

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.01358

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

李桂英^{1,2}, 宋晓玲², 孙艳^{1,2}, 麦康森¹, 谢国驹³, 黄捷²

1. 中国海洋大学教育部海水养殖重点实验室, 山东 青岛 266071;

2. 中国水产科学院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

3. 上海海洋大学, 上海 201306

摘要: 以基础饲料为对照组, 在基础饲料中分别添加坚强芽孢杆菌活菌 (*Bacillus firmus*)、坚强芽孢杆菌活菌(1.0×10^8 CFU/g)+美人鱼发光杆菌(*Photobacterium damsela*)灭活菌(1%)、坚强芽孢杆菌活菌(1.0×10^8 CFU/g)+溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)灭活菌(1%)配制 3 种免疫饲料。每组 3 个重复, 对个体质量为(3.2 ± 0.26) g 的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)进行了为期 30 d 的养殖实验。每 5 d 取样, 以血清中的酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)、一氧化氮合酶(NOS)、超氧化物歧化酶(SOD)和溶菌酶(UL)活性为免疫指标, 探讨了肠道益生菌及其灭活菌体作为免疫制剂对凡纳滨对虾非特异性免疫水平的影响; 在投喂免疫饲料后的第 16 天, 按 0.9 g/10 尾剂量, 直接投喂感染白斑综合征病毒(WSSV)对虾病料, 计算各实验组每天的累计死亡率, 分析肠道益生菌及其灭活菌体作为免疫制剂对凡纳滨对虾病毒感染能力的影响。结果显示: 添加益生菌的实验组对虾血清中 SOD、ACP、AKP 和 NOS 活性明显高于对照组($P < 0.05$), 特别是显著提高了对虾抗 WSSV 感染的能力。其中坚强芽孢杆菌活菌(1.0×10^8 CFU/g)和美人鱼发光杆菌灭活菌(1%)实验组的抗病病毒感染能力最强, 感染 WSSV 14 d 后累计死亡率为 10.71%; 而对照组为 64.28%。结论认为, 饲料中添加肠道益生菌及其灭活菌体能提高凡纳滨对虾非特异性免疫水平和抵抗疾病的能力, 有望作为新型对虾免疫增强剂应用于对虾养殖业。

关键词: 肠道益生菌; 凡纳滨对虾; 非特异性免疫; 抗病力; WSSV

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)06-1358-10

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)因其具有对环境适应性强, 生长速度快, 抗病能力强等优势成为我国养殖范围最广、产量最高的对虾种类。但频频发生的传染性疾病对产业发展构成了严重威胁, 其主要原因在于病原的广泛存在、养殖水环境的恶化, 以及对虾免疫力和抗病力的不足等。抗生素等化学药品的使用在一定程度上对部分疾病起到作用^[1], 但会造成病原体产生抗药性^[2], 残留药品污染水环境并杀害水中有益微生物, 产生二次污染和内源性感染^[3]。益生菌的使用不仅可以减少病害发生^[4], 还可以提高饲料利用率促进对虾生长^[5-6], 提高机体免疫力并减少养殖活

动给环境带来的污染等^[7-8]。益生菌的应用已成为目前水产养殖动物病害防控研究的热点^[9], 在鱼类中相关报道较多, Kozasa^[10]首次将益生菌应用于鱼类养殖, 用从土壤中分离的芽孢杆菌经培养后处理日本鳗鲡, 降低了由爱德华氏菌引起的死亡。Olsson 等^[11]已经证实了在扁鱼、大菱鲆、比目鱼的成鱼体内, 寄生的细菌可以抑制致病菌鳃弧菌的生长。Irene Salinas 等^[12]用乳酸菌, 德氏乳杆菌, 枯草芽孢杆菌及三者复合的益生菌制剂分别饲喂相同条件下的黑鲷属乌颊鱼, 以观察各种益生菌制剂所起到的免疫增强效果, 结果发现益生菌复合制剂的免疫增强作用最显著。Sharifuzzaman

收稿日期: 2011-01-20; 修订日期: 2011-03-28.

基金项目: 农业部公益性行业科研专项(201103034)资助.

作者简介: 李桂英(1985-), 女, 硕士研究生, 主要从事水产动物免疫学研. E-mail: lgytaqf@163.com

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

将分离自虹鳟肠道的外源益生菌 *Kocuiia*SM1 以约 10^8 cells/g 的饲料添加量投喂虹鳟, 并进行鳃弧菌感染, 结果表明, 投喂益生菌的虹鳟死亡率为 10%~28%, 显著低于对照组(73%~92%), 停喂益生菌 3 周后实验组的免疫活性显著高于对照组^[13]。Wang Yan-Bo^[14]研究了将益生菌 *Enterococcus faecium* ZJ4 每 4 天向罗非鱼养殖池投喂 1×10^7 CFU/ml, 40 d 后结果表明实验组罗非鱼的终体质量和日体重增加量(DWG)均显著高于对照组, 但血清总蛋白和白蛋白总量与对照组无显著差异。目前益生菌在对虾养殖生产中大多应用于水质调控和对养殖环境微生物群落的调节^[15], 而在饲料中添加来自对虾肠道的土著菌作为益生菌应用的研究报道较少^[5, 16-17]。Garriques 等^[18]将溶藻弧菌用于虾苗培养, 幼苗的生长率得到提高, 疾病的发生率和严重性均有所减少或降低, 结果为幼苗虾的培养过程中减少使用抗生素提供了明确的实验依据。Rengpipat 等^[5, 7]从斑节对虾(*Penaeus monodon*)体内分离到杆菌 S11, 培养后以活菌、活菌悬液(生理盐水)和冻干菌粉 3 种不同的形式加入到饲料中。致病菌哈维弧菌(*Vibrio harveyi*)感染虾体后, 用菌 S11 的处理组的存活率是 100%, 对照组是 26%, 但 3 种不同的处理其生长率和存活率没有明显的差异。Evelyn Bache`re^[19]研究发现, 在凡纳滨对虾幼体养殖中, 枯草芽孢杆菌可以控制致死率高达 100%的哈维弧菌。益生菌不论在鱼类还是在虾类养殖中的应用均存在候选益生菌株的缺乏和益生菌作用机理的不确定等问题。本研究在实验室前期研究^[20-21]的基础上, 将从健康对虾肠道分离鉴定出的 3 株益生菌通过一定的组合添加在基础饲料中, 探究其对凡纳滨对虾非特异性免疫力和抗病毒能力的影响, 为来自对虾自身的土著菌的益生作用提供实验依据, 同时在体液免疫水平上揭示其作用机理, 以期为该益生菌在对虾养殖中的应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 对虾 实验动物凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)购自青岛宝荣水产科技有限公司对虾

养殖场, 体质量(3.2 ± 0.26) g, 经对虾流行病病原检测试剂盒检测, 确认为 WSSV 阴性。对虾运回实验室暂养 7 d 后挑取个体均匀, 活力较强的 720 尾对虾分配到水族箱中, 共 4 组, 每组 3 个重复, 每个重复 60 尾。实验期间, 每日早上投喂前换水 1 次, 日换水量为 1/3; 每日投喂 3 次, 投喂前吸出残饵和粪便, 日投喂量为凡纳滨对虾体质量的 10%~15%(根据对虾摄食情况调节投喂量), 水温 23~28℃, 盐度(30 ± 1), pH 8.0 ± 0.2 , 连续充气。3 个免疫实验组采用间隔投喂(4 d 免疫饲料, 3 d 基础饲料, 7 d 1 个循环), 直至实验结束。

1.1.2 益生菌及其灭活菌 坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*)、美人鱼发光杆菌(*Photobacterium damsela*)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)由本实验室 2006 年分离自健康对虾消化道, 纯化后-80℃保存, 进行菌种活化和小规模发酵培养, 离心收集菌体, 坚强芽孢杆菌活菌量达到 1.0×10^{11} CFU/mL, 美人鱼发光杆菌和溶藻弧菌离心后进行细胞破碎后收集灭活菌体, 灭活菌添加量为其湿重占饲料重量的 1%。

1.1.3 实验饲料及分组 以投喂基础饲料^[21](含花生粉 250 g/kg, 豆粉 250 g/kg, 鱼粉 300 g/kg, 虾粉 100 g/kg, 面粉 30 g/kg, 复合维生素 10 g/kg, 维生素 C 2 g/kg, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2 g/kg, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3 g/kg, 褐藻酸钠 10 g/kg, 植物油 20 g/kg)为对照组, 实验组共 3 组, 单一组在基础饲料中只添加坚强芽孢杆菌(*B. firmus*)活菌(1.0×10^8 CFU/g), 复合组 1 在基础饲料中添加坚强芽孢杆菌活菌(1.0×10^8 CFU/g)和美人鱼发光杆菌(*P. damsela*)灭活菌(1%)、复合组 2 在基础饲料中添加坚强芽孢杆菌活菌(1.0×10^8 CFU/g)和溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)灭活菌(1%)。在基础饲料中添加上述益生菌制剂后分别配制成 3 种免疫饲料。各种原料分别粉碎过 80 目筛, 准确称重后逐级充分混匀, 以褐藻酸钠为黏合剂, 加适量水后用小型绞肉机挤压制成饲料, 在 37℃条件下烘干, 分袋包装后于 4℃冰箱中保存备用。

1.1.4 病料 感染用 WSSV 病料采自山东省潍坊市昌邑发病虾池, 经对虾流行病病原检测试剂盒

检测确认为 WSSV 阳性, 去除对虾头胸甲后将其充分剪碎并混匀成泥状, -80°C 保存。

1.2 样品采集与处理

实验开始后每 5 d 从各实验组随机取 10 ~ 15 尾对虾, 用一次性无菌注射器(1mL)从对虾围心腔内抽取血淋巴, 注入无菌的 1.5 mL 离心管, 4 冰箱过夜, 次日用无菌针头划破血凝块, 析出血清用于免疫指标的测定^[18]。

1.3 对虾非特异性免疫相关酶活性的测定

超氧化物歧化酶(SOD)、碱性磷酸酶(AKP)、酸性磷酸酶(ACP)、一氧化氮合酶(NOS) 和溶菌酶(UL)活力的测定均使用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒产品, 并参照试剂盒说明书进行操作。

1.4 WSSV 感染实验

通过感染预实验确定本批对虾病料有效感染量为 0.9 g/10 尾。在投喂免疫饲料后的第 16 天, 从各实验组中挑选出大小基本一致的 30 尾对虾进行感染实验, 每组 3 个重复。感染前 1d 停食, 次日上午进行感染实验, 投喂 -80°C 保存的对虾病料。感染实验期间, 养殖管理同前, 及时检出死亡对虾, 记录死亡时间和死亡数量, 14 d 后感染实验结束。

1.5 统计分析

本实验采用 SPSS16.0 软件对实验数据进行单因素方差(one-way ANOVA)分析, 当差异显著($P<0.05$)时用 Duncan 氏法作多重比较。

2 结果与分析

2.1 益生菌对凡纳滨对虾血清中超氧化物歧化酶(SOD)的影响

由图 1 可知, 在免疫阶段的 15 d 内复合组 1 和 2 的 SOD 活性呈升高趋势且均显著高于对照组($P<0.05$), 15 d 时达最大值, 进入感染阶段后复合组 1 和 2 的 SOD 活性先下降后升高且显著高于对照组($P<0.05$), 但感染结束时两实验组均与对照组无显著差异($P>0.05$)。单一组在整个实验阶段除免疫 15 d 时均显著高于对照组($P<0.05$), 但在免疫 15 d 和感染 5 d 时活性下降, 之后继续升高且高于免疫阶段。两复合组 SOD 活性变化较一致且显著优于对照组($P<0.05$), 单一组的 SOD 活性也有显著提高但略低于两复合组, 不同实验阶段各实验组之间的变化规律并不一致。各实验组 SOD 活性在感染后出现较大波动, 且在感染后 5 d 均有降低趋势, 之后大幅升高。结果表明, 饲料中添加益生菌及其灭活菌体可显著提高凡纳滨对

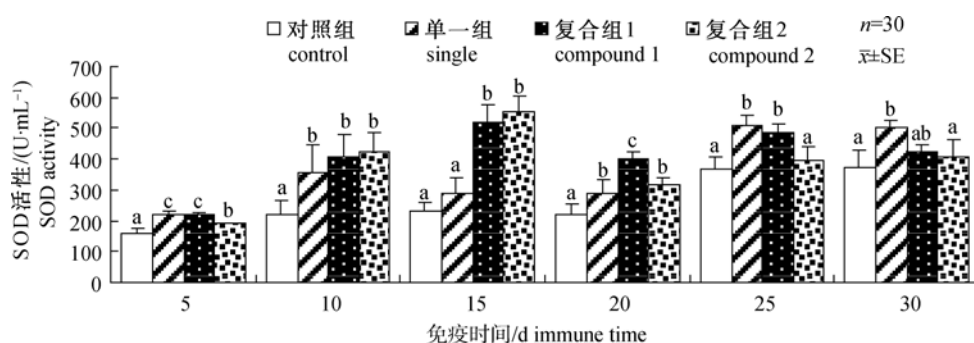


图 1 各实验组凡纳滨对虾血清超氧化物歧化酶活性

不含相同字母的组间差异显著($P<0.05$), 含相同字母的组差异不显著($P>0.05$). 对照组: 未添加益生菌制剂; 复合组 1: 坚强芽孢杆菌活菌(1.0×10^8 CFU/g)与美人鱼发光杆菌灭活菌(浓度为 1%)免疫组; 单一组: 坚强芽孢杆菌活菌(1.0×10^8 CFU/g)免疫组; 复合组 2: 坚强芽孢杆菌活菌(1.0×10^8 CFU/g)与溶藻弧菌灭活菌(浓度为 1%)免疫组。

Fig.1 Serum superoxide dismutase (SOD) activity of *Litopenaeus vannamei* in test groups

Values with different letters mean significant difference ($P<0.05$) between groups. Control: normal diet; Compound group one: immune group with addition of live *B. firmus* (1.0×10^8 CFU/g) and 1% inactivated *P. damsela*; single group: immune group with addition of live *B. firmus* (1.0×10^8 CFU/g); Compound group two: immune group with addition of live *B. firmus* (1.0×10^8 CFU/g) and 1% inactivated *V. alginolyticus*.

虾血清的 SOD 活性, 且复合组的效果优于单一组。

2.2 益生菌对凡纳滨对虾血清中碱性磷酸酶(AKP)的影响

由图 2 可知, 复合组 1 和 2 的 AKP 活性在整个实验阶段除免疫 25 d 时均显著高于对照组 ($P<0.05$), 并分别在实验的 20 d 和 15 d 升至最大值, 之后均降低但仍高于对照组。单一组的 AKP 活性在整个实验阶段均显著高于对照组 ($P<0.05$), 在免疫 10 d 时达最大值, 之后呈下降趋势, 免疫结束时至最低。各实验组的 AKP 活性均表现出

先升高后降低的趋势, 且在感染结束时达最小值。整个实验中各实验组 AKP 活性显著高于对照组 ($P<0.05$)。结果表明, 饲料中添加益生菌及其灭活菌体可以显著提高凡纳滨对虾血清 AKP 活性, 但复合组和单一组之间在不同的实验阶段呈现出不同的变化规律。

2.3 益生菌对凡纳滨对虾血清中酸性磷酸酶(ACP)的影响

由图 3 可知, 复合组 1 在整个实验阶段均显著高于对照组 ($P<0.05$), 在免疫 10 d 升至最大值

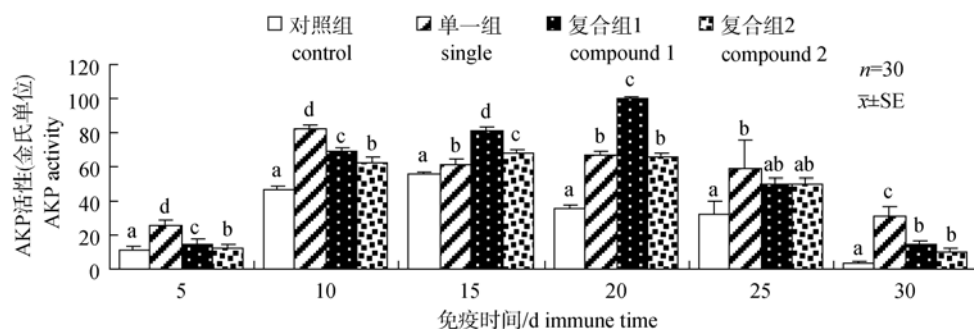


图 2 各实验组凡纳滨对虾血清碱性磷酸酶(AKP)活性

不含相同字母的组间差异显著 ($P<0.05$), 含相同字母的组差异不显著 ($P>0.05$). 对照组: 未添加益生菌制剂; 复合组 1: 坚强芽孢杆菌活菌 (1.0×10^8 CFU/g) 与美人鱼发光杆菌灭活菌 (浓度为 1%) 免疫组; 单一组: 坚强芽孢杆菌活菌 (1.0×10^8 CFU/g) 免疫组; 复合组 2: 坚强芽孢杆菌活菌 (1.0×10^8 CFU/g) 与溶藻弧菌灭活菌 (浓度为 1%) 免疫组。

Fig.2 Serum alkaline phosphatase (AKP) activity of *Litopenaeus vannamei* in test groups

Values with different letters mean significant difference ($P<0.05$) between groups. Control: normal diet; compound group 1: immune group with addition of live *B. firmus* (1.0×10^8 CFU/g) and 1% inactivated *P. damsela*; single group: immune group with addition of live *B. firmus* (1.0×10^8 CFU/g); compound group 2: immune group with addition of live *B. firmus* (1.0×10^8 CFU/g) and 1% inactivated *V. alginolyticus*.

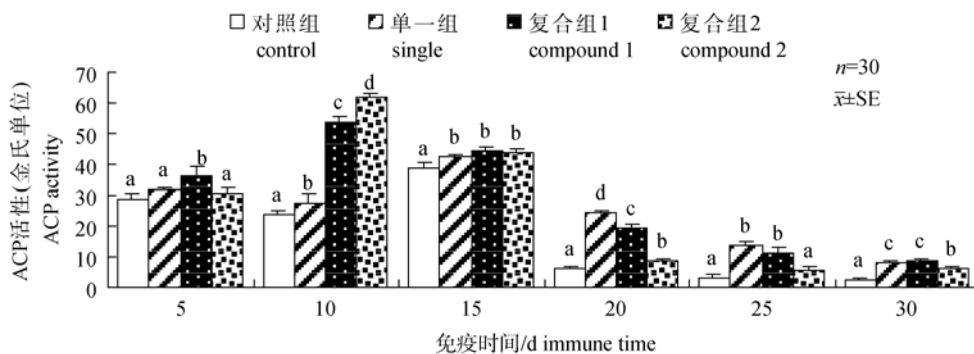


图 3 各实验组凡纳滨对虾血清酸性磷酸酶(ACP)活性

不含相同字母的组间差异显著 ($P<0.05$), 含相同字母的组差异不显著 ($P>0.05$). 对照组: 未添加益生菌制剂; 复合组 1: 坚强芽孢杆菌活菌 (1.0×10^8 CFU/g) 与美人鱼发光杆菌灭活菌 (1%) 免疫组; 单一组: 坚强芽孢杆菌活菌 (1.0×10^8 CFU/g) 免疫组; 复合组 2: 坚强芽孢杆菌活菌 (1.0×10^8 CFU/g) 与溶藻弧菌灭活菌 (浓度为 1%) 免疫组。

Fig.3 Serum acid phosphatase (ACP) activity of *Litopenaeus vannamei* in test groups

Values with different letters mean significant difference ($P<0.05$) between groups. Control: normal diet; compound group 1: immune group with addition of live *B. firmus* (1.0×10^8 CFU/g) and 1% inactivated *P. damsela*; single group: immune group with addition of live *B. firmus* (1.0×10^8 CFU/g); compound group 2: immune group with addition of live *B. firmus* (1.0×10^8 CFU/g) and 1% inactivated *V. alginolyticus*.

后持续下降至感染结束时达最小值。复合组 2 仅在免疫 5 d 和感染后 10 d 时与对照组无显著差异 ($P>0.05$), 其他实验阶段均显著高于对照组 ($P<0.05$), 该实验组也在免疫 10 d 升至最大值后又持续下降至感染结束时达最小值。单一组仅在免疫 5 d 时与对照组无显著差异 ($P>0.05$), 其他实验阶段均显著高于对照组 ($P<0.05$), 该实验组在免疫 15 d 升至最大值后又持续下降至感染结束时达最小值。在感染实验开始后各实验组的 ACP 活性均呈下降趋势且在感染结束时达最低, 但仍显著高于对照组 ($P<0.05$)。结果表明, ACP 活性受病毒感染影响较大但饲料中添加益生菌及其灭活菌体后可以显著提高其活性 ($P<0.05$), 复合组 ACP 活性达最大值的时间早于单一组。

2.4 益生菌对凡纳滨对虾血清中总一氧化氮合酶 (TNOS) 的影响

由图 4 可知, 复合组 1 的 TNOS 活性在免疫阶段和感染 10 d 均显著高于对照组 ($P<0.05$), 感染后 5 d 和 15 d 时与对照组无显著差异 ($P>0.05$), 在实验 10 d 时升至最大值后持续下降至感染 5 d 时达最小值, 之后有所升高但均低于最大值。复合组 2 在免疫 10 d 和感染 5 d 与对照组无显著差异 ($P>0.05$), 其他实验阶段均显著高于对照组 ($P<0.05$), 在感染 5 d 时降至最低后迅速升高至感

染 10 d 达最大值。单一组在免疫 5 d 和感染 5 d 与对照组无显著差异 ($P>0.05$), 其他实验阶段均显著高于对照组 ($P<0.05$)。整个实验阶段呈先下降后上升的趋势, 感染 5 d 达最小值, 感染结束时达最大值。结果表明, 在免疫阶段各实验组均有升高趋势, 但感染 5 d 时各实验组 TNOS 活性受病毒感染明显下降至最小值, 且各实验组与对照组无显著差异 ($P>0.05$)。说明饲料中添加益生菌及其灭活菌体可以提高凡纳滨对虾血清 TNOS 活性, 其中复合组的最大值高于单一组。

2.5 益生菌对凡纳滨对虾血清中诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 的影响

由图 5 可知, 在免疫阶段复合组 1 和 2 均呈现先下降后上升的趋势但均高于对照组, 在免疫 5 d 时达最大, 免疫 10 d 时达最小, 而单一组呈现出先升高后下降的趋势, 免疫 10 d 时达最大值。感染实验后各实验组 iNOS 活性显著下降, 感染 5 d 时达最小值, 之后有轻微的升高, 但感染期间各实验组 iNOS 活性仍高于对照组。整个实验中, 各实验组在不同的采样点也表现出与对照组的显著差异 ($P<0.05$)。结果表明, 饲料中添加益生菌及其灭活菌体对凡纳滨对虾血清 iNOS 的影响并未表现出一定的规律, 但整体上优于对照组。两复合组的变化表现出较高的一致性且达最大值时

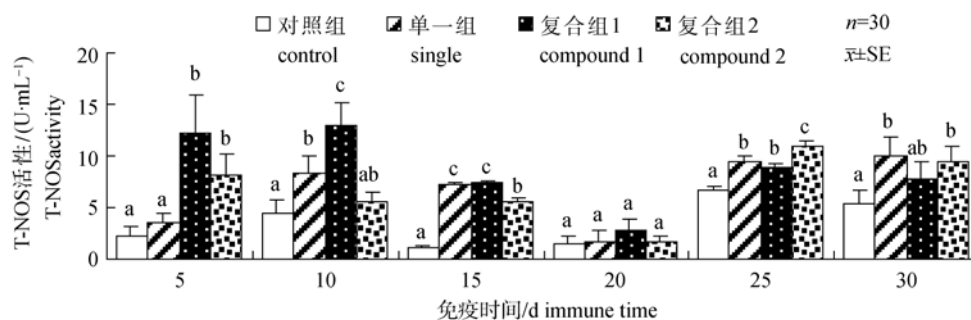


图 4 各实验组凡纳滨对虾血清总一氧化氮合酶 (TNOS) 活性

不含相同字母的组间差异显著 ($P<0.05$), 含相同字母的组差异不显著 ($P>0.05$)。对照组: 未添加益生菌制剂; 复合组 1: 坚强芽孢杆菌活菌 (1.0×10^8 CFU/g) 与美人鱼发光杆菌灭活菌 (浓度为 1%) 免疫组; 单一组: 坚强芽孢杆菌活菌 (1.0×10^8 CFU/g) 免疫组; 复合组 2: 坚强芽孢杆菌活菌 (1.0×10^8 CFU/g) 与溶藻弧菌灭活菌 (浓度为 1%) 免疫组。

Fig. 4 Serum total nitric oxide synthase (TNOS) activity of *Litopenaeus vannamei* in test groups

Values with different letters mean significant difference ($P<0.05$) between groups. Control: normal diet; compound group 1: immune group with addition of live *B. firmus* (1.0×10^8 CFU/g) and 1% inactivated *P. damsela*; single group: immune group with addition of live *B. firmus* (1.0×10^8 CFU/g); compound group 2: immune group with addition of live *B. firmus* (1.0×10^8 CFU/g) and 1% inactivated *V. alginolyticus*.

间早于单一组。

2.6 益生菌对凡纳滨对虾血清中溶菌酶(UL)的影响

由图 6 可知, 在免疫阶段, 各实验组的 UL 活性略高于对照组但无显著差异($P>0.05$), 感染后 5 d 各实验组 UL 活性均下降但除单一组外仍高于对照组, 但在感染结束时各实验组 UL 活性显著升高。结果表明, 饲料中添加益生菌及其灭活菌体对凡纳滨对虾血清溶菌酶活性无显著影响。

2.7 感染实验结果

由图 7 可知, 感染的前 4 d 各实验组与对照组

累计死亡率无显著差异($P>0.05$), 感染第 5 天以后各组的累计死亡率均呈显著的增长趋势。感染后第 6 天开始, 对照组的累计死亡率显著高于各实验组($P<0.05$), 9 d 后各实验组的累计死亡率趋于稳定。至感染结束对照组的累计死亡率($64.28\pm 12.8\%$)分别显著高于复合组 1 的累计死亡率($10.71\pm 7.1\%$), 单一组的累计死亡率($39.28\pm 12.9\%$)和复合组 2 的累计死亡率 ($26.19\pm 5.45\%$) ($P<0.05$)。结果表明, 单一组和复合组均可提高其抗 WSSV 感染的能力, 尤其是坚强芽孢杆菌活菌与美人鱼发

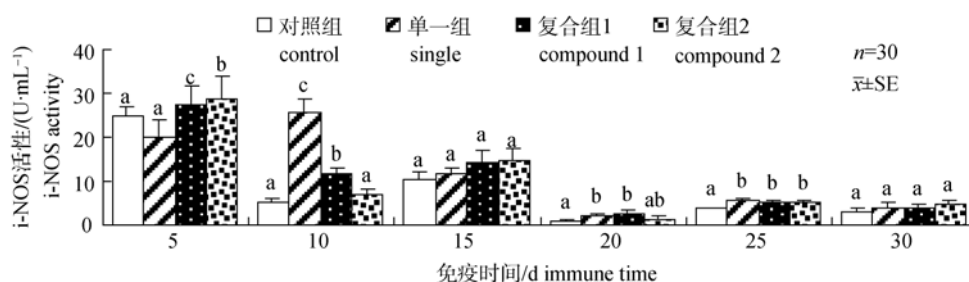


图 5 各实验组凡纳滨对虾血清诱导型一氧化氮合酶(iNOS)活性

不含相同字母的组间差异显著($P<0.05$), 含相同字母的组差异不显著($P>0.05$). 对照组: 未添加益生菌制剂; 复合组 1: 坚强芽孢杆菌活菌(1.0×10^8 CFU/g)与美人鱼发光杆菌灭活菌(浓度为 1%)免疫组; 单一组: 坚强芽孢杆菌活菌(1.0×10^8 CFU/g)免疫组; 复合组 2: 坚强芽孢杆菌活菌(1.0×10^8 CFU/g)与溶藻弧菌灭活菌(浓度为 1%)免疫组。

Fig.5 Serum inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity of *Litopenaeus vannamei* in test groups
Values with different letters mean significant difference ($P<0.05$) between groups. Control: normal diet; compound group 1: immune group with addition of live *B. firmus* (1.0×10^8 CFU/g) and 1% inactivated *P. damsela*; single group: immune group with addition of live *B. firmus* (1.0×10^8 CFU/g); compound group 2: immune group with addition of live *B. firmus* (1.0×10^8 CFU/g) and 1% inactivated *V. alginolyticus*.

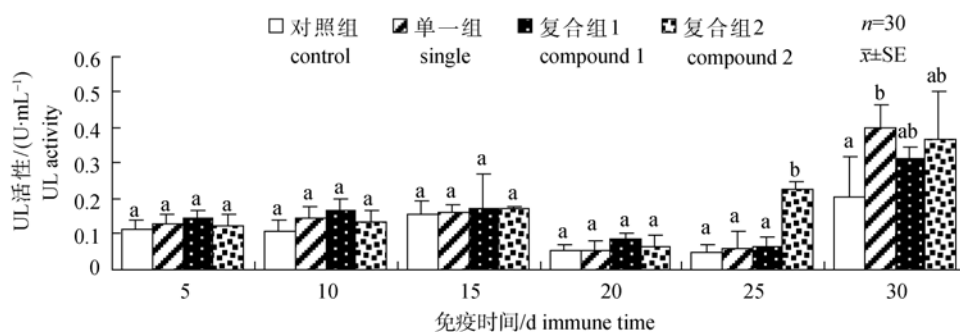


图 6 各实验组凡纳滨对虾血清溶菌酶(UL)活性

不含相同字母的组间差异显著($P<0.05$), 含相同字母的组差异不显著($P>0.05$). 对照组: 未添加益生菌制剂; 复合组 1: 坚强芽孢杆菌活菌(1.0×10^8 CFU/g)与美人鱼发光杆菌灭活菌(浓度为 1%)免疫组; 单一组: 坚强芽孢杆菌活菌(1.0×10^8 CFU/g)免疫组; 复合组 2: 坚强芽孢杆菌活菌(1.0×10^8 CFU/g)与溶藻弧菌灭活菌(浓度为 1%)免疫组。

Fig.6 Serum lysozyme (UL) activity of *Litopenaeus vannamei* in test groups
Values with different letters mean significant difference ($P<0.05$) between groups. Control: normal diet; compound group 1: immune group with addition of live *B. firmus* (1.0×10^8 CFU/g) and 1% inactivated *P. damsela*; single group: immune group with addition of live *B. firmus* (1.0×10^8 CFU/g); compound group 2: immune group with addition of live *B. firmus* (1.0×10^8 CFU/g) and 1% inactivated *V. alginolyticus*.

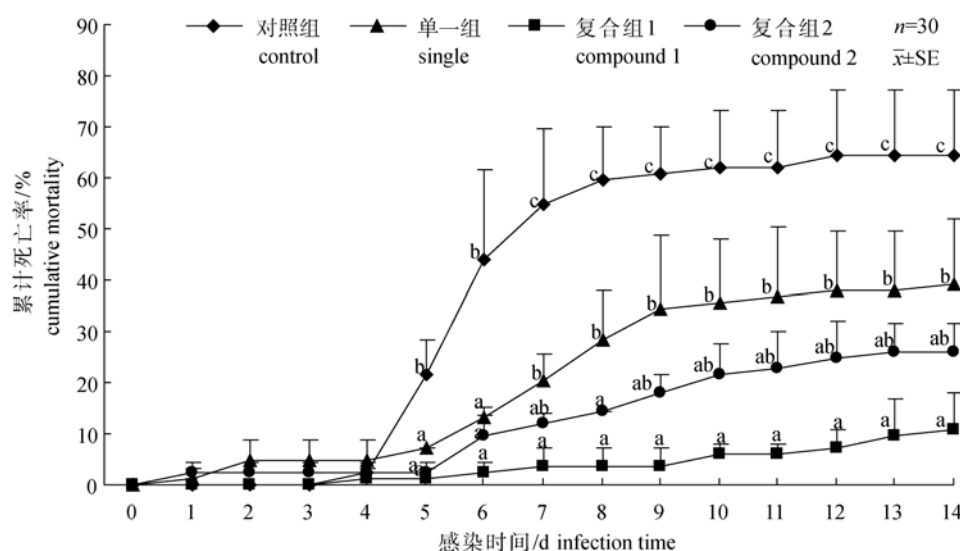


图 7 凡纳滨对虾感染 WSSV 后的累积死亡率

不含相同字母的组间差异显著($P < 0.05$), 含相同字母的组差异不显著($P > 0.05$). 对照组: 未添加益生菌制剂; 复合组 1: 坚强芽孢杆菌活菌(1.0×10^8 CFU/g)与美人鱼发光杆菌灭活菌(浓度为 1%)免疫组; 单一组: 坚强芽孢杆菌活菌(1.0×10^8 CFU/g)免疫组; 复合组 2: 坚强芽孢杆菌活菌(1.0×10^8 CFU/g)与溶藻弧菌灭活菌(浓度为 1%)免疫组.

Fig.7 Cumulative mortality of *L. vannamei* after challenged with WSSV

Values with different letters mean significant difference ($P < 0.05$) between groups. Control: normal diet; compound group 1: immune group with addition of live *B. firmus* (1.0×10^8 CFU/g) and 1% inactivated *P. damsela*; single group: immune group with addition of live *B. firmus* (1.0×10^8 CFU/g); compound group 2: immune group with addition of live *B. firmus* (1.0×10^8 CFU/g) and 1% inactivated *V. alginolyticus*.

光杆菌灭活菌配合使用效果更佳。

3 讨论

本实验所用坚强芽孢杆菌, 溶藻弧菌和美人鱼发光杆菌均分离自健康对虾消化道, 并通过安全性实验证实其对凡纳滨对虾无毒害作用^[22]。其中芽孢杆菌在水产养殖中的应用已较为广泛^[23-26], 其包含的作用机制有芽孢杆菌进入对虾肠道后利用表面抗原或代谢物不断刺激对虾的免疫防御系统, 同时通过与有害细菌争夺营养和附着位点, 保护机体免受病原菌的侵染, 来增强机体的非特异性免疫力^[23, 27-28]。溶藻弧菌广泛存在于世界各地海水及河口处, 以及海洋动物体表或消化道中, 并且数量居海水类弧菌之首。溶藻弧菌作为益生菌制剂已有多年的历史, 厄瓜多尔的许多对虾育苗场从 1992 年开始使用溶藻弧菌作为益生菌制剂, 缩短了孵化时间, 出苗量增加了 35%。Austin 等^[29]用分离的溶藻弧菌注射或浸浴鲑鱼时, 可抵抗致病性杀鲑气单胞菌、鳃弧菌和病毒鱼弧菌

等的感染, 而且该菌在鲑鱼的消化道能存活 21 天以上。Garriques 等^[18]报道溶藻弧菌可增加凡纳滨对虾仔虾成活率和体重, 降低对虾副溶血弧菌感染。Gatesoupe 等^[30]报道溶藻弧菌可提高大菱鲆幼体生长率, 降低幼体感染弧菌死亡率。当然溶藻弧菌作为病原菌的报道更多, 较多的学者认为溶藻弧菌是条件致病菌, 但也不排除菌株本身的基因型存在差异。近来一些学者发现, 溶藻弧菌中的某些蛋白经改造后作为疫苗对宿主有一定的保护作用^[31-32]。美人鱼发光杆菌在水产动物中的作用也颇受争议, 但其灭活菌株所含有的某些成分对对虾的非特异性免疫有一定的促进作用^[21]。已有研究表明复合益生菌比单一益生菌更有利于促进人体和养殖动物健康^[12, 33]。本实验中将坚强芽孢杆菌活菌, 和溶藻弧菌、美人鱼发光杆菌灭活菌按一定的剂量进行配伍后添加入基础饲料。本实验室前期研究表明坚强芽孢杆菌、溶藻弧菌和美人鱼发光杆菌以活菌和灭活菌形式添加在饲料中对凡纳滨对虾均有一定的益生菌作用, 但考

虑到溶藻弧菌和美人鱼发光杆菌多数情况下是条件致病菌, 若以活菌形式添加在饲料中投入养殖水体后其影响不可控制, 因而本实验将以上两种细菌灭活后与坚强芽孢杆菌配伍。

对虾主要依靠非特异性免疫来提高对疾病的抵抗力。超氧化物歧化酶、磷酸酶、溶菌酶及一氧化氮合酶是反映对虾免疫能力的重要指标, 在对虾防御反应中发挥重要作用。在本实验中, 益生菌对凡纳滨对虾超氧化物歧化酶、磷酸酶、溶菌酶和一氧化氮合酶活性都有不同程度的提高。其中除溶菌酶外其他酶活性个别组较对照组均达显著差异水平, 这与本课题之前的研究结果相一致^[21-22]。而过去有研究报道溶菌酶的变化在各实验组并没有明显变化且与对照组基本无显著差异^[34-35]。复合益生菌组有比单一益生菌组更高的免疫相关酶活力, 与 Salinas 等^[12]在乌鲷鱼中发现的芽孢杆菌和乳酸菌的复合菌比单一的芽孢杆菌和乳酸菌有更好的免疫效果相似。可见益生菌可以通过激发机体的体液免疫来增强机体免疫功能。其作用机理可能是通过细菌本身或细胞壁成分刺激非特异性免疫系统使其发挥作用, 从而可以作为良好的免疫增强剂提高动物免疫力。

对虾白斑综合征病毒(WSSV)具有极强的传染性和致病力, 已给世界各国对虾养殖业造成巨大经济损失, 同时也给海洋生态平衡带来一定的威胁。有研究表明, 一些海藻提取物和细菌胞外产物具有抗病毒活性, 但其作用机理还不明确。假单胞菌和棒状杆菌群抗传染性造血组织坏死病毒(IHNV)活性^[36]的研究, 莫拉克斯氏菌群的海洋细菌对小儿脊髓灰质炎病毒具有特异性^[37]和从斑节对虾养殖池分离出的两株弧菌 NICA 1030 和 NICA 1031 对 IHNV 和樱花钩吻鲑病毒(OMV)抗病毒活性^[38]的研究使我们更深入地了解到细菌对病毒的抵抗作用及其机理。根据对 WSSV 结构蛋白和功能基因的解析, 运用现代基因工程技术和分子生物学技术, 益生菌的抗病毒机理也在进一步明确。目前研究热点集中在益生菌激发宿主机体免疫, 影响非特异性免疫酶活, 调节机体免疫相关基因表达水平, 从而间接提高

了机体抗病毒的能力。感染实验的结果表明, 坚强芽孢杆菌活菌组和美人鱼发光杆菌灭活菌的实验组, 其累计死亡率最低。究其原因在于灭活细菌的细胞壁及其他细胞成分参与免疫调节起到免疫增强剂作用^[21], 与有益菌活菌的协同作用进一步提高了机体免疫力。另外两个实验组的累计死亡率均显著低于对照组, 说明单一组和复合组均可以提高对虾抗 WSSV 感染力。

益生菌对凡纳滨对虾非特异免疫力和抗病力的积极作用往往最终表现在对对虾生长的影响上, 但本实验的生长结果分析表明各实验组并无显著差异, 可能与养殖环境有关: 养殖温度没有达到对虾生长的适宜温度, 养殖在室内水族箱内进行与实际的室外养殖池有一定差异, 且养殖时间较短, 免疫两周后又进行 WSSV 病毒感染进一步导致对虾生长缓慢。

本研究结果表明, 饲料中分别添加不同配伍的 3 株肠道益生菌及其灭活菌体作为对虾免疫增强剂, 可以增强对虾的免疫力和抗 WSSV 病毒感染力, 且复合组的添加效果好于单一组。这为益生菌在对虾养殖中的推广应用提供了科学依据, 但活菌与灭活菌共同作用的免疫机理仍有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Li J Q, Tan B P, Mai K S. Comparative study between probiotic bacterium *Arthrobacter* XE-7 and chloramphenicol on protection of *Penaeus chinensis* post-larvae from pathogenic vibrios [J]. *Aquaculture*, 2006, 253(1-4): 140-147.
- [2] Nomoto K. Prevention of infections by probiotics [J]. *J Biosci Bioengin*, 2005, 100(6): 583-592.
- [3] Suzer C, Coban D, Kamaci H, et al. *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: Effects on growth performance and digestive enzyme activities [J]. *Aquaculture*, 2008, 280(1-4): 140-145.
- [4] Vaseeharan B, Ramasamy P. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2003, 36(2): 83-87.
- [5] Rengpipat S, Phianphak W, Piyatiratitivorakul S. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon*

- survival and growth [J]. Aquaculture, 1998, 167(3-4): 301-313.
- [6] Liu K F, Chiu C H, Shiu Y L. Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae[J]. Fish Shellf Immunol, 2010, 28(5-6): 837-844.
- [7] Rengpipat S, Rukpratanporn S, Piyatiratitivorakul S. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11)[J]. Aquaculture, 2000, 191(4): 271-288.
- [8] Wang Y, Zha L, Xu Z. Effects of probiotics on *Penaeus vannamei* pond sediments[J]. 应用生态学报, 2006, 17(9): 1765-1767.
- [9] Wang Y B, Li J R, Lin J. Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook[J]. Aquaculture, 2008, 281(1-4): 1-4.
- [10] Kozasa M. Toyocerin (*Bacillus stoyoi*) as growth promoter for animal reeding[J]. Microbiol Aliment Nutr, 1986, 4: 121-135.
- [11] Ollson J C, Westerdahl A, Conway pl et al. Intestinal colonization potential of turbot (*Scophthalmus maximus*) and dab (*Limandali manda*) associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*[J]. Appland Environ Micro, 2005, 58 (2): 551-556.
- [12] Salinas I, Abelli L, Bertoni F. Monospecies and multispecies probiotic formulations produce different systemic and local immunostimulatory effects in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.)(J). Fish Shellf Immunol, 2008, 25(1-2): 114-123.
- [13] Sharifuzzaman S M, Austin B. Development of protection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) to *Vibrio anguillarum* following use of the probiotic *Kocuria* SM1[J]. Fish Shellf Immunol, 2010, 29(2): 212-216.
- [14] Wang Y B, Tian Z Q, Yao J T. Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response[J]. Aquaculture, 2008, 277(3-4): 203-207.
- [15] Dalmin G, Kathiresan K, Purushothaman A. Effect of probiotics on bacterial population and health status of shrimp in culture pond ecosystem[J]. Indian J Exp Biol, 2001, 39(9): 939-942.
- [16] 李继秋.对虾微生态制剂的研究和应用[D].青岛: 中国海洋大学, 2004.
- [17] Gullian M, Thompson F, Rodriguez J. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*[J]. Aquaculture, 2004, 233(1-4): 1-14.
- [18] Garriques D, Arevalo G. An evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in commercial production of *Penaeus vannamei* post-larvae in Ecuador[J]. In: Browdy C L, Hopkins J S (Eds.), Swimming through Troubled Water. Proceedings of the Special Session on Prawn Farming, Aquaculture '95. World Aquaculture Society, 1995: 53-59.
- [19] Evelyne Bache`re. Anti-infectious immune effectors in marine: potential tools for disease control in larviculture[J]. Aquaculture, 2003, 227: 427-438.
- [20] 李海兵, 宋晓玲, 韦嵩, 等. 4 株对虾肠道益生菌的筛选及鉴定[J]. 海洋与湖沼, 2008(4): 374-380.
- [21] 兰萍, 宋晓玲, 张辉. 美人鱼发光杆菌对凡纳滨对虾非特异性免疫功能及抗病力的影响[J]. 渔业科学进展, 2010(1): 65-73.
- [22] 李海兵.对虾肠道益生菌的筛选与免疫物质活性评价指标的建立[D].青岛: 中国海洋大学, 2008.
- [23] Gomez G B, Roque A, Turnbull J F. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms [J]. Aquaculture, 2000, 191(1-3): 259-270.
- [24] 朱学芝, 郑石轩, 潘庆军. 芽孢杆菌对凡纳滨对虾免疫和生化指标的影响[J]. 饲料研究, 2007(4): 56-59.
- [25] Li K, Zheng T, Tian Y. Beneficial effects of *Bacillus licheniformis* on the intestinal microflora and immunity of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. Biotechnol Lett, 2007, 29(4): 525-530.
- [26] Ziaei N S, Rezaei M H, Takami G A. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*[J]. Aquaculture, 2006, 252(2-4): 516-524.
- [27] Gatesoupe F J. The use of probiotics in aquaculture[J]. Aquaculture, 1999, 180(1-2): 147-165.
- [28] Ninawe A S, Selvin J. Probiotics in shrimp aquaculture: avenues and challenges[J]. Crit Rev Microbiol, 2009, 35(1): 43-66.
- [29] Austin B, Stuckey L F, Robertson P A W, et al. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii* [J]. Fish Dis, 1995, 18: 93-96.
- [30] Gatesoupe F J. Siderophore production and probiotic effect of *Vibriosp.* associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*[J]. Aquat Living Resour, 1997, 10: 239-246.
- [31] Krupesha Sharma S R, Shankar K M, Sathyanarayana M L.

- Evaluation of immune response and resistance to diseases in tiger shrimp, *Penaeus monodon* fed with biofilm of *Vibrio alginolyticus* [J]. Fish Shellf Immunol, 2010, 29(5): 724–732.
- [32] Xiong X P, Zhang B W, Yang M J. Identification of vaccine candidates from differentially expressed outer membrane proteins of *Vibrio alginolyticus* in response to NaCl and iron limitation [J]. Fish Shellf Immunol, 2010, 29(5): 810–816.
- [33] 胡毅, 谭北平, 麦康森. 饲料中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, 02: 244–251.
- [34] 文国樑, 于明超, 李卓佳. 饲料中添加芽孢杆菌和中草药制剂对凡纳滨对虾免疫功能的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2009(2): 2181–2186.
- [35] 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.
- [36] Kamei Y, Yoshimizu M, Ezura Y, et al. Screening of bacteria with antiviral activity from fresh water salmonid hatcheries[J]. Microbiol Immunol, 1988, 32: 67–73.
- [37] Girones R, Jofre J T, Bosch A. Isolation of marine bacteria with antiviral properties [J]. Can J Microbiol, 1989, 35: 1015–1021.
- [38] Direkbusarakom S, Yoshimizu M, Ezura Y, et al. *Vibrio* spp. the dominant flora in shrimp hatchery against some fish pathogenic viruses [J]. Mar Biotechnol, 1998, 6: 266–267.

Effects of probiotics from the shrimp intestine on the non-specific immunity and antiviral capacity of *Litopenaeus vannamei*

LI Guiying^{1, 2}, SONG Xiaoling², SUN Yan^{1, 2}, MAI Kangsen¹, XIE Guosi³, HUANG Jie²

1. The Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education; Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

3. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: We evaluated the effects of probiotics on the non-specific immunity and antiviral capacity of *Litopenaeus vannamei*. We fed groups of shrimp (body weight 3.2 ± 0.26 g) a diet supplemented with either 1.0×10^8 CFU/g *Bacillus firmus* (live) plus 1% *Photobacterium damsela* (inactivated), 1.0×10^8 CFU/g *Bacillus firmus* (live), or 1.0×10^8 CFU/g *Bacillus firmus* (live) plus 1% *Vibrio alginolyticus* (inactivated). The control groups were fed a non-supplemented diet. Each diet was fed to triplicate groups of 60 shrimp that were reared in aquaria. We randomly selected 10 shrimp per group every 5 d and measured a range of humoral immune parameters (superoxide dismutase SOD, acidic phosphatase ACP, alkaline phosphatase AKP, nitric oxide synthase NOS and lysozyme UL) in each individual. The shrimp were challenged with white spot syndrome virus (WSSV) after two weeks. We then calculated the cumulative mortality of each experimental group. Supplementation with bacteria significantly increased serum SOD, ACP, AKP, and NOS compared with the controls. There was significantly lower cumulative mortality in shrimp that were fed the probiotics diet (10.7%, 39.3% and 26.2%, respectively) compared to the control (64.28%). Our results suggest that supplementing the diet with shrimp intestine probiotics improves immunity and the antiviral capacity of *Litopenaeus vannamei*.

Key words: intestinal probiotics; *Litopenaeus vannamei*; non-specific immunity; WSSV

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