

皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)肠道潜在 益生菌的筛选及对幼鲍生长的影响*

姜海峰¹ 刘小林¹ 常亚青² 冷晓飞³ 李丹³ 王高学¹

(1. 西北农林科技大学动物科技学院 陕西杨凌 712100; 2. 大连海洋大学 农业部海洋水产增养殖学重点实验室
大连 116023; 3. 大连太平洋海珍品有限公司 旅顺 116045)

摘要 采用体外实验筛选益生菌结合 16S rDNA 序列分析法, 从 124 株不具有溶血作用的皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)肠道细菌中筛选得到 5 株潜在益生菌并进行了分子鉴定, 进一步对 5 株潜在益生菌进行了安全性实验及体内饲喂实验。结果表明, 2 株具有拮抗哈维弧菌和灿烂弧菌能力的潜在益生菌分别被鉴定为 *Shewanella* sp. (WA64)和 *Shewanella* sp. (WA65), 一株产海藻酸酶和淀粉酶的潜在益生菌被鉴定为 *Vibrio* sp. (WA51), 产蛋白酶潜在益生菌被鉴定为 *Bacillus* sp. (FA12), 产琼脂酶潜在益生菌被鉴定为 *Tamlana* sp. (FA86); 安全性实验表明 5 株潜在益生菌在 10^7 cfu/ml 下对皱纹盘鲍没有明显的毒害作用; 通过体内饲喂实验发现, 潜在益生菌 WA64、WA65 的复合作用能够显著提高幼鲍增重率和存活率($P < 0.05$), 并在生产条件下能够明显降低幼鲍的死亡量。经抗生素敏感性实验, WA64 菌株对 15 种抗生素均敏感或中度敏感, WA65 菌株仅对庆大霉素和链霉素 2 种抗生素产生耐药。

关键词 幼鲍; 益生菌; 筛选; 生长

中图分类号 S963

益生菌是提高水产养殖动物生长、降低病害发生以及保障水产品安全的有效途径之一 (Gatesoupe, 1999; Verschuere *et al*, 2000)。Silva 等(2011)在日粮中添加芽胞杆菌(*Bacillus*)提高了对虾生长和存活率, Burbank 等(2011)报道了应用两株肠杆菌属(*Enterobacter*)的虹鳟肠道益生菌提高了虹鳟抗病力。皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)是我国北方海域重要的养殖珍品。近年来, 由于野生资源的日益减少和国际市场需求的激增, 人工育苗的工业化生产发展迅速, 然而在夏季的皱纹盘鲍苗种培养阶段(饲喂配合饵料阶段), 尤其在高温期间(7—8 月)经常出现大批量死亡, 给苗种生产造成很大的经济损失。传统的疾病防治手段抗生素使用后, 死亡量反弹较快, 而且抗生素的频繁使用导致耐药性的产生和耐药因子的增加, 加大了病害的防治难度, 甚至会威胁到人类的健康, 由此带来的药残问题也是限制出口的贸易壁垒(Sorum *et*

al, 2001; Balczar *et al*, 2006)。如何提高工厂化育苗成活率、降低苗种生产成本以及解决商品生产中的食品安全问题, 尽量做到少用药或不用药, 其益生菌的研究与应用是实现上述目标的重要手段。

最早国外 Macey 等(2005)报道了添加弧菌和两株酵母菌显著提高了南非鲍(*Haliotis midae*)生长及抗病力, 随后 ten Doeschate 等(2008)报道了分离自南非鲍肠道的交替假单胞菌能够显著提高南非鲍的生长; 然而, 国内尚缺乏关于皱纹盘鲍肠道微生物菌群以及专用益生菌的研究。本研究是针对产自大连海域的皱纹盘鲍, 在研究其肠道菌群的基础上, 采用体外拮抗病原菌、产酶能力筛选结合体内饲喂筛选的方法对分离自健康皱纹盘鲍肠道的菌株进行了潜在益生菌的筛选、鉴定与安全性实验, 并进行了应用效果试点, 以期研发高效安全的皱纹盘鲍专用益生菌奠定基础。

* 国家“863”计划项目, 2006AA10A411 号。姜海峰, E-mail: jianghaifeng@nwsuaf.edu.cn

通讯作者: 王高学, 教授, E-mail: wanggaoxue@126.com

收稿日期: 2012-02-10, 收修改稿日期: 2012-04-24

1 材料与方 法

1.1 潜在病原菌的剔除

1.1.1 菌株来源 采用 2216E 海水培养基, 从健康的人工饲养和野生健康皱纹盘鲍肠道内分离到 156 株细菌作为益生菌筛选的待测菌株。

1.1.2 溶血素的产生 将 2216E 液体培养基过夜培养的待测菌株接种于血平板(购自青岛海博)上, 28℃ 培养 24h, 根据菌落周围透明圈的形成, 来判断溶血素产生(Riquelme *et al.*, 1997)。

1.2 潜在益生菌的体外筛选

1.2.1 拮抗菌的筛选 根据 1.1 的结果, 以不具有溶血素的菌株作为待测菌株, 指示菌株为本实验室分离和鉴定的鲍病原菌株, 包括溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)和哈维弧菌(*Vibrio harveyi*), 实验方法采用点种法(李海兵等, 2008), 观察点种区周围是否出现明显的抑菌透明区或覆盖区并测量抑菌透明区的大小。

1.2.2 产酶能力筛选 参照祝玲等(2005)和 Iehata 等(2010)文献的方法配制蛋白酶实验培养基、淀粉酶实验培养基、海藻酸裂解酶实验培养基, 采用点种法筛选产酶能力最强菌株。

1.3 潜在益生菌的鉴定

对拮抗菌 WA64、WA65, 产酶菌 WA51、FA123、FA86 进行 16S rDNA 序列测序, 并将其基因序列提交至 GenBank 核苷酸数据库。

1.4 潜在益生菌的毒性检验

1.4.1 体外浸浴 参照 Sawabe 等(2007)的方法, 选取健康的幼鲍(均重 0.7g, 壳长 1.5—2cm)置于 18 个盛有 2L 自然海水的烧杯中, 每个烧杯内放 10 只幼鲍, 将 18 个烧杯随机分为 6 组, 其中 5 组分别加入潜在益生菌 WA64、WA65、WA51、FA123 和 FA86 的菌悬液, 使浓度达到 10^7 cfu/ml, 另外一组为对照。实验期间保持水温恒定, 持续曝气并加波纹板提供附着, 不换水不投饵, 持续 12 天。

1.4.2 体内注射 实验分组及管理同 1.4.1, 每个重复随机选取健康成鲍(均重 75g, 壳长 5.3—6cm)10 只置于 50L 的 PVC 桶中; 用无菌生理盐水调整浓度至 10^7 cfu/ml, 于每只鲍足部的血淋巴中注射 100 μ l 菌液, 对照组注射鱼类生理盐水, 7 天后分别统计各组鲍的死亡率。

1.5 潜在益生菌的体内筛选

1.5.1 饲料的配制 将潜在益生菌接种于海洋

2216E 液体培养基中, 摇床(140r/min, 28℃)过夜培养, 9000r/min 离心 10min, 生理盐水洗两次后制成浓度较高的菌悬液, 用血球计数板测定浓度后将菌液与配合饲料混匀使菌体浓度达到 10^{10} cfu/g 饲料。低温烘干后放置于干净的塑料袋内贮存于-20℃的冰柜中待用。

1.5.2 实验分组及管理 规格一致的幼鲍(均重 0.6g, 均壳长 16mm)随机分到 15 个 PVC 池中(0.6m×0.88m×0.54m), 每池 50 只; 实验设置潜在益生菌处理组和对照组, 处理组分别为拮抗菌组 C1(WA64)、拮抗菌组 C2(WA65), 拮抗菌复合组 C3(WA64+WA65 比例 1:1), 海藻酸酶和淀粉酶菌组 C4(WA51), 蛋白酶菌组 C5(FA123), 琼脂酶菌组 C6(FA86), 共 6 组, 每个处理设 3 个重复, 实验为期 120d。实验按照标准生长条件进行: 从海洋中抽取海水经沙滤后作为实验所用海水, 养殖过程中水温保持在 16.8—18℃, 盐度 31—34, pH 7.5—7.9, 溶解氧不低于 7.5mg/L; 每天下午 16:00 点饲喂, 投饵量为体重的 10%; 次日早 8:00—9:00 刷洗鲍附着板及饵料池, 换水 1/2 以上; 每日观察记录幼鲍摄食及死亡情况, 发现死鲍及时捞出。

1.5.3 样品采集 饲养实验结束后, 对各池幼鲍进行计数、称重并测量壳长。增重率和日增壳长计算公式如下:

$$\text{增重率 WGR(\%)} = (\text{终重量} - \text{初重量}) / \text{初重量} \times 100$$

$$\text{壳日增长率 DISL}(\mu\text{m/d}) = (\text{终壳长} - \text{初壳长}) / \text{养殖天数} \times 1000$$

1.6 潜在益生菌试点

潜在益生菌在生产条件下对幼鲍存活率影响实验于 2011 年 8—9 月在辽宁大连太平洋海珍品有限公司育苗车间进行。选择死亡量比较稳定的 12 个养殖池, 每个池子中鲍苗(体重 0.05—0.1g, 壳长 0.6—1cm)数量在 3 万左右, 处理组随机选择 6 个池子, 饲喂含 10^8 cfu/g 复合潜在益生菌(WA64+WA65 比例 1:1)的饲料, 对照组为剩余的 6 个养殖池。按照正常生产管理进行, 记录每个池子每天的死亡数量及摄食情况, 实验为期 1 个月。

1.7 抗生素敏感性测定

采用常规的琼脂扩散(K-B)法对筛选得到的益生菌 WA64 和 WA65 菌株进行常用抗菌类药物的敏感性测定, 以抑菌圈直径大小作为敏感与耐药的判定指标(刘春等, 2012)。

1.8 数据统计

实验数据采用 SPSS18.0 中的单因素方差分析

(ONE-WAY ANVOA)进行统计分析, 均值采用 Duncan 法进行多重比较, 数据以平均值±标准差表示。

2 结果

2.1 拮抗菌的筛选

156 株待测菌株中有 32 株在血平板上产生溶血现象, 作为潜在病原菌剔除。采用点种法对剩余的 124 株细菌进行拮抗菌筛选实验, 从中筛选出 2 株对灿烂弧菌和哈维弧菌具有较好拮抗效果的菌株 WA64、WA65, 其中 WA64 对哈维弧菌的拮抗能力较强, 抑菌圈直径达到 10mm。

2.2 产酶能力定性测定

共筛选出 46 株产蛋白酶菌株、17 株产淀粉酶菌

株、24 株产海藻酸裂解酶菌株和 12 株产琼脂酶菌株。其中, 具较强产酶能力的菌株定性测定结果如表 2 所示。产蛋白酶能力最强的菌株为 FA123 菌株, 其水解圈直径与菌落平均直径的比值(H/D)达到 7.60; 产淀粉酶及海藻酸裂解酶能力最强菌株均为 WA51; 产琼脂酶能力最强菌株为 FA86。

2.3 潜在益生菌的鉴定

潜在益生菌鉴定结果如表 3 所示, 拮抗菌 WA64、WA65 菌株与希瓦氏菌属(*Shewanella*)同源性较高; 产蛋白酶菌 FA123 与芽胞杆菌属(*Bacillus*)同源性较高; 产淀粉酶和海藻酸酶菌 WA51 与弧菌属(*Vibrio*)同源性较高; 产琼脂酶菌株 FA86 与古名菌属(*Tamlana*)同源性较高。

表 1 待测菌株对指示菌的抑菌效果
Tab.1 The inhibitory of strains to indicator bacteria

| 菌株 | 抑菌圈直径(mm) | | |
|------|---------------------------------|------------------------------|---------------------------|
| | 溶藻弧菌(<i>V. alginolyticus</i>) | 灿烂弧菌(<i>V. splendidus</i>) | 哈维弧菌(<i>V. harveyi</i>) |
| WA64 | — | 覆盖/2.3 | 覆盖/10.0 |
| WA65 | — | 覆盖/3.3 | 覆盖/4.5 |

注: “—”表示未检测到活性, 数据表示抑菌圈的直径

表 2 产酶能力筛选结果
Tab.2 The results of enzyme-producing ability screening

| 菌株 | 产酶水解圈直径与菌落直径比(H/D) | | | |
|-------|------------------------|------|--------|------|
| | 蛋白酶 | 淀粉酶 | 海藻酸裂解酶 | 琼脂酶 |
| FA123 | 7.60 | — | — | — |
| WA51 | 1.03 | 4.00 | 6.36 | — |
| FA86 | — | — | — | 1.00 |

2.4 潜在益生菌的毒性检验

5 株潜在益生菌的浸浴实验和注射实验同对照组相同均未出现死亡, 表明潜在益生菌在 10^7 cfu/ml 下对鲍安全。

2.5 体内筛选结果

饲料中添加不同益生菌组合对幼鲍的生长和存活率均有一定的影响(表 4)。表 4 结果表明, 饲喂拮

抗菌组 C1、C2、复合拮抗菌组 C3 和产酶菌组 C4 均能提高幼鲍的生长和存活率。复合拮抗菌组 C3 和拮抗菌组 C1 能够显著提高幼鲍的存活率($P<0.05$), 其中, 复合拮抗菌组 C3 亦对幼鲍的增重率具有显著的提高。但添加其它潜在益生菌的幼鲍增重率、日增长和存活率与对照组差异不显著。

2.6 潜在益生菌的中试效果

复合潜在益生菌生产条件下的试点效果如图 1 所示: 第 1 周对照组同潜在益生菌处理组日死亡量呈下降趋势, 并于第 7 天日死亡量达到一致。第 2、3、4 周由于水温升高, 对照组日死亡量呈上升趋势, 而处理组日死亡量远低于对照组并维持在较低水平。处理组每个池子的月总死亡数(1474)较对照组月总死亡总数(2278)低 35.29%, 表明添加复合希瓦氏菌 WA64、

表 3 潜在益生菌 16S rDNA 序列比对结果
Tab.3 Result of 16S rDNA sequences of potential probiotics

| 菌株编号 | BLAST 得到最相近序列 | 相似度(%) | 登录号 |
|-------|---|--------|----------|
| WA64 | <i>Shewanella colwelliana</i> (AY653177.1) | 99 | JQ083340 |
| WA65 | <i>Shewanella pacifica</i> strain UDC382 (HM031976.1) | 99 | JQ083341 |
| WA51 | <i>Vibrio haliotocoli</i> A431 (NR_024632.1) | 99 | JQ083331 |
| FA123 | <i>Bacillus</i> sp. B54Ydz-zz (EU070395) | 99 | JQ083318 |
| FA86 | <i>Tamlana agarivorans</i> strain JW-26 (EU221275.1) | 99 | JQ083324 |

表 4 潜在益生菌对幼鲍生长性能和存活率的影响
(mean±SD, n=3)

Tab.4 Effects of potential probiotics on growth performance and survival rate of juvenile small abalones

| 组别 | 增重率(%) | 日增壳长(μm/d) | 存活率(%) |
|----|----------------------------|-------------|--------------------------|
| C1 | 365.82±6.36 ^{ab} | 98.94±4.33 | 87.33±2.31 ^a |
| C2 | 371.82±5.83 ^{ab} | 99.28±5.85 | 86.67±1.15 ^{ab} |
| C3 | 383.34±9.93 ^a | 102.44±4.28 | 90.67±1.15 ^a |
| C4 | 368.15±16.51 ^{ab} | 100.28±8.46 | 82.00±2.00 ^{bc} |
| C5 | 359.23±6.59 ^{bc} | 93.99±11.03 | 77.33±4.62 ^c |
| C6 | 344.01±15.93 ^c | 102.14±2.99 | 81.33±2.31 ^c |
| 对照 | 352.40±6.77 ^{bc} | 94.82±1.63 | 82.00±3.46 ^{bc} |

注: 同列数据肩注字母不同者表示差异显著(P<0.05)

WA65 能够提高幼鲍的存活率。

2.7 抗生素敏感性实验结果

供试的 2 株潜在益生菌对 15 种抗生素类药物的敏感性实验结果见表 5。从表中可以看出, WA64 菌株对 15 种抗生素均敏感或中度敏感; WA65 菌株仅对庆大霉素和链霉素 2 种抗生素产生耐药, 对另外 12 种抗生素均敏感或中度敏感。

3 讨论

益生菌在水产养殖中应用

已经非常普遍, 起初水产益生菌大多源于陆生动物益生菌制剂或基于陆生动物益生菌思路研制并应用(Gatesoupe, 1999), 然而从健康动物体内或养殖环境中分离筛选益生菌是公认的提倡方法(Verschuere *et al*, 2000; Watson *et al*, 2008)。Iehata 等(2010)报道鲍源的乳酸菌在盘大鲍(*Haliotis gigantean*)肠道中的定植效果和定植时间优于源自陆生动物的乳酸菌。本实验中潜在益生菌分离自健康皱纹盘鲍肠道, 有利于在肠道内粘附或定植。

水产动物益生菌的筛选大多通过在体外条件下筛选拮抗菌和产酶菌株, 然而, 有很多研究表明体外效果并不能保证同体内一致(Tovar *et al*, 2002; Spanggaard

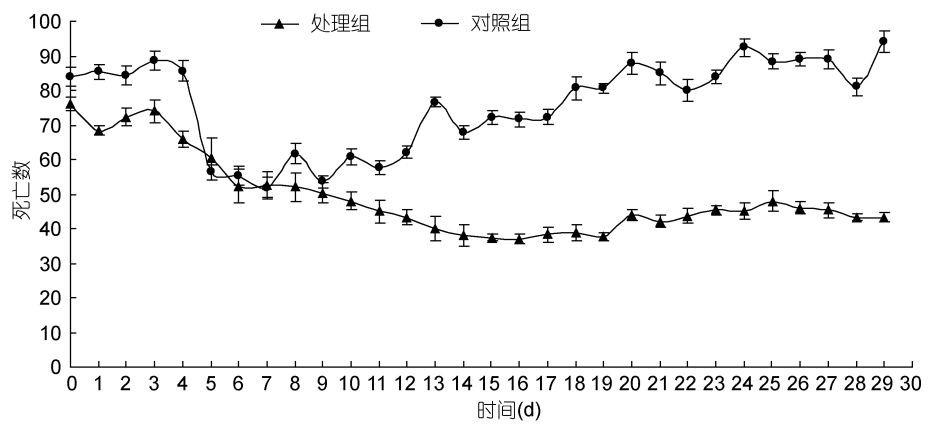


图 1 潜在益生菌的试点效果

Fig.1 Effects of potential probiotics in pilot scale trials

表 5 WA64 菌株和 WA65 菌株药敏实验结果

Tab.5 Results of antibiotic sensitive test of strain WA64 and strain WA65

| 药品 | 规格(μg/片) | WA64 | | WA65 | |
|---------|----------|-----------|-------|-----------|-----|
| | | 抑菌圈直径(mm) | 敏感性 I | 抑菌圈直径(mm) | 敏感性 |
| 多粘菌素 | 300 | 12 | S | 11 | S |
| 磺胺甲基异噁唑 | 1.25 | 31 | S | 31 | S |
| 诺氟沙星 | 10 | 19 | S | 23 | S |
| 氧氟沙星 | 5 | 20 | S | 17 | S |
| 恩诺沙星 | 5 | 21 | S | 21 | S |
| 头孢他啶 | 30 | 28 | S | 20 | I |
| 头孢曲松 | 30 | 22 | S | 21 | S |
| 头孢呋辛 | 30 | 26 | S | 22 | I |
| 庆大霉素 | 10 | 15 | S | 12 | R |
| 卡那霉素 | 30 | 19 | S | 14 | I |
| 链霉素 | 10 | 17 | S | 10 | R |
| 四环素 | 30 | 15 | S | 17 | S |
| 氨苄青霉素 | 10 | 14 | I | 23 | S |
| 阿莫西林 | 20 | 17 | I | 15 | I |
| 利福平 | 5 | 18 | I | 18 | I |

注: “S”表示敏感, “I”表示中介, “R”表示耐药

et al, 2005; Suomalainen *et al*, 2005)。Watson 等(2009)和 Burbank 等(2011)认为有必要采用体外结合体内筛选的方法,以保证益生菌的应用效果。本实验通过体外产酶实验筛选到的潜在益生菌在体内饲喂实验中并不能很好地改善幼鲍的生长速率及存活率,其中产蛋白酶菌株和琼脂酶菌株甚至还有一定的反作用,同样表明有必要对体外筛选的潜在益生菌进行体内实验以保证效果的一致性。此外,在体内筛选中饲喂海藻酸酶、淀粉酶菌株和琼脂酶组对幼鲍的日增壳长均有一定的提高,但饲喂蛋白酶菌株对日增壳长没有提高,据此推测多糖含量可能与壳长的增长相关,然而这一推断还有待于进一步的验证。

希瓦氏菌属细菌在海水中丰度较高,在很多水生动物体内外中均有发现(Pond *et al*, 2006; Huang *et al*, 2010),作者前期对皱纹盘鲍肠道菌群研究中发现,希瓦氏菌属于皱纹盘鲍肠道的次优势菌。已有研究报道了希瓦氏菌属细菌对不同鱼虾的致病菌,包括温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*)、鳃李斯道氏菌(*Listonella anguillarum*)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、哈维弧菌和溶藻弧菌表现出拮抗能力(Chabrilón *et al*, 2005; Flellheim *et al*, 2007; Goldschmidt *et al*, 2008; Zadeh *et al*, 2010)。本实验中,体外拮抗实验筛选到的两株希瓦氏菌属 WA64、WA65 菌株能够抑制哈维弧菌和灿烂弧菌。在体内筛选实验中,两株希瓦氏菌均能够提高幼鲍的生长和存活率,且复合作用能够显著提高幼鲍的增重率和存活率,这同希瓦氏菌 Pdp11 和 Pdp13 在塞内加尔鳎(*Solea senegalensis*, Kaup)中的应用相似, Rosales 等(2009)发现分离自塞内加尔鳎皮肤的两株希瓦氏菌属益生菌 Pdp11 和 Pdp13 能够促进塞内加尔鳎的生长和免疫并且提高了对发光细菌(*Photobacterium damsela* subsp.)的抵抗力。在生产试点应用中,潜在益生菌 WA64 和 WA65 的复合作用同样表现出明显降低幼鲍死亡量的效果,表明潜在益生菌在苗种生产中适用, Makridis 等(2008)发现在金头鲷和塞内加尔鳎幼苗生产中应用希瓦氏菌亦能够降低幼苗死亡率。由于本实验中幼鲍个体较小,无法分析肠道消化酶和非特异性免疫指标,故希瓦氏菌 WA64、WA65 菌株提高幼鲍生长速率和存活率的可能机理有待进一步研究。

菌株对养殖动物的安全性是益生菌筛选和应用的关键。本实验采用检测溶血素的方法剔除具有潜在致病性的菌株,并结合体外浸浴和体内注射安全性实验,潜在益生菌处理组同对照组处于同一水平,证

明了其对鲍的安全性。另外,是否携带耐药因子也是限制应用的重要因素(Salminen *et al*, 1998),对最终筛选得到的潜在益生菌 WA64、WA65 菌株的 15 种抗生素的敏感性实验表明仅 WA65 菌株对庆大霉素和链霉素 2 种抗生素产生耐药,菌株携带的耐药因子较少,为其在幼鲍养殖中的应用作了良好的铺垫。

参 考 文 献

- 刘 春, 李凯彬, 王 庆等, 2012. 杂交鳢(斑鳢♀×乌鳢♂)内脏类结节病原菌的分离、鉴定与特性分析. 水产学报, 36(07): 1119—1125
- 李海兵, 宋晓玲, 韦 嵩等, 2008. 4 株对虾肠道益生菌的筛选及鉴定. 海洋与湖沼, 39(4): 374—380
- 祝 玲, 杨吉霞, 蔡俊鹏等, 2005. 近江牡蛎肠道细菌及其产酶能力. 湛江海洋大学学报, 25: 10—13
- Balczar J L, Blas I D, Ruiz-Zarzuola I *et al*, 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 114(2): 173—186
- Burbank D R, Shah D H, Lapatra S E *et al*, 2011. Enhanced resistance to coldwater disease following feeding of probiotic bacterial strains to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 321: 185—190
- Chabrilón M, Rico, R M, Arijo S *et al*, 2005. Interactions of microorganisms isolated from gilthead sea bream, *Sparus aurata* L. on *Vibrio harveyi*, a pathogen of farmed Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *Fish Dis*, 28: 531—537
- Flellheim A J, Playfoot K J, Skjermo J *et al*, 2007. Fibrionaceae dominates the microflora antagonistic towards *Listonella anguillarum* in the intestine of cultured Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Aquaculture*, 269: 98—106
- Gatesoupe F, 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180: 147—165
- Goldschmidt C, Wahli E, Frey E *et al*, 2008. Identification of bacteria from the normal flora of perch, *Perca fluviatilis* L. and evaluation of their inhibitory potential towards *Aeromonas* species. *Fish Dis*, 31: 353—359
- Huang Z B, Guo F, Zhao J *et al*, 2010. Molecular analysis of the intestinal bacterial flora in cage-cultured adult small abalone, *Haliotis diversicolor*. *Aquaculture Res*, 41: 760—769
- Iehata S, Inagaki T, Okunishi S *et al*, 2010. Improved gut environment of abalone *Haliotis gigantea* through *Pediococcus* sp. Ab1 treatment. *Aquaculture*, 305: 59—65
- Macey B M, Coyne V E, 2005. Improved growth rate and disease resistance in farmed *Haliotis midae* through probiotic treatment. *Aquaculture*, 245: 249—261
- Makridis P, Martins S, Reis J *et al*, 2008. Use of probiotic bacteria in the rearing of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae. *Aquaculture Res*, 39: 627—634
- Pond M J, Stone, D M, Alderman D J, 2006. Comparison of conventional and molecular techniques to investigate the in-

- testinal microflora of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 261: 194—203
- Riquelme C, Araya R, Vergara N *et al*, 1997. Potential probiotic strains in the culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture*, 154: 17—26
- Rosales P D, Arijó S, Chabrilón M *et al*, 2009. Effects of two closely related probiotics on respiratory burst activity of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) phagocytes, and protection against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Aquaculture*, 293: 16—21
- Salminen S, Wright A, Morelil *et al*, 1998. Demonstration of safety of probiotics a review. *Food Microbiol*, 44: 93—106
- Sawabe T, Inoue S, Fukui Y *et al*, 2007. Mass mortality of Japanese abalone *Haliotis discus hannai* caused by *Vibrio harveyi* infection. *Microbes Environ*, 22: 300—308
- Silva E M, Soares M A, Calazans N F *et al*, 2011. Effect of probiotic (*Bacillus* spp.) addition during larvae and postlarvae culture of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Res*, 1: 1—9
- Sorum H, Sunde M, 2001. Resistance to antibiotics in the normal flora of animals. *Veterinary Research*, 32: 227—241
- Spanggaard B, Huber I, Nielsen J *et al*, 2005. The probiotic potential against vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout. *Environmental Microbiology*, 3: 755—765
- Suomalainen L R, Tirola M A, Valtonen E T, 2005. Effect of *Pseudomonas* sp. MT5 baths on *Flavobacterium columnare* infection of rainbow trout and on microbial diversity on fish skin and gills. *Diseases of Aquatic Organisms*, 63: 61—68
- ten Doeschate K I, Coyne V E, 2008. Improved growth rate in farmed *Haliotis midae* through probiotic treatment. *Aquaculture*, 284: 174—179
- Tovar D, Zambonino J, Cahu C *et al*, 2002. Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture*, 204: 113—123
- Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P *et al*, 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4): 655—671
- Watson A K, Kaspar H, Lategan M J *et al*, 2008. Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274: 1—14
- Watson A K, Kaspar H, Lategan M J *et al*, 2009. Screening for probiotics of Greenshell™ mussel larvae, *Perna canaliculus*, using a larval challenge bioassay. *Aquaculture*, 296: 159—164
- Zadeh S S, Saad C R, Christianus A *et al*, 2010. Assessment of growth condition for a candidate probiotic, *Shewanella* algae, isolated from digestive system of a healthy juvenile *Penaeus monodon*. *Aquaculture Res*, 18: 1017—1026

SELECTION OF POTENTIAL PROBIOTICS FROM ABALONE INTESTINAL AND THEIR EFFECTS ON GROWTH OF JUVENILE SMALL ABALONE *HALIOTIS DISCUS HANNAI*

JIANG Hai-Feng¹, LIU Xiao-Lin¹, CHANG Ya-Qing², LENG Xiao-Fei³,
LI Dan³, WANG Gao-Xue¹

(1. College of Animal Science and Technology, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, 712100;

2. Key Laboratory of Mariculture of Ministry of Agriculture, Dalian Ocean University, Dalian, 116023;

3. Dalian Pacific Fisheries Co., Ltd., Lvshun, 116045)

Abstract Five strains of potential probiotics isolated from 124 non-hemolysis strains of the GI of abalone *in vitro* were identified by 16S rDNA sequence analysis. In addition, pathogenicity and feeding experiment were conducted. Results show that Strain WA64 and WA65 which exhibit inhibitory effects against *Vibrio harveyi*, *Vibrio splendidus* are identified as *Shewanella*; WA51 produced amylase and alginase is identified as *Vibrio*; FA123 produced protease is identified as *Bacillus*; FA86 produced agarase is identified as *Tamlana*. Potential probiotics are safe to abalone under 10⁷cfu/ml. Feeding experiment showed the weight gain ratio and survival rate were significantly increased in treatment supplemented with WA64 and WA65 ($P < 0.05$). Furthermore, the effects of WA64 and WA65 in pilot scale trials show the mortality of juvenile small abalone decreases obviously. Antibiotic sensitivity assays revealed that strain WA64 was sensitive or medium sensitive to the 15 antibiotics tested, and WA65 was resistant to Gentamicin and Streptomycin.

Key words juvenile abalone *Haliotis discus hannai*; probiotics; screening; growth