

# 地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)对镉胁迫下泥蚶(*Tegillarca granosa*)的抗氧化酶活性和免疫相关基因表达的影响\*

王 稷 李 晔 瞿 洋 沈灵灵 孙 静 全晶晶

(宁波大学海洋学院 宁波 315211)

**摘要** 本文研究一株地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)对提高泥蚶耐受镉( $Cd^{2+}$ )胁迫的作用, 实验分析了不同浓度地衣芽孢杆菌对  $Cd^{2+}$  胁迫下泥蚶(*Tegillarca granosa*)的存活率及组织中 Cd 残留量的影响; 同时比较了地衣芽孢杆菌作用前后, 泥蚶体内两类抗氧化酶, 超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性, 进一步通过 Real-time PCR 分析了三类免疫相关基因金属硫蛋白(MT)、小热休克蛋白分子(sHSP)和铁蛋白(ferritin)的表达情况。研究结果显示, 地衣芽孢杆菌能降低泥蚶组织中 Cd 残留量, 提高其存活率。并能有效促进泥蚶体内 SOD 和 GSH-Px 酶活性的增加, 同时降低 MT、sHSP 和 ferritin 在 mRNA 水平上的表达。数据表明该地衣芽孢杆菌可通过调节泥蚶的免疫系统, 起到降低  $Cd^{2+}$  对泥蚶毒害的作用。

**关键词** 地衣芽孢杆菌; 泥蚶; 镉残留量; 存活率; 抗氧化酶; 免疫基因

中图分类号 Q936 doi: 10.11693/hyhz20140600187

近年来, 随着沿海工业的高速发展, 周边城镇生活污水和工业废水排放入海的增加, 致使滩涂贝类养殖环境受到不同程度的重金属污染。重金属镉(Cd)是广泛分布于环境的污染物, 通常沉积在河流、滩涂和近岸水体中, 极易被水生生物吸收和蓄积, 并通过食物链传递至高等生物体内。Cd 对人体健康危害严重, 尤其损害肾脏、肝脏、心血管系统以及生殖系统(Korte, 1983; Jung *et al*, 2005; Chen *et al*, 2012; Nair *et al*, 2012)。

泥蚶(*Tegillarca granosa*), 俗称花蚶、血蚶、银蚶、蚶子等, 富含血红蛋白、牛磺酸和甜菜碱等生物活性成分, 有补血、温中、健胃的功效, 且肉味鲜美, 是沿海地区的传统美食(Bao *et al*, 2010)。由于泥蚶属于滤食性动物, 且营底栖生活, 使得它更加容易富集水体中的重金属等污染物(Jung *et al*, 2012)。调查研究发现宁波地区泥蚶中 Cd 含量超标, 其质量指数为 1.85,

各地超标率达 100%(尤仲杰等, 2011)。若不解决泥蚶中 Cd 超标问题, 将直接影响到泥蚶养殖业的可持续发展及泥蚶的食用安全性。因此如何减少 Cd 在贝类体内残留或有效脱除 Cd 已是当务之急, 这对保障我国贝类水产品的质量安全有重要意义。

目前贝类净化的方法多数针对致病性微生物, 对于重金属污染还未见有效净化处理技术(叶盛权等, 2003)。微生物修复治理重金属污染具有安全性、经济性和非破坏性的优点, 是重金属污染治理的重要研究方向之一。目前, 国内外研究发现一些微生物如细菌、真菌和藻类等对重金属  $Cd^{2+}$  有很强的耐受性和富集能力, 研究的细菌多为假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.) (Chien *et al*, 2011; Wei *et al*, 2011)、芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.) (付瑾等, 2011)和皮氏罗尔斯通氏菌属(*Ralstonia* sp.) (孙晶等, 2009; Nies, 2000)。其中地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*), 革兰氏阳性、兼性

\*浙江省海水养殖科技创新团队资助项目, 2010R50025 号。王稷, 硕士研究生, E-mail: 445153628@qq.com

通讯作者: 李晔, 博士, 讲师, E-mail: liye@nbu.edu.cn

收稿日期: 2013-09-22, 收修改稿日期: 2014-05-31

厌氧菌, 在生长代谢中能产生多种抗菌活性物质, 可抑制肠道中的致病菌, 常用其制备益生菌, 用于调整肠道菌群失调(周鸣等, 2006; 何英, 2007)。在重金属污染防治方面, 周鸣等(2006)采用地衣芽孢杆菌死菌体吸附水中的铬( $\text{Cr}^{6+}$ ), 最大吸附量为 60.5mg/g。

通过活化培养实验室驯养的耐 350mg/L  $\text{Cd}^{2+}$  的地衣芽孢杆菌, 研究其对  $\text{Cd}^{2+}$  胁迫下泥蚶存活率、组织中 Cd 残留量、抗氧化酶系活性及免疫相关基因表达情况的影响, 进而探讨微生物菌剂对贝类 Cd 污染的防治和脱除的有效性及其可行性, 并为提高水产食品食用安全性提供参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

**1.1.1 地衣芽孢杆菌** 地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)由宁波大学海洋学院实验室筛选鉴定保存。

**1.1.2 泥蚶** 实验用泥蚶(*Tegillarca granosa*)采自温州乐清, 平均体重为(8.50 ± 0.23)g, 实验前洗刷干净, 清除附着物。

**1.1.3 试剂** 实验用硝酸( $\text{HNO}_3$ )、氯化镉( $\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )为分析纯, 购自宁波博奥生物工程有限公司; SOD 试剂盒、GSH-Px 试剂盒、BCA 试剂盒购自南京建成生物工程研究所; M-MuLV 第一链 cDNA 合成试剂盒由生工生物工程(上海)有限公司提供; SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> 为 TaKaRa 公司产品。

### 1.2 方法

**1.2.1 泥蚶的处理** 泥蚶在 20°C、盐度 30 的海水中充气暂养一周, 每天投喂适量饵料, 隔天换水。实验时泥蚶被随机分为 14 组, 每组 20 枚。根据  $\text{Cd}^{2+}$  对泥蚶 96h 的半致死浓度(刘琴, 2008), 将  $\text{Cd}^{2+}$  在实验水体终浓度设置为 0.437、1.749 和 6.996mg/L; 每组地衣芽孢杆菌的投喂量分别为  $6.24 \times 10^9$ 、 $1.56 \times 10^{10}$ 、 $4.50 \times 10^{11}$  CFU/L (水体中的终浓度)。不加  $\text{Cd}^{2+}$ , 也不投喂地衣芽孢杆菌的为空白组, 而不加  $\text{Cd}^{2+}$ , 仅投喂  $4.50 \times 10^{11}$  CFU/L 地衣芽孢杆菌的作为对照组。 $\text{Cd}^{2+}$  和地衣芽孢杆菌在实验开始时加入, 此后每次换水时加入相应的量。实验水体为 1L, 每个实验组做 2 个平行, 实验周期为 96h。

**1.2.2 菌种培养** 实验时将活化的地衣芽孢杆菌接种到普通 LB 液体培养基中, 摇床培养 24h, 菌液经 5000r/min 离心 5min, 菌体沉淀用无菌水制备成  $3.01 \times 10^{12}$  CFU/L 的菌悬液, 于 4°C 保存备用。

**1.2.3 泥蚶死亡率的统计** 每天观察泥蚶的死亡

情况, 96h 后统计各组泥蚶的死亡率。

**1.2.4 组织中 Cd 残留量的测定** 每组泥蚶随机取 5 枚, 解剖内脏团并捣碎后, 进行微波消解。每 0.5g 样品加入 5mL  $\text{HNO}_3$  消解试剂。微波消解采用梯度升温消解程序: 800W 从室温经 10min 升至 120°C, 保持 5min, 然后从 120°C 再经 5min 升至 150°C, 保持 5min, 最后从 150°C 经 5min 升至 190°C, 保持 15min。冷却后, 消解液用 5%  $\text{HNO}_3$  定容至 50 mL。ICP-AES 测消解液中 Cd 含量。实验中所有器皿使用前均于 5%  $\text{HNO}_3$  中浸泡 24 h。

**1.2.5 泥蚶组织中抗氧化酶活力测定** 冰上解剖泥蚶内脏团, 冰冻生理盐水冲洗干净, 吸干水分后, 准确称取组织质量, 按质量体积比 1 : 9 加入预冷生理盐水, 冰上匀浆, 匀浆液稀释 10 倍后, 离心(3500r/min, 4°C, 10min), 取上清液, 再次稀释为 1% 和 10% 浓度, 分别用于总蛋白浓度和 SOD、GSH-Px 酶活的测定。实验步骤参照试剂盒说明。

### 1.2.6 免疫相关基因的表达分析

(1) 总 RNA 的提取 泥蚶内脏组织, 在液氮中充分研磨, 加入 Trizol 提取总 RNA, 具体步骤参照 Trizol 说明书。总 RNA 使用 Nanodrop 超微量分光光度计进行定量分析, 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳确认完整性。

(2) cDNA 的合成 上述提取的总 RNA, 根据 M-MLV 使用说明进行第一链 cDNA 的合成, 产物于 -20°C 保存备用。

(3) Real-time PCR 根据 NCBI 上的序列信息, 采用 Primer Premier 5.0 软件设计并合成泥蚶的 MT、Ferritin、sHSP 基因的荧光定量 PCR 引物(表 1),  $\beta$ -actin 作为内参。荧光定量 PCR 扩增体系为 20  $\mu$ L: SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> (2 $\times$ ), 10 $\mu$ L; PCR Forward Primer (10 $\mu$ mol/L), 1 $\mu$ L; PCR Reverse Primer (10 $\mu$ mol/L), 1 $\mu$ L; cDNA 模板, 4 $\mu$ L; ddH<sub>2</sub>O, 4 $\mu$ L。反应程序为 95°C 1min; 95°C 10s; 60°C 15s; 75°C 15s, 30 至 40 个循环。以 actin 为内参, 对得到的各样品 Ct 值进行均一化处理, 以正常生长下的泥蚶的相关免疫基因的 mRNA 的表达

表 1 用于 Real-time PCR 的引物序列  
Tab.1 Sequence of primers used for real-time PCR

基因名称	序列号	上游引物和下游引物
MT	AAS753181	F: 5'-TGCCGGCGATAACTGCCGAT-3' R: 5'-TGTCAGTGGTTACACGGACACGA-3'
sHSP	HM125895	F: 5'-CCCAAGTAATGCCCTTTTCG-3' R: 5'-CGTTCAGTTCTCGGGTTCA-3'
ferritin	GU078657	F: 5'-TGTGGCTCTGCCTAGTTTTG C-3' R: 5'-TGCCTGGTTGACACTTTTCTC-3'
$\beta$ -actin		F: 5'-GCCGCTTCTCATCCTCAT-3' R: 5'-GTCGGCAATACCTGGGAAC-3'

量为基准,应用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法确定各个基因 mRNA 的相对含量。

## 2 结果

### 2.1 地衣芽孢杆菌对泥蚶存活率和镉残留量的影响

不同浓度的  $Cd^{2+}$ 和地衣芽孢杆菌对泥蚶存活率和组织中的镉残留量的影响见表 2。

$Cd^{2+}$ 浓度为 0 mg/L 时,  $4.50 \times 10^{11}$  CFU/L 地衣芽孢杆菌作用下泥蚶的存活率与自然生长状态下(即空白组)的存活率一样,均为 100.0%,表明地衣芽孢杆菌对泥蚶无负面影响。未加地衣芽孢杆菌时,不同浓度  $Cd^{2+}$ 的加入对泥蚶存活率的影响具有显著差

异( $P < 0.05$ ),  $Cd^{2+}$ 浓度越高,泥蚶存活率越低。随着地衣芽孢杆菌投入量的增加,一定浓度  $Cd^{2+}$ 胁迫下的泥蚶的存活率逐渐上升。以上数据表明地衣芽孢杆菌的加入对提高  $Cd^{2+}$ 胁迫下泥蚶的存活率具有显著的效果。

在养殖水体中分别加入浓度为 0.473、1.749 和 6.996 mg/L 的  $Cd^{2+}$ ,泥蚶组织中的 Cd 含量相应地为 0.690、1.030 和 4.470 mg/kg (表 2)。表明水体中的不同浓度的  $Cd^{2+}$ 在泥蚶体内引起了不同程度的蓄积。当加入地衣芽孢杆菌后,泥蚶体内的 Cd 残留量发生显著下降( $P < 0.05$ )(表 2)。数据证实地衣芽孢杆菌能够在一定程度上清除泥蚶体内的 Cd 残留量。

表 2 地衣芽孢杆菌对镉胁迫下泥蚶的存活率和组织中镉残留量的影响  
Tab.2 Influences of *B. licheniformis* on the survival rates of *T. granosa* and the Cd concentration in *T. granosa* exposed to cadmium chloride

$Cd^{2+}$ 的加入量(mg/L)		菌投喂量(CFU/L)			
		0	$6.24 \times 10^9$	$1.56 \times 10^{10}$	$4.50 \times 10^{11}$
0	存活率(%)	100	—	—	100
	镉残留量(mg/g)	0	—	—	0
0.473	存活率(%)	80	89.5	100	100
	镉残留量(mg/kg)	0.690	0.63	0.38	0.33
1.749	存活率(%)	56	73.7	78	80
	镉残留量(mg/kg)	1.030	0.86	0.77	0.6
6.996	存活率(%)	38	60	60	71.6
	镉残留量(mg/kg)	4.470	3.90	1.84	1.37

### 2.2 地衣芽孢杆菌对抗氧化酶活性的影响

实验选择 0.437 mg/L  $Cd^{2+}$ 胁迫下的泥蚶进一步研究不同浓度的地衣芽孢杆菌对抗氧化酶 SOD 和 GSH-Px 活性的影响,结果见图 1。当暴露于 0.437 mg/L  $Cd^{2+}$ 的泥蚶被投喂不同量( $6.24 \times 10^9$ ,  $1.56 \times 10^{10}$ ,  $4.50 \times 10^{11}$  CFU/L)的地衣芽孢杆菌后,泥蚶组织中 SOD 活性呈显著升高趋势,且与加入的地衣芽孢杆菌的量呈正相关。地衣芽孢杆菌对 GSH-Px 活性的影响与对 SOD 的影响类似,也表现为随加入浓度增加而活性升高的趋势。

### 2.3 地衣芽孢杆菌对泥蚶体内免疫相关基因表达的影响

同样,选择  $Cd^{2+}$ 浓度为 0.473 mg/L 的实验组泥蚶,研究不同投喂量的地衣芽孢杆菌对组织中三类免疫相关基因 MT、ferritin 和 sHSP 的表达情况,结果见图 2。随着地衣芽孢杆菌投喂量的增加,三类基因的表达量均呈显著下降趋势,其中 MT 的表达量下降最为显著, sHSP 次之, ferritin 表达量的变化最小。

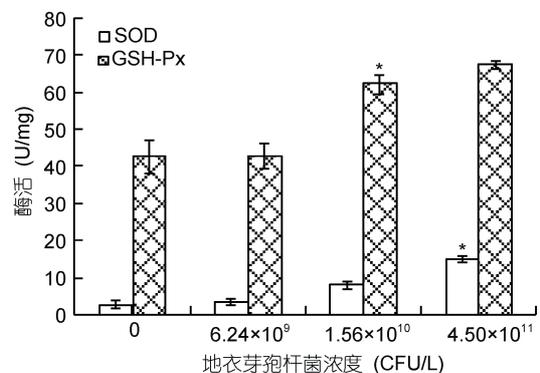


图 1 地衣芽孢杆菌对泥蚶组织中 SOD 和 GSH-Px 活性的影响

Fig.1 Effects of *B. licheniformis* on the activities of SOD and GSH-Px in the visceral mass of *T. granosa* exposed to 0.473 mg/L cadmium

\*表示与对照组比较有显著差异( $P < 0.05$ ); \*\*表示与对照组比较有极显著差异( $P < 0.01$ )

表明这三类基因在泥蚶体内起着相似的免疫调节作用,而地衣芽孢杆菌是通过调控免疫相关基因的表达,从而在一定程度上提高泥蚶耐受镉胁迫的能力。

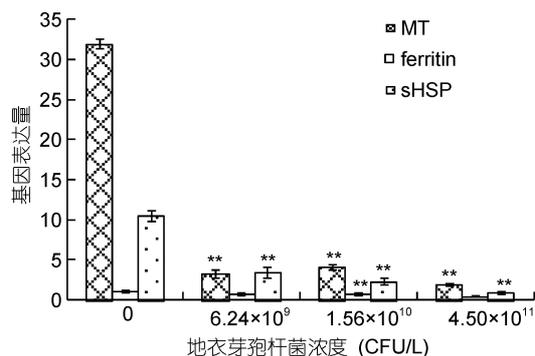


图2 地衣芽孢杆菌对泥蚶组织中免疫基因表达的影响

Fig.2 Effects of *B. licheniformis* on the expression levels of MT, sHSP and ferritin in the visceral mass of *T. granosa* exposed to 0.437 mg/L cadmium

\*表示与对照组比较有显著差异( $P<0.05$ ); \*\*表示与对照组比较有极显著差异( $P<0.01$ )

### 3 讨论

泥蚶是我国水产养殖中极具经济价值的贝类,属滩涂滤食性贝类,经过鳃不断吸收溶解水体中的重金属进入体内。此外,也可通过体表与水体的渗透交换作用使重金属进入体内,并在内脏积累(张传永等,2008)。因此泥蚶的生活环境在很大程度上决定了泥蚶体内Cd的含量。Cd在泥蚶体内的累积能破坏泥蚶体内的离子平衡,改变细胞膜渗透性,也可能抑制钠离子-钾离子( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )主动运输过程,从而降低ATP的有效性。此外,Cd能抑制泥蚶抗氧化酶系统,破坏内脏器官酶系统的正常生理功能,妨碍泥蚶正常代谢(李学鹏等,2010),致使泥蚶存活率下降。另一方面泥蚶体内的Cd也容易通过食物链进入人体内,影响泥蚶的食用安全性。

很多微生物包括细菌、真菌、酵母以及藻类,都具有不同程度的结合重金属的能力(Dhankhar *et al.*, 2011)。研究普遍认为微生物的细胞壁是吸收或结合重金属的主要结构和场所(Pradhan *et al.*, 2007; Fang *et al.*, 2009)。

本实验将地衣芽孢杆菌投喂给镉胁迫下的泥蚶,结果使泥蚶的存活率显著上升(表2),而体内的Cd残留量显著下降(表2),表明泥蚶对地衣芽孢杆菌的吸收能够减少Cd在体内的蓄积,起到保护泥蚶的作用。此结果一方面是因为投放到水体中的地衣芽孢杆菌直接结合了水体中的 $\text{Cd}^{2+}$ ,从而减少了泥蚶对 $\text{Cd}^{2+}$ 的吸收;另一方面可能是进入泥蚶体内的地衣芽孢杆菌通过结合体内的Cd,加速了Cd的排泄。

益生菌已被广泛地应用在养殖业中,对提高养

殖动物的生长率、免疫力以及对病原菌的抵抗力具有重要作用。大量研究表明饲料中添加益生菌能够有效调节动物的抗氧化系统,影响相关免疫基因的表达模式(Brunt *et al.*, 2008; Tovar-Ramírez *et al.*, 2010; Sliva-Aciare *et al.*, 2013)。为此,本实验分析了地衣芽孢杆菌作用下,泥蚶的抗氧化酶活性和相关基因的表达变化情况,以了解该菌株对泥蚶的保护机制。

有研究发现,在 $\text{Cd}^{2+}$ 胁迫下的动物体内会产生大量的活性氧(Reactive oxygen species, ROS),进而耗尽抗氧化酶(Shaikh *et al.*, 1999; Bagchi *et al.*, 2000; Szuster-Ciesielska *et al.*, 2000)。因此一般认为能够提高抗氧化酶活性或者减少重金属吸收的物质都能够降低 $\text{Cd}^{2+}$ 的诱导毒性(Lacorte *et al.*, 2013)。在本实验中,作者发现细菌的投喂量与泥蚶体内的SOD和GSH-Px的活性呈正相关(图1),由此推断,地衣芽孢杆菌通过增加抗氧化酶活性来减少ROS对泥蚶的伤害作用,从而降低Cd诱导的毒性。

同时,研究还发现地衣芽孢杆菌的投喂导致了三类基因MT、sHSP和ferritin在mRNA水平上表达发生显著下调(图2)。MT是一种广泛存在于生物体内的金属结合蛋白,可调节生物细胞体内非必需金属元素的解毒过程;Ferritin是一种高度保守的铁结合蛋白,可对机体氧化损伤起保护作用;sHSP是HSP家族中的一员,也能作用于细胞来抵抗各种应激反应。有研究报告,当泥蚶受到 $\text{Cd}^{2+}$ 胁迫时,MT、sHSP和ferritin往往是高表达的。在本实验中,当水体中加入地衣芽孢杆菌后,进入泥蚶体内的 $\text{Cd}^{2+}$ 的量减少,可能是导致这三类基因表达下调的原因。事实上,在很多情况下基因在mRNA水平上的表达和蛋白水平上的表达并不一致(Sekhar *et al.*, 2011),因此,要阐明地衣芽孢杆菌作用机制,进一步研究这些免疫基因在蛋白水平上的表达是必不可少的。

### 参 考 文 献

- 尤仲杰, 康飞金, 王建萍等, 2011. 宁波地区滩涂贝类养殖区环境及贝体重金属含量与评价. 海洋环境科学, 30(4): 508—511
- 叶盛权, 黄 甫, 2003. 双壳贝类的净化技术研究. 食品研究与开发, 24(4): 28—30
- 付 瑾, 谢学辉, 钱 林等, 2011. 皮氏罗尔斯通氏菌株 DX-T3-01 的耐镉性能及镉富集机理. 应用与环境生物学报, 17(5): 717—721
- 刘 琴, 2008. 重金属 Pb、Cd 和 Cr 在泥蚶中的行为研究. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 16—21
- 孙 晶, 李 红, 李雪龙, 2009. 整肠生中地衣芽孢杆菌对几

- 种常见抗菌药物的体外敏感性. 中国临床药理学杂志, 25(3): 246—248
- 李学鹏, 段青源, 励建荣, 2010. 我国贝类产品中重金属镉的危害及污染分析. 食品科学, 17(31): 457—461
- 何 英, 2007. 地衣芽孢杆菌胶囊联合制霉菌素治疗儿童真菌性肠炎疗效观察. 中国药房, 18(11): 852—857
- 张传永, 刘 庆, 陈燕妮, 2008. 重金属对水生生物毒性作用研究进展. 生命科学仪器, 6(11): 3—7
- 周 鸣, 刘云国, 李 欣, 2006. 地衣芽孢杆菌对  $\text{Cr}^{6+}$  的吸附动力学研究. 应用与环境生物学报, 12(1): 84—87
- Bagchi D, Joshi S S, Bagchi M *et al*, 2000. Cadmium- and chromium-induced oxidative stress, DNA damage, and apoptotic cell death in cultured human chronic myelogenous leukemic K562 cells, promyelocytic leukemic HL-60 cells, and normal human peripheral blood mononuclear cells. *J Biochem Mol Toxicol*, 14: 33—41
- Bao Y, Lin Z, 2010. Generation, annotation, and analysis of ESTs from hemocyte of the bloody clam, *Tegillarca granosa*. *Fish & Shellfish Immunology*, 29(5): 740—746
- Brunt J, Hansen R, Jamieson D J *et al*, 2008. Proteomic analysis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) serum after administration of probiotics in diets. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 121: 199—205
- Chen C, Shen W, Huo L *et al*, 2012. Effects of cadmium on the microstructure and ultrastructure of gill and hepatopancreas in *Tegillarca granosa*. *Journal of fisheries of China*, 36(4): 522—528
- Chien C C, Jiang M H, Tsai M R, 2011. Isolation and characterization of an environmental cadmium and tellurite resistant pseudomonas strain. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(10): 2202—2207
- Dhankhar R, Hooda A, 2011. Fungal biosorption—an alternative to meet the challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. *Environmental Technology*, 32(5): 467—491
- Fang L C, Cai P, Chen W L *et al*, 2009. Impact of cell wall structure on the behavior of bacterial cells in the binding of copper and cadmium. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 347: 50—55
- Jung H B, Yun S T, Mayer B *et al*, 2005. Transport and sediment-water partitioning of trace metals in acid mine drainage: an example from the abandoned Kwangyang Au-Ag mine area, South Korea. *Environ Geol*, 48: 437—449
- Jung S L, Lee Y G, Park J J *et al*, 2012. Microanatomy and ultrastructure of the foot of the infaunal bivalve *Tegillarca granosa* (Bivalvia: Arcidae). *Tissue and Cell*, 44(5): 316—324
- Korte F, 1983. Ecotoxicology of cadmium: general overview. *Ecotoxicol Environ Saf*, 7: 3—8
- Nair P M G, Choi J, 2012. Effects of cadmium chloride and nonylphenol on the expression of StAR-related lipid transfer domain containing protein (START1) gene in aquatic midge, *Chironomus riparius*. *Comp Biochem Physiol C*, 155: 369—374
- Nies D H, 2000. Heavy metal-resistant bacteria as extremophiles: Molecular physiology and biotechnological use of *Ralstonia* sp. CH34. *Extremophiles*, 4(2): 77—82
- Pradhan S, Singh S, Rai L C, 2007. Characterization of various functional groups present in the capsule of *Microcystis* and study of their role in biosorption of Fe, Ni and Cr. *Bioresource Technology*, 98: 595—601
- Sekhar K, Priyanka B, Reddy V D *et al*, 2011. Metallothionein 1 (CcMT1) of pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) confers enhanced tolerance to copper and cadmium in *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana*. *Environmental and Experimental Botany*, 72: 131—139
- Shaikh Z A, Vu T T, Zaman K, 1999. Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium-induced hepatotoxicity and renal toxicity and protection by antioxidants. *Toxicol Appl Pharmacol*, 154: 256—263
- Sliva-Aciaries F, Moraga D, Auffret M *et al*, 2013. Transcriptomic and cellular response to bacterial challenge (Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*) in farmed juvenile *Halotis rufescens* fed with or without probiotic diet. *Journal of Invertebrate Pathology*, 113(2): 163—176
- Szuster-Ciesielska A, Stachura A, Slotwinska M *et al*, 2000. The inhibitory effect of zinc on cadmium-induced cell apoptosis and reactive oxygen species (ROS) production in cell cultures. *Toxicology*, 145: 159—171
- Tovar-Ram í rez D, Mazurais D, Gatesoupe J F *et al*, 2010. Dietary probiotic live yeast modulates antioxidant enzyme activities and gene expression of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture*, 300: 142—147
- Wei X, Fang L C, Cai P *et al*, 2011. Influence of extracellular polymeric substances (EPS) on Cd adsorption by bacteria. *Environmental Pollution*, 159(5): 1369—1374

## INTAKE OF *BACILLUS LICHENIFORMIS* MEDIATES ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITIES AND GENE EXPRESSION IN CADMIUM-STRESSED *TEGILLARCA GRANOSA*

WANG Ji, LI Ye, QU Yang, SHEN Ling-Ling, SUN Jing, QUAN Jing-Jing  
(School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

**Abstract** To assess the ability of *Bacillus licheniformis* in removing Cd from aquatic animals, *Tegillarca granosa* was used to test the effect of *B. licheniformis* intake on Cd removal, and the impacts on the survival, the activities of two antioxidant enzymes, and the expression levels of three genes in *T. granosa* that were co-administrated in Cd. Results show that *B. licheniformis* intake effectively reduced the Cd contents in visceral mass of *T. granosa* and increased the survival rates. Meanwhile, the superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) activities were significantly increased. However, the expression levels of metallothionein (MT), small heat shock protein (sHSP) and ferritin were all down-regulated in *T. granosa* fed *B. licheniformis* compared to the control. Therefore, *B. licheniformis* could protect *T. granosa* potentially and effectively from stress by reducing Cd toxicity and modulating the immune system of the host.

**Key words** *Bacillus licheniformis*; *Tegillarca granosa*; cadmium chloride; survival rate; antioxidant enzymes; immune-related genes