

## 2株消化道优势菌对凡纳滨对虾免疫酶活性和抗白斑综合征病毒感染力的影响

刘君, 宋晓玲\*, 刘莉, 柴鹏程, 黄健

(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

**摘要:** 以凡纳滨对虾为研究对象,在基础饲料中分别添加从健康对虾消化道中分离纯化的优势菌菌株——美人鱼发光杆菌 PC463 和坚强芽孢杆菌 PC465(菌含量  $\geq 10^{11}$  CFU/g)的活菌和破碎菌各 1 g/kg,观察其对凡纳滨对虾血淋巴免疫酶活性和抗 WSSV 感染保护率的影响。经过 20 d 养殖实验后发现,与对照组相比,饲料中添加坚强芽孢杆菌活菌的免疫组和添加美人鱼发光杆菌灭活菌的免疫实验,其凡纳滨对虾血淋巴中酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性在不同程度上有所提高,并显著高于对照组( $P < 0.05$ )。WSSV 感染后饲料中添加坚强芽孢杆菌活菌的免疫组存活率( $53\% \pm 12\%$ )和添加美人鱼发光杆菌灭活菌的免疫组存活率( $49\% \pm 15\%$ )显著高于对照组( $P < 0.05$ )。结果表明:饲料中添加坚强芽孢杆菌活菌和美人鱼发光杆菌灭活菌可以在一定程度上提高凡纳滨对虾免疫酶活性和抗 WSSV 感染能力,上述有防病作用的益生菌株以饲料添加剂的方式应用于对虾养殖生产,可望成为对虾白斑病生物防治的有效途径之一。

**关键词:** 凡纳滨对虾; 益生菌; 非特异性免疫; 白斑综合征病毒

**中图分类号:** S 941

**文献标志码:** A

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)在我国海水养殖业中占有极为重要的地位。然而,对虾白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)在世界范围内广泛传播,每年给对虾养殖业造成几百亿元的经济损失,严重威胁对虾养殖业的可持续发展<sup>[1-2]</sup>。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病毒病。而且对虾缺乏特异性免疫系统,疫苗无法起到有效的防治效果,寻找有效的生态学防治措施是控制对虾病毒病最有前景的策略<sup>[3-4]</sup>。

益生菌能够通过产生非特异性免疫调节因子激发机体免疫功能,刺激宿主的免疫系统,增强机体免疫力和抗病性<sup>[5-7]</sup>。Sakai 等<sup>[8]</sup>指出虹鳟口服酪酸梭菌可以增加体内的白细胞的吞噬活性,进而提高自身免疫力。芽孢杆菌 S11 可以通过激活斑节对虾的细胞和体液的免疫防御系统,提高其抗病能力<sup>[9]</sup>。

Verschuere 等<sup>[10]</sup>的研究表明,芽孢杆菌和弧菌混合使用可以提高凡纳滨对虾幼体的成活率和增长速度,同时也可以增强其对哈维氏弧菌和白斑综合征的抗病性,而其中的原因是由于混合益生菌增强了对虾体内吞噬细胞和抗菌肽的活性,进而刺激了宿主的免疫系统。本研究通过在凡纳滨对虾饲料中添加一定量的坚强芽孢杆菌和美人鱼发光杆菌活体和破碎体,并比较其对凡纳滨对虾非特异性免疫及抗 WSSV 的影响,目的是筛选出免疫活性较强的益生菌株及其添加方式,以便灵活应用于饲料添加剂、微生态制剂、生物絮团养殖技术等,提高凡纳滨对虾养殖成活率和抗 WSSV 感染能力。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验饲料

基础饲料 花生粉 250 g/kg,豆粉 250 g/

收稿日期:2011-06-23 修回日期:2011-10-24

资助项目:公益性行业(农业)科研专项(201103034)

通讯作者:宋晓玲, E-mail: songxl@ysfri.ac.cn

kg, 虾粉 100 g/kg, 面粉 30 g/kg, 玉米粉 30 g/kg, 鱼粉 300 g/kg, 复合维生素 8 g/kg, 维生素 C 1 g/kg,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1 g/kg,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2 g/kg, 褐藻酸钠 8 g/kg, 植物油 20 g/kg。

**免疫饲料** 实验用美人鱼发光杆菌 PC463 (*Photobacterium damsela*) 和坚强芽孢杆菌 PC465 (*Bacillus firmus*) 由本实验室 2006 年分离自健康对虾消化道, 纯化后  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  保存。使用前进行菌种活化和小规模发酵培养, 离心收集菌体。以基础饲料为对照组, 在基础饲料中分别添加上述 2 种菌株的活菌和破碎菌制成 4 组免疫饲料, 做为免疫实验组。饲料原料用双螺杆压条机挤压出直径为 2 mm 粒径的饲料, 于阴凉处晾干, 剪切成 3 mm 长的颗粒贮存于  $-4\text{ }^\circ\text{C}$  中保存待用<sup>[11]</sup>。其中活菌组成品饲料的活菌数量控制在约  $10^8$  CFU/g, 超声波破碎并经高压灭菌的破碎菌组, 其湿重占饲料重量的 1%。

## 1.2 实验动物

健康凡纳滨对虾 600 尾, 购自青岛沙子口对虾养殖场, 经核酸探针斑点杂交检测, 确认 WSSV 阴性。实验对虾随机分为 5 组, 每组 120 尾。每日换水 1 次, 日换水量为 1/3; 每日投喂饲料 4 次, 日投喂量为每 500 尾 60~85 g, 投喂 1 h 后吸去剩余饲料, 并根据残饵的多少调节投喂量; 其中免疫实验组采用间隔投喂方法, 即连续 4 d 投喂免疫饲料, 3 d 投喂基础饲料, 7 d 一个循环, 直至实验结束。水温  $24\sim 26\text{ }^\circ\text{C}$ , 连续充气。试验前暂养 7 d。

## 1.3 对虾血淋巴免疫酶活性的测定

实验开始后的第 5、10、15、20 天, 分别从每组实验对虾中随机取对虾 5~10 尾, 用经抗凝剂润洗的 1 mL 注射器, 从对虾围心腔抽取血淋巴, 合并置于一个无菌 Eppendorf 管中,  $4\text{ }^\circ\text{C}$  静置过夜后, 于  $5\ 000\ \text{r}/\text{min}$  离心 10 min 分离血清, 取上层血清置于  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  保存备用。

以溶壁微球菌 (*Micrococcus lysolei*) (南京建成生物工程研究所) 为底物测定血清溶菌酶活性。首先将细菌冻干粉用  $0.1\ \text{mol}/\text{L}$  的磷酸钾盐缓冲液 ( $\text{pH} = 6.4$ ) 配制底物悬液 ( $\text{OD}_{570} \approx 0.3\sim 0.5$ ), 在酶标板中加入  $190\ \mu\text{L}$  该悬液与  $10\ \mu\text{L}$  血清, 混匀, 测其  $570\ \text{nm}$  处的吸光值  $A_{\text{初}}$ , 移入  $37\text{ }^\circ\text{C}$  水浴中作用 30 min 后, 立即置于冰水浴中 10 min, 以终止反应, 测其吸光值  $A_{\text{终}}$ 。溶菌活力  $\text{UL} =$

$(A_{\text{终}} - A_{\text{初}})/A_{\text{终}}$ 。以实验条件下, 每毫升血清每分钟吸光值减少 0.001 为 1 个酶活性单位 (U)。

酸性磷酸酶 (ACP)、碱性磷酸酶 (AKP)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化氢酶 (CAT) 的活性使用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒测定。血清 ACP 单位定义: 100 mL 血清在  $37\text{ }^\circ\text{C}$  与基质作用 30 min 产生 1 mg 酚为 1 个活力单位; 血清 AKP 单位定义: 100 mL 血清在  $37\text{ }^\circ\text{C}$  与基质作用 15 min 产生 1 mg 酚为 1 个活力单位; 血清中 SOD 活力定义: 每毫升反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 的量为一个活力单位 (U); 血清 CAT 单位定义: 每毫升血清或血浆每秒钟分解  $1\ \mu\text{mol}$  的  $\text{H}_2\text{O}_2$  的量为一个活力单位。

## 1.4 WSSV 感染实验

免疫实验 20 d 后, 每组选取个体大小基本一致的 30 尾对虾进行攻毒实验, 3 个重复。攻毒实验前一天停食, 次日上午取  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  保存的已感染 WSSV 的对虾, 称取鳃和步足充分剪碎并混匀成泥状, 用作感染毒种投喂对虾, 攻毒量为  $0.75\ \text{g}/10$  尾, 1 h 后吸去残饵, 每日继续投喂免疫饲料或基础饲料, 15 d 后结束实验。实验期间记录死亡时间和死亡数。并用镊子摘取虾鳃鳃丝  $0.5\sim 1\ \text{g}$ , 至无菌 Eppendorf 管中 (每管预先加入 SEMP 采样液  $200\ \mu\text{L}$ ),  $4\text{ }^\circ\text{C}$  保存用于病毒检测。

## 1.5 数据统计分析

本实验采用 SPSS 13.0 软件对实验数据进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 若差异显著, 则采用 LSD 法作多重比较。

## 2 结果

### 2.1 血清免疫酶活性

**酸性磷酸酶 (ACP) 活力** 由图 1 可见, 各免疫实验组对虾血清中酸性磷酸酶的变化趋势呈先上升后下降, 在第 10 天达到最大值。第 5、10 天, B0 组即投喂添加坚强芽孢杆菌 PC465 活菌的免疫实验组对虾血清中酸性磷酸酶活性显著高于其他实验组 ( $P < 0.05$ ); 第 15、20 天, B0 组与其他实验组对虾血清中酸性磷酸酶活性差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

**碱性磷酸酶 (AKP) 活力** 由图 2 可见, 各免疫实验组对虾血清中碱性磷酸酶的变化趋势呈先上升后下降, 在第 10 天达到最大值。第 5~15 天, A1 组即投喂添加美人鱼发光杆菌 PC463 灭

活菌的免疫实验组和 B0 组即投喂添加坚强芽孢杆菌活菌 PC465 的免疫实验组对虾血清中碱性磷酸酶活性显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。

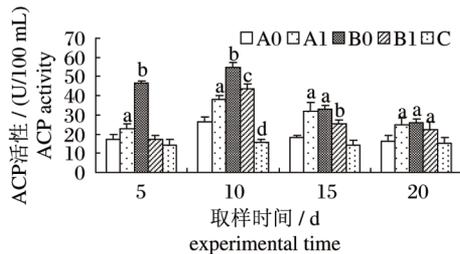


图1 各实验组凡纳滨对虾血清酸性磷酸酶活力

图中的值为平均数 ± 标准差 ( $n = 3$ ) 同行数据上标字母不同者之间包括未标注字母者表示与其他所有标注字母者存在显著差异 ( $P < 0.05$ ), 含相同字母或无字母标注的组差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

(A0) 添加美人鱼发光杆菌活菌; (A1) 添加美人鱼发光杆菌灭活菌; (B0) 添加坚强芽孢杆菌活菌; (B1) 添加坚强芽孢杆菌灭活菌; (C) 为基础饲料对照组。下同。

Fig. 1 Serum acid phosphatase (ACP) activity of *L. vannamei* fed different diets

Means within rows ( $n = 3$ ) with the different letters including the group without letter between with letters are significant different ( $P < 0.05$ ).

(A0) Basic diets containing *P. damsela*; (A1) Basic diets containing ultrasonicated *P. damsela*; (B0) Basic diets containing *B. firmus*; (B1) Basic diets containing ultrasonicated *B. firmus*; (C) Basic diet as blank control group. The same as following.

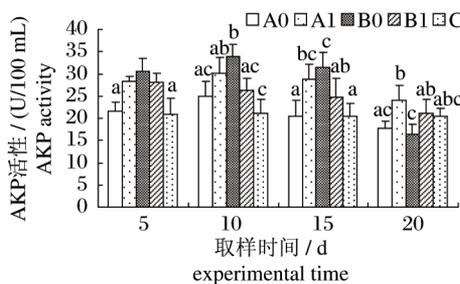


图2 各实验组凡纳滨对虾血清碱性磷酸酶活力

Fig. 2 Serum alkaline phosphatase (AKP) activity of *L. vannamei* fed different diets

过氧化氢酶 (CAT) 活力 由图 3 可见, 各免疫实验组对虾血清中过氧化氢酶活性呈上下波动状的变化趋势。第 5 天时, B0 组即投喂添加坚强芽孢杆菌 PC465 活菌的免疫实验组和 B1 组即投喂添加坚强芽孢杆菌 PC465 灭活菌的免疫实验组对虾血清过氧化氢酶活性显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。

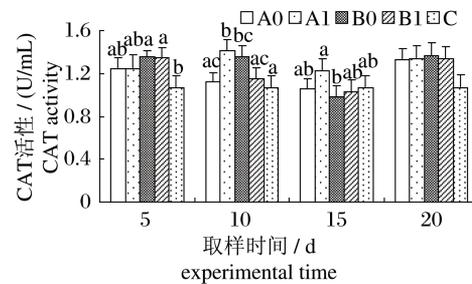


图3 各实验组凡纳滨对虾血清过氧化氢酶活力

Fig. 3 Serum catalase (CAT) activity of *L. vannamei* fed different diets

超氧化物歧化酶 (SOD) 活力 由图 4 可见, 各免疫实验组对虾血清中超氧化物歧化酶活性呈上下波动状的变化趋势。在整个实验期间, A0 组即投喂添加美人鱼发光杆菌 PC463 活菌和 A1 组即投喂添加美人鱼发光杆菌 PC463 灭活菌的免疫实验组对虾血清中超氧化物歧化酶活性显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。

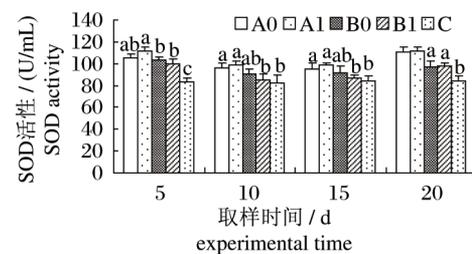


图4 各实验组凡纳滨对虾血清超氧化物歧化酶活力

Fig. 4 Serum superoxide dismutase (SOD) activity of *L. vannamei* fed different diets

溶菌酶 ((UL) 活力 由图 5 可见, 各免疫实验组对虾血清中溶菌酶活性呈上下波动状的变化趋势, 在第 10 天时达到最大值, 且显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。在整个实验期间, A0 组即投喂添加美人鱼发光杆菌 PC463 活菌和 B0 组即投喂添加坚强芽孢杆菌 PC465 活菌的免疫实验组对虾血清中超氧化物歧化酶活性显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。

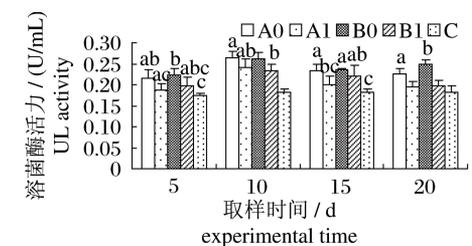


图5 各实验组凡纳滨对虾血清溶菌酶活力

Fig. 5 Serum lysozyme (UL) activity of *L. vannamei* fed different diets

## 2.2 WSSV 感染后凡纳滨对虾存活率

通过 WSSV 感染实验,比较在感染之后 4 ~ 13 d 期间不同免疫组之间凡纳滨对虾存活率的变化趋势。从表 1 可以看出各实验组在感染后第 5 天开始存活率呈较显著的递减趋势。第 9 ~ 13 天时,各免疫实验组对虾存活率显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。在攻毒实验第 13 天时,A1 组即投

喂添加美人鱼发光杆菌 PC463 灭活菌的免疫组的存活率为( $49\% \pm 15\%$ )、B0 组即投喂添加加强芽孢杆菌 PC465 活菌的免疫组的存活率为( $53\% \pm 12\%$ ),实验结果表明饲料中添加美人鱼发光杆菌 PC463 灭活菌和加强芽孢杆菌 PC465 活菌能在一定程度上提高对虾的抗病力。

表 1 各实验组凡纳滨对虾感染 WSSV 后的存活率  
Tab.1 Survival rate of *L. vannamei* with WSSV infection in test groups

感染时间/d time	组别 group				
	A0	A1	B0	B1	C
4	0.97 ± 0.33	1	0.94 ± 0.4 <sup>ab</sup>	0.94 ± 0.4 <sup>ab</sup>	0.96 ± 0.6 <sup>b</sup>
5	0.88 ± 0.2 <sup>a</sup>	1	0.89 ± 0.5 <sup>b</sup>	0.89 ± 0.5 <sup>b</sup>	0.74 ± 0.5 <sup>ac</sup>
6	0.7 ± 0.33 <sup>a</sup>	0.99 ± 0.2	0.86 ± 0.11 <sup>b</sup>	0.83 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.72 ± 0.19 <sup>ab</sup>
7	0.63 ± 0.33 <sup>ac</sup>	0.98 ± 0.2	0.84 ± 0.1 <sup>bc</sup>	0.79 ± 0.13 <sup>ab</sup>	0.53 ± 0.6 <sup>c</sup>
8	0.58 ± 0.5 <sup>ac</sup>	0.94 ± 0.5 <sup>ab</sup>	0.76 ± 0.16 <sup>a</sup>	0.73 ± 0.9 <sup>a</sup>	0.38 ± 0.4 <sup>c</sup>
9	0.54 ± 0.5	0.64 ± 0.2	0.73 ± 0.18	0.6 ± 0.1	0.29 ± 0.2 <sup>a</sup>
10	0.5 ± 0.33	0.56 ± 0.16	0.67 ± 0.13	0.52 ± 0.8	0.16 ± 0.5 <sup>a</sup>
11	0.43 ± 0.3 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.15 <sup>ab</sup>	0.63 ± 0.12 <sup>b</sup>	0.38 ± 0.2 <sup>a</sup>	0
12	0.39 ± 0.5 <sup>ab</sup>	0.49 ± 0.16 <sup>a</sup>	0.53 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.27 ± 0.6 <sup>b</sup>	0
13	0.39 ± 0.5 <sup>ab</sup>	0.49 ± 0.15 <sup>a</sup>	0.53 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.27 ± 0.6 <sup>b</sup>	0

注:表中的值为平均数 ± 标准差( $n=3$ )同行数据上标字母不同者之间包括未标注字母者表示与其他所有标注字母者存在显著差异( $P < 0.05$ ),含相同字母或无字母标注的组差异不显著( $P > 0.05$ )。(A0)添加美人鱼发光杆菌活菌;(A1)添加美人鱼发光杆菌灭活菌;(B0)添加加强芽孢杆菌活菌;(B1)添加加强芽孢杆菌灭活菌;(C)为基础饲料对照组。

Notes: Means within rows ( $n=3$ ) with the different letters including the group without letter between with letters are significant different ( $P < 0.05$ ). (A0) Basic diets containing *P. damsela*; (A1) Basic diets containing ultrasonicated *P. damsela*; (B0) Basic diets containing *B. firmus*; (B1) Basic diets containing ultrasonicated *B. firmus*; (C) Basic diet as blank control group.

## 3 讨论

益生菌在人类、畜牧业、农业等方面的应用研究发展较快,相关规定也比较详尽。益生菌在水产业中的应用起步较晚,目前应用较多的主要有光合细菌、硝化细菌、芽孢杆菌、双歧杆菌、弧菌、假单胞菌等,但农业部对在水产养殖上能够作为益生菌应用的微生物尚无明确的规定。本实验所用美人鱼发光杆菌 PC463 和加强芽孢杆菌 PC465 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<sup>[12]</sup>。芽孢杆菌是水产养殖行业应用最广泛的益生菌之一,它可以提高幼年斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 的存活率、生长速度、健康状况和减少弧菌致病机率<sup>[13]</sup>。芽孢杆菌被证实具有粘附能力,产生抗菌肽,并能够提高宿主动物的免疫活性<sup>[14-16]</sup>。美人鱼发光杆菌可引起养殖的卵形鲳鲹 (*Trachinotus ovatus*)、半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*)、三疣梭子蟹

(*Portunus trituberculatus*) 发生细菌性病害<sup>[17-19]</sup>,较多的学者认为美人鱼发光杆菌是条件致病菌,但也不排除菌株本身的基因型存在差异<sup>[20]</sup>。本实验通过比较两株细菌活体和灭活之后的免疫非特异免疫特性和 WSSV 感染后存活率进行比较,进而筛选出能过增强凡纳滨对虾免疫活性的肠道优势菌株。同时,本实验室将另一株美人鱼发光杆菌给予凡纳滨对虾后,取得了可以提高对虾血清免疫酶活性和抵御 WSSV 感染等结果<sup>[21]</sup>。

### 3.1 美人鱼发光杆菌和加强芽孢杆菌对凡纳滨对虾非特异性免疫酶活性影响的比较

对虾体液免疫主要是依靠血淋巴中的一些非特异性的酶或活性因子免疫因子如酸性磷酸酶、碱性磷酸酶、过氧化物酶、超氧化物歧化酶等共同参与对虾的体液免疫,促进血细胞吞噬,介导凝集和凝固,产生杀菌物质等反应进行免疫防御,进而提高其自身对抗病毒的能力。在本研究中,饲料中添加益生菌活菌和破碎菌能在不同程度上提高

凡纳滨对虾非特异免疫因子的活性。其中,添加坚强芽孢杆菌活菌的免疫组凡纳滨对虾非特异免疫相关因子酸性磷酸酶、碱性磷酸酶、超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。王永胜等<sup>[22]</sup>报道的益生菌能在不同程度上提高凡纳滨对虾非特异性免疫相关因子活性,Rengpipat 等<sup>[23]</sup>用芽孢杆菌 S11 菌株饲喂斑节对虾也取得了类似的实验结果。

酸性磷酸酶和碱性磷酸酶是存在于生物体内的两种重要水解酶类,参与重要的代谢调控,在体内直接参与磷酸基团的转移和代谢。其中,前者可以催化磷酸单酯的水解反应及磷酸基团的转移反应,能加速物质的摄取和转运,在甲壳动物中的 ACP 来自于颗粒细胞的颗粒体,是溶酶体酶的标志酶;后者是一种磷酸单脂酶,可催化所有的磷酸单酯的水解反应及磷酸基团的转移反应,它直接参与磷代谢,加速物质的摄取和转运。在本实验中,饲料中添加坚强芽孢杆菌活菌的免疫组凡纳滨对虾酸性磷酸酶、碱性磷酸酶活性显著高于其他实验组和对照组 ( $P < 0.05$ )。这与朱学芝等<sup>[24]</sup>在凡纳滨对虾饲料中添加芽孢杆菌引起对虾血清中碱性磷酸酶和酸性磷酸酶含量显著升高的结果相近。

过氧化氢酶是生物体内保护酶系统中重要的保护酶之一,起着催化  $H_2O_2$  分解,消除过氧化氢,防止羟自由基的形成,保护生物体组织免受毒害的重要作用。本实验免疫 5 d 和 10 d 时,饲料中添加坚强芽孢杆菌活菌的免疫组凡纳滨对虾血清中过氧化氢酶的活性显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ),其他组差异不显著。

超氧化物歧化酶是一类广泛存在于生物体内的金属酶,通过催化超氧阴离子 ( $O_2^-$ ) 发生歧化反应,产生过氧化氢 ( $H_2O_2$ ) 和氧 ( $O_2$ ),平衡体内的氧自由基,是生物体抗氧化应激酶系统中的重要成员,在维持生物体内活性氧分子的代谢平衡、保护机体免受活性氧损伤和提高机体对病原刺激的防御能力等方面起重要作用。在本实验中,饲料中添加益生菌活菌和破碎菌的所有免疫组其凡纳滨对虾超氧化物歧化酶 (SOD) 活性显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。

溶菌酶是在自然界分布广泛的一种水解酶,能杀死并降解被识别并吞噬的病毒或细菌,是非特异性免疫系统的主要成分,在虾类免疫中起重

要的作用,广泛存在于多种组织和体液中。溶菌酶活性已被作为衡量机体非特异性免疫的重要指标之一。本研究中,饲料中添加坚强芽孢杆菌活菌的免疫组凡纳滨对虾溶菌酶显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。

### 3.2 美人鱼发光杆菌和坚强芽孢杆菌对凡纳滨对虾抗 WSSV 病毒影响的比较

WSSV 具有很高的侵袭性和复制能力,可广泛感染对虾的组织细胞<sup>[2]</sup>,造成受感染的对虾在 7~10 d 内绝大多数发生死亡。每年给对虾养殖业造成几百亿元的经济损失,严重威胁对虾养殖业的可持续发展。1995 年,世界动物卫生组织 (OIE)、联合国粮农组织 (FAO) 以及亚太地区水产养殖发展网络中心 (NACA) 将其列为需要报告的水生动物病毒性疫病之一<sup>[1]</sup>。

本实验中,添加坚强芽孢杆菌活菌免疫组抗 WSSV 存活率 ( $0.53 \pm 0.12$ ) 显著高于对照组的存活率,同时其在免疫阶段溶菌酶、碱性磷酸酶、超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活力显著高于对照组。免疫相关酶活性与凡纳滨对虾的抗病力的高低存在关联性,可能的原因是益生菌本身含有多糖类、多肽类等活性物质,或其也可分泌活性物质,刺激对虾体内免疫系统分泌相关的免疫因子,从而达到提高对虾非特异性免疫能力和疾病抵抗力的目的。

本实验中美人鱼发光杆菌破碎菌与坚强芽孢杆菌破碎菌相比,前者能够更好地提高凡纳滨对虾非特异性免疫酶的活力和抗 WSSV 的免疫保护率,可能是由于美人鱼发光杆菌破碎后其本身或细胞壁成分能刺激对虾的非特异性免疫系统,诱导其发挥作用,在此过程中干扰病毒对宿主细胞的粘附、抑制病毒的复制,从而增强机体的免疫功能。

#### 参考文献:

- [1] OIE (World Organisation for Animal Health; Office International des Epizooties; White spot disease [M] // OIE Aquatic Animal Health Standards Commission, ED. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals, 5th edition. Paris: OIE, 2006: 379-391.
- [2] Lo C F, Kou G H. Virus-associated white spot syndrome of shrimp in Taiwan; a review [J]. Fish Pathology, 1998, 33, 365-371.

- [ 3 ] Robalino J, Bartlett T, Shepard E, *et al.* Double-stranded RNA induces sequence-specific antiviral silencing in addition to nonspecific immunity in a marine shrimp; convergence of RNA interference and innate immunity in the invertebrate antiviral response [ J ]. *Journal of Virology*, 2005, 79: 13561 – 13571 .
- [ 4 ] Sarathi M, Simon M C, Venkatesan C, *et al.* Oral administration of bacterially expressed VP28 dsRNA to protect *Penaeus monodon* from white spot syndrome virus [ J ]. *Marine Biotechnology*, 2008, 10, 242 – 249.
- [ 5 ] Wang Y B, Xu Z R, Xia M S. The effectiveness of commercial probiotics in Northern White Shrimp (*Penaeus vannamei* L.) ponds [ J ]. *Fisheries Science*, 2005, 71: 1034 – 1039.
- [ 6 ] Sakata T. Microflora in the digestive tract of fish and shellfish [ J ]. *Microbiology in Poecilotherms*, 1990: 171 – 176.
- [ 7 ] Dalmin G, Kathiresan K, Purushothaman A. Effect of probiotics on bacterial population and health status of shrimp in culture pond ecosystem [ J ]. *Indian Journal of Experimental Biology*, 2001, 39: 939 – 942.
- [ 8 ] Sakai M, Yoshida T, Astuta S, *et al.* Enhancement of resistance to vibriosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) by oral administration of *Clostridium butyricum* bacteria [ J ]. *Fish Disease*, 1995, 18: 187 – 190.
- [ 9 ] Rengpipat S, Rukpratanporn S, Piyatiratitivorakul S, *et al.* Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11) [ J ]. *Aquaculture*, 2000, 191: 271 – 288.
- [ 10 ] Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, *et al.* Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture [ J ]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000, 64(4): 655 – 671.
- [ 11 ] 胡毅, 谭北平, 麦康森, 等. 饲料中益生菌对凡纳滨对虾肠道菌群及部分免疫指标的影响 [ J ]. *中国水产科学*, 2008, 15(2): 244 – 251.
- [ 12 ] 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.
- [ 13 ] 雷质文, 黄捷, 杨冰, 等. 感染白斑综合征病毒 (WSSV) 对虾相关免疫因子的研究 [ J ]. *中国水产科学*, 2001, 8(4): 46 – 51.
- [ 14 ] Dalmin G, Kathiresan K, Purushothaman A. Effect of probiotics on bacterial population and health status of shrimp in culture pond ecosystem [ J ]. *Indian Journal of Experimental Biology*, 2001, 39: 939 – 942.
- [ 15 ] Cherif A, Ouzari H, Daffonchio D. A novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1.7, a new strain isolated from soil [ J ]. *Letters in Applied Microbiology*, 2001, 32: 243 – 247.
- [ 16 ] Moriarty D. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds [ J ]. *Aquaculture*, 1998, 164(1): 351 – 358.
- [ 17 ] 王瑞旋, 冯娟, 苏友禄, 等. 卵形鲳鲆美人鱼发光杆菌杀鱼亚种的分离鉴定 [ J ]. *中国水产科学*, 2010, 17(5): 1020 – 1027.
- [ 18 ] 王燕, 韩茵, 李筠, 等. 半滑舌鳎病原菌 (发光杆菌杀鱼亚种) 的分离与鉴定 [ J ]. *微生物学报*, 2007, 47(5): 763 – 768.
- [ 19 ] 石亚素, 童国忠, 顾松叶. 三疣梭子蟹中美人鱼发光杆菌的分离鉴定 [ J ]. *中国卫生检验杂志*, 2004, 14(4): 476 – 478.
- [ 20 ] Kim H R, Kim J W, Lee M K, *et al.* Septicemia progressing to fatal hepatic dysfunction in an cirrhotic patient after oral ingestion of *Photobacterium damsela*: a case report [ J ]. *Infection*, 2009, 37(6): 555 – 556.
- [ 21 ] 兰萍, 宋晓玲, 张辉, 等. 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, 31(1): 65 – 73.
- [ 22 ] 王永胜, 钱鲁闽, 陈昌生, 等. 抗生素和有益微生物对凡纳滨对非特异性免疫效应的研究 [ J ]. *台湾海峡*, 2008, 27(2): 945.
- [ 23 ] Rengpipat S, Phianphak W, Piyatiratitivorakul S, *et al.* Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth [ J ]. *Aquaculture*, 1998, 167(3–4): 301 – 313.
- [ 24 ] 朱学芝, 郑石轩, 潘庆军, 等. 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: 55 – 58.

## Effects of digestive tract probiotics on immune enzyme activity and anti-WSSV ability of *Litopenaeus vannamei*

LIU Jun, SONG Xiao-ling\*, LIU Li, CHAI Peng-cheng, HUANG Jie

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

**Abstract:** A 20 days feeding experiment was conducted to study the effects of probiotics on immune enzyme activity( alkaline phosphatase AKP, a cidic phosphatase ACP, superoxide dismutase SOD, catalase CAT and lysozyme UL ) and anti-WSSV ability of *Litopenaeus vannamei*. Diets were supplemented with *Photobacterium damsela*( live,  $\geq 10^{11}$  CFU/g or inactivated, 1 g/kg) or *Bacillus firmus*( live,  $\geq 10^{11}$  CFU/g or inactivated, 1 g/kg). Controls were fed non-supplemented diet. In this experiment, feeding the bacteria species( inactivated *P. damsela*; live *Bacillus firmus*) significantly increased serum ACP, AKP, SOD and CAT compared with controls ( $P < 0.05$ ), at the same time, their cumulative morality were ( $49\% \pm 15\%$ ) and ( $53\% \pm 12\%$ ) respectively, which were significantly increased compared with controls ( $P < 0.05$ ). The present results suggested that the diets supplemented with *B. firmus*( live) or *P. damsela*( inactivated) could improve immune enzyme activity and anti-WSSV ability of shrimp, and the probiotics with the function of preventing disease could be used as one of effective ways of biological prevention and control to WSSV.

**Key words:** *Litopenaeus vannamei*; probiotics; non-specific immunity; white spot syndrome virus(WSSV)

**Corresponding author:** SONG Xiao-ling. E-mail: songxl@ysfri.ac.cn