

微生态净水剂对凡纳滨对虾生理生化指标的影响

翟秀梅^{1,2}, 毛连菊¹, 王斌¹, 郭郁¹, 桂远明¹

(1. 大连水产学院 农业部海洋水产增养殖学与生物技术重点开放实验室, 辽宁 大连 116023; 2. 黑龙江生物科技职业学院 水产系, 黑龙江 哈尔滨 150025)

摘要:为了证实微生态净水剂(含菌量 10×10^9 /g)可以提高虾体免疫力和对污染物(如农药)的抵抗力,在凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)养殖过程中,设置了施用微生态净水剂的实验组和未用微生态净水剂的对照组,采用肌肉注射的方式,对 2 组凡纳滨对虾进行乙酰甲胺磷毒性实验。注射乙酰甲胺磷后,采样测定血细胞吞噬化学发光情况,组织中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、溶菌酶(LSZ)、酯酶活性以及酯酶(EST)、苹果酸脱氢酶(MDH)同工酶表型变化。结果表明:施用微生态净水剂组明显好于对照组。施用微生态净水剂的虾注射乙酰甲胺磷后死亡率降低,血细胞的吞噬功能也有所增加,虾体组织内 SOD、POD、LSZ、酯酶活性变化较未用组的虾变化幅度较小,其中, SOD、POD 活性等高于未用组, EST、MDH 同工酶酶带数目也有增加。说明微生态净水剂从本质上增强虾体内代谢、提高虾体的免疫力、增强其对外界环境变化适应能力,并具有提高虾体防御功能,增强抵抗疾病能力的作用。[中国水产科学, 2007, 14 (2): 281-289]

关键词: 凡纳滨对虾; 乙酰甲胺磷; 微生态净水剂; 生理生化指标

中图分类号: S96

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2007)02-0281-09

随着农业的发展, 农药使用剂量和适用范围的不断扩大, 对环境的污染日趋严重, 其中有机磷农药已成为近岸海域的主要污染物之一^[1], 每年雨季, 河口及近岸水域因有机磷农药污染导致死虾、死贝事故时有发生, 对水产养殖业的健康持续发展构成了严重威胁。乙酰甲胺磷属有机磷农药, 是一种高效、低残留农药, 主要机理是使生物体内胆碱酯酶的活性受到抑制, 阻碍神经冲动的传递, 从而导致正常的生理功能的丧失^[2]。目前, 有关有机磷农药对各种养殖生物的毒性效应的研究已有不少报道^[3-7], 但对虾类毒性效应研究还比较少^[8-9]。

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)是目前世界养殖产量最高的 3 大虾种之一, 具有抗病力和抗逆能力强、营养要求低、生长速度快、虾体出肉率高等优点。随着养殖规模的扩大, 对其防病和抗病的研究也日趋重要。传统防治疾病的方法主要采用抗生素等化学药物, 抗生素长期使用所产生的药残严重影响水产品品质, 同时也造成环境污染, 直接威胁到人体的健康和安全。目前通过生态调整来防病治病是微生态学研究的重要课题之一。微生态净水剂是

从近海底泥中分离、提纯出的优势有益微生物经特殊工艺制成的活菌制剂, 具有改善水质的作用, 并能通过维持肠道菌群的平衡而有效地影响宿主, 提高动物代谢能力、饲料的消化吸收能力和免疫功能, 从而发挥防治消化道疾病和促进生长的作用。

本研究对凡纳滨对虾进行了乙酰甲胺磷的毒性实验, 通过观察比较微生态净水剂施用组和未用微生态净水剂组凡纳滨对虾的死亡情况和对虾机体内生理生化指标的变化情况, 来探讨 2 组在不同养殖环境条件下饲养出的凡纳滨对虾对农药的侵染抵抗能力的差别, 进而评价微生态净水剂对于提高对虾的免疫能力和抗病力的效果。

1 材料与方法

1.1 材料

凡纳滨对虾于 2002 年 9 月中旬采自盘锦, 虾体长 6.1~7.3 cm。微生态净水剂(Microbial water purified agents)购自大连施倍得生物有限公司, 含菌量 10×10^9 /g。实验所用乙酰甲胺磷(Acephate)由大连化学物理研究所提供, 纯度为 99.3%, 为白色粉末。

收稿日期: 2006-04-10; 修订日期: 2006-09-18.

基金项目: 农业部“948”项目(203112).

作者简介: 翟秀梅(1979-), 女, 硕士研究生, 主要从事水产动物生理方面的研究. E-mail: zhaixiumei1019@163.com

通讯作者: 桂远明. E-mail: guiyym99@163.com

1.2 方法

1.2.1 实验用虾的养殖过程 选择自然状况基本相同的3个土池塘,其中1个池(0.467 hm²)设为对照组,清池后不施用微生态净水剂,为对照组;其余2个池分别设为施用组1(0.13 hm²)、施用组2(0.33 hm²),清池后施用微生态净水剂,用量为75 kg/hm²,饲养期间每隔7天施用1次微生态净水

剂,用量均为75 kg/hm²。饲养期间均不换水,用鼓风机和池底气管充气。虾池放苗量为94.5万尾/hm²。养殖所用凡纳滨对虾为同一批虾苗,体质健康,不携带病菌。在饲养期间,投喂饲料,中间于2002年7月16日和2002年8月30日取样测定水质指标(表1)。

表1 凡纳滨对虾饲养期间的水质指标

Tab.1 Parameters of water quality during the experiment of *Litopenaeus vannamei* farming $n=3; \bar{X} \pm SD$

水质指标 Parameters of water quality	采样日期 Sampling date	对照组 Control group	施用组1 Treatment group 1	施用组2 Treatment group 2
温度/℃ Temperature	07-16	27.45±0.57	27.05±0.65	26.7±0.55
	08-30	25.4±0.64	25.3±0.71	25.8±0.78
pH	07-16	8.90±0.77	8.62±0.83	8.72±0.98
	08-30	7.75±0.65	7.79±0.24	7.72±0.58
DO/(mg·L ⁻¹)	07-16	7.76±0.45	6.94±0.45	7.15±0.67
	08-30	2.76±0.26	4.83±0.56	4.21±0.23
COD/(mg·L ⁻¹)	07-16	6.46±0.85	5.58±0.75	6.13±0.75
	08-30	5.46±0.62	5.276±0.45	5.13±0.67
NH ₄ ⁺ -N/(mg·L ⁻¹)	07-16	0.201±0.009	0.187±0.016	0.181±0.010
	08-30	9.03±1.02	6.15±0.43	6.63±0.78
NO ₂ ⁻ -N/(mg·L ⁻¹)	07-16	0.106±0.0041	0.065±0.0023	0.087±0.0038
	08-30	0.113±0.0035	0.103±0.0045	0.095±0.0056

饲养至9月份时采样,用塑料袋带水运回,于大连水产学院海水养殖楼暂养,暂养几日后进行乙酰甲胺磷毒性实验。

1.2.2 毒性实验设计 根据预试验结果,乙酰甲胺磷设置0 μg/L、3 μg/L、30 μg/L、300 μg/L共4个浓度梯度,每组设2个平行缸,实验所用水槽为透明玻璃缸(容量50 L),随机捞取对虾,每缸放10尾,用水泵通气,待虾体对新环境适应后,开始实验。每尾虾注射剂量为0.1 mL,注射部位为对虾的第4到第5腹节处肌肉,其中0 μg/L浓度组注射生理盐水,毒性实验期间不投饵。注射后观察对虾的活动,分别于24 h、48 h、72 h观察各组死亡率,并在72 h时,分别采集各组凡纳滨对虾,采集血淋巴进行吞噬能力的发光实验,并取各组凡纳滨对虾的肌肉、肝脏和肠组织,放入超低温冷冻冰箱(-78 ℃)中备用。

1.2.3 样品的制备

1)肌肉匀浆 虾体去头及外壳,称体质量,加入3.5倍0.1 mol/L的磷酸钾盐缓冲液(pH 6.4),于4 ℃冰箱中静置6 h,低温匀浆、离心(4 ℃,5 000 r/min,20 min)取上清液用于测定。

2)肝脏、肠匀浆 取虾的肝脏、肠分别称重,加

入10倍0.1 mol/L的磷酸钾盐缓冲液(pH 6.4),低温匀浆、离心(4 ℃,3 500 r/min,10 min)取上清液用于测定。其中肠只用于同工酶的测定。

1.2.4 实验数据的测定方法

1)血细胞吞噬化学发光 采用LS-5801型液体闪烁计数器(Beckman公司),使用单光子测定程序,以Luminol为发光剂,在室温下测定,得出其发光值(cpm)。

2)超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定 采用邓碧玉等^[10]改良的连苯三酚自氧化法测定,每mL反应液中,每分钟抑制连苯三酚自氧化速率达50%的酶量为1个活力单位,单位为U/mL,温度为25 ℃。

3)溶菌酶(LSZ)活性的测定 采用南京建成生物工程研究所出售的溶菌酶试剂盒,根据溶壁微球菌悬液浊度变化来推测溶菌酶的含量,单位为U/mL,温度为25 ℃。

4)过氧化物酶(POD)活性的测定 按照沃辛通(Worthington)法^[11]测定,1个过氧化物酶单位相当于在规定条件下,于25 ℃,pH 7.0,分解1 μmol/min过氧化氢时所需的酶量,单位为U/mg。

5)酯酶活性的测定 采用的是BP63法^[11]测定酯

酶,1 个酯酶单位相当于在试验条件下释放出1 μmol醋酸所需要的酶量,其单位为 U/g,温度为 25 ℃。

6)同工酶电泳及分析 采用聚丙烯酰胺垂直平板不连续凝胶电泳方法,对肌肉、肝脏和肠 3 种组织进行酯酶同工酶和苹果酸脱氢酶同工酶的电泳研究。具体制胶、电泳、染色过程参照何忠效等^[12]的方法。将电泳后所制成的胶板,经扫描仪(Microtek Phantom 4 000)扫描后用 Photoshop 绘制图谱。酶谱示意图参考胡能书^[13]等方法绘制,酶带的编号参照国际生物化学命名规则而定,把向阳极泳动最快的同工酶编号为 1,如 EST-1,并从阳极到阴极依次编号。

2 结果与分析

2.1 对凡纳滨对虾死亡率的影响

表 2 的各浓度组的死亡百分数按下列公式进行

校正:

$$P = (P' - C) / (1 - C)$$

式中: P'表示观察到死亡百分数;
C 表示对照组死亡百分数;
P 表示校后的死亡百分数;

表 2 表明,施用组的凡纳滨对虾对注射的乙酰甲胺磷的耐受能力要强于对照组。虾的死亡率随农药浓度的升高而升高,随时间的持续而增加,施用组的死亡率低于对照组(P<0.05)。

表 3 为采用直线内插法计算出的 24 h、48 h、72 h 时对照组和施用组凡纳滨对虾对所注射的乙酰甲胺磷的 LD₅₀。24 h、48 h、72 h 时对照组的 LD₅₀均比施用组的 LD₅₀要小(P<0.05),这表明对照组的凡纳滨对虾对乙酰甲胺磷的敏感性比施用组对乙酰甲胺磷的敏感性要强。

表 2 不同质量浓度的乙酰甲胺磷对凡纳滨对虾死亡率的影响

Tab.2 Effects of different concentration of acephate on mortality of Litopenaeus vannamei				%
分组 Group	质量浓度 / (μg·L ⁻¹) Concentration	持续时间 / h Duration time		
		24	48	72
对照组 Control	0	10	20	20
	3	11.1	12.5	12.5
	30	33.3	33.3	37.5
	300	55.5	75	75
施用组 Treatment group	0	0	10	20
	3	10	11.1	11.1
	30	20	20	25
	300	50	55.5	62.5

表 3 施用微生态净水剂对凡纳滨对虾乙酰甲胺磷的 LD₅₀的影响

Tab.3 Effects of using microbial water purified agents on acephate LD ₅₀ of Litopenaeus vannamei				ng·ind ⁻¹
分组 Group	24 h	48 h	72 h	
对照组 Control	16.957	5.922	5.499	
施用组 Treatment group	35.480	21.252	12.589	

2.2 对凡纳滨对虾吞噬发光的影响

图 1 表明,对照组的发光值随乙酰甲胺磷浓度的增加先升高,到高浓度(300 μg/L)时明显下降并低于 0 μg/L 值(P<0.05)。在质量浓度为 3 μg/L 和 30 μg/L 时发光值差异不明显(P>0.05),3 μg/L 时略高些。在不同时间下各组发光值从大到小的顺序分别是3 μg/L、30 μg/L、0 μg/L、300 μg/L。

图 2 表明,施用组的发光值变化趋势与对照组相似,但其各浓度下发光值存在明显差异(P<0.05),30 μg/L 时发光值最高。在不同时间下各实验组发光值从大到小的顺序依次为: 30 μg/L 组、3 μg/L 组、0 μg/L 组、300 μg/L 组。

由图 1、2 可看出,施用组发光值高于对照组(P<0.05)。

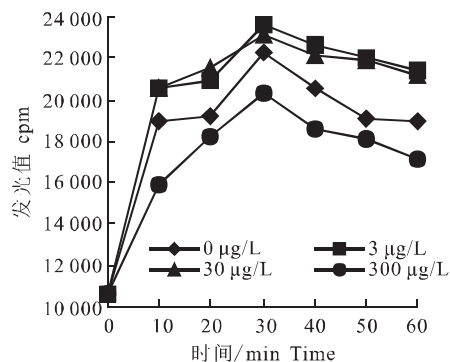


图1 乙酰甲胺磷对对照组凡纳滨对虾吞噬发光的影响

Fig.1 Effects of different concentration of acephate on the chemiluminescent response of *Litopenaeus vannamei* hemocytes in the phagocytosis in control group

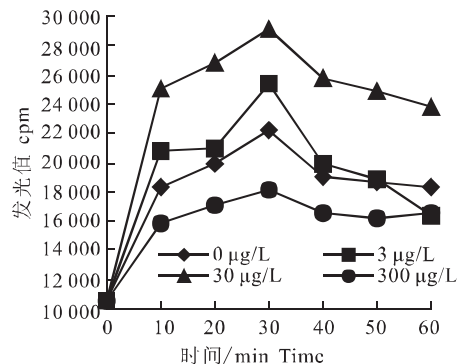


图2 乙酰甲胺磷对施用组凡纳滨对虾吞噬发光的影响

Fig.2 Effects of different concentration of acephate on the chemiluminescent response of *Litopenaeus vannamei* hemocytes in the phagocytosis in treatment groups

2.3 对凡纳滨对虾几种酶类活性的影响

2.3.1 SOD 活性 图3表明, SOD活性在肝脏组织中随注射乙酰甲胺磷浓度的增加呈先下降后上升, 之后再下降的变化规律; 在质量浓度 $3 \mu\text{g/L}$ 和 $30 \mu\text{g/L}$ 下2组之间差异极显著 ($P < 0.01$)。在肌肉组织中变化不显著 ($P > 0.05$), 但仍有呈下降趋势; 施用组与对照组的虾比较, 施用组的 SOD 活力

变化幅度不显著 ($P > 0.05$), 且其活力在 $3 \mu\text{g/L}$ 和 $30 \mu\text{g/L}$ 浓度下高于对照组 ($P < 0.05$)。

2.3.2 LSZ 活性 图4表明, 肝脏组织中 LSZ 活性较高, 与肌肉组织中 LSZ 活性差异极显著 ($P < 0.01$), 随注射乙酰甲胺磷浓度的升高呈先上升后下降变化的趋势。在肌肉组织中 LSZ 活性低, 随注射乙酰甲胺磷浓度变化不显著 ($P > 0.05$)。

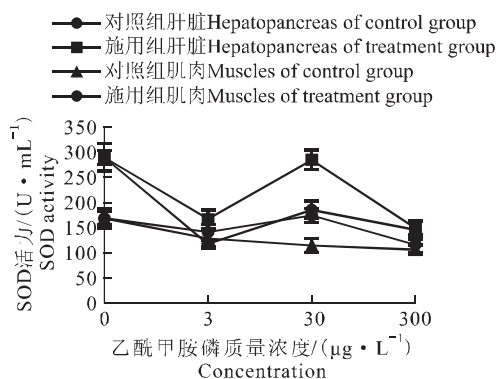


图3 乙酰甲胺磷对凡纳滨对虾 SOD 活力的影响

Fig.3 Effects of different acephate concentrations on superoxide dismutase activity of *Litopenaeus vannamei*

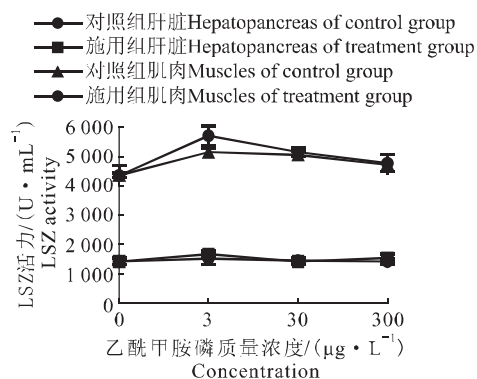


图4 乙酰甲胺磷对凡纳滨对虾的溶菌酶活力的影响

Fig.4 Effects of different acephate concentrations on lysozyme activity of *Litopenaeus vannamei*

2.3.3 POD 活性 图5表明, POD活性在肌肉组织中只有在乙酰甲胺磷质量浓度 $3 \mu\text{g/L}$ 下变化幅度较大 ($P < 0.05$), 表现为施用组的上升, 而对照组的下降; 其他浓度下 POD 活性差异不显著 ($P > 0.05$)。总体上施用组比对照组的 POD 活性高 ($P < 0.05$), 并随注射乙酰甲胺磷浓度的升高有下降的趋势。

2.3.4 酯酶 图6表明, 在肝脏组织中酯酶活性随注射乙酰甲胺磷浓度的升高而下降, 并且各浓度组与 $0 \mu\text{g/L}$ 组差异极显著 ($P < 0.01$)。在 $3 \mu\text{g/L}$ 浓度下施用组比对照组的酯酶活性高 ($P < 0.05$)。

2.4 对凡纳滨对虾同工酶的影响

2.4.1 酯酶同工酶 (EST) 图7表明, 当对虾注射乙酰甲胺磷后, 其肌肉组织的酯酶酶带变化不明显;

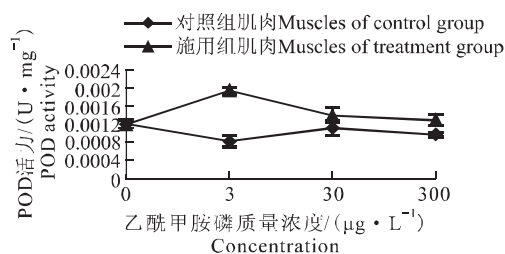


图5 乙酰甲胺磷对凡纳滨对虾 POD 活力的影响

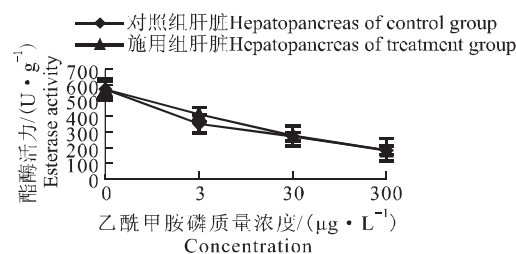
Fig.5 Effects of different concentration of acephate on peroxidase activity of *Litopenaeus vannamei*

图6 乙酰甲胺磷对凡纳滨对虾酯酶活力的影响

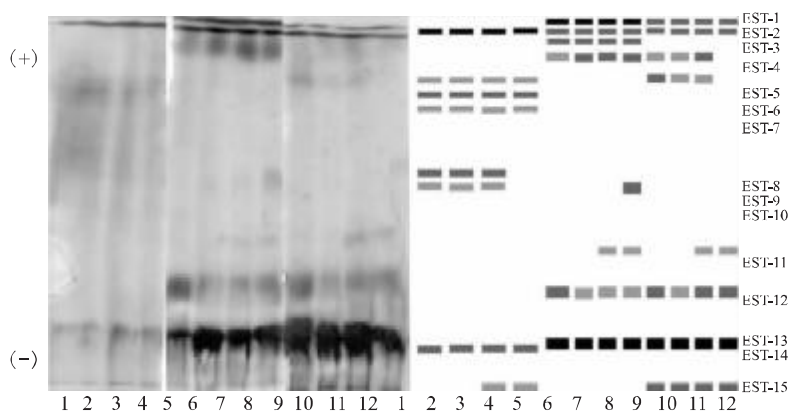
Fig.6 Effects of different concentration of acephate on esterase activity of *Litopenaeus vannamei*

图7 不同质量浓度的乙酰甲胺磷对对照组凡纳滨对虾酯酶同工酶的影响

1~4 为肌肉,5~8 为肝脏,9~12 为肠,各组织中乙酰甲胺磷中质量浓度顺序均为 $0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $300 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $30 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

Fig.7 Effects of different concentration of acephate on EST of *Litopenaeus vannamei* in control group

1-4 muscles,5-8 hepatopancreas,9-12 intestine. In each tissue the order of concentration is $0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $300 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $30 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ and $3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

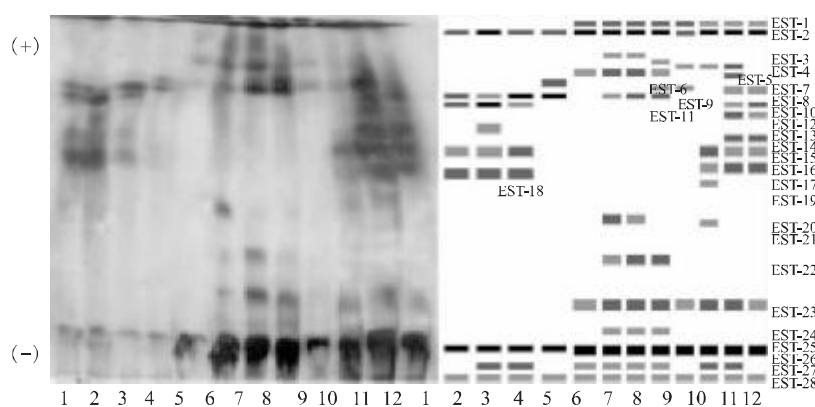


图8 不同浓度的乙酰甲胺磷对施用组凡纳滨对虾的酯酶同工酶的影响

1~4 为肌肉,5~8 为肝脏,9~12 为肠,各组织中乙酰甲胺磷质量浓度顺序均为 $0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $300 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $30 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

Fig.8 Effects of different concentration of acephate on EST of *Litopenaeus vannamei* in treatment group

1-4 muscles,5-8 hepatopancreas,9-12 intestine. In each tissue the order of concentration is $0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $300 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $30 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ and $3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

乙酰甲胺磷质量浓度为 $3 \mu\text{g/L}$ 时 EST-8、EST-9 酶带缺失,并在 $3 \mu\text{g/L}$ 和 $30 \mu\text{g/L}$ 时增加 EST-15。在肝脏、肠组织中酶带分布呈一致性,酶带变化趋势也相似;注射乙酰甲胺磷后酶带数目、活性都有增加,并随乙酰甲胺磷浓度呈先上升后下降的变化趋势,在肝脏组织中酶带数目、活性在 $3 \mu\text{g/L}$ 时最大,而肠组织中酶带数目、活性在 $30 \mu\text{g/L}$ 时最大。

图 8 表明,当对虾被注射乙酰甲胺磷后,其肌肉组织中酶带数目随乙酰甲胺磷浓度的增加呈先缺失后增加的趋势。在肝脏组织中注射乙酰甲胺磷后酶带变化明显,酶带增加较多。在肠组织中注射乙酰甲胺磷后,酶带数目随乙酰甲胺磷浓度呈先上升后下降的变化趋势, $30 \mu\text{g/L}$ 时酶带数目最多。

由图 7、8 得出,施用组酶带数目多于对照组,特别在肝脏、肠组织中注射乙酰甲胺磷后酶带增加较多。

2.4.2 苹果酸脱氢酶同工酶 (MDH) 图 9 表明,对虾肌肉组织中酶带数目随乙酰甲胺磷浓度的增加

呈先下降后上升,之后再下降的变化趋势,只在 $30 \mu\text{g/L}$ 时有 MDH-1 酶带增加,其他情况下均有酶带缺失。在肝脏组织中,注射乙酰甲胺磷后酶带变化不明显,只有 MDH-6 酶带缺失。在肠组织中, $0 \mu\text{g/L}$ 时只有 MDH-4 酶带。注射乙酰甲胺磷后酶带不同程度增加。

图 10 表明,当对虾被注射乙酰甲胺磷后,肌肉组织中增加了 MDH-11 酶带,其他酶带表现稳定;在肝脏组织中,酶带出现缺失,并且酶带数目随乙酰甲胺磷浓度的增加呈先下降后上升的变化趋势,在 $0 \mu\text{g/L}$ 时酶带数目活性呈最低,酶带缺失最多。在肠组织中,注射乙酰甲胺磷后酶带变化较明显, $30 \mu\text{g/L}$ 时酶带数目最少。

由图 9、10 得出,对照组和施用组之间差异不是很明显,对照组注射乙酰甲胺磷后,各浓度下在肌肉中有变化,肝脏和肠中稳定;而在施用组恰好相反,肌肉中稳定,肝脏和肠中有变化。

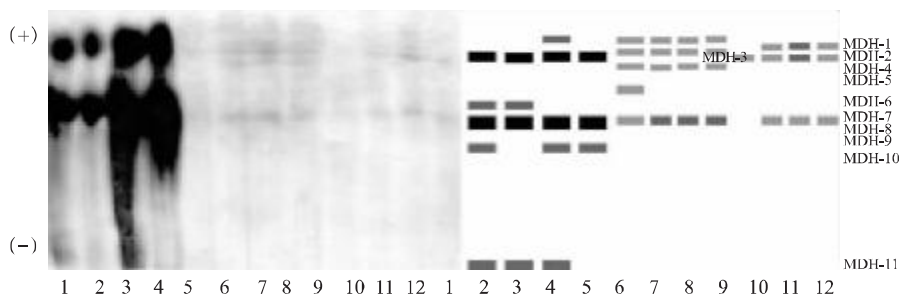


图 9 不同浓度的乙酰甲胺磷对对照组凡纳滨对虾苹果酸脱氢酶同工酶的影响

1~4 为肌肉,5~8 为肝脏,9~12 为肠,各组织乙酰甲胺磷质量浓度顺序均为 $0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $300 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $30 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

Fig.9 Effects of different concentration of acephate on MDH of *Litopenaeus vannamei* in control group

1-4 muscles, 5-8 hepatopancreas, 9-12 intestine. In each tissue the order of concentration is $0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $300 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $30 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

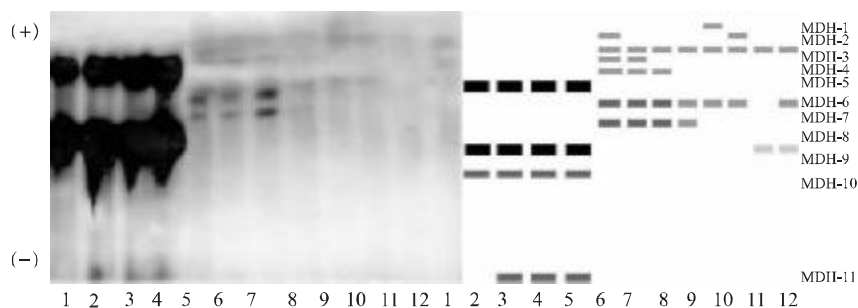


图 10 不同浓度的乙酰甲胺磷对施用组凡纳滨对虾的苹果酸脱氢酶同工酶的影响

1~4 为肌肉,5~8 为肝脏,9~12 为肠,各组织乙酰甲胺磷质量浓度顺序均为 $0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $300 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $30 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

Fig.10 Effects of different concentration of acephate on MDH of *Litopenaeus vannamei* in treatment group

1-4 muscles, 5-8 hepatopancreas, 9-12 intestine. In each tissue the order of concentration is $0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $300 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $30 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

3 讨论

3.1 乙酰甲胺磷对凡纳滨对虾的生理生化指标的影响

超氧化物歧化酶(SOD)是重要的抗氧化酶之一,在清除自由基、防生物分子损伤、抗菌、抗病毒方面有十分重要的作用^[15]。许多研究表明^[16-17],当生物体受到轻度逆境胁迫时,SOD活性往往升高;而当受到重度逆境胁迫时,SOD活性通常降低,使生物体内积累过量的活性氧,从而导致生物体受到伤害,本实验也出现类似的规律。SOD活性与生物的免疫水平密切相关^[18],虾体在低浓度乙酰甲胺磷的刺激时,施用组的抗刺激能力要强于对照组,但随着注射农药浓度的增大,SOD的活性都下降,这说明当对虾的暴露浓度超出虾自身免疫能力时,2组对虾的体质差异不存在。

酯酶是体内参与脂类化合物水解并进入中间代谢的重要酶系,其作用除了维持细胞正常的能量代谢外,还与机体的解毒功能密切相关^[19]。随着注射农药浓度的增大,其肝脏中的酯酶的活性呈下降的趋势,这说明注射乙酰甲胺磷浓度越大对凡纳滨对虾肝脏酯酶的活性的抑制作用越显著。由于肝脏是甲壳动物的营养贮存器官之一,代谢旺盛,而病变使与代谢相关的酶类活性发生变化,从而导致代谢紊乱,酶活性大幅度下降。

酯酶同工酶、苹果酸脱氢酶同工酶分别与酯类、糖类的生理代谢密切相关,而两者在机体内的代谢相互转化,密切关联。农药乙酰甲胺磷侵染对虾后,虾体同工酶表型呈现出酶带丢失、出现新酶带、部分同工酶带迁移率改变3种变化形式^[20],酶带的分布表现出高度组织特异性。总的来说,施用组酶带数多于对照组数目,特别是肝脏和肠的EST同工酶酶带增加较多,这可能由于饲养过程中使用了微生态净水剂,改善了虾肠道的微生态菌群,提高机体代谢水平,增强了虾体的抵抗能力^[21]。

3.2 微生态净水剂改善水质、提高虾体免疫力的作用

通过研究乙酰甲胺磷对凡纳滨对虾生理生化指标的影响,从免疫毒理学方面初步探讨微生态净水剂具有提高虾体免疫力,增强虾体对污染物(如农药)抵抗能力的作用。随着养殖规模的扩大,有关防病和抗病的研究也日趋重要。在对虾的集约化养殖中,水体有机质负荷大大增加,以至超出水体的自净

能力,造成水体水质的恶化,水中氨氮、亚硝酸氮、硫化氢等有害物质增多,同时也降低了对虾自身的免疫能力,一旦面临外来异物(如细菌、农药、病毒)的侵害,很容易造成养殖凡纳滨对虾的死亡。而微生态净水剂在对虾养殖中的大量应用可很好地改善养殖水体的水质,起到加强有机物的降解,提高水体自净能力的作用^[14]。养殖水体得到改善则可以间接的促进养殖对虾的健康生长,提高虾体的免疫能力,增强养殖对虾的抗病力。

对照组和施用组均是由同一批虾苗饲养而成的,可对乙酰甲胺磷的敏感性不同,说明这2组对虾有不同的抗逆性和抗病力。对照组虾池的水质条件不好,溶氧低,氨氮和亚硝态氮高,导致对虾的体质脆弱,抗病力低下。养殖水体中亚硝酸盐含量高会对养殖生物产生毒害作用。有机污染可使得虾体的SOD、LSZ活性下降,组织内自由基增多,扰乱、破坏体内一些重要生化过程,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,许多疾病也逐渐产生和形成^[22]。一些学者根据实验结果认为,任何可以测定出的氨氮浓度对鱼类生长都会产生有害影响^[23]。施用组的虾因经过添加微生态净水剂的饲养,虾池的水质条件好,虾体质壮,对外界环境的改变,适应能力强,对疾病等致毒因子的低抗力强。因此在乙酰甲胺磷的侵染时,施用组的凡纳滨对虾比对照组的凡纳滨对虾死亡率低。综上所述,可以说明微生态净水剂从本质上使虾体内代谢增强提高虾体的免疫力,增强其对外界环境变化适应能力,具有提高虾体防御功能,增强抵抗疾病能力的作用。

4 结论

(1)施用微生态净水剂的凡纳滨对虾注射乙酰甲胺磷后其死亡率降低。

(2)施用组虾体组织内SOD、POD、LSZ、酯酶活性变化较对照组的凡纳滨对虾变化幅度较小,其中SOD、POD活性等均高于对照组,血细胞的吞噬功能也有所增加。

(3)虾体同工酶酶带数目发生不同的变化,特别是肝脏和肠组织的酯酶同工酶,施用组的酶带增加较多。

(4)微生态净水剂具有改善水质,提高虾体的免疫力,增强抵抗疾病能力的作用。

参考文献:

- [1] 李永祺. 1993年我国人工养殖对虾大量死亡原因、教训和对策浅议[J]. 海洋环境科学, 1993, 12(3): 4-4.
- [2] 潘厚军, 吴淑勤, 黄志斌, 等. 鱼类对有机磷和菊酯类农药的敏感性研究[J]. 淡水渔业, 2000, 30(7): 44-45.
- [3] 邹立, 程刚, 李永祺, 等. 11种有机磷农药对海洋微藻致毒效应研究[J]. 海洋环境科学, 1998, 17(3): 29-34.
- [4] 李涛. 国外有机磷农药神经发育毒性研究[J]. 国外医学卫生学分册, 2001, 28(5): 257-260, 294.
- [5] 贾翠红, 汝少国, 李永祺, 等. 久效磷对真鲷幼体中枢系统中乙酰胆碱酯酶活性的影响[J]. 海洋科学, 1999, (3): 7-8.
- [6] 姚庆祯, 臧维玲, 戴习林, 等. 铜、镉、敌敌畏和甲胺磷对南美白对虾幼虾的急性致毒及相互关系[J]. 上海水产大学学报, 2003, 12(2): 117-122.
- [7] 魏渲辉, 汝少国. 有机磷农药对鱼类的毒性效应及内分泌扰乱作用[J]. 海洋科学, 2000, 26(9): 27-31.
- [8] 白洁, 李永祺, 李岩然. 久效磷对中国对虾血淋巴酚氧化酶活性的影响的初步研究[J]. 海洋科学, 1998, (3): 35-36.
- [9] 白洁, 李岩然, 唐学玺, 等. 久效磷对中国对虾体内SOD活力影响的初步研究[J]. 海洋通报, 1998, 17(4): 41-45.
- [10] 邓碧玉, 袁勤生, 熬杰. 改良的连苯三酚自氧化测定超氧化物歧化酶活性的方法[J]. 生物化学与生物物理进展, 1991, 18(2): 163-163.
- [11] [德]B. 施特马赫著(钱嘉渊译). 酶的测定方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1992: 140-142, 276-278.
- [12] 何忠效, 张树政. 生物化学实验技术丛书(第二版)电泳[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 288-289, 296-298.
- [13] 胡能书, 万贤国. 同工酶技术及其应用[M]. 湖南: 湖南科技出版社, 1985: 40-41.
- [14] 王彦波, 许梓荣, 邓岳松. 微生态制剂在水产养殖中的作用机理研究[J]. 中国饲料, 2004, 13(3): 31-32.
- [15] 李廷友, 谢标, 陆波, 等. 中药添加剂对中华绒螯蟹扣蟹非特异性免疫力影响的研究[J]. 淡水渔业, 2005, 5(1): 3-6.
- [16] 唐学玺, 张培玉. 葱对黑超氧化物歧化酶活性的影响[J]. 水产学报, 2000, 24(3): 217-220.
- [17] 金明红, 冯宗炜, 张福珠. 臭氧对水稻叶片膜脂过氧化和抗氧化系统的影响[J]. 环境科学, 2000, 21(3): 1-5.
- [18] 林林, 丁美丽, 孙舰军, 等. 有机污染提高对虾对病原菌敏感性实验[J]. 海洋学报, 1998, 20(1): 90-93.
- [19] 张海琪, 何中央, 徐晓林, 等. 罗氏沼虾肌肉8种同工酶的研究[J]. 海洋湖沼通报, 2004, (1): 32-37.
- [20] 黄灿华, 陈棣华. 中国对虾病虾体内同工酶表型变化的初步研究[J]. 中国水产科学, 1996, 6(1): 45-49.
- [21] 杨兴丽, 周晓林, 唐启斌. 微生态制剂在水产养殖中的应用[J]. 河南水产, 2004, (4): 13-14, 17.
- [22] 吴中华. 中国对虾慢性亚硝酸盐和氨中毒的组织病理学研究[J]. 华中师范大学: 自然科学版, 1999, 33(1): 199-121.
- [23] Colt J, Tchobanoglous G. Chronic exposure of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, to ammonia: effects on growth and survival[J]. Aquaculture, 1978, 15: 353-372.

Effects on physiological and biochemical parameters in *Litopenaeus vannamei* after using microbial water purifying agents

ZHAI Xiu-mei^{1,2}, MAO Lian-ju¹, WANG Bin¹, GUO Yu¹, GUI Yuan-ming¹

(1. Key Laboratory of Mariculture & Biotechnology in Aquaculture Certificated by the Ministry of Agriculture, Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China; 2. Department of Aquaculture, Heilongjiang Vocational College of Biology Science, Harbin, 150025, China)

Abstract: Organic phosphorus is one of the main pollutants inshore because pesticides have been used widely. Microbial water purifying agents is made of live bacterial products that contain probiotic microorganism and were processed by special technology. The agents could not only improve the water quality, but also maintain the balance of intestinal bacterial group. The agents still could improve metabolism ability and immunity function in the bodies of shrimp. Thus the agents could play the part of preventing intestinal disease and promoting growth.

In this experiment of farming white-leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) there were two test groups: in one group the shrimps for treatment group (group A) was cultured in fresh water by using microbial water purifying agents, the other group shrimps for control group (group B) was cultured in the water without using the agents. In order to confirm that the microbial water purifying agents could improve immunity ability and resistant ability of the shrimp against pollutant (such as pesticide). The toxicity tests of the two test groups of shrimp by injecting acephate into the muscle of shrimp were carried out. After injecting with acephate shrimp hemocytes was sampled to measure the chemiluminescent response in the phagocytosis, and tissues were sampled to test the activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), lysozyme (LSZ) and enzyme phenotypes change of esterase isoenzyme (EST), malate dehydrogenase isoenzyme (MDH). The result showed that group A was obviously better than group B in physiological and biochemical parameters. The mortality of group A was lower than that of group B, and the ability of chemiluminescent response of hemocytes in the phagocytosis increased. The change range of activities of SOD, POD, LSZ and EST in shrimp tissues of group A were less than those of group B. Among four kinds of isoenzyme the activities of SOD and POD of group A were higher than those of group B. The band number of EST and MDH of group A was more than those of group B. The shrimps of group A and group B were all farmed from the same batch of shrimp seeding. In the two groups in different treatments, the sensitivity to acephate was different. The results indicated that the experiment could explain two groups had adverse resistance against pollution environment and resistance against disease. The shrimps of group A were farmed in the water where microbial water purifying agents was used in the pond, so that water quality was improved, and the shrimps were more healthy and could adapt itself to the change of water environment, strongly resisting nosogenic factor. But in the pond of group B water quality was not better than those in pond of group A, thus the shrimps were weak, and the ability of resistance to disease was lower. The results indicate that microbial water purifying agents used in the shrimp pond can essentially strengthen the metabolism in shrimp bodies and increase the immune level and the resistance of the organism to exotic environment. Microbial water purifying agents can enhance the functions of increasing the ability of shrimp recovery and strengthening resistance against disease by directly improving water quality and indirectly improving physique. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (2): 281 – 289]

Key words: *Litopenaeus vannamei*; acephate; microbial water purified agents; physiological and biochemical index

Corresponding author: GUI Yuan-ming. E-mail: guiyym99@163.com