

## 一株芽孢杆菌 PC024 的鉴定及其抗 WSSV 感染效果的研究

孙 艳<sup>1</sup>, 宋晓玲<sup>1\*</sup>, 刘 飞<sup>1,2</sup>, 李玉宏<sup>1,3</sup>, 黄 健<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

2. 中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003;

3. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

**摘要:** 为了筛选 WSSV 的防病益生菌株, 从健康中国明对虾消化道分离纯化一株芽孢杆菌 PC024, 经 Biolog 碳源利用反应、ATB 微生物自动鉴定系统、脂肪酸气相色谱分析得出该菌株与坚强芽孢杆菌的生理生化特性最为相似, 该菌株为革兰氏阳性菌, 有一根端极鞭毛; 细胞呈球杆状, 有椭圆芽孢; 单个菌落呈圆形, 中间略微凸起; 16S rRNA 序列分析表明, 该菌株与坚强芽孢杆菌进化地位最接近, 同源性均达到 100%, 综合以上 4 种方法的鉴定结果, 该菌株被鉴定为坚强芽孢杆菌。将已鉴定的 PC024 菌株粘附于对虾饲料表面投喂给凡纳滨对虾 20 d 后, 进行 WSSV 肌肉注射感染, 测定投喂和感染后对虾血淋巴上清和肝胰腺的免疫相关酶活性, 并对对虾肠道总菌数和添加菌 PC024 进行计数及鉴定。结果表明: 添加该菌的实验组对虾相对存活率高, 相对保护率达 33.7%; 投喂含该菌饲料的实验组对虾血清和肝胰腺的相关免疫酶活性较对照组显著提高, 对虾肠道总细菌数始终显著高于对照组, 并在实验组能够分离得到坚强芽孢杆菌, 坚强芽孢杆菌 PC024 可作为 WSSV 的防病益生菌株应用于对虾养殖生产。

**关键词:** 凡纳滨对虾; 坚强芽孢杆菌; 鉴定; 免疫酶活性; 抗病力

**中图分类号:** S 943

**文献标志码:** A

芽孢杆菌 (*Bacillus* spp.) 为革兰氏阳性细菌, 广泛分布于海水养殖环境, 对海水养殖动物极少有致病性, 其生物学功能包括分泌多种活性较强的酶类, 促进养殖动物对营养物质的消化吸收、调节动物肠道的微生态平衡以及增强机体免疫力和抗病力等<sup>[1]</sup>, 是重要的海洋微生物资源<sup>[2]</sup>。芽孢杆菌因其能以孢子形式生存于较恶劣的环境中如低营养、高温和干燥等环境, 稳定性好, 易于生产和保存, 是适宜添加在饲料中的优良益生菌之一<sup>[3-4]</sup>。芽孢杆菌类制剂能够通过促进定植于肠道的一种或几种微生物的活性, 抑制消化道内病原菌的生长, 减少宿主感染疾病的机会, 从而保障养殖动物机体健康<sup>[5-8]</sup>。

益生菌因其具有可以提高饲料利用率, 促进养殖动物生长, 提高机体免疫力和减少养殖活动给环境带来的污染等优点, 逐步成为水产动

物病害防控的研究热点<sup>[7,9-10]</sup>。但益生菌在水产养殖中的应用尚存在候选益生菌株缺乏, 作用机理不明确等问题。本文在完成一株芽孢杆菌 PC024 鉴定的基础上, 将其粘附于对虾饲料表面进行凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 的养殖实验, 通过 WSSV 感染后累积死亡率的比较, 感染前后对虾血清、肝胰腺的相关免疫酶活性的测定, 以及统计肠道细菌总数和添加菌的定植情况, 分析该菌株对对虾免疫力和抗病毒感染能力的影响, 为其在对虾养殖行业的健康稳定发展提供科学依据。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 菌株来源及分离

菌株 PC024 于 2010 年 3 月 28 日分离自健康中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 消化道,

收稿日期: 2012-10-11 修回日期: 2013-01-10

资助项目: 公益性行业(农业)科研专项(201103034); 国家虾现代产业技术体系专项(nycytx-46)

通信作者: 宋晓玲, E-mail: songxl@ysfri.ac.cn

使用 2216E 海水培养基对其进行分离、筛选和纯化。

## 1.2 菌株鉴定

**革兰氏染色及形态学观察** 参照《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[11]</sup>,对纯培养菌株 PC024 进行革兰氏染色及芽孢染色,并进行细菌形态观察。

**菌株 16S rRNA 序列分析** 使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (TIANGEN) 快速提取菌株 PC024 基因组 DNA,按以下反应体系用 PCR 扩增仪 (Applied Biosystems 2720 Thermal cycle) 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 (50  $\mu$ L) 含 2  $\times$  Easy Taq PCR SuperMix (包含 Easy Taq DNA 聚合酶、dNTPs 和优化的反应缓冲液, TaKaRa) 25  $\mu$ L; 10  $\mu$ mol/L 16S rRNA 上下游通用引物; DNA 模板 2.5  $\mu$ L。经 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 45 s, 55  $^{\circ}$ C 45 s, 72  $^{\circ}$ C 90 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。产物在 1.0% 琼脂糖凝胶 (含 0.1  $\mu$ g/mL GeneFinder) 于 1  $\times$  TAE 中 100 V 电泳 30 min, 使用全自动凝胶成像仪 (LAS3000, Fujifilm) 拍照后, 回收 PCR 产物测序 (上海桑尼生物科技有限公司)。将拼接后的序列进行 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 同源性比对, 利用软件 MEGA 4.0 构建系统发育树。

**菌株碳源利用鉴定** 菌株 PC024 按文献 [12] 要求经过氧化酶反应试验和三糖铁试验, 初步确定为 GP-ROD SB (革兰氏阳性芽孢杆菌) 将该菌纯培养后按“十”字法接种到 BUG + M + T 培养基<sup>[12]</sup> (BIOLOG UNIVERSAL GROWTH AGAR + 麦芽糖 + 巯基乙酸钠), 在 35 ~ 37  $^{\circ}$ C 下扩大培养 16 ~ 24 h 后, 按文献 [13] 在培养液中加入 8 滴 7.66% 巯基乙酸钠和 1 mL 浓度为 5 mmol/L 的水杨酸钠, 采用干管分散技术制备菌悬液<sup>[12]</sup> (用接种棒从培养 16 h 的 BUG + M + T 培养基上挑取纯培养物, 插入一支干的试管中, 沿试管内壁旋转几圈, 将菌落转至试管内壁, 然后用接种棒在水平和垂直方向上不停划动, 并转动试管, 将菌落均匀分散; 取一支无菌吸管, 移取 3 ~ 5 mL 接种液, 加至分散良好的干管中。用一支无菌棉签将试管内壁的菌落洗下与接种液均匀混合), 最后悬浊液呈乳白色。用浊度仪 (Biolog Turbidimeter) 调整菌悬液浊度到 28%, 再按每孔 150  $\mu$ L 接种到相应的 GP<sub>2</sub> 鉴定板 (Biolog, MicroPlate<sup>TM</sup>), 培养 4 ~ 6 和 16 ~ 24 h 后依次在微

生物自动分析系统 (BIOLOG MICROSTATION<sup>TM</sup>) 上读数, 得出鉴定结果。

**菌株脂肪酸组成分析鉴定** 将纯培养细菌接种于 TSBA 固体培养基 (胰蛋白胨大豆肉汤培养基 30 g, 琼脂粉 15 g, 蒸馏水 1 L) 上 28  $^{\circ}$ C 培养约 24 h, 收集约 40 mg 细菌培养物于 8 mL 螺口玻璃管中, 按气相色谱仪 (Agilent Technologies 6850 Network GC System) 的脂肪酸抽提技术指南, 经氢氧化钠和甲醇皂化和甲基化, 用正己烷和叔丁基乙醚萃取, 再经氢氧化钠洗涤后, 取 2/3 上层有机相置气相色谱样品瓶中, 按脂肪酸鉴定上机分析步骤注入气相色谱仪中分析。据各脂肪酸组分保留时间计算等链长 (ECL) 值, 确定目标组分的存在, 采用峰面积归一化法计算各组分相对含量, 再将二者与微生物脂肪酸鉴定系统 (MIDI Sherlock 6.1, 安捷伦) 谱库中的标准菌株数值匹配计算相似度 (similarity index, SI), 得出可能的菌种鉴定结果<sup>[13]</sup>。

**菌株生化指标鉴定** 使用 API CH 试条 (法国梅里埃公司) 对纯菌株 PC024 的生化指标进行鉴定, 完全按照试剂盒使用说明书进行菌株生化指标自动鉴定 (ATB 微生物鉴定/药敏系统, 法国梅里埃)。

## 1.3 菌株 PC024 对凡纳滨对虾免疫力和抗 WSSV 感染力的影响

**菌株制备** 将 -80  $^{\circ}$ C 保种的菌株 PC024 用接种环接种于 2216E 固体海水培养基, 37  $^{\circ}$ C 倒置培养 16 ~ 18 h 进行活化, 将活化的菌株 PC024 接种于 2216E 液体培养基中, 在 37  $^{\circ}$ C, 180 r/min 的恒温振荡摇床 (ZHWHY-2102, 上海智诚) 振荡培养 24 h 后, 使用 5 000 r/min 的高速离心机 (湘仪 GL10MD) 离心收集菌体, 通过重新涂板计数确定其活菌量达到  $1.0 \times 10^{11}$  cfu/mL。

**饲料制备** 基础饲料和实验饲料制备按文献 [14] 方法操作, 其中实验饲料中菌株 PC024 达到  $10^8$  cfu/g。将制备好的饲料存放于 4  $^{\circ}$ C 冰箱, 每 7 天涂平板检测实验饲料中菌含量是否满足要求。

**对虾及其暂养** 实验用凡纳滨对虾体长 (8.5  $\pm$  0.6) cm, 2011 年 6 月 14 日购自青岛宝荣水产科技有限公司对虾养殖场, 经对虾白斑综合征病毒 (WSSV) 现场快速高灵敏检测试剂盒 (由本实验室提供) 检测, 确认为 WSSV 阴性。在实

实验室暂养于有效水体为 40 L 的整理箱中,水温 23~27 °C,盐度 29~31,pH 7.8~8.2。每天下午换水 1 次,换水量为 1/3;每日投喂 4 次,投喂前吸出残饵和粪便,全天充气。

**实验分组** 暂养 7 d 后,挑取个体均匀,活力较强的 360 尾对虾随机分配到 6 个水族箱中,分为实验组和对照组,每组各 3 个重复,每个重复 60 尾。实验组每日投喂含 PC024 活菌  $1.0 \times 10^8$  cfu/g 的实验饲料,对照组每日投喂不添加细菌的基础饲料。日投喂量为凡纳滨对虾体质量的  $(12 \pm 3)\%$  (根据对虾摄食情况调节投喂量),按照暂养期间的条件管理所有处理组。

**WSSV 感染实验** 按照文献[14]的方法制备 WSSV 粗提液,在投喂饲料后的 21 d 进行攻毒。实验组和对照组均攻毒 120 尾,分为 4 个平行,每个平行 30 尾。其中 3 个平行用于统计对虾的死亡数量,1 个平行用于采集血淋巴和肝胰腺组织。感染前 1 天停食,次日向每尾虾第 2 腹节肌肉中注射 50  $\mu$ L WSSV 粗提液;对照组每尾虾注射 50  $\mu$ L 0.7% 生理盐水。攻毒后各组均继续投喂相应的饲料,管理与暂养期间相同,及时检出死虾,记录每组对虾死亡数量,14 d 后结束感染实验。

**对虾血清和肝胰腺免疫酶活性的测定**

#### (1) 样品采集与处理

投喂期间每 5 天取样一次,每组随机取 6 尾对虾(3 个重复  $\times$  2 尾),用 1 mL 无菌注射器从对虾围心腔内抽取血淋巴,将血淋巴置于 1.5 mL 无菌离心管中,于 4 °C 冰箱过夜后 3 000 r/min 离心 10 min 获取血清;同时采集肝胰腺,血清和肝胰腺于 -20 °C 保存待测。感染 WSSV 后 0、12、24、48、72、96、192、336 h 采集攻毒对虾的血淋巴和肝胰腺组织,采集和保存方法同上。

#### (2) 免疫酶活性测定

所得血清用于酸性磷酸酶(acid phosphatase, ACP)、总超氧化物歧化酶(total superoxide dismutase, T-SOD)和溶菌酶(lysozyme, LZM)、过氧化物酶(oxidase, POD)和酚氧化酶(phenoloxydase, PO)活力的测定。

取肝胰腺称重,按肝胰腺重量:生理盐水体积为 1:19 制成 5% 组织匀浆液,将所得匀浆液于 4 °C 8 000 r/min 离心 15 min,吸取中间较澄清液体进行 ACP、T-SOD、LZM 活性的测定,并在结果计

算时乘以稀释倍数 20。

ACP、T-SOD、LZM 及 POD 活性测定均参照南京建成试剂盒说明书进行,PO 活性的测定参照王专伟等<sup>[15]</sup>的方法进行。

**凡纳滨对虾肠道细菌计数** 自养殖开始每 5 天取样一次,随机从每组取 6 尾对虾(3 个重复  $\times$  2 尾)。在无菌操作台,用 75% 的酒精擦拭虾体后无菌条件下取对虾肠道。将 6 尾对虾的肠道用灭菌玻璃匀浆器研磨后加入 1 mL 的无菌生理盐水(NaCl, 0.85%)转移到 1.5 mL EP 管中,10 倍梯度进行稀释,稀释到  $10^{-4}$ ,取  $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  两个梯度各 100  $\mu$ L 用玻璃珠进行涂布于 2216E 海水固体培养基中,每个梯度涂布 3 个平行,37 °C 恒温培养箱倒置培养。一般培养 20~24 h 后进行计数;将优势菌挑取单克隆用接种环划线于 2216E 海水固体培养基中进行菌落纯化,接种 2~3 代后确定为纯培养菌后进行保种,并利用 16S rRNA 序列分析统计总菌数和所添加菌的数量。

总细菌数量(每尾对虾) = 细菌克隆数量  $\times$  稀释倍数  $\times$  匀浆稀释倍数/对虾数量

## 1.4 数据分析

所有统计分析采用 SPSS 16.0 统计软件,对实验数据进行单因素方差(One-way ANOVA)分析,当差异显著( $P < 0.05$ )时用 Duncan 氏法作多重比较。

## 2 结果

### 2.1 菌株 PC024 的鉴定

**菌体形态特征** 菌株 PC024 在 2216E 平板上,经 37 °C 培养 24 h 左右即可形成典型菌落(图 1),单个菌落呈圆形边缘不规则,乳白色,中间略微凸起,直径在 2 mm 左右。进行革兰氏染色镜检,为革兰氏阳性,细胞呈球杆状,有椭圆芽孢,且有一根端极鞭毛。



图 1 细菌 PC024 菌落形态

Fig. 1 The form of bacteria PC024 colony

菌株 PC024 的 16S rRNA 序列分析与系统发育关系 菌株 PC024 的基因组 DNA 用 16S rRNA 通用引物扩增,获得 1 443 bp 产物。该产物经序列分析,并与芽孢杆菌属 10 种芽孢杆菌比

较,结果表明,与坚强芽孢杆菌的同源性为 100%。利用 MEGA 4.0 绘制系统发生树(图 2),表明该细菌分离物与芽孢杆菌属中的坚强芽孢杆菌进化地位最接近。

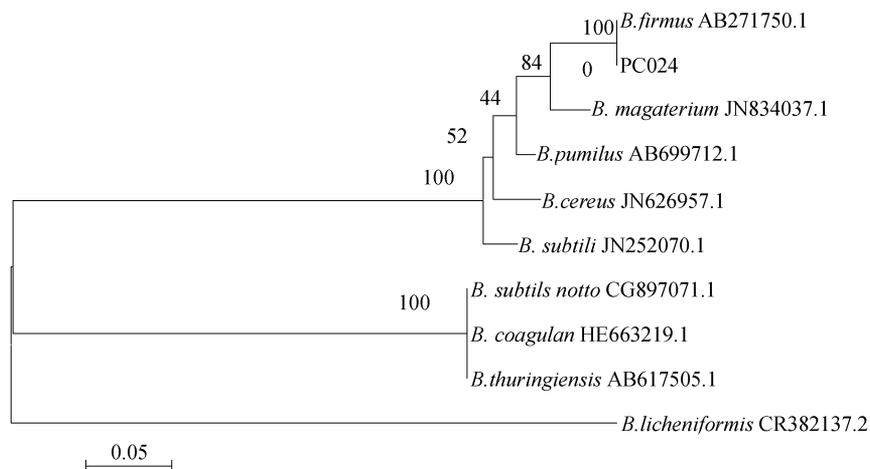


图 2 中国明对虾细菌分离物 PC024 的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of the bacterium PC024 from *F. chinensis*

Biolog 微生物自动鉴定系统鉴定菌株 PC024 从 Biolog 碳源利用结果可以得出菌株 PC024 在培养 6 和 24 h 能够利用  $\alpha$ -环式糊精、 $\alpha$ -D-葡萄糖、 $\beta$ -环式糊精、 $\beta$ -甲基-D-葡萄糖苷、N-乙酰- $\beta$ -D-甘露糖胺、N-乙酰-D-葡萄糖胺、D-阿洛酮糖、D-核糖、D-木糖、D-海藻糖、D-甘露醇、D-果糖、L-阿拉伯糖、L-丙氨酰-甘氨酸、L-丙氨酸、L-丝氨酸、L-谷氨酸、2'-脱氧腺苷麦芽糖、3-甲基-D-葡萄糖、丙酮酸、甘油/丙三酸、麦芽三糖、蔗糖、甘露聚糖、胸苷、尿苷、肌苷/次黄苷等碳源,以上这些碳源是菌株 PC024 的特异性碳源。根据与 Biolog 菌种库中坚强芽孢杆菌标准菌株相比较 6 h 相似度为 0.941,24 h 相似度为 0.501;可能性均为 100%。结果表明该菌株 PC024 为坚强芽孢杆菌。

菌株 PC024 的脂肪酸组分分析 菌株 PC024 的脂肪酸经气相色谱仪分析,确定了该菌的脂肪酸组分,该菌脂肪酸组分按照含量由多到少主要有 15:0 anteiso、15:0 iso、17:0 anteiso、16:0 iso、16:1 w7c alcohol、16:1 w11c 等 11 种。通过微生物脂肪酸鉴定系统鉴定,该菌株属于芽孢杆菌属(*Bacillus* GC group),相似度为 0.856。

ATB 微生物自动鉴定系统对菌株 PC024 的

鉴定分析 菌株 PC024 培养 24 和 48 h 时经 ATB 微生物自动鉴定系统鉴定得出该菌为坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*),相似度(% ID)达 99.9%,*T* 值为 0.73。利用该鉴定系统可以得出菌株 PC024 能够产生淀粉酶水解淀粉且具有水解七叶灵的能力,同时通过生化指标分析,该菌能够利用 D-麦芽糖、D-核糖、D-海藻糖、D-葡萄糖、D-果糖、D-葡糖酸盐、N-乙酰-葡萄糖胺、杨梅酸、糖原、甘油、蔗糖等碳源。

## 2.2 投喂菌株 PC024 对凡纳滨对虾感染 WSSV 的保护作用

两个组在投喂相应饲料 20 d 后注射感染 WSSV,14 d 内的累积死亡率呈现显著差异(图 3)。感染 WSSV 4 d 内,实验组与对照组累积死亡率差异不显著( $P > 0.05$ ),感染 5 d 后两个组的累积死亡率均呈增长趋势。且对照组累积死亡率显著高于实验组( $P < 0.05$ ),在感染 10 d 后实验组的累积死亡率趋于稳定。到 14 d 感染实验结束,对照组的累积死亡率为 100%,显著高于实验组的累积死亡率(66.3%  $\pm$  2.1%),实验组相对于对照组的相对保护率为 33.7%。通过感染实验可以看出,饲喂含有坚强芽孢杆菌 PC024 的饲料可显著提高凡纳滨对虾抗 WSSV 感染的能力。

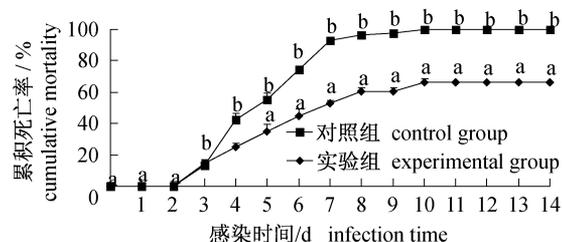


图3 投喂坚强芽孢杆菌 PC024 的凡纳滨对虾经注射感染 WSSV 后的累积死亡率

图中误差线来表示标准误差,字母不相同组差异显著( $P < 0.05$ ),字母相同组差异不显著( $P > 0.05$ )。

Fig. 3 Cumulative mortality of *L. vannamei* fed with *B. firmus* PC024 after the challenge of injection with WSSV

Error bars represent standard deviation (SD). The letters beside the data markers represent the significance of difference. The data with significant difference ( $P < 0.05$ ) were indicated with different letters.

### 2.3 投喂菌株 PC024 对凡纳滨对虾的血清和肝胰腺免疫相关酶活性的影响

投喂期间各处理组凡纳滨对虾血清和肝胰腺免疫相关酶的活性变化 投喂坚强芽孢杆菌

表1 免疫期间各处理组对虾血清和肝胰腺中 ACP、T-SOD、LZM 活性及血清中 PO、POD 活性变化  
Tab.1 Effect of different dietary probiotics on the activity of ACP, T-SOD, LZM of shrimp serum and hepatopancreas and activity of PO, POD of serum of *L. vannamei* during the immunization  $n = 3$

时间/d time	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组
	血清 ACP/ (U/mL)	血清 ACP/ (U/mL)	肝胰腺 ACP/ (U/100 mL)	肝胰腺 ACP/ (U/100 mL)	血清/ 血清/ (U/mL)	血清 T-SOD/ (U/mL)	肝胰腺 T-SOD/ (U/mg prot)	肝胰腺 T-SOD/ (U/mg prot)
5	3.75 ± 0.23 <sup>a</sup>	4.90 ± 0.31 <sup>b</sup>	16.92 ± 0.43 <sup>a</sup>	24.15 ± 0.92 <sup>b</sup>	4.71 ± 1.25 <sup>a</sup>	6.56 ± 1.16 <sup>a</sup>	8.12 ± 1.22 <sup>a</sup>	18.93 ± 4.03 <sup>b</sup>
10	4.09 ± 1.31 <sup>a</sup>	6.49 ± 0.56 <sup>b</sup>	11.12 ± 0.65	40.66 ± 16.54 <sup>b</sup>	4.68 ± 1.59 <sup>a</sup>	4.92 ± 0.52 <sup>a</sup>	4.47 ± 0.64 <sup>a</sup>	13.9 ± 3.64 <sup>b</sup>
15	3.12 ± 0.33 <sup>a</sup>	5.65 ± 0.18 <sup>b</sup>	10.23 ± 0.53 <sup>a</sup>	72.53 ± 2.29 <sup>b</sup>	3.90 ± 0.43 <sup>a</sup>	4.25 ± 0.40 <sup>a</sup>	4.61 ± 0.92 <sup>a</sup>	37.93 ± 8.51 <sup>b</sup>
20	4.15 ± 0.29 <sup>a</sup>	8.53 ± 1.67 <sup>b</sup>	10.05 ± 0.38 <sup>a</sup>	48.35 ± 0.16 <sup>b</sup>	3.53 ± 0.12 <sup>a</sup>	4.83 ± 0.61 <sup>b</sup>	6.18 ± 1.74 <sup>a</sup>	37.07 ± 7.83 <sup>b</sup>
时间/d time	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组
	血清 LZM/ (μg/mL)	血清 LZM/ (μg/mL)	肝胰腺 LZM/ (U/mL)	肝胰腺 LZM/ (U/mL)	血清 PO/ (U/mg)	血清 PO/ (U/mg)	血清 POD/ (U/mL)	血清 POD/ (U/mL)
5	6 916.2 ± 1 415.13 <sup>a</sup>	8 841.7 ± 2 298.73 <sup>b</sup>	73.15 ± 14.15 <sup>a</sup>	271.62 ± 44.36 <sup>b</sup>	0.09 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.26 ± 0.06 <sup>b</sup>	102.84 ± 8.05 <sup>a</sup>	157.18 ± 24.53 <sup>b</sup>
	6 425.6 ± 3 766.79 <sup>a</sup>	8 120.5 ± 2 132.49 <sup>b</sup>	145.89 ± 23.89 <sup>a</sup>	306.21 ± 30.76 <sup>b</sup>	0.49 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.89 ± 0.15 <sup>b</sup>	103.43 ± 1.41 <sup>a</sup>	159.14 ± 23.82 <sup>b</sup>
15	6 953.21 ± 2 132.49 <sup>a</sup>	14 626 ± 2 046.10 <sup>b</sup>	278.98 ± 56.55 <sup>a</sup>	614.89 ± 62.57 <sup>b</sup>	0.39 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.98 ± 0.16 <sup>a</sup>	102.12 ± 8.05 <sup>a</sup>	143.2 ± 25.14 <sup>b</sup>
	6 312.02 ± 2 046.10 <sup>a</sup>	10 528 ± 4 529.44 <sup>b</sup>	342.45 ± 44.77 <sup>a</sup>	754.57 ± 119.20 <sup>b</sup>	0.54 ± 0.24 <sup>a</sup>	0.83 ± 0.12 <sup>b</sup>	104.34 ± 10.23 <sup>a</sup>	166.65 ± 32.26 <sup>b</sup>

WSSV 感染后对虾血清和肝胰腺中免疫相关酶的活性变化 注射感染 WSSV 后,投喂坚强

芽孢杆菌 PC024 期间,实验组对虾血清和肝胰腺中 ACP、LZM 活性均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ) (表 1),血清中 ACP 活性和肝胰腺中 LZM 呈逐渐上升趋势,在投喂 20 d 时达到峰值;而肝胰腺中 ACP 活性和血清中 LZM 活性呈先上升,在投喂 15 d 时达到最大值后,又略微下降的趋势。

在投喂期间实验组血清 T-SOD 活性在免疫前 15 d 内虽高于对照组但与对照组 T-SOD 活性无显著差异 ( $P > 0.05$ ),直到 20 d 时显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。实验组对虾肝胰腺 T-SOD 活性在整个免疫期间显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ),且随免疫时间延长逐渐增加,在 20 d 时达到最大值。

实验组对虾血清 PO 和 POD 活性均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。血清 PO 活性呈逐渐上升的趋势。而血清 POD 活性在整个免疫期间变化不明显。从结果可看出,饲料中添加菌株 PC024 能够提高对虾血清 PO 和 POD 活性。

结果表明,饲料中添加菌株 PC024 投喂对虾能够提高对虾血清和肝胰腺中 ACP、T-SOD 和 LZM 活性,提高对虾血清 PO 和 POD 活性。

0.05)(表 2)。注射 WSSV 后,实验组血清 ACP 活性整体上呈上升的趋势,在注射后 336 h 达到最大值,而肝胰腺中 ACP 活性呈先下降后又逐渐上升的趋势;血清 T-SOD、LZM 活性则无明显变化;肝胰腺中 T-SOD 活性先上升到 48 h 达到峰值后再下降,LZM 活性呈先下降后逐渐上升又略下降。

在感染病毒后实验组对虾血清 PO 活性除了 12 和 192 h 与对照组无显著差异外,其他取样时间点均显著高于对照组( $P < 0.05$ ),且呈先升高

在 96 h 达到峰值后逐渐下降的趋势。而实验组对虾血清中 POD 活性在整个感染期间均显著高于对照组( $P < 0.05$ )。上述结果表明,病毒感染对对虾血清和肝胰腺中 ACP、T-SOD 以及 LZM 活性均有一定的影响,但投喂坚强芽孢杆菌 PC024 菌株的实验组再对虾感染病毒后仍能显著提高血清和肝胰腺中 ACP、T-SOD 以及 LZM 活性。同样,饲料中含有菌株 PC024 的实验组能够提高对虾血清 PO 和 POD 活性,感染 WSSV 后对血清 PO 活性有一定的影响。

表 2 感染 WSSV 后各处理组对虾血清和肝胰腺中 ACP、T-SOD、LZM 活性及血清中 PO、POD 活性变化  
Tab.2 Effect of different dietary probiotics on the activity of ACP, T-SOD, LZM of shrimp serum and hepatopancreas and activity of PO, POD of serum of *L. vannamei* after infection WSSV  $n = 3$

时间/h time	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组
	血清 ACP/ (U/mL)	血清 ACP/ (U/mL)	肝胰腺 ACP/ (U/100 mL)	肝胰腺 ACP/ (U/100 mL)	血清 T-SOD/ (U/mL)	血清 T-SOD/ (U/mL)	肝胰腺 T-SOD/ (U/mg prot)	肝胰腺 T-SOD/ (U/mg prot)
0	4.56 ± 0.25 <sup>a</sup>	7.06 ± 0.83 <sup>b</sup>	10.05 ± 0.38 <sup>a</sup>	54.40 ± 1.19 <sup>b</sup>	3.88 ± 0.49 <sup>a</sup>	6.19 ± 0.56 <sup>b</sup>	1.45 ± 0.67 <sup>a</sup>	4.87 ± 1.42 <sup>b</sup>
4	4.76 ± 0.32 <sup>a</sup>	8.21 ± 0.67 <sup>b</sup>	10.32 ± 0.44 <sup>a</sup>	42.02 ± 0.49 <sup>b</sup>	3.64 ± 0.59 <sup>a</sup>	7.92 ± 0.69 <sup>b</sup>	3.67 ± 1.14 <sup>a</sup>	6.36 ± 0.46 <sup>b</sup>
12	3.89 ± 0.45 <sup>a</sup>	6.42 ± 0.49 <sup>b</sup>	7.39 ± 0.34 <sup>a</sup>	23.82 ± 0.40 <sup>b</sup>	3.86 ± 0.80 <sup>a</sup>	6.98 ± 0.87 <sup>b</sup>	3.56 ± 1.69 <sup>a</sup>	6.20 ± 0.78 <sup>b</sup>
24	3.46 ± 0.33 <sup>a</sup>	7.45 ± 0.66 <sup>b</sup>	11.41 ± 2.08 <sup>a</sup>	30.97 ± 0.69 <sup>b</sup>	4.00 ± 0.98 <sup>a</sup>	5.43 ± 1.45 <sup>b</sup>	2.86 ± 1.44 <sup>a</sup>	6.22 ± 0.47 <sup>b</sup>
48	6.35 ± 0.29 <sup>a</sup>	11.40 ± 0.96 <sup>b</sup>	12.26 ± 1.14 <sup>a</sup>	44.93 ± 5.04 <sup>b</sup>	4.60 ± 0.76 <sup>a</sup>	6.37 ± 0.89 <sup>b</sup>	3.74 ± 1.78 <sup>a</sup>	10.88 ± 0.36 <sup>b</sup>
72	4.46 ± 0.25 <sup>a</sup>	8.51 ± 1.80 <sup>b</sup>	12.44 ± 0.44 <sup>a</sup>	59.36 ± 2.10 <sup>b</sup>	3.75 ± 1.00 <sup>a</sup>	6.76 ± 2.09 <sup>b</sup>	4.36 ± 0.57 <sup>a</sup>	8.73 ± 0.11 <sup>b</sup>
96	5.68 ± 0.32 <sup>a</sup>	12.5 ± 2.27 <sup>b</sup>	31.46 ± 1.51 <sup>a</sup>	59.94 ± 3.02 <sup>b</sup>	4.55 ± 0.99 <sup>a</sup>	6.04 ± 1.31 <sup>b</sup>	1.80 ± 0.72 <sup>a</sup>	7.51 ± 2.62 <sup>b</sup>
192	4.88 ± 0.45 <sup>a</sup>	7.71 ± 0.45 <sup>b</sup>	6.52 ± 0.46 <sup>a</sup>	95.56 ± 0.67 <sup>b</sup>	3.57 ± 0.99 <sup>a</sup>	5.80 ± 1.35 <sup>b</sup>	5.76 ± 1.43 <sup>a</sup>	5.87 ± 0.64 <sup>a</sup>
336		14.28 ± 2.34 <sup>a</sup>		83.96 ± 10.48 <sup>a</sup>		5.56 ± 1.30 <sup>a</sup>		5.693 3 ± 1.87 <sup>a</sup>

时间/h time	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组
	血清 LZM/ (μg/mL)	血清 LZM/ (μg/mL)	肝胰腺 LZM/ (U/mL)	肝胰腺 LZM/ (U/mL)	血清 PO/ (U/mg)	血清 PO/ (U/mg)	血清 POD/ (U/mL)	血清 POD/ (U/mL)
0	6 895.23 ± 3 766.79 <sup>a</sup>	9 885.5 ± 4 187.08 <sup>b</sup>	535.74 ± 62.385 <sup>a</sup>	1 304 ± 288.57 <sup>b</sup>	0.47 ± 0.28 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.29 <sup>b</sup>	70.67 ± 6.67 <sup>a</sup>	111.95 ± 22.09 <sup>b</sup>
4	7 012.23 ± 2 132.49 <sup>a</sup>	11 498 ± 4 881.01 <sup>b</sup>	241.49 ± 70.90 <sup>a</sup>	588.61 ± 203.45 <sup>b</sup>	0.53 ± 0.19 <sup>a</sup>	0.76 ± 0.16 <sup>b</sup>	113.34 ± 2.56 <sup>a</sup>	151.65 ± 18.16 <sup>b</sup>
12	7 112.36 ± 2 046.10 <sup>a</sup>	11 370 ± 2 666.91 <sup>b</sup>	567.78 ± 110.23 <sup>a</sup>	959.70 ± 298.26 <sup>b</sup>	0.57 ± 0.24 <sup>a</sup>	0.59 ± 0.03 <sup>a</sup>	111.6 ± 2.45 <sup>a</sup>	152.93 ± 11.46 <sup>b</sup>
24	7 005.36 ± 2 132.49 <sup>a</sup>	8 876.8 ± 3 468.64 <sup>b</sup>	465.68 ± 38.63 <sup>a</sup>	902.26 ± 53.88 <sup>b</sup>	0.51 ± 0.17 <sup>a</sup>	0.60 ± 0.12 <sup>b</sup>	109.34 ± 2.98 <sup>a</sup>	148.96 ± 12.95 <sup>b</sup>
48	6 985.98 ± 2 046.10 <sup>a</sup>	1 0043 ± 3 600.54 <sup>b</sup>	179.55 ± 208.65 <sup>a</sup>	648.11 ± 237.83 <sup>b</sup>	0.83 ± 0.16 <sup>a</sup>	1.03 ± 0.16 <sup>b</sup>	123.34 ± 10.67 <sup>a</sup>	168.92 ± 37.70 <sup>b</sup>
72	6 726.36 ± 1 415.13 <sup>a</sup>	9 696.7 ± 3 135.46 <sup>b</sup>	466.86 ± 187.14 <sup>a</sup>	644.21 ± 100.72 <sup>b</sup>	0.92 ± 0.14 <sup>a</sup>	1.15 ± 0.19 <sup>b</sup>	108.45 ± 1.89 <sup>a</sup>	139.08 ± 7.80 <sup>b</sup>
96	6 825.47 ± 3 766.79 <sup>a</sup>	8 425.1 ± 4 770.79 <sup>b</sup>	412.88 ± 156.27 <sup>a</sup>	477.08 ± 127.99 <sup>b</sup>	1.15 ± 0.19 <sup>a</sup>	1.53 ± 0.06 <sup>b</sup>	123.56 ± 8.78 <sup>a</sup>	198.35 ± 23.41 <sup>b</sup>
192	7 012.41 ± 2 132.49 <sup>a</sup>	10 683 ± 2 150.13 <sup>b</sup>	247.22 ± 35.77 <sup>a</sup>	920.22 ± 139.13 <sup>b</sup>	0.83 ± 0.30 <sup>a</sup>	0.86 ± 0.22 <sup>a</sup>	102.34 ± 9.67 <sup>a</sup>	157.95 ± 26.67 <sup>b</sup>
336		9 503.3 ± 2 150.13 <sup>b</sup>		247.22 ± 37.77 <sup>b</sup>		0.44 ± 0.06 <sup>a</sup>		191.44 ± 42.53 <sup>a</sup>

## 2.4 饲喂含菌株 PC024 的饲料对凡纳滨对虾的肠道总菌数的影响以及菌株 PC024 在肠道中定殖情况

在整个养殖期间,实验组对虾肠道总细菌数始终显著高于对照组( $P < 0.05$ ) (图 4)。且在投喂饲料第 10 天和第 25 天(即攻毒后第 5 天),实验组对虾肠道细菌总数显著高于其他取样时间点这一结果与实验组对虾血淋巴和肝胰腺免疫相关酶活的变化趋势相吻合。而对照组对虾肠道细菌总数在前 20 d 没有明显的变化,而在感染 WSSV 后对照组对虾肠道细菌总数呈逐渐下降趋势。通过对实验组和对照组对虾肠道细菌的分离纯化和鉴定得出,在实验组对虾肠道中始终可见坚强芽孢杆菌 PC024,但坚强芽孢杆菌在实验组对虾肠道中并不是优势菌,在整个监测过程中其数量仅占肠道细菌总数的 1.2% ~ 4.7%,其优势菌是 *Alpha proteobacterium*,而对照组并未发现有坚强芽孢杆菌。其优势菌主要有 *Microbacterium jejuense*, *Alpha proteobacterium*, *Tenacibaculum lutimaris*, *Rhodobacteraceae bacterium* 等,但是不同检测时间点,优势菌的数量略有不同。结果表明,饲喂含有 PC024 菌株的饲料的实验组对虾肠道的总细菌数量较对照组显著增加,且在实验组中对虾肠道中坚强芽孢杆菌始终存在,但不是优势菌。

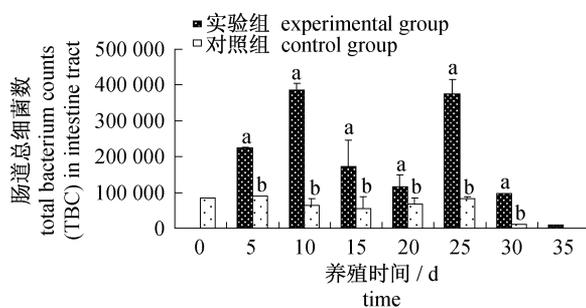


图 4 饲喂含有 PC024 菌饲料对凡纳滨对虾肠道细菌总数影响

图中误差线来表示标准误差,字母不相同组差异显著( $P < 0.05$ ),字母相同组差异不显著( $P > 0.05$ )。

Fig. 4 Effect of different dietary probiotics on total bacterium counts (TBC) in intestine tract of *L. vannamei* fed with *B. firmus* PC024 ( $n = 3, \bar{x} \pm SD$ )

Error bars represent standard deviation (SD). The letters beside the data markers represent the significance of difference. The data with significant difference ( $P < 0.05$ ) were indicated with different letters.

## 3 讨论

由于种质资源退化、养殖密度过高以及管理方式落后等原因,近些年来对虾病害频发,对虾白斑综合征是最严重的一种,对虾白斑综合征病毒(WSSV)是对世界上对虾养殖业危害最大的病毒之一,该病毒具有极强的侵染性和致病力,造成对虾养殖业巨大的经济损失<sup>[16-17]</sup>,给海洋生态平衡带来了一定的威胁<sup>[18]</sup>。近些年,益生菌逐渐取代抗生素等应用在水产养殖中取得了很好的效果,许多研究报道益生芽孢杆菌能增强对虾的免疫力和抗病毒感染能力<sup>[6,19-21]</sup>。益生菌作用机制的研究主要集中在益生菌激发机体免疫力,提高非特异性免疫酶活,调节宿主机体免疫相关基因表达水平等,进而提高机体对抗病毒感染的的能力<sup>[22]</sup>。本研究攻毒实验结果表明,在饲料中添加坚强芽孢杆菌 PC024 并投喂给对虾后可以显著降低对虾感染 WSSV 的死亡率。说明该株益生菌能够在一定程度上提高对虾对抗病毒感染的的能力。

而关于芽孢杆菌作用机制的研究主要包括芽孢杆菌进入对虾肠道刺激对虾的免疫防御系统,与病原菌竞争营养成分和粘附位点,增强水产动物的非特异性免疫力等<sup>[23-24]</sup>。在本研究中投喂期间和感染 WSSV 期间,投喂含有菌株 PC024 的实验组较对照组中凡纳滨对虾血清和肝胰腺酸性磷酸酶、总超氧化物歧化酶、溶菌酶、过氧化氢酶和酚氧化酶活性都有不同程度的提高,这些结果与李桂英等<sup>[22]</sup>研究结果相一致。

通过对实验组和对照组对虾肠道总细菌数和坚强芽孢杆菌的实时检测,发现添加菌株 PC024 的实验组对虾肠道总细菌数却始终显著高于对照组对虾肠道总细菌数,这一结果与 Li 等<sup>[25]</sup>发现地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)可以有效地调节凡纳滨对虾肠道的总菌群数,提高对虾的免疫力相一致。实验组对虾肠道中始终可见坚强芽孢杆菌 PC024,整个监测过程中其数量仅占肠道细菌总数的 1.2% ~ 4.7%,不是肠道优势菌,但是添加了菌株 PC024 的实验组其免疫相关酶活都高于对照组,推测可能是坚强芽孢杆菌在对虾肠道内定殖后,通过菌体自身或其细胞壁成分激发对虾的体液免疫反应,刺激非特异性免疫系统使其发挥作用,作为一种免疫增强剂提高对虾机体免疫力和抗病毒感染的的能力<sup>[22]</sup>。

因有益微生物是以活菌形式经口入消化道而发挥作用,因此细菌存活率直接关系到其作用效果<sup>[5]</sup>。本研究所用的芽孢杆菌分离自健康对虾肠道,并通过安全性实验<sup>[26]</sup>,证明该菌株对对虾安全无毒副作用。且该菌有较强的耐酸碱、耐盐和耐胆盐能力<sup>[5]</sup>,这些特性保证了该菌株在通过胃肠时不会被酸、碱、盐和胆盐所杀死,确保细菌有较高的存活率。

芽孢杆菌可以在对虾肠道内产生多种消化酶,如分泌淀粉酶,将淀粉转化为单糖,再由肠道中其他菌种将这些单糖转化为乳酸,降低肠道中的 pH 值,从而起到抑制病原菌的作用<sup>[5,27]</sup>。菌株 PC024 的 ATB 微生物自动鉴定结果中,可以直观的得出该菌能够产生淀粉酶水解淀粉,推测淀粉酶的产生可能与该菌株抗病能力有关。研究报告,芽孢杆菌产生的过氧化氢酶可以分解肠道内的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 生成游离氧,从而使细胞免受 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的毒害,对肠道内的多种病原菌有杀灭作用<sup>[5,26]</sup>。本研究中投喂菌株 PC024 的实验组过氧化氢酶活性显著高于对照组。从此结果推测有可能菌株 PC024 的添加提高了对虾清除了体内的过氧化氢的能力,而过氧化氢酶起到了生物防御的关键作用。

本实验的结果证实,饲料中添加芽孢杆菌 PC024 能够显著增强对虾的免疫相关酶活性并能够提高对虾抗 WSSV 病毒力,该菌株有望成为研发微生态制剂的候选菌株,用于增强对虾的免疫力,促进生长,提高饲料转化率,最终达到提高对虾抗病毒感染能力的效果。

此外,本文为了得出更加准确的微生物鉴定结果,同时采用 16S rRNA 序列分析法、细菌脂肪气相色谱法、ATB 微生物鉴定系统、Biolog 微生物自动鉴定系统 4 种方法对分离自对虾消化道的一株海水细菌进行鉴定,4 种方法不仅能够准确地将该菌鉴定到属,而且还可以得出一些具体的生理生化信息,为该菌株培养基的优化以及大规模发酵等提供理论参数。

#### 参考文献:

- [1] 施伟达,章文敏,周冬仁,等. 芽孢杆菌研究进展及其在水产养殖中的应用[J]. 现代农业科技,2012(2):310-313.
- [2] 李琴,董在杰. 芽孢杆菌及其在水产养殖中的应用[J]. 科学养鱼,2004(8):44-45.

- [3] Sugita H, Matsuo N, Hirose Y, et al. *Vibrio* sp. strain NM 10, isolated from the intestine of a Japanese coastal fish, has an inhibitory effect against *Pasteurella piscicida*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(12):4986-4989.
- [4] Kennedy S B, Tucker J WJ, Neidig C L, et al. Bacterial management strategies for stock enhancement of warm water marine fish: a case study with common snook (*Centropomus undecimalis*) [J]. Bulletin of Marine Science, 1998, 62(2):573-588.
- [5] 范俊娟. 3 株蜡样芽孢杆菌产酶特性的检测[J]. 畜牧与兽医, 2009, 41(9):73-75.
- [6] Rengpipat S, Phianpak W, Piyairakul S, et al. Effect of probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth [J]. Aquaculture, 1998, 167(3-4):301-313.
- [7] Luiz W, Paccez J, Ferreira R, et al. Biotechnological applications of genetically modified *Bacillus subtilis* strains in the development of vaccines targeting different *Escherichia coli* pathotypes [J]. New Biotechnology, 2009, 25(1):40.
- [8] Leonel Ochoa-Solano J, Olmos-Soto J. The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds[J]. Food Microbiology, 2006, 23(6):519-525.
- [9] Vaseeharan B, Ramasamy P. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2003, 36(2):83-87.
- [10] Liu K F, Chiu C H, Shiu Y L, et al. Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 28(5-6):837-844.
- [11] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001:43-56.
- [12] 程池,杨梅,李金霞,等. Biolog 微生物自动分析系统——细菌鉴定操作规程的研究[J]. 食品与发酵工业,2006,32(5):50-54.
- [13] 王秋红,蓝江林,朱育菁,等. 脂肪酸甲酯谱图分析方法及其在微生物领域的应用[J]. 福建农业学报,2007,22(2):213-218.
- [14] 孙艳,刘飞,宋晓玲,等. 饲料中添加益生菌对凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 非特异免疫基因表达量和抗病力的影响[J]. 海洋与湖沼,2012,43(4):845-851.

- [15] 王专伟,黄建华,杨其彬,等. 感染白斑综合征病毒的斑节对虾免疫酶变化特征[J]. 湖北农业科学, 2011,50(9):1851-1854.
- [16] 蔡生力,黄健,王崇明,等. 1993-1994年对虾暴发病的流行病学研究[J]. 水产学报,1995,19(2):112-117.
- [17] Flegel T W. Major viral disease of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology,1997,13(4):433-442.
- [18] Jory D E, Dixon H M. Shrimp white spot virus in the western hemisphere [J]. Aquaculture, 1999, 25: 83-91.
- [19] Rengpipat S, Rukpratanporn S, Piyatiratitivorakul S, et al. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiotic bacterium (*Bacillus* S11) [J]. Aquaculture, 2000, 191: 271-288.
- [20] Rengpipat S, Tunyamum A, Fast A W, et al. Enhanced growth and resistance to *Vibrio* challenge in pond-reared black tiger shrimp *Penaeus monodon* fed a *Bacillus* probiotic [J]. Diseases of Aquatic Organisms,2003,55(2):169-173.
- [21] Li J Q, Tan B P, Mai K. Dietary probiotic *Bacillus* sp. and isomaltooligosaccharides influence the intestine microbial populations, immune responses and resistance to white spot syndrome virus in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. Aquaculture,2009,291(1-2):35-40.
- [22] 李桂英,宋晓玲,孙艳,等. 几株肠道益生菌对凡纳滨对虾非特异性免疫力和抗病力的影响[J]. 中国水产科学,2011,18(6):1358-1367.
- [23] Gatesoupe F J. The use of probiotics in aquaculture [J]. Aquaculture,1999,180(1):147-165.
- [24] Ninawe A S, Selvin J. Probiotics in shrimp aquaculture: avenues and challenges [J]. Critical Reviews in Microbiology,2009,35(1):43-66.
- [25] Li K,Zheng T L,Tian Y, et al. Beneficial effects of *Bacillus licheniformis* on the intestinal microflora and immunity of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei* [J]. Biotechnology Letters,2007,29(4):525-530.
- [26] 李海兵,宋晓玲,韦嵩,等. 4株对虾肠道益生菌的筛选及鉴定[J]. 海洋与湖沼,2008,39(4):374-380.
- [27] 朱丽娜,侯玉冰,牛秀梅,等. 微生态制剂的作用机理及其在畜禽生产中的应用[J]. 饲料营养,2009:22-23.

## Isolation and identification of *Bacillus* sp. and evaluation of its effect on WSSV disease resistance in *Litopenaeus vannamei*

SUN Yan<sup>1</sup>, SONG Xiaoling<sup>1\*</sup>, LIU Fei<sup>1,2</sup>, LI Yuhong<sup>1,3</sup>, HUANG Jie<sup>1</sup>

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

3. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** In order to select WSSV disease-resistant strains, a marine *Bacillus* sp. was isolated and purified from digestive tract from the healthy of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). The morphology and gram stain indicated that the strain is a gram-positive and rod-shaped bacterium, with a single polar flagellum and oval spores. The colony is circular and slightly raised. Identification analyses by the Biolog Carbon Source Utilization, ATB Microbial Identification System, and the fatty acid gas chromatography indicated that the most similar strain in physiological and biochemical characteristics is *Bacillus firmus*. Phylogenetic analysis with 16S rRNA sequence showed that it has 100% homology with the previously reported *Bacillus firmus*. The cultured strain PC024 was added to feed by conglutinating to the surface of the pellets and fed to *Litopenaeus vannamei*. After feeding for 20 d, the shrimp was challenged with WSSV by intramuscular injection to observe the cumulative mortality in 14 d post-challenge. The results showed that the experimental group fed with the strain PC024 had a relative survival rate of 33.7% in comparison with the control group. The immune-related enzyme activity in the serum and hepatopancreas of shrimp in the experimental group was significantly increased than the control group. And the total number of bacteria of the intestine of the experimental group is always significantly higher than that of the control group and *Bacillus firmus* can be isolated from the experimental group. This study suggests that the *Bacillus firmus* PC024 can be used as the WSSV disease prevention probiotic strains and can further be used in shrimp farming.

**Key words:** *Litopenaeus vannamei*; *Bacillus firmus*; identification; immune enzyme activity; resistance to disease

**Corresponding author:** SONG Xiaoling. E-mail: songxl@ysfri.ac.cn