

二溴海因和碳水化合物水平对凡纳滨对虾生长和免疫的影响

王兴强¹, 马 甦², 曹 梅¹, 阎斌伦¹

(1. 淮海工学院 江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏 连云港 222005; 2. 中国海洋大学 教育部海水养殖重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要: 研究了低盐度条件下, 二溴海因和碳水化合物水平对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)生长和免疫的影响, 共 3 个实验。实验 1 研究了二溴海因对凡纳滨对虾存活的影响, 发现在 0.2、5 和 20 三个盐度水平, 随着二溴海因浓度的升高, 凡纳滨对虾存活率呈下降趋势; 二溴海因对凡纳滨对虾的安全浓度随盐度的增加呈上升趋势。实验 2 和实验 3 研究了盐度、二溴海因浓度和饲料中碳水化合物水平对凡纳滨对虾生长和免疫的影响, 结果表明: 在低盐度养殖条件下, 凡纳滨对虾长期生活于二溴海因环境中, 可导致对虾处于应激状态, 需要消耗体内较多的免疫因子, 血清酚氧化酶和超氧化物歧化酶活性降低, 生长速度下降, 而在饲料中适量增加碳水化合物不仅可促进对虾生长又可起到饲料蛋白质节约作用。

关键词: 二溴海因; 碳水化合物; 凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*); 生长; 免疫

中图分类号: S968.22; X174

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2010)04-0025-08

近年来, 随着凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)传统养殖模式难度的加大以及迎合对虾养殖向低盐度区域拓展的需要, 凡纳滨对虾低盐度养殖面积迅速扩大。在对虾养殖过程中, 人们常用化学消毒剂来预防和治疗虾病^[1-3]。1,3-二溴-5,5-二甲基海因简称二溴海因, 是一类新型的溴释放性消毒剂, 对细菌繁殖体及芽孢、病毒、真菌和藻类等均有杀灭作用^[4]。由于二溴海因具有性能稳定、绿色环保和对水生生物刺激小等优点, 广泛应用于对虾养殖业。一般来说, 每一种消毒剂对对虾都有一定程度的毒副作用, 而对对虾消毒剂的耐受能力与其个体大小、营养生理状况、自身的渗透调节能力、免疫状况和水环境条件等因素密切相关^[5,6]。然而, 目前的研究大多集中于正常条件下消毒剂对对虾短期的急性毒性效应, 而在低浓度条件下消毒剂对对虾长期的慢性毒性研究, 尤其是消毒剂、营养因子和环境因子的交互作用对对虾生长和免疫影响的研究资料比较缺乏^[2]。鉴于此, 作者探讨了低盐度条件下, 二溴海因和饲料中碳水化合物水平对凡纳滨对虾生长和免疫的影响。

1 材料与方 法

1.1 实验饲料

实验所用饲料配方见表 1。这些饲料是在能值基本相等的基础上碳水化合物设 13.89%和 41.76%两

个水平(表 2)。饲料制成直径为 1.6 mm 的颗粒, 70 °C 下烘干, 4 °C 冷藏保存。

1.2 材料来源和淡化

实验共购两批对虾, 第一批凡纳滨对虾平均湿体质量(0.062±0.024)g, 购自连云港市海洋育苗场, 对虾在 3 个玻璃纤维水槽中暂养 1 周, 然后每天以 3 的盐度分别降至 20、5 和 0.2 三个盐度水平, 并适应 3 d, 然后进行急性和慢性毒性实验。第 2 批凡纳滨对虾平均湿体质量(7.144±0.529)g, 购自连云港市海头对虾养殖场, 对虾在两个玻璃纤维水槽中暂养一周, 然后每天以 3 的盐度分别降至 20 和 0.2 两个盐度水平, 并适应 3 d, 然后进行对虾免疫指标测定实验。玻璃纤维水槽规格 200 cm × 100 cm × 80 cm, 驯化起始盐度 28, 水温 23.5 ~ 25.0 °C。低盐度海水用过滤海水加自来水(盐度约为 0.2)配制。

1.3 急性毒性实验

实验采用单因素设计, 设计梯度见表 3 至表 5。每个水族箱(30 cm × 40 cm × 50 cm, 养殖水体 50 L)

收稿日期: 2009-06-12; 修回日期: 2009-10-16

基金项目: 十一五国家科技支撑计划重大项目(2006BAD09A06); 江苏省教育厅青蓝工程项目(QN07008)

作者简介: 王兴强(1975-), 男, 山东济宁人, 博士, 副教授, 从事水生动物生理生态学研究, 电话: 15861247779, E-mail: xqwangaomei@yahoo.com.cn

表 1 饲料原料组成

Tab. 1 Ingredients of diets

组成	鱼粉	豆粕	花生粕	面粉	鱼油	卵磷脂	褐藻酸钠	复合多维	复合多矿
A(%)	55	18	18	0	2.5	2	1.5	1	2
B(%)	28	0	0	60	5.5	2	1.5	1	2

注: 复合多维, 1 000 g 饲料包括: B₁ 30mg, 核黄素 50 mg, 叶酸 5 mg, B₆ 70 mg, 烟酸 200 mg, 泛酸钙 70 mg, 氯化胆碱 2000 mg, 肌醇 2000 mg, Vc 2000 mg, 生物素 1 mg, 对氨基苯甲酸 75 mg, V_E 200 mg, V_K 17 mg, B₁₂ 0.4 mg, V_A 75 000 IU, D₃ 30 000 IU; 复合多矿, 1 000 g 饲料包括: Ca(H₂PO₄)₂ 4.400 g, CaCO₃ 4.120 g, K₂HPO₄ 2.000 g, NaH₂PO₄ 5.600 g, MgSO₄·7H₂O 2.545 g, KCl 0.800 g, FeSO₄·7H₂O 0.200 g, AlCl₃·6H₂O 0.08 g, ZnSO₄·7H₂O 0.216 g, MnSO₄·H₂O 0.040 g, CuSO₄·5H₂O 0.004 g, CoCl₂·6H₂O 0.056 g, KI 0.008 g, Na₂SeO₃ 0.001 g

表 2 饲料的生化组成

Tab. 2 Proximate biochemical composition of diets

组成	碳水化合物 (%)	水分 (%)	粗蛋白 (%)	脂肪 (%)	灰分 (%)	能值 (kJ/g)
A	13.89	6.45	51.27	7.32	11.58	17.83
B	41.76	6.69	24.63	7.69	7.27	17.49

放养 10 尾对虾, 每个处理设 3 个重复, 实验周期 96 h。水族箱中二溴海因浓度采用姜霞等^[4]方法进行校正。实验期间, 溶解氧维持在 6.0 mg/L 以上, pH 7.7~8.2, 水温(25.0±0.1)°C。

1.4 慢性毒性实验

在急性毒性实验结果的基础上, 慢性毒性实验采用 3×3×2 析因设计, 每个水族箱(30 cm × 40 cm × 50 cm, 养殖水体 50 L)放养 5 尾对虾, 每个处理设 3 个重复, 共 54 个水族箱。实验前停食 24 h, 用电子天平称其初始体质量。实验期间, [(盐度: 0.2、5 和 20)×(二溴海因质量浓度: 0.0、0.3 和 0.6 mg/L)]9 个水平分别投喂 A 和 B 两种实验饲料(表 6), 日投饵两次(06:00 和 18:00 时), 过量投饵; 投饵 2.5 h 后从每个水族箱收集残饵和粪便, 70°C 烘干后保存。为维持实验期间水族箱内所设二溴海因浓度的稳定性, 每隔 3 d, 水族箱彻底换水一次, 其他养殖条件控制同急性毒性实验, 实验周期 60 d。实验结束后, 对每个水族箱中的对虾再次进行计数和称量。

1.5 免疫指标测定实验

在急性和慢性毒性实验结果的基础上, 对虾免疫指标测定实验采用 2×2×2 析因设计, 每个水族箱(30 cm × 40 cm × 50 cm, 养殖水体 50 L)放养 5 尾对虾, 每个处理设 3 个重复, 共 24 个水族箱。养殖条件控制同慢性毒性实验, 实验周期 28 d。实验结束后, 取每个水族箱中的对虾, 用 1 mL 无菌注射器, 按照血淋巴与抗凝剂(0.01 mol/L Tris-HCl, 0.25 mol/L 蔗糖, 0.1 mol/L 柠檬酸三钠; pH 7.6; 780 mOS/kg)1:2 的

比例, 自对虾头胸甲后插入心脏抽取血液, 合并置于无菌 Eppendorf 管。所取抗凝血, 一部分离心 10 min(700 g, 4°C)(MIKR022R, 德国 HEYICH 公司), 所得的上清液一部分用于血清酚氧化酶(PO)活性的测定, 参考叶建生等^[7]的方法, 以试验条件下, A₄₉₀ 每分钟增加 0.001 作为一个酶活性单位; 另一部分用于血清超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定, 应用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒, 用酶标仪测量各反应体系在 550 nm 波长下的 A 值。

1.6 数据处理与计算

所得数据用单因素或三因素方差分析、Turkey's 多重比较以及回归分析进行处理, 以 P<0.05 作为差异显著水平。

安全浓度(C_s)、特定生长率(R_{SG})、饲料转换效率(E_F)和吸收效率(E_A)的计算公式为:

$$C_s = LC_{50, 48h} \times 0.3 / (LC_{50, 24h} / LC_{50, 48h})^2$$

$$R_{SG} = 100 \times (\ln W_2 - \ln W_1) / t$$

$$E_F = 100 \times (W_2 - W_1) / C_d$$

$$E_A = 100 \times (C_d - F_d) / C_d$$

式中, LC_{50, 48h}, LC_{50, 24h} 分别为 48, 24h 半致死浓度, W₁ 和 W₂ 为对虾的初体质量和末体质量(干质量), C_d 为以质量表示的对虾的摄食量(干质量), F_d 为排粪量(干质量), t 为实验周期。

2 结果

2.1 急性毒性实验

结果见表 3 至表 5, 96 h 的急性毒性实验表明, 在 0.2、5 和 20 三个盐度水平, 随着二溴海因浓度的

表 3 盐度 0.2 时二溴海因(D)对凡纳滨对虾存活率(R_S)的影响(均值±标准差)

Tab.3 The effects of dimethylhydantoin (D) on the survival (R_S) of *Litopenaeus vannamei* at the salinity of 0.2‰ (Mean±SD)

D(mg/L)	R_S (%)				
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
1	100±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a
2	100±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	86.67±5.77 ^b	83.33±5.77 ^{bc}
3	100±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	96.67±5.77 ^a	80.00±0.00 ^{bcd}	70.00±10.00 ^{bcdef}
4	100±0.00 ^a	86.67±5.77 ^b	80.00±10.00 ^{bcd}	73.33±11.55 ^{bcddef}	60.00±0.00 ^{defg}
5	100±0.00 ^a	76.67±5.77 ^{bcde}	63.33±5.77 ^{cdefg}	53.33±5.77 ^{efgh}	43.33±5.77 ^{hig}
6	100±0.00 ^a	73.33±5.77 ^{bcdef}	63.33±5.77 ^{cdefg}	30.00±10.00 ^{hijk}	13.33±11.55 ^{ijkl}
7	100±0.00 ^a	50.00±10.00 ^{efgh}	40.00±10.00 ^{ghij}	10.00±10.00 ^{kl}	0.00±0.00 ^l
8	100±0.00 ^a	36.67±5.77 ^{ghijk}	20.00±10.00 ^{ijkl}	0.00±0.00 ^l	0.00±0.00 ^l
LC ₅₀ (mg/L)	-	7.49	6.26	4.78	4.26
C _s (mg/L)	1.31				

注: 表中具有不同上标字母的平均值组间差异显著($P<0.05$); 数值为 3 组对虾的平均值, 每组 10 尾; 对虾湿体质量(0.205±0.012) g

表 4 盐度 5 时二溴海因(D)对凡纳滨对虾存活率(R_S)的影响(均值±标准差)

Tab.4 The effects of dimethylhydantoin (D) on survival (R_S) of *Litopenaeus vannamei* at the salinity of 5‰ (Mean±SD)

D(mg/L)	R_S (%)				
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
2	100±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a
4	100±0.00 ^a	96.67±5.77 ^{ab}	93.33±5.77 ^{abc}	83.33±5.77 ^{cde}	70.00±10.00 ^{efg}
6	100±0.00 ^a	90.00±10.00 ^{bcd}	70.00±10.00 ^{efg}	63.33±5.77 ^{efghi}	50.00±0.00 ^{ghijk}
8	100±0.00 ^a	80.00±0.00 ^{def}	53.33±5.77 ^{ghijk}	46.67±5.77 ^{ghijk}	43.33±5.77 ^{ghijk}
10	100±0.00 ^a	66.67±5.77 ^{efgh}	53.33±5.77 ^{ghijk}	33.33±5.77 ^{ijklm}	26.67±5.77 ^{ijklm}
12	100±0.00 ^a	60.00±10.00 ^{fghi}	40.00±0.00 ^{hijkl}	23.33±11.55 ^{klm}	6.67±5.77 ^{lm}
14	100±0.00 ^a	56.67±11.55 ^{fghij}	40.00±0.00 ^{hijkl}	10.00±0.00 ^{lm}	0.00±0.00 ^m
16	100±0.00 ^a	50.00±0.00 ^{ghijk}	33.33±5.77 ^{ijklm}	0.00±0.00 ^m	0.00±0.00 ^m
LC ₅₀ (mg/L)	-	15.42	11.13	8.30	7.19
C _s (mg/L)	1.74				

注: 表中具有不同上标字母的平均值组间差异显著($P<0.05$); 数值为 3 组对虾的平均值, 每组 10 尾; 对虾湿体质量(0.218 ±0.019)g

表 5 盐度 20 时二溴海因(D)对凡纳滨对虾存活率(R_S)的影响(均值±标准差)

Tab.5 The effects of dimethylhydantoin (D) on survival (R_S) of *Litopenaeus vannamei* at the salinity of 20‰ (Mean±SD)

D(mg/L)	R_S (%)				
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
4	100±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a
7	100±0.00 ^a	86.67±5.77 ^b	83.33±5.77 ^b	83.33±5.77 ^b	80.00±0.00 ^{bc}
10	100±0.00 ^a	76.67±5.77 ^{bcd}	66.67±5.77 ^{def}	53.33±5.77 ^{fgh}	36.67±11.55 ^{hijk}
13	100±0.00 ^a	70.00±0.00 ^{cde}	46.67±5.77 ^{ghi}	33.33±5.77 ^{ijkl}	20.00±0.00 ^{klmn}
16	100±0.00 ^a	56.67±5.77 ^{efg}	40.00±0.00 ^{hij}	26.67±5.77 ^{klm}	20.00±10.00 ^{klmn}
19	100±0.00 ^a	46.67±5.77 ^{ghi}	26.67±5.77 ^{klm}	10.00±0.00 ^{mno}	0.00±0.00 ^o
22	100±0.00 ^a	36.67±5.77 ^{hijk}	16.67±5.77 ^{lmno}	0.00±0.00 ^o	0.00±0.00 ^o
25	100±0.00 ^a	23.33±5.77 ^{ijklmn}	6.67±5.77 ^{no}	0.00±0.00 ^o	0.00±0.00 ^o
LC ₅₀	-	17.92 mg/L	14.12 mg/L	12.15 mg/L	10.77 mg/L
C _s	2.63 mg/L				

注: 表中具有不同上标字母的平均值组间差异显著($P<0.05$); 数值为 3 组对虾的平均值, 每组 10 尾; 对虾湿体质量(0.225 ±0.016)g

升高, 凡纳滨对虾存活率呈下降趋势, 24、48、72 和 96 h 的 LC_{50} 分别为 7.49、6.26、4.78、4.26, 15.42、11.13、8.30、7.19, 17.92、14.12、12.15、10.77 mg/L; 二溴海因对凡纳滨对虾的安全浓度随盐度的增加呈上

升趋势, 分别为 1.31、1.74 和 2.63 mg/L。

2.2 慢性毒性实验

结果和变量分析见图 1 和表 6。在三个盐度和两

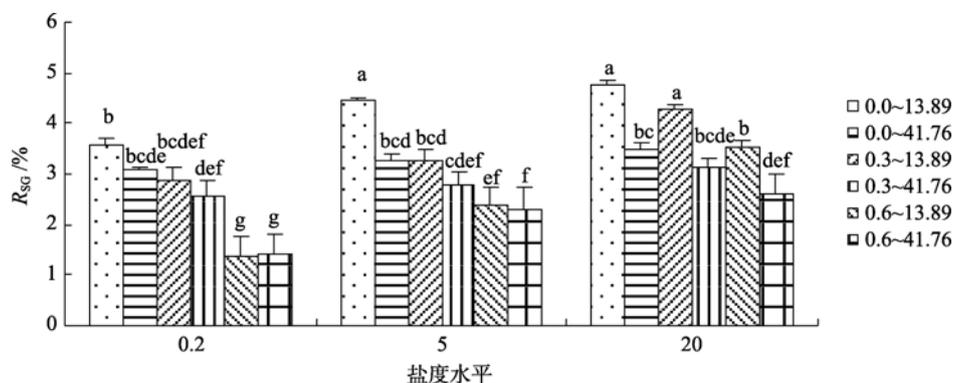


图 1 低盐度条件下, 二溴海因质量浓度(0.0、0.3 和 0.6 mg/L)和碳水化合物水平(13.89%和 41.76%)对凡纳滨对虾特定生长率(R_{SG})的影响

Fig.1 The effects of dimethylhydantoin (0.0, 0.3 and 0.6 mg/L) and dietary carbohydrate levels (13.89% and 41.76%) on the specific growth rates (R_{SG}) of *Litopenaeus vannamei* under low-salinity conditions

表 6 低盐度条件下, 二溴海因和碳水化合物对凡纳滨对虾存活、生长、摄食、转换和吸收的影响

Tab.6 The effects of dimethylhydantoin and dietary carbohydrate levels on the survival, growth, food consumption, food efficiency and absorption efficiency of *Litopenaeus vannamei* under low-salinity conditions

S	D(mg/L)	C(%)	W_I (g)	W_F (g)	R_S (%)	C_F (g)	E_F (%)	E_A (%)
0.2	0.0	13.89	0.238±0.007	2.040±0.204 ^c	86.67±11.55	3.125±0.324 ^{cd}	11.53±0.48 ^{ab}	81.49±1.18 ^a
	0.0	41.76	0.242±0.011	1.530±0.130 ^{def}	93.33±11.55	2.310±0.113 ^{de}	11.13±0.59 ^{ab}	80.30±1.31 ^a
	0.3	13.89	0.246±0.006	1.375±0.232 ^{defg}	93.33±11.55	2.426±0.559 ^{de}	9.35±0.29 ^{cde}	75.11±1.12 ^b
	0.3	41.76	0.245±0.005	1.154±0.223 ^{efg}	93.33±11.55	2.057±0.560 ^{de}	8.90±0.36 ^{def}	76.18±0.97 ^b
	0.6	13.89	0.246±0.011	0.569±0.145 ^h	86.67±11.55	0.784±0.335 ^f	8.28±0.13 ^{ef}	71.27±1.04 ^c
	0.6	41.76	0.243±0.011	0.580±0.156 ^h	86.67±11.55	0.861±0.382 ^f	7.83±0.43 ^f	72.66±0.60 ^c
5	0.0	13.89	0.244±0.004	3.518±0.119 ^b	100.00±0.00	5.561±0.171 ^b	11.78±0.54 ^a	81.40±0.78 ^a
	0.0	41.76	0.248±0.006	1.751±0.172 ^{cd}	100.00±0.00	2.703±0.460 ^{de}	11.20±0.69 ^{ab}	79.49±0.85 ^a
	0.3	13.89	0.247±0.001	1.762±0.221 ^{cd}	100.00±0.00	3.093±0.335 ^{cd}	9.77±0.45 ^{cd}	75.90±0.61 ^b
	0.3	41.76	0.242±0.006	1.303±0.195 ^{defg}	100.00±0.00	2.260±0.340 ^{de}	9.36±0.37 ^{cde}	75.36±1.39 ^b
	0.6	13.89	0.240±0.008	1.015±0.189 ^{fgh}	93.33±11.55	1.799±0.403 ^{ef}	8.59±0.44 ^{def}	72.54±0.94 ^c
	0.6	41.76	0.242±0.011	0.981±0.241 ^{gh}	100.00±0.00	1.812±0.579 ^{ef}	8.16±0.25 ^{ef}	71.35±0.76 ^c
20	0.0	13.89	0.247±0.005	4.335±0.233 ^a	100.00±0.00	6.612±0.204 ^a	12.37±0.69 ^a	80.23±1.01 ^a
	0.0	41.76	0.249±0.009	2.003±0.159 ^c	100.00±0.00	3.120±0.446 ^{cd}	11.30±0.61 ^{ab}	80.14±1.08 ^a
	0.3	13.89	0.245±0.005	3.208±0.225 ^b	93.33±11.55	5.739±0.256 ^{ab}	10.32±0.39 ^{bc}	75.60±0.98 ^b
	0.3	41.76	0.245±0.004	1.593±0.169 ^{cde}	100.00±0.00	2.775±0.382 ^{de}	9.73±0.59 ^{cd}	76.56±0.60 ^b
	0.6	13.89	0.242±0.006	2.032±0.119 ^c	86.67±11.55	3.994±0.462 ^c	9.00±0.46 ^{def}	71.30±0.79 ^c
	0.6	41.76	0.246±0.012	1.198±0.204 ^{efg}	100.00±0.00	2.321±0.560 ^{de}	8.24±0.24 ^{ef}	71.57±1.45 ^c
三因素方差分析结果(P 值)								
	S		0.000	0.288	0.000	0.036	0.175	
	D		0.000	0.998	0.000	0.000	0.000	
	C		0.000	0.537	0.000	0.167	0.044	
	S×D		0.054	0.156	0.969	0.703	0.319	
	S×C		0.000	0.645	0.000	0.252	0.204	
	D×C		0.000	0.711	0.001	0.994	0.052	
	S×D×C		0.109	0.188	0.641	0.658	0.281	

注: 同一列中具有不同上标字母的平均值组间差异显著($P < 0.05$); 数值为 3 组对虾的平均值, 每组 5 尾; S: 盐度, D: 二溴海因质量浓度, C: 碳水化合物水平, W_I : 初湿质量, W_F : 末湿质量, R_S : 存活率, C_F : 摄食量, E_F : 饲料转换效率, E_A : 吸收效率

个碳水化合物水平, 随二溴海因浓度的升高, 对虾特定生长率、摄食量、饲料转换效率和吸收效率呈下降趋势; 在三个二溴海因和两个碳水化合物水平, 随盐度的升高, 对虾特定生长率、摄食量和饲料转换效率呈上升趋势; 在 0.2 盐度和 0.6 mg/L 二溴海因水平, 摄食 13.89% 碳水化合物对虾的特定生长率和摄食量均低于摄食 41.76% 碳水化合物的对虾, 而在 5、20 盐度和 0.3、0.6 mg/L 二溴海因水平, 摄食 13.89% 碳水化合物对虾的特定生长率和摄食量均高于摄食 41.76% 碳水化合物的对虾; 总的来说, 0 mg/L 二溴海因浓度、20 盐度、摄食 13.89% 碳水化合物对虾的特定生长率和摄食量最高。

三因素方差分析表明, 盐度显著影响对虾的末湿质量、特定生长率、摄食量和饲料转换效率, 二溴海因显著影响对虾的末湿质量、特定生长率、摄食量、饲料转换效率和吸收效率, 碳水化合物显著影响对虾的末湿质量、特定生长率、摄食量和吸收效率, 盐度和二溴海因交互作用显著影响对虾的特定生长率、盐度和碳水化合物交互作用显著影响对虾的末湿质量、特定生长率和摄食量, 二溴海因和碳水化合

物交互作用显著影响对虾的末湿质量、特定生长率和摄食量 ($P < 0.05$), 而盐度、二溴海因和碳水化合物的交互作用对对虾以上各个指标的影响均不显著 ($P > 0.05$)。盐度 (S)、二溴海因质量浓度 (D) 和碳水化合物质量浓度 (C) 与凡纳滨对虾末湿质量 (W_F)、特定生长率 (R_{SG})、摄食量 (C_F)、饲料转换效率 (E_F) 和吸收效率 (E_A) 的复合关系如下:

$$W_F = 2.854 + 0.189S - 0.003S^2 - 4.526D - 0.034C - 0.002SC + 0.075DC \quad (R^2 = 0.946)$$

$$R_{SG} = 4.003 + 0.17S - 0.005S^2 - 4.217D - 0.023C - 0.002SC + 0.075SD + 0.041DC \quad (R^2 = 0.926)$$

$$C_F = 4.279 + 0.34S - 0.006S^2 - 6.391D - 0.051C - 0.004SC + 0.111DC \quad (R^2 = 0.925)$$

$$E_F = 11.652 + 0.031S - 7.879D + 4.225D^2 \quad (R^2 = 0.919)$$

$$E_A = 80.524 - 14.544D - 0.005C \quad (R^2 = 0.923)$$

2.3 免疫指标测定实验

结果和变量分析见表 7。在两个盐度和碳水化合物水平, 0 mg/L 二溴海因下对虾的酚氧化酶和超氧化物歧化酶活性高于 0.6 mg/L 二溴海因; 在两个二溴海因和碳水化合物水平, 20 盐度下对虾的酚氧化酶和超氧化物歧化酶活性高于 0.2 盐度下的活性。

表 7 低盐度条件下, 二溴海因和碳水化合物水平对凡纳滨对虾免疫的影响

Tab.7 The effects of dimethylhydantoin and dietary carbohydrate levels on the immune factors of *Litopenaeus vannamei* under the low-salinity conditions

<i>S</i>	<i>D</i>	<i>C</i>	W_1	PO(U/min)	SOD(U/mg)
0.2	0.0	13.89	8.116±0.081	0.0167±0.0011 ^{de}	204.25±7.55 ^c
	0.0	41.76	8.095±0.036	0.0157±0.0010 ^e	207.29±8.20 ^c
	0.6	13.89	8.084±0.025	0.0133±0.0009 ^f	201.02±7.17 ^c
	0.6	41.76	8.064±0.042	0.0127±0.0008 ^f	190.97±5.69 ^c
20	0.0	13.89	8.135±0.047	0.0240±0.0013 ^a	296.90±9.42 ^a
	0.0	41.76	8.071±0.041	0.0216±0.0010 ^b	309.06±4.52 ^a
	0.6	13.89	8.090±0.091	0.0187±0.0008 ^{cd}	260.21±5.47 ^b
	0.6	41.76	8.108±0.035	0.0202±0.0006 ^{bc}	268.41±9.05 ^b
三因素方差分析结果(<i>P</i> 值)					
	<i>S</i>			0.000	0.000
	<i>D</i>			0.009	0.705
	<i>C</i>			0.217	0.632
	<i>S</i> × <i>D</i>			0.063	0.012
	<i>S</i> × <i>C</i>			0.211	0.297
	<i>D</i> × <i>C</i>			0.718	0.142
	<i>S</i> × <i>D</i> × <i>C</i>			0.052	0.456

注: 同一列中具有不同上标字母的平均值组间差异显著 ($P < 0.05$); 数值为 3 组对虾的平均值, 每组 5 尾; *S* 为盐度, *D* 为二溴海因质量浓度, *C* 为碳水化合物质量浓度, W_1 为初湿质量, PO 为酚氧化酶, SOD 为超氧化物歧化酶

三因素方差分析表明, 盐度显著地影响对虾的酚氧化酶和超氧化物歧化酶活性, 二溴海因显著地

影响对虾的酚氧化酶活性, 盐度和二溴海因交互作用显著影响对虾的超氧化物歧化酶活性。盐度 (*S*)、

二溴海因质量浓度(D)和碳水化合物质量浓度(C)与凡纳滨对虾酚氧化酶(PO)和超氧化物歧化酶(SOD)的复合关系如下:

$$PO=0.0162+0.0003S-0.0054D (R^2=0.920)$$

$$SOD=200.045+5.149 S-3.231SD (R^2=0.966)$$

3 讨论

3.1 二溴海因对凡纳滨对虾生长和免疫的影响

本研究中,在0.2、5和20三个盐度水平,二溴海因对凡纳滨对虾的安全浓度以及凡纳滨对虾在24、48、72、96 h的LC₅₀(表3~表5)均显著低于二溴海因对秀丽白虾(*Palaemon modestus*)和草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)的急性毒性实验结果,其原因可能与试验对象、个体大小、发育阶段和试验条件等的不同有关^[1,3]。

关于化学消毒剂对水生动物慢性毒性的研究,王兴强等^[2]研究发现,随着ClO₂浓度的升高(0.0~0.6 mg/L),中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)存活率、特定生长率、摄食量和吸收效率均呈下降趋势,而饲料系数呈上升趋势。同样,本研究中,随二溴海因浓度的升高,凡纳滨对虾特定生长率、摄食量、饲料转换效率和吸收效率呈下降趋势(表6)。这表明,长期使用含氯或含溴类化学消毒剂可导致卤族元素在对虾体内蓄积并产生慢性毒害作用,这在鲤鱼(*Cyprinus carpio*)中也有报道^[8]。不过,二溴海因对凡纳滨对虾存活率的影响,组间差异不显著($P>0.05$,图6);而王兴强等^[2]通过慢性毒性实验研究发现,ClO₂显著影响中国明对虾的存活率。研究结果的差异,可能与凡纳滨对虾比中国明对虾对化学消毒剂有较高的耐受性有关,也可能与ClO₂比二溴海因的慢性毒性大有关。

各种水环境因子均可影响对虾酚氧化酶和超氧化物歧化酶的活性^[6,7]。当虾体受到轻度或短期逆境胁迫时,酚氧化酶和超氧化物歧化酶活性往往升高;而当受到重度或长期逆境胁迫时,酚氧化酶和超氧化物歧化酶活性通常降低^[9]。因此,酚氧化酶和超氧化物歧化酶活性在一定程度上反应了虾体的免疫机能状态。本研究中,0 mg/L二溴海因浓度下对虾的酚氧化酶和超氧化物歧化酶活性高于0.6 mg/L二溴海因浓度下的活性,作者认为这是由于对虾长期生活在含二溴海因的水体中,虾体处于应激状态,需要消耗体内较多的免疫因子,从而导致血清酚氧化酶

和超氧化物歧化酶活性降低。不过,黄彦云等^[5]研究发现,短期高浓度的二溴海因胁迫可导致凡纳滨对虾血清酚氧化酶和超氧化物歧化酶活性出现先降低后回升的趋势。这表明,对虾非特异性免疫因子的变化趋势与二溴海因胁迫的强度和um间密切相关。

3.2 盐度对凡纳滨对虾生长和免疫的影响

按照渗透调节原理,广盐性虾类在等渗点附近时代谢耗能最小,摄食、生长和转换效率最大^[10,11]。本研究也证明了这一论断。表6可以看出,随着盐度的降低,凡纳滨对虾特定生长率、摄食量和饲料转换效率呈下降趋势。

当凡纳滨对虾由海水移入低盐度水环境,其适应于海水的渗透调节机制受到抑制,而适应于淡水的调节机制被激活;但这种调节作用只能局限在一定盐度范围内,如果超越该范围则会导致虾体渗透调节失调,免疫能力下降,甚至引起大量死亡^[10]。本研究中,0.2盐度下凡纳滨对虾的酚氧化酶和超氧化物歧化酶活性均显著低于20盐度下的活性($P<0.5$,表7)。同样,Wang等^[12,13]研究发现,凡纳滨对虾和斑节对虾(*Penaeus monodon*)从盐度25转到盐度5或15的水中,对虾酚氧化酶和超氧化物歧化酶活性在12~96 h内均显著降低;Liu等^[14]在凡纳滨对虾中也得到类似的结论。作者推测,随着盐度的降低,虾体产生应激反应,可能从两条途径影响对虾免疫酶的活性:一是降低酶自身的催化效率,二是减少酶蛋白的合成。不过,有的学者研究发现,随着盐度突变值增加,对虾酚氧化酶和超氧化物歧化酶活性呈上升趋势^[7,15]。研究结果的差异,可能与由于受取血条件限制,对虾无法象其他动物那样连续取样测定,并且由于对虾体质差异较大,因而影响了对其规律性的阐明^[16]。

3.3 盐度和碳水化合物的调节作用

许多学者认为,两个或两个以上生态因子的交互作用可影响单个因子的独立效应^[17]。本研究中,盐度和二溴海因交互作用显著影响对虾的特定生长率和超氧化物歧化酶活性($P<0.05$,图1和表7)。在0.2盐度,二溴海因对对虾超氧化物歧化酶活性的影响,组间差异不显著;而在20盐度,0.6 mg/L二溴海因对对虾超氧化物歧化酶活性显著低于0 mg/L二溴海因($P<0.05$)。从表3~表5可以看出,二溴海因对凡纳滨对虾的安全浓度随盐度的增加呈上升趋势,高二溴海因浓度和低盐度胁迫的协同效应可能是造成这种

现象的原因。

碳水化合物是对虾人工配合饲料中的廉价能量物质, 通常情况下, 杂食性虾类对碳水化合物营养的适应性较好, 可以耐受较高水平的饲料碳水化合物, 碳水化合物在一定程度上具有蛋白质节约效应^[11,18]。Wang 等^[19]研究发现, 水生动物在低渗的水环境中生活会比在等渗环境中消耗更多的能量用于调节渗透压平衡; 在饲料的能值一定时, 适当多增加碳水化合物不仅可促进对虾生长又可起到饲料蛋白质节约作用。本研究中, 盐度和碳水化合物交互作用显著的影响对虾的特定生长率和摄食量($P<0.05$, 图 1 和表 6)。在 0.2 盐度水平, 摄食 13.89% 碳水化合物对虾的特定生长率与摄食 41.76% 碳水化合物的对虾组间差异不显著, 而在 20 盐度, 摄食 13.89% 碳水化合物对虾的特定生长率均显著高于摄食 41.76% 碳水化合物的对虾($P<0.05$)。摄食量也表现出同样的结果。这充分证明在低盐度养殖条件下在饲料中适量增加碳水化合物是有益的。与本研究结果类似, 黄凯等^[20]也发现在低盐度条件下凡纳滨对虾对饲料蛋白质的需求量降低, 对碳水化合物的需求量升高。

参考文献:

- [1] 徐镇, 徐如卫, 周志明, 等. 四种常用渔药对秀丽白虾的急性毒性试验[J]. 水产科学, 2005, **24**(7): 29-31.
- [2] 王兴强, 曹梅, 阎斌伦, 等. ClO_2 和碳水化合物水平对中国明对虾存活和生长的影响[J]. 海洋环境科学, 2007, **26**(2): 154-157.
- [3] 叶素兰, 余治平. 六种水产药物对草鱼鱼种的急性毒性试验[J]. 水产科学, 2007, **26**(10): 564-566.
- [4] 姜霞, 李月平, 郭金铭, 等. 二溴海因消毒剂消毒性能的试验研究[J]. 中国消毒学杂志, 2005, **22**(4): 422-424.
- [5] 黄彦云. 二溴海因对南美白对虾的毒理病理作用以及对免疫机能影响的研究[D]. 华南农业大学硕士学位论文, 2005.
- [6] Pascual C, Arena L, Cuzon G, *et al.* Effect of a size-based selection program on blood metabolites and immune response of *Litopenaeus vannamei* juveniles fed different dietary carbohydrate levels[J]. *Aquaculture*, 2004, **230**: 405-416.
- [7] 叶建生, 王兴强, 马甦, 等. 盐度突变对凡纳滨对虾非特异性免疫因子的影响[J]. 海洋水产研究, 2008, **29**(1): 38-43.
- [8] 刘永, 曹广斌, 蒋树义, 等. 溴化钠对鲤生长、甲状腺激素的影响及其在体内的蓄积[J]. 水产学报, 2004, **28**(5): 499-504.
- [9] Luciane M, Perazzolo L M. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environment and physiological stress[J]. *Aquaculture*, 2002, **214**: 19-33.
- [10] Rosas C, Cuzon G, Gaxiola G, *et al.* An energetic and conceptual model of the physiological role of dietary carbohydrates and salinity on *Litopenaeus vannamei* juveniles[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2002, **268**(1): 47-67.
- [11] Li E C, Chen L Q, Zeng C, *et al.* Growth, body composition, respiration and ambient ammonia nitrogen tolerance of the juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at different salinities[J]. *Aquaculture*, 2007, **265**(1-4): 385-390.
- [12] Wang L U, Chen J C. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* at different salinity levels[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2005, **18**(4): 269-278.
- [13] Wang F I, Chen J C. Effect of salinity on the immune response of tiger shrimp *Penaeus monodon* and its susceptibility to *Photobacterium damsela* subsp. *damselae*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006, **20**(5): 671-681.
- [14] Liu Y, Wang W N, Wang An L, *et al.* Effects of dietary vitamin E supplementation on antioxidant enzyme activities in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) exposed to acute salinity changes[J]. *Aquaculture*, 2007, **265**(1-4): 351-358.
- [15] Li E C, Chen L Q, Zeng C, *et al.* Comparison of digestive and antioxidant enzymes activities, haemolymph oxyhemocyanin contents and hepatopancreas histology of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at various salinities. *Aquaculture*, 2008, **274**(1): 80-86.
- [16] 丁焯, 王雷, 李光友. 中国对虾复合疫苗的初步研究[J]. 海洋与湖沼, 1999, **30**(4): 355-361.
- [17] Gallin R B. Effects of salinity and temperature on survival and behavior of two sympatric species of grass shrimp, *Palaemonetes pugio* and *Palaemonetes vulgaris*, and implications of these effects on their distribution[D]. **Ph.D. Dissertation Abstracts International**, 2001, **62-11**(B): 4 895.
- [18] Dokken Q R. Effects of varying of dietary macronutrient and energy ratios on growth and survival of *Penaeus vannamei* and *Penaeus setiferus*[D]. **Dissertation Abstracts International Part B: Science and Engineering**, 1987, **48**(6): 1 559.
- [19] Wang X Q, Ma S, Dong S L. Effects of salinity and dietary carbohydrate levels on growth and energy budget of juvenile *Litopenaeus vannamei*[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2004, **23**(1): 231-236.
- [20] 黄凯, 王武, 卢洁. 南美白对虾幼虾饲料蛋白质的需要量[J]. 中国水产科学, 2003, **10**(4): 318-324.

(下转 44 页)