



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20210049

数字出版日期: 2021-09-29; 数字出版网址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/12.1355.n.20210928.1128.004.html>

投喂盐富饶菌 *Haloferax* YC-6 强化卤虫对凡纳滨对虾 生长和抗逆能力的影响

郭子仙, 解伟, 任北妮, 段虎, 高美荣, 隋丽英
(天津科技大学海洋与环境学院, 天津 300457)

摘要: 通过生物饵料卤虫 (*Artemia*) 强化的方式研究红色古菌盐富饶菌 (*Haloferax* YC-6) 对凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 生长、肠道菌群和抗逆能力的影响。将凡纳滨对虾仔虾 6 000 尾随机分为 2 组, 每组 3 个重复, 每个重复 1 000 尾虾。各组分别投喂饥饿卤虫 (对照组) 和 *Haloferax* 强化卤虫 (实验组) 养殖 10 d 后, 测定对虾生长、营养组成、肠道菌群结构和丰度。测定对虾在氨氮胁迫和副溶血弧菌攻毒后的存活率, 以及氨氮胁迫后对虾肝胰腺过氧化氢酶 (CAT) 的活性和丙二醛 (MDA) 含量。结果表明: 投喂 *Haloferax* 强化卤虫的对虾存活率和体长显著高于对照组 ($P < 0.05$); *Haloferax* 的摄入改变了对虾肠道菌群门水平的相对丰度, 降低了弧菌属 (*Vibrio*) 的相对丰度; *Haloferax* 的摄入显著提高了对虾肝胰腺 CAT 活性, 显著降低了 MDA 含量 ($P < 0.05$)。氨氮胁迫 48 h 后, 实验组对虾的存活率显著高于对照组, CAT 活性和 MDA 含量显著降低 ($P < 0.05$)。弧菌攻毒后, 实验组对虾的存活率显著高于对照组 ($P < 0.05$)。因此, 用 *Haloferax* 强化卤虫投喂对虾可显著提高其存活率, 促进对虾生长, 改善其肠道菌群组成, 提高对虾的抗逆能力。

关键词: 盐富饶菌; 卤虫强化; 凡纳滨对虾; 肠道菌群; 氨氮胁迫; 弧菌攻毒

中图分类号: S963.2 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2021)06-0008-07

Effects of *Haloferax* YC-6-Enriched *Artemia* Feeding on Growth Performance and Stress Tolerance of *Litopenaeus vannamei*

GUO Zixian, XIE Wei, REN Beini, DUAN Hu, GAO Meirong, SUI Liying

(College of Marine and Environmental Science, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The effect of red archaea *Haloferax* on the growth performance, intestinal microbiota and stress resistance of *Litopenaeus vannamei* postlarvae was investigated through live feed *Haloferax*-enriched *Artemia*. A total of 6 000 shrimp PLs were divided into two groups and were fed *Haloferax*-enriched *Artemia* nauplii (Hfx) and starved *Artemia* nauplii (Ctrl), respectively, with three replicates per group and 1 000 individuals per replicate. After 10 days rearing, the growth, nutritional composition, intestinal microbiota structure and abundance of shrimp were determined. The shrimp were also exposed to ammonia nitrogen stress and *Vibrio parahaemolyticus* challenge, and the catalase (CAT) activity and malondialdehyde (MDA) content in hepatopancreas were measured after the ammonia nitrogen stress. The results showed that the survival rate and body length of shrimp PLs in the Hfx group were significantly higher than the Ctrl group ($P < 0.05$). Compared with the Ctrl group, the intestinal microbiota composition had changed and the relative abundance of *Vibrio* decreased in the Hfx group. The CAT activity in the hepatopancreas in the Hfx group was significantly higher than the Ctrl group, while the MDA content significantly decreased ($P < 0.05$). After being exposed to ammonia nitrogen for 48 h, the PLs in the Hfx group had significantly higher survival rate than the Ctrl group, which the CAT activity and MDA content in hepatopancreas significantly decreased ($P < 0.05$). After challenged by *Vibrio parahaemolyticus* for 48 h, the Hfx group had significantly higher survival rate than the Ctrl group ($P < 0.05$). In conclusion, the red archaea *Haloferax* supplement through *Artemia* bioencapsulation can enhance the survival and growth, benefit the intestinal microbiota diversity, and increase the resistance to am-

收稿日期: 2021-03-07; 修回日期: 2021-05-06

基金项目: 天津科技大学省部共建食品营养与安全国家重点实验室开放基金 (SKLFNS-KF-202008)

作者简介: 郭子仙 (1994—), 女, 山东菏泽人, 硕士研究生; 通信作者: 隋丽英, 教授, suily@tust.edu.cn

monia nitrogen stress and *Vibrio* challenge of *L. vannamei* postlarvae.

Keywords: *Haloferox*; *Artemia* enrichment; *Litopenaeus vannamei*; intestinal microbiota; ammonia nitrogen stress; *Vibrio* challenge

凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 是世界养殖产量最高的优良对虾品种, 2019 年养殖产量达到 496.72 万吨, 我国凡纳滨对虾产量达到 181.55 万吨^[1-2]。近年来, 水产养殖环境恶化和种质退化等问题导致疾病频繁发生, 使凡纳滨对虾养殖产业面临严峻挑战^[3]。对虾拥有开放循环系统, 极易受到养殖水体环境的影响, 而环境胁迫造成的应激对对虾机体抗氧化和免疫系统造成损伤^[4]。将功能性添加剂如益生菌、抗菌肽等应用于凡纳滨对虾养殖是提高对虾免疫力、促进对虾生长的重要途径^[5-7]。

古菌几乎能适应地球上所有极端环境, 古菌细胞可积累相容性溶质、表层蛋白、类胡萝卜素等多种生物活性物质^[8-9]。盐富饶菌 (*Haloferox*) 是在高盐环境下生长的古菌属, 具有生长快、耐盐范围广和代谢功能强等特点, 因富含菌红素、单脱水菌红素和双脱水菌红素等类胡萝卜素而呈红色^[10]。菌红素是一种长链 C₅₀ 类胡萝卜素, 包含 13 对共轭双键, 且末端含有羟基, 是一种有效的自由基清除剂, 具有较高的 DPPH 自由基清除能力, 其抗氧化能力高于 β -胡萝卜素^[11-13]。研究表明, 类胡萝卜素能提高水产动物的经济性状和品质。富含类胡萝卜素的饲料能够促进虹鳟鱼 (*Oncorhynchus mykiss*) 生长, 提高色素含量^[14]。向黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*) 投喂含 β -胡萝卜素的饲料可提高其肝脏中抗氧化酶活性和热休克蛋白 HSP70 基因的表达, 进而降低由高温胁迫和病原菌感染造成的死亡率^[15]。但古菌及其类胡萝卜素作为饲料添加剂在水产养殖乃至畜禽养殖中的应用未见报道。

卤虫是海水苗种培育重要的生物饵料。作为非选择性滤食生物, 卤虫可高效滤食单胞藻、细菌和微小的有机碎屑等。水产育苗中常采用强化方式使卤虫肠道包裹携带营养强化剂 (如鱼油) 和药物等, 通过投喂强化卤虫将其有效送达水产苗种体内。本研究将古菌 *Haloferox* 作为添加剂, 通过卤虫强化的方式将其投喂给凡纳滨对虾仔虾, 从生长性能、肠道菌群组成和抗逆性等方面探讨其对凡纳滨对虾的影响。

1 材料与方法

1.1 发酵培养

盐富饶菌菌株 *Haloferox* YC-6 分离于天津汉沽

盐场结晶池卤水, 将其接种于培养基 (7.5 g/L 酸水解酪蛋白, 10 g/L 酵母提取物, 100 g/L 稀释卤水), 150 r/min、37 °C 和光照 (2 000 lx) 条件下摇瓶培养至对数生长期获得种子液。添加 5 g/L 蔗糖于上述培养基中进行发酵培养, 发酵体积为 3 L。发酵条件: pH 5.5 ~ 8.5, 温度 37 °C, 初始搅拌速度 200 r/min, 每 24 h 升高 100 r/min 直到 400 r/min。发酵 5 d 后 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 4 °C 避光保存。

1.2 卤虫强化

将美国大盐湖卤虫卵 (比利时 INVE 公司) 在 28 °C 和盐度 30 g/L 稀释卤水中连续充气孵化, 24 h 后收集卤虫无节幼体, 转移至盐度 50 g/L 稀释卤水中, 以 *Haloferox* YC-6 菌体强化卤虫。卤虫密度为 200 mL⁻¹, 菌体投加量 (以干质量计) 为 0.3 g/L。强化 12 h 后收集卤虫, 用相同盐度的稀释卤水冲洗, 4 °C 充气保存, 以维持卤虫存活和营养质量。

1.3 实验动物

实验所用凡纳滨对虾仔虾购自河北鑫海生物技术公司。将 PL5 仔虾在 28 °C、盐度 20 g/L 稀释卤水中暂养 3 d, 暂养过程中投喂虾片饲料。

1.4 实验设计

选出活力好且大小均匀的虾苗 (平均体长 0.53 cm) 随机分为 2 组, 分别以饥饿 12 h 卤虫和 *Haloferox* 菌体强化 12 h 卤虫作为对照组和实验组, 投喂凡纳滨对虾。饥饿卤虫和 *Haloferox* 强化卤虫的营养组成 (以干质量计) 见表 1。

养殖在循环过滤养殖系统中进行, 用海绵过滤食物残渣和对虾粪便。养殖箱为长方形聚丙烯箱体 (48 cm×26 cm×39 cm), 每组设 3 个平行, 每个平行箱投放虾苗 1 000 尾, 单位养殖水体为 20 L。养殖期间每天投喂 3 次, 每尾虾每次的初始投喂量为 100 个卤虫, 投喂量按前一天的 10% 增加。养殖周期为 10 d, 从第 6 天开始每天换 1/3 的水。养殖水体盐度为 20 g/L, 水温 (28 ± 1.0) °C, 溶氧量 (5.5 ± 0.5) mg/L, pH 7.6 ± 0.2, 连续充气, 光/暗周期为 16 h/8 h。

1.5 样品采集与指标分析

1.5.1 肠道菌群分析

养殖结束后测定对虾存活率, 并从每个平行箱中随机取 10 尾虾测量体长 (自对虾眼柄基部至尾节末端的长度)。从每个平行箱取 5 尾饥饿 24 h 的对虾,

置于冰上麻醉, 无菌条件下解剖取出对虾肠道, 立即放入灭菌的 EP 管中液氮速冻, 置于 -80 °C 保存. 将样品反复冻融后匀浆, 采用细菌 DNA 提取试剂盒 (天根生化科技公司) 提取肠道菌群 DNA, 样品交予诺禾致源公司使用 TruSeq®DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 文库试剂盒进行文库构建, 构建好的文库经过 Qubit 和 Q-PCR 定量检测文库合格后, 使用 NovaSeq6000 进行上机测序. 使用 Qiime 软件 (Version 1.9.1) 计算 Chao1 指数、香农指数 Shannon、辛普森多样性指数 Simpson、ACE 指数和覆盖率 Good-coverage 指数.

表 1 饥饿卤虫和 *Halofera* 强化卤虫的营养组成

Tab.1 Nutrient composition of starved and *Halofera*-enriched *Artemia*

组成	饥饿卤虫	强化卤虫
粗蛋白/%	62.80	65.38
粗脂肪/%	10.30	12.24
肉豆蔻酸 C _{14:0}	0.52	0.68
肉豆蔻烯酸 C _{14:1n-5}	0.75	0.94
十五烷酸 C _{15:0}	0.18	0.19
棕榈酸 C _{16:0}	10.10	12.42
棕榈油酸 C _{16:1n-7}	1.41	1.49
十七烷酸 C _{17:0}	0.46	0.57
硬脂酸 C _{18:0}	6.35	7.01
脂肪酸/ (mg·g ⁻¹)		
油酸 C _{18:1n-7}	24.96	29.13
亚油酸 C _{18:2n-6}	5.47	6.26
亚麻酸 C _{18:3n-3}	27.80	33.24
十八碳四烯酸 C _{18:4}	4.78	5.76
花生酸 C _{20:0}	0.18	0.18
二十碳一烯酸 C _{20:1n-9}	0.65	0.68
ARA C _{20:4n-6}	0.40	0.35
EPA C _{20:5n-3}	1.72	1.67
DHA C _{22:6n-3}	—	—

注: —表示未检出.

1.5.2 对虾粗蛋白、粗脂肪和脂肪酸测定

将收集的卤虫和对虾进行冷冻干燥 (BTP-3ES 型冷冻干燥机, 美国 SP-Scientific 公司). 称取 0.05 g 冷冻干燥样品, 参照 GB/T 6432—2018 《饲料中粗蛋白的测定·凯氏定氮法》, 利用 Kjeltac-8400 型全自动凯氏定氮仪 (丹麦 FOOS 公司) 测定对虾粗蛋白质含量. 称取 0.2 g 冷冻干燥样品, 参照 GB 5009.6—2016 《食品安全国家标准·食品中脂肪的测定》, 用索氏抽提法测定对虾粗脂肪含量. 称取 0.04 g 冷冻干燥样品, 准确加入 1 mg 内标液 (C_{20:2n-6}, 美国 NU-CHEK PREP 公司), 向混合物中加入 5 mL 甲醇与甲苯混合物 (体积比为 3:2) 和 5 mL 氯乙酰与甲醇混

合物 (体积比为 1:20), 充分匀浆 (T18 型匀浆机, 德国 IKA 公司) 后, 沸水浴 1 h. 用正己烷萃取脂肪酸甲酯并浓缩^[16], 利用 GC-2014 型气相色谱仪 (日本岛津公司) 进行脂肪酸定性和定量测定.

1.5.3 弧菌攻毒实验

副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus* MCCC 1A10122) 购于海洋微生物菌种保藏管理中心 (<https://mccc.org.cn/>). 菌种在 28 °C、150 r/min 条件下于 2216 E 培养基培养至对数生长期. 养殖结束后每缸随机取出 20 尾虾, 根据预实验结果, 以弧菌 10⁸ mL⁻¹ 剂量浸浴攻毒 48 h, 每隔 24 h 测定对虾存活率.

1.5.4 氨氮胁迫实验

每个平行箱中随机各取出 20 尾虾, 置于 1 L 含 30 mg/L 氯化铵 (NH₄⁺-N)、盐度 20 g/L 的水体中. 溶液中非离子氨 (NH₃-N) 质量浓度为 0.8 mg/L^[17]. 每隔 24 h 测定对虾存活率.

1.5.5 对虾肝胰腺抗氧化酶活性

养殖结束后和氨氮胁迫后, 在无菌条件下解剖获得对虾肝胰腺, 用试剂盒 (南京建成生物工程研究所) 测定其过氧化氢酶 (CAT) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 活性以及丙二醛 (MDA) 含量.

1.6 统计分析

数据用“平均值 ± 标准差”表示, 用 SPSS statistics analysis 20.0 软件进行独立样本 *t* 检验, *表示有显著差异 (*P* < 0.05).

2 结果与分析

2.1 凡纳滨对虾仔虾存活和生长

投喂 *Halofera* 强化的卤虫对凡纳滨对虾仔虾存活和生长的影响见表 2. 投喂 *Halofera* 强化卤虫的实验组对虾的存活率和体长均显著高于对照组 (*P* < 0.05).

表 2 投喂 *Halofera* 强化的卤虫对凡纳滨对虾仔虾存活和生长的影响

Tab.2 Effect of *Halofera*-enriched *Artemia* feeding on the survival and growth of *L. vannamei* postlarvae

组别	存活率/%	体长/mm
对照组	74.90 ± 3.25	13.05 ± 0.67
实验组	96.60 ± 7.99*	14.67 ± 0.65*

2.2 凡纳滨对虾营养组成

不同组别凡纳滨对虾营养组成见表 3. 两组对虾粗蛋白质和粗脂肪含量均无显著性差异. 实验组的 C_{14:1n-5}、C_{18:0}、C_{18:1n-9+n-7} 和 C_{18:4} 含量显著低于对照

组 ($P < 0.05$), 其他脂肪酸含量均无显著性差异。

表 3 不同组别凡纳滨对虾营养组成

Tab. 3 Nutritional composition of *L. vannamei* in different groups

组成	对照组	实验组
粗蛋白/%	68.97 ± 1.09	69.17 ± 0.54
粗脂肪/%	4.67 ± 0.00	5.88 ± 0.01
肉豆蔻酸 C _{14:0}	0.17 ± 0.03	0.14 ± 0.05
肉豆蔻烯酸 C _{14:1n-5}	0.21 ± 0.01*	0.17 ± 0.02
十五烷酸 C _{15:0}	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.02
棕榈酸 C _{16:0}	5.60 ± 0.34	4.71 ± 0.44
棕榈油酸 C _{16:1n-7}	0.51 ± 0.10	0.42 ± 0.04
十七烷酸 C _{17:0}	0.40 ± 0.22	0.36 ± 0.01
硬脂酯酸 C _{18:0}	4.96 ± 0.30*	4.26 ± 0.26
油酸 C _{18:1n-9+n-7}	10.47 ± 0.65*	8.80 ± 0.59
亚油酸 C _{18:2n-6}	3.10 ± 0.54	2.30 ± 0.18
亚麻酸 C _{18:3n-3}	9.10 ± 0.71	7.70 ± 0.51
十八碳四烯酸 C _{18:4}	0.71 ± 0.04*	0.56 ± 0.05
花生酸 C _{20:0}	0.22 ± 0.04	0.20 ± 0.01
二十碳一烯酸 C _{20:1n-9}	0.32 ± 0.05	0.34 ± 0.06
ARA C _{20:4n-6}	0.96 ± 0.05	0.93 ± 0.09
EPA C _{20:5n-3}	3.02 ± 0.22	2.95 ± 0.13
DHA C _{22:6n-3}	0.51 ± 0.65	0.54 ± 0.01

2.3 凡纳滨对虾肠道菌群多样性

不同组别凡纳滨对虾肠道微生物 α 多样性见表

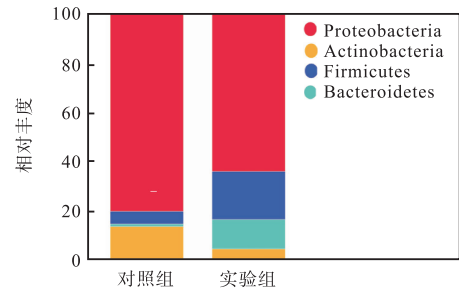
4. 对照组和实验组的 Good-coverage 覆盖率值均为 0.99, 表明每个文库的 16S rRNA 基因代表了对虾肠道中的大多数细菌. 实验组对虾肠道微生物多样性指数均有所上升, 但与对照组没有显著差异 ($P > 0.05$).

凡纳滨对虾肠道菌群结构门水平变化如图 1(a) 所示, 对虾肠道菌群主要以变形菌门 (Proteobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes) 和放线菌门 (Actinobacteria) 为主. 与对照组相比, 实验组变形菌门和放线菌门的相对丰度有所下降, 厚壁菌门和拟杆菌门 (Bacteroidetes) 相对丰度提高. 凡纳滨对虾肠道菌群属水平变化如图 1(b) 所示, 实验组弧菌属 (*Vibrio*) 比例下降, 副球菌属 (*Paracoccus*)、拟杆菌属 (*Bacteroides*)、微小杆菌属 (*Acteroides*) 和乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 的相对丰度均有所上升.

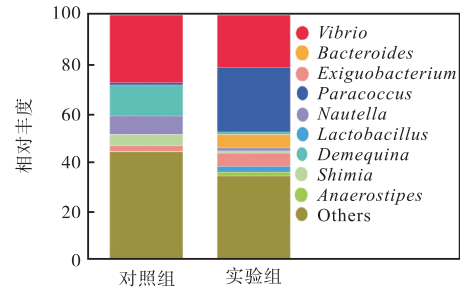
表 4 不同组别凡纳滨对虾肠道微生物 α 多样性

Tab. 4 Alfa-diversity of intestinal microbiota of *L. vannamei* postlarvae in different groups

项目	对照组	实验组
香农指数	3.86 ± 0.28	4.86 ± 1.42
辛普森多样性指数	0.84 ± 0.08	0.87 ± 0.09
Chao 1 指数	423.88 ± 126.98	654.80 ± 139.24
ACE 指数	462.19 ± 132.35	688.54 ± 167.23
覆盖率	0.99	0.99



(a) 门水平



(b) 属水平

图 1 投喂 *Haloferox* 强化卤虫对凡纳滨对虾肠道菌群门和属水平的影响

Fig. 1 Effect of *Haloferox*-enriched *Artemia* feeding on the intestinal microbiota of *L. vannamei* postlarvae in phylum level and in genus level

2.4 凡纳滨对虾肝胰腺抗氧化能力

投喂 *Haloferox* 强化卤虫对对虾肝胰腺抗氧化能力的影响结果见表 5. 与对照组相比, 养殖结束后实验组对虾肝胰腺 SOD 活性有所上升, 但没有显著性差异. 实验组对虾肝胰腺 CAT 活性显著高于对照组 ($P < 0.05$), MDA 含量显著低于对照组 ($P < 0.05$).

表 5 投喂 *Haloferox* 强化卤虫对对虾肝胰腺抗氧化能力的影响

Tab. 5 Effect of *Haloferox*-enriched *Artemia* feeding on antioxidative capacity of *L. vannamei* postlarvae

项目	对照组	实验组
SOD/(U·mg ⁻¹)	73.09 ± 4.62	82.61 ± 12.35
CAT/(U·mg ⁻¹)	2.96 ± 0.59	5.46 ± 1.20*
MDA/(nmol·mg ⁻¹)	1.51 ± 0.06*	1.25 ± 0.05

2.5 凡纳滨对虾抗胁迫能力

2.5.1 氨氮胁迫

氨氮胁迫对凡纳滨对虾存活率的影响如图 2 所示. 24 h 对照组和实验组对虾存活率没有显著差异, 但氨氮胁迫 48 h 后, 实验组存活率显著高于对照组 ($P < 0.05$).

投喂 *Haloferox* 强化的卤虫对氨氮胁迫 48 h 后对虾肝胰腺抗氧化能力的影响结果见表 6. 氨氮胁迫 48 h 后, 实验组对虾肝胰腺 SOD 活性有所降低, 但

差异不显著($P>0.05$), CAT 活性和 MDA 含量显著降低($P<0.05$).

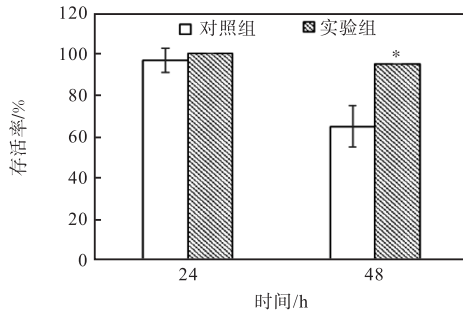


图2 氨氮胁迫对凡纳滨对虾存活率的影响

Fig. 2 Effect of ammonia nitrogen on survival rate of *L. vannamei*

表6 投喂 *Haloferax* 强化卤虫对氨氮胁迫 48 h 后对虾肝胰腺抗氧化能力的影响

Tab. 6 Effect of *Haloferax*-enriched *Artemia* feeding on antioxidative capacity of *L. vannamei* postlarvae after being exposed to ammonia nitrogen for 48 h

项目	对照组	实验组
SOD/(U·mg ⁻¹)	91.79 ± 14.06	83.27 ± 6.12
CAT/(U·mg ⁻¹)	5.34 ± 1.02*	2.37 ± 0.50
MDA/(nmol·mg ⁻¹)	1.52 ± 0.43*	0.58 ± 0.13

2.5.2 副溶血弧菌攻毒

副溶血弧菌攻毒对凡纳滨对虾存活率的影响如图3所示. 攻毒 24 h 的对照组和实验组对虾存活率没有显著差异, 在 91.67% ~ 93.33% 之间. 攻毒 48 h 后, 实验组对虾存活率显著高于对照组 ($P<0.05$).

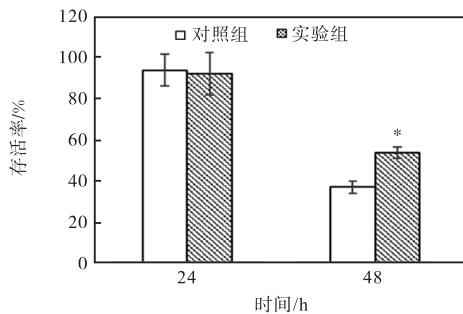


图3 副溶血弧菌攻毒对凡纳滨对虾存活率的影响

Fig. 3 Effect of challenge with *V. parahaemolyticus* on survival rate of *L. vannamei*

3 讨论

3.1 *Haloferax* 对凡纳滨对虾生长和营养组成的影响

本文研究表明, 投喂 *Haloferax* 强化卤虫能显著提高对虾仔虾的存活率, 促进对虾生长. 有研究^[15,18]表明, 饲料中类胡萝卜素的添加起到促进水产

动物生长和提高抗逆能力的作用. *Haloferax* 对对虾的促进作用可能与细胞膜上大量积累的类胡萝卜素有关.

本研究中强化卤虫的各种脂肪酸含量较饥饿卤虫高, 与卤虫在饥饿状态下代谢脂肪酸等营养物质为其提供生长存活必需的能量有关. 一般而言, n-3 多不饱和脂肪酸特别是高不饱和脂肪酸(如 EPA、ARA 和 DHA)对海洋水产动物细胞膜的流动性和渗透性有较大影响^[16,19]. 对照组对虾中 C_{14:1n-5}、C_{18:0}、C_{18:1n-9+n-7} 和 C_{18:4} 含量显著高于实验组, 可能与对虾本身的脂肪酸组成和对饵料中脂肪酸的选择性代谢有关.

3.2 *Haloferax* 对凡纳滨对虾肠道菌群的影响

肠道菌群对对虾维持机体健康和免疫稳态非常重要^[20]. 本研究中 *Haloferax* 的添加在一定程度上增加了对虾肠道菌群的多样性, 同时 *Haloferax* 的摄入降低了变形菌门丰度, 主要表现在弧菌属的丰度降低. 变形菌门广泛存在于水生无脊椎动物肠道微生物群中, 通常是甲壳类动物肠道菌群的主要组成部分^[21]. 弧菌是对虾肠道的优势菌属, 部分弧菌产生的几丁质酶有助于其在肠道菌群形成优势菌, 与宿主共存^[22]. 但弧菌属于条件致病菌, 其数量和毒力与环境因子有关, 环境胁迫造成弧菌的数量和毒力增加, 进而致病性增强, 导致对虾的死亡率较高^[23-24]. 本研究中 *Haloferax* 的添加在一定程度上降低了弧菌属的丰度, 提高了乳杆菌属的丰度, 对对虾肠道健康起到有益作用.

3.3 *Haloferax* 对凡纳滨对虾抗氨氮胁迫能力的影响

古菌细胞膜中含有大量菌红素等长链 C₅₀ 类胡萝卜素^[10]. 与 β-类胡萝卜素相比, *Haloferax* 类胡萝卜素提取物可更有效地清除 DPPH 自由基, 并对 H₂O₂ 介导的红细胞溶血具有更好的保护作用^[25]. 研究^[15,26]表明, 类胡萝卜素的添加对水生动物产生积极的效果, 改善由养殖密度过高、高温胁迫或病原菌感染造成的不良影响. 在脊椎动物中, 类胡萝卜素发挥了其抗氧化和免疫作用, 可以清除过量自由基从而降低自我损伤^[27]. 类胡萝卜素也被证实能够提高甲壳动物免疫力和抗氧化能力^[28-29].

氨氮是影响对虾存活和生长的重要环境因子. 当暴露于高浓度氨氮时, 对虾机体发生一系列改变, 包括肝胰腺损伤、细胞凋亡以及免疫损伤等^[30-31]. 转录组分析^[32]表明, 氨氮暴露破坏对虾氧化和抗氧化平衡, 造成机体的氧化应激. 机体的抗氧化系统包括

两类:酶类(如 SOD 和 CAT 等)和小分子非酶类(如谷胱甘肽、类胡萝卜素和维生素等)。研究^[33]表明,对虾 CAT、SOD、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)等抗氧化酶在对虾氨氮防御中发挥重要作用。本研究发现,养殖过程中 *Haloferax* 的添加使对虾肝胰腺抗氧化酶活力上升,其中 CAT 活性显著增加。氨氮胁迫 48 h 后,实验组对虾的存活率显著高于对照组,表明古菌提高了对虾抵抗氨氮胁迫的能力,与古菌的摄入提高了对虾抗氧化酶活性进而发挥了氨氮防御功能有关。值得一提的是,氨氮胁迫后实验组对虾肝胰腺 SOD 活性有所下降,CAT 活性和 MDA 含量显著降低,可能与机体抗氧化系统的反应机理有关。在抗氧化系统中,SOD 作为清除活性氧和自由基的第一道防线,能将活性氧转化为过氧化氢和氧气,然后过氧化氢通过 CAT 作用转化为水和氧气。MDA 是脂质过氧化的终产物,其含量可以作为细胞膜氧化损伤的标志^[34]。本研究中氨氮胁迫后实验组 MDA 含量显著降低,表明实验组对虾机体氧化损伤程度较轻,而 CAT 活性降低可能是因为 *Haloferax* 提供的类胡萝卜素代替抗氧化酶发挥了清除活性氧和自由基的功能,进而保护对虾免受氧化应激损伤。

3.4 *Haloferax* 对凡纳滨对虾抗弧菌能力的影响

副溶血弧菌是对虾急性肝胰腺坏死综合征(acute hepatopancreatic necrosis syndrome, AHPNS)的主要病原体。除损伤肝胰腺外,弧菌感染还可损伤对虾肠道的屏障功能,造成对虾感染和死亡^[35]。本研究中 *Haloferax* 的添加提升了凡纳滨对虾对弧菌的抵抗能力,显著提高了其存活率。其原因一方面可能是 *Haloferax* 的摄入降低了对虾肠道内弧菌属的丰度,缓解了弧菌感染的程度;另一方面可能与 *Haloferax* 含有的活性物质有关。由于对高盐环境的适应性,嗜盐古菌产生具有生物活性的初级和次级代谢产物,如酶类、类胡萝卜素、PHB 以及嗜盐菌素等^[9,36-38],这些物质可能成为对虾抗弧菌感染的贡献者。

4 结 论

将古菌 *Haloferax* 作为饲料添加剂通过卤虫强化方式投喂给凡纳滨对虾仔虾,可以促进对虾的存活和生长,改善对虾肠道菌群,增强对虾抵抗弧菌和抗氨氮胁迫能力。*Haloferax* 菌体富含大量高抗氧化活性的 C₅₀ 类胡萝卜素,从而提高对虾机体抗氧化能力,增强对虾对弧菌的抵抗力。本研究结果为进一步研究古菌在水产养殖中的应用提供了依据。

参考文献:

- [1] 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. 2019 中国渔业统计年鉴[M]. 北京:中国农业出版社,2019.
- [2] Food and Agriculture Organization of the United Nations. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020[R]. Rome:FAO,2020.
- [3] SHINN A P, PRATOOMYOT J, GRIFFITHS D, et al. Asian shrimp production and the economic costs of disease[J]. Asian fisheries science, 2018, 31(S): 29-58.
- [4] CHEN Y H, HE J G. Effects of environmental stress on shrimp innate immunity and white spot syndrome virus infection[J]. Fish & shellfish immunology, 2019, 84: 744-755.
- [5] XIE S W, TIAN L X, LI Y M, et al. Effect of proline supplementation on anti-oxidative capacity, immune response and stress tolerance of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. Aquaculture, 2015, 448: 105-111.
- [6] LIAO X Z, HU S K, WANG B, et al. Dietary supplementation with polypeptides improved growth performance, antibacterial immune and intestinal microbiota structure of *Litopenaeus vannamei*[J]. Fish & shellfish immunology, 2019, 92: 480-488.
- [7] ZHOU L, LI H, QIN J G, et al. Dietary prebiotic inulin benefits on growth performance, antioxidant capacity, immune response and intestinal microbiota in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) at low salinity[J]. Aquaculture, 2020, 518: 734847.
- [8] PFEIFER K, ERGAL I, KOLLER M, et al. Archaea biotechnology[J]. Biotechnology advances, 2020, 47: 107668.
- [9] ALSAFADI D, AL MASHAQBEH O. A one-stage cultivation process for the production of poly-3-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) from olive mill wastewater by *Haloferax mediterranei*[J]. New biotechnology, 2017, 34: 47-53.
- [10] CRESPO J, MONTERO Z, FUENTES J L, et al. Exploring the valuable carotenoids for the large-scale production by marine microorganisms[J]. Marine drugs, 2018, 16: 203.
- [11] YATSUNAMI R, ANDO A, YANG Y, et al. Identification of carotenoids from the extremely halophilic archaeon *Haloarcula japonica*[J]. Frontiers in microbiology, 2014, 5: 100.

- [12] ZALAZAR L , PAGOLA P , MIRO M V , et al. Bacterioruberin extracts from a genetically modified hyperpigmented *Haloferox volcanii* strain : antioxidant activity and bioactive properties on sperm cells[J]. Journal of applied microbiology , 2019 , 126 (3) : 796–810.
- [13] GIANI M , GARBAYO I , VILCHEZ C , et al. Haloarchaeal carotenoids : healthy novel compounds from extreme environments[J]. Marine drugs , 2019 , 17 (9) : 529.
- [14] TORRES E , FUENMAYOR C A , VASQUEZ S M , et al. Effect of bee pollen extract as a source of natural carotenoids on the growth performance and pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Aquaculture , 2020 , 514 : 734490.
- [15] LIU F , QU Y K , WANG A M , et al. Effects of carotenoids on the growth performance , biochemical parameters , immune responses and disease resistance of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) under high-temperature stress[J]. Aquaculture , 2019 , 503 : 293–303.
- [16] SUI L Y , SUN H X , WU X G , et al. Effect of dietary HUFA on tissue fatty acid composition and reproductive performance of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* (H. Milne-Edwards) broodstock[J]. Aquaculture international , 2011 , 19 (2) : 269–282.
- [17] EMERSON K , RUSSO R , LUND R E , et al. Aqueous ammonia equilibrium calculations : effect of pH and temperature[J]. Journal of the fisheries research board of canada , 1975 , 12 (32) : 2379–2383.
- [18] 刘晓慧. 不同来源的虾青素对凡纳滨对虾幼虾的影响及其作用机制[D]. 青岛 : 中国科学院海洋研究所 , 2018.
- [19] WILLE M , CHENG Y X , SUI L Y , et al. The effect of dietary n-3 HUFA levels and DHA/EPA ratios on growth , survival and osmotic stress tolerance of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* larvae[J]. Aquaculture , 2007 , 273 (1) : 139–150.
- [20] 王金星. 对虾等甲壳类动物肠道与血淋巴菌群的组成、功能与动态平衡调控[J]. 微生物学报 , 2018 , 58 (5) : 760–772.
- [21] HOLY C C , BASS D , STENTIFORD G , et al. Understanding the role of the shrimp gut microbiome in health and disease[EB/OL]. [2021–03–06]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201120300938>.
- [22] SUGITA H , ITO Y. Identification of intestinal bacteria from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and their ability to digest chitin[J]. Letters in applied microbiology , 2006 , 43 (3) : 336–342.
- [23] KAUTSKY N , RONNBACK P , TEDENGREN M , et al. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming[J]. Aquaculture , 2000 , 191 : 145–161.
- [24] JOSEPH A , PHILIP R. Immunocompetence of *Penaeus monodon* under acute salinity stress and pathogenicity of *Vibrio harveyi* with respect to ambient salinity[J]. Fish & shellfish immunology , 2020 , 106 : 555–562.
- [25] HOU J , CUI H L. In Vitro antioxidant , antihemolytic , and anticancer activity of the carotenoids from halophilic archaea[J]. Current microbiology , 2018 , 75 (3) : 266–271.
- [26] SAHIN K , ORHAN C , YAZLAK H , et al. Lycopene improves activation of antioxidant system and Nrf2/HO-1 pathway of muscle in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with different stocking densities[J]. Aquaculture , 2014 , 430 : 133–138.
- [27] WALRAND S , FARGES M C , DEHAESE O , et al. In vivo and in vitro evidences that carotenoids could modulate the neutrophil respiratory burst during dietary manipulation[J]. Original contribution , 2005 , 44 (2) : 114–120.
- [28] DALY B , SWINGLE J S , ECKERT G L. Dietary astaxanthin supplementation for hatchery-cultured red king crab , *Paralithodes camtschaticus* , juveniles[J]. Aquaculture nutrition , 2013 , 19 (3) : 312–320.
- [29] XIE S W , FANG W P , WEI D , et al. Dietary supplementation of *Haematococcus pluvialis* improved the immune capacity and low salinity tolerance ability of post-larval white shrimp , *Litopenaeus vannamei*[J]. Fish & shellfish immunology , 2018 , 80 : 452–457.
- [30] LU X , KONG J , LUAN S , et al. Transcriptome analysis of the hepatopancreas in the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under acute ammonia stress[J]. PLOS ONE , 2016 , 11 (10) : e0164396.
- [31] WANG W , YANG S P , WANG C G , et al. Gill transcriptomes reveal involvement of cytoskeleton remodeling and immune defense in ammonia stress response in the banana shrimp *Fenneropenaeus merguensis*[J]. Fish & shellfish immunology , 2017 , 71 : (下转第 21 页)

- ized Kevlar fiber and epoxy matrix for filament winding composites[J]. Composites science and technology, 2008, 68(15): 3208–3214.
- [11] EVERY H A, JANSSEN G J M, SITTERS E F, et al. Performance analysis of sulfonated PPTA polymers as potential fuel cell membranes[J]. Journal of power sources, 2006, 162(1): 380–387.
- [12] LI J, CAI C L. The friction and wear properties of ECP surface-treated Kevlar fiber-reinforced thermoplastic polyimide composites[J]. Polymer-plastics technology and engineering, 2010, 49(2): 178–181.
- [13] CHEN J R, ZHU Y F, NI Q Q, et al. Surface modification and characterization of aramid fibers with hybrid coating[J]. Applied surface science, 2014, 321: 103–108.
- [14] WEI B, CAO H L, SONG S H. Surface modification and characterization of basalt fibers with hybrid sizings[J]. Composites part A: applied science and manufacturing, 2010, 42(1): 22–29.
- [15] 杨兵, 惠岚峰, 刘倩, 等. 热压对芳纶纤维纸性能的影响[J]. 天津科技大学学报, 2021, 36(1): 25–29.
- [16] 邓婷婷, 张光先, 代方银, 等. 对位芳纶磷酸化表面改性[J]. 纺织学报, 2015, 36(11): 12–19.

责任编辑: 周建军

(上接第 14 页)

- 319–328.
- [32] LI Y D, ZHOU F L, HUANG J H, et al. Transcriptome reveals involvement of immune defense, oxidative imbalance, and apoptosis in ammonia-stress response of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. Fish & shellfish immunology, 2018, 83: 162–170.
- [33] LU X, LUAN S, DAI P, et al. iTRAQ-based comparative proteome analysis for molecular mechanism of defense against acute ammonia toxicity in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. Fish & shellfish immunology, 2018, 74: 52–61.
- [34] SONG Y N, LI Z X, LIN H, et al. Effect of malondialdehyde treatment on the IgE binding capacity and conformational structure of shrimp tropomyosin [J]. Food chemistry, 2015, 175: 374–380.
- [35] JIAO L F, DAI T M, ZHONG S Q, et al. *Vibrio parahaemolyticus* infection impaired intestinal barrier function and nutrient absorption in *Litopenaeus vannamei* [J]. Fish & shellfish immunology, 2020, 99: 184–189.
- [36] ELLEUCHE S, SCHAFERS C, BLANK S, et al. Exploration of extremophiles for high temperature biotechnological processes [J]. Current opinion in microbiology, 2015, 25: 113–119.
- [37] RO BANOS M, GARBAYO I, VILCHEZ C, et al. Carotenoids from haloarchaea and their potential in biotechnology [J]. Marine drugs, 2015, 13(9): 5508–5532.
- [38] JAVOR B J. Industrial microbiology of solar salt production [J]. Journal of industrial microbiology & biotechnology, 2002, 28: 42–47.

责任编辑: 郎婧