

# 三种不同芽孢杆菌对凡纳对虾生长、非特异性免疫及抗病力影响的比较研究\*

田相利<sup>1</sup>, 李明静<sup>1</sup>, 郭泽阳<sup>1</sup>, 罗凯<sup>1</sup>, 李长林<sup>1</sup>, 马振华<sup>2</sup>

(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. 三亚热带水产研究院, 海南 三亚 572018)

**摘要:** 为评估饲料中添加3种不同芽孢杆菌属益生菌对凡纳对虾(*Penaeus vannamei*)生长性能、非特异性免疫及抗病力的影响,在基础饲料中分别添加 $1 \times 10^9$  CFU·kg<sup>-1</sup>浓度的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)BSXE-1601(BD组)、贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*)26.3(BV组)和蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*)BCXE-01(CD组)投喂对虾,以基础饲料投喂组为对照组,进行了为期6周的养殖实验。养殖实验结束后,进行14 d的副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)攻毒实验。研究表明,BD组和BV组对虾末体质量、特定生长率和饲料效率显著高于对照组( $P < 0.05$ ),其中BV组最高。3个处理组对虾血清中过氧化物酶、总超氧化物歧化酶、酸性磷酸酶和酚氧化酶活性均显著高于对照组( $P < 0.05$ ),BV组对虾血清中酸性磷酸酶、碱性磷酸酶和总超氧化物歧化酶活性显著高于BD组( $P < 0.05$ )。与对照组相比,BD和BV组对虾肝胰腺中*proPO*、*LZM*、*SOD*、*HSP70*、*Imd*、*Toll*、*TOR*、*4E-BP*和*eIF4E1a*基因相对表达量均显著上调( $P < 0.05$ )。CD组对虾肝胰腺*proPO*、*LGBP*、*Imd*、*Toll*、*4E-BP*和*eIF4E2*基因相对表达量均显著高于对照组( $P < 0.05$ )。BV组对虾肝胰腺*SOD*、*LGBP*、*Toll*和*4E-BP*基因相对表达量显著高于CD和BD组( $P < 0.05$ )。副溶血弧菌攻毒实验结果表明,与对照组相比,3个处理组凡纳对虾累计死亡率均显著降低( $P < 0.05$ )。本研究表明,添加枯草芽孢杆菌BSXE-1601和贝莱斯芽孢杆菌26.3均可显著提高凡纳对虾的生长性能,二者对机体免疫反应的诱导作用优于蜡样芽孢杆菌BCXE-01,3种芽孢杆菌均可显著提高凡纳对虾对副溶血弧菌的抵抗力。

**关键词:** 生长; 非特异性免疫; 抗病力; 副溶血弧菌; 芽孢杆菌; 凡纳对虾

**中图分类号:** S917.1

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1672-5174(2025)03-023-11

**DOI:** 10.16441/j.cnki.hdx.20240028

**引用格式:** 田相利,李明静,郭泽阳,等. 三种不同芽孢杆菌对凡纳对虾生长、非特异性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), 2025, 55(3): 23-33.

Tian Xiangli, Li Mingjing, Guo Zeyang, et al. A comparative study on effects of three *Bacillus* species on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of *Penaeus vannamei*[J]. Periodical of Ocean University of China, 2025, 55(3): 23-33.

凡纳对虾(*Penaeus vannamei*)又称南美白对虾,因生长速度快、易于养殖、抗逆和抗病力强等特点,在世界范围内得到广泛养殖,已成为水产养殖重要的虾类经济种类之一<sup>[1]</sup>。然而,随着对虾养殖业的规模化和集约化程度的提高,疾病频发已成为制约对虾养殖业绿色可持续发展的关键因素,在全球范围内由于疾病爆发造成的损失每年高达30亿美元以上<sup>[2]</sup>。对虾疾病大多由细菌和病毒引起,抗生素作为治疗对虾细菌性疾病的传统治疗手段,其过度使用会导致细菌抗药性的出现,并且在机体内残留,从而危及人体健康<sup>[3]</sup>。目前益生菌已被广泛开发并用于替代抗生素,作为饲料添加剂可控制多种水生动物疾病,还可提高宿主的生长性能、增强水产动物免疫力等,因此在水产

养殖中具有广阔的应用前景<sup>[4-6]</sup>。

芽孢杆菌是水产养殖中最常用的益生菌之一,是一种需氧/兼性厌氧革兰氏阳性菌<sup>[7]</sup>。芽孢杆菌产生的孢子可抵抗各种理化因子胁迫,对肠道环境具有较强的适应性,因而常被用作水产饲料添加剂使用<sup>[8]</sup>。芽孢杆菌可通过以下机制抑制病原菌的生长:产生肽或脂肽类抗生素和多酮类化合物等次级代谢产物,抑制病原菌生长<sup>[9-10]</sup>;产生溶菌酶,如蛋白酶、几丁质酶和纤维素酶溶解病原菌的细胞壁<sup>[11]</sup>;通过群体感应淬灭作用抑制病原菌信号分子的表达等<sup>[12]</sup>。芽孢杆菌可明显提高对虾对副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)和哈维氏弧菌(*V. harveyi*)等病原菌的抵抗力<sup>[13-14]</sup>。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是水产养殖中最广泛

\* 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:2024-01-25; 修订日期:2024-03-27

作者简介:田相利(1971—),男,教授,研究方向:水生微生物生态学。E-mail: xianglitian@ouc.edu.cn

使用的芽孢杆菌种类,其对机体的有益作用可归因于多种不同的机制,例如产生抑菌化合物、消化酶、竞争排斥以及对肠道微生物的协同作用等<sup>[15-16]</sup>。贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*)具有产生次生代谢产物的能力,包括表面活性素、丰原素等脂肽类抗生素以及大环内酯类抗生素等<sup>[17]</sup>。饲料中添加贝莱斯芽孢杆菌可增强石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂)先天免疫反应,提高对哈维氏弧菌的抵抗力<sup>[5]</sup>。蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*)也是水产养殖常见的益生菌之一。例如,Zhao等研究发现饲料中添加蜡样芽孢杆菌可显著提高刺参(*Apostichopus japonicus*)幼参的免疫力和抗病能力<sup>[18]</sup>。然而,尽管芽孢杆菌类益生菌在水产养殖中的功效已得到广泛认可,相关产品在养殖生产中也得到普遍应用,但目前人们对于其作用和功能的菌种或菌株特异性差异的关注仍有待于进一步深入。

中国海洋大学水产养殖生态学实验室先后定向筛选出3株对对虾常见病原性弧菌等具有广谱抑菌活性的芽孢杆菌菌株,分别为枯草芽孢杆菌 BSXE-1601<sup>[19]</sup>、贝莱斯芽孢杆菌 26.3<sup>[20]</sup>和蜡样芽孢杆菌 BCXE-01<sup>[21]</sup>。其中,BSXE-1601对副溶血弧菌、创伤弧菌(*V. vulnificus*)和溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)等具有较强的抑制作用<sup>[19]</sup>,菌株26.3可以有效抑制哈维氏弧菌、溶藻弧菌和嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)等弧菌<sup>[20]</sup>,而BCXE-01发酵液中活性物质能够耐高温、耐低pH,对副溶血弧菌、溶藻弧菌和灿烂弧菌(*V. splendidus*)等均有较强的抑制作用<sup>[21]</sup>。然而,关于枯草芽孢杆菌、贝莱斯芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌对凡纳对虾生长、免疫和抗病能力影响的比较研究迄今还鲜有报道。鉴于此,本研究对比研究了饲料添加这3株具有抑菌功能芽孢杆菌类益生菌对凡纳对虾生长、非特异性免疫相关基因表达以及副溶血弧菌抵抗力影响的可能差异。旨在为这3种芽孢杆菌在凡纳对虾实际养殖中的合理应用及用户对芽孢杆菌类益生菌产品的精准选用提供科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株

研究所用芽孢杆菌均来自中国海洋大学水产养殖生态学实验室菌种保存中心,分离自健康对虾肠道。3种芽孢杆菌分别为枯草芽孢杆菌 BSXE-1601、蜡样芽孢杆菌 BCXE-01和贝莱斯芽孢杆菌 26.3。前期研究表明,3种芽孢杆菌对水产主要病原性细菌均具有不同程度的抑制作用,抑菌谱存在一定差异<sup>[19-21]</sup>。将3种芽孢杆菌接种于2216E液体培养基,28℃、140 r·min<sup>-1</sup>培养24 h,离心后使用生理盐水重悬备用。副溶血弧

菌(编号:20160303005-1)由中国水产科学研究院黄海水产研究所提供。

### 1.2 饲料制备

处理组所用饲料分别添加3种不同芽孢杆菌,对照组饲料不添加菌体。基础饲料由福州海马饲料有限公司(中国福州)提供的对虾2号饲料。饲料中营养物质的主要成分和含量见表1。对于基础饲料先进行以下处理再投入使用:首先将海藻酸钠和蒸馏水混合,混合后加热至海藻酸钠完全溶解,随后将鱼油和海藻酸钠进行混匀,处理组将重悬在生理盐水中的芽孢杆菌菌体均匀泼洒在已制备好的饲料中,混匀后按比例添加鱼油和海藻酸钠混合物,放置于阴凉处进行晾干。对照组除不添加芽孢杆菌菌体外,其余制备步骤与处理组相同<sup>[22]</sup>。

表1 基础饲料成分

Table 1 Composition of the basic feed

成分 Ingredients	含量 Content/%
水分 Moisture	≤ 11.0
赖氨酸 Lysine	≥ 2.3
粗灰分 Crude ash	≤ 15.0
粗脂肪 Crude fat	≥ 5.0
粗纤维 Crude fiber	≤ 5.0
粗蛋白 Crude protein	≥ 43.0
总磷 Total phosphorus	0.9~2.0

### 1.3 对虾及其养殖管理

健康凡纳对虾幼虾购自正大集团(中国海南),运输至三亚热带水产研究院进行养殖研究。实验前,先将幼虾在实验条件下适应和驯化2周。在这个过程中,适当增氧,并定时适量投喂商品饲料。驯化结束后,先饥饿处理,时间持续24 h,后从对虾中随机挑选560尾健康、规格均匀的幼虾(1.57±0.07)g分配到16个玻璃水族箱中(100 L)进行正式实验。实验过程中,对照组仅投喂基础饲料(CO组),其他各组在基础饲料的基础上分别添加枯草芽孢杆菌 BSXE-1601、蜡样芽孢杆菌 BCXE-01、贝莱斯芽孢杆菌 26.3,添加浓度均为1×10<sup>9</sup> CFU·kg<sup>-1</sup>,分别命名为BD、CD和BV组。养殖实验期间,每日换水一次,换水量为20%~30%。每日在9:00、14:00、19:00、23:00定时投喂饲料,投喂的量是对虾体质量的10%。及时观察对虾的生长情况适当调整投饵量。

整个养殖实验持续42 d,每日观察并记录对虾的死亡情况。养殖过程中,水温为(33.0±0.5)℃、pH为7.8~8.0、盐度为32.0±1.0、溶解氧在6 mg·L<sup>-1</sup>以上。

#### 1.4 样品采集

42 d 养殖实验结束之后, 首先饥饿处理对虾 24 h, 随后称量其体质量并进行记录。从每个大的水族箱中随机抓取 6 尾对虾, 采集其血液和肝胰腺样本。采集血液需要通过从对虾的腹部血窦中抽取, 抽取后立即收集到 1.5 mL 离心管中, 随后将离心管放置于 4 °C 冰箱中静置, 次日使用研磨机将血液样品充分研磨, 3 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min 后吸取上层血清放入一个新的离心管中, 后置于 -80 °C 冰箱中保存待测<sup>[22]</sup>。肝胰腺样品需要通过经灭菌处理的医用剪刀和镊子来采集, 采集完成后立即将肝胰腺样品浸入灭菌离心管中, 灭菌离心管提前加入 RNA 保护液。将离心管在 4 °C 冰箱内静置 12 h, 随后保存于 -80 °C 冰箱备用待测。

#### 1.5 指标测定

1.5.1 对虾生长指标 对虾饥饿处理 24 h 后进行计数和称重, 并按照如下公式计算凡纳对虾特定生长率、存活率以及饲料效率<sup>[23]</sup>:

存活率(SR) = 养殖实验结束时对虾数量 ÷ 养殖实验开始时投放对虾数 × 100%;

特定生长率(SGR) =  $(\ln W_{末} - \ln W_{初}) / t \times 100\%$ ;

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

式中:  $W_{初}$  和  $W_{末}$  分别表示凡纳对虾的初、末体质量;  $t$  为实验周期;  $W_{饲}$  表示养殖实验期间饲料投喂量。

1.5.2 非特异性免疫指标 使用试剂盒(南京建成生物有限公司, 中国南京)测定非特异性免疫酶的活性。严格按照说明书规范分别测定凡纳对虾血清中溶菌酶

(Lysozyme, LZM)、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶活性(Peroxidase, POD)、总一氧化氮合成酶(Total nitric oxide synthase, T-NOS)、酸性磷酸酶(Acid phosphatase, ACP)、碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, AKP)和酚氧化酶(Phenoloxidase, PO)含量。

1.5.3 肝胰腺中免疫相关基因表达 使用 FastPure Cell/Tissue RNA isolation Kit 细胞/组织总 RNA 提取试剂盒(杭州诺维赞生物科技有限公司, 中国杭州)提取肝胰腺组织样品的总 RNA, 随后电泳检测总 RNA 的完整度。随后, 用 SYBR Green Pro Taq HS qPCR 试剂盒(杭州艾科瑞生物科技有限公司, 中国杭州)将总 RNA 反转录为 cDNA, 用荧光实时定量 PCR 方法测定 cDNA 中免疫相关基因 (*Imd*、*Toll*、*Relish*、*TOR*、*4E-BP*、*eIF4E1 $\alpha$* 、*eIF4E2*、*proPO*、*LZM*、*SOD*、*LGBP* 和 *HSP70*) 的相对表达量。qPCR 反应体系如下: 总量为 20  $\mu$ L, 其中 SYBR Green Pro Taq HS Premix 10  $\mu$ L, Primer F 0.4  $\mu$ L, Primer R 0.4  $\mu$ L, ROX Reference Dye 0.4  $\mu$ L, cDNA 模板 2.0  $\mu$ L, 以及 DEPC 处理水 6.8  $\mu$ L。qPCR 反应程序如下: 95 °C 保持 30 s; 95 °C 保持 5 s, 温度降至 60 °C 后保持 30 s, 共 40 个循环; 95 °C 保持 15 s, 温度降至 60 °C 后保持 1 min, 最后 95 °C 保持 15 s<sup>[22]</sup>。扩增完成后, 采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 相对定量法对免疫基因的相对表达量进行计算。qPCR 使用的引物序列见表 2。

表 2 qPCR 所使用的引物序列

Table 2 Sequences of the primers used in qPCR

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 <sup>[24]</sup>
<i>SOD</i>	AGCCAATGACGTAAGCG	ACCATCACAAGAAACCC	孙艳等 <sup>[24]</sup>
<i>LZM</i>	TGTTCCGATCTGATGTCC	GCTGTTGTAAGCCACCC	孙艳等 <sup>[24]</sup>
<i>proPO</i>	TCCATTCGGTCCGTCTG	GGCTTCGCTCTGGTTAGG	孙艳等 <sup>[24]</sup>
<i>LGBP</i>	CATGTCCAACCTTCGCTTTCAGA	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 <sup>[25]</sup>
<i>TOR</i>	TGCCAACGGGTGGTAGA	GGGTGTTTGTGGACGGA	Duan 等 <sup>[26]</sup>
<i>4E-BP</i>	ATGTCTGCTTCGCCGTCGCTCGCC	GGTCTTGGGTGGGCTCTT	Duan 等 <sup>[26]</sup>
<i>eIF4E1<math>\alpha</math></i>	TCCCTTCCCTAACCTCA	GTTTTGCTGTCTCGCTTCC	Duan 等 <sup>[26]</sup>
<i>eIF4E2</i>	TGGAATCAAACCTATGTGGG	GTCTCTGGAAGCGTA	Duan 等 <sup>[26]</sup>

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

1.5.4 攻毒实验 将副溶血弧菌接种于 TSB 培养基,于 28 °C 和 160 r·min<sup>-1</sup> 条件下培养 24 h,培养数代之后在显微镜下用血球计数板统计活菌数。参考本实验室已有的相关研究结果,预实验副溶血弧菌的注射浓度梯度设置如下:1×10<sup>8</sup>、5×10<sup>8</sup>、1×10<sup>9</sup> 和 5×10<sup>9</sup> CFU·mL<sup>-1</sup>,实验结果显示,对虾 LC<sub>50</sub>(半数致死浓度 Lethal concentration 50%)确定为 1×10<sup>9</sup> CFU·mL<sup>-1</sup>,后续以此浓度进行实验。从 4 个组分别选取规格相似的 48 尾对虾进行副溶血弧菌攻毒实验,每组设置 4 个重复样本,用无菌微量注射器注射 25 μL 浓度为 1×10<sup>9</sup> CFU·mL<sup>-1</sup> 副溶血弧菌菌液在对虾倒数第三腹节处,连续 14 d 观察并记录对虾死亡情况,最后计算各组对虾累计死亡率。

## 1.6 数据统计分析

实验数据使用 SPSS 23.0 统计软件进行分析。首先,数据进行方差齐性及正态性分布检验;随后,进行单因素方差分析(ANOVA)以及 Duncan 多重比较检验。结果以平均值±标准误(mean±S.E)的形式来展示。显著性水平设定为 P<0.05。

## 2 结果

### 2.1 对虾生长情况

各实验组凡纳对虾的生长性能见表 3。由表 3 可以看出,BV 组各项生长指标最高,BD 组对虾末体质量、特定生长率和饲料效率显著高于对照组(P<0.05)。CD 组与对照组之间并未展现出显著差异(P>

表 3 凡纳对虾的生长情况和存活率

Table 3 Growth performance and survival of *Penaeus vannamei*

组别 Group	初体质量 Initial weight/g	末体质量 Final weight/g	特定生长率 SGR/(%·d <sup>-1</sup> )	饲料效率 FER/%	存活率 SR/%
BD	1.57±0.03	14.37±0.30 <sup>b</sup>	5.27±0.05 <sup>b</sup>	84.07±2.60 <sup>b</sup>	84.29±4.12 <sup>a</sup>
CD	1.57±0.07	13.70±0.11 <sup>a</sup>	5.16±0.10 <sup>a</sup>	78.43±0.96 <sup>a</sup>	77.86±3.17 <sup>a</sup>
BV	1.56±0.03	14.55±0.23 <sup>b</sup>	5.31±0.06 <sup>b</sup>	84.41±1.41 <sup>b</sup>	80.00±1.65 <sup>a</sup>
CO	1.57±0.04	13.47±0.10 <sup>a</sup>	5.12±0.01 <sup>a</sup>	76.41±0.68 <sup>a</sup>	75.00±3.57 <sup>a</sup>

注:组间不同字母代表数据差异显著(P<0.05)。BD、CD、BV 分别表示饲料中添加枯草芽孢杆菌 BSXE-1601、蜡样芽孢杆菌 BCXE-01 和贝莱斯芽孢杆菌 26.3。CO 为对照组。Data with different letters indicate significant differences between groups (P<0.05). BD, CD and BV indicated that *Bacillus subtilis* BSXE-1601, *Bacillus cereus* BCXE-01 and *Bacillus velezensis* 26.3 were added to the feed, respectively. CO represented the control group.

0.05)。养殖期间,各处理组的对虾存活率未见显著差异(P>0.05)。

### 2.2 对虾血清非特异性免疫指标

3 种不同芽孢杆菌对凡纳对虾血清相关免疫酶活的影响如图 1 所示。3 个处理组对虾 SOD 活性显著高于对照组(P<0.05),BV 组对虾 SOD 活性显著高于其他各组(P<0.05)。BD 组、CD 组和 BV 组对虾 PO 和 POD 活性均显著高于对照组,其中 BV 组对虾 PO 含量和 POD 活性显著高于 CD 组(P<0.05),与 BD 组未见显著差异。BV 组对虾 ACP 和 AKP 活性显著高于其他各组(P<0.05),BD 组和 CD 组对虾 ACP 活性显著高于对照组,BD 组对虾 AKP 活性显著高于对照组(P<0.05),CD 组和对照组组间差异不显著(P>0.05)。BD 组和 BV 组对虾 LZM 活性和 T-NOS 活性均显著高于对照组和 CD 组(P<0.05),CD 组和对照组组间差异不显著(P>0.05)。

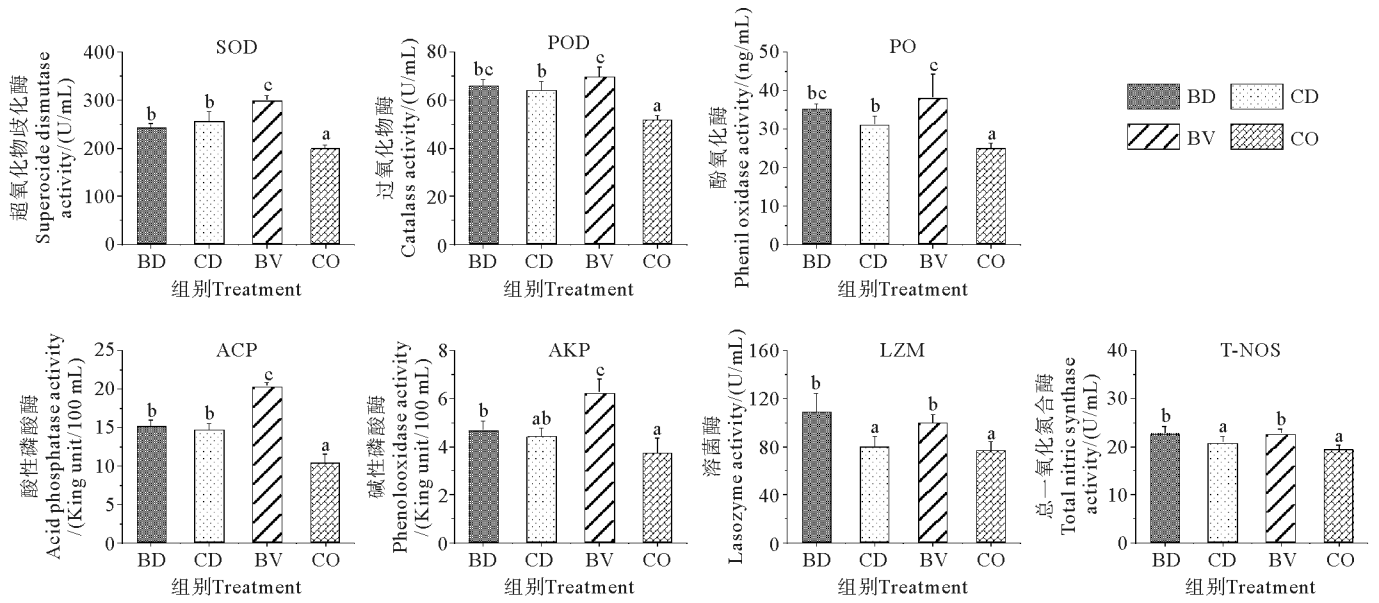
### 2.3 proPO、LZM、SOD、LGBP、HSP70 基因相对表达量

饲料中添加枯草芽孢杆菌 BSXE-1601、蜡样芽孢杆

菌 BCXE-01 和贝莱斯芽孢杆菌 26.3 对凡纳对虾肝胰腺相关基因相对表达量的影响如图 2 所示。由图 2 可以看出,BD 组对虾肝胰腺 proPO 基因和 LZM 基因的相对表达量显著高于 BV 组和 CD 组(P<0.05)。BV 组对虾肝胰腺 SOD 基因和 LGBP 基因相对表达量显著高于其他各组(P<0.05)。BD 组和 BV 组对虾肝胰腺 HSP70 基因相对表达量显著高于 CD 组和对照组(P<0.05)。

### 2.4 Imd、Toll 和 Relish 基因相对表达量

饲料中添加枯草芽孢杆菌 BSXE-1601、蜡样芽孢杆菌 BCXE-01、贝莱斯芽孢杆菌 26.3 对凡纳对虾肝胰腺 Imd、Toll、Relish 基因相对表达量影响如图 3 所示。3 个实验组对虾肝胰腺中 Imd 基因的相对表达量均与对照组有显著差异(P<0.05),而在 BD 组、CD 组和 BV 组之间的差异不显著(P>0.05)。BV 组对虾肝胰腺 Toll 基因相对表达量显著高于 BD 组和 CD 组,3 个实验组对虾肝胰腺 Toll 基因相对表达量均与对照组有显著差异(P<0.05)。BD 组对虾肝胰腺 Relish 基因相对表达量显著高于 CD 组和对照组(P<0.05),与 BV 组未见显著差异。



(BD,CD,BV 分别表示饲料中添加枯草芽孢杆菌 BSXE-1601、蜡样芽孢杆菌 BCXE-01 和贝莱斯芽孢杆菌 26.3。CO 为对照组。图中不同字母表示组间数据差异显著 ( $P < 0.05$ )。下同。BD, CD and BV indicated that *Bacillus subtilis* BSXE-1601, *Bacillus cereus* BCXE-01 and *Bacillus velezensis* 26.3 were added to the feed, respectively. CO represented the control group. Data with different letters indicate significant differences between groups ( $P < 0.05$ ). The same as below.)

图 1 饲料中添加 3 种不同芽孢杆菌对凡纳对虾血清相关免疫酶活的影响

Fig. 1 Effect of diet supplemented with three different *Bacillus* on serum-related immunoenzyme activity in *P. vannamei*

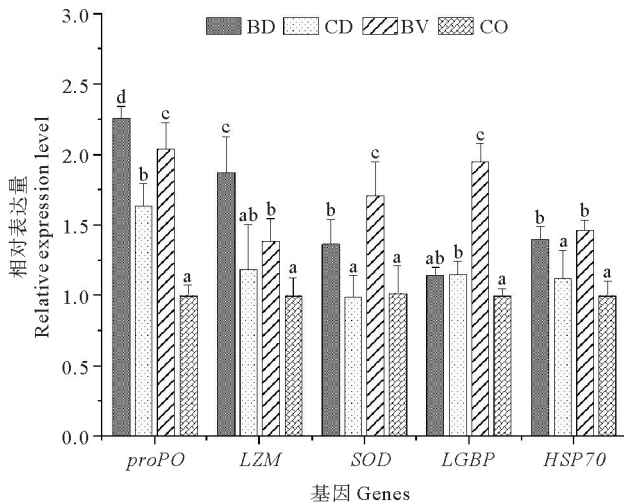


图 2 凡纳对虾肝胰腺中 *proPO*、*LZM*、*SOD*、*LGBP* 和 *HSP70* 基因的相对表达量

Fig. 2 The relative expression level of *proPO*、*LZM*、*SOD*、*LGBP* and *HSP70* genes in the hepatopancreas of *P. vannamei*

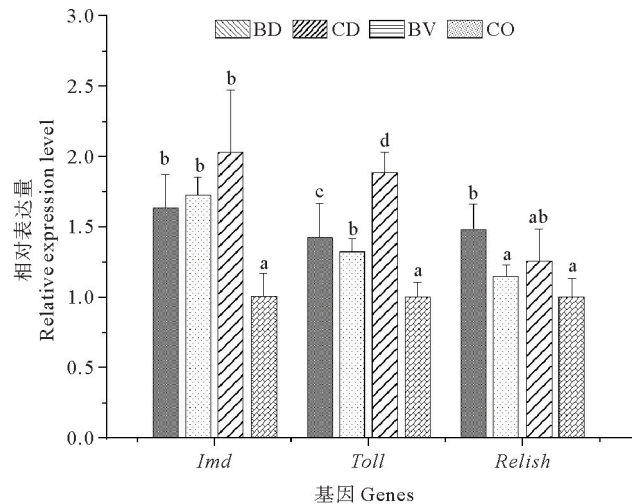


图 3 凡纳对虾肝胰腺中 *Imd*、*Toll* 和 *Relish* 基因的相对表达量

Fig. 3 The relative expression level of *Imd*、*Toll* and *Relish* genes in the hepatopancreas of *P. vannamei*

2.5 mTOR 信号通路相关基因的表达

饲料中添加枯草芽孢杆菌 BSXE-1601、蜡样芽孢杆菌 BCXE-01、贝莱斯芽孢杆菌 26.3 对凡纳对虾肝胰腺 mTOR 信号通路相关基因的表达的影响如图 4 所示。BD 组和 BV 组对虾肝胰腺中 TOR 基因和 *eIF4E1α* 基因相对表达量显著高于 CD 组和对照组 ( $P < 0.05$ ), BD 组和 BV 组之间无显著差异 ( $P > 0.05$ )。BV 组对虾肝胰腺 *4E-BP* 基因相对表达量显

著高于其他 3 组 ( $P < 0.05$ )。BD 组和 CD 组对虾肝胰腺 *eIF4E2* 基因相对表达量显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 3 个实验组组间未见显著性差异 ( $P > 0.05$ )。

2.6 对虾抗病力

副溶血弧菌攻毒后各组对虾累计死亡率如图 5 所示。由图 5 可以看出, 3 个处理组对虾累计死亡率均显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ), BD 组、CD 组和 BV 组之间无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

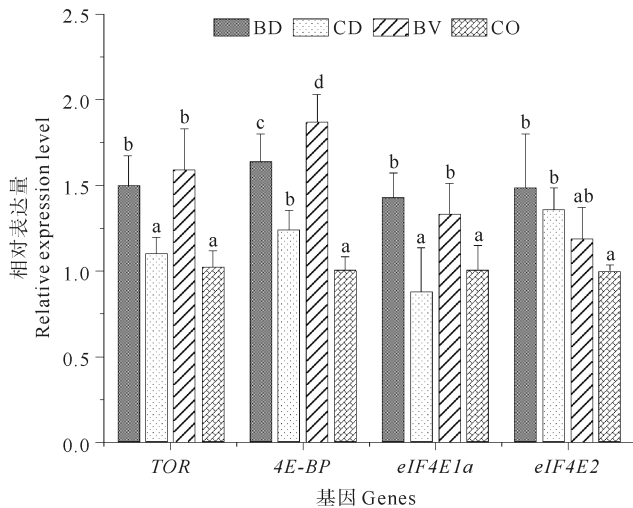


图4 凡纳对虾肝胰腺中 mTOR 信号通路相关基因的相对表达量

Fig. 4 The relative expression levels of mTOR signaling-related genes in the hepatopancreas of *P. vannamei*

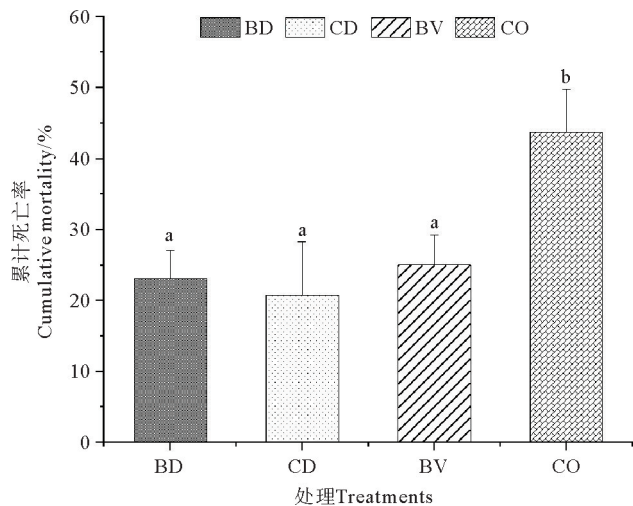


图5 饲料中添加不同芽孢杆菌对凡纳对虾抗病力的影响

Fig. 5 Effect of diet supplemented with different *Bacillus* on disease resistance in *P. vannamei*

### 3 讨论

#### 3.1 对虾生长性能

抗生素的不当使用对生态环境以及人类健康均产生了潜在的危害。鉴于此,目前各个国家均已制定严格的法规禁止或尽量减少抗生素在水产养殖中的非治疗性应用<sup>[27]</sup>。而作为一类绿色环保的水产养殖饲料添加剂,益生菌受到广泛的关注。在候选益生菌中,芽孢杆菌因其具有孢子形成能力强、增强养殖动物对疾病的抵抗力<sup>[28]</sup>、调节肠道菌群的平衡<sup>[29]</sup>、提高养殖动物的免疫力<sup>[28]</sup>、提高宿主消化能力等特点和作用而广泛被应用于水产养殖中。其中,枯草芽孢杆菌是水产养殖中研究和应用最为广泛的益生菌之一,其在虾和鱼类养殖中可以有效提高个体成活率、养殖产量和效

益<sup>[30]</sup>。研究表明,枯草芽孢杆菌作为饲料添加剂可显著提高凡纳对虾的末体质量、比生长率、食物转化率和消化酶活性<sup>[31]</sup>。贝莱斯芽孢杆菌则是近年研究比较多的新的潜在益生菌之一,已有研究表明其可抑制植物病原体并且促进植物生长,同时,该菌作为养殖动物饲料添加剂也受到较多关注<sup>[17]</sup>。相关研究发现,饲料中添加贝莱斯芽孢杆菌可以显著提高部分养殖动物的生长性能,例如促进凡纳对虾<sup>[32]</sup>、鳊鱼(*Siniperca chuatsi*)<sup>[33]</sup>、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)<sup>[34]</sup>、刺参<sup>[35]</sup>等养殖动物的生长性能。而枯草芽孢杆菌和贝莱斯芽孢杆菌的复合使用同样可显著提高尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)的生长性能和消化酶活性<sup>[36]</sup>。尽管在安全性上还存在一定的争议,蜡样芽孢杆菌也显示出较好的益生特性<sup>[37-39]</sup>。例如:王苓等<sup>[23]</sup>研究发现,饲料中添加 $1 \times 10^9$  CFU  $\cdot$  kg<sup>-1</sup> 蜡样芽孢杆菌 CD 可显著提高凡纳对虾的生长性能、饲料效率以及消化率。Zhao 等则发现饲料中添加蜡样芽孢杆菌 EN25 可显著提高刺参幼参的免疫力和抗病能力<sup>[18]</sup>。不过迄今为止,关于枯草芽孢杆菌、贝莱斯芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌对凡纳对虾生长性能影响差异比较的研究尚报道较少。

尽管芽孢杆菌益生菌是目前水产养殖中研究和使用的比较广泛的益生菌种类之一,但不同菌株之间的功能和作用存在明确的菌株特异性<sup>[17,30,37]</sup>。本研究使用的枯草芽孢杆菌 BSXE-1601、蜡样芽孢杆菌 BCXE-01 和贝莱斯芽孢杆菌 26.3 是定向筛选的对水产养殖中常见的弧菌等病原性细菌具有显著抑制作用的菌株,具有广谱抑菌活性,但具体抑菌谱存在明显的不同<sup>[19-21]</sup>。因此,与其他研究涉及的芽孢杆菌类益生菌比较,明确的抑菌性能是本研究使用的菌株的主要特点。从本研究结果可以看出,饲料中添加枯草芽孢杆菌 BSXE-1601 和贝莱斯芽孢杆菌 26.3 均可显著提高凡纳对虾的末体质量、特定生长率和饲料效率等指标。然而添加蜡样芽孢杆菌 BCXE-01 组对虾的末体质量、特定生长率、饲料效率与对照组相比未见显著差异。

#### 3.2 对虾血清非特异性免疫相关指标

对虾属于节肢动物,缺乏适应性免疫,完全依赖先天免疫系统来抵抗病原体入侵,包括体液免疫以及细胞免疫系统<sup>[40]</sup>。体液免疫中具有免疫作用的酶包含非氧化活性酶(T-NOS、LZM、AKP、ACP 和 PO)和氧化活性酶(T-AOC、SOD 和 POD)。其中,NO 的产生依赖于 NOS 的催化,NO 是对虾先天免疫系统中产生的用于抗菌防御的关键效应分子,已有研究表明,在凡纳对虾抵抗哈维氏弧菌感染过程中,NO 是潜在的抗菌物质之一<sup>[41]</sup>;溶菌酶(LZM)是对虾先天免疫防御系统的重要组成部分,可形成水解酶系统,水解细菌细胞壁的

肽聚糖结构从而引起细菌裂解<sup>[42]</sup>;酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(AKP)是一类重要的生物活性物质,它们不仅参与调节部分生理代谢活动,还作为溶酶体酶的一部分,参与机体的免疫反应,对甲壳动物的生长具有重要意义<sup>[43]</sup>;PO由 proPO 系统释放,使机体对病原体感染快速做出反应。在宿主的免疫机制中,活性氧发挥着重要的作用,但过量的活性氧会损坏细胞中的大分子。T-AOC 是评估生物体完全抗氧化能力的重要指标<sup>[44]</sup>;对虾细胞内包括 SOD 和 POD 等在内的避免氧化应激的保护机制,通过清除氧自由基或修复被氧化的生物大分子保护机体免受氧化损伤<sup>[40]</sup>。在本研究中,与对照组相比,饲料中添加枯草芽孢杆菌 BSXE-1601、蜡样芽孢杆菌 BCXE-01 和贝莱斯芽孢杆菌 26.3 均可不同程度提高对虾血清中 7 种免疫酶活性,这一结果与以往研究相似。例如,饲料中添加枯草芽孢杆菌 E20 可显著提高对虾血清中酚氧化酶等的活性<sup>[45]</sup>,而饲料中添加贝莱斯芽孢杆菌 CPA1-1 则可显著提高日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)血清 ACP、AKP 和 SOD 活性<sup>[46]</sup>。类似的,蜡样芽孢杆菌 CD 显著提高了凡纳对虾血清中 NOS、LZM 和 SOD 的活性<sup>[23]</sup>。总体上,本研究中饲料中添加 3 种芽孢杆菌均可在一定程度上提高凡纳对虾血清中非特异性免疫相关酶的活性,但不同菌株之间诱导能力存在一定的差异。其中,贝莱斯芽孢杆菌 26.3 的免疫诱导效果相对更优,对虾血清 SOD、ACP 和 AKP 活性显著高于其他 2 株芽孢杆菌,而蜡样芽孢杆菌 BCXE-01 的作用相对较弱,血清 AKP、LZM 和 T-NOS 活性与对照相比未见显著差异。

### 3.3 对虾肝胰腺组织免疫相关基因表达水平

虾先天免疫反应包括对病原微生物的识别、信号转导(Toll 通路、Imd 通路等)及效应物的产生。先天免疫机制的激活依赖于模式识别受体(PRRs),PRRs 能识别通用的病原相关分子模式(PAMP),进而引发酚氧化酶(proPO)原级联控制等免疫反应<sup>[47]</sup>。目前,在对虾体内已识别到脂多糖(LPS)、LGBP 和凝集素等多种 PRRs,其中 LGBP 和 LPS 是重要的 PRRs,可激活对虾的先天免疫<sup>[47]</sup>。本研究发现,添加芽孢杆菌后,对虾肝胰腺组织中 *proPO*、*LZM* 和 *LGBP* 等免疫相关酶类基因的相对表达量均有不同程度的提高。但不同芽孢杆菌添加组之间存在一定的差异。其中,除了枯草芽孢杆菌 BSXE-1601 添加组 *LGBP* 基因与对照组相比未见显著上调外,枯草芽孢杆菌 BSXE-1601 和贝莱斯芽孢杆菌 26.3 作用总体相当。然而,蜡样芽孢杆菌 BCXE-01 对相关基因表达的诱导作用相对较弱,对虾肝胰腺 *LZM*、*SOD* 和 *HSP70* 基因表达水平与对照组相比未见显著上调。

Toll 和 Imd 等信号通路可调控不同抗菌肽基因的表达,抗菌肽类物质是体液免疫的效应物。在宿主被病原菌感染时,Toll/Imd 受体识别病原体相关分子激活转录因子 NF- $\kappa$ B,NF- $\kappa$ B 进入细胞核诱导抗菌肽等免疫效应物的产生<sup>[48-49]</sup>,而 *Relish* 基因是 NF- $\kappa$ B 家族成员的一部分<sup>[50]</sup>。另外,mTOR 信号通路是一个复杂的营养感应和生长调节系统,TOR 是高度保守的磷酸肌醇相关激酶,并与其他蛋白相互作用形成代谢的主要调节因子 mTORC1<sup>[51]</sup>。帽结合蛋白 eIF4E(IF4E1、IF4E2 和 eIF4E3)直接参与 mTORC1 的合成,且多数 eIF4E 蛋白对机体细胞生长至关重要<sup>[52]</sup>。而 *4E-BP* 可通过磷酸化和去磷酸化控制 eIF4E 活性。本研究表明,添加 3 种芽孢杆菌均可不同程度提高对虾肝胰腺相关免疫基因的表达,这与以往的研究结果相似。例如,Zokaifar 等发现饲料中添加枯草芽孢杆菌时,可显著上调 *ProPO*、过氧化素(*PE*)、 $\beta$ -1,3-葡聚糖结合蛋白(*LGBP*s)、丝氨酸蛋白(*SP*)等免疫相关基因的表达量<sup>[53]</sup>。而 Chen 等研究则发现,饲料中添加贝莱斯芽孢杆菌 BV007 可显著上调 *SOD* 等免疫基因的相对表达水平<sup>[32]</sup>。然而,3 种不同芽孢杆菌之间相比较,其对免疫基因的诱导作用存在一定差异。其中,枯草芽孢杆菌添加组对虾肝胰腺组织中 *Imd*、*Toll* 和 *Relish* 基因相对表达量显著上调,贝莱斯芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌添加组 *Imd* 和 *Toll* 基因相对表达量显著上调。与 mTOR 信号通路相关的免疫基因中,枯草芽孢杆菌添加组 *TOR*、*4E-BP*、*eIF4E1 $\alpha$*  和 *eIF4E2* 这 4 个基因相对表达量均显著增加,贝莱斯芽孢杆菌添加组 *TOR*、*4E-BP* 和 *IF4E1 $\alpha$*  这 3 个基因相对表达量显著增加。然而蜡样芽孢杆菌添加组仅 *4E-BP* 和 *eIF4E2* 显著提高。综合比较,添加枯草芽孢杆菌 BSXE-1601 和贝莱斯芽孢杆菌 26.3 对凡纳对虾免疫基因表达的诱导作用在不同指标之间互有高低,但总体上相当,要明显优于蜡样芽孢杆菌 BCXE-01,不过导致这一差异的机理尚待进一步深入研究。另外,值得注意的是,与上述 mTOR 信号通路相关基因表达水平变化相一致,枯草芽孢杆菌与贝莱斯芽孢杆菌添加组对虾的末体质量、特定生长率及饲料转化效率等反映生长性能的指标也显著高于蜡样芽孢杆菌添加组和对照组,这表明 mTOR 信号通路在对虾生长调控方面具有重要作用。

### 3.4 饲料中添加芽孢杆菌对凡纳对虾抗病力的影响

细菌性病害在水产养殖动物中普遍发生,其中许多细菌性疾病与弧菌属、气单胞菌属、爱德华氏菌属、链球菌属等相关。弧菌属病原菌包括副溶血弧菌、创伤弧菌、灿烂弧菌等多种,是海水养殖动物主要的条件性致病菌。其中,副溶血弧菌是导致对虾急性肝胰腺坏死综合症(AHPND)的主要病原之一,在全球范围内

给对虾养殖业造成了巨大的损失<sup>[54]</sup>。在养殖过程中通过添加益生菌和益生元等提高对虾对病原菌的抵抗力以及免疫力,是目前对虾绿色健康养殖的方法之一。而益生菌可通过产生拮抗化合物、竞争黏附位点、免疫调节、肠道菌群调控等机制,有效提高宿主的抗病力<sup>[3]</sup>。已有研究表明,饲料中添加枯草芽孢杆菌可有效提高凡纳对虾对副溶血弧菌<sup>[55]</sup>、哈维氏弧菌<sup>[53]</sup>、溶藻弧菌<sup>[56]</sup>等病原菌的抵抗力。饲料中添加贝莱斯芽孢杆菌可显著增加对虾肠道中潜在益生菌丰度,并降低弧菌的丰度<sup>[32]</sup>。本研究发现,添加3种芽孢杆菌均可有效提高凡纳对虾对副溶血弧菌的抵抗力,上述免疫相关酶和基因的上调可能与对虾对副溶血弧菌抗性增强有关。不过,对虾非特异性免疫力的提高与抗病力增强的对应关系及机制比较复杂,具体还有待深入研究。

#### 4 结语

饲料中以 $1 \times 10^9$  CFU · kg<sup>-1</sup> 剂量添加具有抑菌性能的枯草芽孢杆菌 BSXE-1601 和贝莱斯芽孢杆菌 26.3 可有效地提高凡纳对虾的生长性能,二者对机体免疫响应的诱导作用优于蜡样芽孢杆菌 BCXE-01。饲料中添加3种芽孢杆菌均可不同程度地提高凡纳对虾的免疫能力,显著提高对虾对副溶血弧菌的抵抗力。综合考虑对虾的生长性能、免疫响应以及对副溶血弧菌的抵抗力,本研究中饲料添加枯草芽孢杆菌 BSXE-1601 和贝莱斯芽孢杆菌 26.3 效果要优于蜡样芽孢杆菌 BCXE-01。

#### 参考文献:

- [1] 张建春, 孔杰, 曹家旺, 等. 凡纳对虾高低繁殖力群体卵巢组织学观察及相关候选基因的表达分析[J]. 渔业科学进展, 2023, 44(1): 1-13.
- Zhang J C, Kun J, Cao J W, et al. Ovarian histology and expression of related candidate genes in high-and low-fecundity populations of *Penaeus vannamei* [J]. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(1): 1-13.
- [2] Farzanfar A. The use of probiotics in shrimp aquaculture[J]. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 2006, 48(2): 149-158.
- [3] Ninawe A S, Selvin J. Probiotics in shrimp aquaculture: Avenues and challenges[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2009, 35(1): 43-66.
- [4] Aly S M, Mohamed M F, John G. Effect of probiotics on the survival, growth and challenge infection in *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) [J]. Aquaculture Research, 2008, 39(6): 647-656.
- [5] Amoah K, Tan B, Zhang S, et al. Host gut-derived *Bacillus* probiotics supplementation improves growth performance, serum and liver immunity, gut health, and resistive capacity against *Vibrio harveyi* infection in hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂) [J]. Animal Nutrition (Zhongguo Xumu Shouyi Xuehui), 2023, 14: 163-184.
- [6] Kuebutornye F K A, Abarike E D, Lu Y, et al. Mechanisms and the role of probiotic *Bacillus* in mitigating fish pathogens in aquaculture[J]. Fish Physiol Biochem, 2020, 46(3): 819-841.
- [7] Patel S, Gupta R S. A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*: Proposal for six new genera of *Bacillus* species, *Peribacillus* gen. nov., *Cytobacillus* gen. nov., *Mesobacillus* gen. nov., *Neobacillus* gen. nov., *Metabacillus* gen. nov. and *Alkalihalobacillus* gen. nov. [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2020, 70(1): 406-438.
- [8] Li E, Wang C, Wang X D, et al. Gut microbiota and its modulation for healthy farming of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. Reviews in Fisheries Science & Aquaculture, 2018, 26(3): 381-399.
- [9] Chen X H, Scholz R, Borriss M, et al. Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease [J]. Journal of Biotechnology, 2009, 140(1): 38-44.
- [10] Chakraborty K, Kizhakkekalam V K, Joy M, et al. Bacillibactin class of siderophore antibiotics from a marine symbiotic *Bacillus* as promising antibacterial agents [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2022, 106(1): 329-340.
- [11] Kuebutornye F K A, Abarike E D, Lu Y. A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture [J]. Fish Shellfish Immunol, 2019, 87: 820-828.
- [12] Vadassery D H, Pillai D. Quorum quenching potential of *Enterococcus faecium* QQ12 isolated from gastrointestinal tract of *Oreochromis niloticus* and its application as a probiotic for the control of *Aeromonas hydrophila* infection in goldfish *Carassius auratus* (Linnaeus 1758) [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2020, 51(3): 1333-1343.
- [13] Kewcharoen W, Srisapoom P. Probiotic effects of *Bacillus* spp. from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) on water quality and shrimp growth, immune responses, and resistance to *Vibrio parahaemolyticus* (AHPND strains) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2019, 94: 175-189.
- [14] Tapaamorndech S, Chantaraskha K, Kingcha Y, et al. Effects of *Bacillus aryabhattai* TBRC8450 on vibriosis resistance and immune enhancement in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2019, 86: 4-13.
- [15] Nayak S K. Multifaceted applications of probiotic *Bacillus* species in aquaculture with special reference to *Bacillus subtilis* [J]. Reviews in Aquaculture, 2021, 13(2): 862-906.
- [16] He X, Abakari G, Tan H, et al. Effects of different probiotics (*Bacillus subtilis*) addition strategies on a culture of *Litopenaeus vannamei* in biofloc technology (BFT) aquaculture system [J]. Aquaculture, 2023, 566: 739216.
- [17] Khalid F, Khalid A, Fu Y, et al. Potential of *Bacillus velezensis* as a probiotic in animal feed: A review [J]. Journal of microbiology (Seoul, Korea), 2021, 59(7): 627-633.
- [18] Zhao Y, Yuan L, Wan J, et al. Effects of potential probiotic *Bacillus cereus* EN25 on growth, immunity and disease resistance of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* [J]. Fish Shellfish

- Immunol, 2016, 49: 237-242.
- [19] Wang D, Li J, Zhu G, et al. Mechanism of the potential therapeutic candidate *Bacillus subtilis* BSXE-1601 against shrimp pathogenic vibrios and multifunctional metabolites biosynthetic capability of the strain as predicted by genome analysis[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 581802.
- [20] 李咏梅. 一株水产动物病原菌拮抗菌抑菌特性、培养条件优化及全基因组分析[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2021.
- Li Y M. Antibacterial Properties, Cultural Condition Optimization and Whole Genome Analysis of an Antagonistic Bacteria Against Aquatic Animal Pathogens[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2021.
- [21] 田相利, 李海东, 赵坤, 等. 一株蜡样芽孢杆菌及其复合菌制剂和制备方法: CN106591206[P]. 2017-03-08.
- Tian X L, Li H D, Zhao K, et al. *Bacillus cereus* and its composite preparation and preparation method: CN106591206 [P]. 2017-03-08.
- [22] 汪仕爽, 罗凯, 王明阳, 等. 屎肠球菌对凡纳对虾生长、非特异性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 *Penaeus vannamei* [J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2023, 53(1): 42-52.
- [23] 王苓, 田相利, 董双林, 等. 两株芽孢杆菌对凡纳对虾生长和血清非特异性免疫指标的影响研究[J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2017, 47(4): 14-21.
- Wang L, Tian X L, Dong S L, et al. Effects of two bacillus on growth performances and serum non-specific immunity of *Penaeus vannamei* [J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2017, 47(4): 14-21.
- [24] 孙艳, 刘飞, 宋晓玲, 等. 饲料中添加益生菌对凡纳对虾(*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 resistance of *Litopenaeus vannamei* [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012, 43(4): 845-851.
- [25] 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.
- [26] Duan Y, Zhang Y, Dong H, et al. Effects of dietary poly- $\beta$ -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.
- [27] Hoseinifar S H, Sun Y Z, Wang A, et al. Probiotics as means of diseases control in aquaculture, a review of current knowledge and future perspectives [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2429.
- [28] Ramesh D, Souissi S. Effects of potential probiotic *Bacillus subtilis* KADR1 and its subcellular components on immune responses and disease resistance in *Labeo rohita* [J]. *Aquaculture Research*, 2018, 49(1): 367-377.
- [29] Standen B T, Rodiles A, Peggs D L, et al. Modulation of the intestinal microbiota and morphology of tilapia, *Oreochromis niloticus*, following the application of a multi-species probiotic [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(20): 8403-8417.
- [30] Olmos J, Acosta M, Mendoza G, et al. *Bacillus subtilis*, an ideal probiotic bacterium to shrimp and fish aquaculture that increase feed digestibility, prevent microbial diseases, and avoid water pollution [J]. *Archives of Microbiology*, 2020, 202(3): 427-435.
- [31] Zokaeifar H, Babaei N, Saad C R, et al. Administration of *Bacillus subtilis* strains in the rearing water enhances the water quality, growth performance, immune response, and resistance against *Vibrio harveyi* infection in juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2014, 36(1): 68-74.
- [32] Chen L, Lv C, Li B, et al. Effects of *Bacillus velezensis* supplementation on the growth performance, immune responses, and intestine microbiota of *Litopenaeus vannamei* [J]. *Frontiers in Marine Science*, 2021, 8: 744281.
- [33] Wang J, Zhang D, Wang Y, et al. Probiotic effects of the *Bacillus velezensis* GY65 strain in the mandarin fish, *Siniperca chuatsi* [J]. *Aquaculture Reports*, 2021, 21: 100902.
- [34] Thurlow C M, Williams M A, Carrias A, et al. *Bacillus velezensis* AP193 exerts probiotic effects in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and reduces aquaculture pond eutrophication [J]. *Aquaculture*, 2019, 503: 347-356.
- [35] Wang J, Li B, Wang Y, et al. Influences of immersion bathing in *Bacillus velezensis* DY-6 on growth performance, non-specific immune enzyme activities and gut microbiota of *Apostichopus japonicus* [J]. *Journal of Oceanology and Limnology*, 2019, 37(4): 1449-1459.
- [36] Kuebutornye F K A, Tang J, Cai J, et al. In vivo assessment of the probiotic potentials of three host-associated *Bacillus* species on growth performance, health status and disease resistance of *Oreochromis niloticus* against *Streptococcus agalactiae* [J]. *Aquaculture*, 2020, 527: 735440.
- [37] Bhatnagar A, Mann D. The synergic effect of gut-derived probiotic *Bacillus cereus* SL1 and *Ocimum sanctum* on growth, intestinal histopathology, innate immunity, and expression of enzymatic antioxidant genes in fish, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton, 1822) [J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2023 (15): 1092-1101.
- [38] Laloo R, Moonsamy G, Ramchuran S, et al. Competitive exclusion as a mode of action of a novel *Bacillus cereus* aquaculture biological agent [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2010, 50(6): 563-570.
- [39] 邓凤如, 陈韵声, 范琳, 等. 动物用芽孢杆菌微生态制剂中蜡样芽孢杆菌的分离及安全性 [J]. *微生物学通报*, 2021, 48(10): 3714-3725.
- Deng F R, Chen Y S, Fan L, et al. Toxicity and antimicrobial resistance of *Bacillus cereus* group from microecological preparations for animal use [J]. *Microbiology China*, 2021, 48(10): 3714-3725.
- [40] Pang H, Wang G, Zhou S, et al. Survival and immune response

- of white shrimp *Litopenaeus vannamei* following single and concurrent infections with WSSV and *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 92: 712-718.
- [41] Chen T, Wong N K, Jiang X, et al. Nitric oxide as an antimicrobial molecule against *Vibrio harveyi* infection in the hepatopancreas of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 42(1): 114-120.
- [42] Sun C B, Wang G, Chan S F. Effects of artificial infection of *Litopenaeus vannamei* by *Micrococcus lysodeikticus* and WSSV on the activity of immunity related enzymes [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 46(2): 778-786.
- [43] Chen Y, Huang X, Wang J, et al. Effect of pure microcystin-LR on activity and transcript level of immune-related enzymes in the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. *Ecotoxicology*, 2017, 26(5): 702-710.
- [44] 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.
- [45] Tseng D Y, Ho P L, Huang S Y, et al. Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20 [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2009, 26(2): 339-344.
- [46] Zhu X, Zhang S, Zhou L, et al. Probiotic potential of *Bacillus velezensis*: Antimicrobial activity against non-O1 *Vibrio cholerae* and immune enhancement effects on *Macrobrachium nipponense* [J]. *Aquaculture*, 2021, 541: 736817.
- [47] Li F, Xiang J. Recent advances in researches on the innate immunity of shrimp in China [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2013, 39(1-2): 11-26.
- [48] Hoffmann J A, Reichhart J M. *Drosophila* innate immunity: An evolutionary perspective [J]. *Nature Immunology*, 2002, 3(2): 121-126.
- [49] Wang P H, Huang T, Zhang X, et al. Antiviral defense in shrimp: From innate immunity to viral infection [J]. *Antiviral Research*, 2014, 108: 129-141.
- [50] 刘文静, 杨丽诗, 李晓兰, 等. 斑节对虾 *Relish* 基因的克隆及免疫刺激对其 mRNA 表达水平的影响 [J]. *中国水产科学*, 2013, 20(1): 50-60.
- Liu W J, Yang L S, Li X L, et al. Cloning and mRNA expression analysis of *Relish* gene in *Panaeus monodon* following immune stimulation [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(1): 50-60.
- [51] 吴龙华, 梁化亮, 戈贤平, 等. 鱼类雷帕霉素靶蛋白信号通路生物学功能的研究进展 [J]. *动物营养学报*, 2021, 33(10): 5486-5496.
- Wu L H, Liang H L, Ge X P, et al. Research progress on biological function of target of rapamycin signaling pathway in fish [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2021, 33(10): 5486-5496.
- [52] Zhuang Y, Huang H, Liu X L, et al. Effect of bovine lactoferricin on the growth performance, digestive capacity, immune responses and disease resistance in Pacific white shrimp, *Panaeus vannamei* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022, 123: 282-289.
- [53] 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(4): 683-689.
- [54] Yu Y B, Choi J H, Kang J C, et al. Shrimp bacterial and parasitic disease listed in the OIE: A review [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2022, 166: 105545.
- [55] Kewcharoen W, Srisapoom P. Probiotic effects of *Bacillus* spp. from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) on water quality and shrimp growth, immune responses, and resistance to *Vibrio parahaemolyticus* (AHPND strains) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2019, 94: 175-189.
- [56] Balcázar J L, Rojas L 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.

## A Comparative Study on Effects of Three *Bacillus* Species on the Growth Performance, Non-Specific Immunity and Disease Resistance of *Penaeus vannamei*

Tian Xiangli<sup>1</sup>, Li Mingjing<sup>1</sup>, Guo Zeyang<sup>1</sup>, Luo Kai<sup>1</sup>, Li Changlin<sup>1</sup>, Ma Zhenhua<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Mariculture (Ocean University of China), Ministry of Education, Qingdao 266003, China; 2. Tropical Fisheries Research Institute of Sanya, Sanya 572018, China)

**Abstract:** An experiment was conducted to study the effect of adding three *Bacillus* species to feed on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of *Penaeus vannamei*. Shrimp was fed with the basal diet supplemented with *Bacillus subtilis* BSXE-1601 (BD group), *B. cereus* BCXE-01 (CD group) and *B. velezensis* 26.3 (BV group) at a density of  $1 \times 10^9$  CFU  $\cdot$  kg<sup>-1</sup> in the basal diet. The basal diet without bacterial additives was used as the control group. The experiment lasted for 6 weeks. After the feeding trial, a 14 d *Vibrio parahaemolyticus* challenge experiment was conducted. Results showed that the final weight, specific growth rate and feed efficiency of shrimp in BD and BV were significantly improved as compared to the control ( $P < 0.05$ ), especially in BV. The activities of peroxidase (POD), superoxide dismutase (SOD), acid phosphatase (ACP) and phenol oxidase (PO) in the serum of shrimp of three treatment groups were significantly higher than those of the control group ( $P < 0.05$ ). The activities of ACP, AKP and SOD in the serum of BV were significantly higher than those of BD ( $P < 0.05$ ). Compared with the control, the relative expression level of *proPO*, *LZM*, *SOD*, *HSP70*, *Imd*, *Toll*, *Relish*, *TOR*, *4E-BP*, *eIF4E1 $\alpha$*  and *eIF4E2* in the hepatopancreas of shrimp of BD was significantly higher than that of the control ( $P < 0.05$ ). The relative expression level of *proPO*, *LGBP*, *Imd*, *Toll*, *4E-BP* and *eIF4E2* in the hepatopancreas of shrimp of CD group was significantly higher than that of the control ( $P < 0.05$ ). The relative expression level of *proPO*, *LZM*, *SOD*, *LGBP*, *HSP70*, *Imd*, *Toll*, *TOR*, *4E-BP* and *eIF4E1 $\alpha$*  in BV was significantly higher than that of the control ( $P < 0.05$ ). The relative expression level of *SOD*, *LGBP*, *Toll* and *4E-BP* in BV was significantly higher than that of CD and BD ( $P < 0.05$ ). The challenge test of *V. parahaemolyticus* revealed that the cumulative mortality of shrimp in three treatment groups was significantly lower than that in the control ( $P < 0.05$ ). In conclusion, the effects of adding *B. subtilis* BSXE-1601 and *B. velezensis* 26.3 in the feed markedly enhanced the growth performance of *P. vannamei*. Two *Bacillus* species elicited a superior immune response compared to *B. cereus* BCXE-01. Three *Bacillus* species significantly enhanced the resistance against *V. parahaemolyticus* of *P. vannamei*.

**Key words:** growth; non-specific immunity; disease resistance; *Vibrio parahaemolyticus*; *Bacillus*; *Penaeus vannamei*

责任编辑 朱宝象