

饲料中添加壳聚糖对异育银鲫的生长及抗病力的影响

陈云波^{1,2}, 周洪琪², 华雪铭², 王树芹²

(1. 皖西学院 化学与生命科学系, 安徽 六安 237012; 2. 上海水产大学渔业学院, 上海 200090)

摘要:在基础饲料中分别添加0.3%、0.5%、1%、2%的壳聚糖以及混合添加0.3%的壳聚糖和 50×10^{-6} 的大蒜素, 投喂异育银鲫2个月。测定鱼体的生长和对病原菌嗜水气单胞菌的抗感染能力-LD₅₀。该研究的目的是利用壳聚糖作为饲料添加剂, 为提高水产经济动物的抗病力和养殖效益提供参考。结果表明, 添加不同浓度的壳聚糖对体重的增加有显著影响($P < 0.05$), 其中0.5%、1%壳聚糖组对体重增加有极显著影响($P < 0.01$), 以0.5%壳聚糖组增重最快; 混合添加0.3%壳聚糖和 50×10^{-6} 大蒜素组对体重增加无显著性影响($P > 0.05$); 添加不同浓度的壳聚糖对异育银鲫的体长增长和成活率无显著影响($P > 0.05$); 饲料中添加0.5%、1%壳聚糖可以极显著地提高异育银鲫对嗜水气单胞菌的抵抗能力($P < 0.01$), 添加0.3%、2%壳聚糖, 混合添加0.3%壳聚糖和 50×10^{-6} 大蒜素, 与对照组LD₅₀无显著性差异($P > 0.05$)。抗感染能力与壳聚糖的添加量有关, 添加量过大, 抗感染能力减弱(0.5%、1%壳聚糖组的LD₅₀极显著高于2%壳聚糖组, ($P < 0.01$))。

关键词:异育银鲫; 生长; 抗病力; 壳聚糖

中图分类号: S965.117.71

文献标识码: A

文章编号: 1009-9735(2005)05-0031-04

随着科学的发展和人们对生命现象认识不断深入, 糖生物学的研究成了生命科学研究领域的新前沿, 如从藻类或微生物及天然植物中提取的多糖类物质, 具有免疫调节和抗病毒的能力; 壳聚糖(chitosan), 又称可溶性甲壳素、聚氨基葡萄糖, 化学名称是聚(1,4-β-D-氨基-2-脱氧-β-D-葡萄糖)^[1]; 是由甲壳素经浓碱水解脱乙酰基后生成的产物, 主要利用虾、蟹等甲壳类加工的废物——虾壳、蟹壳来制备。壳聚糖作为自然界中唯一大量存在的带正电荷氨基多糖, 具有不同于其他多糖的独特作用^[1,2]。王雷等^[3]、江晓路等^[4]用多糖作为添加入饲料中投喂中国对虾, 显著提高了对虾的非特异性免疫功能; Lapatra等^[5]报道了葡聚糖能增强虹鳟抵抗IHN病素的能力。目前关于壳聚糖在水产养殖方面的应用研究报道不多, 仅有庄承纪等^[6]、Sahoo等^[7]、Kolman等^[8]对虾苗、鲢鱼(Labeo rohita)、鲟鱼(Acipenser gueldenstaedti brandt)作过一些研究。

本试验采用壳聚糖作为添加剂饲喂异育银鲫, 旨在研究壳聚糖在促进异育银鲫生长、增强异育银鲫对病原菌嗜水气单胞菌(Aeromonas hydrophila)抵抗能力方面的作用, 为壳聚糖在水产健康养殖上的应用提供参考。

1 材料和方法

1.1 试验设计

采用单因子浓度梯度法, 在基础饲料中分别添加0.3%、0.5%、1%、2%和2%的壳聚糖(由上海水产大学食品学院提供)、混合添加0.3%壳聚糖和 50×10^{-6} 大蒜素(Allitridum)以基础饲料为对照, 试验组和对照组各设三个平行。

1.2 试验饲料

按试验设计加入壳聚糖、大蒜素后, 用逐级扩大混合的方法将粉状原料混匀后, 加工成直径为2.5mm的颗粒, 晒干备用。试验饲料营养物质含量见表1。

• 收稿日期: 2005-08-30

基金项目: 上海市委重点项目“绿色水产饲料, 免疫增强剂”。

作者简介: 陈云波(1964-), 男, 安徽舒城人, 副教授, 主要从事水产动物养殖与营养的教学和科研工作。周洪琪, 教授, 博士生导师。

表1 试验饲料营养物质含量(%)

试验饲料	水分	蛋白质	脂肪	灰分
对照组	9.87	29.85	4.67	4.32
0.3%壳聚糖	10.67	29.54	4.82	4.37
0.5%壳聚糖	10.10	29.47	4.68	4.23
1.0%壳聚糖	10.56	29.26	4.63	4.34
2.0%壳聚糖	10.73	28.89	4.41	4.49
0.3%壳聚糖 + 50×10^{-6} 大蒜素	10.64	29.54	4.81	4.34

1.3 试验鱼及饲养管理

试验异育银鲫取自上海市崇明水产良种场,2002年3月6日将民间育银鲫放入网箱内暂养,以适应网箱环境。4月29日,从网箱中选择体重 $46.20 \pm 3.56\text{g}$ 、体长 $11.24 \pm 0.63\text{cm}$ 、健康活泼的鱼种,放入 $5\text{m} \times 3\text{m} \times 2\text{m}$ 的网箱中,网箱设置于崇明水产良种场内面积为 $1500 \times 667\text{m}^2$ 的明珠湖中,网箱行距 14m ,间距 7m ,网目 0.6cm ,每只网箱放鱼种 100 尾,试验开始前用基础饲料驯养 10d,5月10日试验开始。

以驯养的试验鱼,日投饲量按体重的 5% 投喂,每天 8:00 和 16:00 各投喂一次,定点投喂在食台上,并根据水温和吃食情况适当调节,养殖期间水温为 $17^\circ\text{C} \sim 27^\circ\text{C}$ 。

1.4 测定

饲养 2 个月后,测定各组鱼的体长,体重,并计算相对增长率和相对增重率。相对增长率(%) = (终长 - 初长) / 初长 $\times 100$,相对增重率(%) = (终重 - 初重) / 初重 $\times 100$ 。从各饲料组取鱼 20 尾,进行病原感染试验,将每组鱼平均分成 4 组,以 $6.0 \times 10^8\text{CFC} \cdot \text{ML}^{-1}$ 的嗜水气单胞菌菌液,按 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 及 10^{-3} 四种稀释度注射,每尾鱼腹腔注射 0.3ml ,每饲料组鱼另取 5 尾按相同的剂量注射生理盐水作为对照,试验过程中,水温保持在 28°C ,重复试验一次,观察记录 5d 内试验鱼的死亡情况,并计算异育银鲫对嗜水气单胞菌的半数致死量 LD_{50} ,计算方法参考 Reed-Muench 法^[9]

1.5 数据处理 采用方差分析及多重比较(q 检验)

2 结果

2.1 异育银鲫的生长

异育银鲫摄食含壳聚糖饲料后,对异育银鲫的生长影响,见表 2。

表2 壳聚糖对异育银鲫生长和成活的影响

组别	终长(cm)	终重(g)	体长增长率(%)	增重率(%)	成活率(%)
对照组	15.02 ± 0.55	99.78 ± 19.05	$33.63 \pm 4.89^{\text{Aab}}$	$115.91 \pm 41.24^{\text{ACa}}$	$95.67 \pm 14.33^{\text{a}}$
0.3%壳聚糖组	15.62 ± 0.58	109.37 ± 20.74	$39.00 \pm 5.13^{\text{Ab}}$	$136.73 \pm 44.89^{\text{ABb}}$	$95.00 \pm 1.00^{\text{a}}$
0.5%壳聚糖组	15.59 ± 0.25	115.44 ± 11.19	$38.67 \pm 2.26^{\text{Ab}}$	$149.87 \pm 24.22^{\text{Bb}}$	$95.67 \pm 14.33^{\text{a}}$
1%壳聚糖组	15.39 ± 0.56	111.9 ± 18.74	$36.90 \pm 4.99^{\text{Ab}}$	$142.20 \pm 40.56^{\text{Bb}}$	$96.00 \pm 1.00^{\text{a}}$
2%壳聚糖组	15.25 ± 0.09	110.47 ± 1.19	$35.70 \pm 0.81^{\text{Ab}}$	$136.17 \pm 2.57^{\text{ABb}}$	$97.33 \pm 5.33^{\text{a}}$
0.3%壳聚糖 + 50×10^{-6} 大蒜素组	14.45 ± 0.67	93.37 ± 10.95	$28.57 \pm 5.94^{\text{Ab}}$	$102.97 \pm 23.79^{\text{Ca}}$	$95.67 \pm 4.33^{\text{a}}$

注:表中小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$),大写字母不同表示差异极显著($P < 0.01$),下同。

饲料中添加不同浓度的壳聚糖能够极显著提高异育银鲫的增重率($P < 0.01$,见表 2),其中添加 0.5% 壳聚糖组的效果最好,混合添加 0.3% 壳聚糖和 50×10^{-6} 大蒜素组对体重增加显著低于对照组($P < 0.05$)。添加不同浓度的壳聚糖对异育银鲫体长增长亦有显著影响($P < 0.05$),0.3% 和 0.5% 壳聚糖组鱼显著高于对照组;壳聚糖与大蒜素混合添加组的增长率也显著低于对照组($P < 0.05$)。

壳聚糖或壳聚糖与大蒜素混合添加对异育银鲫的成活率增加无显著影响($P > 0.05$,见表 2)。

2.2 异育银鲫对嗜水气单胞菌的抗感染能力

各组异育银鲫注射嗜水气单胞菌后,在 5d 内陆续出现死亡,根据死亡数计算(LD_{50}),见表 3

表3 壳聚糖对异育银鲫 LD₅₀的影响

级别	对照组	0.3%壳聚糖	0.5%壳聚糖	1%壳聚糖	2%壳聚糖	0.3%壳聚糖 + 50×10 ⁻⁶ 大蒜素
第一次试验	10 ^{-1.83}	10 ^{-1.56}	10 ^{-1.38}	10 ^{-1.17}	10 ^{-2.38}	10 ^{-2.17}
第二次试验	10 ^{-2.22}	10 ^{-2.17}	10 ^{-1.23}	10 ^{-1.40}	10 ^{-2.17}	10 ^{-1.83}
均值	10 ^{-2.03±0.08 Aa}	10 ^{-1.87±0.19 Aab}	10 ^{-1.31±0.01 Ab}	10 ^{-1.29±0.02 Ab}	10 ^{-2.28±0.02 Aa}	10 ^{-2.00±0.06 Aa}

从表3可以看出,异育银鲫摄食含壳聚糖或壳聚糖与大蒜素的混合物以后,0.5%、1.0%壳聚糖组鱼对嗜水气单胞菌的抵抗能力有显著提高($P < 0.05$),这两组鱼的半数致死量显著高于对照组、2.0%壳聚糖组以及混合添加组。0.3%壳聚糖组、2.0%壳聚糖组以及混合添加组的抗感染能力与对照组无显著性差异($P > 0.05$)。

3 讨论

3.1 壳聚糖对异育银鲫生长的作用

3.1.1 正常菌群在宿主体内生存和增殖,对维持宿主组织器官的正常和功能起着十分重要的作用。正常菌群能合成和分泌一些天然食物中没有但对常为宿主生长发育所需的维生素、酶、调节因子、且能分解一些不易被宿主吸收的物质供宿主的吸收^[10]。Vinod等^[11]报道,在饲料中添加0.5%壳聚糖对斑节对虾具有显著的促生长作用,与本试验结果相一致。鱼类摄食含壳聚糖的饲料后,壳聚糖分子中所带的正电荷及其聚合分子结构可与肠道中的病原菌表面的鞭毛及套膜吸附凝集,抑制病原菌繁殖,同时壳聚糖可作为双歧因子的前体发挥作用,促进肠道中双歧杆菌等有益菌增殖^[12],改善肠道代谢的功能;添加适量的壳聚糖,通过改善动物肠道内菌群平衡而对动物产生有利的影响。

3.1.2 本试验研究结果还表明,饲料中混合添加0.3%壳聚糖和50×10⁻⁶大蒜素养对异育银鲫体重增加无显著影响($P > 0.05$),曾虹等^[13]在饲料中添加50×10⁻⁶大蒜素养殖罗非鱼,45d后,罗非鱼的增重率提高1~2%,贾卫斌等^[14]在鲤鱼饵料中添加100×10⁻⁶合成大蒜素,提高鲤鱼增重率14.3%,差异显著($P < 0.05$),导致本试验的结果可能是壳聚糖和大蒜素发生拮抗作用,其原因有待更进一步分析研究。

3.2 壳聚糖对异育银鲫抗病力的影响

据研究^[2,15],壳聚糖能有效增强巨噬细胞的吞噬功能和水解酶的活性,刺激巨噬细胞产生淋巴因子,启动免疫系统,同时不会增加抗体的产生。

本研究表明,壳聚糖对提高异育银鲫对嗜水气单胞菌侵袭的抵抗力与其浓度有关,添加量过大,抗感染能力减弱(0.5%、1%壳聚糖组的LD₅₀极显著高于2%壳聚糖组 $P < 0.01$)。Sakai^[16]认为,免疫增强剂的免疫作用并不是直接依赖于剂量,高剂量有时不仅不会增强免疫效果,反而会抑制免疫反应,本试验也验证了这一观点。混合添加0.3%壳聚糖和50×10⁻⁶大蒜素,可能因拮抗作用,不产生免疫增强效果。

Sahoo等^[7],通过给鲢鱼注射壳聚糖,7d后鲢鱼的非特异性免疫水平有显著提高。但由于鱼类所处的特殊环境,对鱼类每个个体注射免疫增强剂不太实际;庄承纪等^[6]通过调节水体的壳聚糖浓度,增强罗氏沼虾、斑节对虾虾苗的抗病能力,但在实际生产中,养殖水体面积大,成本高,也不实用。在饲料中添加壳聚糖投喂异育银鲫,免疫增强剂出现的效应时间较长,在生产实践中简单可行。

随着我国水产养殖业的迅猛发展,特别是集约化养殖程度的提高,鱼、虾等水产动物的病害问题已成为制约水产养殖的重要因素之一。长期使用抗生素和其他化学药物防治养殖病害已引发了一系列环境和社会问题^[17,18]。壳聚糖无毒、无害,具有优良的生物相容性,可生物降解,其代谢产物无毒,且能被生物体完全吸收^[5],壳聚糖在水产健康养殖生产应用上具有广阔的前景。

参考文献:

- [1]朱立贤,林海.新型饲料添加剂——甲壳素与壳聚糖[J].饲料工业,2000,(7):27-28.
- [2]韩新燕,汪以真,许梓芳,等.新型饲料添加剂——壳聚糖[J].饲料研究,2000,(8):18-19.
- [3]王雷,李光友,毛远兴,等.口服免疫型药物对养殖中国对虾病害防治作用的研究[J].海洋与湖沼,1994,25(5):486-491.
- [4]江晓路,刘树青,张朝辉,等.多糖对中国对虾免疫功能的影响[J].中国水产科学,1999,6(1):66-68.

- [5]Lapatra S E, Lauda K A, Jones G R et al. Resistance to IHN virus infection in rainbow trout is increased by glucan while subsequent production of serum neutralizing activity is decreased[J]. *Fish and shellfish Immunology*, 1998, 8(6): 435 - 446.
- [6]庄承纪, 刘劲科, 杨清友等. 壳多糖对罗氏沼虾、斑节对虾苗生长和抗菌防病作用研究[J]. *湛江海洋大学学报*, 1998, 18(3): 29 - 34.
- [7]Sahoo P K, Mukhejee S C. Influence of the immunostimulant, chitosan on immune responses of healthy and cortisol-treated rohu (*Labeorohita*)[J]. *J-Aquacult-Trop*, 1999, 14(3): 209 - 215.
- [8]Kolman H, Siwicki A K, Kolman R. The effect of natural immunomodulators applied is immersion on non-specific immune responses in Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstadeti* Brandt)[J]. *Arch-Ryb-Pol; Arch - Pol - Fish*, 1998, 6(2): 391 - 410.
- [9]张寿山, 华鼎可. 鱼类免疫学[M]. 北京: 农业出版社, 1984: 110 - 113.
- [10]武汉大学, 复旦大学生物系微生物学教研室. 微生物学[M]. 北京: 人民教育出版社, 1979, 197 - 251.
- [11]Vinod M P, Jose S. Response of *penaeus mondon* (Fabricius) to growth promoters[J]. *Advances - and - priorities - in - fisheries - technoeogy balachandran*, 1998. (2): 11 - 13.
- [12]马小珍, 冯玉兰, 周 围. 新型饲料添加剂——甲壳素与壳聚糖[J]. *饲料博览*, 2001, (2): 33 - 34.
- [13]曾 虹, 任泽林, 郭 庆. 大蒜素在罗非鱼类中的应用[J]. *中国饲料*, 1996, (21): 29 - 30.
- [14]贾卫斌, 任培桃, 胡 波. 大蒜素的应用研究[J]. *粮食与饲料工业*, 1999, (5): 31.
- [15]肖 航. 甲壳质、壳聚糖及其衍生物的免疫与抗癌活性[J]. *海洋科学*, 1999, (3): 30 - 32.
- [16]Sakai M. Current research status of fish immunostimulants. *Aquacultuer*, 1999, 172(1 - 2): 63 - 92.
- [17]许 兵, 纪伟尚, 张 鹏, 等. 对虾病原菌抑菌药物的研究[J]. *青岛海洋大学学报*, 1993, 23(2): 43 - 51.
- [18]Boyd C E, Massaaut L. Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture [J]. *Aqua Engin*, 1999, 20(2): 113 - 132.

(上接第 27 页)

- [3]Jiang Z H, Bai L G, Liao D Z, et al. Spectroscopic properties and electronic states of five-coordinate copper(II) complexes with linear pentadentate ligands containing two amide groups[J]. *Polyhedron* , 1997, 16(1): 89 - 93.
- [4]Wang Wen-zhen, Liu Xin, et al. Crystal structure & spectroscopic study of a mixed Five-coordinated Tetragonal pyramid complex[J]. *Chin J. Applied Chem.* 2003, 10. 990 - 993.
- [5]Antonio costantino fabretti, Giancarlo franchini, Paolo zannini. Aqua (1, 10-phenanthroline)-(oxalato-O¹, O²) copper(II) monohydrate[J]. *Inorganica Chimica Acta*, 1985, 105, 187 - 192.
- [6]J. C. Bailar, E. M. Jones. *Inorg. Synth.* , 1939, 1, 37 - 38.

Crystal Structure and Spectroscopic Study of a Mixed Five-coordinated Tetragonal Pyramid Complex: [Cu(phen)(ox)(H₂O)]·H₂O

Fu Xucheng, Zhang Qiang

(Department of Chemistry and Life Science, West Anhui University, Lu' an, Anhui 237012)

Abstract: A novel mixed copper(II) [Cu(phen)(ox)(H₂O)]·H₂O. has been obtained and its structure was determined. The crystallizes in monoclinic, space group P2(1)/n, a = 8.447(4) Å, b = 9.696(5) Å, c = 17.456(8) Å, β = 103.875(10)°, V = 1388.0(12) Å³, Z = 4, R = 0.0549. The Cu(II) is five-coordinated with a tetragonal pyramid geometry, and the complex molecules are linked to form a one-dimensional network through hydrogen bonding. The IR result is also reported.

Key words: copper complex; phenanthroline; crystal structure