



# 仿刺参(*Apostichopus japonicus*)肠道源植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) HY21 的生长及益生特性分析

李忠琴<sup>1,3#</sup>, 王泽楠<sup>1,4#</sup>, 黄文树<sup>1,3</sup>, 杨求华<sup>2,3</sup>, 邹文政<sup>1,3\*</sup>

1 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021

2 福建省水产研究所, 福建 厦门 361021

3 鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心, 福建 厦门 361021

4 华中农业大学动物科学技术学院·动物医学院, 湖北 武汉 430070

李忠琴, 王泽楠, 黄文树, 杨求华, 邹文政. 仿刺参(*Apostichopus japonicus*)肠道源植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) HY21 的生长及益生特性分析[J]. 微生物学报, 2024, 64(3): 840-853.

LI Zhongqin, WANG Zenan, HUANG Wenshu, YANG Qiuhua, ZOU Wenzheng. Growth and probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* HY21 from intestinal tract of *Apostichopus japonicus*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(3): 840-853.

**摘要:** 【目的】在仿刺参(*Apostichopus japonicus*)健康养殖中为了寻找具有良好耐受性、益生性、安全性的益生菌,本研究从仿刺参肠道内容物中分离获得一株植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) HY21, 对其益生潜能进行评价。【方法】利用摇瓶发酵培养、应用环境因子模拟试验、抗生素药敏测试等方法,分析 *L. plantarum* HY21 的生长特性、产酸性能、发酵液的抗氧化性质和对水产致病菌的抑制作用; 检测菌体的疏水性、自聚性和共聚性、黏附力和药物敏感性, 以及对应用环境因子的耐受性。【结果】*L. plantarum* HY21 摇瓶发酵培养温度 30 °C、初始 pH 8.0, 于 2–10 h 为对数生长期, 发酵 18 h 后 pH 达到最低 3.6; 发酵液对溶藻弧菌的抑菌直径达到(13.96±0.30) mm, 对 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine, DPPH) 自由基清除率达到 95.45%±1.56%; *L. plantarum* HY21 的疏水率为 60.42%±2.78%、自聚率为 22.69%±1.36%, 与溶藻

资助项目: 福建省科技计划(2021N0014); 福建省海洋渔业结构调整专项(闽财指[2021] 66); 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系(CARS-46); 集美大学培育基金(ZP2021003 号)

This work was supported by the Science and Technology Project of Fujian Province (2021N0014), the Marine Fishery Structure Adjustment Special Project of Fujian Province ([2021] 66), the Ministry of Finance and Ministry of Agriculture and Rural Affairs: National Modern Agricultural Industrial Technology System Support (CARS-46), and the Jimei University Cultivation Foundation (ZP2021003).

#These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author. E-mail: wzhou@jmu.edu.cn

Received: 2023-08-29; Accepted: 2023-12-11; Published online: 2023-12-21

弧菌共聚率为 27.98%±1.45%；对体表和肠道黏液蛋白的黏附量分别达到 $(1.66±0.01)×10^6$  CFU/mL 和 $(1.23±0.15)×10^6$  CFU/mL；对 13 种常见的抗菌药物均表现敏感；菌体在模拟胃肠液(pH 3.0, pH 6.8)中孵育 3 h 存活率均可达 99%以上，在 10%鱼胆汁溶液中孵育 3 h 存活率达到 68.11%±7.98%，在 3%海盐溶液中孵育 16 h 存活率达到 97.58%±7.14%。【结论】*L. plantarum* HY21 具有良好的定殖作用、抑菌作用、抗氧化作用等益生特性，而且在应用环境中具有高存活率和高安全性，可以作为一株新的水产益生菌，为开发水产益生菌制剂提供科学理论依据。

关键词：植物乳杆菌；耐受性；黏附性；抑菌作用；抗氧化作用

## Growth and probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* HY21 from intestinal tract of *Apostichopus japonicus*

LI Zhongqin<sup>1,3#</sup>, WANG Zenan<sup>1,4#</sup>, HUANG Wenshu<sup>1,3</sup>, YANG Qiuhua<sup>2,3</sup>, ZOU Wenzheng<sup>1,3\*</sup>

1 Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, Fujian, China

2 Fisheries Research Institute of Fujian, Xiamen 361021, Fujian, China

3 Engineering Research Center of the Modern Technology for Eel Industry, Ministry of Education, Xiamen 361021, Fujian, China

4 College of Veterinary Medicine & College of Animal Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China

**Abstract: [Objective]** To search for the strains with improved tolerance, probiotic properties, and safety, we isolated *Lactobacillus plantarum* HY21 from the intestinal contents of *Apostichopus japonicus* and evaluated the probiotic potential of the strain. **[Methods]** The shake flask fermentation, environmental factor simulation test, and antibiotic susceptibility test were carried out to study the growth characteristics and acid production of the strain, as well as the antioxidant capacity and aquatic pathogen-inhibiting effects of the fermentation broth. In addition, *L. plantarum* HY21 was characterized in terms of the tolerance to environmental factors, hydrophobicity, auto-agglutination and co-aggregation, antibiotic susceptibility, and intestinal adhesion ability. **[Results]** *L. plantarum* HY21 in shake flask culture with the initial pH 8.0 entered the logarithmic growth during the period of 2–10 h. The culture showed a strong acid-producing ability with the minimum pH 3.6 at the time point of 18 h. The fermentation broth of the strain showed an inhibition zone diameter of  $(13.96±0.30)$  mm against *Vibrio alginolyticus* and a 1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine (DPPH) free radical scavenging rate of 95.45%±1.56%. *L. plantarum* HY21 had a hydrophobicity rate of 60.42%±2.78%, an auto-agglutination rate of 22.69%±1.36% and a co-aggregation rate of 27.98%±1.45% with *V. alginolyticus*. Furthermore, the strain showed the adhesion number of  $(1.66±0.01)×10^6$  CFU/mL and  $(1.23±0.15)×10^6$  CFU/mL to fish body surface and intestinal mucus protein, respectively. *L. plantarum* HY21 was susceptible to 13 common antibiotics. The survival rate of *L. plantarum* HY21 reached 99% and above in simulated gastrointestinal fluid (pH 3.0, pH 6.8) within 3 h, 68.11%±7.98% in 10% fish bile fluid within 3 h, and 97.58%±7.14% in 3% sea salt solutions within 16 h. **[Conclusion]** *L. plantarum* HY21 is a probiotic strain with strong

colonization potential, antimicrobial activity, and antioxidant capacity, demonstrating a high survival rate and high safety in the applied environment. The findings provide a theoretical basis for the development of new probiotic strains as probiotic additives for aquaculture.

**Keywords:** *Lactobacillus plantarum*; tolerance; adhesion; antimicrobial effect; antioxidant capacity

随着我国水产养殖业的迅猛发展,养殖水环境持续恶化,近年来频繁暴发水产养殖病害,养殖户不得已增加化学类药物用量,这不仅影响水产品质量,还危及食品安全,成为水产养殖业健康可持续发展的制约因素。随着对水产投入品的监管日趋规范与严厉,根据农业农村部第 194 号公告,饲料中已禁止添加抗生素。为了防治水产养殖病害,益生菌制剂已成为一种优良的抗生素替代产品。益生菌具有与抗生素相似的抗菌活性,在环境保护、食品安全、病原耐药性等方面却无抗生素的负面影响。益生菌能够调节宿主体内的肠道菌群,增加有益菌株的比例,提高消化吸收能力,从而提高饲料利用率,促进养殖动物生长;益生菌代谢产物还能增强肠道免疫力和抗氧化性,提高养殖动物的抗应激能力和抗病原侵染能力,降低死亡率<sup>[1-5]</sup>。

仿刺参(*Apostichopus japonicus*)是我国重要的经济海水品种。自 2003 年开展“北参南养”试验以来,仿刺参养殖在南方取得蓬勃发展,福建省已成为我国南方重要的仿刺参养殖产区,在“北参南养”过程中,疾病问题一直是制约养殖业发展的难题。本研究从仿刺参肠道内容物中分离获得一株植物乳杆菌,对菌株生长特性、定殖作用、抑菌作用、抗氧化作用等益生特性进行分析,为水产用益生菌制剂研发提供备选菌株,为更好地开发和应用益生菌制剂提供理论支撑。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 菌株

植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)分离自

福建水产研究所提供的健康仿刺参的肠道内容物,经 16S rRNA 基因测序鉴定,NCBI 基因序列号为 OP020611。

溶藻弧菌(*Vibrio alginolytica*)、迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)和嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)由鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心提供。

#### 1.1.2 主要试剂及仪器

MRS 肉汤、MRS 琼脂、LB 肉汤和 LB 琼脂购自海博生物技术有限公司;抗菌药物药敏纸片购自杭州微生物试剂有限公司;邻菲咯啉、1,1-二苯基-2-三硝基苯胍(1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine, DPPH)、邻苯三酚等购自上海麦克林生化科技股份有限公司;硫酸亚铁、氯化钠、无水乙醇和过氧化氢等购自国药集团化学试剂有限公司。

全波长酶标仪、大容量高速冷冻离心机购自 ThermoFisher Scientific 公司;纯水系统购自 Millipore 公司;电热鼓风干燥箱购自上海博迅实业有限公司医疗设备厂;超净工作台购自北京东联哈尔仪器制造有限公司;生化培养箱购自上海一恒科学仪器有限公司;恒温培养振荡器购自天津市欧诺仪器仪表有限公司。

### 1.2 细菌浓度和吸光度值的线性相关曲线

参考文献[6],以无菌培养液作为空白对照,取处于对数生长期的 *L. plantarum* 培养液。在波长 600 nm 分别测定系列稀释菌悬液的 OD 值,制作菌浓度与 OD 值的关系曲线,获得线性关系方程式。

### 1.3 不同条件下培养菌株 HY21

MRS 液体培养基分别调节不同 pH 和不同 NaCl 添加量, 分别接种 2% 种子液, 在不同温度条件下进行恒温培养 24 h, 测定其  $OD_{600}$  值。根据 1.2 线性方程式, 计算结果绘制图表。

### 1.4 菌株的生长曲线及产酸能力的测定

将 *L. plantarum* HY21 培养液以 2% 接种于 MRS 液体培养基, 30 °C 恒温厌氧培养。前 12 h 每 1 h 取样一次, 后 20 h 每 2 h 取样一次。测定培养液在 600 nm 处吸光度值并测定培养液 pH。

### 1.5 模拟胃液和肠液的耐受性试验

参考文献[7], 配制不同 pH 的人工胃肠液。将 *L. plantarum* HY21 培养液分别接种于人工胃液或人工肠液中, 30 °C、180 r/min 摇床培养, 分别于 0、1、2、3 h 进行活菌平板计数。

### 1.6 药敏试验

采用纸片扩散法测定 *L. plantarum* HY21 对 8 种常用抗菌药物的敏感性, 依据《抗菌药物敏感性试验执行标准第十九版信息增刊》(CLSI, 2009), 判定对 8 种抗菌药物敏感度。

采用微量肉汤稀释法测定 7 种渔用药物对 *L. plantarum* HY21 抗菌的最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 和最小杀菌浓度 (minimum bactericidal concentration, MBC)。

### 1.7 海盐的耐受性试验

取活化培养 12 h 后的 *L. plantarum* HY21 培养液, 离心去除上层清液, 用 3% 的海盐溶液重新混匀, 再于 28 °C 培养箱培养。分别于 0、1、2、4、8、16 h 进行平板菌落计数。

### 1.8 鱼胆汁的耐受性试验

取新鲜鱼胆汁, 用无菌滤膜过滤。再用 0.9% 生理盐水稀释成 5%、10%、20% 浓度梯度的胆汁溶液。取 5 mL 植物乳杆菌 HY21 悬液与 5 mL 生理盐水混合, 进行平板菌落计数作为对照。各取 5 mL 不同浓度胆汁溶液与 5 mL 菌悬液混合。

于 28 °C 摇床培养 3 h, 进行平板菌落计数。

### 1.9 黏附能力的测定

取 1 mL 黏液蛋白于 2 mL 离心管中, 4 °C 下过夜使黏液蛋白包被于离心管上。去除上层清液以除去未黏附在离心管上的蛋白, 加 1 mL 植物乳杆菌 HY21 悬液于管中, 30 °C 孵育 1 h。去除上层清液, 将 1 mL 无菌生理盐水加入管中混匀。将菌液均匀涂布在平板上, 进行计数, 以确定菌液中的细菌数量。

### 1.10 表面疏水性、自凝聚性、共聚集性测定

采用细菌黏着碳烃化合物法<sup>[8]</sup>, 通过乳酸菌对碳烃化合物的亲和力来测定菌株疏水性。参考文献[8-9], 测定 *L. plantarum* HY21 的自凝聚性, 以及与迟缓爱德华氏菌、嗜水气单胞菌、无乳链球菌和溶藻弧菌的共聚集性。按照公式(1-3)计算自聚性、疏水性及共聚性:

$$\text{自聚性}(\%) = (1 - A_1/A_0) \times 100^{[8]} \quad (1)$$

$$\text{疏水性}(\%) = [(A_2 - A_0)/A_0] \times 100^{[8]} \quad (2)$$

$$\text{共聚性}(\%) = [(A_1 + A_3)/2 - A_4]/[(A_1 + A_3)/2] \times 100\%^{[9]} \quad (3)$$

式中,  $A_0$  为初始菌液  $OD_{600}$  值;  $A_1$  为静置 3 h 后上清液  $OD_{600}$  值;  $A_2$  为与二甲苯混匀后水相  $OD_{600}$  值;  $A_3$  为病原菌  $OD_{600}$  值;  $A_4$  为混合静置 5 h 后上清液  $OD_{600}$  值。

### 1.11 抑菌试验

采用琼脂扩散法<sup>[10]</sup>, 将 4 种水产常用病原指示菌(无乳链球菌、迟缓爱德华氏菌、溶藻弧菌和嗜水气单胞菌)在其最佳培养条件下进行培养, 调整菌液浓度至  $10^6$  CFU/mL, 分别吸取 100  $\mu$ L 菌液于平板上均匀涂开, 放上牛津杯。每个牛津杯内加入 200  $\mu$ L 植物乳杆菌 HY21 发酵上清液, 30 °C 恒温培养 12 h, 观察并用游标卡尺测量抑菌圈直径, 根据抑菌圈直径大小判定其抑菌能力的强弱。

### 1.12 体外抗氧化能力的测定

参考文献[11-13]的方法, 分别测定 *L. plantarum* HY21 的胞外产物、胞内产物、菌细

胞悬液三者清除 DPPH 自由基、羟基自由基、超氧阴离子的能力，以及三者的还原力。按公式(4-7)计算。

$$\text{DPPH 自由基清除率(\%)} = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100 \quad (4)$$

式中， $A_0$  为对照组吸光度； $A_1$  为样品组吸光度； $A_2$  为空白组吸光度。

$$\text{羟基自由基清除率(\%)} = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100 \quad (5)$$

式中， $A_1$  为样品组吸光值； $A_0$  为空白组吸光值。

$$\text{超氧阴离子清除率(\%)} = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100 \quad (6)$$

式中， $A_1$  为样品组吸光值； $A_0$  为空白组吸光值

$$\text{还原能力(\%)} = (A_s - A_b) / A_b \times 100 \quad (7)$$

式中， $A_s$  为样品组吸光值； $A_b$  为 PBS 替代待测样品的空白组吸光度值；以 0.25 mg/mL 的维生素 C (vitamin C, Vc) 溶液作为阳性对照，将待测样品的还原力转换为  $V_c$  当量。

### 1.13 数据分析

数据采用 SPSS 17.0 中单因素方差分析，结果以平均值+标准差表示，其中  $P > 0.05$  表示差异不显著， $P < 0.05$  表示差异显著， $P < 0.01$  表示差异极显著；采用 GraphPad Prism 8 软件作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 细菌浓度和吸光度值的线性相关曲线

*L. plantarum* HY21 的细菌浓度与 OD 值之间相关线性关系的标准曲线如图 1 所示。在波长为 600 nm 下，当吸光度值介于 0.054 0–0.848 6 之间时，*L. plantarum* HY21 细菌浓度与吸光度值之间线性关系良好，建立的回归方程为  $Y = 0.027\ 34X + 0.039\ 11$  ( $R^2 = 0.997\ 6$ )。

### 2.2 植物乳杆菌的培养条件和产酸能力

由图 2 所示，当 pH 4.0–9.0 时，植物乳杆菌 HY21 生长迅速，能大量繁殖。菌株在强酸强碱环境下生长状态明显受到抑制，对 pH 4.0 和 pH 10.0 等环境具有一定的耐受性。在 15 °C 低温条

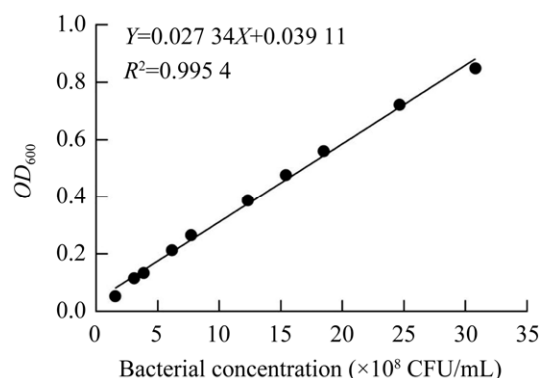


图 1 植物乳杆菌 HY21 的细菌浓度-吸光度的线性相关曲线

Figure 1 Linear curve between bacterial concentration and absorbance of *Lactobacillus plantarum* HY21.

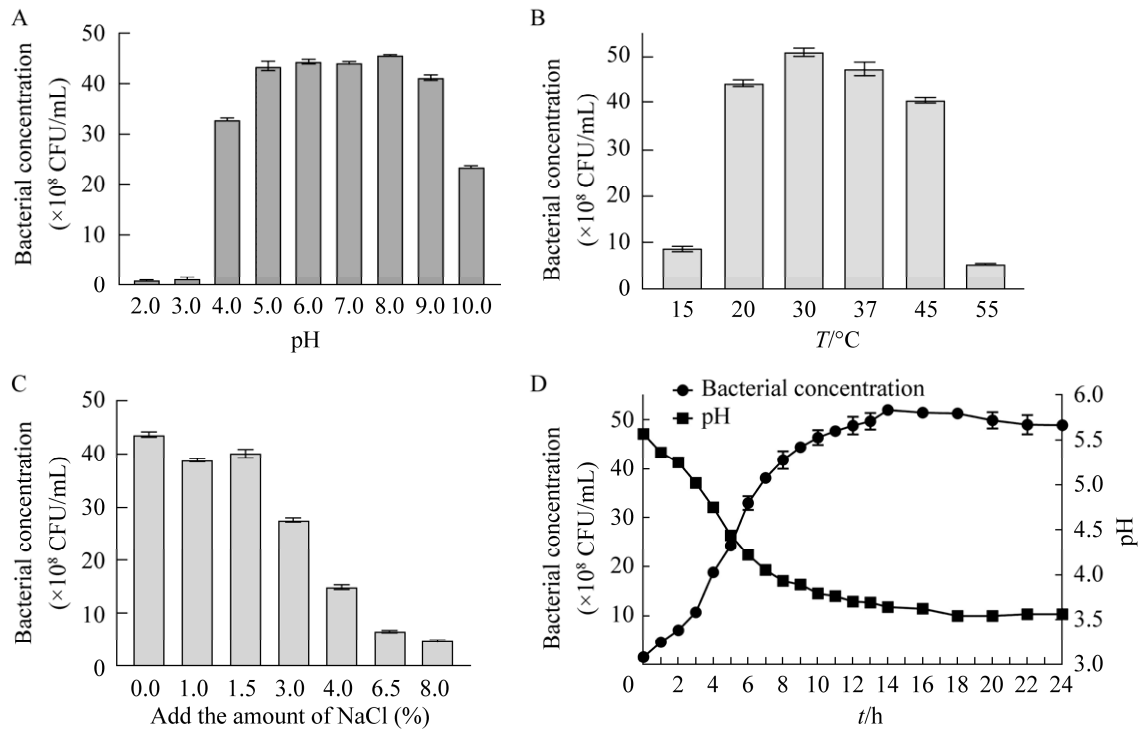
件和 55 °C 高温条件下，生长完全受到抑制，在 20–45 °C 条件下，菌株能够良好生长。在添加 1.0%、1.5% NaCl 的 MRS 培养基中，菌株受影响能正常生长。当添加 NaCl 含量大于 3.0% 时，生长效果逐渐次之。当 NaCl 添加量达到 8.0% 时，生长受到抑制，菌体无法增殖。在接种 2 h 后，迅速进入对数生长期，9 h 后生长速度变缓，14 h 时到达最大生长量。0–10 h 内，菌液 pH 从 5.6 快速下降至 3.8。18 h 后菌液 pH 变化趋于平缓，基本稳定在 3.6 左右。*L. plantarum* HY21 可以在 14 h 内达到最大生长量和较低的 pH。综上所述，*L. plantarum* HY21 在 pH 5.0–8.0 的环境中生长状态最佳，耐温范围较广，14 h 内达到最大生长量和较低的 pH。

### 2.3 植物乳杆菌对模拟胃肠液、海盐溶液、胆汁的耐受性

表 1 比较了 *L. plantarum* HY21 在不同外环境胁迫下的存活情况。在 pH 3.0 的人工胃液和 pH 6.8 的人工肠液中 3 h 后，*L. plantarum* HY21 存活率分别为  $118.83\% \pm 7.42\%$  和  $103.85\% \pm 3.42\%$ 。在不同 pH 的人工胃肠液中处理不同时间后，所检测到的 *L. plantarum* HY21

活菌数随着 pH 降低而明显减少; 而且经 pH 2.5 处理, 随着时间延长活菌数显著减少; 但经 pH 3.0 处理, 随时间延长菌数没有明显变化。植物乳杆菌 HY21 在 3%海盐溶液中处理不同时间后, 所检测到的活菌数随时间延长并没有明显差

异; 在处理 16 h 后存活率仍为  $97.58\% \pm 7.14\%$ 。随着胆汁浓度的增加, 植物乳杆菌 HY21 的活菌数逐渐减少, 存活率逐渐降低; 在 2.5%、5.0%、10%胆汁环境下, 存活率分别为  $89.43\% \pm 1.27\%$ 、 $87.74\% \pm 6.23\%$ 、 $68.11\% \pm 7.98\%$ 。



**图 2** 不同初始条件下植物乳杆菌 HY21 的生长量(A–C)和植物乳杆菌 HY21 的生长与 pH 变化曲线(D)  
**Figure 2** Growth of *Lactobacillus plantarum* HY21 under different initial conditions (A–C), growth and pH change curve of *L. plantarum* HY21 (D). A: Growth of *L. plantarum* HY21 under different pH conditions. B: Effects of different temperatures on the growth of strain HY21. C: Growth of *L. plantarum* HY21 in media with different concentration of NaCl. D: Growth and pH change curve of *L. plantarum* HY21. The error bar reflects the average difference between a data point and the mean.

**表 1** 植物乳杆菌 HY21 在不同溶液中的存活率(平均值 $\pm$ 标准误,  $n=3$ )

**Table 1** Survival rate of *Lactobacillus plantarum* HY21 in different liquids (mean $\pm$ SEM,  $n=3$ )

| Tolerance time (h) | Gastric fluid pH 2.0 survival rate (%) | Gastric fluid pH 2.5 survival rate (%) | Gastric fluid pH 3.0 survival rate (%) | Enteric fluid pH 6.8 survival rate (%) |
|--------------------|--|--|--|--|
| 1                  | <0.1                                   | 44.45 $\pm$ 6.77a                      | 99.25 $\pm$ 8.11                       | 99.16 $\pm$ 6.16b                      |
| 2                  | <0.1                                   | 0.30 $\pm$ 0.00b                       | 106.04 $\pm$ 5.74                      | 113.91 $\pm$ 4.48ab                    |
| 3                  | <0.1                                   | <0.1c                                  | 118.83 $\pm$ 7.42                      | 103.85 $\pm$ 3.42a                     |

Data are means of triplicates. Means in each bar sharing the same superscript letter or absence of superscripts are not significantly different determined by Tukey's test ( $P \geq 0.05$ ). The same below.

## 2.4 植物乳杆菌 HY21 药敏分析

由表 2 可知, 植物乳杆菌 HY21 对 8 种药物均表现敏感; 其中对四环素最敏感, 抑菌直径达到 $(40.66\pm 1.15)$  mm; 对青霉素 G 不敏感。由表 3 得, 7 种水产常用抗菌药对 *L. plantarum* HY21 抗菌的 MIC 均介于常规用量, 均表现敏感。对硫酸新霉素最为敏感, 最低抑菌浓度为  $0.25 \mu\text{g/mL}$ 。

## 2.5 植物乳杆菌 HY21 的益生特性

### 2.5.1 植物乳杆菌 HY21 的体外定殖性能表征

由表 4 可知, 植物乳杆菌 HY21 的自聚率和疏水性分别达到  $22.69\%\pm 1.36\%$ 、 $60.42\%\pm 2.78\%$ ; 与 4 株水产常见的病原菌共聚性达到  $25.33\%\pm 0.81\%$

以上, 其中与迟缓爱德华氏菌的共聚性达到  $33.62\%\pm 0.62\%$ , 显著高于其他 3 株病原菌; 体表、肠道黏液的黏附量分别达到 $(1.66\pm 0.01)\times 10^6$  CFU/mL 和 $(1.23\pm 0.15)\times 10^6$  CFU/mL, *L. plantarum* HY21 对体表黏液的黏附量显著高于肠道黏液。

### 2.5.2 植物乳杆菌 HY21 发酵液的抑菌效果

植物乳杆菌 HY21 对无乳链球菌、迟缓爱德华氏菌、溶藻弧菌和嗜水气单胞菌 4 株指示病原菌的抑制效果如表 5、图 3 所示。由表 5 结果可知, 植物乳酸杆菌 HY21 发酵上清液对 4 株指示菌均有较好的抑菌效果, 其中对无乳链球菌的抑菌效果最强, 抑菌圈直径达 $(17.83\pm 0.50)$  mm。

表 2 植物乳杆菌 HY21 对 9 种药物的敏感度

Table 2 The sensitivities of *Lactobacillus plantarum* HY21 to the nine susceptibility tablets

| Antibiotics                   | Drug content ( $\mu\text{g}/\text{tablet}$ ) | Diameter of inhibition zone (mm) | Sensitivity |
|-------------------------------|--|----------------------------------|-------------|
| Tetracycline                  | 30   | $40.66\pm 1.15$                  | S           |
| Erythromycin                  | 15   | $38.33\pm 0.57$                  | S           |
| Norfloxacin                   | 10   | $34.00\pm 1.00$                  | S           |
| Sulfamethoxazole+Trimethoprim | 23.75/1.25                                   | $42.00\pm 1.73$                  | S           |
| Furazolidone                  | 300  | $37.00\pm 1.00$                  | S           |
| Gentamicin                    | 10   | $30.00\pm 2.00$                  | S           |
| Penicillin G                  | 10   | $22.33\pm 1.15$                  | R           |
| Chloramphenicol               | 30   | $35.00\pm 3.00$                  | S           |
| Ampicillin                    | 100  | $31.66\pm 3.00$                  | S           |

R: Insensitivity; S: Sensitivity.

表 3 七种水产常用药物对植物乳杆菌 HY21 的最低抑菌浓度

Table 3 Minimum inhibitory concentrations of seven commonly used aquatic drugs against *Lactobacillus plantarum* HY21

| Drugs                     | MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) | Conventional dosage (time) |
|---------------------------|--------------------------|----------------------------|
| Enrofloxacin              | 8                        | 6–12                       |
| Neomycin sulphate         | 0.25                     | 3                          |
| Thiamphenicol             | 4                        | 3–6                        |
| Florfenicol               | 8                        | 12–18                      |
| Doxycycline               | 8                        | 12                         |
| Flumequine                | 16                       | 15–30                      |
| Sodium sulfamonomethoxine | 64                       | 48–96                      |

### 2.5.3 植物乳杆菌 HY21 的体外抗氧化能力

图 4 比较 *L. plantarum* HY21 的细胞悬液、发酵胞外产物、胞内产物等 3 种物质的 4 种抗氧化指标, 可知 3 种物质均具有不同程度的抗氧化作用。由图 4A 可知, 胞外产物对 DPPH 自由基的清除率高达 95.45%, 明显高于菌细胞悬液 (21.24%) 和胞内产物 (19.70%) 的清除率。由图 4B 可知, 胞外产物对羟基自由基的清除能力显著高于细胞悬液和胞内产物, 高达 37.70%。由图 4C 可知, 胞内产物对超氧阴离子的清除率最高, 达到 18.73%。由图 4D 可知, 菌细胞悬液和胞内产

表 4 植物乳杆菌 HY21 的表面疏水性、自聚性、共聚性和黏附能力的测试结果

Table 4 Test results of surface hydrophobicity, self-coagulation, copolymerization and adhesion of *Lactobacillus plantarum* HY21

| Item  | Result (%)  |
|---|-------------|
| Self-coagulation  | 22.69±1.36  |
| Hydrophobicity  | 60.42±2.78  |
| Copolymerization with <i>Vibrio alginolytica</i>          | 27.98±1.45b |
| Copolymerization with <i>Edwardsiella tarda</i>           | 33.62±0.62a |
| Copolymerization with <i>Streptococcus agalactiae</i>     | 25.89±2.95b |
| Copolymerization with <i>Aeromonas hydrophila</i>         | 25.33±0.81b |
| Surface mucous adhesion amount ( $\times 10^6$ CFU/mL)    | 1.66±0.01A  |
| Intestinal mucous adhesion amount ( $\times 10^6$ CFU/mL) | 1.23±0.15B  |

The significant differences between the four groups of copolymerization were analyzed (lowercase letters);

Significance analysis between two groups of mucus (capital letters).

物的还原力极低，但胞外产物的还原力相当于 1.06 倍  $0.25 \text{ mg/mL}_C$  的还原力。

### 3 讨论

#### 3.1 不同来源植物乳杆菌的生长特性

对比不同来源植物乳杆菌的生长曲线与产酸曲线发现，大部分植物乳酸杆菌的生长延滞期较短，大多在 2 h 后迅速进入对数期，且产酸较多，大多数进入稳定期时 pH 小于 4.0<sup>[14-19]</sup>。本试验菌株 HY21 的生长曲线和产酸曲线与猪源植物乳酸杆菌 GF103<sup>[14]</sup>的研究结果相似，2 h 后进入对数期，9 h 进入稳定期，稳定后 pH 在 3.6 左右，至 20 h 进入

稳定期末期，菌量才出现下降。该结果表明，菌株 HY21 有较好的稳定性和产酸能力。培养后期可以调节 pH 和添加营养物质等方式，在短时间内获得大量发酵产物和菌体。

表 5 植物乳杆菌 HY21 对 4 株病原菌的抑制作用  
Table 5 Antibacterial effect of *Lactobacillus plantarum* HY21 against four pathogenic bacteria

| Strain                          | Diameter of inhibition zone (mm) |
|---------------------------------|----------------------------------|
| <i>Vibrio alginolytica</i>      | 13.96±0.30c                      |
| <i>Edwardsiella</i>             | 16.93±0.55b                      |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | 17.83±0.50a                      |
| <i>Aeromonas hydrophila</i>     | 9.10±0.26d                       |

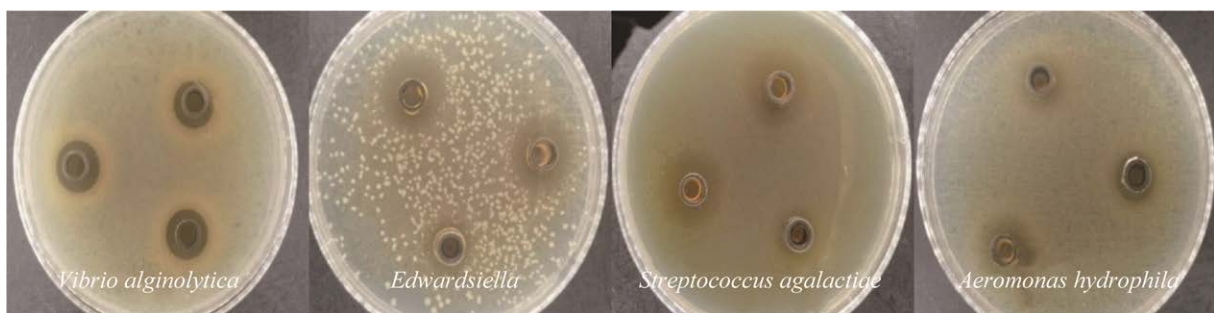


图 3 植物乳杆菌 HY21 对 4 株病原菌的抑制平板

Figure 3 Antibacterial plate of *Lactobacillus plantarum* HY21 against four pathogenic bacteria.



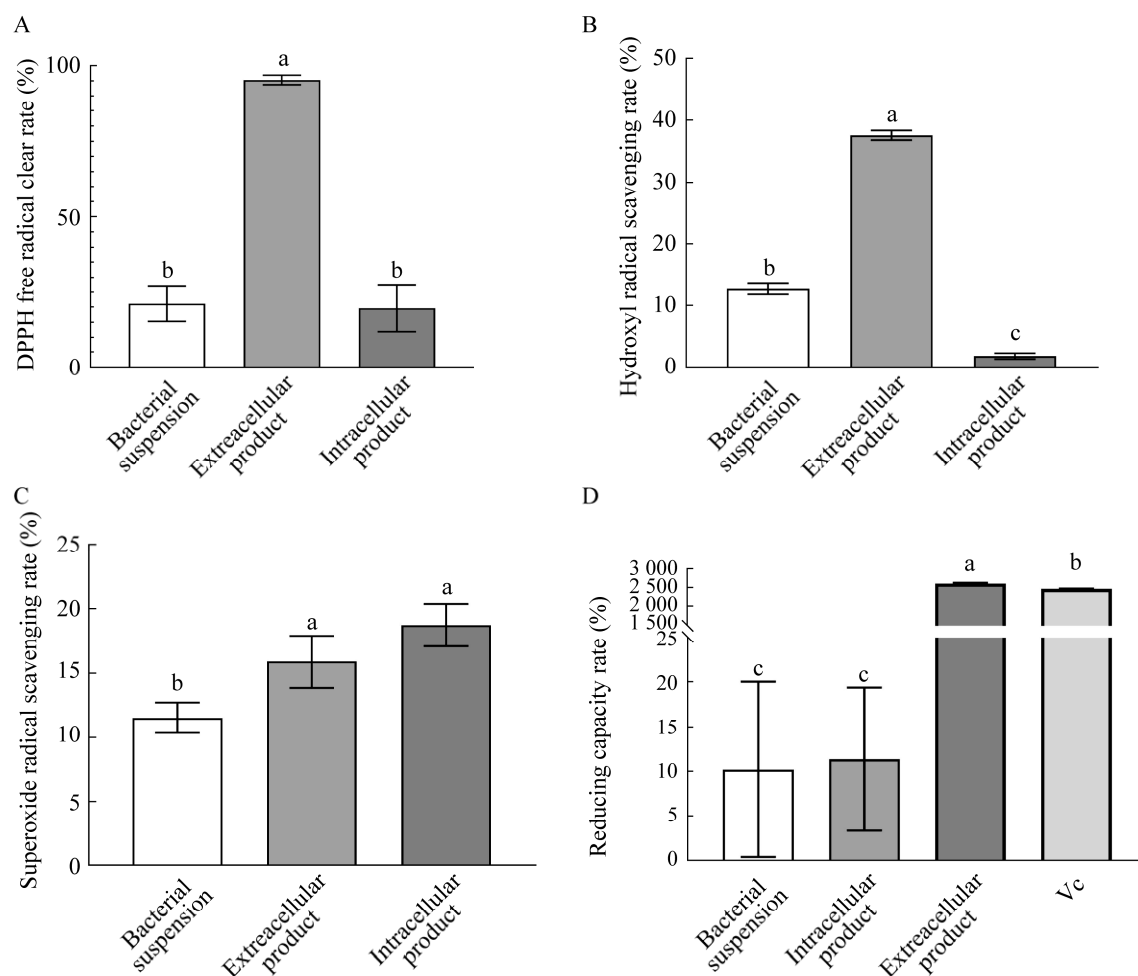


图 4 植物乳杆菌 HY21 清除 3 种自由基的能力和还原力的比较分析 不同小写字母之间表示差异显著，相同字母之间表示差异不显著

Figure 4 Comparative analysis of the ability of *Lactobacillus plantarum* HY21 to scavenge three kinds of free radicals and reductive property. A: DPPH free radical scavenging ability. B: Hydroxyl radical scavenging ability. C: Superoxide radical scavenging ability. D: Reducing capacity. The error bar reflects the average difference between a data point and the mean. Different lowercase letters represent significant differences.

温度是微生物生命活动中重要的环境因子，当温度改变时，微生物必须通过调节脂类的组成、胞内酶的活性、蛋白质的合成、基因调控和 RNA 的合成以适应环境温度的变化。温度不仅影响乳酸菌的生长，还影响代谢产物的产量和质量。Fu 等<sup>[17]</sup>从泡菜中分离出植物乳酸杆菌 ZJ2868，该菌在 20–45 °C 的温度范围内均能正常生长，属于中温性乳酸菌。菌株 HY21 在 30 °C

时生长效果最佳，在 20–45 °C 能够良好生长，与温度对菌株 ZJ2868 的生长影响规律一致，也属于中温性乳酸菌。

### 3.2 植物乳杆菌对宿主内外环境条件的耐受性

为了在肠道中发挥益生菌的作用，摄入的植物乳酸杆菌菌株需要在肠道的胆汁盐中存活，并在胃的酸性条件下存活，以便细菌定殖

在主体<sup>[19]</sup>。因此对胃液、肠液、胆汁的抵抗力是选择潜在益生菌的重要标准。本研究考察了胃液、胆汁、渗透压对植物乳杆菌存活率的影响,测定不同 pH 值的胃液、肠液、胆汁和渗透压条件下菌株的存活率,试验结果与其他来源的植物乳杆菌的研究结果相一致<sup>[19-27]</sup>。

动物进食后 pH 约为 3.0–5.0,一般食物通过胃的时间低于 3 h,益生菌必须在 pH 值为 3.0 的条件下存活 1.5–2.0 h<sup>[20-21]</sup>。因此,选择的益生菌需要对酸性条件具有高耐受性,才能更好地在肠道上部定殖<sup>[22]</sup>。Zommiti 等<sup>[23]</sup>发现在低 pH 条件下,部分乳酸菌仍能保持活力,而低 pH 值与活力损失之间存在负相关关系。本研究发现,菌株 HY21 对 pH 3.0 的模拟胃液和 pH 6.8 的模拟肠液有良好的适应,在 3 h 后仍保持较高的存活率,均达到 99%以上,而大于初始值的原因,可能是低 pH 条件下,菌株仍有少量增殖。

胆汁中含有胆汁盐,胆汁盐是具有强抗菌活性的有机化合物,可能会损坏或严重损害菌体膜功能。此外,胆汁盐会导致氧化应激、DNA 损伤和蛋白质错误折叠<sup>[24]</sup>。因此,必须选择对胆汁盐具有高抗性的菌株。Mathara 等<sup>[25]</sup>研究表明,在 0.3%胆汁盐中培养,与未添加胆汁组对比,生长达到 50%以上的菌株,被认为具有良好抗性的菌株。本研究考虑到实际肠道中胆汁的成分包括无机盐、胆汁酸、胆色素、脂肪酸、胆固醇、卵磷脂和少量蛋白质(包括黏蛋白、浆蛋白)等有机成分及酶的影响。在 10%新鲜鱼胆汁处理下存活率仍达到 68.11%±7.98%。应用新鲜胆汁对菌体进行处理,尚未见其他来源植物乳杆菌的相关研究报道。结果表明,该植物乳杆菌具有良好的胃肠道定殖能力,具有在动物体内存活的潜力。

为应用于海水养殖环境或高渗透压的食物中存活,菌体需要对渗透压有一定的耐受性。海

水的平均盐度为 3.5%。本研究使用 3.0%的海盐溶液和不同梯度的 NaCl 培养。在 4.0%的 NaCl 溶液中仍然能够较好生长,在 3.0%的海盐处理 16 h 后,存活率高达 97.58%±7.14%。

### 3.3 植物乳杆菌的安全性分析

由于益生菌可以作为抗生素抗性基因的宿主,将它们转移到病原菌中,因此从安全性的角度考虑,乳酸杆菌的抗生素敏感性被认为是评估其作为潜在益生菌的重要标准<sup>[28-29]</sup>。本研究结果显示 *L. plantarum* HY21 对绝大部分测试抗菌药物具有较高敏感性,不存在耐药性,表明该菌株有着良好的安全性能。乳酸菌对常用抗生素的多重耐药已成为普遍现象,不同来源的菌株表现出了不同的耐药性<sup>[27]</sup>。Manzoor 等<sup>[27]</sup>和 Zago 等<sup>[30]</sup>研究发现其他来源的植物乳杆菌对红霉素、氯霉素、四环素、庆大霉素表现敏感。本研究结果与之相反,其他植物乳酸杆菌被发现对使用的一些常规抗生素具有耐药性<sup>[14,19]</sup>,可能是由于细菌菌株类型的差异<sup>[27-31]</sup>。

### 3.4 植物乳杆菌作为益生菌的特性

益生菌可以在肠道黏附。黏附后可以与大肠杆菌等肠道病原菌发生黏附竞争,从而抑制病原体生长、调节肠道菌群、增强免疫力和防治肠道感染<sup>[32-33]</sup>。对肠上皮细胞的黏附能力是益生菌发挥其有益作用的原因之一。聚集、共聚集和疏水能力被认为与细胞黏附特性相关<sup>[19]</sup>。益生菌在进入宿主肠道内的过程中,首先在黏蛋白上黏附,因此益生菌与宿主肠黏液的黏附能力是反映其黏附性的重要标准之一<sup>[34]</sup>。本研究测得植物乳杆菌 HY21 的疏水性达到 60.42%±2.78%,与多株水产病原菌共聚性达到 25.33%±0.81%以上,肠道黏液蛋白黏附量达到 10<sup>6</sup> CFU/mL,由此说明植物乳杆菌 HY21 在肠道具有较强的吸附能力与定殖能力。本研究使用的体外黏液黏附模型结果与其他研究的体外细胞黏附模型、体外

肠组织模型得到的结果一致<sup>[28,35]</sup>。

益生菌黏附机体肠道后,可以通过分泌有机酸、多糖类、抗菌肽类等物质来抑制微生物<sup>[36]</sup>。本研究对比其他乳杆菌研究,乳杆菌均体现了良好的抑菌性能,但是不同菌株的抑菌效果存在差别<sup>[37-39]</sup>。在嗜水气单胞菌的抑制效果上,与郭凤茹的研究一致<sup>[39]</sup>。在迟缓爱德华氏菌的抑制效果上,比陆晓岑筛选的菌株 BA09 效果更佳<sup>[40]</sup>。而对于无乳链球菌有抑制作用的益生菌主要是芽孢杆菌类<sup>[38]</sup>。对比以上研究,本研究的植物乳杆菌在水产上抑菌范围广、效果好,丰富了防控致病菌的益生菌资源。

益生菌可以作为抗氧化剂来维持肠道中的氧化还原平衡,减少自由基引起的氧化损伤<sup>[41-42]</sup>。植物乳杆菌 HY21 通过清除不同浓度的 DPPH 自由基、羟基自由基和超氧阴离子,显示出其作为理想抗氧化剂的潜力。Liu 等<sup>[41]</sup>研究来源发酵泡菜中分离的植物乳酸杆菌 LP9010 和 LP6595 时发现,上清液的羟基自由基、超氧阴离子和 DPPH 自由基清除能力均高于细菌沉淀。本研究在 DPPH 自由基和羟基自由基清除能力上与其结果一致,而超氧阴离子与其结果相反,考虑可能是菌株来源不同的影响。植物乳杆菌 HY21 在还原能力上远高于刘珊春发酵乳分离的植物乳酸菌<sup>[13]</sup>,总体均体现了较高的抗氧化力,因此该植物乳杆菌是一种十分有潜力的天然抗氧化剂。

## 4 结论

本研究从健康仿刺参肠道分离纯化一株具有良好耐酸碱性能、适温适盐范围广的植物乳酸杆菌,具有良好的生物安全性和肠道黏附性;对人工模拟的胃肠液、胆汁内环境和高渗透压外环境有一定的耐受性;对水产致病菌具有明显抑制作用,具有较强的抗氧化能力。本研究

为该菌株开发成为水产用新的益生菌制剂提供理论参考。

## 参考文献

- [1] MU GQ, GAO Y, TUO YF, LI HY, ZHANG YQ, QIAN F, JIANG SJ. Assessing and comparing antioxidant activities of *Lactobacilli* strains by using different chemical and cellular antioxidant methods[J]. *Journal of Dairy Science*, 2018, 101(12): 10792-10806.
- [2] WU YP, WANG BK, ZENG ZH, LIU RR, TANG L, GONG L, LI WF. Effects of probiotics *Lactobacillus plantarum* 16 and *Paenibacillus polymyxa* 10 on intestinal barrier function, antioxidative capacity, apoptosis, immune response, and biochemical parameters in broilers[J]. *Poultry Science*, 2019, 98(10): 5028-5039.
- [3] 何江波, 姚志芳, 吴国芳, 杨雨鑫, 王磊. 乳酸菌制剂益生特性及在畜牧业中的应用研究进展[J]. *家畜生态学报*, 2020, 41(8): 85-89.  
HE JB, YAO ZF, WU GF, YANG YX, WANG L. Research progress on probiotic characteristics of lactic acid bacteria preparation and its application in animal husbandry[J]. *Acta Ecologicae Animalis Domastici*, 2020, 41(8): 85-89 (in Chinese).
- [4] 罗燕儿, 赵慧, 郭道远, 王欢, 陈孝煊, 吴志新. 枯草芽孢杆菌对草鱼肝脏脂质代谢的调节作用[J]. *水生生物学报*, 2020, 44(3): 485-493.  
LUO YE, ZHAO H, GUO DY, WANG H, CHEN XX, WU ZX. Effects of *Bacillus subtilis* on the hepatic lipid metabolism of *Ctenopharyngodon idellus*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, 44(3): 485-493 (in Chinese).
- [5] MAÑES-LÁZARO R, van DIEMEN PM, PIN C, MAYER MJ, STEVENS MP, NARBAD A. Administration of *Lactobacillus johnsonii* F19785 to chickens affects colonisation by *Campylobacter jejuni* and the intestinal microbiota[J]. *British Poultry Science*, 2017, 58(4): 373-381.
- [6] 谢小伟, 孙志良, 李元义, 刘兆颖, 陈小军. 猪链球菌 2 型生长曲线与半数致死量的测定[J]. *中兽医医药杂志*, 2016, 35(4): 8-11.  
XIE XW, SUN ZL, LI YY, LIU ZY, CHEN XJ.

- Determination of growth curve and median lethal dose of *Streptococcus suis* type 2[J]. Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine, 2016, 35(4): 8-11 (in Chinese).
- [7] HUANG CH, QIAO SY, LI DF, PIAO XS, REN JP. Effects of *Lactobacilli* on the performance, diarrhea incidence, VFA concentration and gastrointestinal microbial flora of weaning pigs[J]. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2004, 17(3): 401-409.
- [8] NITHYA V, HALAMI PM. Evaluation of the probiotic characteristics of *Bacillus* species isolated from different food sources[J]. Annals of Microbiology, 2013, 63(1): 129-137.
- [9] 刘佳, 卜子晨, 费苏, 夏永军, 艾连中, 王光强. 高黏附罗伊氏乳杆菌的筛选及其益生特性评价[J]. 工业微生物, 2021, 51(3): 36-41.
- LIU J, BU ZC, FEI S, XIA YJ, AI LZ, WANG GQ. Screening of highly adherent *Lactobacillus reuteri* and evaluation of its probiotic properties[J]. Industrial Microbiology, 2021, 51(3): 36-41 (in Chinese).
- [10] 孙群, 易华西, 张冬, 梁晶晶, 蔡玉勇, 张兰威. 潜在益生菌的筛选及抑菌功能特性评价[J]. 食品科技, 2019, 44(12): 1-5.
- SUN Q, YI HX, ZHANG D, LIANG JJ, CAI YY, ZHANG LW. Screening of potential probiotics and evaluation of antibacterial function characteristics[J]. Food Science and Technology, 2019, 44(12): 1-5 (in Chinese).
- [11] WANG Y, ZHOU JZ, XIA XD, ZHAO YC, SHAO WL. Probiotic potential of *Lactobacillus paracasei* FM-LP-4 isolated from Xinjiang camel milk yoghurt[J]. International Dairy Journal, 2016, 62: 28-34.
- [12] [12] YU HS, JANG HJ, LEE NK, PAIK HD. Evaluation of the probiotic characteristics and prophylactic potential of *Weissella cibaria* strains isolated from kimchi[J]. LWT, 2019, 112: 108229.
- [13] 刘珊春. 传统发酵酸乳中抗氧化乳酸菌的筛选与功能评价[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2017.
- LIU SC. Screening and functional evaluating of anti-oxidative lactic acid bacteria in traditional fermented milk[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2017 (in Chinese).
- [14] 董晓丽, 张乃锋, 周盟, 屠焰, 刁其玉, 聂明非. 一株乳酸菌 GF103 的分离鉴定及体外益生效果评价[J]. 动物营养学报, 2012, 24(9): 1832-1838.
- DONG XL, ZHANG NF, ZHOU M, TU Y, DIAO QY, NIE MF. Isolation and identification of *Lactobacillus* sp. GF103 and assess it as potential probiotics *in vitro*[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2012, 24(9): 1832-1838 (in Chinese).
- [15] 张博文, 牛天明, 程明扬, 叶丽萍, 杨桂连, 王春风. 猪源乳酸菌的分离鉴定及部分生物学特性[J]. 中国微生态学杂志, 2021, 33(2): 149-153.
- ZHANG BW, NIU TM, CHENG MY, YE LP, YANG GL, WANG CF. Isolation and identification of lactic acid bacteria from pigs and some of their biological characteristics[J]. Chinese Journal of Microecology, 2021, 33(2): 149-153 (in Chinese).
- [16] 侯颖, 王维宇, 牛明福, 马丽苹, 秦翠丽, 宫强. 自然发酵泡菜汁中植物乳杆菌的分离鉴定与体外益生特性研究[J]. 动物营养学报, 2017, 29(10): 3611-3619.
- HOU Y, WANG WY, NIU MF, MA LP, QIN CL, GONG Q. Isolation and identification of *Lactobacillus plantarum* from naturally fermented pickle juice and its probiotic properties *in vitro*[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2017, 29(10): 3611-3619 (in Chinese).
- [17] FU B, HUANG XX, MA J, CHEN QW, ZHANG QL, YU P. Characterization of an inositol-producing *Lactobacillus plantarum* strain and the assessment of its probiotic potential and antibacterial activity[J]. LWT, 2022, 153: 112553.
- [18] 韦庆旭, 张建鹏, 梁煜晨, 唐连群, 王平. 青贮用乳酸菌的分离鉴定及生物学特性评价[J]. 动物营养学报, 2022, 34(7): 4737-4749.
- WEI QX, ZHANG JP, LIANG YC, TANG LQ, WANG P. Isolation, identification and biological characteristics evaluation of lactic acid bacteria for silage[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2022, 34(7): 4737-4749 (in Chinese).
- [19] LIN XN, XIA YJ, YANG YJ, WANG GQ, ZHOU W, AI LZ. Probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* AR113 and its molecular mechanism of antioxidant[J]. LWT, 2020, 126: 109278.
- [20] KIMOTO H, NOMURA M, KOBAYASHI M, OKAMOTO T, OHMOMO S. Identification and

- probiotic characteristics of *Lactococcus* strains from plant materials[J]. *Japan Agricultural Research Quarterly*: JARQ, 2004, 38(2): 111-117.
- [21] FREIRE AL, RAMOS CL, DA COSTA SOUZA PN, CARDOSO MGB, SCHWAN RF. Nondairy beverage produced by controlled fermentation with potential probiotic starter cultures of lactic acid bacteria and yeast[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2017, 248: 39-46.
- [22] DIVYASHREE S, ANJALI PG, SOMASHEKARAI AH R, SREENIVASA MY. Probiotic properties of *Lactobacillus casei-mysrd* 108 and *Lactobacillus plantarum*-MYSRD 71 with potential antimicrobial activity against *Salmonella paratyphi*[J]. *Biotechnology Reports*, 2021, 32: e00672.
- [23] ZOMMITI M, CONNIL N, BEN HAMIDA J, FERCHICHI M. Probiotic characteristics of *Lactobacillus curvatus* DN317, a strain isolated from chicken ceca[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2017, 9(4): 415-424.
- [24] YOKOTA A. Bile acid stress response in lactic acid bacteria and bifidobacteria[J]. *Japanese Journal of Lactic Acid Bacteria*, 2010, 21: 87-94.
- [25] MATHARA JM, SCHILLINGER U, KUTIMA PM, MBUGUA SK, GUIGAS C, FRANZ C, HOLZAPFEL WH. Functional properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from maasai traditional fermented milk products in Kenya[J]. *Current Microbiology*, 2008, 56(4): 315-321.
- [26] TULUMOĞLU Ş, KAYA Hİ, ŞİMŞEK Ö. Probiotic characteristics of *Lactobacillus fermentum* strains isolated from tulum cheese[J]. *Anaerobe*, 2014, 30: 120-125.
- [27] MANZOOR A, TAYYEBT A. Functional probiotic attributes and gene encoding plantaracin among variant *Lactobacillus plantarum* strains[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2019, 131: 22-32.
- [28] MENG LY, ZHU XM, TUO YF, ZHANG HP, LI Y, XU C, MU GQ, JIANG SJ. Reducing antigenicity of  $\beta$ -lactoglobulin, probiotic properties and safety evaluation of *Lactobacillus plantarum* AHQ-14 and *Lactobacillus bulgaricus* BD0390[J]. *Food Bioscience*, 2021, 42: 101137.
- [29] JOMEHZADEH N, JAVAHERIZADEH H, AMIN M, SAKI M, AL-OUQAILI MTS, HAMIDI H, SEYEDMAHMOUDI M, GORJIAN Z. Isolation and identification of potential probiotic *Lactobacillus* species from feces of infants in southwest Iran[J]. *International Journal of Infectious Diseases*, 2020, 96: 524-530.
- [30] ZAGO M, FORNASARI ME, CARMINATI D, BURNS P, SUÀREZ V, VINDEROLA G, REINHEIMER J, GIRAFFA G. Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses[J]. *Food Microbiology*, 2011, 28(5): 1033-1040.
- [31] 李艳莉. 酸奶及发酵剂中分离乳酸菌药物敏感性研究[D]. 广州: 华南理工大学硕士学位论文, 2015.
- LI YL. Antimicrobial susceptibilities of lactic acid bacteria isolated from yogurts and starter culture[D]. Guangzhou: Master's Thesis of South China University of Technology, 2015 (in Chinese).
- [32] ZHANG W, JI HF, ZHANG DY, LIU H, WANG SX, WANG J, WANG YM. Complete genome sequencing of *Lactobacillus plantarum* ZLP001, a potential probiotic that enhances intestinal epithelial barrier function and defense against pathogens in pigs[J]. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: 1689.
- [33] ALIZADEH BEHBAHANI B, NOSHAD M, FALAH F. Inhibition of *Escherichia coli* adhesion to human intestinal Caco-2 cells by probiotic candidate *Lactobacillus plantarum* strain L15[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2019, 136: 103677.
- [34] 陈强. 致病性溶藻弧菌对大黄鱼粘液的粘附研究[D]. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 2006.
- CHEN Q. Adhesion of pathogenic *Vibrio alginolyticus* to mucus of large yellow croaker[D]. Qingdao: Master's Thesis of Ocean University of China, 2006 (in Chinese).
- [35] 王斌. 高粘附性能乳杆菌的筛选及其对肠上皮细胞粘附机制的初步研究[D]. 重庆: 第三军医大学博士学位论文, 2005.
- WANG B. Screening of adhesive activity of *Lactobacilli* and preliminary study on potential mechanisms of binding to enterocyte-like HT-29 cells[D]. Chongqing: Doctoral Dissertation of Thesis of Army Medical University, 2005 (in Chinese).

- [36] 田宗民. 抑致病菌益生菌菌株及其胞外多糖抗 TGEV 作用的比较分析[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2015.  
TIAN ZM. Analysis and compare of probiotic strains with antibacterial properties and EPS in the role of anti-TGEV [D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [37] YANG JM, MOON GS. Isolation of a *Lactococcus lactis* strain producing anti-staphylococcal bacteriocin[J]. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 2018, 38(6): 1315-1321.
- [38] 王蕊, 付维来, 陈思, 陈晶, 易敢峰. 罗非鱼无乳链球菌拮抗株的筛选及特性研究[J]. 水产科学, 2019, 38(4): 465-472.  
WANG R, FU WL, CHEN S, CHEN J, YI GF. Screening and biological characteristics of a *Bacillus agalactiae* in *Tilapia*[J]. Fisheries Science, 2019, 38(4): 465-472 (in Chinese).
- [39] 郭凤茹. 罗非鱼肠道乳酸菌的益生特性研究[D]. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文, 2019.  
GUO FR. Study on probiotic characteristics of lactic acid bacteria in tilapia intestine[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2019 (in Chinese).
- [40] 陆晓岑. 三种海水病原菌的拮抗菌筛选及其作用机制研究[D]. 大连: 大连海洋大学硕士学位论文, 2022.  
LU XC. Screening antagonistic bacteria of three marine pathogens and study on their mechanism[D]. Dalian: Master's Thesis of Dalian Ocean University, 2022. (in Chinese)
- [41] LIU DM, HUANG YY, LIANG MH. Analysis of the probiotic characteristics and adaptability of *Lactiplantibacillus plantarum* DMDL 9010 to gastrointestinal environment by complete genome sequencing and corresponding phenotypes[J]. LWT, 2022, 158: 113129.
- [42] MAYASANKARAVALLI C, DEEPIKA K, ESTHER LYDIA D, AGADA R, THAGRIKI D, GOVINDASAMY C, CHINNADURAI V, OTHMAN GATAR OM, KHUSRO A, KIM YO, KIM HJ. Profiling the phyto-constituents of *Punica granatum* fruits peel extract and accessing its *in-vitro* antioxidant, anti-diabetic, anti-obesity, and angiotensin-converting enzyme inhibitory properties[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2020, 27(12): 3228-3234.