

蛋白质营养对高密度养殖凡纳滨对虾生长与免疫力的影响

夏苏东¹, 李 勇², 王文琪¹, 于学权³, 王美琴², 王 华²

(1. 青岛农业大学 动物科技学院, 山东 青岛 266109; 2. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 3. 天津海发珍品实业有限公司, 天津 300450)

摘要: 在 高 密 度 养 殖 条 件 下, 进 行 单 因 素 随 机 设 计 动 物 试 验。 用 5 种 饲 料(蛋 白 质 水 平 31%、35%、39%、43%、47%, 以 A~E 组 表 示)分 别 投 喂 平 均 体 质 量 6.2 g±0.2 g、平 均 养 殖 密 度 3.1 kg/m³ 的 凡 纳 滨 对 虾 (*Litopenaeus vannamei*), 探 寻 蛋 白 质 营 养 对 虾 生 长、免 疫、水 质、抗 胁 迫 的 影 响 特 征。 结 果 表 明:(1) 中 高 蛋 白 质 水 平 具 有 显 著 促 进 对 虾 生 长 的 效 果, 随 着 蛋 白 水 平 的 提 高, 特 定 生 长 率 先 增 加 后 降 低, 饲 料 系 数 正 好 相 反, D 组 两 指 标 最 佳, 分 别 为 110.98 % 和 2.54; C、D、E 组 差 异 不 显 著。(2) 中 高 蛋 白 质 水 平 有 利 于 提 高 对 虾 多 数 免 疫 指 标 的 活 力, 血 淋 巴 中 血 细 胞 浓 度、T-AOC 活 力、POD 活 力、总 蛋 白 含 量、白 蛋 白、血 蓝 蛋 白 含 量, 随 着 蛋 白 质 水 平 提 高 先 增 加 后 降 低, 前 5 指 标 含 量 均 以 D 组 最 高, 比 A 组 显 著 提 高 16.8%~33.9%; 而 血 蓝 蛋 白 含 量 C 组 最 高, 比 A 组 提 高 15.0%。(3) 高 蛋 白 质 水 平 有 利 于 提 高 对 虾 SOD 活 力, 也 显 著 增 强 抗 低 盐 胁 迫 的 能 力, 但 同 时 极 显 著 加 大 了 水 环 境 中 氨 氮 和 亚 硝 氮 的 污 染。(4) 在 我 国 北 方 集 约 化 高 密 度 养 殖 条 件 下, 凡 纳 滨 对 虾 中 后 期 生 长 阶 段 适 宜 的 饲 料 蛋 白 质 营 养 水 平 为 39%~43%。

关键词: 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*); 蛋白质水平; 生长性能; 免疫力; 抗胁迫; 水质因子

中图分类号: S96

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2009)05-0051-08

在对虾及水产动物饲料中, 蛋白质是必需的核心营养物质, 蛋白质不足, 影响对虾生长和免疫抗病能力; 蛋白质过高, 不仅会增加饲料成本和影响其代谢及生长, 并且会使氮排泄造成的水体污染加重, 使其机体处于亚健康状态, 最终导致病害发生^[1~3]。因此, 通过生态营养调控, 确定饲料中适宜的蛋白质等营养水平, 对提高养殖对虾的免疫力、减少环境胁迫和病害发生, 保证对虾健康生长, 将发挥越来越重要的作用^{4, 5}。

水产养殖动物营养与免疫的关系已逐步引起国内外研究人员的重视^[6, 7]。关于饲料维生素、微量元素等含量对甲壳动物免疫和抗病力的影响, 国内外已进行了一些研究^[8~11]; Yannick Goimier^[12]研究了蛋白质水平与南美蓝对虾亲虾生殖与免疫的关系; 饲料蛋白水平对凡纳滨对虾幼虾、罗氏沼虾幼虾免疫力的影响也有报道^[13, 14]; 但是关于高密度养殖条件下, 凡纳滨对虾蛋白质营养与免疫的研究报道尚未见到。本研究对我国北方集约化高密度养殖条件下, 不同蛋白质营养水平对中后期凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)生长、免疫、水质、抗胁迫的

关系进行探寻, 为确定饲料适宜蛋白质营养与提高免疫抗病力提供参考和借鉴。

1 材料与方法

1.1 生长试验方法

1.1.1 试验设计与动物分组

采用单因素随试验设计, 即 5 种饲料蛋白质水平(31%、35%、39%、43%、47%; 以 A~E 组表示)处理, 每处理 3 重复, 每重复 30 尾虾。试验用凡纳滨对虾购于天津立达水产有限公司, 选取体质健康的凡纳滨对虾, 经消毒处理, 暂养在 40 m² 矩形水泥池中驯化 2 周, 挑选平均质量 6.2 g±0.2 g 虾 450 尾随机分到各试验组中。

收稿日期: 2009-02-19; 修回日期: 2009-03-11

基金项目: 国家 863 计划重点项目(2006AA100305)

作者简介: 夏苏东(1982-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 水产动物营养与免疫学, E-mail: xsd20022003@126.com; 李勇, 通信作者, 博士, 研究员, 研究方向: 水产动物营养与饲料学, 电话: 0532-82898724, E-mail: lyzhyh@hotmail.com

1.1.2 试验饲料

根据试验设计和同质优化方法,确定5种蛋白质梯度水平的试验饲料配方,见表1。饲料原料主要采用优质鱼粉、蛋白粉、鱼油、淀粉、复合矿物质、复合维生素等。按照饲料配方将原料混匀、超微粉碎后,经双螺杆压条机挤压出直径为2 mm的颗粒配合饲料,60℃烘干至恒重。粉碎过筛后,选取1.2~1.6 mm的作为对虾试验料。

表1 凡纳滨对虾试验饲料组成及主要营养成分含量(%)

Tab. 1 Ingredients and analysis of nutrients of trial pellet diets for the white shrimp(%)

组别	A	B	C	D	E
秘鲁鱼粉	9.00	13.00	17.00	21.00	26.42
面粉	41.99	33.78	25.87	19.50	19.50
花生粕	8.00	12.68	15.00	11.59	10.07
玉米蛋白粉	2.00	3.00	5.00	10.00	10.00
棉籽蛋白	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
美国肉骨粉	10.00	10.00	10.00	10.00	8.51
虾壳粉	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
羽毛粉	3.97	3.00	3.08	4.00	4.00
沸石粉	3.50	3.50	3.50	3.41	0
卵磷脂	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
血球蛋白粉	1.00	1.00	1.00	1.00	2.00
精炼鱼油	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
磷酸二氢钙	1.04	0.54	0.05	0	0
复合维生素	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
复合矿物元素	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60
三氧化二铬	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
合计	100	100	100	100	100
干物质	90.60	91.80	91.30	90.80	92.10
粗蛋白	31.30	35.30	39.20	42.80	46.80
钙	2.03	2.12	2.20	2.35	2.44
总磷	1.26	1.30	1.33	1.39	1.50
粗脂肪	4.70	4.80	4.90	5.20	5.30
粗灰分	6.20	6.30	6.40	6.60	6.80

注:表中各营养成分均为实测值

1.1.3 饲养管理

试验于7~9月在天津海发珍品实业有限公司进行,试验期60 d。试验桶为80 L圆桶,配备气石充气,盖塑料网防逃。水温25℃±2℃,盐度35±2‰。试验始末养殖密度分别为2.3 kg/m³和3.9 kg/m³(对虾集约化精养密度一般为1~2 kg/m³)。养殖前期每天换水1次,后期每天换水2次,每次换取30%水量。日投饲量为虾体质量的3%~6%,投喂时间分别为06:00、11:30、17:30、21:30。根据对虾摄食变化情况,及时调整投喂量。发现死虾及时称重,记录。试验开始和结束时各组虾空腹称质量。

1.1.4 样品采集与分析

试验饲料养分含量测定方法^[15]:干物质用105℃烘干法;粗蛋白质用微量凯氏定氮法;粗脂肪用索氏抽提法;粗灰分用550℃灼烧法;总磷采用磷钼蓝分光光度法。

水质测定于9月5日进行,下午17:00投喂饲料后,次日8:00分别采集水样300 mL,置于-20℃冷冻保存,24 h内完成检测。水生态因子测定采用国家标准(GB 17378.4-1998):NH₄-N用靛酚蓝分光光度法;NO₂-N用萘乙二胺分光光度法。

试验结束后饥饿12 h,选取蜕皮间期对虾,每桶取12尾,每处理共取36尾,用滤纸吸干体表水分,测量体长、体质量,置冰盘上解剖,称腹部质量,去壳后肌肉称质量,65℃烘干至恒重;在头胸部取出完整肝胰腺,用预冷重蒸水(0~4℃)冲洗干净,吸干水分后称质量,保存于低温(-20℃)冰箱中,待分析用。

1.1.5 测定指标及方法

存活率=100×试验结束时虾体数/试验开始时虾体数;

增重率=100×(末质量-初质量)/初质量;

蛋白质效率=(末质量-初质量)/(摄食量×蛋白质含量);

净增重=末均质量-初质量;

特定生长率=100×(ln末质量-ln初质量)/养殖天数;

饲料系数=摄食量/(末质量-初质量);

肥满度=100×体质量/体长³;

出肉率=100×腹部质量/虾体质量;

肝体比=100×肝胰腺质量/体质量;

肌肉水分含量=100×(1-肌肉风干质量/肌肉鲜质量);

总有害氮浓度=氨氮浓度+亚硝氮浓度。

1.2 血液免疫指标测定与胁迫试验

1.2.1 血清制备

生长试验结束后饥饿12 h,选取蜕皮间期对虾,每桶取12尾,每处理共取36尾,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^[16],抗凝剂与虾血体积比为1:1,从虾腹部血窦抽血,注入到1.5 mL无菌离心管内,4℃冷藏过夜,3 000 r/min冷冻离心6 min,取上层血清用于各项免疫指标测定。

1.2.2 免疫指标测定方法

血细胞计数:采用1 mL一次性无菌注射器取血,10%福尔马林作固定液混匀,血球计数板计数。

血蓝蛋白:血淋巴中氧合血蓝蛋白含量测定参照Chen(1995)^[19]的方法。血蓝蛋白含量表达为:

血蓝蛋白含量(mmol/L) = (OD × R) / (ε × S × P)。式中 OD 为直接读取的吸光值; ε 为消光系数; R 为反应总体积(μL); S 为待测样品体积(μL); P 为光穿透长度(cm)。

血清总蛋白浓度、白蛋白浓度、SOD(超氧化物歧化酶)、T-AOC(总抗氧化力)、POD(过氧化物酶)和 MDA(丙二醛)指标,使用南京建成科技有限公司试剂盒测定,其测定原理概述如下:

总蛋白浓度测定:在碱性溶液中蛋白与 Cu²⁺ 形成紫红色络合物,其颜色的深浅与蛋白质的浓度成正比。

白蛋白浓度测定:溴甲酚绿与白蛋白结合后,由黄色变成绿色,绿色的深浅与白蛋白浓度成正比。

SOD 测定:超氧阴离子自由基(O₂⁻)氧化羟胺形成亚硝酸盐,显色剂作用下呈紫红色,用光度计测其吸光度。

T-AOC 测定:抗氧化物能使 Fe³⁺ 还原成 Fe²⁺,后者与菲啉类形成稳固络合物,通过比色测其抗氧化能力。

POD 测定:利用过氧化物酶催化过氧化氢反应原理,测定 420 nm 处吸光度的变化得出其酶活性。

MDA 测定:采用 TBA 法。丙二醛可与硫代巴比妥酸缩合,形成红色产物,在 532 nm 处有最大吸收峰。

1.2.3 胁迫试验

离水胁迫试验:生长、免疫试验结束后,每处理取虾 15 尾(每桶 5 尾),直接放到干燥的水泥地面上,观察记录离水至死亡时间,以心脏停止跳动为准,室温 25℃。低盐胁迫试验:每处理取虾 24 尾(每

桶 8 尾),直接放到 1%淡水中,观察记录放入至死亡时间,以心脏停止跳动为准,水温 24℃。

1.3 统计分析

试验数据用 SPSS11.5 统计软件进行单因素方差分析,多重比较采用 LSD 和 Duncan 法进行。

2 试验结果

2.1 生长试验

2.1.1 生长指标

由表 2 可知,日增重、特定生长率随蛋白质水平增加先增后降,C、D、E 组之间差异不显著,均显著高于 A、B 组。饲料系数随蛋白质水平增加先降后增,C、D 组显著低于 A、B、E 组。蛋白质效率随蛋白质水平升高而降低,只有 E 组与其它组差异显著。各组存活率差异不显著。

肌肉水分含量随蛋白梯度增加而降低,低蛋白组(A 和 B)与中高蛋白组(C、D 和 E)差异显著。出肉率和肝体比随蛋白梯度增加有增加趋势,但与饱满度一样各组差异不显著。

2.1.2 水质指标

由表 3 可知,随蛋白质水平提高,水体总有害氮、氨氮和亚硝氮浓度总体为增加趋势。总有害氮 B、C、D、E 组分别比 A 组高 17.1%、37.5%、48.3%、92.4%;氨氮 B、C、D、E 组分别比 A 组高 24.7%、45.4%、42.8%、78.4%;亚硝氮 B、C、D、E 组分别比 A 组高 9.1%、29.4%、54%、106.9%。

表 2 饲料蛋白质水平对凡纳滨对虾生长性能的影响

Tab. 2 Effect of dietary protein levels on growth performance of the white shrimp

组别	A	B	C	D	E
蛋白水平(%)	31	35	39	43	47
存活率(%)	88.49 ± 2.21 ^a	89.53 ± 2.27 ^a	91.99 ± 0.10 ^a	92.93 ± 0.17 ^a	92.35 ± 2.41 ^a
末均重(g)	11.14 ± 0.17 ^b	11.71 ± 0.49 ^b	12.85 ± 0.27 ^a	13.08 ± 0.49 ^a	12.88 ± 0.44 ^a
净增重(g)	4.94 ± 0.17 ^b	5.50 ± 0.49 ^b	6.65 ± 0.26 ^a	6.88 ± 0.49 ^a	6.68 ± 0.04 ^a
增重率(%)	79.70 ± 2.75 ^b	88.81 ± 8.01 ^b	107.30 ± 4.3 ^a	110.98 ± 8.0 ^a	107.89 ± 0.7 ^a
特定生长率	0.97 ± 0.02 ^b	1.05 ± 0.07 ^b	1.21 ± 0.03 ^a	1.24 ± 0.06 ^a	1.21 ± 0.005 ^a
饵料系数	3.1 ± 0.24 ^a	2.90 ± 0.02 ^a	2.59 ± 0.18 ^b	2.54 ± 0.26 ^b	2.66 ± 0.08 ^a
蛋白质效率	1.075 ± 0.08 ^a	0.984 ± 0.01 ^a	0.980 ± 0.07 ^a	0.956 ± 0.09 ^a	0.814 ± 0.02 ^b
饱满度	1.29 ± 0.01 ^a	1.30 ± 0.01 ^a	1.29 ± 0.02 ^a	1.29 ± 0.01 ^a	1.30 ± 0.014 ^a
出肉率(%)	68.22 ± 0.12 ^a	68.23 ± 0.21 ^a	68.30 ± 0.04 ^a	68.80 ± 0.29 ^a	68.89 ± 0.42 ^a
肝体比(%)	3.75 ± 0.15 ^a	3.86 ± 0.07 ^a	3.88 ± 0.09 ^a	3.98 ± 0.06 ^a	3.95 ± 0.02 ^a
肌肉水分(%)	73.71 ± 0.30 ^a	73.22 ± 0.27 ^a	72.66 ± 0.27 ^b	72.43 ± 0.29 ^b	72.80 ± 0.25 ^b

注:表中数据为平均值 ± 标准误。同一行数据右上角的相同字母表示差异不显著(P > 0.05),相邻字母表示差异显著(P < 0.05),相间字母表示差异极显著(P < 0.01)。下同。

2.2 免疫力

由表 4 可知, 随蛋白质水平增加, 对虾血清总蛋白、白蛋白和血蓝蛋白的浓度先增后稍降; 总蛋白和白蛋白 D 组最高, 血蓝蛋白 C 组最高。其中总蛋白和血蓝蛋白 A 组与 C、D、E 组差异显著, 白蛋白 A 组仅与 D、E 组差异显著, 其余均差异不显著。

对虾血细胞浓度、血清 POD 与 T-AOC 活力, 随蛋白水平增加先增后降, 均以 D 组最高, A 组与 D

组差异显著。血清 SOD 活力随蛋白水平升高而增加, A 组与 D、E 组差异显著。血清 MDA 含量随饲料蛋白含量增加变化不明显, 各组差异不显著。

由表 4 可知, 随饲料蛋白水平提高, 虾对低盐胁迫和离水胁迫的抵抗能力先增后降, 抗低盐胁迫能力 D 组最好, A 组与 C、D 组差异显著; 抗离水胁迫能力 C 组最好, 但各组差异不显著。

表 3 饲料蛋白质水平对凡纳滨对虾水质测定指标的影响(mg/L)

Tab. 3 Effect of dietary protein levels on water quality of the white shrimp(mg/L)

组别	A	B	C	D	E
总有害氮浓度	0.381 ± 0.018 ^e	0.446 ± 0.009 ^e	0.524 ± 0.015 ^c	0.565 ± 0.018 ^c	0.733 ± 0.008 ^a
氨氮浓度	0.194 ± 0.032 ^d	0.242 ± 0.014 ^{cd}	0.282 ± 0.025 ^{abc}	0.277 ± 0.010 ^{bc}	0.346 ± 0.014 ^a
亚硝氮浓度	0.187 ± 0.015 ^f	0.204 ± 0.008 ^d	0.242 ± 0.010 ^{ce}	0.288 ± 0.018 ^c	0.387 ± 0.021 ^a

3 讨论

3.1 蛋白质营养对生长性能的影响

刘栋辉等^[13]研究表明, 饲料蛋白含量在 20% ~ 45% 时, 凡纳滨对虾(0.28 ~ 5.6 g)增重率随蛋白增加先增后降并在 40% 达到最大值, 40% 以上差异不显著。凡纳滨对虾(0.01 ~ 1.1 g)摄食 28%、33%、38%、43% 和 48% 的 5 种蛋白饲料时, 增质量率在 33% 时达最大值^[17]。Kureshy 等^[18]用 16%、32%、48% 蛋白饲料分别投喂凡纳滨对虾幼虾(1.3 ~ 4.9 g)和成虾(5.6 ~ 10.4 g)28 d 后, 发现 32% 蛋白组特定生长率显著高于 16% 和 48% 蛋白组。本研究中, 增重率变化趋势与

上述研究基本相似, 当蛋白超过 43% 时, 增重率下降, 蛋白 39% 与 46% 之间各指标差异不显著。而增重的适宜蛋白质水平仅与刘栋辉等研究相近, 比黄凯、Kureshy 等提出的要高。这与不同研究中虾的生长阶段^[19]、蛋白梯度设计、养殖模式^[20] 等方面差异较大有关。当蛋白质不足时, 饲料无法满足机体生长与代谢对蛋白质的需要, 生长缓慢^[20]; 蛋白质过高时, 对虾生长也会受到抑制, 一方面吸收的过量蛋白需要耗能代谢排出体外, 蛋白质利用率降低^[20], 另一方面, 水体氨氮、亚硝氮浓度迅速升高(表 3), 接近或超过安全浓度上限^[21] (氨氮 0.6 mg/L、亚氮 0.1 mg/L), 长期处于有害氮胁迫下的对虾生长减缓^[22]。

表 4 饲料蛋白质水平对凡纳滨对虾免疫力与抗胁迫能力的影响

Tab. 4 Effect of dietary protein levels on immunity indicator and anti-stress ability of the white shrimp

组别	A	B	C	D	E
血细胞浓度(10 ⁵ ind./mL)	87.20 ± 4.42 ^b	88.50 ± 4.96 ^{ab}	90.92 ± 4.72 ^{ab}	101.87 ± 5.4 ^a	92.83 ± 4.38 ^{ab}
SOD(U/mL)	85.74 ± 2.86 ^b	88.99 ± 1.31 ^{ab}	89.98 ± 2.13 ^{ab}	95.99 ± 3.73 ^a	97.07 ± 4.00 ^a
T-AOC(U/mL)	8.50 ± 0.29 ^b	8.56 ± 0.37 ^b	8.96 ± 0.44 ^{ab}	9.78 ± 0.30 ^a	9.60 ± 0.52 ^{ab}
POD(U/mL)	85.66 ± 6.22 ^b	87.10 ± 4.47 ^b	97.60 ± 3.38 ^{ab}	103.9 ± 3.72 ^a	93.8 ± 4.59 ^{ab}
MDA(nmol/mL)	11.24 ± 0.78 ^a	12.20 ± 0.42 ^a	11.72 ± 0.80 ^a	12.14 ± 0.44 ^a	12.86 ± 0.44 ^a
血蓝蛋白浓度(mmol/L)	0.895 ± 0.34 ^b	0.972 ± 0.05 ^{ab}	1.029 ± 0.02 ^a	1.015 ± 0.04 ^a	1.025 ± 0.03 ^a
总蛋白(mg/mL)	86.00 ± 2.79 ^c	95.04 ± 2.17 ^{abc}	98.46 ± 3.17 ^{ab}	103.6 ± 3.45 ^a	102.11 ± 4.1 ^a
白蛋白(mg/mL)	15.32 ± 0.80 ^b	17.47 ± 0.57 ^{ab}	18.18 ± 1.33 ^{ab}	20.51 ± 1.93 ^a	19.33 ± 0.74 ^a
低盐胁迫时间(min)	483.4 ± 15.5 ^b	514.5 ± 14.5 ^{ab}	540.5 ± 12.8 ^a	548.3 ± 10.2 ^a	516.0 ± 12.7 ^{ab}
离水胁迫时间(min)	41.5 ± 8.90 ^a	54.3 ± 9.12 ^a	64.6 ± 10.37 ^a	56.2 ± 8.92 ^a	53.3 ± 7.65 ^a

Kureshy^[18]、刘栋辉^[13]、胡毅^[23]的研究, 饲料系数均表现出随蛋白水平提高先降后升的规律, 分别在蛋白含量 32%、40% 和 34% 时最低。但黄凯等^[17]研究表明, 随蛋白含量增加饲料系数持续减小, 这可能与使用高利用率的酪蛋白、明胶作为蛋白源有关^[24]。本研究饲料系数变化规律与 Kureshy、刘栋辉和胡毅的报道相似, 但达到最低值的蛋白质含量为 43%。

本试验蛋白质效率随着蛋白梯度增加而降低。刘栋辉等^[13]研究也表明蛋白梯度在 25%~45% 时, 蛋白质效率随蛋白含量增加而降低, 45% 蛋白组显著低于其它组。凡纳滨对虾摄食蛋白含量为 28%、33%、38%、43% 和 48% 的饲料时, 蛋白质效率随着蛋白含量的增加而显著降低^[17]。同样结果在胡毅^[23]研究中也报道。低蛋白水平显著降低对虾生长, 但高蛋白水平饲料中多余的蛋白质要被排泄或用作能量消耗掉, 用于生长的比例降低^[23]。另外, 39% 蛋白组肌肉水分含量显著降低, 表明中蛋白水平对肌肉干物质积累有一定作用。

3.2 蛋白质营养对免疫力和抗胁迫的影响

3.2.1 对血细胞影响

血细胞是抵御外来病原生物的第一道防线, 在对虾防御反应中起决定性作用^[25]。Yannick Goimier 等^[12]研究表明, 55% 蛋白组凡纳滨对虾血细胞总浓度、透明细胞浓度、颗粒细胞浓度均显著高于 35%、45% 蛋白组。对虾血细胞浓度随蛋白水平升高而增加, 40% 显著高于 15%、5% 蛋白组^[26]。刘栋辉等^[13]报道, 当蛋白质在 20% 时凡纳对虾的血细胞总蛋白显著低于 25%~45% 蛋白组。本研究也发现: 31% 蛋白组显著低于 43% 蛋白组, 表明当饲料蛋白质不足时无法满足对虾合成大量血细胞所需要的蛋白质营养, 血细胞浓度降低; 关于高蛋白含量造成对虾免疫指标下降的原因尚未见有研究报道, 可能与氨氮排泄量增加, 水环境胁迫降低血细胞的合成有关。

3.2.2 对抗氧化影响

甲壳动物呼吸爆发产生活性氧和氧自由基, 能攻击周围几乎所有的生物分子, 引起蛋白质变性、脂类过氧化以及 DNA 断裂^[27], 最终可导致机体老化、抗病能力下降、甚至死亡^[28]。Munoz 等^[29]在凡纳滨对虾体内证实了超氧阴离子的存在。SOD 和 POD 是生物体内两种相互关联的抗氧化酶, 可联合清除活性氧自由基, 使机体免受氧化伤害^[30]; T-AOC 是机体抗氧化能力的总体反映。谢国驹等^[31]报道, 日

本沼虾饲料蛋白 28%~44%, 肝胰脏中碱性磷酸酶、SOD 活力随蛋白质增加先升后降, AKP 在 40% 达到最大, SOD 在蛋白为 36% 时达到最大。本研究发现: 当饲料中蛋白水平较低时, SOD、POD 和 T-AOC 活力显著降低。这可能由于一方面, 充足的蛋白质营养为抗氧化酶合成提供了重要物质基础; 另一方面, 饲料蛋白含量可以影响血淋巴中血细胞浓度, 血淋巴中大量免疫酶与血细胞浓度有密切关系^[32]。蛋白水平对凡纳滨对虾抗氧化能力的影响, 还未见有报道。

过多的活性氧将使脂质过氧化程度加剧, 丙二醛是其的代谢产物之一, 被广泛用作细胞膜氧化损伤的评价指标^[33]。本研究表明, 血清 MDA 含量随蛋白含量变化的趋势不明显, 各组差异不显著。类似 MDA 的测定仅在一些胁迫实验中发现^[30], 关于蛋白水平对 MDA 影响还需进一步研究。

3.2.3 对血清蛋白影响

血蓝蛋白具有抗真菌^[34]、类酚氧化酶原的作用^[35]。Yannick Goimier^[12]研究表明 55% 蛋白组对虾血淋巴中总蛋白含量和血蓝蛋白含量显著高于 35% 和 45% 组。当蛋白在 20% 时, 凡纳对虾的血淋巴指标如血蓝蛋白和血淋巴蛋白均显著低^[12]。这与本研究结果基本一致, 即蛋白水平较低时, 显著降低血淋巴蛋白、血清白蛋白和血蓝蛋白的含量。当蛋白质含量较低时, 无法提供充足的蛋白质完成机体生长及合成代谢需要, 血清蛋白含量就较低。当蛋白含量超过 39% 时, 血蓝蛋白含量下降, 超过 43% 时血清总蛋白、白蛋白含量下降, 但统计差异不显著, 这可能与水质间接影响有关。

3.2.4 水质间接影响

在中国明对虾试验中发现, 氨氮浓度为 0.74~3.02 mg/L 时, 7 d 后各组血细胞浓度降低, 并与氨氮浓度负相关^[36]。孙舰军等^[37]研究发现, 中国明对虾在 2.5 mg/L 氨氮溶液中 20 d 后, 与抗病有关的酶活力比对照组明显下降, 试验组中 SOD、过氧化物酶、溶菌和抗菌酶的活力分别明显下降。本试验 E 组的氨氮、亚硝氮浓度显著高于 D 组(表 3), 而 D 组血清总蛋白、血蓝蛋白、血清白蛋白、血细胞浓度、T-AOC 活力、POD 活力较高于 E 组。这表明水中氨氮、亚硝氮胁迫使虾免疫力降低, 机体处于亚健康。

目前国内关于对虾蛋白营养与水质关系的研究未见报道。Luis 等研究养殖对虾 3 周后, 40% 蛋白组分别比 35%、30%、25% 蛋白组水体氨氮含量提高 24%、37%、131%^[38]; Burfford M 等^[39]

指出,凡纳滨对虾养殖水体中氮积累随蛋白含量增加而升高,8周后40%蛋白组比30%蛋白组总氮含量高79%。Koshlo S^[40]研究日本对虾表明,5小时内氨氮排泄量50.3%蛋白组比21%蛋白组高193%。本研究中,47%蛋白组,氨氮、亚硝氮浓度比43%蛋白组显著高23.5%、34.5%。可见,当饲料蛋白质含量超过需要量时,氨氮、亚硝氮等在水中积累,其胁迫因素间接降低对虾的免疫力,另外蛋白含量过低时直接影响对虾免疫力。因此在对虾养殖过程中确定适宜饲料蛋白水平是非常重要的。高蛋白质饲料的吸收、利用、排泄等代谢过程是复杂的生理生化反应,总体上加重机体的负担,关于其是否直接影响对虾免疫力还需进一步的研究。

3.2.5 对抗胁迫的影响

胁迫试验是对凡纳滨对虾总体健康情况和生命力强弱的考察。本研究发现,对虾抗低盐胁迫能力随蛋白水平增加先增后降,在43%达到最大,并且43%蛋白组显著高于30%蛋白组。刘栋辉^[13]报道,凡纳滨对虾盐度应激测试存活率,在蛋白含量从20%~30%时,随蛋白增加而增加。这是因为甲壳类在低盐度条件下用蛋白质的氨基酸来源以维持渗透压平衡。当虾摄食低蛋白高糖饲料时,一方面维持生长和渗透压的氨基酸来源减少,另一方面吸收过多葡萄糖引起肝胰脏糖原积累达到饱和^[41],阻止氨基酸和肽进入肝胰脏B细胞^[19,42]。低蛋白高糖饲料组肝胰脏糖原显著高,损害肝脏蛋白质代谢功能,抗胁迫能力降低^[13]。

对虾抗离水胁迫能力各组差异不显著,但39%蛋白组较好。可能是由于对虾离水后环境完全改变,胁迫强度大,饲料蛋白水平的影响力相对变弱,因而表现不出显著差异。

4 小结

本研究在高密度养殖条件下,通过蛋白质营养对凡纳滨对虾生长性能、免疫力、水质因素、抗胁迫能力影响特征和规律的探寻,获得以下主要结果:

(1) 中高蛋白质水平具有显著促进对虾生长的效果,随着蛋白水平的提高,特定生长率先增加后降低,饲料系数正好相反,D组两指标最佳,分别为110.98%和2.54;C、D、E组差异不显著。

(2) 中高蛋白质水平有利于提高对虾多数免疫指标的活力,血淋巴中血细胞浓度、T-AOC活力、

POD活力、总蛋白含量、白蛋白、血蓝蛋白含量,随着蛋白质水平提高先增加后降低,前5指标含量均以D组最高,比A组显著提高16.8%~33.9%;而血蓝蛋白含量C组最高,比A组提高15.0%。

(3) 高蛋白质水平有利于提高对虾SOD活力,也显著增强抗低盐胁迫的能力,但同时极显著加大了水环境中氨氮和亚硝氮的污染。

(4) 在我国北方集约化高密度养殖条件下,凡纳滨对虾中后期生长阶段适宜的饲料蛋白质营养水平为39%~43%。

参考文献:

- [1] 蒋克勇,李勇,李军,等. 大菱鲆幼鱼蛋白质的生态营养需要量探寻[J]. 海洋科学, 2005, 29(9): 65-70.
- [2] Mathis N, Feidt C, Brun-Bellut J. Influence of protein/energy ratio on carcass quality during the growing period of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) [J]. *Aquaculture*, 2003, (217): 453-464.
- [3] Burfford M A, Smith D M, Tabrett S J, et al. The effect of dietary protein on the growth and survival of the shrimp *Penaeus monodon* in outdoors tanks [J]. *Aquaculture Nutrition* 2004, 10: 15-23.
- [4] 袁春营,崔青曼. 通过营养调控降低养殖水体污染[J]. 饲料研究, 2003(5): 25-27.
- [5] 李勇,王雷,蒋克勇,等. 水产动物营养的生态适宜与环保饲料[J]. 海洋科学, 2004, 28(3): 76-78.
- [6] 艾庆辉,麦康森. 鱼类营养免疫研究进展[J]. 水生生物学报, 2007, 31(3): 425-430.
- [7] Min-Hsien Lee, Shi-Yen Shiau. Dietary vitamin C and its derivatives affect immune responses in grass shrimp, *Penaeus monodon* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2002, 12(2): 119-129.
- [8] Shi-Yen Shiau, Shu-Lin S. Dietary inositol requirement for juvenile grass shrimp, *Penaeus monodon* [J]. *Aquaculture* 2004, 24(1-4): 1-8.
- [9] Shi-Yen Shiau, Lee-Chun Jiang. Dietary zinc requirements of grass shrimp *Penaeus monodon*, and effects on immune responses [J]. *Aquaculture* 2006, 254(1-4): 476-482.
- [10] Min-Hsien Lee, Shi-Yen Shiau. Vitamin E requirements of juvenile grass shrimp *Penaeus monodon*, and effects on non-specific immune responses [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2004, 16(4): 475-485.
- [11] 周歧存,郑艾,阳会军,等. 维生素C和免疫多糖对凡纳滨对虾生长、饲料利用和虾体主要成分的影响[J]. 海洋科学, 2004, 28(8): 9-13.

- [12] Yannick G, Ariadna S, Gabriela G, *et al.* Relation between reproductive, physiological and immunological condition of *Litopenaeus setiferus* pre-adult males fed different dietary protein levels (Crustacea; Penaeidae) [J]. **Animal Reproduction Science**, 2006, 92: 193-208.
- [13] 刘栋辉, 何建国, 刘永坚, 等. 极低盐度下饲料蛋白质质量分数对凡纳对虾生长表现和免疫状况的影响 [J]. 中山大学学报(自然科学版), 2005, 11(44): 217-223.
- [14] 吴锐全, 肖学铮, 黄樟翰, 等. 罗氏沼虾饲料蛋白质质量最适含量的研究 [J]. 大连水产学报, 2000, 15(3): 164-168.
- [15] 杨诗兴. 饲料营养价值评定方法 [M]. 甘肃人民出版社, 1982: 166-205.
- [16] 蒋琼, 王雷, 罗日祥. 中国对血淋巴抗凝剂的筛选 [J]. 水产学报, 2001, 25(4): 359-362.
- [17] 黄凯, 王武, 卢洁. 南美白对虾幼虾蛋白质的需要量 [J]. 中国水产科学, 2003, 10(4): 308-321.
- [18] Kureshy N, Davis D. Protein requirement for maintenance and maximum weight gain for the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. **Aquaculture**, 2002, 204: 125-143.
- [19] Brito R, Rosas C, Chimal M, *et al.* Effect of different diets on growth and digestive enzyme activity in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) early post-larvae [J]. **Aquaculture Research**, 2001, 32(4): 257-266.
- [20] Gomez-Jimenez S. Effect of dietary protein level on growth, survival and ammonia efflux rate of *Litopenaeus vannamei* (Boone) raised in a zero water exchange culture system [J]. **Aquaculture Research**, 2005, 36: 834-840.
- [21] 李生, 黄德平. 对虾健康养成实用技术 [M]. 海洋出版社, 2003: 23-24.
- [22] 吴中华, 刘昌斌, 刘存仁, 等. 对虾慢性亚硝酸盐和氨中毒的组织病理学研究 [J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 1999, 33(1): 119-122.
- [23] 胡毅. 凡纳滨对虾饲料配方优化及几种饲料添加剂的应用 [D]. 博士论文, 中国海洋大学, 青岛, 2007.
- [24] Rovine J D, Stamler J S. Sodium nitroprusside, an endothelium-derived relaxing factor congener, increases platelet cyclic GM P levels and inhibits epinephrine-exacerbated in vivo platelet thrombus formation in stenosed canine coronary arteries [J]. **J Cardiovasc Pharmacol** 1993, 22(4): 626-631.
- [25] 攀延俊. 对虾非特异性免疫与对虾疾病监控的研究 [J]. 海洋科学, 2002, 4(26): 26-31.
- [26] Pascual C, Zenteno E, Cuzon G, *et al.* *Litopenaeus vannamei* juveniles energetic balance and immunological response to dietary protein [J]. **Aquaculture**, 2004, 236: 431-450.
- [27] Halliwell B, Gutteridge J. Free Radicals in Biology and Medicine, 2nd ed [M]. Clarendon Predd, Oxford, 1989.
- [28] Winston G W. Oxidants and antioxidants in aquatic animals [J]. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 1991, 100C: 173-176.
- [29] Munoz M, Rodnguez J, Vandei K, *et al.* Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei* [J]. **Aquaculture**, 2000, 191: 89-107.
- [30] 洪美玲, 陈立侨, 顾顺樟, 等. 氨氮胁迫对中华绒螯蟹免疫指标及胰腺腺组织结构的影响 [J]. 中国水产科学, 2007, 14(3): 412-418.
- [31] 谢国驹, 蔡永祥, 徐维娜, 等. 饲料蛋白水平对日本沼虾生长、消化酶和免疫酶的影响 [J]. 江苏农业学报, 2007, 23(6): 612-620.
- [32] Cassels F L, Marchalonis J J, Vasta G R. Heterogeneous humoral and hemocyte associated lectins with N-acylaminosugar specificities from the blue crab, *Callinectes sapidus* Rathbunae [J]. **Comp Biochem**, 1986, B85: 23-30.
- [33] Lepage G, Mnuoz G, Champagne J, *et al.* Preparative steps for the accurate measurement of malondialdehyde by high-performance liquid chromatography [J]. **Anal Bioche**, 1991, 197: 277-283.
- [34] Destoumieux D, Saulnier D, Garnier J, *et al.* Antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge [J]. **J Bio Chem**, 2001, 276: 47 070-47 077.
- [35] Adachi K, Hirata T, Nishioka T, *et al.* Hemocyte components in crustaceans convert hemocyanin into a phenoloxidase-like enzyme [J]. **Comp Biochem Physiol** 2003, 134B: 135-141.
- [36] 管越强. 主要环境因子对养殖对虾抗病力及白斑综合症发生的影响 [D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2003.
- [37] 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.
- [38] Luis R, Martinez C, Denisse A, *et al.* Investigation of the Effects of Salinity and Dietary Protein Level on Growth and Survival of Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei* [J]. **Journal of the World Aquaculture Society**, 2007, 38(4): 475-485.
- [39] Burfford M A, Smith D M, Tabrett S J, *et al.* The effect of dietary protein on the growth and survival of the shrimp, *Penaeus monodon* in outdoor tanks [J]. **Aquaculture Nutrition**, 2004, 10: 15-23.

- [40] Koshlo S. Effect of dietary protein levels on growth, feed utilization and nitrogen excretion of juvenile *Penaeus japonicus* [J] . **Aquaculture** 1993, **113**(1-2): 101-114.
- [41] Claybrook D L. Nitrogen metabolism// mental L H. ed. *The Biology of Crustacea, Internal Anatomy and Physiological Regulation*[M] . New York: Academic Press, 1983.
- [42] Rosas C, Cuzon G, Gaxiola G, *et al.* Metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei*; effect of salinity and dietary carbohydrates levels [J] . **Exp Mar Biol Ecol.** 2001a. 259: 1-22.

Effects of dietary protein levels on growth and immunity of *Litopenaeus vannamei* in high density culture system

XIA Su-dong¹, LI Yong², WANG Wen-qi¹, YU Xue-quan³, WANG Mei-qin², WANG Hua²

(1. Animal Science department, Qingdao Agriculture University, Qingdao 266109, China; 2. Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 3. Tianjin Seafood Industrial Development Co. Ltd., Tianjin 300450, China)

Received Feb., 19, 2009

Key words: *Litopenaeus vannamei*; protein levels; growth performance; immunity; anti-stress ability

Abstract: An experiment was conducted for 60 days to determine the relationship between the different dietary protein content and the growth and immunity of *Litopenaeus vannamei* in high density culture system. 450 white shrimps (average initial weight 6.2 ± 0.2 g) were assigned randomly to five treatments with three replicates within each treatment and were fed diets with 5 different protein levels 31%, 35%, 39%, 43% and 47% respectively in average density 3.1 kg/m^3 . The results were as follows: (1) Shrimps fed 43% dietary protein had the maximal special growth rate and the minimal feed conversion, there was no significant difference when the protein level was above 39%. (2) The total hemocyte counts, T-AOC activity, POD activity, total protein content, and white protein content in haemolymph were increased at first and then decreased with the increase of protein content in the diet. Compared with 31% protein content, the above 5 indicators of 43% protein content which was the best group were enhanced from 16.8% to 33.9% ($P < 0.05$). The SOD activity and oxyhemoly content reached a peak in 47% and 39% protein content respectively. (3) The concentrations of total ammonia, nitrite in the feeding water were increased significantly with the increasing of dietary protein level. The best group under low salinity stress has 43% protein content and had a significant difference with the shrimps fed 31% protein content. (4) Based on the results of the special growth rate, immune indicators, water quality and anti-stress abilities, the optimum protein requirement in the diet for sub-adult white shrimps in high density culture is 39% ~ 43%.

(本文编辑: 康亦兼)