

一种微生物絮团的生化分析及其 对凡纳滨对虾免疫力的影响

孙 振^{1,2}, 王秀华^{2*}, 黄 健²

(1. 中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003;
2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

摘要: 利用红糖与尿素为碳氮源在自然海水中培养微生物絮团, 获得絮团产物, 其离心后进行初步的生化分析表明, 絮团产物上清液中微生物胞外产物重均分子量为 213 281 u。絮团沉淀物中多糖含量占 29.6%, 氨基酸含量占 12.6%。将絮团产物按 0、0.02%、0.1%、0.5%、2.5% 的比例添加至低蛋白饵料中投喂凡纳滨对虾, 14 d 后分别测定实验对虾血清溶菌活力、抗菌活力和酚氧化酶活力, 结果显示, 在饵料中添加微生物絮团浓度为 2.5% 的对虾血清中抗菌与溶菌活力最高, 添加微生物絮团浓度为 0.5% 与 2.5% 的对虾血清中酚氧化酶活力较低蛋白饵料对照组显著提高。用哈维氏弧菌感染实验对虾后, 饵料中添加 0.1% 微生物絮团产物组对虾的死亡率最低。综合分析认为, 凡纳滨对虾摄食微生物絮团后, 能够显著提高对虾的非特异免疫力, 抗微生物感染的能力得到增强。

关键词: 凡纳滨对虾; 微生物絮团; 生化组成; 非特异免疫力

中图分类号: S 917.1

文献标志码: A

微生物絮凝剂(microbial flocculants, MBF)是一类由微生物产生的具有絮凝功能的高分子有机物, 含有糖蛋白、粘多糖、纤维素和核酸等成分^[1]。微生物絮凝剂可以将环境中的细菌、微型浮游动植物、有机碎屑等凝集在一起, 形成微生物絮团(microbial flocs)。微生物絮团在水产养殖中作为饵料能被养殖动物有效利用, 提高饵料利用率^[2-3]。利用微生物絮团调控技术养殖凡纳滨对虾是近年来国内外广受关注的一项新的养殖技术, 该项技术利用养殖水体中的氮源, 通过外源添加碳源, 促进产絮团微生物的生长, 形成可被生物利用的絮团, 达到降低水体总氮浓度、提高饵料利用率、减少养殖换水量之目的^[4]。国内的研究也表明, 该项技术不仅适用于凡纳滨对虾养殖, 在日本对虾(*Marsupenaeus japonicus*)工厂化养殖及海参的养殖中, 也具有显著的效果^[5-6], 并且能够抑制潜在病原生物繁殖^[7]。

生物絮团技术在水产养殖中具有较大的开发

潜力与推广价值, 国外在生物絮团的形成机制、调控技术和应用效果等方面开展了一些研究^[8-10], 为了探讨生物絮团的营养组成及对对虾生物学活性的影响, 本实验将培养的微生物絮团添加到饵料中投喂对虾, 分析生物絮团的生化组成及对对虾生长及相关非特异免疫因子的影响, 以期从生物絮团的促免疫效能评价生物絮团在对虾养殖中的优点, 为该项技术的普及推广奠定理论基础。

1 材料与方 法

1.1 实验用 虾

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) 虾苗购于深圳市环球生物科技有限公司, 暂养至体长(6.9 ± 1) cm 后用于实验, 暂养时平均水温 23 °C, 海水盐度为 27 ~ 30, pH 7.4 ~ 8.1, 溶氧 > 5.0 mg/L。

1.2 微生物絮团培养

用 5 个 0.8 m³ 的圆形玻璃缸桶, 分别加入近

收稿日期:2012-09-12 修回日期:2012-11-02
资助项目:公益性行业(农业)科研专项(201103034)
通信作者:王秀华, E-mail: wangxh@ysfri.ac.cn

岸海水 0.5 m³、红糖 3 600 g、尿素 130 g (C:N = 23.8), 在 23 °C 条件下进行连续充气培养一周, 当出现足够浓度的絮团悬浮物时, 停气收集桶内沉淀物作为实验用微生物絮团, 称量沉淀物产量, 取样 105 °C 烘干 1 h, 计算干物质量。

1.3 微生物絮团中可培养菌群组成分析

采用 2216E 平板划线分离法, 对微生物絮团中的菌种进行分离, 采用细菌 16S rDNA 分子鉴定方法对所分离的细菌进行初步分类鉴定, 具体方法参照文献[11]。

1.4 微生物絮团生化组成分析

取絮团沉淀物样品 500 g, 4 000 × g 离心 10 min, 分别收集上清和沉淀。参照赵伟伟等^[1]方法, 用无水乙醇提取上清液中溶解的微生物胞外产物, 用凝胶渗透色谱法 (GPC)^[12] 分析其分子量。沉淀物中总糖含量采用苯酚-硫酸法^[13] 测定, 氨基酸组成分析应用 835-50 型氨基酸自动分析仪 (日本日立公司) 进行, 相应的分析工作委托中国海洋大学海洋药物与食品研究所完成。

1.5 饵料配制

在 Lin 等^[14] 的饵料配方基础上, 进行配方改进如表 1, 配制实验对虾全价营养饵料和低蛋白饵料, 同时按 0、0.02%、0.1%、0.5%、2.5% 的比例向低蛋白饵料中添加微生物絮团 (按干物质计), 分别制作实验饵料。所制饵料直径为 2 mm 颗粒料, 晾干后置于 4 °C 保存备用。

表 1 实验饵料配方

Tab. 1 The ingredients of shrimp feed in the experiment

原料 ingredients	全价营养 饵料配方/g ingredient of complete nutrition feed	低蛋白 饵料配方/g ingredient of low protein feed
鱼粉 fish meal	30.00	10.00
花生粉 peanut powder	25.00	8.30
豆饼 soybean cake	25.00	8.30
面粉 flour	3.00	29.70
玉米粉 maize flour	3.00	29.70
虾糠 shrimp meal	10.00	10.00
Na ₂ HPO ₄	0.34	0.34
NaH ₂ PO ₄	0.96	0.96
复合维生素 complex vitamins	1.20	1.20
MgSO ₄	0.30	0.30
(NH ₄) ₃ PO ₄	0.20	0.20
褐藻酸钠 sodium alginate	1.00	1.00

1.6 试验分组及养殖管理

随机取暂养的实验对虾 1 080 尾, 分别置于 18 个有效水体为 0.8 m³ 的实验水槽内, 每个水槽 60 尾。按照实验饵料的种类, 将 18 个实验水槽分为 A、B、C、D、E、F 6 个组, 每组设 3 个平行。其中 A、B、C、D 组分别投喂含 0.02%、0.1%、0.5%、2.5% 微生物絮团的实验饵料, E 组投喂低蛋白组饵料 (絮团含量为 0), F 组投喂全价营养饵料。

养殖实验为期 30 d, 实验用水为沉淀后的自然海水, 每周排污换水 2 次, 每次换水量为 20%。养殖过程中连续充气, 每天投喂 3 次 (8:00、16:00 和 22:00), 饵料日投喂量按虾体质量的 1.5% 计算。

1.7 对虾生长及成活率测定

实验结束时, 统计各组对虾的成活率, 并从各实验组中随机抽取 30 尾对虾, 测量其生物学体长, 计算体长增长率。成活率 (%) = 终末尾数/初始尾数 × 100; 体长增长率 (%) = (终末体长 - 初始体长)/初始体长 × 100。

1.8 对虾免疫力评价

对虾免疫力评价主要从对虾的非特异免疫因子活力及攻毒感染后的存活率进行评定。投喂实验饵料 14 d 后, 取各组对虾 9 尾, 围心腔采集血淋巴, 提取血清^[15]。对虾血清溶菌活力与抗菌活力的测定均参照王雷等^[16] 方法。酚氧化酶 (PO) 活力的测定采用改进的 Ashida^[17] 的方法。

1.9 病原菌人工感染

在投喂实验 30 d 后, 用浓度为 3.6 倍 LD₅₀ (4.5 × 10⁵ CFU/mL) 的哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 注射攻毒实验对虾, 每尾注射 0.1 mL, 注射部位为第二腹节和第三腹节连接处。每实验组设 3 个平行, 共注射对虾 60 尾。实验期间, 每天 8:00 和 20:00 统计对虾存活情况, 每天正常投喂、吸污、换水。攻毒后观察 10 d, 统计对虾死亡率, 以低蛋白饵料组为空白组, 计算相对存活率

$$(RPS), RPS(\%) = \left(1 - \frac{\text{实验组死亡率}}{\text{对照组死亡率}}\right) \times 100。$$

1.10 统计分析

本试验采用 SPSS 16.0 软件对试验数据进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA)。如果有显著性差异, 再做 LSD 多重比较。显著水平采用 0.05, 若 $P < 0.05$, 则表示有显著性差异。

2 结果

2.1 微生物絮团产量及生化组成分析

0.5 m³ 的絮团培养液经 1 周的培养,共得含水量 96% 的絮团沉淀物 12.1 kg,推算干物质含量为 0.48 kg。凝胶渗透色谱分析结果显示,微生物絮团上清中胞外产物的分子量呈单峰分布(图 1),重均分子量(Mw)为 213 281 u,数均分子量(Mn)为 190 081 u,分布系数(Mw/Mn)为 1.12,分子量分布较窄,表明该微生物胞外产物分子量组分比较均一。微生物絮团沉淀物中总糖含量为 29.57%。氨基酸组成分析显示,微生物絮团沉淀物中氨基酸含量为 12.63%,确定的氨基酸种类有 16 种(表 2)。综合分析结果推断,培养的絮团中含有多糖及蛋白等成分。

2.2 微生物絮团中菌群组成分析

从微生物絮团产物中分离出 5 株细菌,经过 16S rDNA 测序及同源性比对,初步对该 5 株细菌进行分类鉴定(表 3)。确定了菌株 2011090801 与泰安郡盐单胞菌(*Halomonas taeanensis*)的同源性大于 99%,菌株 2011090802 与脱氮鲍曼氏菌(*Bowmanella denitrificans*)同源性大于 99%。菌株 2011090803、2011090804 和 2011090805 均为弧菌。

2.3 对虾成活率及体长增长率

对虾养殖 28 d 后,统计各组对虾的成活率(图 2)。添加微生物絮团的各实验组的对虾成活率均略高,絮团含量分别为 0.02、0.1、0.5、2.5% 组的对虾成活率分别为 94.2%、94.5%、96.2% 与 90.7%,低蛋白组与全价营养组的成活率分别为 95.4% 与 96.7%。差异显著性分析表明,实验组与对照组之间差异均不显著($P > 0.05$)。统计各组的体长增长率(图 3)可以看出,仅有低蛋白对照组的

表现出较低的趋势,但显著性分析表明,各组之间无显著差异($P > 0.05$)。

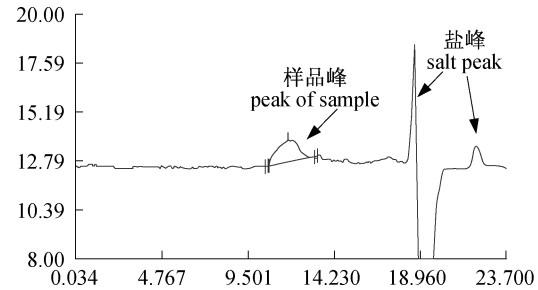


图 1 微生物絮团上清提取物 GPC 色谱图

样品分析有效时间区间在 10.635 至 13.168 min(见箭头指示处样品峰),其他峰为实验缓冲液所致的盐峰。

Fig. 1 GPC chromatograms of extractive in supernatant of microbial flocs

Effective absorption peak of sample appeared at the time between 10.6 and 13.2 min(see arrow), other peaks were caused by salt in buffer.

表 2 100 g 微生物絮团中各种氨基酸含量分析

Tab. 2 Composition analysis of amino acid in 100 g microbial flocs g

氨基酸 type of amino acid	含量 content	氨基酸 type of amino acid	含量 content
天门冬氨酸 ASP	1.324	亮氨酸 LEU	0.620
苏氨酸 THR	0.652	酪氨酸 TYR	0.881
丝氨酸 SER	0.554	苯丙氨酸 PHE	0.361
谷氨酸 GLU	2.286	赖氨酸 LYS	0.297
甘氨酸 GLY	0.581	组氨酸 HIS	1.414
丙氨酸 ALA	0.709	精氨酸 ARG	0.163
缬氨酸 VAL	0.933	色氨酸 TRP	0.449
蛋氨酸 MET	0.761		
异亮氨酸 ILE	0.26		
总和 total	12.634		

表 3 微生物絮团中的细菌组成

Tab. 3 Bacteria in microbial flocs

菌株编号 code of strain	比对同源菌株 homologous strain	相似性/% maximum ident	初步鉴定结果 preliminary results of identification
2011090801	<i>Halomonas taeanensis</i>	99	<i>Halomonas taeanensis</i>
2011090802	<i>Bowmanella denitrificans</i>	99	<i>Bowmanella denitrificans</i>
2011090803	<i>Vibrio natriegens</i>	99	<i>Vibrio natriegens</i>
2011090804	<i>Vibrio ruber</i>	99	<i>Vibrio ruber</i>
2011090805	<i>Vibrio furnissii</i>	99	<i>Vibrio furnissii</i>

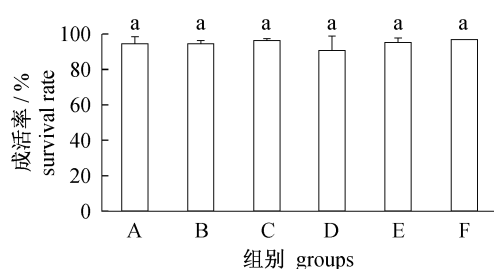


图2 养殖28 d后各试验组对虾成活率

A、B、C、D分别为在低蛋白饵料中添加0.02%、0.1%、0.5%及2.5%微生物絮团的实验组,E、F分别为低蛋白饵料与全价营养饵料对照组。图中误差线为标准差,相同字母表示对应的组间无显著差异($P > 0.05$)。

Fig. 2 Survival rate of experimental *L. vannamei*

A, B, C, D are shrimp groups fed the diet containing 0.02%, 0.1%, 0.5% and 2.5% microbial flocs respectively; E and F are shrimp groups fed the low protein diet and complete nutrition diet. Error bars (SD) with the same letters mean no significant difference between the groups ($P > 0.05$).

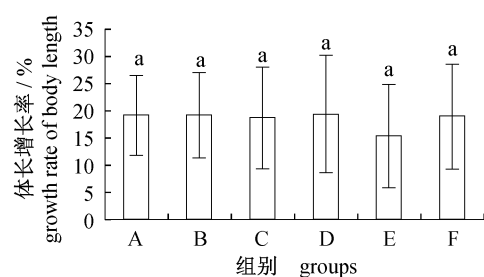


图3 养殖28 d后各试验组对虾体长增长率

A、B、C、D分别为在低蛋白饵料中添加0.02%、0.1%、0.5%及2.5%微生物絮团的实验组,E、F分别为低蛋白饵料与全价营养饵料对照组。图中误差线为标准差,相同字母表示对应的组间无显著差异($P > 0.05$)。

Fig. 3 The body length growth rate of *L. vannamei* in 28 days

A, B, C, D are shrimp groups fed the diet containing 0.02%, 0.1%, 0.5% and 2.5% microbial flocs respectively; E and F are shrimp groups fed the low protein diet and complete nutrition diet. Error bars (SD) with the same letters mean no significant difference between the groups ($P > 0.05$).

2.4 对虾免疫力评价

微生物絮团对溶菌(U_L)活力的影响 投喂微生物絮团产物14 d后,A、B、C、D 4个组随着饵料中微生物絮团添加量的加大,溶菌活力有增大的趋势(图4)。统计分析表明,添加微生物絮团高浓度的D组显著高于其他各组($P < 0.05$),添加次高浓度的C组与全价营养饵料F组的溶菌活力相当,且均高于最低添加浓度组A

($P < 0.05$),其他组间差异不明显($P > 0.05$)。

微生物絮团对抗菌活力的影响 14 d时各组对虾血清中的抗菌活力见图5,分析显示A、B、C三组与E组对虾的抗菌活力均无显著差异($P > 0.05$),D组显著高于对照组E及A、B、C三个低微生物絮团浓度组($P < 0.05$),全价营养饵料F组与添加高浓度生物絮团的D组对虾的抗菌活力无显著差异($P > 0.05$)。

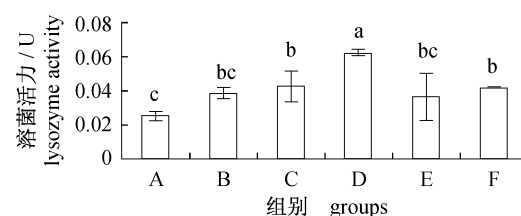


图4 各实验组凡纳滨对虾血清溶菌活力

A、B、C、D分别为在低蛋白饵料中添加0.02%、0.1%、0.5%及2.5%微生物絮团的实验组,E、F分别为低蛋白饵料与全价营养饵料对照组。图中误差线为标准差,相同字母表示对应的组间无显著差异($P > 0.05$)。

Fig. 4 Lysozyme activity of serum in each experimental group

A, B, C, D are shrimp groups fed the diet containing 0.02%, 0.1%, 0.5% and 2.5% microbial flocs respectively; E and F are shrimp groups fed the low protein diet and complete nutrition diet. Error bars (SD) with the same letters mean no significant difference between the groups ($P > 0.05$).

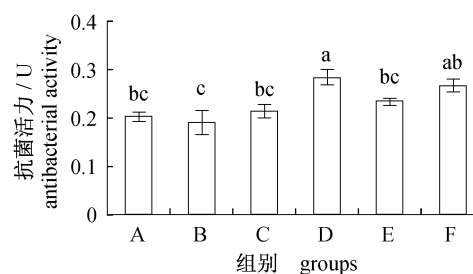


图5 各试验组凡纳滨对虾血清抗菌活力

A、B、C、D分别为在低蛋白饵料中添加0.02%、0.1%、0.5%及2.5%微生物絮团的实验组,E、F分别为低蛋白饵料与全价营养饵料对照组。图中误差线为标准差,相同字母表示对应的组间无显著差异($P > 0.05$)。

Fig. 5 Antibacterial activity of serum in each experimental group

A, B, C, D are shrimp groups fed the diet containing 0.02%, 0.1%, 0.5% and 2.5% microbial flocs respectively; E and F are shrimp groups fed the low protein diet and complete nutrition diet. Error bars (SD) with the same letters mean no significant difference between the groups ($P > 0.05$).

微生物絮团产物对酚氧化酶(PO)活力的影响 B、C、D 3 组对虾的酚氧化酶活力有增高的趋势,而 A、E、F 组 PO 活力偏低。统计分析显示添加絮团量高的 C、D 两组显著高于添加量最低的组 A 及低蛋白对照组 E($P < 0.05$)。添加絮团量高的 3 个组 B、C、D 的酚氧化酶活力较高蛋白对照组 F 有增高的趋势,但分析显示其差异性不显著($P > 0.05$)。

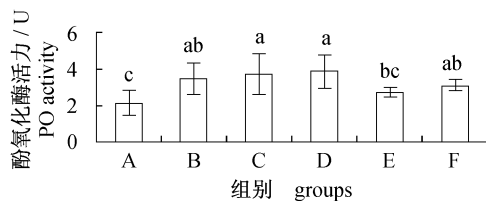


图 6 各试验组凡纳滨对虾血清酚氧化酶活力

A、B、C、D 分别为在低蛋白饵料中添加 0.02%、0.1%、0.5% 及 2.5% 微生物絮团的实验组, E、F 分别为低蛋白饵料与全价营养饵料对照组。图中误差线为标准差, 相同字母表示对应的组间无显著差异($P > 0.05$)。

Fig. 6 Phenoloxidase (PO) activity of serum in each experimental group

A, B, C, D are shrimp groups fed the diet containing 0.02%, 0.1%, 0.5% and 2.5% microbial flocs respectively; E and F are shrimp groups fed the low protein diet and complete nutrition diet. Error bars (SD) with the same letters mean no significant difference between the groups ($P > 0.05$).

2.5 哈维氏弧菌人工感染试验

对虾养殖 30 d 后, 用哈维氏弧菌对各组对虾进行注射攻毒感染, 感染初期表现为对虾活力降低, 游动缓慢或沉底不动, 摄食量减退; 之后头胸甲呈淡黄色, 游泳足及附肢变红, 多数虾的第一至第三腹节肌肉变为白浊; 后期患病虾腹部肌肉白浊面积扩大, 肝胰腺呈糜烂性坏死。统计攻毒感染 10 d 时各组累积死亡率(图 7)可以看出, 投喂低蛋白饵料的对照组(E 组)累积死亡率最高达 70%, 显著高于其他 A、B、C、D 4 个实验组($P < 0.05$)。次高组死亡率出现在高蛋白饵料的对照组 F, 累积死亡率达 61.6%, 显著高于絮团添加量为 0.1% 的 B 组($P < 0.05$), 与其他各组的差异不显著($P > 0.05$)。在 A、B、C、D 4 个实验组间, B 组的累积死亡率显著低于其他三个组($P > 0.05$); 计算 A、B、C、D 4 个实验组及对照组 F 的相对成活率分别为 26.3%、71.4%、31.0%、33.4%、12.0%, 分析表明 B 组的相对成活率显著高于其他各组($P > 0.05$)。表明添加絮团的各

实验组中, 对虾的成活率比对照组均有不同程度的提高, 尤以添加量为 0.1% 的 B 组最佳。

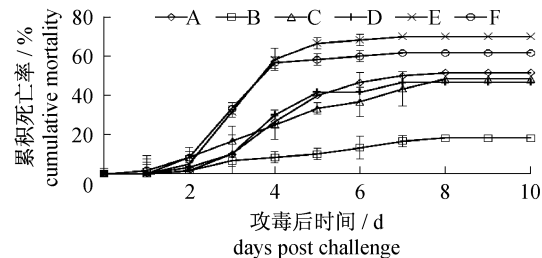


图 7 哈维氏弧菌攻毒后凡纳滨对虾的累积死亡率

A、B、C、D 分别为在低蛋白饵料中添加 0.02%、0.1%、0.5% 及 2.5% 微生物絮团的实验组, E、F 分别为低蛋白饵料与全价营养饵料对照组。

Fig. 7 Cumulative mortality of *L. vannamei* after being challenged by *V. harveyi*

A, B, C, D are shrimp groups fed the diet containing 0.02%, 0.1%, 0.5% and 2.5% microbial flocs respectively; E and F are shrimp groups fed the low protein diet and complete nutrition diet.

3 讨论

在水产养殖系统中, 微生物絮团的组成成分较为复杂, 其内部不仅含有微生物、有机碎屑及细菌胞外产物, 通常还含有多种原生动物的^[18-20]。本实验通过向自然海水中添加尿素与红糖, 获得了生物组成种类相对少的微生物絮团, 经初步分析表明, 絮团中仅有 5 种微生物, 但对絮团产物的生化分析表明, 其内部不仅含有一定量的多糖, 氨基酸组成种类也较多(表 2)。微生物絮团调控技术在凡纳滨对虾及罗非鱼养殖中的应用已经取得了显著的经济及社会效益^[21], 该项技术的突破不仅能够有效降低饵料系数, 提高饵料利用率^[22], 还为零换水的养殖方式提供了技术支持^[2-3, 7]。本实验将添加微生物絮团的饵料投喂对虾, 分析了非特异免疫指标及抗病力, 从生物絮团营养免疫学角度证实了微生物絮团对提高对虾抗病力具有显著效果。

Panjaitan^[3] 研究发现, 利用生物絮团技术进行对虾养殖, 可以减少 30% 饵料用量, 表明生物絮团的营养成分可以被对虾吸收利用。本实验向低蛋白饵料中添加微生物絮团, 以评价微生物絮团的营养效果, 但并未得到对虾的存活率与生长率各组间存在明显差别, 推测原因可能与凡纳滨对虾对低蛋白饲料具有较好得适应性有关, Alava

等^[23]报道凡纳滨对虾对蛋白的需求较低,实验所用的低蛋白饵料在短期的养殖中,对对虾生长速度并没有产生明显影响,因此以生物絮团替代蛋白促进对虾的生长作用在本研究中并未得到良好的体现。

溶菌活力与抗菌活力是衡量对虾抗病力的常用免疫指标^[24],对虾摄食添加高浓度(2.5%)微生物絮团的饲料后,其血清溶菌酶活力与抗菌活力明显提高,进一步的攻毒实验显示最低累积死亡率出现在添加絮团0.1%的组,表明微生物絮团具有提高对虾免疫力的效果。对虾免疫力的高低与多种免疫因子有关,除了本实验检测的溶菌酶活力、抗菌活力及酚氧化酶活力外,血细胞吞噬活力、血细胞数量、血清中超氧化物歧化酶、呼吸暴发等指标也是重要因子^[25-27],本实验结果显示,最低死亡率组的生物絮团添加浓度与溶菌酶、抗菌酶活力最高组的并非一致,表明对虾抗病力强弱不仅仅与血清中溶菌活力、抗菌活力的高低有关,其他未检测的免疫指标可能会在对虾免疫中发挥更加重要的作用,Nonwachai等^[26]的研究表明,免疫因子如总血细胞数量、超氧化物歧化酶活力及杀菌活力高时,对虾抗哈维氏弧菌感染的能力增强。根据微生物絮团的生化组成分析结果可知,微生物絮团内部含有一定的多糖及氨基酸,推测该类物质可能以糖蛋白的形式由絮团中的细菌分泌到胞外,细菌胞外蛋白对对虾具有良好的免疫促进活性^[28]。生物絮团中菌种组成复杂^[7],其活性成分的组成含量会存在差异,在将生物絮团做为饲料添加剂时,用量上需要区别对待,本实验根据攻毒后相对存活率、相关免疫指标及产品的制备成本,认为批量饲料生产中,合适的添加量宜控制在0.1%。

对虾酚氧化酶是衡量对虾免疫活力强弱的重要参照指标^[29]。对虾以酚氧化酶原激活系统(proPO系统)为防御中心,proPO具有识别外来物并联系增强与抗病有关的一些反应^[30],本实验对摄食微生物絮团后的对虾血清酚氧化酶活性进行了分析,证实了对虾摄食一定剂量的微生物絮团后,其血淋巴中酚氧化酶活力得到显著提高,本实验结果同时证实,饲料中蛋白含量过低,可导致对虾免疫力降低。在饲料蛋白不足的情况下,采用生物絮团对虾养殖技术,可以弥补饲料蛋白不足导致对虾抗病力低的缺陷。

参考文献:

- [1] 赵伟伟,王秀华,孙振,等.一株产絮凝剂芽孢杆菌的分离鉴定及絮凝剂特性分析[J].中国水产科学,2012,19(4):647-653.
- [2] Burford M A, Thompson P J, McIntosh R P, et al. The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero-exchange system [J]. Aquaculture, 2004, 232 (1-4):525-537.
- [3] Panjaitan P. Field and laboratory study of *Penaeus monodon* culture with zero water exchange and limited water exchange model using molasses as a carbon source [D]. Darwin NT: Charles Darwin University, 2004.
- [4] Schryver P D, Crab R, Defoirdt T, et al. The basics of bio-flocs technology: The added value for aquaculture [J]. Aquaculture, 2008, 277 (3-4): 125-137.
- [5] 邓应能,赵培,孙运忠,等.生物絮团在凡纳滨对虾封闭养殖试验中的形成条件及作用效果[J].渔业科学进展,2012,3(2):69-75.
- [6] 李爽,李耕,潘玉洲,等.生物絮团技术对工厂化养殖海参生长及存活率的影响[J].科学养鱼,2011(11):65-66.
- [7] Zhao P, Huang J, Wang, X H, et al. The application of bioflocs technology in high-intensive, zero exchange farming systems of *Marsupenaes japonicus* [J]. Aquaculture, 2012, 354-355: 97-106.
- [8] Avnimelech Y. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds [J]. Aquaculture, 2007, 264 (1-4): 140-147.
- [9] Defoirdt T, Bossier P, Sorgeloos P, et al. The impact of mutations in the quorum sensing systems of *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio harveyi* on their virulence towards gnotobiotically cultured *Artemia franciscana* [J]. Environmental Microbiology, 2005, 7 (8): 1239-1247.
- [10] Avnimelech Y. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems [J]. Aquaculture, 1999, 176(3-4):227-235.
- [11] 范文辉,黄健,王秀华,等.养殖大菱鲆溃疡症病原菌的分离鉴定及系统发育分析[J].微生物学报,2005,45(5):665-670.
- [12] 张惟杰.糖复合物生化研究技术[M].2版.杭州:浙江大学出版社,1999.

- [13] 董群,郑丽伊,方积年.改良的苯酚-硫酸法测定多糖和寡糖含量的研究[J].中国药学杂志,1996,31(9):550-553.
- [14] Lin H Z, Li Z J, Chen Y Q, *et al.* Effect of dietary traditional Chinese medicines on apparent digestibility coefficients of nutrients for white shrimp *Litopenaeus vannamei*, Boone [J]. *Aquaculture*, 2006, 253(1-4):495-501.
- [15] 王秀华,宋晓玲,黄捷.肽聚糖制剂对南美白对虾体液免疫因子的影响[J].中国水产科学,2004,11(1):26-30.
- [16] 王雷,李光友,毛远兴.中国对虾血淋巴中的溶菌活力与酚氧化酶活力的测定及其特性研究[J].海洋与湖沼,1995,26(2):179-185.
- [17] Ashida M. Purification and characterization of prophenol oxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori* [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1971, 144(2):749-762.
- [18] Tacon A G J, Cody J J, Conquest L D, *et al.* Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2002, 8(2):121-137.
- [19] Bratvold D, Lu J, Browdy C L. Disinfection, microbial community establishment and shrimp production in a prototype biosecure pond [J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 1999, 30(4):422-432.
- [20] Bratvold D, Browdy C L. Effects of sand sediment and vertical surfaces (AquaMats™) on production, water quality, and microbial ecology in an intensive *Litopenaeus vannamei* culture system [J]. *Aquaculture*, 2001, 195(1-2):81-94.
- [21] Moss M S, Pruder G D. Characterization of organic particles associated with rapid growth in juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei* Boone, reared under intensive culture conditions [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1995, 187(2):175-191.
- [22] McIntosh P R. Changing paradigms in shrimp farming: IV. Low protein feeds and feeding strategies [M]. *Global Aquaculture Advocate*, 2000, 3(2):44-50.
- [23] Alava V R, Pascual F P. Carbohydrate requirements of *Penaeus monodon* (Fabricius) juveniles [J]. *Aquaculture*, 1987, 61(3-4):211-217.
- [24] 王雷,李光友,毛远兴.中国对虾血淋巴中的抗菌、溶菌活力和酚氧化酶活力的测定及其特性研究[J].海洋与湖沼,1995,26(2):179-185.
- [25] Huynh T G, Yeh S T, Lina Y C, *et al.* White shrimp *Litopenaeus vannamei* immersed in seawater containing *Sargassum hemiphyllum* var. *chinense* powder and its extract showed increased immunity and resistance against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 31(2):286-293.
- [26] Nonwachai T, Purivirojkul W, Limsuwan C. *et al.* Growth, nonspecific immune characteristics, and survival upon challenge with *Vibrio harveyi* in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) raised on diets containing algal meal [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29(2):298-304.
- [27] Li C C, Chen J C. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under low and high pH stress [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 25(6):701-709.
- [28] 莫照兰,李会荣,俞勇,等.细菌糖蛋白对螯虾免疫因子的影响[J].中国水产科学,2000,7(3):28-32.
- [29] Sritunyalucksana K, Sithisarn P, Withayachumnarnkul B, *et al.* Activation of prophenoloxidase, agglutinin and antibacterial activity in haemolymph of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, by immunostimulants [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1999, 9(1):21-30.
- [30] Söderhäll K. Prophenoloxidase activating system and melanization - a recognition mechanism of arthropods: A review [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 1982, 6(4):601-611.

The biochemical analysis of a microbial floc and its effect on the immunity of *Litopenaeus vannamei*

SUN Zhen^{1,2}, WANG Xiuhua^{2*}, HUANG Jie²

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

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

Abstract: Microbial floc is a complex of bacteria, residue of feed, algae, and protozoa in aquaculture. Biofloc technology (BFT) based on microbial flocs been applied in the culture of *Oreochromis mossambicus*, *Litopenaeus vannamei*, *Macrobrachium rosenbergii* and so on. In this study, microbial floc was achieved by artificial culture in natural marine water. In order to investigate the active ingredients in the microbial flocs, molecular weight, content of total polysaccharide and amino acid in the microbial flocs were analyzed by methods of gel permeation chromatography, phenol sulfuric acid colorimetry and automatic analyzer for amino acid, respectively. The results of preliminary biochemical analysis showed that the average molecular weight of extractive from supernatant of microbial flocs was about 213 281 u, the polysaccharide and amino acid content of sediment from microbial flocs was 29.57% and 12.63% respectively. Further study was conducted to investigate the function of microbial flocs to enhance the immune activity of shrimp. Microbial flocs were added in the *L. vannamei* diet at a ratio of 0%, 0.02%, 0.1%, 0.5%, and 2.5%. Activity of antibacterial, lysozyme and phenoloxidase (PO) in serum of shrimp were analyzed after 14 days of feeding trial. Challenge test was carried out to evaluate the effect of microbial flocs on improving the ability of shrimp against virulent bacterium of *Vibrio harveyi* after 30 days of feeding trial. Results show that activity of antibacterial and lysozyme in serum of shrimp fed diet containing microbial flocs at a ratio 2.5% were higher than that in other groups ($P < 0.05$). PO activity in serum of shrimp fed diet containing microbial flocs at ratio 0.5% and 2.5% were higher than that in other groups ($P < 0.05$). Challenge test showed that cumulative mortality of shrimp fed diet containing microbial flocs at a ratio of 0.1% was the lowest in all groups ($P < 0.05$). The present results suggested that microbial flocs can be utilized by shrimp and can improve the ability of non-specific immunity of shrimp.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; microbial flocs; biochemical composition; nonspecific immunity

Corresponding author: WANG Xiuhua. E-mail: wangxh@ysfri.ac.cn