



枯草芽孢杆菌对氨氮胁迫下半滑舌鲷非特异性免疫酶活性、血液生化指标及相关基因表达量的影响

张晶晶, 左志晗*, 张晓月, 李文悦, 孙金生*
(天津师范大学生命科学学院, 天津市动植物抗性重点实验室, 天津 300387)

摘要: 为探究益生菌对氨氮胁迫下半滑舌鲷的非特异性免疫酶活、血液生化指标及相关基因表达是否具有调节作用, 实验首先选用枯草芽孢杆菌 Y2 益生菌对半滑舌鲷进行饲喂, 然后对半滑舌鲷进行氨氮胁迫, 胁迫过程中持续饲喂 Y2 并对相关指标进行监测。其中宏观生长指标结果显示, 氨氮胁迫组半滑舌鲷体质量、体长低于非氨氮胁迫组, 在氨氮胁迫及非氨氮胁迫条件下 Y2 组舌鲷体质量、体长高于空白对照组。免疫酶活测定结果显示, 氨氮胁迫后半滑舌鲷血清过氧化氢酶 (CAT)、酸性磷酸酶 (ACP)、过氧化物酶 (POD)、碱性磷酸酶 (AKP) 活性均有所升高; 在氨氮胁迫及非氨氮胁迫条件下饲喂 Y2 菌株的 2 组 ACP、CAT 和 POD 活性均高于其相应对空白组。血液相关生化指标结果显示, 非氨氮胁迫 Y2 组半滑舌鲷血清中白蛋白 (ALB) 和球蛋白 (GLB) 含量略高于空白对照组, 白蛋白与球蛋白比值 (A/G) 较高, 甘油三酯 (TG)、胆固醇 (CHO) 含量差异较小; 氨氮胁迫对照组舌鲷血清中 ALB、CHO 含量下降, GLB 含量略有升高, 血清中总蛋白 (TP) 及总脂肪呈下降趋势, 且 A/G 降低, 而氨氮胁迫 Y2 组比空白组舌鲷血清中 ALB、TG 及 CHO 含量升高, 导致 A/G 升高。同时氨氮胁迫使血清中丙二醛 (MDA)、谷草转氨酶 (AST) 及谷丙转氨酶 (ALT) 的含量显著升高, Y2 在氨氮胁迫及非氨氮胁迫条件下均可以降低 MDA、AST 及 ALT 的含量。相关基因表达结果显示, 氨氮胁迫使半滑舌鲷肠、肝脏、肌肉及鳃组织热休克蛋白基因 (*HSP70*) 及血红蛋白 $\alpha 1$ 基因 (*Hb- $\alpha 1$*) 表达量升高, 且 *HSP70* 的表达量 Y2 组高于空白组, 其中在肝脏组织中上调最明显, 相反, 氨氮胁迫下 Y2 组的 *Hb- $\alpha 1$* 表达量下降, 在肝脏及肌肉组织中下降最明显。此外氨氮胁迫使半滑舌鲷相应组织中生长因子基因 (*IGF*) 的表达量均降低, 但在氨氮及非氨氮胁迫条件下 Y2 组的 *IGF* 表达量均高于其空白对照组。综上, Y2 可以改善氨氮胁迫对半滑舌鲷的免疫能力、血液生化指标、氧气运输、应激能力及生长等造成的多方面影响, 降低氨氮胁迫对半滑舌鲷造成的负面作用, 在水产养殖行业中具有良好的应用前景。

关键词: 半滑舌鲷; 枯草芽孢杆菌; 氨氮胁迫; 免疫酶活; 血清生化指标; 基因表达
中图分类号: S 942.3 **文献标志码:** A

半滑舌鲷 (*Cynoglossus semilaevis*) 隶属舌鲷科 (*Cynoglossidae*) 舌鲷属 (*Cynoglossus*), 是我国

本土特有的大型底栖名贵海水, 目前, 半滑舌鲷养殖业已在我国沿海地区迅速发展, 并取得显著

收稿日期: 2020-11-01 修回日期: 2021-04-10

资助项目: 天津市人才发展特殊支持计划高层次创新创业团队项目 (ITFRS2017007); 天津市高等学校创新团队建设规划项目 (TD13-5076)

第一作者: 张晶晶 (照片), 从事水生动物微生态及免疫研究, E-mail: 2235729161@qq.com

通信作者: 左志晗, 从事肠道微生物对水产动物生长及免疫调节作用方面的研究, E-mail: zhihanzuo@163.com;
孙金生, 从事水生经济甲壳动物神经内分泌学、重要水产养殖动物病害的发生与免疫防治方面的研究,
E-mail: skysjs@tjnu.edu.cn



的经济效益和社会效益^[1-3]。近年来,随着半滑舌鲷高密度集约化养殖,导致动物疾病频发,其中水产养殖动物残饵和排泄物的氨化作用是诱发鱼病的主要环境因子。鱼类经常会受到持续性的氨氮胁迫,水体中氨氮浓度可在短时间内急剧升高,从而会对水产养殖生物造成急性氨氮胁迫伤害^[4-5]。氨氮在水体中通常以离子氨(NH₄⁺)和非离子氨(NH₃) 2种形式存在。非离子氨毒性较强,由于其分子半径较小、脂溶性较强,极易通过鳃等组织器官进入机体,使体内产生大量自由基而出现氧化应激现象^[6-8],严重时会引起水产动物组织发生病变、抗氧化防御系统发生紊乱以及呼吸、排泄功能受损^[9-10],最终导致水产动物摄食量下降、生长受阻,甚至出现大规模死亡。因此,如何缓解水体氨氮对水产动物的毒性是目前亟待解决的问题之一^[11]。

益生菌是一类通过定殖在生物体内,改变宿主主体内菌群组成并对宿主有益的活性微生物,因其具有降低养殖动物发病率,同时不会导致药物残留而对人体健康产生不利影响的特点,现已成为水产养殖业中新的研究热点^[12]。芽孢杆菌(*Bacillus*)是益生菌中常见的菌种之一,被广泛用于水产养殖中。芽孢杆菌在水生动物肠道中可产生大量的水解酶类,补充动物肠道内源性酶的缺乏,提高饲料利用率,从而促进动物生长;芽孢杆菌可以促进多种益生菌增殖以抵抗外来病原菌的入侵和定殖;还可以作为免疫促进剂,增强鱼的非特异性免疫功能^[13-15]。

实验用枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)Y2分离于健康半滑舌鲷肠道,以饲料添加的形式对半滑舌鲷进行60d的饲喂,随后将饲喂60d的半滑舌鲷的空白组与实验组进行为期20d的氨氮胁迫实验,探究Y2菌株对半滑舌鲷在氨氮胁迫条件下的血清非特异性免疫酶活、血液生化指标以及相关基因表达量的影响,以评价Y2菌株是否具有缓解氨氮胁迫对半滑舌鲷机体造成的负面作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验动物:半滑舌鲷由天津市海发珍品实业发展有限公司提供。

益生菌:枯草芽孢杆菌Y2为本实验室前期

从健康半滑舌鲷肠道中分离获得的菌株,其对哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)、迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、鳃弧菌(*V. anguillarum*)、杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)、副溶血性弧菌(*V. parahaemolyticus*)均具拮抗作用,其中对鳃弧菌抑菌效果最为明显,且其抑菌活性主要来源于外泌物质。

试剂盒:酸性磷酸酶(ACP)、丙二醛(MDA)、碱性磷酸酶(AKP)采用南京建成科技有限公司测定试剂盒测定;过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)采用苏州科铭技术有限责任公司测定试剂盒测定。

1.2 氨氮胁迫后半滑舌鲷生长指标的测定

称取氨氮胁迫前后不同处理组半滑舌鲷的体长及体质量,并计算此期间半滑舌鲷体长及体质量的增长率公式如下:

$$\text{体长增长率} = (L_0 - L_1) / L_1 \times 100\%;$$

$$\text{体质量增长率} = (W_0 - W_1) / W_1 \times 100\%$$

式中, L_0 与 W_0 为氨氮胁迫前半滑舌鲷体长(cm)与体质量(g); L_1 与 W_1 为氨氮胁迫后半滑舌鲷体长与体质量。

1.3 半滑舌鲷半致死浓度的测定

实验前期以空白对照组半滑舌鲷为实验材料进行氨氮胁迫预实验,以24h未见死亡的浓度为最小氨氮浓度,以24h全部死亡的浓度为最大浓度,最终确定5组实验浓度分别为0.123 30、15.464 26、32.890 04、54.791 56和85.890 56 mg/L。按照该浓度将半滑舌鲷分为5组,每组6尾,并设置3个平行,对24、48和96h半滑舌鲷的死亡率进行统计,计算半致死浓度,计算方法参照葛建龙等^[16]所用方法。

采用纳氏试剂分光光度法测定水体氨氮浓度。

1.4 半滑舌鲷的养殖

取体长(15±5)cm健康半滑舌鲷120尾随机分为2组(饲料中添加Y2菌株发酵液实验组和只添加无菌培养基的空白对照组),每组60尾,设3个平行,进行为期60d的养殖实验。随后将饲喂60d的半滑舌鲷的空白对照组和Y2组分别分为无氨氮组和氨氮胁迫组(即非氨氮胁迫空白对照组、非氨氮胁迫Y2组、氨氮胁迫空白组、氨氮

胁迫 Y2 组, 每组 30 尾, 并设 3 个平行) 进行为期 20 d 的氨氮胁迫实验, 每 4 h 测定水中氨氮含量并补足氯化铵保持氨氮浓度为 5 mg/L。氨氮胁迫过程中 Y2 组持续饲喂益生菌。

1.5 饲料的制备方法

Y2 活化后, 测定菌液 OD₆₀₀ 计算菌液浓度, 将菌液混匀至饲料中使饲料中, Y2 含量为 1×10⁷ CFU/g, 待饲料较为干燥时加入质量分数为 10% 海藻酸钠溶液, 使海藻酸钠溶液完全包裹饲料, 避免溶失情况, 最好现配现用, 制备的饲料放于 4 °C 冰箱保存备用, 不超过 48 h。对照组饲料中加入等量 TSB 液体培养基及海藻酸钠, 操作与上述实验组相同。所用饲料为三通生物工程 (潍坊) 有限公司生产的“海童海水鱼配合饲料”成品饲料。

1.6 氨氮胁迫后半滑舌鲷血清免疫酶活的测定

每组随机取 3 尾氨氮胁迫 20 d 的半滑舌鲷, 通过试剂盒测定血清免疫酶活。

1.7 氨氮胁迫后半滑舌鲷血清生化指标的测定

每个样本取 300 μL 送于中国医学科学院放射医学研究所测定血清中血脂、蛋白、谷草转氨酶 (AST)、谷丙转氨酶 (ALT) 等血清生化指标。

血清中丙二醛采用试剂盒检测。

1.8 总 RNA 提取

根据 TRIzol 试剂盒说明书, 对半滑舌鲷肠、鳃、肌肉及肝脏组织的总 RNA 进行提取, 将提取的 RNA 以 1% 琼脂糖凝胶电泳, 检测 RNA 降解情况, 并用微量核酸蛋白测定仪 (NanoDrop2000, Thermo Fisher) 测定 RNA 浓度, 其余 RNA 于 -80 °C 保存用于后续反转录实验。

1.9 组织 RNA 的反转录

采用反转录试剂盒 (购于南京诺唯赞生物科技股份有限公司) 按照说明书进行各组分加样, 将预混后的组分充分混匀后, 加到 200 μL 离心管中, 然后加入 RNA, 使反应体系中 RNA 的量为 2 μg, 最后以无酶水补齐体系。反转录程序设定为 42 °C 15 min, 70 °C 15 min。

1.10 相关基因表达量的检测

选取半滑舌鲷 *GAPDH* 为内参基因, 对各组织的热休克蛋白 70 基因 (*HSP70*)、血红蛋白 α1 基因 (*Hb-α1*) 及生长因子基因 (*IGF*) 进行定量 PCR

检测, 引物见表 1; 加样体系: 引物-F 和引物-R 各 0.4 μL, 各组织的 cDNA 2 μL, 2×AceQ qPCR SYBR Green Master Mix 10 μL, Nuclease-Free Water 7.2 μL; 定量程序设定: 95 °C 5 min, 95 °C 10 s; 60 °C 30 s, 95 °C 15 s, 40 个循环; 60 °C 1 min, 95 °C 15 s; 40 °C 30 s。经定量后利用 2^{-ΔΔC_t} 法计算半滑舌鲷基因的相对表达量, 并利用统计学分析各组数据之间差异的显著性。

表 1 半滑舌鲷相关基因表达分析所用引物

Tab. 1 Primers used for analysis of expression of related genes of *C. semilaevis*

引物 primers	引物序列 (5'-3') primer sequences
<i>GAPDH</i> : F	GAAGGGCATTCTGGATACACT
R	TCAAAGATGGAGGAGCGGC
<i>Hb-α1</i> : F	AACCAAGACCTACTCCACCCA
R	CTTCTCGCTGAGGTCCAACA
<i>HSP70</i> : F	CGAGGGCATCGACTTCTAC
R	TCTGGGTTGATGCTCTTGTTTC
<i>IGF</i> : F	ATCTCCTGTAGCCACACCCCT
R	GCCATAGCCTGTTGGTTTGC

2 结果

2.1 半滑舌鲷氨氮半致死浓度的测定

以氨氮浓度分别为 0.123 30、15.464 26、32.890 04、54.791 56 及 85.890 56 mg/L 胁迫半滑舌鲷, 发现氨氮浓度为 85.890 56 mg/L 组半滑舌鲷随时间持续 (24 h 内) 出现急性中毒症状, 表现为沿池壁不断游动, 焦躁不安, 受惊后快速游动或跃出水面, 平衡能力逐渐丧失, 出现鱼体侧翻现象, 最后死亡。随着氨氮胁迫时间的延长及氨氮浓度的升高, 半滑舌鲷死亡率逐渐增高, 经计算得出 96 h 氨氮半致死浓度为 32.60 mg/L, 安全浓度为 3.26 mg/L。

2.2 氨氮胁迫后半滑舌鲷生长指标的测定

通过分析氨氮胁迫期间不同处理组半滑舌鲷的体长及体质量增长率发现, 氨氮胁迫 2 组较非氨氮胁迫 2 组半滑舌鲷体长及体质量增长率明显降低, 且氨氮胁迫组中 Y2 组半滑舌鲷体质量增长率略高于空白对照组; 非氨氮胁迫中的 Y2 组体长及体质量相对于空白对照组增加显著 ($P < 0.05$)。 (图 1)

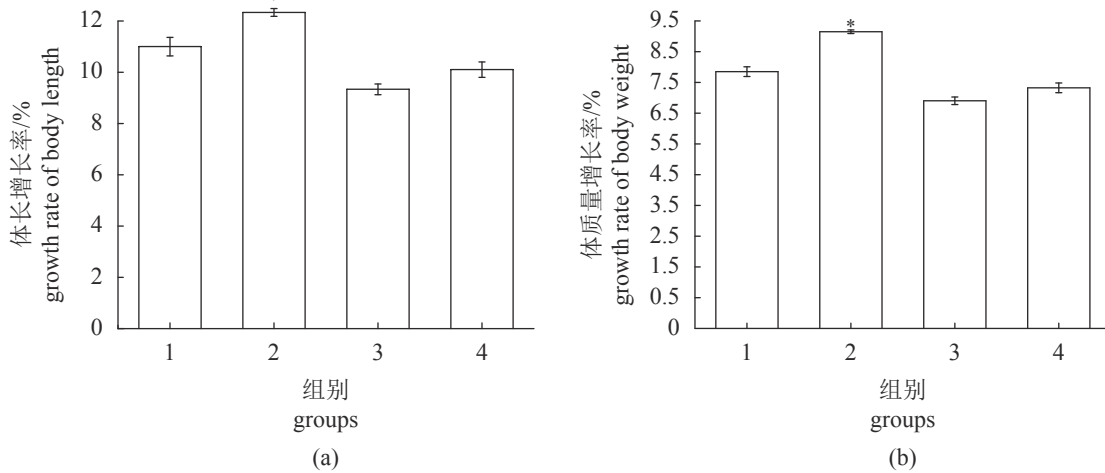


图 1 半滑舌鲷体长和体质量增长率

(a) 体长增长率, (b) 体质量增长率; 1. 非氨氮胁迫空白对照组 (C), 2. 非氨氮胁迫 Y2 组 (D), 3. 氨氮胁迫空白对照组 (G), 4. 氨氮胁迫 Y2 组 (H); *. 差异显著 $P<0.05$; 下同

Fig. 1 Growth rate of body length and weight of *C. semilaevis*

(a) growth rate of body length, (b) growth rate of body weight; 1. blank group without ammonia nitrogen stress (C), 2. Y2 group without ammonia nitrogen stress (D), 3. blank group with ammonia nitrogen stress (G), 4. Y2 group with ammonia nitrogen stress (H); *. significant difference $P<0.05$; the same below

2.3 氨氮胁迫后半滑舌鲷血清免疫酶活的测定

益生菌饲喂和氨氮胁迫均导致半滑舌鲷的血清酶活发生显著性变化。4 组中, Y2 添加组半滑舌鲷血清中的 ACP、CAT 和 POD 活性均高于其相应空白对照组 (C 组为 D 组的空白对照, G 组为 H 组的空白对照)。总体上氨氮胁迫后的 G、H 组的 ACP、AKP、CAT 和 POD 活性相对于胁迫前的 C、D 组均有所升高, 且添加 Y2 菌株组相较于各自的空白对照组在受到氨氮胁迫后, 血清中 ACP、CAT 及 POD 活性提高的幅度更高, 其中

CAT 活性表现为氨氮胁迫 Y2 组显著高于其他 3 组 ($P<0.05$), AKP 活性氨氮胁迫 Y2 组略低于氨氮胁迫空白组, 但差异不显著。(图 2)

2.4 氨氮胁迫后半滑舌鲷血清生化指标的测定

相较于非氨氮胁迫组, 氨氮胁迫组半滑舌鲷血清中白蛋白 (ALB)、胆固醇 (CHO) 含量均有所下降, 球蛋白 (GLB) 含量上升, 高密度脂蛋白 (HDL) 及低密度脂蛋白 (LDL) 含量无明显变化, 血清中总蛋白 (TP) 及各种脂类含量出现下降趋势 (图 3, 图 4); 而氨氮胁迫组的 GLB 含量相比非氨

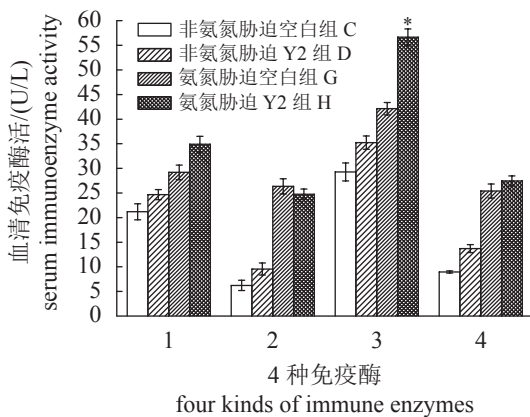


图 2 血清免疫酶活性的测定

1. 酸性磷酸酶, 2. 碱性磷酸酶, 3. 过氧化氢酶, 4. 过氧化物酶

Fig. 2 Determination of serum immune enzyme activity

1. ACP, 2. AKP, 3. CAT, 4. POD

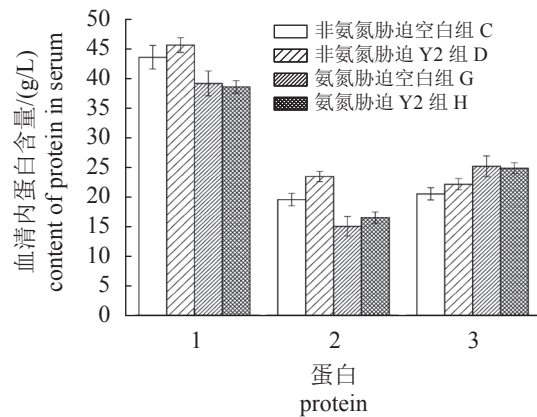


图 3 血清内蛋白含量的测定

1. 总蛋白; 2. 白蛋白; 3. 球蛋白

Fig. 3 Determination of serum protein content

1. TP, 2. ALB, 3. GLB

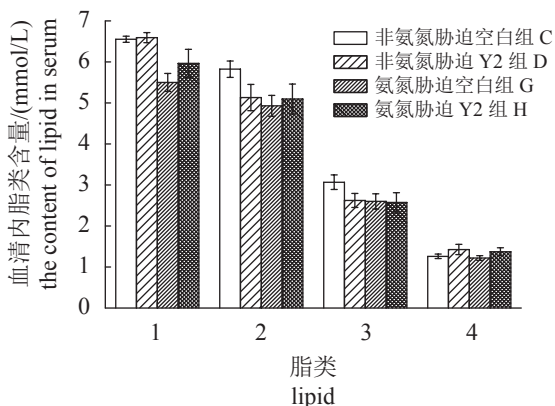


图 4 血清内脂类含量的测定

1. 甘油三酯, 2. 胆固醇, 3. 高密度脂蛋白, 4. 低密度脂蛋白

Fig. 4 Determination of serum lipid content

1. TG, 2. CHO, 3. HDL, 4. LDL

氮胁迫组的升高, 导致氨氮胁迫组白蛋白与球蛋白比值 (A/G) 降低, 且氨氮胁迫组中 Y2 组比其对照组的 A/G 高 (图 5); 总体上氨氮胁迫下 Y2 组血清中蛋白及脂肪含量与空白组差异均较小, 说明 Y2 的添加对氨氮胁迫过程中血液中脂肪及蛋白含量影响较小。非氨氮胁迫组中, Y2 组半滑舌鲷血清内 TP、ALB 及 GLB 含量略高于其空白对照组, 而 TG、CHO 差异较小。氨氮胁迫及有无 Y2 添加对半滑舌鲷血清中 HDL、LDL 均无显著影响 (图 3, 图 4)。

氨氮胁迫后半滑舌鲷相比于非氨氮胁迫组半滑舌鲷血清中 MDA 含量明显上升, 说明氨氮胁迫导致半滑舌鲷血清中 MDA 显著增加; 其中氨氮胁迫组中的对照组 MDA 增加最显著, 说明在

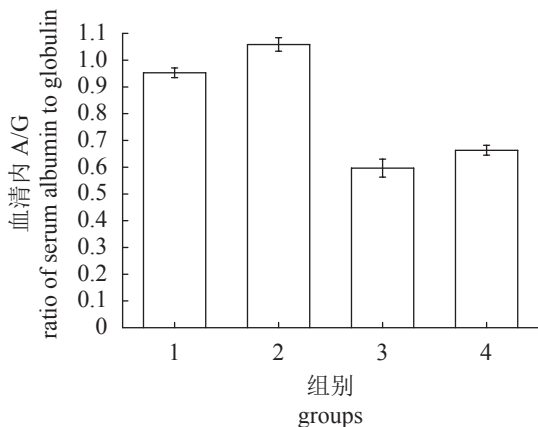


图 5 血清中白蛋白与球蛋白比值 (A/G)

1. C 组, 2. D 组, 3. G 组, 4. H 组; 下同

Fig. 5 Ratio of albumin to globulin in serum

1. group C; 2. group D; 3. group G; 4. group H; the same below

不添加 Y2 的情况下, 半滑舌鲷受到氨氮胁迫时其体内 MDA 会显著性增加, 其增加幅度 (59.21%) 明显高于氨氮胁迫 Y2 组增幅 (20.30%), 说明 Y2 菌株的添加可以有效降低氨氮胁迫造成的半滑舌鲷血清内 MDA 含量升高; 此外比较饲喂 Y2 组与无 Y2 添加组半滑舌鲷测定结果, 可见半滑舌鲷无论有无氨氮胁迫, 饲喂 Y2 后其血清内 MDA 含量都低于相应的空白对照组。(图 6)

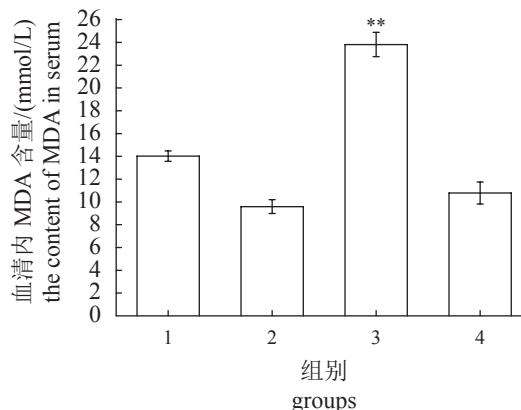


图 6 血清内 MDA 含量的测定;

**表示 $P < 0.01$

Fig. 6 Determination of MDA in serum;

** represents $P < 0.01$

氨氮胁迫组血清内转氨酶含量显著高于非氨氮胁迫组, 说明氨氮胁迫导致了半滑舌鲷血清中转氨酶含量升高, 其中 AST 和 ALT 均表现为 Y2 组增加幅度 (88.85%、96.12%) 低于其相应空白对照组 (91.80%、104.63%), 总体上氨氮胁迫组与非氨氮胁迫组的 Y2 添加组的谷草转氨酶 (AST) 及谷丙转氨酶 (ALT) 的含量均低于其相应空白对照组。(图 7)

2.5 氨氮胁迫下半滑舌鲷各组织相关基因表达量的测定

目前, 较为认可的氨氮致毒机理是 NH_3 经鱼的鳃、表皮和肠黏膜等组织进入机体, 使血氨含量升高, 降低血液的载氧能力, 长期接触氨甚至会导致组织氨氮含量升高, 损害鱼的鳃组织, 肝肾系统出现充血、水肿、肝昏迷甚至死亡现象^[10,17]。因此本实验选取半滑舌鲷的肠、肝脏、肌肉及鳃组织并测定各组织中 *HSP70*、*Hb- α 1* 及 *IGF* 的表达量, 探究 Y2 对受到氨氮胁迫的半滑舌鲷的应激能力、血液载氧能力及生长的影响。

对半滑舌鲷肠、肝脏、肌肉及鳃组织的

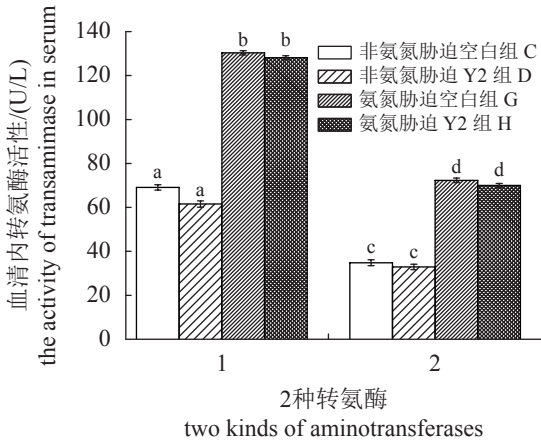


图7 血清中转氨酶活性的测定

1. 谷草转氨酶, 2. 谷丙转氨酶

Fig. 7 Determination of serum aminotransferase activity

1. AST, 2. ALT

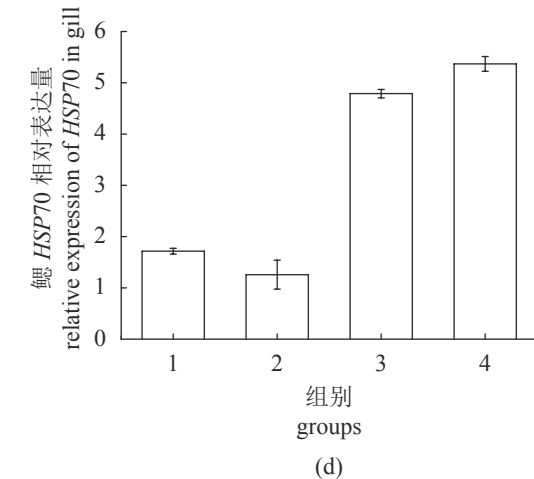
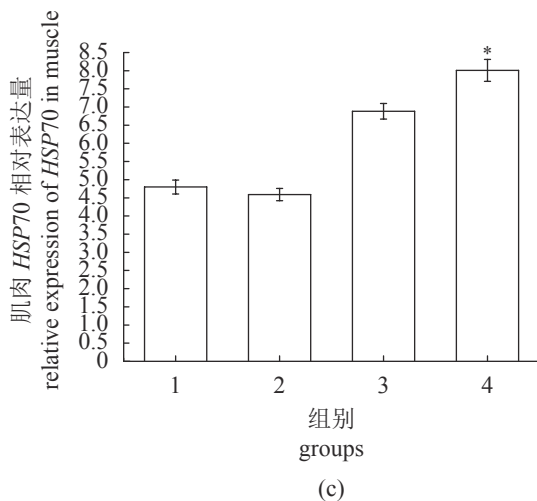
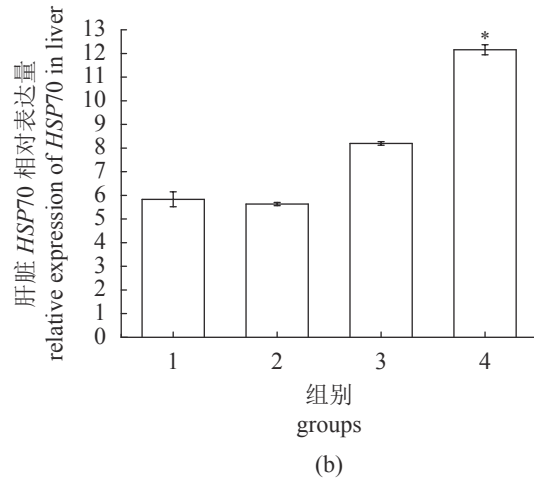
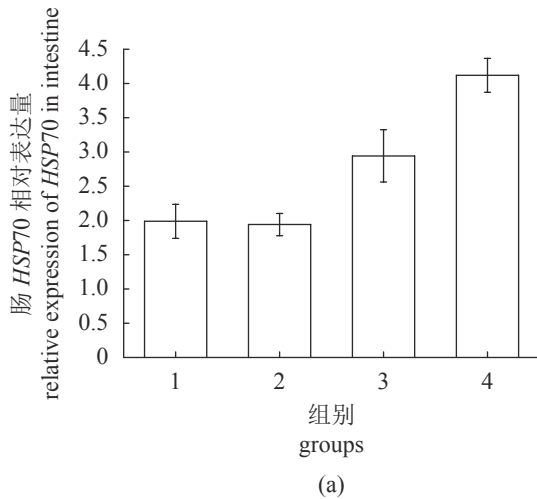


图8 各组织 HSP70 mRNA 相对表达量的测定

(a) 肠, (b) 肝脏, (c) 肌肉, (d) 鳃; 下同

Fig. 8 Determination of relative expression of HSP70 mRNA in different tissues

(a) intestine, (b) liver, (c) muscle, (d) gill; the same below

HSP70 表达量进行测定, 结果显示, 4 个组织中 HSP70 的表达量总体趋势相似, 氨氮胁迫组表达量均明显高于非胁迫组。非氨氮胁迫条件下, 肠和肝脏组织中 Y2 组和空白对照组 HSP70 表达量比较接近, 在肌肉和鳃中空白对照组 HSP70 表达量略高于 Y2 组, 但差异不显著; 而氨氮胁迫组中 4 个组织均表现为 Y2 组表达量高于空白对照组, 且肝脏及肌肉组织差异显著 ($P < 0.05$), 其中在肝脏中表达量差异最为显著 (图 8)。

对半滑舌鲷肠、肝脏、肌肉及鳃组织的 Hb- $\alpha 1$ 表达量进行测定, 结果显示, 4 个组织中 Hb- $\alpha 1$ 表达趋势相似, 氨氮胁迫组表达量明显高于非氨氮胁迫组。非氨氮胁迫时肠和肝脏组织中 Y2 组和空白对照组 Hb- $\alpha 1$ 表达量比较接近, 而在肌

肉和鳃中空白对照组 *Hb-α1* 表达量略高于 Y2 组, 但差异不明显; 而在氨氮胁迫条件下, 4 个组织中都是空白对照组表达量高于 Y2 组, 且在肝脏及肌肉组织中表达量差异显著 ($P < 0.05$) (图 9)。

对半滑舌鲷肠、肝脏、肌肉及鳃组织的 *IGF* 表达量进行测定, 结果显示, 4 个组织 *IGF* 表达量总体趋势相似, 氨氮胁迫组表达量均明显低于非氨氮胁迫组, 在非氨氮胁迫及氨氮胁迫条件下 4 个组织 *IGF* 表达量空白对照组均低于 Y2 组, 且在肌肉和鳃组织中差异显著 ($P < 0.05$)。 (图 10)

3 讨论

人类废物的排放、水产动物饲养过程中高蛋白饵料的投喂、水中微生物的作用、水生生物代谢废物的排放等多种原因都会造成水体中氨氮含

量的升高^[18-21]。已有研究表明, 养殖水体中氨氮含量的升高会对凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)^[22]、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)^[23]、黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*)^[24] 等大量水产生物产生不利影响甚至导致死亡。枯草芽孢杆菌是水产生殖常用的益生菌种之一, 其在净化养殖水体、改善养殖环境方面有很好的作用^[25]。杭小英等^[26] 在罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 养殖池塘中投用枯草芽孢杆菌制剂后, 水体中氨氮、亚硝酸态氮的最大降解率分别为 59.61% 和 86.70%, 邹文娟等^[27] 在污水处理中同时使用光合细菌 (*Photosynthetic bacteria*) 和枯草芽孢杆菌, 发现水体中亚硝酸盐氮、氨氮、活性磷酸盐和高锰酸钾指数 (COD_{Mn}) 的去除率分别是 71.96%、86.13%、87.08% 和 58.73%。

本实验将枯草芽孢杆菌 Y2 饲喂半滑舌鲷 60 d

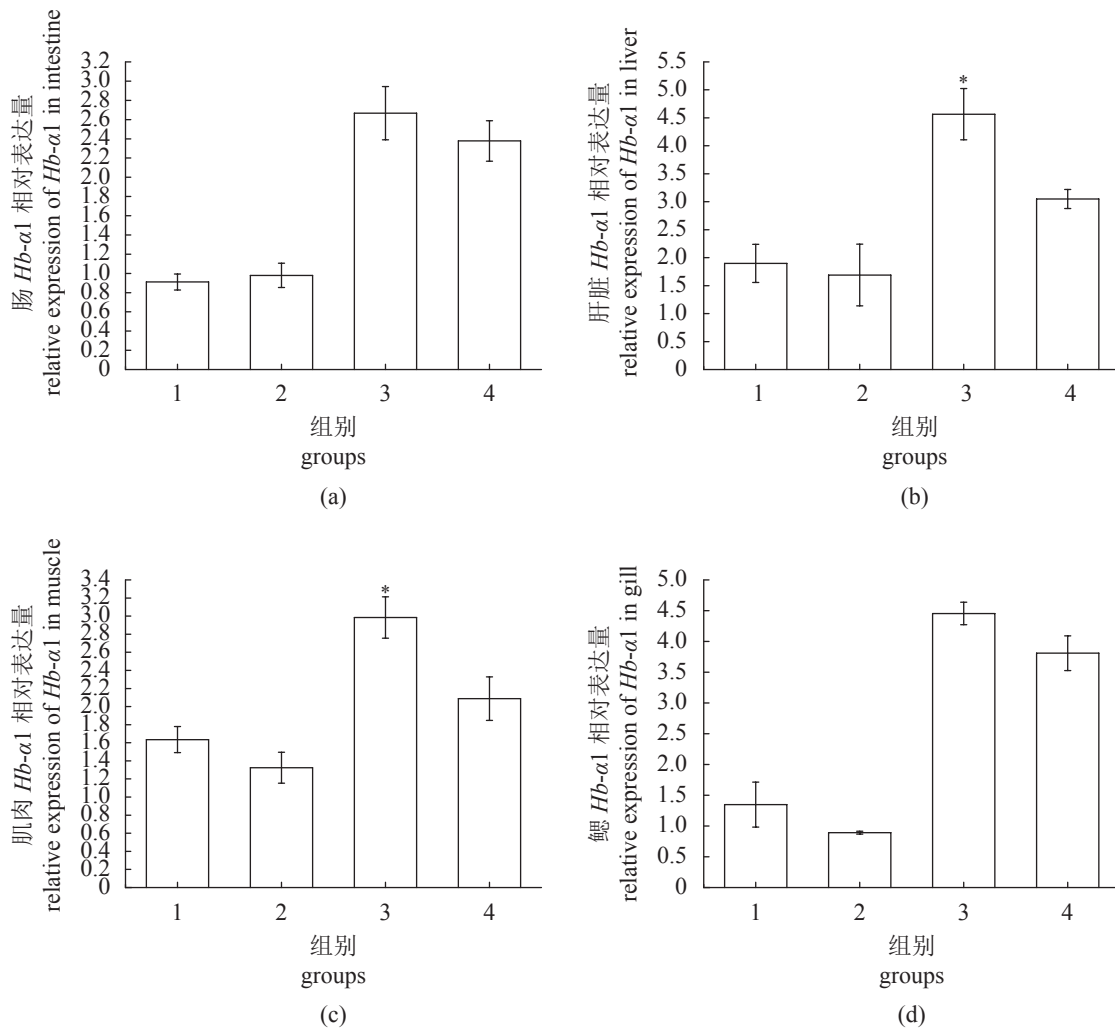


图 9 各组织 *Hb-α1* mRNA 相对表达量的测定

Fig. 9 Determination of relative expression of *Hb-α1* mRNA in different tissues

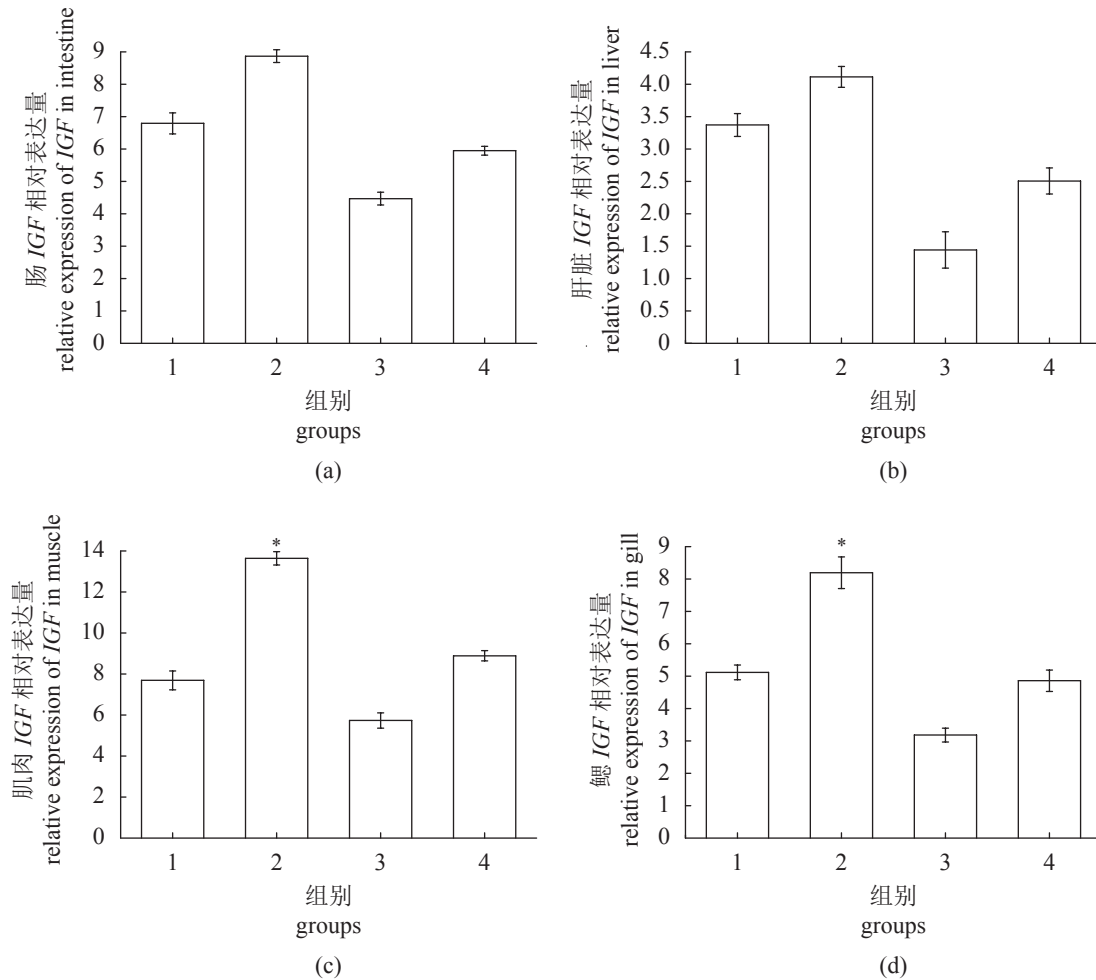


图 10 各组织 IGF mRNA 相对表达量的测定

Fig. 10 Determination of relative expression of IGF mRNA in different tissues

后,对半滑舌鳎进行氨氮胁迫,胁迫浓度为 5 mg/L 远远高于工厂化养殖水体中氨氮浓度 (0.02 mg/L) 的要求。结果发现,氨氮胁迫对半滑舌鳎的生长、血清非特异性免疫酶活、生化指标及相关基因表达量等指标具有一定影响,但 Y2 的饲喂可以改善氨氮胁迫对这些指标的影响。

实验中氨氮胁迫组的半滑舌鳎体质量、体长均低于非氨氮胁迫组,且在氨氮胁迫及非氨氮胁迫条件下 Y2 组的体质量、体长均高于其对应空白对照组,说明 Y2 能够促进半滑舌鳎的生长,并缓解氨氮胁迫对其生长的抑制作用。

水生动物体内的需氧细胞会产生相当多的活性氧簇,这些活性氧簇在正常情况下处于生成与分解的平衡中,当其处于氨氮胁迫时会产生应激反应,使体内的平衡被打破,大量自由基在体内积累,自由基会利用细胞代谢过程中的还原氢,导致细胞代谢损伤^[28-30]。机体内的抗氧化酶主要

包括 SOD 和 POD 等,其中 CAT 属于 POD,它们通过抗氧化作用清除体内过多的自由基,缓解自由基积累导致的细胞损伤^[31-32]。而 ACP 和 AKP 可通过调节蛋白(酶)的去磷酸化过程,参与一些营养物质的消化、吸收、运输过程,同时也构成了生物体内重要的解毒体系^[33],2 种酶都与生物体的免疫相关。本实验中氨氮胁迫后的 G、H 组相关酶活均高于胁迫前的 C、D 组,说明氨氮胁迫会导致半滑舌鳎血清中 CAT 和 POD 含量升高,且添加 Y2 菌株组相较于各自的空白对照组在受到氨氮胁迫后,血清中 CAT 及 POD 活性提高的幅度更显著。氨氮胁迫后半滑舌鳎血清 AKP 及 ACP 含量显著性提高,且氨氮胁迫及非氨氮胁迫条件下 Y2 组均略高于其空白对照组,除氨氮胁迫 Y2 组 AKP 略低于其对照组。氨氮胁迫后的酶活结果与徐杨^[34]在研究尼罗罗非鱼在氨氮胁迫 30 d 后肝脏中 ACP 及 AKP 酶活趋势及谭春明等^[28]研

究氨氮胁迫后方斑东风螺 (*Babylonia areolata*) 体内多种免疫酶活趋势一致, 均呈上升趋势, 说明半滑舌鲮在受到氨氮胁迫后, 可通过提高自身体内的抗氧化酶、AKP 和 ACP 活性对抗应激反应导致的机体损伤, 提高机体免疫能力, 而添加 Y2 菌株组相较于各自的空白对照组在受到氨氮胁迫后, 相关酶活性提高的幅度更高, 说明添加 Y2 可以提高半滑舌鲮对抗氨氮胁迫时导致的应激反应能力, 降低机体损伤。此外, MDA 为脂质过氧化的终产物, 当机体处于低温、氨氮胁迫等条件下时, 机体内处于氧化应激状态, 对生物膜造成损伤, 导致机体内 MDA 含量升高。因此, MDA 可以作为生物膜系统损伤及机体抗氧化能力的重要指标^[35-36]。实验中, 氨氮胁迫空白对照组的血清 MDA 含量显著高于其他 3 组, 而在非氨氮胁迫及氨氮胁迫条件下 Y2 添加组的 MDA 含量均低于其空白对照组, 说明 Y2 菌株的添加提高了半滑舌鲮产生免疫酶活的能力, 促进了半滑舌鲮清除氨氮胁迫中产生的自由基的能力, 并且减少了机体内 MDA 堆积。

ALB 和 GLB 为机体内的常见蛋白, 其中 ALB 在血清中含量较为丰富, 在血液中具有物质运输等功能, GLB 参与机体的免疫活动, A/G 能够反应机体肝功能健康情况, 当机体内球蛋白大量增加, 会导致 A/G 下降, 说明肝脏受到了一定损伤。TG、CHO、LDL 及 HDL 均为机体内脂类物质, 对机体内物质运输及新陈代谢具有重要作用^[37]。半滑舌鲮血清生化指标的测定结果表明, 氨氮胁迫 20 d 时半滑舌鲮 A/G 相对非氨氮胁迫组显著下降, 说明氨氮胁迫对半滑舌鲮的肝脏功能造成了损伤, 而 Y2 添加组半滑舌鲮血清中 A/G 相比对应空白对照组有所升高, 说明 Y2 菌株对半滑舌鲮的肝脏具有一定的保护作用。此外, 氨氮胁迫后半滑舌鲮血清总蛋白及脂肪的含量下降, 说明氨氮胁迫影响了半滑舌鲮对机体中蛋白及脂肪的利用, 氨氮胁迫过程中半滑舌鲮免疫酶活上升, 机体内糖类不足, 转而增加机体对蛋白及脂肪的利用, 这一结果与谢雨欣等^[8]研究黄颡鱼在氨氮胁迫下血清内脂肪及蛋白含量减少相类似。然而 Y2 添加组半滑舌鲮血清内蛋白及脂肪含量下降较少, 可能是由于 Y2 的添加增加了其肠道对营养物质的转运和吸收能力, 部分满足了半滑舌鲮所需的营养物质, 减少了半滑舌鲮对自身蛋白及脂肪的利用。AST 及 ALT 一般主要存在于肝

脏中, 血液中含有量较少, 但当肝脏受到损伤时, 会造成肝脏中的大量 AST 及 ALT 释放至血液中, 因此, 以上 2 种转氨酶常作为评定肝脏健康状态的重要指标^[38]。氨氮胁迫第 20 天时半滑舌鲮血清中 AST 及 ALT 的显著上升, 这一结果与梁健^[39]研究氨氮胁迫下草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 转氨酶升高的研究结果一致, 说明氨氮胁迫使半滑舌鲮的肝脏受到了损伤, 而在氨氮胁迫及非氨氮胁迫条件下添加 Y2 菌株, 在一定程度上降低了 AST 及 ALT 的含量, 表明 Y2 减轻了氨氮胁迫导致的肝脏损伤。

此外, 本实验还对与半滑舌鲮氨氮胁迫致毒机理有关的基因进行了检测。*HSP70* 在特异性免疫及非特异性免疫中均能发挥作用, 当机体处于不同的生理环境及物理条件下, 如细菌感染、运输压力、温度变化等胁迫因子均能引起 *HSP70* 表达量的升高。*HSP70s* 家族在进化上高度保守, 常被用作标志物来判定机体是否处于应激反应状态及其反应的强弱^[40-41]。从氨氮胁迫的半滑舌鲮各组织基因表达情况来看, 氨氮胁迫组的 *HSP70* 表达量均高于非氨氮胁迫组, 说明氨氮胁迫能引起水生动物的应激反应, 造成机体组织 *HSP70* 表达量升高, 而添加 Y2 菌株组各组织 *HSP70* 高于空白对照组, 其中在肝脏和肌肉中更显著, 说明 Y2 菌株的添加提高了半滑舌鲮的应激能力, 且肝脏和肌肉的应激能力提升更显著。这种应激能力能够很大程度上减少环境胁迫对组织的损伤。血红蛋白具有在动物体内运输氧气的重要作用, 在水生动物缺氧条件下, 不同物种血红蛋白含量的增多或减少不同。青鳉 (*Oryzias latipes*)^[42] 在缺氧环境中血红蛋白基因表达量上调, 而斑马鱼 (*Danio rerio*) 在缺氧环境下表达量下调。王资生等^[43] 探究了半滑舌鲮各组织 *Hb- α 1* 的表达量, 发现肝脏、肾脏、心脏、血、脾脏等组织内表达量较高, 在低溶氧条件下肝脏、鳃、肾脏、心脏、血、脾脏中 *Hb- α 1* 的表达量上调。而本实验中氨氮胁迫后半滑舌鲮各组织内 *Hb- α 1* 的表达量上调可能是由于氨氮胁迫对半滑舌鲮的鳃造成了损伤, 影响半滑舌鲮的呼吸作用, 从而引起了各组织内 *Hb- α 1* 的表达量上调, 增强半滑舌鲮氧气运输能力, 进而调节半滑舌鲮的呼吸作用。而氨氮胁迫中空白对照组的 *Hb- α 1* 表达量高于 Y2 组, 说明 Y2 可以缓解氨氮胁迫对半滑舌鲮氧气运输能力的影响。

氨氮胁迫除对机体造成损伤外, 还会减缓水

生动物的生长^[44], 本实验中氨氮胁迫组半滑舌鳎 IGF 表达量明显下调, 说明氨氮胁迫同样抑制了半滑舌鳎的生长; 而氨氮胁迫组中 Y2 组 IGF 表达量高于空白对照组, 说明 Y2 的添加可以减轻氨氮胁迫对半滑舌鳎生长的抑制作用, 该结果与半滑舌鳎的体质量、体长等生长指标的测定结果相对应。

综上所述, 氨氮胁迫下枯草芽孢杆菌 Y2 能够提高半滑舌鳎的免疫力及改善血清生化指标, 增强半滑舌鳎的氧运输力和应激能力, 并缓解氨氮胁迫对其造成的生长抑制等多种负面作用, 在水产养殖上有很好的应用前景。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 周兴, 牛化欣. 颗粒饲料和杂鱼对半滑舌鳎生长和饲料利用率的影响[J]. 饲料工业, 2020, 41(8): 48-52.
Zhou X, Niu H X. Effects of different fat commercial pellet feed and trash fish on growth, efficiency of feed utilization of tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther)[J]. Feed Industry, 2020, 41(8): 48-52 (in Chinese).
- [2] Ma A J, Liu X X, Xu Y J, et al. Feeding rhythm and growth of the tongue sole, *Cynoglossus semilaevis* Günther, during its early life stages[J]. Aquaculture Research, 2006, 37(6): 586-593.
- [3] Wang W J, Yi Q L, Ma L M, et al. Sequencing and characterization of the transcriptome of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. BMC Genomics, 2014, 15(1): 470.
- [4] 张武肖, 孙盛明, 戈贤平, 等. 急性氨氮胁迫及毒后恢复对团头鲂幼鱼鳃、肝和肾组织结构的影响[J]. 水产学报, 2015, 39(2): 233-244.
Zhang W X, Sun S M, Ge X P, et al. Acute effects of ammonia exposure on histopathology of gill, liver and kidney in juvenile *Megalobrama amblycephala* and the post-exposure recovery[J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(2): 233-244 (in Chinese).
- [5] Chang Z W, Chiang P C, Cheng W, et al. Impact of ammonia exposure on coagulation in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2015, 118: 98-102.
- [6] 王芸, 李健, 何玉英, 等. 氨氮胁迫对中国明对虾血淋巴氨氮、尿素氮含量和抗氧化能力的影响[J]. 中国水产科学, 2017, 24(1): 180-189.
WANG Y, LI J, HE Y Y, et al. Effects of ambient ammonia-N exposure on hemolymph nitrogen metabolism and antioxidant capacity of *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(1): 180-189 (in Chinese).
- [7] Ching B, Chew S F, Wong W P, et al. Environmental ammonia exposure induces oxidative stress in gills and brain of *Boleophthalmus boddarti* (mudskipper)[J]. Aquatic Toxicology, 2009, 95(3): 203-212.
- [8] 谢雨欣, 张木子, 黎明, 等. 氨氮胁迫下饥饿和再投喂对黄颡鱼幼鱼生长性能、血液健康、抗氧化能力及免疫应答的影响[J]. 动物营养学报, 2018, 30(8): 3073-3081.
Xie Y X, Zhang M Z, Li M, et al. Effects of starvation and refeeding on growth performance, blood health, antioxidant capacity and immune response of juvenile Yellow catfish under ammonia stress[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2018, 30(8): 3073-3081 (in Chinese).
- [9] Romano N, Zeng C S. Ontogenetic changes in tolerance to acute ammonia exposure and associated gill histological alterations during early juvenile development of the blue swimmer crab, *Portunus pelagicus*[J]. Aquaculture, 2007, 266(1-4): 246-254.
- [10] Benli A Ç K, Köksal G, Özkul A. Sublethal ammonia exposure of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.): effects on gill, liver and kidney histology[J]. Chemosphere, 2008, 72(9): 1355-1358.
- [11] 梁俊平, 张静, 覃宝利, 等. 维生素C对氨氮胁迫下大鳞鲃幼鱼存活及鳃抗氧化酶活性的影响[J]. 河南农业科学, 2020, 49(1): 157-164.
Liang J P, Zhang J, Qin B L, et al. Effects of vitamin C on the survival and antioxidant enzyme activities of juvenile *Barbus capito* under ammonia-N stress[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2020, 49(1): 157-164 (in Chinese).
- [12] 陈赓. 益生菌在水产养殖中的应用[J]. 畜牧兽医科技信息, 2020(2): 164.
Chen G. Application of probiotics in aquaculture[J]. Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2020(2): 164 (in Chinese).
- [13] 蔡艳, 曹根凤, 叶盛, 等. 枯草芽孢杆菌代替抗生素在水产养殖上的应用[J]. 山西农经, 2018(19): 75.
Cai Y, Cao G F, Ye S, et al. Application of *Bacillus subtilis* instead of antibiotics in aquaculture[J]. Shanxi Agricultural Economy, 2018(19): 75 (in Chinese).
- [14] 胡娟, 高辰辰, 药园园, 等. 饲用枯草芽孢杆菌HGcc-1对鲤肝肠健康、血清补体及肠道菌群的影响[J]. 水产学

- 报, 2021, 45: 1753-1763.
- Hu J, Gao C C, Yao Y Y, *et al.* Effects of dietary *Bacillus subtilis* HGcc-1 on gut and liver health, serum complement and gut microbiota of common carp fingerlings (*Cyprinus carpio*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45: 1753-1763 (in Chinese).
- [15] Gao Z H, Wu H H, Shi L, *et al.* Study of *Bacillus subtilis* on growth performance, nutrition metabolism and intestinal microflora of 1 to 42 d broiler chickens[J]. *Animal Nutrition*, 2017, 3(2): 109-113.
- [16] 葛建龙, 孟乾, 陈四清, 等. 氨氮对海月水母钵状体和碟状体的急性及慢性毒性作用[J]. *海洋与湖沼*, 2018, 49(4): 809-814.
- Ge J L, Meng Q, Chen S Q, *et al.* Acute and chronic toxicity of ammonia nitrogen to the polyps and ephyrae of moon jellyfish *Aurelia coerulea*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2018, 49(4): 809-814 (in Chinese).
- [17] 乔顺风, 李红顺. 水体生物急性氨中毒的成因和调控技术[J]. *河北渔业*, 2005(2): 27-29.
- Qiao S F, Li H S. Causes and control techniques of acute ammonia poisoning in aquatic organisms[J]. *Hebei Fisheries*, 2005(2): 27-29 (in Chinese).
- [18] 沈建. 养殖水体中氨氮的危害及管理措施[J]. *科学养鱼*, 2014(7): 91.
- Shen J. Harm and management measures of ammonia nitrogen in aquaculture water[J]. *Scientific Fish Farming*, 2014(7): 91 (in Chinese).
- [19] 路庆鹏, 金雪霞. 养殖池塘水体中氨氮的来源、危害及控制[J]. *科学养鱼*, 2019(6): 87.
- Lu Q P, Jin X X. Source, harm and control of ammonia nitrogen in aquaculture pond[J]. *Scientific Fish Farming*, 2019(6): 87 (in Chinese).
- [20] 郑华楠. 芦苇生物炭基质改善固定化微生物技术去除水体中氨氮的研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2019.
- Zheng H N. Research on removal of ammonia nitrogen from water by phragmites communis biochar substrate and immobilized microbial technology[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2019 (in Chinese).
- [21] 彭友莲. 水产养殖环境的污染现状及控制对策[J]. *畜牧兽医科技信息*, 2019(12): 34-35.
- Peng Y L. Pollution status and control countermeasures of aquaculture environment[J]. *Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2019(12): 34-35 (in Chinese).
- [22] Geng Z X, Liu Q, Wang T, *et al.* Changes in physiological parameters involved in glutamine and urea synthesis in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed *Ampithoe* sp. meal and exposed to ammonia stress[J]. *Aquaculture Research*, 2020, 51(7): 2725-2734.
- [23] 徐杨, 肖炜, 李大宇, 等. 慢性氨氮胁迫对尼罗罗非鱼幼鱼生长及生理功能的影响[J]. *南方农业学报*, 2015, 46(2): 327-331.
- Xu Y, Xiao W, Li D Y, *et al.* Effects of chronic ammonia stress on growth and physiological function of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2015, 46(2): 327-331 (in Chinese).
- [24] 孙丽颖, 张木子, 黎明, 等. 急性氨氮胁迫对黄颡鱼组织抗氧化酶活性及HSP70和HSP90基因mRNA表达水平的影响[J]. *水产学报*, 2020, 44(5): 707-714.
- Sun L Y, Zhang M Z, Li M, *et al.* Effects of acute ammonia stress on antioxidant enzyme activity and mRNA expression levels of HSP70 and HSP90 genes in tissues of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(5): 707-714 (in Chinese).
- [25] 苏艳丽, 孙盛明, 朱健, 等. 枯草芽孢杆菌在水产养殖中的研究进展[J]. *中国渔业质量与标准*, 2016, 6(6): 32-39.
- Su Y L, Sun S M, Zhu J, *et al.* Advances of *Bacillus subtilis* application in aquaculture[J]. *Chinese Fishery Quality and Standards*, 2016, 6(6): 32-39 (in Chinese).
- [26] 杭小英, 叶雪平, 施伟达, 等. 枯草芽孢杆菌制剂对罗氏沼虾养殖池塘水质的影响[J]. *浙江海洋学院学报(自然科学版)*, 2008, 27(2): 197-200.
- Hang X Y, Ye X P, Shi W D, *et al.* Effects of the biological preparation on the shrimp (*Macrobrachium rosenbergii*) ponds' water quality[J]. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)*, 2008, 27(2): 197-200 (in Chinese).
- [27] 邹文娟, 许晓慧, 王国武, 等. 光合细菌和枯草芽孢杆菌在污水处理中的应用[J]. *广东农业科学*, 2010, 37(09): 199-201.
- Zou W J, Xu X H, Wang G W, *et al.* Application in sewage treatment of *Photosynthetic bacteria* and *Bacillus subtilis*[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2010, 37(09): 199-201 (in Chinese).
- [28] 谭春明, 赵旺, 吴开畅, 等. 氨氮胁迫对方斑东风螺六种免疫酶活性的影响[J]. *海洋科学*, 2019, 43(4): 8-15.
- Tan C M, Zhao W, Wu K C, *et al.* Effects of ammonia nitrogen stress on the activities of six immune enzymes of *Babylonia areolata*[J]. *Marine Science*, 2019, 43(4): 8-15 (in Chinese).
- [29] 邱德全, 周鲜娇, 丘明生. 氨氮胁迫下凡纳滨对虾抗病

- 力和副溶血弧菌噬菌体防病效果研究[J]. *水生生物学报*, 2008, 32(4): 455-461.
- Qiu D Q, Zhou X J, Qiu M S. Study on anti-disease ability of *Litopenaeus vannamei* and the biological control of *Vibrio parahaemolyticus* bacteriophage under stresses of ammonia nitrogen[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, 32(4): 455-461 (in Chinese).
- [30] 张亚娟, 王超, 刘存歧, 等. 氨态氮和亚硝态氮对日本沼虾酚氧化酶活力及血蓝蛋白含量的影响[J]. *水产科学*, 2010, 29(1): 31-34.
- Zhang Y J, Wang C, Liu C Q, *et al.* Effects of ammonia-N and nitrite-N on phenoloxidase activity and hemocyanin content in hemolymph of prawn *Macrobrachium nipponense*[J]. *Fisheries Sciences*, 2010, 29(1): 31-34 (in Chinese).
- [31] 房子恒, 田相利, 董双林, 等. 不同盐度下半滑舌鳎幼鱼非特异性免疫酶活力分析[J]. *中国海洋大学学报*, 2014, 44(5): 46-53.
- Fang Z H, Tian X L, Dong S L, *et al.* Analysis of the activity of non-specific immune enzymes of juvenile tongue soles cultured in various salinities[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2014, 44(5): 46-53 (in Chinese).
- [32] Livingstone D R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2001, 42(8): 656-666.
- [33] Yin F, Peng S M, Sun P, *et al.* Effects of low salinity on antioxidant enzymes activities in kidney and muscle of juvenile silver pomfret *Pampus argenteus*[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(1): 55-60.
- [34] 徐杨. 尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 对氨氮和亚硝酸盐氮胁迫的生理响应 [D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
- Xu Y. Physiological response to stress of ammonia and nitrite in tilapia, *Oreochromis niloticus*[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [35] García-González A, Herrera-Abarca J, Ochoa J L. Effect of superoxide dismutase from bovine erythrocytes on different activity parameters in adjuvant-induced arthritis[J]. *Archives of Medical Research*, 1999, 30(2): 132-137.
- [36] Viarengo A, Canesi L, Martinez P G, *et al.* Pro-oxidant processes and antioxidant defence systems in the tissues of the Antarctic scallop (*Adamussium colbecki*) compared with the Mediterranean scallop (*Pecten jacobaeus*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1995, 111(1): 119-126.
- [37] Halver J E, Hardy R W. *Fish Nutrition* (Vol III)[M]. New York: Academic Press, 2002.
- [38] 何玲, 王佩, 罗来婷, 等. 螺旋藻对中华鳖生长和体组成及血清生化指标的影响[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2019, 45(5): 536-540.
- He L, Wang P, Luo L T, *et al.* Effects of feeding *Spirulina* on growth performance, body composition and serum biochemical indexes of *Pelodiscus sinensis*[J]. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)*, 2019, 45(5): 536-540 (in Chinese).
- [39] 梁健. α -酮戊二酸对草鱼氨氮胁迫的缓解作用研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2014.
- Liang J. Studies of α -ketoglutarate on alleviating ammonia nitrogen stress of *Ctenopharyngodon idellus*[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2014 (in Chinese).
- [40] Kim Y E, Hipp M S, Bracher A, *et al.* Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2013, 82: 323-355.
- [41] Mohamed B A, Barakat A Z, Zimmermann W H, *et al.* Targeted disruption of *Hspa4* gene leads to cardiac hypertrophy and fibrosis[J]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2012, 53(4): 459-468.
- [42] Wawrowski A, Gerlach F, Hankeln T, *et al.* Changes of globin expression in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*) in response to acute and chronic hypoxia[J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 2011, 181(2): 199-208.
- [43] 王资生, 齐志涛, 田敬云, 等. 半滑舌鳎血红蛋白 $\alpha 1$ 的基因克隆及其在短期低氧胁迫下的表达分析[J]. *动物学研究*, 2011, 32(6): 641-646.
- Wang Z S, Qi Z T, Tian J Y, *et al.* Cloning of hemoglobin- $\alpha 1$ from half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) and its expression under short-term hypoxia[J]. *Zoological Research*, 2011, 32(6): 641-646 (in Chinese).
- [44] 唐首杰, 刘辛宇, 吴太淳, 等. 慢性氨氮胁迫对“新吉富”罗非鱼幼鱼生长及血清生化指标的影响[J]. *水产科学*, 2019, 38(6): 741-748.
- Tang S J, Liu X Y, Wu T C, *et al.* Effects of chronic exposure to ammonia on growth and serum biochemical indices in juvenile new GIFT strain of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*[J]. *Fisheries Science*, 2019, 38(6): 741-748 (in Chinese).

Effects of *Bacillus subtilis* on nonspecific immune enzyme activity, blood biochemical indexes and related gene expression of *Cynoglossus semilaevis* under ammonia nitrogen stress

ZHANG Jingjing, ZUO Zhihan*, ZHANG Xiaoyue, LI Wenyue, SUN Jinsheng*

(Tianjin Key Laboratory of Animal and Plant Resistance, College of Life Science, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China)

Abstract: To investigate whether probiotics can regulate nonspecific immune enzyme activities, blood biochemical indexes and expression of related genes of *Cynoglossus semilaevis* under ammonia nitrogen stress, *Bacillus subtilis* Y2 as a probiotic was fed to *C. semilaevis*, and then ammonia nitrogen stress was applied to *C. semilaevis*. During the stress, Y2 was continuously fed and the related indexes were monitored. The results of macroscopical growth indexes showed that the body weight and length of the *C. semilaevis* in the ammonia nitrogen stress groups were lower than those of the non-ammonia nitrogen stress groups, and the figures for the Y2 groups were higher than those of the blank groups both with and without ammonia nitrogen stress. The results of immune enzyme assays showed that the activities of catalase (CAT), acid phosphatase (ACP), peroxidase (POD) and alkaline phosphatase (AKP) of *C. semilaevis* were increased after ammonia nitrogen stress; the activities of ACP, CAT and POD in the two groups fed with Y2 strain with and without ammonia nitrogen stress were higher than those in the control groups. The results of blood biochemical indexes showed that the contents of albumin (ALB) and globulin (GLB) in serum of *C. semilaevis* in the non-ammonia nitrogen stress Y2 group were slightly higher than those in the control group, the albumin/globulin ratio (A/G) was higher, and the contents of triglyceride (TG) and cholesterol (CHO) had little difference; under ammonia nitrogen stress, the contents of ALB and CHO in the serum of *C. semilaevis* in the control group was decreased, the content of GLB was slightly increased, the total protein (TP) and total fat in serum were decreased, and the A/G was decreased. However, Y2 could increase the content of ALB, TG and CHO, under the condition of ammonia nitrogen stress resulting in the increase of the A/G. At the same time, the content of malondialdehyde (MDA), aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) in serum was significantly increased under ammonia nitrogen stress. Y2 could reduce the content of MDA, AST and ALT both with and without ammonia nitrogen stress. The results of the related gene expression showed that the expression levels of heat shock protein gene (*HSP70*) and hemoglobin α 1 gene (*Hb- α 1*) in intestine, liver, muscle and gill of *C. semilaevis* were increased under ammonia nitrogen stress, and the expression of *HSP70* in Y2 group was higher than that in control group, with the increase most obvious in liver tissue. On the contrary, *Hb- α 1* expression in Y2 group decreased, especially in liver and muscle tissue. In addition, the expression of growth factor gene (*IGF*) in intestine, liver, muscle and gill of *C. semilaevis* was decreased under ammonia nitrogen stress, but the expression of *IGF* in both Y2 groups was higher than that in control groups both with and without ammonia nitrogen stress. In conclusion, Y2 can alleviate the effects of ammonia nitrogen stress on the immune ability, blood biochemical indexes, oxygen transport, stress ability and growth of *C. semilaevis*, reducing the negative effects of ammonia stress on *C. semilaevis*. It has a good prospect for application in the aquaculture industry.

Key words: *Cynoglossus semilaevis*; *Bacillus subtilis*; ammonia nitrogen stress; immune enzyme activity; blood biochemical indexes; gene expression

Corresponding authors: ZUO Zhihan. E-mail: zhihanzuo@163.com; SUN Jinsheng. E-mail: skysjs@tjnu.edu.cn

Funding projects: Tianjin Development Program for Innovation and Entrepreneurship Team (ITTFRS2017007); Program for Innovative Research Team in University of Tianjin (TD13-5076)