

海洋放线菌作为益生菌在水产养殖中的潜在应用

王蓉, 何晓娜, 刘维, 唐贤明, 陈积明 (海南省水产研究所, 海南海口 570203)

摘要 近年来水产养殖业发展迅速, 但面临着严重的病害问题。海洋放线菌是获取生物活性物质的重要来源, 已有人将海洋放线菌作为益生菌用于水产养殖病害的预防与控制, 其在水产养殖生产中具有重要的应用价值和广阔的应用前景。

关键词 海洋放线菌; 益生菌; 抗病; 水产养殖

中图分类号 S948 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)24-10007-03

Potential Use of Marine Actinobacteria as Probiotics in Aquaculture

WANG Rong et al (Hainan Provincial Fisheries Research Institute, Haikou, Hainan 570203)

Abstract Aquaculture industry has developed rapidly in recent years, but is faced with serious disease problem. Marine actinobacteria is an important source of bioactive substances. In recent years, the marine actinobacteria as probiotics has been applied in diseases prevention and control in aquaculture, which shows important application value and broad prospect in the aquaculture.

Key words Marine actinobacteria; Probiotic; Anti-disease; Aquaculture

水产养殖业是正在快速成长的产业, 1970 年以来水产养殖部门以每年平均 9.2% 的速度扩大。但是, 水产养殖产业面临着严重的病害问题。水产动物受其周围环境变化的影响很大, 如果其生长环境中病原菌达到一定的密度, 就能引起动物疾病或导致其免疫力低下^[1]。另外, 在养殖生产中过多的或质量差的种苗会导致“寄主-病原菌-环境”的失衡, 最终导致疾病的爆发。抗生素已被广泛应用于控制水产养殖病害, 但由于抗生素和各种化学药剂的滥用, 导致许多耐药性病菌的产生, 如目前使用抗生素治疗发光弧菌引起的病害已不再有效^[2], 使得许多国家水产养殖业的发展受到阻碍^[3]。此外, 水产养殖业中出现的耐药性病菌可能会将其含有的耐药质粒转移到人类致病菌中。综合考虑这些因素以及存在药物残留的水产养殖产品对人类健康的影响, 欧盟和美国已禁止或限制抗生素在水产养殖动物上使用^[4]。

1 益生菌的定义

益生菌(Probiotics)一词源自希腊语的“pro”和“bios”^[5], 由 Parker 于 1974 引用, 将其定义为“有助于肠道微生物平衡的生物体和物质”。此后, 又对其原始定义提出了很多修改^[6-7]。但其被广泛接受的定义是由 Fuller 提出的: 指能改善宿主动物肠道微生物平衡的活微生物饲料添加剂^[8]。Verschuere 等对此定义又提出了修改: “对宿主具有有益作用(如调节宿主相关微生物群体, 确保提高食物的利用或增强其营养价值, 增强宿主对疾病的快速响应或提高其生存环境质量)的微生物活菌群”^[9]。由此可见, 益生菌不仅有助于宿主营养吸收, 而且可以改善宿主生存环境^[4]。常见的益生菌包括可产孢的芽孢杆菌和酿酒酵母。芽孢杆菌具有附着能力并能够产生细菌素, 而酿酒酵母具有免疫调节作用, 也能够产生抑菌物质。

2 益生菌在水产养殖中的作用

在水产养殖中微生物起到非常重要的作用。益生菌能

够通过产生拮抗化合物或竞争(竞争营养和或竞争生存位点)来抑制病原菌^[10]。益生菌群能够直接吸收或降解有机物质来改善养殖水产动物的水生生态系统的水质。有益微生物群也能够产生多种胞外酶(如淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶等), 这些酶能降解残余的饲料和池塘中的粪便。另外, 它们还能通过提高食物消化和利用来增强水产养殖动物的营养摄取。

在水产养殖中, 益生菌的稳定性受多种因素的影响, 包括种类、菌株的生物类型、温度、pH、水活度、渗透压、机械摩擦以及氧气, 有效的益生菌处理可为水产动物广谱性和非特异性疾病提供保护^[11-13]。益生菌抑制病原菌包含多种机制, 如产生类细菌素类物质、竞争附着位点、竞争营养物(在海洋微生物中尤其是铁)、改变致病菌的酶活性、免疫调节功能以及提高食物的消化和利用等^[4,8,14]。用于水产养殖中的益生微生物有革兰氏阳性菌和阴性菌、噬菌体、酵母菌以及单细胞藻类^[7]。已有人根据益生微生物的体外拮抗作用以及在消化肠道中的粘附、定殖和生长的结果对其进行选择^[7,9,15-16]。

3 海洋放线菌及其在水产养殖中的应用

海洋是新型放线菌菌种的重要来源, 具有非常重要的价值, 已发现的生物活性物质有一半以上由其产生。对海洋放线菌的研究一直以来都存在一定的困难, 主要是因为其在海洋环境中的零星分布, 人工培养上存在一系列问题(如培养基、抑菌物质、缓慢的生长速度以及在依赖培养的菌种鉴定研究中存在的繁琐试验操作。虽然它们在海洋中持续存在^[17], 但对其在海洋中的多样性、分布以及生态学研究较少^[18]。

迄今为止, 微生物产生的抗生素中超过 50% 来自放线菌, 但是这些抗生素大部分产自土壤中链霉菌属和小单胞菌放线菌^[19]。近年来, 专性海洋放线菌 *Salinispora* 属菌株被报道能够产生多种结构多样的次级代谢物, *Salinispora* 属放线菌被证明是新化学结构物质丰富的来源, 包括潜在的蛋白酶抑制剂 salinosporamide A、新蒽类化合物、氨基酸衍生物以及多烯大环内酯类^[20-21]。

海洋放线菌在水产养殖中具有重要的应用价值, 已有人

基金项目 海南省科学事业费项目(10-20410-0001)。

作者简介 王蓉(1982-), 女, 湖北荆州人, 助理研究员, 硕士, 从事微生物与水产药物学研究, E-mail: wangrong1982@gmail.com。

收稿日期 2013-06-23

将海洋放线菌应用于水产养殖致病菌引起病害的预防。游建岚等研究表明利用海洋放线菌治疗和预防致病性弧菌引起的虾病害,能够抑制弧菌菌膜的形成,其在养殖池塘水系中具有降解淀粉、蛋白等大分子与产抗菌类物质以及可形成耐热耐干燥的孢子等优点,海洋放线菌具有成为益生菌的潜力^[22-23]。Das 等报道海洋链霉菌作为益生菌应用于促进斑节对虾(*Penaeus monodon*)的生长^[24]。Kumar 等从海洋放线菌中提取抗菌物质,并将其与食物一同喂养凡纳滨对虾,对携带白点综合症病毒的对虾产生抗病毒效应^[25]。

4 海洋放线菌作为益生菌应用于水产养殖可能存在的问题

将放线菌作为益生菌应用于水产养殖中存在的一个潜在争议是抗生素抗性基因(链霉菌通过使用该基因编码抗生素外排泵、核糖体保护蛋白以及进行酶修饰,保护自身免受其产生的抗生素危害)的横向基因转移风险。水产养殖中使用的益生菌菌株最好不含有毒力抗性基因或抗生素抗性基因,因为其容易导致水产养殖动物多重耐药病菌的出现。目前,在水产养殖中使用的抗生素引起耐药性细菌的产生和广泛传播^[26],导致养殖水环境可能成为一个抗生素抗性的发生池^[27]。然而,如果生物体为保护自身而自然出现耐药性基因,是否会自然传给其他生物则有待进一步研究。Chopra 和 Roberts 报道了编码核糖体保护蛋白和抗生素修饰酶的抗生素抗性基因可能通过横向基因转移来源于链霉菌或其他产抗生素的微生物^[28]。因此,即使不将链霉菌作为益生菌,横向基因转移也会自然发生。另外,有研究表明水产微生物中出现大量抗生素耐药类型是因为在水产养殖中大量使用合成抗生素和药物^[29],而直接使用放线菌作为益生菌其出现抗性基因横向转移机会低,值得在水产养殖中推广应用。

在水产养殖中,使用海洋放线菌作为益生菌可能存在的另一弊端是在淡水养殖^[30]以及在再循环养殖体系中产生多种气味(如土味素、MIB 或 2-甲基异冰片)^[31]。这些化合物均为半挥发性萜类化合物,能传播土腥味到水中以及养殖的鱼类中。当土味素和 MIB 释放到水中后,将通过鳃、皮肤、或胃肠道吸收到富脂的鱼组织中,从而降低淡水养殖鱼类的质量,进而降低养殖鱼类的商业价值^[32]。然而,不仅放线菌能产生这 2 种化合物,而且浮游蓝藻、细菌以及一些种类的真菌同样也能产生这些物质^[33]。因此,放线菌在海洋环境中产生这些气体从而降低鱼类质量的说法,还有待进一步证实。

5 小结

对海洋放线菌益生菌的研究,必须特别注意益生菌的选择过程,需要从大量供试菌中筛选出 1 株可靠的菌株。从“功能食品”的角度来看,随着水产养殖中益生菌和益生生素使用需求的日益增长,海洋放线菌产生的酶也将为益生菌、益生生素或二者在水产养殖研究与生产中的联合使用提供一种重要的选择。从海洋环境中寻找海洋益生菌的研究正日益深入,益生菌作为水产饲料添加成分将广泛应用于水产养殖中。

参考文献

[1] MORIARTY D J W. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquacul-

- ture ponds [J]. *Aquaculture*, 1998, 164(1/4): 351-358.
- [2] DAS S. Studies on benthic marine microbial diversity from the continental slope (200-1000 m depth) of Bay of Bengal (India) [D]. CAS in Marine Biology, Annamalai University India, 2007.
- [3] KARUNASAGAR I, PAI R, MALATHI G R, et al. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection [J]. *Aquaculture*, 1994, 128(3/4): 203-209.
- [4] KESARCODI-WATSON 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.
- [5] GISMONDO M R, DRAGO L, LOMBARDI A. Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 1999, 12(4): 287-292.
- [6] GRAM L, MELCHIORSEN J, SPANGGAARD B, et al. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(3): 969-973.
- [7] IRIANTO A, AUSTIN B. Probiotics in aquaculture [J]. *J Fish Dis*, 2002, 25(11): 633-642.
- [8] FULLER R. Probiotics in man and animals: a review [J]. *J Appl Bacteriol*, 1989, 66(5): 365-378.
- [9] VERSCHUERE L, ROMBAUT G, SORGELOOS P, et al. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2000, 64(4): 655-671.
- [10] DIVYA K R, ISAMMA A, RAMASUBRAMANIAN V, et al. Colonization of probiotic bacteria and its impact on ornamental fish *Puntius conchoniis* [J]. *J Environ Biol*, 2012, 33(3): 551-555.
- [11] RENGPIPAT S, RUKPRATANPORN S, PIYATIRATTIVORAKUL S, et al. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiotic bacterium (*Bacillus* S11) [J]. *Aquaculture*, 2000, 191(4): 271-288.
- [12] PANIGRAHI A, AZAD I S. Microbial intervention for better fish health in aquaculture: the Indian scenario [J]. *Fish Physiol Biochem*, 2007, 33(4): 429-440.
- [13] NIMRAT S, SUKSAWAT S, BOONTHAI T, et al. Potential *Bacillus* probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. *Vet Microbiol*, 2012, 159(3/4): 443-450.
- [14] NAYAK S K. Probiotics and immunity: a fish perspective [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2010, 29(1): 2-14.
- [15] FJELLHEIM A J, KLINKENBERG G, SKJERMO J, et al. Selection of candidate probiotics by two different screening strategies from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae [J]. *Vet Microbiol*, 2010, 144(1/2): 153-159.
- [16] VINE N G, LEUKES W D, KAISER H. In vitro growth characteristics of five candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 231(1): 145-152.
- [17] MINCER T J, JENSEN P R, KAUFFMAN C A, et al. Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(10): 5005-5011.
- [18] STACH J E M, MALDONADO L A, MASSON D G, et al. Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(10): 6189-6200.
- [19] BÉRDY J. Bioactive microbial metabolites [J]. *J Antibiot*, 2005, 58(1): 1-26.
- [20] FELING R H, BUCHANAN G O, MINCER T J, et al. Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinospora* [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2003, 42(3): 355-357.
- [21] JENSEN P R, WILLIAMS P G, OH D C, et al. Species-specific secondary metabolite production in marine actinomycetes of the genus *Salinispora* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(4): 1146-1152.
- [22] YOU J L, CAO L X, LIU G F, et al. Isolation and characterization of actinomycetes antagonistic to pathogenic *Vibrio* spp. from nearshore marine sediments [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2005, 21(5): 679-682.
- [23] YOU J L, XUE X L, CAO L X, et al. Inhibition of *Vibrio* biofilm formation by a marine actinomycete strain A66 [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 76(5): 1137-1144.
- [24] DAS S, LYLIA P S, AJMAL KHAN S. Application of *Streptomyces* as a probiotic in the laboratory culture of *Penaeus monodon* (Fabricius) [J]. *Isr J Aquac Bamidgheh*, 2006, 58(3): 198-204.
- [25] KUMAR S S, PHILIP R, ACHUTHANKUTTY C T. Antiviral property of

- marine actinomycetes against white spot syndrome virus in penaeid shrimps [J]. *Curr Sci*, 2006, 91(6): 807–811.
- [26] FURUSHITA M, SHIBA T, MAEDA T, et al. Similarity of tetracycline resistance genes isolated from fish farm bacteria to those from clinical isolates [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(9): 5336–5342.
- [27] BIYEPA P T, LIN J, BEZUIDENHOUT C C. The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes [J]. *Water Sci Technol*, 2004, 50(1): 45–50.
- [28] CHOPRA I, ROBERTS M. Tetracycline antibiotics, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance [J]. *Microb Mol Biol Rev*, 2001, 65(2): 232–260.
- [29] DANG H Y, REN J, SONG L S, et al. Dominant chloramphenicol-resistant bacteria and resistance gene in coastal marine waters of Jiaozhou Bay, China [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2008, 24(2): 209–217.
- [30] KLAUSEN C, NICOLAISEN M H, STROBEL B W, et al. Abundance of actinobacteria and production of geosmin and 2-methylisoborneol in Danish streams and fish ponds [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2005, 52(2): 265–278.
- [31] GUTTMAN L, VAN RIJN J. Identification of conditions underlying production of geosmin and 2-methylisoborneol in a recirculating system [J]. *Aquaculture*, 2008, 279(1/4): 85–91.
- [32] HOWGATE P. Tainting of farmed fish by geosmin and 2-methylisoborneol: a review of sensory aspects and of uptake/depuration [J]. *Aquaculture*, 2004, 234(1/4): 155–181.
- [33] WOOD S, WILLIAMS S T, WHITE W R. Microbes as a source of earthy flavours in potable water—a review [J]. *Int Biodeterior Biodegrad*, 2001, 48(1/4): 26–40.
- (上接第 9910 页)
- [26] SONG W L, CHEN L L, KIN H S, et al. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene *Xa21* [J]. *Science*, 1995, 270(5243): 1804–1806.
- [27] GU K Y, TIAN D, WU L, et al. R gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice [J]. *Nature*, 2005, 435: 1122–1125.
- [28] WU L F, MEI L G, CHELLAMMA S, et al. *XA27* depends on an amino-terminal signal-anchor-like sequence to localize to the apoplast for resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* [J]. *Plant Physiol*, 2008, 148(3): 1497–1509.
- [29] 章琦, 赵炳宇, 赵开军, 等. 普通野生稻的抗水稻白叶枯病新基因的鉴定和分子标记定位[J]. *作物学报*, 2000, 26(5): 536–542.
- [30] 谭光轩, 任翔, 翁青妹, 等. 药用野生稻转育后代一个抗白叶枯病新基因的定位[J]. *遗传学报*, 2004, 31(7): 724–729.
- [31] 郑崇珂, 王春连, 于元杰, 等. 水稻抗白叶枯病新基因 *Xa32(t)* 的鉴定和初步定位[J]. *作物学报*, 2009, 35(7): 1173–1180.
- [32] 郭颀斌, 张瑞品, 林兴华. 小粒野生稻抗白叶枯病新基因的鉴定与初步定位[J]. *中国农业科学*, 2010, 43(13): 2611–2618.
- [33] 阮辉辉, 严成其, 安德荣, 等. 疣粒野生稻抗白叶枯病新基因 *Xa32(t)* 的鉴定及其分子标记定位[J]. *西北农业学报*, 2008, 17(6): 170–174.
- [34] WANG X M, ZHOU J, YANG Y, et al. Transcriptome analysis of a progeny of somatic hybrids of cultivated rice (*Oryza sativa* L.) and wild rice (*Oryza meyeriana* L.) with high resistance to bacterial blight [J]. *Journal Phytopathology*, 2013, 161(5): 324–334.
- [35] YONG Y, CHEN L N, YAN C Q, et al. Construction of a genetic linkage map of a bacterial blight resistance rice line derived from *Oryza meyeriana* L [J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2012, 24(5): 846–852.
- [36] LV Q M, XU X, SHANG J J, et al. Functional analysis of *Pid3-A4*, an ortholog of rice blast resistance gene *Pid3* revealed by allele mining in common wild rice [J]. *Genetics and Resistance*, 2013, 103(6): 594–599.
- [37] ALOK D, SOUBAM D, SINGH P K, et al. A novel blast resistance gene, *Pi54rh* cloned from wild species of rice, *Oryza rhizomatis* confers broad spectrum resistance to *Magnaporthe oryzae* [J]. *Funct Integr Genomics*, 2012, 12(2): 215–218.
- [38] HUANG C L, HWANG S Y, CHIANG Y C, et al. Molecular evolution of the *Pi-ta* gene resistant to rice blast in wild rice (*Oryza rufipogon*) [J]. *Genetics*, 2008, 179(3): 1527–1538.
- [39] 韩飞, 侯立恒. 中国普通野生稻优异基因的研究与利用[J]. *安徽农业科学*, 2007, 35(25): 7794–7796.
- [40] PRASAD B, EIZENGA G C. Rice sheath blight disease resistance identified in *Oryza* spp. accessions [J]. *Plant Dis*, 2008, 92(11): 1503–1509.
- [41] EIZENGA G C, PRASAD B, JACKSON A, et al. Identification of rice sheath blight and blast quantitative trait loci in two different *O. sativa*/*O. nivara* advanced backcross populations [J]. *Mol Breeding*, 2013, 31(4): 889–907.
- [42] 谢建坤, 胡标林, 万勇, 等. 东乡普通野生稻与栽培稻苗期抗旱性的比较[J]. *生态学报*, 2010, 30(6): 1665–1674.
- [43] 付学琴, 贺浩华, 罗向东, 等. 东乡野生稻渗入系苗期抗旱遗传及生理机制初步分析[J]. *江西农业大学学报*, 2011, 33(6): 845–850.
- [44] 胡标林, 余守武, 万勇, 等. 东乡普通野生稻全生育期抗旱性鉴定[J]. *作物学报*, 2007, 33(3): 425–432.
- [45] 夏瑞祥, 肖宁, 洪义欢, 等. 东乡野生稻苗期耐冷性的 QTL 定位[J]. *中国农业科学*, 2010, 43(3): 443–451.
- [46] MAIKO K, NORIYUKI K, SHOJI Y, et al. Identification and fine mapping of a major quantitative trait locus originating from wild rice, controlling cold tolerance at the seedling stage [J]. *Mol Genet Genomics*, 2010, 284: 45–54.
- [47] 武汉大学遗传研究室. 利用华南野生稻和栽培稻杂交选育三系的研究[J]. *遗传学报*, 1977, 4(3): 219–227.
- [48] 陈大洲. 杂交水稻技术培训教程[M]. 南昌: 江西科学技术出版社, 2010.
- [49] 王云生. 粗型温敏不育系 6311S 的评价及转育为矮败型不育系 6311A 的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2003.
- [50] 宋昕蔚, 林建荣, 吴明国. 矮败型广亲和粳稻不育系的遗传改良及生物学特性研究[J]. *中国水稻科学*, 2010, 24(6): 595–600.
- [51] 秦学毅, 李容柏, 韦素美. 普通野生稻抗褐稻虱基因导入栽培稻研究[J]. *广西农业科学*, 2002(2): 57–59.
- [52] JENA K K, KHUSH G S. Introgression of genes from *Oryza officinalis* Willd ex Watt to cultivated rice *O. sativa* L. [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1990, 80: 737–745.
- [53] 余文金, 罗科, 郭学兴. 以水稻雄性不育系为母本不经幼胚培养获得 *Oryza sativa* × *O. officinalis* 杂种的研究[J]. *遗传学报*, 1993, 20(4): 348–353.
- [54] 颜辉煌, 胡慧英, 傅强, 等. 栽培稻与药用野生稻杂种后代的形态学和细胞遗传学研究[J]. *中国水稻科学*, 1996, 10(3): 138–142.
- [55] 黄水金, 秦文婧, 涂雪琴. 江西东乡野生稻对褐飞虱的抗性鉴定初报[J]. *江西农业大学学报*, 2012, 24(11): 64–65.
- [56] KHUSH G S. Disease and insect resistance in rice [J]. *Advances in Agronomy*, 1997, 29: 265–341.
- [57] KHUSH G S, BSCALANGCO E, OGAWA A. New gene resistance to bacterial blight from *O. longistaminata* [J]. *Rice Genetics News Letter*, 1990, 7: 221–222.
- [58] 唐清杰, 王效宁, 云勇, 等. 海南普通野生稻稻瘟病的抗性鉴定与评价[J]. *中国野生植物资源*, 2010(6): 8–12.
- [59] ZHOU Y L, UZOKWE V N E, ZHANG C H, et al. Improvement of bacterial blight resistance of hybrid rice in China using the *Xa23* gene derived from wild rice (*Oryza rufipogon*) [J]. *Crop Protection*, 2011, 30(6): 637–644.
- [60] 简水溶, 万勇, 罗向东, 等. 东乡野生稻苗期耐冷性的遗传分析[J]. *植物学报*, 2011, 46(1): 21–27.
- [61] YU C H, YUAN Q H, XU L X, et al. Research on flowering habits and fertility of Gaozhou common wild rice (*Oryza rufipogon*) in Lingshui of Hainan Province [J]. *Agricultural Science & Technology*, 2011, 12(11): 1608–1611, 1614.
- [62] 褚绍尉, 王林, 刘桂富, 等. 广东高州普通野生稻耐铝性及其 QTL 定位[J]. *华北农学报*, 2013(3): 12–18.