

饲料中添加益生菌对凡纳滨对虾抗感染和 5 种免疫基因表达的影响

张盛静^{1,2}, 宋晓玲^{1*}, 赵小金^{1,2}, 黄 健^{1,3}

(1. 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;

3. 青岛国家海洋科学重点实验室, 山东 青岛 266071)

摘要: 为研究饲料中添加益生菌对凡纳滨对虾抗副溶血弧菌感染能力和非特异性免疫基因表达水平的影响,以初体质量为(6.95 ± 1.20)g 的凡纳滨对虾为研究对象,在室内养殖箱进行 3 周的养殖实验和 2 周的副溶血弧菌人工感染实验;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、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌/枯草芽孢杆菌(1:1)配制成的 3 组实验饲料,实验饲料中益生菌的终浓度为 10⁷ cfu/g。并采用实时荧光定量 RT-PCR 方法,对保护率最高的地衣芽孢杆菌/枯草芽孢杆菌实验组进行凡纳滨对虾相关免疫基因表达水平的分析。实验结果表明,在饲料中添加单一益生菌或复合益生菌均可显著提高对虾抗副溶血弧菌感染的能力($P < 0.05$),且复合益生菌的保护效果更佳,其相对免疫保护率为 31.11%。感染副溶血弧菌后,地衣芽孢杆菌 + 枯草芽孢杆菌实验组凡纳滨对虾血淋巴中的先天免疫缺陷基因(innate immune deficiency gene, IMD)、对虾素 3a 分子(penaiedin 3a)、酚氧化酶原(prophenoloxidase, proPO)、溶菌酶(Lysozyme, LZM)和甲壳素 Crustin 的 mRNA 的相对表达量均显著上调,且分别在 18 ~ 24 h 达到最大值。实验结果提示:饲料中添加芽孢杆菌可有效提高凡纳滨对虾抗副溶血弧菌感染的能力,这种能力的提高可能是通过增加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; 副溶血弧菌

中图分类号: Q 785; S 963.73

文献标志码: A

自 20 世纪 80 年代初,对虾养殖业成为世界范围内的重要经济产业。然而,全球范围内的对虾养殖由于传染性疾病的发生遭受严重的损失^[1-2]。2012 年底,在泰国东部沿海养殖场首次发现凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)感染偷死病(early mortality syndrome, EMS)。早期 30 ~ 35 d 的斑节对虾和凡纳滨对虾的仔虾容易感染 EMS,并造成仔虾的急性死亡^[3-5]。对虾感染 EMS,表现的特征为肝胰腺严重萎缩和上皮细胞大量脱落。因此,该病重新被定义为急性肝胰腺坏死综合症(acute hepatopancreatic necrosis

disease, AHPND)^[6-7]。来自美国亚利桑那大学的研究小组运用实验室研究模型,使用科赫法则确定了越南对虾患 AHPND 的病原微生物是副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)^[8]。

凡纳滨对虾的免疫系统由 2 个重要系统组成:先天免疫系统和非特异性免疫系统。一般认为,甲壳动物在对抗外来病原微生物入侵时是非特异性免疫起到主要作用^[9]。其体液免疫包括血淋巴凝集、产生溶血素、释放酚氧化酶和黑色素以及溶酶体的水解,并通过一系列免疫因子如对虾素 3a 分子(penaiedin 3a)、酚氧化酶原

收稿日期:2015-02-14 修回日期:2015-04-10

资助项目:国家重点基础研究发展计划(2012CB114405);山东省自主创新专项(2013CXC80202);山东省泰山学者建设工程专项;农业部科研杰出人才和创新团队专项

通信作者:宋晓玲, E-mail: songxl@ysfri.ac.cn

(prophenoloxidase, proPO)、溶菌酶(Lysozyme, LZM)和甲壳素Crustin等发挥作用,上述免疫分子与凡纳滨对虾抗病原感染能力的强弱密切相关^[10]。

近年来,人们提出微生物防控理念用于预防和控制水产动物疾病的发生。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。益生菌的使用有利于水产养殖业的可持续发展^[11-13]。

本研究将分离自虾池生物絮团的2株芽孢杆菌添加在基础饲料中,探讨在商品饲料中添加单一和复合益生菌对凡纳滨对虾抵抗副溶血弧菌能力的影响。选择死亡率最低的实验组,利用相对实时荧光定量RT-PCR(real-time PCR)技术,研究感染副溶血弧菌后凡纳滨对虾血淋巴中先天免疫缺陷基因(innate immune deficiency gene, IMD)、对虾素3a分子(penaiedin 3a)、酚氧化酶原(prophenoloxidase, proPO)、溶菌酶(Lysozyme, LZM)和甲壳素Crustin等对虾抗病相关基因mRNA表达水平的变化规律,从对虾抗病基因表达水平分析益生菌发挥拮抗弧菌保护作用可能的机制,为益生菌在对虾养殖生产中的应用提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验对虾 实验用凡纳滨对虾于2014年8月3日购自青岛市沙子口对虾养殖场,体质量(6.95±1.20)g。实验对虾暂养于60L水族整理箱中,有效水体约为40L。养殖期间每天换水1次,投喂饲料3次,水温(23±2)℃,连续充气。

益生菌 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*),菌株编号分别为2012071701和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,用PBS缓冲液稀释制成菌悬液用于包裹饲料。

副溶血弧菌 攻毒用副溶血弧菌菌株编号20130628001S02,从患AHPND的凡纳滨对虾中分离获得。活化菌种后使用2216E液体培养基扩

大培养,离心收集菌体,用PBS缓冲液稀释用于人工感染实验。

1.2 饲料制备

基础饲料为青岛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(3g/500g)。实验饲料:按一定的比例将菌液与PBS缓冲液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),实验饲料中芽孢杆菌的终浓度为10⁷cfu/g,制备好后存放于4℃冰箱,并定期平板涂布计数,保证添加芽孢杆菌数量在实验期间的一致性。

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质量的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 副溶血弧菌感染实验

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尾对虾进行副溶血弧菌人工感染实验,每组5个重复,其中3个重复用于统计死亡率,两个重复用于取样。用无菌注射器向每尾虾第二腹节肌肉中注射50μL的副溶血弧菌悬浊液(悬浊液的浓度为10⁶cfu/mL,此剂量经预实验确定),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,14d后结束感染实验。

1.5 免疫相关基因的表达量分析

样品采集及RNA的提取 攻毒实验开始后分别在6h、12h、18h、24h、36h、48h、72h和7d从各组随机取3尾虾,用无菌注射器抽取血淋巴后放入RNase-Free的1.5mL 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)提取血淋巴总RNA,方法参照说明书。用NanoDrop 2000c(Thermo)定量检测RNA的OD_{260nm}和OD_{280nm}值以及OD_{260nm}/OD_{280nm}比值,1.5%的琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性,放入-80℃冰箱中保存,用于IMD、penaiedin 3a、Crustin、proPO和LZM mRNA表达

量的测定。

cDNA 的合成 应用 PrimeScript[®] RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒(大连宝生物工程股份有限公司)进行 cDNA 合成。该试剂盒合成 cDNA 反应分两步:1. 基因组 DNA 的除去反应,反应体系 10 μ L (5 \times g DNA Eraser Buffer 2 μ L, gDNA Eraser 1 μ L, total RNA 1 μ g, RNase Free dH₂O 6 μ L), 42 $^{\circ}$ C 孵育 2 min; 2. 反转录反应,反应体系 20 μ L (5 \times PrimeScript[®] Buffer 24 μ L,

PrimeScript[®] RT Enzyme Mix 1 μ L, RT Primer Mix 1 μ L, 第一步反应液 10 μ L, RNase Free dH₂O 4 μ L), 37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min, 85 $^{\circ}$ C 加热 5 s 合成 cDNA 模板。

1.6 实时荧光定量 PCR 分析基因表达

凡纳滨对虾免疫相关基因,内参基因 β -actin 引物序列见表 1,使用的引物序列参考文献[14-16],引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 凡纳滨对虾非特异性免疫基因与内参基因 β -actin 引物序列

Tab. 1 Primer pairs for IMD, lysozyme, and β -actin etc. genes for *L. vannamei*

目的基因 aim gene	序列号 no. sequence	正向引物(5'-3') forward primer(5'-3')	反向引物(3'-5') reverse primer(3'-5')
β -actin	AF300705	GAG CAA CAC GGA GTT CGT TGT	CAT CAC CAA CTG GGA CGA CAT GGA
IMD	AY170126.2	ATA CAT CCT GCC GTT GCC GA	CCG AGA TGG GTT CCC TTG TT
penaiedin 3a	Y14926	CACCCTTCGTGAGACCTTTG	AATATCCCTTTCCACGTGAC
Crustin	AY488497	GAGGGTCAAGCCTACTGCTG	ACTTATCGAGGCCAGCACAC
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

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 RT-PCR。程序为 95 $^{\circ}$ C 10 min 预变性;95 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 15 s,72 $^{\circ}$ C 20 s 共 45 个循环;反应后 65 $^{\circ}$ C 上升至 95 $^{\circ}$ C 测定熔解曲线检测反应特异性。每个复孔以 β -actin 为内参基因。基因表达结果采用相对表达量的形式,以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[17] 进行计算。

1.7 数据处理和统计分析

实验结果用平均数 \pm 标准差 (mean \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 ANOVA) 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 凡纳滨对虾感染副溶血弧菌的累积死亡率

各实验组和对照组在投喂相应的饲料 20 d 后注射感染副溶血弧菌,感染实验期间各组对虾的累积死亡率结果见表 2。感染的前 2 天各实验组和对照组累积死亡率无显著差异 ($P > 0.05$),感染第 3 天各实验组对虾的累积死亡率均显著低于对照组 ($P < 0.05$),感染第 4 天地衣芽孢杆菌单一实验组、枯草芽孢杆菌单一实验组和对照组

的对虾累积死亡率均显著高于地衣芽孢杆菌/枯草芽孢杆菌复合组 ($P < 0.05$)。感染第 5 天地衣芽孢杆菌/枯草芽孢杆菌复合实验组的对虾累积死亡率均显著低于地衣芽孢杆菌单一实验组、枯草芽孢杆菌单一实验组和对照组 ($P < 0.05$),枯草芽孢杆菌单一实验组的对虾累积死亡率和对照组无显著差异 ($P > 0.05$),地衣芽孢杆菌单一实验组的对虾累积死亡率显著低于对照组 ($P < 0.05$)。从感染第 6 天以后对照组的对虾累积死亡率均显著高于各实验组 ($P < 0.05$),各实验组的累积死亡率无显著差异 ($P > 0.05$)。8 d 后各实验组的对虾累积死亡率趋于稳定,至感染结束后对照组的对虾累积死亡率为 100%,显著高于地衣芽孢杆菌单一实验组的对虾累积死亡率 73.34% \pm 9.43%,枯草芽孢杆菌单一实验组的对虾累积死亡率 77.78% \pm 6.29%,地衣芽孢杆菌/枯草芽孢杆菌复合实验组的对虾累积死亡率 68.89% \pm 8.31%。实验结果表明,投喂含单一地衣芽孢杆菌、单一枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌/枯草芽孢杆菌复合实验组的饲料可显著提高对虾抗副溶血弧菌感染的能力 ($P < 0.05$),其免疫相对保护率分别为 26.66% \pm 9.43%、22.22% \pm 6.29% 和 31.11% \pm 8.31%。且地衣芽孢杆菌/枯草芽孢杆菌复合实验组配合的使用效果最佳。

表2 投喂芽孢杆菌的凡纳滨对虾注射感染副溶血弧菌后的累积死亡率
Tab.2 Cumulative mortality of *L. vannamei* fed with probiotics preparations after being challenged with *V. parahaemolyticus*

	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
Bl	4.44 ± 6.28 ^a	26.67 ± 9.42 ^a	40.00 ± 9.42 ^a	55.56 ± 8.32 ^a	60.00 ± 5.45 ^a	66.67 ± 5.44 ^a	71.11 ± 6.28 ^a
Bs	4.45 ± 3.14 ^a	28.89 ± 3.14 ^a	46.67 ± 5.44 ^a	62.22 ± 3.14 ^a	68.89 ± 8.31 ^b	71.11 ± 6.28 ^a	77.78 ± 6.29 ^a
Bl/Bs	2.22 ± 3.14 ^a	24.45 ± 3.14 ^a	40.00 ± 5.45 ^a	48.89 ± 6.28 ^b	53.33 ± 5.44 ^c	57.78 ± 8.31 ^a	64.44 ± 8.32 ^a
C	6.67 ± 5.44 ^a	37.78 ± 3.14 ^a	57.78 ± 3.14 ^b	68.89 ± 3.14 ^a	80.00 ± 5.45 ^b	91.11 ± 6.28 ^b	91.11 ± 6.28 ^b
	8 d	9 d	10 d	11 d	12 d	13 d	14 d
Bl	73.34 ± 9.43 ^a						
Bs	77.78 ± 6.29 ^a						
Bl/Bs	68.89 ± 8.31 ^a						
C	93.33 ± 5.44 ^b	95.55 ± 3.14 ^b	100 ± 0.00 ^b	100 ± 0.00 ^b	100 ± 0.00 ^b	100 ± 0.00 ^b	100 ± 0.00 ^b

注:上标字母相同表示差异不显著($P > 0.05$),字母不相同表示差异显著($P < 0.05$),下同。C:对照组;Bl:地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*);Bs:枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*);Bl/Bs:地衣芽孢杆菌/枯草芽孢杆菌

Notes: The same superscript letters indicates no significant difference ($P > 0.05$), different letters mean significant difference ($P < 0.05$), the same below. Bl means *B. licheniformis* group; Bs means *B. subtilis* group; Bl/Bs means *B. licheniformis*/*B. subtilis* group; C means control group

从感染实验结果得知,地衣芽孢杆菌/枯草芽孢杆菌复合实验组相对保护率最高,达到31.11%。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副溶血弧菌感染的死亡率。

2.2 凡纳滨对虾感染副溶血弧菌后血淋巴 IMD mRNA 相对表达量

使用实时荧光定量 RT-PCR 方法测定地衣芽孢杆菌/枯草芽孢杆菌复合实验组和对照组在感染副溶血弧菌后血淋巴 IMD mRNA 相对表达量的变化见图1。实验组感染副溶血弧菌后在12 h、18 h、24 h、36 h、72 h 和 7 d 的 IMD mRNA 的相对表达量均显著高于0 h ($P < 0.05$),24 h 达到峰值之后开始下降,到7 d 时仍显著高于初始水平。对照组感染副溶血弧菌后在12、18、24 和 48 h 的 IMD mRNA 的相对表达量均显著高于0 h ($P < 0.05$),18 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12 h、18 h、24 h、36 h、72 h 和 7 d 的 IMD mRNA 的相对表达量显著高于对照组 ($P < 0.05$),只有48 h 显著低于对照组。

2.3 凡纳滨对虾感染副溶血弧菌后血淋巴 penaeidin 3a mRNA 相对表达量

使用实时荧光定量 RT-PCR 方法测定地衣芽孢杆菌/枯草芽孢杆菌复合实验组和对照组在感染副溶血弧菌后血淋巴 penaeidin 3a mRNA 相对表达量的变化见图2。实验组感染副溶血弧菌后在6、12、18、24、36 和 72 h 的 penaeidin 3a mRNA 的相对表达量均显著高于0 h ($P < 0.05$),18 h 达

到峰值之后开始下降,到7 d 时基本降至初始水平。对照组感染副溶血弧菌后在6 h、12 h、24 h、36 h、72 h 及 7 d 的 penaeidin 3a mRNA 的相对表达量均显著低于0 h ($P < 0.05$);18 和 48 h 的 penaeidin 3a mRNA 的相对表达量均显著高于0 h ($P < 0.05$),18 h 达到峰值之后开始下降,到48 h 时表达量略有上升,到7 d 时显著低于初始水平。实验组在6、18、24、36 和 72 h 的 penaeidin 3a mRNA 的相对表达量均显著高于对照组 ($P < 0.05$),实验组在0 h 和 48 h 的 penaeidin 3a mRNA 的相对表达量均显著低于对照 ($P < 0.05$)。

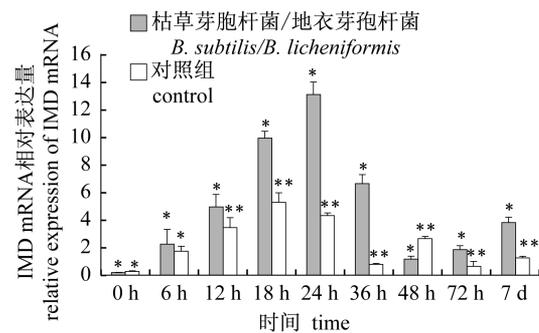


图1 凡纳滨对虾感染副溶血弧菌后血淋巴 IMD mRNA 的相对表达量

柱上 * 不同表示差异显著 ($P < 0.05$), * 相同表示差异不显著 ($P > 0.05$); 下同

Fig.1 Relative expression of IMD mRNA in the hemolymph of *L. vannamei* after being infected with *V. parahaemolyticus*

The bar chart * different showed significant difference ($P < 0.05$), the same * indicates no significant difference ($P > 0.05$); The same as the following

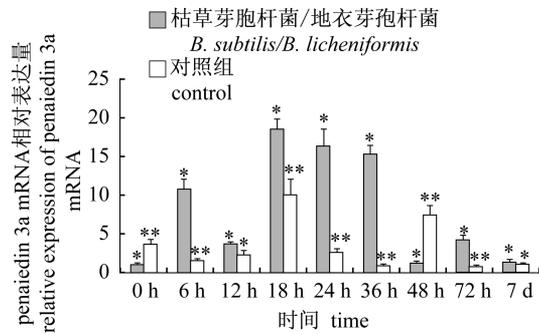


图2 凡纳滨对虾感染副溶血弧菌后血淋巴
penaeidin 3a mRNA 的相对表达量

Fig.2 Relative expression of penaeidin 3a mRNA in
the hemolymph of *L. vannamei* after being
infected with *V. parahaemolyticus*

2.4 凡纳滨对虾感染副溶血弧菌后血淋巴 proPO mRNA 相对表达量

使用实时荧光定量 RT-PCR 方法测定地衣芽孢杆菌/枯草芽孢杆菌复合实验组和对照组在感染副溶血弧菌后血淋巴 proPO mRNA 相对表达量的变化见图 3。实验组感染副溶血弧菌后在 6 h、12 h、18 h、24 h、36 h、72 h 和 7 d 的 proPO mRNA 的相对表达量均显著高于 0 h ($P < 0.05$), 24 h 达到峰值之后开始下降,到 7 d 时仍显著高于初始水平。对照组感染副溶血弧菌后在 6、12 和 18 h 的 proPO mRNA 的相对表达量均显著高于 0 h ($P < 0.05$), 在 24 h、36 h、48 h、72 h 和 7 d 的 proPO mRNA 的相对表达量与 0 h 无显著差异 ($P > 0.05$), 12 h 达到峰值之后开始下降,到 48 h 时基本降至初始水平。实验组在 6、12、18、24 和 36 h 的 proPO mRNA 的相对表达量均显著高于对照组 ($P < 0.05$)。

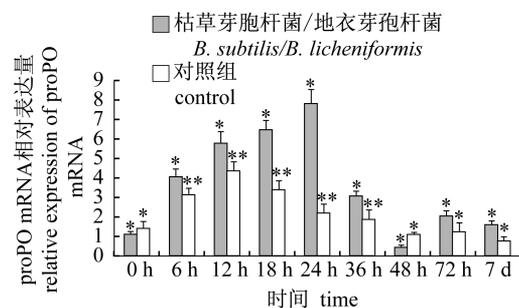


图3 凡纳滨对虾感染副溶血弧菌后血淋巴
proPO mRNA 的相对表达量

Fig.3 Relative expression of proPO mRNA in
the hemolymph of *L. vannamei* after being
infected with *V. parahaemolyticus*

2.5 凡纳滨对虾感染副溶血弧菌后血淋巴 LZM mRNA 相对表达量

使用实时荧光定量 RT-PCR 方法测定地衣芽孢杆菌/枯草芽孢杆菌复合实验组和对照组在感染副溶血弧菌后血淋巴 LZM mRNA 相对表达量的变化见图 4。实验组感染副溶血弧菌后在 6 h、12 h、18 h、24 h、36 h、48 h、72 h 和 7 d 的 LZM mRNA 的相对表达量均显著高于 0 h ($P < 0.05$), 18 h 达到峰值之后开始下降,到 7 d 时仍显著高于初始水平。对照组感染副溶血弧菌后在 6 h、12 h、18 h、24 h、36 h 和 7 d 的 LZM mRNA 的相对表达量均显著高于 0 h ($P < 0.05$), 24 h 达到峰值之后开始下降,到 7 d 时仍显著高于初始水平。实验组在 12、18、24 和 48 h 的 LZM mRNA 的相对表达量均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 实验组在 36 h 和 7 d 的 LZM mRNA 的相对表达量均显著低于对照组 ($P < 0.05$)。

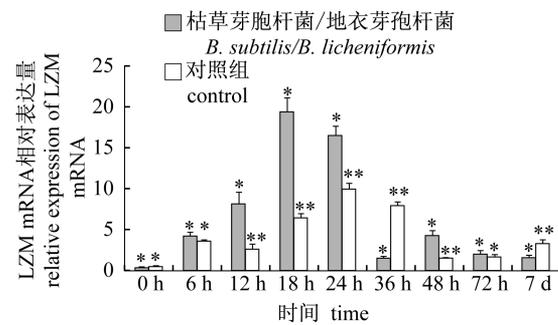


图4 凡纳滨对虾感染副溶血弧菌后血淋巴
LZM mRNA 的相对表达量

Fig.4 Relative expression of LZM mRNA in
the hemolymph of *L. vannamei* after being
infected with *V. parahaemolyticus*

2.6 凡纳滨对虾感染副溶血弧菌后血淋巴 Crustin mRNA 相对表达量

使用实时荧光定量 RT-PCR 方法测定地衣芽孢杆菌/枯草芽孢杆菌复合实验组和对照组在感染副溶血弧菌后血淋巴 Crustin mRNA 相对表达量的变化见图 5。实验组感染副溶血弧菌后在 18、24 和 36 h 的 Crustin mRNA 的相对表达量均显著高于 0 h ($P < 0.05$), 24 h 达到峰值之后开始下降,到 7 d 时基本降至初始水平。对照组感染副溶血弧菌后在 6、18、24 和 48 h 的 Crustin mRNA 的相对表达量均显著高于 0 h ($P < 0.05$), 24 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 24 和 36 h 的 Crustin mRNA 的相对表达量均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 实验组在 6、18 和 48 h 的 Crustin mRNA 的相对表达量均显著低于对照组 ($P < 0.05$)。

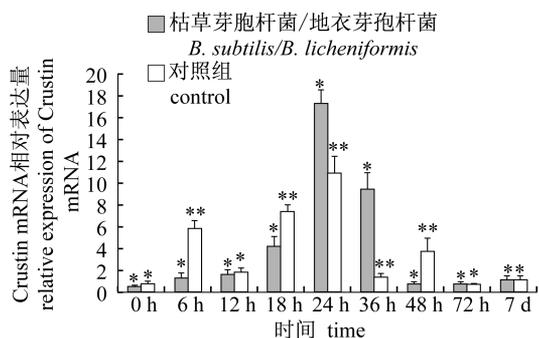


图 5 凡纳滨对虾感染副溶血弧菌后血淋巴 Crustin mRNA 的相对表达量

Fig. 5 Relative expression of Crustin mRNA in the hemolymph of *L. vannamei* after being infected with *V. parahaemolyticus*

3 讨论

芽孢杆菌是一类好氧或兼性厌氧的革兰氏阳性细菌,由于其具有促进动物营养物质的消化吸收、调节动物消化道的微生态平衡以及可减少养殖水环境的污染作用,被公认为一种有发展前景的益生菌^[18-20]。Liu 等^[21]指出在饲料中添加 5×10^{10} cfu/kg 的枯草芽孢杆菌 S12 在投喂 4 周和 8 周后分别感染哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*), 投喂含有枯草芽孢杆菌 S12 的实验组对虾在两次感染实验中死亡率均显著低于对照组。Balcázar 等^[22]用含有枯草芽孢杆菌 UTM 126 的饲料投喂凡纳滨对虾幼虾 28 d 后注射哈维氏弧菌 10^5 cfu/mL, 24 h 对照组的死亡率为 51.75%, 实验组的死亡率为 18.25%, 显著低于对照组。本实验将 2 株益生菌添加在基础饲料中投喂凡纳滨对虾, 养殖 20 d 后感染副溶血弧菌, 攻毒 14 d 后对照组的死亡率为 100%, 添加单一地衣芽孢杆菌实验组的死亡率为 73.34%, 单一枯草芽孢杆菌实验组的死亡率为 77.78%, 地衣芽孢杆菌/枯草芽孢杆菌复合组的死亡率为 68.89%, 均显著低于对照组的死亡率 ($P < 0.05$), 与上述报道结果相近。另外, 本研究中采用的副溶血弧菌感染浓度为 10^6 cfu/mL, 该浓度经预实验确定, 其原则是选择半数感染死亡的时间为 3~5 d, 全部感染死亡的

时间在 10 d 之上的最低剂量。这是由于益生菌提高养殖对虾抗感染能力不仅与外源补充益生菌的浓度有关, 更与病原感染浓度有关, 如果病原注射感染剂量过高, 对虾快速死亡, 益生菌的作用恐怕难以体现。

IMD 信号途径是凡纳滨对虾免疫防御的重要信号传导因子, 当机体受到病原菌入侵时, IMD 蛋白具有将特定异物入侵的信号由细胞外向细胞内传递, 并引起细胞产生一系列级联反应形成免疫效应因子 (如抗菌肽) 的功能^[23]。溶菌酶 (LZM) 广泛分布于对虾体内, 它能破坏革兰氏阳性菌细胞壁中的 N-乙酰胞壁酸和 N-乙酰氨基葡萄糖之间的 β -1,4 糖苷键 (肽聚糖层), 从而机体能够抵御病原微生物的入侵^[24]。病原微生物能够刺激酚氧化酶原 (prophenoloxidase activating system, proPO 系统) 产生有活性的酚氧化酶 (phenoloxidase, PO) 参与机体防御反应^[25]。Penaiedin 3a 具有 8 个保守存在的半胱氨酸残基和一段富含脯氨酸的基序, 在先天免疫系统对抗病原微生物侵染的过程中, 发挥着重要的抗菌功能^[26]。Crustin 基因属于 AMPs 家族, 在对虾免疫防御中具有重要作用, 其不仅具有抵抗病原菌侵入的作用, 而且还可以通过调节信号传导以及细胞因子的产生和释放参与免疫调节^[27]。Zokaeifar 等^[28]指出在饲料中添加枯草芽孢杆菌饲喂 8 周后感染哈维氏弧菌, proPO 和 LZM mRNA 的相对表达量显著高于对照组。张艳艳等^[29]对凡纳滨对虾注射副溶血弧菌 1.0×10^5 cfu/mL, 对照组注射等量的生理盐水, 实验组在 48 h 的 Crustin mRNA 的相对表达量显著高于对照组。葛倩倩等^[30]等对中国明对虾注射鳃弧菌 1.0×10^7 cfu/mL, 对照组注射等量的生理盐水, 实验组 IMD mRNA 的相对表达量呈先上升后降低的趋势, 在 24 h 达到最大值, 显著高于对照组。本实验中凡纳滨对虾感染副溶血弧菌后, 地衣芽孢杆菌/枯草芽孢杆菌复合实验组凡纳滨对虾血淋巴中的 IMD、penaiedin 3a、proPO、LZM 和 Crustin 的 mRNA 的相对表达量均显著上调, 且分别在 18~24 h 达到最大值, 与上述报道结果相一致。本研究选择的 5 种基因均是参与对虾抗病原感染非特异反应的主要蛋白, 综合 5 种基因 mRNA 在感染过程的表达结果来分析, 对虾感染病原后不论实验组还是对照组, 在感染前期各基

因的 mRNA 表达水平都有一个逐渐升高的过程,对照组在 12 ~ 24 h 达到最高值,实验组在 18 ~ 36 h 达到最高值;而在感染后期不论实验组还是对照组,各基因的 mRNA 表达水平快速下降,继而维持一个较低数值或接近初始水平。这可能与对虾体内的病原增殖速度和增殖量有关,病原感染前期对虾体内病原数量较少,病原刺激感染相关基因的表达和合成,而感染后期病原达到一定数量,抗病原感染分子的作用也就微乎其微了。外源补充益生菌能够显著提高抗病原感染免疫分子的表达量,且与对照组相比延长了表达高峰的周期,这可能是凡纳滨对虾感染副溶血弧菌后成活率提高的主要原因。

综上所述,在饲料中添加单一或复合益生菌,均可有效提高凡纳滨对虾抗副溶血弧菌感染的能力,以复合益生菌使用效果更佳,且 IMD、penaiedin 3a、proPO、LZM 和 Crustin 基因相对表达量在一定程度上高于对照组。地衣芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌可以作为益生菌候选菌株应用于对虾养殖生产,成为对虾防治 AHPND 的有效途径之一。

参考文献:

- [1] Zhou M, Wang A L, Cao J M. Effects of different forms of copper and supplement on growth performance, serum ceruloplasmin, and growth hormone level of *Panaeus vannamei* [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2010, 41 (4): 577 - 582. [周萌, 王安利, 曹俊明. 饲料中不同形式的铜及添加量对凡纳滨对虾 (*Panaeus 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, 2010, 41 (4): 577 - 582.]
- [2] Shaw K S, Sapkota A R, Jacobs J M, et al. Recreational swimmers' exposure to *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in the Chesapeake Bay, Maryland, USA [J]. *Environment International*, 2015, 74: 99 - 105.
- [3] Leano E M, Mohan C V. Early mortality syndrome threatens Asia' s shrimp farms [J]. *Global Aquaculture Advocate*, 2012, 15 (4): 38 - 39.
- [4] Flegel T W. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2012, 110 (2): 166 - 173.
- [5] Lightner D V, Redman R M, Pantoja C R et al. Early Mortality Syndrome Affects Shrimp In Asia [J]. *Global Aquaculture Advocate*, 2012, 15 (1): 40.
- [6] Joshi J, Srisala J, Truong V H, et al. Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) [J]. *Aquaculture*, 2014, 428 - 429: 297 - 302.
- [7] Nunan L, Lightner D, Pantoja C, et al. Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico [J]. *Diseases Aquatic Organisms*, 2014, 111 (1): 81 - 86.
- [8] Tran L, Nunan L, Redman R M, et al. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp [J]. *Diseases Aquatic Organisms*, 2013, 105 (1): 45 - 55.
- [9] Guo H, Xian J A, Bi J Z, et al. Research progress in immune factors of shrimp [J]. *Feed Industry Magazine*, 2013, 34 (22): 42 - 46. [郭慧, 冼健安, 毕建柱, 等. 虾类免疫因子的研究进展. 饲料工业, 2013, 34 (22): 42 - 46.]
- [10] Hou F J, He S L, Liu Y J, et al. RNAi knock-down of shrimp *Litopenaeus vannamei* Toll gene and immune deficiency gene reveals their difference in regulating antimicrobial peptides transcription [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2014, 44 (2): 255 - 260.
- [11] Luis-Villaseñor I E, Castellanos-Cervantes T, Gomez-Gil B, et al. Probiotics in the intestinal tract of juvenile whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*: Modulation of the bacterial community [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2013, 29 (2): 257 - 265.
- [12] 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]. *Veterinary Microbiology*, 2012, 159 (3 - 4): 443 - 450.
- [13] Diego I, Paula D, María T M, et al. Potential environmental effects of probiotics used in aquaculture [J]. *Aquaculture International*, 2012, 20: 779 - 789.
- [14] 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. 海洋与湖沼, 2012, 43 (4): 846 - 851.]

- [15] Luo C X, Huang X X, Li S, *et al.* Expressions of Toll receptor, IMD and lysozymem RNA 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. 中国水产科学, 2014, 21(1): 189 - 196.]
- [16] Wang K C H C, 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]. Developmental and Comparative Immunology, 2010, 34(1): 49 - 58.
- [17] 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, 25 (4): 402 - 408.
- [18] Decamp O, Moriarty D J W, Lavens P. Probiotics for shrimp larviculture: Review of field data from Asia and Latin American [J]. Aquaculture Research, 2008, 39(4): 334 - 348.
- [19] Vaseeharan B, Ramasamy P. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. Letters in Applied Microbiology, 2003, 36(2): 83 - 87.
- [20] Wang X, Wu Y F, Yao X H, *et al.* Effect of probiotics on water quality and bacteria community in shrimp pools at later stage of cultivation [J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2014, 26 (1): 40 - 47. [王新, 吴逸飞, 姚晓红, 等. 微生态制剂对养殖后期虾池水质及细菌群落的影响. 浙江农业学报, 2014, 26(1): 40 - 47.]
- [21] 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 white shrimp, *Litopenaeus vannamei* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 41 (2): 300 - 307.
- [22] Balcázar J L, Rojas-Luna T. Inhibitory activity of probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 against vibrio species confers protection against vibriosis in juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. Current Microbiology, 2007, 55(5): 409 - 412.
- [23] Li F H, Xiang J H. Signaling pathways regulating innate immune responses in shrimp [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 34(4): 973 - 980.
- [24] Zhang S C, Xu N. Advance in Study of Animal Lysozymes [J]. Periodical of Ocean University of China, 2014, 44(6): 46 - 51. [张士瑾, 许娜. 动物型溶菌酶研究新进展. 中国海洋大学学报, 2014, 44(6): 46 - 51.]
- [25] Huang H Y, Li S J, Wang G Z. Studies on the Crustacean Phenoloxidase Activity and its Application [J]. Marine Science Bulletin, 2000, 19 (3): 80 - 84. [黄辉洋, 李少菁, 王桂忠. 甲壳动物酚氧化酶活力及其在养殖中的应用. 海洋通报, 2000, 19(3): 80 - 84.]
- [26] Du Z Q. Gene Cloning and Sequence Analysis of Penaeidin 3 in *Litopenaeus vannamei* [J]. Journal of Yunnan Agriculture University, 2013, 28 (1): 79 - 82. [杜志强. 凡纳滨对虾对虾素 3a 基因的克隆与序列分析. 云南农业大学学报, 2013, 28 (1): 79 - 82.]
- [27] Kim M S, Jeon J M, Oh C W, *et al.* Molecular characterization of three crustin genes in the morotoge shrimp, *Pandalopsis japonica* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2012, 163(2): 161 - 171.
- [28] 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 Immunology, 2012, 33: 683 - 689.
- [29] Zhang Y Y, Liu X L, Huang H H, *et al.* Molecular cloning of Crustin-like gene in the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and its mRNA expression with *Vibrio Parahaemolyticus* challenge [J]. Journal of Northwest A & F University: Natural Science Edition, 2012, 40(12): 42 - 48. [张艳艳, 刘小林, 黄海洪, 等. 凡纳滨对虾 Crustin-like 基因的克隆及在副溶血弧菌感染条件下的表达分析. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2012, 40(12): 42 - 48.]
- [30] Ge Q Q, Li J, Liang J P, *et al.* Cloning of Imd immune signal pathway relating genes of *Fenneropenaeus chinensis* and their expression analysis [J]. Periodical of Ocean University of China, 2014, 44(1): 46 - 51. [葛倩倩, 李健, 梁俊平, 等. 中国明对虾 Imd 免疫信号通路相关基因克隆及表达分析. 中国海洋大学学报, 2014, 44(1): 46 - 51.]

Effects of adding probiotics to the feed on anti-infection and five kinds of immune gene expression of *Litopenaeus vannamei*

ZHANG Shengjing^{1,2}, SONG Xiaoling^{1*}, ZHAO Xiaojin^{1,2}, HUANG Jie^{1,3}

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

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

3. Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China)

Abstract: A 3-week feeding experiment and a 2-week *Vibrio parahaemolyticus* infection experiment were conducted to study the effects of adding probiotics to the feed on non-specific immune gene expression and resistance to *V. parahaemolyticus* of *L. vannamei* [initial body weight (6.95 ± 1.20) g]. *Litopenaeus vannamei* was fed four different diets: Control group (commercial fodder) and experimental group (feed supplemented with *Bacillus licheniformis*; or with *Bacillus subtilis* and with mixed diet comprising *Bacillus licheniformis*/*Bacillus subtilis* at the ratio of 1:1), the final concentration of probiotics was 10^7 cfu/g. And real-time PCR method was used to study the non-specific immune gene expression of *L. vannamei* in *Bacillus licheniformis*/*Bacillus subtilis* experimental group, which is the highest protection group after being infected with *V. parahaemolyticus*. The results showed that all probiotics groups can effectively improve the ability of shrimp to resist the *V. parahaemolyticus*'s infection, and compound probiotics can better resist the *V. parahaemolyticus* infections, its relative protection ratio is 31.11%. After infection with the *V. parahaemolyticus*, the relative expressions of IMD, penaeidin 3a, proPO, LZM and Crustin were obviously up-regulated in hemolymph of shrimp fed diets supplemented with the compound probiotics (*Bacillus licheniformis*/*Bacillus subtilis*) compared to the control during the immunization. In hemolymph, the relative expression of immune deficiency gene, penaeidin 3a, prophenoloxidase, Lysozyme and Crustin were increased to the maximum levels at 18–24 h. The experimental result indicates: adding probiotics to the feed can effectively improve the ability of *L. vannamei* to resist the *V. parahaemolyticus* infection, and the improvement of this ability may be made through enhancing the disease resistance related gene expression.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; probiotics; resistance to disease; immune gene; *Vibrio parahaemolyticus*

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