

两种微藻改善虾池环境增强凡纳对虾抗病力的研究

黄翔鹄 李长玲 刘楚吾 郑 莲 何 嘉

(湛江海洋大学水产学院, 湛江 524025)

摘要: 人工引入波吉卵囊藻和微绿球藻于凡纳对虾养殖环境中, 检测与凡纳对虾抗病力有关因子变化和测定主要水质因子, 研究微藻生态调控对凡纳对虾抗病力的影响。结果表明, 引入波吉卵囊藻和微绿球藻能改善养殖水体的水质, 凡纳对虾的血细胞数目, 血清蛋白的含量以及酚氧化酶、超氧化物歧化酶, 溶菌酶, 抗菌酶的活性都较对照组显著提高。因此, 微藻生态调控是防止对虾疾病的重要技术措施。

关键词: 波吉卵囊藻; 微绿球藻; 凡纳对虾; 抗病力; 微藻生态调控

中图分类号: S945.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-3207(2002)04-0342-06

通过生物技术引入和改变养殖水域中微小生物群落的结构与功能的生态调控防病技术, 是生态防病的重要内容之一^[1]。波吉卵囊藻(*Oocystis borgei* snow) 具有在虾池分布广、种群稳定、适应能力强特点, 微绿球藻(*Nannochloris oculata*) 是虾塘中广泛存在的优势藻种, 分属绿藻门(*Chlorophyta*) 的绿球藻目(*Chlorococcales*) 和四胞藻目(*Tetrasporales*)。本研究通过引入这两种微藻于凡纳对虾(*Penaeus vannamei*) 养殖环境中来调控养殖生态系统, 以养殖水体中几个主要理化因子作为外环境指标, 虾体内几种与抗病有关的因子变化作为内环境的主要指标, 在不使用化学药品情况下, 研究微藻生态调控对虾抗病能力, 以期今后微藻生态调控防病理论的研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验用虾 实验用凡纳对虾(下称对虾)取材于湛江市硇洲岛宜人海珍养殖场, 平均体长 9.7cm, 健康无病。

1.2 微藻来源 波吉卵囊藻 2000 年 5 月直接从湛江东海岛恒兴对虾养殖试验场 1 号池分离, 微绿球藻 2000 年 7 月从海南三亚湛泰对虾养殖场分离, 养殖场虾池均系高位池, 两种微藻经驯化培养在实验室中备用。

1.3 海水与饵料 海水取自湛江市东风码头海区, 经沉淀砂滤, 密度为 1.010 ± 1 , 温度为 29 ± 1 °C; 饵料为湛江市粤海饲料厂对虾配合饲料。

1.4 方法 在水体为 0.5m^3 的实验室水族箱中进行, 设 3 个试验组, 1 个对照组。实验 1 组引入波吉卵囊藻, 实验 2 组引入微绿球藻, 实验 3 组为波吉卵囊藻、微绿球藻混合组, 对

收稿日期: 2001-12-21; 修订日期: 2002-03-28

基金项目: 广东省科技攻关项目, (项目编号: C20823); 广东粤海饲料公司科技资金

作者简介: 黄翔鹄(1962—)男; 讲师; 从事养殖水域微藻生态调控防病的生态学理论研究

照组为空白组。实验时间是 2001 年 8 月 11 日至 2001 年 8 月 31 日; 实验室的光照强度为 700—15,000 lx; 海水经 NaClO 消毒后再以 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 中和处理, 每组放养平均体长约为 9.7 cm 的对虾 25—30 尾, 各组通气量、温度、盐度、投饵量及投饵次数等实验条件一致。养殖过程适当换水, 定期追加培养两种微藻所需的营养盐, 5 d 测定一次微藻量和主要水化因子, 实验进行至 20 d, 取对虾血清进行各项与抗病力相关因子测定。

1.5 水质的测定 上午 10:00—11:00 从各试验组和对照组取水样, 立即测定各项水质因子。氨氮($\text{NH}_3\text{-N}$)用奈氏试剂法测定; 亚硝酸氮($\text{NO}_2\text{-N}$)用 GR 试剂法测定; 溶解氧(DO)和化学耗氧量(COD)分别用碘量法和碱性高锰酸钾法测定; pH 值用玻璃电极法测定; 光密度值(OD)用 756 紫外分光光度计测定。

1.6 血细胞计数 用卡介苗注射器, 采用 7 号针头, 从对虾心脏取血, 用 10% 福尔马林作固定液(固定液: 血液 = 1:1), 装入 Eppendorf 离心管混匀, 在光镜下进行血细胞计数。

1.7 与抗病力相关酶活力测定 每组取 10—15 尾对虾, 用注射器从心脏取血, 置于 Eppendorf 管中, 在 4℃ 静置数小时, 取出蓝色血清在 -20℃ 保存备用。对虾血清蛋白含量测定按照 Comassie 亮蓝法^[2], 按该方法规定的条件, 蛋白质含量(mg/mL) = (测定管 OD / 标准管 OD) × 标准血清浓度。超氧化物歧化酶(SOD)活力按邓碧玉等^[3]改良的连苯三酚自氧化法测定。酚氧化酶(PO)活力参照 Ashida^[4]以 L-dopa 为底物比色的方法测定。溶菌酶活性(LSZ)的测定, 按王雷等^[6]将经二次活化的溶壁微球菌(中国科学院微生物研究所提供)接种于牛肉膏蛋白胨固体培养基培养 48 h, 取出后离心, 收集菌体。再按 Hultmark^[5]等人的方法改进, 用 0.1 mol/L 的磷酸钾盐缓冲液($\text{pH} = 6.4$)稀释至 $A_{570\text{ nm}} = 0.3$, 配成底物悬液供测试用; 按该方法规定条件, 溶菌酶活性(U/mL) = $(A_0 - A) / A_0$ 。抗菌活力的测定是以大肠杆菌(本校微生物组提供)为底物^[5], 用 0.1 mol/L 的磷酸钾盐缓冲液($\text{pH} = 6.4$)稀释至 $A_{570\text{ nm}} = 0.3$, 在该方法规定条件下, 抗菌活力 = $[(A_0 - A) / A_0]^{1/2}$ 。

2 结果

2.1 微藻数量

实验过程中各实验组微藻种群细胞数处于稳定范围, 透明度为 33—45 cm, 引入微藻量与多数对虾高位池养殖后期优势微藻种群数量相似, 波吉卵囊藻为 $0.12\text{—}2.31 \times 10^7 \text{ Cell} \cdot \text{L}^{-1}$, 生物量为 $0.66\text{—}12.71 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 微绿球藻为 $4.23\text{—}18.5 \times 10^7 \text{ Cell} \cdot \text{L}^{-1}$, 生物量为 $1.42\text{—}6.20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 基本可代表自然养殖池优势微藻种群特征, 其试验养殖水环境相关特征基本由该微藻种群所控制(表 1)。微绿球藻种群数量明显大于波吉卵囊藻, 这是由于微绿球藻细胞相对较小所致。

2.2 主要水质因子的检测

2.2.1 COD、DO 和 pH 值的变化 实验 1, 2, 3 组在水质调控中均收到良好效果(表 2), 实验结束时 DO 值比对照组分别提高了 13.0%, 18.7% 和 15.8%; COD 值比对照组分别降低了 7.60%, 6.67% 和 13.5%; pH 值实验组均有上升, 对照组则变化不大。微绿球藻对于增加溶氧作用较为明显, 混合藻对于降低 COD 作用较为突出, 接入微藻对养殖水环境 pH 值提高均有促进作用。

表 1 微藻生物量的变化(2001.8.11—8.31)
Tab. 1 The changes of microalage biomass

试验组	种类	微藻生物量/(mg·L ⁻¹)				
		08.11	08.16	08.21	08.26	08.31
1	波吉卵囊藻	9.46	10.51	12.71	12.43	12.16
2	微绿球藻	2.77	4.39	5.83	6.20	6.06
3	波吉卵囊藻	0.66	1.43	3.96	4.51	4.57
	微绿球藻	1.42	3.03	4.32	4.12	4.19
4	—	—	—	—	—	—

表 2 试验过程中 COD、DO 和 pH 值的变化
Tab.2 The changes of COD, DO and pH during the experimental

时间	COD/(mg·L ⁻¹)				DO/(mg·L ⁻¹)				pH 值			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
2001-08-11	5.31	5.31	5.31	5.31	6.92	6.92	6.92	6.92	7.43	7.43	7.43	7.43
2001-08-16	5.29	5.23	5.18	5.44	7.08	7.09	7.04	7.02	7.66	7.52	7.52	7.50
2001-08-21	5.43	5.54	5.26	5.71	7.53	7.76	7.89	7.48	7.70	7.59	7.60	7.53
2001-08-26	5.72	5.83	5.51	6.10	7.62	7.95	7.88	6.93	7.72	7.60	7.61	7.41
2001-08-31	5.96	6.02	5.58	6.45	7.73	8.12	7.92	6.84	7.78	7.62	7.60	7.40

2.2.2 氨氮与亚硝酸氮变化 引入微藻均可降低养殖环境中氨氮与亚硝酸氮含量, 实验结束时, 实验 1, 2, 3 组的氨氮含量比对照组分别降低 51.7%, 37.8%和 39.3%; 亚硝酸氮含量分别比对照组降低了 30.2%, 27.0%和 26.4%, 波吉卵囊藻种群对降低氨氮与亚硝酸氮效果较为显著(表 3)。因为稳定的微藻种群可吸收和利用水体有机质及排泄物, 降低养殖水体中的氨氮和亚硝酸氮含量。实验 2, 3 组的氨氮和亚硝酸氮含量基本相似, 是由于实验 3 组后期中的微绿球藻种群有所增加, 成为主要的优势种群(表 1), 导致这两组的水质指标相近。

表 3 氨氮和亚硝酸氮的变化
Tab. 3 The changes of NH₃-N and NO₂-N

时间	氨氮/(mg·L ⁻¹)				亚硝酸氮/(mg·L ⁻¹)			
	1	2	3	4	1	2	3	4
2001-08-11	0.031	0.031	0.031	0.031	0.004	0.004	0.004	0.004
2001-08-16	0.034	0.056	0.035	0.081	0.046	0.065	0.071	0.082
2001-08-21	0.280	0.336	0.224	0.448	0.152	0.180	0.183	0.190
2001-08-26	0.350	0.434	0.428	0.526	0.385	0.497	0.491	0.617
2001-08-31	0.432	0.556	0.543	0.894	0.662	0.693	0.698	0.949

2.3 与抗病力相关酶活力的测定

1, 2, 3 组的对虾各项抗病力因子指标均比对照组有明显的提高。实验 1, 2, 3 组血细胞数比对照组分别提高了 23. 7%, 24. 7% 和 25. 2%; 血清蛋白含量提高了 1. 7%, 1. 3% 和 1. 1%; 溶菌 (LSZ) 活力提高了 25. 8%, 21. 0% 和 38. 7%; 抗菌活力提高了 52. 6%, 41. 1% 和 42. 1%; 超氧化物歧化酶 (SOD) 提高了 72. 7%, 22. 9% 和 17. 9%; 酚氧化酶 (PO) 提高了 75. 0%, 68. 8% 和 87. 5% (表 4)。引入两种微藻于对虾养殖环境中, 对虾与抗病力相关指标有显著提高, 其中 1 组和 3 组对虾抗病力的有关因子指标高于 2 组 (表 4)。

表 4 凡纳对虾抗病力相关因子的测定
Tab. 4 Analyzing effects on factors that relating to anti disease ability of *P. vannamei*

组别	PO /(OD•mol ⁻¹)	SOD /(U•mol ⁻¹)	抗菌活力	溶菌活力	血清蛋白量 /(mg•mL ⁻¹)	血细胞数目/ 1×10^6 (cell•mL ⁻¹)
1	0. 0028	98. 6	0. 145	0. 078	4. 79	4. 75
2	0. 0027	70. 2	0. 134	0. 075	4. 77	4. 79
3	0. 0030	67. 3	0. 135	0. 086	4. 76	4. 80
4	0. 0016	57. 1	0. 095	0. 062	4. 71	3. 84

3 讨论

3.1 对虾的免疫机制

对虾类的免疫是非特异性免疫, 其免疫机理可分为两种: 一是体液性免疫机制, 主要包括血淋巴的溶菌作用、凝集作用、抗菌作用及血淋巴中与免疫有关的一些酶; 另一种是细胞免疫, 是指血淋巴中的血细胞对异物的吞噬作用、杀灭和排除作用^[6]。一些学者认为^[6-8]: 对虾血细胞数量的多少, 血清中蛋白质含量, 与体液性免疫有关的酶的活性高低均能反映对虾抗病力的强弱, 如: 抗菌、溶菌活力, 酚氧化酶活性、SOD 活性的强弱, 在一定程度上可以作为衡量对虾免疫功能及机体状态的指标。在实验结束时, 实验组相关因子比对照组都有明显增高, 其增加幅度: 血细胞数为 23. 7—25. 2%, 血清蛋白含量为 1. 1—1. 7%, LSZ 活力为 21. 0—38. 7%, 抗菌活力为 41. 1—52. 6%, SOD 为 17. 9—72. 7%, PO 为 68. 8—87. 5%, 这些变化与氨氮和亚硝酸氮含量有密切关系 (表 3, 4)。作者认为, 选择这些因子作为本实验对虾抗病力内环境指标, 具有一定的代表性。

3.2 对虾疾病发生原因

对虾养殖过程中, 疾病的发生与虾体抗病力和其环境因素有密切的关系, 其中环境因素起着重要作用, 它不仅影响病原体的数量, 也影响虾体抗病能力。对虾疾病的暴发不与环境中致病菌与病毒数量呈正相关, 更多的是由于生态系统的破坏和放养密度的增加而导致生态失衡的综合因素所致^[9-11]; 孙舰军等^[12]更进一步证明, 在对虾养殖的水环境中氨氮等有毒物质的增加, 使对虾的抗病力降低, 即与对虾抗病力有关的酶活力如 SOD、POD、溶菌和抗菌活力等降低, 血细胞数量减少, 因而提高了对致病菌的易感染性。本研究中对对照组氨氮与亚硝酸氮明显高于其他各实验组, 对虾抗病力相关因子都相对较弱 (表 3, 4)。因此, 水质恶化可导致对虾生长环境平衡失调, 从而增加了对虾患病几率。作者认

为, 养殖过程中通过调节好生态系统平衡, 保持良好的水质, 以增强对虾抗病力来减少疾病的暴发是预防虾病的一个重要途径。

3.3 微藻生态调控与对虾抗病力

浮游植物在对虾养殖池塘中占有重要位置, 它对于维持池塘生态系统的正常功能, 稳定池塘环境是不可缺少的^[13]。微藻在种群持续稳定过程中, 通过光合作用一方面能降低并消除养殖水体中的有机污染和其他有害物质; 另一方面为水体提供充足的氧气, 保持养殖生态系统良性循环, 达到改善水质的目的。许多学者认为, 通过改善对虾养殖环境能增加对虾的抗病力^[2, 8, 10-14]。本实验通过引入种群稳定的波吉卵囊藻和微绿球藻作为对虾养殖水体的微生态良性调控的主要结构, 不但可以降低水体中氨氮、亚硝酸氮和 COD 等有害因子的浓度, 消除胁迫因子, 还能提高水中溶解氧含量(表 2, 3), 使水体环境长时间处于良好的动态平衡状态, 利于对虾生长。更重要的是, 试验组中与对虾抗病力相关的酶活力比对照组有显著提高, 对虾体内血细胞的数量和血清蛋白的含量也有增多(表 4)。作者认为: 通过微藻生态调控, 改善养殖环境来提高对虾的抗病力, 是对虾池生态调控防病的重要组成部分, 也是对虾养成的关键技术。

3.4 微藻种群稳定性及其对对虾抗病力影响

作者认为, 进行微藻生态调控的优良藻株选育, 其种群的稳定性是一个重要指标。引入波吉卵囊藻实验 1 组对虾抗病力明显高于引入微绿球藻实验 2 组(表 4), 这说明不同藻类种群对对虾抗病力影响存在显著差异, 这可能与不同微藻在进行光全作用时对无机氮和无机磷吸收强度等生理特征差异性有密切关系, 因此, 藻种选育是微藻生态调控的关键。对这两种微藻的一些生理特征还有待作进一步研究。

参考文献:

- [1] 曾呈奎, 相建海. 海洋生物技术[M]. 济南: 山东科学出版社, 1998, 327—340
- [2] 陈 勤. 抗衰老研究实验方法[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1996, 606—607
- [3] 邓碧玉, 袁勤生, 李文杰. 改良的连苯三酚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
- [4] Ashida M. Purification and characterization of pro phenoloxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori* [J]. *Arch. Biochem Biophys.*, 1971, 144: 749—762
- [5] 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]. 海洋与湖沼, 1995, 26(2): 179—185
- [6] 管华诗. 海水养殖动物的免疫、细胞培养和病害研究[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1999, 1—31
- [7] 李光友, 王 青. 中国对虾血细胞及其免疫研究[J]. 海洋与湖沼, 1995, 26(1): 591—597
- [8] 李永祺. 海水养殖生态环境的保护与改善[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1999, 61—70
- [9] 马悦欣, 李 华, 陈 营. 1993 年中国对虾爆发性流行病细菌病原学研究[J]. 大连水产学院学报, 1995, 10(2): 1—8
- [10] 丁美丽, 林 林, 李光友等. 有机污染对中国对虾体内外环境影响的研究[J]. 海洋与湖沼, 1997, 28(1): 7—12
- [11] 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
- [12] 孙舰军, 丁美丽. 氨氮对中国对虾抗病力的影响[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(3): 267—272
- [13] 王崇明, 张 岩, 麻次松. 对虾池塘浮游植物与主要水质因子的关系[J]. 海洋科学, 1993, 4: 10—12
- [14] 孙舰军, 丁美丽. 改善虾池环境增强中国对虾抗病力的研究[J]. 海洋科学, 1999, 3—5

STUDIES ON TWO MICROALGAE IMPROVING ENVIRONMENT
OF SHRIMP POND AND STRENGTHENING ANTI DISEASE ABILITY
OF *PENAEUS VANNAMEI*

HUANG Xiang-hu, LI Chang-ling, LIU Chur-wu, ZHENG Lian and HE Jia
(Fisheries College, Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang 524025)

Abstract: By means of artificial introduction *Oocystis borgei* and *Nannochloris oculata* into the cultural environment of shrimp, *Penaeus vannamei*, then inspecting the changes of factors that relate to the anti-disease ability of shrimp and measuring the main water quality factors to study the influence of microalga micro-ecology control over the anti-disease ability of shrimp. The result shows: Introducing *Oocystis borgei* and *Nannochloris oculata* into cultural environment can improve the water quality. The number of blood cell, the content of blood serum protein and the activity of phenoloxidase, superoxide dismutase(SOD), antibacterial enzyme and lysozyme are dramatically improved in contrast to the control group. Microalga-ecology control is an important measure to prevent the shrimp disease.

Key words: *Oocystis borgei*; *Nannochloris oculata*; *Penaeus vannamei*; Anti-disease ability; Microalga-ecology control