

中国科技核心期刊  
中文核心期刊

ISSN 2095-9869  
CN 37-1466/S

# 渔业科学进展

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

第36卷

VOL. 36

第6期 NO. 6

# 2015

中国水产科学研究院黄海水产研究所  
中国水产学会  
科学出版社

主办  
出版

# 渔业科学进展

YUYE KEXUE JINZHAN

(海洋水产研究更名为渔业科学进展)

第 36 卷 第 6 期

2015 年 12 月

中国科技核心期刊

中文核心期刊

全国优秀农业期刊

中国水产核心期刊

中文科技期刊数据库来源期刊

中国期刊全文数据库(CJFD)来源期刊

中国科学引文数据库(CSCD)核心库来源期刊

中国科技论文统计源期刊

中国海洋文献数据库(CODS)来源期刊

中国生物学文献数据库来源期刊

英国《动物学记录》(ZR)收录期刊

《水科学和渔业文摘》(ASFA)收录期刊

## 目 录

### 研究论文

- 渔业多鱼种综合开捕网目尺寸和捕捞努力量管理目标确定方法探讨.....刘 勇 程家骅 (1)
- 长江口及其邻近海域渔业资源结构的季节变化.....孙鹏飞 戴芳群 陈云龙 单秀娟 金显仕 (8)
- 北黄海 3 种常见蛇尾的主要营养成分分析.....房景辉 张继红 蒋增杰 毛玉泽 臧元奇 方建光 (17)
- 低盐胁迫对黄姑鱼(*Nibea albiflora*)幼鱼鳃离子调节、呼吸代谢酶和皮质醇的影响.....施兆鸿 张晨捷 彭士明 张艳亮 王建钢 高权新 (22)
- 壳寡糖与低聚木糖对大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)幼鱼生长、体组成和血液生化指标的影响.....蔡胜昌 张利民 张德瑞 王际英 马晶晶 武明欣 孙永智 王世信 (29)
- 饥饿对云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*)卵黄囊期仔鱼摄食和生长的影响.....于欢欢 陈 超 张廷廷 李炎璐 孔祥迪 刘 莉 马文辉 (37)
- 普安银鲫(*Carassius auratus gibelio*)卵黄囊期脂蛋白脂酶和肝脂酶基因的表达及葡萄糖、维生素 C 对其的影响.....蒋左玉 姚俊杰 熊铎龙 安 苗 朱忠胜 宋 娇 (43)
- 病原性鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)双重 PCR 与 LAMP 检测方法的建立.....孙晶晶 高晓建 张晓君 马丽娜 阎斌伦 白雪松 赵佳铭 毕可然 秦 蕾 (49)
- 中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) Tetraspanin-3 与 WSSV 的体外相互作用.....关广阔 刘庆慧 黄 捷 (56)
- 基于家系水平的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)保种群体出肉率与表型性状的相关性分析.....柴 展 栾 生 罗 坤 孔 杰 许圣钰 (63)
- 聚  $\beta$ -羟基丁酸酯对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)非特异性免疫力及氨氮胁迫后免疫基因表达量的影响.....邓康裕 孟宪红 孔 杰 张恒恒 史晓丽 曹家旺 罗 坤 栾 生 曹宝祥 刘 宁 (71)
- 夏季保苗期刺参(*Apostichopus japonicus*)腐皮综合征病原菌的分离鉴定及其致病阈值.....张文泽 王印庚 廖梅杰 荣小军 李 彬 张 正 李 华 范瑞用 (79)
- 无机镉对魁蚶(*Scapharca broughtonii*)毒性效应及其安全性评价.....刘天红 于晓清 刘广斌 王 颖 吴莹莹 刘恩孚 邱兆星 (88)
- 光裸方格星虫(*Sipunculus nudus*)对 3 种不同底质的适应能力.....李俊伟 朱长波 郭永坚 颀晓勇 陈素文 张文文 (95)
- 壳聚糖固定化海洋微生物 YS2071 脂肪酶及其酶学性质.....张 权 盛 军 刘均忠 郑鸿飞 孙 溢 (100)
- 饵料中添加海洋红酵母(*Rhodotorula* sp.) C11 对幼参消化酶及免疫反应的影响.....杨志平 徐 哲 周 倩 张粹粹 孙建明 (107)
- 15 种中草药对刺激隐核虫(*Cryptocaryon irritans*)的杀灭效果及包囊破裂的条件.....刘婷婷 唐小千 周 丽 (113)
- 消油剂对海湾扇贝(*Argopecten irradians*)的急性毒性效应.....徐 勇 朱建新 江 涛 刘文文 (121)
- 栉江珧(*Atrina pectinata*)催产方法及幼虫培养条件.....郑言鑫 杨爱国 吴 彪 孙秀俊 周丽青 李东明 董迎辉 (127)
- 基于支持向量机的新鲜与解冻许氏平鲈(*Sebastes schlegeli*)近红外光谱鉴别技术.....刘申申 孙 永 周德庆 (134)
- 黑尾近红鲷(*Ancherythroculter nigrocauda*)加工过程腌制工艺的优化.....胡 王 陈小雷 李正荣 周蓓蓓 鲍俊杰 (139)
- 《渔业科学进展》2015 年第 36 卷总目录..... (147)

# PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

## CONTENTS

Vol.36 No.6 December 2015

A Multi-Species Management Model Combining Fishery Catchable Mesh Size and Fishing Effort .....	LIU Yong, CHENG Jiahua	(1)
Seasonal Variations in Structure of Fishery Resource in the Yangtze River Estuary and Its Adjacent Waters .....	SUN Pengfei, DAI Fangqun, CHEN Yunlong, SHAN Xiujuan, JIN Xianshi	(8)
The Analysis of Nutrient Components of Three Brittle Star Species in the North Yellow Sea .....	FANG Jinghui, ZHANG Jihong, JIANG Zengjie, MAO Yuze, ZANG Yuanqi, FANG Jianguang	(17)
Effects of Low-Salinity Stress on the Ion Regulation, Respiratory Metabolic Enzymes and Serum Cortisol in the Gill of <i>Nibea albiflora</i> Juvenile .....	SHI Zhaohong, ZHANG Chenjie, PENG Shiming, ZHANG Yanliang, WANG Jiangang, GAO Quanxin	(22)
Effects of Chitosan Oligosaccharide and Xylo-oligosaccharide on the Growth Performance, Body Composition and Serum Biochemistry of Juvenile Turbots ( <i>Scophthalmus maximus</i> ) .....	CAI Shengchang, ZHANG Limin, ZHANG Derui, WANG Jiying, MA Jingjing, WU Mingxin, SUN Yongzhi, WANG Shixin	(29)
Feeding and Growth of <i>Epinephelus moara</i> of Larvae in the Process of Nourishing Transformation .....	YU Huanhuan, CHEN Chao, ZHANG Tingting, LI Yanlu, KONG Xiangdi, LIU Li, MA Wenhui	(37)
The Effects of Glucose and Vitamin C on the Gene Expression of Lipoprotein Lipase and Hepatic Lipase During the Development of the Yolk-Sac Larva of <i>Carassius auratus gibelio</i> .....	JIANG Zuoyu, YAO Junjie, XIONG Hualong, AN Miao, ZHU Zhongsheng, SONG Jiao	(43)
Detection of Pathogenic <i>Vibrio anguillarum</i> by Using Duplex PCR and LAMP Assays .....	SUN Jingjing, GAO Xiaojian, ZHANG Xiaojun, MA Lina, YAN Binlun, BAI Xuesong, ZHAO Jiaming, BI Keran, QIN Lei	(49)
Interaction of Tetraspanin-3 in <i>Fenneropenaeus chinensis</i> with WSSV <i>in vitro</i> .....	GUAN Guangkuo, LIU Qinghui, HUANG Jie	(56)
Correlation Analysis of Fillet Yield with Phenotypic Traits for Families from Conservation Population of <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	CHAI Zhan, LUAN Sheng, LUO Kun, KONG Jie, XU Shengyu	(63)
Effects of Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate on Non-Specific Immunity and Expression of Immune Gene Under the Ammonia Stress of <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	DENG Kangyu, MENG Xianhong, KONG Jie, ZHANG Hengheng, SHI Xiaoli, CAO Jiawang, LUO Kun, LUAN Sheng, CAO Baoxiang, LIU Ning	(71)
Isolation and Identification of the Pathogenic Bacteria of Skin Ulcerative Syndrome (SUS) from <i>Apostichopus japonicus</i> Juveniles in Summer and Study on Its Pathogenic Threshold .....	ZHANG Wenze, WANG Yingeng, LIAO Meijie, RONG Xiaojun, LI Bin, ZHANG Zheng, LI Hua, FAN Ruiyong	(79)
The Safety Evaluation of the Acute Toxicological Effects of Inorganic-Cadmium on <i>Scapharca broughtonii</i> .....	LIU Tianhong, YU Xiaoqing, LIU Guangbin, WANG Ying, WU Yingying, LIU Enfu, QIU Zhaoxing	(88)
Adaptability of <i>Sipunculus nudus</i> to Three Types of Different Sediments .....	LI Junwei, ZHU Changbo, GUO Yongjian, XIE Xiaoyong, CHEN Suwen, ZHANG Wenwen	(95)
Chitosan Immobilization of Lipase from Marine Microorganism YS2071 and Its Enzyme Characteristics .....	ZHANG Quan, SHENG Jun, LIU Junzhong, ZHENG Hongfei, SUN Mi	(100)
Effects of Dietary Supplementation of Marine Yeast <i>Rhodotorula</i> sp. C11 on Digestive Enzyme Activity and Immune Response in Juvenile Sea Cucumber <i>Apostichopus japonicus</i> .....	YANG Zhiping, XU Zhe, ZHOU Qian, ZHANG Cuicui, SUN Jianming	(107)
The Pesticidal Effects of Chinese Herbal Medicine on the Trophonts and the Theronts of Ciliate <i>Cryptocaryon irritans</i> and the Influence of Temperature and Salinity on the Cyst Rupture .....	LIU Tingting, TANG Xiaoqian, ZHOU Li	(113)
The Acute Toxicity of Dispersant and Chemically Dispersed Oil on the <i>Argopecten irradians</i> .....	XU Yong, ZHU Jianxin, JIANG Tao, LIU Wenwen	(121)
Studies on the Spawning Inducement and the Conditions for the Larval Culture of <i>Atrina pectinata</i> .....	ZHENG Yanxin, YANG Aiguo, WU Biao, SUN Xiujun, ZHOU Liqing, LI Dongming, DONG Yinghui	(127)
Distinguishing the Fresh from the Frozen-Thawed <i>Sebastes schlegeli</i> Using the NIR Spectroscopy Identification Technology Based on Support Vector Machine .....	LIU Shenshen, SUN Yong, ZHOU Deqing	(134)
Optimization of the Salting Process of <i>Ancherythroculter nigrocauda</i> .....	HU Wang, CHEN Xiaolei, LI Zhengrong, ZHOU Beibei, BAO Junjie	(139)
Total Contents of <i>PROGRESS IN FISHERY SCIENCES</i> , Vol. 36, 2015 .....		(147)

# 渔业多鱼种综合开捕网目尺寸和捕捞努力量 管理目标确定方法探讨\*



刘勇 程家骅

(农业部海洋与河口渔业重点开放实验室 中国水产科学研究院东海水产研究所 上海 200090)

**摘要** 本研究基于B-H模型创建了一种多鱼种管理方法,即把针对单鱼种的“开捕年龄”和“捕捞死亡系数”管理目标替换成面对多鱼种的“开捕网目尺寸”和“捕捞努力量”管理目标,从而实现多鱼种管理。利用文献参数,对东海两种主要经济鱼种带鱼和小黄鱼的综合管理进行了尝试和探讨。结果显示,带鱼和小黄鱼由于体型和个体大小差距较大,最适产量重叠范围较小,两个鱼种不适宜综合管理;可以针对不同渔场、不同专捕渔船进行单独管理。该模型具直观、易判、及时等优点;同时存在短期有效、要求体形相近等缺点。若要推广该模型,需要积累足够的基础数据以获取必要的模型参数;另外还需要探讨捕捞努力量标准化方法,进一步提高模型准确性。

**关键词** 多鱼种管理; B-H模型; 网目尺寸; 捕捞努力量

**中图分类号** Q178.53 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)06-0001-07

B-H动态综合模型基于较易得到的种群基础生物学特征,结合少量的捕捞参数来推导开捕年龄与捕捞死亡系数这两个重要的渔业管理参数(费鸿年等, 1990; 詹秉义, 1995)。该模型因参数容易获取、得到的管理参数可操作性强,因此得到广泛的推广和应用(陈丕茂, 2004; 刘勇等, 2006a、b)。

B-H模型是单鱼种模型,仅能对单一鱼种的管理提供建议。而现实的情况中很少有种群在海洋或河流中单独存在,一般都是几个鱼种彼此混合、一定空间共存。这样根据模型获得的单个鱼种管理参数,如捕捞网目大小(对应开捕年龄),对目标鱼种的管理没有问题,但对于与它共存的其他鱼种就可能不适合。网目大了就会丢掉可捕资源、浪费宝贵资源,小了就会过度捕捞、甚至可能导致资源衰退,因此单鱼种的管理方法在实际应用中不太合适。国外有研究提出多鱼种的管理模型(Andersen *et al.*, 1977; Pauly, 1982; Sissenwine *et al.*, 1991; Magnusson, 1995; Hollowed *et al.*, 2000),我国也已经开始关注该问题(李辉权, 1990;

仝龄, 1994; 丘建文等, 1995; 陈丕茂, 2003; 陈超群, 2005)。众多模型中主要有两类模型得到较多认可:一类是在经典资源评估模型基础上添加鱼种之间的捕食和竞争等生物间关系建立的模型,此类模型需要补充重要且不易准确估算的物种间关系定量参数,因此其推广受到一定限制(Rice *et al.*, 1991; 仝龄, 1994; Magnusson, 1995);另一类完全是基于生态系统的方式,把一定范围相对封闭的水域看作一个相对稳定的生态系统,再把该系统分成几个主要功能组、关键鱼种和目标鱼种,然后通过生物量关系、物质平衡关系等假设推断出物种间相互关系、建立生态模型,进而通过该模型模拟不同管理措施的后果,为多鱼种的综合管理提供可行性建议(Christensen *et al.*, 1992、2004; Pauly *et al.*, 2000)。此类生态模型的最后结论通常仅能提供类似资源总量控制的管理建议,不能提供如B-H模型这样具体的、渔业管理上操作性较强的管理参数。B-H模型通常提供的管理参数有两个,一是开捕年龄,二是捕捞死亡系数;这两个管理参数均是针

\* 农业部专项“东海区海洋捕捞基础信息动态采集分析”(2011-2013)、农业部专项“中日暂定水域渔业资源调查”(2011-2013)、农业公益性行业科研专项“东海渔业资源评价和增殖养护技术研究与示范”和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(中国水产科学研究院东海水产研究所)资助项目(2009M01)共同资助。刘勇, E-mail: liuy@ecsf.ac.cn

收稿日期: 2014-09-18, 收修改稿日期: 2014-12-04

对某个具体鱼种，对于其他鱼种是没有意义的。若这两个参数能延伸到鱼种间通用的参数，则可以利用通用参数同时对多个鱼种资源变化特征进行比较与研究，从而可以提供多鱼种的管理参数和依据。本研究基于上述思路创建了一种基于 B-H 模型的多鱼种管理方法，既能避免单鱼种模型的缺陷，也能提供比较明确的管理目标，以期为多鱼种的管理提供一种新的方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 动态综合模型的变换与推导

鱼种的开捕年龄对应开捕尺寸，落实开捕尺寸的管理措施是限制渔具的网目大小，以此代替鱼种的开捕年龄。类似地，可以用捕捞努力量代替捕捞死亡系数。通过上述替换，可以把针对单一鱼种的 B-H 模型扩展成可以容纳多个鱼种在同一坐标系统进行比较研究的模型，本研究称之为“综合管理 B-H 模型”。出现的字母符号说明见表 1。

从首次捕捞年龄  $t_c$  开始到最大年龄  $t_{\lambda}=\infty$  止，其一生中所提供的渔获量用积分方程表示：

$$Y_w = \int_{t_c}^{\infty} F \cdot N_t \cdot W_t \cdot dt \quad (1)$$

式中，  $N_t = R \cdot e^{-M(t-t_r)} \cdot e^{-(F+M)(t-t_c)} \quad (2)$

$$W_t = W_{\infty}[1 - e^{-K(t-t_0)}]^b \quad (3)$$

捕捞努力量与捕捞死亡系数之间的关系：

$$f = F/q, \text{ 推导可得： } F = q \cdot f \quad (4)$$

根据 von Bertalanffy 体长生长方程：

$$l_t = l_{\infty}[1 - e^{-K(t-t_0)}]$$

推导可得

$$t = t_0 - \ln(1 - l_t/l_{\infty})/K \quad (5)$$

拖网的 50%选择体长( $L_{0.5}$ )与拖网网囊的网目大小( $m$ )之间成正相关关系(詹秉义, 1995)，此关系称为选择系数  $Sf$  (Selection factor)，可以用下述公式表达：

$$L_{0.5} = Sf \cdot m + a \quad (6)$$

把选择体长符号  $L_{0.5}$  替换成  $l_t$ ，网目大小  $m$  替换成  $m_t$ ，公式(6)变成：

$$l_t = Sf \cdot m_t + a \quad (7)$$

把公式(7)代入公式(5)得到：

$$t = t_0 - \ln\left(1 - \frac{a}{l_{\infty}} - \frac{Sf}{l_{\infty}} \cdot m_t\right)/K \quad (8)$$

把公式(4)、(8)代入公式(2)、(3)得到：

$$N_t = R \cdot e^{-M(t-t_r)} \cdot e^{-(q \cdot f + M)\left[t_0 - t - \ln\left(1 - \frac{a}{l_{\infty}} - \frac{Sf}{l_{\infty}} \cdot m_t\right)/K\right]} \quad (9)$$

$$W_t = W_{\infty}\left[1 - e^{-\ln\left(1 - \frac{a}{l_{\infty}} - \frac{Sf}{l_{\infty}} \cdot m_t\right)/K}\right]^b \quad (10)$$

然后把公式(4)、(8)、(9)、(10)代入公式(1)中得 到：

表 1 符号说明

Tab.1 Explanation of symbols

符号 Symbol	解释 Explanation*	符号 Symbol	解释 Explanation*
$Y_w$	渔获重量 Yield in weight	$t_r$	补充年龄 Recruitment age
$F$	捕捞死亡系数 Fishing mortality coefficient	$t_{\infty}$	最大年龄 Maximum age
$M$	自然死亡系数 Natural mortality coefficient	$K$	生长参数 Growth parameter( $-\infty - \infty$ )
$N_t$	$t$ 龄个体数量 Individual number at age $t$	$b$	体长与体重关系的幂指数 Power index of length and weight
$W_t$	$t$ 龄体重 Weight at age $t$	$f$	捕捞努力量 Fishing effort
$W_{\infty}$	最大体重 Maximum weight	$q$	可捕系数 Catchability coefficient
$l_t$	$t$ 龄体长 Length at age $t$	$L_{0.5}$	50%选择体长 50% retention lengths
$l_{\infty}$	最大体长 Maximum length	$Sf$	选择系数 Selection factor
$R$	补充量 Recruitment	$m$	网囊网目大小 Mesh size of cod-end
$t$	$t$ 年龄 Age $t$	$m_t$	50%选择体长为 $t$ 龄体长时对应的网囊网目大小 Mesh size for 50% retention lengths of age $t$
$t_0$	出生年龄 Birth age	$a$	网目尺寸与平均选择体长关系常数项( $-\infty - \infty$ ) Constant term in the equation of mesh size and length
$t_c$	首次捕捞年龄 Age at fishing( $t_r - t_{\infty}$ )		

\*未包含范围的参数，其理论上的范围均为  $0-\infty$

\*Parameters without range are theoretically from 0 to infinite

$$\begin{aligned}
 Y_W &= R \cdot q \cdot f \cdot W_\infty \cdot e^{-M(t_c - t_r)} \cdot e^{-(q \cdot f + M)} \\
 &\cdot \int_{m_{t_0}}^{m_{t_\infty}} e^{-\left[ t_0 - t_c - \ln\left(1 - \frac{a}{l_\infty} - \frac{Sf}{l_\infty} \cdot m_t\right) / K \right]} \cdot \left[ 1 - e^{-\ln\left(1 - \frac{a}{l_\infty} - \frac{Sf}{l_\infty} \cdot m_t\right)} \right]^b \\
 &\cdot d \left[ t_0 - \ln\left(1 - \frac{a}{l_\infty} - \frac{Sf}{l_\infty} \cdot m_t\right) / K \right] \\
 &= R \cdot q \cdot f \cdot Sf \cdot W_\infty \cdot e^{-M(t_c - t_r)} \cdot e^{-(q \cdot f + M)} \\
 &\cdot \int_{m_{t_0}}^{m_{t_\infty}} \frac{e^{-\left[ t_0 - t_c - \ln\left(1 - \frac{a}{l_\infty} - \frac{Sf}{l_\infty} \cdot m_t\right) / K \right]} \cdot \left[ 1 - e^{-\ln\left(1 - \frac{a}{l_\infty} - \frac{Sf}{l_\infty} \cdot m_t\right)} \right]^b}{(l_\infty - a - Sf \cdot m_t) \cdot K} \cdot dm_t
 \end{aligned} \tag{11}$$

可得单位补充渔获量的积分方程:

$$\begin{aligned}
 \frac{Y_W}{R} &= \frac{q \cdot f \cdot Sf \cdot W_\infty}{K} \cdot e^{-M(t_c - t_r)} \cdot e^{-(q \cdot f + M)} \\
 &\cdot \int_{m_{t_0}}^{m_{t_\infty}} \frac{e^{-\left[ t_0 - t_c - \ln\left(1 - \frac{a}{l_\infty} - \frac{Sf}{l_\infty} \cdot m_t\right) / K \right]} \cdot \left[ 1 - e^{-\ln\left(1 - \frac{a}{l_\infty} - \frac{Sf}{l_\infty} \cdot m_t\right)} \right]^b}{l_\infty - a - Sf \cdot m_t} \\
 &\cdot dm_t
 \end{aligned} \tag{12}$$

根据上式, 可采用数字积分的计算方法对其进行运算。

上述是计算公式的推导过程, 在实际演算过程中, 本研究采用一种相对简单的替换方法。依据“网目大小代替鱼种的开捕年龄”和“捕捞努力量代替捕捞死亡系数”思路, 实现以“捕捞努力量”为横坐标、“网目大小”为纵坐标的“综合管理 B-H 模型”。具体做法是, 按照常规 B-H 模型的做法描绘出等渔获量曲

线图, 然后对坐标进行转换。横坐标转换, 是根据公式  $f = F/q$ , 把原横坐标捕捞死亡系数转换成捕捞努力量; 纵坐标转换, 是根据公式(8)推导得到:

$$m_t = \frac{l_\infty [1 - e^{K(t-t_0)}] - a}{Sf} \tag{13}$$

再根据上式, 把原纵坐标开捕年龄转换成网目大小。

### 1.2 材料来源

研究对象的相关生长参数及死亡系数大部分都是引用自相关文献(凌建忠等, 2008; 张国政等, 2010)。带鱼、小黄鱼相关参数分别来自文献(凌建忠等, 2008; 张国政等, 2010), 参数特征可归属于同一时期阶段; 分析样品分别来自东海和黄海南部。黄海南部和东海北部水域是多种水团综合作用区域, 是带鱼和小黄鱼的共栖水域, 是多种鱼类的产卵场和索饵场(郑元甲等, 2003)。本研究所引用参数满足本研究的前提假设, 即研究对象为同期共栖的鱼种。另外, 由于影响捕捞能力的因素很多, 捕捞能力量化是一个复杂的过程(顾惠庭等, 1987; 周应祺等, 2000); 考虑该过程不是本研究的研究重点, 另外, 渔业管理实践中对捕捞能力的控制指标主要有渔船数和主机总功率(周应祺等, 2000), 所以本研究选择用渔船数代替捕捞努力量来进行模型的演算。具体的主要参数及文献来源见表 2。

表 2 模型使用参数及来源  
Tab.2 Parameters and their references used in the model

模型 Model	参数 Parameters	鱼种 Species	
		带鱼 Hairtail	小黄鱼 Small yellow croaker
B-H 模型 B-H model	$l_\infty$ (mm)	507.8	270
	$W_\infty$ (g)	1892	285.7541
	$b$	2.8802	2.814
	$t_0$	-0.599	-0.47
	$t_r$	0.25	0.3
	$t_c$	0.5	0.3
	$t_\infty$	7	23
	$M$	0.44	0.77
	$K$	0.313	0.45
	$F$	2.8	1.63
参数来源 Reference	(凌建忠等, 2008)	(张国政等, 2010)	
网目选择模型 Selection of cod-end mesh size	$sf$	2.5199	2.4568
	$a$	20.91	-18.306
	参数来源 Reference	(黄洪亮等, 2005)	(黄洪亮等, 2005)
捕捞努力量与捕捞死亡系数关系模型 Equation of fishing effort and fishing mortality	$f$	13839	13839
参数来源 Reference	*	*	

\*捕捞努力量是依据《2013 中国渔业统计年鉴》统计的东海区三省一市(包括江苏省、福建省、浙江省和上海市)拖网的总船数为 13839 只

\*The value of fishing effort referred from the total number of trawling boats of 3 provinces and 1 city (including Jiangsu, Fujian, Zhejiang and Shanghai) along the coast of the East China Sea, the data from the book “Annuals of Chinese Fishery Statistics of 2013” is 13839

### 1.3 数据处理方法

数据处理与分析采用R统计软件(R Development Core Team, 2008),模型的运算及其图形的绘制均采用R软件编程实现。

## 2 结果与分析

### 2.1 B-H 模型分析结果

图1与图2是根据文献参数(凌建忠等, 2008; 张国政等, 2010)建立模型而获得的不同开捕年龄与捕捞死亡系数对应的渔获量等值线图。图1、图2中加粗黑点是捕捞现状点,对应当前捕捞死亡系数和开捕年龄。根据该等值线图,可找到两条捕捞死亡系数与开捕年龄的最佳组合曲线,一条是在限定捕捞死亡系数下的最佳开捕年龄曲线(称为最佳 $t_c$ 点连线),另一条是在限定开捕年龄下的最佳捕捞死亡系数曲线(称为最佳 $F$ 点连线)。两条曲线是最大持续产量线,也称最适渔获量曲线,两条曲线之间的区域被称为最适产量区(费鸿年等, 1990; 詹秉义, 1995)。根据该等值线图,可以进行捕捞现状分析,为渔业资源管理提供建议。由图1、图2可见,代表捕捞现状的黑点均落在最适产量区之外,可见目前两个鱼种捕捞状况都不是处于可持续生产状态;现状点均处于最佳 $t_c$ 点连线下区域,说明目前开捕年龄均偏小,若在目前捕捞强度下(即捕捞死亡系数不变),开捕年龄能提高到图1、图2中所示两条水平线之间,可持续捕捞产量能提高三成(图2, 小黄鱼)到一倍多(图1, 带鱼)(凌建忠等, 2008; 张国政等, 2010)。

### 2.2 单鱼种获得的结果

开捕年龄替换成网目尺寸、捕捞死亡系数替换成

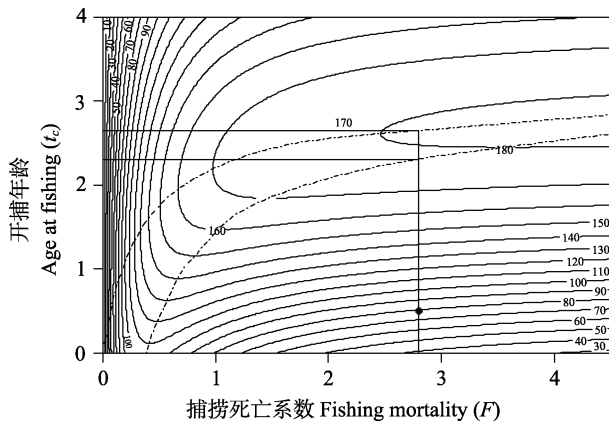


图1 带鱼  $t_c$ - $F$  等渔获量曲线

Fig.1 Curve of equal catch of  $t_c$ - $F$  for hairtail

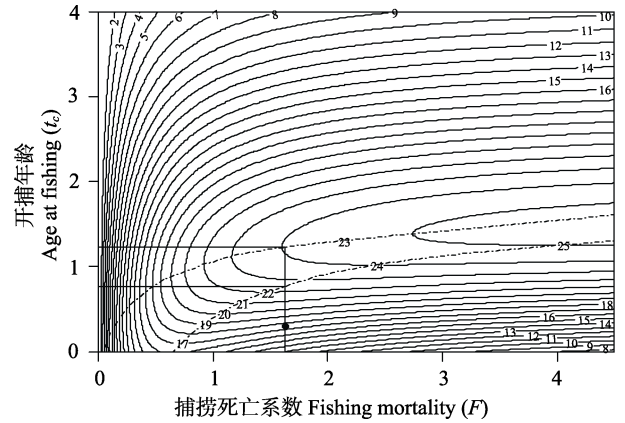


图2 小黄鱼  $t_c$ - $F$  等渔获量曲线

Fig.2 Curve of equal catch of  $t_c$ - $F$  for small yellow croaker

捕捞努力量,这样获得网目尺寸与捕捞努力量关系下的单位补充量渔获量等值线图(图3、图4)。变换坐标前后的等值线趋势基本一致,主要发生变化的地方是坐标数值,分别由数值范围较小的年龄与捕捞死亡系数变成范围较大的网目尺寸和捕捞努力量。年龄、网目尺寸之间并不是直线对应关系(公式8、13),观察可见等值曲线纵向稀疏程度有差异(图3与图1比较,图4与图2比较),年龄与体长之间的非线性关系是导致该差异产生的原因。鱼的生长一般在幼体时生长较快,随年龄增长生长速度会越来越慢;对比前后等值曲线稀疏程度,可以看到一个明显变化趋势,即在网目尺寸较小(对应低龄生长速度快)的下半部分等值线稀疏程度明显增大,而上半部分则相反。而等值曲线图在横向上则没有上述特征,主要原因是捕捞努力量与捕捞死亡系数呈线性关系。

从图3、图4中可以看到带鱼和小黄鱼捕捞现状(图中加粗黑点)对应的捕捞努力量相同,均为13839,这是由于本研究假设捕捞努力量均来自拖网渔船所致。带鱼和小黄鱼捕捞现状对应的开捕网目尺寸分别是50 mm和40 mm(图3、图4);而根据同为拖网作业捕捞的假设,二者开捕网目尺寸本应相同,结果虽然比较接近,但存在差异。该差异的来源比较复杂,可能主要来自模型的不一致性和不确定性。开捕年龄( $t_c$ ,图1、图2)转换为开捕网目尺寸( $m_t$ ,图3、图4)需要依据两个函数,即生长函数(见公式5)和选择性函数(见公式6)。其中生长函数描述体长与年龄之间的关系,虽是一一对应关系,但带鱼和小黄鱼所采用体长数据不尽相同。前者是肛长,后者是体长。肛长、体长与年龄的对应关系误差系数不相同,从而会导致生长函数推导误差的差别。另外,选择性函数描述囊网网目尺寸与50%选择体长( $L_{0.5}$ )之间的关系,需要两

个步骤推导出来: 首先在不同囊网网目尺寸条件下做数次拖网实验, 获得不同网目的选择曲线, 即描述囊网网目对不同体长个体的选择率; 然后根据选择曲线确定 50% 选择体长( $L_{0.5}$ ), 即选择率为 50% 的对应体长。根据上述获得的 50% 选择体长和对应网目数据才可以推导选择性函数。在确认 50% 选择体长( $L_{0.5}$ )过程中, 难免一些影响结果的主观因素, 比如分析体长与网目选择率的关系时, 需要把体长数据分成多个体长组, 取中间值代表该组的体长, 然后分别计算各体长组的网目选择率(詹秉义, 1995; 黄洪亮等, 2005)。前述肛长与体长的区别, 同样也会影响选择性函数的一致性。上述不确定性和不一致性均可以传递到体长与网目尺寸的关系, 都有可能是导致图 3 和图 4 中开捕网目尺寸差别的原因。

考虑上述不一致性和不确定性因素, 网目尺寸 10 mm 的差别, 与其最大年龄 3 a 或 4 a 对应的网目尺寸(>100 mm, 图 3、图 4)相比, 差异程度是可以接受的, 可以近似地认为二者是一致的。从另一方面看来, 这个现状点所对应的捕捞努力量与网目尺寸基

本达到一致。可以反过来证明, 本研究采用模型的相关参数基本可信, 因为本研究所采用的方法综合了许多函数(体长、体重生长函数、50% 选择体长与囊网网目关系函数), 涉及不同学科方向(渔业资源评估、渔业网具选择性), 还能达到上述准确性, 可见相关模型参数还是比较可信的。

### 2.3 多鱼种组合结果

把图 3 和图 4“最适产量区域”合并在一张图中(图 5), 可以把先前独立的两个管理目标区域放在同一个坐标系中进行综合分析, 可以避免顾此失彼, 可以综合考虑各种捕捞措施对目标鱼种的影响。图 5 所示, 小黄鱼“最适产量区域”基本均处于带鱼下方, 仅有在捕捞努力量较小的情况下有部分区域重叠, 这个结果反应出二者个体大小上的区别。观察图 3 与图 4, 二者“最适产量区域”在捕捞努力量较小的时候, 最适开捕网目尺寸均有一个较为敏感区域; 而图 5 中, 比较发现带鱼的这一敏感区域发生的捕捞努力量范围相比小黄鱼更小; 这就是说捕捞努力量较低的情况下, 要使带鱼捕捞达到较为理想状态, 需要更为严格的控制开捕网目尺寸。小黄鱼的最适开捕网目尺寸控制范围, 70 mm 左右是其上限, 而带鱼的控制上限是 120 mm 左右, 若超出上述范围则不能把捕捞产量控制在“最适产量区域”范围内。

在目前捕捞努力量条件下, 小黄鱼的最适开捕网目尺寸为 54.53–66.25 mm, 带鱼的为 112.04–120.19 mm, 二者的最适开捕网目尺寸范围差别很大。也就是说在目前高强度捕捞压力下, 要能同时合理捕捞带鱼和小黄鱼的目标不会达到; 除非把捕捞努力量削减到几乎没有, 才有可能通过调节网目尺寸使二者同时达到最佳捕捞状态(图 5 最适产量重叠区域), 这种情况没有现实指导意义, 因为捕捞压力不可能出现这么大幅度的下降。另外从外形来看, 带鱼和小黄鱼属于两种差别较大的体型, 一个是带形, 另一个是纺锤形, 而且平均个体大小差别较大, 网目选择差别明显(见表 1 网目选择模型参数)。综上所述, 带鱼和小黄鱼不宜进行综合捕捞管理, 可以分别制定管理目标管理特定捕捞渔船以达到合理捕捞利用目的。

选择小黄鱼和带鱼作为代表鱼种来尝试本研究提出的多鱼种管理方法, 主要原因是这两个鱼种是东海的主要经济鱼类, 相关参数相对比较完整, 如 B-H 模型参数、网具选择性参数, 符合本研究基本参数的要求。前文也有阐述, 二者体型差异较为明显, 不适宜进行综合管理。若有体型相近的鱼种使用本方法, 可能更容易找到共同的最适产量重叠区, 从而能提出比较好的综合管理办法。

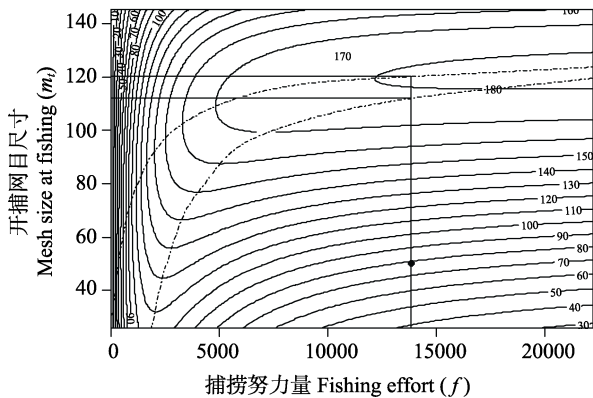


图 3 带鱼  $m_t-f$  等渔获量曲线

Fig.3 Curve of equal catch of  $m_t-f$  for hairtail

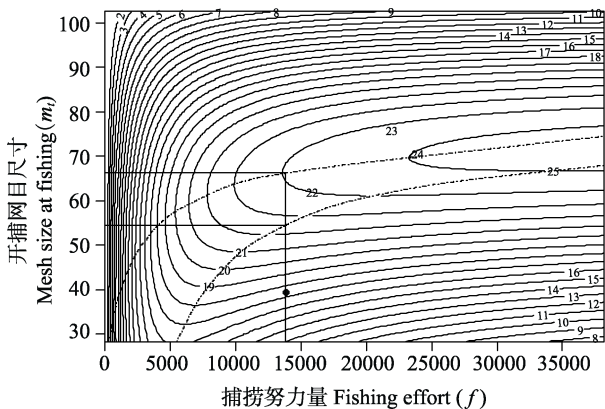


图 4 小黄鱼  $m_t-f$  等渔获量曲线

Fig.4 Curve of equal catch of  $m_t-f$  for small yellow croaker



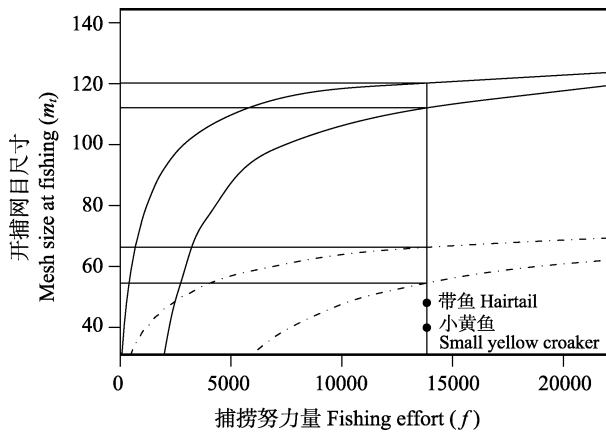


图5 带鱼和小黄鱼最佳捕捞管理线

Fig.5 The best fishing management areas of hairtail and small yellow croaker

### 3 讨论

与其他多渔业资源评估模型的分析,本研究采用的方法存在以下优点:不需要收集鱼种之间的捕食关系参数,仅需与B-H模型相差不多的参数;可以同时进行单鱼种和多鱼种的综合管理;直观、可视化的分析过程,易判断、易操作;可即时提供有效的管理措施,而其他多鱼种管理模型则需要整个渔业生态系统达到一个相对平衡的状态下才能达到管理目标的一个长期过程,二者之间可以取长补短、各取所需。但是此模型未考虑生态系统长期发展的变化趋势,即没有考虑鱼种之间的关系,可以解决当前短期的管理问题,但缺乏维护生态系统平衡的一个长期考虑;对外形结构相近种类的综合管理比较有效,而对外形结构差异较大种类则有一定局限性,由于网目选择的差异性较大,导致属于可持续管理目标的最适产量区域重叠度较低,从而难以找到共同的管理目标。

本研究主要依据两个模型,一个是渔业资源综合动态模型(B-H模型),另一个是渔业网具选择模型。前者数据来自一定时期、一定范围内所获得的目标资源的生物学参数,该数据来源并未区分渔船作业类型,虽然主要数据是来自拖网作业(黄洪亮等, 2005; 凌建忠等, 2008; 张国政等, 2010),但还可能包括除拖网外的其他作业。后者数据主要依据的是双拖作业渔船数据(黄洪亮等, 2005)。上述两个模型所依据数据的渔船作业类型不一致,但考虑主要都是来自拖网作业,因此本研究采用拖网渔船数量来量化捕捞努力量。不同渔船作业类型,很可能给本研究的方法带来不确定性,理想的情况是要保持两个模型的一致性,但不同的作业类型究竟会给本方法带来多大的影响还需进一步的研究和探讨。

本研究讨论的多鱼种管理模型需要把捕捞死亡系数转换成统一的捕捞努力量,文中捕捞努力量是简单的用东海区拖网渔船数量来代替,这种方法可能会影响模型的准确性。本研究用作捕捞努力量的拖网渔船实际包括多种作业类型渔船,除双拖作业渔船,还包括单拖、拖虾等渔船;几种作业渔船对捕捞对象所导致的死亡系数是有明显差别的,如双拖作业的捕捞效率可能比单拖的两倍还要高;不同大小渔船的捕捞能力也有差别,因此仅靠船数不能全面准确的反应拖网渔船的捕捞努力量。另外,除拖网渔船,其他类型渔船同样也可以捕捞到同样的渔获物,若考虑总的捕捞努力量,这些作业的捕捞努力量同样也需要计算在内。如何把不同大小、不同作业类型的渔船对某渔获物的捕捞努力量进行标准化,是未来本模型实际应用将要面临和需要解决的问题。

该多鱼种管理模型方法简单、目标明确、便于实施。而模型所需基础参数比较多,比如鱼种的生长模型参数、死亡系数,网目选择模型参数,捕捞努力量与捕捞死亡系数关系参数。若要扩大该模型的使用范围,即增加鱼种的数量,上述参数都需要补充。要实现将来多鱼种的综合管理,还需大量工作做好基础数据的储备,包括各鱼种的基础生物学特征和相关模型的重要参数。

我国近海渔场基本上是多鱼种混栖渔场,实行多鱼种的综合管理措施很有必要。东海拖网捕捞的主要经济鱼类有带鱼、小黄鱼、蓝点马鲛、银鲳、鲈鱼等,这些鱼种的体型差异较大,所以不适宜采用本研究的多鱼种管理方法。在这种情况下,可以考虑将这些鱼种进行叠加分析,即选择一套合适的管理指标,综合考虑各鱼种的资源状况、渔业权重和养护目标等因素,通过适当的方法找到一个合理的平衡点,从而提出最小网目尺寸、渔船数量和捕捞产量等管理目标。再将目标逐步细化分配到各个渔场,对现行管理措施提出整改建议,最后实现多鱼种的综合管理目标。

**致谢:** 感谢詹秉义老师给本研究提供的热情指导和帮助。感谢匿名审稿人给予本文的宝贵意见和修改建议。

### 参 考 文 献

- 丘建文, 吴宝铃. 黄海渔业: 从单种和多种资源管理走向生态系统水平的管理. 自然资源学报, 1995, 10(3): 259-266
- 全龄. 多鱼种资源数量评估方法介绍. 现代渔业信息, 1994, 9(8): 5-9
- 刘勇, 程家骅, 李圣法. 东海区黄鲫资源的利用现状及合理利用探讨. 中国水产科学, 2006a, 13(3): 485-491
- 刘勇, 严利平, 程家骅. 东海北部和海南南部鲈鱼生长特性及合理利用. 中国水产科学, 2006b, 13(5): 814-822

- 陈超群. 多鱼种 Schaefer 模式及图解. 福建水产, 1984(1): 24-33
- 陈丕茂. 南海北部主要捕捞种类最适开捕规格研究. 水产学报, 2004, 28(4): 393-400
- 陈丕茂. 南沙群岛西南部陆架 17 种鱼类最佳开捕规格和多鱼种拖网最佳网目尺寸. 中国水产科学, 2003, 10(1): 41-45
- 李辉权. 珠江河口多鱼种渔业最佳网目尺寸的估计. 水产科学, 1990, 9(3): 4-7
- 张国政, 李显森, 金显仕, 等. 黄海南部小黄鱼生长、死亡和最适开捕体长. 中国水产科学, 2010, 17(4): 839-846
- 郑元甲, 陈雪忠, 程家骅, 等. 东海大陆架生物资源与环境. 2003. 上海: 上海科学技术出版社, 450-487
- 周应祺, 陈新军, 张相国. 有关捕捞能力量化统计方法的探讨. 上海水产大学学报, 2000, 9(2): 119-124
- 费鸿年, 张诗全. 水产资源学. 北京: 中国科学技术出版社, 1990, 397-437
- 顾惠庭, 尤红宝. 东、黄海拖网渔业捕捞努力量修正方法的探讨. 海洋科学, 1987(4): 43-46
- 凌建忠, 李圣法, 严利平, 等. 基于 Beverton-Holt 模型的东海带鱼资源利用与管理. 应用生态学报, 2008, 19(1): 178-182
- 黄洪亮, 王明彦, 徐宝生, 等. 东海区拖网网囊网目选择性研究. 水产学报, 2005, 29(2): 232-237
- 詹秉义. 渔业资源评估. 北京: 中国农业出版社, 1995, 18-25
- Andersen KP, Ursin E. A multispecies extension to the Beverton and Holt theory of fishing, with accounts of phosphorus circulation and primary production. Medd Danm Fisk Havunders, 1977, 7: 319-435
- Christensen V, Pauly D. ECOPATH II—a software for balancing steady-state ecosystem models and calculating network characteristics. Ecol model, 1992, 61(3): 169-185
- Christensen V, Walters CJ. Ecopath with Ecosim: methods, capabilities and limitations. Ecol model, 2004, 172(2): 109-139
- Hollowed AB, Bax N, Beamish R, *et al.* Are multispecies models an improvement on single-species models for measuring fishing impacts on marine ecosystems? ICES J Marine Science: Jour du Con, 2000, 57(3): 707-719
- Magnusson KG. An overview of the multispecies VPA—theory and applications. Revi in Fish Biol Fish, 1995, 5(2): 195-212
- Pauly D. ICLARM-CSIRO Workshop on the Theory and Management of Tropical Multispecies Fish Stocks: Cronulla, Australia, 12-23 January 1981. Mar Poli, 1982, 6(1): 72-74
- Pauly D, Christensen V, Walters C. Ecopath, Ecosim, and Ecospace as tools for evaluating ecosystem impact of fisheries. ICES J Mar Sci: Jour du Con, 2000, 57(3): 697-706
- R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. 2008. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. <http://www.R-project.org>
- Rice JC, Daan N, Pope JG, *et al.* The stability of estimates of suitability in MSVPA over four years of data from predator stomachs. ICES Marine Science Symposia, 1991, 193: 34-45
- Sissenwine MP, Daan N. An overview of multi-species models relevant to management of living resources. ICES Marine Science Symposia, 1991, 6-11

(编辑 江润林)

## A Multi-Species Management Model Combining Fishery Catchable Mesh Size and Fishing Effort

LIU Yong<sup>①</sup>, CHENG Jiahua

(Key Laboratory of East China Sea & Oceanic Fishery Resources Exploitation and Utilization, Ministry of Agriculture, East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090)

**Abstract** B-H model, a single-species management model, is not suitable for multi-species coexistence situation due to several limitations. In this paper, a multi-species management approach is created based on B-H model by replacing "catchable age" and "fishing mortality" of single species management model with "catchable mesh size" and "fishing effort" of multi-species management model to achieve multi-species management objective. The multi-species management approach was used to test with the two typical species of the East China Sea, hairtail and small yellow croaker based on literatures. The big differences in body shape and body size between hairtail and small yellow croaker and the small optimum yield overlapping area demonstrated that these two species are not suitable for the integrated management, which should be managed separately by different fishing areas or different fishing vessels. This model has merits like intuitive, easy-judging and timely but with limitations of short-term effectiveness and similar shape requirements. To promote the application of this multi-species management approach, it needs to further accumulate various basic data for the relevant elementary parameters, standardize fishing efforts and explore ways to improve the model accuracy.

**Key words** Multi-species management; B-H model; Mesh size; Fishing effort

① Corresponding author: LIU Yong, E-mail: liuy@ecsf.ac.cn

# 长江口及其邻近海域渔业资源结构的季节变化\*

孙鹏飞<sup>1,3</sup> 戴芳群<sup>1,2</sup> 陈云龙<sup>1,2,4</sup> 单秀娟<sup>1,2①</sup> 金显仕<sup>1,2</sup>

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 山东省渔业资源与生态环境重点实验室  
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 3. 中国海洋大学环境科学与工程学院 青岛 266100;  
4. 中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

**摘要** 基于2012年8月(夏季)和11月(秋季)、2013年1月(冬季)和5月(春季)长江口及其邻近海域的渔业底拖网调查数据,对渔业种类组成、数量分布、群落多样性及其与环境因子的关系进行了研究。结果显示,共捕获渔业种类114种,隶属于17目66科90属,其中鱼类12目36科50属58种,鲈形目种类最多(26种),甲壳类2目25科33属49种,头足类仅3目5科6属7种。长江口及其邻近海域渔业资源优势种季节更替明显,仅龙头鱼(*Harpodon nehereus*)为全年优势种。秋季平均单位网次渔获量最高(29.20 kg/h-net),春季(17.95 kg/h-net)高于夏季(14.60 kg/h-net),冬季最低(10.15 kg/h-net),各季节均以底层鱼类和甲壳类为主,中上层鱼类渔获量仅春季较高,占总渔获量20.1%。春、夏季群落多样性指数较秋、冬季高,春季(163)和夏季(176)渔业资源群落更替指数较高,群落稳定性较低,夏季(6)和冬季(-5)迁移指数接近于零,渔业生物迁入和迁出处于相对平衡状态。各季节渔获种类数和总渔获量分别与底层鱼类和甲壳类渔获量呈极显著正相关( $P<0.01$ );秋季渔获种类数与表层温度呈显著正相关( $P<0.05$ ),与深度呈极显著正相关( $P<0.01$ )。长江口及其邻近海域渔业低质种类呈增加趋势,并且渔业资源结构存在明显的季节变化,渔获种类数、总渔获量及群落多样性指数与表层温度及深度关系密切。

**关键词** 长江口; 渔业资源; 群落结构; 季节变化; 环境因子

**中图分类号** Q178.53 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)06-0008-09

河口是淡水和海水交汇的水域,环境因子复杂多变,生物资源丰富,对海洋生物资源的补充和海洋生态平衡的保持具有重要意义(罗秉征,1992)。长江口是我国最大的河口,南有舟山渔场,北接吕泗渔场,是我国重要的渔业基地,同时,在我国海洋生态系统的研究中也占有重要地位。近年来,关于该海域渔业资源结构、多样性及鱼卵、仔稚鱼的分布和数量变动等方面研究广泛开展(王金辉等,2004;李建生等,2004、2006;李宝泉等,2007;李显森等,2013),但近10年来对该海域渔业资源结构的季节动态研究较少。

本研究基于2012-2013年长江口及其邻近海域的渔业底拖网数据,对该海域的渔获种类组成、数量分布及群落多样性的季节变化进行了初步分析,旨在为该海域可持续的渔业资源管理与开发提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 数据来源

数据取自2012年8月(夏季)和11月(秋季)、2013年1月(冬季)和5月(春季)对长江口及其邻近海域的6

\*国家国际科技合作专项项目(2013DFA31410)和山东省泰山学者专项基金共同资助。孙鹏飞, E-mail: spfsxlxs@126.com

① 通讯作者: 单秀娟, 副研究员, E-mail: shanxj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-12-08, 收修改稿日期: 2015-05-29

个断面进行的渔业底拖网调查, 调查区域为 122°00'–124°00'E, 30°30'–31°45'N, 总调查站位 62 个(图 1), 春、夏、秋和冬季调查站位数分别为 36、46、33 和 25 个, 各航次在各断面近岸、远岸及中部均设取样站位, 以减小个别航次站位较少所引起的误差。调查船为“沪捕渔 47058”(184 kW), 平均拖速 2 kn, 每站拖网 0.5–1 h。调查网具为单船底拖网, 网口周长 30.6 m, 囊网网目 20 mm, 拖曳时网口宽度约 8 m。在实验室对渔获物进行种类鉴定和生物学测定, 记录各渔获种类的重量和数量, 数据标准化到 1 h, 以各种类的平均单位网次渔获量(kg/h·net)和渔获尾数(ind/h·net)表示。每站现场用“Seabird219”型 CTD 测定水深、温度数据。

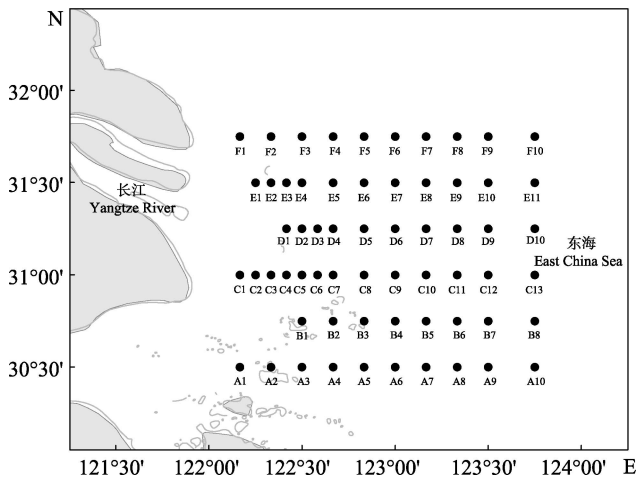


图 1 长江口及其邻近海域渔业调查站位

Fig.1 Sampling stations in the Yangtze River estuary and its adjacent waters

## 1.2 分析方法

**1.2.1 优势种** 优势种由相对重要性指数(Index of Relative Importance, *IRI*)确定(Pinkas *et al*, 1971):

$$IRI = (N + W) \times F$$

式中, *N* 为某种类的尾数占总渔获尾数的百分比; *W* 为某种类的渔获量占总渔获量的百分比; *F* 为某种类在调查中被捕获的站数与总调查站位百分比。

其中, *IRI* 值大于 500 为优势种, 500–100 为常见种, 100–10 为一般种, 10–1 为少见种, 小于 1 为稀有种(程济生等, 2000)。

**1.2.2 群落相似性和多样性指数** 用 Bray-Curtis 的相似性系数(Bray *et al*, 1957), 计算各调查航次(季节)种类渔获量组成的相似性, 分析长江口及其邻近海域渔业资源结构随时间的变化特征。

$$S_B = 1 - \frac{\sum_{i=1}^s |X_{ij} - X_{im}|}{\sum_{i=1}^s |X_{ij} + X_{im}|}$$

式中,  $S_B$  为相似性系数,  $X_{ij}$  和  $X_{im}$  分别为第 *i* 种在 *j* 和 *m* 航次调查中的平均单位网次渔获量或单位网次渔获尾数。

用 Margalef 丰富度指数(*D*)、Shannon-Wiener 多样性指数(*H'*)及 Pielou 均匀度指数(*J'*)分析长江口及其邻近海域渔业生物群落多样性(Margalef, 1958; Shannon *et al*, 1949; Pielou, 1975)。

Margalef 丰富度指数  $D = (S-1)/\ln W$  或  $D = (S-1)/\ln N$

$$\text{Shannon-Wiener 多样性指数 } H' = -\sum_{i=1}^s P_i \ln P_i$$

$$\text{Pielou 均匀度指数 } J' = H' / \ln S$$

式中, *S* 为种类数; *W* 为总渔获量; *N* 为总渔获尾数;  $P_i$  为第 *i* 种所占总渔获量或总渔获尾数的比例。

### 1.2.3 群落更替指数和迁移指数

$$AI = \frac{(C + B)}{(A - R)} \times 100 \quad MI = \frac{(C - B)}{(A - R)} \times 100$$

式中, *A* 为各次调查实际物种数; *C* 为本次调查新迁入物种数; *B* 为本次调查迁出物种数; *R* 为 4 次调查中均出现的物种数。*AI* 反映了物种更替导致群落稳定性降低的节律, 其值越大则表示群落稳定性小; *MI* 研究了系统外迁入与迁出种的两种成分在群落中的相对比例(朱鑫华等, 1994)。

## 1.3 数理统计

运用 Primer 5.0 软件对渔业资源组成的相似性和多样性进行分析; 运用 SPSS 16.0 软件对渔业资源结构与环境因子的相关关系进行分析, 分析方法为 Pearson 相关系数法。

## 2 结果

### 2.1 种类组成和优势种季节变化

共捕获渔业种类 114 种, 隶属于 17 目 66 科 90 属, 鱼类 12 目 36 科 50 属 58 种, 其中鲈形目种类最多, 14 科 22 属 26 种, 占鱼类总种类数的 45%, 其次为鲱形目, 2 科 6 属 7 种, 其余各目均在 5 种以下; 甲壳类 2 目 25 科 33 属 49 种, 主要为十足目种类; 头足类 3 目 5 科 6 属 7 种(表 1)。

优势种渔获量在春、夏、秋和冬季分别占总渔获量的 51.6%、62.3%、70.0% 和 35.5%, 渔获尾数分别

表1 长江口及其邻近海域渔业种类各分类阶元的分布  
Tab.1 Taxonomic category of fishery species in the Yangtze River estuary and its adjacent waters

目 Order	科 Family	属 Genus	种 Species
八腕目 Octopoda	2	2	2
枪形目 Teuthoidea	3	3	3
乌贼目 Sepioidea	1	2	2
口足目 Stomatopoda	1	1	1
十足目 Decapoda	23	32	48
鲛鳗目 Lophiiformes	2	2	2
刺鱼目 Gasterosteiformes	1	2	2
灯笼鱼目 Myctophiformes	2	2	2
鲷形目 Pleuronectiformes	2	2	5
鲱形目 Clupeiformes	2	6	7
鲑形目 Salmoniformes	1	1	1
鲈形目 Perciformes	14	22	26
鳗鲡目 Anguilliformes	5	5	5
鲑形目 Siluriformes	1	1	1
鲉形目 Tetraodontiformes	1	1	1
燕魮目 Myliobatiformes	1	1	1
鲉形目 Scorpaeniformes	4	5	5
总计 Total	66	90	114

占总渔获尾数的 70.6%、79.2%、40.8%和 29.6%。春季优势种为六丝钝尾虾虎鱼(*Amblychaeturichthys hexanema*)、中国毛虾(*Acetes chinensis*)、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)、龙头鱼(*Harpodon nehereus*)和鳀(*Engraulis japonicus*)。其中龙头鱼和六丝钝尾虾虎鱼占总渔获量的 22.0%，中国毛虾和三疣梭子蟹的渔获量占总渔获量的 20.4%，鳀占总渔获量的 9.1%。夏季优势种为葛氏长臂虾(*Palaemon gravieri*)、红狼牙虾虎鱼(*Odontamblyopus rubicundus*)、双斑螭(*Charybdis bimaculata*)、中华管鞭虾(*Solenocera crassicornis*)、细巧仿对虾(*Parapenaeopsis tenella*)、口虾蛄(*Oratosquilla oratoria*)和龙头鱼。其中甲壳类渔获量占总渔获量和渔获尾数的 38.5%和 63.6%，底层鱼类占总渔获量的 23.8%；秋季优势种为三疣梭子蟹、龙头鱼、日本螭(*Charybdis japonica*)和棘头梅童鱼(*Collichthys lucidus*)。其中三疣梭子蟹和日本螭渔获量占总渔获量的 43.6%，龙头鱼和棘头梅童鱼占总渔获量的 26.4%；冬季优势种为葛氏长臂虾、长吻红舌鳎(*Cynoglossus lighti*)、口虾蛄和龙头鱼。其中长吻红舌鳎和龙头鱼占总渔获量的 24.6%，葛氏长臂虾和口虾蛄渔获量占总渔获量的 10.9%。由此可见，4 个季节优势种主要由甲壳类和底层鱼类组成，仅春季优

势种中出现鳀，夏、秋和冬季优势种中甲壳类渔获量百分比均明显高于底层鱼类，春季甲壳类渔获量百分比略低于底层鱼类。夏、冬季葛氏长臂虾均为第一优势种，渔获量分别占总渔获量的 6.6%和 3.9%，渔获尾数分别占 27.7%和 11.2%；秋季三疣梭子蟹为第一优势种，渔获量占总渔获量的 23.3%，渔获尾数占总渔获尾数的 14.1%；春季六丝钝尾虾虎鱼为第一优势种，渔获量占总渔获量的 7.3%，渔获尾数占总渔获尾数的 34.6%(表 2)。

## 2.2 渔获量的分布

长江口及其邻近海域秋季平均单位网次渔获量最高，春季高于夏季，冬季最低，春、夏、秋和冬季甲壳类和底层鱼类平均单位网次渔获量较高，分别为 7.20、6.95、7.60、6.15、15.8、13.00、4.15、5.58 kg/h-net。其渔获量占总渔获量的百分比分别为 40.1%和 38.8%、50.2%和 42.0%、54.2%和 44.4%、40.8%和 57.4%，除冬季底层鱼类渔获量百分比高于甲壳类外，其他季节均为甲壳类渔获量百分比最高。各季节头足类和中上层鱼类平均单位网次渔获量较低，仅春季中上层鱼类平均单位网次渔获量和渔获量百分比比较高，分别为 3.65 kg/h-net 和 20.1%(图 2)。

春季各调查断面中部渔获量百分比比较高，近岸、远岸及北部断面渔获量百分比均较低；夏季渔业资源主要分布在调查区域中部及河口地区；秋季较夏季更向河口集中，平均单位网次渔获量最高(29.2 kg/h-net)；冬季由于调查站位较少，仅个别站位渔获量百分比比较高，平均单位网次渔获量最低(10.15 kg/h-net)(图 3)。

## 2.3 相似性和多样性特征

以尾数计算的相似性指数比以重量计算的高，并且各季节相似性指数较接近，以重量计算的相似性指数，夏季和秋季、秋季和冬季相似性较高，相似性指数分别为 0.25 和 0.28(表 3)。

秋、冬季渔获种类数最多，均有 75 种，夏季和春季较少，分别有 67 和 66 种。

春季总丰富度指数( $D$ )和总多样性总指数( $H'$ )均最大，为 5.55 和 3.02，各站位分别在 0.38–2.11 和 0.49–2.39 之间波动；秋季均最小，总指数为 4.64 和 2.37，各站位分别在 0.32–5.48 和 0.42–2.21 之间波动。春、秋季平均丰富度指数( $D$ )较夏冬季大，分别为 1.64 和 1.63，夏季平均多样性指数最大，为 1.70，秋季最小，为 1.27。春、夏和冬季总均匀度指数( $J'$ )相近，分别为 0.72、0.70 和 0.73，各站位分别在 0.27–0.85、0.11–

1.00 和 0.54–0.89 之间波动, 秋季最小, 总指数为 0.59, 各站位在 0.21–0.89 之间波动。夏、冬季平均均匀度指数( $J'$ )较大, 分别为 0.71 和 0.73, 春、秋季较小,

分别为 0.62 和 0.60。多样性指数春、夏季较秋、冬季高, 各季节平均多样性指数的变化趋势与总指数的变化趋势相一致(表 4)。

表 2 长江口及其邻近海域渔业资源优势种季节变化

Tab.2 Seasonal variations of dominant fishery species in the Yangtze River estuary and its adjacent waters

季节 Seasons	种名 Species	W%	N%	IRI
春季 Spring	六丝钝尾虾虎鱼 <i>A. hexanema</i>	7.3	34.6	2515
	中国毛虾 <i>A. chinensis</i>	4.8	29.5	1669
	三疣梭子蟹 <i>P. trituberculatus</i>	15.6	0.8	935
	龙头鱼 <i>H. nehereus</i>	14.7	0.9	668
	鳀 <i>E. japonicus</i>	9.1	4.8	517
夏季 Summer	葛氏长臂虾 <i>P. gravieri</i>	6.6	27.7	2729
	红狼牙虾虎鱼 <i>O. rubicundus</i>	16.3	11.5	1589
	双斑蟳 <i>C. bimaculata</i>	10.2	8.7	1391
	中华管鞭虾 <i>S. crassicornis</i>	6.5	12.7	1335
	细巧仿对虾 <i>P. tenella</i>	6.6	9.8	1041
	口虾蛄 <i>O. oratoria</i>	8.6	4.7	1036
	龙头鱼 <i>H. nehereus</i>	7.5	4.1	634
秋季 Autumn	三疣梭子蟹 <i>P. trituberculatus</i>	23.3	14.1	1222
	龙头鱼 <i>H. nehereus</i>	8.9	10.0	657
	日本蟳 <i>C. japonica</i>	20.3	8.4	585
	棘头梅童鱼 <i>C. lucidus</i>	17.6	8.2	579
冬季 Winter	葛氏长臂虾 <i>P. gravieri</i>	3.9	11.2	1135
	长吻红舌鳎 <i>C. lighti</i>	14.6	5.2	991
	口虾蛄 <i>O. oratoria</i>	7.0	8.1	847
	龙头鱼 <i>H. nehereus</i>	10.0	5.1	567

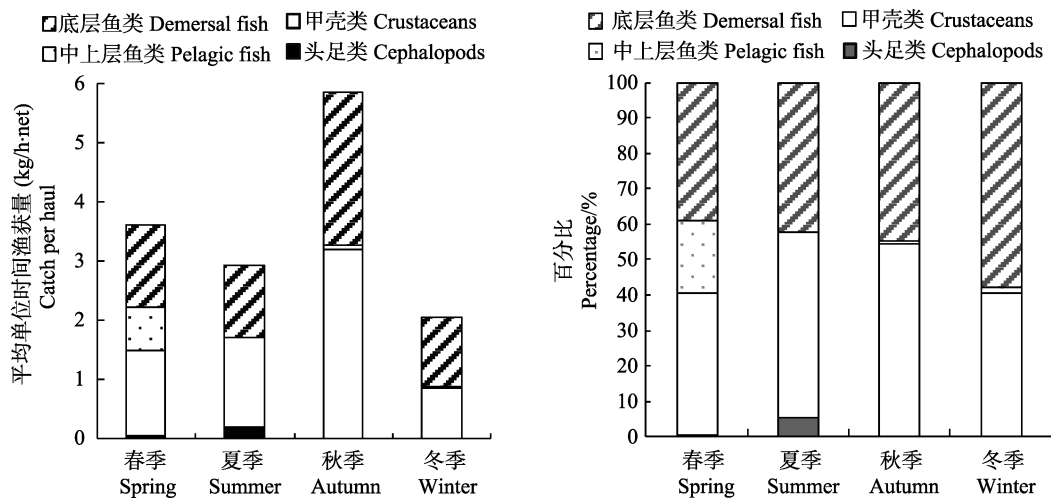


图 2 各生态类型平均单位网次渔获量的季节分布

Fig.2 Seasonal variations of average catch per haul in different ecotypes

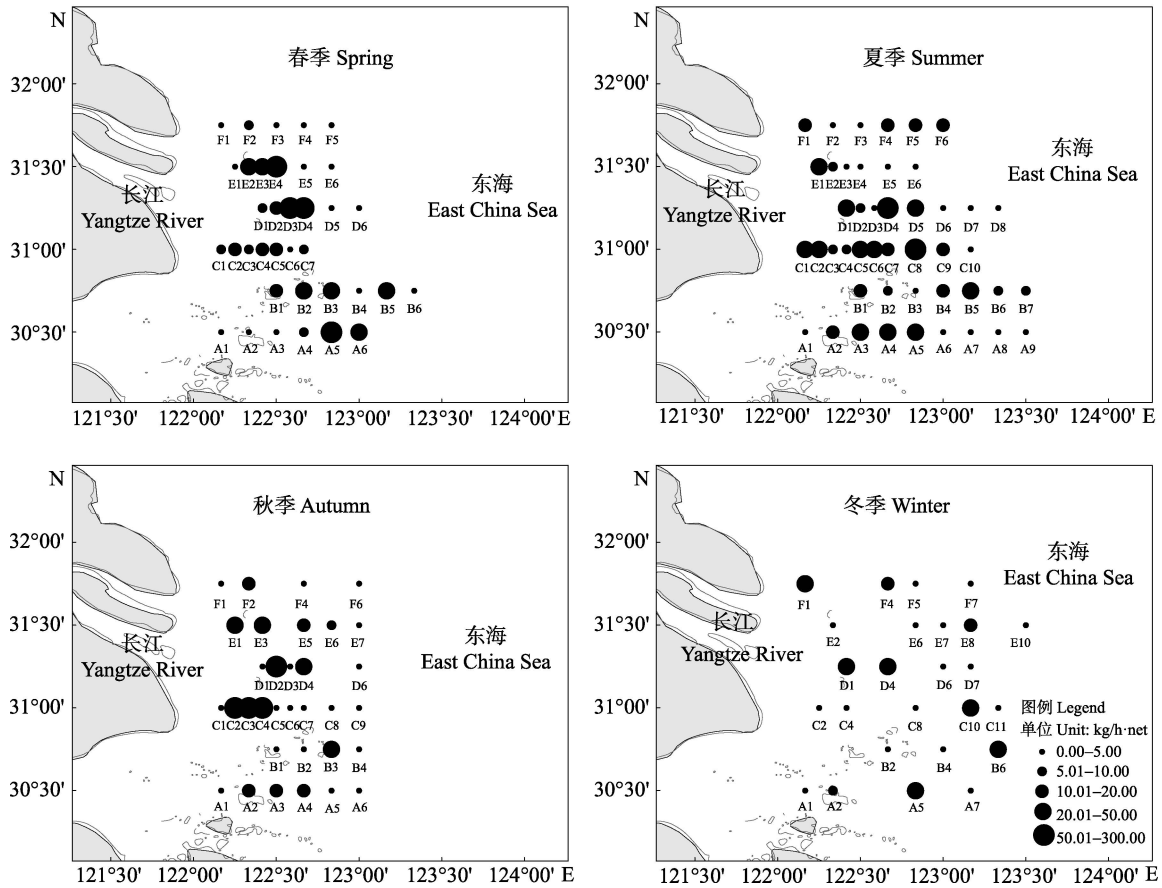


图 3 长江口及其邻近海域平均单位网次渔获量的空间分布

Fig.3 Distribution of average catch per haul in the Yangtze River estuary and its adjacent waters

表 3 长江口及其邻近海域渔业种类组成的相似性指数

Tab.3 The similarity index of fishery species composition in the Yangtze River estuary and its adjacent waters

季节 Season	春季 Spring	夏季 Summer	秋季 Autumn	冬季 Winter
春季 Spring		0.31	0.40	0.19
夏季 Summer	0.10		0.32	0.26
秋季 Autumn	0.09	0.25		0.20
冬季 Winter	0.04	0.13	0.28	

注：对角线上方数字为以尾数计，下方数字为以重量计

Note: The data above the diagonal are on number basis, and below the diagonal are on weight basis

表 4 长江口及其邻近海域渔业种类多样性的变化

Tab.4 Variations of fishery species diversity indices in the Yangtze River estuary and its adjacent waters

季节 Season	$D_w$			$H'_w$			$J'_w$		
	范围 Range	平均 Average	总指数 Total index	范围 Range	平均 Average	总指数 Total index	范围 Range	平均 Average	总指数 Total index
春季 Spring	0.38–2.11	1.63	5.55	0.49–2.39	1.52	3.02	0.27–0.85	0.62	0.72
夏季 Summer	0.46–2.60	1.51	5.33	0.15–2.34	1.70	2.93	0.11–1.00	0.71	0.70
秋季 Autumn	0.32–5.48	1.64	4.64	0.42–2.21	1.27	2.37	0.21–0.89	0.60	0.59
冬季 Winter	0.30–2.30	1.36	4.78	0.41–2.40	1.60	2.86	0.54–0.89	0.73	0.73

注： $D_w$ 、 $H'_w$ 和 $J'_w$ 表示以重量计算的多样性指数

Note:  $D_w$ ,  $H'_w$  and  $J'_w$  denote the biodiversity indices calculated by weight

## 2.4 渔业资源群落结构的稳定性

春、夏季稳定性较低, 更替指数分别为 163 和 176, 秋、冬季均小于 100, 分别为 73 和 63; 夏、冬季渔业生物迁入和迁出处于相对平衡状态, 迁移指数接近于零, 分别为 6 和 -5(图 4)。

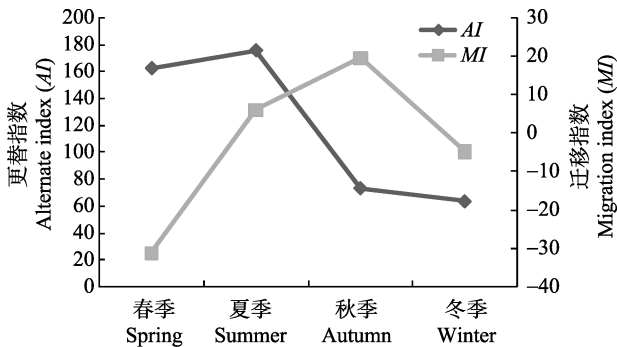


图 4 长江口及其邻近海域渔业生物群落更替指数(AI)和迁移指数(MI)

Fig.4 The MI and AI of fisheries community in the Yangtze River estuary and its adjacent waters

## 2.5 渔业资源结构与海域环境因子的关系

各季节渔获种类数和总渔获量分别与底层鱼类和甲壳类渔获量呈极显著正相关 ( $P < 0.01$ ), 仅秋季渔获种类数与中上层鱼类渔获量呈显著正相关 ( $P < 0.05$ ), 春季和秋季总渔获量与中上层鱼类渔获量呈显著正相关 ( $P < 0.05$ ), 夏季总渔获量与头足类渔获量呈显著正相关 ( $P < 0.05$ ); 各季节多样性指数 ( $H'$ )和均匀度指数 ( $J'$ )呈显著正相关 ( $P < 0.05$ ), 秋季渔获种类数与表层温度和深度分别呈显著正相关 ( $P < 0.05$ )和极显著正相关 ( $P < 0.01$ ), 渔获种类数、总渔获量及多样性指数 ( $H'$ )与表层温度及深度关系密切(表 5)。

## 3 讨论

### 3.1 种类组成及优势种的季节变化

本次调查捕获渔业种类数仅为 2006 年 6、8 和 10 月长江口调查捕获渔业种类数的 55.3%, 鱼类、甲壳类和头足类种类数分别为 2006 年调查的 35.4%、144.1%和 66.7%(金显仕等, 2009), 这可能与调查网具差异有关。甲壳类和鱼类为各季节优势类群, 其渔获量分别占总渔获量的 40.1%–54.2%和 42.1%–59.2%, 头足类在各个季节所占百分比均较低, 夏季最高, 仅为 5.7%。根据李建生等(2004)的研究, 2000–2002 年长江口海域各季节均以鱼类为绝对优势类群, 所占渔

获量百分比在 75.2%–95.0%之间, 甲壳类和头足类单季所占百分比最高分别为 11.2%和 23.9%。

夏、秋季甲壳类优势度较冬、春季高。优势种由带鱼 (*Trichiurus lepturus*)、小黄鱼 (*Larimichthys polyactis*)、三疣梭子蟹等经济种类向葛氏长臂虾、三疣梭子蟹、口虾蛄等甲壳类转变, 龙头鱼、鳀和长吻红舌鲷等中小型鱼类也占有一定比例(罗秉征等, 1994; 李建生等, 2004; 金显仕等, 2009)。长江口及其邻近海域渔业资源种类更替加快, 这在其他河口的研究也有类似结果(朱鑫华等, 2001; 金显仕等, 1998、2001、2003; 任一平等, 2005)。

过度捕捞和环境退化使生态系统的生物群落失去恢复力和完整性, 生态系统稳定性变差(Ryder *et al*, 1981)。带鱼、凤鲚 (*Coilia mystus*)、大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)和小黄鱼等传统捕捞对象近年来资源衰退严重, 低龄化和小型化明显(杨伟祥等, 1992; 宓崇道, 1997; 任一平等, 2001; 刘凯等, 2004)。鱼类资源的衰退可能使甲壳类资源相对增加(吴强等, 2012)。长江口及其邻近海域主要受重金属和有机物的污染, 2000–2002 年该海域生态环境总体质量处于重污染水平(钟霞芸等, 1999; 全为民等, 2004), 污染导致该海域渔业资源衰退(倪勇等, 2006)。2005 年后长江口及其邻近海域及杭州湾可能已经成为长江口水域重金属元素的重要沉积“汇”, 而其他近海表层沉积物质量优良, 生态环境总体质量有所恢复(何松琴等, 2011; 方涛等, 2012)。环境污染使产卵场受到严重影响, 甲壳类作为一种生命周期短、营养层次低、繁殖力强、生长迅速的类群, 其恢复力较大型底层经济鱼类强, 这可能是甲壳类渔获量百分比比较高的原因。

### 3.2 渔获量时空分布

长江口及其邻近海域秋季平均单位网次渔获量最高, 春季高于夏季, 冬季最低, 季节变化明显, 可能与我国实行伏季禁渔政策有关。各季节渔获物以甲壳类和底层鱼类为主, 春季中上层鱼类平均单位网次渔获量和渔获量百分比较高, 各调查断面中部渔获量百分比较高, 近岸、离岸及北部断面渔获量百分比均较低, 夏、秋季则向河口集中, 冬季分布较分散。这可能与鳀、小黄鱼、大黄鱼及白姑鱼 (*Argyrosomus argentatus*)等越冬场鱼群的洄游有关, 这些鱼类均在 3–4 月进入舟山渔场和长江口渔场, 5–6 月在长江口和吕泗渔场近海形成索饵群体, 6–8 月, 索饵群体北上黄海南部索饵, 10 月以后回到长江口及其邻近海域以后, 一部分群体游向外海越冬场, 一部分群体继续南下



表5 长江口及其邻近海域渔业资源结构与各因子的相关性

Tab.5 Correlations among environmental factors and fishery resource structure in the Yangtze River estuary and its adjacent waters

季节 Season	因子 Factors											
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	
春季 Spring	F1	1										
	F2	0.674**	1									
	F3	0.217	0.568**	1								
	F4	0.609**	0.786**	0.621**	1							
	F5	0.230	0.036	-0.031	0.149	1						
	F6	0.605**	0.711**	-0.034	0.180	-0.066	1					
	F7	0.962**	0.511*	0.091	0.336	0.216	0.500*	1				
	F8	0.738**	0.363	0.022	0.264	0.277	0.351	0.764**	1			
	F9	0.215	-0.004	-0.176	-0.006	0.174	0.073	0.284	0.750**	1		
	F10	-0.015	-0.064	-0.125	-0.072	0.156	0.008	-0.048	0.137	0.366	1	
	F11	-0.244	-0.059	0.371	0.015	-0.019	-0.272	-0.273	-0.412*	-0.279	0.258	1
夏季 Summer	F1	1										
	F2	0.656**	1									
	F3	0.056	0.062	1								
	F4	0.447*	0.841**	0.152	1							
	F5	0.317	0.486*	-0.056	0.119	1						
	F6	0.663**	0.770**	-0.056	0.388	0.342	1					
	F7	0.819**	0.367	0.037	0.222	0.220	0.386	1				
	F8	0.754**	0.264	0.112	0.109	0.135	0.366	0.696**	1			
	F9	0.043	-0.227	0.056	-0.240	-0.035	-0.148	0.348	0.583**	1		
	F10	0.089	-0.022	0.030	-0.026	-0.276	0.156	0.099	0.171	0.147	1	
	F11	-0.212	-0.183	-0.320	-0.272	0.085	-0.070	-0.174	-0.140	0.062	0.097	1
秋季 Autumn	F1	1										
	F2	0.621**	1									
	F3	0.550*	0.518*	1								
	F4	0.621**	0.970**	0.421	1							
	F5	0.363	0.304	0.064	0.384	1						
	F6	0.590**	0.984**	0.553**	0.912**	0.231	1					
	F7	0.193	0.112	0.178	0.113	0.043	0.103	1				
	F8	0.600**	0.476*	0.562**	0.361	0.304	0.537**	-0.047	1			
	F9	-0.343	-0.032	0.135	-0.150	-0.068	0.056	-0.126	0.470*	1		
	F10	-0.479*	-0.218	-0.648**	-0.181	0.122	-0.224	-0.066	0.502*	-0.135	1	
	F11	-0.641**	-0.475*	-0.444*	-0.489*	-0.108	-0.442*	0.289	0.565**	-0.001	0.594**	1
冬季 Winter	F1	1										
	F2	0.884**	1									
	F3	0.266	-0.040	1								
	F4	0.751**	0.901**	-0.017	1							
	F5	0	0	0	0	1						
	F6	0.739**	0.780**	-0.110	0.432*	0	1					
	F7	0.980**	0.789**	0.365	0.659*	0	0.670**	1				
	F8	0.789**	0.487*	0.405*	0.418*	0	0.389	0.873**	1			
	F9	0.212	-0.061	0.244	-0.065	0	-0.045	0.357	0.699**	1		
	F10	-0.311	-0.313	0.166	-0.179	0	-0.399	-0.272	0.288	-0.285	1	
	F11	0.408*	0.404*	-0.129	0.239	0	0.500*	0.404*	0.257	0.149	-0.231	1

\*表示显著相关( $P<0.05$ ); \*\*表示极显著相关( $P<0.01$ )。F1. 渔获种类数; F2. 总渔获量; F3. 中上层鱼类渔获量; F4. 底层鱼类渔获量; F5. 头足类渔获量; F6. 甲壳类渔获量; F7.  $D_w$ ; F8.  $H'$ ; F9.  $J'$ ; F10. 表层温度; F11. 深度

\* denote significant correlation; \*\* denote highly significant correlation. F1. Fishery species number; F2. Catch; F3. Pelagic fish catch; F4. Demersal fish catch; F5. Cephalopods catch; F6. Crustaceans catch; F7.  $D_w$ ; F8.  $H'$ ; F9.  $J'$ ; F10. Sea surface temperature; F11. Depth

回到东海中南部的越冬场(水柏年, 1999; 徐兆礼等, 2009、2010、2011)。近 10 余年来, 由于高强度捕捞, 传统的大型经济鱼类资源衰退, 甲壳类被捕食的压力降低, 甲壳类资源得以繁衍生长, 导致渔获物中甲壳类资源量相对增加(Jin *et al*, 1996; 唐启升等, 2006)。

### 3.3 多样性及相似性

长江口及其邻近海域春、秋季渔业生物群落丰富度指数较高, 夏、冬季较低, 多样性指数和均匀度指数则夏、冬季高于春、秋季。夏季(8月)多样性指数(0.15–2.34)与 2006 年(0.10–2.35)对应季节多样性指数( $H'$ )范围较一致(金显仕等, 2009)。各季节多样性指数( $H'$ )和均匀度指数( $J'$ )呈显著正相关( $P < 0.05$ )。由夏至秋群落多样性指数( $H'$ )随海水温度的降低而降低, 秋季多样性指数最低, 平均单位网次渔获量最高(29.20 kg/h·net), 夏、冬季多样性指数较高, 其渔获量相对较低, 这在其他海域也有类似发现(单秀娟等, 2013)。夏、秋季之间和秋、冬季之间的相似性指数较高, 春、夏季更替指数较高, 群落稳定性较高, 夏、冬季迁移指数接近于零, 群落迁入和迁出的种类处于相对平衡状态。各季节渔业资源结构均以底层鱼类和甲壳类为主, 而秋、冬季中上层鱼类所占比重逐渐加大, 这可能与秋、冬季三疣梭子蟹、日本蟳、锈斑蟳(*Charybdis feriatus*)等甲壳类随海水温度下降, 自北向南迁移有关(唐启升等, 2006)。

## 参 考 文 献

- 王金辉, 黄秀清, 刘阿城, 等. 长江口及邻近水域的生物多样性变化趋势分析. 海洋通报, 2004, 23(1): 32–39
- 水柏年. 黄、东海鳀鱼洄游及渔场分布初探. 舟山渔业, 1999, S(57): 17–20
- 方涛, 李道季, 唐静亮, 等. 长江口及近海区沉积物重金属与底质环境评价. 人民长江, 2012, 43(10): 68–71, 81
- 朱鑫华, 吴鹤洲, 徐凤山, 等. 黄渤海沿岸水域游泳动物群落多样性及其相关因素的研究. 海洋学报, 1994, 16(3): 102–112
- 朱鑫华, 缪锋, 刘栋, 等. 黄河口及邻近海域鱼类群落时空格局与优势种特征研究. 海洋科学集刊, 2001, 43(1): 141–151
- 任一平, 高天翔, 刘群, 等. 黄海南部小黄鱼 *Pseudosciaena polyactis* (Bleeker) 渔获群体结构与繁殖特征的初步研究. 海洋湖沼通报, 2001(1): 41–46
- 任一平, 徐宾铎, 叶振江, 等. 青岛近海春、秋季渔业资源群落结构特征的初步研究. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2005, 35(5): 792–798
- 全为民, 沈新强. 长江口及邻近水域渔业环境质量的现状及变化趋势研究. 海洋渔业, 2004, 26(2): 93–98
- 刘凯, 张敏莹, 徐东坡, 等. 长江口凤鲚资源变动及最大持续产量研究. 上海水产大学学报, 2004, 13(4): 298–303
- 李宝泉, 李新正, 王洪法, 等. 长江口附近海域大型底栖动物群落特征. 动物学报, 2007, 53(1): 76–82
- 李建生, 李圣法, 任一平, 等. 长江口渔场渔业生物群落结构的季节变化. 中国水产科学, 2004, 11(5): 432–439
- 李建生, 李圣法, 程家骅. 长江口渔场鱼类组成和多样性. 海洋渔业, 2006, 28(1): 37–41
- 李显森, 于振海, 孙珊, 等. 长江口及其毗邻海域鱼类群落优势种的生态位宽度与重叠. 应用生态学报, 2013, 24(8): 2353–2359
- 杨伟祥, 罗秉征, 卢继武, 等. 长江口区鱼类资源调查与研究. 海洋科学集刊, 1992(33): 281–301
- 吴强, 王俊, 陈瑞盛, 等. 黄渤海春季甲壳类群落结构的时空变化. 水产学报, 2012, 36(11): 1685–1693
- 何松琴, 宋金明, 李学刚, 等. 长江口及邻近海域夏季表层沉积物中重金属等的分布、来源与沉积物环境质量. 海洋科学, 2011, 35(5): 4–9
- 罗秉征. 河口及近海的生态特点与渔业资源. 长江流域资源与环境, 1992, 1(1): 24–30
- 罗秉征, 沈焕庭. 三峡工程与河口生态环境. 北京: 科学出版社, 1994, 253–343
- 金显仕, 唐启升. 渤海渔业资源结构、数量分布及其变化. 中国水产科学, 1998, 5(3): 18–24
- 金显仕. 渤海主要渔业生物资源变动的研究. 中国水产科学, 2001, 7(4): 22–26
- 金显仕. 山东半岛南部水域春季游泳动物群落结构的变化. 水产学报, 2003, 27(1): 19–24
- 金显仕, 单秀娟, 郭学武, 等. 长江口及其邻近海域渔业生物群落结构特征. 生态学报, 2009, 29(9): 4761–4772
- 单秀娟, 孙鹏飞, 金显仕, 等. 黄海典型断面渔业资源结构的季节变化. 水产学报, 2013, 37(3): 425–435
- 宓崇道. 东海带鱼资源状况、群体结构及繁殖特性变化的研究. 中国水产科学, 1997, 4(1): 7–14
- 钟霞芸, 杨鸿山, 赵立青, 等. 长江口水域氮、磷的变化及其影响. 中国水产科学, 1999, 6(5): 6–9
- 倪勇, 陈亚瞿. 长江口区渔业资源、生态环境和生产现状及渔业的定位和调整. 水产科技情报, 2006, 33(3): 121–123, 127
- 徐兆礼, 陈佳杰. 小黄鱼洄游路线分析. 中国水产科学, 2009, 16(6): 931–940
- 徐兆礼, 陈佳杰. 依据大规模捕捞统计资料分析东黄海白姑鱼种群划分和洄游路线. 生态学报, 2010, 30(23): 6442–6450
- 徐兆礼, 陈佳杰. 东黄海大黄鱼洄游路线的研究. 水产学报, 2011, 35(3): 429–437
- 唐启升, 贾晓平, 郑元甲, 等. 中国专属经济区海洋生物资源与栖息环境. 北京: 科学出版社, 2006, 974–1013
- 程济生. 东、黄海冬季底层鱼类群落结构及其多样性. 渔业科学进展, 2000, 21(3): 1–8
- Bray TR, Curtis JT. An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. Ecol Monogr 1957, 27(4): 325–349
- Jin XS, Tang QS. Changes in fish species diversity and dominant

- species composition in the Yellow Sea. *Fish Res*, 1996, 26(3): 337–352
- Margalef DR. Information theory in ecology. *Int J Gen Syst*, 1958, 3(1): 36–71
- Pielou EC. *Ecological Diversity*. New York: John Wiley and Sons, 1975
- Pinkas L, Oliphant MS, Iverson ILK. Food habits of albacore, bluefish tuna, and bonito in California waters. *Water Res*, 1971, 18(6): 653–594
- Ryder RA, Kerr SR, Taylor WW, *et al*. Community consequences of fish stock diversity. *Can J Fish Aquat Sci*, 1981, 38(12): 1856–1866
- Shannon CE, Weaver W. *The mathematical theory of communication*. Urbana: University of Illinois Press, 1949, 19(7): 1

(编辑 江润林)

## Seasonal Variations in Structure of Fishery Resource in the Yangtze River Estuary and Its Adjacent Waters

SUN Pengfei<sup>1,3</sup>, DAI Fangqun<sup>1,2</sup>, CHEN Yunlong<sup>1,2,4</sup>, SHAN Xiujuan<sup>1,2①</sup>, JIN Xianshi<sup>1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Shandong Provincial Key Laboratory of Fishery Resources and Ecological Environment, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Function Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071; 3. College of Environmental Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100; 4. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071)

**Abstract** In this study we analyzed the spatial distribution and the diversity of the fishery species in the Yangtze River estuary and its adjacent waters, and explored how they are affected by the environmental factors, based on the bottom trawl survey data collected from August 2012 to May 2013. A total of 114 fishery species (17 orders, 66 families and 90 Genera) were collected, including 58 fish species (12 orders, 36 families and 50 Genera), the richest species was found in Perciformes (26 species), 49 crustacean species (2 orders, 25 families and 33 Genera) and 7 cephalopod species (3 orders, 5 families and 6 Genera). The dominant species were season-dependent, whereas *Harpodon nehereus* was the only all-year-round dominant species. The average catch per haul was highest in autumn (29.20 kg/h-net), followed by that in spring (17.95 kg/h-net), summer (14.60 kg/h-net), and the least in winter (10.15 kg/h-net). Generally the demersal fish and crustaceans constituted the majority in the catch in all seasons, and the percentage of the pelagic fish was only slightly higher in spring (20.1%). The diversity indices of fishery species in spring and summer were higher than those in autumn and winter. The migration index and alternate index of fishery species were higher in spring (163) and summer (176), which meant the higher stability in fisheries community in the Yangtze River estuary. The migration index was close to 0 in summer (6) and winter (−5), suggesting that the immigration and emigration of the fishery species were in a state of balance. The number of fishery species and total catches were significantly positively correlated with the catches of the demersal fish and the crustaceans respectively in all seasons ( $P < 0.01$ ). The number of fishery species in autumn was positively correlated with both the sea surface temperature ( $P < 0.05$ ) and the water depth ( $P < 0.01$ ). These results showed a trend of increase in the low-valued species in the Yangtze River estuary and the adjacent waters. Our study suggested that there were significant seasonal variations in the structure of the fishery resource, and that the number of fishery species, the total catches and the diversity indices were highly related to the sea surface temperature and water depth.

**Key words** Yangtze River estuary; Fishery resource; Community structure; Seasonal variations; Environmental factor

① Corresponding author: SHAN Xiujuan, E-mail: shanxj@ysfri.ac.cn

# 北黄海3种常见蛇尾的主要营养成分分析\*

房景辉<sup>1</sup> 张继红<sup>1</sup> 蒋增杰<sup>1</sup> 毛玉泽<sup>1</sup> 臧元奇<sup>2</sup> 方建光<sup>1①</sup>

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;  
2. 青岛出入境检验检疫局 青岛 266000)

**摘要** 采用常规分析方法,对我国北黄海3种常见蛇尾种类[紫蛇尾(*Ophiopholis mirabilis*)、史氏盖蛇尾(*Stegophiura sladeni*)和浅水萨氏真蛇尾(*Ophiura sarsii vadicola*)]的主要营养成分进行了分析比较。将鲜活蛇尾样品超低温(-70℃)冷冻后,在冷冻干燥机中干燥至恒重,用于成分分析。结果显示,3种蛇尾的水分含量均未超过50%,其中史氏盖蛇尾的水分含量最低,为41.61% ( $P < 0.05$ ),而其灰分含量最高,为80.70% ( $P < 0.05$ )。3种蛇尾的氨基酸总量较低,其中紫蛇尾氨基酸总量最高,为14.90% ( $P < 0.05$ )。紫蛇尾、史氏盖蛇尾和浅水萨氏真蛇尾必需氨基酸占总氨基酸的比值(EAA/TAA)依次为35.37%、29.58%和34.97%,紫蛇尾的必需氨基酸和呈味氨基酸总量均显著高于其他两种蛇尾( $P < 0.05$ ),其氨基酸评分(AAS)、化学评分(CS)和必需氨基酸指数(EAAI)均是3种蛇尾中最高的。紫蛇尾、史氏盖蛇尾和浅水萨氏真蛇尾的不饱和脂肪酸含量分别为52.91%、50.03%和64.31%,其中浅水萨氏真蛇尾的不饱和脂肪酸含量显著高于其他两种蛇尾( $P < 0.05$ ),而其饱和脂肪酸含量最低,仅为13.32%,显著低于其他两种蛇尾( $P < 0.05$ )。3种蛇尾富含矿物质元素,其中浅水萨氏真蛇尾的Ca、Mg含量最高,分别达到了348000 mg/kg和28500 mg/kg ( $P < 0.05$ )。研究表明,这3种蛇尾不适合作为优质蛋白源,而可能用于补钙功能食品的开发,同时其体内较高的碳酸盐含量表明其可能对海洋碳汇具有重要意义。

**关键词** 紫蛇尾; 史氏盖蛇尾; 浅水萨氏真蛇尾; 营养成分

**中图分类号** S963.16 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)06-0017-05

很多海洋棘皮动物因其营养价值丰富而倍受我国消费者青睐,例如海参、海胆和海星等。海参富含酸性粘多糖、硒多糖等生物活性物质,其药用、滋补价值很高(房英春等,2007);海胆黄不仅味道鲜美,而且营养丰富、药用价值很高(温成器,1997);海星中的多棘海盘车体壁和内脏中均含有丰富的营养成分,具有广阔的开发利用前景(郝林华等,1998)。而有关蛇尾的营养成分研究较少,此类生物在海洋中分布广泛,生物量很大,是棘皮动物中种类最多的类别(廖玉麟,2004)。郭承华等(2007)制备了金氏真蛇尾的生物活性物质蛇尾皂苷,结果显示,其具有很好的药用价值。王荣镇等(2010)研究了紫蛇尾的营养成分,肯

定了其营养成分丰富并可以开发为海洋功能食品。本研究以北黄海海域的3种常见蛇尾:紫蛇尾(*Ophiopholis mirabilis*)、史氏盖蛇尾(*Stegophiura sladeni*)和浅水萨氏真蛇尾(*Ophiura sarsii vadicola*)为研究对象,比较分析了3种蛇尾的营养成分,旨在为蛇尾的生物学研究和开发利用提供参考资料。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验动物来源

本研究的实验动物于2013年11月取自大连獐子岛海域,每种蛇尾取120只做样品分析,并随机各取

\* 中国水产科学研究院基本科研业务费重大项目预研项目(2014A01YY01)、中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金“獐子岛生态渔业专项”(20603022015017)和973计划课题(2011CB409805)共同资助。房景辉, E-mail: hui861@163.com

① 通讯作者: 方建光, 研究员, E-mail: fangjg@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-09-14, 收修改稿日期: 2014-12-07

25只称量体重,将样品在 $-70^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存。其中,紫蛇尾规格为 $(0.84\pm 0.11)\text{g}$ ;浅水萨氏真蛇尾规格为 $(1.01\pm 0.16)\text{g}$ ;史氏盖蛇尾规格为 $(1.61\pm 0.18)\text{g}$ 。

## 1.2 样品处理与营养成分测定

将冷冻的蛇尾样品分别分成重量相近的3份,在实验室内使用冷冻干燥机干燥至恒重,计算水分含量,再研磨用于其他成分测定,除矿物质元素测定单样外,其他各指标均测定3个平行样。其中,粗蛋白按 GB 5009.5-2010 中的方法测定,粗脂肪按 GB/T 5009.6-2003 中的方法测定,粗灰分按 GB 5009.4-2010 中的方法测定;氨基酸按 GB/T 5009.124-2003 中的方法使用氨基酸自动分析仪测定除色氨酸以外的其他氨基酸成分;色氨酸使用荧光分光光度法测定;脂肪酸按 GB/T 17377-2008 中的方法测定,矿物质元素使用等离子体发射光谱法(ZJB 302,单样)测定。

## 1.3 营养品质评价方法

根据 FAO/WHO 1973 年建议的氨基酸评分标准模式(% ,干重)和全鸡蛋蛋白质的氨基酸模式(% ,干重),分别按以下公式计算氨基酸评分(AAS)、化学评分(CS)和必需氨基酸指数(EAAI)(王建新等,2010):

$$AAS = \frac{aa}{AA(\text{FAO/WHO})}$$

$$CS = \frac{aa}{AA(\text{Egg})}$$

$$EAAI = \sqrt[n]{\frac{100A}{AE} \times \frac{100B}{BE} \times \frac{100C}{CE} \times \dots \times \frac{100I}{IE}}$$

式中, $aa$ 为实验样品氨基酸含量(%), $AA(\text{FAO/WHO})$ 为 FAO/WHO 评分标准模式中同种氨基酸含量(%), $AA(\text{Egg})$ 为全鸡蛋蛋白质中同种氨基酸含量(%), $n$ 为比较的必需氨基酸个数, $A$ 、 $B$ 、 $C$ 、 $\dots$ 、 $I$ 为蛇尾蛋白质的必需氨基酸含量(% ,干重), $AE$ 、 $BE$ 、 $CE$ 、 $\dots$ 、 $IE$ 为全鸡蛋蛋白质的必需氨基酸含量(% ,干重)。

## 1.4 数据处理

本研究所得数据采用 SPSS11.0 统计分析软件分析处理,采用单因素方差分析(ANOVA)及 Duncan 多重检验比较3种蛇尾一般营养成分、氨基酸和脂肪酸组成,以 $P < 0.05$ 作为差异显著水平。

## 2 结果

### 2.1 一般营养成分

3种蛇尾的水分含量较低,均未超过50%,其中史氏盖蛇尾的水分含量最低,为41.61%。与之相对应,三者的灰分含量均很高,最高者亦为史氏盖蛇尾,其灰分含量超过干重的80%。3种蛇尾的蛋白和脂肪含量均较低。3种蛇尾的一般营养成分间均差异显著( $P < 0.05$ ,表1)。

### 2.2 氨基酸组成与评价

从表2可以看出,紫蛇尾、史氏盖蛇尾和浅水萨氏真蛇尾的氨基酸总含量均较低,分别为14.90%、8.89%和11.81%,必需氨基酸总量分别为5.27%、2.63%和4.13%。各氨基酸中,甘氨酸含量最高,紫蛇尾、史氏盖蛇尾和浅水萨氏真蛇尾的甘氨酸含量分别为1.88%、1.48%和1.36%。紫蛇尾和浅水萨氏真蛇尾必需氨基酸占总氨基酸含量的比例没有显著差异( $P > 0.05$ ),并且均显著高于史氏盖蛇尾( $P < 0.05$ )。而史氏盖蛇尾的呈味氨基酸占总氨基酸的比例显著高于其他两种蛇尾( $P < 0.05$ )。紫蛇尾的必需氨基酸和呈味氨基酸总量均显著高于其他两种蛇尾,其氨基酸评分(AAS)、化学评分(CS)和必需氨基酸指数(EAAI)均是3种蛇尾中最高的。

### 2.3 脂肪酸组成

由表3可以看出,紫蛇尾、史氏盖蛇尾和浅水萨氏真蛇尾的不饱和脂肪酸含量均超过了50%,分别为

表1 3种蛇尾的一般营养成分

Tab.1 Nutrient compositions of the three brittle star species

蛇尾 Brittle stars	水分 Moisture (%)	蛋白 Protein (% DW)	脂肪 Lipid (% DW)	灰分 Ash (% DW)
紫蛇尾 <i>O. mirabilis</i>	44.57±0.16 <sup>b</sup>	19.10±0.52 <sup>c</sup>	3.10±0.11 <sup>c</sup>	66.90±0.65 <sup>a</sup>
史氏盖蛇尾 <i>S. sladeni</i>	41.61±0.24 <sup>a</sup>	11.60±0.21 <sup>a</sup>	1.50±0.09 <sup>b</sup>	80.70±0.35 <sup>b</sup>
浅水萨氏真蛇尾 <i>O. vadicola</i>	47.81±0.31 <sup>c</sup>	16.90±0.23 <sup>b</sup>	1.10±0.09 <sup>a</sup>	67.50±0.27 <sup>a</sup>

注:表中不同蛇尾种类之间带有不同字母的数据表示相互之间差异显著( $P < 0.05$ ),蛋白、脂肪、灰分分别为占干重(% DW)的百分比,下同

Note: The data with different letters in the same column are significantly different with each other ( $P < 0.05$ ). Protein, lipid and ash were the percentages of dry weight (% DW). The same below

表 2 3 种蛇尾的氨基酸组成  
Tab.2 Amino acids contents of the three brittle star species (% DW)

氨基酸 Amino acids	紫蛇尾 <i>O. mirabilis</i>	史氏盖蛇尾 <i>S. sladeni</i>	浅水萨氏真蛇尾 <i>O. sarsii vadicola</i>
Asp**	1.43±0.16 <sup>c</sup>	0.7±0.05 <sup>a</sup>	1.08±0.11 <sup>b</sup>
Tyr	0.52±0.03 <sup>c</sup>	0.28±0.02 <sup>a</sup>	0.36±0.09 <sup>b</sup>
Ser	1.09±0.08 <sup>b</sup>	0.64±0.02 <sup>a</sup>	0.92±0.08 <sup>b</sup>
Glu**	1.03±0.10 <sup>c</sup>	0.6±0.08 <sup>a</sup>	0.86±0.03 <sup>b</sup>
Gly**	1.88±0.10 <sup>b</sup>	1.48±0.05 <sup>a</sup>	1.36±0.10 <sup>a</sup>
His	0.37±0.02 <sup>b</sup>	0.22±0.01 <sup>a</sup>	0.3±0.02 <sup>b</sup>
Arg	1.12±0.06 <sup>c</sup>	0.68±0.05 <sup>a</sup>	0.94±0.04 <sup>b</sup>
Pro	0.68±0.04 <sup>c</sup>	0.4±0.01 <sup>a</sup>	0.54±0.02 <sup>b</sup>
Ala**	1.51±0.11 <sup>b</sup>	1.26±0.09 <sup>a</sup>	1.32±0.11 <sup>a</sup>
Val*	0.81±0.09 <sup>c</sup>	0.41±0.03 <sup>a</sup>	0.58±0.04 <sup>b</sup>
Met*	0.44±0.04 <sup>b</sup>	0.2±0.01 <sup>a</sup>	0.28±0.03 <sup>a</sup>
Ile*	0.60±0.05 <sup>c</sup>	0.28±0.02 <sup>a</sup>	0.46±0.02 <sup>b</sup>
Leu*	1.02±0.03 <sup>c</sup>	0.49±0.05 <sup>a</sup>	0.81±0.07 <sup>b</sup>
Trp*	0.02±0.00 <sup>b</sup>	0.01±0.00 <sup>a</sup>	0.02±0.00 <sup>b</sup>
Thr*	0.74±0.04 <sup>c</sup>	0.38±0.01 <sup>a</sup>	0.57±0.04 <sup>b</sup>
Phe*	0.60±0.03 <sup>b</sup>	0.32±0.01 <sup>a</sup>	0.54±0.04 <sup>b</sup>
Lys*	1.04±0.07 <sup>c</sup>	0.54±0.02 <sup>a</sup>	0.87±0.05 <sup>b</sup>
TAA	14.90±0.53 <sup>c</sup>	8.89±0.39 <sup>a</sup>	11.81±0.59 <sup>b</sup>
EAA	5.27±0.42 <sup>c</sup>	2.63±0.21 <sup>a</sup>	4.13±0.45 <sup>b</sup>
DAA	5.85±0.51 <sup>b</sup>	4.04±0.30 <sup>a</sup>	4.62±0.38 <sup>a</sup>
EAA/TAA(%)	35.37±2.31 <sup>b</sup>	29.58±2.01 <sup>a</sup>	34.97±2.18 <sup>ab</sup>
DAA/TAA(%)	39.26±3.58 <sup>a</sup>	45.44±3.45 <sup>b</sup>	39.12±2.87 <sup>a</sup>
AAS	0.77±0.04 <sup>b</sup>	0.63±0.06 <sup>a</sup>	0.68±0.08 <sup>ab</sup>
CS	0.57±0.02 <sup>b</sup>	0.47±0.03 <sup>a</sup>	0.50±0.01 <sup>ab</sup>
EAAI	46.87±3.19 <sup>b</sup>	38.28±2.11 <sup>a</sup>	42.15±3.91 <sup>ab</sup>

\*\* 表示必需氨基酸; \* 表示呈味氨基酸  
\*\* Essential amino acid, \* Flavour amino acid

52.91%、50.03%和 64.31%，其中浅水萨氏真蛇尾的不饱和脂肪酸含量显著高于其他两种蛇尾( $P < 0.05$ )，而其饱和脂肪酸含量最低，仅为 13.32%，显著低于其他两种蛇尾( $P < 0.05$ )。紫蛇尾的 EPA 含量最高( $P < 0.05$ )，而史氏盖蛇尾没有检出 DHA，其 C20:0 含量达到了 15.89%。

### 2.4 矿物质元素

3 种蛇尾富含 Ca、Mg、K 等人体必需矿物质元素，其中 Ca 含量超过了 100000 mg/kg，浅水萨氏真蛇尾的 Ca、Mg 含量最高，分别达到了 348000 mg/kg 和 28500 mg/kg。另外，3 种蛇尾均含有丰富的其他矿物质元素，其中，浅水萨氏真蛇尾的矿物质元素含量较高(表 4)。

表 3 3 种蛇尾的脂肪酸组成  
Tab.3 Fatty acids contents of the three brittle star species (%)

脂肪酸 Fatty acids	紫蛇尾 <i>O. mirabilis</i>	史氏盖蛇尾 <i>S. sladeni</i>	浅水萨氏真蛇尾 <i>O. sarsii vadicola</i>
C14:0	9.74±0.68 <sup>b</sup>	6.84±0.33 <sup>a</sup>	7.97±0.67 <sup>a</sup>
C16:0	8.30±0.46	0.80±0.25	0.72±0.05
C17:0	1.25±0.10 <sup>a</sup>	2.38±0.12 <sup>b</sup>	2.65±0.08 <sup>b</sup>
C18:0	7.35±0.37 <sup>b</sup>	0.98±0.05 <sup>a</sup>	0.92±0.02 <sup>a</sup>
C20:0	0.58±0.03 <sup>a</sup>	15.89±0.89 <sup>c</sup>	1.06±0.04 <sup>b</sup>
饱和脂肪酸 Saturated fatty acids	27.22±1.82 <sup>b</sup>	26.89±1.59 <sup>b</sup>	13.32±0.91 <sup>a</sup>
C16:1	2.42±0.15 <sup>a</sup>	13.20±0.96 <sup>c</sup>	11.02±0.14 <sup>b</sup>
C18:1n11	3.98±0.29 <sup>a</sup>	7.00±0.52 <sup>b</sup>	7.03±0.09 <sup>b</sup>
C18:1n9	1.20±0.02 <sup>a</sup>	2.96±0.02 <sup>c</sup>	1.89±0.10 <sup>b</sup>
C18:1n7	4.76±0.34 <sup>b</sup>	4.46±0.33 <sup>b</sup>	3.40±0.02 <sup>a</sup>
C18:2n6	1.21±0.01 <sup>a</sup>	2.67±0.19 <sup>b</sup>	3.11±0.17 <sup>c</sup>
C18:3n3	0.88±0.01 <sup>b</sup>	0.72±0.03 <sup>a</sup>	0.72±0.03 <sup>a</sup>
C18:4n3	8.92±0.09 <sup>c</sup>	1.82±0.11 <sup>b</sup>	0.55±0.02 <sup>a</sup>
C20:1n9	9.07±0.42 <sup>b</sup>	1.92±0.09 <sup>a</sup>	16.12±1.01 <sup>c</sup>
C20:4n6	1.36±0.08 <sup>a</sup>	6.20±0.89 <sup>c</sup>	2.78±0.12 <sup>b</sup>
EPA	14.24±0.99 <sup>c</sup>	3.90±0.06 <sup>a</sup>	10.49±0.76 <sup>b</sup>
C22:1n9	2.44±0.03 <sup>a</sup>	5.18±0.13 <sup>c</sup>	3.84±0.21 <sup>b</sup>
DHA	2.43±0.02 <sup>a</sup>	—	3.36±0.01 <sup>b</sup>
不饱和脂肪酸 Unsaturated fatty acids	52.91±3.11 <sup>a</sup>	50.03±2.45 <sup>a</sup>	64.31±3.11 <sup>b</sup>

表 4 3 种蛇尾的矿物质元素含量  
Tab.4 Mineral element contents of the three brittle star species (mg/kg DW)

元素 Elements	紫蛇尾 <i>O. mirabilis</i>	史氏盖蛇尾 <i>S. sladeni</i>	浅水萨氏真蛇尾 <i>O. vadicola</i>
K	4060	6760	6280
Al	84	103	178
Ca	100000	107000	348000
Mg	7880	9200	28500
P	1430	2390	3070
Fe	170	240	452
Mn	27	34	46
Cu	1.74	2.77	3.72
Cr	4.19	4.06	7.14
Zn	39	75	104
Se	1.45	1.12	2.13
Pb	<0.50	0.69	1.73
Cd	0.19	0.29	0.71
As	0.13	0.07	0.05
Hg	0.002	0.004	0.012

### 3 讨论

目前,关于蛇尾的营养成分研究报道较少,张慧等(2011)对金氏真蛇尾的营养成分进行了研究,而本研究涉及的紫蛇尾营养成分此前已有两篇研究报道(王荣镇等,2010;姜森颖等,2012)。总体而言,蛇尾的体成分组成相似,其水分含量均较低,而灰分含量较高,无机元素中钙、镁含量很高。但是,就紫蛇尾来看,不同报道研究结果存在一定差异,本研究结果的水分含量结果与姜森颖等(2012)的研究结果一致,而与王荣镇等(2010)的研究结果不同,其蛋白、脂肪和灰分含量均差异较大。另外,其他营养成分,包括氨基酸、脂肪酸和矿物质元素含量报道间也存在差别,这可能与样品来源、采集时间、测定手段等相关。对于同一种类的营养成分测定结果不同也说明,样品来源、测定过程和方法等对研究结果影响较大,做相关分析比较时必须考虑这些因素。本研究比较3种蛇尾的营养成分,在相同的实验背景下研究,保证了研究结果的可靠性。

棘皮动物的常规营养成分与很多其他动物类群,例如脊索动物门的鱼类、节肢动物门的甲壳类及软体动物门的贝类等差异较大(温成器,1997;潘英等,2001;房英春等,2007;梁萌青等,2010;王建新等,2010;王荣镇等,2010;王颖等,2013),即使棘皮动物各个纲之间的常规营养成分差异也较大(姜健等,2004;牛宗亮等,2009;刘小芳等,2011)。刺参的水分含量可达90%(郭娜等,2011),多棘海盘车内脏的水分含量分别可达69.80%(郝林华等,1998),而本研究中3种蛇尾的水分含量均低于50%,这导致其干物质含量很高,同时其灰分含量达到了66.90%~80.70%,这主要是其体内含有大量钙质骨板所致(廖玉麟,2004)。从3种蛇尾的矿物质元素含量来看,钙、镁含量很高,这两种元素是钙质骨板的主要组成部分,其存在形态主要是碳酸钙和碳酸镁(杨德渐等,1999),这也印证了蛇尾灰分含量高的特点,同时较高的矿物质元素含量,使蛇尾成为较好的海洋食品开发对象,有可能应用于补钙产品的开发。

由于3种蛇尾的有机成分含量偏低,其氨基酸和脂肪酸含量均较低,氨基酸评分也均低于鱼类等高蛋白生物(梁萌青等,2010;王建新等,2010)。根据FAO/WHO的理想模式,质量较好的蛋白质其组成氨基酸的EAA/TAA为40%左右(冀德伟等,2009),而3种蛇尾的EAA/TAA均低于这一数值,不是较好的蛋白质供给源。虽然3种蛇尾的脂肪酸含量较低,但是,其中不饱和脂肪酸含量占脂肪酸的比例均超过了50%,

这一组成特点优于一些贝类和鱼类的脂肪酸组成(梁萌青等,2010;王颖等,2013)。

蛇尾在海洋中分布范围极广,遍布潮间带到几千米深的大洋底部(李覆雪等,1990;黄宗国,2008),其常聚集并呈斑块状分布,局部密度能够达到每平方米几百甚至上千只。据估计,仅大连獐子岛海域蛇尾存量就达20000 t。加之其体内大量碳酸钙成分,表明其可能对海洋碳汇具有重要意义。很多蛇尾种类以沉积物、悬浮有机颗粒为食(廖玉麟,2004),这可能将沉积物中的碳汇集到蛇尾体内,从而减缓由于底泥有机质分解而向海水和大气中释放的二氧化碳,对海洋碳汇起到积极作用。但是,由于蛇尾的相关研究资料较少,这其中有很多科学问题等待解决。

### 4 结论

本研究所涉及的3种蛇尾,水分含量较低,均低于其湿重的50%。因此,其干物质含量很高。其中,主要以碳酸钙、碳酸镁形式存在的钙、镁元素含量很高,可应用于补钙产品的开发。同时,其碳酸盐成分含量较高,可能成为海洋碳汇的重要种类,对底质碳元素的汇集、埋藏具有重要意义。

### 参 考 文 献

- 王建新, 邴旭文, 张成锋, 等. 梭鱼肌肉营养成分与品质的评价. 渔业科学进展, 2010, 31(2): 60-66
- 王荣镇, 郭承华, 董新伟, 等. 紫蛇尾(*Ophiopholis mirabilis*)主要营养成分含量测定. 营养学报, 2010, 32(4): 401-403
- 王颖, 吴志宏, 李红艳, 等. 青岛魁蚶软体部营养成分分析及评价. 渔业科学进展, 2013, 34(1): 133-139
- 牛宗亮, 王荣镇, 董新伟, 等. 马粪海胆生殖腺营养成分的含量测定. 中国海洋药物, 2009, 28(6): 26-30
- 刘小芳, 薛长湖, 王玉明, 等. 乳山刺参体壁和内脏营养成分比较分析. 水产学报, 2011, 35(4): 587-593
- 李覆雪, 蔡立哲, 王雄进. 厦门港潮间带蛇尾类动物群落生态的研究. 生态学报, 1990, 10(3): 231-236
- 杨德渐, 孙世春. 海洋无脊椎动物学. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1999
- 张慧, 王荣镇, 郭承华. 金氏真蛇尾(*Ophiura kinbergi*)营养成分含量测定. 食品科学, 2011, 32(9): 282-284
- 房英春, 王晓益, 张慧, 等. 海参的营养及药用价值. 农技服务, 2007, 24(11): 64-64
- 郝林华, 李八方. 多棘海盘车营养成分的研究. 水产学报, 1998, 22(4): 385-388
- 姜健, 杨宝灵, 邵阳. 海参资源及其生物活性物质的研究. 生物技术通讯, 2004, 15(5): 537-540
- 姜森颖, 梁峻, 孙欣. 紫蛇尾的生化成分及作为饲料原料对

- 刺参幼参生长和存活的影响. 饲料工业, 2012, 33(16): 13-17
- 郭承华, 金海洙, 倪新江, 等. 金氏真蛇尾(*Ophiura kinbergi*) 蛇尾皂甙的制备及特性研究. 动物学报, 2001, 47(专刊 S1): 131-133
- 郭娜, 董双林, 刘慧. 几种饲料原料对刺参幼参生长和体成分的影响. 渔业科学进展, 2011, 32(1): 122-128
- 黄宗国. 中国海洋生物种类与分布. 北京: 海洋出版社, 2008
- 梁萌青, 雷霖霖, 吴新颖, 等. 3 种主养鲆鲽类的营养成分分析及品质比较研究. 渔业科学进展, 2010, 31(4): 113-119
- 温成器. 海胆是高级营养食品. 广东科技, 1997, (5): 23-24
- 廖玉麟. 中国动物志: 无脊椎动物 第四十卷 棘皮动物门 蛇尾纲. 北京: 科学出版社, 2004
- 潘英, 王如才, 罗永巨, 等. 海水和淡水养殖南美白对虾肌肉营养成分的分析比较. 青岛海洋大学学报(自然科学版), 2001, 31(6): 828-834
- 冀德伟, 李明云, 史雨红, 等. 光唇鱼的肌肉营养组成与评价. 营养学报, 2009, 31(3): 298-300

(编辑 江润林)

## The Analysis of Nutrient Components of Three Brittle Star Species in the North Yellow Sea

FANG Jinghui<sup>1</sup>, ZHANG Jihong<sup>1</sup>, JIANG Zengjie<sup>1</sup>, MAO Yuze<sup>1</sup>,  
ZANG Yuanqi<sup>2</sup>, FANG Jianguang<sup>1①</sup>

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;  
2. Qingdao Entry-Exit Inspection Quarantine Bureau, Qingdao 266000)

**Abstract** Nutrient components of brittle stars *Ophiopholis mirabilis*, *Stegophiura sladeni* and *Ophiura sarsii vadicola* collected in the North Yellow Sea of China were studied. Alive samples were frozen at  $-70^{\circ}\text{C}$ , and then dried in a lyophilizer. The results showed that the moisture content of the brittle stars was less than 50%, and it was 41.61% in *S. sladeni* that was significantly lower than those in the others ( $P<0.05$ ). The ash content in *S. sladeni* was 80.70%, which was higher than those of the others ( $P<0.05$ ). The total amino acid content in the brittle stars was low, and the highest one was in *O. mirabilis* with 14.90% ( $P<0.05$ ). The percentage of essential amino acids to the total amino acids (EAA/TAA) of *O. mirabilis*, *S. sladeni* and *O. sarsii vadicola* was 35.37%, 29.58% and 34.97%, respectively. The essential amino acids and flavour amino acids in *O. mirabilis* were significantly higher than those in the others ( $P<0.05$ ). Furthermore, the highest amino acids score, chemical score and essential amino acids index were in *O. mirabilis*. The unsaturated fatty acids in *O. mirabilis*, *S. sladeni* and *O. sarsii vadicola* were 52.91%, 50.03% and 64.31%, respectively, and the highest one was in *O. sarsii vadicola* ( $P<0.05$ ). However, the lowest saturated fatty acid was in *O. sarsii vadicola* with 13.32% ( $P<0.05$ ). All species were rich in mineral element. The Ca and Mg contents in *O. sarsii vadicola* were significantly higher than those in the others ( $P<0.05$ ), which were 348000 mg/kg and 28500 mg/kg, respectively. The results suggested that these three species are not good protein sources but suitable for developing function food for Ca supplement. The high carbonate content in brittle stars showed that brittle stars are probably important to the ocean carbon sink.

**Key words** *Ophiopholis mirabilis*; *Stegophiura sladeni*; *Ophiura sarsii vadicola*; Nutrient components

① Corresponding author: FANG Jianguang, E-mail: fangjg@ysfri.ac.cn



# 低盐胁迫对黄姑鱼(*Nibea albiflora*)幼鱼鳃离子调节、呼吸代谢酶和皮质醇的影响\*



施兆鸿<sup>1①</sup> 张晨捷<sup>1</sup> 彭士明<sup>1</sup> 张艳亮<sup>1,2</sup> 王建钢<sup>1</sup> 高权新<sup>1</sup>

(1. 农业部东海与远洋渔业资源开发利用重点实验室 中国水产科学研究院东海水产研究所 上海 200090;  
2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

**摘要** 挑选平均体重为(5.0±1.4) g, 平均全长为(8.3±0.8) cm 的黄姑鱼(*Nibea albiflora*)幼鱼, 进行低盐度胁迫试验, 以 23 盐度组为对照组, 设置 9 和 16 两个盐度胁迫组, 在 0、1、3、7 d 进行取样。通过检测鳃 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP 酶(NKA)、Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶、H<sup>+</sup>-ATP 酶、乳酸脱氢酶(LDH)、琥珀酸脱氢酶(SDH)活力以及血清皮质醇含量, 研究低盐度对黄姑鱼离子调节和呼吸代谢的影响。结果显示, 鳃 NKA 活力在盐度胁迫后出现显著增强( $P<0.05$ ); Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶活力略有上升后即出现下降的变化, 而 H<sup>+</sup>-ATP 酶活力呈现上升后恢复的变化。血清皮质醇含量在低盐度胁迫后呈显著的波动变化( $P<0.05$ ), 9 和 16 盐度组的皮质醇水平交替上升。鳃 LDH 活力在低盐度胁迫后显著增强( $P<0.05$ ), 且 9 盐度组增强程度大于 16 盐度组。鳃 SDH 活力先减弱然后增强, 9 盐度组在 7 d 时增强十分显著( $P<0.05$ )。试验中, 仅 9 盐度组出现实验鱼死亡两尾的情况, 16 及 23 盐度组黄姑鱼进食和活动均正常, 9 盐度组略差。研究表明, 盐度降低可显著影响黄姑鱼幼鱼离子调节能力及呼吸代谢功能。盐度胁迫程度超过黄姑鱼适应能力与机体储备的承受范围会对机体造成伤害。

**关键词** 黄姑鱼; 低盐胁迫; 离子调节; 呼吸代谢; 皮质醇

**中图分类号** S965.334 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)06-0022-07

黄姑鱼(*Nibea albiflora*)属石首鱼科, 黄姑鱼属, 分布于朝鲜、日本南部以及中国等西太平洋沿岸海域, 是我国重要的传统经济鱼类(朱元鼎等, 1963)。黄姑鱼属于广盐性鱼类, 其适盐范围为 10–40, 最适盐度为 20–25, 仔、稚鱼可以在 1–34 盐度下存活, 与大部分石首鱼科鱼类一样, 也是相对耐低温的种类之一(薛宝贵等, 2013; Han *et al.*, 2008)。另外, 黄姑鱼具有生长速度快、食性广、抗病和抗急流能力强等优点, 有良好的养殖发展前景(楼宝等, 2011; 王志铮等, 2005)。

鳃是鱼类调节外界生活水域与体内离子水平的重要器官, 其主要功能为气体交换、调控体内外离子和酸碱平衡(Huang *et al.*, 2010; Rombough, 2007)。在鱼

类鳃部离子平衡中, Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、H<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>、HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>、Ca<sup>2+</sup>等是最重要的调控对象, 相关离子调节酶 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP 酶(NKA)、Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶和 H<sup>+</sup>-ATP 酶在调控过程中不仅转运特定离子, 还能为整个转运机制提供动力(Shigehisa *et al.*, 2003; Zimmer *et al.*, 2012)。鱼类渗透压调节涉及的激素有多种, 如: 生长激素(Growth hormone)、胰岛素样生长因子 I (Insulin-like growth factor- I) 和皮质醇(Cortisol)等。皮质醇不仅对应激反应和糖代谢有调控功能, 对渗透压也有调节作用, 能增加鳃细胞数量和 NKA 活力, 提高耐盐性(马慧等, 2012; Juan *et al.*, 2002)。乳酸脱氢酶(LDH)与细胞代谢活动关系密切, 可催化丙酮酸与乳酸的相互转化, 并伴随产生能量, 是糖酵解途径与三羧酸(TCA)循环之

\* 国家科技部“863”项目(2012AA10A413-5)和中央级公益性科研院所基本科研业务费项目(东 2015M04)共同资助。

① 通讯作者: 施兆鸿, 研究员, E-mail: shizh@eastfishery.ac.cn

收稿日期: 2014-12-18, 收修改稿日期: 2015-01-24

间的关键酶,其活力可作为衡量无氧条件下代谢与能量供给水平的指标(Abdel-Mohsen, 2009; Koenig *et al.*, 2014)。琥珀酸脱氢酶(SDH)是有氧代谢的首要酶类和衡量指标,在 TCA 循环中起到连接氧化磷酸化与电子传递的作用,为细胞线粒体需氧和产能的呼吸链提供电子(路允良等, 2012; Liu *et al.*, 2010)。鳃组织离子调节酶与 LDH、SDH 活力以及血清皮质醇水平能够反映盐度胁迫下鱼类渗透压调节、呼吸代谢和供能情况。因此, NKA、Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶、H<sup>+</sup>-ATP 酶、LDH、SDH 和皮质醇等指标在研究黄姑鱼受盐度胁迫下的渗透压调节和生理变化中具有重要意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试鱼和试验条件

黄姑鱼取自当年秋季自行繁育的幼鱼,挑选平均体重为(5.0±1.4) g,平均全长为(8.3±0.8) cm,体表无伤、体色正常的个体作为试验对象。试验于 2013 年 12 月在浙江省舟山市朱家尖养殖基地进行。养殖用水为暗沉淀后砂滤处理的天然海水(盐度为 23),换水量为 50%/d, pH 为 8.0±0.5,溶解氧为 6–8 mg/L,控温电加热棒维持水温恒定,水温为(18±1)°C, 24 h 不间断充气。养殖水总氨氮浓度低于 0.1 mg/L。

### 1.2 试验设计和取样

试验开始前,采用随机分组法,以每桶 25 尾的密度,将试验用鱼分别放入 500 L 的 9 个实验玻璃钢养殖桶中,并作适应性暂养 5 d,暂养期间,所有桶中的黄姑鱼喂同 1 种配合饵料,每天两次饱食投喂。试验设置 3 个处理(9、16、23 盐度组, 23 为对照组),每个处理 3 个平行;组间个体大小无显著差异( $P>0.05$ ),用曝气后的自来水调节盐度,不同处理组通过换水将盐度同步调节至设定盐度。试验周期为 7 d,随机取样,盐度调节前(0)从每桶中各取 1 尾,分别于 1、3、7 d 取样,每个平行每次取 3 尾( $n=9$ )。

将试验用鱼麻醉后,称量每尾样品的体重和全长,之后置于冰盘上进行尾静脉采血。采血后解剖,取全鳃置于 2 ml 离心管中保存。静脉血静置后经 2500 r/min 离心 15 min,取上层血清移入 1.5 ml 离心管中。鳃组织与血清置于-70°C 超低温冰箱中保存备用。由于该试验幼鱼较小,血量和组织较少,故将同一平行 3 尾鱼的血液和鳃组织合为 1 个样本( $n=3$ ),-70°C 超低温保存。

鳃组织用做检测离子调节酶 NKA、Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶、H<sup>+</sup>-ATP 酶以及 LDH、SDH 活力,血清检测皮质醇含量。

### 1.3 指标检测

**1.3.1 鳃组织相关酶活力检测** 将鳃瓣在匀浆介质(pH 7.4, 0.01 mol/L Tris-HCl, 0.1 mmol/L EDTA-2Na, 0.01 mol/L 蔗糖, 0.8% NaCl)中剪碎,用匀浆机 15000 r/min 研磨制成匀浆。用低温离心机 4°C 下 2500 r/min,离心 5 min,取上清液检测酶活。

**1.3.2 ATP 酶分解** ATP 生成 ADP 和无机磷,测定无机磷含量可判断 ATP 酶活力,无机磷测定采用钼蓝法,ATP 酶活力单位为 U/mg prot: 每毫克组织蛋白中 ATP 酶 1 h 分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷的量。

LDH 催化乳酸生成丙酮酸,丙酮酸与 2,4-二硝基苯肼生成红棕色物质,可用比色法检测,以计算 LDH 活性。LDH 活力单位为 U/g protein: 每克组织蛋白 37°C 与基质作用 15 min,反应体系中产生 1 μmol 丙酮酸。

SDH 催化底物反应, FAD 为辅基, FAD 被还原成 FADH 的反应与 2,6-DPIP 的还原相偶联,测定 2,6-DPIP 的还原速度可推算 SDH 活力。SDH 活力单位为 U/mg prot: 每毫克蛋白每分钟使反应体系的吸光度降低 0.01。

采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒检测酶活,同时用考马斯亮蓝法测定蛋白含量,以计算酶比活力,按说明书要求操作。

血清皮质醇含量由南京建成生物工程研究所代为检测,采用 ELISA 法,所用试剂由 R&D systems (USA)提供。

### 1.4 数据统计与分析

试验结果用 SPSS 13.0 软件进行统计与分析。运用单因素方差分析(One-Way ANOVA),先进行方差齐性检验,不满足方差齐性时,对数据进行自然对数或平方根转换,然后采用 Duncan's 检验进行多重比较, $P<0.05$  为有显著性差异,数据以平均值±标准差(Mean±SD)表示。用 Excel 2007 绘制图表。

## 2 结果

### 2.1 鳃 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP 酶(NKA)活力

随着时间推移,黄姑鱼幼鱼在低盐度胁迫下鳃 NKA 活力变化见图 1。从图 1 可以看出,9 盐度组 NKA 活力出现了先增强后恢复的变化,3 d 时最高,各时间点均显著高于初始值( $P<0.05$ )。16 盐度组鳃 NKA 活力随时间呈逐步增强趋势,且不同时间点存在显著差异( $P<0.05$ )。23 盐度对照组鳃 NKA 活力也呈逐渐增强变化,但各时间点差异不显著( $P>0.05$ )。比较 1、3 d 时,9 与 16 盐度组 NKA 活力显著高于对照组

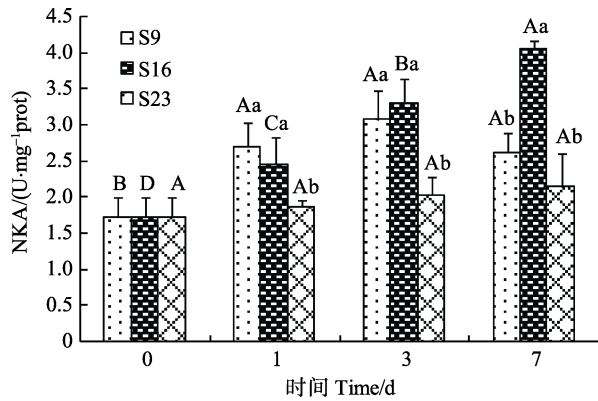


图1 低盐胁迫对黄姑鱼幼鱼鳃  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP 酶活力的影响

Fig.1 The effects of low salinity on the gill NKA activity of juvenile *N. albiflora*

NKA 活力单位: U/mg protein。不同大写字母表示同一盐度组中存在显著差异( $P < 0.05$ ), 不同小写字母表示同一时间点中存在显著差异( $P < 0.05$ )

The unit of NKA activity: U/mg protein. Different uppercase letters indicate significant difference from each other in the same salinity group ( $P < 0.05$ ). Different lowercase letters indicate significant difference from each other in the same time ( $P < 0.05$ )

( $P < 0.05$ ); 7 d 时, 9 盐度组 NKA 活力减弱, 16 盐度组 NKA 活力持续增强, 并显著高于 9 盐度组和对照组( $P < 0.05$ )。

## 2.2 鳃 $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活力

盐度逐步降低时, 黄姑鱼幼鱼鳃  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活力随时间变化见图 2。从图 2 可以看出, 9 盐度组鳃  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活力随时间呈先上升后下降的变化趋势。1、3 d 时, 其显著高于初始值; 7 d 时, 显著低于初始值( $P < 0.05$ )。16 盐度组鳃  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活力变化与 9 盐度组类似。1 d 时, 显著高于初始值; 3、7 d 时, 显著低于初始值( $P < 0.05$ )。23 盐度组鳃  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活力呈波动变化, 波动幅度不剧烈, 仅 7 d 时显著高于初始值( $P < 0.05$ )。各时间点中, 1 d 时, 9、16 盐度组  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活力显著高于对照组; 3 d 时, 16 盐度组  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活力出现减弱, 并显著低于 9 盐度组和对照组; 7 d 时, 9 盐度组  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活力也出现减弱, 两个胁迫组都显著低于 23 盐度对照组( $P < 0.05$ )。

## 2.3 鳃 $\text{H}^+$ -ATP 酶活力

低盐胁迫下, 各时间点黄姑鱼幼鱼鳃  $\text{H}^+$ -ATP 酶活力变化见图 3。从图 3 可以看出, 随时间推移, 各盐度组鳃  $\text{H}^+$ -ATP 酶活力都出现了先增强后恢复的变化, 16 盐度组变化最剧烈。在 1、3 d 时显著高于初

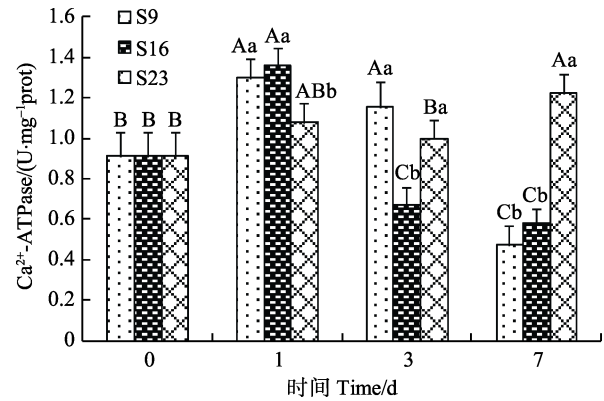


图2 低盐胁迫对黄姑鱼幼鱼鳃  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活力的影响  
Fig.2 The effects of low salinity on the gill  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity of juvenile *N. albiflora*

$\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活力单位: U/mg protein。不同大写字母表示同一盐度组中存在显著差异( $P < 0.05$ ), 不同小写字母表示同一时间点中存在显著差异( $P < 0.05$ )

The unit of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity: U/mg protein. Different uppercase letters indicate significant difference from each other in the same salinity group ( $P < 0.05$ ). Different lowercase letters indicate significant difference from each other in the same time ( $P < 0.05$ )

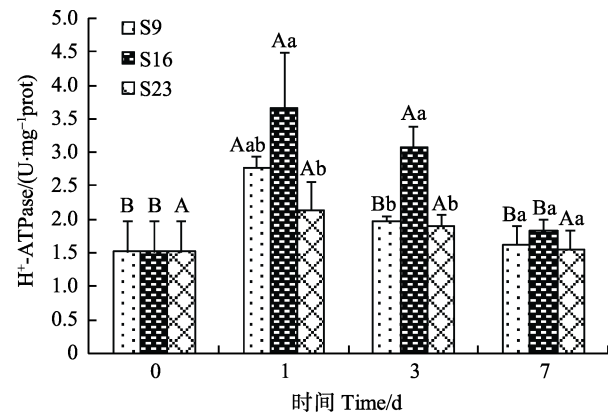


图3 低盐胁迫黄姑鱼幼鱼对其鳃  $\text{H}^+$ -ATP 酶活力的影响  
Fig.3 The effects of low salinity on the gill  $\text{H}^+$ -ATPase activity of juvenile *N. albiflora*

$\text{H}^+$ -ATP 酶活力单位: U/mg protein。不同大写字母表示同一盐度组中存在显著差异( $P < 0.05$ ), 不同小写字母表示同一时间点中存在显著差异( $P < 0.05$ )

The unit of  $\text{H}^+$ -ATPase activity: U/mg protein. Different uppercase letters indicate significant difference from each other in the same salinity group ( $P < 0.05$ ). Different lowercase letters indicate significant difference from each other in the same time ( $P < 0.05$ )

始值( $P < 0.05$ )。9 盐度组  $\text{H}^+$ -ATP 酶活力在 1 d 时显著增强( $P < 0.05$ ), 而后逐渐恢复。23 盐度对照组活力变化不显著( $P > 0.05$ )。低盐胁迫后, 16 盐度组鳃  $\text{H}^+$ -ATP 酶活力始终处于较高水平, 且在 1、3 d 时显

著高于对照组。在 3 d 时显著高于 9 盐度组( $P<0.05$ ); 9 盐度组  $H^+$ -ATP 酶活力略高于对照组, 二者差异不显著( $P>0.05$ )。

## 2.4 鳃乳酸脱氢酶(LDH)活力

盐度逐步降低, 黄姑鱼幼鱼鳃 LDH 活力随时间变化见图 4。从图 4 可以看出, 9 盐度组 LDH 活力出现先增强后恢复的变化, 1、3 d 时显著高于初始值( $P<0.05$ )。16 盐度组 LDH 活力呈先增强后下降的变化, 1、3 d 时, 显著强于 7 d 值( $P<0.05$ )。对照组 LDH 活力呈波动变化, 各时间点差异不显著( $P>0.05$ )。各时间点的比较中, 1、3 d 时鳃 LDH 活力随盐度降低而增强, 9 盐度组活力显著高于 23 盐度对照组( $P<0.05$ ); 7 d 时, 16 盐度组活力减弱, 并显著低于对照组( $P<0.05$ )。

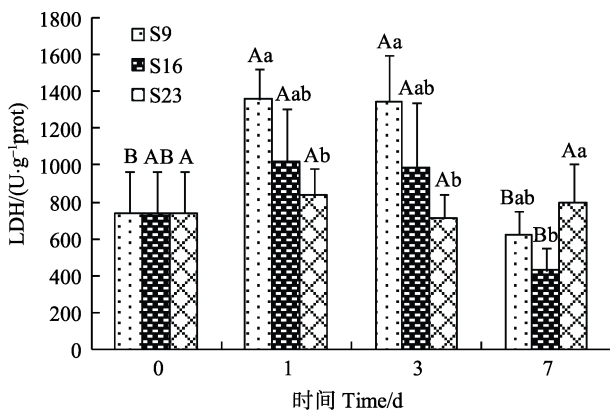


图 4 低盐度胁迫对黄姑鱼幼鱼鳃乳酸脱氢酶活力的影响  
Fig.4 The effects of low salinity on the gill LDH activity of juvenile *N. albiflora*

LDH 活力单位: U/g protein。不同大写字母表示同一盐度组中存在显著差异( $P<0.05$ ), 不同小写字母表示同一时间点上存在显著差异( $P<0.05$ )

The unit of LDH activity: U/g protein. Different uppercase letters indicate significant difference from each other in the same salinity group ( $P<0.05$ ). Different lowercase letters indicate significant difference from each other in the same time ( $P<0.05$ )

## 2.5 鳃琥珀酸脱氢酶(SDH)活力

黄姑鱼幼鱼在低盐度胁迫下, 鳃 SDH 活力各时间点的变化见图 5。从图 5 可以看出, 9 盐度组 SDH 活力随时间推移, 略有下降, 而在 7 d 时显著跃升( $P<0.05$ )。16 盐度组 SDH 活力呈先下降后上升的变化, 1 d 时最低, 并显著低于对照组; 7 d 时, 活力增强, 显著高于 1、3 d( $P<0.05$ )。23 盐度对照组各时间点鳃 SDH 活力差异不显著( $P>0.05$ )。低盐度胁迫后 1 d 时, 16 盐度组显著低于对照组( $P<0.05$ ); 3 d 时, 各盐度组差

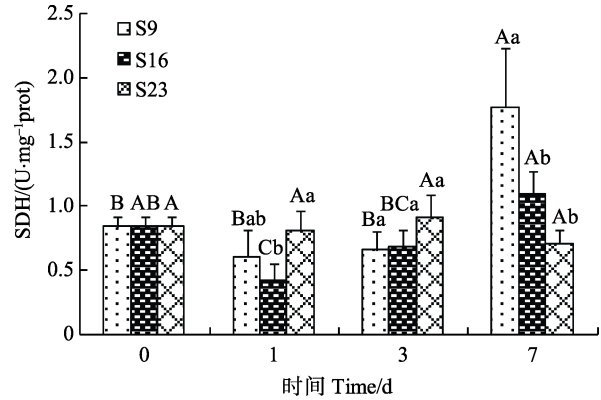


图 5 低盐度胁迫对黄姑鱼幼鱼鳃琥珀酸脱氢酶活力的影响

Fig.5 The effects of low salinity on the gill SDH activity of juvenile *N. albiflora*

SDH 活力单位: U/mg protein。不同大写字母表示同一盐度组中存在显著差异( $P<0.05$ ), 不同小写字母表示同一时间点上存在显著差异( $P<0.05$ )

The unit of SDH activity: U/mg protein. Different uppercase letters indicate significant difference from each other in the same salinity group ( $P<0.05$ ). Different lowercase letters indicate significant difference from each other in the same time ( $P<0.05$ )

异不显著( $P>0.05$ ); 7 d 时, 9 盐度组显著高于其他两组( $P<0.05$ )。

## 2.6 血清皮质醇水平

低盐度胁迫下, 黄姑鱼幼鱼血清皮质醇含量随时间变化见图 6。从图 6 可以看出, 9 盐度组血清皮质醇含量呈波动上升趋势, 1、7 d 显著高于初始值( $P<0.05$ )。16 盐度组血清皮质醇含量在 1 d 时出现下降, 3 d 时又上升, 但各时间点含量差异不显著( $P>0.05$ )。23 盐度对照组血清皮质醇含量略有波动, 各时间点含量差异不显著( $P>0.05$ )。在 1 d 时, 9 盐度组血清皮质醇含量显著高于 16 盐度组( $P<0.05$ ), 而二者与对照组差异不显著( $P>0.05$ ); 3 d 时, 16 盐度组血清皮质醇含量上升, 而 9 盐度组含量下降, 二者间存在显著差异( $P<0.05$ ), 但与对照组差异不显著( $P>0.05$ ); 7 d 时, 9 盐度组含量再次上升并显著高于 16 盐度组和对照组( $P<0.05$ )。

## 3 讨论

当环境盐度降低时, 硬骨鱼类为了生存必须维持体内渗透压稳定。在硬骨鱼类渗透压调节中, 鳃的作用是独一无二, 其主要功能区为氯细胞。氯细胞含丰富的线粒体和离子转运酶类, 既是离子运转场所又为转运过程提供能量支持(Hwang *et al*, 2007)。而渗透压

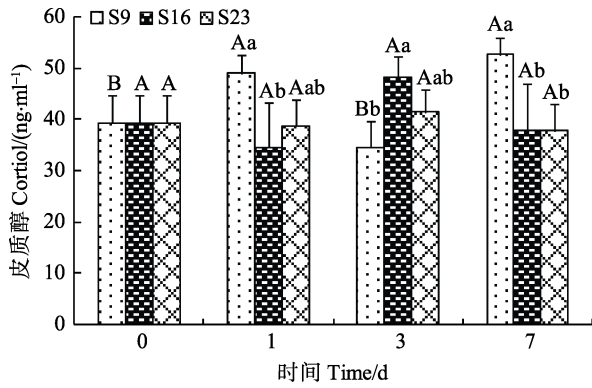


图6 低盐度胁迫对黄姑鱼幼鱼血清皮质醇含量的影响

Fig.6 The effects of low salinity on the serum cortisol concentration of juvenile *N. albiflora*

皮质醇含量单位: ng/ml。不同大写字母表示同一盐度组中存在显著差异( $P<0.05$ ), 不同小写字母表示同一时间点中存在显著差异( $P<0.05$ )

The unit of cortisol concentration: ng/ml. Different uppercase letters indicate significant difference from each other in the same salinity group ( $P<0.05$ ). Different lowercase letters indicate significant difference from each other in the same time ( $P<0.05$ )

调节过程又与皮质醇等激素调控密切相关(张晨捷等, 2013; Singer *et al*, 2008)。

### 3.1 低盐度胁迫对黄姑鱼渗透压调节的影响

硬骨鱼类具有高效的渗透压调节能力以维持体内水分及液体动态平衡, 离子调节酶 NKA、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶和  $\text{H}^{+}$ -ATP 酶以及皮质醇在渗透压调节中都起着重要的作用。

受低盐胁迫时, 黄姑鱼 NKA 活力显著增强, 其中, 9 盐度组 NKA 活力增强后有所恢复, 而 16 盐度组 NKA 活力呈逐步增强。孙鹏等(2010)报道, 条石鲷 (*Oplegnathus fasciatus*) NKA 活力在盐度为 8 和 38 时, 都高于 28 盐度组; 大底鲷 (*Fundulus grandis*) 幼鱼鳃 NKA 表达最高点出现在盐度为 0.5, 最低点盐度为 12 (Patterson *et al*, 2012); 赤鲷 (*Pagrus pagrus*) 仔鱼的 NKA mRNA 表达 24 盐度组显著强于 34 盐度组 (Ostrowski *et al*, 2011)。说明盐度降低时鱼体内离子会向外流失, NKA 活力增强由外界环境摄入离子以维持渗透压动态平衡。而 9 盐度组 NKA 活力在 7 d 时有所回落, 可能与渗透压调节需要消耗能量(菅玉霞等, 2012), 能量储备消耗后不足以维持高 NKA 活力有关。

$\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶和  $\text{H}^{+}$ -ATP 酶也是重要的离子调节酶, 为  $\text{Na}^{+}$  与  $\text{H}^{+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  的交换提供动力。Masahiro 等(2009)认为, 鳃通过排出  $\text{H}^{+}$  转换摄入  $\text{Na}^{+}$  和  $\text{Cl}^{-}$  的能

量, 在低渗环境中作用尤为重要。Tsai 等(1998)认为,  $\text{Ca}^{2+}$  对维持渗透压调节的离子流和细胞离子浓度有重要影响。本研究中,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活力略有上升后即出现下降的变化, 而  $\text{H}^{+}$ -ATP 酶活力呈现上升后恢复的变化, 推测这两种酶在盐度胁迫初期活力增强为离子转运提供能量, 在渗透压平衡重新建立后活力随之减弱。

15 盐度组胁迫会使青鳉 (*Oryzias latipes*) 鳃内 NKA 基因表达显著升高, 转回淡水后表达会基本恢复, 但暴露于含 100 ng/L 皮质醇的淡水, NKA 基因表达仍维持较高水平(侯彦峰等, 2009)。注射皮质醇后, 无论淡水或海水培养的金头鲷 (*Sparus aurata*), NKA 酶活力都显著提高, 海水培养金头鲷的血浆渗透压和离子浓度也显著降低 (Juan *et al*, 2002)。本研究中黄姑鱼血清皮质醇含量在低盐度胁迫后呈显著的波动变化, 9 和 16 盐度组的皮质醇水平交替上升, 且 9 盐度组的变化更明显, 说明在应对不同程度的盐度刺激时, 皮质醇水平会出现不同的变化, 从而调控其相关渗透压调节功能。

### 3.2 低盐度胁迫对黄姑鱼呼吸代谢的影响

盐度变化时, 鱼类不仅需要直接的渗透压调节, 还需要对呼吸耗氧、能量消耗等生理代谢加以调整达到间接调节(宋振鑫等, 2013)。有研究报道, 龙虎斑 (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Pinephelus lanceolatus* ♂) 和条石鲷在盐度为 5–15 时, 盐度越低, 耗氧率越高 (闫茂仓等, 2008; 梁华芳等, 2014)。本研究中, 黄姑鱼 LDH 活力在低盐度胁迫后显著增强, 且 9 盐度组增强程度大于 16 盐度组。表明盐度胁迫使黄姑鱼的能量消耗加速, 通过无氧呼吸代谢提供应急能量供给。低盐度胁迫后, 黄姑鱼鳃 SDH 活力先减弱然后增强, 9 盐度组在 7 d 时增强十分显著。环境胁迫会影响黄姑鱼正常的有氧呼吸代谢, 随着渗透压调节的进行, 需氧量增加, SDH 活力随之显著增强。

本研究中, 除 9 盐度组出现两尾死鱼外, 其余组均未出现死亡情况。实验中, 16 及 23 盐度组黄姑鱼进食和活动均正常, 9 盐度组略差。鉴此, 低盐胁迫时, 黄姑鱼幼鱼能够增强渗透压调节功能, 并且调整体内呼吸代谢平衡, 使体内离子平衡维持动态平衡。渗透压调节能力与体质和能量储备相关, 所以当盐度降低过大, 超出其调节范围, 会导致严重损害, 养殖时应当密切注意。

## 参 考 文 献

马慧, 柳淑芳, 马骞, 等. 硬骨鱼类渗透压的内分泌激素调节

- 机制. 水产科学, 2012, 31(1): 55–59
- 王志铮, 刘祖毅, 吕敢堂, 等.  $Hg^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Cr^{6+}$ 对黄姑鱼幼鱼的急性致毒效应. 中国水产科学, 2005, 12(6): 745–750
- 朱元鼎, 罗云林, 伍汉霖. 中国石首鱼类分类系统的研究和新属新种的叙述. 上海: 上海科学技术出版社, 1963, 50–51
- 闫茂仓, 单乐州, 谢起浪, 等. 温度、盐度及体重对条石鲷幼鱼耗氧率和排氨率的影响. 海洋科学进展, 2008, 26(4): 486–496
- 孙鹏, 彭士明, 尹飞, 等. 盐度对条石鲷幼鱼  $Na^+/K^+$ -ATP 酶活力的影响. 水产学报, 2010, 34(8): 1204–1209
- 宋振鑫, 陈超, 吴雷明, 等. 盐度与 pH 对云纹石斑鱼胚胎发育和仔鱼活力的影响. 渔业科学进展, 2013, 34(6): 52–58
- 张晨捷, 彭士明, 王建钢, 等. 盐度对银鲳(*Pampus argenteus*)  $Na^+/K^+$ -ATP 酶活力及血清渗透压调节激素浓度的影响. 海洋与湖沼, 2013, 44(5): 1395–1402
- 侯彦峰, 张照斌, 胡建英. 皮质醇影响青鳉鳃内钠钾 ATP 酶基因表达的研究. 生态毒理学报, 2009, 4(2): 212–217
- 梁华芳, 黄东科, 吴耀华, 等. 温度和盐度对龙虎斑耗氧率和排氨率的影响. 渔业科学进展, 2014, 35(2): 30–34
- 菅玉霞, 潘雷, 胡发文, 等. 温度和盐度对大泷六线鱼仔鱼存活与生长的影响. 渔业科学进展, 2012, 33(5): 24–29
- 路允良, 王芳, 高勤峰, 等. 盐度对三疣梭子蟹成熟前后呼吸代谢的影响. 水产学报, 2012, 36(9): 1392–1399
- 楼宝, 史会来, 毛国民, 等. 黄姑鱼全人工繁育及大规模苗种培育技术研究. 现代渔业信息, 2011, 26(3): 20–23
- 薛宝贵, 楼宝, 徐冬冬, 等. 密度胁迫对黄姑鱼幼鱼生长、代谢及非特异性免疫的影响. 渔业科学进展, 2013, 34(2): 45–51
- Abdel-Mohsen HA. Assessment of respiratory and ion transport potential of *Penaeus japonicus* gills in response to environmental pollution. Mediterr Mar Sci, 2009, 10(1): 5–18
- Han ZQ, Gao TX, Yanagimoto T, et al. Genetic population structure of *Nibea albiflora* in Yellow Sea and East China Sea. Fish Sci, 2008, 74(3): 544–552
- Hirose S, Kaneko T, Nobuko N, et al. Molecular biology of major components of chloride cells. Comp Biochem Phys Part B, 2003, 136(4): 593–620
- Huang CY, Chao PL, Lin HC.  $Na^+/K^+$ -ATPase and vacuolar-type  $H^+$ -ATPase in the gills of the aquatic air-breathing fish *Trichogaster microlepis* in response to salinity variation. Comp Biochem Phys, Part A, 2010, 155(3): 309–318
- Hwang PP, Lee TH. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. Comp Biochem Phys, Part A, 2007, 148(3): 479–497
- Juan MM, Raul LC, Maria del Pilar Martin del Rio. Osmoregulatory action of PRL, GH, and cortisol in the gilthead seabream. Gen Comp Endocr, 2002, 129(2): 95–103
- Koenig S, Sole M. Muscular cholinesterase and lactate dehydrogenase activities in deep sea fish from the NW Mediterranean. Mar Environ Res, 2014, 94: 16–23
- Liu XJ, Luo Z, Xiong BX, et al. Effect of waterborne copper exposure on growth, hepatic enzymatic activities and histology in *Synechogobius hasta*. Ecotox Environ Safe, 2010, 73 (6): 1286–1291
- Masahiro E, Kazuyuki H, Nobuhiro N, et al. Mechanism of development of ionocytes rich in vacuolar-type  $H^+$ -ATPase in the skin of zebrafish larvae. Dev Biol, 2009, 329 (1): 116–129
- Ostrowski AD, Watanabe WO, Montgomery FP, et al. Effects of salinity and temperature on the growth, survival, whole body osmolality, and expression of  $Na^+/K^+$  ATPase mRNA in red porgy (*Pagrus pagrus*) larvae. Aquaculture, 2011, 314(1–4): 193–201
- Patterson J, Bodinier C, Green C. Effects of low salinity media on growth, condition, and gill ion transporter expression in juvenile Gulf killifish, *Fundulus grandis*. Comp Biochem Phys, Part A, 2012, 161(4): 415–421
- Rombough P. The functional ontogeny of the teleost gill: Which comes first, gas or ion exchanger. Comp Biochem Phys, Part A, 2007, 148(4): 732–742
- Singer TD, Keir KR, Hinton M. Structure and regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene in killifish: A comparative genomics approach. Comp Biochem Phys, Part D, 2008, 3(2): 172–185
- Tsai JC, Hwang PP. Effects of wheat germ agglutinin and colchicines on microtubules of the mitochondria-rich cells and  $Ca^{2+}$  uptake in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) larvae. J Exp Biol, 1998, 201(15): 2263–2271
- Zimmer AM, Barcarolli IF, Wood CM, et al. Waterborne copper exposure inhibits ammonia excretion and branchial carbonic anhydrase activity in euryhaline guppies acclimated to both fresh water and sea water. Aquat Toxicol, 2012, 122–123: 172–180

## Effects of Low-Salinity Stress on the Ion Regulation, Respiratory Metabolic Enzymes and Serum Cortisol in the Gill of *Nibea albiflora* Juvenile

SHI Zhaohong<sup>1</sup>Ⓐ, ZHANG Chenjie<sup>1</sup>, PENG Shiming<sup>1</sup>, ZHANG Yanliang<sup>1,2</sup>,  
WANG Jiangang<sup>1</sup>, GAO Quanxin<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of East China Sea and Oceanic Fishery Resources Exploitation, Ministry of Agriculture, East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090;

2. Fisheries and Life Science college, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

**Abstract** In this study *Nibea albiflora* juveniles with the average weight of (5.0±1.4) g and the average length of (8.3±0.8) cm were divided into 3 salinity groups including salinity 23 as the control group and salinity 9 and 16 as the stress groups. Fish samples were collected on the 0, 1st, 3rd and 7th day. To evaluate the effects of low salinity on the ion regulation and respiratory metabolism of *N. albiflora*, we tested the changes in activities of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (NKA), Ca<sup>2+</sup>-ATPase, H<sup>+</sup>-ATPase, lactate dehydrogenase (LDH) and succinate dehydrogenase (SDH) in gills, and the level of cortisol in the serum. In response to the low-salinity stress, the NKA activity increased significantly ( $P<0.05$ ), and the Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity decreased after a slight increase in the beginning, and the H<sup>+</sup>-ATPase activity first increased and then recovered to the initial level. The enhanced activities of NKA, Ca<sup>2+</sup>-ATPase and H<sup>+</sup>-ATPase could provide more energy for the ion transport to maintain the dynamic balance of the osmotic pressure. The cortisol level in the serum fluctuated significantly ( $P<0.05$ ) during the low-salinity stress, and the cortisol levels of salinity 9 or 16 group increased alternately. The LDH activity in the gill increased significantly ( $P<0.05$ ), and the activity of the salinity 9 group was higher than that of the salinity 16 group. The SDH activity in the gill first increased and then decreased, and the activity of the salinity 9 group increased significantly on the 7th day ( $P<0.05$ ). Environmental stress would affect the normal aerobic respiration of *N. albiflora*. Along with the osmotic adjustment, the need of oxygen increased, which may significantly enhance the SDH activity. Noticeably, two experimental fishes died in the salinity 9 group during experiment. The feeding and activity of *N. albiflora* juveniles in the salinity 16 and 23 groups were normal, whereas they were impaired in the salinity 9 group. Our results suggested that low salinity could have significant effects on the ion regulation and respiratory metabolism of *N. albiflora*. Excessively low salinity may overwhelm the adaption ability of *N. albiflora* and cause harm to the health of the fish.

**Key words** *Nibea albiflora*; Low salinity stress; Ion-regulatory; Respiratory metabolism; Cortisol

Ⓐ Corresponding author: SHI Zhaohong, E-mail: shizh@eastfishery.ac.cn

# 壳寡糖与低聚木糖对大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)幼鱼生长、体组成和血液生化指标的影响\*



蔡胜昌<sup>1,2</sup> 张利民<sup>2①</sup> 张德瑞<sup>3</sup> 王际英<sup>2</sup> 马晶晶<sup>2</sup>  
武明欣<sup>1,2</sup> 孙永智<sup>3</sup> 王世信<sup>3</sup>

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 山东省海洋资源与环境研究院 烟台 264006;  
3. 山东升索渔用饲料研究中心 烟台 265000)

**摘要** 本研究以初始体重为(15.46±0.06) g的大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)幼鱼为实验对象,采用2×3双因素实验设计,研究饲料中壳寡糖(Chitosan oligosaccharide, COS)和低聚木糖(Xylo-oligosaccharide, XOS)对大菱鲂幼鱼生长、体组成和血液生化指标的影响。养殖实验在全封闭循环水养殖系统中进行,养殖周期为60 d。9组实验饲料粗蛋白和粗脂肪含量分别为53%和11%;每组饲料随机投喂3桶,每桶30尾鱼。结果显示,饲料中同时添加0.5%的壳寡糖、1.0%的低聚木糖对大菱鲂幼鱼的促生长作用最明显,相对增重率显著提高。饲料中壳寡糖和低聚木糖对大菱鲂幼鱼增重率、特定生长率、饵料系数、蛋白质效率均有显著影响( $P<0.05$ ),但对大菱鲂体成分影响不显著( $P>0.05$ );低聚木糖和壳寡糖对大菱鲂幼鱼特定生长率、增重率、全鱼粗脂肪和灰分、血清甘油三酯、溶菌酶以及碱性磷酸酶均存在显著交互作用( $P<0.05$ )。研究表明,低聚木糖和壳寡糖配合使用可以显著提高大菱鲂幼鱼的生长效果,并且可在一定程度上增强其非特异性免疫能力,降低血脂含量。

**关键词** 大菱鲂; 壳寡糖; 低聚木糖; 非特异性免疫

**中图分类号** S963 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)06-0029-08

随着水产养殖的迅猛发展,功能性添加剂的应用研究越来越广泛。功能性低聚糖作为一种饲料添加剂,其结构稳定,贮藏加工中不易失活,无毒、无害、无残留,能提高动物的生长性能和抗病力,是一种新型的绿色饲料添加剂。我国农业部批准在饲料中使用的寡糖包括果寡糖、低聚木糖、甘露寡糖和糖萜素(明建华等,2008)。目前,关于功能性寡糖在水生动物饲料中的应用已经进行了大量的研究,然而,同时使用两种功能性寡糖对水生动物影响的研究在国内尚无报道。本研究选取了壳寡糖(Chitosan oligosaccharide,

COS)和低聚木糖(Xylo-oligosaccharide, XOS)作为组合,探寻其对大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)幼鱼生长、体组成和血液生化指标的影响,为大菱鲂健康养殖和研制生态环保饲料提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

大菱鲂幼鱼购自山东省烟台市蓬莱宗哲养殖有限公司,为当年同一批繁殖鱼苗,体重为(15.46±0.06) g。

\* 国家海洋生物产业-水生动物营养与饲料研发创新示范平台资金(201403004)和国家海洋公益性行业科研专项(201205025; 201205028)共同资助。蔡胜昌, E-mail: 793386301@qq.com

① 通讯作者: 张利民, 研究员, E-mail: zhanglimin@126.com

收稿日期: 2014-12-14, 收修改稿日期: 2015-01-19



壳寡糖由山东青岛博世汇力生物科技有限公司提供, 纯度 $\geq 90\%$ , 以虾、蟹壳的甲壳质为原料, 经酶解法制成; 低聚木糖由山东龙力生物科技有限公司提供, 纯度 $\geq 95\%$ , 主要成分是木二糖和木三糖。

## 1.2 实验设计

在满足大菱鲂幼鱼基本营养需求的前提下, 以鱼粉、大豆浓缩蛋白为主要蛋白源, 鱼油、大豆油为主要脂肪源, 采用 $2 \times 3$ 双因素设计, 分别在基础饲料中添加 $0(A0)$ 、 $0.5\%(A0.5)$ 、 $1.0\%(A1.0)$ 的壳寡糖和 $0(B0)$ 、 $0.5\%(B0.5)$ 、 $1.0\%(B1.0)$ 的低聚木糖, 配制成9组实验饲料(A0B0、A0B0.5、A0B1.0、A0.5B0、A0.5B0.5、A0.5B1.0、A1.0B0、A1.0B0.5和A1.0B1.0)。所有原

料分析营养成分后, 粉碎过80目筛, 按配比称量后加入适量水搅拌均匀, 经螺旋挤压机配制硬性颗粒饲料( $1.5 \text{ mm} \times 2.0 \text{ mm}$ ,  $2.5 \text{ mm} \times 3.0 \text{ mm}$ ),  $50^\circ\text{C}$ 烘干,  $4^\circ\text{C}$ 冷藏备用。饲料配方及营养成分见表1。

## 1.3 实验用鱼与饲养管理

养殖实验在山东省海洋资源与环境研究院全封闭水循环养殖系统中进行。实验前, 大菱鲂在养殖系统中驯养14 d, 期间投喂对照组饲料, 使其逐渐适应实验饲料和养殖环境。实验开始时, 实验鱼饥饿24 h, 然后称体重, 挑选出规格一致、平均初始体重为( $15.46 \pm 0.06$ ) g的大菱鲂进行分组, 随机分成9组, 每组3个重复, 每个重复30尾鱼, 分别放养于高70 cm、

表1 实验饲料配方及营养成分组成(%)  
Tab.1 Diet formulation and proximate composition(%)

原料 Ingredients	组别 Groups								
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
鱼粉 Fish meal	45	45	45	45	45	45	45	45	45
大豆浓缩蛋白 Soy protein concentrate	25	25	25	25	25	25	25	25	25
小麦粉 Wheat flour	6	6	6	6	6	6	6	6	6
鱼油 Fish oil	3	3	3	3	3	3	3	3	3
大豆油 Soybean oil	3	3	3	3	3	3	3	3	3
$\alpha$ -淀粉 $\alpha$ -Starch	8.45	8.45	8.45	8.45	8.45	8.45	8.45	8.45	8.45
羧甲基纤维素钠 CMC	5.0	4.5	4.0	4.5	4.0	3.5	4.0	3.5	3.0
甜菜碱 Betaine	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
大豆卵磷脂 Soybean lecithin	1	1	1	1	1	1	1	1	1
维生素预混料 Vitamin premix <sup>1)</sup>	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
矿物质预混料 Mineral premix <sup>2)</sup>	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
抗氧化剂 Antioxidant	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
壳寡糖 COS	0	0	0	0.5	0.5	0.5	1.0	1.0	1.0
低聚木糖 XOS	0	0.5	1.0	0	0.5	1.0	0	0.5	1.0
合计 Total	100	100	100	100	100	100	100	100	100
营养组成(干物质%) Proximate composition (Dry matter basis %)									
粗蛋白 Crude protein	53.26	53.30	53.20	53.25	53.33	53.32	53.97	53.67	53.89
粗脂肪 Crude lipid	11.44	11.50	11.58	11.40	11.34	11.59	11.70	11.83	11.87
粗灰分 Ash	10.54	10.34	10.26	10.42	10.41	10.22	10.55	10.58	10.39
总能 Gross energy(kJ/g)	19.18	19.17	19.43	19.34	19.68	19.47	19.71	20.17	20.19
蛋能比 Energy protein ratio (mg/kJ)	27.77	27.80	27.38	27.53	27.10	27.39	27.38	26.61	26.69

1) 维生素预混料(mg/kg 饲料): 维生素 A, 38.0; 维生素 D, 13.2;  $\alpha$ -生育酚, 210.0; 硫胺素, 115.0; 核黄素, 380.0; 盐酸吡哆醇, 88.0; 泛酸, 368.0; 烟酸, 1030.0; 生物素, 10.0; 叶酸, 20.0; 维生素 B<sub>12</sub>, 1.3; 肌醇, 4000.0; 抗坏血酸 500.0。2) 矿物质预混料(mg/kg 饲料): MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 3568.0; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 25568.0; KCl, 3020.5; KAl(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 8.3; CoCl<sub>2</sub>, 28.0; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 353.0; Ca-lactate, 15968.0; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 9.0; KI, 7.0; MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O, 63.1; Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, 1.5; C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Fe·5H<sub>2</sub>O, 1533.0; NaCl, 100.0; NaF, 4.0

1) Vitamin mixture (mg/kg diet): retinol acetate, 38.0; cholecalciferol, 13.2; alpha-tocopherol, 210.0; thiamin, 115.0; riboflavin, 380.0; pyridoxine HCl, 88.0; pantothenic acid, 368.0; niacin acid, 1030.0; biotin, 10.0; folic acid, 20.0; vitamin B<sub>12</sub>, 1.3; inositol, 4000.0; ascorbic acid, 500.0。2) Mineral mixture (mg/kg diet): MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 3568.0; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 25568.0; KCl, 3020.5; KAl(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 8.3; CoCl<sub>2</sub>, 28.0; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 353.0; Ca-lactate, 15968.0; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 9.0; KI, 7.0; MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O, 63.1; Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, 1.5; C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Fe·5H<sub>2</sub>O, 1533.0; NaCl, 100.0; NaF, 4.0

直径 80 cm 的圆形养殖桶中,控制水深为 40 cm 左右。微流水养殖(0.4 L/min),溶氧为 5.0–8.0 mg/L,氨氮、亚硝氮浓度<0.1 mg/L,水温为 16–18℃,pH 为 7.8–8.2,盐度为 28–30。实验期间,每天饱食投喂两次(08:30, 16:30),30 min 后,排残饵,数颗粒,计算残饵量。正式实验时间为 2014 年 2 月 28 日–2014 年 4 月 28 日,实验周期 60 d。

#### 1.4 样品采集和分析

实验开始前,随机取 10 尾大菱鲂用于常规营养成分分析。养殖实验结束前饥饿 24 h,称每桶鱼体总重,计算增重率。经 MS-222 麻醉后,每桶随机取 10 尾鱼,称量体重,测量体长。随机取 3 尾鱼用于全鱼体组成的常规分析,剩余 7 尾采集血清、肝脏、肠道及背肌样品。血清在 4℃ 静置 4 h 后,4℃ 离心(4000 r/min, 10 min),取上清液置于–80℃ 超低温冰箱中保存。其他样品均放于–20℃ 冰箱中保存。计算增重率(Weight gain rate, *WGR*)、饲料效率(Feed efficiency, *FE*)、蛋白质效率(Protein efficiency ratio, *PER*)、特定生长率(Specific growth rate, *SGR*)、肝体比(Hepatosomatic index, *HSI*)、脏体比(Visceral index, *VSI*)、肥满度(Condition factor, *CF*)等指标,计算公式如下:

增重率(*WGR*, %)

$$= 100 \times (\text{终末体重} - \text{初始体重}) / \text{初始体重}$$

饲料效率(*FE*, %) = 100 × 增重 / 饲料消耗量

蛋白质效率(*PER*)

$$= \text{增重} / (\text{摄食量} \times \text{饲料蛋白质含量} \%)$$

特定生长率(*SGR*, %/d) =  $(\ln \text{结束平均体重} - \ln \text{开始平均体重}) / \text{实验天数} \times 100\%$

肝体比(*HSI*, %) = 100 × 肝脏重量 / 鱼体重

脏体比(*VSI*, %) = 100 × 内脏重量 / 鱼体重

肥满度(*CF*, g/cm<sup>3</sup>) = 100 × 体重 / (体长)<sup>3</sup>

饲料及组织样品水分测定采用恒温干燥法(105℃),粗蛋白测定采用杜马斯(LECO, FP-528)燃烧定氮法,粗脂肪测定采用索氏抽提法,粗灰分测定采用箱式电阻炉灼烧法(550℃),能量的测定采用全自动氧弹量热仪(PARR 6100, 美国)。

血清甘油三酯(TG)、总胆固醇(TCHO)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)及低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、碱性磷酸酶(ALP)采用全自动生化分析仪(7020 型, Hitachi, 日本)进行测定,反应温度均为 37℃,所用试剂盒由北京利德曼生化技术有限公司提供。血清中溶菌酶(LSZ)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)均采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒进行测定。

#### 1.5 数据统计与分析

数据结果统一采用平均值±标准差( $X \pm SD$ )的形式表示,差异显著水平为 0.05。采用数据分析软件 SPSS 17.0 对所得数据进行双因素方差分析(Two-way ANOVA)。

## 2 结果

### 2.1 对生长性能、饲料利用效果及形体指标的影响

饲料中添加壳寡糖和低聚木糖对大菱鲂生长性能、饲料利用效果以及形体指标的影响见表 2。由表 1 可知,与对照组(T1)相比,饲料中添加单一寡糖(壳寡糖或低聚木糖)以及二者交互水平组均能显著提高大菱鲂幼鱼的增重率(*WGR*)、蛋白质效率(*PER*)、特定生长率(*SGR*)和饲料利用率(*FE*)( $P < 0.05$ )。其中,单独添加低聚木糖时,添加 1.0%的低聚木糖组促生长效果要优于 0.5%的低聚木糖组,与对照组相比,T3 组的特定生长率显著提高了 5.08%( $P < 0.05$ ),鱼体增重率显著提高了 8.7%( $P < 0.05$ ),蛋白质效率显著提高了 11.82%( $P < 0.05$ ),饲料利用率显著提高了 10%( $P < 0.05$ )。当单独添加壳寡糖时,添加 1.0%的壳寡糖促生长效果显著优于添加 0.5%的壳寡糖组( $P < 0.05$ ),与对照组(T1)相比,T7 组的特定生长率显著提高了 9.2%( $P < 0.05$ ),增重率显著提高了 15.55%( $P < 0.05$ ),蛋白质效率显著提高了 16.82%( $P < 0.05$ ),饲料系数显著降低了 17.78%( $P < 0.05$ )。当同时使用壳寡糖和低聚木糖时,0.5%壳寡糖与 1.0%低聚木糖组合(T6)以及 1.0%壳寡糖和 1.0%低聚木糖组合(T9)促生长效果最好、饲料系数最低、蛋白质效率最高,与对照组相比,特定生长率显著提高了 10.92%( $P < 0.05$ ),增重率显著提高了 18.75%( $P < 0.05$ ),蛋白质效率显著提高了 20.91%( $P < 0.05$ ),饲料系数显著降低了 17.78%( $P < 0.05$ ),促生长效果和饲料利用率均优于添加单一寡糖(壳寡糖或低聚木糖)组。

单独添加壳聚糖显著降低了大菱鲂幼鱼的肝体比( $P < 0.05$ ),提高了脏体比和肥满度。单独添加低聚木糖降低了大菱鲂幼鱼的肝体比,提高了脏体比,对肥满度无显著影响( $P > 0.05$ )。添加低聚木糖和壳寡糖降低了大菱鲂幼鱼肝体比,提高了肥满度,对脏体比影响不显著( $P > 0.05$ )。由双因素方差统计分析可知,饲料中添加不同水平的壳寡糖和低聚木糖对大菱鲂幼鱼的鱼体增重率和特定生长率存在显著的交互作用( $P < 0.05$ ),对饲料系数、蛋白质效率以及形体指标均无显著交互作用( $P > 0.05$ )。

表2 饲喂实验饲料对大菱鲂生长性能、饲料利用效果及形体指标的影响(平均值±标准差, n=3)  
Tab.2 Effects of Feeding the experimental diets on growth performance, feed utilization and physical indicator of *S. maximus* (Mean±SD, n=3)

饲料组 Dietary treatments	特定增长率 SGR(%/d)	增重率 WGR(%)	饲料系数 FCR	蛋白质效率 PER	肝体比 HIS(%)	脏体比 VSI(%)	肥满度 CF(%)
T1	1.77±0.03 <sup>a</sup>	189.45±5.64 <sup>a</sup>	0.85±0.05 <sup>d</sup>	2.36±0.16 <sup>a</sup>	1.39±0.05 <sup>b</sup>	5.38±0.26 <sup>ab</sup>	3.39±0.15 <sup>a</sup>
T2	1.79±0.03 <sup>ab</sup>	191.54±4.62 <sup>ab</sup>	0.83±0.04 <sup>cd</sup>	2.41±0.10 <sup>a</sup>	1.28±0.08 <sup>ab</sup>	5.41±0.18 <sup>ab</sup>	3.39±0.05 <sup>a</sup>
T3	1.80±0.03 <sup>ab</sup>	194.66±5.34 <sup>ab</sup>	0.82±0.01 <sup>bcd</sup>	2.43±0.03 <sup>a</sup>	1.37±0.08 <sup>b</sup>	5.41±0.20 <sup>ab</sup>	3.34±0.16 <sup>a</sup>
T4	1.81±0.01 <sup>ab</sup>	195.94±1.11 <sup>ab</sup>	0.83±0.03 <sup>bcd</sup>	2.41±0.11 <sup>a</sup>	1.22±0.09 <sup>a</sup>	5.47±0.33 <sup>b</sup>	3.46±0.15 <sup>a</sup>
T5	1.82±0.01 <sup>b</sup>	198.71±1.51 <sup>b</sup>	0.79±0.01 <sup>abc</sup>	2.49±0.02 <sup>ab</sup>	1.24±0.06 <sup>ab</sup>	5.61±0.09 <sup>b</sup>	3.40±0.10 <sup>a</sup>
T6	1.92±0.01 <sup>d</sup>	216.97±1.34 <sup>d</sup>	0.75±0.01 <sup>a</sup>	2.64±0.02 <sup>b</sup>	1.19±0.06 <sup>a</sup>	5.24±0.17 <sup>ab</sup>	3.39±0.07 <sup>a</sup>
T7	1.88±0.02 <sup>c</sup>	208.98±3.42 <sup>c</sup>	0.77±0.03 <sup>ab</sup>	2.47±0.10 <sup>a</sup>	1.12±0.07 <sup>a</sup>	5.30±0.23 <sup>ab</sup>	3.52±0.11 <sup>ab</sup>
T8	1.88±0.03 <sup>c</sup>	209.77±6.49 <sup>cd</sup>	0.77±0.01 <sup>abc</sup>	2.47±0.02 <sup>a</sup>	1.14±0.11 <sup>a</sup>	5.25±0.08 <sup>ab</sup>	3.46±0.11 <sup>a</sup>
T9	1.91±0.02 <sup>cd</sup>	214.78±3.41 <sup>cd</sup>	0.76±0.04 <sup>a</sup>	2.51±0.12 <sup>ab</sup>	1.16±0.11 <sup>a</sup>	5.04±0.14 <sup>a</sup>	3.68±0.08 <sup>b</sup>

双因素方差分析 Two-way ANOVA analysis

COS	***	***	**	*	***	*	*
XOS	***	***	*	*	ns	ns	ns
COS × XOS	**	*	ns	ns	ns	ns	ns

注: 不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ ) \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , ns: 不显著。以下表格同

Note: Different superscripted capital letters within the same column mean significant different ( $P<0.05$ ) \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , ns: non-significant. The same below

## 2.2 饲料中壳寡糖和低聚木糖水平对大菱鲂体组成的影响

从表3可知, 饲料中添加单一寡糖(壳寡糖或低聚木糖)或两种寡糖不同组合对大菱鲂幼鱼鱼体水分、粗蛋白、粗脂肪、灰分均无显著影响( $P>0.05$ )。双因素方差统计分析表明, 饲料中添加壳寡糖和低聚木糖对大菱鲂幼鱼粗脂肪、粗灰分存在明显交互作用( $P<0.05$ )。

## 2.3 饲料壳寡糖和低聚木糖水平对大菱鲂幼鱼血脂的影响

从表4可知, 与对照组相比, 添加单一寡糖(壳寡糖或低聚木糖)时, 均显著降低了甘油三酯(TG)和总胆固醇(TCHO)水平( $P<0.05$ ), 对高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)均无显著影响( $P>0.05$ )。当同时添加低聚木糖和壳寡糖时, 能降低甘油三酯(TG)水平, 但没有显著效果, 其中, T6

表3 饲喂实验饲料对大菱鲂全鱼体组成的影响(平均值±标准差, n=3)(湿重%)

Tab.3 Effects of feeding experimental diets on the final body composition of *S. maximus* (Mean±SD, n=3)(Wet weight%)

饲料组 Dietary treatments	水分 Moisture	粗蛋白 Crude protein	粗脂肪 Crude lipid	粗灰分 Ash
T1	77.22±0.45	15.75±0.21	3.31±0.32 <sup>a</sup>	3.61±0.01 <sup>b</sup>
T2	76.90±0.49	15.63±0.27	3.71±0.18 <sup>ab</sup>	3.57±0.07 <sup>b</sup>
T3	77.02±0.24	15.60±0.03	3.91±0.22 <sup>b</sup>	3.33±0.05 <sup>a</sup>
T4	76.94±0.19	15.70±0.21	3.77±0.21 <sup>ab</sup>	3.58±0.13 <sup>b</sup>
T5	76.97±0.05	15.61±0.12	3.92±0.21 <sup>b</sup>	3.44±0.10 <sup>ab</sup>
T6	76.84±0.06	15.35±0.06	3.43±0.10 <sup>a</sup>	3.54±0.10 <sup>b</sup>
T7	76.84±0.20	15.38±0.19	3.38±0.22 <sup>a</sup>	3.50±0.12 <sup>b</sup>
T8	76.40±0.08	15.67±0.05	3.59±0.97 <sup>ab</sup>	3.53±0.03 <sup>b</sup>
T9	76.68±0.28	15.46±0.08	3.45±0.42 <sup>a</sup>	3.55±0.06 <sup>b</sup>

双因素方差分析 Two-way ANOVA analysis

COS	ns	ns	ns	ns
XOS	ns	ns	ns	ns
COS × XOS	ns	ns	*	*

表 4 饲喂实验饲料对大菱鲂幼鱼血脂的影响(平均值±标准差,  $n=3$ )Tab.4 Effects of feeding experimental diets on serum lipid on *S. maximus* (Mean±SD,  $n=3$ )

饲料组 Dietary treatments	甘油三酯 TG(mmol/L)	总胆固醇 TCHO(mmol/L)	高密度脂蛋白胆固醇 HDL-C(mmol/L)	低密度脂蛋白胆固醇 LDL-C(mmol/L)
T1	4.87±0.53 <sup>b</sup>	3.94±0.74 <sup>c</sup>	3.34±0.91 <sup>bc</sup>	0.28±0.08
T2	2.68±0.01 <sup>a</sup>	2.88±0.61 <sup>a</sup>	2.68±0.11 <sup>a</sup>	0.30±0.05
T3	2.53±0.36 <sup>a</sup>	2.72±0.19 <sup>a</sup>	2.32±0.23 <sup>a</sup>	0.31±0.04
T4	1.94±0.48 <sup>a</sup>	2.87±0.61 <sup>a</sup>	2.71±0.53 <sup>a</sup>	0.30±0.02
T5	2.52±0.53 <sup>a</sup>	3.73±0.24 <sup>c</sup>	3.19±0.35 <sup>bc</sup>	0.33±0.02
T6	2.94±0.34 <sup>a</sup>	3.78±0.10 <sup>c</sup>	3.56±0.14 <sup>c</sup>	0.30±0.04
T7	2.64±0.76 <sup>a</sup>	3.41±0.53 <sup>bc</sup>	3.26±0.29 <sup>bc</sup>	0.26±0.09
T8	2.37±0.95 <sup>a</sup>	3.34±0.88 <sup>bc</sup>	3.24±0.92 <sup>bc</sup>	0.30±0.05
T9	2.92±0.96 <sup>a</sup>	3.90±0.78 <sup>c</sup>	3.69±0.61 <sup>c</sup>	0.31±0.04
双因素方差分析 Two-way ANOVA analysis				
COS	*	*	ns	ns
XOS	*	*	*	ns
COS × XOS	*	*	*	ns

和 T9 组能提高高密度脂蛋白胆固醇的含量。由双因素方差分析可知,壳寡糖与低聚木糖的交互水平对大菱鲂幼鱼血清中的甘油三酯、总胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇均有显著影响( $P<0.05$ ),对大菱鲂幼鱼血清中的低密度脂蛋白胆固醇无显著影响( $P>0.05$ )。

#### 2.4 饲料壳寡糖和低聚木糖水平对大菱鲂幼鱼血清生化指标的影响

从表 5 可知,与对照组相比,单独添加壳寡糖能显著提高大菱鲂幼鱼血清溶菌酶的活力( $P<0.05$ ),单独添加低聚木糖也能提高大菱鲂幼鱼血清溶菌酶的活力,但差异不显著( $P>0.05$ ),同时添加 1.0%的壳寡

糖和 1.0%的低聚木糖时,则会降低血清中溶菌酶的活力。大菱鲂幼鱼血清中的超氧化物歧化酶和过氧化氢酶在各处理组间均没有显著性差异( $P>0.05$ )。由双因素统计分析可知,饲料中单独添加壳寡糖、低聚木糖以及二者交互作用对大菱鲂幼鱼血清的溶菌酶、碱性磷酸酶均有显著影响( $P<0.05$ )。

### 3 分析与讨论

#### 3.1 低聚木糖和壳寡糖对大菱鲂幼鱼生长及饲料利用效果的影响

以往有关大菱鲂(李勇等,2006)、斑点叉尾鲷(齐志涛

表 5 实验饲料对大菱鲂幼鱼血清溶菌酶、碱性磷酸酶、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶的影响(平均值±标准差,  $n=3$ )Tab.5 Effects of feeding experimental diets on LSZ, ALP, SOD, and CAT of juvenile *S. maximus* (Mean±SD,  $n=3$ )

饲料组 Dietary treatments	溶菌酶 LSZ(U/ml)	碱性磷酸酶 ALP(U/L)	超氧化物歧化酶 SOD(U/ml)	过氧化氢酶 CAT(U/ml)
T1	320.93±5.93 <sup>ab</sup>	22.67±0.58 <sup>bc</sup>	91.84±1.14	4.24±0.27
T2	328.84±8.67 <sup>abc</sup>	17.00±2.64 <sup>a</sup>	80.69±7.13	3.68±0.09
T3	321.11±9.21 <sup>ab</sup>	15.00±1.73 <sup>a</sup>	78.16±8.18	4.00±0.52
T4	356.60±9.53 <sup>bc</sup>	14.33±2.31 <sup>a</sup>	84.34±2.78	4.45±0.80
T5	335.31±12.20 <sup>ab</sup>	17.67±0.58 <sup>ab</sup>	86.50±7.07	4.02±0.43
T6	332.43±5.24 <sup>abc</sup>	22.67±2.89 <sup>bc</sup>	90.34±6.49	4.87±0.89
T7	349.69±4.89 <sup>c</sup>	22.00±3.00 <sup>bc</sup>	76.61±3.38	3.81±1.00
T8	341.06±2.49 <sup>bc</sup>	18.33±5.03 <sup>ab</sup>	88.47±3.40	4.78±0.86
T9	314.46±7.95 <sup>a</sup>	26.67±2.52 <sup>c</sup>	91.65±3.97	5.08±0.51
双因素方差分析 Two-way ANOVA analysis				
COS	**	**	ns	ns
XOS	***	*	ns	ns
COS × XOS	**	**	ns	ns

等, 2011)、虹鳟(刘含亮等, 2012)、宝石鲈(宋理平, 2009)<sup>1)</sup>、罗非鱼(刘兴国等, 2004; 刘爱君等, 2009; 强俊等, 2009)、异育银鲫(熊沈学等, 2007)、凡纳滨对虾(黄燕华等, 2010)等的研究表明, 饲料中添加适宜水平的低聚木糖能显著提高鱼体增重率, 降低饲料系数。与此一致, 在本研究中, 与对照组相比, 饲料中单独添加低聚木糖, 大菱鲆的特定生长率提高了 5.08%, 增重率提高了 8.7%, 饲料系数降低了 10%, 这可能由于低聚木糖在体内发酵后被双歧杆菌和乳酸菌利用(Kimura *et al.*, 2002; Hsu *et al.*, 2004), 促进了有益菌的增殖并抑制了有害菌(周俊等, 2007; 雷浪伟等, 2005), 刺激了胃肠道上皮细胞的增生, 提高了消化酶的活性(Howard *et al.*, 1995), 促进了营养物质的吸收, 进而提高了水产动物的增重率, 降低了饲料系数。

壳寡糖是由 2-10 个氨基葡萄糖分子通过  $\beta$ -1,4-糖苷键连接而成的低聚糖, 具有广谱抗菌和促生长作用(Rinaudo, 2006)。有关大西洋鲑鱼(Refstie, 1998)、罗非鱼(刘兴国等, 2004)、异育银鲫(曹丹等, 2004)、虹鳟(刘含亮等, 2012)、吉富罗非鱼(孙立威等, 2011)等的研究表明, 饲料中添加适宜的壳寡糖能显著提高鱼体生长性能、饲料利用率。在本研究中, 与对照组相比, 饲料中单独添加壳寡糖, 大菱鲆的特定生长率提高了 9.2%, 增重率提高了 15.55%, 饲料系数降低了 17.78%。

然而, 目前未见有关于壳寡糖和低聚木糖交互作用的研究。本研究表明, 二者的交互水平在增重率上极显著高于对照组, 说明二者之间存在一定的协同作用。其促生长的机理可能是因为寡糖可调节动物胃肠道微生物区系(Oyazabal *et al.*, 1996)、维护肠黏膜的完整性、改善肠道内环境(刘爱君等, 2009), 从而提高动物生产性能和饲料利用率。

### 3.2 低聚木糖和壳寡糖对大菱鲆幼鱼体成分和形体指标的影响

张荣斌等(2011)研究显示, 奥尼罗非鱼幼鱼饲料中添加一定量的低聚木糖对其体常规成分的影响不显著。华雪铭(2005)等在饲料中添加 0.2%、0.5%、1.0% 的壳聚糖, 显著提高了暗纹东方鲀肌肉中的蛋白含量, 降低了脂肪含量, 并在一定程度上降低肝体比。与上述研究结果一致, 在本研究中, 壳寡糖和低聚木糖对大菱鲆体成分影响不显著, 但能显著降低肌肉脂肪含量, 提高肌肉蛋白含量。壳寡糖能显著降低大菱鲆的肝体比和脏体比, 显著提高肥满度, 可能是因为

壳聚糖成分中的聚葡胺链带有 4 价铵离子, 具有较高的阴离子交换性能, 能黏合胆汁酸, 阻止胆汁酸循环, 降低脂肪吸收(魏涛等, 2000), 从而相应地减少肝脏解毒的负荷。然而, 二者交互作用对全鱼体成分却有显著影响, 表明低聚木糖在一定程度上促进了壳寡糖的添加效果。

### 3.3 低聚木糖和壳寡糖对大菱鲆幼鱼血清生化指标和非特异性免疫指标的影响

比较免疫学专家认为, 非特异性免疫防御机制是鱼类抵抗病原的第一道屏障, 除皮肤、黏膜、血脑屏障外, 还包括主要反映非特异性免疫能力的 SOD 和溶菌酶等(张永安等, 2000)。SOD 在防御氧的毒性、抗衰老、抗辐射、抗肿瘤、抗炎症以及提高机体自身免疫功能等方面起着非常重要的作用(Fletcher, 1982), 宋理平(2009)<sup>1)</sup>在饲料中添加不同水平的低聚木糖, 显著降低了宝石鲈血清中血糖、甘油三酯和胆固醇含量。褚武英等(2008)在草鱼饲料中添加 0.4% 低聚木糖, 草鱼生长速度和血清总蛋白水平显著升高, 胆固醇含量显著降低。胡毅(2007)<sup>2)</sup>研究表明, 饲料中添加低聚木糖能显著降低凡纳滨对虾血清胆固醇和尿素氮含量。齐志涛等(2011)研究发现, 低聚木糖可显著降低斑点叉尾鲷血清中甘油三酯、总胆固醇、血糖含量。Lin 等(2012)研究表明, 日粮中添加 2 g/kg COS 可显著提高鲤鱼特定生长率, 显著增强血清溶菌酶活性, 从而有效抵抗病原微生物的感染。Choi 等(2012)研究表明, COS 作为壳聚糖酸解或酶解产物, 具有降血脂作用。孙立威等(2011)研究表明, 饲料中添加壳寡糖, 能在一定程度上降低吉富罗非鱼幼鱼血清 TG 和 HDL-C 的含量, 但无显著差异。徐后国等(2011)研究表明, 在每个枯草芽孢杆菌水平下, 饲料中添加 0.3% 和 0.6% 的壳寡糖显著提高了大黄鱼幼鱼血清溶菌酶的活性, 而对大黄鱼血清替代途径补体活力, 超氧化物歧化酶(SOD)活力及过氧化氢酶(CAT)活力没有显著性影响。Lee 等(1999)认为, COS 可通过与胆盐静电结合, 阻碍胆盐通过肠肝循环进行重吸收, 促使胆固醇转化为胆盐, 进而降低胆固醇含量。

本研究表明, 壳寡糖能显著降低甘油三酯的含量; 壳寡糖和低聚木糖均能在一定程度上降低总胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇, 但差异不显著, 与上述研究结果类似。壳寡糖能显著提高大菱鲆血清中溶菌酶的活性, 但降低了碱性磷酸酶

1) 宋理平. 宝石鲈营养需求的研究. 山东师范大学博士研究生学位论文, 2009

2) 胡毅. 凡纳滨对虾饲料配方优化及几种饲料添加剂的应用. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2007

和超氧化物歧化酶的活性,可能原因是壳寡糖具有抗菌活性,由于壳寡(聚)糖分子带正电荷,分子中带有游离氨基可以与细胞表面带阴离子的物质或鞭毛荚膜等结构物质发生吸附,阻碍细菌正常代谢,或者结合氢离子在细菌表面形成一层高分子膜,阻止营养物质向细菌细胞内的运输(Helander *et al.*, 2001),小分子的壳寡糖还可以通过渗透进入细胞内部与细胞内部带阴离子的物质发生吸附,干扰细菌细胞的正常代谢(徐后国等, 2011),因此,降低了ALP和SOD的活性。

#### 4 结论

本研究表明,低聚木糖和壳寡糖配合使用可显著提高大菱鲂幼鱼的生长效果,并且能在一定程度上提高其非特异性免疫能力以及调节血脂水平,二者之间有一定的协同作用。在本实验条件下,以增重率为评价指标,在大菱鲂幼鱼饲料中同时添加0.5%壳寡糖和1.0%的低聚木糖时,实验鱼取得最佳生长效果。

#### 参 考 文 献

- 华雪铭,周洪琪,张宇峰,等. 饲料中添加壳聚糖和益生菌对暗纹东方鲀幼鱼生长及部分消化酶活性的影响. 水生生物学报, 2005, 29(3): 299-305
- 刘兴国,宋理平,周洪琪. 低分子壳聚糖对罗非鱼肝组织抗氧化能力和肝脂含量影响的研究. 海洋渔业, 2004, 26(4): 291-294
- 刘含亮,孙敏敏,王红卫,等. 壳寡糖对虹鳟生长性能、血清生化指标及非特异性免疫功能的影响. 动物营养学报, 2012, 24(3): 479-486
- 刘爱君,冷向军,李小勤,等. 甘露寡糖对奥尼罗非鱼(*Oreochromis niloticus*×*O. aureus*)生长、肠道结构和非特异性免疫的影响. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2009, 35(3): 329-336
- 齐志涛,张启焕,仇明,等. 低聚木糖对斑点叉尾鲷生长及血液指标的影响. 水产科学, 2011, 30(12): 785-788
- 孙立威,文华,蒋明,等. 壳寡糖对吉富罗非鱼幼鱼生长性能、非特异性免疫及血液学指标的影响. 广东海洋大学学报, 2011, 31(3): 43-49
- 李勇,王优军,王雷,等. 不同添加剂及其组合对大菱鲂生长性能与水环境的影响. 饲料工业, 2006, 27(10): 25-28
- 张永安,孙宝剑,聂品. 鱼类免疫组织和细胞的研究概况. 水生生物学报, 2000, 24(6): 648-654
- 张荣斌,曹俊明,黄燕华,等. 饲料中添加低聚木糖对奥尼罗非鱼生长性能和血清生化指标的影响. 动物营养学报, 2011, 23(11): 2000-2008
- 明建华,刘波,周群兰,等. 功能性寡糖在水产动物饲料中的应用. 水产科学, 2008, 27(9): 490-493
- 周俊,王蓉,杨廷桂,等. 低聚木糖对肉鸭空肠菌群的影响. 黑龙江畜牧兽医, 2007(4): 62-63
- 徐后国,艾庆辉,麦康森,等. 饲料中添加枯草芽孢杆菌和壳寡糖对大黄鱼幼鱼血清免疫指标的影响. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2011, 41(Z2): 42-47
- 黄燕华,王国霞,刘襄河,等. 低聚木糖对凡纳滨对虾生长及消化道主要消化酶活性的影响. 华南农业大学学报, 2010, 31(3): 61-64
- 曹丹,周洪琪. 壳聚糖对异育银鲫的生长、蛋白质合成及肌肉营养成分的影响. 淡水渔业, 2004, 34(1): 6-9
- 强俊,王辉,李瑞伟,等. 低聚木糖对奥尼罗非鱼幼鱼生长、体成分和消化酶活力的影响. 淡水渔业, 2009, 39(6): 63-68
- 雷浪伟,李培荣,李志霞,等. 低聚木糖对模拟失重大鼠肠道微生态的影响. 中国微生态学杂志, 2005, 17(4): 244-246
- 褚武英,吴信,成嘉,等. 低聚木糖对草鱼生长性能及血液生化指标的影响. 饲料研究, 2008(6): 60-61
- 熊沈学,刘文斌,詹玉春,等. 低聚木糖梯度添加对异育银鲫生产性能的影响. 饲料研究, 2007(7): 60-62
- 魏涛,唐粉芳,高兆兰,等. 壳聚糖降血脂、降血糖及增强免疫作用的研究. 食品科学, 2000, 21(4): 48-52
- Choi CK, Kim EK, Kim YS, *et al.* Chitooligosaccharides decreases plasma lipid levels in healthy men. *Int J Food Sci Nutr*, 2012, 63(1): 103-106
- Fletcher TC. Non-specific defense mechanisms of fish. *Dev Comp Immunol*, 1982, 10(2): 123-132
- Helander IM, Nurmiaho-Lassila EL, Ahvenainen R, *et al.* Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gramnegative bacteria. *Int J Food Microbiol*, 2001, 71(2-3): 235-244
- Howard MD, Gordon DT, Garleb KA, *et al.* Dietary fructooligosaccharide, xylooligosaccharide and gum arabic have variable effects on cecal and colonic microbiota and epithelial cell proliferation in mice and rats. *J Nutr*, 1995, 125(10): 2604-2609
- Hsu CK, Liao JW, Chung YC, *et al.* Xylooligosaccharides and fructooligosaccharides affect the intestinal microbiota and precancerous colonic lesion development in rats. *J Nutr*, 2004, 134(6): 1523-1528
- Lee JK, Kim SU, Kim JH. Modification of chitosan to improve its hypocholesterolemic capacity. *Biosci Biotech Biochem*, 1999, 63(5): 833-839
- Lin SM, Mao SH, Guan Y, *et al.* Effects of dietary chitosan oligosaccharides and *Bacillus coagulans* on the growth, innate immunity and resistance of koi(*Cyprinus carpio koi*). *Aquaculture*, 2012, 342-343: 36-41
- Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and applications. *Prog Polym Sci*, 2006, 31(7): 603-632
- Oyazabal OA, Conner DE. Application of direct fed microbial bacteria and FOS for salmonella control in broilers during feed withdrawal. *Poultry Sci*, 1996, 75(2): 186-190
- Refstie S, Storebakken T, Roem AJ. Feed consumption and conversion in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with fish meal, extracted soybean meal or soybean meal with

reduced content of oligosaccharides, trypsin inhibitors, lectins and soya antigens. *Aquaculture*, 1998, 162(3-4): 301-312  
Kimura Y, Nagata YC, Buddington R. Nondigestible oligosa-

ccharides do not increase accumulation of lipid soluble environmental contaminants by mice. *J Nutr*, 2002, 132(1): 80-87

(编辑 陈辉)

## Effects of Chitosan Oligosaccharide and Xylo-oligosaccharide on the Growth Performance, Body Composition and Serum Biochemistry of Juvenile Turbots (*Scophthalmus maximus*)

CAI Shengchang<sup>1,2</sup>, ZHANG Limin<sup>2①</sup>, ZHANG Derui<sup>3</sup>, WANG Jiying<sup>2</sup>, MA Jingjing<sup>2</sup>,  
WU Mingxin<sup>1,2</sup>, SUN Yongzhi<sup>3</sup>, WANG Shixin<sup>3</sup>

(1. Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306;

2. Shandong Marine Resources and Environment Research Institute, Yantai 264006;

3. Shengsuo Fishery Feed Research Centre of Shandong Province, Yantai 265000)

**Abstract** Here we conducted a 2×3 two-factorial experiment to evaluate the effects of Chitosan oligosaccharide(COS) and Xylo-oligosaccharide(XOS) on the growth, body composition and serum biochemistry of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) with initial body weight of (15.46±0.06) g. The feeding trial lasted 8 weeks. Totally 9 diets were formulated to provide graded levels of COS (0, 0.5%, and 1.0%) and XOS (0, 0.5%, and 1.0%). The results showed that the levels of COS and XOS significantly affected the weight gain, specific growth rate, feed conversion, protein efficiency rate, muscle moisture and crude lipid of juvenile turbot ( $P<0.05$ ). The addition of COS and XOS at different levels did not generate significant differences in the body composition and the muscle ash content ( $P>0.05$ ). There were significant interactions between XOS and COS in the growth rate, weight gain, whole fish fat and ash, muscle fat and protein, serum triglycerides, high-density lipoprotein cholesterol, lysozyme and alkaline phosphatase ( $P<0.05$ ). The results above implied that the combination of XOS and COS could significantly improve the growth of juvenile turbot, moderately enhance the non-specific immunity, and facilitate the regulation of the level of the serum lipid. According to our experimental data we recommend that 0.5% COS and 1.0% XOS should be the optimal combination in the diet.

**Key words** *Scophthalmus maximus*; Chitosan oligosaccharide; Xylo-oligosaccharide; Non-specific immune

① Corresponding author: ZHANG Limin, E-mail: zhanglimin@126.com

# 饥饿对云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*) 卵黄囊期仔鱼摄食和生长的影响\*



于欢欢<sup>1,2</sup> 陈超<sup>2①</sup> 张廷廷<sup>1,2</sup> 李炎璐<sup>2</sup>  
孔祥迪<sup>1,2</sup> 刘莉<sup>1,2</sup> 马文辉<sup>3</sup>

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 农业部海洋渔业资源可持续发展重点实验室  
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 莱州明波水产有限公司 烟台 2614118)

**摘要** 研究了在水温为(23±0.5)℃, 盐度为 29–30 的培育条件下, 饥饿胁迫对云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*)仔鱼生长、摄食、存活等一系列的变化。结果显示, 2.5 日龄体长出现负增长现象, 3 日龄仔鱼开口摄食, 4.5 日龄卵黄囊和油球消耗殆尽; 仔鱼摄食率随日龄的变化呈先升高后降低, 最终为 0, 最大值出现在卵黄囊和油球消失之后的当天, 即 5.5 日龄仔鱼达到最大初次摄食率, 摄食率为 66.67%; 6 日龄仔鱼的初次摄食率为最大初次摄食率的 1/2, 仔鱼达到不可逆点, 其混合营养的时间为 2–3 d, 即仔鱼初次摄食率发生到达不可逆点的时间为 2.5 d; 云纹石斑鱼仔鱼孵化出膜后的 3–6 d 为其摄食的重要时期。

**关键词** 云纹石斑鱼; 仔鱼; 饥饿; 初次摄食率; 不可逆点

**中图分类号** S965 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)06-0037-06

云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*)属于鲈形目(Perciformes)、鲷科(Serranidae)、石斑鱼亚科(Epinephelinae)、石斑鱼属, 为暖温性中下层鱼类, 主要分布于韩国、日本、中国(至海南)和中国台湾沿岸(郭明兰等, 2008), 它的适应能力较强(黄滨等, 2013), 具有较广的温度适应范围(8–35℃)和生长水温(18–27℃), 生长迅速, 肉味鲜美, 具较高的经济价值, 是适合我国沿海工厂化养殖的优良品种之一(黄进光等, 2010)。野生的云纹石斑鱼资源较紧缺, 价格较昂贵(于佳明, 2008)。目前, 云纹石斑鱼苗种培育方式主要有室外土池粗放育苗和室内工厂化育苗(宋振鑫等, 2012), 随着其规模化繁育技术取得突破性进展(王民生, 2001), 掀起了一股石斑鱼养殖的浪潮。

初孵仔鱼无摄食能力, 依靠卵黄囊和油球提供营养物质, 为内源性营养期。随着仔鱼的生长发育, 卵

黄囊和油球逐渐被消耗吸收, 仔鱼开口摄食并依靠卵黄囊和油球提供的营养和能量生长, 此时仔鱼处于混合营养期。卵黄囊和油球被消耗殆尽后, 仔鱼需要依靠外界环境的营养物质维持生长、发育和新陈代谢, 即为外源性营养期(殷名称, 1995)。当仔鱼的卵黄囊被吸收完毕之后, 其必须建立主动摄食能力来完成内源性营养向外源性营养的转换, 来维持早期正常的新陈代谢和生长发育(单秀娟等, 2008)。当鱼类得不到外界营养物质或营养物质匮乏时, 生长、发育和繁殖都将会受到影响, 甚至会涉及个体的存亡(宋昭彬等, 1998)。很多鱼类在仔鱼期都比较脆弱和敏感, 学者们发现, 仔鱼在开口时期很容易受到饥饿的威胁(McGurk, 1984; Yúfera *et al*, 1993)。一些学者将仔鱼从内源性营养转换到外源性营养的阶段成为“危险期”或“临界期”, 饥饿也被认为是仔鱼开口期死亡

\* 科技部国际合作项目(2012DFA30360)和农业部东海海水健康养殖重点实验室开放课题(2013ESHML07)共同资助。

于欢欢, E-mail: yuhuanhuan0612@163.com

① 通讯作者: 陈超, 研究员, E-mail: ysfriuchencao@126.com

收稿日期: 2014-11-28, 收修改稿日期: 2015-03-24



的主要原因之一(殷名称, 1995)。Blaxter 等(1963)首先提出了“不可逆点”(Point-of-No-Return, PNR)的概念, 当饥饿的仔鱼抵达该不可逆点时, 即使还能生存较长一段时间, 已经虚弱的不能再恢复摄食能力, 此概念从生态学的角度描述了仔鱼摄食期耐饥饿能力和仔鱼致死的饥饿程度。不可逆点存在着差异性, 不同种属的鱼类, 其不可逆点是不同的, 在生产实践过程中, 特别是名贵海水鱼类育苗中, 若由于营养不良造成仔鱼大量死亡, 将使养殖户蒙受严重损失(殷名称, 1991)。因此, 了解掌握仔鱼营养转换期的摄食特性和规律, 有助于在苗种繁育过程中科学的进行饵料投喂和管理。石斑鱼类仔鱼口径小, 前期仔鱼游动能力差, 人工培育时, 需要转换的饵料种类较多。在育苗生产实践中, 云纹石斑鱼开口 2-3 d 内常常由于营养问题而发生大批量的死亡, 从而导致其出苗率较低。因此, 本研究从刚孵化出膜的仔鱼着手, 研究了在仔鱼的营养转换期饥饿胁迫对其生长存活的影响, 以期为生产实践提供理论指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 仔鱼来源及培育条件

本研究于 2014 年 5 月在山东省莱州明波水产有限公司进行。实验所用亲鱼为公司自养云纹石斑鱼种鱼, 经催产和人工授精获得受精卵。受精卵采用微充气、微流水孵化, 孵化水温为 21-22℃, 盐度为 29-30。仔鱼孵化出膜后, 放到容量为 120 L 的圆柱形水桶中进行培育, 分为两组, 一组为饥饿组, 另一组为对照组, 每个实验组设置 3 个平行, 各组培育条件均相同。饥饿组实验过程中不予投喂饵料; 对照组在仔鱼开口前 1 d 投喂经小球藻(*Chlorella vulgaris*)营养强化 SS 型轮虫(*Brachionus plicatilis*), 饵料密度维持 10-15 个/ml。

### 1.2 方法

**1.2.1 初次摄食率的测定** 仔鱼开口后, 每隔 12 h 测试 1 次, 从饥饿实验组中随机选取 30 尾仔鱼放入盛有 1000 ml 海水的玻璃烧杯中, 投喂饵料, 密度为 10-15 个/ml。投喂 2 h 后在尼康(Nikon)E200 显微镜下观察仔鱼的摄食情况, 解剖观察并统计消化道内饵料的数目。每隔 12 h 随机取正常对照组和饥饿实验组各 15 尾仔鱼, 在显微镜下测量其全长卵黄囊长径、卵黄囊短径、油球直径, 消化道内有饵料的个体即为摄食个体。仔鱼的初次摄食率=摄食个体数目/取样仔鱼总尾数 × 100%(柴毅等, 2012)。

**1.2.2 不可逆点的确定** 不可逆点以仔鱼的日龄来表示(贾瑞锦等, 2014)。实验过程中测得仔鱼每天的初次摄食率, 得到其初次摄食率的最大值, 当测得饥饿组仔鱼的初次摄食率下降至最大初次摄食率的一半时, 即为仔鱼的不可逆点(PNR)。卵黄囊体积的变化公式:

$$V=4/3\pi \times (r/2)^2 \times R/2 \text{ (殷名称, 1991),}$$

油球体积按圆球体积公式:

$$V=4/3 \times \pi \times (D/2)^3 \text{ (张海发等, 2009),}$$

式中,  $R$  表示卵黄囊长径,  $r$  表示卵黄囊短径,  $D$  表示油球直径, 近似计算。

**1.2.3 数据处理及分析** 实验数据以平均值±标准差(Mean ± SD)表示, 用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差(ANOVA)统计分析。

## 2 结果

### 2.1 仔鱼生长变化及营养转换

刚孵化出膜的云纹石斑鱼平均体长为(2.220±0.040) mm, 鱼体透明, 分布有少量的黑色素细胞, 卵黄囊较大且饱满, 为淡黄色, 占据鱼体的大部分体积, 长径为(0.715±0.090) mm, 短径为(0.515±0.110) mm, 体积为(0.103±0.050) mm<sup>3</sup>; 油球位于卵黄囊后端, 球形, 有折光性, 直径为(0.195±0.010) mm, 体积为(0.004±0.000) mm<sup>3</sup>; 肠管较短, 肛门与口为封闭状态。仔鱼在经历内源性营养、混合营养和外源性营养时期时, 卵黄囊、油球、体长等都发生较大变化, 其变化情况见表 1。从表 1 可以看出, 1 日龄内仔鱼的卵黄囊和油球变化最大, 消耗较明显; 0.5 日龄仔鱼卵黄囊体积为(0.066±0.010) mm<sup>3</sup>, 缩小到约为初孵仔鱼时期的 3/5, 此时, 油球体积为(0.004±0.000) mm<sup>3</sup>, 与初孵仔鱼油球体积相差不大; 仔鱼生长发育至 1 日龄时, 卵黄囊体积缩小至(0.031±0.010) mm<sup>3</sup>, 约为初孵仔鱼时期的 1/3; 此时油球体积为(0.003±0.000) mm<sup>3</sup>, 为初孵仔鱼时期的 3/4; 2 日龄时, 仔鱼体长增加但尚未开口摄食, 卵黄囊和油球消耗进一步加剧, 卵黄囊体积缩小至初孵仔鱼时期的 1/10, 油球体积缩小至初孵仔鱼时期的 1/2; 2.5 日龄时, 仔鱼体长明显减小, 3 日龄时体长又开始进一步增加, 口窝形成且张开, 仔鱼开始主动摄食, 进入到混合营养阶段; 此时卵黄囊体积为(0.002±0.000) mm<sup>3</sup>, 缩小至初孵仔鱼时期 1/57, 油球体积为初孵仔鱼时期的 1/13。4 日龄仔鱼卵黄囊和油球几乎消失殆尽, 仔鱼口裂变大, 胃肠蠕动有力, 摄食较明显。4.5 日龄仔鱼体长继续增加, 胃含物增多,

表 1 云纹石斑鱼仔鱼营养转换前后全长和油球、卵黄囊的变化

Tab.1 Total length of larvae, size of yolk sac and oil globule of *E. moara*

孵化后时间 Day after hatching(d)	仔鱼全长 Total length(mm)	油球直径 Diameter of oil globule(mm)	油球体积 Volume of oil globule(mm <sup>3</sup> )	卵黄囊长径 Long diameter of yolk sac(mm)	卵黄囊短径 Short diameter of yolk sac(mm)	卵黄囊体积 Volume of yolk sac(mm <sup>3</sup> )
0	2.220±0.040	0.195±0.010	0.004±0.000	0.715±0.090	0.515±0.110	0.103±0.050
0.5	2.612±0.100	0.194±0.010	0.004±0.000	0.594±0.020	0.461±0.030	0.066±0.010
1.0	2.650±0.080	0.175±0.020	0.003±0.000	0.435±0.060	0.360±0.040	0.031±0.010
1.5	2.711±0.060	0.171±0.020	0.003±0.000	0.425±0.040	0.350±0.030	0.027±0.010
2.0	2.730±0.280	0.160±0.010	0.002±0.000	0.295±0.050	0.275±0.050	0.012±0.010
2.5	2.646±0.220	0.146±0.020	0.002±0.000	0.254±0.030	0.225±0.030	0.007±0.000
3.0	2.918±0.130	0.073±0.040	0	0.178±0.060	0.128±0.040	0.002±0.000
3.5	2.920±0.070	0.070±0.030	0	0.065±0.070	0.055±0.060	0
4.0	2.925±0.100	0.069±0.040	0	0.028±0.060	0.028±0.050	0
4.5	2.948±0.090	0	0	0	0	0

卵黄囊和油球消耗吸收完毕,云纹石斑鱼仔鱼进入外源营养期。

## 2.2 仔鱼初次摄食率和不可逆点的确立

云纹石斑鱼进入摄食期(外源营养)之后,经不同时间的饥饿胁迫后的初次摄食率变化:3日龄仔鱼开口,口裂宽为(2.175±0.120)mm,较小,仅有轻微的上下开合,仔鱼的游动能力和捕食能力都弱,无较明显的摄食行为,仔鱼的初次摄食率为30.77%;3.5日龄时,仔鱼进一步发育,胃肠开始蠕动,仔鱼口上下开合频率变大,仔鱼的初次摄食率为41.67%;5.5日龄仔鱼口裂变大,游动能力和捕食能力增强,初次摄食率达到最大值为66.67%;随后仔鱼的初次摄食率逐渐下降,6.5日龄时仔鱼的初次摄食率为22.22%,其初次摄食率低于初次摄食率最大值的1/2,6日龄仔鱼进入不可逆点,即PNR期,即进入外源性营养期的第2天。7.5日龄仔鱼的初次摄食率为0,8日龄饥饿组仔鱼全部死亡(图1)。

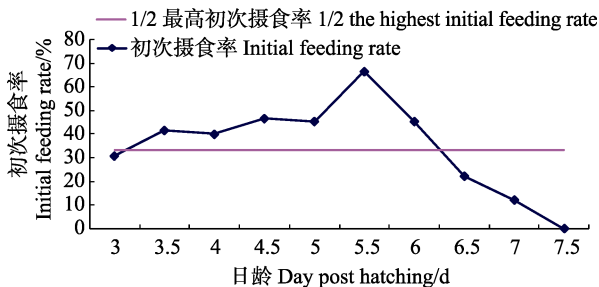


图 1 云纹石斑鱼仔鱼期初次摄食率的变化

Fig.1 Variation of initial feeding rate of *E. moara* larvae

## 2.3 饥饿组仔鱼摄食强度和形态变化

云纹石斑鱼仔鱼孵化出膜后3d开口摄食,摄食

期饥饿组仔鱼经不同饥饿时间后,其摄食强度的变化如图2。饥饿组仔鱼摄食强度的变化曲线与其仔鱼初次摄食率的变化曲线相似,其摄食强度总的变化趋势是先升高后下降,其具体变化是3日龄仔鱼刚开口,仔鱼的摄食强度较低,平均每尾仔鱼仅摄食1.31个SS型轮虫,仔鱼主动摄食能力较差。随着仔鱼生长发育,仔鱼泳动能力和捕食能力不断提高,仔鱼摄食强度逐渐增加。5.5日龄时,仔鱼的摄食强度最高,平均每尾仔鱼能摄食4个SS型轮虫,其中,最多的1尾仔鱼摄食18个SS型轮虫。6日龄仔鱼的摄食强度逐渐下降,平均每尾仔鱼摄食2个SS型轮虫,7.5日龄仔鱼的摄食强度降到最低,仔鱼摄食个数为0。

饥饿组仔鱼进入外源性营养期后,未及时从外界获得营养物质和能量的出现游动速度较慢,鱼体较瘦弱,静卧在池底不动;饥饿状态持续,出现内部器官萎缩,鱼体畸形,负增长,甚至死亡等现象。图3是饥饿组仔鱼与对照组仔鱼的形态对比。由图3可见,对照组仔鱼形态正常,消化道内饵料饱满;饥饿组仔鱼畸形较严重,脊椎弯曲,鳍膜破裂,内部器官萎缩,

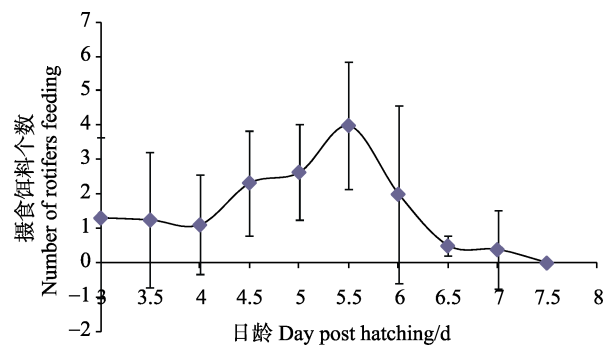


图 2 云纹石斑鱼饥饿组仔鱼开口后摄食强度变化

Fig.2 Variation in feeding intensity of *E. Moara* larvae in unfed group

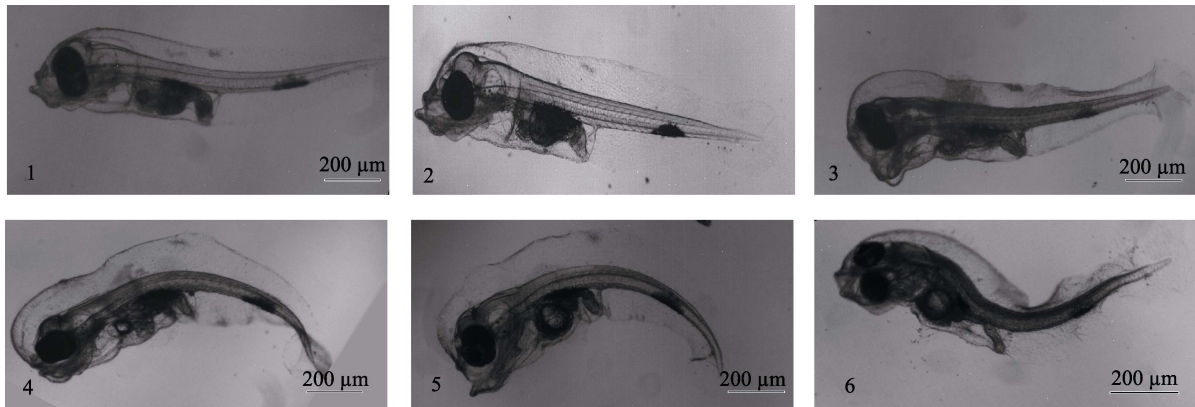


图3 云纹石斑鱼7.5龄仔鱼饥饿组与对照组形态对比

Fig.3 Morphological comparison between the fed and unfed *E. Moara* larvae 7.5 days post hatching

1、2为对照组正常仔鱼；3、4、5、6为饥饿组畸形仔鱼

1、2 control group of normal larvae; 3、4、5、6 unfed group of abnormal larvae

消化道内无饵料，仔鱼体长与对照组相比较短。

### 3 讨论

#### 3.1 云纹石斑鱼仔鱼的初次摄食和混合营养期

云纹石斑鱼仔鱼在生长发育过程中需要分别经过内源性营养期、混合营养期和外源性营养期3个阶段。在仔鱼建立完善的外源性营养之前必须经历一段混合营养期，而其发生初次摄食的时间与鱼种、水温、卵质、卵黄囊的吸收速度等多种因子相关(单秀娟等, 2008)。仔鱼混合营养期的长短也因种类和环境因素的不同而不同。大西洋鲑(*Salmo salar*)卵径为5.5 mm, 在水温为12.4℃的条件下, 41日龄仔鱼才开口摄食, 卵黄囊在71日龄时才被吸收完毕(Hansen *et al.*, 1985), 莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)卵径为2.0 mm, 在水温为28℃的条件下, 仔鱼在6-7日龄时才开口摄食, 卵黄囊在15日龄时被完全吸收(Rana, 1985), 这两种鱼类属于大型卵质, 因此, 其开口摄食时间延迟较长(单秀娟等, 2008)。云纹石斑鱼初孵仔鱼卵黄囊长径为(0.715±0.090) mm, 短径为(0.515±0.110) mm, 体积仅为(0.103±0.050) mm<sup>3</sup>, 属于少卵黄鱼类。随着仔鱼的生长发育, 卵黄囊被迅速吸收消耗, 1日龄后卵黄囊体积仅为初孵仔鱼时期的1/3; 油球的消耗速度较卵黄囊慢一些, 仅为初孵仔鱼时期的3/4; 孵化后第3天, 仔鱼已开口摄食, 但摄食能力较差, 卵黄囊缩小为初孵仔鱼时期的1/57; 4.5日龄仔鱼卵黄囊和油球消耗完毕, 仔鱼进入外源性营养阶段。由此可见, 云纹石斑鱼仔鱼的混合营养期仅为2.5 d。单秀娟等(2008)认为, 用仔鱼开口摄食到卵黄囊消耗完毕时间与仔鱼孵化出膜后到开口摄

食时间的比率来反映仔鱼的相对混合营养期, 混合营养期的长短(二者比率大于1为长, 反之为短)进一步反映仔鱼开口摄食的快慢。如红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)仔鱼4日龄开始摄食, 12日龄卵黄囊完全吸收, 因此, 仔鱼从开口摄食到卵黄囊完全吸收的时间为8 d, 仔鱼孵化出膜到开口摄食的时间为4 d, 二者的比例为2:1(>1)(姜志强等, 2002); 露斯塔野鲮(*Labeo rohita*)仔鱼从开口摄食到卵黄囊吸收完毕所用时间与仔鱼孵化出膜到开口摄食所用时间的比值为4:1(>1)(Mookeriji *et al.*, 1999); 这些鱼类有较长时间的混合营养期来提高摄食能力和积累摄食经验。但是, 云纹石斑鱼仔鱼从开口摄食到卵黄囊消耗完毕的时间为2.5 d, 仔鱼孵化出膜到开口摄食的时间为3 d, 二者的比例为5:6(<1), 属于相对混合营养期较短的鱼类。仔鱼在卵黄囊即将消耗尽前才开口摄食, 混合营养期较短, 仔鱼需要相对较长的时间来提高摄食能力和捕食经验, 因此石斑鱼仔鱼属于容易遭受饥饿威胁的鱼类。

#### 3.2 云纹石斑鱼仔鱼的PNR及饥饿状态下的生长发育

仔鱼外源性营养的开始是与搜索、摄取活饵料相关器官功能的形成以及相关的运动模式, 特别是巡游模式的建立是相适应的(强俊等, 2008)。PNR主要是从生态学的角度描述初次摄食仔鱼的耐饥饿能力, 仔鱼抵达该点的时间也受鱼卵孵化时间、卵黄容量和温度的影响, 孵化时间长、卵黄大、温度低, 则该点出现晚, 反之则早(殷名称, 1991)。云纹石斑鱼仔鱼3日龄开口摄食, 4.5日龄卵黄囊和油球消失殆尽, 此时仔鱼必须从外界环境中获取营养物质来满足自身生长发育的需求, 在此期间, 仔鱼必须从内源性营养

阶段向外源性营养阶段过度, 否则就会遭受到饥饿甚至死亡的威胁。不同种鱼类的仔鱼进入 PNR 时期的时间是不一样的, 斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)仔鱼进入 PNR 时期的时间是仔鱼孵化出膜后的第 5.5 天(张海发等, 2009); 点带石斑鱼(*Epinephelus malabaricus*)仔鱼进入 PNR 时期的时间是仔鱼孵化后的第 8 天(邹记兴等, 2003); 条纹锯鲈(*Centropristis striata*)仔鱼进入 PNR 时期的时间是孵化后第 5 天(贾瑞锦等, 2014); 云纹石斑鱼仔鱼进入 PNR 的时间为孵化出膜后第 6 天, 7.5 日龄饥饿组仔鱼的初次摄食率为 0, 8 日龄饥饿组仔鱼全部死亡, 这说明云纹石斑鱼仔鱼的 PNR 时期与饥饿仔鱼完全死亡的时间很接近, 仔鱼到达不可逆点之后很快就会面临死亡的威胁。因此, 在生产实践中, 在仔鱼进入外源性营养时期之前, 应及时投喂饵料使其积累捕食经验和建立巡游模式。

Farris(1959)曾把 4 种海水鱼类卵黄囊期仔鱼的生长划分为 3 个时期: 初孵仔鱼时期的快速生长期, 卵黄囊消失前后的慢速生长期, 不能建立外源性营养时的负增长期, 而云纹石斑鱼仔鱼卵黄囊时期全长的生长与这 3 个时期大致相符。仔鱼在经历混合营养期之后需要及时建立外源性营养, 否则会遭受到死亡的威胁。卵黄囊时期的仔鱼自身储存的营养物质和能量, 主要是用于提高自身的泳动和捕食能力, 为建立外源性营养而暂缓生长消耗(殷名称, 1991)。这点在云纹石斑鱼卵黄囊时期仔鱼的生长过程当中得到了体现, 仔鱼在开口摄食之前出现了一定的负增长现象, 这是仔鱼为其快速建立外源性营养而主动暂缓了自身生长发育对营养物质和能量的消耗。此外, 卵黄囊期仔鱼在饥饿胁迫下外部形态特征和行为发生了明显的变化, 体型比较瘦弱, 游动能力较差, 头后部下陷等, 饥饿仔鱼头部脂肪被代谢消耗, 失去浮力, 给捕食增加难度, 导致摄食量不足, 致使鱼体较虚弱并很快死亡, 这与柳敏海等(2006)对点带石斑鱼仔鱼以及 Don 等(2002)对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)的生长和发育的研究结论一致。

### 3.3 云纹石斑鱼仔鱼最适投喂时间

掌握最佳的投喂时间在生产实践当中具有至关重要的意义。投喂过早或过量同样会造成育苗过程中仔鱼的大量死亡(宋兵等, 2003)。若过早投喂, 仔鱼尚未开口且消化器官发育不完善, 因仔鱼不能摄食, 造成饵料的浪费; 若投喂过晚, 仔鱼到达 PNR 之后仍无建立外源性营养, 仔鱼非常虚弱无法进食, 进而导致仔鱼的死亡。云纹石斑鱼仔鱼 3 d 开口, 相对混合营养期较短, 属于易受饥饿威胁的鱼类, 因此, 本

研究表明, 云纹石斑鱼最适的投喂时间是孵化出膜后的 2.5–3 d。

## 参 考 文 献

- 于佳明. 石斑鱼货稀价贵前景广阔. 农村新技术, 2008, (5): 5
- 王民生. 日本七带石斑鱼和云纹石斑鱼苗种批量生产成功. 中国渔业经济, 2001, (6): 54
- 宋振鑫, 陈超, 翟介明, 等. 云纹石斑鱼生物学特性及人工繁育技术研究进展. 渔业信息与战略, 2012, 27(1): 47–53
- 宋兵, 陈立侨, 高露姣, 等. 延迟投饵对杂交鲟仔鱼生长、存活和体成分的影响. 中国水产科学, 2003, 10(3): 222–226
- 宋昭彬, 何学福. 鱼类饥饿研究现状. 动物学杂志, 1998, 33(1): 48–52
- 邹记兴, 向文洲, 胡超群, 等. 点带石斑鱼仔鱼营养转换期的摄食与生长. 高技术通讯, 2003, 13(5): 87–91
- 张海发, 刘晓春, 刘付永忠, 等. 饥饿对斜带石斑鱼卵黄囊期仔鱼摄食、存活及生长的影响. 中山大学学报(自然科学版), 2009, 48(1): 51–55
- 单秀娟, 窦硕增. 饥饿胁迫条件下黑鲷仔鱼的生长与存活过程研究. 海洋与湖沼, 2008, 39(1): 14–23
- 姜志强, 姜国建, 张弼. 红鳍东方鲀仔鱼期的摄食和生长的研究. 大连水产学报, 2002, 17(1): 20–24
- 柳敏海, 施兆鸿, 陈波, 等. 饥饿对点带石斑鱼饵料转换期仔鱼生长和发育的影响. 海洋渔业, 2006, 28(4): 292–298
- 柴毅, 危起伟, 谭凤霞. 延迟投饵对中华鲟仔鱼摄食、存活及生长的影响. 湖北农业科学, 2012, 51(23): 5432–5435
- 殷名称. 鱼类仔鱼期的摄食和生长. 水产学报, 1995, 19(4): 336–341
- 殷名称. 鱼类早期生活史研究与其进展. 水产学报, 1991, 15(4): 348–358
- 殷名称. 北海鲱卵黄囊期仔鱼的摄食能力和生长. 海洋与湖沼, 1991, 22(6): 554–560
- 贾瑞锦, 陈超, 孔祥迪, 等. 饥饿对条纹锯鲈仔鱼的存活、摄食及生长的影响. 海洋科学, 2014, 38(4): 44–49
- 郭明兰, 苏永全, 陈晓峰, 等. 云纹石斑鱼与褐石斑鱼形态比较研究. 海洋学报, 2008, 30(6): 106–114
- 黄进光, 谢恩义. 云纹石斑鱼工厂化健康育苗技术初探. 水产养殖, 2010 (4): 8–9
- 黄滨, 关长涛, 梁友. 北方海域云纹石斑鱼的陆海接力高效养殖试验. 渔业现代化, 2013, 40(2): 1–5
- 强俊, 李瑞伟, 王辉. 延迟投饵对奥尼罗非鱼仔鱼摄食、生长和存活的影响. 淡水渔业, 2008, 38(5): 60–64
- Blaxter JHS, Hempe G. The influence of egg size on herring larvae. Cons Int Explor Mer, 1963, 28: 211–240
- Farris DA. A change in the early growth rate of four larval marine fishes. Limnol Oceanogr, 1959, 4(1): 29–36
- Hansen TJ, Møller D. Yolk absorption, yolk sac constrictions, mortality, and growth during first-feeding of Atlantic salmon (*Salmo salar*) incubated on Astro-turf. Can J Fish Aquat Sci, 1985, 42(6): 1073–1078

- McGurk, MD. Effects of delayed feeding and temperature on the age of irreversible starvation and on the rates of growth and mortality of Pacific herring larvae. *Mar Biol*, 1984, 84(1): 13–26
- Mookeriji N, Rao TR. Rates of yolk utilization and effects of delayed initial feeding in the larvae of freshwater fishes rohu and singhi. *Aquacult Int*, 1999, 7(1): 45–56
- Rana KJ. Influence of egg size on the growth, onset of feeding, point-of-no-return, and survival of unfed *Oreochromis mossambicus* fry. *Aquaculture*, 1985, 46(2): 119–131
- Yúfera, M, Pascual, E, Polo A, *et al.* Effect of starvation on the feeding ability of gilthead seabream (*Sparusaurata* L.) larvae at first feeding. *J Exp Mar Biol and Ecol*, 1993, 169: 259–272

(编辑 陈严)

## Feeding and Growth of *Epinephelus moara* Larvae in the Process of Nourishing Transformation

YU Huanhuan<sup>1,2</sup>, CHEN Chao<sup>2①</sup>, ZHANG Tingting<sup>1,2</sup>, LI Yanlu<sup>2</sup>,  
KONG Xiangdi<sup>1,2</sup>, LIU Li<sup>1,2</sup>, MA Wenhui<sup>3</sup>

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. College of Fisheries and Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. Laizhou Mingbo Aquatic Co., Ltd, Yantai 261418)

**Abstract** Newly hatched larvae do not have feeding activities. Instead, they obtain nutrients from the oil globule and yolk sac during the endogenous period. The oil globule and yolk sac are gradually consumed and absorbed with the development of the larvae. Then the larvae start to feed on a combination of baits, the oil globule and yolk sac for energy, and their development progress into the mixed vegetative period. As the oil globule and yolk sac are fully consumed, the larvae develop into the exogenous vegetative stage when they acquire the nutrients solely from the external environment. Here we investigated the growth, feeding and survival of the *Epinephelus moara*. The larvae were divided into a fasting group and a control group. In the fasting group the larvae were deprived of feed, and in the control group they were fed on the 3rd day after hatching. The feeding was conducted at temperature (23±0.5)°C and salinity 29–30. We found that the body length of the larvae grouper grew negatively, and that they started feeding on the 3rd days after hatching. The yolk sac and oil globules were exhausted on the 4.5 day after hatching. We also found the initial feeding rate of the larvae changed over the days after hatching, first increased followed by a continuous decrease till 0 eventually. The maximum initial feeding rate (66.67%) appeared on the 5.5 day after hatching when the yolk sac and oil globules were completely exhausted. The initial feeding rate reduced to half of the peak value on the 6th day after hatching when the larvae reached PNR (point-of -no-return). Therefore the nutrition-mixture stage of the larvae lasted for 2.5 days, and 3-6 days after hatching should be the crucial feeding period of the larvae.

**Key words** *Epinephelus moara*; Larvae; Starvation; Initial feeding rate; Point-of -no-return

① Corresponding author: CHEN Chao, E-mail: ysfrichenchao@126.com

# 普安银鲫(*Carassius auratus gibelio*) 卵黄囊期脂蛋白脂酶和肝脂酶基因的表达 及葡萄糖、维生素 C 对其的影响\*



蒋左玉<sup>1,2</sup> 姚俊杰<sup>2①</sup> 熊铨龙<sup>1,2</sup> 安 苗<sup>2</sup> 朱忠胜<sup>2</sup> 宋 娇<sup>2</sup>

(1. 贵州省瓮安县农村工作局 瓮安 550400; 2. 贵州大学动物科学学院水产科学系  
高原山地动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室 贵阳 550025)

**摘要** 为了探讨普安银鲫(*Carassius auratus gibelio*)卵黄囊期脂蛋白脂酶(Lipoprotein lipase, LPL)和肝脂酶(Hepatic lipase, HL)的表达特点及葡萄糖和维生素 C 溶液分别浸泡对它们的影响,本研究采用荧光定量 PCR 技术检测 LPL 和 HL 基因在普安银鲫卵黄囊仔鱼发育中的表达情况及 mRNA 表达水平,并检测了葡萄糖、维生素 C 对这两种基因 mRNA 表达量的影响。结果显示, LPL 和 HL 基因在普安银鲫内源营养期、混合营养期和外源营养期均有表达,且 LPL 和 HL mRNA 表达量呈上升变化。葡萄糖组 LPL 和 HL mRNA 表达量呈上升变化,维生素 C 组也呈上升变化。在内源营养期、混合营养期和外源营养期,葡萄糖能显著上调 LPL 和 HL mRNA 的表达量( $P < 0.05$ );在内源营养期、混合营养期和外源营养期,维生素 C 能显著上调 LPL mRNA 的表达量,而 HL mRNA 的表达量在混合营养期和外源营养期显著高于对照组( $P < 0.05$ )。研究表明,普安银鲫发育至混合营养期时,机体内脂质分解代谢增强。适宜水平的葡萄糖、维生素 C 能诱导 LPL 和 HL mRNA 的表达。

**关键词** 普安银鲫; 卵黄囊期; 脂蛋白脂酶; 肝脂酶; 葡萄糖; 维生素 C

**中图分类号** S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)06-0043-06

卵黄物质的组分及比例是卵生鱼类胚胎发育和卵黄囊仔鱼期发育的物质基础,会影响鱼类受精率、孵化率及成活率,并对混合性营养期及外源性营养期仔鱼的发育及成活起重要作用(宋志东等, 2014)。脂质是卵黄物质的主要营养成分之一,作为最高的营养素,在生理条件下,其含能是蛋白质和碳水化合物的 2.25 倍左右(朱大世, 2005)<sup>1</sup>。蒋左玉等(2014a)研究表明,在普安银鲫卵黄囊仔鱼发育过程中,脂类作为此发育阶段的主要能量来源而被代谢利用,这也见于其他淡水鱼类的仔鱼发育过程中(Gunasekera *et al*, 1999; Cejasa *et al*, 2004)。脂蛋白脂酶(Lipoprotein lipase,

LPL)是动物组织中脂肪沉积的关键酶,是甘油三酯降解为甘油和游离脂肪酸反应的限速酶,在脂质代谢和转运过程中起着重要作用;而肝脂酶(Hepatic lipase, HL)主要在肝脏中合成,作用于乳糜微粒、极低密度脂蛋白代谢残粒及高密度脂蛋白中的甘油三酯和磷脂的代谢,二者合称总脂酶(Total lipase, TL)。葡萄糖作为一种广受关注的营养物质,在脂质代谢中发挥着重要作用,它能通过调控脂质代谢酶相关基因的表达来促进脂肪的合成、贮存及分解,进而影响脂肪的沉积(符自英, 2008)<sup>2</sup>。维生素 C(Vitamin C, Vc)是鱼、虾、蟹不可或缺的一种营养素和免疫刺激剂,对维持机体

\* 国家自然科学基金项目(31160527)资助。蒋左玉, E-mail: gzuzuyjiang@163.com

① 通讯作者: 姚俊杰, 教授, E-mail: junjieyao@163.com

收稿日期: 2014-11-15, 收修改稿日期: 2014-12-29

1) 朱大世. 饥饿和不同脂肪源对草鱼体脂含量及脂肪酸合成酶的影响. 华中农业大学硕士研究生学位论文, 2005

2) 符自英. 胰岛素和葡萄糖对鹅肝细胞 TG 含量及脂肪代谢相关基因表达的调控. 四川农业大学硕士研究生学位论文, 2008

正常代谢、生长具有重要作用(Lightner *et al.*, 1979)。Hwang 等(2002)和颀志刚等(2003)研究表明, 维生素 C 能通过参与肉碱的合成而间接促进脂质代谢, 同时, 通过在脂质代谢中发挥抗氧化功能来阻断脂肪的氧化链, 防止脂质过氧化。

普安银鲫(*Carassius auratus gibelio*)属鲤形目、鲤科、鲤亚科、鲫鱼属, 作为贵州省普安县青山镇一带独特高原环境条件下形成的一种天然雌核发育鲫鱼, 相关学者已对其胚胎发育特点、胚胎发育中脂酶活性变化特点、仔稚鱼生长特性、早期发育中消化道组织学及酶活性等开展了研究(梁正其等, 2013; 姚俊杰等, 2013; 蒋左玉等, 2014a、b、c; 熊铎龙等, 2014)。鉴于此, 本研究探究普安银鲫卵黄囊仔鱼发育过程中脂蛋白脂酶和肝脂酶的基因的相对表达量及葡萄糖溶液和维生素 C 溶液分别浸泡对其相对表达量的影响, 旨在初步了解普安银鲫卵黄囊期仔鱼的脂质利用规律。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验在贵州省普安县普安银鲫原种场进行。普安银鲫为母本, 兴国红鲤(*Cyprinus carpio*)为父本, 经人工催产和干法异源授精后进行人工孵化, 从受精卵至外源营养期的整个发育过程均处于相同的实验环境, 待仔鱼发育至内源营养期、混合营养期和外源营养期时, 分别对正常组(对照组)、15 g/L 葡萄糖组和 30 mg/L 维生素 C 组取样。

### 1.2 实验设计

实验中根据前期实验结果(在 15 g/L 葡萄糖溶液、30 mg/L 维生素 C 溶液中, 仔鱼的孵化率及成活率最高, 仔鱼生长最快)(熊铎龙等, 2014), 分别设置葡萄糖浓度为 0 g/L 和 15 g/L、维生素 C 浓度为 0 mg/L 和 30 mg/L 进行实验。将受精卵放置在 90 cm × 50 cm ×

55 cm 的水箱内孵化, 孵化水体中卵(仔鱼)的平均密度为 1000 粒/L(尾/L), 水温控制在 24℃, 每 8 h 全部换 1 次同温度、同浓度的实验水。每个浓度设 3 个平行组。

本实验设定 80%的胚胎发育至某个时期为取样点, 用显微镜和解剖镜连续观察, 记录发育时间和发育时期。仔鱼的内源营养期为 1 日龄, 混合营养期为 2-3 日龄, 外源营养期为 4-5 日龄(梁正其等, 2013; 姚俊杰等, 2013)。在内源营养期(1 d)、混合营养期(3 d)及外源营养期(5 d) 3 个时期分别取样, 将样品用滤纸吸干水分后放入 1.5 ml 的 Eppendorf 管中, 将采集的所有样品放入液氮中速冻, 带回实验室后, 于 -80℃ 低温保存, 用于后续实验。

### 1.3 LPL 和 HL mRNA 表达量的测定

利用 Trizol 法对普安银鲫不同时期仔鱼样品进行总 RNA 提取, 逆转录为 cDNA, 以  $\beta$ -actin 为内参作为对照。采用 SYBR Green I 法对 LPL 和 HL 基因 mRNA 表达量进行相对定量分析。分别以 LPL、HL 和  $\beta$ -actin 基因 PCR 纯化产物为模板, 用 EASY Dilution 进行 10 倍梯度稀释, 以扩增对应 LPL、HL 和  $\beta$ -actin 基因的引物进行实时荧光定量 PCR 扩增, 建立标准曲线, 获得标准曲线方程、扩增效率及曲线拟合度。反应体系为 10  $\mu$ l: Ultra SYBR Mixture (With ROX) 5  $\mu$ l, Forward-primer (0.10  $\mu$ g/ $\mu$ l) 0.2  $\mu$ l, Reverse-primer (0.10  $\mu$ g/ $\mu$ l) 0.2  $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O 2.6  $\mu$ l, cDNA 模板 2.0  $\mu$ l。实时荧光定量 PCR 反应程序: 95℃ 预变性 3 min, 95℃ 变性 10 s, 退火温度退火 30 s, 读板收集荧光, 42 个循环, 最后从 65-95℃、按 0.5℃/s 升温, 得出溶解曲线, 检测引物特异性。试验对所有样本进行 3 个重复测定, 并在每次试验时设阴性对照。引物序列见表 1。

### 1.4 数据分析

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析检验, 结果用

表 1 引物序列及扩增片段大小  
Tab.1 Primer sequences and sizes of amplified fragments

基因 Gene	退火温度 <i>T<sub>m</sub></i> (°C)	引物序列 Primer sequence(5'→3')	扩增长度 Amplification size (bp)	GenBank 登录号 GenBank Accession No.
$\beta$ -actin	59	F: TCCCTGTATGCCTCTGGTCGTA R: TGGTGAAGCTGTAGCCTCTCTC	183	NM_181601.4
LPL	55	F: ATGGACGGTCACGGGTATGT R: ATGTAGGGTAGTGCTGTTGC	127	FJ204474.1
HL	55	F: CCAGTGCGGACTTTCTTGAT R: CTCTTCATTGACTCCCTGTTA	149	FJ436064.1

平均值±标准差表示( $n=3$ ),  $P < 0.05$  表示差异显著。实验结果采用相对比较  $Ct$  法( $Qr = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ )分析, 以内参基因  $\beta$ -actin 进行标准化校正。正常组中以内源营养期为对照, 3 个取样时间的数据进行单因素方差分析和 Duncan 法多重比较; 葡萄糖组和维生素 C 组均以正常组相对应的时期为对照, 数据进行组间差异  $t$  检验。

## 2 结果

### 2.1 普安银鲫卵黄囊仔鱼发育中 $LPL$ 和 $HL$ mRNA 的相对表达量

普安银鲫卵黄囊仔鱼发育中  $LPL$  和  $HL$  mRNA 的表达水平见图 1。从内源营养期发育到外源营养期,  $LPL$  mRNA 相对表达量显著上升( $P < 0.05$ ), 混合营养期和 外源营养期的表达量分别为内源营养期的 1.351 倍和 1.519 倍。  $HL$  mRNA 表达量呈上升变化, 从内源营养期显著上升到混合营养期( $P < 0.05$ ), 随之上升到外源营养期, 且混合营养期和 外源营养期的表达量分别为内源营养期的 1.454 倍和 1.525 倍。

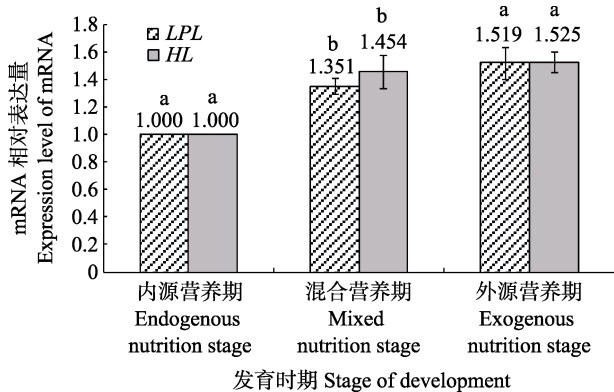


图 1 普安银鲫卵黄囊仔鱼发育中  $LPL$  和  $HL$  mRNA 的相对表达量

Fig.1 The expression level of  $LPL$  and  $HL$  mRNA during yolk-sac larva development of *C. auratus gibelio*

相同基因不同上标字母表示显著差异( $P < 0.05$ )  
Different letters for same gene mean significant difference ( $P < 0.05$ )

### 2.2 葡萄糖、维生素 C 对普安银鲫卵黄囊仔鱼发育中 $LPL$ 和 $HL$ mRNA 相对表达量的影响

葡萄糖、维生素 C 对普安银鲫卵黄囊仔鱼发育中  $LPL$  和  $HL$  mRNA 的表达量的影响见图 2。葡萄糖组和 维生素 C 组也呈上升变化。在内源营养期、混合营养期和 外源营养期, 葡萄糖能显著上调  $LPL$  和  $HL$  mRNA 的表达量

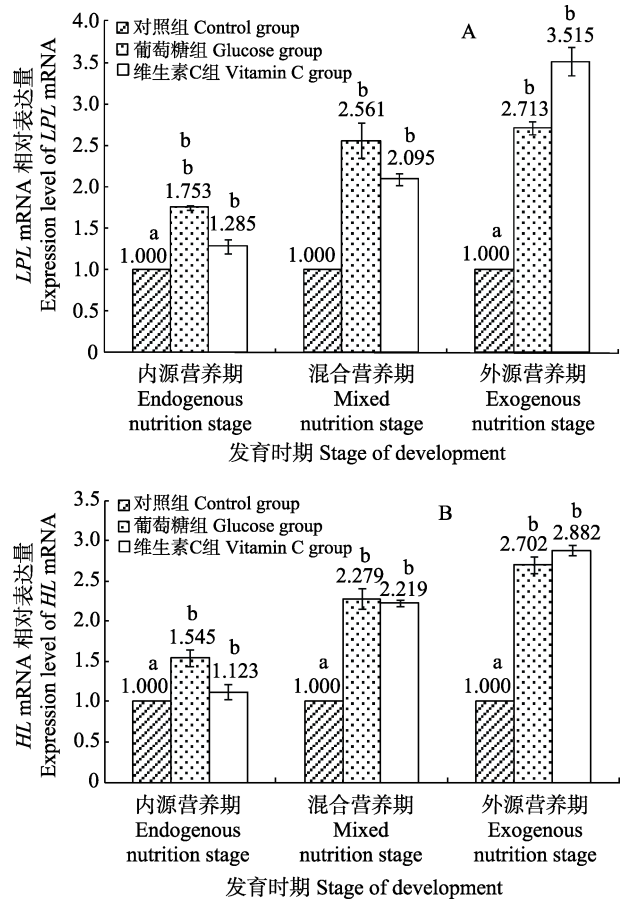


图 2 葡萄糖、维生素 C 对普安银鲫卵黄囊仔鱼发育中  $LPL$ (A)和  $HL$ (B) mRNA 相对表达量的影响

Fig.2 Effects of glucose and Vitamin C on the expression level of  $LPL$ (A) and  $HL$ (B) mRNA during yolk-sac larva development of *C. auratus gibelio*

同一时期图柱有不同上标字母表示组间差异显著( $P < 0.05$ )  
Different superscript letters in the same period of group mean significant difference ( $P < 0.05$ )

( $P < 0.05$ ); 在内源营养期、混合营养期和 外源营养期, 维生素 C 能显著上调  $LPL$  mRNA 的表达量, 而  $HL$  mRNA 的表达量在混合营养期和 外源营养期显著高于对照组( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

在脂质代谢中, 参与合成与分解代谢的脂质均需要经过血液中的乳糜微粒和极低密度脂蛋白等多种脂蛋白的携带完成转运, 被转运的甘油三酯到达脂肪和肌肉组织后, 需由一系列酶及辅助因子的参与, 分解并释放出脂肪酸, 在脂肪组织和肌肉的脂肪细胞中合成脂肪贮存或氧化供能。在此过程中,  $LPL$  发挥着关键的调控作用, 它通常以同源二聚体的形式, 发挥甘油三酯水解酶及在受体介导的脂蛋白摄入时作为配



体或桥接因子的双重功能(吉红等, 2009)。Oku 等(2006)和朱俊华等(2014)研究表明, *LPL* 基因存在营养诱导性表达, 饥饿、高脂食物均是其表达诱导因子。脂质作为高能量物质, 当鱼类在饥饿状态时, 机体能量需求增多, 机体会通过消耗脂肪或蛋白质以获得维持生存的能量。为了满足能量的需要, 将动员贮存于脂肪组织细胞中的甘油三酯, 产生游离脂肪酸和甘油, 从脂肪组织中扩散进入血液, 产生能量, 这一过程主要是分解代谢(朱大世, 2005)<sup>1)</sup>。本研究结果表明, *LPL* mRNA 表达量呈上升变化, 在混合营养期时, 仔鱼虽已开口摄食, 但由于该时期仔鱼的摄食器官和消化器官均发育不太完善(梁正其等, 2013; 姚俊杰等, 2013), 摄食能力和消化能力都较弱, 因此, *LPL* 基因在饥饿过程中表达水平增加, 提示 *LPL* 在饥饿后水解甘油三酯, 为机体抵抗饥饿提供能量。仔鱼完全转入外源营养以后, 其摄食和消化能力有所加强(梁正其等, 2013), 外源营养的进入诱导了 *LPL* mRNA 的表达。*HL* 和 *LPL* 均属酯酶家族, 合称总脂酶。*HL* 是血液循环中内源性甘油三酯代谢有关酶之一, 具有多种脂酶活性, 几乎能水解各类脂蛋白中的甘油三酯、甘油二酯、甘油一酯及磷脂。对瓯江彩鲤(*Cyprinus carpio* var. *color*)早期发育过程中 *HL* 活性的研究表明, 随早期发育的进行, 其活性呈上升趋势, 且由于外源营养的诱导, 使其活性在仔鱼发育到外源营养期时达到最大值(朱俊华等, 2014)。本研究结果表明, 普安银鲫卵黄囊仔鱼发育中 *HL* mRNA 表达量呈上升变化, 这可能与仔鱼的各器官及系统(血液循环系统)不断趋于完善, 加之仔鱼开口摄食后外源营养物质进入血液中为 *HL* 提供一定量的底物有关(梁正其等, 2013; 姚俊杰等, 2013), 但具体原因还有待进一步研究。

葡萄糖不仅是一个能量源, 也能参与调控碳水化合物和脂肪代谢(Dentin *et al.*, 2005)。Brauge 等(1995)用放射性元素标记的葡萄糖喂虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*), 发现其可以把食物中的葡萄糖转化为体内的脂肪来储存。而鱼类能够调节酶的合成与分泌来形成新的代谢水平, 以适应营养条件的改变。糖可通过刺激脂肪分解相关酶的活性, 加强脂肪的分解供能作用(苗惠君等, 2014)。在吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)幼鱼饲料中糖添加水平分别为 30%和 20%时, *HL* 和

*LPL* 活性均达到峰值, 分别为 683.15 和 481.81 U/L(蒋利和等, 2013), 表明适宜的糖水平能提高脂质分解酶活性来分解利用脂质, 以确保机体内脂质代谢的动态平衡。Sartippour 等(2000)研究表明, 葡萄糖能诱导 *LPL* 基因的表达。本研究结果表明, 葡萄糖组 *LPL* 和 *HL* 的 mRNA 水平均显著高于对照组, 其可能原因为机体内脂质的代谢包括合成代谢和分解代谢, 当机体内合成代谢加强时, 分解代谢也会随之增强。在高糖条件下, *LPL* 的 mRNA 水平提高, 会使 *LPL* 对甘油三酯(Triglyceride, TG)的水解加剧, 减少 TG 的外运, 使更多的脂肪被组织利用和贮存(符自英, 2008)<sup>2)</sup>, 说明适宜水平的葡萄糖可以通过调节脂质代谢酶的表达来维持机体内脂质代谢的动态平衡。

研究表明, 维生素 C 可促进蛋白质和脂质的良性循环, 促进能量代谢, 同时, 其可通过参与肉碱的合成而间接促进脂质代谢(Hwang *et al.*, 2002; 颀志刚等, 2003)。本研究结果显示, 维生素 C 组 *LPL* 和 *HL* 的表达均高于对照组, 其可能原因有三个: 其一, 采用适宜浓度的维生素 C 溶液浸泡普安银鲫卵黄囊仔鱼, 降低了机体的损伤, 提高了普安银鲫卵黄囊仔鱼的免疫力, 从而为整个发育过程中正常的代谢提供了保障(蒋左玉等, 2014); 其二, 维生素 C 可能在脂质代谢中发挥了抗氧化功能(Hwang *et al.*, 2002); 其三, 维生素 C 通过参与肉碱的合成而间接促进了脂质代谢, 但具体原因还有待进一步研究。

## 参 考 文 献

- 吉红, 苏尚顺, 刘茜, 等. 草鱼 *LPL* 基因的表达及饥饿和再投喂对其影响. 水产学报, 2009, 33(6): 980-986
- 朱俊华, 姚俊杰, 冯亚楠, 等. 瓯江彩鲤早期发育中两种脂酶活性及间甲酚对其活性的影响. 淡水渔业, 2014, 44(1): 32-35
- 宋志东, 李培玉. 卵生鱼类的内源性营养研究进展(一). 饲料与畜牧, 2014, 9: 20-24
- 苗惠君, 聂琴, 苗淑彦, 等. 不同类型糖源对大菱鲆脂肪代谢酶活性和脂肪酸组成的影响. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2014, 44(4): 22-28
- 姚俊杰, 梁正其, 冯亚楠, 等. 普安银鲫消化系统胚后发育的组织学观察. 贵州农业科学, 2013, 41(11): 152-155
- 梁正其, 姚俊杰, 熊铎龙, 等. 普安银鲫仔稚鱼的发育及生长

1) 朱大世. 饥饿和不同脂肪源对草鱼体脂含量及脂肪酸合成酶的影响. 华中农业大学硕士研究生学位论文, 2005

2) 符自英. 胰岛素和葡萄糖对鹅肝细胞 TG 含量及脂肪代谢相关基因表达的调控. 四川农业大学硕士研究生学位论文, 2008

- 研究. 水产科学, 2013, 32(7): 380–384
- 颀志刚, 牛翠娟. 维生素 C 在鱼类营养与饲料研究中的重要作用及应用. 饲料广角, 2003(13): 29–32
- 蒋利和, 吴宏玉, 黄凯, 等. 饲料糖水平对吉富罗非鱼幼鱼生长和肝代谢功能的影响. 水产学报, 2013, 37(2): 245–255
- 蒋左玉, 姚俊杰, 熊铎龙. 普安银鲫早期发育过程中消化酶活性变化及外源维生素 C 对其的影响. 动物营养学报, 2014a, 26(5): 1246–1253
- 蒋左玉, 姚俊杰, 安苗, 等. 普安银鲫胚胎发育中两种脂酶活性及葡萄糖对其活性的影响. 淡水渔业, 2014b, 44(4): 3–6
- 蒋左玉, 安苗, 姚俊杰, 等. 维生素 C 对普安银鲫胚胎发育中两种脂酶活性的影响. 水产学杂志, 2014c, 27(3): 28–32
- 熊铎龙, 姚俊杰, 安苗, 等. 葡萄糖、维生素 C 对普安银鲫早期发育的影响. 南方水产科学, 2014, 10(6): 89–92
- Brauge C, Corraze G, Médale F. Effects of dietary levels of carbohydrate and lipid on glucose oxidation and lipogenesis from glucose in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, reared in freshwater or in seawater. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 1995, 111(1): 117–124
- Cejasa JR, Almansab E, Jérezs S, *et al.* Changes in lipid class and fatty acid composition during development in white sea bream (*Diplodus sargus*) eggs and larvae. *Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol*, 2004, 139(2): 209–216
- Dentin R, Girard J, Postic C. Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. *Biochimie*, 2005, 87(1): 81–86
- Gunasekera RM, De SS, Ingram BA. Early ontogeny-related changes of the fatty acid composition in the Percichthyid fishes trout cod, *Maccullochella macquariensis* and Murray cod, *M. peelii peelii*. *Aquat Living Resour*, 1999, 12(3): 219–227
- Hwang DF, Lin TK. Effect of temperature on dietary vitamin C requirement and lipid in common carp. *Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol*, 2002, 131(1096–4959): 1–7
- Lightner DV, Hunter B, Magarelli PC, *et al.* Ascorbic acid: nutritional requirement and role in wound repair in penaeid shrimp // *Proceedings of the World Mariculture Society*. Blackwell Publishing Ltd, 1979, 10(1–4): 513–528
- Oku H, Koizum IN, Okumura T, *et al.* Molecular characterization of lipoprotein lipase, hepatic lipase and pancreatic lipase genes: Effects of fasting and refeeding on their gene expression in red sea bream *Pagrus major*. *Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol*, 2006, 145(2): 168–178
- Sartippour MR, Renier G. Differential regulation of macrophage peroxisome proliferator-activated receptor expression by glucose role of peroxisome proliferator-activated receptors in lipoprotein lipase gene expression. *Arterioscl Throm Vas*, 2000, 20(1): 104–110

(编辑 冯小花)

## The Effects of Glucose and Vitamin C on the Gene Expression of Lipoprotein Lipase and Hepatic Lipase During the Development of the Yolk-Sac Larva of *Carassius auratus gibelio*

JIANG Zuoyu<sup>1,2</sup>, YAO Junjie<sup>2①</sup>, XIONG Hualong<sup>1,2</sup>, AN Miao<sup>2</sup>, ZHU Zhongsheng<sup>2</sup>, SONG Jiao<sup>2</sup>

(1. Rural Work Bureau of Wengan County, Guizhou Province, Wengan 550400; 2. Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction in the Plateau Mountainous Region, Ministry of Education; Department of Fisheries Science, College of Animal Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025)

**Abstract** In this study we investigated the expression patterns of lipoprotein lipase and hepatic lipase genes, as well as the effects of the glucose solution and the vitamin C solution on its regulation during the development of the yolk-sac larva of *Carassius auratus gibelio*. In the preliminary experiments, the membrane break time and hatching rates were recorded to determine the optimal concentrations of glucose and vitamin C. Solutions without (control group) and with glucose (optimal concentration 15 g/L glucose group) or vitamin C (optimal concentration 30 mg/L vitamin C group) were used for hatching, and the gene expression patterns of lipoprotein lipase and hepatic lipase were analyzed. Real-time PCR was applied to measure the mRNA level of lipoprotein lipase and hepatic lipase, and to test how glucose and vitamin C regulated the expression of two genes during the development of the yolk-sac larva. We found that genes of lipoprotein lipase and hepatic lipase were expressed at the endogenous nutrition stage, the mixed nutrition stage and the exogenous nutrition stage, and that the expression was increased over time. The mRNA levels of both lipoprotein lipase and hepatic lipase were up-regulated from the endogenous nutrition stage to the exogenous nutrition stage in the group treated with 15 g/L glucose ( $P<0.05$ ). Similarly they were also re-regulated from the endogenous nutrition stage to the exogenous nutrition stage in the group treated with 30 mg/L vitamin C, which caused a significant increase in the expression of lipoprotein lipase mRNA during the yolk-sac larva developmental stage. Vitamin C increased the expression of hepatic lipase mRNA during the mixed nutrition stage and the exogenous nutrition stage ( $P<0.05$ ). Our study suggested that the lipid catabolism of *C. auratus gibelio* increased during the mixed nutrition stage, and that appropriate concentrations of glucose (15 g/L) and vitamin C (30 mg/L) could induce the mRNA expression of lipoprotein lipase and hepatic lipase.

**Key words** *Carassius auratus gibelio*; Yolk-sac larva stage; Lipoprotein lipase; Hepatic lipase; Glucose; Vitamin C

① Corresponding author: YAO Junjie, E-mail: junjieyao@163.com

# 病原性鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*) 双重 PCR 与 LAMP 检测方法的建立\*



孙晶晶<sup>1</sup> 高晓建<sup>1</sup> 张晓君<sup>1,2①</sup> 马丽娜<sup>3①</sup> 阎斌伦<sup>1</sup>  
白雪松<sup>1</sup> 赵佳铭<sup>1</sup> 毕可然<sup>1</sup> 秦蕾<sup>1</sup>

(1. 淮海工学院 连云港 222005; 2. 扬州大学动物科学与技术学院 扬州 225009;  
3. 吉林大学再生医学研究所 长春 130021)

**摘要** 本研究检测了分离自发病大菱鲆、半滑舌鳎及鲤鱼的 22 株病原鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*) 毒力相关基因的携带情况,并建立了病原鳃弧菌的分子生物学检测方法。以 PCR 方法检测 8 个毒力相关基因的分布,结果显示,22 株病原鳃弧菌均可扩增出 6 个基因(*empA*、*vah1*、*vah4*、*flaA*、*rtxA* 和 *tonB*)目的条带,未扩增出 *virA* 和 *angM* 基因;针对 *vah4* 和 *rtxA* 设计引物进行双重 PCR 扩增,同一 PCR 反应体系可扩增出两条目的条带,灵敏度为  $2.4 \times 10^3$  CFU/ml,对照菌无任何扩增条带;以 *vah4* 设计引物进行 LAMP 扩增,病原鳃弧菌可扩增出阶梯状条带,呈现阳性反应,6 株对照菌无阶梯状扩增条带且呈现阴性反应,LAMP 扩增灵敏度为  $2.4 \times 10^1$  CFU/ml。LAMP 检测灵敏度是双重 PCR 的 100 倍,LAMP 技术与 PCR 比较,操作简便、快速、灵敏度高且不需昂贵仪器,LAMP 检测鳃弧菌的方法更适合于养殖生产实际应用。

**关键词** 鳃弧菌;毒力相关基因;双重 PCR;环介导恒温扩增技术(LAMP)

**中图分类号** Q522 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)06-0049-07

鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)亦称鳃利斯顿氏菌(*Listonella anguillarum*),是海淡水环境及鱼体微生物区系中的正常菌群,为条件致病菌;同时,鳃弧菌也是引起鱼类弧菌病的高致病性的主要细菌性病原,当水温适宜、营养丰富时,其数量剧增,宿主养殖密度过大、应激状态如感染、损伤、低溶氧量时,常暴发鳃弧菌病(Bolinches *et al*, 1986; Bowser *et al*, 1981)。鳃弧菌可经消化道、鳃以及受损的皮肤侵入鱼体(Wang *et al*, 1998),可导致牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)、鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)等多种鱼类的败血症(莫照兰等, 2002; Mo *et al*, 2001; 张晓君等, 2006、2009)。患病鱼体表最初出现局部褪色,鳍条、

鳍基部及鳃骨下部充血发红,肛门红肿,继而肌肉组织有弥散性或点状出血,体表发黑,鳍基部出现溃烂;消化道膨胀并充满液体,解剖时有明显的黄色粘稠腹水,肠粘膜组织腐烂脱落,部分鱼肝脏坏死;个别病鱼体表出现大面积的溃疡症状或局部膨胀病灶,膨隆处肌肉溃烂,剪破皮肤有脓状组织坏死物流出,发展成为出血性败血症的病鱼大多在较短时间内(7 d)死亡,死亡率为 30%~100%。此外,该病原菌能引起世界范围内的多种贝类及甲壳类等发生相应的弧菌病(Vibriosis)(吴后波等, 2001)。

因此,明确鳃弧菌的毒力相关基因并以毒力基因作为分子靶标建立快速检测方法,对鳃弧菌引起的水产动物疾病的诊断、预防及治疗具有重要的现实意义

\* 江苏省高校自然科学研究重大项目(14KJA240001)、江苏省水产三项工程项目(Y2014-35; D2013-5-4)、江苏高校优势学科建设工程项目(2014)和教育部留学回国人员科研启动基金共同资助。孙晶晶, E-mail: y0741810@126.com

① 通讯作者: 张晓君, 教授, E-mail: zxj9307@163.com; 马丽娜, 教授, E-mail: malan@jlu.edu.com

收稿日期: 2014-12-16, 收修改稿日期: 2015-01-11

义。目前,国内外学者通过分子生物学水平的研究发现,鳃弧菌的致病性是由许多毒力因子相互作用而形成的一套复杂机制,这些毒力因子主要包括质粒编码的铁吸收系统、细胞外溶血毒素、重复序列毒素、细菌鞭毛蛋白、胞外蛋白酶、细胞表面成分等(Frans *et al.*, 2011)。本研究选取鳃弧菌的 8 个毒力基因分别为:铁吸收系统核糖体多肽合成酶毒力因子 *angM* 基因、铁离子弧菌素复合体转运毒力因子 *tonB* 基因、细胞外溶血毒素毒力因子 *vah1* 和 *vah4* 基因、细菌鞭毛蛋白毒力因子 *flaA* 基因、胞外锌金属蛋白酶侵袭因子 *empA* 基因、细胞表面成分抗原合成有关蛋白毒力因子 *virA* 基因及重复序列毒素 *rtxA* 基因,检测了鳃弧菌分离株中毒力基因的携带情况,建立了双重 PCR 与 LAMP 两种快速检测病原鳃弧菌的方法,并进行了比较研究,旨在为水产养殖中病原鳃弧菌快速检测及分子流行病学研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株

供试 22 株鳃弧菌分离自发病大菱鲆、半滑舌鲷和鲤鱼(*Cyprinus carpio*),已通过致病性、表型及分子鉴定(张晓君等, 2006、2009),本实验室保存供用;阴性对照菌需钠弧菌(*Vibrio natriegen*)、哈氏弧菌(*Vibrio harveyi*)、美人鱼弧菌(*Vibrio damsela*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholera*)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、河口弧菌(*Vibrio aestuarianus*)均分离自发病水生动物,本实验室保存,菌株编号及来源见表 1。

### 1.2 引物设计与合成

根据文献及 GenBank 已收录的鳃弧菌毒力基因序列,利用 Primer Premier 5.0 和 Oligo 6.0 软件设计 PCR 特异性引物(表 2);以鳃弧菌毒力基因 *vah4* 为靶序列,利用 Primer Explorer V4 软件设计 LAMP 4 条

特异性引物(表 2),各引物均由上海生物工程技术公司合成。

### 1.3 细菌模板 DNA 的制备

将供试菌株接种于营养肉汤培养基中,28℃培养 18 h,取 2 ml 菌悬液,按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒(上海赛百盛生物工程有限公司)所述方法提取的 DNA 作为 PCR 及 LAMP 扩增模板,-20℃保存备用。

### 1.4 毒力基因检测

以表 2 中 PCR 引物分别对鳃弧菌及对照菌株 DNA 模板进行扩增。20 μl 反应体系:2×Power Taq PCR MasterMix 10 μl,正反引物各 0.5 μl,模板 DNA 1 μl,无菌双蒸水 8 μl;扩增条件:95℃预变性 5 min;95℃变性 1 min,复性 45 s(*empA*、*vah1* 和 *vah4* 复性温度为 55℃, *virA*、*flaA* 和 *angM* 复性温度为 54℃, *rtxA* 复性温度为 56℃, *tonB* 复性温度为 53℃),72℃延伸 1 min,循环 30 次;最后 72℃延伸 10 min,4℃保温。扩增后的 PCR 产物,用 1.0%琼脂糖凝胶电泳。

### 1.5 双重 PCR 及 LAMP 扩增条件的优化及特异性检测

选择鳃弧菌 *vah4* 和 *rtxA* 基因的两对引物对模板 DNA 进行双重 PCR 扩增,优化引物浓度和退火温度,确定鳃弧菌双重 PCR 最佳反应条件;以鳃弧菌 *vah4* 基因的外引物(F3 和 B3)和内引物(FIP 和 BIP)对模板 DNA 进行恒温扩增,优化出鳃弧菌 LAMP 最佳反应条件。以需钠弧菌、哈氏弧菌、美人鱼弧菌、霍乱弧菌、副溶血弧菌及河口弧菌作为对照菌株,检验引物的特异性。LAMP 产物一部分用琼脂糖凝胶电泳检测,另一部分加入 SYBR Green I 荧光染料后观察反应液的颜色变化以判断结果。

### 1.6 双重 PCR 及 LAMP 扩增的灵敏性检测

以菌液稀释方法进行灵敏性试验。将鳃弧菌各菌

表 1 供试菌株来源  
Tab.1 Origin of strains used in the study

菌株编号 Strain No.	菌名 Species	来源 Origin
S010610-1-S010610-10, S010623-1-S010623-10	鳃弧菌 <i>V. anguillarum</i>	大菱鲆 <i>S. maximus</i>
BH1	鳃弧菌 <i>V. anguillarum</i>	半滑舌鲷 <i>C. semilaevis</i>
LD080323	鳃弧菌 <i>V. anguillarum</i>	鲤鱼 <i>Cyprinus carpio</i>
JGB080708-1	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>
S090801	哈氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	矛尾复鰕虎鱼 <i>Synechogobius hasta</i>
ST1	美人鱼弧菌 <i>V. damsela</i>	半滑舌鲷 <i>C. semilaevis</i>
JL120508	需钠弧菌 <i>V. natriegen</i>	日本对虾 <i>Penaeus japonicus</i>
LD081008B-1	霍乱弧菌 <i>V. cholerae</i>	泥鳅 <i>Misgurnus anguillicaudatus</i>
TS1	河口弧菌 <i>V. aestuarianus</i>	半滑舌鲷 <i>C. semilaevis</i>

表 2 引物序列  
Tab.2 Sequence of primers

基因 Gene	产物长度 Product size(bp)	引物序列 Primers sequence (5'-3')	参考文献 Reference /GenBank No.
<i>empA</i>	248	F: CCTTTAACCAAGTGGGCGTA R: CGATTTGTAAGGGCGACAAT	陈吉祥等, 2005
<i>vah1</i>	493	F: TGCGCTATATTGTCGATTTTCAGTT R: GCACCCGTTGTATCATCATCTAAG	Rodkhum <i>et al</i> , 2006
<i>vah4</i>	603	F: ATGAAAACCATACGCTCAGCATCT R: TCACGCTTGTTTTTGGTTTAAATGAAATCG	Rodkhum <i>et al</i> , 2006
<i>rtxA</i>	441	F: GCCTTCTTCGCCTAAACCT R: ATTCGAGCCACTACCAG	GenBank, EU155486
<i>virA</i>	468	F: TTATTGGGCCTTTCGATACTG R: CTGGGTAACCTGTCCGATTATC	鲁雪, 2010 <sup>1)</sup>
<i>angM</i>	500	F: CCTGAAGTTGAGCCTCGTAAG R: CGCTTTGATGCTGAAGTTGAC	鲁雪, 2010 <sup>1)</sup>
<i>flaA</i>	435	F: GTGCTGATGACTTCCGTATGG R: GCTCTGCCCGTTGTGAATC	鲁雪, 2010 <sup>1)</sup>
<i>tonB</i>	195	F: GGCGTAGAAGGTTTCGTT R: CTCCACAGTCACGGTTTG F3: TTGACCAACCTGCCGATG B3: GCATCAAAGCATGCAGTGG	GenBank, AY644719
<i>vah4</i>	LAMP	FIP: ACGACAAAAGAGGCCAGTTGATTTTCGAGCGTTTTGATTGCC BIP: TCGGCGCTGCACTTTACTTTGATTTTCGTTGCTGTAAAAACGCACC	GenBank, AB189397

株培养至对数生长期, 平板计数。菌液 10 倍比梯度稀释为  $2.4 \times 10^8$ 、 $2.4 \times 10^7$ 、 $2.4 \times 10^6$ 、 $2.4 \times 10^5$ 、 $2.4 \times 10^4$ 、 $2.4 \times 10^3$ 、 $2.4 \times 10^2$ 、 $2.4 \times 10^1$ 、 $2.4 \times 10^0$  CFU/ml, 提取模板 DNA 后按照上述建立的双重 PCR 与 LAMP 检测方法进行灵敏性检测。

### 1.7 鳃弧菌双重 PCR 与 LAMP 检测的应用

取市场水产品泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)、半滑舌鳎(*C. semilaevis*)、缢蛏(*Sinonovacula constricta*)、中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)、日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)、毛蚶(*Scapharca subcrenata*)、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)、文蛤(*Lioconcha castrensis*)、小黄鱼(*Larimichthys polyactis*)、长牡蛎(*Crassostrea gigas*)肌肉组织匀浆, 匀浆液人工感染鳃弧菌, 之后增菌培养 4 h。按照 1.3 方法提取 DNA, 并按照 1.5 建立的双重 PCR 和 LAMP 方法检测, 对照组为未染菌的肌肉组织匀浆液, 琼脂糖凝胶电泳和荧光染料 SYBR Green I 检测试验结果。

## 2 结果

### 2.1 鳃弧菌毒力基因

分离自大菱鲂、半滑舌鳎和鲤鱼的 22 株病原鳃

弧菌基因组 DNA 均可扩增出 *empA*、*vah1*、*vah4*、*flaA*、*rtxA* 及 *tonB* 基因条带, 未扩增出 *virA* 和 *angM* 基因条带, 未加模板阴性对照无任何扩增条带, 表明供试 22 株病原鳃弧菌携带 *empA*、*vah1*、*vah4*、*flaA*、*rtxA* 及 *tonB* 6 种毒力基因, 这些分子标记可用于该菌的初步检测, 图 1 为选择的代表菌株 S010610-1 毒力基因的检测结果。

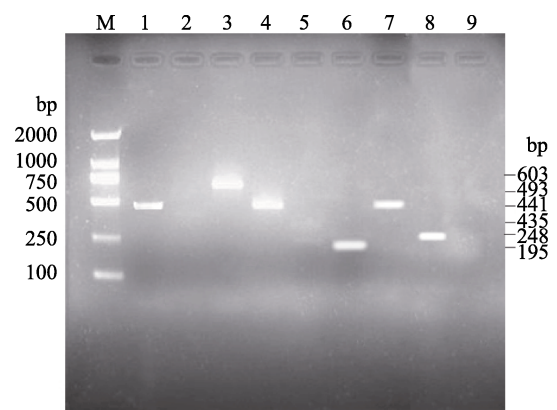


图 1 鳃弧菌毒力基因 PCR 扩增结果  
Fig.1 PCR amplification result of virulence genes of *V. anguillarum*

M. DL2000; 1. *vah1*; 2. *virA*; 3. *vah4*; 4. *rtxA*; 5. *angM*; 6. *tonB*; 7. *flaA*; 8. *empA*; 9. 对照 Control

1) 鲁雪. 鳃弧菌 6 个毒力基因的多重 PCR 与基因芯片检测技术的建立以及创新检测技术的初步探索. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2010

## 2.2 鳃弧菌双重 PCR 及 LAMP 检测方法的建立

经过优化之后的双重 PCR 反应体系(20  $\mu$ l): 2 $\times$  Power Taq PCR MasterMix 10  $\mu$ l, *vah4* 和 *rtxA* 两对正反引物各 0.25  $\mu$ l (10  $\mu$ mol/L), 模板 1  $\mu$ l, 无菌双蒸水 8  $\mu$ l; 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 退火 45 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 次循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保温。

经过优化之后的 LAMP 反应体系(25  $\mu$ l): 10 $\times$  Thermopol buffer 2.5  $\mu$ l, dNTP 2.5  $\mu$ l (10 mmol/L),  $Mg^{2+}$  2  $\mu$ l (25 mmol/L), 甜菜碱 4  $\mu$ l (5 mol/L), FIP、BIP 各 1.6  $\mu$ l (10  $\mu$ mol/L), F3、B3 各 0.2  $\mu$ l (10  $\mu$ mol/L)、模板 DNA 1  $\mu$ l、BstDNA 酶 1  $\mu$ l (8000 U)、ddH<sub>2</sub>O 8.4  $\mu$ l; LAMP 的反应条件: 65 $^{\circ}$ C 恒温保持 60 min, 之后 80 $^{\circ}$ C 终止反应 10 min。

## 2.3 鳃弧菌双重 PCR 及 LAMP 的特异性

双重 PCR 结果显示, 鳃弧菌代表菌株 S010610-1 株基因组 DNA 可扩增出 603 和 441 bp 两条目的条带, 而其他 6 株对照病原菌均未出现任何扩增条带(图 2), 表明本研究建立的鳃弧菌双重 PCR 检测方法具有较强的特异性。

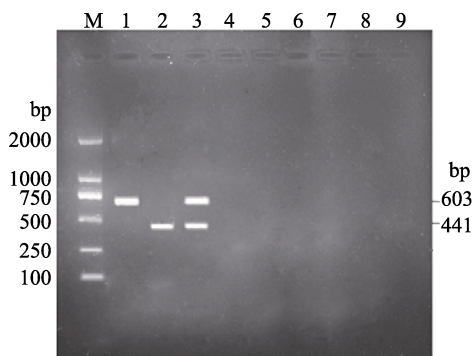


图 2 鳃弧菌双重 PCR 特异性检测结果  
Fig.2 Specificity of duplex PCR for detection of *V. anguillarum*

M. DL2000; 1. *vah4*; 2. *rtxA*; 3. *vah4*, *rtxA*;  
4-9. 6 株对照菌 Six controls

LAMP 扩增结果表明, 鳃弧菌可扩增出阶梯状条带, 而其他 6 株病原菌均未扩增出任何条带(图 3)。LAMP 反应液经 SYBR Green I 染色, 可见鳃弧菌呈现绿色的阳性反应, 而其他 6 株对照病原菌均呈现橙色的阴性反应(图 4)。该结果表明, 所建立的鳃弧菌 LAMP 检测方法具有很好的特异性。

## 2.4 鳃弧菌双重 PCR 及 LAMP 检测的灵敏度

10 倍比系列稀释菌液提取 DNA 后按照 2.2 建立

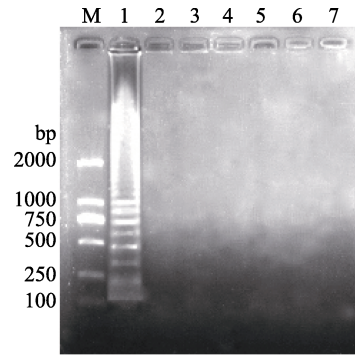


图 3 鳃弧菌 LAMP 特异性检测结果(电泳)  
Fig.3 Specificity of LAMP for detection of *V. anguillarum*(electrophoresis)

M. DL2000; 1. 鳃弧菌; 2-7. 6 株对照菌  
M. DL2000; 1. *V. anguillarum*; 2-7. Six controls



图 4 鳃弧菌 LAMP 特异性检测结果(SYBR Green I)  
Fig.4 Specificity of LAMP for detection of *V. anguillarum*(SYBR Green I)

1. 鳃弧菌; 2-7. 6 株对照菌  
1. *V. anguillarum*; 2-7. Six controls

的双重 PCR 及 LAMP 检测方法进行灵敏性检测, 结果显示, 双重 PCR 菌体浓度自  $2.4 \times 10^8$ – $2.4 \times 10^3$  CFU/ml 均可扩增出清晰条带(图 5), 表明本研究建立的双重 PCR 方法检测鳃弧菌灵敏度为  $2.4 \times 10^3$  CFU/ml; LAMP 检测的结果显示, 菌体浓度自  $2.4 \times 10^8$ – $2.4 \times 10^1$  CFU/ml 均可扩增出清晰的阶梯状条带(图 6), 且反应液中加入 SYBR Green I 荧光染料后呈现明显的绿色阳性反应(图 7), 表明本研究建立的 LAMP 检测鳃弧菌灵敏度为  $2.4 \times 10^1$  CFU/ml。

## 2.5 鳃弧菌双重 PCR 与 LAMP 检测应用

人工染菌的 10 种水产品组织匀浆增菌液, 提取 DNA 后分别进行双重 PCR 和 LAMP 检测。双重 PCR 和 LAMP 检测电泳结果显示, 人工染菌组均呈现阳性扩增, 未染菌组均无电泳条带(图 8、图 9); LAMP 反应液中加入 SYBR Green I 染色, 可见人工染菌组呈现绿色阳性反应, 未染菌组呈现橙色阴性反应(图 10)。该结果表明, 双重 PCR 与 LAMP 两种方法均能将感染鳃弧菌的样品准确检出。

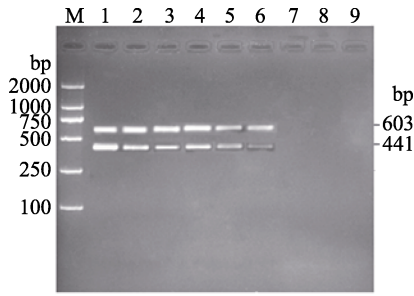


图 5 鳃弧菌双重 PCR 检测方法的灵敏性  
Fig.5 Sensitivity of duplex PCR for detection of *V. anguillarum*

M. DL2000; 1-8. *vah4* 和 *rtxA* 扩增片段(菌液 10 倍系列稀释为  $2.4 \times 10^8$ – $2.4 \times 10^1$  CFU/ml); 9. 对照  
M. DL2000; 1-8. Amplified fragments of *vah4* and *rtxA* (serially diluted:  $2.4 \times 10^8$ – $2.4 \times 10^1$  CFU/ml); 9. Control

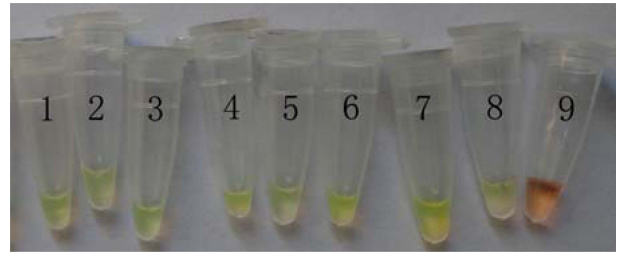


图 7 鳃弧菌 LAMP 检测方法的灵敏性 (SYBR Green I)  
Fig.7 Sensitivity of LAMP method for detection of *V. anguillarum* (SYBR Green I)

M. DL2000; 1-8. LAMP 扩增(菌液 10 倍系列稀释为  $2.4 \times 10^8$ – $2.4 \times 10^1$  CFU/ml); 9. 对照  
M. DL2000; 1-8. Amplified fragments of LAMP (serially diluted:  $2.4 \times 10^8$ – $2.4 \times 10^1$  CFU/ml); 9. Control

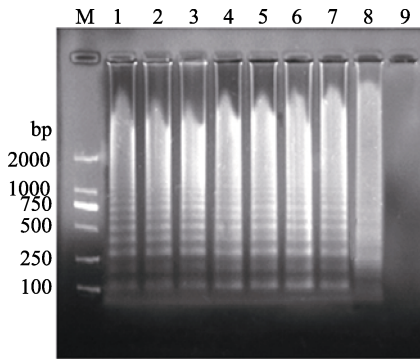


图 6 鳃弧菌 LAMP 检测方法的灵敏性(电泳)  
Fig.6 Sensitivity of LAMP methods for detection of *V. anguillarum*(electrophoresis)

M. DL2000; 1-8. 扩增片段(菌液 10 倍系列稀释为  $2.4 \times 10^8$ – $2.4 \times 10^1$  CFU/ml); 9. 对照  
M. DL2000; 1-8. Amplified fragments (serially diluted:  $2.4 \times 10^8$ – $2.4 \times 10^1$  CFU/ml); 9. Control

### 3 讨论

鳃弧菌广泛存在于沿岸海水、沉积物和海洋动物体中,是海水鱼、虾、贝类的一种常见的细菌性病原。本研究选取鳃弧菌 8 个毒力基因 *angM*、*tonB*、*vah1*、*vah4*、*flaA*、*empA*、*virA*、*rtxA*, 检测了本实验室保存的分离自半滑舌鳎、大菱鲆和鲤鱼的 22 株病原鳃弧菌毒力基因的携带情况,结果显示,22 株病原鳃弧菌基因组 DNA 均可扩增出 *empA*、*vah1*、*vah4*、*flaA*、*rtxA*、*tonB* 基因目的条带,而没有扩增出 *virA* 和 *angM* 基因目的条带,可能供试菌株不表达 *virA* 和 *angM* 两种基因调控的毒力蛋白,病原鳃弧菌携带的 *empA*、*vah1*、*vah4*、*flaA*、*rtxA*、*tonB* 6 种毒力基因,可用于该菌的初步检测。溶血素(Hemolysin)和重复序列毒素(Repeat in toxin, RTX)是鳃弧菌产生的两个重要毒力因子,在鳃弧菌的致病性上发挥重要作用,本研究选择调控溶血素和重复序列毒素的 *vah4* 和 *rtxA* 两种

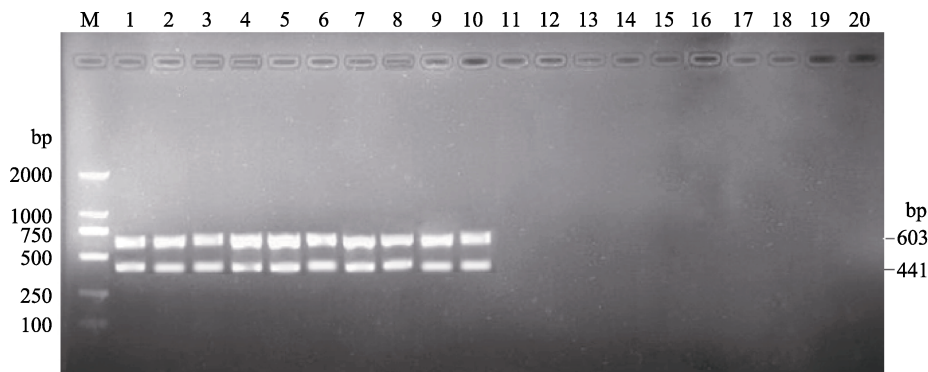


图 8 鳃弧菌的双重 PCR 检测应用  
Fig.8 Application of duplex PCR for detection of *V. anguillarum*

M. DL2000; 1-10. 10 种水产品染菌组织匀浆增菌液; 11-20. 10 种水产品未染菌组织匀浆液  
M. DL2000; 1-10. Bacterial enrichment of 10 aquatic products; 11-20. Bacterial no-enrichment



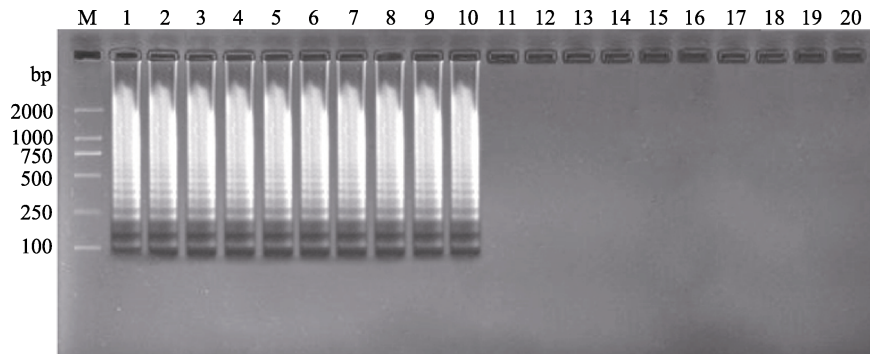


图9 鳃弧菌的 LAMP 检测应用(电泳)

Fig.9 Application of LAMP for detection of *V. anguillarum* (electrophoresis)

M. DL2000; 1-10. 10 种水产品染菌组织匀浆增菌液; 11-20. 10 种水产品未染菌组织匀浆液  
M. DL2000; 1-10. Bacterial enrichment of 10 aquatic products; 11-20. Bacterial no-enrichment

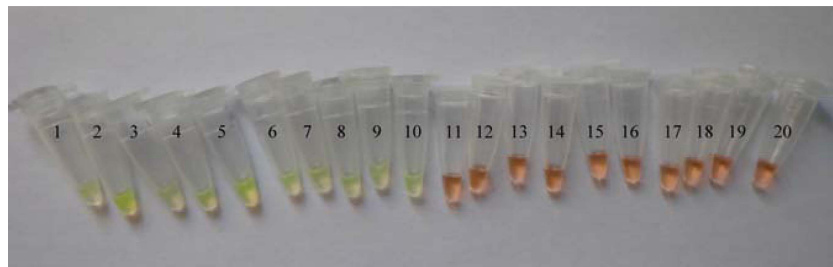


图10 鳃弧菌的 LAMP 检测应用(SYBR Green I)

Fig.10 Application of LAMP for detection of *V. anguillarum* (SYBR Green I)

M. DL2000; 1-10. 10 种水产品染菌组织匀浆增菌液; 11-20. 10 种水产品未染菌组织匀浆液  
M. DL2000; 1-10. Bacterial enrichment of 10 aquatic products; 11-20. Bacterial no-enrichment

毒力基因,设计两对特异性引物建立双重 PCR 检测方法,其特异性强,检测灵敏度为  $2.4 \times 10^3$  CFU/ml;以溶血素毒力基因 *vah4* 为分子靶标设计的 4 条引物(FIP、BIP、F3、B3)建立 LAMP 检测方法,其灵敏度为  $2.4 \times 10^1$  CFU/ml, LAMP 检测方法的灵敏度是双重 PCR 方法的 100 倍,双重 PCR 与 LAMP 对人工感染鳃弧菌的 10 种水产品检测应用试验,证明了所建立的双重 PCR 与 LAMP 两种检测方法均能将感染鳃弧菌的样品准确检出。

有关鳃弧菌的分子检测技术,国内外学者已多有报道,陈吉祥等(2005)用金属蛋白酶基因和溶血素基因建立了鳃弧菌的 PCR 检测方法;鲁雪(2010)<sup>1)</sup>用 6 个毒力基因建立了鳃弧菌的多重 PCR 检测方法;Xiao 等(2009)用 *empA* 基因建立了鳃弧菌的 PCR 检测方法;Gao 等(2010)以 *empA* 基因建立了鳃弧菌的 LAMP 检测方法,这些检测技术为水产养殖中病原鳃弧菌快

速检测及分子流行病学研究奠定了重要的理论基础。本研究以 *vah4* 和 *rtxA* 两种毒力基因建立了鳃弧菌的双重 PCR 及 LAMP 检测方法,并对两种检测方法进行了分析比较,两种检测方法均具有较好的特异性和灵敏性,以人工染菌的 10 种水产品进行的双重 PCR 和 LAMP 检测,人工染菌组均呈现阳性扩增,对照组呈阴性,表明本研究建立的双重 PCR 与 LAMP 两种检测方法在实际应用中的可行性,为病原鳃弧菌养殖场快速检测及分子流行病学研究奠定了基础。检测过程中注意外源性 DNA 污染问题,避免出现假阳性结果。LAMP 技术与 PCR 比较,操作简便、耗时短,不需要精密的仪器,检测结果可以用肉眼观察或浊度仪检测反应管中的沉淀(焦磷酸镁沉淀)或向扩增管中加入嵌入剂 SYBR Green I 通过颜色变化来判断扩增结果等优点,但由于 LAMP 扩增的阳性反应呈现弥散和一些低分子质量的带,一旦产生非特异性扩增,

1) 鲁雪. 鳃弧菌 6 个毒力基因的多重 PCR 与基因芯片检测技术的建立以及创新检测技术的初步探索. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2010

则不易鉴别, 因此, 设计及筛选引物时, 应特别关注反应的特异性。

## 参 考 文 献

- 吴后波, 潘金培. 弧菌属细菌及其所致海水养殖动物疾病. 中国水产科学, 2001, 8(1): 89-93
- 张晓君, 陈翠珍, 房海, 等. 大菱鲆(*Scophthalmus maximus* L.) 病原鳃利斯顿氏菌的鉴定. 海洋与湖沼, 2006, 37(5): 417-423
- 张晓君, 秦国民, 阎斌伦, 等. 半滑舌鳎病原鳃利斯顿氏菌表型及分子特征研究. 海洋学报, 2009, 31(5): 112-122
- 张晓君, 阎斌伦, 邢旭文, 等. 鲤病原鳃利斯顿氏菌的分离鉴定及生物学特性研究. 淡水渔业, 2009, 39(5): 47-53
- 陈吉祥, 李彩凤, 颜显辉, 等. 大菱鲆病原鳃弧菌生物学及分子特征研究. 高技术通讯, 2005, 15(6): 92-96
- 莫照兰, 茅云翔, 陈师勇, 等. 一株牙鲆皮肤溃烂症病原菌的鉴定. 微生物学报, 2002, 42(3): 263-269
- Bolinches J, Toranzo AE, Silva A, et al. Vibriosis as the main causative factor of heavy mortalities in the oyster culture industry in northwestern Spain. Bull Eur Assoc. Fish Pathol, 1986, 6: 1-4
- Bowser PR, Rosemark R, Reiner CR. A preliminary report of vibriosis in cultured American lobsters, *Homarus americanus*. J Invertebr Pathol, 1981, 37(1): 80-85
- Frans I, Michiels CW, Bossier P, et al. *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention. J Fish Dis, 2011, 34(9): 643-661
- Gao HW, Li FH, Zhang XJ, et al. Rapid, sensitive detection of *Vibrio anguillarum* using loop-mediated isothermal amplification. Chin J Oceanol Limnol, 2010, 28(1): 62-66
- Mo ZL, Tan XG, Xu YL, et al. A *Vibrio anguillarum* strain associated with ulcerative skin in cultured flounder, *Paralichthys olivaceus*. Chin J Oceanol Limnol, 2001, 19(4): 319-326
- Rodkhum C, Hirono I, Crosa JH, et al. Multiplex PCR for simultaneous detection of five virulence hemolysin genes in *Vibrio anguillarum*. J Microbiol Meth, 2006, 65: 612-618
- Wang XH, Oon HL, Ho GWP, et al. Internalization and cytotoxicity are important virulence mechanisms in vibrio fish epithelial cell interactions. Microbiology, 1998, 144(11): 2987-3002
- Xiao P, Mo ZL, Mao YX, et al. Detection of *Vibrio anguillarum* by PCR amplification of the *empA* gene. J Fish Dis, 2009, 32(3): 293-296

(编辑 冯小花)

## Detection of Pathogenic *Vibrio anguillarum* by Using Duplex PCR and LAMP Assays

SUN Jingjing<sup>1</sup>, GAO Xiaojian<sup>1</sup>, ZHANG Xiaojun<sup>1,2①</sup>, MA Lina<sup>3①</sup>, YAN Binlun<sup>1</sup>,  
BAI Xuesong<sup>1</sup>, ZHAO Jiaming<sup>1</sup>, BI Keran<sup>1</sup>, QIN Lei<sup>1</sup>

(1. Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005; 2. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009; 3. Jilin University, School of Pharmaceutical Sciences, Changchun 130021)

**Abstract** *Vibrio anguillarum* widely exists in aquatic environments and has been recognized as one of the prominent waterborne pathogens that undermine the aquaculture industry worldwide. In this study, we investigated the prevalent distribution of eight virulence-associated genes in the *V. anguillarum* strains isolated from *Scophthalmus maximus*, *Cynoglossus semilaevis* and *Cyprinus carpio*, and improved the detection of *V. anguillarum* by using duplex PCR and LAMP assays. Six genes (*empA*, *vah1*, *vah4*, *flaA*, *rtxA*, and *tonB*) were detected in all 22 pathogenic strains of *V. anguillarum*, but *virA* and *angM* were not detected. The duplex PCR assay was established with *vah4* and *rtxA* genes as molecular markers. Two gene fragments from the chromosomal DNA of *V. anguillarum* were detected in one PCR reaction with the detection limit of  $2.4 \times 10^3$  CFU/ml. The assay in 6 other control strains generated negative results. The LAMP assay was established with *vah4* as the molecular marker. The positive reaction was shown as stair-step amplified bands and the detection limit was  $2.4 \times 10^1$  CFU/ml. The assay produced negative reactions in 6 types of control pathogenic bacteria (no amplified bands). The LAMP method was 100 times more sensitive than the PCR method. Therefore we concluded that the LAMP assay could be a sensitive, rapid and simple tool for the detection of *V. anguillarum*, and recommend to employ this method in the early diagnosis of *V. anguillarum* infection in aquatic animals.

**Key words** *Vibrio anguillarum*; Virulence gene; Duplex PCR; LAMP

① Corresponding author: ZHANG Xiaojun, E-mail: zxj9307@163.com; MA Lina, E-mail: malan@jlu.edu.com

# 中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) Tetraspanin-3 与 WSSV 的体外相互作用\*



关广阔<sup>1,2</sup> 刘庆慧<sup>2,3</sup>① 黄 健<sup>2,3</sup>

(1. 上海海洋大学 上海 201306; 2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院  
黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 青岛国家海洋科学重点实验室 青岛 266071)

**摘要** Tetraspanin-3 是四跨膜蛋白超家族的一员, 在信号转导和免疫等过程中起到重要作用。本研究将中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) Tetraspanin-3 (FcT<sub>3</sub>)的大胞外环区(Large extracellular loop, LEL)基因片段克隆, 与原核表达载体 pBAD/gIII A 连接, 获得重组表达载体 pBAD/gIII A-T<sub>3</sub>L, 转化入大肠杆菌 TOP 10 中, 用 L-阿拉伯糖(L-Arab)诱导并经钴离子亲和层析纯化得到重组蛋白。质谱分析显示, 纯化的重组蛋白为 FcT<sub>3</sub>。用地高辛将 FcT<sub>3</sub>L 标记并与 WSSV 作用, Far-western 分析显示, FcT<sub>3</sub>L 与 VP26 结合。ELISA 实验结果显示, FcT<sub>3</sub>L 与 VP26 蛋白的相互作用随 VP26 量的增加而增强。推测 FcT<sub>3</sub> 通过与 VP26 作用介导病毒核衣壳的入胞过程。

**关键词** 中国明对虾; Tetraspanin-3; WSSV; 相互作用

**中图分类号** S945 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)06-0056-07

对虾白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)自 20 世纪 90 年代被发现以来, 在世界范围内给对虾养殖业造成了巨大损失(Chou *et al.*, 1995; 黄健等, 1995; Zhan *et al.*, 1998)。WSSV 具有宿主范围广、致死率高等特点(何建国等, 1999), 国内外学者针对 WSSV 的致病机理开展了大量的研究, 取得了明显的进展, 但限于 WSSV 基因组的复杂性, WSSV 如何利用宿主分子进行感染尚有许多未知之处。

Tetraspanin-3 蛋白是四跨膜蛋白超家族的一员, 该超家族蛋白在细胞膜表面进行四次跨膜, 在细胞膜外侧形成大、小两个胞外环(Large Extracellular Loop, LEL 和 Small Extracellular Loop, SEL)及在细胞膜内侧形成 N 端和 C 端末部, 且各区域表现出不同的功能(Maecker *et al.*, 1997)。LEL 区主要介导蛋白与蛋白间的相互作用(Stipp *et al.*, 2003)。四跨膜蛋白参与细胞活化、增殖、粘附、分化等过程, 此外, 在病毒侵染、癌变和免疫过程中也起到重要作用(Hemler, 2003;

Meerlo *et al.*, 1992)。Todd 等(1998)从人 cDNA 库中鉴定并测序得到 Tetraspanin-3 序列。Wang 等(2010)首次从中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)中克隆得到 Tetraspanin-3 (FcT<sub>3</sub>), 荧光定量分析显示, 其表达量在 WSSV 侵染后明显上调。Gui 等(2012)通过 FcT<sub>3</sub> 抗体中和及 RNAi 技术证明, 封闭 FcT<sub>3</sub> 的 LEL 区可以抑制 WSSV 的侵染, 说明 FcT<sub>3</sub> 蛋白可能在 WSSV 侵染中起重要作用, 但 FcT<sub>3</sub> 是否直接通过与 WSSV 作用进而参与 WSSV 的感染尚不清楚。本研究将 FcT<sub>3</sub> 蛋白 LEL 区(FcT<sub>3</sub>L)进行原核表达, 利用 Far-western 及 ELISA 技术筛选出 FcT<sub>3</sub> 与 WSSV 的相互作用蛋白, 为深入探讨 FcT<sub>3</sub> 介导 WSSV 的感染提供依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

WSSV、表达载体 pBAD/gIII A 由中国水产科学

\* 国家重点基础研究发展计划(2012CB114401)、泰山学者"建设工程专项经费"和农业部科研杰出人才和创新团队专项经费共同资助。关广阔, E-mail: guan871026@sina.com

① 通讯作者: 刘庆慧, 研究员, E-mail: liuqh@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-12-11, 收修改稿日期: 2015-01-26

研究院黄海水产研究所海水养殖生物疾病控制与分子病理学实验室保存; 大肠杆菌 TOP10 感受态细胞、海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒购自 TIANGEN 公司; *Taq* 酶、RNAiso、PrimerScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser 及 DNA 标准(DNA Marker DL2000)购自 TaKaRa 公司;  $T_4$  DNA Ligase、限制性内切酶 *Xho* I、*Xba* I 及蛋白 Marker 购自 Thermo 公司; 地高辛(DIG)购自 Roche 公司; 氨苄青霉素、L-阿拉伯糖(L-Arab)、质粒小提试剂盒购自 Solarbio 公司; 胶回收试剂盒购自 ZYMO 公司。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 中国明对虾肌肉 cDNA 合成** 剪取中国明对虾肌肉组织, 加入 RNAiso, 依照 RNAiso 试剂盒说明书提取 RNA。提取的 RNA 用 PrimeScript RT Reagent Kit With gDNA Eraser 试剂盒进行反转录成 cDNA,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

**1.2.2  $FcT_3L$  基因的克隆** 根据 GenBank 公布的中国明对虾  $T_3$  ( $FcT_3$ ) mRNA 序列(EF032649), 用 Primer Premier 5.0 软件设计引物, 并分别于上下游引物添加限制性内切酶 *Xho* I 和 *Xba* I 酶切位点, 引物序列为: F: 5'-GACTCGAGACCGATGAAGCTGAA-GA-3'; R: 5'-CGTCTAGAGCATTCTGCAGATCATC-3'。以反转录的 cDNA 为模板, PCR 扩增目的基因。PCR 程序为:  $25\ \mu\text{l}$  体系,  $94^{\circ}\text{C}$ , 预变性 5 min;  $94^{\circ}\text{C}$  30 s,  $55^{\circ}\text{C}$  30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  30 s, 扩增 35 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 目的条带用胶回收试剂盒回收纯化。

**1.2.3 重组表达载体 pBAD/gIII A- $T_3L$  的构建** 用 *Xba* I 和 *Xho* I 对已纯化的目的条带及载体 pBAD/g III A 进行双酶切, 酶切后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 胶回收目的条带, 用  $T_4$  连接酶连接目的片段及载体, 将重组载体转化到 *E. coli* TOP 10 感受态细胞中, 涂布 LB 平板(氨苄青霉素浓度为  $50\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ), 在  $37^{\circ}\text{C}$  培养 14 h 后, 挑取单克隆菌落至 LB 液体培养基中(氨苄青霉素浓度为  $50\ \mu\text{g}/\text{ml}$ )培养, 菌落 PCR 检测重组转化结果, 选取阳性菌液送上海生工生物工程股份有限公司测序。

**1.2.4 重组载体 pBAD/gIII A- $T_3L$  的诱导表达** 将测序正确的菌液以 1% 比例接种至 LB 培养基中(氨苄青霉素浓度为  $50\ \mu\text{g}/\text{ml}$ )扩大培养,  $37^{\circ}\text{C}$  振荡培养 5 h 后 ( $OD_{600\text{nm}}=0.5-0.6$ ), 添加 L-阿拉伯糖至终浓度为  $0.2\ \text{g}/\text{L}$ , 继续诱导表达 4 h。8000 r/min 离心 5 min, 收集菌体, 加入 PBS 重悬后超声波破碎, 破碎液进行 SDS-PAGE 检测分析。以未诱导的重组菌体破碎液作为对照。

**1.2.5  $\text{Co}^{2+}$  亲和层析纯化蛋白** 破碎液经 12000 r/min 离心 15 min, 收集沉淀, 将沉淀用 A 液(含  $6\ \text{mol}/\text{L}$  盐酸胍)溶解后, 于  $4^{\circ}\text{C}$  条件下, 12000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 上清液分别经  $0.8\ \mu\text{m}$  和  $0.45\ \mu\text{m}$  滤膜过滤。将树脂装入层析柱中, 先用 PBS 平衡洗柱, 用 A 液将紫外吸收峰洗至 0, 加入蛋白上清液, 先用 A 液将峰值洗脱至 0, 然后用  $150\ \text{mmol}/\text{L}$  咪唑洗脱, 收集重组蛋白, 尿素梯度复性液中复性透析, SDS-PAGE 分析纯化结果。

**1.2.6 质谱分析** MALDI-TOF-MS 考染样品的酶解与混合肽段提取: 用手术刀准确切割经 SDS-PAGE 分离后的蛋白质亚基条带, 置于小离心管中。加入  $100\ \mu\text{l}$  50% 乙腈+ $50\ \text{mmol}/\text{L}$  碳酸氢铵, 将之脱色 20 min 左右; 重复此步骤两次; 加入  $100\ \mu\text{l}$  100% 乙腈, 干胶约 10 min; 然后弃去乙腈, 放入烘箱中  $37^{\circ}\text{C}$  条件下 5-10 min; 加入  $12.5\ \text{ng}/\mu\text{l}$  的 Trypsin 酶溶液 5-10  $\mu\text{l}$ , 置于  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱中 30 min, 取出后于  $37^{\circ}\text{C}$  条件下酶解过夜; 加入  $60\ \mu\text{l}$  50% 乙腈 + 0.1% TFA, 常温下放置 30-40 min, 将溶液转移至 96 孔板中, 重复 2-3 次; 然后将此肽段溶液于氮气流下吹干浓缩, 备用。

MALDI-TOF-MS 鉴定: 重新将干燥肽段溶解于  $0.7\ \mu\text{l}$   $0.5\ \text{g}/\text{L}$  CHCA 溶液(溶剂, 0.1% TFA + 50% ACN)中, 然后将其点到 MALDI 靶板上, 自然干燥。用 4700 串联飞行时间质谱仪[4700 Proteomics Analyzer (TOF/TOFTM) (Applied Biosystems, 美国)]进行质谱分析, 将质谱所得所有肽段的质量数及其 MS/MS 图谱(碎片离子质量数)用 Mascot (网址: <http://www.matrixscience.com>, Matrix Science Ltd, UK)中的搜索功能(MS/MS Ions Search)与数据库中相应肽段的理论质量数以及其 MS/MS 裂解图谱进行相关性比较、检索、鉴定。

**1.2.7 DIG 标记  $FcT_3L$  及 VP26** 用枪头取少量 DIG 粉末溶于 DMSO 中, 分别加入纯化的  $FcT_3L$  和 VP26 蛋白, 旋转混合仪中混匀 2 h,  $4^{\circ}\text{C}$  PBS 溶液中透析, 去除过量的 DIG。

**1.2.8 Far-western 分析  $FcT_3L$  与 WSSV 蛋白的相互作用** 将已提纯的 WSSV 病毒液进行 15% SDS-PAGE 后, 转印至 PVDF 膜上,  $4^{\circ}\text{C}$  条件下封闭液(PBS+5% BSA)中封闭过夜, PBS-T 清洗后加入  $FcT_3L$  蛋白,  $4^{\circ}\text{C}$  条件下孵育 12 h, PBS-T 清洗后加入 1:5000 稀释的 HRP-6 $\times$ His 抗体, 于  $4^{\circ}\text{C}$  条件下孵育过夜, PBS-T 清洗后用 DAB 试剂盒显色。将已表达纯化的 WSSV 重组蛋白 VP26、VP28C、VP28N、VP37 按上述方法转印至 PVDF 膜上,  $4^{\circ}\text{C}$  条件下封闭液中封闭过夜, PBS-T 清洗后加入 DIG 标记的  $FcT_3L$  蛋白,  $4^{\circ}\text{C}$  条件下孵育 12 h, PBS-T 清洗后加入 Anti-DIG-AP (1:3000),  $4^{\circ}\text{C}$  条件下

孵育过夜, PBS-T 清洗后用 BCIP/NBT 显色液显色。

**1.2.9 ELISA 检测 VP26 与 FcT<sub>3</sub>L 的相互作用** 用包被液将纯化的重组蛋白 FcT<sub>3</sub>L 稀释为 0.02 μg/μl, 向 96 孔板的每孔中加入 50 μl 稀释液, 4℃ 过夜包板。PBST 清洗后, 加入封闭液, 37℃ 封闭 2 h, PBST 洗板。加入 50 μl 含不同总量的 DIG-VP26 蛋白(50 μl 中所含蛋白总量分别为 0.01、0.1、1.0、5.0 μg), 37℃ 孵育 2 h, PBST 洗板。加入碱性磷酸酶(AP)标记的抗 DIG 抗体(Anti-DIG-AP, 1 : 5000 稀释), 37℃ 孵育 2 h, PBST 洗板后, 加入 50 μl PNPP 显色液, 室温下至出现明显颜色时, 加入 0.3 mol/L 的 NaOH (50 μl) 中止反应。酶标仪测定 405 nm 处吸光度值。同时设 BSA 为阴性对照组, 每组设 3 个平行。P/N 计算公式:  $P/N = (OD_{405\text{ nm}} - OD_{405\text{ nm 空白}}) / (OD_{405\text{ nm BSA}} - OD_{405\text{ nm 空白}})$ 。

## 2 结果

### 2.1 重组表达载体 pBAD/gIII A-T<sub>3</sub>L 的构建

用设计的引物进行 PCR 扩增, 电泳结果显示, 扩增片段为 300 bp, 与理论值一致(图 1)。将 PCR 扩增产物经胶回收纯化及双酶切后, 与酶切的 pBAD/g IIIA 质粒连接并转化感受态细胞 TOP10 中, 菌落 PCR 结果显示(图 2), 在 500 bp 左右有目的条带, 初步确定为阳性克隆。将 PCR 阳性克隆进行测序, 测序结果显示, 重组体序列正确。

### 2.2 基因表达产物的分析

将诱导后的菌液进行超声波破碎后, 将破碎液进

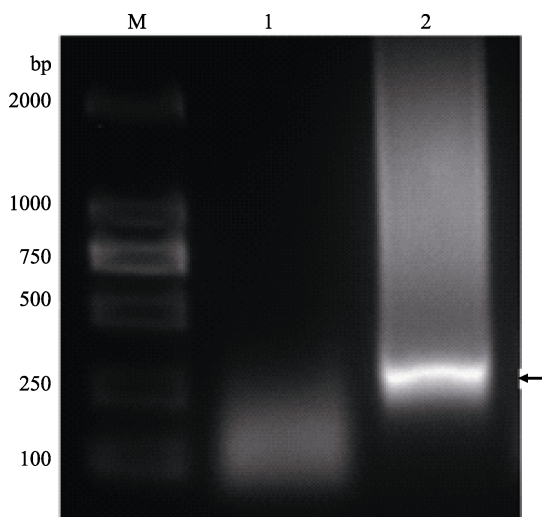


图 1 PCR 扩增 FcT<sub>3</sub>L  
Fig.1 PCR amplification of FcT<sub>3</sub>L

M: DNA Marker DL2000; 1: 阴性对照 Negative control;  
2: FcT<sub>3</sub>L

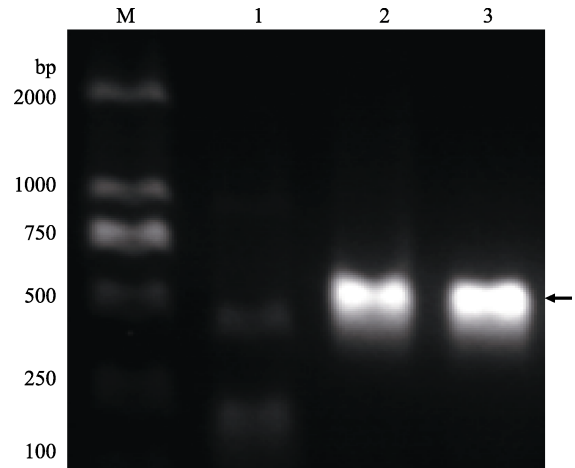


图 2 菌落 PCR 结果  
Fig.2 PCR result of the colony

M: DNA 标准品 DL2000; 1: 阴性对照; 2-3: 重组 FcT<sub>3</sub>L  
M: DNA Marker DL2000; 1: Negative control; 2-3:  
Recombinant FcT<sub>3</sub>L

行 SDS-PAGE 电泳, 以未诱导菌液为对照。电泳结果显示, 与未诱导菌液相比, 诱导菌液在分子量约为 20 kDa 出现明显诱导蛋白带(图 3)。将目的条带切胶进行质谱分析, 结果表明, 该蛋白为中国明对虾 Tetraspanin-3(表 1)。

### 2.3 目的蛋白的纯化

表达载体 pBAD/gIII A 上带有 6×His 标签, 可利

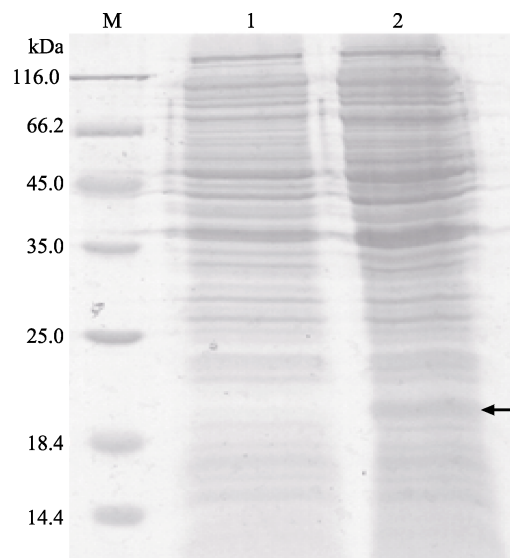


图 3 SDS-PAGE 分析在 *E. coli* 中表达的 FcT<sub>3</sub>L  
Fig.3 SDS-PAGE analysis of FcT<sub>3</sub>L expressed in *E. coli*

M: 蛋白分子质量标准; 1: 未诱导的重组 FcT<sub>3</sub>L;  
2: 诱导重 FcT<sub>3</sub>L

M. Protein molecular weight Marker; 1: Recombinant FcT<sub>3</sub>L  
before induction; 2: Induced recombinant FcT<sub>3</sub>L

表 1 FcT<sub>3</sub>L 质谱分析结果  
Tab.1 Results of MS analysis of FcT<sub>3</sub>L

肽段分子量 Observed Mr of peptide	肽段实验分子量 Expected Mr of peptide	肽段理论分子量 Calculated Mr of peptide	起始位点 Start position	终止位点 End position	肽段 Peptide
902.4186	901.4113	901.4869	131	138	SLDLAQQK
1094.3867	1093.3794	1093.4685	139	148	LHCCGVDGYK
1514.6532	1513.6459	1513.7599	188	200	QTIYIQGCYQAVK
1641.6505	1640.6432	1640.7682	117	130	VFNEYGQQDEALTK
3437.3577	3437.3577	3436.9567	2	33	GFFSKFALFVLNFIVFGVGVATVVLASIFISK

用 Co<sup>2+</sup>亲和层析法对其进行纯化,洗脱液经尿素梯度复性后得到正确折叠的蛋白, 然后进行 SDS-PAGE 检测分析, 结果显示, 经纯化的蛋白纯度较高, 可用于进一步实验(图 4)。

#### 2.4 FcT<sub>3</sub>L 与 WSSV 结构蛋白的相互作用

将纯化的 WSSV 病毒经 SDS-PAGE 分离后转印到 PVDF 膜上, 与 FcT<sub>3</sub>L 蛋白孵育, 然后再与 6×His 抗体孵育后显色发现, FcT<sub>3</sub>L 与 VP26 有条带显色(图 5)。为进一步验证与 FcT<sub>3</sub>L 相作用的病毒蛋白, 将已表达纯化的 VP26、VP28C、VP28N 和 VP37 蛋白进行 SDS-PAGE 并转印, 与 DIG 标记的 FcT<sub>3</sub>L 蛋白孵育后, 用 DIG 抗体孵育显色。结果显示, 只有 VP26 条带处显色, 而 VP28C、VP28N 和 VP37 条带处没有显色, 说明这 3 种蛋白与 FcT<sub>3</sub>L 没有相互作用, 只有 VP26 与 FcT<sub>3</sub>L 有相互作用(图 6)。

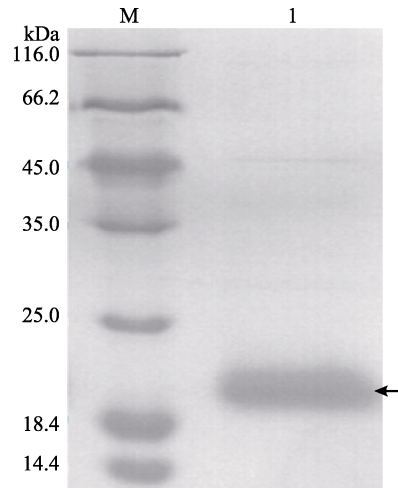


图 4 SDS-PAGE 分析纯化的 FcT<sub>3</sub>L  
Fig.4 SDS-PAGE analysis of purified FcT<sub>3</sub>L

M: 蛋白分子质量标准; 1: 纯化后的 FcT<sub>3</sub>L  
M: Protein molecular weight Marker; 1: Purified FcT<sub>3</sub>L

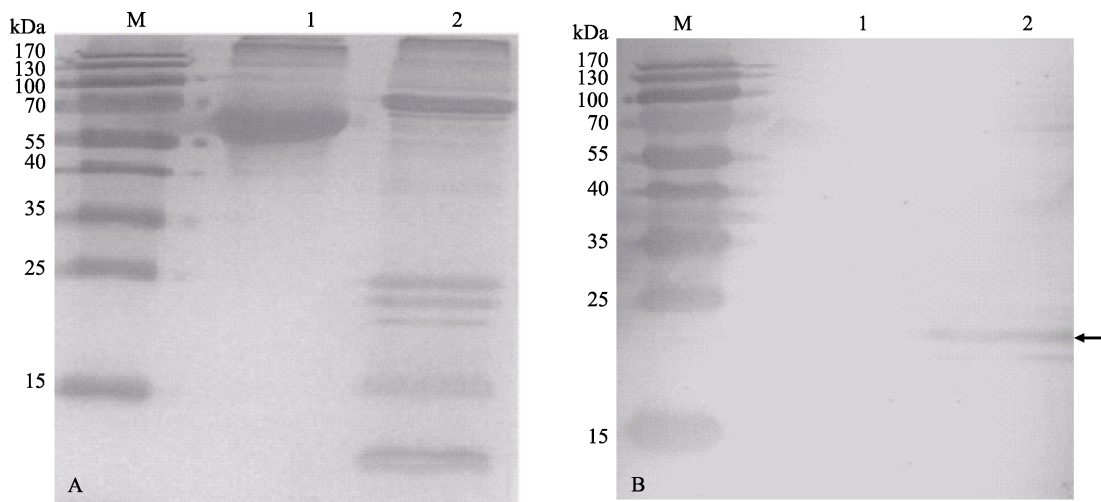


图 5 FcT<sub>3</sub>L 与 WSSV 的相互作用分析

Fig.5 Interaction between FcT<sub>3</sub>L and WSSV protein

A: SDS-PAGE 结果; B: Far-western blot 结果

M: 蛋白分子质量标准; 1: BSA; 2:WSSV

A: Profile of SDS-PAGE; B: Far-western blot analysis  
M: Protein molecular weight Marker; 1: BSA; 2: WSSV

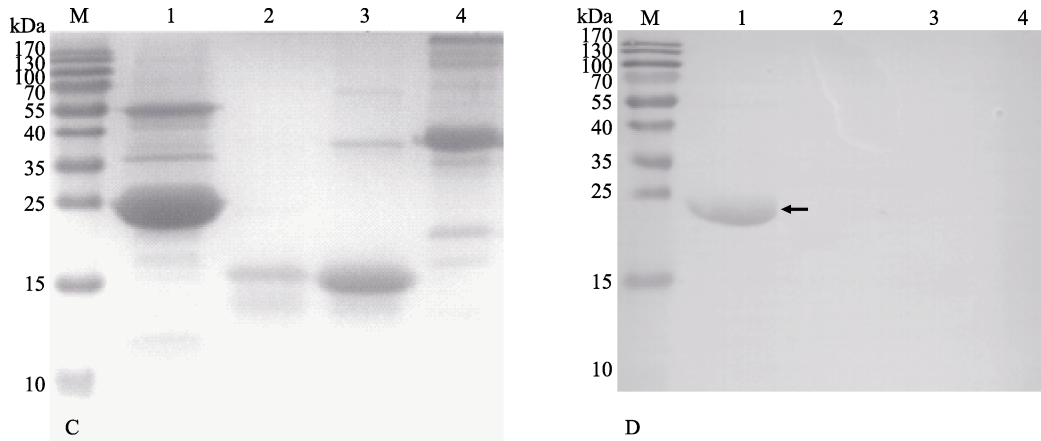


图6 FcT<sub>3</sub>L与WSSV重组蛋白的相互作用

Fig.6 Interaction of FcT<sub>3</sub>L with recombinant protein of WSSV

C: SDS-PAGE 结果; D: Far-western blot 结果

M: 蛋白分子质量标准; 1: VP26; 2: VP28C; 3: VP28N; 4: VP37

C: Profile of SDS-PAGE; D: Far-western blot analysis

M: Protein molecular weight Marker; 1: VP26; 2: VP28C; 3: VP28N; 4: VP37

## 2.5 ELISA 分析

通过将 FcT<sub>3</sub>L 蛋白包板与 DIG 标记的 VP26 蛋白相互作用, 并与 Anti-DIG-AP 抗体孵育后经 pNPP 显色进行 ELISA 分析。结果显示, FcT<sub>3</sub>L 与 VP26 蛋白的相互作用随 VP26 蛋白量的增加而增强, 当 VP26 为 0.01 μg 时, P/N 值仅为 1.61, VP26 增加至 0.1 μg 时, P/N 值为 4.46, 当 VP26 蛋白量达到 1 μg 时, 相互作用达到最高值(P/N=11.63), 继续增加 VP26 用量, P/N 值不再随之增加(图 7), 表明两蛋白的结合达到饱和。

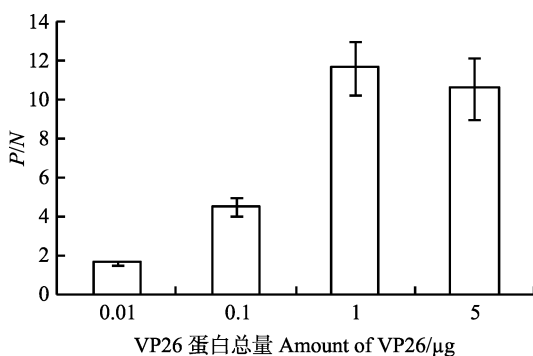


图7 ELISA 分析 VP26 与 FcT<sub>3</sub>L 蛋白的相互作用

Fig.7 ELISA analysis of VP26 interaction with FcT<sub>3</sub>L

## 3 讨论

蛋白与蛋白的特异性结合是病毒与宿主细胞相互作用的分子基础。病原蛋白与宿主蛋白相互作用是诱发感染、致病的关键环节。WSSV 感染宿主是多分

子相互作用的复杂过程, 已报道包括 Rab7 (Sritunyalucksana *et al*, 2006)、β-整联蛋白(Li *et al*, 2007)、β-肌动蛋白(Xie *et al*, 2005; Liu *et al*, 2011)、几丁质结合蛋白(Chen *et al*, 2009)、热休克蛋白 70(Xu *et al*, 2009)、F<sub>1</sub> 和 F<sub>0</sub>-ATP 合成酶(Liang *et al*, 2010; Li *et al*, 2013)、凝集素(Zhao *et al*, 2009)、抑制素(Lan *et al*, 2013)、精氨酸激酶(Ma *et al*, 2014)和腺嘌呤核苷转移酶(Ma *et al*, 2014)等诸多宿主蛋白与白斑综合征病毒结构蛋白存在相互作用, 参与病毒的侵染过程。但 WSSV 借助宿主哪些分子穿过细胞膜进入宿主细胞内感染宿主尚不清楚。

本研究通过将 FcT<sub>3</sub>L 区域进行原核表达, 纯化获得重组蛋白。Far-western 实验结果显示, FcT<sub>3</sub>L 重组蛋白可以特异性地与 VP26 蛋白相互作用, 而与 VP28 及 VP37 则无结合作用。进一步用 ELISA 方法分析显示, FcT<sub>3</sub>L 与 VP26 蛋白的相互作用随 VP26 蛋白量的增加而增强。VP26 蛋白被认为是一种主要的被膜蛋白, 连接囊膜蛋白和核衣壳(Tsai *et al*, 2006)。主要囊膜蛋白 VP37 和核衣壳蛋白 VP51 被鉴定出与 VP26 存在相互作用关系, 三者可能通过形成复合体起到稳定病毒结构的作用(Wan *et al*, 2008; Liu *et al*, 2009)。Xie 等(2005)和 Liu 等(2013)报道, VP26 蛋白与 β 肌动蛋白存在相互作用, 而 β 肌动蛋白在细胞内物质和器官运输过程中起重要作用, 并被报道参与到一些病毒的入侵、细胞内转运和释放等过程中(Gouin *et al*, 2005), 因此, VP26 通过与核衣壳蛋白相互作用引导病毒核衣壳进入细胞内部。本研究进一步发现, FcT<sub>3</sub>L

与 VP26 存在相互作用, 推测 VP26 可能通过与 FcT<sub>3</sub> 相互作用引导 WSSV 核衣壳入胞, 并进一步与  $\beta$  肌动蛋白相互作用完成病毒核衣壳向细胞核部位的转运过程, 具体分子机制还需进一步研究。

## 参 考 文 献

- 何建国, 周化民, 姚伯, 等. 白斑综合征杆状病毒的感染途径和宿主种类. 中山大学学报(自然科学版), 1999, 38(2): 65-70
- 黄捷, 宋晓玲, 于佳, 等. 杆状病毒性的皮下及造血组织坏死—对虾暴发性流行病的病原和病理学. 海洋水产研究, 1995, 16(1): 1-10
- Chen KY, Hsu TC, Huang PY, *et al.* *Penaeus monodon* chitin-binding protein (PmCBP) is involved in white spot syndrome virus (WSSV) infection. *Fish Shellfish Immunol*, 2009, 27(3): 460-465
- Chou HY, Huang CY, Wang CH, *et al.* Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Dis Aquat Org*, 1995, 23(3): 165-173
- Gouin E, Welch MD, Cossart P. Actin-based motility of intracellular pathogens. *Curr Opin Microbiol*, 2005, 8(1): 35-45
- Gui L, Wang B, Li FH, *et al.* Blocking the large extracellular loop (LEL) domain of FcTetraspanin-3 could inhibit the infection of white spot syndrome virus (WSSV) in Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish Shellfish Immunol*, 2012, 32(6): 1008-1015
- Hemler ME. Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Ann Rev Cell Dev Biol*, 2003, 19: 397-422
- Lan JF, Li XC, Sun JJ, *et al.* Prohibitin interacts with envelope proteins of white spot syndrome virus and prevents infection in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkia*. *J Virol*, 2013, 87(23): 12756-12765
- Li DF, Zhang MC, Yang HJ, *et al.*  $\beta$ -Integrin mediates WSSV infection. *Virology*, 2007, 368(1): 122-132
- Li Q, Liu QH, Huang J. F<sub>0</sub>ATP synthase  $\beta$ -chain of *Litopenaeus vannamei* involved in white spot syndrome virus infection. *Virus Genes*, 2013, 47(1): 42-48
- Liang Y, Cheng JJ, Yang B, *et al.* The role of F1 ATP synthase beta subunit in WSSV infection in the shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Viol J*, 2010, 7: 144
- Liu BL, Tang XQ, Zhan WB. Interaction between white spot syndrome virus VP26 and hemocyte membrane of shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Aquaculture*, 2011, 314(1-4): 13-17
- Liu QH, Ma CY, Chen WB, *et al.* White spot syndrome virus VP37 interacts with VP28 and VP26. *Dis Aquat Org*, 2009, 85(1): 23-30
- Ma FF, Chou ZG, Liu QH, *et al.* White spot syndrome virus VP12 interacts with adenine nucleotide translocase of *Litopenaeus vannamei*. *J Invertebr Pathol*, 2014, 118(4): 28-33
- Ma FF, Liu QH, Guan GK, *et al.* Arginine kinase of *Litopenaeus vannamei* involved in white spot syndrome virus infection. *Gene*, 2014, 539: 99-106
- Maecker HT, Todd SC, Levy S. The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J*, 1997, 11(6): 428-442
- Meerlo T, Parmentier HK, Osterhaus AD, *et al.* Modulation of cell surface molecules during HIV-1 infection of H9 cells: An immunoelectron microscopic study. *Aids*, 1992, 6(10): 1105-1116
- Sritunyalucksana K, Wannapapho W, Lo CF, *et al.* PmRab7 is a VP28-binding protein involved in white spot syndrome virus infection in shrimp. *J Virol*, 2006, 80(21): 10734-10742
- Stipp CS, Kolesnikova TV, Hemler ME. Functional domains in tetraspanin proteins. *Trends Biochem Sci*, 2003, 28(2): 106-112
- Todd SC, Doctor VS, Levy S. Sequences and expression of six new members of the tetraspanin/TM4SF family. *Biochim Biophys Acta-Gene Structure and Expression*, 1998, 1399(1): 101-104
- Tsai JM, Wang HC, Leu JH, *et al.* Identification of the nucleocapsid, tegument, and envelope proteins of the shrimp white spot syndrome virus virion. *J Virol*, 2006, 80: 3021-3029
- Wan Q, Xu L, Yang F. VP26 of white spot syndrome virus functions as a linker protein between the envelope and nucleocapsid of virions by binding with VP51. *J Virol*, 2008, 82(24): 12598-12601
- Wang B, Li F, Xiang J, *et al.* Three tetraspanins from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*, may play important roles in WSSV infection. *J Fish Dis*, 2010, 33(1): 15-29
- Xie X, Yang F. Interaction of white spot syndrome virus VP26 protein with actin. *Virology*, 2005, 336(1): 93-99
- Xu H, Yan F, Deng X, *et al.* The interaction of white spot syndrome virus envelope protein VP28 with shrimp Hsc70 is specific and ATP-dependent. *Fish Shellfish Immunol*, 2009, 26(3): 414-421
- Zhan WB, Wang YH, Fryer JL, *et al.* White spot syndrome virus infection of cultured shrimp in China. *J Aquat Anim Health*, 1998, 10(4): 405-410
- Zhao ZY, Yin ZX, Xu XP, *et al.* A novel C-type lectin from the shrimp *Litopenaeus vannamei* possesses anti-white spot syndrome virus activity. *J Virol*, 2009, 83(1): 347-356



## Interaction of Tetraspanin-3 in *Fenneropenaeus chinensis* with WSSV *in vitro*

GUAN Guangkuo<sup>1,2</sup>, LIU Qinghui<sup>2,3①</sup>, HUANG Jie<sup>2,3</sup>

(1. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. National Oceanographic Center, Qingdao 266071)

**Abstract** White spot syndrome virus (WSSV) is a widespread and disastrous viral pathogen of cultured shrimp that infects many different species of crustaceans. Tetraspanin-3 protein belongs to the tetraspanin superfamily, which plays an important role in signal transduction and immune process. Increasing evidence has shown that tetraspanins play important roles in virus invasion, penetration and fusion events. Antibody to the large extracellular loop (LEL) of Tetraspanin-3 of *Fenneropenaeus chinensis* can block the WSSV infection. However, whether the *F. chinensis* Tetraspanin-3 is involved directly with WSSV remained largely unknown. In this research, we cloned the LEL fragment of Tetraspanin-3 from shrimp *F. chinensis* (FcT<sub>3</sub>L) and ligated it with prokaryotic expression vector pBAD/g IIIA to get recombinant expression vector pBAD/g IIIA-FcT<sub>3</sub>L. After transformed into *E. coli* (TOP 10) and induced using the L-arabinose, we successfully obtained the pure recombinant protein using Co<sup>2+</sup> affinity chromatography purification. Mass spectrometry analysis showed the correctness of the recombinant protein. Moreover, FcT<sub>3</sub>L was labeled with DIG and incubated with WSSV and the results showed that FcT<sub>3</sub>L can interact with VP26. Furthermore, recombinant VP26, VP28N, VP28C and VP37 were separated by SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes. After incubating with DIG-labeled FcT<sub>3</sub>L, a positive band was shown with VP26. To confirm the interaction of FcT<sub>3</sub>L with VP26, FcT<sub>3</sub>L was coated with 96-well plates and different amount of VP26 was added. ELISA assay showed that the interaction between FcT<sub>3</sub>L and VP26 grew stronger with the increasing concentration of FcT<sub>3</sub>L. Results suggested that VP26 might bind to the Tetraspanin-3 and act to help the WSSV diffuse and penetrate into the cytoplasm. The detailed mechanism needs further investigation.

**Key words** Tetraspanin-3; *Fenneropenaeus chinensis*; WSSV; Interaction

① Corresponding author: LIU Qinghui, E-mail: liuqh@ysfri.ac.cn

# 基于家系水平的凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)保种群体 出肉率与表型性状的相关性分析\*



柴 展<sup>1,2</sup> 栾 生<sup>2</sup> 罗 坤<sup>2</sup> 孔 杰<sup>2①</sup> 许圣钰<sup>3</sup>

(1. 大连海洋大学水产与生命学院 大连 116023; 2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室  
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 青岛海壬水产种业科技有限公司 青岛 266071)

**摘要** 本研究从家系水平上比较凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)保种群体出肉率的差异,评估出肉率性状的选择潜力,寻找替代出肉率的间接选择性状,可为出肉率性状的遗传改良提供技术参数。2012年,保种群体养殖350 d后,测定42个家系(2094尾凡纳滨对虾)的8个表型性状(净肉重、体重、头胸甲长、腹节长、头胸甲-腹节长、体长、全长、肥满度),然后将虾杀死,剖取虾肉,计算出肉率;利用单因素方差分析方法,比较不同家系间出肉率的差异;计算各表型性状与出肉率之间的相关系数,利用逐步回归方法构建表型性状对出肉率的多元线性回归方程。结果显示,凡纳滨对虾家系出肉率的均值为(53.59±3.26)%,分布范围为50.25%–59.51%,变异系数为6.08%,家系间差异达到极显著水平( $P<0.01$ );在8个表型性状中,与出肉率的相关性最高的3个性状分别为净肉重( $r=0.478$ )、头胸甲-腹节长( $r=0.376$ )和腹节长( $r=0.370$ );在表型性状对出肉率的多元线性回归方程中,包括头胸甲-腹节长、体重和头胸甲-腹节长/全长3个性状,预测方程的决定系数为0.172。本研究首次在家系水平上表明,凡纳滨对虾保种群体家系间出肉率差异显著,但遗传变异度较低,为提高遗传进展,需进一步持续收集外部种质资源群体,并对出肉率进行家系间和家系内选择,以便获得期望的遗传进展。已测定表型性状与出肉率均处于中低度线性相关水平,初步获得与出肉率中度相关的间接选择性状;已构建的多元线性回归方程预测出肉率的准确度较低,因此,应进一步采用新的技术如超声波、核磁共振等,测定肌肉横截面积、腹节周长等新的性状,提高预测出肉率的准确性。

**关键词** 凡纳滨对虾; 家系; 出肉率; 相关

**中图分类号** S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)06-0063-08

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)是我国重要的对虾养殖品种,2012年海淡水养殖产量达145万t,占我国对虾总产量的90.4%(农业部渔业局,2013)。凡纳滨对虾壳薄体肥、肉质鲜嫩,深受国内外消费者的喜爱。然而,占凡纳滨对虾体重40%以上的头胸甲部

分无法食用,仅腹节部分可直接食用或加工为虾仁(王锭安等,2010)。因此,净肉重占体重比例(即出肉率)越高,其经济价值越大。不同物种的出肉率存在差异,罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*) (Hung *et al*, 2014)、小龙虾和龙虾(Silva *et al*, 2010)等其他甲壳类

\* 国家“863”项目“基于全基因组信息的对虾遗传选育”(2012AA10A404)和农业部948项目“基于高通量SNP信息的凡纳滨对虾分子辅助遗传评估技术引进”(2015-Z17)以及青岛市科技成果转化引导计划(青年专项)(14-2-4-52-jch)共同资助。

柴 展, E-mail: shandongchaizhan@163.com

① 通讯作者: 孔 杰, 研究员, E-mail: kongjie@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-11-19, 收修改稿日期: 2015-01-11

动物的出肉率分别为 37%–45%、15%–45%；即使是同一物种，不同研究者的报道也存在一定差异，如陈晓汉等(2001)测定了凡纳滨对虾的出肉率，其变化范围为 53.03%–53.81%，与 Kim 等(2011)报道的变化范围(52.1%–53.0%)相近，但低于 Briggs 等(2004)报道的范围(66%–68%)。

为了准确测定鱼虾个体的出肉率，通常需要杀死受试个体，但这种方法意味着无法实施家系内个体选择，只能进行家系间选择，因为出肉率高的个体已经被杀死，只能选择它的同胞个体留种(Sang *et al.*, 2009)。由此可见，家系间选择通常意味着无法实现遗传进展最大化，因此，寻找与“出肉率”这一参数值相关的形态性状，建立准确的预测方程成为育种研究中的一个重要内容。目前，已在鲈鱼(Bosworth *et al.*, 1998)、鲤鱼(*Cyprinus carpio*) (Cibert *et al.*, 1999)、养殖鲶鱼(Bosworth *et al.*, 2001)、罗非鱼(董在杰等, 2010)等物种中，报道了体重、体高、体长、体宽等性状与出肉率和净肉重的相关性；也已经报道了克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)、红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*) (安丽等, 2012)和凡纳滨对虾(李刚等, 2007)出肉率和形态性状的相关性，并建立了预测方程。

国内已报道的凡纳滨对虾出肉率测定结果，主要是从个体水平上进行分析，目前尚未见基于家系水平的大样本出肉率的测定报道。本研究选取了相同饲养条件下 42 个凡纳滨对虾家系，共计约 2094 尾凡纳滨对虾成虾，进行了出肉率和表型性状测定，从家系和个体水平上分析出肉率差异，尝试建立表型性状对出肉率性状的回归方程，以期为开展凡纳滨对虾出肉率性状的遗传评估提供基础数据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 凡纳滨对虾保种群体家系构建和养殖管理

奠基者群体为 2012 年引入国内的 8 个凡纳滨对虾亲本群体。将引进的亲虾进行免疫检验、隔离保种，每尾亲虾经过眼柄环标记后，放入虾池中强化培育。2012 年 3 月，挑选性腺发育成熟亲虾，利用定向交尾技术，通过巢式设计(2 尾雄虾与 1 尾雌虾交配；1 尾雌虾与 2 尾雄虾交配)成功建立全同胞家系。每个家系移入孵化车间独立的 170 L 孵化桶，水温 30℃孵化，全部家系生产周期为 24 d。

每个家系孵出幼体后，随机留取 1000 尾在 170 L 孵化桶内继续培育至仔虾。期间的饵料主要包括角毛藻、虾片、螺旋藻、卤虫和配合饲料等。每 4 h 喂 1 次，投喂量和投喂比例根据凡纳滨对虾不同发育阶段进行调整。每天换水，换水量逐渐增加，仔虾阶段

换水量达到 100%。仔虾平均体重达到 3 g 后，每个家系随机抽取 90 尾，单独移入 1 个正方形水泥池(1.2 m × 1.2 m × 0.8 m)养殖，作为保种群体。养殖期间，各家系水质控制、饵料投喂和日常管理等方面均按照标准化程序保持一致，降低各家系环境间的差异。家系个体平均日龄达到 350 d 时，随机选取 42 个家系(每个家系测定样本数大于 30 尾)，共计约 2094 尾凡纳滨对虾作为实验材料，测定表型性状和出肉率。

### 1.2 测量方法

**1.2.1 凡纳滨对虾保种群体表型性状的测量** 先将虾体用滤纸吸干表面水分，在电子天平上测定体重(*BW*)，然后使用直尺测量全长(*TL*)、体长(*BL*)、头胸甲长(*CL*)、腹节长(*SL*)和头胸甲-腹节长(*ESL*) 5 个表型性状。其中，体长是指从眼柄基部到尾脊末端的长度；全长是指从额剑前端到尾脊末端的长度；头胸甲长是指从眼柄基部到头胸甲后缘的长度；腹节长是指全部 6 个腹节的长度；头胸甲-腹节长是指从眼柄基部到第 6 腹节的长度。

$$\text{肥满度}(CF): CF = 100 \times BW / BL^3$$

**1.2.2 凡纳滨对虾保种群体出肉率的测定** 去除虾壳、附肢、鳃、胃等非肌肉部分，用滤纸吸干肌肉表面的水分，然后在电子天平上称重，即净肉重(*FW*)，并计算出肉率( $Y_F$ )：

$$Y_F = (FW / BW) \times 100\%$$

所有虾肉均为同一熟练工人剖取，避免人为因素导致净肉重不同。

### 1.3 数据处理

使用 Excel 对实验数据进行初步整理，然后采用 SPSS 17.0 对凡纳滨对虾表型性状和出肉率进行统计性描述、方差分析、相关以及逐步回归分析，并建立多元线性回归方程。

为进一步综合考虑不同表型性状，将各表型性状两两组合的比值作为新的性状，纳入相关和逐步回归分析中，主要包括 *SL/ESL*、*BL/TL*、*CL/TL*、*SL/TL*、*ESL/TL*、*CL/BL*、*SL/BL*、*ESL/BL* 和 *CL/SL* 等 9 个比值性状。

## 2 结果

### 2.1 凡纳滨对虾保种群体表型性状和出肉率的统计性描述

凡纳滨对虾保种群体出肉率和表型性状数据统计性描述值见表 1。净肉重和体重的分布范围分别为 3.20–31.60 g 和 6.80–56.10 g，变异系数分别为 31.91%

表 1 凡纳滨对虾保种群体表型和出肉率性状的统计性描述

Tab.1 Statistical description of phenotypic and fillet yield traits for the conservation population of *L. vannamei*

性状 Traits	均值 Mean	极小值 Minimum	极大值 Maximum	标准差 Standard deviation	变异系数 Variable coefficient(%)
出肉率 Fillet yield (%)	53.59	33.17	68.46	3.26	6.08
净肉重 Fillet weight (g)	14.21	3.20	31.60	4.54	31.91
体重 Body weight (g)	26.37	6.80	56.10	7.72	29.28
头胸甲长 Carapace length (cm)	3.51	2.30	4.80	0.36	10.17
腹节长 Segment length (cm)	7.79	5.00	12.30	0.77	9.87
头胸甲-腹节长 <i>ESL</i> (cm)	11.31	7.30	15.60	1.07	9.43
体长 Body length (cm)	13.08	8.50	21.10	1.19	9.11
全长 Total length (cm)	15.12	10.20	19.70	1.32	8.73
肥满度 Condition factor ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )	1.16	0.87	1.92	0.09	8.07

和 29.28%，个体间有较大差异。出肉率的均值为 53.59%，标准差为 3.26%，变异系数为 6.08%，个体间差异小。从变异系数看，出肉率的遗传改良速度要低于体重和净肉重。

## 2.2 凡纳滨对虾保种群体家系出肉率性能的比较

凡纳滨对虾保种群体 42 个家系出肉率的统计性描述见表 2。每个家系出肉率的变异系数的分布范围在 3.10%–11.05%之间。家系出肉率均值分布范围在 50.25%–59.51%之间，均值为(53.57±1.94)%，变异系数为 3.52%。家系出肉率的单因素方差分析结果见表

3，家系间差异达到极显著水平( $P<0.01$ )，对出肉率进行家系间选择可能具有较大的选择潜力。

## 2.3 凡纳滨对虾保种群体表型与出肉率性状的相关性

从表 4 可以看出，净肉重与出肉率相关系数最大( $r=0.478$ )，其次为头胸甲-腹节长、腹节长、全长、体长、头胸甲长、体重( $0.314\leq r\leq 0.376$ )，肥满度与出肉率的相关性最低( $r=-0.064$ )。在比值性状中，*ESL/TL*、*SL/TL* 与出肉率的相关性最高，分别为 0.117、0.109，二者与净肉重的相关性也是比值性状中最高的，分别达到 0.195、0.164。

表 2 凡纳滨对虾 42 个全同胞家系出肉率性能比较

Tab.2 Comparison of fillet yield performance of different families of *L. vannamei*

家系编号 Family No.	个体数 Number of individuals (ind.)	均值 Mean (%)	极小值 Minimum (%)	极大值 Maximum (%)	标准差 Standard deviation (%)	变异系数 Variable coefficient (%)
F31519	48	59.51	50.72	63.41	2.53	4.26
F31813	39	58.87	49.09	64.34	2.83	4.81
F31921	44	57.04	48.17	61.89	3.44	6.03
F31506	41	56.93	51.55	61.43	2.45	4.30
F31518	78	55.67	48.45	68.46	2.67	4.80
F31604	30	55.59	50.49	61.66	3.18	5.71
F31721	52	55.38	45.14	61.61	2.72	4.92
F31520	61	54.92	49.13	59.20	1.78	3.24
F31621	44	54.71	49.22	61.18	2.67	4.89
F32514	48	54.18	49.46	65.27	2.57	4.74
F32413	50	54.14	42.32	60.00	2.78	5.13
F32101	34	53.96	50.20	57.55	2.16	4.00
F32418	84	53.95	48.43	66.49	2.51	4.66
F31609	31	53.76	50.22	59.33	2.00	3.72
F31903	34	53.71	49.59	58.82	2.18	4.06
F31710	55	53.70	47.21	59.09	2.35	4.38
F31712	48	53.66	49.84	66.26	2.79	5.21

续表 2

家系编号 Family No.	个体数 Number of individuals (ind.)	均值 Mean (%)	极小值 Minimum (%)	极大值 Maximum (%)	标准差 Standard deviation (%)	变异系数 Variable coefficient (%)
F31405	69	53.63	48.31	59.43	2.33	4.35
F31410	47	53.58	47.38	58.69	2.18	4.07
F31511	53	53.52	46.93	61.00	2.56	4.78
F31515	69	53.40	47.57	60.91	2.26	4.23
F32001	47	53.25	48.53	59.23	2.20	4.12
F31411	65	53.22	46.47	57.43	1.93	3.63
F32010	45	53.21	50.00	57.04	1.81	3.41
F31608	60	53.02	49.24	64.90	2.37	4.47
F31809	54	52.99	47.67	60.15	2.36	4.46
F31504	48	52.85	47.01	57.14	2.44	4.61
F31701	41	52.57	48.11	58.02	2.41	4.58
F32107	71	52.53	42.64	57.21	2.75	5.22
F32421	68	52.45	37.82	59.07	3.01	5.74
F31803	35	52.29	39.08	58.66	3.43	6.55
F31909	79	52.19	46.86	66.67	3.04	5.82
F31706	55	52.15	42.86	67.11	3.73	7.16
F32316	30	52.14	48.65	56.61	1.87	3.58
F32308	41	52.10	43.73	59.49	3.63	6.97
F31507	48	52.07	43.22	63.08	3.04	5.84
F31517	40	51.89	48.45	55.18	1.61	3.10
F32002	53	51.81	47.50	56.14	2.01	3.87
F31616	46	51.23	36.90	59.12	4.19	8.17
F32415	45	51.22	43.59	58.10	3.41	6.66
F32506	34	51.03	43.75	57.91	3.59	7.03
F31901	30	50.25	33.17	64.97	5.55	11.05
均值 Mean	50	53.57	—	—	2.70	5.06
变异系数 Variable coefficient		3.52				

表 3 凡纳滨对虾 42 个全同胞家系的出肉率单因素方差分析  
Tab.3 ANOVA analysis of fillet yield among 42 full-sib families of *L. vannamei*

变异来源 Sources	平方和 Quadratic sum	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F	P
家系间 Between families	0.683	41	0.017	22.204	0
家系内 Within families	1.540	2052	0.001		
总计 Total	2.223	2093			

#### 2.4 凡纳滨对虾保种群体出肉率多元线性回归方程的建立

选择 *BW*、*CL*、*SL*、*ESL*、*BL*、*TL*、*CF*、*SL/ESL*、*BL/TL*、*CL/TL*、*SL/TL*、*ESL/TL*、*CL/BL*、*SL/BL*、*ESL/BL*、*CL/SL* 等表型性状，通过逐步回归法，初步构建了 4 个多元线性回归方程。尽管净肉重与出肉率的相关性最高，但由于获得该性状值要杀死个体，因此，无法

作为间接选择性状纳入回归方程中。综合多重共线性、决定系数、偏回归系数、方程截距、标准回归系数、标准误差以及回归系数的显著性检验结果等参数，获得表型性状对出肉率的最优多元线性回归方程：

$$y = 0.440 + 0.032 \text{ ESL} - 0.003 \text{ BW} - 0.257 \text{ ESL/TL}$$

该方程决定系数为 0.172，*ESL*、*BW* 和 *ESL/TL* 这 3 个自变量偏回归系数的统计性检验均达到显著性水

表 4 凡纳滨对虾性状间表型相关系数  
Tab.4 The phenotype correlation coefficient between the morphometric traits of *L. vannamei*

$Y_F$	$FW$	$BW$	$CL$	$SL$	$ESL$	$BL$	$TL$	$CF$	$SL/ESL$	$BL/TL$	$CL/TL$	$SL/TL$	$ESL/TL$	$CL/BL$	$SL/BL$	$ESL/BL$	$CL/SL$
$Y_F$	0.478**	0.314**	0.328**	0.370**	0.376**	0.362**	0.369**	-0.065**	0.051*	0.037	0.021	0.109**	0.117**	0.005	0.079**	0.075**	-0.054*
$FW$		0.982**	0.849**	0.906**	0.937**	0.928**	0.947**	0.147**	0.049*	0.090**	0.067**	0.164**	0.195**	0.014	0.091**	0.090**	-0.049*
$BW$			0.857**	0.911**	0.943**	0.936**	0.956**	0.172**	0.043	0.089**	0.068**	0.156**	0.188**	0.014	0.084**	0.083**	-0.045*
$CL$				0.763**	0.885**	0.878**	0.879**	0.011	-0.383**	0.143**	0.508**	-0.036	0.238**	0.413**	-0.119*	0.085**	0.384**
$SL$					0.976**	0.901**	0.919**	0.086**	0.300**	0.093**	-0.057**	0.468**	0.425**	-0.108**	0.362**	0.282**	-0.296**
$ESL$						0.943**	0.957**	0.066**	0.088**	0.115**	0.129**	0.325**	0.386**	0.061**	0.221**	0.232**	-0.085**
$BL$							0.960**	-0.101**	-0.001	0.309**	0.106**	0.126**	0.179**	-0.059	-0.067**	-0.090**	0
$TL$								0.061**	0.023**	0.032**	0.038**	0.084**	0.102**	0.017	0.054*	0.058**	-0.022
$CF$									0.106**	-0.569**	-0.087**	0.079**	0.030	0.321**	0.510**	0.619**	-0.105**
$SL/ESL$										-0.074**	-0.846**	0.706**	0.232**	-0.781**	0.674**	0.252**	-0.998**
$BL/TL$											0.238**	0.163**	0.287**	-0.276**	-0.424**	-0.519**	0.071**
$CL/TL$												-0.224**	0.319**	0.843**	-0.342**	0.082**	0.848**
$SL/TL$													0.852**	-0.305**	0.797**	0.589**	-0.696
$ESL/TL$														0.157**	0.591**	0.617**	-0.220**
$CL/BL$															-0.073**	0.403**	0.785**
$SL/BL$																0.883**	-0.663**
$ESL/BL$																	-0.240**
$CL/SL$																	

\* 表示差异显著 ( $P < 0.05$ ); \*\* 表示差异极显著 ( $P < 0.01$ )

\* means significant difference ( $P < 0.05$ ); \*\* means highly significant difference ( $P < 0.01$ )

平( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

#### 3.1 凡纳滨对虾保种群体出肉率比较分析

本研究中, 凡纳滨对虾 2012 年保种群体出肉率的均值为(53.59±3.26)%, 接近 Jory(2012)报道的海水虾类出肉率范围(56%–63%)。同一种对虾, 处于不同的生长发育阶段, 其出肉率可能存在差异。在已报道的凡纳滨对虾出肉率研究中, 所分析样本的平均体重或平均净肉重分别为 4.55–9.31 g (陈晓汉等, 2001)、4.20–14.69 g (田丽等, 2013)、21.9–23.6 g (Kim *et al.*, 2011)和 6.26 g (李刚等, 2007), 低于本研究测定样品的规格[平均体重为(26.37±7.72)g, 最大值为 61.80 g]。而 20–25 g 是凡纳滨对虾性腺开始发育的一个临界点, 而本研究中超过 25 g 的对虾占总测试虾的 49.8%, 由此推测, 体重的值越大, 一部分能量可能转换为性腺, 导致出肉率降低。

在出肉率的测定过程中, 不同的工人由于其操作熟练程度、个人习惯差异等原因, 也会造成出肉率的差异。使用 6 种解剖方法测定尼罗罗非鱼的出肉率, 即使是同一种鱼, 不同的剖肉方法, 所获得的出肉率也不相同(Souza *et al.*, 2002)。即使是同一种对虾, 不同的品系之间, 出肉率也存在差异(Rutten *et al.*, 2004; Peterman *et al.*, 2012)。

在本研究中, 家系间差异达到极显著水平( $P < 0.01$ ), 但是, 42 个家系出肉率均值分布范围在 50.25%–59.51% 之间, 家系间出肉率的变异系数仅为 3.52%, 表明凡纳滨对虾出肉率测定群体的遗传变异度较低。因此, 为进一步提高出肉率的遗传进展, 仍需进一步引入外部种质资源群体。

#### 3.2 凡纳滨对虾保种群体出肉率和形态性状的相关性回归分析

本研究中, 与出肉率性状相关性最高的性状为净肉重( $r=0.478$ )。然而, 获取净肉重需要杀死个体, 出肉率高的个体无法作为候选亲本, 只能选择其同胞个体参与下一代家系构建, 降低了选择的准确度和遗传进展。因此, 获取除了净肉重外与出肉率相关性较高的可直接测量性状尤为关键。本研究中, 与出肉率相关性较高的表型性状依次是头胸甲-腹节长、腹节长、全长、体长、头胸甲-腹节长、腹节长与全长, 相关系数的范围为 0.314–0.378。在克氏原螯虾和红螯螯虾出肉率和可量性状的相关性分析中(安丽等, 2012), 发现第一腹节宽与克氏原螯虾出肉率的相关性最高

( $r=0.370$ ); 姜巨峰等(2010)在丁鱼岁、川鲶的出肉率与可量性状相关性研究中发现, 与丁鱼岁出肉率最相关的性状为鱼的体高( $r=0.577$ )。在已报道的凡纳滨对虾、克氏原螯虾和红螯螯虾(安丽等, 2012)以及尼罗罗非鱼(董在杰等, 2010)的出肉率研究中, 尚未发现与出肉率高度线性相关的可直接测量性状( $r \geq 0.8$ )。

本研究首次根据凡纳滨对虾表型性状及其比值建立了出肉率的多元线性回归方程, 尽管所得方程的决定系数较低( $R^2=0.17$ ), 略高于国外学者由 4 个变量(体长、体高、体宽和头长)得到预测尼罗罗非鱼方程的决定系数( $R^2=0.15$ ) (Rutten *et al.*, 2004)。然而, 在鱼类育种中, 已经建立了出肉率预测准确度较高的多元线性回归方程, Sang 等(2009)利用鱼体的 4 个部位的长、高、宽、体积、周长等性状研究了鲶鱼的出肉率, 得到出肉率的预测方程的决定系数  $R^2$  高达 0.77; 在养殖鲶鱼中利用超声图像方法得到出肉率的预测方程的决定系数  $R^2=0.56$  (Bosworth *et al.*, 2001), 比利用传统方法研究的尼罗罗非鱼出肉率预测方程的决定系数( $R^2=0.14$ ) (Pires *et al.*, 2006)要高得多。受测定性状和解剖方法限制, 本研究已构建的多元线性回归方程预测出肉率的准确度较低, 下一步应考虑采用新的技术如超声波、核磁共振等, 测定肌肉横截面积、腹节周长等新的性状。

### 参 考 文 献

- 王锭安, 吉宏武. 冷冻即食熟虾仁加工工艺. 食品科技, 2010(4): 133–135
- 田丽, 文菁, 王雁. 凡纳对虾斑节对虾及日本对虾含肉率的比较. 农业与技术, 2013, 33(5): 231
- 安丽, 孟庆磊, 董学飒, 等. 克氏原螯虾和红螯螯虾出肉率与可量性状的相关性. 农学学报, 2012, 2(12): 54–56
- 农业部渔业局. 2013 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2013
- 李刚, 刘小林, 黄皓, 等. 凡纳滨对虾净肉质量的影响因素分析. 海洋科学, 2007, 31(6): 70–74
- 陈晓汉, 陈琴, 谢达祥. 南美白对虾含肉率及肌肉营养价值的评定. 水产科技情报, 2001, 28(4): 165–168
- 姜巨峰, 王玉佩, 李春艳, 等. 丁鱼岁和川鲶含肉率与可量性状的相关性分析. 河北渔业, 2010, 3(10): 8–10
- 董在杰, 梁政远, 徐跑, 等. 尼罗罗非鱼出肉率与可量性状的相关性. 中国水产科学, 2010, 17(2): 212–217
- Bosworth BG, Holland M, Brazil BL, *et al.* Evaluation of ultrasound imagery and body shape to predict carcass and fillet yield in farm-raised catfish. *J Anim Sci*, 2001, 79(6): 1483–1490
- Bosworth BG, Libey GS. Relationship among total weight, body shape, visceral components, and fillet traits in palmetto bass (Striped bass female *Morone saxatilis* × white bass male

- M. chrysops*) and paradise bass (Striped bass female *Morone saxatilis* × yellow bass male *M. mississippiensis*). J World Aquacult Soc, 1998, 29(1): 40–50
- Briggs M, Funge-Smith S, Subasinghe R, *et al.* Introduction and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. FAO: Publication, RAP, 2004
- Cibert C, Fermon Y, Vallod D, *et al.* Morphological screening of carp *Cyprinus carpio*: relationship between morphology and fillet yield. Aquat Living Resour, 1999, 12(1): 1–10
- Hung D, Nguyen NH. Modeling meat yield based on measurements of body traits in genetically improved giant freshwater prawn (GFP) *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture International, 2014, 22(2): 619–631
- Jory DTC. Marine Shrimp. In: Lucas JS, Southgate PC (eds) Aquaculture: Farming Aquatic Animals and Plants, 2nd edn. Oxford: Wiley-Blackwell, 2012, 648
- Kim JD, Nhut TM, Hai TN, *et al.* Effect of dietary essential oils on growth, feed utilization and meat yields of white leg shrimp *L. vannamei*. Asian-Australas J Anim Sci, 2011, 24(8): 1136–1141
- Peterman MA, Phelps RP. Fillet yields from four strains of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and a red variety. J Appl Aquacult, 2012, 24(4): 342–348
- Pires AV, Fonseca AM, Silva LHS, *et al.* Modeling fillet weight and fillet yield on body traits in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Brazil: Belo Horizonte, Minas Gerais, 2006
- Rutten JM, Bovenhuis H, Komen H, *et al.* Modeling fillet traits based on body measurements in three Nile tilapia strains (*Oreochromis niloticus* L.). Aquaculture, 2004, 231(1–4): 113–122
- Sang NV, Thomassen M, Klemetsdal G, *et al.* Prediction of fillet weight, fillet yield, and fillet fat for live river catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). Aquaculture, 2009, 288(3–4): 166–171
- Silva JL, Philips H, Madrid RMM. Post-harvest handling and processing. In: New MB, Valenti WC, Tidwell JH, *et al.* (eds) Freshwater Prawns: Biology and Farming. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010, 400–419
- Souza MLR. Comparison of six filleting methods and their relation with fillet yield and by-products of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) processing. Revista Brasileira de Zootecnia, 2002, 31(3): 1076–1084

(编辑 冯小花)



## Correlation Analysis of Fillet Yield with Phenotypic Traits for Families from Conservation Population of *Litopenaeus vannamei*

CHAI Zhan<sup>1,2</sup>, LUAN Sheng<sup>2</sup>, LUO Kun<sup>2</sup>, KONG Jie<sup>2①</sup>, XU Shengyu<sup>3</sup>

(1. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. Qingdao Higen Aquabreeding Technology CO., LTD, Qingdao 266071)

**Abstract** The objective of this study on Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) was to evaluate the fillet yield performance of different families in the conservation population. A multivariate linear regression equation of fillet yield was established to find alternative indirect traits of fillet yield. A total of 2094 shrimps from 42 full-sib families were randomly sampled for measuring phenotypic traits and fillet yield in the conservation population after rearing 350 days. These traits were measured for each shrimp: fillet weight(*FW*), body weight(*BW*), carapace length(*CL*), segment length(*SL*), the length from the base of eye stalk to the 6th segment(*ESL*), body length(*BL*), total length(*TL*) and condition factor(*CF*). Fillet yield was obtained after anatomizing the shrimp and taking the meat. Differences of fillet yield between different families were analyzed using the ANOVA method. The component of variance and heritability of fillet yield trait were estimated using REML method and an individual animal model. Correlation coefficients between the phenotypic traits and fillet yield were calculated, and the prediction equations for fillet yield were established using step-wise regression analysis method. The results showed that the average fillet yield was 53.59% in *L. vannamei*. The mean of fillet yield between families ranged from 50.25% to 59.51%. The variation coefficient of fillet yield was 6.08% and there were significant differences between families ( $P < 0.01$ ). Three traits having strong correlation with fillet yield were *FW* ( $r=0.478$ ), *ESL* ( $r=0.376$ ) and *SL* ( $r=0.370$ ). The multivariate linear regression equation for fillet yield was composed of *ESL*, *BW* and *ESL/TL*, and the coefficient of determination of the equation was 0.172. This study first implied that difference between families for fillet yield was significant. Although genetic variation for fillet yield was poor at the family level in the conservation population of *L. vannamei*, improved strains or populations will be introduced to increase genetic gain of fillet yield, and desirable genetic gain will be obtained using inter-family and within-family selections. Indirect selection traits with moderate correlation with fillet yield were found because correlation coefficient between phenotypic traits and fillet yield varied from low to moderate. In this study, the prediction accuracy of the constructed multiple linear regression equation for predicting fillet yield was low. Therefore, new technologies including ultrasound, magnetic resonance imaging should be developed, and new traits including cross-sectional area of muscle, circumference of segment should be measured in the future study.

**Key words** *Litopenaeus vannamei*; Family; Fillet yield; Correlation

① Corresponding author: KONG Jie, E-mail: kongjie@ysfri.ac.cn

# 聚β-羟基丁酸酯对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)非特异性免疫力及氨氮胁迫后免疫基因表达量的影响\*



邓康裕<sup>1,2</sup> 孟宪红<sup>2①</sup> 孔杰<sup>2</sup> 张恒恒<sup>2,3</sup> 史晓丽<sup>2</sup> 曹家旺<sup>2</sup>  
罗坤<sup>2</sup> 栾生<sup>2</sup> 曹宝祥<sup>2</sup> 刘宁<sup>2</sup>

(1. 南京农业大学无锡渔业学院 无锡 214081; 2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 大连海洋大学水产与生命学院 大连 116023)

**摘要** 以凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)为研究对象,探讨饲料中添加聚β-羟基丁酸酯(Poly-β-hydroxybutyrate, PHB)对其非特异性免疫能力的影响。采用单因子浓度梯度法,在基础饲料中分别添加1.0%、2.5%和5.0%的PHB配制成实验饲料,饲喂21 d后测定对虾免疫酶活性,选择最佳浓度组与空白对照组进行氨氮胁迫实验,测定对虾丙二醛(MDA)含量,同时利用RT-PCR技术测定氨氮胁迫48 h内对虾免疫基因表达水平,观察PHB对免疫基因表达量的影响。结果显示,总抗氧化能力(T-AOC)随PHB浓度升高呈现先上升后下降的趋势,血液、肝胰腺及鳃丝中T-AOC分别在2.5%、2.5%及1.0% PHB浓度时达到最高;PHB对肝胰腺中超氧化物歧化酶(SOD)活力无显著影响,血淋巴及鳃丝中SOD活力在最高浓度组(5.0% PHB)与对照组之间差异显著( $P < 0.05$ );过氧化物酶(POD)和溶菌酶(LZM)在鳃和肝胰腺中的活力于PHB浓度为1.0%和2.5%时达到最高,其中POD相对于对照组分别提高了7.63倍和0.68倍,LZM活力分别提高了0.88及0.18倍。氨氮胁迫实验结果显示,对虾经PHB饲喂后,体内免疫基因表达量高于对照组,且体内MDA含量低于对照组。综上结果说明,PHB能提高凡纳滨对虾非特异性免疫能力。

**关键词** 凡纳滨对虾;聚β-羟基丁酸酯;免疫因子;酶活力;RT-PCR

中图分类号 S973 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2015)06-0071-08

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)属于无脊椎动物,其免疫反应主要是先天性免疫。Fearon(1996)发现先天性免疫对获得性免疫具有指导作用,将先天性免疫提升到了重要地位。对虾在胁迫条件下可导致机体代谢紊乱、自由基生成过多,从而造成组织损伤甚至死亡。组织中抗氧化酶系统可以清除体内过多的

氧自由基,超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)等是研究较多的免疫因子,其在一定程度上可以反映机体的抗氧化应激能力(管晓娟,2009;刘晓华等,2007)。同时,在胁迫条件下,机体对病菌的易感性提高(刘强等,2013;管越强,2003<sup>1)</sup>)。总抗氧

\* 国家自然科学基金面上项目(31172402)、广东省水产良种体系建设项目“南美白对虾育种关键技术研究及其产业化”(zj0001)、江苏省科技支撑计划“凡纳滨对虾育繁养推关键技术集成创新与示范”子课题(BE2014414)共同资助。邓康裕, E-mail: dengkangyu@yeah.net

① 通讯作者:孟宪红,研究员, E-mail: mengxh@ysfri.ac.cn

收稿日期:2014-11-27, 收修改稿日期:2014-12-07

1) 管越强. 主要环境因子对养殖对虾抗病力及白斑综合征发生的影响. 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士研究生学位论文, 2003

化能力(T-AOC)是衡量机体抗氧化酶系统及非酶促系统对外界应激能力的重要指标(谭树华等, 2005)。溶菌酶(LZM)是甲壳动物非特异性免疫系统的重要组成部分, 可以水解革兰氏阳性菌细胞壁中 N-乙酰葡萄糖胺与 N-乙酰胞壁酸之间的  $\beta$ -1,4-糖苷键, 破坏细胞内外的渗透压, 裂解细胞(管晓娟, 2009)。而过多的氧自由基可以造成体内脂质过氧化物(MDA)的生成, 引起细胞损伤。

凡纳滨对虾作为我国重要的经济养殖水产动物, 促进了国内水产养殖行业的发展。随着其高密度集约化养殖, 养殖过程中普遍出现水体质量下降, 病害问题也日益严重。氨氮胁迫是凡纳滨对虾养殖过程中最易出现的胁迫, Romano 等(2007)、洪美玲(2007)<sup>1)</sup>和 Bucher 等(1993)研究表明, 氨氮能破坏水产动物的鳃、肝和肾组织, 并通过渗透作用进入血淋巴, 对水产养殖动物的排泄(姜令绪等, 2004)、呼吸和生长发育等生理功能产生毒害作用(de Freitas Rebelo *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 1992; Koo *et al.*, 2005)。高浓度的氨氮抑制甲壳动物体内抗氧化酶的催化作用并破坏细胞膜的稳定性, 进而影响渗透平衡(孙舰军等, 1999)。Martinez-Cordova 等(2003)研究表明, 降低饲料中蛋白含量可以降低凡纳滨对虾的氨氮排泄水平。

聚  $\beta$ -羟基丁酸酯(Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate, PHB)是短链脂肪酸(Short chain fatty acid, SCFA)的聚合体, 可以在肠道内通过水解作用形成丁酸。SCFA 具有抑菌、降低动物肠道 pH 值和促进营养物质吸收利用等生理功能, 是一种具有广泛应用前景的生物活性物质和饲料添加剂(Mathew *et al.*, 1996; Antongiovanni *et al.*, 2007)。Nhan 等(2010)研究发现, 在饲料中添加 PHB 能够促进罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)的生长, 并有利于肠道益生菌的形成。另外, PHB 在一定程度上能够提高中国对虾抗白斑综合征病毒的能力(邓康裕等, 2014)。国内外研究多着重于 PHB 对生长及抑菌作用, 其对机体内部免疫力的研究鲜有报道。

本研究选用世界三大养殖对虾中的凡纳滨对虾, 利用添加 PHB 的饲料投喂凡纳滨对虾, 并使用最佳浓度组与空白对照组进行氨氮胁迫, 探讨 PHB 对凡纳滨对虾免疫能力的影响, 以期 PHB 投入生产实践提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

凡纳滨对虾取自中国水产科学研究院黄海水产研究所青岛国家海洋科学研究中心培育的凡纳滨对虾仔虾, 平均体重为 3.18–3.53 g, 暂养期间投喂不含 PHB 的基础饲料驯化 7 d, 实验前 1 d 停止喂食。

### 1.2 饲料及制备

基础饲料配方由中国水产科学研究院黄海水产研究所食品工程与营养研究室提供。实验饲料在基础饲料配方上添加不同量的 PHB, 采用逐级放大方式混合原料, 饲料原料经过 60 目粉碎后制成颗粒, 放于密封袋内, 存放于通风干燥区域。

### 1.3 实验管理

将 360 尾凡纳滨对虾随机分为 4 组(对照组及实验组 A、B、C), 每组 3 个重复, 每个重复 30 尾, 饲养于 140 L 白桶内, 置于恒温水浴池中。对照组投喂不含 PHB 的基础饲料, 实验组依次投喂含 PHB 浓度为 1.0%、2.5%、5.0%的饲料, 每天投喂 3 次(07:00、13:30、22:00), 日投喂量为体重的 5%。养殖期间, 水温为 26℃, pH=7.2,  $\text{NH}_4^+\text{-N}<0.2 \text{ mg/L}$ , 养殖历时 21 d。每周开始时称量各组对虾体重, 进行投喂量调整, 同时记录各组实验对虾数量。

### 1.4 样品采集与处理

养殖实验结束后, 实验对虾饥饿 24 h, 每组随机取虾 3 尾, 自对虾头胸甲后插入围心腔取血淋巴液, 吸取等量抗凝剂混匀后置于离心管中, 4℃、8000 r/min 离心 10 min, 取上清液用于血淋巴非特异性免疫指标的测定。取血淋巴后, 该对虾的鳃、肝胰腺组织按照 1:9 (W/V)的比例加 PBS 后, 于超低温组织破碎仪中低温破碎, 4℃、4000 r/min 离心 10 min, 取上清液待测。

酶活力指标参照南京建成生物研究所试剂盒进行测定。测定的酶活力指标包括 T-AOC、SOD、POD、LZM 及 MDA。

### 1.5 氨氮胁迫测试

养殖实验结束后, 加分析纯  $\text{NH}_4\text{Cl}$  使水体中铵

1) 洪美玲. 水中亚硝酸盐和氨氮对中华绒螯蟹幼体的毒性效应及维生素 E 的营养调节. 华东师范大学博士研究生学位论文, 2007

2) 郭艳. Survivin、hTERT 及 STK15 在喉鳞状细胞癌中的表达及临床意义. 天津医科大学硕士研究生学位论文, 2009

3) 逢锦菲. “黄海 2 号”中国对虾高通量 SNP 筛选及其与抗 WSSV 性状的关联分析. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2013

离子态的氮浓度为 15 mg/L, 于 0、3、6、12、24、48 h 心脏采血, 解剖后取肝胰腺、鳃丝, 液氮冻存。RNA 提取方法使用 Trizol 法, 具体参考郭艳(2009)<sup>1</sup>。cDNA 合成使用 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser(TaKaRa)试剂盒进行。

1.6 基因相对表达量的测定

SOD、LZM、GSH-Px 引物设计参照刘群芳等(2013), 18S 序列参照逢锦菲(2013)<sup>2</sup>, CAT 引物序列根据 GenBank: AY518322.1 设计(表 1)。反应程序参照 SYBR® Premix Ex Taq™ II (TaKaRa)试剂盒说明书进行。所有实验设 3 个平行。结果使用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法进行处理, 使用 SPSS 软件 t 检验进行显著性分析。

表 1 RT-PCR 定量引物序列  
Tab.1 The primer sequences in real-time PCR

引物 Primer	序列 Sequence (5'→3')
18S-F	TATACGCTAGTGGAGCTGGAA
18S-R	GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT
SOD-F	TGCCACCTCTCAAGTATGATTTTC
SOD-R	TCCAACCAACTTCTTCGTAGCG
CAT-F	TCAAGTGGCGATTACCCCTC
CAT-R	TCTGCTCCACCTCAGCAAAG
GSH-Px-F	AAGATGGTTATGTTTCGGCAAAG
GSH-Px-R	GCAGACAGGTGTCCAAATGAT
LZM-F	TATTCTGCCTGGGTGGCTTAC
LZM-R	CTAGAACATAGAGCTCGAAGTGTC

1.7 数据处理

实验数据以平均值±标准差表示, 采用 SPSS 17.0 进行差异显著性分析和多重比较, 差异显著水平为 P<0.05。

2 结果

2.1 PHB 对凡纳滨对虾非特异性免疫酶活性的影响

实验发现, 不同浓度的 PHB 对对虾的非特异性免疫酶活力具有不同的影响(图 1)。PHB 对凡纳滨对虾 T-AOC 影响较一致, 在鳃、肝胰腺及血淋巴中, T-AOC 随饲料中 PHB 浓度升高呈现先上升后下降的趋势, 分别在 PHB 浓度为 2.5%、2.5%及 1.0%时达到最高, 分别为空白对照组的 4.32 倍、1.53 倍和 1.03 倍。与空白组相比, PHB 对肝胰腺 SOD 酶活力无显

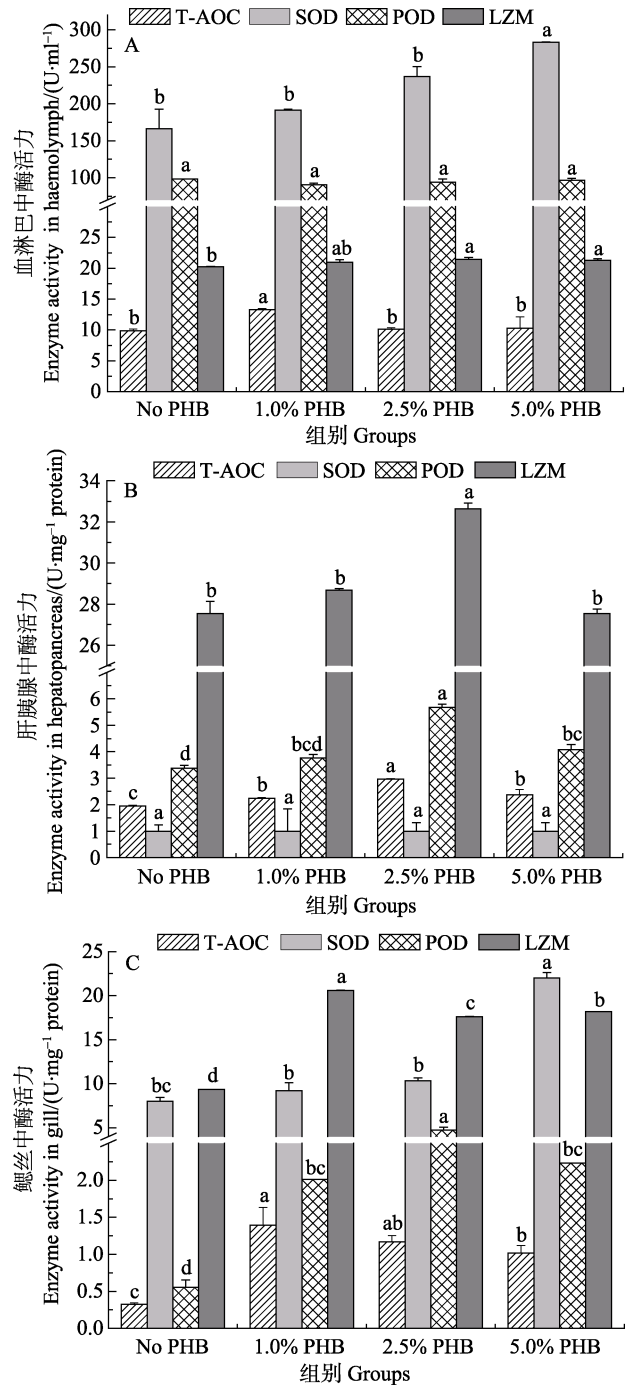


图 1 凡纳滨对虾不同组织中 T-AOC、SOD、POD、LZM 活力  
Fig.1 The activity of T-AOC, SOD, POD, and LZM in different tissues of *L. vannamei*

柱形图数据均以平均值±标准差表示, 相同酶标注不同字母表示差异显著(P<0.05)  
Each pillar represents the mean value from three determinations with the standard deviations (SD).  
Data (Mean±SD) with different letters significantly differ in the same enzyme (P<0.05)

1) 郭艳. Survivin、hTERT 及 STK15 在喉鳞状细胞癌中的表达及临床意义. 天津医科大学硕士研究生学位论文, 2009  
2) 逢锦菲. “黄海 2 号”中国对虾高通量 SNP 筛选及其与抗 WSSV 性状的关联分析. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2013

著影响( $P<0.05$ ),其余组织中 SOD 酶活力均提高,且血淋巴和鳃丝中 SOD 活力在最高浓度组(5.0% PHB)与对照组具有显著差异( $P<0.05$ )。PHB 对 POD、LZM 活力影响在鳃丝及肝胰腺中表现一致,POD 及 LZM 在鳃和肝胰腺中活力分别于 1.0% PHB 和 2.5% PHB 时达到最高,相对于对照组,POD 活性分别提高了 7.63 倍和 0.68 倍,LZM 活力则分别提高了 0.88 倍及 0.18 倍。在血淋巴中,PHB 对 POD 活力无显著影响( $P>0.05$ ),但能显著提高 LZM 活力( $P<0.05$ )。

## 2.2 PHB 对氨氮胁迫后组织中 MAD 含量的影响

氨氮胁迫后,饲喂 2.5% PHB 的对虾体内 MDA 含量要低于未投喂 PHB 的空白对照组,在血淋巴中差异显著( $P<0.05$ )。氨氮胁迫的 48 h 内,鳃中各时间点 MDA 含量变化不显著( $P>0.05$ ),血液及肝胰腺中均呈现先上升后下降的趋势,但二者变化不完全一致。血液中 MDA 含量在 6 h 达到最高,随后下降至最初水平,实验组对虾 MDA 含量下降至 24 h 达到稳定水平且低于最初水平。肝胰腺 MDA 含量在 6 h 上升到最高水平后下降,之后基本维持在同一水平,对照组与实验组在 48 h 含量为初始值的 1.21 倍和 1.18 倍。

## 2.3 PHB 对氨氮胁迫后组织中免疫基因表达量的影响

利用实时荧光定量 RT-PCR 测定 2.5% PHB 组对虾体内免疫基因在氨氮胁迫后的变化(图 2)。在氨氮胁迫后,血淋巴中 SOD 表达水平上升,在 12 h 达到最高,随后开始下降,至 48 h 其表达水平仍高于 0 h。肝胰腺及鳃中自胁迫开始 SOD 含量下降,但两部位的变化不完全一致。肝胰腺自胁迫开始 SOD 显著低于初始值( $P<0.05$ ),鳃丝中 SOD 含量在 6 h 达到最低后开始上升,至 48 h 恢复到初始水平。

抗氧化系统中的 CAT、GSH-Px 表达量在血淋巴、鳃丝、肝胰腺中 3 h 内均急速上升,CAT 分别为初始值的 3.54、3.35、3.35 倍,GSH-Px 分别为初始值的 13.01、2.60、5.78 倍。CAT 含量经过急速上升后急速下降,然后缓慢升高。3 h 后,GSH-Px 在血淋巴及肝胰腺中变化一致,缓慢下降至最低值,鳃中 GSH-Px 在 3 h 后略有下降,但基本维持在稳定水平。

LZM 在氨氮胁迫后在 3 种组织中变化完全不同。肝胰腺中 LZM 在胁迫后开始下调表达达到最低值后然后上升,鳃中呈现先缓慢上调后下调的趋势。而在血淋巴中,LZM 水平在胁迫的 6 h 内与 0 h 无显著差异( $P>0.05$ ),随后开始下调表达。

## 2.4 PHB 对氨氮胁迫后凡纳滨对虾免疫基因表达增强效应

相对于对照组,投喂 2.5% PHB 的对虾体内 SOD、CAT、GSH-Px、LZM 基因表达量均高于对照组(图 3)。在氨氮胁迫后,血淋巴中 SOD 及 CAT 比值呈现先上升后下降再上调的趋势,到 48 h,表达量是对照组的 3.81 倍和 1.56 倍( $P<0.05$ )。肝胰腺及鳃中 SOD 和 CAT 活力则呈现略微下降后上升,表达水平与 0 h 无显著差异( $P>0.05$ )。而 GSH-Px、LZM 基因表达在肝胰腺中均呈现先上升后下降的趋势,至实验结束时仍是对照组的 2.24 倍和 2.36 倍。而在血淋巴及鳃中 GSH-Px 和 LZM 比值在胁迫后略微下降后上升再下降。

## 3 讨论

PHB 首先被发现于巨大芽孢杆菌(*Bacillus pasteurii*)中,随后被分离用于研究。PHB 的疏水性避免了短链脂肪酸的过多挥发,对水质具有保护作用

表 2 氨氮胁迫下凡纳滨对虾不同组织中 MDA 含量  
Tab.2 Effects of ambient ammonia on MDA level in tissues of *L. vannamei*

时间 Time(h)	血淋巴 Haemolymph		肝胰腺 Hepatopancreas		鳃丝 Gill	
	0	2.5%	0	2.5%	0	2.5%
0	15.443±1.209 <sup>b</sup>	10.574±2.094 <sup>b/*</sup>	16.980±7.759 <sup>b</sup>	14.079±2.524 <sup>c</sup>	9.847±6.519 <sup>a</sup>	9.712±4.269 <sup>a</sup>
3	21.603±1.715 <sup>a</sup>	9.991±0.224 <sup>bc/*</sup>	26.095±12.320 <sup>b</sup>	17.921±3.887 <sup>bc</sup>	10.313±2.411 <sup>a</sup>	10.001±1.659 <sup>a</sup>
6	20.615±0.913 <sup>a</sup>	13.802±1.003 <sup>a/*</sup>	46.286±9.666 <sup>a</sup>	38.711±4.623 <sup>a</sup>	13.978±7.007 <sup>a</sup>	11.800±4.289 <sup>a</sup>
12	15.382±0.804 <sup>b</sup>	9.521±0.633 <sup>bc/*</sup>	21.573±4.828 <sup>b</sup>	20.432±2.695 <sup>b</sup>	12.007±2.846 <sup>a</sup>	11.000±1.507 <sup>a</sup>
24	12.436±1.473 <sup>c</sup>	8.214±0.868 <sup>d/*</sup>	18.097±7.063 <sup>b</sup>	15.713±3.187 <sup>c</sup>	12.034±4.869 <sup>a</sup>	10.239±4.596 <sup>a</sup>
48	14.128±0.904 <sup>bc</sup>	7.976±0.764 <sup>cd/*</sup>	20.691±4.927 <sup>b</sup>	16.606±1.704 <sup>bc</sup>	9.282±3.121 <sup>a</sup>	9.661±2.719 <sup>a</sup>

注:表中数据以平均值±标准差表示,同列中不同字母上标表示差异显著( $P<0.05$ ),\*表示同一时间点相同部位 MDA 含量与对照组相比具有显著差异( $P<0.05$ )

Note: Data (Mean±SD) within the same column with different letters significantly differ ( $P<0.05$ ), data with \* in the same tissue at the same point significantly differ compared to the control group ( $P<0.05$ )

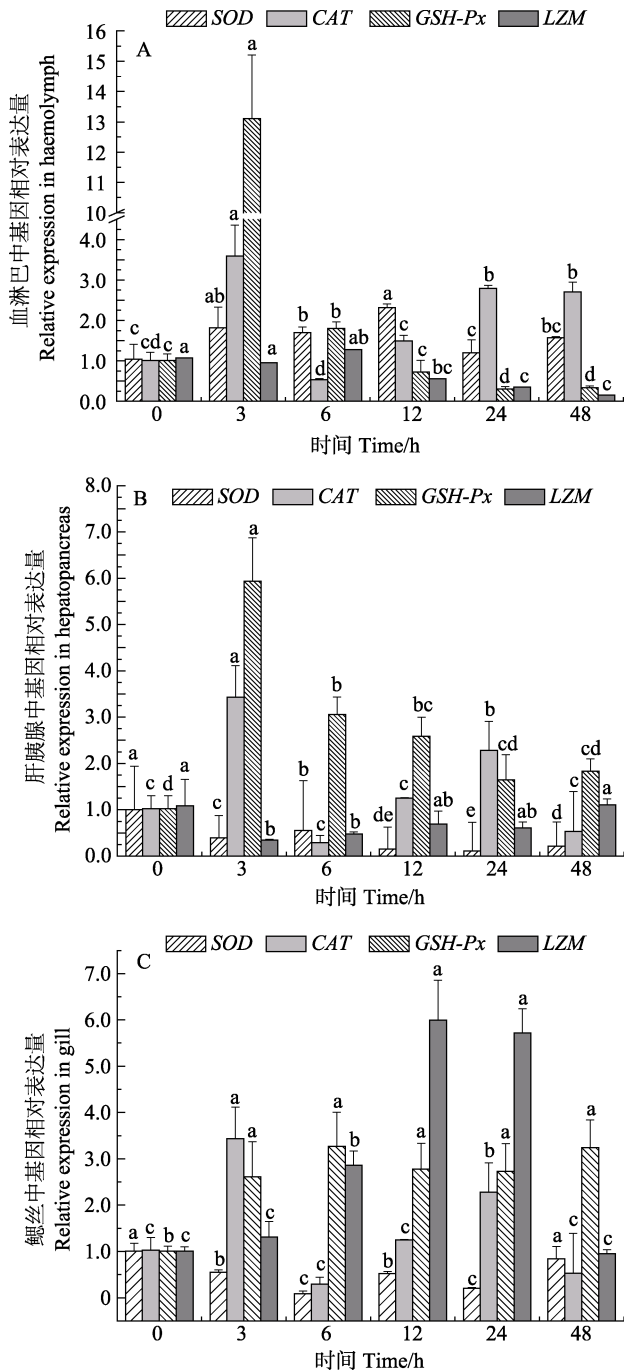


图 2 氨氮胁迫后凡纳滨对虾 *SOD*、*CAT*、*GSH-Px*、*LZM* 相对表达水平

Fig.2 The relative expression level of *SOD*, *CAT*, *GSH-Px* and *LZM* in *L. vannamei* under ammonia stress

每个柱形图数据均以平均值±标准差表示，相同基因标注不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )

Each pillar represents the mean value from three determinations with the standard deviations (SD).

Data (Mean±SD) for the same gene with different letters significantly differ ( $P < 0.05$ ) among treatments

用。但 PHB 颗粒在水中易结块，实验中将 PHB 与饲料混合后进行投喂，保证其饲喂水产动物的效果。

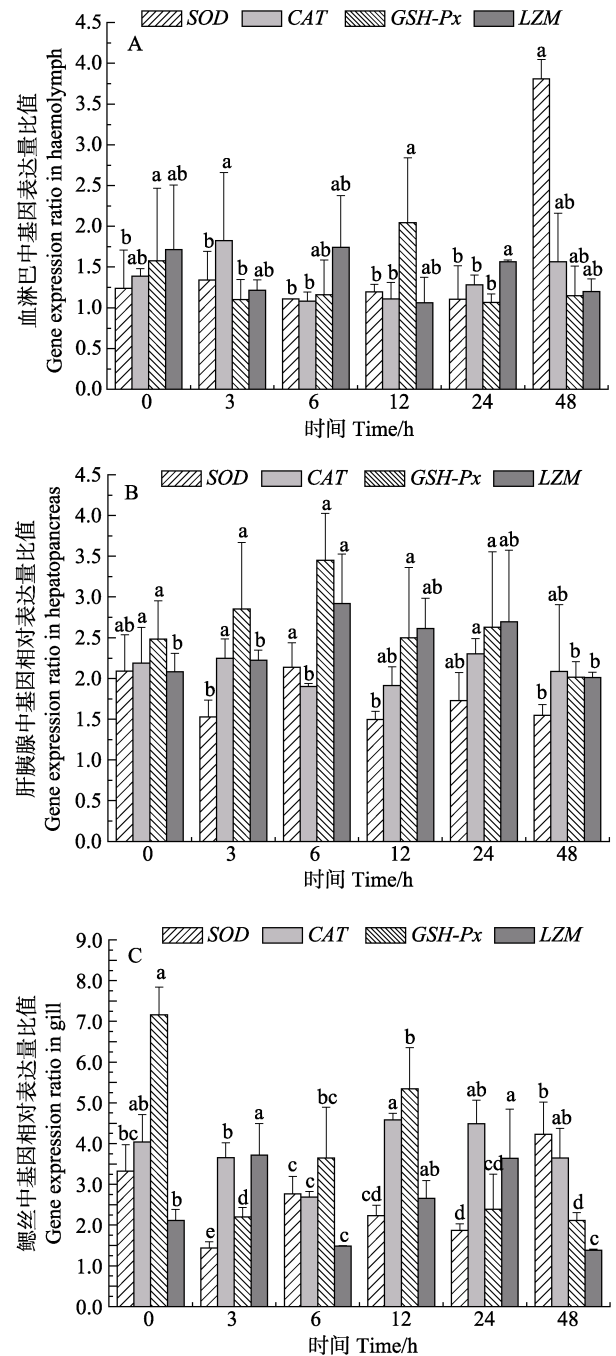


图 3 PHB 对氨氮胁迫后凡纳滨对免疫基因表达增强效应

Fig.3 The expression enhancing effects of immune gene in *L. vannamei* under ammonia stress after feeding with PHB

每个柱形图数据均以平均值±标准差表示，相同基因标注不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )

Each pillar represents the mean value from three determinations with the standard deviations (SD).

Data (Mean±SD) with different letters significantly differ ( $P < 0.05$ ) among treatments

刘树青等(1999)认为，过氧化物酶活力的提高可以提高动物机体的解毒免疫功能和防病抗病能力，研究分析了组织中非特异性免疫因子的变化，以反应

PHB 对凡纳滨对虾非特异性免疫能力及氨氮耐受力的影响。

本研究中, PHB 对 SOD 酶活性无影响, 但对虾经 PHB 投喂后体内 T-AOC 显著上升( $P < 0.05$ )。这可能是由于 PHB 提高了机体某些抗氧化物质而造成总抗氧化能力上升, 例如本研究中 PHB 对 POD 酶的影响显著。对虾经 PHB 饲喂后, LZM 活力要高于对照组, 在血液中尤其显著( $P < 0.05$ ), 这与一些研究相似, 杨鸢劫等(2008)研究发现, 在饲料中添加脂肪酸后能提高黄鳝血清 LZM 活性和血细胞吞噬能力。Puangkaew 等(2004)在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss* Walbaum)饲料中添加脂肪酸后, 提高了巨噬细胞杀菌能力。PHB 提高机体免疫酶活性的原因可能与其在体内代谢产生的  $\beta$ -羟基丁酸并改变体内微生物菌群丰富度有关。丁酸对肠道黏膜有营养性作用, 进而保护肠道黏膜和机体免疫系统(徐世伟等, 2002)。Manzanilla 等(2006)研究发现, 在仔猪中添加丁酸钠盐可以增加肠道淋巴细胞数量, 提高肠道免疫功能。另外, 脂溶性、非游离态的  $\beta$ -羟基丁酸能穿过革兰氏阴性细菌( $G^-$ )的细胞膜, 在偏碱性的胞质中转变为游离态并释放  $H^+$ , 而较低的 pH 抑制酶活性, 使微生物利用能量释放质子, 进而抑制  $G^-$  的生长, 促进有益菌生长。益生菌能够通过本身或者细胞壁成分刺激宿主非特异性免疫系统, 从而提高动物免疫力(Rengpipat *et al.*, 2000; 北平等, 2003; Chang *et al.*, 2003)。王玲等(2011)研究发现, 在饲料中添加枯草芽孢杆菌可显著影响凡纳滨对虾酸性磷酸酶(ACP)和酚氧化酶(PO)活性, 但对 SOD 及 POD 影响不显著。而胡毅等(2008)在饲料中添加益生菌后发现, 凡纳滨对虾的血淋巴 LZM、T-AOC 及 PO 活性上升。本研究结果显示, PHB 能提高凡纳滨对虾的非特异性免疫力, 这与 PHB 能够提高中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)的非特异性免疫能力(刘玉等, 2013)的研究结果类似。

甲壳动物在胁迫环境条件下会出现免疫力下降及对病原菌的抵抗力减弱的现象(Liu *et al.*, 2004; Le Moullac *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2002、2003; Vergheze *et al.*, 2007)。氨氮胁迫会引起机体免疫指标的变化, MDA 反映机体脂质氧化程度, 间接反映细胞损伤程度(陈新谦等, 1985)。与对照组相比, 2.5% PHB 浓度组中 MDA 含量低于对照组, 在血液中表现尤为显著( $P < 0.05$ )。该结果说明, PHB 能提高机体的抗氧化能力、减少机体损伤。氨氮胁迫后, 随氨氮胁迫时间延长, MDA 含量为先上升后下降, 且不同部位变化趋势不相同, 可能与氨氮胁迫途

径有关。水体中氨氮通过扩散作用和主动运输经鳃与氧一起进入血淋巴, 鳃吸收的氨氮大部分进入血淋巴(刘晓华等, 2007), 肝胰腺是主要的解毒器官。氨氮胁迫后各组织 MDA 含量变化趋势说明, 对于该浓度的氨氮胁迫, 凡纳滨对虾肝胰腺敏感性最高, 其次为血液, 然后是鳃丝。推测肝胰腺可能是凡纳滨对虾主要的氨氮代谢中心。

PHB 作为短链脂肪酸  $\beta$ -羟基丁酸的聚合物, 能够影响基因表达。研究发现, SCFA 可以影响刺激人或动物的 G-蛋白耦合受体, 进而影响某些物质的释放(Karaki *et al.*, 2006、2008)。经过氨氮胁迫后, 各免疫基因出现波动变化, 说明氨氮胁迫对凡纳滨对虾免疫系统是一个明显刺激。对比饲喂 PHB 组与对照组之间对虾体内免疫基因表达量的差别, 发现仅血液部位 SOD 表达量与对照组无显著差别, 对虾体内免疫基因表达量均显著高于对照组( $P < 0.05$ )。另外, 在氨氮胁迫后, 实验组免疫基因表达量均高于对照组, 说明投喂 PHB 后对虾免疫系统反应应激能力提高。

综上所述, 本研究中添加 PHB 可以提升凡纳滨对虾的免疫力, 并且提升机体对外界环境胁迫的抵抗力, 可以作为候选免疫增强剂用于对虾生长养殖。

## 参 考 文 献

- 王玲, 张春晓, 孙明, 等. 饲料中添加枯草芽孢杆菌(CGMCC NO. 3755)对凡纳滨对虾生长性能和非特异性免疫力的影响. 饲料工业, 2011, 32(4): 47-52
- 邓康裕, 孔杰, 孟宪红, 等. 聚  $\beta$ -羟基丁酸酯对中国明对虾抗 WSSV 能力的影响. 水产学报, 2014, 38(8): 1167-1174
- 北平, 周歧存, 郑石轩, 等.  $\beta$ -1,3/1,6 葡聚糖制剂对凡纳滨对虾生长及免疫力的影响. 高技术通讯, 2003, 13(5): 73-77
- 刘玉, 隋丽英, 邓元告, 等. 聚  $\beta$ -羟基丁酸酯(PHB)对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)幼蟹生长和肝胰腺酶活力的影响. 海洋与湖沼, 2013, 44(5): 1333-1338
- 刘树青, 江晓路, 牟海津, 等. 免疫多糖对中国对虾血清溶菌酶、磷酸酶和过氧化物酶的作用. 海洋与湖沼, 1999, 30(3): 278-283
- 刘晓华, 曹俊明, 杨大伟, 等. 氨氮胁迫前后凡纳滨对虾组织中抗氧化酶和脂质过氧化产物的分布. 水利渔业, 2007, 27(6): 24-26
- 刘强, 周俊芳, 房文红, 等. 毒死蜱胁迫下 WSSV 对凡纳滨对虾的致病性. 水产学报, 2013, 37(7): 1106-1112
- 刘群芳, 曹俊明, 黄燕华, 等.  $\beta$ -葡聚糖与硒、维生素 E 联合添加对凡纳滨对虾生长、血清免疫和抗氧化指标及抗病力的影响. 中国水产科学, 2013, 20(5): 997-1006
- 孙舰军, 丁美丽. 氨氮对中国对虾抗病力的影响. 海洋与湖沼, 1999, 30(3): 267-272
- 杨鸢劫, 邴旭文, 徐增洪. 不饱和脂肪酸对黄鳝部分非特异性免疫力和代谢指标的影响. 中国水产科学, 2008, 15(4):

- 600-605
- 陈新谦, 金有豫. 新编药理学(第12版). 北京: 人民卫生出版社, 1985
- 胡毅, 谭北平, 麦康森, 等. 饲料中益生菌对凡纳滨对虾生长、肠道菌群及部分免疫指标的影响. 中国水产科学, 2008, 15(2): 245-251
- 姜令绪, 潘鲁青, 肖国强. 氨氮对凡纳滨对虾免疫指标的影响. 中国水产科学, 2004, 11(6): 537-541
- 徐世伟, 汪仕良. 肠道营养与机体免疫. 免疫学杂志, 2002, 18(S1): 233-236
- 管晓娟. 甲壳动物体液免疫相关酶及免疫因子研究概况. 生命科学仪器, 2009(7): 3-7
- 谭树华, 何典翼, 严芳, 等. 亚硝酸钠对鲫鱼肝脏丙二醛含量和总抗氧化能力的影响. 农业环境科学学报, 2005, 24(z1): 21-24
- Antongiovanni M, Buccioni A, Petacchi F, *et al.* Butyric acid glycerides in the diet of broiler chickens: effects on gut histology and carcass composition. *Ital J Anim Sci*, 2007, 6(1): 19-25
- Bucher F, Hofer R. The effects of treated domestic sewage on three organs (gills, kidney, liver) of brown trout (*Salmo trutta*). *Water Res*, 1993, 27(2): 255-261
- Chang CF, Su MS, Chen HY, *et al.* Dietary  $\beta$ -1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol*, 2003, 15(4): 297-310
- Chen JC, Lin CY. Oxygen consumption and ammonia-N excretion of *Penaeus chinensis* juveniles exposed to ambient ammonia at different salinity levels. *Comp Biochem Physiol C*, 1992, 102(2): 287-291
- Cheng W, Chen JC. The virulence of *Enterococcus* to freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its immune resistance under ammonia stress. *Fish Shellfish Immunol*, 2002, 12(2): 97-109
- Cheng W, Chen JC, Chen S, *et al.* Effects of temperature, pH, salinity and ammonia on the phagocytic activity and clearance efficiency of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* to *Lactococcus garvieae*. *Aquaculture*, 2003, 219(1): 111-121
- de Freitas Rebelo M, Rodriguez EM, Santos EA. Histopathological changes in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Crustacea Decapoda) following acute exposure to ammonia. *Comp Biochem Physiol Toxicol Pharmacol*, 2000, 125(2): 157-164
- Fearon DTLR. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science*, 1996, 272(5258): 50-53
- Jiang G, Yu R, Zhou M. Modulatory effects of ammonia-N on the immune system of *Penaeus japonicus* to virulence of white spot syndrome virus. *Aquaculture*, 2004, 241(1): 61-75
- Karaki S, Mitsui R, Hayashi H, *et al.* Short-chain fatty acid receptor, GPR43, is expressed by enteroendocrine cells and mucosal mast cells in rat intestine. *Cell Tissue Res*, 2006, 324(3): 353-360
- Karaki S, Tazoe H, Hayashi H, *et al.* Expression of the short-chain fatty acid receptor, GPR43, in the human colon. *J Mol Hist*, 2008, 39(2): 135-142
- Koo J, Kim S, Jee J, *et al.* Effects of ammonia and nitrite on survival, growth and moulting in juvenile tiger crab, *Orithyia sinica* (Linnaeus). *Aquacult Res*, 2005, 36(1): 79-85
- Le Moullac G, Haffner P. Environmental factors affecting immune responses in crustacean. *Aquaculture*, 2000, 191(1): 121-131
- Liu CH, Chen JC. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. *Fish Shellfish Immunol*, 2004, 16(3): 321-334
- Manzanilla EG, Nofrarias M, Anguita M, *et al.* Effects of butyrate, avilamycin, and a plant extract combination on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs. *J Anim Sci*, 2006, 84(10): 2743-2751
- Martinez-Cordova LR, Campana TA, Porchas-Cornejo MA. Dietary protein level and natural food management in the culture of blue (*Litopenaeus stylirostris*) and white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in microcosms. *Aquacult Nutr*, 2003, 9(3): 155-166
- Mathew AG, Franklin MA, Upchurch WG, *et al.* Effect of weaning on ileal short-chain fatty acid concentrations in pigs. *Nutr Res*, 1996, 16(10): 1689-1698
- Nhan DT, Wille M, De Schryver P, *et al.* The effect of poly  $\beta$ -hydroxybutyrate on larviculture of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 2010, 302(1): 76-81
- Puangkaew J, Kiron V, Somamoto T, *et al.* Nonspecific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) in relation to different status of vitamin E and highly unsaturated fatty acid. *Fish Shellfish Immunol*, 2004, 16(1): 25-39
- Rengpipat S, Rukpratanporn S, Piyatiratitivorakul S, *et al.* Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture*, 2000, 191(4): 271-288
- Romano N, Zeng CS. Ontogenetic changes in tolerance to acute ammonia exposure and associated gill histological alterations during early juvenile development of the blue swimmer crab, *Portunus pelagicus*. *Aquaculture*, 2007, 266(1-4): 246-254
- Vergheze B, Radhakrishnan EV, Padhi A. Effect of environmental parameters on immune response of the Indian spiny lobster, *Panulirus homarus* (Linnaeus, 1758). *Fish Shellfish Immunol*, 2007, 23(5): 928-936



## Effects of Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate on Non-Specific Immunity and Expression of Immune Gene Under the Ammonia Stress of *Litopenaeus vannamei*

DENG Kangyu<sup>1,2</sup>, MENG Xianhong<sup>2①</sup>, KONG Jie<sup>2</sup>, ZHANG Hengheng<sup>2,3</sup>, SHI Xiaoli<sup>2</sup>,  
CAO Jiawang<sup>2</sup>, LUO Kun<sup>2</sup>, LUAN Sheng<sup>2</sup>, CAO Baoxiang<sup>2</sup>, LIU Ning<sup>2</sup>

(1. Wuxi Fisheries College of Nanjing Agriculture University, Wuxi 214081; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023)

**Abstract** Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) is a polymer of the short-chain fatty acid  $\beta$ -hydroxybutyrate.  $\beta$ -hydroxybutyric acid facilitates food digestion, absorption, and the protein and mineral utilization. The bacteria-derived PHB can be potentially used as an alternative to the conventional antibiotics in aqua-farming. Here we explored the effects of PHB on non-specific immunity of *Litopenaeus vannamei*. The *L. vannamei* was fed with baits containing PHB at different concentrations (0, 1.0%, 2.5% and 5.0%). The enzyme activities of the total antioxidant capacity (T-AOC), superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and lysozyme (LZM) in gill, hepatopancreas and serum were analyzed and compared among groups. The group with the best performance and the control group were selected for the ammonia stress test. After the  $\text{NH}_4\text{Cl}$  treatment, we measured the concentration of malonaldehyde (MDA) and the expression levels of related genes in tissues by using real-time PCR. The results suggested that PHB affected the congenital immunity in the shrimp. As the concentration of PHB increased, the T-AOC activity in the experimental groups was first elevated followed by a decline. The activities of T-AOC in the serum, the hepatopancreas and the gill reached the maximum when the concentration of PHB was 2.5%, 2.5% and 1.0% respectively. The SOD activity in the gill and serum of shrimp fed with 5.0% PHB was significantly different from that in the control group. In the gill and hepatopancreas, the activity of POD and LZM peaked when the PHB concentration was 1.0% and 2.5% respectively. Compared with the control group, the POD activities of the experiment group supplemented with 1.0% and 2.5% PHB were 7.63-fold and 0.68-fold in the gill and hepatopancreas, and LZM activities were 1.88-fold and 1.18-fold, respectively. After the ammonia stress test, the shrimp fed with PHB showed lower MDA concentration than that without PHB, and the difference was significant in the serum ( $P < 0.05$ ). Furthermore, the expression levels of related genes were higher in the experimental groups compared to the control group. Our data indicated that PHB could improve non-specific immunity of shrimps.

**Key words** *Litopenaeus vannamei*; Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate; Immune factor; Enzyme activity; RT-PCR

① Corresponding author: MENG Xianhong. E-mail: mengxh@ysfri.ac.cn

# 夏季保苗期刺参(*Apostichopus japonicus*) 腐皮综合征病原菌的分离鉴定及其致病阈值\*



张文泽<sup>1,2</sup> 王印庚<sup>2①</sup> 廖梅杰<sup>2</sup> 荣小军<sup>2</sup> 李彬<sup>2</sup>  
张正<sup>2</sup> 李华<sup>1</sup> 范瑞用<sup>3</sup>

(1. 大连海洋大学 大连 116023; 2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院  
黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 青岛瑞滋海珍品发展有限公司 青岛 266400)

**摘要** 2013年夏季山东地区某刺参育苗场处于保苗期的刺参苗种暴发腐皮综合征疾病,表现为附着力下降、棘刺顶端溃烂、排脏、表皮溃疡和自溶等症状。自患病个体病灶组织分离优势细菌,并利用形态学观察、生理生化测定、回接感染、16S rDNA基因序列分析等方法完成致病原的鉴定。此外,通过对发病前后养殖系统中优势菌丰度的变化,追踪确定了所分离病原菌的致病阈值。结果显示,从患病参苗体表病灶处分离的一株优势菌HP130917A-1,经回接感染证实,该菌株具有较强的致病力,其对刺参苗种的半致死浓度为 $1.2 \times 10^6$  CFU/ml。生理生化结合分子鉴定表明,该菌株为溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)。此外,完成了患病池保苗期间池水和附着基表面微生物菌群结构动态分析,共分离得到了6种主要优势菌,分别为溶藻弧菌、需钠弧菌(*Vibrio natriegens*)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)和马胃葡萄球菌(*Staphylococcus equorum*)。溶藻弧菌一直是养殖系统中优势度最高的种类,且随着附着基在保苗池中时间的延长,其在附着基表面沉积物中的浓度越来越高。到第50天时,浓度达到 $8.97 \times 10^6$  CFU/cm<sup>2</sup>。而此时系统中参苗开始暴发腐皮综合征疾病,可将此浓度视为该病原的致病阈值。因此,在夏季保苗过程中应加强养殖系统中弧菌总数的监测,制定适宜的附着基更换频率,建立和优化刺参保苗工艺,以期对刺参苗期疾病防控和优化健康养殖管理提供理论依据和参考。

**关键词** 刺参; 保苗期; 腐皮综合征; 病原菌; 溶藻弧菌; 致病阈值

**中图分类号** S965 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)06-079-09

近年来,我国刺参(*Apostichopus japonicus*)养殖业迅猛发展,养殖面积迅速扩大,年产量(鲜重)超过20万t,产值逾300亿元,成为我国海水养殖单产最高的物种。然而,随着集约化养殖的发展,刺参病害问题也日趋严重,病害问题成为产业可持续发展的瓶颈。其中,腐皮综合征发生率高、致病力强,在苗期

和养成期均暴发,造成重大经济损失并成为刺参养殖业可持续发展的重要限制性因素(王印庚等,2014)。对腐皮综合征病原的研究表明,其病原主要以细菌为主,继发感染霉菌、寄生虫等(王印庚等,2004;王印庚等,2005)。目前,已报道的病原菌有灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)、假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas* sp.)、恶

\* 国家十二五“863”项目(2012AA10A412-4)、海洋经济创新发展区域示范重点项目—山东省海水养殖重要疾病高效专用药物研发及产业化、山东省自主创新成果转化专项(2013ZHZX2A0801)和国家自然科学基金项目(31202016)共同资助。  
张文泽, E-mail: zwz19870609@163.com

① 通讯作者: 王印庚, 研究员, E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-05-20, 收修改稿日期: 2015-08-27

臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)、哈维式弧菌(*Vibrio harveyi*)和蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)等(张春云等, 2006; 王印庚等, 2006; 黄华伟等, 2010; Deng *et al.*, 2009; 骆艺文等, 2009; 艾新海等, 2012)。

水产疾病的发生是病原、环境、养殖体三者相互作用的结果, 疾病暴发是由于外界环境发生不良改变、病原感染后增殖到一定数量水平(达到致病阈值)、自身免疫水平下降等多因素共同作用引发的(王印庚等, 2014)。黄华伟等(2011)通过研究池塘养殖模式下高温期和低温期刺参腐皮综合征的发生与环境因子之间的关系, 发现刺参养殖池塘中刺参腐皮综合征的发生与池塘水体、底泥中致病性弧菌数量密切相关, 这与刺参营底栖生活的特性密切相关。在刺参保苗期, 苗种附着基为参苗的主要的栖息地, 参苗新陈代谢产生的排泄物、老化沉淀的饵料等不断沉积到池底和附着基上, 滋生大量病原菌, 不断累积容易使参苗栖息环境恶化, 导致参苗病害的发生。因此, 解析疾病发生与附着基沉积物菌群关系对优化养殖工艺具有重要的现实意义。

2013年8月, 山东某育苗场参保苗车间部分育苗池发生腐皮综合征现象, 发病参苗规格为(4.00±0.12)g/头, 发病时参龄为6月龄, 作者对养殖流程中的附着基更换工艺进行了追踪、采集发病刺参并从病灶处分离出了一株优势菌, 继而对该优势菌进行了鉴定和致病性分析, 结合保苗期养殖系统中附着基沉积物中细菌群落结构变化确定其致病阈值。相应研究结果为刺参苗种培育期的疾病防控以及健康养殖管理提供了理论依据和参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

2013年8月, 患病刺参苗种取自山东省青岛市某刺参育苗场, 疾病暴发时水温为28℃, 苗种规格为(4.00±0.12)g/头, 每天投饵1次, 每天换1次水, 每4-5d倒池1次, 每50d更换1次附着基。

采集发病样品30头, 同时收集健康刺参苗种700头, 规格为(3.84±0.22)g/头。溶藻弧菌的标准菌株购自北京微生物研究所, 菌株编号为VABZ0005。

### 1.2 病原菌分离与形态学观察

剪取典型患病参苗的病灶处组织, 用无菌研磨器对其进行研磨, 在胰蛋白胨大豆肉汤培养基(Trypticase, 北京陆桥技术有限责任公司)上进行划线分离, 28℃培养16-24h, 挑取优势菌进行分离纯化培养3次并

对纯化菌落保种。采用革兰氏染色对所分离细菌进行分类。另外, 刮取培养基上纯培养的菌落将其用无菌的1.5% NaCl溶液稀释成浓度约 $1 \times 10^7$  CFU/ml的菌悬液, 用3%戊二醛固定5min, 再经3%磷钨酸负染, 晾干, 在透射电镜下观察细菌的形态特征。

### 1.3 人工回接感染实验

将受试的健康刺参苗种暂养于4m<sup>3</sup>水泥池中5d, 每天换水30%, 换水温差不超过0.5℃, 换水后投喂饵料, 保证受试苗种处于健康状态。

将分离纯化后的优势菌于液体TSB培养基中进行扩大培养, 培养条件为28℃, 150r/min振荡培养16h。离心收集菌体后采用麦氏比色法用无菌的1.5% NaCl溶液配制成浓度为 $6 \times 10^8$  CFU/ml、 $6 \times 10^7$  CFU/ml、 $6 \times 10^6$  CFU/ml、 $6 \times 10^5$  CFU/ml、 $6 \times 10^4$  CFU/ml和 $6 \times 10^3$  CFU/ml的菌液。

实验采用细菌浸浴感染, 实验组共设置8组, 分别为空白对照组(不投饵料, 不加菌液)、阴性对照组(投喂饵料, 但不加菌液)、6个攻毒实验组为 $6 \times 10^8$  CFU/ml组、 $6 \times 10^7$  CFU/ml组、 $6 \times 10^6$  CFU/ml组、 $6 \times 10^5$  CFU/ml组、 $6 \times 10^4$  CFU/ml组、 $6 \times 10^3$  CFU/ml组。每组设置3个平行, 每个平行投入30头参苗。试验在10L的塑料水槽中进行, 每天投饵1次, 每日换水量为总量的1/2, 换水后补充新培养菌液至原试验浓度。实验周期为25d, 试验期间, 每日观察刺参苗种的摄食、发病状态、病灶变化, 记录死亡参苗的头数。从患病刺参病灶处分离细菌。采用GB15193.3-2003《急性毒性实验》中寇氏法计算其半致死浓度, 计算公式为:

$$M=XK-I(\sum p-0.5) \text{ 和 } LD_{50}=\log^{-1}M$$

式中,  $p$ 为死亡率,  $XK$ 为最大剂量的对数值,  $I$ 为相邻两剂量组对数值的差。

### 1.4 细菌的生理生化鉴定

参照麦氏比浊法, 制备浓度约为 $1 \times 10^5$  CFU/ml的菌悬液, 以API 32E细菌鉴定系统试验条和细菌微量检定管进行生理生化指标的测定。参照《伯杰氏细菌学鉴定手册》和《常见细菌系统鉴定手册》进行分类判定(Holt *et al.*, 1994; 东秀珠等, 2001)。

### 1.5 细菌的16S rDNA鉴定

采用细菌基因组DNA提取试剂盒(北京天根生物)提取所纯化细菌的DNA, 利用细菌16S rDNA基因通用引物对相应序列进行扩增, 引物为27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和1492R(5'-TACGGCT-

ACCTTGTTACGACTT-3'), PCR 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检验后, 送至南京金斯瑞测序公司测序。测序结果在 NCBI 基因库中进行序列比对, 并通过 MEGA 5.1 软件构建系统发育树。

### 1.6 发病前后刺参保苗系统中菌群结构分析

对该育苗场保苗期间保苗系统中池水和附着基沉积物的菌群结构进行监测, 以附着基全新更换当天为监测起始点, 监测时间为 60 d, 取样间隔为 10 d, 监测内容为池水和附着基沉积物的异养细菌和弧菌的丰度, 同时记录相应取样点时刺参苗种的健康程度。其中, 附着基沉积物的取样方法为随机剪下一块附着基的边角 1 cm<sup>2</sup>, 将其在 10 ml 的灭菌海水里冲刷; 池水取样方法为保苗池底部水样。将二者梯度稀释后分别涂布于 TSB 和 TCBS 培养基, 经 28℃ 培养 24 h 后, 进行菌落计数, 分离保存优势细菌, 并利用 16S rDNA 基因序列分析对优势细菌进行鉴定。

### 1.7 数据处理

使用 Excel 2003 软件进行绘图分析和数据处理。使用 SPSS 进行标准差的计算, 数值以平均值±标准差(Mean±SD)表示。

## 2 结果

### 2.1 病原菌的分离与形态学观察

从患病刺参病灶处分离获得 1 株优势菌, 优势度为 90%, 编号为 HP130917A-1。该菌株在 TSB 固体培养基上菌落形态为: 菌落圆形、黄白色、不透明、边缘粗糙、易挑取; 生长较快, 容易连片生长。革兰氏染色显示该菌株为革兰氏阴性菌, 短杆状(图 1)。

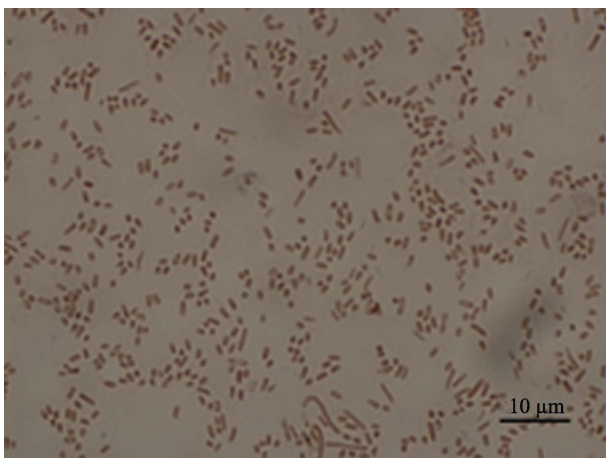


图 1 所分离优势菌株的革兰氏染色

Fig.1 Gram staining of the dominant bacteria

对菌体负染后电镜观察显示, 该菌体长约为 2.6 μm, 具有较长的极生单鞭毛, 鞭毛长度约是菌体的 2 倍以上(图 2)。



图 2 所分离优势菌株的电镜照片

Fig.2 The transmission electron microscopy of the dominant bacteria

### 2.2 回接感染实验

利用不同浓度 HP130917A-1 菌株对健康苗种的人工感染试验结果表明, 6×10<sup>8</sup> CFU/ml 组参苗自攻毒第 5 天时开始出现死亡现象, 到第 14 天时全部死亡, 死亡率为 100%; 6×10<sup>7</sup> CFU/ml 组在攻毒第 8 天开始出现死亡, 到第 25 天时死亡率达到(62.22±0.04)%; 6×10<sup>6</sup> CFU/ml 组在攻毒第 9 天时开始出现死亡现象, 到第 25 天时死亡率达到(51.11±0.04)%; 6×10<sup>5</sup> CFU/ml 组在攻毒第 10 天时开始出现死亡现象, 到第 25 天时死亡率达到(35.56±0.08)%; 6×10<sup>4</sup> CFU/ml 组在攻毒第 14 天时开始出现死亡现象, 到第 25 天时死亡率为(21.11±0.04)%; 6×10<sup>3</sup> CFU/ml 组、空白对照组和阴性对照组在试验期间均未出现化皮和死亡现象。按照寇氏法计算菌株 HP130917A-1 的半致死浓度为 1.2×10<sup>6</sup> CFU/ml(图 3)。

人工感染后, 发病个体初期症状为参苗附着力下降、摄食量减小、身体蜷缩、肿嘴、部分苗种排脏、棘刺溃烂发白; 发病后期症状为: 参苗不摄食、表皮溃疡、自溶。发病症状与自然发病的刺参症状相同(图 4)。自人工感染刺参病灶处分离的优势菌 HP130917A-2, 菌落形态上与感染菌株 HP130917A-1 相同。根据科赫法则确定 HP130917A-1 菌株确定为刺参大规模苗种腐皮综合征的致病菌。

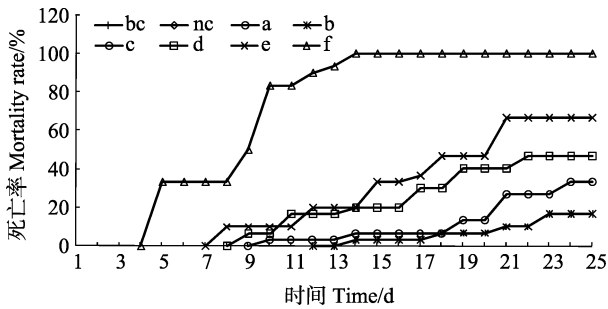


图3 攻毒感染试验各组海参苗种死亡率

Fig.3 Mortality of sea cucumbers in the artificial infection test from different groups

bc: 空白对照组; nc: 阴性对照组; a:  $6 \times 10^3$  CFU/ml;

b:  $6 \times 10^4$  CFU/ml; c:  $6 \times 10^5$  CFU/ml; d:  $6 \times 10^6$  CFU/ml;

e:  $6 \times 10^7$  CFU/ml; f:  $6 \times 10^8$  CFU/ml

bc: Blank control; nc: Negative control; a:  $6 \times 10^3$  CFU/ml;

b:  $6 \times 10^4$  CFU/ml; c:  $6 \times 10^5$  CFU/ml; d:  $6 \times 10^6$  CFU/ml;

e:  $6 \times 10^7$  CFU/ml; f:  $6 \times 10^8$  CFU/ml

### 2.3 病原菌生理生化特征检测结果

对自然发病分离的优势菌株 HP130917A-1 和人工感染试验分离的优势菌株 HP130917A-2 的生理生化指标测定结果见表 1。从表 1 可以看出, HP130917A-1 和菌株 HP130917A-2 的生理生化特征一致, 在 TCBS 培养基上生长, 氧化酶试验阳性, 对弧菌抑制剂 O/129 敏感。能分解葡萄糖、海藻糖、鼠李糖、麦芽糖、甘露醇、L-阿拉伯糖、D-阿拉伯醇。并且赖氨酸脱羧酶、胍酶、N-乙酸- $\beta$ -葡萄糖甙、 $\beta$ -半乳糖甙、 $\beta$ 葡萄糖甙酶、VP、明胶酶和淀粉酶等反应均为阳性。L-阿拉伯糖醇、酚红、 $\beta$ 葡萄糖苷酸酶、5 酮基-葡萄糖酸钾、蔗糖、半乳糖酸盐、鸟氨酸脱羧酶、精氨酸双水解酶、侧金盏花醇、丙二酸、吡嗪、古老糖、 $\alpha$ -半乳糖苷酶、肌醇、山梨醇、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶、纤维二糖、L-天冬氨酸芳胺酶、蛋白胨水、麦芽糖甙酶、硫化氢、脲酶等反应均为阳性。可以初步判定 HP130917A-1 和 HP130917A-2 为同一菌株, 而

二者与溶藻弧菌标准菌株在生理生化上有 3 项结果不同。其中, 在赖氨酸脱羧酶试验中, 菌株 HP130917A-1 和菌株 HP130917A-2 呈阳性, 而标准菌株呈阴性。在  $\beta$ -半乳糖甙试验中, 菌株 HP130917A-1 和菌株 HP130917A-2 呈阳性, 而标准菌株呈阴性。在蔗糖试验中, 菌株 HP130917A-1 和菌株 HP130917A-2 呈阴性, 而标准菌株呈阳性。根据《伯杰氏细菌鉴定手册》和《常见细菌系统鉴定手册》初步鉴定为溶藻弧菌。

### 2.4 病原菌的 16S rDNA 序列分析

采用通用引物对 HP130917A-1 和 HP130917A-2 菌株的 16S rDNA PCR 扩增产物的长度均为 1440 bp, 采用 Blast 对所获得的测序结果在 NCBI 数据库进行序列相似性比对分析表明, 本研究分离所获得的菌株与溶藻弧菌 JF836178 序列同源性达到 100%。利用 MEGA5.1 进行系统发育树的构建(图5), 确定了 HP130917A-1 和 HP130917A-2 为同一菌株, 鉴定为溶藻弧菌。

### 2.5 发病前后刺参保苗系统中菌群结构的变化分析

以更换全新附着基当天为监测起始点, 对该育苗场保苗池养殖系统进行了为期 50 d 的苗种健康状况和水质监测, 结果显示, 在前 20 d 内参苗摄食良好, 参体伸展正常; 在第 30-40 天内参苗摄食较好, 少量刺参身体收缩; 自第 43 天开始少量苗种附着力下降; 到第 50 天保苗池出现大量参苗棘刺顶端溃烂、排脏、表皮溃疡, 甚至出现自溶现象(表 2)。

对养殖池水的菌群结构检测结果显示, 异养细菌的数量在前 30 d 呈上升的趋势, 并在第 30 天达到最高值  $3.35 \times 10^3$  CFU/ml, 随后呈下降趋势, 弧菌数量在前 30 d 同样呈上升的趋势, 并在第 30 天达到最高值  $2.90 \times 10^3$  CFU/ml, 而 30 d 后开始下降, 水中的异养细菌数



图4 自然发病与回接感染发病的刺参保苗种

Fig.4 Naturally infected sea cucumber(A) and artificially infected sea cucumber(B)

表 1 菌株 HP130917A-1、菌株 HP130917A-2 和溶藻弧菌标准菌株的生理生化特征  
 Tab.1 Physiological and biochemical characteristics of the strains HP130917A-1, HP130917A-2 and the standard strain of *V. alginolyticus*

项目 Item		HP130917A-1	HP130917A-2	溶藻弧菌标准株 Standard strain of <i>V.alginolyticus</i>
TCBS	TCBS	+	+	+
氧化酶	Oxidase	+	+	+
O/129(150 μg)	O/129(150 μg)	+	+	+
鸟氨酸脱羧酶	Ornithine decarboxylase	+	+	+
精氨酸双水解酶	Drosase	-	-	-
赖氨酸脱羧酶	Lysine decarboxylase	+	+	-
脲酶	Urease	-	-	-
L-阿拉伯糖醇	L-Arabitol	-	-	-
半乳糖酸盐	Galactose acid salt	-	-	-
5-酮基-葡萄糖酸钾	5-keto-potassium gluconate	-	-	-
肢酶	Limb enzyme	+	+	+
酚红	Phenol red	-	-	-
β-葡萄糖甙酶	Beta-Glucosidase	+	+	+
甘露醇	Mannitol	+	+	+
麦芽糖	Maltose	+	+	+
侧金盏花醇	Adonitol	-	-	-
古老糖	Old sugar	-	-	-
β-葡萄糖苷酸酶	Beta-Glucuronidase	-	-	-
丙二酸	Malonicacid	-	-	-
吡啶	Benzpyrole	-	-	-
N-乙酸-β-葡萄糖甙	N-acetic acid-beta glucose glucoside	+	+	+
β-半乳糖甙	Beta-galactose glucoside	+	+	-
葡萄糖	Glucose	+	+	+
蔗糖	Saccharose	-	-	+
L-阿拉伯糖	L-Pectinose	+	+	+
D-阿拉伯醇	D-Arab alcohol	+	+	+
α-葡萄糖苷酶	Alpha Glucosidase	-	-	-
α-半乳糖苷酶	Alpha galactose glucoside enzyme	-	-	-
海藻糖	Mycose	+	+	+
鼠李糖	Rhamnose	+	+	+
肌醇	Inositol	-	-	-
纤维二糖	Cellose	-	-	-
山梨醇	Sorbitol	-	-	-
麦芽糖甙酶	Maltose glucosidase	-	-	-
L-天冬氨酸芳胺酶	L-aspartate aromatic amine enzymes	-	-	-
蛋白胨水	Peptone water	-	-	-
VP 反应	Vogus-Proskauer reaction	+	+	+
硫化氢产生	H <sub>2</sub> S production	-	-	-
明胶酶	Gelatinase	+	+	+
淀粉酶	Amylase	+	+	+

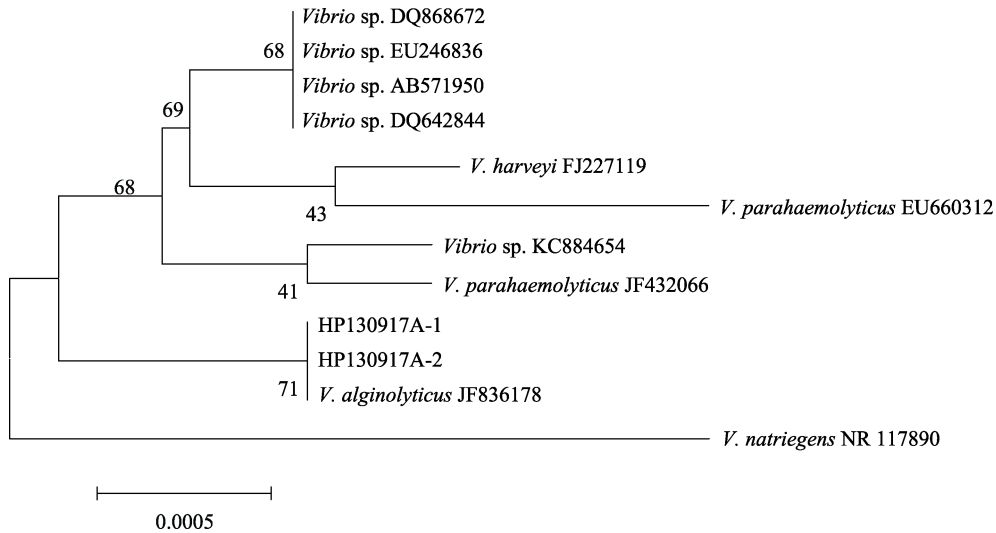


图 5 菌株 HP130917A-1 和 HP130917A-2 的 16S rDNA 系统发育树构建

Fig.5 The phylogenetic tree of HP130917A-1 and HP130917A-2 based on analysis of 16S rDNA sequence

量和弧菌数量的变化趋势与温度的变化趋势相近(图 6)。对于附着基沉积物中菌群结构变化,异养细菌的数量在 0-50 d 内呈上升趋势,并在第 50 天时达到最高值  $1.02 \times 10^6$  CFU/cm<sup>2</sup>;弧菌数量在 0-50 d 内也同样呈上升趋势,并在第 50 天时达到最高值  $1.49 \times 10^5$  CFU/cm<sup>2</sup>(表 2),沉积物中异养细菌数量和弧菌数量随附着基在养殖系统中的时间而增加,与温度相关性分析,分别为 -0.18-0.148,  $P > 0.05$ ,相关性不显著(图 7)。

自养殖水体和附着基沉积物中分离得到 6 株优势菌株,利用 16S rDNA 基因序列分析对其进行鉴定

分析结果显示,所分离出 6 种主要优势菌分别为溶藻弧菌、需钠弧菌、副溶血弧菌、枯草芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌和马胃葡萄球菌。对这 6 株细菌在养殖池水及附着基沉积物的丰度分析见图 6 和图 7。由图 6 和图 7 可以看出,溶藻弧菌一直为水体中和附着基沉积物上的优势菌,且优势度较高。水中溶藻弧菌的优势度在第 30 天时达到弧菌最高值的 57%,其数量可达  $1.16 \times 10^3$  CFU/ml;附着基上溶藻弧菌的优势度在第 50 天时优势度达到弧菌最高值的 88%,其数量可达  $8.97 \times 10^6$  CFU/cm<sup>2</sup>。

表 2 育苗 50 d 过程中参苗健康状况

Tab.2 The juvenile healthy status during 50-day cultivation

时间 Time(d)	水中异养细菌总数 Concentration of heterotrophic bacteria in water(CFU/ml)	水中弧菌总数 Concentration of <i>Vibrio</i> in water (CFU/ml)	附着基异养细菌总数 Concentration of heterotrophic bacteria in sediment on substrates (CFU/cm <sup>2</sup> )	附着基弧菌总数 Concentration of <i>Vibrio</i> on substrates (CFU/cm <sup>2</sup> )	刺参苗种健康状况 Healthy status of the sea cucumber
0	$2.09 \times 10^2$	$1.98 \times 10^2$	$6.03 \times 10^4$	$2.86 \times 10^4$	H
10	$8.57 \times 10^2$	$2.13 \times 10^2$	$2.42 \times 10^5$	$8.10 \times 10^4$	H
20	$3.14 \times 10^3$	$2.05 \times 10^3$	$5.32 \times 10^5$	$1.47 \times 10^5$	H
30	$3.35 \times 10^3$	$2.90 \times 10^3$	$1.82 \times 10^6$	$2.50 \times 10^5$	SH
40	$2.64 \times 10^3$	$1.69 \times 10^3$	$5.04 \times 10^6$	$1.03 \times 10^6$	SH
50	$1.83 \times 10^3$	$5.99 \times 10^2$	$1.02 \times 10^7$	$9.49 \times 10^6$	S

注: 1、水质条件: 温度为 27.61-29.12℃、盐度为 29.65-30.01、pH 为 7.75-8.25、溶解氧为 5.13-6.07 mg/L

2、H (Health)表示刺参摄食良好,刺参伸展。SH (Sub-health)表示刺参摄食较好,部分刺参身体收缩,活力欠佳。S (Sick)表示有附着力下降、棘刺顶端溃烂、排脏、表皮溃疡、自溶等现象出现

Note: 1. The conditions of water quality during the experiment: temperature 27.61-29.12℃, salinity 29.65-30.01, pH 7.75-8.25 and dissolved oxygen 5.13-6.07 mg/L

2. H (Health) indicates that sea cucumber was feeding well and the body of sea cucumber was stretching. SH (Sub-health) indicates that the feeding of sea cucumber was well, while a few of sea cucumbers showed body contraction. S (Sick) indicates that the ability of adhesive decreased, the top of spines festerd, viscera everted skin showed ulceration, and autolysis occurred

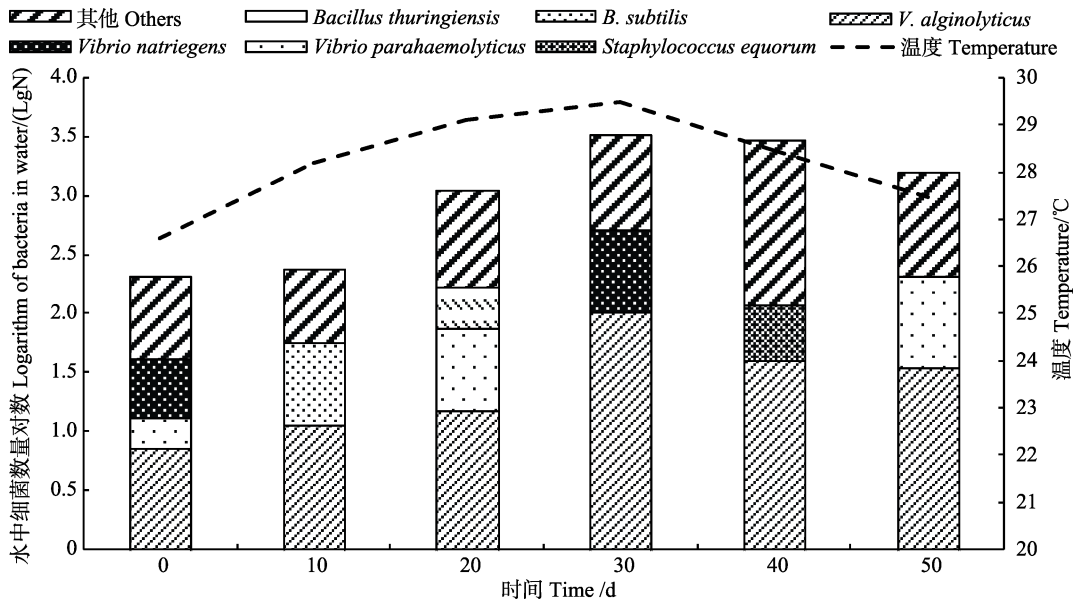


图 6 养殖池水中优势菌丰度变化

Fig.6 Microbial community structure variation in the culture pond

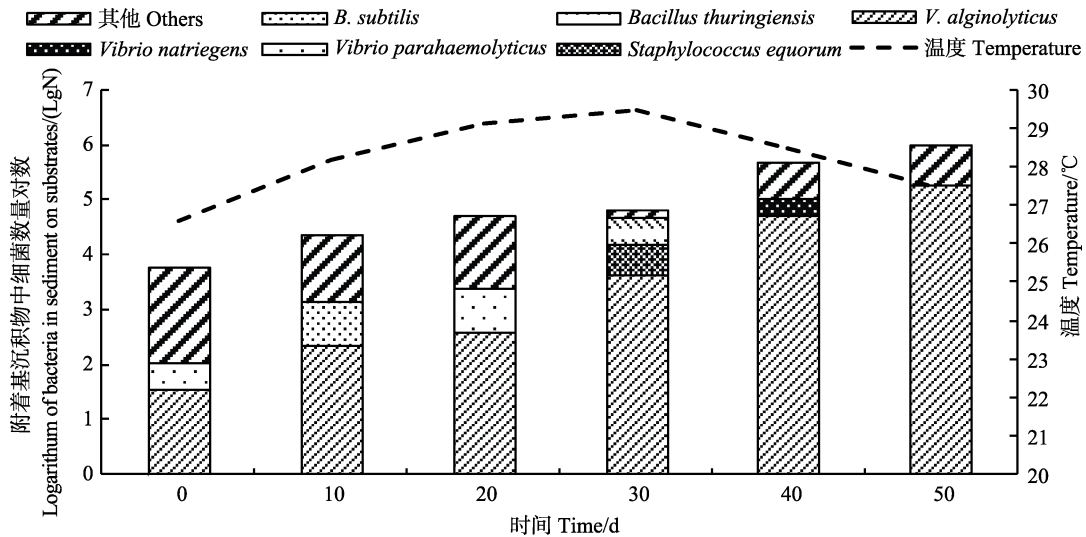


图 7 附着基沉积物中优势菌的变化

Fig.7 Microbial community structure variation in the sediment on substrates

### 3 讨论

通过人工回接感染试验证实,从患病刺参苗种病灶处分离的优势菌 HP130917A-1 能够导致刺参苗种发病,并且其发病症状与自然刺参发病症状相同;从人工感染刺参病灶处分离的优势菌 HP130917A-2 与接种感染的细菌为同一菌株,并具有较强的致病力,符合科赫法则,证实该菌株为本次病例的致病菌。通过细菌形态学、生理生化和 16S rDNA 序列分析确定了本例参苗腐皮综合征的致病菌为溶藻弧菌。

溶藻弧菌是水产养殖经济品种中常见的致病菌(苑淑宾等, 2012)。金珊等(2005)对浙江省沿海近 12 个

海水网箱养殖场进行了大量的调查和研究,发现大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)弧菌病的致病菌为溶藻弧菌和哈氏弧菌,大黄鱼感染致病菌后,肝、肾、脾等组织的病变非常明显。陈寅儿等(2005)通过对鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)血液生理生化指标的研究表明,溶藻弧菌对鲈鱼具有极强的致病性。郑国兴等(1991)发现溶藻弧菌为文蛤(*Mercenaria mercenaria*)的病原菌,可造成肠上皮及肝脏组织病变。胡超群等(2000)发现,溶藻弧菌也可以引起对虾(*Penaeus orientalis*)弯曲、失去游泳和平衡能力、肌肉不透明等不良状态。由此看来,溶藻弧菌给海水养殖产业造成了较大的危害。

对于刺参而言,腐皮综合征是刺参最为常见的疾



病(Deng *et al*, 2009; Liu *et al*, 2010), 其中, 溶藻弧菌是刺参腐皮综合征的重要病原菌之一。杨嘉龙等(2007)研究发现, 山东乳山某刺参养殖场暴发刺参成参溃疡病的病原菌为溶藻弧菌, 其半致死浓度为  $5.68 \times 10^6$  CFU/头。郝佳等(2013)自室内养殖刺参苗期出现身体发红, 随即开始出现溃烂, 分离得到主要的病原菌为溶藻弧菌。Becker 等(2004)通过研究发现, 溶藻弧菌和哈维式弧菌可导致糙海参幼体皮肤出现溃烂, 并引发糙海参育苗和保苗阶段出现大批死亡。本研究表明, 刺参腐皮综合征的病原菌为溶藻弧菌, 其发病特点与杨嘉龙等(2007)、郝佳等(2013)研究结果有所不同。此次疾病发生于刺参高温期保苗阶段, 而杨嘉龙等(2003)的研究结果是在刺参低温成参阶段, 其半致死浓度相对较低。另外, 本例未发现郝佳等(2013)的结果参体发红现象。

在刺参的育苗和保苗阶段, 附着基是刺参采食、生长的栖息载体。随着附着基在养殖池中使用时间的增加, 附着基上的有机残留物增多、水质恶化、滋生大量的细菌和霉菌, 导致刺参患病的几率加大, 因此, 合理确定附着基更换频率对苗种健康养殖十分重要。本研究通过对保苗池附着基沉积物菌群结构分析可以看出, 随着附着基在养殖池中使用时间的增加, 附着基上异养菌总数和弧菌总数都一直在增加, 到第 50 天时, 浓度分别达到  $1.02 \times 10^7$ 、 $1.49 \times 10^6$  CFU/cm<sup>2</sup>, 且致病菌溶藻弧菌的浓度和相对丰度都达到了峰值, 浓度为  $8.97 \times 10^6$  CFU/cm<sup>2</sup>, 丰度达到 88%, 而海参苗种也于第 50 天暴发了腐皮综合征。由此可见, 确定最佳的附着基更换频率, 对保持苗种培育系统良好的水质条件和菌群结构进而保障刺参的成活率和生长效益具有重要的现实意义。

根据人工回接感染实验结果, 按照寇氏法计算溶藻弧菌对参苗的半致死浓度为  $1.2 \times 10^6$  CFU/ml。这一浓度比出现腐皮综合征现象时池水中溶藻弧菌的数量高 4 个数量级, 而与附着基上沉积物中溶藻弧菌的浓度处于同一个数量级。随着附着基使用时间的增加, 附着基沉积物中溶藻弧菌浓度也持续增加, 而刺参苗种摄食沉积物时, 溶藻弧菌也随之进入刺参体内, 达到一定浓度(致病阈值)时, 引发腐皮综合征。由此可以推测出, 溶藻弧菌引发腐皮综合征的致病阈值为其在附着基沉积物上的浓度达到  $8.97 \times 10^6$  CFU/cm<sup>2</sup>。

一般认为, 病原弧菌首先通过菌毛并在荚膜和外膜蛋白的辅助下牢靠的粘附在感染部位的细胞上, 随后通过降解感染部位的蛋白质及细胞外基质而快速

繁殖, 使感染部位破损, 如皮肤溃疡及肠炎等(吴后波等, 2003)。此次疾病发生在 8 月的高温期(温度变化范围为 27–29℃), 高温期的水温及附着基沉积饵料等有机质为细菌滋生提供了适宜条件, 使其附着基沉积物中病原菌数量大幅度增加, 直接影响到刺参苗种的成活率。因此, 在高温保苗期应当注意对养殖水体中弧菌尤其是致病性弧菌的控制。由于芽孢杆菌对一般弧菌类细菌有抑制作用(伏传永等, 2008)<sup>1)</sup>, 所以, 在夏季保苗过程中应定期泼洒微生态制剂抑制弧菌的大量增殖。陈辉等(2012)报道五倍子、公丁香和石榴皮等中草药能够有效抑杀溶藻弧菌, 王印庚等(2009)研究发现, 复方中草药穿心莲、大青叶、金银花和川芎(最佳配比为 2 : 1 : 3 : 2)可有效防治刺参腐皮综合征。故可考虑定期使用上述中草药进行预防和治疗。此外, 在生产过程中应加强对池水中、附着基上进行微生物特别是弧菌总数的监测, 建立和优化良好的刺参保苗工艺, 以提高苗种的成活率 and 经济效益。

## 参 考 文 献

- 王印庚, 荣小军, 廖梅杰, 等. 刺参健康养殖与病害防控丛解. 北京: 中国农业出版社, 2014, 116–158
- 王印庚, 荣小军, 张春云, 等. 养殖刺参暴发性疾病“腐皮综合症”的初步研究与防治. 齐鲁渔业, 2004, 21(5): 44–47
- 王印庚, 荣小军, 张春云, 等. 养殖海参主要疾病及防治技术. 海洋科学, 2005, 29(3): 1–7
- 王印庚, 方波, 张春云, 等. 养殖刺参保苗期重大疾病腐皮综合征病原及其感染源分析. 中国水产科学, 2006, 13(4): 610–616
- 王印庚, 冷敏, 陈霞, 等. 中草药对刺参腐皮综合征病原菌的体外抑菌试验. 渔业科学进展, 2009, 30(2): 1–7
- 艾海新, 于晶晶, 郑方亮, 等. 刺参“腐皮综合症”致病菌 LNUB415 的分离及防治的初步研究. 微生物学杂志, 2012, 32(2): 68–72
- 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001
- 吴后波, 潘金培. 病原弧菌的致病机理. 水生生物学报, 2003, 27(4): 422–426
- 陈辉, 张其中. 100 种中草药对溶藻弧菌的体外抑菌实验. 中国预防兽医学报, 2012, 34(6): 452–455
- 张春云, 王印庚, 荣小军, 等. 养殖刺参腐皮综合征病原菌的分离与鉴定. 水产学报, 2006, 30(1): 118–123
- 骆艺文, 郝志凯, 王印庚, 等. 一株引起刺参腐皮综合征的蜡样芽孢杆菌. 水产科技情报, 2009, 36(2): 60–62
- 黄华伟, 王印庚, 陈霞, 等. 老化参池刺参腐皮综合征病原菌的分离与鉴定. 水产学报, 2010, 34(9): 1460–1468
- 黄华伟, 王印庚, 陈霞, 等. 渡夏期养殖刺参腐皮综合征的发生与环境因子间的关系. 农产品质量安全与现代农业发

1) 伏传永. 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)对刺参腐皮综合病致病菌的拮抗作用以及对水质的影响. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2008: 28–36

- 展专家论坛论文集, 2011a: 132-140
- 黄华伟, 王印庚, 陈霞, 等. 低温期养殖刺参腐皮综合征的发生与环境因子间的关系. 水产科技情报, 2011b, 38(6): 292-297
- 苑淑宾, 朱爱意. 溶藻弧菌对水产动物致病性及其防治的研究进展. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2012, 31(3): 256-264
- 金珊, 王国良, 赵青松, 等. 海水网箱养殖大黄鱼弧菌病的病原菌. 水产科学, 2005, 24(1): 17-19
- 陈寅儿, 金珊, 王国良, 等. 鲈鱼溶藻弧菌病的血液生理生化指标研究. 台湾海峡, 2005, 24(1): 104-108
- 郑国兴, 李何, 黄宁宁, 等. 文蛤病原菌(溶藻弧菌)的分离与性状及病文蛤组织的电镜观察. 水产学报, 1991, 15(2): 85-95
- 胡超群, 陶保华. 对虾弧菌病及其免疫预防的研究进展. 热带海洋, 2000, 19(3): 84-94
- 杨嘉龙, 周丽, 绳秀珍, 等. 养殖刺参溃疡病病原菌RH2的鉴定及其生物学特性分析. 水产学报, 2007, 31(4): 504-511
- 郝佳, 王洪军, 陈文博, 等. 室内养殖仿刺参“红体症”的初步研究. 水产科学, 2013, 32(5): 261-266
- Becker P, Gillan D, Lanterbecq D, *et al.* The skin ulceration disease in cultivated juveniles of *Holothuria scabra* (Holothuroidea, Echinodermata). *Aquaculture*, 2004, 242(1-4): 13-30
- Deng H, He CB, Zhou ZC, *et al.* Isolation and pathogenicity of pathogens from skin ulceration disease and viscera ejection syndrome of the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Aquaculture*, 2009, 287(1-2): 18-27
- Holt JG, Krieg NR, Sheath PHA, *et al.* *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*(Ninth Edition). Baltimore, Williams & Wilkins. 1994, 262-263
- Liu H, Zheng F, Sun X, *et al.* Identification of the pathogens associated with skin ulceration and peristome tumescence in cultured sea cucumbers *Apostichopus japonicus* (Selenka). *J Invertebr Pathol*, 2010, 105(3): 236-242

(编辑 陈严)

## Isolation and Identification of the Pathogenic Bacteria of Skin Ulcerative Syndrome (SUS) from *Apostichopus japonicus* Juveniles in Summer and Study on Its Pathogenic Threshold

ZHANG Wenze<sup>1,2</sup>, WANG Yingeng<sup>2①</sup>, LIAO Meijie<sup>2</sup>, RONG Xiaojun<sup>2</sup>, LI Bin<sup>2</sup>,  
ZHANG Zheng<sup>2</sup>, LI Hua<sup>1</sup>, FAN Ruiyong<sup>3</sup>

(1. Dalian Ocean University, Dalian 116023; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. Qingdao Ruizhi Seafood Development Co., Ltd, Qingdao 266400)

**Abstract** In the summer of 2013, there was an outbreak of skin ulcerative syndrome (SUS) in *Apostichopus japonicus* juveniles at a hatchery in Shandong Province. The symptoms included weak adhesion, rotten spines, viscera eversion, skin ulceration, and body autolysis. From the skin lesions of diseased juveniles we isolated a dominant strain HP130917A-1 with a median lethal concentration of  $1.2 \times 10^6$  CFU/ml. This strain exhibited high pathogenicity and caused the same symptoms as SUS. The identification of this pathogen was verified using morphological observation, physiological and biochemical test, and 16S rDNA gene sequence analysis. The results demonstrated that HP130917A-1 was *Vibrio alginolyticus* and the causative pathogen associated with SUS. The microbial community structure was also analyzed using 16S rDNA gene sequencing, from which six major strains were found in the rearing system including *V. alginolyticus*, *V. natriegens*, *V. parahaemolyticus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis* and *Staphylococcus equorum*. *V. alginolyticus* was predominant among six major strains during the 50 days. On the 50th day of the experiment, the amount of *V. alginolyticus* reached the highest value of  $1.31 \times 10^5$  CFU/ml in the substrates, which was considered as the pathogenic threshold of causing sea cucumber SUS. These results provided insights into the mechanisms of SUS and the health management of sea cucumber *A. japonicus*. Based on our findings we recommend healthy management strategies such as regular monitor of the amount of *Vibrios*, suitable frequency changing of the substrates, and the application of probiotics or herbal medicines.

**Key words** *Apostichopus japonicus*; Nursery period; Skin ulcerative syndrome; Pathogen; *Vibrio alginolyticus*; Pathogenic threshold

① Corresponding author: WANG Yingeng, E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn

# 无机镉对魁蚶(*Scapharca broughtonii*)毒性 效应及其安全性评价\*



刘天红<sup>1</sup> 于晓清<sup>1</sup> 刘广斌<sup>1,2</sup> 王颖<sup>1</sup> 吴莹莹<sup>1,2</sup>  
刘恩孚<sup>1,2</sup> 邱兆星<sup>1,2</sup>①

(1. 山东省海洋生物研究院 青岛 266100; 2. 青岛市浅海底栖渔业增殖学重点实验室 青岛 266100)

**摘要** 为研究无机镉对不同规格魁蚶的毒性,采用急性毒性试验方法和定性定量研究  $Cd^{2+}$  对不同规格魁蚶(*Scapharca broughtonii*) 24、48、72、96 h 的半致死浓度( $LC_{50}$ )和安全养殖浓度( $SC_{50}$ )。结果显示,  $Cd^{2+}$  对小规格魁蚶 24、48、72、96 h 的  $LC_{50}$  和  $SC_{50}$  分别为 131.11、41.40、3.57、3.37、1.24 mg/L;  $Cd^{2+}$  对中规格魁蚶 24、48、72、96 h 的  $LC_{50}$  和  $SC_{50}$  分别为 54.10、9.46、2.54、0.50、0.09 mg/L;  $Cd^{2+}$  对大规格魁蚶 24、48、72、96 h 的  $LC_{50}$  和  $SC_{50}$  分别为 157.36、38.13、8.90、3.46、0.67 mg/L,  $Cd^{2+}$  对于各规格魁蚶的安全养殖浓度均高于国内各类养殖水质标准。结果表明,  $Cd^{2+}$  对于小规格魁蚶属于中毒类物质,对于中规格魁蚶属于剧毒类物质,对于大规格魁蚶属于高毒类物质,小规格魁蚶可能对无机镉产生明显的毒物兴奋效应。

**关键词**  $Cd^{2+}$ ; 不同规格; 魁蚶; 安全养殖浓度; 毒物兴奋效应

中图分类号 S966.9; S967.5 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2015)06-0088-07

魁蚶(*Scapharca broughtonii*)是一种大型底栖贝类,属双壳纲(Bivalvia)、翼形亚纲(Pteriomorpha),主要分布于俄罗斯东南部、日本、朝鲜半岛、菲律宾和中国,我国主要分布于黄、渤海、辽东半岛东南部、山东半岛北部和东部沿岸的软泥底(卓亮亮, 2010<sup>1</sup>); 阮飞腾等, 2014)。现代营养学分析表明,魁蚶是一种高蛋白、低脂肪、氨基酸含量丰富且均匀、营养价值较高的贝类(王颖等, 2013)。魁蚶多栖息于 3–50 m 水深的泥或泥沙质海底,而进入水体中的重金属绝大多数迅速由水相转为固相,最终进入水体底泥中(晏丽蓉, 2013)<sup>2</sup>。魁蚶属潜沙性滤食性贝类,食性决定了魁蚶

具有易富集重金属的特性。

镉对人体危害较大,一旦进入食物链,很难完全代谢。1993年,镉已被国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)归为 I 级致癌物(IARC, 1993; 顾捷, 2014<sup>3</sup>; 陈忠翔, 2014<sup>4</sup>)。孙安强(1978)研究表明,“骨痛病”与食物或水中镉有关。2013年中国湖南“镉大米”事件引起各界广泛关注(李国庆, 2013)。镉能在生物体内蓄积和放大(刘浩明等, 2012),海洋中镉对海产品的可给性主要是体表接触、内脏吸收、沉积物暴露,崔岩山等(2013)认为,动物实验能很好地反映污染物的生物有效性。近年

\* 国家海洋局公益性行业专项(201205023)、现代农业产业技术体系建设专项资金(NYCYTX-47)和山东省优秀中青年科学家科研奖励基金(BS2010HZ017)项目共同资助。刘天红, E-mail: oucthl@126.com

① 通讯作者: 邱兆星, 研究员, E-mail: 13808956497@163.com

收稿日期: 2015-01-23, 收修改稿日期: 2015-04-28

1) 卓亮亮. 魁蚶养殖中有害生物东亚壳菜蛤(*Musculista senhousia*)的污染控制及繁殖生物学研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2010

2) 晏丽蓉. 几种沉水植物对底泥中镉、铜、铅、锌修复作用的研究. 浙江师范大学硕士研究生学位论文, 2013

3) 顾捷. 浙江沿岸养殖贝类重金属(铅、镉)含量的调查与分析. 浙江海洋学院硕士研究生学位论文, 2014

4) 陈忠翔. 重金属镉胁迫细胞氧化毒理分子机制研究. 东华大学硕士研究生学位论文, 2014

来,关于扇贝、牡蛎等贝类对重金属镉的富集与代谢情况、毒理学研究颇多,但魁蚶的相关研究较少。因此,镉对魁蚶的毒性,尤其对不同规格魁蚶的毒性,涉及到魁蚶育苗和养成水体中重金属对其存活的影响,以及养成后魁蚶产品的质量安全问题,亟待探讨。

本文研究了在不同  $Cd^{2+}$  浓度下, 24、48、72、96 h 内  $Cd^{2+}$  对不同规格魁蚶的半致死浓度和安全养殖浓度,为魁蚶等底栖贝类的急性毒理学研究提供基础数据,可用于魁蚶养殖水体安全的监测预报,进而指导魁蚶安全生产,也可为评价海洋生态环境质量和修订渔业水质标准提供相应的生物学研究基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

不同规格魁蚶于 2014 年 4 月采自山东日照两城养殖场,于暂养池内暂养 3 d,每 12 h 换水 1 次,每天 06:00、12:00 投饵(金藻  $1 \times 10^5$  cell/ml)两次,暂养期间活动正常,受刺激后闭壳反应迅速,死亡率低于 5%。实验前 24 h 停止投饵,选择健康、闭壳肌刺激反应灵敏的魁蚶,取样时避免损伤其基部,同一规格的魁蚶随机分组(表 1)。

$CdCl_2 \cdot 2.5H_2O$  (A. R. 100 g) 产自国药集团化学试剂有限公司,用蒸馏水配成质量浓度为 10 mg/ml 的  $Cd^{2+}$  母液,然后根据实验设计制成暴露液质量浓度分别为: 4.67、8.32、14.79、26.30、46.77、83.18、147.91 mg/L。

表 1 不同规格受试魁蚶生物学参数  
Tab.1 Biological parameters of *S. broughtonii* in different sizes (cm)

规格 Size	壳长 Length	壳高 Height	壳宽 Width
小规格 Small	2.34±0.15	1.70±0.11	1.26±0.09
中规格 Medium	3.68±0.15	2.76±0.17	2.26±0.18
大规格 Large	5.12±0.33	3.90±0.31	3.19±0.31

### 1.2 理化条件

该研究在山东省海洋生物研究院海水良种繁育中心(鳌山卫)贝类生产车间内进行,试验过程中水温为  $(18.5 \pm 1.5)^\circ C$ ,溶解氧含量  $\geq 6$  mg/L, 24 h 不间断充氧; pH 为 7.93–8.25; 盐度为  $3.10 \pm 0.03$ ; 实验过程中白天光照为 200–600 lx, 夜间无光照。

### 1.3 攻毒试验

试验期间,养殖用海水符合标准《GB11607-89 渔业水质标准》要求,其中,  $Cd^{2+}$  浓度为  $0.4 \times 10^{-3}$  mg/L。取 70 L 聚乙烯养殖箱,加 1.1 所述含不同浓度  $Cd^{2+}$

海水溶液 50 L,并放入同一规格魁蚶 10 粒,根据等比梯度浓度试验结果,确定  $Cd^{2+}$  的 100% 致死浓度与 0 致死的最大浓度,试验重复 3 次。根据上述结果,按浓度对数等差数列设试验组和 1 个对照组,平行两组,试验进行 96 h,期间不投饵,不换水,注意观察记录 24、48、72、96 h 各组试验魁蚶累计死亡粒数,及时清理死亡魁蚶。

魁蚶死亡标准为外套膜萎缩 0.3–0.5 cm 左右(小规格和中规格魁蚶萎缩约为 0.3 cm,大规格魁蚶萎缩约 0.5 cm),双壳张开,无闭壳反应,斧足部外伸,多次刺激无收缩反应,视为死亡。

使用 SPSS18.0 数理统计软件计算不同时间的半致死浓度  $LC_{50}^{24}$ 、 $LC_{50}^{48}$ 、 $LC_{50}^{72}$ 、 $LC_{50}^{96}$  及各自的 95% 置信区间,并利用下列公式计算安全养殖浓度:

$$SC = \frac{LC_{50}^{48} \times 0.3}{(LC_{50}^{24} / LC_{50}^{48})^2}$$

## 2 结果

### 2.1 不同规格魁蚶的中毒症状

暴露试验开始时,所有受试组的魁蚶外套膜均外伸约 0.4–0.6 cm, 1 h 左右对照组中小规格魁蚶基部足丝口开始分泌少量足丝,附着于箱体,中规格和大规格魁蚶基部足丝口在 2–8 h 后开始分泌足丝,基本在 24 h 后达到量多,明显可见;小规格魁蚶低浓度组(4.5、6.5、10 mg/L)在开始试验 1 h 后分泌了少量足丝,但暴露 3 h 后,其足丝分泌量并未大量上升,外套膜触手伸出;中规格魁蚶斧足部外伸,双壳张合状态(魁蚶无水管)较积极,大规格魁蚶次之,小规格魁蚶活动最少;小规格和中规格的魁蚶高浓度组中只有 1–2 个在 24 h 后观察到少量足丝,且不能挂壁,贝壳紧闭,外套膜触手和斧足部极少伸出;大规格魁蚶高浓度组的基部无足丝粘连,贝壳微开,开口约为 0.3–0.5 cm,外套膜外伸 0.2–0.3 cm,斧足外伸 0.3 cm 左右; 24 h 后除了对照组和低浓度组(4.5、6.5 mg/L)的魁蚶足丝口分泌足丝与箱体相连,斧足部和触手外伸,反应迅速,呈现出正常生活状态;稍高浓度试验组(20、30 mg/L)各规格的贝壳张开为 0.2–0.8 cm,外套膜收缩为 0.3–0.5 cm,斧足处呈现大小不一的白斑或黑斑,内脏团有充血现象,刺激后双壳闭合无力,偶见魁蚶有足丝分泌,但量很少,不挂壁;高浓度组(50、79 mg/L)的各规格魁蚶双壳可以闭合,但外套膜极少外伸,刺激后有轻微的收缩反应,闭壳反应较慢,无足丝分泌现象。48 h 后各规格魁蚶闭壳反应均较微弱,各水体

中呈现白色浑浊现象,氨氮范围为 35.40–79.45 μg/L;当魁蚶贝壳完全张开,斧足外伸、刺激无反应,外套膜萎缩,判为死亡。

2.2 镉对不同规格魁蚶的毒性影响

2.2.1 Cd<sup>2+</sup>对不同规格魁蚶急性毒性试验结果

Cd<sup>2+</sup>对不同规格魁蚶的 24 h、100% 致死浓度为 140 mg/L 左右, 24 h、0 致死的最大浓度为 4.7 mg/L 左右,因此,各试验组浓度设定在 4.67–147.91 mg/L,根据浓度对数规则设置攻毒浓度见表 2。

使用 SPSS18.0 对试验结果进行数据处理,计算出 Cd<sup>2+</sup>浓度对数与不同规格魁蚶死亡概率方程,分别求出 LC<sub>50</sub><sup>24</sup>、LC<sub>50</sub><sup>48</sup>、LC<sub>50</sub><sup>72</sup>、LC<sub>50</sub><sup>96</sup>,并计算出 95%(α=0.05) 置信区间,结果见表 3–表 5。由表 3–表 5 可以看出,Cd<sup>2+</sup>对不同规格魁蚶的 LC<sub>50</sub><sup>24</sup>、LC<sub>50</sub><sup>48</sup>、LC<sub>50</sub><sup>72</sup>、LC<sub>50</sub><sup>96</sup> 组间和组内差异较大,24 h 半致死浓度最高的是大规格魁蚶(157.36 mg/L),其次为小规格魁蚶(131.11 mg/L),最低为中规格魁蚶(54.10 mg/L); 48 h 半致死浓度最高的是小规格魁蚶(41.40 mg/L),其次为大规格魁蚶

表 2 Cd<sup>2+</sup>对不同规格魁蚶急性毒性试验结果  
Tab.2 The results of Cd<sup>2+</sup> toxicity to different-sized *S. broughtonii*

浓度 Concentration (mg/L)	受试 总数 Total	24 h 累计死亡数 Cumulative mortality at 24 h			48 h 累计死亡数 Cumulative mortality at 48 h			72 h 累计死亡数 Cumulative mortality at 72 h			96 h 累计死亡数 Cumulative mortality at 96 h		
		小规格 Small	中规格 Medium	大规格 Large	小规格 Small	中规格 Medium	大规格 Large	小规格 Small	中规格 Medium	大规格 Large	小规格 Small	中规格 Medium	大规格 Large
		0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4.67	10	0	0	0	0	0	0	2	1	5	10	10	10
8.32	10	0	1	0	2	4	0	5	7	6	10	10	10
14.79	10	1	2	0	3	5	1	6	8	7	10	10	10
26.30	10	2	4	1	4	7	4	8	10	8	10	10	10
46.77	10	3	5	2	5	10	6	8	10	8	10	10	10
83.18	10	6	4	3	7	10	6	8	10	8	10	10	10
147.91	10	10	5	4	10	10	8	9	10	10	10	10	10

注: 结果以 3 次平行取平均值表示, 四舍五入  
Note: Results are shown as the mean of three tests and rounded

表 3 Cd<sup>2+</sup>对小规格魁蚶急性毒性试验数理统计结果  
Tab.3 The statistical results of Cd<sup>2+</sup> toxicity to small-sized *S. broughtonii*

时间 Time(h)	浓度对数-死亡概率方程 logC-death probability equation	LC <sub>50</sub> (mg/L)	RSD <sub>LC50</sub> (mg/L)	95% 置信区间 95% confidence interval(mg/L)	R <sup>2</sup>
24	P=1.64X-3.48	131.11	4.12	79.30–458.68	0.82
48	P=0.90X-1.46	41.40	3.48	25.61–108.28	0.99
72	P=1.08X-0.60	3.57	0.16	0.43–7.19	0.83
96	P=2.68X-1.41	3.37	0.97	0.40–5.40	0.97

表 4 Cd<sup>2+</sup>对中规格魁蚶急性毒性试验数理统计结果  
Tab.4 The statistical results of Cd<sup>2+</sup> toxicity to medium-sized *S. broughtonii*

时间 Time(h)	浓度对数-死亡概率方程 logC-death probability equation	LC <sub>50</sub> (mg/L)	RSD <sub>LC50</sub> (mg/L)	95% 置信区间 95% confidence interval (mg/L)	R <sup>2</sup>
24	P=0.94X-1.64	54.10	4.12	33.28–169.70	1.00
48	P=3.13X-3.05	9.46	0.01	7.41–11.43	1.00
72	P=1.73X-0.70	2.54*	0.16	0.27–4.93	0.83
96	P=1.44X+0.44	0.50*	0.07	0.01–1.28	0.99

\*表示二组差异不显著(P=0.76>0.05)  
\* The difference between groups is not significant (P=0.76>0.05)

表 5  $Cd^{2+}$ 对大规格魁蚶急性毒性试验数理统计结果  
Tab.5 The statistical results of  $Cd^{2+}$  toxicity to large-sized *S. broughtonii*

时间 Time(h)	浓度对数-死亡概率方程 logC-death probability equation	$LC_{50}$ (mg/L)	$RSD_{LC_{50}}$ (mg/L)	95%置信区间 95% Confidence interval (mg/L)	$R^2$
24	$P=1.74X-3.82$	157.36	4.12	83.80–419.52	0.99
48	$P=2.28X-3.61$	38.13	0.01	29.51–52.49	0.72
72	$P=1.41X-1.34$	8.90	0.16	4.91–13.02	0.72
96	$P=2.10X-1.13$	3.46	0.07	0.01–7.47	0.70

(38.13 mg/L), 最低为中规格魁蚶(9.46 mg/L), 这与 24 h 的结果呈现的不一致; 72 h 半致死浓度最高的是大规格魁蚶(8.90 mg/L), 其次为小规格和中规格魁蚶(均为 0.16 mg/L); 96 h 半致死浓度最高的是大规格魁蚶(3.46 mg/L), 其次为小规格魁蚶(3.37 mg/L), 最低为中规格魁蚶(0.07 mg/L), 与 24 h 所呈现的结果一致。经 SPSS18.0 对不同规格魁蚶的半致死浓度与暴露时间统计学处理, 得出不同的暴露时间对小规格魁蚶和大规格魁蚶的半致死浓度影响极其显著( $P<0.001$ ), 但中规格魁蚶的半致死浓度在 24、48 h 之间差异极其显著, 72、96 h 的半致死浓度之间差异不显著( $P=0.76>0.05$ ); 暴露时间与小规格、中规格魁蚶对  $Cd^{2+}$  相应时间的半致死浓度大小均呈明显正相关( $R^2>0.80$ ), 大规格魁蚶的 24 h 半致死浓度与暴露时间相关系数良好( $R^2=0.99$ ), 但 48、72、96 h 的半致死浓度与暴露时间的相关系数一般( $R^2<0.80$ ), 可能和大规格魁蚶的个体差异有关。研究表明, 小规格的魁蚶对各浓度  $Cd^{2+}$  的半致死浓度高于中规格魁蚶的响应值可能是由于“毒物兴奋效应(Hormesis)” (顾海龙, 2013<sup>1)</sup>; Calabrese, 2010), 即低剂量的毒物表现为刺激效应, 而高剂量则表现为抑制效应(Zhang *et al.*, 2013)。已有研究表明, 氯化镉可诱导小鼠成纤维(L929)细胞增殖的毒物兴奋效应, 但对于双壳贝类的毒物兴奋效应研究较少(袁雪峰, 2013)<sup>2)</sup>。

**2.2.2 不同规格魁蚶与  $Cd^{2+}$  不同时间的半致死浓度关系** 不同规格魁蚶与  $Cd^{2+}$  不同时间的半致死浓度关系见图 1。由图 1 可见, 不同时间的半致死浓度与暴露时间成幂指数函数关系, 大、中、小规格魁蚶不同时间的半致死浓度与暴露时间成幂指数函数分别为:  $y = 1 \times 10^6 x^{-2.757}$  ( $R^2 = 0.98, P < 0.001$ )、 $y = 2 \times 10^6 x^{-3.251}$  ( $R^2 = 0.97, P < 0.001$ )、 $y = 2 \times 10^6 x^{-2.901}$  ( $R^2 = 0.91, P < 0.001$ ), 魁蚶规格与半致死浓度呈负相关关系。

**2.2.3  $Cd^{2+}$  对不同规格魁蚶的安全养殖浓度** 按安

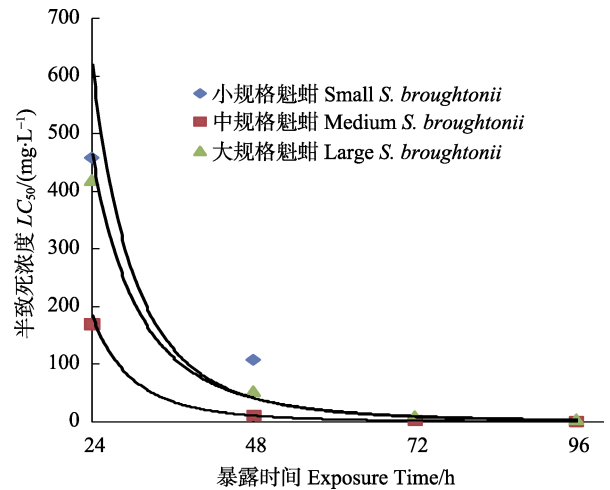


图 1 不同规格魁蚶  $Cd^{2+}$  的半致死浓度与暴露时间的关系  
Fig.1 The relationships of  $LC_{50}$  exposure time among different specifications *S. broughtonii*

全养殖浓度公式, 计算得出  $Cd^{2+}$  对不同规格魁蚶的安全养殖浓度见表 6。不同规格魁蚶对  $Cd^{2+}$  的安全养殖浓度依次为小规格(1.24 mg/L)>大规格(0.67 mg/L)>中规格(0.09 mg/L)。其中, 小规格魁蚶对  $Cd^{2+}$  的安全养殖浓度分别是大规格魁蚶的 1.85 倍、中规格魁蚶的 13.78 倍( $P<0.001$ ), 说明海水中  $Cd^{2+}$  的含量对中规格魁蚶的影响大于小规格和大规格魁蚶。因此, 建议魁蚶生长中后期尤其是壳长 3.68 cm 时, 应注意密切监测水中  $Cd^{2+}$  的含量。不同规格魁蚶对  $Cd^{2+}$  的安全养殖浓度均高于国家二类水质标准 18–248 倍, 但水质标准指标应结合魁蚶体内镉含量和相应的风险评估结果, 这有待进一步研究。

**2.2.4  $Cd^{2+}$  对不同规格魁蚶的毒性分类** 依据有毒物质对水产类的毒性分类标准(张志杰等, 1991)与不同规格魁蚶对  $Cd^{2+}$  的安全养殖浓度, 对  $Cd^{2+}$  对不同规格魁蚶的毒性进行分级, 具体情况见表 7。 $Cd^{2+}$  对不同规格魁蚶的毒性大小不一致,  $Cd^{2+}$  对小规格魁

1) 顾海龙. Cd、Pb、Hg 暴毒下泥蚶的分子生态毒理学研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文. 2013, 15–16, 48  
2) 袁雪峰. 低剂量氯化镉诱导 L929 细胞增殖 hormesis 效应的研究. 暨南大学硕士研究生学位论文. 2013, 32–36

表6 不同规格魁蚶对 Cd<sup>2+</sup>的安全养殖浓度与国标限量对比  
Tab.6 Comparison between national standard and SC<sub>50</sub> of different specifications (mg/L)

魁蚶规格 Size	小规格 Small	中规格 Medium	大规格 Large
安全养殖浓度 Safety concentration	1.24 <sup>a</sup>	0.09 <sup>b</sup>	0.67 <sup>c</sup>
95%置信区间 95% confidence interval	0.29–1.81	0.02–0.11	0.25–1.10
NY5052-2001*	≤0.005		
GB3097-1997*	第1类 primary ≤0.001	第2类 secondary ≤0.005	第3类、第4类 third&fourth-class ≤0.010
GB11607-1989*	≤0.005		

注：\*表示国家强制性标准；不同的肩注表示二者差异极其显著(P<0.001)

Note: \* National mandatory standard, Different shoulder means highly significant difference (P<0.001)

表7 有毒物质对水产类的毒性标准

Tab.7 The classification standard of toxicants for aquatic animal (mg/L)

等级 Class	剧毒 Rank poison	高毒 High toxic	中毒 General toxicity	低毒 Low toxicity
MRLs	<0.1	0.1–1	1–10	>10
小规格 Small			1.24	
中规格 Medium	0.09			
大规格 Large		0.67		

蚶属于中毒物质，对中规格魁蚶属于剧毒物质，对于大规格魁蚶是高毒物质，这可能是由于中规格魁蚶的活动能力较大规格和小规格魁蚶强，实际暴露时间长，这一推论是经长期观察，大、中、小规格魁蚶闭壳肌打开滤水时间所得，有待进一步验证。

### 3 讨论

#### 3.1 Cd<sup>2+</sup>对不同规格魁蚶的毒性机理

镉对毛蚶(*Scapharca subcrenata*)的致毒机理主要是 Cd<sup>2+</sup>引发毛蚶体内脂质过氧化、DNA 链的断裂以及蛋白质的氧化修饰等损伤(陈建华等, 2010)。陈彩芳等(2012)研究发现, Cd<sup>2+</sup>对泥蚶(*Tegillarca granosa*)肝胰腺的显微和超微结构损伤均远大于鳃,可能是 Cd<sup>2+</sup>经由鳃进入血液循环后在内脏团重新分布积累,最终对内脏团造成巨大损伤。本研究也发现,高浓度组魁蚶内脏团有充血现象。王召根(2013)<sup>1)</sup>认为,不同浓度 Cd<sup>2+</sup>(0.1–1.6 mg/L),对泥蚶呼吸和排泄有较明显抑制作用,即随着 Cd<sup>2+</sup>浓度增加,泥蚶耗氧率和排氮率出现逐渐减弱趋势,且影响极其显著。本研究结果表明,

不同浓度 Cd<sup>2+</sup>对不同规格斧足和外套膜有不同的影响,基本表现为外套膜收缩,斧足外伸不能收回,斧足有大小不一的白斑或黑斑,内脏出血,且足丝脱离箱体,无附着力,刺激后双壳无力闭合。这是魁蚶对 Cd<sup>2+</sup>中毒的表现,与泥蚶的中毒机理类似,均可能是由呼吸和排泄异常引起的。其中, Cd<sup>2+</sup>对魁蚶基部足丝分泌的影响与刘天红等(2010)的研究较为一致,具体机理有待进一步确证。

#### 3.2 Cd<sup>2+</sup>对不同规格魁蚶的毒性分析

Cd<sup>2+</sup>对不同规格魁蚶的 24、48、72、96 h 半致死浓度差别较大,表现为 24、72、96 h 半致死浓度为 大规格魁蚶>小规格≥中规格,48 h 半致死浓度变化为小规格魁蚶>大规格>中规格。陈建华等(2010)发现, Cd<sup>2+</sup>对毛蚶(壳长为 2.87–3.66 cm,壳高为 2.35–2.77 cm)的 24、48、72、96 h 的半致死浓度分别为 12.27、7.86、6.16、5.17 mg/L,远低于本研究小规格魁蚶[壳长为(2.34±0.50) cm,壳高为(1.70±0.11) cm] 24、48 h 的半致死浓度(131.11、41.40、3.57、3.37 mg/L),而泥蚶 72、96 h 的半致死浓度约为小规格魁蚶的 1.73 倍和 1.53 倍,说明同等规格的蚶类对 Cd<sup>2+</sup>的耐受力差别较大。霍礼辉(2012)<sup>2)</sup>研究了壳长为(2.67±0.15) cm 的泥蚶对 Cd<sup>2+</sup>的耐受性,其 96 h 的半致死浓度为 2.25 mg/L,低于小规格魁蚶的 96 h 半致死浓度 (3.37 mg/L)。王召根(2013)<sup>1)</sup>研究结果表明,壳长在(2.82±0.16) cm 的泥蚶对 Cd<sup>2+</sup>的 96 h 半致死浓度为 0.46 mg/L,远远低于小规格魁蚶的 96 h 半致死浓度(3.37 mg/L)。上述学者均是研究了泥蚶对 Cd<sup>2+</sup>的耐受性,对比发现,总体上小规格魁蚶对 Cd<sup>2+</sup>的耐受性要远高于同等规格的泥蚶,虽然二者均为蚶类,但因生活环境(盐度)不同,种的不同,个体差异较为

1) 王召根. 重金属镉和铜对泥蚶的毒性效应研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2013, 1, 11, 16–17

2) 霍礼辉. 泥蚶对重金属(铜、铅、镉)的富集和响应初步研究. 宁波大学硕士研究生学位论文, 2012, 14–19

明显。

同为海水双壳贝类, 李玉环等(2006)研究表明, 镉对海湾扇贝(*Argopecten irradians*)的 24、48、96 h 的半致死浓度分别是 5.85、4.52、3.45 mg/L, 安全养殖浓度为 0.035 mg/L, 是小规格魁蚶安全养殖浓度的 1/35; 刘天红等(2010)研究认为,  $\text{Cd}^{2+}$ 对栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)的 24、48、96 h 的半致死浓度分别是 5.74、3.30、0.97 mg/L, 安全养殖浓度为 0.33 mg/L, 是小规格魁蚶安全养殖浓度的 1/11; 徐彦(2012)<sup>1)</sup>研究了  $\text{Cd}^{2+}$ 对菲律宾蛤仔 24、48、96 h 的半致死浓度分别是 11.15、7.58、4.74 mg/L, 安全养殖浓度为 0.65 mg/L; 张聪(2012)<sup>2)</sup>通过模拟褶牡蛎(*Ostrea picatula* Gmelin)生长环境, 利用富集系数计算褶牡蛎对  $\text{Cd}^{2+}$ 的安全养殖浓度为 0.96  $\mu\text{g/L}$ , 是小规格魁蚶安全养殖浓度的 1/1292, 说明褶牡蛎对  $\text{Cd}^{2+}$ 的敏感性更高; 上述海水贝类的急性毒性研究结果均低于大规格魁蚶相应时间的半致死浓度(157.36、38.13、3.46 mg/L)和安全养殖浓度 0.67 mg/L, 说明不同种类之间存在较大的差异性, 魁蚶(2.19–5.45 cm)对  $\text{Cd}^{2+}$ 的耐受性高于其他双壳海水贝类(如扇贝、牡蛎等), 可能与魁蚶体内的金属硫蛋白含量有关。有学者认为, 一定暴露浓度范围内,  $\text{Cd}^{2+}$ 可诱导近江牡蛎(*Ostrea rivularis*)金属硫蛋白的表达, 表现出“阈值效应”, 即体内镉含量达到一定值时, 本底金属硫蛋白开始迅速表达, 使其体内金属硫蛋白含量显著升高, 但当金属硫蛋白浓度太高时又产生负反馈调节, 这时会抑制其生存状态, 以上研究是基于蛋白质介导的离子通道转运的结果(周湖明, 2013)<sup>3)</sup>。

本研究中, 各规格魁蚶对于  $\text{Cd}^{2+}$ 的安全养殖浓度均低于相关水质标准的规定, GB3097-1997 中规定第 3 类、第 4 类水质( $\leq 0.01$  mg/L)不适于养殖。作者认为, 在此条件下魁蚶仍能健康存活, 但可能不适于安全食用, 应结合其体内镉含量的变化和风险分析进行评估。 $\text{Cd}^{2+}$ 对于小规格魁蚶属于中毒类物质, 对于中规格魁蚶属于剧毒类物质, 对于大规格魁蚶属于高毒类物质。这与刘天红等(2010)研究发现,  $\text{Cd}^{2+}$ 对于栉孔扇贝属于高毒类物质的结果一致。李玉环等(2006)

认为,  $\text{Cd}^{2+}$ 对于海湾扇贝属于剧毒类物质与本研究稍有差异; 田鹏(2013)<sup>4)</sup>和杨艳红(2013)<sup>5)</sup>研究认为, 水产动物(鱼类)对  $\text{Cd}^{2+}$ 有一定的耐受力与本研究结果一致。其他学者少有对  $\text{Cd}^{2+}$ 对水产动物毒性进行定性, 作者认为, 本部分的研究定性可能会有助于渔业标准和养殖环境区域划分定性。

### 3.3 镉对中规格魁蚶和小规格魁蚶半致死浓度的影响分析

$\text{Cd}^{2+}$ 对不同规格魁蚶的 24、48、72、96 h 半致死浓度和安全养殖浓度结果不同, 可能与魁蚶对镉胁迫应答机制有关。动物在镉胁迫下主要有 3 种应答机制, 以保护机体的免受损伤: 1) 启动应激反应, 如 SOD、CAT 等其他抗氧化防御系统; 2) 合成更多的可螯合镉的蛋白质(如金属硫蛋白)以消除多余的镉; 3) 降低自身的代谢速率, 减少与外界物质的交换, 以避免更多对镉的吸收。当机体内镉的积累速度超出自身的解毒和代谢能力时, 便会产生毒性作用(Cuyper *et al*, 2010)。因此, 作者认为, 中规格魁蚶因处于足丝分泌和生长快速期, 可能会降低自身对镉的代谢速率导致其体内镉含量较高, 引起中毒表现。上述推断有待进一步从细胞毒理学角度进行验证。

## 参 考 文 献

- 王颖, 吴志宏, 李红艳等. 青岛魁蚶软体部营养成分分析及评价. 渔业科学进展, 2013, 34(1): 133–139
- 孙安强. 西方对镉的论谈. 环境科学研究, 1978, (3)7: 7–79
- 刘天红, 孙福新, 王颖, 等. 无机镉对栉孔扇贝(*Chlamys Farreri*)急性毒性研究及其安全评价. 食品研究与开发, 2010, 31(4): 161–165
- 刘浩明, 董迎辉, 霍礼辉, 等.  $\text{Cu}^{2+}$ 对缢蛏稚贝的急性毒性及对抗氧化酶活力和丙二醛含量的影响. 中国水产科学, 2012, 19(1): 182–187
- 阮飞腾, 高森, 李莉, 等. 山东沿海魁蚶繁殖周期与生化成分的周年变化. 水产学报, 2014, 38(1): 47–55
- 李玉环, 林洪. 镉对海湾扇贝的急性毒性研究. 海洋水产研究, 2006, 27(6): 80–83
- 李国庆. 从广东“镉大米”事件看我国粮食质量安全的监管.

1) 徐彦. 菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)对重金属离子  $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 免疫应激响应的研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2012, 24–26

2) 张聪. 褶牡蛎对重金属的富集与释放规律及相关安全限量研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2012, 48–52

3) 周湖明. 近江牡蛎富集和排出 Cd、Pb 及其与金属硫蛋白含量相关性的研究. 广东海洋大学硕士研究生学位论文, 2013, 16–18

4) 田鹏. 水体中镉暴露对草鱼的氧化胁迫研究. 西南大学硕士研究生学位论文, 2013, 25–28

5) 杨艳红. 重金属( $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Cr}^{6+}$ )对厚颌鲂幼鱼生物毒性效应的研究. 西南大学硕士研究生学位论文, 2013, 10–12



- 河南工业大学学报(社会科学版), 2013, 9(3): 20–23
- 陈建华, 阎斌伦, 李盈蕾, 等. 石油烃和镉对毛蚶的急性毒性与联合毒性效应研究. 水生态学杂志, 2010, 3(3): 85–89
- 陈彩芳, 沈伟良, 霍礼辉, 等. 重金属离子  $Cd^{2+}$  对泥蚶鳃及肝脏细胞显微和超微结构的影响. 水产学报, 2012, 36(4): 522–528
- 张志杰, 张维平. 环境污染生物监测与评价. 北京: 中国环境科学出版社, 1991, 68–69
- 崔岩山, 陈晓晨. 土壤中镉的生物可给性及其对人体的健康风险评估. 环境科学, 2010, 31(2): 403–407
- Calabrese EJ. Hormesis is central to toxicology, pharmacology and risk assessment. *Hum Exp Toxicol*, 2010, 29(4): 249–261
- Cuypers A, Plusquin M, Remans T, *et al.* Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biometals*, 2010, 23(5): 927–940
- IARC In. IARC Monographs on evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 1993
- Zhang J, Liu SS, Yu ZY, *et al.* Time-dependent hormetic effects of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride and their mixtures on *Vibrio qinghaiensis* sp. -Q67: Luminescence, redox reactants and antioxidases. *Chemosphere*, 2013, 91(4): 462–467

(编辑 陈严)

## The Safety Evaluation of the Acute Toxicological Effects of Inorganic-Cadmium on *Scapharca broughtonii*

LIU Tianhong<sup>1</sup>, YU Xiaoqing<sup>1</sup>, LIU Guangbin<sup>1,2</sup>, WANG Ying<sup>1</sup>, WU Yingying<sup>1,2</sup>,  
LIU Enfu<sup>1,2</sup>, QIU Zhaoxing<sup>1,2</sup><sup>①</sup>

(1. Marine Biology Institute of Shandong Province Qingdao 266100;

2. Key Laboratory of Benthic Fisheries Aquaculture and Enhancement Qingdao 266100)

**Abstract** Heavy metals are considered as the most deleterious contaminants in the environment due to their non-degrading and bioaccumulative properties. Shellfish have been used as an indicator for the toxicity of Cd, Pb, and other heavy metals. However, there are very few studies about the effects of heavy metals on *Scapharca broughtonii*. The safety of the seafood largely depends on the level of heavy metals accumulated in the body, which is determined by the content of heavy metals in the aquaculture environment. Here qualitative and quantitative methods were conducted to study the acute toxicity of cadmium on *S. broughtonii* with different sizes, which serves as a sign of the seafood safety. We determined the semi lethal concentration ( $LC_{50}$ ) and the safety concentration ( $SC_{50}$ ) of cadmium in different time courses (24 h, 48 h, 72 h and 96 h), by SPSS18.0 statistical software (Prob-Ig). The  $LC_{50}$  values of small *S. broughtonii* were 131.11, 41.40, 3.57 and 3.37 mg/L corresponding to the time courses above, and the  $SC_{50}$  value was 1.24 mg/L. In the medium *S. broughtonii* the  $LC_{50}$  values were 54.10, 9.46, 2.54, and 0.50 mg/L, and the  $SC_{50}$  value was 0.09 mg/L. About the large *S. broughtonii* the  $LC_{50}$  values were 157.36, 38.13, 8.90, 3.46 mg/L and the  $SC_{50}$  value was 0.67 mg/L. These results demonstrated that the  $SC_{50}$  values of  $Cd^{2+}$  in *S. broughtonii* were higher than the water quality standard in aquaculture. The toxicity of  $Cd^{2+}$  was identified as moderate for small *S. broughtonii*, extreme toxicity medium *S. broughtonii*, and high toxicity for large *S. broughtonii*. There was hermetic effect on inorganic cadmium for small *S. broughtonii*.

**Key words** Inorganic-cadmium; Different size; *Scapharca broughtonii*;  $SC_{50}$ ; Hormesis

① Corresponding author: QIU Zhaoxing, E-mail: 13808956497@163.com

# 光裸方格星虫(*Sipunculus nudus*) 对3种不同底质的适应能力\*



李俊伟 朱长波 郭永坚 颀晓勇<sup>①</sup> 陈素文 张文文

(中国水产科学研究院南海水产研究所 农业部南海渔业资源开发利用重点试验室 广州 510300)

**摘要** 在室内养殖系统中开展光裸方格星虫(*Sipunculus nudus*)对3种不同底质适应能力的研究。3个底质处理组分别为海沙组(S-s)、对虾池塘底质组(S-sp)和鱼塘底质组(S-fp),各设5个重复;方格星虫[(2.58±0.23)g]的养殖密度为5条/缸。结果显示,3个处理组中,方格星虫的存活率均高于90%;3个处理组中,方格星虫的排泄物主要由粒径( $R$ )小于0.4 mm的物质组成,其中 $R<0.224$  mm的物质占较大比例,在S-s、S-sp和S-fp组中分别达到47.70%、85.95%和69.99%。试验结束时,S-fp组的方格星虫表现出一定程度的生长,而S-s和S-sp组体重稍有下降。研究结果表明,方格星虫成体对于底质的还原状态具有较大的耐受范围,而对于较小粒径( $R<0.224$  mm)的物质具有较高摄食需求;同时,底质中的有机质含量也是影响其生长的因素之一。

**关键词** 方格星虫;底质;存活率;适应能力

**中图分类号** S958 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)06-0095-05

光裸方格星虫(*Sipunculus nudus*)隶属于星虫动物门,是一种营穴居生活的大型底栖动物,多栖息于以沙质为主的滩涂区域,广泛分布于中国近海沿岸(李凤鲁等,1992;张琴等,2011;李俊伟等,2014)。方格星虫具有重要的食用和药用价值,现代医学研究表明,方格星虫含有多种活性物质,具有一定的提高免疫力、抗疲劳及延缓衰老等效果(蒋定文等,2004;沈先荣等,2003、2004),同时在其体内提取的多糖物质也表现出一定的抗菌作用(夏乾峰等,2007)。

方格星虫在生态系统中也具有较为重要的生态意义(Li *et al.*, 2015; 李俊伟等, 2015)。由于方格星虫摄食和利用表层沉积物中的营养物质,并将粪便排泄在洞穴深处,实现了将表层沉积物向底层的搬运和封埋,属于下行搬运者(孙刚等, 2013; Li *et al.*, 2015)。星虫类动物对沉积物中有机质的摄食利用可以减少

有机质在沉积物表层的积累,对改善沉积物的理化特征具有重要作用(Shields *et al.*, 2009; 郑忠明, 2009<sup>1)</sup>; Wang *et al.*, 2012)。

目前,方格星虫的增养殖主要集中于平坦、细沙质的潮间带区域,且产量较低。底部为沙质的池塘中曾有丰富的方格星虫资源,但近年来的高密度养殖引起的池塘底质环境恶化及清塘等因素导致沙质池塘中方格星虫资源的急剧减少。中国沿海的沙底池塘或滩涂养殖面积颇为广阔,而方格星虫具有较广的耐盐和耐温性能(曾志南等, 2008、2010),因此,在具有沙底的池塘或滩涂中,在养殖适宜品种的基础上,进行方格星虫的增养或搭配养殖具有较好的应用前景。方格星虫不能直接对饵料进行摄取,其营养物质的获取主要依赖对适宜粒径沙粒摄入时产生的附带效果。因此,生长环境中底质的粒径组成对其摄食和生长具

\* 广东省自然科学基金博士启动项目(2015A030310260)、中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(中国水产科学研究院南海水产研究所)(2014TS03; 2014ZD01)共同资助。李俊伟, E-mail: lijunwei303@163.com

<sup>①</sup> 通讯作者: 颀晓勇, 副研究员, E-mail: xiexiaoyongsh@sina.com

收稿日期: 2015-01-28, 收修改稿日期: 2015-03-11

1) 郑忠明. 刺参养殖池塘沉积物-水界面营养盐通量的研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2009, 105-111

有重要作用。不同养殖环境中的有机质含量、细沙所占比例以及其他理化因子间的差别较大,会在不同程度上影响方格星虫的生存、摄食及生长。因此,对方格星虫在不同底质中的适应能力展开研究,对其在池塘或滩涂中增养殖的推广具有重要意义。

本研究采用3种不同类型的底质(海边细沙、对虾池塘底质以及罗非鱼池塘底质)作为方格星虫的生长环境,基于方格星虫在不同底质中的存活状态和生长情况,确定方格星虫对不同底质的适应能力,为推广方格星虫的增养殖提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验在中国水产科学研究院南海水产研究所深圳养殖基地进行,试验时间为35 d。试验共3个处理组,包括海沙组(S-s)、对虾池塘底质组(S-sp)以及罗非鱼池塘底质组(S-fp),每个处理组分别设5个重复。3种底质均经过曝晒以除掉其中的大型底栖动物,在养殖箱(31 cm × 20 cm × 30 cm)底部铺设相同厚度(10 cm)的底质,并注入等量海水,测定底质中的初始氧化还原电位( $Eh$ )。在每个养殖箱中放入5条方格星虫[(2.58 ± 0.23) g]。

### 1.2 日常管理

试验期间,投喂粉碎过筛的马尾藻粉( $R < 0.28$  mm),投喂量为1 g/d。采用充气石进行连续充氧,养殖期间DO浓度高于6 mg/L,养殖期间不换水。

### 1.3 样品的收集及测定

初始沉积物样品先进行粒径组成测定。分别于初始和结束时,采集沉积物和方格星虫样品,于60℃烘干保存后用于有机质的测定。水体的温度、盐度、

pH以及溶解氧采用YSI(556, YSI Incorporated, Yellow Springs, 美国)进行现场测定。采用氧化还原电位仪(SX-630, 上海)测定试验初始和结束时3种底质表层和底层间隙水中的氧化还原电位。

试验结束时,将方格星虫取出,置于盛水烧杯中(4 h),观察其排泄过程并收集排泄物质。排泄结束后,记录终末重量,并将收集到的排泄物质烘干保存,测定其中的有机质含量和粒径组成。沉积物、排泄物以及生物样品的有机质含量均采用马弗炉灼烧法(550℃)进行测定。

海沙、对虾池塘底质以及罗非鱼池塘底质的初始有机质含量分别为1.08%、2.12%和3.49%。3种底质在烘干后经过多级样品筛进行粒径组成的分析(表1)。

由于该试验结果侧重的是方格星虫对不同底质的耐受情况,并且由于方格星虫放养数量较少,其对于底质的粒径组成影响不大,且投入的饵料(有机质)相对于养殖箱内的底质重量(有机质)影响较小。

### 1.4 计算公式

试验期间,对方格星虫的成活率(Survival rate)和特定生长率(Specific growth rate)进行计算和分析。

$$\text{存活率}(\%) = N_1 \times 100 / N_2$$

$$\text{特定生长率}(\%) = 100 (\ln W_2 - \ln W_1) / T$$

式中, $N_1$ (条)和 $N_2$ (条)分别为试验初始和结束时方格星虫的数量; $W_1$ (g)和 $W_2$ (g)分别为方格星虫的初始重量和终末重量; $T$ 为试验进行的时间(d)。

### 1.5 数据分析

采用SPSS 17.0进行数据统计和分析。百分数值均进行数据转换后进行方差分析。不同处理组间的数据差异采用One-way ANOVA进行分析,显著度为 $P < 0.05$ 。

表1 不同底质的有机质含量及粒径组成

Tab.1 The organic content and grain composition of the different sediments (Mean ± SD)

组别 Treatment	有机质含量 Organic content (%)	粒径组成比例 Grain composition (%)			
		$R > 0.4$ mm	$0.28$ mm $< R < 0.4$ mm	$0.224$ mm $< R < 0.28$ mm	$R < 0.224$ mm
S-s	1.08 ± 0.05	7.69 ± 0.08	21.64 ± 0.12	38.36 ± 0.26	32.31 ± 0.23
S-sp	2.12 ± 0.04	81.92 ± 0.21	5.40 ± 0.10	4.20 ± 0.09	8.48 ± 0.16
S-fp	3.49 ± 0.09	66.88 ± 0.25	8.77 ± 0.08	0.03 ± 0.00	24.31 ± 0.20

## 2 结果

### 2.1 水质

养殖箱内的水温变化范围为25–30℃,盐度变化范

围为29–31,pH为8.0–8.3,溶解氧含量为6.0–6.5 mg/L,3个处理组之间无显著差异( $P > 0.05$ )。

### 2.2 间隙水中氧化还原电位( $Eh$ )的变化

试验初期,海沙组(S-s)表层和底层间隙水中的

*Eh* 值分别为 105 mV 和 80 mV, 虾塘底质组(S-sp)表层和底层间隙水的 *Eh* 值分别为-170 mV 和-180 mV, 鱼塘底质组(S-fp)表层和底层间隙水中的 *Eh* 值分别为-260 mV 和-279 mV。试验结束时, S-s 组间隙水中的 *Eh* 值仍然显著高于 S-sp 和 S-fp 组( $P<0.05$ ); S-sp 和 S-fp 组间隙水的 *Eh* 值仍较低, 且两组的底层间隙水 *Eh* 值均低于相应的表层间隙水(图 1)。

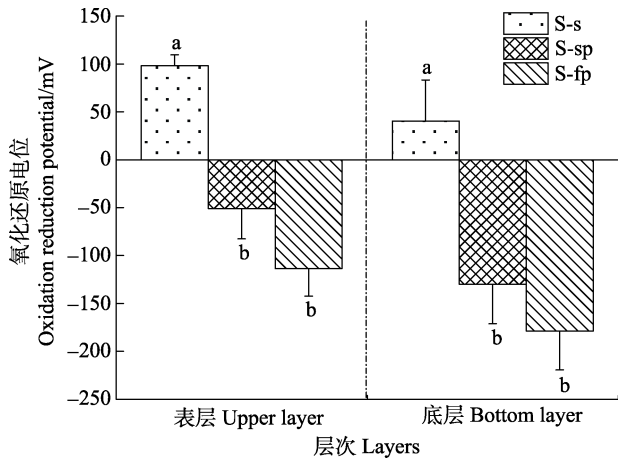


图 1 不同处理组底质表层和底层的氧化还原电位  
Fig.1 The oxidation reduction potential of the pore water in upper and bottom layers of the sediment at the end of the experiment

S-s. 海沙底质组; S-sp. 对虾池塘底质组; S-fp. 鱼塘底质组。数据为平均值±标准误差( $n=5$ )。字母 a 和 b 表示不同处理组之间的数据差异显著( $P<0.05$ )。下同

S-s, S-sp and S-fp represent the treatments of sea sand, shrimp-pond sediment and fish-pond sediment, respectively. Values were given as Mean±SD ( $n=5$ ). Different letters indicate significant difference among treatments ( $P<0.05$ ), same in the following figure

### 2.3 方格星虫的存活与生长

试验结束时, 不同处理组的方格星虫均表现出较高的成活率(图 2), S-s、S-sp 和 S-fp 组的成活率分别为 96%、92% 和 92%, 处理组之间无显著差异( $P>0.05$ )。试验期间, 仅有 S-fp 组的方格星虫表现出一定程度的增重, 而其他两组的方格星虫重量均减轻, 其中以 S-s 组的方格星虫失重最多(表 2)。

### 2.4 方格星虫的摄食和排泄

试验结束时, 将方格星虫取出放至烧杯中, 观察其排泄过程并收集排泄物质。通过观察发现, 方格星虫的吻部伸展和收缩频率为 8-12 次/min, 吻部快速向外伸展并带动前段的肠道伸展, 其星状触手接触到物质后, 吻部随即收缩。在吻部收缩的同时, 肠道末端的排泄物通过排泄孔排出体外, 每次排泄时仅有少

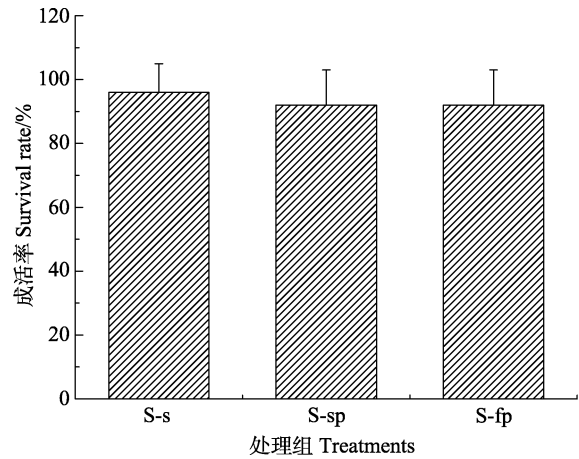


图 2 不同处理组方格星虫的成活率  
Fig.2 The survival rate of *S. nudus* in three treatments

S-s 表示海沙底质组; S-sp 表示对虾池塘底质组; S-fp 表示鱼塘底质组  
S-s, S-sp and S-fp represent the treatments of sea sand, shrimp-pond sediment and fish-pond sediment, respectively

表 2 试验期间方格星虫的生长性能  
Tab.2 The growth performance of *S. nudus* in the experiment

处理组 Treatments	初始重量 Initial weight (g)	终末重量 Final weight (g)	特定生长率 Specific growth rate (%)
S-s	2.52±0.12	2.32±0.31	-
S-sp	2.73±0.28	2.68±0.15	-
S-fp	2.49±0.30	2.62±0.13	0.17

S-s. 海沙底质组; S-sp. 对虾池塘底质组; S-fp. 鱼塘底质组。-表示该组方格星虫的特定生长率为负值  
S-s, S-sp and S-fp represent the treatments of sea sand, shrimp-pond sediment and fish-pond sediment, respectively. - means the SGR value of *S. nudus* is a negative change

量絮状物质排出。方格星虫的吻部, 无论是否粘附到合适的物质, 均会再次重复伸展和收缩过程。

3 个处理组中(S-s、S-sp 和 S-fp), 方格星虫排泄物的有机质含量分别是 1.81%、5.80% 和 5.87%; 各组排泄物质中的细沙均以细颗粒( $R<0.224$  mm)为主, S-s、S-sp 和 S-fp 组分别为 47.70%、85.95% 和 69.99%。

## 3 讨论

光裸方格星虫对于不同氧化还原状态和不同沙质组成的底质具有较强的耐受和适应能力。试验期间, 3 种底质的氧化还原状态存在显著差异, 并且虾塘底质和鱼塘底质均处于较强的还原状态(*Eh* 分别为 -180 和 -279 mV), 且强还原状态一直持续到试验结束。然而, 试验结束时, 3 个处理组中的方格星虫成

活率均较高(图 2), 表明方格星虫对还原性较强的底质具有较强的耐受能力。Li 等(2015)报道, 方格星虫能够在还原性较强( $Eh$ ,  $-100 - -150$  mV)的底质中生存。本研究中, 3 个处理组的底质结构和粒径组成之间存在显著差异( $P < 0.05$ ), 然而, 方格星虫的成活率(图 2)和排泄物质状况(表 3)显示, 方格星虫对于生存环境中底质的细沙比例具有广适性。3 个处理组中方格星虫的排泄物均以较小粒径( $R < 0.224$  mm)的颗粒为主要组成, 表明方格星虫的摄食器官更适宜捕获较小粒径的颗粒。吴鹏飞等(2010)对方格星虫(8–15 g)的消化道结构分析后发现, 方格星虫的咽部收缩时, 空隙约为  $0.06$  mm $\times$  $0.18$  mm, 适合摄食较小粒径的物质。

表 3 试验期间方格星虫的排泄物质组成

Tab.3 The composition of the excrement of *S. nudus* (Mean  $\pm$  SD,  $n=5$ )

组别 Treatment	有机质含量 Organic content (%)	粒径组成 Grain composition (%)			
		$R > 0.4$ mm	$0.28$ mm $<$ $R < 0.4$ mm	$0.224$ mm $<$ $R < 0.28$ mm	$R < 0.224$ mm
S-s	1.81 $\pm$ 0.23	5.23 $\pm$ 0.76	14.38 $\pm$ 1.22	32.68 $\pm$ 1.36	47.70 $\pm$ 3.56
S-sp	5.80 $\pm$ 0.73	0	0	14.05 $\pm$ 1.03	85.95 $\pm$ 4.38
S-fp	5.87 $\pm$ 0.82	8.80 $\pm$ 0.64	11.11 $\pm$ 1.12	10.10 $\pm$ 0.64	69.99 $\pm$ 4.50

3 个处理组中, 方格星虫均表现出较差的特定生长率, 仅有鱼塘底质组(S-fp)的方格星虫表现出一定程度的生长, 而其他两组的方格星虫重量均减轻, 尤以海沙组(S-s)的方格星虫失重最多。S-fp 组底质中的有机质含量为 3.49%, 而 S-s 组的有机质含量仅为 1.08%, 二者之间的有机质含量差异可能是导致方格星虫生长差异的原因之一(表 1)。蒋艳等(2010)研究发现, 在沙底中混合一定量配合饲料以提高有机质含量, 有利于方格星虫的生长和存活。本研究中, 与海沙组相比, 鱼塘底质组细沙含量较低(24.31%), 但具有较高的有机质含量(3.49%), 由此可知, 方格星虫对于沙底中细沙的组成比例具有较大的耐受范围, 但其生长对底质中的有机质含量具有较高要求。本研究中, 3 个处理组的方格星虫均生长缓慢, 可能受其饵料来源(马尾藻粉)的限制, 相关的方格星虫对大型藻粉的摄食和消化利用的研究需要进一步开展。

方格星虫的摄食器官限定了其摄食的粒径大小, 而其摄食行为决定了其生长性能。方格星虫的摄食器官主要由翻吻和星状触手构成(邓中日等, 2009; 童潼等, 2011; 吴鹏飞等, 2010), 由触手粘附合适粒径的食物, 经咽部和食道滑入肠道中(童潼等, 2011)。方格星虫对高有机质含量的物质摄取效率较低, 只能通过增加吻部伸展与收缩的次数来满足其生长需要, 因此, 摄食过程中产生的能量消耗可能导致其生长能分配较低。另外, 方格星虫缺乏专门的消化腺(邓中日等,

童潼等(2011)研究发现, 方格星虫所摄食沙质粒径主要受到其摄食器官的影响, 即便生长环境中的沙质粒径较大, 方格星虫仍可摄食较小的有机颗粒, 且生长速度未受明显影响。李雷斌等(2012)研究发现, 方格星虫(0.14–0.69 g)在粒径  $0.25 - 0.50$  mm 的沙底中生长效果优于粒径为  $0.063 - 0.25$  mm 的沙底, 分析其主要原因, 可能是粒径较大使得水通透性和溶解氧含量较高。本研究对方格星虫[(2.58 $\pm$ 0.23) g]的排泄物研究发现, 较小粒径( $R < 0.224$  mm)的物质仍是其摄取的主体。因此, 在养殖方格星虫的沙底中, 补充适量的细沙( $R < 0.224$  mm)才能满足其摄食的基本需求, 同时需要加入较大粒径的沙粒以提高间隙水的溶解氧含量。

2009; 吴鹏飞, 2010; 童潼等, 2011), 尽管其较大的摄食量和回环盘绕的肠道在一定程度上弥补消化能力的不足(邓中日等, 2009), 但消化腺的缺乏可能造成其对一些食物消化利用率较低。

#### 4 结论

本研究发现, 光裸方格星虫可以在还原性较强的底质中生存和生长。方格星虫的摄食是通过摄入合适粒径的细沙或碎屑带入有机物质, 所以其在沙质较少、有机碎屑较多的环境中也能够摄食和生长。因此, 在养殖方格星虫的沙底中具有少量细沙( $R < 0.224$  mm)以满足其摄食需求, 同时混合较大粒径的物质( $0.28$  mm $<$  $R < 0.4$  mm)以提高间隙水的溶解氧含量。结合沙底和水质的实际情况, 可以在埋栖型贝类和鱼类养殖池塘或滩涂进行方格星虫的增养殖。

#### 参 考 文 献

- 邓中日, 黄勃. 裸体方格星虫消化道组织学研究. 海洋科学, 2009, 33(4): 40–44
- 孙刚, 房岩. 底栖动物的生物扰动效应. 北京: 科学出版社, 2013, 30–40
- 李凤鲁, 周红, 王玮. 中国沿海星虫动物门名录. 中国海洋大学学报(自然科学版), 1992, 22(2): 72–88
- 李俊伟, 朱长波, 郭永坚, 等. 光裸方格星虫(*Sipunculus nudus*)生物扰动对混养系统沉积物及间隙水中营养物质

- 的影响. 渔业科学进展, 2015, 36(1): 103–110
- 李俊伟, 朱长波, 颌晓勇, 等. 方格星虫的繁育、养殖及研究开发进展. 南方水产科学, 2014, 10(5): 94–98
- 李雷斌, 林向阳, 宁岳, 等. 两种不同粒径海沙中培育裸体方格星虫中苗效果比较. 福建水产, 2012, 34(2): 147–150
- 吴鹏飞, 王嫣, 顾志峰, 等. 光裸方格星虫消化道的形态和组织学观察. 渔业科学进展, 2010, 31(1): 74–79
- 沈先荣, 蒋定义, 贾福星, 等. 方格星虫延缓衰老作用研究. 中国海洋药物, 2004, 23(1): 30–32
- 沈先荣, 蒋定义, 贾福星, 等. 海洋星虫提取物的抗疲劳作用研究. 中华航海医学与高气压医学杂志, 2003, 10(2): 112–114
- 张琴, 童万平, 董兰芳, 等. 饲料中脂肪水平对方格星虫稚虫生长性能、体组成及消化酶活性的影响. 渔业科学进展, 2011, 32(6): 99–106
- 夏乾峰, 谭河林, 覃西, 等. 方格星虫多糖抗菌活性的初步研究. 中国热带医学, 2007, 7(12): 2192–2193
- 蒋定义, 沈先荣, 贾福星, 等. 海洋星虫提取物的营养分析及免疫调节作用的初步观察. 中国生化药物杂志, 2004, 25(2): 96–97
- 蒋艳, 蔡德建, 邹杰, 等. 方格星虫苗种池塘中间培育试验研究. 广西科学, 2010, 17(2): 175–177
- 童潼, 邹杰, 蔡德建, 等. 方格星虫消化道发育与摄食研究. 广西科学院学报, 2011, 27(3): 218–220
- 曾志南, 刘伟斌, 林向阳, 等. 光裸方格星虫成体对温盐耐受研究. 福建水产, 2008, 30(4): 1–6
- 曾志南, 刘伟斌, 林向阳, 等. 光裸方格星虫初期海球幼体对温度和盐度的耐受试验. 福建水产, 2010, 32(1): 14–18
- Li JW, Zhu CB, Guo YJ, *et al.* Experimental study of bioturbation by *Sipunculus nudus* in a polyculture system. *Aquaculture*, 2015, 437: 175–181
- Shields MA, Kedra M. A deep burrowing sipunculan of ecological and geochemical importance. *Deep Sea Research*, 2009, 56(11): 2057–2064
- Wang F, Wang WX, Huang XP. Spatial distribution of gut juice extractable Cu, Pb and Zn in sediments from the Pearl River Estuary, Southern China. *Mar Environ Res*, 2012, 77(6): 112–119

(编辑 冯小花)

## Adaptability of *Sipunculus nudus* to Three Types of Different Sediments

LI Junwei, ZHU Changbo, GUO Yongjian, XIE Xiaoyong<sup>①</sup>, CHEN Suwen, ZHANG Wenwen

(Key Laboratory of Fishery Ecology and Environment, Ministry of Agriculture; South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300)

**Abstract** To study the adaptive capability of *Sipunculus nudus* to three different types of sediments, we carried out a rearing experiment of *S. nudus* under the laboratory conditions. Treatments in quintuplicate were the sea sand (S-s), shrimp-pond sediment (S-sp) and fish-pond sediment (S-fp), respectively, with different oxidation reductive potential value, organic material content and different grain sizes. After sunlight exposure, all types of sediments were paved onto the bottom of the tanks (31 cm × 20 cm × 30 cm) to 10 cm thick, and the same water was put into each tank. Five individuals with mean weight of (2.58±0.23) g were stocked in each tank and cultured with a normal ration supply. DO content in the water was above 6.0 mg/L and no water change during the experiment. The results showed that the survival rate of *S. nudus* was up to 96%, 92% and 92% in S-s, S-fp and S-fp ( $P>0.05$ ), respectively. Main component of the excrement of *S. nudus* was fine particles smaller than 0.4 mm, especially the 0.224 mm particles reached 47.70%, 85.95% and 69.99% in the treatments of S-s, S-sp and S-fp, respectively. At the end of the experiment, *S. nudus* presented growth to some extent in S-fp, while a little weight loss in other two groups. These results suggest that *S. nudus* has strong adaptive capability to the reductive condition and different grain size of sediment, while it has a higher need for the smaller size of particles ( $R<0.224$  mm) for the restriction of its feeding organs. Meanwhile, the organic material of the sediment was a key factor to the growth of *S. nudus*, including the quality (source) and quantity of the food. Therefore, based on its strong adaptive capability to the different sediments, the culturing of *S. nudus* in the suitable ponds/beaches was an ecological-economical model with potential development.

**Key words** *Sipunculus nudus*; Sediments; Survival; Adaptability

① Corresponding author: XIE Xiaoyong, E-mail: xiexiaoyongsh@sina.com

# 壳聚糖固定化海洋微生物 YS2071 脂肪酶 及其酶学性质\*



张 权<sup>1,2</sup> 盛 军<sup>1</sup> 刘均忠<sup>1</sup> 郑鸿飞<sup>1</sup> 孙 谧<sup>1①</sup>

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;  
2. 上海海洋大学食品学院 上海 201306)

**摘要** 采用壳聚糖为载体,优化了海洋微生物 YS2071 脂肪酶的壳聚糖固定化条件。结果显示,在壳聚糖浓度为 2% (m/v)、氢氧化钠浓度为 12% (m/v)、乙酸浓度为 1% (v/v)、戊二醛浓度为 0.25% (v/v)、与戊二醛交联的时间为 12 h 及添加 2 ml (1120 U)的游离脂肪酶时,固定化脂肪酶的活力最高,其活力回收率达到 69.4%。对游离脂肪酶与固定化脂肪酶的酶学性质进行比较,结果显示,游离脂肪酶的最适反应温度为 40℃,而固定化脂肪酶的最适反应温度为 45℃,固定化脂肪酶的温度稳定性明显优于游离脂肪酶。最适反应 pH 均为 8.0,脂肪酶经过固定化之后,酸碱耐受性增大。重复利用 10 次的固定化脂肪酶的酶活力保留率仍高于 65%。固定化脂肪酶贮藏半衰期为 96 d,而游离脂肪酶的贮藏半衰期是 33 d。固定化脂肪酶与游离脂肪酶的酶活力保留率在不同有机试剂中表现出不同的稳定性。

**关键词** 壳聚糖;海洋微生物脂肪酶;固定化;酶学性质

**中图分类号** S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)06-0100-07

脂肪酶(Lipase, EC 3.1.1.3)是一类特殊的酯键水解酶,作用于羧酸酯的酯键,能够水解甘油三酯、甘油二酯和甘油单酯,并称为三酰甘油酰基水解酶(Jaeger *et al*, 2002)。脂肪酶因其多功能性,在工业、农业以及医学等领域具有广泛的用途,应用于食品、医药、皮革、纺织、精细化工等工业生产中(王庭等, 2010; 刘海洲等, 2008; 宋欣等, 1999; 姚庆龙等, 2006; 王智等, 2003)。但是,游离脂肪酶的温度稳定性、酸碱耐受性以及有机试剂中的稳定性较差。在工业生产应用中,游离的脂肪酶无法与产物分离,同时不能回收利用。因此,采用壳聚糖固定化脂肪酶,不仅保证酶的高效性,还可以克服游离脂肪酶的一些缺点(Chua *et al*, 2004)。

壳聚糖是一类生物界中来源广泛且具有生物相容性、易降解、无毒的一种天然生物高分子多糖,溶

液有良好的成胶性,是一种性能优良的固定化载体(王金瑾等, 2009; Krajewska, 2004; Taqieddin *et al*, 2004)。本研究选取壳聚糖为固定化脂肪酶的载体,对固定化的条件进行了优化,同时对固定化脂肪酶的酶学性质进行研究,为以后脂肪酶的应用奠定基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料、试剂及主要仪器

脂肪酶为从黄海中筛选的一株海洋细菌 YS2071 所产。壳聚糖、对硝基苯基月桂酸酯(4-Nitrophenyl dodecanoate)购自 Sigma, 异丙醇、考马斯亮蓝 G-250、Triton X-100、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、戊二醛购自国药集团化学试剂有限公司。日本岛津 Shimadzu UV2550 全波长扫描分光光度计, FA 1204B 电子分析天平,

\* 国际科技合作与交流专项(2014DFG30890)、国家自然科学基金-联合基金(U1406402-5)和青岛市科技计划(13-4-1-57-nsh)共同资助。张 权, E-mail: zqcy89@163.com

① 通讯作者: 孙 谧, 研究员, E-mail: sunmi@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-04-08, 收修改稿日期: 2014-07-01

Thermo 481 摇床, DC-2006 低温恒温槽。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 脂肪酶活力的测定** 游离酶活力的测定参照(Hatzinikolaou *et al*, 1999; 李忠磊等, 2012; 段晓琛等, 2013)的方法并加以改进。反应体系为: A 液, 称取 0.0834 g 对硝基苯基月桂酸酯, 40℃水浴条件下溶解在 10 ml 的异丙醇中, 并使用异丙醇定容到 25 ml。B 液, 准确称取 4.00 g 的 Triton X-100 溶于 800 ml pH 8.0 的磷酸盐缓冲液中, 最终定容到 1 L。4℃下冷藏 A、B 液。取 1.5 ml B 液与 100  $\mu$ l 的 A 液, 振荡混匀后, 40℃水浴预热 2 min, 加入 100  $\mu$ l 脂肪酶酶液(空白对照使用等量灭活的酶液), 继续水浴 6 min, 取出反应液, 加入对等的 1.7 ml 的无水乙醇终止反应, 410 nm 处测定其吸光值。每分钟催化底物水解生成 1  $\mu$ mol 的脂肪酸所需的酶量定义为 1 单位的酶活力(U)。

固定化酶测活方法: 用 pH 8.0 的磷酸盐缓冲液代替酶液, 加入固定化酶, 按照游离酶活力测定方法测定, 空白对照使用等量的灭活固定化酶的载体。

固定化酶活力回收率的计算

$$\text{固定化酶活力回收率}\% = \frac{\text{固定化酶的总活力}}{\text{加入酶的总活力}} \times 100\%$$

**1.2.2 蛋白含量的测定** 采用 Bradford(1976)测定方法测定蛋白含量。固定化实验之前发酵液蛋白含量的测定: 取 1 ml 发酵液与 4 ml 的考马斯亮蓝, 振荡混匀, 室温静置 2 min, 595 nm 处测定其吸光值。固定化之后测定清液中蛋白含量, 方法同前。以牛血清蛋白作为标准物, 制作标准曲线, 回归系数  $R^2=0.997$ 。

蛋白吸附率的计算

$$\text{蛋白吸附率}\% = \frac{\text{固定化之前总蛋白含量} - \text{固定化之后清液中蛋白含量}}{\text{固定化之前总蛋白含量}} \times 100\%$$

**1.2.3 壳聚糖交联吸附法** 根据 Chang 等(2005)、段晓琛等(2013)、张艳等(2010)的方法先交联再吸附, 配制 1% (v/v) 的乙酸溶液溶解壳聚糖, 常温下磁力搅拌 30 min, 超声脱气 10 min, 使用注射器逐滴加入到 10% 的 NaOH (m/v) 溶液中, 20 r/min 磁力搅拌, 防止形成壳聚糖小球而粘在一起, 常温静置 1 h, 用蒸馏水反复冲洗直到小球的表面 pH 为中性。将小球浸泡于终浓度为 0.25% 的戊二醛(v/v)溶液中, 80 r/min 振荡 3 h, 使壳聚糖小球和戊二醛充分交联。取出小球, 再次使用蒸馏水反复冲洗 10 次, 除去表面残存的戊二醛, 得到交联好的壳聚糖小球。取一定量的脂肪酶溶液浸泡壳聚糖小球 12 h, 进行充分的吸附交联。第 2 天用蒸馏水冲洗吸附交联脂肪酶的壳聚糖小球, 去

除未能牢固结合的游离酶, 置于冰箱中保藏。

## 1.2.4 固定化脂肪酶和游离脂肪酶的酶学性质比较

结合 Veeraragavan 等(1990)、乔红群等(1998)、Kumar 等(2005)、Benjamin 等(2001)的研究内容, 主要对固定化脂肪酶的操作稳定性、在部分有机试剂中的稳定性、固定化脂肪酶和游离酶的贮藏稳定性、最适 pH、pH 稳定性、最适反应温度、热稳定性进行探究。

操作稳定性:  $t_{1/2} = 0.693 t / 2.303 \lg (E_0/E)$

式中,  $t_{1/2}$  为固定化酶半衰期;  $t$  为贮藏时间;  $E_0$  为初始酶活力;  $E$  为贮藏  $t$  后的酶活力。

最适反应温度: 按照 1.2.1 脂肪酶活力测定方法, 游离脂肪酶的发酶液和固定化脂肪酶分别置于不同温度(0–70℃)下, 每 10℃测定其酶活力, 得到最适温度后, 测定最适温度 $\pm 5^\circ\text{C}$ 的酶活, 定义酶活力最高组的酶活力为 100%, 计算其他各温度下游离酶和固定化脂肪酶的相对活力。

热稳定性: 将游离脂肪酶的发酶液和固定化脂肪酶置于 20–70℃(间隔 10℃)下保温 60 min, 测定其酶活力, 以酶活力最高组的酶活力为 100%, 比较不同温度下游离酶和固定化酶的残余酶活力。

最适反应 pH: 在 pH 3–12 的缓冲液中测定游离脂肪酶和固定化脂肪酶的最适 pH。缓冲溶液: 50 mmol/L 柠檬酸钠-柠檬酸缓冲液(pH 3.0–5.0), 50 mmol/L 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液(pH 6.0–8.0), 50 mmol/L 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(pH 9.0–10.0), 50 mmol/L 磷酸氢二钠-氢氧化钠缓冲液(pH 11.0), 50 mmol/L 的 KCl-NaOH (pH 12.0)。

用 50 mmol/L 不同 pH(3–12)的缓冲液和 Triton X-100 配制的 B 液, 根据 1.2.1 酶活力的测定方法, 40℃下测定其活性。得到最适 pH 后, 测定最适 pH $\pm 0.5$  的酶活力, 以酶活力最高组的酶活力为 100%, 计算其他 pH 下游离酶和固定化脂肪酶的相对活力。

pH 稳定性: 在 50 mmol/L 不同 pH(3–12)的缓冲液体系中常温下保存 4 h, 测定酶活力, 以活力最高组的酶活力为 100%, 计算不同 pH 缓冲液保存之后的游离酶和固定化脂肪酶的活力保留率。

在有机试剂中的稳定性: 取 4 ml 有机试剂处理游离酶和固定化微球, 4℃冰箱中保存 6 h, 测定游离酶和固定化脂肪酶的酶活力, 空白组以 4 ml 的去离子水代替。以空白组的酶活力为 100%, 比较不同有机试剂处理后的酶活力残余量。

## 2 结果与分析

### 2.1 壳聚糖固定化脂肪酶条件的优化

#### 2.1.1 壳聚糖浓度对脂肪酶固定化的影响 实验



发现,壳聚糖的浓度为0.5%和1%时,形成的壳聚糖微球较不规则且极易碎裂,壳聚糖浓度高于4%时,壳聚糖溶液的黏度高,不易成球,故最终实验在1.5%–3.5%之间进行,结果如图1所示,酶的活力回收率随着壳聚糖浓度增大而增大,在壳聚糖浓度为2%时,酶的活力回收率最高为71.57%。因此,壳聚糖浓度选定为2%。

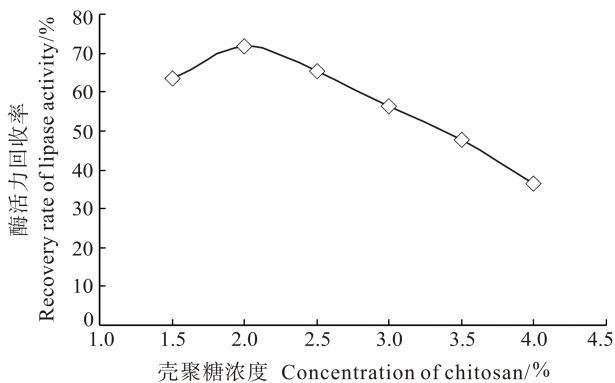


图1 壳聚糖浓度对脂肪酶固定化效果的影响

Fig.1 Effects of the chitosan concentration on the lipase immobilization

**2.1.2 乙酸浓度对脂肪酶固定化的影响** 乙酸浓度为0.25%时,溶液的黏度较低,无法形成大表面积的壳聚糖微球,故选择0.5%–3%的乙酸进行实验,结果如图2所示,乙酸浓度对脂肪酶的固定化的影响较小,1%乙酸的条件下得到最大的酶活力回收率,为74.3%。

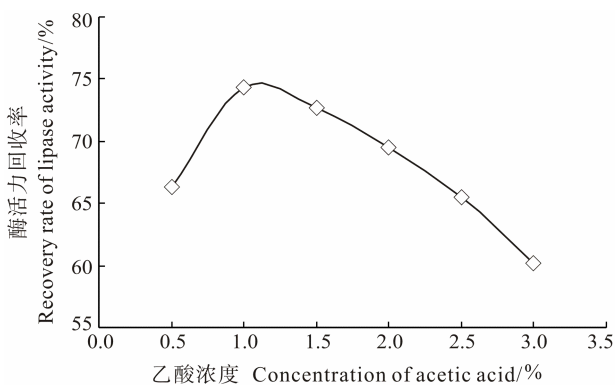


图2 乙酸浓度对脂肪酶固定化的影响

Fig.2 Effects of the acetic acid concentration on the lipase immobilization

**2.1.3 戊二醛浓度对脂肪酶固定化的影响** 实验结果如图3所示,当戊二醛浓度低于0.75%时,固定化脂肪酶活力回收率高;当戊二醛浓度0.25%时,有最高的酶活力回收率,为75.66%;而当戊二醛浓度大于1%时,固定化脂肪酶活力回收率较低。说明高

浓度的戊二醛一方面会使脂肪酶的构象发生变化进而活性降低,另一方面脂肪酶和壳聚糖的结合位点更加紧密,产生空间结构障碍造成脂肪酶活力的减小。

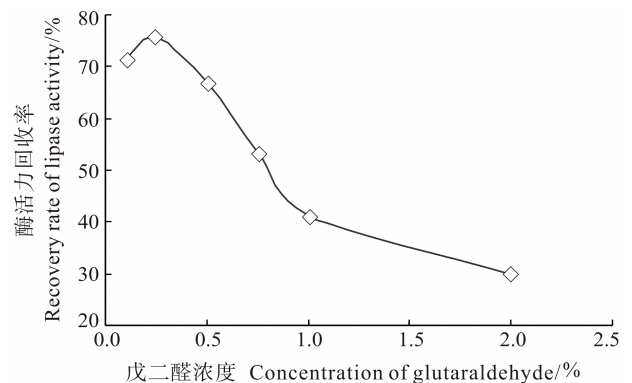


图3 戊二醛浓度对脂肪酶固定化影响

Fig.3 Effects of the glutaraldehyde concentration on the lipase immobilization

**2.1.4 氢氧化钠浓度对脂肪酶固定化的影响** 壳聚糖液滴加到氢氧化钠溶液中,可以形成表面光滑的微球,且微球的强度较好,不易碎裂。过低浓度的氢氧化钠溶液不能起到很好的硬化作用,但是过高浓度又会造成污染、不利于洗至中性,对酶活力有影响。实验选择4%、8%、12%、16%、20%、24%的氢氧化钠溶液(m/v),结果如图4所示,氢氧化钠溶液的浓度对酶活力回收率影响相对较小,在12%条件下脂肪酶有最大酶活力回收率,为77.1%。

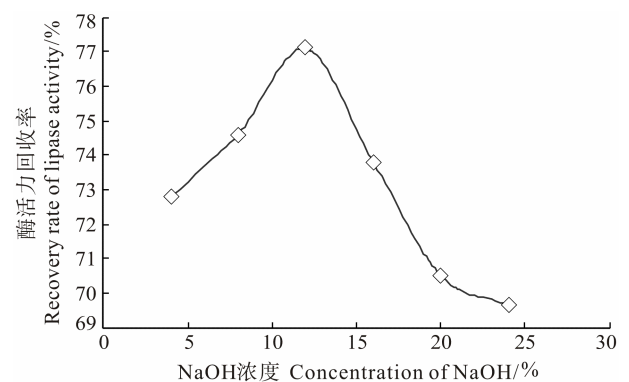


图4 氢氧化钠浓度对脂肪酶固定化的影响

Fig.4 Effects of NaOH concentration on the lipase immobilization

**2.1.5 与戊二醛的交联时间对脂肪酶固定化的影响**

根据上面实验所得到的最优条件,将壳聚糖微球与游离酶发酵液置于4℃冰箱中交联吸附3–18 h(间隔3 h)。由图5可知,脂肪酶的活力回收率随交联时间的增加而增大,当交联时间达到12 h时,酶活力回收率趋于最大,之后变化很小。

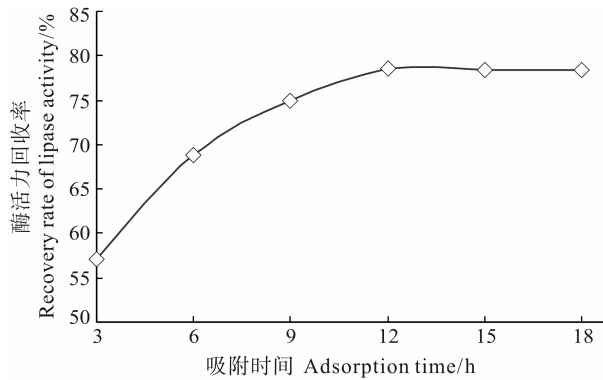


图 5 吸附交联时间对脂肪酶固定化的影响  
Fig.5 Effects of the adsorption time on the lipase immobilization

**2.1.6 加酶量对脂肪酶固定化的影响** 由图 6 可知, 固定化脂肪酶的酶活力回收率与加入游离酶的酶活力呈负相关, 固定化脂肪酶的活力随游离酶溶液增多而增大, 加入 2 ml (1120 U) 的游离脂肪酶时, 固定化酶的酶活力达到最大, 且其酶活力回收率达到 69.4%。

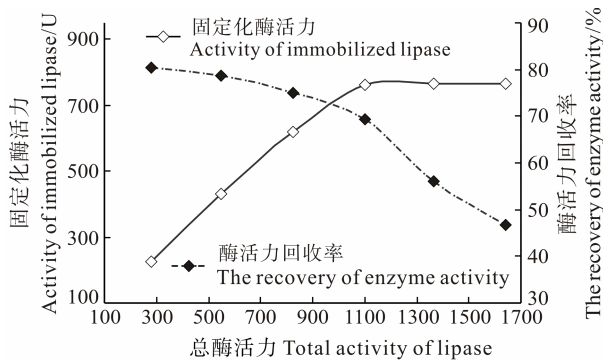


图 6 加酶量对脂肪酶固定化的影响  
Fig.6 Effects of the enzyme addition on the lipase immobilization

**2.2 固定化脂肪酶和游离脂肪酶的酶学性质比较**

**2.2.1 固定化脂肪酶的操作稳定性** 结果如图 7 所示, 重复利用 10 次的固定化小球的酶活力保留率仍然高于 65%, 且微球较规则, 没有发生碎裂的情况, 离心之后即可回收, 说明壳聚糖固定化脂肪酶具有较好的活力回收率、操作稳定性较好且易于回收重复利用。

**2.2.2 固定化脂肪酶与游离脂肪酶的贮藏稳定性比较** 将游离脂肪酶和固定化脂肪酶均于 4℃ 下放置, 每间隔 5 d 测定 1 次游离脂肪酶和固定化脂肪酶的酶活, 探索游离脂肪酶和固定化酶的贮藏稳定性, 实验结果见图 8, 固定化脂肪酶在 4℃ 下放置 30 d 后, 酶活力仍保留了 80.2%, 而游离酶 30 d 后只有起初活力的 52.4%。由半衰期计算公式可得, 固定化脂肪酶贮藏半衰期为 96 d, 而游离脂肪酶的贮藏半衰期是 33 d。

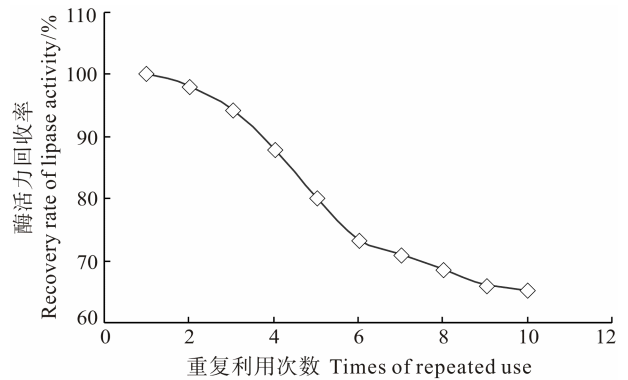


图 7 固定化脂肪酶的操作稳定性  
Fig.7 The stability of the immobilized lipase

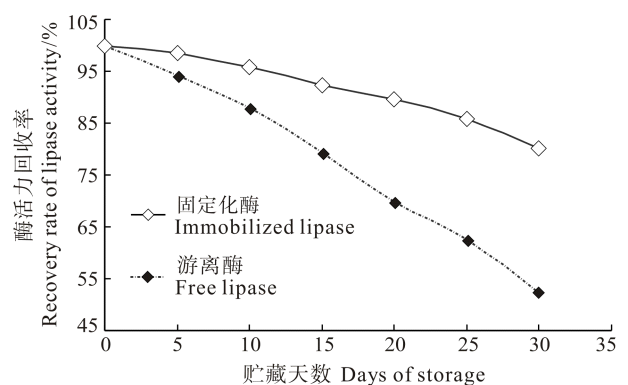


图 8 固定化脂肪酶的贮藏稳定性  
Fig.8 The storage of the immobilized lipase

由此得出, 壳聚糖固定化脂肪酶的贮藏期更长, 更利于酶的保存。

**2.2.3 固定化脂肪酶和游离脂肪酶的最适反应温度**

由图 9 可知, 固定化脂肪酶和游离脂肪酶的最适温度分别为 40℃ 和 45℃, 在 10~30℃ 之间游离脂肪酶的活力相对较高, 而固定化酶在低温下显示较弱的催化能力, 说明游离脂肪酶在低温条件下酶活力受温度影

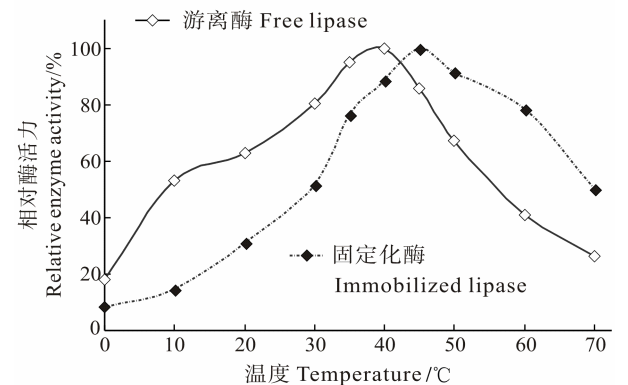


图 9 固定化脂肪酶和游离脂肪酶的最适反应温度  
Fig.9 The optimal temperature of the free and immobilized lipase

响较小,而固定化脂肪酶受温度影响较大。随着温度的升高,酶与底物的结合速度变快,40℃时游离酶活力最高,而后酶活力迅速下降;固定化脂肪酶在45℃时表现出最高酶活力,在45–60℃酶活力缓慢下降,70℃时酶活力下降较为严重,但是仍然高于游离酶的酶活力。

#### 2.2.4 固定化脂肪酶和游离脂肪酶的温度稳定性

结果见图10,在20–40℃之间保存1h后,游离脂肪酶和固定化脂肪酶均有较为稳定的残留活性,40℃时游离脂肪酶和固定化脂肪酶的酶活保留率分别为76.33%和85.01%,但是游离脂肪酶在温度高于50℃处理1h之后,酶活力下降明显,在70℃条件下,游离脂肪酶的酶活力保留率仅为10.5%,而固定化脂肪酶在70℃处理后酶活力保留率仍然高达42.54%。说明经过壳聚糖固定化之后,酶的热稳定性得到了很大提高,这是由于酶和交联了戊二醛的壳聚糖载体之间发生了相互作用使得固定化酶的热稳定性得到了很大提高,反之,游离酶由于缺少作用力容易在高温条件下失活。

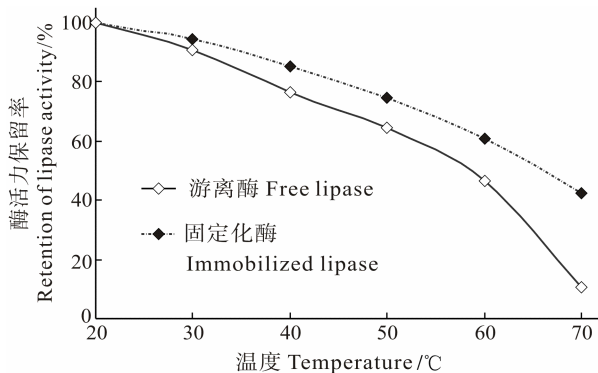


图10 固定化脂肪酶和游离脂肪酶的温度稳定性  
Fig.10 The temperature stability of the free and immobilized lipase

#### 2.2.5 固定化脂肪酶和游离脂肪酶的最适作用 pH

游离脂肪酶和固定化脂肪酶最高酶活力的 pH 均为 8.0 (图 11), 说明游离酶与壳聚糖固定化过程对脂肪酶的最适作用 pH 没有太大影响。当 pH 小于 4.0 时, 游离脂肪酶基本失活; 随着 pH 增大, 游离酶的酶活力也增大; 当 pH 达到 8.0 时, 有最高酶活; 酶活力随着 pH 再次增大而呈现下降的趋势, 游离酶在碱性条件下酶活力比酸性条件要高。经过固定化之后, 固定化脂肪酶的耐酸碱性得到提高, 固定化脂肪酶在 pH 5.0 时酶活力保留率达到 37.48%, 在 pH 为 12.0 的条件下, 固定化脂肪酶的酶活力保留率也达到了 35.97%。

#### 2.2.6 固定化脂肪酶和游离脂肪酶的 pH 稳定性

在 pH 3–12 的缓冲液中, 分别保存固定化脂肪酶

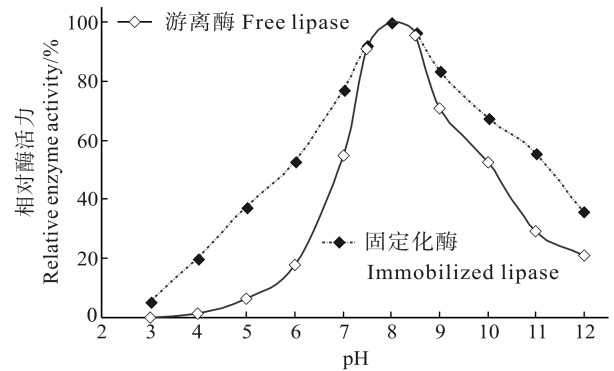


图11 游离脂肪酶和固定化脂肪酶的最适 pH  
Fig.11 The optimal pH for the free and immobilized lipase

和游离脂肪酶 4 h 之后, 测定其酶活力。结果见图 12, 在 pH 为 9 时, 游离脂肪酶和固定化脂肪酶有最高的酶活力稳定性, 固定化脂肪酶的酸碱耐受性均优于游离酶, 在 pH 7–10 之间, 游离脂肪酶和固定化脂肪酶活力在处理 4 h 之后, 能够稳定在 80% 以上, 固定化脂肪酶在酸性和碱性较强的溶液中仍能保留 35% 以上的酶活力。经过酶和壳聚糖载体的结合, 提高了酶的酸碱耐受性。

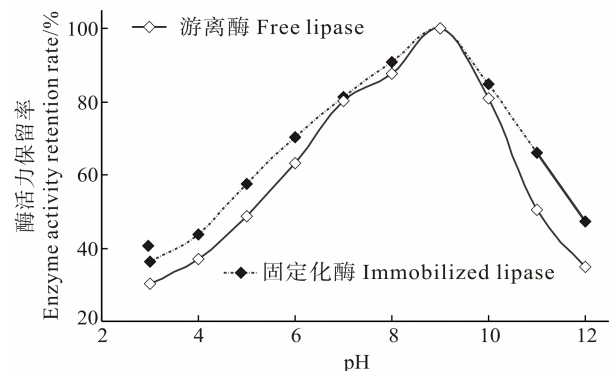


图12 固定化脂肪酶和游离脂肪酶的 pH 稳定性  
Fig.12 The pH stability of the free and immobilized lipase

#### 2.2.7 固定化脂肪酶和游离脂肪酶在有机试剂中的稳定性

将固定化脂肪酶和游离脂肪酶在有机试剂中处理之后, 结果见图 13。固定化之后脂肪酶在不同有机试剂中发生了一些性质上的改变, 在叔丁醇中, 固定化脂肪酶的酶活力保留率较高; 在异丙醇溶液和正丁烷溶液中, 游离酶反而显示出较高的酶活力保留率。这对脂肪酶的应用提供了数据基础, 有助于选择反应体系。

### 3 结论

选取壳聚糖为固定化的载体, 采用交联吸附法固定化海洋微生物脂肪酶, 根据固定化脂肪酶的活力回

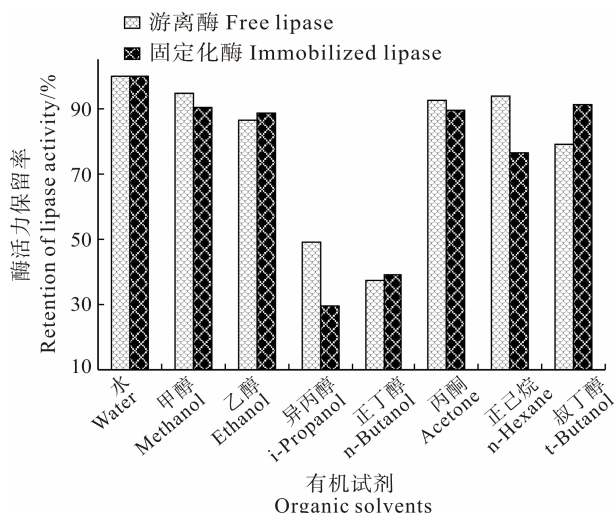


图 13 在有机试剂中游离脂肪酶和固定化脂肪酶的稳定性

Fig.13 The stability in organic solvents of the free and immobilized lipase

收率和蛋白吸附量等指标来检测固定化的效果。壳聚糖的浓度为 2% ( $m/v$ )、乙酸浓度为 1% ( $v/v$ )、戊二醛的浓度为 0.25% ( $v/v$ )、氢氧化钠的浓度为 12% ( $m/v$ )、吸附交联时间为 12 h、加入 2 ml (1120 U) 的脂肪酶时, 固定化脂肪酶有最大酶活力, 且酶活力回收率达到 69.4%。固定化脂肪酶的酸碱耐受性、在不同温度和在有有机试剂中的稳定性均大大提高, 固定化脂肪酶贮藏半衰期为 96 d, 而游离脂肪酶的贮藏半衰期是 33 d, 并且固定化脂肪酶重复使用 10 次之后, 酶活力保留率仍高达 65% 以上。

## 参 考 文 献

王金瑾, 赵哈. 壳聚糖固定脂肪酶的方法研究. 重庆科技学院学报(自然科学版), 2009, 11(6): 53-55

王庭, 秦刚. 脂肪酶及其在食品工业中的应用. 肉类研究, 2010(1): 72-74

王智, 苟小军, 曹淑桂. 脂肪酶在生物化工中的应用. 成都大学学报(自然科学版), 2003, 22(1): 1-8

乔红群, 徐虹, 付闪雷. 脂肪酶产生菌的筛选及其酶性质. 南京化工大学学报, 1998, 20(1): 15-19

刘海洲, 吴小飞, 牛佰慧. 脂肪酶在食品工业中的应用与研究进展. 西部粮油科技, 2008, 33(5): 55-57

李忠磊, 王跃军, 盛军, 等. Bohaisea-9145 海洋耶氏酵母碱性脂肪酶基因的克隆、异源表达和重组酶酶学性质. 海洋与湖沼, 2012, 43(2): 230-236

宋欣, 曲音波. 有机相中脂肪酶催化作用的应用. 微生物学通报, 1999, 26(4): 296-299

张艳, 郑媛, 王海英, 等. 不同载体固定化海洋微生物酯酶 ETM-b 的性能比较. 渔业科学进展, 2010, 31(5): 110-116

段晓琛, 盛军, 徐甲坤, 等. 海洋脂肪酶 ADM47601 固定化方法的研究. 海洋与湖沼, 2013, 44(5): 1311-1317

姚庆龙, 高传福. 碱性脂肪酶在驴马皮制革中的应用研究. 中国皮革, 2006, 35(9): 4-5

Benjamin S, Pandey A. Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation. Braz Arch Biotechnol, 2001, 44: 213-221

Chang M, Juang R. Activities, stabilities, and reaction kinetics of three free and chitosan-clay composite immobilized enzymes. Enzyme Microb Tech, 2005, 36(1): 75-82

Chua LS, Mohamad RS. Immobilized lipase-catalyzed resolution of (R, S)-1-phenylethanol in recirculated packed bed reactor. J Mol Catal B: Enzym, 2004, 28: 111-119

Hatzinikolaou DG, Kourentzi E, Stamatis H. A novel lipolytic activity of *Rhodotorula glutinis* cells: production, partial characterization and application in the synthesis of esters. J Biosci Bioengineer, 1999, 8(1): 53-56

Jaeger K, Eggert T. Lipases for biotechnology. Curr Opin Biotechnol, 2002, 13(4): 390-397

Krajewska B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. Enzyme Microb Tech, 2004, 35: 126-139

Kumar S, Kikon K, Upadhyay A. Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. Protein Express Purif, 2005, 41(1): 38-44

Taqieddin E, Amiji M. Enzyme immobilization in novel alginate-chitosan core-shell microcapsules. Biomaterials, 2004, 25(10): 1937-1945

Veeraragavan K, Colpitts T, Gibbs BF. Purification and characterization of two distinct lipases from *Geotrichum candidum*. Biochim Biophys Acta, 1990, 1044(1): 26-33

(编辑 冯小花)

## Chitosan Immobilization of Lipase from Marine Microorganism YS2071 and Its Enzyme Characteristics

ZHANG Quan<sup>1,2</sup>, SHENG Jun<sup>1</sup>, LIU Junzhong<sup>1</sup>, ZHENG Hongfei<sup>1</sup>, SUN Mi<sup>1</sup><sup>①</sup>

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;

2. College of Food Science & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

**Abstract** Lipase (EC 3.1.1.3) is one of hydrolases that specifically catalyzes the hydrolysis of triglyceride. It plays an important role in the food improvement, the health care, and the environment protection. The lipase of our interest here is produced by a marine microorganism YS2071 and has high enzymatic capability. Chitosan is a type of biological sources which possesses good biocompatibility and biodegradation. It is a natural, biological, and macromolecular polysaccharide, the solution of which is a non-toxic and functional gel. Therefore, chitosan is an excellent immobilization carrier. The separation and recycling of materials have been a challenge in the industrial production process. In this study we aimed to solve this problem by immobilizing YS2071 lipase on a chitosan microsphere. The properties of the immobilized lipase was compared to the free lipase to verify the immobilization method. The activity of the immobilized enzyme reached the maximum when the conditions were as below: 2% chitosan (*m/v*), 1% acetic acid concentration (*v/v*), 0.25% glutaraldehyde concentration (*v/v*), 12% sodium hydroxide concentration (*m/v*), crosslinking time 12 h, and 2 ml (1120 U) enzyme. The recovered activity of the immobilized lipase was 69.4%. The optimal temperature for the functions of the free lipase and the immobilized lipase was 40°C and 45°C respectively. The optimal pH for both the free lipase and the immobilized lipase was 8.0. It was also showed that immobilization obviously increased the stability of the temperature and pH. After 10-time reuse the recovered enzyme activity was still higher than 65%. The storage half-life of the immobilized lipase was 96 days while it was only 33 days for the free lipase. The free lipase and the immobilized lipase exhibited distinct stabilities in different organic reagents. These results suggested that the immobilized lipase might have great values in the industrial process.

**Key words** Chitosan; Marine microorganism lipase; Immobilization; Enzyme characters

① Corresponding author: SUN Mi, E-mail: sunmi@ysfri.ac.cn

# 饵料中添加海洋红酵母(*Rhodotorula* sp.) C11 对幼参消化酶及免疫反应的影响\*



杨志平 徐哲 周倩 张粹粹 孙建明<sup>①</sup>

(大连汇新钛设备开发有限公司 大连 116039)

**摘要** 将海洋红酵母(*Rhodotorula* sp.) C11以 $10^4$ 、 $10^5$ 和 $10^6$  CFU/g饵料添加到基础饵料中,每一剂量组设3个平行,每一平行50头幼参,用100 L塑料桶进行30 d静水充气养殖试验。试验期间每日投饵1次,投喂量为幼参体重的5%。投喂试验结束后,评估其对幼参消化酶及免疫反应的影响。结果显示,与对照组比较,投喂海洋红酵母C11 $10^4$ 、 $10^5$  CFU/g,显著提高了幼参肠道胰蛋白酶活力( $P<0.05$ );投喂海洋红酵母C11 $10^4$  CFU/g,显著增加淀粉酶活力( $P<0.05$ )。投喂海洋红酵母C11 $10^5$  CFU/g,幼参体腔细胞的吞噬活力显著高于对照组( $P<0.05$ )。与投喂基础饵料的幼参比较,投喂海洋红酵母C11 $10^5$ 、 $10^6$  CFU/g,幼参具有较高的体腔液溶菌酶(LSZ)活力( $P<0.05$ )。投喂海洋红酵母C11 $10^4$  CFU/g,幼参具有较高的体腔细胞裂解液(CLS)LSZ活力( $P<0.05$ )。投喂海洋红酵母C11 $10^4$  CFU/g,幼参体腔液总一氧化氮合酶(T-NOS)活力显著增加( $P<0.05$ ),投喂海洋红酵母C11 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$  CFU/g,幼参CLS的T-NOS活力显著提高( $P<0.05$ )。本研究表明,饵料补充海洋红酵母C11可促进幼参的消化酶活力和免疫反应。

**关键词** 幼参;海洋红酵母C11;消化酶活力;免疫反应

中图分类号 Q178.53 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2015)06-0107-06

益生菌是活的微生物,供给适量时,有益于宿主健康(FAO/WHO Report, 2001)。我国水产养殖业从1980年代开始使用益生菌,其应用呈指数增长(Qi *et al.*, 2009)。海洋酵母的适当应用可促进鲍鱼和幼参肠道消化酶活力(Macey *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014)。先前的研究表明,海洋酵母是南非鲍 *Haliotis midae* (Macey *et al.*, 2005)、印度明对虾 *Fenneropenaeus indicus* (Sajeevan *et al.*, 2006; Sarlin *et al.*, 2011)、斑节对虾 *Penaeus monodon* (Divya *et al.*, 2013)和幼参 *Apostichopus japonicus* (Liu *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2013)养殖中有效的免疫增强剂。海洋红酵母 *Rhodotorula* sp. C11 体外可抑制幼参病原菌的生长(李明等, 2012)。本研究的目的是研究饵料中添加该酵母对幼参消化酶活力和先天性免疫反应的影响,及其在幼参养殖中用作益生菌的潜力。

## 1 材料与方法

### 1.1 酵母菌

海洋红酵母C11从健康幼参肠道分离获得,体外可抑制幼参病原菌黄海希瓦氏菌 *Shewanella marisflavi* AP629和灿烂弧菌 *Vibrio splendidus* NB13的生长(李明等, 2012)。

### 1.2 安全性试验

选用健康的幼参(1-2 g)进行试验菌株的安全性试验。将80头幼参饲养在盛有70 L过滤海水的100 L塑料桶中,每桶10头,水温14℃,暂养14 d。实验组幼参每头腹腔注射浓度为 $10^7$  CFU/ml的待测菌株菌液(10头),投喂含菌株 $10^8$  CFU/g饵料(30头),每日投喂1次,对照组幼参注射等量的无菌生理盐水(10头),

\* 海洋公益性行业科研专项(201305001)资助。杨志平, E-mail: yangzhiping\_1962@163.com

① 通讯作者: 孙建明, 教授级高级工程师, E-mail: sjm@dlhuixin.com

收稿日期: 2015-01-04, 收修改稿日期: 2015-04-28

投喂基础饵料(30头)(表1),记录30d养殖过程中幼参发病和死亡情况。试验期间每天按幼参体重的5%投饵,每2d换水1/2并吸底去除残饵及粪便。

表1 幼参饵料配方及化学组成(g/kg干物质)

Tab.1 Formulation and chemical proximate composition of experimental diets for sea cucumber *Apostichopus japonicus* (g/kg dry matter)

组分 Ingredients	含量 Concentration(g/kg)
豆粕 Soybean meal	100
鱼粉 Fish meal	80
马尾藻粉 <i>Sargassum</i> sp. meal	250
脱胶海带粉 Degumming kelp powder	300
麦饭石 Maifanitem	100
石粉 Stone-powder	165
多维预混料 Multidimensional premix	5
粗蛋白质 Crude protein	163
粗脂肪 Crude lipid	55
粗纤维 Crude fiber	161
粗灰分 Ash	308

### 1.3 含菌饵料的制备与试验设计

将海洋红酵母 C11 接种酵母膏蛋白胨葡萄糖 (YPD)液体培养基中,25℃下震荡培养12h,细胞悬液以4000 r/min离心10min,细胞用生理盐水重悬,平板菌落计数,添加到幼参基础饲料,制备 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$  CFU/g含菌饲料。

将健康幼参在水温14℃条件下暂养14d开始投喂试验。选择 $(1.374 \pm 0.558)$ g幼参随机分配到12个盛过滤海水100L的塑料桶中,每桶放50头幼参,用3个浓度的含菌饵料和基础饵料分别投喂一组幼参,每组均设3个平行,每日投喂1次,投喂量为幼参体重的5%,每2d换水1/2并吸底去除残饵及粪便。试验期间温度为7–14℃,pH为7.8–8.2,盐度为33–34。

### 1.4 样品采集与处理

投喂试验结束后,将幼参转移至另一盛有海水的桶中16h使肠道内容物排空。随机取5头幼参用灭菌海水冲洗体表,立即断尾解剖,取体腔液500μl加入盛有等体积抗凝剂(0.02 mol/L EDTA, 0.34 mol/L NaCl, 0.019 mol/L KCl, 0.068 mol/L Tris-HCl, pH 8.0 (Xing *et al*, 1998)的离心管中,混合均匀,取300μl做吞噬实验,剩余的体腔液在6000 r/min下离心10min,取上清液,测定其溶菌酶(LSZ)和总一氧化氮合酶(T-NOS)活力;沉淀用体腔细胞等渗液(0.001 mol/L EDTA, 0.34 mol/L NaCl, 0.01 mol/L Tris-HCl, pH 8.0

(Xing *et al*, 1998)重悬,将重悬液在冰浴中用超声波破碎机破碎,然后在10000 r/min下离心10min,上清液为体腔细胞裂解液(CLS),分析其LSZ和T-NOS活力。同时取出肠道,合并称重,加入盛有9倍体积(w/v)预冷的生理盐水离心管中,可调速匀浆器匀浆,将匀浆液离心(6000 r/min, 4℃, 10min),收集上清液用于消化酶活力的测定。

### 1.5 蛋白含量测定

肠道上清液和体腔液中总蛋白含量测定采用考马斯亮蓝法(Bradford, 1976),用牛血清白蛋白作标准。

### 1.6 消化酶活力测定

胰蛋白酶和淀粉酶活力的测定均使用南京建成科技有限公司生产的试剂盒产品,并参照试剂盒说明书进行操作。1个胰蛋白酶活力单位定义为pH 8.0, 37℃条件下,肠道中每毫克蛋白每分钟使吸光度变化0.003所需要的酶量;1个淀粉酶活力单位定义为37℃条件下,肠道中每毫克蛋白与底物作用30min,水解10mg淀粉所需的酶量。

### 1.7 免疫指标测定

依据Hannam等(2010)的方法,通过测定中性红染过的酿酒酵母颗粒确定体腔细胞的吞噬活力,体腔细胞对酵母颗粒的吞噬吸收通过标准曲线计算,以50μl样品中每毫克蛋白吞噬的酵母细胞数量表示吞噬活力。LSZ活力测定以溶壁微球菌冻干粉为底物,按Hultmark等(1980)的方法进行,并加以改进。用0.1 mol/L、pH 6.4的磷酸盐缓冲液配成底物( $OD_{570\text{nm}} \approx 0.3$ ),取300μl该悬液于试管内置冰浴中,再加入5μl待测样品混匀,测定 $A_0$ ,然后将试液置入37℃水浴中保温30min,取出后立刻置于冰浴中10min以终止反应,测其A值。LSZ活力 $U=(A_0-A)/A$ 。T-NOS活力的测定使用南京建成科技有限公司生产的试剂盒产品,并参照试剂盒说明书进行操作,1个T-NOS活力单位定义为每分钟生成1 nmol NO所需要的酶量。

### 1.8 数据统计分析

数据用SPSS19.0软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA)以及Dunnuncan多重比较法,结果以平均值±标准差( $X \pm SD$ )表示,当 $P < 0.05$ 时认为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 安全性试验

试验组幼参注射细胞浓度为 $10^7$  CFU/ml菌悬液

0.1 ml, 投喂含菌株  $10^8$  CFU/g 饵料, 饲养观察 30 d, 试验组和对照组幼参均无发病和死亡现象, 因此海洋红酵母 C11 在试验浓度下同对照组一样对幼参无毒力。

## 2.2 饵料中添加海洋红酵母 C11 对幼参消化酶活力的影响

幼参投喂海洋红酵母 C11  $10^4$ 、 $10^5$  CFU/g, 肠道胰蛋白酶活力显著高于对照组( $P<0.05$ ; 图 1); 与对照组比较, 饵料中添加海洋红酵母 C11  $10^4$  CFU/g, 可使幼参肠道淀粉酶活力显著增加( $P<0.05$ ; 图 2)。

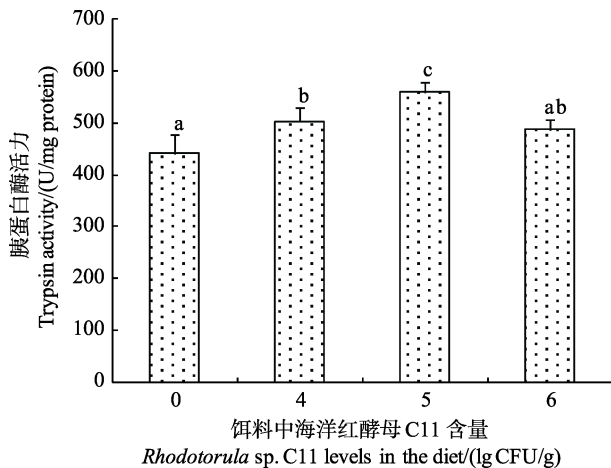


图 1 海洋红酵母 C11 对幼参肠道胰蛋白酶活力的影响

Fig.1 Effect of *Rhodotorula* sp. C11 on intestinal trypsin activity of juvenile *A. japonicus*

不同的字母表示差异显著( $P<0.05$ ), 误差线表示标准差( $n=3$ )

Means with different letters are significantly different ( $P<0.05$ ). Error bars represent standard deviations ( $n=3$ )

## 2.3 饵料中添加海洋红酵母 C11 对幼参免疫指标的影响

幼参投喂海洋红酵母 C11  $10^5$  CFU/g, 体腔细胞的吞噬活力显著高于对照组( $P<0.05$ ; 图 3)。与投喂基础饵料的幼参比较, 投喂海洋红酵母 C11  $10^5$ 、 $10^6$  CFU/g 幼参具有较高的体腔液溶菌酶(LSZ)活力( $P<0.05$ ; 图 4A), 投喂海洋红酵母 C11  $10^4$  CFU/g, 幼参 CLS 具有较高的 LSZ 活力( $P<0.05$ ; 图 4B); 投喂海洋红酵母 C11  $10^4$  CFU/g 幼参体腔液 T-NOS 活力显著增加( $P<0.05$ ; 图 5A), 投喂海洋红酵母 C11  $10^4$ 、 $10^5$  和  $10^6$  CFU/g, 幼参 CLS 的 T-NOS 活力显著提高( $P<0.05$ ; 图 5B)。

## 3 讨论

幼参肠道含有消化酶, 如蛋白酶、淀粉酶和脂肪

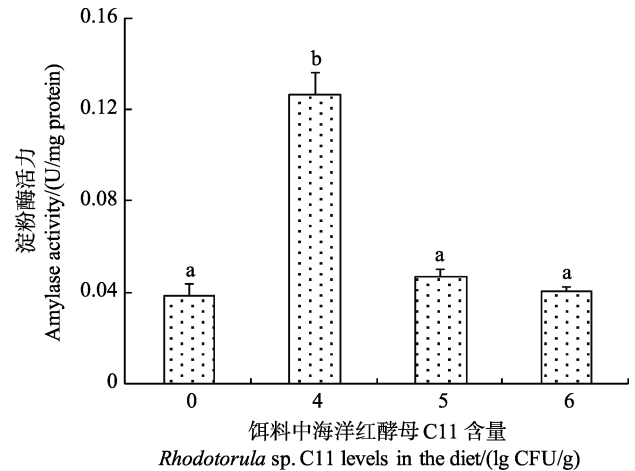


图 2 海洋红酵母 C11 对幼参肠道淀粉酶活力的影响  
Fig.2 Effect of *Rhodotorula* sp. C11 on intestinal amylase activity of juvenile *A. japonicus*

不同的字母表示差异显著( $P<0.05$ ), 误差线表示标准差( $n=3$ )

Means with different letters are significantly different ( $P<0.05$ ). Error bars represent standard deviations ( $n=3$ )

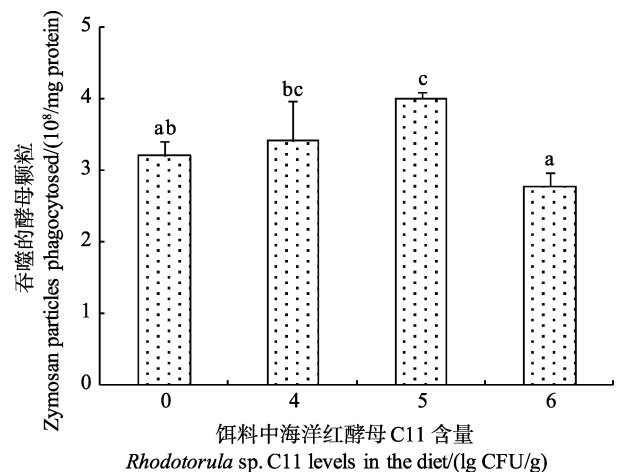


图 3 海洋红酵母 C11 对幼参吞噬活力的影响  
Fig.3 Effect of *Rhodotorula* sp. C11 on phagocytic activity of juvenile *A. japonicus*

不同的字母表示差异显著( $P<0.05$ ), 误差线表示标准差( $n=3$ )

Means with different letters are significantly different ( $P<0.05$ ). Error bars represent standard deviations ( $n=3$ )

酶(Fu *et al*, 2005; Gao *et al*, 2009; 唐黎等, 2010)。幼参投喂添加海洋酵母梅奇酵母 *Metschnikowia* sp. C14 和仙人掌有孢汉逊酵母 *Hanseniopsis opuntiae* C21 的饵料, 其肠道蛋白酶和脂肪酶活力显著提高(Ma *et al*, 2014; Yang *et al*, 2014)。本研究结果显示, 饵料中添加海洋红酵母 C11 可使幼参肠道胰蛋白酶和淀粉酶活力显著增加, 这很可能促进饵料的消化和吸收。类



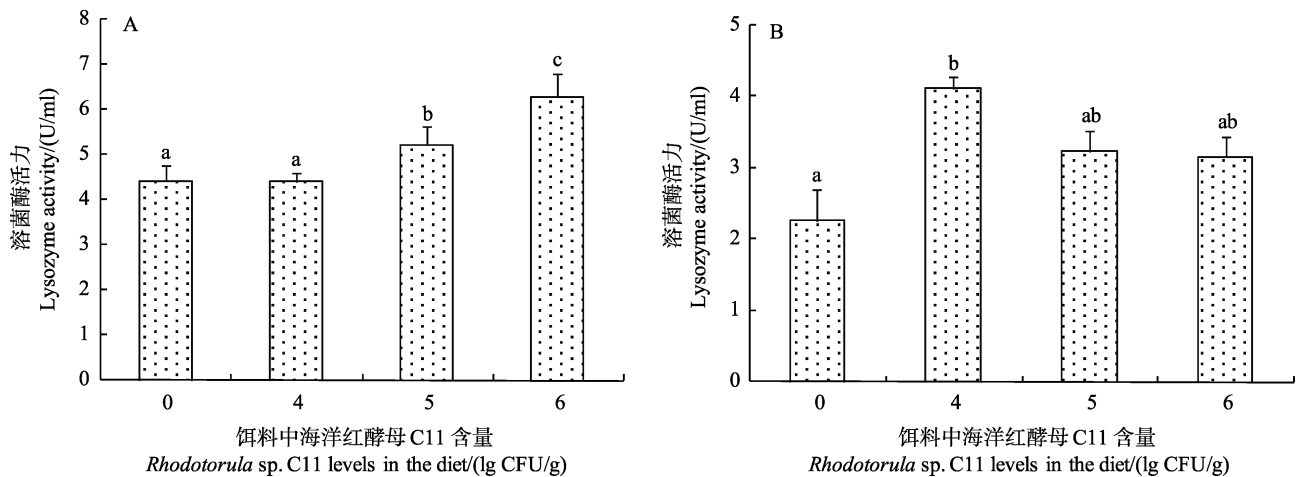


图4 海洋红酵母 C11 对幼参体腔液(A)和体腔细胞裂解液(B)溶菌酶活力影响

Fig.4 Effect of *Rhodotorula* sp. C11 on lysozyme activity in coelomic fluid (A) and coelomocyte lysate supernatant (B) of juvenile *A. japonicus*

不同的字母表示差异显著( $P < 0.05$ ), 误差线表示标准差( $n = 3$ )

Means with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). Error bars represent standard deviations ( $n = 3$ )

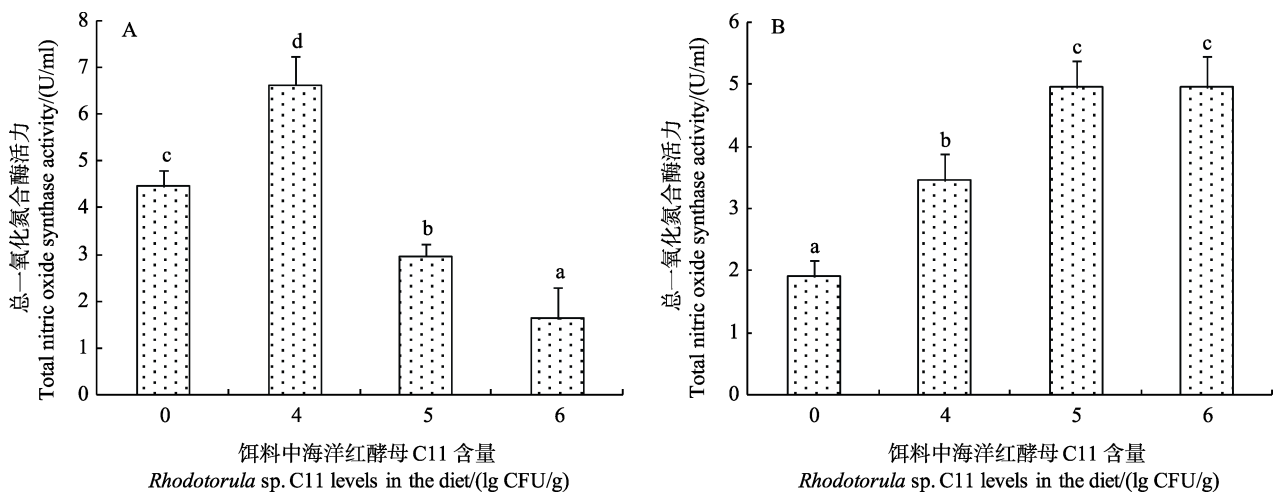


图5 海洋红酵母 C11 对幼参体腔液(A)和体腔细胞裂解液(B)总一氧化氮合酶活力影响

Fig.5 Effect of *Rhodotorula* sp. C11 on total nitric oxide synthase activity in coelomic fluid (A) and coelomocyte lysate supernatant (B) of juvenile *A. japonicus*

不同的字母表示差异显著( $P < 0.05$ ), 误差线表示标准差( $n = 3$ )

Means with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). Error bars represent standard deviations ( $n = 3$ )

似地, 3 株益生菌(2 株酵母菌和 1 株细菌)的使用可使南非鲍消化道肠区蛋白酶活力显著增加, 这与鲍鱼消化道该区蛋白消化和吸收量的显著增加相关(Macey *et al.*, 2005)。

一般认为, 幼参缺乏适应性免疫, 完全依赖其先天性免疫防御外来病原菌。酵母菌通常是蛋白质、核酸、维生素和多糖良好的来源。在过去的几十年, 使用酵母菌作为免疫刺激剂来源有所增加(Sajeevan *et al.*, 2006; Reyes-Becerril *et al.*, 2008; Sarlin *et al.*, 2011; Divya *et al.*, 2013)。本研究证明, 饲料中添加海洋红

酵母 C11 投喂幼参具有免疫刺激效果。

体腔细胞是棘皮动物抵御感染和损伤的第一道防线, 起吞噬、诱捕和包裹入侵微生物的作用(Gliński *et al.*, 2000)。饲料中添加梅奇酵母 C14 和仙人掌有孢汉逊酵母 C21 投喂幼参, 可提高其体腔细胞的吞噬活力(Liu *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2013)。本研究表明, 幼参投喂含海洋红酵母 C11 的饲料时, 其体腔细胞的吞噬活力显著增强。类似地, 金头鲷 *Sparus aurata* 投喂汉逊德巴利酵母 *Debaryomyces hansenii* CBS 8339 14 d, 其头肾白细胞的吞噬活力显著增加(Reyes-Becerril *et al.*,

2008)。

溶菌酶广泛分布在动物界,其作用机制主要是催化细菌尤其是革兰氏阳性细菌细胞壁中肽聚糖组分 N-乙酰葡萄糖胺和 N-乙酰胞壁酸之间的  $\beta$ -1, 4 糖苷键的水解,作为非特异性免疫分子抵抗细菌病原的侵入(Jollès *et al*, 1984)。通常,棘皮动物的溶菌酶主要存在于体腔细胞和体腔液中(Canicattí *et al*, 1989; Shimizu *et al*, 1999)。本研究中,与对照组比较,饲喂含海洋红酵母 C11 饵料的幼参体腔液和 CLS 的溶菌酶活力显著提高。梅奇酵母 *Metschnikowia* sp. C14 和仙人掌有孢汉逊酵母 *H. opuntiae* C21 也有类似的有益效果(Liu *et al*, 2012; Ma *et al*, 2013)。金头鲷投喂酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* fks-1 14 d 和 28 d 后可促进其血清溶菌酶活力(Rodríguez *et al*, 2003)。

软体动物和甲壳动物血细胞中存在一氧化氮合酶(Conte *et al*, 1995; Novas *et al*, 2004; Yeh *et al*, 2006)。由一氧化氮合酶催化 L-精氨酸与氧分子经多步氧化还原反应生成一氧化氮,一氧化氮被认为是软体动物和甲壳动物免疫细胞利用的杀细菌分子(Yeh *et al*, 2006; Ottaviani *et al*, 1993)。饵料中添加梅奇酵母 *Metschnikowia* sp. C14 和仙人掌有孢汉逊酵母 *H. opuntiae* C21 可使幼参体腔液和 CLS 的 T-NOS 活力显著提高(Liu *et al*, 2012; Ma *et al*, 2013)。本研究中,投喂含海洋红酵母 *Rhodotorula* sp. C11 饵料也能使幼参体腔液和 CLS 的一氧化氮合酶活力显著增加。

总之,海洋红酵母 C11 是幼参益生菌,不仅能提高幼参肠道消化酶活力,而且可刺激幼参的非特异性免疫反应。

## 参 考 文 献

- 李明, 马悦欣, 刘志明, 等. 刺参机体酵母菌组成及其拮抗活性的研究. 大连海洋大学学报, 2012, 27(5): 436-440
- 唐黎, 王吉桥, 许重, 等. 仿刺参 4 种消化酶活力的周年变化. 上海海洋大学学报, 2010, 19(6): 768-771
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 1976, 72(1): 248-254
- Canicattí C, Roch P. Studies on *Holothuria poli* (Echinodermata) antibacterial proteins. I. Evidence for and activity of a coelomocyte lysozyme. Experientia, 1989, 45(8): 756-759
- Conte A, Ottaviani E. Nitric oxide synthase activity in molluscan hemocytes. FEBS Lett, 1995, 365(2): 120-124
- Divya TB, Swapna AP, Simi JP, *et al*. Marine yeast *Candida aquatextoris* S527 as a potential immunostimulant in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. J Invertebr Pathol, 2013, 112(3): 243-252
- FAO/WHO. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with liver lactic acid bacteria. Food and Agriculture Organization and World Health Organization Joint report, 2001
- Fu XY, Xue CH, Miao BC, *et al*. Characterization of proteases from the digestive tract of sea cucumber (*Stichopus japonicus*): High alkaline protease activity. Aquaculture, 2005, 246(1): 321-329
- Gao F, Yang HS, Xu Q, *et al*. Effect of water temperature on digestive enzyme activity and gut mass in sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka), with special reference to aestivation. Chin J Oceanol Limnol, 2009, 27(4): 714-722
- Gliński Z, Jarosz J. Immune phenomena in echinoderms. Arch Immunol Ther Ex, 2000, 48(3): 189-193
- Hannam ML, Bamber SD, Moody JA, *et al*. Immunotoxicity and oxidative stress in the Arctic scallop *Chlamys islandica*: Effects of acute oil exposure. Ecotoxicol Environ Safe, 2010, 73(6): 1440-1448
- Hultmark D, Steiner H, Rasmuson T, *et al*. Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. Eur J Biochem, 1980, 106(1): 7-16
- Jollès P, Jollès J. What's new in lysozyme research? Always a model system, today as yesterday. Mol Cell Biochem, 1984, 63(2): 165-189
- Liu ZM, Ma YX, Yang ZP, *et al*. Immune responses and disease resistance of the juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* induced by *Metschnikowia* sp. C14. Aquaculture, 2012, 368-369(1): 10-18
- Ma YX, Liu ZM, Yang ZP, *et al*. 2014. Effects of *Hanseniaspora opuntiae* C21 on the growth and digestive enzyme activity of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Chin J Oceanol Limnol, 2014, 32(4): 743-748
- Ma YX, Liu ZM, Yang ZP, *et al*. Effects of dietary live yeast *Hanseniaspora opuntiae* C21 on the immune and disease resistance against *Vibrio splendidus* infection in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Fish Shellfish Immun, 2013, 34(1): 66-73
- Macey BM, Coyne VE. Improved growth rate and disease resistance in farmed *Haliotis midae* through probiotic treatment. Aquaculture, 2005, 245(1): 249-261
- Novas A, Cao A, Barcia R, *et al*. Nitric oxide release by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk was provoked by interleukin-2 but not by lipopolysaccharide. Int J Biochem Cell B, 2004, 36(3): 390-394
- Ottaviani E, Paemen LR, Cadet P, *et al*. Evidence for nitric oxide production and utilization as a bacteriocidal agent by invertebrate immunocytes. Eur J Pharmacol, 1993, 248(4): 319-324
- Qi ZZ, Zhang XH, Boon N, *et al*. Probiotics in aquaculture of China-Current state, problems and prospect. Aquaculture, 2009, 290(1-2): 15-21
- Reyes-Becerril M, Salinas I, Cuesta A, *et al*. Oral delivery of live yeast *Debaryomyces hansenii* modulates the main innate immune parameters and the expression of immune-relevant genes in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Fish Shellfish Immun, 2008, 25(6): 731-739
- Rodríguez A, Cuesta A, Ortuño J, *et al*. Immunostimulant properties of a cell wall-modified whole *Saccharomyces cerevisiae* strain administered by diet to seabream (*Sparus aurata* L.). Vet Immunol Immunopathol, 2003, 96(3): 183-192
- Sajeevan TP, Philip R, Singh ISB. Immunostimulatory effect of a marine yeast *Candida sake* S165 in *Fenneropenaeus indicus*. Aquaculture, 2006, 257(1): 150-155
- Sarlin PJ, Philip R. Efficacy of marine yeasts and baker's yeast as immunostimulants in *Fenneropenaeus indicus*: a com-

- parative study. *Aquaculture*, 2011, 321: 173–178
- Shimizu M, Kohno S, Kagawa H, *et al.* Lytic activity and biochemical properties of lysozyme in the coelomic fluid of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *J Invertebr Pathol*, 1999, 73(2): 214–222
- Xing J, Leung MF, Chia FS. Quantitative analysis of phagocytosis by amebocytes of a sea cucumber, *Holothuria leucospilota*. *Invertebr Biol*, 1998, 117(1): 67–74
- Yang ZP, Sun JM, Xu Z, *et al.* Beneficial effects of *Metschnikowia* sp. C14 on growth and intestinal digestive enzymes of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Anim Feed Sci Tech*, 2014, 197: 142–147
- Yeh FC, Wu SH, Lai CY, *et al.* Demonstration of nitric oxide synthase activity in crustacean hemocytes and antimicrobial activity of hemocyte-derived nitric oxide. *Comp Biochem Phys B*, 2006, 144(1): 11–17

(编辑 江润林)

## Effects of Dietary Supplementation of Marine Yeast *Rhodotorula* sp. C11 on Digestive Enzyme Activity and Immune Response in Juvenile Sea Cucumber *Apostichopus japonicus*

YANG Zhiping, XU Zhe, ZHOU Qian, ZHANG Cuicui, SUN Jianming<sup>①</sup>

(Dalian Huixin Titanium Equipment Dev. Co., Ltd., Dalian 116039)

**Abstract** Here we conducted a feeding experiment to investigate the effects of *Rhodotorula* sp. C11 on the digestive enzyme activity and the immune response of juvenile *Apostichopus japonicus*, and to explore its potential use as probiotics in the aquaculture of sea cucumbers. *Rhodotorula* sp. C11 was added to the diets at the concentrations of 0 (control),  $10^4$ ,  $10^5$  and  $10^6$  CFU/g feed. The juvenile sea cucumbers were randomly allocated in 12 plastic tanks (100 L) with 50 individuals per tank. During the 30 day trial, all experimental sea cucumbers were fed one dose of diet per that weighed 5% of their body mass. At the end of the trial we measured the activities of the intestinal digestive enzyme and immunological parameters of the sea cucumbers. Data were analyzed with one-way analysis of variance (ANOVA) and Duncan's multiple comparison of the means with SPSS 19.0 software. A statistical difference was considered significant when  $P < 0.05$ . It was shown that comparing to the control *Rhodotorula* sp. C11 at the concentration of  $10^4$  and  $10^5$  CFU/g feed significantly enhanced the activity of the intestinal trypsin, and at  $10^4$  CFU/g feed, *Rhodotorula* sp. C11 boosted the activity of amylase ( $P < 0.05$ ). *Rhodotorula* sp. C11 at the concentration of  $10^5$  CFU/g feed also increased the phagocytic activity in coelomocytes of sea cucumbers ( $P < 0.05$ ). Moreover, dietary *Rhodotorula* sp. C11 at the concentrations of  $10^5$  and  $10^6$  CFU/g feed significantly elevated the activities of lysozyme (LSZ) in the coelomic fluid, while that at  $10^4$  CFU/g feed increased LSZ activities in the coelomocyte lysate supernatant (CLS) respectively ( $P < 0.05$ ). Comparing to the control, the activity of total nitric oxide synthase (T-NOS) in the coelomic fluid was enhanced by *Rhodotorula* sp. C11 at  $10^4$  CFU/g feed, and the activity of this enzyme in CLS was elevated at  $10^4$ ,  $10^5$  and  $10^6$  CFU/g feed ( $P < 0.05$ ). Our results indicated that live yeast *Rhodotorula* sp. C11 could improve the activity of the intestinal digestive enzyme and activate the innate immune response of *A. japonicus*, therefore, it could potentially be used as an effective probiotic in sea cucumber farming.

**Key words** *Apostichopus japonicus*; *Rhodotorula* sp. C11; Digestive enzyme activity; Immune response

① Corresponding author: SUN Jianming, E-mail: sjm@dlhuixin.com

# 15 种中草药对刺激隐核虫(*Cryptocaryon irritans*) 的杀灭效果及包囊破裂的条件\*



刘婷婷 唐小千 周 丽<sup>①</sup>

(中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003)

**摘要** 比较分析了 15 种中草药对刺激隐核虫(*Cryptocaryon irritans*)滋养体和幼虫的离体杀灭效果, 并探讨了刺激隐核虫包囊破裂产生幼虫的最适温度和盐度条件。结果显示, 中草药药物浓度为 4.55 g/L 时, 槟榔对滋养体和幼虫有杀灭效果, 大黄和野菊花仅对幼虫有杀灭效果; 药物浓度为 9.09 g/L 时, 苦参、贯众对滋养体和幼虫具有杀灭效果。药物浓度为 18.18 g/L 时, 黄芩、川楝子、枳壳对滋养体和幼虫都具有杀灭效果。野菊花对滋养体也具有杀灭效果; 在 45.45、90.09 g/L 较高药物浓度时, 黄芪、鱼腥草、板蓝根、白头翁、金银花、熟地黄对幼虫和滋养体具有杀灭效果。研究表明, 槟榔、苦参、大黄、贯众、黄芩、枳壳、川楝子、野菊花杀虫效果显著; 黄芪、鱼腥草、板蓝根、白头翁、金银花、熟地黄、黄连的杀虫效果不显著。不同培养温度和盐度对刺激隐核虫包囊破裂产出幼虫所需时间比较结果显示, 包囊破裂产出幼虫的最适温度为 26℃、最适盐度为 20–30。

**关键词** 中草药; 刺激隐核虫; 滋养体; 幼虫; 包囊; 温度; 盐度

**中图分类号** S941.5 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)06-0113-08

刺激隐核虫(*Cryptocaryon irritans*)又称海水小瓜虫, 属于纤毛门、前口纲、前管目、隐核虫科、隐核虫属(*Cryptocaryon*)(Diggles *et al.*, 1995; Wright *et al.*, 2002)。球形或卵圆形, 全身表面披有均匀一致的纤毛, 个体大小(34–66) μm×(360–500) μm, 做缓慢旋转运动。生活史分为滋养体、包囊前体、包囊和幼虫 4 个阶段。刺激隐核虫不能离体培养, 只能在鱼体上进行传代培养(Dan *et al.*, 2006)。刺激隐核虫感染海水鱼类会造成病鱼活动异常、呼吸困难以及由于机械损伤引起的继发性细菌感染(刘振勇等, 2012), 严重感染可导致鱼类大量死亡。

海水鱼类养殖过程中主要采用化学药物杀灭刺激隐核虫, 防治“白点病”。通常使用高锰酸钾、福尔马林、铜离子类药物以及染料类药物吡啶黄、亚甲基等化学药物(黄玮等, 2005)。化学药物对养殖鱼类和环境都有一定的危害性, 如甲醛的使用浓度常在 200–1000 ml/m<sup>3</sup>, 不但不能彻底杀灭刺激隐核虫, 而

且可以引起鱼类厌食或组织损伤, 给更多的敌害生物可乘之机, 加重病情(王印庚等, 2011)。此外刺激隐核虫对药物极易产生抗性, 同时具有造成食品安全、环境污染的隐患(王大鹏等, 2013)。因此探讨环境友好、安全有效又能杀灭虫体的中草药对防治海水鱼类“白点病”具有参考价值。已有研究发现槟榔、苦参、苦楝 3 种中草药配伍, 熬成药汤, 全池泼洒, 经过处理之后, 红鳍东方鲀体表小白点消失, 鱼体恢复正常, 治愈率可达 90% 以上(陈章群, 2005)。

本研究试验了槟榔、苦参、大黄、贯众、黄芩、野菊花等 15 种中草药对刺激隐核虫滋养体和幼虫离体杀灭效果, 并分析了刺激隐核虫包囊脱包、产生幼虫的最适温度和盐度条件。旨在筛选对刺激隐核虫具有杀灭效果的中草药, 了解刺激隐核虫包囊脱包、产出幼虫的环境条件, 为进一步研究海水鱼类“白点病”的防治技术提供参考。

\* 国家科技支撑计划(2012BAD17B01)资助。刘婷婷, E-mail: tliu901024@163.com

① 通讯作者: 周 丽, 教授, E-mail: zhouli@ouc.edu.cn

收稿日期: 2015-01-05, 收修改稿日期: 2015-04-06

## 1 材料与方 法

### 1.1 刺激隐核虫滋养体的收集、包囊和幼虫的培养以及形态学观察

病鱼为取自中国海洋大学太平角试验基地暂养的红鳍东方鲀(体重 450–500 g)。将病鱼麻醉致死,用载玻片从鱼体上刮取黏液置于盛有过滤海水的培养皿中,黏液中含有大量刺激隐核虫滋养体。用 1 ml 移液枪吸取虫体置于另一洁净平皿中,用过滤海水反复洗涤。将洗涤干净的滋养体分成两部分,一部分滋养体用于中草药杀灭实验,另一部分滋养体放置在室温下(22℃左右)静置 5–8 h,使其形成包囊。由于滋养

体离体后极易形成包囊,将滋养体放置在室温下(22℃左右)静置观察后发现 5–8 h 后包囊才形成,因此用于中草药杀灭实验的滋养体于室温下(22℃左右)观察 4 h 不会形成包囊。将形成的包囊置于 26℃恒温培养箱,培养 72–84 h 至包囊破裂,待幼虫大量孵化产出,离心(800×g, 10 min)收集幼虫,用过滤煮沸海水调整幼虫浓度至 100 个/ml,用于检测中草药对幼虫的杀灭效果。Olympus1×71 倒置显微镜观察刺激隐核虫生活史各期虫体外观形态。

### 1.2 实验用中草药

用于实验的中草药如表 1 所示。

表 1 实验用中草药名录  
Tab.1 List of the tested Chinese herbal medicines

科名 Family name	中草药名 Name of Chinese herbal medicine	主要功效 Main function
唇形科 Labiatae	黄芩 <i>Scutellaria baicalensis</i>	泻火解毒, 抗菌、抗病毒 Purging fire and detoxification, Antibacterial, Antiviral
蓼科 Polygonaceae	大黄 <i>Rheum officinale</i>	清热燥湿、泻火、解毒 Heat-clearing dampness-drying, Purging fire and detoxification
楝科 Meliaceae	川楝子 <i>Melia toosendan</i>	止痛、驱虫 Pain, Insect repellent
豆科 Leguminosae	苦参 <i>Sophora flavescens</i>	清热燥湿、杀虫 Heat-clearing dampness-drying, Kill insects
豆科 Leguminosae	黄芪 <i>Astragalus membranaceus</i>	固表、生肌、利水退肿 Strengthening superficies, Promoting granulation, Detumescence
棕榈科 Palmaceae	槟榔 <i>Areca catechu</i>	消积、化痰、疗疟、杀虫 Removing food retention, Reduce phlegm, Malaria shot, Kill insects
菊科 Compositae	野菊花 <i>Dendranthema indicum</i>	消肿、抗菌、抗病毒 Detumescence, Antibacterial, Antiviral
芸香科 Rutaceae	枳壳 <i>Citrus aurantium</i>	行痰、消积 Reduce phlegm, Removing food retention
玄参科 Scrophulariaceae	熟地黄 <i>Rehmannia glutinosa</i>	安神补血、提高免疫力 Calm the nerves and enrich the blood, Immunity enhancement
毛茛科 Ranunculaceae	白头翁 <i>Anemone chinensis</i>	清热燥湿、抗菌、解毒 Heat-clearing dampness-drying, Antibacterial and detoxification
三白草科 Saururaceae	鱼腥草 <i>Houttuynia cordata</i>	抗菌、抗病毒、提高机体免疫力 Antibacterial, Antiviral, Immunity enhancement
毛茛科 Ranunculaceae	黄连 <i>Coptis chinensis</i>	泻火解毒、抗菌、抗病毒 Purging fire and detoxification, Antibacterial, Antiviral
忍冬科 Caprifoliaceae	金银花 <i>Lonicera japonica</i>	清热解毒、抗菌、增强免疫力 Heat-clearing and detoxification, Antibacterial, Immunity enhancement
十字花科 Cruciferae	板蓝根 <i>Isatis tinctoria</i>	清热解毒、抑菌 Heat-clearing and detoxification, Antibacterial
鳞毛蕨科 Dryopteridaceae	贯众 <i>Cyrtomium rhizoma</i>	清热解毒, 止血, 杀虫 Heat-clearing and detoxification, Hemostasis, Kill insects

### 1.3 中草药药液制备

15 种中草药粉碎后, 各取 20 g 用 500 ml 海水浸泡 30 min 后煎煮 2 h, 纱布过滤浓缩药液至 200 ml, 其终浓度相当于原药 100 g/L(鈕超等, 2010)。分别将原药液稀释成 50、20、10、5 g/L 4 种不同的浓度, 每种浓度的中草药药液配制 10 ml 用于实验。

### 1.4 中草药杀灭滋养体、幼虫

**1.4.1 滋养体** 移液枪吸取虫体放入 24 孔板中, 每孔中大约有 15–20 个虫体, 体积 100  $\mu$ l。分别加入 100、50、20、10、5 g/L 5 种不同浓度的中草药 1 ml, 每一药物浓度做 3 组平行, 对照组加入等体积的过滤灭菌海水, 在室温下(22 $^{\circ}$ C左右)分别于 10、30、60、120、240 min 镜检观察滋养体死亡情况, 记录全部虫体死亡所需时间。数据用 Microsoft Excel 软件分析处理, 用于杀灭滋养体的中草药的最终浓度计算采用: 药液浓度 $\times$ 1 ml/1.1 ml; 刺激隐核虫滋养体全部死亡时间计算采用平均值 $\pm$ 标准差。

**1.4.2 幼虫** 移液枪吸取混匀幼虫(约 100 个/ml) 100  $\mu$ l, 放入 24 孔板中, 分别加入 100、50、20、10、5 g/L 5 种不同浓度的中草药 1 ml, 每一个处理做 3 组平行, 对照组加入等体积的过滤灭菌海水, 在室温下(22 $^{\circ}$ C左右)分别于 10、30、60、120、240 min 镜检观察幼虫死亡情况, 记录全部虫体死亡所需时间。数据处理同 1.4.1。

### 1.5 温度和盐度对包裹破裂、幼虫脱包产出的影响

吸取 2 ml 盐度为 30 的过滤海水, 依次置于 6 孔板中, 吸取一定量(约 10 个)滋养体放入 6 孔板中, 处理做 3 组平行; 分别将 6 孔板放置于 15、21、26、31、37 $^{\circ}$ C 恒温箱中, 每隔 12 h, 镜检观察虫体分裂、脱包情况, 记录幼虫产出所需时间。

用海水晶将海水盐度分别调成 15、20、25、30、35、40, 6 个梯度, 吸取 2 ml 不同盐度的海水依次置于 6 孔板中, 吸取一定量(约 10 个)滋养体放入 6 孔板中, 每一个处理做 3 组平行; 分别将这 6 个盐度梯度的 6 孔板放置于 26 $^{\circ}$ C 恒温箱中, 每隔 12 h, 镜检观察虫体分裂、脱包情况, 记录幼虫产出所需时间。

## 2 结果

### 2.1 症状及虫体形态

患病鱼体色暗淡无光, 浮于水面缓慢游动。体表、鳍、鳃等处肉眼可见小白点。鱼体表黏液增多, 腹部皮肤点状充血, 感染严重的鱼体表发炎溃疡, 鳍条缺

损、开叉, 眼睛白浊, 鳃丝褪色腐烂, 伴有继发细菌感染病症(图 1-a)。刮取体表黏液或剪取鳃组织, 倒置显微镜下观察, 可见滋养体呈圆形或梨形, 在所寄生组织处缓慢旋转(图 1-b), 部分滋养体可观察到 U 形排列的大核(图 1-c), 离体后的滋养体逐渐变圆形成包裹(图 1-d)。分别观察并测量了 20 个滋养体、包裹和幼虫的大小, 发现滋养体与包裹大小相似, 约为 200–500  $\mu$ m, 幼虫大小为 30–50  $\mu$ m(图 2)。

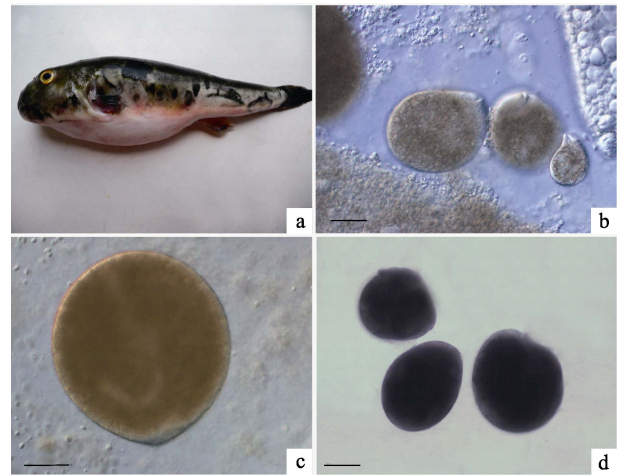


图 1 病鱼外观症状及滋养体离体前后的形态  
Fig.1 Symptoms of infected fish and morphologies of trophonts in the gill and *in vitro*

a: 患病红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*); b: 鳃组织上的滋养体;  
c: 滋养体 U 型大核; d: 离体后的滋养体形态(标尺=100  $\mu$ m)  
a: diseased *T.rubripes*  
b: The trophonts in the gill; c: The U macronucleus;  
d: The morphology of trophonts *in vitro* (bar=100  $\mu$ m)

### 2.2 中草药对滋养体的杀灭效果

从 15 种中草药对刺激隐核虫滋养体的杀灭效果(表 2)可以看出, 药物浓度为 4.55 g/L 时, 槟榔对滋养体有明显的杀灭作用, 滋养体在 110 min 时间内全部破裂死亡(图 3)。药物浓度为 9.09 g/L 时, 大黄、苦参、黄连、贯众在 150 min 内均能杀灭滋养体, 杀灭强度由强到弱依次为苦参、大黄、黄连、贯众。药物浓度为 18.18 g/L 时, 黄芩、川楝子、野菊花、枳壳在 120 min 内均能杀灭滋养体, 杀灭强度由强到弱依次为黄芩、枳壳、川楝子、野菊花。药物浓度为 45.45 g/L 时, 黄芪、鱼腥草、板蓝根、白头翁、金银花在 183 min 内能杀灭滋养体。药物浓度为 90.91 g/L 时, 熟地黄对滋养体具有杀灭作用, 时间为 5 min 左右。比较分析可以看出, 黄芪、鱼腥草、板蓝根、白头翁、金银花、熟地黄只有药物浓度在 45.45 g/L 或以上时对滋养体才具有杀灭作用, 与同浓度的其他中草药相比, 杀灭

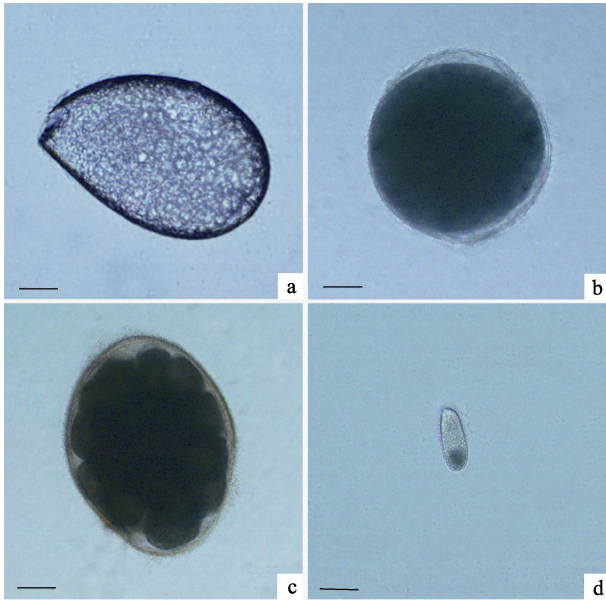


图2 刺激隐核虫生活史中各期虫体外观形态  
Fig.2 The morphology of *Cryptocaryon irritans* in each phase of its life cycle

a: 滋养体; b: 包囊前体; c: 包囊; d: 幼虫  
(10×20)(标尺=50 μm)

a: Trophonts; b: Protomonts; c: Tomonts; d: Theronts  
(10×20)(bar=50 μm)

滋养体所需时间更长,证明黄芪、鱼腥草、板蓝根、白头翁、金银花、熟地黄的杀灭效果不显著。黄连虽然在药物浓度为 9.09 g/L 时就有杀灭效果,但所用时间较长(148 min),并且在 45.45 g/L 浓度时,杀灭时间为 75 min,而对滋养体杀灭效果较好的中草药如槟

榔、大黄、苦参、黄芩、川楝子在相同浓度下仅需 1–10 min 即可杀死滋养体,说明黄连虽有杀虫效果但杀灭时间较长,对滋养体的杀灭效果不理想。实验得出,槟榔、苦参、大黄、贯众 4 种中草药杀灭滋养体效果较好;黄芩、枳壳、川楝子、野菊花 4 种中草药的杀灭效果一般;黄芪、鱼腥草、板蓝根、白头翁、金银花、熟地黄、黄连 7 种中草药杀灭滋养体效果不显著。对照组滋养体在 4 h 内没有死亡,并进一步形成包囊,在 26℃ 恒温箱培养后,释放出大量具有感染性的幼虫。(表 2 中的数据用 Microsoft Excel 软件分析处理,计算采用:平均值±标准差)。

### 2.3 中草药对幼虫杀灭效果

如表 3 所示,中草药药物浓度为 4.55–9.09 g/L 时,槟榔、苦参、大黄、贯众、野菊花对幼虫有明显的杀灭作用,镜下观察,滴加药物后,幼虫游动逐渐缓慢,60 min 内全部停止游动死亡。药物浓度为 18.18 g/L 时,黄芩、川楝子、枳壳在 60 min 内均能杀灭幼虫。药物浓度为 45.45 g/L 时,黄芪、熟地黄、白头翁、黄连在 12 min 内能杀灭幼虫。药物浓度为 90.91 g/L 时,鱼腥草、板蓝根对幼虫具有杀灭作用,时间为 1 min 左右。结果显示,槟榔、苦参、大黄、贯众、野菊花、黄芩、川楝子、枳壳、金银花杀虫效果显著。黄芪、鱼腥草、板蓝根、白头翁、熟地黄、黄连只有在高浓度 45.45–90.91 g/L 时才有效,其他较低浓度均没有效果,因此杀虫效果不显著。对照组幼虫在 1 h 内没有死亡。(表 3 中的数据用 Microsoft Excel



图3 中草药杀灭前后滋养体的形态变化

Fig.3 The morphological changes of trophonts before and after the Chinese herbal medicine treatment

a: 用药前正常的滋养体; b: 用药后刚解体死亡的滋养体

c: 用药后最终解体死亡的滋养体 显微镜观察(10×20) (标尺=50 μm)

a: Trophonts before Chinese herbal medicine treatment; b: Immediately dead trophonts after Chinese herbal medicine treatment; c: Dead trophonts after Chinese herbal medicine treatment. The three figures were all microscope observation (10×20)(bar=50 μm)

表 2 15 种中草药杀灭刺激隐核虫滋养体效果  
Tab.2 The killing effects of Chinese herbal medicine on *C. irritans* trophonts *in vitro*

药名 Name of Chinese herbal medicine	浓度 Concentration				
	90.91 g/L	45.45 g/L	18.18 g/L	9.09 g/L	4.55 g/L
	刺激隐核虫滋养体全部死亡时间(min) Trophonts of <i>C. irritans</i> all of the time of death				
黄 芩 <i>S. baicalensis</i>	1.0±0.0	8.0±1.0	40.0±5.0	—	—
大 黄 <i>R. officinale</i>	1.0±0.0	1.0±0.0	5.0±1.0	144.0±10.0	—
川 楝 子 <i>M. toosendan</i>	1.0±0.0	1.0±0.33	119.0±5.0	—	—
苦 参 <i>S. flavescens</i>	1.0±0.0	2.0±0.38	21.0±5.0	41.0±2.0	—
黄 芪 <i>A. membranaceus</i>	1.0±0.0	183.0±10.0	—	—	—
槟 榔 <i>A. catechu</i>	1.0±0.0	1.0±0.0	12.0±2.0	90.0±5.0	110.0±10.0
野菊花 <i>D. indicum</i>	1.0±0.0	20.29±5.0	120.72±10.0	—	—
枳 壳 <i>C. aurantium</i>	1.0±0.0	9.0±1.0	52.0±10.0	—	—
熟地黄 <i>R. glutinosa</i>	5.35±2.0	—	—	—	—
白头翁 <i>A. chinensis</i>	1.0±0.0	36.26±6.0	—	—	—
鱼腥草 <i>H. cordata</i>	47.53±5.0	119.43±9.6	—	—	—
黄 连 <i>C. chinens</i>	1.0±0.0	75.0±11.0	106.32±10.0	148.0±15.0	—
金银花 <i>L. japonica</i>	1.0±0.0	41.0±5.0	—	—	—
板蓝根 <i>I. tinctoria</i>	1.0±0.0	182.0±15.0	—	—	—
贯 众 <i>C. Rhizoma</i>	1.0±0.0	1.0±0.0	80.0±3.0	180.0±7.0	—
对 照 Contrast	—	—	—	—	—

“—”表示滋养体在药物处理 4 h 后仍然存活, 判定药物无效

“—” means that medicine is invalid when trophont is still alive after 4 h of medicine treatment

表 3 15 种中草药杀灭刺激隐核虫幼虫效果  
Tab.3 The killing effects of Chinese herbal medicine on *C. irritans* theronts *in vitro*

药名 Name of Chinese herbal medicine	浓度 Concentration				
	90.91 g/L	45.45 g/L	18.18 g/L	9.09 g/L	4.55 g/L
	刺激隐核虫幼虫全部死亡时间(min) Theronts of <i>C. irritans</i> all of the time of death				
黄 芩 <i>S. baicalensis</i>	1.0±0.0	1.0±0.0	12.41±1.9	—	—
大 黄 <i>R. officinale</i>	1.0±0.0	1.0±0.0	5.50±1.3	17.0±3.0	37.2±1.21
川 楝 子 <i>M. toosendan</i>	1.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0	—	—
苦 参 <i>S. flavescens</i>	1.0±0.0	1.0±0.0	22.0±1.3	37.23±2.5	—
黄 芪 <i>A. membranaceus</i>	1.0±0.0	1.0±0.0	200.41±10.0	—	—
槟 榔 <i>A. catechu</i>	1.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0	5.0±1.0	8.21±0.9
野菊花 <i>D. indicum</i>	1.0±0.0	1.0±0.0	37.54±2.3	53.03±4.0	58.09±6.8
枳 壳 <i>C. aurantium</i>	1.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0	—	—
熟地黄 <i>R. glutinosa</i>	1.0±0.0	1.0±0.0	—	—	—
白头翁 <i>A. chinensis</i>	1.0±0.0	1.0±0.0	81.74±10.4	—	—
鱼腥草 <i>H. cordata</i>	1.0±0.0	—	—	—	—
黄 连 <i>C. chinens</i>	1.0±0.0	11.52±2.5	84.00±11.5	—	—
金银花 <i>L. japonica</i>	1.0±0.0	1.0±0.0	5.32±2.2	—	—
板蓝根 <i>I. tinctoria</i>	1.0±0.0	—	—	—	—
贯 众 <i>C. Rhizoma</i>	1.0±0.0	1.0±0.0	15.17±2.0	35.41±5.0	—
对 照 Contrast	—	—	—	—	—

“—”表示滋养体在药物处理 4 h 后仍然活着, 判定药物无效

“—” means that medicine is invalid when theronts is still alive after 4 h of medicine treatment



软件分析处理, 计算采用: 平均值±标准差)

#### 2.4 温度、盐度对包囊破裂幼虫产出的影响

在正常海水盐度(30)下, 温度设为 15、21、26、31、37℃, 5 个梯度培养包囊, 连续 6 d 观察包囊破裂情况(图 4)。在 26、31℃, 包囊从 60 h 开始破裂, 其中温度为 26℃时, 包囊在 84 h 全部破裂, 产出幼虫游动快速, 活力好; 温度为 31℃时, 包囊在 84 h 达到 80% 破裂, 此后包囊停止破裂。产出的幼虫游动缓慢, 活力较弱。温度为 15、21℃时, 包囊从 96 h 开始破裂且始终未达到 100% 破裂。37℃下培养的包囊实验期间始终没有破裂。结果显示, 26℃是包囊破裂的适宜温度。

在温度为 26℃, 盐度设为 15、20、25、30、35、40, 6 个梯度培养包囊, 观察包囊破裂情况(图 5)。盐度为 20、25、30、35, 包囊从 72 h 开始破裂, 破裂率依次为 33%、25%、25%、17%。其中, 盐度为 20、25、30, 包囊在 84 h 达到 100% 破裂。盐度为 15, 包囊在

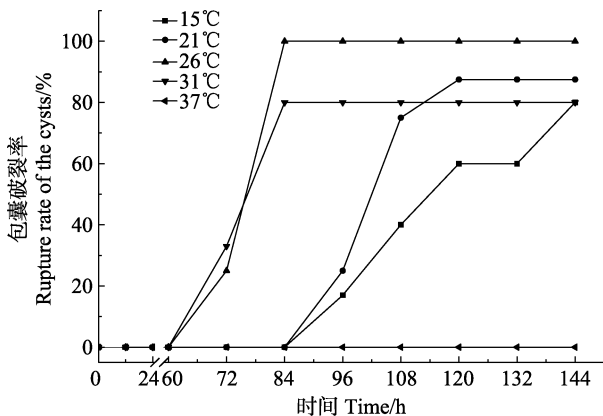


图 4 不同温度条件下包囊破裂情况

Fig.4 Results of the cysts rupture at different temperatures

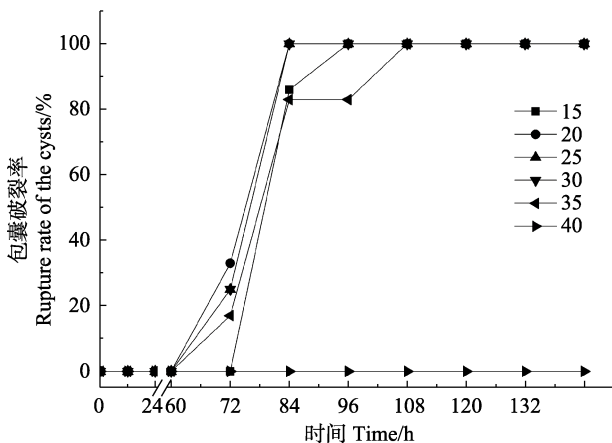


图 5 不同盐度条件下包囊破裂情况

Fig.5 Results of the cysts rupture at different salinities

84 h 开始破裂, 96 h 达到 100% 破裂。盐度为 35, 包囊在 108 h 达到 100% 破裂。盐度为 40, 包囊始终未破裂。盐度为 15 的包囊虽能达到 100% 破裂但开始破裂所需时间较长, 盐度为 15 包囊虽开始破裂所需时间与盐度 20、25、30 相同, 但达到 100% 破裂所需时间较长, 因此认为包囊破裂的适宜盐度为 20–30 之间。

### 3 讨论

中草药毒副作用小, 制剂使用安全, 容易分解, 不会在鱼体中形成药残, 不会对环境造成污染, 国内应用中草药防治鱼病越来越被重视(刘海侠等, 2006; 胡梁及等, 2014; 曹红峰等, 2006)。本研究发现槟榔、苦参、大黄、贯众、黄芩、野菊花等中草药对刺激隐核虫具有杀灭效果且杀灭强度与药物浓度呈正相关, 浓度范围为 4.55–90.91 g/h 时, 浓度越高, 则杀灭强度越大。据报道, 槟榔对多子小瓜虫游离滋养体具有杀灭和抑制作用, 最适药物浓度为 100–300 mg/L, 理想浓度为 150–200 mg/L(陈熙春, 2004), 本研究证明槟榔在药物浓度为 4.55 g/L 时, 可杀灭滋养体和幼虫。本研究表明, 相比较其他 14 种中草药, 槟榔对刺激隐核虫杀灭效果非常明显, 可以考虑作为防治刺激隐核虫病的首选中草药。

药理学研究表明, 大黄、野菊花在抑制鱼类病原微生物上有独特的功效。从 116 种中草药中筛选出大黄对粘细菌有抑制作用, 并进行了有效成分的提取和试验, 证实大黄中的含酚基有机酸类可抑制粘细菌体内的脱氢酶系的活性, 从而阻碍了该菌的正常生物氧化过程(中国水产学会鱼病研究会, 1990)。张海宾等(2003)测定 10 种中草药沸水提取物的抗菌活性和最低抑菌浓度, 表明大黄、野菊花抑菌效果好。本研究发现, 大黄和野菊花在 4.55 g/L 浓度下 1 h 内杀灭幼虫, 可以在一定程度上阻断刺激隐核虫的生活史, 说明大黄和野菊花对杀灭刺激隐核虫有一定药用价值。

本研究发现, 在药物浓度 9.09 g/L 时, 苦参、贯众对刺激隐核虫滋养体具有杀灭作用, 槟榔、大黄、野菊花对幼虫的杀灭作用更进一步, 杀灭时间缩短, 药效更强。据研究报道, 中草药成分中的生物碱如苦参碱作用于寄生虫的中枢神经系统, 使之兴奋产生惊厥, 进而作用于呼吸及神经系统, 使寄生虫死于呼吸抑制。张继平等(2005)研究表明, 苦参碱对鱼类鳃寄生的车轮虫起到有效驱杀作用。黄芩中含有黄酮类化合物, 通过破坏细胞膜的完整性, 导致膜电子传递、营养吸收、核苷酸合成及 ATP 活性等功能障碍, 从而起到抑菌杀虫的作用(谢鹏等, 2005)。日本学者

Tsuyoshi 等(2014)研究发现,可在真鲷上使用苦参杀灭刺激隐核虫。将药物浓度为 10 g/kg 的提取物放入鱼食中口服 7 d,可以减少 40%鱼体上的滋养体且对鱼体安全,苦参提取物在鱼体上起到的杀灭刺激隐核虫滋养体的效果和离体杀灭效果一致,证明了离体杀灭刺激隐核虫具有有效性和实用性,可以参考使用到临床实践中。本研究所得的药效结果都是基于离体杀虫试验,发现槟榔、苦参、大黄、贯众、黄芩、枳壳、川楝子、野菊花 8 种中草药具有较好的杀虫效果,可以参考使用到养殖鱼类刺激隐核虫病的防治中。

包囊由于其外面是一层较厚的包囊壁,药物很难进入,难以杀灭。从其分裂产出幼虫的温度、盐度等环境条件入手,了解包囊破包产出幼虫的最适环境条件,从而调节养殖环境条件,减缓包囊破裂的时间或者在包囊破裂产出幼虫的第一时间用药将幼虫杀灭,防止幼虫侵染鱼类而导致白点病的发生。因此本研究进行了包囊破裂产生幼虫最适温度、盐度条件的研究。

本研究证明包囊破裂百分比与温度呈正相关,温度越高则包囊破裂的时间越早,但在 37℃下,没有包囊破裂现象。Cheung 等(1979)报道,在 7℃低温和 37℃高温下,刺激隐核虫包囊不发生破裂现象,证明在相对低温和高温情况中,包囊都不能产生破裂,包囊破裂的最适温度为 30℃。Dan 等(2009)研究发现,刺激隐核虫包囊在 12℃的条件下可以保存 4-5 个月之久。当保存的包囊再次放到常温下可以孵化出大量幼虫,幼虫依然具有感染性,低温处理对防治刺激隐核虫病的暴发,效果不显著。但学明(2006)<sup>1)</sup>试验结果显示,培育温度维持在 20-30℃之间,刺激隐核虫包囊破裂率能达到 90%以上。温度越高,虫体发育速度越快,包囊破裂时间越集中。在 27℃时,包囊破裂集中在 2 d 内完成,而在 20℃时,需延续到 5 d 才完全破裂,所以认为包囊破裂的最适温度为 27℃。这与本实验得出的刺激隐核虫包囊破裂的最适温度为 26℃基本一致。

本研究通过盐度对包囊破裂的影响发现,20-30 盐度范围内,包囊的破裂率和破裂时间无显著性差异。认为包囊破裂的盐度适应范围较广,20-30 盐度范围内均适合包囊破裂。40 高盐度下无包囊破裂现象,15 低盐度下包囊破裂所需时间长,大约需要 4 d 的时间,故较高盐度和较低盐度条件均不适合包囊破裂产出幼虫。Cheung 等(1979)证明在盐度为 16 或者更低时,刺激隐核虫包囊不能正常发育破裂。Colorni 等

(1985)报道,将被刺激隐核虫侵染的金头鲷置于盐度为 45-60 的盐水中处理 5-20 min,鱼体上 45%-50%的滋养体可被杀死。因此,在海水鱼类刺激隐核虫病暴发的春秋季节,如能适当调节养殖海水的盐度,在一定程度上可阻止刺激隐核虫病的大规模发生。

## 参 考 文 献

- 王大鹏,何安尤,谢达祥,等. 龙胆石斑刺激隐核虫病防治技术研究. 水产科技情报, 2013, 40(1): 22-26
- 王印庚,刘志伟,林春媛,等. 养殖大菱鲆刺激隐核虫病及其治疗. 水产学报, 2011, 35(7): 1105-1112
- 中国水产学会鱼病研究会. 我国水产药的发展现状、存在问题及国外的研究概况. 鱼类病害研究, 1990, 12(4): 3-10
- 刘振勇,林小金,谢友佳,等. 大黄鱼刺激隐核虫病继发细菌感染致死原因的研究. 福建水产, 2012, 34(1): 11-15
- 刘海侠,于三科. 我国鱼类寄生虫病现状及防治对策. 动物医学进展, 2006, 27(5): 103-105
- 张海宾,张书霞. 温和气单胞菌对 10 种中草药耐药性的初步研究. 信阳师范学院学报(自然科学版), 2003, 16(1): 39-41
- 张继平,贺顺连,胡卫平. 苦参不同方法提取物抗鱼体车轮虫作用的研究. 长江大学学报(自然科学版), 2005, 2(2): 57-59
- 陈章群. 中草药防治红鳍东方鲀刺激隐核虫病. 水产养殖, 2005, 26(4): 40
- 陈熙春. 槟榔防治小瓜虫初报. 科学养鱼, 2006, (1): 52
- 胡梁及,朱盛山,张雄飞,等. 中草药防治寄生性鱼病的研究进展. 中国兽药杂志, 2014, 48(9): 66-69
- 黄玮,李安兴. 刺激隐核虫及其防治措施的研究. 中国水产, 2005(3): 78-80
- 曹红峰,黄文芳,宋靖芳. 中草药防治鱼病研究进展. 海洋科学, 2006, 30(4): 83-87
- 谢鹏,张敏红. 黄酮类化合物抑菌作用的研究进展. 中国动物保健, 2004(12): 35-37
- 鉏超,张其中,罗芬. 20 种中草药杀灭离体小瓜虫的药效研究. 淡水渔业, 2010, 40(1): 55-60
- Cheung PJ, Nigrelli RF, Ruggieri GD. Studies on cryptocaryoniasis in marine fish: effect of temperature and salinity on the reproductive cycle of *Cryptocaryon irritans* Brown, 1951. J Fish Dis, 1979(2): 93-97
- Colorni A. Aspects of the biology of *Cryptocaryon irritans* and hyposalinity as a control measure in culture gilt-head sea bream *Sparus aurata*. Dis Aquat Organ, 1985, 1: 19-22
- Dan XM, Li AX, Lin XT, et al. A standardized method to propagate *Cryptocaryon irritans* on a susceptible host pompano *Trachinotus ovatus*. Aquaculture, 2006, 258(1-4): 127-133
- Dan XM, Lin XT, Yan YX, et al. A technique for the preservation

1) 但学明. 刺激隐核虫(*Cryptocaryon irritans*)的传代、保存及刺激隐核虫病的防治研究. 暨南大学博士学位研究生论文, 2006

- of *Cryptocaryon irritans* at low temperatures. *Aquaculture*, 2009, 297(1): 112–115
- Diggles BK, Adlard RD. Taxonomic affinities of *Cryptocaryon irritans* and *Ichthyophthirius multifiliis* inferred from ribosomal RNA sequence data. *Dis Aquat Organ*, 1995, 22(1): 39–43
- Tsuyoshi G, Hirazawa N, Takaishi Y, Kashiwada Y. Antiparasitic effects of *Sophora flavescens* root extracts on the ciliate, *Cryptocaryon irritans*. *Aquaculture*, 2014, 435: 173–177
- Wright ADG, Colorni A. Taxonomic re-assignment of *Cryptocaryon irritans*, a marine fish parasite. *Eur J Protistol*, 2002, 37(4): 375–378

(编辑 江润林)

## The Pesticidal Effects of Chinese Herbal Medicine on the Trophonts and the Theronts of Ciliate *Cryptocaryon irritans* and the Influence of Temperature and Salinity on the Cyst Rupture

LIU Tingting, TANG Xiaoqian, ZHOU Li<sup>①</sup>

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

**Abstract** In this study we performed *in vitro* study on the pesticidal effects of 15 Chinese herbal medicines on the trophonts and theronts of ciliate *Cryptocaryon irritans*, including Betel nut (*Areca catechu*), Bitter ginseng (*Sophora flavescens*), Rhubarb (*Rheum officinale*), Cyrtomium rhizome (*Cyrtomium Rhizoma*), Radix scutellariae (*Scutellaria baicalensis*) and Wild chrysanthemum (*Dendranthema indicum*). We also explored the optimum temperature and salinity for the cyst rupture. At the concentration of 4.55 g/L, Betel nut could kill both the trophonts and the theronts of the ciliate, but Rhubarb and Wild chrysanthemum could only kill theronts. At the concentration of 9.09 g/L, both Bitter ginseng and Cyrtomium rhizome were able to kill the trophonts and the theronts. At the concentration of 18.18 g/L, Radix scutellariae, Toosendan fruit (*Melia toosendan*) and Fructus aurantii (*Citrus aurantium*) could kill the trophonts and the theronts, and Wild chrysanthemum could kill the trophonts. Other herbs could annihilate the trophonts and the theronts at much higher concentrations (45.45 g/L to 90.91 g/L), such as Astragalus root (*Astragalus membranaceus*), Heartleaf houttuynia herb (*Houttuynia cordata*), Isatis root (*Isatis tinctoria*), Chinese bulbul (*Anemone chinensis*), Honeysuckle (*Lonicera japonica*), Radix rehmanniae preparata (*Rehmannia glutinosa*), and Rhizoma coptidis (*Coptis chinensis*). These results suggested that Betel nut, Bitter ginseng, Rhubarb, Cyrtomium rhizome, Radix scutellariae, Toosendan fruit, Fructus aurantii, and Wild chrysanthemum might be more pesticidal than the other herbs, and hence they could be used to control the ciliate. Our study also revealed that the optimum temperature and salinity for the cyst rupture were 26°C and 20–30 respectively.

**Key words** Chinese herbal medicine; Ciliate *Cryptocaryon irritans*; Trophonts; Theronts; Cysts; Temperature; Salinity

① Corresponding author: ZHOU Li, E-mail: zhouli@ouc.edu.cn

# 消油剂对海湾扇贝(*Argopecten irradians*) 的急性毒性效应\*



徐勇<sup>1,2</sup> 朱建新<sup>1①</sup> 江涛<sup>1</sup> 刘文文<sup>1,2</sup>

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;  
2. 中国海洋大学化学化工学院 266100)

**摘要** 本研究以海湾扇贝(*Argopecten irradians*)为研究对象,通过96 h半静水毒性实验,探讨了消油剂、0号柴油分散液(WAF)与0号柴油乳化液(CEWAF)对海湾扇贝24 h、48 h、72 h、96 h急性毒性效应。结果显示,消油剂对海湾扇贝的24 h、48 h、72 h和96 h半致死浓度(95%可信限)分别为1905(1570–2451 mg/L)、1293(1070–1556 mg/L)、1015(721–1348 mg/L)、846 mg/L(660–1020 mg/L); WAF对海湾扇贝的24 h、48 h、72 h和96 h半致死浓度(95%可信限)分别为36.57(29.42–48.96 mg/L)、23.10(21.07–25.39 mg/L)、14.99(13.66–16.41 mg/L)、11.31 mg/L(8.37–14.47 mg/L); CEWAF对海湾扇贝的24 h、48 h、72 h和96 h半致死浓度(95%可信限)分别为12.71(10.78–15.55 mg/L)、8.51(7.99–9.07 mg/L)、6.56(4.46–7.74 mg/L)、5.42 mg/L(4.51–6.29 mg/L)。消油剂、0号柴油分散液、0号柴油乳化液对海湾扇贝96 h安全浓度分别为84.6、1.13、0.54 mg/L。随着实验时间的延长,消油剂、WAF和CEWAF对海湾扇贝的半致死浓度(LC<sub>50</sub>)均呈逐渐降低之势,半致死浓度与时间呈幂函数关系,其关系式分别为 $y=12242x^{-0.583}$ 、 $y=564.37x^{-0.848}$ 、 $y=89.987x^{-0.613}$ 。在受试溶液中暴露相同时间,海湾扇贝的半致死浓度从高到低依次为消油剂、WAF和CEWAF,说明CEWAF对海湾扇贝的毒性大于消油剂和WAF,这对于在养殖海区使用消油剂处理溢油事故具有重要的指导意义。

**关键词** 海湾扇贝(*A. irradians*); 消油剂; 0号柴油; 急性毒性

**中图分类号** S912 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)06-0121-06

随着海上运输业和海上采油业的发展,溢油污染已成为各种海洋污染类型中发生频率最高、分布面积最广、危害程度最大的污染源,不但对海洋生物的生存构成巨大威胁,而且对海洋生态环境安全造成严重破坏。在海上溢油清除过程中,消油剂扮演着十分重要的角色。消油剂处理溢油是将大面积的浮油分散成悬浮状小油滴以加速溶解,增加水体含氧量及细菌对溢油的降解速度,阻止溢油进一步影响海岸线及其敏感的生态环境,降低海洋上层生物(藻类、海洋哺乳动物)受污染的风险,从而减弱溢油带来的环境影响;但其形成的化学分散原油水溶组分因含有更多毒性

较大的多环芳烃,不仅导致水体环境恶化,而且严重威胁水体中、下层特别是近岸生物的繁殖、摄食、生长及免疫系统功能。消油剂的使用不仅能提高海洋生物的死亡率(韩方圆等, 2011; 王颖等, 2011),而且会增加海水浑浊度,影响浮游植物的光合作用,降低水体初级生产力(Nordtug *et al*, 2011),并对水生植物的再生细胞造成不可复原的损害,导致水生植物发生亚致死的情况(杨庆霄等, 1997)。同时损伤水生生物呼吸器官,影响鱼类的味觉器官,进而对其进食、生长、迁徙、繁殖及防御行为造成不利影响(Brooke, 1990);另外,消油剂会剥蚀贝类壳体,影响附着性贝类的附

\* 国家海洋局海洋溢油鉴别与损害评估技术重点实验室开放基金资助(201317)。徐勇, E-mail: xuyong@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 朱建新, 副研究员, E-mail: zhujx@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-12-09, 收修改稿日期: 2015-09-10

着能力。鉴于以上原因,世界各国纷纷发展低毒高效消油剂,采用聚乙二醇的浓缩型第3代化学分散剂,其毒性只是第一代的1%,以降低对环境的影响。即便如此,美国、加拿大、日本及欧洲等多国对消油剂的使用都持谨慎态度,在机械清除无效或海区环境不适宜时才允许使用,且禁止在沿海及养殖区使用(Fingas, 2001)。

目前国内外学者对消油剂毒性效应的研究主要集中在鱼类(韩方圆等, 2011; Nordtug *et al.*, 2011)、藻类(Wilson *et al.*, 2012)、浮游动物(王颖等, 2011; 黄逸君等, 2010)方面,关于消油剂对扇贝毒性效应的研究尚未见报道。扇贝为滤食性底栖动物,分布范围广,生活方式固定,对其生活环境中的污染物有较强的生物蓄积作用。通过测定贝类体内污染物的残留量,可以监测和评价其周围海洋环境的污染程度和变化趋势。海湾扇贝(*A. irradians*)由于其具有生长速度快、抗病能力较强等优点,在我国的养殖规模不断扩大,已成为北方海区的主要养殖对象之一。本研究选用海湾扇贝为研究对象,进行消油剂及消油剂处理石油对海湾扇贝毒性效应的研究,为消油剂安全使用和管理提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验海水** 实验用海水为过滤海水,盐度为29–31, pH 7.9, 溶解氧浓度为7.8–8.2 mg/L, 石油烃浓度为3.05 μg/L。

**1.1.2 实验生物** 实验用海湾扇贝购自青岛农贸市场,在室温下养于室内20 L盛有天然海水的塑料箱中,连续充气,24 h换水。每天投喂海藻1次,水温为(17±1)°C,暂养7 d,待其状态稳定后,选取活力好,体长4–5 cm的个体进行实验。

**1.1.3 药剂** 0号柴油,购自青岛中石化加油站,密度0.84 g/cm<sup>3</sup>。消油剂为青岛光明环保技术有限公司生产的青岛光明GM-2型溢油分散剂,淡黄色透明液体,密度1 g/cm<sup>3</sup>。

### 1.2 方法

**1.2.1 实验试剂的制备** 按照消油剂与海水1:9的比例混合,机械搅拌1 h,静止1 h,即得消油剂母液。

**1.2.2 0号柴油分散液(WAF)的制备** 将0号柴油与过滤海水按体积比1:9混合,电动低速搅拌机连续搅拌24 h,在分液漏斗中静置4 h后,分离后取下层水相即为石油分散液(WAF)母液。母液置于冰箱4°C

保存。

**1.2.3 0号柴油乳化液(CEWAF)的制备** 将消油剂、0号柴油和水按照1:5:45的比例混合,用电动低速搅拌机连续搅拌24 h,在分液漏斗中静置4 h后,取下层水相,即得化学增强的石油分散液(CEWAF)母液,置于4°C低温保存。

**1.2.4 急性毒性实验** 根据预实验结果,确定试验溶液的浓度范围,按等比间距设置试验溶液的浓度。海湾扇贝实验组消油剂浓度梯度为0.53、0.75、1.06、1.50、2.12、3.00 g/L,0号柴油分散液浓度梯度为5.88、9.32、14.77、23.41、37.10、58.80 mg/L,0号柴油乳化液浓度梯度为3.54、5.00、7.07、10.00、14.14、20.00 mg/L。每个实验浓度设置3个平行,同时设置1个空白对照组。试验容器为5 L玻璃缸,每个缸随机投放实验扇贝10只,实验期间不投喂,实验水温(17±1)°C,每隔12 h全量更换等浓度试验液1次。实验持续96 h,开始的2 h连续观察,之后每隔12 h观察1次受试生物活动状况,并记录死亡个体数。为避免实验过程中水质败坏和病原微生物交叉感染,每次观察后均将死亡生物及时捞出。

### 1.3 数据处理

采用概率单位算法并利用SPSS17.0进行数据处理,求得回归方程并进行可靠性检验,计算半致死浓度 $LC_{50}$ 及95%置信区间。然后计算安全浓度(SC):

$$SC=96 \text{ h } LC_{50} \times 0.1$$

## 2 实验结果

### 2.1 海湾扇贝中毒症状和死亡情况

消油剂、0号柴油乳化液高浓度组中海湾扇贝首先出现中毒症状,表现为在玻璃缸内剧烈运动,贝壳快速张合。随着时间的延长,部分中毒扇贝死亡时贝壳张开,闭壳肌松弛。实验生物在不同浓度实验溶液中死亡数量见表1–表3。

### 2.2 实验试剂对海湾扇贝的半致死浓度( $LC_{50}$ )

通过SPSS17.0线性回归法计算得到消油剂对海湾扇贝的24 h、48 h、72 h和96 h半致死浓度(95%可信限)分别为1905(1570–2451 mg/L)、1293(1070–1556 mg/L)、1015(721–1348 mg/L)、846 mg/L(660–1020 mg/L)。0号柴油分散液对海湾扇贝的24 h、48 h、72 h和96 h半致死浓度(95%可信限)分别为36.57(29.42–48.96 mg/L)、23.10(21.07–25.39 mg/L)、14.99(13.66–16.41 mg/L)、11.31 mg/L(8.37–14.47 mg/L)。0号柴油乳化液对海湾扇贝的24 h、48 h、72 h和96 h半

表 1 消油剂对海湾扇贝的急性毒性实验  
Tab.1 The acute toxic effects of oil dispersant on *A. irradians*

浓度(mg/L) Concentration	24 h 死亡数(个) Mortality for 24 h (ind)			48 h 死亡数(个) Mortality for 48 h (ind)			72 h 死亡数(个) Mortality for 72 h (ind)			96 h 死亡数(个) Mortality for 96 h (ind)		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.53	0	0	0	0	1	0	2	2	1	2	3	2
0.75	0	0	0	1	1	2	3	3	3	4	4	5
1.06	1	2	3	3	4	4	6	5	4	7	7	6
1.50	2	4	4	6	6	7	8	6	8	9	7	9
2.12	5	6	6	8	8	9	10	10	9	10	10	10
3.00	8	7	9	10	9	10	10	10	10	10	10	10

表 2 0 号柴油分散液对海湾扇贝的急性毒性实验  
Tab.2 The acute toxic effects of 0 diesel oil on *A. irradians*

浓度(mg/L) Concentration	24 h 死亡数(个) Mortality for 24 h (ind)			48 h 死亡数(个) Mortality for 48 h (ind)			72 h 死亡数(个) Mortality for 72 h (ind)			96 h 死亡数(个) Mortality for 96 h (ind)		
0	0	1	0	0	2	1	2	1	1	3	3	0
0	0	0	1	0	2	2	3	2	2	5	3	2
2	2	1	3	2	3	5	5	4	6	6	7	5
3	3	2	4	5	5	7	8	6	8	9	7	6
5	4	5	8	7	7	10	9	9	10	10	10	9
9	8	6	10	9	9	10	9	10	10	10	10	10
3.00	8	7	9	10	9	10	10	10	10	10	10	10

表 3 0 号柴油乳化液对海湾扇贝的急性毒性实验  
Tab.3 The acute toxic effects of dispersed 0 diesel oil on *A. irradians*

浓度(mg/L) Concentration	24 h 死亡数(个) Mortality for 24 h (ind)			48 h 死亡数(个) Mortality for 48 h (ind)			72 h 死亡数(个) Mortality for 72 h (ind)			96 h 死亡数(个) Mortality for 96 h (ind)		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3.54	0	0	0	0	0	1	2	2	1	2	3	2
5.00	0	1	1	2	3	2	3	5	3	4	6	4
7.07	0	2	2	3	4	4	4	5	4	6	5	5
10.00	4	3	3	4	6	5	7	6	6	8	8	9
14.14	7	6	8	8	9	8	9	10	10	9	10	10
20.00	7	8	6	10	10	9	10	10	10	10	10	10

致死浓度(95%可信限)分别为 12.71(10.78–15.55 mg/L)、8.51(7.99–9.07 mg/L)、6.56(4.46–7.74 mg/L)、5.42 mg/L (4.51–6.29 mg/L)。

### 2.3 实验试剂对海湾扇贝的安全浓度

采用 96 h  $LC_{50}$  值乘以安全系数 0.1 作为安全浓度, 可以得到消油剂、0 号柴油分散液、0 号柴油乳化液对海湾扇贝安全浓度分别为 84.6、1.13、0.54 mg/L。

### 2.4 半致死浓度与暴露时间相关性

从实验结果可以看出, 半致死浓度与时间呈幂函数关系(图 1), 在受试液中暴露相同时间, 海湾扇贝

的半致死浓度从高到低依次为消油剂、0 号柴油分散液、0 号柴油乳化液, 说明 0 号柴油乳化液对海湾扇贝的毒性大于消油剂、0 号柴油分散液。

由图 1 显示, 消油剂对海湾扇贝半致死浓度与时间关系式为  $y=12242x^{-0.583}$ 。式中,  $y$  为半致死浓度,  $x$  为时间。0 号柴油分散液对海湾扇贝半致死浓度与时间关系式为  $y=564.37x^{-0.848}$ , 0 号柴油乳化液对海湾扇贝半致死浓度与时间关系式为  $y=89.987x^{-0.613}$ 。

## 3 讨论

虽然消油剂处理溢油会减轻溢油带来的环境影

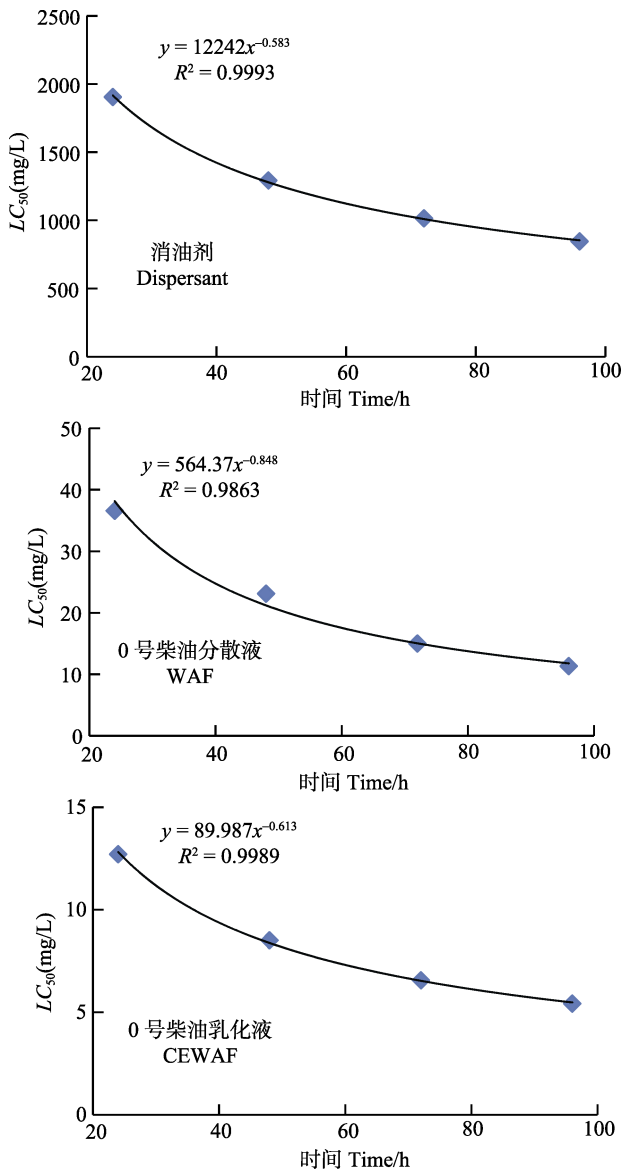


图1 海湾扇贝的  $LC_{50}$  与时间之间的关系  
Fig.1 The relationship between  $LC_{50}$  for *A. irradians* and time

影响,但由于水体中石油烃含量的增加及自身毒性的影响,会造成海洋环境的二次污染。近年来,我国学者研究了消油剂及其与油混合溶液对刺参(陈皓璿等, 2012)、菲律宾蛤仔(杨波等, 1991)、马粪海胆(吕福荣等, 2010)、红鳍东方鲀(于晓明等, 2014)的毒性效应。各种消油剂对不同的海洋生物均存在毒性,即使同种消油剂对不同海洋生物的毒性也存在差异。GM-2 消油剂对蒙古裸腹蚤 1 龄幼体、裸项栉虾虎鱼仔鱼、卤虫 *Artemia* 幼体和凡纳滨对虾仔虾的 24 h  $LC_{50}$  为 53.08、228.98、4132.79、9404.08 mg/L(王颖等, 2011), GM-2 牌消油剂对合浦珠母贝稚贝的 96 h  $LC_{50}$  为 1258 mg/L(邓岳文等, 2000), 本研究中 GM-2 消油剂对海湾扇贝的 24 h  $LC_{50}$  为 1905 mg/L, GM-2 消油

剂对以上几种生物的毒性由高到低依次为: 蒙古裸腹蚤 1 龄幼体>裸项栉虾虎鱼仔鱼>合浦珠母贝稚贝>海湾扇贝>卤虫幼体>凡纳滨对虾仔虾; 而同种海洋生物对不同消油剂的耐受能力也有所不同, 双象 I 号、碧浪宁 868 和 Correxit 9527 对菲律宾蛤仔的 96 h  $LC_{50}$  分别为 2140、46、500 mg/L(杨波等, 1991), GM-2 牌、海环牌、青岛牌消油剂对合浦珠母贝稚贝的 96 h  $LC_{50}$  分别为 1258、4469、2545 mg/L(邓岳文等, 2000)。杨波等(1991)根据 96 h  $LC_{50}$  将消油剂毒性分为 3 种: 1–100 mg/L 为高毒性; 100–1000 mg/L 为一般毒性; 1000–10 000 mg/L 为微毒性。按照此原则, 本研究中 GM-2 消油剂对海湾扇贝的 96 h  $LC_{50}$  为 846 mg/L, 其毒性为一般毒性; 0 号分散液对海湾扇贝的 96 h  $LC_{50}$  为 11.31 mg/L, 为高毒性; 0 号柴油乳化液对海湾扇贝的 96 h  $LC_{50}$  为 5.42 mg/L, 为高毒性。

消油剂处理溢油增加了碳氢化合物的数量, 尤其是较大分子的、不溶性的多环芳烃的数量, 从而引起毒性增加。石油乳化液(CEWAF)对水生生物的致死能力是消油剂、石油分散液(WAF)的几倍甚至上百倍(Hemmer *et al.*, 2011)。吕福荣等(2012)研究发现, 0 号柴油分散液对马粪海胆幼胆的 24 h、48 h、72 h、96 h 半致死浓度分别为 18.2、15.5、11.5、9.5 mg/L; 0 号柴油乳化液对马粪海胆幼胆的 24 h、48 h、72 h、96 h 半致死浓度分别为 11.7、9.1、7.4、5.1 mg/L。石油乳化液(CEWAF)可导致 45.4% 桡足类死亡, 远高于石油分散液(WAF)22.7% 的致死率(Hansen *et al.*, 2012); 而且石油乳化液(CEWAF)对糠虾、银河鱼、浮游生物的毒性研究(Hemmer *et al.*, 2011)也证明 CEWAF 毒性高于消油剂、WAF, 本研究结果与以上研究结论一致。此外, 消油剂提高了低分子量烃类在水中的溶解, 增加了油成分的生物可利用性, 导致海洋生物更易富集多环芳烃进而威胁生物健康及食品安全(Milinkovitch *et al.*, 2011)。因此在消油剂处理溢油污染时, 不能只考虑消油剂自身对生物及生态的影响, 应该全方位的考虑消油剂和溢油共同作用下的效力、乳化液的毒性。

目前, 我国对消油剂使用的管理较为宽松(宋春印, 1995), 有关消油剂特别是其与油类混合后对生态环境的直接危害与潜在影响研究还不够充分, 相关国家标准(GB 18188.1-2000)和行业标准(HY044-1997)均以鳊虎鱼或者斑马鱼成鱼 24 h 的半致死浓度 3000 mg/L 作为判断合格与否的毒性限量, 超过以上标准, 可以认为对成鱼的毒性很小。由于不同生物对消油剂的耐受力存在巨大差异, 这一标准并不能充分表征消油剂的生物毒性。如王颖等(2011)及本研究中消油剂的生物毒性显著高于以上两个标准。另外, 水体的温度、

盐度、pH 都会影响消油剂在水体中的溶解、分布、附着力等,从而影响到实验生物的敏感性。因而,上述两个标准中用来评价消油剂毒性的生物种类较为单一,不能全面有效地衡量消油剂对生物的影响程度。因此,需要从多种生物及其不同生长发育阶段、生理生态指标等方面开展进一步研究,为合理评估和使用消油剂,提供客观真实、全面系统的参考依据。

### 参 考 文 献

- 于晓明, 刘海映, 张国胜, 等. 消油剂对红鳍东方鲀幼鱼的急性毒性效应. 大连海洋大学学报, 2014, 29(2): 179-182
- 王颖, 孙丽萍, 魏社林, 等. 四种水生动物对GM-2消油剂的急性毒性反应. 实验动物与比较医学, 2011, 31(4): 259-265
- 邓岳文, 杨丰华, 湛波, 等. 钻井泥浆和消油剂对合浦珠母贝稚贝的急性毒性试验. 湛江海洋大学学报, 2000, 20(4): 23-28
- 吕福荣, 熊德琪. 消油剂对马粪海胆污染效应的研究. 海洋环境科学, 2010, 29(3): 328-331
- 宋春印. 渤海消油剂使用应纳人规范化管理. 海洋信息, 1995(4): 13-14
- 陈皓鋈, 房建孟, 印春生, 等. 经消油剂处理的石油水溶组分对刺参幼参的急性毒性研究. 海洋环境科学, 2012, 31(3): 414-417
- 杨庆霄, 高光智, 粟俊, 等. 化学消油剂对孔石莼生长影响的研究. 海洋学报, 1997, 19(3): 45-49
- 杨波, 关敏, 徐汉光, 等. 几种常用消油剂对海洋生物的毒性影响. 海洋环境科学, 1991, 10(4): 14-20
- 海洋石油勘探开发常用消油剂性能指标及检验方法 HY044-1997. 国家海洋局, 1997
- 黄逸君, 陈全震, 曾江宁, 等. 原油和消油剂对海洋桡足类的急性毒性效应. 应用与环境生物学报, 2010, 16(4): 566-571
- 韩方园, 杨开亮, 邢小丽, 等. 几种溢油分散剂对斑马鱼的急性毒性研究. 上海海事大学学报, 2010, 31(3): 86-90
- 溢油分散剂技术条件 GB18188.1-2000. 北京: 中国标准出版社, 2000
- Brooke J. The Dock and Harbour. London: Foxlow Publications, 1990
- Fingas M. Oil spill clean up (second edition). New York: Lewis Publishers, 2001
- Hansen BH, Altin D, Olsen AJ, *et al.* Acute toxicity of naturally and chemically dispersed oil on the filter-feeding copepod *Calanus finmarchicus*. Ecotoxicol Environ Safety, 2012, 86(6): 38-46
- Hemmer MJ, Barron MG, Greene, *et al.* Comparative toxicity of eight oil dispersants, Louisiana sweet crude oil(LSC), and chemically dispersed LSC to two aquatic test species. Environ Toxicol Chem, 2011, 30(10): 2244-2252
- Milinkovitch T, Kanan R, Thomas-Guyon H, *et al.* Effects of dispersed oil exposure on the bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons and the mortality of juvenile *Liza ramada*. Sci Total Environ, 2011, 409(9): 1643-1650
- Nordtug, T, Olsen AJ, Altin D, *et al.* Oil droplets do not affect assimilation and survival probability of first feeding larvae of North-East Arctic cod. Sci Total Environ, 2011(412-413): 148-153
- Wilson KG, Ralph PJ. Laboratory testing protocol for the impact of dispersed petrochemicals on seagrass. Mar Poll Bull, 2012, 64(11): 2421-2427

(编辑 江润林)



## The Acute Toxicity of Dispersant and Chemically Dispersed Oil on the *Argopecten irradians*

XU Yong<sup>1,2</sup>, ZHU Jianxin<sup>1</sup>①, JIANG Tao<sup>1</sup>, LIU Wenwen<sup>1,2</sup>

(1. Key Laboratory for Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100)

**Abstract** Chemical dispersant has rapidly gained popularity in controlling unwanted oil spill in the aquatic environment, however, it exerts adverse effects on the aquatic organisms. The acute toxicity of chemical dispersant on fish, algae and zooplanktons has been widely investigated in previous studies. In the contrast, the acute toxic effects on shellfish remains unclear. In this study, we examined the acute toxic effects of chemical dispersant, dispersed 0 diesel oil (WAF) and chemically dispersed 0 diesel (CEWAF) on *A. irradians*. The test was performed within 96h, and the concentrations of chemical dispersant, WAF and CEWAF ranged from 0.50–3.00, 5.88–58.80 and 3.54–20.00 mg/L respectively. The  $LC_{50}$  values (within 95% confidence intervals) of dispersant in *A. irradians* were 1905, 1293, 1015 and 846 mg/L in the time courses of 24 h, 48 h, 72 h and 96 h respectively. The  $LC_{50}$  values of WAF were 36.57, 23.10, 14.99 and 11.31 mg/L corresponding to different time courses, and the values of CEWAF were 12.71, 8.51, 6.56 and 5.42mg/L respectively. As the time course increased from 24 h to 96 h, the median lethal concentrations ( $LC_{50}$ ) of chemical dispersant, WAF and CEWAF were decreased accordingly. The median lethal concentration and time course appeared to be highly correlated. The functions of  $LC_{50}$  (y) of dispersant, WAF and CEWAF against time (x) were  $y=12242x^{-0.583}$ ,  $y=564.37x^{-0.848}$ , and  $y=89.987x^{-0.613}$  respectively. For the same exposure time, the order of the median lethal concentrations was dispersant > WAF > CEWAF, suggesting that the acute toxicity of CEWAF on *A. irradians* was higher than dispersant and WAF.

**Key words** *Argopecten irradians*; Dispersant; No.0 diesel oil; Acute toxicity

① Corresponding author: ZHU Jianxin, E-mail: zhujx@ysfri.ac.cn

# 栉江珧(*Atrina pectinata*)催产方法及 幼虫培养条件\*



郑言鑫<sup>1,2</sup> 杨爱国<sup>1①</sup> 吴彪<sup>1</sup> 孙秀俊<sup>1</sup> 周丽青<sup>1</sup>  
李东明<sup>1,2</sup> 董迎辉<sup>3</sup>

- (1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;  
2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306;  
3. 浙江省水产种质资源高效利用技术研究重点实验室 浙江万里学院 宁波 315100)

**摘要** 为探究江珧亲贝的最佳催产方法及减少工厂化育苗过程中栉江珧幼虫上浮粘连现象,分别研究了不同催产方法对受精率和胚胎发育的效果,不同培育密度和培育方式对幼虫生长发育的影响。结果显示,阴干4 h后用升温3℃的次氯酸钠中和海水,可诱导亲贝大量排放精卵。并且对卵子受精及胚胎发育影响较小。幼虫培养实验结果显示,幼虫最适培育密度为1 ind/ml,在降低幼虫培育密度的同时,在培育池内安装造浪泵,使培育水体流动起来,能够有效减少幼虫的相互粘连提高幼虫的成活率。

**关键词** 栉江珧;催产;胚胎发育;幼虫培育;上浮粘连

**中图分类号** Q178.53 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)06-0127-07

栉江珧(*Atrina pectinata*)是一种广泛分布于温、热带近海海域的大型底栖双壳贝类,在我国北起辽东半岛南至琼州海峡均有分布,具有较高的经济和药用价值(王如才等,2008)。我国学者对于栉江珧的研究大约开始于20世纪60年代,已有的资料主要集中在分类学、形态学、资源、生化和繁殖生物学等方面(王祯瑞,1995;王如才等,2008;谢开恩等,1980;江宇等,1981;余祥勇等,1999;王梅芳等,2000a,2000b,2000c,2000d;邱盛尧等,2000),关于栉江珧人工催产和幼虫培育条件的研究报道较少(林笔水,1987;郭世茂等,1987;曾祥玲等,2005;周维武等,2006)。Leal-Soto等(2011)报道了有关*Atrina maura*的养殖研究获得了成功,并且指出江珧科其他物种也适合作为养殖品种进行广泛的养殖。目前,栉江珧人工育苗还处于试验阶段(任建峰等,2005),尚未见大规模人工育苗成功的报道,存在的主要难题是栉江珧自然排放产卵量低不能满

足生产需要,人工催产困难;幼虫上浮粘连会导致幼虫大量死亡(张红云等,2009)。因此开展规模化人工育苗技术的研究,解决人工育苗的技术瓶颈是保障栉江珧资源可持续利用和发展的重要措施。

本文研究了不同人工催产方法对亲贝产卵率和受精率的影响,不同幼虫培育密度与培育方法对幼虫生长成活率的影响,旨在实现栉江珧大规模人工育苗提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 亲贝来源及促熟

亲贝于2014年5月采自山东海区,选择活力强、贝壳无破损的栉江珧(壳长20 cm以上),将表面洗刷干净置于室内升温促熟。亲贝培养密度为5 ind/m<sup>3</sup>,投喂硅藻、小球藻、扁藻混合饵料,每天投喂3~4次,

\* 青岛市战略性新兴产业培育计划项目(13-4-1-60-hy)和浙江省水产种质资源高效利用技术研究重点实验室开放基金资助项目(KL2013-3)共同资助。郑言鑫, E-mail: zhengyanxin1989@163.com

① 通讯作者: 杨爱国, 研究员, E-mail: yangag@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-12-09, 收修改稿日期: 2014-12-30

根据亲贝的摄食情况适量增减饵料,每天定时投喂螺旋藻对亲贝进行营养强化。促熟初始温度为 16℃,暂养 2 d 后以每天升温 0.5℃ 的幅度进行升温促熟,期间连续升温 5 d 后恒温稳定 2 d 再升温,升至 23℃ 恒温培育至性腺成熟,显微镜下检查亲贝性腺的成熟程度。

### 1.2 不同催产方法

选取性腺发育成熟的栉江珧雌、雄亲贝各 90 只,均随机分成 S1、S2、S3 三组,每组 3 个重复,催产在 200 L 圆形塑料桶中进行。

将三组亲贝同时进行阴干和流水刺激,具体如下:将所有亲贝扇面向下倒置于阴凉处 2 h 使其充分失水后,平放 2 h,然后将亲贝移至流水(温度 22℃)中刺激 0.5–1 h。

各组处理如下: S1 组为 26℃ 海水刺激; S2 组为硫代硫酸钠中和后的次氯酸钠(20 mg/L) 26℃ 海水刺激; S3 组为经过紫外线照射的 26℃ 海水刺激,剂量为 750 mW·h/dm<sup>3</sup>,照射剂量(mW·h/dm<sup>3</sup>)=紫外线灯管总功率(mW)×照射时间(h)÷被照射水体(dm<sup>3</sup>)。

其中 S2 组,向每升 26℃ 海水中加入 20 mg 次氯酸钠,处理 12 h 后用硫代硫酸钠中和。精卵排放后,同组精卵混合进行人工授精,每隔 0.5 h 搅动 1 次,直至发育至具有游泳能力的担轮幼虫,胚胎孵化温度为 24℃。测定受精率、胚胎孵化率时,将样品水体混合均匀后取 5 ml 在显微镜下计数,根据以下公式计算各指标,各组中每个重复计数 3 次,统计分析各组卵子的受精及胚胎发育状况。

产卵率=产卵的雌贝数/亲贝总数×100%

排精率=排精的雄贝数/亲贝总数×100%

受精率=分裂受精卵个数/卵子总数×100%

胚胎孵化率=担轮幼虫个数/受精卵总数×100%

另取性腺发育成熟的雌、雄亲贝各 10 只,人工解剖获得卵子和精子,经过滤海水冲洗干净后在温度为 24℃ 的氨海水(氨水浓度为 0.05‰–0.1‰)中人工授精,受精后每 30–50 min 换水清洗 1 次,清洗 3 次,每隔 0.5 h 搅动 1 次,直至幼虫具有游泳能力,取样方法同上,统计分析受精率和胚胎孵化率。

### 1.3 不同培养密度对幼虫发育的影响

为研究培养密度对幼虫成活率的影响,本研究采用单因素多水平试验进行幼虫不同培养密度的研究。密度梯度分别为: 0.5、1、2、4、7、10 ind/ml,分别编号为 D1、D2、D3、D4、D5、D6,每个梯度 3 个平

行。幼虫培育在 200 L 圆形塑料桶中,保持连续充气培育,每天早晚各换水 1 次,换水后投喂金藻(注意观察幼虫胃内含物的状况及时增减饵料),每隔 2 d 倒桶 1 次,并观察记录幼虫的生长成活状况。取样时将样品水体混合均匀,取 40 ml 显微镜下计数,各组中每个重复计数 3 次。

成活率=幼虫密度/幼虫初始密度×100%

### 1.4 不同培养方式对幼虫成活率的影响

为有效解决工厂化育苗过程中幼虫上浮粘连等问题,研究了不同幼虫培养方式对幼虫存活和粘连的作用效果。实验用幼虫培育池规格为: 5 m×3 m×1 m,培养密度为 1 ind/ml。培养方式分 C1、C2、C3、C4 四种不同的模式,每组 3 个平行。具体为: C1 组,在培育池底均匀安放 6 个气石,避免充气死角; C2 组,在培育水体上层的水泥池上分别安装 4 台造浪泵,造浪泵交错相对安装(图 1),使培育水体流动起来; C3 组,将 6 根气线直接放入培育池底充气,气线末端均匀摆放在培养池中,避免充气死角; C4 组,在培育池一角中上层安装 1 台射流泵,通过射流泵使水体流动起来,获得单方向的顺时针水流。C1、C3 组用风量为 12.5 m<sup>3</sup>/min、风压为 467 kPa 的罗茨鼓风机充气。C2 组造浪泵设备型号: JVP-402,生产厂家: 森森集团股份有限公司,功率: 48W,最大流量: 24000 L/h。C4 组射流泵最大流量: 1×10<sup>5</sup> L/h。投饵等日常管理如 1.3 中所述,取样、统计方法与不同密度组实验相同,统计分析幼虫成活率。

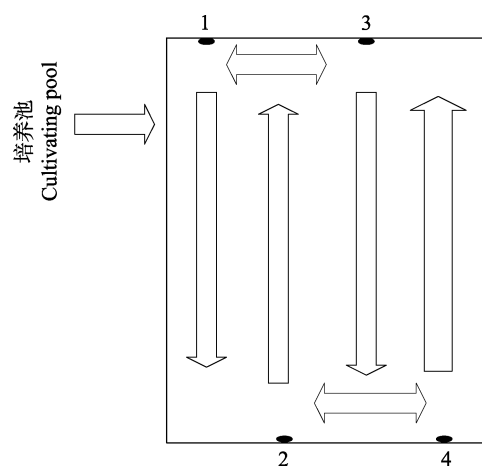


图 1 培养池中造浪泵安装位置

Fig.1 The position of the wave machine in cultivating pool

(1、2、3、4 为造浪泵的安装位置,箭头表示水流方向)  
(1、2、3、4 is the location of the surf pump, arrows indicate the direction of water flow)

## 2 结果

### 2.1 不同催产方法效果比较

催产方法对精卵排放、受精率、胚胎发育的影响, 结果如图 2 所示。S2 组, 中和的次氯酸钠升温海水对栉江珧雌、雄亲贝的催产效果最好, 平均产卵率和排精率分别为 56.67% 和 63.33%; S3 组, 紫外线升温海水催产效果次之, 平均产卵率为 43.33%, 排精率为 56.67%; 升温海水效果较差, 平均产卵率、排精率分为 36.67%、43.33%; SPSS 分析显示: 产卵率方面, S1 与 S2、S3 组差异显著( $P < 0.05$ ), S2 组与 S3 组差异不显著( $P > 0.5$ ); 排精率方面, S2 组与 S1、S3 组差异显著( $P < 0.05$ ), 而 S1 组与 S3 组差异不显著( $P > 0.05$ )。在受精率方面, 升温海水处理组较好, 受精率为 81.51%, 中和的次氯酸钠处理组次之(79.81%), 紫外线水最差(67.08%), S1 组与 S2 组差异不显著( $P > 0.05$ ), S3 组与 S1、S2 组差异显著( $P < 0.05$ )。S1、S2、S3 三组受精卵在 24℃ 海水中孵化, 取样观察各组胚胎发育状况, 升温海水和中和的次氯酸钠处理组胚胎发育率分别为 79.91% 和 77.88%, 差异不显著( $P > 0.05$ ), 但与紫外线水组(胚胎发育率为 61.49%)差异显著( $P < 0.05$ )。不同催产方法下每只亲贝排放配子量结果如图 3 所示, S1 组中雌贝平均产卵量为  $1.26 \times 10^7$  粒/只, 雄贝排精量为  $3.94 \times 10^8$  粒/只; S2 组产卵量为  $1.97 \times 10^7$  粒/只, 排精量为  $4.93 \times 10^8$  粒/只; S3 组, 产卵量为  $2.18 \times 10^7$  粒/只, 排精量为  $4.86 \times 10^8$  粒/只。S2、S3 组平均产卵量和排精量差异不显著( $P > 0.05$ ), 但与 S1 组差异显著( $P < 0.05$ )。

解剖获得的精子和卵子清洗混合后, 卵子的受精

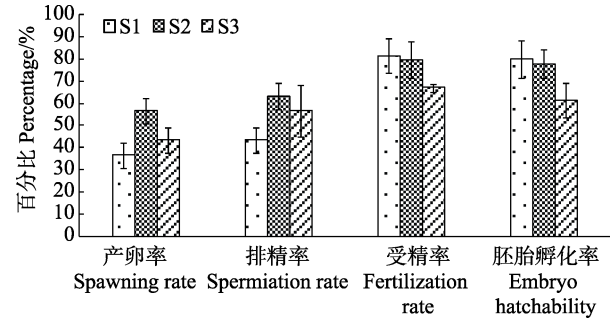


图 2 不同催产方法对配子排放及受精率、孵化率的影响  
Fig.2 The effects of different methods on spawning and spermiation rate, fertilization rate and embryo hatchability

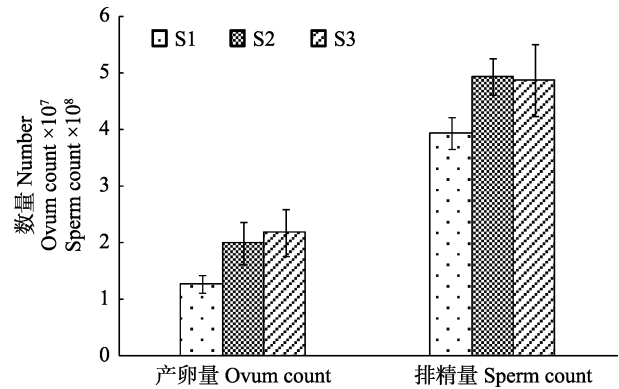


图 3 不同催产方法得到的配子量(平均每亲贝)  
Fig.3 The amount of gametes induced by different methods (the average individual)

率比较低, 仅为 62.47%, 其胚胎孵化率也较低, 且胚胎发育畸形率较高, 虽然小部分能发育到 D 形幼虫, 但是 D 形幼虫初期成活率较低。

### 2.2 不同培养密度对幼虫发育的影响

幼虫在不同密度培养下的成活率如图 4 所示。结

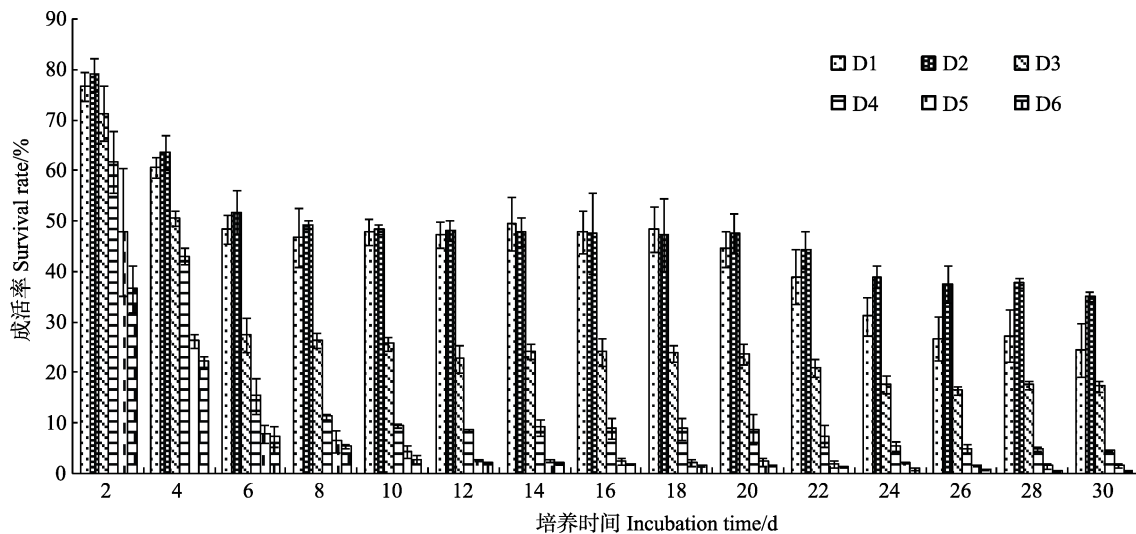


图 4 不同培养密度培养幼虫成活率变化

Fig.4 Survival rates of *Atrina pectinata* larvae at different stocking densities

果显示,各组幼虫在孵化0–6 d出现第1个死亡高峰,密度较低的D1、D2、D3和D4组存活率基本保持稳定,而密度较高的D5和D6组在6 d后成活率继续降低,至10 d基本稳定,但D4组成活率低。各组幼虫的第2个死亡高峰出现在孵化后20–24 d,此时高密度D5、D6组几乎全部死亡。SPSS分析结果显示,D1组与D2组成活率0–20 d差异不显著( $P>0.05$ ),20–30 d成活率差异显著( $P<0.05$ ),D2组与D3、D4、D5、D6组成活率差异显著( $P<0.05$ ),D3组与D4、D5、D6组除第2天成活率差异显著( $P<0.05$ ),D4组与D5、D6组成活率差异显著( $P<0.05$ ),D5与D6组除第4天外,差异都不显著( $P>0.05$ )。

不同密度下幼虫平均生长变化如图5所示。研究表明,幼虫在前期1–12 d生长相对较慢,后期14–28 d生长较快。发育前期不同密度组壳长相差并不大,随着培养时间的增长,幼虫壳长差别逐渐变大。SPSS分析结果显示,前2 d各密度组间平均壳长差异不显著( $P>0.05$ ),D1与D2组除第18天外差异均不显著( $P>0.05$ ),D2与D3组除第14–18天外差异均不显著( $P>0.05$ ),D2组与D4组从第10天开始平均壳长差异显著( $P<0.05$ ),D2组与D5、D6组从第2天开始平均壳长差异显著( $P<0.05$ ),D5与D6组平均壳长差异不显著( $P>0.05$ )。D4、D5、D6三组在培养20 d以后其平均壳长明显小于D1、D2、D3三组,且差异显著( $P<0.05$ )。

综上所述,培育密度为1 ind/ml时的生长最快,成活率高,最终为35.00%,密度为0.5 ind/ml(最终成活率为24.44%)和2 ind/ml(最终成活率为17.22%)次之,其他高密度培养的幼虫成活率较低、生长慢,且密度越高成活率越低。

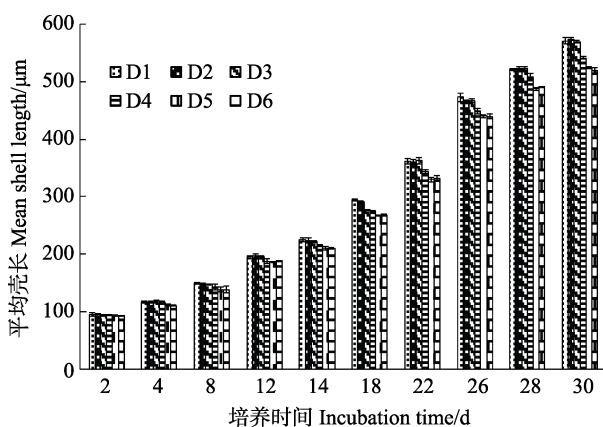


图5 不同培养密度条件下幼虫壳长变化  
Fig.5 Shell length of *Atrina pectinata* larvae at different stocking densities

### 2.3 不同培养方法对幼虫成活率的影响

在水泥池中采用不同培养方式培养栉江珧幼虫,通过测定密度变化计算其成活率,结果如图6所示。幼虫期0–6 d都有一个明显的死亡高峰,而后C2、C3组成活率稳定,C1、C4组成活率持续下降,直至几乎完全死亡。结果显示,C2组安装造浪泵培养效果较好,C3组无气石充气培养效果次之,C1组气石充气 and C4组安装射流泵培养效果较差。SPSS分析结果显示,C2组与C1、C3、C4组成活率差异显著( $P<0.05$ ),C3组与C1、C4组之间成活率差异显著( $P<0.05$ ),C1组与C4组差异不显著( $P>0.05$ )。

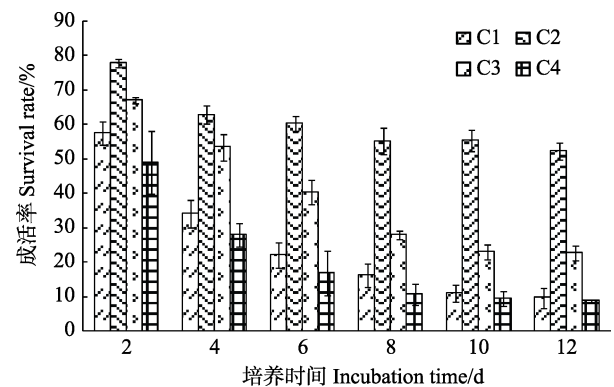


图6 不同培养方法培养前期幼虫成活率变化  
Fig.6 Survival rate of early larvae at different cultural methods

## 3 讨论

### 3.1 不同催产方法效果比较

本研究表明,用中和的次氯酸钠升温海水对栉江珧亲贝进行催产具有较好的效果,亲贝配子排放率较高,配子排放量大,且对受精卵的胚胎发育影响较小,与其他几种方法差异显著,适合栉江珧工厂化育苗过程中亲贝的催产。紫外线照射海水组效果差,紫外线照射海水可使水中的氧气激发成臭氧,臭氧迅速分解产生原子态氧,原子态氧可与海水中的卤化物反应生成卤代化合物(严正凇等,2007),这些卤代化合物对亲贝产卵排精有一定的刺激作用,但卤代化合物可能对精卵结合及受精卵的胚胎发育也有一定的影响,从而导致卵子受精率低及胚胎发育的畸形率较高。升温海水诱导亲贝排放虽然胚胎发育较好,但是亲贝配子排放率低,产卵量也较少,不适合应用于大规模工厂化育苗。

人工解剖雌、雄亲贝得到的精卵要在氨海水中受精,受精后每隔20–30 min换水洗卵1次,一般换水

2-3 次(曾祥玲等, 2005), 这样可以尽可能的清除杂质, 减少对卵子受精及受精卵胚胎发育的影响。虽然人工解剖亲贝可以获得大量精子和卵子, 但这些精子和卵子并不全是完全成熟的, 其中混有很多未发育成熟的配子, 这些配子往往不能正常受精, 另外解剖得到的一些精子活力也比较差, 最终导致得到的受精卵胚胎发育率较低, 畸形率较高。

栉江珧 1 龄即可性成熟(邱盛尧等, 2000), 因此选择亲贝时注意挑选 1 龄以上的作为亲贝, 确保亲贝性腺可以发育成熟。催产前处理时, 阴干要先将亲贝倒立, 这样可以使种贝体内的水分充分流失, 但是倒立时间不超过 2 h, 否则会使亲贝失水过多, 不利于亲贝的排精产卵, 甚至还会导致亲贝死亡。升温海水一般要求高于培育温度 3-4℃(于瑞海等, 2010), 这样对亲贝的刺激效果较好。刺激亲贝产卵时, 刺激不应过大, 否则亲贝会将未成熟的生殖细胞排出, 造成受精率及胚胎发育率较低。将精卵混合时, 应密切观察加入精子的量, 精子过少卵子不能受精, 精子过多造成多精入卵导致胚胎畸形率过高。

### 3.2 幼虫培养密度对幼虫发育的影响

在不同密度培养幼虫的试验中, 出现两个死亡高峰, 由于幼虫间的粘连及由幼虫开始进入壳顶期, 形成了幼虫前 6 d 出现的第 1 个死亡高峰, 幼虫在培养 24 d 左右开始由壳顶幼虫后期进入匍匐幼虫期, 形成第 2 个死亡高峰。栉江珧幼虫培养密度越高, 幼虫粘连现象越严重, 因此高密度组幼虫成活率较低。高密度组由于前期的相互粘连造成幼虫的面盘损伤及水体中碎屑较多, 换水倒池也无法将其彻底去除, 使得幼虫在后期成活率较低。在栉江珧幼虫培养过程中降低幼虫的密度, 可以降低幼虫相遇的几率, 一定程度上减少粘连。因此低密度培养有较高的成活率, 但是密度过低不利于大规模苗种生产。

研究各密度组幼虫的生长发现, 按照平均壳长的变化可分为两个阶段: 慢速生长期(1-12 d)和快速生长期(14-28 d), 在培养幼虫第 12 天, 高密度 D4、D5、D6 组与 D1、D2、D3 组的平均壳长开始出现显著差异, 发育延缓现象逐渐明显。高密度培养栉江珧幼虫会加剧幼虫间及幼虫与碎屑间的粘连, 幼虫粘连导致幼虫面盘不能游动无法摄食, 影响幼虫的生长, 最终导致幼虫发育迟缓甚至死亡。不同密度组幼虫前期虽然平均壳长差异不显著, 但是各密度组成活率差异显著, 后期高密度组发育延缓现象明显, 因此幼虫不适合高密度培养。

幼虫培养密度的合理安排对工厂化育苗至关重要

要, 培养密度过高影响浮游幼虫的生长、存活及附着变态, 最终导致幼虫培育时间延长甚至幼虫死亡; 培养密度过低, 幼虫虽然成活率较高, 但是不利于工厂化苗种培育。栉江珧幼虫有粘连的习性, 控制栉江珧幼虫培养密度是解决幼虫上浮粘连问题的关键(王海涛等, 2006)。实验证明, 幼虫培育最佳密度为 1 ind/ml。此密度条件下, 既能提高栉江珧幼虫成活率又能充分利用培育水体, 适合应用于大规模苗种生产。

### 3.3 幼虫培养方式对幼虫成活率的影响

在幼虫培养池中上层加装造浪泵, 使培养池中的海水流动起来模拟幼虫在自然条件下的生活状态。水流可以将粘连在一起的幼虫冲散开, 减少幼虫的粘连, 从而减少幼虫因粘连而造成的死亡; 而海水本身起到一定的缓冲作用, 可以减少造浪泵对幼虫的损伤, 培养幼虫效果较好。射流泵虽然也能形成水流, 但是射流泵喷射出的水流带有大量小气泡, 这些气泡会将水中的碎屑等杂质聚集起来, 幼虫更加容易和这些碎屑粘连在一起导致幼虫的死亡。带气石充气也会在水里形成小气泡, 但其数量相对射流泵较少, 造成幼虫粘连也较少。此外, 这种方式对水体的搅动效果较差, 水体流动性相对较差, 幼虫彼此相遇机会较大, 因此栉江珧幼虫的成活率也较低。无气石充气方式是将气线直接放入池底, 在水体中形成较大的气泡, 这种充气方式比较剧烈, 培育水体在一定程度上被搅动起来, 因此相对带气石充气培养方式效果较好。另外采用无气石充气方式培养幼虫时, 应该注意气线的摆放位置, 一定要将气线摆放均匀, 使培养池中的水充分流动起来。与 200 L 圆形塑料桶相比, 水泥池气石充气培养效果较差, 因 200 L 圆形塑料桶水体较小, 充气能使海水充分的搅动起来, 幼虫粘连现象相对较少, 而水泥池培养水体较大, 充气不能使水体充分搅动, 幼虫粘连现象明显, 因此水泥池培养效果相对较差。不同培养方法培养幼虫, 8 d 以后成活率基本稳定, 而无气石充气组和射流泵组的成活率低, 幼虫培养池内幼虫密度很低, 此时实验结果误差较大, 实验结果即可说明问题, 因此不同培养方法实验培养幼虫 12 d。在栉江珧幼虫培养池安装造浪泵模拟栉江珧幼虫在自然条件下的生活状态, 可以减少幼虫的粘连, 提高幼虫的成活率, 适合工厂化育苗中幼虫的培育。

幼虫上浮粘连是栉江珧不同于其他贝类幼虫的一个显著特征, 同时也是目前制约栉江珧工厂化育苗最突出的问题之一。浮游期的幼虫面盘会分泌一些黏液, 导致幼虫之间及幼虫和碎屑之间相互粘合在一起无法游动摄食, 造成幼虫的大量死亡, 死亡的幼虫会

破坏水质,从而进一步加剧幼虫死亡,最终导致幼虫成活率进一步降低。

栉江珧幼虫从 D 形幼虫开始到附着变态都会漂浮于水表面,形成一层油状的“幼虫膜”(林笔水等,1987)。同时观察到不少漂浮幼虫体内含有气泡,这种现象在 D 形幼虫前期最为明显,且在高密度、高温时培养幼虫分泌黏液相互粘连现象较明显(于瑞海等,2007)。增加换水体积及倒池次数在一定程度上可以减少粘连(于瑞海等,2010),定期施加 1–2 g/m<sup>3</sup> 的抗菌素抑菌也可预防幼虫粘连(周维武等,2006)。

栉江珧幼虫培育过程中浮游时间长,要减少其上浮粘连现象的发生,(1)要控制幼虫培育密度,密度一般不超过 1 ind/ml;(2)改进传统的培养方式,借助造浪泵等使培育水体流动起来,模拟幼虫在自然条件下的生活状态,借助海水将幼虫冲散,减少粘连;(3)增加换水量,及时倒池。倒池可以及时清除培育池里的残饵、粪便和其他碎屑,防止幼虫与其发生粘连;(4)保证投喂优质干净的饵料,为幼虫的成长提供保障,如果投喂饵料时带进碎屑杂质会加剧幼虫的粘连死亡。

## 参 考 文 献

- 于瑞海,王昭萍,李琪,等. 江珧工厂化育苗技术研究. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2007, 37(5): 704–708
- 于瑞海,王昭萍,李琪,等. 栉江珧亲贝室内升温促熟培育技术的研究. 海洋湖沼通报, 2010(1): 31–35
- 王如才,王昭萍. 海水贝类养殖学. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2008, 532–534
- 王海涛,王世党,周维武,等. 栉江珧室内人工育苗技术. 水产养殖, 2006, 27(2): 34–36
- 王祯瑞. 中国近海江珧科的初步研究. 海洋科学集刊, 1995(5): 30–42
- 王梅芳,余祥勇,叶富良. 北部湾及附近海域栉江珧性腺发育研究. 广西科学, 2000a, 7(2): 140–143
- 王梅芳,余祥勇,王如才. 栉江珧生殖细胞的发生. 青岛海洋大学学报(自然科学版), 2000b(3): 441–446
- 王梅芳,余祥勇,杨书婷,等. 无裂栉江珧种内同工酶表型差异的比较研究. 热带海洋, 2000c, 19(4): 45–50
- 王梅芳,余祥勇,杨荣权,等. 二色裂江珧 EST 和 SOD 同工酶组织特异性研究. 湛江海洋大学学报, 2000d, 20(1): 5–8
- 任建峰,杨爱国. 栉江珧研究现状及开发利用前景. 海洋水产研究, 2005, 26(4): 84–88
- 江宇,陈炳能. 福建沿海栉江珧的生态习性观察. 福建水产, 1981(1): 27–29
- 严正凜,关瑞章,胡家财,等. 紫外线照射剂量对九孔鲍胚胎及幼虫的影响. 台湾海峡, 2007, 26(3): 404–409
- 邱盛尧,杨建敏,张锡佳,等. 栉江珧的繁殖生物学. 水产学报, 2000, 24(1): 28–31
- 余祥勇,王梅芳,杨书婷,等. 有棘和无棘两种表型江珧同工酶差异的比较. 湛江海洋大学学报, 1999, 19(2): 5–8
- 张红云,严正凜,张静. 栉江珧生物学及人工育苗研究进展. 上海海洋大学学报(自然科学版), 2009, 18(5): 623–628
- 林笔水,何进金,韦信敏,等. 栉江珧人工育苗的初步研究. 台湾海峡, 1987, 6(3): 260–267
- 周维武,于瑞海. 栉江珧人工升温繁育技术要点. 中国水产, 2006(4): 49–51
- 曾祥玲,庞田胜,陈小宏. 栉江珧人工育苗试验. 海洋科学, 2005, 29(8): 53–55
- 谢开恩,陈炳能,陈世杰. 泉州湾栉江珧调查研究报告. 福建水产科技, 1980(2): 10–23
- Leal-Soto SR, Barraza-Guardado R, Castro-Longoria J, et al. Cultivation of pen shells: An example with *Atrina maura* in northwestern Mexico. J World Aquacult Soc, 2011, 42(6): 789–800

(编辑 江润林)

## Studies on the Spawning Inducement and the Conditions for the Larval Culture of *Atrina pectinata*

ZHENG Yanxin<sup>1,2</sup>, YANG Aiguo<sup>1①</sup>, WU Biao<sup>1</sup>, SUN Xiujun<sup>1</sup>, ZHOU Liqing<sup>1</sup>,  
LI Dongming<sup>1,2</sup>, DONG Yinghui<sup>3</sup>

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University Shanghai 201306; 3. Zhejiang Key Laboratory of Aquatic Germplasm Resources, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100)

**Abstract** *Atrina pectinata* is a large deepwater mollusk that is widely distributed in temperate and tropical ocean waters. The China costal line, from the Liaodong peninsula in the north to the Qiongzhou strait in the south, is a major habitat of *Atrina pectinata*. The provinces along the costal line included Liaoning, Shandong, Fujian and Guangdong, etc. This bivalve animal possesses high economic and medicinal values. The dried scallop of *A. pectinata* is large in size and has a tender texture and delicious taste. In recent years the overfishing has caused a rapid drop in the natural resource of *Atrina pectinata* and thus hindered the breeding in the aquaculture industry. The difficulty in the spawning inducement and the larval adhesion during culture has been the major issues in the large-scale production of *A. pectinata* seed. In the present study we explored different inductive methods and identified the optimal one to improve the fertilization rates and the embryonic development. Our study suggested that the combination of thermal stimulation (3°C rise in the temperature) and sodium hypochlorite would neutralize the seawater and could be the optimal spawning-inducing method without noticeable impact on the fertilization rate and the embryonic development. To reduce the larval adhesion during the breeding, we adopted a lower breeding density and changed the incubation method. It was found that the larval adhesion could be effectively avoided at a lower larval density, and that at the density of 1 ind/ml the larval survival rate reached the maximum. Moreover, we also changed the cultural method for the *A. pectinata* larvae by equipping the cultivating pool with a surf pump. The surf pump generated a water flow inside the pool that prevented the larval adhesion and thus improved the larval survival rates. Our study provided a valuable tool for the large-scale production of the seed of *A. pectinata*.

**Key words** *Atrina pectinate*; Spawning inducement; Embryonic development; Larval culture; Adhesion

① Corresponding author: YANG Aiguo, E-mail: yangag@ysfri.ac.cn



# 基于支持向量机的新鲜与解冻许氏平鲷 (*Sebastes schlegeli*)近红外光谱鉴别技术\*



刘申申<sup>1,2</sup> 孙永<sup>1</sup> 周德庆<sup>1①</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 上海海洋大学食品学院 上海 201306)

**摘要** 本研究建立了一种近红外光谱技术,用于鉴别鱼类是否经过解冻处理。首先测定了120个样品的近红外光谱,通过主成分分析对原始光谱数据进行降维处理,再结合支持向量机建模进行分类鉴别。对所有建模样品的主成分1和2按得分值绘制得分图,进行分析聚类,并将前10个主成分的得分值作为支持向量机的输入,优化惩罚参数 $c$ 和核函数参数 $g$ ,对90个样本训练;用未知的30个样本进行判别验证,建立鉴别鲜、冻许氏平鲷的支持向量机分类模型,预测准确率达100%。研究表明,近红外光谱技术结合主成分分析和支持向量机可以作为一种简便、快速、准确的方法用于判断鱼类是否经过解冻处理。

**关键词** 近红外光谱;许氏平鲷;解冻;主成分分析;支持向量机;鉴别

**中图分类号** TS254 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)06-0134-05

鱼类富含水分和营养物质,容易发生腐败变质,对保鲜保存的要求较高。冷冻作为鱼类等水产品长期贮藏的方法,可大大延长货架期,但易造成品质的下降。冷冻鱼市场价格比新鲜鱼低,一些商贩常常将冷冻鱼解冻后冰藏,冒充新鲜鱼出售,不仅损害了消费者的合法权益,更不利于市场的公平竞争。因此,为了保护消费者的利益,保障水产品贸易的有序进行,亟需建立一种快速鉴别鱼类是否经过冷冻处理的方法。

目前,已建立一些比较成熟的新鲜鱼鉴别方法(Bozzetta *et al.*, 2012; Duflos *et al.*, 2002; Baixas-Nogueras *et al.*, 2007),但这些方法存在费时、成本高、需要专业人员操作等缺点。近红外光谱法(Near-infrared spectroscopy, NIR)因其快速、简便、成本低、无损和多组分同时测定等优点受到人们的重视,已经越来越多地应用于鱼类及其制品的品质评价,包括化学组成测定(徐文杰等, 2013; Khodabux *et al.*, 2007)、微生物快速测定(Lin *et al.*, 2006; Sone *et al.*, 2011)、感官评价(Isaksson *et al.*, 2002)以及鉴别(Uddin *et al.*, 2004、

2005)等方面,而国内在判断鱼类是否经过冷冻处理的文献报道较少。

近红外光谱主要来源于分子振动的倍频与合频,含有大量数据信息,但很难从光谱图中直接得出物质组成信息,必须依靠化学计量学方法(梁逸曾等, 2012)。主成分分析(Principal component analysis, PCA)主要是对数据进行降维处理,将原变量转化为少数综合变量,且这些变量能表征原变量信息,相互正交(梁逸曾等, 2012; 张菊华等, 2011)。支持向量机(Support vector machine, SVM)是Vapnik于1995年新提出的学习算法(Vapnik, 1995),它采用结构风险最小化原理,兼顾训练误差和泛化能力,在解决小样品、非线性、高维数、局部极小值等模式识别问题中表现出多方面的优势(邓乃扬等, 2004; 李国正等, 2004)。

许氏平鲷(*Sebastes schlegeli*),俗称黑头鱼,属鲷形目、鲷科、平鲷属,一般体长20–30 cm,吻较尖,背及两侧灰褐色,为冷温性近海底层鱼类,广泛分布于中国黄渤海和东海,其肉质细嫩、低脂肪、软硬适

\* 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(20603022013018)资助。刘申申, E-mail: shen616@126.com

① 通讯作者:周德庆,研究员, E-mail: zhoudeqing@ysfri.ac.cn

收稿日期:2014-12-01, 收修改稿日期:2015-03-10

口, 深受人们的喜爱(张德胜等, 2012)。本研究选取许氏平鲈作为样品, 采用 PCA 和 SVM 相结合的方法建立新鲜与解冻许氏平鲈的近红外光谱鉴别技术。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

从青岛某市场购买不同规格的鲜活许氏平鲈 60 尾。样品重量为 269.00–720.20 g/尾, 体长为 21.00–29.90 cm/尾。

### 1.2 主要仪器

傅里叶变换红外光谱仪(Bruker Tensor 27, 德国布鲁克光谱仪器公司), 近红外积分球附件(美国 Pike 公司)。

数据处理软件: OPUS 7.0 光谱分析软件; MATLAB R2014a 软件。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 样品制备** 鲜活鱼买回后立即宰杀、去鳞、去内脏、清洗干净。每条鱼沿脊背一分为二, 一侧作为 1 个样品, 共 120 个样品。将其样品分为两组, F 组为新鲜组, T 组为解冻组, 每组 60 个样品。对 F 组鱼去除鱼皮以后沿背部采肉, 用绞肉机混匀绞碎, 装到样品袋中, 尽快用于近红外光谱分析; T 组放到样品袋中, 密封, 储存在 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱中, 10 d 后取出,  $4^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜解冻, 之后处理同上, 用于近红外光谱分析。

**1.3.2 光谱采集** 取按照 1.3.1 制备的鱼肉样品装入培养皿中, 轻轻压实以排除培养皿底部的气泡, 且保持培养皿表面平整光洁。培养皿置于积分球光谱采集系统之上。每份样品重复扫描 3 次, 取平均光谱作为该样品的原始光谱。光谱采集条件为扫描波数:  $10000\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ ; 扫描次数: 64; 分辨率:  $8\text{ cm}^{-1}$ ; 测量方式: 漫反射测量; 近红外光谱扫描采集样品光谱时保持稳定的实验室温度和湿度。工作温度范围为  $23\text{--}25^{\circ}\text{C}$ ; 相对湿度范围为 40%–45%。

## 2 结果与分析

### 2.1 近红外光谱图

120 个样品的近红外原始光谱曲线如图 1 所示, F 组样品与 T 组样品的光谱曲线相互交错, 肉眼很难观察到二者的区别。

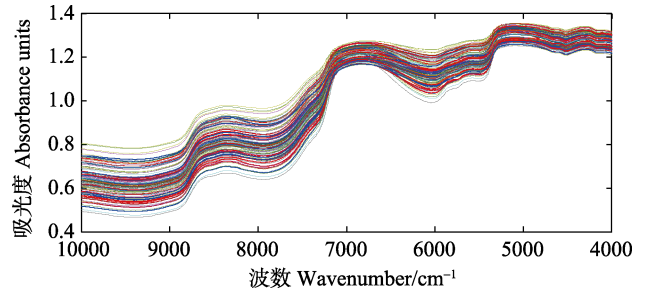


图 1 新鲜与解冻许氏平鲈的原始光谱  
Fig.1 The original NIR spectra of fresh and frozen-thawed *S. schlegeli*

分别对 F 组和 T 组样品的标准近红外光谱图取其平均光谱曲线(图 2)。从图 2 中可以看出, F 组和 T 组鱼肉的光谱有明显区别, 并具有一定的特征性和指纹性, 这一差异是鉴定新鲜和解冻许氏平鲈的基础。F 组样品吸光度大于 T 组, 相差约 0.02–0.06 个单位。肌肉组织间隙的大小导致了光散射的差异, 这是 F 组与 T 组样品能够有效区别的依据(张晓敏, 2012)<sup>1)</sup>。一般认为, 新鲜鱼类的细胞完整, 当光线进入新鲜鱼体内之后, 鱼体细胞不仅吸收光线, 还通过散射作用改变光线传入方向, 使其传到下一个细胞, 增加了光线传输距离, 导致吸水度的增加。而当鱼类经过解冻处理以后, 冰晶的生长致使细胞破裂, 内容物外流, 光散射的细胞数量减少, 导致吸水度的减少(Uddin *et al.*, 2005)。

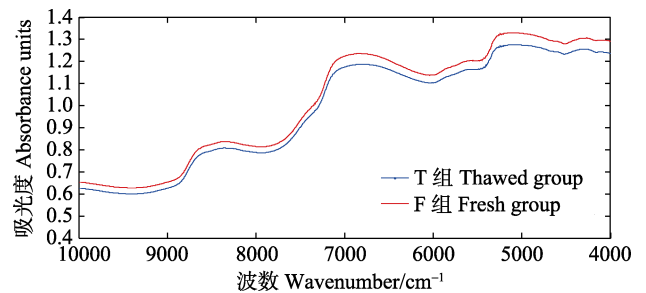


图 2 新鲜与解冻许氏平鲈的平均红外光谱  
Fig.2 The average NIR spectra of fresh and frozen-thawed *S. schlegeli*

### 2.2 主成分分析结果

对 F 组和 T 组, 共 120 个样品进行主成分分析聚类, 前 10 个主成分的特征值即累计可信度如表 1 所示。

由于前两个主成分累计可信度已达到 98.000% 以上, 所以仅用前两个主成分就可以表示原始近红外光谱的信息(戴素贤等, 1999)。图 3 表示 120 个样品的主成分 1、2 得分, 其中 X 轴表示样品的第 1 主

1) 张晓敏. 近红外光谱技术快速评估鲈鱼新鲜度的方法研究. 浙江工商大学硕士研究生学位论文, 2012, 41–62

表 1 主成分与累计可信度

Tab.1 Reliabilities of principal components (%)

主成分 Principal components	累计可信度 Cumulative reliability	主成分 Principal components	累计可信度 Cumulative reliability
PC1	90.770	PC6	99.982
PC2	99.456	PC7	99.990
PC3	99.877	PC8	99.993
PC4	99.928	PC9	99.996
PC5	99.968	PC10	99.997

成分得分(PC1), Y 轴表示样品的第 2 主成分得分(PC2)。图 3 中, F 组和 T 组许氏平鲈明显分为两类, 说明主成分 1、2 对新鲜和解冻许氏平鲈有较好的聚类作用。从图 3 可以看出, F 组的样品大多位于 X 轴上方, T 组样品大多位于 X 轴下方, 且分布较新鲜组比较集中, 但 F 组样品分布分散。为了提高预测精确度, 本研究采用 SVM 结合 PCA 的方法建立新鲜和解冻许氏平鲈的鉴别模型。

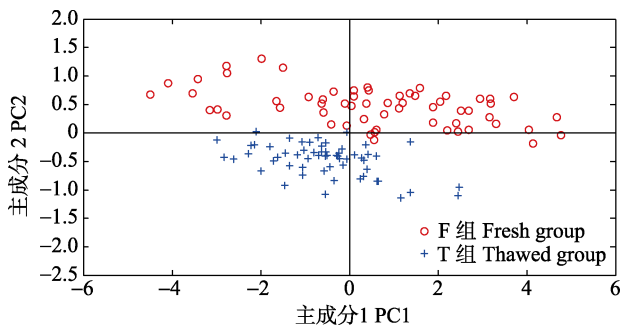


图 3 主成分 1 和 2 的得分

Fig.3 Principal component score plot of fresh and frozen-thawed *S. schlegeli*

### 2.3 支持向量机分析结果

由于全波段从 10000–4000  $\text{cm}^{-1}$  共有 1556 个数据点, 如果采用全光谱计算, 不仅计算量大, 而且有些区域样品的光谱信息很弱, 与样品的组成或性质间缺乏相关性。由表 1 可知, 前 10 个主成分的累计可信度为 99.997%, 这 10 个综合变量可以代表原变量包含的绝大部分信息。因此, 将 90 个样本(随机分别从 F 组和 T 组中抽取 45 个样品)的前 10 个主成分的得分作为训练集, 将剩余 30 个样本(F 组和 T 组各 15 个样品)的前 10 个主成分的得分作为测试集。另外, 设定 F 组样品标签为 0, T 组样品标签为 1。

SVM 主要是建立一个分类超平面作为决策曲面, 使正例和反例之间的隔离边缘最大化(史峰等, 2010)。本研究选择了 RBF 径向基核函数, 其中, 惩罚参数  $c$  ( $c$  为回归误差的权重)和径向基核参数  $g$  是

两个需要确定的重要参数。因为当  $c$  值太大时, 会使样品数据出现过学习现象, 而  $c$  值太小, 会使样品数据出现欠学习现象(刘星等, 2014)。因此, 常采用交互验证(Cross validation, CV)意义下的网格搜寻(Grid search)、遗传算法(Genetic algorithm, GA)和粒子群优化算法(Particle Swarm Optimization, PSO)参数寻优, 然后利用最佳参数  $c$  和  $g$  进行 SVM 网络训练, 构建模型。

如表 2 所示, 任意给定两组  $c$  和  $g$  值时, 测试集分类准确率分别为 86.67% 和 96.67%, 因此, 随机选择的参数无法保证测试集分类准确率达到最理想的效果。于是, 采用 3 种方法对  $c$  和  $g$  两个参数寻优。在 3 种参数寻优方法中, 用 GA 和 POS 方法选择出的最佳参数  $c$  和  $g$  构建模型时, 所建模型对测试集的预测错 1 个, 即 1 个冷冻样品被误判为新鲜样品, 此时预测集分类准确率为 96.67%; 而采用 CV 方法优化的参数  $c$  和  $g$  构建模型, 该模型的测试集分类准确率最高, 为 100%。由此可见, CV 参数寻优方法可以提高 SVM 模型的稳健性和泛化性能。

利用 CV 方法优化的最佳的参数进行 SVM 网络训练, 建立预测模型, 图 4 为测试集的预测结果。图 4 中样本 1–15 为 F 组样品, 样本 16–30 为 T 组样品, 即样本 1–15 对应的样本标签为 0, 样本 16–30 对应

表 2 SVM 参数优化与模型结果

Tab.2 The kernel function parameters and model results of support vector machine

参数优化方法 Parameter optimization methods	Best $c$	Best $g$	测试集分类准确率 Classification accuracy of test sets /%
任意给定 1 (Random set 1)	10.000	3.000	86.670(26/30)
任意给定 2 (Random set 2)	5.000	2.000	96.670(29/30)
CV	0.707	0.500	100.000(30/30)
GA	9.165	1.162	96.670(29/30)
POS	1.500	1.700	96.670(29/30)

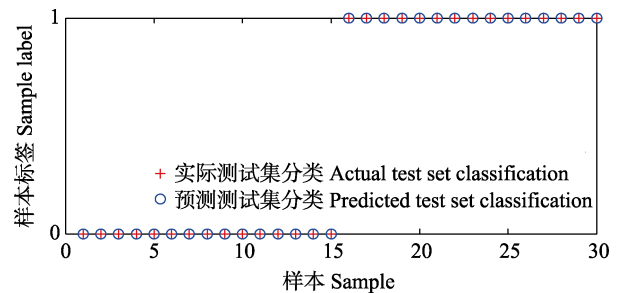


图 4 采用 CV 优化参数的测试集分类结果

Fig.4 Classification result of SVM with CV optimal parameters

的样本标签为 1。由图 4 可以看出, 预测测试集分类与实际预测集分类相同, 即模型对测试集的判断结果均正确, 预测准确率为 100%。由此说明, 用 SVM 方法鉴别新鲜鱼和解冻鱼是可行的。

### 3 讨论

本研究应用 NIR 在 10000–4000  $\text{cm}^{-1}$  波数范围内对 120 个新鲜和解冻许氏平鲷样品采集近红外光谱, 结合 PCA 和 SVM, 建立新鲜和冷冻–解冻许氏平鲷的鉴别模型。该模型的预测效果较好, 预测准确率达到 100%, 说明近红外光谱技术可以简便、快速、准确地鉴别许氏平鲷是否经过解冻处理。

由于新鲜鱼类经过解冻处理, 冰晶的生长使细胞破裂, 内容物外流, 严重影响肉的品质, 导致肌肉蛋白质结构、颜色、脱水、质构、脂肪氧化、pH 的变化。因此, 在以后的研究中, 可以考虑将近红外光谱数据与理化指标数据结合起来, 并且从增加样品数量和分析比较其他判别方法(如 BP 人工神经网络等)角度提高判别的精度和稳定性, 为近红外光谱技术应用用于鉴别新鲜和解冻鱼类奠定基础。

### 参 考 文 献

- 邓乃扬, 田英杰. 数据挖掘中的新方法—支持向量机. 北京: 科学出版社, 2004, 1–223
- 史峰, 王小川, 郁磊, 等. MATLAB 神经网络 30 个案例分析. 北京: 北京航空航天大学出版社, 2010, 112–121
- 刘星, 毛丹卓, 王正武, 等. 薏仁种类的近红外光谱技术快速鉴别. 光谱学与光谱分析, 2014, 34(5): 1259–1263
- 徐文杰, 李俊杰, 贾丹, 等. 近红外光谱技术分析草鱼营养成分. 食品安全, 2013, 34(20): 161–164
- 李国正, 王猛, 曾华军, 译. 支持向量机导论. 北京: 电子工业出版社, 2004, 1–82
- 张菊华, 朱向荣, 李高阳, 等. 近红外光谱法结合化学计量学方法用于茶油真伪鉴别分析. 分析化学, 2011, 39(5): 748–752
- 张德胜, 陆波, 汪晓慧. 深水抗风浪网箱养殖许氏平鲷技术研究. 水产科技情报, 2012, 39(2): 92–95
- 梁逸曾, 许青松. 复杂体系仪器分析: 白、灰、黑分析体系及其变量解析方法. 北京: 化学工业出版社, 2012, 480–482
- 戴素贤, 谢赤军, 陈栋, 等. 七种高香型乌龙茶香气成分的主成分分析. 华南农业大学学报, 1999, 20(1): 113–117
- Bozzetta E, Pezzolato M, Cencetti E, *et al.* Histology as a valid and reliable tool to differentiate fresh from frozen-thawed fish. J Food Protect, 2012, 75(8): 1536–1541
- Baixas-Nogueras S, Bover-Cid S, Veciana-Nogué MT, *et al.* Effects of previous frozen storage on chemical, microbiological and sensory changes during chilled storage of Mediterranean hake (*Merluccius merluccius*) after thawing. Eur Food Res Technol, 2007, 226(1): 287–293
- Duflos G, Le Fur B, Mulak V, *et al.* Comparison of methods of differentiating between fresh and frozen-thawed fish or fillets. J Sci Food Agric, 2002, 82: 1341–1345
- Isaksson T, Swensen LP, Taylor RG, *et al.* Non-destructive texture analysis of farmed Atlantic salmon using visual/near-infrared reflectance spectroscopy. J Sci Food Agric, 2002, 82(1): 53–60
- Khodabux K, L'Omelette MSS, Jhaumeer-Laulloo S *et al.* Chemical and near-infrared determination of moisture, fat and protein in tuna fishes. Food Chem, 2007, 102(3): 669–675
- Lin MS, Mousavi M, Al-Holy M, *et al.* Rapid near infrared spectroscopic method for the detection of spoilage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillet. J Food Sci, 2006, 71(1): S18–S23
- Sone I, Olsen RL, Dahl R, *et al.* Visible/near-infrared spectroscopy detects autolytic changes during storage of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). J Food Sci, 2011, 76(3): 203–209
- Uddin M, Okazaki E. Classification of fresh and frozen-thawed fish by near-infrared spectroscopy. J Food Sci, 2004, 69(8): 665–668
- Uddin M, Okazaki E, Torza S, *et al.* Non-destructive visible/NIR spectroscopy for differentiation of fresh and frozen-thawed fish. J Food Sci, 2005, 70(8): 506–510
- Vapnik V. The Nature of Statistical Learning Theory. New York: Springer-Verlag, 1995

## Distinguishing the Fresh from the Frozen-Thawed *Sebastes schlegeli* Using the NIR Spectroscopy Identification Technology Based on Support Vector Machine

LIU Shenshen<sup>1,2</sup>, SUN Yong<sup>1</sup>, ZHOU Deqing<sup>1</sup>①

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;

2. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

**Abstract** Frozen fish are usually less desirable than the fresh counterparts on the market. As a result, it has become a common issue that the frozen-thawed fish are disguised as fresh for a higher price. In this study the near infrared (NIR) spectroscopy was employed to separate the frozen-thawed fish from the fresh. One hundred and twenty prepared *Sebastes schlegeli* samples including 60 fresh and 60 frozen-thawed were scanned using a near-infrared spectroscopy system between 10000–4000  $\text{cm}^{-1}$  wavenumbers. The working model was based on the fact that the average NIR spectra of fresh fish were distinctive from the frozen-thawed and possessed certain characteristics and fingerprint resistance. Principal component analysis (PCA) was used for the dimension reduction of the spectra data. The first two principal components (PCs) explained over 98% of variances in all the spectral bands. Clustering was performed and analyzed based on the first two PCs of all samples. The principal component score plot demonstrated that the fresh (above the X axis) and the frozen-thawed samples (below the X axis) were well separated, and that the distribution of fresh samples was dispersal. In order to improve the accuracy of prediction, the support vector machine (SVM) classification model was developed to differentiate the fresh fish from the frozen-thawed, based on principal component analysis scores. The score values of the first ten PCAs were used as the input variables of the SVM, and the penalty parameter  $c$  and kernel function parameter  $g$  were optimized. Ninety samples were used for building the SVM model. This model was then applied to predict the rest 30 unknown samples, and the prediction rate was 100%. These results suggested that the near infrared spectroscopy combined with principal component analysis and support vector machine could be used as a rapid, simple and reliable method to identify the fresh and frozen-thawed fish.

**Key words** NIR; *Sebastes schlegeli*; Frozen-thawed; PCA; SVM; Identification

① Corresponding author: ZHOU Deqing, E-mail: zhoudq@ysfri.ac.cn

# 黑尾近红鲂(*Ancherythroculter nigrocauda*)

## 加工过程腌制工艺的优化\*



胡王 陈小雷 李正荣 周蓓蓓 鲍俊杰

(安徽省农业科学院水产研究所 合肥 230031)

**摘要** 黑尾近红鲂(*Ancherythroculter nigrocauda*)因肉质细腻深受消费者喜爱,其鱼体扁平,适合加工成整鱼产品,所以腌制是黑尾近红鲂加工的关键环节。为缩短腌制时间、降低鱼肉含盐量、提高黑尾近红鲂制品的安全性和标准化,本研究对黑尾近红鲂的腌制工艺进行优化。试验以鱼肉含盐量和挥发性盐基氮(TVB-N)值为指标,利用单因素试验和响应面分析法对加盐量、腌制时间和腌制温度3个因素进行优化。单因素试验中,加盐量分别为3%、5%、7%和9%,腌制温度为5℃、10℃、15℃和20℃,腌制时间为24 h、48 h、72 h和96 h,并通过响应面分析软件分别得到鱼肉含盐量、TVB-N值与加盐量、腌制温度、腌制时间的二次回归方程,通过计算得出最佳腌制工艺参数为:加盐量4.5%、腌制温度7℃、腌制时间38 h,此条件下黑尾近红鲂鱼肉含盐量为3.23%、TVB-N值为32.35 mg/100 g。通过验证试验,证明模型预测与实际实验结果相差很小,说明模型能够很好地预测实际生产情况。此模型能够为黑尾近红鲂的工业化生产服务,并对其他体形扁平鱼类的腌制有指导意义。

**关键词** 黑尾近红鲂;腌制;响应面分析法;优化

**中图分类号** S986.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)06-0139-08

黑尾近红鲂(*Ancherythroculter nigrocauda*)俗称高肩,隶属鲤科、鲂亚科、近红鲂属,属温和肉食兼杂食性鱼类,是长江上游的特有鱼类。黑尾近红鲂与其他的鲂属鱼类不同,具有较强的耐低氧能力,捕捞离水后存活时间较长,运输成活率高。作为新开发的名优淡水养殖推广品种,具有体形好、养殖成本低等特点。2010年以来,先后在南昌、赣州等地开展了黑尾近红鲂的苗种培育、成鱼养殖等,黑尾近红鲂养殖效益明显。目前,对黑尾近红鲂的研究主要集中在人工繁育、肌肉营养成分分析以及年龄和生长等方面,而加工方面的研究尚未见报道。黑尾近红鲂肉质细嫩、味道鲜美,深受消费者的喜爱,因此,开展黑尾近红鲂加工方面的研究,无论在生产、销售,还是在

人工养殖方面都有重要的意义。无论将黑尾近红鲂制作成何种形式的产品,腌制调味是其不可或缺的中间环节,所以,本研究着重研究腌制工艺条件对黑尾近红鲂制品的影响,为黑尾近红鲂制品的规模化生产提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

鲜活黑尾近红鲂、食盐、味精、五香粉、黄酒、花椒、生姜、白糖、八角、桂皮、猪肉等,均购于安徽省合肥市合家福超市;氯化钠、氢氧化钠、硫氰酸钾、硝酸银、盐酸、硝酸等,均为分析纯。

\* 安徽省农业科学院“淡水鱼加工增值关键技术创新团队”(15C0501)、安徽省农业科学院成果推广“大宗淡水鱼高值化加工技术产业化”(14E0513)、2014年马鞍山市科技攻关项目“复合天然抗氧化剂对鱼肉脂肪氧化的抑制作用研究与应用”(NY-2014-04)共同资助。胡王, E-mail: huwang101@sina.com

收稿日期: 2015-01-20, 收修改稿日期: 2015-04-15

## 1.2 仪器与设备

DHG-9243B5-Ⅲ型电热恒温鼓风干燥箱,上海新苗医疗器械有限公司;AL204型电子分析天平,梅特勒-托利多(上海)有限公司;FA25型高速分散机,弗鲁克(上海)有限公司;HITACHI CR22G型高速冷冻离心机,日本HITACHI koki公司;2300型Kjeltec™自动凯氏定氮仪,丹麦Foss公司。

## 1.3 试验方法

**1.3.1 黑尾近红鲂的加工工艺流程** 原料鱼→预处理(宰杀、剖割、去内脏、清洗、沥干)→腌制→复合增香→干燥→包装→灭菌→成品。

**1.3.2 原料预处理** 将新鲜黑尾近红鲂宰杀,沿背部切开,去鳃、内脏等,洗净内腔黑膜及血污,用离心机甩干表面水分。

**1.3.3 腌制** 将预处理后的原料鱼加入食盐滚揉5 min,并进行腌制,腌制后将鱼放入天然香辛料熬制的卤汁中浸泡增香24 h,之后用离心机甩干表面水分。

**1.3.4 干燥及包装** 采用循环风可控温实验装置风干后真空包装。

**1.3.5 产品性质检测** 氯化钠含量的测定:参照GB12457-2008的间接沉淀滴定法。挥发性盐基总氮(TVB-N)值的测定参照SC/T3032-2007的方法。

**1.3.6 单因素试验** 挑选外观良好且大小均匀的新鲜原料鱼进行单因素试验。黑尾近红鲂腌制过程中主要影响因素有加盐量、腌制温度、腌制时间,为了考察各因素对黑尾近红鲂制品的影响,进行单因素试验。以加盐量(3%、5%、7%、9%)、腌制温度(5℃、10℃、15℃、20℃)、腌制时间(24 h、48 h、72 h、96 h)作为考察因素,以鱼肉含盐量和TVB-N值作为试验指标,每组试验重复3次。

**1.3.7 响应面试验** 根据单因素试验结果,利用Box-Behnken试验设计原理,设计加盐量、腌制温度和腌制时间3因素3水平中心组合试验,每组试验重复3次(表1)。

表1 Box-Behnken试验设计因素水平

Tab.1 Factors and their levels used by Box-Behnken design

因素 Factors	水平及编码 Level and code		
	-1	0	1
A 加盐量 Salt content (%)	3	5	7
B 腌制温度 Salting temperature (°C)	5	10	15
C 腌制时间 Salting time (h)	24	48	72

## 1.4 数据处理

采用Excel、SPSS和Design Expert软件进行数据统计、处理。所有试验均设3次平行,测定结果以平均值±标准差表示,试验数据进行方差分析,以 $P < 0.05$ 为显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验

以鱼肉含盐量和TVB-N值为试验指标,分别考察腌制过程中加盐量、腌制温度和腌制时间对各指标的影响。

**2.1.1 加盐量对鱼肉含盐量和TVB-N值的影响** 用不同加盐量来腌制黑尾近红鲂,10℃条件下腌制48 h,各指标的测定如图1所示。

由图1可知,随着加盐量的增加,鱼肉含盐量呈增高的趋势,然而加盐量为7%时,鱼肉含盐量已超过5%,不符合消费者对现代食品低盐、健康的要求;并且含盐量过高,鱼肉质地较硬(章银良等,2007a),食用前需较长时间地浸泡,食用品质降低;另外,由于腌制时鱼体和微生物酶的作用,蛋白质、脂类被分解,游离氨基酸增加,而蛋白质和脂类的分解程度与加盐量成反比(章银良等,2006),由此,加盐量过高不利于游离氨基酸的增加,从而影响黑尾近红鲂制品的风味。加盐量过低(3%),盐的渗透速率慢,鱼体盐分达到平衡所需时间长,加剧了营养损失,且制品在腌制过程中易变质。随着加盐量的增加,鱼肉的TVB-N值呈下降趋势,在加盐量3%~5%之间下降程度最剧烈,之后随着加盐量的提高,TVB-N值下降趋于平缓。所以,综合鱼肉的盐度、营养和新鲜度考虑,初步确定加盐量为5%。

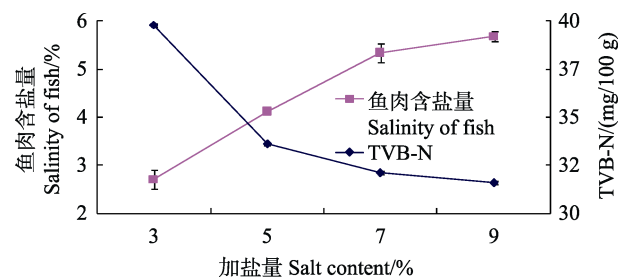


图1 加盐量对鱼肉含盐量和TVB-N值的影响  
Fig.1 Effects of salt content on the salinity and TVB-N value in fish muscle

### 2.1.2 腌制温度对鱼肉含盐量和TVB-N值的影响

将黑尾近红鲂用5%的盐,在不同温度下腌制48 h,鱼肉含盐量和TVB-N值的变化如图2所示。

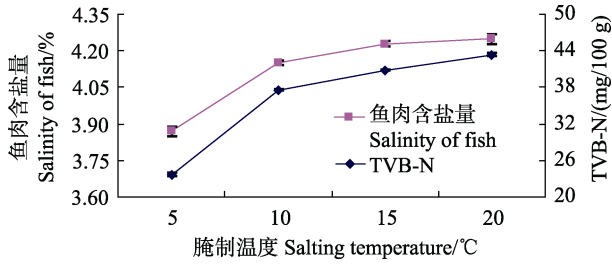


图 2 腌制温度对鱼肉含盐量和 TVB-N 值的影响  
Fig.2 Effects of salting temperature on the salinity and TVB-N value in fish muscle

从图 2 可以看出,随着腌制温度的升高,鱼肉含盐量和 TVB-N 值都呈增高趋势。这是因为,随着腌制温度的提高,食盐向鱼肉的渗透速度加快(Delvalle *et al*, 1967; Telis *et al*, 2003),所以,在一定温度范围内(5–15℃),鱼肉的含盐量随着腌制温度的提高而升高;而在 15–20℃ 范围内,鱼肉含盐量趋于平稳,说明 10–15℃ 时腌制同样的时间鱼肉中的盐分已经达到平衡;另一方面,升高腌制温度会加速鱼肉的腐败变质,所以,随着腌制温度的升高,鱼肉的 TVB-N 值呈升高趋势。从图 2 可以看出,在腌制温度为 5–10℃ 时,鱼肉含盐量和 TVB-N 值升高剧烈,之后温度继续升高,鱼肉含盐量增加幅度不大,而 TVB-N 值增幅较大,所以为了尽量减少鱼肉的腐败变质,初步确定腌制温度为 10℃。

### 2.1.3 腌制时间对鱼肉含盐量和 TVB-N 值的影响

在加盐量为 5%、10℃ 条件下腌制黑尾近红鲷,不同腌制时间对鱼肉含盐量和 TVB-N 值的影响如图 3 所示。

从图 3 可以看出,鱼肉含盐量和 TVB-N 值与腌制时间正相关:鱼肉含盐量在 24–48 h 升高幅度较大,48 h 之后鱼肉含盐量增加不明显;TVB-N 值在 48–72 h 内升高幅度较大,说明腌制 48–72 h 内鱼肉腐败变质加剧,且腌制时间越长,鱼肉营养损失也越严重(吴晓琛等, 2007),所以腌制时间初步确定为 48 h。

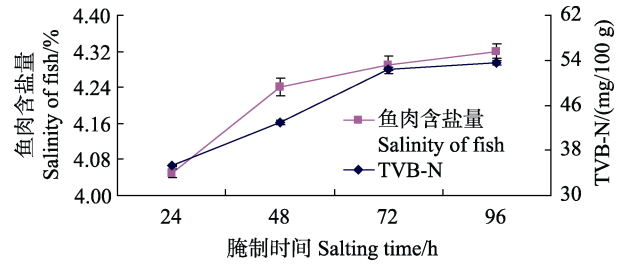


图 3 腌制时间对鱼肉含盐量和 TVB-N 值的影响  
Fig.3 Effects of salting time on the salinity and TVB-N value in fish muscle

## 2.2 响应面分析法优化黑尾近红鲷的腌制工艺

**2.2.1 Box-Behnken 试验设计及结果** 根据 3 因素 3 水平的响应面试验设计共选择试验点 17 个,其中,12 个分析点、5 个零点,方案与结果见表 2。

表 2 Box-Behnken 试验设计及结果  
Tab.2 Box-Behnken experiment design and results

试验号 Experiment number	A 加盐量 Salt content(%)	B 腌制温度 Salting temperature(°C)	C 腌制时间 Salting time(h)	R1 含盐量 Salinity(%)	R2 TVB-N 值 TVB-N value(mg/100 g)
1	0	0	0	3.86	30.25
2	-1	-1	0	2.24	42.05
3	1	-1	0	5.70	28.42
4	0	0	0	4.02	29.49
5	1	0	1	6.32	36.16
6	1	0	-1	5.09	30.67
7	0	0	0	3.95	31.49
8	0	1	-1	3.59	36.50
9	0	0	0	3.70	31.90
10	0	-1	-1	3.37	35.58
11	-1	0	-1	2.54	44.36
12	0	-1	1	3.57	44.76
13	1	1	0	5.92	32.47
14	0	1	1	3.81	48.31
15	-1	0	1	2.70	52.73
16	-1	1	0	2.93	43.83
17	0	0	0	4.15	30.05



**2.2.2 回归模型的建立与显著性分析** 用 Design Expert 8.0 软件对表 2 中的数据进行回归分析, 得出 3 个因素与鱼肉含盐量之间的二次回归方程为:

$$R1=3.94+1.58A+0.17B+0.23C-0.12AB+0.27AC+(5.000E-003)BC+0.42A^2-0.16B^2-0.19C^2$$

3 个因素与鱼肉 TVB-N 值之间的二次回归方程为:

$$R2=30.64-6.91A+1.29B+4.36C+0.57AB-0.72AC+0.66BC+2.87A^2+3.18B^2+7.47C^2$$

由上面两个方程可以看出, 对鱼肉含盐量和 TVB-N 值的影响顺序均为: A(加盐量) > C(腌制时间) > B(腌制温度)。

鱼肉含盐量回归方程的方差分析见表 3。从表 3 可以看出, 鱼肉含盐量整体模型  $P < 0.001$ , 说明模型极显著, 与试验拟合较好。决定系数  $R^2=0.988$ , 说明鱼肉含盐量的结果与模型回归值有良好的一致性。模型校正系数  $R_{Adj}^2=0.972$ , 说明试验结果的 97.2% 受到所选因素的影响。失拟项表示模型预测值与实际值不拟合的概率(谭汝成等, 2005),  $P=0.290 > 0.05$ , 失拟项不显著, 说明该模型能够充分反映实际情况。变异系数(CV)反映模型的置信度, CV 越低, 模型的置信度越高。鱼肉含盐量的模型  $CV=4.92\%$ , 较小, 说明该模型能够很好地反映真实的试验值, 可以用来分析响应面的

变化。从表 4 可以看出, TVB-N 值的整体模型  $P < 0.001$ ,  $R^2=0.984$ ,  $R_{Adj}^2=0.964$ , 失拟项  $P=0.143 > 0.05$ ,  $CV=3.85\%$ , 以上数据均说明 TVB-N 值的模型也可以用来分析响应面的变化。

**2.2.3 响应面分析** 利用 Design Expert 8.0 软件对表 2 的数据进行二次多元回归拟合, 得到的二次回归方程的响应面如图 4、图 5 所示。从图 4 可以看出, 加盐量和腌制时间的交互作用对鱼肉含盐量影响较大。随着加盐量、腌制温度和腌制时间的提高, 鱼肉含盐量呈升高趋势, 其中加盐量对鱼肉含盐量影响最大, 腌制温度和时间影响较小。腌制过程包括两个传质过程(Fougere, 1952; Barat *et al.*, 2003): 一个是食盐从溶液进入食品结构内(鱼肌肉中), 另一个是鱼肉中的水渗透出来。所以, 随着加盐量的提高和腌制时间的延长, 鱼肉的含盐量会随之升高, 而升高腌制温度, 会加快分子的运动, 从而加快上述两个传质过程, 鱼肉含盐量也就随之升高(张娜, 2010)<sup>1)</sup>。

从图 5 可以看出, 随着加盐量的提高, 鱼肉 TVB-N 值呈下降趋势; 随着腌制温度的升高和腌制时间的延长, TVB-N 值呈上升趋势, 这与曾令彬等(2009)的研究结果相符。挥发性盐基氮是鱼肉在酶和细菌的作用下, 使蛋白质分解产生氨及胺类等碱性含氮物质, 是

表 3 鱼肉含盐量回归方程的方差分析

Tab.3 Analysis of variance for the fitted quadratic polynomial model of salinity

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
Source of variation	Sum of squares	Degree of freedom	Mean squares	F value	P value	Significance
模型 Model	21.85	9	2.43	63.58	< 0.001	**
A	19.91	1	19.91	521.46	< 0.001	**
B	0.23	1	0.23	6.15	0.042	*
C	0.41	1	0.41	10.73	0.014	*
AB	0.06	1	0.06	1.45	0.268	
AC	0.29	1	0.29	7.50	0.029	*
BC	$1.00 \times 10^{-4}$	1	$1.000 \times 10^{-4}$	$2.62 \times 10^{-3}$	0.961	
A <sup>2</sup>	0.74	1	0.74	19.41	0.003	**
B <sup>2</sup>	0.11	1	0.11	2.75	0.141	
C <sup>2</sup>	0.16	1	0.16	4.11	0.082	
残差 Residual	0.27	7	0.04	—	—	
失拟项 Lack of fit	0.15	3	0.05	1.78	0.290	
误差 Error	0.11	4	0.03	—	—	
总和	22.11	16	—	—	—	
Total						$R^2=0.988$ $R_{Adj}^2=0.972$

\*影响显著( $P < 0.05$ ); \*\*影响极显著( $P < 0.01$ )

\* Significant influence ( $P < 0.05$ ); \*\* Highly significant influence ( $P < 0.01$ )

1) 张娜. 低盐度腌腊鱼生产中几个安全指标的变化及评价. 华中农业大学硕士研究生学位论文, 2010, 11-15

表 4 鱼肉 TVB-N 值回归方程的方差分析

Tab.4 Analysis of variance for the fitted quadratic polynomial model of TVB-N value

方差来源 Source of variation	平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方 Mean squares	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
模型 Model	891.51	9	99.06	48.86	< 0.001	**
A	381.57	1	381.57	188.23	< 0.001	**
B	13.26	1	13.26	6.54	0.038	*
C	151.82	1	151.82	74.89	< 0.001	**
AB	1.29	1	1.29	0.64	0.452	
AC	2.07	1	2.07	1.02	0.346	
BC	1.73	1	1.73	0.85	0.386	
A <sup>2</sup>	34.79	1	34.79	17.16	0.004	**
B <sup>2</sup>	42.63	1	42.63	21.03	0.003	**
C <sup>2</sup>	234.92	1	234.92	115.89	< 0.001	**
残差 Residual	14.19	7	2.03	—	—	
失拟项 Lack of fit	10.06	3	3.35	3.24	0.143	
误差 Error	4.13	4	1.03	—	—	
总和 Total	905.70	16	—	—	—	
		$R^2=0.984$		$R_{Adj}^2=0.964$		

\*影响显著( $P<0.05$ ); \*\*影响极显著( $P<0.01$ )\* Significant influence ( $P<0.05$ ); \*\* Highly significant influence ( $P<0.01$ )

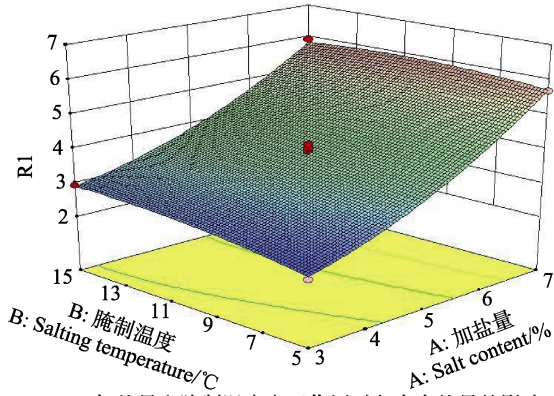
鱼肉腐败程度的一个重要指标。提高加盐量能够抑制微生物的生长和蛋白质的分解(章银良等, 2007b), 所以, 随着加盐量的升高, TVB-N 值呈下降趋势; 提高腌制温度使鱼肉中微生物生长繁殖和蛋白质分解加快, 所以, TVB-N 值与腌制温度正相关; 鱼体中的蛋白质分解产生的氨及胺类等碱性含氮物质会随着腌制时间的延长在鱼体中不断积累, 所以腌制时间延长, TVB-N 值升高(章银良, 2007b)。

**2.2.4 腌制工艺的优化组合及其验证** 根据 Box-Behnken 试验结果和二次多项式方程, 利用 Design Expert 8.0 软件计算出最佳的腌制工艺条件为: 加盐量 4.44%, 腌制温度 7.44℃, 腌制时间 37.92 h, 此条件下鱼肉含盐量为 3.28%, TVB-N 值为 32.61 mg/100 g。为了实际操作方便, 将上述优化工艺修正为加盐量 4.5%、腌制温度 7℃、腌制时间 38 h。根据修正后的工艺条件经过 5 次验证试验, 黑尾近红鲌鱼肉含盐量为 3.23%, TVB-N 值为 32.35 mg/100 g, 分别与理论值相差 1.5%和 0.8%, 该模型能够很好地预测试验结果。

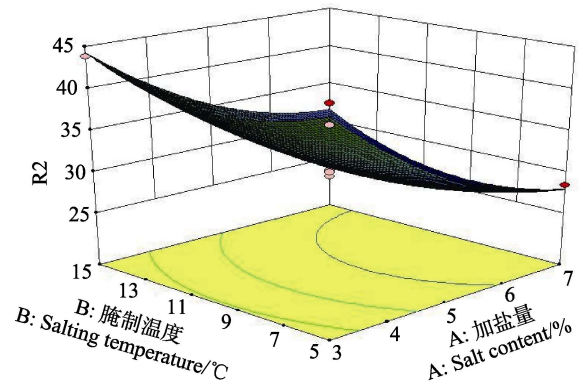
### 3 讨论

黑尾近红鲌作为我国长江上游江河、水库中常见的一种特有经济鱼类, 因其肉质细嫩、味道鲜美而深受消费者的喜爱。近年来, 关于黑尾近红鲌的研究多集中在人工繁殖(徐凯等, 2014; 张建铭等, 2011; 殷海成等,

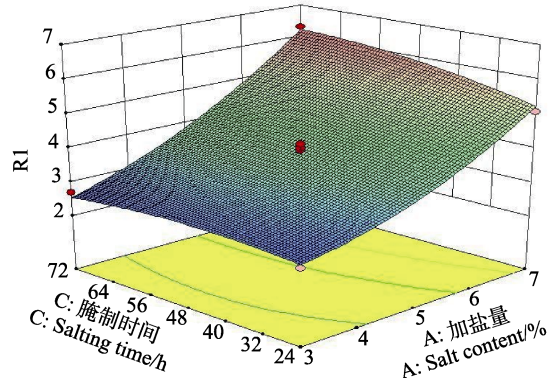
2010; 薛正楷等, 2001)、池塘养殖(曹义虎等, 2011a; 曾庆祥等, 2010; 魏辉杰等, 2010)、毒性试验(李代金等, 2010; 王贵英等, 2005)、形态学(曹义虎等, 2011b)、生物学特性(陈见等, 2014; 曹义虎等, 2014)、肌肉营养与成分分析(谭德清等, 2004)、不同年龄段消化酶(白晓慧等, 2007)及对蛋白质的营养需求(丁立云等, 2012)等。随着人工繁育和养殖技术的日渐成熟, 如何促进黑尾近红鲌产业从一产向二产、三产发展是接下来需要解决的问题, 而黑尾近红鲌加工技术水平的提高和标准化生产是促进其产业发展的重要途径。黑尾近红鲌鱼体扁平, 特别适合整条加工制成产品, 所以, 市场中黑尾近红鲌的加工以整鱼腌制、调味之后制成半干鱼制品为主, 但是, 这类产品及生产工艺存在诸多问题: 以手工作坊式生产为主, 产业规模难以扩张; 规范性差、工艺参数模糊; 产品质量不稳定、含盐量偏高等。腌制是这类制品的关键加工环节, 所以, 优化腌制工艺对黑尾近红鲌的加工具有十分重要的意义。试验优化的腌制工艺与黑尾近红鲌传统的工艺相比, 加盐量由原来的 6%降至 4.5%, 腌制时间由 48 h 缩短至 38 h, 产品的含盐量由 4.8%降低至 3.28%, TVB-N 值由 52.04 mg/100 g 降低至 32.61 mg/100 g, 且与其他鱼类的腌制研究相比, 能有效地降低腌制过程中的加盐量, 并缩短腌制时间(律佳雪等, 2007; 杨华等, 2013; 高娟等, 2013)。



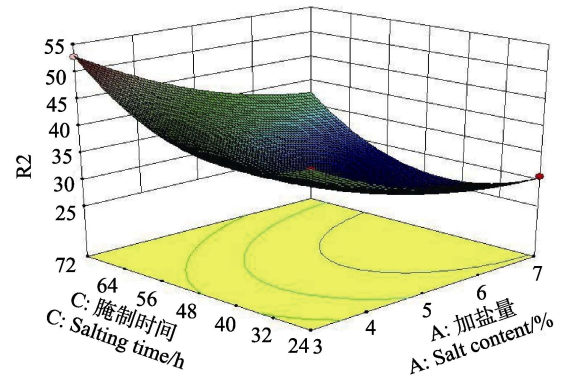
a. 加盐量和腌制温度交互作用对鱼肉含盐量的影响  
a. Response surface for effects of salt content and salting temperature on salinity



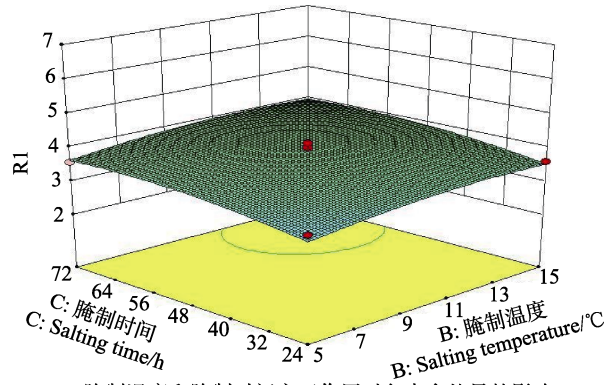
a. 加盐量和腌制温度交互作用对鱼肉 TVB-N 值的影响  
a. Response surface for effects of salt content and salting temperature on TVB-N value



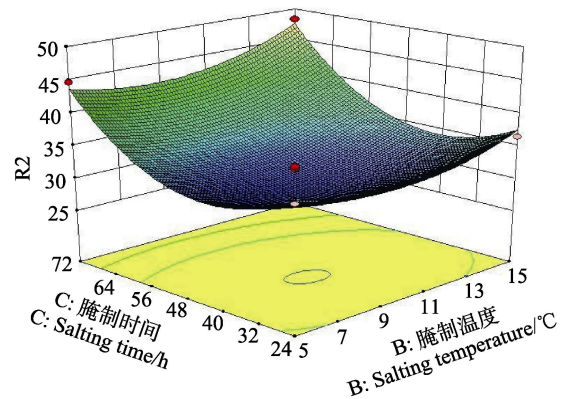
b. 加盐量和腌制时间交互作用对鱼肉含盐量的影响  
b. Response surface for effects of salt content and salting time on salinity



b. 加盐量和腌制时间交互作用对鱼肉 TVB-N 值的影响  
b. Response surface for effects of salt content and salting time on TVB-N value



c. 腌制温度和腌制时间交互作用对鱼肉含盐量的影响  
c. Response surface for effects of salting temperature and salting time on salinity



c. 腌制温度和腌制时间交互作用对鱼肉 TVB-N 值的影响  
c. Response surface for effects of salting temperature and salting time on TVB-N value

图4 影响鱼肉含盐量(R1)的两因素交互作用响应面  
Fig.4 Response surface for effects of three processing parameters on salinity

图5 影响 TVB-N 值(R2)的两因素交互作用响应面  
Fig.5 Response surface for effects of three processing parameters on TVB-N value

### 4 结论

本研究通过单因素试验和 Box-Behnken 试验设计与响应面分析,建立了鱼肉含盐量和 TVB-N 值的二次多项式数学模型,确定最佳腌制工艺参数为:加盐量 4.5%,腌制温度 7℃,时间 38 h,此条件下,鱼

肉含盐量 3.23%, TVB-N 值 32.35 mg/100 g。

### 参 考 文 献

丁立云,曹义虎,周秋白,等.黑尾近红鲷幼鱼对蛋白质营养需求的初步研究.江苏农业科学,2012,40(10):216-218

- 王贵英, 李清, 童红斌, 等. 四种常用药物对黑尾近红鲌的急性毒性研究. 淡水渔业, 2005(增刊): 70-72
- 白晓慧, 王贵英, 熊传喜. 不同年龄黑尾近红鲌消化酶活性比较. 淡水渔业, 2007, 37(3): 30-33
- 李代金, 黄辉, 谭德清. 5种常用渔药对黑尾近红鲌的急性毒性试验. 四川动物, 2010, 6(2): 227-231
- 杨华, 张李玲, 梅清清. 不同腌制工艺处理对美国红鱼品质的影响. 食品科学, 2013, 34(11): 126-129
- 吴晓琛, 许学勤, 夏文水, 等. 酸浸草鱼腌制工艺研究. 食品与机械, 2007, 23(6): 105-107
- 张建铭, 曾庆祥, 张家海, 等. 黑尾近红鲌人工繁殖技术研究. 水产科技情报, 2011, 38(2): 74-76
- 陈见, 李清, 王贵英, 等. 翘嘴红鲌(♀)×黑尾近红鲌(♂)杂种F<sub>1</sub>的 AFLP 分析. 水生生物学报, 2014, 38(5): 891-896
- 律佳雪, 陈运中. 风味醉鱼生产过程中腌制条件的优化研究. 食品科技, 2007, 7(4): 110-113
- 徐凯, 汪启华, 魏敏, 等. 安徽省黑尾近红鲌人工繁殖技术试验研究. 现代农业科技, 2014(20): 254-255
- 殷海成, 吕海英. 黑尾近红鲌人工繁殖及胚胎发育的研究. 大连水产学院学报, 2010, 25(3): 265-269
- 高娟, 朱凯悦, 武晋先, 等. 响应面分析法优化草鱼的干腌工艺. 食品工业科技, 2013, 34(6): 246-250
- 曹义虎, 陈蓉, 邓勇辉, 等. 黑尾近红鲌冬片鱼种池塘培育技术试验. 江西水产科技, 2011a(2): 30-33
- 曹义虎, 马保新, 邓勇辉, 等. 池塘养殖条件下黑尾近红鲌(0-2龄)的可量性状研究. 安徽农业科学, 2011b, 39(33): 20498-20500
- 曹义虎, 徐先栋, 邓勇辉, 等. 人工养殖黑尾近红鲌卵巢发育的周年变化. 四川动物, 2014, 33(4): 584-587
- 章银良, 夏文水. 海藻糖对盐渍海鳗肌动球蛋白的影响的研究. 食品科学, 2007a, 28(7): 39-41
- 章银良, 夏文水. 海鳗盐渍过程中的渗透脱水规律研究. 食品研究与开发, 2006, 27(11): 93-98
- 章银良, 夏文水. 腌鱼产品加工技术与理论研究进展. 中国农学通报, 2007b, 23(3): 116-120
- 曾令彬, 熊善柏, 王莉. 腊鱼加工过程中微生物及理化特性的变化. 食品科学, 2009, 30(3): 54-57
- 曾庆祥, 朱恩华, 张家海, 等. 黑尾近红鲌池塘养殖试验. 中国水产, 2010(3): 37-38
- 谭汝成, 赵思明, 熊善柏, 等. 白鲢腌制过程中鱼肉与盐卤成分的变化. 华中农业大学学报, 2005, 24(3): 300-303
- 谭德清, 王剑伟, 但胜国. 黑尾近红鲌含肉率及肌肉营养成分分析. 水生生物学报, 2004, 28(3): 240-246
- 薛正楷, 何学福. 黑尾近红鲌的年龄和生长研究. 西南师范大学学报(自然科学版), 2001, 26(6): 712-717
- 魏辉杰, 刘英武, 王艳. 黑尾近红鲌商品鱼高效养殖技术. 中国水产, 2010(11): 81-82
- Barat JM, Rodriguez-Barona S, Andres A, *et al.* Cod salting manufacturing analysis. Food Res Int, 2003, 36(5): 447-453
- Delvalle FR, Nickerson JTR. Studies on salting and drying fish I: Equilibrium consideration in salting. J Food Sci, 1967, 32(2): 173-179
- Fougere H. The water transfer in codfish muscle immersed in sodium chloride solutions. J Fish Res Board Can, 1952, 9(8): 388-392
- Telis VRN, Romanelli PF, Gabas AL, *et al.* Salting kinetics and salt diffusivities in famed pantanal caiman muscle. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 2003, 38(4): 529-535

(编辑 陈辉)

## Optimization of the Salting Process of *Ancherythroculter nigrocauda*

HU Wang<sup>①</sup>, CHEN Xiaolei, LI Zhengrong, ZHOU Beibei, BAO Junjie

(Fisheries Institute, Anhui Academy of Agricultural Science, Hefei 230031)

**Abstract** *Ancherythroculter nigrocauda* has been popular for the delicate texture of the meat, and is a proper material of processed food due to its flat shape. Salting is a key step in the processing of *A. nigrocauda*. In this study we aimed to optimize the conditions of the salting process, including reducing the salting time, lowering the salinity and improving the safety of the products, and hence to provide theoretical guides for the large-scale production. Using *A. nigrocauda* as the raw material, and the salinity and the total volatile basic nitrogen (TVB-N) as the indicators, we optimized parameters such as the salt concentration, the salting temperature and the salting time in single factor experiments. In these experiments, the salt concentrations were 3%, 5%, 7%, and 9%, the salting temperatures were 5°C, 10°C, 15°C, and 20°C, and the salting time was 24 h, 48 h, 72 h, and 96 h. Then the response surface methodology (based on the Box-Behnken experimental design principle) was used to optimize the salting process of *A. nigrocauda*. The response surface methodology analysis was adopted to build two second order quadratic equations between the salinity, TVB-N and salting conditions including the salt concentration, the salting temperature and the salting time. Taking the convenience into consideration, we set the optimal salting parameters as follows: salt concentration 4.5%, salting temperature 7°C, and salting time 38 h. Under these conditions, the salinity of the product was 3.23% and the total volatile basic nitrogen was 32.35 mg/100 g. The validating test showed that the actual results were very close to the predicted results from the corresponding second-order quadratic equations, thus the model may effectively predict the salt concentration and the TVB-N values of salted *A. nigrocauda* products. This technology could be applied to the large-scale production with reduced salting time, lower salinity, and improved food safety. Furthermore, it could also be employed in the salting process of other kinds of fresh water fishes.

**Key words** *Ancherythroculter nigrocauda*; Salting technology; Response surface methodology; Optimization

① Corresponding author: HU Wang, E-mail: huwang101@sina.com

# 《渔业科学进展》2015 年第 36 卷总目录



## 第 1 期

### 研究论文

- 莱州湾小拟哲水蚤(*Paracalanus parvus*)丰度分布周年变动 ..... 王秀霞 左涛 吴强 陈瑞盛 (1)
- 海水人工湿地脱氮效果与系统内基质酶、微生物分析 ..... 周强 崔正国 王加鹏 曲克明 马绍赛 毛成全 (10)
- 臭氧对赤点石斑鱼神经坏死病毒 RNA 破坏效果的评价方法的建立与应用 ..... 李晋 史成银 王胜强 栗子丹 (18)
- 基于 Roche 454 GS FLX 的钝吻黄盖鲈(*Pleuronectes yokohamae*)微卫星标记的开发 ..... 潘婷 张岩 张辉 高天翔 肖永双 姜云荣 (26)
- 三倍体牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)群体遗传多样性的微卫星分析 ..... 刘慧 吴志昊 李桢 朱香萍 尤锋 宋宗诚 李军 胡金伟 (33)
- 牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) Activin 基因两种  $\beta$  亚基的启动子克隆及生物信息学分析 ..... 刘蒙蒙 王晶 高金宁 马丽曼 张全启 (41)
- 4 种饲料投喂对鲮(*Mugil cephalus*)生长及鱼体组成的影响 ..... 郭永坚 罗昭林 阴晓丽 李俊伟 朱长波 颀晓勇 (48)
- 棕点石斑鱼中草药免疫增强剂的快速筛选 ..... 孙晓飞 郭伟良 谢珍玉 王世锋 胡文婷 李富盛 王文慧 周永灿 (54)
- 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)“黄海 3 号”新品种的培育 ..... 李健 何玉英 王清印 刘萍 李吉涛 王学忠 (61)
- 采用 OIE 标准检测养殖对虾中传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)的 PCR 检出类型 ..... 袁颜颜 杨冰 万晓媛 刘笋 刘天齐 黄捷 (67)
- 解放眉足蟹(*Blepharipoda liberate* Shen)形态特征观察 ..... 王雪梅 (74)
- 海湾扇贝晚苗池塘底播及在褐潮暴发海区筏式养殖效果 ..... 王东哲 毛玉泽 方笑 杜美荣 张福崇 方建光 (79)
- 急性病毒性坏死病毒魁蚶株 IAP-86 基因全长 cDNA 克隆和生物信息学分析 ..... 张帅 王崇明 岳志芹 宋晓玲 白昌明 尹伟力 黄捷 (85)
- 低盐环境对 3 种规格刺参(*Apostichopus japonicus*)幼参生长与消化酶活力的影响 ..... 赵斌 胡炜 李成林 韩莎 董晓亮 王波 姜涛 (91)
- 多棘海盘车(*Asterias amurensis*)对 5 种双壳贝类的摄食选择性及摄食节律 ..... 代克涛 李娇 关长涛 张媛 赵学伟 (97)
- 光裸方格星虫(*Sipunculus nudus*)生物扰动对混养系统沉积物及间隙水中营养物质的影响 ..... 李俊伟 朱长波 郭永坚 颀晓勇 黄国强 陈素文 (103)
- 刺参养殖池环境细菌群落对底质改良剂的响应 ..... 李晓龙 李秋芬 姜妮妮 刘淮德 王晓红 宋娴丽 安鑫龙 (111)
- 多巴胺复合超滤膜的制备及其在海水养殖废水处理中的应用 ..... 王栋 徐佳 单宝田 宋迪 刘瑞聪 (119)
- 研究综述**
- 我国近海渔业资源可持续产出基础研究的热点问题 ..... 金显仕 窦硕增 单秀娟 王震宇 万瑞景 卞晓东 (124)
- 海胆早期多巴胺能神经系统的发育及功能研究进展 ..... 汝少国 王翠翠 (132)

## 第 2 期

### 研究论文

- 南极半岛邻近海域南极大磷虾(*Euphausia superba* Dana)的数量组成和分布 .....

- .....左 涛 陈 丹 赵宪勇 吴 强 李显森 (1)
- 莱州湾大型砂壳纤毛虫丰度的水平分布.....陈 雪 吴 强 栾青杉 张武昌 徐剑虹 肖 天 (11)
- 福建古雷半岛周边海域春季大型底栖生物多样性现状.....  
.....林俊辉 王建军 林和山 何雪宝 黄雅琴 李荣冠 郑凤武 郑成兴 (23)
- 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) *CSFR2* 基因的重组表达及其蛋白纯化与功能分析.....  
.....王凯琳 胡乔木 陈松林 (30)
- 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) miR-223 的表达特征及免疫应答分析.....  
.....颜 慧 曾 艳 公光业 陈亚东 陈松林 刘 洋 沙珍霞 (37)
- 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)体表色素细胞观察及 POMC 表达特性分析.....  
.....史学营 徐永江 武宁宁 柳学周 杨洪军 臧 坤 史 宝 李存玉 (45)
- 利用微卫星标记分析 3 个暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)养殖群体的遗传多样性.....  
.....邹 杰 马爱军 赵艳飞 何伟国 王 婷 岳 亮 刘大勇 郭正龙 (55)
- 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*) $\alpha 2$ -巨球蛋白 cDNA 全长的克隆和表达分析.....  
.....王有昆 刘 萍 段亚飞 李吉涛 李 健 (63)
- 多抗间接 ELISA 方法的建立及其在海洋细菌快速检测中的应用.....  
.....职通瑞 宋晓玲 张晓静 张盛静 黄 捷 (71)
- 自然养殖水体投喂 CpG ODN 和表面展示 VP28 的解脂耶罗维亚酵母对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)  
抗 WSSV 的免疫保护作用.....衣启麟 刘 瑞 孙 瑞 王玲玲 刘聪辉 迟振明 宋林生 (77)
- 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) F<sub>0</sub>-ATP 合酶 b 链全长 cDNA 的克隆及组织分布.....  
.....何晓东 刘庆慧 关广阔 李 倩 李 晨 黄 捷 (87)
- 盐度对四指马鲛(*Eleutheronema tetradactylum*)幼鱼生长及其鳃丝 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP 酶的影响.....  
.....罗海忠 李伟业 傅荣兵 柳敏海 许益铵 油九菊 章 霞 (94)
- 自生物絮团养殖池分离具有亚硝酸盐去除功能的细菌及其鉴定和特性.....  
.....王志杰 胡修贵 刘旭雅 宋晓玲 马 牲 黄 捷 (100)
- 红尾皇冠鱼(*Aequidens rivulatus*)病原无乳链球菌的分离、鉴定与特性分析.....  
.....姚学良 徐晓丽 李贺密 钟文慧 臧 莉 李 灏 杨超敬 (106)
- 3 种磺胺类药物在中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)体内的药代动力学特征.....  
.....李金宝 常志强 李 健 孙 铭 (113)
- 饲料蛋白脂肪比对圆斑星鲈(*Verasper variegates*)生长、消化酶及血清生化指标的影响.....  
.....吕云云 陈四清 于朝磊 常 青 秦 搏 王志军 (118)
- 饲料中添加不同水平的维生素 E 对半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)亲鱼繁殖性能及后代质量的影响.....  
.....肖登元 梁萌青 王新星 郑珂珂 赵 敏 (125)
- 裸盖鱼(*Anoplopoma fimbria*)肌肉的营养成分分析及评价.....  
.....刘长琳 陈四清 王有廷 秦 搏 燕敬平 赵法箴 刘思玮 刘春胜 (133)
- 条斑紫菜蛋白酶解多肽的抑菌活性.....宋惠平 于 佳 李 钡 魏玉西 王文秀 许丽娜 韩 丹 (140)
- 凡隆气单胞菌(*Aeromonas veronii*)拮抗菌 4-1-3 的筛选鉴定及其活性物质初探.....  
.....凡 飞 张生武 李联泰 李 燕 苏晓烽 安贤惠 (146)

### 第 3 期

#### 研究论文

- 福宁湾浮游植物的群落结构特征.....全汉锋 单秀娟 戴芳群 (1)
- 阿根廷滑柔鱼(*Illex argentinus*)适宜栖息地模型比较及其在渔场预报中的应用.....丁 琪 陈新军 汪金涛 (8)
- 大亚湾紫海胆(*Anthocardia crassispina*)增殖放流苗种生长情况.....  
.....罗虹霞 陈丕茂 袁华荣 秦传新 王莲莲 周艳波 冯 雪 聂永康 (14)
- 中西太平洋长鳍金枪鱼(*Thunnus alalunga*)延绳钓渔场分布的时空变化.....唐衍力 徐 湛 (22)
- 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)雌性特异基因 *CSW3* 重组蛋白的表达与应用.....  
.....王天姿 王 娜 胡乔木 邵长伟 陈松林 (30)
- 池塘养殖条件下牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)甲状腺轴和生长轴关键激素的变化规律.....  
.....李晓妮 史 宝 柳学周 徐永江 常亚青 陈圣毅 臧 坤 (36)

云纹石斑鱼(*E. moara*)(♀)×七带石斑鱼(*E. septemfasciatus*)(♂)杂交 F<sub>1</sub> 生长特征与其亲本子代的比较……李炎璐 陈超 王清印 吴雷明 宋振鑫 林利民 翟介明 奥谷亮 大田智 (42)

大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)四月龄幼鱼雌雄性比及体重差异分析……胡玉龙 王伟继 孔杰 官健涛 徐利永 马雨 王清印 (50)

以色列红罗非鱼与其他罗非鱼群体杂交子一代在海水中生长性能分析……张天时 姜涛 孔杰 魏宝振 笄金华 张艳红 栾生 (56)

温度和盐度对墨吉明对虾(*Fenneropenaeus meiguensis*)生长与存活的联合效应……钱佳慧 栗志民 叶宁 刘建勇 胡志国 郑开江 (62)

基于鞭毛蛋白基因的坚强芽孢杆菌特异性套式 PCR 和荧光定量 PCR 方法的建立……许彦芬 王海亮 陈大恭 宋晓玲 黄捷 (68)

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)耐低盐的遗传力估计……王正 高保全 刘萍 李健 (74)

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*) 4 个地理群体体色差异分析……高保全 刘萍 李健 刘磊 (79)

蛹肽蛋白替代鱼粉对大菱鲂(*Scophthalmus maximus* L.)幼鱼生长、饲料利用、消化代谢酶及免疫性能的影响……梅琳 周慧慧 麦康森 徐玮 何良 (85)

鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)养殖中期对饲料硒的需求量……谈枫 梁萌青 郑珂珂 徐后国 (93)

牛磺酸对半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)亲鱼繁殖性能及仔鱼质量的影响……赵敏 梁萌青 郑珂珂 肖登元 李庆华 (101)

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)在刺参养殖中的益生作用……董春光 杨爱国 孙秀俊 吴彪 刘志鸿 周丽青 侯丫 (109)

虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)对铅和镉的生物富集与释放规律……崔正国 苑旭洲 崔毅 陈碧鹃 李永霞 梁峻 赵学伟 (116)

鼠尾藻(*Sargassum thunbergii*)对刺参生长及水环境的影响……王志刚 胡凡光 郭萍萍 吴志宏 宋娴丽 孙福新 李美真 王保廷 逢邵楠 (125)

二氟沙星在大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)体内的药代动力学特征……梁俊平 段亚飞 李健 常志强 (131)

水产品中氯霉素、甲矾霉素、氟苯尼考、氟苯尼考胺多残留的同时测定—GC/MS 法……邵会 冷凯良 周明莹 高华 孙伟红 邢丽红 苗钧魁 刘坤 (137)

通告  
《渔业科学进展》投稿指南…… (142)

### 第 4 期

#### 研究论文

2012/2013 渔季 CCAMLR 48 区南极磷虾(*Euphausia superba*)资源时空分布……李显森 张吉昌 赵宪勇 左涛 朱建成 王新良 徐国栋 孟涛 徐玉成 张鹏 应一平 孙珊 (1)

基于贝叶斯的鲈鱼(*Scomber japonicus*)生物经济模型及管理策略……王从军 汪金涛 陈新军 官文江 (10)

鄱阳湖翘嘴鲌(*Siniperca chuatsi*)的生物学参数及资源量的估算……吴斌 方春林 张燕萍 傅培峰 陈文静 熊小英 周辉明 贺刚 王生 王庆萍 (21)

崂山湾中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)增殖放流的效果评价……袁伟 林群 王俊 孙坚强 陈瑞盛 (27)

獐子岛海域浮游植物的粒径结构及碳流途径……蒋增杰 杜美荣 姜绪 梁峻 赵学伟 刘毅 张媛 张晓芳 方建光 (35)

黄岛区南部海域营养水平和有机污染状况分析与评价……过锋 陈聚法 张艳 陈碧鹃 (44)

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis* Günther) IGF- II 的体外重组表达……徐永江 柳学周 张凯 武宁宁 刘芝亮 李春广 (51)

长鳍吻鲈(*Rhinogobio ventralis*)胚胎发育和仔鱼发育……管敏 肖衍 胡美宏 刘勇 鲁雪报 倪勇 郭文韬 曲焕韬 李莎 (57)

北部湾鲷(*Euthynnus affinis*)的摄食习性及其随生长发育的变化……宿鑫 李永东 何雄波 卢伙胜 颜云榕 (65)

大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)仔稚鱼发育期消化道可培养细菌的菌群特征分析……史秀清 张正 王印庚 于永翔 邓威 李华 (73)

罗非鱼(*Tilapia nilotica*)简达气单胞菌病的病原分离鉴定及药敏试验……杨宁 姜芳燕 黄海 焦健 (83)

白斑综合征病毒感染凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) TRx、LvP38、CAT、POD 基因的表达……刘鹏飞 刘庆慧 吴垠 黄捷 (89)



温度对中华原钩虾( <i>Eogammarus possjeticus</i> )摄食率和消化酶活力的影响	薛素燕 毛玉泽 赵法箴 方建光	(94)
罗氏沼虾( <i>Macrobrachium rosenbergii</i> )幼体病原肠杆菌 PCR 检测技术的建立与应用	陈雪峰 杨国梁 高强 夏正龙 濮剑威 慎佩晶 黄振远	(99)
养殖密度、饵料种类和丰度对日本囊对虾( <i>Marsupenaeus japonicus</i> )争胜行为的影响	秦浩 王仁杰 来守敏 李娜 李玉全	(105)
中国刺参( <i>Apostichopus japonicus</i> )与韩国刺参杂交子一代生长和抗病力比较	谭杰 王亮 高菲 邹安格 孙慧玲 李凤辉 范超晶 左之良 燕敬平	(109)
温度和盐度对红刺参( <i>Apostichopus japonicus</i> )耗氧率与排氨率的影响	包杰 姜宏波 田相利 董双林	(116)
穗花狐尾藻( <i>Myriophyllum spicatum</i> L.)饲喂对刺参( <i>Apostichopus japonicus</i> )幼参生长、体成分及消化酶的影响	何舟 宋坚 常亚青 程龙 宁军号 庞云龙 马里	(122)
恩诺沙星和环丙沙星在泥鳅( <i>Misgurnus anguillicaudatus</i> )体内的残留和消除规律	孙慧宇 陈君义 王云飞 顾开朗	(128)
气相色谱-质谱法测定渔业水质中 8 种除草剂的残留量	罗方方 王艳君 叶玫 余颖 刘海新 姜琳琳	(132)
闽南地区水产品中邻苯二甲酸酯类(PAEs)的分布特征及风险评价	姜琳琳	(139)
复合酶提取法对浒苔( <i>Enteromorpha</i> sp.)膳食纤维吸附能力的影响	李月欣 刘楠 周德庆	(145)
基于电子鼻技术的鱼露与鱼酿酱油的品质分析	赵玲 刘淇 曹荣	(150)

## 第 5 期

### 研究论文

转录因子 <i>Runx2</i> 和 <i>Osterix</i> 在半滑舌鳎( <i>Cynoglossus semilaevis</i> )早期发育阶段的时序性表达分析	马骞 庄志猛 冯文荣 柳淑芳	(1)
流沙湾水产养殖区浮游动物群落特征	郭永坚 李俊伟 罗昭林 颀晓勇 陈素文 朱长波 郭奕惠	(8)
黄海中南部狮子鱼种类的分析	杨涛 单秀娟 陈云龙 戴芳群 周志鹏	(19)
鄱阳湖通江水道翘嘴鲌( <i>Culter alburnus</i> )的生物学参数估算	张燕萍 吴斌 方春林 陈文静 贺刚 傅培峰 周辉明 王生 俞泽溪	(26)
基于 BP 人工神经网络的大沽河湿地海水水质综合评价	徐勇 赵俊 过锋 乔向英 张艳 陈聚法	(31)
波纹唇鱼( <i>Cheilinus undulatus</i> )的胚胎发育及初孵仔鱼的形态观察	陈猛猛 骆剑 陈国华 文鑫 吴光灿 李文深 韩玉龙	(38)
摄食豆肽对星斑川鲈( <i>Platichthys stellatus</i> )幼鱼肝脏蛋白表达的影响	宋志东 王际英 李培玉 乔洪金 张利民 郝甜甜	(45)
牙鲆( <i>Paralichthys olivaceus</i> )丝氨酸蛋白酶 I - 1 基因多态性	付瑞雪 周纳宇 刘金相 王旭波 贺艳 张全启 于海洋	(55)
滁州鲫( <i>Carassius auratus</i> )线粒体全基因组序列分析及系统进化	胡玉婷 胡王 江河 凌俊 段国庆 潘庭双	(63)
凡纳滨对虾( <i>Litopenaeus vannamei</i> )组织样品常温保存液的筛选和优化	陈大恭 黄捷 王海亮 李晋	(71)
洪泽湖野生河蚬( <i>Corbicula fluminea</i> )线粒体 CO I 基因序列的遗传多样性分析	李大命 张彤晴 唐晟凯 钟立强 刘小维	(81)
吠喃西林代谢产物在中国对虾( <i>Fenneropenaeus chinensis</i> )体内的消除规律及其对代谢酶活性的影响	李东利 李健 常志强 孙铭 王莹 葛红星	(87)
海星棘皮投喂仿刺参( <i>Apostichopus japonicus</i> Selenka)的效果	吴志宏 孙元芹 刘天红 李晓 李红艳 王颖	(95)
饲料中添加 3 种不同投入品对筏式浅海网箱刺参( <i>Apostichopus japonicus</i> )养殖生长的影响	郝继光 王印庚 廖梅杰 李彬 崔浩 许燕 邹安革 张振	(102)
蓬莱玉参( <i>Apostichopus</i> sp.)体壁的营养成分分析及评价	刘长琳 王有廷 秦搏 阮飞腾 陈四清 燕敬平 赵法箴 刘春胜 崔恒全	(111)

两种三疣梭子蟹( <i>Portunus trituberculatus</i> )养殖塘中浮游细菌的季节变化.....	陈逸斐 韦 梦 裘琼芬 蒋霞敏 王春琳	(119)
大海马( <i>Hippocampus kuda</i> Bleeker)幼体口吻部骨骼形态观察及其对摄食的影响.....	王子晖 徐永健 李 响	(126)
一株海洋中性蛋白酶高产菌 S-3685 的鉴定及产酶条件.....	马子宾 郑鸿飞 刘均忠 郝建华 孙 谧	(131)
基于 PIV 技术的方形网箱二维流场分析.....	崔 勇 关长涛 赵 侠 刘 超 黄 滨 李 娇	(138)
大马哈鱼( <i>Oncorhynchus keta</i> )鱼皮的营养成分分析.....	姜晓东 李红艳 王 颖 吴志宏 刘天红 李 晓 孙元芹	(145)
表面活性效应下强力霉素伏安行为及其检测.....	张旭志 刘明文 丁东生 郭萌萌 赵 俊 曲克明	(151)
通告		
《渔业科学进展》图表的写作要求.....		(158)

## 第 6 期

### 研究论文

渔业多鱼种综合开捕网目尺寸和捕捞努力量管理目标确定方法探讨.....	刘 勇 程家骅	(1)
长江口及其邻近海域渔业资源结构的季节变化.....	孙鹏飞 戴芳群 陈云龙 单秀娟 金显仕	(8)
北黄海 3 种常见蛇尾的主要营养成分分析.....	房景辉 张继红 蒋增杰 毛玉泽 臧元奇 方建光	(17)
低盐胁迫对黄姑鱼( <i>Nibea albiflora</i> )幼鱼鳃离子调节、呼吸代谢酶和皮质醇的影响.....	施兆鸿 张晨捷 彭士明 张艳亮 王建钢 高权新	(22)
壳寡糖与低聚木糖对大菱鲂( <i>Scophthalmus maximus</i> )幼鱼生长、体组成和血液生化指标的影响.....	蔡胜昌 张利民 张德瑞 王际英 马晶晶 武明欣 孙永智 王世信	(29)
饥饿对云纹石斑鱼( <i>Epinephelus moara</i> )卵黄囊期仔鱼摄食和生长的影响.....	于欢欢 陈 超 张廷廷 李炎璐 孔祥迪 刘 莉 马文辉	(37)
普安银鲫( <i>Carassius auratus gibelio</i> )卵黄囊期脂蛋白脂酶和肝脂酶基因的表达及葡萄糖、维生素 C 对其的影响.....	蒋左玉 姚俊杰 熊铧龙 安 苗 朱忠胜 宋 娇	(43)
病原性鳃弧菌( <i>Vibrio anguillarum</i> )双重 PCR 与 LAMP 检测方法的建立.....	孙晶晶 高晓建 张晓君 马丽娜 阎斌伦 白雪松 赵佳铭 毕可然 秦 蕾	(49)
中国明对虾( <i>Fenneropenaeus chinensis</i> ) Tetraspanin-3 与 WSSV 的体外相互作用...关广阔 刘庆慧 黄 捷		(56)
基于家系水平的凡纳滨对虾( <i>Litopenaeus vannamei</i> )保种群体出肉率与表型性状的相关性分析.....	柴 展 栾 生 罗 坤 孔 杰 许圣钰	(63)
聚 β-羟基丁酸酯对凡纳滨对虾( <i>Litopenaeus vannamei</i> )非特异性免疫力及氨氮胁迫后免疫基因表达量的影响.....	邓康裕 孟宪红 孔 杰 张恒恒 史晓丽 曹家旺 罗 坤 栾 生 曹宝祥 刘 宁	(71)
夏季保苗期刺参( <i>Apostichopus japonicus</i> )腐皮综合征病原菌的分离鉴定及其致病阈值.....	张文泽 王印庚 廖梅杰 荣小军 李 彬 张 正 李 华 范瑞用	(79)
无机镉对魁蚶( <i>Scapharca broughtonii</i> )毒性效应及其安全性评价.....	刘天红 于晓清 刘广斌 王 颖 吴莹莹 刘恩孚 邱兆星	(88)
光裸方格星虫( <i>Sipunculus nudus</i> )对 3 种不同底质的适应能力.....	李俊伟 朱长波 郭永坚 颀晓勇 陈素文 张文文	(95)
壳聚糖固定化海洋微生物 YS2071 脂肪酶及其酶学性质.....	张 权 盛 军 刘均忠 郑鸿飞 孙 谧	(100)
饵料中添加海洋红酵母( <i>Rhodotorula</i> sp.) C11 对幼参消化酶及免疫反应的影响.....	杨志平 徐 哲 周 倩 张粹粹 孙建明	(107)
15 种中草药对刺激隐核虫( <i>Cryptocaryon irritans</i> )的杀灭效果及包囊破裂的条件.....	刘婷婷 唐小千 周 丽	(113)
消油剂对海湾扇贝( <i>Argopecten irradians</i> )的急性毒性效应.....	徐 勇 朱建新 江 涛 刘文文	(121)
栉江珧( <i>Atrina pectinata</i> )催产方法及幼虫培养条件.....	郑言鑫 杨爱国 吴 彪 孙秀俊 周丽青 李东明 董迎辉	(127)
基于支持向量机的新鲜与解冻许氏平鲷( <i>Sebastes schlegeli</i> )近红外光谱鉴别技术.....	刘申申 孙 永 周德庆	(134)
黑尾近红鲷( <i>Ancherythroculter nigrocauda</i> )加工过程腌制工艺的优化.....	胡 王 陈小雷 李正荣 周蓓蓓 鲍俊杰	(139)

## Total Contents of *PROGRESS IN FISHERY SCIENCES*, Vol. 36, 2015

### No.1

- Annual dynamic distributions of *Paracalanus parvus* (Copepoda Calanoida) in Laizhou Bay, China ..... WANG Xiuxia, ZUO Tao, WU Qiang, CHEN Ruisheng (1)
- Substrate Enzyme, Microbe Distribution and Denitrification Effects of the Constructed Sea Water Wetland ..... ZHOU Qiang, CUI Zhengguo, WANG Jiapeng, QU Keming, MA Shaosai, MAO Chengquan (10)
- Development and Application of the LR RT-PCR Method for Evaluating Destructive Effects of Ozone on Red-spotted Grouper Nervous Necrosis Virus ..... LI Jin, SHI Chengyin, WANG Shengqiang, SU Zidan (18)
- Microsatellite Loci Isolated by Roche 454 GS FLX in *Pleuronectes yokohamae* ..... PAN Ting, ZHANG Yan, ZHANG Hui, GAO Tianxiang, XIAO Yongshuang, JIANG Yunrong (26)
- Genetic Diversity Analysis on Artificial Triploid Stock of *Paralichthys olivaceus* using Microsatellite DNA Marker ..... LIU Hui, WU Zhihao, LI Zhen, ZHU Xiangping, YOU Feng, SONG Zongcheng, LI Jun, HU Jinwei (33)
- Bioinformatic Characterization of Promoters of Two Activin- $\beta$  Subunit Genes in *Paralichthys olivaceus* ..... LIU Mengmeng, WANG Jing, GAO Jinning, MA Liman, ZHANG Quanqi (41)
- Effects of Four Types of Diet on the Growth and Body Composition of *Mugil cephalus* ..... GUO Yongjian, LUO Zhaolin, YIN Xiaoli, LI Junwei, ZHU Changbo, XIE Xiaoyong (48)
- Rapid Screening of Chinese Herbal Immunostimulants for *Epinephelus fuscoguttatus* ..... SUN Xiaofei, GUO Weiliang, XIE Zhenyu, WANG Shifeng, HU Wenting, LI Fusheng, WANG Wenhui, ZHOU Yongcan (54)
- Selective Breeding of Fast-Growing and Ammonia Toxicity-Resistant Chinese Shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) ..... LI Jian, HE Yuying, WANG Qingyin, LIU Ping, LI Jitao, WANG Xuezhong (61)
- PCR Detecting Types by the OIE Standards for Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) in Farmed Shrimp ..... YUAN Yanyan, YANG Bing, WAN Xiaoyuan, LIU Sun, LIU Tianqi, HUANG Jie (67)
- The Morphological Characteristics of the *Blepharipoda liberate* Shen ..... WANG Xuemei (74)
- Studies on Bottom Sowing Culture in Pond and Longline Aquaculture of Late Seedling in Bay Scallop *Argopecten irradians* ..... WANG Dongzhe, MAO Yuze, FANG Xiao, DU Meirong, ZHANG Fuchong, FANG Jianguang (79)
- Full Length cDNA Cloning and Bioinformatics Analysis of Acute Viral Necrosis Virus IAP-86 Gene From *Anadara uropygimelana* ..... ZHANG Shuai, WANG Chongming, YUE Zhiqin, SONG Xiaoling, BAI Changming, YIN Weili, HUANG Jie (85)
- The Effects of Low Salinity on the Growth and Activities of Digestive Enzymes in Sea Cucumber *Apostichopus japonicus* ..... ZHAO Bin, HU Wei, LI Chenglin, HAN Sha, DONG Xiaoliang, WANG Bo, JIANG Tao (91)
- Selective Feeding on Five Species of Bivalves and Feeding Rhythm of *Asterias amurensis* ..... DAI Ketao, LI Jiao, GUAN Changtao, ZHANG Yuan, ZHAO Xuewei (97)
- Influence of Bioturbation of *Sipunculus nudus* on the Nutrients of Sediment and Pore Water in the Polyculture System of *S. nudus* and *Mugil cephalus* ..... LI Junwei, ZHU Changbo, GUO Yongjian, XIE Xiaoyong, HUANG Guoqiang, CHEN Suwen (103)
- Responses of Bacterial Community to the Sediment Improver in the Environment of *Apostichopus japonicus* Culture Ponds ..... LI Xiaolong, LI Qiufen, JIANG Weiwei, LIU Huaide, WANG Xiaohong, SONG Xianli, AN Xinlong (111)
- Preparation of Composite Ultrafiltration Membrane With Dopamine and Its Application in the Wastewater Treatment in Aquaculture ..... WANG Dong, XU Jia, SHAN Baotian, SONG Di, LIU Ruicong (119)
- Hot Spots of Frontiers in the Research of Sustainable Yield of Chinese Inshore Fishery ..... JIN Xianshi, DOU Shuozeng, SHAN Xiujuan, WANG Zhenyu, WAN Ruijing, BIAN Xiaodong (124)
- Progress on the Research of the Development and Function of the Dopaminergic Nervous System of Sea Urchin in the Early Developmental Stage ..... RU Shaoguo, WANG Cuicui (132)

### No.2

- The Abundance, Distribution, and Stage-Specific Compositions of *Euphausia superba* in the Water Around the Antarctic Peninsula ..... ZUO Tao, CHEN Dan, ZHAO Xianyong, WU Qiang, LI Xiansen (1)
- The Horizontal Distribution of Dominant Large Tintinnid (Ciliophora, Tintinnida) in Laizhou Bay ..... CHEN Xue, WU Qiang, LUAN Qingshan, ZHANG Wuchang, XU Jianhong, XIAO Tian (11)
- Studies on the Macrobenthic Diversity in the Water Around Gulei Peninsula of Fujian in Spring ..... LIN Junhui, WANG Jianjun, LIN Heshan, HE Xuebao, HUANG Yaqin, LI Rongguan, ZHENG Fengwu, ZHENG Chengxing (23)
- Recombinant Expression, Purification and Functional Analysis of Half-Smooth Tongue Sole CSFR2 Protein ..... WANG Kailin, HU Qiaomu, CHEN Songlin (30)

The Expression Pattern of miR-223 in Different Tissues of <i>Cynoglossus semilaevis</i> and the Regulation of Expression in Response to Infections.....	YAN Hui, ZENG Yan, GONG Guangye, CHEN Yadong, CHEN Songlin, LIU Yang, SHA Zhenxia	(37)
Preliminary Studies on Blind-side Hypermelanosis of <i>Cynoglossus semilaevis</i> : Chromatophores Observation and Expression of Proopiomelanocortin.....	SHI Xueying, XU Yongjiang, WU Ningning, LIU Xuezhou, YANG Hongjun, ZANG Kun, SHI Bao, LI Cunyu	(45)
Study on the Genetic Structure of Three Cultured Populations of <i>Takifugu obscurus</i> with Microsatellite Markers.....	ZOU Jie, MA Aijun, ZHAO Yanfei, HE Weiguo, WANG Ting, YUE Liang, LIU Dayong, GUO Zhenglong	(55)
The Cloning and Expression of Alpha2-Macroglobulin Gene of <i>Exopalaemon carinicauda</i> .....	WANG Youkun, LIU Ping, DUAN Yafei, LI Jitao, LI Jian	(63)
Establishment of Polyclonal Antibody Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and the Application in the Rapid Detection of Marine Bacteria.....	ZHI Tongrui, SONG Xiaoling, ZHANG Xiaojing, ZHANG Shengjing, HUANG Jie	(71)
Oral Administration of CpG ODNs and <i>Yarrowia lipolytica</i> Harboring VP28 in Farm Ponds to Protect Shrimp From White Spot Syndrome Virus Infection.....	YI Qilin, LIU Rui, SUN Rui, WANG Lingling, LIU Conghui, CHI Zhenming, SONG Linsheng	(77)
cDNA Cloning and Study on Tissue Distribution of F <sub>0</sub> -ATP Synthase b-chain of <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	HE Xiaodong, LIU Qinghui, GUAN Guangkuo, LI Qian, LI Chen, HUANG Jie	(87)
The Effects of Salinity on the Growth of Juvenile <i>Eleutheronema tetradactylum</i> and Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATP Enzyme.....	LUO Haizhong, LI Weiye, FU Rongbing, LIU Minhai, XU Yian, YOU Jiuju, ZHANG Xia	(94)
The Isolation, Identification and Analysis of a Nitrogen-Removing Bacterium Strain from Shrimp Farming Pond Using Bio-Floc Technology.....	WANG Zhijie, HU Xiugui, LIU Xuya, SONG Xiaoling, MA Shen, HUANG Jie	(100)
Biological Characteristics of Pathogenic <i>Streptococcus agalactiae</i> Isolated From <i>Aequidens rivulatus</i> .....	YAO Xueliang, XU Xiaoli, LI Hemi, ZHONG Wenhui, ZANG Li, LI Hao, YANG Chaojing	(106)
Pharmacokinetics of Three Sulfa-Drugs in the <i>Fenneropenaeus chinensis</i> .....	LI Jinbao, CHANG Zhiqiang, LI Jian, SUN Ming	(113)
The Effects of the Ratio of Dietary Protein to Lipid on the Growth, Digestive Enzyme Activities and Blood Biochemical Parameters in Spotted Halibut, <i>Verasper variegates</i> .....	LÜ Yunyun, CHEN Siqing, YU Chaolei, CHANG Qing, QIN Bo, WANG Zhijun	(118)
Effects of Different Levels of Dietary Vitamin E on the Reproductive Performance and Offspring Quality of Tongue Sole <i>Cynoglossus semilaevis</i> .....	XIAO Dengyuan, LIANG Mengqing, WANG Xinxing, ZHENG Keke, ZHAO Min	(125)
The Analysis and Evaluation of the Nutritive Composition of the Muscles of Sablefish ( <i>Anoplopoma fimbria</i> ).....	LIU Changlin, CHEN Siqing, WANG Youting, QIN Bo, YAN Jingping, ZHAO Fazhen, LIU Siwei, LIU Chunsheng	(133)
The Antibacterial Activity of Peptides From <i>Porphyrax yezoensis</i> .....	SONG Huiping, YU Jia, LI Shan, WEI Yuxi, WANG Wenxiu, XU lina, HAN Dan	(140)
Screening and Characterization of a Bacterium Named 4-1-3 Antagonizing <i>Aeromonas veronii</i> .....	FAN Fei, ZHANG Shengwu, LI Liantai, LI Yan, SU Xiaofeng, AN Xianhui	(146)

### No.3

The Community Structure of the Phytoplankton in the Funing Bay.....	QUAN Hanfeng, SHAN Xiujian, DAI Fangqun	(1)
Comparison Habitat Suitability Index Model of <i>Illex argentinus</i> and Its Application into Fishing Ground Forecasting.....	DING Qi, CHEN Xinjun, WANG Jintao	(8)
Growth of Juvenile <i>Anthocidaris crassispina</i> Released and Enhanced in Dayawan Bay.....	LUO Hongxia, CHEN Pimao, YUAN Huarong, QIN Chuanxin, WANG Lianlian, ZHOU Yanbo, FENG Xue, NIE Yongkang	(14)
The Spatio-Temporal Changes in the Long-Line Fishing Grounds of Albacore ( <i>Thunnus alalunga</i> ) in Western and Central Pacific Ocean.....	TANG Yanli, XU Zhan	(22)
The Expression and Application of the Recombinant Protein of the Female Specific Gene <i>CSW3</i> in Half-Smooth Tongue Sole ( <i>Cynoglossus semilaevis</i> ).....	WANG Tianzi, WANG Na, HU Qiaomu, SHAO Changwei, CHEN Songlin	(30)
The Key Hormone Change Pattern of Thyroid Hormone Axis and Growth Axis of Japanese flounder ( <i>Paralichthys olivaceus</i> ) in the Ponds.....	LI Xiaoni, SHI Bao, LIU Xuezhou, XU Yongjiang, CHANG Yaqing, CHEN Shengyi, ZANG Kun	(36)
Comparative Analysis of Growth Characteristics Between Hybrid F <sub>1</sub> by <i>Epinephelus moara</i> (♀) × <i>Epinephelus septemfasciatus</i> (♂) and the Offspring of Their Parents.....	LI Yanlu, CHEN Chao, WANG Qingyin, WU Leiming, SONG Zhenxin, LIN Limin, ZHAI Jieming, Okutani Akira, Satoshi Ota	(42)
Sex Ratio and Body Weight Analysis of Four-Month Juvenile Turbot ( <i>Scophthalmus maximus</i> L.).....	HU Yulong, WANG Weiji, KONG Jie, GUAN Jiantao, XU Liyong, MA Yu, WANG Qingyin	(50)
The Growth Performance of the Hybridization Offspring of Israel Strain Red Tilapia and Other Tilapia Populations in Sea Water.....	ZHANG Tianshi, JIANG Tao, KONG Jie, WEI Baozhen, JIE Jinhua, ZHANG Yanhong, LUAN Sheng	(56)
Combined Effects of Temperature and Salinity on the Growth and Survival of <i>Fenneropenaeus meiguensis</i> .....	QIAN Jiahui, LI Zhimin, YE Ning, LIU Jianyong, HU Zhiguo, ZHENG Kaijiang	(62)
Establishment of Specific Detection Methods by Nested PCR and qPCR for <i>Bacillus firmus</i> Based on the <i>hag</i> Gene.....	XU Yanfen, WANG Hailiang, CHEN Datian, SONG Xiaoling, HUANG Jie	(68)

- Estimation of the Heritability of the Tolerance to Low-Salinity in *Portunus trituberculatus* ..... WANG Zheng, GAO Baoquan, LIU Ping, LI Jian (74)
- Analysis of Body Color Variations Among Four Wild Populations of *Portunus trituberculatus* ..... GAO Baoquan, LIU Ping, LI Jian, LIU Lei (79)
- Effects of Dietary Substitution of Fishmeal by Fermented Silkworm Pupae on the Growth, Feed Intake, Digestion and Immunity of Juvenile Turbot (*Scophthalmus maximus* L.) ..... MEI Lin, ZHOU Huihui, MAI Kangsen, XU Wei, HE Gen (85)
- The Requirement of Dietary Selenium at the Middle Growth Stage of Japanese Seabass (*Lateolabrax japonicus*) ..... TAN Feng, LIANG Mengqing, ZHENG Keke, XU Houguo (93)
- Effects of Dietary Taurine on the Reproductive Performance and the Larval Quality in Tongue Sole *Cynoglossus semilaevis* ..... ZHAO Min, LIANG Mengqing, ZHENG Keke, XIAO Dengyuan, LI Qinghua (101)
- The Health-Promoting Effects of *Bacillus subtilis* in the Culture of Sea Cucumber ..... DONG Chunguang, YANG Aiguo, SUN Xiujun, WU Biao, LIU Zhihong, ZHOU Liqing, HOU Ya (109)
- Study on the Accumulation and Elimination of Pb and Cd in *Patinopecten yessoensis* ..... CUI Zhengguo, YUAN Xuzhou, CUI Yi, CHEN Bijuan, LI Yongxia, LIANG Jun, ZHAO Xuewei (116)
- The Effects of *Sargassum thunbergii* on the Growth of Sea Cucumbers and the Water Environment ..... WANG Zhigang, HU Fanguang, GUO Pingping, WU Zhihong, SONG Xianli, SUN Fuxin, LI Meizhen, WANG Baoting, PANG Shaonan (125)
- Pharmacokinetics of Difloxacin in Turbot (*Scophthalmus maximus*) Following Intravenous and Oral Administration ..... LIANG Junping, DUAN Yafei, LI Jian, CHANG Zhiqiang (131)
- Simultaneous Determination of Chloramphenicol, Thiamphenicol, Florfenicol and Florfenicol Amine Residues in Aquatic Products with Gas Chromatography/Mass Spectrometry ..... SHAO Hui, LENG Kailiang, ZHOU Mingying, GAO Hua, SUN Weihong, XING Lihong, MIAO Junkui, LIU Kun (137)

## No.4

- Spatiotemporal Distribution of *Euphausia superba* in CCAMLR Area 48 During 2012/2013 Fishing Season ..... LI Xiansen, ZHANG Jichang, ZHAO Xianyong, ZUO Tao, ZHU Jiancheng, WANG Xinliang, XU Guodong, MENG Tao, XU Yucheng, ZHANG Peng, YING Yiping, SUN Shan (1)
- Bayesian Bio-economic Model and Management Strategy of Chub Mackerel (*Scomber japonicus*) in the East China Sea and the Yellow Sea ..... WANG Congjun, WANG Jintao, CHEN Xinjun, GUAN Wenjiang (10)
- The Assessment of Biological Parameters and Stock Biomass of *Siniperca chuatsi* in the Poyang Lake ..... WU Bin, FANG Chunlin, ZHANG Yanping, FU Peifeng, CHEN Wenjing, XIONG Xiaoying, ZHOU Huiming, HE Gang, WANG Sheng, WANG Qingping (21)
- Assessment of Enhancement Effectiveness of Chinese Shrimp *Fenneropenaeus chinensis* Stock in the Laoshan Bay ..... YUAN Wei, LIN Qun, WANG Jun, SUN Jianqiang, CHEN Ruisheng (27)
- Size-fraction of Phytoplankton and Photosynthetic Carbon Flow Pathway in the Coastal Area of Zhangzidao Island ..... JIANG Zengjie, DU Meirong, JIANG Xu, LIANG Jun, ZHAO Xuewei, LIU Yi, ZHANG Yuan, ZHANG Xiaofang, FANG Jianguang (35)
- Analysis and Evaluation on Nutritional Status and Organic Pollution Condition in the Southern Offshore Area of Huangdao District of Qingdao City ..... GUO Feng, CHEN Jufa, ZHANG Yan, CHEN Bijuan (44)
- In vitro* Recombinant Expression of Insulin-Like Factor II from *Cynoglossus semilaevis* Günther ..... XU Yongjiang, LIU Xuezhou, ZHANG Kai, WU Ningning, LIU Zhiliang, LI Chunguang (51)
- Study on the Embryonic and Early Larval Development of *Rhinogobio ventralis* ..... GUAN Min, XIAO Kan, HU Meihong, LIU Yong, LU Xuebao, NI Yong, GUO Wentao, QU Huantao, LI Sha (57)
- Feeding Habits and Ontogenetic Diet Shifts of Mackerel Tuna (*Euthynnus affinis*) in the Beibu Gulf, South China Sea ..... SU Xin, LI Yongdong, HE Xiongbo, LU Huosheng, YAN Yunrong (65)
- The Characteristics of Culturable Bacterial Microflora in the Gastrointestinal Tract of Turbot (*Scophthalmus maximus*) Larvae ..... SHI Xiuqing, ZHANG Zheng, WANG Yingeng, YU Yongxiang, DENG Wei, LI Hua (73)
- Isolation, Identification and Drug Sensitive Test of *Aeromonas jandaei* from Tilapia (*Tilapia nilotica*) ..... YANG Ning, JIANG Fangyan, HUANG Hai, JIAO Jian (83)
- Expression of *TRx*, *LvP38*, *CAT*, and *POD* Gene of *Litopenaeus vannamei* Response to WSSV Infection ..... LIU Pengfei, LIU Qinghui, WU Yin, HUANG Jie (89)
- Effects of Temperature on the Feeding Rate and the Digestive Enzymes Activities of *Eogammarus possjeticus* ..... XUE Suyan, MAO Yuze, ZHAO Fazhen, FANG Jianguang (94)
- Development and Application of the PCR Detection Method of Pathogenic Enterobacters in the Larvae of the Giant Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii* ..... CHEN Xuefeng, YANG Guoliang, GAO Qiang, XIA Zhenglong, PU Jianwei, SHEN Peijing, HUANG Zhenyuan (99)
- Effects of Stocking Density and Food on Agonistic Behavior of *Marsupenaeus japonicus* ..... QIN Hao, WANG Renjie, LAI Shoumin, LI Na, LI Yuquan (105)

Comparative Study on Growth and Disease Resistance of Hybrids between Chinese and Korean Stocks of Sea Cucumber <i>Apostichopus japonicus</i> .....	TAN Jie, WANG Liang, GAO Fei, ZOU Ange, SUN Huiling, LI Fenghui, FAN Chaojing, ZUO Zhiliang, YAN Jingping	(109)
Effects of Temperature and Salinity on Oxygen Consumption Rate and Ammonia-N Excretion Rate of Red <i>Apostichopus japonicus</i> (Selenka) .....	BAO Jie, JIANG Hongbo, TIAN Xiangli, DONG Shuanglin	(116)
Effects of Adding <i>Myriophyllum spicatum</i> L. Meal in Diets on the Growth, Body Composition and Digestive Enzymes Activities of Juvenile Sea Cucumber <i>Apostichopus japonicus</i> (Selenka) .....	HE Zhou, SONG Jian, CHANG Yaqing, CHENG Long, NING Junhao, PANG Yunlong, MA Li	(122)
The Residues and Elimination of Enrofloxacin and Ciprofloxacin in Loach <i>Misgurnus anguillicaudatus</i> .....	SUN Huiyu, CHEN Junyi, WANG Yunfei, GU Kailang	(128)
Determination of Eight Herbicides in Fishery Water by Gas Chromatography-Mass Spectrometry .....	LUO Fangfang, WANG Yanjun, YE Mei, YU Ying, LIU Haixin, JIANG Linlin	(132)
The Distribution Characteristics and Risk Assessment of Phthalic Acid Esters (PAEs) in Aquatic Products in Minnan Region .....	JIANG Linlin	(139)
Effects of Complex Enzymes Extraction on Adsorption Capabilities of Dietary Fiber from <i>Entenmorpha</i> sp. ....	LI Yuexin, LIU Nan, ZHOU Deqing	(145)
The Quality Analysis of Fish Sauce and Fish Soy Sauce using Electronic Nose .....	ZHAO Ling, LIU Qi, CAO Rong	(150)

## No.5

Temporal Expression of Transcription Factors <i>Runx2</i> and <i>Osterix</i> During Early Development of <i>Cynoglossus semilaevis</i> .....	MA Qian, ZHUANG Zhimeng, FENG Wenrong, LIU Shufang	(1)
Characteristics of Zooplankton Community in Aquaculture Areas of Liusha Bay .....	GUO Yongjian, LI Junwei, LUO Zhaolin, XIE Xiaoyong, CHEN Suwen, ZHU Changbo, GUO Yihui	(8)
Analysis of Liparidae Species in Central and Southern Yellow Sea .....	YANG Tao, SHAN Xiujuan, CHEN Yunlong, DAI Fangqun, ZHOU Zhipeng	(19)
The Estimation of Biological Parameters for <i>Culter alburnus</i> in the Waterway Connecting the Poyang Lake and the Yangtze River .....	ZHANG Yanping, WU Bin, FANG Chunlin, CHEN Wenjing, HE Gang, FU Peifeng, ZHOU Huiming, WANG Sheng, YU Zexi	(26)
Integrated Quality Assessment of Dagou River Wetland Sea Water Based on Back Propagation (BP) Artificial Neural Network .....	XU Yong, ZHAO Jun, GUO Feng, QIAO Xiangying, ZHANG Yan, CHEN Jufa	(31)
Embryonic Development and Morphologic Observations of Newly-Hatched <i>Cheilinus undulatus</i> Larvae .....	CHEN Mengmeng, LUO Jian, CHEN Guohua, WEN Xin, WU Guangcan, LI Wenshen, HAN Yulong	(38)
Effects of Soy Peptide on Protein Expression in Liver of Juvenile Starry Flounder ( <i>Platichthys stellatus</i> ) .....	SONG Zhidong, WANG Jiying, LI Peiyu, QIAO Hongjin, ZHANG Limin, HAO Tiantian	(45)
The Polymorphism of Serine Protease I-1 in Japanese Flounder ( <i>Paralichthys olivaceus</i> ) .....	FU Ruixue, ZHOU Nayu, LIU Jinxiang, WANG Xubo, HE Yan, ZHANG Quanqi, YU Haiyang	(55)
Sequence and phylogenetic analysis of the complete mitochondrial genome of Chuzhou Crucian Carp ( <i>Carassius auratus</i> ) .....	HU Yuting, HU Wang, JIANG He, LING Jun, DUAN Guoqing, PAN Tingshuang	(63)
Selection and Optimization of Simple and Convenient Sample Solutions for Shrimp Tissue Preservation at Normal Temperature .....	CHEN Datian, HUANG Jie, WANG Hailiang, LI Jin	(71)
Genetic Diversity of Wild <i>Corbicula fluminea</i> Population in the Hongze Lake Analyzed by Mitochondrial DNA CO I Gene Sequence .....	LI Daming, ZHANG Tongqing, TANG Shengkai, ZHONG Liqiang, LIU Xiaowei	(81)
The Elimination Rules of Nitrofurazone Metabolites and Its Effects on Activities of Metabolic Enzymes in <i>Fenneropenaeus chinensis</i> .....	LI Dongli, LI Jian, CHANG Zhiqiang, SUN Ming, WANG Ying, GE Hongxing	(87)
The Effects of Asterias Echino-Skin as Additive Component of the Feed on <i>Apostichopus japonicus</i> .....	WU Zhihong, SUN Yuanqin, LIU Tianhong, LI Xiao, LI Hongyan, WANG Ying	(95)
The Effects of Three Types of Feed Supplements on the Growth of <i>Apostichopus japonicus</i> Cultured in Cages .....	HAO Jiguang, WANG Yingeng, LIAO Meijie, LI Bin, CUI Hao, XU Yan, ZOU Ange, ZHANG Zhen	(102)
Analysis and Evaluation of Nutrient Composition in the Body Wall of Penglai Sea Cucumber ( <i>Apostichopus</i> sp.) .....	LIU Changlin, WANG Youting, QIN Bo, RUAN Feiteng, CHEN Siqing, YAN Jingping, ZHAO Fazhen, LIU Chunsheng, CUI Hengquan	(111)
The Seasonal Variations of Bacterioplankton in Two Types of Ponds of <i>Portunus trituberculatus</i> .....	CHEN Yifei, WEI Meng, QIU Qiongfeng, JIANG Xiamin, WANG Chunlin	(119)
The Skeletal Morphology of Snout Tube and Its Effect on Feeding of Juvenile Yellow Seahorse, <i>Hippocampus kuda</i> Bleeker .....	WANG Zihui, XU Yongjian, LI Xiang	(126)
Identification of a Marine Bacterium S-3685 with High Neutral Protease and Optimization of Its Fermentation Conditions .....	MA Zibin, ZHENG Hongfei, LIU Junzhong, HAO Jianhua, SUN Mi	(131)

- Analysis of Two-Dimension Flow Field of the Square Cage Based on Particle Image Velocimetry (PIV) ..... CUI Yong, GUAN Changtao, ZHAO Xia, LIU Chao, HUANG Bin, LI Jiao (138)
- The Analysis of Nutrient Components of *Oncorhynchus keta* Skin ..... JIANG Xiaodong, LI Hongyan, WANG Ying, WU Zhihong, LIU Tianhong, LI Xiao, SUN Yuanqin (145)
- Voltammetric Behaviour of Doxycycline in the Presence of Surfactant and Its Determination ..... ZHANG Xuzhi, LIU Wenwen, DING Dongsheng, GUO Mengmeng, ZHAO Jun, QU Keming (151)

## No.6

- A Multi-Species Management Model Combining Fishery Catchable Mesh Size and Fishing Effort ..... LIU Yong, CHENG Jiahua (1)
- Seasonal Variations in Structure of Fishery Resource in the Yangtze River Estuary and Its Adjacent Waters ..... SUN Pengfei, DAI Fangqun, CHEN Yunlong, SHAN Xiujian, JIN Xianshi (8)
- The Analysis of Nutrient Components of Three Brittle Star Species in the North Yellow Sea ..... FANG Jinghui, ZHANG Jihong, JIANG Zengjie, MAO Yuze, ZANG Yuanqi, FANG Jianguang (17)
- Effects of Low-Salinity Stress on the Ion Regulation, Respiratory Metabolic Enzymes and Serum Cortisol in the Gill of *Nibea albiflora* Juvenile ..... SHI Zhaohong, ZHANG Chenjie, PENG Shiming, ZHANG Yanliang, WANG Jiangang, GAO Quanxin (22)
- Effects of Chitosan Oligosaccharide and Xylo-oligosaccharide on the Growth Performance, Body Composition and Serum Biochemistry of Juvenile Turbots (*Scophthalmus maximus*) ..... CAI Shengchang, ZHANG Limin, ZHANG Derui, WANG Jiying, MA Jingjing, WU Mingxin, SUN Yongzhi, WANG Shixin (29)
- Feeding and Growth of *Epinephelus moara* of Larvae in the Process of Nourishing Transformation ..... YU Huanhuan, CHEN Chao, ZHANG Tingting, LI Yanlu, KONG Xiangdi, LIU Li, MA Wenhui (37)
- The Effects of Glucose and Vitamin C on the Gene Expression of Lipoprotein Lipase and Hepatic Lipase During the Development of the Yolk-Sac Larva of *Carassius auratus gibelio* ..... JIANG Zuoyu, YAO Junjie, XIONG Hualong, AN Miao, ZHU Zhongsheng, SONG Jiao (43)
- Detection of Pathogenic *Vibrio anguillarum* by Using Duplex PCR and LAMP Assays ..... SUN Jingjing, GAO Xiaojian, ZHANG Xiaojun, MA Lina, YAN Binlun, BAI Xuesong, ZHAO Jiaming, BI Keran, QIN Lei (49)
- Interaction of Tetraspanin-3 in *Fenneropenaeus chinensis* with WSSV *in vitro* ..... GUAN Guangkuo, LIU Qinghui, HUANG Jie (56)
- Correlation Analysis of Fillet Yield with Phenotypic Traits for Families from Conservation Population of *Litopenaeus vannamei* ..... CHAI Zhan, LUAN Sheng, LUO Kun, KONG Jie, XU Shengyu (63)
- Effects of Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate on Non-Specific Immunity and Expression of Immune Gene Under the Ammonia Stress of *Litopenaeus vannamei* ..... DENG Kangyu, MENG Xianhong, KONG Jie, ZHANG Hengheng, SHI Xiaoli, CAO Jiawang, LUO Kun, LUAN Sheng, CAO Baoxiang, LIU Ning (71)
- Isolation and Identification of the Pathogenic Bacteria of Skin Ulcerative Syndrome (SUS) from *Apostichopus japonicus* Juveniles in Summer and Study on Its Pathogenic Threshold ..... ZHANG Wenze, WANG Yingeng, LIAO Meijie, RONG Xiaojun, LI Bin, ZHANG Zheng, LI Hua, FAN Ruiyong (79)
- The Safety Evaluation of the Acute Toxicological Effects of Inorganic-Cadmium on *Scapharca broughtonii* ..... LIU Tianhong, YU Xiaoqing, LIU Guangbin, WANG Ying, WU Yingying, LIU Enfu, QIU Zhaoxing (88)
- Adaptability of *Sipunculus nudus* to Three Types of Different Sediments ..... LI Junwei, ZHU Changbo, GUO Yongjian, XIE Xiaoyong, CHEN Suwen, ZHANG Wenwen (95)
- Chitosan Immobilization of Lipase from Marine Microorganism YS2071 and Its Enzyme Characteristics ..... ZHANG Quan, SHENG Jun, LIU Junzhong, ZHENG Hongfei, SUN Mi (100)
- Effects of Dietary Supplementation of Marine Yeast *Rhodotorula* sp. C11 on Digestive Enzyme Activity and Immune Response in Juvenile Sea Cucumber *Apostichopus japonicus* ..... YANG Zhiping, XU Zhe, ZHOU Qian, ZHANG Cuicui, SUN Jianming (107)
- The Pesticidal Effects of Chinese Herbal Medicine on the Trophonts and the Theronts of Ciliate *Cryptocaryon irritans* and the Influence of Temperature and Salinity on the Cyst Rupture ..... LIU Tingting, TANG Xiaoqian, ZHOU Li (113)
- The Acute Toxicity of Dispersant and Chemically Dispersed Oil on the *Argopecten irradians* ..... XU Yong, ZHU Jianxin, JIANG Tao, LIU Wenwen (121)
- Studies on the Spawning Inducement and the Conditions for the Larval Culture of *Atrina pectinata* ..... ZHENG Yanxin, YANG Aiguo, WU Biao, SUN Xiujun, ZHOU Liqing, LI Dongming, DONG Yinghui (127)
- Distinguishing the Fresh from the Frozen-Thawed *Sebastes schlegeli* Using the NIR Spectroscopy Identification Technology Based on Support Vector Machine ..... LIU Shenshen, SUN Yong, ZHOU Deqing (134)
- Optimization of the Salting Process of *Ancherythroculter nigrocauda* ..... HU Wang, CHEN Xiaolei, LI Zhengrong, ZHOU Beibei, BAO Junjie (139)

# 《渔业科学进展》编辑委员会

THE EDITORIAL BOARD OF *PROGRESS IN FISHERY SCIENCES*

主 编 Editor-in-Chief 唐启升 TANG Qisheng

副主编 Associate Editors-in-Chief 金显仕 JIN Xianshi 麦康森 MAI Kangsen 孙 松 SUN Song 孔 杰 KONG Jie

顾 问 Advisors (以姓名笔画为序)

苏纪兰 SU Jilan 林浩然 LIN Haoran 赵法箴 ZHAO Fazhen 徐 洵 XU Xun

曹文宣 CAO Wenxuan 雷霖霖 LEI Jilin 管华诗 GUAN Huashi

编 委 Members (以姓名笔画为序)

于志刚 YU Zhigang	戈贤平 GE Xianping	方建光 FANG Jianguang	王清印 WANG Qingyin
王新鸣 WANG Xinming	包振民 BAO Zhenmin	司徒建通 SITU Jiantong	关瑞章 GUAN Ruizhang
刘占江 LIU Zhanjiang	刘海金 LIU Haijin	孙效文 SUN Xiaowen	孙 谧 SUN Mi
庄 平 ZHUANG Ping	曲克明 QU Keming	江世贵 JIANG Shigui	何建国 HE Jianguo
吴常文 WU Changwen	吴淑勤 WU Shuqin	张士瑾 ZHANG Shicui	张全启 ZHANG Quanqi
张国范 ZHANG Guofan	张显良 ZHANG Xianliang	李来好 LI Laihao	李杰人 LI Jieren
李 健 LI Jian	李家乐 LI Jiale	杨红生 YANG Hongsheng	邹桂伟 ZOU Guiwei
陈立侨 CHEN Liqiao	陈松林 CHEN Songlin	陈雪忠 CHEN Xuezhong	周永灿 ZHOU Yongcan
林 洪 LIN Hong	俞志明 YU Zhiming	姚 杰 YAO Jie	相建海 XIANG Jianhai
赵宪勇 ZHAO Xianyong	徐 皓 XU Hao	桂建芳 GUI Jianfang	殷邦忠 YIN Bangzhong
秦 松 QIN Song	贾晓平 JIA Xiaoping	常亚青 CHANG Yaqing	常剑波 CHANG Jianbo
黄 捷 HUANG Jie	董双林 DONG Shuanglin	翟毓秀 ZHAI Yuxiu	魏宝振 WEI Baozhen

编辑部 Editorial Office 常 青 (编辑部主任) CHANG Qing (Chief)

江润林 (责任编辑) JIANG Runlin (Responsible Editor)

冯小花 FENG Xiaohua 陈 辉 CHEN Hui 陈 严 CHEN Yan

## 渔 业 科 学 进 展

YUYE KEXUE JINZHAN

(双月刊, 1980年创刊)

第36卷 第6期 2015年12月

## PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

(Bimonthly, founded in 1980)

Vol.36 No.6 Dec. 2015

主管单位 中华人民共和国农业部  
主办单位 中国水产学会  
中国水产科学研究院黄海水产研究所  
出版单位 科学出版社  
地址: 北京东黄城根北街16号, 邮编: 100717  
编辑单位 中国水产科学研究院黄海水产研究所  
地址: 青岛市南京路106号 邮编: 266071  
电话: 0532-85833580  
<http://www.yyqxjz.cn>  
E-mail: yyqxjz@ysfri.ac.cn

主 编 唐启升  
印 刷 青岛星球印刷有限公司  
国内发行 青岛市邮政局  
订 购 全国各地邮政局  
国外发行 中国国际图书贸易总公司  
地址: 北京339信箱 邮编: 100044

Supervised by Ministry of Agriculture, P.R. China  
Sponsored by Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, China Society of Fisheries  
Published by Science Press  
Add: 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China  
Edited by Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences  
Add: 106 Nanjing Road, Qingdao, 266071, China; Tel: 0532-85833580  
<http://www.yyqxjz.cn>; E-mail: yyqxjz@ysfri.ac.cn  
Editor-in-Chief Tang Qisheng  
Printed by Qingdao Xingqiu Printing Co., Ltd.  
Domestic Distributed by Post Office of Qingdao  
Subscription Post Offices All Over China  
Overseas Distributed by China International Book Trading Corporation  
P.O. Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号  
ISSN 2095-9869  
CN 37-1466/S

国内邮发代号: 24-153  
国外发行代号: 4578Q  
国内外公开发行人

定 价: 30.00元

ISSN 2095-9869



9 772095 986156