

复方中草药对凡纳滨对虾生长、消化酶和免疫因子活性及抗WSSV的影响

陈辉辉¹, 涂晨凌¹, 唐杨¹, 黄永春^{1,2*}

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021;

2. 福建省海洋渔业资源与生态环境重点实验室, 福建 厦门 361021)

摘要: 研究复方中草药(葛根、黄连、金银花、板蓝根、黄芪、甘草、柴胡、当归、山楂、陈皮和茯苓)对凡纳滨对虾生长、消化酶和免疫因子活性及抗WSSV的影响, 为对虾健康养殖提供科学依据。分别在饲料中添加0%(对照组)、0.4%、0.8%、1.2%、1.6%和2.0%该复方中草药, 连续投喂凡纳滨对虾[体质量(0.026±0.007) g] 28 d(每组3个重复, 每个重复160尾), 每隔1周随机采样10尾/桶测量体长、体质量, 并取肝胰腺用于生长指标(WGR、SGR、FR和SR)、相关酶(淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶、SOD、GPT和GOT)及MDA含量的测定。研究结果表明, 复方中草药对凡纳滨对虾的生长均有提高, 其中0.8%和1.2%添加组效果最佳, 差异显著; 且饵料系数显著下降。对虾肝胰腺消化酶(淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶)和免疫相关因子(SOD、GPT和GOT)随养殖时间的延长, 高酶活性逐渐由高添加量组向低添加量组移动, 其中以0.8%和1.2%添加组效果最佳, 差异显著; 与对照组相比, 0.4%、0.8%和1.2%添加组MDA含量差异显著下降。对照组和0.4%添加组对虾经投喂感染WSSV后全部死亡, 但0.4%添加组对虾第1尾死亡时间、50%死亡时间以及100%死亡时间分别比对照组延后8 h、16 h和8 h; 0.8%添加组成活率最高(33.3%), 与其他组差异显著。复方中草药能促进对虾生长、消化, 提高免疫和抗WSSV能力, 其中以添加0.8%和1.2%效果最佳。

关键词: 凡纳滨对虾; 复方中草药; 生长; 消化酶; 免疫因子; 抗WSSV

中图分类号: S 966.1

文献标志码: A

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)俗称南美白对虾, 是世界养殖产量最高的三大优良虾种之一, 已成为我国对虾养殖主要种类^[1-3]。但随着养殖规模、地域的扩大, 凡纳滨对虾的养殖出现环境恶化、生长速率减慢和病害频发等问题, 阻碍健康养殖的可持续发展^[4-5], 其中以白斑综合征(white spot disease, WSD)危害最为严重^[6]。生产中使用抗生素类等化学药物则存在耐药性和毒副作用, 对病毒性疾病无效等诸多缺点, 不能有效解决虾类疾病的防治问题^[7]。因

此, 增强其自身抵抗力、提高成活率就显得尤为重要。

中草药取自于自然界, 无化学添加、副作用相对较小, 富含多种有效成分如生物碱、黄酮类、多聚糖、苷、挥发油等, 在水产动物疾病防治方面起到良好的作用^[8]。研究发现, 适量添加虎杖(*Polygonum cuspidatum*)、贯众(*Dryopteris crassirhizomz*)^[9]; 大黄(*Rhubarb*)、茯苓(*Poria cocos*)、黄芪(*Astragalus radix*)、板蓝根(*Isatidis radix*)、柴胡(*Bupleurum*)、甘草(*Glycyrrhiza*

收稿日期: 2016-09-08 修回日期: 2016-12-18

资助项目: 福建省自然科学基金项目(2013J01139); 厦门市海洋经济创新发展区域示范项目(13PZY001SF25); 福建省科技厅高校产学合作项目(2017N5012)

通信作者: 黄永春, E-mail: ychuang@jmu.edu.cn

uralensis Fisch)^[10-11]、杜仲(*Cortex eucommiae*)^[12]等以及植物提取物如虫草多糖(*Cordyceps polysaccharide*)^[13]、 β -葡聚糖(β -glucan)^[14-15]、狗牙根(*Cyanodon dactylon*)提取物^[16]、大黄提取物^[17]能有效促进虾类生长和提高非特异性免疫。但单一中草药效果稳定性差, 不如复方效果显著。目前复方中草药在凡纳滨对虾方面已有初步应用^[18-19], 但复方的组成种类较少, 不能涵盖生长消化、免疫、抗病等多方面生理功能。

本实验中药组方遵循“君、臣、佐、使”原则^[20], 体现主次协调关系, 结合中药配伍目的与禁忌, 将抗微生物的中药[黄芩(*Radix acutellariae*)、葛根(*Puerarin*)、黄连(*Coptidis rhizoma*)、金银花(*Honeysuckle*)和板蓝根], 调节机体的中药[黄芪、甘草、柴胡和当归(*Angelica sinensis*)], 配上辅助消化的中药[(山楂(*Hawthorn*)、陈皮(*Citrus*)、茯苓]组成一味复方, 研究不同添加量对凡纳滨对虾生长、消化酶和相关免疫因子活性及抗白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)的影响, 为凡纳滨对虾健康养殖提供科学依据。

1 材料与方

1.1 实验材料

实验用虾来自厦门市厦兴龙种苗有限公司, 规格为全长(1.763±0.143) cm, 体质量(0.026±0.007) g的健康凡纳滨对虾。

复方中草药由药材店购自原产地并且晒干, 黄芩、葛根、金银花、板蓝根、黄芪、甘草、柴胡、当归、山楂、陈皮、茯苓和黄连按1:1比例均匀混合, 超微粉碎, 过200目筛绢, 按0、0.4%、0.8%、1.2%、1.6%、2.0%的比例添加到凡纳滨对虾饲料中。具体配方与用量见表1。

1.2 实验方法

实验设计 实验设置6个组即对照组和5个实验组, 每组3个平行。将凡纳滨对虾放置于500 L的PVC桶中, 盛水2/3, 每桶160尾, 经暂养稳定后, 分别投喂添加0、0.4%、0.8%、1.2%、1.6%和2.0%复方中草药的饲料。

饲养管理 定时投喂(6:00、11:00、17:00、22:00), 投喂量为体质量的3%~5%, 具体根据对虾的吃食情况灵活掌握。每天吸污、换水1次, 换水25%左右, 水温(28.6±1.5)°C, 全程充气(溶氧4.0 mg/L

以上), 盐度19.5±0.6, 饲养周期28 d。

采样 每隔7 d采样1次, 每桶分别随机采取10尾对虾, 测量体长、体质量, 并取肝胰腺于-30 °C下保存。

酶液制备及测定 肝胰腺按体质量: 体积=1:9 (g/mL)加入0.02 mol/L pH 7.5预冷磷酸缓冲液, 用组织匀浆机冰浴匀浆后于4 °C, 5000 r/min离心机离心10 min, 取上清液即为粗酶提取液, 并于4 °C冰箱中保存, 24 h内完成分析测定。

消化酶和总超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷草转氨酶(GOT)和谷丙转氨酶(GPT)免疫相关因子活性测定均采用南京建成生物工程研究所提供的试剂盒。

生长指标的计算

增重率(weight gain rate, WGR, %)=($W_2 - W_1$)/ $W_1 \times 100$

特定增长率(specific growth rate, SGR, %)= $[(\ln W_2 - \ln W_1)/(t_2 - t_1)] \times 100$

饵料系数(feed conversion ratio, FCR, %)= $F/(W_2 - W_1)$

肥满度(condition factor, FR, %)=(W/L^3) $\times 100$

成活率(survival ratio, SR, %)= $N_2/N_1 \times 100$

式中, W_2 、 W_1 和 W_t 为实验个体在 t_2 、 t_1 和 t 时刻的体质量, F 为投饵量, L 为体长, N_2 , N_1 为采样时刻和最初放入实验虾数量。

WSSV感染试验 随机抽取25尾/桶对虾(每组3个平行桶), 投喂经检测感染WSSV的新鲜病虾, 剁碎按体质量5%~10%投喂, 每天正常投喂、吸污、换水, 全程曝气, 投喂24 h后开始记录, 每隔12 h观察1次, 期间及时收集、编号、记录死亡对虾, 计算其抗WSSV的性能。

1.3 统计与分析

采用统计软件SPSS19.0进行单因素方差分析(ANOVA), 再用Duncan氏方法进行均值间多重比较。

2 结果

2.1 复方中草药对凡纳滨对虾生长的影响

复方中草药对凡纳滨对虾体长、体质量的影响 随着养殖时间的延长, 对虾体质量、体长逐步增加, 在0~14 d阶段各组对虾体质量、体长无显著差异($P > 0.05$), 在15~28 d阶段, 对照组的体质量、体长低于其他实验组, 除与0.4%添加

组差异不显著($P>0.05$)外, 与其他各组差异显著($P<0.05$), 其中0.8%添加量和1.2%添加量对体质量、体长促进效果最好(图1, 2)。

复方中草药对凡纳滨对虾生长性能的影响经过28 d的饲养表明不同复方中草药添加量能影响凡纳滨对虾生长。其中增重率表现为: 0.4%添加组>1.2%添加组>0.8%添加组>1.6%添加组>2.0%添加组对照组(表2)。

特定生长率表现为: 0.4%添加组>1.2%添加组>0.8%添加组>2.0%添加组>1.6%添加组对照组。

肥满度率表现为: 0.4%添加组>1.2%添加组>0.8%添加组>1.6%添加组>2.0%添加组对照组。0.4%添加组表现最为突出, 肥满度为 8.09 ± 0.44 显

著高于其他组别($P<0.05$)。

2.2 复方中草药对凡纳滨对虾存活率和饵料系数的影响

经过28 d的饲养结果发现, 不同复方中草药添加量影响凡纳滨对虾的存活, 存活率表现为: 2.0%添加组>0.4%添加组>1.2%添加组>1.6%添加组>0.8%>对照组, 其中对照组与2.0%和0.4%添加组, 差异显著($P<0.05$), 与其他添加组差异不明显($P>0.05$)(表2)。

复方中草药能降低凡纳滨对虾的饵料系数, 表现为: 对照组>1.6%添加组>0.4%添加组>2.0%添加组>1.2%添加组>0.8%添加组, 差异显著($P<0.05$)。

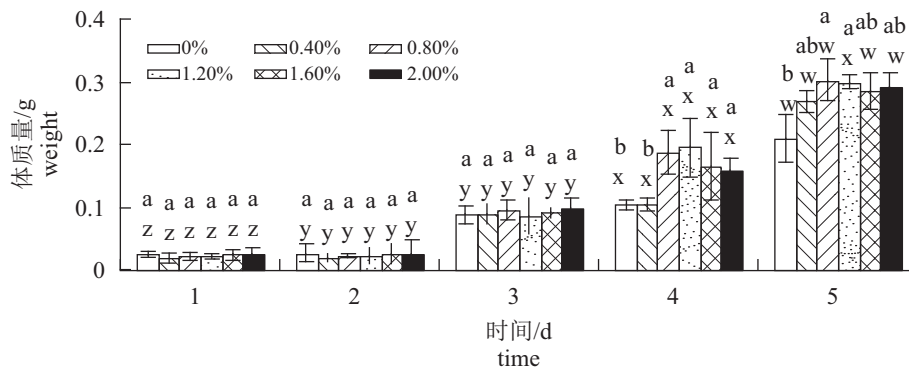


图1 复方中草药对凡纳滨对虾体质量的影响

1.1.0 d, 2.7 d, 3.14 d, 4.21 d, 5.28 d(图2~9同); 2.图标上方a、b(图3~10的c、图4~9的d、图7, 9的e、图9的f)字母不同表示同一时间段不同复方中草药添加组存在显著差异($P<0.05$), 并且随着字母的变化数值依次下降; w、x、y、z(图7, 9的v)字母不同表示相同复方中草药添加组在不同时间段存在显著差异性($P<0.05$), 并且随着字母的变化数值依次下降, 下同

Fig. 1 Effects of compound Chinese herbs on weight of *L. vannamei*

1. represents the time of 0 day, 2. represents the time of 7 day, 3. represents the time of 14 day, 4. represents the time of 21 day, 5. represents the time of 28 day (the same as figure 2~9); 2. different small letters of a, b, (c of figure 3~10, d of figure 4~9, e of the figure 7 and 9, f of figure 9) mean significant difference in stage under different densities ($P<0.05$) and there are decreasing through the different letters, while different small letters of w, x, y (v of figure 7 and 9) and z mean significant difference in different stage of *L. vannamei* under the same densities ($P<0.05$) and there are decreasing through the different letters; the same as below

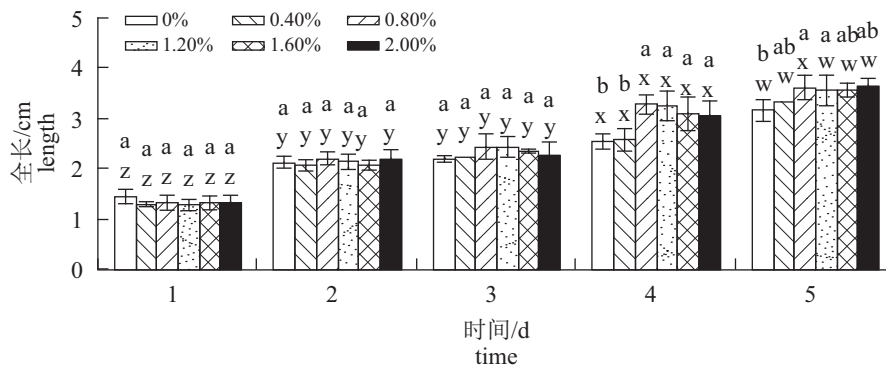


图2 复方中草药对凡纳滨对虾体长的影响

Fig. 2 Effects of compound Chinese herbs on length of *L. vannamei*

表 1 复方中草药饲料配方
Tab. 1 Composition of experimental diets with compound Chinese herbs %

	0%	0.4%	0.8%	1.2%	1.6%	2.0%
鱼粉 fish meal	30	30	30	30	30	30
豆粕 soybean meal	37	37	37	37	37	37
虾粉 shrimp meal	5	5	5	5	5	5
面粉 flour	19	18.6	18.2	17.8	17.4	17.0
鱼油 fish oil	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
豆油 soybean oil	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
大豆磷脂 soybean phospholipid	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
胆碱 choline	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
矿物质预混料 mineral premix ¹	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
维生素混合物 vitamin premix ²	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
维生素C Vc	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
防霉剂 mildew preventive	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
粘合剂 binder	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
抗氧化剂 antioxidant	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
中草药复方 compound Chinese herbs	0	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0
磷酸二氢钙 Ca(H ₂ PO ₄) ₂	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
总计 total	100	100	100	100	100	100

注: 1. 矿物质预混料以占每千克饲料重为标准, 含有Mg 233.3 mg、Zn 92.8 mg、Se 40 mg、I 20 mg、Mn 220.1 mg和Cu 128 mg; 2. 参考叶等(2012)^[21]

Notes: 1. mineral premix provided per kg of feed, magnesium 233.3 mg, zinc 92.8 mg, selenium 40 mg, iodine 20 mg, manganese 220.1 mg, and copper 128 mg; 2. vitamin premix was prepared according to Ye *et al.* (2012)

表 2 复方中草药对凡纳滨对虾生长性能的影响
Tab. 2 Effects on of compound Chinese herbs growth performance of *L. vannamei* %

生长指标 growth index	0%	0.4%	0.8%	1.2%	1.6%	2.0%
WGR	7.76±0.94 ^c	14.37±0.84 ^a	13.52±2.36 ^{ab}	14.28±0.74 ^a	10.92±2.63 ^b	10.59±0.92 ^{bc}
SGR	0.85±0.10 ^b	1.36±0.04 ^a	1.32±0.13 ^a	1.34±0.04 ^a	1.21±0.19 ^a	1.247±0.07 ^a
FR	5.99±0.64 ^b	8.09±0.44 ^a	6.73±0.37 ^{ab}	7.06±0.34 ^{ab}	6.33±0.45 ^b	6.08±0.48 ^b
SR	0.69±0.01 ^b	0.79±0.08 ^a	0.73±0.03 ^{ab}	0.78±0.02 ^{ab}	0.75±0.07 ^{ab}	0.79±0.03 ^a
FCR	3.35±0.98 ^a	2.28±1.08 ^c	1.83±0.58 ^c	2.07±0.63 ^d	2.43±1.01 ^b	2.14±0.73 ^d

注: 各列不同小写字母表示存在显著差异($P<0.05$)

Notes: The different lowercase letters represent the significant difference ($P<0.05$)

2.3 复方中草药对凡纳滨对虾消化酶活性的影响

在1~7 d阶段中凡纳滨对虾肝胰腺的淀粉酶活力表现为实验组均显著高于对照组, 最高的组分别为1.2%和1.6%添加组, 与其他各组差异显著($P<0.05$); 8~14 d阶段中1.2%、1.6%和2.0%添加组淀粉酶活力最高且与其他各组差异($P<0.05$);

15~28 d阶段, 淀粉酶活力较高的组往添加量较小的组移动, 表现为0.8%和1.2%添加组效果最佳, 与其他各组差异显著($P<0.05$)(图3)。

经过28 d的饲养, 各实验组对虾肝胰腺蛋白酶活力均高于对照组, 在1~14 d阶段中, 1.2%添加组和1.6%添加组的蛋白酶活力最佳, 与其他各组差异显著($P<0.05$); 15~21 d阶段中, 0.8%、

1.2%添加组和1.6%添加组的蛋白酶活力最佳，与其他各组差异显著 ($P<0.05$)；22~28 d阶段中0.8%添加组和1.2%添加组的蛋白酶活力最佳，与其余各组差异显著 ($P<0.05$) (图4)。

各组实验对虾肝胰腺脂肪酶随饲养时间的

增加均有不同程度的升高，1~14 d阶段中，1.6%添加组和2.0%添加组脂肪酶活力最佳，且与其他各组差异显著 ($P<0.05$)；15~28 d阶段中，0.8%添加组和1.2%添加组脂肪酶活力最高，且与其他各组差异显著 ($P<0.05$) (图5)。

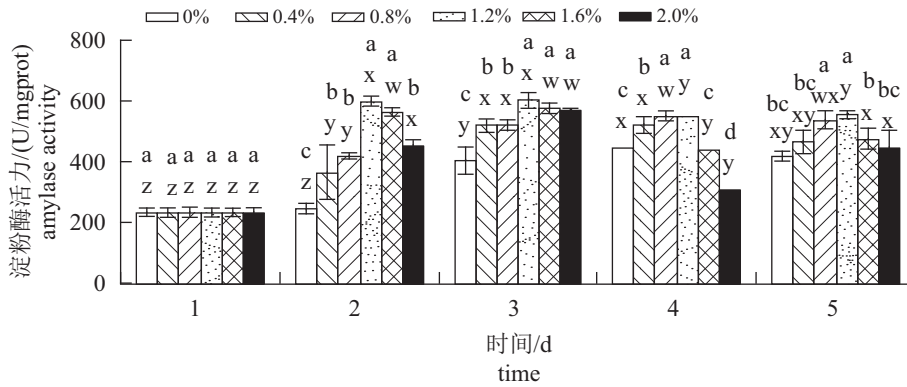


图3 中草药复方对凡纳滨对虾淀粉酶活力的影响

Fig. 3 Effects of compound Chinese herbs on amylase activity in *L. vannamei*

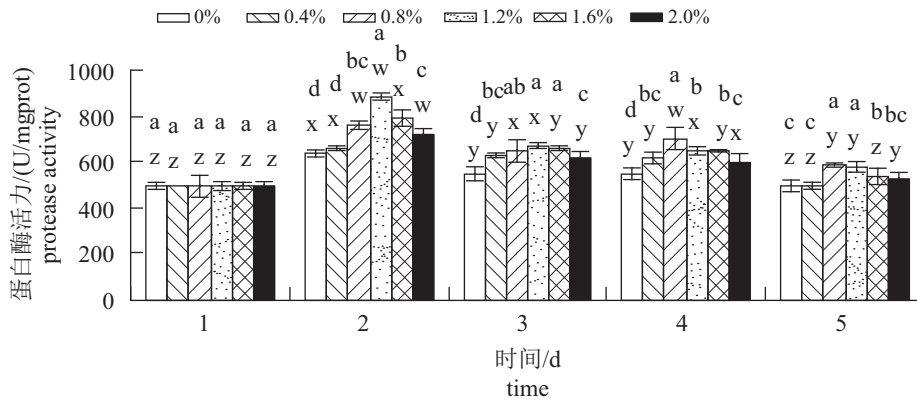


图4 复方中草药对凡纳滨对虾蛋白酶活力的影响

Fig. 4 Effects of compound Chinese herbs on protease activity in *L. vannamei*

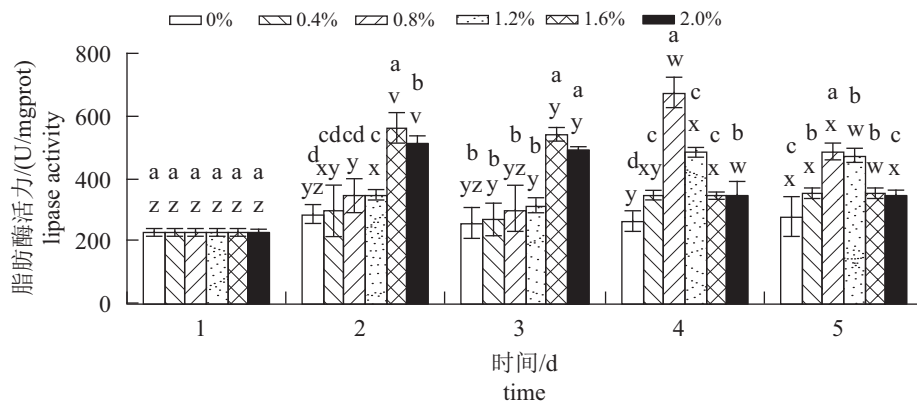


图5 复方中草药对凡纳滨对虾脂肪酶活力的影响

Fig. 5 Effects of compound Chinese herbs on lipase activity in *L. vannamei*

2.4 复方中草药对凡纳滨对虾免疫相关因子活性的影响

复方中草药对凡纳滨对虾总超氧化物歧化酶活力影响显著。在1~14 d阶段中, 1.6%和2.0%添加组超氧化物歧化酶活力最高, 且与其他各组差异显著 ($P<0.05$); 15~28 d阶段中, 酶活力较高的组往添加量较小的组移动, 表现为0.8%和1.2%添加组效果最佳, 与其他各组差异显著 ($P<0.05$)(图6)。

中草药添加对凡纳滨对虾GOT影响显著, 整个养殖过程中, 除7 d阶段0.4%添加组与对照组无显著差异 ($P>0.05$)外, 实验组的酶活力均显著高于对照组。在1~7 d阶段中, 1.2%、1.6%添加组和2.0%添加组GOT活力最高, 且与其他各组差异显著 ($P<0.05$); 8~14 d阶段中, 1.6%添加组和2.0%添加组GOT活力最高, 且与其他各组差异显著 ($P<0.05$); 15~28 d阶段中, 酶活力较高的组往添加量较小的组移动, 为0.8%、1.2%添加组, 差异显著 ($P<0.05$)(图7)。

中草药添加对凡纳滨对虾GPT影响显著, 整个养殖过程中, 实验组的酶活力均高于对照组。在1~14 d阶段中, 1.2%添加组和1.6%添加组GPT活力最高, 且与其他各组差异显著 ($P<0.05$); 15~28 d阶段中, 酶活力较高的组往添加量较小的组移动, 为0.8%、1.2%添加组, 差异显著 ($P<0.05$)(图8)。

在实验开始前对虾的MDA含量较高, 养殖周期内, 对虾的MDA含量均有不同程度的下降; 7 d阶段, 对照组和2.0%添加组MDA含量最高, 与其他实验组差异显著 ($P<0.05$); 14 d阶段对照组和添加量较高的组(1.6%, 2.0%)MDA含量较高且差异显著 ($P<0.05$); 21和28 d阶段对虾MDA含量逐步下降, 但是对照组一直处于含量较高的状态, MDA含量最低的组为0.4%、0.8%和1.2%添加组(图9)。

2.5 复方中草药对凡纳滨对虾抗WSSV性能的影响

对照组在第24 h开始出现实验对虾死亡, 0.4%、

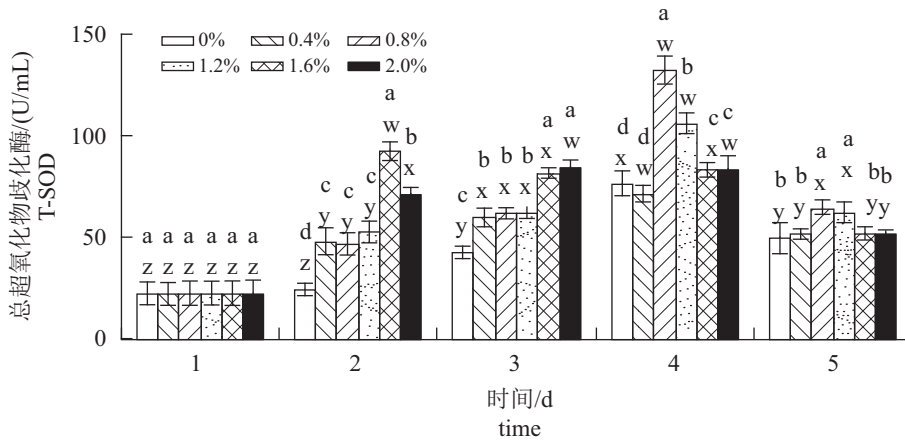


图 6 复方中草药对凡纳滨对虾SOD酶活力的影响

Fig. 6 Effects of compound Chinese herbs on SOD activity in *L. vannamei*

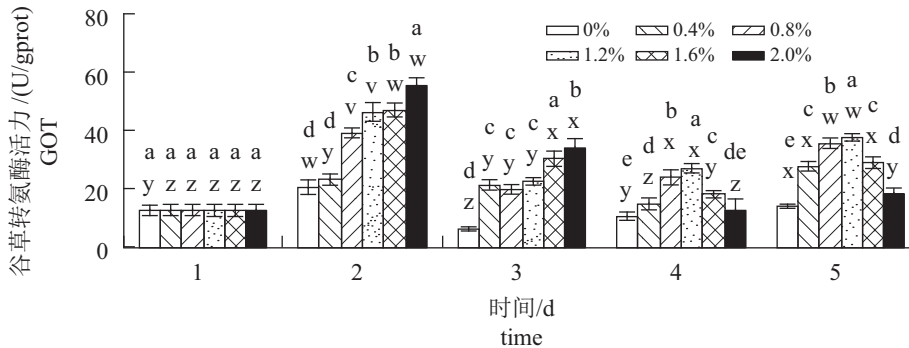


图 7 复方中草药对凡纳滨对虾GOT酶活力的影响

Fig. 7 Effects of compound Chinese herbs on GOT activity in *L. vannamei*

1.2%、1.6%和2.0%组在48 h出现对虾死亡，而0.8%添加组到第72 h才出现死亡。50%死亡时间最早的为对照组，最迟的为0.8%添加组，与其余各组差异显著($P<0.05$)；各组死亡的高峰期不同，其中对照组、1.6%添加组和2.0%添加组对虾死亡高峰期为72~96 h，差异显著($P<0.05$)；0.4%和0.8%添加组对虾死亡高峰期为96 h，差异显著($P<0.05$)；1.2%添加组死亡高峰期为168 h。总之，对照组和0.4%添加组对虾死亡出现时间短，死亡率高，达到100%；0.8%添加组对虾死亡时间出现较晚且死亡率最低，与其余各组差异显著($P<0.05$) (图10, 表3)。

3 讨论

3.1 复方中草药对凡纳滨对虾生长消化酶活性的影响

由于黄芪、甘草、柴胡、当归含有黄芪多糖、甘草多糖、黄酮类以及生物碱等成份，能

有效调节机体功能，提高对虾机体免疫，改善机体内环境，因此，中草药能促进血红蛋白、血清蛋白合成，提高营养物质利用效率、增强新陈代谢功能、改善消化、促进生长^[22]。此外中草药中的生物碱、有机酸、醌类化合物和苷类等生物活性物质，不仅能加强水产动物的胸腺、脾脏和头肾等器官的功能^[23]；还能刺激网状内皮系统，激活T淋巴细胞、B淋巴细胞以及巨噬细胞增生，诱导免疫细胞产生凝集素和抗体^[24]。

美国红鱼(*Sciaenops ocellatus*)用黄芪和茯苓的提取物饲喂一定时期后，体长增长率和相对质量增加率均有显著提高^[25]；在饲料中添加一定比例的复方中草药，对草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)^[26]、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[27]、尼罗罗非鱼(*Oreochromis nilotica*)^[28]的生长、消化都有促进作用。投喂添加1%等比例混合的黄芪、大黄、甘草和大黄的饲料能使凡纳滨对虾的增重率和相对增重率显著高于对照组^[29]；将黄芪等多味中草药组成的复方投喂凡纳滨对虾，发现其对对虾的生长消化

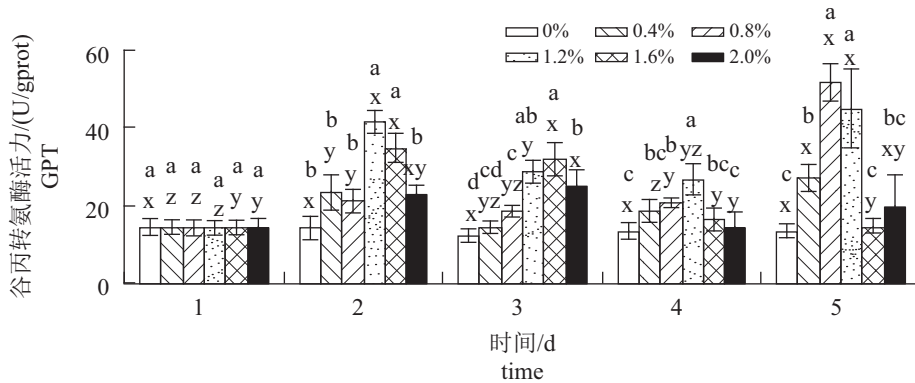


图 8 复方中草药对凡纳滨对虾GPT酶活性的影响

Fig. 8 Effects of compound Chinese herbs on GPT activity in *L. vannamei*

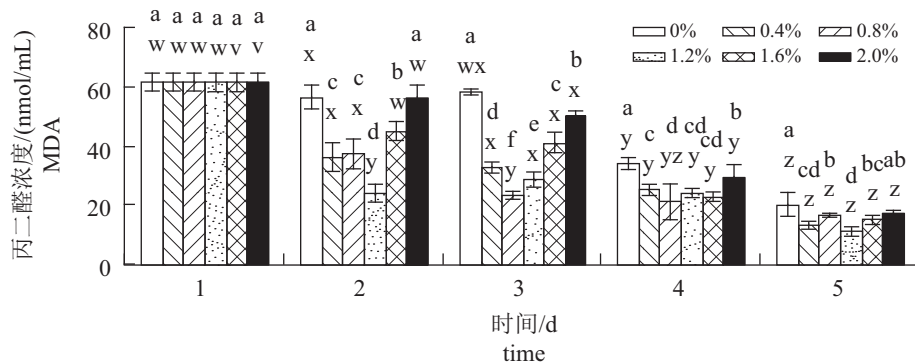


图 9 复方中草药对凡纳滨对虾MDA含量的影响

Fig. 9 Effects of compound Chinese herbs on MDA content in *L. vannamei*

有显著影响^[30]; 板蓝根等中草药能影响凡纳滨对虾营养成分的比例, 提高消化率和脂肪酸含量^[31]。

本实验经过28 d复方中草药添加饲养实验, 实验组的成活率、特定生长率、增重率以及饱满度都高于基础对照组, 以0.8%和1.2%的添加量效果最佳。

实验发现, 投喂不同添加量的复方中草药以及投喂时间均对凡纳滨对虾的消化酶具有一定影响, 在养殖早期阶段, 消化酶活力较高的组为添加量比较高的组(1.2%, 1.6%, 2.0%), 随着养殖时间的推移, 酶活力较高的组逐渐从添加量高的组往添加量低的组变化, 最终酶活力保持较高的组为0.8%, 1.2%添加组。

3.2 复方中草药对凡纳滨对虾免疫因子活性的影响

中草药能提高水生动物的免疫性能, 有学

者发现添加2g/kg的枸杞提取物能有效提高饲料效率、特定生长率和蛋白质消化率, 同时能提高非特异免疫参数^[32]; V_C与复方中草药(黄芪、茯苓、当归、白术、党参)混合投喂能够提高凡纳滨对虾非特异性免疫相关机能^[33]; 2%的中草药(霍羊藿、黄芩、甘草、当归、金银花、板蓝根、麦芽、党参等)制剂可以促进凡纳滨对虾的生长、增强免疫力和抗病力^[34]。

本实验对虾免疫相关因子GOT、GPT、SOD的酶活力的变化规律与消化酶变化规律相似, 前14 d酶活力较高的组为1.6%和2.0%添加组, 后14 d则表现为0.8%和1.2%添加组的活力较高。同样, 养殖前期添加量高的组各活性因子较好, 后期则表现为往添加量低组移动的现象。原因可能是因为在饲养早期阶段, 复方中草药的有效成分在对虾体内积累较少, 故添加量较高的实验组表现出较明显的促消化和提高

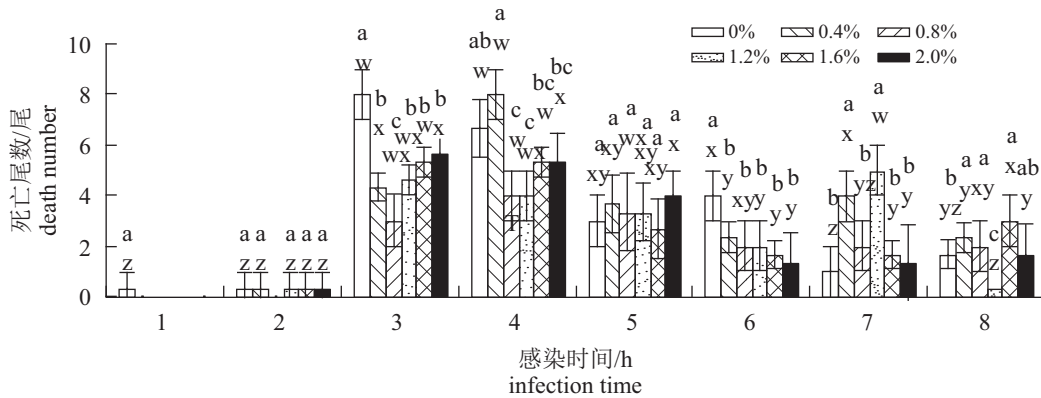


图 10 凡纳滨对虾感染WSSV后的死亡数变化

注: 1. 0 h, 2. 24 h, 3. 48 h, 4. 72 h, 5. 96 h, 6. 120 h, 7. 144 h, 8. 168 h

Fig. 10 The change of mortality in WSSV-infected *L. vannamei*

Notes: 1. represents the time of 0 hour; 2. represents the time of 24 hours; 3. represents the time of 48 hours; 4 represents the time of 72 hours; 5. represents the time of 96 hours; 6. represents the time of 120 hours; 7. represents the time of 144 hours; 8. represents the time of 168 hours

表 3 复方中草药对凡纳滨对虾抗WSSV性能的影响

Tab. 3 The effects of compound Chinese herbs on WSSV-resistance of *L. vannamei*

处理组 treatment group	第1尾死亡时间/h time of the first death	50%死亡时间/h median lethal time	100%死亡时间/h time of 100% death	成活率/% survival rate
0%	45.33±18.90 ^a	84.00±12.00 ^b	166.67±34.02 ^c	0.00±0.00 ^b
0.4%	53.33±6.11 ^a	100.00±6.93 ^{ab}	176.00±13.85 ^c	0.00±0.00 ^b
0.8%	52.00±24.98 ^a	138.67±48.88 ^a	/	33.33±6.11 ^a
1.2%	48.00±14.42 ^a	125.33±28.10 ^{ab}	/	21.33±4.16 ^{ab}
1.6%	53.33±4.62 ^a	114.67±16.65 ^{ab}	/	20.00±2.00 ^{ab}
2.0%	60.00±12.00 ^a	109.33±14.05 ^{ab}	/	20.00±5.00 ^{ab}

注: 各列不同小写字母表示存在显著差异(P<0.05)

Notes: The different lowercase letters represent the significant difference (P<0.05)

免疫的效果。随着饲养时间的增长,添加量较少的实验组其有效成分在对虾体内积累到一定量时,发挥出明显促进效果,而添加量较高的实验组由于对虾体内过多的有效成分反而起抑制效果,其消化和免疫性能相对于添加量少的组有所下降。这与徐涛等^[18]以黄芪、人参、甘草的复方中草药饲喂凡纳滨对虾第28 d时AST下降,持续受药会对肝脏产生一定的损伤的结果相似;叶建生等^[35]认为随着中草药剂量的添加,可能会超过凡纳滨对虾能够消化的最高阈值,从而导致机体蛋白酶和淀粉酶活力下降;黄忠等^[36]发现连续投喂可使凡纳滨对虾产生免疫疲劳,阻碍非特异免疫因子发挥正常作用,影响成活率,间歇的投喂策略反而效果较好;王芸等^[9]以2%的鱼腥草(*Houttuynia cordata* Thunb.)、黄芪、大黄、甘草和黄芩的水提物饵料连续28 d饲喂凡纳滨对虾,在实验后期发现各组PO大幅度下降,说明5种中草药不能长期使用。因此,中草药虽源于自然,副作用小,但长期服用,对于对虾自身来说也是一种刺激和应激,所以需掌握用量以及合理的投喂策略,以期充分利用中草药的优势。

MDA的高低间接反应了机体细胞受自由基攻击的严重程度。本实验中各添加组对虾MDA含量逐步下降,说明对虾体内受自由基攻击程度也逐步下降,机体内环境逐步改善,对照组的MDA则一直处于较高的水平,0.8%和1.2%添加组的MDA含量一直处于较低的水平。

3.3 复方中草药对凡纳滨对虾免抗WSSV性能的影响

复方中草药中的黄芩、葛根、黄连、金银花、板蓝根具有抗微生物,增强机体自身抵抗力的功能。本实验结果显示,复方中草药能显著提高凡纳滨对虾抗病力及成活率,在感染试验第7天时,对照组和0.4%添加组对虾的死亡率达到100%,0.8%、1.2%组的死亡率降低到66.67%、78.67%,其余各组也均有一定的成活率,且半数死亡时间比对照有所延迟,说明复方中草药在对虾免疫方面起到了一定的作用。这与Murugan等^[37]将狗牙根(*Cynodon dactylon*)、木橘(*Aegle marmelos*)、心叶青牛胆(*Tinospora cordifolia*)、印度胡黄连(*Picrohiza scrophulariiflora pennell*)、旱莲草(*Eclipta prostrata*)1:1混合,饲喂斑节虾,25 d后用WSSV感染,成活率显著提

高;添加0.1%的复方中草药,连续饲喂26 d,对虾的抗病力最为明显,在治疗试验中,中草药添加浓度为0.2%,饲喂30 d时,效果最佳^[38];此外,Sudheer等^[39]Kumaran等^[40]、Yogeeswaran等^[41]都证明中草药对抗白斑病毒病有显著作用。

4 结论

复方中草药可以促进凡纳滨对虾的生长消化、改善免疫功能、提高抗WSSV的性能,且不同的剂量和投喂时间均能影响其效果,较高投喂剂量可在较短时间内促进凡纳滨对虾的生长和免疫,但过长时间投喂则降低效果,反之亦然。添加0.8%和1.2%复方中草药能有效地促进对虾生长、消化,提高免疫和抗WSSV性能。

参考文献:

- [1] 黄永春,艾华水,殷志新,等.第四代凡纳滨对虾抗WSSV选育家系的抗病及免疫特性研究[J].水产学报,2010,34(10):1549-1558.
Huang Y C, Ai H S, Yin Z X, et al. Studies on WSSV-resistant and immune characteristics of the 4th generation selective breeding families for resistance to the white spot syndrome virus (WSSV) of *Litopenaeus vannamei* [J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(10): 1549-1558(in Chinese).
- [2] 黄永春,艾华水,潘忠诚,等.凡纳滨对虾抗WSSV选育家系的建立及其抗病特性[J].水产学报,2013,37(3):359-366.
Huang Y C, Ai H S, Pan Z C, et al. Establishment and WSSV resistant characteristics of selective breeding families for resistance to the white spot syndrome virus of *Litopenaeus vannamei* [J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(3): 359-366(in Chinese).
- [3] 黄永春,艾华水,殷志新,等.凡纳滨对虾抗WSSV选育家系的抗病与生长特性[J].台湾海峡,2011,30(3):412-418.
Huang Y C, Ai H S, Yin Z X, et al. Growth characteristics of selected *Litopenaeus vannamei* breeding families and their resistance to the white spot syndrome virus (WSSV) [J]. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 2011, 30(3): 412-418(in Chinese).
- [4] 冯东岳,钱冬.2005~2009年凡纳滨对虾白斑综合征和桃拉综合征的流行情况分析[J].南方水产科学,2011,7(1):78-83.

- Feng D Y, Qian D. Prevalence study on *Penaeus vannamei* infected with WSD and TS during 2005~2009[J]. South China Fisheries Science, 2011, 7(1): 78-83(in Chinese).
- [5] Reverter M, Bontemps N, Lecchini D, *et al.* Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives[J]. Aquaculture, 2014, 433: 50-61.
- [6] Lotz J M , Soto M A. Model of white spot syndrome virus (WSSV) epidemics in *Litopenaeus vannamei*[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2002, 50(3): 199-209.
- [7] 杜爱芳, 叶均安, 于涟. 复方大蒜油添加剂对中国对虾免疫机能的增强作用[J]. 浙江农业大学学报, 1997, 23(3): 317-320.
- Du A F, Ye J A, Yu L. Immuno potentiation activities of garlic oil compound as a feed additive in *Penaeus chinensis*[J]. Journal of Zhejiang Agricultural University, 1997, 23(3): 317-320(in Chinese).
- [8] 杨先乐, 沈锦玉, 李爱华, 等. 2013年执业兽医资格考试应试指南(水生生物类)[M]. 北京: 中国农业出版社, 2013: 359-361.
- Yang X L, Shen J Y, Li A H, *et al.* The test guide of the examination system for the qualifications of licensed veterinarians(Aquatic organisms) of 2013[M]. Beijing: Agricultural Press of China, 2013: 359-361 (in Chinese).
- [9] 王芸, 李健, 刘淇, 等. 5种中草药对凡纳滨对虾生长及非特异性免疫功能的影响[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(26): 8236-8239.
- Wang Y, Li J, Liu Q, *et al.* Effect of five species of herbs on nonspecific immune activity of *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2007, 35(26): 8236-8239(in Chinese).
- [10] 李素莹, 周歧存. 大黄对凡纳滨对虾生长和非特异性免疫指标的影响[J]. 广东海洋大学学报, 2009, 29(6): 36-41.
- Li S Y, Zhou Q C. Effect of dietary rhubarb levels on growth and non-specific immune response of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2009, 29(6): 36-41(in Chinese).
- [11] 黄永春, 陈辉辉, 涂晨凌, 等. 5种中草药对凡纳滨对虾生长和抗病力的影响[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(1): 86-90.
- Huang Y C, Chen H H, Tu C L, *et al.* Effects of five species of Chinese herbs on the growth and disease-resistance of *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2016, 44(1): 86-90(in Chinese).
- [12] 刘波, 冷向军, 李小勤, 等. 杜仲对凡纳滨对虾生长、血清非特异性免疫和肌肉成分的影响[J]. 中国水产科学, 2013, 20(4): 869-875.
- Liu B, Leng X J, Li X Q, *et al.* Effect of *Eucommia ulmoides* on growth, serum non-specific immunity, and muscle composition of *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(4): 869-875(in Chinese).
- [13] 昌鸣先, 陈孝煊, 吴志新, 等. 虫草多糖对日本沼虾免疫机能的影响[J]. 华中农业大学学报, 2001, 20(3): 275-278.
- Chang M X, Chen X X, Wu Z X, *et al.* The effect of cordyceps polysaccharide on *Macrobrachium nipponense* immune function[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2001, 20(3): 275-278(in Chinese).
- [14] 陈云波, 周洪琪, 华雪铭, 等. 饲料中添加 β -葡聚糖对南美白对虾的生长、存活及饲料系数的影响[J]. 淡水渔业, 2002, 32(5): 55-56.
- Chen Y B, Zhou H Q, Hua X M, *et al.* Effects of dietary β -glucan on the growth survival and food coefficient of *Penaeus vannamei*[J]. Freshwater Fisheries, 2002, 32(5): 55-56(in Chinese).
- [15] 张志勇, 程宗佳, 柏世军, 等. 海藻 β -1, 3葡聚糖对南美白对虾(*Litopenaeus vannamei*)生长性能及体成分的影响[J]. 饲料工业, 2014, 35(24): 12-15.
- Zhang Z Y, Cheng Z J, Bai S J, *et al.* Effects of Algamune™ (β -1, 3 glucan) on growth performance and body composition of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)[J]. Feed Industry, 2014, 35(24): 12-15(in Chinese).
- [16] Balasubramanian G, Sarathi M, Venkatesan C, *et al.* Studies on the immunomodulatory effect of extract of *Cyanodon dactylon* in shrimp, *Penaeus monodon*, and its efficacy to protect the shrimp from white spot syndrome virus (WSSV)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 25(6): 820-828.
- [17] Jian J C, Wu Z H. Effects of traditional Chinese medicine on nonspecific immunity and disease resistance of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* (Richardson)[J]. Aquaculture, 2003, 218(1-4): 1-9.
- [18] 覃振林, 韦海英, 李学坚, 等. 复方马齿苋影响南美白

- 对虾非特异性免疫功能研究[J]. 水利渔业, 2006, 26(5): 100-101.
- Qin Z L, Wei H Y, Li X J, *et al.* Effects of the compound purslane on the nonspecific immunity of *Litopenaeus vannamei*[J]. Reservoir Fisheries, 2006, 26(5): 100-101(in Chinese).
- [19] 董晓慧, 李明, 叶继丹. 复方中草药对凡纳滨对虾生长性能和血清非特异免疫因子的影响[J]. 大连水产学院学报, 2009, 24(2): 162-165.
- Dong X H, Li M, Ye J D. Effect of Chinese herbal medicines on growth and non-specific immunity in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2009, 24(2): 162-165(in Chinese).
- [20] 杨先乐, 沈锦玉, 李爱华, 等. 2013年执业兽医资格考试应试指南(水生生物类)[M]. 北京: 中国农业出版社, 2013: 362-364.
- Yang X L, Shen J Y, Li A H, *et al.* The test guide of the examination system for the qualifications of licensed veterinarians(Aquatic organisms) of 2013[M]. Beijing: Agricultural Press of China, 2013: 362-364 (in Chinese).
- [21] Ye, J D, Liu, *et al.* The evaluation of practical diets on a basis of digestible crude protein, lysine and methionine for *Litopenaeus vannamei*[J]. Aquac. Nutr., 2012, 18: 651-661.
- [22] 陈丽婷, 郇志利, 王晓清, 等. 中草药添加剂在水产养殖中的应用研究进展[J]. 水产科学, 2014, 33(3): 190-194.
- Chen L T, Huan Z L, Wang X Q, *et al.* Research progress of application of dietary Chinese herbal medicine additives in fish: A review[J]. Fisheries Science, 2014, 33(3): 190-194(in Chinese).
- [23] 李霞, 马驰原, 李雅娟, 等. 中草药对牙鲆免疫力的影响[J]. 东北农业大学学报, 2011, 42(3): 60-67.
- Li X, Ma C Y, Li Y J, *et al.* Effect of Chinese herbal medicine on immunity of flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2011, 42(3): 60-67(in Chinese).
- [24] Wu C C, Liu C H, Chang Y P, *et al.* Effects of hot-water extract of *Toona sinensis* on immune response and resistance to *Aeromonas hydrophila* in *Oreochromis mossambicus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 29(2): 258-263.
- [25] 马爱梅, 闫茂仓, 常维山, 等. 5种中草药对美国红鱼生长和免疫机能的影响[J]. 海洋科学, 2009, 33(12): 96-102.
- Ma A M, Yan M C, Chang W S, *et al.* Effects of Chinese herbs on the growth and immune function in *Sciaenops ocellatus*[J]. Marine Sciences, 2009, 33(12): 96-102(in Chinese).
- [26] 李超, 张其中, 杨莹莹, 等. 不同剂量复方中草药免疫增强剂对草鱼生长性能和免疫功能的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2011, 20(4): 534-540.
- Li C, Zhang Q Z, Yang Y Y, *et al.* Effect of different doses of compound Chinese herbal immunostimulant in feed on the growth and immune function of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2011, 20(4): 534-540(in Chinese).
- [27] 王吉桥, 孙永新, 张剑诚. 金银花等复方草药对牙鲆生长、消化和免疫能力的影响[J]. 水产学报, 2006, 30(1): 90-96.
- Wang J Q, Sun Y X, Zhang J C. Effects of Chinese herb additives on growth, digestive activity and non-specific immunity in flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2006, 30(1): 90-96(in Chinese).
- [28] Ahmad M H, Abdel-Tawwab M. The use of caraway seed meal as a feed additive in fish diets: growth performance, feed utilization, and whole-body composition of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) fingerlings[J]. Aquaculture, 2011, 314(1-4): 110-114.
- [29] 王芸, 李健, 陈萍, 等. 复方中草药对凡纳滨对虾生长及非特异性免疫功能的影响[J]. 中国农学通报, 2012, 28(29): 109-114.
- Wang Y, Li J, Chen P, *et al.* Effects of compound Chinese herbs on growth performance and nonspecific immunity of *Litopenaeus vannamei*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(29): 109-114(in Chinese).
- [30] 汤菊芬, 陆志款, 彭卫正, 等. 复方中草药对凡纳滨对虾生长、肌肉营养成分和抗病力的影响[J]. 饲料工业, 2008, 29(20): 23-26.
- Tang J F, Lu Z K, Peng W Z, *et al.* Effect of Chinese herbal on growth, nutrition composition of meat and disease resistance for *Litopenaeus vannamei* boone[J]. Feed Industry, 2008, 29(20): 23-26(in Chinese).
- [31] Lin H Z, Li Z J, Chen Y Q, *et al.* Effect of dietary traditional Chinese medicines on apparent digestibility coefficients of nutrients for white shrimp *Litopenaeus*

- vannamei*, Boone[J]. Aquaculture, 2006, 253(1-4): 495-501.
- [32] Mo W Y, Lun C H I, Choi W M, *et al.* Enhancing growth and non-specific immunity of grass carp and Nile tilapia by incorporating Chinese herbs (*Astragalus membranaceus* and *Lycium barbarum*) into food waste based pellets[J]. Environmental Pollution, 2016, 219: 475-482.
- [33] Qiao J, Du Z H, Zhang Y L, *et al.* Proteomic identification of the related immune-enhancing proteins in shrimp *Litopenaeus vannamei* stimulated with vitamin C and Chinese herbs[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 31(6): 736-745.
- [34] 郭文婷, 李健. 中草药制剂对凡纳滨对虾生长及血淋巴中免疫因子的影响[J]. 饲料工业, 2005, 26(6): 6-10.
Guo W T, Li J. Effect of Chinese herbal medicine on growth and immune factors of blood lymph for *Penaeus vannamei* boone[J]. Feed Industry, 2005, 26(6): 6-10(in Chinese).
- [35] 叶建生, 马甦, 王兴强, 等. 中草药制剂对凡纳滨对虾生长和消化酶活性的影响[J]. 中国海洋大学学报, 2007, 37(S): 151-154, 150.
Ye J S, Ma S, Wang X Q, *et al.* Effects of dietary traditional Chinese medicines on the growth and activities of digestive enzymes of *Litopenaeus vannamei*[J]. Periodical of Ocean University of China, 2007, 37(S): 151-154, 150(in Chinese).
- [36] 黄忠, 林黑着, 李卓佳, 等. 复方中草药投喂策略对凡纳滨对虾生长、消化及非特异性免疫功能的影响[J]. 南方水产科学, 2013, 9(5): 37-43.
Huang Z, Lin H Z, Li Z J, *et al.* Effects of feeding strategy of dietary Chinese herbs on growth performance, digestive enzymes and non-specific immunity of *Litopenaeus vannamei*[J]. South China Fisheries Science, 2013, 9(5): 37-43(in Chinese).
- [37] Citarasu T, Sivaram V, Immanuel G, *et al.* Influence of selected Indian immunostimulant herbs against white spot syndrome virus (WSSV) infection in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* with reference to haematological, biochemical and immunological changes[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2006, 21(4): 372-384.
- [38] 杨清华, 郭志勋, 林黑着, 等. 复方中草药添加浓度和投喂策略对凡纳滨对虾抗WSSV能力的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2011(2): 142-145.
Yang Q H, Guo Z X, Lin H Z, *et al.* Effects of feeding strategy and different doses of compound Chinese herbs on WSSV-resistant of *Litopenaeus vannamei*[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2011(2): 142-145(in Chinese).
- [39] Sudheer N S, Philip R, Singh I S B. *In vivo* screening of mangrove plants for anti WSSV activity in *Penaeus monodon*, and evaluation of *Ceriops tagal* as a potential source of antiviral molecules[J]. Aquaculture, 2011, 311(1-4): 36-41.
- [40] Kumaran T, Michaelbabu M, Selvaraj T, *et al.* Production of anti WSSV IgY edible antibody using herbal immunoadjuvant *Asparagus racemosus* and its immunological influence against WSSV infection in *Penaeus monodon*[J]. Journal of Aquaculture Feed Science and Nutrition, 2010, 2(1): 1-5.
- [41] Yogeewaran A, Velmurugan S, Punitha S M J P, *et al.* Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by inactivated vaccine with herbal immunostimulants[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 32(6): 1058-1067.

Effects of compound Chinese herbs on growth, digestive enzyme, immunologic factors and WSSV-resistant capacity of *Litopenaeus vannamei*

CHEN Huihui¹, TU Chenling¹, TANG Yang¹, HUANG Yongchun^{1,2*}

(1. College of Fisheries, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Key Laboratory of Marine Fishery Resources and Ecological Environment, Xiamen 361021, China)

Abstract: The purpose of this study is to find out the effects of compound Chinese herbs (*Radix acutellariae*, *Puerarin*, *Coptidis*, *rhizome*, *Honeysuckle*, *Isatidis radix*, *Astragalus radix*, *Glycyrrhiza wralensis* Fisch, *Bupleurum*, *Angelica sinensis*, *Hawthorn*, *citrusa* and *Poria cocos*) on growth digestive enzyme, immunologic factors and WSSV-resistant capacity of *Litopenaeus vannamei* and provide scientific basis for the healthy culture of it. *Litopenaeus vannameis* (0.026±0.007) g were randomly divided into 6 groups with 3 replicates per group and 160 shrimps per replicate. The shrimps were fed 28-days with basal diets supplemented with 0 (control group), 0.4%, 0.8%, 1.2%, 1.6%, 2.0% of compound Chinese herbs, respectively. The results showed that the growth performance (WGRSGRFR and SR) in experimental groups was significantly increased compared with that of the control group, and the 0.8% and 1.2% supplemental groups showed the best results. While the FCR was significantly decreased. The high activities of Digestive enzyme (Amylase, Potease and Lipase) and immunologic factors (SOD, GPT and GOT) on hepatopancreas of *Litopenaeus vannamei* were found in high supplemental groups, while with the time went by they were found in little supplemental groups, and the 0.8% and 1.2% supplemental groups showed the best results. Compared with control group, the content of MDA in 0.4%, 0.8% and 1.2% supplemental groups were significantly decreased. The shrimp in the control group and 0.4% supplemental groups were 100% death after infected with WSSV, however the time of the first death shrimp, the time of 50% death and the time of 100% death in 0.4% supplemental groups were delayed by 8, 16 and 8 h compared with that of the control group, respectively. The survival rate of 0.8% supplemental group was 33.3%, significantly higher than that of other groups. In short, compound Chinese herbs can promote growth, digestion, immune and WSSV-resistant ability, and 0.8% and 1.2% supplemental groups indicated best results.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; compound Chinese herbs; growth; digestive enzyme; immune factors; WSSV resistance

Corresponding author: HUANG Yongchun. E-mail: ychuang@jmu.edu.cn

Funding projects: Natural Science Fund Project of Fujian (2013J01139); Marine Economic Innovation and Development of Regional Demonstration Projects of Xiamen (13PZY001SF25); Science and Technology Department of Production and Research Cooperation Projects of Fujian (2017N5012)