

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.15408

饲料添加益生菌对凡纳滨对虾肠道菌群、Toll 受体及溶菌酶基因表达及抗感染的影响

张盛静^{1,2}, 赵小金¹, 宋晓玲¹, 王春迪¹, 刘文亮¹, 黄健¹

1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室, 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306

摘要: 以初体重为(7.20±1.38) g 的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)为研究对象, 在室内养殖箱进行 3 周的养殖实验和 2 周的哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)人工感染实验, 其中对照组每日投喂普通商品饲料, 实验组每日投喂在普通商品饲料中添加地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) 1.0×10^8 CFU/mL 配制成的实验饲料。目的是研究饲料中添加益生菌对凡纳滨对虾肠道菌群、Toll 受体及溶菌酶基因表达量和抗哈维氏弧菌能力的影响。实验结果表明, 在饲料中添加地衣芽孢杆菌可显著提高对虾抗哈维氏弧菌感染的能力, 其相对免疫保护率为 22.22%。与对照组相比, 实验组可显著降低对虾肠道内弧菌数量($P < 0.05$)。感染哈维氏弧菌后, 实验组溶菌酶(lysozyme, LZM) mRNA 的相对表达量在 12 h、18 h、24 h、36 h、48 h、72 h 均显著高于对照组($P < 0.05$)。实验组感染哈维氏弧菌后在 6 h、12 h、18 h、24 h、36 h、48 h、72 h、7 d 的 Toll 受体(Toll receptor) mRNA 的相对表达量均显著高于对照组($P < 0.05$)。实验结果提示: 饲料中添加地衣芽孢杆菌可有效提高对虾抗哈维氏弧菌感染的能力, 这种能力的提高可能是通过降低对虾肠道内的弧菌量, 并提高抗病相关基因的表达量实现的。

关键词: 凡纳滨对虾; 益生菌; 抗病力; 免疫基因; 哈维氏弧菌

中图分类号: S94

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)04-0846-09

近年来, 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)养殖在中国迅速发展, 2014 年对虾类养殖总产量为 174.7 万 t, 其中凡纳滨对虾产量为 157.7 万 t, 占对虾类养殖产量的 90.24%(中国渔业统计年鉴, 2015), 为社会创造了显著的经济效益和社会效益。然而, 由弧菌引起的传染性病害给对虾养殖带来的危害越来越严重^[1-2]。抗生素曾广泛应用于水产养殖中的疾病控制, 由它产生的病原菌的耐药性以及药物残留问题, 严重影响了水产养殖业的可持续发展。近年来, 人们提出了微生物修复观念, 益生菌的使用可以减少抗生素的使用, 并且不会形成二次污染, 有利于对虾养殖业的健康可持续发展^[3-5]。

益生菌(probiotic)是指在一定浓度范围内, 对宿主健康产生益处的活的微生物^[6]。在对虾养殖中常用的益生菌主要有芽孢杆菌属、乳酸菌属、双歧杆菌属细菌^[7]。益生菌的作用机制主要包括 4 个方面: 通过竞争营养附着位点或产生拮抗物质来抑制有害微生物繁殖; 通过特别的消化酶分泌促进营养物质吸收; 通过激活免疫系统提高机体免疫力; 通过分解有机污染物净化水质^[8-11]。

凡纳滨对虾主要依赖非特异性免疫系统抵御外来病原侵害。溶菌酶(lysozyme)作为对虾体内重要的非特异免疫因子之一, 在引发和维持机体防御过程中发挥重要作用^[12-13]。高风英等^[14]以 PCR 方法制备罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)溶

收稿日期: 2015-10-31; 修订日期: 2015-12-24.

基金项目: 国家 973 计划项目(2012CB114405); 农业部引进国际先进农业科学技术计划项目(2016-X56).

作者简介: 张盛静(1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产病害微生物防控技术研发. E-mail: zhangshengjing@126.com

通信作者: 宋晓玲, 研究员. E-mail: songxl@ysfri.ac.cn

菌酶基因的生物素标记探针,检测感染弧菌后溶菌酶基因 mRNA 的转入水平,结果表明溶菌酶基因在非特异性免疫中具有直接的作用。Toll 受体在介导对虾启动非特异性免疫系统时起到关键性作用。当外来病原生物入侵对虾体内时,Toll 受体将病原入侵的信号从细胞外传递到细胞内,并引起细胞内信号级联反应,介导细胞启动先天非特异性免疫反应。因此,Toll 受体基因的表达水平在一定程度上可以作为评价对虾免疫抗菌能力的重要指标之一^[15-16]。自从 2007 年以来,中国明对虾和斑节对虾等多种对虾的 Toll 受体的基因被克隆出来^[17-18]。

本研究主要是将分离自虾池生物絮团的地衣芽孢杆菌添加在基础饲料中,探讨在商品饲料中添加益生菌对凡纳滨对虾肠道菌群和抗哈维氏弧菌能力的影响,并且利用实时荧光定量 PCR(real-time PCR)技术,研究了注射哈维氏弧菌后对虾鳃中溶菌酶(lysozyme)和 Toll 受体(Toll receptor)基因表达水平的变化规律,从而分析益生菌发挥抗弧菌感染保护作用可能的机制,以期深入了解对虾的肠道益生菌与弧菌之间的作用关系,为益生菌在对虾养殖生产中的应用提供基础依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验用虾 实验用凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)于 2014 年 5 月 31 日购自青岛宝荣水产有限公司对虾养殖场,体长(7.90±1.15) cm,体重(7.20±1.38) g,经 PCR 检测未检出对虾白斑综合征病毒(WSSV)。实验对虾暂养于 60 L 水族整理箱中,有效水体约为 40 L。养殖期间,每天换水 1 次,投喂饲料 3 次,水温(23±2)℃,盐度(29±2),连续充气。

1.1.2 实验用益生菌 地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*),编号 201112010602,由本实验室分离自对虾池塘生物絮团,纯化后于-80℃保存,进行菌种活化和小规模发酵培养,离心收集菌体,地衣芽孢杆菌活菌量达到 1.0×10^8 CFU/mL。

1.1.3 感染用哈维氏弧菌 攻毒用哈维氏弧菌

(*Vibrio harveyi*),菌株编号 2011053001,由本实验室保存。使用 2216E 培养基上划线培养 18 h,刮取单菌落到 2216E 液体培养基扩大培养,离心收集菌体,用 PBS 缓冲液稀释制成 1.0×10^7 CFU/mL 菌悬液。

1.2 饲料制备

基础饲料为青岛玖瑞大海跃饲料科技有限公司生产的凡纳滨对虾配合饲料,在其表面直接包裹一层褐藻酸钠(3 g/500 g);实验饲料:按一定的比例将菌液与水混匀后喷洒在基础饲料外,揉搓阴干后,再在其表面包裹一层褐藻酸钠(比例同基础饲料),实验饲料制备好后存放于 4℃冰箱。

1.3 实验分组

凡纳滨对虾在实验室暂养一周后,挑取个体均匀、活力较强的对虾分为实验组和对照组,每组 3 个平行,每个平行 60 尾,实验组投喂实验饲料,对照组投喂基础饲料。实验期间各组对虾每日投喂 3 次,日投喂量约为对虾体重的 10%(根据对虾摄食情况调节投喂量),所有组别按照暂养时的条件进行管理。

1.4 哈维氏弧菌感染实验

在投喂实验饲料的第 21 天,从各实验组中挑取大小基本一致的 120 尾对虾进行哈维氏弧菌人工感染实验,每组 5 个平行(其中 3 个平行用于统计死亡率,2 个平行用于取样)。实验组和对照组均用无菌注射器向每尾虾第二腹节肌肉中注射 50 μL 的哈维氏弧菌悬浊液(此剂量经预实验确定),空白对照组注射等剂量 PBS 缓冲液。攻毒后各组分别继续投喂相应的实验饲料或基础饲料,及时捞出死亡对虾,记录死亡数量和死亡时间,14 d 后结束感染实验。

1.5 对虾肠道可培养细菌总数和弧菌属细菌数量的测定

投喂实验开始后,每隔 7 d 测定对虾肠道弧菌数和细菌总数,测定方法参考李继秋等^[19]的方法。实验组和对照组分别随机取 3 尾虾,无菌条件下取出肠道,用剪刀剪破肠道,将肠道放在 PBS 缓冲液反复冲洗尽可能去除肠道内容物,取出肠道并放在滤纸沥干。将肠道组织放入 1.5 mL

的无菌 EP 管中称重, 分别往无菌 EP 管加入 1 mL 的 PBS 缓冲液, 用无菌研磨棒研磨均匀, 用 10 倍递增稀释法制成菌悬液。细菌总数和弧菌数分别通过涂布 2216E 和 TCBS 培养基测定。

1.6 免疫相关基因的表达量分析

1.6.1 样品采集及 RNA 的提取 攻毒实验开始后 6 h、12 h、18 h、24 h、36 h、48 h、72 h、7 d 从各组随机取 3 尾活虾, 无菌条件下取其鳃组织放入 RNase-Free 的 1.5 mL EP 管内, 于液氮中速冻后放入-80℃冰箱中保存。利用 RNAiso plus (TaKaRa 公司)提取虾鳃总 RNA, 方法参照说明书。用 NanoDrop 2000c (Thermo)测定 RNA 的 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 值以及 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值进行定量检测, 放入-80℃冰箱中保存, 用于溶菌酶和 Toll 受体 mRNA 表达量的测定。

1.6.2 cDNA 的合成 应用 PrimeScript® RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒(大连宝生物工程有 限 公 司)进 行 cDNA 合 成。该 试 剂 盒 合 成 cDNA 反应分两步, 基因组 DNA 的除去反应, 反应体系 10 μL(5×gDNA Eraser Buffer 2 μL, gDNA Eraser 1 μL, 总 RNA 1μg, RNase Free dH₂O 6 μL), 42℃孵育 2 min。 反转录反应, 反应体系 20 μL (5×PrimeScript® Buffer 24 μL, PrimeSycrypt® RT Enzyme Mix1 1 μL, RT Primer Mix 1 μL, 中的反应液 10 μL, RNase Free dH₂O 4 μL), 37℃孵育 15 min, 85℃加热 5 s 合成 cDNA 模板。

1.6.3 实时荧光定量 PCR 分析基因表达 凡纳滨对虾溶菌酶、Toll receptor, 内参基因 β -actin 引物序列见表 1, 使用的引物序列参考文献^[20-21], 引物均由上海生工(生物工程)有限公司合成。

表 1 凡纳滨对虾 Toll 受体、溶菌酶基因与内参基因 β -actin 引物序列
Tab. 1 Primer pairs for lysozyme, Toll receptor, and β -actin genes for *Litopenaeus vannamei*

目的基因 target gene	序列号 serial number	正向引物(5'-3') forward primer (5'-3')	反向引物(3'-5') reverse primer (5'-3')
β -actin	AF300705	GAGCAACACGGAGTTCGTTGT	CATCACCAACTGGGACGACATGGA
lysozyme	AY170126.2	TGTTCCGATCTGATGTCC	GCTGTTGTAAGCCACCC
Toll receptor	DQ923424.1	TGAGAGATGCCCACTGCCTG	CGCTTGAAGGTTTGTGAGGGAG

按照 FastStart Essential DNA Green Master 试剂盒 (Roche 公司)说明书, 用 Bio-rad Real-time CFX96 进行荧光定量 PCR。PCR 程序为: 95℃ 10 min 预变性; 95℃ 10 s, 60℃ 15 s, 72℃ 20 s 共 45 个循环; 反应后 65℃ 上升至 95℃测定熔解曲线检测反应特异性。每个复孔以 β -actin 为参照基因。基因表达结果采用相对表达量的形式, 以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[22]进行计算。

1.7 数据处理和统计分析

实验结果用平均数±标准差($\bar{x} \pm SD$)表示, 使用 SPSS 16.0 分析软件对数据进行单因素方差 (One-way ANOVE)分析, Duncan 氏法进行多重比较, 处理间 $P < 0.05$ 则认为差异显著。

2 结果与分析

2.1 哈维氏弧菌感染凡纳滨对虾的累积死亡率

实验组和对照组在投喂相应的饲料 20 d 后注

射感染哈维氏弧菌, 感染实验期间各组对虾的累积死亡率结果见表 2。从表中数据可以看出, 感染的前 2 d 实验组和对照组累积死亡率无显著差异 ($P < 0.05$), 从感染第 2 天开始实验组和对照组的死亡率呈显著上升趋势, 对照组的累积死亡率显著高于实验组 ($P < 0.05$), 第 9 天后实验组和对照组的死亡率趋于稳定。至感染结束后对照组的累积死亡率为 100%, 显著高于投喂地衣芽孢杆菌实验组的累积死亡率(77.78±3.14)%。结果表明, 投喂地衣芽孢杆菌可显著提高凡纳滨对虾抗哈维氏弧菌的能力, 其相对保护率为(22.22±3.14)%。

2.2 凡纳滨对虾肠道可培养细菌总数及弧菌总数

凡纳滨对虾养殖期间在第 7 天、第 14 天、第 21 天、第 28 天(攻毒后第 7 天)、第 35 天(攻毒后第 14 天)测定的可培养细菌总数结果见表 3。从表中数据可以看出, 实验组和对照组在各个时间点计数结果均为显著性差异 ($P < 0.05$), 在养殖第 7

表 2 投喂地衣芽孢杆菌的凡纳滨对虾注射感染哈维氏弧菌后的累积死亡率

Tab. 2 Cumulative mortality of *L. vannamei* fed with *B. licheniformis* preparations and then challenged by injection with *V. harveyi* %

组别	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
实验组 <i>Bacillus</i>	4.45±3.14 ^a	35.55±3.14 ^a	48.89±6.28 ^a	57.78±3.14 ^a	68.89±6.28 ^a	73.33±9.43 ^a	75.56±6.28 ^a
对照组 control	8.89±3.14 ^a	42.22±3.14 ^a	71.11±6.28 ^b	83.34±3.14 ^b	91.11±3.14 ^b	95.55±5.44 ^b	95.55±5.44 ^b
组别	8 d	9 d	10 d	11 d	12 d	13 d	14 d
实验组 <i>Bacillus</i>	75.56±6.28 ^a	77.78±3.14 ^a	77.78±3.14 ^a	77.78±3.14 ^a	77.78±3.14 ^a	77.78±3.14 ^a	77.78±3.14 ^a
对照组 control	95.55±5.44 ^b	100±0.0 ^b	100±0.0 ^b	100±0.0 ^b	100±0.0 ^b	100±0.0 ^b	100±0.0 ^b

注: 同一天上标字母不相同表示差异显著($P<0.05$).
Note: Values with different letters on the same day indicates significant difference ($P<0.05$).

表 3 凡纳滨对虾养殖期间肠道内可培养细菌总数

Tab. 3 Total culturable bacteria counts in intestinal tract of *L. vannamei* during the period of farming

$n=3$; $\bar{x} \pm SE$; lgCFU/g

	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d
实验组 <i>Bacillus</i>	6.84±0.08 ^a	8.35±0.07 ^a	7.22±0.07 ^a	6.42±0.06 ^a	6.17±0.05 ^a
对照组 control	7.49±0.05 ^b	8.10±0.05 ^b	7.14±0.05 ^b	6.70±0.05 ^b	6.39±0.06 ^b

注: 同一天上标字母不相同表示差异显著($P<0.05$).
Note: Values with different letters on the same day indicate significant difference ($P<0.05$).

天、28 天、35 天对照组对虾肠道内可培养细菌总数显著高于实验组($P<0.05$), 在养殖第 14 天、21 天实验组对虾肠道内可培养细菌总数显著高于对照组($P<0.05$)。

凡纳滨对虾养殖期间在第 7 天、14 天、21 天、

28 天、35 天测定 TCBS 培养基可培养弧菌总数结果见表 4。从表中数据可以看出, 实验组对虾肠道内可培养弧菌总数在养殖期间均显著低于实验组($P<0.05$), 表明饲料添加地衣芽孢杆菌可有效降低对虾肠道内弧菌数量。

表 4 凡纳滨对虾养殖期间肠道内可培养弧菌总数

Tab. 4 Total culturable *Vibrio* bacteria counts in intestinal tract of *L. vannamei* during the period of farming

$n=3$; $\bar{x} \pm SE$; lgCFU/g

	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d
实验组 <i>Bacillus</i>	5.91±0.14 ^a	6.64±0.05 ^a	5.15±0.06 ^a	5.34±0.09 ^a	5.10±0.06 ^a
对照组 control	7.01±0.11 ^b	7.19±0.03 ^b	5.39±0.05 ^b	5.60±0.09 ^b	5.30±0.07 ^b

注: 同一天不同上标字母表示差异显著($P<0.05$).
Note: Values with different letters on the same day indicate significant difference ($P<0.05$).

2.3 凡纳滨对虾感染哈维氏弧菌后鳃组织溶菌酶和 Toll 受体的 mRNA 相对表达量

2.3.1 凡纳滨对虾感染哈维氏弧菌后鳃组织溶菌酶的 mRNA 相对表达量 使用实时荧光定量 RT-PCR 方法测定的实验组和对照组在感染哈维氏弧菌后鳃组织溶菌酶 mRNA 相对表达量的变化见图 1。投喂含有地衣芽孢杆菌的实验组感染哈维氏弧菌后在 12 h、18 h、24 h、36 h、48 h 和 72 h 的溶菌酶 mRNA 的相对表达量均显著高于 0 h($P<0.05$),

36 h 达到峰值之后开始下降, 到 7 d 时基本降至初始水平; 投喂普通饲料的对照组感染哈维氏弧菌后在 12 h、18 h、24 h、36 h、48 h 和 72 h 的溶菌酶 mRNA 的相对表达量均显著高于 0 h($P<0.05$), 36 h 达到峰值之后开始下降, 到 7 d 时基本降至初始水平。实验组在 0 h、6 h 和 7 d 溶菌酶 mRNA 的相对表达量与对照组差异不显著($P<0.05$); 在 6 h、12 h、18 h、24 h、36 h、48 h 和 72 h 的溶菌酶 mRNA 的相对表达量均显著高于对照组, 其基

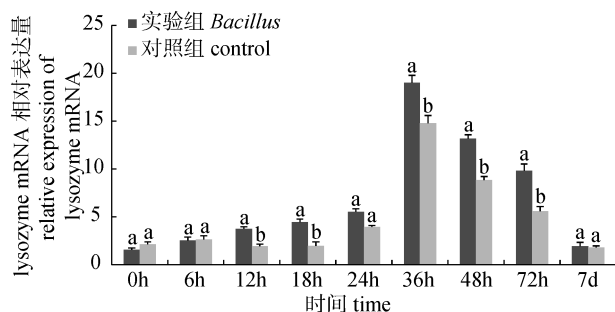


图 1 凡纳滨对虾感染哈维氏弧菌后鳃组织溶菌酶 mRNA 的相对表达量

同一时间不相同字母表示差异显著 ($P<0.05$).

Fig. 1 Relative expression of lysozyme mRNA in the gill of *L. vannamei* during *Vibrio harveyi* infection
Values with different letters on the same time indicate significant difference ($P<0.05$).

因表达量分别是对照组的 1.96、2.23、1.40、1.29、1.49、1.76、1.08 倍。

2.3.2 凡纳滨对虾感染哈维氏弧菌后鳃组织 Toll 受体 mRNA 相对表达量 使用实时荧光定量 RT-PCR 方法测定的实验组和对照组在感染哈维氏弧菌后鳃组织 Toll 受体 mRNA 相对表达量的变化见图 2。投喂含有地衣芽孢杆菌的实验组感染哈维氏弧菌后在 6 h、12 h、18 h、24 h、36 h、48 h、72 h、7 d 的 Toll 受体 mRNA 的相对表达量均显著高于 0 h ($P<0.05$), 36 h 达到峰值之后开始下降, 在 48 h 时的相对表达量高于 24 h, 是 24 h 表达量的 1.20 倍; 投喂普通饲料的对照组感染哈维氏弧菌后在 6 h、12 h、18 h、24 h、36 h、48 h、72 h、7 d 的 Toll 受体 mRNA 的相对表达量均显著高于 0 h ($P<0.05$), 36 h 达到峰值之后开始下降, 在 24 h 时的表达量高于 48 h, 是 48 h 表达量的 1.64 倍。在 0 h、12 h、7 d 实验组的 Toll 受体 mRNA 的相对表达量与对照组差异不显著 ($P>0.05$), 实验组在 18 h、24 h、36 h、48 h、72 h 的 Toll 受体 mRNA 的相对表达量均显著高于对照组, 其基因表达量分别是对照组的 1.76、1.24、1.53、2.43、1.77 倍。对照组在 6 h 的 Toll 受体 mRNA 的表达量显著高于实验组, 其基因表达量是实验组的 1.39 倍。

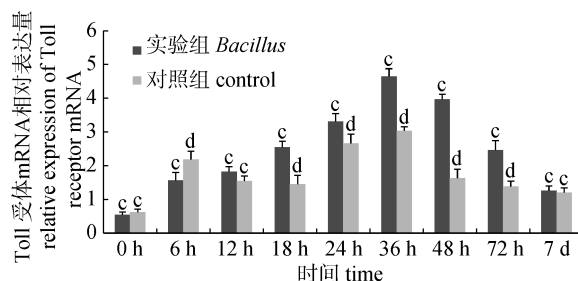


图 2 凡纳滨对虾感染哈维氏弧菌后鳃组织 Toll 受体 mRNA 的相对表达量

同一时间组字母不相同表示差异显著 ($P<0.05$).

Fig. 2 Relative expression of Toll receptor mRNA in the gill of *L. vannamei* during *Vibrio harveyi* infection
Values with different letters on the same time indicate significant difference ($P<0.05$).

3 讨论

哈维氏弧菌是一种可发光的革兰氏阴性菌, 广泛分布于海洋环境中, 是水产养殖动物中的条件致病菌^[23]。哈维氏弧菌可以感染多种虾类、贝类及鱼类并造成大量死亡, 对水产养殖业造成大量损失^[24-26]。哈维氏弧菌主要是通过分泌胞外蛋白酶、磷脂酶、溶血素以及密度感应系统对水产养殖动物产生致病作用, 并造成大量死亡^[27-31]。本文养殖实验的对照组在感染哈维氏弧菌后在第 9 天全部死亡, 投喂含有地衣芽孢杆菌的实验组的死亡率为 $(77.78\pm 3.14)\%$, 免疫相对保护率为 $(22.22\pm 3.14)\%$, 实验结果表明在饲料中添加地衣芽孢杆菌可有效提高抗哈维氏弧菌感染的能力。

芽孢杆菌是一类好氧或兼性厌氧的革兰氏阳性细菌, 被公认为一种有发展前景的益生菌^[32]。Zokaeifar 等^[33]指出, 在饲料中添加枯草芽孢杆菌 L10 和 G1, 使用的剂量分别为 10^5 CFU/g (BM5) 和 10^8 CFU/g (BM8) 饲喂 8 周后感染哈维氏弧菌, 对照组的累计死亡率为 60%, 而 BM5 和 BM8 的累计死亡率分别为 20.0% 和 33.3%。胡毅等^[34]报道了在饲料中添加地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌以及复合益生菌进行投喂实验, 结果表明在饲料中添加益生菌可以有效提高凡纳滨对虾生长率、存活率以及显著降低对虾肠道和粪便中弧菌属细菌数量 ($P<0.05$)。于明超等^[35]在饲料中添加 0.10%

中草药制剂和 0.15%芽孢杆菌投喂凡纳滨对虾 56 d 后测定对虾肠道异养细菌和弧菌数量, 对照组的异养细菌和弧菌数量分别 4.12×10^8 CFU/g 和 1.49×10^8 CFU/g, 添加 0.10%中草药制剂和 0.15%芽孢杆菌的实验组的异养细菌和弧菌数量分别为 1.37×10^7 CFU/g 和 1.09×10^7 CFU/g 均显著低于对照组 ($P < 0.05$)。本研究使用含有地衣芽孢杆菌的饲料投喂凡纳滨对虾, 在养殖期间实验组的对虾肠道弧菌数均显著低于对照组 ($P < 0.05$), 与上述报道结果相一致。

溶菌酶广泛存在于原核生物和真核生物中, 是机体抗菌先天免疫的效应因子, 能够水解细菌细胞壁肽聚糖中 N-乙酰葡萄糖胺与 N-乙酰胞壁酸之间的 β -1, 4-糖苷键, 使细菌裂解^[36-37]。Wang 等^[38]用哈维氏弧菌(8.3×10^3 CFU/g 虾)感染凡纳滨对虾(10~12 g), 发现在感染 36 h 后对虾血细胞中溶菌酶 mRNA 的相对表达量显著性升高。Toll 受体在无脊椎动物中先天免疫保护起到重要作用, 参与机体 Toll 信号途径的传递, 将病原入侵的信号传递到细胞内, 引起细胞内一系列的级联反应, 诱导抗菌肽等免疫基因的表达^[39-40]。曹煜成等^[41]根据芽孢杆菌的使用量设置测试 1 组(LDG, 用菌量 2.0×10^3 CFU/mL), 测试 2 组(HDG, 用菌量 1.0×10^4 CFU/mL)及未使用芽孢杆菌的对照组(CG), 结果表明对虾肝胰腺 Toll 基因 mRNA 表达量在 LDG 组和 HDG 组分别较 CG 组提高了 410.05%和 78.31%。孙艳等^[20]报道指出在饲料中添加复合益生菌可以显著上调对虾血淋巴的 proPO、SOD 和溶菌酶基因的 mRNA 的相对表达量。本实验中凡纳滨对虾鳃组织中 Toll 受体和溶菌酶 mRNA 的相对表达量均在 36h 达到峰值且显著高于对照组($P < 0.05$), 非特异性免疫基因 Toll 受体和溶菌酶 mRNA 的相对表达量显著上调, 与上述报道结果相一致。

综上所述, 本研究证实, 在饲料中添加地衣芽孢杆菌可有效提高凡纳滨对虾抗哈维氏弧菌感染的能力, 能显著降低对虾肠道内的弧菌数, 且溶菌酶和 Toll 受体 mRNA 的相对表达量一定程度上高于对照组。该株地衣芽孢杆菌可以作为益生

菌候选菌株应用于对虾养殖生产, 成为防治对虾弧菌病的有效途径之一。

参考文献:

- [1] Ballamoole K K, Vijaya K D, Juliet R M R, et al. Diversity of *Vibrio parahaemolyticus* associated with disease outbreak among cultured *Litopenaeus vannamei*(Pacific white shrimp) in India[J]. Aquaculture, 2014, 433: 247-251.
- [2] Austin B. Vibrios as causal agents of zoonoses[J]. Veterin Microbiol, 2010, 140(3-4): 310-317.
- [3] Liu H Y, Li Z, Tan B P, et al. Isolation of a putative probiotic strain S12 and its effect on growth performance, non-specific immunity and disease-resistance of whiteshrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2014, 41(2): 300-307.
- [4] Villaseñor L, Irasema E, Cervantes C, et al. Probiotics in the intestinal tract of juvenile white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*: modulation of the bacterial community[J]. World J Microbiol Biotech, 2013, 29(2): 257-265.
- [5] Subuntith N, Sunisa S, Traimat B, et al. Potential Bacillus probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)[J]. Veterin Microbiol, 2012, 159(3-4): 443-450.
- [6] Liu Z Y, Liu Y, Bao X B, et al. Research advances in aquaculture probiotics[J]. Fisheries Science, 2010, 29(8): 501-503.[刘忠颖, 刘洋, 鲍相渤, 等. 水产养殖益生菌的研究进展[J]. 水产科学, 2010, 29(8): 501-503.]
- [7] Wang Y B, He Z L. Effect of probiotics on alkaline phosphatase activity and nutrient level in sediment of shrimp, *Penaeus vannamei*, ponds[J]. Aquaculture, 2009, 287(1): 94-97.
- [8] Newaj-Fyzul A, Al-Harbi A H, Austin B. Review: Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture[J]. Aquaculture, 2014, 431: 1-11.
- [9] Diego I, Paula D, Maria T M, et al. Potential environmental effects of probiotics used in aquaculture[J]. Aquacult Int, 2012, 20: 779-789.
- [10] Tania P S, Imanol R Z, Ignacio D B, et al. Probiotics in aquaculture: a current assessment[J]. Rev Aquacult, 2014, 6(3): 133-146.
- [11] Priyadarshini P, Deivasigamani B, Rajasekar T, et al. Probiotics in aquaculture[J]. Drug Invent Today, 2013, 5(1): 55-59.
- [12] Soudhi F, Izumi T T, Keiko K, et al. Protein purification cDNA cloning and gene expression of lysozyme from eri-silkworm, *Samia cynthia ricini*[J]. Comp Biochem Physiol, 2014, 167(1): 1-11.

- 2001, 128(4): 709–718.
- [13] Zhang H B, Tan H X, Wang X Q, et al. Expression of *Litopenaeus vannamei* lysozyme gene in *Escherichia coli* and evaluation of its lytic activity[J]. Marine Science, 2009, 33(1): 48–53.[张海波, 谭洪新, 王兴强, 等. 凡纳滨对虾溶菌酶基因在大肠杆菌中的表达和活性检测[J]. 海洋科学, 2009, 33(1): 48–53.]
- [14] Gao F Y, Ye X, Bai J J, et al. cDNA cloning and expression characterization of lysozyme gene in two freshwater prawn[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2005, 29(6): 615–620.[高凤英, 叶星, 白俊杰, 等. 两种沼虾溶菌酶基因 ORF 的克隆和罗氏沼虾溶菌酶基因的组织表达[J]. 水生生物学报, 2005, 29(6): 615–620.]
- [15] Huang X X, Luo C X, Guo T F, et al. Expression of Toll receptor and lysozyme Mrna among tissues of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2012, 21(1): 29–32.[黄旭雄, 罗词兴, 郭腾飞, 等. 凡纳滨对虾 Toll 受体和溶菌酶 mRNA 组织表达的差异研究[J]. 上海海洋大学学报, 2012, 21(1): 29–32.]
- [16] Yang L S, Yin Z X, Liao J X, et al. A Toll receptor in shrimp[J]. Mol Immunol, 2007, 44(8): 1999–2008.
- [17] Yang C, Zhang J, Li F, et al. A Toll receptor from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* responsive to *Vibrio anguillarum* infection[J]. Fish Shellfish Immunol, 2008, 24(5): 564–574.
- [18] Arts J A J, Cornelissen F H J, Cijssouw T, et al. Molecular cloning and expression of a Toll receptor in the giant tiger, *Penaeus monodon*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2007, 23(3): 504–513.
- [19] Li J Q, Tan B P, Mai K S. Study on the relationships between white spot syndrome virus outbreak in cultured shrimp (*Penaeus vannamei*) and the composition of aerobic heterotrophic bacterium communities in shrimp intestine[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2006, 15(1): 110–113.[李继秋, 谭北平, 麦康森. 白斑综合征病毒与凡纳滨对虾肠道菌群区系之间关系的初步研究[J]. 上海水产大学学报, 2006, 15(1): 110–113.]
- [20] Sun Y, Liu F, Song X L, et al. Effects of adding probiotics in the feed on non-specific immune gene expression and disease resistance of *Litopenaeus vannamei*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2012, 43(4): 846–851.[孙艳, 刘飞, 宋晓玲, 等. 饲料中添加益生菌对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)非特异免疫基因表达量和抗病力的影响[J]. 海洋与湖沼, 2012, 43(4): 846–851.]
- [21] Luo C X, Huang X X, Li S, et al. Expression of Toll receptor, IMD and lysozyme mRNA in the gills of the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) after acute challenge with *Vibrio alginolyticus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(1): 189–196.[罗词兴, 黄旭雄, 李桑, 等. 溶藻弧菌感染后凡纳滨对虾鳃组织免疫相关基因的表达[J]. 中国水产科学, 2014, 21(1): 189–196.]
- [22] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. Methods, 2001, 254: 402–408.
- [23] Alvarez J D, Austin B, Alvarez A M, et al. *Vibrio harveyi*: a pathogen of penaeid shrimps and fish in Venezuela[J]. J Fish Dis, 1998, 21(4): 313–316.
- [24] Liu W, Qian D, Yang G L, et al. A study on the pathogen of luminous bacterial disease of *Penaeus vannamei* post-larvae during desalinization[J]. Journal of Jimei University: Natural Science, 2004, 9(4): 300–304.[刘问, 钱冬, 杨国梁, 等. 南美白对虾育苗淡化期间发光病原研究[J]. 集美大学学报: 自然科学版, 2004, 9(4): 300–304.]
- [25] Wang B K, Yu J H, Li J, et al. Isolation and identification of pathogen (*Vibrio harveyi*) from sea perch, *Lateolabrax japonicus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2002(1): 52–55.[王保坤, 余俊红, 李筠, 等. 花鲈弧菌病原菌(哈维氏弧菌)的分离与鉴定[J]. 中国水产科学, 2002(1): 52–55.]
- [26] Pass D A, Dybdahl R, Mannion M M. Investigations into the causes of mortality of the pearl oyster, *Pinctada maxima* (Jamson), in Western Australia[J]. Aquaculture, 1987, 65: 149–169.
- [27] Zhang X H, Zhong Y B, Chen J X. The Biological Characteristics, Epidemiology and Detection Techniques of *Vibrio harveyi*[J]. 2007, 37(5): 740–748.[张晓华, 钟英斌, 陈吉祥. 哈维氏弧菌的生物学特性、流行病学及检测技术[J]. 中国海洋大学学报, 2007, 37(5): 740–748.]
- [28] Shen J Y, Li X H, Pan X Y, et al. Characterization of major virulent factor produced by pathogenic *Vibrio harveyi*[J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences), 2011, 37(2): 142–148.[沈锦玉, 李新华, 潘晓艺, 等. 哈维氏弧菌的主要致病因子及其特性分析[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2011, 37(2): 142–148.]
- [29] Bai F F, Zhang X H. Studies on the effect of quorum sensing systems of *Vibrio harveyi* on the activities of extracellular enzymes[J]. Periodical of Ocean University of China, 2010, 40(6): 91–95.[白方方, 张晓华. 哈维氏弧菌密度感应系统对几种胞外酶的活性影响[J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2010, 40(6): 91–95.]
- [30] Chen J X, Y H, Yan X H, et al. Cloning of hemolysin gene from a pathogenic *Vibrio harveyi* SF1 and its detection in diseased marine animals and marine environments[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2005, 12(5): 580–587.[陈

- 吉祥, 杨慧, 颜显辉, 等. 致病性哈维氏弧菌溶血素基因克隆及其检测[J]. 中国水产科学, 2005, 12(5): 580–587.]
- [31] Zhong Y, Zhang X H, Chen J, et al. Overexpression, purification, characterization and pathogenitity of *Vibrio haveyi* haemolysin VHH[J]. Infect Immun, 2006, 74: 6001–6005.
- [32] Nayak S K. Probiotics and immunity: A fish perspective[J]. Fish Shellfish Immunol, 2010, 19(1): 2–14.
- [33] Zokaeifar 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: 683–689.
- [34] Hu Y, Tan B P, Mai K S, et al. Effects of dietary probiotic on growth, immunity and intestinal bacteria of juvenile *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15(2): 245–251.[胡毅, 谭北平, 麦康森, 等. 饲料中添加益生菌对凡纳滨对虾生长、肠道菌群及部分免疫指标的影响[J]. 中国水产科学, 2008, 15(2): 245–251.]
- [35] Yu M C, Li Z J, Lin H Z, et al. Effects of dietary *Bacillus* spp. and traditional Chinese medicines on growth and intestinal bacterial flora of shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Tropical Oceanography, 2010, 29(4): 132–137. [于明超, 李卓佳, 林黑着, 等. 饲料中添加芽孢杆菌和中草药制剂对凡纳滨对虾生长及肠道菌群的影响[J]. 热带海洋学报, 2010, 29(4): 132–137.]
- [36] Chen Y, Jiang M F, Ye Y H, et al. Advances in the study of lysozyme[J]. Journal of Biology, 2009, 26(2): 64–66.[陈艳, 江明锋, 叶煜辉, 等. 溶菌酶的研究进展[J]. 生物学杂志, 2009, 26(2): 64–66.]
- [37] Burge E J, Madigan D J, Burnett L E, et al. Lysozyme gene expression by hemocytes of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after injection with *Vibrio*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2007, 22(4): 327–339.
- [38] Wang K H, Tseng C W, Lin H Y, et al. RNAi knock-down of the *Litopenaeus vannamei* Toll gene (LvToll) significantly increases mortality and reduces bacterial clearance after challenge with *Vibrio harveyi*[J]. Dev Comp Immunol, 2010, 34(1): 49–58.
- [39] Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity[J]. Nat Rev Immunol, 2001, 1(2): 135–145.
- [40] Ligoxygakis P, Pelte N, Hoffmann J A, et al. Activation of *Drosophila* Toll during fungal infection by a blood serine protease[J]. Science, 2002, 297(5578): 114–116.
- [41] Cao Y C, Wen G L, Zhang H J, et al. Effect of *Bacillus licheniformis* on mRNA expression of *Toll* and *HSP70* genes in *Litopenaeus vannamei*[J]. Chinese Journal of Microecology, 2013, 25(8): 882–886.[曹煜成, 文国樑, 张华军, 等. 地衣芽孢杆菌对凡纳滨对虾 *Toll* 和 *HSP70* 基因表达的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2013, 25(8): 882–886.]

Effects of adding probiotics on promoting intestinal bacteria, Toll receptors, and lysozyme immune gene expression and resistance to *Vibrio harveyi* in *Litopenaeus vannamei*

ZHANG Shengjing^{1,2}, ZHAO Xiaojin¹, SONG Xiaoling¹, WANG Chundi¹, LIU Wenliang¹, HUANG Jie¹

1. Key Laboratory for Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: The white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Decapoda, Penaeidae), is omnivorous, grows quickly, and has a low food nutrition demand, which has made it an economically important crustacean species in China. However, the single breed type and high-density culture can result in bacterial and viral disease outbreaks. *Vibrio* is the dominant bacteria in shrimp and causes disease when shrimp are immunocompromised. In this study, *L. vannamei* (initial body length, 7.90 cm±1.15 cm; initial body weight, 7.20 g±1.38 g) were purchased from Qingdao Baorong Aquaculture Co., Ltd. A 3-week feeding experiment and a 2-week *Vibrio harveyi* infection experiment were performed to evaluate the effects of adding the probiotic *Bacillus licheniformis* to feed on promoting intestinal bacteria, non-specific immune gene expression, and resistance to *V. harveyi*. The experimental shrimp were divided into control and experimental groups. Control group shrimp were fed commercial feed throughout the experiment, and the experimental group shrimp were fed the same feed supplemented with 1.0×10^8 CFU/mL *B. licheniformis*. The numbers of *Vibrio* and total intestinal bacteria in *L. vannamei* were checked every 7 days using 2216E and TCBS media. After 3 weeks of feeding, all shrimp were injected with 1.0×10^7 CFU/mL *V. harveyi* (50 µL; dose determined in preliminary experiment). Then, 6 h, 12 h, 18 h, 24 h, 36 h, 48 h, and 72 h, as well as 7 d later, three shrimp from each group were captured randomly to extract RNA from the gill. The RNA was reversed transcribed into cDNA and tested for lysozyme and Toll receptor expression levels. The cumulative mortality rate of the control group was 100%, and the cumulative mortality rate of the experimental group was 22.78% after 14 days. The relative protection ratio was 22.22%. The experimental feed significantly reduced the number of *Vibrio* in the shrimp intestine compared with that in the control group ($P < 0.05$). Relative lysozyme mRNA expression levels in the experimental group 12 h, 18 h, 24 h, 36 h, 48 h, and 72 h after the *V. harveyi* challenge were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$). Relative Toll receptor mRNA expression levels in the experimental group 6 h, 12 h, 18 h, 24 h, 36 h, 48 h, and 72 h, as well as 7 d after the *V. Harveyi* challenge were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$). These results indicate that adding *B. licheniformis* to shrimp feed effectively improved the ability of *L. vannamei* to resist a *V. harveyi* infection, possibly by reducing the number of *Vibrio* in the intestine and improving immune-related gene expression.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; probiotic; resistance to disease; immune gene; *Vibrio harveyi*

Corresponding author: SONG Xiaoling. E-mail: songxl@ysfri.ac.cn