

有机污染对中国对虾体内外环境 影响的研究*

丁美丽 林 林 李光友 朱谨钊

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

摘要 于1994—1995年分二批以人工配合饵料作为有机污染源, 进行有机污染对中国对虾体内外环境影响的研究。结果表明: 1. 经10d, 试验池水中DO含量明显降低, 而COD、 $\text{NH}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 等迅速增加, 分别是对照池的2.5, 2.1, 11.3倍; H_2S 含量经28d后为对照组2.1倍; 同时, 试验组各菌群的密度也分别比对照组增加2—3个数量级。2. 试验组虾的超氧化物歧化酶、酚氧化酶及溶菌酶的活性比对照组显著下降。3. 病理切片观察表明, 试验池虾的肝胰腺、鳃、中肠等处有明显病变, 且肝胰腺中细小样病毒包涵体增多, 而对照池情况与本底近似。上述结果表明, 养殖水体有机污染引起水质恶化, 使虾体内与抗病有关酶的活性下降, 促使疾病发生。

关键词 中国对虾 有机污染 内环境 免疫水平

近年来虾病暴发, 许多学者已注意到与环境有关(张金城, 1994; 岑丰, 1994)。在我国对虾养殖环境中有机污染是普遍存在的, 是主要污染源。因此深入开展有机污染对养殖环境质量的影响, 以及环境恶化对虾体内环境的影响是防治对虾病害的重要问题。在对虾养殖过程中, 有机污染主要是投饵过多而造成的(陈于望, 1991), 有关残饵过多引起水质变化已有零星资料(许金树等, 1991; 陈于望, 1991), 但水环境的恶化又通过什么途径引起虾体内环境的变化, 迄今尚未见报道。本研究以中国对虾为材料, 选用残饵作为污染源, 以养殖水体中几个主要理化和微生物因子作为外环境指标, 并选用几个重要酶的活性变化作为虾体内环境变化的主要指标, 进行有机污染对虾体内外环境影响的研究, 以期能对有机污染导致对虾病害暴发有进一步的认识。

1 材料与方法

1.1 试验对虾

试验于1994—1995年进行。中国对虾(*Penaeus chinensis*), 第一批试验材料由本所开放实验室提供12条, 平均体长5cm。这批虾肝胰腺上皮细胞有少量细小样病毒感染, 但无明显发病迹象。第二批试验材料系青岛市上马镇对虾养殖场提供的越冬亲虾, 平均体长12cm。

*国家攀登计划B资助项目, PDB-6-7-2。丁美丽, 女, 出生于1935年3月, 研究员。

在组织病理学方面承蒙王文兴教授赐教, 谨志谢忱。

收稿日期: 1995年11月25日, 接受日期: 1996年5月22日。

1.2 试验用海水与饵料

取自本所经沉淀、过滤的海水。所用饵料由青岛上马镇对虾养殖场提供。

1.3 试验方法

二批试验都在 0.24m^3 水体长方形水泥池中进行。第一批试验是在 1994 年 8 月 22 日—9 月 21 日进行的, 每池放养 5cm 左右中国对虾 12 尾, 试验温度为 $29-22\text{ }^\circ\text{C}$ 。第二批试验于 1995 年 4 月 4 日—4 月 19 日进行, 放养 12cm 左右亲虾 5 尾, 温度为 $28\text{ }^\circ\text{C}$ 左右。每批试验设试验池和对照池各一个, 通气, 日投饵早、晚各一次, 每天换水。试验池与对照池不同之处是: 前者投饵量为后者的 2 倍, 不吸底, 并定期取表层水样, 作理化及微生物因子分析。在试验结束前各池均取样, 测定、分析虾体内一些酶的活性, 并作病理切片观察病理变化。

1.3.1 水质理化因子的测定

DO, 用碘量法; COD, 用碱性高锰酸钾法; $\text{NO}_2\text{-N}$, 用萘乙二胺分光光度法; 氨氮, 用次溴酸盐氧化法; H_2S , 用对氨基二甲基苯胺比色法定量测定; 定性检测是采用“醋酸铅滤纸条”法。

1.3.2 微生物因子测定

选用 MPN 三管法检测总异养、弧菌、硫酸盐还原菌、氨化细菌及产 H_2S 细菌的菌量。弧菌用 TCBS 培养基。硫酸盐还原菌培养基: 乳酸钠 5ml; Na_2SO_4 , 0.5g; NH_4Cl , 1g; CaCl_2 , 0.1g; K_2HPO_4 , 0.5g; MgSO_4 , 2g; 硫酸亚铁铵, 0.5g; 酵母膏, 1g; 陈海水, 1000ml; pH=7.4。总异养菌、氨化细菌、产 H_2S 细菌培养基: 蛋白胨, 8g; 胱氨酸, 0.1g; Na_2SO_4 , 0.1g; 牛肉膏, 5g; 酵母膏, 1g; 陈海水, 1000ml; pH=7.4; 用醋酸铅试纸和红石蕊试纸分别测定产 H_2S 细菌与氨化细菌。

1.4 酶活性测定

从中国对虾心脏取血, 置于 Eppendorf 管中于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 过夜, 将析出的蓝色血清倾出, 作测定用。肝胰腺或肌肉匀浆: 取每组中国对虾各 3 尾, 取肝胰腺或肌肉称重, 加磷酸盐缓冲液, 匀浆, 在 $0\text{ }^\circ\text{C}$ 下以 $10\ 000\text{r}/\text{min}$ 速度离心 15min。取上清液作为粗酶液进行各项测定。

溶菌活力测定, 按 Hultmark 等(转引自王雷, 1995)的方法进行测定。超氧化物歧化酶(SOD)活力测定; 参照邓碧玉等(1991)改良的连苯三酚自氧化法。酚氧化酶(PO)活力测定, 以 L-dopa 为底物比色法测定。

1.5 组织病理观察

取中国对虾待测组织, 经 Davidson 液固定、包埋、切片、染色, 光镜检查。

2 结果

2.1 饵料对水体生态环境的影响

结果表明, 在试验过程中, 水体中 COD, $\text{NH}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$ 含量, 试验池比对照池显著提高, DO 减少, 见表 1。试验进行至第 10 天, 试验池中上述三项浓度分别比本底提高 2.1, 36.0 与 127.6 倍, 比对照池分别高 2.5, 2.1 和 11.3 倍; 而对照池 COD 一直波动在本底水平, $\text{NH}_3\text{-N}$ 与 $\text{NO}_2\text{-N}$ 分别提高 16.3 和 10.4 倍。经 28d 试验池 H_2S 含量为对照池 2.1 倍。二组虽都连续通气, 对照组溶氧始终波动在本底水平, 稍有上升, 而

试验组在逐步下降。

微生物丰度随着试验进程, 试验池中各类菌群量迅速增加, 经 10d 后总异养菌、弧菌、硫酸盐还原菌、氨化细菌及产 H_2S 细菌分别比本底增加了 2—6 个数量级, 比同期对照池分别增加 2—3 个数量级, 见表 2。表明在有机污染情况下, 虾池生态因子发生一系列变化, 水质恶化。

表 1 有机污染对水质理化因子的影响结果(第一批试验)(mg/L)

Tab.1 Effects of organic pollution on aquatic physicochemical factors (1st group test)(mg/L)

日期 (年.月.日)	水温 (°C)	COD		DO		pH		NH ₃ -N		NO ₂ -N		H ₂ S	
		试验组	对照组	试验组	对照组	试验组	对照组	试验组	对照组	试验组	对照组	试验组	对照组
1994.08.22	27.0	3.702	3.702	6.976	6.976	8.2	8.2	0.042	0.042	0.005	0.005	- ²⁾	-
08.27	26.8	5.841	3.537	5.762	7.198								
09.01	26.8	7.713	3.036	5.951	6.676	7.6	8.0	1.554	0.728	0.643	0.057	+ ³⁾	-
09.12	22.5	7.220	2.297										
09.19	22.5	5.099	1.645	5.707	7.092	7.6	8.0	2.618	0.588	0.068	0.006	0.515	0.240

1) 上午 09:00 测定(表 2 同); 2) 定性测定未检出; 3) 定性测定为阳性。

表 2 有机污染对水体微生物因子的影响结果(第一批试验)(cell/ml)

Tab.2 Effects of organic pollution on aquatic microbiological factors (1st group test)(cell/ml)

日期 (年.月.日)	水温 (°C)	总异养菌		弧菌		氨化细菌		产 H_2S 细菌		硫酸盐还原菌	
		试验组	对照组								
1994.08.22	27.0	1.9×10^4	1.9×10^4	9.0×10^3	9.0×10^3	3.0×10^2	3.0×10^2	3.0×10^2	3.0×10^2	1.8×10^3	1.8×10^3
08.26	26.8	5.0×10^3	2.8×10^3	1.8×10^3	5.0×10^2	9.0×10^2	3.0×10^4	9.0×10^2	1.5×10^4	5.0×10^4	1.9×10^2
09.01	26.8	5.0×10^4	5.0×10^3	5.0×10^3	8.0×10^3	5.0×10^3	5.0×10^3	5.0×10^4	5.0×10^3	5.0×10^3	1.8×10^3
09.19	22.5	9.0×10^3	5.0×10^4	5.0×10^3	1.9×10^3	1.9×10^3	5.0×10^4	1.9×10^3	5.0×10^4	5.0×10^3	5.0×10^3

2.2 溶菌酶、PO 及 SOD 活力的测定结果

二批试验结果基本一致, 列于表 3。试验池同对照池相比, 溶菌酶活性下降 26%—86%, PO 下降 53%, SOD 下降 25%。表明生长在过量残饵环境中的中国对虾, 无论是 5cm 的虾还是亲虾, 它们的一些酶活性都显著下降。此外, 还取上马镇对虾养殖场虾池中健康虾与病虾分析了 PO、溶菌酶及血细胞数, 结果表明健康虾的分别为 1.23, 0.11 及 $2.3 \times 10^6 \text{cell/cm}^3$; 病虾的为 0.86, 0.04 及 $1.15 \times 10^6 \text{cell/cm}^3$, 后者也都明显低于前者。

2.3 组织病理变化

第一批试验进行到第 14 天, 试验组中国对虾肝胰腺外膜大部变白, 而对照组未见

表 3 有机污染对中国对虾 PO, SOD 及溶菌酶活力的影响

Tab.3 Effect of organic pollution on *P. chinensis* PO, SOD and lysozyme activities

组别	PO 活力	SOD 活力	溶菌酶活力
试验组	2.66	113.902	0.0150 — 0.0769
对照组	5.68	151.870	0.1042 — 0.1110

变化。第 28 天取中国对虾经组织切片、镜检,观察到试验组的肝胰腺上皮细胞内细小样病毒形成的核内包涵体(图版 I:1 箭头所示)数量比本底增加近一倍,且部分肝胰腺有坏死和融合现象;而对照组中国对虾的肝胰腺内细小样病毒包涵体的数量,同本底相近。试验组中国对虾步足周围和鳃部发现有大量原生动物附生(图版 I:2—3 箭头所示);对照组的中国对虾仅在鳃盖下发现有少量原生动物。第二批试验经 15d 后,试验虾鳃部有严重炎症,有的鳃丝完全坏死;对照虾的鳃部仅有部分角质层增厚。(图版 I:4—5) 试验组的中国对虾的中肠粘膜上皮细胞大量坏死、脱落;而对照组仅在肠壁处发现有轻微炎症。(图版 I:6—7, 箭头所示)

上述结果表明:试验组虾与对照组的相比,不仅三种酶活性明显下降,并且在虾体组织中也有病理变化。

3 讨论与结语

3.1 SOD 活性对疾病发生的影响

对虾疾病发生是由病原体、虾体及环境三者共同作用的结果。没有病原体存在,生物性疾病当然不会发生,但有病原体存在时,虾病也不一定发生,要视病原体数量及致病能力,还取决于虾体抗病力及环境因素。其中环境因素起着重要作用,它不仅影响虾体抗病能力也影响病原体数量。因此生活在有污染物的胁迫环境中,虾体往往容易患病。目前有许多学者用自由基伤害来阐明污染对生物的伤害进而导致疾病发生(Malins et al., 1983; 李永祺等, 1991; 唐学玺等, 1995; Zhou et al., 1995)。健康的生物体,其内环境中自由基的产生与消除处于动态平衡。有些酶主要是 SOD 具有消除自由基的功能,当 SOD 酶活性降低时,生物体内会出现自由基量过多,势必扰乱、破坏一些体内重要生化过程,导致代谢混乱、正常生理功能失调、体内免疫水平下降、潜在的病原被激活,许多疾病也逐步产生和形成(Chung, 1992; Max, 1987)。上述机理的阐明适于本研究中国对虾致病原因的解释。

3.2 PO 等酶活性对疾病发生的影响

另外一些酶活性,对疾病发生也有密切关系,如 PO 与中国对虾血细胞吞噬、包裹,血淋巴抗菌活性以及外源物质的识别有密切关系(Söderhäll, 1982)。它在整个防御机制全面启动中起着关键作用(宋宏红等, 1995)。溶菌酶能水解微生物细胞壁中粘多糖,而破坏细胞结构。这些酶的活性的强弱,反映出虾体抵御疾病能力的高低。

本试验结果也符合上述情况。在中国对虾外环境中,由于残饵不断积累,促使各类微生物大量繁殖,包括病原微生物,微生物代谢活动不仅消耗大量溶氧,也产生许多有

毒物质等, 导致外环境恶化。本研究表明, 生活在这样污染压力下的中国对虾受多种因子综合影响, 特别是 $\text{NH}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$ 和 H_2S 浓度显著提高, 促使体内一些重要酶活性如 SOD, PO 及溶菌酶明显下降, 致使虾体抗疾病能力降低。因此, 在降低了上述几种酶活性的虾体中有明显病变出现, 肝胰腺部分坏死或鳃部、中肠严重炎症。而对照池虾, 水环境中理、化及微生物因子变化远远低于试验池, 因而三种酶活性仍维持在正常水平, 各组织没有明显病变发生。表明在适宜养殖条件下, 中国对虾内外环境不会发生明显变化, 疾病一般也不易发生。因此, 采取有效措施, 改善养殖环境, 消除有机污染是目前防止中国对虾疾病发生的重要途径。

参 考 文 献

- 王雷等, 1995, 海洋与湖沼, 26(2): 179 — 185.
- 许金树等, 1991, 海洋与湖沼, 22(4): 384 — 388.
- 岑丰, 1994, 中国水产, 12: 35.
- 李永祺等, 1991, 海洋污染生物学, 海洋出版社(北京), 305 — 309.
- 宋宏红等, 1995, 养鱼世界(台), 2: 22 — 28.
- 陈于望等, 1989, 台湾海峡, 8(1): 30 — 34.
- 张金城, 1994, 中国水产, 2: 6.
- 郑碧玉等, 1991, 生物化学与生物物理进展, 18(2): 163.
- 唐学玺等, 1995, 海洋通报, 14(2): 29 — 34.
- Chung, M. H. et al., 1992, *Free Radic. Biol. Med.*, 12(6): 523.
- Malins, D. C. et al., 1983, *Environ. Sci. Technol.*, 17: 679 — 685.
- Max, J. L., 1987, *Science*, 235(4 788): 529 — 531.
- Söderhäll, K., 1982, *Dev. Comp. Immunol.*, 6: 601 — 611.
- Zhou Zhigang et al., 1995, *J. Phycol. Supp.*, 31(3): 17.

EFFECTS OF ORGANIC POLLUTION ON *PENAEUS CHINENSIS* BODY'S INTRAEENVIRONMENT AND EXTERNAENVIRONMENT

Ding Meili, Lin Lin, Li Guangyiqu, Zhu Jinzhao

(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071)

Abstract *P. chinensis* from the Institute of Oceanology and from the Prawn Farm of Shangma County, Qingdao, were used in 1994 — 1995 experiments using excessive artificial diets as organic pollutants. Twelve about 5 cm body length or 5 about 12 cm body length *P. chinensis* were put into the test pond and control pond. Diet amount supplied to the test pond was twice that of the control pond whose bottom was cleaned everyday. Other culture conditions of the two ponds were the same. Various physicochemical and microbiological factors were examined regularly. The lysozyme, SOD, PO activities and histopathological changes of the two shrimp groups were compared. The results were as follows.

1. In 10 days, the test pond's DO content decreased strikingly; its COD, $\text{NH}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$ contents increased rapidly and were 2.5, 2.1, 11.3 time that of the control pond respectively. (Tab.1) After 28 days, the test pond H_2S content was 2.1 time that of the control pond; the microbiological contents increased greatly and were more than that of the control pond by 2—3 orders of magnitude. (Tab.2)

2. The lysozyme, SOD and PO activities of the test pond decreased in varying degrees compared with those of the control pond. (Tab.3)

3. Light microscope examination showed the test pond shrimp had much more Hepatopancreatic Parvo-like Virus (HPV) occlusion bodies, and serious pathological changes in the hepatopancreas, gill and midguts, while the microphotos of the body parts of the control pond shrimp before and sometime after experiments were almost the same. (Plate 1)

The following conclusion could be drawn: organic pollution affects aquatic environment. The $\text{NH}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$ and H_2S contents especially increased markedly, changes the shrimp's intraenvironment, decreases its immune level, and may induce disease.

Key words *Penaeus chinensis* Organic pollution Intraenvironment Immune level