 ± 0.98	23.13 ± 2.40	1.215 ± 0.089
9-D	16.83 ± 1.20	14.07 ± 1.05	1.197 ± 0.079
28-D	15.93 ± 1.16	13.47 ± 1.07	1.183 ± 0.116
29-D	25.53 ± 3.59	21.87 ± 3.07	1.168 ± 0.021
3-D	24.77 ± 3.58	22.13 ± 5.77	1.119 ± 0.165
4-D	22.60 ± 0.44	20.23 ± 0.83	1.117 ± 0.033
31-D	23.00 ± 1.75	20.63 ± 1.21	1.115 ± 0.128
32-D	29.47 ± 1.29	26.57 ± 2.08	1.109 ± 0.050
33-D	30.87 ± 2.87	28.30 ± 1.39	1.091 ± 0.057
34-D	27.13 ± 6.46	25.13 ± 4.48	1.080 ± 0.083
35-D	34.27 ± 0.57	31.93 ± 0.15	1.073 ± 0.018
36-D	28.83 ± 0.70	26.98 ± 1.72	1.069 ± 0.535
37-D	36.80 ± 1.18	35.03 ± 1.96	1.050 ± 0.026
38-D	29.40 ± 5.34	28.03 ± 5.62	1.049 ± 0.027
39-D	16.70 ± 0.30	16.80 ± 2.82	0.994 ± 0.169

促进水产动物肠道蠕动,刺激内源消化酶分泌,提高水产动物对营养物质的消化率,提升水产动物的健康状态,在水产养殖中有广阔的应用前景。

2.2 酶活性的定量测定

综合蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶定性结果,选取酶活性较高的 9 株菌(1-D,2-D,3-D,4-D,5-D,6-D,7-D,8-D,9-D),定量测定其酶活性。由图 1 可知,其中菌株 1-D 和 2-D 的酶活性最强,依次为 (10.137 ± 0.046)、(9.66 ± 0.022) U/mL。其余菌株活性为 (6.028 ± 0.018) ~ (0.396 ± 0.006) U/mL。其他文献中报道,枯草芽孢杆菌 BY7 的蛋白酶活性可达到 43.28 U/mL^[19]。可见本研究中的菌株蛋白酶活性并不高,可能与菌株培养基的差异有关。蛋白质是水产动物饲料中最重要的成分之一,然而饲料中蛋白质的利用率却很低,造成了极大的浪费。且未被消化利用的蛋白质随着

表 3 潜在益生菌的纤维素酶活性定性测定结果

菌株编号	纤维素溶解圈直径 (mm)	菌落直径 (mm)	溶解圈直径/菌落直径
6-D	26.2 ± 2.2	6.8 ± 0.2	3.88 ± 0.30
1-D	21.4 ± 0.6	6.9 ± 0.2	3.11 ± 0.13
9-D	30.4 ± 0.9	10.4 ± 1.0	2.95 ± 0.32
22-D	31.0 ± 2.1	11.8 ± 0.9	2.65 ± 0.30
11-D	37.7 ± 5.0	15.0 ± 1.3	2.51 ± 0.13
21-D	45.6 ± 1.8	19.1 ± 2.5	2.41 ± 0.22
20-D	29.9 ± 2.4	12.8 ± 3.2	2.39 ± 0.36
2-D	43.1 ± 2.1	18.4 ± 1.6	2.35 ± 0.11
17-D	30.2 ± 1.6	13.4 ± 3.4	2.32 ± 0.41
19-D	39.0 ± 4.5	17.3 ± 1.6	2.26 ± 0.20
32-D	46.6 ± 1.1	20.9 ± 1.4	2.24 ± 0.17
27-D	35.9 ± 4.8	16.2 ± 2.7	2.22 ± 0.13
28-D	30.9 ± 1.7	13.9 ± 0.8	2.22 ± 0.19
25-D	38.2 ± 2.8	17.7 ± 1.4	2.16 ± 0.02
23-D	48.9 ± 1.0	23.5 ± 0.7	2.08 ± 0.05
31-D	26.6 ± 7.6	13.8 ± 2.0	1.97 ± 0.70
13-D	33.0 ± 6.0	19.6 ± 7.4	1.80 ± 0.48
12-D	40.7 ± 3.9	23.3 ± 4.7	1.79 ± 0.34
18-D	24.9 ± 0.3	14.1 ± 0.3	1.77 ± 0.05
16-D	38.4 ± 1.8	22.7 ± 4.2	1.73 ± 0.35
35-D	38.7 ± 2.9	22.6 ± 3.7	1.73 ± 0.16
4-D	42.6 ± 3.7	25.1 ± 4.8	1.72 ± 0.21
10-D	43.8 ± 4.9	26.2 ± 2.9	1.67 ± 0.08
33-D	41.4 ± 1.6	25.1 ± 0.8	1.65 ± 0.02
39-D	25.2 ± 2.3	15.3 ± 0.4	1.64 ± 0.10
37-D	34.2 ± 0.4	21.4 ± 0.6	1.60 ± 0.06
24-D	40.6 ± 1.4	26.0 ± 2.1	1.57 ± 0.08
36-D	36.0 ± 3.3	23.7 ± 1.2	1.52 ± 0.17
38-D	41.4 ± 2.0	27.8 ± 3.5	1.50 ± 0.20
34-D	34.9 ± 4.3	24.6 ± 2.7	1.42 ± 0.07
15-D	17.2 ± 2.4	12.7 ± 0.7	1.35 ± 0.22
29-D	41.9 ± 1.6	33.2 ± 1.4	1.26 ± 0.01

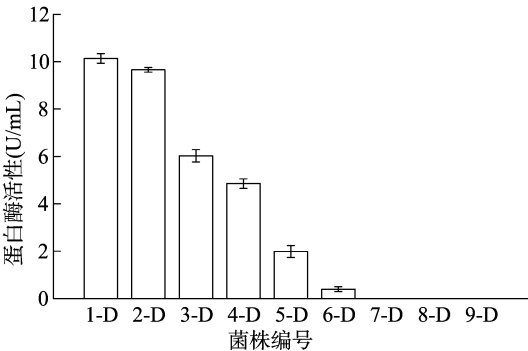


图 1 各种芽孢杆菌在培养基中的胞外蛋白酶活性

粪便排放到水体中,造成了水质劣化,危害了水产动物的健康^[25]。有许多研究发现,产蛋白酶的益生菌有利于提高水产动物对饲料中干物质、粗蛋白和粗脂肪的表现消化率^[26],从而降低养殖成本,并且改善水质,符合健康生态养殖的理念。

由图 2 可知 9 株芽孢杆菌在 LB 培养基中的胞外淀粉酶活性,其中菌株 8-D 和 4-D 酶活性最强,依次为 (5.739 ± 0.018)、(5.416 ± 0.009) U/mL。其余菌株活性为 (4.823 ± 0.027) ~ (1.163 ± 0.001) U/mL。有报道发现,高产淀粉酶

的芽孢杆菌在淀粉摇瓶发酵培养基中培养 24 h 后,胞外淀粉酶活性可达到 2.01 U/mL ^[15]。可见本研究中菌株 8-D 和 4-D 酶活性较高。补充产胞外淀粉酶的芽孢杆菌,可以提高水产品消化道的淀粉酶活性,促进鱼体生长^[27]。因此,本研究中菌株 8-D 和 4-D 可能具有促进水产动物生长的功效。

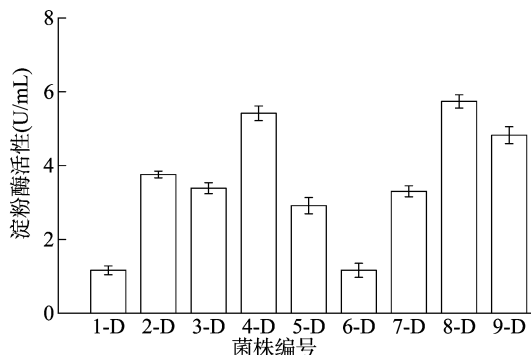


图2 各种芽孢杆菌在培养基中的胞外淀粉酶活性

由图 3 可知,其中菌株 9-D 和 5-D 酶活性最强,依次为 (63.436 ± 0.006) 、 $(61.887 \pm 0.002) \text{ U/mL}$ 。其余菌株活力为 $(30.225 \pm 0.005) \sim (17.272 \pm 0.003) \text{ U/mL}$ 。与其他报道相比,本研究的芽孢杆菌纤维素酶活性属于中等水平。据报道,高产纤维素的枯草芽孢杆菌 Pab02 纤维素酶活性高达

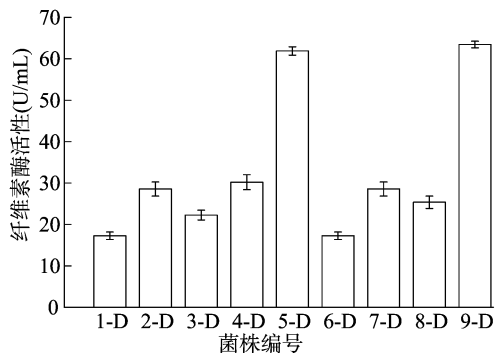


图3 各种芽孢杆菌在培养基中的胞外纤维素酶活性

2.3 高产酶活芽孢杆菌抗肉桂醛特性

为了评价本研究所筛选的益生菌是否适用于含肉桂醛水产饲料,采用生长抑制法测定 9 株益生菌的肉桂醛耐受力。由图 4 可知,各益生菌在含有肉桂醛的 LB 培养基中生长 12 h 后,光密度与肉桂醛浓度呈线性负相关, r^2 均在 0.98 以上。

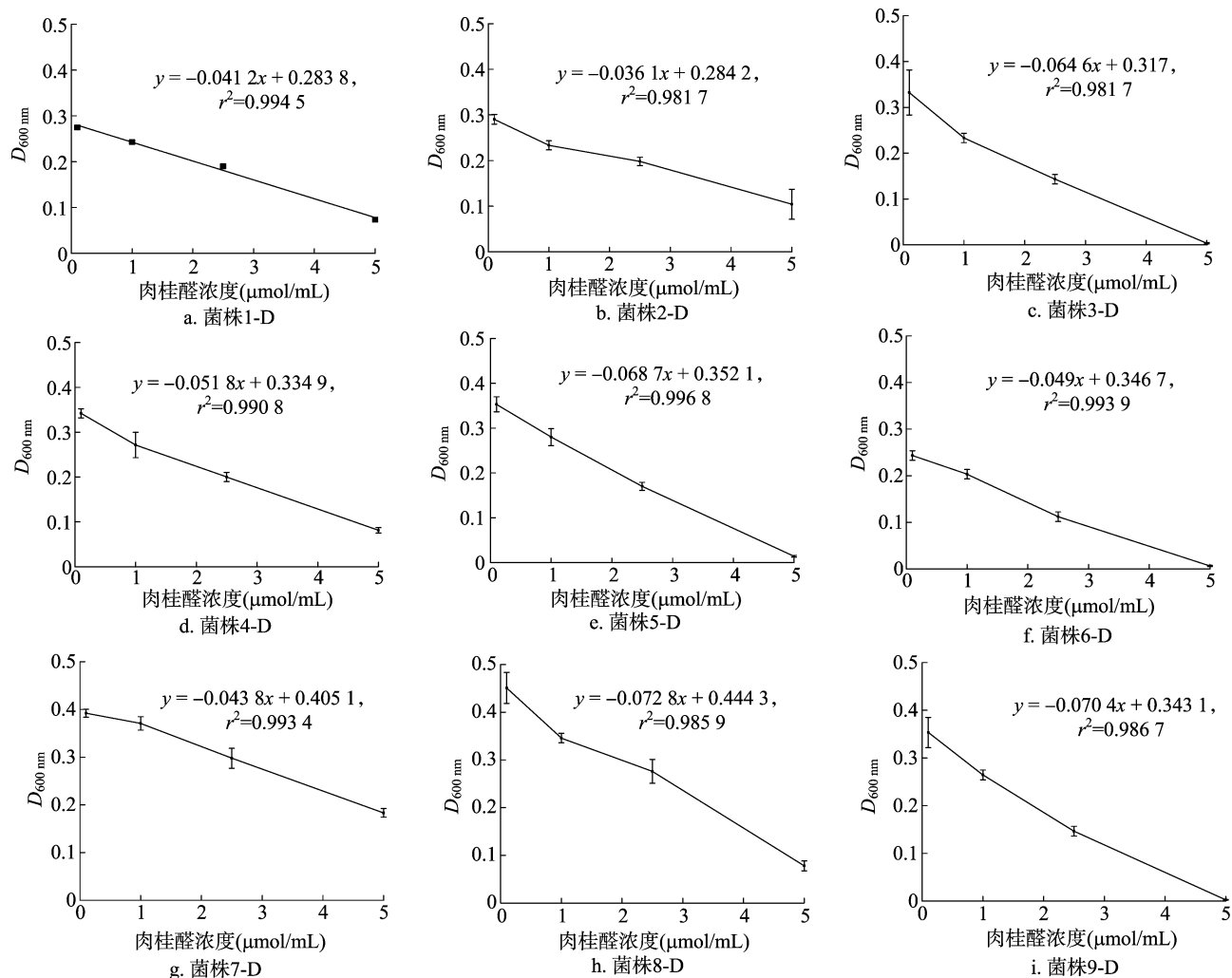


图4 生长抑制法测定的各菌株耐受肉桂醛的能力

建立光照度与肉桂醛浓度的线性方程,计算各菌株在肉桂醛含量为 $2.5 \mu\text{mol/mL}$ ($330.4 \mu\text{g/mL}$) 时的敏感性,菌株 9-D 对肉桂醛最敏感,在 $2.5 \mu\text{mol/mL}$ 浓度下 $D_{600 \text{ nm}}$ 降低了 51.30%,相比之下,菌株 7-D 在同样浓度的肉桂醛处理下最不敏感,菌体浓度仅下降了 27.03% (其他芽孢杆菌 $D_{600 \text{ nm}}$ 下降率分别为 1-D 36.29%、2-D 31.76%、3-D 58.09%、5-D 48.78%、6-D 49.66%、8-D 40.96%、9-D 51.30%)。另根据方程推算半数抑制浓度 ($D_{600 \text{ nm}}$ 降低到不含肉桂醛时的 50%),各菌株对肉桂醛的半数抑制浓度从高到低依次为 8-D $0.222 2 \mu\text{mol/mL}$ 、7-D $0.202 6 \mu\text{mol/mL}$ 、5-D $0.176 1 \mu\text{mol/mL}$ 、9-D $0.171 6 \mu\text{mol/mL}$ 、4-D $0.167 5 \mu\text{mol/mL}$ 、3-D $0.158 5 \mu\text{mol/mL}$ 、2-D $0.142 1 \mu\text{mol/mL}$ 、1-D $0.141 9 \mu\text{mol/mL}$ 、6-D $0.123 4 \mu\text{mol/mL}$ 。肉桂醛对多种细菌有抑制作用,但对不同种的菌抑制效果不同。据报道,肉桂醛能抑制人肺癌细胞系 A-549 细胞增殖,且呈剂量依赖性, IC_{50} 值为 $2.72 \mu\text{mol/mL}$ ^[29]。还有报道显示,肉桂醛 100% 杀灭滋养体和感染性幼虫的剂量分别为 50 和 8 mg/L,半数有效浓度分别为 $105.3 \mu\text{mol/mL}$ 和 $13.64 \mu\text{mol/mL}$;使用剂量在 50 mg/L 时可完全抑制小瓜虫包囊孵化^[30]。因此在水产品养殖过程中,肉桂醛的使用量一般为 10~1 000 mg/kg,本研究中的菌株对肉桂醛的抗性较强,推测将其添加于含肉桂醛的饲料中,可保持较好的活性,从而进入消化道发挥益生作用。

2.4 高产酶活且耐受肉桂醛芽孢杆菌的鉴定

通过测定各菌株的 16S rDNA 序列,并在美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 数据库中进行比对,鉴定菌株 2-D、5-D、6-D、7-D、8-D 为枯草芽孢杆菌,菌株 1-D、3-D、9-D 为地衣芽孢杆菌,菌株 4-D 为解淀粉芽孢杆菌。

3 结论

肉桂醛是从中草药肉桂中提取的一种脂溶性活性物质,具有较强的抗菌作用,是水产养殖中抗生素的理想替代品之一,不过肉桂醛可能会影响肠道内的益生菌数量。本研究筛选的芽孢杆菌对肉桂醛有一定的耐受力,同时具有较强的胞外蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶的活性,有作为益生菌应用于含肉桂醛饲料中,与肉桂醛互补,共同提高水产动物生长性能和抗病性的潜力。

参考文献:

- [1] Viazis S, Akhtar M, Feirtag J, et al. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 viability on leafy green vegetables by treatment with a bacteriophage mixture and trans-cinnamaldehyde [J]. Food Microbiology, 2011, 28(1): 149-157.
- [2] Amalaradjou M A, Narayanan A, Baskaran S A, et al. Antibiofilm effect of trans-cinnamaldehyde on uropathogenic *Escherichia coli* [J]. Journal of Urology, 2010, 184(1): 358-363.
- [3] Tung Y T, Yen P L, Lin C Y, et al. Anti-inflammatory activities of essential oils and their constituents from different provenances of indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves [J]. Pharmaceutical Biology, 2010, 48(10): 1130-1136.
- [4] Cabello C M, Bair I W, Lamore S D, et al. The cinnamon-derived Michael acceptor cinnamic aldehyde impairs melanoma cell

- proliferation, invasiveness, and tumor growth [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2009, 46(2): 220-231.
- [5] Upadhyaya I, Upadhyay A, Kollanoorjohney A, et al. In-feed supplementation of trans-cinnamaldehyde reduces egg-borne transmission of *Salmonella enteritidis* in layer chickens [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2015, 81(9): 2985-2994.
- [6] Toranzo A E, Magariños B, Romalde J L. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems [J]. Aquaculture, 2005, 246(1/2/3/4): 37-61.
- [7] 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(1/2/3): 107-114.
- [8] 刘洋, 臧素敏, 李同洲, 等. 肉桂醛对肉鸡肠道菌群、肠道结构及营养物质消化率的影响 [J]. 中国畜牧杂志, 2013, 49(13): 65-68.
- [9] Hong H A, Duc L H, Cutting S M. The use of bacterial spore formers as probiotics [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2005, 29(4): 813-835.
- [10] Vine N G, Leukes W D, Kaiser H. Probiotics in marine larviculture [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2006, 30(3): 404-427.
- [11] Turnbaugh P J, Ley R E, Mahowald M A, et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest [J]. Nature, 2006, 444(7122): 1027-1031.
- [12] Semova I, Carten J D, Stombaugh J, et al. Microbiota regulate intestinal absorption and metabolism of fatty acids in the zebrafish [J]. Cell Host & Microbe, 2012, 12(3): 277-288.
- [13] Sun Y Z, Yang H L, Ma R L, et al. Probiotic applications of two dominant gut *Bacillus* strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 29(5): 803-809.
- [14] 魏宜琴, 赵学兰. 胃蛋白酶活力测定法的探讨 [J]. 中国生化药物杂志, 1991(2): 74-76.
- [15] 陈号, 陆雯, 虞婷, 等. 淀粉酶高产菌株的诱变选育 [J]. 农业科学研究, 2010, 31(1): 26-28.
- [16] 张海, 冯成利, 房兴莉. 饲料添加剂中纤维素酶活力的标准测定方法 [J]. 质量指南, 1995(4): 37-38.
- [17] 张永师. 肉桂醛微乳制备及其对革兰氏阳性菌抑菌机理研究 [D]. 新乡: 河南科技学院, 2015.
- [18] 牛春华, 高岩, 李玉秋, 等. 紫外诱变选育高产蛋白酶枯草芽孢杆菌 [J]. 中国酿造, 2011, 30(12): 67-69.
- [19] 王晓云. 高产蛋白酶枯草芽孢杆菌的筛选与诱变选育研究 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2015.
- [20] 杨慧, 王振华, 潘康成, 等. 芽孢杆菌产淀粉酶活性的研究 [J]. 现代农业科技, 2007, 2(2): 90, 93.
- [21] 郝向举. 中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 肠道益生芽孢杆菌 (*Bacillus*) 的筛选、生长特性及其应用效果研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2010.
- [22] 吴敏峰. 产纤维素酶兼性厌氧芽孢杆菌的分离筛选及在动物生产上的初步应用 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2007.
- [23] 李旺, 孙二刚, 刘永磊, 等. 添加纤维素酶产生菌对鸡饲料养分消化率的影响 [J]. 饲料博览, 2013, 5(5): 1-4.
- [24] 王仁华. 浅谈纤维素酶在水产动物生产中的应用 [J]. 饲料广角, 2016, 17: 40-41.
- [25] 苗淑彦, 王际英, 张利民, 等. 水产动物残饵及粪便对养殖水环

仲崇虎,王梦杰,魏 星,等. 磺胺二甲嘧啶对脊尾白虾抗氧化酶活性的影响[J]. 江苏农业科学,2019,47(15):205–207.
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2019.15.048

磺胺二甲嘧啶对脊尾白虾抗氧化酶活性的影响

仲崇虎^{1,4}, 王梦杰^{1,4}, 魏 星^{1,4}, 高 煊^{1,4}, 王怀忠², 王海华³, 陈建华^{1,4}

(1. 淮海工学院海洋生命与水产学学院/江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏连云港 222005; 2. 连云港忠玉水产有限公司, 江苏连云港 222100; 3. 江西省水产科学研究所, 江西南昌 330039; 4. 江苏省农业种质资源保护与利用平台, 江苏南京 210014)

摘要:研究不同浓度磺胺二甲嘧啶(sulfadimidine, SM2)对脊尾白虾谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量的影响。结果表明,低浓度组(158、500 $\mu\text{g/L}$) CAT 和 GSH-Px 活性先上升后下降;高浓度组(1 580、5 000 $\mu\text{g/L}$)在 15 d 时被显著抑制。500 $\mu\text{g/L}$ 浓度组 SOD 活性在 3 d 时显著诱导(3.58 倍);1 580、5 000 $\mu\text{g/L}$ 浓度组在 3 d 时被显著诱导(2.68、3.22 倍),在 15 d 时被显著抑制。低浓度组(50、158、500 $\mu\text{g/L}$) MDA 含量随暴露时间延长而增加;1 580、5 000 $\mu\text{g/L}$ 浓度组表现为先上升后下降的变化趋势且均在 3 d 时达到最大值(3.77、3.96 倍)。提示 GSH-Px、CAT、SOD 活性和 MDA 含量对磺胺二甲嘧啶敏感,均可作为磺胺二甲嘧啶暴露的生物标记物。

关键词:脊尾白虾;磺胺二甲嘧啶;SOD;CAT;GSH-Px;MDA

中图分类号: S917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2019)15–0205–03

目前,在水产养殖业向规模化、集约化快速发展的背景下,水产动物病害频繁暴发,导致各种抗生素在水产养殖领域被广泛使用。由于磺胺类抗生素疗效良好、性质稳定、价格低廉等优点,在畜牧和水产养殖的疾病控制中起着不可替代的作用。研究发现,约 60%~90% 磺胺类抗生素会随动物粪便排出体外,通过雨水冲刷进入水体^[1]。在饮用水、污水及地表水抗生素检测中,磺胺类药物的检出率最高^[2],在不同水环境中检出的磺胺类抗生素质量浓度范围一般为 ng/L ~ mg/L 水平,如磺胺类抗生素在丹麦垃圾填埋厂淋滤液中检出的质量浓度高达 0.04~6.47 mg/L ^[3]。大量磺胺类抗生素不断排入环境,对生态环境和人类健康均会造成严重危害^[4]。人类在长期受磺胺类抗生素药物污染影响后,也会产生排尿和造血紊乱等问题^[5]。目前,关于环境中磺胺类抗生素的研究主要集中于药物残留检测,而对其在环境中尤其是水环境中的潜在影响研究已逐渐在斑马鱼^[2]、罗非鱼^[6]等鱼类中开展,但

虾蟹类的相关报道较少,缺乏系统的生态毒理学研究,因此有必要开展磺胺类抗生素对虾蟹类毒性作用的研究。

脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*),俗称小白虾,是我国沿海重要的经济虾类之一。脊尾白虾具有环境适应性广(广温、广盐和广食)、繁殖周期短(3~4 个月可繁殖 1 代)、生长速度快(1 年内可多茬养殖)等优点^[7],且脊尾白虾能在室内通过控温促使其繁育不受季节影响,其他甲壳动物 1 年只能繁殖 1 代,相对于三疣梭子蟹可在较短时间内获得不同发育时期的试验材料。因此,脊尾白虾是一种理想的测试生物体,可用于监测和评价海洋水体环境和质量变化及水体污染状况。本研究的脊尾白虾在磺胺二甲嘧啶(sulfadimidine, SM2)暴露胁迫下,观察体内谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)等酶活性变化及其体内丙二醛(MDA)含量的变化,评价 GSH-Px、CAT、SOD 活性和 MDA 含量作为磺胺二甲嘧啶暴露的生物标志物的适用性,为抗生素对虾类的早期损伤和应急反应筛选出有效的生物标志物。

1 材料与方法

1.1 试验材料

脊尾白虾取自江苏省连云港市忠玉水产养殖场,虾体长(5.34 ± 0.15) cm,体质量(2.97 ± 0.13) g。本试验于 2017 年 3 月中旬至 4 月中旬于淮海工学院江苏省海洋生物技术重点实验室进行。试验前选择健康的脊尾白虾放入室内水族箱

境的影响[J]. 饲料研究,2009,2(2):64–67.

[26] 曲 艺,吴志新,杨 丽,等. 饲料中添加芽孢杆菌对草鱼表观消化率及消化酶活性的影响[J]. 华中农业大学学报,2012,31(1):106–111.

[27] 陈鹏飞,谭 斌. 芽孢杆菌对苗王云鲫淀粉酶活性的影响[C]//三峡地区特色渔业发展论坛,2012:287–292.

[28] 祝 小,耿秀蓉,潘康成,等. 枯草芽孢杆菌 Pab02 产纤维素酶活性的研究[J]. 饲料研究,2007,1(1):61–63.

[29] 宋晓兵. 肉桂醛对肺癌细胞 A549 具有体外抑制作用[J]. 中国卫生标准管理,2014,5(6):30–32.

[30] 梁靖涵,张其中,付耀武,等. 肉桂活性成分肉桂醛杀灭离体多子小瓜虫效果[J]. 水产学报,2014,38(3):457–463.