

文章编号: 1674-5566(2009)02-0181-06

饲料中添加芽孢杆菌和中草药制剂对凡纳滨对虾免疫功能的影响

文国樑¹, 于明超², 李卓佳¹, 林黑着¹

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300;

2. 广东恒兴集团有限公司, 广东, 湛江 524094)

摘要:研究了饲料中添加芽孢杆菌和中草药制剂对凡纳滨对虾免疫功能的影响。以基础饲料为对照(Diet⁰),通过添加中草药和芽孢杆菌配制成 6 种实验饲料: 0.10% 中草药 + 0.10% 芽孢杆菌(Diet¹¹), 0.10% 中草药 + 0.20% 芽孢杆菌(Diet¹²), 0.10% 中草药 + 0.30% 芽孢杆菌(Diet¹³); 0.20% 中草药 + 0.10% 芽孢杆菌(Diet²¹), 0.20% 中草药 + 0.20% 芽孢杆菌(Diet²²), 0.20% 中草药 + 0.30% 芽孢杆菌(Diet²³)。实验共进行了 56 d 对血细胞数目、酚氧化酶活力(PO)、溶菌酶活力、超氧化物歧化酶(SOD)活力以及总抗氧化能力(TAOC)进行了测定。芽孢杆菌对血细胞数目产生显著影响, Diet¹², Diet¹³和 Diet²³组对虾的血细胞数目显著高于其余各组($P < 0.05$)。中草药以及交互作用对血清 PO 产生显著影响($P < 0.05$), Diet²³组获得最高的血清 PO 活力。芽孢杆菌、中草药及交互作用对溶菌酶影响不显著,但高剂量的芽孢杆菌和中草药有提高对虾溶菌酶活力的趋势,其中 Diet¹³显著高于 Diet⁰($P < 0.05$)。中草药、芽孢杆菌以及它们的交互作用对 SOD 未产生显著影响($P > 0.05$)。Diet²³组对虾血清的 TAOC 最高,除 Diet²¹组外,与其余各组差异显著($P < 0.05$)。综上所述,芽孢杆菌和中草药制剂能够对凡纳滨对虾免疫指标产生积极影响,其中 Diet²³组(0.20% 中草药 + 0.30% 芽孢杆菌)取得最好的效果。

关键词:中草药;芽孢杆菌;凡纳滨对虾;免疫功能

中图分类号: S 963.1 **文献标识码:** A

Effects of dietary *Bacillus* spp. and traditional Chinese medicines on immunity of shrimp *Litopenaeus vannamei*

WEN Guo-liang¹, YU Ming-chao², LI Zhuo-jia¹, LIN Hei-zhao¹

(1. South China Sea Fisheries Research Institute Chinese Academy of Fishery Science Guangzhou 510300, China;

2. Guangdong Evergreen Group Zhanjiang 524094, China)

Abstract: A feeding experiment was conducted to investigate the effects of *Bacillus* and traditional Chinese medicines (TCM) on immunity of shrimp *L. vannamei*. Six experimental diets were formulated by adding the *Bacillus* and TCM to basal diet (Diet⁰, Control); 0.10% TCM + 0.10% *Bacillus* (Diet¹¹), 0.10% TCM + 0.20% *Bacillus* (Diet¹²), 0.10% TCM + 0.30% *Bacillus* (Diet¹³); 0.20% TCM + 0.10% *Bacillus* (Diet²¹), 0.10% TCM + 0.20% *Bacillus* (Diet²²), 0.10% TCM + 0.30% *Bacillus* (Diet²³). After 56 days of feeding, the total haemocyte count (THC), phenoloxidase (PO), lysozyme activity, superoxide

收稿日期: 2008-08-22

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划(2006BAD09A11, 2007BAD29B05); 公益性行业(农业)和研究专项(200803012); 广东省科技计划项目(2005B20301012, 2006A20301004); 广东省重大科技兴海项目(A200601A01)

作者简介: 文国樑(1978-), 男, 江西会昌人, 助理研究员, 从事水产健康养殖技术研究。E-mail: guowen66@163.com

通讯作者: 李卓佳, E-mail: zhuojialf09@163.com

dismutase (SOD) and total antioxidant capacity (TAOC) were measured. The data indicated that THC was significantly affected by *Bacillus* so that it was higher in shrimp fed with Diet12, Diet13 and Diet23 than that of others ($P < 0.05$). PO was significantly affected by TCM and their interaction ($P < 0.05$). And the value of PO in Diet23 was highest around the treatments. The lysozyme activity was not significantly affected by *Bacillus*, TCM or their interaction, while its value in shrimp fed with high dosage of *Bacillus* and TCM showed a rising trend. SOD seemed to be unaffected by the feed supplements. In the case of TAOC, the shrimp fed with Diet23 exhibited significantly ($P < 0.05$) higher values than that of other groups except for Diet21. Results revealed that the combined TCM and *Bacillus* in diet could enhance immunity of shrimp. The best dosage was 0.2% TCM and 0.3% *Bacillus* in this experiment.

Key words: traditional Chinese medicines; *Bacillus* spp; *Litopenaeus vannamei*; immunity

长期使用抗生素和其它化学类药物防治养殖病害已引发了一系列的环境和社会问题^[1-2]。近年来,由于健康养殖的需要,人们加大了绿色、环保药物和添加剂的研发力度,有益菌和中草药制剂等在水产养殖中的应用日趋广泛^[3-4]。有益菌在饲料中使用能够竞争排斥病原微生物,提高宿主的免疫力^[5]。中草药在饲料中添加同样能够抑制病毒,提高养殖动物的免疫^[6-8]。中草药添加剂量对菌的生长影响很大,甚至会出现截然相反的结果,中草药和有益菌作为饲料添加剂共同使用,两者将相互影响,其结果如何,目前仍不得而知。因此,本文研究了中草药和芽孢杆菌以不同比例添加到饲料中对凡纳滨对虾免疫功能的影响。

1 材料与方法

1.1 实验对虾

本实验于2006年7—10月在广东恒兴集团国家863海水养殖种子工程南方基地进行。挑选外观正常,体质健壮,大小均匀的凡纳滨对虾幼虾,室内驯养两周后用于实验[初始体重(0.68 ± 0.02) g]。

1.2 实验饲料

实验用基础配方参照Lin^[6],在基础饲料中添加不同量的芽孢杆菌和中草药制剂作为实验用料(表1)。实验用芽孢杆菌及中草药制剂均由中国水产科学研究院南海水产研究所饲料与健康养殖技术开发中心提供。芽孢杆菌制剂(*Bacillus* spp)的含菌量为 10^9 CFU/g,中草药呈粉末状,主要由黄芪、大青叶、连翘、广藿香、板蓝根等组成。

1.3 实验设计与管理

实验设7个处理,每个处理3个重复,分别投喂上述饲料。养殖容器为 0.3 m^3 的圆形玻璃缸纤维桶(水体 0.27 m^3),每桶放养对虾35尾。实验期间根据对虾的生长及采食情况,调整投饵量,以1 h后基本摄食完为准。投饲频率为3次/d,时间分别为7:30、16:00、23:00。实验期间连续充气,每天下午虹吸粪便残物,隔天换水 $1/3 \sim 1/2$ 。实验共进行56 d,平均水温 29.3°C ,盐度 $29 \sim 31$ 。

1.4 指标测定

1.4.1 血淋巴的采集与血清的制备

用抗凝剂(10 mmol/L EDTA, $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$, 450 mmol/L NaCl, 10 mmol/L KCl, 10 mmol/L HEPES, pH 7.3, 850 mOsm/kg)润洗1 mL注射器,于对虾围心腔取血样。将血样准确移取0.2 mL与等量抗凝剂混合,用于血细胞计数。其余血样置于离心管,4℃过夜。测定时,用吸液管尖端划破凝块,于 $3000 \times g$ 离心

表 1 各处理组芽孢杆菌和中草药制剂添加量
Tab. 1 Addition of *Bacillus* and traditional Chinese medicine in each treatment

处理组	组成
Diet0	基础饲料
Diet1	基础饲料 + 0.1% 中草药 + 0.1% 芽孢杆菌
Diet2	基础饲料 + 0.1% 中草药 + 0.2% 芽孢杆菌
Diet3	基础饲料 + 0.1% 中草药 + 0.3% 芽孢杆菌
Diet1	基础饲料 + 0.2% 中草药 + 0.1% 芽孢杆菌
Diet2	基础饲料 + 0.2% 中草药 + 0.2% 芽孢杆菌
Diet3	基础饲料 + 0.2% 中草药 + 0.3% 芽孢杆菌

15 min, 取上清液, 立即分析。

1.4.2 血细胞总数

利用血球计数板在光学显微镜 400倍下直接计数, 计算出每毫升血淋巴中血细胞数目。

1.4.3 酚氧化酶 (PO) 活力

参考 Hernández-López等^[9]方法略作改动。取 50 μL待测样品 (离心所得血淋巴 (hemolymph)上清液)与 50 μL胰蛋白酶溶液 (0.1 mg/mL in CAC buffer) (CAC: 10 mmol/L sodium cacodylate 10 mmol/L CaCl₂, pH 7.0)放入 96微孔板中, 室温下温育 10 min, 然后加入 50 μL L-DOPA 溶液 (3 mg/mL in CAC buffer), 室温下温育 10 min后, 立刻放入酶标仪 (TECAN, mode 550 microplate reader California)中, 在 492 nm 下测定酶活动力学。以实验条件下, 每毫升样品每分钟 OD₄₉₂增加 0.001, 定义为一个酶活力单位。

1.4.4 溶菌酶活力

以溶壁微球菌 (*Micrococcus lysolei*) (购自中科院微生物所菌种室)冻干粉为底物。将底物用 0.1 mol/L pH为 6.4的磷酸钾盐缓冲液配成底物悬液 (OD₅₇₀≈0.3)。取 3 mL该悬液 50 μL待测血清于试管中混匀, 测其 A₀值。然后将试液移入 37℃水浴中保温 30 min, 取出后立刻置于冰浴中 10 min以终止反应, 测其 A值。溶菌活力 U_L按下式计算:

$$U_L = (A_0 - A) / A$$

式中, U_L为溶菌活力, A₀为反应前光密度值, A为反应后光密度值

1.4.5 超氧化物歧化酶 (SOD) 活力

用超氧化物歧化酶测定试剂盒测定 (南京建成生物工程研究所生产)。SOD活力定义为: 每毫升反应液中 SOD抑制率达 50%时所对应的 SOD的量为 1个 SOD活力单位 (U)。

1.4.6 总抗氧化能力 (TAOC)

应用总抗氧化能力测定试剂盒进行测定 (南京建成生物工程研究所生产)。机体中中有许多抗氧化物质, 能使 Fe³⁺还原成 Fe²⁺, 后者可与菲啉类物质形成稳固的络合物, 通过比色可测定除其抗氧化能力的高低。以 37℃时, 每分钟每毫升血清使反应体系的吸光值 (OD)每增加 0.01时, 为一个总抗氧化能力单位。

1.5 数据分析

将芽孢杆菌和中草药的添加量作为两个因子, 应用双因子方差分析 (two-way ANOVA and ANCOVA) 统计数据, 当处理间存在显著差异时, 应用 Duncan氏 多重比较进行分析。所有统计分析使用 SPSS 11.5统计软件, 以 P<0.05为差异显著性。

2 结果

2.1 血细胞数目

芽孢杆菌对血细胞数目产生显著影响 (P<0.05), 而中草药以及两者的交互作用对血细胞数目的影响不显著 (表 2)。高剂量的芽孢杆菌可以提高血细胞数目, Diet2、Diet3和 Diet3组的血细胞数目显著高于其余各组 (P<0.05) (图 1)。

表 2 各免疫指标双因子方差分析结果 (P值)
Tab. 2 The P value of two-way ANOVA and ANCOVA

项目	中草药	芽孢杆菌	中草药 + 芽孢杆菌
血细胞数目	0.099	0.013	0.208
酚氧化酶活性	0.001	0.055	0.039
溶菌酶活性	0.083	0.293	0.084
超氧化物歧化酶	0.758	0.929	0.562
总抗氧化能力	0.027	0.048	0.032

2.2 PO活力

如表 2 所示,中草药以及交互作用对血清 PO 活力产生显著影响 ($P < 0.05$), Diet23 组显著高于 Diet13 和 Diet11 组 ($P < 0.05$, 图 2)。

2.3 溶菌酶活力

中草药、芽孢杆菌以及它们的交互作用对血清溶菌酶均未产生显著影响 ($P > 0.05$, 表 2)。但是从数值来看, Diet13 组的溶菌酶显著高于对照组, 除 Diet12 组外, 其余各组的溶菌酶也均高于对照组 (图 3)。

2.4 SOD 活力

从表 2 可以看出,中草药、芽孢杆菌以及它们的交互作用对血清 SOD 活力未产生显著影响 ($P > 0.05$, 表 2)。虽然实验各组间的 SOD 活力均无显著性差异,但是从数值来看对照组 (Diet0) 的酶活力最低 (图 4)。

2.5 TAOC

中草药、芽孢杆菌以及它们的交互作用对血清 TAOC 均产生显著影响 ($P < 0.05$, 表 2)。Diet23 组的 TAOC 最高, 除 Diet21 组外, 与其余各组差异显著 ($P < 0.05$, 图 5)。

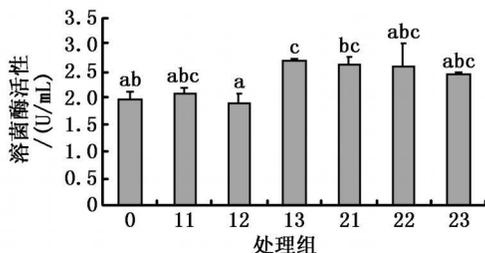


图 3 不同饲料对凡纳滨对虾溶菌酶活性的影响
Fig 3 The lysozyme activity of shrimp
L. vannamei fed with different test diets

3 讨论

对虾主要依靠非特异性免疫反应来提高机体对疾病的抵抗力^[10]。其中血细胞在甲壳类动物的免疫防御中占主导作用^[11]。血细胞通过粘附、吞噬、趋化和包裹作用等过程来消除外来异物^[12]。血细胞数量变化与许多因子相关,并在一定程度上反应了对虾的健康状态,免疫增强剂可以提高对虾的血细胞数量^[13-14]。经灭活哈维氏弧菌和灭活鳃弧菌刺激后,中国对虾总血细胞的数量分别增多了 73.4% 和 111.3%^[15]。在本实验中,高剂量的芽孢杆菌可以提高血细胞的数目,可能是由于菌细胞壁的某些成分或其分泌物起到了免疫刺激的作用。

研究已确认,甲壳类对异物识别等免疫反应起关键作用的是甲壳类动物血细胞内的酚氧化物酶原

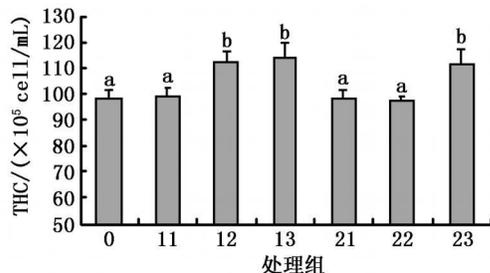


图 1 不同饲料对凡纳滨对虾血细胞总数的影响
Fig 1 The total haemocyte count (THC) of shrimp
L. vannamei fed with different test diets
注:柱形上方的字母相同表示数据间差异不显著 ($P > 0.05$)

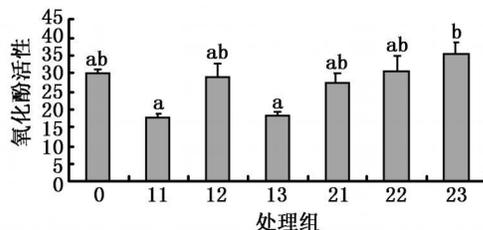


图 2 不同饲料对凡纳滨对虾酚氧化酶活性的影响
Fig 2 The phenoloxidase (PO) of shrimp
L. vannamei fed with different test diets

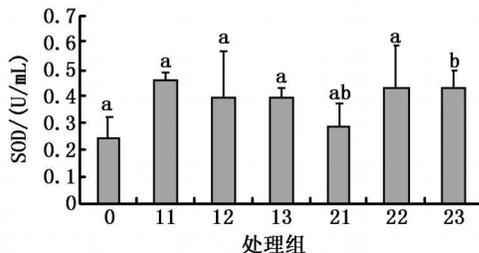


图 4 不同饲料对凡纳滨对虾超氧化物歧化酶的影响
Fig 4 The superoxide dismutase (SOD) of shrimp
L. vannamei fed with different test diets

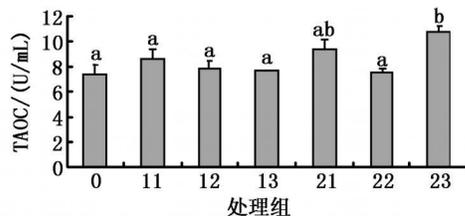


图 5 不同饲料对凡纳滨对虾总抗氧化能力的影响
Fig 5 The total antioxidant capacity (TAOC) of shrimp
L. vannamei fed with different test diets

(ProPO)系统^[16], ProPO系统主要以酶原的形式存在于颗粒细胞中。该系统的成分被激活后可以促进血细胞的吞噬、介导凝集和凝固,产生杀菌物质等^[17]。李义等^[18]报道在饲料中添加党参等中药可以显著提高罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)体内的 PO ($P<0.05$)。其它研究也表明,在饲料中添加不同种类的中草药能够提高对虾的 PO 活力^[8,19]。多糖类被证实可以提高对虾的免疫能力,包括提高对虾的 PO 活力^[20]。本实验所选用的中草药含有黄芪多糖、板蓝根多糖等活性成分,因此高剂量的中草药能够提高 PO 的活性。芽孢杆菌对中草药的代谢可能有一定的促进作用^[21],所以它们的交互作用对 PO 活性同样产生显著影响。

溶菌酶是非特异性免疫系统的主要成分,在虾类免疫中起重要的作用,是吞噬细胞杀菌的物质基础。它是一种碱性蛋白,广泛存在于体内多种组织和体液中,能水解革兰氏阳性细菌细胞壁粘性多糖中的乙肽氨基多糖,使之裂解并释放出来。本实验中,添加中草药和芽孢杆菌对溶菌酶活力的影响不显著,这一结果与凡纳滨对虾摄食一定剂量的肽聚糖后的酶活力变化相一致^[22]。

SOD对机体的氧化与抗氧化平衡起着至关重要的作用,该酶能清除超氧阴离子自由基,保护细胞免受损伤。呼吸爆发产生的多余的 O_2^- 可以被胞质中的超氧化物歧化酶催化生成 H_2O_2 , 它是一切需氧有机体清除 O_2^- 保护机体免受损害的关键酶^[23]。机体防护氧化作用的体系有酶促与非酶促两个体系, SOD属于酶促体系,非酶促体系中主要有维生素、氨基酸和金属蛋白质等。本实验中的 TAOC是机体防护氧化作用的总体评价。SOD是一种底物诱导酶,它的活力升高说明体内超氧负离子或羟自由基含量上升,氧化压力过大。本实验中,各组的 SOD活性有所提高,但是差异不显著,而 TAOC则显著提高,这可能是对虾体内的氧化压力不是很大, SOD等酶促抗氧化体系没有显著升高,而添加的中草药和芽孢杆菌具有非酶促体系的抗氧化作用^[23],从而使 TAOC较高,增强了机体防护氧化侵害的能力。

有益菌的抗病保护作用主要是通过以下两种途径而获得的^[5]:一方面通过激活细胞和体液免疫系统,从而提高虾体的免疫力;另一方面通过在虾的消化道中竞争排斥作用,减少肠道中的有害菌群,减少有害菌的致病机会。许多中草药成分有免疫增强作用,作为免疫增强剂具有安全低毒,不易在产品中产生有害残留等优点^[24]。天然药物代谢反应中,最重要的配糖体的水解需要 A糖苷酶、B糖苷酶,而芽孢杆菌中就含有这 2种酶^[21];中药的化学成分比较复杂,其成分主要有激素类、氨基酸类、多糖类、多种微量元素及其它有机物和无机物类,其中许多成分对细菌的生长代谢有促进作用^[25]。因此,中草药和芽孢杆菌配伍使用将产生一定的协同作用。实验结果也表明,芽孢杆菌和中草药制剂对部分的免疫指标产生积极影响,且具有一定的协同作用,其最佳配伍剂量为 0.2%的中草药和 0.3%的芽孢杆菌。

参考文献:

- [1] 许兵,纪伟尚,张鹏,等.对虾病原菌抑菌药物的研究[J].青岛海洋大学学报,1993,23(2):43-51.
- [2] Boyd C E. Massault L. Risks associated with the use of chemical in pond aquaculture [J]. Aqua Engin, 1999, 20(2): 113-132.
- [3] Gatesoupe F J. The use of probiotics in aquaculture [J]. Aquaculture, 1999, 180, 147-165.
- [4] 李卓佳,林黑着,郭志勋,等.中草药对斑节对虾生长、饲料利用和肌肉营养成分的影响[J].南方水产,2007,3(2):20-24.
- [5] Rengpipat S, Rukpratanpom S, Piyatititivorakul S et al. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiotic bacterium (*Bacillus S11*) [J]. Aquaculture, 2000, 191, 271-288.
- [6] Lin H Z, Li Z J, Chen Y Q, et al. Effect of dietary traditional Chinese medicines on apparent digestibility coefficients of nutrients for white shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone [J]. Aquaculture, 2006, 253, 495-501.
- [7] Jian J C, Wu Z H. Influences of traditional Chinese medicine on non-specific immunity of Jian common carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) [J]. Fish & Shellfish Immunol, 2004, 16, 185-191.
- [8] 罗日祥.中药制剂对中国对虾免疫活性物的诱导作用[J].海洋与湖沼,1997,28(6):573-578.
- [9] Hernández-López J, Gollas-Galván T. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes) [J]. Comp Biochem Physiol, 1996, 113C, 61-66.
- [10] Anderson D P. Immunostimulants, adjuvants and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture [J]. Annu Rev Fish Dis, 1992, 2, 281-307.
- [11] Jenny R, Gilles L M. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp [J]. Aquaculture, 2000, 191, 109-119.

- [12] Söderhäll K. β -1, 3-Glycan enhancement of protease activity in crayfish hemocytelysate [J]. *Comp Biochem Physiol* 1996, 74B: 221—224.
- [13] 姚翠鸾. 免疫刺激后中国明对虾血液抗菌力应答及两种免疫相关因子 LYZ和 AK的研究 [D]. 中国科学院海洋研究所: 博士学位论文, 2004.
- [14] Campa-Córdova A I, Hemández-Saavedra N Y, Ascencio F. Superoxide dismutase as modulator of immune function in American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. *Comp Biochem Physiol* 2002, 133C: 557—565.
- [15] 汪小锋, 樊廷俊, 丛日山, 等. 几种免疫促进剂对中国对虾血细胞数量、形态结构以及酚氧化酶产量和活性的影响 [J]. *水产学报*, 2005, (29)1: 66—73.
- [16] Hemández-López J, Gollas-Galvan T, Vargas-Albores F. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp *Penaeus californiensis* Holmes haemolymph [J]. *Comp Biochem Physiol* 1996, 104B: 407—413.
- [17] Bachere E, Miahle E, Noel T, et al. Knowledge and research prospects in marine mollusc and crustacean immunology [J]. *Aquaculture* 1995, 132: 17—32.
- [18] 李义, 宋学宏, 蔡春芳, 等. 复方中药添加剂对罗氏沼虾免疫功能的增强作用 [J]. *饲料工业*, 2002, 23(7): 45—47.
- [19] 王雷. 口服免疫型药物对养殖中国对虾病害防治作用的研究 [J]. *海洋与湖沼*, 1994, 25(5): 486—491.
- [20] 刘恒, 李光友. 免疫多糖对养殖南美白对虾作用的研究 [J]. *海洋与湖沼*, 1998, 29(2): 113—117.
- [21] 刘明杰, 林琳, 王钊. 肠道细菌对天然药物代谢的研究进展 [J]. *中国现代应用药学杂志*, 2001, 1(2): 90—91.
- [22] 王秀华, 宋晓玲, 黄捷. 肽聚糖制剂对南美白对虾体液免疫因子的影响 [J]. *中国水产科学*, 2004, 11(1): 26—30.
- [23] Holmblad T, Söderhäll K. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean possible role in immunity [J]. *Aquaculture* 1999, 172: 111—123.
- [24] 邱妍. 四种中药多糖增强免疫和抗病毒作用及机理研究 [D]. 南京农业大学: 博士学位论文, 2007.
- [25] 赵玲, 李英伦, 王讯. 中草药与肠道生态系的相互影响 [J]. *兽药与饲料添加剂*, 2003, 8: 24—26.