

双齿围沙蚕与赤子爱胜蚓对凡纳滨对虾生长和免疫指标的影响

刘石林^{1,2}, 刘 鹰¹, 杨红生¹, 游 奎^{1,2}, 陈基雁^{1,2}, 俞立东¹

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100039)

摘要:以鲜活饵料双齿围沙蚕(*Perinereis aibuhitensis*)、赤子爱胜蚓(*Eisenia foetida*)和人工配合饵料投喂凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*),并测定各种饵料对其生长和免疫指标的影响。结果表明,沙蚕和蚯蚓单独投喂或与人工配合饵料配合投喂都可显著提高凡纳滨对虾的生长速率,但用沙蚕单独投喂的对虾成活率较低。蚯蚓与人工配合饵料配合投喂可显著提高对虾血清中抗菌活力、溶菌活力、酚氧化酶活力和血细胞数量;蚯蚓单独投喂可显著提高血清中抗菌活力、酚氧化酶活力和血细胞数量,对血清中溶菌活力作用不明显。沙蚕与人工配合饵料配合投喂可显著提高对虾血清中抗菌和溶菌活力,但对血清中酚氧化酶活力和血细胞数量变化作用不明显;单独投喂沙蚕对所测各项免疫指标影响均不显著。研究结果证实:利用蚯蚓和沙蚕可显著提高对虾的生长速率,但蚯蚓的饵料效果优于沙蚕。[中国水产科学,2006,13(4):561-565]

关键词:凡纳滨对虾;沙蚕;蚯蚓;生长;免疫

中图分类号:S963.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2006)04-0561-05

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)因其适应性广、抗病力强等优点,已成为中国的主要养殖品种之一。但是,由于利益驱使,养殖密度过高,致使环境恶化,造成了对虾生长缓慢、免疫力下降,以至于病害肆虐。工程化养殖因易于调控环境,隔断病原传播途径,高密度精养等优点,是实现水产养殖业可持续发展的的重要途径之一,已在全国各地推广应用^[1-4]。然而,相对于池塘养殖生态系统,工程化养殖缺少食物链的完整结构,对虾缺少鲜活饵料的摄入,生长速度明显慢于野外池塘养殖,特别是当对虾生长到体长5.0~6.0 cm以后,不但生长缓慢,且易发病死亡^[1]。为了促进对虾生长,提高其免疫力,国内外已开展了大量的研究工作^[1-7],但关于鲜活饵料对凡纳滨对虾生长与免疫力影响方面的研究很少。蚯蚓不仅营养成分含量高,还因其特殊的生活环境造成了体内抗逆性成分含量也很高^[8],备受世人关注,已在医药、保健和环保等方面广泛应用。沙蚕也因其营养丰富,体内含有消毒作用的沙蚕毒素而在动物营养和农药方面应用广泛。为优化工程化养殖系统,弥补其中鲜活饵料的不足,提高工程化养殖系统的生产力,本实验选择赤子爱胜蚓

(*Eisenia foetida*)和双齿围沙蚕(*Perinereis aibuhitensis*)作为鲜活饵料,并以人工配合饵料作对照,研究它们对凡纳滨对虾生长和免疫指标的影响,以期对对虾工程化养殖提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

实验于2004年11月13日至12月28日在中国科学院海洋研究所海洋生态与环境科学重点实验室进行,实验水温(24 ± 1)℃,盐度30。凡纳滨对虾取自室内工程化养殖水泥池,体质量(6.03 ± 0.55)g,具有明显的白斑综合症特征,体表黑斑明显,断须率90%以上。人工配合饵料由中国科学院海洋研究所提供;双齿围沙蚕购于青岛水产品市场,赤子爱胜蚓采自青岛胜利桥附近,投喂前都用(6.33×10^{-5})mol/L的高锰酸钾溶液浸泡消毒30 min,使沙蚕和蚯蚓吐出体内污物。大肠杆菌(*E. coli*)DH5 α 由青岛市进出口检验检疫局提供,溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*)AS1.634冻干粉购于中国科学院微生物所菌种中心,LB固体培养基于37℃下活化培养。

收稿日期:2005-10-14; 修订日期:2006-01-17.

基金项目:中国科学院知识创新工程重要方向项目(ZKXC2-211),中国科学院海洋研究所知识创新项目(LA00223108)。

作者简介:刘石林(1977-),硕士研究生,主要从事海水养殖生态学的研究工作。E-mail:shiliu@ms.qdio.ac.cn

通讯作者:杨红生。E-mail:hsyang@ms.qdio.ac.cn

1.2 实验设计

实验共设5组,对照组A:只投喂人工配合饵料;实验组B:每日沙蚕和人工配合饵料各投喂1次;实验组C:只投喂沙蚕;实验组D:每日投喂蚯蚓和人工配合饵料各1次;实验组E:只投喂蚯蚓,每组设3个重复。实验前将对虾移入装有40 L海水的塑料水桶内,每桶放养20尾,投喂人工配合饵料,驯化7 d。实验期间,每天8:00和20:00按上述各组饵料组合过量投喂,蚯蚓整条投喂,根据沙蚕个体大小分成2~3段投喂,3 h后吸出残饵及粪便,日换水2次,每次换出1/3,连续充气,使溶解氧保持在5.0 mg/L以上。

1.3 血清制备

投喂45 d后,每个重复随机取6尾对虾,预先在1 mL一次性无菌注射器中吸入已灭菌预冷的虾血抗凝剂(NaCl 450 mmol/L; KCl 10 mmol/L; EDTA·Na₂ 10 mmol/L; HEPES 10 mmol/L; pH 7.45)^[9],从对虾腹部血窦抽血,抗凝剂与虾血体积比为1:1,注入1.5 mL无菌离心管内,4℃冷藏过夜,3 000 r/min冷冻离心6 min,取出上层血清用于各项免疫指标测定。

1.4 指标的测定

1.4.1 特定生长率 检测特定生长率(Specific growth rate, SGR)按下列公式计算:

$$\text{SGR}(\% \text{ d}^{-1}) = 100(\ln W_t - \ln W_0)/T$$

式中, W_0 和 W_t 分别为实验开始和结束时对虾湿体质量, T 为2次测定期间间隔的天数。

1.4.2 水解氨基酸组成测定 饵料蛋白质氨基酸组成采用盐酸水解法测定。分别取经105℃烘干的人工饵料、沙蚕、蚯蚓各30 mg放入安培瓶中,加入10 mL 6 mol/L的盐酸溶液,充氮气,封管,110℃水解24 h,之后过滤,去酸,用0.02 mol/L的盐酸定容为20 mL,定容液上日立835-50型氨基酸自动分析仪测定。

1.4.3 免疫指标的测定

(1)血清抗菌活力的测定 以大肠杆菌为底物,采用Hultmark等^[10]和王雷等^[11]的方法进行。将底物用0.1 mol/L, pH 6.4的磷酸钾盐缓冲液从固

体斜面上将菌洗下,配成一定浓度的悬液($\text{OD}_{570} = 0.3 \sim 0.5$)。取3 mL该悬液与50 μL 待测血清在试管中混匀(冰浴条件),570 nm下测 A_0 值。然后将试管置37℃水浴中保温30 min,取出后立即置冰浴中10 min以终止反应,570 nm下测其 A 值。抗菌活力 U_a 按 $[(A_0 - A)/A]^{1/2}$ 式计算。

(2)血清溶菌活力的测定 以溶壁微球菌为底物,采用Hultmark等^[10]和王雷等^[11]改进的方法进行。将底物用0.1 mol/L, pH 6.4的磷酸钾盐缓冲液配成一定浓度的悬液($\text{OD}_{570} \approx 0.3$)。取3 mL该悬液与50 μL 待测血清在试管中混匀(冰浴条件),570 nm下测 A_0 值。然后将试管置37℃水浴中保温30 min,取出后立即置冰浴中10 min以终止反应,570 nm下测 A 值。溶菌活力 U_L 按 $(A_0 - A)/A$ 式计算。

(3)酚氧化酶活力的测定 以L-dopa为底物,参照Ashida^[12]的方法进行。将3 mL 0.1 mol/L, pH 6.0的磷酸钾盐缓冲液与100 μL 的底物及100 μL 血清于室温下混匀,每隔2 min读取在490 nm波长下的光密度值,以 OD_{490} 对反应时间(min)作图,酶活力以实验条件下每分钟 OD_{490} 增加0.001为1个酶活力单位(U)。

(4)血细胞计数 采用1 mL一次性无菌注射器从对虾腹部血窦取血,以10%福尔马林作固定液(固定液、抗凝剂、血液的体积比为1:1:1),混匀,血球计数板计数。

2 结果

2.1 生长指标

由表1可见,实验结束时,各实验组对虾体质量显著高于对照组A组对虾体质量,D组和E组对虾体质量高于B组和C组,且E组对虾体质量显著高于B组和C组;C组对虾体质量又显著低于其他各实验组。对虾成活率:各实验组对虾成活率与对照组差异不明显,但实验组D组和E组对虾成活率最高,且显著高于C组对虾成活率,与B组差异不明显。对虾的表现特征:除对照组A和实验组C外,对虾体表黑斑消失,洁净透亮,触须完整。

表1 对虾的生长与成活率测定结果

Tab.1 Average weight and the survival rate of *L. vannamei* $(\bar{X} \pm SD; n=20)$

项目 Item	组别 Group				
	A(Con.)	B	C	D	E
成活率/% Survival rate	72 ± 12 ^{ab}	65 ± 9 ^{ab}	58 ± 3 ^a	77 ± 8 ^b	77 ± 14 ^b
初体质量/g Initial body weight	5.95 ± 0.88 ^a	6.05 ± 0.88 ^a	6.14 ± 0.99 ^a	5.96 ± 0.87 ^a	6.02 ± 0.97 ^a
末体质量/g Final body weight	6.34 ± 1.08 ^a	8.17 ± 0.28 ^b	7.23 ± 0.56 ^c	8.54 ± 0.93 ^{bd}	9.37 ± 1.07 ^d
SGR/%d ⁻¹	11 ± 7 ^a	68 ± 11 ^b	35 ± 23 ^c	93 ± 13 ^{bd}	103 ± 12 ^d

注:同一行中不同上标为差异显著($P < 0.05$).Note: The different letters in the same line show significant difference($P < 0.05$).

由表2可以看出,沙蚕和蚯蚓水解氨基酸总量以及其中的总必需氨基酸(Thr、Val、Met、Ile、Leu、Phe、Lys、His、Arg)、总鲜味氨基酸(Ser、Glu、Gly、Ala、Pro)的含量都显著高于人工配合饲料,而蚯蚓这3类氨基酸的含量又分别高出沙蚕12.5%、11.7%、13.9%。

2.2 免疫指标

2.2.1 抗菌活力 各实验组(B、C、D、E)对虾的血清抗菌活力均高于对照组A,且除C组外都达到了显著水平,B组、D组和E组相互之间对虾血清抗菌活力差异不显著(表3)。

表2 蚯蚓、沙蚕和人工配合饲料的氨基酸组成(mg/100 mg)

Tab.2 Compositions of amino acid in the earthworm, lobworm and formulated diet

氨基酸 Amino acid	人工饲料 Formulated diet	沙蚕 Lobworm	蚯蚓 Earthworm	氨基酸 Amino acid	人工饲料 Formulated diet	沙蚕 Lobworm	蚯蚓 Earthworm
苏氨酸 Thr	1.31	2.75	3.26	天冬氨酸 Asp	3.91	6.71	7.02
缬氨酸 Val	1.94	3.07	3.60	甘氨酸 Gly	2.21	3.61	3.64
蛋氨酸 Met	0.71	1.72	1.60	丙氨酸 Ala	1.94	4.62	7.03
异亮氨酸 Ile	1.53	2.99	3.35	脯氨酸 Pro	1.09	2.26	2.45
亮氨酸 Leu	2.98	5.30	6.21	胱氨酸 Cys	0.35	0.58	0.62
苯丙氨酸 Phe	1.89	2.77	2.93	酪氨酸 Tyr	1.03	2.11	2.25
赖氨酸 Lys	1.72	4.17	4.72	谷氨酸 Glu	7.38	10.46	11.02
氨 NH ₃	1.19	1.03	1.12	氨基酸总量	35.67	61.59	69.31
组氨酸 His	0.76	1.27	1.56	总必需氨基酸	15.99	28.66	32.00
精氨酸 Arg	3.15	4.62	4.77	总鲜味氨基酸	18.30	30.24	34.44
丝氨酸 Ser	1.77	2.58	3.28	总促摄食氨基酸	4.64	9.50	9.96

表3 对虾血清中抗菌活力、溶菌活力、酚氧化酶活力和血液中血细胞数量的测定结果

Tab.3 Activities of antibacterial, bacteriolytic, phenoloxidase in the haemolymph and the total hemocyte count of *L. vannamei* in different treatments $\bar{X} \pm SD; n=18$

分组 Group	抗菌活力/ U_a Antibacterial activity	溶菌活力/ U_L Bacteriolytic activity	酚氧化酶活力/ U Phenoloxidase activity	血细胞数量/ $(\times 10^4 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1})$ Total hemocyte count (THC)
A(Con.)	0.190 ± 0.008 ^a	0.065 ± 0.013 ^a	1.54 ± 0.15 ^a	1 550 ± 341 ^a
B	0.310 ± 0.049 ^b	0.135 ± 0.012 ^b	1.95 ± 0.28 ^{ab}	1 547 ± 379 ^a
C	0.246 ± 0.043 ^{ab}	0.067 ± 0.027 ^a	1.61 ± 0.31 ^{ab}	1 155 ± 293 ^b
D	0.319 ± 0.013 ^b	0.156 ± 0.021 ^b	2.47 ± 0.55 ^{bc}	1 986 ± 334 ^c
E	0.286 ± 0.051 ^b	0.096 ± 0.013 ^a	2.75 ± 0.61 ^c	2 234 ± 249 ^c

注:同一栏中不同上标为差异显著($P < 0.05$).Note: The different letters in the same column show significant difference($P < 0.05$).

2.2.2 溶菌活力 B组与D组对虾的血清溶菌活力显著高于A组、C组和E组的溶菌活力,B组和D组之间与A组、C组和E组之间差异不显著(表3)。

2.2.3 酚氧化酶活力 D组和E组对虾的血清酚氧化酶活力显著高于A组,B组和C组对虾的血清酚氧化酶活力与A组差异不显著;D组和E组对虾的血清酚氧化酶活力高于B组和C组,且E组相对于C组达到了显著水平(表3)。

2.2.4 血细胞数量 D组和E组对虾的血细胞数量显著高于A、B、C组;C组最低,且与其他组差异显著(表3)。

3 讨论

3.1 不同饵料对凡纳滨对虾生长和成活率的影响

对虾生长的测定结果表明(表1),投喂鲜活饵料的对虾生长速率显著快于单独投喂人工配合饵料的对虾,而投喂蚯蚓的对虾生长速率又快于投喂沙蚕的对虾。原因可能有:(1)蚯蚓营养丰富,其总的必需氨基酸、鲜味氨基酸和促摄食氨基酸含量都远高于人工配合饵料,略高于沙蚕(表2);(2)对虾喜食蚯蚓,陆生蚯蚓被投入海水中后受到刺激,活动强度大于被切断的沙蚕,更容易引起对虾的注意而被摄食。

从对虾的成活率看,各实验组的对虾成活率与对照组相比差异均不显著,但蚯蚓相对于沙蚕,蚯蚓单独投喂或与人工饵料配合投喂均可提高对虾的成活率,且显著高于沙蚕单独投喂时的成活率,其原因可能是:沙蚕虽经高锰酸钾溶液消毒但难以彻底,与对虾之间存在交叉感染;而陆生蚯蚓由于与对虾的栖息环境不同,交叉感染的概率很低,作为饵料的安全系数也相对较高。

目前关于鲜活饵料对对虾生长的影响已有报道。张明凤等^[13]以蚊子幼虫投喂日本对虾的研究结果表明,日本对虾喜食蚊子幼虫,且长势良好;王持^[1]的研究表明,以蚯蚓为鲜活饵料投喂亲虾,可提高亲虾成活率、产卵量和卵的孵化率;碳的同位素实验测定结果也表明,在对虾半精养体系中,天然饵料占对虾生长所消耗饵料的60%~70%,配合饵料不超过30%~40%^[14]。因而,天然饵料在对虾养殖中的作用是不可忽视的。沙蚕作为一种对虾养殖中较理想的大型活体饵料生物,已用于亲虾的培育

方面。蚯蚓在地球上分布广、数量多、营养丰富,含有10种人体必需的氨基酸和多种不饱和脂肪酸^[15-16],已成为许多国家开辟蛋白饲料的新来源,但作为一种水生生物的活体饵料生物还没有得到广泛应用。

3.2 不同饵料对凡纳滨对虾免疫指标的影响

从免疫指标的测定结果看,蚯蚓与人工配合饵料配合投喂可有效提高血清中抗菌活力、溶菌活力、酚氧化酶活力和血细胞数量;蚯蚓单独投喂可有效提高血清中抗菌活力、酚氧化酶活力和血细胞数量,对血清中溶菌活力增强作用不明显。沙蚕与人工配合饵料配合投喂可有效提高凡纳滨对虾血清中抗菌和溶菌活力,但对血清中酚氧化酶活力和血细胞数量作用不明显;沙蚕单独投喂对所测各项免疫指标影响均不明显。表明蚯蚓和沙蚕对提高凡纳滨对虾免疫功能有一定的促进作用,这与林少琴等^[17]以蚯蚓喂养小鼠和王巍等^[18]以蝇蛆投喂对虾,均可增强生物体的免疫功能相似;但是,以蚯蚓作为鲜活饵料在提高对虾免疫功能方面的效果要优于沙蚕,其原因可能是:(1)营养物质既是机体生长发育的物质基础,也是机体免疫系统的物质基础。从不同饵料水解氨基酸的分析结果可以看出,蚯蚓必需氨基酸和总促摄食氨基酸的含量比沙蚕分别高出约11.65%和13.89%,体内氨基酸不足或缺乏某种必需氨基酸,就会影响抗体的合成速度或阻碍抗体的合成,进而影响到机体免疫功能的发挥。(2)蚯蚓生活环境特殊,体内活性成分和抗逆性成分含量都很高^[17],可有效激活对虾相应的免疫系统,增强对虾的免疫功能。

本研究从对虾的生长和免疫方面证实,以陆生蚯蚓为鲜活饵料能更有效地促进对虾生长,增强对虾的免疫功能,其效果优于海生沙蚕。目前,蚯蚓养殖业已在世界各地蓬勃发展起来,蚯蚓作为一种中医药材料也备受世人关注,特别是在当前对虾高密度养殖条件下,以蚯蚓作为一种优质的中药型鲜活饵料来源,不失为对虾工程化养殖的一种好的选择。

参考文献:

- [1] 刘金明,陈东亮,许振松.利用地下咸水兑淡水进行南美白对虾工程化养殖试验[J].淡水渔业,2004,34(3):36-37.
- [2] Gillen Le Moullac, Philippe Halfner. Environmental factors af-

1) 王 持. 蚯蚓喂亲虾试验初探. 全国鱼虾科学学术讨论文集, 1988, 225-258.

- fecting immune responses in Crustacea[J]. *Aquaculture*, 2000, 191:121-131.
- [3] 丁美丽,林 林,李光友,等. 有机物污染对中国对虾体内外环境影响的研究[J]. *海洋与湖泊*, 1997, 28(1):7-12.
- [4] 孙毓军,丁美丽. 氨氮对中国对虾抗病力的影响[J]. *海洋与湖泊*, 1999, 30(1):267-272.
- [5] 潘鲁青,姜令婧. 盐度、pH 突变对 2 种养殖对虾免疫力的影响[J]. *青岛海洋大学学报*, 2002, 32(6):903-910.
- [6] 刘 恒,李光友. 免疫多糖对养殖南美白对虾作用的研究[J]. *海洋与湖泊*, 1998, 29(2):113-118.
- [7] 王宜艳,孙虎山,李光友. 复合免疫药物对中国对虾血淋巴氧化酶和抗氧化酶活力的影响[J]. *海洋科学进展*, 2004, 22(1):69-72.
- [8] 武金霞,赵晓瑜. 蚯蚓体内生物活性成分的研究[J]. *自然杂志*, 2004, 26(1):27-30.
- [9] 蒋 琼,王 雷,罗日祥. 中国对虾血淋巴抗凝剂的筛选[J]. *水产学报*, 2001, 25(4):359-362.
- [10] Hultmark D, Steiner H, Rasmussen T, et al. Insect immunity: purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia* [J]. *Eur J Biochem*, 1980, 106:7-16.
- [11] 王 雷,李光友,毛远兴. 中国对虾血淋巴中的抗菌、溶菌活力与酚氧化酶活力的测定及其特性研究[J]. *海洋与湖泊*, 1995, 26(2):179-185.
- [12] Ashida M. Purification and characterization of pro-phenoloxidase from hemolymph of the silkworm [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1971, 144:749-762.
- [13] 张明凤,吴小琴,王 健. 培养蚊子幼虫作为日本对虾鲜活饲料的研究[J]. *福建畜牧兽医*, 2000, 1:4-5.
- [14] Imre, Cgvas. 世界养虾业成功的关键因素及展望[J]. *国外水产*, 1994, (1):1-6.
- [15] 武金霞,赵晓瑜. 蚯蚓体内生物活性成分的研究[J]. *自然杂志*, 2004, 26(1):27-30.
- [16] 杨代勤,严安生,陈 芳,等. 不同饲料对黄颡鱼消化酶活性的影响[J]. *水产学报*, 2003, 27(6):558-563.
- [17] 林少琴,邹开煜. 蚯蚓 OY-1 对荷瘤小鼠免疫功能及抗氧化酶的影响[J]. *海峡药学*, 2002, 14(1):10-12.
- [18] 王 赜,冯 江,王振堂,等. 对虾爆发流行病的群体感染及投喂蝇幼的抗病机制研究[J]. *应用生态学报*, 2002, 13(6):728-730.

Effects of *Perinereis aibuhitensis* and *Eisenia foetida* on growth and immune parameters of the shrimp *Litopenaeus vannamei*

LIU Shi-lin^{1,2}, LIU Ying¹, YANG Hong-sheng¹, YOU Kui^{1,2}, CHEN Mu-yan^{1,2}, YU Li-dong¹

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: The effect of different diets on growth and immune parameters of *Litopenaeus vannamei* has been studied in this paper. Shrimps were fed each of five diets: earthworm, lobworm, formulated diet, formulated diet mixed with earthworm or lobworm. The result as follows: Comparing with formulated diet, earthworm, lobworm and formulated diet mixed with earthworm or lobworm significantly improved the growth of shrimp, while the survival rate for shrimps only fed lobworm was lower than those of other groups. The formulated diet mixed with earthworm appeared to have a positive effect on total hemocyte count and the activities of antibacterial, bacteriolytic and phenoloxidase in the haemolymph. Similarly, a positive effect was noticed on total hemocyte count and the activities of antibacterial and phenoloxidase when only earthworm was fed, but not significant on the activity of bacteriolytic. The shrimps fed formulated diet mixed with lobworm improved the activities of antibacterial and bacteriolytic, but not the total hemocyte count and the activity of phenoloxidase. When shrimps were only fed by lobworm, no significant effects were observed. According to the result, we can conclude that the earthworm and lobworm have a positive effect on the growth of shrimp, and the effect of earthworm is better than that of lobworm. [*Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(4):561-565]

Key words: *Litopenaeus vannamei*; Lobworm; Earthworm; Growth; Immune parameters