

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

兰萍^{1,2} 宋晓玲¹ 张辉^{1,3} 成君军^{1,4}

(1.中国水产科学研究院黄海水产研究所,青岛266071)

(2.上海海洋大学,上海200090) (3.大连水产学院,大连116023)

(4.中国科学院武汉病毒研究所,武汉430071)

摘要 在基础饲料中分别添加0.1%和1%美人鱼发光杆菌灭活菌、0.1%美人鱼发光杆菌活菌配制成三种免疫实验饲料,以基础饲料为空白对照组饲料,每组设3个平行样。对个体质量为(4.83±0.36)g的凡纳滨对虾进行为期20天的饲养实验,分别在0、5、10、15和20d进行取样,以血清中的酚氧化酶(PO)、酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)、超氧化物歧化酶(SOD)和溶菌酶(UL)活性为免疫指标,探讨了美人鱼发光杆菌作为免疫制剂对凡纳滨对虾非特异性免疫效应的影响;在投喂免疫饲料后的第22d,按0.0042kg/kg体重的剂量,直接投喂对虾白斑综合征病毒(White Spot Syndrome Virus, WSSV)病料,并记录累积死亡率。结果表明,美人鱼发光杆菌免疫实验组对凡纳滨对虾血清中PO、ACP、AKP、UL、SOD活性影响明显高于对照组,并且在饲料中添加美人鱼发光杆菌后,明显提高了对虾抵御WSSV感染的的能力,其中0.1%美人鱼发光杆菌活菌实验组的抗病毒感染能力最强,WSSV感染14d内累计死亡率为63.3%±5.8%;而对照组为96.7%±7.3%。研究表明,美人鱼发光杆菌添加在对虾饲料中能提高凡纳滨对虾非特异性免疫水平、增强抵抗疾病的能力,将其作为对虾免疫增强剂具有良好的应用前景。

关键词 凡纳滨对虾 美人鱼发光杆菌 非特异性免疫 抗病力 WSSV

中图分类号: S963.73

Effect of photobacterium *Damselae subsp. damselae* on the non-specific immune response and disease resistance of *Litopenaeus vannamei*

LAN Ping^{1,2} SONG Xiao-ling¹ ZHANG Hui^{1,3} CHENG Jun-jun^{1,4} HUANG Jie¹

(¹ Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(² Shanghai Ocean University, 200090)

(³ Dalian Fisheries University, 116023)

(⁴ Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, 430071)

ABSTRACT *Litopenaeus vannamei* at 4.83±0.36g body weight were fed with 0.1% heat-killed, 1% heat-killed and 0.1% living photobacterium *Damselae subsp. damselae* for 21 days respectively. The serum was collected at 0, 5, 10, 15 and 20 days post-immunization. Phenoloxidase (PO), acid phosphatase (ACP), alkaline phosphatase (AKP), superoxide dismutase (SOD) and lysozyme activity (UL) in the serum of *L. vannamei* were determined to evaluate the non-specific immune effect of *D. subsp. damselae*. After 21 days, the shrimps were challenged by white spot syndrome virus (WSSV) and the mortalities of challenging test were recorded. The results showed that most PO, ACP, AKP, UL and SOD in the serum of *L. vannamei* of the test groups were significantly different ($P<0.05$ or $P<0.01$), and the resistance ability of shrimps to WSSV was also significantly enhanced by the diet supplemented with *D. subsp. damselae*. The group fed with 10g heat-killed *D. subsp. damselae* per 1kg shrimps exhibited the strongest resistance to WSSV in 14 days and its final cumulative mortality was 63.3±5.8%, while the control was 96.7±7.3%. The results indicated that *D. subsp. damselae* improved shrimp non-specific immunity and its resistance to WSSV, suggesting that it might be a promising

基金项目:国家863计划项目(2006AA100313)和国家973计划项目(2006CB101806)共同资助

作者简介:兰萍(1983-),女,硕士研究生,从事水产动物免疫学研究.E-mail:lanping0524@163.com,Tel:0532-85823062

通讯作者:宋晓玲.E-mail:songxl@ysfri.ac.cn

diet supplement in shrimp farming.

KEY WORDS *Litopenaeus vannamei* Photobacterium *Damselae* subsp. *Damselae*
Non-special immunity Resistance to disease White Spot Syndrome Virus (WSSV)

随着对虾高密度集约化养殖的不断扩大,病害流行、优良种质资源匮乏和养殖生态环境恶化这三大问题,成为制约我国对虾养殖业持续健康发展的主要瓶颈,其中病害问题尤为突出且亟待解决(王清印 2007)。目前,在对虾疾病防治过程中,抗生素起着非常重要的作用,但由于抗生素肆意滥用、养殖环境恶化、病原耐药性加强及药物残留等问题,其应用正逐步受到严格的控制。近年来,国内外一些学者通过研究具有免疫调节作用的免疫增强剂,试图来激活对虾的免疫系统,提高机体防御能力而达到防治疾病和替代抗生素使用的目的,目前已取得较好的应用效果(Lopez et al. 2003; Montero-Rocha et al. 2006; 陈国福等 2007; 余德光等 2006)。

益生菌是一种活的微生物添加剂,通过改善与动物相关的或其周围的微生物群落,确保增加饲料的营养价值及其利用率,或改善其周围环境的水质而增强动物对疾病的应答(沈南南等 2006)。目前的研究指出,有益微生物是一类较好的免疫调节剂,具有从本质上提高对虾机体的免疫力、增强其对外界环境变化的适应能力,并提高对虾机体的防御功能,增强抵抗各种疾病能力的作用(王永胜等 2008)。然而,国内外有关美人鱼发光杆菌作为免疫增强剂,以提高对虾非特异性免疫功能及抗病力的研究尚未见报道。

本研究用分离自健康对虾消化道美人鱼发光杆菌作为凡纳滨对虾饲料中的免疫增强剂,在20天的饲养实验中,分5次检测对虾血清中与机体非特异免疫相关的酚氧化酶(PO)、酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)、超氧化物歧化酶(SOD)和溶菌酶(UL)活性的变化;并通过投喂WSSV病毒攻毒感染后,统计分析免疫实验组与对照组的累积死亡率情况,以验证美人鱼发光杆菌防御WSSV感染效果。进而探讨美人鱼发光杆菌与对虾非特异性免疫力及抗WSSV的感染能力的关系,以期为更深入了解凡纳滨对虾的免疫防御机制及其病害防治提供理论依据和实践基础。

1 材料与方法

1.1 材料与实验处理

健康凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)1000余尾,体长(5.70±1.18)cm,体质量(4.83±0.36)g,于2008年8月购自青岛市崂山区沙子口东海湾对虾养殖场,随机分组饲养于550L玻璃钢水槽内。每日换水1次,日换水量为1/3;每日投喂饲料4次,日投喂量约为60-85克/500尾,投喂1h后吸去剩余饲料,并根据残饵的多少调节投喂量;水温22~25℃,pH8.2±0.2,并连续充气(DO≥7.0 mg/ml),实验前暂养7d。

美人鱼发光杆菌(*Photobacterium damsela* subsp. *damsela*)由本实验室2006年分离自健康对虾消化道,-80℃保存,经过菌种活化和小规模发酵培养后(OD_{600nm}≈1×10¹⁰CFU/ml),分别添加在普通饲料中(见表1),配制成三种免疫实验饲料。各种原料分别粉碎过60目筛,准确称重后逐级充分混匀,以褐藻酸钠作为粘合剂,加适量水用小型绞肉机挤压制成颗粒饲料,在40℃条件下烘干至水分含量10%以下,分袋包装于4℃冰箱中保存备用。

实验所用凡纳滨对虾被设计为4个处理组,每个处理组有3个平行,每个平行组放养对虾80尾。A组为空白对照组,在整个实验阶段一直投喂普通饲料;另外三个处理组作为免疫实验组,其中B组和C组分别饲喂添加了0.1%和1%美人鱼发光杆菌灭活菌制剂的免疫饲料,D组饲喂添加了0.1%美人鱼发光杆菌活菌制剂的免疫饲料,并且三个免疫实验组采用间隔投喂方法,即连续4天投喂免疫饲料,3天投喂普通饲料,7天1个循环,直至实验结束。

表 1 基础饲料的基本组成
Table 1 Composition of the basic diet

组成	含量 (g/kg)
Component	Content (g/kg)
复合维生素 Vitamin mixture	10
维生素 C Vitamin C	2
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	2
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	3
褐藻酸钠 Sodium alginate	10
植物油 Vegetable oil	20
花生粉 Peanuts powder	250
豆粉 Soybean powder	250
虾粉 Shrimp powder	100
面粉 Flour	30
玉米粉 Corn powder	30
鱼粉 Fishmeal	300

1.2 对虾血清的获取

实验开始后的第0、5、10、15、20d,分别从每组实验对虾中随机取对虾10-15尾,用一次性注射器(1mL)从对虾的围心腔内抽取血淋巴,注入无菌的1.5mL离心管中,4℃冰箱中过夜,次日用无菌针头划破血凝块,吸出血清用于免疫指标的测定。

1.3 非特异性免疫因子的测定

1.3.1 酚氧化酶 (PO) 活力的测定

采用雷质文等(2001)改进Ashida的方法进行。在本实验条件下,每分钟每毫克蛋白吸光值增加0.001定义为1个活力单位(Unit/mg Protein)。PO活力= $10^3 (A_{终} - A_{初}) / C$,其中C为血清蛋白浓度。

1.3.2 溶菌 (UL) 活力的测定

以溶壁微球菌 (*Micrococcus lysolei*) 冻干粉(南京建成生物工程研究所生产)为底物,按以下步骤进行:用0.1molpH=6.4的磷酸钾盐缓冲液配制底物悬液(OD₅₇₀≈0.3~0.5)。在酶标板中加入190μL该悬液与10μL血清,混匀,测其570nm处的吸光值作为A_初,之后移入37℃水浴中孵育30min后,立即置于冰水浴中10min以终止反应,测其吸光值为A_终。溶菌活力UL=(A_终 - A_初) / A_终。

1.3.3 酸性磷酸酶 (ACP) 活力的测定

按照酸性磷酸酶测定试剂盒(南京建成生物研究所)的测定步骤进行。酸性磷酸酶活力(U/100mL)=A_{测定值}/A_{标准值}×酚含量×稀释倍数。

1.3.4 碱性磷酸酶 (AKP) 活力的测定

按照碱性磷酸酶测定试剂盒(南京建成生物研究所)测定步骤进行。碱性磷酸酶活力(U/100mL)=A_{测定值}/A_{标准值}×酚含量×稀释倍数。

1.3.5 超氧化物歧化酶 (SOD) 活力的测定

按照超氧化物歧化酶测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)测定步骤进行。在本实验中,SOD活力定义为:每毫升反应液中SOD抑制率达50%时所对应的SOD的量为1个活力单位(U)。SOD活力(U/mL)=(A_{对照值} - A_{测定值}) / A_{对照值}÷50%×反应体系的稀释倍数。

1.4 WSSV感染实验

投喂感染用WSSV病料的制备:选用本实验室-80℃保存的经核酸探针斑点杂交检测确认已感染WSSV的对虾,称取鳃和足步剪碎并混匀成泥状,用作感染毒种。为了检测各处理组对虾的抗病力,在养殖实验结束后从各实验组中挑选出大小基本一致(具体到长度或重量最好,写个大概值)的30尾对虾做攻毒实验用,养殖于120L体积的塑料桶中,每个攻毒组设三个重复。攻毒实验前一天停食,次日上午

进行感染实验，取-80℃保存的毒种，投喂对虾。并且在攻毒实验期间，各实验组继续投喂相应的免疫饲料或基础饲料，14d后攻毒实验结束。攻毒实验期间日常管理同前，及时检出死亡对虾，记录死亡时间和死亡数量。

1.5 统计分析

本实验采用SPSS13.0软件对实验数据进行单因素方差分析，用Duncan氏法作多重比较。

2 结果

2.1 美人鱼发光杆菌对凡纳滨对虾血清中PO活性的影响

由图1可见，各实验组在投喂美人鱼发光杆菌后20天内PO活性均呈现短暂的升高，然后逐渐降低趋于对照组。经统计分析，在第5天时，3个处理组的PO活性均显著高于对照组($P<0.05$)；在第10天、15天、20天，B组和C组的PO活性均呈降低趋势，而D组在投喂美人鱼发光杆菌的15天内，PO活性一直持续升高，第20天时呈现下降趋势。结果表明，美人鱼发光杆菌作为饲料添加剂投喂凡纳滨对虾后20天内，PO活性均在第5天有显著性升高，短暂的升高后逐渐降低；其中效果最佳的是B组和D组，在实验期间，PO活性一直维持在较高水平。

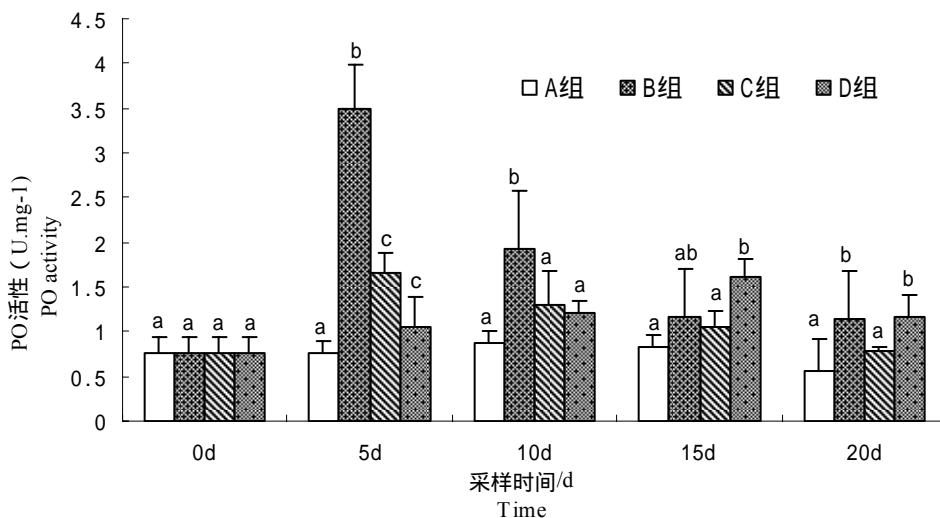


图 1 各实验组凡纳滨对虾血清酚氧化酶活力

Fig. 1 Serum phenoloxidase activity of *L. vannamei* in the test groups

注：图中误差线用标准误差表示，不含有相同字母的组之间差异显著 ($P<0.05$)，含有相同字母的组之间无显著差异。

A：未添加美人鱼发光杆菌组，为空白对照组；B：美人鱼发光杆菌（灭活菌）浓度为0.1%的免疫组；C：美人鱼发光杆菌（灭活菌）浓度为1%的免疫组；D：美人鱼发光杆菌（活菌）浓度为0.1%的免疫组

Note: Error bars represent standard deviation (SD), significant difference lies between the groups which have no same letter while same letter means no significant difference between the groups.

A: Normal diet without photobacterium *Damselae subsp. damsela*, blank control; B: Immune group with addition of 0.1% heat-killed *D. subsp. damsela*; C: Immune group with addition of 1% heat-killed *D. subsp. damsela*; D: Immune group with an addition of 0.1% living *D. subsp. damsela*

2.2 美人鱼发光杆菌对凡纳滨对虾血清中SOD活性的影响

由图2可见，投喂美人鱼发光杆菌后第5天，3个处理组的SOD活性均显著高于对照组 ($P<0.05$)；第10天时3个处理组SOD活性均有所上升，与对照组相比差异均显著 ($P<0.05$)；第15天时，除D组外，其它两处理组的SOD活性略有降低，但3个处理组与对照组相比差异显著 ($P<0.05$)；第20天时，3个处

理组的SOD活性均比第15天略有降低。结果表明,投喂美人鱼发光杆菌的20天内,0.1%美人鱼发光杆菌活菌制剂组的SOD活性均高于其它处理组。

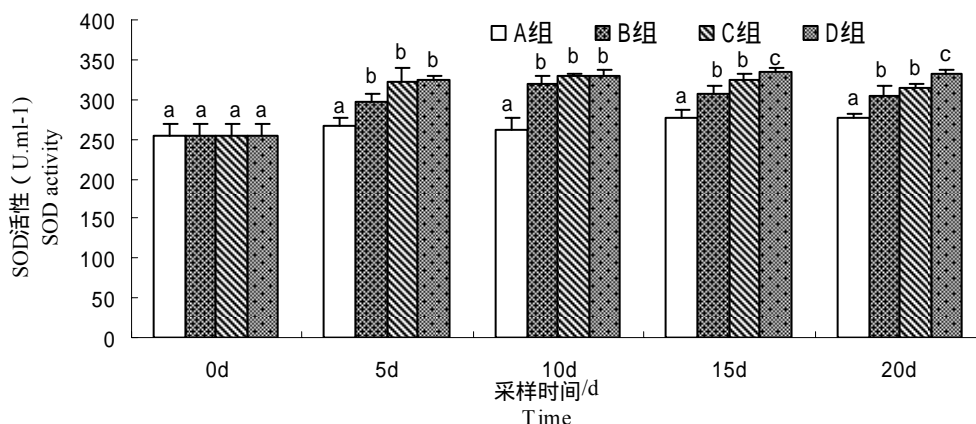


图 2 各实验组凡纳滨对虾血清超氧化物歧化酶活力

Fig. 2 Serum superoxide dismutase activity of *L. vannamei* in the test groups

注: 图中误差线用标准误差表示, 不含有相同字母的组之间差异显著 ($P < 0.05$), 含有相同字母的组之间无显著差异。

A: 未添加美人鱼发光杆菌组, 为空白对照组; B: 美人鱼发光杆菌(灭活菌)浓度为0.1%的免疫组; C: 美人鱼发光杆菌(灭活菌)浓度为1%的免疫组; D: 美人鱼发光杆菌(活菌)浓度为0.1%的免疫组

Note: Error bars represent standard deviation (SD), significant difference lies between the groups which have no same letter while same letter means no significant difference between these four groups.

A: Normal diet without photobacterium *Damselae subsp. damsela*, blank control; B: Immune group with addition of 0.1% heat-killed *D. subsp. damsela*; C: Immune group with addition of 1% heat-killed *D. subsp. damsela*; D: Immune group with an addition of 0.1% living *D. subsp. damsela*

2.3 美人鱼发光杆菌对凡纳滨对虾血清中UL活性的影响

由图3可见, B组和C组两个处理组在投喂美人鱼发光杆菌后20天内UL活性一直略有升高, 但与对照组差异不显著 ($P > 0.05$)。而D组在投喂美人鱼发光杆菌的20天内, 与其它实验组及对照组相比差异均显著 ($P < 0.05$)。在相同采样时间点, 0.1%美人鱼发光杆菌活菌处理组的UL活性均高于其它处理组, 免疫增强效果明显。

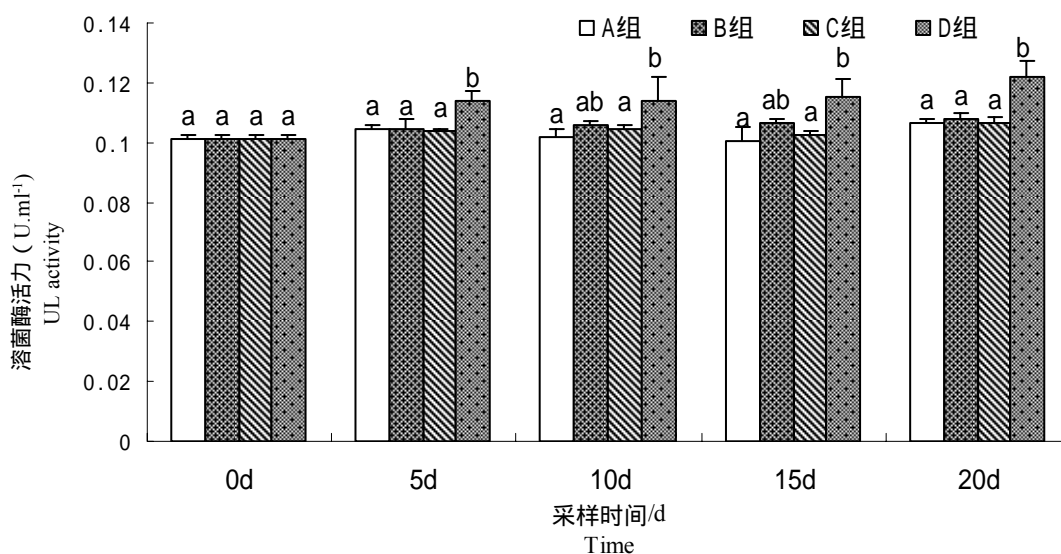


图 3 各实验组凡纳滨对虾血清溶菌活力

Fig. 3 Serum lysozyme activity of *L. vannamei* in test groups

注: 图中误差线用标准误差表示, 不含有相同字母的组之间差异显著 ($P < 0.05$), 含有相同字母的组之间无显著差异。

A: 未添加美人鱼发光杆菌组, 为空白对照组; B: 美人鱼发光杆菌 (灭活菌) 浓度为0.1%的免疫组; C: 美人鱼发光杆菌 (灭活菌) 浓度为1%的免疫组; D: 美人鱼发光杆菌 (活菌) 浓度为0.1%的免疫组

Note: Error bars represent standard deviation (SD), significant difference lies between the groups which have no same letter while same letter means no significant difference between these four groups.

A: Normal diet without photobacterium *Damselae subsp. damsela*, blank control; B: Immune group with addition of 0.1% heat-killed *D. subsp. damsela*; C: Immune group with addition of 1% heat-killed *D. subsp. damsela*; D: Immune group with addition of 0.1% living *D. subsp. damsela*

2.4 美人鱼发光杆菌对凡纳滨对虾血清中ACP活性的影响

由图4可见, 投喂美人鱼发光杆菌后第5天, 3个处理组的ACP活性均呈现较大幅度的升高趋势, 且实验组均显著高于对照组 ($P < 0.05$); 第10天时, D组的ACP活性继续上升, 而其它两组的ACP活性则下降, 且3个处理组与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$); 第15天和第20天时, 3个处理组的ACP活性均降低, 其中D组与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$), 而其它两组与对照组相比差异均不显著 ($P < 0.05$)。结果表明, D组的ACP活性在第15天和第20天时显著高于B,C处理组 ($P < 0.05$), 表明在相同采样时间点, 0.1%美人鱼发光杆菌活菌处理组的免疫增强效果显著优于两组灭活菌处理组 ($P < 0.05$)。

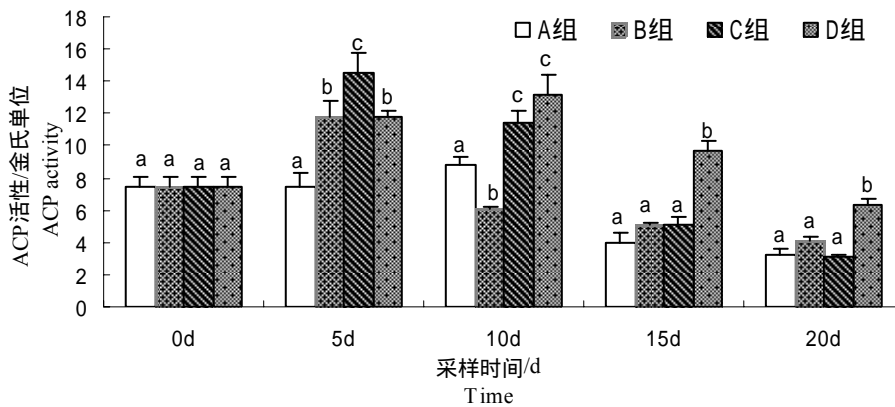


图4 各实验组凡纳滨对虾血清酸性磷酸酶活力

Fig. 4 Serum acidic phosphatase activity of *L. vannamei* in test groups

注: 图中误差线用标准误差表示, 不含有相同字母的组之间差异显著 ($P < 0.05$), 含有相同字母的组之间无显著差异。

A: 未添加美人鱼发光杆菌组, 为空白对照组; B: 美人鱼发光杆菌 (灭活菌) 浓度为0.1%的免疫组; C: 美人鱼发光杆菌 (灭活菌) 浓度为1%的免疫组; D: 美人鱼发光杆菌 (活菌) 浓度为0.1%的免疫组

Note: Error bars represent standard deviation (SD), significant difference lies between the groups which have no same letter while same letter means no significant difference between these four groups.

A: Normal diet without photobacterium *Damselae subsp. damsela*, blank control; B: Immune group with addition of 0.1% heat-killed *D. subsp. damsela*; C: Immune group with addition of 1% heat-killed *D. subsp. damsela*; D: Immune group with addition of 0.1% living *D. subsp. Damsela*

2.5 美人鱼发光杆菌对凡纳滨对虾血清中AKP活性的影响

由图5可见, B组和C组两个灭活菌处理组的AKP活性均在第5天时达到最大值, 然后开始下降, 至第15天时恢复到接近正常水平; 而D组在第10天达到最大值, 之后缓慢下降, 但在第10、15、20天内一直维持在较高水平, 且与对照组相比存在显著差异 ($P < 0.05$)。结果表明, 自第10天起, 0.1%美人鱼发光杆菌活菌制剂组的AKP活性变化与其它两个处理组 (B、C组) 相比存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

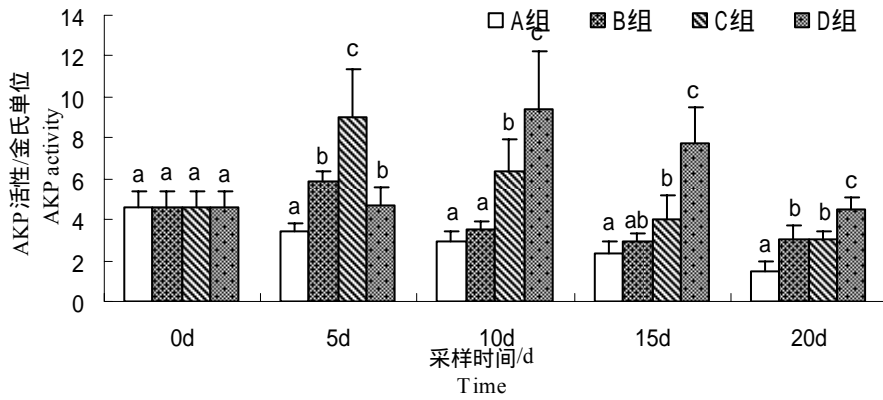


图5 各实验组凡纳滨对虾血清碱性磷酸酶活力

Fig. 5 Serum alkaline phosphatase activity of *L. vannamei* in test groups

注: 图中误差线用标准误差表示, 不含有相同字母的组之间差异显著 ($P < 0.05$), 含有相同字母的组之间无显著差异。(A) 未添加美人鱼发光杆菌组, 为空白对照组; (B) 美人鱼发光杆菌(灭活菌)浓度为0.1%的免疫组; (C) 美人鱼发光杆菌(灭活菌)浓度为1%的免疫组; (D) 美人鱼发光杆菌(活菌)浓度为0.1%的免疫组。

Note: Error bars represent standard deviation (SD), significant difference lies between the groups which have no same letter while same letter means no significant difference between these four groups.

A: Normal diet without photobacterium *Damselae subsp. damsela*, blank control; B: Immune group with addition of 0.1% heat-killed *D. subsp. damsela*; C: Immune group with addition of 1% heat-killed *D. subsp. damsela*; D: Immune group with an addition of 0.1% living *D. subsp. Damselae*

2.6 凡纳滨对虾抗WSSV病毒感染实验结果

病毒感染实验的数据及分析结果见图6。从实验结果可以看出各实验组在感染后的前6天累计死亡率相差不大, 6天以后各组的累计死亡率均呈较显著的递增趋势。在攻毒后的6~10天内, A组的累计死亡率显著地高于B组和D组 ($P < 0.05$), 10天后各实验组的死亡率趋于稳定。最终A组的死亡率 ($96.7\% \pm 7.3\%$) 显著高于B组的死亡率 ($76.7\% \pm 8.1\%$) 和D组的死亡率 ($63.3\% \pm 5.8\%$) ($P < 0.05$); C组的最终累积死亡率为 ($88.3\% \pm 6.9\%$), 比A组低, 但比B组和D组高, 与对照组相比差异不显著 ($P > 0.05$)。结果表明, 凡纳滨对虾摄食添加了美人鱼发光杆菌的饲料后, 可显著提高其抵御白斑综合征病毒感染的效果, 尤其是0.1%美人鱼发光杆菌活菌制剂组表现出最优的抗WSSV病毒感染效果。

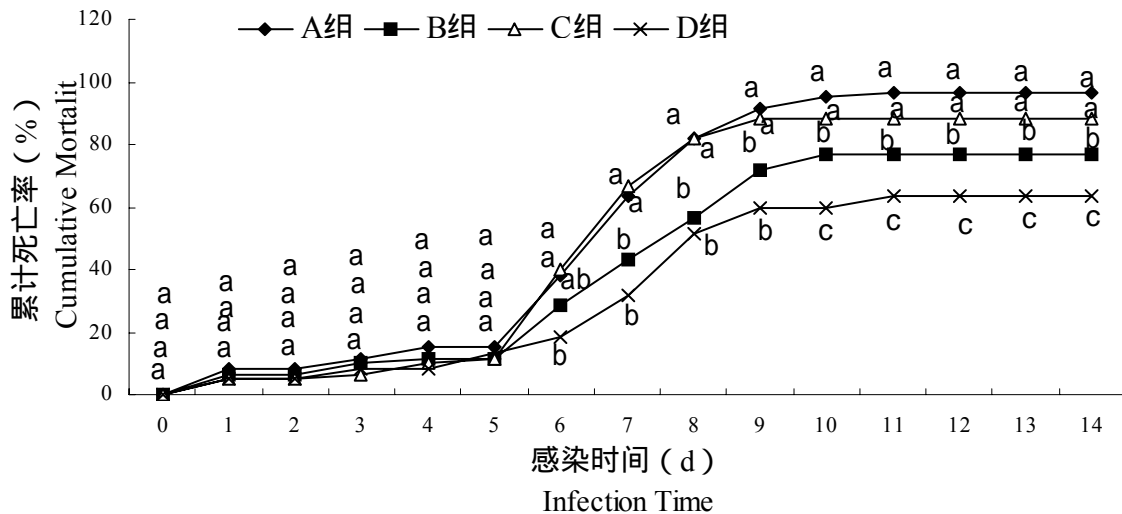


图6 WSSV攻毒后凡纳滨对虾的累积死亡率

Fig. 6 Cumulative mortality of *L. vannamei* after challenged with WSSV

注: (A) 未添加美人鱼发光杆菌组, 为空白对照组; (B) 美人鱼发光杆菌(灭活菌)浓度为0.1%的免疫组; (C) 美人鱼发光杆菌(灭活菌)浓度为1%的免疫组; (D) 美人鱼发光杆菌(活菌)浓度为0.1%的免疫组

Note: A: Normal diet without photobacterium *Damselae subsp. damselae*, blank control; B: Immune group with addition of 0.1% heat-killed *D. subsp. damselae*; C: Immune group with addition of 1% heat-killed *D. subsp. damselae*; D: Immune group with an addition of 0.1% living *D. subsp. damselae*

3 讨论

3.1 美人鱼发光杆菌对凡纳滨对虾非特异性免疫力的影响

目前,有益微生物在水产养殖中的应用主要侧重于对虾养殖生态环境调控方面的研究(李卓佳等 2008),而对提高凡纳滨对虾的非特异性免疫功能和抗病力方面的研究较少。本实验以美人鱼发光杆菌为研究对象,实验结果表明该有益微生物可以显著提高凡纳滨对虾的非特异性免疫能力和抗病力,与 Rengpipat (1998) 用 *Bacillus S11*(芽孢杆菌)菌株饲喂斑节对虾的实验结果相同。国外有较多学者认为,美人鱼发光杆菌是一种嗜盐条件性致病菌,广泛分布于海洋水产动物体表和养殖环境中,其重要致病因子为胞外蛋白酶类、胞外溶血素和细胞溶素等,可引起多种鱼类的创伤感染、出血性败血症,甚至致死(Thyssen *et al.* 2000; Osorio *et al.* 2005; Kijima *et al.* 2007)。从益生菌的筛选到实际应用所存在的最大隐患

是安全问题,筛选的菌株对养殖动物是否有害,是拮抗菌得到应用的关键。本实验所用美人鱼发光杆菌是从健康对虾消化道分离纯化培养的,并通过安全性实验证实其对凡纳滨对虾无毒害作用,说明该菌株可作为对虾的免疫刺激物,这些菌的代谢产物中可能含有抑制病原菌的活性物质,以此提高其非特异性免疫功能(李海兵 2008)。

由于对虾的体液中不具有免疫球蛋白,缺乏抗体介导的特异性免疫反应,其免疫途径主要为非特异性免疫,主要包括血细胞的吞噬、包掩以及血淋巴中的一些酶或细胞因子的杀菌、抗菌作用,来抑制病原体的生长和扩散,或者直接将其杀灭并排出体外,国内外大多数学者通常采用血淋巴液中一些酶的活性作为评价对虾免疫水平的标准。在本实验中,对虾连续饲喂实验饲料的20天内,分别将4次取样的实验组对虾的血清免疫活性分析值与对照组比较,发现在添加美人鱼发光杆菌制剂的3个实验组,多数血淋巴中酚氧化酶、溶菌酶、酸性和碱性磷酸酶及超氧化物歧化酶的活性值均较高。尤其添加0.1%美人鱼发光杆菌活菌制剂组,在投喂免疫饲料过程中,各项免疫酶活性一直维持在较高水平。由此可证实在对虾饲料中添加美人鱼发光杆菌制剂后,的确可以增强对虾的非特异性免疫能力。

3.2 美人鱼发光杆菌对凡纳滨对虾抗病力的影响

对虾白斑综合征病毒是引起对虾白斑综合征的主要病原,具有很高的侵染性和复制能力,传播迅速,致病力强,进入虾体后可广泛感染各组织、器官的上皮细胞(Van Hulst *et al.* 2000),造成受感染的对虾在7~10d内绝大多数发生死亡,不仅给世界对虾养殖业造成了不可估量的损失,同时也威胁着整个海洋生态的平衡。因此,采用WSSV作为攻毒实验的感染毒种,能较好地评价美人鱼发光杆菌对凡纳滨对虾抗病力的影响。另外,在攻毒实验中,对虾的累积死亡率具有较好的规律性和重复性,能实时反映出对虾对特定病原的抵抗力,可作为衡量免疫刺激物质对机体免疫作用的重要指标。

WSSV攻毒实验结果表明,对照组和C组的最终累积死亡率均高于B组和D组,而在养殖实验的20天内,血清的酚氧化酶活性(PO)和溶菌酶活性(U_L)的大小变化趋势与本实验的累积死亡率的结果基本一致,呈明显的规律性变化,说明血清中的酚氧化酶和溶菌酶这两项免疫指标与凡纳滨对虾的抗病力的高低存在较好的关联性。可能的原因是美人鱼发光杆菌的细胞壁含有多糖类、多肽类等活性物质,本身也可分泌活性物质,这些活性物质被对虾摄食和吸收以后,进一步作用于对虾的非特异性免疫系统,特别是溶酶体酶、酚氧化酶原激活系统,刺激其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。另外,C组的最终累积死亡率高于B组,说明饲料中过高的有益微生物添加量,反而会降低对凡纳滨对虾的非特异性免疫功能的刺激效果,降低其疾病抵抗力。朱学芝(2007)和胡毅等(2008)也分别证实了饲料中添加0.1%低剂量组的有益微生物,均能提高对虾的非特异性免疫功能和抗病力。

在与本实验类似的研究中,Chang等(2003)用 β -1,3-glucan投喂对虾20天后,将WSSV病毒注射对虾体内进行感染实验,发现对虾的死亡速度较快且累积死亡率高达80%。而从本实验结果可以得出,各实验组在WSSV感染6天后,累积死亡率才迅速增加,且免疫效果较好的实验组的最终累积死亡率仅为63.3%。这可能是由于功毒途径的不同导致的,Chang等使用注射感染的方式,对对虾体直接造成严重的侵害感染,而本实验使用投喂感染的方法较为温和,对对虾体的应激较小,病毒侵袭机体的速度缓慢。陈国福等(2005)也证实以投喂病料的方式进行感染时,对虾对WSSV病毒的侵袭有较低的敏感性。然而,在这种病原性较强的病毒的感染下,美人鱼发光杆菌本身或细胞壁成分如何来保护虾体组织不受WSSV感染,有待更进一步的研究。

4 结论

本研究结果表明,美人鱼发光杆菌作为对虾免疫增强剂,对WSSV病毒的侵染有一定抵抗力,可能是由于美人鱼发光杆菌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。0.1%活菌制剂组在各项与机体非特异免疫相关的几种重要指标测定中与对照组相比均表现较显著差异,但因美人鱼发光杆菌是一种条件性致病菌,建议其作为对虾免疫增强剂应严格控制添加量及使用周期。

参考文献

- 王永胜,钱鲁闽,陈昌生,李和阳,周仁孙,储修好.2008.抗生素和有益微生物对凡纳滨对虾非特异性免疫效应的研究.台湾海峡,27(2):62-167.
- 朱学芝,郑石轩,潘庆军,董爱华.2007.芽孢杆菌对凡纳滨对虾免疫和生化指标的影响.饲料研究,4:55-58.
- 余德光,朱红友,王广军,谢骏,于方兆,黄志斌.2006.嗜酸小球菌对凡纳滨对虾体液免疫因子的影响.海洋水产研究,27(5):51-55.
- 李卓佳,周海平,杨莺莺,洪敏娜,梁晓华.2008.乳酸杆菌(*Lactobacillus* spp) LH对水产养殖污染物的降解研究.农业环境科学学报,27(11):342-349.
- 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[学位论文],青岛,中国海洋大学,2008
- 沈南南,李纯厚,贾晓平,李卓佳.2008.小球藻与芽孢杆菌对对虾养殖水质调控作用的研究.海洋水产研究,29(2):48-52.
- 陈国福,宋晓玲,黄健,周进,王秀华.2007.A3- α -肽聚糖对凡纳滨对虾磷酸酶及细胞内酚氧化酶活性的影响.海洋水产研究,28(1):59-64.
- 陈国福,宋晓玲,黄健,周进,刘莉.2005.A3- α -肽聚糖对凡纳滨对虾生长、免疫机能和抗病毒感染的影响.高技术通讯,15(8):100-106.
- 胡毅,谭北平,麦康森,艾庆辉,郑石轩,程开敏.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,黄健,杨冰,俞开康.2001.感染白斑综合征病毒(WSSV)对虾相关免疫因子的研究.中国水产科学,8(4):46-51.
- Chang C F,Su M S,Chen H Y.2003. Dietary β -1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. Fish and Shellfish Immunol,15:297-310.
- Kijima M T,Kowanishi M,Fukuda Y.2007.Molecular diversity of *Photobacterium damsela* sp. Piscicida from cultured amberjacks (*Seriola* spp.) in Japan by pulsed-field gel electrophoresis and plasmid profiles. Journal of applied microbiology,103:381-389.
- Lopez A,Pierce,G J,Santos M B.2003.Fishery by-catches of marine mammals in Galician waters results from on-board observations and an interview survey of fishermen. Biological Conservation, 111:25-40.
- Montero-Rocha A D,McIntosh R, Sanchez-Merino. Immunostimulation of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following dietary administration of Ergosan. Invertebrate Pathol,2006,91:188-194.
- Osorio,C R,Collins,M D,Romalde,J L.2005.Variation in 16 S - 23 S rRNA Intergenic Spacer Regions in *Photobacterium damsela*:a Mosaic-like Structure. Applied and Environmental Microbiology,71(2):636-645.
- Rengpipat S,Phianphak W,Piyatiratitivorakul S.1998.Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. Aquaculture,167(3-4):301-313.
- Thyssen,A.,van Eygen,S,Hauben L.2000.Application of AFLP for taxonomic and epidemiological studies of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,50:1013-1019.
- Van Hulten M C,Westenberg M,Goodall S D.2000. Identification of two major virion protein genes of white spots syndrome virus of shrimp. Virology,266(2):227-236