

添加不同形式屎肠球菌对凡纳对虾生长性能、非特异免疫及抗病力影响的比较研究*

田相利¹, 刘云慧¹, 刘怡君¹, 汪仕爽¹, 罗凯¹, 刘杨¹, 秦光彩¹, 范瑞用²

(1. 海水养殖教育部重点实验室(中国海洋大学), 山东 青岛 266003; 2. 青岛瑞溢海洋工程研究院有限公司, 山东 青岛 266408)

摘要: 为了研究饲料中添加不同形式的屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)LYB对凡纳对虾(*Penaeus vannamei*)生长、免疫及抗病力的影响。本研究设置了5种不同添加形式,分别为屎肠球菌发酵液(FJ)、活菌体(HJ)、发酵上清液(FQ)、超声波破碎菌体(CS)和热灭活菌体(RM),以商品饲料作为对照(Con),实验周期为42 d。研究表明,各处理组对虾成活率在84.0%~96.0%之间,Con组成活率最高且与CS组差异不显著($P>0.05$)。从对虾生长情况来看,HJ和CS组对虾末体质量和特定生长率显著高于FQ、RM和Con组($P<0.05$),与FJ组差异不显著($P>0.05$)。各处理组对虾血清中的超氧化物歧化酶(SOD)、酚氧化酶(PO)、碱性磷酸酶(AKP)、酸性磷酸酶(ACP)、溶菌酶(LZM)活性以及总抗氧化能力(T-AOC)均显著高于Con组($P<0.05$),其中CS组的ACP活性最高,HJ、CS、FJ和RM组的AKP活性显著高于FQ组($P<0.05$),CS和FJ组的POD活性显著高于HJ和RM组。HJ、CS、FJ和RM组对虾肝胰腺SOD、LZM、*proPO*、*LGBP*和*HSP70*基因表达水平显著高于FQ和Con组,其中CS组的*HSP70*、*LZM*和*proPO*基因表达水平最高,各处理组对虾肝胰腺中*Imd*、*Toll*和*Relish*基因相对表达量显著高于Con组($P<0.05$),HJ和CS组的*Imd*表达量显著高于FQ和FJ组($P<0.05$),CS组的*Toll*和*Relish*基因相对表达量最高($P>0.05$)。在mTOR信号通路中,FJ、CS和RM组对虾肝胰腺*TOR*和*4E-BP*基因表达水平显著高于FQ和Con组($P<0.05$),HJ、FJ和RM组对虾肝胰腺*elF4E1A*和*elF4E2*基因表达水平显著高于CS、FQ和Con组($P<0.05$)。副溶血弧菌(*Vibrio Parahaemolyticus*)攻毒结果表明,CS组对虾累计死亡率显著低于对照组($P<0.05$)。综合各项指标,在凡纳对虾饲料中添加屎肠球菌LYB活菌菌液和超声波破碎菌体可显著提升其生长性能和免疫能力,其中超声波破碎菌体可作为潜在后生元,用于提高凡纳对虾的生长、免疫和抗病力。

关键词: 屎肠球菌; 凡纳对虾; 饲料; 生长; 免疫; 抗病力; 后生元

中图分类号: S917.1

文献标志码: A

文章编号: 1672-5174(2024)10-179-11

DOI: 10.16441/j.cnki.hdxh.20240027

引用格式: 田相利, 刘云慧, 刘怡君, 等. 添加不同形式屎肠球菌对凡纳对虾生长性能、非特异免疫及抗病力影响的比较研究[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2024, 54(10): 179-189.

Tian Xiangli, Liu Yunhui, Liu Yijun, et al. Effects of *Enterococcus faecium* in different forms on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of *Penaeus vannamei*[J]. Periodical of Ocean University of China, 2024, 54(10): 179-189.

凡纳对虾(*Penaeus vannamei*),又称南美白对虾,是全球三大水产养殖品种之一,也是目前我国主要的对虾养殖种类,具有抗病力强、生长速度快以及经济价值高等优势^[1]。近年来,我国凡纳对虾的养殖产量呈递增趋势,2022年总产量达210万t^[2]。然而,随着对虾养殖集约化程度和规模的不断增大,该产业的负面影响也受到更多的关注。其中,水质恶化、疾病频发、饲料利用率低等问题成为制约对虾养殖业健康发展的重要因素^[3]。此外,抗生素的滥用导致细菌产生耐药性以及抗生素残留,对人体健康也存在不可忽视的潜在危害^[4]。因此,为保障对虾养殖业的可持续发展,寻

找绿色安全的抗生素替代品具有重要意义。

益生菌是一类有益于宿主健康,可改善宿主肠道菌群平衡的活性微生物,因具有安全无毒、无抗药性、无污染等特点^[5],成为抗生素友好替代品之一,被广泛应用于水产养殖业。目前常用于对虾养殖业的益生菌已有很多种类,例如芽孢杆菌、乳酸菌、酵母菌等^[6]。近年来,随着对益生菌相关研究的不断深入,“后生元”(Postbiotics)这一新概念越来越多被科研和产业界提及。2021和2022年,益生菌和益生元国际协会^[7]和中国食品科学技术学会益生菌分会^[8]先后将后生元定义为:对宿主健康有益的无生命微生物和/或菌体成分。

* 基金项目:国家重点研发计划项目(2023YFD2401705, 2020YFD0900200)资助

Supported by the National Key Research and Development Program of China(2023YFD2401705, 2020YFD0900200)

收稿日期:2024-01-24; 修订日期:2024-03-12

作者简介:田相利(1971—),男,博士,教授,研究方向:主要从事水产微生物生态学研究。E-mail:xianglitian@ouc.edu.cn

根据非活性成分来源的不同,可分为灭活菌体、菌体结构成分和菌体代谢物三类^[9]。目前,后生元在水产养殖动物上发挥作用的机制尚不明确,但已有研究表明,后生元相较于益生菌具有更高的安全性、更好的稳定性、更长的保存期限等特点^[10]。例如,喷雾干燥的丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)孢子和活细胞与上清液混合在调节对虾免疫应答方面具有更好的益生菌效果^[11]。在真鲷(*Pagrus major*)饲料中添加热灭活的植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)及 β -葡聚糖能够增强其生长和免疫应答功能^[5],在凡纳对虾饲料中添加乳酸菌代谢产物则可提高饲料的转化效率,并抑制病原微生物的生长^[12]。

屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)属肠球菌属,因其可产生乳酸,归属于乳酸菌类^[13]。研究表明,屎肠球菌可产生细菌素、有机酸和过氧化氢等物质,可以提高养殖动物的生长性能和机体免疫反应^[14]、抑制致病菌的增殖以及维持肠道菌群平衡等^[15]。然而,在水产养殖中,尽管屎肠球菌的实践应用比较普遍,但其研究数据目前还相对较少,尤其在饲料中的最佳添加形式和作用机制尚不明确。本研究旨在比较饲料中添加不同形式的屎肠球菌 LYB 对凡纳对虾生长性能、免疫反应和抗病力的影响,同时对灭活屎肠球菌的后生元应用潜力进行评价,以期对屎肠球菌在凡纳对虾饲料中的科学应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验用凡纳对虾从青岛正大农业公司所购买。由于对虾原养殖用水盐度在 18 左右,而实验基地所用海水盐度为 31 左右,故幼虾运回后,以每天盐度 2 的递增速度对对虾进行了盐度驯化,直至达到盐度 31,再进行为期 2 周的暂养。驯化好的对虾经饥饿处理 24 h 后,随机选取大小一致的健康对虾,放养在规格 30 cm×40 cm×50 cm、实际养殖水体 50 L 的水族箱中,每个水族箱中放养 15 尾。

1.2 实验设计

实验所用的屎肠球菌 LYB 分离自健康凡纳对虾的肠道,保存在中国海洋大学养殖生态实验室菌种保藏中心。将屎肠球菌 LYB 菌株活化后,接种至 MRS 液体培养基,于 37 °C 恒温震荡培养 24 h 后得到菌体浓度约为 5×10^9 cfu · mL⁻¹ 的发酵液。取一定体积的发酵液以 $10\,000$ r · min⁻¹ 离心 10 min 后,得到发酵上清液及活菌体。将得到的活菌体用无菌生理盐水漂洗两次后,再加入等量灭菌的生理盐水配制成重悬液备用。以超声波破碎(300 W 超声波破碎 20 min)及热灭活(105 °C 热灭活处理 5 min)两种处理方式对菌体浓度为

5×10^9 cfu · mL⁻¹ 的重悬液进行处理,得到超声波破碎菌体悬浊液及热灭活处理的菌体悬浊液。

本研究共设置了 5 个处理组,分别为投喂添加屎肠球菌发酵液(FJ)、活菌体(HJ)、发酵上清液(FQ)、超声波破碎菌体(CS)和热灭活菌体(RM)的饲料,以商品饲料作为对照(Con),每个处理设置 5 个重复。根据汪仕爽^[16]研究结果,LYB 活菌和灭活菌体的添加浓度设置为 1×10^{11} cfu kg⁻¹,即活菌体和灭活菌体悬浊液的添加量为 20 mL · kg⁻¹,屎肠球菌发酵液和发酵上清液的添加量也均为 20 mL · kg⁻¹。

对虾养殖实验为期 42 d,在每天的 8:00、12:00、16:00 和 20:00 定时投喂,共 4 次,根据对虾的体质量(4%~5%)确定投喂量。按时收集对虾残饵、粪便,烘箱温度设置为 80 °C,烘干后保存、称重。每天的换水量为 1/3~1/2。

1.3 实验饲料制备

每 100 mL 蒸馏水添加 3.15 g 的海藻酸钠,混合均匀后 80 °C 条件下加热至完全溶解,每 100 mL 溶解液加入 4.2 mL 的鱼油混匀,将各组处理后的液体均匀喷洒到饲料表面,再按相应比例添加配好的混合物。Con 组饲料将处理组添加的菌液换成等量的无菌生理盐水。基础饲料为从青岛正大农业公司购入的凡纳滨对虾商品饲料。最后置于阴凉通风处晾干,于 4 °C 冰箱保存。基础饲料主要成分见表 1。

表 1 饲料主要成分

Table 1 Composition of the feed

成分 Ingredient	含量 Content/%
粗蛋白 Crude protein	≥ 42.0
粗脂肪 Crude fat	≥ 4.0
粗纤维 Crude fibre	≤ 3.0
粗灰分 Crude ash	≤ 15.0
水分 Moisture	≤ 12.0
赖氨酸 Lys	≥ 2.40
总磷 Total phosphorus	≥ 1.00

1.4 样品采集与处理

养殖 42 d 后,禁食 24 h,称重。在不同的水族箱中,随机选择 7 尾虾,取血液及肝脏胰脏样品。采集的血液样品置于 4 °C 条件下,离心($3\,000$ r · min⁻¹, 10 min),取上清于低温(-80 °C)保存。对虾肝胰腺的收集采用无菌工具(剪刀和镊子)将其切成小块,置于含有 RNA 保护液的离心管内,做好标记后先于 4 °C 条件下静置 12 h,然后于 -80 °C 条件保存待测。

1.5 各项指标测定

1.5.1 生长指标 对虾饥饿处理 1 d 后,将每个水族

箱对虾的初、末体质量进行称重记录。生长性能指标包括对虾的成活率(SR)、特定增长率(SGR)以及饲料效率(FER)等,计算公式参照汪仕爽等^[16]的研究方法:

$$SR = (S_{末} / S_{初}) \times 100\%;$$

$$SGR = [(\ln W_{末} - \ln W_{初}) / t] \times 100\%;$$

$$FER = (W_{末} - W_{初}) / W_{饲} \times 100\%。$$

式中: $S_{末}$ 和 $S_{初}$ 分别代表实验开始和结束时的凡纳对虾数量; $W_{初}$ 和 $W_{末}$ 分别表示实验开始和结束时凡纳对虾的体质量; t 表示实验天数; $W_{饲}$ 表示投喂对虾饲料的量。

1.5.2 非特异性免疫指标 以采集的凡纳对虾的血清为样品,测定其碱性磷酸酶(AKP)、酸性磷酸酶

(ACP)、超氧化物歧化酶(SOD)、总一氧化氮合酶(T-NOS)、溶菌酶(LZM)、酚氧化酶(PO)、过氧化物酶(POD)活性以及总抗氧化能力(T-AOC),参照南京建成本物公司对应的试剂盒说明书进行测定。

1.5.3 免疫信号通路相关基因表达 采用 Trizol 法提取肝胰腺样品中的总 RNA, RNA 的完整度采用琼脂糖凝胶电泳法进行验证。然后将检测合格的 RNA 进行反转录。采用实时荧光定量 PCR 的方法测定对虾肝胰腺中相关免疫基因的表达水平,免疫基因及其引物序列参照表 2^[16-18],参照汪仕爽等^[19]的 20 μ L 反应体系进行扩增。各处理组相关免疫基因的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量法计算。

表 2 引物序列

Table 2 Sequences of the primers

基因 Gene	正向引物(5'—3') Forward primers (5'—3')	反向引物(5'—3') Reverse primers (5'—3')	引物来源 Primers source
<i>Actin</i>	GAGCAACACGGAGTTCGTTGT	CATCACCAACTGGGACGACATGGA	孙艳等 ^[16]
<i>SOD</i>	AGCCAATGACGTAAGCG	ACCATCACAAGA AACCC	孙艳等 ^[16]
<i>LZM</i>	TGTTCGATCTGATGTCC	GCTGTTGTAAGCCACCC	孙艳等 ^[16]
<i>proPO</i>	TCCATTCCGTCGTCTG	GGCTTCGCTCTGGTTAGG	孙艳等 ^[16]
<i>LGBP</i>	CATGTCCAACCTCGCTTTCAGA	ATCACCGCGTGGCATCTT	AY723297*
<i>HSP70</i>	AACGATTCTCAGCGTCAGG	AGGTGCCACGGAACAGAT	AY645906*
<i>Imd</i>	TCACATTGGCCCCGTTATCC	ATCTCGCGACTGCACTTCAA	FJ592176*
<i>Toll</i>	TGGACTTCTGCTCGGACAAC	GTACATGTCCTTGGTCGGCA	DQ923424*
<i>Relish</i>	CCTGTGAAGACATTAGGAGGAGTA	CCAGTTGTGGCATTCTTTAGG	葛倩倩等 ^[17]
<i>TOR</i>	TGCCAACGGGTGGTAGA	GGGTGTTTGTGGACGGA	Duan 等 ^[18]
<i>4E-BP</i>	ATGCTCTGCTTCGCCCCGCTCGCC	GGTCTTGGGTGGGCTCTT	Duan 等 ^[18]
<i>eIF4E1α</i>	TCCCTTCCCTAACCCCTCA	GTTTTGCTGTCTCGCTTCC	Duan 等 ^[18]
<i>eIF4E2</i>	TGGAATCAAACCTATGTGGG	GTCTCTGGAAGCGTA	Duan 等 ^[18]

注: *: 引物在 GenBank 中的序列号。*: Sequence number of the primer in GenBank.

1.6 副溶血弧菌攻毒实验

攻毒实验所使用的副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, 20160303005-1)由中国水产科学研究院黄海水产研究所提供。副溶血弧菌的培养采用 TSB 培养基,培养温度为 28 $^{\circ}$ C,培养 20 h 左右。活菌数量在培养数代后使用血球计数板进行计数。

经预实验,确定副溶血弧菌对对虾的半致死浓度为 8.1×10^8 cfu \cdot mL⁻¹,依此浓度进行副溶血弧菌攻毒实验。将养殖实验取样后剩余的对虾继续投喂 5 d,在各组中(HJ、FJ、CS、HJ、RM 和 Con 组)随机获取凡纳对虾 24 尾(各组 3 个平行,每个平行缸取 8 尾),攻毒的周期为 2 周,副溶血弧菌的注射浓度为 8.1×10^8 cfu \cdot mL⁻¹。对不同处理组凡纳对虾的生长状态以及

存活、死亡情况进行记录。

1.7 实验数据统计分析

在利用 SPSS 26.0 软件保证方差齐性和正态分布的情况下,进行单因素方差分析及 Tukey's 多重比较, $P < 0.05$ 水平为显著,数据表示形式为平均值 \pm 标准误差(Mean \pm S. E. M)。

2 结果

2.1 对虾生长性能

如表 3 所示,HJ 和 CS 组对虾的末体质量分别为 11.79 和 11.38 g,显著高于 FQ、RM 和 Con 组($P < 0.05$),且 FQ、FJ 和 RM 组与 Con 组差异不显著($P > 0.05$),HJ 和 CS 组组间差异不显著($P > 0.05$);HJ 和

CS组对虾的特定生长率显著高于FQ、RM和Con组($P < 0.05$),且HJ和CS组组间无显著差异($P > 0.05$),FJ组的特定生长率为 $5.25\% \cdot d^{-1}$ 与其他各组差异不显著($P > 0.05$);对虾成活率在84%~96%之间,CS和Con组成活率最高且无显著差异($P > 0.05$);

HJ和CS组对虾的饲料效率分别为84.14%和85.00%,显著高于FQ、RM和Con组($P < 0.05$),且HJ、CS和FJ组之间以及FQ、FJ、RM和Con组之间差异不显著($P > 0.05$)。

表3 不同添加形式对凡纳对虾生长性能的影响

Table 3 Effects of different addition forms on the growth performance of *P. vannamei*

处理 Treatment	初体质量 Initial weight/g	末体质量 Final weight/g	特定生长率 Specific growth rate/(% · d ⁻¹)	成活率 Survival rate/%	饲料效率 Feed efficiency/%
HJ	1.23 ± 0.02	11.79 ± 0.19 ^b	5.37 ± 0.06 ^b	84.00 ± 5.80 ^a	84.14 ± 1.17 ^b
CS	1.23 ± 0.01	11.38 ± 0.22 ^b	5.29 ± 0.06 ^b	92.00 ± 3.90 ^{bc}	85.00 ± 2.03 ^b
FQ	1.22 ± 0.01	10.77 ± 0.43 ^a	5.18 ± 0.09 ^a	89.33 ± 4.00 ^{ab}	78.30 ± 1.60 ^a
FJ	1.23 ± 0.01	11.14 ± 0.15 ^{ab}	5.25 ± 0.06 ^{ab}	84.00 ± 4.00 ^a	80.44 ± 2.84 ^{ab}
RM	1.24 ± 0.01	10.51 ± 0.39 ^a	5.09 ± 0.09 ^a	84.00 ± 2.70 ^a	74.92 ± 2.45 ^a
Con	1.21 ± 0.01	10.59 ± 0.11 ^a	5.15 ± 0.03 ^a	96.00 ± 1.60 ^c	75.76 ± 1.09 ^a

注:组间不同字母代表差异显著($P < 0.05$)。HJ:尿肠球菌活菌体组;CS:尿肠球菌超声波破碎菌体;FQ:尿肠球菌发酵上清液;FJ:尿肠球菌发酵液;RM:尿肠球菌热灭活菌体;Con:对照组。Data with different letters indicate significant difference with each other ($P < 0.05$). HJ: The live cells of *E. faecium*; CS: Sonication-killed cell-free extracts of *E. faecium*; FQ: Fermentation supernatant of *E. faecium*; FJ: Fermentation liquid of *E. faecium*; RM: Heat-killed whole-cell of *E. faecium*; Con: The control.

2.2 对虾血清非特异性免疫指标

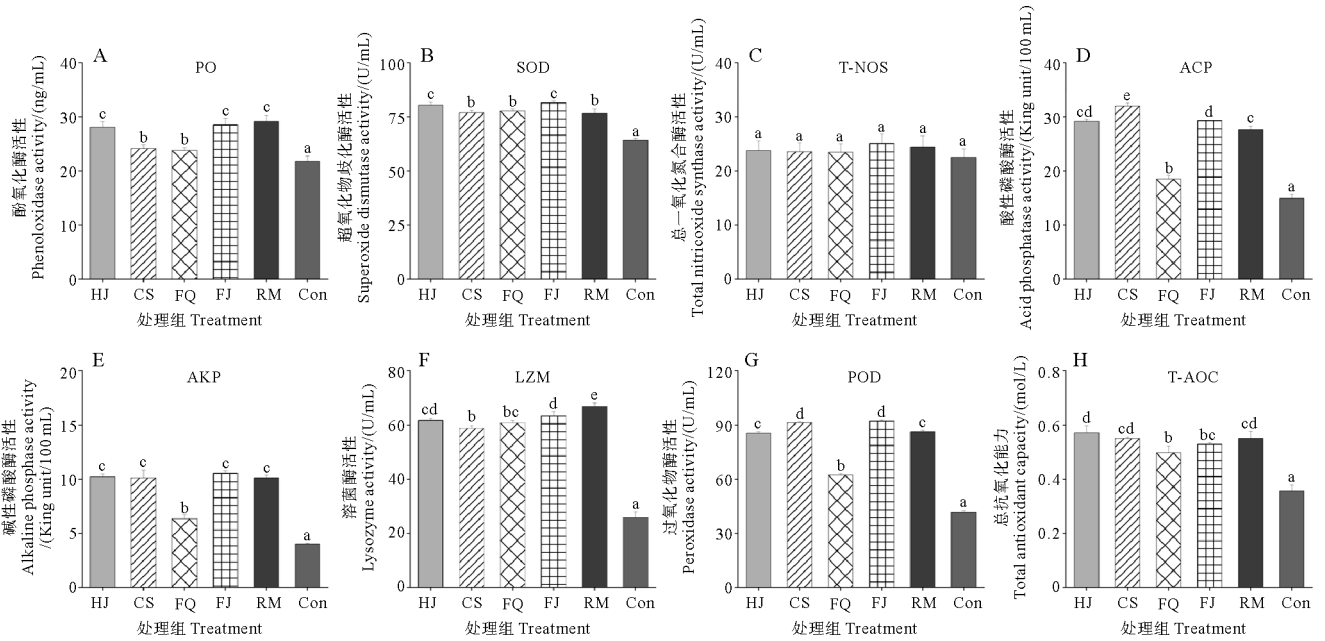
如图1A所示,HJ、FJ和RM组的PO活性明显高于FQ、CS和Con三组($P < 0.05$),其中RM组活性最高,为29.10 ng/mL,Con组活性最低,为21.76 ng/mL,且前三组组间无显著差异($P > 0.05$)。如图1B所示,HJ和FJ组为SOD活性最高的两组,分别是80.46和81.45 U/mL,其次为CS、FQ和RM组,其SOD活性均显著高于Con组的64.18 U/mL($P < 0.05$)。各组T-NOS活性如图1C所示,各组间无显著差异($P > 0.05$)。如图1D所示,CS、FJ、RM、HJ和FQ组的ACP活性依次高于Con组($P < 0.05$),其中活性最高的为CS组(31.98 King unit/100 mL),最低的是Con组(14.93 King unit/100 mL),FJ、RM及HJ组组间无显著差异($P > 0.05$)。AKP活性如图1E所示,其中CS、FJ、RM和HJ组组间无差异($P > 0.05$),但这4个处理组的AKP活性均显著高于Con组($P < 0.05$)。如图1F所示,各处理组的LZM活性均高于Con组的25.84 U/mL($P < 0.05$),其中RM组的LZM活性最高,为66.92 U/mL。如图1G所示,CS组和FJ组对虾的POD活性显著高于RM和HJ组($P < 0.05$),且这4组的POD活性显著高于FQ组($P < 0.05$),其中FJ组的POD活性最高,为92.22 U/mL,Con组的活性最低,为47.14 U/mL。如图1H所示,各处理组对虾的T-AOC情况与LZM活性

相类似,均显著高于Con组($P < 0.05$),活性最高的是HJ组(0.57 mmol/L),活性最低的是Con组(0.36 mmol/L)。

2.3 对虾肝胰腺免疫相关基因表达水平

如图2所示,CS、FJ、RM和HJ组对虾HSP70基因相对表达量相比于Con组显著提高($P < 0.05$),各处理组组间差异不显著($P > 0.05$)。LGBP基因各组间相对表达量的差异与HSP70基因相类似,与Con组相比,各处理组均显著提高($P < 0.05$),且CS、FJ、RM和HJ组组间无显著差异($P > 0.05$)。各处理组LZM基因的相对表达量相较于Con组同样有显著提高($P < 0.05$)。CS组的proPO基因表达量显著高于其他处理组($P < 0.05$),表达量最高,FJ、RM和HJ组组间无显著差异($P > 0.05$)。CS、FJ、RM和HJ组对虾SOD基因相对表达量显著高于Con组($P < 0.05$),CS和RM组、FJ和HJ组组间差异不显著($P > 0.05$)。

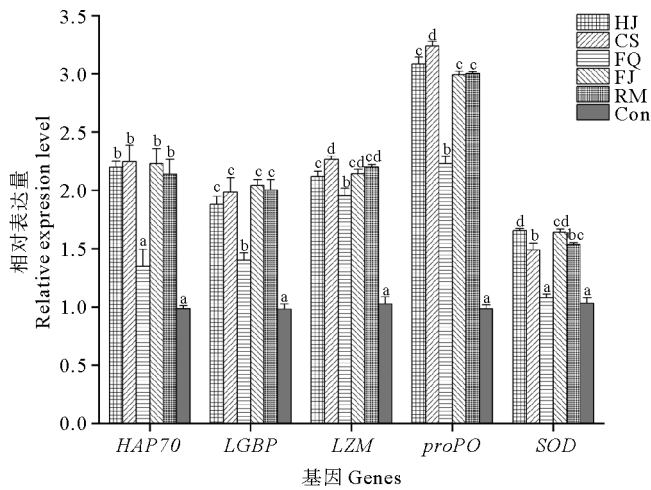
如图3所示,CS、FQ、FJ和HJ组Imd基因相对表达量显著高于Con组($P < 0.05$),CS组和HJ组组间差异不显著,FQ组和FJ组组间差异不显著($P > 0.05$)。CS组Toll基因相对表达量最高,显著高于Con组($P < 0.05$),FQ组和RM组组间差异不显著,FJ组和HJ组组间差异不显著($P > 0.05$)。各处理组Relish基因的相对表达量显著高于Con组($P < 0.05$)。



(HJ: 屎肠球菌活菌体; CS: 屎肠球菌超声波破碎菌体; FQ: 屎肠球菌发酵上清液; FJ: 屎肠球菌发酵液; RM: 屎肠球菌热灭活菌体; Con: 对照组。下同。图中不同的字母表示组间差异显著($P < 0.05$), 图中相同字母表示组间差异不显著($P > 0.05$)。HJ: The live cells of *E. faecium*; CS: Sonication-killed cell-free extracts of *E. faecium*; FQ: Fermentation supernatant of *E. faecium*; FJ: Fermentation liquid of *E. faecium*; RM: Heat-killed whole-cell of *E. faecium*; Con: The control. The same as below. Data with different letters indicate significant difference with each other ($P < 0.05$), data with same letters indicate no significant difference with each other ($P > 0.05$).)

图 1 添加不同形式的屎肠球菌对凡纳对虾血清相关免疫酶活的影响

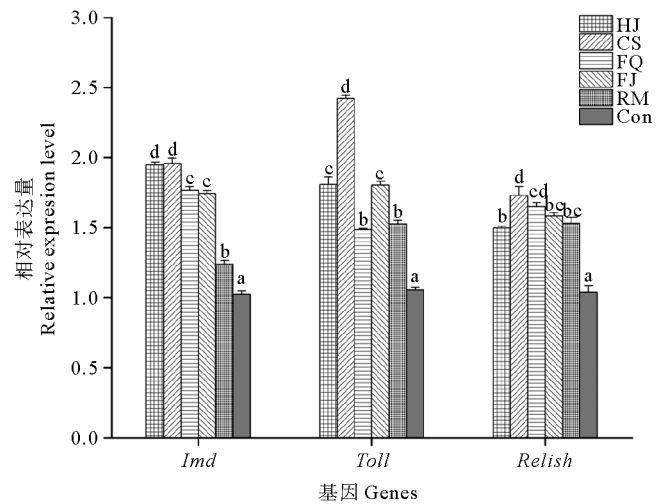
Fig. 1 Effects of *E. faecium* in different forms on serum-related immunoenzyme activity in *P. vannamei*



(图中不同的字母表示组间差异显著($P < 0.05$), 图中相同字母表示组间差异不显著($P > 0.05$)。Data with different letters indicate significant difference with each other ($P < 0.05$), data with same letters indicate no significant difference with each other ($P > 0.05$).)

图 2 不同屎肠球菌添加形式下凡纳对虾肝胰腺中 HSP70、LGBP、LZM、proPO、SOD 基因相对表达量的变化

Fig. 2 Changes in the relative expression levels of HSP70, LGBP, LZM, proPO and SOD genes in hepatopancreas of *P. vannamei* under different forms of *E. faecium*



(图中不同的字母表示组间差异显著($P < 0.05$), 图中相同字母表示组间差异不显著($P > 0.05$)。Data with different letters indicate significant difference with each other ($P < 0.05$), data with same letters indicate no significant difference with each other ($P > 0.05$).)

图 3 不同屎肠球菌添加形式下凡纳对虾肝胰腺中 Imd、Toll 和 Relish 基因相对表达量的变化

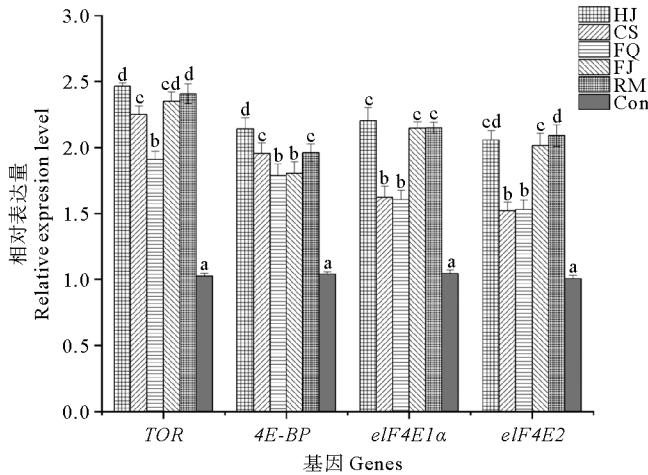
Fig. 3 Changes in the relative expression levels of Imd, Toll and Relish genes in hepatopancreas of *P. vannamei* under different forms of *E. faecium*

2.4 mTOR 信号通路相关基因的表达水平

如图 4 所示, CS、FQ、FJ、RM 和 HJ 组的 TOR 基因、4E-BP 基因、elF4E1 α 基因以及 elF4E2 基因的相

对表达量均显著高于 Con 组 ($P < 0.05$)。其中, HJ、FJ 和 RM 组的 TOR 基因表达量最高, 且这 3 组间无显著差异。HJ 组 4E-BP 基因的相对表达量最高, 其次为

CS和RM组。就 *elF4E1a* 基因而言, HJ、FJ和RM这3组的相对表达量最高且组间差异不显著, 其次为CS和FQ处理组, 其表达量显著低于前三组, 高于Con组 ($P < 0.05$)。RM、FJ和HJ组 *elF4E2* 基因的相对表达量显著高于其他处理组, CS和FQ两组间无显著差异 ($P > 0.05$)。



(图中不同的字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$), 图中相同字母表示组间差异不显著 ($P > 0.05$)。Data with different letters indicate significant difference with each other ($P < 0.05$), data with same letters indicate no significant difference with each other ($P > 0.05$)).

图4 不同屎肠球菌添加形式下凡纳对虾肝胰腺中mTOR信号通路相关基因相对表达量的变化

Fig. 4 Changes in the relative expression levels of mTOR signaling pathway related genes in hepatopancreas of *P. vannamei* under different forms of *E. faecium*

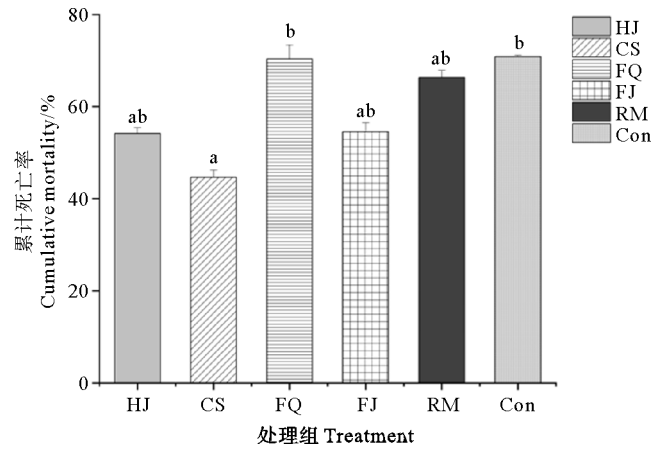
2.5 对虾抗病力

由图5可知, 就攻毒实验的累计死亡率而言, CS组凡纳对虾的死亡率最低, 显著低于FQ和Con组 ($P < 0.05$), 但CS组与HJ、FJ和RM这3组组间无显著差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论

3.1 屎肠球菌不同添加形式对对虾生长的影响

近年来, 益生菌作为抗生素的重要替代品之一受到广泛关注。大量研究证实, 益生菌具有提高水产动物消化能力、增强水产动物免疫功能以及改善养殖水体水质等多种功能^[20]。而自2013年“后生元”概念^[21]首次提出后, 很多研究先后发现含有灭活微生物细胞或细胞成分的后生制剂, 无论是否含有代谢物, 都可增强宿主的机体健康^[10]。目前已证实后生元同样具有多种生物学功能, 其中包括抗炎^[22]、抗氧化以及调节肠道菌群等作用^[8]。屎肠球菌作为乳酸菌的一种, 具有良好的耐药性、耐热性、耐酸性及抑菌性^[23], 在实际生产中得到了广泛应用。然而, 在水产养殖中, 关于屎肠球



(图中不同的字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$), 图中相同字母表示组间差异不显著 ($P > 0.05$)。Data with different letters indicate significant difference with each other ($P < 0.05$), data with same letters indicate no significant difference with each other ($P > 0.05$)).

图5 屎肠球菌不同添加形式对凡纳对虾抗病力的影响

Fig. 5 Effects of *E. faecium* in different forms on disease resistance in *P. vannamei*

菌不同添加方式的比较研究相对较少。本研究比较了屎肠球菌LYB的5种不同添加形式(即活菌体、超声波破碎菌体、热灭活完整菌体、活菌发酵液和发酵上清液)对凡纳对虾生长、免疫及抗病力的不同影响。结果显示, 活菌体超声波破碎菌体均可显著提高凡纳对虾的生长性能和饲料效率, 超声波破碎菌体还增强了对虾对副溶血弧菌的抵抗力。这一结果与Luo等^[24]、Li等^[11]以及Zheng等^[25]的研究结果基本一致。不过, 本研究表明热灭活菌体和发酵上清液对对虾的生长性能无显著影响, 与Li等^[11]研究结果相似, 但这与Hamer等^[26]、Liu等^[27]的研究结果有所不同。值得注意的是, Motomichi等^[28]发现丁酸可引起肠道生态系统中两种细菌之间的拮抗作用, 体外抑菌效果则取决于丁酸和乳酸的剂量。与此类似, 推测发酵上清液中代谢物的剂量或成分差异可能是导致其对对虾的生长性能影响差异的主要因素。

3.2 屎肠球菌不同添加形式对对虾非特异性免疫酶活以及免疫相关基因表达水平的影响

免疫系统是维持水生动物健康的重要生理机制之一^[29], 甲壳类动物如凡纳对虾不具有适应性免疫系统, 只能依靠先天免疫系统抵御外界病原体的入侵, 细胞免疫和体液免疫组成了对虾的非特异性免疫系统^[30]。细胞免疫是由血细胞及其释放到血浆中的因子产生的, 能够发挥多种防御功能, 其中包括识别作用、吞噬作用、包裹作用等, 是对虾抵御病原体入侵的主要屏障^[31]。体液免疫是由具有免疫作用的酶和因子组成的^[30], 可将体液中具有免疫作用的酶根据作用机制分为氧化活性酶和非氧化活性酶两类^[32], 液体内具有免

疫作用的因子包括抗菌肽、凝集素、溶血素等^[33]。对虾的细胞免疫和体液免疫没有严格的界限^[1], 两者相辅相成, 共同抵御病原体的侵袭。

血液参数是重要的生理和病理学指标^[31]。研究表明, 虾类血清中这几种氧化活性酶(T-AOC、SOD 和 POD) 和非氧化活性酶 (AKP、ACP、PO、LZM 和 T-NOS) 的含量是反映非特异性免疫的重要参数^[33-34]。其中, T-AOC 代表生物体在清除外界刺激和自由基方面的完全抗氧化能力^[1], SOD 和 POD 可清除多余自由基, 减轻机体所受伤害。本研究中, 添加屎肠球菌的各处理组对虾血清 T-AOC、SOD 和 POD 的含量均显著高于对照组, 此外, 除 FQ 组外, 其他处理组的 HSP70 和 SOD 的基因表达量也显著上调 ($P < 0.05$), 此结果与汪仕爽等^[28]、Li 等^[11]的研究结果一致, 即适当浓度的屎肠球菌可诱导相关免疫基因的表达, 可有效提高水生动物的抗氧化能力。与此类似, Zheng 等^[35]也发现酵母及酵母无细胞提取物也可有效提高对虾的抗氧化能力。非氧化活性酶 ACP、AKP、PO、LZM 和 T-NOS 也是对虾免疫能力的重要参数。本研究中, 屎肠球菌各处理组对虾血清 AKP、ACP、PO 和 LZM 的活性均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 其中添加不同形式菌体的各处理组的免疫能力均显著高于添加发酵上清液组。而从免疫相关基因看, 各处理组肝胰腺 LZM、LGBP 和 proPO 基因表达量与对照组相比显著上调 ($P < 0.05$), 其中添加超声波灭活菌体组基因表达量最高, 添加活菌和热灭活菌体组次之。这一结果与 Dash 等^[3]、Zheng 等^[35]、汪仕爽等^[19]的研究结果类似, 即植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)、丁酸梭菌 (*Clostridium butyricum*) 以及屎肠球菌的活菌体、热灭活菌体和超声波破碎菌体均可显著提高凡纳对虾的免疫参数。类似结果在刘昂等的研究结果中也有发现, 在饲料中添加适量非灭活与热灭活的益生菌均可改善凡纳对虾的非特异性免疫酶与抗氧化酶活性^[29]。值得注意的是, 添加发酵上清液组的对虾免疫相关酶活性以及基因表达量相较于其他处理组均偏低, 推测原因可能与发酵上清液中不包含屎肠球菌菌体及细胞内成份有关。屎肠球菌 LYB 活菌以及含有屎肠球菌的灭活细胞或细胞的后生元成分均可以激活凡纳对虾的先天免疫, 从而提高其免疫和抗氧化能力。

在对病原体的防御反应中, 抗菌肽类物质可作为体液免疫的效应物, 其产生受到 Toll 和 Imd 信号通路的调节^[36]。NF- κ B 家族是存在于无脊椎动物中重要的核转录因子, 与对虾的生长和免疫密切相关, Relish 作为 NF- κ B 家族的一部分, 是抗菌肽类物质产生的调节因子之一^[37]。此外, mTOR 信号转导通路在细胞生长和营养调节中具有关键作用^[38]。帽结合蛋白 eIF4E

(eIF4E1、eIF4E2、eIF4E3) 在 mTORC1 信号通路中发挥重要作用, 其活性受 4E-BP 的调控^[39]。本研究结果证实了在凡纳对虾饲料中添加不同形式的屎肠球菌可显著提高对虾肝胰腺中 Toll、Imd 和 Relish 基因的相对表达量, 且各处理组的 4E-BP、eIF4E1 α 、eIF4E2 以及 TOR 基因的相对表达量也显著提高。这些结果与 Li 等的研究结果基本一致, 即添加活菌、无细胞提取物和上清液均可以诱导 mTOR 信号通路中的基因相对表达水平。沙玉杰等^[40]也发现饲料中添加屎肠球菌 NRW-2 可诱导凡纳对虾免疫相关基因的表达。综上所述, 饲料中添加屎肠球菌 LYB 活菌、热灭活菌体、超声波破碎菌体、活菌发酵液和发酵上清液都可有效增强凡纳对虾的免疫应答。

3.3 屎肠球菌不同添加形式对对虾抗病力的影响

研究表明, 饲料中添加多种潜在的益生菌可通过刺激免疫系统增强对虾的抗病力。副溶血弧菌是引起对虾疾病的主要致病菌之一^[41], 如何提高对虾对其的抗病力, 一直是相关领域的研究热点。近年来, 大量研究表明水产动物的生长、免疫和抗病力因饲料中添加益生菌方式的不同而有所差异, 其中灭活菌体或细菌代谢物或成分等后生元制剂受到越来越多的关注。例如, 李桂英等^[42]在饲料中添加热灭活的芽孢杆菌 (*Bacillus firmus*), 显著提高了凡纳对虾的非特异性免疫水平和抗病能力; Wang 等^[28]在饲料中添加热灭活和超声波破碎的海洋红酵母菌 (*Rhodotorula mucilaginosa* JM-01) 可显著提高对虾的抗病力。而丁酸梭菌 (*Clostridium butyricum* CBG01) 的热灭活菌体和超声波破碎菌体可提高凡纳对虾的免疫能力, 但未发现饲料中添加丁酸梭菌热灭活菌体有增强凡纳对虾对副溶血弧菌抵抗力的作用^[24]。在本研究中, 超声波破碎菌体显著提高了凡纳对虾对副溶血弧菌的抵抗力 ($P < 0.05$), 而其他处理形式的对虾抗病力与对照组相比则未见显著差异 ($P > 0.05$)。屎肠球菌的细胞壁成分如肽聚糖和蛋白质可在热失活过程中保持完整^[43], 而其超声波破碎菌体则可能含有更多的营养成分, 如单细胞蛋白、脂质胆酸^[44]和表层蛋白^[45]等, 推测本实验中超声波破碎菌体含有更多细胞内和细胞壁成分, 这可能是两种灭活方式下凡纳对虾抗病力表现出差异的原因。不过, 这种差异的内在作用机制尚待进一步深入研究确定。

3.4 屎肠球菌 LYB 作为后生元的潜力

越来越多的证据表明, 当引入灭活的细菌细胞、细胞结构成分、片段或细菌分泌物时, 可能会对宿主健康产生同样有益作用^[46]。这些非活菌添加剂不仅表现出对肠道的调节作用, 而且还能促进对虾的生长, 提高免疫功能和存活率等^[47]。这些对宿主健康有益的无生命

微生物和/或菌体成分可统称为“后生元”，其作用可能主要源自细胞的复杂分子或代谢物所产生的免疫调节作用。例如，革兰氏阳性菌的肽聚糖，是细胞壁成分中具有免疫刺激特性的显著例子之一^[48]，尽管细菌失活，这些成分的生物活性仍可能发挥益生作用。迄今为止，尽管屎肠球菌目前已广泛应用于人体保健、畜禽及水产养殖业中，然而其活菌应用的安全性还存在一定的争议。同时，相比于活菌，后生元更易储存、运输、处理以及具有更高的安全性^[49]。因此，后生元可能更实用且适用于商业化。目前较多研究报道已证明后生元具有与益生菌相似甚至更优的性能，如植物乳杆菌 L-137 的热灭活菌体和超声波破碎菌体可以提高对虾的生长性能和抗应激能力^[50]，灭活的索氏鲸杆菌(*Cetobacterium somerae*)和小红酵母(*Rhodotorula minuta*)则使作为优势菌群的厚壁菌门相对丰度增加了42%，从而改善了杂交鲟鱼(*Acipenser baerii* × *Acipenser schrenckii*)的肠道菌群结构^[51]。饲料中添加乳酸菌发酵产物使感染格式乳球菌(*Lactococcus garvieae*)的虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)存活率提高了43%^[52]。而饲料中添加丁酸梭菌 CBG01 的超声波破碎菌体可提高凡纳对虾的生长性能、成活率和免疫应答水平^[24]。在本研究中，在凡纳对虾的饲料中添加屎肠球菌活菌体和超声波破碎菌体可显著提高其生长性能及饲料转化效率。饲料中添加屎肠球菌活菌、灭活菌体及发酵上清液均可提高凡纳对虾免疫相关酶的活性、增加免疫相关基因的表达量。但当考虑到对虾对副溶血弧菌的抵抗力时，仅屎肠球菌的超声波破碎菌体提高了凡纳对虾的抗病力。综上可见，超声波破碎的屎肠球菌 LYB 可作为一种潜在的后生元制剂，有效提高凡纳对虾的生长性能、免疫以及抗病能力。

4 结语

在凡纳对虾饲料中添加屎肠球菌 LYB 活菌体和灭活菌体均可显著提高其生长性能和免疫能力，而超声波破碎菌体对于凡纳对虾对副溶血弧菌的抵抗力表现出积极作用。鉴于后生元与活菌相比在储存、运输、处理以及安全性方面的优点，屎肠球菌 LYB 超声波破碎菌体可作为凡纳对虾潜在的后生元，其可有效提高凡纳对虾的生长性能、免疫水平和对副溶血弧菌的抵抗力。

参考文献:

- [1] Hu F, Wang S, Hu J, et al. Comprehensive evaluation of dietary tandem CpG oligodeoxynucleotides on enhancement of antioxidant capacity, immunological parameters, and intestinal microbiota in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. *Aquaculture*, 2024, 579: 740250.
- [2] 农业农村部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2022.
Fisheries and Fishery Administration Bureau, Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. *China Fishery Statistical Yearbook* [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2022.
- [3] Dash G, Raman R P, Pani Prasad K, et al. Evaluation of *Lactobacillus plantarum* as feed supplement on host associated microflora, growth, feed efficiency, carcass biochemical composition and immune response of giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Aquaculture*, 2014, 432: 225-236.
- [4] 肖倩. 水产养殖中抗生素滥用问题研究[J]. *养殖与饲料*, 2020, 19(10): 46-48.
Xiao Q. Research on the misuse of antibiotics in aquaculture [J]. *Animals Breeding and Feed*, 2020, 19(10): 46-48.
- [5] Dawood M, Koshio S, Ishikawa M, et al. Dietary supplementation of β -glucan improves growth performance, the innate immune response and stress resistance of red sea bream, *Pagrus major* [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2017, 23(1): 148-159.
- [6] Ringo E, Hoseinifar S H, Ghosh K, et al. Lactic acid bacteria in finfish—an update [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1818.
- [7] Salminen S, Collado M C, Endo A, et al. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics [J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2021, 18(9): 649-667.
- [8] 中国食品科学技术学会益生菌分会. 后生元的研究现状及产业应用 [J]. *中国食品学报*, 2022, 22(8): 416-426.
Probiotics Society of the Chinese Institute of Food Science and Technology. Research of Postbiotics and Industrial Application [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2022, 22(8): 416-426.
- [9] Choudhury T G, Kamilya D. Paraprobiotics: An aquaculture perspective [J]. *Reviews in Aquaculture*, 2019, 11(4): 1258-1270.
- [10] 王岩, 杨彩梅, 胡爱心, 等. 后生元的益生机制及其在动物生产中的应用前景 [J]. *中国畜牧杂志*, 2022, 58(6): 73-78.
Wang Y, Yang C M, Hu A X, et al. Mechanism of postbiotics-exerted benefits and its application prospect in animal production [J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2022, 58(6): 73-78.
- [11] Li H, Tian X, Zhao K, et al. Effect of *Clostridium butyricum* in different forms on growth performance, disease resistance, expression of genes involved in immune responses and mTOR signaling pathway of *Litopenaeus vannamei* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 87: 13-21.
- [12] 刘承毅, 吕仲伦, 何协助, 等. 乳酸菌代谢产物可抑制水产病原菌的生长并且提高虱目鱼和白虾的换肉率 [C]. 苏州: 中国食品科学技术学会, 2021: 2.
Liu C R, Lu Z L, He X X, et al. Lactic Acid Bacteria Metabolites Inhibits Growth of Aquatic Pathogens and Improves Feed Conversion While Utilizing as Food Additive in Fish Milkfish and White Shrimps [C]. Suzhou: Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021: 2.
- [13] Xu Q, Yang Z, Chen S, et al. Effects of replacing dietary fish meal by soybean meal co-fermented using *Bacillus subtilis* and *Enterococcus faecium* on serum antioxidant indices and gut microbiota of crucian carp *Carassius auratus* [J]. *Fishes*, 2023, 8(12):

- 601.
- [14] 雷喜玲, 叶金云, 陈丽仙, 等. 尿肠球菌的作用机制及其在水产动物中的应用[J]. 饲料工业, 2022, 43(22): 9-15.
Lei X L, Yie J Y, Chen L X, et al. The mechanisms and its application of *Enterococcus faecium* in aquatic animals[J]. Feed Industry Magazine, 2022, 43(22): 9-15.
- [15] Chen D, Liang X, Lei J, et al. *Enterococcus faecium* inhibits NF- κ B/NLRP3/IL-1 β signaling pathway and antagonizes Salmonella-mediated inflammatory response[J]. Future Microbiology, 2023; 19(2): 131-140.
- [16] 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[J]. 海洋与湖沼, 2012, 43(4): 845-851.
Sun Y, Liu F, Song X L, et al. Effects of adding probiotics in the feed on non-specific immune gene expression and disease of *Litopenaeus vannamei* [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2012, 43(4): 845-851.
- [17] 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[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2014, 44(1): 46-51.
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.
- [18] Duan Y, Zhang Y, Dong H, et al. Effects of dietary poly- β -hydroxybutyrate (PHB) on microbiota composition and the mTOR signaling pathway in the intestines of *Litopenaeus vannamei* [J]. Journal of Microbiology, 2017, 55(12): 946-954.
- [19] 汪仕爽, 罗凯, 王明阳, 等. 尿肠球菌对凡纳滨对虾生长、非特异免疫及抗病力的影响[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2023, 53(1): 42-52.
Wang S S, Luo K, Wang M Y, et al. Effect of *Enterococcus faecium* on growth performance, non-specific immunity and disease resistance of *Litopenaeus vannamei* [J]. Periodical of Ocean University of China, 2023, 53(1): 42-52.
- [20] Zorriehzaha M J, Delshad S T, Adel M, et al. Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: An update on their multiple modes of action: A review[J]. The Veterinary Quarterly, 2016, 36(4): 228-241.
- [21] Tsilingiri K, Rescigno M. Postbiotics: What else? [J]. Beneficial Microbes, Wageningen Academic Publishers, 2013, 4(1): 101-107.
- [22] Dicks L M T, Dreyer L, Smith C, et al. A review: The fate of bacteriocins in the human gastro-intestinal tract: Do they cross the gut-blood barrier? [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2297.
- [23] Tilwani Y M, Sivagnanavelmurugan M, Lakra A K, al. Enhancement of growth, innate immunity, and disease resistance by probiotic *Enterococcus faecium* MC-5 against *Aeromonas hydrophila* in Indian major carp *Cirrhinus mrigala* [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2022, 253: 110503.
- [24] Luo K, Tian X, Wang B, et al. Evaluation of paraprobiotic applicability of *Clostridium butyricum* CBG01 in improving the growth performance, immune responses and disease resistance in Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei* [J]. Aquaculture, 2021, 544: 737041.
- [25] Zheng X, Duan Y, Dong H, et al. Effects of dietary *Lactobacillus plantarum* on growth performance, digestive enzymes and gut morphology of *Litopenaeus vannamei* [J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2018, 10(3): 504-510.
- [26] Hamer H M, Jonkers D M A E, Bast A, et al. Butyrate modulates oxidative stress in the colonic mucosa of healthy humans [J]. Clinical Nutrition, 2009, 28(1): 88-93.
- [27] 刘婷婷, 张帅, 邓斐月, 等. 谷氨酰胺与丁酸梭菌对断奶仔猪生长性能、免疫功能、小肠形态和肠道菌群的影响[J]. 动物营养学报, 2011, 23(6): 998-1005.
Liu T T, Zhang S, Deng F Y, et al. Effects of glutamine and *Clostridium butyricum* on growth performance, immune function, small intestinal morphology and microflora in weanling piglets [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2011, 23(6): 998-1005.
- [28] Wang B, Liu Y, Luo K, et al. 'Biotic' potential of the red yeast *Rhodotorula mucilaginosa* strain JM-01 on the growth, shell pigmentation, and immune defense attributes of the shrimp, *Penaeus vannamei* [J]. Aquaculture, 2023, 572: 739543.
- [29] 刘昂, 查广才, 张振霞, 等. 对虾免疫系统及调控机制的研究进展[J]. 韩山师范学院学报, 2013, 34(3): 60-66.
Liu A, Cha G C, Zhang Z X, et al. Research progress of immunity systems and regulatory mechanisms of penaeid shrimps [J]. Journal of Hanshan Normal University, 2013, 34(3): 60-66.
- [30] Chen J, Wang H, Yuan H, et al. Tapping *Chlorella vulgaris* potential for enhanced growth, immunity, digestion, microbiota, and immunometabolism in *Litopenaeus vannamei* feeding across varied salinities [J]. Aquaculture, 2024, 581: 740469.
- [31] Lu M, Liu R, Chen Z, et al. Corrigendum to "Effects of dietary dihydromyricetin on growth performance, antioxidant capacity, immune response and intestinal microbiota of shrimp (*Litopenaeus vannamei*)" [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2024, 144: 109238.
- [32] 常金涛, 李春岭, 刘金珂, 等. 凝结芽孢杆菌 BC320 对南美白对虾生长和血液免疫指标的影响[J]. 河北渔业, 2023(11): 1-4, 27, 47.
Chang J T, Li C L, Liu J K, et al. Influence of *Bacillus coagulans* BC320 on the growth and hematology immune of *Penaeus vannamei* [J]. Hebei Fisheries, 2023(11): 1-4, 27, 47.
- [33] Long L, Liu H, Lu S. Effects of low salinity on growth, digestive enzyme activity, antioxidant and immune status, and the microbial community of *Litopenaeus vannamei* in biofloc technology aquaculture systems [J]. Journal of Marine Science and Engineering, 2023, 11(11): 2076.
- [34] Shen W, Fu L, Li W, et al. Effect of dietary supplementation with *Bacillus subtilis* on the growth, performance, immune response and antioxidant activities of the shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. Aquaculture Research, 2010, 41(11): 1691-698.
- [35] Zheng L, Xie S, Zhuang Z, et al. Effects of yeast and yeast extract on growth performance, antioxidant ability and intestinal microbiota of juvenile Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. Aquaculture, 2021, 530: 735941.
- [36] Amparyup P, Kondo H, Hirono I, et al. Molecular cloning, genomic organization and recombinant expression of a crustin-like

- antimicrobial peptide from black tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. *Molecular Immunology*, 2008, 45(4): 1085-1093.
- [37] Karin M. NF- κ B and cancer: Mechanisms and targets[J]. *Molecular Carcinogenesis*, 2006, 45(6): 355-361.
- [38] Jewell J L, Guan K. Nutrient signaling to mTOR and cell growth [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2013, 38(5): 233-242.
- [39] Laplante M, Sabatini D M. mTOR signaling in growth control and disease[J]. *Cell*, 2012, 149(2): 274-293.
- [40] 沙玉杰, 王雷, 孙国琼, 等. 饲料中添加两株乳酸菌及其发酵上清液对凡纳滨对虾消化酶活性的影响[J]. *海洋科学*, 2016, 40(3): 59-64.
- Sha Y J, Wang L, Sun G Q, et al. Effects of two lactic acid bacteria species and the corresponding supernatants on the activities of digestive enzymes in *Litopenaeus vannamei* [J]. *Marine Sciences*, 2016, 40(3): 59-64.
- [41] Liu S, Wang W, Jia T, et al. *Vibrio parahaemolyticus* becomes lethal to post-larvae shrimp via acquiring novel virulence factors [J]. *Microbiology Spectrum*, American Society for Microbiology, 2023, 11(6): 00492-23.
- [42] 李桂英, 宋晓玲, 孙艳, 等. 几株肠道益生菌对凡纳滨对虾非特异免疫力和抗病力的影响[J]. *中国水产科学*, 2011, 18(6): 1358-1367.
- Li G Y, Song X L, Sun Y, et al. Effects of probiotics from the shrimp intestine on the non-specific immunity and antiviral capacity of *Litopenaeus vannamei* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(6): 1358-1367.
- [43] Bergonzelli G E, Granato D, Pridmore R D, et al. GroEL of *Lactobacillus johnsonii* La1 (NCC 533) is cell surface associated: Potential role in interactions with the host and the gastric pathogen *Helicobacter pylori* [J]. *Infection and Immunity*, American Society for Microbiology, 2006, 74(1): 425-434.
- [44] Kim H, Bi Y, Pal S, et al. IsoformEx: Isoform level gene expression estimation using weighted non-negative least squares from mRNA-Seq data[J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12(1): 305.
- [45] Chapot Chartier M P, Vinogradov E, Sadovskaya I, et al. Cell surface of *Lactococcus lactis* is covered by a protective polysaccharide pellicle[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(14): 10464-10471.
- [46] Pérez-Sánchez T, Mora-Sánchez B, Vargas A, et al. Changes in intestinal microbiota and disease resistance following dietary postbiotic supplementation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 142: 104060.
- [47] Goh J X H, Tan L T, Law J W, et al. Harnessing the potentialities of probiotics, prebiotics, synbiotics, paraprobiotics, and postbiotics for shrimp farming [J]. *Reviews in Aquaculture*, 2022, 14(3): 1478-1557.
- [48] Meng D, Hao Q, Zhang Q, et al. A compound of paraprobiotic and postbiotic derived from autochthonous microorganisms improved growth performance, epidermal mucus, liver and gut health and gut microbiota of common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Aquaculture*, 2023, 570: 739378.
- [49] Pérez-Sánchez T, Mora-Sánchez B, Jirón W, et al. Effect of a postbiotic on the histopathological features and expression levels of immune-related genes in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Aquaculture Research*, 2021, 52(11): 5882-5885.
- [50] Sagada G, Wang L, Xu B, et al. Interactive effect of dietary heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 and berberine supplementation on intestinal mucosa and microbiota of juvenile black sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*) [J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2023, 239: 104-112.
- [51] Wu X, Teame T, Hao Q, et al. Use of a paraprobiotic and postbiotic feed supplement (HWFTM) improves the growth performance, composition and function of gut microbiota in hybrid sturgeon (*Acipenser baerii* X *Acipenser schrenckii*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 104: 36-45.
- [52] 杭柏林, 王倩, 陈成成, 等. 后生元的功能及其在动物养殖中的应用[J]. *广东饲料*, 2022, 31(12): 35-37.
- Hang B L, Wang Q, Chen C C, et al. The function of postbiotics and their application in animal farming [J]. *Guangdong Feed*, 2022, 31(12): 35-37.

Effects of *Enterococcus faecium* in Different Forms on the Growth Performance, Non-Specific Immunity and Disease Resistance of *Penaeus vannamei*

Tian Xiangli¹, Liu Yunhui¹, Liu Yijun¹, Wang Shishuang¹,
Luo Kai¹, Liu Yang¹, Qin Guangcai¹, Fan Ruiyong²

(1. The Key Laboratory of Mariculture (Ocean University of China), Ministry of Education, Qingdao 266003, China;
2. Qingdao Ruizi Marine Engineering Research Institute Limited Company, Qingdao 266408, China)

Abstract: In this study, we evaluated the growth, immune and disease resistance of *Penaeus vannamei* fed diets supplemented with different forms of *Enterococcus faecium* including live cells (HJ), sonication-killed cell-free extracts (CS), heat-killed whole-cell (RM), fermentation broth (FJ), fermentation supernatant (FQ) and the control (basal diet without *E. faecium*, Con) for 42 days. The results showed that the survival rate each diets ranges from 84.0% to 96.0% while that of con is the highest, and there was no significant difference between Con and CS ($p > 0.05$). The minced shrimp body weight and specific growth rate of HJ and CS were significantly higher than those of FQ, RM and Con ($p < 0.05$), but not between these groups and FJ ($p > 0.05$). Compared with Con, the ACP, AKP, SOD, PO, T-AOC activities and LZM content of FJ, HJ and RM were conspicuously higher ($p < 0.05$). The ACP activity was the highest in CS, the AKP activity of HJ, CS, FJ and RM was significantly higher than that of FQ ($p < 0.05$), and the POD activity of CS and FJ was significantly higher than that of HJ and RM. The transcript abundances *SOD*, *LZM*, *proPO*, *LGBP* and *HSP70* of FJ, CS, HJ and RM were conspicuously higher than those of Con and FQ. The transcript abundances of *Imd*, *Toll* and *Relish* of FJ, CS, FQ, HJ and RM were conspicuously higher than those of Con ($p < 0.05$). The transcript abundance of *Imd* of HJ and CS was significantly higher than that of FQ and FJ ($p < 0.05$). The transcript abundances of *Toll* and *Relish* of CS were the highest ($p > 0.05$). Along the mTOR signaling pathway, the transcript abundances of *TOR* and *4E-BP* of FJ, CS and RM were significantly higher than those of FQ and Con ($p < 0.05$), and those of *elF4E1 α* and *elF4E2* of HJ, FJ and RM were significantly higher than those of CS, FQ and Con ($p < 0.05$). The challenge test of *Vibrio parahaemolyticus* revealed that the cumulative mortality of CS was conspicuously lower than that of Con ($p < 0.05$). In conclusion, the live cells and sonication-killed cell-free extracts of *E. faecium* improved the growth performance and immunity of *P. vannamei*. Sonication-killed cell-free extracts of *E. faecium* can be applied as a potential postbiotics to improve the growth, immune and disease resistance of *P. vannamei*.

Key words: *Enterococcus faecium*; *Penaeus vannamei*; feed; growth; immunity; disease resistance; postbiotics

责任编辑 朱宝象