

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190317001

http://www.yykxjz.cn/

杨运楷, 宋晓玲, 王海亮, 谢国驹, 黄捷. 一种复合益生菌对凡纳滨对虾抗副溶血弧菌感染能力的影响. 渔业科学进展, 2020, 41(3): 133-141

Yang YK, Song XL, Wang HL, Xie GS, Huang J. Effect of a compound probiotics on the ability of *Litopenaeus vannamei* to resist *Vibrio parahaemolyticus* infection. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(3): 133-141

# 一种复合益生菌对凡纳滨对虾抗副溶血弧菌感染能力的影响\*

杨运楷<sup>1,2</sup> 宋晓玲<sup>2①</sup> 王海亮<sup>2</sup> 谢国驹<sup>2</sup> 黄捷<sup>2</sup>

(1. 上海海洋大学 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室 青岛市海水养殖流行病学与生物安保重点实验室 青岛 266071)

**摘要** 本研究选择1株地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) BL-9、1株枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) BS-12、1株金丽假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas flavipulchra*) CDM8, 以1:1:1将其组成复合益生菌,各益生菌水体添加浓度为 $10^7$  CFU/ml,进行为期30 d的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)养殖实验。实验分为暂养期(7 d)、益生菌处理期(15 d)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)攻毒期(10 d)。结果显示,养殖水体中添加复合益生菌能显著增加水体和对虾肠道可培养细菌总数( $P<0.05$ ),攻毒实验结束时,实验组对虾累积存活率为 $(73.33\pm 6.83)\%$ ,显著高于阳性对照组 $(25.33\pm 15.43)\%$ 。对虾抗病基因热激蛋白70 (Heat shock proteins 70, *Hsp70*)、 $\beta$ -1,3-葡聚糖结合蛋白-脂蛋白(Beta-1,3-glucan-binding protein-lipoprotein,  $\beta$ GBP-HDL)、脂多糖- $\beta$ -1,3-葡聚糖结合蛋白(Lipopolysaccharide- $\beta$ -1, 3-glucan binding protein, *LGBP*)、抗菌肽 *Crustin* 在益生菌处理阶段均出现不同程度的上调,在攻毒阶段虽呈现各自不同的表达情况,但所有基因都经历了更大幅度上调。研究表明,水体中添加芽孢杆菌和假交替单胞菌组成的复合益生菌可提高凡纳滨对虾抗副溶血弧菌感染能力,对虾抗病力的提高可能与益生菌增加对虾肠道可培养细菌数量、抗病相关基因表达水平及过氧化氢酶(CAT)活性有关。

**关键词** 凡纳滨对虾; 复合益生菌; 副溶血弧菌; 免疫基因; 过氧化氢酶

**中图分类号** S945 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)03-0133-09

致急性肝胰腺坏死病(Acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND)是近5年来严重危害全球对虾养殖业发展的疫病之一,该病是由携带 *pirVP* 基因

的弧菌引起的一类细菌性疾病。目前,已报道的致 AHPND 弧菌包括副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)、坎贝氏弧菌(*V. campbelli*)、欧文氏

\* 中国水产科学研究院基本科研业务费专项(2017HY-ZD0502; 2017HY-ZD1002)和现代农业产业技术体系(CARS-47)共同资助 [This work was supported by Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Chinese Academy of Fishery Sciences (2017HY-ZD0502; 2017HY-ZD1002), and China Agriculture Research System (CARS-47)]. 杨运楷, E-mail: 891293238@qq.com

① 通讯作者: 宋晓玲, 研究员, E-mail: songxl@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2019-03-17, 收修改稿日期: 2019-04-09

弧菌(*V. owensii*)等(贾丹等, 2018)。本研究所用副溶血弧菌为本实验室在2013年从广西患AHPND的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)中分离出1株致病性副溶血弧菌(AHPND-causing *Vibrio parahaemolyticus*, *V<sub>P</sub>AHPND*), 编号为20130629002S01。该菌对卤虫无节幼体的半致死浓度(LD<sub>50</sub>)为 $2.58 \times 10^5$  CFU/ml(王娜等, 2016; 陈蒙蒙等, 2018)。

益生菌是指在一定浓度范围内能够提高机体健康的活性微生物制剂, 作为抗生素及化学药剂的替代品, 在医学、食品、养殖等领域已经得到了快速的发展(Balcázar *et al*, 2006)。益生菌在水产养殖过程中的作用机理有以下几个方面: 一是通过细菌自身代谢分解食物或产生消化酶提高机体消化能力; 二是竞争性抑制, 通过竞争营养、附着位点或合成、分泌抗菌活性因子等来抑制有害微生物的繁殖; 三是通过降低水体中的氨氮等有害物质改善养殖水环境; 四是通过增强机体免疫功能来提高抗病能力等(Thompson *et al*, 1999; Balcázar *et al*, 2006)。高戈等(2017)使用巨大芽孢杆菌(*Bacillus magaterium*)进行凡纳滨对虾生物絮团养殖实验, 养殖结束时, 添加巨大芽孢杆菌组的对虾体长、体重均显著高于其他2组。张盛静等(2015)研究发现, 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, 且复合益生菌的保护效果更佳。

芽孢杆菌在水产养殖中的应用较为广泛。刘观斌等(2015)在养殖水体中泼洒适当浓度的枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)可以改善水质, 提高罗非鱼机体的免疫力、抗氧化能力, 进而提高罗非鱼抗无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)病的能力。张欢欢等(2016)研究发现, 生物絮团对虾养殖系统中添加菌株02, 能改善菌群结构, 抑制弧菌生长。作者在前期的研究工作发现, 在凡纳滨对虾养殖水体中单独添加 $10^7$  CFU/ml数量级的地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)BL-9、枯草芽孢杆菌BS-12菌液后, 使用副溶血弧菌进行攻毒, 实验组相对于对照组均显著提高对虾的成活率。金丽假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas flavipulchra*)CDM8具有突出的弧菌拮抗能力(Wang *et al*, 2018), 在零交换水条件下, 能显著提高凡纳滨对虾ZⅢ幼体和仔虾PL5的变态率和成活率(孙博超等, 2019)。因此, 本研究选择上述3株菌组成复合益生菌添加到养殖水体中, 评价其对养殖水体及凡纳滨对虾肠道菌群、抗副溶血弧菌感染能力、过氧化氢酶(CAT)活性、抗病基因表达水平的影响, 以期复合益生菌在凡纳滨对虾养殖中的应用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 对虾与益生菌

**1.1.1 实验用凡纳滨对虾** 实验用凡纳滨对虾购自山东莱州单山水产养殖公司(体长为6.2~10.6 cm)。实验前参照OIE(2017)水生动物疾病诊断手册及Wang等(2018)中的PCR方法, 进行AHPND病原的套式PCR检测, 结果为阴性。投喂饲料为宁波天邦饲料有限公司生产的凡纳滨对虾全熟化颗粒饲料, 对虾养殖容器为100 L的PC塑料桶, 养殖有效水体为60 L的过滤海水。

**1.1.2 实验用菌种及培养** 实验用菌株: 金丽假交替单胞菌 CDM8、地衣芽孢杆菌 BL-9、枯草芽孢杆菌 S-12、副溶血弧菌 20130629002S01, 均由本实验室分离、鉴定及保存。

菌液发酵采用2216E培养基, 28℃恒温震荡培养, 当菌液的OD<sub>580 nm</sub>≈1时(此时, 细菌浓度约为 $2 \times 10^9 \sim 3 \times 10^9$  CFU/ml), 终止发酵, 使用时通过稀释的方法调整细菌的水体添加浓度。

CDM8、BL-9、BS-12和副溶血弧菌在水体的添加浓度分别为 $2.24 \times 10^7$ 、 $2.93 \times 10^7$ 、 $2.77 \times 10^7$ 和 $2.13 \times 10^5$  CFU/ml。

### 1.2 实验期及实验分组

实验分3个时期: 暂养期、益生菌处理期、副溶血弧菌感染期。

**暂养期:** 对虾不分组, 共7 d。期间随机挑选12尾凡纳滨对虾进行病原检测, 暂养第7天检测养殖水体及对虾肠道可培养细菌数量, 采集对虾肝胰腺组织用于抗病基因表达及CAT酶活性检测。暂养稳定后, 挑选630尾大小均匀、活力良好的对虾用于后续实验。

**益生菌处理期:** 对虾分为实验组和对照组。每组7个平行, 其中, 3个用于统计死亡率, 4个用于采样(对照组为2组, 预先设置攻毒阶段的阴性和阳性对照组)。实验组养殖水体中添加复合益生菌, 各菌以1:1:1比例添加, 对照组不添加益生菌。实验周期为15 d, 由于CDM8拮抗能力较强, 所以益生菌添加采取交替添加的方式, 即3 d为1个添加周期。第1天添加益生菌CDM8菌液, 第2天添加BL-9和BS-12菌液, 共5个添加周期。在益生菌处理期, 第7天和第14天检测养殖水体及对虾肠道可培养细菌数量, 采集对虾肝胰腺组织用于抗病基因表达及酶活性检测。

**副溶血弧菌攻毒期:** 对虾分为3组, 实验组、阳性对照组和阴性对照组, 每组7个平行, 其中, 3个用于统计死亡率, 4个用于采样。益生菌处理期, 每桶包含对虾30尾, 攻毒期调整为每桶25尾。实验组

和阳性对照组使用副溶血弧菌浸浴攻毒, 先将对虾于  $2.13 \times 10^7$  CFU/ml 副溶血弧菌菌液中浸泡 15 min, 然后放回, 向养殖水体中添加副溶血弧菌菌液使得水体中的弧菌浓度达到  $2.13 \times 10^5$  CFU/ml 左右, 阴性对照组使用无菌 2216E 培养基浸浴。副溶血弧菌攻毒期持续 10 d, 攻毒期间不添加益生菌。在攻毒的 6、18、42、66、90 h 采集对虾的肝胰腺组织进行实验相关指标的测量, 并统计每天对虾的累积死亡率。

### 1.3 实验管理

实验期间连续充气, 水温控制在  $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。根据每天对虾桶内是否有残饵来调整投喂量, 每天投喂 2 次。48 h 换水 1 次, 换水量为水体积的 2/3。

### 1.4 样品及处理

**1.4.1 水体和对虾肠道内可培养细菌计数** 水体及对虾肠道细菌计数采用 2216E 琼脂平板涂布计数的方式。对虾肠道活菌计数, 先将对虾完整肠道加入无菌 PBS 缓冲液研磨, 后进行活菌计数。

**1.4.2 对虾肝胰腺样品采集及处理** 在各个取样时间点采集对虾肝胰腺, 每桶取对虾 2 尾, 每组 3 个平行, 共 6 尾对虾。解剖采集的对虾肝胰腺经液氮迅速冷冻后, 放置在  $-80^\circ\text{C}$  超低温冰箱保存。

### 1.5 RNA 提取及 cDNA 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, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量后, 保存于  $-80^\circ\text{C}$  备用。cDNA 合成采用 TaKaRa 公司生产的反转录试剂盒进行, 使用方式参考试剂盒说明书。

### 1.6 实时荧光定量 PCR

**1.6.1 实时荧光定量 PCR 及引物** 使用 Fast Essential DNA Green Master 荧光定量试剂盒 (Roche, 瑞士) 进行实时荧光定量 PCR 检测, 方法参考试剂盒说明书。抗病相关基因的检测引物名称及序列见表 1。

**1.6.2 荧光定量体系及反应程序** PCR 反应体系包括 SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> (2 $\times$ ) 12.5  $\mu\text{l}$ , cDNA 模板 1  $\mu\text{l}$ , 上下游引物各 0.5  $\mu\text{l}$  (10  $\mu\text{mol/L}$ ), DEPC 处理水 10.5  $\mu\text{l}$ 。PCR 反应条件:  $94^\circ\text{C}$ , 5 min;  $94^\circ\text{C}$  30 s,  $58^\circ\text{C}$  30 s,  $72^\circ\text{C}$  30 s, 35 个循环。每个组织的样品设 3 个重复。对实验结果采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法进行相对定量分析 (Livak *et al.*, 2001)。

### 1.7 免疫酶活性检测

对各组凡纳滨对虾肝胰腺组织进行 CAT 酶活测定, 测定方法参照检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所) 说明书进行。

### 1.8 数据分析与处理

采用 SPSS 16.0 软件对实验数据进行单因素方差分析 (One-way ANOVA), 以 Duncan's 多重比较进行不同处理间的显著性分析,  $P < 0.05$  为差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 益生菌处理期养殖水体及对虾肠道可培养细菌数量

养殖水体可培养细菌数量见图 1A, 在添加益生菌前 (0 d), 各组水体可培养细菌数量处于  $10^5$  CFU/ml 数量级 ( $P > 0.05$ )。益生菌处理阶段第 7 天和第 14 天实验组水体可培养细菌数量均处于  $10^7$  CFU/ml 数量级, 显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。对虾肠道可培养细菌数量见图 1B, 在添加益生菌前 (0 d) 凡纳滨对虾肠道细菌总数在  $10^4$  CFU 数量级, 添加益生菌后实验组对虾肠道内可培养细菌数量第 7 天 ( $3.22 \times 10^4$  CFU), 第 14 天 ( $3.54 \times 10^4$  CFU) 均显著高于对照组 (第 7 天为  $3.04 \times 10^4$  CFU, 第 14 天为  $3.03 \times 10^4$  CFU) ( $P < 0.05$ )。

### 2.2 副溶血弧菌攻毒后各组对虾累积存活率

副溶血弧菌攻毒后取实验组和阳性对照组濒死对虾肝胰腺组织, 用 TCBS 平板涂布培养, 长出大量

表 1 实时荧光定量 PCR 所用的引物及序列  
Tab.1 Primer sequences used in quantitative real-time PCR

基因 Gene	正向引物 Forward primer (5'~3')	反向引物 Reverse primer (3'~5')	序列号 Accession number	文献 Reference
<i><math>\beta</math>-actin</i>	CATCAAGGAGAACTGTGCT	GATGGAGTTGTAGGTGGTCT	AF300705	柴鹏程(2012)
<i>Hsp70</i>	CCTCCAGGACTTCTTCAACG	GGTCACGTCCAACAGCAAC	EF495128	王春迪等(2016)
<i><math>\beta</math>GBP-HDL</i>	CGAGAACCGGACAAGAAGTGGAGG	ATCGACGAACACGCAGGGAATG	AY249858	王春迪等(2016)
<i>Crustin</i>	ACGAGGCAACCATGAAGG	AACCACCACCAACACCTAC	AY488497	张盛静等(2016)
<i>LGBP</i>	CATGTCCAACCTTCGCTTTCAGA	ATCACCGCGTGCCATCTT	AY723297	王春迪等(2016)
<i>Lysozyme</i>	GGACTACGGCATCTTCGAGA	ATCGGACATCAGATCGGAAC	AY170126.2	柴鹏程(2012)

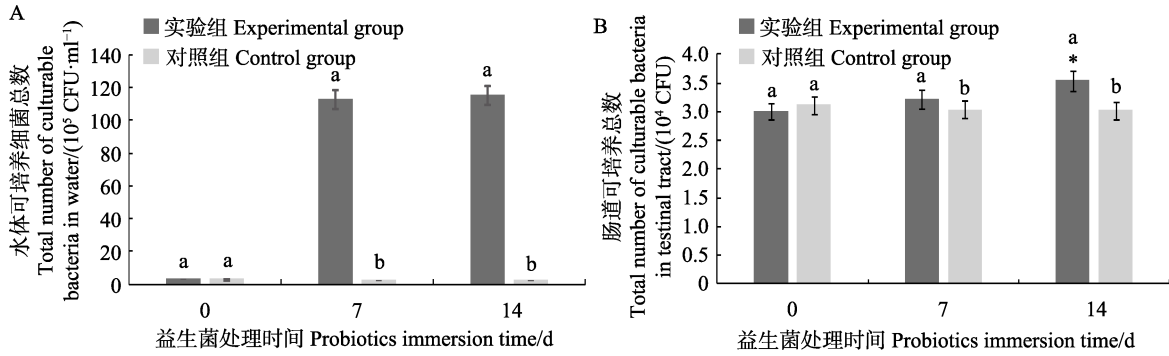


图 1 养殖水体(A)及对虾肠道(B)可培养细菌总数

Fig.1 Total number of culturable bacteria in aquaculture water (A) and *L. vannamei* intestines(B)

不同字母代表同一时间点不同组之间存在显著差异,“\*”代表同一组之间不同时间点存在显著差异。下同  
 Different letters in the same time mean significantly different at 0.05 level ( $P<0.05$ ),  
 “\*” means significantly different at 0.05 level in the same group ( $P<0.05$ ). The same as below

绿色菌落,与攻毒所用副溶血弧菌菌落形态相同。实验组和阳性对照组的对虾均在第 18 小时开始出现死亡。攻毒后 258 h 时,实验组和阴性对照组对虾的累积存活率分别为 73.33%和 86.67%,而阳性对照组对虾的累积存活率为 25.33%。实验组比阳性对照组累积存活率提高了 48.00% (表 2)。

2.3 对虾肝胰腺组织免疫基因相对表达量

2.3.1 *Hsp70* 基因的相对表达量 益生菌处理期,凡纳滨对虾肝胰腺 *Hsp70* 的相对表达量测定结果见图 2A。第 7 天和第 14 天实验组基因表达量显著高于对照组( $P<0.05$ )。攻毒期,凡纳滨对虾肝胰腺 *Hsp70* 的相对表达量测定结果见图 2B。实验组和阳性对照组 *Hsp70* 表达均呈现上升后下降的趋势,均在 18 h 达到最大值( $P<0.05$ )。

2.3.2  $\beta$ GBP-HDL 基因的相对表达量 益生菌处理期,凡纳滨对虾肝胰腺  $\beta$ GBP-HDL 的相对表达量测定结果见图 3A,第 7 天和第 14 天实验组基因表达

量均显著高于对照组( $P<0.05$ )。攻毒期,凡纳滨对虾肝胰腺  $\beta$ GBP-HDL 的相对表达量测定结果见图 3B,实验组对虾的  $\beta$ GBP-HDL 的表达量呈先升高后下降趋势,而阳性对照组呈先升高再下降,再升高再下降的趋势;实验组和阳性对照组基因的表达量分别在 6 和 66 h 达到最高( $P<0.05$ )。

2.3.3 *Crustin* 基因的相对表达量 益生菌处理期,凡纳滨对虾肝胰腺 *Crustin* 的相对表达量测定结果见图 4A。实验组基因表达量在第 7 天和第 14 天均显著高于对照组( $P<0.05$ )。攻毒期,凡纳滨对虾肝胰腺 *Crustin* 的相对表达量测定结果见图 4B。实验组和阳性对照组基因的表达均呈先升高后下降的趋势,实验组基因表达量在 42 h 达到最大值,阳性对照组中基因在 18 h 基因达到最大值。

2.3.4 *LGBP* 基因的相对表达量 益生菌处理期,凡纳滨对虾肝胰腺 *LGBP* 的相对表达量测定结果见图 5A,实验组表达量在第 7 天显著高于对照组,而在第 14 天时表达量则低于对照组的( $P<0.05$ )。攻毒

表 2 凡纳滨对虾感染副溶血弧菌后累积存活率  
 Tab.2 Accumulative survival rate of *L. vannamei* post *V. parahaemolyticus* challenge (%;  $n=3$ ;  $\bar{x} \pm SD$ )

组别 Group	感染后时间 Time post infection (h)										
	6	18	42	66	90	114	138	186	210	234	258
实验组 Experimental group	100.00±0 <sup>a</sup>	98.67±1.89 <sup>a</sup>	97.33±1.89 <sup>a</sup>	97.33±1.89 <sup>a</sup>	97.33±1.89 <sup>a</sup>	93.33±1.89 <sup>a</sup>	90.67±1.89 <sup>a</sup>	82.67±5.00 <sup>a</sup>	77.33±3.78 <sup>a</sup>	73.33±6.83 <sup>a</sup>	73.33±6.80 <sup>a</sup>
阳性对照组 Positive control group	100.00±0 <sup>a</sup>	97.33±3.78 <sup>a</sup>	90.67±4.99 <sup>a</sup>	85.33±6.80 <sup>b</sup>	80.00±8.64 <sup>b</sup>	66.67±6.80 <sup>b</sup>	60.00±8.64 <sup>b</sup>	46.67±10.51 <sup>b</sup>	38.67±10.53 <sup>b</sup>	28.00±14.24 <sup>b</sup>	25.33±15.43 <sup>b</sup>
阴性对照组 Negative control group	100.00±0 <sup>a</sup>	100.00±0 <sup>a</sup>	98.67±1.89 <sup>a</sup>	97.33±1.89 <sup>a</sup>	97.33±1.89 <sup>a</sup>	96.00±3.27 <sup>a</sup>	92.00±3.27 <sup>a</sup>	88.00±3.27 <sup>a</sup>	88.00±3.27 <sup>a</sup>	88.00±3.27 <sup>a</sup>	86.67±1.89 <sup>a</sup>

注: 同列中数据后面不同字母表示显著性差异( $P<0.05$ )

Note: Different letters in the same column mean significantly different ( $P<0.05$ )

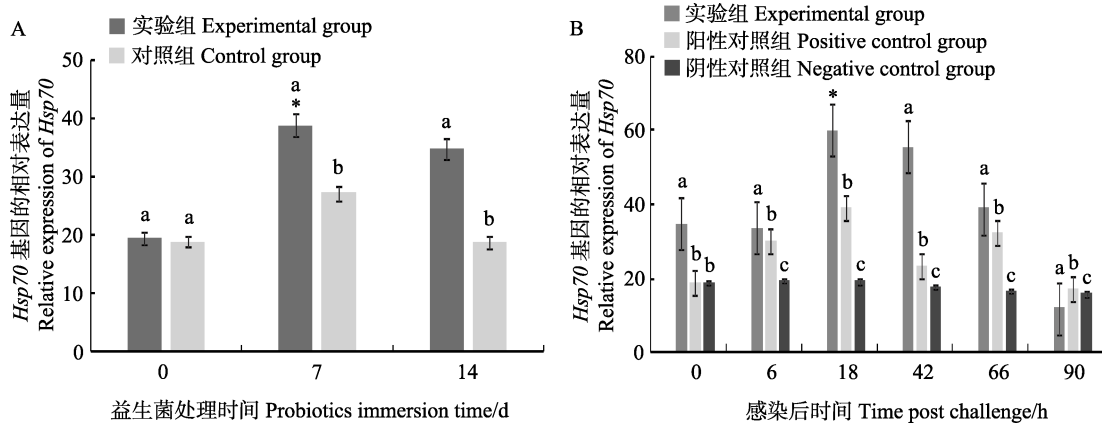


图 2 凡纳滨对虾肝胰腺中 *Hsp70* 基因的相对表达量  
Fig.2 Relative expression of *Hsp70* in the hepatopancreas of *L. vannamei*

A: 益生菌处理阶段; B: 攻毒阶段  
A: Probiotics immersion period; B: *Vp*<sub>AHPND</sub> infection period

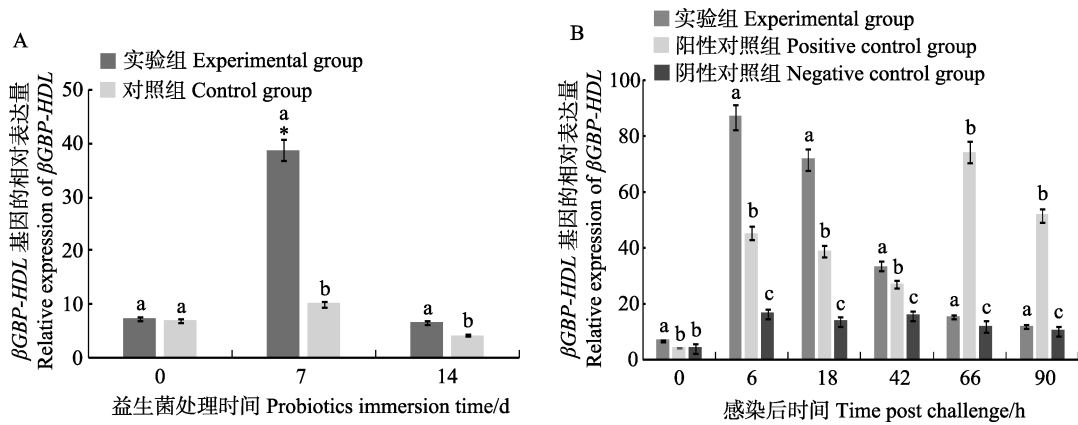


图 3 凡纳滨对虾肝胰腺中  $\beta$ GBP-HDL 基因的相对表达量  
Fig.3 Relative expression of  $\beta$ GBP-HDL in the hepatopancreas of *L. vannamei*

A: 益生菌处理阶段; B: 攻毒阶段  
A: Probiotics immersion period; B: *Vp*<sub>AHPND</sub> infection period

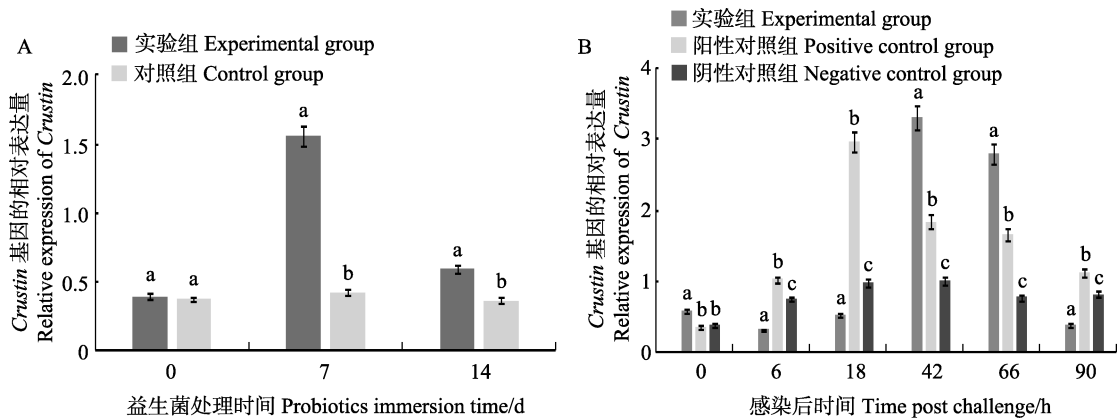


图 4 凡纳滨对虾肝胰腺中 *Crustin* 基因的相对表达量  
Fig.4 Relative expression of *Crustin* in the hepatopancreas of *L. vannamei*

A: 益生菌处理阶段; B: 攻毒阶段  
A: Probiotics immersion period; B: *Vp*<sub>AHPND</sub> infection period

期,凡纳滨对虾肝胰腺 *LGBP* 的相对表达量测定结果见图 5B, 实验组和阳性对照组基因的表达量均呈先升高后下降的趋势, 攻毒 42 h 以后, 实验组对虾 *LGBP* 的表达量高于阳性对照组 ( $P < 0.05$ )。

**2.3.5 过氧化氢酶(CAT)活性** 益生菌处理期, 凡

纳滨对虾肝胰腺 CAT 活性的测定结果见图 6A, 实验组 CAT 活性显著高于对照组的 ( $P < 0.05$ ), 呈逐渐升高趋势。攻毒期, 凡纳滨对虾肝胰腺 CAT 活性的测定结果见图 6B, 实验组从第 18 小时开始呈逐渐升高的趋势, 而阳性对照组呈先升高后下降、再升高再下降的趋势。

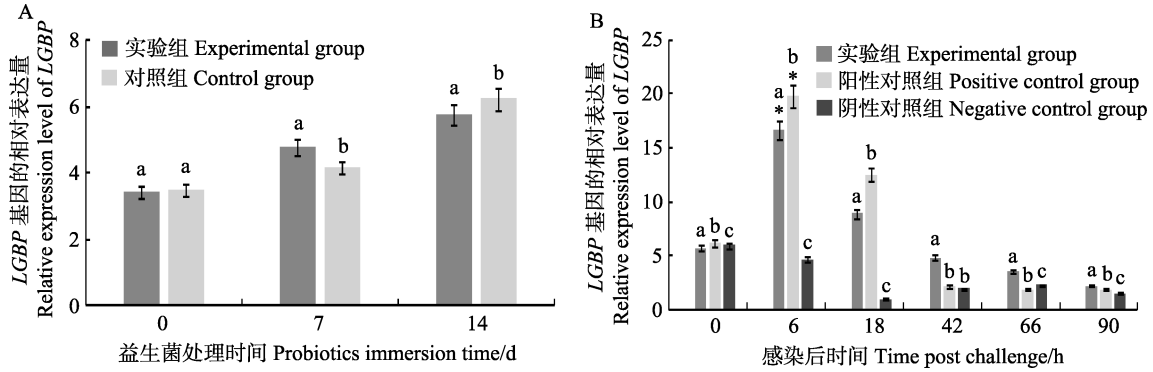


图 5 凡纳滨对虾肝胰腺中 *LGBP* 的相对表达量

Fig.5 Relative expression of *LGBP* in the hepatopancreas of *L. vannamei*

A: 益生菌处理阶段; B: 攻毒阶段

A: Probiotics immersion period; B: *VpAHPND* infection period

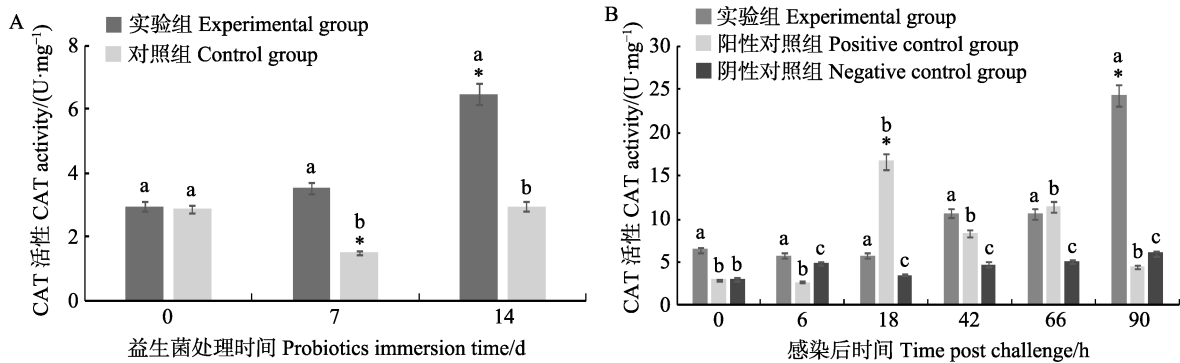


图 6 凡纳滨对虾肝胰腺 CAT 活性

Fig.6 CAT activity of *L. vannamei* hepatopancreas

A: 益生菌处理阶段; B: 攻毒阶段

A: Probiotics immersion period; B: *VpAHPND* infection period

### 3 讨论

Wu 等(2008)研究表明, 益生菌可以在对虾肠道内复杂的环境中竞争有限的生态位点, 阻止致病微生物在该位点定植与繁殖。竞争性抑制是益生菌通过与肠道上皮细胞发生反应, 与致病菌竞争肠道黏膜表面结合位点, 进而抑制致病菌在肠道内的黏附和定植, 是益生菌的益生机制之一(廖文艳等, 2011)。本研究中, 实验组水体可培养细菌总数显著高于对照组, 且实验组对虾肠道可培养细菌总数也显著高于对照组, 说明添加益生菌不仅对养殖水体可培养细菌总数产

生影响, 同时, 也影响对虾肠道可培养细菌总数。类似地, 胡毅等(2008)研究发现, 饲料中添加枯草芽孢杆菌能显著增加凡纳滨对虾肠道细菌总数, 且与对照组相比饲料中添加益生菌在实验前期和末期均显著降低了对虾肠道的弧菌数量。刘文亮等(2017)在凡纳滨对虾养殖水体中投喂含有蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)的饲料, 用 16S rDNA 序列 V3+V4 区高通量测序方法检测对虾肠道内微生物群落的结构及变化, 结果表明, 饲料中添加蜡样芽孢杆菌投喂凡纳滨对虾后, 可改变对虾肠道的微生物组成, 提高凡纳滨对虾生长速度、增强抗病能力。本研究攻毒阶段实验组对

虾相对于阳性对照组对虾累积存活率提高了 48.00%, 说明复合益生菌能够提高对虾抗副溶血弧菌感染能力, 这可能与益生菌增加对虾肠道可培养细菌总数有关。由于本研究取样次数较多, 导致每次取样的对虾样本量偏少, 对虾肠道可培养细菌数量增多并不足以说明对虾肠道菌落结构的变化。益生菌是否在凡纳滨对虾体内定植还有待进一步探索。

LGBP 作为一种模式识别受体能够识别革兰氏阴性菌和真菌细胞壁的脂多糖和  $\beta$ -1,3-葡聚糖, 并通过激活 ProPO 系统发挥作用, 它是甲壳动物对抗副溶血弧菌感染的一个重要免疫因子(王锡波等, 2013); 与 LGBP 功能类似,  $\beta$ GBP-HDL 在激活 ProPO 系统、凝结过程等方面起着重要作用(王春迪等, 2016)。本研究中, 益生菌处理阶段 LGBP,  $\beta$ GBP-HDL 在第 7 天均出现不同程度上调, 孙艳等(2012)研究也发现, 凡纳滨对虾  $\beta$ GBP 在含益生菌的饲料饲喂对虾过程中表达上调, 并在 72 h 时达到最大值, 与本研究结果类似。攻毒阶段, 实验组的 LGBP 表达始终显著高于阴性对照组, 阳性对照组的 LGBP 则在攻毒后第 66 小时低于阴性对照组, 且攻毒 42 h 后, 实验组 LGBP 表达始终高于阳性对照组; 而实验组的  $\beta$ GBP-HDL 在攻毒后前 42 h 显著高于阳性对照组。分析实验结果, 水体添加复合益生菌不同程度的促进了 LGBP,  $\beta$ GBP-HDL 表达, 说明复合益生菌在凡纳滨对虾抵抗副溶血弧菌侵染的过程中发挥了积极的作用。

HSP 作为一种对环境应激敏感的蛋白, 在外界环境刺激下其表达量会明显增加, 参与到细胞保护机制中, 对保证正常的细胞结构, 维持机体新陈代谢具有重要意义(明建华等, 2009)。本研究攻毒阶段, 实验组和阳性对照组 *Hsp70* 表达均呈先上升后下降的趋势, 但实验组基因表达量显著高于阳性对照组, 说明养殖水体添加益生菌后, 相比阳性对照组实验对虾抗应激反应能力更强。类似的研究, 王春迪等(2016)在养殖水体中添加蜡芽孢杆菌后, 用 WSSV 感染凡纳滨对虾, 实验组对虾 *Hsp70* 在第 96 小时表达量显著高于对照组。水体添加高浓度副溶血弧菌攻毒能引起对虾的应激反应, 而本研究结果表明, 副溶血弧菌攻毒时, 复合益生菌能够提高凡纳滨对虾抗应激反应的能力。

抗菌肽(Antimicrobial peptides, AMPs)是一种原始的具有防御功能的生物分子, 目前主要包括: ALFs、Crustins、Peneidins 三大类以及一些血蓝蛋白、溶菌酶、C 型外源凝集素等(Antony *et al*, 2011)。本实验中益生菌处理阶段, 实验组 *Crustin* 在第 7 天和第 14 天的表达量均高于对照组, 说明水体添加益生菌能促进 *Crustin* 表达。攻毒阶段, 实验组和阳性对照

组 *Crustin* 的表达均呈现先升高后下降的趋势, 阳性对照组在第 18 小时达到最大, 实验组在第 42 小时达到最大。赵伟等(2017)用副溶血弧菌攻毒发现, 攻毒后的实验组对虾 *Crustin* 呈现先上升后下降的趋势, 并在攻毒的第 12 小时达到最大, 跟本研究阳性对照组实验结果类似。攻毒后, 副溶血弧菌对对虾机体造成伤害, *Crustin* 短时间内的迅速表达能够抵抗副溶血弧菌的入侵。研究表明, 复合益生菌增强对虾抗副溶血弧菌入侵的能力, 可能与攻毒后复合益生菌延缓对虾 *Crustin* 基因的表达有关。

氢氧自由基(OH $\cdot$ , ROS)是化学性质最活泼的活性氧, 它几乎与细胞内的每一类有机物如糖、氨基酸、磷脂、核苷酸和有机酸发生反应, 其破坏性极强(Liu *et al*, 2010)。当副溶血弧菌侵入凡纳滨对虾体内时, 会激发对虾天然免疫系统, 产生 ROS 以对抗弧菌的入侵, 虽然释放 ROS 是甲壳动物对抗微生物感染的重要防御机制, 产生过量同时会导致细胞损伤, 但它可以被过氧化氢酶分解(Duan *et al*, 2015)。本研究益生菌处理阶段, 复合益生菌能够显著提高对虾 CAT 活性。桂琳等(2015)研究也发现, 水体添加复合益生菌能显著提高草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)血清中 CAT 活性。本研究攻毒阶段, 阳性对照组 CAT 活性呈上升、下降、再上升、再下降的趋势。赵伟等(2017)使用副溶血弧菌攻毒, 36 h 内观察对凡纳滨对虾 CAT 的影响, 发现实验组凡纳滨对虾肝胰腺 CAT 活性呈先升高后降低的趋势, 与本研究阳性对照组结果相似, 说明副溶血弧菌对凡纳滨对虾的这种天然免疫系统造成了破坏; 而本研究中, 实验组 CAT 活性则呈逐渐上升的趋势, 这种逐渐上升的趋势说明实验组对虾的这种免疫机制仍然完善。分析实验结果, 益生菌增强对虾抗弧菌感染能力, 可能与益生菌能够提高对虾的 CAT 活性有关。

## 4 结论

凡纳滨对虾养殖水体中添加的复合益生菌能显著提高对虾感染副溶血弧菌后的成活率, 增加水体和对虾肠道中可培养细菌量。在益生菌处理时期, 复合益生菌能够不同程度的提高对虾抗病相关基因的表达量和 CAT 活性; 副溶血弧菌攻毒时期, 对虾抗病相关基因表达呈现各自不同的情况。实验结果表明, 复合益生菌提高凡纳滨对虾抗副溶血弧菌感染能力的原因可能与复合益生菌增加水体和对虾肠道中可培养细菌量、提高凡纳滨对虾抗病相关基因表达和 CAT 活性有关。

## 参 考 文 献

- Antony SP, Singh ISB, Jose RM, *et al.* Antimicrobial peptide gene expression in tiger shrimp, *Penaeus monodon* in response to gram-positive bacterial probiotics and white spot virus challenge. *Aquaculture*, 2011, 316(1-4): 6-12
- Balcázar JL, Blas ID, Ruiz-Zarzuola I, *et al.* The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 2006, 114(3-4): 173-186
- Chai PC. Application of *Bacillus firmus* PC465 in shrimp culture and the evaluation of effects on growth, disease resistance of *L. vannamei*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2012 [柴鹏程. 坚强芽孢杆菌PC465在凡纳滨对虾养殖中的应用技术及效果评价. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2012]
- Chen MM, Dong X, Qiu L, *et al.* Quantitative analysis of acute hepatopancreatic necrosis disease causing *Vibrio parahaemolyticus* (VpAHPND) in infected *Litopenaeus vannamei*. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(4): 93-100 [陈蒙蒙, 董宣, 邱亮, 等. 凡纳滨对虾感染致急性肝胰腺坏死病副溶血弧菌(VpAHPND)的定量分析. *渔业科学进展*, 2018, 39(4): 93-100]
- Duan Y, Zhang J, Dong H, *et al.* Oxidative stress response of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* to *Vibrio parahaemolyticus* challenge. *Fish and Shellfish Immunology*, 2015, 46(2): 354-365
- Gao G, Zhu KL, Zhang QQ, *et al.* Simplified fermentation of a functional probiotics and the application in prawn (*Litopenaeus vannamei*) bio-floc breeding. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(3): 140-147 [高戈, 朱开玲, 张庆起, 等. 一株功能益生菌的简易发酵及其在凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)生物絮团养殖中的应用. *渔业科学进展*, 2017, 38(3): 140-147]
- Gui L, Wang XQ, Kang Y, *et al.* Effects of one compound probiotics on growth and antioxidant function of *Ctenopharyngodon idellus*. *Freshwater Fisheries*, 2015, 45(5): 83-87 [桂琳, 王晓清, 康银, 等. 一种复合益生菌对草鱼生长和抗氧化功能的影响. *淡水渔业*, 2015, 45(5): 83-87]
- Hu Y, Tan BP, Mai KS, *et al.* Effects of dietary probiotic on growth, immunity and intestinal bacteria of juvenile *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2008, 15(2): 244-251 [胡毅, 谭北平, 麦康森, 等. 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*, 2008, 15(2): 244-251]
- Jia D, Shi CY, Huang J, *et al.* Identification and pathogenicity analysis of bacterial pathogen associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in the Pacific shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(3): 103-111 [贾丹, 史成银, 黄健, 等. 凡纳滨对虾急性肝胰腺坏死病(AHPND)病原分离鉴定及其致病性分析. *渔业科学进展*, 2018, 39(3): 103-111]
- Liao WY, Zhou LH, Wang YY, *et al.* Recent progress on probiotic mechanisms in intestine and the studying methods. *Chinese Journal of Microecology*, 2011, 23(2): 184-189 [廖文艳, 周凌华, 王荫榆, 等. 近年来益生菌肠道功能作用机制及研究方法的进展. *中国微生态学杂志*, 2011, 23(2): 184-189]
- Liu GB, Wang M, Lu MX, *et al.* Application of *Bacillus subtilis* in comprehensive prevention and control of streptococcus disease of tilapia. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2015, 42(13): 123-129 [刘观斌, 王淼, 卢迈新, 等. 枯草芽孢杆菌在罗非鱼链球菌病综合防控中的应用研究. *广东农业科学*, 2015, 42(13): 123-129]
- Liu KF, Yeh MS, Kou GH, *et al.* Identification and cloning of a selenium-dependent glutathione peroxidase from tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and its transcription following pathogen infection and related to the molt stages. *Developmental and Comparative Immunology*, 2010, 34(9): 935-944
- Liu WL, Xu H, Tang Y, *et al.* The effect of diet with *Bacillus cereus* biofilm on the growth rate, disease resistance and intestinal microflora of *Litopenaeus vannamei*. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(4): 87-95 [刘文亮, 许华, 唐杨, 等. 饲料中补充蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)生物膜对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)生长、抗病力及其肠道微生物组成的影响. *渔业科学进展*, 2017, 38(4): 87-95]
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- Ming JH, Xie J, Liu B, *et al.* Cloning sequence analysis of *HSP70* cDNA and effects of heat stress on its mRNA expression in *Megalobrama amblycephala*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2009, 16(5): 635-648 [明建华, 谢骏, 刘波, 等. 团头鲂 *HSP70* cDNA 的克隆、序列分析以及热应激对其 mRNA 表达的影响. *中国水产科学*, 2009, 16(5): 635-648]
- Sun BC, Yang YK, Wang HL, *et al.* Effects of probiotics combination on breeding of *Litopenaeus vannamei* under zero-water exchange condition. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2019, 28(1): 93-102 [孙博超, 杨运楷, 王海亮, 等. 零换水条件下益生菌组合在凡纳滨对虾育苗生产中的应用. *上海海洋大学学报*, 2019, 28(1): 93-102]
- Sun Y, Liu F, Song XL, *et al.* Effects of adding probiotics in the feed on non-specific immune gene expression and disease resistance of *Litopenaeus vannamei*. *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(*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): 845-850]
- Thompson FL, Abreu PC, Cavalli R. The use of microorganisms as food source for *Penaeus paulensis* larvae. *Aquaculture*, 1999, 174(1-2): 139-153
- Wang CD, Song XL, Zhang XJ, *et al.* Effects of adding *Bacillus cereus* PC465 to rearing water on disease resistance of *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(1): 146-155 [王春迪, 宋晓玲, 张晓静, 等. 养殖水体添加蜡样芽孢杆菌 PC465 对凡纳滨对虾抗病力的影响. *中国水产科学*, 2016, 23(1): 146-155]
- Wang HL, Wang CD, Tang Y, *et al.* *Pseudoalteromonas* probiotics as potential biocontrol agents improve the survival of *Penaeus vannamei* challenged with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND)-causing *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*, 2018, 494: 30-36
- Wang N, Wang HL, Bai N, *et al.* Isolation of lysogenic phage in *Vibrio parahaemolyticus* and its relationship with the pathogenicity of the host bacteria. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(2): 105-110 [王娜, 王海亮, 白楠, 等. 副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)中溶源噬菌体与其宿主菌致病力的相关性. *渔业科学进展*, 2016, 37(2): 105-110]
- Wang XB, Jin S, Chen YE, *et al.* Temporal expression of the



- LGBP gene in mainly tissues of *Portunus trituberculatus* challenged by different pathogens. *Journal of Biology*, 2013, 30(6): 5–9 [王锡波, 金珊, 陈寅儿, 等. 不同病原菌刺激下三疣梭子蟹主要组织 LGBP 基因的时序表达. *生物学杂志*, 2013, 30(6): 5–9]
- WU X, Vallance BA, Boyer L, *et al.* *Saccharomyces boulardii* ameliorates *Citrobacter rodentium*-induced colitis through actions on bacterial virulence factors. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2008, 294(1): 295–306
- Zhang HH, Wang XH, Li C, *et al.* Isolation and identification of a bacterial strain with *Vibriosis*-antagonism from shrimp ponds. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(3): 85–92 [张欢欢, 王秀华, 李晨, 等. 对虾养殖池中一株弧菌拮抗菌的分离鉴定. *渔业科学进展*, 2016, 37(3): 85–92]
- Zhang SJ, Song XL, Zhao XJ, *et al.* Effects of adding probiotics to the feed on anti-infection and five kinds of immune gene expression of *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(6): 899–907 [张盛静, 宋晓玲, 赵小金, 等. 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. *水产学报*, 2015, 39(6): 899–907]
- Zhang SJ, Zhao XJ, Song XL, *et al.* Effects of adding probiotics on promoting intestinal bacteria, Toll receptors, and lysozyme immune gene expression and resistance to *Vibrio harveyi* in *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(4): 846–854 [张盛静, 赵小金, 宋晓玲, 等. 饲料添加益生菌对凡纳滨对虾肠道菌群、Toll 受体及溶菌酶基因表达及抗感染的影响. *中国水产科学*, 2016, 23(4): 846–854]
- Zhao W, Wang L, Liu M, *et al.* The effects of *Vibrio parahaemolyticus* on hepatopancreas antioxidant enzyme activity and gene expression of *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(6): 1261–1270 [赵伟, 王雷, 刘梅, 等. 副溶血弧菌对凡纳滨对虾肝胰腺抗氧化酶活性和基因表达的影响. *中国水产科学*, 2017, 24(6): 1261–1270]

(编辑 马瑾艳)

## Effect of A Compound Probiotics on the Ability of *Litopenaeus vannamei* to Resist *Vibrio parahaemolyticus* Infection

YANG Yunkai<sup>1,2</sup>, SONG Xiaoling<sup>2①</sup>, WANG Hailiang<sup>2</sup>, XIE Guosi<sup>2</sup>, HUANG Jie<sup>2</sup>

(1. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao); Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Qingdao Key Laboratory of Mariculture Epidemiology and Biosecurity, Qingdao 266071)

**Abstract** In this culture experiments of *Litopenaeus vannamei*, we explore the effect of compound probiotics on the ability of *L. vannamei* to resist *Vibrio parahaemolyticus* infection at different experimental stages. One strain of *Bacillus licheniformis* (BL-9), one *B. subtilis* (BS-12), and one *Pseudoalteromonas flavipulchra* (CDM8) were selected to make up a compound of probiotics at the same concentration ( $10^7$  CFU/ml). The effect of compound probiotics on the *V. parahaemolyticus* infection of *L. vannamei* was observed by adding the compound probiotics to the culture water of the *L. vannamei*. The experiment took place over 30 d, including a temporary period (7 d), a probiotics immersion period (15 d), and a *V. parahaemolyticus* infection period (10 d). The experiment results showed that the addition of compound probiotics in the culture water could significantly increase the total number of bacteria culture in the water and the intestinal tract of *L. vannamei* ( $P < 0.05$ ). The cumulative survival rate of shrimp in the experimental group was  $(73.33 \pm 6.83)\%$  at the end of the infection period which was significantly higher than that of the positive control group  $(25.33 \pm 15.43)\%$ . The disease-resistant-related gene: heat shock protein 70 (*Hsp70*),  $\beta$ -1,3-glucan binding protein-lipoprotein ( $\beta$ GBP-HDL), lipopolysaccharide- $\beta$ -1,3-glucan binding protein (LGBP), *crustin*, and immune related enzymes catalase (CAT), was up-regulated by different degrees in the probiotics immersion phase. And all the genes up-regulated extensively during the *V. parahaemolyticus* infection stage, but expressed at different levels. The results suggested that the compound probiotics with BL-9, BS-12, and CDM8 in water could improve the ability of shrimp to resist *V. parahaemolyticus* infection. The increase of disease resistance of *L. vannamei* may be related to the colonization of probiotics in the intestinal tract, and the expression level of disease resistance related genes and catalase activity in *L. vannamei*. It is hoped that the results of this study can provide a reference for the application of compound probiotics in the cultivation of *L. vannamei*.

**Key words** *Litopenaeus vannamei*; Compound probiotics; *Vibrio parahaemolyticus*; Immune genes; Catalase

① Corresponding author: SONG Xiaoling, E-mail: songxl@ysfri.ac.cn