

聚 β -羟基丁酸酯对中国明对虾抗 WSSV 能力的影响

邓康裕^{1,2}, 孔杰^{1,2*}, 孟宪红², 罗坤², 曹宝祥²,
刘宁², 栾生², 史晓丽², 李旭鹏², 曹家旺²

(1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071)

摘要: 为探索聚 β -羟基丁酸酯 (PHB) 对感染白斑综合征病毒 (WSSV) 的水生动物存活率、病毒含量的影响, 实验采用单因子浓度梯度法, 对感染 WSSV 的中国明对虾投喂添加了不同浓度聚 β -羟基丁酸酯 (0.0%、0.5%、1.0%、2.5%、5.0%、10.0%) 的饵料, 统计相同时间点对虾死亡数量、存活率、相对免疫保护率 (RPS), 并利用 real-time PCR 测定死亡对虾体内病毒绝对含量。结果显示, PHB 对中国明对虾存活率、平均存活时间及体内病毒拷贝数均有一定影响, 主要表现在与对照组 (0.0%) 相比, 随 PHB 浓度的升高, 实验组对虾存活率和平均存活时间呈现先上升后下降趋势。各组平均存活时间为 82.23、90.71、95.55、91.15、85.56 及 79.40 h, 1.0% 浓度组实验对虾平均存活时间与 0.5% 及 2.5% 浓度组无显著差异 ($P > 0.05$), 但是显著高于其余各组 ($P < 0.05$); 各组累计死亡率均为 100%。另外还发现各组平均病毒拷贝数为 1.08×10^7 , 1.15×10^7 , 4.75×10^7 , 1.27×10^7 , 1.14×10^7 , 3.29×10^6 个/ng DNA; 对照组与 1% 浓度组病毒含量具有显著差异 ($P < 0.05$)。结果表明, PHB 能提高中国明对虾抗 WSSV 的能力且 1% PHB 浓度为最适浓度。

关键词: 中国明对虾; 聚 β -羟基丁酸酯; 存活率; 白斑综合征病毒; 攻毒实验; 实时荧光定量
中图分类号: S 963 **文献标志码:** A

中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 又称东方对虾, 属节肢动物门 (Arthropoda), 甲壳纲 (Crustacea), 十足目 (Decapoda), 枝鳃亚目 (Dendrobranchiata), 对虾总科 (Penaeoidea), 对虾科 (Penaeidae), 明对虾属 (*Fenneropenaeus*)。中国明对虾主要分布在我国黄海、渤海及朝鲜半岛西海岸, 其适应能力强、生长快、耐低温、品质好及营养价值高, 因而成为我国重要的海水养殖经济物种。

白斑综合征病毒 (white spot syndrome virus, WSSV) 自 1992 年暴发以来对对虾养殖业造成严重影响, 是引起对虾暴发性死亡的最为肆虐的病毒之一^[1]。WSSV 具有很高的侵袭性和复制能力, 具有传播快、流行面广、死亡率高、防治困难等

特点, 感染 WSSV 后一般 3~10 d 养殖池中对虾死亡率便可近 100%^[2]。由于 WSSV 引起的经济损失非常巨大, 已经给我国乃至全球的对虾养殖业造成了极大危害, 我国每年仅因感染 WSSV 造成的损失就达数千万元^[3]。国内外许多学者尝试从中和抗体、免疫增强剂、疫苗、RNAi 等^[4-8] 方面防治 WSSV 的暴发, 虽为进一步认识对虾的免疫机制及调控作用机理提供了丰富的基础信息, 但目前尚无有效的药物和防治方法。

聚 β -羟基丁酸酯 (poly- β -hydroxybutyrate, PHB) 是短链脂肪酸 β -羟基丁酸的聚合物, 直径为 0.2~0.5 μm 的脂溶性颗粒。1925 年, Lemoigne^[9] 首次从巨大芽孢杆菌 (*Baillus qathecium*) 细胞中发现 PHB, 并于 1927 年将它从

收稿日期: 2014-01-23 修回日期: 2014-05-14

资助项目: 国家自然科学基金面上项目 (31172402, 31372523)

通信作者: 孔杰, E-mail: kongjie@ysfri.ac.cn

细胞中分离提取出来,标志着关于 PHB 研究的开始。它具有生物可降解性、生物相容性、光学活性、无毒性、无刺激性、无免疫原性等特殊性质,在生物医学领域及组织工程中广为应用。研究表明,在坐骨神经损伤修复中,PHB 导管复合应用神经生长因子,神经修复效果与自体神经移植相似,显著优于异体神经移植和 PHB 神经导管移植^[10]。

PHB 在动物肠道内可通过酶解和化学水解的方式,降解为 β -羟基丁酸单体,彻底水解成 CO_2 和 H_2O ^[11]。脂溶性、非游离态的 β -羟基丁酸能穿过革兰氏阴性细菌 (G^-) 的细胞膜,在偏碱性的胞质中转变为游离态并释放 H^+ ,而较低的 pH 抑制酶活性,使微生物利用能量释放质子,进而抑制 G^- 的生长,促进有益菌生长。另外, β -羟基丁酸还能促进食物消化及营养物质吸收,提高蛋白质和矿物质的利用率,从而促进生长^[12]。Sinha^[13]发现 PHB 能促进欧洲鲈鱼幼体生长,并能提高肠道内益生菌菌群丰富度。益生菌有抗病毒的作用,该作用主要通过干扰病毒周期、竞争抑制作用阻止病毒复制、促进细胞自动调节间接感染病毒导致的病理过程等来实现^[14]。在医疗方面,益生菌能够治疗人的病毒性感冒、轮状病毒腹泻甚至艾滋病及其并发症等^[15];在水产养殖方面,益生菌能够增强鱼体抗虹彩病毒的能力^[16-17]。

目前针对 PHB 在水产养殖中应用的研究在国际上尚处于起步阶段,且 PHB 对水产动物病毒性病原体的作用尚未有报道。本实验旨在探索 PHB 对中国明对虾抵抗病毒性病原体 WSSV 能力的影响,以期开发、扩展 PHB 在水产动物中的应用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

中国明对虾取自中国水产科学研究院黄海水产研究所遗传育种中心,平均体质量 1.08 g;实验前暂养 1 周,暂养期间投喂不含 PHB 的基础饲料,实验前 1 d 停止喂食。实验用海水为天然海水,盐度 30。

1.2 饲料及制备

基础饲料配方由中国水产科学研究院黄海水产研究所食品工程与营养研究室提供。实验原料

购于山东省青岛市国家海洋科学研究中心,实验饲料在基础饲料配方上添加 PHB,采用逐级放大方式混合原料,饲料原料经过 60 目粉碎,制成直径为 2 mm,长度为 3 mm 的颗粒。制粒后放于密封袋内,存放于通风干燥区域。PHB 由宁波天安生物材料有限公司提供。

1.3 实验分组及管理

将 540 尾中国明对虾随机分为 6 组(A、B、C、D、E、F),每组 3 个重复,每重复 30 尾。A 组(即对照组)投喂不含 PHB 的基础饲料,B、C、D、E、F 组(即实验组)依次投喂含 PHB 浓度为 0.5%、1.0%、2.5%、5.0%、10.0% 的饲料,每天投喂 4 次(6:00,12:00,18:00,24:00),日投喂量为体质量的 5%,随实验进行调整日投喂量;早晚各换水 1 次,每次换水量为 1/2。实验期间水体均充气,水温控制在 $(25 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 。

1.4 人工 WSSV 感染实验

采用单尾、等量、口饲 WSSV 方法进行对虾人工感染(授权专利号:ZL201210107477.8),对每尾实验对虾单独投喂毒饵 10 mg(约 10^6 个 WSSV 病毒粒子),进食毒饵后,所有实验对虾按组别放于 18 个 62 cm \times 54 cm \times 47 cm 的整理箱中。

1.5 样品采集与处理

实验共进行 8 d,实验期间随时捞出死亡对虾,记录其死亡时间、水温等数据后于 -20°C 保存。实验结束后计算各组死亡率、相对免疫保护率^[18](relative percent survival, RPS),并根据实验各组对虾死亡曲线,取感染 WSSV 过程中初期、中期、高峰期、后期及最后存活个体,取其肌肉提取基因组 DNA。

$$\text{存活率} = \text{存活对虾数} / \text{初始对虾数} \times 100\%$$

$$\text{死亡率} = \text{对虾死亡数} / \text{初始对虾数} \times 100\%$$

$$\text{RPS}(\%) = (\text{对照组死亡率} - \text{实验组死亡率}) / \text{对照组死亡率}$$

1.6 DNA 提取、质量检测与浓度测定

DNA 提取参照王伟继^[19]的方法。DNA 经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳,利用 EC3 Imaging system 检测 DNA 质量,要求不含大量蛋白质及降解的 DNA 片段。使用超微量紫外分光光度计(Biodropsis Bo-2000)测定 DNA 含量及吸光度比值(要求 $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$ 为 1.8 ~ 2.0),在确保 DNA 质量的情况下,将溶液稀释至 20 ng/ μL , -20°C 保存备用。

1.7 实时荧光定量 PCR

病毒检测所用引物及探针参考 Durand 等^[20]。标准品为本实验室自行制备,是含有目的片段的重组质粒 PUCm-T/WSSV69,以作阳性对照及构建标准曲线。每个样品检测 3 次,取平均值作为该样品的病毒含量值。

1.8 数据处理

数据使用 SPSS 17.0、Origin 8.0 处理。

2 结果

2.1 中国明对虾存活时间

A ~ F 组各组平均存活时间为 (82.23 ± 33.37) h、 (90.71 ± 34.54) h、 (95.55 ± 28.91) h、 (91.15 ± 27.08) h、 (85.56 ± 31.11) h、 (79.40 ± 23.70) h,呈现先上升后下降的趋势(图 1)。经过多重比较发现,C 组与 A、F 组存活时间差异非常显著($P < 0.01$),与 E 组相比差异显著($P < 0.05$),与 B、D 组间差异不显著($P > 0.05$)。

2.2 中国明对虾存活率

每 24 h 记录各组对虾存活数量,取平均值作为该组存活率(表 1)。各组对虾存活率均随着时间的延长而下降。在整体死亡率达到 50% 后对各组存活率进行多重比较分析,发现实验 A 组与其余实验组存活率无差异($P > 0.05$),但均值不高于 B、C、D 组,高于 E、F 组,其中 C 组存活率最高;而 C 组中存活率与 E、F 组间差异非常显著($P < 0.01$)(表 2)。

2.3 中国明对虾免疫保护率变化趋势

免疫保护率取各组平均值作图(图 2)。各组 RPS 均随时间延长而下降,但各组下降趋势不同;

B 组 RPS 下降后在 72 h 趋近于 0,C、D 2 组 RPS 高于对照组,且 C 组 RPS 最高;E、F 2 组保护率呈现负值,表明该浓度 PHB 促进对虾的死亡。F 组在第 6 天全部死亡,对前 120 h 各组 RPS 进行多重分析发现,各组平均 RPS 为 (0.0 ± 0.0) 、 (0.3646 ± 0.49752) 、 (0.5094 ± 0.40202) 、 (0.4116 ± 0.36110) 、 (-0.1509 ± 0.67456) 、 (0.1442 ± 0.55869) 。A 组与 C 组存在显著差异($P < 0.05$),与其余各实验组无显著差异($P > 0.05$);C 组与 B、D 组间 RPS 无显著差异($P > 0.05$),与 E、F 组差异显著($P < 0.05$)。

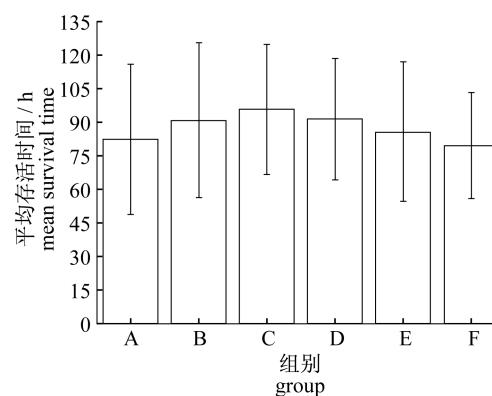


图 1 不同组别中国明对虾平均存活时间

A 为空白对照组,即投喂不含 PHB 的饲料;B、C、D、E、F 为实验组,依次投喂 PHB 含量为 0.5%、1.0%、2.5%、5.0%、10.0% 的饲料,下同

Fig. 1 Mean survival time of *F. chinensis* in different groups

A. control group, supplement with no PHB in bait; B, C, D, E, F. experiment groups, supplement with 1.0%, 2.5%, 5.0% and 10.0% of PHB in bait successively, the same as below

表 1 同一时间点各组存活率

Tab. 1 Survival rate of each group at the same time point

时间/h time	组别 groups						%
	A	B	C	D	E	F	
0	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	
24	94.44 ± 1.57	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	98.33 ± 1.67	100.00 ± 0.00	98.33 ± 1.67	
48	82.22 ± 3.14	85.56 ± 1.57	90.00 ± 2.72	86.67 ± 0.00	76.67 ± 9.43	80.00 ± 0.00	
72	62.22 ± 1.57	62.22 ± 5.67	80.00 ± 5.44	73.33 ± 0.00	42.22 ± 14.99	50.00 ± 3.33	
96	36.67 ± 11.86	36.67 ± 11.86	50.00 ± 7.20	46.67 ± 6.67	26.67 ± 19.05	23.33 ± 3.33	
120	17.78 ± 3.14	17.78 ± 6.85	23.33 ± 7.20	23.33 ± 3.33	10.00 ± 7.20	3.33 ± 0.00	
144	5.56 ± 4.16	6.67 ± 2.72	13.33 ± 5.44	6.67 ± 3.33	2.22 ± 1.57	0.00 ± 0.00	
168	1.11 ± 1.57	2.22 ± 1.57	6.67 ± 2.72	1.67 ± 1.67	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	
192	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	6.67 ± 2.72	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	

表 2 不同组别中国明对虾存活率的多重比较
Tab.2 Multiple comparison of survival rates of *F. chinensis* in different groups

组别 groups	A	B	C	D	E	F
A		0.638	0.110	1.000	0.695	0.391
B	0.026 67		0.198	0.638	0.336	0.161
C	0.100 00	0.073 33		0.110	0.034 *	0.016 *
D	0.000 00	0.026 67	0.100 00		0.695	0.391
E	0.022 22	0.048 89	0.122 22 *	0.022 22		0.583
F	0.046 67	0.073 33	0.156 67 *	0.046 67	0.024 44	

注: 对角线上方为 P 值, * 表示存在显著差异, 对角线下方为均值差绝对值

Notes: the numbers above the diagonal are P values, * shows significant difference; the numbers under the diagonal are absolute values of mean differences

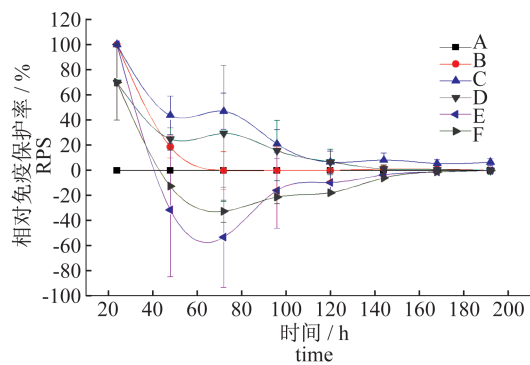


图 2 RPS 随时间变化趋势

Fig. 2 Trends of RPS with change of time

2.4 中国明对虾实时荧光定量

根据死亡分布曲线, 每组取对虾 10 尾, 利用实时荧光定量 PCR, 测定各组对虾的病毒含量, 取病毒拷贝数对数作图 (图 3)。各组病毒含量均经过对数增长期, 之后含量基本维持稳定。A、B、C、D、E、F 组病毒拷贝数分别在 45、45、78、60、35、35 h 达到最大值。结果显示, 在实验前 72 h, A 组病毒拷贝数与 B、E、F 组无显著差异 ($P > 0.05$), 与 C、D 2 组差异显著 ($P < 0.05$) 且 C 组病毒拷贝数最低。实验 72 h 后, A 组病毒拷贝数显著低于

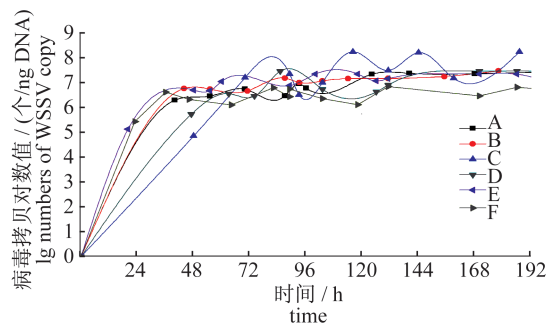


图 3 病毒含量随时间变化趋势

Fig. 3 Trends of the copy of WSSV with change of time

C 组 ($P < 0.05$), 与其余实验组间病毒拷贝数无显著差异 ($P > 0.05$)。整个实验过程中, 各组平均拷贝数为 1.08×10^7 , 1.15×10^7 , 4.75×10^7 , 1.27×10^7 , 1.14×10^7 , 3.29×10^6 个/ng DNA; A 组与 1% 浓度组病毒拷贝数具有显著差异 ($P < 0.05$), 且 1.0% 浓度组病毒拷贝数最高。

3 讨论

抗生素在养殖生产中不仅可作为药剂还可用作生长促进剂^[21]。最近一些研究着眼于使用其他的一些生物试剂来代替抗生素用于生产养殖^[22-23]。PHB 是具有广泛应用前景的可替代抗生素的生物控制剂。

短链脂肪酸 (short chain fatty acids, SCFA) 具有抑菌、降低动物肠道 pH 值和促进营养物质吸收利用等广泛的生理功能, 是一种具有应用前景的生物活性物质和饲料添加剂^[24-25]。PHB 的疏水特性减少挥发性短链脂肪酸对水质的破坏作用, 比较适于在水产育苗和养殖中的应用。研究表明, 在养殖水体中加入 PHB 颗粒或者积累 PHB 的细菌, 可保护感染发光弧菌的卤虫 (*Artemia franciscana*)^[26-27]。孙慧贤等^[28]发现当水体 PHB 浓度为 100 mg/L 时, 卤虫的成活率最高, 并能够提高卤虫对发光弧菌 (*Vibrio campbellii*) 的抵抗力。由于 PHB 比重较轻, 易悬浮于水中且易结块, 实验中将 PHB 与饲料原料混合后进行制粒, 投喂对虾。

研究发现单纯使用 WSSV 粗提取液浸泡和共居不能使对虾感染发病死亡^[29-30]。刘萍等^[31]发现温度低时, 对虾可以感染病毒, 但表现为不发病; 温度高时, 对虾体内病毒含量随温度升高而加快升高, 进而死亡。本研究的人工感染实验以投喂方式对对虾进行感染, 即在饥饿状态下投喂

毒饵,以保证实验对虾同时感染同等剂量病毒。实验中对温度进行控制,维持在 $(25 \pm 0.5)^\circ\text{C}$,保证病毒在对虾体内的正常复制。本研究对对虾初始投喂感染量为 10^6 个,感染对虾的病毒拷贝数在达到稳定后维持在 10^7 个/ng DNA 以上,各组对虾平均存活时间均高于 80 h,其中 1% PHB 浓度组平均存活时间达到 95 h。盖春蕾等^[32]研究发现中国明对虾初始感染量为 10^5 个时,对虾平均存活时间仅为 (53.21 ± 0.05) h。董世瑞等^[33]报道,投喂卤虫和鱼肉的中国明对虾攻毒存活率要高于投喂配合饲料的中国明对虾,且差异极显著($P < 0.01$)。李旭鹏等^[34]也进行了相关方面的研究,其结果与董世瑞等^[33]的结果一致。这说明饵料中的营养成分与对虾的抗病力可能存在重要关系。

对虾体内 WSSV 病毒含量达到耐受阈值后,对虾随即死亡。实验中发现,实验组对虾在前期活力明显高于对照组,但随实验进行,实验组对虾死亡率开始升高,可能由于实验后期对虾摄食量减少,PHB 未达到具有免疫保护的初始浓度。本实验还发现在浓度为 1% 时,对虾存活率较高,且体内病毒拷贝数在实验前期明显低于其余几组。在实验后期,C 组病毒含量高于对照组(图 3),但存活率仍高于对照组(表 1),可能原因有 2 个:一方面,PHB 随着代谢改变了机体内菌群结构,增加了益生菌的数量;另一方面是 PHB 在对虾体内经过代谢改变了肠道内 pH,改变某些免疫酶活性,提升了对虾自身免疫力进而提高了对虾对 WSSV 的耐受性。因而在前期,对虾体内病毒复制受到一定的抑制,含量低于对照组;但随实验进行,存活对虾体内病毒继续复制导致含量上升,到达新的耐受阈值后死亡。但高浓度组 PHB 在前期对对虾存活有抑制作用(表 1,表 2),可能原因有 2 个:① PHB 虽混合在饲料中,但仍有一定 PHB 随残饵溶于水体中,水体粘稠度升高,对对虾的运动及呼吸造成一定的困难,导致活力较弱的对虾死亡。这与孙慧贤等^[28]研究相似,水体中 PHB 浓度高于 100 mg/L 时,较弱活力卤虫死亡;② 中国明对虾对 PHB 利用率有一定的范围,不能利用的 PHB 降解为 β -羟基丁酸,从而引起酮中毒现象,这点在卤虫研究中有发现,Weltzien 等^[35]发现卤虫无节幼体可以利用 PHB 作为生长原料,但水体中 PHB 浓度过高引起酮酸代谢过多,导致

幼体死亡率上升。但在实验后期,对虾摄食量减少,酮中毒现象有所缓解。

综上所述,PHB 在一定程度上能提高对虾抗 WSSV 的能力,初步研究结果显示最适浓度为 1%。

参考文献:

- [1] Lighiner D V. Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two Penaeid shrimp viruses in the Americas [J]. *Revue Scientifique et Technique*, 1996, 15(2) : 579 - 601.
- [2] Lighiner D V. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp [M]. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 1996.
- [3] Dong B, Xiang J H, Yang M, *et al.* Research on the disease occurrence and disease resistance of the commercially important organisms in mariculture [J]. *China Basic Science*, 2003(6) : 19 - 24. [董波, 相建海, 杨鸣, 等. 海水养殖生物病害发生和抗病力的基础研究. *中国基础科学*, 2003(6) : 19 - 24.]
- [4] Luo Z, Huang J, Zhou L. Developing strategies available for resistance to white spot syndrome virus (WSSV) [J]. *Marine Fisheries Research*, 2007, 28(5) : 116 - 122. [罗展, 黄捷, 周丽. 抗白斑综合征病毒 (WSSV) 感染途径研究进展. *海洋水产研究*, 2007, 28(5) : 116 - 122.]
- [5] Yang F, He J, Lin X, *et al.* Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus [J]. *Journal of Virology*, 2001, 75 (23) : 11811 - 11820.
- [6] Zhang H, Gu L, Yang F. RNA interference on *vp15* gene of shrimp white spot syndrome virus (WSSV) [J]. *Journal of oceanography in Taiwan Strait*, 2012, 31(1) : 47 - 52. [张衡, 谷力, 杨丰. 对虾白斑综合征病毒 *vp15* 基因的 RNA 干扰研究. *台湾海峡*, 2012, 31(1) : 47 - 52.]
- [7] Li Z J, Meng X H, Kong J, *et al.* Quasi-immune response of *Fenneropenaeus chinensis* to WSSV and its verification [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, 19(6) : 989 - 993. [李战军, 孟宪红, 孔杰, 等. 中国对虾对白斑综合征病毒的类免疫反应与验证. *中国水产科学*, 2012, 19(6) : 989 - 993.]
- [8] He Y D, Zhang X B. Comprehensive characterization of viral miRNAs involved in white spot syndrome virus (WSSV) infection [J]. *RNA Biology*, 2012, 9(7) : 1019 - 1029.
- [9] Xue L G, Zhao X, Chang S J, *et al.* A strain of high

- PHB output by mutagenesis of 80 MeV/u C-12 ions [J]. *Nuclear Techniques*, 2010, 33 (4): 284 – 288. [薛林贵, 赵旭, 常思静, 等. 80 MeV/u C-12 离子诱变选育 PHB 高产菌株. *核技术*, 2010, 33 (4): 284 – 288.]
- [10] Chen Y, Wang D Y, Weng Z. Study of the PHB guidance combined with nerve growth factor in sciatic nerve injury [J]. *Chongqing Medicine*, 2008, 37(4): 393 – 395. [陈渝, 王大勇, 翁政. PHB 导管复合神经生长因子在大鼠坐骨神经损伤模型中的疗效研究. *重庆医学*, 2008, 37(4): 393 – 395.]
- [11] Yu J, Plachett D, Chen L X. Kinetics and mechanism of the monomeric products from abiotic hydrolysis of poly [(R)-3-hydroxybutyrate] under acidic and alkaline conditions [J]. *Polymer Degradation and Stability*, 2005, 89: 289 – 299.
- [12] Partanen K H, Mroz Z. Organic acids for performance enhancement in pig diets [J]. *Nutrition Research Reviews*, 1999, 12(1): 117 – 145.
- [13] Sinha A K. Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) increase growth performance and intestinal bacterial range-weighted richness in juvenile European sea bass, *Dicentrarchus labrax* [J]. *Applied Microbial and Cell Physiology*, 2010, 86: 1525 – 1541.
- [14] Gao Q X, Shi Z H, Peng S M. Probiotics in aquaculture; recent progress and outlook [J]. *Marine Fisheries*, 2013, 35 (3): 364 – 372. [高权新, 施兆鸿, 彭士明. 益生菌在水产养殖中的研究进展. *海洋渔业*, 2013, 35(3): 364 – 372.]
- [15] Wang Z F, Zhang P, Wei P. The research progress of the antiviral effect and its mechanism in intestinal probiotics [J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2010, 22 (2): 184 – 185, 189. [王占峰, 张萍, 魏萍. 肠道益生菌抗病毒作用及其机制研究进展. *中国微生物学杂志*, 2010, 22(2): 184 – 185, 189.]
- [16] Son V M, Chang C C, Wu M C, *et al.* Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides* [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2009, 26(5): 691 – 698.
- [17] Liu C H, Chiu C H, Wang S W, *et al.* Dietary administration of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, enhances the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides* [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2012, 33(4): 699 – 706.
- [18] Yan D W, Hua X M, Zhou H Q. Effects of chitosan on the growth and disease-resistant in grass carp [J]. *Feed Industry*, 2007, 28 (12): 17 – 18. [闫大伟, 华雪铭, 周洪琪. 壳聚糖对草鱼生长、抗病性能的影响. *饲料工业*, 2007, 28(12): 17 – 18.]
- [19] Wang W J. Genetic Mapping of the Chinese Shrimp *Fenneropenaeus chinensis* using AFLP Markers and commercial traits QTL mapping [D]. Ocean University of China, 2008. [王伟继. 中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) AFLP 分子标记遗传连锁图谱的构建以及相关性状 QTL 定位分析. 中国海洋大学, 2008.]
- [20] Durand S V, Lightner D V. Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2002, 25(7): 381 – 389.
- [21] Acar J, Casewell M, Freeman J, *et al.* Avoparcin and virginiamycin as animal growth promoters: a plea for science in decision-making [J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2000, 6(9): 477 – 482.
- [22] Mahious A S, Gatesoupe F J, Hervi M, *et al.* Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning turbot, *Psetta maxima* (Linnaeus, C. 1758) [J]. *Aquaculture International*, 2006, 14 (3): 219 – 229.
- [23] Zhou Z G, Ding Z K, Huiyuan L V. Effects of dietary short-chain fructooligosaccharides on intestinal microflora, survival, and growth performance of juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei* [J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2007, 38 (2): 296 – 301.
- [24] Matthew A G, Franklin M A, Upchurch W G, *et al.* Effect of weaning on ileal short-chain fatty acid concentrations in pigs [J]. *Nutrition Research*, 1996, 16(10): 1689 – 1698.
- [25] Antongiovanni M, Buccioni A, Petacchi F, *et al.* Butyric acid glycerides in the diet of broiler chickens: effects on gut histology and carcass composition [J]. *Italian Journal of Animal Science*, 2007, 6(1): 19 – 25.
- [26] Defoirdt T, Halet D, Vervareren H, *et al.* The bacterial storage compound poly- β -hydroxybutyrate protects *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii* [J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9 (2): 445 – 452.
- [27] Dirk H, Tom D, Petra V, *et al.* Poly- β -hydroxybutyrate-accumulating bacteria protect gnotobiotic *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii* [J]. *FEMS Microbiology Ecology*,

- 2007,60(3):363-369.
- [28] Sun H X, Sui L Y. *Artemia* nauplii enrichment with ploy- β -hydroxybutyrate [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2011, 20(3):392-398. [孙慧贤, 隋丽英. 聚 β -羟基丁酸酯对卤虫幼体的强化作用. 上海海洋大学学报, 2011, 20(3):392-398.]
- [29] Huang J, Cai S L, Song X L, et al. Study on Artificial infection for *Penaeus chinensis* by the pathogen of the explosive epidemic disease of shrimp [J]. Marine Fisheries Research, 1995, 16(1):51-58. [黄健, 蔡生力, 宋晓玲, 等. 对虾暴发性流行病原的人工感染研究. 海洋水产研究, 1995, 16(1):51-58.]
- [30] He J G, Zhou H M, Yao B, et al. White Spot Syndrome Baculovirus (WSBV) Host Range and Transmission Route [J]. Acta Scientiarum Naturalium, Universitatis Sunyatseni, 1999, 38(2):65-69. [何建国, 周化明, 姚伯, 等. 白斑综合症杆状病毒的感染途径和宿主种类. 中山大学学报:自然科学版, 1999, 38(2):65-69.]
- [31] Liu P, Kong J, Li J, et al. Experiment on the ovum and larvae of *Penaeus chinensis* artificially infected with the white spot syndrome virus (WSSV) [J]. Marine Fisheries Research, 2001, 22(1):1-6. [刘萍, 孔杰, 李健, 等. 白斑综合症病毒(WSSV)对中国对虾卵及各期幼体人工感染的试验研究. 海洋水产研究, 2001, 22(1):1-6.]
- [32] Gai C L, Xu L, Ye H B, et al. Comparison of sensitivities of *Fenneropenaeus chinensis* and *Marsupenaeus Japonicus* to white spot syndrome virus (WSSV) [J]. Fisheries Science & Technology Information, 2013, 40(4):207-209. [盖春蕾, 许拉, 叶海斌, 等. 中国对虾和日本对虾对白斑综合征病毒(WSSV)敏感性的比较. 水产科技情报, 2013, 40(4):207-209.]
- [33] Dong S R, Gao H, Kong J, et al. Effects of diets on growth of Chinese shrimp *Fenneropenaeus Chinensis* and survival rate from WSSV [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(1):52-58. [董世瑞, 高焕, 孔杰, 等. 不同饵料对中国对虾幼虾生长及感染 WSSV 存活率的影响. 中国水产科学, 2006, 13(1):52-58.]
- [34] Li X P, Meng X H, Kong J, et al. Effects on survival time of *Fenneropenaeus chinensis* challenged by different doses of WSSV and diets [J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(2):263-268. [李旭鹏, 孟宪红, 孔杰, 等. WSSV 人工感染量和饵料对中国明对虾存活时间的影响. 水产学报, 2013, 37(2):263-268.]
- [35] Weltzien F A, Hemre G I, Evjemo J O, et al. β -hydroxybutyrate in developing nauplii of brine shrimp (*Artemia franciscana* K.) under feeding and non-feeding conditions [J]. Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry and Molecular Biology, 2000, 125(1):63-69.

Effects of poly- β -hydroxybutyrate on WSSV resistance in *Fenneropenaeus chinensis*

DENG Kangyu^{1,2}, KONG Jie^{1,2*}, MENG Xianhong², LUO Kun², CAO Baoxiang²,
LIU Ning², LUAN Sheng², SHI Xiaoli², LI Xupeng², CAO Jiawang²

(1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China;

2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture,

Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: This study was designed to explore the anti-WSSV influences of PHB in Chinese shrimp to provide a theoretical basis for the use of PHB in the aquaculture industry. This study used the single factor concentration gradient method. *Fenneropenaeus chinensis* were artificially infected with WSSV. The *F. chinensis* were also fed bait that contained different concentrations of PHB (0.0%, 0.5%, 1.0%, 2.5%, 5.0% and 10.0%); these concentrations were adjusted based on the weights of the shrimp at the beginning of the day and the number of shrimp in the tank. During the experimental period, the dead shrimp were collected and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, and the time of death and water temperatures were recorded. After the experiment, some of the shrimp were selected based on the death curve, and DNA was extracted. The shrimp survival rates for each treatment were determined daily, and the treatments were compared at each time point in terms of mean survival time, survival rates and relative percent survival (RPS) rates. Moreover, the absolute WSSV loads among the dead shrimp were determined by real-time PCR. The results indicated that the PHB influenced the survival rates, mean survival time and WSSV loads in the shrimp. Compared with the control group, the survival rates and mean survival time of the experimental groups exhibited downward trends following initial increases as the concentrations of PHB increased. The mean survival time of the groups treated with 0.0%, 0.5%, 1.0%, 2.5%, 5.0% and 10.0% PHB were 82.23, 90.71, 95.55, 91.15, 85.56 and 79.40 h, respectively. There were no significant differences in the mean survival time among the shrimp that were supplied with feed containing the 0.5%, 1% and 2.5% concentrations of PHB ($P > 0.05$), but the mean survival time of the other groups were all significantly lower than that of the 1.0% PHB group ($P < 0.05$). The mortality rates for all groups were ultimately 100%. Compared to the control group, the survival rates of the experimental groups were higher and the WSSV loads were lower in the groups in which the PHB concentration did not exceed 2.5% at the same time points. However, similar results were not observed at PHB concentrations above 2.5%. The mean RPS rates of each group were 0.0, 0.364 6, 0.509 4, 0.411 6, -0.150 9 and 0.144 2. There was a significant difference in the RPS rates of the control and 1.0% PHB group ($P < 0.05$). The RPS of the 1.0% PHB group was the highest. When the quantity of WSSV reached the threshold to cause death, the shrimp began to die. During the experimental period, the numbers of WSSV copies for each group were 1.08×10^7 , 1.15×10^7 , 4.75×10^7 , 1.27×10^7 , 1.14×10^7 and 3.29×10^6 copies/ng DNA. There was a significant difference between the group that was supplied with 1.0% PHB and the control group ($P < 0.05$). We also found that the numbers of WSSV copies in the 1.0% PHB treatment group were lower than those of the control group in the first 72 h ($P < 0.05$), but higher 72 h later ($P < 0.05$). These results indicated that PHB enhanced the immunity to and tolerance of WSSV in shrimp. This study also revealed that high concentrations of PHB inhibited shrimp survival. The present study found that 1% PHB in the feed was the preferable concentration for improving the ability of shrimp to resist WSSV.

Key words: *Fenneropenaeus chinensis*; poly- β -hydroxybutyrate; survival rate; WSSV; challenge test; real-time PCR

Corresponding author: KONG Jie. E-mail: kongjie@ysfri.ac.cn