

# 有机污染提高对虾对病原菌易感性研究\*

林 林 丁美丽 孙舰军 朱谨钊 李光友

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

**摘 要** 1995年5~11月, 以人工合成饵料作为有机污染源, 取体长8、10和12cm以上中国对虾, 在0.9m<sup>3</sup>水族箱中, 分批进行有机污染提高对虾对病原体易感性试验。对虾在上述环境中培育2~3周后, 测定其对付溶血性弧菌易感性及体内与抗病有关一些酶的活性。结果: 与对照组相比, 试验组对虾对病原菌易感性提高1~3倍; 体内SOD、PO及溶菌酶活性分别下降约22%、50%和28%~86%。血细胞数量减少50%左右。这与人工合成饵料在水环境中经分解后, 产生一些对对虾有害物质, 其中以氨氮产生和DO减少尤为显著有关。

**关键词** 中国对虾 有机污染 抗病力 免疫水平

## 1 引言

虾池有机污染是导致虾病发生的一个重要外因, 目前大多数学者已取得共识。虾池有机污染主要是投饵过多造成的。有关投饵过多引起水质的变化已有一些报导道<sup>[1,2]</sup>。但水质变化又如何引起虾体内环境变化, 进而导致疾病发生, 有关这方面的研究甚少。为此, 我们开展以下几方面工作, 即: 寻找饵料在水环境中经分解后, 影响虾体抗病力的主要因子; 对虾体内几种与抗病有关酶活性及对血细胞超微结构的影响; 以及改变对虾对病原体易感性等试验。以期能对有机污染诱发病害发生的过程与机理有所认识。

## 2 材料与方 法

### 2.1 试验用对虾

以中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 为材料, 分别选体长8、10、12cm以上分批进行试验。

### 2.2 试验用海水与饵料

取中科院海洋所水族楼经沉淀、过滤的海水。饵料为人工合成饵料。

本文于1996-07-20收到, 修改稿于1997-03-25收到。

\* PDB6-7-2资助项目。

第一作者简介: 林 林, 女, 28岁, 硕士, 现在美国 City University of New York 生化系攻读学位。

## 2.3 试验方法

### 2.3.1 有机污染对虾体内抗病特性影响

试验主要是在 $0.9\text{m}^3$ 水体的水族箱中进行的. 每批试验各设试验组和对照组, 两组的不同点: (1) 是投饵量差异, 试验组多于对照组; (2) 是对照组每天吸底, 试验组不吸底. 对照组 COD 始终维持在 $2\text{mg}/\text{dm}^3$ 左右, 而试验组用增减投喂量逐步提高及控制 COD 在 $8\text{mg}/\text{dm}^3$ 左右, 其他管理条件二者相同. 即试验组用过量投饵方法人为造成有机胁迫环境. 分别用体长8、10、12cm 以上的中国对虾进行了3批试验. 每组用虾20尾左右, 试验持续2~3周. 待试验结束时, 分别测定2组对虾对病原体易感性及有关酶活性.

### 2.3.2 不同温度条件下饵料对水环境的影响

试验是在 $0.05\text{m}^3$ 水体玻璃水族箱中进行的. 加入人工合成饵料量为 $40\text{mg}/\text{m}^3$ . 3组温度分别为 $16^\circ\text{C}$ 、 $22^\circ\text{C}$ 和 $28^\circ\text{C}$ , 重复2次.

## 2.4 分析方法

### 2.4.1 水环境中理、化及微生物因子分析

用常规方法.

### 2.4.2 对病原体易感性试验

随机取2组对虾各8~10尾, 采用肌肉注射法, 在中国对虾腹部注射致病菌——副溶血性弧菌, 注射量为浓度 $4.7 \times 10^7$ 细胞/ $\text{cm}^3$ 的菌悬液 $0.05\text{cm}^3/\text{尾}$ , 观察其死亡率.

### 2.4.3 有关酶活性测定

随机取2组对虾各3~5尾, 从心脏抽取血淋巴混合后进行分析. 超氧化物歧化酶 (SOD) 选用改良的连苯三酚自氧化法<sup>[3]</sup>; 酚氧化酶 (PO), 以 L-dopa 为底物比色测定; 溶菌酶按 Hultmark 方法进行<sup>[4]</sup>. 血细胞内部结构电镜观察, 取血淋巴在戊二醛中作前固定, 再经锇酸固定、包埋、超薄切片、染色后观察.

## 3 结果与讨论

### 3.1 不同温度条件下, 饵料对水环境的影响

饵料在 $16^\circ\text{C}$ 、 $22^\circ\text{C}$ 及 $28^\circ\text{C}$ 的海水中经1d, 分别取样进行分析, 结果与本底比较 COD 分别上升74%~138%, 与温度呈正相关. 溶氧下降 $1.34 \sim 3.602\text{mg}/\text{dm}^3$ , 在 $16^\circ\text{C}$ 条件下下降 $1.34\text{mg}/\text{dm}^3$ ,  $22^\circ\text{C}$ 下降 $2.57\text{mg}/\text{dm}^3$ ,  $28^\circ\text{C}$ 下降 $3.602\text{mg}/\text{dm}^3$ , 温度越高下降越多. 经2d 水体中氨氮增加尤为显著, 达7.9~103倍, 增加量也与温度呈正比. 在微生物方面, 经1d 总异养菌、弧菌、硫酸盐还原菌、氨化细菌及产硫化氢细菌丰度分别上升1~4个数量级, 同样上升量与温度呈正相关. 如硫酸盐还原菌在 $16^\circ\text{C}$ 、 $22^\circ\text{C}$ 、及 $28^\circ\text{C}$ 中菌量分别增加2、3和4个数量级. 试验重复2次, 获得结果基本一致. 根据试验结果, 及参考有关资料进行分析后, 我们认为有机物经微生物分解后, 其代谢产物中氨可能是影响虾体内环境的主要因子. 同时, 在此过程中溶氧急剧下降也是极为重要的因素.

### 3.2 有机污染对虾体抗病特性影响

#### 3.2.1 虾体对病原体易感性变化

试验进行2~3周后, 任意取2组对虾, 分别在腹部注射浓度为 $4.7 \times 10^7$ 细胞/ $\text{cm}^3$ 付溶血性弧菌 $0.05\text{cm}^3$ . 结果试验组与对照组相比死亡率增加1~3倍, 表1列出体长10cm 对虾试验结

果, 从中不难看出有机污染组的对虾对病原体的易感性显著提高. 这与在鱼类等一些海洋动物情况相似<sup>[5~7]</sup>.

表1 比较2组对虾肌注射致病弧菌后死亡率

组别	注射尾数	感染后死亡数				死亡数/注射数
		12h	24h	48h	72h	
有机污染组	8	4	3	0	0	7/8
对照组	8	1	2	0	0	3/8

虾体长为10cm左右, 注射致病弧菌浓度为 $4.7 \times 10^7 \text{ cell/cm}^3$ , 注射量为 $0.05 \text{ cm}^3/\text{尾}$ .

### 3.2.2 虾体内与抗病有关的酶活性变化

为了探索有机污染导致对虾对病原体易感性提高、疾病发生的机理. 在每批试验取样分析对病原体易感性变化时, 同时取虾样3~5尾, 抽取血淋巴测定SOD、PO、溶菌酶活性、血细胞数, 以及观察血细胞内部结构变化. 试验共进行3批, 所获得结果基本一致. 试验组与对照组相比SOD活性下降22%左右, PO下降50%左右, 溶菌酶下降26%~86%, 血细胞数量减少50%左右, 表2列出体长10cm左右对虾的分析结果. 电镜观察血细胞结构时, 观察到试验组对虾血细胞内线粒体中嵴不如对照组清晰.

表2 有机污染对对虾体内一些酶活性及血细胞数影响

组别	SOD		PO		溶菌酶		血细胞数	
	单位	%	单位	%	单位	%	$\times 10^5 \text{ 个/cm}^3$	%
试验组	168.1	77.6	1.05	48	0.097	61	2.27	60
对照组	216.6	100	2.20	100	0.160	100	3.78	100

上述结果表明: 试验组对虾水环境中, 由于残饵不断积累, 促使各类微生物大量繁殖, 微生物分解有机物不仅消耗大量溶氧, 同时产生许多代谢产物如氨氮、亚硝酸氮、硫化氢等, 特别是氨氮增加尤为显著, 导致环境恶化, 养殖在这样污染压力下的对虾, 受多种因子综合影响, 体内一些重要酶活性明显下降, 如SOD、PO、溶菌酶. 血细胞数量下降也很明显.

已知, 对虾类免疫是以非专一性免疫反应为主, 其中血细胞(由透明细胞、半颗粒细胞和颗粒细胞组成)在这一机制中起着重要作用. 因为一系列免疫反应都由特定血细胞参与. 如其防御机制全面的启动关键在于颗粒细胞与半颗粒细胞的颗粒释放, 颗粒中所含酚氧化酶原系统的活化. 原酚氧化酶激活系统实际为防御中心, 进行识别外来物并联击和增强与抗病有关的一些反应<sup>[8,9]</sup>. 酚氧化酶系统中最终活化酶为酚氧化酶, 同时它可将酚催化为黑色素. 黑色素及其中间产物可将一些病原体杀死<sup>[10]</sup>. 因此酚氧化酶的活性强弱在一定程度上反映出对虾抗病力的强弱. 而超氧化物歧化酶(SOD)是超氧自由基的天然消除剂, 可以消除体内多余的自由基, 使自由基形成与消除处于一种动态平衡中, 免除对生物体的伤害<sup>[11~13]</sup>. SOD还具有抗菌、抗病毒、抗衰老等作用, 与生物体免疫水平密切相关<sup>[14]</sup>. 因此, 可以认为在上述酶活性下降了的对虾, 其抵御疾病能力降低, 势将导致对病原菌易感性的提高, 病害也就容易发生.

试验用副溶血性弧菌由青岛海洋大学徐怀恕教授提供, 特此致谢。

## 参考文献

- 1 王方国. 对虾养殖水质与饵料的关系研究. 东海海洋, 1995, (2): 9~14
- 2 董存有, 张金荣. 虾塘 COD 的变化及其对对虾生长和产量的影响. 海洋科学, 1993, (3): 8~12
- 3 郑碧玉, 袁勤生, 李文杰. 改良后的连苯三酚自氧化测定 SOD 活性方法. 生物化学与生物物理进展, 18(2): 163~163
- 4 丁美丽, 林 林, 李光友. 有机污染对虾体内外环境影响研究. 海洋与湖沼, 1997, 28 (1): 7~11
- 5 Walters G R, Plumb J A. Environmental stress and bacterial infection in channel Catfish, *Ictalurus punctatus punctatus* Ratnesque. J. Fish. Biol., 1980, 17, 171~185
- 6 Wedemeyer G A, Goodyear C P. Disease caused by environmental stressors. Disease of Marine Animals, D. Biologische Anstalt Helgoland, Hamsurg, 1984, 4 (1): 424~434
- 7 Chu F L, Hale R C. Relationship between pollution and susceptibility to infections disease in the eastern oyster *Crassostrea virginica*. Mar. Environ. Res., 1994, 38, 243~256
- 8 Soderhall K. Prophenoloxidase activating system and melanization—a recognition mechanism of arthropods A review. Dev. Comp. Immunol., 1982, 6, 601~611
- 9 宋宏红, 谢允廷, 宋延令. 虾子的防御系统与抗病力的增强. 养鱼世界 (台), 1995, (2): 22~23
- 10 张 尧, 宋延令. 甲壳类血球细胞的免疫功能及其交互作用. 中国水产 (台), 1993, (483): 7~14
- 11 Malins D C, Myers M S, Roubal W T. Organic free radicals associated with idiopathic liver lesions of English Sole (*Parophry vetulus*) from polluted marine environments. Environ. Science and Technology, 1983, 17, 679~685
- 12 李永祺, 丁美丽. 海洋污染生物学. 北京: 海洋出版社, 1991, 305~309
- 13 Zhou Zhigang. The influence of selenium on the antioxidation in spirulina. J. Phycology, Supplement to Volume, 1995, 31(3): 17
- 14 李文杰. 超氧化物歧化酶在治疗超氧阴离子自由基所引起的疾病及抗衰老上的应用. 中国药物杂志, 1989, 24 (7): 397~401

## Organic pollution enhance susceptibilities of *Penaeus chinensis* to pathogenic bacteria

Lin Lin,<sup>1</sup> Ding Meili,<sup>1</sup> Sun Jianjun,<sup>1</sup> Zhu Jinzhao,<sup>1</sup> Li Guangyou<sup>1</sup>

1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071

**Abstract**—From May to November of 1995, *P. chinensis* were used experiments using excessive artificial diets as organic pollutants. Twenty about 8, 10 or 12cm body length *P. chinensis* were put into the test pond and control pond. After 2~3 weeks, susceptibilities to pathogenic bacteria the number of haemocyte and lysozyme, SOD, PO activities were compared. The results were as follows. Susceptibilities to *Vitrio parahaemolyticus*, were 1~3 times that of the control pond shrimp (Table 1), the haemocyte number of the test shrimps decreased about 50%, the SOD, PO and lysozyme activities of the test pond decreased about 22%, 50% and 28%~86% compared with those of the control pond (Table 2). Additionally it has been proved that in the test pond following the excessive artificial diets degraded, the DO content decreased, NH<sub>3</sub>-N increased markedly. So the conclusion could be drawn: organic pollution affects aquatic environment, decreases immune level, enhances susceptibilities to pathogen bacteria.

**Key words** *Penaeus chinenses*, organic pollution, anti-disease ability, immune level