

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.15118

养殖水体中添加蜡样芽孢杆菌 PC465 对凡纳滨对虾抗病力的影响

王春迪^{1,2}, 宋晓玲², 张晓静³, 张盛静^{1,2}, 孙新颖^{1,2}, 刘宝彬^{1,2}, 高文辉¹, 黄健²

1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

3. 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003

摘要: 将蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)PC465 添加到凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)养殖水体中至终浓度分别为 10^4 、 10^5 和 10^6 CFU/mL, 以无益生菌添加的养殖组为对照组, 定期检测实验对虾肠道和养殖水体中的细菌总数、弧菌总数以及水体中氨氮含量和亚硝酸氮含量。实验结果表明, 水体中添加益生菌能降低凡纳滨对虾肠道内细菌数量, 且与对照组相比差异显著($P<0.05$); 高浓度的益生菌处理组可以明显降低养殖水体内弧菌数量($P<0.05$), 但是益生菌并没有显著影响水体中的氨氮含量和亚硝酸氮含量。养殖 4 周后进行 WSSV 投喂感染实验, 感染实验表明, 实验组 H 组(益生菌浓度为 10^6 CFU/mL)和 M 组(益生菌浓度为 10^5 CFU/mL)凡纳滨对虾的累计死亡率分别为 63.9%和 74.6%, 显著低于对照组 100%的累计死亡率($P<0.05$)。感染实验期间采用荧光定量 PCR 方法测定了凡纳滨对虾 3 种免疫相关基因的表达情况, 统计数据显示, 益生菌处理组的脂多糖- β -1, 3-葡聚糖结合蛋白(lipopolysaccharide- β -1, 3-glucan-binding protein, LGBP)、 β -1, 3-葡聚糖结合蛋白-脂蛋白(beta-1, 3-glucan-binding protein-lipoprotein, β GBP-HDL)、热激蛋白 70(heat shock proteins, Hsp70) mRNA 的表达量在 WSSV 感染后呈显著上调趋势。实验结果提示, 水体中添加蜡样芽孢杆菌 PC465 可以提高凡纳滨对虾抗 WSSV 感染能力, 其作用机制可能是降低对虾肠道和养殖水体中的细菌和弧菌数量, 或调节免疫相关基因的表达水平。

关键词: 凡纳滨对虾; 蜡样芽孢杆菌; WSSV; 肠道菌群; 水质; 抗病力

中图分类号: S945

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)01-0146-11

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)是中国大陆规模养殖的主要经济虾类之一, 也是中国主要的出口创汇品种, 然而高密度的养殖模式和养殖品种单一等均会导致养殖生态环境失调^[1], 且养殖水环境富含各种微生物, 许多致病性细菌或病毒通过水体传播并引起虾病暴发。白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)和弧菌是常见的对虾病原, 两者均会引起养殖对虾大量死亡, 造成巨大的经济损失^[2]。

对虾与其他无脊椎动物一样, 缺乏特异性免疫系统, 以天然的免疫反应为主, 一些病毒虽然

能够诱导特异的免疫反应, 但这种保护作用并不能长久有效地进行^[3], 而过多地使用抗生素不仅会干扰养殖环境的微生物区系, 还会使细菌的耐药性增加。目前, 在对虾养殖生产中使用益生菌是一种有效且重要的疾病防治手段。对虾养殖中常用的益生菌有光合细菌属、酵母菌属、乳酸杆菌属、假单胞菌属和芽孢杆菌属细菌^[4]。将芽孢杆菌作为益生菌用于对虾养殖业已经取得了非常好的效果, 它可以通过抑制病原微生物, 提高消化酶的活性, 激活生长因子及提高机体免疫力等机制作用于对虾^[5]。蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)

收稿日期: 2015-03-26; 修订日期: 2015-06-10.

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(2012CB114405); 山东省自主创新专项(2013CXC80202).

作者简介: 王春迪(1991-), 硕士, 研究方向为对虾病害及其防控. E-mail: 393665047@qq.com

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

属于芽孢杆菌科(Bacillaceae), 芽孢杆菌属, 革兰氏染色阳性, 无荚膜, 兼性好氧, 存在于土壤、水、空气以及动物肠道等处, 是水产养殖中一种常用的益生菌^[6]。

益生菌有多种应用形式, 国外学者将益生菌加工成微胶囊形式和冻干粉形式应用于凡纳滨对虾幼虾, 探讨其对幼虾生长及水质的影响^[7]; 益生菌也可作为一种饲料补充剂优化虾的肠道内微生物菌群结构, 并通过提高虾体免疫力来提高其生长性能^[8], 然而, 将芽孢杆菌直接加入水体中作为免疫增强剂的方式并不多见。本研究以凡纳滨对虾为实验对象, 将不同浓度的蜡样芽孢杆菌直接加入水体中, 探讨该菌株对凡纳滨对虾肠道及水体内细菌数量的影响, 并通过之后的 WSSV 感染实验分析芽孢杆菌对宿主对虾免疫保护的效果, 同时应用荧光定量 PCR 技术, 探讨芽孢杆菌对凡纳滨对虾感染 WSSV 后相关免疫基因表达的影响, 以期为益生菌作用机制的研究以及该菌株在凡纳滨对虾养殖生产中的应用提供重要依据。

1 材料与方法

1.1 实验对虾及益生菌

实验对虾为凡纳滨对虾, 于 2014 年 7 月 25 日购自青岛市崂山区沙子口镇, 体长为 6~8 cm, 在水实验室整理箱内暂养 7 d 后进行养殖实验, 暂养期间, 随机取 5 尾对虾, 取对虾鳃组织经套式 PCR 检测为 WSSV 阴性。

蜡样芽孢杆菌 PC465(*Bacillus cereus*)由黄海水产研究所海水养殖生物疾病控制与分子病理实验室分离自健康凡纳滨对虾的肠道, 经鉴定后保存于-80℃冰箱中。

1.2 蜡样芽孢杆菌发酵液的制备

活化后的菌株在装有 200 mL 2216E 液体培养基的锥形瓶中 37℃ 培养 18 h, 培养物 5000 g 离心 10 min, 去除上清液, 用 PBS 重悬, 600 nm 下将吸光度调整为 1 左右(大约为 10^8 CFU/mL), 再用 PBS 做系列稀释, 最后分别以终浓度 10^6 CFU/mL、 10^5 CFU/mL、 10^4 CFU/mL 加入到养殖水体中。

1.3 实验分组及日常管理

1.3.1 实验分组 将暂养的对虾随机分为 16 组, 每组 25 尾对虾, 分别置于容积为 30 L 的白色整理箱中, 其中有效水体体积为 20 L。按芽孢杆菌终浓度设置为 10^4 CFU/mL 组(L 组)、 10^5 CFU/mL 组(M 组)和 10^6 CFU/mL 组(H 组)3 个实验组和 1 个空白对照组, 每组 4 个重复。养殖实验共持续 30 d, 之后进行 WSSV 感染实验, 感染实验为期 15 d。

1.3.2 换水及管理 每天投喂 3 次, 时间为每日 8:00、12:00、18:00, 日投饵量为养殖对虾总体重的 3%。每日 8:00 换水 1 次, 换水前测量水温、pH 值等指标, 每次根据水质情况换水, 一般换水为水体体积的 1/3~1/2, 换水前吸出粪便和残饵。实验开始前一天加入培养的菌液至所需浓度, 之后每天换水后再补充一定量的菌液至所需实验浓度。每隔 5 天取水样在 2216E 培养基上涂布计数, 检测蜡样芽孢杆菌浓度是否符合要求。

1.4 凡纳滨对虾肠道及水体中细菌数量的变化

于实验开始后的第 10、20、30 天从 M 组及空白对照组分别取 3 尾对虾, 无菌操作将虾解剖并分离肠道, 加入 PBS 缓冲液后研磨, 再依次以 10 倍梯度稀释, 选取合适稀释度涂布至 2216E 和 TCBS 的平板, 37℃ 培养 24 h 后记录有效菌落的数量^[9]。

同时取 M 组水样 1 mL 置于无菌的离心管内, 梯度稀释后按同样的方法涂布至 2216E 和 TCBS 的平板, 将平板置于生化培养箱内 37℃ 培养 24 h, 统计并计算细菌总数及弧菌数。

1.5 氨氮和亚硝酸氮浓度的测定

在实验开始后的第 0、5、10、15、20、25 天于上午 8:00 分别于每个实验组取水样 5 mL, 以实验用海水为空白对照, 对水样进行氨氮含量、亚硝酸氮含量的测定, 其中氨氮采用纳氏试剂分光光度法测定(依据标准 GB7479-87)^[10], 亚硝酸氮采用盐酸-萘乙二胺分光光度法测定^[11]。

1.6 WSSV 感染实验

WSSV 病料来源于本实验室保存的感染 WSSV 后自然死亡的对虾, 通过预实验确定本批病料的有效感染剂量为 0.2 g/尾。在加入蜡样芽孢杆菌之后的第 31 天开始 WSSV 感染实验, 感染前

1 天停食, 次日早晨投喂 WSSV 病料, 30 min 后及时清除病料残饵, 每天及时检出并记录对虾死亡数量和死亡时间, 感染期间投喂及管理方法同上。

1.7 凡纳滨对虾相关免疫基因 mRNA 表达水平的测定

1.7.1 样品采集及处理 在 WSSV 感染后 0 h, 12 h, 24 h, 48 h, 96 h, 192 h 分别从各实验组随机取 2 尾活虾, 无菌操作取其鳃组织和肝胰腺组织, 在液氮中速冻, 然后迅速转移至-80℃冰箱中保存, 以上组织用于 LGBP、βGBP-HDL、Hsp70 这 3 种凡纳滨对虾免疫相关基因 mRNA 表达量的测定。

1.7.2 RNA 的提取及 cDNA 的合成 按 TRIZOL Reagent(Invitrogen)说明书进行总 RNA 的抽提, 用 Nanodrop 2000c(Thermo)测定 RNA 浓度, 并对 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 进行定量检测, 核酸电泳检测 RNA 的质量后保存于-80℃备用。

按照 PrimeScript™ RT reagent Kit With gDNAEraser (Perfect Real Time)试剂盒(TaKaRa 公司)说明书, 将提取的总 RNA 反转录为 cDNA: 在 1.5 mL 的无 RNA 酶离心管中加入 5×gDNA Eraser Buffer 2.0 μL, gDNA Eraser 1.0 μL, Total RNA 1 μL、并加入 RNase Free dH₂O 至 10 μL, 将体系置于 42℃, 2 min 去除基因组 DNA。再向反应液中加入 5×PrimeScript Buffer2 4.0 μL, PrimeScript RT Enzyme Mix 1.0 μL, RT PrimerMix 1.0 μL, RNase Free dH₂O 4.0 μL 至 20 μL, 于 PCR 仪上经 37℃, 15 min, 85℃, 5 s, 反转录为 cDNA 并测定其浓度后保存于-20℃备用^[12]。

1.7.3 实时荧光定量 PCR 检测基因表达 参照 GenBank 中凡纳滨对虾 LGBP、βGBP-HDL、Hsp70

3 种基因的相应序列用 Primer Premier 5.0 进行设计荧光定量所需引物, 以 β-Actin 为内参基因, 设计序列详见表 1, 引物均由上海生工生物工程有 限公司合成。扩增时加入等量模板, 扩增后进行 熔解曲线分析有无特异性扩增。

荧光定量 PCR 扩增体系及反应程序参考 SYBRPremix Ex Taq™II 说明书。反应体系为: 2× SYBR Premix Ex Taq II 10 μL, PCR Forward Primer 0.8 μL, PCR Reverse Primer 0.8 μL, cDNA 1.6 μL, H₂O 6.8 μL。预变性条件为: 95℃, 30 s, 1 个循环; PCR 反应: 95℃预变性 5 s; 60℃退火延伸 30 s, 40 个循环, 反应完成后进行熔解曲线分析, 反应程 序为 95℃, 0 s; 65℃, 15 s; 95℃ 0 s。每个组织的样 品设 3 个重复。对实验结果采用 2^{-ΔΔC_t} 法进行相 对定量分析^[13]。

1.8 数据处理与统计分析

实验数据采用 Excel 和 SPSS 软件辅助进行统 计分析, 数据取平均值±标准误($\bar{x} \pm SD$), 使用 SPSS(17.0)分析软件对数据进行单因素方差分析, 当差异显著时, 用 Duncan 检验法进行多重比较, 当 $P < 0.05$ 则认为差异显著。

2 实验结果与分析

2.1 蜡样芽孢杆菌处理期间凡纳滨对虾肠道和养 殖水体中细菌数量

M 组凡纳滨对虾在养殖期间其肠道内细菌总 数和弧菌总数如表 2 所示, 实验第 10 天, 凡纳滨 对虾肠道中细菌总数和弧菌总数并无明显差异 ($P > 0.05$); 在实验第 20 天, 添加芽孢杆菌 M 组对

表 1 实时荧光定量 PCR 中使用的引物序列^[14]
Tab. 1 Sequences of primer pairs used in real-time PCR^[14]

基因 gene	引物 primer	序列(5'-3') sequence(5'-3')	基因序列号 accession number	长度/bp length
看家基因 housekeeping gene	β-actin-F	CCACGAGACCACCTACAAC	AF300705	19
	β-actin-R	AGCGAGGGCAGTGATTTTC	AF300705	18
热休克蛋白 heat shock protein	Hsp70-F	CCTCCAGGACTTCTTCAACG	EF495128	20
	Hsp70-R	GGTCACGTCCAACAGCAAC	EF495128	19
脂多糖-β-1, 3-葡聚糖结合蛋白 lipopolysaccharide-β-1, 3-glucan-binding protein	LGBP-F	CATGTCCAAC TTCGTTTCAGA	AY723297	22
	LGBP-R	ATCACCGCTGGCATCTT	AY723297	18
β-1, 3-葡聚糖结合蛋白-脂蛋白 β-1, 3-glucan-binding protein-lipoprotein	βGBP-HDL-F	CTCCTCTCACTGGCTGGACT	AY249858	20
	βGBP-HDL-R	TGGCTTTCAGGTCTCCTTCT	AY249858	20

表 2 蜡样芽孢杆菌处理期间凡纳滨对虾肠道内可培养细菌总数和弧菌总数

Tab.2 Total bacterium counts (TBC) and *Vibrios* bacterium counts (VBC) in digestive tracts of *Litopenaeus vannamei* handled with or without probiotics

n=3; $\bar{x} \pm SD$

处理时间 treatment time	M 组 M group		对照组 control group	
	细菌总数/(CFU·g ⁻¹) TBC	弧菌总数/(CFU·g ⁻¹) VBC	细菌总数/(CFU·g ⁻¹) TBC	弧菌总数/(CFU·g ⁻¹) VBC
第 10 天 day10	(2.9±0.8)×10 ⁶	(2.0±0.6)×10 ⁴	(3.8±2.5)×10 ⁶	(8.0±2.8)×10 ⁴
第 20 天 day20	(1.2±0.6)×10 ⁶ *	(1.0±0.6)×10 ⁴	(3.1±2.9)×10 ⁸	(2.3±0.9)×10 ⁴
第 30 天 day30	(1.3±0.9)×10 ⁷ *	(5.5±2.1)×10 ⁴	(7.9±1.9)×10 ⁸	(6.2±2.83)×10 ⁴

注: *表示 M 组与对照组相比有显著差异($P<0.05$).

Note: * denotes significant difference between M group and control group($P<0.05$).

虾肠道内细菌总数为 $(1.2\pm0.6)\times10^6$ CFU/g, 显著低于对照组的 $(3.1\pm2.9)\times10^8$ CFU/g($P<0.05$); 在实验后期, 与对照组相比, 添加芽孢杆菌的 M 组中凡纳滨对虾肠道中的总细菌数为 $(1.3\pm0.9)\times10^7$ CFU/g, 也显著低于对照组的 $(7.9\pm1.9)\times10^8$ CFU/g($P<0.05$), 这说明添加到水体中的芽孢杆菌可以对凡纳滨对虾肠道内其他细菌起到一定的抑制效果, 特别是在第 20 天和第 30 天, 实验组的可培养细菌总数显著低于对照组, 但在整个养殖期间, 实验组和

对照组对虾肠道内弧菌数量并无显著区别。

蜡样芽孢杆菌处理期间养殖水体中的细菌总数和弧菌总数见表 3, 在整个养殖期间 M 组和对照组养殖水体中可培养细菌总数并无显著差异($P>0.05$)。实验前 20 天养殖水体的弧菌计数结果显示对照组和实验组的弧菌总数差异不大; 实验第 30 天, 实验组的水体中弧菌为 $(5.6\pm3.4)\times10^2$ CFU/mL, 显著低于对照组的 $(5.5\pm3.5)\times10^3$ CFU/mL($P<0.05$), 说明添加到水体中的蜡样芽孢杆菌对水体中弧菌有明显的抑制效果。

表 3 蜡样芽孢杆菌处理的养殖水体中可培养细菌总数和弧菌总数

Tab.3 Total bacterium counts (TBC) and *Vibrios* bacterium counts (VBC) in water handled with or without probiotics

n=3; $\bar{x} \pm SD$

处理时间 treatment time	M 组 M group		对照组 control group	
	细菌总数/(CFU·g ⁻¹) TBC	弧菌总数/(CFU·g ⁻¹) VBC	细菌总数/(CFU·g ⁻¹) TBC	弧菌总数/(CFU·g ⁻¹) VBC
第 10 天 day10	(2.1±1.3)×10 ⁶	(6.9±3.4)×10 ³	(1.7±1.6)×10 ⁶	(1.6±0.8)×10 ⁴
第 20 天 day20	(2.4±0.8)×10 ⁷ *	(1.3±0.9)×10 ³	(1.2±0.6)×10 ⁶	(7.9±4.7)×10 ³
第 30 天 day30	(3.6±1.8)×10 ⁶	(5.6±3.4)×10 ² *	(1.6±0.8)×10 ⁶	(5.5±3.5)×10 ³

注: *表示 M 组与对照组相比有显著差异($P<0.05$).

Note: * denotes significant difference between M group and control group($P<0.05$).

2.2 蜡样芽孢杆菌处理期间养殖水体的水质测定结果

2.2.1 不同时间养殖水体中氨氮浓度的测定结果

不同时间养殖水体中氨氮浓度的测定结果见图 1。由图中结果可知, 蜡样芽孢杆菌处理期间, 不同实验组养殖水体中的氨氮含量范围为 5.46~16.78 mg/L, 且随时间呈波动趋势, 养殖实验开始之后氨氮含量逐渐减小, 但在第 5 天之后又缓慢增加至最初状态, 第 10 天之后又开始逐渐降低, 至 15 天时达到整个养殖期间的最小值, 但随后又在不断增加, 在整个实验期间变化并不稳定, 且实验组与对照组相比氨氮含量差异并不显著, 各个实验组之间

差异也并不显著($P>0.05$)。

2.2.2 不同时间养殖水体中亚硝酸氮含量的测定结果

不同时间养殖水体中亚硝酸氮含量的测定结果见图 2。由图中结果可知, 蜡样芽孢杆菌处理期间, 不同实验组养殖水体中的亚硝酸氮含量范围为 0.12~5.22 mg/L, 在实验开始前 5 天波动较小, 5 天之后各实验组和对照组总体呈缓慢增长趋势, 但各实验组亚硝酸氮含量均低于对照组, 且在第 15 天时 3 个实验组的亚硝酸氮含量分别为 (2.84 ± 0.96) mg/L、 (1.93 ± 0.55) mg/L、 (1.53 ± 0.28) mg/L, 显著低于对照组的亚硝酸氮含量 (3.68 ± 0.06) mg/L($P<0.05$)。但各实验组之间亚硝酸氮含量差异并不

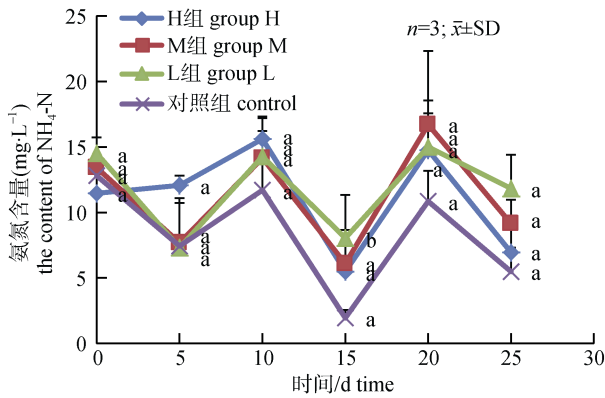


图 1 蜡样芽胞杆菌对养殖水体中氨氮的清除效果
同一时间点标有不同上标字母的各项间差异显著($P<0.05$)。H 组: 水体中益生菌浓度为 10^6 CFU/mL; M 组: 水体中益生菌浓度为 10^5 CFU/mL; L 组: 水体中益生菌浓度为 10^4 CFU/mL; 对照组: 水体中未添加益生菌。

Fig. 1 The effects of ammonia nitrogen removal from culture water by probiotics
Values in the same point without a common superscript are significantly different($P<0.05$). Group H: addition of *Bacillus cereus* with the content of 10^6 CFU/mL; Group M: addition of *Bacillus cereus* with the content of 10^5 CFU/mL; Group L: addition of *Bacillus cereus* with the content of 10^4 CFU/mL; Control: no addition of probiotics.

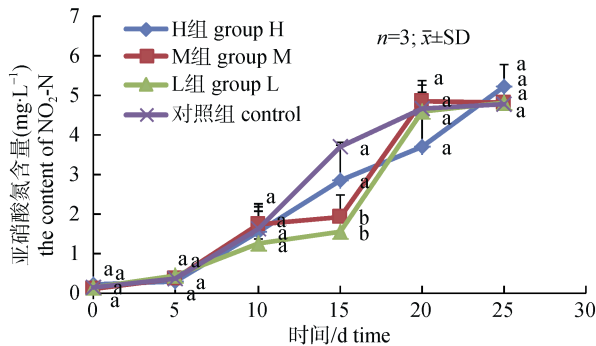


图 2 蜡样芽胞杆菌对养殖水体中亚硝酸氮的净化效果
同一时间点标有不同上标字母的各项间差异显著($P<0.05$)。H 组: 水体中益生菌浓度为 10^6 CFU/mL; M 组: 水体中益生菌浓度为 10^5 CFU/mL; L 组: 水体中益生菌浓度为 10^4 CFU/mL; 对照组: 水体中未添加益生菌。

Fig. 2 The effects of nitrite removal from culture water by probiotics
Values in the same point without a common superscript are significantly different($P<0.05$). Group H: addition of *Bacillus cereus* with the content of 10^6 CFU/mL; Group M: addition of *Bacillus cereus* with the content of 10^5 CFU/mL; Group L: addition of *Bacillus cereus* with the content of 10^4 CFU/mL; Control: no addition of probiotics.

显著($P>0.05$)。水体中亚硝酸氮的含量随养殖天数呈逐渐增加的趋势, 这可能是由于实验水体过

小, 而加菌量过大超过了水体的自净作用所致。

2.3 凡纳滨对虾感染 WSSV 后累计死亡率

凡纳滨对虾感染 WSSV 后的累计死亡率如图 3 所示, 感染后的前 5 天, 对照组与各实验组累计死亡率之间的差异并不显著($P>0.05$), 从感染后的第 6 至 10 天, 对照组和实验组的累计死亡率都呈显著增长的趋势, 而 H 组、M 组和对照组相比死亡率明显降低, 且差异显著($P<0.05$), 但 H 组、M 组和 L 组 3 个实验组之间差异并不显著($P>0.05$); 感染 10 d 之后, 凡纳滨对虾的累计死亡率逐渐趋于稳定; 最终 15 d 的感染实验结束后对照组的累计死亡率达到 100%, 显著高于 H 和 M 组两实验组的累计死亡率(分别为 63.9%和 74.6%)。以上结果表明, 用益生菌处理能显著降低凡纳滨对虾累计死亡率, 特别是蜡样芽胞杆菌添加浓度达到 10^6 CFU/mL 的实验组, 其累计死亡率在整个感染实验期间一直维持一个较低数值。

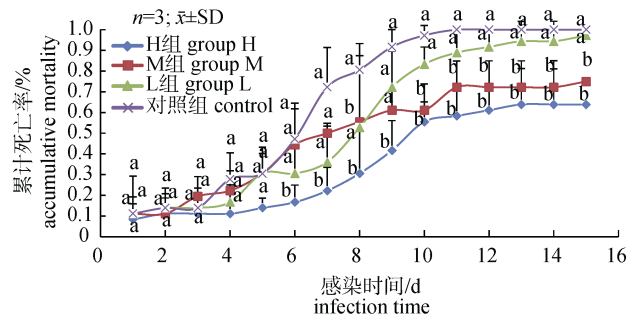


图 3 水体中添加蜡样芽胞杆菌对凡纳滨对虾感染 WSSV 后累计死亡率的影响

同一时间点标有不同上标字母的各项间差异显著($P<0.05$)。H 组: 水体中益生菌浓度为 10^6 CFU/mL; M 组: 水体中益生菌浓度为 10^5 CFU/mL; L 组: 水体中益生菌浓度为 10^4 CFU/mL; 对照组: 水体中未添加益生菌。

Fig. 3 Cumulative mortality of *Litopenaeus vannamei* handled with or without probiotic after challenging with WSSV
Values in the same point without a common superscript are significantly different($P<0.05$). Group H: addition of *Bacillus cereus* of the content of 10^6 CFU/mL; Group M: addition of *Bacillus cereus* of the content of 10^5 CFU/mL; Group L: addition of *Bacillus cereus* of the content of 10^4 CFU/mL; Control: no addition of probiotics.

2.4 凡纳滨对虾感染 WSSV 后免疫相关基因表达

2.4.1 凡纳滨对虾在感染 WSSV 后不同时间 LGBP 基因相对表达量 图 4 展示了不同实验组凡纳滨对

虾感染 WSSV 后在不同时间的 *LGBP* mRNA 的基因表达量。在整个实验期间, 添加益生菌的处理组 *LGBP* 的表达量有明显上调趋势。且在 48 h 各实验组 *LGBP* 的表达量均达到最大值, 分别为对照组的 3.64 ± 0.68 倍、 8.59 ± 0.56 倍和 6.35 ± 0.12 倍 ($P < 0.05$)。48 h 之后表达量开始逐渐下降, 但仍然显著高于对照组, 且高浓度实验组和低浓度实验组之间差异显著 ($P < 0.05$)。

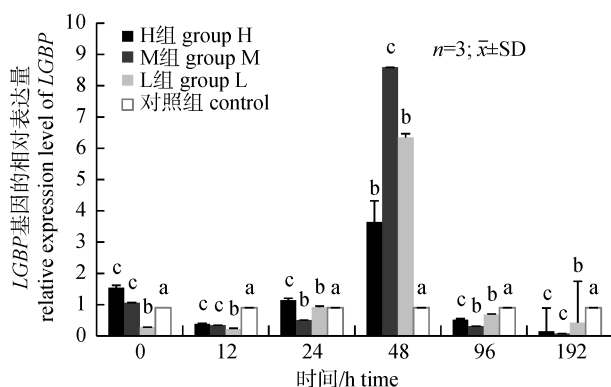


图 4 凡纳滨对虾感染 WSSV 后 *LGBP* 基因的相对表达量

同一时间上方不同字母代表各组有显著性差异 ($P < 0.05$); H 组: 水体中益生菌浓度为 10^6 CFU/mL; M 组: 水体中益生菌浓度为 10^5 CFU/mL; L 组: 水体中益生菌浓度为 10^4 CFU/mL; 对照组: 水体内未添加益生菌。

Fig. 4 The relative expression level of *LGBP* in different time of *Litopenaeus vannamei* after challenging with WSSV. Values in the same time without a common superscript are significantly different ($P < 0.05$); Group H: addition of *Bacillus cereus* of the content of 10^6 CFU/mL; Group M: addition of *Bacillus cereus* of the content of 10^5 CFU/mL; Group L: addition of *Bacillus cereus* of the content of 10^4 CFU/mL; Control: no addition of probiotics.

2.4.2 凡纳滨对虾感染 WSSV 后不同时间 β GBP-HDL 基因相对表达量 凡纳滨对虾感染 WSSV 后不同时间内 β GBP-HDL mRNA 的基因表达量如图 5 所示, 感染前 24 h 内, 各处理组的表达量呈逐渐减低趋势, 但 24 h 之后开始逐渐增加, 且表达量在 48 h 内达到最大值, 且各实验组均明显高于对照组 ($P < 0.05$)。在不同的时间段, 高浓度芽孢杆菌处理组的 β GBP-HDL 基因的相对表达量均高于低浓度的处理组, 且在 12 h、48 h 与其他处理组相比差异显著 ($P < 0.05$)。

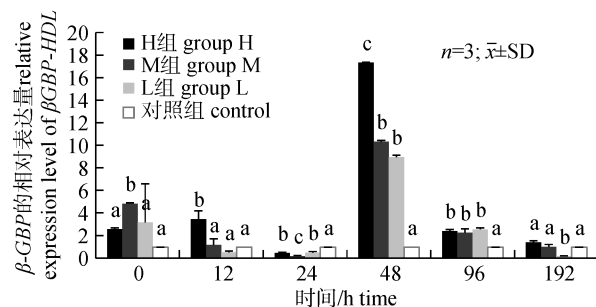


图 5 凡纳滨对虾感染 WSSV 后 β GBP-HDL 基因在不同时间的相对表达量

同一时间上方不具有相同字母的各组间有显著性差异 ($P < 0.05$)。H 组: 水体中益生菌浓度为 10^6 CFU/mL; M 组: 水体中益生菌浓度为 10^5 CFU/mL; L 组: 水体中益生菌浓度为 10^4 CFU/mL; 对照组: 水体内未添加益生菌。

Fig. 5 The relative expression level of β GBP-HDL in different time of *Litopenaeus vannamei* after the infection of WSSV. Values in the same time without a common superscript are significantly different ($P < 0.05$). Group H: addition of *Bacillus cereus* with the content of 10^6 CFU/mL; Group M: addition of *Bacillus cereus* with the content of 10^5 CFU/mL; Group L: addition of *Bacillus cereus* with the content of 10^4 CFU/mL; Control: no addition of probiotics.

2.4.3 凡纳滨对虾感染 WSSV 后不同时间 Hsp70 基因相对表达量 凡纳滨对虾感染 WSSV 后不同时间 Hsp70 基因的相对表达量如图 6 所示, 在感染 WSSV 的前 24 小时内, Hsp70 基因的相对表达量变化并不大, 各实验组和对照组之间差异并不显著 ($P > 0.05$); 但在第 96 小时, 3 个实验组的相对表达量分别为 2.97 ± 0.06 、 3.27 ± 0.63 和 2.91 ± 0.48 , 显著高于对照组 ($P < 0.05$), 但 3 个实验组之间并无显著性差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论

3.1 蜡样芽孢杆菌对凡纳滨对虾肠道及养殖水体中细菌数量的影响

养殖水体环境本身就是一个由多种微生物组成的动态平衡系统, 有益菌和有害菌共生^[15]。许多研究表明, 向水体添加有益微生物, 通过大量繁殖成为优势种群可抑制有害病菌的生长。李卓佳等^[16]报道芽孢杆菌可以通过改善微生物群落结构来改善水质, 从而提高虾的产量。黄建华等^[17]发现施用 3 mg/kg 芽孢杆菌制剂后, 对虾池中弧菌和异养细菌的数量显著低于不施用芽孢杆菌制剂

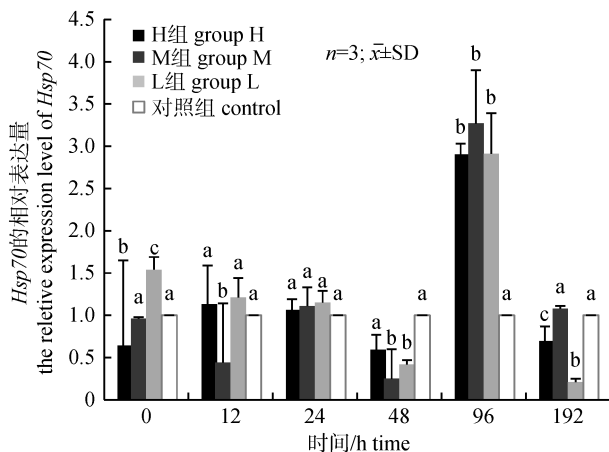


图 6 凡纳滨对虾感染 WSSV 后 *Hsp70* 基因的相对表达量
同一时间上方不同字母代表各组有显著性差异 ($P<0.05$)。H 组: 水体中益生菌浓度为 10^6 CFU/mL; M 组: 水体中益生菌浓度为 10^5 CFU/mL; L 组: 水体中益生菌浓度为 10^4 CFU/mL; 对照组: 水体内未添加益生菌。

Fig. 6 The relative expression level of the mRNA of *Hsp70* in different time of *Litopenaeus vannamei* after challenging with WSSV. Values in the same time without a common superscript are significantly different ($P<0.05$). Group H: addition of *Bacillus cereus* of the content of 10^6 CFU/mL; Group M: addition of *Bacillus cereus* of the content of 10^5 CFU/mL; Group L: addition of *Bacillus cereus* of the content of 10^4 CFU/mL; Control: no addition of probiotics.

的对照组。Boonthai 等^[18]认为无论是作为饲料添加剂还是水体添加剂, 益生菌都能在斑节对虾和凡纳滨对虾肠道中定植。

本实验的研究结果表明, 添加到水体中的益生菌能减少凡纳滨对虾肠道内总的细菌数量, 表明蜡样芽孢杆菌作为一种益生菌可以抑制对虾肠道内其他细菌的生长, 且添加芽孢杆菌显著降低了养殖水体中弧菌数量, 表现出其对弧菌的抑制作用, 这可能是因为蜡样芽孢杆菌的密度增大, 在水体中逐渐成为优势菌群, 通过竞争营养物质、生存空间等抑制了其他细菌的增长。也有学者认为益生菌在繁殖过程中, 会产生多种生物活性物质, 如抗菌蛋白等物质, 通过创造出一个阻止致病菌定植的环境条件, 从而抑制一些致病菌的繁殖^[19]。

3.2 蜡样芽孢杆菌对水质的影响

养殖水体中氨氮主要来源于含氮有机物的分解以及水生生物的分解, 氨氮含量过高时, 会消

耗水体中的溶解氧, 也易形成水华而使水质迅速恶化。且分子氨对水产养殖动物具有毒性, 浓度过高会抑制养殖动物的生长, 降低鱼虾的产卵能力, 严重时甚至会带来死亡^[20]。

亚硝酸盐作为硝化反应和反硝化反应过程中的产物, 是另一种具有潜在毒性的无机氮化合物, 一旦硝化反应不畅, 亚硝酸盐可在养殖水体中积累, 其含量的高低直接关系到水质好坏和育苗能否成功^[21]。且养殖水体中亚硝酸盐含量过高时, 会进入水生生物血液, 使得血红蛋白转变为高铁血红蛋白, 最终使得水生生物缺氧而窒息死亡。

在本实验中, 添加蜡样芽孢杆菌的实验组与对照组相比, 氨氮含量和亚硝酸氮含量并无明显差异, 这与益生菌能降低水体中氨氮和亚硝酸氮含量的研究结果不同, 可能是因为不同种类的益生菌对氨氮和亚硝酸氮的作用不同, 酵母属、乳酸菌属的益生菌分泌较少的胞外酶, 偏向利用小分子有机物为能源、碳源, 氨氮为氮源^[22]。而本实验采用的蜡样芽孢杆菌能分泌丰富的胞外酶, 在降解大分子有机物为小分子物质的过程中, 会释放多余的氨氮, 从而使得水体中氨氮含量增加; 也有可能是因为经常性换水, 使得实验组和对照组的氨氮及亚硝酸氮含量差别不大。虽然在本实验中, 对照组与实验组之间相比差异并不显著 ($P>0.05$), 即添加益生菌并未起到水质净化效果, 但是也无不良影响。刘飞等^[22]的实验也表明, 添加微生态制剂后, 益生菌组、芽孢杆菌组、光合细菌组池塘水中总氨氮提高 41%~99.8%, 亚硝酸氮水平有所升高, 但是对养殖动物来说并无危害。

3.3 水体中添加蜡样芽孢杆菌对凡纳滨对虾累积死亡率的影响

WSSV 感染实验采用饲喂攻毒的方式, 可以尽量减小感染对凡纳滨对虾造成的刺激, 从而降低实验误差。在养殖过程中可观察到高浓度益生菌处理组水质浑浊, 但是该实验组的凡纳滨对虾较对照组更活跃, 反应更为迅速。在实验过程中, 益生菌处理组凡纳滨对虾的摄食情况好于对照组, 且每日的饵料剩余量也明显小于对照组, 其后的

WSSV 投喂感染实验也证明, H 组、M 组实验组的累计死亡率为 64%、75%, 显著低于对照组(100%)。Zokaeifar 等^[23]将两种芽孢杆菌作为饲料添加剂投喂凡纳滨对虾, 8 周后注射哈维氏弧菌, 结果表明, 实验组的累计死亡率为 20.0%、33.3%, 显著低于对照组的 63.3%, 与本研究结果相近。

3.4 水体中添加蜡样芽孢杆菌对凡纳滨对虾感染 WSSV 后免疫相关基因表达的影响

Cheng 等^[24]认为, LGBP 是生物体对抗感染的一个重要免疫因子, 其通过激活 ProPO 系统发挥作用。Cheng 曾报道 LGBP 在对虾早期阶段在其免疫防御方面发挥重要作用, 凡纳滨对虾在感染溶藻弧菌后的 24 h, LGBP 的表达有明显上调趋势。本研究结果表明, 凡纳滨对虾在用蜡样芽孢杆菌处理后的水体中养殖 30 d 后, 在投喂感染 WSSV 后的 48 h, LGBP 的基因表达量达到最大值, 显著高于对照组, 且高浓度益生菌处理的效果也要好于低浓度的实验组。

β GBP-HDL 在对虾的肝胰腺、血细胞和肠中表达, 且在肝胰腺中的合成量最高, 在激活 ProPO 系统、凝结过程等方面都起着至关重要的作用^[25]。刘艳等^[2]曾报道凡纳滨对虾用含益生菌的饲料饲喂过程中 LGBP 和 β GBP 表达量的变化, 结果表明, 两种免疫蛋白的基因在 72 h 后达到最大值, 这与本次实验结果基本一致。

细胞在受热和其他应激反应后发生热休克反应, 生成热激蛋白, 其中以 Hsp70 最为重要, 正常情况下, Hsp70 基因在正常细胞中表达量较少, 而应激反应时 Hsp70 的表达水平升高, 且其升高程度与应激耐受能力呈正相关^[26]。一些国外学者研究表明, 凡纳滨对虾或者斑节对虾受到相关病毒或者细菌感染会引起鳃组织 Hsp70 表达的上调。本实验的研究结果表明, H 组、M 组、L 组 3 个实验组 Hsp70 基因在前 24 h 内表达量变化并不明显, 但在 96 h 上升至最大值, 大约为对照组的 3 倍, 说明不同免疫基因表达量与时间也有一定的关系。

3 种凡纳滨对虾免疫相关基因在对虾感染 WSSV 后都表现出了明显的上调趋势, 这些结果

都表明, 益生菌处理组能增强凡纳滨对虾相关免疫基因表达, 这可能是实验组凡纳滨对虾抗 WSSV 感染能力提高的原因之一。

4 结论

养殖水体中添加蜡样芽孢杆菌可以明显降低凡纳滨对虾肠道内的细菌数量和养殖水体弧菌数量, 且不会对水体中氨氮含量、亚硝酸盐含量造成压力; 养殖水体中添加蜡样芽孢杆菌可以明显提高凡纳滨对虾感染 WSSV 后的成活率, 且在感染实验后会刺激凡纳滨对虾鳃和肝胰腺组织的 LGBP、 β GBP-HDL、Hsp70 等免疫相关基因呈现上调表达。实验结果提示, 水体中添加蜡样芽孢杆菌 PC465 可以提高凡纳滨对虾抗 WSSV 感染能力, 其作用机制可能是降低对虾肠道和水体中的细菌和弧菌数量, 或调节免疫相关基因的表达水平。

参考文献:

- [1] Gatesoupe F J. The use of probiotics in aquaculture[J]. Aquaculture, 1999, 180(12): 147-165.
- [2] 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): 845-850.[孙艳, 刘飞, 宋晓玲, 等. 饲料中添加益生菌对凡纳滨对虾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): 845-850.]
- [3] Gao Y, Jin H Y, Wang W. Advances on antiviral immunity in shrimp[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2011, 23(12): 1297-1299.[高俱, 金黄英, 王蔚. 对虾抗病毒免疫研究现状[J]. 生命科学, 2011, 23(12): 1297-1299.]
- [4] Li G Y, Sun Y, Song X L, et al. Potential probiotics supplement may impact intestinal digestive enzyme and bacteria composition of *Litopenaeus vannamei*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2013, 34(3): 84-92.[李桂英, 孙艳, 宋晓玲, 等. 饲料中添加潜在益生菌对凡纳滨对虾肠道消化酶活性和菌群组成的影响[J]. 渔业科学进展, 2013, 34(3): 84-92.]
- [5] Karla LM, Antonio L G, Cesar E B, et al. Screening for potential probiotic bacteria to reduce prevalence of WSSV and IHNV in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under experimental conditions[J]. Aquaculture, 2011, 322: 16-22.
- [6] Qin Y, Li W F, Yu D Y. Optimization of fermentation conditions of *Bacillus cereus*[J]. Feed Industry, 2008, 29(2): 34-37.[秦艳, 李卫芬, 余东游. 蜡样芽孢杆菌发酵条件的

- 优化[J]. 饲料工业, 2008, 29(2): 34–37.]
- [7] 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): 443–450.
- [8] Wang Y B, Xu Z R. The effectiveness of commercial probiotics in northern white shrimp *Penaeus vannamei* ponds[J]. Fish Sci, 2005, 71(5): 1036–1041.
- [9] Farzanfar A. The use of probiotics in shrimp aquaculture[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2006, 48: 149–158.
- [10] Bi Y Z, Li G F, Li H Y, et al. Changing pattern of nitrite-nitrogen and ammonia-nitrogen in nursery tank water of the freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) and effect on the larvae[J]. Journal of South China Agricultural University, 2002, 23(2): 67–70.[毕英佐, 李桂峰, 李海燕, 等. 罗氏沼虾育苗水体氨氮、亚硝酸盐氮的变化规律及对幼体的影响[J]. 华南农业大学学报, 2002, 23(2): 67–70.]
- [11] Zhang X L, Yuan K P, Geng K, et al. Effect of aerobic denitrifying bacteria on water quality and cyprinid feeding effect[J]. Journal of Hydroecology, 2011, 32(3): 114–119.[张小玲, 袁科平, 耿康, 等. 好氧反硝化菌对水质和鱼体饲喂效果的影响研究[J]. 水生态学杂志, 2011, 32(3): 114–119.]
- [12] Dong H B, Su Y Q, Mao Y. Dietary supplementation with *Bacillus* can improve the growth and survival of the kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* in high-temperature environments[J]. Aquacult Int, 2014, 22(2): 607–617.
- [13] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. Methods, 2001, 25: 402–408.
- [14] Hao K, Liu J Y, Ling F. 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(3): 141–149.
- [15] Xia L G, Song X H, Zhang L L, et al. Effects of four microecological agents on water quality in culture ponds and growth performance of oriental river prawn[J]. Journal of Hydroecology, 2012, 33(3): 101–106.[夏来根, 宋学宏, 张磊磊, 等. 4 种微生态制剂对虾池水质及青虾生长性能的影响[J]. 水生态学杂志, 2012, 33(3): 101–106.]
- [16] Li Z J, Luo Y S, Wen G L. A research on purification of intensive shrimp effluent by *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* and probiotics[J]. Journal of Tropical Oceanography, 2007, 26(3): 73–75.[李卓佳, 罗勇胜, 文国梁. 细基江蓠繁枝变种与益生菌净化养殖废水的研究[J]. 热带海洋学报, 2007, 26(3): 73–75.]
- [17] Huang J H, Zhou F L, Ma Z M, et al. Effects of microbial preparations on heterotrophic bacteria in *Penaeus monodon* fabricius broodstock culturing tank[J]. Chinese Journal of Ecology, 2007, 26(6): 826–830.[黄建华, 周发林, 马之明, 等. 微生物制剂对斑节对虾亲虾池异养细菌的影响[J]. 生态学杂志, 2007, 26(6): 826–830.]
- [18] Boonthai T, Vuthiphandchai V, Nimrat S. Probiotic bacteria effects on growth and bacterial composition of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)[J]. Aquacult Nutr, 2013, 17(6): 634–644.
- [19] Xia Z Q, Bao Z H, Zhou C, et al. Determination of antifungal marine bacteria L1-9 coenzyme activity[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2009, (7): 74–77.[夏振强, 暴增海, 周超, 等. 抗真菌海洋细菌 L1-9 菌株的几种胞外酶活性测定[J]. 河南农业科学, 2009, (7): 74–77.]
- [20] Li Z J, Zhou H P, Yang Y Y, et al. The degradation of aquaculture contaminants by LH (*Lactobacillus* spp.)[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2008, 27(1): 342–349.[李卓佳, 周海平, 杨莺莺, 等. 乳酸杆菌 (*Lactobacillus* spp.) LH 对水产养殖污染物的降解研究[J]. 农业环境科学学报, 2008, 27(1): 342–349.]
- [21] Liu H Y, Qu K M, Ma S S. Survey of both the variation and the absorption and consumption budget of dissolved oxygen in culture ponds[J]. Marine Fisheries Research, 2005, 26(2): 79–84.[刘海英, 曲克明, 马绍赛. 养殖水体中溶解氧的变化及收支平衡研究概况[J]. 海洋水产研究, 2005, 26(2): 79–84.]
- [22] Liu F, Li X L, Zhao Q Z, et al. The effects of adding microbial agents on total ammonia-N and nitrite-N in intensive shrimp culture ponds[J]. Freshwater Fisheries, 2007, 37(6): 41–44.[刘飞, 李小龙, 赵强忠. 投加微生态制剂对对虾养殖池总氨氮与亚硝酸盐氮的影响[J]. 淡水渔业, 2007, 37(6): 41–44.]
- [23] Zokaeifar H, Balcázar J L, Saad C R. 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.
- [24] Cheng W, Liu C H, Tsai C H, et al. Molecular cloning and characterization of a pattern recognition molecule, lipopolysaccharide- and β -1, 3-glucan binding protein (LGBP) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2005, 18: 297–310.
- [25] Vargas A F, Yepiz P G. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response[J]. Aquaculture, 2000, 191: 13–21.
- [26] Zhang H P, Wan Y T, Wang L Z, et al. The protection and

regulation of HSP70 in cellular stress response[J]. China Practical Medicine, 2009, 14(4): 228–229.[张红波, 万亚涛,

王莲哲, 等. 在细胞应激反应中 HSP70 的保护与调节作用[J]. 中国实用医药, 2009, 14(4): 228–229.]

Effects of adding *Bacillus cereus* PC465 to rearing water on disease resistance of *Litopenaeus vannamei*

WANG Chundi^{1,2}, SONG Xiaoling², ZHANG Xiaojing³, ZHANG Shengjing^{1,2}, SUN Xinying^{1,2}, LIU Baobin^{1,2}, GAO Wenhui¹, HUANG Jie²

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

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

3. College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, China

Abstract: We evaluated the effect of three different doses of *Bacillus cereus* as a probiotic added to rearing water on the number of bacteria, water quality, and disease resistant ability of *Litopenaeus vannamei* compared with those in a control group. Shrimp were divided into four groups treated with different probiotic doses: group H (10^6 CFU/mL), group M (10^5 CFU/mL), group L (10^4 CFU/mL), and the control group (0 CFU/mL). The intestinal tracts of the shrimp were sampled every 10 days to count total bacteria and *Vibrio* spp.. A water sample was collected at 8:00 every 5 days. Ammonia-nitrogen and nitrite levels were measured by spectrophotometry. The shrimp were challenged with white spot syndrome virus (WSSV) after 4 weeks, and dead shrimp were removed and recorded every day until the end of the experiment. Quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) analysis was performed to evaluate the expression of three immune-related genes after 0, 12, 24, 48, 96, and 192 h of exposure. The results showed that adding the probiotic significantly reduced the number of bacteria in the *L. vannamei* intestinal tract compared with that in the control group. It also reduced the number of *Vibrio* spp. in culture water ($P < 0.05$). However, no differences in ammonia-nitrogen or nitrite levels were detected, which contrasts with most previous studies. Cumulative shrimp mortality rates in group H (10^6 CFU/mL) and group M (10^5 CFU/mL) were 63.9% and 74.6%, respectively, after WSSV challenge, which were significantly lower than that in the control group with 100% mortality ($P < 0.05$). Lipopolysaccharide, β -1, 3-glucan-binding protein, and beta-1, 3-glucan-binding protein-lipoprotein mRNA levels were significantly upregulated 48 h after the WSSV infection, compared with those in the control group ($P < 0.05$). Heat shock protein 70 mRNA expression was significantly upregulated 96 h after the WSSV infection compared with that in the control group but the difference between the three experimental groups was not significant. We conclude that *B. cereus* as a probiotic added to rearing water reduced the number of bacteria in the intestinal tract of *L. vannamei* and *Vibrio* spp. in culture water ($P < 0.05$) and did not increase ammonia-nitrogen or nitrite level. Adding *B. cereus* to the water improved the survival rate of WSSV-infected *L. vannamei*. Moreover, *B. cereus* stimulated the expression of immune-related genes, which could improve disease resistance.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*; *Bacillus cereus*; WSSV; intestinal flora; water quality; disease resistance

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