

## 添加剂

克白克对中国对虾生长发育及  
免疫机能的影响

河北农业大学山区研究所  
唐山三丰饲料有限公司  
天津汉沽农场

赵杰 谷子林 崔青曼  
赵树志 李树友  
张敬善

随着天津高密度养虾模式的成功,高密度养殖造成的对虾疾病也越来越严重,白斑病毒病(WSSV)已成为危害养虾业的主要病害之一。该病特点是突然发病,周期短、传播快,可引起对虾大批死亡甚至绝产,给养虾业带来巨大损失。为此,河北农业大学山区研究所研制了一种新的对虾专用免疫营养添加剂“克白克”,并进行了试验。

## 1 材料与方法

1.1 “克白克”来源与添加量 河北农业大学山区研究所研制,粉剂,系对虾专用复方免疫营养添加剂,试验添加量为5‰、4‰、3‰、2‰、0。

1.2 虾池选择与放苗 选用面积为2亩的土池5个,池深3m左右,水深1.2m以上,池底为重粘土。选择1cm左右健康中国对虾虾苗,来自同一批次同一孵化室,放苗量20万尾/池。

1.3 试验时间 2001年5月17日~8月28日。

1.4 池水处理 选用高度卤水,兑入淡水,配成盐度1.5~2.3的海水,调整池水理化指标(见表1)。

表1 池水理化指标

	5‰	4‰	3‰	2‰	0
盐度	15~23	15~23	15~23	15~23	15~23
透明度(cm)	20~40	20~40	20~40	20~40	20~40
pH	7.5~8.6	7.5~8.6	7.5~8.6	7.5~8.6	7.5~8.6
溶氧量(mg/L)	≥3.5	≥3.5	≥3.5	≥3.5	≥3.5

## 1.5 取样和样品处理

1.5.1 从每个试验池中取对虾50尾,分别记录体长和体重。

## 1.5.2 样品处理

1.5.2.1 血清的制备 用5mL蓝心注射器心脏

采血,注入2.5mL塑料离心管中,每10尾并为一个样,4℃3000r/min离心5min,析出血清备用。

1.5.2.2 血细胞的制备 用加入肝素钠抗凝剂的注射器心脏采血,注入10mL玻璃管中备用。

## 1.6 样品测定

1.6.1 酚氧化酶(PO)测定 以L-Dopa为底物,取3mL 0.1mol/L pH=6.0磷酸盐缓冲液与0.1mL的L-Dopa混匀,室温下加入0.1mL待测血清,490nm比色。

计算公式:  $U/\text{mL}\cdot\text{min} = (A_1 - A_0)/T \times \text{反应液体积}/\text{样液体积} \times 1000$  (注:  $A_1$ 、 $A_0$ 为反应末、初值,  $T$ 为反应时间)

1.6.2 超氧化物歧化酶(SOD)测定 按SOD试剂盒说明书将各试剂按顺序添加,加入0.03mL待测血清,550nm比色。

计算公式:  $\text{SOD活力 NU} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{测}})/A_{\text{对照}} \div 50\% \times \text{反应液体积}/\text{样液体积}$

1.6.3 血清溶菌酶(LSZ)测定 用pH=6.4磷酸盐缓冲液稀释溶壁微球菌至 $10^5 \sim 10^6$ 个/mL,取3mL稀释液,加入0.1mL血清,570nm比色。

计算公式:  $\text{溶菌酶活力 } U = (A_0 - A_1)/A_0 \times 1000$  (注:  $A_1$ 、 $A_0$ 为反应末、初值)

1.6.4 血细胞吞噬活性测定 用生理盐水稀释白色念珠菌至 $10^6 \sim 10^7$ 个/mL,取制备好的血细胞1mL,加入pH=7.3磷酸盐缓冲液1mL,28℃孵化30min,摇匀,低倍镜观察、计数。

规定:在试验条件下,每个血细胞吸附2个以上白色念珠菌为1个花环。

## 2 结果与分析

2.1 “克白克”对对虾生长的影响 见表2。

表2 “克白克”对中国对虾生长发育的影响

时间	5‰		4‰		3‰		2‰		0‰	
	体长	体重	体长	体重	体长	体重	体长	体重	体长	体重
17/7	8.5	6.1	8.3	5.8	9.3	6.5	8.2	5.3	8.1	5.1
	±0.2	±1.3	±8.3	±0.1	±0.7	±0.3	±0.2	±0.4	±0.4	±0.2
28/8	12.8	17.9	13.3	17.1	14.1	20.1	12.9	17.9	-	-
	±0.3	±2.8	±0.3	±2.2	±0.3	±2.1	±0.4	±2.4	-	-

“克白克”对对虾早期促生长作用不是很明显,但添加组无论体长、体重都高于对照组。随着饲养期的延长,“克白克”的促生长作用越来越明显,尤其是3‰添加组体长、体重都明显高于其他组。这是因为“克白克”可提高对虾消化道内消化酶活性,维持消化道上皮正常功能,促进营养物质消化吸收。“克白克”富含促甲壳素生成因子,有利于对虾正常蜕皮和新甲壳的正常硬化,正常甲壳可有效预防病原菌入侵和纤毛虫、缩聚虫等吸附,有利于对虾健康生长。

### 2.2 “克白克”对对虾血清中 PO、SOD 的影响

目前普遍认为,甲壳动物免疫机制以非特异性免疫反应为主。血细胞可产生酚氧化酶原,能在甲壳动物中起识别和防御病原菌作用(王雷等,1995)。异物入侵可激活丝氨酸蛋白酶,丝氨酸蛋白酶激活酚氧化酶原转化成 PO。PO 可将带苯环氨基酸转化为黑色素,杀灭入侵病原菌。SOD 存在于细胞线粒体中,是体内重要抗氧化酶,对清除自由基、防止生物氧化损伤起重要作用。“克白克”对对虾血清中 PO 和 SOD 的影响见表 3。

表3 “克白克”对对虾血清中 PO、SOD 的影响

	5‰	4‰	3‰	2‰	0
PO	625.2±9.2b	618.4±8.3b	608.1±7.9b	563.2±4.9a	528.4±9.2a
SOD	105.8±4.1b	110.4±8.1b	106.9±8.1b	114.9±9.6b	132.6±9.6a

注:同行数据标不同字母表示差异显著( $p < 0.05$ ),下同。

从表 3 可以看出,“克白克”可增加 PO 活性。PO 是对虾体内重要免疫酶类,可氧化入侵异物中含苯环氨基酸,使异物蛋白质变性,最后被虾体分解。添加 3‰以上“克白克”可使 PO 活性显著增加。黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶反应系统产生大量超氧自由基等,激发 SOD 活性,SOD 清除超氧自由基,保护细胞膜不被氧化。“克白克”参与机体金属硫蛋白的合成,金属硫蛋白本身有很强抗氧化能力,可直接清除部分自由基,机体内超氧自由基含量低,使 SOD 活性下降。

2.3 “克白克”对对虾 LSZ 活性、血细胞吞噬活力 (PR) 的影响 溶菌酶是吞噬细胞的物质基础,能分解入侵病原微生物细胞壁,起到机体抗病功能。甲壳动物没有免疫球蛋白,通过血细胞的吞噬作用清除血液中的异物,可直接或间接反映机体的免疫功能状态。“克白克”对对虾血清 LSZ 和 PR 的影响见表 4。

表4 “克白克”对对虾血清 LSZ 活性和 PR 的影响

	5‰	4‰	3‰	2‰	0
LSZ	63.4±4.2b	55.0±2.1b	56.5±1.7b	48.4±0.6a	43.2±2.3a
PR	24.3±4.2a	28.9±3.4a	33.3±2.7b	22.3±3.4a	20.2±1.2a

从表 4 可知,“克白克”可提高 LSZ 活性,添加剂量超过 3‰LSZ 达到差异显著水平( $p < 0.05$ );而血细胞吞噬率只有 3‰达到差异显著水平( $p < 0.05$ )。“克白克”提高 LSZ 活力是由于其所含天然活性成分刺激吞噬细胞,发生吞噬反应释放大量溶菌酶和酚氧化酶。随“克白克”添加量的加大,吞噬活性明显加强,当吞噬细胞吞噬大量天然活性成分后再吞噬白色念珠菌能力减弱,出现先升高后降低情况。

### 3 小结

对虾免疫营养添加剂“克白克”有促生长作用。对虾前期生长速度慢,“克白克”作用不明显,到中后期“克白克”促生长作用明显。3‰添加量促生长作用显著( $p < 0.05$ ),5‰、4‰、2‰添加量也有促生长作用但不如 3‰添加量。

“克白克”对提高对虾免疫力有促进作用,能够提高 PO、LSZ 活力和 PR。PO 和 LSZ 活性随“克白克”添加量增加而升高,添加量超过 3‰时差异显著( $p < 0.05$ );而血细胞吞噬活性随添加量的增加呈现先升高后降低趋势,添加 3‰效果最好( $p < 0.05$ )。

“克白克”对 SOD 有抑制作用。SOD 对氧化代谢过程中产生自由基有清除作用,保护细胞膜。SOD 活性高低与氧自由基含量有关,当氧自由基增加,SOD 活性随之升高。“克白克”可有效清除氧自由基,使 SOD 活性降低,表现抑制作用。实际上,对虾机体代谢并没有减弱,而是表现方式不同。

(参考文献略)

[通讯地址:河北省保定市灵雨寺街,邮编:071001]