

Hu X D, Tong Y M, Huang Y L, et al. Application of *Bacillus subtilis* to improve growth, immunity, and resistance to *Vibrio parahaemolyticus* infection in *Litopenaeus vannamei* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2025, 49(11): 102517. [胡效东, 童艳梅, 黄玉柳, 等. 枯草芽孢杆菌对南美白对虾生长、免疫及抗副溶血弧菌感染的影响 [J]. 水生生物学报, 2025, 49(11): 102517.]

## 枯草芽孢杆菌对南美白对虾生长、免疫及抗副溶血弧菌感染的影响

胡效东<sup>1</sup> 童艳梅<sup>1</sup> 黄玉柳<sup>2</sup> 张铭林<sup>1</sup> 李强勇<sup>2,3</sup> 杨春玲<sup>2</sup> 彭敏<sup>2</sup> 陈田聪<sup>2</sup>  
洪传远<sup>2</sup> 赵永贞<sup>2,3</sup> 胡庭俊<sup>1</sup>

(1. 广西大学动物科学技术学院, 南宁 530004; 2. 广西壮族自治区水产科学研究院广西水产遗传育种与健康养殖重点实验室, 南宁 530021; 3. 广西虾类种业技术创新中心, 南宁 530021)

**摘要:** 为综合评估饲料中添加枯草芽孢杆菌制剂(*Bacillus subtilis*, BS)对南美白对虾生长、免疫及抗副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)感染的作用, 研究将4500尾南美白对虾[(0.95±0.25) g]随机均分为5个组, 分别设置BS添加量为0 (对照组)、0.2%、0.4%、0.8%的实验组及0.05%三黄散(SH)药物对照组, 并进行42d养殖实验及48h副溶血弧菌感染实验。结果显示, 饲料中添加0.2%、0.4%、0.8%BS或0.05%SH均能显著提高南美白对虾的体长、体重、增长率和增重率, 并提高饵料系数。与对照组相比, 0.4%BS组对虾血淋巴内天冬氨酸转移酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)活性显著降低, 0.8%BS组对虾血淋巴及肝胰腺中超氧化物歧化酶(SOD)含量及总抗氧化能力(T-AOC)显著提高; 0.05%SH组对虾血淋巴酸性磷酸酶(ACP)活性、血淋巴T-AOC及肝胰腺SOD显著提高, 血淋巴ALT活性显著降低。此外, 混饲喂养BS或SH能显著提高对虾感染副溶血弧菌后Hsp70、LGBP、 $\beta$ -GBP-HDL、Crustin、Lysozyme等肝胰腺免疫相关因子的表达量, 并提高对虾感染副溶血弧菌后的存活率。其中, 0.2%、0.4%、0.8%BS组和0.05%SH组将存活率从43.3%分别显著提升至66.7%、76.7%、73.3%和80.0%。在饲料中添加适量BS能够提高南美白对虾的生长性能及抗氧化能力, 并促进肝胰腺中免疫相关因子的表达, 增强免疫力, 进而提升对虾抵抗副溶血弧菌感染的能力。

**关键词:** 枯草芽孢杆菌; 副溶血弧菌; 非特异性免疫; 抗氧化; 南美白对虾

中图分类号: S941.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2025)11-102517-10

doi: 10.3724/1000-3207.2025.2025.0050 CSTR: 32229.14.SSSWXB.2025.0050



南美白对虾(*Litopenaeus vannamei*)原产于太平洋西海岸至墨西哥湾中部一带, 具有个体大、肉质鲜美、抗病力强、生长迅速等特点, 是目前世界上养殖规模最大、产量最高的对虾品种, 总产量达410万吨, 约占全球对虾产量的80%以上<sup>[1-3]</sup>。同时, 南美白对虾也是我国重要的水产养殖虾类之一。2023年的数据显示, 我国南美白对虾总产量达到230万吨以上, 在甲壳类动物养殖产量中位列第一<sup>[4]</sup>。然而, 随着养殖规模的不断扩大, 对虾养殖的病害问题日益严重。其中, 副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)感染所引起的急性肝胰腺坏死病具有高致病性和高致死率, 在全

球范围内给对虾的养殖发展造成巨大的经济损失<sup>[5]</sup>。使用抗生素是防治副溶血弧菌的有效方法, 但过量使用会导致抗生素残留和耐药性等问题, 给人类健康和环境安全带来严重的危害。因此寻找一种绿色、安全、有效的替抗产品至关重要。

目前, 多种益生菌被广泛应用于水产养殖业中以替代抗生素的使用, 在促进水产动物生长、增强免疫力等方面发挥着重要作用。其中, 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是可用于替抗的优势益生菌之一。Wang等<sup>[6]</sup>发现, 饲喂含枯草芽孢杆菌的饲料能够显著提高幼年斑节对虾肠道中蛋白酶、淀粉

收稿日期: 2025-02-19; 修订日期: 2025-04-17

基金项目: 国家虾蟹产业体系(CARS-48-02)资助 [Supported by National Shrimp and Crab Industry System (CARS-48-02)]

作者简介: 胡效东(2000—), 男, 硕士研究生; 主要从事兽药创制研究。E-mail: [hxd991104@163.com](mailto:hxd991104@163.com)

通信作者: 胡庭俊(1965—), 男, 教授, 博士生导师; 主要从事中药免疫药理学研究。E-mail: [Tingjunhu@126.com](mailto:Tingjunhu@126.com)

酶、脂肪酶和纤维素酶的活性,促进消化吸收、促进生长发育。金鱼饲喂含枯草芽孢杆菌制剂的饵料后,提高了免疫相关基因的表达,进而有效调节血清指数,并提高免疫蛋白活性<sup>[7]</sup>。Kewcharoen等<sup>[8]</sup>在饲料中添加枯草芽孢杆菌饲喂南美白对虾,发现南美白对虾肝胰腺和血细胞中ALF、LSZ、SOD等基因的表达水平上升,从而提高血淋巴细胞的清除效率和吞噬活性。此外,已有研究表明,枯草芽孢杆菌菌株能够产生多种抗菌活性物质,对水中的弧菌、异养菌等有害致病菌的生长繁殖具有显著的抑制作用<sup>[9]</sup>。在实验室前期研究中也发现,向养殖水体中施洒枯草芽孢杆菌制剂,能够显著降低南美白对虾肠道中的弧菌丰度,抑制水体中弧菌的生长。然而,目前关于枯草芽孢杆菌对对虾作用效果的研究多局限于单一或少数作用层面的考察,尚缺乏从添加剂量、生长性能、抗氧化能力、非特异性免疫调控、抗副溶血弧菌感染能力与其他传统药物的效果对比等多个维度的综合评价;且已有的研究中对虾个体较少,每个重复组的个体数约为50—130尾,群体个数较小,使用的养殖塑料桶也难以还原实际养殖中的环境,研究结果难以应用于实际生产中<sup>[6-8]</sup>。

因此,本研究采用贴近实际养殖环境的水泥池,扩大实验个体规模,从添加剂量、生长性能、抗氧化能力、非特异性免疫调控、抗副溶血弧菌感染能力与其他传统药物的效果对比等多个维度对枯草芽孢杆菌对南美白对虾的作用效果进行了综合评估。旨在全面评估枯草芽孢杆菌在对虾养殖产业的应用前景,为促进对虾养殖产业可持续发展提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及材料

南美白对虾幼虾4500尾,购于广西东兴鸿生实业有限公司,初始体重( $0.95 \pm 0.25$ ) g,初始体长为( $5.07 \pm 0.45$ ) cm。经聚合酶链式反应病原检测,无WSSV、AHPNS、IHHNV和EHP等病原感染。枯草芽孢杆菌制剂,购自广西农保生物有限公司,生产批号20220221。三黄散购自山西首爱动物药业有限公司,生产批号20170502。

### 1.2 实验仪器

多功能酶标仪购自瑞士PerkinElmer公司;实时定量PCR仪(型号CRX96)、梯度PCR仪(型号BIO-RAD T100)购自美国BIO-RAD公司;UV-1750型紫外可见分光光度计购自日本岛津公司;HH-S2数显恒温水浴锅购自常州市金坛医疗器械厂。

### 1.3 养殖试验设计

将南美白对虾随机分为5组,分别为空白对照组、0.05%三黄散药物对照(0.05% SH)组和0.2%枯草芽孢杆菌制剂(0.2% BS)组、0.4%枯草芽孢杆菌制剂(0.4% BS)组、0.8%枯草芽孢杆菌制剂(0.8% BS)组,每组900尾。每组设置3个重复组,每个重复组300尾,饲养于1 m<sup>3</sup>的水泥池中。除空白对照组投喂基础饲料外,其余各组分别投喂含相应浓度药物的饲料,每日投喂3次,每次投喂的饲料量为对虾总体重的3%,饲喂前打捞粪便和废弃物,喂食后1h打捞残饵,并根据剩料情况及时调整下次饲料投喂量,以保证对虾的生长需求。连续饲喂42d。在实验期间定期检测并记录水体的氨氮含量、亚硝酸盐含量、溶解氧、温度及pH的变化,及时进行水质调控,实验期间DO $\geq 4$  mg/L,水温29—31℃,盐度17‰,每3天换水1次,每次换水量为总水量的1/3。

### 1.4 生长性能测定

在42d养殖实验结束后,分别测量各组南美白对虾的体长、体重,计算增重率、增长率及饵料系数。增重率、增长率、饵料系数计算公式:

$$\text{增重率}(\%) = (\text{终末体重} - \text{初始体重}) / \text{初始体重} \times 100$$

$$\text{增长率}(\%) = (\text{终末体长} - \text{初始体长}) / \text{初始体长} \times 100$$

$$\text{饵料系数} = \text{采食量} / (\text{终末体重} - \text{初始体重})$$

### 1.5 免疫及抗氧化相关酶活性测定

在养殖实验结束后,每组采集对虾的血淋巴和肝胰腺各22份,液氮速冻后保存于-80℃备用。血淋巴中酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)、谷丙转氨酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、超氧化物歧化酶(SOD)和总抗氧化能力(T-AOC)的酶活性和肝胰腺组织中的SOD、T-AOC的活性均严格按照试剂盒(购自南京建成生物工程研究所)说明书进行测定。其中肝胰腺样本按组织重与生理盐水体积1:9比例进行混合,并在冰浴下进行机械匀浆,在4℃下12000 r/min离心10min,然后取上清液进行测定。

### 1.6 菌液制备

取出冻存的副溶血弧菌菌种,置于100 mL的Luria肉汤中(LB培养基, Sangon Biotech)复苏,180 r/min,37℃培养24h后,8000 r/min,4℃离心10min,去除上清液,加入适量无菌预冷生理盐水重悬,采用麦氏比浊法,在600 nm波长处测定其分光光度值,计算细菌浓度,再将细菌液重新悬浮在无菌预冷生理盐水中,通过连续稀释获得梯度剂量为10<sup>6</sup>、10<sup>7</sup>、10<sup>8</sup>、10<sup>9</sup>和10<sup>10</sup> CFU/mL的菌悬液。

## 1.7 副溶血弧菌感染实验设计

**感染预实验** 以肌肉注射副溶血弧菌的方式评估对虾的抗弧菌能力。取540尾空白对照组对虾,随机分为 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 和 $10^{10}$  CFU/mL组和生理盐水对照组;每个组3个平行,每个平行30尾对虾,分别注射对应浓度的细菌液0.1 mL/尾,生理盐水对照组注射等量的无菌生理盐水。每6h统计1次各处理组的死亡数,连续统计至48h。根据寇氏法测定副溶血弧菌对南美白对虾48h的 $LC_{50}$ ,计算公式:

$$\lg LC_{50} = 1/2 \sum (X_i + X_{i+1})(P_{i+1} - P_i)$$

$$S_{x50} = i \times [(\sum P - \sum P^2) / (n-1)] \times 0.5$$

$$LC_{50} \text{的可信限} = \lg^{-1}(\lg LC_{50} \pm 1.96 \times S_{x50})$$

式中,  $S_{x50}$ 为 $\lg LC_{50}$ 的标准误;  $X_i$ 为浓度对数;  $P_i$ 为死亡率,用小数表示;  $i$ 为相邻两组剂量对数值之差;  $n$ 为每组动物数。

**挑战性实验** 在42d给药结束后,分别从0.05%SH组、0.2%BS组、0.4%BS组和0.8%BS组中随机挑选90尾南美白对虾,分别肌肉注射浓度为 $LC_{50}$ 的副溶血弧菌,然后移至20 L水族箱中持续饲养观察48h;空白对照组注射等量的无菌生理盐水,各组的饲养条件一致。分别于攻毒后0、6h、12h、24h和48h统计各实验组南美白对虾的死亡情况,计算存活率,并采集各组存活对虾的肝胰腺组织液氮速冻后保存于 $-80^\circ\text{C}$ 备用。存活率计算方式:

$$\text{存活率}(\%) = \text{终末成活数量} / \text{初始数量} \times 100$$

## 1.8 肝胰腺免疫相关基因表达水平测定

采用挑战性实验结束后采集得到的各组肝胰腺样本,使用TRIzol试剂提取总RNA,并测定其浓度和纯度,然后将获得的总RNA按照SPARKscript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒(购自山东思科捷生物技术有限公司)进行反转录,得到cDNA片段,使用2×SYBR Green qPCR Mix试剂盒(购自山东思科捷生物技术有限公司)检测相关基因的

mRNA表达水平,所用引物由南宁捷尼斯生物科技有限公司合成,引物序列如表1所示。

## 1.9 数据分析

采用SPSS 23.0对测得数据进行分析,试验所得数据用平均数±标准误(mean±SD)表示,经单因素方差分析(One-way ANOVA)后,进行Duncan多重比较,肩标不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ );肩标不同大写字母表示差异极显著( $P < 0.01$ );肩标相同字母或不标表示没有差异性( $P > 0.05$ )。

## 2 结果

### 2.1 生长性能

各组南美白对虾生长性能情况见表2。在饲喂实验42d后,0.2%BS组的体长、体重、增长率、增重率均显著高于空白对照组( $P < 0.05$ ),0.05%SH、0.4%BS和0.8%BS组的体长、体重、增长率、增重率均极显著高于空白对照组( $P < 0.01$ )。此外,添加SH和各剂量的BS均能显著降低对虾的饵料系数( $P < 0.05$ );其中,在BS组中,0.4%和0.8%的BS添加量的对虾饵料系数优于0.2%添加量。

### 2.2 免疫及抗氧化相关酶活性

为了探究枯草芽孢杆菌制剂对南美白对虾非特异性免疫能力的影响,测定了不同枯草芽孢杆菌

表1 基因引物序列

| Tab. 1 The sequence of gene primers |                                                                    |                    |
|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|--------------------|
| 基因<br>Gene                          | 引物序列<br>Primer sequence (5'—3')                                    | 登录号<br>Gene number |
| $\beta$ -actin                      | GCGAGAAATCGTTCGTGACA<br>GGTCATCTCCTGCTCGAAGT                       | XM_027364954.1     |
| Hsp70                               | CCTCCAGGACTTCTT<br>GGTCACGTCCAACAGCAAC                             | XM_027369405.1     |
| $\beta$ -GBP-<br>HDL                | CGAGAACGGACAAGAAGTGG<br>AGG<br>ATCGACGAACACGCAGGGAA<br>TG          | XM_027365374.1     |
| Crustin                             | ACGAGGCAACCATGAAGG<br>AACCACCACCAACACCTAC                          | XM_027352254.1     |
| LGBP                                | CATGTCCAACCTCGCTTTCAG<br>A                                         | XM_027358431.1     |
| Lysozyme                            | ATCACCGCGTGCCATCTT<br>GGACTACGGCATCTTCGAGA<br>ATCGGACATCAGATCGGAAC | XM_027352840.1     |

表2 枯草芽孢杆菌制剂对南美白对虾生长性能的影响

Tab. 2 Changes in growth performance of *Litopenaeus vannamei* (mean±SE, n=30)

| 组别Group                   | 空白对照Control             | 0.05% SH                | 0.2% BS                 | 0.4% BS                  | 0.8% BS                  |
|---------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 体长Body length (cm)        | 7.72±0.09 <sup>b</sup>  | 8.43±0.13 <sup>a</sup>  | 8.13±0.12 <sup>a</sup>  | 8.36±0.11 <sup>a</sup>   | 8.38±0.14 <sup>a</sup>   |
| 体重Bdoy weight (g)         | 2.54±0.10 <sup>c</sup>  | 3.48±0.19 <sup>a</sup>  | 3.00±0.13 <sup>b</sup>  | 3.13±0.15 <sup>ab</sup>  | 3.21±0.16 <sup>ab</sup>  |
| 增长率Length gain rate (%)   | 52.3±1.7 <sup>b</sup>   | 66.3±2.6 <sup>a</sup>   | 60.4±2.4 <sup>a</sup>   | 64.9±2.1 <sup>a</sup>    | 65.3±2.7 <sup>a</sup>    |
| 增重率Weight gain rate (%)   | 167.7±10.9 <sup>c</sup> | 266.3±20.3 <sup>a</sup> | 215.3±13.9 <sup>b</sup> | 229.4±15.3 <sup>ab</sup> | 238.2±17.3 <sup>ab</sup> |
| 饵料系数Feed conversion ratio | 3.78±0.64 <sup>a</sup>  | 2.38±0.29 <sup>b</sup>  | 2.93±0.40 <sup>c</sup>  | 2.76±0.37 <sup>d</sup>   | 2.66±0.35 <sup>bed</sup> |

注:同行数据肩标不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ );下同

Note: Different superscript lowercase letters in the same row indicate significant differences ( $P < 0.05$ ); the same applies below

水平处理后对虾的免疫酶和抗氧化酶活性(图 1)。结果表明, 0.05%SH在饲料中的添加能够显著增强虾体ACP活性, 并降低ALT水平( $P<0.05$ ), 且显著提高血淋巴T-AOC及肝胰腺SOD( $P<0.05$ )。在投喂BS后, 南美白对虾血淋巴中的ACP和AKP活性与空白对照组相比均没有显著差异( $P>0.05$ )。与空白对照组相比, 饲喂不同水平的枯草芽孢杆菌均能极显著降低南美白对虾血淋巴ALT活性( $P<0.01$ ), 极显著提高T-AOC活性( $P<0.01$ )。当饲喂剂量为0.4%

时, 对虾血淋巴中的AST活性显著低于空白对照组( $P<0.05$ )。饲喂剂量为0.8%时, 对虾血淋巴中的SOD活性显著高于空白对照组( $P<0.05$ )。

在肝胰腺组织中, 0.4%BS组和0.8%BS组的SOD活性均极显著高于空白对照组( $P<0.01$ )。空白对照组的T-AOC活性与0.05%SH组、0.2%BS组、0.4%BS组相比无显著性差异( $P>0.05$ ), 但极显著低于0.8%BS组( $P<0.01$ )。综上可知, 饲料中添加0.4%、0.8%BS或0.05%SH能显著改善南美白对虾的免疫

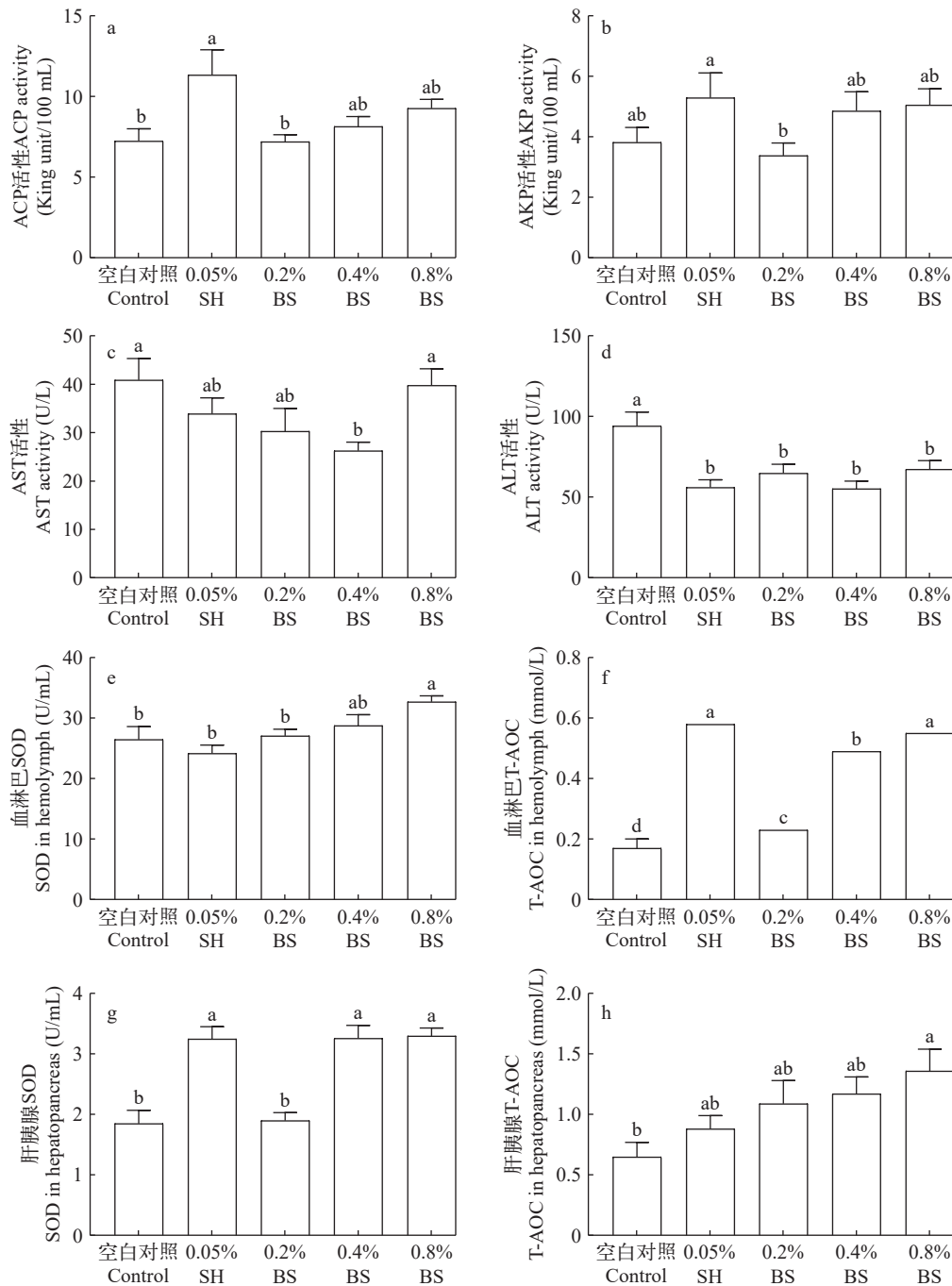


图 1 南美白对虾免疫及抗氧化活性

Fig. 1 Immune and antioxidant activities of *Litopenaeus vannamei* (mean±SE, n=22)

及抗氧化能力。

### 2.3 副溶血弧菌感染实验

南美白对虾经肌肉注射不同剂量的副溶血弧菌,其死亡情况如表 3 所示,经寇氏法测得南美白对虾的感染副溶血弧菌的 48h 的  $LC_{50}$  为  $10^{8.2}$  CFU/mL,  $LC_{50}$  的可信限=1.094—1.095,  $Sx_{50}$ =0.003。枯草芽孢杆菌制剂对南美白对虾感染副溶血弧菌的预防效果如图 2 所示。其中,在副溶血弧菌感染 48h 后,0.2%、0.4%、0.8%BS 组及 0.05%SH 组南美白对虾的存活率均显著高于空白对照组,分别将存活率提升至 66.7%、76.7%、73.3%和 80.0%。

### 2.4 肝胰腺免疫相关基因表达水平

如图 3a 所示,在副溶血弧菌感染后,0.05%SH 组对虾的 *Hsp70* 表达量呈先上升后下降再上升的趋势。而感染后 12—48h,0.2%BS 组、0.4%BS 组和 0.8%BS 组对虾的 *Hsp70* 的表达量均极显著高于空白对照组( $P<0.01$ ),其中 0.2%BS 组的表达量均极显著高于其余各组( $P<0.01$ )。

图 3b 显示,从开始感染直至感染后 48h,0.05%SH 组对虾的 *LGBP* 表达量均始终显著高于对照组。副溶血弧菌感染的初始时刻,0.8%BS 组对虾的 *LGBP* 表达量极显著高于空白对照组( $P<0.01$ )。感染后 6—24h,BS 各剂量处理组的 *LGBP* 表达量与空白对照组相比极显著增加( $P<0.01$ )。其中在攻毒 0—24h,0.8%BS 剂量组的表达量最高,并在 6h 时达到峰值,极显著高于 0.2%BS 组、0.4%BS 组、0.05%SH 组和空白对照组( $P<0.01$ ),48h 时表达量最低,与空白对照组无显著性差异( $P>0.05$ )。由图 3c 知,副溶血弧菌侵入南美白对虾机体后,对虾肝胰腺中的  $\beta$ -*GBP-HDL* 基因相对表达量呈先上升后下降趋势,12h 时表达量最高。0.05%SH 组同样呈与对照组相同的趋势,且表达量变化的浮动更大,在 12h 时显著高于对照组。6h 时,0.2%和 0.4%BS 组的  $\beta$ -*GBP-HDL* 表达量极显著高于空白对照组( $P<0.01$ )。12h 和 24h 时,BS 各剂量处理组的  $\beta$ -*GBP-HDL* 表达量均显著高于空白对照组( $P<0.05$ )。

在副溶血弧菌感染 48h 内,对虾肝胰腺中的 *Crustin* 表达量呈时间依赖性上升(图 3d)。感染后 12h,0.05%SH 组对虾的 *Crustin* 表达量与对照组无显著差异,但在感染后 24h、48h 时显著高于对照组。6h 时 0.2%BS 组的 *Crustin* 表达量极显著高于空白对照组( $P<0.01$ )。随着感染时间的增加,BS 各剂量处理组的 *Crustin* 表达量均明显上升,与空白对照组相比具有极显著差异( $P<0.01$ )。其中,48h 时,0.4%BS 组的表达量达到最大值,极显著高于 0.2%BS 组和 0.8%BS 组( $P<0.01$ )。由图 3e 可知,对虾感染副溶血弧菌的前 12h,0.05%SH 组对虾的 *Lysozyme* 表达量与对照组相当,在 12h 后则显著高于对照组。在感染开始时,0.2%BS 组的 *Lysozyme* 表达量上调,感染 6h 时 0.4%BS 组的表达量上调,两者与空白对照组相比均有极显著差异( $P<0.01$ )。在 12h 和 24h 时,0.2%和 0.8%BS 处理组的 *Lysozyme* 表达量与空白组相比极显著上升( $P<0.01$ )。在 48h 时,各 BS 处理组的表达量开始呈下降趋势,但仍显著高于空白对照组( $P<0.05$ )。

以上结果表明,在南美白对虾饲料中添加 BS、SH 能够提高肝胰腺免疫相关基因表达水平,其中 BS 添加剂量为 0.4%和 0.8%时效果更佳。

## 3 讨论

### 3.1 枯草芽孢杆菌对南美白对虾生长性能的影响

枯草芽孢杆菌具有抑制致病菌生长繁殖、提高宿主免疫力等多种生物活性,且使用后对环境无污染、无残留。本研究发现,在饲料中添加 0.2%、0.4%和 0.8%BS 能够显著提高南美白对虾的增重率、增长率等生长性能指标,并降低饵料系数。Alagarasu 等<sup>[10]</sup>的研究证实,通过膳食补充枯草芽孢杆菌的方式,能够显著提高南美白对虾的体重、增重、比生长率、平均日生长量和存活率,这一结果与本研究的结果一致;同样,Shen 等<sup>[11]</sup>的研究也表明,在为期 40d 的饲养周期内,饲喂含枯草芽孢杆菌的饲料时,南美白对虾的生长速度显著优于饲喂普通饲

表 3 肌肉注射感染副溶血弧菌南美白对虾 48h 的  $LC_{50}$

Tab. 3  $LC_{50}$  of *Vibrio parahaemolyticus*-infected *Litopenaeus vannamei* after 48h intramuscular injection

| 感染方式<br>Mode of infection | 菌液浓度<br>Concentration of<br>bacterium (CFU/mL) | 对虾数(尾)<br>Number of shrimp | 6h 死亡数(尾)<br>Number of deaths<br>after 6h | 12h 死亡数(尾)<br>Number of deaths<br>after 12h | 24h 死亡数(尾)<br>Number of deaths<br>after 24h | 48h 死亡数(尾)<br>Number of deaths<br>after 48h |
|---------------------------|------------------------------------------------|----------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|
| 肌注 Intramuscular          | 生理盐水 Normal saline                             | 90                         | 0                                         | 0                                           | 0                                           | 0                                           |
| 肌注 Intramuscular          | $10^6$                                         | 90                         | 0                                         | 0                                           | 0                                           | 0                                           |
| 肌注 Intramuscular          | $10^7$                                         | 90                         | 10                                        | 3                                           | 1                                           | 0                                           |
| 肌注 Intramuscular          | $10^8$                                         | 90                         | 18                                        | 9                                           | 0                                           | 3                                           |
| 肌注 Intramuscular          | $10^9$                                         | 90                         | 33                                        | 26                                          | 18                                          | 9                                           |
| 肌注 Intramuscular          | $10^{10}$                                      | 90                         | 41                                        | 32                                          | 12                                          | -                                           |

料时的生长速度; 该观点还在Eissa等<sup>[12]</sup>的研究中得到验证。这些研究与本研究得出的结果相近, 进一步表明BS在饲料中的添加对南美白对虾的生长有利。

### 3.2 枯草芽孢杆菌对南美白对虾抗氧化能力及肝胰腺功能的影响

南美白对虾属于无脊椎动物, 其主要依赖非特异性免疫系统发挥免疫功能。SOD是高效的自由基清除酶, 通过特异性转化超氧化物以维护细胞稳态<sup>[13]</sup>。T-AOC能够直接体现机体内自由基代谢的状态, 是评估机体抗氧化系统功能的综合性指标<sup>[14]</sup>。

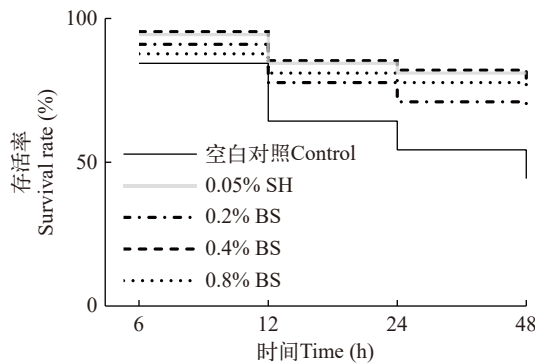


图2 枯草芽孢杆菌制剂对南美白对虾副溶血弧菌感染的预防效果( $n=30$ )

Fig. 2 Preventive effect of *Bacillus subtilis* preparation on *Vibrio parahaemolyticus* infection in *Litopenaeus vannamei* ( $n=30$ )

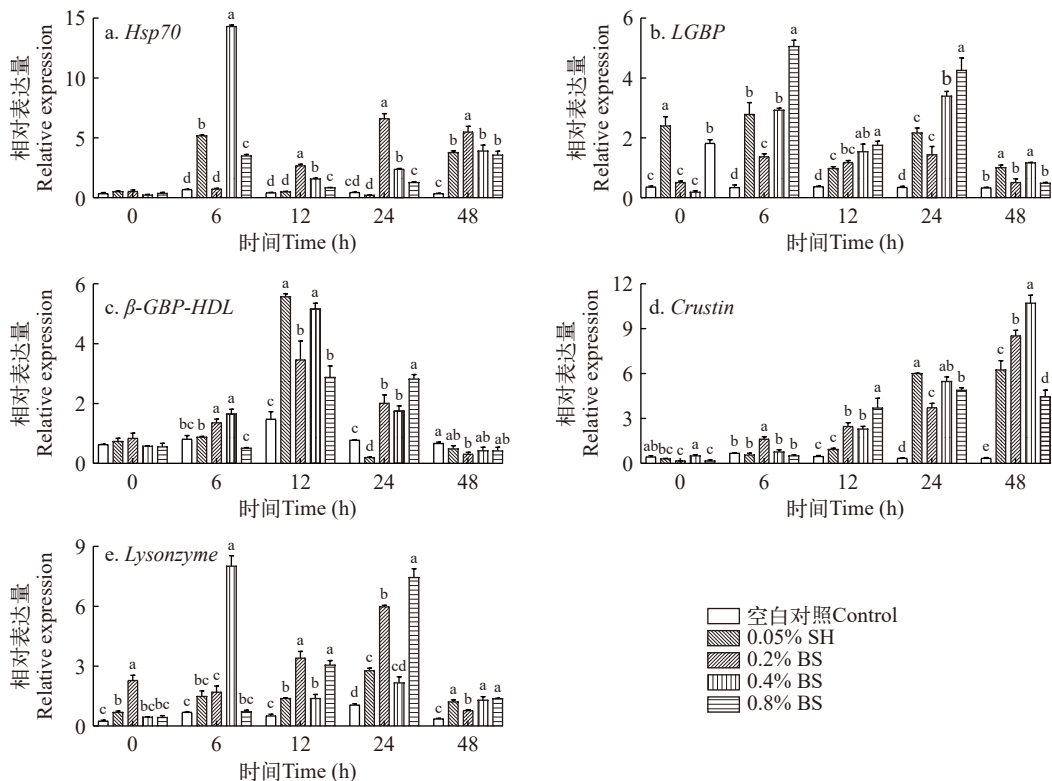


图3 攻毒阶段南美白对虾肝胰腺中免疫因子的相对表达量

Fig. 3 Relative expression of immune factors in the hepatopancreas of *Litopenaeus vannamei* during the attack phase (mean±SE)

在病原体感染时, 对虾体内活性氧的积累可介导氧化应激, 导致蛋白质、DNA受损; 由SOD、谷胱甘肽(GSH)等构成的抗氧化系统可清除活性氧, 缓解机体氧化损伤, 进而提高感染的存活率<sup>[15, 16]</sup>。本研究发现, 在南美白对虾的饲料中添加0.8%的BS能显著提高对虾血淋巴和肝胰腺中SOD和T-AOC的水平, 表明BS可能通过增强SOD的活性和T-AOC, 提升南美白对虾对副溶血弧菌感染的抵抗力。Luo等<sup>[17]</sup>在先前的研究中发现, 在日粮中添加枯草芽孢杆菌能够显著提高南美白对虾的SOD活性, 且对副溶血弧菌的抗病性增强。Hao等<sup>[18]</sup>的研究也表明, 饲喂含适量双壳气单胞菌的日粮能提高对虾的SOD活性, 并降低对虾感染哈维氏弧菌后的死亡率。以上研究均与本研究结果相符, 混饲BS能够增强虾体抗氧化系统功能, 进而提高抗副溶血弧菌感染能力的这一观点得到进一步验证。

谷草转氨酶(AST)和谷丙转氨酶(ALT)在血淋巴中的活性水平可作为评估虾肝胰腺功能状态的重要指标, 当肝胰腺受到损伤时, AST和ALT在血淋巴中的活性升高<sup>[19-21]</sup>。Abdelsamad等<sup>[22]</sup>的研究表明, 饲料中添加贝莱斯芽孢杆菌能够降低AST和ALT在对虾血淋巴中的活性, 肝胰腺功能得到改善。类似地, 于道德等<sup>[23]</sup>的研究也表明, 饲料中添加枯草芽孢杆菌Hsp05后, 对虾血淋巴中AST和ALT

的活性呈显著降低趋势。这些研究结果与本研究  
中0.4%BS的应用效果一致,表明饲料中添加0.4%  
BS能够通过保护肝胰腺以提高非特异性免疫能力  
和抗病能力。

### 3.3 枯草芽孢杆菌对肝胰腺免疫相关基因表达水平的影响

肝胰腺作为对虾重要的免疫器官之一,其相关  
基因的表达水平可作为评估对虾的健康状况及免  
疫应答水平的重要依据,如热休克蛋白70 (Hsp70)、  
脂多糖- $\beta$ -1, 3-葡聚糖结合蛋白(LGBP)和 $\beta$ -1, 3-葡聚  
糖结合蛋白-脂蛋白( $\beta$ -GBP-HDL)等<sup>[24—27]</sup>。研究表  
明,Hsp70是一种分子伴侣,对生物体内蛋白质稳态  
的维持、组织修复等具有重要作用。当Hsp70释放  
至细胞外时,可激活酚氧化酶原(Propo)系统和谷氨  
酰胺转氨酶的表达,增强虾体的非特异性免疫能力,  
以抵抗细菌、病毒等多种病原体的侵入<sup>[28—31]</sup>。脂  
多糖- $\beta$ -1, 3-葡聚糖结合蛋白(LGBP)和 $\beta$ -1, 3-葡聚  
糖结合蛋白-脂蛋白( $\beta$ -GBP-HDL)主要参与激活Propo  
系统,促进虾体合成大量抗菌肽和黑色素等物质,  
并增强血淋巴细胞的凝结、吞噬能力,进而提高  
机体对多种病原体的防御能力<sup>[32—34]</sup>。同时,Hsp70  
可作为LGBP的配体,与LGBP结合后促进Propo系  
统的激活,进而调节虾的先天免疫系统<sup>[35, 36]</sup>。本研  
究发现,在感染副溶血弧菌后,各剂量BS饲喂的南  
美白对虾存活率显著提升( $P < 0.05$ ),且Hsp70、LGBP  
和 $\beta$ -GBP-HDL表达量分别在多个时间段显著上升  
( $P < 0.05$ )。这表明饲料中添加适量BS能提高肝胰  
腺中Hsp70、LGBP和 $\beta$ -GBP-HDL基因的表达水平,  
并可能通过激活Propo系统,生成大量抗菌肽和黑  
色素等抗菌物质,提高血淋巴细胞的吞噬率,进而  
显著提高对虾的非特异性免疫能力和抗弧菌能力。  
Luo等<sup>[17]</sup>探究了在饲料中补充枯草芽孢杆菌对  
南美白对虾免疫力的影响,发现LGBP、Hsp70的表  
达量显著提高,这与本研究的结果相一致。王春迪  
等<sup>[24]</sup>也发现,在养殖水体中添加蜡样芽孢杆菌能刺  
激对虾Hsp70、LGBP和 $\beta$ -GBP-HDL等免疫相关基  
因的表达上调,机体抗感染的能力也随之提高,这  
也进一步验证了本研究的可靠性。

Crustin和溶菌酶(Lysozyme)是甲壳动物体内  
两种重要的抗菌肽<sup>[37]</sup>。Crustin兼具抗微生物、抑  
制蛋白酶的活性、促进吞噬作用和创伤愈合的功  
能,其含量的提升能够增强虾体对病原体感染的抵  
抗力<sup>[38]</sup>; Lysozyme能够催化细菌肽聚糖特定糖苷键  
的裂解,对细菌感染起到直接的防御作用<sup>[39]</sup>。在  
Duan等<sup>[40]</sup>的研究中,饲料中添加适宜浓度的丁酸梭  
菌可增强Crustin和Lysozyme基因的表达,提升南美

白对虾的非特异性免疫能力。Huang等<sup>[41]</sup>研究显  
示,副干酪乳杆菌和长双歧杆菌联合添加至南美白  
对虾饲料,可显著提高Crustin和Lysozyme基因的表  
达水平,提升副溶血弧菌感染后的存活率。这些研  
究均表明Crustin和Lysozyme基因的表达水平与对  
虾的抗弧菌能力具有正向相关。本试验发现,在肌  
注副溶血弧菌后,BS组对虾的Crustin基因表达显著  
高于空白对照组,并在肌注后的12—48h呈逐渐上  
升趋势;相似地,经副溶血弧菌攻毒12h后,BS组在  
肝胰腺中的Lysozyme基因的相对表达量均显著高  
于空白对照组。这表明南美白对虾可能通过上调  
Crustin和Lysozyme基因的表达水平以增强机体抗  
副溶血弧菌感染的能力。张盛静等<sup>[42]</sup>在饲料中添  
加含枯草芽孢杆菌的复合益生菌饲喂南美白对虾,  
发现在副溶血弧菌侵入后,对虾体内Crustin及  
Lysozyme的mRNA相对表达量均显著上调,抗副溶  
血弧菌感染的能力显著提高。柴鹏程<sup>[43]</sup>在饲料中  
添加坚强芽孢杆菌PC465也得到了类似的结果。这  
些研究均与本研究的结果相一致,表明适量枯草芽  
孢杆菌制剂添加于饲料可有效提高南美白对虾  
Crustin和Lysozyme基因表达量,进而增强机体抗副  
溶血弧菌感染的能力。

综上所述,在饲料中添加适量枯草芽孢杆菌制  
剂,可显著提高南美白对虾的生长性能,有效保护  
对虾肝胰腺免受损伤,并显著增强血淋巴、肝胰腺  
中的抗氧化相关酶活性;同时,混饲喂养枯草芽孢  
杆菌能提高对虾肝胰腺中Hsp70、LGBP、 $\beta$ -GBP-  
HDL、Crustin和Lysozyme等免疫相关因子的相对  
表达量,进而增强南美白对虾对副溶血弧菌感染的  
抵抗力,提高感染后的存活率。经综合分析,建议  
在南美白对虾日粮中添加的枯草芽孢杆菌制剂剂  
量为0.4%—0.8%。

(作者声明本文符合出版伦理要求)

### 参考文献:

- [1] Lu J Q. Identification of potential multiple pathogens and design of antagonistic probiotics of *Litopenaeus vannamei* [D]. Ningbo: Ningbo University, 2021: 1. [陆嘉祺. 南美白对虾潜在多病原菌的鉴定及拮抗益生菌设计 [D]. 宁波: 宁波大学, 2021: 1.]
- [2] Knibb W, Giang C T, Premachandra H K A, et al. Feasible options to restore genetic variation in hatchery stocks of the globally important farmed shrimp species, *Litopenaeus vannamei* [J]. *Aquaculture*, 2020(518): 734823.
- [3] Zhang M L, Ou M X, Xie Y H, et al. Safety evaluation of Chinese herbal medicine and microecological compound in *Penaeus vannamei* [J]. *Modern Journal of Animal*

- Husbandry and Veterinary Medicine*, 2023(11): 31-35. [张铭林, 欧梦馨, 谢映红, 等. 中草药微生态复方制剂对南美白对虾的安全性评价 [J]. 现代畜牧兽医, 2023(11): 31-35.]
- [4] Fisheries and Fisheries Administration of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. 2024 China Fishery Statistical Yearbook [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2024: 22-24. [农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2024中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2024: 22-24.]
- [5] Schofield P J, Noble B L, Caro L F A, *et al.* Pathogenicity of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) on the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, and Pacific White Shrimp, *Penaeus vannamei*, at various salinities [J]. *Aquaculture Research*, 2021, **52**(4): 1480-1489.
- [6] Wang Y, Al Farraj D A, Vijayaraghavan P, *et al.* Host associated mixed probiotic bacteria induced digestive enzymes in the gut of tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2020, **27**(9): 2479-2484.
- [7] Cai Y, Yin Y, Wang L, *et al.* Effect on serum parameters and immune responses of *Carassius auratus gibelio* exposed to dietary lead and *Bacillus subtilis* [J]. *Biological Trace Element Research*, 2019, **190**(1): 217-225.
- [8] 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 Immunology*, 2019(94): 175-189.
- [9] Liu Z Z, Fan Z, Liu H H, *et al.* Screening of *Bacillus subtilis* and purification of aquaculture water by *Bacillus subtilis* and photosynthetic bacteria [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2020, **48**(6): 164-167. [刘珍珠, 樊振, 刘欢欢, 等. 枯草芽孢杆菌的筛选及其与光合细菌复配对养殖水体的净化 [J]. 江苏农业科学, 2020, **48**(6): 164-167.]
- [10] Alagarasu T, Baboonsundaram A, Ayyaru G, *et al.* Influence of oral administration of *Bacillus subtilis* on growth performance and physiological responses in *Litopenaeus vannamei* cultured in low saline waters [J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2021, **13**(6): 1734-1746.
- [11] Shen W Y, Fu L L, Li W F, *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): 1691-1698.
- [12] Eissa E H, Ahmed N H, El-Badawi A A, *et al.* Assessing the influence of the inclusion of *Bacillus subtilis* AQUA-GROW<sup>®</sup> as feed additive on the growth performance, feed utilization, immunological responses and body composition of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* [J]. *Aquaculture Research*, 2022, **53**(18): 6606-6615.
- [13] Borgstahl G E O, Oberley-Deegan R E. superoxide dismutases (SODs) and SOD mimetics [J]. *Antioxidants*, 2018, **7**(11): 156.
- [14] Wang Y, Wu P, Shen H Y. Effect of ampicillin wastewater on the T-AOC and LDH activities of zebrafish. [J]. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2019, **295**(2): 012018.
- [15] Estrada-Cárdenas P, Peregrino-Uriarte A B, Gómez-Jiménez S, *et al.* Responses and modulation of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* glutathione peroxidases 2 and 4 during hypoxia, reoxygenation and GPx4 knock-down [J]. *Biochimie*, 2023, 214(Pt B): 157-164.
- [16] Wang Y, Liu X, Su C, *et al.* Process optimization for fermented siwu decoction by multi-index-response surface method and exploration of the effects of fermented siwu decoction on the growth, immune response and resistance to *Vibrio harveyi* of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022(120): 633-647.
- [17] Luo K, Guo Z, Liu Y, *et al.* Responses of growth performance, immunity, disease resistance of shrimp and microbiota in *Penaeus vannamei* culture system to *Bacillus subtilis* BSXE-1601 administration: Dietary supplementation versus water addition [J]. *Microbiological Research*, 2024(283): 127693.
- [18] Hao K, Liu J Y, Ling F, *et al.* Effects of dietary administration of *Shewanella haliotis* D4, *Bacillus cereus* D7 and *Aeromonas bivalvium* D15, single or combined, on the growth, innate immunity and disease resistance of shrimp, *Litopenaeus vannamei* [J]. *Aquaculture*, 2014(428): 141-149.
- [19] Li Y L, Fu Y Y, Zhang H, *et al.* Dietary yeast hydrolysate on growth, digestion, antioxidation and immunity of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2024, **48**(3): 393-404. [李玉龙, 付运银, 张恒, 等. 酵母水解物对克氏原螯虾生长性能、消化、抗氧化和免疫能力的影响 [J]. 水生生物学报, 2024, **48**(3): 393-404.]
- [20] Xiang X, Zhou X H, Chen J, *et al.* Effect of dietary replacement of fish meal protein with soybean meal protein on the growth, body composition and hematology indices of *Schizothorax prenanti* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, **36**(5): 723-731. [向泉, 周兴华, 陈建, 等. 饲料中豆粕蛋白替代鱼粉蛋白对齐口裂腹鱼幼鱼生长性能、体成分及血液生化指标的影响 [J]. 水产学报, 2012, **36**(5): 723-731.]
- [21] Jin H H, Xiao C B, Sun Q R, *et al.* Protein requirement of *Procambarus clarkii* juvenile farming in rice field [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2024, **48**(10): 149-162. [金

- 鸿浩, 肖川波, 孙倩容, 等. 稻田养殖模式下克氏原螯虾幼虾的蛋白质需求量 [J]. *水产学报*, 2024, **48**(10): 149-162.]
- [22] Abdelsamad A E M, Said R E M, Assas M, *et al.* Effects of dietary supplementation with *Bacillus velezensis* on the growth performance, body composition, antioxidant, immune-related gene expression, and histology of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* [J]. *BMC Veterinary Research*, 2024, **20**(1): 368.
- [23] Yu D D, Chen S L, Guo S J, *et al.* Effects of dietary *Bacillus subtilis* HSP05 on growth performance, disease resistance and non-specific immunity of *Litopenaeus vannamei* [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2022, **34**(10): 6634-6642. [于道德, 陈胜林, 郭少菁, 等. 饲料中添加枯草芽孢杆菌HSP05对凡纳滨对虾生长性能、抗病力和非特异性免疫力的影响 [J]. *动物营养学报*, 2022, **34**(10): 6634-6642.]
- [24] Wang C D, Song X L, Zhang X J, *et al.* Effects of adding *Bacillus cereus* PC465 to rearing water on disease resistance of *Litopenaeus vannamei* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, **23**(1): 146-155. [王春迪, 宋晓玲, 张晓静, 等. 养殖水体中添加蜡样芽孢杆菌PC465对凡纳滨对虾抗病力的影响 [J]. *中国水产科学*, 2016, **23**(1): 146-155.]
- [25] Wang G H, Liu J Y, Xi Q K, *et al.* Effects of enzymatic chicken pulp on the growth performance, feed efficiency, immune function and digestive enzyme activity of *Litopenaeus vannamei* [J]. *Scientific Fish Farming*, 2023(1): 70-72. [王光花, 刘佳裕, 席庆凯, 等. 酶解鸡浆对凡纳滨对虾生长性能、饲料效率、免疫性能及消化酶活性的影响 [J]. *科学养鱼*, 2023(1): 70-72.]
- [26] Tian H J, Ren S J, Yang Z G, *et al.* Effect of compound Chinese herb medicine on resistance to white spot syndrome infection in red swamp crayfish *Procambarus clarkii* [J]. *Fisheries Science*, 2024, **43**(1): 129-135. [田海军, 任胜杰, 杨治国, 等. 复方中草药制剂对克氏原螯虾抗白斑综合征感染研究 [J]. *水产科学*, 2024, **43**(1): 129-135.]
- [27] Fu Y M, Li Z, Liu F S, *et al.* The toxicity impact of microcystin on expression of cellular immune-related genes in *Litopenaeus vannamei* [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2015, **24**(2): 196-202. [傅一鸣, 李智, 柳峰松, 等. 微囊藻毒素MC-LR对凡纳滨对虾细胞免疫相关基因表达水平的影响 [J]. *上海海洋大学学报*, 2015, **24**(2): 196-202.]
- [28] Johnston C L, Marzano N R, van Oijen A M, *et al.* Using single-molecule approaches to understand the molecular mechanisms of heat-shock protein chaperone function [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2018, **430**(22): 4525-4546.
- [29] Amparyup P, Charoensapsri W, Tassanakajon A. Two prophenoloxidases are important for the survival of *Vibrio harveyi* challenged shrimp *Penaeus monodon* [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2009, **33**(2): 247-256.
- [30] Anirudhan A, Okomoda V T, Mimi Iryani M T, *et al.* Pandanus tectorius fruit extract promotes Hsp70 accumulation, immune-related genes expression and *Vibrio parahaemolyticus* tolerance in the white-leg shrimp *Penaeus vannamei* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2021(109): 97-105.
- [31] Junprung W, Supungul P, Tassanakajon A. HSP70 and HSP90 are involved in shrimp *Penaeus vannamei* tolerance to AHPND-causing strain of *Vibrio parahaemolyticus* after non-lethal heat shock [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017(60): 237-246.
- [32] Yang Y K, Song X L, Wang H L, *et al.* Effect of a compound probiotics on the ability of *Litopenaeus vannamei* to resist *Vibrio parahaemolyticus* infection [J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, **41**(3): 133-141. [杨运楷, 宋晓玲, 王海亮, 等. 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 [J]. *渔业科学进展*, 2020, **41**(3): 133-141.]
- [33] Wang X B, Jin S, Chen Y E, *et al.* Temporal expression of the LGBP gene in mainly tissues of *Portunus trituberculatus* challenged by different pathogens [J]. *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 [J]. *生物学杂志*, 2013, **30**(6): 5-9.]
- [34] Wang Y C, Chang P S, Chen H Y. Differential time-series expression of immune-related genes of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in response to dietary inclusion of  $\beta$ -1, 3-glucan [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, **24**(1): 113-121.
- [35] Sinnasamy S, Mat Noordin N, MacRae T H, *et al.* Ingestion of food pellets containing *Escherichia coli* overexpressing the heat-shock protein DnaK protects *Penaeus vannamei* (Boone) against *Vibrio harveyi* (Baumann) infection [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2016, **39**(5): 577-584.
- [36] Junprung W, Supungul P, Sangklai N, *et al.* Heat shock protein 70 is a damage-associated molecular pattern that by binding to lipopolysaccharide and  $\beta$ -1, 3-glucan-binding protein activates the prophenoloxidase system in shrimp [J]. *The Journal of Immunology*, 2022, **209**(3): 582-592.
- [37] Chen J P, Feng G P, Li X C. Expression pattern and immune function analysis of Es Crus3 and Es Crus4 from Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2023, **47**(11): 1838-1848. [陈剑平, 冯广朋, 李新苍. 中华绒螯蟹甲壳肽Es Crus3和Es Crus4表达模式与免疫功能 [J]. *水生生物学报*, 2023, **47**(11): 1838-1848.]
- [38] Lü X J. The diversity of *Crustins* and their functioning mechanism in the immune defense of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* against *Vibrio* infection [D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy

- of Sciences, 2020: 12-14. [吕新嘉. 凡纳滨对虾 *Crustin* 基因的多样性及其在抵御弧菌感染中的作用机制研究 [D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2020: 12-14.]
- [39] Phillips D C. The three-dimensional structure of an enzyme molecule [J]. *Scientific American*, 1966, **215**(5): 78-90.
- [40] Duan Y F, Wang Y, Dong H B, *et al.* Changes in the intestine microbial, digestive, and immune-related genes of *Litopenaeus vannamei* in response to dietary probiotic *Clostridium butyricum* supplementation [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018(9): 2191.
- [41] Huang H T, Hu Y F, Lee B H, *et al.* Dietary of *Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium longum* improve nonspecific immune responses, growth performance, and resistance against *Vibrio parahaemolyticus* in *Penaeus vannamei* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022(128): 307-315.
- [42] Zhang S J, Song X L, Zhao X J, *et al.* Effects of adding probiotics to the feed on anti-infection and five kinds of immune gene expression of *Litopenaeus vannamei* [J]. *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 [J]. *水产学报*, 2015, **39**(6): 899-907.]
- [43] Chai P C, Song X L. Effects of *Bacillus* PC465 added in feed on the growth rate and expression of *STAT* gene of *Litopenaeus vannamei* [J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, **34**(13): 97-103. [柴鹏程, 宋晓玲. 饲料中添加芽孢杆菌PC465对凡纳滨对虾生长和 *STAT* 基因表达的影响 [J]. *渔业科学进展*, 2013, **34**(13): 97-103.]

## APPLICATION OF *BACILLUS SUBTILIS* TO IMPROVE GROWTH, IMMUNITY, AND RESISTANCE TO *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* INFECTION IN *LITOPENAEUS VANNAMEI*

HU Xiao-Dong<sup>1</sup>, TONG Yan-Mei<sup>1</sup>, HUANG Yu-Liu<sup>2</sup>, ZHANG Ming-Lin<sup>1</sup>, LI Qiang-Yong<sup>2,3</sup>, YANG Chun-Ling<sup>2</sup>, PENG Min<sup>2</sup>, CHEN Tian-Cong<sup>2</sup>, HONG Chuan-Yuan<sup>2</sup>, ZHAO Yong-Zhen<sup>2,3</sup> and HU Ting-Jun<sup>1</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Aquatic Genetic Breeding and Healthy Aquaculture, Guangxi Academy of Fishery Sciences, Nanning 530021, China; 3. Guangxi Technology Innovation Center for Shrimp Breeding Industry, Nanning 530021, China)

**Abstract:** To comprehensively evaluate the effects of dietary supplementation with *Bacillus subtilis* (BS) on the growth, immunity, and resistance to *Vibrio parahaemolyticus* infection in *Litopenaeus vannamei*, 4500 shrimp [(0.95±0.25) g] were randomly assigned to five groups, including a control group without BS, experimental groups supplemented with BS at 0.2%, 0.4%, and 0.8%, and a positive control group with 0.05% Sanhuang Powder (SH). A 42-day feeding trial and a 48-hour *V. parahaemolyticus* challenge were conducted. Results showed that BS and SH supplementation significantly improved body length, body weight, specific growth rate, weight gain rate, and feed conversion ratio. Compared with the control group, the 0.4% BS group exhibited significantly reduced activities of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) in hemolymph, while the 0.8%BS group showed significantly increased superoxide dismutase (SOD) content and total antioxidant capacity (T-AOC) in hemolymph and hepatopancreas. The 0.05%SH group exhibited significantly enhanced acid phosphatase (ACP) and T-AOC in hemolymph and SOD content in hepatopancreas, while the activities of ALT decreased significantly. Furthermore, BS and SH supplementation significantly upregulated the expression of immune-related factors such as *Hsp70*, *LGBP*,  $\beta$ -*GBP-HDL*, *Crustin*, and *Lysozyme* in the hepatopancreas after *V. parahaemolyticus* infection and improved the survival rate of shrimp. Specifically, the survival rates in the 0.2%, 0.4%, and 0.8%BS, and 0.05%SH groups increased from 43.3% (control) to 66.7%, 76.7%, 73.3%, and 80.0%, respectively. This study demonstrates that dietary supplementation with appropriate amount of BS enhance the growth performance, nonspecific immunity, and hepatopancreas immune gene expression in *L. vannamei*, thereby improving resistance to *V. parahaemolyticus* infection.

**Key words:** *Bacillus subtilis*; *Vibrio parahaemolyticus*; Nonspecific immunity; Antioxidation; *Litopenaeus vannamei*