

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*

孙艳^{1,2} 刘飞^{1,2} 宋晓玲² 麦康森¹ 李玉宏^{2,3} 黄健²

(1. 中国海洋大学 教育部海水养殖重点实验室 青岛 266003; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 上海海洋大学 上海 201306)

提要 采用实时荧光定量 PCR 方法, 进行肠道复合益生菌对凡纳滨对虾相关免疫基因表达量的研究。通过感染实验, 分析饲料中添加益生菌对凡纳滨对虾病毒感染能力的影响。结果表明, Real-time PCR 揭示在投喂期间饲料中添加芽孢杆菌/溶藻弧菌组的对虾血淋巴细胞中的 proPO、SOD 和 LZM 的相对表达量均显著高于对照组($P < 0.05$); 感染 WSSV 后, 对芽孢杆菌/溶藻弧菌组凡纳滨对虾血淋巴 7 个采样时间点的 proPO、SOD、LZM 的表达进行 Real-time PCR 分析, 检测表明 WSSV 刺激 24h 后, 对虾血淋巴中的 proPO、SOD 和 LZM 的表达呈现显著性上调, 且分别在 48h、96h、96h 达到最大值。累积死亡率结果证实饲料中添加益生菌均可提高其对虾抗 WSSV 感染的能力, 尤其以坚强芽孢杆菌活菌与溶藻弧菌活菌配合使用效果更佳。

关键词 凡纳滨对虾, 益生菌, 实时荧光定量 PCR, 抗病力, WSSV, 免疫相关基因

中图分类号 S963.73

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)是我国养殖量最大的经济甲壳动物之一(周萌等, 2010)。但频繁发生的传染性疾病尤其是白斑综合症病毒(WSSV)引发的白斑病(WSD), 对对虾产业的可持续发展构成了严重威胁。由于病毒有严格的细胞寄生特性, 目前尚无有效的化学药物可预防和治疗对虾白斑病, 而且对虾缺乏特异性免疫系统, 疫苗无法起到有效地防治效果。因此, 寻找有效的生态防治措施, 特别是能增强对虾抗病能力的内源性益生菌制剂, 就成为控制对虾病毒病害最有前景的策略之一。

对虾养殖环境中存在着数量庞大、种类繁多的细菌类微生物。水环境中的细菌通过对虾的摄食行为进入消化道, 不同种类的细菌在对虾消化道内组成一个复杂的、动态的微生物生态系统。消化道内有益菌的主要作用包括: 维持消化道微生态平衡、提高饲料的消化能力(Decamp *et al.*, 2008; Wang, 2007)、增强机

体的非特异性免疫能力(Rengpipat *et al.*, 2000), 防御病原微生物在消化道的增殖和扩散(Vaseeharan *et al.*, 2003)。目前, 在对虾养殖中应用的益生菌主要有乳酸菌属、芽孢杆菌属和弧菌属细菌, 且大多应用于水质调控和对养殖环境微生物群落的调节(Rengpipat *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2009), 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尚不多见(Wang, 2007; Dalmin *et al.*, 2001)。

本研究主要是将从健康对虾肠道分离鉴定的 2 株益生菌添加在基础饲料中, 探讨单一和复合益生菌对凡纳滨对虾抗病毒能力的影响, 并选择免疫保护率最高组利用实时荧光定量 PCR(real-time PCR)技术, 研究了投喂含益生菌饲料和 WSSV 刺激后对虾血淋巴中 proPO、SOD、LZM 基因表达的变化规律, 从而分析益生菌发挥抗病毒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病毒之间的

* 公益性行业(农业)科研专项经费项目, 201103034 号; 国家虾现代产业技术体系, CARS-47 号。孙艳, E-mail: sunyanlansheyoun@163.com

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

收稿日期: 2011-08-15, 收修改稿日期: 2011-10-28

作用关系,为益生菌在对虾养殖生产中的应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 对虾与益生菌

1.1.1 对虾 实验用凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)于2011年6月14日购自青岛宝荣水产科技有限公司对虾养殖场,体长(8.5±0.6)cm,经对虾流行病病原检测试剂盒(由黄海水产研究所海水养殖生物疾病控制与分子病理学研究室提供)检测,确认为WSSV阴性。运回实验室暂养于60L的整理箱中,有效水体40L。暂养期间,每日下午换水1次,换水量为1/3;每日投喂4次,投喂前吸出残饵和粪便,水温(25±2)℃,盐度(30±1),pH 8.0±0.2,连续充气。

1.1.2 益生菌 坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*) PC024和溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*) LV463由本实验室(黄海水产研究所海水养殖生物疾病控制与分子病理学研究室)分离自健康中国对虾和凡纳滨对虾消化道,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,坚强芽孢杆菌活菌量达到 1.0×10^{11} cfu/ml,溶藻弧菌活菌量达 1.0×10^9 cfu/ml。

1.2 饲料制备

基础饲料为青岛长生中科水产饲料有限公司生产的海森特凡纳滨对虾配合饲料,在其表面直接包裹一层褐藻酸钠(3.15g/500g)和鱼油(4.2ml/500g);免疫饲料:先按一定比例将菌液与水混匀后喷洒在基础饲料外,揉搓阴干后,再在其表面直接包裹一层褐藻酸钠和鱼油(比例同基础饲料)。阴干后饲料存放于4℃冰箱,每周涂平板检测饲料中菌含量是否达到要求。

1.3 实验分组

对虾在实验室暂养7d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。4个分组分别投喂不同的饲料:(1)芽孢杆菌单一菌组,每克饲料含PC024活菌 1.0×10^8 cfu;(2)芽孢杆菌/溶藻弧菌组,每克饲料含PC024活菌 1.0×10^8 cfu和LV463活菌 3.0×10^7 cfu;(3)芽孢杆菌/灭活溶藻弧菌组,每克饲料含PC024活菌 1.0×10^8 cfu和LV463灭活菌10mg。(4)对照组,为不添加细菌的基础饲料。实验期间各实验组每日投喂4次相应的免疫饲料,日投喂量为凡纳滨对虾体重的(12±3)% (根据对虾摄食情况调节投喂量),所有实验组按暂养时的条件进行管理。

1.4 WSSV 感染实验

1.4.1 WSSV 粗提液制备 称取6.85g实验室保存的感染WSSV死亡的对虾去除肝胰腺的头胸组织,加入适量4℃预冷的生理盐水(0.7% NaCl),20000r/min冰浴匀浆。获得的匀浆液4℃,3000g离心10min,取上清4℃反复离心3次(4000g,6000g,8000g各10min)。上清液经400目筛绢过滤除去杂质后,用0.45μm滤膜过滤除菌,分装并于-70℃冻存。制备的病毒粗提液中的病料浓度为0.14g/ml,并在注射感染实验前进行预实验,确定合适的感染剂量为50μl/尾。

1.4.2 注射感染实验 在投喂实验饲料后的第21天,从各实验组中挑选出大小基本一致的120尾对虾进行感染实验,每组4个重复,其中一个重复作为取样组用。感染前1天停食,次日上午用无菌注射器向每尾虾第2腹节肌肉中注射50μl WSSV粗提液,以0.7% NaCl溶液为阴性对照。攻毒后各实验组分别继续投喂相应的实验饲料或基础饲料。及时检出死亡对虾,记录死亡时间和死亡数量,14d后结束感染实验。

1.5 样品采集与处理

投喂实验开始后,每5天从各实验组随机取3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,加入等体积的抗凝剂。3尾对虾血淋巴混在一起4℃注入RNase-free的1.5ml离心管立即放于液氮后存于-80℃冰箱保存备用。攻毒实验开始后0h、12h、24h、48h、96h、192h及14d从各组随机取样3尾,操作同免疫期间取样。其中对照组在感染14d全部死亡,故没有取样。

1.6 RNA 的提取

利用TRIzol Reagent (Invitrogen公司)提取总RNA,方法参照使用说明书。用NanoDrop 2000c (Thermo)测定RNA的 OD_{260} 和 OD_{280} 值进行定量检测,-80℃保存备用。在进行反转录前,使用DNase I [宝生物工程(大连)有限公司]参照说明书去除总RNA中残留的基因组DNA。

1.7 cDNA 合成

应用TransScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒(北京全式金生物技术有限公司)进行cDNA合成,在20μl的反应体系中加入1μl (50ng—5μg/μl)的总RNA,2×TS Reaction Mix 10μl,TransScript RT/RI Enzyme Mix 1μl,0.5μg/μl Anchored Oligo (dT)₁₈ 1μl,RNase free Water 7μl,轻轻混匀后,42℃孵育30min,85℃加热5min合成cDNA模板。

1.8 实时荧光定量 PCR 分析基因表达

1.8.1 引物 参照 GenBank 中凡纳滨对虾相应序列用 Primer Premier 5.0 进行目的基因酚氧化酶原(proPO)、超氧化物歧化酶(SOD)、溶菌酶(LZM)引物设计,引物序列见表 1,内参基因 β -actin 引物参见文献(Liu *et al.*, 2010)。 β -actin 作为内参基因与目的基因 proPO、SOD、LZM 在扩增时加入等量的模板,扩增后进行溶解曲线分析确定有无非特异性扩增。

1.8.2 实时荧光定量 PCR 反应体系与程序 实时荧光定量 PCR 按 TransScript Green qPCR Super MIX 试剂盒(北京全式金生物技术有限公司)说明进行,反应体系为 20 μ l(含 cDNA 模板 200—400ng,正向引物 5pmol,反向引物 5pmol,1 \times TransStart Green qPCR Super Mix,1 \times Passive Reference Dye);在 Rotor Gene 3000 (Corbett, 澳大利亚)上按 95 $^{\circ}$ C 预变性 30s,1 个循环;95 $^{\circ}$ C 预变性 5s,60 $^{\circ}$ C 退火延伸 30s,45 个循环的反应程序进行实时荧光定量 PCR 反应。

1.8.3 溶解曲线测定 实时荧光定量 PCR 反应完成后,在 Rotor Gene 3000 中温度从 72 $^{\circ}$ C 逐步升高到 95 $^{\circ}$ C,每升高 1 $^{\circ}$ C 进行信号采集。用 Rotor-Gene Real-Time Analysis Software 6.0 进行实时荧光定量 PCR 数据分析,3 种基因的相对表达量计算采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法来表示(Livak *et al.*, 2001)。

1.9 统计分析

采用 SPSS 16.0 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 WSSV 感染凡纳滨对虾的累积死亡率结果

各实验组和对照组在投喂相应的饲料 20d 后,注射感染 WSSV 14d 后的累积死亡率结果见表 2。感染的前 4d 各实验组与对照组累积死亡率无显著差异($P > 0.05$),感染第 5 天以后各组的累积死亡率均呈显著的增长趋势。对照组的累积死亡率显著高于各实验组($P < 0.05$),各实验组的累积死亡率无显著差异($P > 0.05$),10d 后各实验组的死亡率趋于稳定。至感染结束对照组的累积死亡率(100%),显著高于芽孢杆菌/溶藻弧菌复合组的累积死亡率(58.4% \pm 0.6%),芽孢杆菌组的累积死亡率(66.3% \pm 2.1%)和芽孢杆菌/灭活溶藻弧菌复合组的累积死亡率(69.7% \pm 1.2%) ($P < 0.05$)。芽孢杆菌/溶藻弧菌复合组的累积死亡率显著高于芽孢杆菌组和芽孢杆菌/灭活溶藻弧菌复合组($P < 0.05$),而后两者的累积死亡率无显著差别($P > 0.05$)。这些结果表明,投喂含单一芽孢杆菌、芽孢杆菌/灭活溶藻弧菌和芽孢杆菌/溶藻弧菌的饲料均可显著提高

表 1 Real-time PCR 中使用的引物序列
Tab.1 Sequences of the primers used in real-time PCR

目的基因	序列号	正向引物(5'—3')	反向引物(5'—3')
β -actin	AF300705	GAG CAA CAC GGA GTT CGT TGT	CAT CAC CAA CTG GGA CGA CAT GGA
SOD	DQ029053.1	AGC CAA TGA CGT AAG CG	ACC ATC ACA AGA AAC CC
proPO	AY723296.1	TCC ATT CCG TCC GTC TG	GGC TTC GCT CTG GTT AGG
LZM	AY170126.2	TGT TCC GAT CTG ATG TCC	GCT GTT GTA AGC CAC CC

表 2 投喂不同益生菌制剂的凡纳滨对虾经注射感染 WSSV 后的累积死亡率(%)

Tab.2 Cumulative mortality (%) of *L. vannamei* fed with different probiotic preparations and then challenged by injection with WSSV

组别	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d
B	0	0	14.46 \pm 6.92 ^a	24.47 \pm 6.93 ^a	34.43 \pm 9.64 ^a	44.43 \pm 7.68 ^a	52.20 \pm 8.4 ^a
B/V	0	0	16.71 \pm 5.7 ^a	25.57 \pm 5.1 ^a	32.23 \pm 6.93 ^a	43.3 \pm 0.0 ^a	55.57 \pm 1.96 ^a
B/Av	0	2.47 \pm 2.14 ^a	23.43 \pm 7.7 ^a	28.37 \pm 9.31 ^a	39.47 \pm 9.31 ^a	49.33 \pm 5.65 ^a	65.37 \pm 5.65 ^a
C	0	0	14.8 \pm 7.4 ^a	46.87 \pm 2.14 ^b	60.43 \pm 4.27 ^b	81.4 \pm 1.10 ^b	95.57 \pm 4.4 ^b
组别	8d	9d	10d	11d	12d	13d	14d
B	59.97 \pm 15.27 ^a	65.53 \pm 6.93 ^a	65.53 \pm 6.93 ^a	65.53 \pm 6.93 ^a	65.53 \pm 6.93 ^a	65.53 \pm 6.93 ^a	65.53 \pm 6.93 ^a
B/V	57.0 \pm 0.0 ^a	57.8 \pm 1.9 ^a	57.8 \pm 1.9 ^a	57.8 \pm 1.9 ^a	57.8 \pm 1.9 ^a	57.8 \pm 1.9 ^a	57.8 \pm 1.9 ^a
B/Av	70.37 \pm 3.7 ^a	76.57 \pm 4.27 ^b	76.57 \pm 4.27 ^b	76.57 \pm 4.27 ^b	76.57 \pm 4.27 ^b	76.57 \pm 4.27 ^b	76.57 \pm 4.27 ^b
C	96.67 \pm 3.33 ^b	100 \pm 0.0 ^c	100 \pm 0.0 ^c	100 \pm 0.0 ^c	100 \pm 0.0 ^c	100 \pm 0.0 ^c	100 \pm 0.0 ^c

注: 上标字母不相同表示差异显著($P < 0.05$), 字母相同表示差异不显著($P > 0.05$)。C: 未添加益生菌制剂; B: PC024 活菌(1.0×10^8 cfu/g); B/V: PC024 活菌(1.0×10^8 cfu/g)与 LV463 活菌(1.0×10^7 cfu/g); B/Av: PC024 活菌(1.0×10^8 cfu/g)与 LV463 灭活菌(浓度为 1.0%)

凡纳滨对虾抗 WSSV 感染的能力,其相对保护率分别达 $33.7\% \pm 2.1\%$ 、 $30.3\% \pm 1.2\%$ 和 $41.6\% \pm 0.6\%$, 坚强芽孢杆菌与溶藻弧菌配合使用的效果更佳,而单独的坚强芽孢杆菌使用或坚强芽孢杆菌与灭活的溶藻弧菌复合使用没有显著差别。

2.2 芽孢杆菌/溶藻弧菌复合组投喂期间及感染 WSSV 后对虾血淋巴中相关免疫基因实时荧光定量 PCR 结果

从感染实验结果得知芽孢杆菌/溶藻弧菌复合组相对保护率最高,达到 41.6%。选择该组实验对虾血淋巴样品进行免疫相关基因表达量的分析,以期了解抗病菌株是否通过提高对虾的免疫水平而降低了病毒感染的死亡率。

2.2.1 复合益生菌在投喂期间对凡纳滨对虾血淋巴中免疫基因表达量的影响

实时荧光定量 RT-PCR 测定了 B/V 组在用含坚强芽孢杆菌和溶藻弧菌的饲料投喂凡纳滨对虾期间对虾血淋巴中 proPO、SOD、LZM 表达量的变化(图 1)。在投喂阶段的 20d 内, B/V 组对虾血淋巴中 proPO、SOD、LZM 3 种免疫基因相对表达量都在 20d 时达最大值,分别是对照组的 11.4 倍、10.3 倍和 5.7 倍,显著高于对照组($P < 0.05$)。随着投喂时间延长, SOD 的相对表达量呈逐渐上调的趋势; proPO 的相对表达量在投喂前 10d 逐渐上调,但在 15d 突然下调,但仍显著高于对照组($P < 0.05$),随后又逐渐上调直至达到最高值($P < 0.05$); LZM 的相对表达量在 5d 时没有明显上调($P > 0.05$); 随后 15d 内, LZM 相对表达量呈逐渐上调趋势($P < 0.05$)。结果表明,饲料中添加益生菌可以随不同投喂时间显著提高凡纳滨对虾血淋巴中 3 种免疫基因的相对表达量,各基因在不同的实验阶段的变化规律大致相似。

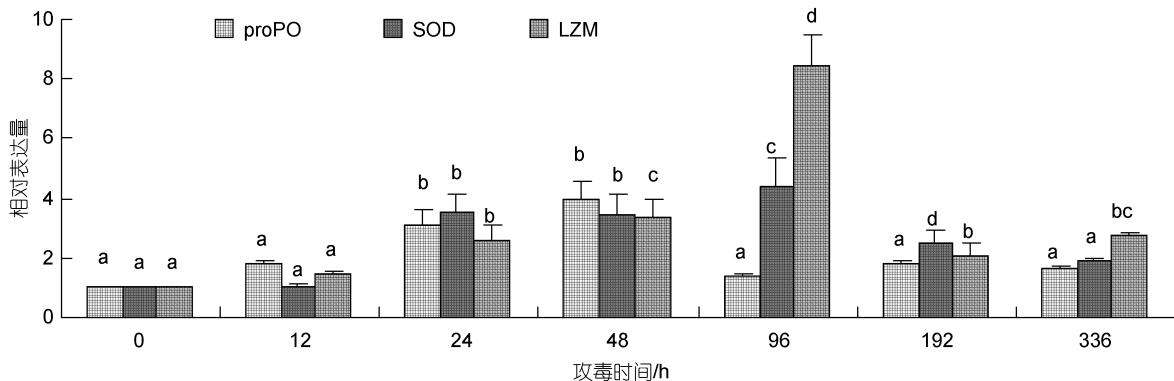


图 2 芽孢杆菌/溶藻弧菌复合组感染 WSSV 期间血淋巴中三种基因相对表达量

Fig.2 Relative expression of three immune genes in the hemolymph of *L. vannamei* in the *B. firmus* / *V. alginolyticus* composite group during WSSV infection

注: 柱上字母不相同表示差异显著($P < 0.05$), 字母相同表示差异不显著($P > 0.05$)

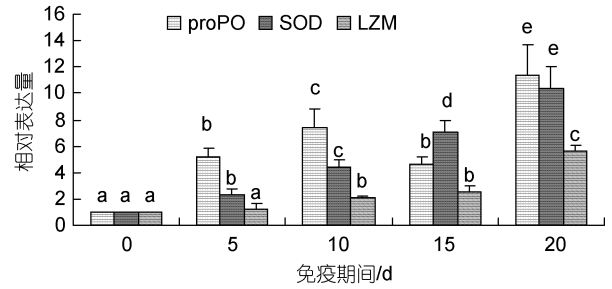


图 1 芽孢杆菌/溶藻弧菌复合投喂期间对虾血淋巴中 3 种免疫基因相对表达量

Fig.1 Relative expression of three immune genes in the hemolymph of *L. vannamei* fed with *B. firmus* / *V. alginolyticus* composite group during immunization time

注: 柱上字母不相同表示差异显著($P < 0.05$), 字母相同表示差异不显著($P > 0.05$)

2.2.2 芽孢杆菌/溶藻弧菌投喂对凡纳滨对虾感染 WSSV 后血淋巴中免疫基因表达的影响

实时荧光定量 RT-PCR 测定了在 WSSV 感染后,芽孢杆菌/溶藻弧菌复合组对虾血淋巴中 proPO、SOD、LZM 表达量的变化(图 2)。凡纳滨对虾在注射感染 WSSV 后其各组免疫基因相对表达量呈先上调后下降的趋势。在攻毒感染后, SOD 和 LZM 相对表达量均高于 0h (未攻毒时),且从 24h 开始显著高于 0h ($P < 0.05$),分别是 0h 的 3.5 倍和 2.62 倍,直至 96h,这两种基因的相对表达量均达到最大值($P < 0.05$)分别是 0h 的 4.4 倍和 8.5 倍,之后这两种基因相对表达量开始下调, SOD 直至攻毒结束后基本降至初始水平($P > 0.05$)。LZM 在达到最高值之后,虽然表达量下调,但仍然显著高于 0h ($P < 0.05$); proPO 相对表达量在注射感染后逐渐上调,自 24h 后开始显著上调,且在 48h 时达到最大值,随后开始下调降至初始水平($P > 0.05$)。

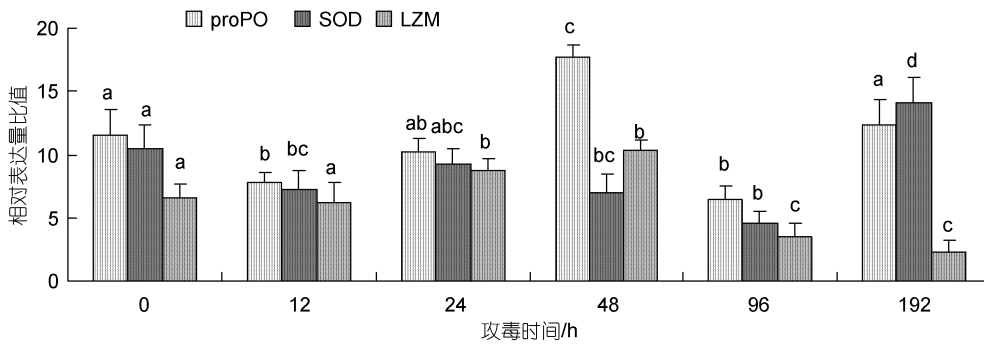


图3 芽孢杆菌/溶藻弧菌对凡纳滨对虾受 WSSV 感染后免疫基因表达的增强效应

Fig.3 The expression enhancing effects of the immune genes of *L. vannamei* during WSSV infection after feeding with *B. firmus* / *V. alginolyticus*

注: 柱上字母不相同表示差异显著($P < 0.05$), 字母相同表示差异不显著($P > 0.05$)。图中各柱表示同一采样时间点芽孢杆菌/溶藻弧菌复合组血淋巴免疫基因相对表达量与对照组血淋巴免疫基因相对表达量的比值

2.2.3 复合益生菌投喂对凡纳滨对虾受 WSSV 感染后血淋巴免疫基因表达的增强效应 芽孢杆菌/溶藻弧菌复合组与对照组血淋巴中 proPO、SOD、LZM 基因表达量的比值能清晰地反映出复合益生菌投喂对凡纳滨对虾受 WSSV 感染后血淋巴免疫基因表达的增强效应(图 3)。芽孢杆菌/溶藻弧菌复合组凡纳滨对虾 proPO 和 SOD 在注射感染 WSSV 后基因表达量分别是对照组的 11.55 倍和 10.5 倍。其比值呈先略下降再上调又下降, 到 192h 感染实验结束时依然是对照组 12.28 倍和 14.1 倍。芽孢杆菌/溶藻弧菌复合组 LZM 基因在攻毒感染后的表达量与对照组比值呈先略微上调, 在感染 48h 时达到最大比值是对照组的 10.36 倍, 而后逐渐下降, 在 192h 时是对照组的 2.23 倍。芽孢杆菌/溶藻弧菌复合组的 3 个基因在 6 个取样时间点的相对表达量与对照组的比值均高于 1。

3 讨论

本实验所用坚强芽孢杆菌 PC024 和溶藻弧菌 LV463 均分离自健康对虾消化道, 并通过安全性实验(李海兵等, 2008)证实其对凡纳滨对虾无致病性, 通过本文的投喂实验证实, 芽孢杆菌与溶藻弧菌混合添加到饲料中可以提高 proPO、SOD、LZM 免疫基因的表达, 并显著提高了 WSSV 感染时对虾的存活率。投喂芽孢杆菌、芽孢杆菌/溶藻弧菌及芽孢杆菌/灭活溶藻弧菌都表现出提高对虾抵抗 WSSV 感染的能力, 相对保护率分别为 33.7%、41.6%、31.46%, 其中投喂含芽孢杆菌/溶藻弧菌的饲料时的保护效果显著高于单独投喂芽孢杆菌和投喂芽孢杆菌/灭活溶藻弧菌组, 说明 2 株候选益生菌的复合应用比单独的坚强芽

孢杆菌或坚强芽孢杆菌与灭活的溶藻弧菌的复合应用效果更好。原因可能是活的细菌能在肠道定殖, 能在对虾肠道占据一定的区位并刺激非特异性免疫系统, 从而提高动物免疫力(Rengpipat *et al*, 2000), 在本文实验中观察到在投喂芽孢杆菌和溶藻弧菌的 20d 中三种免疫基因的表达表现出持续性地增长(图 1), 也印证了这一推测。

芽孢杆菌属细菌广泛分布于海水养殖动物内外环境中, 对水产动物极少有致病性, 是较好的益生菌候选菌株。芽孢杆菌能促进淀粉和纤维素的分解, 降低肠道内 NH_3 浓度; 产生抗菌肽、细胞壁肽聚糖等多种抗菌活性物质和免疫活性物质, 提高宿主的免疫能力(王秀华等, 2004; Gatesoupe, 1999; Cherif *et al*, 2001; Pinchuk *et al*, 2002)。国外研究显示, 芽孢杆菌饲喂对虾或对虾幼体, 可用于控制哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)的感染(Rengpipat *et al*, 2000; Bachère, 2003)。胡毅等(2008)分别在在对虾基础饲料中添加枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)及复合益生菌进行饲喂实验, 结果显示均可提高肠道消化酶活力, 不同程度提高凡纳滨对虾酚氧化酶活力、溶菌酶活力、血清蛋白浓度和总抗氧化能力。Liu 等(2010)报道了用含有枯草芽孢杆菌的水体饲养对虾幼体, 其酚氧化酶表达量较对照组显著上调; Chiu 等(2007)报道了用含有乳酸菌(*Lactobacillus plantarum*)饲喂凡纳滨对虾 168h 时 proPO 的相对表达量高于对照组 6.1 倍和 4.4 倍。这些报道与本文用芽孢杆菌/溶藻弧菌复合组投喂后能够显著提高对虾血淋巴 proPO 的表达量相一致。

溶藻弧菌为无芽孢、无荚膜、嗜盐嗜温、兼性厌氧的革兰氏阴性短杆菌, 主要分布于世界各地海水及河口处, 并且数量居海水类弧菌之首, 溶藻弧菌也大量分布在海洋动物中(Stefan *et al*, 2000; 林业杰等, 1993)。溶藻弧菌作为益生菌制剂已有多年的历史, 墨西哥、厄瓜多尔的许多对虾育苗场使用溶藻弧菌作为益生菌制剂, 缩短了孵化时间, 使出苗量增加了 35% (Austin *et al*, 1995)。Garriques 等(1995)将溶藻弧菌

用于虾苗培养,可增加凡纳对虾仔虾成活率和体重,降低对虾副溶血弧菌感染。但也有很多报道指出溶藻弧菌是条件致病菌(Austin *et al*, 1995; 林业杰等, 1993)。本研究分别设立了溶藻弧菌的活菌和灭活菌组,其目的就是考虑溶藻弧菌在生产应用中可能带来的风险。

WSSV 的感染无疑会影响对虾免疫指标。Tian 等(2011)报道在感染 WSSV 3h 后,对虾血淋巴细胞外铜锌超氧化物歧化酶(ECSOD)基因相对表达量是对照组的 2.64 倍,随后在 24h 逐渐下降并低于对照组水平。Mai 等(2010)报道注射感染 WSSV 病毒后,细角滨对虾(*L. stylirostris*)溶菌酶基因较对照组显著上调。本文在 WSSV 感染后,观察到三种免疫基因出现于感染前的免疫过程不一致的波动,其中 proPO 在 48h 时达到最高, SOD 在 24—96h 时达到最高水平, LZM 则在 96h 时出现跃升,这些情况表明 WSSV 感染对对虾免疫系统是一个明显的刺激。但通过将芽孢杆菌/溶藻弧菌投喂组与对照组的这些免疫指标的表达水平的对比可以看到,这时芽孢杆菌/溶藻弧菌投喂组的 proPO、SOD 和 LZM 表达量比对照组高得多,说明芽孢杆菌/溶藻弧菌的投喂为对虾提供了更强的免疫刺激。雷质文等(2001)对不同 WSSV 感染发病状况的对虾群体的免疫指标分析表明, WSSV 感染与对虾血淋巴酚氧化酶及碱性磷酸酶活性有紧密的联系,高水平酚氧化酶和碱性磷酸酶活性的对虾个体在 WSSV 感染中可能得以幸存。本文观察到 proPO 等免疫指标的升高与感染实验的保护效果的关系与这一结果相符。

综上所述,本研究中添加坚强芽孢杆菌和溶藻弧菌的饲料组免疫保护率高,且酚氧化酶、超氧化物歧化酶和溶菌酶基因相对表达水平均有不同程度的提高,可以作为有防病作用的益生菌候选菌株应用于对虾养殖生产,成为对虾白斑病生物防治的有效途径之一。

参 考 文 献

- 王秀华, 黄 捷, 宋晓玲, 2004. 免疫增强剂——肽聚糖在对虾养殖中的应用. 海洋水产研究, 24(1): 69—74
- 李海兵, 宋晓玲, 韦 高等, 2008. 4 株对虾肠道益生菌的筛选及鉴定. 海洋与湖沼, 39(4): 374—380
- 林业杰, 陈亢川, 陈拱立等, 1993. 溶藻弧菌噬菌体的分离. 微生物学报, 33(4): 285—289
- 周 萌, 王安利, 曹俊明, 2010. 饲料中不同形式的铜及添加量对凡纳滨对虾(*Penaeus vannamei*)生长性能、血清铜蓝蛋白和生长激素水平的影响. 海洋与湖沼, 41(4): 577—582
- 胡 毅, 谭北平, 麦康森等, 2008. 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. 中国水产科学, 15(2): 244—251
- 雷质文, 黄 捷, 杨 冰等, 2001. 感染白斑综合症病毒(WSSV)的对虾相关免疫因子的研究. 中国水产科学, 8(4): 46—51
- Austin B L F, Stuckey P A W, Robertson I *et al*, 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. Journal of Fish Disease, 18: 93—96
- Bach è re E, 2003. Anti-infectious immune effectors in marine: potential tools for disease control in larviculture. Aquaculture, 227: 427—438
- Cherif A, Ouzari H, Daffonchio D *et al*, 2001. Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMGI.7, a new strain isolated from soil. Letters in Applied Microbiology, 32: 243—247
- Chiu C H, Guu Y K, Liu C H *et al*, 2007. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. Fish & Shellfish Immunology, 23: 364—377
- Dalmin G, Kathiresan K, Purushothaman A, 2001. Effect of probiotics on bacterial population and health status of shrimp in culture pond ecosystem. Indian Journal of Experiment Biology, 39(9): 939—942
- Decamp O, Moriarty D J W, Lavens P, 2008. Probiotics for shrimp larviculture: review of field data from Asia and Latin America. Aquaculture Research, 39: 334—348
- Garriques D, Arevalo G, 1995. 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. In: Browdy C L, Hopkins J S ed. Swimming through Troubled Water. Proceedings of the Special Session on Prawn Farming, Aquaculture'95. World Aquaculture Society, 53—59
- Gatesoupe F J, 1999. The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture, 180(1—2): 147—165
- Liu K F, Chiu C H, Shiu Y L *et al*, 2010. Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. Fish & Shellfish Immunology, 28(5—6): 837—844
- Livak K J, Schmittgen T D, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods, 254: 402—408
- Mai W J, Wang W N, 2010. Protection of blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) against the White Spot Syndrome Virus (WSSV) when injected with shrimp lysozyme. Fish & Shellfish Immunology, 28: 727—733

- Pinchuk I V, Bressollier P, Sorokulova I B, 2002. Amicoumacin antibiotic production and genetic diversity of *Bacillus subtilis* strains isolated from different habitats. *Research in Microbiology*, 153: 269—276
- Rengpipat S, Rukpratanporn S, Piyatiratitivorakul S *et al*, 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture*, 191(4): 271—288
- Stefan H, Helmut W, Karin N B *et al*, 2000. Isolation of *Vibrio alginolyticus* from seawater aquaria. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 203: 169—175
- Tian J X, Chen J, Jiang D *et al*, 2011. Transcriptional regulation of extracellular copper zinc superoxide dismutase from white shrimp *Litopenaeus vannamei* following *Vibrio alginolyticus* and WSSV infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 30: 234—240
- Vaseeharan B, Ramasamy P, 2003. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Letters Applied Microbiology*, 36(2): 83—87
- Wang Y B, 2007. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 269: 259—264
- Wang Y B, He Z L, 2009. Effect of probiotics on alkaline phosphatase activity and nutrient level in sediment of shrimp, *Penaeus vannamei*, ponds. *Aquaculture*, 287(1): 94—97

EFFECTS OF ADDING PROBIOTICS IN THE FEED ON NON-SPECIFIC IMMUNE GENE EXPRESSION AND DISEASE RESISTANCE OF *LITOPENAEUS VANNAMEI*

SUN Yan^{1,2}, LIU Fei^{1,2}, SONG Xiao-Ling², MAI Kang-Sen¹,
LI Yu-Hong^{2,3}, HUANG Jie²

(1. *The Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao, 266003*; 2. *Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, 266071*; 3. *Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306*)

Abstract This study was conducted to investigate the effects of *Bacillus firmus* and *Vibrio alginolyticus* on relative expression of non-specific immune related genes and antiviral ability of *Litopenaeus vannamei*. The relative expressions of non-specific immune related genes encoding prophenoloxidase (proPO), superoxide dismutase (SOD), lysozyme (LZM) were analyzed by quantitative real-time reverse transcription PCR (RT-PCR). The results show that the relative expressions of proPO, SOD, and LZM were obviously up-regulated in hemolymph of shrimp fed diets supplemented with the probiotics compared to the control during the immunization. In hemolymph, the relative expression of proPO, SOD, and LZM were significantly up-regulated 24h post WSSV challenge, and increased to the maximum levels at 48h, 96h, and 96h, respectively. The cumulative mortality results confirm that the diet containing probiotics can improve the ability of the shrimp anti-WSSV infection. Results suggest that *B. firmus* and *V. alginolyticus* are potential candidates for use as probiotics.

Key words *Litopenaeus vannamei*, Probiotics, Real-time PCR, Resistance to disease, White spot syndrome virus (WSSV), Immune related gene