

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20191024001

http://www.yykxjz.cn/

肖威, 单洪伟, 马甦, 李忠帅. 亚硝态氮慢性胁迫对凡纳滨对虾体成分和糖代谢的影响. 渔业科学进展, 2020, 41(6): 74–81
Xiao W, Shan HW, Ma S, Li ZS. Effects of chronic nitrite stress on body composition and glucose metabolism of *Litopenaeus vannamei*. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(6): 74–81

亚硝态氮慢性胁迫对凡纳滨对虾 体成分和糖代谢的影响*

肖 威 单洪伟 马 甦^① 李忠帅

(中国海洋大学 海水养殖教育部重点实验室 青岛 266003)

摘要 为研究亚硝态氮($\text{NO}_2\text{-N}$)慢性胁迫对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)[(2.03±0.33) g]生长、摄食、体成分和糖代谢的影响, 实验设置 0 (对照组)、8 (N8 组)、15 (N15 组)和 30 mg/L (N30 组) $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度组, 进行 36 d 的 $\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫实验。结果显示, 随着 $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度升高, 对虾的终末体重、特定生长率、增重率和日摄食率均呈显著下降趋势。N8 组和 N15 组对虾的血糖和肝胰腺中糖原含量在实验中期高于对照组, 但最终均低于对照组, 而肌肉中糖原含量在实验期间始终低于对照组。胁迫组凡纳滨对虾肌肉中的己糖激酶活力低于对照组; 而肝胰腺己糖激酶活力和丙酮酸激酶活力均高于对照组, 同时, 肝胰腺乳酸含量与乳酸脱氢酶活力呈先上升后下降的趋势, 最终与对照组相比无显著差异。终末体成分中, N30 组的粗脂肪含量显著低于对照组。结果表明, $\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫会降低对虾食欲, 减缓凡纳滨对虾的生长, 机体糖代谢调节可作为对虾应对 $\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫的短期响应, 对虾对脂质的利用在应对 $\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫过程中起重要作用。

关键词 凡纳滨对虾; 亚硝态氮胁迫; 体成分; 糖代谢

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)06-0074-08

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)是我国主要甲壳动物养殖品种之一。2018 年, 全国养殖产量为 176 万 t, 为国内甲壳动物养殖总量的 34.2% (国家统计局, 2019)。凡纳滨对虾高密度养殖期间, 大量饲料的投入和粪便的排出, 使水体中含氮废物含量不断提高(寇红岩等, 2014; Wang *et al*, 2019), 其在亚硝化细菌的作用下很快转化成亚硝态氮, 但能将亚硝态氮降解的硝化细菌却生长速度缓慢, 最终导致水体中的亚硝态氮大量积累(姚艳玲等, 2018), 在养殖后期, 水中的亚硝态氮含量达到 20 mg/L (Tseng *et al*, 2004)。水体中高浓度的 NO_2 会与 Cl^- 以及其他阴离子争夺对虾鳃上的吸收位点(寇红岩等, 2014; Wang *et al*, 2016),

通过血液运输在对虾体内各部分不断积累, 一部分 NO_2 还会在对虾体内转化成 NO_3^- 、尿素和谷氨酸(Tsng *et al*, 2004)。

亚硝态氮($\text{NO}_2\text{-N}$)胁迫会降低虾类血蓝蛋白载氧能力, 是高浓度 $\text{NO}_2\text{-N}$ 对虾类产生毒性的主要原因(寇红岩等, 2014)。急性 $\text{NO}_2\text{-N}$ 胁迫会降低虾类的存活率(Lin *et al*, 2003; 寇红岩等, 2014), 破坏虾类血细胞(郭慧等, 2015)、肝胰腺和鳃等组织结构(吕晓燕等, 2010), 降低虾类机体免疫力(Wang *et al*, 2004), 增加虾类对病菌的易感性(黄翔鸽等, 2006; 葛红星等, 2014), 破坏虾类的正常代谢(Jiang *et al*, 2014)。研究表明, 虾类长期生活在低浓度 $\text{NO}_2\text{-N}$ 环境中, 有利

* 中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室开放课题(KLM2018010)资助 [This work was supported by the Open Fund of the Key Laboratory of Mariculture, Ocean University of China (KLM2018010)]. 肖 威, E-mail: 576670096@qq.com

① 通讯作者: 马 甦, 教授, E-mail: mashen@ouc.edu.cn

收稿日期: 2019-10-24, 收修改稿日期: 2019-11-27

于摄食能转化为生长能(朱其建等, 2014), 并且在一定范围内, 盐度越高, 虾类对 $\text{NO}_2\text{-N}$ 耐受能力提高(Sowers *et al.*, 2004; Furtado *et al.*, 2016)。规格为 10 cm 的凡纳滨对虾在盐度 17 和 31 的海水中, $\text{NO}_2\text{-N}$ 安全浓度分别为 4.0 和 8.9 mg/L(黄翔鸽等, 2006)。但目前关于 $\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫对虾类影响的资料较少。

Ulaje 等(2019)研究表明, 凡纳滨对虾应对环境胁迫会加快糖类的动员和储存。本研究关注凡纳滨对虾在 $\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫下的存活率、生长情况、体成分、糖酵解和无氧代谢途径的变化, 以期对凡纳滨对虾健康养殖提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验用虾

实验所用的凡纳滨对虾购自山东省威海文登泰裕水产良种繁育有限公司。凡纳滨对虾初始体长为 (5.71 ± 0.38) cm, 初始体重为 (2.03 ± 0.33) g, 购回后驯养 7 d。驯养期间, 水温为 26°C , 盐度为 29。每天定时投喂 3 次人工配合饲料(主要成分: 水分 8.31%、粗蛋白 43.50%、粗脂肪 6.94%、灰分 12.19%)。

1.2 实验设计与管理

通过预实验得知凡纳滨对虾 96 h 半致死浓度(96 h-LC₅₀)为 150 mg/L $\text{NO}_2\text{-N}$, 以该浓度的 20%为慢性胁迫实验最高浓度组, 等比例设计 4 个浓度组: $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度分别为 0 (对照组)、8 mg/L(N8 组)、15 mg/L(N15 组)和 30 mg/L(N30 组), 进行持续 36 d 的 $\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫实验。每个处理设 6 个平行, 其中, 3 个平行用于取样, 3 个平行用于记录摄食量和存活率。

实验在 $50\text{ cm} \times 35\text{ cm} \times 35\text{ cm}$ 的玻璃水缸中进行, 水体积为 50 L, 每个水缸(20 尾虾)为 1 个平行实验。实验持续 36 d, 每天换水 1/2~2/3, 通过添加 10 g/L $\text{NO}_2\text{-N}$ 母液保持各组胁迫浓度。实验期间, 各组实测 $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度分别为 0~0.15(对照组)、7.31~8.12(N8 组)、14.13~15.45(N15 组)和 28.92~32.23 mg/L(N30 组)。

实验期间, 温度为 26°C ~ 27°C , pH 7.1~7.5, 盐度为 29, 总氨氮 ≤ 0.70 mg/L, 非离子氨 ≤ 0.03 mg/L, 溶解氧 ≥ 5.95 mg/L。每天 07:00、14:00 和 22:00 投喂人工配合饲料, 饱食投喂。

在投喂饲料前 10 min, 虹吸去除各组水体中的粪便, 投喂 1 h 后, 虹吸收集各组剩余饲料于 250 目筛绢中, 用 0.5 mol/L 的甲酸铵冲洗, 再放入 70°C 烘箱中烘干至恒重。通过预实验测量出该饲料的含水量和

在水中 1 h 的溶失率, 残饵量由饲料的溶失率和含水量校正得到(林继辉等, 2004)。每尾虾单日摄食量为投饵量和残饵量之差除以缸中生存对虾数量得出。

1.3 生长相关指标计算

存活率(Survival rate, SR, %) = $N_t/N_0 \times 100$

摄食率(Feeding rate, FR_d, %) = $100F/[T \times (W_t + W_0)/2]$

相对增重率(Weight gain rate, WGR, %) = $[(W_t - W_0)/W_0] \times 100$

特定生长率(Specific growth rate, SGR, %/d) = $[(\ln W_t - \ln W_0)/T] \times 100$

饲料转化率(Feed conversion rate, FCR, %) = $100 \times (W_t - W_0)/F$

式中, W_0 为凡纳滨对虾初始体重(g); W_t 为凡纳滨对虾终末体重(g); T 为实验时间(d); N_0 为凡纳滨对虾的放养数量; N_t 为凡纳滨对虾终末数量; F 为每只虾 36 d 的总摄食量(g)。

1.4 对虾样品采集与分析

第 1、3、6、12、24 和 36 天随机从各组取 6 尾凡纳滨对虾, 用一次性注射器从凡纳滨对虾腹血窦处按血淋巴与抗凝剂(450 mmol/L NaCl, 10 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na₂-EDTA, 10 mmol/L HEPES, pH 7.3)体积比为 1 : 3 的比例抽血(Vargas-Albores *et al.*, 1993), 抽出的血淋巴立即离心(4000 r/min, 10 min), 取上清液, 经液氮快速冷却后, 放入 -80°C 超低温冰箱保存待测。取对虾肝胰腺和肌肉, 同样经液氮快速冷却后放入 -80°C 超低温冰箱保存待测。第 36 天, 随机从各组取 3 尾对虾, 测量对虾全虾体成分。

凡纳滨对虾血糖、肝糖原、肌糖原含量; 肝胰腺与肌肉中己糖激酶(HK)活性和丙酮酸激酶(PK)活性; 肝胰腺中的乳酸含量和乳酸脱氢酶(LDH)活性测定均使用南京建成公司试剂盒, 操作按照说明书进行。

全虾样品在 105°C 烘干至恒重来测定水分, 粗蛋白采用凯氏定氮法测量, 粗脂肪采用氯仿-甲醇抽提法测量, 灰分采用 550°C 马弗炉灰化法测量。

1.5 数据处理

实验数据均采用平均数 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示。分析之前测试数据的正态性(Shapiro-Wilk test)和方差齐性(Levene's test), 若数据不具有方差齐性, 则对数据进行 lg 转化并进一步测试。采用 Tukey 多重比较检验对符合正态分布和方差齐性的数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA)。对于不符合正态分布及 lg 转化后仍不具有方差齐性的数据采用非参数检验, 并通过 Kruskal-Wallis 测试进行显著性差异分

析。 $P<0.05$ 表示各组数据差异显著。

2 结果

2.1 亚硝态氮慢性胁迫对凡纳滨对虾生长和成活率的影响

$\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫对凡纳滨对虾存活率、生长和摄食的影响见表 1。从表 1 可以看出, 凡纳滨对虾的存活率随着 $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度升高而降低, 且 N30 组显著低于对照组($P<0.05$)。各组的终末体重、特定生长率和相对增重率均随着 $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度上升而显著下降($P<0.05$), 其中, N15 组和 N30 组之间没有显著差异

($P>0.05$), N30 组的特定生长率和相对增重率分别仅为对照组的 48.55%和 29.68%。日摄食率和饲料转化率随着 $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度上升而下降, 其中, N30 组的日摄食率是对照组日摄食率的 66.20%。

2.2 亚硝态氮慢性胁迫对凡纳滨对虾体成分的影响

$\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫对凡纳滨对虾体成分的影响见表 2。从表 2 可以看出, 凡纳滨对虾的水分和对虾干重的粗蛋白含量随着 $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度上升而上升, 但各组之间没有显著差异($P>0.05$); N30 组的粗脂肪含量显著低于对照组($P<0.05$); 各胁迫组灰分均与对照组无显著差异($P>0.05$)。

表 1 亚硝态氮慢性胁迫对凡纳滨对虾的生长、摄食和成活率的影响

Tab.1 Effects of chronic nitrite nitrogen stress on the life, feeding and survival rate of *L. vannamei*

项目 Items	组别 Group			
	对照 Control	N8	N15	N30
存活率 Survival rate (%)	78.33±2.89 ^a	56.67±2.89 ^{ab}	55.00±10.00 ^{ab}	40.00±5.00 ^b
摄食率 Feeding rate (%)	3.55±0.46 ^a	3.44±0.68 ^a	3.18±0.74 ^a	2.35±0.25 ^b
终末体重 Final body weight (g)	10.26±1.55 ^a	8.47±1.87 ^b	6.14±1.79 ^c	4.47±0.71 ^c
特定生长率 Specific growth rate (%/d)	4.47±0.43 ^a	3.89±0.67 ^b	2.95±0.86 ^c	2.17±0.44 ^c
相对增重率 Weight gain rate (%)	405.65±76.57 ^a	316.42±95.33 ^b	202.71±88.12 ^c	120.42±35.09 ^c
饲料转化率 Feed conversion rate (%)	106.53±20.11	102.77±18.43	92.70±26.16	87.14±19.80

注: 同行数据上标不同字母表示组间差异显著($P<0.05$)。下同

Note: Different superscripts in the same row indicate significant differences between groups ($P<0.05$). The same as below

表 2 亚硝态氮慢性胁迫对凡纳滨对虾体组分的影响

Tab.2 Effects of chronic nitrite nitrogen stress on body composition of *L. vannamei*

项目 Items	组别 Group			
	对照 Control	N8	N15	N30
水分 Moisture (%)	74.47±1.12	74.59±1.49	75.95±1.45	77.23±1.53
粗蛋白 Crude protein (%)	73.05±0.25	72.60±1.69	73.65±0.52	74.67±0.75
粗脂肪 Crude lipid (%)	9.35±1.44 ^a	7.85±0.58 ^{ab}	8.56±0.77 ^a	5.37±1.56 ^b
灰分 Ash (%)	12.55±0.20 ^{ab}	14.65±0.14 ^a	11.90±0.41 ^b	12.96±0.15 ^{ab}

注: 除水分数据为湿重测量外, 其他均为干重测量

Note: Except that the moisture data is wet-weight measurement, the others are all dry-weight measurement

2.3 亚硝态氮慢性胁迫对凡纳滨对虾的糖代谢途径关键酶活力和物质含量的影响

$\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫对凡纳滨对虾血糖影响见图 1。从图 1 可以看出, 第 1 天, 胁迫组的血糖浓度出现了下降的趋势; 第 12 天, N15 组的血糖浓度显著高于对照组($P<0.05$); 第 24 天, N8 组的血糖浓度显著高于对照组($P<0.05$), 说明 N8 和 N15 组血糖浓度在胁迫期间呈先下降再上升的趋势, 但最终在 36 d 再次下降至显著低于对照组($P<0.05$)。而在胁迫期间, N30 组的血糖浓度一直显著低于对照组($P<0.05$)。

$\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫对凡纳滨对虾的肝胰腺和肌肉

中糖原含量的影响见图 2 和图 3。第 1 天, 各组间的肝胰腺中糖原含量保持相对稳定, 各组之间没有显著差异($P>0.05$); 第 3 天, N8 组肝胰腺中糖原含量显著高于对照组($P<0.05$); 第 6 天, N15 与 N30 组的肝胰腺中糖原含量显著高于对照组($P<0.05$); 第 36 天时, 胁迫组的肝胰腺中糖原含量显著低于对照组($P<0.05$), 说明胁迫组肝胰腺中糖原含量的变化趋势与 N8 组和 N15 组的血糖含量变化趋势相同。而在实验期间, 胁迫组对虾肌肉中糖原含量始终显著低于对照组($P<0.05$)。

$\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫对凡纳滨对虾的肝胰腺己糖激酶活力影响见图 4。第 6 天后, N8 组和 N15 组的己

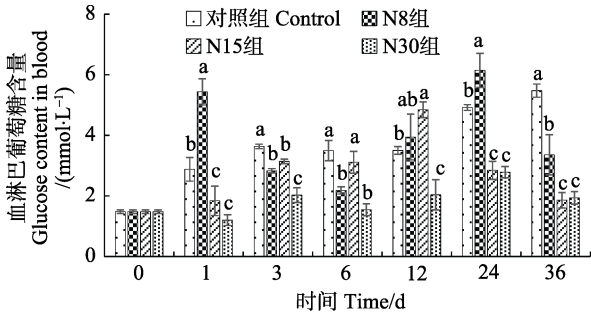


图 1 亚硝态氮慢性胁迫期间凡纳滨对虾血糖浓度的变化
Fig.1 Changes of blood glucose concentration of *L. vannamei* during chronic nitrite stress

同组数据上标不同字母表示组间差异显著($P<0.05$)。下同
Different letter superscripts in the same group indicate significant differences between groups ($P<0.05$). Same as below

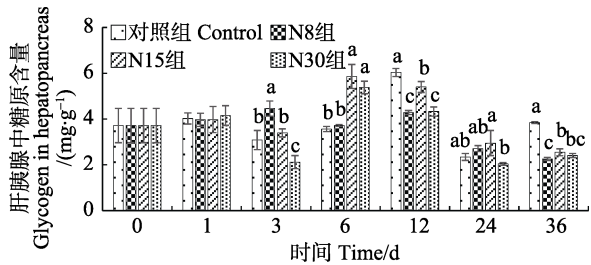


图 2 亚硝态氮慢性胁迫期间凡纳滨对虾肝胰腺中糖原含量的变化
Fig.2 Changes of glycogen in hepatopancreas of *L. vannamei* during chronic nitrite stress

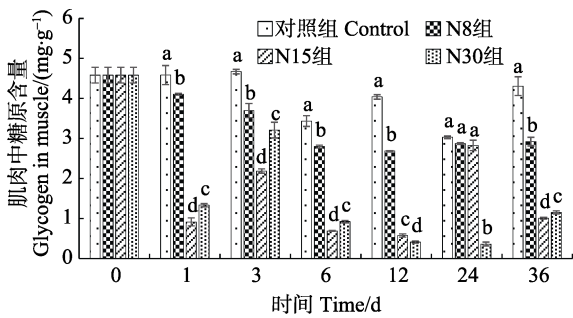


图 3 亚硝态氮慢性胁迫期间凡纳滨对虾肌肉中糖原含量的变化
Fig.3 Changes of glycogen in muscle of *L. vannamei* during chronic nitrite stress

糖激酶活力与对照组相比无显著差异($P>0.05$), 但 N30 组的己糖激酶活力一直高于对照组, 且其肝胰腺中的己糖激酶活力在第 36 天时显著高于对照组 ($P<0.05$)。NO₂-N 慢性胁迫对凡纳滨对虾的肝胰腺丙酮酸激酶活力影响见图 5。从图 5 可以看出, 第 1 天, 胁迫组肝胰腺丙酮酸激酶活力显著高于对照组 ($P<0.05$); 第 6 天后, 其活力随 NO₂-N 浓度升高而升高, 且 N30 组的丙酮酸激酶活力始终显著高于对照

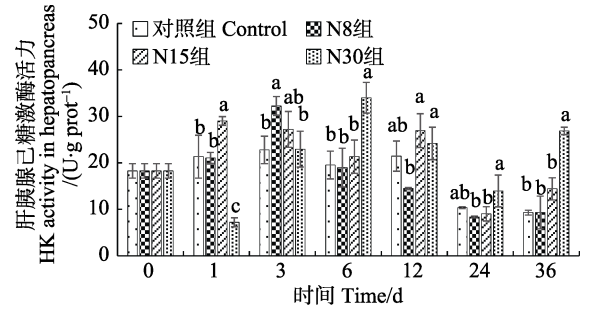


图 4 亚硝态氮慢性胁迫期间凡纳滨对虾肝胰腺己糖激酶活力的变化
Fig.4 Changes of HK activity in hepatopancreas of *L. vannamei* during chronic nitrite stress

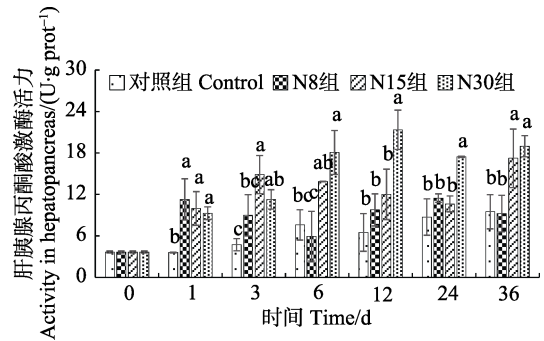


图 5 亚硝态氮慢性胁迫期间凡纳滨对虾肝胰腺丙酮酸激酶活力的变化
Fig.5 Changes of PK activity in hepatopancreas of *L. vannamei* during chronic nitrite stress

组($P<0.05$)。

NO₂-N 慢性胁迫对凡纳滨对虾的肌肉己糖激酶活力影响见图 6。胁迫组肌肉中的己糖激酶活力先升高后降低, 但除了胁迫开始的第 1 天, 胁迫组的己糖激酶活力均低于对照组, 且在实验期间各组之间无显著差异($P>0.05$)。NO₂-N 慢性胁迫对凡纳滨对虾的肌肉丙酮酸激酶活力影响见图 7。NO₂-N 胁迫使肌肉中的丙酮酸激酶活力提高, 最终在第 36 天胁迫组都高于对照组。

NO₂-N 慢性胁迫对凡纳滨对虾的肝胰腺乳酸脱氢酶活力影响见图 8。从图 8 可以看出, 肝胰腺乳酸脱氢酶活力呈先上升后下降的趋势。第 1 天, 各组肝胰腺中乳酸脱氢酶活力无显著差异($P>0.05$), 随着时间的延长, 胁迫组肝胰腺的乳酸脱氢酶活力提高, 且 N30 组的乳酸脱氢酶活力显著高于对照组($P<0.05$)。第 24 天后, 胁迫组肝胰腺的乳酸脱氢酶活力下降, 且在 36 d 时, 各组无显著差异($P>0.05$)。NO₂-N 慢性胁迫对凡纳滨对虾的肝胰腺中乳酸含量影响见图 9。NO₂-N 胁迫会提高凡纳滨对虾肝胰腺中的乳酸含量, N30 组肝胰腺中乳酸含量显著高于对照组($P<0.05$), 但在 36 d 时, 各组的乳酸含量无显著差异($P>0.05$)。

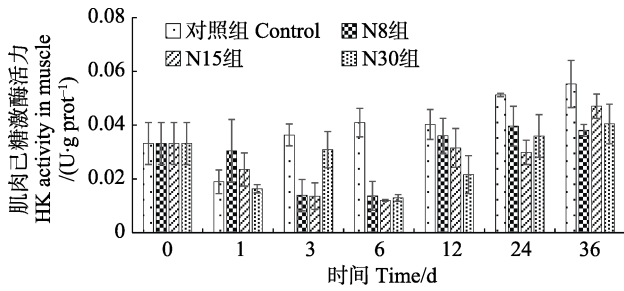


图6 亚硝态氮慢性胁迫期间凡纳滨对虾肌肉己糖激酶活力的变化

Fig.6 Changes of HK activity in muscle of *L. vannamei* during chronic nitrite stress

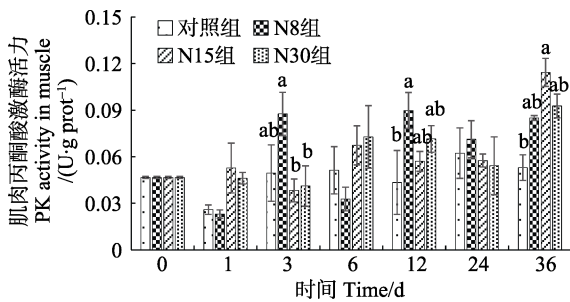


图7 亚硝态氮慢性胁迫期间凡纳滨对虾肌肉丙酮酸激酶活力的变化

Fig.7 Changes of PK activity in muscle of *L. vannamei* during chronic nitrite stress

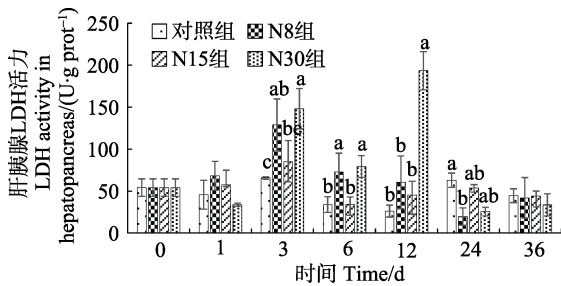


图8 亚硝态氮慢性胁迫期间凡纳滨对虾肝胰腺乳酸脱氢酶活力的变化

Fig.8 Changes of LDH activity in hepatopancreas of *L. vannamei* during chronic nitrite stress

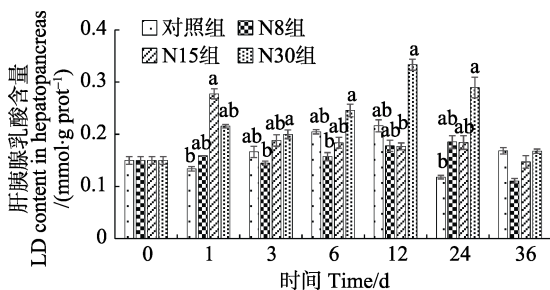


图9 亚硝态氮慢性胁迫期间凡纳滨对虾肝胰腺乳酸含量的变化

Fig.9 Changes of lactic acid content in hepatopancreas of *L. vannamei* during chronic nitrite stress

3 讨论

3.1 亚硝态氮慢性胁迫对凡纳滨对虾存活和生长的影响

水体中 $\text{NO}_2\text{-N}$ 通过鳃丝进入对虾体内,且随着时间的延长在机体内各部位积累,影响对虾的代谢,最终降低对虾的存活率(Li *et al.*, 2019)。在 $\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫期间,凡纳滨对虾活动减少,摄食率随着 $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度上升而显著下降,在 36 d 后,对虾的生长指标和存活率均随着 $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度上升而显著下降。提示 $\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫会显著降低对虾的存活率和生长速度,且降低程度与 $\text{NO}_2\text{-N}$ 水平呈正相关。

3.2 亚硝态氮慢性胁迫对凡纳滨对虾体成分的影响

在环境胁迫下,虾类体内代谢加强,某些营养物质会耗竭或者合成受阻(于赫男, 2007; 鞠波, 2014)。为了满足 $\text{NO}_2\text{-N}$ 急性胁迫引起的虾类对能量需求的增长,日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)对氨基酸的利用可能比体内的脂质代谢起到更重要的作用(Jiang *et al.*, 2014);同时,凡纳滨对虾在慢性氮氮胁迫中,粗脂肪含量随着胁迫浓度升高而下降,但粗蛋白含量却随着胁迫浓度升高而升高(曾庆婷等, 2016)。本研究发现,在 $\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫下,随着 $\text{NO}_2\text{-N}$ 胁迫浓度增大,凡纳滨对虾粗蛋白含量几乎没有发生变化,但对虾的粗脂肪含量显著下降,提示凡纳滨对虾对脂质的利用在应对 $\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫中起重要作用。

3.3 亚硝态氮慢性胁迫对凡纳滨对虾糖代谢的影响

在适宜的生长环境中,动物的血糖浓度处于相对稳定的状态,而当动物遭遇环境胁迫时,机体会迅速将糖原分解为葡萄糖以满足其对营养物质和能量需求(李莉, 2011)。在 $\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫前期,胁迫组的凡纳滨对虾肌肉中糖原迅速降低以支持体内的代谢需求,而在中期,胁迫组的血糖和肝胰腺中糖原含量却存在提高的现象。研究发现,处于长期饥饿中的日本囊对虾(*Penaeus japonicus*)(Hong *et al.*, 2009)和处于被农药敌百虫污染环境中的罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)(Chang *et al.*, 2006)的血糖与肝胰腺中的糖原含量也出现上升的情况,且最终含量低于对照组,本研究存在相似现象。推测是因为对虾肌肉中糖原的分解转运和体内糖原衍生途径的增强,使血糖和肝糖原在 $\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫中保持稳定与提高。在 $\text{NO}_2\text{-N}$ 急性胁迫下,甲壳动物的血糖含量在实验期间始终高于对照组(Hong *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2019)。但本研究发现,在 $\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫中,

凡纳滨对虾体内的血糖和糖原含量最终均低于对照组, 提示在 $\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫下, 虾类体内的糖原含量和血糖含量持续被消耗, 最终已经不能满足体内对能量增长的需求。

$\text{NO}_2\text{-N}$ 会使凡纳滨对虾的血蓝蛋白转变为脱氧血蓝蛋白和变性血蓝蛋白, 导致凡纳滨对虾血淋巴载氧能力下降, 使对虾处于缺氧的状态(寇红岩等, 2014; Wang *et al.*, 2019), 而当对虾处于缺氧状态和抵抗环境胁迫时, 就会增强细胞质中的糖酵解途径得到丙酮酸, 最终获得更多能量来满足机体需求(郭彪等, 2008; 李英等, 2012; 贾旭颖等, 2014; Wang *et al.*, 2016; Shan *et al.*, 2019)。己糖激酶和丙酮酸激酶都是糖酵解反应中重要的限制酶, 而肌肉和肝胰腺是甲壳动物进行糖酵解的主要场所(郭彪等, 2008; 戴超等, 2014)。本研究表明, 在 $\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫下, 凡纳滨对虾肝胰腺中的糖酵解途径增强, 而肌肉中的糖酵解途径因为己糖激酶活力的降低而被抑制。在非离子氨慢性胁迫中, 凡纳滨对虾肌肉中的己糖激酶和丙酮酸激酶也出现下降的现象(贾旭颖等, 2014), 提示在 $\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫中, 凡纳滨对虾可能通过加强肝胰腺中的糖酵解途径来获得更多的能量, 而肌肉并不作为主要的糖代谢场所。但在慢性胁迫的后期, 血糖和肝胰腺中糖原的含量已经消耗殆尽, 肝胰腺中的糖酵解途径无法产生足够的能量与物质来满足凡纳滨对虾体内代谢, 此时, 源于脂类代谢供能则可能起到一定作用。

乳酸脱氢酶是生物体内的无氧代谢标志酶, 乳酸脱氢酶能将丙酮酸反应成乳酸, 并获得少量的能量(贾旭颖等, 2014; 连春盎等, 2017)。在亚硝态急性氮胁迫下, 甲壳动物体内的乳酸脱氢酶活力和乳酸含量在胁迫期间始终显著高于对照组(Hong *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2014)。本研究中, 胁迫组的乳酸脱氢酶先上升后下降, 最终在养殖实验 36 d 结束时, 各组的乳酸脱氢酶活力没有显著性差别, 同时, 各组肝胰腺中的乳酸含量有相同的趋势, 表明 $\text{NO}_2\text{-N}$ 胁迫会在短期内加强凡纳滨对虾的无氧呼吸, 但随着 $\text{NO}_2\text{-N}$ 胁迫时间的延长, 肝胰腺中的乳酸脱氢酶活力受到抑制, 无氧呼吸减弱, 产生的乳酸减少。以上研究结果表明, 在 $\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫前期, 对虾通过加强体内无氧代谢途径以应对胁迫效应; 而在胁迫后期, 对虾无氧代谢供能减弱, 其应对胁迫效应的供能途径可能发生改变。关于 $\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫对对虾能量代谢途径的影响及其机制, 还需进一步研究。

4 结论

$\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫会降低凡纳滨对虾的生长率和

存活率。为了应对 $\text{NO}_2\text{-N}$ 胁迫, 凡纳滨对虾会加强体内糖的无氧代谢途径来获取能量, 应对胁迫效应。然而, 在长期 $\text{NO}_2\text{-N}$ 胁迫下, 对虾体内的血糖含量和糖原含量均被消耗殆尽, 糖代谢已经不能为对虾应对胁迫效应提供充足的能量, 同时, 根据粗脂肪含量变化, 表明凡纳滨对虾通过脂类代谢供能在应对 $\text{NO}_2\text{-N}$ 慢性胁迫过程中起到重要作用。

参 考 文 献

- Chang CC, Lee PP, Hsu JP, *et al.* Survival, and biochemical, physiological, and histopathological responses of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, to short-term trichlorfon exposure. *Aquaculture*, 2006, 253(1-4): 653-666
- Dai C, Wang F, Fang ZH, *et al.* Effects of temperature on the respiratory metabolism and activities of related enzymes of swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(2): 90-96 [戴超, 王芳, 房子恒, 等. 温度对三疣梭子蟹呼吸代谢及其相关酶活力的影响. *渔业科学进展*, 2014, 35(2): 90-96]
- Furtado PS, Valenzuela MAJ, Rodriguez-Fuentes G, *et al.* Chronic effect of nitrite on the rearing of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* in two salinities. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 2016, 49(3): 201-211
- Ge HX, Li J, Chen P, *et al.* Susceptibility of *Litopenaeus vannamei* to *Vibrio parahaemolyticus*: The influence of environmental nitrite nitrogen. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(3): 629-636 [葛红星, 李健, 陈萍, 等. 亚硝酸盐氮胁迫下凡纳滨对虾对副溶血弧菌的易感性. *中国水产科学*, 2014, 21(3): 629-636]
- Guo B, Wang F, Hou CQ, *et al.* Effects of acute temperature fluctuation on HK and PK activity, HSP70 relative content in *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2008, 15(5): 885-889 [郭彪, 王芳, 侯纯强, 等. 温度突变对凡纳滨对虾己糖激酶和丙酮酸激酶活力以及热休克蛋白表达的影响. *中国水产科学*, 2008, 15(5): 885-889]
- Guo H, Xian JA, Wang AL. Effects of nitrite stress on haemocyte toxicity and p53 gene expression of *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Hydroecology*, 2015, 36(2): 61-67 [郭慧, 洗健安, 王安利. 亚硝酸盐对凡纳滨对虾血细胞毒性及 p53 基因表达的影响. *水生态学杂志*, 2015, 36(2): 61-67]
- Hong ML, Chen LQ, Qin JG, *et al.* Acute tolerance and metabolic responses of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) juveniles to ambient nitrite. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 2009, 149(3): 419-426
- Huang XH, Li CL, Zheng L, *et al.* The toxicity of $\text{NO}_2\text{-N}$ on *Litopenaeus vannamei* and effects of $\text{NO}_2\text{-N}$ on factors relating to the anti-disease ability. *Acta Hydrobiologica*

- Sinica, 2006, 30(4): 466–471 [黄翔鹤, 李长玲, 郑莲, 等. 亚硝酸盐氮对凡纳滨对虾毒性和抗病相关因子影响. 水生生物学报, 2006, 30(4): 466–471]
- Jia XY, Guo XT, Wang F, *et al.* Comparison of the effect of nonionic ammonia stress on respiratory metabolic enzyme of *Litopenaeus vannamei* in seawater and freshwater. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(11): 1837–1846 [贾旭颖, 国先涛, 王芳, 等. 非离子氨胁迫对淡水和海水养殖凡纳滨对虾呼吸代谢酶活力影响的比较. 水产学报, 2014, 38(11): 1837–1846]
- Jiang QC, Dilixiati A, Zhang WY, *et al.* Effect of nitrite exposure on metabolic response in the freshwater prawn *Macrobrachium nipponense*. *Central European Journal of Biology*, 2014, 9(1): 86–91
- Ju B. The effects of regulating-controlling water quality by constructed wetlands and the daily feeding rhythm of *Macrobrachium rosenbergii*, and the impacts of $\text{NO}_2\text{-N}$ on its energy metabolism. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2014 [鞠波. 人工湿地调控罗氏沼虾塘水质效果与罗氏沼虾摄食节律及 $\text{NO}_2\text{-N}$ 对其能量代谢影响的研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2014]
- Kou HY, Xian JA, Guo H, *et al.* Research progress of toxic effects of nitrite on shrimp. *Marine Sciences*, 2014, 38(2): 107–115 [寇红岩, 洗健安, 郭慧, 等. 亚硝酸盐对虾类毒性影响的研究进展. 海洋科学, 2014, 38(2): 107–115]
- Li L. Study on crustacean hyperglycemia hormone (CHH) modulates the osmoregulation and glucose metabolism of *Litopenaeus vannamei*. Master's Thesis of Ocean University of China, 2011 [李莉. 高血糖激素(CHH)在对虾渗透调节和血糖代谢中调控机制的初步研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2011]
- Li Y, Wang F, Zhao ZY, *et al.* Effects of salinity fluctuations on hemocyanins and glycolysis of *Litopenaeus vannamei*. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2012, 42(9): 28–34 [李英, 王芳, 赵卓英, 等. 盐度突变对凡纳滨对虾渗透调节中血蓝蛋白和糖酵解影响的初步研究. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2012, 42(9): 28–34]
- Li ZS, Ma S, Shan HW, *et al.* Responses of hemocyanin and energy metabolism to acute nitrite stress in juveniles of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 186: 109753
- Lian CA, Li J, Li JT, *et al.* Effects of dry exposure on the respiratory metabolism-related enzymes of *Exopalaemon carinicauda*. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(4): 53–60 [连春盎, 李健, 李吉涛, 等. 干露胁迫对脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)呼吸代谢相关酶的影响. 渔业科学进展, 2017, 38(4): 53–60]
- Lin JH, Li SQ, Lin XT, *et al.* Study on ingestion and growth of shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Marine Sciences*, 2004, 28(8): 43–46 [林继辉, 李松青, 林小涛, 等. 凡纳滨对虾摄食与生长的实验研究. 海洋科学, 2004, 28(8): 43–46]
- Lin YC, Chen JC. Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels. *Aquaculture*, 2003, 224(1–4): 193–201
- Liu L, Wu LX, Zhang WG, *et al.* Effects of starvation and re-feeding on carbohydrate metabolism of *Marsupenaeus japonicus*. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2007, 18(3): 697–700 [刘璐, 吴立新, 张伟光, 等. 饥饿及再投喂对日本囊对虾糖代谢的影响. 应用生态学报, 2007, 18(3): 697–700]
- Lü XY, Li JY, Fang Y, *et al.* Nitrite stress on immune-related enzymes and the ultrastructure in different tissue of redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(12): 1812–1820 [吕晓燕, 李嘉尧, 方燕, 等. 亚硝酸盐对红螯光壳螯虾不同组织免疫相关酶活性及超微结构的影响. 水产学报, 2010, 34(12): 1812–1820]
- National Bureau of Statistics. *China fisheries statistical yearbook*. Beijing: China Statistics Press, 2019 [国家统计局. 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国统计出版社, 2019]
- Shan HW, Wang T, Dong Y, *et al.* Effects of dietary *Ampithoe* sp. supplementation on the growth, energy status, antioxidant capacity, and ammonia-N tolerance of the shrimp *Litopenaeus vannamei*: Continuous versus interval feeding. *Aquaculture*, 2019, 509: 32–39
- Sowers A, Young SP, Isely JJ, *et al.* Nitrite toxicity to *Litopenaeus vannamei* in water containing low concentrations of sea salt or mixed salts. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2004, 35(4): 445–451
- Tseng IT, Chen JC. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under nitrite stress. *Fish and Shellfish Immunology*, 2004, 17(4): 325–333
- Ulaje SA, Rojo-Arreola L, Lluch-Cota SE, *et al.* Gene expression and energetic metabolism changes in the white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to short-term hypoxia. *Aquaculture Research*, 2019, 50(4): 994–1004
- Vargas-Albores F, Guzmán MA, Ochoa JL. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 1993, 106(2): 299–303
- Wang WN, Wang AL, Zhang YJ, *et al.* Effects of nitrite on lethal and immune response of *Macrobrachium nipponense*. *Aquaculture*, 2004, 232(1–4): 679–686
- Wang X, Li E, Chen L. A review of carbohydrate nutrition and metabolism in crustaceans. *North American Journal of Aquaculture*, 2016, 78(2): 178–187
- Wang XD, Shen ZH, Wang CL, *et al.* Dietary supplementation of selenium yeast enhances the antioxidant capacity and immune response of juvenile *Eriocheir sinensis* under nitrite stress. *Fish and Shellfish Immunology*, 2019, 87: 22–31
- Wang YB, Zhang WJ, Li WF, *et al.* Acute toxicity of nitrite on tilapia (*Oreochromis niloticus*) at different external chloride concentrations. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2006,

- 32(1): 49–54
- Yao YL, Yuan CY, Cui QM, *et al.* Isolation, identification and characterization of a bacterium with highly efficient removal of nitrite nitrogen. *Fisheries Science*, 2018, 37(5): 689–693 [姚艳玲, 袁春营, 崔青曼, 等. 一株去除亚硝态氮细菌分离鉴定及特性研究. *水产科学*, 2018, 37(5): 689–693]
- Yu HN. Effect of environmental stress on behavior, growth and physiological activity of *Macrobrachium rosenbergii* and *Litopenaeus vannamei*. Doctoral Dissertation of Jinan University, 2007 [于赫男. 环境胁迫对罗氏沼虾和凡纳滨对虾行为、生长及生理活动的影响. 暨南大学博士研究生学位论文, 2007]
- Zeng QT, Yu HN, Li XT, *et al.* Effects of ammonia-nitrogen on locomotor performance and the energy budget of *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(1): 198–206 [曾庆婷, 于赫男, 林小涛, 等. 氨氮胁迫下凡纳滨对虾运动行为与能量分配模式变化. *中国水产科学*, 2016, 23(1): 198–206]
- Zhu QJ, Ju B, Dai XL. Effects of nitrite nitrogen on survival rate, growth and energy metabolism of *Macrobrachium rosenbergii*. *Fisheries Science and Technology Information*, 2019, 46(1): 14–18 [朱其建, 鞠波, 戴习林. 亚硝态氮对罗氏沼虾存活率、生长及能量代谢的影响. *水产科技情报*, 2019, 46(1): 14–18]

(编辑 冯小花)

Effects of Chronic Nitrite Stress on Body Composition and Glucose Metabolism of *Litopenaeus vannamei*

XIAO Wei, SHAN Hongwei, MA Shen^①, LI Zhongshuai

(Key Laboratory of Mariculture, Ocean University of China, Ministry of Education, Qingdao 266003)

Abstract In this study, we examined the effects of chronic nitrite stress on the growth, feeding, body composition, and glucose metabolism of *Litopenaeus vannamei* [(2.03±0.33) g]. The experiment lasted for 36 days, and there were control group, N8, N15, and N30 (stress groups) with concentrations of 0, 8, 15, and 30 mg/L NO₂-N. With increasing NO₂-N concentrations, the final body weight, specific growth rate, weight gain rate, and feeding rate of the shrimp showed a significant decline. At day 18, the blood glucose and glycogen in the hepatopancreas in the N8 and N15 groups were higher than those in the control group; however, they were lower than the control group by the end of the experiment. The muscle glycogen in the stress group was always lower than the control group during the experiment. In addition, the activity of hexokinase in the muscle of the stress group was lower than that of the control group, whereas the activity of hexokinase and pyruvate kinase in the hepatopancreas of the stress group was significantly higher than that of the control group. Further, the activity of lactate dehydrogenase in the hepatopancreas first increased and then decreased, but there was no significant difference compared with the control group. In the final body composition, there was almost no change in the water and crude protein of each group, but the crude lipid content of the N30 group was significantly lower than that of the control group. The above results indicated that chronic stress of nitrite can reduce the appetite and slow down the growth in shrimps. The glucose metabolism in shrimp is only a short-term response model to cope with the chronic stress of nitrite. At the same time, according to the change of crude lipid, it is speculated that the lipid metabolism of *L. vannamei* played an important role in the chronic nitrite stress for the shrimps.

Key words *Litopenaeus vannamei*; Nitrite stress; Body composition; Glucose metabolism

① Corresponding author: MA Shen, E-mail: mashen@ouc.edu.cn