

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2015.14565

不同比例复合益生菌对凡纳滨对虾生长、免疫及抗氨氮能力的影响

夏磊^{1,2}, 赵明军¹, 张洪玉^{1,2}, 唐夏², 杨铿³, 杨润清¹

1. 中国水产科学研究院, 北京 100141;

2. 北京鑫洋水产高新技术有限公司, 北京 102488;

3. 中国水产科学研究院 南海水产研究所, 广东 广州 510300

摘要: 对从凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)肠道中分离出的鲍鱼希瓦氏菌(*Shewanella haliotis*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)和双壳气单胞菌(*Aeromonas bivalvium*) 3 株有益菌株, 利用正交设计得到 9 种复合比例, 通过饲料中添加上述 9 种比例混合的菌体(菌数总量为 10^9 cfu/g)饲喂凡纳滨对虾, 经过 28 d 养殖实验, 评价其对凡纳滨对虾生长、免疫指标的影响。随后, 利用氯化铵调节水体氨氮浓度至 26.67 mg/L, 经过 16 d 的氨氮毒性实验, 研究不同比例复合益生菌对凡纳滨对虾抗氨氮能力的影响。研究表明, 9 个复合益生菌实验组的增重率和特定生长率均显著高于对照组($P < 0.05$), 并且以 3 株菌菌数 6 : 1 : 3 比例效果较好; 不同配比的复合益生菌能够显著提高酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(ALP)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)活力($P < 0.05$), 并表现出了不同的影响效果, 其中, 3 株菌菌数(菌数总量为 10^9 cfu/g, 下同) 2 : 3 : 3、4 : 2 : 3 及 6 : 1 : 3 比例对 ACP 活力具有显著促进作用($P < 0.05$), 3 株菌菌数 4 : 2 : 3 和 6 : 1 : 3 比例对 ALP 活力具有显著促进作用($P < 0.05$); 3 株菌菌数 2 : 1 : 1 比例对 T-SOD 活力具有显著促进作用($P < 0.05$); 各比例的复合菌对溶菌酶活力的影响不显著($P > 0.05$); 氨氮浓度 26.67 mg/L 条件下, 不同比例复合菌组对虾累计存活率显著高于对照组($P < 0.05$), 其中以 3 株菌菌数 4 : 3 : 1 和 6 : 3 : 2 比例组累计存活率较高, 即抗氨氮效果较好。

关键词: 凡纳滨对虾; 鲍鱼希瓦氏菌; 蜡样芽孢杆菌; 双壳气单胞菌; 生长; 免疫; 抗氨氮能力

中图分类号: S96

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2015)06-1299-09

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)属对虾科(Penaeidae), 滨对虾属, 是中国对虾养殖范围最广, 养殖量最大的种类。2012 年凡纳滨对虾产量达到 76.3 万 t^[1], 超过全部虾养殖产量的 83%。然而, 随着养殖规模的不断增大, 种质退化、水质恶化及病害肆虐等原因, 其养殖成活率不断下降, 影响了对虾产业持续、健康的发展。益生菌在水产养殖过程中备受广大学者和养殖户所青睐^[2], 由于其减少了化学药物的使用量, 被视为无公害养殖的手段之一。广谱使用的光合细菌、芽孢杆菌等在对虾池塘或者肠道中的定植性和有效性有

待评估。为了提高对虾免疫力及抗病力, 我们进行了系统的研究, 从对虾肠道中分离到 3 株优势有益菌, 分别为鲍鱼希瓦氏菌(*Shewanella haliotis*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、双壳气单胞菌(*Aeromonas bivalvium*), 此 3 株菌均是首次从凡纳滨对虾肠道内分离^[3], 目前尚未见其他相关报道。优势菌群具有可以定植并对宿主及环境无害的优点, 极具开发为高效可定植益生菌的潜力。Gatesoupe 等^[4]的研究认为, 能够在肠道内定植的微生物能够起到抵抗外援致病菌侵袭的功能。益生菌能否定植是发挥其功效的关键因素, 从肠道

收稿日期: 2015-01-13; 修订日期: 2015-07-01.

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2012C016).

作者简介: 夏磊(1976-), 副研究员, 研究方向为渔用药物研发. E-mail: xialei666@126.com

通信作者: 张洪玉, 男, 研究方向为渔用药物开发. E-mail: zhanghy@cafs.ac.cn

优势微生物中筛选可定植益生菌可能是研发高效益生菌的捷径。

项目前期实验结果表明,这 3 株单株菌和 2:1:1 比例的复合菌均对凡纳滨对虾具有显著促生长、增强免疫力的效果,并且复合菌较单株菌的效果更好^[3]。复合菌制剂与单菌种微生物制剂相比,不仅集合了单菌的功能,而且增加了协同共生作用,更加适合复杂多变的生态环境。Salinas 等^[5-6]研究表明,两种不同的益生菌(有活性或无活性的乳杆菌和枯草芽孢杆菌)联合添加比单独添加效果更显著。Aly 等^[7]研究表明,植物乳杆菌和枯草芽孢杆菌混合物在提高罗非鱼血清杀菌能力上较单一菌种或者对照组的效果好,并且能抵御包括嗜水气单胞菌和荧光假单胞菌等病原体的侵染。而复合菌以何种比例复配能够达到最优的目的效果,国内外研究较少,也制约了复合益生菌的应用。为深入研究 3 株菌的协同共生效果,本研究以 3 株菌菌数在凡纳滨对虾肠道中的自然比例 2:1:1 为基础,利用正交设计得到 9 种不同比例复合菌,研究饲料中添加不同比例复合菌对凡纳滨对虾生长、免疫和抗氨氮能力的影响,以期获得高效可定植、低成本、质量稳定的对虾专用复合肠道微生态制剂,为产业化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*),来自中国水产科学研究院南海所深圳实验基地,体长(6.5±0.6) cm,体重(5.0±0.5) g。

从凡纳滨对虾肠道中分离,经生理生化和生物学鉴定得到 3 株有益优势菌株,分别为鲍鱼希

瓦氏菌(*Shewanella haliotis*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)及双壳气单胞菌(*Aeromonas bivalvium*)。具体分离鉴定方法见文献[4]

血清学指标碱性磷酸酶(ALP)、酸性磷酸酶(ACP)、超氧化物歧化酶(SOD)及溶菌酶(lysozyme)采用试剂盒测定,由南京建成生物工程研究所提供。

1.2 实验设计

鲍鱼希瓦氏菌(*Shewanella haliotis*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)及双壳气单胞菌(*Aeromonas bivalvium*) 3 株菌菌数在凡纳滨对虾肠道中的自然比例接近 2:1:1,并以此比例为基础,采用三因素三水平进行正交设计,鲍鱼希瓦氏菌、蜡样芽孢杆菌及双壳气单胞菌作为 3 个因素,设置 3 个水平,选用 L₉(3⁴)安排试验方案(表 1)。

1.3 复合比例益生菌制备

鲍鱼希瓦氏菌、蜡样芽孢杆菌及双壳气单胞菌 3 株菌于海洋 2216E 液体培养基培养 24 h 后,用血球计数板测定每株菌的菌液浓度,称取一定量饲料,饲料中含菌总量设定为 10⁹ cfu/g,3 株菌菌数按照表 2 中 9 个不同比例((S₁-S₉))进行复配,将菌液与配合饲料混匀后,放置于阴凉通风处自然干燥后装袋,4℃保存备用,定期测定饲料中的菌含量。设置 1 个对照组,饲料中不添加益生菌。

1.4 实验方法

1.4.1 生长及免疫实验 实验于中国水产科学研究院南海水产研究所深圳实验基地进行。按照 1.2 中设计的 10 个实验组在 0.7 m³ 养殖缸中养殖,共需要 30 个养殖缸。每个实验组作为一个处理,每个处理 3 个重复,每个重复 150 尾对虾。实验前实验虾暂养 7 d。实验开始后,分别于 7 d、14 d、21 d 和 28 d,从每个养殖缸中随机捞取 20 尾对虾,

表 1 正交实验因素水平
Tab. 1 Orthogonal experiment factor levels

水平 level	因素 factor		
	鲍鱼希瓦氏菌 A <i>Shewanella haliotis</i> A	蜡样芽孢杆菌 B <i>Bacillus cereus</i> B	双壳气单胞菌 C <i>Aeromonas bivalvium</i> C
1	2.5	1.25	1.25
2	5	2.5	2.5
3	10	5	5

表 2 3 株益生菌配比
Tab. 2 Ratio of the three probiotics

实验号 group	鲍鱼希瓦氏菌 D ₄ : 蜡样芽孢杆菌 D ₇ : 双壳气单胞菌 D ₁₅ <i>Shewanella haliotis</i> D ₄ : <i>Bacillus cereus</i> D ₇ : <i>Aeromonas bivalvium</i> D ₁₅	
S ₁		2 : 1 : 1
S ₂		1 : 1 : 1
S ₃		2 : 3 : 3
S ₄		4 : 1 : 2
S ₅		4 : 2 : 3
S ₆		4 : 3 : 1
S ₇		6 : 1 : 3
S ₈		6 : 2 : 1
S ₉		6 : 3 : 2

测量体长、体重, 心脏取血, 12000 r/min, 4℃离心 10 min, 取上清, 测定血清碱性磷酸酶(ALP)、酸性磷酸酶(ACP)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)及溶菌酶。此养殖期间日投喂基础饲料 4 次, 每隔两天换水 1 次, 换水量约 1/3; 连续充气, 溶解氧高于 6 mg/L; 水温 24~30℃; 盐度 15~20, pH 7.8~8.4。

1.4.2 抗氨氮实验 28 d 后, 开始抗氨氮实验。将每个处理(3 个缸)中剩余的虾重新分配, 每个养殖缸随机保留 40 尾对虾, 即每个处理 120 尾虾。用 NH₄Cl 调节水体的氨氮浓度, 使用氨氮分析测定仪持续监测氨氮浓度, 使其保持在 26.67 mg/L^[8]。每 2 h 捞取死虾, 统计累计死亡率, 16 d 后结束实验。此养殖期间不换水, 日投喂基础饲料 4 次, 连续充气, 溶解氧高于 6 mg/L; 水温 24~30℃。

1.5 数据处理

利用 SPSS 17.0 统计软件对三因素正交设计试验结果进行方差分析, 各因素不同水平间的差异采用 LSD 法进行多重比较。实验结果以平均值±标准误($\bar{x} \pm SE$)表示, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

增重率(%)=(终末体重-初始体重)/初始体重×100%;

特定生长率(SGR, %)=100%×(ln W_{t_2} -ln W_{t_1})/(t_2-t_1), 其中 t_2 和 t_1 分别为某个实验阶段的结束时间(d)和开始时间(d), W_{t_2} 和 W_{t_1} 分别为某一实验阶段虾的结束体重和初始体重;

累计死亡率(%)=(攻毒后死亡虾尾数/攻毒虾尾

数)×100%, 本实验中每处理攻毒虾尾数为 120 尾。

2 结果与分析

2.1 不同比例复合益生菌对凡纳滨对虾生长的影响

饲料中添加不同配合比例的复合益生菌饲喂凡纳滨对虾, 28 d 后, 凡纳滨对虾的增重率和特定生长率均显著提高(表 3), 并且各实验组与对照组之间差异很大。增重率数据显示, 实验组 S₇、S₅ 及 S₄ 组体重增率较高, 其中 S₇ (129.40±7.61)>S₅ (125.55±5.71)>S₄ (111.35±4.91); 特定生长率数据显示, 实验组 S₇、S₅ 及 S₄ 组体重增量较大, 其中 S₇ (1.29±0.05)>S₅ (1.26±0.04)>S₄ (1.16±0.04)。综合分析结果显示, S₇ 组比例(6 : 1 : 3)的复合益生菌对凡纳滨对虾生长的影响效果最好。

2.2 不同比例复合益生菌对凡纳滨对虾免疫指标的影响

2.2.1 酸性磷酸酶(ACP)活力 取凡纳滨对虾血清测定酸性磷酸酶活力(图 1), 21 d 实验数据显示, S₁、S₂、S₃、S₅、S₆、S₇ 及 S₉ 处理组显著高于对照组($P < 0.05$), S₄ 和 S₈ 处理组显著低于对照组($P < 0.05$); 28 d 实验数据显示, S₁、S₂、S₃、S₅、S₆ 及 S₇ 处理组显著高于对照组($P < 0.05$), S₄ 处理组与对照组差异性不显著($P > 0.05$), S₈ 和 S₉ 处理组显著低于对照组($P < 0.05$); 综合分析表明 S₁、S₂、S₃、S₅、S₆、S₇ 处理组能够显著提高凡纳滨对虾血清 ACP 活力($P < 0.05$), 其中以 S₃ (2 : 3 : 3)、S₅ (4 : 2 : 3)及 S₇ (6 : 1 : 3)比例的复合益生菌效果较好。

表 3 不同比例复合益生菌对凡纳滨对虾生长性能的影响

Tab. 3 Influence of the compound bacteria in different proportion on the growth performance of *Litopenaeus vannamei*
 $\bar{x} \pm SE; n=3; \%$

组别 group	初始体重/g initial body weight	终末体重/g terminal body weight	平均增重/g weight gain	增重率/% weight gain rate	特定生长率/% specific growth rate
D	4.90±0.12 ^a	7.89±0.04 ^f	2.99±0.15 ^g	61.13±4.58 ^f	0.74±0.05 ^f
S ₁	4.97±0.12 ^a	9.35±0.18 ^{de}	4.38±0.23 ^{df}	88.44±6.38 ^{cde}	0.98±0.05 ^{cde}
S ₂	5.04±0.09 ^a	9.29±0.48 ^{de}	4.25±0.57 ^{ef}	84.74±12.57 ^{de}	0.94±0.11 ^{de}
S ₃	5.03±0.06 ^a	10.26±0.17 ^c	5.24±0.11 ^c	104.13±0.94 ^{bc}	1.11±0.01 ^{bc}
S ₄	4.94±0.13 ^a	10.44±0.19 ^{bc}	5.49±0.16 ^b	111.35±4.91 ^{ab}	1.16±0.04 ^{ab}
S ₅	4.92±0.03 ^a	11.09±0.23 ^{ab}	6.17±0.24 ^a	125.55±5.71 ^a	1.26±0.04 ^a
S ₆	4.96±0.04 ^a	9.52±0.14 ^{de}	4.56±0.18 ^{cdf}	91.93±4.47 ^{cde}	1.01±0.04 ^{bcd}
S ₇	5.00±0.1 ^a	11.45±0.29 ^a	6.46±0.31 ^a	129.40±7.61 ^a	1.29±0.05 ^a
S ₈	5.03±0.15 ^a	9.01±0.09 ^e	3.99±0.20 ^f	79.68±6.43 ^{ef}	0.91±0.05 ^e
S ₉	4.93±0.05 ^a	9.91±0.03 ^{cd}	4.98±0.05 ^{bcd}	101.18±2.11 ^{bcd}	1.08±0.02 ^{bcd}

注：同列标注不同字母的两项间差异显著($P<0.05$).
Note: The two items with different letters in the same column are significantly different ($P<0.05$).

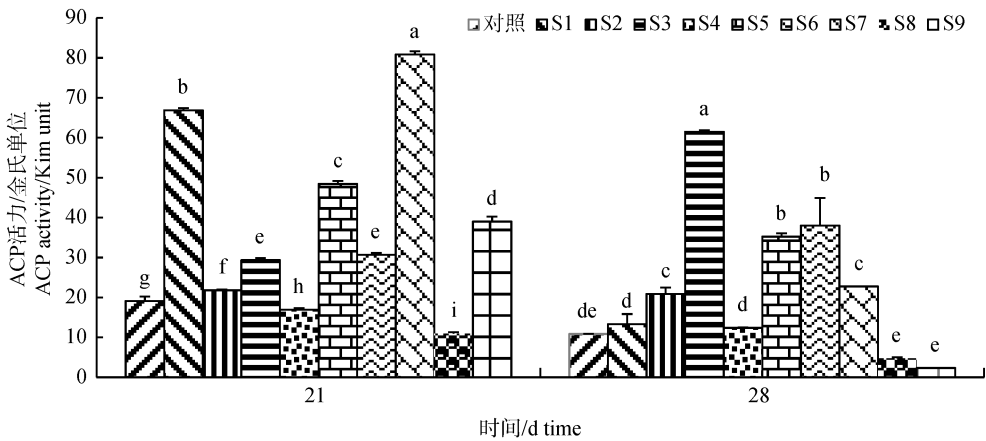


图 1 不同比例复合益生菌对凡纳滨对虾血清 ACP 活力的影响
柱上不同字母表示不同实验组间存在显著性差异($P<0.05$).

Fig. 1 Influence of the compound bacteria in different proportion on the ACP activity of *Litopenaeus vannamei*
Different letters above the bars indicate significant differences ($P<0.05$).

2.2.2 碱性磷酸酶(ALP)活力 碱性磷酸酶结果显示(图 2), 在实验第 21 天时, 除 S₈ 实验组外, 其余 8 个实验组均显著高于对照组 ($P<0.05$); 在实验第 28 天结束时, S₃、S₄、S₅、S₆、S₇ 实验组显著高于对照组($P<0.05$), S₁、S₂、S₈ 实验组与对照组差异性不显著($P>0.05$), 而 S₉ 实验组显著低于对照组($P<0.05$)。综合分析表明 S₃、S₄、S₅、S₆、S₇ 比例的复合益生菌能够显著提高凡纳滨对虾血清 ALP 活力, 其中以 S₅(4 : 2 : 3)和 S₇(6 : 1 : 3)比例的复合益生菌效果较好。

2.2.3 总超氧化物歧化酶(T-SOD)活力 饲料中

添加不同配比的复合益生菌对凡纳滨对虾血清中 T-SOD 活力的影响显著(图 3)。整个实验期间, S₁–S₉ 处理组均显著高于对照组($P<0.05$)。这表明饲料中添加不同配比的益生菌对血清中 T-SOD 活力的影响显著, 其中以 S₁(2 : 1 : 1)实验组效果最好, 并且 1 周即可达到提高 T-SOD 活力的效果。

2.2.4 溶菌酶活力 溶菌酶结果显示(图 4), 在实验第 21 天结束时, 除 S₁ 与 S₃ 实验组溶菌酶活力显著高于对照组外($P<0.05$), 其余各实验组与对照组之间差异性不显著; 在实验第 28 天结束时, 所有处理组之间的溶菌酶活力未表现出显著差

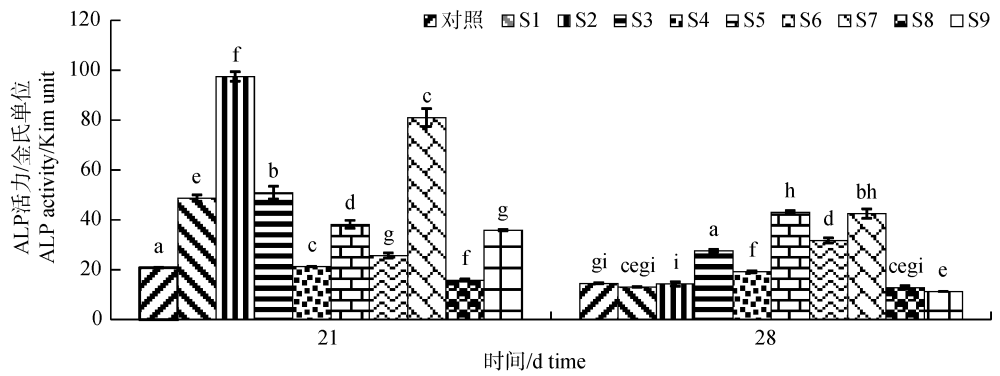


图 2 不同比例复合益生菌对凡纳滨对虾血清 ALP 活力的影响
柱上不同字母表示不同实验组间存在显著性差异($P<0.05$).

Fig. 2 Influence of the compound bacteria in different proportion on the ALP activity of *Litopenaeus vannamei*
Different letters above the bars indicate significant differences ($P<0.05$).

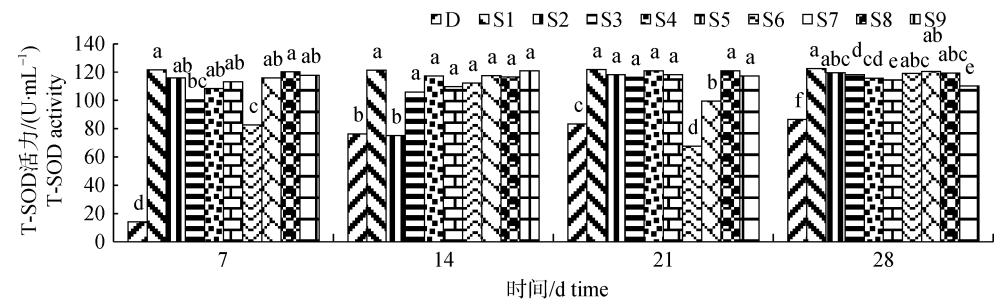


图 3 不同比例复合益生菌对凡纳滨对虾血清 T-SOD 活力的影响
柱上不同字母表示不同实验组间存在显著性差异($P<0.05$).

Fig. 3 Influence of the compound bacteria in different proportion on the T-SOD activity of *Litopenaeus vannamei*
Different letters above the bars indicate significant differences ($P<0.05$).

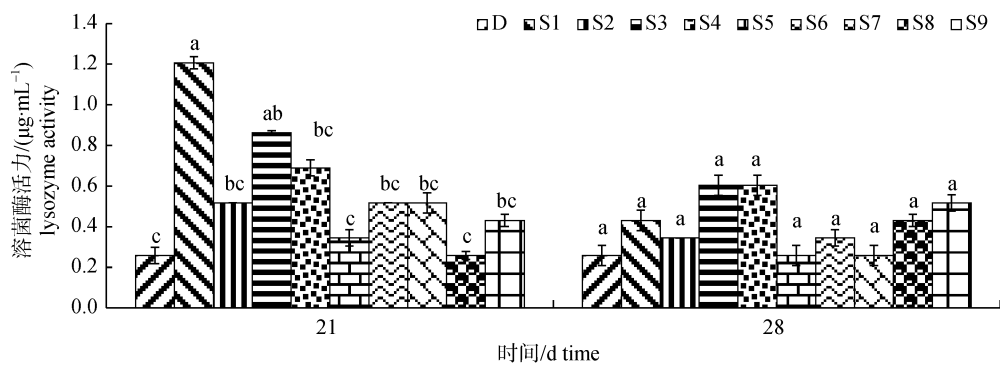


图 4 不同比例复合益生菌对凡纳滨对虾血清溶菌酶活力的影响
柱上不同字母表示不同实验组间存在显著性差异($P<0.05$).

Fig. 4 Influence of the compound bacteria in different proportion on the lysozyme activity of *Litopenaeus vannamei*
Different letters above the bars indicate significant differences ($P<0.05$).

异。综合分析表明, S_1 (2 : 1 : 1)与 S_3 (2 : 3 : 3)比例的复合益生菌能够在一定程度上显著增强凡纳滨对虾血清溶菌酶活力, 但是持续效果不稳定,

长期使用, 效果可能不大。

2.3 不同比例复合益生菌对抗氨氮能力的影响

当养殖水体氨氮浓度持续在 26.67 mg/L 时,

各实验组与对照组相比均能显著降低凡纳滨对虾死亡率(表 4), 各实验组中 $S_6(4:3:1)$ 和 $S_9(6:3:2)$ 实验组相对于其他组效果更加显著。由表 4 可以看出, 对照组(D)在第 2 天时首先开始出现死亡现象, 到第 8 天时累计死亡率升高到 53.33%, 16 d 时累计死亡率高达率 81.67%。 $S_6(4:3:1)$ 实验组在 0~12 d 内一直保持零死亡率率状态, 直到第 13 天才开始出现死亡现象, 13~14 d 累计死亡率基本保持在 20%以下, 14~16 d 之间死亡率才开始增加, 到 16 d 时累计死亡率为 41.67%; $S_9(6:3:2)$ 组在 16 d 实验结束时累计死亡率最低, 最终存活率保持在 70%以上。其余各组各时间段累计死亡率情况见表 4。

表 4 高浓度氨氮条件下凡纳滨对虾平均累计死亡率
Tab. 4 Average cumulative mortality rates of *Litopenaeus vannamei* under the condition of high concentration of ammonia nitrogen

组别 group	暴露时间/d exposure time				
	0	4	8	12	16
D	0.00±0.00 ^a	6.67±0.00 ^a	53.33±17.32 ^a	58.33±14.43 ^a	81.67±0.96 ^a
S ₁	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^d	3.33±1.92 ^b	14.17±8.17 ^c	57.50±12.99 ^b
S ₂	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^d	1.67±0.96 ^b	5.83±3.37 ^c	40.00±1.92 ^{bc}
S ₃	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^d	3.33±1.92 ^b	8.33±4.81 ^c	44.17±1.44 ^{bc}
S ₄	0.00±0.00 ^a	2.50±1.44 ^{bc}	12.50±7.21 ^b	43.33±23.09 ^{ab}	57.50±14.91 ^b
S ₅	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^d	1.67±0.96 ^b	6.67±3.85 ^c	52.50±1.44 ^b
S ₆	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^{cd}	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^c	41.67±0.00 ^{bc}
S ₇	0.00±0.00 ^a	2.50±1.44 ^b	3.33±1.92 ^b	23.33±10.59 ^{bc}	82.50±0.48 ^a
S ₈	0.00±0.00 ^a	0.83±0.48 ^{bcd}	0.83±0.48 ^b	9.17±0.48 ^c	42.50±3.37 ^{bc}
S ₉	0.00±0.00 ^a	2.50±1.44 ^b	4.17±2.40 ^b	13.33±0.96 ^c	25.00±4.81 ^c

注: 同列标注不同字母的两项间差异显著($P<0.05$).
Note: The two items with different letters in the same column are significantly different ($P<0.05$).

3 讨论

3.1 不同配比的复合菌对凡纳滨对虾生长性能的影响

对虾肠道中存在着诸多微生物, 它们作为一个整体影响着机体的生长、生理、生化和免疫反应^[9]。很多学者证明了外源添加益生菌具有促进水产动物生长的特性。例如, Silva 等^[10]研究发现在饲料中添加芽孢杆菌可以促进凡纳滨对虾生长; Rahiman 等^[11]将 NL110 杆菌和 NE17 弧菌用于罗氏沼虾, 虾体生长率、存活率及免疫水平均得到显著提高; Zokaeifar 等^[12]研究发现饵料中添加两株枯草芽孢杆菌投喂凡纳滨对虾幼体, 其生长性能、消化酶活性及抗哈维氏弧菌能力显著提高。本实验结果显示, 饲料中添加 9 组不同配合比例的复合益生菌均对凡纳滨对虾生长产生了积极影响, 并且以 3 株菌菌数 6:1:3 比例的复合菌效

果最好。

有研究表明, 一些益生菌可以通过分泌一些酶类包括海藻酸裂解酶、淀粉酶、蛋白酶等来提高机体的消化吸收率, 促进宿主生长^[12]。还可以通过产生一些营养物质如脂肪酸、维生素 B₁₂ 等对养殖动物的健康产生积极的影响^[13]。在本研究中复合菌能够促进凡纳滨对虾生长, 作者认为最重要的一点可能是 3 株益生菌从凡纳滨对虾肠道中分离, 作为土著益生菌摄入后, 能够在对虾肠道定植, 形成优势菌群, 通过分泌营养物质、提高饲料消化率等形式促进对虾的生长。此外, 本实验中复合益生菌对对虾非特异性免疫力及抗氨氮能力的积极作用可能最终表现在对对虾生长的影响上。

3.2 不同配比的复合益生菌对凡纳滨对虾免疫指标的影响

对虾和其他无脊椎动物一样, 免疫系统较原

始, 缺乏真正意义上的抗体, 只能依靠先天性的免疫反应来提高疾病的抵抗力。外源添加益生菌即可提高对虾的免疫力。Zhou 等^[14]研究表明红假单胞菌可以提高罗非鱼的免疫力。Li 等^[15]研究表明节细菌属 XE-7 能够调节肠道菌群, 显著提高凡纳滨对虾免疫参数。本实验结果显示, 凡纳滨对虾摄食一定剂量的复合益生菌后, 血清中的酸性磷酸酶、碱性磷酸酶、总超氧化物歧化酶活力均有显著性提高, 说明复合菌对以上 3 个免疫指标产生了积极的影响。而复合益生菌对溶菌酶活力影响不大, 该研究结果与王秀华等^[16]研究凡纳滨对虾摄食肽聚糖后血淋巴中相应的酶活力变化结果相似, 此外, 李桂英等^[17]也表明了类似的观点, 即饲料中添加五株肠道益生菌, 除溶菌酶与对照组无显著性差异外, 超氧化物歧化酶、磷酸酶和一氧化氮合酶活性都有不同程度的提高。产生的这些差异还有待进一步地研究。

3.3 抗氨氮能力

氨氮是养殖水体中影响水质的最大氮态, 高氨氮环境会使对虾体内血液与组织中氨浓度升高, 进而引起虾体中毒, 并发生一系列异常反应, 如体内多种酶的活力发生异常、机体代谢功能失常、内脏器官的皮膜通透性改变、免疫力下降、获得氧的能力降低等, 从而影响对虾生长, 甚至导致死亡^[18]。对虾养殖过程中, 水体中氨氮过高是导致对虾死亡的重要原因之一, 有研究表明脊尾白虾^[19]、斑节对虾^[20]、克氏原螯虾^[21]等虾的死亡率都随着氨氮浓度的升高或者中毒时间的延长而逐渐增加。本实验结果显示, 在氨氮浓度 26.67 mg/L 的条件下, 对照组与复合益生菌组的凡纳滨对虾均出现了不同程度的死亡现象, 对照组最早出现死亡, 并且在整个氨氮实验期间, 对照组的累计死亡率显著高于复合益生菌组, 其中 3 株菌菌数 4:3:1 比例组平均累计死亡率最低。从实验结果看, 饲料中复合益生菌的添加增强了凡纳滨对虾对高浓度氨氮毒性的抵抗力。

作者认为抗氨氮能力是对虾对环境的一种应激能力, 其能力与自身的免疫力有关。众多学者研究表明处于高氨氮水平下的对虾血细胞数量减

少, 酚氧化酶(PO)、酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(ALP)、超氧化物歧化酶等免疫酶活力^[20, 22-24]以及溶菌、抗菌活力明显下降。反之, 当对虾免疫水平提高, 其对抗氨氮的能力也会相应提高, 因此, 本实验中复合益生菌对凡纳滨对虾免疫力的提高, 可能是其抗氨氮能力的提高的重要原因。

4 结论

正交设计的 9 种比例复合益生菌对凡纳滨对虾生长、免疫和抗氨氮能力均有一定程度的提高, 而不同复配比例对各指标的积极效果不同。3 株菌菌数的复配比例为 6:1:3 时, 其促生长效果最好; 复配比例为 2:3:3、4:2:3 或 6:1:3 时, ACP 活力较强; 复配比例为 4:2:3 或 6:1:3 时, ALP 活力较强; 复配比例为 2:1:1 时, T-SOD 活力较强; 复配比例为 2:1:1 或 2:3:3 时, 溶菌酶活力较强; 复配比例为 4:3:1 时对高氨氮水环境的耐受性较强。可以在生产使用上根据不同的需求提供不同的复配比例。

致谢: 本实验得到了中国水产科学研究院南海水产研究所深圳实验基地林黑着研究员及其学生刘岩、李涛、黄小林、杨育凯等的帮助与支持, 在此表示感谢。

参考文献:

- [1] The Fisheries Bureau of Ministry of Agriculture. Statistical Yearbook of China[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2013.[农业部渔业局. 中国统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2013.]
- [2] Aguirre-Guzmán G, Lara-Flores M, Sánchez-Martínez J G, et al. The use of probiotics in aquatic organisms: a review[J]. Afr J Microbiol Res, 2012, 6(23): 4845-4857.
- [3] Hao K, Liu J Y, Ling F, et al. Effects of dietary administration of *Shewanella haliotis* D4, *Bacillus cereus* D7 and *Aeromonas bivalvium* D15, single or combined, on the growth, innate immunity and disease resistance of shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. Aquaculture, 2014, 428-429: 141-149.
- [4] Gatesoupe F J, Lesel R. An environmental approach to intestinal microflora in fish[J]. Cah Agric, 1998, 7(1): 29-35.
- [5] Salinas I, Cuesta A, Esteban M Á, et al. Dietary administration of *Lactobacillus delbrückii* and *Bacillus subtilis*, single

- or combined, on gilthead seabream cellular innate immune responses[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2005, 19(1): 67–77.
- [6] Salinas I, Abelli L, Bertoni F, et al. Monospecies and multispecies probiotic formulations produce different systemic and local immunostimulatory effects in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.)[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2008, 25(1–2): 114–123.
- [7] Aly S M, Ahmed Y A G, Ghareeb A A A, et al. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2008, 25(1–2): 128–136.
- [8] Sun G M, Tang J H, Zhong X M. Toxicity research of ammonia nitrogen and nitrite to *Penaeus vannamei*[J]. *Journal of Aquaculture*, 2002(1): 22–24.[孙国铭, 汤建华, 仲霞铭. 氨氮和亚硝酸氮对南美白对虾的毒性研究[J]. *水产养殖*, 2002(1): 22–24.]
- [9] Seenivasan C, Radhakrishnan S, Muralisankar T, et al. *Bacillus subtilis* on survival, growth, biochemical constituents and energy utilization of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* post larvae[J]. *Egypt J Aquat Res*, 2012, 38(3): 195–203.
- [10] Silva E F, Soares M A, Calazans N F, et al. Effect of probiotic (*Bacillus* spp.) addition during larvae and postlarvae culture of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Aquac Res*, 2013, 44(1): 13–21.
- [11] Rahiman K M M, Jesmi Y, Thomas A P, et al. Probiotic effect of *Bacillus* NL110 and *Vibrio* NE17 on the survival, growth performance and immune response of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man)[J]. *Aquac Res*, 2010, 41(9): e120–e134.
- [12] Zokaiefar H, Balcázar J L, Saad C R, et al. Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2012, 33(4): 683–689.
- [13] Vine N G, Leukes W D, Kaiser H. Probiotics in marine larviculture[J]. *Fems Microbiol Rev*, 2006, 30: 404–427.
- [14] Zhou X X, Tian Z Q, Wang Y B, et al. Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response[J]. *Fish Physiol Biochem*, 2010, 36(3): 501–509.
- [15] Li J Q, Tan B P, Mai K S, et al. Immune responses and resistance against *Vibrio parahaemolyticus* induced by probiotic bacterium *Arthrobacter* XE-7 in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. *J World Aquac Soc*, 2008, 39(4): 477–489.
- [16] Wang X H, Song X L, Huang J. Effects of peptidoglycan (PG) preparation on humoral immune factors of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2004, 11(1): 26–30.[王秀华, 宋晓玲, 黄健. 肽聚糖制剂对南美白对虾体液免疫因子的影响[J]. *中国水产科学*, 2004, 11(1): 26–30.]
- [17] Li G Y, Song X L, Sun Y, et al. Effects of probiotics from the shrimp intestine on the non-specific immunity and antiviral capacity of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(6): 1358–1367.[李桂英, 宋晓玲, 孙艳, 等. 几株肠道益生菌对凡纳滨对虾非特异免疫力和抗病力的影响[J]. *中国水产科学*, 2011, 18(6): 1358–1367.]
- [18] Li Yong. Artificial selection of *Penaeus monodon* and impacts of ammonia-N on immune parameters, detoxification[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012.[李永. 斑节对虾人工选育及氨氮对其免疫、解毒代谢影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2012.]
- [19] Liang J P, Li J, Li J T. Acute toxicity of ammonia nitrogen to juvenile and adult ridgetail white prawn, *Exopalaemon carinicauda*[J]. *Fisheries Science*, 2012, 31(9): 526–529.[梁俊平, 李健, 李吉涛. 氨氮对脊尾白虾幼虾和成虾的毒性试验[J]. *水产科学*, 2012, 31(9): 526–529.]
- [20] Li Y, Yang Q B, Su T F, et al. The toxicity of ammonia-N on *Penaeus monodon* and immune parameter[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2012, 21(3): 358–362.[李永, 杨其彬, 苏天凤, 等. 氨氮对斑节对虾的毒性及免疫指标的影响[J]. *上海海洋大学学报*, 2012, 21(3): 358–362.]
- [21] Zhong J W, Zhu Y A, Meng Q L, et al. The toxicity research of ammonia-N on two kinds *Procambarus clarkii*[J]. *Journal of Yangtze University (Natural Science Edition)*, 2013, 10(23): 55–59.[钟君伟, 朱永安, 孟庆磊, 等. 氨氮对 2 种规格克氏原螯虾的急性毒性研究[J]. *长江大学学报(自然科学版)*, 2013, 10(23): 55–59.]
- [22] Chen Y Y, Sim S S, Chiew S L, et al. Dietary administration of a *Gracilaria tenuistipitata* extract produces protective immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* in response to ammonia stress[J]. *Aquaculture*, 2012, 370–371: 26–31.
- [23] Wongsasak U, Chaijamrus S, Kumkhong S, et al. Effects of dietary supplementation with β -glucan and synbiotics on immune gene expression and immune parameters under ammonia stress in Pacific white shrimp[J]. *Aquaculture*, 2015, 436: 179–187.
- [24] Lv X Y. Effects on the Physiological and biochemical of red-claw crayfish, *Cherax quadricarinatus* under the Nitrite and Ammonia nitrogen Stress[D]. Shanghai: East China Normal University, 2011.[吕晓燕. 亚硝酸盐和氨氮对红螯光壳螯虾生理生化的影响[D]. 上海: 华东师范大学, 2011.]

Effects of different proportions of a group of compound bacteria on growth, innate immunity, and ammonia nitrogen resistance in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*

XIA Lei^{1,2}, ZHAO Mingjun¹, ZHANG Hongyu^{1,2}, TANG Xia², YANG Keng³, YANG Runqing¹

1. Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100141, China;

2. Beijing Xinyang Fisheries High-Technology Co. Ltd, Beijing 102488, China;

3. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China

Abstract: Nine different proportions of a group of bacteria, including *Shewanella haliotis*, *Bacillus cereus*, and *Aeromonas bivalvium* were isolated from the gut of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. The shrimp were fed fodder with 10^9 cfu/g compound bacteria for 28 d using an orthogonal experimental design, and the effects on growth and innate immunity of the shrimp were assessed. Ammonia-nitrogen was adjusted to 26.67 mg/L with NH_4Cl after 16 d, and ammonia-nitrogen resistance of the shrimp was tested. The results show that shrimp growth improved after the 28 d probiotic feeding regime, compared to that of the control ($P<0.05$), and the 6 : 1 : 3 proportion was better than the others. These results suggest that the compound bacteria promoted growth through secretion of nutrients and improved feed digestibility. Moreover, the positive effects of the compound bacteria on innate immunity and ammonia-nitrogen resistance of *L. vannamei* were eventually expressed as improved growth. The activities of acid phosphatase (ACP), alkaline phosphatase (ALP), and total superoxide dismutase (T-SOD) were also enhanced compared to those in the control ($P<0.05$), but the effects were different. The 2 : 3 : 3, 4 : 2 : 3, and 6 : 1 : 3 proportions increased ACP activity significantly more than the others ($P<0.05$), and the 4 : 2 : 3 and 6 : 1 : 3 proportions increased ALP activity significantly more than the others ($P<0.05$). The 2 : 1 : 1 proportion increased T-SOD activity significantly more than the others. No changes in shrimp serum lysozyme activity were detected in any of the bacteria-tested groups compared to the control. The results that serum ACP, ALP, and T-SOD activities were enhanced compared to the control show that the different proportions of bacteria positively affected shrimp innate immunity. In addition, the 4 : 3 : 1 and 6 : 3 : 2 bacterial proportions significantly enhanced ammonia-nitrogen resistance in Pacific white shrimp ($P<0.05$). These results show that the compound bacteria had positive effects on ammonia-nitrogen resistance of *L. vannamei* and suggest that ammonia-nitrogen resistance is associated with the immune system.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; *Shewanella haliotis*; *Bacillus cereus*; *Aeromonas bivalvium*; growth; innate immunity; ammonia nitrogen resistance

Corresponding author: ZHANG Hongyu. E-mail: zhanghy@cafs.ac.cn