中国科技核心期刊
中 文 核 心 期 刊
全国优秀农业期刊
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核心期刊
RCCSE 中国权威学术期刊
中国期刊全文数据库(CNKI)、万方数据、
中文科技期刊数据库(维普网)收录期刊
中国海洋文献数据库(CODS)来源期刊
英国《动物学记录》(ZR)收录期刊
《水科学与渔业文摘》(ASFA)收录期刊
《剑桥科学文摘》(CSA)收录期刊
《乌利希期刊指南》(UPD)收录期刊
《开放获取期刊指南》(DOAJ)收录期刊

渔 业 科 学 进 展

YUYE KEXUE JINZHAN

第 37 卷　　第 3 期

2016 年 6 月

目　　录

研究论文

南极磷虾(*Euphausia superba*)脂肪与蛋白含量的季节变化 …… 聂玉晨　张　波　赵宪勇　王新良　张吉昌　李显森 (1)

渤海石油平台污损生物生态研究 …… 周　斌　冯春辉　刘　伟　赵　升 (9)

辽东湾近岸表层海水重金属污染分析与评价 …… 宋永刚　吴金浩　邵泽伟　于彩芬　张玉凤　杜　静　姜　冰　宋　伦　王年斌 (14)

辽东湾水体中石油类的时空分布特征和污染状况 …… 王召会　吴金浩　胡超魁　刘桂英　王年斌　李　爱　田甲申　马志强 (20)

温度对云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*)胚胎发育和仔鱼活力的影响 …… 张廷廷　陈　超　施兆鸿　李炎璐　于欢欢　任保辉　徐万土 (28)

星突江鳕(*Platichthys stellatus*)、石鳕(*Kareius bicoloratus*)及其正反杂交种肌肉的营养成分分析及评价 …… 曹栋正　张小忠　陈四清　秦　搏　常　青　刘长琳　柳　茜　吕云云 (34)

不同糖源对卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)日增重、饲料利用和消化酶活性的影响 …… 董兰芳　张　琴　许明珠　童　潼　王　珺　熊向英　彭银辉 (42)

高植物蛋白饲料中不同水平低分子水解鱼蛋白对大菱鲆(*Scophthalmus maximus* L.)幼鱼生长及肝脏 IGF-I 受体表达的影响 …… 牟玉超　梁萌青　郑珂珂　卫育良 (49)

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)微卫星多重 PCR 体系的建立及其在家系亲权鉴定中的应用 …… 李东宇　孔　杰　孟宪红　栾　生　罗　坤　卢　霞　曹宝祥 (58)

我国一株新型黄头病毒的分子流行病学 …… 朱罗罗　张庆利　万晓媛　邱　亮　马　芳　黄　倢 (68)

一株兼具氨氮去除能力和对副溶血弧菌拮抗作用的有益菌的筛选及其初步应用 …… 王　磊　王志杰　高　戈　黄　倢 (78)

对虾养殖池中一株弧菌拮抗菌的分离鉴定 …… 张欢欢　王秀华　李　晨　黄　倢 (85)

普通刺参(*Apostichopus japonicus*)和白刺参不同组织基因组 DNA 的 MSAP 研究 …… 左之良　谭　杰　吴　彪　陈四清　高　菲　燕敬平　王　爽　孙慧玲 (93)

青、白刺参(*Apostichopus japonicus*)体壁营养成分的比较分析 …… 李忠清　夏　斌　王际英　黄炳山　张利民　李宝山 (101)

海萝(*Gloiopeltis furcata*)藻体保存和容器内的培养方法 …… 陈素文　郭永坚　李俊伟　颉晓勇　朱长波 (108)

基因条码在条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)不同品系间种质鉴定中的适用性 …… 曹殿嘉　严兴洪 (114)

高温对海带(*Saccharina japonica*)抗氧化酶及叶绿素荧光参数的影响 …… 凌晶宇　梁洲瑞　王飞久　孙修涛　汪文俊　刘福利　姚海芹 (120)

饲料中添加蛋氨酸寡肽对大黄鱼(*Larimichthys crocea*)生长、饲料利用和蛋白质代谢反应的影响 …… 马　俊　魏泽宏　邢淑娟　依丽娜　徐　玮　周慧慧　张文兵　麦康森 (126)

广西茅尾海的香港巨牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)在不同养殖区的性腺发育变化 …… 於　锋　罗　帮　陈雪芬　李琼珍　王　嫣 (134)

不同浓度臭氧对循环水养殖系统生物膜活性及其净化效能的影响 …… 黄　滨　马　腾　刘宝良　刘　滨　洪　磊　梁　友　翟介明　张丽丽 (143)

研究简报

鲜饵不同投饵率对 2–5 龄大鲵(*Andrias davidianus*)生长的影响 …… 李　欣　张树明　卞秋云　王　震　陈宇珺　梁　刚 (148)

产木聚糖酶菌株 YS1069 的产酶条件优化 …… 董延娟　郝建华　郑鸿飞　孙　谧 (154)

5 种褐藻的甘露糖醛酸和古罗糖醛酸比值测定 …… 曲艳艳　王伟伟　曹增梅　王　娜　李晓捷　张壮志　梁广津 (160)

期刊基本参数： CN37-1466/S * 1980 * b * A4 * 164 * zh+en * p * ￥30.00 * 800 * 23 * 2016-06

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

CONTENTS

Vol.37 No.3 June 2016

Seasonal Variation in Lipids and Protein Content of Antarctic Krill (*Euphausia superba*) ····· NIE Yuchen, ZHANG Bo, ZHAO Xianyong, WANG Xinliang, ZHANG Jichang, LI Xiansen (1)
Ecological Research of Fouling Organisms on the Offshore Platform in Bohai Sea ····· ZHOU Bin, FENG Chunhui, LIU Wei, ZHAO Sheng (9)
Evaluation of Heavy Metal Pollution in the Offshore Surface Seawater of the Liaodong Bay ····· SONG Yonggang, WU Jinhao, SHAO Zewei, YU Caifen, ZHANG Yufeng, DU Jing, JIANG Bing, SONG Lun, WANG Nianbin (14)
Temporal and Spatial Distribution of Petroleum Hydrocarbon and the Pollution in Seawater of the Liaodong Bay ····· WANG Zhaohui, WU Jinhao, HU Chaokui, LIU Guiying, WANG Nianbin, LI Ai, TIAN Jiashen, MA Zhiqiang (20)
Effects of Temperature on the Embryonic Development and Larval Activity of *Epinephelus moara* ····· ZHANG Tingting, CHEN Chao, SHI Zhaohong, LI Yanlu, YU Huanhuan, REN Baohui, XU Wantu (28)
Analysis and Evaluation of Nutritive Composition in Muscles of *Platichthys stellatus*, *Kareius bicoloratus* and Their Reciprocal Hybrids ····· CAO Dongzheng, ZHANG Xiaozhong, CHEN Siqing, QIN Bo, CHANG Qing, LIU Changlin, LIU Xi, LÜ Yunyun (34)
Effect of Different Carbohydrate Sources on Daily Weight Growth, Feed Utilization and Digestive Enzyme Activities of *Trachinotus ovatus* ····· DONG Lanfang, ZHANG Qin, XU Mingzhu, TONG Tong, WANG Jun, XIONG Xiangying, PENG Yinhui (42)
Effects of Small Molecule Weight Fish Protein Hydrolysate in High Plant Protein Diets on the Expression of Liver IGF-I Receptor and the Growth of Juvenile Turbot (*Scophthalmus maximus* L.) ····· MU Yuchao, LIANG Mengqing, ZHENG Keke, WEI Yuliang (49)
Development of Multiplex PCR Systems of Microsatellite Markers for Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and Its Application for Parentage Identification ····· LI Dongyu, KONG Jie, MENG Xianhong, LUAN Sheng, LUO Kun, LU Xia, CAO Baoxiang (58)
Molecular Epidemiology of a New Yellow Head Virus Strain in China ····· ZHU Luoluo, ZHANG Qingli, WAN Xiaoyuan, QIU Liang, MA Fang, HUANG Jie (68)
Identification and Application of a Probiotic Strain Functioning in Both Ammonia Nitrogen Removal and *Vibrio parahaemolyticus* Antagonism ····· WANG Lei, WANG Zhijie, GAO Ge, HUANG Jie (78)
Isolation and Identification of a Bacterial Strain with Vibrios-Antagonism from Shrimp Ponds ····· ZHANG Huanhuan, WANG Xiuhua, LI Chen, HUANG Jie (85)
MSAP Analysis of Genomic DNA in the Tissues of *Apostichopus japonicus* and White *A. japonicus* ····· ZUO Zhiliang, TAN Jie, WU Biao, CHEN Siqing, GAO Fei, YAN Jingping, WANG Shuang, SUN Huiling (93)
Comparative Study on Nutrient Composition of Body Walls of Green and White Sea Cucumbers (*Apostichopus japonicus*) ····· LI Zhongqing, XIA Bin, WANG Jiying, HUANG Bingshan, ZHANG Limin, LI Baoshan (101)
Studies on Culture and Storage of *Gloiopeltis furcata* Thalli ····· CHEN Suwen, GUO Yongjian, LI Junwei, XIE Xiaoyong, ZHU Changbo (108)
Applicability of DNA Barcoding in the Identification of Different Strains in *Pyropia yezoensis* ····· CAO Dianjia, YAN Xinghong (114)
Effects of High Temperature on the Antioxidant Enzymes and Chlorophyll Fluorescence Parameters of *Saccharina japonica* ····· LING Jingyu, LIANG Zhourui, WANG Feijiu, SUN Xiutao, WANG Wenjun, LIU Fuli, YAO Haiqing (120)
Effects of Dietary Oligo-Methionine on the Growth Performance, Feed Utilization and Protein Metabolism Responses of Juvenile Large Yellow Croaker (*Larimichthys crocea*) ····· MA Jun, WEI Zehong, XING Shujuan, YI Lina, XU Wei, ZHOU Huihui, ZHANG Wenbing, MAI Kangsen (126)
Gonad Development of Oyster (*Crassostrea hongkongensis*) at Different Cultural Sites in Maowei Bay, Guangxi, China ····· YU Feng, LUO Bang, CHEN Xuefen, LI Qiongzhen, WANG Yan (134)
Effects of Ozone Concentration on the Activity of Biofilm and Its Effectiveness of Purification in Recirculating Aquaculture Systems ····· HUANG Bin, MA Teng, LIU Baoliang, LIU Bin, HONG Lei, LIANG You, ZHAI Jieming, ZHANG Lili (143)
Effects of Frequency of Feeding with Fresh Diet on the Growth of the 2 to 5-year-old *Andrias davidianus* ····· LI Xin, ZHANG Shuming, BIAN Qiuyun, WANG Zhen, CHEN Yujun, LIANG Gang (148)
Optimization of the Fermentation Conditions for Xylanase-Producing Strain YS1069 ····· DONG Yanjuan, HAO Jianhua, ZHENG Hongfei, SUN Mi (154)
Determining the Ratio of Mannuronic Acid to Guluronic Acid(M/G) of Five Species of Brown Algae ····· QU Yanyan, WANG Weiwei, CAO Zengmei, WANG Na, LI Xiaojie, ZHANG Zhuangzhi, LIANG Guangjin (160)

DOI: 10.11758/yykxjz.20150408001 http://www.yykxjz.cn/

南极磷虾(*Euphausia superba*)脂肪与蛋白含量的季节变化*

聂玉晨[1,2] 张 波[2,3] 赵宪勇[2,3①] 王新良[2] 张吉昌[2] 李显森[2]

(1. 上海海洋大学海洋科学学院 上海 201306；2. 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；3.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)

摘要 为了有效提取营养功效和附加值均更高的磷虾油，对南极磷虾(*Euphausia superba*)资源的综合开发利用提供参考，利用 2013 年 7−8 月和 2013 年 12 月−2014 年 5 月在南乔治亚群岛和南设得兰群岛附近海域采集的南极磷虾样品，采用索氏抽提法，分别用无水乙醇、丙酮、石油醚、正己烷、乙酸乙酯、环己烷 6 种常见的有机溶剂作为提取试剂，对南极磷虾体内的脂肪进行提取，并确定最佳萃取溶剂。同时对南极磷虾脂肪、蛋白含量的季节变化及其与体长的关系进行了分析。结果显示，无水乙醇为南极磷虾脂肪提取的最佳溶剂。南乔治亚群岛海域 7−8 月南极磷虾脂肪含量和蛋白含量(干重)分别为(22.03±0.51)%和(64.52±0.16)%；其中，全长小于 40 mm 的磷虾个体，脂肪与蛋白含量均显著高于全长大于 40 mm 的个体($P<0.05$)。从南极的初夏到秋末，南设得兰群岛海域的南极磷虾脂肪含量呈逐渐上升趋势，由 12 月的(19.83±0.04)%上升至翌年 4 月的最大值(30.58±0.02)%；5 月则略有降低，为(28.66±0.03)%。与此相反，南极磷虾的蛋白含量则是 12 月最高、4 月最低，分别为(66.75±0.14)%和(58.02±0.23)%；脂肪含量与蛋白含量呈显著负相关($P=0.005$)。研究结果对南极磷虾渔业及其生产安排具有直接的指导意义。

关键词 脂肪含量；蛋白含量；萃取溶剂；季节变化；南极磷虾

中图分类号 S932.5+1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)03-0001-08

磷虾隶属于节肢动物门(Arthropoda)、甲壳动物纲(Crustacea)、磷虾目(Euphausiacea)，是南大洋海洋浮游动物中一个重要类群(Everson, 2000)。南极的磷虾种类多达 11 种，其中南极大磷虾(*Euphausia superba* Dana)数量最多且个体最大，即我们平常所称的南极磷虾(*Euphausia superba*)。南极磷虾不仅作为南大洋最大的单种生物资源，支撑企鹅、海豹、鲸类等庞大的高层捕食者的种群(王荣等, 1995)，而且是世界上生物量最大的可捕海洋生物资源之一(Everson, 2000; Nicol *et al*, 1997)。据估算南极磷虾的生物量为 6.5−10.0 亿 t (Roger *et al*, 2000)，最新研究结果为 3.79 亿 t (Atkinson *et al*, 2009)。由于其本身巨大的生物量和潜在的商业开发价值(黄洪亮等, 2007; 苏学锋等, 2012; 张吉昌等, 2012)，日益受到世界各国的关注。我国于 2009 年末正式启动了磷虾资源的实质性探捕和研究，逐步成为南极磷虾的主要捕捞国之一(左涛等, 2012; 陈森等, 2013)。

南极磷虾营养丰富而全面，蛋白含量(干样)高达的 60%−65%，富含 8 种人体必需氨基酸且比例适宜，是一种优质动物性蛋白质源(Tou *et al*, 2007；孙雷等, 2008；刘丽等, 2010)。此外，南极磷虾的脂类营养物质含量也十分丰富，含量占湿重的 1%−6%(Fricke *et al*,

* 科技支撑计划课题(2013BAD13B03)、公益性行业(农业)科研专项(201203018)和农业部“南极海洋生物资源开发利用”项目共同资助。聂玉晨，E-mail: nieyuchenasd@163.com

① 通讯作者：赵宪勇，研究员，E-mail: zhaoxy@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-04-08, 收修改稿日期: 2015-05-22

1984)。从南极磷虾中提取的磷虾油富含不饱和脂肪酸，含量约占总脂肪酸含量的 49.1%−67.6%，其中 EPA 和 DHA 在不饱和脂肪酸中所占的比例为 79.1%−89.2%，这些指标均高于 EPA 和 DHA 含量在 15%左右的普通鱼油(王南平等, 2012)；磷脂的含量约占磷虾油脂总量的 40%(Bottino *et al*, 1975)；此外南极磷虾体内富含高抗氧化活性的虾青素，每 100 g 磷虾油中含有 3−4 mg 虾青素(Yamaguchi *et al*, 1983)。目前，南极磷虾除具有较高的食用价值之外，主要用于提取附加值极高的磷虾油，而提取虾油之后的虾肉与虾壳的混合物，还可作为大马哈鱼等高档养殖鱼类的饲料，用于提高这些鱼类肌肉的色泽并促进生长(王南平等, 2012)。

脂肪与蛋白含量对于磷虾油的提取与饲料品质至关重要，直接影响着磷虾渔业的经济效益。Saether 等(1986)的研究表明，随着季节变化，南极磷虾的脂肪含量也随之变化，其干样中脂肪含量的范围为 12%−50%；Meyer 等(2010)的研究还表明，在食物缺少的冬季，除了脂肪作为主要能源物质，蛋白质也被中度利用。因此探究南极磷虾脂肪与蛋白含量的季节变化规律有利于实现南极磷虾的综合利用。

索氏抽提法是公认的脂肪含量测定的经典方法(韦方三等, 2011)。脂肪含量测定中最关键的一步是脂肪的提取。目前南极磷虾脂肪的提取主要采用溶剂萃取法，所用溶剂包括乙醇、丙酮、石油醚、正己烷、环己烷、乙酸乙酯等毒性较低的有机溶剂(孙甜甜等, 2012)。本研究首先对无水乙醇、丙酮、石油醚、正己烷、环己烷、乙酸乙酯 6 种常见溶剂的脂肪萃取效果进行了比较筛选，并在此基础上测定南极磷虾脂肪含量和蛋白含量，此外还分析了脂肪含量和蛋白含量的季节变化规律以及与体长的关系，以期为南极磷虾生产的优化配置提供参考、为南极磷虾生理生态学研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 样品采集与保存

实验样品为搭载中国渔轮“福荣海”，于 2013 年 7−8 月和 2013 年 12 月−2014 年 5 月在南大洋南乔治亚群岛附近水域和南设得兰群岛附近水域采集所获。取样工具为磷虾中层拖网，囊网网目尺寸为 2.0 cm。从渔获物中随机抽取磷虾样品 200−500 g，放入密封袋中于船上冷库保存，其后以冷冻方式运至陆地实验室，并贮藏于−25℃冰柜中暂存。

2013 年 7−8 月采集于南乔治亚群岛附近水域的磷虾样品来自岛屿的北部(图 1，右)，体长范围为 27−63 mm；2013 年 12 月−2014 年 5 月采集于南设得兰群岛附近水域的样品来自 6 个站位(图 1，右)，分别取自每月的 15 日左右，体长范围为 29−68 mm。

1.2 主要仪器与试剂

实验中使用的主要仪器、设备包括：DGX−9003 鼓风干燥箱；电热恒温水浴锅；ALC−210.4 型电子分析天平；索式抽提装置；全自动凯氏定氮仪 Kjeldahl 2300；Tecator Digestor Auto 20 消化炉。

主要试剂包括：无水乙醇(AR)、丙酮(AR)、石油醚(AR)、正己烷(AR)、乙酸乙酯(AR)、环己烷(AR)浓硫酸(AR)、硼酸(AR)、甲基红(AR)、溴甲酚绿(AR)、

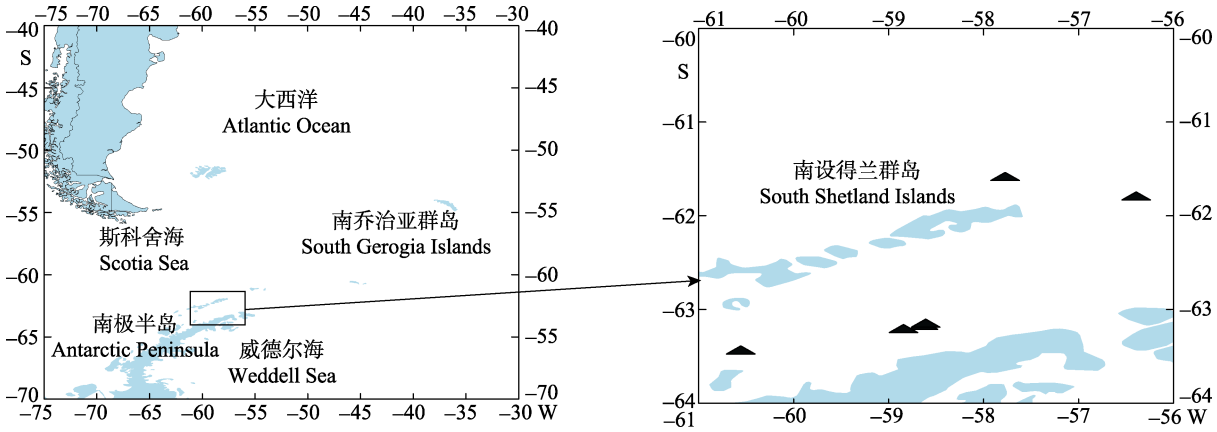

图 1 2013 年 7−8 月和 2013 年 12 月−2014 年 5 月分别在南乔治亚群岛和南设得兰群岛附近水域的调查区域(左)及南设得兰群岛附近水域的样品采集站位分布(右图)。“▲”代表站位

Fig.1 (Left) survey areas for Antarctic krill in the waters nearby the South Georgia Islands from June to August in 2013 and the South Shetland Islands from December 2013 to May 2014; (Right) distribution of the sampling stations nearby the South Shetland Islands “▲” denoted sampling stations

氢氧化钠(AR)、95%乙醇(AR)、无水碳酸钠(AR)、盐酸(AR)。

1.3　样品预处理

将冷冻虾样取出后，解冻。采用常压烘干法，恒温(70℃)烘干至恒重，测得水分含量；然后用粉碎机将烘干好的样品粉碎、磨细、混匀，且保证每个干燥后样本重量达 10 g 以上，分别装入密封袋中，置于−25℃的冰箱中暂存，供后续脂肪与蛋白含量测定之用。

从 2013 年 7−8 月采集于南乔治亚群岛附近水域的样品中随机选取其中的 20 个样品，分别用无水乙醇、丙酮、石油醚、正己烷、乙酸乙酯、环己烷 6 种常见的有机溶剂作为萃取溶剂，采用索氏抽提法测定每个南极磷虾样品的脂肪含量，根据提取的脂肪含量以及提取过程中是否出现不溶物质以及溶剂毒性等，筛选能够稳定有效地提取南极磷虾脂肪的适宜溶剂。

用于分析脂肪和蛋白含量与体长关系的南极磷虾亦采用 2013 年 7−8 月采集于南乔治亚群岛附近水域的南极磷虾样品，干燥前先进行体长分组，根据样品的体长范围以及采集的样品量将样品分为小于 40 mm、40−45 mm、46−50 mm 以及 50 mm 以上 4 个体长组，每个体长组 20 个样本，共 80 个样本。体长以全长(TL，mm)为准，即额角前端至尾节末端的长度(Kirkwood *et al*, 1982)。

2013 年 12 月−2014 年 5 月采集于南设得兰群岛附近水域的样品，每 30 d 采集了 5 个样本，共 30 个样品，主要用于分析脂肪和蛋白含量的季节变化。

1.4　脂肪含量与蛋白含量的测定

采用索氏抽提法(GB/T 5009.6−2003)测定样品的脂肪含量，萃取溶剂采用筛选所得最适宜的溶剂，每个样品测定两次，测定结果相差超过 0.5%，则测第 3 次；取差值在 0.5%以内的两测定值的平均值为测定结果。采用微量凯氏定氮法(GB/T 5009.5−2010)测定样品的总氮含量，再乘以 6.25 得蛋白质的含量(张波等, 2008)。结果保留两位有效数字。

脂肪含量计算公式如下：

$$F=\frac{m_1-m_2}{m_1-m}\times 100\%$$

式中，F 为脂肪占干重百分比，m 为干燥至恒重的滤纸重，m_1 为装有样品的滤纸包重，m_2 为抽提后干燥至恒重的滤纸包重。

蛋白质含量计算公式如下：

$$P=\frac{(v_1-v_0)\times c\times 0.014}{m}\times 6.25\times 100\%$$

式中，P 为蛋白占干重的百分比，v_1 为样品消耗盐酸标准滴定液的体积，v_0 为试剂空白消耗盐酸标准滴定液的体积，c 为盐酸标准滴定溶液浓度，m 为取样重，6.25 为氮换算为蛋白质的系数，0.014 为 1 ml 盐酸标准滴定溶液相当的氮的质量。

1.5　数据处理与分析

所有统计分析均以 SPSS®(V.16.0)统计软件进行，对于采用不同溶剂测定的南极磷虾的脂肪含量、不同体长组、月份间的脂肪、蛋白质含量采用单因素方差分析(One-way ANOVE)，数据差异显著时采用 Duncan 氏法进行多重比较，显著水平为 P<0.05；对不同月份间南极磷虾脂肪与蛋白含量关系以 Pearson 相关性进行分析，以 P<0.05 作为显著相关的标志。

所得实验数据结果均用平均值±标准误(Mean±SE)表示。

2　结果

2.1　不同溶剂南极磷虾脂肪的提取效果

图 2 给出了以不同溶剂作为萃取剂测定的南极磷虾脂肪含量。从图 2 中可以看出，不同溶剂的测定结果从高到低依次为无水乙醇(22.03±0.19)、丙酮(14.26±0.22)、乙酸乙酯(13.62±0.22)、环己烷(13.01±0.24)、正己烷(12.68±0.21)、石油醚(12.08±0.10)，检验结果显示，除正己烷与环己烷的测定结果不存在显著性差异外(P>0.05)，其他各组间均存在显著性差异(P<0.05)；其中用正己烷与环己烷萃取过程中出现过乳状不溶物。无水乙醇的萃取效果(测定的脂肪含量)显著高于其他 5 种萃取溶剂，且在实验过程中没有出现胶溶现象；抽提后含有南极磷虾脂质的提取液颜色呈橙红色，较其他溶剂所获提取物颜色更深、更清澈。

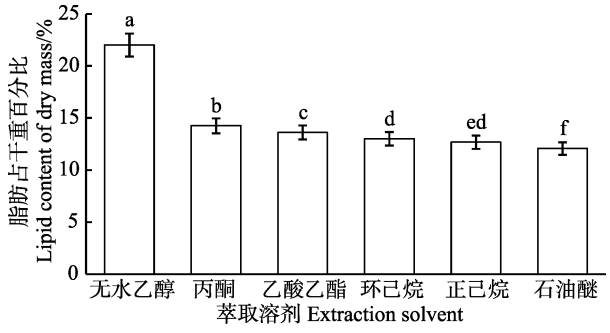

图 2　不同溶剂测定的南极磷虾的脂肪含量

Fig.2　Lipid content of Antarctic krill measured using different solvents

数据上标字母不同表示显著性差异(P<0.05)

Date with different letters were significantly different (P<0.05)

2.2 南极磷虾脂肪含量和蛋白含量与体长的关系

表 1 显示了不同体长组的南极磷虾脂肪含量(溶剂为无水乙醇)和蛋白含量。

检验结果显示，40 mm 以下的体长组南极磷虾脂肪与蛋白含量均显著高于 40 mm 以上的体长组(P<0.05)；40−45 mm 与 46−50 mm 组以及 46−50 mm 与 50 mm 以上的体长组之间，脂肪与蛋白含量均无显著性差异(P>0.05)；50 mm 以上体长组的脂肪含量显著高于 40−45 mm 体长组，而前者的蛋白含量则显著低于后者，尽管差异幅度均较小。

单从均值来看(表 1)，40 mm 以上体长组的磷虾随体长的增长其脂肪含量有增加、蛋白含量有降低的趋势。

2.3 南极磷虾脂肪含量与蛋白含量的季节变化

表 2 列示了 2013 年 7−8 月南乔治亚群岛附近海域和 2013 年 12 月−2014 年 5 月南设得兰群岛附近海域南极磷虾的脂肪与蛋白含量测定结果。南设得兰群岛附近海域南极磷虾脂肪含量的变化范围为 19.83%−30.58%，最低值出现在初夏 12 月，为(19.83±0.04)%；最高值出现在秋季 4 月，为(30.58±0.02)%。冬季 7−8 月南乔治亚群岛附近海域磷虾的脂肪含量为(22.03±0.51)%，明显高于初夏 12 月的含量。

如图 3 所示，南极磷虾蛋白含量与脂肪含量的季节变化趋势恰好相反，初夏 12 月最高，为(66.75±0.14)%；秋季 4 月最低，为(58.02±0.23)%。脂肪与蛋白含量均呈显著负相关(P=0.005，r=−0.905)。

3 讨论

3.1 不同提取溶剂对南极磷虾脂肪的提取效果

南极磷虾由于处于南极低温、严酷的生态环境和独特的生活方式使其具有产生新型生物活性物质的巨大潜力。作为南极特有的生物，南极磷虾的磷脂水

表 1 2013 年 7−8 月南乔治亚群岛附近海域不同体长组南极磷虾干样的脂肪与蛋白含量

Tab.1 Contents of lipids and proteins of Antarctic krill in different body length groups from the water adjacent to the South Georgia Islands from July to August 2013 (% dry matter)

样本量 Sample size	脂肪占干重百分比 Lipid content (%DM)			蛋白质占干重百分比 Protein content (%DM)		
	体长组 Length groups	范围 Range	平均值±标准误 Mean±SE	体长组 Length groups	范围 Range	平均值±标准误 Mean±SE
20	<40	19.45−25.14	23.06±0.26^{a}	<40	64.31−66.45	65.13±0.13^{a}
20	>50	19.83−23.78	22.28±0.20^{b}	40−45	63.09−64.81	63.80±0.12^{b}
20	46−50	19.69−23.03	21.66±0.19^{bc}	46−50	62.66−64.41	63.50±0.09^{bc}
20	40−45	19.79−22.65	21.56±0.15^{cd}	>50	62.20−63.99	63.33±0.11^{cd}

注：同列数据中含有不同的上标字母表示差异显著(P<0.05)

Note: In the same column values with different superscripts were significantly different (P<0.05)

表 2 2013 年 7−8 月和 2013 年 12 月−2014 年 5 月南乔治亚群岛海域(CCAMLR 统计亚区 48.3)和南设得兰群岛海域(CCAMLR 统计亚区 48.1)各月份南极磷虾干样的脂肪与蛋白含量

Tab.2 Contents of lipids and proteins of Antarctic krill from the South Georgia Islands (CCAMLR statistical subarea 48.3) between July and August 2013 and from the South Shetland Islands (CCAMLR statistical subarea 48.3) between December 2013 and May 2014 (% dry matter)

月份 Month	粗脂肪占干重百分比 Lipid content (%DM)			月份 Month	蛋白质占干重百分比 Protein content (%DM)	
	海表温度 Sea surface temperature (℃)	范围 Range	平均值±标准误 Mean±SE		范围 Range	平均值±标准误 Mean±SE
4	−0.5	30.53−30.65	30.58±0.02^{a}	12	66.32−67.02	66.75±0.14^{a}
3	0.0	29.65−29.84	29.75±0.04^{b}	1	64.21−65.16	64.68±0.20^{b}
2	2.0	28.51−28.90	28.70±0.08^{c}	7−8	64.09−64.90	64.52±0.16^{bc}
5	−0.5	28.57−28.75	28.66±0.03^{cd}	2	62.33−62.62	62.51±0.05^{d}
1	1.5	25.69−25.92	25.79±0.04^{e}	5	60.88−61.42	61.19±0.09^{e}
7−8	1.0	20.68−23.52	22.03±0.51^{f}	3	60.28−61.23	60.89±0.18^{ef}
12	1.0	19.75−19.94	19.83±0.04^{g}	4	57.62−58.84	58.02±0.23^{g}

注：同列数据中含有不同的上标字母表示差异显著(P<0.05)

Note: In the same column values with different superscripts were significantly different (P<0.05)

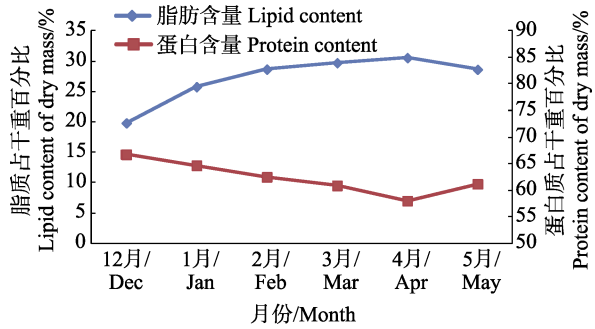

图 3　2013 年 12 月−2014 年 5 月南设得兰群岛海域南极磷虾干样的脂肪与蛋白质含量季节变化

Fig.3　Seasonal variations in the contents of lipids and proteins of Antarctic krill in the water adjacent to the South Shetland Islands from December 2013 to May 2014 (% dry matter)

平达到其总脂的 30%以上(娄乔明等, 2011、2012), 因而用不同提取溶剂测定的含量亦不尽相同。对于提取虾类(包括南极磷虾)脂肪适宜溶剂的选择，近几年也有不少研究，溶剂选择包括氯仿甲醇(孙甜甜等, 2012)、正己烷(周如金等, 2008)、环己烷(张立彦等, 2004)、正己烷+乙酸乙酯(崔秀明等, 2011)、无水乙醇(赵传凯等, 2012)等。本研究进一步验证了无水乙醇是提取南极磷虾脂类的适宜溶剂。研究过程中石油醚、正己烷、环己烷等非极性溶剂的脂肪测定值均较低且易发生乳化现象，而丙酮毒性较大。此外，常用作实验室测定脂肪含量的石油醚、乙醚以及常规作为定量测定水产品脂肪含量的氯仿/甲醇三种溶剂中，石油醚做提取剂时脂肪量明显偏低；乙醚与氯仿作为二级禁药，易燃易爆且有毒；而乙醚易被 2%的水饱和，使测定值偏低。除脂肪提取效果较好外(图 2)，无水乙醇的价格相对便宜，安全性更高，残溶对人身体健康影响较小，因此无水乙醇更适合实验室测定南极磷虾脂肪含量。

3.2　南极磷虾脂肪含量和蛋白含量与体长的关系

根据 Meyer 等(2010)和左涛等(2012)对南极磷虾捕捞群体年龄与体长的相关描述，体长小于 40 mm 组的南极磷虾主要属于未成体与次成体($1^+/2^+$)，40−45 mm、46−50 mm 以及体长大于 50 mm 组的南极磷虾则属于成体或高龄群体。分析结果显示，全长小于 40 mm 的未成体与次成体磷虾个体的脂肪与蛋白含量均显著高于全长大于 40 mm 的成体或高龄群体(P<0.05)；全长大于 40 mm 的成体间不同体长组脂肪与蛋白含量均变化不大，脂肪与蛋白含量分别在 21%、63%左右。南极磷虾幼体经历 3 个阶段 9 个发育期，雄 22 个月、雌 25 个月可达到性成熟。南极磷虾的主要产卵季节为 1−3 月、或更长的 12 月−翌年 4 月，夏末出现了早期蚤状幼体，然后经过越冬与蜕皮，在第 2 年夏季来临之前发育为未成体。第 2 年在食物丰盛的夏秋季节，未成体与次成体体内脂肪明显增加，以能很好地度过漫长的冬季并发育为成体(Hagen *et al*, 2001)。

3.3　南极磷虾脂肪和蛋白含量的季节变化

南大洋水温的季节变化不大(表 2)，南极磷虾生化成分季节变化主要由于南大洋高纬度短暂的光照周期与冬季广泛的海冰覆盖限制了初级生产力，从而限制了南极磷虾的食物来源。在饵料严重缺乏的冬季，南极磷虾似乎主要通过 3 种途径予以适应，(1)夏秋季储存大量脂肪为越冬提供能量；(2)摄食属性由浮游植物转化为杂食性；(3)某些生理机能如呼吸频率、摄食率等的降低(Marschall *et al*, 1988; Quetin *et al*, 1991; Huntley *et al*, 1994; Hagen *et al*, 2001; Meyer *et al*, 2011)。本研究表明，从春末(12 月)到秋末(5 月)，南设得兰群岛附近水域的南极磷虾脂肪含量基本呈现上升趋势，并在 4 月达最大值 30.6%，然后在 5 月有所下降，表明该阶段南极磷虾脂肪的连续性累积；南乔治亚群岛附近水域冬季 7−8 月南极磷虾脂肪含量仍处于较高水平，达 22.0%，高于 12 月南设得兰群岛水域南极磷虾脂肪含量，表明经过冬季消耗，脂肪含量在春季达到最低。

如表 3 所示，Meyer 等(2010)的研究表明，拉扎列夫海的南极磷虾成体的脂肪含量(占干重百分比)，春季(5.2%)显著低于秋季(31.9%)与冬季(29.6%)，秋季最高，冬季仍处于较高水平。Hagen 等(2001)的研究表明，维德尔海南极磷虾总脂含量从晚冬或早春的极低水平(10−11 月，10%)经过夏季积累(1−2 月，28%)在秋季达到最大值(4−5 月，40%以上)；该研究同时显示拉扎列夫海与南极半岛海域有类似变化趋势，拉扎列夫海冬季磷虾脂肪含量同样维持在一个较高水平，南极半岛海域夏季早期仅比冬春之交的脂肪含量略有增长。以上研究与本研究显示了相同的趋势。Hagen 等(2001)的研究还表明，在秋季中期或末期(4、5 月)到春季中期或末期(10、11 月)维德尔海和拉扎列夫海南极磷虾的脂肪含量减少了 70%；其中指示脂肪分解的代谢酶 3−羟酰辅酶 A 脱氢酶(HOAD)，冬季是晚春和秋季的 5 倍左右，表明脂肪在冬季被大量利用；秋季(4 月)南极磷虾的 O∶N 比为 15，表明秋季没有利用体内储存的脂肪(Atkinson *et al*, 2002)；冬季(7、8 月)南极磷虾的 O∶N 比为 66，表明该阶段磷虾体内的脂肪被充分利用(Ikeda *et al*, 2000)，从而使脂肪含量直线下降，在春季达到最小值。

与脂肪含量的变化相比，12 月−翌年 5 月南极磷虾蛋白含量的相对变化要缓和的多，范围为 57%−

表 3 不同海区与季节的南极磷虾脂肪含量

Tab.3 Lipid content of Antarctic krill from different locations and seasons (% dry matter)

海域 Area	时间 Time	季节 Season	月份 Month	脂肪含量 Lipid content	文献 Reference
南极半岛 Antarctic Peninsula	1985−1986	冬季/春季 Winter/spring	10−11 月 Oct−Nov	7.0	Hagen *et al*，2001
		夏季 Summer	1 月 Jan	16.5	
拉扎列夫海 Lazarev Sea	1985−1986	冬季 Winter	7−8 月 Jul−Aug	28.3	Hagen *et al*，2001
		冬季/春季 Winter/spring	10−11 月 Oct−Nov	20.6	
维德尔海 Weddell Sea	1985−1986	冬季/春季 Winter/spring	10−11 月 Oct−Nov	10.7	Hagen *et al*，2001
		夏季 Summer	1−2 月 Jan−Feb	27.6	
		秋季 Autumn	4−5 月 Apr−May	38.7	
拉扎列夫海 Lazarev Sea	2005−2006	春季下旬 Late spring	12 月 Dec	5.2	Meyer *et al*，2010
		秋季 Autumn	4 月 Apr	31.9	
		冬季 Winter	7−8 月 Jul−Aug	29.6	
南乔治亚群岛海域 South Georgia Islands	2013	冬季 Winter	7−8 月 Jul−Aug	22.0	本研究 This study
南设得兰群岛海域 South Shetland Islands	2013−2014	春季 Spring	12 月 Dec	19.8	本研究 This study
		夏季 Summer	1 月 Feb	25.8	
		秋季 Autumn	4 月 Apr	30.6	

67%，基本维持在 58%以上。同样，扎列夫海域同样大小的南极磷虾 2005 年春末(12 月)与 2006 年冬季(7 月)的蛋白含量仅相差 0.6%，表明越冬过程中蛋白几乎没有被利用(Meyer *et al*, 2010)。Torres 等(1994)的研究也得出类似结论，相较于脂肪几近耗尽，南设得兰–威德尔海海域 3−8 月蛋白含量仅减少了 16%。Anger(2001)通过研究不同季节 N 与蛋白的关系表明，越冬过程中仅有少量蛋白被利用，大部分 N 元素稳定存在于肌肉蛋白中。

以上分析显示，南极磷虾脂肪含量的季节变化剧烈程度要比蛋白含量的季节变化程度大的多，当磷虾渔获主要用于生产南极磷虾油等高值产品时，应充分考虑南极磷虾脂肪含量的季节变化，以提高磷虾产业的整体效益。

参 考 文 献

王南平, 何兰, 曹俊, 等. 南极磷虾的特性和利用. 水产科技情报, 2012, 40(3): 128–131

王荣, 孙松. 南极磷虾渔业现状与展望. 海洋科学, 1995, (4): 28–32

韦芳三, 李纯厚, 戴明, 等. 索氏提取法测定海洋微藻粗脂肪含量及其优化方法的研究. 上海海洋大学学报, 2011, 20(4): 619–623

田晓清, 杨桥, 邵盛男, 等. 南极磷虾脂溶性成分的研究进展. 海洋渔业, 2011, 33(4): 462–466

左涛, 赵宪勇, 黄洪亮, 等. 南极半岛邻近水域南极大磷虾商业捕捞群体的年龄结构时空变化. 渔业科学进展, 2012, 33(4): 1–10

刘志东, 陈雪忠, 黄洪亮, 等. 南极磷虾粉的营养成分分析及评价. 中国海洋药物杂志, 2012, 31(2): 43–48

刘丽, 刘承初, 赵勇, 等. 南极磷虾的营养保健功效以及食用安全性评价. 食品科学, 2010, 31(17): 443–447

孙雷, 周德庆, 盛晓风. 南极磷虾营养评价与安全性研究. 海洋水产研究, 2008, 29(2): 57–64

孙甜甜, 薛长湖, 薛勇, 等. 南极磷虾脂质提取方法的比较. 食品工业科技, 2012, 33(16): 115–121

陈森, 赵宪勇, 左涛, 等. 南极磷虾渔业监管体系浅析. 中国渔业经济, 2013, 31(3): 75–83

苏学锋, 冯迪娜. 南极磷虾产业开发特点及发展趋势. 食品研究与开发, 2012, 33(12): 214–217

张立彦, 王琨, 曾庆孝. 虾头中脂溶性成分的提取研究. 武汉工业学院学报, 2004, 23(4): 5–9

张波, 张敏, 戴芳群, 等. 黄海中南部 16 种重要生物资源种类的生化组成及能量含量. 海洋水产研究, 2008, 29(5): 11–18

张吉昌, 赵宪勇, 王新良, 等. 商业探鱼仪南极磷虾声学图像的数值化处理. 渔业科学进展, 2012, 33(4): 64–71

赵传凯, 姜国良, 赵静, 等. 南极大磷虾油脂的提取及其脂肪酸组成分析. 食品工业科技, 2012, 33(3): 207–209

周如金, 赵顺珠, 黄晓梅等. 虾头油提取工艺研究. 中国油脂, 2008, 33(5): 77–79

娄桥明, 王玉明, 刘小芳, 等. 南极磷虾脂肪酸组成及多不饱和脂肪酸质谱特征分析. 中国水产科学, 2011, 18(4): 929–935

娄桥明, 王玉明, 杨文鸽, 等. 南极磷虾粉脂质及脂肪酸组成分析. 水产学报, 2012, 36(8): 1256–1262

黄洪亮, 陈雪忠, 冯春雷. 南极磷虾资源开发现状分析. 渔业现代化, 2007, 34(1): 48–51

崔秀明, 汪之和, 施文正. 南极磷虾粗虾油提取工艺优化. 食品科学, 2011, 32(24): 126–129

Anger K. Chemical composition. In: Vonk R (ed) The biology of decapod crustacean larvae (Crustacean Issues 14). Rotterdam:

Balkema Publishers. 2001, 183–211

Atkinson A, Meyer B, Stübing D, *et al*. Feeding and energy budgets of Antarctic krill *Euphausia superba* at the onset of winter. II. Juveniles and adults. Limnol Oceanogr, 2002, 47(4): 953–966

Atkinson A, Siegel V, Pakhomov EA, *et al*. A re-appraisal of the total biomass and annual production of Antarctic krill. Deep Sea Res PT I, 2009, 56(5): 727–740

Bottino NR. Lipid composition of two species of Antarctic krill: *Euphausia superba* and *E. crystallorophias*. Comp Biochem Physiol B, 1975, 50(3): 479–484

Everson, I. Krill: biology, ecology and fisheries. Oxford: Blackwell Science, 2000

Frazer TK, Quetin LB, Ross RM. Energetic demands of larval krill, *Euphausia superba*, in winter. J Exp Mar Biol Ecol, 2002, 277(2): 157–171

Fricke H, Gercken G, Schreiber W, *et al*. Lipid, sterol and fatty acid composition of antarctic kril (*Euphausia superba* Dana) Lipids, 1984, 19(11): 821–827

Gigliotti JC, Davenport MP, Beamer SK, *et al*. Extraction and characterization of lipids from Antarctic krill (*Euphausia superba*). Food Chem, 2011, 125(3): 1028–1036

Hagen W, Kattner G, Terbrüggen A, *et al.* Lipid metabolism of the Antarctic krill *Euphausia superba* and its ecological implications. Mar Biol, 2001, 139(1): 95–104

Huntley ME, Nordhausen W, Lopez MDG. Elemental composition, metabolic activity and growth of Antarctic krill *Euphausiasuperba*during winter. Mar Ecol-Prog Ser, 1994, 107(1–2): 23–40

Ikeda T, Torres JJ, Hernandez LS, *et al*. Metabolism. In: Harris RP, Wiebe PH, Lenz J, *et al* (eds) ICES zooplankton methodology manual. London: Academic Press. 2000, 455–532

Janet CT, Jacek J, Chen YC. Krill for human consumption: nutritional value and potential health benefits. Nutrition Reviews, 2007, 65(2): 63–77

Kirkwood JM. A guide to the Euphausiacea of the Southern Ocean. ANARE Res Notes 1, 1982, 1–45

Marschall HP. The overwintering strategy of Antarctic krill under the pack-ice of the Weddell Sea. Polar Biol, 1988, 9(2): 129–135

Meyer B, Auerswald L, Siegel V, *et al.* Seasonal variation in body composition, metabolic activity, feeding, and growth of adult krill *Euphausia superba* in the Lazarev Sea. Mar Ecol Prog Ser, 2010, 398(12): 1–18

Meyer B. The overwintering of Antarctic krill, *Euphausia superba,* from an ecophysiological perspective. Polar Biol, 2012, 35(1): 15–37

Nicol S, Endo Y. Krill fisheries of the world. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1997

Phleger CF, Nelson MM, Mooney BD, *et al.* Interannual and between species comparison of the lipids, fatty acids and sterols of Antarctic krill from the US AMLR Elephant Island survey area. Comp Biochem and Phys B, 2002, 131(4): 733–747

Putland J, Sutton TT. Survey of larval *Euphausia superba* lipid content along the Western Antarctic Peninsula during late autumn 2006. Polar Sci, 2011, 5(3): 383–389

Quetin LB, Ross RM. Behavioural and physiological characteristics of the Antarctic krill, *Euphausia superba*. Integr Comp Biol, 1991, 31(1): 49–63

Roger PH, Elizabeth HL, Linen L. The fishery on Antarctic krill: Defining an ecosystem approach to management. Rev Fish Sci, 2000, 8(3): 235–298

Ross RM, Quetin LB. Energetic cost to develop the first feeding stage of *Euphausia superba* Dana and the effect of delays in food availability. J Exp Mar Biol Ecol, 1989, 133(1–2): 103–127

Saether O, Ellingsen TE, Mohr V. Lipids of north Atlantic krill. J Lipid Res, 1986, 27(3): 274–285

Siegel V. Age and growth of Antarctic *Euphausiacea* (Crustacea) under natural conditions. Mar Biol, 1987, 9(4): 483–495

Siegel V, Kalinowski J. Krill demography and small-scale processes: a review. In: EI-Sayed SZ(ed): Southern Ocean ecology: the BIOMASS perspective. Cambrige: Cambridge University Press. 1994, 145–163

Torres JJ, Donnelly J, Hopkins TL, *et al*. Proximate composition and overwintering strategies of Antarctic micronektonic Crustacea. Mar Ecol-Prog Ser, 1994, 113(3): 221–232

Tou JC, Jaczynski J, Chen YC. Krill for human consumption: nutritional value and potential health benefits. Nutr Rev, 2007, 65(2): 63–77

Yamaguchi K, Miki W, Toriu N, *et al*. The composition of carotenoid pigments in the Antarctic Krill *Euphausia superba.* Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. 1983, 49(9): 1411–1415

(编辑　江润林)

Seasonal Variation in Lipids and Protein Content of Antarctic Krill (*Euphausia superba*)

NIE Yuchen[1,2], ZHANG Bo[2], ZHAO Xianyong[2,3,①], WANG Xinliang[2], ZHANG Jichang[2], LI Xiansen[2]

(1. *College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai* 201306; 2. *Key Laboratory for Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Key Laboratory for Fishery Resources and Eco-Environment, Shandong Province, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao* 266071; 3. *Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao* 266071)

Abstract Antarctic krill (*Euphausia superba*) is a rich resource of polyunsaturated fatty acids and proteins. Therefore the contents of the two nutritional components are the determining factors of the economic value of Antarctic krill. To help improve the efficiency of utilization of Antarctic krill, we employed the Soxhlet extraction method and selected the optimal solvent for lipid extraction from anhydrous ethanol, acetone, petroleum ether, hexane, ethyl acetate and cyclohexane. We also analyzed the seasonal variation in the levels of lipids and proteins, and investigated the effect of the body length on the nutritional contents of Antarctic krill. Samples were collected from the water nearby the South Georgia Islands between June and August 2013 and from the water nearby the South Shetland Islands between December 2013 and May 2014. It shows that anhydrous ethanol was the best extraction solvent examined for determining the lipid content of Antarctic krill. The contents of lipids and proteins of samples from the South Georgia Islands were (22.03±0.51)% and (64.52±0.16)% (in dry matter) respectively. The levels of both lipids and proteins of smaller individuals (<40 mm in total length) were higher than those of the larger ones (>40 mm, $P<0.05$). The lipid content of samples from the South Shetland Islands showed an increasing trend from early summer to late fall, the level raised from (19.83±0.04)% in December to the peak value (30.58±0.02)% in April, followed by a decline to (28.66±0.03)% in May. In contrast, the protein content was the highest in December (66.75±0.14)% and the lowest in April (58.02±0.23)%. There was a significant and negative correlation between the lipid content and the protein content ($P=0.005$). These results can be used directly to guide the arrangement of actual fishing operation of the krill fishery.

Key words Lipid content; Protein content; Extraction solvent; Seasonal variation; Antarctic krill

① Corresponding author: ZHAO Xianyong, E-mail: zhaoxy@ysfri.ac.cn

DOI: 10.11758/yykxjz.201512002 http://www.yykxjz.cn/

渤海石油平台污损生物生态研究*

周 斌[1①] 冯春辉[1] 刘 伟[2] 赵 升[3]

(1. 国家海洋局北海海洋工程勘察研究院 青岛 266061；2. 山东省分析测试中心 济南 250014；
3. 国家海洋局北海环境监测中心 青岛 266033)

摘要 2013 年 9 月–2014 年 9 月在渤海海域进行了污损生物挂板试验，共记录污损生物 24 种，以温带种和广温种为主，优势种是多棘麦秆虫(*Caprella acanthogaster*)、日本大螯蜚(*Grandidierella japonica*)、理石叶钩虾(*Jassa marmorata*)、拟钩虾(*Gammaropsis* sp.)等。季板分析结果显示，表层季板的平均生物量为 1764.23 g/m^2，中层季板的平均生物量为 2322.31 g/m^2。试验海域全年均有污损生物附着，但种类和附着量季节性差异明显，污损生物附着盛期为夏季和秋季。污损生物群落 Shannon-Wiener 多样性指数(*H'*)和 Margalef 丰富度指数(*d*)秋季最高。多元统计分析表明，污损生物群落按时间可分为 3 个群落类型，反映出渤海海域污损生物群落的季节变化明显。相关性分析显示，表层和中层试板污损生物的生物量与水温具有显著的相关性，相关系数分别为 0.959 和 0.986 (P<0.01)。

关键词 污损生物；群落结构；渤海

中图分类号 Q178.532 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)03-0009-05

从 20 世纪 80 年代开始，渤海石油生产进入商业开发阶段。目前，渤海已建成的导管架结构石油平台已超过百余座。经过多年的运行，部分平台导管架上污损生物附着现象较为严重，海洋污损生物对平台导管架造成危害主要表现在两个方面(严岩, 1995; 严文侠等, 1995; 马士德等, 2000)：(1)增大构件直径，增加对波浪和海流的阻力，造成结构物静力荷载和动力荷载增加; (2)直接穿破结构表面涂层或产生腐蚀代谢物，通过提供微生物生长条件而间接地影响导管架腐蚀环境。荷载的增加和腐蚀的加剧导致平台存在较大的安全隐患，特别是风暴潮期间可能使平台发生倾斜或倒塌，造成重大经济损失并引发严重的生态灾难。

国内外学者对于海洋石油平台污损生物开展了大量研究(Sammarco *et al*, 2004; Whomersley *et al*, 2003; 严文侠等, 1994; 严涛等, 2000)，主要包括污损生物的生态调查研究，污损生物附着机理的研究以及防除技术的研究开发。我国南海海域相关研究较多，而渤海仅在 20 世纪 70 和 80 年代开展过污损生物调查(黄宗国等, 1980; 林盛等, 1989; 王建军, 1991; 黄修明等, 1994)，此后，渤海海域污损生物的研究鲜有报道。本研究文以渤海石油平台污损生物为研究对象，通过挂板试验并借助多元统计方法，掌握渤海石油平台污损生物群落的种类组成、结构特点及其演变规律，分析污损生物附着的影响因素，为渤海众多超期服役石油平台的改造和石油平台的建设提供防污设计参数，提出污损生物防除建议，降低因污损生物引起的平台安全风险。

1 材料和方法

2013 年 9 月–2014 年 9 月在渤海 CB30A 采油平台(118°55′36″E、38°11′37″N)进行了污损生物挂板试验，平台所在海域平均水深为 12 m，挂板位置见图 1。

挂板材料采用《海洋调查规范》(GB/T 12763.6-2007)中规定的环氧酚醛玻璃布层压板(简称“环氧板”)，其具有表面平整，机械强度高的特点，规格为 3 mm×80 mm×145 mm。按表层和中层挂放在 CB30A 平台导管架上，

* 国家海洋局青年海洋科学基金(2013115)资助。周 斌，E-mail: zhoubin@bhfj.gov.cn
收稿日期: 2015-05-12，收修改稿日期: 2015-07-06

表层板的上缘与水面齐平，中层板离水面 2.0 m。试板共 16 片，分别在 2013 年 9、12 月和 2014 年 3、6、9 月取放试板。标本处理及室内分析和资料整理均按《海洋调查规范》要求进行。试验过程中部分试板丢失，但各期、各层次均有代表性试板，生物学统计指标为各期、各层次各期、各层次的累计平均值。取试板时，采用 YSI6920- M 水质检测仪测定海水温度、pH、溶解氧和盐度等参数。

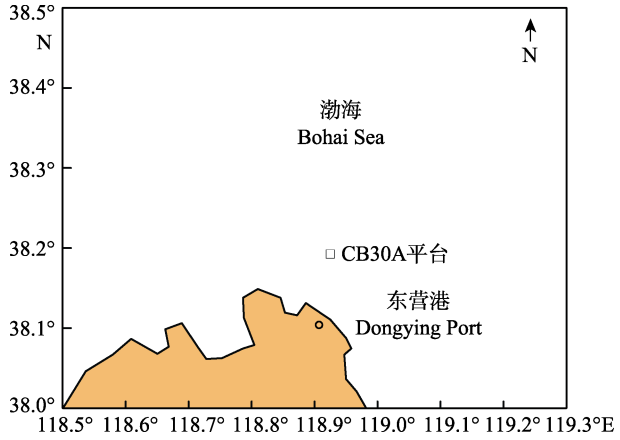

图 1 污损生物挂板位置

Fig.1 Sampling stations of fouling organisms

采用 Margalef 物种丰富度指数(d)、Shannon-Wiener 多样性指数(H')、Pielou 均匀度指数(J')以及种群优势度指数(Y)进行群落多样性分析，公示如下：

$$d = (S-1)/\log_2 N$$

$$H' = -\sum_{i=1}^{s} P_i \log_2 P_i$$

$$J' = H'/\log_2 S$$

$$Y = P_i f_i$$

式中，N 为样品中所有种类的总个体数目，S 为样品中的种类总数，P_i 为第 i 种的个体数与样品中的总个体数的比值，f_i 为第 i 种在所有站位出现的频率。

污损生物群落结构多变量统计分析采用 PREMIER7.0 软件，根据物种相对生物量进行 log(x+1)变换，计算 Bray-Curtis 相似性系数矩阵，利用软件中的聚类分析(CLUSTER)和多维尺度排序(MDS)分析污损生物群落结构。

2 结果

2.1 种类组成和主要优势种

本次调查共记录污损生物 24 种(表 1)，其中，动物 23 种，植物 1 种。在动物中，共发现节肢动物 9 种，棘皮动物、环节动物和软体动物各 3 种，腔肠动物 2 种，脊索动物、纽形动物、苔藓动物各 1 种；在植物中发现绿藻 1 种。本次调查优势种为多棘麦秆虫(*Caprella acanthogaster*)、日本大螯蜚(*Grandidierella japonica*)、理石叶钩虾(*Jassa marmorata*)、拟钩虾(*Gammaropsis* sp.)。常见种有泥藤壶(*Balanus uliginosus*)、麦秆虫(*Caprella* sp.)、海筒螅(*Tubularia marina*)、长牡蛎(*Crassostrea gigas*)等。

2.2 附着量及时空变化

季板分析结果显示，表层季板的平均生物量为 1764.23 g/m^2，中层季板的平均生物量为 2322.31 g/m^2，试验海域污损生物的附着种类和附着量季节性差异明显，污损生物附着盛期为夏季和秋季。冬季污损生物附着量较小，表层板为 8.09 g/m^2，中层板为 99.55 g/m^2，表层板和中层板的面积覆盖率分别为 17.5%和 22.8%。冬季共发现污损生物 3 种，其中，表层 2 种，中层 3 种，群落结构较为单一；春季表层板和中层板附着量

表 1 污损生物种名录

Tab.1 List of fouling organisms

种类 Species	表层 Surface layer	中层 Middle layer
日本大螯蜚 *G. japonica*	+	+
多棘麦秆虫 *C. acanthogaster*	+	+
泥藤壶 *B. uliginosus*	+	+
青岛板钩虾 *Stenothoe qingdaoensis*	+	+
拟钩虾 *Gammaropsis* sp.	+	+
麦秆虫 *Caprella* sp.		+
中华哲水蚤 *Calanus sinicus*	+	
理石叶钩虾 *J. marmorata*	+	+
河蜾蠃蜚 *Corophium acherusicum*	+	+
海葵 Actiniidae		+
沙蚕 *Nereis* sp.		+
多齿围沙蚕 *Perinereis nuntia*	+	
裂虫 Syllidae		+
细雕刻肋海胆 *Temnopleurus oreumaticus*	+	
蛇尾 Ophiuroidea		+
马粪海胆 *Hemicentrotus pulcherrimus*		+
苔藓动物 Bryozoa	+	+
玻璃海鞘 *Ciona intestinalis*	+	
纽虫 Nemertinea	+	
长牡蛎 *C. gigas*	+	
经氏壳蛞蝓 *Philine kinglipini*	+	
土加螅 *Tugali*	+	
缘管浒苔 *Enteromorpha linza*	+	+
海筒螅 *T. marina*	+	+

变化不大，3–6 月海筒螅开始附着，表层板和中层板面积覆盖率分别为 35.6%和 41.2%；由于海筒螅、玻璃海鞘和泥藤壶的大量附着导致生物量显著增加，春季共发现污损生物 4 种，其中，表层 2 种，中层 4 种；夏季表层板附着量为 2888.67 g/m^2，中层板为 4697.14 g/m^2，面积覆盖率均为 100%，共发现污损生物 13 种，其中表层 9 种，中层 9 种；秋季表层板和中层板的附着量分别达到 4155.78 g/m^2 和 4371.77 g/m^2，面积覆盖率均为 100%，共发现污损生物 13 种，其中，表层 10 种，中层 8 种，对于附着量贡献较大的污损生物主要有长牡蛎、马粪海胆、缘管浒苔、苔藓动物等。

2.3　群落多样性

多样性指数 H' 和均匀度指数 J' 在周年的变化趋势基本一致(表 2)。采集到的污损生物的丰富度指数为秋季 > 夏季 > 春季 > 冬季；多样性指数为秋季 > 春季 > 冬季 > 夏季；均匀度指数为春季 > 秋季 > 冬季 > 夏季；优势度指数冬季 > 春季 > 夏季 > 秋季。

表 2　不同季节的污损生物群落指数

Tab.2　Community indices of the fouling organism in different seasons

群落指数 Community indices	冬季 Winter	春季 Spring	夏季 Summer	秋季 Autumn
丰富度 d	0.207	0.243	0.789	0.866
多样性 H'	0.787	1.191	0.534	2.114
均匀度 J'	0.394	0.596	0.144	0.571
优势度 D	0.988	0.963	0.950	0.697

2.4　群落特征

依据 Bray-Curtis 相似性系数聚类分析和多维尺度排序，污损生物在 30%的相似性水平上可划分为 3 个群落类型(图 2、图 3)。群落Ⅰ种类少、优势度高，以端足类的日本大螯蜚和多棘麦秆虫为主，出现在水温较低的冬季和春季；群落Ⅱ出现在夏季，显著特征是海筒螅大量附着，在表层和中层试板其面积覆盖率均达到 100%，其生物量所占权重也是最大的，理石叶钩虾等端足类附着在海筒螅基部。群落Ⅲ出现在水温较高的秋季，种类多、生物量大，个体较大的长牡蛎占据附着生物量的绝对优势。

2.5　群落结构与环境因子的相关性

采用 SPSS19.0 软件对试板中污损生物的生物量与温度、DO、pH、盐度进行相关性分析(表 3–表 5)。

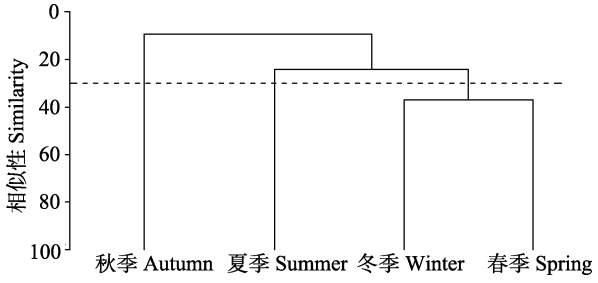

图 2　污损生物群落聚类分析

Fig.2　Cluster analysis of fouling organism communities

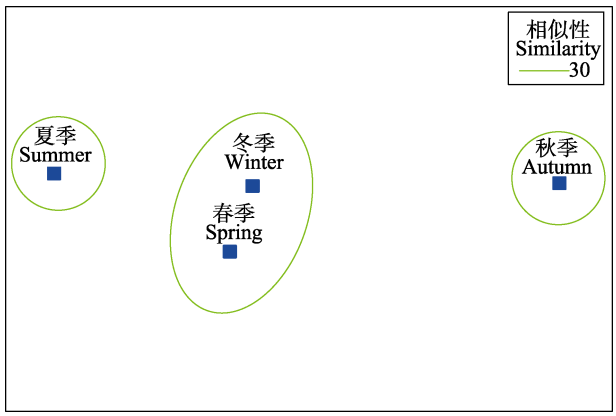

图 3　污损生物群落多维尺度排序

Fig.3　MDS analysis of fouling organism communities

表 3　季板中污损生物的生物量和环境参数

Tab.3　Biomass and environmental parameters of the fouling organism in different seasons

季节 Season	层次 Layer	生物量 Biomass (g/m^2)	温度 Temperature (℃)	溶解氧 DO (mg/L)	酸碱度 pH	盐度 Salinity
冬季 Winter	表层 Surface layer	8.09	0.79	9.19	7.83	29.81
	中层 Middle layer	99.55	0.80	8.95	7.98	29.81
春季 Spring	表层 Surface layer	4.39	5.30	9.47	7.95	27.05
	中层 Middle layer	120.79	5.29	9.57	7.94	27.05
夏季 Summer	表层 Surface layer	2888.67	22.94	8.81	7.98	28.94
	中层 Middle layer	4697.14	22.98	8.76	7.99	28.91
秋季 Autumn	表层 Surface layer	4147.56	23.25	7.18	8.07	28.98
	中层 Middle layer	4366.58	23.42	7.25	8.08	28.77

表 4 表层试板污损生物的生物量与环境参数的相关性分析矩阵

Tab.4 Pearson correlation coefficients of biomass and environmental parameters on the surface panels

项目 Items	生物量 Biomass	温度 Temperature	溶解氧 DO	酸碱度 pH	盐度 Salinity
生物量 Biomass	1.000	0.959*	–0.889	0.853	0.258
温度 Temperature		1.000	–0.732	0.858	0.107
溶解氧 DO			1.000	–0.777	–0.314
酸碱度 pH				1.000	–0.266
盐度 Salinity					1.000

*表示皮尔逊相关指数(P<0.01)

* Pearson correlation coefficients (P<0.01)

表 5 中层试板污损生物的生物量与环境参数的相关性分析矩阵

Tab.5 Pearson correlation coefficients of biomass and environmental parameters on the middle panels

项目 Items	生物量 Biomass	温度 Temperature	溶解氧 DO	酸碱度 pH	盐度 Salinity
生物量 Biomass	1.000	0.986*	–0.702	0.699	0.204
温度 Temperature		1.000	–0.697	0.690	0.050
溶解氧 DO			1.000	–1.000	–0.371
酸碱度 pH				1.000	0.390
盐度 Salinity					1.000

*表示皮尔逊相关指数(P<0.01)

* Pearson correlation coefficients (P<0.01)

从表 3–表 5 中可以看出，表层和中层试板污损生物的生物量与水温具有显著的相关性，相关系数分别为 0.959 和 0.986 (P<0.01)。

3 讨论

渤海主要入海河流约 45 条，黄河、海河、辽河三大流域，七个水系，年入海泥沙为 13×10^8 t (杨建强等, 2013)，大量泥沙入海使渤海海域海水呈透明度小、盐度低的特点，且年水温差较大，冬季水温偏低。上述环境特征对渤海海域污损生物群落特征起到了决定作用，与黄海、东海和南海相比(严涛等, 2003, 2008; 刘勐伶等, 2006; 方芳等, 2004)，其种类组成较为简单，以温带种和广温种为主。

污损生物附着的种类、生物量等受多种因素制约(齐占会等, 2010; 陈翔峰等, 2011; 李恒翔等, 2010; 林和山等, 2014; 黄宗国, 2008)，渤海 CB30A 平台海域污损生物的生物量与海水温度的相关性明显随着海水温度的升高，污损生物生长的速度加快，相应的其生物量显著增大。污损生物的附着量表层与中层存在一定差异，中层试板生物量高于表层试板，研究海域潮差为 1.0–1.8 m (沈汉红, 2008)，表层试板受到潮差影响可能干露，造成表层试板和中层试板生物量的差异。

秋季采集的样品种类和数量均较多，各物种间数量差距较小，导致秋季样品的丰富度指数、多样性指数和均匀度指数较高，优势度较低，群落结构最稳定；夏季采集的样品种类和数量较多，但是理石叶钩虾数量远多于其他物种，从而导致夏季样品优势度和丰富度指数较高，多样性指数、均匀度较低；冬季和春季采集到的样品中，生物种类和数量都低于夏季和秋季样品。因此，这两个季节样品的丰富度指数、多样性指数和均匀度指数较低，介于夏季和秋季之间；冬季和春季样品中，日本大螯蜚和多棘麦秆虫数量均占明显优势，导致这两个季节的优势度较高。

本研究结果显示，渤海 CB30A 平台海域全年都有污损生物附着，附着盛期为夏季和秋季。群落结构的聚类分析和多维尺度排序表明，污损生物群落按时间可分为 3 个群落类型，反映出渤海海域污损生物群落的季节变化明显。优势种为多棘麦秆虫、日本大螯蜚、理石叶钩虾、拟钩虾。常见种有泥藤壶、麦秆虫、海筒螅和长牡蛎等。由于牡蛎等石灰质外壳污损生物对平台荷载增加作用明显，应作为石油平台污损生物防除的重点。

参 考 文 献

马士德, 孙虎元. 海洋污损生物对碳钢腐蚀的影响. 中国腐蚀与防护学报, 2000, 20(3): 177–182

方芳, 严涛. 南海污损生物研究的现状及展望. 热带海洋学报, 2004, 23(1): 76–85

王建军. 黄渤海沿岸污损生物中的多毛类. 动物学报, 1991, 10(5): 52–58

齐占会, 方建光, 张继红, 等. 桑沟湾贝藻养殖区附着生物群落季节演替研究. 渔业科学进展, 2010, 31(4): 72–77

刘勐伶, 严涛. 南海污损生物生态研究进展. 海洋通报, 2006, 25(1): 84–91

李恒翔, 严岩, 何伟宏, 等. 北部湾白龙半岛邻近海域污损生物生态研究. 热带海洋学报, 2010, 29(3): 108–113

沈汉红. 埕岛油田海域气象规律研究与应用. 海岸工程, 2008,

29(4): 11–22
杨建强, 冷宇. 渤海水体环境生物生态调查与研究. 北京: 海洋出版社, 2003, 1–2
陈翔峰, 侯健, 穆振军, 等. 海洋污损生物变化及附着规律研究. 材料开发与应用, 2011, 26(1): 24–28
严文侠, 董钰, 王华接, 等. 南海北部石油开发区海洋污损生物研究. 海洋技术, 1995, 14(4): 57–59
严文侠, 董钰, 王华接, 等. 近海污损生物的调查方法. 热带海洋, 1994, 13(4): 81–86
严岩. 海洋污损生物对近海平台钢结构的影响. 南海研究与开发, 1995(3): 33–36
严涛, 严文侠, 董钰, 等. 北部湾近海结构物污损生物研究. 海洋学报, 2000, 22(4): 137–146
严涛, 严文侠, 董钰, 等. 珠江口东南近海海区污损生物研究. 海洋学报, 2003, 25(6): 117–125
严涛, 曹文浩. 黄、渤海污损生物生态特点及研究展望. 海洋学研究, 2008, 26(3): 107–118
林和山, 王建军, 郑成兴, 等. 泉州湾污损生物生态研究. 海洋学报, 2014, 36(4): 100–109
林盛. 黄渤海沿岸污损生物中的腔肠动物. 动物学报, 1989, 35(3): 341–343
黄宗国. 海洋污损生物及其防涂(下册). 北京: 海洋出版社, 2008, 88–131
黄宗国, 李传燕, 张良兴, 等. 渤海湾附着生物生态. 海洋学报, 1980, 2(3): 111–122
黄修明, 尹建德, 刘建军, 等. 渤海石油平台附着生物生态的研究. 海洋科学集刊, 1994, 35: 131–141
Sammarco PW, Atchison AD, Boland GS. Expansion of coral communities within the Northern Gulf of Mexico via offshore oil and gas platforms. Mar Ecol-Prog Ser, 2004, 280(1): 129–143
Whomersley P, Picken GB. Long-term dynamics of fouling communities found on offshore installations in the North Sea. J Mar Biol Assoc UK, 2003, 83(5): 897–901

(编辑　陈严)

Ecological Research of Fouling Organisms on the Offshore Platform in Bohai Sea

ZHOU Bin[1①], FENG Chunhui[1], LIU Wei[2], ZHAO Sheng[3]

(1. *Marine Engineering Prospecting Institute of North China Sea, SOA, Qingdao*　266061; 2. *Shandong Analysis and Test Center, Jinan*　250014; 3. *North China Sea Environment Monitoring Center, SOA, Qingdao*　266033)

Abstract　Fouling organisms have caused great damages to offshore platforms in the sea. Some reports have discussed the impacts of fouling organisms on offshore platforms, however, little is known about the situation in the Bohai Sea. In this study, we investigated the species composition, structural characteristics, evolving rules, and factors of fouling organism attachment on offshore platforms in the Bohai Sea, by means of a series of artificial test panel experiments and multiple statistical analyses. The artificial test panel experiments in the Bohai Sea were conducted from September 2013 to September 2014, and we identified a total of 24 species the majority of which were temperate and eurythermal species. The dominant species were *Caprella acanthogaster*, *Grandidierella japonica*, *Jassa marmorata* and *Gammaropsis* sp. etc. The seasonal panel tests showed that the average biomass on the surface panels and the middle panels were 1764.23 g/m^2 and 2322.31 g/m^2 respectively. Settlements of fouling organisms occurred throughout the year particularly in summer and autumn, indicating an obvious seasonal variation in species and biomass. The Shannon-Wiener Diversity Index and the Margalef Richness Index were at the highest level in autumn. The multivariate analysis showed that there were three types of fouling organism communities in chronological order, which implied an apparent seasonal variation of fouling organisms in the Bohai Sea. There was significant correlation between the water temperature and the biomass of fouling organisms on the surface and middle panels, and the correlation coefficient was 0.959 and 0.986 respectively (P<0.01). These results provided valuable information on anti-fouling designs for both the restoration of overly used offshore platforms and the construction of new platforms in the Bohai Sea. Moreover, our study could serve as important reference on the prevention and elimination of fouling organisms, and therefore could help reduce security risks of offshore platforms.

Key words　Fouling organism; Community structure; Bohai Sea

① Corresponding author: ZHOU Bin, E-mail: zhoubin@bhfj.gov.cn

DOI: 10.11758/yykxjz.20150820001 http://www.yykxjz.cn/

辽东湾近岸表层海水重金属污染分析与评价*

宋永刚 吴金浩 邵泽伟 于彩芬 张玉凤 杜 静
姜 冰 宋 伦① 王年斌

(辽宁省海洋水产科学研究院 辽宁省海洋环境监测总站 大连 116023)

摘要 根据 2013 年春季、夏季和秋季对辽东湾近岸表层海水重金属的调查数据，分析了该调查区域海水重金属浓度的季节变化，并运用内梅罗(Nemerow)指数法和综合质量指数法对该海域海水重金属污染状况进行了综合评价。结果显示，辽东湾调查海域表层海水中重金属浓度夏季最高，仅 Pb 超过第一类海水水质标准，且 Pb 的站位超标率为 66.67%。按照美国国家海洋与大气管理局(National Oceanic and Atmospheric Administration, NOAA)推荐的海水中重金属生物慢性安全浓度下限，仅 Cu 在个别站位的浓度高于 NOAA 推荐的生物慢性安全浓度下限，其余所有元素的浓度均未超出，不会对生物体产生显著影响。内梅罗指数法和综合质量指数法评价结果显示，辽东湾调查海域属于清洁–轻污染等级，水环境分级属于尚清洁–允许级别，重金属污染较重的区域主要有 3 个，分别是绥中近岸海域、辽东湾北部河口区、复州湾和金州湾近岸海域。

关键词 辽东湾；环境质量；重金属

中图分类号 X822 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)03-0014-06

重金属是海洋环境中主要的污染物之一，可在海水、沉积物、固体悬浮颗粒和海洋生命物质中循环迁移，虽然人类已经在着手控制海洋环境中金属元素的人为污染，但其浓度仍在不断增加，并严重威胁到海洋生物和人体健康(Islam *et al*, 2004; Bellos *et al*, 2005)，重金属污染已成为一种重要的海洋环境问题(Kumar *et al*, 2008)。海水又是人为影响施加在海洋环境中的第一层受体，进入海水中的重金属可通过食物链在人体内蓄积，因此，海水中重金属的含量、分布及归宿等科学问题已成为海洋环境科学研究的热点(Wu, 2005; Saager *et al*, 1992; Cotté-Krief *et al*, 2002)。

辽东湾位于渤海东北部，周边城市和入海河流较多。辽东湾曾是小黄鱼(*Pseudosciaena polyatis*)、带鱼(*Coilia* spp.)、对虾(*Penacus orientalis*)等的重要渔场，但近年来，由于水域环境污染及过度捕捞等人类活动影响的原因(侯玉忠, 2003)，上述资源已经衰退不再形成渔场，仅进行海蜇(*Rhopilema* sp.)、毛虾(*Acetes* sp.)、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)等生产(中国水产科学研究院资源与环境研究中心, 2006)。可见，良好的海洋生态环境是海洋渔业资源可持续开发利用的基础条件和保障，对于海洋经济的可持续发展具有重要的意义(任以顺, 2006; 崔毅等, 2013)。近岸是众多渔业生物的优良产卵场，支撑着渔业种群的持续补充和繁衍，但同时又是人类活动的密集区，其生境和生物资源受人类活动和环境压力的影响显而易见(Worm *et al*, 2006; Lotze *et al*, 2006)，已经产生了许多渔业环境和资源问题(金显仕等, 2015)。因此，对辽东湾近岸海洋环境质量进行监测与评价显得尤为重要。

李建军等(2001)研究表明，1999 年辽东湾浅水区水环境重金属污染 Pb 超标比较严重；秦延文等(2010)研究表明，2004–2008 年辽东湾水质重金属的污染特征是 Cu 和 Pb 有超标现象。为了跟踪监测近年来辽东湾水质重金属污染状况，本研究根据 2013 年 3 个航次的辽东湾近岸海水中 6 种重金属(Cu、Pb、Zn、

* 蓬莱 19-3 油田溢油事故生态补偿项目和辽宁省海洋与渔业厅科研项目(201303)共同资助。宋永刚，E-mail: hyzjs_lnshky@163.com

① 通讯作者：宋 伦，副研究员，E-mail: songlun827421@sohu.com

收稿日期: 2015-08-20, 收修改稿日期: 2015-10-14

Cd、Hg、As)调查数据，分析和探讨了该区域表层海水重金属污染状况以及季节变化，并进行了综合评价和分析，为该海湾的海洋渔业环境保护和可持续发展提供科学依据。

1　采样与分析方法

1.1　采样站位与时间

调查区域位于渤海(辽东半岛南端)老铁山角至(绥中)止锚湾连线以北(辽东湾)全部近岸海域，共设调查站位 18 个(图 1)，调查时间为 2013 年 5 月(春季)、8 月(夏季)和 10 月(秋季)。

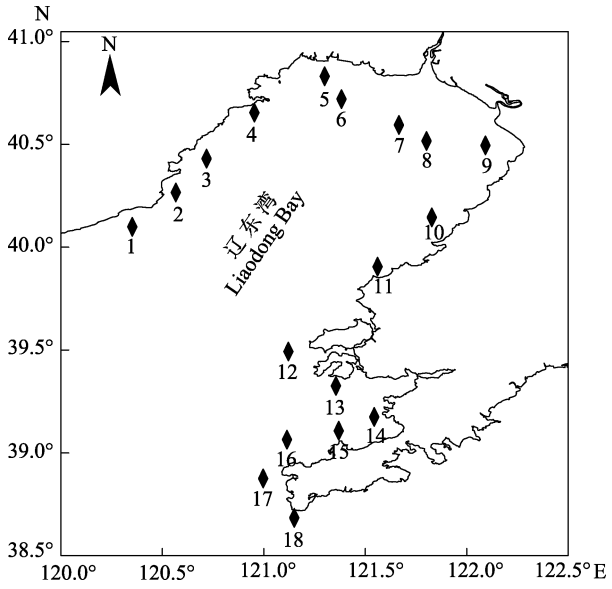

图 1　辽东湾调查站位

Fig.1　Sampling stations in the Liaodong Bay

1.2　测定参数与分析方法

样品采集采用 Niskin 采水器，采样层次为表层。样品检测项目包括铜(Cu)、铅(Pb)、锌(Zn)、镉(Cd)、汞(Hg)、砷(As)。样品的采集、现场处理及分析方法均按照《海洋监测规范》(GB 17378.4–2007)中所规定的方法进行(中国国家标准化管理会, 2007)。Cu、Pb、Cd 采用石墨炉原子吸收法(日立 Z-2000)测定，Zn 采用火焰原子吸收法测定；Hg、As 采用原子荧光法(GXY-1101A)测定。样品分析采用加标回收的方法进行质量控制，Cu、Pb、Zn、Cd、Hg、As 的平均加标回收率分别为 95%、110%、85%、99%、92%、105%。

1.3　评价方法

1.3.1　内梅罗(Nemerow)指数　　采用内梅罗指数对水质污染情况进行综合评价(马洪瑞等, 2011)，其公式为：

$$P=\sqrt{\frac{P_{max}^2+\left(\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}P_i\right)^2}{2}} \tag{1}$$

$$P_i=\frac{C_i}{C_s} \tag{2}$$

式中，P 为内梅罗综合指数，P_i 为污染物的单因子污染指数，P_{max} 为水质参数中最大的单因子污染指数，C_i 为实际测量值，C_s 为评价因子的评价标准值，本研究采用第一类海水水质标准作为评价标准值(GB3097–1997)(国家海洋局, 1997)。内梅罗水质指数污染等级划分标准见表 1。

1.3.2　综合污染指数　　综合污染指数(Q)能很好地反映渔业环境综合质量，用于评价污染程度，随实际浓度增加而加重的因子(贾晓平等, 2003)，评价公式为：

$$Q=\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{N}P_i \tag{3}$$

式中，Q 为综合污染指数，N 为污染物项数。综合污染指数与环境分级的关系见表 2。

表 1　内梅罗水质指数污染等级划分标准

Tab.1　Water pollution degrees based on Nemerow pollution index

水质等级 Pollution degree	Ⅰ清洁 Clean	Ⅱ较清洁 Relative clean	Ⅲ轻污染 Slightly polluted	Ⅳ中污染 Moderately polluted	Ⅴ重污染 Seriously polluted
P	≤0.6	0.6 < P ≤1.0	1.0 < P ≤2.6	2.6 < P ≤5.0	> 5.0

表 2　综合污染指数与环境分级关系

Tab.2　Relationship between the comprehensive quality index and the environmental classfication

分级 Classification	水质质量综合指数(Q) Comprehensive quality index	分级 Classification	水质质量综合指数(Q) Comprehensive quality index
清洁 Clean	Q < 0.3	污染 Pollution	2≤Q < 3
尚清洁 Slight clean	0.3≤Q < 0.7	重污染 Serious pollution	3≤Q < 5
允许 Permit	0.7≤Q < 1.0	恶性污染 More serious pollution	Q≥5
轻污染 Light pollution	1 < Q < 2		

2 结果与讨论

2.1 表层海水中重金属浓度状况

辽东湾近岸表层海水重金属浓度见表 3。从表 3 可以看出，在春、夏、秋季中，重金属浓度平均值均为 Zn > As > Cu > Pb > Cd > Hg，且夏季最高。夏季 Cu、Pb、Zn、Cd、Hg、As 的浓度均值分别为(1.96±0.39)、(1.30±0.64)、(11.96±3.12)、(0.64±0.21)、(0.05±0.01)、(3.24±1.12) μg/L，仅 Pb 超过第一类海水水质标准(国家海洋局, 1997)，且 Pb 的站位超标率为 66.67%，其余元素在个别站位也出现了超标现象，Hg 的站位超标率为 38.89%，Cd 仅在站位 9 出现超标现象，且所有元素的浓度均未超出美国国家海洋与大气管理局(National Oceanic and Atmospheric Administration, NOAA)推荐的海水中重金属生物慢性安全浓度(张晓举等, 2014)，不会对生物体产生显著影响。Pb 在春季和秋季也出现了个别站位超标现象，超标率分别为 55.56%和 11.11%，但均未超出 NOAA 的生物慢性安全浓度(8.1 μg/L)，春季 Cu 在个别站位的浓度(3.4 μg/L)已高于 NOAA 的生物慢性安全浓度(3.1 μg/L)，应加强控制。

2.2 海水重金属季节变化

2013 年辽东湾近岸海域表层海水中重金属 Cu、Cd、Hg 浓度表现为夏季 > 秋季 > 春季；Pb、Zn、As 浓度表现为夏季 > 春季 > 秋季(图 2)，可见，Cu、Pb、Zn、Cd、Hg、As 平均浓度的最大值均出现在夏季。

一般来说，海水中重金属主要源于陆源输入、大气沉降和深海热液活动(张晓举等, 2014; 贺志鹏等, 2008)，但就辽东湾而言不存在深海热液活动的影响。辽东湾三面为陆地，相对封闭，污染物排放对海水影响严重，再加上流入辽东湾的河流众多，有辽河、双台子河、大凌河和小凌河等，仅辽河就接纳了辽宁省中部 8 个城市的工业和生活污水，夏季重金属浓度高于春季和秋季，可能与流入辽东湾的河流径流量密切相关。辽宁省平均雨季为 6 月第 5 候至 8 月第 6 候，春、夏、秋季降雨量及径流均存在很大差异，2013 年辽宁省平均降水量春季为 86 mm，夏季为 516 mm，秋季为 157 mm(辽宁省气象局, 2014)，杨东等(2011)对辽宁省近 53 年(1956–2008)来降水的季节贡献率的研究表明，春季为 14.9%，夏季为 64.1%，秋季为 18.0%，可见夏季辽东湾河流进入洪季，径流量明显增大(孙欣等, 2007)。因此，季节性降雨引起的地表径流所携带的陆源污染物是辽东湾近岸海水重金属浓度增加的主要原因，与 Swarnalatha 等(2014)和崔毅等(2013)的研究结果一致。由于大气沉降是面源污染，同时受季节变化影响较小，这里不做讨论。

2.3 海水重金属污染状况评价

采用内梅罗指数法对辽东湾近岸表层海水进行综合评价。结果显示，春季第 1、2、14、15、16 号站位水质等级均为Ⅲ级，处于轻污染水平，其余调查站位水质等级均为Ⅱ级，处于较清洁水平；夏季第 1、2、4、5、6、8、11、12、14 号站位水质等级均为Ⅲ级，处于轻污染水平，18 号站位水质等级为Ⅰ级，处于清洁水平，其余调查站位水质等级均为Ⅱ级，处于

表 3 辽东湾近岸表层海水重金属浓度

Tab.3 Heavy metal concentrations in the offshore surface seawater of the Liaodong Bay

季节 Season	指标 Indices		浓度 Concentration (μg/L)					
			Cu	Pb	Zn	Cd	Hg	As
春季 Spring	范围	Range	1.01–3.40	0.38–3.21	7.57–22.13	0.14–0.96	0.03–0.05	2.01–3.51
	平均值	Average	1.71	1.16	11.70	0.44	0.04	2.59
	标准差	Standard deviation	0.51	0.64	3.18	0.25	0.01	0.43
夏季 Summer	范围	Range	1.20–2.58	0.41–2.69	6.46–19.80	0.21–1.02	0.04–0.07	1.87–5.75
	平均值	Average	1.96	1.30	11.96	0.64	0.05	3.24
	标准差	Standard deviation	0.39	0.64	3.12	0.21	0.01	1.12
秋季 Autumn	范围	Range	1.09–2.85	0.18–1.66	6.70–19.73	0.22–0.90	0.04–0.06	1.74–3.98
	平均值	Average	1.82	0.56	10.34	0.62	0.05	2.57
	标准差	Standard deviation	0.45	0.42	3.50	0.18	0.01	0.73
国家一类海水水质标准(国家海洋局, 1997) First class of national seawater quality standards			≤5.0	≤1.0	≤20	≤1.0	≤0.05	≤20
生物慢性安全浓度(NOAA)(张晓举等, 2014) Chronic safe concentration of organisms			> 3.1	> 8.1	> 81.0	> 9.3	> 0.94	> 36.0

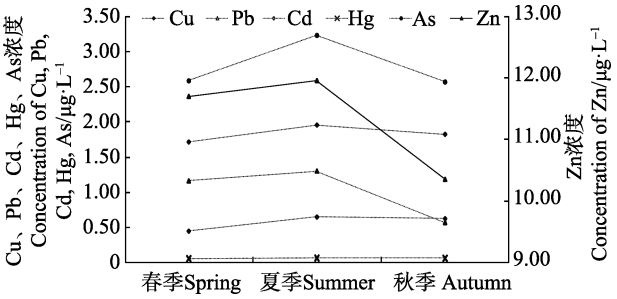

图 2　辽东湾重金属浓度季节变化

Fig.2　Seasonal variation in the heavy metal concentrations in the Liaodong Bay

较清洁水平；秋季第 12、13 号站位水质等级均为Ⅲ级，处于轻污染水平，其余调查站位水质等级均为Ⅱ级，处于较清洁水平(表 4)。比较调查海域各站位内梅罗指数平均值发现，春季为 0.98，水质等级均为Ⅱ级，处于较清洁水平；夏季为 1.10，水质等级均为Ⅲ级，处于轻污染水平；秋季为 0.83，水质等级均为Ⅱ级，处于较清洁水平。由此可见，辽东湾近岸表层海水污染程度由重到轻依次为夏季 > 春季 > 秋季。

采用综合污染指数法对辽东湾海域表层海水中重金属进行评价，评价方法以《海水水质标准》(GB3097–1997)(国家海洋局, 1997)中的第一类水质标准作为标准值(表 5)。从季节变化角度分析，春季综合污染指数范围为 0.39–0.97，平均值为 0.59；夏季综合污染指数范围为 0.39–0.95，平均值为 0.68；秋季综合污染指数范围为 0.43–0.63，平均值为 0.53。2013 年综合污染指数随季节的变化呈先升高后降低趋势，夏季达到最大值，表明辽东湾近岸表层海水水质夏季相对较差，此结果与内梅罗指数分析结果一致。但春、夏、秋季水质综合污染指数均值范围在 0.3–0.7 之间，根据综合污染指数与环境分级关系表明，(表 2)，调查海域水质环境分级为尚清洁。从调查站位角度分析，春季除站位 2 和 5 污染指数范围在 0.7–1.0 之间，水质环境分级属于允许级别外，其余站位污染指数均处于 0.3–0.7 之间，水质环境分级为尚清洁；夏季第 2、4、5、8、11、12 号站位的水质环境分级为允许级别，其余站位为尚清洁；秋季仅第 12 号站位的水质环境分级为允许级别，其余站位均为尚清洁。总之，辽东湾近岸表层海水受重金属污染的季节变化趋势为夏季 > 春季 > 秋季，此结果与秦延文等(2010)对辽东湾水质重金属污染特征的分析结果类似，且这种季节变化趋势是典型的与陆源输入有关。

通过对以上两种方法的评价结果进行综合分析，按近岸水环境重金属污染程度对整个辽东湾近岸海域进行了区域划分，重金属污染较重的区域主要有 3 个，绥中近岸海域、辽东湾北部河口区、复州湾和金

表 4　辽东湾各站位水质内梅罗指数及等级

Tab.4　Nemerow pollution index and the degree of each sampling station in the Liaodong Bay

站位 Station	春季 Spring		夏季 Summer		秋季 Autumn	
	污染指数 Pollution index	质量等级 Pollution degree	污染指数 Pollution index	质量等级 Pollution degree	污染指数 Pollution index	质量等级 Pollution degree
1	1.12	Ⅲ	1.30	Ⅲ	0.85	Ⅱ
2	2.37	Ⅲ	1.77	Ⅲ	0.81	Ⅱ
3	0.73	Ⅱ	0.70	Ⅱ	0.62	Ⅱ
4	0.80	Ⅱ	1.33	Ⅲ	0.82	Ⅱ
5	0.95	Ⅱ	1.30	Ⅲ	0.97	Ⅱ
6	0.80	Ⅱ	1.01	Ⅲ	0.87	Ⅱ
7	0.72	Ⅱ	0.94	Ⅱ	0.82	Ⅱ
8	0.83	Ⅱ	1.12	Ⅲ	0.82	Ⅱ
9	0.92	Ⅱ	0.88	Ⅱ	0.64	Ⅱ
10	0.61	Ⅱ	0.73	Ⅱ	0.66	Ⅱ
11	0.87	Ⅱ	2.02	Ⅲ	0.76	Ⅱ
12	0.78	Ⅱ	1.58	Ⅲ	1.28	Ⅲ
13	0.92	Ⅱ	0.93	Ⅱ	1.26	Ⅲ
14	1.39	Ⅲ	1.23	Ⅲ	0.64	Ⅱ
15	1.23	Ⅲ	0.80	Ⅱ	0.80	Ⅱ
16	1.15	Ⅲ	0.98	Ⅱ	0.74	Ⅱ
17	0.67	Ⅱ	0.66	Ⅱ	0.73	Ⅱ
18	0.82	Ⅱ	0.43	Ⅰ	0.80	Ⅱ
均值 Average	0.98	Ⅱ	1.10	Ⅲ	0.83	Ⅱ

表 5 辽东湾各站位水质综合污染指数

Tab.5 Comprehensive quality index of each sampling station in the Liaodong Bay

站位 Station	季节 Season		
	春季 Spring	夏季 Summer	秋季 Autumn
1	0.60	0.68	0.56
2	0.97	0.86	0.51
3	0.53	0.53	0.46
4	0.53	0.83	0.57
5	0.75	0.92	0.56
6	0.56	0.68	0.55
7	0.50	0.69	0.52
8	0.58	0.71	0.56
9	0.68	0.68	0.45
10	0.41	0.55	0.48
11	0.56	0.95	0.47
12	0.50	0.80	0.71
13	0.52	0.60	0.63
14	0.67	0.69	0.46
15	0.62	0.61	0.54
16	0.64	0.56	0.44
17	0.39	0.54	0.55
18	0.54	0.39	0.43
均值 Average	0.59	0.68	0.53

州湾近岸海域。分析原因是绥中六股河流域主要集中分布有铜、铅、锌等矿厂，有色金属矿开采和冶炼后的工业污水输入辽东湾(林曼曼等, 2013)，使绥中近岸海域重金属污染加重。辽东湾北部入海河流众多，且沿河周边城市经济发达，入海河流所携带的各种工业和生活污水随河流入海，使河口区域重金属浓度升高，而且河流的输入属于点源污染，在河口处呈发射状分布，重金属污染较重区域仍出现在河口附近(贺志鹏等, 2008)；复州湾和金州湾周边分布有众多新型的石油化工企业，经过处理的工业污水直接通过排污口排入湾内，使湾内的重金属污染加重，可见，辽东湾重金属污染较重的区域主要是以陆源输入为主。

3 结论

(1)2013 年辽东湾调查海域表层海水中重金属浓度夏季最高，Cu、Pb、Zn、Cd、Hg、As 的浓度均值分别为 1.96、1.30、11.96、0.64、0.05、3.24 μg/L，仅 Pb 超过第一类海水水质标准，且 Pb 的站位超标率为 66.67%，Cu 在个别站位的浓度高于 NOAA 推荐的生物慢性安全浓度，应加强控制，其余所有元素的浓度均未超出，不会对生物体产生显著影响。

(2)内梅罗指数法和综合质量指数法评价结果表明，辽东湾调查海域属于清洁–轻污染等级，水环境分级属于尚清洁–允许级别。该海域海水受重金属污染状况由重到轻表现为夏季 > 春季 > 秋季，降雨引起的径流所携带的陆源污染物是辽东湾近岸海水重金属浓度增加的主要原因，重金属污染较重的区域主要有 3 个，绥中近岸海域、辽东湾北部河口区、复州湾和金州湾近岸海域。

致谢：感谢辽宁省海洋水产科学研究院马志强副研究员、田金助理研究员、赵海勃助理研究员、王召会助理研究员、李楠助理研究员、宋广军副研究员在样品采集及检测中给予的帮助。

参 考 文 献

马洪瑞, 陈聚法, 崔毅, 等. 胶州湾湿地海域水体和表层沉积物环境质量评价. 应用生态学报, 2011, 22(10): 2749– 2756

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局中国国家标准化管理会. 海洋监测规范—第 4 部分: 海水分析(GB17378.4–2007). 北京: 中国标准出版社, 2007

中国水产科学研究院资源与环境研究中心. 辽东湾渔场. 国家农业科学数据共享中心, http://fishery.agridata.cn/detail.asp?db=fishData&table=A040105&id=2, 2006

辽宁省气象局. 辽宁省 2013 年气候公报. 辽宁日报, 2014

田琳, 陈洪涛, 杜俊涛, 等. 北黄海表层海水溶解态重金属的分布特征及影响因素. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2009, 39(4): 617–621

任以顺. 我国近岸海域环境污染成因与管理对策. 青岛科技大学学报(社会科学版), 2006, 22(3): 106–111

孙欣, 陈传雷, 卢娟. 辽宁雨季和多雨季标准的划分研究. 气象与环境学报, 2007, 23(5): 62–66

李建军, 冯慕华, 喻龙. 辽东湾浅水区水环境质量现状评价. 海洋环境科学, 2001, 20(3): 42–45

张晓举, 赵升, 冯春辉, 等. 渤海湾南部海域生物体内的重金属含量与富集因素. 大连海洋大学学报, 2014, 29(3): 267–271

国家海洋局. 海水水质标准(GB3097–1997). 北京: 中国标准出版社, 1997

林曼曼, 张勇, 薛春汀, 等. 环渤海海域沉积物重金属分布特征及生态环境评价. 海洋地质与第四纪地质, 2013, 33(6): 41–46

金显仕, 窦硕增, 单秀娟, 等. 我国近海渔业资源可持续产出基础研究的热点问题. 渔业科学进展, 2015, 36(1): 124–131

杨东, 刘洪敏, 郭盼盼, 等. 1956–2008 辽宁省近 53 年的降水量变化. 干旱区资源与环境, 2011, 25(1): 96–101

侯玉忠. 渤海渔业资源下降原因及修复建议. 中国海洋报, 2003, 11 月 7 日

贺志鹏, 宋金明, 张乃星, 等. 南黄海表层海水重金属的变化特征及影响因素. 环境科学, 2008, 29(5): 1153–1162

贾晓平, 杜飞雁, 林钦, 等. 海洋渔场生态环境质量状况综合评价方法探讨. 中国水产科学, 2003, 10(2): 160−164

秦延文, 郑丙辉, 张雷, 等. 2004–2008 年辽东湾水质污染特征分析. 环境科学研究, 2010, 23(8): 987–992

崔毅, 马菲菲, 夏斌, 等. 靖海湾松江鲈鱼种质资源保护区海

水环境质量年际变化趋势及综合评价. 渔业科学进展, 2013, 34(6): 1–8
Bellos D, Sawidis T. Chemical pollution monitoring of the River Pinios (Thessalia-Greece). J Environ Manage, 2005, 76(4): 282–292
Islam MS, Tanaka M. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. Mar Pollut Bull, 2004, 48(7–8): 624–649
Cotté-Krief MH, Thomas AJ, Martin JM. Trace metal (Cd, Cu, Ni, and Pb) cycling in the upper water column near the shelf edge of the European continental margin (Celtic Sea). Mar Chem, 2002, 79(1): 1–26
Lotze HK, Lenihan HS, Bourque BJ, *et al*. Depletion, degradation, and recovery potential of estuaries and coastal seas. Science, 2006, 312(5781): 1806–1809
Kumar KS, Sajwan KS, Richardson JP, *et al*. Contamination profiles of heavy metals, organochlorine pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons and alkylphenols in sediment and oyster collected from marsh/estuarine Savannah GA, USA. Mar Pollut Bull, 2008, 56(1): 136–149
Saager PM, Barr HJWD, Howland RJ. Cd, Zn, Ni and Cu in the Indian Ocean. Deep-Sea Res PT A, 1992, 39(1): 9–35
Swarnalatha K, Letha J, Ayoob S. Effect of seasonal variations on the surface sediment heavy metal enrichment of a lake in South India. Environ Monit Assess, 2014, 186(7): 4153–4168
Worm B, Barbier EB, Beaumont N, *et al*. Impacts of biodiversity loss on ocean ecosystem services. Science, 2006, 314(5800): 787–790
Wu JY. Assessing surface water quality of the Yangtze Estuary with genotoxicity data. Mar Pollut Bull, 2005, 50(12): 1661–1667

(编辑　陈严)

Evaluation of Heavy Metal Pollution in the Offshore Surface Seawater of the Liaodong Bay

SONG Yonggang, WU Jinhao, SHAO Zewei, YU Caifen, ZHANG Yufeng, DU Jing, JIANG Bing, SONG Lun①, WANG Nianbin

(*Liaoning Ocean and Fishery Science Research Institute, Liaoning Ocean Environment Monitoring Station, Dalian* 116023)

Abstract　Human activities have aggravated the offshore ecologic environment in the Liaodong Bay and endangered aquatic bioresources in these areas. The Liaodong Bay used to be an important fishing ground and the habitat of a variety of fish species such as *Larimichthys polyactis*, *Trichiurus lepturus*, and *Fenneropenaeus chinensis*. However, in recent years the fish resources have been diminishing because of water pollution, over-fishing and other human activities. Sustainable development is the key to healthy marine economy, which depends on good marine ecological environment. In this study we evaluated the offshore surface water quality of the Liaodong Bay by analyzing 18 samples collected in three consecutive seasons in 2013 including May (spring), August (summer), and October (autumn). We monitored the concentrations of six typical metallic pollutants (Cu, Pb, Zn, Cd, Hg, As) and employed the Nemerow Pollution Index and the Comprehensive Quality Index to evaluate the degree of heavy metal pollution. The concentrations of these heavy metals were highest in summer. The concentration of Pb did not meet the first-class seawater standard, which was 66.67% higher than the limit, however, all others complied with the first-class seawater standard. Concentrations of all heavy metals were below chronic safe concentration of organisms recommended by National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) except for Cu. The Nemerow Pollution Index of the offshore surface seawater of the Liaodong Bay was in the range of 0.43–2.37, which was lower than 2.6, thus the pollution degree in 2013 was determined to be clean to slightly polluted. The Comprehensive Quality Index was between 0.39–0.97, which was lower than 1.0, therefore the water environment was acceptable and ranked as clean to slight clean. There were three areas that were relatively heavily polluted, including the Suizhong offshore area, north of the Liaodong Bay estuary area, and the Fuzhou Bay and Jinzhou Bay offshore areas.

Key words　Liaodong Bay; Environmental quality; Heavy metals

① Corresponding author: SONG Lun, E-mail: songlun827421@sohu.com

DOI: 10.11758/yykxjz.20150824001 http://www.yykxjz.cn/

辽东湾水体中石油类的时空分布特征和污染状况*

王召会 吴金浩 胡超魁 刘桂英 王年斌
李 爱 田甲申 马志强①
(辽宁省海洋水产科学研究院 辽宁省海洋环境监测总站 大连 116023)

摘要 根据 2013–2014 年春、夏、秋、冬季对辽东湾海域 8 个航次的调查资料，研究了水体中石油类的空间分布特征及季节变化趋势，分析了其污染状况，探讨了其污染来源。结果显示，辽东湾海域海水石油类含量范围为(0.003–0.239) mg/L，平均为 0.027 mg/L，随着季节周期性变化波动，整体呈下降的变化趋势；春、秋、冬季各航次均存在不同程度的海水水质超标准现象，表底层石油类含量存在显著相关性，具有秋季>冬季>春季>夏季的季节变化趋势，石油类含量呈沿岸高于远岸，开放海域大于海洋保护区的平面分布特征。深入分析发现，石油类含量范围为 0.030–0.032 mg/L，分布区域面积最广，为 6960 km^2，占调查海域的 27.0%；集中分布在辽东湾北部沿岸和西部近岸海域。石油类含量低于 0.024 mg/L 的区域分布面积为 2806 km^2，占辽东湾调查面积的 10.9%，分布区域主要集中在大连斑海豹国家级自然保护区范围内。石油类含量高于 0.032 mg/L，区域分布面积为 1170 km^2，仅占辽东湾调查面积的 4.5%，集中分布在辽东湾西部沿岸港口区海域。季节变化主要受机动渔船海上作业污染影响；陆源输入和人类海上活动的输入为辽东湾海域石油类主要来源。

关键词 辽东湾，石油类，分布特征，变化趋势
中图分类号 X55 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)03-0020-08

辽东湾位于渤海北部，西起河北省大清河口，东到辽东半岛南端老铁山角，面积为 3.3×10^4 km^2，是我国纬度最高的海湾。辽东湾是我国重要的海上石油开采区，沿岸分布着秦皇岛港、锦州港、鲅鱼圈港、仙人岛港、长兴岛港等重要港口，石油开发、港口航运和陆源输入均有可能造成石油类污染物的注入。另外，辽东湾为典型半封闭海湾，湾内外水体交换缓慢，自身净化能力有限，石油类污染问题日益突出。

石油类成分是十分复杂的物质，含有多种难以被微生物降解的致癌化合物，其中的低分子量芳香族化合物，通常是摄入毒性效应的重要化学物质(Gilde *et al*, 2012)。海洋是石油类污染物的最终汇聚地，随着开采、加工、使用石油类化合物总量的增加，通过各种途径进入海洋的石油类总量日益增加，石油类污染物已成为近岸海域的主要污染物之一(Zakaria *et al*, 2000)。

国内已有一些关于辽东湾石油烃污染调查与评价方面的研究，王召会等(2016)根据 2013 年 6–8 月对辽东湾海域拖网采集的 127 个生物体样品石油烃含量测试结果显示，辽东湾海域生物体内石油烃污染状况处于较高水平；在水体方面，宛立等(2007)研究表明，2001–2004 年辽东湾北部海域表层水体夏季油类的污染状况为大凌河口海域石油类污染比较严重。而针对整个辽东湾海域石油类含量分布特征、变化趋势以及污染状况等则尚未见报道。为了解辽东湾海域石油类的污染程度，寻求应对污染的有效途径，根据 2013–2014 年 8 个航次的调查数据，对辽东湾表、底层海水中石油类含量及其影响因素进行深入的分析，揭示石油类在该海区的分布现状，阐述季节变化趋势，为辽东湾的海洋环境健康状况评价和生态环境保护提供科学依据，以利于该海区海洋生态健康和可持续发展。

*辽宁省海洋与渔业科研项目(201420、201303)资助。王召会，E-mail: king3708@163.com
① 通讯作者：马志强，副研究员，E-mail: mzq_1967@sina.com
收稿日期：2015-08-24，收修改日期：2015-10-15

1　材料与方法

1.1　采样时间和站位设置

分别于 2013、2014 年的春季(5月)、夏季(8月)、秋季(10月)、冬季(12月)进行 8 个航次的调查，调查范围自渤海老铁山角(辽东半岛南端)至绥中止锚湾连线以北，基本覆盖辽东湾海域，调查面积约为 2.6×10^4 km^2，垂直东西岸线布设 7 个断面，共计 38 个站位(图 1)。10 m 等深线以浅站位采集表层水样(在海面以下 0.5 m 处采集)，深于 10 m 等深线站位采集表底层水样(底层水样在离海底 1 m 处采集)。采样时将 500 ml 棕色玻璃瓶固定于采油器中直接采集，然后立即用 1:3 硫酸溶液调节至弱酸性(GB/T12763.4–2007)，并用 10 ml×2 无芳烃正己烷萃取，萃取液密封后于(5±2)℃条件下避光保存，采用紫外分光光度法测定其石油类浓度(GB 17378.4–2007)。

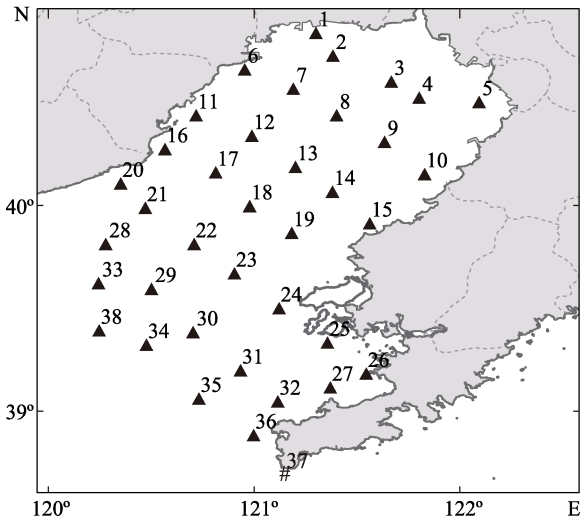

图 1　站位分布
Fig.1　Sampling locations

1.2　评价方法

选用变异系数来定量反映各站位之间石油类在空间尺度上波动程度的大小差异，变异系数计算公式为(崔党群, 1994):

$$CV = SD / \bar{X}$$

式中，CV 为变异系数；SD 表示各站位石油类的标准差；$\bar{X}$ 表示各站位石油类的平均值。

使用单因子指数法对水体中石油类质量进行评价，其计算公式为:

$$P_i = C_i / S_i$$

式中，P_i 表示 i 站位石油类污染指数；C_i 和 S_i 分别为 i 站位石油类评价的实测数据和评价标准值，$P_i > 1$ 表明调查海域石油类含量不能满足相应功能区划环境目标要求。本研究评价标准采用《海水水质标准》(GB3097–1997)进行评价。

1.3　数据分析

应用 Kolmogorove-Smirnov 检验法进行概率分布检验；采用 Pearson 法进行表底层相关性分析；采用 Mann-Kendall 统计方法对辽东湾石油类变化进行趋势分析(刘亮等, 2014)，以上分析方法均采用 SPSS 19.0 软件进行处理。

使用 Oringin8.5 绘制季节变化。采用 ArcGIS10.0 进行年度石油类平面分布叠加统计分析，使用克里金法(Kriging)对未测点进行插值预测，经栅格计算器(Raster Calculator)分析，叠加海域年度 4 个航次平面分布图，栅格转面(Raster to Polygon)工具转为矢量格式，经融合(Coverage)工具合并同类项，统计各石油类含量范围的区域面积。

2　结果与分析

2.1　辽东湾海域石油类含量水平

经 Kolmogorove-Smirnov 检验法进行的概率分布检验发现(表 1，图 2)，2013 年的夏季和 2014 年的春、秋季石油类含量服从正态分布，2013 年春、秋、冬季和 2014 年夏季 4 个航次虽为偏态分布，但接近正态分布。因此，以上 7 个航次可用样本的算术平均值描述随机变量的大小特征。而 2014 年冬季航次出现多个不规律的高值点，经检验为非离群值，其石油类含量不服从正态分布，则算术平均值不能准确反映该变量的大小特征，本研究用中位数(0.017 mg/L)来描述该航次石油类质量浓度变量的大小特征。辽东湾海域水体中各站位石油类均有检出，其浓度范围为 0.003–0.239 mg/L，平均浓度为 0.027 mg/L，就各航次变异系数看，2013 年春、夏、冬季和 2014 年春、夏、秋季 6 个航次变异系数较小，属中等变异水平，2013 年秋季和 2014 年冬季变异系数为高等变异水平(张乃明等, 2001)，表明各站位间水体中石油类含量在调查海域具有一定的空间离散度，这可能是由于石油类污染物来源的偶然性和不确定性造成的。采取 Mann-Kendall 统计方法对辽东湾 8 个航次石油类含量按采样时间序列进行变化趋势分析，结果发现，辽东湾海域石油类含量随着季节变化有周期性波动，但整体是下降的变化趋势(S=–12，P=0.089)。表明近两年辽东湾海域石油类污染状况呈逐渐好转的态势。

1 号站位于龙栖湾港口航运区，其环境保护目标

表 1 各航次调查石油类含量统计特征值

Tab.1 The statistical feature values of petroleum hydrocarbon concentration in eight voyages(mg/L)

航次 Voyage number	样品数 Amount of sample	分布类型 Distribution pattern	平均值 Mean	中位数 Median	标准差 Standard deviation	变异系数 Variation coefficient	范围 Range
2013–05	67	偏态 Skew	0.031	0.025	0.013	0.42	0.014–0.076
2013–08	67	正态 Normal	0.023	0.021	0.008	0.35	0.006–0.046
2013–10	58	偏态 Skew	0.037	0.027	0.029	0.78	0.006–0.098
2013–12	68	偏态 Skew	0.037	0.031	0.016	0.43	0.017–0.107
2014–05	67	正态 Normal	0.025	0.022	0.009	0.36	0.008–0.056
2014–08	63	偏态 Skew	0.014	0.011	0.007	0.50	0.004–0.037
2014–10	64	正态 Normal	0.023	0.021	0.008	0.35	0.008–0.053
2014–12	64	偏态 Skew	0.029	0.017	0.043	1.48	0.003–0.239

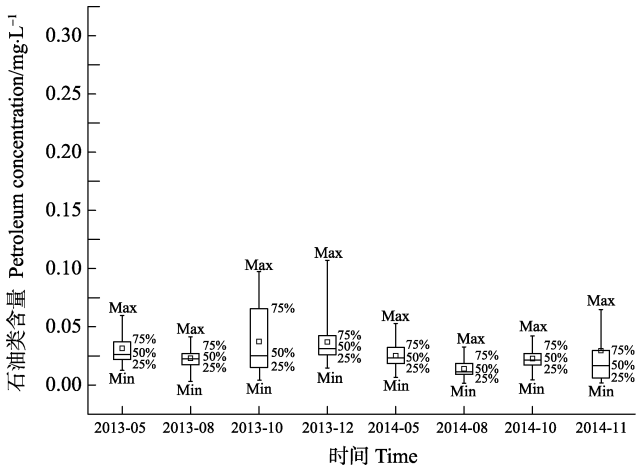

图 2 各航次间石油类含量变化

Fig.2 Changes in petroleum hydrocarbon concentration in different voyages

为水质执行第Ⅳ类海水水质标准(0.5 mg/L)；5 号站位处在营口海域保留区，执行不低于第Ⅲ类海水水质标准(0.3 mg/L)；14、18、19、23、24、25、27、31、32 站位处在大连斑海豹国家级自然保护区内，36 号站位于蛇岛自然保护区，以上 10 个站位执行第Ⅰ类海水水质标准(0.05 mg/L)；2、3、4、6、10、11、16、20 位于农渔业区，执行第Ⅱ类海水水质标准(海水水质标准第Ⅰ、Ⅱ类限值均为 0.05 mg/L)，其他站位离岸 12 n mile 以外不在功能区划范围内，本研究执行海水水质第Ⅱ类标准。单因子评价结果显示，2013、2014 年的夏季航次各站位石油类含量均满足其功能区环境管理目标要求，其他航次调查海域石油类含量存在不同程度的超标现象，其中，2013 年秋季航次超标率最高为 25.9%，其次为 2013 年的冬季航次，其超标率为 16.2%；2013 年春季和 2014 年冬季站位超标率基本持平，分别为 10.4%和 10.9%，2014 年的秋季和春季超标率较低分别为 3.1%和 1.5%。

2.2 水体中石油类的空间分布特征

2013–2014 两年间，辽东湾海域石油类表层含量总体算术平均值为 0.027(0.003–0.176) mg/L，略高于底层的 0.025(0.003–0.239) mg/L，经 Pearson 相关性检验，表底层数据显著相关(r=0.621，P < 0.01)，表明表层石油类含量越高，相应底层含量则越高。

2013 年表层石油类含量范围为 0.008–0.098 mg/L，算术平均值为 0.033 mg/L，略高于底层的 0.030 (0.006–0.107) mg/L。表、底层具有相似的平面分布特征见图 3。从图 3 可以看出，高值区出现在葫芦岛港、锦州港为主的西部沿岸海域和大辽河口区，低值区位于东南部长兴岛外部海域，整体呈由东南向西北沿岸梯度递增的变化趋势。

2014 年表层石油类含量范围为 0.003–0.176 mg/L，算术平均值为 0.024 mg/L，略高于底层的 0.022

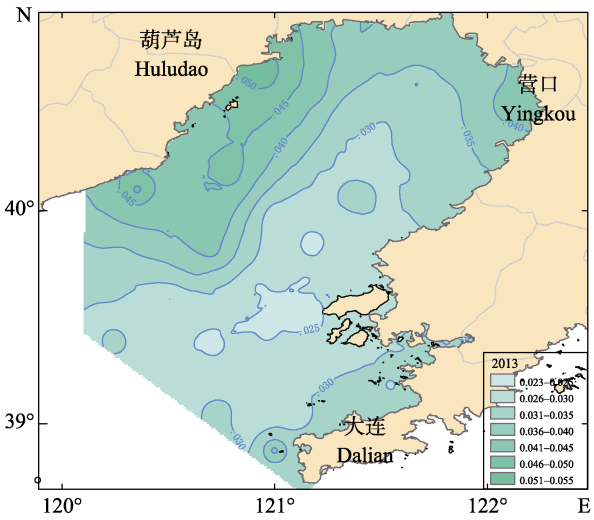

图 3 辽东湾海域石油类含量 2013 年叠加分布

Fig.3 The plane distribution of petroleum hydrocarbon concentration in surface seawater of Liaodong Bay in 2013

(0.003–0.239) mg/L，表、底层石油类含量均明显低于2013 年。2014 年辽东湾海域表层石油类平面叠加分布见图 4。从图 4 可以看出，湾东北部辽河口和大辽河口区出现一个明显高值区，同时，形成呈东–西走向的舌状凸出等值面，且等值面梯度由陡变转为平缓，此为典型的河口区污染物分布特征，表明该年度辽东湾海域石油类含量及其分布明显受到大辽河等沿岸河流径流携带大量石油类等污染物入海的影响。

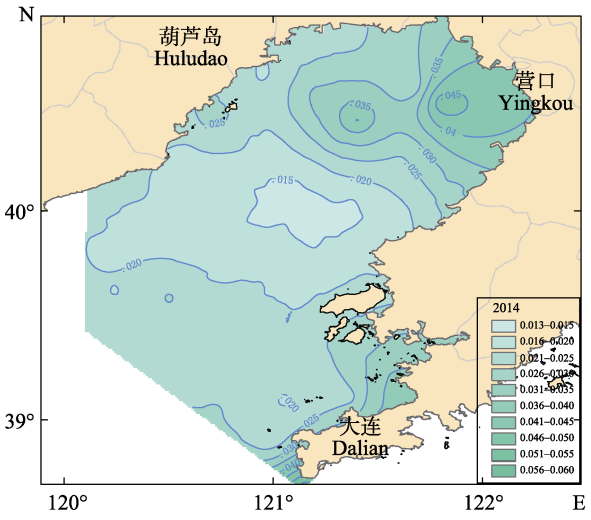

图 4　辽东湾海域石油类含量 2014 年叠加分布

Fig.4　The plane distribution of petroleum hydrocarbon concentration in surface seawater of Liaodong Bay in 2014

辽东湾海域近 2 年石油类含量、主要海洋保护区和海上污染源叠加分布见图 5。从图 5 可以看出，石油类含量高值区出现在湾西部沿岸和北部沿岸，其中，西部沿岸主要为港口和河流聚集区，有锦州港、葫芦岛港和秦皇岛港三大港口和六股河；北部沿岸主要为河流和采油平台聚集区，有大小凌河、辽河、大辽河等主要入海河流和辽河油田采油平台。低值区主要分布在大连斑海豹国家级自然保护区内，由于保护区内限制人类开发活动，这在一定程度上减少了石油类污染物来源，从而降低了该海域水体石油类含量。

辽东湾海域近 2 年各站位水体石油类均值范围、分布区域面积和所占调查区域比率见表 2。从表 2 可以看出，石油类含量范围为 0.030–0.032 mg/L，分布

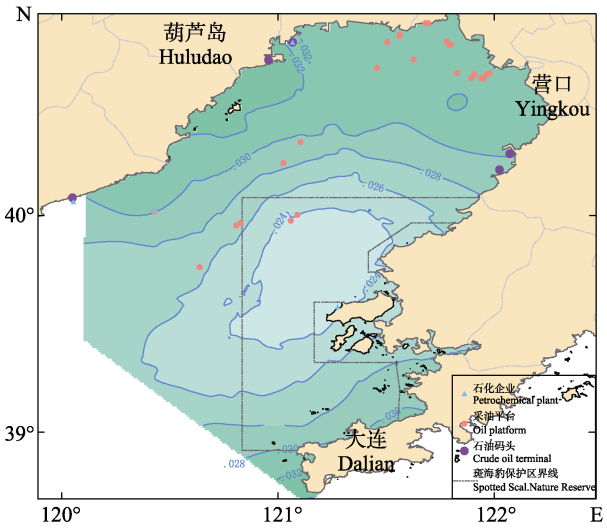

图 5　辽东湾海域近 2 年石油类含量、主要海洋保护区和海上污染源叠加分布

Fig.5　The superposition map of petroleum hydrocarbon concentration, marine protected area and pollution source of Liaodong Bay in recent two years

区域面积最广，为 6960 km^2，占辽东湾调查面积的 27.0%，集中分布在辽东湾北部沿岸和西部近岸海域，另外，金州湾南部沿岸也有小范围分布；其次为 0.026–0.028 mg/L，分布区域面积为 5880 km^2，占辽东湾调查面积的 22.8%，集中分布在中部海域；石油类含量低于 0.024 mg/L 的区域分布面积为 2806 km^2，占辽东湾调查面积的 10.9%，分布区域主要集中在大连斑海豹国家级自然保护区范围内。石油类含量高于 0.032 mg/L，区域分布面积为 1170 km^2，仅占辽东湾调查面积的 4.5%，集中分布在辽东湾西部沿岸港口区海域。

2.3　水体中石油类季节变化趋势分析

各航次间石油烃含量的顺序依次为 2013 年秋(0.037 mg/L)=2013 年冬(0.037 mg/L)>2013 年春(0.031 mg/L) > 2014 年春(0.025 mg/L)>2014 年秋 (0.023 mg/L)=2013 夏(0.023 mg/L)>2014 年冬(0.017 mg/L)>2014 年夏季(0.014 mg/L)。从表 3 可以看出，整个辽东湾的水体石油类分布存在明显的季节差异。2013 年秋、冬季石油类含量最高，其次为春季，夏季最低；2014 年春季最高，其次为秋季和冬季，夏季最低。表 3 显

表 2　辽东湾海域各站位水体石油类均值范围分布区域面积和区域比率

Tab.2　The distribution area and area ratio of petroleum hydrocarbon contents average in seawater of the Liaodong Bay

含量范围 Content range (mg/L)	0.024≤	0.024–0.026	0.026–0.028	0.028–0.030	0.030–0.032	> 0.032
面积 Area (km^2)	2806	4692	5880	4292	6960	1170
占区域比率 Proportion (%)	10.9	18.2	22.8	16.6	27.0	4.5

表 3 各季节石油类含量统计表

Tab.3 Statistics of petroleum hydrocarbon concentrations in different seasons

季节 Reason	春季 Spring	夏季 Summer	秋季 Autumn	冬季 Winter
样品数 Amount of sample	134	130	122	132
范围 Range (mg/L)	0.008–0.076	0.004–0.046	0.006–0.098	0.003–0.239
平均值±标准差(Mean±SD) (mg/L)	0.028±0.012	0.018±0.009	0.030±0.022	0.027±0.016
超标率 Exceed standard rate (%)	6.0	0	13.9	13.6

示，整体呈秋、春、冬、夏季依次减小的变化趋势。秋、冬、春季石油类含量虽依次减小但相差不大，夏季则明显小于其他 3 个季节；秋冬季节超标率最高，且两季基本持平，该季节出现多个分散的高值点，尤其是冬季航次，可能为海上无规律排污造成的。春季航次各站位之间石油类含量比较稳定，均值虽然略高于冬季航次，但超标率却明显低于该航次；夏季航次各站位石油类处于较低的含量水平，均满足其功能区环境管理目标要求。

3 讨论

3.1 水体石油类空间分布特征分析

石油溢入海洋后，因其密度比海水小故而漂浮在水面上，但它会以分子形式溶解于海水，在海流和波浪的作用下，不仅在水面上水平扩散，而且也向下垂直扩散，最终通过蒸发、溶解、光氧化、吸附、沉淀、生物降解等逐渐达到平衡，因此，一般表层石油类含量大于底层，且二者具有显著相关性。但是，如果溢油污染发生在底层海水，比如输油管道破裂、油轮触礁溢油或者采油平台泄漏，会出现个别站位表层石油类含量低于底层。环辽东湾主要河流近 5 年石油类入海量(辽宁省海洋与渔业厅, 2010–2014)见表 4。由表 4 可以看出，大辽河 2014 年石油类污染物入海量虽不及辽河，但其近几年一直处于较高水平，为主要石油类污染物陆地输入源。因此，辽东湾东北部河口区历年来均为石油类含量高值区，这与本研究结果一致。由图 3、图 4 和图 5 可以看出，河流入海口、港口分布的沿岸海域和人类活动比较频繁，近岸海域石油类含量明显高于远岸海域，而禁止开发和受限制开发的海洋保护区海域则为石油类含量的低值区，作者认为，陆源输入和人类活动的无规律输入为辽东湾海域石油类主要来源。

3.2 水体石油类季节变化趋势分析

辽东湾水体石油类季节变化趋势为秋季 > 春季 > 冬季 > 夏季，推测原因主要受机动渔船海上作业排污影响。每年的夏季(6–9 月)为辽东湾的禁渔期，此时，所有机动渔船锚定渔港，因此，辽东湾海域石油类含量为年度最小值；秋季辽东湾禁渔期解禁初期，沿岸各渔港泊靠的机动渔船涌入调查海域，排放的废机柴油污染物造成石油类污染，为该海域石油类含量最高值。夏、秋季节间石油类含量的差值可能就是渔船的贡献值。秋、冬季航次进入平水期和枯水期，陆源入海径流对调查区域的石油类污染物贡献减小，海上排污是调查海区的石油类的主要来源，这种排污方式最直接的表现形式就是污染物浓度呈比较分散的点源分布，无明显平面变化趋势。冬季航次由于天气和渔业资源减少等原因，海上作业船只相对减少，但此时海水温度较低，低水温不仅造成降解烃的微生物数量减少，而且微生物对石油类的降解率也降低，微生物最大降解活性在 10–20℃，在 4–30℃之间对柴油的降解率随温度的增加而增大，冬季调查期间水温为 4–5℃，此时，微生物降解活性最低(Kim *et al*, 2010)。因此，冬季航次调查海域石油类含量仍处于较高水平。

春、冬季节海上光照不强，石油类的蒸发较弱；在夏季时，光照强度明显增大，海面石油类蒸发、分解和溶解速率增大，同时平衡吸附量减小，蒸发和分解使海水中石油类质量浓度降低，溶解和吸附量减小使石油类质量浓度增大。而蒸发对于石油类污染物的

表 4 近 5 年辽东湾主要河流石油类入海量

Tab.4 The amout of petroleum hydrocarbon into the Liaodong Bay from river in recent five years (t)

河流 River	2010 年	2011 年	2012 年	2013 年	2014 年
大辽河 Daliao River	219	240.9	186.1	144.3	19.9
辽河 Liao River	217	100.9	47.1	122.1	86.7
小凌河 Xiaoling River	28	20.0	16.5	34.0	–
六股河 Liugu River	–	19.2	0.7	21.4	12.9

去除起着至关重要的作用, 在正常海表条件下, 石油溶解的速率仅是蒸发的 0.1%(Kim *et al*, 1996), 所以前者对石油类质量浓度的影响要远大于后者; 加上夏季海水出现最高温, 微生物的活动能力随之提高, 对石油类的降解能力增强, 致使夏季海水中石油类质量浓度降低。

3.3　与其他海域水体石油类含量的比较

表 5 为国内部分海域各季节水体的石油类含量, 分析方法均为紫外分光光度法。从表 5 可以看出, 辽东湾海域水体石油类的含量略低于北黄海海域, 明显低于长江口和深圳湾海域, 整体处于较低含量水平; 春季航次中辽东湾海域石油类含量略高于北黄海海域, 明显低于其他南方海域; 北黄海、长江口和深圳湾海域夏季航次石油类含量明显高于其他季航次, 处于最高含量水平, 而夏季为丰水期, 表明径流入海为其他海域石油类污染物主要来源, 而辽东湾海域夏季航次明显低于其他航次, 表明海上机动渔船排污为石油类污染物主要来源; 秋季航次各海域石油类含量最为接近, 辽东湾、北黄海和流沙湾相差不大, 低于深圳湾海域; 冬季航次辽东湾海域石油类含量明显低于其他各海域, 处于较低含量水平。

3.4　辽东湾石油类污染物来源分析

辽东湾为我国著名的天然渔场, 辽宁省环辽东湾有渔港 100 余个, 机动渔船 31200 余艘, 每年向辽东湾海域排放 1300 t 余石油类污染物(袁宇等, 2008), 为辽东湾石油类污染物主要来源。辽宁省沿辽东湾海域直接入海有名可查的河流有 60 余条, 流域面积在 500 km^2 以上的有 10 条。这些河流携带上游地区污染物通过河口排入研究海域, 形成入海污染源(袁宇等, 2008)。近 3 年来, 2013 年辽宁省辽东湾海域主要河流石油类入海量最高为 706 t, 其次为 2012 年的 640 t, 2014 年降雨量剧减加上节能减排效果明显, 其石油类入海量为 239 t。陆源入海排污口每年排放的污水也给辽东湾海洋环境造成很大的压力, 辽东湾沿岸陆源入海排污口大约有 30 个, 2013 年环辽东湾陆源排污口石油类入海量为 21.1 t (辽宁省海洋与渔业厅, 2010–2014)。陆源径流携带石油类污染物入海为辽东湾石油类重要来源, 夏季航次正处丰水期, 环辽东湾入海河流和陆源排污口入海量均处年度高峰期, 该航次石油类污染物含量分布特征呈由沿岸河口区向远岸梯度递减的变化趋势为重要例证。另外, 船舶溢油灾害和石油平台溢油灾害为辽东湾石油类污染物重要来源, 2000–2008 年之间, 辽宁海域共发生海损性船舶溢油事故 52 起, 操作性船舶溢油事故 93 起, 泄露油品及油水混合物 1500 t 余(国家海洋环境监测中心, 2011)。辽东湾北部海域的辽河油田采油带为我国重要海上采油区, 近年该海域石油勘探和开发过程虽无重大溢油事故发生, 但由于石油勘探和开发活动固

表 5　不同海域水体石油类含量

Tab.5　The petroleum hydrocarbon concentrations in different seas

海域 Waters	季节 Season	含量范围 Content range(mg/L)	平均含量 Average content(mg/L)	资料来源 References
北黄海 Northern the Yellow Sea	春季 Spring	0.01–0.047	0.022	侯俊妮等(2011)
	夏季 Summer	0.043–0.154	0.099	
	秋季 Autumn	0.018–0.042	0.027	
	冬季 winter	0.012–0.178	0.051	
辽东湾 Liaodong Bay	春季 Spring	0.008–0.076	0.028	本研究
	夏季 Summer	0.004–0.046	0.018	
	秋季 Autumn	0.006–0.098	0.030	
	冬季 winter	0.003–0.239	0.027	
长江口 Yangtze River Estuary	春季 Spring	0.070–0.130	0.095	李磊等(2014)
	夏季 Summer	0.050–0.180	0.103	
深圳湾 Shenzhen Bay	春季 Spring	0.042–0.279	0.101	胡利芳等(2010)
	夏季 Summer	0.065–0.406	0.214	
	秋季 Autumn	0.033–0.139	0.063	
	冬季 winter	0.022–1.130	0.277	
流沙湾 Liusha Bay	春季 Spring	0.041–1.930	0.219	李雪英等(2011)
	夏季 Summer	0.010–0.090	0.032	
	秋季 Autumn	ND–0.044	0.014	
	冬季 winter	0.00–0.110	0.055	

有的溢油风险和其他海域已发生的溢油灾害，重大溢油风险依然存在。

4 结论

(1) 2013–2014 年，辽东湾海域水体中石油类浓度范围为(0.003–0.239) mg/L，平均浓度为 0.027 mg/L，各站位间水体中石油类含量在调查海域具有一定的空间离散度，随着季节有周期性波动变化，整体是下降的变化趋势。2013、2014 年的夏季航次各站位石油类含量均满足其功能区环境管理目标要求，其他航次调查海域石油类含量存在不同程度的超标现象。

(2) 表底层石油类含量显著相关，石油类含量范围为(0.030–0.032) mg/L，分布区域面积最广，为 6960 km^2，占辽东湾调查面积的 27.0%，集中分布在辽东湾北部沿岸和西部近岸海域。石油类含量低于 0.024 mg/L 的区域分布面积为 2806 km^2，占辽东湾调查面积的 10.9%，分布区域主要集中在大连斑海豹国家级自然保护区范围内。石油类含量高于 0.032 mg/L 区域分布面积为 1170 km^2，仅占辽东湾调查面积的 4.5%，集中分布在辽东湾西部沿岸港口区海域。

(3) 辽东湾水体石油类季节变化趋势为秋季 > 冬季 > 春季 > 夏季，可能受机动渔船海上作业排污影响。河流入海口、港口分布的沿岸海域和人类活动比较频繁近岸海域石油类含量明显高于远岸海域，而禁止开发和受限制开发的海洋保护区海域则为石油类含量的低值区，陆源输入和人类活动的无规律输入可能为辽东湾海域石油类主要来源。

参 考 文 献

辽宁省海洋与渔业厅. 辽宁省海洋环境质量公报. 沈阳: 辽宁省海洋与渔业厅, 2010–2014

刘亮, 王菊英, 胡莹莹, 等. 渤海近岸海域石油类污染变化趋势. 海洋与湖沼, 2014, 45(1): 88–93

张乃明, 李保国, 胡克林, 等. 太原污灌区土壤重金属和盐分含量的空间变异特征. 环境科学学报, 2001, 21(3): 349–353

李雪英, 孙省利, 赵利容, 等. 流沙湾海水中石油烃的时空分布特征研究. 生态环境学报, 2011, 20(5): 908–912

李磊, 蒋枚, 沈新强, 等. 长江口及邻近海域水体中石油烃分布特征及其污染评价. 环境化学, 2014, 33(8): 1366–1372

宛立, 田继辉, 马志强, 等. 辽东湾北部海域表层水体夏季油类的污染状况. 水产科学, 2007, 26(9): 515–517

国家环境保护局. 海水水质标准(GB3097–1997). 北京: 中国环境科学出版社, 1998

国家环境保护局. 环境影响评价技术导则地面水环境(HJ/T2.3–1993). 北京: 中国环境科学出版社, 1994

国家海洋局. 海洋监测规范(GB 17378.4–2007). 北京, 2007

国家海洋局. 海洋调查规范(GB/T12763.4–2007). 北京, 2007

国家海洋环境监测中心. 辽宁省海洋资源环境基本状况. 2011. 280–289

胡利芳, 孙省利, 李雪英, 等. 深圳湾海水石油烃分布特征及其相关因素的探讨. 广州海洋大学学报, 2010, 30(3): 99–102

侯俊妮, 张传松, 石晓勇. 北黄海石油烃含量的季节变化和分布特征. 渔业科学进展, 2011, 32(5): 121–125

袁宇, 朱京海, 侯永顺, 等. 辽东湾入海污染物调查及海域水质安全分析. 中国安全科学学报, 2008, 18(2): 12–16

崔党群. 生物统计学. 北京: 中国科学技术出版社, 1994. 34–35

Gilde K, Pinckney JL. Sublethal effects of crude oil on the community structure of estuarine phytoplankton. Estuaries and Coasts, 2012, 35(3): 853–861

Riazi MR, Edalat M. Prediction of the rate of oil removal from seawater by evaporation and dissolution. J Petrol Sci Eng, 1–996, 16(4): 291–300

Kim M, Yim HU, Hong SH, *et al*. HeBei Sprit oil spill monitored on site by fluoronetric detection of residual oil in coastal waters off Tacan, Korea. Mar Pollu Bull, 2010, 60(3): 383–389

Zakaria MP, Horinouchi A, TsutsumiS, *et al*. Oil pollution in the Straits of Malacca, Malaysia: Application of molecular markers for source identification. Environ Sci Technol, 2000, 34(7): 1189–1196

(编辑 陈严)

Temporal and Spatial Distribution of Petroleum Hydrocarbon and the Pollution in Seawater of the Liaodong Bay

WANG Zhaohui, WU Jinhao, HU Chaokui, LIU Guiying, WANG Nianbin,
LI Ai, TIAN Jiashen, MA Zhiqiang①

(*Liaoning Marine and Fisheries Science Research Institute, Liaoning Marine Environment Monitoring Station, Dalian* 116023)

Abstract　Here we studied the seasonal, temporal and spatial distribution of petroleum hydrocarbon in the Liaoning Bay based on the all-year-around environmental monitoring data in 2013 and 2014. The source and degree of pollution were also analyzed and discussed. The range of petroleum hydrocarbon concentration in seawater was 0.003–0.239 mg/L with an average of 0.027 mg/L. The concentration tended to decrease over time and exhibited seasonal fluctuation. Petroleum hydrocarbon concentrations in spring, autumn and winter exceeded the limit of the national benchmark with varying degrees. There was a significant correlation between concentrations in the surface and bottom seawater. The petroleum hydrocarbon concentration varied in seasons (autumn > winter > spring > summer), and gradually decreased from inshore to offshore, and from open areas to protected areas. It could be concluded that regions with petroleum hydrocarbon concentrations of 0.030–0.032 mg/L, < 0.024 mg/L, and > 0.032 mg/L accounted for 27%, 10.9%, 4.5% of the total investigated sea area respectively. The region with a concentration of 0.030–0.032 mg/L had an region of 6960 km^2 and was mostly within the northern and western coastal region of the Liaodong Bay. The area with petroleum hydrocarbon concentration below 0.024 mg/L was 2806 km^2 and was mainly located in the Dalian harbor seal nature reserve. The smallest area was about 1170 km^2 in the western harbor area of the Liaodong Bay. Analysis also showed that seasonal variation in petroleum hydrocarbon concentration was affected by the pollution from fishing vessel operations, and that the major sources of petroleum hydrocarbon were the terrestrial inputs and marine anthropogenic activities.

Key words　Liaodong Bay; Petroleum hydrocarbon; Distribution characteristics; Change trend

① Corresponding author: MA Zhiqiang, E-mail: mzq_1967@sina.com.

DOI: 10.11758/yykxjz.20150121003 http://www.yykxjz.cn/

温度对云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*)胚胎发育和仔鱼活力的影响*

张廷廷[1,3] 陈 超[1①] 施兆鸿[2] 李炎璐[1]
于欢欢[1,3] 任保辉[4] 徐万土[5]

(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. 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;
3. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 4. 莱州明波水产有限公司 烟台 261400;
5. 宁波象山港湾水产苗种有限公司 浙江 315700)

摘要 研究了不同孵化温度(16℃、18℃、20℃、22℃、24℃、26℃、28℃和 30℃)对云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*)胚胎发育的影响，记录并分析不同温度处理组受精 12 h 后的胚胎发育时期、受精卵的孵化周期、孵化率和初孵仔鱼的畸形率，并对初孵仔鱼进行不同温度下的饥饿耐受性实验，测定其每天的存活率和生存活力指数(Survival activity index，*SAI*)。结果显示，当温度在 18–28℃范围内时，胚胎均可孵化出仔鱼，且孵化时间随温度的升高而缩短，孵化时间 *y* 与温度 *x* 呈极显著的负相关关系，$y=12139x^{-1.869}$，$R^2=0.993$($P<0.01$)。22℃时受精卵孵化率最高，为 71.01%，该温度下对应最低畸形率(9.70%)，其次为 24℃时，受精卵孵化率为 65.37%，畸形率为 13.07%；温度低于 22℃时，孵化率逐渐降低，18℃时的孵化率为 24.39%；温度高于 22℃时，孵化率亦明显降低，28℃孵化率最低，为 16.11%，而畸形率的变化趋势与孵化率相反。温度为 16℃时，受精卵发育至高囊胚期后不再继续发育；温度为 30℃时，胚胎停止于胚体形成期。仔鱼的 *SAI* 值随着温度的升高先升高后降低，在 20℃时，*SAI* 值最高(25.97)，仔鱼的半数死亡时间最长为 7 d；22℃时，*SAI* 值有所降低(22.38)，仔鱼在该温度下半数死亡时间为 6 d。分析结果可知，云纹石斑鱼受精卵培育的最适温度为 22–24℃，仔鱼孵化的最适温度为 20–22℃。

关键词 云纹石斑鱼；温度；胚胎发育；仔鱼活力
中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)03-0028-06

云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*)俗称草斑、真油斑，隶属于硬骨鱼纲、鲈形目(Perciformes)、鮨科(Serranidae)、石斑鱼亚科(Epinephelinae)、石斑鱼属。云纹石斑鱼为暖温性中下层鱼类，主要分布于韩国、日本、中国和中国台湾沿岸(郭明兰等, 2008)。云纹石斑鱼体格粗壮，呈长椭圆形，侧扁，身体多为褐色或棕色，体侧有 6 条暗棕色的横带，各带下方略分叉，与褐石斑鱼(*Epinephelus bruneus*)相似(宋振鑫等, 2012)。云纹石斑鱼属于石斑鱼类中生长速度较快的鱼种，体长可达 120 cm，适应能力强，其肉味鲜美，是海水石斑鱼中的极品，具有较高的经济价值。近年来，云纹石斑鱼养殖在广东、福建、山东、江苏等地发展迅速，属于海水鱼中工厂化养殖的优良品种之一。

水温是影响海水鱼类生存与生长的重要环境因

* 科技部国际合作项目(2012DFA30360)和农业部东海与远洋渔业资源开发利用重点实验室开放课题共同资助。
张廷廷, E-mail: 13256879033@163.com
① 通讯作者：陈 超, 研究员, E-mail: ysfrichenchao@126.com
收稿日期: 2015-01-21, 收修改稿日期: 2015-02-07

子之一, 也是海水鱼在胚胎发育及仔鱼阶段正常生长的关键因素。当温度低于或高于其适宜范围, 均会对其生长发育造成胁迫, 导致较高的死亡率和畸形率。关于温度对海水鱼类早期发育阶段的影响已有报道(王涵生, 1997; 张培军, 1999)。张鑫磊等(2006)研究发现, 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)胚胎发育适宜的孵化水温为 22–23℃。张海发等(2006)对斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)研究中得出其胚胎发育及仔鱼生长最适温度范围均为 24–26℃。云纹石斑鱼(*E. moara*) (♀)与七带石斑鱼(*Epinephelus septemfasciatus*) (♂)杂交 F_1 代胚胎发育的适宜温度范围为 17–25℃, 仔鱼在 17–21℃时生长活力最好(于欢欢等, 2014)。由以上研究结果可知, 不同鱼类其受精卵最适孵化水温和初孵仔鱼最佳培育温度存在种间差异。

温度和盐度对云纹石斑鱼早期幼鱼生长和存活的影响已有相关报道(刘银华等, 2014), 但有关温度对云纹石斑鱼胚胎发育与苗种培育阶段的影响研究尚未见报道。本研究对云纹石斑鱼受精卵孵化和仔鱼阶段最适温度范围进行初步研究, 分析其生长速率、孵化率及畸形率与温度的关系, 为人工繁育过程中提高孵化率及育苗成活率提供理论依据, 为石斑鱼等其他鱼种的生产和研究提供参考资料。

1　材料与方法

1.1　材料来源

2014 年 5 月 29 日–6 月 9 日在山东莱州明波水产有限公司选取健康、生长活力旺盛且体表色泽鲜亮的云纹石斑鱼亲鱼, 通过人工注射催产激素和人工授精获得受精卵。受精卵的孵化水温为 23–24℃, 孵化盐度为 30, pH=7.8, 静水孵化。经显微镜镜检后, 挑选正常发育的受精卵用于实验。另外取部分受精卵置于孵化桶中, 微充气流水孵化, 孵化条件同上。待仔鱼孵化出膜后, 挑选正常的仔鱼用于饥饿耐受性实验。

1.2　不同温度条件下受精卵的孵化实验

云纹石斑鱼的适宜生长水温为 18–27℃(梁友等, 2011), 故本实验设置 8 个温度梯度, 即 16℃、18℃、20℃、22℃、24℃、26℃、28℃和 30℃, 每组设 3 个平行。用恒温水浴槽控制水温, 温控范围±0.5℃。待受精卵发育至两细胞期时, 放入 1000 ml 烧杯中, 每个烧杯中放入 100 粒受精卵, 将其置于调好温度的恒温水浴槽中。孵化盐度为 30, pH=7.8, 静水孵化, 每隔 8 h 换水 1 次, 更换约 2/3 体积的海水。观察云纹石斑鱼受精卵的发育状况、不同温度下胚胎的发育形态, 记录各组的孵化周期、孵化率和初孵仔鱼的畸形率。孵化率是指成形仔鱼所占的百分比; 畸形率是指尾部或脊柱弯曲、油球异位或异数个体所占初孵仔鱼的百分比。

1.3　不同培育温度下仔鱼不投饵存活系数的测定

温度梯度设置与 **1.2** 相同。挑选发育正常、活力好的初孵仔鱼各 100 尾放入盛有 1000 ml 海水的烧杯中, 每组设 3 个平行(A、B、C), 置于调控好实验温度的恒温水浴槽中, 盐度为 30, pH=7.8, 静水培育, 不投饵。仔鱼的活力以不投饵存活系数为衡量指标(Survival activity index, *SAI*)(张海发等, 2006)。每天记录死亡仔鱼数至仔鱼全部死亡, 比较各组的 *SAI* 值。仔鱼的生存活力指数用下列公式计算。

$$SAI = \sum_{i=1}^{k} (N - h_i) \times i / N$$

式中, N 为实验起始时仔鱼的数量, h_i 为第 i 天时仔鱼的累积死亡数量, k 为仔鱼全部死亡的天数(新间脩子ぢ, 1981)。

1.4　数据处理

孵化率=孵出仔鱼数/受精卵数×100%;

畸形率=孵出的畸形仔鱼/孵出仔鱼总数×100%;

存活率=(N_t/N_0)×100%;

式中, t 为实验开始时间(d), N_t 为最终存活的仔鱼数目, N_0 为实验起始时仔鱼尾数。

培育周期是指同一批受精卵中有 50%孵化出膜时所用的时间。实验数据以平均值±标准差表示, 用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差(ANOVA)统计分析。并采用 Duncan's 多重比较法检验组间差异, P<0.05 为差异显著, P<0.01 为差异极显著。

2　结果

2.1　不同温度对受精卵孵化的影响

云纹石斑鱼受精卵无色透明, 呈圆球状, 卵径为(0.87±0.01) mm, 中央有 1 个油球, 其油球径为(0.22±0.02) mm。实验过程中, 除温度不同外, 其他条件均保持一致。水温对云纹石斑鱼受精卵的孵化率、初孵仔鱼畸形率及胚胎孵化时间的影响见表 1。随着温度的升高, 胚胎发育速度亦随之加快, 18℃时的孵化时间(53.75 h)是 28℃(23.5 h)时的两倍多。在实验进行 12 h 后, 分别观察不同温度下胚胎的发育情况, 16℃与 18℃两组的受精卵发育最慢, 均发育至高囊胚期; 30℃下的受精卵超过半数已发育至胚体形成期。受精卵的

表 1 不同温度条件下云纹石斑鱼受精卵的孵化

Tab.1 Hatching of the fertilized eggs of *E. moara* at different temperature

项目 Items	温度 Temperature(℃)							
	16	18	20	22	24	26	28	30
12 h 受精卵发育 Embryonic development of fertilized egg at 12 h	高囊胚 High blastula	高囊胚 High blastula	低囊胚 Low blastula	原肠前期 Early gastrula stage	原肠中期 Middle gastrula stage	原肠末期 Late gastrula stage	原肠末期 Late gastrula stage	胚体形成期 Embryo body stage
孵化时间 Hatching time (h)	止于高囊胚 Stopped at high blastula stage	53.75±0.37^{a}	45.00±2.11^{b}	36.00±0.20^{c}	33.50±0.55^{c}	26.00±1.65^{d}	23.50±0.24^{d}	止于胚体形成期 Stopped at embryo body stage
孵化率 Hatching rate (%)	—	24.39±4.71^{d}	53.54±3.99^{b}	71.01±1.92^{a}	65.37±5.63^{a}	45.25±3.97^{c}	16.11±7.41^{e}	—
畸形率 Deformity rate (%)	—	17.32±3.31^{c}	11.33±5.37^{d}	9.70±0.96^{d}	13.07±1.36^{cd}	24.64±2.80^{b}	45.91±4.61^{a}	—

注：表中各项指标为平均值±标准差，同一行数值右上角不同字母表示差异显著($P < 0.05$)，n=3

Note: The indices in the table were all denoted as $\bar{X}$ ±SD, data in the upper right with different superscripts are significantly different, $P < 0.05$, n=3

孵化时间随着温度的升高而缩短，孵化时间与温度呈极显著的负相关关系(图 1)，$y=12139x^{-1.869}$，$R^2=0.993$ ($P<0.01$) (y 代表孵化时间，x 代表温度)。

当温度在 18–28℃范围内时，云纹石斑鱼受精卵均能孵化出仔鱼；当温度为 16℃时，胚胎发育至高囊胚后便不再继续分裂；当温度为 30℃时，受精卵发育至胚体形成期终止发育，极少数到达尾芽期。受精卵的孵化率与温度有明显相关关系，在 18–28℃范围内，孵化率呈现先升高后降低的趋势，在 22℃时具有最高的孵化率(71.01%)，其次是 24℃，孵化率为 65.37%，在 28℃孵化率最低(16.11%)。对孵化率进行多项式回归分析，得到回归方程：$y=0.045x^3-5.102x^2+160.770x-1481.6$，$R^2=0.995$($y$ 代表孵化率，x 代表温度) (图 2)。

初孵仔鱼的畸形率与孵化温度有着显著性关系。20–24℃范围内，初孵仔鱼的畸形率较低，均在 10%左右，当温度低于或高于此范围时，畸形率明显升高。22℃畸形率最低，为 9.7%，而 28℃畸形率高，达 45.91%。对畸形率进行多项式回归分析(图 2)，得回归方程：$y=0.841x^2-36.067x+395.110$，$R^2=0.993$($y$ 代表畸形率，x 代表温度)。

2.2 不同温度条件对仔鱼饥饿耐受性的影响

不同温度下测定的云纹石斑鱼仔鱼的不投饵存活系数(SAI 值)见图 3。在温度 16–20℃范围内，随着温度的增加，仔鱼的 SAI 值逐渐升高；到达 20℃后，

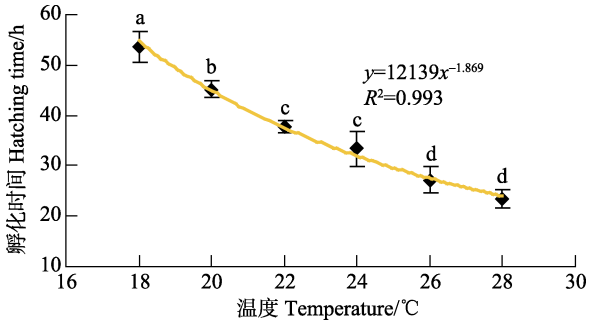

图 1 温度对云纹石斑鱼受精卵孵化时间的影响

Fig.1 Effect of temperature on the hatching time of *E. moara* embryo

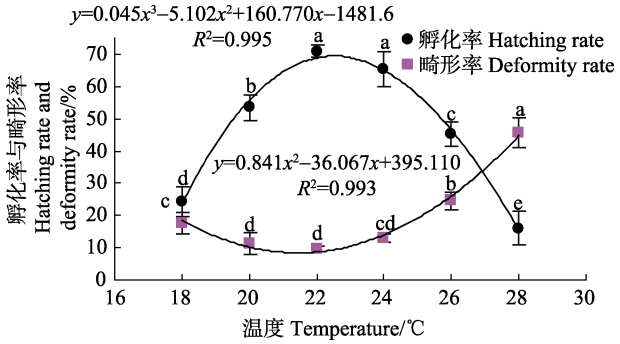

图 2 温度对云纹石斑鱼受精卵孵化率与畸形率的影响

Fig.2 Effect of temperature on the hatching rate and deformity rate of *E. moara* embryo

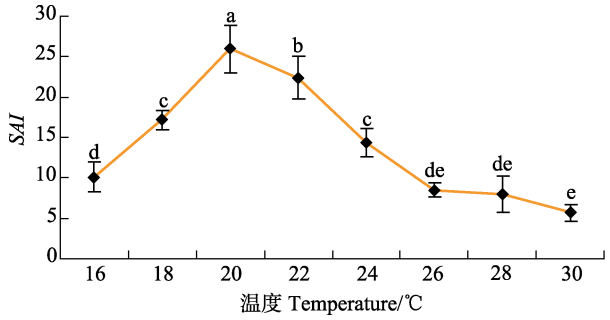

图 3　不同温度下云纹石斑鱼仔鱼的 *SAI* 值
Fig.3　*SAI* of *E. moara* larva at different temperature

仔鱼的 *SAI* 值随着温度的升高大幅度降低。温度为 20℃时，具有最大 *SAI* 值(25.97±3.19)，其次是 22℃时, *SAI* 值为 22.38±2.30。当温度超过 26℃时，*SAI* 值均在 10 以下，30℃时仔鱼的不投饵存活系数最小，为 5.69±0.79。

实验中测得仔鱼的半致死时间的变化趋势(图 4)与 *SAI* 的一致，均为先增加后减少。在 20℃下的半致死时间最长，为 7 d；30℃下的半致死时间最短，为 2.7 d。

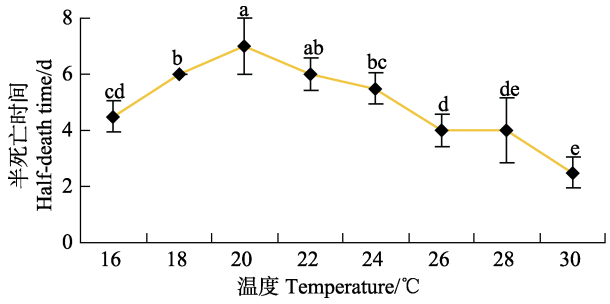

图 4　不同温度下云纹石斑鱼仔鱼的半数死亡时间
Fig.4　Half-death time of *E. moara* larva at different temperature

3　讨论

3.1　温度对云纹石斑鱼胚胎发育的影响

温度是影响鱼类受精卵孵化的重要因素，不同鱼种受精卵孵化所要求的温度条件不同，并且对温度的适应范围也有明显的差异(张培军, 1999)。至今，国内外多位学者已针对温度对鱼类受精卵孵化的影响开展了大量的研究，这些工作为水产养殖产业提供了理论指导和科学依据(王宏田等, 1998)。尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)受精卵孵化最适的温度范围为 24–30℃(强俊等, 2008)。鲤(*Cyprinus carpio* L.)受精卵孵化适宜的水温范围为 20–30℃(郭永军等, 2004)。孵化水温对美国红鱼(*Sciaenops ocellatus*)胚胎的发育有显著影响，在 25–28℃的水温条件下孵化时，具有较高的孵化率，低于此温度范围时，孵化率随着温度的降低而降低，且培育时间也随之延长(阮树会等, 2000)。

在不同温度对云纹石斑鱼受精卵孵化影响的实验中，选取培育周期、孵化率、畸形率以及 12 h 后胚胎的发育状况作为指标进行衡量，来评定温度对受精卵孵化的影响。随着温度的逐渐递增，受精卵孵化率先升高再降低，而初孵仔鱼畸形率的变化趋势与之相反。该结果与温度对其他海水鱼的影响基本一致(陈舒泛等, 2003)。楼允东(1965)认为，鱼类胚胎的孵化出膜主要依靠两方面的作用：胚体的运动和孵化酶的作用。温度是影响酶的催化活性的最重要的外界因素之一，酶只有在其适宜的温度范围之内拥有最大活性，当温度在其适宜范围之外时，酶活力会大大降低，且高温下酶失活后活性不可逆(袁勤生, 2012)。

本研究中，受精卵的培育时间与温度呈明显的负相关关系，18℃时的培育时间是 28℃时的两倍多。低温条件下，胚胎发育比较缓慢，低温抑制了胚胎孵化酶的分泌和催化活性。樊廷俊等(2002)指出，在胚胎发育过程中，温度降低不仅显著延迟孵化，而且胚胎的存活率也降低至 6.5%–47%。当温度到达 30℃时，受精卵发育至胚体形成期便停止分裂，长时间的高温使孵化酶分泌受到抑制或过早消耗，最终导致绝大多数的胚胎无法破膜而出。22–24℃条件下云纹石斑鱼受精卵的孵化率最高、初孵仔鱼的活力最好、畸形率最低。不同鱼类胚胎的孵化酶最适宜的温度范围不同，本实验中 22–24℃条件下云纹石斑鱼受精卵的孵化率最高、初孵仔鱼的活力最好、畸形率最低，由此可推断，云纹石斑鱼胚胎中孵化酶在 22–24℃条件下，具有较高的催化活性。因此，在工厂化生产中，云纹石斑鱼受精卵最适宜的孵化水温是 22–24℃，水温最低不宜低于 20℃，最高不宜超过 26℃。

3.2　温度对仔鱼饥饿耐受性的影响

仔鱼存活时间长短与受精卵的质量、卵黄等内源性营养物质的数量和质量、亲鱼的营养状态以及仔鱼生活环境等因素相关(Blaxter *et al*, 1963)，而温度是影响仔鱼生存的重要环境因素之一，温度较高或较低均会影响仔鱼的存活与生长，仔鱼的生命活动包括细胞分化、器官形成、组织间相互作用等一系列过程，这些过程的生理生化反应都涉及到一系列的酶促反应，温度正是影响酶活力的关键因子，因此，温度过高或过低都会影响到仔鱼的存活率与生长率。

初孵仔鱼进行生命活动所需要的能量来源于卵

黄囊与油球(李兵等, 2012)。仔鱼口裂形成后，开始由内源性营养向外源性营养逐渐过渡。柳敏海等(2006)认为，点带石斑鱼仔鱼在不投饵条件下的存活时间与水温呈负相关，温度越高，仔鱼的发育越快，卵黄囊与油球内的营养物质消耗越快，外源性营养阶段就会提前，仔鱼死亡速度将会加快。在本实验中，通过测定初孵仔鱼 *SAI* 值与半数死亡时间可以判断仔鱼的活力。张海发等(2006)认为，仔鱼在无外界食物供给情况下，*SAI* 值越大，说明仔鱼的活力越高，并由此可以判断受精卵的质量。*SAI* 值越大，半致死时间越长，仔鱼活力就越好，用于苗种培育时的成活率就越高。本研究中，*SAI* 值呈先升高再降低的变化趋势，温度为 20℃时具有最高 *SAI* 值(25.97±3.19)，半数死亡时间最长，为 7 d，其次是 22℃时的 *SAI* 值为 22.38±2.30，半数死亡时间为 6 d。18℃时的半数死亡时间虽然也为 6 d，但此时的 *SAI* 值只有 18.54±1.15，明显低于前两者，当温度超过 26℃时，*SAI* 值均在 10 以下，30℃时，仔鱼的不投饵存活系数最低，为 5.69±0.79，该温度下的半数死亡时间为 2.5 d。由此得出，在 20–22℃时，仔鱼具有最大的活力，苗种的成活率较高。

综上所述，在云纹石斑鱼苗种生产繁育的过程中，最适宜的孵化水温为 20–24℃，仔鱼孵化后最适宜的培育水温为 20–22℃，可以保障获得更多的优质苗种。本研究只针对仔鱼阶段开展了相关实验，温度对稚鱼和幼鱼生长发育的影响有待于做深入的观察和分析，从而为云纹石斑鱼苗种的繁育提供更加完善的理论指导和科学依据。

参 考 文 献

于欢欢, 李炎璐, 陈超, 等. 云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*)(♀)×七带石斑鱼(*Epinephelus septemfasciatus*)(♂)杂交 F_1 胚胎发育和仔鱼活力的影响. 渔业科学进展, 2014, 35(5): 109–114

王宏田, 张培军. 环境因子对海产鱼类受精卵及早期仔鱼发育的影响. 海洋科学, 1998, 3(4): 50–64

王涵生. 海水盐度对牙鲆仔稚鱼的生长、存活率及白化率的影响. 海洋与湖沼, 1997, 28(4): 399–405

刘银华, 钟幼平, 曾庆民, 等. 温度和盐度对云纹石斑鱼早期幼鱼生长和存活的影响. 集美大学学报(自然科学版), 2014, 19(4): 241–246

阮树会, 原永党, 曲永琪, 等. 温度和盐度的变化对美国红鱼受精卵孵化的影响. 海洋湖沼通报, 2000(1):30–35

李兵, 钟英斌, 吕为群. 大黄鱼早期发育阶段对盐度的适应性. 上海海洋大学学报, 2012, 21(2): 204–211

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

张海发, 刘晓春, 王云新, 等. 温度、盐度及 pH 对斜带石斑鱼受精卵孵化和仔鱼活力的影响. 热带海洋学报, 2006, 25(2): 31–36

张培军. 海水鱼类繁殖发育和养殖生物学. 济南: 山东科学技术出版社, 1999, 1–207

张鑫磊, 陈四清, 刘寿堂, 等. 温度、盐度对半滑舌鳎胚胎发育的影响. 渔业科学进展, 2006, 24(3): 342–348

陈舒泛, 周昕, 华元渝, 等. 温度对全人工繁殖暗纹东方鲀胚胎发育的影响. 水利渔业, 2003, 23(3): 5–6

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

袁勤生. 酶与酶工程. 上海: 华东理工大学出版社, 2012, 18

郭永军, 陈成殒, 李占军. 水温和盐度对鲤鱼(*Cyprinus carpio* L.)胚胎和前期仔鱼发育的影响. 天津农学院学报, 2004, 11(3): 6–9

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

梁友, 倪琦, 王印庚, 等. 云纹石斑鱼规模化人工繁育技术研究. 渔业现代化, 2011, 38(5): 31–34

强俊, 李瑞伟, 王辉. 温度对奥尼罗非鱼受精卵孵化和仔鱼活力的影响. 淡水渔业, 2008, 38(4): 25–29

楼允东. 鱼类的孵化酶. 动物学杂志, 1965, 7(3): 97–101

新间脩子ぢ. カサゴ親魚の生化學的性狀と仔魚の活力について. 養殖研報, 1981(2): 11–20

樊廷俊, 史振平. 鱼类孵化酶的研究进展及其应用前景. 海洋湖沼通报, 2002(1): 48–56

Blaxter JHS, Hempel G. The influence of egg size on herring larvae (*Clupea harengus* L.). Ices J Mar Sci, 1963, 28(2): 211–240

(编辑 冯小花)

Effects of Temperature on the Embryonic Development and Larval Activity of *Epinephelus moara*

ZHANG Tingting[1,3], CHEN Chao[1①], SHI Zhaohong[2], LI Yanlu[1],
YU Huanhuan[1,3], REN Baohui[4], XU Wantu[5]

(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. *Key Laboratory of East China Sea & Oceanic Fishery Resources Exploitation and Utilization, Ministry of Agriculture, East China Sea Fisheries Research Institute, Shanghai* 200090; 3. *College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai* 201306; 4. *Laizhou Mingbo Fisheries Limited Company, Yantai* 261400; 5. *Xiangshan Gangwan Aquatic Seedlings Limited Company of Ningbo, Zhejiang* 315700)

Abstract In this study we investigated the effect of incubation temperatures (16℃, 18℃, 20℃, 22℃, 24℃, 28℃, and 30℃) on the embryonic development and larval activity of the *Epinephelus moara*. The stage of embryonic development after 12 hours of hatching, the hatching rate and the deformity rate of newly-hatched larvae were also measured and analyzed. We performed the starvation test on the newly-hatched larvae and evaluated their daily survival rate and the survival activity index *(SAI*) at different temperatures. It showed that the embryos could be hatched at 18−28℃. The hatching time was negatively correlated to the temperature as shown in the equation $y=12139x^{-1.869}$ ($R^2=0.993$, $P<0.01$), in which y was the hatching time and x was the temperature. The highest hatching rate (71.01%) and the lowest deformity rate (9.7%) were observed at 22℃. A lower hatching rate (65.37%) and higher deformity rate (13.07%) appeared at 20℃. The hatching rate decreased gradually when the temperature was below 22℃, and reached 24.39% at 18℃. The hatching rate also decreased significantly when the temperature was above 22℃, and the lowest hatching rate (16.11%) appeared at 28℃. The effect of temperature on the deformity rate of newly-hatched larvae showed an opposite pattern. The embryonic development stopped at the stage of blastula at 16℃. At 30℃, the cell dividing ceased at the embryo body stage. The *SAI* first increased and then decreased along with the rise in the temperature. At 20℃, *SAI* of the larva was the highest (25.97) with the longest half-death time of 7 d. Therefore, the optimal hatching temperature for the fertilized eggs of *E. moara* could be 22–24℃, and the most suitable temperature for the survival of newly-hatched larvae could be 20–22℃.

Key words *Epinephelus moara*; Temperature; Embryonic development; Larval activity

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

DOI: 10.11758/yykxjz.20150611002 http://www.yykxjz.cn/

星突江鲽(*Platichthys stellatus*)、石鲽(*Kareius bicoloratus*)及其正反杂交种肌肉的营养成分分析及评价*

曹栋正[1,2] 张小忠[3] 陈四清[2①] 秦 搏[1,2] 常 青[2]
刘长琳[2] 柳 茜[1,2] 吕云云[1,2]

(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. 青岛市环境保护局市北分局 青岛 266033)

摘要 以体重为 338.32–445.98 g 的星突江鲽(*Platichthys stellatus*)、石鲽(*Kareius bicoloratus*)及其正反杂交种为研究对象，采用国家标准方法对其肌肉的营养成分进行了分析，并对其营养品质进行了评价。结果显示，正交种(星突江鲽♀×石鲽♂)的粗蛋白含量显著高于反交种(石鲽♀×星突江鲽♂)(P<0.05)，与星突江鲽、石鲽差异不显著(P>0.05)；正交种的粗脂肪含量最高，为 1.44%，显著高于其他 3 种鱼(P<0.05)；反交种粗脂肪含量最低，为 0.43%，与星突江鲽差异显著(P<0.05)，与石鲽差异不显著(P>0.05)。正交种的水分含量显著低于反交种(P<0.05)，与星突江鲽、石鲽没有显著性差异(P>0.05)，反交种的水分含量最高。4 种鱼的灰分含量差异不显著(P>0.05)；正交种的液体、水分、脂质流失率均显著低于星突江鲽和石鲽(P<0.05)，其熟肉率显著高于反交种(P<0.05)。正交种的必需氨基酸、鲜味氨基酸和氨基酸总量均明显高于其他 3 种鱼，且支/芳值接近人体正常水平。4 种鱼的必需氨基酸总量均高于 FAO/WHO 标准，尤其是正交种，还高于鸡蛋蛋白质标准。正交种的氨基酸评分、化学评分和必需氨基酸指数也均为最高，而反交种均为最低。研究表明，正交种(星突江鲽♀×石鲽♂)营养价值较高，其肌肉品质更优于星突江鲽和石鲽，在营养物质方面具有一定的杂交优势；反交种(石鲽♀×星突江鲽♂)未表现出明显的杂交优势，这为星突江鲽和石鲽杂交育种性状的选择提供了参考。

关键词 星突江鲽；石鲽；杂交种；肌肉；营养成分

中图分类号 S965 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)03-0034-08

星突江鲽(*Platichthys stellatus*)体扁平、长圆形，侧线发达、于胸鳍上部弯曲，背鳍、臀鳍和尾鳍上分布有黑、白、黄相间的垂直条纹。国内品种主要为左眼型，其营养丰富，肉质细嫩、弹性高，肉味鲜美，口感独特，是高级生鱼片的主要材料(马爱军等, 2006; 齐国山等, 2009)。石鲽(*Kareius bicoloratus*)形态特征与星突江鲽极为相似，但其侧线较直，两眼均在头的右侧，具有肉质鲜嫩、营养丰富、耐低温能力强等优点(王文君等, 2007)。二者同属于鲽形目(Pleuronectiformes)、鲽科(Pleuronectidae)，在生活习性、繁殖调控和遗传进化等方面很相似(马爱军等, 2006; 肖永双等, 2010; Cooper *et al*, 1998; Zhang *et al*, 2008)。目前，针对星

* 山东省自主创新成果转化专项(2013ZHZX2A0803)和鳌山科技创新计划(2015ASKJ02-03)共同资助。曹栋正，E-mail: dongzhengcao@163.com

① 通讯作者：陈四清，研究员，E-mail: chensq@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-06-11，收修改稿日期: 2015-09-15

突江鳖与石鳖杂交育种的研究已有相关报道(Takeda *et al*, 2007)，但尚未见关于星突江鳖与石鳖杂交种肌肉营养成分的研究报道。本研究中，对星突江鳖、石鳖及其正反杂交种肌肉营养成分进行了比较分析和评价，探讨了星突江鳖与石鳖正反杂交种肌肉的营养价值，以期为星突江鳖和石鳖杂交育种性状的选择提供科学依据。

1　材料与方法

1.1　实验材料

星突江鳖、石鳖及其正反杂交种由山东科合海洋高技术有限公司于 2014 年 9 月提供。其中，正交种为星突江鳖♀×石鳖♂子一代，反交种为石鳖♀×星突江鳖♂子一代。4 种鱼为同一批次人工繁殖的 1.5 龄鱼，体重为 338.32–445.98 g，全长为 28.2–31.4 cm。各组鱼在同一条件下进行工厂化养殖，水温为 10–19℃，盐度为 28.50–30.50，pH 为 7.9–8.0。

1.2　实验方法

1.2.1　样品采集　　星突江鳖、石鳖及其正反杂交种各取 10 尾，带回实验室，立即取样，每尾鱼的各部位肌肉分开存放，以保证同一指标测定的为每尾鱼的同一部位肌肉。

1.2.2　肌肉营养成分的测定　　参照国家标准，水分含量的测定为常压 105℃烘箱干燥法(GB/T5009.3–1985)；粗蛋白含量的测定为凯氏定氮法(GB/T5009.5–1985)；粗脂肪含量的测定为索氏抽提法(GB/T5009.6–1985)；灰分含量的测定为马弗炉 550℃灼烧法(GB/T 5009.4–1985)；氨基酸的测定采用盐酸水解法(GB/T5009.124–1985)，使用氨基酸自动分析仪测定。

能值计算：参照 Brett 等(1979)的计算方法，蛋白质、脂肪、总糖的比能值分别为 23.64 、39.54 、17.15 kJ/g。能值(*Q*)的计算公式如下：

$$Q\ (\mathrm{kJ/g}) = \omega_1\times 23.64+\omega_2\times 39.54+\omega_3\times 17.15$$

式中，ω_1、ω_2、ω_3 分别为粗蛋白、粗脂肪、总糖百分含量。

1.2.3　肌肉系水力的测定　　熟肉率(Cooked meat yield, *CMY*, %)：参照黄钧等(2010)和王丽宏等(2014)的测定方法，每尾鱼取 5 g 左右肌肉，称初重 m_0，沸水中煮 15 min，冷却，吸去表面水分，称重 m_1。熟肉率计算公式如下：

$$CMY\ (\%)=(m_1/m_0)\times 100$$

流失率：参照 Rørå 等(2003)的测定方法，每尾鱼取 10 g 左右肌肉，称初重 m_2，然后用一恒重 m_3 的滤纸包裹肉样放入离心管，3000 r/min 离心 10 min，取出滤纸，去鱼肉，称滤纸湿重 m_4，然后将滤纸 50℃下烘至恒重，称重 m_5。液体流失率(Juice loss yield, *JLY*, %)、水分流失率(Water loss yield, *WLY*, %)和脂质流失率(Fat loss yield, *FLY*, %)的计算公式分别如下：

$$JLY\ (\%)=[(m_4-m_3)/m_2]\times 100$$

$$WLY\ (\%)=[(m_4-m_5)/m_2]\times 100$$

$$FLY\ (\%)=[(m_5-m_3)/m_2]\times 100$$

1.2.4　肌肉氨基酸的评价方法　　氨基酸的支/芳值(*BCAA*/*AAA*)按(缬氨酸+异亮氨酸+亮氨酸)/(苯丙氨酸+酪氨酸)来计算(唐雪等, 2011)。

根据 FAO/WHO(1973)的氨基酸评分标准和全鸡蛋蛋白质的氨基酸评分标准两种模式，氨基酸评分(*AAS*)、化学评分(*CS*)和必需氨基酸指数(*EAAI*)分别按以下公式计算(尹洪滨等, 2006; 冀德伟等, 2009)：

$$AAS=\frac{aa}{AA(\mathrm{FAO/WHO})}\times 100$$

$$CS=\frac{aa}{AA(\mathrm{Egg})}\times 100$$

$$EAAI=\sqrt[n]{\frac{100A}{AE}\times\frac{100B}{BE}\times\frac{100C}{CE}\times\cdots\times\frac{100H}{HE}}$$

式中，*aa* 为样品氨基酸含量(mg/g N)，*AA* (FAO/WHO)、*AA* (Egg)分别为 FAO/WHO 标准、鸡蛋蛋白质中同种氨基酸的含量(mg/g N)，mg/g N 为每克 N 中氨基酸的毫克数[样品粗蛋白中的氨基酸含量(g/100 g, dry)×62.5]。*n* 为比较的必需氨基酸个数，*A*, *B*, *C*, …, *H* 为样品必需氨基酸的含量(mg/g N)，*AE*, *BE*, *CE*, …, *HE* 为鸡蛋蛋白质中必需氨基酸的含量(mg/g N)。

1.2.5　数据处理　　试验数据用平均值±标准差(Mean±SD)表示。采用 EXCEL 2010 和 SPSS 13.0 软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA)和 Duncan 多重比较统计分析，显著性水平 $P<0.05$。

2　结果

2.1　一般营养成分

由表 1 可知，水分含量：反交种明显高于其他 3 种鱼，其中反交种显著高于正交种($P<0.05$)，正交种与星突江鳖、石鳖差异不显著($P>0.05$)；粗蛋白含量：正交种、星突江鳖、石鳖之间无显著性差异($P>0.05$)，但均显著高于反交种($P<0.05$)；粗脂肪含量：正交种显著高于其他 3 种鱼($P<0.05$)，反交种与石鳖之间无显著性差异($P>0.05$)，但均显著低于星突江鳖($P<0.05$)；灰分含量：4 种鱼之间差异不显著($P>0.05$)；总糖含量：正交种、反交种之间无显著性差异($P>0.05$)，但

表 1 星突江鳖、石鳖及其正反杂交种肌肉营养成分的比较

Tab.1 Comparison of nutritional composition in the muscles of *P. stellatus*, *K. bicoloratus* and their reciprocal hybrids

(Wet weight, %)

种类 Species	水分 Moisture	粗蛋白 Crude protein	粗脂肪 Crude lipid	灰分 Ash	总糖 Total carbohydrate	能值 Energy value (kJ/g)
星突江鳖♀×石鳖♂ *P. stellatus*♀×*K. bicoloratus*♂	76.12±0.93^{a}	20.28±0.09^{b}	1.44±0.28^{c}	1.54±0.06	0.62±0.09^{c}	5.47±0.23^{d}
石鳖♀×星突江鳖♂ *K. bicoloratus*♀×*P. stellatus*♂	78.56±1.37^{b}	18.97±0.65^{a}	0.43±0.04^{a}	1.41±0.10	0.63±0.05^{c}	4.76±0.19^{a}
星突江鳖 *P. stellatus*	76.93±0.67^{ab}	20.22±0.71^{b}	1.13±0.06^{b}	1.52±0.08	0.20±0.03^{a}	5.26±0.18^{c}
石鳖 *K. bicoloratus*	77.38±0.35^{ab}	20.16±0.43^{b}	0.50±0.06^{a}	1.55±0.04	0.41±0.05^{b}	5.03±0.14^{b}

注：总糖=100–(粗蛋白+粗脂肪+灰分+水分)(钱耀森等, 2010); 同列中标有不同小写字母者表示组间有显著性差异(P<0.05)，标有相同小写字母者表示组间无显著性差异(P>0.05)。下同

Note: Total carbohydrate (%) =100–[crude protein (%) + crude lipid (%) + ash (%) + moisture (%)]. In the same column: numbers with different letters were significantly different (P<0.05), and numbers with the same letter were not significantly different (P>0.05). The same below

均显著高于星突江鳖、石鳖(P<0.05)，石鳖显著高于星突江鳖(P<0.05)；能值：正交种>星突江鳖>石鳖>反交种，且 4 种鱼之间均有显著性差异(P<0.05)。

2.2 肌肉系水力

由表 2 可知，熟肉率：正交种、星突江鳖、石鳖之间无显著性差异(P>0.05)，但均显著高于反交种(P<0.05); 液体流失率、水分流失率、脂质流失率：正交种、反交种之间无显著性差异(P>0.05)，但均显著低于星突江鳖、石鳖(P<0.05)，星突江鳖、石鳖之间差异不显著(P>0.05)。

2.3 氨基酸组成与含量

本研究中，除色氨酸在酸水解条件下被破坏未检测出、含硫氨基酸的胱氨酸未检测外，从星突江鳖、石鳖及其正反杂交种中均检测到 16 种氨基酸，其中必需氨基酸(EAA) 7 种，半必需氨基酸(SEAA) 2 种，非必需氨基酸(NEAA) 7 种。由表 3 可知，天门冬氨酸、谷氨酸、苏氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、组氨酸含量的高低顺序均为正交种>星突江鳖>反交种>石鳖。其中，苏氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、组氨酸含量反交种、星突江鳖之间差异不显著(P>0.05)，均与正交种、石鳖之间也无显著性差异(P>0.05)，但正交种显著高于石鳖(P<0.05)，其余氨基酸含量 4 种鱼之间均无显著性差异(P>0.05)；甘氨酸、精氨酸、丝氨酸含量的高低趋势均为正交种>反交种>星突江鳖>石鳖，丝氨酸含量反交种、星突江鳖之间无显著性差异(P>0.05)，均与正交种、石鳖之间也无显著性差异(P>0.05)，但正交种显著高于石鳖(P<0.05)；丙氨酸含量正交种与石鳖之间差异不显著(P>0.05)，但均显著低于反交种、星突江鳖(P<0.05)，反交种与星突江鳖之间也无显著性差异(P>0.05)，酪氨酸、脯氨酸含量 4 种鱼之间均无显著性差异(P>0.05)。

4 种鱼肌肉的氨基酸种类齐全，含量丰富。氨基酸总量(TAA)、EAA 总量的高低顺序均为正交种>星突江鳖>反交种>石鳖，且 4 种鱼的 TAA 没有显著性差异(P>0.05)，正交种的 EAA 总量显著高于石鳖(P<0.05)，与反交种、星突江鳖差异不显著(P>0.05)；

表 2 星突江鳖、石鳖及其正反杂交种肌肉系水力指标的比较

Tab.2 Comparison of the water holding capacity in the muscles of *P. stellatus*, *K. bicoloratus* and their reciprocal hybrids (%)

种类 Species	熟肉率 *CMY*	液体流失率 *JLY*	水分流失率 *WLY*	脂质流失率 *FLY*
星突江鳖♀×石鳖♂ *P. stellatus*♀×*K. bicoloratus*♂	77.85±0.42^{b}	25.96±0.56^{a}	22.59±0.10^{a}	3.38±0.58^{a}
石鳖♀×星突江鳖♂ *K. bicoloratus*♀×*P. stellatus*♂	73.50±1.09^{a}	27.32±1.75^{a}	23.51±1.51^{a}	3.80±0.29^{a}
星突江鳖 *P. stellatus*	79.45±1.93^{b}	32.54±1.29^{b}	28.11±0.83^{b}	4.43±0.48^{b}
石鳖 *K. bicoloratus*	77.98±2.26^{b}	31.09±1.71^{b}	26.80±1.61^{b}	4.29±0.15^{b}

表 3　星突江鳖、石鳖及其正反杂交种肌肉氨基酸含量的比较

Tab.3　Comparison of amino acid contents in the muscles of *P. stellatus*, *K. bicoloratus* and their reciprocal hybrids (Dry weight, %)

氨基酸 Amino acids	星突江鳖♀×石鳖♂ *P. stellatus*♀×*K. bicoloratus*♂	石鳖♀×星突江鳖♂ *K. bicoloratus*♀×*P. stellatus*♂	星突江鳖 *P. stellatus*	石鳖 *K. bicoloratus*
天门冬氨酸 Asp*	9.56±0.10	8.49±0.17	8.57±0.25	8.25±0.26
谷氨酸 Glu*	16.02±0.34	14.43±0.53	14.46±0.65	13.77±0.60
甘氨酸 Gly*	4.74±0.36	4.66±0.44	4.43±0.10	4.22±0.37
丙氨酸 Ala*	5.84±0.05^{a}	6.43±0.22^{b}	6.38±0.03^{b}	5.74±0.23^{a}
苏氨酸 Thr**	4.42±0.07^{b}	3.81±0.12^{ab}	3.85±0.13^{ab}	3.65±0.17^{a}
缬氨酸 Val**#	5.19±0.10	4.79±0.05	4.84±0.13	4.58±0.27
蛋氨酸 Met**	2.90±0.06	2.55±0.27	2.66±0.04	2.51±0.36
异亮氨酸 Ile**#	4.68±0.15	4.24±0.08	4.26±0.06	4.07±0.50
亮氨酸 Leu**#	8.08±0.18^{b}	7.45±0.21^{ab}	7.52±0.18^{ab}	7.04±0.53^{a}
苯丙氨酸 Phe**&	4.37±0.17^{b}	3.90±0.13^{ab}	4.13±0.08^{ab}	3.75±0.37^{a}
赖氨酸 Lys**	9.10±0.25	8.11±0.16	8.33±0.39	7.96±0.42
组氨酸 His***	2.51±0.07^{b}	2.27±0.07^{ab}	2.29±0.01^{ab}	2.14±0.23^{a}
精氨酸 Arg***	6.35±0.10	6.02±0.25	5.92±0.09	5.63±0.22
丝氨酸 Ser	4.28±0.03^{b}	3.78±0.16^{ab}	3.73±0.05^{ab}	3.62±0.49^{a}
酪氨酸 Tyr &	3.64±0.16	3.49±0.04	3.65±0.08	3.26±0.30
脯氨酸 Pro	2.17±0.35	2.60±0.26	2.34±0.30	2.44±0.35
鲜味氨基酸 DAA	36.16±0.71	34.02±1.32	33.84±0.82	31.98±1.08
必需氨基酸 EAA	38.75±0.81^{b}	34.85±0.35^{ab}	35.56±0.78^{ab}	33.56±1.20^{a}
非必需氨基酸 NEAA	46.24±0.93	43.88±1.85	43.56±0.66	41.31±0.99
氨基酸总量 TAA	93.85±1.41	87.02±1.19	87.32±1.54	82.63±1.02
支链氨基酸 BCAA	17.96±0.40	16.48±0.33	16.62±0.38	15.69±1.90
芳香族氨基酸 AAA	8.01±0.29^{b}	7.39±0.12^{ab}	7.77±0.01^{ab}	7.01±0.66^{a}
支/芳值 *BCAA/AAA*	2.24	2.23	2.14	2.24
EAA/TAA	41.29	40.05	40.72	40.61
EAA/NEAA	83.80	79.42	81.63	81.24

*表示鲜味氨基酸，**表示必需氨基酸，***表示半必需氨基酸，#表示支链氨基酸，&表示芳香族氨基酸; 同行中标有不同小写字母者表示组间有显著性差异(P<0.05)

*denoted delicious amino acid; ** denoted essential amino acid; *** denoted semi-essential amino acid; # denoted branched-chain amino acid; & denoted aromatic amino acid. In the same line, numbers with different letters were significantly different (P<0.05)

鲜味氨基酸(DAA)总量的高低趋势为正交种>反交种>星突江鳖>石鳖，且 4 种鱼之间没有显著性差异(P>0.05)。*EAA/TAA* 及 *EAA/NEAA* 的高低趋势均为正交种>星突江鳖>石鳖>反交种。

2.4　必需氨基酸组成与含量

食品蛋白质的营养价值很大程度上取决于 EAA 的含量及比例。由表 4 可知，4 种鱼的 EAA 总量的高低趋势为正交种>星突江鳖>石鳖>反交种，均高于 FAO/WHO 标准，接近鸡蛋蛋白质标准。其中，只有正交种高于鸡蛋蛋白质标准，正交种的苏氨酸、亮氨酸、赖氨酸含量均高于两标准，缬氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸+酪氨酸含量均介于两标准之间。

4 种鱼的氨基酸评分(*AAS*)、化学评分(*CS*)、必需氨基酸指数(*EAAI*)比较结果显示(表 5)，正交种 7 种 EAA 的 *AAS*、*CS* 均明显高于其他 3 种鱼，而反交种的几乎均为最低; 4 种鱼的 *EAAI* 高低顺序为正交种>星突江鳖>石鳖>反交种，且正交种明显高于其他 3 种鱼，反交种为最低。

3　讨论

3.1　营养成分及系水力的比较

鱼体肌肉中的粗蛋白和粗脂肪等营养物质含量的高低是衡量鱼类营养价值的重要指标(庄平等, 2010)。随着人们生活水平的提高，保健意识增强，人们更加

表 4 星突江鳖、石鳖及其正反杂交种肌肉的必需氨基酸含量与 FAO/WHO 标准和鸡蛋蛋白质的比较

Tab.4 Comparison of the essential amino acid contents in the muscles of *P. stellatus*, *K. bicoloratus* and their reciprocal hybrids with the FAO/WHO standard and the egg protein (mg/g N)

必需氨基酸 EAA	星突江鳖♀×石鳖♂ *P. stellatus*♀×*K. bicoloratus*♂	石鳖♀×星突江鳖♂ *K. bicoloratus*♀×*P. stellatus*♂	星突江鳖 *P. stellatus*	石鳖 *K. bicoloratus*	FAO/WHO 标准 FAO/WHO standard	鸡蛋蛋白质 Egg protein
Thr	310	269	274	269	250	292
Val	364	338	345	337	310	411
Met + Cys	203	180	189	185	220	386
Ile	328	300	303	300	250	331
Leu	567	526	536	518	440	534
Phe + Tyr	562	522	554	516	380	565
Lys	638	573	594	586	340	441
总含量 Total contents	2972	2708	2795	2711	2190	2960

表 5 星突江鳖、石鳖及其正反杂交种的必需氨基酸 *AAS*、*CS*、*EAAI* 的比较

Tab.5 Comparison of *AAS*, *CS* and *EAAI* of the essential amino acids in *P. stellatus*, *K. bicoloratus* and their reciprocal hybrids

必需氨基酸 EAA	星突江鳖♀×石鳖♂ *P. stellatus*♀×*K. bicoloratus*♂		石鳖♀×星突江鳖♂ *K. bicoloratus*♀×*P. stellatus*♂		星突江鳖 *P. stellatus*		石鳖 *K. bicoloratus*	
	AAS	*CS*	*AAS*	*CS*	*AAS*	*CS*	*AAS*	*CS*
Thr	124.00	106.16	107.60	92.12	109.60	93.84	107.60	92.12
Val	117.42	88.56	109.03	82.24	111.29	83.94	108.71	82.00
Met + Cys	92.27	52.59	81.82	46.63	85.91	48.96	84.09	47.93
Ile	131.20	99.09	120.00	90.63	121.20	91.54	120.00	90.63
Leu	128.86	106.18	119.55	98.50	121.82	100.37	117.73	97.00
Phe + Tyr	147.89	99.47	137.37	92.39	145.79	98.05	135.79	91.33
Lys	187.65	144.67	168.53	129.93	174.71	134.69	172.35	132.88
EAAI	95.95		87.04		89.72		87.29	

倾向于高蛋白质的食物，例如牛奶、鸡蛋等。本研究中，以蛋白质含量高低作为杂交选育指标，正交种具有较好的优势，粗蛋白含量(20.28%)高于星突江鳖和石鳖，而反交种未表现出相应的优势，同时正交种的粗蛋白含量高于同规格的大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)(马爱军等, 2003)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)(梁萌青等, 2010)、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)(马爱军等, 2006)、圆斑星鳖(*Verasper variegatus*)(王远红等, 2006)、梭鱼(王建新等, 2010)等常见海水鱼类。正交种的粗脂肪含量(1.44%)高于其他 3 种鱼，就食用口感而言，肌肉中比较合适的脂质含量为 1.5% (Fortin *et al*, 2005)，正交种粗脂肪含量与之基本一致。反交种的水分含量(78.56%)是 4 种鱼中最高的，这是影响其营养品质的重要原因之一。因此，正交种粗蛋白含量较高、粗脂肪含量适中，是一种营养价值较好的鱼类。

系水力是指肌肉受到外力作用时保持其所含水分的能力，肌肉静电荷减少、肌肉收缩、肌肉细胞蛋白降解以及遗传因素等都会影响肌肉的系水力(马玲巧等, 2014)。熟肉率是衡量肌肉在加热过程中蛋白质变性凝固失去水分的重要指标，其水平的高低与肌肉系水力有直接关系，熟肉率越高，其系水力越高(张宏博等, 2013)。液体流失率也是评价肌肉系水力的另一重要指标，包括水分流失率和脂质流失率，常用于衡量肌肉受外力作用时保持液体的能力，流失率愈低，液体保持能力愈高，而肌肉中汁液量保持的多少，特别是脂质保持能力的高低，与肉的口味有直接关系(王丽宏等, 2014)。本研究中，正交种和反交种的脂质流失率、水分流失率、液体流失率等均显著低于星突江鳖和石鳖，而正交种的熟肉率显著高于反交种，这说明正交种具有较好的肉质口味。

3.2 氨基酸组成的比较

肌肉营养品质的评定受蛋白质营养价值的影响，而蛋白质的营养价值主要取决于其氨基酸，特别是 EAA 的组成及含量，含有 EAA 种类多、含量高的肌

肉营养价值相对较高(许星鸿等, 2011; 高露姣等, 2011)，因此，EAA、TAA 等是评价肌肉营养品质的几个重要指标。本研究中，正交种的 EAA 总量、TAA 均明显高于其他 3 种鱼，4 种鱼的 *EAA/TAA* 为 40.05%–41.29%，*EAA/NEAA* 为 79.42%–83.80%，正交种均为最高，反交种均为最低。根据 FAO/WHO 理想蛋白质模式，质量较好的蛋白质，其 *EAA/TAA* 为 40%左右，*EAA/NEAA* 在 60%以上(庄平等, 2010)。因此，从 EAA 方面可看出，4 种鱼的肌肉蛋白质是质量较好的蛋白质，以正交种为最佳，EAA 比例比较适宜人体的吸收，相对更有利于人体健康。

4 种鱼的 EAA 中含量最高的赖氨酸是人乳中第一限制性氨基酸(施永海等, 2013)。正交种的赖氨酸含量(9.10%)是 4 种鱼中最高的，同时高于牙鲆(梁萌青等, 2010)、半滑舌鳎(梁萌青等, 2010)、圆斑星鲽(王远红等, 2006)、梭鱼(王建新等, 2010)等，低于大菱鲆(梁萌青等, 2010)。因此，正交种肌肉还是一种较好的催乳食品。另外，鱼肉中的赖氨酸还可以弥补谷物中其含量的不足，提高以谷物为主食的人们对蛋白质的利用率(高露姣等, 2011)。

正交种是 4 种鱼中唯一一种 EAA 总量既高于 FAO/WHO 标准又高于鸡蛋蛋白质标准的鱼类，而且其 7 种 EAA 含量均高于其他 3 种鱼，*AAS*、*CS*、*EAAI* 的比较结果与之一致。*EAAI* 是评价食品营养价值的常用指标之一(许星鸿等, 2011)，Oser(1951)提出当 *EAAI* >90，表示蛋白质的营养价值高，*EAAI* 为 70–90 时，表示蛋白质的营养价值良，正交种的 *EAAI*(95.95)明显高于星突江鳖(89.72)和石鳖(87.29)，为 4 种鱼中最高的，反交种(87.04)最低，所以正交种肌肉中蛋白质的营养价值较高。从以上指标可以看出，正交种在蛋白质营养价值方面具有明显的优势，结合其粗蛋白含量的优势，可以认为正交种在蛋白质含量及营养价值方面具有一定的杂交优势。

精氨酸是人体的半必需氨基酸，不仅可以促进伤口愈合，而且还是人类幼年生长所必需的氨基酸(施永海等, 2013)。正交种的精氨酸含量(6.35%)是 4 种鱼中最高的，与大菱鲆(梁萌青等, 2010)、牙鲆(梁萌青等, 2010)、半滑舌鳎(梁萌青等, 2010)、圆斑星鲽(王远红等, 2006)、梭鱼(王建新等, 2010)等常见海水鱼类基本接近。

鱼肉蛋白质的鲜美程度受其 DAA 组成及含量的影响，主要取决于呈鲜味的天门冬氨酸和谷氨酸以及呈甘味的丙氨酸和甘氨酸的组成与含量(董辉等, 2011; 施永海等, 2013)。本研究中，正交种的 DAA 总量明显高于其他 3 种鱼，肉味更鲜美; 4 种鱼肌肉中 DAA 含量的高低顺序均为谷氨酸>天门冬氨酸>丙氨酸>甘氨酸，与常见海水鱼类如大菱鲆(梁萌青等, 2010)、牙鲆(梁萌青等, 2010)、半滑舌鳎(梁萌青等, 2010)、圆斑星鲽(王远红等, 2006)、梭鱼(王建新等, 2010)等基本一致。在 DAA 中，谷氨酸不仅鲜味最强，还参与合成多种生理活性物质，是脑组织生化代谢过程中的重要氨基酸(庄平等, 2010)，正交种的谷氨酸含量(16.02%)是 4 种鱼中最高的，明显高于大菱鲆(梁萌青等, 2010)、牙鲆(梁萌青等, 2010)、半滑舌鳎(梁萌青等, 2010)、圆斑星鲽(王远红等, 2006)、梭鱼(王建新等, 2010)等常见海水鱼类。

正常人体及哺乳动物的支/芳值(*BCAA/AAA*)为 3.0–3.5，高支、低芳氨基酸的食物具有降低胆固醇、保护肝脏等作用，当肝受损伤时，则降为 1.0–1.5(刘世禄等, 2009)。本研究中，4 种鱼的 *BCAA/AAA* 均明显高于人体肝脏受损伤时的水平，接近人体正常水平，对患肝病的病人有良好的保健功能。

综上所述，正交种(星突江鳖♀×石鳖♂)肌肉粗蛋白含量较高、粗脂肪含量适中、氨基酸组成较为均衡、必需氨基酸组成符合人体需要，在营养物质方面表现出明显的优势，而反交种(石鳖♀×星突江鳖♂)未表现出这些优势。因此，正交种是一种营养价值较高、肉味鲜美、口感较好且有一定保健功能的健康食品，显示出了一定的杂交优势，可在今后星突江鳖和石鳖杂交育种中有目的地开发利用。

参　考　文　献

马玲巧, 亓成龙, 曹静静, 等. 水库网箱和池塘养殖斑点叉尾鮰肌肉营养成分和品质的比较分析. 水产学报, 2014, 38(4): 532–536

马爱军, 庄志猛, 李晨, 等. 星突江鳖生物学特性及养殖前景. 渔业科学进展, 2006, 27(5): 91–95

马爱军, 刘新富, 翟毓秀, 等. 野生及人工养殖半滑舌鳎肌肉营养成分分析研究. 渔业科学进展, 2006, 27(2): 49–54

马爱军, 陈四清, 雷霁霖, 等. 大菱鲆鱼体生化组成及营养价值的初步探讨. 渔业科学进展, 2003, 24(1): 11–14

王文君, 王开顺, 邵明瑜, 等. 石鳖仔、幼鱼性腺发育的组织学观察. 中国水产科学, 2007, 14(5): 843–848

王远红, 陈四清, 吕志华, 等. 圆斑星鲽鱼的营养成分分析. 营养学报, 2006, 28(3): 271–272

王丽宏, 吉红, 胡家, 等. 匙吻鲟、杂交鲟和鳙肌肉品质的比较研究. 食品科学, 2014, 35(1): 62–68

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

尹洪滨, 姚道霞, 孙中武, 等. 黑龙江鲶形目鱼类的肌肉营养组成分析. 营养学报, 2006, 28(5): 438–441

庄平, 宋超, 章龙珍. 舌虾虎鱼肌肉营养成分与品质的评价. 水产学报, 2010, 34(4): 559–564

刘世禄, 王波, 刘振华, 等. 星斑川鲽的营养分析与评价. 渔业科学进展, 2009, 30(6): 18–24
齐国山, 陈四清, 李琪, 等. 星突江鲽肌肉的营养成分. 营养学报, 2009, 31(3): 293–294,297
许星鸿, 刘翔, 阎斌伦, 等. 日本对虾肌肉营养成分分析与品质评价. 食品科学, 2011, 32(13): 297–301
肖永双, 张岩, 高天翔. 基于线粒体 DNA 部分片段探讨石鲽与星突江鲽的亲缘关系. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2010, 40(6): 69–76
张宏博, 王贵印, 袁倩, 等. 巴美肉羊的食用品质. 食品科学, 2013, 34(19): 19–22
施永海, 张根玉, 刘永士, 等. 野生及养殖哈氏仿对虾肌肉营养成分的分析与比较. 水产学报, 2013, 37(5): 768–776
钱耀森, 郑小东, 王培亮, 等. 天鹅湖长蛸营养成分的分析及评价. 海洋科学, 2010, 34(12): 14–18
高露姣, 黄艳青, 夏连军, 等. 不同养殖模式下红鳍东方鲀的品质比较. 水产学报, 2011, 35(11): 1668–1676
唐雪, 徐钢春, 徐跑, 等. 野生与养殖刀鲚肌肉营养成分的比较分析. 动物营养学报, 2011, 23(3): 514–520
黄钧, 杨淞, 覃志彪, 等. 云斑鲗、泥鳅和瓦氏黄颡鱼的含肉率及营养价值比较研究. 水生生物学报, 2010, 34(5): 990–997
梁萌青, 雷霁霖, 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
董辉, 王颉, 刘亚琼, 等. 杂色蛤软体部营养成分分析及评价. 水产学报, 2011, 35(2): 276–282
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): 298–303
Brett JR, Groves TDD. Physiological energetics, fish physiology. New York: Academic Press, 1979, 8: 279–352
Cooper JA, Chapleau F. Monophyly and intrarelationships of the family Pleuronectidae (Pleuronectiformes), with a revised classification. Fish Bull, 1998, 96(4): 686–726
FAO/WHO Ad Hoc Expert Committee. Energy and protein requirements. FAO Nutrition Meeting Report Series, 1973, 52: 40–73
Fortin A, Robertson WM, Tong AKW. The eating quality of Canadian pork and its relationship with intramuscular fat. Meat Sci, 2005, 69(2): 297–305
Oser BL. Method for integrating essential amino acid content in the nutritional evaluation of protein. J Am Diet Assoc, 1951, 27(5): 396–402
Rørå AMB, Regost C, Lampe J. Liquid holding capacity, texture and fatty acid profile of smoked fillets of Atlantic salmon fed diets containing fish oil or soybean oil. Food Res Int, 2003, 36(3): 231–239
Takeda Y, Tanaka M. Freshwater adaptation during larval, juvenile and immature periods of starry flounder *Platichthys stellatus*, stone flounder *Kareius bicoloratus* and their reciprocal hybrids. J Fish Biol, 2007, 70(5): 1470–1483
Zhang Y, Xiao YS, Gao TX. Molecular phylogeny of familiar flatfish species (Pleuronectidae) in the northwestern Pacific Ocean based on mitochondrial cytochrome oxidase I gene. Acta Oceanol Sin, 2008, 27(2): 93–101

(编辑 江润林)

Analysis and Evaluation of Nutritive Composition in Muscles of *Platichthys stellatus*, *Kareius bicoloratus* and Their Reciprocal Hybrids

CAO Dongzheng[1,2], ZHANG Xiaozhong[3], CHEN Siqing[2①], QIN Bo[1,2], CHANG Qing[2], LIU Changlin[2], LIU Xi[1,2], LÜ Yunyun[1,2]

(1. *College of Fishers and Life Sciences, 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. *Qingdao Environmental Protection Bureau, North Branch, Qingdao* 266033)

Abstract　Reciprocal hybrids of *Platichthys stellatus* and *Kareius bicoloratus* have been reported, however, little is known about the nutritional facts of their muscles. In this study we analyzed the nutritional components in muscles of *P. stellatus*, *K. bicoloratus* and the reciprocal hybrids (initial body weight 338.32–445.98 g) using the current national standard methods. We found that the obverse hybrid (*P. stellatus*♀×*K. bicoloratus*♂) had significantly higher crude protein content than the inverse (*K. bicoloratus*♀×*P. stellatus*♂, $P<0.05$), but not significantly different from that of *P. stellatus* and *K. bicoloratus* ($P>0.05$). The crude lipid content of the obverse hybrid (1.44%) was significantly higher than that of the other three species ($P<0.05$). The inverse hybrid had the lowest level of crude lipid (0.43%) and significantly higher moisture level than the other three species. There was no significant difference in the muscle ash content among the four species ($P>0.05$). The obverse hybrid had significantly lower juice loss yield, water loss yield and fat loss yield than *P. stellatus* and *K. bicoloratus* ($P<0.05$), and its cooked meat yield was obviously higher than that of the inverse hybrid ($P<0.05$). The obverse hybrid possessed the highest contents of essential amino acid, delicious amino acid and total amino acid, and its ratio of branched-chain amino acid amount to aromatic amino acid amount was close to the normal value in humans. The contents of essential amino acids in the four species were higher than the Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (FAO/WHO) standard, moreover, it was the highest in the obverse hybrid of which the level was even higher than egg protein standard. The obverse hybrid had remarkably higher amino acids score (*AAS*), chemical score (*CS*) and essential amino acid index (*EAAI*) than the other three species, whereas the inverse hybrid had the lowest scores. These findings indicated that the obverse hybrid showed apparent hybrid advantages and exhibited higher nutritional values and muscle qualities than *P. stellatus* and *K. bicoloratus*. However these advantages were not present in the inverse hybrid. Our study provided valuable information for the selection of traits in the breeding between *P. stellatus* and *K. bicoloratus*.

Key words　*Platichthys stellatus*; *Kareius bicoloratus*; Hybrid; Muscle; Nutritional composition

① Corresponding author: CHEN Siqing, E-mail: chensq@ysfri.ac.cn

DOI: 10.11758/yykxjz. 20150508001 http://www.yykxjz.cn/

不同糖源对卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)日增重、饲料利用和消化酶活性的影响*

董兰芳[1] 张 琴[①1] 许明珠[1] 童 潼[1]
王 珺[2] 熊向英[1] 彭银辉[1]

(1. 广西壮族自治区海洋研究所 广西海洋生物技术重点实验室 北海 536000;
2. 农业部水产品加工重点实验室 中国水产科学研究院南海水产研究所 广州 510300)

摘要 以葡萄糖、蔗糖、糊精、玉米淀粉和糊化玉米淀粉为糖源制成 5 种等氮等脂饲料，投喂卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*) 8 周，研究不同糖源对其日增重、饲料利用和肝脏消化酶活性的影响。结果显示，不同糖源对卵形鲳鲹日增重、饲料效率和蛋白效率均有显著影响($P<0.05$)。糊化玉米淀粉组的日增重、饲料效率和蛋白效率均最高，显著高于非淀粉糖源组($P<0.05$)，而与玉米淀粉组无显著差异($P>0.05$)；葡萄糖组的日增重、饲料效率和蛋白效率均最低，显著低于其他糖源组($P<0.05$)。消化酶活性结果显示，饲料中的不同糖源对卵形鲳鲹的肝脏消化酶活性有显著影响($P<0.05$)。两个淀粉组的蛋白酶活性显著低于分子量较低其他三组($P<0.05$)；蔗糖组的淀粉酶活性最高，显著高于除糊精组外的其他糖源组($P<0.05$)；脂肪酶活性随着糖分子量的增大而增大。本研究中淀粉类大分子糖类对卵形鲳鲹的促生长效果优于葡萄糖、蔗糖和糊精，糊化玉米淀粉组的促生长效果最好。

关键词 卵形鲳鲹；糖源；日增重；饲料利用；消化酶活性
中图分类号 S963.16 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)03-0042-07

与大多数哺乳动物不同，鱼类对蛋白质的要求很高，尤其是肉食性鱼类，其蛋白质需要量一般为40%–55%(钱雪桥等, 2002)。而饲料蛋白质数量有限，价格也在市场压力下变得愈来愈昂贵。据“蛋白质节约效应”，在饲料中添加一定量的脂肪或糖类，部分代替用于能源的蛋白质，从而提高水生动物对蛋白质的利用率，可以起到节约蛋白质的作用(李孟均等, 2008)。糖类因来源广泛，价格低廉，受到广泛关注。充分利用糖类作为能量来源，使蛋白质最大限度地合成体蛋白，对于节约饲料成本，减轻氨氮排放有重要意义。研究表明，鱼类对糖的消化和代谢能力较差，缺乏对血糖水平的调控能力(罗毅平等, 2010)，且其对糖的利用受到鱼种、投饲频率、饲料组成、环境因子等因素的影响(蔡春芳等, 2006a)。

卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)，俗称金鲳、黄腊鲳，是一种暖水性肉食性鱼类，在中国主要分布于南海、东海和黄海(区又君等, 2005)，是近年来南方沿海经济鱼类规模化养殖最成功的种类之一。国内外学者对卵形鲳鲹的繁殖发育(Xie *et al*, 2014; 区又君等, 2012)、养殖技术(Zheng *et al*, 2016; 张邦杰等, 2001; 许晓娟等; 2008)、免疫与病害(蔡小辉等, 2012; Zhou *et al*, 2014; Lin *et al*, 2012)等方面研究较多，对其营养生理的研究也有报道(Lin *et al*, 2012; Niu *et al*, 2013)，而在糖营养生理方面仅有零星报道(Wu *et al*, 2015)。

* 广西自然科学基金(2012GXNSFDA053013)、广西科学院基本科研业务费资助项目(15YJ22HY14)、广西海洋生物技术重点实验室开发课题(GLMBT-201104)和广东省省级科技计划项目(2013B020503053)共同资助。董兰芳，E-mail: 0xiao0dong0@163.com
① 通讯作者：张 琴，副研究员，E-mail: zhangqin821220@163.com
收稿日期: 2015-05-08, 收修改稿日期: 2015-06-08

本研究基于糖的蛋白质节约效应及其生理功能，研究了葡萄糖、蔗糖、糊精、玉米淀粉和糊化玉米淀粉对卵形鲳鲹日增重、饲料利用和消化酶活性的影响，以期为卵形鲳鲹人工配合饲料的研制开发提供理论依据。

1　材料和方法

1.1　饲料配方与制作

实验饲料配方及基本营养组成分析见表 1。从表 1 可以看出，以鱼粉、酪蛋白、豆粕、鱼油、卵磷脂等为饲料基础组分，按 20%的添加量加入葡萄糖、蔗糖、糊精、玉米淀粉和糊化玉米淀粉 5 种不同糖源，配制成等氮(约 44%)、等脂(约 9%)饲料。饲料配方中各固体组分原料粉碎后，过 80 目筛，按照设定比例逐级放大混合拌匀，再加入称好的鱼油和大豆卵磷脂手工搓油，混合均匀后加水揉成面团，用制粒机(F–26Ⅱ，华南理工大学)制成直径为 2.5 mm 的饲料。饲料用烘箱 50℃恒温烘干，于–20℃冰箱保存备用。

1.2　饲养管理

饲养实验于 2014 年 7 月 18 日正式开始，在广西海洋研究所海水增养殖实验基地 15 个规格相同(4 m× 3 m× 2 m)、挂在大塘里的网箱中进行。实验用卵形鲳鲹为北海市铁山港区养殖厂培育的同一批苗种，实验前先在桶里用商品化饲料饱食驯养 14 d。饥饿 24 h 后，对鱼体进行称重、分组，平均初始体重为(31.24±0.58) g，每个网箱放养 30 尾卵形鲳鲹，每个饲料设置 3 个平行处理。养殖实验持续 8 周，每天分别在 8:00 和 18:00 进行 1 次饱食投喂，并记录每组鱼摄食饲料的重量，实验期间水温为 27–33℃，pH 为 7.6–8.0，盐度为 20.9–25.2，溶解氧大于 6.0 mg/L。

1.3　样品收集与分析

养殖实验结束后，卵形鲳鲹饥饿处理 24 h，将各个网箱的卵形鲳鲹捞出，用 MS-222 (1∶10000)麻醉后，称量总重并记录尾数。每组随机挑选 5 尾，解剖分离取出肝脏，液氮速冻后保存于–80℃冰箱用于消化酶活性的分析。

饲料常规成分测定：水分采用恒温干燥法(105℃)；粗蛋白采用凯氏定氮法(Kjeltec 8400, 瑞典)；粗脂肪采用索氏抽提法(Soxtec 2050, 瑞士)；粗灰分用马弗卢灰化法(550℃)；可消化糖的实际含量用 3,5–二硝基水杨酸法测定。

消化酶活性测定：取保存的卵形鲳鲹肝脏，按照质量体积比 1∶4 加入 pH=7 的磷酸缓冲液，低温下用玻璃匀浆器将其捣碎，4℃ 3 000 r/min 离心 10 min，用移液枪取上清液用于消化酶指标的测定。蛋白酶活性采用 Folin-酚法测定；脂肪酶活性、淀粉酶活性和酶液蛋白质量分数均采用专业试剂盒测定。酶活力用比活力(U/mg prot)表示。

1.4　计算公式和统计分析

平均终末体质量(W_t, g)=W/n

日增重(Daily weight growth, DWG, g/d)=$(W_t–W_0)/t$

饲料效率(Feed efficiency, FE)=$(W_t–W_0)/M$

蛋白效率(Protein efficiency ratio, PER)=$(W_t–W_0)/m$

式中：W 和 n 分别为实验结束时每个网箱中鱼体的总质量(g)和总尾数；W_t 和 W_0 分别表示鱼体的终末平均体质量(g)和初始平均体质量(g)；t 为实验天数；M 为摄食量(g)；m 为饲料蛋白(g)。

采用 SPSS19.0 软件对所得数据进行一维方差分析(One-way ANOVA)，所得结果用平均值±标准误(Mean±SE)表示，若显著性水平 P<0.05，则进行 Tukey 多重比较。

2　结果

2.1　不同糖源对卵形鲳鲹日增重、饲料效率和蛋白效率的影响

由表 2 可知，不同糖源对卵形鲳鲹日增重有显著影响(P<0.05)，糊化玉米淀粉组鱼体的日增重最高，为(2.19±0.11) g/d，玉米淀粉组次之，二者无显著差异(P>0.05)；葡萄糖组鱼体的日增重最低，显著低于其他各糖源组(P<0.05)；蔗糖组和糊精组鱼体的日增重相近，且显著低于糊化玉米淀粉组(P<0.05)，而显著高于葡萄糖组(P<0.05)。卵形鲳鲹的饲料效率和蛋白效率随糖分子量增大呈显著增大的趋势(P<0.05)，葡萄糖组最小，糊化玉米淀粉组最大，玉米淀粉组与糊精组、糊化玉米淀粉组无显著差异(P>0.05)。日增重、饲料效率和蛋白效率的数据结果均显示卵形鲳鲹对添加糊化玉米淀粉饲料的利用效果最好。

2.2　不同糖源对卵形鲳鲹肝脏消化酶活性的影响

从表 3 可以看出，不同糖源组卵形鲳鲹肝脏的 3 种消化酶活性均有显著差异(P<0.05)。淀粉组的蛋白酶活性最低，显著低于葡萄糖组、蔗糖组和糊精组(P<0.05)，但分子量较低的三组间无显著差异(P>0.05)；蔗糖组鱼体肝脏的淀粉酶活性最高，显著高于除糊精组外的其他糖源组(P<0.05)；脂肪酶活性随糖分子的增大而增大，葡萄糖组最低，淀粉组最高，两淀粉组均显著高于其他三组(P<0.05)。该研究结果显示，糖分子的大小显著影响卵形鲳鲹肝脏消化酶的活性(P<0.05)，而淀粉的糊化加工对其消化酶活性没有显著影响(P>0.05)。

表 1 实验饲料配方及营养组成

Tab.1 Formulation and proximate composition of the experimental diets (% dry matter)

原料 Ingredients	葡萄糖 Glucose	蔗糖 Sucrose	糊精 Dextrin	玉米淀粉 Corn starch	糊化玉米淀粉 Gelatinized corn starch
鱼粉 Fish meal	43.5	43.5	43.5	43.5	43.5
酪蛋白 Casein	6	6	6	6	6
豆粕 Soybean meal	20	20	20	20	20
鱼油 Fish oil	6	6	6	6	6
卵磷脂 Lecithin	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
复合维生素 Vitamin premix[1]	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
复合矿物盐 Mineral premix[2]	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
葡萄糖 Glucose	20				
蔗糖 Sucrose		20			
糊精 Dextrin			20		
玉米淀粉 Corn starch				20	
糊化玉米淀粉 Gelatinized corn starch					20
营养组成 Proximate analysis					
粗蛋白 Crude protein	43.93	44.16	43.86	43.69	43.74
粗脂肪 Crude lipid	9.12	9.19	9.23	9.28	9.06
灰分 Ash	8.69	8.36	7.85	8.14	7.98
糖含量 Dietary CBH	20.78	20.33	20.86	20.81	20.44

1. 复合维生素(mg 或 g/kg 饲料): 维生素 B1, 25 mg; 维生素 B2, 45 mg; 盐酸吡哆醇, 20 mg; 维生素 B12, 0.1 mg; 维生素 K3, 10 mg; 泛酸, 60 mg; 烟酸, 200 mg; 肌醇, 800 mg; 叶酸, 20 mg; 生物素, 1.2 mg; 维生素 A 乙酸酯, 32 mg; 维生素 D3, 5 mg; 维生素 E, 120 mg; 维生素 C, 2000 mg; 氯化胆碱, 2500 mg; 乙氧基喹啉, 150 mg; 次粉, 14.012 g (Niu *et al*, 2013)

2. 复合矿物盐(mg 或 g/kg 饲料): NaF, 2 mg; KI, 0.8 mg; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (1%), 50 mg; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 10 mg; $ZnSO_4 \cdot H_2O$, 50 mg; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 60 mg; $FeSO_4 \cdot H_2O$, 80 mg; NaCl, 100 mg; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1200 mg; $Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$, 3000 mg; 沸石粉, 15.447 g (Niu *et al*, 2013)

1. Vitamin premix (mg or g/kg diet): thiamin, 25 mg; riboflavin,45 mg; pyridoxine HCl, 20 mg; vitamin B12, 0.1 mg; vitamin K3,10 mg; pantothenic acid, 60 mg; niacin acid, 200 mg; inositol, 800 mg; folic acid, 20 mg; biotin, 1.20 mg; retinol acetate, 32 mg; cholecalciferol, 5 mg; α-tocopherol, 120 mg; ascorbic acid, 2000 mg; choline chloride, 2500 mg; ethoxyquin 150 mg; wheat middling, 14.012 g (Niu *et al*, 2013)

2. Mineral premix (mg or g/kg diet): NaF, 2 mg; KI, 0.8 mg; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (1%), 50 mg; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 10 mg; $ZnSO_4 \cdot H_2O$, 50 mg; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 60 mg; $FeSO_4 \cdot H_2O$, 80 mg; NaCl, 100 mg; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1200 mg; $Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$, 3000 mg; zoelite, 15.447 g (Niu *et al*, 2013)

表 2 饲料不同糖源对卵形鲳鲹日增重、饲料效率和蛋白效率的影响

Tab.2 Effects of dietary carbohydrate sources on daily weight growth, feed efficiency and protein efficiency ratio of *T. ovatus*

项目 Items	糖源 Carbohydrate source				
	葡萄糖 Glucose	蔗糖 Sucrose	糊精 Dextrin	玉米淀粉 Corn starch	糊化玉米淀粉 Gelatinized corn starch
初始体质量 Initial weight (g)	31.03±0.11	31.35±0.21	31.04±0.18	31.46±0.22	31.34±0.21
终末体质量 Final weight (g)	92.2±2.79^{a}	115.6±6.58^{b}	117.1±1.73^{b}	127.4±2.42^{bc}	136.4±4.93^{c}
日增重 Daily weight growth (g/d)	1.28±0.06^{a}	1.76±0.13^{b}	1.79±0.04^{b}	2.00±0.06^{bc}	2.19±0.11^{c}
饲料效率 Feed efficiency	0.54±0.02^{a}	0.62±0.02^{b}	0.74±0.01^{c}	0.78±0.01^{cd}	0.82±0.01^{d}
蛋白效率 Protein efficiency ratio	1.16±0.04^{a}	1.41±0.03^{b}	1.68±0.02^{c}	1.79±0.03^{cd}	1.88±0.02^{d}

注：同行数据上标字母不同者之间表示存在显著差异(P<0.05)

Note: Values with different superscripts in the same row denoted significantly different (P<0.05)

表 3　饲料不同糖源对卵形鲳鲹肝脏消化酶活性的影响

Tab.3　Effects of dietary carbohydrate sources on digestive enzyme activities in the liver of *T. ovatus* (U/mg prot)

消化酶 Digestive enzyme	糖源 Carbohydrate source				
	葡萄糖 Glucose	蔗糖 Sucrose	糊精 Dextrin	玉米淀粉 Corn starch	糊化玉米淀粉 Gelatinized corn starch
蛋白酶活性 Activity of protease	83.88±7.07^{b}	102.0±7.76^{b}	93.68±6.58^{b}	47.83±2.81^{a}	41.85±9.92^{a}
淀粉酶活性 Activity of amylase	9.89±0.43^{a}	14.73±0.19^{c}	12.84±0.88^{bc}	10.66±0.39^{ab}	9.71±0.51^{a}
脂肪酶活性 Activity of lipase	21.42±1.63^{a}	23.11±1.23^{a}	31.18±1.94^{b}	38.98±1.71^{c}	40.09±0.67^{c}

注：同行数据上标字母不同者之间表示存在显著差异(P<0.05)

Note: Values with different superscripts in the same row denoted significantly different (P<0.05)

3　讨论

3.1　不同糖源对卵形鲳鲹日增重的影响

糖分子结构是影响鱼类对饲料中糖的利用的因素之一，饲料糖种类不同，鱼类表现出不同的生长速度(Hemre *et al*, 2002)。越来越多的研究表明，鱼类利用淀粉、糊精等分子量较大糖类要好于葡萄糖、蔗糖等结构简单的小分子糖类。当饲料糖水平为 20%时，摄食含葡萄糖、糊精及淀粉的饲料，星斑川鲽(*Platichthys stellatus*)的增重率、饲料效率和蛋白质效率的大小依次为糊精组>淀粉组>葡萄糖组(Lee *et al*, 2004)；金头鲷(*Sparus aurata*)的饲料效率和蛋白质效率以糊精和糊化玉米淀粉组最高，显著高于葡萄糖组(Enes *et al*, 2010)；摄食玉米淀粉、小麦淀粉和糊精的军曹鱼(*Rachycentron canadum*)，其增重率、特定生长率和蛋白效率显著高于麦芽糖、蔗糖和葡萄糖组，葡萄糖组最低且显著低于其他组(Cui *et al*, 2010)。摄食糖水平为 15%饲料的牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)，糊精组的饲料效率和蛋白质效率最高，麦芽糖次之，葡萄糖最低(Lee *et al*, 2003)。另外，斑点叉尾鮰(*Ietalurus punetaus*) (Wilson *et al*, 1987)、异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)和长吻鮠(*Leiocassis longirostris*) (Tan *et al*, 2006)、欧洲鲈鱼(*Dicentrarchus labrax*) (Enes *et al*, 2006)、青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)和鲫鱼(*Carassius auratus*) (蔡春芳等, 2006b)等对糖类的利用也符合上述规律。鱼类被视为具有先天的糖尿病体质(Shiau, 1997)，过去认为鱼类利用糖能力低下的原因是鱼类的胰岛素分泌不足，然而鱼类血液中胰岛素含量比人类要高。谭肖英等(2007)由此推断，鱼类对糖利用能力的有限可能不是胰岛素分泌绝对量不足引起的，而是胰岛素分泌速度跟不上鱼类对饲料糖的吸收速度。因此，鱼类对不同糖源的利用差异可能与糖类的消化吸收速率以及胰岛素分泌速度有关。小分子糖类消化吸收速率较快，鱼体食用后血糖在短时间内迅速升高，此时，胰岛素的分泌速度跟不上血糖的升高速度，过高的血糖将造成生理胁迫，对鱼的生长有一定抑制。林小植等(2006)认为，血糖升高过快，糖代谢相关酶活尚未相应增加，同样引起了血糖水平过高以及糖原饱和等生理胁迫效应。血糖水平过高也可能导致血液中的葡萄糖在进入细胞被有效利用之前就直接排出体外，因而葡萄糖利用率较低(张琴等, 2014)。而淀粉等大分子糖类在消化道内需经过 α-淀粉酶水解成分子较小的糖类，再通过葡萄糖淀粉酶进一步水解成葡萄糖才能被鱼体吸收，血糖升高速率相对较慢，分泌的胰岛素有效地调节了血糖浓度的平衡。另外，也有研究认为，鱼类对不同结构糖利用的差异，是实验鱼种类及其摄食习惯的差异造成的(Tan *et al*, 2006)。

本研究结果显示，大分子糖源组卵形鲳鲹的日增重、饲料效率、蛋白效率均高于小分子糖源组，其中，葡萄糖组的日增重、饲料效率、蛋白效率均最低，两个淀粉组最高。日增重是鱼体平均每天增加的重量，与饲料效率、蛋白效率共同反映了卵形鲳鲹对添加不同糖源饲料的利用和转化效率。实验结果显示，卵形鲳鲹与上述鱼类相似，对淀粉类大分子糖类的利用效率较高，对葡萄糖的利用效率最差，且淀粉的糊化对其消化利用也有一定的促进作用，即 5 种糖源中，卵形鲳鲹对糊化玉米淀粉的利用效果最好。

3.2　不同糖源对卵形鲳鲹肝脏消化酶活性的影响

糖类首先要经过消化酶分解成葡萄糖才能被鱼体吸收利用，消化酶活性的高低直接影响鱼类对营养物质的利用效率，进而影响其生长发育。研究表明，饲料营养素的种类和添加水平对鱼类消化酶活性有重要影响。杨奇慧等(2008)比较了投喂冰鲜鱼和人工配合饲料的军曹鱼消化酶活力，结果显示，饲料组的前肠与肝脏的蛋白酶比活力显著高于冰鲜鱼组，胃的

蛋白酶比活力则相反；冰鲜鱼组胃中的淀粉酶活力显著高于配合饲料组，前肠则相反，两种饲料对肝脏的淀粉酶活力影响不显著；配合饲料组的肝脏脂肪酶活力显著高于冰鲜鱼组，而胃和前肠的脂肪酶活力差异不显著。任鸣春等(2014)的研究表明，饲料淀粉水平对团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)消化酶活性有显著影响，随着淀粉水平的增加，肝脏中淀粉酶活性先增加后降低，肠道中淀粉酶活性先升高后趋于平缓，淀粉水平对蛋白酶活性也有一定影响但差异不显著。Yu 等(2012)在饲料蛋白水平对大黄鱼(*Pseudosciaena Crocea*)生长和酶活影响的研究中，发现大黄鱼淀粉酶活性随饲料中碳水化合物水平的增加而增加，而胰蛋白酶活性在 42 d 的养殖周期内没有显著差异。有关饲料成分对鱼类消化酶活性影响的报道还有很多，研究结果不尽相同。一般规律为在一定范围内增加饲料某种营养成分，会促使消化该成分的消化酶分泌增加或活性增强，同时，其他消化酶也会由此相应改变。而鱼类消化酶活性还受其食性、生长阶段、环境因子以及营养成分等各方面因素的影响，造成了研究结果的差异。

本研究结果显示，不同糖源对卵形鲳鲹肝脏蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶均有显著影响。其中，淀粉酶是与糖类消化吸收关系最为密切的消化酶(张丽丽等, 2009)。与哺乳动物相比，鱼类的淀粉酶活性要低得多，而肝脏是分泌淀粉酶的主要器官，肝脏淀粉酶活性的高低直接影响鱼类对食物中糖类物质的消化能力。本研究中，蔗糖组的肝脏淀粉酶活力最高，糊精次之，葡萄糖组和糊化玉米淀粉组最低。葡萄糖不需消化分解就能被机体直接吸收，而糊化玉米淀粉的加工方式使淀粉分子以单分子形式存在，具有更大的表面积与消化酶作用分解，因此，葡萄糖组和糊化玉米淀粉组的淀粉酶活性较低的原因可能是两种糖源易于消化吸收(叶为标, 2009; Panserat *et al*, 2001)，鱼体适应性分泌较少。同时也说明，鱼类对营养物质的消化能力取决于消化酶活性的高低，这是针对相同营养成分的饵料来说的。饲料组成不同的情况下，消化酶活性的高低并不能反映鱼体对营养成分的利用效率，因该成分被机体消化吸收的难易程度对消化酶的诱导和分泌有重要影响。另外，本研究中测定的是鱼体饥饿 24 h 后的消化酶活，而消化酶活力还与进食时间有关。因此，卵形鲳鲹进食后不同时间点消化酶活力的动态变化有待进一步研究。卵形鲳鲹两个淀粉组的肝脏蛋白酶活性显著低于分子量较小的其他三组，而肝脏脂肪酶活力则随着糖分子量的增大而显著增加。不同糖源与饲料蛋白和脂肪结合方式不同，可能影响了鱼体对蛋白和脂肪的消化吸收，而不同糖源对其消化腺的刺激作用也不同。

消化酶活性的高低关系到鱼体对营养物质的消化吸收效率，然而这仅是鱼体利用营养成分的第一步。糖类在鱼体内的转化过程复杂多变，其代谢途径包括分解、合成、转化、运输等，当中有一个过程受到影响，都会影响其生长发育。本研究并未发现卵形鲳鲹消化酶活性与其生长存在相关性。有关不同糖源对其生长及消化酶活性影响的机制，有待进一步研究与讨论。

4 结论

不同糖源对卵形鲳鲹的日增重、饲料利用和消化酶活性均有显著影响。本研究条件下，淀粉类大分子糖类对卵形鲳鲹的促生长效果优于葡萄糖、蔗糖和糊精，其中糊化玉米淀粉的促生长效果最好，该糖源组的日增重达到 2.19 g/d，饲料效率和蛋白效率分别为 0.82%和 1.88。

参 考 文 献

区又君, 李加儿. 卵形鲳鲹的早期胚胎发育. 中国水产科学, 2005, 12(6): 786–789

区又君, 何永亮, 李加儿, 等. 卵形鲳鲹胚后发育阶段的体色变化和鳍的分化. 热带海洋学报, 2012, 31(1): 62–66

叶为标. 淀粉糊化及其检测方法. 粮食与油脂, 2009, 22(1): 7–10

任鸣春, 贾文锦, 戈贤平, 等. 饲料不同淀粉水平对团头鲂成鱼生长性能、消化酶活性及肌肉成分的影响. 水产学报, 2014, 38(9): 1494–1502

许晓娟, 李加儿, 区又君, 等. 深水网箱养殖卵形鲳鲹血液指标. 动物学杂志, 2008, 43(6): 109–116

李孟均, 陈春娜. 饲料中的糖对水产动物的影响. 北京水产, 2008, (2): 57–59

杨奇慧, 周歧存, 郑海娟, 等. 不同饲料对军曹鱼组织消化酶活力的影响. 水产科学, 2008, 27(12): 633–636

张邦杰, 梁仁杰, 王晓斌, 等. 卵形鲳鲹 *Trachinotus ovatus* (Linnaeus)的引进、咸、海水池塘养与越冬. 现代渔业信息, 2001, 16(3): 16–20

张丽丽, 周歧存, 程怡秋, 等. 不同糖源对方斑东风螺生长、饲料利用和消化酶活性的影响. 广东海洋大学学报, 2009, 29(4): 14–18

张琴, 许明珠, 童潼, 等. 饲料不同糖源对方格星虫稚虫日增重和消化酶的影响. 南方水产科学, 2014, 10(1): 21–26

林小植, 罗毅平, 谢小军. 饲料碳水化合物水平对南方鲇幼鱼餐后糖酵解酶活性及血糖浓度的影响. 水生生物学报, 2006, 30(3): 304–310

罗毅平, 谢小军. 鱼类利用碳水化合物的研究进展. 中国水

产科学, 2010, 17(2): 381–390

钱雪桥, 崔奕波, 解绶启, 等. 养殖鱼类饲料蛋白需要量研究进展. 水生生物学报, 2002, 26(4): 410–416

蔡小辉, 文雪, 徐力文, 等. 卵形鲳鲹一例疑似神经性病毒病的初步分析. 水产科学, 2012, 31(10): 597–601

蔡春芳, 王永玲, 陈立侨, 等. 饲料糖种类和水平对青鱼、鲫生长和体成分的影响. 中国水产科学, 2006a, 13(3): 452–459

蔡春芳, 陈立侨. 鱼类对糖的利用评述. 水生生物学报, 2006b, 30(5): 608–613

谭肖英, 罗智, 刘永坚. 鱼类对饲料中糖的利用研究进展. 中国饲料, 2007, 7(6): 19–23

Cui XJ, Zhou QC, Liang HO, *et al*. Effects of dietary carbohydrate sources on the growth performance and hepatic carbohydrate metabolic enzyme activities of juvenile cobia (*Rachycentron canadum* Linnaeus.). Aquac Res, 2010, 42(1): 99–107

Enes P, Peres H, Couto A, *et al*. Growth performance and metabolic utilization of diets including starch, dextrin, maltose or glucose as carbohydrate source by gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. Fish Physiol Biochem, 2010, 36(4): 903–910

Enes P, Panserat S, Kaushik S, *et al*. Rapid metabolic adaptation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles fed different carbohydrate sources after heat shock stress. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2006, 145(1): 73–81

Hemre GI, Mommsen TP, Krogdahl A. Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. Aquac Nutr, 2002, 8(3): 175–194

Lee SM, Lee JH. Effect of dietary glucose, dextrin and starch on growth and body composition of juvenile starry flounder *Platichthys stellatus*. Fisheries Sci, 2004, 70(1): 53–58

Lee SM, Kim KD, Lall SP. Utilization of glucose, maltose, dextrin and cellulose by juvenile flounder (*Paralichthys olivaceus*). Aquaculture, 2003, 221(1–4): 427–438

Lin S, Mao S, Guan Y, *et al*. Dietary administration of chitooligosaccharides to enhance growth, innate immune response and disease resistance of *Trachinotus ovatus*. Fish Shellfish Immunol, 2012, 32(5): 909–921

Niu J, Du Q, Lin HZ, *et al*. Quantitative dietary methionine requirement of juvenile golden pompano *Trachinotus ovatus* at a constant dietary cystine level. Aquac Nutr, 2013, 19(5): 677–686

Panserat S, Capilla E, Gutierrez J, *et al*. Glucokinase is highly induced and glucose-6-phosphatase poorly repressed in liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by a single meal with glucose. Comp Biochem and Physiol B Biochem Mol Biol, 2001, 128(2): 275–283

Shiau SY. Utilization of carbohydrates in warm water fish with particular reference to tilapia, *Orechromis niloticus* × *O. aureus*. Aquaculture, 1997, 151(1–4): 79–96

Tan Q, Xie S, Zhu X, *et al*. Effect of dietary carbohydrate sources on growth performance and utilization for gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) and Chinese longsnout catfish (*Leiocassis longirostris* Gunther). Aquac Nutr, 2006, 12(1): 61–70

Wilson RP, Poe WE. Apparent inability of channel catfish to utilize dietary mono- and disaccharides as energy sources. J Nutr, 1987, 117(2): 280–285

Wu Y, Han H, Qin J, *et al*. Replacement of fishmeal by soy protein concentrate with taurine supplementation in diets for golden pompano (*Trachinotus ovatus*). Aquac Nutr, 2015, 21(2): 214–222

Xie ZZ, Xiao L, Wang DD, *et al*. Transcriptome analysis of the *Trachinotus ovatus*: identification of reproduction, growth and immune-related genes and microsatellite markers. PLoS ONE, 2014, 9(10): e109419

Yu HR, Ai QH, Mai KS, *et al*. Effects of dietary protein levels on the growth, survival, amylase and trypsin activities in large yellow croaker, *Pseudosciaena Crocea* R., larvae. Aquac Res, 2012, 43(2): 178–186

Zheng PL, Ma ZH, Guo HY, *et al*. Osteological ontogeny and malformations in larval and juvenile golden pompano *Trachinotus ovatus* (Linnaeus 1758). Aquac Res, 2016, 47(5): 1421–1431

Zhou CP, Ge XP, Lin HZ, *et al*. Effect of dietary carbohydrate on non-specific immune response, hepatic antioxidative abilities and disease resistance of juvenile golden pompano (*Trachinotus ovatus*). Fish Shellfish Immunol, 2014, 41(2): 183–190

(编辑　马璀艳)

Effect of Different Carbohydrate Sources on Daily Weight Growth, Feed Utilization and Digestive Enzyme Activities of *Trachinotus ovatus*

DONG Lanfang[1], ZHANG Qin[1①], XU Mingzhu[1], TONG Tong[1],
WANG Jun[2], XIONG Xiangying[1], PENG Yinhui[1]

(1. *Guangxi Institute of Oceanology, Key Laboratory of Marine Biotechnology of Guangxi, Beihai* 536000;
2. *The Key Laboratory of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou* 510300)

Abstract A cost-efficient formula of feed in fish farming usually contains a large amount of low-cost energy sources supplemented with sufficient level of high-cost essential nutrients such as protein. Carbohydrate is the least costly dietary energy for animals. However, the utilization of carbohydrate varies a lot between different fish species, and the mechanisms underlying distinctive carbohydrate-consuming abilities have been obscure. In this study we aimed to explore the effects of different carbohydrate sources on daily weight growth (DWG), feed utilization and digestive enzyme activities of *Trachinotus ovatus*. Fish (initial weight 31.24±0.58 g) were fed with 5 groups of isonitrogenous and isolipidic diets each of which contained 1 type of carbohydrate at 20% including glucose, sucrose, dextrin, corn starch or gelatinized corn starch. Each group was fed for 8 weeks. The results showed that different carbohydrate sources significantly affected the DWG, feed efficiency (*FE*) and the protein efficiency ratio (PER) (P<0.05). The gelatinized corn starch group had significantly higher DWG (2.19 g/d), *FE* (0.82%) and PER (1.88) than other groups (P<0.05), and there was no significant difference between the two starch groups (P>0.05). The glucose group had the lowest DWG, *FE* and PER (P<0.05). Dietary carbohydrate sources also had great effects on activities of digestive enzymes (P<0.05). The protease activity of the two starch groups was significantly lower than that of the other three groups (P<0.05). The sucrose group displayed the highest amylase activity (P<0.05). The lipase activity was boosted along with the increase in the molecular weight of the dietary carbohydrate, and was the highest in the gelatinized corn starch group. In conclusion, large-molecule carbohydrates may have better effects on the growth of *T. ovatus* than glucose, sucrose and dextrin. Gelatinized corn starch was the optimal carbohydrate source in this study.

Key words *Trachinotus ovatus*; Carbohydrate sources; Daily weight growth; Feed utilization; Digestive enzyme activities

① Corresponding author: ZHANG Qin, E-mail: zhangqin821220@163.com

DOI: 10.11758/yykxjz.20150211002 http://www.yykxjz.cn/

高植物蛋白饲料中不同水平低分子水解鱼蛋白对大菱鲆(*Scophthalmus maximus* L.)幼鱼生长及肝脏 IGF-I 受体表达的影响*

牟玉超[1,2] 梁萌青[1,3①] 郑珂珂[1] 卫育良[1]

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071；2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306;
3. 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)

摘要 本研究利用低分子水解鱼蛋白设计了 4 组等氮等能的高植物蛋白饲料，研究不同水平低分子水解鱼蛋白对大菱鲆(*Scophthalmus maximus* L.)幼鱼[(4.16±0.01) g]生长性能、鱼体组成及肝脏中类胰岛素生长因子 I 受体(Insulin-like growth factor receptor, IGF-IR)表达的影响。水解鱼蛋白分别替代总蛋白的 5%(UF-5)、10%(UF-10)、20%(UF-20)的鱼粉，无添加 FPH 组为对照组(UF-0)，用这 4 种饲料饲喂大菱鲆幼鱼 84 d，结果显示，UF-0、UF-5 和 UF-10 组的增重率、特定生长率无显著差异(P>0.05)，但显著高于 UF-20 组(P<0.05)；UF-0、UF-5 组的饲料效率、蛋白质效率和蛋白质沉积率无显著差异(P>0.05)，而显著高于 UF-10、UF-20 组(P<0.05)；UF-0、UF-5 和 UF-10 三组鱼体粗蛋白、粗脂肪含量无显著差异(P>0.05)，但显著高于 UF-20 组(P<0.05)；UF-5 组必需氨基酸含量及必需氨基酸与非必需氨基酸比值显著高于其他 3 组(P<0.05)，其他 3 组间无显著差异(P>0.05)；肝脏中 IGF-IR mRNA 的表达随着水解鱼蛋白替代水平的增加而升高，且 UF-20 组与其他 3 组差异显著(P<0.05)。结果表明，适当添加低水平水解鱼蛋白(UF-5)可促进大菱鲆幼鱼的生长、提高饲料效率及促进肌肉必需氨基酸的积累；高水平添加低分子水解鱼蛋白(UF-20)会抑制其生长及饲料利用等；低分子水解鱼蛋白可提高大菱鲆肝脏中 IGF-IR 基因的表达量。

关键词 水解鱼蛋白；植物蛋白；大菱鲆；生长；IGF-I 受体

中图分类号 S963 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)03-0049-09

大菱鲆(*Scophthalmus maximus* L.)属于鲽形目(Pleuronectiformes)、鲆科(Bothidae)、菱鲆属(*Scophthalmus*)，俗称“多宝鱼”，为原产于大西洋东岸的冷水性经济海水鱼类(马爱军等, 2003)。自 1992 年引进我国后，由于其适应低水温生活、生长迅速、经济价值高、易于集约化养殖等特点(Bromley, 1980)，大菱鲆的工厂化养殖已经成为北方海水养殖业的支柱产业。

鱼粉需求量上升，价格不断上涨，依靠鱼粉为主要饲料蛋白源已经难以满足水产养殖业的发展要求。用价格低廉的植物蛋白替代部分鱼粉是解决目前鱼粉短缺问题的一种有效措施，但由于植物蛋白含有抗营养因子、氨基酸不平衡等，限制了其在水产饲料中的添加量(周歧存等, 2005; Bureau *et al*, 1998; Francis *et al*, 2001; Gomes *et al*, 1995; 陈伟等, 2009[1)]; El-Saidy

* 国家自然科学基金项目(31172423)和农业公益性行业专项(201303053)共同资助。牟玉超, E-mail: muyuchao@163.com
① 通讯作者：梁萌青，研究员, E-mail: liangmq@ysfri.ac.cn
收稿日期: 2015-02-11，收修改稿日期: 2015-03-27

1) 陈伟. 抗营养因子对牙鲆(*Paralichthys olivaceus olivaceus*)利用大豆蛋白源的影响. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2009

et al, 2003; Kaushik *et al*, 1998; 庄平等, 2002)。

水解鱼蛋白(Fish protein hydrolysate, FPH)是鱼蛋白在酸、碱或酶的条件下水解获得的一种含有不同长度的多肽片段和少量游离氨基酸的蛋白制品(Liaset *et al*, 2008; 王新星等, 2011)。FPH 已作为一种新型的优质蛋白源用于水产饲料(王长云等, 1995; Liaset *et al*, 2000; Kotzamanis *et al*, 2007; Zheng *et al*, 2013)。经过超滤获得的 FPH 分子量较小，低分子 FPH 在鱼类饲料中的效果要优于高分子 FPH(郑珂珂等, 2011; Bui *et al*, 2014)。Aksnes 等(2006a)研究发现，低分子 FPH 是维持虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)在饲喂高植物蛋白饲料条件下正常生物功能必不可少的成分。许团辉等(2012)在研究不同水平低分子 FPH 对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)的影响时发现，特定生长率、摄食率、饲料效率等随着 FPH 添加量的增加呈先上升后下降的趋势。然而，关于大菱鲆高植物蛋白饲料中低分子 FPH 的适宜添加水平的研究尚未报道。

本研究的目的是在含有高植物蛋白源的大菱鲆幼鱼饲料中添加不同水平的低分子 FPH 替代鱼粉，探讨其对大菱鲆幼鱼生长存活状况、鱼体组成及肝脏中类胰岛素生长因子 I 受体(Insulin-like growth factor receptor, IGF-IR)基因表达量的影响，并以此评价低分子 FPH 替代鱼粉的效果，筛选合适的 FPH 替代水平，为肉食性鱼类科学利用 FPH 及提高植物蛋白源的利用效率提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 水解鱼蛋白的制备及分子量测定

水解鱼蛋白的实验用鱼为去头和内脏的太平洋狭鳕鱼(*Theragra chalcogramma*)，水解鱼蛋白的制备参考 Zheng 等(2012)的方法。

利用高效液相色谱仪测定水解蛋白的分子量，依据 Zheng 等(2012)的方法，测得低分子水解鱼蛋白的分子量分布见表 1。

1.2 实验饲料

本实验以鱼粉、植物蛋白(豆粕、玉米蛋白粉、谷朊粉)及水解鱼蛋白为蛋白源，以鱼油为脂肪源，制作成 4 种等氮等能的饲料(表 2)：无添加 FPH 组为对照组(UF-0)，FPH 替代总蛋白的 5%、10%、20%分别为 UF-5、UF-10、UF-20 组。所有原料粉碎过 80 目筛，按照饲料配方(表 2)将原料混合，制成粒径为 3 mm 的饲料，用烘箱在 55℃下烘 12 h 至恒重，置于–20℃冰箱保存备用。饲料氨基酸组成见表 3。

表 1 水解鱼蛋白的分子量分布

Tab.1 Distribution of molecular weight of FPH

分子量 Molecular weight (Da)	水解鱼蛋白 Fish protein hydrolysate (%)
10000–5000	0.20
5000–2000	1.14
2000–1000	5.21
1000–500	21.34
200–500	56.64
100–200	3.66
<100	11.82

1.3 实验鱼及养殖管理

实验鱼选用初始体重为(4.16±0.01) g 的大菱鲆幼鱼，养殖基地在烟台开发区天源水产有限公司。将鱼苗暂养 14 d 使其适应养殖环境。采用自然采光，养殖于水体体积为 120 L 的玻璃钢桶内。养殖用水为深井海水，采用流水养殖模式，流速为 5 L/min，连续充气，水温为(14.0±0.5)℃，溶氧高于 7 mg/L，盐度为 30.0±0.5，pH 为 7.5–8.0。生长实验开始时，停食 24 h，选择大小均匀、体格健壮且体表无病的大菱鲆幼鱼，称重后随机分配在 16 个玻璃钢桶内(1 个对照组，3 个实验组)，每桶 25 尾鱼，每天用实验饲料饱食投喂两次(06:30 和 16:30)，投喂结束 30 min 后，对残饵进行统计，根据 100 粒饲料的平均重量计算残饵的重量。养殖周期为 84 d。

1.4 样品采集和生化分析

实验开始时，随机取 10 尾鱼麻醉处理后，保存于–20℃以供后续的鱼体成分分析实验。实验结束时，停食 24 h，每桶鱼称重，随机取 5 尾鱼，保存于–20℃用于鱼体成分分析；每桶取两尾鱼的肌肉，保存于–20℃；每桶取 1 尾鱼，取同一位置的肝脏保存于 RNAwait 保存液(Slarbio)中。

饲料和鱼体样品在 105℃烘干至恒重，通过失重法测定干物质含量，然后进行生化测定。粗蛋白采用凯氏定氮法；粗脂肪采用索氏抽提法；灰分的测定需先在电炉上炭化后再在马福炉中 550℃燃烧 3 h，失重法测定。使用日立 L-8900 型氨基酸分析仪测定饲料和鱼体肌肉氨基酸组成。

1.5 实时定量检测肝脏中 IGF-IR 基因表达量

1.5.1 RNA 的提取和 cDNA 的合成 利用 RNA Extraction Kit(TaKaRa)试剂盒从实验鱼的肝脏中提取总 RNA，利用微量核酸测定仪(Nanodrop ND2000)检

表 2　实验饲料配方和营养组成

Tab.2　Formulation and proximate chemical composition of the experimental diets (%)

原料 Ingredients (%)	UF-0	UF-5	UF-10	UF-20
鱼粉 Fish meal	15.00	11.50	8.00	1.00
豆粕 Soybean meal	24.00	24.00	24.00	24.00
玉米蛋白粉 Corn gluten meal	12.00	12.00	12.00	12.00
谷朊粉 Wheat gluten	18.00	18.00	18.00	18.00
水解鱼蛋白 FPH	0	3.10	6.20	12.40
小麦粉 Wheat meal	12.30	12.50	12.60	12.90
鱼油 Fish oil	8.70	8.90	9.20	9.70
卵磷脂 Soybean lecithin	1.00	1.00	1.00	1.00
维生素混合物 Vitamin premix[1]	1.50	1.50	1.50	1.50
矿物质混合物 Mineral premix[2]	1.50	1.50	1.50	1.50
氯化胆碱 Choline chloride	2.00	2.00	2.00	2.00
磷酸二氢钙 CaH_2PO_4	2.00	2.00	2.00	2.00
维生素 C Vitamin C	0.50	0.50	0.50	0.50
L-赖氨酸 L-lysine	0.80	0.80	0.80	0.80
D/L-蛋氨酸 D/L-methionine	0.40	0.40	0.40	0.40
L-精氨酸 L-arginine	0.30	0.30	0.30	0.30
营养组成 Proximate composition (%)				
粗蛋白 Crude protein	51.81	52.42	52.24	52.16
粗脂肪 Crude lipid	10.56	10.71	10.75	10.78
灰分 Ash	7.24	7.06	7.00	6.83

注：1. 维生素混合料(mg/kg or g/kg 饲料)：硫胺素，25 mg；核黄素，45 mg；盐酸吡哆醇，20 mg；维生素 B_{12}，0.1 mg；维生素 K_3，10 mg；肌醇，800 mg；泛酸，60 mg；烟酸，200 mg；叶酸，20 mg；生物素，1.20 mg；维生素 A，32 mg；维生素 D，5 mg；维生素 E，120 mg；次粉 18.67 g

2. 矿物质混合料(mg/kg or g/kg 饲料)：氟化钠，2 mg；碘化钾，0.8 mg；氯化钴，50 mg；硫酸铜，10 mg；硫酸铁，80 mg；硫酸锌，50 mg；硫酸镁，1200 mg；磷酸二氢钙，3000 mg；氯化纳，100 mg；沸石粉，15.51 g

Note: 1. Vitamin premix (mg/kg or g/kg diet): thiamine 25 mg, riboflavin 45 mg, pyridoxine 20 mg, vitamin B_{12} 0.1 mg, menadione 10 mg, inositol 800 mg, pantothenate 60 mg, tocopherol acetate 200 mg, folic acid 20 mg, biotin 1.20 mg, vitamin A 32 mg, vitamin D 5 mg, vitamin E 120 mg, wheat flour 18.67 g

2. Mineral premix (mg/kg or g/kg) diet: NaF 2 mg; KI 0.8 mg; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 50 mg; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 10 mg; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 80 mg; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 50 mg; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 1200 mg; $Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$ 3000 mg; NaCl 100 mg; Mordenzeo 15.51 g

表 3　饲料氨基酸含量分析(饲料干物质%)

Tab.3　Amino acid composition of the experimental diets (Dry matter%)

氨基酸 Amino acid (%)	UF-0	UF-5	UF-10	UF-20
天冬氨酸 Asp	2.86	2.58	2.47	2.77
苏氨酸 Thr	1.43	1.34	1.28	1.36
丝氨酸 Ser	1.92	1.78	1.75	1.86
谷氨酸 Glu	10.54	9.61	9.59	10.38
甘氨酸 Gly	1.67	1.58	1.54	1.65
丙氨酸 Ala	2.07	1.98	1.93	2.06
半胱氨酸 Cys	0.53	0.58	0.49	0.55
缬氨酸 Val	1.81	1.74	1.63	1.75
蛋氨酸 Met	0.89	0.62	0.84	0.92
异亮氨酸 Ile	1.61	1.61	1.50	1.60
亮氨酸 Leu	3.56	3.50	3.38	3.59
酪氨酸 Tyr	1.58	1.47	1.33	1.43
苯丙氨酸 Phe	2.72	3.06	3.72	3.42
赖氨酸 Lys	2.31	2.45	2.32	2.38
组氨酸 His	1.02	1.06	0.96	0.89
精氨酸 Arg	1.93	2.24	1.88	1.90
牛磺酸 Tau	0.14	0.15	0.15	0.16
总氨基酸 TAA	38.59	37.35	36.76	38.67
必需氨基酸 EAA	17.28	17.62	17.51	17.81
非必需氨基酸 NEAA	21.31	19.73	19.25	20.86
EAA/TAA	44.78	47.18	47.67	46.06
EAA/NEAA	81.09	89.31	90.96	85.38

测 RNA 的浓度和纯度,使用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量；–80℃保存。

以提取的肝脏总 RNA 为模板，根据 PrimeScript™RT Reagent Kit(TaKaRa)反转录试剂盒的操作说明合成 cDNA，利用微量核酸测定仪(Nanodrop ND2000)检测 cDNA 的浓度；–20℃保存。

1.5.2　引物的设计　本实验采用的是荧光定量的相对定量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法，选用 β-actin 管家基因，目的基因 IGF-IR 的引物根据 GenBank 中大菱鲆 IGF-IR (AJ224993.1)基因序列设计，两种引物由上海生工生物工程股份有限公司合成(表 4)。

1.5.3　荧光定量　采用 SYBR Green I 染料法，荧光定量试剂由 TaKaRa 公司提供；在荧光定量仪(Applied Biosystem 7500 Real-Time PCR System)上进行扩增和数据分析。反应体系为 10 μl：SYBR® Premix Ex *Taq*™ Ⅱ (×2) 5 μl，ROX Reference Dye Ⅱ(×50) × 3 0.2 μl，上下游引物各 0.4 μl (10 μmol/L)，模板 cDNA

表 4 RT-PCR 实验用到的引物

Tab.4 Real-time PCR primers used in the experiment

基因 Gene	引物序列 Primer sequence (5′−3′)	引物长度 Length (bp)
β-actin	F:CCAAAGCCACACGGGAGAA	19
	R:AGAGGCATACAGGGACAGCACA	22
IGF-IR	F:CGTGGACAAATGCTGTGGAT	20
	R:CCAGAAGGCAGATGAAGAGG	20

1 μl，ddH_2O 3 μl 补充至总体积。反应程序为：95℃ 30 s；95℃ 5 s，60℃ 34 s，40 个循环；95℃ 15 s，60℃ 1 min，95℃ 15 s。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 IGF-IR 基因的相对表达量，$\Delta\Delta C_t=(C_{t\,目的基因}-C_{t\,管家基因})_{实验组}-(C_{t\,目的基因}-C_{t\,管家基因})_{对照组}$。

1.6 计算及统计分析方法

增重率(%)=100×(终末体重−初始体重)/初始体重

特定生长率(%/d)=100×[ln(终末体重)−ln(初始体重)]/实验天数

摄食率(%体重/d)=100×总干物质摄食量/[实验天数×(初始体重+终末体重)/2]

饲料效率=鱼体增重(湿重)/总干物质摄食量

蛋白质效率=(终末体重−初始体重)/蛋白摄入量

蛋白质沉积率(%)=100×鱼体蛋白质贮存量/蛋白摄入量

采用 SPSS 17.0 统计软件对实验数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA)，当差异达到显著水平($P<0.05$)，进行邓肯多重比较(Duncan's multiple range tests)，数据表示为平均值±标准差(Mean±SD)。

2 结果

2.1 不同水平低分子 FPH 对大菱鲆幼鱼生长性能的影响

不同水平低分子 FPH 对大菱鲆生长性能的影响如表 5 所示。经过 84 d 的饲喂，4 个组的大菱鲆幼鱼的成活率在 98%以上，且成活率在各组之间无显著差异($P>0.05$)。高植物蛋白饲料组 UF-5 的增重率、特定生长率高于 UF-0、UF-10 组，但差异不显著($P>0.05$)，3 组显著高于 UF-20 组($P<0.05$)。UF-5 组的饲料效率、蛋白质效率和蛋白质沉积率与 UF-0 组无显著差异($P>0.05$)，但显著高于 UF-10 和 UF-20 组($P<0.05$)。UF-10 组的饲料效率、蛋白质效率和蛋白质沉积率显著高于 UF-20 组($P<0.05$)。摄食率随着 FPH 添加量的增加有上升趋势，且 UF-20 组显著高于其他 3 组($P<0.05$)。

2.2 不同水平低分子 FPH 对大菱鲆幼鱼鱼体成分及肌肉氨基酸组成的影响

高植物蛋白饲料中添加不同水平水解鱼蛋白对鱼体化学组成的影响见表 6。对照组 UF-0 与 UF-5、UF-10 组的鱼体水分、粗蛋白和粗脂肪含量无显著差异($P>0.05$)，但 UF-5 组与 UF-10 组鱼体粗蛋白含量及粗脂肪含量高于对照组，且二者之间无显著差异($P>0.05$)。FPH 高添加组 UF-20 的水分含量最高，蛋白和脂肪含量最低。UF-0 组的灰分含量最高，与其他 3 组差异显著($P<0.05$)。

4 组实验的鱼体肌肉氨基酸含量组成中(表 7)，UF-5 组肌肉中的缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸和亮氨酸 4 种必需氨基酸含量显著高于 UF-0、UF-20 组($P<0.05$)，与 UF-10 组无显著差异。UF-5 组的苯丙氨酸、赖氨酸和组氨酸 3 种必需氨基酸含量显著高于其他 3 组($P<0.05$)，其他 3 组之间无显著差异($P>0.05$)。UF-5 组必需氨基酸含量及必需氨基酸与非必需氨基酸比值最高，且显著高于其他 3 组($P<0.05$)，UF-0、UF-10 和 UF-20 三组间无显著差异($P>0.05$)。

2.3 IGF-IR 基因实时定量的表达结果

本实验采取相对定量的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对 IGF-IR 基因在对照组 UF-0 和实验组 UF-5、UF-10、UF-20 的表

表 5 不同水平低分子 FPH 对大菱鲆幼鱼生长性能的影响(平均值±标准差)

Tab.5 The effects of small molecular weight of fish protein hydrolysate levels on the growth performance of juvenile turbot (Mean±SD)

组别 Group	鱼体增重率 Weight gain rate(%)	特定生长率 Specific growth rate(%/d)	摄食率 Feeding rate(%/d)	饲料效率 Feed efficiency	蛋白质效率 Protein efficiency ratio	蛋白沉积率 Protein deposition rate(%)
UF-0	630.92±44.02^a	2.37±0.07^a	1.29±0.02^c	1.38±0.03^a	2.37±0.06^a	35.02±0.72^a
UF-5	642.04±37.65^a	2.38±0.06^a	1.31±0.05^c	1.41±0.07^a	2.43±0.13^a	35.51±1.74^a
UF-10	578.29±109.81^a	2.27±0.18^a	1.36±0.03^b	1.29±0.08^b	2.22±0.14^b	32.77±1.97^b
UF-20	428.20±15.49^b	1.98±0.02^b	1.45±0.02^a	1.12±0.01^c	1.92±0.03^c	26.89±1.00^c

注：同列数据中相同上标字母表示差异不显著($P>0.05$)

Note: Values in the same column with same superscripts are not significantly different ($P>0.05$)

表 6　不同水平低分子 FPH 对大菱鲆鱼体化学组成的影响(平均值±标准差)

Tab.6　The effects of small molecular weight of fish protein hydrolysate levels on the body chemical compositions of juvenile turbot (Mean±SD)

组别 Group	水分 Moisture(%)	粗蛋白 Crude protein(%)	粗脂肪 Crude lipid(%)	灰分 Ash(%)
UF-0	76.93±0.42^{b}	14.64±0.20^{a}	3.99±0.20^{ab}	3.40±0.10^{a}
UF-5	76.87±0.35^{b}	14.74±0.02^{a}	4.31±0.22^{a}	3.13±0.24^{b}
UF-10	76.88±0.39^{b}	14.75±0.11^{a}	4.53±0.37^{a}	3.15±0.10^{b}
UF-20	78.94±0.69^{a}	14.12±0.30^{b}	3.64±0.67^{b}	3.05±0.10^{b}

注：同列数据中相同上标字母表示差异不显著(P>0.05)

Note: Values in the same column with same superscripts are not significantly different (P>0.05)

表 7　不同水平低分子 FPH 对大菱鲆鱼体肌肉氨基酸组成的影响(%)(平均值±标准差)

Tab.7　The effects of small molecular weight of fish protein hydrolysate levels on the amino acid composition of fish muscle in juvenile turbot (%) (Mean±SD)

氨基酸 Amino acid(%)	UF-0	UF-5	UF-10	UF-20
天冬氨酸 Asp	8.54±0.12^{a}	7.07±0.03^{b}	8.73±0.15^{a}	8.52±0.14^{a}
苏氨酸 Thr	3.78±0.09^{a}	3.44±0.13^{b}	3.88±0.05^{a}	3.79±0.06^{a}
丝氨酸 Ser	3.39±0.08^{a}	2.96±0.15^{b}	3.45±0.02^{a}	3.42±0.08^{a}
谷氨酸 Glu	13.78±0.20^{a}	12.94±0.64^{b}	14.17±0.19^{b}	13.42±0.11^{b}
甘氨酸 Gly	4.03±0.04^{a}	3.66±0.24^{c}	3.81±0.07^{b}	3.72±0.04^{b}
丙氨酸 Ala	5.20±0.13^{ab}	4.97±0.22^{b}	5.25±0.03^{a}	5.12±0.11^{ab}
半胱氨酸 Cys	0.79±0.04^{c}	1.78±0.21^{a}	1.00±0.15^{bc}	1.09±0.12^{b}
缬氨酸 Val	3.79±0.17^{b}	4.18±0.18^{a}	3.88±0.12^{ab}	3.91±0.12^{ab}
蛋氨酸 Met	2.31±0.04^{b}	2.56±0.07^{a}	2.31±0.03^{b}	2.18±0.11^{b}
异亮氨酸 Ile	3.69±0.02^{b}	3.91±0.14^{a}	3.80±0.07^{ab}	3.68±0.08^{b}
亮氨酸 Leu	6.45±0.09^{b}	6.72±0.26^{a}	6.63±0.11^{a}	6.49±0.13^{b}
酪氨酸 Tyr	2.82±0.03^{ab}	2.91±0.07^{a}	2.74±0.03^{b}	2.79±0.08^{b}
苯丙氨酸 Phe	3.57±0.07^{b}	6.83±0.58^{a}	3.55±0.05^{b}	3.64±0.18^{b}
赖氨酸 Lys	7.68±0.10^{b}	8.42±0.32^{a}	7.79±0.14^{b}	7.83±0.07^{b}
组氨酸 His	1.70±0.02^{b}	1.93±0.02^{a}	1.72±0.02^{b}	1.70±0.02^{b}
精氨酸 Arg	5.00±0.07	5.02±0.12	4.99±0.09	4.84±0.13
牛磺酸 Tau	0.12±0.01^{b}	0.15±0.02^{b}	0.12±0.02^{b}	0.20±0.04^{a}
总氨基酸 TAA	76.63±1.04^{b}	79.45±1.23^{a}	77.82±0.78^{ab}	76.37±0.63^{b}
必需氨基酸 EAA	37.97±0.50^{b}	43.01±0.37^{a}	38.55±0.33^{b}	38.09±0.56^{b}
非必需氨基酸 NEAA	43.01±0.57^{a}	36.43±0.95^{b}	39.28±0.51^{a}	38.29±0.10^{a}
EAA/TAA	49.55±0.15^{b}	54.14±0.53^{a}	49.53±0.24^{b}	49.87±0.33^{b}
EAA/NEAA	98.22±0.60^{b}	118.09±2.53^{a}	98.14±0.93^{b}	99.47±1.29^{b}

注：同列数据中相同上标字母表示差异不显著(P>0.05)

Note: Values in the same column with same superscripts are not significantly different (P>0.05)

达量进行相对定量，UF-0 组的表达量设定为 1(表 8)。从表 8 中可以看出，肝脏中 IGF-IR 基因的表达水平随着水解鱼蛋白添加水平的升高而上升，且 UF-20 组表达量显著高于其他 3 组(P<0.05)，UF-10 组显著高于 UF-0 组(P<0.05)，UF-5 组与 UF-0、UF-10 组差异不显著(P>0.05)。

表 8 不同水平低分子 FPH 对大菱鲆幼鱼肝脏中 IGF-IR 基因 mRNA 表达量的影响(平均值±标准差)

Tab.8 The effects of small molecular weight of fish protein hydrolysate levels on mRNA expression of IGF-IR gene in liver of juvenile turbot (Mean ± SD)

组别 Group	IGF-IR 基因 mRNA 相对表达量 mRNA relative expression of IGF-IR gene
UF-0	1.00 ± 0.00^{c}
UF-5	1.12 ± 0.20^{bc}
UF-10	1.37 ± 0.22^{b}
UF-20	1.90 ± 0.39^{a}

注：数据中相同上标字母表示差异不显著(P>0.05)

Note: Values with the same superscripts are not significantly different (P>0.05)

3 讨论

3.1 低分子 FPH 对大菱鲆幼鱼生长的影响

本研究中 90%的 FPH 的分子量小于 1000 Da，含有丰富的必需氨基酸、呈味氨基酸及牛磺酸。Oliva-Teles 等(1999)在大菱鲆幼鱼饲料中添加不同水平的 FPH，结果发现，FPH 不能提高其摄食率。Refstie 等(2004)在大西洋鲑(*Salmo salar*)饲料中添加不同水平的 FPH，发现摄食率随着 FPH 添加水平的升高而升高；本研究的摄食率随着 FPH 添加量的升高而升高，且 UF-20 显著高于其他 3 组(P<0.05)，表明 FPH 能提高大菱鲆幼鱼的摄食率，因此，各实验组之间的生长差异不是由于饲料的适口性造成的，与 Refstie 等(2004)结果相似。许多研究表明，在一定范围内添加 FPH 可以提高鱼类的生长性能和饲料利用，但高水平的添加会造成鱼类生长性能的下降(Hevrøy *et al*, 2005; Aksnes *et al*, 2006b; 柳旭东等; 2010; 许团辉等, 2012)。Espe 等(2012)在大西洋鲑高植物蛋白饲料中添加水解浓缩鱼蛋白(FPC)的研究表明，几组实验饲料氨基酸组成相似，添加 FPC 没有改变饲料氨基酸组成，随着 FPC 的增加生长呈下降趋势，可能原因是消耗相同的饲料时，添加高水平 FPC 跟低水平相比会消耗更多的能量在代谢上，所以生长积累就少，表现出生长性能下降，该研究结果跟本研究的生长结果相似。本研究中高水平添加组 UF-20 的增重率、特定生长率等生长指标显著低于 UF-0、UF-5、UF-10 组(P<0.05)，UF-20 组与 UF-0、UF-5、UF-10 组饲料氨基酸组成无显著差异(表 3)，说明高水平添加 FPH 抑制生长不是由于氨基酸不平衡造成的。Oliva-Teles 等(1999)在大菱鲆幼鱼饲料中添加不同水平 FPH，结果表明 FPH 对大菱鲆幼鱼的生长及饲料利用无促进作用，分析其原因可能是鱼粉含量较高，在这种高含量鱼粉基础饲料中加入 FPH，可能会掩盖 FPH 的作用，而本研究对照组的鱼粉含量只有 15%，UF-5、UF-10 及 UF-20 组分别只含有 11.5%、8%、1%的鱼粉，在低鱼粉含量条件下，UF-5、UF-10 与对照组的增重率、特定生长率之间无显著差异(P>0.05)，未对大菱鲆幼鱼的生长造成不利影响，可见在低鱼粉含量条件下 FPH 的作用不可忽视。因此，高植物蛋白饲料中适量添加低分子 FPH 可节约鱼粉的使用量，提高植物蛋白饲料的利用率，从而降低生产成本，提高生产效益。

3.2 低分子 FPH 对大菱鲆幼鱼鱼体组成的影响

低分子 FPH 影响了鱼类的鱼体成分(郑珂珂等, 2011; 卫育良等, 2014)，许团辉等(2012)在牙鲆饲料中添加不同水平低分子 FPH，发现添加 4.5% FPH 组(FPH_{11})显著提高了鱼体粗蛋白和粗脂肪含量，高水平 FPH 组(FPH_{26})粗蛋白含量最低。Zheng 等(2013)在高植物蛋白的大菱鲆饲料中分别添加 1.2%、3.7%的低分子水解鱼蛋白，发现水解鱼蛋白组提高了鱼体蛋白含量，且 3.7%组鱼体粗蛋白含量显著高于对照组。与许团辉等(2012)和 Zheng(2013)结果相似。本研究中 UF-5 和 UF-10 组的鱼体粗蛋白含量和粗脂肪含量显著高于对照组和 UF-20 组(表 6)，表明在大菱鲆幼鱼饲料中添加适量的低分子 FPH 可促进鱼体蛋白和脂肪的积累。

本研究通过对鱼体肌肉氨基酸分析，4 组实验鱼在测得的 16 种氨基酸中，除了精氨酸含量没有差异外，其他氨基酸都有差异(表 7)，表明添加 FPH 对实验鱼肌肉氨基酸组成有影响。Espe 等(1993、1999)发现，饲料中添加水解鱼蛋白使大西洋鲑血浆和肌肉中的氨基酸浓度增加。Hevrøy 等(2005)研究发现，添加不同水平的 FPH 对大西洋鲑鱼体肌肉氨基酸组成无显著影响。而本研究的 4 组鱼体肌肉中蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、组氨酸几种必需氨基酸的含量较高，且 UF-5 组肌肉中的苯丙氨酸、赖氨酸、组氨酸 3 种氨基酸含量、必需氨基酸含量及必需氨基酸与非必需氨基酸比值显著高于其他 3 组(P<0.05)，说明低水平 FPH 可以促进肌肉必需氨基酸的吸收积累，提高鱼体肌肉必需氨基酸的含量。

3.3 低分子 FPH 对大菱鲆幼鱼肝脏中 IGF-IR 基因表达的影响

类胰岛素生长因子受体是胰岛素生长因子家族中的一员，广泛存在于脊椎动物体内(Toyoshima *et al*,

2008; Laustsen *et al*, 2006)。关于虹鳟、大菱鲆(Elies *et al*, 1996)、斑马鱼(Ayaso *et al*, 2002)和牙鲆(Nakao *et al*, 2002)等的 IGF-IR 结构和生理功能的研究早有报道。IGF-IR 是一种跨膜酪氨酸激酶，通过促进细胞有丝分裂抑制细胞凋亡，促进胚胎、神经和骨骼的生长发育，对鱼类的生长和发育有重要的调节作用。IGF-IR 在 IGF 家族中发挥重要作用，IGF-IR 结合 IGF-I 以促进 IGF-I 跨血管壁运输(Chauvigne *et al*, 2003)，延长 IGF-I 在血液中的半衰期，提高 IGF-I 的促生长作用。IGF-IR mRNA 的表达受到营养、温度及应激等因素的影响(Chauvigne *et al*, 2003; 沈文英等, 2012; Montserrat *et al*, 2007)。Gabillard 等(2003)对虹鳟的研究表明，水温跟食物差异都会对虹鳟 IGF-IR mRNA 的表达进行调节。Valentinis 等(2001)研究发现，IGF-IR 的信号传递作用与胰岛素受体底物 1(Insulin receptor substrate 1, IRS-1)的浓度有关：IRS-1 浓度高时，IGF-IR 就会传递促有丝分裂、抗细胞凋亡的信号；浓度低时，IGF-IR 就会传递变异信号，导致造血细胞的粒系分化。本研究 UF-20 组肝脏中 IGF-IR mRNA 表达量显著高于对照组($P<0.05$)，但生长却显著低于对照组($P<0.05$)，可能与鱼体内的 IRS-1 浓度有关。同时，本研究 IGF-IR 的相对定量表达的结果与张俊玲等(2012)提出的 IGF-IR 的表达不一致，推断 IGF-IR 的高表达量是对体内 IGF-I 低表达量的一种补偿，从而使 IGF-I 保持组织敏感性和促生长活性，但仍需要进一步的实验来证明 IGF-IR 与 IGF-I 表达的关系。

4　结论

高植物蛋白饲料中添加低水平低分子 FPH(UF-5)可促进大菱鲆幼鱼的生长，提高饲料利用率，促进肌肉必需氨基酸的积累。添加高水平 FPH(UF-20)抑制其生长，添加低分子 FPH 可提高肝脏中 IGF-IR 基因的表达量。因此，大菱鲆幼鱼的高植物蛋白饲料中可适当添加低分子 FPH 以节约鱼粉使用量，提高植物蛋白的利用。

参　考　文　献

马爱军, 雷霁霖, 陈四清, 等. 大菱鲆营养需求与饲料研究进展. 海洋与湖沼, 2003, 34(4): 450–459

卫育良, 梁萌青, 郑珂珂, 等. 水解鱼蛋白对大菱鲆幼鱼消化率的影响. 水生生物学报, 2014, 38(5): 910–920

王长云, 林洪, 周东, 等. 从鳕鱼碎肉中提取水解蛋白. 海洋湖沼通报, 1995(4): 33–39

王新星, 孔凡华, 许团辉, 等. 水解鱼蛋白营养组成及评价. 渔业科学进展, 2011, 32(3): 104–110

庄平, 陈喜斌, 曾翠平, 等. 中华鲟幼鲟饲料中适宜动植物蛋白比的研究. 动物营养学报, 2002, 14(1): 61–64

许团辉, 高湘萍, 梁萌青, 等. 高植物蛋白饲料中以低分子水解蛋白替代鱼粉对牙鲆生长性能及非特异性免疫的影响. 渔业科学进展, 2012, 33(3): 60–69

沈文英, 任岗, 祝尧荣. 补偿生长对异育银鲫 IGF-1、IGFBP-1 水平及 IGF-1、IGF-1R mRNA 表达的影响. 动物学研究, 2012, 33(3): 298–303

张俊玲, 施志仪, 翟万营, 等. Western 印迹法检测 IGF-I 及其受体蛋白在牙鲆仔鱼变态中的表达. 上海海洋大学学报, 2012, 21(5): 679–683

周歧存, 麦康森, 刘永坚, 等. 动植物蛋白源替代鱼粉研究进展. 水产学报, 2005, 29(3): 404–410

郑珂珂, 梁萌青, 姚宏波, 等. 在高植物蛋白饲料中添加水解鱼蛋白对牙鲆幼鱼的影响. 水生生物学报, 2011, 35(5): 829–834

柳旭东, 梁萌青, 张利民, 等. 饲料中添加水解鱼蛋白对半滑舌鳎稚鱼生长及生理生化指标的影响. 水生生物学报, 2010, 34(2): 242–249

Aksnes A, Hope B, Høstmark Ø, *et al*. Inclusion of size fractionated fish hydrolysate in high plant protein diets for Atlantic cod, *Gadus morhua*. Aquaculture, 2006a, 261(3): 1102–1110

Aksnes A, Hope B, Jönsson E, *et al*. Size-fractionated fish hydrolysate as feed ingredient for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed high plant protein diets. I: Growth, growth regulation and feed utilization. Aquaculture, 2006b, 261(1): 305–317

Ayaso E, Nolan CM, Byrnes L. Zebrafish insulin-like growth factor-I receptor: molecular cloning and developmental expression. Mol Cell Endocrinol, 2002, 191(2): 137–148

Bromley PJ. The effect of dietary water content and feeding rate on the growth and food conversion efficiency of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Aquaculture, 1980, 20(2): 91–99

Bui HTD, Khosravi S, Fournier V, *et al*. Growth performance, feed utilization, innate immunity, digestibility and disease resistance of juvenile red seabream *(Pagrus major*) fed diets supplemented with protein hydrolysates. Aquaculture, 2014, 418: 11–16

Bureau DP, Harris AM, Cho CY. The effects of purified alcohol extracts from soy products on feed intake and growth of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and rainbow trout (*Oncorhychus mykiss*). Aquaculture, 1998, 161(1–4): 27–43

Chauvigne F, Gabillard JC, Weil C, *et al*. Effect of refeeding on IGF I, IGF II, IGF receptors, FGF2, FGF6, and myostatin mRNA expression in rainbow trout myotomal muscle. Gen Comp Endocr, 2003, 132(2): 209–215

Elies G, Groigno L, Wolff J, *et al*. Characterization of the insulin-like growth factor type 1 receptor messenger in two

teleost species. Mol Cell Endocrinol, 1996, 124(1): 131–140

El-Saidy DMSD, MMA Gaber. Replacement of fish meal with a mixture of different plant protein sources in juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) diets. Aquac Res, 2003, 34(13): 1119–1127

Espe M, Lieda E, Torrissen KR. Changes in plasma and muscle free amino acids in Atlantic salmon (*Salmo salar*) during absorption of diets containing different amounts of hydrolyzed cod muscle protein. Comp Biochem Phys A. 1993, 105(3): 555–562

Espe M, Ruohonen K, El-Mowafi A. Hydrolysed fish protein concentrate (FPC) reduces viscera mass in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed plant-protein-based diets. Aquacult Nutr, 2012, 18(6): 599–609

Espe M, Sveier H, Hogoy I, *et al*. Nutrient absorption and growth of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed fish protein concentrate. Aquaculture, 1999, 174(1–2): 119–137

Francis G, Makkar HPS, Becker K. Antinutritional factors present in plant derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. Aquaculture, 2001, 199(3–4): 197–227

Gabillard JC, Weil C, Rescan PY, *et al*. Effects of environmental temperature on IGF1, IGF2, and IGF type I receptor expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Gen Comp Endocr, 2003, 133(2): 233–242

Gomes EF, Rema P, Kaushik SJ. Replacement of fish meal by plant proteins in the diets of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): digestibility and growth performance. Aquaculture, 1995, 130(2–3): 177–186

Hevrøy EM, Espe M, Waagbø R, *et al*. Nutrient utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed increased levels of fish protein hydrolysate during a period of fast growth. Aquacult Nutr, 2005, 11(4): 301–313

Kaushik SJ. Whole body amino acid composition of European seabass (*Dicentrarchus labrax*), gilthead seabream (*Sparus aurata*) and turbot (*Psetta maxima*) with an estimation of their IAA requirement profiles. Aquat Living Resour, 1998, 11(5): 355–358

Kotzamanis YP, Gisbert E, Gatesoupe FJ, *et al*. Effects of different dietary levels of fish protein hydrolysates on growth, digestive enzymes, gut microbiota, and resistance to *Vibrio anguillarum* in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Comp Biochem Physiol Part A: Mol Int Physiol, 2007, 147(1): 205–214

Laustsen PG, Russell SJ, Cui L, *et al*. Essential role of insulin and insulin-like growth factor 1 receptor signaling in car diac development and function. Mol Cell Biol, 2006, 27(5): 1649–1664

Liaset B, Espe M. Nutritional composition of soluble and insoluble fractions obtained by enzymatic hydrolysis of fish-raw materials. Process Biochem, 2008, 43(1): 42–48

Liaset B, Lied E, Espe M. Enzymatic hydrolysis of by-products from the fish-filleting industry; chemical characterisation and nutritional evaluation. J Sci Food Agr, 2000, 80(5): 581–589

Montserrat N, Gómez-Requeni P, Bellini G, *et al*. Distinct role of insulin and IGF-I and its receptors in white skeletal muscle during the compensatory growth of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Aquaculture, 2007, 267(1): 188–198

Nakao N, Tanaka M, Higashimoto Y, *et al*. Molecular cloning, identification and characterization of four distinct receptor subtypes for insulin and IGF-I in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. J Endocrinol, 2002, 173(2): 365–375

Oliva-Teles A, Cerqueira AL, Gonçalves P. The utilization of diets containing high levels of fish protein hydrolysate by turbot (*Scophthalmus maximus*) juveniles. Aquaculture, 1999, 179(1): 195–201

Refstie S, Olli JJ, Standal H. Feed intake, growth, and protein utilization by post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*) in response to graded levels of fish protein hydrolysate in the diet. Aquaculture, 2004, 239(1–4): 331–349

Toyoshima Y, Monson C, Duan C, *et al*. The role of insulin receptor signaling in zebrafish embryogenesis. Endocrinology, 2008, 149(12): 5996–6005

Valentinis B, Baserga R. IGF-I receptor signalling in transformation and differentiation. Mol Pathol, 2001, 54(3): 133–137

Zheng KK, Liang MQ, Yao HB, *et al*. Effect of dietary fish protein hydrolysate on growth, feed utilization and IGF-I levels of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Aquacult Nutr, 2012, 18(3): 297–303

Zheng KK, Liang MQ, Yao HB, *et al*. Effect of size-fractionated fish protein hydrolysate on growth and feed utilization of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Aquac Res, 2013, 44(6): 895–902

(编辑 冯小花)

Effects of Small Molecule Weight Fish Protein Hydrolysate in High Plant Protein Diets on the Expression of Liver IGF-I Receptor and the Growth of Juvenile Turbot (*Scophthalmus maximus* L.)

MU Yuchao[1,2], LIANG Mengqing[1,3①], ZHENG Keke[1], WEI Yuliang[1]

(1. *Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao* 266071; 2. *College of Fisheries and Life Science, Shanghai 0cean University, Shanghai* 201306; 3. *Function Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao* 266071)

Abstract This experiment was conducted to investigate the effects of small molecule weight fish protein hydrolysate on the growth performance and the expression of insulin-like growth factor I receptor (IGF-IR) mRNA in the liver of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Four isonitrogenous and isoenergetic diets were formulated and fed to fish with initial weight of (4.16±0.01) g. In the experimental diets, fish meal was replaced with fish protein hydrolysate by 0% (UF-0), 5% (UF-5), 10% (UF-10), and 20% (UF-20) of total dietary protein, respectively. The experiment lasted 12 weeks. The results showed that there were no significant differences in the weight gain rate and specific growth rate among groups UF-0, UF-5 and UF-10 (P>0.05), but these groups showed higher values than group UF-20 (P<0.05). UF-0 and UF-5 showed similar feeding rate (P>0.05), which was significantly lower than that of UF-10 and UF-20 (P<0.05). The feed efficiency, protein efficiency, and protein retention effiency of UF-0 and UF-5 were significantly higher than those of UF-10 and UF-20 (P<0.05), and the parameter values of UF-10 were significantly higher than those of UF-20 (P<0.05). There were no differences in the contents of crude protein and crude lipid among groups UF-0, UF-5 and UF-10 (P>0.05), but the values in these groups were higher than those of UF-20 (P<0.05). The content of essential amino acids in the muscle and the ratio of essential amino acids to non-essential amino acids in group UF-5 was higher than those of other groups (P<0.05). It was also found that the expression of insulin-like growth factor I receptor (IGF-IR) mRNA in the liver increased with increasing levels of dietary fish protein hydrolysate, and it was higher in UF-20 compared to other three groups (P<0.05). These results indicated that low level of small molecule weight fish protein hydrolysate could improve the growth and feed utilization of juvenile turbot. However, higher level may restrain the growth. Furthermore, dietary fish protein hydrolysate could improve the expression of IGF-IR mRNA in the liver of juvenile turbot.

Key words Fish protein hydrolysate; Plant protein; Turbot; Growth; IGF-IR

① Corresponding author: LIANG Mengqing, E-mail: liangmq@ysfri.ac.cn

DOI: 10.11758/yykxjz.20151125002 http://www.yykxjz.cn/

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)微卫星多重 PCR 体系的建立及其在家系亲权鉴定中的应用*

李东宇[1,2,3] 孔 杰[1,2,3①] 孟宪红[2,3] 栾 生[2,3]
罗 坤[2,3] 卢 霞[2,3] 曹宝祥[2,3]

(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. 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)

摘要 为了在遗传分析研究中提高效率并节约成本，本研究从已报道的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)微卫星位点中选取多态性较高的位点，基于各位点的扩增片段大小及退火温度等因素进行微卫星位点的组合。通过不断优化位点组合、反应体系及反应程序，成功建立了 1 个五重、2 个四重和 1 个三重 PCR 反应体系，并将其应用于 11 个凡纳滨对虾家系的亲权鉴定。结果显示，四组多重 PCR 体系中的 16 个微卫星位点在 11 个凡纳滨对虾家系中的平均等位基因数(N_a)为 6，平均多态信息含量(PIC)为 0.5813，平均观测杂合度(H_o)为 0.513，平均期望杂合度(H_e)为 0.636。利用 Cervus3.0 软件，对已知系谱关系的 11 个凡纳滨对虾家系进行亲权分析，其第一亲本累积排除率(CE-1P)、第二亲本累积排除率(CE-2P)和双亲累积排除率(CE-PP)分别为 0.99525487、0.99990862 和 0.99999986。进一步分析表明，当同时使用四组多重 PCR 体系进行亲权分析时，其模拟配对率和亲权鉴定准确率均为 100%，全同胞和半同胞家系鉴别效果良好，表现出准确的鉴别能力。本研究所建立的四组凡纳滨对虾微卫星多重 PCR 体系均可为后续的凡纳滨对虾遗传多样性分析和亲权鉴定提供高效、准确的检测手段。

关键词 凡纳滨对虾；微卫星多重 PCR；亲权鉴定
中图分类号 Q341 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)03-0058-10

凡纳滨对虾(Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*),又名南美白对虾,隶属于节肢动物门(Arthropoda)、甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda)、游泳亚目(Natantia)、对虾科(Penaeidae)、滨对虾属(*Litopenaeus*)，是世界重要的对虾类养殖品种之一(张伟权, 1990)。凡纳滨对虾适应性广泛、对不良环境抗逆性强、生长速度快、肉质鲜美，深受人们的喜爱，有着十分广阔的市场前景(王兴强等, 2004)。

为了促进我国凡纳滨对虾产业的进一步发展，培育具有优良经济性状的优质苗种已经成为凡纳滨对虾育种领域的重要目标。然而，由于我国不是凡纳滨对虾的原产地，需从国外引进种源，引进的亲本群体的遗传信息未知，种群间个体内的亲缘关系远近未知，如果盲目的进行选育，容易造成严重的近交衰退(张凯, 2013[1)]; Luo *et al*, 2014)。近交衰退的危害在于，不但会降低已经改良性状的性能，同样会引起其他性

* 泰山学者种业计划专家良种工程项目、农业部 948 项目(2015-Z17)和青岛市科技成果转化引导计划(14-2-4-52-jch)共同资助。李东宇，E-mail: 1138854187@qq.com
① 通讯作者：孔 杰，研究员，E-mail: kongjie@ ysfri.ac.cn
收稿日期: 2015-11-25，收修改稿日期: 2016-01-14
1) 张凯. 凡纳滨对虾引进群体分子系谱构建及中国对虾分子标志家系放流效果评估.中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2013, 8–9

状退化。如存活率和繁殖力降低等现象，从而最终导致育种工作功亏一篑(孔杰等, 2009)。所以，为了选育工作能够长久的进行下去，必须对选育群体进行亲权鉴定，明确亲缘关系。

在家系选育过程中，建立完整、准确的系谱信息，可以明确各家系间的亲缘关系远近(苗贵东等, 2011)。目前，系谱信息的构建主要通过对个体采用荧光标记来实现，但是荧光标记易脱落、难弥补、可持续时间短、对幼体无法标记，这些缺点会对系谱信息的准确率产生影响(张涛等, 2010)。随着分子标记的发展，微卫星标记以其分布广、多态性高、重复性和稳定性好、共显性等优点，被应用于家系识别和亲缘关系的分析中，可以很好的解决物理标记的缺点，提高亲权分析的效率和准确率。

微卫星多重 PCR (Multiplex PCR)是指在 1 个 PCR 反应体系中，同时进行多个微卫星位点的特异扩增，产生出多个 PCR 扩增产物(张博等, 2012)。利用微卫星多重 PCR 技术进行水产动物的亲权分析，可以极大地提高基因分型的效率并节约成本。目前，在许多水产动物中都有相关的研究报道，如大菱鲆(*Scophthalmus maximus*) (苗贵东等, 2011)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*) (李佳凯等, 2014)、中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) (李伟亚等, 2012)、斑节对虾(*Penaeus monodon*) (Li *et al*, 2007)、皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai* Ino) (聂洪涛等, 2013)、美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*) (Wang *et al*, 2010)等。

虽然关于应用微卫星分子标记对凡纳滨对虾进行家系识别(王鸿霞等, 2006)、群体遗传多样性分析(Zhang *et al*, 2014)、亲缘关系分析(王霞, 2009)[1)]等方面的研究已有不少，然而这些研究均局限于单个位点，有关凡纳滨对虾微卫星多重 PCR 的研究鲜有报道。本研究利用已报道的凡纳滨对虾微卫星位点，建立了 1 个五重 PCR，2 个四重 PCR 和 1 个三重 PCR 反应体系，并将其应用于凡纳滨对虾家系亲权鉴定中，旨在为凡纳滨对虾家系选育、亲权鉴定和遗传多样性分析等方面的研究提供高效、准确的检测手段。

1　材料与方法

1.1　实验材料

实验所用材料来自于 2013 年中国水产科学研究院黄海水产研究所农业部海水遗传育种中心构建的 75 个物理系谱已知的凡纳滨对虾家系。从中选取 11 个家系，其中，2 个家系为父系半同胞家系，2 个家系为母系半同胞家系，其余家系为全同胞家系。每个家系随机选取 10–20 尾个体，加上每个家系对应的亲本，共计 211 个样品。对样品进行肌肉组织取样，并保存在−80℃冰箱中备用。

1.2　实验方法

1.2.1　*凡纳滨对虾基因组 DNA 的提取与检测*　参照王伟继(2008)[2)]的方法提取凡纳滨对虾基因组 DNA。用 0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性。用超微量紫外分光光度计对 DNA 进行定量检测，检测浓度和吸光值(260 nm/280 nm，最佳范围在 1.8–2.0)，定量后将 DNA 溶液稀释至 50 ng/μl，–20℃冷冻保存备用。

1.2.2　*凡纳滨对虾微卫星引物的筛选及多重 PCR 体系的优化*　本研究从 Meehan 等(2003)、Zhang 等(2007)、Alcivar-Warren 等(2007)、Garcia 等(2007)和于洋(2014)[3)]等研究中公布的微卫星数据中筛选多态性微卫星位点。根据每个微卫星位点扩增片段长度的差异性和退火温度进行多重 PCR 位点组合，同时利用 MPEprimers 软件(申志勇, 2009[4)]; 王稳等, 2010)检测筛选好的多重 PCR 组合反应体系中的引物是否会产生错配、引物二聚体和发卡结构，去除或替换影响整个体系稳定性的引物对。通过优化多重 PCR 反应体系中各引物浓度、退火温度、循环次数以及反应体系中各成分的浓度，达到多重 PCR 体系的最佳扩增效果。

1.2.3　*荧光标记修饰及基因分型*　本研究采用 4 种不同的荧光标记来修饰引物，分别是 6-FAM、ROX、HEX、TAMRA，保持每个多重 PCR 组合中扩增片段大小相邻的位点引物修饰的荧光种类不同。利

1) 王霞. 微卫星分型技术用于凡纳滨对虾遗传多样性和亲缘关系分析. 西北农林科技大学硕士研究生学位论文, 2009, 35–40

2) 王伟继. Ⅰ中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)AFLP 分子标记遗传连锁图谱的构建以及相关性状的 QTL 定位分析 Ⅱ蓝鳃太阳鱼(*Lepomis macrochirus*)AFLP 分子标记遗传连锁图谱的构建及性别决定机制初探. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2008, 19–20

3) 于洋. 凡纳滨对虾分子标记的开发及其在遗传育种中的应用.中国科学院研究生院(海洋研究所)博士研究生学位论文, 2014, 49–57

4) 申志勇. PCR 引物特异性评估体系及多重 PCR 引物设计系统的构建与应用. 中国人民解放军军事医学科学院硕士研究生学位论文, 2009, 23–37

用 ABI3130xl 测序仪对 PCR 产物进行基因分型。荧光引物合成由金唯智生物技术公司完成。

1.3 数据分析

利用 GeneMapper4.0 软件进行基因分型数据分析。利用 Cervus3.0 软件对基因型数据进行亲权分析，主要分析内容包括等位基因数(N_a)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)和多态信息含量(PIC)，计算微卫星累积排除概率以及哈迪-温伯格(Hardy-Weinberg)平衡，模拟家系配对率，最后进行家系鉴定，根据已知的亲缘关系估计亲权鉴定准确率。

2 结果与分析

2.1 凡纳滨对虾多重 PCR 反应体系的构建及产物的基因分型

本研究从已报道的凡纳滨对虾微卫星位点中，选取多态性较高的位点，通过不断进行位点组合和优化反应条件，最终构建出 1 个五重 PCR 反应体系，2 个四重 PCR 反应体系和 1 个三重 PCR 反应体系。四组多重 PCR 体系中 16 个微卫星位点的信息及修饰荧光种类见表 1。四组凡纳滨对虾多重 PCR 的反应体系和反应程序见表 2。

表 1 凡纳滨对虾微卫星多重 PCR 位点信息及其修饰荧光种类

Tab.1 The information and the fluorescence labeling of microsatellite multiplex PCR for *L. vannamei*

组别 Groups	位点名称 Loci	扩增片段大小 Amplified fragment size (bp)	最佳退火温度 Annealing temperature (℃)	引物序列(5'–3')及荧光类型 Primer sequences (5' to 3') and the fluorescence labeling of primers
五重 PCR Multiplex PCR of 5 loci	TM6	93–96	60	F：6-FAM-TGGAGATTTCGGAACCTTTG R：CTGCTGGAGCACCAAAATCT
	TUMXLv3.1	135–153	58	F：ROX-TAAAACCGAAAGACAATGGCG R：CTGACATTGCGTTATGATTGG
	TUMXLv7.121	194–244	58	F：HEX-GGCACACTGTTTAGTCCTCG R：CGAACAGAATGGCAGAGGAG
	TUMXLv9.90	282–298	58	F：TAMRA-GACCAAAGGATATTGGCTCG R：GTAATCAGGAGATGGTCCGC
	1103	376–391	55	F：6-FAM-GGCTGTGTTTGCGGTGTAGTTT R：TCATACGATAATGGCATAGAAGG
四重 PCR 1 Multiplex PCR 1 of 4 loci	TUMXLv10.117	101–118	58	F：6-FAM-CTCCAGGACCGATAATGAGG R：CGACAGTCAAAACAAACATCC
	TUMXLv9.103	199–393	58	F：ROX-CACCAAAACGAACGAAACG R：GGATAAAAACGAATTGTATACCG
	TUMXLv10.14	208–263	55	F：HEX-CAGTCTACACGCACAGGCAC R：TTATACGGCGGTTCTCTTGG
	10749	354–416	55	F：TAMRA-GAATACGTAGCGGAGATCCCA R：TAATGCAGCGATGCGATT
四重 PCR 2 Multiplex PCR 2 of 4 loci	Lv12	125–134	55	F：6-FAM-GATCATTCGCCCCTCTTTTT R：ATCTACGGTTCGAGAGCAGA
	Lv14	177–191	55	F：ROX-TATGCTCGTTCCCTTTGCTT R：TTGAAGGAAAAGTGTTGGGG
	TUMXLv10.33	252–324	56	F：HEX-CGAAGAGATTTATCCAGGG R：CGTGCATTATTATCCTTTCC
	10592b	372–393	55	F：TAMRA-AAAGACACTTACTAAACAGTCGAT R：CGTCTCGTTGTTGAGTTATAAACA
三重 PCR Multiplex PCR of 3 loci	TUMXLv8.256	150–163	55	F：6-FAM-GGACTCACACTTCTGGTTC R：GGCTGCACCTTGTAAGTC
	TUMXLv8.220	210–458	58	F：HEX-GATGTGGTTGATGAAGTGATG R：CGCATTATCTAAATGGCAAG
	TUMXLv7.56	311–490	62	F：TAMRA-CCATGGCTTTCCTCTTCTTTC R：AGGTAGGGAAGTCGTGAGGG

表 2　凡纳滨对虾微卫星多重 PCR 反应体系和程序

Tab.2　The multiplex PCR systems and corresponding programs for *L. vannamei*

组别 Groups	成分 Ingredient	体积 Volume (μl)	程序 Program	
五重 PCR	DNA 模板(50 ng/μl)	2	94℃ 5 min	
Multiplex PCR of 5 loci	10×*Taq* Buffer	2.8	94℃ 30 s	
			58℃ (每循环降 1℃) 40 s	8 r
	Mg^{2+} (25 mM each)	2.8	72℃ 1 min	
	dNTP (2 mM each)	2.8	94℃ 30 s	
	TM6 (10μM)	0.2	55℃ 40 s	15 r
	TUMXLv3.1 (10μM)	0.25	72℃ 1 min	
	TUMXLv7.121 (10μM)	0.25	94℃ 30 s	
	TUMXLv9.90 (10μM)	0.3	50℃ 40 s	15 r
	1103 (10μM)	0.3	72℃ 1 min	
	Taq 酶(2.5 U/μl)	0.3	72℃ 5 min	
	ddH_2O	11.7	4℃ Hold	
四重 PCR 1	DNA 模板(50 ng/μl)	2	94℃ 5 min	
Multiplex PCR 1 of 4 loci	10×*Taq* Buffer	2.8	94℃ 40 s	
			62℃ (每循环降 0.5℃) 1 min	10 r
			72℃ 1 min	
	Mg^{2+} (25 mM each)	2.8	94℃ 40 s	
	dNTP (2 mM each)	2.8	58℃ 1 min	15 r
	TUMXLv10.117 (10μM)	0.2	72℃ 1 min	
	TUMXLv9.103 (10μM)	0.25	94℃ 40 s	
	TUMXLv10.14 (10μM)	0.25	55℃ 1 min	15 r
	10749 (10μM)	0.3	72℃ 1 min	
	Taq 酶(2.5 U/μl)	0.3	72℃ 5 min	
	ddH_2O	12.3	4℃ Hold	
四重 PCR 2	DNA 模板(50 ng/μl)	2 μl	94℃ 5 min	
Multiplex PCR 2 of 4 loci	10×*Taq* Buffer	2.8	94℃ 40 s	
			60℃ (每循环降 1℃) 1 min	10 r
	Mg^{2+} (25 mM each)	2.8	72℃ 1 min	
	dNTP (2 mM each)	2.8	94℃ 40 s	
	Lv12 (10μM)	0.2	55℃ 1 min	30 r
	Lv14 (10μM)	0.25	72℃ 1 min	
	TUMXLv10.33 (10μM)	0.25	72℃ 5 min	
	10592b (10μM)	0.3	4℃ Hold	
	Taq 酶(2.5 U/μl)	0.3		
	ddH_2O	12.3		
三重 PCR	DNA 模板(50 ng/μl)	2	94℃ 5 min	
Multiplex PCR of 3 loci	10×*Taq* Buffer	2.5	94℃ 40 s	
			62℃ (每循环降 0.5℃) 1 min	10 r
	Mg^{2+} (25 mM each)	2.5	72℃ 1 min	
	dNTP (2 mM each)	2.5	94℃ 40 s	
	TUMXLv8.256 (10μM)	0.2	58℃ 1 min	15 r
	TUMXLv8.220 (10μM)	0.25	72℃ 1 min	
	TUMXLv7.56 (10μM)	0.3	94℃ 40 s	
	Taq 酶(2.5 U/μl)	0.3	55℃ 1 min	15r
	ddH_2O	13.7	72℃ 1 min	
			72℃ 5 min	
			4℃ Hold	

基因分型结果显示，四组凡纳滨对虾微卫星多重 PCR 反应体系均可以获得较好的扩增效果。其中，五重 PCR、四重 PCR 1 和四重 PCR 2 的基因分型峰值分别见图 1、图 2 和图 3。

2.2 微卫星位点多态性分析

四组多重 PCR 体系的 16 个微卫星位点在 211 个凡纳滨对虾实验样品中获得等位基因数为 2–12，平均等位基因数(N_a)为 6，平均多态信息含量(PIC)为 0.581，平均观测杂合度(H_o)为 0.513，平均期望杂合度(H_e)为 0.636。除位点 TM6 和 TUMXLv10.117 观测杂合度略高于期望杂合度外，其余位点观测杂合度均低于期望杂合度，表现为杂合子的缺失。对 16 个微卫星位点进行 Hardy-Weinberg 平衡检验，结果显示，有 7 个位点偏离不显著(P>0.05)，9 个位点极显著偏离(P<0.001)。16 个微卫星位点在凡纳滨对虾 11 个家系中参数信息见表 3。

2.3 凡纳滨对虾家系亲权分析

2.3.1 亲权排除率分析 利用四组微卫星多重 PCR 体系进行家系的亲权分析，当双亲基因型未知情况下，单亲本排除率(E–1P)在 0.046–0.614 之间，平均值为 0.264；当只有一个亲本已知，另一亲本的排除率(E–2P)在 0.130–0.763 之间，平均值为 0.408；当双亲基因型已知时，双亲排除率(E–PP)处在 0.213–0.913 之间，平均值为 0.565。16 个微卫星位点的排除率见表 4。

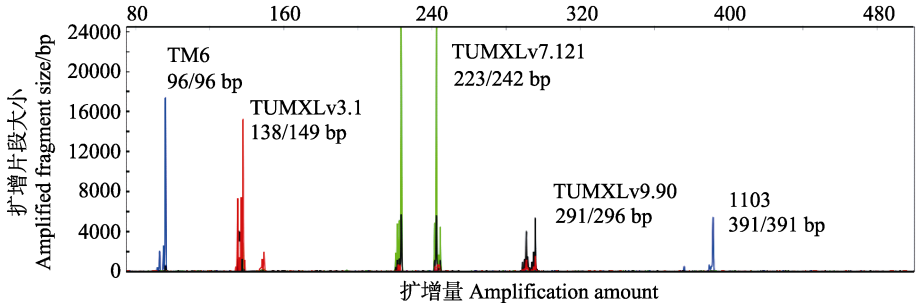

图 1 凡纳滨对虾五重 PCR 经 ABI 3130xl 测序仪分型结果

Fig.1 The genotyping of multiplex PCR of 5 loci for *L. vannamei* using ABI 3130xl platform

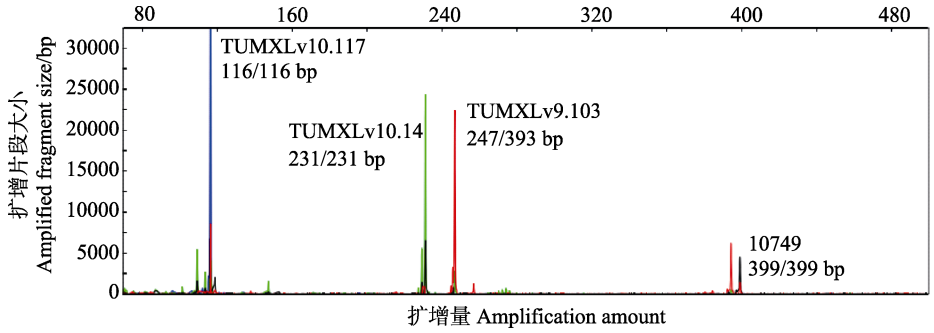

图 2 凡纳滨对虾四重 PCR 1 经 ABI 3130xl 测序仪分型结果

Fig.2 The genotyping of multiplex PCR 1 of 4 loci for *L. vannamei* using ABI 3130xl platform

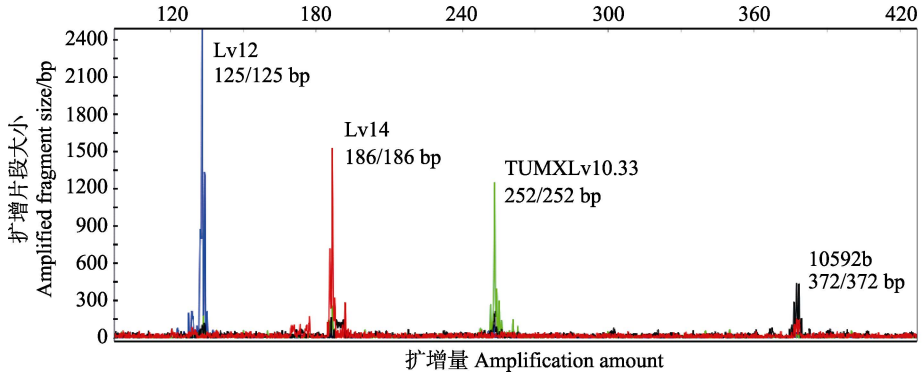

图 3 凡纳滨对虾四重 PCR 2 经 ABI 3130xl 测序仪分型结果

Fig.3 The genotyping of multiplex PCR 2 of 4 loci for *L. vannamei* using ABI 3130xl platform

表 3　16 个微卫星在 11 个凡纳滨对虾家系中的参数信息

Tab.3　The information of 16 loci in 11 families of *L. vannamei*

组别 Groups	微卫星位点 Loci	等位基因数 N_a	观测杂合度 *HObs*	期望杂合度 *HExp*	多态信息含量 PIC	哈迪温伯格平衡 HW	无效等位基因频率 NuLL
五重 PCR Multiplex PCR of 5 loci	TM6	2	0.640	0.498	0.373	***	–0.1263
	TUMXLv3.1	4	0.403	0.607	0.526	***	0.2096
	TUMXLv7.121	5	0.621	0.624	0.557	***	–0.0194
	TUMXLv9.90	6	0.631	0.694	0.640	NS	0.0534
	1103	3	0.384	0.449	0.350	NS	0.0785
四重 PCR 1 Multiplex PCR 1 of 4 loci	TUMXLv10.117	3	0.305	0.304	0.259	NS	–0.0033
	TUMXLv9.103	9	0.628	0.834	0.813	***	0.1395
	TUMXLv10.14	12	0.781	0.813	0.790	NS	0.0195
	10749	6	0.367	0.567	0.540	***	0.2198
四重 PCR 2 Multiplex PCR 2 of 4 loci	Lv12	5	0.384	0.601	0.548	***	0.2371
	Lv14	5	0.621	0.638	0.575	NS	0.0016
	TUMXLv10.33	4	0.517	0.640	0.571	***	0.1089
	10592b	7	0.227	0.634	0.582	***	0.4805
三重 PCR Multiplex PCR of 3 loci	TUMXLv8.256	5	0.422	0.579	0.512	NS	0.0509
	TUMXLv8.220	12	0.472	0.818	0.795	***	0.2698
	TUMXLv7.56	10	0.807	0.885	0.871	NS	0.0433
平均 Average	—	6	0.513	0.636	0.581	—	—

NS：不显著偏离；***：极显著偏离

NS meant no significant deviation; *** meant highly significant deviation (P<0.001)

表 4　16 个微卫星位点的排除率

Tab.4　The exclusion probability for 16 microsatellite loci

组别 Groups	微卫星位点 Loci	第一亲本排除率 E–1P	第二亲本排除率 E–2P	双亲排除率 E–PP
五重 PCR	TM6	0.123	0.187	0.280
Multiplex PCR of 5 loci	TUMXLv3.1	0.192	0.325	0.478
	TUMXLv7.121	0.208	0.358	0.523
	TUMXLv9.90	0.278	0.445	0.627
	1103	0.100	0.176	0.269
四重 PCR1	TUMXLv10.117	0.046	0.130	0.213
Multiplex PCR1 of 4 loci	TUMXLv9.103	0.503	0.674	0.851
	TUMXLv10.14	0.467	0.643	0.829
	10749	0.188	0.367	0.568
四重 PCR2	Lv12	0.195	0.355	0.528
Multiplex PCR2 of 4 loci	Lv14	0.218	0.374	0.542
	TUMXLv10.33	0.218	0.368	0.533
	10592b	0.226	0.391	0.572
三重 PCR	TUMXLv8.256	0.172	0.315	0.470
Multiplex PCR of 3 loci	TUMXLv8.220	0.480	0.651	0.836
	TUMXLv7.56	0.614	0.763	0.913
平均 Average	—	0.264	0.408	0.565

2.3.2 *微卫星多重 PCR 组合与累积排除率及模拟配对率分析* 利用 Cervus3.0 软件中模拟分析模块(Simulation of parentage analysis)来进行微卫星多重 PCR 组合与累积排除率和模拟配对率之间关系的分析。模拟分析相关参数为：置信度为 95%，子代样本数为 10000 个，基因分型错误率为 1%，真实亲本采样率为 1。分析结果显示，五重 PCR 双亲累积排除率为 95.11%，四重 PCR 1 和四重 PCR 2 双亲累积排除率分别为 99.13%、95.70%，三重 PCR 双亲累积排除率为 99.24%。四组多重 PCR 组合可以达到 100%的模拟配对率，其 16 个微卫星位点第一亲本累积排除率(CE-1P)为 0.99525487，第二亲本累积排除率(CE-2P)为 0.99990862，双亲累积排除率(CE-PP)为 0.99999986。四组多重 PCR 的累积排除概率及模拟配对率见表 5。

表 5 四组多重 PCR 的累积排除概率和模拟配对率

Tab.5 Combined exclusion probability and simulated assignment rate of four multiplex PCR system

组别 Groups	第一亲本累积排除率 CE−1P	第二亲本累积排除率 CE−2P	双亲累积排除率 CE−PP	模拟配对率 Simulated assignment rate (%)
五重 PCR Multiplex PCR of 5 loci	0.63549976	0.83873049	0.95113086	22
四重 PCR1 Multiplex PCR1 of 4 loci	0.79481014	0.93581102	0.99135259	35
四重 PCR2 Multiplex PCR2 of 4 loci	0.61874957	0.84440207	0.95695493	26
三重 PCR Multiplex PCR of 3 loci	0.83358814	0.94326594	0.99238194	18
总体 Total	0.99525487	0.99990862	0.99999986	100

2.3.3 *微卫星多重 PCR 组合的亲权鉴定准确率分析* 在亲本总数为 20 个，置信度为 95%的情况下，实验验证了四组微卫星多重 PCR 体系亲权鉴定的准确率。从图 4 可以看出，随着不断累加多重 PCR 体系，其亲权鉴定准确率逐渐提高。当同时使用四组多重 PCR 体系进行亲权分析时，无论亲本性别是否已知，其亲权鉴定准确率均为 100%。半同胞和全同胞家系均鉴别效果良好，验证结果与模拟结果基本吻合，说明亲权分析的结果具有较高的准确度和可信度。

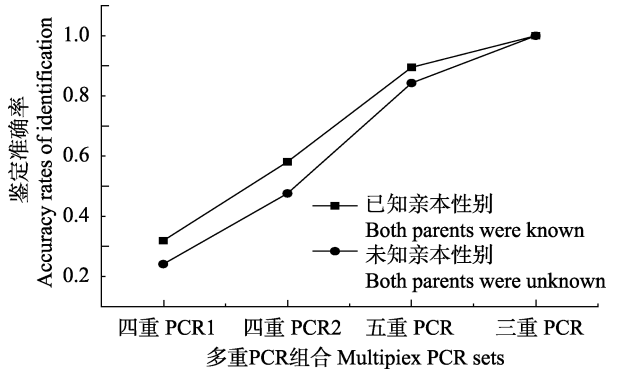

图 4 微卫星多重 PCR 组合的亲权鉴定准确率

Fig.4 The accuracy rates of parentage identification for different multiplex PCR sets

3 讨论

3.1 凡纳滨对虾微卫星多重 PCR 体系的构建

微卫星多重 PCR 即在 1 次 PCR 反应中，可以同时进行多个位点的特异扩增，技术难度较大。理想的多重 PCR 体系的构建，需要从位点选择、引物组合、反应条件优化等多方面进行全面的分析和反复的试验。本实验在构建凡纳滨对虾微卫星多重 PCR 体系时发现，微卫星位点选择和引物组合是影响多重 PCR 构建成功与否的主要因素之一。这与张毅等(2008)的研究结果相一致。要在同一 PCR 反应中得到多个扩增片段产物，首先，每个位点的扩增片段长度必须有所差异。罗伟等(2013)认为多个位点的产物大小两两之间的差异应大于 20 bp。在本研究中，相邻位点之间扩增片段长度相差不小于 30 bp，使相邻位点间的荧光信号不会相互干扰，从而不会对基因分型结果产生影响。其次，同一位点上下游引物间，不同位点的引物之间不能形成错配、二聚体及发卡结构。本研究利用多重 PCR 引物设计软件 MPEprimers 对多重 PCR 组合中的引物进行二聚体结构检测，排除影响多重 PCR 体系稳定的引物对。在引物组合过程中，很少有引物之间完全没有影响。在这种情况下，可以挑选二聚体结构不稳定的引物组合，来尝试构架多重 PCR 体系。

在确定多重 PCR 组合后，对多重 PCR 的反应条件进行优化是必不可少的。任宪云等(2011)研究结果显示，对于多重 PCR 的成功扩增，退火温度、$MgCl_2$ 浓度、引物相对浓度等参数是关键影响因素。多重 PCR 反应要求每个位点的引物扩增效率要尽量一致。否则，扩增效率高的引物会抑制其他引物，造成多重 PCR 构建失败。调整各引物间的浓度比例，是使各引

物达到相同扩增效率的主要方法。各引物间的浓度比例，需要反复的实验才能确定。本研究首先以相同的引物浓度来进行多重 PCR 的扩增，再通过条带的明亮度来判断每个引物的扩增效率，适当地增加扩增效率低的引物浓度和降低扩增效率高的引物浓度，使每个引物扩增效率相近。另外，引物的总体浓度过高会大幅度增加形成引物二聚体的可能，严重影响多重 PCR 的扩增效果，要注意控制引物总体浓度。

引物的退火温度是影响多重 PCR 扩增效果的主要因素之一。Kong 等(2006)研究表明，多重 PCR 各引物退火温度最好相近，相差不超过 5℃。作者认为大多数情况下，引物的退火温度是一个温度范围，在此范围内，引物均可有效扩增。所以，本研究在优化多重 PCR 体系的最佳退火温度时，利用 Touch down 程序，从 1 个较高的退火温度开始，每 1 个循环降低一定的温度，这样可以覆盖一定范围的温度值，使每对引物都能达到期望的退火值，往往能获得较好的扩增效果，这与 Markoulatos 等(2000)的研究结果相符。

Markoulatos 等(2000)的研究还表明，在聚合酶反应过程中，Mg^{2+}的浓度会影响 PCR 扩增的效果。Mg^{2+}浓度过大，会造成非特异性扩增；浓度过小，会减少 PCR 产物量。本研究在多重 PCR 体系其他组分浓度不变的前提下，针对 Mg^{2+}设计了一系列浓度梯度，通过正交实验的方法确定 Mg^{2+}的最佳浓度，使多重 PCR 得到最佳的扩增效果。

除以上 3 个主要方面外，PCR 反应的循环次数也是多重 PCR 反应体系优化的内容之一。循环次数的多少直接影响着 PCR 反应的产量，但是，并非循环次数越多越好。当 PCR 反应循环次数过多时，体系中某一组分消耗殆尽时，引物错配的几率会增大，极易产生杂带，从而影响 PCR 反应的效果(任宪云等, 2011)。所以，建议普通 PCR 的循环次数为 25–35 次，而多重 PCR 则需要更多的循环次数。本研究所建立的 4 个多重 PCR 体系，分别采用 38、40、40、40 个循环，均能得到较好的扩增效果。

3.2　凡纳滨对虾遗传多样性及亲权分析

多态信息含量(PIC)是一个遗传标记多态性可提供的信息量的度量，是衡量基因变异程度高低的重要指标(贾舒雯, 2012)[1)]。Bostein 等(1980)提出衡量基因变异程度高低的多态信息量指标：PIC≥0.5 时为高度多态，0.25≤PIC<0.5 为中度多态，PIC<0.25 为低度多态。本实验所利用的 16 个微卫星位点中，有 13 个位点为高度多态(PIC≥0.5)，其余 3 个位点为中度多态(0.25≤PIC<0.5)，PIC 值介于 0.259–0.871 之间，平均多态信息含量(PIC)为 0.5813，为高度多态。表明，16 个微卫星位点在实验群体中有较高的遗传多样性，可以用于后续的家系亲权分析。

微卫星标记因具有符合孟德尔遗传模式，且呈共显性遗传，现已广泛应用于水产动物亲权鉴定、遗传连锁图谱的绘制以及群体遗传研究等多个方面。微卫星多重 PCR，因具有省时、高效和节约等特点，使得微卫星标记识别在实际应用中可以更加方便和快捷。于洋等(2014)[2)]利用 15 个多态性微卫星位点，构建了凡纳滨对虾多重 PCR 体系，并对 8 个家系的子代及其亲本进行亲权分析，其结果显示，在亲本性别已知和亲本性别未知的情况下，模拟分析配对率均为 100%，除 3 个家系鉴定准确率较低外，其余的家系均达到 100%的亲权鉴定准确率，平均鉴定准确率为 98%。虽然于洋等建立的多重 PCR 已经有了较高的鉴定准确率，但其研究也发现，对于亲缘关系较近的个体仍然出现了较高的错判率，其最高鉴定准确率仅能达到 93%。在本研究中，增加了用于亲权分析的微卫星位点数量和家系数量，使亲权分析结果具有更高的准确性和可信度。本研究利用 16 个凡纳滨对虾多态性微卫星位点，构建了 1 个五重，2 个四重和 1 个三重 PCR 体系，在亲本性别已知和亲本性别未知的情况下，应用四组多重 PCR 体系对 11 个家系子代及其亲本进行亲权分析时，其模拟配对率和亲权鉴定准确率均达到 100%，对 2 个父系半同胞家系和 2 个母系半同胞家系也均能准确鉴别。相比于洋等(2014)[2)]的研究，本研究在微卫星位点数量上仅有较少增加，但是对更多的家系进行亲权分析时，均能达到 100%的鉴定准确率，尤其是对亲缘关系更近的半同胞家系鉴别效果较好，显示出建立的四组微卫星多重 PCR 拥有较高的鉴别能力和实际应用效果。

4　结论

本实验构建了 1 个五重，2 个四重和 1 个三重 PCR 体系，凡纳滨对虾多重 PCR 体系扩增效果良好。利用已建立的四组多重 PCR 体系，对 11 个家系子代及

1) 贾舒雯. 脊尾白虾微卫星引物筛选及群体遗传多样性分析. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2012, 28–31

2) 于洋. 凡纳滨对虾分子标记的开发及其在遗传育种中的应用.中国科学院研究生院(海洋研究所)博士研究生学位论文, 2014, 49–57

其亲本进行亲权分析，得到的模拟配对率和亲权鉴定准确率均达到 100%。显示出，该组多重 PCR 可以实际应用在凡纳滨对虾家系育种的过程中，为凡纳滨对虾家系选育、亲权分析、群体遗传多样性等方面的研究提供高效、准确的检测手段。

参 考 文 献

王兴强, 马甡, 董双林. 凡纳滨对虾生物学及养殖生态学研究进展. 海洋湖沼通报, 2004(4): 94–100

王鸿霞, 吴长功, 张留所, 等. 微卫星标记应用于凡纳滨对虾家系鉴别的研究. 遗传, 2006, 28(2): 179–183

王稳, 屈武斌, 申志勇, 等. 利用 MPprimer 设计引物并优化扩增条件以提高多重 PCR 效率的实验研究. 生物化学与生物物理进展, 2010, 37(3): 342–346

孔杰, 金武, 栾生, 等. 水产动物选择育种的近交分析. 自然科学进展, 2009, 19(9): 917–923

任宪云, 刘萍, 李健, 等. 三疣梭子蟹微卫星多重 PCR 技术建立及条件的优化. 渔业科学进展, 2011, 32(3): 76–83

李伟亚, 王伟继, 孔杰, 等. 中国对虾微卫星四重 PCR 技术的建立及其在模拟放流效果评估方面的应用. 海洋学报(中文版), 2012, 34(5): 213–220

李佳凯, 王志勇, 韦信键, 等. 大黄鱼微卫星多重 PCR 体系的建立及其应用. 水产学报, 2014, 38(4): 472–477

张伟权. 世界重要养殖品种——南美白对虾生物学简介. 海洋科学, 1990(3): 69–73

张涛, 庄平, 章龙珍, 等. 可视荧光硅橡胶标志用于西伯利亚鲟幼鱼标志的初步评价. 水生生物学报, 2010, 34(3): 639–641

张博, 宋文平. 微卫星多重 PCR 在水生动物亲权分析中的研究进展. 海洋渔业, 2012, 34(3): 350–356

张毅, 孙东晓, 俞英, 等. 家养水牛 30 个微卫星标记的多重 PCR 体系建立及其多态性检测. 遗传, 2008, 30(1): 59–64

苗贵东, 杜民, 杨景峰, 等. 大菱鲆亲子鉴定的微卫星多重 PCR 技术建立及应用. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2011, 41(1/2): 97–106

罗伟, 高泽霞, 曾聪, 等. 团头鲂微卫星多重 PCR 体系的建立及应用. 大连海洋大学学报, 2013, 28(5): 418–423

聂鸿涛, 李琪, 孔令锋. 皱纹盘鲍微卫星多重 PCR 体系构建及其在家系鉴定中的应用. 水产学报, 2013, 37(2): 207–215

Alcivar-Warren A, Meehan-Meola D, Park SW, *et al*. Shrimp Map: A low-density, microsatellite-based linkage map of the pacific white-leg shrimp, *Litopenaeus vannamei*: Identification of sex-linked markers in linkage group 4. J Shellfish Res, 2007, 26(4): 1259–1277

Botstein D, White RL, Skolnick M, *et al*. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am J Hum Genet, 1980, 32(3): 314–331

Garcia DK, Alcivar-Warren A. Characterization of 35 new microsatellite genetic markers for the pacific white-leg shrimp, *Litopenaeus vannamei*: their usefulness for studying genetic diversity of wild and cultured stocks, tracing pedigree in breeding programs, and linkage mapping. J Shellfish Res, 2007, 26(4): 1203–1216

Kong F, Gilbert GL. Multiplex PCR-based reverse line blot hybridization assay (mPCR/RLB)-a practical eqidemiological and diagnostic tool. Nat Protoc, 2006, 1(6): 2668–2680

Li YT, Wongprasert K, Shekhar M, *et al*. Development of two microsatellite multiplex systems for black tiger shrimp *Penaeus monodon* and its application in genetic diversity study for two populations. Aquaculture, 2007, 266(1–4): 279–288

Luo K, Kong J, Luan S, *et al*. Effect of inbreeding on survival, WSSV tolerance and growth at the postlarval stage of experimental full-sibling inbred populations of the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. Aquaculture, 2014, 420–421(3): 32–37

Markoulatos P, Georgopoulou A, Kotsovassilis C, *et al*. Detection and typing of HSV-1, HSV-2, and VZV by a multiplex polymerase chain reaction. J Clin Lab Anal, 2000, 14(5): 214–219

Meehan D, Xu Z, Zuniga G, *et al*. High frequency and large number of polymorphic Microsatellites in cultured shrimp, *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* [Crustacea:Decapoda]. Mar Biotechnol, 2003, 5(4), 311–330

Wang Y, Wang X, Wang A, *et al*. A 16-microsatellite multiplex assay for parentage assignment in the eastern oyster (*Crassostrea virginica* Gmelin). Aquaculture, 2010, 308(S1): 28–33

Zhang K, Wang W, Li W, *et al*. Analysis of genetic diversity and differentiation of seven stocks of *Litopenaeus vannamei* using microsatellite markers. J Ocean Univ China, 2014, 13(4): 647–656

Zhang L, Yang C, Zhang Y, *et al*. A genetic linkage map of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*): sex-linked microsatellite markers and high recombination rates. Genetica, 2007, 131(1), 37–49

(编辑 马璀艳)

Development of Multiplex PCR Systems of Microsatellite Markers for Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and Its Application for Parentage Identification

LI Dongyu[1,2,3], KONG Jie[1,2,3①], MENG Xianhong[2,3], LUAN Sheng[2,3], LUO Kun[2,3], LU Xia[2,3], CAO Baoxiang[2,3]

(1. *Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural 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. *Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao* 266071)

Abstract　Microsatellite markers have been widely used in parentage identification, genetic linkage mapping, and diversity study of aquatic animals, due to the advantages including mendelian inheritance pattern, wide distribution, high polymorphism, high repeatability and stability, and co-dominant inheritance. This technique efficiently helps with analysis of genetic background of different populations, as well as selective breeding. Multiplex PCR could amplify many microsatellite loci simultaneously, therefore is an efficient, rapid, and economic method, and could be a powerful tool of parentage identification, pedigree management, and population genetic analysis of aquatic animals. In order to improve the efficiency and reduce the cost of genetic studies of *Litopenaeus vannamei*, previously reported microsatellite loci with high polymorphism were selected in developing multiplex PCR systems in this study. Four multiplex PCR systems were successfully established and optimized based on the allelic lengths and annealing temperatures of the microsatellite loci. We used these systems to perform pedigree analysis of 11 families of selected *L. vannamei*, and found that the average number of alleles (N_a) was 6, the average polymorphism information content (PIC) was 0.5813, and the average observed heterozygosity (H_o) and expected heterozygosity (H_e) were 0.513 and 0.636 respectively. Together with Cervus 3.0 software, the four multiplex PCR systems were also used to verify the capacity of parentage assignment in the 11 families of *L. vannamei* of which the pedigree relationships were already known. The combined exclusion probability of the first parent (CE-1P), the second parent (CE-2P), and a parent pair (CE-PP) were shown to be 0.99525487, 0.99990862, and 0.99999986 respectively. Further analysis suggested that if all the multiplex PCR systems were used for pedigree analysis, the accuracy rates of both simulated assignment rate and parentage identification could reach 100%. It also indicated that the full-sib and half-sib families had great capability for precise identification. In conclusion, the four multiplex PCR systems for microsatellite markers could serve as an efficient and accurate approach in further genetic diversity and pedigree analysis of *L. vannamei*.

Key words　*Litopenaeus vannamei*; Microsatellite multiplex PCR; Parentage identification

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

DOI: 10.11758/yykxjz.20150430001 http://www.yykxjz.cn/

我国一株新型黄头病毒的分子流行病学*

朱罗罗[1,2] 张庆利[1,3] 万晓媛[1] 邱 亮[1,2]
马 芳[1,2] 黄 倢[1,2,3①]

(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 上海 201306; 3. 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)

摘要 为查明黄头病毒(Yellow Head Virus, YHV)在我国的存在和变异情况, 本研究采用世界动物卫生组织(OIE)《水生动物诊断手册》中 YHV 套式 RT-PCR 检测方法对 2012–2014 年采集的 299 份样品进行了 YHV 监测, 并对部分 YHV 阳性样品基因进行了克隆测序及系统发育分析。流行病学调查显示, 299 份样品中 YHV 的阳性率为 11%, 我国养殖的中国明对虾、凡纳滨对虾、日本囊对虾以及罗氏沼虾的部分样品中均检出了 YHV, 中国明对虾和罗氏沼虾是本次调查中新发现的 YHV 自然宿主, 而且 YHV 在中国明对虾中的检出率最高。对 6 份较强阳性样品 YHV 基因组 ORF1b 内 1002 bp 的分型片段进行克隆测序和序列分析, 序列比对结果显示, 阳性样品的 YHV 与国外报道的 YHV 的 6 个基因型相似度为 81.0%–90.5%; 系统发育分析显示, 6 份阳性样品归于同一分支, 但与已知 YHV 的 6 个基因型均不在同一分支内, 其与 YHV 基因 1 型(YHV-1)亲缘关系较近。对阳性样品 YHV 基因组 ORF3 内编码 gp116 蛋白的一段序列进行克隆测序, 得出其序列长度为 509 bp, 与 YHV-1a 的 545 bp、YHV-1b 的 383 bp 和 YHV-2 (即鳃联病毒 GAV)的 476 bp 均不同; 依据该片段构建的系统发育树显示, 6 份阳性样品归于同一分支, 与 YHV 已知的 6 个基因型不同, 与 YHV-1 亲缘关系较近, 且与 YHV-1a 相似度大于 YHV-1b。对其中两份样品的 ORF2 序列进行比对显示, 两份样品序列相似性为 99.8%, 蛋白序列完全相同, 与 YHV-1 的序列相似度为 85.9%, 与 YHV-2 相似性为 80.9%。样品调查结果对增补 YHV 的宿主范围有重要意义; YHV 核酸检测和序列比对结果表明, 感染我国养殖对虾的 YHV 为一种新的致病株型。

关键词 黄头病毒; 新基因型; 系统发育树; 对虾; 流行病学
中图分类号 S945 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)03-0068-10

黄头病毒(Yellow Head Virus, YHV)属于单链 RNA 病毒的套式病毒目、杆套病毒科、头甲病毒属(Cowley *et al*, 2012)。黄头病毒群分为黄头病毒(YHV-1 型)、鳃联病毒(Gill-associated virus, GAV)(YHV-2 型)及其他至少 4 种基因型(YHV-3 型–YHV-6 型)(Wijegoonawardane *et al*, 2009)。

2010 年起, 越南、马来西亚、泰国和我国海南等地养殖的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)相继出现不明原因的疫病, 并导致较高的死亡率。目前, 已经确定对虾早期死亡综合征能感染凡纳滨对虾、斑节对虾(*Penaeus monodon*)、中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)等。Tran 等(2013)证实, 一

* 公益性行业(农业)科研专项经费项目(201103034)、现代农业产业技术体系专项资金项目(CARS-47)、中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2014A06XK01)、山东省“泰山学者”建设工程专项经费、青岛海洋科学与技术国家实验室鳌山科技创新计划项目(2015ASKJ02)和农业部科研杰出人才和创新团队专项经费共同资助。朱罗罗, E-mail: zhuluoluo666@163.com
① 通讯作者: 黄 倢, 研究员, E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn
收稿日期: 2015-04-30, 收修改稿日期: 2015-06-05

种高毒力的副溶血弧菌是导致早期死亡综合征(EMS)或急性肝胰腺坏死病(AHPND)的病原。2012 年在疑似 EMS 的中国明对虾样品中用 PCR 方法检测出了 YHV(刘群等, 2014)。随后，3 年持续的流行病学监测表明，我国沿海对虾养殖省市都存在 YHV 感染，通过 ORF1、ORF3 部分序列的比对发现，我国对虾中检出的 YHV 与现有 YHV、GAV 的基因型不同。这为我国对虾新发疫病的病原学研究提供了重要信息，该结果也表明我国养殖对虾正面临着新的病害威胁。

研究者已报道了世界各地的患病对虾中 YHV 的 6 个基因型。根据刘群等(2014)发表的部分基因序列，将此 YHV 的基因型编号为 YHV-9。我国各地检出的 YHV 与这些已知基因型的 YHV 在进化上的亲缘关系如何，感染的对虾种类和地区分布均尚无报道。本研究在流行病学调查及 YHV-9 基因测序的基础上，对我国不同地区 YHV 样品 ORF1、ORF2 和 ORF3 序列与已知 YHV 株系的同源性进行分析，以期阐明我国流行的 YHV 株系与已知 YHV 株系在进化上的关系，丰富对 YHV 基因组变异和进化的认识，为 YHV 的有效防治提供基础理论知识。

1　材料与方法

1.1　样品采集与保存

2012–2014 年从天津、河北、山东和浙江等地的对虾养殖场采集或送检的凡纳滨对虾、中国明对虾、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)、日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)等样品共计 299 份(表 1)。用于核酸检测的样品采用 RNALater 保存或冻存于–80℃冰箱，用于组织病理学检查的样品采用 RNA Friendly 固定液(Hasson *et al*, 1997)和 Davidson's AFA 固定液，固定方法参考 Lightner(1996)。

表 1　样品信息

Tab.1　The information of samples

省市 Province/city	2012	2013	2014
山东 Shandong	8	16	52
广东 Guangdong	7	9	10
浙江 Zhejiang	3	12	18
河北 Hebei	10	15	24
天津 Tianjin	3	7	3
江苏 Jiangsu	7	7	31
广西 Guangxi	/	6	6
海南 Hainan	/	15	8
辽宁 Liaoning	2	/	8
新疆 Xinjiang	/	6	/
福建 Fujian	/	1	4
湖南 Hunan	/	/	1
总计 Total	40	94	165

1.2　RNA 的提取

取 RNALater 保存的或冰冻虾肝胰腺和鳃丝 10–50 mg，加入 800 μl TRIzol 试剂(Invitrogen)。用 RNase-free 研磨棒将样品匀浆，加入 160 μl 氯仿，振荡混匀后室温静置 15 min，然后 12000 r/min 4℃离心 15 min，取上层水相，加入等体积异丙醇，混匀后放置 5 min，12000 r/min 4℃离心 10 min，弃上清液，于沉淀中加入 1 ml 冰冷 75%乙醇，轻轻混匀，静置 5 min，12000 r/min 4℃离心 10 min，沉淀晾干，加入 50 μl RNase-free 水溶解，经核酸蛋白测定仪(NanoDrop 2000，美国)测定其浓度与纯度，置于–80℃保存。

1.3　YHV 的套式 RT-PCR 检测

1.3.1　cDNA 的合成　　根据世界动物卫生组织(OIE)《水生动物诊断手册》(OIE，2012)推荐的 YHV 套式 RT-PCR 检测方法对样品进行检测。取 2 μl 样品模板，加入 50 μmol/L 引物 GY1 和 GY5 (表 2)各 1.0 μl、0.5 μl 10 mmol/L dNTP 和 2.5 μl 无 RNase 水，混匀，70℃反应 5 min 后，置于冰上 2 min，向体系内加入 2 μl 5×MMLV Buffer、0.5 μl 40 U/μl RNase inhibitor (TaKaRa)和 0.5 μl 200 U/L MMLV 反转录酶(TaKaRa)，42℃保温 60 min，72℃反应 10 min，以此合成 cDNA 作为模板。

1.3.2　第一步 PCR 反应　　第一步 PCR 用 25 μl 反应体系，含 2.5 μl 10× Ex *Taq* PCR Buffer (Mg^{2+}-free, TaKaRa)、1.5 μl 25 mmol/L $MgCl_2$、0.5 μl 10 mmol/L dNTP、50 μmol/L 引物 GY1 和 GY4 各 0.35 μl (表 2)、0.25 μl 5 U/μl Ex *Taq* DNA 聚合酶(TaKaRa)，85℃预热 3 min，加入 1.0 μl cDNA，18.55 μl ddH_2O。扩增反应程序为：95℃ 30 s，66℃ 30 s，72℃ 45 s，35 个循环；72℃ 7 min；4℃保存。

1.3.3　第二步 PCR 反应　　第二步 PCR 采用 25 μl 反应体系，含 2.5 μl 10×Ex *Taq* PCR Buffer (Mg^{2+}-free, TaKaRa)、1.5 μl 25 mmol/L $MgCl_2$、0.5 μl 10 mmol/L dNTP、50 μmol/L 引物 GY2 和 Y3 各 0.35 μl (表 2)、0.25 μl 5 U/μl Ex *Taq* DNA 聚合酶(TaKaRa)，85℃预热 3 min，加入 1.0 μl 第一步 PCR 反应产物。扩增反应程序为：95℃ 30 s，66℃ 30 s，72℃ 30 s，35 个循环；72℃ 7 min；4℃保存。反应产物于 1%琼脂糖凝胶电泳，并采用凝胶成像仪(培清 JS-380)拍照。

1.4　ORF1b 部分基因片段的扩增

根据 Wijegoonawardan 等(2008)和已测序 YHV 序列

表 2 PCR 扩增引物序列

Tab.2 Sequences of primers used in PCR amplification

引物 Primer [a]	序列 Sequence (5'–3')	产物大小 Size of product (bp)
GY1	GAC ATC ACT CCA GAC AAC ATC TG	794
GY4	GTG AAG TCC ATG TGT GTG AGA CG	
GY2	CAT CTG TCC AGA AGG CGT CTA TGA	277
Y3	ACG CTC TGT GAC AAG CAT GAA GTT	
GY5	GAG CTG GAA TTC AGT GAG AGA ACA	
1b-F1	CTT GAC AAG ATG GC	1630
1b-R1	ACT GTG AGT GTA GGA G	
1b-F2	CTA GCA YTC AAA CAT CAT CAA YAA YCA	1002
1b-R2	GAG ATG ATY TGR TKC TTG AAT TTC TG	
116-F1	CTA TCA ACG TGC YAC AAC ACA A	1300
116-R1	TGG AAT CTG CGT CAT GAT ACT CT	
116-F2	CCT ATT GCT AAA TCT TTC AT	509
116-R2	GTG TAT TTG ATA GCC TGA GT	
P20-S	ACT TCT GCT AGC ATG AAC CGT CGT CCT CGC ACC GCC	445
P20-A	ATT TAG CTC GAG TTA TGA TGT TTC CTC GGC TTC	

a：检测引物参见 OIE《水生动物诊断手册》中 YHV 套式 RT-PCR 部分。Y=C/T；R=A/G；K=G/T

a: OIE. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. World Organisation for Animal Health. 2012. YHV, RT-PCR. Y=C/T; R=A/G; K=G/T

(编号 20120706，未发表)设计 ORF 1b 扩增引物(表 2)。

1.4.1 cDNA 的合成 所用反转录的引物为 10 μmol/L 1b-F1/R1(表 2)，其余操作方法与 **1.3.1** 相同。

1.4.2 第一步 PCR 反应 第一步 PCR 反应采用 25 μl 反应体系，含 2.5 μl 10×LA *Taq* PCR Buffer (Mg^{2+}-free, TaKaRa)、2.5 μl 25 mmol/L $MgCl_2$、4.0 μl 10 mmol/L dNTP、10 μmol/L 引物 1b-F1/R1 各 0.5 μl (表 2)、0.25 μl 25 U/μl LA *Taq* DNA 聚合酶，1.0 μl cDNA，13.75 μl ddH_2O。扩增反应程序为：94℃ 3 min；94℃ 30 s、46℃ 30 s、72℃ 100 s，30 个循环；72℃ 7 min；4℃保存。

1.4.3 第二步 PCR 反应 第二步 PCR 反应体系与第一步相同，取 1.0 μl 第一步 PCR 产物作为模板，引物为 1b-F2/R2 (表 2) (10 μmol/L)。扩增反应程序为：94℃ 3 min；94℃ 30 s、58℃ 30 s、72℃ 60 s，35 个循环；72℃ 7 min，4℃保存。反应产物于 1%琼脂糖凝胶电泳，并采用凝胶成像仪拍照。

1.5 ORF3 部分基因片段的扩增

根据 Gangnonngiw 等(2009)和 Senapin 等(2010)以及已测序 YHV-9(20120706)序列(未发表)设计 ORF3 扩增引物(表 2)。

1.5.1 cDNA 合成 方法参照 **1.3.1**，引物为 116-F1/R1 (表 2)。

1.5.2 套式 RT-PCR PCR 反应体系参照 **1.4.2**，第一步扩增反应中，引物为 116-F1/R1 (表 2)，扩增反应退火温度为 55℃，其余扩增反应参数与 **1.4.2** 中反应程序相同。第二步扩增反应中，引物为 116-F2/R2 (表 2)，退火温度为 50℃，扩增 35 个循环，其余扩增反应参数与 **1.4.3** 相同。反应产物于 1%琼脂糖凝胶电泳，并采用凝胶成像仪拍照。

1.6 ORF 2 片段的扩增

根据 Wijegoonawardan 等(2008)和已测序 YHV-9 (20120706)序列(未发表)设计引物(表 2)。

cDNA 合成参照 **1.3.1**，引物为 p20-S/A (表 2)。PCR 反应体系与 **1.4.2** 相同扩增反应，退火温度为 60℃，扩增 35 个循环，其余扩增反应参数与 **1.4.3** 相同。产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳。

1.7 DNA 的回收和连接转化

采用胶回收试剂盒(QIAGEN)回收电泳后的 PCR 扩增目的产物片段，按照试剂盒说明书操作，加 10 μl 无菌水，溶解后离心，取 2 μl 胶回收产物于 1%琼脂糖凝胶电泳，取条带明亮、单一的样品进行连接转化。NanoDrop 2000 测定浓度，取 pMD18-T 载体(TaKaRa) 1 μl，胶回收产物(0.1–0.3 pmol) 4 μl，Solution Ⅰ 5 μl，16℃连接 30 min，置于冰上，加入 50 μl *E coli* DH5α 感受态细胞，冰浴转化 30 min，于 42℃热激 45 s，置于冰上 2 min，接入 LB 液体培养基于 37℃摇床培养。

1.8　挑取单克隆菌落及菌落 PCR

摇菌 1 h 后，取 50 μl 菌液涂布于含氨苄青霉素(Amp)的 LB 平板，倒置培养 16 h 后，挑取单克隆，每个样品挑选 10 个平行于含 Amp 的 LB 液体培养基 37℃培养，2 h 后取 2 μl 作为模板进行菌落 PCR。体系与 **1.3.2** 相同，加入 10 μmol/L 通用引物 M13-47 和 RV-M 各 0.5 μl，反应程序为：94℃ 10 min；94℃ 30 s、55℃ 30 s、72℃ 60 s，30 个循环；72℃ 7 min。反应产物于 1%琼脂糖凝胶电泳，挑选 3 份平行的单克隆样品至上海生工生物工程有限公司测序。

1.9　序列比对和系统发育分析

采用 Bioedit 软件对核酸序列进行拼接、比对，采用 Geneious 软件进行多序列比对分析，并构建 NJ 系统发育树。

2　结果

2.1　阳性样品 RT-PCR 检测结果

299 份样品两步法共检出阳性样品 33 个，有 6 份样品第一步 RT-PCR 产物电泳就能出现明亮的 794 bp 的目的条带(图 1-a, b)，其中，两份来自山东的中国

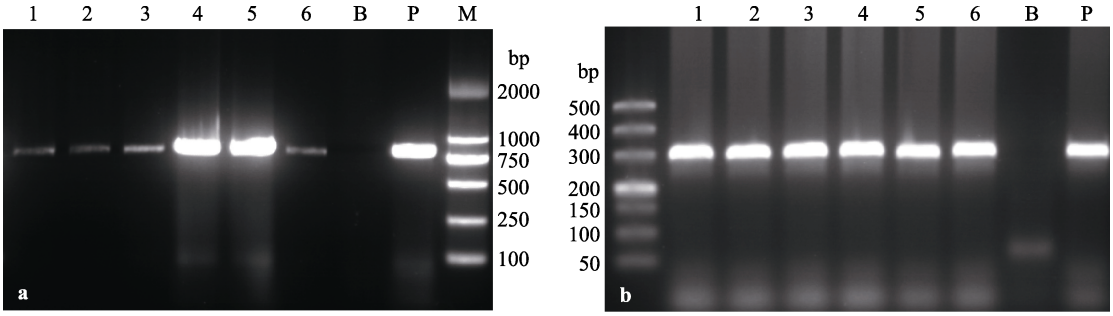

图 1　YHV 套式 RT-PCR 检测结果
Fig.1　Results of nested-RT-PCR of YHV

a: 样品第一步 PCR 结果 Result of first-step PCR; b: 样品第二步 PCR 结果 Result of second-step PCR
M: Marker; B: 空白对照 Blank control; P: 阳性对照 Positive control; 1: 20130301-ZJ; 2: 20130902-JX; 3: 20120706-TH; 4: 20140707-JM; 5: 20121018-JM; 6: 20120628-HG

明对虾样品阳性强，其他 4 份样品阳性较弱。6 份样品编号分别为 20130301-ZJ(广东，凡纳滨对虾)、20130902-JX(浙江，罗氏沼虾)、20120706-TH(河北，中国明对虾)、20140707-JM(山东，中国明对虾)、20131018-JM(山东，中国明对虾)和 20120628-HG(天津，凡纳滨对虾)。

2.2　YHV 的流行病学调查

对来自辽宁、河北、天津、山东、江苏、浙江、福建、广东、广西、海南等省市的凡纳滨对虾、中国明对虾、日本囊对虾、罗氏沼虾、斑节对虾、脊尾白虾、克氏原螯虾、梭子蟹、卤虫等样品进行了套式 RT-PCR 检测。结果显示，在凡纳滨对虾、中国明对虾、日本囊对虾和罗氏沼虾部分样品中检测到 YHV 阳性，其中，中国明对虾的阳性检出率最高，21 份样品中有 11 份为阳性，185 分凡纳滨对虾中有 13 份为阳性(图 2)。在 **2.1** 中的 6 份第一步 RT-PCR 样品中，有 3 份是中国明对虾，提示 YHV 可能对我国中国明对虾养殖存在严重风险。

从阳性样品的分布地区来看，我国沿海省市均检出

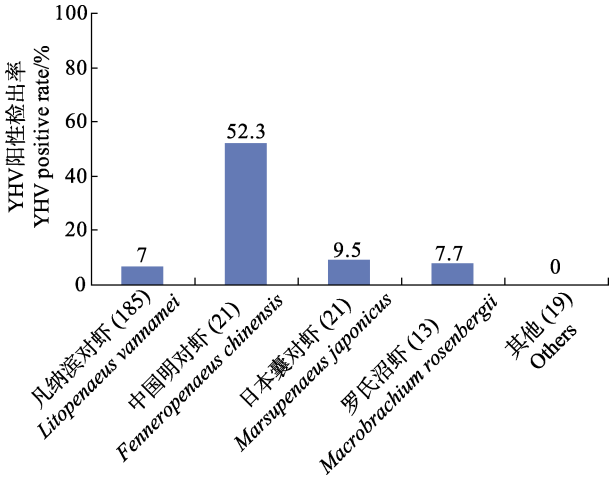

图 2　YHV 在不同宿主样品中的检出情况(2013.03–2014.12)
Fig.2　Detection of YHV in different hosts (March 2013–December 2014)

括号内为检测样品总数，其他包括斑节对虾、脊尾白虾、克氏原螯虾、梭子蟹、卤虫等
The number in parentheses is the total number of samples. "Others" includes *Penaeus monodon*, *Palaemon carinicauda*, *Procambarus clarkia*, Portunidae and *Artemia* sp. *etc*

YHV 阳性样品，新疆也检出 YHV 阳性样品，说明 YHV 在我国已经广泛蔓延(表 3)。YHV 虽然在我国多个省市检出，但作为主要养殖品种的凡纳滨对虾检出率低于平均水平且样品多采集健康状态不佳的对虾，其他品种受采样数量等因素的影响，实际检出率可能更低。

2.3 ORF1b、ORF3 部分片段和 ORF2 片段的序列分析

对上述 6 份阳性样品 ORF1b 部分片段第二步扩增所得的 1002 bp 产物进行测序。其序列与 YHV 已知 6 个基因型 24 份样品的 ORF1b 片段进行多重序列比对，结果显示，6 份样品的 ORF1b 序列长度与 YHV-1 的相同，比 YHV-2–YHV-6 少 3 bp。6 份样品间差异很小，相似度为 97.6%–98.5%。6 份样品共有序列与 YHV-1–YHV-6 型共有序列相似度为 90.5%–80.9%，与 YHV-1 相似度较高(图 3)。

6 份样品 ORF3 片段套式 PCR 扩增目的条带经测

表 3 不同省市的样品中 YHV 检出情况(2012.05–2014.12)

Tab.3 Detection of YHV in samples from different provinces and cities (May 2012–December 2014)

省市 Province/city	样品总数 Total sample number	阳性样品数 Positive sample number	阳性检出率 Positive sample percentage (%)
山东 Shandong	76	9	13
广东 Guangdong	26	1	4
浙江 Zhejiang	38	3	8
河北 Hebei	49	7	14
天津 Tianjin	13	2	15
江苏 Jiangsu	50	5	10
广西 Guangxi	12	2	17
海南 Hainan	23	1	4
辽宁 Liaoning	10	1	10
福建 Fujian	5	1	20
湖南 Hunan	1	0	0
新疆 Xinjiang	6	1	17

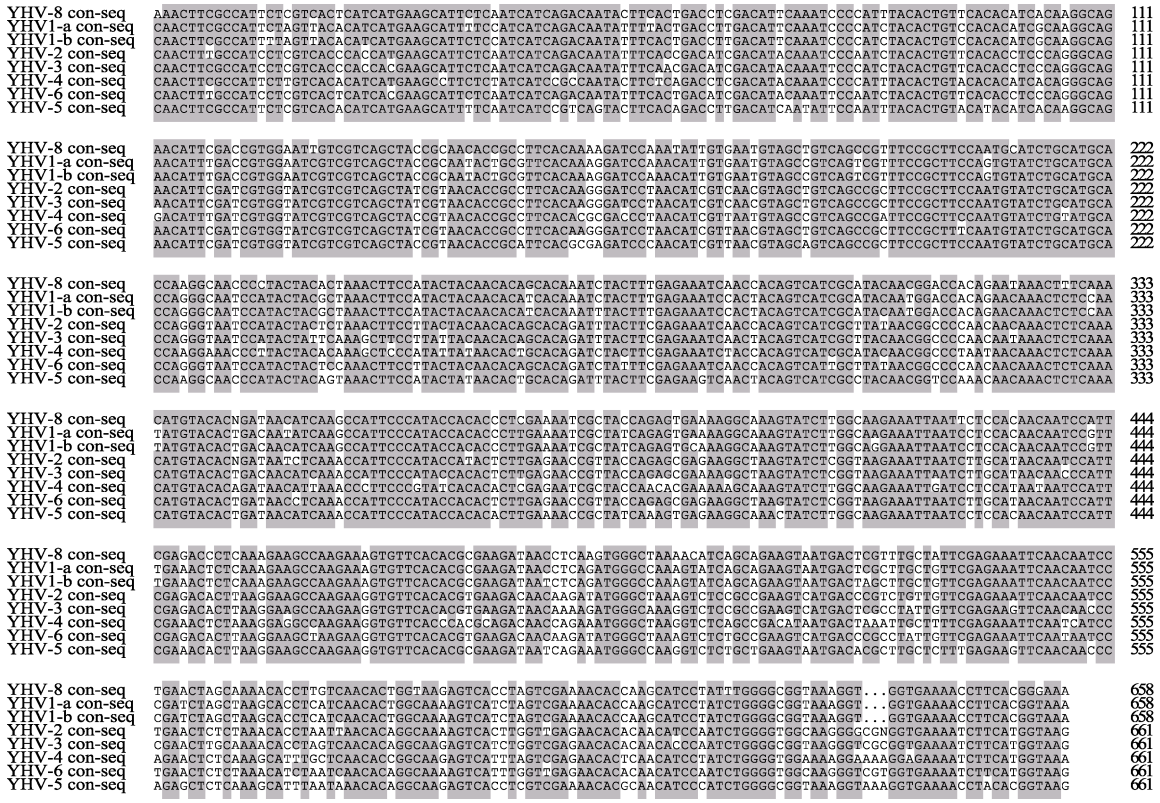

图 3 ORF1b 片段共有序列比对

Fig.3 Alignment of ORF1b fragment consensus sequence

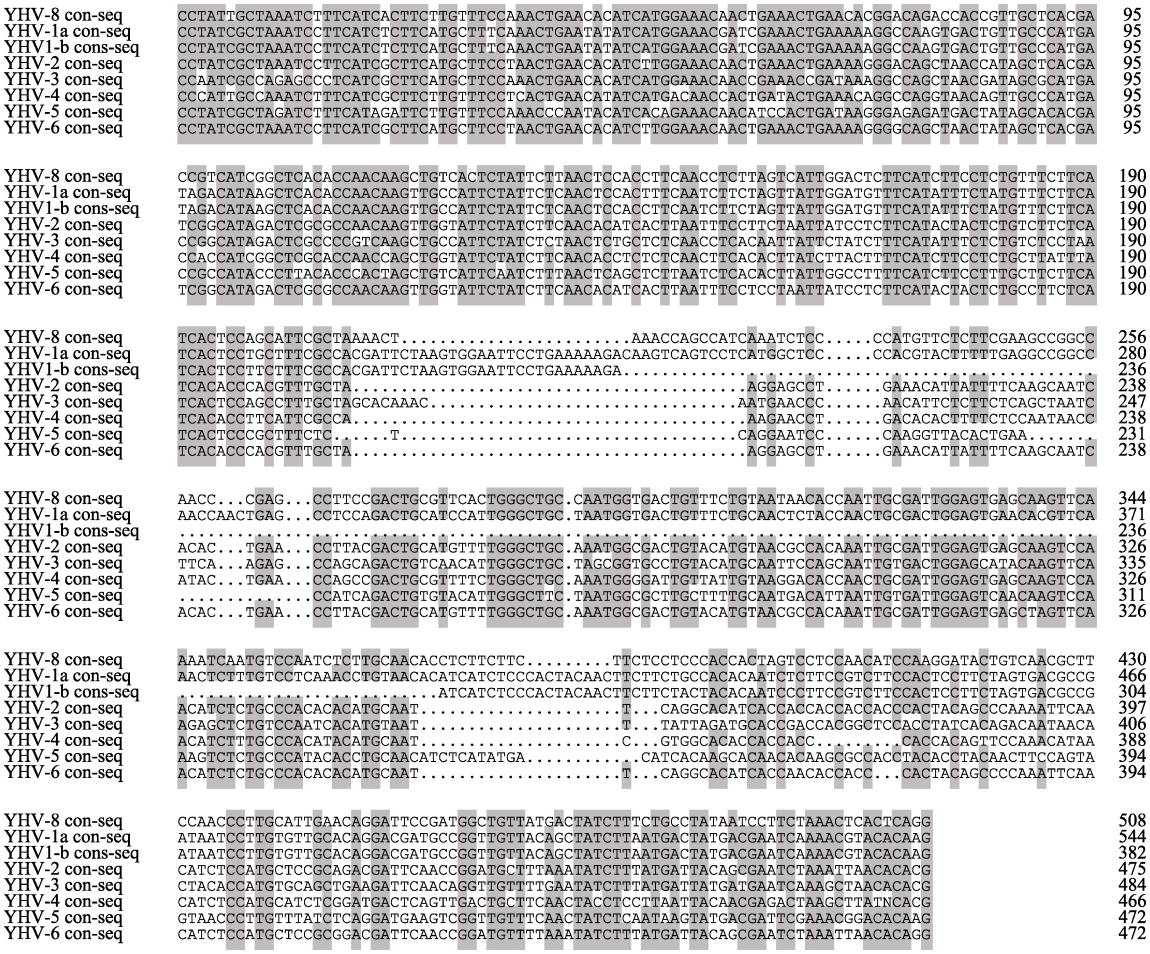

图 4　ORF3 片段共有序列比对

Fig.4　Alignment of ORF3 fragment consensus sequence

序显示，产物大小为 509 bp，与 YHV-1a 545 bp、YHV-1b 383 bp、YHV-2 476 bp 均不同。序列与 YHV 已知 6 个基因型 20 份样品进行多重序列比对显示(图 4)，6 份样品间相似度为 97.2%–99.4%。6 份样品共有序列与 YHV-1a、YHV-1b、YHV-2、YHV-3、YHV-4、YHV-5 和 YHV-6 型共有序列的相似度分别为 67.9%、63.2%、62.5%、60.8%、62.8%、62.5%和 62.1%，相似度均较小。

两份样品 ORF2 的套式 PCR 扩增目的条带经测序得到 445 bp 产物序列，共编码 144 aa，与 YHV-2–YHV-5 型长度相同，比 YHV-1 型(146 aa)短。多重序列比对结果显示(图 5)，两份样品序列相似性为 99.8%，蛋白序列完全相同，与 YHV-1–YHV-4 共有序列相似度分别为 85.9%、80.7%、80.6%、82.4%，与 YHV-1 相似度较高。

2.4　ORF1b、ORF3 部分片段和 ORF2 片段的系统发育树结果与分析

采用 Geneious(v4.8.5)软件对 ORF1b、ORF3 部分片段和 ORF2 片段序列与 NCBI 中部分已知序列构建系统发育树(图 6–图 8)。

ORF1b 部分片段的系统发育树显示(图 6)，6 份样品处于同一分支，都属于 YHV-9 的基因型，该分支的各样品在年代和地域上没有明显聚合规律。YHV-9 与 YHV-1 聚为一个较大的分支，与 YHV 其他 5 个基因型分支较远；YHV-2 和 YHV-6 亲缘关系较近，先聚为同一支，再与 YHV-3 聚合；前述这 5 个基因型再聚为一个大簇，最后与 YHV-4 及 YHV-5 汇聚。该基因片段无法有效对 YHV-1a 和 YHV-1b 进行区分。

ORF3 部分片段的系统发育树分析显示(图 7)，6 份样品相似性高，与 20120706TH 一起均属于 YHV-9，处于同一分支；YHV-2 与 YHV-4 先聚为一支，再依次与 YHV-5、YHV-3、YHV-9、YHV-1 等各大分支聚合。YHV-9 与 YHV 已知 6 个基因型分支距离较为均等。YHV-1a 和 YHV-1b 则在分支上被清晰地区分出来。

ORF2 片段只有 20120706-TH 和 20131018-JM 这两份样品得到有效扩增和测序，序列位于 YHV-9 的同一分支，该分支再与 YHV-1 聚于同一大的分支；

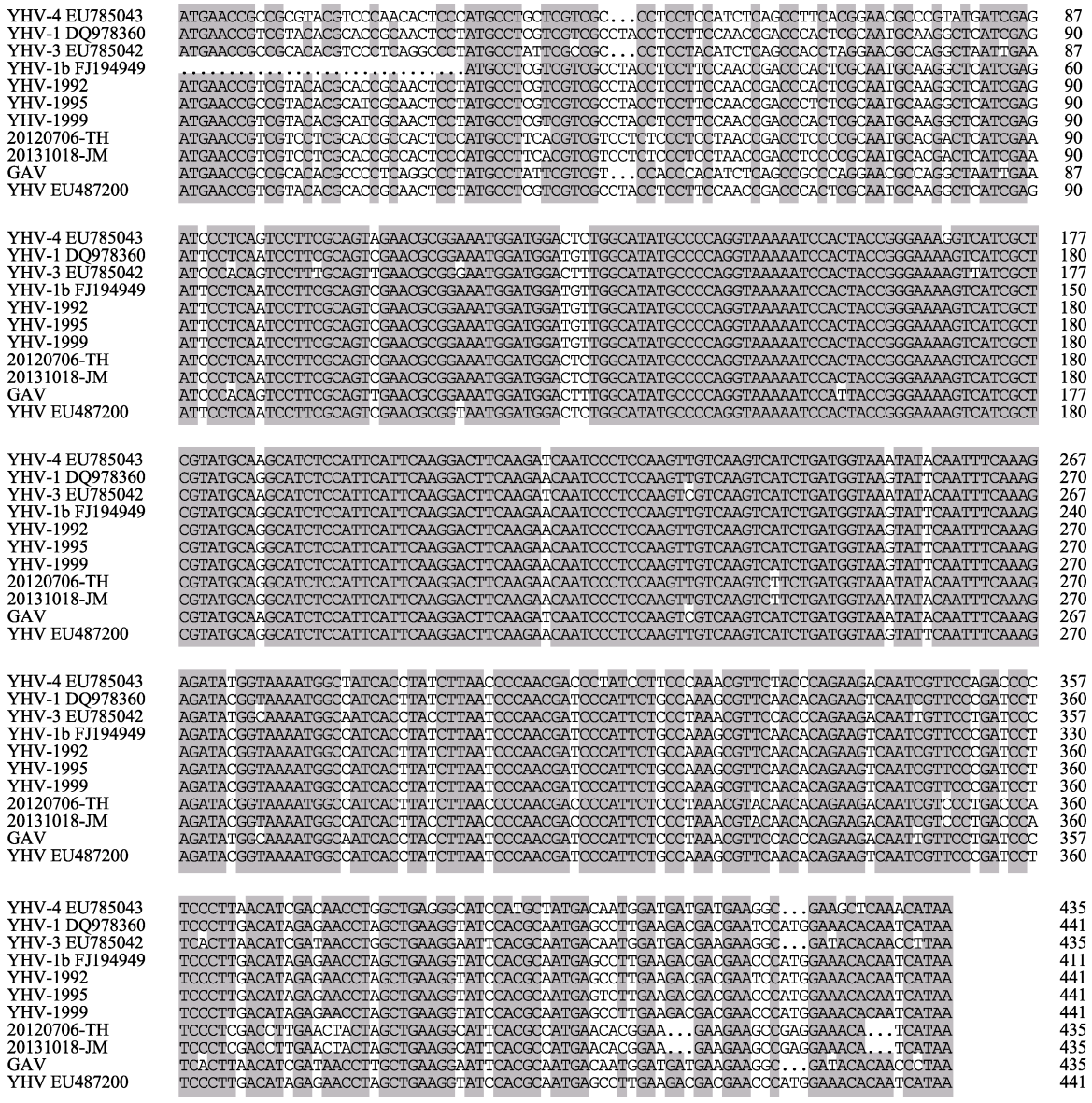

图 5 ORF2 序列比对

Fig.5 Alignment of ORF2 consensus sequence

而在该片段上，YHV-2 和 YHV-3 的亲缘关系很近，这两个基因型再与 YHV-4 汇聚为一大分支；表现出 YHV-1、YHV-9 和 YHV-2、YHV-3、YHV-4 两大分支的结构(图 8)。由于报道序列较少，YHV-5 和 YHV-6 均未能在该片段的系统发育树上绘出。

3 个片段进化树的分析显示，YHV-9 与 YHV-1 的进化关系较近，ORF1b 和 ORF2 片段的进化关系比 ORF3 片段的进化关系近，说明 YHV 中国株虽然与 YHV-1 进化关系较近，但不同片段的进化关系仍存在显著差别。

3 讨论

黄头病是养殖对虾的主要病害之一，是 OIE 收录的甲壳动物疫病，我国将其列为二类动物疫病。黄头病毒(YHV)最早在泰国被发现(Limsuwan, 1991)，澳大利亚于 1995 年在养殖对虾内发现另一致病型 YHV(Spann *et al*, 1995)。我国台湾地区很早就在养殖的斑节对虾、日本囊对虾中检测到 YHV 的存在，但为非致病型(Wang *et al*, 1996)。我国于 2005 年从泰国进口的斑节对虾内检测到 YHV，但我们国内养殖对虾中未曾检测到 YHV 阳性(熊炜等, 2006)。2012 年，在疑似发生 EMS 养殖场的中国明对虾内检测到 YHV 阳性(刘群等, 2014)。由于我国长期从国外引进亲虾，东南亚及澳洲地区作为 YHV 的主要疫病区和水产品出口地，我国通过水产品进口或引进携带 YHV 亲虾并垂直传播的可能性较高。本研究对 2012–2014 年间

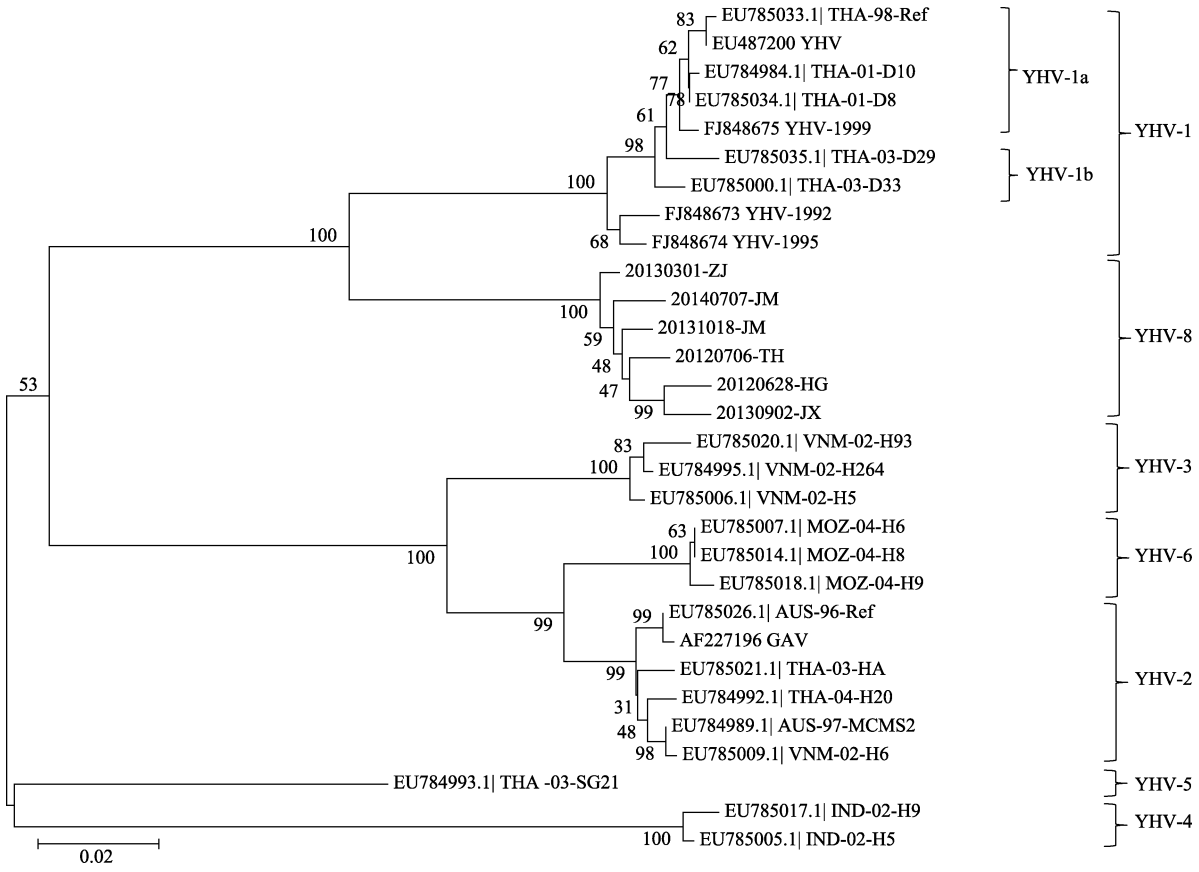

图 6　基于 YHV ORF1b 片段序列多重比对后构建的系统发育树

Fig.6　Phylogenetic tree based on the sequences of ORF1b fragment multiple sequence alignment

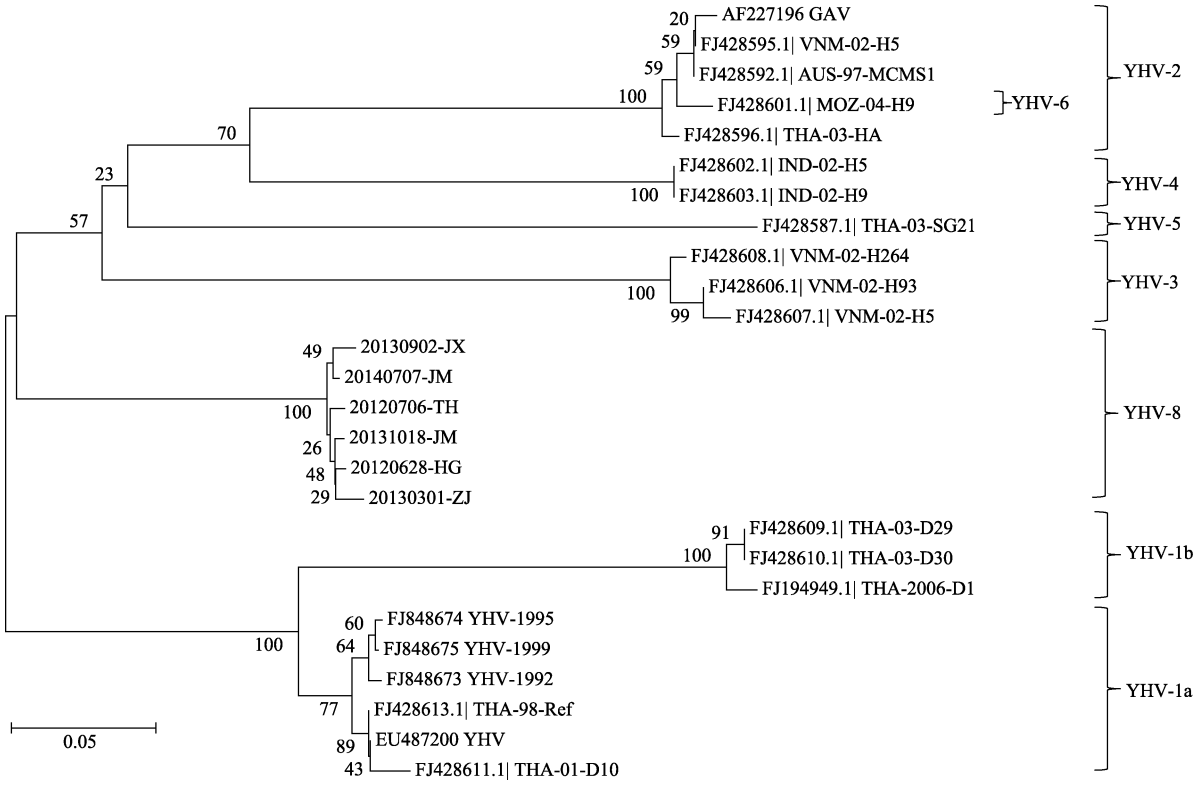

图 7　基于 ORF3 片段序列多重比对后构建的系统发育树

Fig.7　Phylogenetic tree based on the sequences of ORF3 fragment multiple sequence alignment

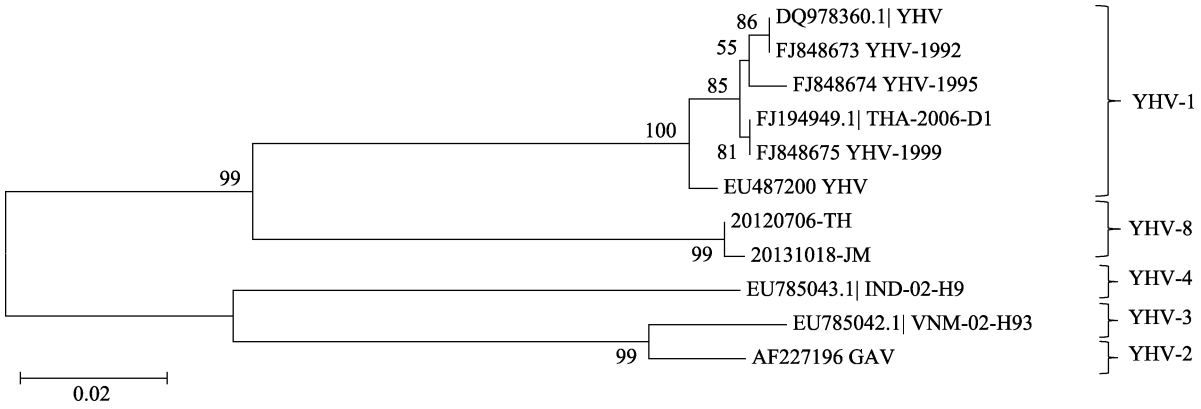

图 8 基于 ORF2 序列多重比对后构建系统发育树

Fig.8 Phylogenetic tree based on the sequences of ORF2 fragment multiple sequence alignment

采集自国内的 299 份对虾样品进行了 YHV 检测，套式 RT-PCR 检出 32 份 YHV 阳性样品，其中，6 份样品在第一步 RT-PCR 检出阳性。

前人研究表明，YHV 病毒包括至少 6 种基因型 YHV，其中，YHV-1 是对虾的主要病原，GAV 是 YHV-2，与其他基因型(YHV-3–YHV-6)多存在于东南亚、澳洲及东非等地养殖的健康斑节对虾体内，很少引起疫病(Walker *et al*, 2001; Wijegoonawardane *et al*, 2008、2009)。根据 2012 年在我国发现的 YHV 的 RT-PCR 检测的目的片段的序列，推测我国新发现的 YHV 是一个新的基因型(刘群等, 2014)。本研究对我国更多地区采集的样品的 YHV 的检测和 YHV 基因组的 ORF1b、ORF3 和 ORF2 片段的序列测定和比对进一步确证了这一推测，这一新的基因型在其基因组的 ORF1b、ORF3 和 ORF2 区域与 YHV 的已知基因型均表现出了遗传差异，均属于 YHV 的同一个亚型。为避免在今后的研究中出现亚型命名混乱的问题，本研究仍采用了澳大利亚对我国该亚型的命名方式，称为 YHV-9。本研究检出的 6 份 YHV-9 阳性样品在不同片段上也存在亚型内的差异，由于 YHV 为 RNA 病毒，依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶缺乏 3'→5'的外切活性，无法修复复制中的错误，导致 RNA 复制过程中变异较大，YHV 核酸序列的差异变化符合 RNA 病毒变异较快的特点。

在对多亚型间和亚型内的各片段序列比对中可以看出，YHV 基因组的 ORF3 序列表现出较高的亚型间的变异性和亚型内的稳定性，能更好地用于 YHV 亚型的分型；而 ORF2 序列表现出较高的亚型间的相似性，适用于对各种 YHV 变异型的检出。由于这些序列的差异，OIE《水生动物诊断手册》中的 YHV 检测的 RT-PCR 检测法对 YHV-9 型的检测灵敏度可能有一定影响，表明还需根据 YHV 全基因序列的比对结果，设计新的 RT-PCR 引物，以实现对多种 YHV 的同时检测或分型检测(OIE, 2012)。

YHV 对一些重要养殖对虾种类，如斑节对虾、凡纳滨对虾、褐对虾(*Penaeus aztecus*)、墨吉明对虾(*Fenneropenaeus merguiensis*)、细角滨对虾(*Litopenaeus stylirostris*)、刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*)、白滨对虾(*Litopenaeus setiferus*)等都具有感染性(Jatuyosporn *et al*, 2014)。本研究的流行病学调查显示，我国养殖的中国明对虾、凡纳滨对虾、日本囊对虾以及罗氏沼虾中均检出了 YHV，而且在中国明对虾中的检出率最高，阳性也最强，说明中国明对虾是 YHV 的一个新发现的自然宿主，罗氏沼虾也是本研究新发现的一个自然宿主，这对增补 YHV 的宿主范围有重要意义(OIE, 2012)。近年来，陆续在国内多个省市检测到 YHV 病毒的存在，说明 YHV 已经在我国养殖区域扩散，但由于发病样品较少，且受养殖品种、采样区域等因素限制，病原的源头尚未确定。新型 YHV 的出现表明我国对虾养殖产业已面临了新的疫病威胁，建立高效、系统、全面防控疫病的引入、传播和扩散风险的生物安保体系对于对虾健康养殖具有重要意义。

参 考 文 献

刘群, 黄倢, 杨昊霖, 等. 疑患 EMS/AHPNS 对虾中检出黄头病毒的一种新株型. 海洋与湖沼, 2014, 45(4): 703–709

熊炜, 邱璐, 李健, 等. 上海检验检疫局从泰国进境草虾中检出虾黄头病毒. 检验检疫科学, 2006, 16(6): 61–62

Cowley JA, Walker PJ, Flegel TW, *et al.* Family Roniviridae. *In* King A, ed, Virus Taxonomy, IXth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, Academic Press, London, 2012: 797–801

Gangnonngiw W, Anantasomboon GOW, Sang-oum W, *et al.* Non-virulence of a recombinant shrimp nidovirus is associated with its non-structural gene sequence and not a large structural gene deletion. Virology, 2009, 385(1): 161–168

Hasson KW, Hasson J, Aubert H, *et al.* A new RNA-friendly fixative for the preservation of penaeid shrimp samples for

virological detection using cDNA genomic probes. J Virol Methods, 1997, 66(2): 227–236

Jatuyosporn T, Supungul P, Tassanakajon A, *et al.* The essential role of clathrin-mediated endocytosis in yellow head virus propagation in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Dev Comp Immunol, 2014, 44(1): 100–110

Lightner DV. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. Baton Rouge, LA: World Aquaculture Society, 1996

Limsuwan C, Handbook for cultivation of black tiger prawns. Tansetakit Co. Ltd, Bangkok, 1991

OIE. Manual of diagnostic tests for aquatic animals. World Organization for Animal Health, 2012

Senapin S, Thaowbut Y, Gangnonngiw W, *et al*. Impact of yellow head virus outbreaks in the whiteleg shrimp, *Penaeus vannamei* (Boone), in Thailand. J Fish Dis, 2010, 33(5): 421–430

Spann KM, Vickers JE, Lester RJG. Lymphoid organ virus of *Penaeus monodon* from Australia. Dis Aquat Organ, 1995, 23(2): 127–134

Tran L, Nunan L, Redman RM, *et al*. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. Dis Aquat Organ, 2013, 105(1): 45–55

Walker PJ, Cowley JA, Spann KM, *et al.* Yellow head complex viruses: transmission cycles and topographical distribution in the Asia-Pacific region. The New Wave: Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture, 2001, 227–237

Wang CS, Tang KFJ, Kou GH, *et al.* Yellow head disease-like virus infection in the Kuruma shrimp *Penaeus japonicus* cultured in Taiwan. Fish Pathol, 1996, 31(4): 177–182

Wijegoonawardane PKM, Cowley JA, Phan T, *et al.* Genetic diversity in the yellow head nidovirus complex. Virology, 2008, 380(2): 213–225

Wijegoonawardane PKM, Sittidilokratna N, Petchampai N, *et al.* Homologous genetic recombination in the yellow head complex of nidoviruses infecting *Penaeus monodon* shrimp. Virology, 2009, 390(1): 79–88

(编辑　冯小花)

Molecular Epidemiology of a New Yellow Head Virus Strain in China

ZHU Luoluo[1,2], ZHANG Qingli[1,3], WAN Xiaoyuan[1], QIU Liang[1,2], MA Fang[1,2], HUANG Jie[1,2,3①]

(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. *Shanghai Ocean University, Shanghai* 201306; 3. *Function Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao* 266071)

Abstract　Yellow head virus (YHV) is a highly lethal pathogen that causes majority of shrimp diseases. In this study we conducted the epidemiology study and revealed the existence of YHV and the current infectious situation in China. We collected 299 samples in 2012-2014 and detected YHV using the nested RT-PCR method that was recommended in the World Organization for Animal Health (OIE) manual. Genes of some YHV-positive samples were sequenced and underwent the phylogenetic tree analysis. The epidemiology survey showed that the YHV infection rate was 11% and this virus was found in cultured *Litopenaeus vannamei*, *Fenneropenaeus chinensis*, *Marsupenaeus japonicus* and *Macrobrachium rosenbergii* in China. *F. chinensis* showed the highest infection rate. *F. chinensis* and *M. rosenbergii* were newly reported as natural hosts of YHV. We then amplified a 1002 bp fragment located in the ORF1b region. The alignment results suggested that YHVs from the six infected samples shared 81.0%–90.5% sequence identity with the six YHV genotypes archived in NCBI. The phylogenetic tree analysis showed that YHVs from the six samples clustered in one branch, but they did not share the same branch with the six already known YHV strains. YHVs in the 6 samples were relatively closely related to YHV Type 1 (YHV-1) and had higher similarity with YHV-1b than with YHV-1a. We also amplified a 509 bp sequence located in the ORF3 region. It encoded gp116 and was different from the 545 bp of YHV Type 1a (YHV-1a), the 383 bp of YHV-1b and the 476 bp of YHV-2 (GAV). We next compared the ORF2 sequence of two samples and found that they were 99.8% identical in gene sequence and had the same protein sequence. Their sequence similarities with YHV-1 and YHV-2 (GAV) were 85.9% and 80.9% respectively. Results of gene sequence alignment suggested that the YHV found in China was a new pathogenic strain.

Key words　Yellow Head Virus (YHV); New genotype; Phylogenetic tree; Shrimp; Epidemiology

① Corresponding author: HUANG Jie, E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn

DOI: 10.11758/yykxjz.20150519001 http://www.yykxjz.cn/

一株兼具氨氮去除能力和对副溶血弧菌拮抗作用的有益菌的筛选及其初步应用*

王 磊[1,2] 王志杰[2] 高 戈[1,2] 黄 倢[2,3①]

(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)

摘要 采用无机氮筛选培养基，从对虾养殖水体和对虾肠道中分离到 3 株具有脱氮效果的异养硝化菌株(编号分别为 20131023A00、20131023A01 和 20131023A05)，它们在氨氮含量为 0.12%的液体筛选培养基上(pH=7.2)，28℃经 24 h 对氨氮的转化能力分别为(38.9±0.1)%、(43.1±0.4)%和(49.9±0.5)%；采用纸片法拮抗实验选出菌株 20131023A05 对副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)具有拮抗作用，在 1.57×10^5 CFU/cm^2、1.57×10^4 CFU/cm^2 和 1.57×10^3 CFU/cm^2 的副溶血弧菌平板上产生的抑菌圈直径分别为(9.14±0.05) mm、(11.57±0.03) mm 和(13.59±0.02) mm。经 16S rDNA 序列测定，表明该菌株与杀鱼假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas piscicida*)有最近的亲缘关系。在日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)养殖水体中加入该株菌至 2.5×10^5 CFU/ml 时，该菌株表现出对副溶血弧菌注射感染的保护作用，该菌株浸浴组的日本囊对虾相对存活率(RPS)为 35%。在凡纳滨对虾养殖水体中每 3 d 加入该株细菌(3.13×10^4 CFU/ml)，每天加入 70%饲料量的赤砂糖，经 60 d 养殖，水体中氨氮含量比对照组及其他组显著降低。菌株 20131023A05 兼具去除氨氮和对副溶血弧菌拮抗作用，在对虾养殖生产中有广阔的应用前景。

关键词 脱氮菌；副溶血弧菌；杀鱼假交替单胞菌；拮抗作用

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)03-0078-07

在高密度工业化水产养殖中，随着残饵和养殖动物的粪便和分泌物的积累，养殖水体中的氨态氮和亚硝酸氮等无机氮浓度不断增加，影响了养殖动物的健康，甚至导致患病及死亡，降低了养殖产量，增加了养殖成本，成为限制水产养殖业可持续发展的重要原因之一(丁彦文等, 2000)。在养殖过程中，为了要保持水温和各种条件的稳定，降低成本，也为了减轻养殖产业对环境的污染，不提倡大量换水。因此，在相对密闭的水环境中，如何高效及时地转化或去除无机氮，特别是消除对养殖动物有强烈毒性的氨态氮和亚硝酸氮(丁爱中等, 2000)，成为水产养殖中亟待解决的重要问题。

淡水养殖中无机氮的去除技术的研究和应用较为全面，而海水养殖脱氮技术受盐度的影响，其应用效果与淡水相比还有待进一步优化，随着集约化海水养殖产业的快速发展，该技术已成为一个重要的产业需求，在减轻和消除海水无机氮污染方面拥有广阔前景(王晓姗等, 2009)。微生物在去除水中的氨氮和亚硝氮的过程中具有重要的作用，值得对此开展深入研究，充分开发微生物在高密度和工业化水产养殖业中的应用，为海水养殖可持续发展提供核心技术(李基东, 2008)。

抗生素等化学药物常常作为控制海水养殖中的

*公益性行业科研专项经费项目(201103034)、现代农业产业技术体系(CARS-47)、山东省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。王 磊，E-mail: wanglei1118120@163.com

① 通讯作者：黄 倢，研究员，E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn

收稿日期：2015-05-19，收修改稿日期：2015-08-13

细菌病害的主要手段, 频繁的使用导致微生物抗药性的提高, 带来了生物安全风险和微生态失衡。通过向水体中添加对病原菌具有拮抗作用的有益微生物的方式来控制病原菌的数量, 改善养殖系统的微生态, 成为控制疾病发生的一个新的技术发展方向。对虾的急性肝胰腺坏死病(AHPND)是由带有特定致病基因的高毒力副溶血弧菌所致(张宝存等, 2012), 造成对虾养殖的严重损失。本研究拟从对虾养殖系统中筛选出对副溶血弧菌具有拮抗作用的有益微生物, 通过添加抗副溶血弧菌的有益微生物以减少疾病的发生。

1　材料与方法

1.1　实验动物和菌株

健康凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)仔虾于 2014 年 7 月 6 日购自山东日照某育苗场, 体长为(1.5±0.3) cm, 经 PCR 方法检测白斑综合征病毒(WSSV)及虾肝肠胞虫为阴性, 5000 尾/桶, 暂养于 80 L、28℃的海水中, 每天投喂饲料 3 次。健康日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)于 2014 年 10 月 27 日购自江苏赣榆某养殖场, 体长为(5.35±0.23) cm, 经 PCR 方法检测 WSSV 为阴性, 暂养于养殖箱 40 L 的海水中, 海水盐度为 28, 每天投喂饲料 3 次。

自 2013 年在水族试验区养殖的一批来自于海口某育苗场的健康凡纳滨对虾中选取 3 尾体长约 2 cm 的对虾, 解剖取出对虾肠道, 置于无菌 1.5 ml 离心管中, 加入 800 μl 无菌水, 研磨, 用于分离和筛选脱氮菌株。

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)来源于本实验室保存的菌种, 编号 20130629002S01。

1.2　肠道菌群的富集培养

将上述研磨后的对虾肠道样品加入装有 200 ml 的 2216E 富集液体培养基(5 g 蛋白胨, 1 g 酵母膏, 0.1 g $FePO_4{\cdot}4H_2O$, 用盐度为 28 的海水溶解至 1000 ml, 调节 pH 为 7.2–7.4, 经 121℃灭菌 20 min)的锥形瓶中, 28℃、150 r/min 振荡培养 24 h。

1.3　脱氮菌株的筛选

将 1 ml 上述富集培养液用 PBS 进行 10^{-3}–10^{-5} 梯度稀释后, 分别取 100 μl 涂布于固体筛选培养基(23.2 g 葡萄糖, 14.2 g 柠檬酸钠, 6.5 g KNO_3, 4.6 g NH_4Cl, 1.7 g KH_2PO_4, 19.4 g 琼脂, 用盐度为 30 的海水溶解至 1000 ml, 调节 pH 为 7.2–7.4, 经 121℃灭菌 20 min)平板上, 28℃培养 12 h, 待形成单菌落后挑取单菌落在 2216E 固体培养基(同 2216E 液体培养基加琼脂)上进行纯化培养。

1.4　菌株脱氮能力检测

挑取上述筛选培养基上的单菌落于 250 ml 的 2216E 液体培养基中, 28℃、150 r/min 摇床培养 12 h, 按液体筛选培养基(固体筛选培养基不加琼脂)的 3% 体积加入菌液, 采用纳氏试剂法(宋岚, 2000)测定初始氨氮浓度, 放入 28℃摇床培养 24 h, 再次测定氨氮浓度, 并用 N-(1-萘基)-乙二胺光度法(周运友等, 2005)测定亚硝酸氮的浓度。

1.5　菌株对副溶血弧菌的拮抗实验

将所筛选到的脱氮菌株接种到 2216E 液体培养基中, 28℃、150 r/min 摇床培养 12 h。分别将 100 μl 浓度为 1×10^8、1×10^7 和 1×10^6 CFU/ml 的副溶血弧菌液涂布 2216 平板, 待菌液干后, 贴上直径为 5 mm 的圆形无菌滤纸片, 滴加 5 μl 筛选的浓度为 1×10^8 CFU/ml 菌株培养液, 28℃培养 24 h, 测量滤纸片周围的抑菌圈直径, 每个样品重复 3 次(Vaseeharan *et al*, 2003)。

1.6　菌株 16S rDNA 同源性比对分析

取少量菌落放入装有 800 μl 无菌水的 1.5 ml 离心管中煮沸 15 min, 以细菌基因组 DNA 为模板, 用 16S rDNA 通用引物(27F: 5′-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3′, 1492R: 5′-TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T-3′)(Lane, 1991)进行 PCR 扩增。50 μl 扩增体系含 2× Ex *Taq* Premix 25 μl(TaKaRa, 大连)、正反向引物各 2.5 μl、DNA 模板 2.5 μl。94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30 循环; 72℃ 10 min。将 PCR 产物交上海生工测序公司测序(Lane, 1991)。测序结果经 GenBank 中已知序列进行同源性筛选, 选取同源性最高的序列进行多重序列比较, 并以邻接法构建系统发育树(王景峰等, 2011)。

1.7　生长曲线的绘制

选取具有脱氮能力和对副溶血弧菌拮抗作用的菌株, 接种到 200 ml 的 2216E 液体培养基中, 28℃、150 r/min 培养 24 h。取 10 ml 菌液, 4000 r/min 离心 10 min, 去除上清液, 以 10 ml 无菌 PBS 重悬沉淀, 取 7.5 ml 接种到 250 ml 2216E 液体培养基中, 28℃、150 r/min 摇床培养, 每隔 2 h 测量菌液的 $OD_{600\ nm}$ 值, 绘制生长曲线。

1.8　对虾体内的副溶血弧菌感染拮抗实验

将暂养 7 d 的 180 尾日本囊对虾随机分为 3 组, 每组 3 个重复, 置于 10 L 盐度为 28 的海水中, 水温

为 22–25℃，pH 为 7.8–8.5。每天投喂 3 次配合饲料，试验期间不换水。实验组每天接种 25 ml 约 10^8 CFU/ml 的上述筛选到的菌株的海水悬液，使水体中菌液浓度达 2.5×10^5 CFU/ml，对照组为空白组，养殖 10 d 后感染副溶血弧菌(傅松哲等, 2009)。向对虾第二腹节肌肉注射 10 μl 浓度为 1×10^7 CFU/ml 副溶血弧菌菌液，24 h 后统计对虾的死亡情况。

1.9 菌株在对虾养殖实验中的应用

将 1200 尾大小约(1.5±0.3) cm 的健康凡纳滨对虾随机分为 4 组，分别为加菌加糖组(A+S)、加菌组(A)、加糖组(S)和空白组(C)。每组设置 3 个重复的实验桶，加入盐度为 28 的海水 80 L，按 100 尾/桶进行养殖，水温为 22–25℃，pH 为 7.8–8.5，每 3 d 吸污并更换约 1/3 的水。加菌组添加 25 ml 浓度约 10^8 CFU/ml 的上述细菌的培养液，水体中细菌浓度约为 3.13×10^4 CFU/ml，需加糖的组按照前一天饲料添加量 70%添加赤砂糖(邓应能, 2011[1]; 张许光, 2012[2]; 赵培, 2011[3])。每 15 d 检测氨氮和亚硝酸氮和浓度。

1.10 安全性分析

将 240 尾大小约 3 cm 的健康凡纳滨对虾随机分为 4 组，每组 3 个重复，置于 10 L 盐度为 28 的海水中，水温为 22–25℃，pH 为 7.8–8.5。每天投喂 3 次配合饲料，并吸去残饵和粪便，换水 1/3。阴性对照组在对虾第二腹节肌肉中注射 10 μl 生理盐水，实验组在对虾第二腹节肌肉分别注射 10 μl 筛选出的 20131023A05 菌株的 1×10^6 CFU/ml、1×10^7 CFU/ml 和 1×10^8 CFU/ml 浓度的 PBS 悬液，每 24 h 记录对虾死亡情况，观察 7 d。

1.11 数据处理

实验数据采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析，数据差异显著时采用 Duncan's 进行多重比较，显著水平为 $P<0.05$，数据以平均值±标准差表示。

2 结果

2.1 菌株的筛选

对虾肠道匀浆液经 2216E 富集培养和无机氮固体培养基筛选，分离到 3 株在筛选培养基上生长良好的细菌，编号分别为 20131023A00、20131023A01 和 20131023A05。经测定，3 株细菌在 28℃条件下，24 h 对无机氮含量为 0.12%的液体培养基中的氨氮去除能力为 38%–50%，其中，菌株 20131023A05 清除氨氮效果最好，达到(49.9±0.5)%(表 1)。

表 1 经无机氮筛选培养基获得的 3 株菌的氨氮去除效果

Tab.1 NH_3-N removing effect by the three bacterial strains isolated from the inorganic nitrogen screening medium

菌株编号 Strain No.	20131023A00	20131023A01	20131023A05
氨氮清除率 Removal rate of NH_3-N (%)	38.9±0.1	43.1±0.4	49.9±0.5

2.2 对副溶血弧菌的拮抗能力

5×10^5 CFU/ml 的菌株 20131023A05、20131023A00 和 20131023A01 在涂布有一定浓度的副溶血弧菌的 2216E 平板的滤纸片上生长，并产生对副溶血弧菌具有拮抗作用的分泌物时，滤纸片周围会出现不生长副溶血弧菌的透明圈。初步拮抗实验显示，菌株 20131023A00 和 20131023A01 未出现抑菌圈，菌株 20131023A05 出现抑菌圈。采用不同浓度的副溶血弧菌对具有抑菌圈的菌株的拮抗能力分析显示，随着副溶血弧菌菌液的浓度的降低，抑菌圈变大。其中，菌株 20131023A05 在副溶血弧菌为 1.57×10^5 CFU/cm^2 时，抑菌圈直径为(9.14±0.05) mm；副溶血弧菌在 1.57×10^4 CFU/cm^2 时，抑菌圈直径为(11.57±0.03) mm；副溶血弧菌在 1.57×10^3 CFU/cm^2 时，抑菌圈直径为(13.59±0.02) mm(表 2)。

2.3 细菌系统发育树的建立

通过氨氮去除能力和对副溶血弧菌的拮抗能力

表 2 候选菌株在不同浓度的副溶血弧菌平板上产生的抑菌圈大小

Tab.2 The sizes of inhibition zone of the candidate bacterial isolates on the plates with *V. parahaemolyticus* at different concentrations (Diameter: mm)

副溶血弧菌浓度 Concentration of *V. parahaemolyticus* (CFU/cm^2)	1.57×10^5	1.57×10^4	1.57×10^3
菌株编号 Strain 20131023A05	9.14±0.05	11.57±0.03	13.59±0.02
菌株编号 Strain 20131023A00	0	0	0
菌株编号 Strain 20131023A01	0	0	0

1) 邓应能. 不同养殖系统生物絮团调控模式研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2011

2) 张许光. 生物絮团技术在凡纳滨对虾工厂化养殖中的应用与研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2012

3) 赵培. 生物絮团技术在海水养殖中的研究与应用. 上海海洋大学博士研究生学位论文, 2011

分析，初步筛选出菌株 20131023A05 进行菌株的种属鉴定。经 16S rDNA 序列测定，在 GenBank 用 BLAST 比对发现，该菌属于假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas* spp.)，比对结果中有大量未分类的假交替单胞菌属成员的序列信息，筛选结果中已分类的假交替单胞菌种类包括杀鱼假交替单胞菌(*P. piscicida*)、金丽假交替单胞菌(*P. flavipulchra*)、解肽假交替单胞菌(*P. peptidolytica*)、柠檬假交替单胞菌(*P. citrea*)和温海假交替单胞菌(*P. maricaloris*)等。下载相关菌株序列，构建系统发育树(图 1)，结果显示，该菌株与杀鱼假交替单胞菌(*P. piscicida*)有最近的亲缘关系，但相近的假交替单胞菌的系统发育树的部分分支存在不同菌种的交叉分布。

2.4　菌株 20131023A05 的生长曲线

菌株 20131023A05 在 2216E 液体培养基中的生长曲线符合典型的“S”型细菌生长曲线。在 0–4 h 时处在延缓期，在 4–20 h 进入对数生长期，持续时间较长，20 h 后进入稳定期。

2.5　菌株 20131023A05 对副溶血弧菌感染的保护作用

体长为(5.35±0.23) cm 的日本囊对虾在菌株 20131023A05 (2.5×10^5 CFU/ml)水体中养殖 10 d 后，在腹节注射 10^5 CFU 副溶血弧菌，3 d 后菌株 20131023A05 浸浴组的日本囊对虾存活率为(50.0±5.6)%，而对照组的平均存活率为(22.0±5.6)% (图 3)，菌株浸浴组的相对成活率(RPS)为 35%，表明该菌一定程度保护了日本囊对虾免于副溶血弧菌的感染。

2.6　菌株 20131023A05 在对虾养殖中的应用

将菌株 2013023A05 用于凡纳滨对虾养殖试验，将 1200 尾对虾随机分为加糖加菌、加菌、加糖和对照共 4 组，分别以 1250 尾/m^3 的密度在 4 组的 12 个 80 L 水体中养殖，经 60 d 养殖，各组对虾存活率分别为(32.7±2.1)%、(24.0±3.0)%、(29.0±2.8)%和(23.0±1.4)%，即最终密度为 408.7±26.3、300±37、362.5±35.0 和 287.5±17.5 尾/m^3。15–30 d 时，各组之间对虾存活率均有下降，但各组间无显著差异；45 d 以后，加菌加糖组对虾存活率显著高于其他 3 组；60 d 时，加菌加糖组存活率显著高于加菌组和对照组，而与加糖组无显著差异(图 4)。

定期测定养殖水体的氨氮(图 5)，结果表明，在养殖的 60 d 之内，水体中的氨氮一直呈上升趋势，在

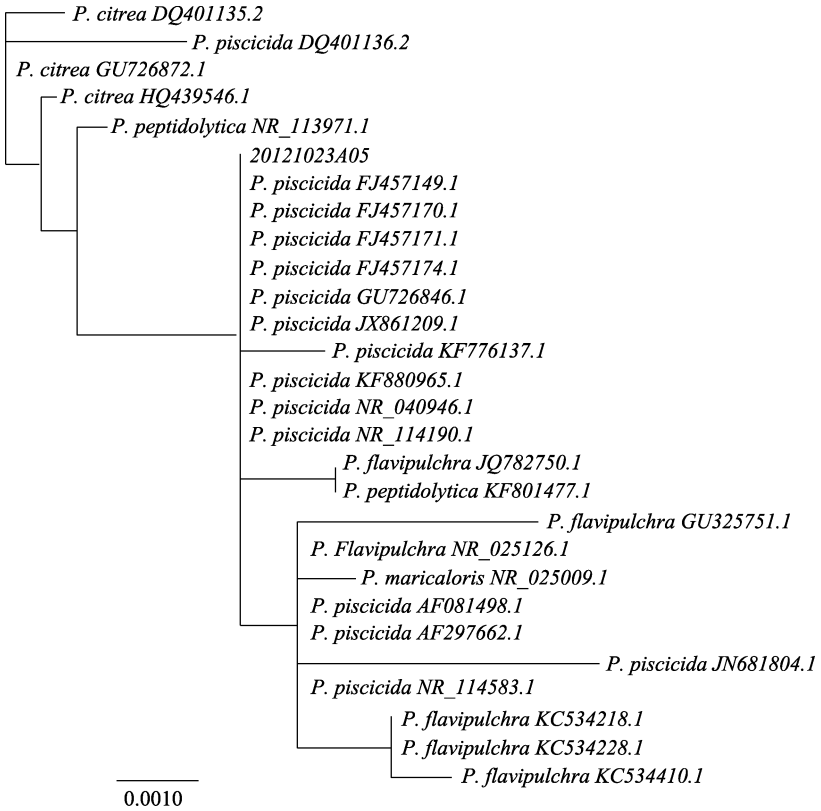

图 1　菌株 20131023A05 与相关菌株的 16S rDNA 序列系统发育树

Fig.1　Phylogenetic tree constructed based on the 16S rDNA sequences of the bacterial isolate 20131023A05 and related strains

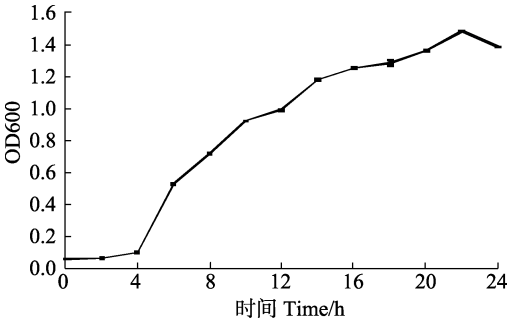

图 2 菌株 20131023A05 在 2216E 液体培养基中的生长曲线

Fig.2 The growth curve of bacterial isolate 20131023A05 in 2216E broth

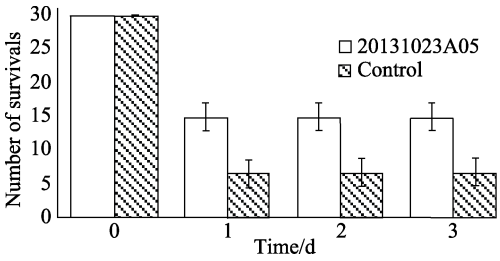

图 3 菌株 20131023A05 对日本囊对虾感染副溶血弧菌的保护作用

Fig.3 Protection of bacterial isolate 20131023A05 against *V. parahaemolyticus* in *M. japonicus*

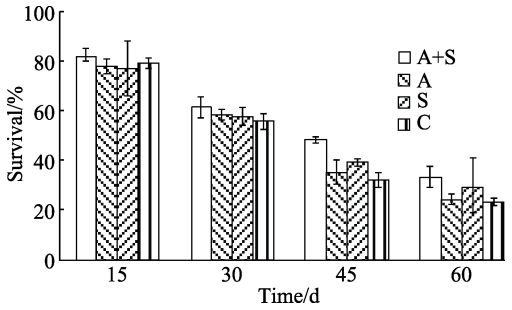

图 4 采用菌株 20131023A05 进行凡纳滨对虾养殖的存活率

Fig.4 Survival rate of cultured *L. vannamei* immersed in the bacterial strain 20131023A05

A+S: 加菌加糖组; A: 加菌组; S: 加糖组; C: 对照组

A+S: Experiment group with addition of bacteria and sugar; A: Experiment group with addition of bacteria; S: Experiment group with addition of sugar; C: Control group

15 d 时，加菌的实验组出现氨氮更快上升的情况，但 15–30 d 时氨氮水平保持平稳，在随后的养殖过程中与对照组没有显著差异，而加糖组和加菌加糖组在 15 d 时氨氮水平与对照组无显著差异，而在 30 d 以后，氨氮表现出比对照组降低的趋势。在 45–60 d 养殖中，加菌加糖组氨氮水平明显低于其他 3 组，在养殖 60 d 时，加菌加糖组氨氮水平低于加糖组，加菌组与对照组之间差异不显著。

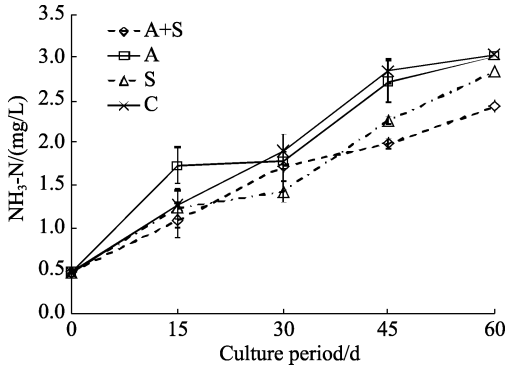

图 5 采用菌株 20131023A05 进行凡纳滨对虾养殖的水体中氨氮含量变化

Fig.5 Changes in the concentration of NH_3-N in the water of *L. vannamei* culture tanks treated with bacterial strain 20131023A05

A+S: 加菌加糖组; A: 加菌组; S: 加糖组; C: 对照组

A+S: Experiment group with addition of bacteria and sugar; A: Experiment group with addition of bacteria; S: Experiment group with addition of sugar; C: Control group

定期测量养殖水体中的亚硝酸氮(图 6)，结果表明，在养殖的 60 d 之内，水体中的亚硝酸氮一直呈上升趋势，在养殖 0–15 d 时，养殖水体中亚硝酸氮迅速上升，在 15 d 时各组与对照组之间无显著差异；在 15–45 d 时，养殖水体中亚硝酸氮上升缓慢，加菌组中亚硝酸氮水平高于其他 3 组，而加菌加糖组、加糖组与对照组之间无显著差异；在 45–60 d 时，加菌加糖组亚硝酸盐水平高于加糖组和对照组。在养殖周期内，水体中添加菌株 20131023A05，未观察到加菌组与对照组之间的显著差异。

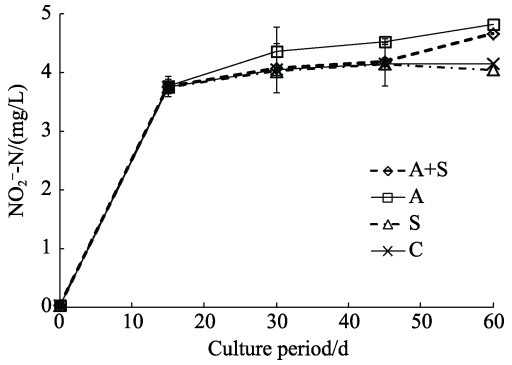

图 6 采用菌株 20131023A05 进行凡纳滨对虾养殖的水体中亚硝酸氮含量变化

Fig.6 Changes in the concentration of NO_2^--N in the water of *L. vannamei* culture tanks treated with bacterial strain 20131023A05

A+S: 加菌加糖组; A: 加菌组; S: 加糖组; C: 对照组

A+S: Experiment group with addition of bacteria and sugar; A: Experiment group with addition of bacteria; S: Experiment group with addition of sugar; C: Control group

2.7　菌株 20131023A05 对对虾的安全性

在凡纳滨对虾第二腹节肌肉注射 10^4–10^6 CFU 菌株 20131023A05 悬液,观察 7 d 以确认菌株的安全性。结果显示，实验组对虾体内注射 10^6 CFU、10^5 CFU 和 10^4 CFU 的菌悬液后 7 d 内，均没有明显病症，只是在个别组出现偶发性死亡，而且死亡的发生迟于对照组，统计上与对照组无显著差异(P>0.05)(表 3)，说明该菌株对对虾没有致病作用和致死作用。

表 4　注射 20131023A05 安全性试验中各组凡纳滨对虾的累积死亡率

Tab.4　The cumulative mortality of *L. vannamei* injected with bacterial isolate 20131023A05 (%)

时间 Time (d)	对照组 Control	10^6 CFU	10^5 CFU	10^4 CFU
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	1.11±1.56	0	0	0
5	1.11±1.56	0	0	0
6	1.11±1.56	1.11±1.56	0	0
7	1.11±1.56	1.11±1.56	1.11±1.56	0

3　讨论

随着凡纳滨对虾养殖规模的扩大和产业的持续，近年来的病害越来越严重，2010 年在我国南方和越南发生急性肝胰腺坏死病，随后已扩展到马来西亚、泰国、墨西哥等多个国家，对这些国家的对虾养殖业造成了灾难性的打击(FAO, 2013)。经研究表明，这一病害是由高致病力的副溶血弧菌所致(张宝存等, 2012; Tran *et al*, 2013)，对虾养殖过程中，由于残饵以及对虾排泄物的积累，使得养殖水体中的无机氮和高致病力的副溶血弧菌数量增加，导致了急性肝胰腺坏死病的迅速传播。因此，分离和筛选具有降低养殖水体中无机氮、拮抗副溶血弧菌的有益菌，对于急性肝胰腺坏死病的防控具有重要意义。

本研究对兼具无机氮转化能力和拮抗副溶血弧菌能力的有益菌进行了筛选。采用不含有机氮素的筛选培养基分离到 3 株无机氮转化功能菌株，对其氨氮转化率进行分析，结果显示，在盐度为 30 的海水中，pH 在 7.2–7.4 范围内，在 28℃时，3 株菌对氨氮含量为 0.12%的液体筛选培养基中氨氮的转化效率在 38.9%–49.9%范围内，其中，菌株 20131023A05 去除氨氮能力最高。胡修贵等(2013)在对虾养殖池的生物絮团中筛选出两株对氨氮具有高转化率的菌株，食物盐单胞菌和胜利盐单胞菌，通过对温度、盐度、pH、碳氮比等各方面的适应性比较研究，筛选出的胜利盐单胞菌在 27–42℃的温度范围、盐度为 30–50、pH 为 7–9 时，对氨氮含量为 1%的液体培养基中氨氮的转化率达 80%以上，上述菌株虽然比本研究筛选的菌株的氨氮转化率表现得更好，但缺乏抗病原菌的功能。病原拮抗菌也有大量研究报道，傅松哲等(2009)从海洋沉积物中分离到两株对需钠弧菌有抑制作用的拮抗菌，对凡纳滨对虾弧菌病有明显的预防效果。孙艳等(2013)也从健康中国明对虾消化道分离到多株具有抵抗 WSSV 感染的芽孢杆菌，其中一株坚强芽孢杆菌添加到对虾饲料中进行投喂，与对照组相比，相对保护率达 33.7%。本研究采用纸片法观察上述 3 株菌在副溶血弧菌平板上产生的抑菌圈，筛选出菌株 20131023A05 对副溶血弧菌具有拮抗作用，注射副溶血弧菌的日本囊对虾在 2.5×10^5 CFU/ml 的该菌浸浴浓度下，与对照组相比的相对存活率达 35%。

生物絮团技术是氨氮降解菌在对虾养殖中的最佳应用方式之一，通过在水体中添加糖类，能有效满足利用无机氮的氨氮降解菌的碳源需求。本研究观察到，在凡纳滨对虾养殖实验中添加菌株 20131023A05 和赤砂糖的方式能获得最佳的对虾存活率和氨氮去除效率，单纯添加糖类或者添加该菌株的效果不如两者同时添加的实验组。这一结果与孙运忠等(2012)在日本囊对虾室内集约化养殖水体中同时添加红糖和枯草芽胞杆菌所观察到的效果类似，但在亚硝酸盐的转化作用上效果不是十分显著，这一问题可能需要针对亚硝酸盐筛选特效的菌株来解决。

本研究筛选到的菌株 20131023A05 经 16S rDNA 序列比对鉴定，该菌株与杀鱼假交替单胞菌有最近的亲缘关系，但对该菌的安全性分析表明，对虾腹节肌肉中直接注射 10^6 CFU 的该菌，也未导致对虾的明显死亡，表明该菌具有良好的安全性。该菌分离自健康对虾肠道，是对虾的土著菌株，其在使用上具有较好的安全性。本实验室在对虾急性肝胰腺坏死病原菌的研究中，分离到大量副溶血弧菌菌株，感染试验表明副溶血弧菌是导致对虾大规模死亡的病原(张宝存等, 2012; Tran *et al*, 2013)，但也证明不少副溶血弧菌菌株对对虾完全没有致病作用(另文发表)，说明不能仅凭细菌的种类作为判断其是否具有致病性的依据。

本研究结合无机氮转化和病原菌拮抗两种筛选法进行功能有益菌的筛选，在其他的研究中少有报道。所筛选到的菌株兼备去除水体中的氨氮和对虾病原菌副溶血弧菌的功能，有望在对虾生物絮团养殖技术中，起到既能改善对虾养殖的水环境，又能防控对

虾急性肝胰腺坏死的作用，将具有广泛的应用前景。下一步值得对该菌株在这两种作用的协同效应的机制及其应用方式上开展进一步深入研究。

参 考 文 献

丁彦文, 艾红. 微生物在水产养殖中的应用. 湛江海洋大学学报, 2000, 20(1): 68–73

丁爱中, 陈繁忠, 雷剑泉, 等. 光合细菌调控水产养殖业水质的研究. 农业环境保护, 2000, 19(6): 339–341, 344

王晓姗, 刘杰, 于建生. 海洋氮循环细菌研究进展. 科学技术与工程, 2009, 9(17): 5057–5064

王景峰, 金敏, 谌志强, 等. 一株好氧脱氮菌的筛选与脱氮特性研究. 环境科学. 2011, 32(8): 2409–2413

孙运忠, 赵培, 王彦怀, 等. 添加红糖和芽胞杆菌对日本囊对虾室内集约化养殖水质的调控作用. 渔业科学进展, 2012, 33(3): 70–76

孙艳, 宋晓玲, 刘飞, 等. 一株芽孢杆菌 PC024 的鉴定及其抗 WSSV 感染效果的研究. 水产学报, 2013, 37(4): 574–583

李基东. 反硝化脱氮碳源研究现状. 山西建筑, 2008, 34(8): 8–9

宋岚. 纳氏试剂光度法测定水中氨氮的影响因素分析. 青海科技, 2000, 7(3): 42–43

张宝存, 刘飞, 边慧慧, 等. 一株凡纳滨对虾病原菌的分离、鉴定及其致病力分析. 渔业科学进展, 2012, 33(2): 56–62

周运友, 余世科, 卢琴, 等. N-(1-萘基)-乙二胺荧光光度法测定痕量亚硝酸根. 光谱学与光谱分析杂志, 2005, 25(8): 1318–1321

胡修贵, 赵培, 李玉宏, 等. 生物絮团中异养亚硝化菌的分离鉴定及其特性. 渔业科学进展, 2013, 34(5): 97–103

傅松哲, 宋奔奔, 刘鹰, 等. 弧菌拮抗菌的筛选及其对凡纳滨对虾的抑菌防病作用. 中国环境科学, 2009, 29(8): 867–872

FAO. Report of the FAO/MARD Technical Workshop on Early Mortality Syndrome (EMS) or Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS) of Cultured Shrimp (under TCP/VIE/3304) Hanoi, Vietnam, 2013

Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics, 1991, 125–175

Tran L, Nunan L, Redman RM, *et al*. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. Dis Aquat Org, 2013, 105(1): 45–55

Vaseeharan B, Ramasamy P. Control of pathogenic Vibrio spp. by *Bacillus subtilis* BT 23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Lett Appl Microbiol, 2003, 36(2): 83–87

(编辑 陈辉)

Identification and Application of a Probiotic Strain Functioning in Both Ammonia Nitrogen Removal and *Vibrio parahaemolyticus* Antagonism

WANG Lei[1,2], WANG Zhijie[2], GAO Ge[1,2], HUANG Jie[2,3①]

(1. *Shanghai Ocean University, Shanghai* 201306; 2. *Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao* 266071; *Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Function Laboratory of Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao* 266071)

Abstract Three bacterial strains, 20131023A00, 20131023A01, and 20131023A05, were isolated from shrimp guts and the farming ponds using inorganic selecting medium. When cultured in the liquid selecting medium (pH=7.2) containing 0.12% ammonia nitrogen at 28℃ for 24 h, the ammonia conversion rates of the three strains were (38.9±0.1)%, (43.1±0.4)%, and (49.9±0.5)% respectively. Using the paper disk method, we identified that 20131023A05 was the only strain that antagonized *Vibrio parahaemolyticus*. We measured the diameters of inhibition zones produced by Strain 20131023A05 on the plates coated with *V. parahaemolyticus* at the densities of 1.57×10^5 CFU/cm^2, 1.57×10^4 CFU/cm^2, and 1.57×10^3 CFU/cm^2, and the diameters were (9.14±0.05) mm, (11.57±0.03) mm, and (13.59±0.02) mm respectively. It was identified that the strain had the closest genetic relationship with *Pseudoalteromonas piscicida* according to 16S rDNA sequencing. *Marsupenaeus japonicus* immersed with Strain 20131023A05 at 2.5×10^5 CFU/ml showed resistance to intramuscular-injected *V. parahaemolyticus* and the relative survival rate (RPS) was 35%. We applied strain 20131023A05 at 3.13×10^4 CFU/ml once every three days as well as brown sugar (70% of diet) every day in the culture water of *Litopenaeus vannamei* for 60 days. Subsequently the concentration of ammonia nitrogen in the water became significantly lower than the control and other groups. Our results suggested that Strain 20131023A05 could function in both ammonia removal and *V. parahaemolyticus* inhibition, therefore may have great potentials in shrimp farming industry.

Key words Denitrifying bacteria; *Vibrio parahaemolyticus*; *Pseudoalteromonas piscicida*; Antagonism

① Corresponding author: HUANG Jie, E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn

DOI: 10.11758/yykxjz.20150417001 http://www.yykxjz.cn/

对虾养殖池中一株弧菌拮抗菌的分离鉴定*

张欢欢[1,2] 王秀华[2①] 李 晨[2] 黄 倢[2,3]

(1. 中国海洋大学海洋生命学院 青岛 266003；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)

摘要 从对虾养殖池中分离出 1 株编号为 2013082515(简称菌株 15)的菌株，以鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*)、哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)和副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)为指示菌，分析了菌株 15 对指示菌的抑菌效果及最低抑菌浓度，同时，分析了菌株 15 对其他 7 株弧菌的抑菌效果。结果显示，菌株 15 对 3 株指示菌均具有抑菌效果，对鳗弧菌、哈维氏弧菌及副溶血弧菌的最低抑菌浓度分别为 2.50×10^4、2.50×10^5、2.50×10^5 CFU/ml；对其他弧菌也具有一定的抑菌效果。采用注射及浸泡感染方法分析了菌株 15 对对虾的生物安全性，结果显示，在高浓度时，菌株 15 对对虾具有潜在毒性。分别用细菌全细胞脂肪酸气相色谱法和 16S rDNA 序列分析比对法对该菌进行分类鉴定，表明菌株 15 为一株假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas* sp.)。

关键词 假交替单胞菌；拮抗菌；弧菌；抑菌效果

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)03-0085-08

近年来，对虾养殖病害频繁发生，新发疾病危害严重，由病毒、细菌导致的偷死病及早期死亡症已成为危害产业发展的重要原因(Zhang *et al*, 2014; Joshi *et al*, 2014)。弧菌是海水养殖中常见微生物，可导致对虾感染发病的病原弧菌有鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*) (邓欢等, 1998)、哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*) (Liu *et al*, 1996)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*) (Joshi *et al*, 2014)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*) (Lee *et al*, 1996)和创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*) (Alapide-Tendencia *et al*, 1997)等。

早期的水产养殖动物细菌性疾病控制主要依靠抗生素，近年来，发现持续使用抗生素不仅会导致耐药菌株产生，还会引起药物残留、降低养殖动物免疫力及破坏水体微生态平衡等(Alcaide *et al*, 2005)，为此，寻找安全有效的水产养殖病害防治方法成为水产病害防治领域的一个热点。在对虾养殖水体中添加假单胞菌(Das *et al*, 2006)、芽孢杆菌(Ziaei-Nejad *et al*, 2006)、乳酸杆菌(Immanuel *et al*, 2007)等，可以有效控制病原微生物，优化养殖生态环境，减少虾病发生。

本实验从河北黄骅一对虾养殖池中分离出一株对弧菌具有明显拮抗作用的细菌，研究了该拮抗菌株对多株弧菌的拮抗效果，初步评价了该菌的生物安全性，并进行了细菌的分类鉴定。研究结果可为开发对虾养殖用有益菌提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

菌株安全评价用凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)购于山东潍坊龙威公司，注射感染对虾平均体长为(5.0±1.0) cm，浸泡感染对虾平均体长为(2.0±0.3) cm。攻毒期间对虾养殖平均水温为(28±1)℃，海水盐度为 33.0±1.9，pH 值为 7.7−8.1，溶氧为(5.86±0.44) mg/L。

筛选弧菌拮抗菌用指示菌分别为鳗弧菌、哈维氏弧菌、副溶血弧菌。其他弧菌分别为创伤弧菌、溶藻弧菌、魔鬼弧菌(*Vibrio diabolicus*)、坎氏弧菌(*Vibrio*

* 公益性行业(农业)科研专项经费项目(201103034)资助。张欢欢，E-mail: zhanghh12141202@163.com

① 通讯作者：王秀华，研究员，E-mail: wangxh@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-04-17, 收修改稿日期: 2015-04-29

campbellii)、需钠弧菌(*Vibrio natriegens*)、巴西弧菌(*Vibrio brasiliensis*)和轮虫弧菌(*Vibrio rotiferianus*)。上述菌株均为作者实验室分离保存。

1.2 菌株采集与分离纯化

从山东省潍坊市及青岛市、河北省黄骅市、江苏省盐城市、浙江省杭州市等地的对虾养殖池中，用无菌采样瓶采集水样，低温保存带回实验室。在无菌条件下，取水样于 2216E 平板上划线分离纯化，对不同的菌株编号入菌种资源库保存备用。

1.3 拮抗菌的筛选

参照林敏等(2005)的方法，将活化后的鳗弧菌、哈维氏弧菌以及副溶血弧菌分别接种于 2216E 液体培养基，28℃摇床振荡培养 24 h，用无菌水稀释成浓度为 10^7 CFU/ml 的菌悬液，分别涂布于固体平板。用接种环挑取活化 24 h 的待筛选菌株，点种于上述平板上(莫照兰等, 2001)，对各测试菌株编号，于 28℃恒温培养箱培养 48 h 后，观察点种区附近是否出现明显的抑菌透明区或覆盖区，每个平板 3 个平行。

1.4 拮抗菌的抑菌效果测定

采用滤纸片法测定拮抗菌的抑菌效果，具体步骤参照单文荣等(2010)。用无菌镊子在涂布鳗弧菌、哈维氏弧菌以及副溶血弧菌的平板上等距离放置 4 片直径为 6 mm 的无菌滤纸片，向两片滤纸片上分别加入 5 μl 的拮抗菌发酵液(浓度为 2.50×10^8 CFU/ml)，另两片加 5 μl 未接种菌的 2216E 液体培养基为空白对照，每个平板 3 个重复。静置 20 min 后，放入恒温培养箱中，28℃静置培养 24 h。观察并用游标卡尺十字交叉法测量抑菌圈直径，结果取平均值。根据抑菌圈的大小设定抑菌效果，定义直径>20 mm 的为强抑菌效果，标记为“+++”；11 mm < 直径≤20 mm 的为中等抑菌效果，标记为“++”；6 mm < 直径≤11 mm 的为弱抑菌效果，标记为“+”；直径=6 mm 的为无抑菌效果，标记为“－”。

1.5 最低抑菌浓度的测定

用 10 倍梯度稀释法稀释拮抗菌株的发酵液(初始浓度为 2.50×10^8 CFU/ml)，最低稀释到 2.50×10^2 CFU/ml。参照 **1.4** 的方法，选用鳗弧菌、哈维氏弧菌及副溶血弧菌为指示菌，进行各稀释梯度发酵液的抑菌实验，每个平板放 4 张滤纸片，用未接种菌的 2216E 液体培养基为空白对照，每个平板 3 个平行，于 28℃恒温培养箱中静置培养 24 h，观察抑菌情况。参照李成海等(2013)的判定方法，“+”表示有抑菌活性，“－”表示没有抑菌活性。

1.6 拮抗菌对其他弧菌的拮抗效果

参考 **1.4** 的方法，取发酵的拮抗菌分别对创伤弧菌、溶藻弧菌、魔鬼弧菌、坎氏弧菌、需钠弧菌、巴西弧菌和轮虫弧菌进行拮抗效果分析，根据抑菌圈的大小分析抑菌效果，抑菌效果参照 **1.4** 的设定。

1.7 菌株安全性试验评价

1.7.1 *注射感染法* 试验设待测菌株 15 组、阳性对照组和空白对照组，阳性对照组的菌株为实验室分离保存的一株对虾病原菌哈维氏弧菌，空白对照组为 PBS。将待测菌株发酵后的离心沉淀用 PBS 稀释成 1.29×10^9、1.29×10^8、1.29×10^7、1.29×10^6、1.29×10^5 CFU/ml 共 5 个浓度组；阳性对照菌稀释成 2.38×10^7、2.38×10^6、2.38×10^5、2.38×10^4 CFU/ml 共 4 个浓度组。采用腹部肌肉注射感染的方法，每尾注射菌悬液 50 μl，每组对虾 12 尾。试验期间，每天正常投喂、吸污、换水，记录对虾死亡情况，感染后观察 14 d，统计对虾累计死亡率，采用 Reed 等(1938)的方法计算半致死剂量(LD_{50})。对死亡对虾进行解剖和菌株的分离鉴定。

1.7.2 *浸泡感染法* 试验设待测菌株 15 组、阳性对照组和海水对照组，阳性对照组的菌株为实验室分离保存的一株对虾病原菌哈维氏弧菌。将待测菌株、哈维氏弧菌发酵后的离心沉淀用海水分别稀释成 1.76×10^8、1.76×10^7、1.76×10^6、1.76×10^5、1.76×10^4 CFU/ml 共 5 个浓度及 1.10×10^8、1.10×10^7、1.10×10^6、1.10×10^5、1.10×10^4 CFU/ml 共 5 个浓度。感染采用浸泡的方法，每组对虾 15 尾。试验期间不换水，每天正常投喂、吸污，记录对虾死亡情况，感染后观察 96 h，统计对虾累计死亡率，采用软件 SPSS 16.0 计算 96 h 半致死浓度 96 h LC_{50}，对死亡对虾进行解剖和菌株的分离鉴定。

1.8 菌株鉴定

1.8.1 *16S rDNA 序列分析比对及系统发育分析法* 参照范文辉等(2005)扩增细菌 16S rDNA 序列。将扩增产物交由上海桑尼生物工程有限公司测序，所得序列在 GenBank 数据库中利用 BLAST 进行同源性比对，选取同源性较高的序列，利用 MEGA 5.0 进行多重比较后通过邻接法构建系统发育树，以确定分离菌株的分类地位。

1.8.2 *细菌全细胞脂肪酸分析鉴定法* 细菌全细胞脂肪酸的提取按照 MIDI 公司(美国)提供的标准方

法进行，气相色谱系统应用美国 Agilent 6850 型气相色谱仪，分析软件应用 MIDI 公司开发的细菌全细胞脂肪酸鉴定及分析系统(MIS)。

2　结果

2.1　拮抗菌的筛选

从山东省潍坊市及青岛市、河北省黄骅市、江苏盐城市、浙江杭州市等地的对虾养殖池中，共分离出菌株 111 株，用平板点种法筛选到 1 株对鳗弧菌、哈维氏弧菌和副溶血弧菌均具有拮抗作用的菌株，编号为 2013082515(简称菌株 15)。该菌分离自河北黄骅市一室内对虾养殖池，菌株在 2216E 平板上的菌落形态为圆形，边缘整齐，单菌落直径约为 1 mm，产黄色色素。用菌株 15 发酵液对鳗弧菌、哈维氏弧菌和副溶血弧菌进行抑菌效果分析，显示该菌对上述 3 株弧菌的抑菌圈直径分别为(34.90±0.36) mm、(25.74±0.17) mm、(13.07±0.39) mm，如图 1 所示。结果表明，菌株 15 对鳗弧菌及哈维氏菌具有强的抑菌效果(+++)，对副溶血弧菌抑菌效果中等(++)。

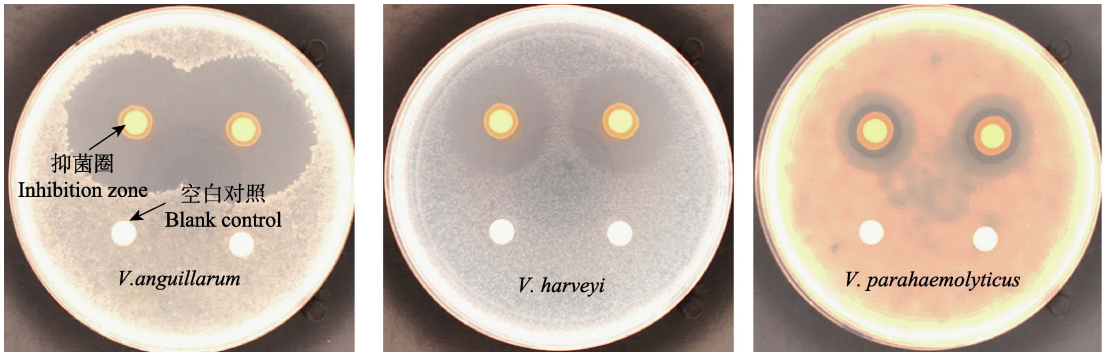

图 1　菌株 15 对鳗弧菌、哈维氏弧菌和副溶血弧菌的抑菌效果

Fig.1　The antibacterial effect of Strain 15 against *V. anguillarum*, *V. harveyi* and *V. parahaemolyticus*

2.2　菌株 15 对 3 株弧菌的最低抑菌浓度

菌株 15 发酵液经梯度稀释，不同稀释浓度的发酵液对鳗弧菌、哈维氏弧菌、副溶血弧菌的最低抑菌浓度分别为 2.50×10^4 CFU/ml、2.50×10^5 CFU/ml、2.50×10^5 CFU/ml(表 1)。

2.3　菌株 15 对其他弧菌的拮抗效果

选用创伤弧菌、溶藻弧菌、魔鬼弧菌、坎氏弧菌、需钠弧菌、巴西弧菌和轮虫弧菌，分别测试菌株 15 对其抑菌效果，结果见图 2。结果显示，菌株 15 对 7 株弧菌均具有一定的拮抗效果，但抑菌效果存在差别。对其抑菌圈大小进行统计，可知产生抑菌圈最大的弧菌分别是巴西弧菌和轮虫弧菌，其次是创伤弧菌、坎氏弧菌和需钠弧菌，魔鬼弧菌与溶藻弧菌抑菌圈较小(表 2)。

2.4　菌株的生物安全性评价

实验对虾经注射感染后累计死亡率结果见表 3。观察发现，注射高浓度组实验菌(1.29×10^9 CFU/ml 与 1.29×10^8 CFU/ml)的凡纳滨对虾，在 24 h 后开始出现死亡，对虾停止摄食，空肠胃，对外界反应迟钝，对死亡对虾肌肉和肝胰腺进行细菌的分离鉴定，确定菌株 15 为优势菌，至第 4 天时，该组对虾的死亡数趋于稳定。阳性对照哈维氏弧菌注射组中，高浓度组(2.38×10^7 CFU/ml)的对虾在注射 24 h 内死亡率达 91.7%，症状为肝胰腺发黄，胃肠内无食物，感染后

表 1　不同浓度菌株 15 发酵液的抑菌效果

Tab.1　The antibacterial effect of Strain 15 in different concentration

指示菌 Indicator bacteria	拮抗菌浓度 Concentration of antagonism bacteria(CFU/ml)				
	2.50×10^7	2.50×10^6	2.50×10^5	2.50×10^4	2.50×10^3
鳗弧菌 *V. anguillarum*	+	+	+	+	–
哈维氏弧菌 *V. harveyi*	+	+	+	–	–
副溶血弧菌 *V. parahaemolyticus*	+	+	+	–	–

“+”表示有抑菌活性，“–”表示没有抑菌活性

“+” means positive bacteriostatic activity, “–”means no bacteriostatic activity

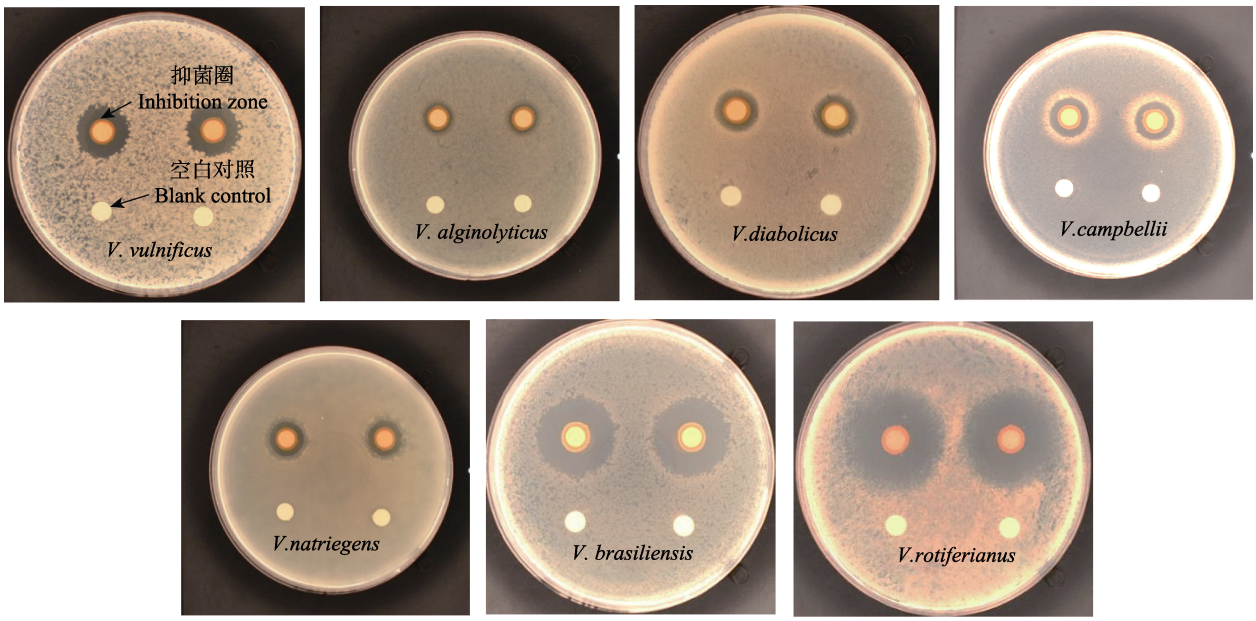

图 2 菌株 15 对创伤弧菌、溶藻弧菌、魔鬼弧菌、坎氏弧菌、需钠弧菌、巴西弧菌和轮虫弧菌的抑菌效果
Fig.2 The antibacterial effect of Strain 15 against *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. diabolicus*, *V. campbellii*, *V. natriegens*, *V. brasiliensis* and *V. rotiferianus*

表 2 菌株 15 对弧菌的抗菌效果
Tab.2 The antibacterial effect of Strain 15 against vibrios

细菌名称 Name of bacteria	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone (mm)	抑菌效果 Antibacterial effect
创伤弧菌 *V. vulnificus*	14.98±0.13	++
溶藻弧菌 *V. alginolyticus*	10.07±0.09	+
魔鬼弧菌 *V. diabolicus*	10.93±0.08	+
坎氏弧菌 *V. campbellii*	14.05±0.17	++
需钠弧菌 *V. natriegens*	13.06±0.11	++
巴西弧菌 *V. brasiliensis*	24.08±0.13	+++
轮虫弧菌 *V. rotiferianus*	23.00±0.12	+++

对虾活力较弱。对死亡对虾肌肉和肝胰腺进行细菌的分离鉴定，显示该组的优势菌为哈维氏弧菌。试验期间，阴性对照组对虾无死亡。菌株 15 与哈维氏弧菌注射感染凡纳滨对虾的 LD_{50} 分别为 2.63×10^7 CFU/ml 与 9.21×10^5 CFU/ml，二者相差 28.5 倍。

用菌株 15 及哈维氏弧菌浸泡感染对虾，各组的累计死亡结果见表 4。观察发现，高浓度组(10^8 CFU/ml)的对虾，在浸泡 24 h 后开始出现死亡，对虾停止摄食，空肠胃，感染后对虾活力较弱。对死亡对虾肠道和肝胰腺进行细菌的分离鉴定，菌株 15、哈维氏弧菌分别为各组的优势菌。试验期间，阴性对照组对虾无死亡。统计显示，菌株 15 与哈维氏弧菌的 96 h LC_{50} 分别为 2.70×10^7、3.50×10^6 CFU/ml，菌株 15 的 LC_{50} 是哈维氏弧菌的 7.7 倍。综合分析两次感染试验结果认为，用高浓度菌株 15 感染对虾后，均表现出显著的临床症状，表明该菌株对对虾具有潜在的毒性。

2.5 菌株鉴定

2.5.1 16S rDNA 序列分析比对及系统发育分析

PCR 扩增菌株 15 16S rDNA，获得 1359 bp 序列，将该序列提交到 GenBank，序列登录号为 KP757027，经 BLAST 比对分析，发现该菌与杀鱼假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas piscicida* JCM 20779)的亲缘关系最近，同源性达 100%。选取假交替单胞菌属及其他属与之同源性相近的 16 株细菌 16S rDNA 序列，构建系统发育树，结果见图 3。推断该菌株 15 为一株假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas* sp.)细菌。

2.5.2 菌株脂肪酸结果分析

菌株 15 全细胞脂肪酸的气相色谱分析结果见图 4，MIDI 数据库比对结果如表 5 所示。在 TSBA6(6.10)数据库中，该菌与河豚毒素假交替单胞菌(*P. tetraodonis*)和产黑假交替单胞菌(*P. nigrifaciens*)的相似度分别为 0.595 和 0.516，均大于 0.5，结合菌株 16S rDNA 序列比对结果，综合确定该菌为假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas* sp.)。

表 3　凡纳滨对虾人工注射感染菌株 15 和哈维氏弧菌后的死亡率

Tab.3　Mortalities of *L. vannamei* infected with Strain 15 or *V. harveyi* by injection

菌株 Strain	菌液浓度 Bacteria concentration (CFU/ml)	攻毒前对虾数 Shrimp number(ind.)	累计死亡数 Cumulative mortality(ind.)	死亡率 Mortality rate(%)	半致死剂量 LD_{50}(CFU/ml)
菌株 15	1.29×10^{9}	12	12	100.0	2.63×10^{7}
Strain 15	1.29×10^{8}	12	10	83.3	
	1.29×10^{7}	12	6	50.0	
	1.29×10^{6}	12	0	0	
	1.29×10^{5}	12	0	0	
哈维氏弧菌	2.38×10^{7}	12	11	91.7	9.21×10^{5}
V. harveyi	2.38×10^{6}	12	6	50.0	
	2.38×10^{5}	12	4	33.3	
	2.38×10^{4}	12	3	25.0	
PBS		12	0	0	

表 4　凡纳滨对虾人工浸泡感染菌株 15 和哈维氏弧菌后的死亡率

Tab.4　Mortalities of *L. vannamei* infected with Strain 15 or *V.harveyi* by immersion

菌株 Strain	菌液浓度 Bacteria concentration(CFU/ml)	攻毒前对虾数 Shrimp number(ind.)	累计死亡数 Cumulative mortality(ind.)	死亡率 Mortality rate(%)	96 h 半致死浓度 96 h LC_{50}(CFU/ml)
菌株 15	1.76×10^{8}	15	15	100.0	2.70×10^{7}
Strain 15	1.76×10^{7}	15	3	20.0	
	1.76×10^{6}	15	0	0	
	1.76×10^{5}	15	0	0	
	1.76×10^{4}	15	0	0	
哈维氏弧菌	1.10×10^{8}	15	15	100.0	3.50×10^{6}
V. harveyi	1.10×10^{7}	15	10	66.7	
	1.10×10^{6}	15	4	26.7	
	1.10×10^{5}	15	0	0	
	1.10×10^{4}	15	0	0	
海水 Sea water		15	0	0	

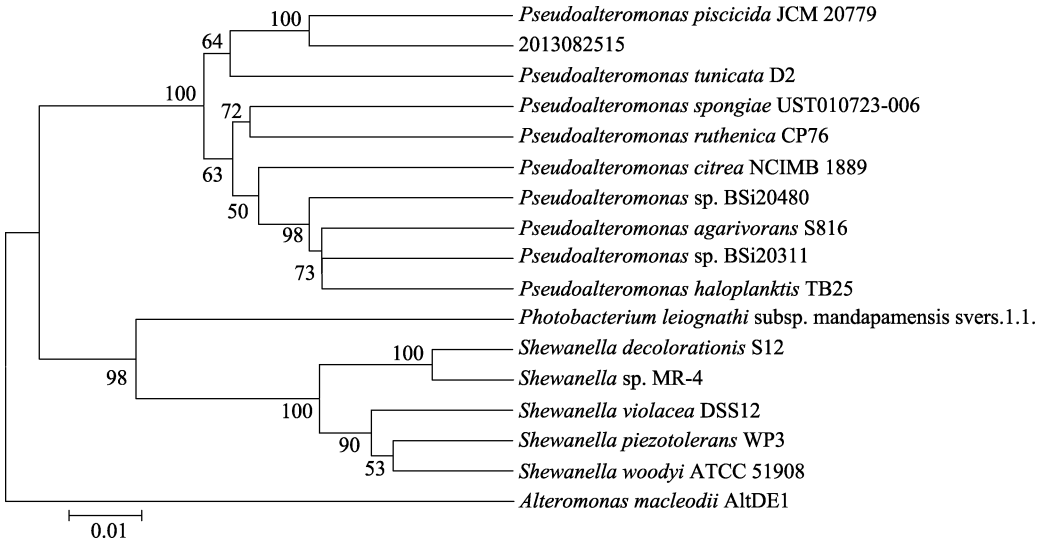

图 3　依据 16S rDNA 基因序列构建的菌株 15 与相近菌株的系统进化树

Fig.3　Phylogenetic tree of Strain 15 with other similar strains based on 16S rDNA sequences

节点数字表示 bootstrap 支持率，1000 次重复

Numbers at nodes indicate the percentage of bootstrap support after 1000 replicates

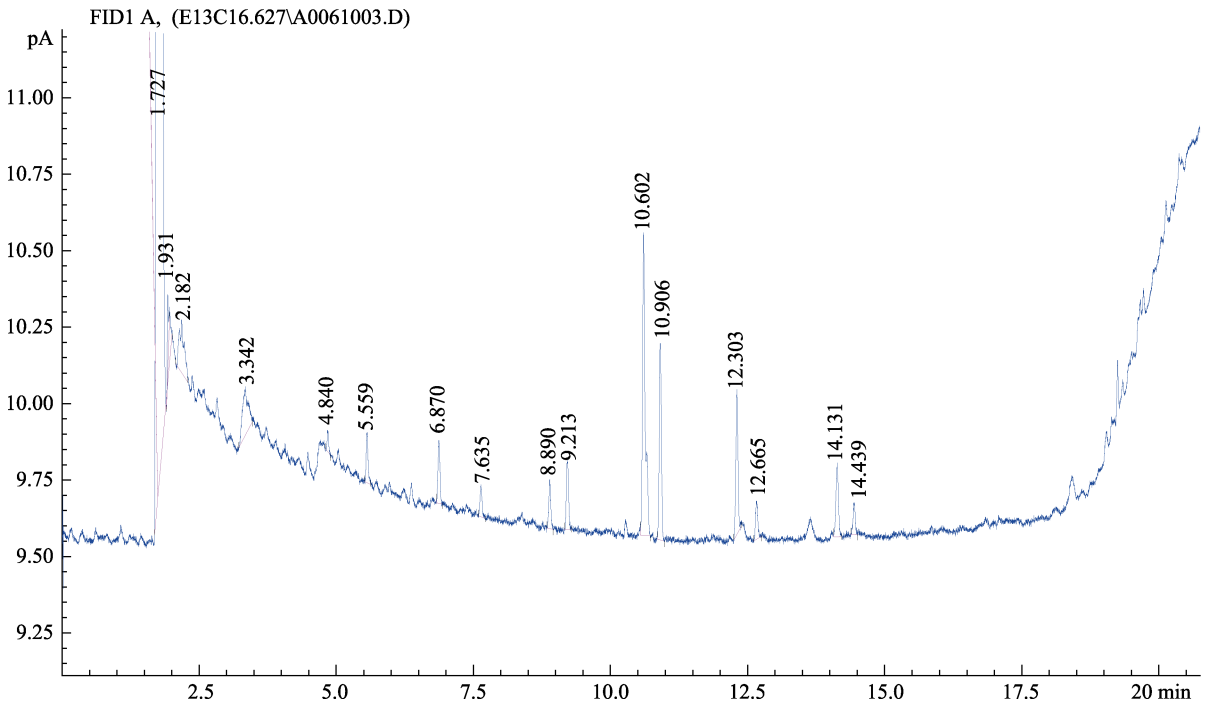

图 4 菌株 15 全细胞脂肪酸气相色谱

Fig.4 Gas chromatographic diagram of Strain 15 whole cell fatty acid

表 5 菌株 15 全细胞脂肪酸的气相色谱鉴定结果

Tab.5 Identification result of Strain 15 based on gas chromatographic analysis of whole cell fatty acid

菌株编号 Strain number	数据库 Database	相似度 Similarity index	登录名称 Entry name
15	TSBA6 6.10	0.595	*Pseudoalteromonas tetraodonis*
15	TSBA6 6.10	0.516	*Pseudoalteromonas nigrifaciens*

3 讨论

假交替单胞菌为革兰氏阴性、杆状细菌，目前，已发现 30 余种来自于海洋的假交替单胞菌属细菌，游海假交替单胞菌(*P. haloplanktis* ATCC 14393^{T})为该属的模式菌种(Gauthier *et al*, 1995)。假交替单胞菌在海洋中分布广泛，能够漂浮或营附着生活，甚至在深海、极地等极端海洋环境中也有存在(Skovhus *et al*, 2004)。该属细菌代谢类型多，根据产色素与否，分为产色素种和不产色素种。产色素种通常产生多种胞外生物活性物质，具有抗细菌(Longeon *et al*, 2004)、抗真菌(詹萍等, 2007)和溶藻(黄姿等, 2008)等活性；而不产色素种类多具有卡拉胶酶、几丁质酶、褐藻酸酶、低温酶的活性，对环境的耐受性较强(Bowman, 2007)，在海洋生态系统中具有重要的作用。本研究从对虾养殖环境中分离的弧菌拮抗菌株 15 即为一株假交替单胞菌，产黄色色素，对多种海水养殖动物病原弧菌具有拮抗活性(图 1、图 2)。

在水产养殖中，利用细菌间的拮抗特性控制养殖动物疾病的方法已经有较多的报道(Balcázar *et al*, 2007; Leyva-Madrigal *et al*, 2011)。研究发现，许多拮抗菌产生的抑菌物质能够杀死或抑制病原菌生长。假交替单胞菌种类较多，至今已发现多个菌株具有拮抗菌特性，多种从珊瑚(*Montipora aequituberculata*)中分离的假交替单胞菌(*P. flavipulchra*)能够合成分子量为 60 kDa 的抗菌蛋白，对耐甲氧西林葡萄球菌株(*Staphylococcus aureus*)具有强抗菌活力(Chen *et al*, 2010)。从卵石上分离出的一株假单胞菌 X153 能够分泌分子量为 87 kDa 的抗菌蛋白，该抗菌蛋白对人皮肤病原及多种鱼类病原弧菌均具有强的抑制效果，还能够提高贝类幼体成活率(Longeon *et al*, 2004)。王树杉(2009)[1)]从海水养殖环境中分离的杀鱼假交替单胞菌

1) 王树杉. 海洋有益菌 JG1 的分类鉴定及其抑菌活性物质的分离纯化与性质研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2009, 42–44

JG1，可分泌蛋白类抑菌物质，能抑制哈维氏弧菌和鳗弧菌的生长，且该菌对养殖动物安全性较高，可作为水产养殖中的有益菌加以研究和应用。本研究分离并鉴定的假交替单胞菌 15，对弧菌同样表现出良好的拮抗作用，但其抗菌机理还有待查明。

对虾养殖是世界渔业经济的支柱产业，近年来，受弧菌病的影响，多地养殖对虾发生早期死亡症(Kumar *et al*, 2014; Joshi *et al*, 2014)，为了寻找替代抗生素的防治方法，利用有益微生物拮抗作用进行对虾早期死亡症的微生物防治将成为未来发展的方向之一。尽管研究结果表明，有多种假交替单胞菌对不同病原菌具有良好的拮抗特性，可以作为有益菌使用，但也发现部分菌株(*P. undina*)对养殖鱼类表现出一定致病性(Pujalte *et al*, 2007)。国内研究也表明，假交替单胞菌可引起养殖刺参溃疡病(孟庆国等, 2006)及腐皮综合征(王印庚等, 2006)。本研究对所分离菌株 15 采用注射及浸泡方式进行生物安全性评价，结果显示，两种感染方式的 LD_{50} 与 96 h LC_{50} 分别为 1.84×10^7 CFU/ml 与 2.70×10^7 CFU/ml，该浓度下，试验对虾出现临床症状，而 Vijayan 等(2006)发现的生物安全性较高的弧菌拮抗菌(*Pseudomonas* PS-102)，在浸泡浓度达到 10^7 CFU/ml 时，浸泡对虾斑节对虾不表现出临床症状，没有出现死亡，表明本研究分离的菌株 15 在高浓度时对对虾具有潜在的毒性。因此，在对该菌株开发应用之前，尚需开展相关研究，阐明该菌株的致病机制，并寻找减毒方法。

参　考　文　献

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

邓欢, 王年斌, 安育新. 日本对虾 *Penaeus japonicus* 受弧菌感染的发病情况与感染剂量、温度条件的关系. 水产科学, 1998, 17(2): 3–7

李成海, 负建民, 艾对元, 等. 金黄色葡萄球菌拮抗菌株的筛选及鉴定. 食品工业科技, 2013, 34(7): 195–198

范文辉, 黄倢, 王秀华, 等. 养殖大菱鲆溃疡症病原菌的分离鉴定及系统发育分析. 微生物学报, 2005, 45(5): 665–670

林敏, 宁喜斌. 具抑菌活性海洋微生物的筛选. 微生物学杂志, 2005, 25(5): 23–25

单文荣, 李俊霞, 刘花粉. 滤纸片法筛选不同活性物对棉花黄萎病菌抑制效果研究. 中国农学通报, 2010, 26(19): 285–289

孟庆国, 吴刘记, 吴信中, 等. 养殖刺参溃疡病病原学研究. 水产科学, 2006, 25(12): 635–639

莫照兰, 俞勇, 李会荣, 等. 弧菌拮抗菌的筛选. 青岛海洋大学学报(自然科学版), 2001, 31(2): 225–231

黄姿, 李春强, 于晓玲, 等. 一株溶藻细菌(*Pseudoalteromonas* sp.)的分离鉴定及溶藻活性初探. 海洋技术, 2008, 27(3): 56–60

詹萍, 梁静娟, 庞宗文, 等. 假交替单胞菌 JIV-49 产抗真菌活性物质的发酵条件研究. 生物技术, 2007, 17(1): 69–72

Alapide-Tendencia EV, Dureza LA. Isolation of *Vibrio* spp. from *Penaeus monodon* (Fabricius) with red disease syndrome. Aquaculture, 1997, 154(2): 107–114

Alcaide E, Blasco MD, Esteve C. Occurrence of drug-resistant bacteria in two European eel farms. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(6): 3348–3350

Balcázar JL, Rojas-Luna T, Cunningham DP. Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp(*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. J Invertebr Pathol, 2007, 96(2): 147–150

Bowman JP. Bioactive compound synthetic capacity and ecological significance of marine bacterial genus *Pseudoalteromonas*. Mar Drugs, 2007, 5(4): 220–241

Chen WM, Lin CY, Chen CA, *et al*. Involvement of an L-amino acid oxidase in the activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas flavipulchra* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Enzyme Microb Technol, 2010, 47(1–2): 52–58

Das BK, Samal SK, Samantaray BR, *et al*. Antagonistic activity of cellular components of *Pseudomonas* species against *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture, 2006, 253(1–4): 17–24

Gauthier G, Gauthier M, Christen R. Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas, Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen.nov., and proposal of twelve new species combinations. Int J Syst Bacteriol, 1995, 45(4):755–761

Immanuel G, Citarasu T, Sivaram V, *et al*. Delivery of HUFA, probionts and biomedicine through bioencapsulated artemia as a means to enhance the growth and survival and reduce the pathogenesity in shrimp *Penaeus monodon* postlarvae. Aquacult Int, 2007, 15(2): 137–152

Joshi J, Srisala J, Truong VH, *et al*. Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). Aquaculture, 2014, 428–429: 297–302

Kumar BK, Deekshit VK, Raj JRM, *et al*. Diversity of *Vibrio parahaemolyticus* associated with disease outbreak among cultured *Litopenaeus vannamei* (Pacific white shrimp) in India. Aquaculture, 2014, 433: 247–251

Lee KK, Yu SR, Chen FR, *et al*. Virulence of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased tiger prawn, *Penaeus monodon*. Curr Microbiol, 1996, 32(4): 229–231

Leyva-Madrigal KY, Luna-González A, Escobedo-Bonilla CM, *et al*. Screening for potential probiotic bacteria to reduce prevalence of WSSV and IHHNV in white-leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under experimental conditions. Aquaculture, 2011, 322–323: 16–22

Liu PC, Lee KK, Yii KC, *et al*. Isolation of *Vibrio harveyi* from diseased kuruma prawns *Penaeus japonicus*. Curr Microbiol, 1996, 33(2): 129–132

Longeon A, Peduzzi J, Barthelemy M, *et al*. Purification and partial identification of novel antimicrobial protein from

marine bacterium *Pseudoalteromonas* species strain X153. Mar Biotechnol, 2004, 6(6): 633–641

Pujalte MJ, Sitjà-Bobadilla A, Macián MC, *et al*. Occurrence and virulence of *Pseudoalteromonas* spp. in cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Molecular and phenotypic characterization of *P. undina* strain U58. Aquaculture, 2007, 271(1–4): 47–53

Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. Am J Epidemiol, 1938, 27(3): 493–497

Skovhus TL, Ramsing NB, Holmstrom C, *et al*. Real-time quantitative PCR for assessment of abundance of *Pseudoalteromonas* species in marine samples. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(4): 2373–2382

Vijayan KK, Bright Singh IS, Jayaprakash NS, *et al*. A brackishwater isolate of *Pseudomonas* PS-102, a potential antagonistic bacterium against pathogenic vibrios in penaeid and non-penaeid rearing systems. Aquaculture, 2006, 251(2–4): 192–200

Zhang QL, Liu Q, Liu S, *et al*. A new nodavirus is associated with covert mortality disease of shrimp. J Gen Virol, 2014, 95(12): 2700–2709

Ziaei-Nejad S, Rezaei MH, Takami GA, *et al*. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. Aquaculture, 2006, 252(2–4): 516–524

(编辑 冯小花)

Isolation and Identification of a Bacterial Strain with Vibrios-Antagonism from Shrimp Ponds

ZHANG Huanhuan[1,2], WANG Xiuhua[2①], LI Chen[2], HUANG Jie[2,3]

(1. *College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao* 266003; 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. *Function Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao* 266071)

Abstract *Vibrio*s were common microbe in marine aquaculture. Most of them such as *Vibrio anguillarum*, *V. harveyi* and *V. parahaemolyticus* etc. were opportunistic pathogen to aquaculture animals. In the latest years, shrimp culture worldwide was subjected to heavy economic loss which was caused by *V. parahaemolyticus* infection. In order to find a high effective and safety method to control the serious shrimp vibrio disease, instead of using antibiotics, screening and using probiotics is a promising way. In this study, a strain was isolated from a shrimp pond and designated as 2013082515 (Strain 15). The antibacterial effect and minimum antibacterial concentrations of Strain 15 were analyzed using *V. anguillarum*, *V. harveyi* and *V. parahaemolyticus* as indicator bacteria. At the same time, the antibacterial effect of Strain 15 against other seven marine vibrios including *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. diabolicus*, *V. campbellii*, *V. natriegens*, *V. brasiliensis* and *V. rotiferianus* was analyzed. Biological safety evaluation test on Strain 15 used as probiotic was conducted by injection and immersion challenge. The results showed that Strain 15 had obvious antibacterial effect against three indicator bacteria. Furthermore, the strongest antibacterial effect presented on *V. anguillarum* with an inhibition zone around (34.90±0.36) mm, the second largest inhibition zone presented on *V. harveyi* around (25.74±0.17) mm; The minimal inhibitory concentration of Strain 15 on *V. anguillarum*, *V. harveyi* and *V. parahaemolyticus* was 2.50×10^4 CFU/ml, 2.50×10^5 CFU/ml, and 2.50×10^5 CFU/ml respectively, and the antibacterial effect of Strain 15 against other 7 vibrios were obtained in different degree. Data also showed that Strain 15 at high concentrations (injection challenge 1.84×10^7 CFU/ml, immersion challenge 4.17×10^7 CFU/ml) had potential toxicity to shrimp. In order the identify Strain 15, both gas chromatographic analysis of bacterial whole cell fatty acids and 16S rDNA sequencing were employed. The results showed that Strain 15 was a *Pseudoalteromonas* sp. Results from this study could provide technical support for developing biological agents used for preventing vibriosis in aquatic animals.

Key words *Pseudoalteromonas* sp.; Antagonistic bacteria; Vibrio; Antibacterial effect

① Corresponding author: WANG Xiuhua, E-mail: wangxh@ysfri.ac.cn

DOI: 10.11758/yykxjz.20151010001 http://www.yykxjz.cn/

普通刺参(*Apostichopus japonicus*)和白刺参不同组织基因组 DNA 的 MSAP 研究*

左之良[1,2] 谭 杰[2] 吴 彪[2] 陈四清[2] 高 菲[2]
燕敬平[2] 王 爽[3] 孙慧玲[2①]

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306；2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071；
3. 烟台海益苗业有限公司 烟台 265608)

摘要 本研究分别以普通刺参(*Apostichopus japonicus*)和白刺参基因组 DNA 为实验材料，应用甲基化敏感扩增多态性(Methylation-sensitive amplified polymorphism, MSAP)技术对刺参体壁、呼吸树和消化道 3 个组织的 DNA 甲基化水平和甲基化模式进行了研究，初步探讨了 DNA 甲基化对刺参组织间基因特异性表达的影响。结果显示，筛选得到的 9 对引物组合能够在普通刺参和白刺参两个群体中得到稳定扩增，在两群体刺参中分别检测到 5932 和 5208 个位点，均以未甲基化位点为主，普通刺参和白刺参未甲基化位点数分别为 4317 和 3944，分别占总扩增条带数的 72.78%和 75.73%。普通刺参体壁的甲基化水平为 31.07%，呼吸树为 23.36%，消化道为 26.34%；白刺参中体壁的甲基化水平为 29.88%，呼吸树为 23.25%，消化道为 19.45%，由此可见，体壁的甲基化率在两群体中是最高的。普通刺参和白刺参同一组织间的甲基化水平和甲基化模式不同，同一群体体壁、呼吸树和消化道不同组织间的甲基化水平和模式也不同。甲基化在普通刺参和白刺参组织分化和发育过程中可能发挥着十分重要的作用。在检测的 3 个组织中，CCGG 序列的全甲基化位点较半甲基化位点多。

关键词 刺参；MSAP; CCGG 位点；甲基化水平
中图分类号 S965 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)03-0093-09

刺参(*Apostichopus japonicus*)，又称仿刺参，在我国主要分布于辽宁、山东、河北等北方沿海地区，其营养价值高且药用价值广泛(廖玉麟, 1997)，是我国重要的海水养殖品种。刺参体色变化较大，背面一般为黄褐色或棕褐色，腹面为浅黄褐色，此外还有黄绿色、赤褐色、灰白色(于东祥等, 2005)，而只有极少数刺参背腹面均为纯白色，呈白化特征，被称为“白刺参”(赵鹤凌, 2011)[1)]。野生白化刺参十分稀少，其经济和营养价值不容小觑，受到研究人员的广泛关注。

DNA 甲基化(DNA methylation)是一种表观遗传(Epigenetic)现象，即在生物发育过程中，虽然核苷酸序列没有发生变化，但基因表达调控发生改变，它可以遗传，也可以逆转(Henikoff *et al*, 1997)。DNA 甲基化在基因沉默、基因印迹、X 染色体失活、染色体完整性的维持、细胞分化、发育、DNA 修复及重组等多个生物学过程中发挥着重要作用(宫时玉等, 2005)。目前，DNA 甲基化检测的方法较多，其中，甲基化敏感扩增多态性(Methylation-sensitive amplified

* 国家高技术研究发展计划(2012AA10A412)、山东省科技发展计划项目(2012GGA06021)和农业部北方海水增养殖重点实验室基金(2014-MSENC-KF-03)共同资助。左之良，E-mail: zhiliangzuo@163.com
① 通讯作者：孙慧玲，研究员，E-mail: sunhl@ysfri.ac.cn
收稿日期: 2015-10-10, 收修改稿日期: 2015-12-02
1) 赵鹤凌. 刺参 *Apostichopus japonicus* (Selenka)白化特征发生机理的基础研究. 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士研究生学位论文, 2011, 1–74

polymorphism, MSAP)技术由于其简便、高效、可靠且对全基因组和片段基因都可以进行检测等优点而得到广泛应用。MSAP 分析是基于选择性 PCR 的一种新技术，是 AFLP 技术的延伸(Reyna-Lopez *et al*, 1997)，其独特之处是利用两种对 DNA 甲基化敏感程度不一样的内切酶(*Hpa*Ⅱ和 *Msp*Ⅰ)，分别与一种对 DNA 甲基化不敏感的内切酶(*EcoR*Ⅰ)一起对同一识别序列 CCGG 进行不同的切割，从而产生不同大小的酶切片段，再连接相应的接头和引物进行特异性扩增，以辨别哪些位点存在甲基化。

目前，MSAP 技术已广泛应用于检测生物在胁迫条件下基因组 DNA 甲基化的变化(Vandegehuchte *et al*, 2009; Labra *et al*, 2004; Aina *et al*, 2004; Wang *et al*, 2011; 朱华平等, 2013)，杂种优势与杂交种基因组 DNA 甲基化的关系(Sun *et al*, 2014; Zhang *et al*, 2007; Tsaftaris *et al*, 1998)，DNA 甲基化对发育相关基因表达的调控作用(Bröske *et al*, 2009; Rai *et al*, 2006; Beaujean *et al*, 2004; Feng *et al*, 2010)，生物不同组织基因组 DNA 甲基化水平分析 (曹哲明等, 2007、2009; 姜群等, 2014; 杜盈等, 2013)等方面。郭婷婷等(2013)通过对刺参 4 种组织基因组甲基化状态的 MSAP 分析，证实了甲基化是刺参基因组 DNA 的一种普遍特征，而且不同组织间甲基化模式存在显著差异。目前，有关白刺参 DNA 甲基化方面的研究，尚未见报道。本研究运用 MSAP 技术比较分析了普通刺参和白刺参的体壁、呼吸树、消化道 3 种组织的基因组 DNA 甲基化水平和模式，初步探讨了 DNA 甲基化差异性调控对组织间基因特异性表达的影响，以期为白刺参的选育提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料来源

普通刺参和白刺参采自烟台海益苗业有限公司，其中，普通刺参为人工选育的快速生长的 F_2 代刺参，白刺参为人工选育的 F_2 代白刺参。两个群体各取 10 头刺参，普通刺参平均体质量为(49.58±0.78) g，白刺参平均体质量为(51.02±0.97) g。刺参在实验室驯养 7 d 后，清空消化道，分别取其等量体壁、呼吸树和消化道于–80℃保存备用。

1.2 基因组 DNA 提取

DNA 提取采用 CTAB 法(战爱斌等, 2006)，略有改动。取材料约 100 mg，用液氮研磨至粉末，加入裂解液 600 μl (2% CTAB，1.4 mol/L NaCl，0.1 mol/L Tris-HCl，20 mmol/L EDTA-Na_2，0.2% β-羟基乙醇，pH=8.0)，15 μl 20 mg/ml 的蛋白酶 K，混合均匀，60℃水浴锅中 3–5 h，期间每隔片刻缓慢晃动离心管，用氯仿：异戊醇=24：1 抽提两次后，用酚：氯仿：异戊醇=25：24：1 抽提两次，再加入等量异丙醇，然后用预冷的无水乙醇沉淀，风干，后用灭菌 ddH_2O 溶解。通过 1%琼脂糖电泳检测 DNA 是否降解，检测 $OD_{260nm/280nm}$ 以确定 DNA 的纯度，并稀释至 300 ng/μl，–20℃中保存备用。

1.3 MSAP 分析

参考 Xiong 等(1999)的 MSAP 分析方法，并作适当改动，MSAP 反应程序和条件如下：

1.3.1 *酶切和连接反应体系* 对于每份 DNA，同时设置 *EcoR*Ⅰ + *Msp*Ⅰ和 *EcoR*Ⅰ+*Hpa*Ⅱ两种酶切反应。酶切反应体系 20 μl：300 ng DNA，5 U *EcoR* I (TaKaRa)，5 U *Hpa* II/*Msp* I (TaKaRa)，2 μl 10×Buffer (TaKaRa)，加灭菌 ddH_2O 至 20 μl。酶切体系经过 37℃水浴 6 h、70℃变性 10 min 后进行 1%琼脂糖电泳检测酶切产物，于–20℃保存备用。连接反应体系：5 μl 酶切产物，50 pmol HM 接头，10 pmol E 接头，5 U T_4 DNA Ligase (TaKaRa)，4 μl 5×T_4 DNA Ligase Buffer，补水至 20 μl，16℃连接过夜，产物稀释 10 倍后用于预扩增。

1.3.2 *预扩增反应体系* 预扩增反应体系：5 μl 稀释连接产物，20 pmol 预扩引物 E_0 和 HM_0，0.1 μl *Taq* 酶，2 μl dNTPs，2 μl buffer(含 Mg^{2+})，加入灭菌 ddH_2O 至 20 μl。混匀后进行预扩增反应，PCR 预扩增反应为 25 个循环，每个循环包括 94℃变性 30 s，56℃退火 1 min，72℃延伸 1 min，首次循环前 94℃预变性 5 min；最后一次循环结束后 72℃延伸 10 min。产物于 4℃保存，1%琼脂糖检测扩增产物后，稀释 20 倍用于选择性扩增，–20℃保存备用。

1.3.3 *选择性扩增反应体系* 选择性扩增反应体系：3 μl 稀释预扩增产物，20 pmol 选扩引物 HMn 和 0.5 pmol 选扩引物 En，2 μl buffer(含 Mg^{2+})，2 μl dNTPs，0.1 μl *Taq* 酶，加入灭菌 ddH_2O 至 20 μl。混匀后进行选择性扩增反应，PCR 选择性扩增反应条件为：94℃预变性 5 min；94℃变性 30 s，65℃退火 30 s(每循环降低 0.7℃)，72℃延伸 1 min，13 个循环；95℃变性 30 s，56℃退火 30 s，72℃延伸 1 min，27 个循环；72℃延伸 10 min；–20℃保存备用。本研究所用的引物信息见表 1。

变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测：选扩引物与上样缓冲液按 4：1.5 均匀混合，95℃变性 10 min，迅速

表 1　本研究所用的接头及引物序列

Tab.1　Sequence of adapters and primers used in this study

	EcoR Ⅰ	*Msp* Ⅰ/*Hpa* Ⅱ
接头 Adapters(5′-3′)	EA_1: CTCGTAGACTGCGTACC EA_2: AATTGGTACGCAGTCTAC	HMA_1: GACGATGAGTCTAGAA HMA_2: CGTTCTAGACTCATC
预扩引物 Pre-amplification primers(5′-3′)	E_0: GACTGCGTACCAATTCA	HM_0: GATGAGTCTAGAACGGT
选扩引物 Selective amplification primers(5′-3′)	E_1: GACTGCGTACCAATTCAAC E_2: GACTGCGTACCAATTCAAG E_3: GACTGCGTACCAATTCACA E_4: GACTGCGTACCAATTCATC	HM_1:FAMGATGAGTCTAGAACGGTAC HM_2: FAMGATGAGTCTAGAACGGTAG HM_3: GATGAGTCTAGAACGGTCT HM_4: GATGAGTCTAGAACGGTCA

冰浴 5 min，6%聚丙烯酰胺凝胶电泳(功率为 60 W) 2.5 h，电泳结束后采用银染法显色。

1.4　MSAP 条带统计及数据分析

同一 DNA 分别用 *Hpa* Ⅱ/*Msp* Ⅰ与 *EcoR* Ⅰ组合酶切后选扩，因此，MSAP 图谱上对应有两个泳道，分别是 H 和 M 泳道，根据扩增产物在两个泳道内有无的情况，可以将甲基化模式分为 4 种(吕佳等, 2013)：Ⅰ型，H 泳道无带，M 泳道有带，为双链内甲基化，代表全甲基化位点；Ⅱ型，H 泳道有带，M 泳道无带，为单链外甲基化，代表半甲基化位点；Ⅲ型，两个泳道均有条带，代表去甲基化位点；Ⅳ型，H 和 M 泳道均没有带，代表双链外甲基化的位点，Ⅳ型位点不做统计。统计 MSAP 电泳图每个泳道中大小为 100–1500 bp 的条带，同一位点上有带记为 1，无带记为 0，并计算每种组织的全甲基化率、半甲基化率及总甲基化率，利用 SPSS 19.0 进行方差分析。

2　结果

2.1　引物筛选

普通刺参和白刺参体壁、呼吸树、消化道混合基因组 DNA 通过酶切、连接和预扩增之后，由 4 个 HM 引物和 4 个 E 引物组成的引物对进行选择性扩增，并进行聚丙烯酰胺凝胶电泳、银染、成像和统计。从 16 对引物组合中筛选出 9 对组合(表 1)，这些引物组合能够稳定地扩增出清晰、多态的谱带，并运用 9 对引物组合对刺参和白刺参不同组织进行基因组 DNA 的 MSAP 分析。

2.2　MSAP 带型分析

刺参基因组 DNA 的选扩产物经过 6%的聚丙烯酰氨凝胶电泳后，银染成像(图 1)，形成 3 种类型条带，包括不同的甲基化类型和多态性类型。

2.3　不同组织间基因组 DNA 甲基化水平差异

用 MSAP 方法分析普通刺参和白刺参的体壁、呼吸树、消化道 3 种组织的基因组的甲基化水平，并用 SPSS 19.0 统计分析软件进行方差分析。扩增条带类型及甲基化水平结果见表 2 和表 3。结果显示，普通刺参和白刺参 3 种组织的总扩增条带数分别为 5932 和 5208，且都以未甲基化位点为主，其中：普通刺参未甲基化位点数为 4317，占总扩增条带数的 72.78%；白刺参未甲基化位点数为 3944，占总扩增条带数的 75.73%。而且，3 种组织的总扩增位点数变化趋势是一致的，均是体壁最高，其次是呼吸树和消化道。普通刺参中由高到低依次是体壁(2317)、呼吸树(1918)、消化道(1697)，白刺参中由高到低依次是体壁(1777)、呼吸树(1733)、消化道(1698)。3 种组织的总甲基化率关系如表 4 所示，在普通刺参中，体壁(31.07%)>消化道(26.34%)>呼吸树(23.36%)，3 种组织之间差异显著(P<0.05)；在白刺参中，体壁(29.88%)>呼吸树(23.25%)>消化道(19.45%)，三者之间存在显著性差异(P<0.05)。刺参和白刺参各组织的全甲基化率之间也存在显著性差异(P<0.05)。

2.4　刺参不同群体间 DNA 甲基化水平差异

本研究中，普通刺参群体 3 种组织的甲基化扩增位点数和总甲基化率均高于白刺参群体(表 2 和表 3)，普通刺参群体和白刺参群体的体壁和呼吸树的总甲基化率之间差异不显著(P>0.05)(图 2 和图 3)，分别是 31.07%、29.88%和 23.36%、23.25%，而消化道的总甲基化率群体间差异显著(P<0.05)(图 4)；不同组织的甲基化类型也不同，两刺参群体体壁的基因组全甲基化率和半甲基化率差异不显著(P>0.05)，普通刺参呼吸树的全甲基化率显著低于白刺参群体(P<0.05)，半甲基化率显著高于白刺参群体(P<0.05)，而普通刺参消化道的全甲基化率和半甲基化率均显著高于白刺参群体(P<0.05)。

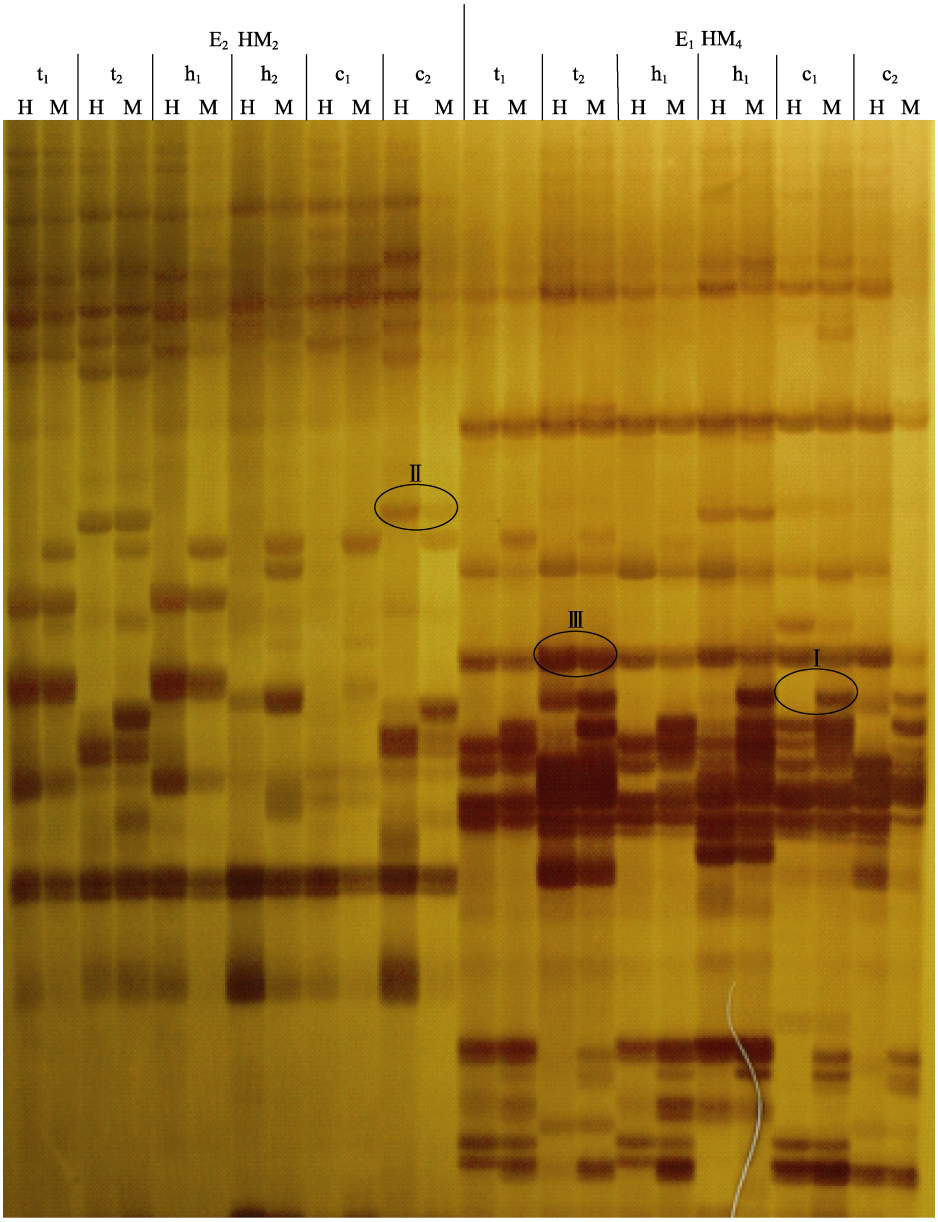

图 1 不同引物组合在刺参基因组 DNA 中的 MSAP 图谱

Fig.1 DNA methylation profiles in *Apostichopus japonicus* using different primer pairs

Ⅰ型：全甲基化位点；Ⅱ型：半甲基化位点；Ⅲ型：去甲基化位点

泳道 t_1、h_1、c_1 分别代表普通刺参的体壁、呼吸树、消化道；泳道 t_2、h_2、c_2 分别代表白刺参的体壁、呼吸树、消化道

Ⅰ: fully methylated; Ⅱ: hemi-methylated; Ⅲ: unmethylated

Lane t_1, h_1, and c_1 represented body wall, respiratory tree, and digestive tract of *A. japonicus*, respectively; Lane t_2, h_2, and c_2 represented body wall, respiratory tree, and digestive tract of white *A. japonicus*, respectively

表 2 普通刺参不同组织中甲基化扩增位点

Tab.2 Methylation amplification sites in different tissues of *A. japonicus*

组织 Tissue	总位点 Total sites	非甲基化的 CCGG 位点 Unmethylated CCGG sites	甲基化的 CCGG 位点 Methylated CCGG sites		
			全甲基化位点 Fully-methylated sites	半甲基化位点 Hemi-methylated sites	总计 Total
体壁 Body wall	2317	1597	555	165	720
呼吸树 Respiratory tree	1918	1470	265	183	448
消化道 Digestive tract	1697	1250	302	145	447

表 3　白刺参不同组织中甲基化扩增位点

Tab.3　Methylation amplification sites in different tissues of white *A. japonicus*

组织 Tissue	总位点 Total sites	非甲基化的 CCGG 位点 Unmethylated CCGG sites	甲基化的 CCGG 位点 Methylated CCGG sites		
			全甲基化位点 Fully-methylated sites	半甲基化位点 Hemi-methylated sites	总计 Total
体壁 Body wall	1777	1246	399	132	531
呼吸树 Respiratory tree	1733	1330	290	113	403
消化道 Digestive tract	1698	1368	215	115	330

表 4　普通刺参和白刺参中 3 种组织之间甲基化差异

Tab.4　Differences of methylation in three tissues of *A. japonicus* and white *A. japonicus*

甲基化类型 Methylation type	刺参组织 *A. japonicus* tissues			白刺参组织 White *A. japonicus* tissues		
	体壁 Body wall	呼吸树 Respiratory tree	消化道 Digestive tract	体壁 Body wall	呼吸树 Respiratory tree	消化道 Digestive tract
Ⅰ (%)	23.95±0.76^{a}	13.82±0.97^{c}	17.80±0.98^{b}	22.45±2.21^{a}	16.73±0.55^{b}	12.67±1.05^{c}
Ⅱ (%)	7.12±0.50^{b}	9.54±0.56^{a}	8.54±1.02^{a}	7.43±1.08^{a}	6.52±1.05^{a}	6.78±0.18^{a}
Ⅰ+Ⅱ (%)	31.07±0.81^{a}	23.36±0.77^{c}	26.34±1.48^{b}	29.88±1.80^{a}	23.25±1.33^{b}	19.45±1.21^{c}

注：数值表示个体的平均值±标准差。不同字母表示差异显著(P<0.05)

Note: Values were shown as mean±SD. Different letters denoted significant difference

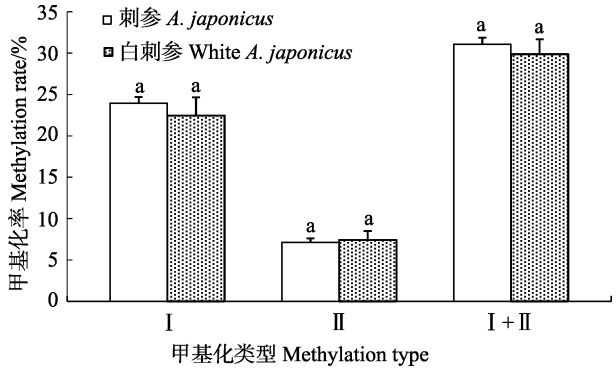

图 2　普通刺参和白刺参体壁之间甲基化差异

Fig.2　Differences of methylation in the body wall of *A. japonicus* and white *A. japonicus*

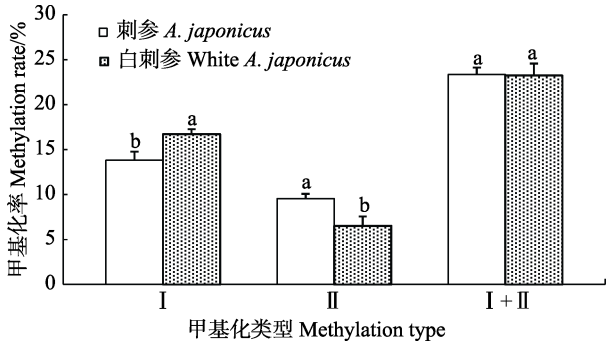

图 3　普通刺参和白刺参呼吸树之间甲基化差异

Fig.3　Differences of methylation in the respiratory tree of *A. japonicus* and white *A. japonicus*

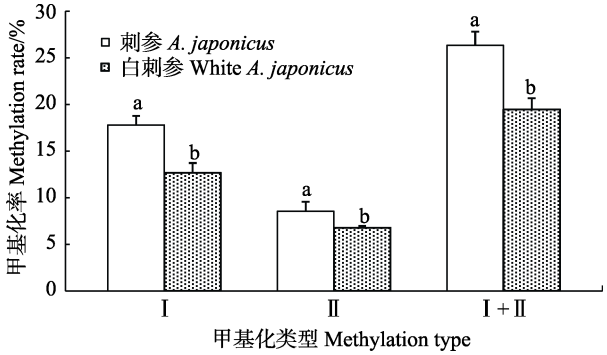

图 4　普通刺参和白刺参消化道之间甲基化差异

Fig.4　Differences of methylation in the digestive tract of *A. japonicus* and white *A. japonicus*

注：不同字母表示差异显著(P<0.05)

Note：Different letters denoted significant difference

3　讨论

3.1　刺参的甲基化水平

近年来，随着MSAP技术的不断革新发展，MSAP在越来越多动植物的研究中得到应用(Waalwijk *et al*, 1978)。DNA 甲基化机制和功能的研究多集中在哺乳动物和植物中，无脊椎动物的甲基化研究相对起步较晚。研究表明，无脊椎动物存在不同程度的甲基化(Roberts *et al*, 2012)，水产无脊椎动物总甲基化率一般在20%–40%之间，如虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)和栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)甲基化率分别为 32.79%和 24.13% (于涛等, 2010)；太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)甲基化水平约为 26% (Jiang *et al*, 2013)；文蛤(*Meretrix*

meretrix) 4 个品系 CCGG 序列中有 26.7%–30.0%发生甲基化(朱东丽, 2011)[1]；背角无齿蚌(*Anodonta woodiana*) 5 个组织的甲基化水平范围在 35.5%–56%(曹哲明等, 2009)。棘皮动物甲基化研究报道较少，有报道认为棘皮动物的甲基化水平属于中等水平(Regev *et al*, 1998)。棘皮动物门的海星(*Echinus esculentus*)总甲基化率约为 40% (Bird *et al*, 1979)；马粪海胆(*Glyptocidaris crenularis vivo*)甲基化水平约为 11.86%–14.57% (王路燕, 2013)[2]。研究表明，刺参总甲基化率为 28.60%–35.77% (郭婷婷等, 2013)，也有研究表明为 27.61%–56.52% (Zhao *et al*, 2015)。本研究得到的普通刺参和白刺参 3 种组织基因组 DNA 总甲基化率为 23.36%–31.07%，与栉孔扇贝(*C. farreri*) (于涛等, 2010)的类似，处于中等水平。本研究得到刺参的总甲基化率大大低于郭婷婷等(2013)和 Zhao 等(2015)得到的刺参总甲基化率。在对虾夷扇贝和栉孔扇贝 DNA 甲基化与生长速度相关性的研究中证明，DNA 甲基化与生长速度呈负相关(吴彪等, 2012)。对中国明对虾的研究也表明，快速生长的“黄海 1 号”中国明对虾总体甲基化率比例低于野生组中国明对虾(杜盈等, 2013)。本研究采集的普通刺参和白刺参均是海益苗业有限公司人工选育的快速生长的 F_2 代刺参，这可能是导致本研究中刺参总甲基化率较低的主要原因。

3.2 刺参不同组织基因组 DNA 甲基化模式具有特异性

本研究中，刺参不同组织基因组 DNA 的甲基化模式具有特异性，3 种组织的总甲基化率和全甲基化率大小顺序为：体壁>消化道>呼吸树，而且体壁的半甲基化率与呼吸树和消化道的半甲基化率差异显著(P<0.05)，呼吸树和消化道之间差异不显著(P>0.05)，这与 Zhao 等(2015)的研究结果一致。这些结果表明，甲基化在刺参组织分化和发育过程中可能发挥着十分重要的作用(Holiday *et al*, 1975)。动物体不同组织行使着不同的生理功能，而甲基化在功能基因调控中起着一定作用，推测甲基化的组织特异性与此相关。在本研究中，无论普通刺参还是白刺参中体壁组织的总甲基化率都是最高的，分别为 31.07%和 29.88%，刺参体壁组织富含致密结缔组织，因此其代谢水平和基因表达水平都低于其他组织，这可能是超甲基化修饰的结果(Zhao *et al*, 2015; Takemae *et al*, 2009)。本研究中，普通刺参和白刺参体壁的总甲基化率、全甲基化率和半甲基化率之间差异不显著(P>0.05)，而呼吸树和消化道的全甲基化率和半甲基化率在两群体之间具有显著性差异(P<0.05)。呼吸树和消化道分别是刺参非常重要和敏感的器官，极易受到养殖环境中水温、食物等各种因素的刺激和影响，从而影响到基因组 DNA 甲基化修饰水平的表达，导致该两个组织的甲基化在不同群体中产生差异，这些差异的结果是否与两个刺参群体体色、摄食与生长相关，有待进一步验证。

3.3 白刺参与普通刺参基因组 DNA 甲基化的比较

本研究中普通刺参 3 种组织的总甲基化率是高于白刺参的。大量研究表明，同一物种不同群体的相同组织基因组 DNA 甲基化水平也存在着不同。不同品种猪肌肉组织基因组 DNA 甲基化程度差异显著(杨春, 2011)[3] (P<0.05)；在对不同品种鸡的研究中发现，鸡同一组织的甲基化水平在不同群体中是不同的，而不同组织甲基化水平的排序在不同的群体也是不一致的(徐青等, 2011)。以上研究说明，动物组织基因组甲基化水平会受到群体遗传背景的影响。目前，DNA 甲基化也越来越多应用于具有不同体色动物群体间的比较研究，同一物种的不同体色可能与甲基化状态有关。研究表明，不同壳色花纹的文蛤品系之间的甲基化模式存在差异，推测 DNA 甲基化有可能参与调控文蛤不同壳色花纹的形成(朱东丽, 2011)[1]。“海大金贝”为中国海洋大学选育的虾夷扇贝新品种，由于类胡萝卜素的积累，使其闭壳肌呈橘红色，吕佳等(2013)通过对扇贝全基因组 DNA 甲基化进行了研究，发现“海大金贝”和普通虾夷扇贝 MSAP 图谱有 46 个位点的甲基化模式存在差异，推测“海大金贝”与普通虾夷扇贝闭壳肌积累类胡萝卜素性状的差异很可能是由于相关基因调控区域甲基化状态的改变引起。目前，在鱼类中已发现多个基因参与动物黑色素的合成，只要影响黑色素生成过程中的任意环节，都会导致白化的发生(马得友, 2013)[4]。白刺参中黑色素的合成受阻是否受表观遗传影响以及影响的机制有待更进一步的研究。通过对白刺参基因组甲基化的深入研究，

1) 朱东丽. 文蛤(*Meretrix meretrix*)不同壳色花纹品系的分子标记及 DNA 甲基化分析. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2011, 1–53

2) 王路燕. PFOS 对黄海胆体内酶活及 DNA 甲基化的影响研究. 大连海事大学硕士研究生学位论文, 2013, 1–52

3) 杨春. 猪不同组织和不同品种肌肉组织基因组 DNA 甲基化分析. 吉林大学博士研究生学位论文, 2011, 1–107

4) 马得友. 基于高通量测序的刺参白化发生和子代体色分离研究. 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士研究生学位论文, 2013, 1–97

还可能获得与刺参体色相关的特异性的甲基化片段，进而获得相关的功能基因，通过对其功能进行分析，可以探索甲基化在调控白刺参体色形成中的作用及机制。

参 考 文 献

于东祥, 孙慧玲, 陈四清, 等. 海参健康养殖技术(第2版). 北京: 海洋出版社, 2005, 29–30

于涛, 杨爱国, 吴彪, 等. 栉孔扇贝、虾夷扇贝及其杂交子代的 MSAP 分析. 水产学报, 2010, 34(9): 1335–1342

吕佳, 侯睿, 李宁, 等. 应用 MSAP 技术研究扇贝全基因组 DNA 甲基化水平. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2013, 43(10): 48–53

朱华平, 卢迈新, 黄樟翰, 等. 低温对罗非鱼基因组 DNA 甲基化的影响. 水产学报, 2013, 37(10): 1460–1467

杜盈, 何玉英, 李健, 等. 野生和"黄海 1 号"中国明对虾不同组织基因组 DNA 的 MSAP 分析. 中国水产科学, 2013, 20(3): 536–543

吴彪, 杨爱国, 刘志鸿, 等. 两种扇贝杂交和自交家系早期生长及甲基化的比较分析. 海洋科学, 2012, 36(2): 1–6

战爱斌, 包振民, 陆维, 等. 仿刺参的微卫星标记. 水产学报, 2006, 30(2): 192–196

姜群, 于红, 孔令锋, 等. 太平洋牡蛎不同组织 DNA 甲基化的 F-MSAP 分析. 中国水产科学, 2014, 21(4): 676–683

宫时玉, 蒋曹德, 邓昌彦. DNA 甲基化及其生物学功能. 华中农业大学学报(自然科学版), 2005, 24(6): 651–657

徐青, 张沅, 孙东晓, 等. 应用 MSAP 方法检测鸡不同组织基因组的甲基化状态. 遗传, 2011, 33(6): 620–626

郭婷婷, 孙国华, 杨建敏, 等. 刺参(*Apostichopus japonicus*)不同组织基因组甲基化状态 MSAP 分析. 海洋与湖沼, 2013, 44(1): 77–82

曹哲明, 丁炜东, 俞菊华, 等. 草鱼全同胞鱼苗不同个体甲基化位点的差异. 动物学报, 2007, 53(6): 1083–1088

曹哲明, 杨健. 背角无齿蚌不同组织的基因组 DNA 甲基化分析. 生态环境学报, 2009, 18(6): 2011–2016

廖玉麟. 中国动物志: 棘皮动物门海参纲. 北京: 科学出版社, 1997, 1–2

Aina R, Sgorbati S, Santagostino A, *et al*. Specific hypomethylation of DNA is induced by heavy metals in white clover and industrial hemp. Physiologia Plantarum, 2004, 121(3): 472–480

Beaujean N, Taylor J, Gardner J, *et al*. Effect of limited DNA methylation reprogramming in the normal Sheep embryo on somatic cell nuclear transfer. Biol Reprod, 2004, 71(1): 185–193

Bird AP, Taggart MH, Smith BA. Methylated and unmethylated DNA compartments in the Sea Urchin Genome. Cell, 1979, 17(4): 889–901

Bröske A, Vockentanz L, Kharazi S, *et al*. DNA methylation protects hematopoietic stem cell multipotency from myeloerythroid restriction. Nat Genet, 2009, 41(11): 1207–1215

Feng SH, Jacobsen SE, Reik W. Epigenetic reprogramming in plant and animal development. Science, 2010, 330(6004): 622–627

Henikoff S, Matzke MA. Exploring and explaining of epigenetic effects. Trends Genetics, 1997, 13(8): 293–295

Holiday R, Pugh JE. DNA modification mechanisms and gene activity during development. Science, 1975, 187(4173): 226–232

Jiang Q, Li Q, Yu H, *et al*. Genetic and epigenetic variation in mass selection populations of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Genes Genom, 2013, 35(5): 641–647

Labra M, Grassi F, Imazio S, *et al*. Genetic and DNA-methylation changes induced by potassium dichromate in *Brassica napus* L. Chemosphere, 2004, 54(8): 1049–1058

Rai K, Nadauld LD, Chidester S, *et al*. Zebra Fish Dnmt1 and Suv39h1 regulate organ-specific terminal differentiation during development. Mol Cell Biol, 2006, 26(19): 7077– 7085

Regev A, Lamb MJ, Jablonka E. The role of DNA methylation in invertebrates: developmental regulation or genome defense. Mol Biol Evol, 1998, 15(7): 880–891

Reyna-Lopez GE, Simpson J, Ruiz-Herrera J. Difference in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of restriction polymorphism. Mol Gen Genet, 1997, 253(6): 703–710

Roberts SB, Gavery MR. Is there a relationship between DNA methylation and phenotypic plasticity in invertebrates. Front Physiol, 2012, 2: 116

Sun Y, Hou R, Fu XT, *et al*. Genome-wide analysis of DNA methylation in five tissues of Zhikong Scallop, *Chlamys farreri*. PLoS One, 2014, 9(1): 1–8

Takemae N, Nakaya F, Motokawa T. Low oxygen consumption and high body content of catch connective tissue contribute to low metabolic rate of sea cucumbers. Biol Bull, 2009, 216(1): 45–54

Tsaftaris AS, Kafka M. Mechanism of heterosis in crop plants. J Crop Prod, 1998, 1(1): 95–111

Vandegehuchte MB, Kyndt T, Vanholme B, *et al*. Occurrence of DNA methylation in *Daphnia magna* and influence of multigeneration Cd exposure. Environ Int, 2009, 35(4): 700–706

Waalwijk C, Flavell RA. DNA methylation at a CCGG sequence in the large intron of the rabbit beta-globin gene: tissue-specific variations. Nucleic Acids Res, 1978, 5(12): 4631–4634

Wang WW, Zhao XQ, Pan Y, *et al*. DNA methylation changes detected by methylation-sensitive amplified polymorphism in two contrasting rice genotypes under salt stress. J Genet Genomics, 2011, 38(9): 419–424

Xiong LZ, Xu CCCG, Saghai Maroof MA, *et al*. Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental

lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. Mol Gen Genet, 1999, 261(3): 439–446

Zhang MS, Yan HY, Zhao N, *et al*. Endosperm-specific hypomethylation, and meiotic inheritance and variation of DNA methylation level and pattern in *sorghum* (*Sorghum bicolor* L.) inter-strain hybrids. Theor Appl Genet, 2007, 115(2): 195–207

Zhao Y, Chen MY, Storey KB, *et al*. DNA methylation levels analysis in four tissues of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) based on fluorescence-labeled methylation-sensitive amplified polymorphism (F-MSAP) during aestivation. Comp Biochem Phys B: Biochem Mol Biol, 2015, 181: 26–32

(编辑 冯小花)

MSAP Analysis of Genomic DNA in the Tissues of *Apostichopus japonicus* and White *A. japonicus*

ZUO Zhiliang[1,2], TAN Jie[2], WU Biao[2], CHEN Siqing[2], GAO Fei[2], YAN Jingping[2], WANG Shuang[3], SUN Huiling[2①]

(1. *College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai* 201306;
2. *Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao* 266071;
3. *Yantai Haiyi Seeds Co., Ltd, Yantai* 265608)

Abstract DNA methylation was one of key epigenetic modifications in eukaryotes genomes, and has been extensively studied in the field of fishery in recent years. Here we applied MSAP (Methylation-sensitive amplified polymorphism) and analyzed the level and pattern of methylation of genomic DNA in the body wall, the respiratory tree, and the digestive tract of *Apostichopus japonicus* and white *A. japonicus*. We also compared the effects of DNA methylation in specific gene expression in different tissues of *A. japonicus* and white *A. japonicus*. In this study, a combination of 9 pairs of primers was used for the amplification of stable and clear fragments of the two populations. A total of 5932 and 5208 sites were detected in normal *A. japonicus* and white *A. japonicus* respectively, and they were mainly located at the unmethylated CCGG sites. There were 4317 and 3944 unmethylated sites in normal *A. japonicus* andwhite *A. japonicus* populations, accounting for 72.78% and 75.73% respectively. The methylation rates in the body wall, respiratory tree, and digestive tract of normal *A. japonicus* were about 31.07%, 23.36%, and 26.34% respectively, and those in *A. japonicus* were 29.88%, 23.25%, and 19.45%. These results suggested that the methylation rate in the body wall was the highest in both populations. It was inferred that the degree and pattern in DNA methylation could be different at both tissues and populations. DNA methylation may play an important role in the process of tissue differentiation and development in normal *A. japonicus* and white *A. japonicus*. Fully-methylated sites outnumbered hemi-methylated sites in the three tissues of both populations. This study provided better understanding of distinct levels and patterns of genome DNA methylation in different tissues and populations. Our findings also shed light on the relationship between the DNA methylation and the albino body wall of white *A. japonicus.*

Key words *Apostichopus japonicus;* Methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP); CCGG sites; Methylation level

① Corresponding author: SUN Huiling, E-mail: sunhl@ysfri.ac.cn

DOI: 10.11758/yykxjz.20160350425001 http://www.yykxjz.cn/

青、白刺参(*Apostichopus japonicus*)体壁营养成分的比较分析*

李忠清[1,2] 夏 斌[1] 王际英[1①] 黄炳山[1] 张利民[1] 李宝山[1]

(1. 山东省海洋资源与环境研究院 烟台 264006；2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 通过对相同养殖环境条件下，青、白刺参(*Apostichopus japonicus*)体壁中营养成分(粗蛋白、粗脂肪、多糖、脂肪酸、氨基酸、微量元素等)的测定，比较两种刺参的营养品质与价值。结果显示，青、白刺参的出皮率，体壁中的水分、多糖和灰分含量差异显著($P<0.05$)，粗蛋白和粗脂肪差异不显著($P>0.05$)。青、白刺参体壁中均检测出 20 种主要脂肪酸，脂肪酸总量和多不饱和脂肪酸(PUFA)的含量差异不显著($P>0.05$)，而青刺参饱和脂肪酸(SFA)含量显著高于白刺参，单不饱和脂肪酸(MUFA)含量显著低于白刺参($P<0.05$)。MUFA 中青刺参的花生四烯酸(AA)和二十二碳六烯酸(DHA)含量均显著低于白刺参($P<0.05$)。青、白刺参体壁中检测出 17 种氨基酸，必需氨基酸(EAA)、鲜味氨基酸(FAA)和药效氨基酸(DAA)的含量均无显著差异($P>0.05$)。青刺参体壁中天冬氨酸和精氨酸含量均显著低于白刺参($P<0.05$)。青刺参体壁中 Mn 和 Cr 的含量显著低于白刺参($P<0.05$)。重金属元素 Pb、Cd、Hg、As 的含量均符合相关食品卫生标准。综合评价认为，相同养殖环境条件下，白刺参的出皮率、多糖含量、脂肪酸中不饱和脂肪酸含量、AA 和 DHA 的相对百分含量、氨基酸中天冬氨酸和精氨酸含量以及微量元素中 Mn 和 Cr 含量均优于青刺参。

关键词 白刺参；青刺参；体壁；营养成分

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)03-0101-07

我国约有 140 种海参，其中可食用海参有 20 多种，以北方黄、渤海区域的刺参(*Apostichopus japonicus*)品质和营养价值最高(李成林等, 2010; 常亚青等, 2004)。刺参的营养和药用价值在于其体壁含有丰富的胶原蛋白、酸性粘多糖及具有抗肿瘤作用的海参皂苷(苏秀榕等, 2003; Sun *et al*, 2010; Shimada, 1969; Moon *et al*, 1999; Thurmond *et al*, 1995)。此外，刺参还含有丰富的矿物元素、不饱和脂肪酸、氨基酸(尤其呈味氨基酸及精氨酸较高)(樊绘曾, 2001; 李春艳等, 2006; Yutaka *et al*, 1990)。白刺参俗称“白玉参”，体内黑色素细胞缺乏，黑色素体不成熟(赵鹤凌, 2011)[1)]，以及多种基因在黑色素合成信号通路上的表达受到抑制(马得友, 2013)[2)]。目前为止，关于白刺参营养成分的研究尚未见报道。本研究对相同养殖环境条件下的白刺参和青刺参体壁营养成分进行分析，从而探讨两种刺参营养品质与价值的差异。

* 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(201501004)、山东省现代农业产业技术体系刺参创新团队(SDAIT-08-011-08)、国家海洋公益性行业科研专项(201505022)和烟台市科技发展计划(2015ZH075)共同资助。李忠清，E-mail: longxingzhongqing@163.com

① 通讯作者：王际英，研究员，E-mail: ytwjy@126.com

收稿日期: 2015-04-25, 收修改稿日期: 2015-06-12

1) 赵鹤凌. 刺参 *Apostichopus japonicus*(Selenka)白化特征发生机理的基础研究. 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士研究生学位论文, 2011, 18–19

2) 马得友. 基于高通量测序的刺参白化发生和子代体色分离研究. 中国科学院大学博士研究生学位论文, 2013, 31–32

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用青、白刺参均为健康苗种，放养在 3 m×6 m、水深 1 m 左右的养殖池内，池底均放有波纹板支架及 60 cm×60 cm 的波纹板，每池放养 90 头(5 头/m^2)，设 3 个平行。实验在微流水环境中进行，采用充气增氧，溶氧 > 6.5 mg/L，控制水温 18–21℃，pH 7.8–8.2，盐度 28–32，亚硝酸氮、氨氮均 < 0.05 mg/L，其他生长环境因子均相同，青、白刺参在养殖期间均投喂相同的人工饵料。

1.2 样品采集与处理

随机从每个养殖池内各捞取 20 头刺参，依次用消过毒的纱布吸干刺参表面的水分，再将其置于灭菌后的培养皿上称重，实验所取青、白刺参的平均体重分别为(44.21±3.96) g 和(40.30±4.02) g。依次解剖，去除内脏后测定其出皮率。去除石灰环并用过滤后的海水冲洗，称重。用剪刀将解剖后的青、白刺参剪成小块，并用组织捣碎机捣碎。将捣碎后的青、白刺参均分成两份，一份放在烘箱中(105℃)烘至恒重，存放于干燥器中备用；另一份存放于–80℃的冰箱中备用。

1.3 样品的测定与方法

水分采用 105℃烘干恒重法(GB 5009.3-2010)；粗蛋白质采用杜马斯燃烧法(Leco-FP528，美国)；粗脂肪采用索氏抽提法(GB/T14772-2008)；灰分采用 550℃马弗炉灼烧恒重法(GB5009.4-2010)；多糖含量测定以葡萄糖为标准品，采用苯酚-硫酸法(王光亚等, 2002)。

脂肪酸测定：脂肪酸的测定参照 Metcalfe 等(1966)和马晶晶等(2014)的方法。称取约 300 mg 捣碎的备用样品于 50 ml 带帽的消化管中，经甲酯化(正己烷 2 ml、甲酰氯 3 ml、6% K_2CO_3 5 ml、正己烷 2 ml)等处理后，采用气相色谱仪(GC-2010，岛津，日本)火焰离子化检测器(FID)检测。采用 Supelco 37 种脂肪酸甲酯混标(Supelco, Bellefonte, PA, 美国)识别样品脂肪酸，采用面积归一法计算脂肪酸相对百分含量。

氨基酸测定：从干燥器的备用样品中称取约 30 mg，样品经 6 mol/L HCl，110℃封管水解 22 h，赶酸，过 0.22 μm 滤膜后，用氨基酸自动分析仪(L-8900，日立，日本)测定(GB/T5009.124-2003)。

微量元素测定：从–80℃冰箱中取出备用样品，分别称约 1 g 鲜样品放入微波消解罐中，加入 10 ml 硝酸，经微波消解仪(MARS XPRESS，CEM，美国)消解等处理后，用电感耦合等离子体质谱仪(7500 CE，Aglient，美国)测定样品中 Ca、Fe、Mg、Cu、Cr、Zn、Mn 的含量。

重金属元素测定：从–80℃冰箱中取出备用样品，分别称约 1 g 样品放入微波消解罐中，加入 10 ml 硝酸，经微波消解仪(MARS XPRESS, CEM, 美国)消解等处理后，用原子荧光形态分析仪(SA-10，北京吉天，中国)测定样品中 Cd、Pb、As、Hg 元素的含量。

1.4 数据统计分析

对青、白刺参体壁中蛋白质营养价值的评定基于 FAO/WHO 模式和国家食品卫生研究所提出的全鸡蛋蛋白模式进行比较(唐雪等, 2011; 孙雷等, 2008)，计算公式如下：

氨基酸评分(%)(*AAS*) = 待评蛋白质中氨基酸含量(mg/g)/参考蛋白质中同等氨基酸含量(mg/g)×100

化学评分(%)(*CS*)=待评蛋白质中氨基酸含量(mg/g)/鸡蛋蛋白质中同种氨基酸含量(mg/g)×100

采用 SPSS 19.0 软件对数据进行独立样本的 T 检测，确定其组间差异显著性($P < 0.05$)，取置信水平 95%。统计数据以平均值±标准差($\bar{X} \pm SD$)表示。

2 结果

2.1 两种海参中蛋白质、粗脂肪、灰分、多糖的含量分析

由表 1 可知，白刺参出皮率显著高于青刺参($P < 0.05$)。青、白刺参体壁中水分含量分别为 90.37%和 91.32%。白刺参体壁中的灰分和多糖含量显著高于青刺参($P < 0.05$)。青、白刺参体壁干物质中粗蛋白和粗脂肪的含量均无显著差异($P > 0.05$)。

2.2 脂肪酸组成分析

由表 2 可知，青刺参体壁中检测出 20 种脂肪酸，其中，饱和脂肪酸(SFA)7 种，单不饱和脂肪酸(MUFA) 5 种，多不饱和脂肪酸(PUFA) 8 种；总脂肪酸的相对含量为 67.52%，其中，SFA、MUFA 和 PUFA 相对含量分别为 23.42%、21.65%和 22.67%。白刺参体壁含 20 种脂肪酸，其中，SFA 6 种，MUFA 5 种，PUFA 9 种；总脂肪酸的相对含量 67.42%，其中，SFA、MUFA 和 PUFA 相对含量分别为 21.33%、23.02%和 23.18%。青、白刺参体壁中所含总脂肪酸的相对含量及 PUFA 的相对含量均无显著差异($P > 0.05$)，而 SFA 和 MUFA 的相对含量均有显著性差异($P < 0.05$)。青刺参体壁中 C16:0 和 C18:0 的相对含量均显著高于白刺参($P < 0.05$)；

表 1　青、白刺参的出皮率和体壁基本营养成分

Tab.1　Production rate and nutrient composition of the body wall of green and white sea cucumbers (mean±SD)

刺参 Sea cucumber	出皮率 Body wall production rate (%)	水分 Moisture (%)	灰分(干基) Ash (Dry matter) (%)	粗蛋白(干基) Crude protein(Dry matter) (%)	粗脂肪(干基) Crude lipid (Dry matter) (%)	多糖(干基) Polysaccharides (Dry matter) (%)
白刺参 White sea cucumber	66.08±2.42[a]	91.32±0.31[a]	32.06±0.11[a]	48.30±0.16	2.59±0.25	2.13±0.06[a]
青刺参 Green sea cucumber	61.60±2.57[b]	90.37±0.13[b]	29.99±0.10[b]	47.72±0.40	2.67±0.18	1.85±0.07[b]

注：同列间无字母或数据肩标相同字母表示差异不显著($P > 0.05$)，不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。下表同

Note: In same column, values with no letter or the same letter superscripts indicated no significant difference ($P > 0.05$), and values with different superscripts indicated significant difference ($P < 0.05$). The same applied as below

表 2　青、白刺参体壁脂肪酸的组成与含量(干基)

Tab.2　Composition and content of fatty acids in the body wall of green and white sea cucumbers (mean±SD)

脂肪酸 Fatty acids	青刺参 Green sea cucumber (%)	白刺参 White sea cucumber(%)
饱和脂肪酸 SFA		
C14:0	1.15±0.03	1.19±0.08
C15:0	0.30±0.03	0.27±0.02
C16:0	12.40±0.10[a]	11.61±0.14[b]
C17:0	1.29±0.04	1.34±0.05
C18:0	5.52±0.04[a]	5.21±0.06[b]
C20:0	1.38±0.08	1.30±0.06
C22:0	1.38±0.10	—
单不饱和脂肪 MUFA		
C16:1n-7	8.20±0.27	8.25±0.14
C18:1n-7	5.73±0.14	5.49±0.14
C18:1n-9	5.67±0.04[a]	6.08±0.03[b]
C20:1n-7	2.33±0.05[a]	2.60±0.05[b]
C22:1n-9	0.41±0.03	0.43±0.03
多不饱和脂肪酸 PUFA		
C18:2n-6	4.21±0.03	4.16±0.02
C18:3n-3	1.10±0.03	1.12±0.04
C18:3n-6	0.30±0.02	0.29±0.01
C20:2n-9	—	0.50±0.02
C20:3n-6	0.33±0.02	0.32±0.02
20:4n-6 AA	6.73±0.10[a]	7.18±0.08[b]
20:5n-3 EPA	6.57±0.17	6.24±0.18
22:5n-3 DPA	0.26±0.03	0.23±0.02
22:6n-3 DHA	3.10±0.06[a]	3.60±0.16[b]
总量 Total	67.52±0.61	67.42±0.17
∑SFA	23.42±0.18[a]	21.33±0.28[b]
∑MUFA	21.65±0.50[a]	23.02±0.09[b]
∑PUFA	22.67±0.61	23.18±0.57
∑n-3 PUFA	11.35±0.14	11.18±0.20
∑n-6 PUFA	11.50±0.16	11.63±0.23
n-3/ n-6	0.99±0.01	0.96±0.02

注：　—. 未检出 not detected

而青刺参体壁中 C18:1n-9 和 C20:1n-7 的相对含量均显著低于白刺参($P < 0.05$)；青刺参体壁中 AA 和 DHA 相对含量均显著低于白刺参($P < 0.05$)。青、白刺参体壁中其他脂肪酸组分的相对含量均无显著性差异($P > 0.05$)。

2.3　氨基酸组成分析

由表 3 可知，青、白刺参的体壁中检测出 17 种氨基酸，其中含 7 种必需氨基酸(EAA)、6 种鲜味氨基酸(FAA)、6 种药效氨基酸(DAA)。青、白刺参体壁中所含氨基酸总量分别为 39.41%和 39.89%，无显著性差异($P > 0.05$)。其中，青、白刺参体壁中必需氨基酸的含量无显著性差异($P > 0.05$)；鲜味氨基酸的含量分别为 21.51%和 21.63%，无显著性差异($P > 0.05$)；药味氨基酸的含量也无显著性差异($P > 0.05$)。青、白刺参体壁氨基酸组分中含量最高的均为谷氨酸(Glu)，分别为 7.78%和 7.34%，含量最低的均为组氨酸(His)，分别为 0.61%和 0.54%，均无显著差异($P > 0.05$)。青刺参体壁中天冬氨酸含量显著低于白刺参($P < 0.05$)；青刺参体壁中精氨酸含量也显著低于白刺参($P < 0.05$)。青、白刺参体壁中其他氨基酸组分含量均无显著性差异($P > 0.05$)。

2.4　氨基酸营养评价

为更好地评价青、白刺参体壁中氨基酸的营养价值，本研究将氨基酸含量折算成每克蛋白质中含氨基酸的量(mg)与 FAO/WHO 制定的氨基酸标准模式和全鸡蛋蛋白模式进行比较(唐雪等, 2011; 孙雷等, 2008)，分别计算出青、白刺参体壁中必需氨基酸的化学分(*CS*)和氨基酸分(*AAS*)(表 4 和表 5)。青、白刺参体壁中苏氨酸的 *AAS* 分别为 123.74 和 124.35，均超过 100，*CS* 分别为 97.05 和 97.53，也接近 100；苯丙氨酸+酪氨酸的 *AAS* 分别为 121.85 和 116.49，也均超过 100，但 *CS* 相对较低，分别为 73.13 和 66.87。

2.5 微量元素及重金属元素含量的分析

本研究分别对青、白刺参体壁鲜样中 7 种微量元素(表 6)和 4 种重金属元素(表 7)的含量进行了测定。青、白刺参体壁中均含有丰富的钙(Ca)、铁(Fe)、镁(Mg)、锌(Zn)等微量元素。青、白刺参体壁中含量最高的元素均为 Mg 元素，含量分别为 1517.87 mg/kg 和 1523.71 mg/kg，无显著性差异($P > 0.05$)。青、白刺参体壁鲜样中 Cr 的含量分别为 0.37 mg/kg 和 0.41 mg/kg，青刺参体壁中含量显著低于白刺参($P < 0.05$)；青、白刺参体壁鲜样中 Mn 含量分别为 0.56 mg/kg 和 0.60 mg/kg，青刺参体壁中含量也显著低于白刺参($P < 0.05$)。青、白刺参体壁鲜样中其他微量元素均无显著差异($P > 0.05$)。青、白刺参体壁鲜样中重金属元素 Cd、Pb、As、Hg 的含量均无显著性差异($P > 0.05$)，且均符合国家食品卫生标准要求。

3 讨论

出皮率是评价刺参品质是否优良的一个重要指标(Jiang *et al*, 2013; 刘小芳等, 2011; 李丹彤等, 2009)，出皮率高说明刺参品质优良，本研究结果显示，白刺参出皮率比青刺参显著高 4.48%。海参体壁中的多糖类成分具有提高机体免疫力和抗癌等作用(马同江等, 1982)，白刺参体壁中多糖含量比青刺参高 0.28%，本研究测得多糖含量介于展学孔等(2011)的 1.25%–2.51% (表 1 中多糖为 2.13%、1.85%)之间。究其原因，一方面是不同种类、不同季节和不同养殖条件造成海参体壁中多糖的含量存在一定差异(刘小芳等, 2011)；另一方面为目前测定多糖的方法不统一，因而得出的多糖含量不同。Jiang 等(2013)曾对相同养殖环境下青、红刺参体壁的营养成分进行过报道，其测得红刺

表 3 青、白刺参体壁中氨基酸的组成与含量(干基)

Tab.3 Composition and content of amino acids in the body wall of green and white sea cucumbers (mean±SD)

氨基酸 Amino acids	青刺参 Green sea cucumber (%)	白刺参 White sea cucumber(%)
天门冬氨酸 Asp②③	4.01±0.09[a]	4.39±0.14[b]
苏氨酸 Thr①	2.33±0.04	2.53±0.10
丝氨酸 Ser②	2.04±0.04	2.18±0.08
谷氨酸 Glu②③	7.78±0.32	7.34±0.21
脯氨酸 Pro②	1.81±0.12	1.97±0.10
苷氨酸 Gly②③	3.77±0.52	4.02±0.28
丙氨酸 Ala②	2.03±0.16	2.18±0.22
半胱氨酸 Cys③	0.61±0.07	0.63±0.04
缬氨酸 Val①	1.95±0.08	2.02±0.02
甲硫氨酸 Met①	0.86±0.06	0.84±0.16
异亮氨酸 Ileu①	1.29±0.03	1.31±0.03
亮氨酸 Leu①	1.93±0.12	2.02±0.06
酪氨酸 Tyr③	1.84±0.10	1.71±0.08
苯丙氨酸 Phe①	1.65±0.10	1.52±0.09
赖氨酸 Lys①	1.93±0.16	1.83±0.04
组氨酸 His	0.61±0.09	0.54±0.05
精氨酸 Arg③	2.61±0.06[a]	3.14±0.08[b]
∑必需氨基酸 EAA	12.46±0.30	12.54±0.08
∑鲜味氨基酸 FAA	21.51±0.46	21.63±0.40
∑药效氨基酸 DAA	20.87±0.84	21.04±0.43
∑氨基酸 TAA	39.41±0.22	39.89±0.51
∑EAA/∑TAA	31.63	31.82
∑EAA/∑NEAA	46.06	46.19

注：①必需氨基酸；②鲜味氨基酸；③药效氨基酸

Note: ①Essential amino acids; ②Flavor amino acids; ③Drug-effective amino acids

表 4 青刺参体壁氨基酸组分的评价

Tab.4 Evaluation of amino acids in the body wall of green sea cucumber (mean±SD)

必需氨基酸 EAA	青刺参 Green sea cucumber(mg/g)	青刺参 Green sea cucumber		鸡蛋蛋白 Egg protein (mg/g)	评分标准 FAO/WHO
		化学分 Chemical score	氨基酸分 Amino acid score		
苏氨酸 Thr	49.52±0.63	97.05±1.24	123.74±1.58	51	40
缬氨酸 Val	41.01±1.70	56.15±2.31	81.98±3.37	73	50
蛋氨酸+半胱氨酸 Met+Cys	31.04±2.63	56.40±4.30	88.64±7.52	55	35
异亮氨酸 Ileu	27.11±1.04	41.05±1.57	67.74±2.60	66	40
亮氨酸 Leu	40.53±2.61	46.04±2.95	57.88±3.72	88	70
苯丙氨酸+酪氨酸 Phe+Tyr	73.17±3.95	73.13±3.95	121.85±4.92	100	60
赖氨酸 Lys	40.38±3.42	63.07±5.34	73.38±6.23	64	55

表 5　白刺参体壁氨基酸组分的评价

Tab.5　Evaluation of amino acids in the body wall of white sea cucumber (mean±SD)

必需氨基酸 EAA	白刺参 White sea cucumber (mg/g)	白刺参 White sea cucumber		鸡蛋蛋白 Egg protein(mg/g)	评分标准 FAO/WHO
		化学分 Chemical score	氨基酸分 Amino acid score		
苏氨酸 Thr	49.74±0.48	97.53±0.95	124.35±1.21	51	40
缬氨酸 Val	41.76±0.41	57.21±0.56	83.52±0.82	73	50
蛋氨酸+半胱氨酸 Met+Cys	31.27±0.48	56.67±2.4	89.06±3.47	55	35
异亮氨酸 Ileu	27.14±0.49	41.13±0.76	67.86±1.24	66	40
亮氨酸 Leu	41.78±1.25	47.48±1.43	59.69±1.80	88	70
苯丙氨酸+酪氨酸 Phe+Tyr	66.87±3.89	66.87±3.90	116.49±6.49	100	60
赖氨酸 Lys	37.91±3.88	59.23±4.37	70.53±5.59	64	55

表 6　青、白刺参体壁中微量元素含量比较

Tab.6　Comparison of contents of trace elements in the body wall of green and white sea cucumbers

微量元素 Trace element	青刺参 Green sea cucumber	白刺参 White sea cucumber
	鲜样 Wet matter (mg/kg)	鲜样 Wet matter(mg/kg)
钙 Ca	738.59±3.20	734.86±4.68
铁 Fe	2.06±0.10	2.11±0.03
镁 Mg	1517.87±57.72	1523.71±48.74
锌 Zn	2.44±0.31	2.32±0.13
铜 Cu	0.27±0.05	0.28±0.05
铬 Cr	0.37±0.01[a]	0.41±0.01[b]
锰 Mn	0.56±0.02[a]	0.60±0.02[b]

表 7　青、白刺参体壁中重金属含量

Tab.7　Contents of heavy metal elements in the body wall of green and white sea cucumbers

重金属元素 Heavy metal element	青刺参 Green sea cucumber	白刺参 White sea cucumber
	鲜样 Wet matter(mg/kg)	鲜样 Wet matter(mg/kg)
镉 Cd	0.04±0.01	0.04±0.01
铅 Pb	0.14±0.01	0.15±0.01
砷 As	0.02±0.00	0.02±0.00
汞 Hg	< 0.01	< 0.01

参的出皮率和粗脂肪与本研究白刺参的结果相似，而红刺参体壁灰分含量低于白刺参，粗蛋白则高于白刺参。

由脂肪酸的测定结果比较分析可知，青刺参体壁中 SFA 相对含量最高，白刺参体壁中 PUFA 的相对百分含量最高。脂肪酸的营养价值主要体现在 PUFA 上，PUFA 匮乏会导致机体心脏、大脑等器官严重发育不良(Samadi *et al*, 2006; Kitajka *et al*, 2002)。此外，青刺参体壁中的 MUFA 显著低于白刺参，相关研究表明，MUFA 不仅有降低胆固醇的作用，还有促进人体类脂代谢的功能(Thomsen *et al*, 1999)。WHO 推荐，食物中 n-3/n-6 的值要>0.1 才对人体健康有益(Sánchez-Machado *et al*, 2004)，青、白刺参体壁中 n-3/n-6 值都近似于 1，均符合健康食品的要求。脂肪酸组分中，青刺参体壁中 AA 和 DHA 的相对含量均显著低于白刺参。

青、白刺参体壁中均检测出 17 种氨基酸。其中 EAA 含量显著高于其他近 20 余种海参(李春艳等, 2006)。青刺参体壁中天冬氨酸和精氨酸含量均显著低于白刺参。青、白刺参体壁中其他氨基酸组分均无显著差异。根据 FAO/WHO 制定的必需氨基酸标准评分模式(*AAS*)，青、白刺参体壁的氨基酸分分别在 57–125 和 59–124 之间，其中，青、白刺参体壁中苏氨酸和苯丙氨酸+酪氨酸的 *AAS* 均超过 100。

青、白刺参体壁中富含人体必需的微量元素，尤其是 Ca、Fe、Mg 含量较高，这与刘小芳等(2011)、王哲平等(2012)、肖宝华等(2014)和董晓弟等(2013)对刺参微量元素的研究结果一致。此外，青、白刺参体壁中 Zn 含量均高于海胆、鱼翅等海产品，而 As、Hg、Pb、Cd 重金属含量低于其他海洋贝类(邓必阳等, 1999; 章超桦等, 2000; 杨宝灵等, 2009)。白刺参体壁中的 Mn 和 Cr 含量均显著高于青刺参。

我国《食品中污染物限量标准》(GB-2762，2012)对水产品(鲜品)中重金属限量指标为：Pb≤1.0 mg/kg，Cd≤0.1 mg/kg，As≤0.5 mg/kg，Hg≤0.5 mg/kg。青、白刺参体壁中重金属含量均明显低于国家食品卫生标准。

4　结论

本研究对相同养殖环境下青、白刺参体壁营养成分进行了比较分析，结果显示，白刺参的出皮率、多

糖含量，、脂肪酸中不饱和脂肪酸含量、AA 和 DHA 的相对含量，氨基酸中天冬氨酸和精氨酸含量以及微量元素 Mn 和 Cr 含量均优于青刺参。

参 考 文 献

马晶晶, 王际英, 孙建珍, 等. 饲料中 DHA/EPA 值对星斑川鲽幼鱼生长、体组成及血清生理指标的影响. 水产学报, 2014, 38(2): 244–256

马同江, 周清凯, 蔡云见. 海参的药理作用及应用. 海洋药物, 1982, 2(2): 9–13

王哲平, 刘淇, 曹荣, 等. 野生与养殖刺参营养成分的比较分析. 南方水产科学, 2012, 8(2): 64–70

王光亚, 王竹, 白鸿, 等. 保健食品功效成分检测方法. 北京: 中国轻工业出版社, 2002, 9–19

邓必阳, 张展霞. 鲨鱼软骨营养成分分析及其评价. 营养学报, 1999, 21(1): 104–108

孙雷, 周德庆, 盛晓风. 南极磷虾营养评估与安全性研究. 海洋水产研究, 2008, 29(2): 57–64

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

李成林, 宋爱环, 胡炜, 等. 山东省刺参养殖产业现状分析与可持续发展对策. 渔业科学进展, 2010, 31(4): 126–133

李丹彤, 常亚青, 吴振海, 等. 獐子岛夏秋季野生仿刺参体壁营养成分的分析. 水产科学, 2009, 28(7): 365–369

李春艳, 常亚青. 海参的营养成分介绍. 科学养鱼, 2006(2): 71–72

苏秀榕, 娄永江, 常亚青, 等. 海参的营养成分及海参多糖的抗肿瘤活性的研究. 营养学报, 2003, 25(2): 181–182

肖宝华, 杨小东, 劳赞, 等. 北方刺参与南方糙海参口感及营养成分比较分析. 水产科技情报, 2014, 41(6), 280–289

杨宝灵, 姜健, 王冰, 等. 海胆微量元素的光谱测定. 安徽农业科学, 2009, 37(2): 613–615

董晓弟, 潘如佳, 王长海. 海地瓜、黑乳参和乌皱辐肛参营养成分对比. 现代食品科技, 2013, 29(12): 2986–2990

展学孔, 周海妹, 马小花, 等. 海参多糖提取新工艺. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(15): 40–42

唐雪, 徐钢春, 徐跑. 野生与养殖刀鲚肌肉营养成分的比较分析. 动物营养学报, 2011, 23(3): 514–520

常亚青, 丁君, 宋坚, 等. 海参、海胆生物学研究与养殖. 北京海洋出版社, 2004, 56

章超桦, 吴红棉, 洪鹏志, 等. 马氏珠母贝肉的营养成分及其游离氨基酸组成. 水产学报, 2000, 24(2): 180–184

樊绘曾. 海参: 海中人参. 中国海洋药物杂志, 2001(4): 37–441

Jiang SH, Dong SL, Gao QF, *et al*. Comparative study on nutrient composition and growth of green and red sea cucumber, *Apostichopus japonicus* (Selenka, 1867), under the same culture conditions. Aquac Res, 2013, 44, 317–320

Kitajka K, Puskas LG, Zvara A, *et al*. The role of n-3 polyunsaturated fatty acids in brain: Modulation of rat brain gene expression by dietary n-3 fatty acid. PNAS, 2002, 99(5): 2619–2224

Moon JH, Ryu HS, Suh JS. Antitumor effects of glycoproteins extracted from sea cucumber (*Stichopus japonicus*). J Food Sci Nutr, 1999, 4(2): 117

Metcalfe LD, Schmitz AA, Pelka JR. Rapid preparation of fatty acids esters from lipids for gas chromatographic analysis. Anal Chem, 1966, 38(3): 514–515

Shimada S. Antifungal Steroid glycoside from sea cucumber. Science, 1969, 163(3874): 1462

Sun WH, Leng KL, Lin H, *et al*. Analysis and evaluation of chief nutrient composition in different parts of *Stichopus japonicus*. Chinese J Anim Nutr, 2010, 22(1): 212–220

Sánchez-Machado DI, López-Cervantes J, López-Hernández J, *et al*. Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds. Food Chem, 2004, 85(3): 439–444

Samadi PG, Regoire L, Rouillard C. Do cosahexaenoic acid reduces levodopa induced dyskinesias in 1-methy1-4-phenyl-1, 2, 3, 6 tetrahydropyridine monkeys. Ann Neurol, 2006, 59: 282–288

Thomsen C, Rasmussen O, Lousen T, *et al*. Differential effects of saturated and monounsaturated fatty acids on postprandial lipemia and incretin responses in healthy subjects. Am J Clin Nutr, 1999, 69(6): 1135–1143

Thurmond F, Totter T. Covalent composition of colla2 gen fibrils from the dermis of the sea cucumber, Cucumar ia fron2 dosa, a tissue with mutable mechanical propertises. Comp Biochem Physiol, 1995(112A): 463–478

Yutaka K, Shugo W, Kanehisa H, *et al*. Occurrence of chondroitin sulfate E in glycols-aminoglycan isolated from the body wall of sea cucumber *Stichopus juponicus*. J Biol Chem, 1990, 265(9): 5081–5085

(编辑 刘丛力)

Comparative Study on Nutrient Composition of Body Walls of Green and White Sea Cucumbers (*Apostichopus japonicus*)

LI Zhongqing[1,2], XIA Bin[1], WANG Jiying[1①], HUANG Bingshan[1], ZHANG Limin[1], LI Baoshan[1]

(1. *Shandong Marine Resourse and Environment Research Institute, Yantai* 264006;
2. *College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai* 201306*)*

Abstract In this study we compared the nutrient compositions of the body walls of green and white sea cucumbers that were cultured in the same environment. It was found that there were significant differences in the contents of moisture, polysaccharides and ash, as well as the production rate of the body wall between the green and white sea cucumbers (P<0.05). However, there was no difference in the content of crude proteins and crude fat (P>0.05). Twenty major types of fatty acids were detected in the body wall, and there were no significant differences in the contents of the total fatty acids and polyunsaturated fatty acids (P>0.05). The content of saturated fatty acids was higher in green sea cucumber than in white sea cucumber, whereas the content of monounsaturated fatty acids was lower in green sea cucumber (P<0.05). Contents of AA and DHA were also lower in green sea cucumber (P<0.05). Seventeen types of major amino acids were detected in body walls, and the contents of EAA, FAA and DAA were not significantly different between white and green sea cucumbers (P>0.05). Green sea cucumbers had lower levels of aspartic acid, arginine, Mn, and Cr in the body wall than white sea cucumber (P<0.05). The contents of heavy metals such as Pb, Cd, Hg and As in the body wall of both green and white sea cucumbers met the food safety standard. In conclusion, under the same culture conditions, white sea cucumber exhibited higher quality than green sea cucumber in terms of the production rate of the body wall, the contents of polysaccharide and unsaturated fatty acid, the relative percentage of AA and DHA, and the levels of arginine, aspartic acid and trace elements (Mn and Cr).

Key words White sea cucumber; Green sea cucumber; Body wall; Nutrient composition

① Corresponding author: WANG Jiying, E-mail: ytwjy@126.com

DOI: 10.11758/yykxjz. 20150521001 http://www.yykxjz.cn/

海萝(*Gloiopeltis furcata*)藻体保存和容器内的培养方法*

陈素文 郭永坚 李俊伟 颉晓勇 朱长波①

(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实验室 广州 510300)

摘要 为探索海萝(*Gloiopeltis furcata*)藻体的陆地工厂化养殖，分三部分实验进行研究：(1)不同长度(0.5、1、1.5 cm)和断开部位(从基部断开、从顶部断开和从藻体分叉处断开)的海萝藻体培养；(2)不同培养密度(0.5、1、2、4 g/L)和培养容器(方形水槽、圆柱形透明塑料薄膜容器和亚克力筒)；(3)不同风干方式(自然风干、培养箱风干和空调加风扇吹干)和保存温度(4、–18℃)对保存后藻体存活率的影响。结果显示，不同断开部位对相同长度的藻体生长影响不显著(P>0.05)；较小藻体(0.5 cm)的生长速率显著低于其他各组(1.0、1.5 cm) (P<0.05)；方形水槽中海萝藻体的生长速率显著低于亚克力筒和塑料薄膜装置中(P<0.05)；随着培养密度的增加，海萝的日特定生长率呈显著的下降趋势(P<0.05)；以空调加风扇方式进行风干的藻体成活率最高(P<0.05)，在–18℃保存 6 个月，其成活率为 93.8%；在 4℃下保存 1 个月，各组藻体的成活率都为 0。较好的条件组合为：进行陆地工厂化养殖的海萝规格应大于 0.5 cm，合适的培养密度范围为 0.5–1 g/L；成本低且高效的塑料薄膜装置是海萝藻体培养的适宜容器；采用保存海萝藻体于–18℃的方法可使海萝陆地工厂化养殖或相关研究不受制于海萝生长季节，可按需要进行。

关键词 海萝；藻体；规格；培养；容器；保存

中图分类号 S968.43+3 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)03-0108-06

海萝(*Gloiopeltis furcata*)隶属于红藻门(Rhodophyta)内枝藻科(Endocladiaceae)，在日本和中国广泛分布，可供食用、药用(具有治肠炎、痔疾、干咳痰结和抗癌作用)及作为工业原料(曾呈奎等, 1962; 夏邦美, 2004; 余杰等, 2007)。因其用途广泛，价格颇高(约 1500 元/千克)，导致过度采摘，自然资源遭到严重破坏。为满足市场的需求，亟待进行海萝人工养殖。

日本采用去除海萝生长岩礁上杂藻的方法来进行海萝的海区增殖，并在自然海区采苗(网帘、投石、移植种藻和孢子喷洒法)后进行人工养殖(末廣恭雄等, 1957; 九万田一巳等, 2000)。这些增养殖手段效果较差，部分方法已逐渐被淘汰(九万田一巳等, 2000)。然而，目前仍未发现更加行之有效的养殖方法。中国也一直在自然海区开展海萝的增殖，直到近几年，陈素文等(2014b)才开始利用海萝陆地工厂化育苗及用培养的苗种进行海区养殖实验，针对海萝藻体较小，不易于夹苗养殖的特点，发明了适合海萝藻体海区养殖的装置及方法(吕国敏等, 2007; Chen *et al*, 2014; 张汉华等, 2013)。尽管上述方法在海区养殖方面已初具成效，但海区养殖的可控性差，海萝容易被杂藻、附着生物及浮泥等遮盖而死亡。海萝的价格远高于其他海藻，甚至高于鲍鱼价格。因此，开展低成本、高效率的陆地工厂化养殖，可以开创海萝养殖新局面。

开展海萝工厂化养殖，首先要探明藻体培养所需的适宜条件。近年来，对海萝藻体生理生态学的研究

* 中国水产科学研究院基本科研业务费专项项目(2014A07XK01)、国家科技支撑计划项目(2011BAD13B02)和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(中国水产科学研究院南海水产研究所 2013YD05)共同资助。陈素文，E-mail: chensuwen407@163.com

① 通迅作者：朱长波，副研究员，E-mail: changbo@ecowin.org

收稿日期: 2015-05-21，收修改稿日期: 2015-06-17

主要包括：广东沿海海萝属藻类生态调查(吴进锋等, 2007)；山东小黑山岛海萝生物量及长度时空变化特征调查(刘洪亮等, 2013)；干露、光照对海萝光合活性的影响(刘洪亮等, 2014)及三十烷醇和环境因子对海萝藻体生长的影响(陈素文等, 2011、2014a)。而对于进行海萝工厂化养殖所需的适宜藻体规格、培养密度及培养容器等条件尚无相关报道。此外，每年自然海区海萝可采集时间较短(约 2 个月)且采集时机受限(需在退潮期进行)。为保证藻体工厂化养殖及相关研究的开展，藻体的保存必不可少。作者研究了不同海萝藻段长度和截取部位对其生长的影响、合适培养密度和装置，以及不同处理方式保存藻体后对其成活率的影响，以期为海萝藻体工厂化养殖提供参考。

1　材料与方法

实验设备为专业气候培养箱。所用天然海水，经黑暗沉淀 10 d 以上，盐度为 31。

1.1　海萝苗种规格和断裂部位对其生长的影响

实验于 2013 年 2 月 28 日在中国水产科学研究院南海水产研究所生态实验室内进行。实验材料为人工育苗培养的藻体(0.5–2 cm)：A 组为从基部断开的整丛藻体，B 组为切藻体顶端部位，C 组为藻体分叉处断裂出来的部位。每组分别取 3 种藻体规格：0.5 cm (A1、B1 和 C1)、1 cm (A2、B2 和 C2)、1.5 cm (A3、B3 和 C3)。每个实验组各取 0.25 g 藻体，置于装有 400 ml 16℃海水的锥形瓶中，各设 3 个平行组，所有实验组均放入培养箱(设置温度为 16℃，光照为 8500 lx)里充气培养。实验周期为 60 d，期间每 7 d 全换水 2 次，每次换水时，每升海水添加 10 mg 硝酸钠($NaNO_3$)与 1 mg 磷酸氢二钾(K_2HPO_4)。每隔 20 d，各组海萝藻体经纸巾吸掉水分后称重。

1.2　不同培养密度和装置对海萝生长的影响

实验在中国水产科学研究院南海水产研究所深圳试验基地室外大棚(顶棚半透明)内进行。研究了不同培养容器(E 组)和不同培养密度(F 组)对海萝藻体(采自深圳杨梅坑，藻体长度为 1–2 cm)生长的影响。E1 为蓝色方形水槽(0.45 m×0.45 m×0.45 cm)；E2 为研制的透明塑料薄膜柱状培养装置(图 1-B)，其直径为 30 cm，长为 1.5 m (加入水位为 1.2 m)；E3–E5 为不同直径亚克力筒(图 1-A)，直径依次为 20、30、40 cm，筒高均为 1.2 m (水位 1 m)。每种培养容器按照 0.5 g/L 海萝藻体密度进行培养。F 组采用 E2 作为培养容器(图 1)，F1–F4 分别对应海萝藻体密度 0.5、1、2、4 g/L。各实验组设置 3 个平行组，充气培养。E 组培养 20 d 后称重，F 组培养 30 d 后称重。实验期间，每 7 d 全换水 2 次，换水时适量添加 $NaNO_3$ 和 K_2HPO_4，使海水中 N 和 P 浓度分别为 10 mg/L 和 1 mg/L。

特定生长率(Specific growth rate, SGR, %/d)=$(\ln W_t-\ln W_0)/t\times100\%$

式中，W_t 为藻体终末质量，W_0 为藻体初始质量，t 为培养天数。

1.3　不同处理方式对藻体保存效果的影响

海萝藻体(1.5–2 cm)采自深圳杨梅坑海区，用毛巾吸干水份后，进行 3 种方式风干处理(D1，D2 和 D3)：D1 组置于室内自然风干(温度为 18–19℃)、D2 组置于培养箱风干(温度为 18℃)、D3 组用空调冷气加上风扇直吹干(温度为 17–18℃)。每种处理方式用海萝藻体 40 g，分别风干到 10 g 左右并记录风干时间。将风干处理后的各组海萝藻体进行分装(每个密封袋装 0.5 g 海萝藻体)后，1/2 冷藏(4℃)，1/2 冷冻

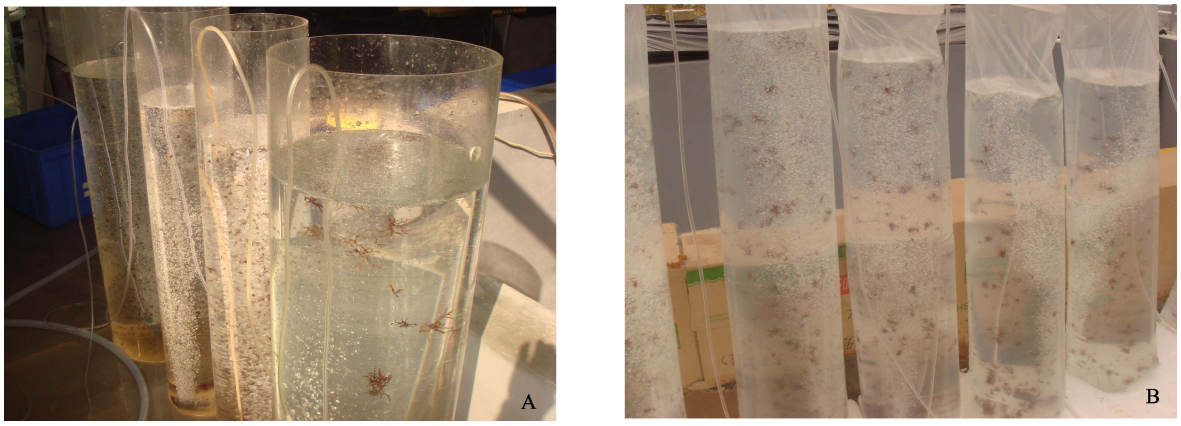

图 1　海萝藻体在亚克力筒(A)及塑料薄膜装置(B)中培养

Fig.1　*G. furcata* incubated in acrylic cylinder (A) and plastic membrane culture device (B)

(–18℃)。保存 3、30、180 d 后，分别取冷藏和冷冻条件下的每个处理组各取 3 袋藻体，分别置于 12℃海水(2 L)中，在温度为 16℃、光照强度为 8000 lx 的培养箱中培养 7 d 后称重(期间，换水 1 次，水温为 16℃)。

成活率(Survival rate, %) = 培养 7 d 后质量/初始质量×100%。

1.4 数据分析

采用 SPSS 21.0 软件进行数据处理和统计分析。不同处理先做单因素方差分析(One-way ANOVA)，再通过 Duncan 比对差异，以 $P<0.05$ 作为差异显著水平。所有数据均为平均值±标准差(Mean±SD)。

2 结果

2.1 海萝藻体规格和断裂部位对其生长的影响

3 个阶段(20、40、60 d)的测定结果显示，相同生长阶段中，相同规格藻体间所呈现的组间(A，B 和 C)质量差异不显著($P>0.05$)；而不同规格藻体间，小规格藻体(0.5 cm：A1、B1 和 C1)的终末质量显著低于较大规格藻体(1 cm：A2、B2 和 C2；1.5 cm：A3、B3 和 C3) ($P<0.05$)；随着培养天数的增加，各组藻体质量呈缓慢增长趋势(图 2)。

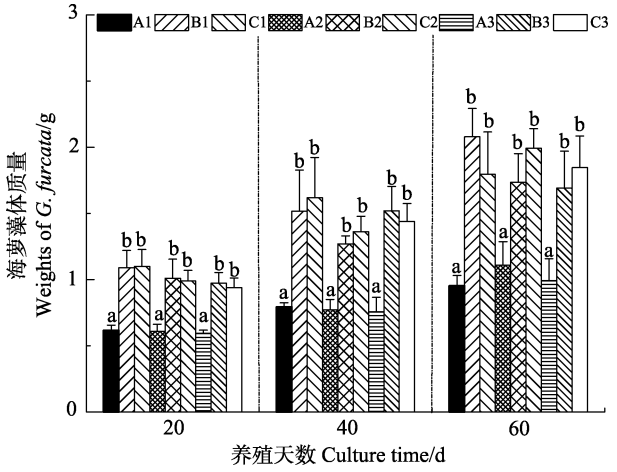

图 2 不同规格和断裂方式的海萝藻体经不同时间培养后的质量

Fig.2 Weights of different size and part of *G. furcata* by incubated for various period

注：柱图上方不同字母代表在相同的养殖天数时海萝藻体质量的组间差异显著($P<0.05$)

Note: Different letters above the columns denoted significant difference in the weight among groups on the same day of culture ($P<0.05$)

2.2 不同培养密度和装置对生长的影响

培养于水槽(E1)中的海萝藻体，在充气条件下，藻体分布不均匀，部分藻体成团堆积，其生长速率显著低于其他培养容器中的藻体；培养于透明塑料薄膜培养装置(E2)与亚克力筒(E3–E5)的海萝藻体，充气时，藻体呈悬浮状态，形成立体式培养，因此，其生长速率可达水槽培养条件下的 2 倍(表 1)。不同直径的亚克力筒和透明塑料薄膜养殖装置培养中，海萝藻体生长速率差异不显著，然而，直径较大的亚克力筒(直径为 40 cm)需较大的充气量，才能使海萝呈悬浮状态。

表 1 不同培养容器中海萝的特定生长率

Tab.1 Special growth rate of *G. furcata* incubated in different containers

组别 Group	特定生长率 Daily SGR (%/d)
E1	2.4178±1.02876[a]
E2	4.9492±0.43229[b]
E3	5.0330±0.56539[b]
E4	4.7690±0.19012[b]
E5	5.1265±0.25495[b]

注：不同字母表示组间明显的差异性($P<0.05$)

Note: Different letters denoted significant differences among groups ($P<0.05$)

不同培养密度下，海萝特定生长率的组间差异显著($P<0.05$)。随着培养密度的增加，海萝日特定特长率呈下降趋势：密度最小组(F1)的特定生长率可达 4.596%，密度最大组(F4)的特定生长率仅为 1.98% (图 3)。

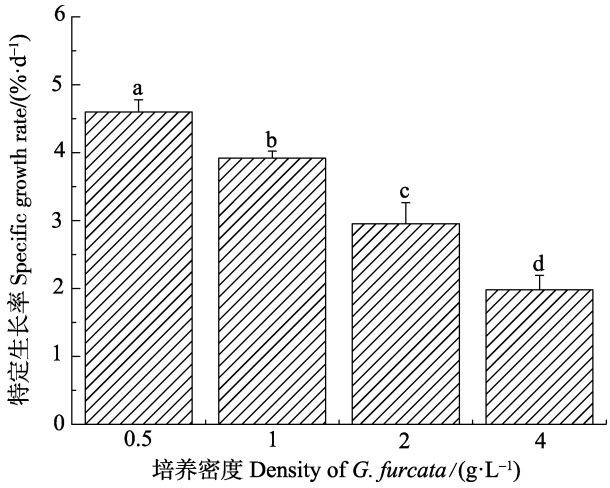

图 3 不同培养密度海萝特定生长率

Fig.3 Daily SGR of *G. furcata* incubated with different densities

注：不同字母表示组间明显的差异性($P<0.05$)

Note: Different letters denoted significant differences among groups ($P<0.05$)

2.3 不同处理方式对藻体保存后成活率的影响

D1、D2 和 D3 组所需的风干时长依次为 78、60、

2 h。保存期为 3 d 时，各组藻体置于冷冻和冷藏环境中均可存活，且以 D3 组最高(P<0.05)；保存 30 d 后，各组藻体冷藏保存(4℃)的成活率都为 0，而冻冷保存(–18℃)的成活率则与保存 3 d 的差异不显著(P>0.05)。保存 180 d 后，各组藻体冷冻保存的成活率显著低于保存期为 30 d 的成活率(P<0.05)。冷冻保存后的成活率，D1 组和 D2 组之间差异不显著(P>0.05)，D3 组则显著高于 D1 组和 D2 组(P<0.05)(表 2)。

表 2　不同处理方式下海萝藻体的成活率

Tab.2　Survival rates of *G. furcata* treated with different methods

实验组 Group	保存温度 Storage temperature (℃)	成活率 Survival rate (%)		
		3 d	30 d	180 d
D1	4	35.8±17.2^{a}	0^{c}	0^{c}
	–18	37.9±14.9^{a}	31.5±17.6^{a}	15.6±13.5^{d}
D2	4	40.5±10.3^{a}	0^{c}	0^{c}
	–18	39.6±12.7^{a}	42.8±10.7^{a}	22.8±11.9^{d}
D3	4	94.5±4.5^{b}	0^{c}	0^{c}
	–18	95.3±4.9^{b}	93.8±6.5^{b}	72.3±13.5^{e}

注：不同字母表示组间差异性显著(P<0.05)

Note: Different letters denoted significant differences among groups (P<0.05)

3　讨论

3.1　海萝藻体长度和断裂部位对其生长的影响

对于海藻切段离体再生的研究，如对江蓠(*Gracilaria tenuistipitata*)、顶群藻(*Acrosorium yendoi* Yamada)、舌状蜈蚣藻(*Grateloupia livida* Yamada)和长心卡帕藻(*Kappaphycus alvarezii*)的研究，大部分都是切藻体不同部位来试验不同部位长出新芽的情况(赵素芬等，1999；陈昌生等，1987；张丽娟，2000；唐贤明等, 2014)。海藻的生长不仅体现在长出新芽，还包括藻体的增粗，这两方面的综合衡量指标是质量变化。本研究旨在探索海萝工厂化养殖的适宜海萝藻段长度，故以质量作为生产性产量衡量指标。

实验结果显示，海萝藻体采取从基部断开、藻体切顶端部位或分叉处断裂出来的部位进行培养对其质量增长影响不大，而小规格(0.5 cm)藻体的质量增长速率小于大规格藻体(1 cm 以上)。实验采用的是人工育苗培养的苗种，这些苗种比海区采集的同等规格藻体纤细，在培养过程中易被其他杂藻附着，尤其是 0.5 cm 规格，因外形小，附着物不易被清洗干净而影响其生长。所以，人工育苗的海萝最好培养到 0.5 cm 以上，再进行藻体悬浮养殖，可采用切藻体顶端部位作为苗种，留下基部于附着器上继续生长。

3.2　不同培养密度和装置对海萝藻段生长的影响

在进行实验之前，作者曾尝试把海区采集的海萝藻体培养于半透明顶棚下的方形水泥池(3 m×3 m)中，然而无论充气量多大都无法使大部分藻体悬浮。培养 4 d 后，藻体逐渐腐烂死亡，出现负增长。表明水池不适合离体海萝藻体的工厂化养殖，必须寻找更合适的容器。这是进行不同培养装置对海萝生长影响实验的原因。

实验中的方形蓝色水槽，相当于小型水泥池，因高度较矮，接受光照充分且有小部分藻体能悬浮，所以藻体略有生长，但与透明的塑料薄膜袋和亚克力筒相比，其效果较差。海萝藻体在塑料薄膜袋与亚克力筒中主体上呈悬浮状态，充分利用阳光，生长速度快；因为这两种容器培养的藻体生长差异不显著，且透明塑料薄膜袋柱状培养装置的成本远远低于亚克力筒，故将透明塑料薄膜袋柱状培养装置作为海萝藻体进行工厂化培养装置较为合适。实验结果显示，柱状培养装置的直径对藻体的生长影响不明显，从提高工作效率及充分利用场地的角度出发，塑料薄膜袋的直径可增加到 50 cm 左右。采用透明塑料薄膜袋培养装置进行海萝属藻类工厂化养殖的方法已获国家发明专利授权(陈素文等，2014b)。

实验表明，海萝藻体培养密度为 0.5 g/L 时，其生长速率达到最大，从提高单位水体产量的角度出发，应该适当增加培养密度。藻体密度为 1 g/L 时，其生长速率比 0.5 g/L 时的低，但却显著高于密度为 2、4 g/L 时的生长速率。因此，海萝藻体合适培养密度范围为 0.5–1 g/L。

3.3　不同处理方式对藻体保存后成活率的影响

陈素文等(2012)对海萝属藻类种藻保存的研究阐明了藻体风干到原鲜重的 1/4 时，孢子的保存效果最好。存在于藻体中的孢子与藻体的存活密切相关，

即藻体保存得好，孢子也就保存好。所以，在进行实验设计时，根据种藻保存实验的结果，把全部藻体都风干为原鲜重的 1/4。

实验结果显示，经不同方式风干处理的海萝藻体，达到相同重量(相同含水量)所需时间不同，其成活率也不同。采用空调加风扇进行风干的海萝(D3)所用时间最短(2 h)，其成活率最高。刘洪亮等(2014)在光照培养箱中进行干露对海萝光合活性的影响(控温为 11℃)，表明干露 72 h 的藻体(含水量为 5.9%)重新浸入海水中 12 h 后可完全恢复光合活性，而干露 108 h 的(含水量为 3.2%)藻体完全不能恢复光合活性。本研究中，保存 3 d 后重新浸入海水的各组海萝(D1，D2 和 D3)，实际的干露时间已为 150 h，但 D3 组的最高成活率仍可达 95%以上，这可能与不同保存温度及含水量有关。尽管没有进行 D 组藻体含水量的测算，但从藻体质量减少为原鲜重 1/4 可估算含水量比刘洪亮等(2014)实验中干露 108 h 的多。此外，刘洪亮实验中的海萝干露时都处于 11℃，而实验中的 D3 组处于 18℃的时间为 2 h (最短)，其余的 148 h 都是在 4℃以下进行保存的，D1 组的则处于 18℃的时间 78 h，处于 4℃以下的时间为 72 h。显然藻体的含水量影响其成活率，而在干露状态下，温度越低，成活率越高。

有关种藻冷冻保存的报道表明，孢子的保存效果符合细胞在冷冻后的活性随着时间的延长而降低，随着冷冻温度的降低而提高的原理(陈素文等, 2012; Taylor *et al*, 1999)。本研究中藻体的保存也符合这一原理。

参 考 文 献

吕国敏, 吴进锋, 陈素文, 等. 海萝属藻类的生态与人工增养殖技术. 水产科技, 2007(4): 5–9

刘洪亮, 李雪萌, 南国宁, 等. 潮间带红藻—海萝光合活性对干露胁迫的响应. 应用生态学报, 2014, 25(5): 1491–1498

刘洪亮, 唐永政, 于永强, 等. 山东小黑山岛海萝生物量和长度的时空变化及影响因素. 应用生态学报, 2013, 24(11): 3259–3264

吴进锋, 陈素文, 陈利雄, 等. 广东沿海海萝属藻类生态与分布调查. 南方水产, 2007, 3(5): 7–13

余杰, 许肇成, 颜璐璐, 等. 海萝多糖抗突变与抗肿瘤作用的研究. 汕头大学学报(自然科学版), 2007, 22(2): 59–63

张汉华, 陈素文, 朱长波, 等.一种海萝属藻类海区养殖装置及使用该装置的养殖方法. 申请专利号: 201210051178. X, 2013

张丽娟. 舌状蜈蚣藻切段离体再生的初步研究. 集美大学学报(自然科学版), 2000, 5(3): 35–39

陈昌生, 章景荣. 顶群藻切段离体培养的研究. 福建水产, 1987(1): 44–49

陈素文, 吴进锋, 陈利雄, 等. 三十烷醇对海萝孢子萌发、幼苗及藻体生长的影响. 华南农业大学学报, 2011, 32(1): 78–82

陈素文, 吴进锋, 陈利雄. 海萝种藻冷冻保存对其释放孢子量及孢子附着的影响. 热带海洋学报, 2012, 31(1): 67–71

陈素文, 陈利雄, 朱长波, 等. .环境因子对海萝藻体生长及成活的影响. 南方水产科学, 2014a, 10(3): 92–96

陈素文, 陈利雄, 黄忠, 等.一种海萝属藻类工厂化养殖方法、养殖棚及养殖装置. 申请专利号: 201210124825.5, 2014b

赵素芬, 庄承纪. 2 种江蓠藻体切段的再生. 湛江海洋大学学报, 1999, 19(2): 25–29

夏邦美. 中国海藻志: 第 2 卷, 红藻门, 第 3 册, 隐丝藻目. 北京: 科学出版社, 2004, 50–53

唐贤明, 王瑛睿, 刘翠, 等. 长心卡帕藻切段培养的初步研究. 南方水产科学, 2014, 10(2): 36–41

曾呈奎, 张德瑞. 中国经济海藻志. 北京: 科学出版社, 1962, 123–178

九万田一巳, 小松光男, 新村巖, 等. 鹿児島県水産技術のあゆみ, 第 3 編増·養殖部門-1. 日本: 鹿児島県水産技術者 OB なぎさ会, 2000

末廣恭雄, 大島泰雄, 檜山義夫. 水産學集成//須藤俊造. フノリの養殖(A). 日本: 東京大學出版會, 1957, 819–828

Chen SW, Chen LX, Zhu CB, *et al*. 2014. Spore culture of red seaweed, *Gloiopeltis furcata*. J World Aquacult Soc, 2014, 45(4): 355–492

Taylor R, Fletcher RL. Cryopreservation of eukaryotic algae-a review of methodologies. J Appl Phycol, 1999, 10(5): 481–501

(编辑 马璀艳)

Studies on Culture and Storage of *Gloiopeltis furcata* Thalli

CHEN Suwen, GUO Yongjian, LI Junwei, XIE Xiaoyong, ZHU Changbo①

(*Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou* 510300)

Abstract　Three experiments were conducted in this study to explore proper on-land culture conditions for *Gloiopeltis furcata* thalli. In the first experiment vegetable fragments with different sizes (0.5cm, 1cm, and 1.5cm) and cut parts (cut from base, top, and fork) were incubated in lab for 60 days. In the second experiment *G. furcata* thalli were incubated in different containers (square tank, acrylic cylinder, and plastic membrane cylinder), and with different densities (0.5 g/L, 1 g/L, 2 g/L, and 4 g/L). In the third experiment *G. furcata* thalli dried in different ways (indoor wind, artificial climate incubation chambers, air-conditioning and fan) were stored at different temperatures (4℃ and –18℃). We found that with a certain size there was no significant difference in the growth between vegetable fragments from various cut parts. Vegetable fragments with a length of 0.5 cm grew slower than those with other lengths (1.0 cm and 1.5 cm, $P<0.05$). The SGR (specific growth rate) of *G. furcata* thalli was the lowest in the square tank ($P<0.05$), and was decreased along with the increase in culture density ($P<0.05$). The survival rate was higher in *G. furcata* thalli dried with air-conditioning and fan ($P<0.05$) and was 93.8% after preserved at –18℃ for 6 months. However, the survival rate of all groups decreased to 0 in 1 month after stored at 4℃. The results indicated that appropriate on-land culture conditions included reasonable size of vegetable fragments (> 0.5 cm), density between 0.5 g/L and 1 g/L, and plastic membrane cylinder as the container. Vegetable fragments for culture can be readily obtained if preserved at –18℃.

Key words　*Gloiopeltis furcata*; Thalli; Size; Culture; Container; Storage

① Corresponding author: ZHU Changbo, E-mail: changbo@ecowin.org

DOI: 10.11758/yykxjz.20150430002 http://www.yykxjz.cn/

基因条码在条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)不同品系间种质鉴定中的适用性*

曹殿嘉[1] 严兴洪[1,2①]

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306;
2. 上海海洋大学省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室 上海 201306)

摘要 为寻找适宜的条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)品系间种质分子标记鉴定法, 利用 4 种基因条码(RUBISCO Spacer、UPA、Cox2-3 和 ITS-5.8S)对产自中国和日本的 6 个条斑紫菜品系的亲缘关系进行了分析研究。结果显示, 在 6 个条斑紫菜品系中, 上述 4 种基因条码的序列同源性较高, 同源性为 97.8%–100%, 其中, RUBISCO Spacer 序列的同源性为 100%。UPA 序列的同源性分析结果显示, 在中国产的 LS、B4、HT 和 TM18 品系中, 该序列完全相同, 但与日本产的 GT 和 ROS-2 两个品系的序列有差异, 该序列的同源性为 99.2%。在 6 个品系中, Cox2-3 和 ITS-5.8S 序列的同源性相对较低, 分别为 97.8%–99.2%和 98.4%–99.8%。根据 UPA、Cox2-3 和 ITS-5.8S 基因条码通过邻接法构建的系统进化树显示, 依据 ITS-5.8S 和 UPA 序列均能分别区分中国产的 4 个品系(LS、B4、HT 和 TM18)与日本产的两个品系(GT 和 ROS-2), 分别形成两个大分支, 其聚类结果与实际亲缘关系一致。但利用 ITS-5.8S 序列均能对中国产的 4 个品系和日本产的两个品系进行再区分, 而利用 UPA 序列却无法对中国产的 4 个品系进行再区分, 只能区分日本产的两个品系。使用 Cox2-3 序列则将 GT、ROS-2、LS 和 TM18 这 4 个品系聚成一个大分支, 其聚类结果与实际亲缘关系不一致。上述结果说明, 利用 ITS-5.8S 序列对本研究的 6 个条斑紫菜品系进行种质鉴定, 效果最好。

关键词 条斑紫菜; 基因条码; 品系; 种质鉴定

中图分类号 Q949.29+2.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)03-0114-06

条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)为主要分布于我国北方及韩国和日本等地的重要紫菜栽培物种(张美如等, 2012)。近年来, 全球海水温度不断上升, 对人工栽培紫菜的品质和产量产生了较大影响。为此, 研究者通过人工选育的方法获得了稳定高产且抗逆性好的条斑紫菜优良品系(王华芝等, 2012; Yan, 2000; Zhang *et al*, 2011)。条斑紫菜品系间的准确种质鉴定, 不仅可以加快优良品种的选育速度, 而且也是推广紫菜良种的重要基础工作。

目前, 紫菜的种质鉴定主要有形态学、细胞学、生理生化和分子标记辅助等鉴定方法(张庆杰, 2012)[1)]。在以往的条斑紫菜种质鉴定中, 主要是依据传统的形态学和细胞学特征(Miura, 1984、1988; Niwa, 2005)。Hebert 等(2003a、b)首次提出了基因条形码(DNA

* 国家高科技研究发展计划(863 计划)项目(2012AA10A411)、国家自然科学基金项目(31072208)、国家海洋局公益专项(201105008; 201105023)、国家农业科技成果转化资金项目(2013GB2C220537)、农业部公益性专项(200903030)、上海市科委重点科技攻关项目(10391901100)、上海高校水产学一流学科建设项目、福建省科技重大专项(2011NZ0001-1)和福建省省长专项基金(2014S1477-10)共同资助。曹殿嘉, E-mail: cdjyoona@163.com

① 通讯作者: 严兴洪, 教授, E-mail: xhyan@shou.edu.cn

收稿日期: 2015-04-30, 收修改稿日期: 2015-05-25

1) 张庆杰. 坛紫菜“申福 2 号”SSR 分子标记的研究和性别相关 AFLP 反应体系的建立. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2012, 1–38

barcoding)的概念；随后，基因条码在紫菜种质鉴定中也得到了较广泛的应用(赵玲敏等, 2009; Niwa, 2003、2008、2009; Saunders, 2005)。Wang 等(2009)采用直接 PCR 技术对 8 个紫菜种的 RUBISCO Spacer 序列进行比较分析，表明该序列的同源性与紫菜种的来源呈相关关系，说明 RUBISCO Spacer 序列适用于紫菜种的分类。Milstein 等(2012)对巴西 3 个紫菜种的 25 个品系的 UPA、Cox1 和 Cox2-3 基因条码进行了分析，并依据这 3 种序列的同源性成功命名了 1 个新的紫菜种(*Pyropia* sp. 77)，同时确认了 *Pyropia drewiana* 和 *Pyropia spiralis* 是同一紫菜种。谢小雪等(2013)测定了坛紫菜 11 个品系的 UPA、Cox2-3、Cox1 和 ITS-5.8S 共 4 种基因条码序列，发现只有 ITS-5.8S 序列可以完全区分各个坛紫菜品系。

本研究利用 4 种基因条码(RUBISCO Spacer、UPA、Cox2-3 和 ITS-5.8S)对条斑紫菜 6 个品系的亲缘关系进行了比较分析，旨在找到一种适合于条斑紫菜品系间种质鉴定的方法。

1　材料与方法

1.1　实验材料

本研究所用条斑紫菜 6 个品系(LS、B4、HT、TM18、GT 和 ROS-2)均以自由丝状体的形式被保存于实验室内，其保存和培养方法同 Kato 等(1984)，其来源、代码及特性见表 1。

1.2　实验方法

1.2.1　*基因组 DNA 的提取*　　条斑紫菜各品系的自由丝状体用灭菌 ddH_2O 清洗 3 次，用灭菌吸水纸吸去水分，取 0.1 g 自由丝状体，经液氮快速充分研磨后，使用 DP320 新型植物基因组试剂盒(TIANGEN，北京)提取基因组 DNA，再用 1%琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 的完整性，利用 NanoDrop2000 测定其基因组 DNA 的浓度和纯度，DNA 保存在–20℃备用。

表 1　本研究所用的 6 个条斑紫菜品系的代码、来源及特性

Tab.1　The codes, origins and characteristics of the six strains of *Pyropia yezoensis* in this study

序号 No.	代码 Code	来源与特性 Source and characteristics
1	LS	由采自江苏吕泗海区一株野生型的条斑紫菜叶状体放散的果孢子萌发而来
2	B4	条斑紫菜野生型品系(LS)的叶状体经 ^{60}Co-γ 射线照射后，从其体细胞苗再生体中筛选出来的耐高温品系(Zhang *et al*, 2011)
3	HT	条斑紫菜品系(B4)的叶状体经 ^{60}Co-γ 射线照射后，从其体细胞苗再生体中筛选出来的红色品系(Zhang *et al*, 2011)
4	TM18	条斑紫菜品系(B4)的叶状体经 ^{60}Co-γ 射线照射后，从其体细胞苗再生体中筛选出来的耐高温品系(王华芝等, 2012)
5	GT	日本产条斑紫菜野生型品系(U-511)的叶状体经 MNNG 处理后，从单孢子萌发体中筛选出来的绿色突变品系(严兴洪等, 2000)
6	ROS-2	日本产条斑紫菜野生型品系(U-511)的叶状体经 MNNG 处理后，从单孢子萌发体中筛选出来的生长快的优良突变品系(严兴洪等, 2000)

1.2.2　*基因条码的扩增和测序*　　用于 RUBISCO Spacer、UPA、Cox2-3 和 ITS-5.8S 基因条码扩增的特异性引物分别依据 Wang 等(2009)和谢小雪等(2013)，由生工(上海)生物工程有限公司合成，具体的扩增位点及复性温度列入表 2。

PCR 反应体系均为 25 μl，其中，ddH_2O 13.5 μl，10×Loading buffer 2.5 μl，$MgCl_2$ 2 μl，dNTP 2.5 μl，正反向引物各 0.5 μl，1 U *Taq* 酶 0.5 μl，基因组 DNA 3.0 μl。

RUBISCO Spacer、UPA、Cox2-3 和 ITS-5.8S 序列的 PCR 反应程序：94℃ 5 min；35 个循环：94℃ 45 s，退火依据各引物的复性温度，72℃延伸 45 s；最后 72℃延伸 10 min，4℃下保存。PCR 产物经纯化后由生工(上海)生物工程有限公司进行克隆测序。

1.2.3　*序列分析及系统树的构建*　　用 Blast 软件进行同源性检测，利用 DNAMAN 软件进行序列比对及同源性分析，使用 MEGA 5.0 软件通过邻接法(NJ)构建 4 种基因条码的系统发育树。

2　结果与分析

2.1　条斑紫菜 6 个品系丝状体基因组 DNA 的提取

条斑紫菜 6 个品系丝状体基因组 DNA 的分子量约为 23 kb (图 1)，$OD_{260\ nm}/OD_{280\ nm}$ 在 1.8–2.0 之间，可满足后续的实验需要。

表 2 4 种基因条码的扩增引物序列

Tab.2 Primers used for the amplification of the four DNA barcodings

基因条码 DNA barcoding	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5′-3′)	复性温度 Annealing temperature (℃)
RUBISCO Spacer	RuF	CGCTGCTAAAACTTGTGGGC	56
	RuR	GGCGTTGTAATAAGAATCCTGG	56
UPA	UPAF	GGACAGAAAGACCCTATGAA	50
	UPAR	TCAGCCTGTTATCCCTAGAG	50
Cox2-3	Cox23F	GATGCTGTACCCGGTAGAT	55
	Cox23R	GTTGTAATTGTTTAGCTGTTTTT	55
ITS-5.8S	ITSF	GGGATCCGTTTCCGTAGGTGAACCTGC	60
	ITSR	GGGATCCATATGCTTAAGTTCAGCGGGT	60

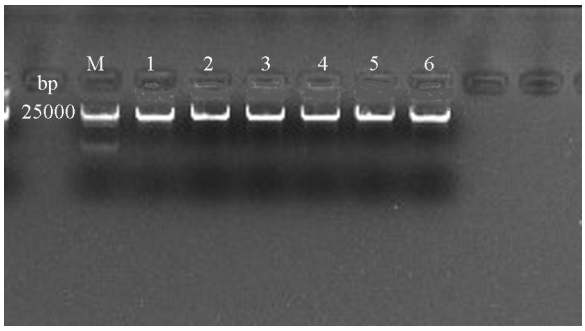

图 1 条斑紫菜 6 个品系的基因组 DNA 的琼脂糖凝胶电泳

Fig.1 Agarose electrophoresis of the total DNA extracted from the six strains of *P. yezoensis*

M: λDNA/*Hind*Ⅲ digest DNA marker; 1–6: LS, B4, HT, TM18, GT, and ROS-2 respectively

2.2 条斑紫菜 6 个品系的 4 种基因条码扩增结果

经 PCR 反应，从条斑紫菜 6 个品系的基因组 DNA 中分别扩增出 4 种基因条码的特异性产物，分子量分别约为 500 bp、365 bp、365 bp 和 1100 bp (图 2)。PCR 反应产物条带单一，经克隆测序后，4 种基因条码的 NCBI 收录号列入表 3。

2.3 条斑紫菜 6 个品系 4 种基因条码的序列同源性

条斑紫菜 6 个品系的 RUBISCO Spacer 序列产物包括大亚基 rbcL、小亚基 rbcS 以及基因间隔区 RUBISCO Spacer。根据基因间隔区 RUBISCO Spacer 序列计算的同源性如表 4 所示，条斑紫菜 6 个品系具有

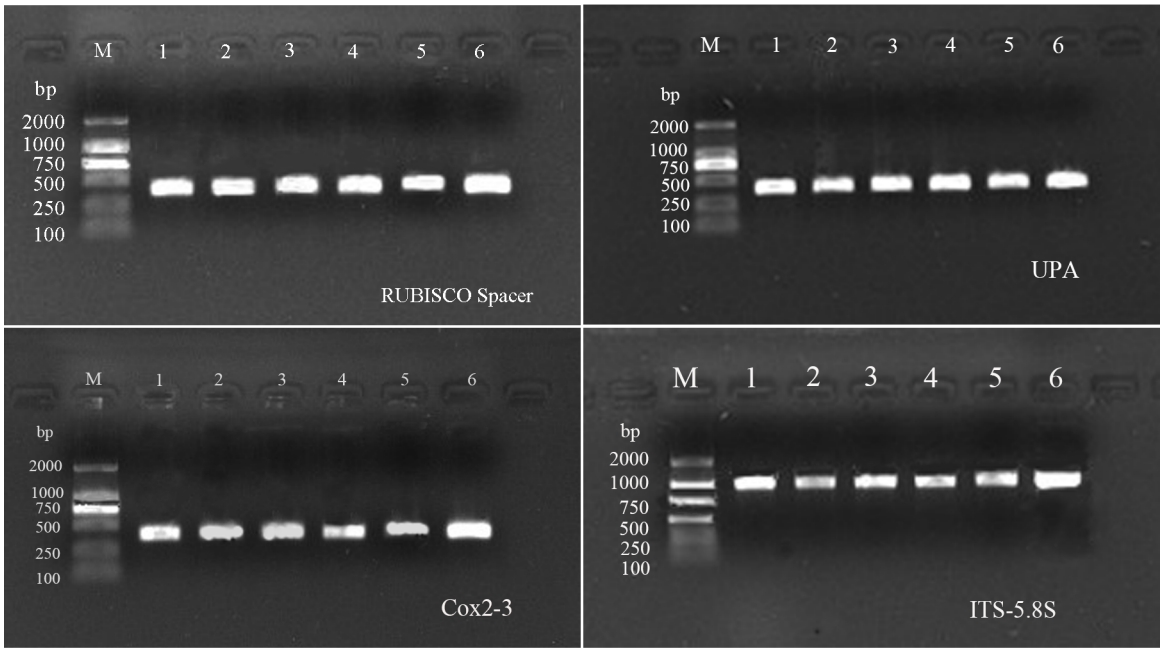

图 2 条斑紫菜 6 个品系的 4 种基因条码的琼脂糖凝胶电泳

Fig.2 Agarose electrophoresis of the four DNA barcodings of the six strains of *P. yezoensis*

M: DL2000 DNA Marker; 1–6: LS, B4, HT, TM18, GT, and ROS-2 respectively

表 3　条斑紫菜 6 个品系 4 种基因条码的 NCBI 收录号

Tab.3　Accession numbers of the four DNA barcodings of the six strains of *P. yezoensis*

代码 Code	NCBI 的收录号 GenBank accession No.			
	RUBISCO Spacer	UPA	Cox2-3	ITS-5.8S
LS	KR260245	KR260251	KR349291	KR260257
B4	KR260246	KR260253	KR349293	KR260259
HT	KR260248	KR260252	KR349292	KR260258
TM18	KR260247	KR260254	KR349294	KR260260
GT	KR260249	KR260255	KR349295	KR260261
ROS-2	KR260250	KR260256	KR349296	KR260262

表 4　基于 RUBISCO Spacer 和 UPA 序列的条斑紫菜 6 个品系同源性分析

Tab.4　Sequence homology analysis of the six strains of *P. yezoensis* based on RUBISCO Spacer and UPA

代码 Code	序列同源性 Sequence homology (%)					
	LS	B4	HT	TM18	GT	ROS-2
LS		100	100	100	99.2	99.2
B4	100		100	100	99.2	99.2
HT	100	100		100	99.2	99.2
TM18	100	100	100		99.2	99.2
GT	100	100	100	100		99.4
ROS-2	100	100	100	100	100	

注：RUBISCO Spacer: 对角线下方; UPA: 对角线上方

Note: RUBISCO Spacer: below diagonal; UPA: above diagonal

完全相同的 RUBISCO Spacer 序列，同源性为 100%。

条斑紫菜 6 个品系的 UPA 序列的同源性在 99.2%–100%之间，其中 LS、B4、HT 和 TM18 这 4 个品系的 UPA 序列完全相同，序列同源性为 100%。ROS-2 和 GT 品系在 4 个位点发生了突变，与 LS、B4、HT 和 TM18 这 4 个品系的序列同源性均为 99.2%。

Cox2-3 序列由 COX2 和 COX3 的部分编码序列以及基因间隔区 3 个部分组成。条斑紫菜 6 个品系的 Cox2-3 序列同源性在 97.8%–99.2%之间(表 5)。GT 与 ROS-2 品系和 HT 与 B4 品系的序列同源性最高，均达到 99.2%，HT 与 ROS-2 品系序列同源性最低，只有 97.8%。

表 5　基于 Cox2-3 和 ITS-5.8S 序列的条斑紫菜 6 个品系同源性分析

Tab.5　Sequence homology analysis of the six strains of *P. yezoensis* based on Cox2-3 and ITS-5.8S

代码 Code	序列同源性 Sequence homology (%)					
	LS	B4	HT	TM18	GT	ROS-2
LS		98.9	99.6	99.6	98.4	98.6
B4	98.1		99.1	99.8	98.6	98.8
HT	98.4	99.2		99.1	99.5	99.6
TM18	98.9	98.3	98.1		98.7	98.8
GT	98.6	98.4	98.6	98.9		99.8
ROS-2	98.0	98.1	97.8	98.6	99.2	

注：Cox2-3: 对角线下方; ITS-5.8S: 对角线上方

Note: Cox2-3: below diagonal; ITS-5.8S: above diagonal

ITS-5.8S 序列包括核糖体 18S、28S 部分序列以及 ITS-5.8S 完整序列。条斑紫菜 6 个品系 ITS-5.8S 序列同源性较高，同源性在 98.4%–99.8%之间。其中，GT 与 ROS-2 品系、B4 与 TM18 品系的 ITS-5.8S 序列同源性最高，均为 99.8%。B4 与 ROS-2 品系的序列同源性最低，为 98.6%。

2.4　条斑紫菜 6 个品系 4 种基因条码的系统发育树

基于 UPA、Cox2-3 和 ITS-5.8S 基因条码，通过邻接法(NJ)构建的系统发育树如图 3–图 5 所示。UPA 和 ITS-5.8S 两种序列均将中国产的 4 个品系与日本产

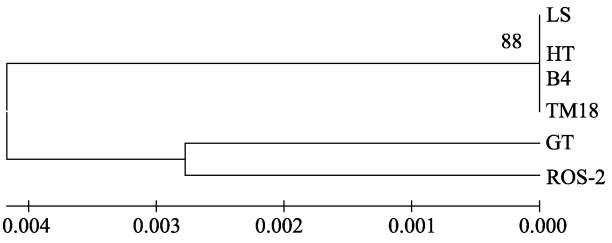

图 3　基于 UPA 序列通过邻接法构建的条斑紫菜 6 个品系的系统发育树

Fig.3　Phylogenetic tree of UPA of the six strains of *P. yezoensis* constructed with the neighbor-joining analysis

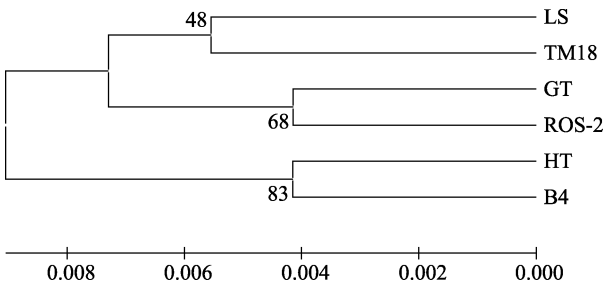

图 4　基于 Cox2-3 序列通过邻接法构建的条斑紫菜 6 个品系的系统发育树

Fig.4　Phylogenetic tree of Cox2-3 of the six strains of *P. yezoensis* constructed with the neighbor-joining analysis

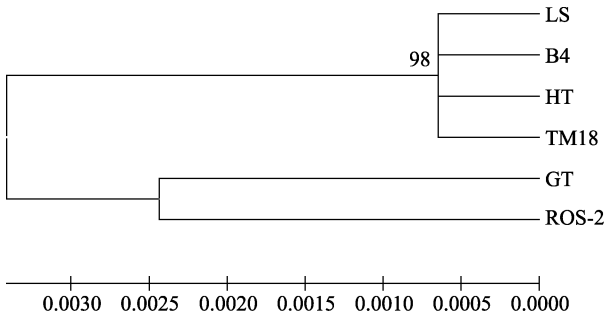

图 5 基于 ITS-5.8S 序列通过 NJ 法构建的条斑紫菜 6 个品系的系统发育树

Fig.5 Phylogenetic tree of ITS-5.8S of six strains of *P. yezoensis* constructed with the neighbor-joining analysis

的两个品系分别聚成两个分支，其聚类结果与 6 个品系的原有地域亲缘关系是一致的。利用 ITS-5.8S 序列均能对中国产的 4 个品系和日本产的两个品系进行再区分，而利用 UPA 序列却无法对中国产的 4 个品系进行再区分，只能区分日本产的两个品系。依据 Cox2-3 序列将中国产的两个品系(LS 和 TM18)和日本产的两个品系(GT 和 ROS-2)聚集成一个大分支，其聚类结果与实际亲缘关系不一致。以上结果表明，在本研究的 6 个条斑紫菜品系的种质鉴定中，ITS-5.8S 序列的区分效果最好。

3 讨论

目前，DNA 分子标记技术主要有两种：一是依据 PCR 反应扩增产物的有无和长短，对生物物种的遗传多样性进行研究，如 SSR、AFLP、SRAP 等。这类分子标记技术已经在紫菜的种质鉴定中得到了较广泛的应用(杨锐等, 2005; 袁昭岚等, 2006; 纪德华等, 2008; 张鹏等, 2009; 谢潮添等, 2010; 贾威等, 2013; 王婷等, 2013)；二是以基因条码(DNA barcoding)即基因组中 DNA 片段的序列信息为基础，对生物物种的遗传多样性进行分析。作为基因组的一部分，在个体发育的不同时期和处于环境胁迫条件下，基因条码的序列不会发生改变，避免了传统形态学和细胞学鉴定中易受环境因子影响的弊端，使得鉴定的结果更加真实可靠(徐涤等, 2001; 袁昭岚等, 2006)。

本研究利用 4 种基因条码(RUBISCO Spacer、UPA、Cox2-3 和 ITS-5.8S)对中国产和日本产的 6 个条斑紫菜品系的亲缘关系进行了研究，其结果证实，6 个条斑紫菜品系具有完全相同的 RUBISCO Spacer 序列，序列同源性均为 100%，中国产的 4 个条斑紫菜品系(LS、B4、HT 和 TM18)的 UPA 序列完全相同，与日本产的两个品系(GT 和 ROS-2)相比，存在 4 个碱基的差别，序列同源性均为 99.2%，上述结果与孙雪等(2006)对坛紫菜的 RUBISCO Spacer 以及 Milstein 等(2012)对紫菜的 UPA 序列的研究结果类似，说明 RUBISCO Spacer 和 UPA 的序列在紫菜种间或品系间均是很保守的。另外，本研究也发现 ITS-5.8S 序列的同源性虽然为 98.4%–99.8%，但分子量为 160 bp 的 5.8S rDNA 的序列则完全相同。利用 UPA 和 ITS-5.8S 两种序列均能将中国产的 4 个品系与日本产的两个品系分别聚成两个分支，其聚类结果与 6 个品系的原有地域亲缘关系是一致的，表明生长环境的差异也许是导致以上两种序列聚类结果的原因。但是，利用 ITS-5.8S 序列均能对中国产的 4 个品系和日本产的两个品系进行再区分，而利用 UPA 序列却无法对中国产的 4 个品系进行再区分，只能区分日本产的两个品系。依据 Cox2-3 序列则将中国产的两个品系(LS 和 TM18)和日本产的两个品系(GT 和 ROS-2)聚集成一个大分支，其聚类结果与实际亲缘关系不一致，这与谢小雪等(2013)对坛紫菜 Cox2-3 序列的研究结果相似。依据本研究结果，在 6 个条斑紫菜品系间的种质鉴定中，ITS-5.8S 序列的区分效果最好，这个结果与坛紫菜品系间分子鉴定的相关研究结果类似(谢小雪等, 2013)。

参 考 文 献

王华芝, 严兴洪, 李琳. 条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)耐高温品系的筛选及特性分析. 海洋与湖沼, 2012, 43(3): 363–369

王婷, 徐燕, 谢潮添, 等. 基于 SCAR 标记的坛紫菜“闽丰 1 号”多重 PCR 鉴定技术的建立. 水产学报, 2013, 37(5): 688–695

孙雪, 杨锐, 刘必谦, 等. 坛紫菜 rbcS 及 rbcL-rbcS 基因间隔区的序列分析. 水产科学, 2006, 25(1): 23–26

纪德华, 谢潮添, 陈昌生, 等. 坛紫菜 ISSR 反应体系的建立与优化. 海洋科学, 2008, 32(6): 20–24

严兴洪, 田中次郎, 有贺佑胜. 条斑紫菜色彩突变体的诱导、分离和特性分析. 水产学报, 2000, 24(3): 221–228

杨锐, 刘必谦, 骆其君, 等. 利用 AFLP 技术研究条斑紫菜的遗传变异. 海洋学报, 2005, 27(3): 159–162

张美如, 陆勤勤, 许广平. 条斑紫菜产业现状及对其健康发展的思考. 中国水产, 2012(11): 15–19

张鹏, 张源, 王铁杆, 等. 坛紫菜不同品系亲缘关系的 SSR 标记分析. 中国水产科学, 2009, 16(6): 842–849

赵玲敏, 谢潮添, 陈昌生, 等. 5.8S rDNA-ITS 区片段的序列分析在坛紫菜种质鉴定中的应用. 水产学报, 2009, 33(6): 940–948

袁昭岚, 黄鹤忠, 沈颂东, 等. 条斑紫菜 5 个栽培品系的 ISSR 分析. 海洋科学, 2006, 30(7): 9–14

贾威, 黄林彬, 严兴洪. 条斑紫菜 6 个品系的 SRAP 分析. 水产学报, 2013, 37(10): 1495–1502

徐涤, 宋林生, 秦松, 等. 五个紫菜品系间遗传差异的 RAPD 分析. 高科技通讯, 2001, 11(12): 1–4

谢小雪, 陈昌生, 徐燕, 等. DNA 序列标记在坛紫菜种质鉴定中适用性的比较分析. 应用海洋学学报, 2013, 32(3): 404–410

谢潮添, 陈昌生, 纪德华, 等. 坛紫菜种质材料 DNA 指纹图谱的构建. 水产学报, 2010, 34(6): 913–920

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, *et al*. Biological identifications through DNA barcodes. Proc Biol Sci, 2003a, 270(1512): 313–322

Hebert PDN, Ratnasingham S, dewaard JR. Barcoding animal life: cytochrome Coxidase I divergences among closely related species. Proc Roy Soc B Biol Sci, 2003b, 270 (1524): S96–S99

Kato M, Aruga Y. Comparative studies on the growth and photosynthesis of the pigmentation mutants of *Porphyra yezoensis* in laboratory culture. J Phycol, 1984, 32: 333–347

Milstein D, Medeiros AS, Oliveira EC, *et al*. Will a DNA barcoding approach be useful to identify *Porphyra* species (Bangiales, Rhodophyta). J Appl Phycol, 2012, 24(4): 837–845

Miura A. A new variety and a new form of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) from Japan: *Porphyra tenera* Kjellman var. *tamatsuensis* Miura, var. nov. and *P. yezoensis* Ueda form. narawaensis Miura, form. nov. J Tykyo Univ Fish, 1984, 71: 1–37

Miura A. Taxonomic studies of *Porphyra* species cultivated in Japan, referring to their transition to the cultivated variety. J Tokyo Univ Fish, 1988, 75: 311–325

Niwa K, Aruga Y. Rapid DNA extraction from conchocelis and ITS-1 rDNA sequences of seven strains of cultivated *Porphyra yezoensis* (Bangiales Rhodophyta). J Appl Phycol, 2003, 15(1): 29–35

Niwa K, Iida S, Kato A, *et al*. Genetic diversity and introgression in two cultivated species (*Porphyra yezoensis* and *Porphyra tenera*) and closely related wild species of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta). J Phycol, 2009, 45(2): 493–502

Niwa K, Kato A, Kobiyama A, *et al*. Comparative study of wild and cultivated *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta) based on molecular and morphological data. J Appl Phycol, 2008, 20(3): 261–270

Niwa K, Kikuchi N, Aruga Y. Morphological and molecular analysis of the endangered species *Porphyra tenera* (Bangiales, Rhodophyta). J Phycol, 2005, 41(2): 294–304

Saunders GW. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2005, 360(1462): 1879–1888

Wang C, Dong D, Wang GC, *et al*. An improved PCR method for direct identification of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) using conchocelis based on a RUBISCO intergenic spacer. Chin J Oceanol Limnol, 2009, 27(3): 513–518

Zhang BL, Yan XH, Huang LB. Evaluation of an improved strain of *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales Rhodophyta) with high-temperature tolerance. J Appl Phycol, 2011, 23(5): 841–847

(编辑　冯小花)

Applicability of DNA Barcoding in the Identification of Different Strains in *Pyropia yezoensis*

CAO Dianjia[1], YAN Xinghong[1,2①]

(1. *College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai* 201306; 2. *Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University, Ministry of Education, Shanghai* 201306)

Abstract　In order to find out an effective method to identify *Pyropia yezoensis* germplasm, we tested the efficacy of four common DNA barcodings—RUBISCO Spacer, UPA, Cox2-3, and ITS-5.8S—in determining the genetic relationships between six strains of *P. yezoensis* from China and Japan. The four DNA barcodings showed high sequence homologies varying from 97.8% to 100%, and the homology of RUBISCO Spacer was 100%. Four Chinese strains (LS, B4, HT, and TM18) shared the same UPA sequence. However, the barcoding was different from that of the Japanese strains GT and ROS-2 and the homology was 99.2%. The homologies of Cox2-3 and ITS-5.8S sequences were 97.8%–99.2% and 98.4%–99.8% respectively, which were lower than those of RUBISCO Spacer and UPA. Phylogenesis of UPA, Cox2-3 and ITS-5.8S sequences revealed that the four Chinese strains clustered into one branch according to their UPA and ITS-5.8S sequences, whereas the two Japanese strains belonged to another branch. These results were consistent with their actual relationships. Moreover, the four Chinese strains could be further distinguished according to their ITS-5.8S sequences, but were identified as in the same branch with the Cox2-3 barcoding. The results confirmed that ITS-5.8S was the most effective barcoding for identifying *P. yezoensis* strains in this study.

Key words　*Pyropia yezoensis*; DNA barcodings; Strains; Germplasm identification

① Corresponding author: YAN Xinghong, E-mail: xhyan@shou.edu.cn

DOI: 10.11758/yykxjz.20150413001 http://www.yykxjz.cn/

高温对海带(*Saccharina japonica*)抗氧化酶及叶绿素荧光参数的影响*

凌晶宇[1,2] 梁洲瑞[1] 王飞久[1①] 孙修涛[1]
汪文俊[1] 刘福利[1,3] 姚海芹[1]

(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. 热带海洋生物资源研究中心 中国热带农业科学院热带生物技术研究所 海口 571101;
3. 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 266200)

摘要 以海带(*Saccharina japonica*)幼苗为材料，研究了高温(25℃)条件下其抗氧化酶、叶绿素含量、叶绿素荧光参数的变化。研究表明，(1)高温组的可溶性蛋白含量在处理 12 h 后达最大值(P<0.05)，相比初始含量升高了 37.9%。(2)随着胁迫时间的延长，高温组的丙二醛(MDA)含量呈增加趋势，在 48 h 时达最大值，与对照组差异显著(P<0.05)。(3)高温组海带幼苗的叶绿素含量随胁迫时间延长呈下降趋势，胁迫 48 h 时，叶绿素含量达最小值，与初始值相比下降了 38.5% (P<0.05)。(4)在高温条件下，过氧化物酶(POD)活性随胁迫时间延长逐渐下降，在 48 h 时达最小值，与初始值相比下降 47.2%，呈显著性差异(P<0.05)；超氧化物歧化酶(SOD)活性呈现波动趋势，处理 8 h 后，SOD 活性达最小值；40 h 后，SOD 活性达最大值，与初始值相比上升了 36% (P<0.05)。过氧化氢酶(CAT)活性随胁迫时间延长呈下降趋势，处理 36 h 后，海带幼苗的 CAT 活性略有升高；处理 48 h 后，CAT 活性达最小值，与初始值相比下降了 75.8% (P<0.05)。(5)高温条件下，海带幼苗的光化学最大量子产量(F_v/F_m)随着胁迫时间延长呈现下降趋势，处理 48 h 后，高温组的 F_v/F_m 达最小值，与初始条件相比下降了 56.8%，呈显著性差异(P<0.05)。本研究可为海带的耐高温品种选育提供理论依据。

关键词 海带；高温；抗氧化酶；叶绿素；叶绿素荧光
中图分类号 S917.3 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)03-0120-06

海带(*Saccharina japonica*)生长和发育受温度影响较大，高温可导致海带吸收光能过剩，光合作用效率下降，CO_2 同化速率降低。而过剩光能若不及时耗散会造成光损伤，发生光抑制，造成光系统Ⅱ光化学效率和光合效率下降(冯玉龙等, 2001; 韩博平等, 2003)。高温在诱发光抑制的同时，还会刺激藻体内产生活性氧。为抵御活性氧的破坏，生物体依赖抗氧化系统的作用，通过抑制活性氧生成或缓解活性氧引起的损伤等途径降低活性氧的氧化胁迫(Sies, 1993)。王悠等(2005)证实，不同海带品种其抗氧化能力的差异是决定海带耐热的主要原因；鹿宁等(2010)的研究结果显示，龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)耐热性与其所含抗氧化活性物质相关；侯和胜等(2008)研究表明，高温对条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)抗氧化酶活性有显著影响。

本文通过研究高温胁迫对海带幼苗可溶性蛋白、丙二醛(MDA)、过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、叶绿素荧光参数及叶绿

* 国家高技术研究发展计划(863 计划)(2012AA10A406)、山东省科技项目(2013GGF01028)和山东省农业良种工程项目“抗逆功能性海带种质的基因开与利用”共同资助。凌晶宇，E-mail: ljingyu@outlook.com
① 通讯作者：王飞久，研究员，E-mail: wangfj@ysfri.ac.cn
收稿日期: 2015-04-13, 收修改稿日期: 2015-09-29

素的影响，探讨高温条件下的海带生理变化机制，为海带良种选育提供理论基础。

1　材料和方法

1.1　材料

实验用海水为取自青岛近岸的经过灭菌处理的海水。海带幼苗(10–12 cm)于 2014 年 11 月中旬取自山东寻山集团青鱼滩养殖有限公司海带育苗场，经灭菌低温海水清洗数次后，在光照恒温培养箱中暂养 7 d。培养条件：白色日光灯，光强为 50 μmol/(m^2·s)，温度为 13℃，光周期为 12 L∶12 D；培养液采用灭菌消毒海水，营养盐添加 NO_3^--N 浓度为 3 mg/L，PO_4^--P 浓度为 0.3 mg/L；海带幼苗在充气悬浮条件下培养。每 7 d 更换培养海水 2 次。

1.2　方法

1.2.1　*形态变化记录*　　每 12 h 使用相机(NIKON-D80)记录高温诱导条件下的海带生长状况。

1.2.2　*高温诱导条件下的海带幼苗抗氧化酶的测定*

设置高温组(25℃)和对照组(13℃)，每组 4 个平行，分别培养 4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48 h 后，取样测定。培养条件同 **1.1**。称取 0.1 g 海带幼苗材料，用 1.5 ml 提取液(0.1 mol/L 磷酸缓冲液 pH=7.0；1 mol/L EDTA；1% PVP)在冰浴条件下研磨匀浆。4℃，10000 r/min 离心 10 min，取上清液待测。可溶性蛋白测定采用考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒(A045-2)；抗氧化酶使用专业试剂盒测定，包括：超氧化物歧化酶(SOD)测试盒(A001-1)、过氧化氢酶(Catalase CAT)测定试剂盒(A007-1)、过氧化物酶(POD)测试盒(A005)和丙二醛测定试剂盒(A003-1)。

1.2.3　*温度胁迫下海带幼苗叶绿素荧光参数的测定*

设置高温组(25℃)和对照组(13℃)，每组 9 个平行，分别培养 4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48 h 后，取样测定。培养条件同 **1.1**。叶绿素荧光参数的测定均采用 DUAL-PAM-100 (WALZ, Germany)。海带幼苗进行暗适应 20 min 后，再测最大潜在量子产量(F_v/F_m)。

1.2.4　*温度胁迫下海带幼苗叶绿素含量测定*　　设置高温组(25℃)和对照组(13℃)，每组 4 个平行，分别培养 4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48 h 后，取样测定。培养条件同 **1.1**。海带叶绿素含量测定参照 Davison 等(1991)和 Seely 等(1972)的方法。用 UV-2802 型紫外可见分光度计，测定溶液在 665、664、631、582、581、470、480 nm 处的吸光度，按 Seely 等(1972)方法中的公式计算叶绿素质量浓度。

1.3　数据分析

采用 Origin 整理数据及绘制图形，采用 SPSS 软件进行单因子方差分析(One-way ANOVA)、Duncan 多重比较，以 $P<0.05$ 作为差异显著。数据用平均值±标准差(Mean±SD)形式表示。

2　结果

2.1　形态变化

高温胁迫对海带幼苗造成的损伤较明显(图 1)。高温处理 12 h 后，少数海带幼苗叶片尖端出现烂梢现象；处理 24 h 后，部分叶片出现腐烂斑点；处理 36 h 后，叶片中下部褪色，大部分叶片伴有烂梢现象；处理 40 h 后，叶片出现明显褪色，并伴有大量腐烂斑点，触摸会有黏液，出现典型的绿烂病症状；处理 48 h 后，海带叶片腐烂面积为 70%，绿烂病症状显著。

2.2　温度胁迫对海带幼苗抗氧化系统活性的影响

2.2.1　*温度胁迫对海带幼苗可溶性蛋白含量、丙二醛(MDA)含量和叶绿素含量的影响*　　由图 2 可知，实验组海带幼苗的可溶性蛋白含量呈先上升后下降的波动趋势，处理 12 h 后，可溶性蛋白的含量达最大值($P<0.05$)，与初始值相比升高了 37.9%；处理 20 h 后，可溶性蛋白的含量达最小值；实验组海带幼苗的可溶性蛋白的含量在 32–48 h 时呈上升趋势。

丙二醛(MDA)是自由基作用于脂质发生过氧化反应的最终产物，会引起蛋白质、核酸等大分子的交联聚合，具有细胞毒性。从图 3 可以看出，实验组 MDA 的积累明显增加，在 48 h 时达最大值，与对照组对比差异性显著($P<0.05$)。对照组的 MDA 含量在实验期间整体变化平稳。

实验组海带幼苗叶绿素含量随胁迫时间延长呈下降趋势(图 4)，在胁迫 12、20、36 h 时叶绿素含量略上升，胁迫 48 h 时，实验组叶绿素含量达最小值，与初始值相比下降了 38.5%，呈显著性差异($P<0.05$)。

2.2.2　*温度胁迫对海带幼苗酶促抗氧化系统活性的影响*　　在 25℃条件下，海带幼苗 POD 活性随时间的变化趋势见图 5-(a)。从图 5-(a)中可以看出，与对照组相比，实验组的 POD 活性随胁迫时间延长逐渐下降，16 h 时 POD 活性略上升，48 h 时达最小值，与初始值相比呈显著性差异($P<0.05$)，下降了 47.2%。对照组 POD 活性呈无显著变化。

在 25℃条件下，海带幼苗 SOD 活性随培养时间的变化趋势见图 5-(b)。从图 5-(b)可以看出，实验组的

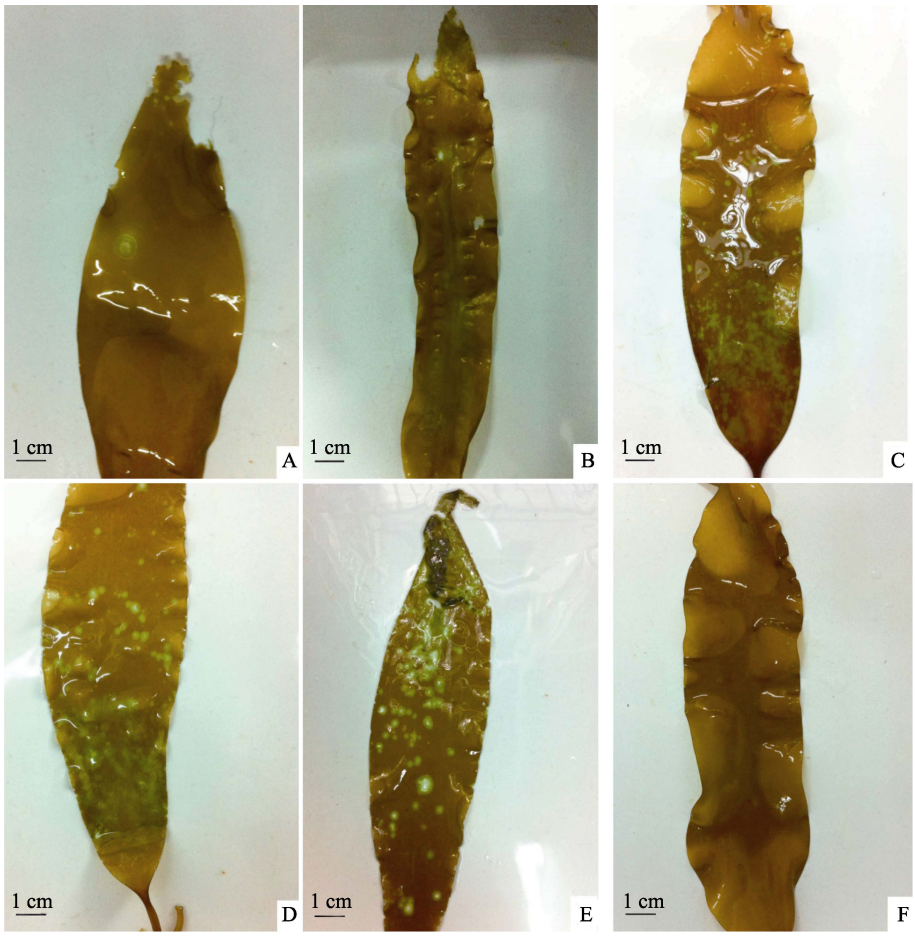

图 1 25℃下不同胁迫时间段海带幼苗形态观察

Fig.1 Morphological observation of *S. japonica* young sporophytes cultured under 25°C

A: 胁迫 12 h; B: 胁迫 24 h; C: 胁迫 36 h; D: 胁迫 40 h; E: 胁迫 48 h; F: 对照组

A: 12 h; B: 24 h; C: 36 h; D: 40 h; E: 48 h; F: Control group

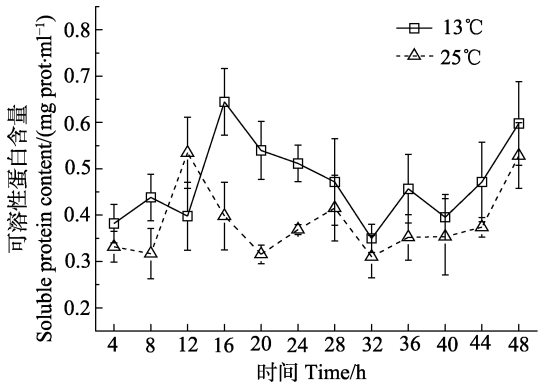

图 2 温度胁迫对海带幼苗可溶性蛋白含量的影响

Fig.2 Effects of temperature on the content of soluble proteins in *S. japonica* young sporophytes

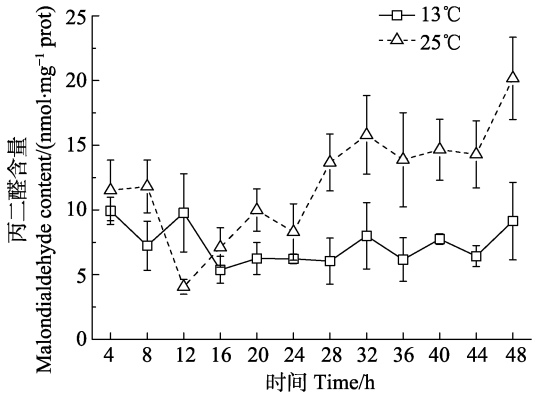

图 3 温度胁迫对海带幼苗丙二醛含量的影响

Fig.3 Effects of temperature on the content of malondialdehyde (MDA) in *S. japonica* young sporophytes

SOD 活性呈波动趋势，处理 8 h 时，SOD 活性达最小值；处理 24、40 h 时，SOD 活性达最大值，与初始值相比呈显著性差异(P<0.05)，分别上升了 33%和 36%。对照组的 SOD 活性变化较平稳。

在 25℃条件下，海带幼苗 CAT 活性随着培养时间的变化趋势见图 5-(c)。从图 5-(c)可以看出，实验

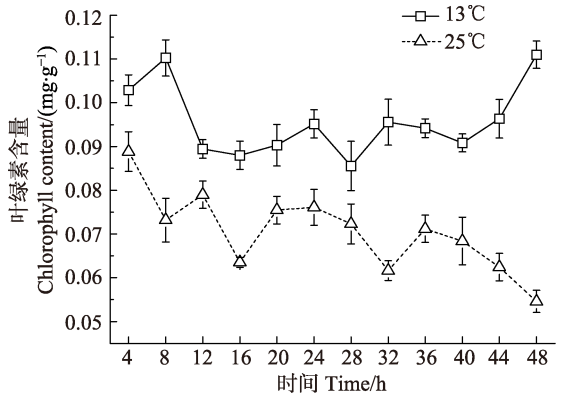

图 4　温度胁迫对海带幼苗叶绿素含量的影响

Fig.4　Effects of temperature on the content of chlorophyll in *S. japonica* young sporophytes

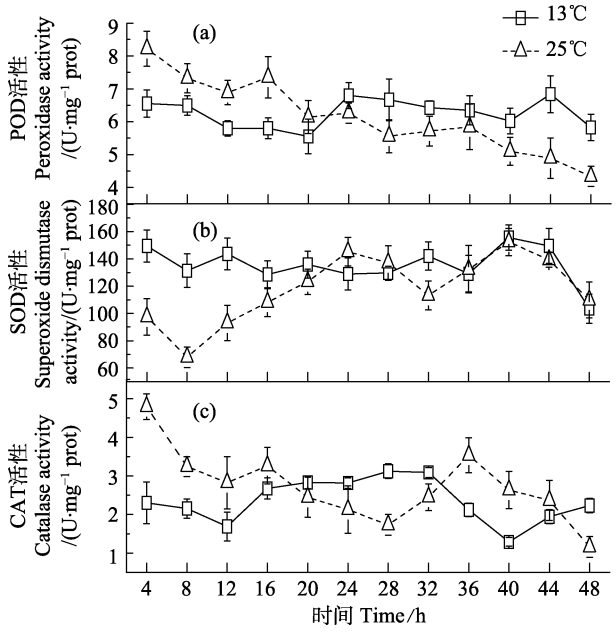

图 5　温度胁迫对海带幼苗抗氧化酶活性的影响

Fig.5　Effects of temperature on activities of antioxidant enzymes in *S. japonica* young sporophytes

(a) POD 活性; (b) SOD 活性; (c) CAT 活性

(a) Peroxidase activity; (b) Superoxide dismutase activity; (c) Catalase activity

组的 CAT 活性随胁迫时间延长呈下降趋势,处理 36 h 时，海带幼苗 CAT 活性略升高，处理 48 h 时，CAT 活性达最小值，与初始值相比具有显著性差异(P<0.05)，下降了 75.8%。对照组 CAT 活性较为稳定。

2.3　温度胁迫对海带幼苗叶绿素荧光参数的影响

高温胁迫对海带幼苗光系统Ⅱ光化学最大量子产量的影响如图 6 所示。高温处理条件下海带幼苗的 F_v/F_m 随着胁迫时间延长呈现下降趋势,处理 48 h 后，实验组的 F_v/F_m 达最小值，与初始条件相比下降了

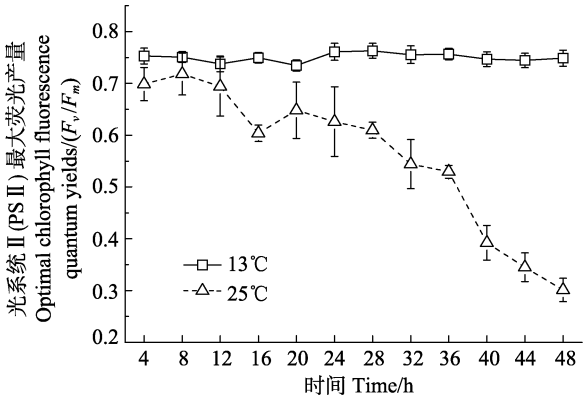

图 6　温度胁迫对海带幼苗的光化学最大量子产量(F_v/F_m)的影响

Fig.6　Effects of temperature on the optimal chlorophyll fluorescence quantum yields (F_v/F_m) in *S. japonica* young sporophytes

56.8%，呈显著性差异(P<0.05)。对照组的 F_v/F_m 值在实验过程中较平稳。

3　讨论

3.1　细胞受损程度与耐热性关系

细胞膜的稳定性与膜脂的脂肪酸饱和程度有关，高度饱和脂肪酸有利于提高细胞膜的相变温度，但高温会加剧膜脂过氧化作用，损伤细胞膜的稳定性。高温条件下，植物细胞膜被破坏是由膜脂中不饱和脂肪酸发生氧化所致，其氧化产物为丙二醛(MDA)。MDA 是脂类过氧化物之一，其含量可以间接反映膜受损程度并指示植物体膜过氧化程度(利容千等, 2002)。本研究发现，随着 25℃处理时间延长，高海带幼苗的 MDA 含量逐渐增加，虽在 12 h 时下降，但在之后胁迫时间内呈增长趋势，48 h 时达最大值。这说明在高温培养条件下，海带幼孢子体中活性氧含量升高，可能对其膜系统产生过氧化危害。而对照组海带幼苗的 MDA 含量一直处于平稳状态。研究表明，可溶性蛋白在抵御温度逆境胁迫过程中起重要作用。细菌、植物及动物体在受到高温胁迫时，其机体内热激蛋白含量均会升高，从而抵御高温胁迫(黄希莲等, 2007)。高温处理初期，海带幼苗可溶性蛋白含量明显升高，这可能与幼苗对高温度处理做出的生化应答反应有关，在处理 12 h 后，可溶性蛋白的含量达最大值，20 h 和 32 h 时分别降低，而对照组变化幅度相对较小。

3.2　温度胁迫对海带幼苗光合作用的影响

光合效率的高低可以直接影响藻类发育、生长和繁殖。Santarius 等(1991)认为，在高温胁迫过程中，

光合磷酸化受阻会导致净光合速率下降。高温会损伤植物叶绿体的结构，造成光合色素降解，抑制光合作用(Senaratna *et al*, 2005)；梁英等(2009)研究显示，高温条件可激活海藻类囊体膜上的脂肪酶，降解细胞膜脂，钝化 PSⅡ反应中心，同时导致叶绿体结构发生改变，引起叶绿素的降解。本研究中，高温处理 16 h 后，F_v/F_m 值明显下降，叶绿素含量也同样下降了 30%，这说明高温对海带幼苗的光合速率有抑制作用，此时海带叶片尖端和中下部发生颜色变化。正常生理状态下，大型藻类的 F_v/F_m 值约在 0.7，当受到胁迫时，其值明显下降(张守仁, 1999; Kolber *et al*, 1988)。植物中 PSⅡ是一种对热最敏感的色素蛋白复合体，当处于逆境胁迫时其活性受到抑制(Wen *et al*, 2005; Yordanov, 1995)。本研究过程中，叶绿素含量相对较低，表现为 F_v/F_m 值呈下降趋势。

3.3 温度胁迫对海带幼苗抗氧化系统的影响

在抗氧化系统中酶促防御体系主要由 SOD、CAT、POD 等构成，主要清除 O_2^-、羟过氧化物、过氧化氢和酚类等物质。在高温条件下，海带机体活性氧含量增加、活性氧清除平衡遭到破坏及钝化抗氧化酶类活性(王悠, 2003)[1)]。实验发现，POD 和 CAT 酶活性随高温胁迫时间的延长呈降低趋势，在 16 h 时略有回升，处理 48 h 后，两种酶都达最低值。此时，海带呈现大的烂洞、颜色变绿，其叶绿素含量显著降低，F_v/F_m 达最小值。SOD 酶活性总体呈上升趋势，在 25℃高温处理 40 h 后，其活性下降，对照组中海带 SOD 酶活性变化不大。本研究表明，在高温胁迫条件下，不同酶做出的反应不同，有的酶活性提高，达到抑制毒害作用，有的是通过增加稳定性以达到增强保护的功能。

参 考 文 献

王悠, 唐学玺. 不同海带品系抗氧化系统活性与耐热性的相关性研究. 应用生态学报, 2005, 16(8): 1507–1512

冯玉龙, 张亚杰, 朱春全. 调控活性氧代谢对渗透胁迫时杨树光合作用光抑制的影响. 植物生态学报, 2001, 25(4): 451–459

张守仁. 叶绿素荧光动力学参数的意义及讨论. 植物学通报, 1999, 16(4): 444–448

利容千, 王建波. 植物逆境细胞及生理学. 武汉: 武汉大学出版社, 2002, 9–10

侯和胜, 何文君, 李洪艳, 等. 高温胁迫对条斑紫菜丝状体的生长和生理影响. 辽宁师范大学学报(自然科学版), 2008, 31(4): 487–490

鹿宁, 臧晓南, 张学成, 等. 高温胁迫下不同龙须菜品系抗氧化能力的比较. 武汉大学学报(理学版), 2010, 56(5): 570–577

黄希莲, 宋丽莎. 植物耐热生理生化指标研究进展. 黔南民族师范学院学报, 2007, 27(3): 23–26

梁英, 冯力霞, 田传远. 高温胁迫对球等鞭金藻 3011 和 8701 叶绿素荧光特性的影响. 水产学报, 2009, 33(1): 37–44

韩博平, 韩志国, 付翔. 藻类光合作用机理与模型. 北京: 科学出版社, 2003, 24–29

Davison IR, Greene RM, Podolak EJ. Temperature acclimation of respiration and photosynthesis in the brown alga *Laminaria saccharina*. Mar Biol, 1991, 110(3): 449–454

Kolber Z, Zehr J, Falkowski P. Effects of growth irradiance and nitrogen limitation on photosynthetic energy conversion in photosystem Ⅱ. Plant Physiol, 1988, 88(3): 923–929

Santarius K, Exner M, Thebudlassak R. Effects of high-temperature on the photosynthetic apparatus in isolated mesophyll protoplasts of Valerianella-locusta (l) betcke. Mol Microbiol, 1991, 25(1): 17–26

Seely GR, Duncan MJ, Vidaver WE. Preparative and analytical extraction of pigments from brown algae with dimethyl sulfoxide. Mar Biol, 1972, 12(2): 184–187

Senaratna T, Mckersie BD, Borochov A. Desiccation and free radical mediated changes in plant membranes. J Exp Bot, 1987, 38(12): 2005–2014

Sies H. Strategies of antioxidant defense. Eur J Biochem, 1993, 215(2): 213–219

Wen X, Gong H, Lu C. Heat stress induces an inhibition of excitation energy transfer from phycobilisomes to photosystem Ⅱ but not to photosystem I in a cyanobacterium *Spirulina platensis*. Plant Physiol Biochem, 2005, 43(4): 389–395

Yordanov I. Responses of photosynthesis to stress and plant growth regulators. Plant Physiol, 1995, 21(2–3): 51–70

(编辑 马璀艳)

1) 王悠. 海带对高温胁迫的生理生化响应和耐高温机理的初步研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2003

Effects of High Temperature on the Antioxidant Enzymes and Chlorophyll Fluorescence Parameters of *Saccharina japonica*

LING Jingyu[1,2], LIANG Zhourui[1], WANG Feijiu[1①], SUN Xiutao[1], WANG Wenjun[1], LIU Fuli[1,3], YAO Haiqing[1]

(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. *Research center for tropical marine Bioresource, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Science, Haikou* 571101; 3. *Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao* 266071)

Abstract The aim of this study was to identify the effects of high temperature (25℃) on the activity of antioxidant enzymes, the chlorophyll content, and the chlorophyll fluorescence parameter of *Saccharina japonica* young sporophytes. Samples were taken every 4 h over a 48 h period. The major results included: (1) after 12 h culture the content of soluble proteins of the 25℃ group reached the maximum value that was 37.9% higher than initial level (P<0.05). (2) MDA content of the 25℃ group increased over the time and reached the highest value after 48 h, which was significantly different from the control group (P<0.05). (3) The chlorophyll content of the 25℃ group decreased during prolonged culture, the lowest value appeared after 48 h and was 38.5% lower than the initial level (P<0.05). (4) At high temperature the POD activity decreased over the time, the minimum appeared after 48 h and was 47.2% lower than initial (P<0.05); The SOD activity fluctuated, reached the minimum after 8 h, and the maximum activity was observed after 40 h which was 36% higher than the initial level (P<0.05); The CAT activity declined to the lowest level after 48 h and was 75.8% lower than initial (P<0.05). (5) The value of F_v/F_m of the 25℃ group dropped to the lowest after 48 h and was 56.8% lower than initial (P<0.05). Our results provide important information for the selection of heat-resistant *S. japonica*.

Key words *Saccharina japonica*; High temperature; Antioxidant enzyme; Chlorophyll; Chlorophyll fluorescence

① Corresponding author: WANG Feijiu, E-mail: wangfj@ysfri.ac.cn

DOI: 10.11758/yykxjz. 20150519002 http://www.yykxjz.cn/

饲料中添加蛋氨酸寡肽对大黄鱼(*Larimichthys crocea*)生长、饲料利用和蛋白质代谢反应的影响*

马 俊 魏泽宏 邢淑娟 依丽娜 徐 玮
周慧慧 张文兵① 麦康森

(水产动物营养与饲料农业部重点实验室 海水养殖教育部重点实验室 中国海洋大学水产学院 青岛 266003)

摘要 为研究饲料中添加蛋氨酸寡肽(OMet)对大黄鱼(*Larimichthys crocea*)幼鱼生长、饲料利用和蛋白质代谢反应的影响，并与在饲料中添加等量的晶体蛋氨酸(CMet)的效果相比，实验以初始体重为(26.0±1.6) g 的大黄鱼幼鱼为研究对象，以鱼粉和豆粕为主要蛋白源，设计 1 个低鱼粉(31.8%)对照饲料(LF)。在 LF 的基础上分别添加 0.35%、0.65%和 0.95%的晶体蛋氨酸或蛋氨酸寡肽，配制其他 6 组饲料，并分别命名为 CMet 0.35、CMet 0.65、CMet 0.95、OMet 0.35、OMet 0.65 和 OMet 0.95，养殖周期为 8 周。结果显示，与 LF 组相比，OMet 组和 CMet 组大黄鱼的增重率均显著升高，并随着蛋氨酸水平的增加而显著提高(P<0.05)，其中，OMet 0.95 组的增重率最高。与 CMet 组相比，OMet 组大黄鱼的增重率和蛋白质效率均显著提高(P<0.05)。不同饲料处理对大黄鱼存活率、饲料系数、体组成(粗蛋白、粗脂肪、灰分和水分)、脏体比和肥满度没有显著影响(P>0.05)。OMet 组大黄鱼的肝体比较 CMet 组显著降低(P<0.05)。饲料中添加晶体或蛋氨酸寡肽显著影响了大黄鱼幼鱼的肝脏谷丙转氨酶和谷草转氨酶活力，OMet 组大黄鱼肝脏中这两种酶的活力均显著高于 CMet 组的(P<0.05)，蛋氨酸添加水平对大黄鱼肝脏谷草转氨酶活力也有显著影响(P<0.05)。但各饲料处理组之间血清中的血氨浓度和尿素氮含量没有显著差异(P>0.05)。综上所述，等量添加蛋氨酸寡肽比晶体蛋氨酸更能促进大黄鱼幼鱼的生长及其对饲料的利用。

关键词 蛋氨酸寡肽；晶体蛋氨酸；大黄鱼；生长；饲料利用

中图分类号 S963.7 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)03-0126-08

大黄鱼(*Larimichthys crocea*)属鲈形目(Perciformes)，石首鱼科(Sciaenidae)，黄鱼属(*Larimichthys*)，是我国传统“四大海产”之一。其营养价值高，肉质鲜美，为我国近海主要养殖鱼类。目前，大黄鱼养殖主要采用传统的网箱养殖，其养成阶段以投喂冰冻鲜杂鱼为主或辅以配合饲料。但是，鲜杂鱼饵料极易流失，不仅导致饲料系数过高而浪费资源，而且会造成水环境污染，诱发疾病(张彩兰等, 2002)。随着颗粒饲料的推广，海水养殖对鱼粉的需求量也日益增加。寻求廉价高效的鱼粉替代蛋白源已成为大黄鱼等海水鱼配合饲料开发亟待解决的问题。

豆粕类与其他植物蛋白源相比，氨基酸组成较好，消化吸收率高(唐晓亮等, 2010)，但因其蛋氨酸和赖氨酸含量低，限制了其在饲料中的使用(熊本海等,

* 国家自然科学基金项目(31372542)资助。马 俊，E-mail: majun200801@163.com
① 通讯作者：张文兵，教授，E-mail: wzhang@ouc.edu.cn
收稿日期: 2015-05-19, 收修改稿日期: 2015-06-09

2014)。目前，主要以添加晶体氨基酸的方式补充替代鱼粉饲料中的必需氨基酸。已有研究表明，饲料中添加晶体氨基酸普遍在鲑鳟鱼类饲料中有效(Yamamoto *et al*, 2005; Rodehutscord *et al*, 2000)，而在斑点叉尾鮰(*Ictalurus punctatus*) (Robinson, 1991; Li *et al*, 1998)和鲤鱼(*Cyprinus carpio*) (Viola *et al*, 1991)等的研究中结论并不一致。导致晶体氨基酸利用率低的原因主要是其在水中易溶失(刘永坚等, 2002)，以及与饲料中蛋白质结合态氨基酸的吸收利用不同步等(冷向军等, 2007)。寡肽与晶体氨基酸相比，随着肽链的延长，其在水中的溶失率下降，延缓了消化吸收速率，从而有望替代晶体氨基酸成为一种新型、高效的外源氨基酸来源。国内外对于寡肽在水产动物饲料应用方面的研究较少，且多集中在动植物蛋白水解肽上。本研究以酶法合成的蛋氨酸寡肽为蛋氨酸源，比较豆粕替代鱼粉饲料中添加晶体蛋氨酸或蛋氨酸寡肽对大黄鱼幼鱼生长、饲料利用和蛋白质代谢反应的影响，为蛋氨酸寡肽在大黄鱼配合饲料中的应用提供基础数据。

1　材料与方法

1.1　实验设计

以鱼粉、豆粕为主要蛋白源，鱼油、豆油、大豆卵磷脂为主要脂肪源，配制 7 种等氮等脂的饲料，每个处理组 3 个重复。设计 1 个低鱼粉(31.8%)对照组(LF)。在 LF 的基础上分别添加 0.35%、0.65%和 0.95%的晶体蛋氨酸或蛋氨酸寡肽，配制其他 6 组饲料，并分别命名为 CMet 0.35、CMet 0.65、CMet 0.95、OMet 0.35、OMet 0.65 和 OMet 0.95。饲料配方和常规成分分析见表 1，饲料氨基酸组成分析见表 2。根据专利技术制备蛋氨酸寡肽(专利号为 ZL 201110330500.8)，由质谱测定蛋氨酸寡肽中不同聚合度肽的分子量。结果显示，蛋氨酸寡肽为蛋氨酸 2 肽、3 肽、4 肽、5 肽、6 肽、7 肽和 8 肽的混合物。在饲料制作过程中，原料粉碎后经 80 目过筛，按照饲料配方混合后加入鱼油、豆油和大豆卵磷脂揉匀，然后加入适量水混合均匀，用 F(II)–26 型双螺杆挤条机(华南理工大学，广州)加工成颗粒饲料(3 mm× 3 mm)，最后用鼓风烘箱(55℃)烘干至水分含量 10%以下，储存于–20℃冰箱中备用。

1.2　实验鱼及饲养管理

实验于 2013 年 9 月 2 日–11 月 11 日在宁波象山西沪港进行，实验用大黄鱼购自浙江省宁波市象山港湾水产苗种有限公司。正式实验前，所有大黄鱼均置于 3.0 m×3.0 m×3.0 m 的网箱中暂养 2 周，挑选规格相同、体格健壮的大黄鱼随机分配到 21 个 1.5 m×1.5 m×2.0 m 的网箱中进行养殖实验，每个网箱放养 50 尾。大黄鱼初始平均体重为(26.0±1.6) g，每天分别于 05:30 和 17:30 饱食投喂 1 次。养殖周期为 8 周，养殖过程中的死鱼均计数并称重。养殖期间海水温度为 24–31℃，盐度 24–29，pH 为 7.1–7.4，溶解氧不低于 6 mg/L。

1.3　样品收集和分析

正式养殖实验开始时，从实验鱼中随机挑选 6 尾，置于–20℃冰箱中保存，用于全鱼体常规分析。养殖实验 8 周后，所有实验鱼饥饿 24 h，然后计数，称重。每个网箱随机取 3 尾鱼，于–20 冰箱中保存，用于全鱼体常规分析。每个网箱随机取 3 尾鱼，测量体长、体重、肝重、内脏重，用于计算肥满度(*CF*)、肝体比(HSI)和脏体比(VSI)。每个网箱随机取 8 尾鱼，进行尾静脉取血，其中，6 尾鱼取血后立即解剖取肝脏，保存于液氮中，用于肝脏谷丙转氨酶(GPT)和谷草转氨酶(GOT)活力测定。血液在 4℃冰箱中静置 12 h 后，3000 r/min 离心 10 min，得到的血清置于液氮中保存，用于血清中血氨、尿素氮含量的测定。

全鱼和饲料中常规成分的测定采用 AOAC (2012)的标准方法。血氨、尿素氮、肝脏 GOT 活力和 GPT 活力采用专业试剂盒测定。大黄鱼饲料中的氨基酸组成采用日立 L-8900 型全自动氨基酸分析仪测定。

1.4　计算及统计方法

增重率(Weight gain rate, WGR, %)=100×(终末体重–初始体重)/初始体重

存活率(Survival rate, *SR*, %)=100×终末实验鱼数量/初始实验鱼数量

摄食率(Feed intake, *FI*, %)=100×总摄食量/[(终末体重+初始体重)/2]/天数

饲料系数(Feed conversion ratio, FCR)=摄食量/(终末体重–初始体重)

蛋白质效率(Protein efficiency ratio, PER)=鱼体增重量/摄入蛋白

肝体比(Hepatosomati index, HSI, %)=(肝脏重量/终末体重)×100

脏体比(Viscerosomatic index, VSI, %)=(内脏重量/终末体重)×100

肥满度(Condition factor, *CF*)=(终末体重/鱼体体长 ^{3})×100

表 1 饲料配方及营养成分分析

Tab.1 Ingredients and proximate composition of the experimental diets (%, dry matter)

成分 Ingredients	饲料组 Diets						
	LF	CMet 0.35	CMet 0.65	CMet 0.95	OMet 0.35	OMet 0.65	OMet 0.95
鱼粉 Fish meal	31.80	31.80	31.80	31.80	31.80	31.80	31.80
豆粕 Soybean meal	25.60	25.60	25.60	25.60	25.60	25.60	25.60
小麦淀粉 Wheat starch	20.78	20.78	20.78	20.78	20.78	20.78	20.78
啤酒酵母 Beer yeast	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
鱼油 Fish oil	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
豆油 Soybean oil	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81
卵磷脂 Lecithin	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50
混合氨基酸 Amino acids premix[1]	3.91	3.91	3.91	3.91	3.91	3.91	3.91
多维预混料 Vitamin premix[2]	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
多矿预混料 Mineral premix[3]	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
防霉剂 Mold inhibitor[5]	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
乙氧基喹啉 Ethoxyquin	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
复合诱食剂 Attractant[4]	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
晶体蛋氨酸 CMet	0	0.35	0.65	0.95	0	0	0
蛋氨酸寡肽 OMet	0	0	0	0	0.35	0.65	0.95
丙氨酸 DL-Alanine	0.95	0.60	0.30	0.00	0.60	0.30	0.00
营养成分分析 Proximate composition							
粗蛋白 Crude protein	45.94	45.27	45.15	44.94	45.23	45.50	45.25
粗脂肪 Crude lipid	13.42	13.47	13.24	13.43	13.47	13.59	13.34
水分 Moisture	3.21	3.13	2.88	3.33	3.01	2.83	2.87

1. 混合氨基酸(%饲料): 以 45%大黄鱼鱼体氨基酸为标准, 平衡各处理组的必需氨基酸(蛋氨酸除外). 混合氨基酸成分如下: 精氨酸 1.24; 组氨酸 0.15; 异亮氨酸 0.31; 亮氨酸 0.71; 赖氨酸 0.77; 苯丙氨酸 0.10; 缬氨酸 0.31; 苏氨酸 0.25; 半胱氨酸 0.06. 2. 多维预混料(mg or g/kg 饲料): 维生素 B_1, 25 mg; 核黄素, 45 mg; 维生素 B_6, 20 mg; 维生素 B_{12}, 10 mg; 维生素 K_3, 10 mg; 肌醇, 800 mg; 泛酸钙, 60 mg; 烟酸, 200 mg 叶酸, 20 mg; 生物素, 60 mg; 维生素 A, 32 mg; 维生素 D_3, 5 mg; 维生素 E, 240 mg; 维生素 C, 2000 mg; 氯化胆碱, 4000 mg; 微晶纤维素, 12.47 g. 3. 多矿预混料(mg or g/kg 饲料)亚硒酸钠 20 mg; 碘酸钙, 60 mg; 氯化钴(1%), 50 mg; 五水硫酸铜, 10 mg; 硫酸亚铁, 80 mg; 硫酸锌, 50 mg; 硫酸锰, 45 mg; 硫酸镁, 1200 mg; 磷酸二氢钙, 10 g; 沸石粉, 8.49 g. 4. 诱食剂: 甜菜碱：甘氨酸=1∶1. 5. 防霉剂：丙酸钙：富马酸=1∶1

1. Amino acids premix (% diet): arginine, 1.24; histidine, 0.15; isoleucine, 0.34; leucine, 0.71; lysine 0.77; phenylalanine, 0.10; valine, 0.31; threonine, 0.25; cysteine, 0.06. 2. Vitamin premix (mg or g/kg diet): thiamin, 25 mg; riboflavin, 45 mg; pyridoxine-HCl, 20 mg; vitaminB_{12}, 10 mg; vitaminK_3, 10 mg; inositol, 800 mg; pantothenic acid, 60 mg; niacin acid, 200 mg; folic acid, 20 mg; biotin, 60 mg; retinolacetate, 32 mg; cholecalciferol, 5 mg; alpha-tocopherol, 240 mg; ascorbic acid, 2000 mg; choline chloride, 4000 mg; microcrystalline cellulose, 12.47 g. 3. Mineral premix (mg or g/kg diet): Na_2SeO_3, 20 mg; $Ca(IO_3)_2$, 60 mg; $CoCl_2$ (1%), 50 mg; $CuSO_4{\cdot}5H_2O$, 10 mg; $FeSO_4{\cdot}H_2O$, 80 mg; $ZnSO_4{\cdot}H_2O$, 50 mg; $MnSO_4{\cdot}H_2O$, 45 mg; $MgSO_4{\cdot}7H_2O$, 1200 mg; $Ca(H_2PO_4)_2{\cdot}H_2O$, 10 g; Zoelite, 8.49 g. 4. Attractant: betaine:glycine=1∶1. 5. Mold inhibitor: calcium propionate: fumaric acid=1∶1

计算方法中体重和摄食量单位均为 g，体长单位为 cm。所得实验数据采用平均值±标准差(Mean±SD)表示，采用 SPSS17.0 软件进行双因素方差分析(2×3，Two-way ANOVA)，差异显著水平为 $P<0.05$。

2 结果

2.1 生长、存活和饲料利用

饲料中添加的蛋氨酸源和蛋氨酸水平对大黄鱼幼鱼的增重率均有显著影响($P<0.05$) (表 3)。饲料中添加蛋氨酸寡肽组大黄鱼的增重率显著高于添加晶体蛋氨酸组($P<0.05$)。与低鱼粉对照组相比较，饲料中添加晶体蛋氨酸或蛋氨酸寡肽均提高了大黄鱼的增重率，且随着添加蛋氨酸水平的升高，大黄鱼幼鱼的增重率显著升高($P<0.05$)，其中，OMet 0.95 组大黄鱼幼鱼增重率最高。饲料中添加晶体蛋氨酸或蛋氨酸寡肽对大黄鱼幼鱼的存活率没有显著影响($P>0.05$)。

表 2　实验饲料氨基酸组成分析

Tab.2　Amino acid composition of the experimental diets (%, dry matter)

氨基酸 Amino acids	饲料组 Diets						
	LF	CMet 0.35	CMet 0.65	CMet 0.95	OMet 0.35	OMet 0.65	OMet 0.95
精氨酸 Arg	3.58	3.45	3.65	3.49	3.52	3.52	3.53
组氨酸 His	1.31	1.23	1.21	1.22	1.30	1.28	1.26
异亮氨酸 Ile	1.67	1.74	1.78	1.76	1.81	1.69	1.73
亮氨酸 Leu	3.54	3.59	3.48	2.52	3.61	3.62	3.55
赖氨酸 Lys	3.54	3.54	3.49	3.51	3.55	3.46	3.50
蛋氨酸 Met	0.78	1.13	1.41	1.73	1.12	1.42	1.72
苯丙氨酸 Phe	1.76	1.67	1.66	1.81	1.75	1.72	1.77
苏氨酸 Thr	1.79	1.88	1.91	1.83	1.97	1.87	1.90
缬氨酸 Val	1.88	1.97	1.96	1.89	1.95	2.01	1.96
天冬氨酸 Asp	3.85	3.92	3.86	3.87	3.91	3.79	3.88
丝氨酸 Ser	1.75	1.78	1.76	1.68	1.83	1.75	1.78
甘氨酸 Gly	1.90	1.89	1.96	1.94	1.86	1.93	1.97
丙氨酸 Ala	3.01	2.80	2.41	2.12	2.75	2.60	2.08
胱氨酸 Cys	0.19	0.20	0.18	0.21	0.18	0.21	0.19
酪氨酸 Tyr	1.35	1.38	1.35	1.37	1.41	1.28	1.30
谷氨酸 Glu	5.77	5.78	5.68	5.82	5.80	5.76	5.72

注：采用日立 L-8900 氨基酸分析仪检测氨基酸

Note: The amino acid compositions were analyzed with Automatic Amino Acid Analyzer (L-8900 Hitachi-hitech, Japan)

表 3　饲料中添加晶体蛋氨酸或蛋氨酸寡肽对大黄鱼生长性能和饲料利用的影响

Tab.3　Effects of dietary crystalline methionine or oligo-methionine on the growth performance and feed utilization of large yellow croakers (Means±SD, *n*=3)

蛋氨酸源 Met sources	蛋氨酸水平 Met levels (%)	初始体重 IBW (g)	终末体重 FBW (g)	存活率 *SR* (%)	增重率 WGR (%)	饲料系数 FCR	蛋白质效率 PER
对照组 LF	0	26.0±1.6	44.59±4.73	75.33±11.021	71.50±18.18	1.83±0.22	0.81±0.21
晶体蛋氨酸 CMet	0.35	26.0±1.6	49.99±2.05	60.67±35.23	92.26±7.89	1.45±0.10	1.27±0.17
	0.65	26.0±1.6	50.58±1.53	56.00±17.44	94.54±5.91	1.66±0.30	1.09±0.16
	0.95	26.0±1.6	56.35±3.66	83.33±8.33	116.73±14.09	1.30±0.13	1.42±0.14
蛋氨酸寡肽 OMet	0.35	26.0±1.6	51.28±3.26	74.67±9.45	97.23±12.56	1.57±0.27	1.28±0.32
	0.65	26.0±1.6	57.87±2.33	75.33±7.02	122.58±8.98	1.21±0.15	1.57±0.27
	0.95	26.0±1.6	61.85±1.73	86.67±11.02	137.86±6.66	1.22±0.03	1.72±0.11
蛋氨酸源 Source	CMet	26.0±1.6	52.30±3.78^{a}	66.67±23.75	101.17±14.52^{a}	1.47±0.23	1.26±0.20^{a}
	OMet	26.0±1.6	57.00±5.11^{b}	78.89±9.96	119.22±19.66^{b}	1.34±0.23	1.52±0.29^{b}
蛋氨酸水平 Level	0	26.0±1.6	44.59±4.73^{a}	75.33±11.02	71.50±18.18^{a}	1.83±0.23	0.81±0.21
	0.35	26.0±1.6	50.63±6.38^{b}	67.70±28.93	94.74±24.52^{b}	1.51±0.39	1.28±0.42
	0.65	26.0±1.6	54.22±4.20^{bc}	65.67±12.44	108.56±16.17^{bc}	1.44±0.11	1.33±0.20
	0.95	26.0±1.6	59.08±5.08^{c}	85.01±4.08	127.29±19.54^{c}	1.26±0.15	1.57±0.20
蛋氨酸源 Source			0.005	0.168	0.005	0.112	0.018
蛋氨酸水平 Level			0.001	0.157	0.001	0.117	0.067
蛋氨酸源 × 水平 Source×level			0.233	0.733	0.233	0.066	0.183

注：同一列中上标字母不同表示差异显著(P<0.05)

Note: Values in the same column with different superscript letters denoted significant difference (P<0.05)

饲料中的蛋氨酸源对大黄鱼幼鱼的蛋白质效率有显著影响(P<0.05) (表 3)。饲料中添加蛋氨酸寡肽组，大黄鱼的蛋白质效率显著高于添加晶体蛋氨酸组(P<0.05)。与低鱼粉对照组相比较，饲料中添加晶体蛋氨酸或蛋氨酸寡肽均增高了大黄鱼的蛋白质效率，且随着添加蛋氨酸水平的提高，大黄鱼幼鱼的蛋白质效率呈升高趋势，但无显著差异(P>0.05)，其中 OMet 0.95 组大黄鱼幼鱼的蛋白质效率最高。与低鱼粉对照组相比较，饲料中添加晶体蛋氨酸或蛋氨酸寡肽均降低了大黄鱼的饲料系数，但差异不显著(P>0.05)。

2.2 体常规组成

经过 8 周的养殖实验，不同饲料处理对大黄鱼的体常规组成无显著影响(P>0.05) (表 4)。其中，鱼体粗蛋白含量为 15.60%–16.60%，粗脂肪含量为 7.70%–8.30%，灰分含量为 3.17%–4.70%，水分含量为 70.77%–72.77%。

2.3 形体指数

蛋氨酸源对大黄鱼的肝体比有显著影响(P<0.05)，饲料中添加蛋氨酸寡肽组大黄鱼幼鱼的肝体比显著高于添加晶体蛋氨酸组，其中，OMet 0.95 组大黄鱼幼鱼的肝体比最低。饲料中添加晶体蛋氨酸或蛋氨酸寡肽对大黄鱼幼鱼的脏体比和肥满度没有显著影响(P>0.05)。

2.4 蛋白质代谢反应

饲料中蛋氨酸源对大黄鱼幼鱼肝脏谷丙转氨酶活性有显著影响(P<0.05) (表 6)。饲料中添加蛋氨酸寡肽组大黄鱼的谷丙转氨酶活性显著高于添加晶体蛋氨酸组(P<0.05)，其中，OMet 0.95 组大黄鱼的肝脏谷丙转氨酶活性显最高。饲料中蛋氨酸源和蛋氨酸水平对大黄鱼幼鱼肝脏谷草转氨酶影响显著(P<0.05)。蛋氨酸寡肽组大黄鱼幼鱼的肝脏谷草转氨酶活性显著高于晶体蛋氨酸组(P<0.05)。晶体蛋氨酸组和蛋氨酸寡肽组大黄鱼肝脏谷草转氨酶活性均显著高于低鱼粉组，且随着蛋氨酸添加水平升高，肝脏谷草转氨酶活性显著升高(P<0.05)。其中，OMet 0.95 组的肝脏谷草转氨酶活性最高，为 38.73 U/g·prot。大黄鱼血清中的血氨浓度和尿素氮含量均不受不同饲料处理的显著影响(P>0.05)。

3 讨论

蛋氨酸是豆粕中的主要限制性氨基酸，本研究采用外源晶体蛋氨酸或蛋氨酸寡肽补充低鱼粉饲料中的蛋氨酸。结果显示，在 LF 组饲料基础上补充晶体蛋氨酸或蛋氨酸寡肽，大黄鱼幼鱼的增重率显著提高，并随着蛋氨酸水平提高而显著增加(P<0.05)，这

表 4 饲料中添加晶体蛋氨酸或蛋氨酸寡肽对大黄鱼体组成的影响

Tab.4 Effects of dietary crystalline methionine or oligo-methionine on the body composition of large yellow croakers (%, wet weight) (Means±SD, n=3)

蛋氨酸源 Met sources	蛋氨酸水平 Met levels	粗蛋白 Crude protein	粗脂肪 Crude lipid	灰分 Ash	水分 Moisture
对照组 LF	0	15.60±0.36	8.20±0.60	3.53±0.47	72.77±0.74
晶体蛋氨酸 CMet	0.35	15.93±0.61	8.10±0.26	3.30±0.50	72.63±0.90
	0.65	16.13±0.31	8.00±0.62	3.73±1.12	72.23±0.76
	0.95	16.27±0.51	8.03±0.78	3.17±0.29	72.57±1.07
蛋氨酸寡 OMet	0.35	16.60±0.44	8.30±0.44	4.03±2.25	71.20±2.36
	0.65	16.43±0.47	8.03±0.72	4.70±0.52	70.77±0.91
	0.95	16.47±0.25	7.70±0.70	4.00±0.95	71.83±1.94
蛋氨酸源 Source	CMet	16.11±0.45	8.04±0.52	3.40±0.68	72.48±0.82
	OMet	16.50±0.35	8.01±0.61	4.24±1.30	71.27±1.66
蛋氨酸水平 Level	0	15.60±0.36	8.20±0.61	3.53±0.47	72.77±0.74
	0.35	16.27±0.59	8.20±0.60	4.33±1.35	71.73±1.90
	0.65	16.28±0.38	8.02±0.39	3.55±0.62	71.95±1.14
	0.95	16.36±0.36	7.87±0.62	3.58±1.03	71.93±1.00
蛋氨酸源 Source		0.080	0.910	0.103	0.067
蛋氨酸水平 Level		0.914	0.650	0.205	0.344
蛋氨酸源×水平 Source×level		0.632	0.748	0.650	0.498

表 5　饲料中添加晶体蛋氨酸或蛋氨酸寡肽对大黄鱼肝体比、脏体比和肥满度的影响

Tab.5　Effects of dietary crystalline methionine or oligo-methionine on HSI, VSI and *CF* of large yellow croakers (Means±SD, *n*=3)

蛋氨酸源 Met sources	蛋氨酸水平 Met levels (%)	肝体比 HSI (%)	脏体比 VSI (%)	肥满度 *CF*
对照组 LF	0	2.68±0.15	8.07±0.51	1.65±0.04
晶体蛋氨酸 CMet	0.35	2.40±0.85	8.11±1.90	1.68±0.15
	0.65	2.42±0.36	7.30±0.54	1.53±0.13
	0.95	2.50±0.74	7.97±0.99	1.77±0.28
蛋氨酸寡肽 OMet	0.35	2.09±0.69	7.96±1.33	1.69±0.11
	0.65	1.54±0.50	8.84±0.86	1.69±0.05
	0.95	1.10±0.12	8.07±1.08	1.71±0.98
蛋氨酸源 Source	CMet	2.44±0.59[a]	7.79±1.29	1.66±0.14
	OMet	1.58±0.61[b]	8.29±1.02	1.70±0.08
蛋氨酸水平 Level	0	2.68±0.15	8.07±0.51	1.65±0.04
	0.35	2.25±0.99	8.04±1.34	1.69±0.14
	0.65	1.98±0.71	8.07±0.93	1.61±0.78
	0.95	1.80±0.53	8.02±0.71	1.74±0.88
蛋氨酸源 Source		0.006	0.390	0.436
蛋氨酸水平 Level		0.420	0.998	0.108
蛋氨酸源×水平 Source×level		0.286	0.437	0.194

注：同一列中上标字母不同表示差异显著(P<0.05)

Note: Values in the same column with different superscript letters denoted significant difference (P < 0.05)

表明了蛋氨酸在豆粕替代鱼粉饲料中的重要作用。Mai 等(2006)研究表明，当水生动物饲料鱼粉被部分或完全替代时，补充外源蛋氨酸可提高蛋白质效率，促进生长，这与本研究的结果一致。

从本研究结果可以看出，与晶体氨基酸相比，蛋氨酸寡肽对大黄鱼幼鱼具有更好的促生长作用。蛋氨酸寡肽组大黄鱼幼鱼的增重率和蛋白质效率均显著高于晶体蛋氨酸组(P<0.05)。另外，肝脏谷丙转氨酶和谷草转氨酶是蛋白质合成代谢过程中重要的转氨酶，其活性间接反映了蛋白质合成效率。本研究中，蛋氨酸寡肽组的大黄鱼幼鱼肝脏的谷丙转氨酶活力和谷草转氨酶活力均显著高于晶体蛋氨酸组(P<0.05)，与蛋氨酸寡肽组增重率和蛋白质效率的提高相一致，但饲料中添加蛋氨酸寡肽或晶体蛋氨酸对大黄鱼血氨和尿素氮含量并没有显著影响(P>0.05)，说明了蛋氨酸寡肽较晶体蛋氨酸可以显著促进蛋白质的合成效率，而对蛋白质的分解代谢影响较小，从而促进了大黄鱼幼鱼的生长。

分析蛋氨酸寡肽较晶体蛋氨酸生长性能提高的原因，可能是由于饲料中补充晶体蛋氨酸，虽然可以弥补替代鱼粉饲料中蛋氨酸的缺失，但是晶体蛋氨酸可能会被过早的吸收和利用，从而导致与饲料中其他氨基酸吸收和利用不同步，降低了晶体蛋氨酸的利用率(Kaushik *et al*, 1983; Zarate *et al*, 1999)。而与晶体蛋氨酸相比，蛋氨酸寡肽由于为多个蛋氨酸单体聚合而成，其被分解、吸收的速率较晶体蛋氨酸明显下降，从而可以更好地解决蛋白质合成代谢过程中蛋氨酸与其他氨基酸不同步的问题。目前，关于寡肽对水产动物生长促进作用的机制尚不清楚，除了以上原因之外，还有研究表明，蛋白质合成可能与完整吸收的寡肽有直接关系，例如 Wang (1994)观察到蛋氨酸肽相比与游离蛋氨酸可以促进 ^{3}H-Leu 掺入组织蛋白。Nielsen 等(1994)研究发现水解酪蛋白可以降低大鼠整体蛋白质的降解率，并与完整酪蛋白均可提高蛋白质合成率等，其具体机理还有待进一步研究。

另外，饲料中添加蛋氨酸寡肽对大黄鱼幼鱼的肝体比有显著影响。硫的代谢主要发生在肝脏组织(Mato *et al*, 1997)。Espe 等(2008)指出大西洋鲑(*Salmo salar*)每天摄入有 0.05–0.06 g 似乎可以保障良好的肝脏高甲基化能力，从而避免肝脏的增大。Chiji 等(1990)的研究表明，与添加晶体蛋氨酸相比，在老鼠饲料中添加蛋氨酸寡肽可以显著降低老鼠肝脏脂肪沉积。近年来，大黄鱼在养殖过程中，肝病频发，病鱼体表无显著特征而肝脏出现肝肿大、“花肝”、“绿肝”等现象。本研究在养殖过程中也发生过类似情况，部分大黄鱼出现了肝脏肥大。本研究显示，蛋氨酸寡肽组大黄鱼

表 6 饲料中添加晶体蛋氨酸或蛋氨酸寡肽对大黄鱼蛋白质代谢反应的影响

Tab.6 Effects of dietary crystalline methionine or oligo-methionine on protein metabolism responses of large yellow croakers (Means±SD, *n*=3)

蛋氨酸源 Met sources	蛋氨酸水平 Met levels (%)	肝脏谷丙转氨酶 GPT (U/g·prot)	肝脏谷草转氨酶 GOT (U/g·prot)	血氨 Ammonia (μmol/L)	尿素氮 UN (mmol/L)
对照组 LF	0	61.53±0.71	32.13±0.45	537.33±20.60	8.20±0.36
晶体蛋氨酸 CMet	0.35	63.50±0.98	34.07±0.75	542.67±18.50	8.53±0.21
	0.65	64.50±0.44	34.43±2.08	538.00±18.15	8.50±0.40
	0.95	66.13±1.89	36.43±1.85	536.67±4.58	8.60±0.52
蛋氨酸寡肽 OMet	0.35	65.97±2.42	35.70±1.10	527.00±24.51	8.30±0.35
	0.65	66.43±2.27	36.47±1.17	539.67±19.66	8.80±0.30
	0.95	67.07±1.08	38.73±1.57	552.67±10.50	8.87±0.55
蛋氨酸源 Source	CMet	64.71±1.58^{a}	34.98±1.82^{a}	539.11±14.85	8.54±0.35
	OMet	66.49±1.81^{b}	36.97±1.77^{b}	539.78±19.95	8.66±0.45
蛋氨酸水平 Level	0	61.53±0.71	32.13±0.45^{a}	537.33±20.60	8.20±0.36
	0.35	64.73±1.80	34.88±1.55^{b}	534.83±23.68	8.42±0.53
	0.65	65.47±1.22	35.45±2.89^{bc}	542.17±12.74	8.65±0.26
	0.95	66.60±2.65	37.58±1.58^{c}	541.33±14.71	8.73±0.37
蛋氨酸源 Source		0.031	0.009	0.938	0.565
蛋氨酸水平 Level		0.155	0.011	0.741	0.388
蛋氨酸源×水平 Source×level		0.700	0.917	0.193	0.453

注：表中同一列中上标字母不同表示差异显著(P<0.05)

Note: Values in the same column with different superscript letters denoted significant difference (P<0.05)

幼鱼的肝体比较晶体蛋氨酸组显著降低(P<0.05)。这表明与晶体蛋氨酸相比，饲料中添加蛋氨酸寡肽可以降低大黄鱼幼鱼的肝体比，保持肝脏活力，提高存活率。

综上所述，蛋氨酸寡肽较晶体蛋氨酸可以更好地改善增重率，蛋白质效率和蛋白质代谢反应，降低肝体比，从而促进大黄鱼幼鱼的生长。

参 考 文 献

刘永坚, 田丽霞, 刘栋辉, 等. 实用饲料补充结晶或包膜赖氨酸对草鱼生长、 血清游离氨基酸和肌肉蛋白质合成率的影响. 水产学报, 2002, 26(3): 252–258

冷向军, 王冠, 李小勤, 等. 饲料中添加晶体或包膜氨基酸对异育银鲫生长和血清游离氨基酸水平的影响. 水产学报, 2007, 31(6): 743–748

张彩兰, 刘家富, 李雅璀, 等. 福建省大黄鱼养殖现状分析与对策. 上海水产大学学报, 2002, 11(1): 77–83

唐晓亮, 曹俊明, 朱选, 等. 7 种饲料原料蛋白质和氨基酸对凡纳滨对虾的影响. 饲料研究, 2010(2): 5–8

熊本海, 庞之洪, 赵峰, 等. 中国饲料成分及营养价值表(2014 年第 25 版)制订说明. 中国饲料, 2014, 14(21): 29–39

AOAC: Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of AOAC, 2012. Arlington, 19th ed

Chiji H, Harayama K, Kiriyama S. Effects of feeding rats low protein diets containing casein or soy protein isolate supplemented with methionine or oligo-L-methionine. J Nutr, 1990, 120(2): 166–171

Espe M, Hevrøy, EM, Liaset B, *et al*. Methionine intake affect hepatic sulphur metabolism in Atlantic salmon, *Salmo salar*. Aquaculture, 2008, 274(1): 132–141

Kaushik SJ, Dabrowski K, Blanc D. Nitrogen and energy utilization in juvenile carp (*Cyprinus carpio*) fed casein, amino acids or a protein-free diet. Reprod Nutr Dévelop, 1983, 23(4): 741–754

Li MH, Robinson EH. Effects of supplemental lysine and methionine in low protein diets on weight gain and body composition of young channel catfish *Ictalurus punctatus*. Aquaculture, 1998, 163(3–4): 297–307

Mai K, Wan J, Ai Q, *et al*. Dietary methionine requirement of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* R. Aquaculture, 2006, 253(1): 564–572

Mato JM, Alvarez L, Ortiz P, *et al*. S-adenosylmethionine synthesis: molecular mechanisms and clinical implications. Pharmacol Ther, 1997, 73(3): 265–280

Nielsen K, Kondrup J, Elsner P, *et al*. Casein and soya-bean protein have different effects on whole body protein turnover at the same nitrogen balance. Br J Nutr, 1994, 72(1): 69–81

Robinson EH. Improvement of cottonseed meal protein with supplemental lysine in feeds for channel catfish. J Appl Aquacult, 1991, 1(2): 1–14

Rodehutscord M, Borchert F, Gregus Z, *et al*. Availability and utilisation of free lysine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): 1. Effect of dietary crude protein level. Aquaculture, 2000, 187(1): 163–176

Viola S, Lahav E. Effects of lysine supplementation in practical carp feeds on total protein sparing and reduction of pollution. Isr J Aquacult Bamid, 1991, 43(3): 112–118

Wang S. Utilization of methionyl peptides as a source of methionine for the synthesis of secreted protein by mouse mammary explants and cultured and cultured bovine mammary epithelial cells. J Dair Sci, 1994, 77: 354

Yamamoto T, Sugita T, Furuita H. Essential amino acid supplementation to fish meal-based diets with low protein to energy ratios improves the protein utilization in juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture, 2005, 246(1): 379–391

Zarate DD, Lovell RT, Payne DM. Effects of feeding frequency and rate of stomach evacuation on utilization of dietary free and protein-bound lysine for growth by channel catfish *Ictalurus punctatus*. Aquacult Nutr, 1999, 5(1): 17–22

(编辑　马璀艳)

Effects of Dietary Oligo-Methionine on the Growth Performance, Feed Utilization and Protein Metabolism Responses of Juvenile Large Yellow Croaker (*Larimichthys crocea*)

MA Jun, WEI Zehong, XING Shujuan, YI Lina, XU Wei, ZHOU Huihui, ZHANG Wenbing①, MAI Kangsen

(*The Key Laboratory of Aquaculture Nutrition and Feeds, Ministry of Agriculture; the Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education; Ocean University of China, Qingdao* 266003)

Abstract　Enzyme-catalyzed synthesis of oligo-methionine (OMet) has been available, however, little is known on the application of OMet in aquatic feed. In this study, an 8 week feeding trial was conducted to investigate the effects of dietary crystalline methionine (CMet) and OMet on the growth performance, feed utilization and protein metabolism responses of juvenile large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) with initial body weight of (26.0±1.6) g. A practical diet with low fish meal content (31.8%) was used as the control diet (LF). Six other experimental diets (CMet 0.35, CMet 0.65, CMet 0.95, OMet 0.35, OMet 0.65, and OMet 0.95) were formulated with 0.35%, 0.65% and 0.95% CMet or OMet respectively. The weight gain rate (WGR) of fish treated with OMet or CMet was significantly higher than control and increased significantly along with the elevated level of supplement (P<0.05). The WGR was the highest in fish treated with OMet 0.95. The WGR and protein efficiency ratio (PER) of fish in OMet treatment were significantly higher than those treated with CMet (P<0.05). In all treatments there was no significant difference in survival rate, feed conversion ratio or body composition (crude protein, crude lipid, ash, and moisture, P>0.05). Compared to CMet treatment, OMet caused lower hepatosomatic index (HSI) and higher activities of glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT) and glutamic-pyruvic transaminase (GPT) in the liver (P<0.05). Meanwhile, the methionine level greatly affected activities of GOT. The fish in OMet 0.95 treatment showed the lowest HSI and the highest GPT and GOT activities. However, in all groups no significant difference was detected in the concentrations of ammonia and urea nitrogen in the serum (P>0.05). This study indicated that compared to CMet, OMet might be more effective in improving the growth performance and feed utilization of large yellow croakers, therefore could replace the former as the external methionine source to balance the amino acids in the soybean protein feed.

Key words　Oligo-methionine; Crystalline methionine; Large yellow croaker; Growth; Feed utilization

① Corresponding author: ZHANG Wenbing. E-mail: wzhang@ouc.edu.cn

DOI: 10.11758/yykxjz.20150513001 http://www.yykxjz.cn/

广西茅尾海的香港巨牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)在不同养殖区的性腺发育变化*

於 锋[1#] 罗 帮[2#] 陈雪芬[1] 李琼珍[2①] 王 嫣[1①]

(1. 教育部热带生物资源重点实验室 海南大学海洋学院 海口 570228;
2. 广西壮族自治区水产科学研究院 南宁 530021)

摘要 为探究香港巨牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)的繁殖特性以及春季死亡原因，采用肉眼观察、活体镜检和组织切片方法研究了茅尾海沙井的香港巨牡蛎苗种吊养于大风江黄场的 1 龄牡蛎的性腺发育周年变化，并建立了快速判断香港巨牡蛎性腺发育程度的方法。对比分析了吊养在茅尾海沙井、大风江入海口内的黄场和入海口外的鑫丰场的 2 龄牡蛎性腺发育的启动和发展过程。结果显示，广西茅尾海的香港巨牡蛎每年只有 1 个繁殖周期，性腺发育过程可划分为未分化期(1–3 月)、分化期(4 月)、成熟排放期(5–10 月)及休止期(11–12 月) 4 个阶段；1 龄和 2 龄牡蛎的性腺发育基本同步；大风江入海口外的牡蛎的性腺发育较入海口内的牡蛎提前约 15 d，而比茅尾海内海的牡蛎提前约 30 d，入海口外的牡蛎的性腺 4 月即发育到成熟排放期，冬季饵料的丰富程度和温度、盐度等因素可能是造成这种差异的原因。研究还发现，高温少雨天气下，海水盐度高，抑制了牡蛎性细胞的排放，导致入海口外侧吊养牡蛎的大规模死亡，濒临死亡的牡蛎性腺处于退化和崩解状态。鉴于此，认为 4 月初即需密切监测吊养于入海口外的牡蛎性腺的发育状况和天气状况，及时收获性腺饱满的牡蛎，或将吊养牡蛎的蚝排放置在河流入海口内区域过冬。

关键词 香港巨牡蛎；组织切片；性腺发育；盐度；温度

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)03-0134-09

香港巨牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)为双壳纲(Bivalvia)、牡蛎科(Ostreidae)软体动物，其软体部为白色，生长迅速，是我国南方重要的养殖种类之一，(王海艳, 2004)[1)]。香港巨牡蛎曾长期被误认为是“近江牡蛎”(*Crassostrea rivularis*, Gould 1861)，其现名由 Lam 等(2003)通过分子系统学和形态学分析重新确定。Wang 等(2004)与王海艳等(2007)利用形态分析和 DNA 证据，证明华南沿海的“白肉蚝”为香港巨牡蛎。

广西钦州的茅尾海牡蛎养殖基地是中国最大的牡蛎天然采苗区，其海域面积合计 2340.1 km^2，最高年产苗种约 1000 亿粒(钟方杰, 2013)[2)]。香港巨牡蛎为茅尾海采苗区的优势种，其幼虫和稚贝数量占比超过 97.5%(钟方杰, 2013[2)]; 宋忠魁等, 2010)，因其肉质鲜美、营养丰富，形成了特色地标品牌“钦州大蚝”。

* 广西社会公益研究项目(GXIF-2014-005)、现代农业产业技术体系建设专项项目(CARS-48)、国家自然科学基金(31060354)和海南大学研究生优秀学位论文培育计划资助。

共同第一作者；於 锋，E-mail: 249137506@qq.com；罗 帮，E-mail: 76959887@qq.com
① 通讯作者：王 嫣，教授，E-mail: wy2005@163.com；李琼珍，副研究员，E-mail: 310687878@qq.com

收稿日期: 2015-05-13, 收修改稿日期: 2015-06-06

1) 王海艳. 中国近海常见牡蛎分子系统演化和分类的研究. 中国科学院海洋研究所博士研究生学位论文, 2004, 36–38
2) 钟方杰. 广西茅尾海香港巨牡蛎半人工采苗技术研究. 广西大学硕士研究生学位论文, 2013, 1–42

其苗种不仅在广西茅尾海和大风江入海口等处大量养殖，而且输送到广东、福建和海南等地，对南方牡蛎养殖产业有重要贡献(苏天凤, 2006)。尽管每年的5–9 月，在茅尾海均可用附苗器采到天然牡蛎幼苗，但附苗的速度和苗种的质量在不同的时间差别很大(钟方杰等, 2014)。2008 年前后，茅尾海的香港巨牡蛎自然苗种数量出现骤减，养殖户便从广东珠海引进苗种。随后的两年中，引进的养殖牡蛎也出现大量死亡现象。

为探明香港巨牡蛎的性腺发育规律和繁殖特性，了解野生和幼苗种群的遗传结构及其变迁规律，并掌握不同海区养殖牡蛎的性腺发育速度的差异，本研究将肉眼观察、活体镜检和组织切片技术相结合，对广西主要采苗区和养殖区的香港巨牡蛎的性腺发育周年变化进行研究，同时建立了肉眼快速判断牡蛎性腺发育程度的方法，并对茅尾海沙井和大风江入海口内外吊养的牡蛎性腺发育的启动和发展过程进行比较，以期为香港巨牡蛎的生产实践和资源动态研究提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　实验材料

2012 年 6 月从茅尾海沙井采集牡蛎苗种后吊养于大风江入海口内黄场(HH: N21°39′14.15″，E108°52′6.49″，图 1)。2013 年 7 月–2014 年 6 月，每月随机取样 10 个，进行性腺发育观察和组织切片。

2011 年 8 月采自茅尾海沙井的同一批牡蛎苗种，分别吊养于茅尾海沙井(MS: N21°49′57.85″, E108°32′41.56″)、黄场(HH: N21°39′14.15″，E108°52′6.49″)和大风江入海口外鑫丰牡蛎养殖场(XF: N21°36′15.83″，E108°52′28.14″)(图 1)。2014 年 1–6 月，每月随机取样 10 个，进行性腺发育观察和组织切片，比较不同养殖区域间性腺发育差异。

1.2　方法

将牡蛎样品进行标号和测量，测量其壳长、壳宽、壳高，称量壳重、肉重，肉眼观察性腺发育情况，并用数码相机拍照。

去壳，取软体部，用 Bouin's 液固定。从固定的内脏囊后背侧和后腹侧分别切取包括左右外套膜在内的软体部组织块，经系列浓度酒精脱水、石蜡包埋、4–6 μm 切片、HE 染色后，光学显微镜(Leica DMA2500 或 OLYMPUS IX71)观察并拍照。结合肉眼观察和组织切片分析，对牡蛎的性腺周年变化进行分期，统计每月各期性腺所占比例，确定香港巨牡蛎的产卵排精高峰，并对比分析 3 个不同地区吊养牡蛎性腺发育启动和过程的差异。

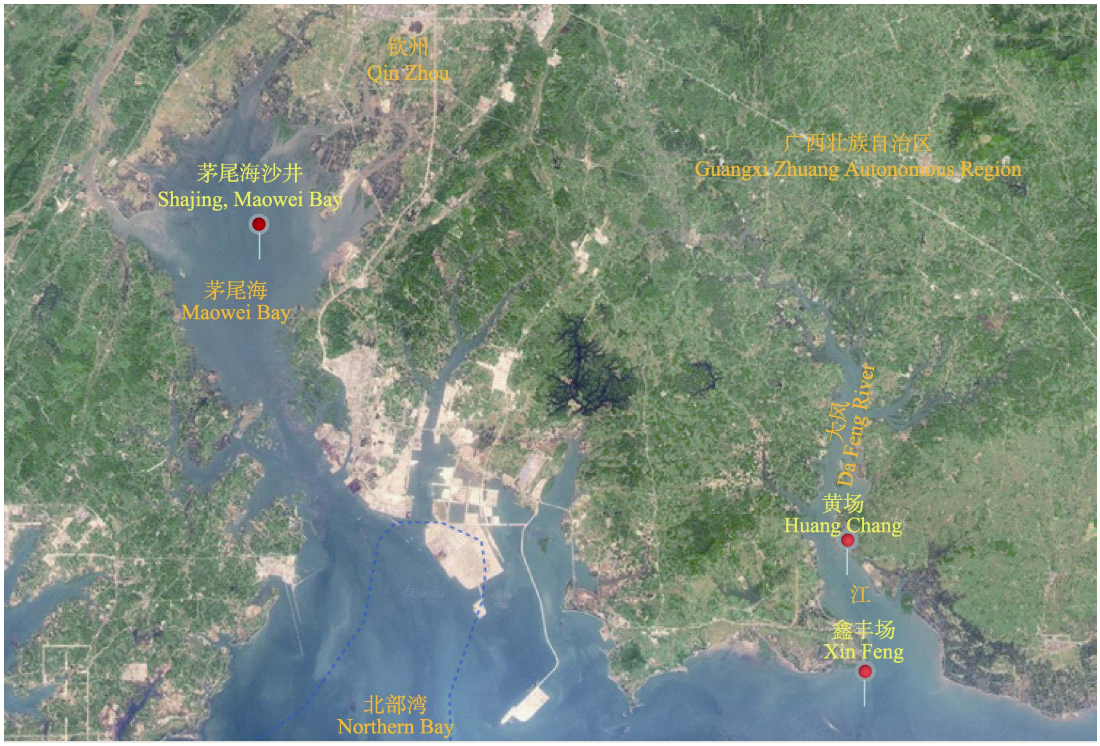

图 1　牡蛎样本采集地点

Fig.1　Sampling sites of *Crassostrea hongkongensis*

细胞测量：将牡蛎样品逐个切片，选取所需部位各一张切片，用显微镜附带软件(Leica: LAS V3.7 或 OLYMPUS: Image-Pro Plus 7.0C)在 10×40 放大倍数下随机测量每种细胞 30 个，分别测量单个细胞及其细胞核的长轴和短轴，取其均值进行统计分析。

将盐度(电导率)和温度记录仪(DST-CT，冰岛 Star-Oddi 公司)放置在茅尾海沙井(MS)水面下 0.5 m 水深，记录 2014 年全年茅尾海海水温度和盐度的变化，将每月数据汇总，取平均值作图。而在大风江黄埚则于 2014 年 2–7 月每月测量温度和盐度 2 d，作为参照。

2 结果

2.1 香港巨牡蛎性腺发育分期

2.1.1 未分化期(Ⅰ) 性腺刚刚开始发育，肉眼隐约可见在内脏团表面有一层很薄的白色半透明的性腺组织，主要分布于消化腺背部两侧。外套膜半透明，深色消化腺清晰可见(图 2-1)。此时用牙签或细镊子取半透明处组织，显微镜下检测不到生殖细胞。切片观察，在外套膜和消化腺之间是一层染色浅淡的结缔组织，其中不均匀地分布有索状和带状的生殖腺滤泡，不能分辨雌雄(图 2-2)。滤泡细胞直径为(6.43±0.94) μm，滤泡细胞核直径为(4.11±0.67) μm(表 1)。

2.1.2 性分化期(Ⅱ) 性腺不断加厚，区域增大。肉眼观察呈乳白色或淡黄色，并向腹面扩展，覆盖内脏团的 1/3 以上。深色消化腺仅局部隐约可见(图 2-4)。以牙签取少量性腺组织在显微镜下观察，可见呈梨形的卵母细胞。组织切片显示，雌雄性腺分化，滤泡数量增多，体积增大，呈圆形或椭圆形，从性腺外膜向内伸展，滤泡间结缔组织减少。雌性滤泡内卵原细胞(直径 18.16±4.77 μm，细胞核直径 10.53±3.38 μm)分裂增殖，形成卵母细胞(直径 30.52±8.73 μm，细胞核直径 17.53±5.64 μm)，多呈倒梨形，具短柄，附着于滤泡腔壁，细胞质中有稀疏的细小颗粒(图 2-5)。雄性滤泡中体积最大的精原细胞(直径 3.86±0.61 μm)位于滤泡边缘，向内分别是较小的初级精母细胞(直径 2.64±0.24 μm)和精子细胞(直径 2.00±0.13 μm) (图 2-6)。

2.1.3 成熟排放期(Ⅲ) 性腺进一步发育，乳白色或淡黄色的性腺厚厚地覆盖了整个内脏团，肥满、具光泽且富有弹性。性腺表面叶脉状生殖导管清晰可见，分支越来越细密和清晰(图 2-7)，稍加挤压，精子或卵母细胞可从泄殖孔流出，此时若以毛细管扎入性腺组织，可虹吸出生殖细胞。置海水中于显微镜下可见精子涌动，具很强活力。卵母细胞增大，呈多角形。组织切片观察，可进一步将性腺分为成熟期和排放期。成熟期整个性腺由充满生殖细胞的滤泡组成，滤泡充盈饱满相互挤压呈不规则多角形。卵母细胞发育基本同步(直径 33.35±9.72 μm，细胞核直径 19.61±4.37 μm)。雌性滤泡中，卵母细胞进一步发育，卵柄断裂，卵母细胞进入滤泡腔内，胚泡消失，启动减数分裂 I (Kennedy *et al*, 1964)。此时卵黄颗粒变大增多，聚集呈泡沫状(图 2-8)，雄性滤泡精原细胞(直径 4.14±0.74 μm)和精母细胞(直径 2.92±0.46 μm)层变薄，界限变模糊。滤泡内充满成熟精子，精子(直径 1.55±0.12 μm)聚集成束，沿排出通道密集排列(图 2-9)。排放期由于成熟滤泡中卵母细胞或精子的排放，部分滤泡腔出现大小不等的空腔。雌性滤泡明显缩

表 1 牡蛎各时期细胞及细胞核平均直径

Tab.1 Average diameter of cells and nucleus of *C. hongkongensis* at different stage (μm)

细胞类型 Cell types	未分化期Ⅰ Indifferent stage	性分化期Ⅱ Sexual differentiation stage	成熟排放期Ⅲ Mature and spawn stage	休止期Ⅳ Resting stage
滤泡细胞 Follicular cell	6.43±0.94[a]	–	–	4.74±1.59[b]
滤泡细胞核 Nuclear of follicular cell	4.11±0.67[a]	–	–	2.77±0.84[b]
卵原细胞 Oogonium	–	18.16±4.77	19.61±8.18	–
卵原细胞核 Nuclear of oogonium	–	10.53±3.38	10.01±2.70	–
初级卵母细胞 Primary oocyte	–	30.52±8.73	33.35±9.72	–
初级卵母细胞核 Nuclear of primary oocyte	–	17.53±5.64	19.61±4.37	–
精原细胞 Spermatogenium	–	3.86±0.61	4.14±0.74	–
初级精母细胞 Primary spermatocyte	–	2.64±0.24	2.92±0.46	–
精子细胞 Spermatid	–	2.00±0.13	2.17±0.70	–
精子 Sperm	–	–	1.55±0.12	1.53±0.12

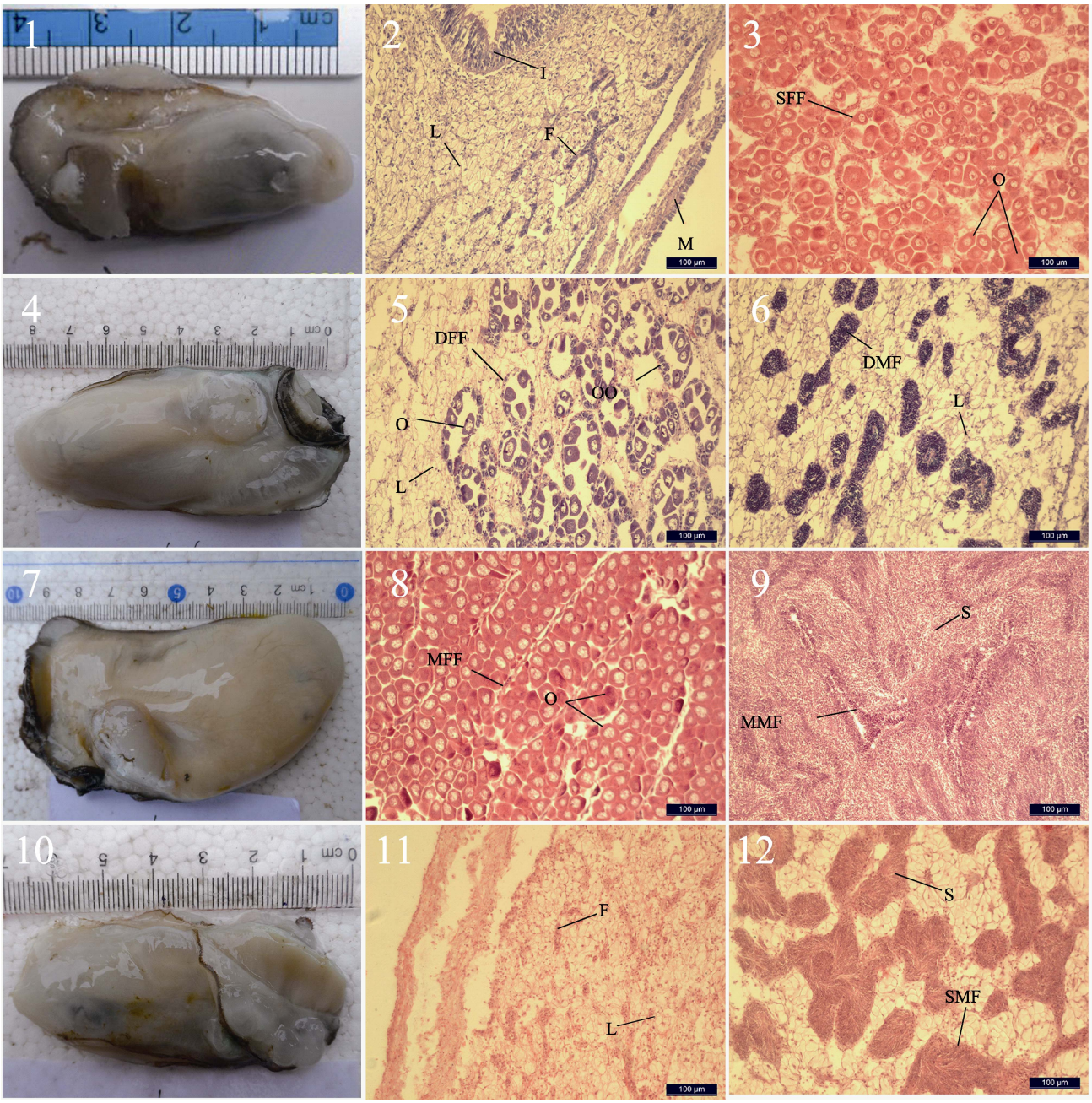

图 2　牡蛎性腺的周年变化

Fig.2　Annual changes of the gonads of *C. hongkongensis*

性腺外观: 1. 未分化期; 4. 性分化期; 7. 成熟排放期; 10. 休止期

性腺组织切片: 2. 未分化期; 5. 性分化期卵巢; 6. 性分化期精巢; 8. 成熟卵巢; 9. 成熟精巢; 3. 排放中的卵巢; 12. 排放中的精巢; 11. 休止期

DFF: 发育中的雌性滤泡; DMF: 发育中的雄性滤泡; F: 滤泡; I: 肠道; L: 间质组织; M: 外套膜; MFF: 成熟雌性滤泡; MMF: 成熟雄性滤泡; O: 初级卵母细胞; S: 精子; SFF: 排放时的雌性滤泡; SMF: 排放时的雄性滤泡

Gonad appearance: 1. undifferentiated stage; 4. differentiation stage; 7. mature and discharging stage; 10. resting stage

Gonad histological section: 2. undifferentiated stage; 5. female follicle in differentiation stage; 6. male follicle; 8. mature female follicle; 9. mature male follicle; 3. spawning female follicle; 12. spawning male follicle; 11. resting stage

DFF: developing female follicle; DMF: developing male follicle; F: follicle; I: intestine; L: leydig tissue; M: mantle; MFF: mature female follicle; MMF: mature female follicle; O: primary oocyte; S: sperm; SFF: spawning female follicle; SMF: spawning male follicle;

小，滤泡间结缔组织增多，卵原细胞(直径 19.61± 8.18 μm，细胞核直径 10.01±2.70 μm)明显，可见少量初级卵母细胞(图 2-3)。排放的雄性滤泡中排出通道清晰可见，周围仍有稀疏的精子(图 2-12)。

2.1.4 休止期Ⅳ 性腺萎缩直至消失，软体部表面透明，呈水泡状，内脏团十分明显(图 2-10)。以牙签取性腺部组织在显微镜下看不到生殖细胞。组织切片显示，滤泡萎缩退化，壁变薄，形状不规则。个别滤泡内可观察到极少量的性细胞。血淋巴组织入侵滤泡，滤泡间被结缔组织填充。滤泡细胞(直径 4.74±1.59 μm，细胞核直径 2.77±0.84 μm)，显著小于未分化期滤泡细胞(P<0.05) (图 2-11)。

2.2 生殖周期

香港巨牡蛎性腺发育各时期所占比例见图 3。1–3 月，香港巨牡蛎的性腺处于未分化期，性别无法分辨。3 月底–4 月中为性分化期，此时雌雄性腺可辨。4 月下旬–5 月，性腺迅速成熟，进入成熟排放期，这一阶段可一直持续至 10 月。11–12 月，牡蛎生殖腺萎缩至消失，进入休止期。

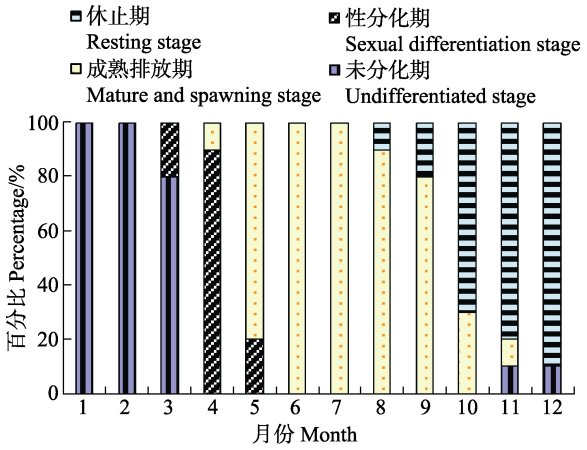

图 3 2013 年 7 月–2014 年 6 月大风江黄场牡蛎不同性腺发育时期的百分比

Fig.3 Percentage of different developmental stages of *C. hongkongensis* in the Huang hatchery of Dafeng River from July 2013 to June 2014

2013 年 7 月–2014 年 6 月，周年性腺的切片观察显示，香港巨牡蛎每年有 1 个生殖周期，繁殖期为 5–10 月。在 1 个生殖周期中，1 龄、2 龄牡蛎的性腺发育基本同步，雄性发育略快。在实际观察中，牡蛎个体在繁殖季节可多次产卵排精，部分排放期的牡蛎性腺为半透明，呈分散和松软状态，与性分化期的性腺透明度低、结构紧实不同。从排放至性腺再次充盈，间隔时间短，仅需 7 d 左右。

2.3 不同地点香港巨牡蛎性腺发育的差异

香港巨牡蛎的主要采苗区是茅尾海沙井(MS)，该处周年温度盐度变化趋势都有连续的监控(图 4、图 5)。茅尾海为钦州内海，面积约 135 km^2，东西径最长(15 km)，南北径最长(17 km)，距北部湾的连通峡口仅 5 km，且其外分布多个岛屿，影响内外海水的交换。其东、北和西面分别由两条钦江支流和茅岭江注入。因此，其盐度取决于涨潮时海水的涌入和钦江注入的淡水量，其周年盐度变化幅度为 0–24，变化剧烈。黄场(HH)位于大风江入海口上游，周年盐度比较平稳(10–14)，只在 4 月高温少雨季节，盐度有时会超过 20。性腺组织切片显示(图 6)，大风江入海口外的 XF 牡蛎性腺发育比入海口内 HH 和茅尾海内海 MS 提前。XF 牡蛎性腺发育比 MS 的提前 30 d 左右，而 HH 比 MS 提前 15 d 左右。

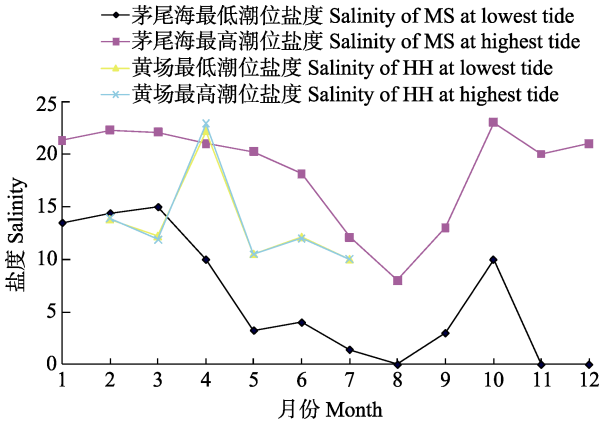

图 4 2013–2014 年茅尾海海沙井与大风江黄场盐度变化趋势

Fig.4 Variation of salinity in the Shajing of Maowei Bay and Huang hatchery of Dafeng River during 2013–2014

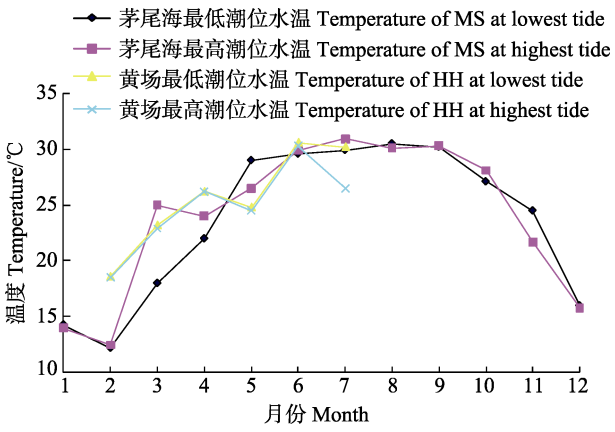

图 5 2013–2014 年广西茅尾海沙井与大风江黄场温度变化趋势

Fig.5 Variation of temperature in the Shajing of Maowei Bay and Huang hatchery of Dafeng River during 2013–2014

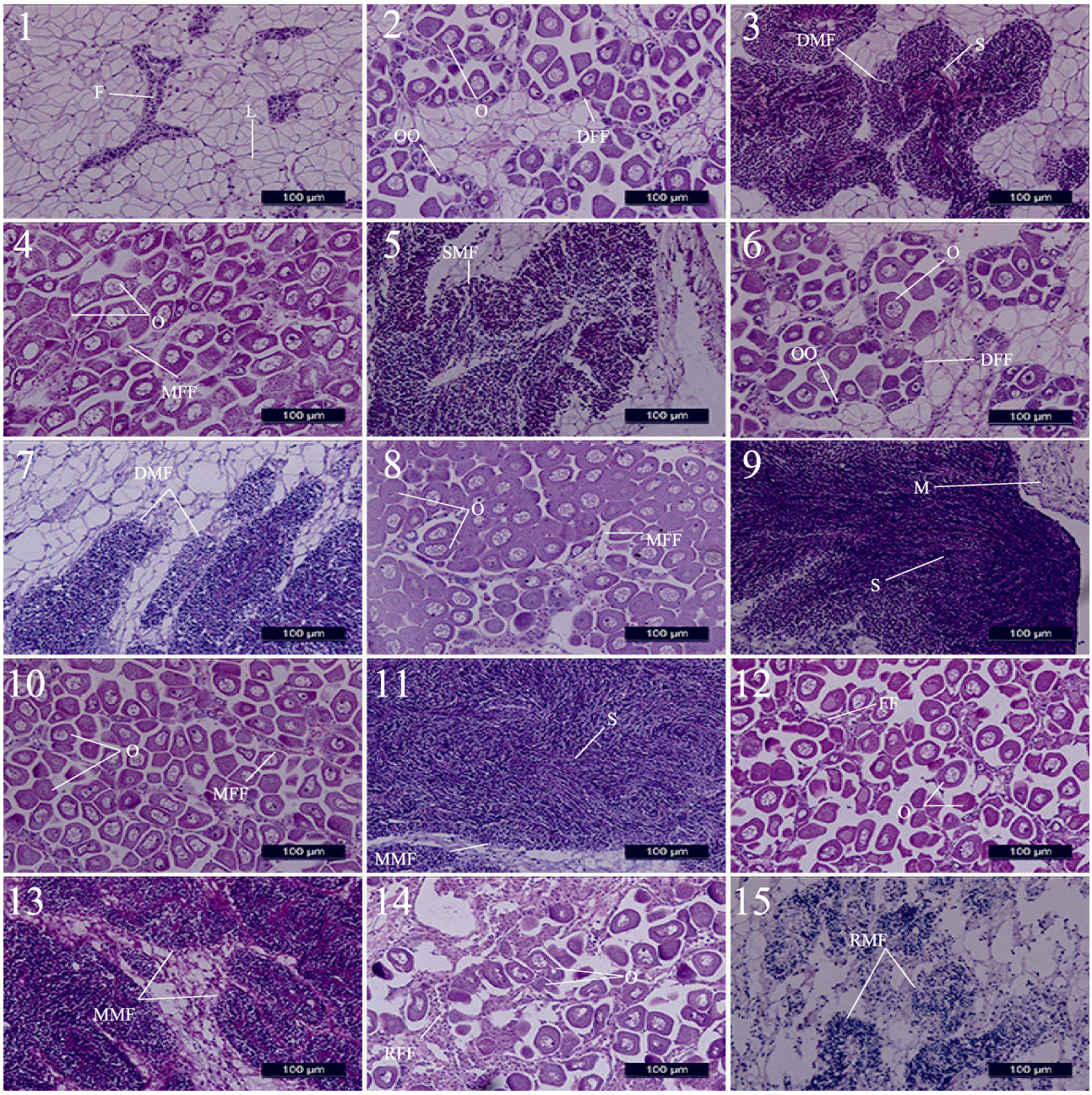

图 6　不同吊养地点牡蛎性腺组织切片示性腺发育的差异

Fig.6　Histological section of gonad of *C. hongkongensis* from different locations, showing the different developmental stages

MS: 1. 4 月未分化期; 2. 5 月卵巢; 3. 5 月精巢; 4. 6 月卵巢; 5. 6 月精巢

HH: 6. 4 月卵巢; 7. 4 月精巢; 8. 5 月卵巢; 9. 5 月精巢; 10. 6 月卵巢; 11. 6 月精巢

XF: 12. 4 月卵巢; 13. 4 月精巢; 14. 5 月卵巢; 15. 5 月精巢

DFF: 发育中的雌性滤泡; DMF: 发育中的雄性滤泡; F: 滤泡; L: 间质组织; M: 外套膜; MFF: 成熟雌性滤泡; MMF: 成熟雄性滤泡; O: 初级卵母细胞; OO: 卵原细胞; RFF: 退化的雌性滤泡; RMF: 退化的雄性滤泡; S: 精子; SFF: 排放时的雌性滤泡; SMF: 排放时的雄性滤泡

MS: 1. gonads in April; 2. female follicle in May; 3. male follicle in May; 4. female follicle in June; 5. male follicle in June

HH: 6. female follicle in April; 7. male follicle in April; 8. female follicle in May; 9. male follicle in May; 10. female follicle in June; 11. male follicle in June

XF: 12. female follicle in April; 13. male follicle in April; 14. female follicle in May; 15. male follicle in May

DFF: developing female follicle; DMF: developing male follicle; F: follicle; L: leydig tissue; M: mantle; MFF: mature female follicle; MMF: mature male follicle; O: primary oocyte; OO: oogonium; RFF: regressive female follicle; RMF: regressive male follicle; S: sperm; SFF: spawning female follicle; SMF: spawning male follicle

2.3.1 *茅尾海内海 MS 与大风江入海口内侧 HH 香港巨牡蛎的性腺发育比较* MS 牡蛎性腺至 4 月仍处于未分化期，性腺难分雌雄(图 6-1)，而 HH 牡蛎性腺 1–3 月为未分化期，4 月进入性分化期，雌雄滤泡发育并逐渐延展(图 6-6、7)，因此，HH 牡蛎性腺发育比 MS 提前 15 d 左右。5 月 MS 牡蛎雌雄性腺迅速发育，接近或达到成熟期。雌性滤泡成熟，卵母细胞与卵原细胞或未成熟卵母细胞并存(图 6-2)，而雄性滤泡之间结缔组织明显，滤泡内成熟的精子清晰可见(图 6-3)，HH 牡蛎雌性滤泡内可见大量饱满的初级卵母细胞(图 6-8)，雄性滤泡中充满成熟精子(图 6-9)。6 月，MS 牡蛎卵巢饱满，雌性滤泡中充满成熟的卵母细胞(图 6-4)，精巢中饱满与排空的雄性滤泡共存，后者只剩下精原和精母细胞层，中央有少量间质细胞(图 6-5)，而 HH 牡蛎性腺同样处于成熟排放期，雌雄滤泡中充塞着成熟的卵母细胞(图 6-10)和成熟精子(图 6-11)，雄性滤泡界限模糊，精原和精母细胞层薄。

2.3.2 *大风江入海口外 XF 香港巨牡蛎的性腺发育特点* 虽然 XF 牡蛎的性腺在 1–3 月取样时均处于未分化期，但 4 月迅速发育至成熟排放期。雌、雄性腺的滤泡饱满(图 6-12、13)，有的雄性滤泡边缘精原细胞和精母细胞层不明显，整个滤泡充满精子细胞和精子，显示出精子排放受抑制现象(图 6-13)。5 月，雌雄性腺出现不同程度的退化和崩解：卵巢局部滤泡中有大量体小、核圆且染色深的细胞入侵，类似正常性腺排放期后入侵雌性滤泡的血细胞(Kennedy *et al*, 1996)。同时可见卵母细胞变形、融解，细胞核膜皱缩、塌陷(图 6-14)。精巢中，原来椭圆形切面的雄性滤泡结构不完整，间质细胞增生，与精子细胞和精子间杂排列(图 6-15)，呈现异常排放状态。由于 2014 年 5 月起，XF 牡蛎大量死亡，导致 6 月样本缺失。而 6 月 XF 的其他存活牡蛎，被检者均为雌性。

2.3.3 *温度与香港巨牡蛎性腺发育的关系* 就 HH 性腺发育的周年变化而言，牡蛎性腺发育的启动与水温的升高关系密切。1–3 月平均水温低于 23℃(图 5)，但处于快速回升阶段，牡蛎性腺处于未分化期。随着 4–5 月水温持续升至 25℃以上，牡蛎性腺开始分化并迅速发育至成熟排放期。同样，1–4 月茅尾海平均水温持续升高，但低于 25℃(图 5)，MS 牡蛎性腺处于未分化期。至 5 月平均水温快速升至 27.5℃，MS 的牡蛎性腺发育也快速接近或达到成熟期。因此，平均水温达到 25℃是牡蛎性腺发育启动和快速进入成熟期的标志性环境因子。从图 5 可见，大风江 HH 虽然因温度监测密度低而呈现出较大的波动幅度，但变化趋势与茅尾海相同。平均水温在 6–9 月维持在 30℃高位，之后开始下降，至 10 月中旬降至 27.5℃，之后进入 11 月即降至 25℃以下。香港巨牡蛎性腺的排放期持续至 10 月，11 月后进入休止期。因此，推测其性腺进入和维持成熟排放期的环境温度在 25℃以上。

3 讨论

3.1 香港巨牡蛎性腺发育的特点及其对群体遗传结构的影响

根据牡蛎性腺在繁殖季节成熟与排放期相重叠而呈多次排放的特点，从肉眼可快速准确观察判断的角度出发，将香港巨牡蛎性腺发育分为 4 个时期，这与其他双壳贝类如近江牡蛎(*Crassostrea ariakensis*)(杜玄, 2009)[1)]、菲律宾蛤仔(*Rudotapes philippinarum*)(李霞等, 2007)、文蛤(*Meretrix meretrix*)(林志华等, 2004)、日月贝(*Amusium laurenti*)(Penchaszadeh *et al*, 2000)等基于组织切片观察，将性腺发育划分为增殖期、生长期、成熟期、排放期和休止期 5 个时期略有不同。本研究主要是着眼于在生产现场快速准确判读牡蛎的性腺发育状况为目的，便于采苗和收贝。

在实际观察中，进入繁殖季节的牡蛎个体性腺发育的速度极快，从开始性分化到进入成熟排放期的过程不足 30 d，性分化期很短。同时，性腺排放高峰至性腺再次饱满的时间间隔也很短，可能只需 7 d。这一特性一方面显示牡蛎极强的繁殖力，另一方面会使更多参与繁殖的牡蛎个体在变化的环境条件中，以多次机会使自己的后代得以存活。因此，对整个茅尾海区来说，这一特性将增加牡蛎有效群体的大小(Li *et al*, 1998; He *et al*, 2012)，增强牡蛎群体遗传结构随时间的稳定性(Hedgecock *et al*, 2011)。

3.2 影响香港巨牡蛎性腺发育的主要因素

香港巨牡蛎性腺的发育与海水温度有密切关系。虽然限于设备原因，大风江 HH 和 XF 尚缺少连续的海水温度监测数据，但周期性的测量数据显示 HH 与 MS 温度变化趋势一致。因此，推断平均水温 25℃是牡蛎性腺保持活跃的成熟排放期的温度下限。这与许多研究(毕庶万等, 1996; 廖承义等, 1983; 曾志南等, 1991)证实海洋双壳贝类栖息环境的水温波动与它们

1) 杜玄. 福建沿海巨蛎属牡蛎的主要种类及其分布和近江牡蛎性腺发育的研究. 国家海洋局第三海洋研究所硕士研究生学位论文, 2009, 36–43

的性腺发育有密切的关系相一致。而 HH 与 XF 分别位于大风江入海口的内外，相距不过 5 km，推测两地海水温度差异很小，XF 的盐度或高于 HH 且相对稳定。但 XF 牡蛎性腺发育明显早于 HH，说明影响香港巨牡蛎性腺发育的因素不仅是温度。

钦州地区通常 4 月高温少雨，进入 5 月后降雨增加，海水盐度降低，并持续至 8 月，9 月后降水逐渐减少，这也体现在茅尾海沙井周年最低潮位海水盐度变化趋势上。5 月海水的平均盐度迅速降低，诱发性腺成熟牡蛎的第一波排放高峰。这与钟方杰(2013)[1)]通过检测茅尾海牡蛎幼虫密度所得到的结论基本一致。因此，6 月初适宜投放采苗器。

事实上，牡蛎性腺的发育除与海水温度、盐度密切相关外，还受饵料、水环境和亲本密度等多重因子的综合影响(王如才等, 2008)。大风江入海口外的 XF 牡蛎性腺的发育早于茅尾海内海 MS 约 30 d，早于大风江入海口内 HH 约 15 d。由于三地邻近，平均水温的差异非常小，不宜简单地以有效积温来解释(周玮, 1991)。XF 地处入海口，冬季海水搅动剧烈，营养盐丰富，浮游生物相对较多。XF 牡蛎性腺发育的提前，应与其摄食饵料更充足有关。因此，相较于茅尾海内海和大风江入海口内，鑫丰场更适宜于吊养牡蛎过冬。

3.3　入海口外侧养殖区牡蛎春季的死亡

2014 年 5 月，香港巨牡蛎在北部湾近海、江河入海口外侧养殖区，包括鑫丰场，吊养的牡蛎开始出现大量死亡(近 60%的死亡率)，而这种发生在江河入海口外侧养殖区春季牡蛎大批死亡的现象，过去也时有发生，却少有研究。2014 年 XF 牡蛎性腺发育快，4 月已进入成熟排放期，而此时，恰逢钦州高温少雨，大风江入海口区盐度居高不下(高达 23)。降雨的缺乏使香港巨牡蛎精卵的排放受到抑制，进而性腺出现过熟和退化形变，这可能是造成该养殖区牡蛎大量死亡的主要原因。检测 6 月鑫丰场存活牡蛎，发现几乎全为雌性。这可能与两方面因素有关，一是繁殖盛期，牡蛎雄性性腺逆转为雌性，群体中雌性比例远高于雄性(李霞, 2005)；另一方面，可能与雄性性腺的发育略提前于雌性而遭遇的性腺过熟压力更大有关。海洋双壳贝类中雄性性腺先成熟比较普遍(王子臣等, 1984; 尤仲杰等, 1991; 吴洪流等, 2002)，在性腺组织切片观察中，发现雄性性腺退化和崩解状态确实比雌性性腺更严重。因此，入海口外侧养殖区虽然适宜于牡蛎吊养过冬，但在春天，却需要密切监测牡蛎性腺的发育和海水盐度的变化，一旦性腺进入成熟期，则需及时收获和卖出牡蛎，以获得较高的经济效益。若春季没有收获，则需将吊养牡蛎的蚝排移往河流入海口内过冬，以避免牡蛎性腺在少雨的春季成熟，排放受到抑制而大规模死亡所造成的经济损失。

参　考　文　献

王子臣, 刘吉明, 朱岸, 等. 鸭绿江口中国蛤蜊生物学初步研究. 水产学报, 1984, 8(1): 33–44

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, 91

王海艳, 郭希明, 刘晓, 等. 中国近海“近江牡蛎”的分类和订名. 海洋科学, 2007, 31(9): 85–86

尤仲杰, 王一农, 叶雄会, 等. 等边浅蛤 *Gomphina veneriformis* 的繁殖周期. 台湾海峡, 1991, 10(4): 356–362

毕庶万, 徐宗发. 海湾扇贝控温育苗采卵时间的预报方法. 海洋与湖沼, 1996, 27(1): 93–97

苏天凤. 华南沿海养殖近江牡蛎的分类研究. 南方水产, 2006, 2(6): 72–75

李霞. 水产动物组织胚胎学. 北京: 中国农业出版社, 2005, 262–268

李霞, 梁峻, 闫喜武, 等. 人工控温促熟条件下不同海域菲律宾蛤仔的性腺发育. 水产学报, 2007, 31(6): 853–859

吴洪流, 王红勇, 王珺. 波纹巴非蛤性腺发育分期的研究. 海南大学学报(自然科学版), 2002, 20(1): 41–47

宋忠魁, 蔡小辉, 童潼, 等. 广西茅尾海常见牡蛎的分子鉴定. 海洋科学, 2010, 34(8): 11–16

林志华, 单乐州, 柴雪良, 等. 文蛤的性腺发育和生殖周期. 水产学报, 2004, 28(5): 510–514.

周玮. 海湾扇贝性腺发育的生物学零度. 水产学报, 1991, 15(1): 82–84

钟方杰, 严雪瑜, 高扬, 等. 广西茅尾海牡蛎天然种苗种类鉴定和群体组成的初步分析. 海洋科学, 2014, 38(3): 91–97

曾志南, 李复雪. 青蛤的繁殖周期. 热带海洋学报, 1991, 10(1): 86–91

廖承义, 徐应馥, 王远隆. 栉孔扇贝的生殖周期. 水产学报, 1983, 7(1): 1–13

He Y, Ford SE, Bushek D, *et al*. Effective population sizes of eastern oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin) populations in Delaware Bay, USA. J Mar Res, 2012, 70(2–3): 357–379

Hedgecock D, Pudovkin AI. Sweepstakes reproductive success in highly fecund marine fish and shellfish: a review and commentary. Bull Mar Sci, 2011, 87(4): 971–1002

Kennedy AV, Battle HI. Cycle changes in the gonad of the American oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). Can J Zool, 1964, 42(2): 305–321

Kennedy VS, Newell RIE, Eble AE. The Eastern Oyster *Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant College, 1996, 335–364

1) 钟方杰. 广西茅尾海香港巨牡蛎半人工采苗技术研究. 广西大学硕士研究生学位论文, 2013, 1–42

Lam K, Morton B. Mitochondrial DNA and morphological identification of a new species of *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) cultured for centuries in the Pearl River Delta, Hong Kong, China. Aquaculture, 2003, 228(1): 1–13

Li G, Hedgecock D. Genetic heterogeneity, detected by PCR-SSCP, among samples of larval Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) supports the hypothesis of large variance in reproductive success. Can J Fish Aquat Sci, 1998, 55(4): 1025–1033

Penchaszadeh PE, Paredes C, Salaya JJ. Reproductive cycle of the south American scallop *Amusium laurenti* (Gmelin, 1791) (Bivalvia, Pectinidae). Aquacult Int, 2000, 8(2–3): 227–235

Wang HY, Guo XM, Zhang GF, *et al*. Classification of Jinjiang oysters *Crassostrea rivularis* (Gould, 1861) from China, based on morphology and phylogenetic analysis. Aquaculture, 2004, 242(1): 137–155

(编辑 冯小花)

Gonad Development of Oyster (*Crassostrea hongkongensis*) at Different Cultural Sites in Maowei Bay, Guangxi, China

YU Feng[1#], LUO Bang[2#], CHEN Xuefen[1], LI Qiongzhen[2①], WANG Yan[1①]

(1. *Key Laboratory of Tropical Biological Resources of Ministry of Education, Ocean College, Hainan University, Haikou* 570228; 2. *Guangxi Academy of Fishery Sciences, Nanning* 530021)

Abstract The oyster *Crassostrea hongkongensis* is the main aquaculture species along south China coast and has an important economic value. The Maowei Bay adjacent to Qinzhou of Guangxi Province has been the largest natural oyster seed field, and oysters originating from this area are named after the place (Qinzhou oyster). The estuary of the Dafeng River is a major aquaculture site for Qinzhou oyster in Guangxi Province. Due to the promotion of the deepwater-raft-hanging-culture mode, massive death of oysters has occurred frequently in spring since 2008 and resulted in the rapid drop in the amount of oyster seeds in the Maowei Bay. In this study we explored the reproductive cycle of oyster gonad development and investigated the causes of the massive death, using one-year old oysters from the estuary of Dafeng River (HH, whose larva came from the Maowei Bay). We developed a method for rapid identifying the developmental stage of oyster gonad with the combination of naked-eye observation, biopsy and histological analysis. We also compared the gonad development of two-year old oysters from inside (HH) and outside (XF) of the estuary of the Dafeng River and from the Maowei Bay (MS). We found that Qinzhou oysters had only one breeding cycle each year which can be divided into 4 gonad developmental stages: the undifferentiated stage from January to March, the differentiation stage in April when the gender became distinguishable, the mature and discharging stage from May to October when the oysters spawned repeatedly, and the resting stage from November to December during which the gonads atrophied and disappeared. Gonad development of XF oysters started half a month earlier than HH oysters and one month earlier than MS oysters. In 2014 it was observed that the gonad of XF oysters developed into mature stage in April. The variation might be caused by differences in temperature, salinity and food abundance. Moreover, in overly hot and dry weather the gonad discharge was inhibited probably by high salinity, which may explain the massive death in the high salinity area. Therefore, we recommend close monitoring on the gonad development and seawater salinity in spring. The oysters should be harvested or transported to the inner estuary immediately after they mature, so as to avoid the massive death caused by scarce rainfall.

Key words *Crassostrea hongkongensis*; Histological study; Gonad development; Salinity; Temperature

① Corresponding author: WANG Yan, E-mail: wy2005@163.com; LI Qiongzhen, E-mail: 310687878@qq.com

DOI: 10.11758/yykxjz.20150309003 http://www.yykxjz.cn/

不同浓度臭氧对循环水养殖系统生物膜活性及其净化效能的影响*

黄 滨[1①] 马 腾[2] 刘宝良[1] 刘 滨[1] 洪 磊[1]
梁 友[1] 翟介明[3] 张丽丽[4]

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071；2. 中国海洋大学水产学院 青岛 266003；3. 莱州明波水产有限公司 烟台 264000；4. 连云港众利水产养殖有限公司 连云港 222000)

摘要 本文通过在循环水养殖系统中添加不同浓度的臭氧，研究其对循环水养殖系统生物膜活性及其净化效能的影响。结果显示，当氧化还原电位(ORP)小于 450 mV 时，氨氮的去除率随着臭氧浓度升高而升高，最高去除率达 39.9%，亚硝酸盐氮的平均去除率为 28.2%，生物膜菌群的平均存活率为 88.1%，生物膜对养殖水体氨氮和亚硝酸盐氮的处理效果良好；当氧化还原电位为 500 mV 时，经过臭氧 24 h 处理，氨氮和亚硝酸盐氮的去除率分别由 36.5%、28.1%降到 12.2%、8.4%，而臭氧 4 h 处理后，生物膜对氨氮和亚硝酸盐氮的去除率分别由 47.5%、32.1%降到 5.0%、3.3%，水处理效果明显下降，生物膜菌群存活率由 88.1 %降到 31.5%。由此可见臭氧添加浓度对生物膜及净化效能有重大影响。综合试验结果和分析评估，建议封闭循环水养殖系统的臭氧添加量以控制生物滤池内的氧化还原电位低于 400 mV 为宜，可保证循环水系统的安全性和经济性。

关键词 臭氧；循环水养殖系统；生物膜；净化效能

中图分类号 S949 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)03-0143-05

臭氧(O_3)作为强氧化剂，具有去除水产养殖系统中固体杂质、脱色除臭、氧化氨氮、降解有机物、杀菌消毒和保持养殖水质稳定的作用(Paller *et al*, 1988; Reid *et al*, 1994; Liltved *et al*, 1995; Rueter *et al*, 1995)。随着工厂化水产高效养殖模式在我国的蓬勃发展，臭氧的杀菌、消毒和净化水质等功能在工厂化封闭循环水养殖系统(Recirculating Aquaculture Systems, RAS)中得到了广泛应用。目前，国内外研究已经证明，在 RAS 水处理系统中，臭氧能够快速有效地杀死水体中的有害微生物，有效改善养殖水质，提高系统整体性能，确保鱼类健康生长(Davidson *et al*, 2011)；对于养殖水体的处理，臭氧浓度为 0.1–0.2 mg/L，处理时间 10–30 min 就可以达到很好效果(Bullock *et al*, 1997; Summerfelt, 2003; Ghomi *et al*, 2007)；在臭氧对养殖鱼类的影响方面，由于水体中臭氧浓度过高会对养殖鱼类产生毒害作用，其对一般鱼类的安全浓度为 0.008–0.060 mg/L，在半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)封闭循环水养殖系统中，臭氧投加量控制在氧化还原电位(Oxidation-Reduction Potential, ORP)在 350 mV 以内，可达到安全高效的处理效果(周游等, 2012)。

在工厂化循环水养殖系统中，利用生物膜进行水质净化是养殖水处理的核心技术，其净化效能决定了养殖水环境的稳定以及养殖生产的高效和安全。但是，臭氧对生物滤池中生物膜的影响却鲜有报道。当

* 国家鲆鲽类产业技术体系(CARS-50-G10)、江苏省重点研发计划(BE2015328)和江苏省科技计划(BN2015052)共同资助。
① 通讯作者：黄 滨，研究员，E-mail: huangbin@ysfri.ac.cn
收稿日期: 2015-03-09, 收修改稿日期: 2015-12-31

臭氧浓度超过一定值时，不仅会对养殖鱼类产生毒害，对生物滤池中的生物膜也将带来影响和损伤。一旦生物膜被破坏，循环水养殖系统将面临崩溃的危险。可见合理控制臭氧添加浓度是必要的(戚翠战等, 2014)。因此，深入研究臭氧在养殖水处理技术中的应用，对改善养殖水质、减少病害、提高养殖密度、增加产量、保障安全生产及促进工业化养殖的快速发展具有深远意义。本研究利用珍珠龙胆石斑鱼养殖生产系统中挂有生物膜的滤料和养殖废水，模拟工厂化循环水养殖系统，通过添加不同臭氧量，研究了臭氧对生物膜活性和水处理效率的影响，以期获得 RAS 中安全高效的臭氧添加剂量，为实际生产应用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验条件

本试验在山东莱州明波水产有限公司试验车间进行。试验时间为 2013 年 11 月 12 日–12 月 23 日，为期 41 d。试验系统模拟工厂化循环水系统，配置有养殖废水蓄水池、生物试验滤池、生产系统中挂有生物膜的滤料以及臭氧发生器。养殖废水蓄水池采用玻璃钢圆形池，容量为 1000 L；试验用水取自珍珠龙胆石斑鱼循环水养殖废水；物理过滤采用合成纤维过滤棉；生物试验滤池采用圆形玻璃钢养殖池，直径为 30 cm，深为 50 cm，水深为 15 cm，容量约为 10 L，池底呈锥形，在池底使用气石曝气；生物滤料来自于循环水养殖系统中生物滤池内取出的已挂膜的弹性滤料。根据养殖车间内日循环次数 20 次，确定由废水池流向试验池的流量；根据生物滤池内滤料量与生物滤池体积比确定试验池内所放滤料量，流程见图 1。

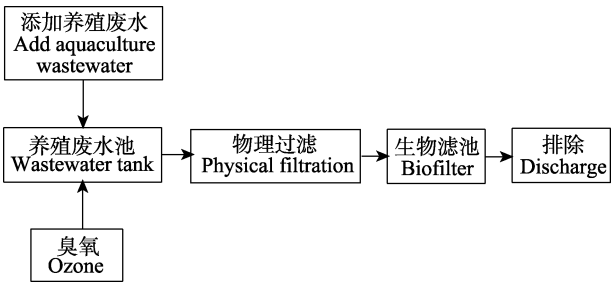

图 1 试验系统工艺流程

Fig.1 Scheme of water treatment in the experimental system

1.2 试验设计

试验中臭氧添加 6 个浓度，ORP 值分别为 300、350、400、450、500 和 550 mV；每个浓度臭氧连续对生物试验滤池及滤料添加处理 7 d，检测生物试验滤池中挂膜滤料对养殖废水处理效能的变化以及生物膜菌群存活率。试验分为 A 和 B 两个组。A 组为试验组，由臭氧发生器向养殖废水池中通入臭氧，保持水中氧化还原电位稳定，经物理过滤后，流入生物滤池。连续进行 7 d 的臭氧注入试验，设计氧化还原电位初始为 300 mV，臭氧注入试验开始后，在 1 h、2 h、4 h、8 h、12 h、24 h、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d、7 d 共 12 个时间点，分别测定进出水口的氨氮和亚硝酸盐氮的含量。取样结束后立即进行测定，若无显著变化，7 d 试验后将氧化还原电位提高 50 mV，更换相同的滤料继续试验，直到水中的氨氮、亚硝酸盐氮含量出现显著变化。B 组为对照组，不通入臭氧，其他条件与 A 组一致。试验过程中，每 6 h 测定一次氧化还原电位，保证氧化还原电位的稳定。试验过程中 B 组的氧化还原电位保持在(221.3±6.8) mV。

1.3 日常管理

试验期间，每 12 h 补充一次新的养殖废水，并保证试验池内氧化还原电位保持在稳定状态。每天监测并记录试验池的 pH、DO、ORP 和水温等水质指标。试验期间保持水温控制在 25–26℃，盐度为 25–26，pH 维持在 7.5–8.0，DO≥8 mg/L。

1.4 参数测定与数据处理

1.4.1 *水质测定方法* 总氨氮采用次溴酸钠氧化比色法，亚硝酸盐氮采用盐酸萘乙二胺分光光度法，所选用的仪器为 7230G 型分光光度计；化学需氧量采用碱性高锰酸钾法；溶解氧、pH、水温、盐度和氧化还原电位等水质数据的测定，使用专业水质分析仪。

1.4.2 *异养菌数量测定* 剪下弹性滤料部分毛刷，称重后，将滤料上的附着物取下，放入 500 ml 灭菌海水中，匀浆，制成细菌原液。异养菌数量测定选取 Zobell 2216E 海水培养基，每个水样涂 5 个平板，28℃恒温，培养 48 h，观察结果。菌落人工计数，细菌总数在 30–300 之间最合适。

1.4.3 *生物滤料细菌存活率* 将 **1.4.2** 中制备细菌原液稀释 100 倍，采用吖啶橙染色直接计数法(许兵等, 1992)，橙色的为活菌，绿色的为死菌，在荧光显微镜下观察计数。

1.5 数据分析

采用 SPSS17.0 统计软件对所采集的数据进行差异显著性分析。计算测定数据平均值、标准差，以

P<0.05 作为差异显著，P<0.01 作为差异极其显著。

2　结果与分析

2.1　同浓度臭氧条件下的水质变化

试验分两组，对照组经滤料处理后的水质稳定，氨氮浓度为(0.32±0.01) mg/L，亚硝酸盐氮浓度为 0.03 mg/L，平均去除率分别为 21.4%、16.7%。氧化还原电位值分别设置为 300、350、400、450、500、550 mV 时的氨氮和亚硝酸盐氮的含量变化趋势见图 2 和图 3。

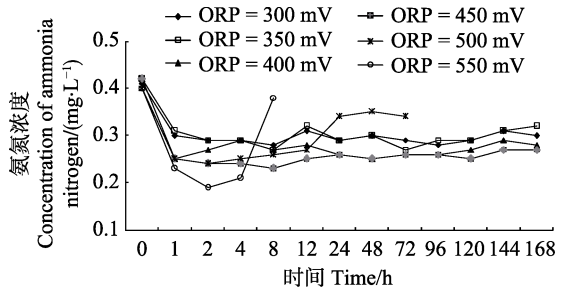

图 2　不同氧化还原电位条件下出水口氨氮浓度

Fig.2　The concentration of ammonia nitrogen in the outlet of filters under different oxidation-reduction potentials

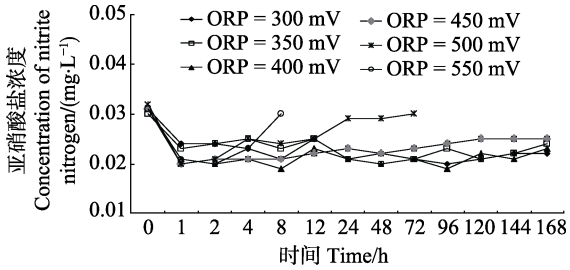

图 3　不同氧化还原电位条件下出水口亚硝酸盐浓度变化

Fig.3　The concentration of nitrite nitrogen in the outlet of filters under different oxidation-reduction potentials

氧化还原电位设定值为 300 mV 时，实际测量的氧化还原电位为(301.4±1.7) mV，进行臭氧处理后，氨氮含量为(0.29±0.01) mg/L，亚硝酸盐氮含量为 0.02 mg/L。未经过生物滤料的养殖废水氨氮、亚硝酸盐氮的含量分别为 0.41、0.03 mg/L。氨氮和亚硝酸盐氮的去除率分别为 28.3%、29.0%。

氧化还原电位设定值为 350 mV 时，实际测量的氧化还原电位为(350.6±1.5) mV，进行臭氧处理后，氨氮含量为(0.30±0.02) mg/L，亚硝酸盐氮含量为 0.02 mg/L。未经过生物滤料处理的养殖废水氨氮、亚硝酸盐氮的含量分别为 0.42、0.03 mg/L。氨氮和亚硝酸盐氮的去除率分别为 29.5%、22.3%。氧化还原电位设定值为 400 mV 时，实际测量氧化还原电位为(401.6±1.1) mV，进行臭氧处理后，氨氮含量为(0.27±0.01) mg/L，亚硝酸盐氮含量为 0.02 mg/L。未经过生物滤料的养殖废水氨氮、亚硝酸盐氮的含量分别为 0.42、0.03 mg/L。氨氮和亚硝酸盐氮的去除率分别为 35.9%、32.6%。

氧化还原电位设定值为 450 mV 时，实际测量的氧化还原电位为(450.6±0.7) mV，进行臭氧处理后，氨氮含量为(0.25±0.01) mg/L，亚硝酸盐氮含量为 0.02 mg/L。未经过生物滤料处理的养殖废水氨氮、亚硝酸盐氮的含量分别为 0.42、0.03 mg/L。氨氮和亚硝酸盐氮的去除率分别为 39.9%、26.8%。

氧化还原电位设定值为 500 mV 时，实际测量的氧化还原电位为(500.6±0.7) mV，经过臭氧处理 24 h 时，氨氮和亚硝酸盐氮含量升高。在处理 1 h–12 h 时，氨氮含量为(0.25±0.01) mg/L，亚硝酸盐氮含量为 0.02 mg/L。未经过生物滤料的养殖废水氨氮、亚硝酸盐氮的含量分别为 0.40、0.03 mg/L。氨氮和亚硝酸盐氮的去除率分别为 36.5%、28.1%。在处理 24–48 h 时，氨氮含量为(0.34±0.01) mg/L，亚硝酸盐氮含量(0.03±0.01) mg/L。氨氮和亚硝酸盐氮的去除率分别为 12.2%、8.4%。

氧化还原电位设定值为 550 mV 时，实际测量的氧化还原电位为(550.0±0.2) mV，经过臭氧处理 4 h 时，氨氮和亚硝酸盐氮含量升高。在处理 1–3 h 时，氨氮含量为(0.21±0.02) mg/L，亚硝酸盐氮含量为 0.02 mg/L。未经过滤料的养殖废水氨氮、亚硝酸盐氮的含量分别为 0.40、0.03 mg/L。氨氮和亚硝酸盐氮的去除率分别为 47.5%、32.1%。在处理 4 h 时，氨氮含量为 0.38 mg/L，亚硝酸盐氮含量为 0.30 mg/L。氨氮和亚硝酸盐氮的去除率分别为 5.0%和 3.3%。

由试验结果可以看出，添加臭氧后，当氧化还原电位由 300 mV 增加至 450 mV 时，氨氮的去除率表现出随着臭氧浓度升高而升高的趋势，最高去除率达 39.9%，亚硝酸盐氮的去除率在 22.3%–32.6%之间波动，氨氮和亚硝酸盐氮的平均去除率分别为 33.4%、28.2%；当氧化还原电位为 500 mV 时，经过臭氧 24 h 处理，氨氮和亚硝酸盐氮的去除率分别由 36.5%、28.1%降到 12.2%、8.4%；氧化还原电位为 550 mV 时，经过臭氧 4 h 处理后，氨氮和亚硝酸盐氮的去除率分别由 47.5%、32.1%降到 5.0%、3.3%。可见，当氧化还原电位小于 450 mV 时，生物膜对养殖水体的处理效果良好，当超过 500 mV 时，生物膜的水处理效果明显下降，在臭氧和硝化细菌共同对养殖水中氨氮和亚硝酸盐氮的去除过程中，当氧化还原电位超过 500 mV 时，氨氮和亚硝酸盐氮去除率却显著下降，说明在臭氧的强氧化性不减的情况下，硝化细菌的去除效能明显减弱。

2.2 不同浓度臭氧处理对生物滤料细菌存活率的影响

利用吖啶橙染色直接计数法测得，滤料上细菌的总平均数为(2.43±0.56)×10^{10} 个/g。对照组细菌存活率开始为 97.9%，试验系统运行 7 d 后成活率为 95.6%。氧化还原电位为 300 mV 时，试验开始前细菌存活率为 98.1%，系统运行 7 d 后为 90.5%。氧化还原电位为 350 mV 时，试验开始前细菌存活率为 98.7%，系统运行 7 d 后为 91.4%。氧化还原电位为 400 mV 时，试验开始前细菌存活率为 98.4%，系统运行 7 d 后为 82.7%。氧化还原电位为 450 mV 时，试验开始前细菌存活率为 99.2%，系统运行 7 d 后为 85.8%。氧化还原电位为 450 mV 时，试验开始前细菌存活率为 97.6%，系统运行 12 h 后为 82.2%，系统运行 24 h 后为 43.2%。氧化还原电位为 550 mV 时，试验开始前细菌存活率为 98.3%，系统运行 3 h 后为 81.8%，系统运行 4 h 后为 31.5%。

对照组在试验开始和结束时滤料细菌成活率差异不显著。实验组在试验结束时，当氧化还原电位为 300–450 mV 时，滤料细菌成活率比试验开始时减少约 10%，可能是臭氧对滤料外层细菌有一定的杀灭作用；当氧化还原电位为 500 mV 时，臭氧处理前 12 h 与 300–450 mV 时的结果基本一致，臭氧处理 24 h 后细菌成活率开始明显下降；当超过 500 mV 时，细菌存活率明显下降。这表明高浓度臭氧添加对硝化细菌造成了严重伤害，硝化细菌数量显著减少，进一步说明了，臭氧浓度增加去除率反而显著下降的原因。

3 讨论

生物膜法是一种以各种滤料为载体，通过微生物形成的生物膜去除养殖水体中化学物质(包括氨氮和亚硝酸盐氮等)的方法(高喜燕等, 2009)。利用生物膜法去除养殖水体中的有害物质，在此条件下生长的生物膜主要由氨氧化细菌、硝化细菌、反硝化细菌、光合细菌、藻类(光照条件下)和原生动物等组成，其中大部分通过细菌的代谢活动被降解(张正等, 2012)。生物膜法对养殖水体中化学物质的去除效果良好，张正等(2012)研究表明，海水循环水养殖系统中生物滤池经快速挂膜，对氨氮、亚硝酸盐和化学需氧量(Chemical Oxygen Demand, COD)的去除率分别为 52.04%、26.82%、62.94%。齐巨龙等(2010)通过研究循环水养殖系统中预培养生物滤膜得出，养殖池排水口的氨氮含量为 0.44 mg/L，进水口的氨氮含量为 0.05 mg/L，一次性平均去除率为 88.64%。李岑鹏等(2009)利用循环水处理系统处理鳗鲡养殖污水，氨氮、亚硝酸盐氮和 COD 的平均去除率分别为 25.2%、52.2%、52.6%。臭氧也可以去除循环水养殖系统水体中的化学物质，宋奔奔等(2011)通过研究臭氧对大菱鲆半封闭循环水养殖系统水质净化作用得出，向低压喷淋式溶氧器添加 0.26 mg/L 的臭氧后，总氨氮去除率约为 18%，亚硝酸盐氮去除率约为 8%。由此可见，生物膜是利用生物去除水中氨氮、亚硝酸盐氮和 COD，臭氧是通过强氧化剂化学减少水中的有害物质。

在本研究中，对照组对氨氮和亚硝酸盐氮的去除率分别为 21.4%、16.7%，细菌存活率为 95.6%。当氧化还原电位在 300–450 mV 范围内时，经过臭氧处理 168 h，氨氮和亚硝酸盐氮的平均去除率分别为 33.4%、28.2%，细菌存活率平均为 88.1%；当氧化还原电位为 500 mV 时，经过臭氧 24 h 处理，氨氮和亚硝酸盐氮的去除率分别由 36.5%、28.1%减少到 12.2%、8.4%，细菌存活率由 82.2%降到 43.2%；当氧化还原电位为 550 mV 时，经过臭氧 4 h 处理后，氨氮和亚硝酸盐氮的去除率分别由 47.5%、32.1%降到 5.0%、3.3%，细菌存活率由 81.8%降到 31.5%。当氧化还原电位小于 450 mV 时，滤料对养殖水体的处理效果良好，细菌存活率稍有下降；在超过 500 mV 时，高浓度的臭氧可对细菌造成巨大伤害，导致水处理效果明显下降。因此，综合考虑封闭循环水系统工艺流程、设备可控性和安全性等因素，以及不同规格和不同品种养殖鱼类对臭氧的适应力或耐受力的差异，建议将封闭循环水系统中养殖池内和生物滤池内的氧化还原电位控制在 400 mV 之内为宜。本研究结果与周游等(2012)在臭氧前后置工艺变化对循环水半滑舌鳎养殖系统水环境的影响试验中，得到的臭氧投加量要控制在 ORP 指标 350 mV 以内的结果非常接近。

参 考 文 献

齐巨龙, 赖铭勇, 谭洪新, 等. 预培养生物膜法在海水循环水养殖系统中的应用效果. 渔业现代化, 2010, 37(2): 14–18

许兵, 徐怀恕. 水生细菌几种计数方法的比较. 青岛海洋大学学报(自然科学版), 1992, 22(3): 43–48

李岑鹏, 关瑞章, 江兴龙, 等. 循环水处理系统处理鳗鲡养殖污水的应用实验. 集美大学学报(自然科学版), 2009, 14(2): 126–130

张正, 王印庚, 曹磊, 等. 海水循环水养殖系统生物膜快速挂膜试验. 农业工程学报, 2012, 28(15): 157–162

宋奔奔, 倪琦, 张宇雷, 等. 臭氧对大菱鲆半封闭循环水养殖系统水质净化研究. 渔业现代化, 2011, 38(6): 11–15

周游, 黄滨, 宋协法, 等. 臭氧前后置工艺变化对循环水半滑舌鳎养殖系统水环境的影响. 渔业现代化, 2012, 39(6): 5–9

高喜燕, 傅松哲, 刘缨, 等. 循环海水养殖中生物滤器生物膜研究现状与分析. 渔业现代化, 2009, 36(3): 16–20

戚翠战, 韩世成, 曹广斌, 等. 鱼类循环水养殖水处理中的臭氧浓度 PID 控制. 渔业现代化, 2014, 41(2): 18–22

Bullock GL, Summerfelt ST, Noble AC, *et al*. Ozonation of a recirculating rainbow trout culture system Ⅱ. Effects on microscreen filtration and water quality. Aquaculture, 1997, 158(1–2): 57–67

Davidson J, Good C, Welsh C, *et al*. The effects of ozone and water exchange rates on water quality and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* performance in replicated water recirculating systems. Aquacult Eng, 2011, 44(3): 80–96

Ghomi MR, Esmaili A, Vossoughi G, *et al*. Comparison of ozone, hydrogen peroxide and removal of infected eggs for prevention of fungal infection in sturgeon hatchery. Fish Sci, 2007, 73(6): 1332–1337

Liltved H, Landfald B. Use of alternative disinfectants, individually and in combination, in aquaculturalwastewater treatment. Aquacult Res, 1995, 26(8): 567–576

Paller MH, Lewis WM. Use of ozone and fluidized-bed biofilters for increased ammonia removal and fish loading rates. Prog Fish Cult, 1988, 50(3): 141–147

Reid B, Arnold CR. Use of ozone for water treatment in recirculating-water raceway system. Prog Fish Cult, 1994, 56(1): 47–50

Rueter J, Johnson R. The use of ozone to improve solids removal during disinfection. Aquacult Eng, 1995, 14(2): 123–141

Summerfelt ST. Ozonation and UV irradiation-an introduction and examples of current applications. Aquacult Eng, 2003, 28(1–2): 21–36

(编辑　马璀艳)

Effects of Ozone Concentration on the Activity of Biofilm and Its Effectiveness of Purification in Recirculating Aquaculture Systems

HUANG Bin[1①], MA Teng[2], LIU Baoliang[1], LIU Bin[1], HONG Lei[1], LIANG You[1], ZHAI Jieming[3], ZHANG Lili[4]

(1. *Key Laboratory for Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao* 266071; 2. *Fishery College, Ocean University of China, Qingdao* 266003; 3. *Laizhou Mingbo Aquatic Co. Ltd., Yantai* 264000; 4. *Lianyungang Zhongli Aquaculture Co. Ltd., Lianyungang* 222000)

Abstract　Ozone (O_3) is a strong oxidizing agent that has been widely used in factory recirculating aquaculture systems. The proper concentration is a key to the utilization of ozone. Ozone at inappropriately high concentration could impair the growth, behavior, and health of farmed fish. Furthermore, ozone at high concentration also affects the biofilm in the biofilter, which could reduce the efficiency of water treatment in the recirculating aquaculture systems (RAS). In this study, ozone was added in RAS at different concentrations, and the subsequent effects on the activity and purification effectiveness of biofilm were tested. It was shown that when the Oxidation-Reduction Potential (ORP) was lower than 450 mV, the efficiency of ammonia nitrogen treatment was increased along with the elevation in ozone concentration. Under this condition the highest removal rates of ammonia nitrogen and nitrite nitrogen reached 39.9% and 28.2% respectively, and the survival rate of bacteria in the biofilm was 88.1%. This suggested that ozone did not affect the efficiency of the biofilter as ORP was below 450 mV. When ORP was 500 mV, after 24-hour treatment with ozone the removal efficiency was decreased from 36.5% to 12.2% for ammonia nitrogen, and from 28.1% to 8.4% for nitrite nitrogen. When ORP was 550 mV, 4-hour ozone treatment reduced the efficiency from 47.5% to 5.0% for ammonia nitrogen, and from 32.1% to 3.3% for nitrite nitrogen. This implied that higher ORP significantly reduced the efficiency of water treatment. The survival rate of bacteria in the biofilm dropped from 88.1% to 31.5%. Our study indicated that the effectiveness of water treatment and the survival rate of bacteria could be greatly affected by ozone. To ensure the safety and cost efficiency of RAS, we recommended that the concentration of ozone added in RAS should be controlled to keep ORP in the biofilter under 400 mV.

Key words　Ozone; Recirculating aquaculture systems; Biofilm; Purification efficiency

① Corresponding author: HUANG Bin, E-mail: huangbin@ysfri.ac.cn

DOI: 10.11758/yykxjz.20150609002 http://www.yykxjz.cn/

鲜饵不同投饵率对 2–5 龄大鲵 (*Andrias davidianus*)生长的影响*

李 欣[1] 张树明[2] 卞秋云[2] 王 震[2] 陈宇珺[3] 梁 刚[1①]

(1. 陕西师范大学生命科学学院 西安 710119;
2. 陕西省水产工作总站 渭南 714000; 3. 陕西龙泉大鲵养殖有限公司 宁陕 711600)

摘要 为探寻大鲵(*Andrias davidianus*)的适宜投饵率，在水温为 18–19℃、pH 为 8.0 和溶氧为 6.0 mg/L 的工厂化养殖条件下，用鲜饵分别投喂了 2、3、4 和 5 龄大鲵各 60 d。比较了各实验组体重增加量、全长增加量、饵料系数、平均增重率、特定生长率和饵料转化率等生长指标。结果显示，2 龄大鲵的投饵率为 2.0%时，其饵料系数均显著低于投饵率为 1.7%、2.6%、2.9%的组，其平均增重率和饵料转化率均显著高于投饵率为 1.7%、2.3%、2.6%、2.9%的组，其特定生长率均显著高于投饵率为 1.7%、2.6%的组(P<0.05)；3 龄大鲵的投饵率为 2.2%时，其饵料系数均显著低于投饵率为 1.9%、2.5%、2.8%的组，其平均增重率和特定生长率均显著高于投饵率为 1.6%、1.9%、2.5%、2.8%的组，其饵料转化率均显著高于投饵率为 2.5%、2.8%的组(P<0.05)；4 龄大鲵的投饵率为 2.3%时，其饵料系数均显著低于投饵率为 1.7%、2.0%、2.9%的组，其平均增重率和特定生长率均显著高于投饵率为 1.7%、2.0%、2.9%的组，其饵料转化率均显著高于投饵率为 1.7%、2.9%的组(P<0.05)；5 龄大鲵的投饵率为 2.5%时，其饵料系数显著低于投饵率为 1.9%的组，其平均增重率和特定生长率均显著高于投饵率为 1.9%、2.2%、2.8%、3.1%的组，其饵料转化率均显著高于投饵率为 2.2%、2.8%、3.1%的组(P<0.05)。为使大鲵的饵料系数较低，平均增重率、特定生长率和饵料转化率较高，研究表明，2、3、4 和 5 龄大鲵的适宜投饵率分别为 2.0%、2.2%、2.3%、2.5%；随着大鲵年龄的增加，适宜投饵率呈逐渐增加的变化规律，关系式为 y=0.000212x+2.07 (r^2=0.8797)。

关键词 大鲵；鲜饵；投饵率；生长

中图分类号 S966.6 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)03-0148-06

大鲵(*Andrias davidianus*)隶属于两栖纲、有尾目、隐鳃鲵科，是我国特有的有尾两栖类，也是全球现存个体最大的两栖动物，国家Ⅱ类重点保护野生动物(费梁等, 2006)。由于大鲵具有较高的经济价值(金桥等, 2012)，自 20 世纪 90 年代起，我国科研人员开展大鲵人工繁殖研究并获得了突破，先后形成了大鲵全人工繁育(Captive Breeding)、原生态繁育(Natural Eco-breeding)与仿生态繁育(Imitated Natural Eco-breeding) 3 种技术模式(梁刚, 2007)，使大鲵人工种群数量迅速增加。大鲵养殖作为新兴特种水产养殖业已初具规模，并逐渐向规模化和集约化发展(王芳等, 2013)。但大鲵养殖业目前存在着诸如经济效益、养殖规范、疾病防治和健康养殖等一系列技术与理论问题(牟洪民等, 2011)。投饵率与水产动物的种类、数量、大小、食欲、环境及饵料质量等有关，因为投饵率过低会导致养殖动物生长参差不齐，投饵率过高会造成饵料浪费，增加养殖成本，并对养殖环境造成污染。因此，对不同养殖对象务必探寻其适宜的投饵率(楼宝

* 农业部 2013 年农业技术服务创新项目(农财发[2013]111 号)资助。李 欣，E-mail: lixin9578@sina.com
① 通讯作者：梁 刚，副教授，E-mail: lianggang@snnu.edu.cn
收稿日期: 2015-06-09, 收修改稿日期: 2015-08-23

等, 2007)。目前, 国内外学者已对黑鲷(*Sparus macrocephalus*)、白鲟(*Psephurus gladius*)、鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)、施氏鲟(*Acipenser schrenckii*)、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)、花鳗鲡(*Anguilla marmorata*)、暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)、细鳞鲑(*Brachymystax lenok*)、许氏平鲉(*Sebastes schlegeli*)等鱼类的投饵率进行了研究(楼宝等, 2007; Deng *et al*, 2003; 朱秋华等, 2004; 赵吉伟等, 2004; 王吉桥等, 2005; 邓伟霞等, 2011; 杨城等, 2012; 徐革锋等, 2013; Mizanur *et al*, 2014), 但迄今为止, 未见对包括大鲵在内的经济两栖动物适宜投饵率的相关研究报道。为探讨不同投饵率对不同年龄大鲵生长的影响, 确定适宜投饵率, 依据王芳等(2013)以及李欣等(2015)的实验结果, 在工厂化养殖条件下, 使用鲜饵开展了该项实验, 旨在探寻不同年龄大鲵工厂化养殖的适宜投饵率, 为大鲵养殖生产中饵料的合理投喂提供理论依据。

1　材料与方法

实验在陕西龙泉大鲵养殖有限公司合阳大鲵养殖基地进行, 地理坐标为 35°05′27″N、110°17′36″E, 海拔为(348±7) m。依据在工厂化养殖条件下 2、3、4、5 龄大鲵的适宜养殖密度分别为 27、17、10、5 尾/m^2 (王芳等, 2013)及该基地养殖池大小, 分别选择健康活跃的 2、3、4、5 龄大鲵各 540、345、210、105 尾, 单尾体重分别为(50.16±6.72) g、(165.04±33.91) g、(1134.91±171.23) g 和(2015.32±210.51) g。将选取的大鲵分别放入已消毒的养殖池内, 预实验 7 d, 以确定 2–5 龄大鲵的饱和投饵率。以已确定的饱和投饵率为中值, 分别设置 2–5 龄大鲵的投饵率梯度各 5 个。将各龄大鲵平均分为 5 个投饵率梯度组, 每个投饵率组设置 3 个重复。

正式实验时间为 2014 年 5 月 25 日–7 月 24 日, 共 60 d。实验前、后分别称量各组大鲵的体重与全长。将体长为 3–5 cm 的鲤鱼苗, 用 1%的食盐水消毒, 然后放入饵料池中暂养。在投喂前 30 min 将鲤鱼苗捞出, 暴露在空气中使其自然死亡作为鲜饵, 实验全部使用鲜饵。4 龄、5 龄大鲵投喂长约 5 cm 的鲜饵, 3 龄大鲵投喂长约 3 cm 的鲜饵, 2 龄大鲵投喂加工成长约 1 cm 的鲤鱼肉丝。每天 18:00 投饵, 次日 08:00 捞出残饵, 分别记录每日各组的投饵量与残饵量。实验用水为抽取的地下水, pH 8.0、水温为 18–19℃、溶氧为 6.0 mg/L。2 龄、3 龄大鲵的养殖水深均为 5 cm, 4 龄、5 龄大鲵的养殖水深均为 9 cm。在实验过程中, 若出现死亡、病变的大鲵个体, 立即捞出并用相同规格的大鲵代替, 以保持养殖密度不变。

实验数据采用 Excel 和 SPSS20.0 分析软件处理并进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 所有数据均采用样本平均值±标准差(Mean±SD)表示。各参数的计算公式如下:

体重增加量(Weight gain, g)=$W_2 - W_1$;

全长增加量(Total length increment, cm)=$L_2 - L_1$;

饵料系数(Feed coefficient)=$(F_1 - F_2)/(W_2 - W_1)$;

平均增重率(Weight gain rate, %)=$[(W_2 - W_1)/W_1]/n\times100\%$;

特定生长率(Specific growth rate, %/d)=$(\ln W_2 - \ln W_1)/t\times100\%$;

饵料转化率(Feed conversion ratio, %)=$(W_2 - W_1)/(F_1 - F_2)\times100\%$。

式中, W_1 为实验前大鲵的总重、W_2 为实验后大鲵的总重, L_1 为实验前大鲵的全长、L_2 为实验后大鲵全长, n 为各组大鲵的样本数, F_1 为总投饵量、F_2 为总残饵量, t 为实验总天数。

2　结果与分析

2.1　鲜饵不同投饵率对 2–5 龄大鲵生长的影响

在工厂化养殖条件下, 2、3、4、5 龄大鲵的饱和投饵率分别为 2.3%、2.2%、2.3%和 2.5%, 2–5 龄大鲵的投饵率、实验前、后的体重与全长等数据见表 1。表 2 列出并比较了在鲜饵不同投饵率时, 2–5 龄大鲵的体重增加量、全长增加量、饵料系数、平均增重率、特定生长率和饵料转化率等 6 个参数。

图 1-A 分别比较了在鲜饵不同投饵率时, 2 龄大鲵的饵料系数、平均增重率、特定生长率和饵料转化率等参数。从图 1-A 与表 2 可以看出, 在 5 个投饵率梯度中, 2 龄大鲵的饵料系数呈先减后增的趋势, 其中, 投饵率为 2.0%时的饵料系数最低, 且投饵率为 2.0%时的饵料系数均与投饵率为 1.7%、2.6%、2.9%时的饵料系数差异显著($P<0.05$)。在 5 个投饵率梯度中, 2 龄大鲵的平均增重率、特定生长率与饵料转化率均呈先增后减再增的趋势, 三者均以投饵率为 2.0%时的最高, 且投饵率为 2.0%时的平均增重率和饵料转化率均与投饵率为 1.7%、2.3%、2.6%、2.9%时的值差异显著($P<0.05$), 投饵率为 2.0%时的特定生长率均与 1.7%、2.6%时的值存在显著差异($P<0.05$)。基于以上分析, 在工厂化养殖条件下, 2 龄大鲵的适宜投饵率为 2.0%。

在鲜饵不同投饵率条件下, 3 龄大鲵的饵料系数、平均增重率、特定生长率和饵料转化率等比较结果见图 1-B。从图 1-B 与表 2 可以看出, 在 5 个投饵率梯

表 1 鲜饵不同投饵率时 2–5 龄大鲵实验前、后的体重与全长

Tab.1 The change of weight and total length of the 2 to 5-year-old *A. davidianus* after feeding with different amount of fresh diet

年龄 Age	分组 Group	投饵率 Feeding rate (%)	体重 Weight (g)		全长 Total length (cm)	
			实验前 Before the test	实验后 After the test	实验前 Before the test	实验后 After the test
2 龄	2-1	1.7	48.90±7.97	60.72±24.13	22.71±1.03	23.71±2.81
	2-2	2.0	49.41±8.43	76.90±28.12	22.50±0.98	23.70±2.84
	2-3	2.3	51.60±6.72	74.44±25.82	22.32±1.51	23.84±3.35
	2-4	2.6	52.75±7.49	70.44±30.24	22.04±1.15	22.83±3.05
	2-5	2.9	48.10±7.96	67.50±29.64	23.20±1.14	25.20±2.94
3 龄	3-1	1.6	158.00±67.90	242.54±80.11	35.21±3.61	36.52±3.76
	3-2	1.9	167.64±36.80	261.80±76.81	32.90±3.53	35.51±3.53
	3-3	2.2	160.09±31.00	278.57±72.23	29.72±1.21	33.52±4.37
	3-4	2.5	172.71±75.80	283.44±88.92	30.23±3.51	32.40±3.16
	3-5	2.8	166.71±49.70	265.22±95.91	35.68±3.70	38.03±4.01
4 龄	4-1	1.7	1193.50±79.40	1396.40±300.51	54.72±4.87	55.04±4.46
	4-2	2.0	1087.85±105.40	1346.44±388.73	55.73±4.01	57.30±2.52
	4-3	2.3	1079.64±98.30	1414.33±355.84	55.72±5.24	58.00±4.10
	4-4	2.6	1112.04±123.20	1450.44±311.44	56.71±4.77	59.31±4.54
	4-5	2.9	1201.63±79.50	1460.71±310.91	58.70±4.93	60.34±4.19
5 龄	5-1	1.9	2113.85±448.00	2494.34±471.92	63.32±5.07	63.70±3.63
	5-2	2.2	1927.74±286.10	2294.25±330.84	63.71±7.37	68.69±1.53
	5-3	2.5	1998.34±335.50	2473.10±364.93	65.34±5.64	68.71±1.97
	5-4	2.8	2088.34±267.50	2350.10±290.32	65.00±4.87	70.04±3.12
	5-5	3.1	1948.10±260.90	2205.61±346.01	63.32±4.69	69.70±3.76

表 2 鲜饵不同投饵率对 2–5 龄大鲵生长的影响

Tab.2 Effects of fresh dead carp feeding rate on growth of the 2 to 5-year-old *A. davidianus*

年龄 Age	分组 Group	体重增加量 Weight gain (g)	全长增加量 Total length increment (cm)	饵料系数 Feed coefficient	平均增重率 Weight gain rate (%)	特定生长率 Specific growth rate (%/d)	饵料转化率 Feed conversion ratio (%)
2 龄	2-1	11.82±5.30^{a}	1.00±2.11^{a}	1.54±0.32^{a}	24.17±3.01^{a}	0.36±0.01^{a}	23.66±3.23^{a}
	2-2	27.49±9.14^{b}	1.20±1.02^{ab}	1.13±0.48^{b}	55.64±7.84^{b}	0.74±0.04^{b}	46.39±6.80^{b}
	2-3	22.84±7.19^{b}	1.52±1.65^{b}	1.19±0.43^{b}	44.26±5.05^{c}	0.61±0.06^{b}	32.02±5.66^{c}
	2-4	17.69±8.42^{c}	0.79±1.45^{a}	1.63±0.26^{c}	33.54±7.20^{c}	0.48±0.02^{c}	21.37±3.05^{a}
	2-5	19.40±7.02^{c}	2.00±1.50^{c}	1.68±0.39^{c}	40.33±7.85^{c}	0.56±0.05^{b}	23.18±4.95^{a}
3 龄	3-1	84.54±17.44^{a}	1.31±0.73^{a}	1.65±0.45^{a}	53.51±5.10^{a}	0.71±0.02^{a}	55.71±8.23^{a}
	3-2	94.16±18.21^{b}	2.61±1.71^{b}	1.91±0.03^{b}	56.17±4.32^{a}	0.74±0.07^{a}	49.30±5.58^{a}
	3-3	118.48±26.89^{c}	3.80±2.10^{c}	1.52±0.25^{a}	74.01±7.11^{b}	0.92±0.04^{b}	56.11±7.66^{a}
	3-4	110.73±31.23^{b}	2.17±1.08^{b}	2.03±0.42^{b}	64.11±9.01^{a}	0.82±0.12^{c}	42.58±4.55^{b}
	3-5	98.51±29.01^{b}	2.35±1.05^{b}	2.21±0.30^{b}	59.09±3.50^{a}	0.77±0.09^{a}	35.17±5.43^{c}
4 龄	4-1	202.90±75.40^{a}	0.32±1.02^{a}	4.30±1.22^{a}	17.00±3.31^{a}	0.26±0.04^{a}	16.67±3.23^{a}
	4-2	258.59±90.10^{b}	1.57±0.94^{b}	3.94±0.26^{b}	23.77±2.32^{b}	0.36±0.07^{b}	19.80±3.84^{ab}
	4-3	334.69±125.55^{c}	2.28±1,25^{c}	2.54±0.75^{c}	31.00±4.19^{c}	0.45±0.08^{c}	22.45±5.71^{b}
	4-4	338.40±94.71^{c}	2.60±1.57^{c}	2.79±0.12^{c}	30.43±3.47^{c}	0.44±0.11^{c}	19.51±5.65^{ab}
	4-5	259.08±99.48^{b}	1.64±1.05^{b}	4.60±0.05^{a}	21.56±6.34^{b}	0.33±0.03^{b}	12.39±2.15^{c}
	5-1	380.49±158.10^{a}	0.38±1.32^{a}	4.23±0.14^{a}	18.00±4.23^{a}	0.28±0.01^{a}	15.79±7.23^{a}
	5-2	366.51±104.70^{a}	4.98±2.04^{b}	2.25±0.32^{c}	19.01±6.31^{a}	0.29±0.08^{a}	14.41±5.45^{b}
5 龄	5-3	474.76±138.41^{b}	3.37±2.53^{b}	3.78±0.20^{b}	23.76±7.22^{b}	0.36±0.04^{b}	15.84±8.05^{a}
	5-4	261.76±108.11^{c}	5.04±2.37^{b}	2.62±0.18^{c}	12.53±2.67^{c}	0.20±0.03^{c}	7.46±4.40^{c}
	5-5	257.51±158.96^{c}	6.38±3.05^{b}	3.70±0.31^{b}	13.22±2.06^{c}	0.20±0.08^{c}	7.11±3.03^{c}

注：同列数据上标不同字母表示差异显著(P<0.05)

Note: Data within each column with different superscripts are significantly different (P<0.05)

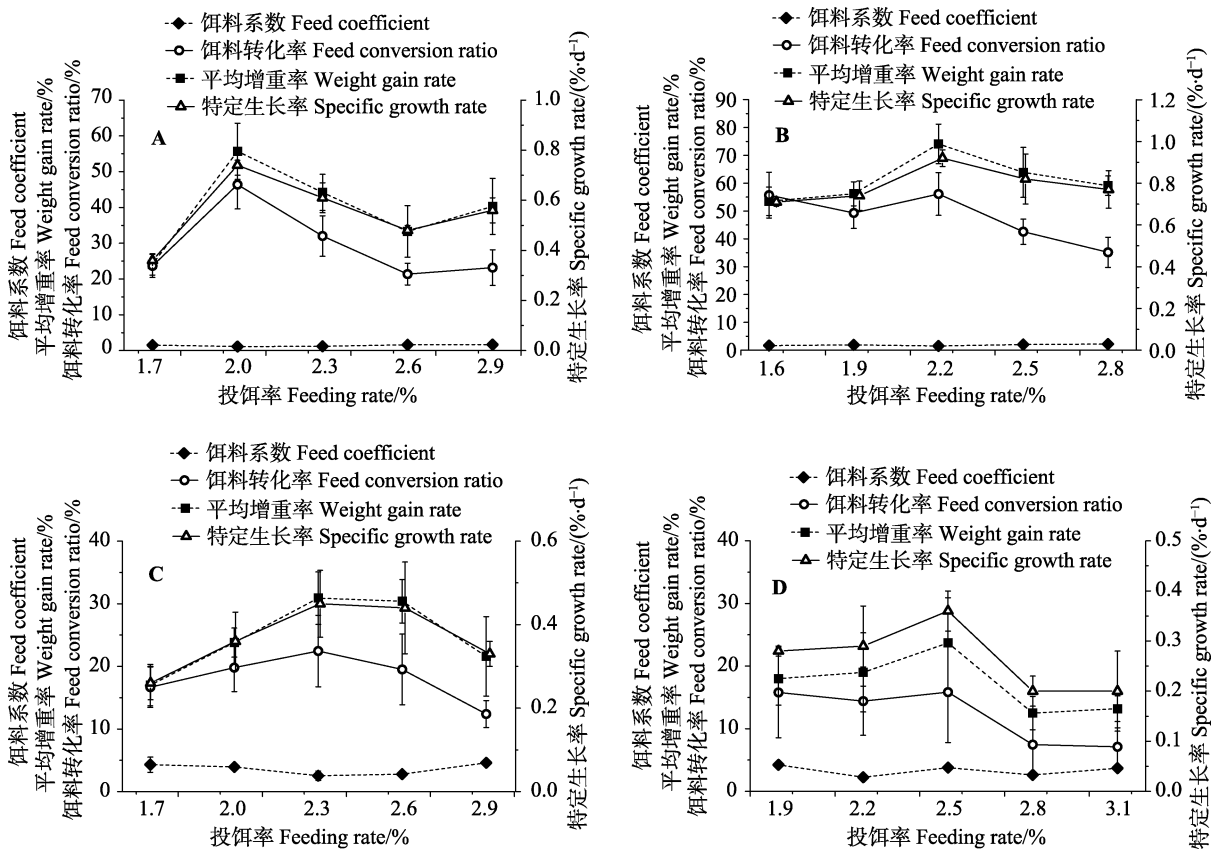

图 1　2–5 龄大鲵鲜饵不同投饵率对其生长的影响

Fig.1　Effects of fresh diet feeding rate on growth of 2 to 5-year-old *A. davidianus*

A: 2 龄大鲵; B: 3 龄大鲵; C: 4 龄大鲵; D: 5 龄大鲵

A: 2-year-old *A. davidianus*; B: 3-year-old *A. davidianus*; C: 4-year-old *A. davidianus*; D: 5-year-old *A. davidianus*

度中，3 龄大鲵的饵料系数整体变化较小，其中，投饵率为 2.2%时的饵料系数最低，且投饵率为 2.2%时的饵料系数均与投饵率为 1.9%、2.5%、2.8%时的值差异显著(P<0.05)。在 5 个投饵率梯度中，3 龄大鲵的平均增重率、特定生长率与饵料转化率基本上均呈先增后减的趋势，其中均以投饵率为 2.2%时的值最高，且投饵率为 2.2%时的平均增重率和特定生长率均与投饵率为 1.6%、1.9%、2.5%、2.8%时的值差异显著(P<0.05)，投饵率为 2.2%时的饵料转化率与投饵率为 2.5%、2.8%时的值存在显著差异(P<0.05)。从此可知，在工厂化养殖条件下，3 龄大鲵的适宜投饵率为 2.2%。

图 1-C 分别比较了在鲜饵不同投饵率时，4 龄大鲵的饵料系数、平均增重率、特定生长率和饵料转化率等参数。从图 1-C 与表 2 可以看出，在 5 个投饵率梯度中，4 龄大鲵的饵料系数呈先减后增的趋势，其中，以投饵率为 2.3%时的饵料系数最低，且投饵率为 2.3%的饵料系数均与投饵率为 1.7%、2.0%、2.9%时的值差异显著(P<0.05)。在 5 个投饵率梯度中，4 龄大鲵的平均增重率、特定生长率与饵料转化率均呈先增后减的趋势，以投饵率为 2.3%时的值最高，且投饵率为 2.3%时的平均增重率和特定生长率均与投饵率为 1.7%、2.0%、2.9%时的值差异显著(P<0.05)，投饵率为 2.3%时的饵料转化率均与投饵率为 1.7%、2.9%时的值存在显著差异(P<0.05)。基于以上分析，在工厂化养殖条件下，4 龄大鲵的适宜投饵率应为 2.3%。

在鲜饵不同投饵率条件下，5 龄大鲵的饵料系数、平均增重率、特定生长率和饵料转化率的比较结果见图 1-D。从图 1-D 与表 2 可知，在 5 个投饵率梯度中，5 龄大鲵的饵料系数整体变化较小，饵料系数从高到低依次是投饵率为 1.9%、2.5%、3.1%、2.8%、2.2%，且投饵率为 2.5%时的饵料系数与投饵率为 1.9%时的值差异显著(P<0.05)。在 5 个投饵率梯度中，5 龄大鲵的平均增重率、特定生长率与饵料转化率都呈先增后减的趋势，其中以投饵率为 2.5%时的值最高，且投饵率为 2.5%的平均增重率和特定生长率均与投饵率为 1.9%、2.2%、2.8%、3.1%时的值差异显著(P<0.05)，投饵率为 2.5%时的饵料转化率均与投饵率为 2.2%、2.8%、3.1%时的值存在显著差异(P<0.05)。

综合考虑以上参数变化趋势，本研究表明，5 龄大鲵较适宜的投饵率应为 2.5%。

2.2 大鲵鲜饵适宜投饵率与体重的相关性

对 2–5 龄大鲵的鲜饵适宜投饵率与体重之间进行了回归分析，结果显示，大鲵的鲜饵适宜投饵率与体重之间存在显著的正相关性(图 2)，其关系式为 y=0.000212x+2.07 (r^2=0.8797)。由图 2 可以看出，随着大鲵体重的增加，鲜饵适宜投饵率会逐渐增加，这可能与大鲵的摄食、消化及吸收能力同时逐渐增强有关。

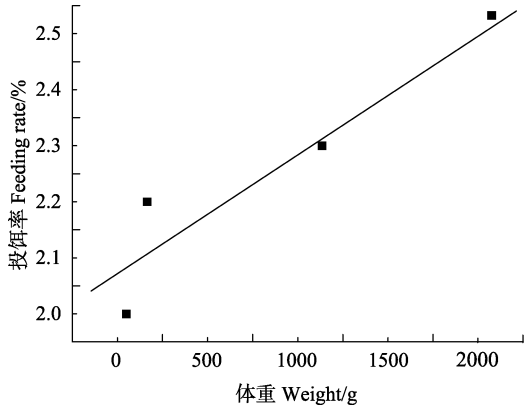

图 2 大鲵鲜饵适宜投饵率与体重的相关性

Fig.2 Correlation between the suitable fresh diet feeding rate and the weight of *A. davidianus*

3 讨论

迄今为止，有关适宜投饵率的研究主要集中在鱼类，而对于包括大鲵在内的经济两栖动物适宜投饵率的研究仍为空白。研究表明，鱼类的摄食率与水温、养殖密度和饲料蛋白质含量等均有密切关系(朱秋华等, 2004)；陈云祥等(2006)指出，大鲵的摄食量随着体重的增加逐渐增加。本研究结果显示，在大鲵的养殖水温、密度与饵料等养殖条件基本相同时，2、3、4、5 龄大鲵的适宜投饵率分别是 2.0%、2.2%、2.3%、2.5%。从以上结果可进一步得出，随着大鲵年龄的增加，适宜投饵率基本上呈现逐渐增加的规律性变化。

此外，鲜饵不同投饵率对 2–5 龄大鲵的体重增加量、全长增加量、饵料系数、平均增重率、特定生长率和饵料转化率均有显著影响，且随着投饵率由低到高，体重增加量、全长增加量、平均增重率、特定生长率和饵料转化率均呈先升高后下降的趋势，饵料系数呈先下降后升高的趋势。本实验结果与黑鲷、白鲟、鲈鱼、施氏鲟幼鱼、黄颡鱼、花鳗鲡、暗纹东方鲀幼鱼、细鳞鲑等的研究结果基本一致(楼宝等, 2007; Deng *et al*, 2003; 朱秋华等, 2004; 赵吉伟等, 2004; 王吉桥等, 2005; 邓伟霞等, 2011; 杨城等, 2012; 徐革锋等, 2013)。基于以上研究结果，作者认为在人工养殖条件下，不同投饵率对无羊膜水生脊椎动物生长的影响可能具有基本一致的规律。

若投饵率低于适宜投饵率，会使大鲵不能发挥其生长潜能，影响大鲵的正常生长和发育。原因可能主要有两个方面：一是由于食物不足，摄取的能量与营养将更多用于维持大鲵的基础代谢，用于生长发育的能量与营养相对较少甚至缺乏，从而限制了大鲵自身的生长潜能；二是由于食物不足，会引起大鲵个体之间的捕食竞争，导致大鲵机体损伤甚至相互残食(费梁等, 2006)，这样会使大鲵的活动量加大，能量消耗相对增加，用于大鲵生长发育的能量与营养相对减少。

如果投饵率大于适宜投饵率，虽然在一定程度上减少了大鲵个体之间的捕食竞争，满足了大鲵生长和发育的基本食物需求，但从大鲵养殖业的经济效益与生态效益考虑，产生的残饵至少具有如下两个明显缺陷：首先，残饵不仅使养殖成本明显增加，使大鲵养殖经济效益下降，且造成了不必要的资源浪费；其次，残饵长时间浸泡在水中，会逐渐发酵甚至腐败，使养殖水体富营养化，不仅给大鲵养殖池中的病菌滋生创造了良好的环境条件，增加了大鲵的患病率，甚至引起大鲵死亡，而且富营养化的养殖用水排放后，在也会对周围的水环境造成一定程度的污染。

参 考 文 献

王吉桥, 王凯, 王声权, 等. 不同投饲率对黄颡鱼幼鱼生长和存活的影响. 水产学杂志, 2005, 18(2): 1–5

王芳, 刘小召, 冯骞, 等. 工厂化养殖条件下大鲵适宜养殖密度的研究. 淡水渔业, 2013, 43(6): 73–77

邓伟霞, 袁重桂, 阮成旭, 等. 不同投饵率对花鳗鲡黑仔苗生长的影响. 福建水产, 2011, 33(2): 50–52

朱秋华, 钱国英, 许梓荣. 投饲率对鲈鱼生长和体成分的影响. 浙江农业学报, 2004, 16(6): 384–388

牟洪民, 李媛, 姚俊杰, 等. 大鲵生物学研究的新进展. 水产科学, 2011, 30(8): 513–516

李欣, 孙增民, 王明文, 等. 活饵与鲜饵对 3–5 龄大鲵生长的影响. 中国水产, 2015(7): 85–88

杨城, 袁重桂, 阮成旭, 等. 不同投饵率对暗纹东方鲀幼鱼生长的影响. 福建水产, 2012, 34(2): 160–162

陈云祥, 阳爱生, 王伟军, 等. 温度和体重对大鲵摄食的影响. 水利渔业, 2006, 26(5): 32–47

金桥, 成芳, 曲敏, 等. 大鲵的开发研究现状. 广州化工, 2012, 40(2): 9–10, 35

赵吉伟, 邱岭泉, 杨雨辉, 等. 不同投饵率对施氏鲟幼鱼生长及体成分的影响. 中国水产科学, 2004, 11(4): 375–378

费梁, 胡淑琴, 叶昌媛, 等. 中国动物志 两栖纲(上卷)总论 蚓螈目 有尾目. 北京: 科学出版社, 2006: 243–249
徐革锋, 刘洋, 李永发, 等. 不同投喂率对细鳞鲑(*Brachymystax lenok*)幼鱼生长及体成分的影响. 海洋与湖沼, 2013, 44(2): 433–437
梁刚. 陕西省大鲵的繁育模式及初步评价. 经济动物学报, 2007, 11(4): 234–237
楼宝, 毛国民, 骆季安, 等. 不同投饵率对黑鲷生长及体生化成分的影响. 上海水产大学学报, 2007, 16(3): 230–235
Deng DF, Koshio S, Yokoyama S, *et al*. Effects of feeding rate on growth performance of white sturgeon. Aquaculture, 2003, 217(1): 589–598
Mizanur RM, Park G, Yun H, *et al*. The effects of feeding rates in juvenile Korean rockfish, (*Sebastes schlegeli*) reared at 17℃ and 20℃ water temperatures. Aquacult Int, 2014, 22(3): 1121–1130

(编辑　马璀艳)

Effects of Frequency of Feeding with Fresh Diet on the Growth of the 2 to 5-year-old *Andrias davidianus*

LI Xin[1], ZHANG Shuming[2], BIAN Qiuyun[2], WANG Zhen[2], CHEN Yujun[3], LIANG Gang[1①]

(1. *College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an*　710119; 2. *Shaanxi Province Fisheries Working Station, Weinan*,　714000; 3. *Shaanxi Longquan Giant Salamander Breeding Co. Ltd, Ningshan*,　711600)

Abstract　In this study we aimed to explore the influence of feeding rate on the growth of the Chinese giant salamander *Andrias davidianus* under certain conditions in industrial aquaculture such as water temperature 18–19℃, pH 8.0 and dissolved oxygen 6.0 mg/L. Chinese giant salamander aged 2, 3, 4 and 5-year-old were fed with fresh dead carp at five different rates, and the corresponding growth rates were recorded during 60 days. We compared a variety of growth traits between different groups including the weight gain, the total length increment, the feed coefficient, the weight gain rate, the specific growth rate and the food conversion rate. Two-year-old Chinese giant salamander with feeding rate 2.0% had a significantly lower feed coefficient but higher weight gain rate and food conversion rate than those fed at 1.7%, 2.3%, 2.6%, and 2.9%. Moreover, its specific growth rate was also higher than that of groups fed at 1.7% and 2.6% (P<0.05). Three-year-old Chinese giant salamander with feeding rate 2.2% had a significantly lower feed coefficient than those fed at 1.9%, 2.5%, 2.8%, but higher weight gain rate and specific growth rate than those fed at 1.6%, 1.9%, 2.5% and 2.8%. Their food conversion rate was significantly higher than those fed at 2.5% and 2.8% (P<0.05). Four-year-old Chinese giant salamander with feeding rate 2.3% had a significantly lower feed coefficient but higher weight gain rate and specific growth rate compared to those fed at 1.7%, 2.0% and 2.9%, and its the food conversion rate were significantly higher than those fed at 1.7% and 2.9% (P<0.05). Five-year-old Chinese giant salamander fed at 2.5% had a significantly lower feed coefficient than those fed at 1.9%, higher weight gain rate and specific growth rate than those fed at 1.9%, 2.2%, 2.8% and 3.1%, and higher food conversion rate than those fed at 2.2%, 2.8% and 3.1% (P<0.05). In order to reduce the feed coefficient and to raise the weight gain rate, specific growth rate and food conversion rate, we recommended that the appropriate feeding rates should be 2.0%, 2.2%, 2.3% and 2.5% for 2, 3, 4 and 5-year-old Chinese giant salamander respectively. The optimal feeding rate appeared to increase along with growing age, which conformed to equation y=0.000212x+2.07 (r^2=0.8797).

Key words　*Andrias davidianus*; Fresh diet; Feeding rate; Growth

① Corresponding author: LIANG Gang, E-mail: lianggang@snnu.edu.cn

DOI: 10.11758/yykxjz.20150430003 http://www.yykxjz.cn/

产木聚糖酶菌株 YS1069 的产酶条件优化*

董延娟[1,2] 郝建华[1] 郑鸿飞[1] 孙 谧[1①]

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市海洋酶工程重点实验室 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 为获得较高的木聚糖酶产量，采用单因素实验和响应面实验方法，筛选氮源、碳源、无机盐、接种量、装液量、Na_2CO_3、发酵温度、发酵时间多个单因素，对产木聚糖酶的芽孢杆菌 YS1069 的发酵培养基和发酵条件进行了优化。结果显示，豆饼粉 25 g/L、麸皮 40 g/L、$NaNO_3$ 0.9 g/L、K_2HPO_4 3 g/L、$MgSO_4·7H_2O$ 0.6 g/L、接种量 4%、装液量 30 ml/250 ml(*v*/*v*)、Na_2CO_3 添加量 18 g/L、培养温度 30℃、培养时间 96 h 时，酶活性达到最高。再通过 Plackett-Burman 设计对影响木聚糖酶产量的 8 个主要因素进行评价，确定 Na_2CO_3 浓度、麸皮浓度和 $MgSO_4·7H_2O$ 浓度是影响产酶量的 3 个主要因素。利用中心组合设计及 Design-Expert 8.05 软件分析，获得了主要因素的最优条件，即 Na_2CO_3 浓度 21.86 g/L、麸皮浓度 51.41 g/L、$MgSO_4·7H_2O$ 浓度 0.59 g/L，实验最终酶活性比发酵优化前提高了 5 倍。

关键词 芽孢杆菌; 木聚糖酶; 响应面; 发酵条件; 优化

中图分类号 S932 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)03-0154-06

木聚糖是植物半纤维素的主要成分，其含量仅次于纤维素，是自然界中最为丰富的可再生资源之一(单志琼等, 2012)。木聚糖的主链由 D-木糖以 β-l,4-糖苷键连接而成(余英鹏等, 2014)，内切-β-l,4-木聚糖酶作用于木聚糖主链，可以将其水解为低聚木糖(Beg *et al*, 2001)。低聚木糖一般由 2–7 个木糖残基构成，它在人体肠道内会促进有益菌的生长，改善肠道微环境，增强机体免疫力(凌沛学等, 2007)。另外，低聚木糖能有效降低高血压、高血脂和糖尿病的发病率；还可以润肠通便，治疗腹泻(孙毅等, 2014)。木聚糖酶也被广泛应用于饲料、造纸及食品等行业。

产木聚糖酶的微生物来源非常广泛，包括细菌(刘程程等, 2014; 孙明哲等, 2013)、放线菌(朱运平等, 2012)、霉菌(江正强等, 2007; 郑虹, 2014)及酵母(Liu *et al*, 1999; 陆彬等, 2014)，来源不同的木聚糖酶的酶学性质差异较大。真菌产的木聚糖酶多为酸性且热稳定性不高(Shi *et al*, 2012)，细菌产的木聚糖酶多为中性或偏碱性且具有较好的耐碱性和热稳定性。本研究对分离自黄海海域的一株产木聚糖酶的芽孢杆菌进行发酵优化，优化筛选参考马子宾等(2015)、陈世建等(2014)的研究方法，使木聚糖酶产量达到较高水平。

1 材料与方法

1.1 菌株

芽孢杆菌 YS1069 由中国水产科学研究院黄海水产研究所海洋产物资源与酶工程研究室提供。

1.2 培养基及培养条件

1.2.1 培养基 种子培养基：淀粉 10 g/L，蛋白胨 5 g/L，酵母膏 5 g/L，K_2HPO_4 1 g/L，$MgSO_4·7H_2O$ 0.2 g/L，NaCl 50 g/L，Na_2CO_3 10 g/L。基础发酵培养基：麸皮 40 g/L，豆饼粉 20 g/L，Na_2CO_3 12 g/L。

* 国家自然科学基金-联合基金(U1406402-5)和国际科技合作与交流专项(2014DFG30890)共同资助。董延娟，E-mail: dongyanjuan112@126.com

① 通讯作者：孙 谧，研究员，E-mail: sunmi@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-04-30, 收修改稿日期: 2015-06-07

1.2.2 培养条件　将保存的斜面菌种接种于液体种子培养基中，30℃、200 r/min 培养 22 h，再以 4%的接种量将菌液转入基础发酵培养基中，30℃、230 r/min 培养 96 h。

1.3 方法

1.3.1 酶活性的测定方法　发酵液离心(10000×*g*、15 min)后，上清液用 pH=8.0、50 mmol/L 的 Na_2HPO_4-NaH_2PO_4(PBS)缓冲液适当稀释，采用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法测定木聚糖酶酶活性(孙丰慧等, 2008)：在比色管中加入 0.4 ml 用 pH=8.0 的 PBS 缓冲液配制的 1%的木聚糖(Sigma 公司)溶液，置于 55℃水浴中预热 10 min，再加入稀释酶液 0.1 ml，55℃水浴反应 30 min。用冰冷却终止反应，加入 1.5 ml DNS，煮沸 15 min，加蒸馏水定容至 10 ml，用分光光度法测定反应的 $OD_{497\ nm}$，以木糖浓度和 $OD_{497\ nm}$ 制作标准曲线。在 pH=8.0、55℃反应条件下，以每小时木聚糖酶水解木聚糖产生 1 mg 木糖所需要的酶量定义为 1 个酶活力单位。

1.3.2 单因素实验　根据单因素实验设计原理，在其他发酵条件不变的前提下，依次考察氮源、碳源、无机盐、接种量、装液量、起始 pH、发酵温度和发酵时间对菌株产酶的影响，每个实验重复两次，每次设 3 个平行，每组数据重复测定两次，通过取各组数据的均值来评价各因素对菌株发酵产酶的影响。

1.3.3 响应面实验　在单因素实验的基础上，根据 Plackett-Burman 实验设计和中心组合实验设计原理，以每毫升发酵液中所含的酶活性单位数作为响应值 Y1(U/ml)，每个实验重复两次，每次设 3 个平行，每组数据重复测定两次，取各组数据的均值，利用 Design-Expert 8.05 软件对实验结果进行响应面回归分析，考察各因素的主效应和交互效应对菌株产木聚糖酶的影响，以获得最佳的产木聚糖酶条件。

2 结果与分析

2.1 单因素实验设计与分析

2.1.1 氮源对菌株产木聚糖酶的影响　从基础发酵培养基出发，研究不同氮源(20 g/L)对菌株产木聚糖酶的影响。结果如图 1 所示，其发酵产酶的最佳氮源为豆饼粉。随后进行了不同浓度的豆饼粉对产酶的影响(图 2)，当豆饼粉在浓度为 25 g/L 时，相对酶活力最高。

2.1.2 碳源对菌株产木聚糖酶的影响　固定氮源为豆饼粉(25 g/L)，研究不同碳源(40 g/L)对产酶的影响(图 3 和图 4)。相同条件下，麸皮为碳源时，产酶效果最好；麸皮浓度为 40 g/L 时，获得较高的酶活力。

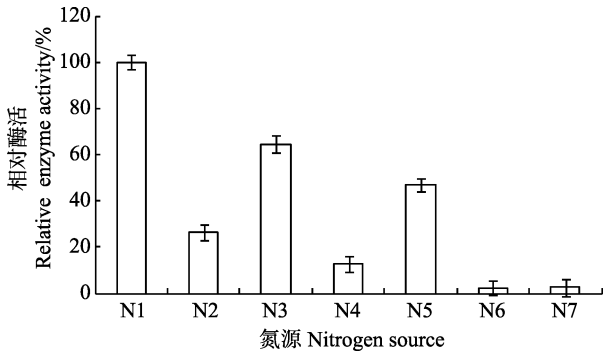

图 1　氮源种类对产酶的影响

Fig.1 Effects of nitrogen source on the production of xylanase

N1: 豆饼粉; N2: 酵母粉; N3: 蛋白胨; N4: 玉米浆; N5: 酵母膏; N6: 牛肉膏; N7: 硫酸铵

N1: bean cake powder; N2: yeast powder; N3: peptone; N4: corn paste; N5: yeast extract; N6: beef extract;N7: $(NH_4)_2SO_4$

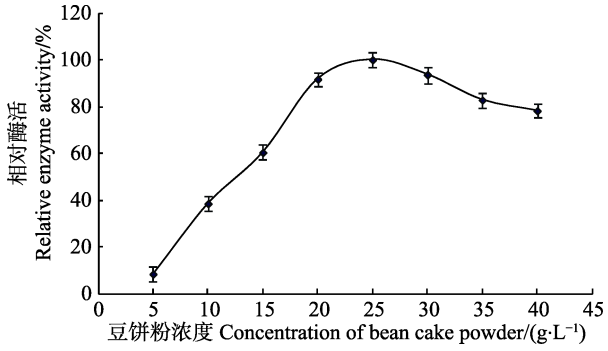

图 2　豆饼粉浓度对产酶的影响

Fig.2　Effects of concentration of bean cake powder on the production of xylanase

2.1.3 无机盐对菌株产木聚糖酶的影响　$NaNO_3$、K_2HPO_4、$MgSO_4·7H_2O$ 在添加量分别为 0.9 g/L、3 g/L 和 0.6 g/L 时，菌株 YS1069 产酶量达到最高。

2.1.4 接种量对菌株产木聚糖酶的影响　在 30 ml 的发酵培养基中分别按照体积分数 1%、2%、4%、6%、8%、10%和 12%接入种子培养液。接种量为 4%时，酶活性相对较高。

2.1.5 装液量对菌株产木聚糖酶的影响　250 ml 三角瓶中，较低装液量水平时(<40 ml)，酶产量相对稳定；较高装液量水平时，酶产量快速减少，这主要是由于溶氧较低、供氧不足造成的。

2.1.6 Na_2CO_3 浓度对菌株产木聚糖酶的影响　其他条件不变，通过改变 Na_2CO_3 的添加量来改变发酵培养基的起始 pH，考察其对菌株产酶的影响(图 5)。当 Na_2CO_3 添加量为 18 g/L、起始 pH 为 9.5 时，酶产量相对较高。

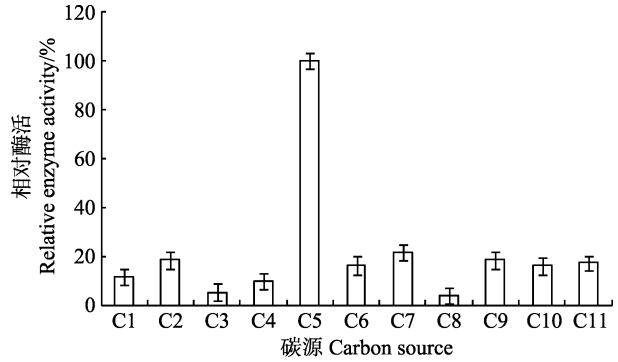

图 3 碳源种类对产酶的影响

Fig.3 Effects of carbon source on the production of xylanase

C1: 可溶性淀粉; C2: 麦芽糖; C3: 葡萄糖; C4: 蔗糖; C5: 麸皮; C6: 乳糖; C7: 木聚糖; C8: β-环糊精; C9: 甘油; C10: 柠檬酸; C11: 糊精

C1: soluble starch; C2: maltose; C3: glucose; C4: sucrose; C5: wheat bran; C6: lactose; C7: xylan; C8: β-cyclodextrin; C9: glycerin; C10: citric acid; C11: dextrin

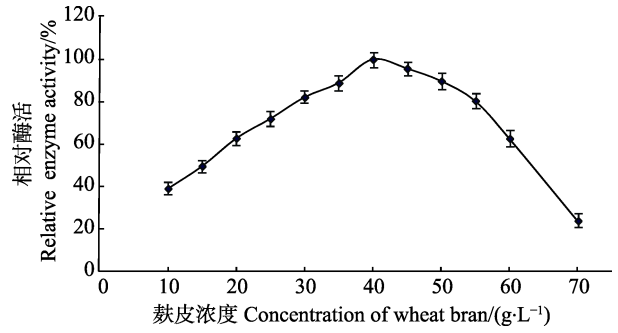

图 4 麸皮浓度对产酶的影响

Fig.4 Effects of concentration of wheat bran on the production of xylanase

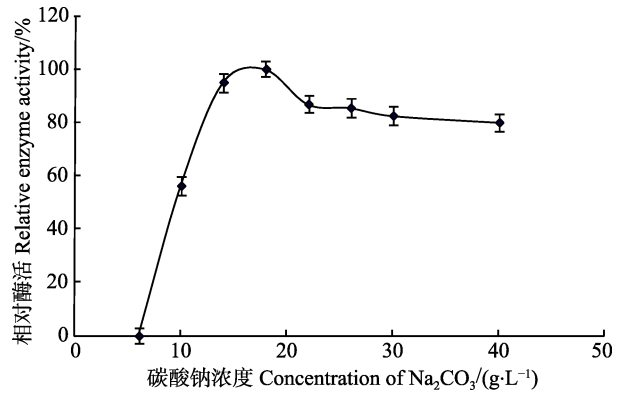

图 5 Na_2CO_3 浓度对产酶的影响

Fig.5 Effects of concentration of Na_2CO_3 on the production of xylanase

2.1.7 发酵温度对菌株产木聚糖酶的影响 考察不同温度(15℃、20℃、25℃、28℃、30℃、33℃、37℃和 40℃)对产酶的影响(图 6),该菌在相对较低温度下(25–33℃),产酶较高;在较高温度下(>37℃),

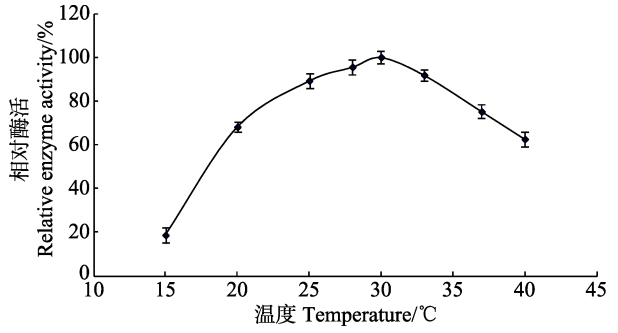

图 6 发酵温度对产酶的影响

Fig.6 Effects of temperature on the production of xylanase

产酶量明显下降。这可能与菌株 YS1069 来自海洋环境并长期适应低温环境有关。

2.1.8 发酵时间对菌株产木聚糖酶的影响 种子培养液按 4%(*v*/*v*)接种量接种入 250 ml 三角瓶中的 30 ml 基础发酵培养基中,30℃、230 r/min 培养,间隔取样测定酶活力(图 7),在培养 96 h 时,酶产量达到最大。因此,确定其最佳培养时间为 96 h。

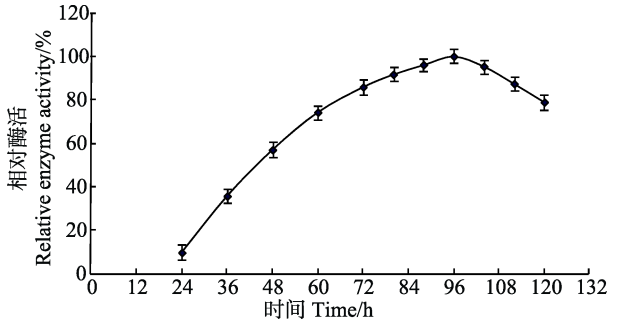

图 7 发酵时间对产酶的影响

Fig.7 Effects of culturing time on the production of xylanase

2.2 响应面实验设计与分析

2.2.1 Plackett-Burman 实验设计与结果 单因素实验后,为筛选对发酵产木聚糖酶影响较大的因素,用每毫升发酵液中所含的酶活力单位数作为响应值 Y1(U/ml),选择麸皮、接种量、装液量、$MgSO_4·7H_2O$、豆饼粉、K_2HPO_4、Na_2CO_3 和 $NaNO_3$ 作为研究对象,另外,在实验运行次数不增加的情况下,选择 3 个虚拟项,各影响因素的编码水平及 PB 实验结果分析见表 1 和表 2。

利用响应面软件分析 PB 实验结果,可以确定 Na_2CO_3、$MgSO_4·7H_2O$、麸皮为主要影响因素(P<0.05),贡献值合计达 82.06。

2.2.2 中心组合实验设计与结果 为进一步研究因素之间的交互作用并获得最大产酶量,设计 3 个主要因素 5 个水平、N=20 的中心组合实验,以 Design-

表 1　Plackett-Burman 实验因素水平

Tab.1　Levels of independent variables in Plackett-Burman test

因素 Factors	单位 Unit	因素代码 Symbol code	低水平 Low level	高水平 High level
麸皮 Wheat bran	g/L	X_1	10	70
接种量 Inoculum volume	%(*v*/*v*)	X_2	2	6
装液量 Liquid volume	ml	X_3	25	35
$MgSO_4·7H_2O$	g/L	X_4	0.3	0.9
豆饼粉 Bean cake powder	g/L	X_5	10	40
K_2HPO_4	g/L	X_6	2	4
Na_2CO_3	g/L	X_7	10	22
$NaNO_3$	g/L	X_8	0	2

Expert 8.05 软件对中心组合实验结果进行响应面回归分析。因素水平编码见表 3，实验设计及结果见表 4。

通过 Design-Expert 数据分析软件对中心组合实验结果进行回归分析，得到的方差分析结果如表 5 所示。结果显示，实验所用模型 $P<0.0001$，表明该二次方程模型达到极显著水平，并且失拟项 $P=0.1023>0.05$，表明该模型的失拟度不显著，说明回归方程对数据进行了较好的拟合，二次多项回归方程为：

$$Y=4163.42+661.47X_7+29.10X_4-742.95X_1+209.02X_7X_4+871.90X_7X_1+105.09X_4X_1-426.06X_7^2-255.59X_4^2-1023.05X_1^2$$

由统计软件分析可知，Y预测最大值为4462.34 U/ml，此时，Na_2CO_3浓度为 21.86 g/L，麸皮浓度为 51.41 g/L，$MgSO_4·7H_2O$ 浓度为 0.59 g/L。在该条件下对模型预测值进行实验验证，结果为 4408.63 U/ml，比发酵优化前(738.21 U/ml)提高了约 5 倍。实验值与预测值基本相符，说明预测模型可应用于该木聚糖酶发酵条件的优化。

表 2　Plackett-Burman 实验结果分析

Tab.2　Analysis of experimental results in Plackett-Burman test

因素 Factors	代码 Code	影响值 Impact value	贡献值 Contribution value	*F*	*P*	显著性 Significance
麸皮 Wheat bran	X_1	877.02	14.48	11.76	0.0415	*
接种量 Inoculum volume	X_2	–16.48	0.02	0.021	0.9527	
装液量 Liquid volume	X_3	813.24	12.45	10.12	0.0501	
$MgSO_4·7H_2O$	X_4	–962.26	17.43	14.16	0.0328	*
豆饼粉 Bean cake powder	X_5	–46.05	0.04	0.032	0.8686	
K_2HPO_4	X_6	–283.26	1.51	1.23	0.3488	
Na_2CO_3	X_7	1632.08	50.15	40.74	0.0078	*
$NaNO_3$	X_8	–110.88	0.23	0.19	0.6938	

表 3　中心组合实验设计的因素及其编码值

Tab.3　Factors and codes in central composite test design

因素 Factors	编码 Code	水平 Level				
		–1.682	–1	0	1	1.682
Na_2CO_3 (g/L)	X_7	11.27	14	18	22	24.73
$MgSO_4·7H_2O$ (g/L)	X_4	0.16	0.3	0.5	0.7	0.84
麸皮 Wheat bran (g/L)	X_1	16.36	30	50	70	83.64

由 Design-Expert 8.05 软件分析得到三因素交互作用(图 8)，其中，Na_2CO_3 和麸皮的交互作用对木聚糖酶活性的影响最为显著。

表 4　中心组合实验设计及其结果

Tab.4　Experimental design and results of central composite test

Run NO.	Na_2CO_3 X_7	$MgSO_4·7H_2O$ X_4	麸皮 Wheat bran X_1	木聚糖酶活性 Xylanase activity *Y*(U/ml)
1	–1	–1	–1	3768.6
2	1	–1	–1	2858.5
3	–1	1	–1	3106.3
4	1	1	–1	3150.8
5	–1	–1	1	262.4
6	1	–1	1	2958.4
7	–1	1	1	138.9
8	1	1	1	3552.6
9	–1.682	0	0	1809.3
10	1.682	0	0	4062.5
11	0	–1.682	0	3329.9
12	0	1.682	0	3506.3
13	0	0	–1.682	2488.5
14	0	0	1.682	6.3
15	0	0	0	4145.2
16	0	0	0	4138.4
17	0	0	0	4133.8
18	0	0	0	4161.1
19	0	0	0	4198.1
20	0	0	0	4211.7

3　讨论

微生物发酵产酶量的高低受多种因素的影响，因此，为了获得较高的酶产量就需要对各种因素进行优化，从而获得有利于产酶的最优组合。另外，不同来源的菌种发酵产酶量也有很大的差别，因此，目的菌株的选择对于发酵的影响也是至关重要的。海洋环境的

表 5 响应面模型方差分析

Tab.5 Variance analysis of the response surface quadratic model

来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	*F*	*P*
模型 Model	3.689×10^7	9	4.099×10^6	1736.16	<0.0001
残差 Residual	23608.13	10	2360.81		
失拟性 Lack of fit	18252.09	5	3650.42	3.41	0.1023
纯误差 Pure error	5356.04	5	1071.21		
总差 Cor total	3.691×10^7	19			

低温、高压、高盐环境使海洋微生物表现出许多独特的性质，因此，比来自陆地的微生物更具开发应用前景。

本研究通过单因素实验和响应面实验优化了芽孢杆菌 YS1069 产木聚糖酶的发酵条件。实验最终确定了发酵培养的最佳碳源麸皮、氮源豆饼粉的浓度分别为 51.41 g/L 和 25 g/L，无机盐 $NaNO_3$、K_2HPO_4、$MgSO_4\cdot7H_2O$ 的最佳浓度分别为 0.9 g/L、3 g/L 和 0.59 g/L。在 Na_2CO_3 浓度 21.86 g/L、4%接种量、30 ml 装液量和 30℃的条件下发酵 96 h 获得最优酶产量。优化后木聚糖酶的酶活力与未优化前相比，提高约 5 倍，优化效果显著，优化后的摇瓶发酵液 1 ml 可催化木聚糖生成木糖的速率为 483.26 μmol/min。目前，国内外也有许多对微生物产木聚糖酶的研究报道，芽孢

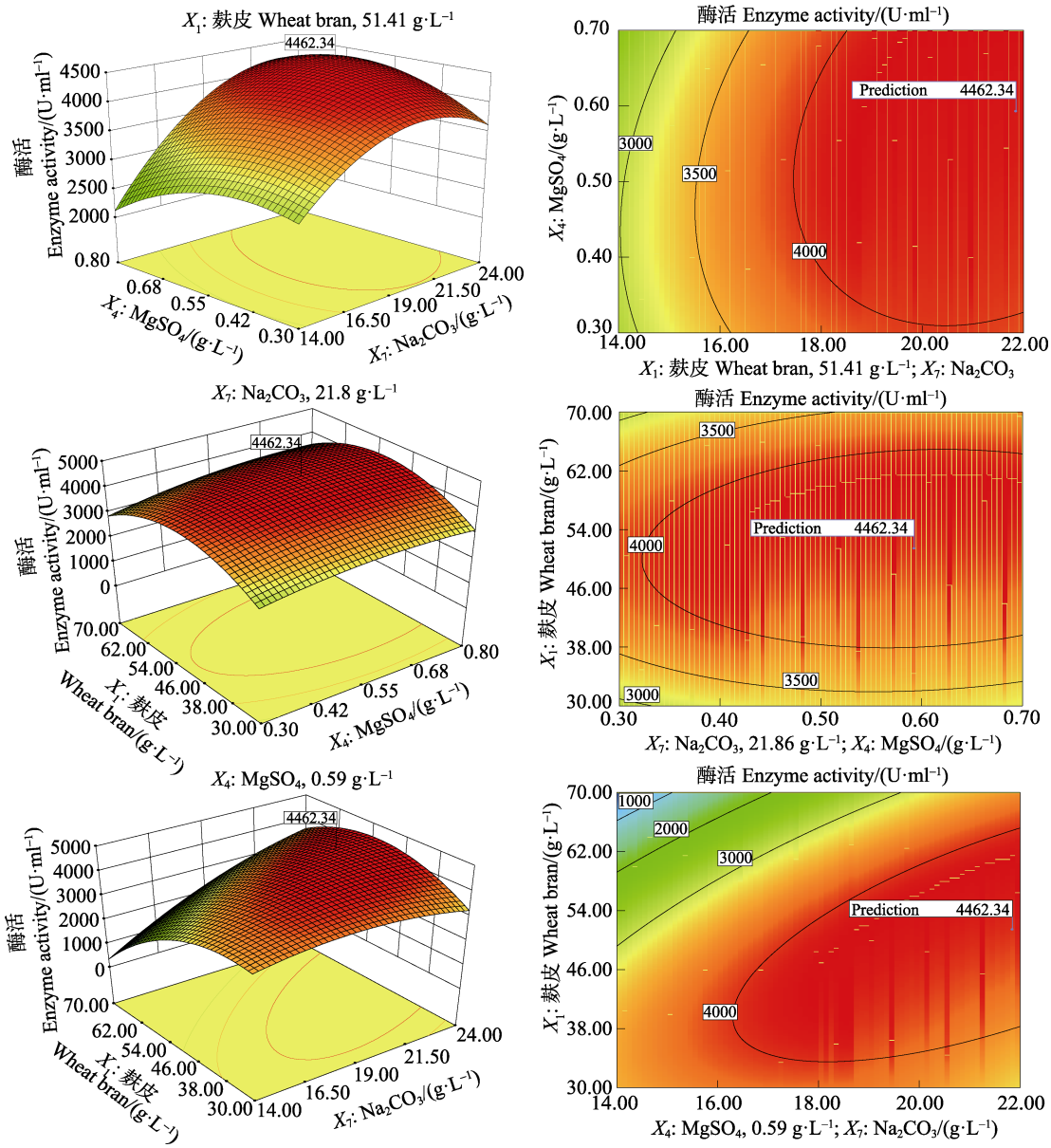

图 8 响应面三维图和对应的等高线

Fig.8 Three-dimensional response surface diagrams and the corresponding contour plots

杆菌 *Bacillus* sp. QH14(单志琼等, 2014)和 *Bacillus* sp. No. X-18(葛方兰等, 2009)的摇瓶发酵液 1 ml 催化生成木糖的速率为 648.79 μmol/min 和 72.41 μmol/min；*Bacillus altitudinis* DHN8 的摇瓶发酵液 1 ml 催化生成木糖的速率为 245 μmol/min(Adhyarua *et al*, 2014)。与其他芽孢杆菌产木聚糖酶的报道相比，芽孢杆菌 YS1069 的产木聚糖酶酶活力相对较高且培养基原料成本低，为该酶的理论研究和工业应用奠定了基础。

参　考　文　献

马子宾, 郑鸿飞, 刘均忠, 等. 一株海洋中性蛋白酶高产菌 S-3685 的鉴定及产酶条件. 渔业科学进展, 2015, 36(5): 131–137

朱运平, 褚文丹, 李秀婷, 等. 一株产木聚糖酶放线菌的液体发酵条件优化及水解特性研究. 食品科学, 2012, 33(21): 177–182

刘程程, 刘波, 蓝江林, 等. 产木聚糖酶芽胞杆菌的筛选及产酶条件优化. 福建农业学报, 2014, 29(8): 757–767

江正强, 邓伟, 翟倩, 等. 链霉菌 D21 产木聚糖酶的发酵条件研究. 林产化学与工业, 2007, 27(1): 52–56

孙丰慧, 李安明. 耐碱性木聚糖酶产生菌的筛选及发酵条件研究. 应用与环境生物学报, 2008, 14(3): 436–439

孙明哲, 郑宏臣, 孙君社, 等. 产耐高温木聚糖酶菌株的筛选及其产酶条件优化. 中国酿造, 2013, 32(8): 15–20

孙毅, 韩春超. 低分子木糖的制备与应用. 化工时刊, 2014, 28(6): 31–34

余英鹏, 姜腾飞, 李茜, 等. 黑曲霉木聚糖酶 XynB 耐热性的定向改造及表达、纯化. 应用与环境生物学报, 2014, 20(6): 1082–1085

陆彬, 万红贵. 木聚糖酶发酵工艺在 50 L 罐中的放大. 生物加工过程, 2014, 12(2): 63–65

陈世建, 王伟, 孙谧. 一株海洋过氧化氢酶高产菌的鉴定及产酶条件优化. 渔业科学进展, 2014, 35(4): 103–109

郑虹. 应用响应面法优化黑曲霉固态发酵稻谷壳产木聚糖酶条件. 食品工业科技, 2014, 35(8): 210–222

单志琼, 周峻岗, 周宇飞, 等. 产碱性木聚糖酶菌株的筛选及酶学性质. 遗传, 2012, 34(3): 356–365

凌沛学, 朱希强, 苏移山, 等. 低聚木糖功能与应用研究进展. 食品与药品, 2007, 9(9): 35–39

葛方兰, 王宇, 杜良俊, 等. 碱性木聚糖酶产生菌的筛选及培养基成分的优化. 西南农业学报, 2009, 22(2): 311–314

Adhyarua DN, Bhatt NS, Modi HA. Enhanced production of cellulase-free, thermo-alkali-solvent-stable xylanase from *Bacillus altitudinis* DHN8, its characterization and application in sorghum straw saccharification. Biocat Agricult Biotech, 2014, 3(2): 182–190

Beg QK, Kapoor M, Mahajan L, *et al*. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. Appl Microbiol Biotech, 2001, 56(3–4): 326–338

Liu W, Lu YL, Ma GR. Induction and glucose repression of endo-β-xylanase in the yeast *Trichosporon cutaneum* SL409. Process Biochem, 1999, 34(1): 67–72

Shi P, Qiu Z, Bai Y, *et al*. A new xylanase from *Streptomyces megasporus* DSM41476 with high yield of xylobiose. World J Microbiol Biotechnol, 2012, 28(2): 687–692

(编辑　冯小花)

Optimization of the Fermentation Conditions for Xylanase-Producing Strain YS1069

DONG Yanjuan[1,2], HAO Jianhua[1], ZHENG Hongfei[1], SUN Mi[1①]

(1. *Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Qingdao Key Laboratory of Marine Enzyme Engineering, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao* 266071; 2. *College of Food Science & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai* 201306)

Abstract　In this study we applied one-single factor and response surface method to optimize the culture medium and other conditions for strain YS1069, which would improve the yield of xylanase. First, the single factor method was used to screen eight factors including the nitrogen source, the carbon source, the inorganic salts, the inoculation volume, the liquid volume, Na_2CO_3, fermentation temperature and fermentation time. The optimal results corresponding to each single factor was as follows: bean cake powder 25 g/L, wheat bran 40 g/L, $NaNO_3$ 0.9 g/L, K_2HPO_4 3 g/L, $MgSO_4{\cdot}7H_2O$ 0.6 g/L, inoculums at 4%, 30 ml/250 ml (*v*/*v*) liquid volume, Na_2CO_3 18 g/L, cultured at 30℃ for 96 h. Secondly, these main variables were evaluated with the Plackett-Burman test. The results suggested that Na_2CO_3, wheat bran and $MgSO_4{\cdot}7H_2O$ were the most impactful factors. Finally, the optimal levels of the three factors were determined with central composite design and Design-Expert 8.05 software. The results were shown as follows: Na_2CO_3 21.86 g/L, wheat bran 51.41 g/L, and $MgSO_4{\cdot}7H_2O$ 0.59 g/L. Under the optimized conditions, the production of xylanase was increased by 5 folds.

Key words　*Bacillus*; Xylanase; Response surface methodology; Fermentation conditions; Optimization

① Corresponding author: SUN Mi, E-mail: sunmi@ysfri.ac.cn

DOI: 10.11758/yykxjz.20150205001 http://www.yykxjz.cn/

5 种褐藻的甘露糖醛酸和古罗糖醛酸比值测定*

曲艳艳 王伟伟 曹增梅 王 娜 李晓捷 张壮志 梁广津

(山东东方海洋科技股份有限公司 国家海藻与海参工程技术研究中心
山东省海藻遗传育种与栽培技术重点实验室 烟台 264003)

摘要 通过 PMP 柱前衍生高效液相色谱法测定 5 种褐藻(多肋藻、海带、裙带菜、海蒿子和萱藻)的甘露糖醛酸和古罗糖醛酸比值(M/G)。结果显示，多肋藻在所测褐藻中的 M/G 值最大(2.22)，其次为海带(2.10)，萱藻最小(0.60)。多肋藻与海带的褐藻胶凝胶强度小，持水性好，而萱藻的褐藻胶凝胶强度大，持水性差。同一生长期、不同海带品种(系)的 M/G 值相差不大，海带在生长期的 M/G 值呈下降趋势，在成熟期达到最低。此研究结果可为褐藻在相关生产领域应用提供参考依据。

关键词 褐藻；甘露糖醛酸；古罗糖醛酸；M/G 值；高效液相色谱

中图分类号 S985 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)03-0160-05

褐藻胶(Algin)是从褐藻门藻类的细胞壁中提取的(陈利梅等, 2010)、由甘露糖醛酸(Mannuronic acid, M)和古罗糖醛酸(Guluronic acid, G)以 C_{1-4} 键混合连接起来的直链高分子水溶性多糖，两种糖醛酸的含量和结合方式因海藻的种类、生态环境和季节的不同而不同，直接影响着褐藻胶的凝胶强度和对金属离子的选择性，从而影响褐藻胶的理化性质及其应用(纪明侯, 1997)。作为一种安全的功能高分子，褐藻胶广泛应用于食品、化工及药物开发等领域，不同领域对褐藻胶中 M 和 G 的含量要求不同(吴建东等, 2011)。

关于褐藻胶 M/G 值的测定方法主要有化学法、液相色谱法及气相色谱法。化学法操作繁琐费时，不适应大批量样品检测的需求(郑瑞津等, 2003)；高效液相色谱法及气相色谱法操作较为简便，但高效液相法采用的 Waters 5-SAX 阴离子交换柱(郑瑞津等, 2003; Gacesa *et al*, 1993)分离褐藻胶 M 和 G 的效果不佳。采用 PMP(1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮)柱前衍生高效液相色谱法，褐藻胶 M 和 G 分离效果好，灵敏度高，受干扰峰影响小，适合快速、有效、批量样品的褐藻胶 M/G 值的测定(吴健等, 2013)。

本研究利用 PMP 柱前衍生高效液相色谱法，针对 5 种褐藻(多肋藻、海带、裙带菜、海蒿子和萱藻)的 M/G 值、海带不同品种(系)M/G 值进行比较，研究了海带生长期 M/G 值的变化规律，旨在为生产及研究提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

收获期褐藻采集：多肋藻、“东方 6 号”海带、海蒿子、萱藻分别于 2014 年 4 月、6 月、5 月、5 月采集于山东荣成宁津附近海域；裙带菜于 2014 年 4 月采集于山东荣成朱口院夼附近海域。

海带在生长期 M/G 值的变化：“爱伦湾”海带于 2014 年 2–6 月采集于山东荣成宁津附近海域。

同一时期海带不同品种(系)间 M/G 值的比较：“东方 5 号”、“东方 6 号”、“爱伦湾”、“黄官 1 号”海带均于 2013 年 5 月采集于山东荣成宁津附近海域。

* 国家科技支撑计划项目(2012BAD55G01)、国家高技术研究发展计划项目(863 计划) (2012AA10A406)和烟台市科技发展计划项目(2013LGS002)共同资助。曲艳艳，E-mail: quyanchn@163.com

收稿日期: 2015-02-05, 收修改稿日期: 2015-08-10

1.2　试剂及仪器

β-D-甘露糖醛酸和 α-L-古罗糖醛酸标准品(含量≥98%), 青岛博智汇力生物科技公司; 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP, ≥98%), Alfa Aesar 公司; 乙腈为色谱纯, 国药集团; 其他试剂均为分析纯, 国药集团。Agilent 1260 型高效液相色谱仪及 Zorbax SB-C18 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 美国 Agilent 公司。

1.3　实验方法

1.3.1　褐藻胶的提取　　称取适量褐藻干粉, 加入 30 倍体积的 0.5% $NaCO_3$(*m*/*v*)溶液, 55℃水浴 1.5 h; 筛绢过滤藻渣, 将滤液离心, 取上清液。在上清液中加入适量盐酸, 边加边搅拌, 此时溶液中有褐藻酸产生, 静置 10 min, 离心取沉淀。转移沉淀, 加入 95% 乙醇,用 40% NaOH 调节溶液 pH 至 8.0,静置 40 min, 离心取沉淀, 得褐藻酸钠, 40℃烘干至恒重。

1.3.2　褐藻胶的降解　　称取 50 mg 褐藻酸钠干品于试管中,加入 0.5 ml 的 80% H_2SO_4,室温酸解 18 h。用水稀释 H_2SO_4 浓度至 2 mol/L, 沸水浴 5 h, 冷却至室温。用 $CaCO_3$ 中和 pH 至 7.0, 离心取上清液, 滤纸过滤, 收集滤液, 得到褐藻胶 M 和 G 单糖溶液。

1.3.3　PMP 柱前衍生　　称取 M、G 单糖标准品, 用蒸馏水配制成 2.0、1.0、0.5、0.25、0.125 mg/ml 系列浓度。取 200 μl 标准品溶液, 加入 200 μl 0.3 mol/L 的 NaOH, 混合均匀后, 加入 240 μl 0.5 mol/L PMP 试剂, 涡旋混匀, 于 70℃水浴加热 1 h, 取出冷却至室温, 加入 200 μl 0.3 mol/L HCl 中和, 氯仿萃取 3 次, 取水相过 0.22 μm 滤膜, 待上机。褐藻胶单糖裂解液柱前衍生步骤同上。

1.3.4　高效液相色谱　　Zorbax SB-C18 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH= 7.0)/CH_3CN(83/17, 体积分数), 流速为 0.8 ml/min, 柱温为 30℃, 进样体积为 20 μl, 检测器为 VWD, 检测波长为 245 nm。

1.3.5　M/G 校正系数的确立　　称取 M 和 G 标准品各 250 mg(称量值), 分别进行酸解、衍生及液相分析。根据 M、G 线性回归方程计算酸解后 M 和 G 的质量(测定值), M 和 G 的回收率即为质量测定值与称量值之比,M/G 回收系数为 M 回收率与 G 回收率的比值。

2　结果与讨论

2.1　M 和 G 标准曲线的建立

以浓度 *x* (mg/ml)、峰面积 *y* (×10^4)进行回归计算, 分别得到 M 和 G 的线性回归方程, M: y=1.497x–0.012(R^2=0.9998); G: y=1.381x–0.017 (R^2=0.9991)。

2.2　M/G 校正系数的确立

糖醛酸在强酸作用下会受到一定程度的破坏, 且不同糖醛酸破坏程度不同, 因此, 确定甘露糖醛酸和古罗糖醛酸强酸作用下的回收率对于测定 M/G 值至关重要。表 1 为 M 和 G 标准品在酸解后的回收率, M、G 酸解后回收率不同, G 破坏程度明显大于 M, 在计算褐藻中褐藻胶 M/G 值时需要乘以校正系数 1/1.86, 即 0.54 进行校正。

表 1　糖醛酸酸解后的回收率

Tab.1　The recovery rate of M and G after acidolysis

次数 No.	糖醛酸 Alduronic acid	酸解前质量 Weight before acidolysis (mg)	酸解后质量 Weight after acidolysis (mg)	回收率 Recovery rate (%)	回收系数 M/G	平均值 Avg
Ⅰ	M	2.5000	2.0054	80.22	1.87	1.86
Ⅰ	G	2.6000	1.1173	42.97		
Ⅱ	M	2.6000	2.2462	86.39	1.85	
Ⅱ	G	2.3000	1.0751	46.74		

2.3　5 种褐藻 M/G 的测定

图 3 为褐藻胶裂解液的液相色谱图, 根据 M 单糖标准品(图 1)和 G 单糖标准品(图 2)确定 9.215 min 为 G, 10.089 min 为 M。M 和 G 分离度较好, 除 5 min 之前的试剂峰外, 其他干扰峰较小, 由此可推断, 褐藻胶酸解较彻底, 不存在未解聚的多聚体形态。

沸水浴加热时间对于多聚嵌段结构的水解起到关键作用, 实验探索了沸水浴加热的最佳水解时间为 5 h。PMP 柱前衍生高效液相色谱法作为一种准确有效的测定褐藻胶 M/G 值的方法, 也可适用于其他褐藻胶类药物制品 M/G 值的测定(吴健等, 2013)。

由图 4 可知, 收获期 5 种褐藻 M/G 值由大到小依次为多肋藻、海带、裙带菜、海蒿子、萱藻, 最大值为 2.22, 最低值为 0.60, 多肋藻约为萱藻的 4 倍。M/G 值的差异反映了不同来源褐藻胶凝胶特性的不同, M/G 值高, 其凝胶强度低, 持水性好, 弹性好, 因而多肋藻、海带较适用于对弹性要求高、持水性要求好的工业领域以及要求高 M 含量的医药、食品等领域, 例如食品涂膜、增稠剂、医药材料等(朱思明等, 2003; Clark, 1996; Fujihara *et al*, 1992)。萱藻褐藻胶的 G 含量较高, 凝胶强度大, 硬度大, 质地脆, 持水性差, 该特点不仅适用于去除有毒金属离子, 而且在含钙食品中可作为胶凝剂、添加剂(朱思明等,

2003; 刘树兴等, 2001; Sellimi *et al*, 2015)，另外，此类褐藻胶在纺织、橡胶等领域得到广泛应用(黄来英等, 2000; 金骏等, 1993; 隋战鹰, 1993)。

在生产领域，除了根据褐藻胶的特性进行原材料的选择，还应考虑原材料褐藻胶产量的高低。本研究中，多肋藻的褐藻胶含量为 27.87%，海带为 22.11%。多肋藻能较大程度满足对 M/G 值要求较高的工业领域，养殖量大、产量高的海带在此领域也颇受欢迎。

2.4 海带不同品种(系)间 M/G 值的比较

同一生长期海带品种(系)间 M/G 值相差不大，接近 2.0(图 5)，M 含量基本维持在 15%左右，G 含量基本维持在 8%左右，褐藻胶特性颇为相似。海带 M/G 值存在一定差异，原因可能为气候、水温等自然条件对海带的生长带来一定影响，造成测定值的偏差。

2.5 海带生长期 M/G 值的变化

为了探究海带在生长期的 M/G 值以及 M、G 含量的变化，选择 2 月薄嫩期至 6 月成熟期海带，测定 M/G 值以及 M、G 含量变化情况(图 6)。结果显示，海带在生长过程中，M/G 值呈下降趋势，M 含量呈下降趋势，G 含量呈上升趋势，即海带在成熟期的

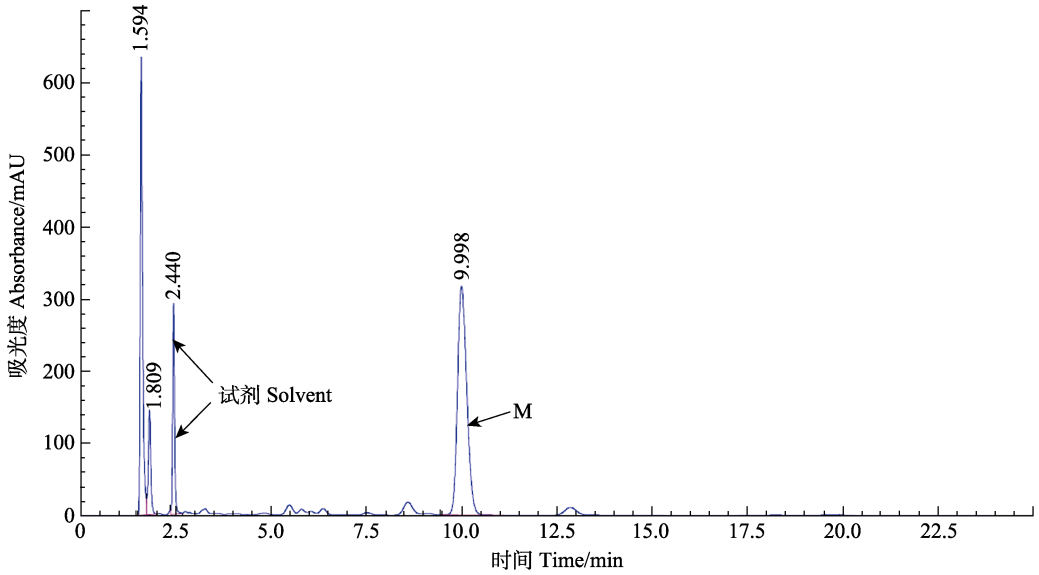

图 1 甘露糖醛酸标准品的液相色谱

Fig.1 The standard liquid chromatogram of Mannuronic acid

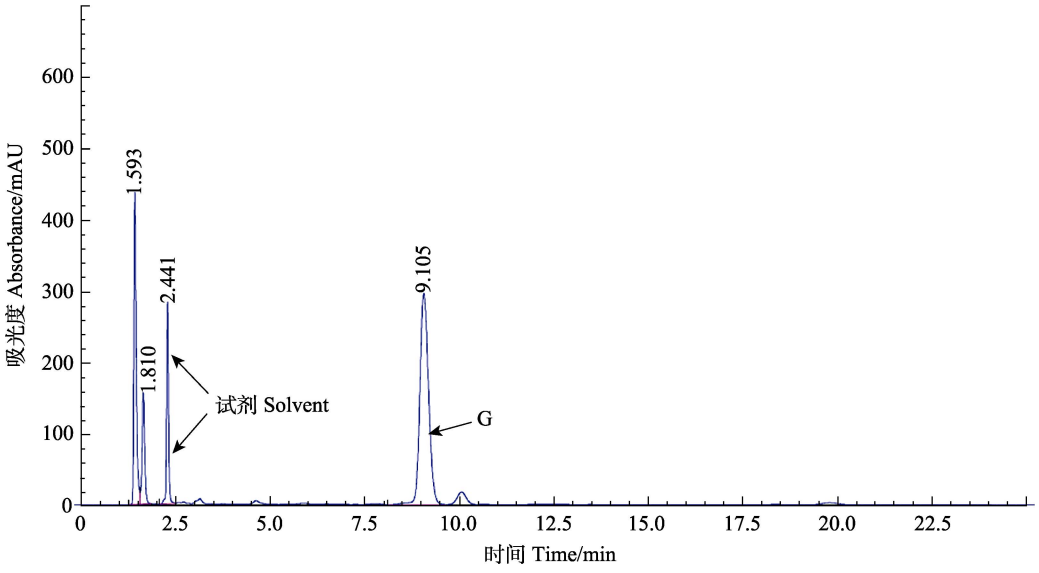

图 2 古罗糖醛酸标准品的液相色谱

Fig.2 The standard liquid chromatogram of Guluronic acid

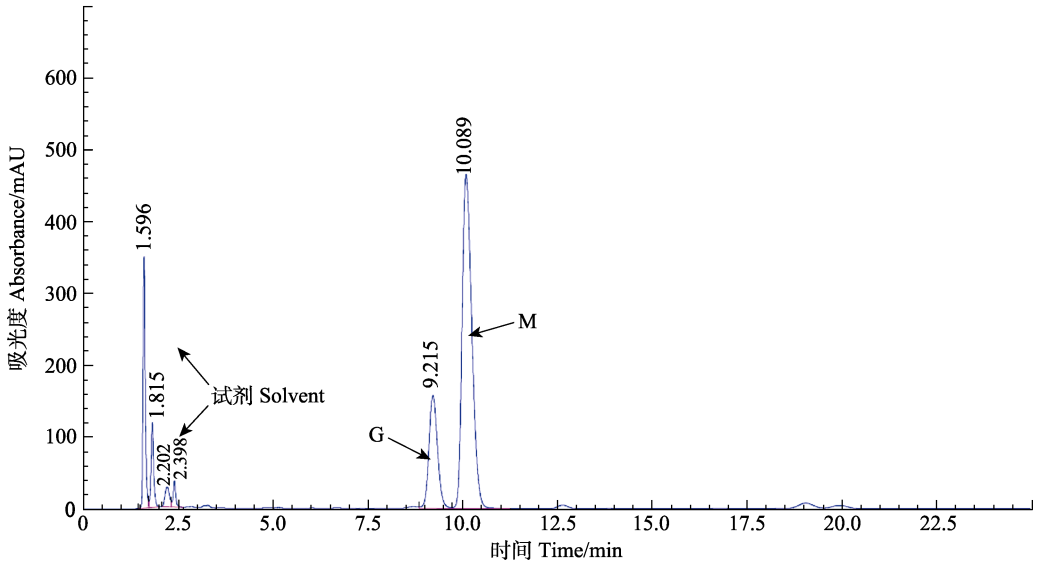

图 3　褐藻胶裂解液的液相色谱

Fig.3　The liquid chromatogram of the degraded algin

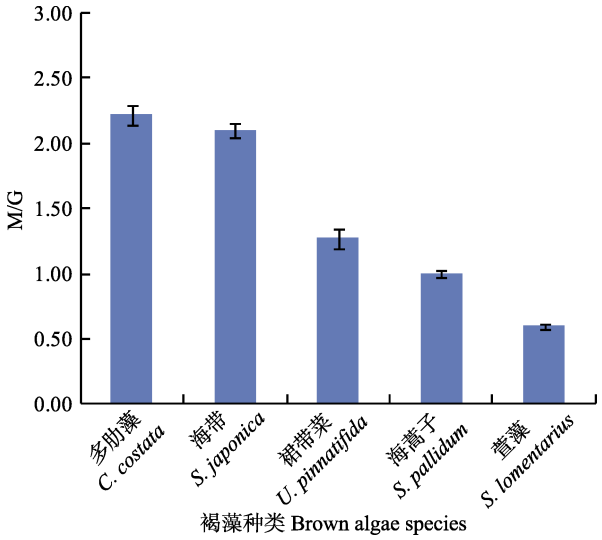

图 4　不同褐藻种间 M/G 值

Fig.4　M/G ratios of different brown algae species

M/G 值最低。由此可以推断，海带褐藻胶在生物合成过程中是由 D-甘露糖醛酸逐渐转变成 L-古罗糖醛酸，此结论与纪明侯(1997)所阐述的观点相吻合。海带在 4 月 M/G 值出现短暂的上升，M 含量上升，G 含量下降，原因可能为海带在此生长阶段由 M 转化为 G 的速率相比于海带的生长速率有所下降。

3　结语

本研究比较了 5 种褐藻(多肋藻、海带、裙带菜、海蒿子和萱藻)种间 M/G 值的大小，多肋藻和海带凝胶特性较为接近，其凝胶强度小，持水性好，而萱藻凝胶特性则相反；同一时期不同海带品种(系)间 M/G 值差异不明显，因而褐藻胶特性相差不大。海带在整个生长期的 M/G 值呈下降趋势，在收获期达到最低。

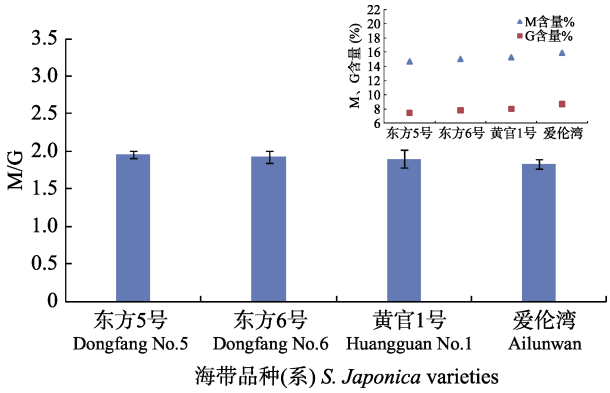

图 5　海带不同品种(系)间 M/G 值以及 M、G 含量

Fig.5　M/G ratios and the contents of M and G in different varieties (lines) of *S. japonica*

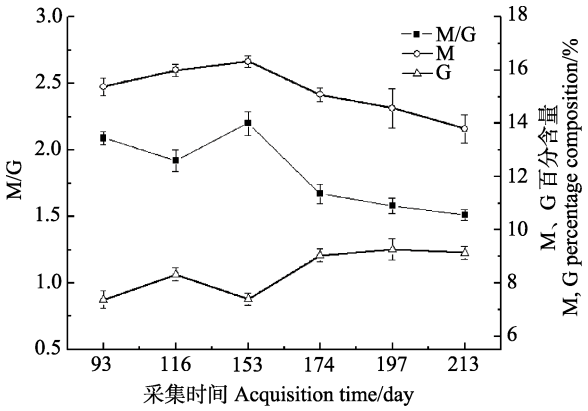

图 6　海带生长期 M/G 值的变化情况

Fig. 6　The change of M/G of *S. japonica* during the growth period

以上研究结果可为褐藻胶性能选择提供参考依据。

参 考 文 献

朱思明, 于淑娟, 彭志英, 等. 海藻酸(盐)的生产、应用及研究现状. 中国食品添加剂, 2003, 6: 61–65
刘树兴, 李宏梁, 黄峻榕. 食品添加剂. 北京: 中国石油出版社, 2001, 2–5
纪明候. 海藻化学. 北京: 科学出版社, 1997, 235–236
吴建东, 于广利, 王培培, 等. 高古罗糖醛酸含量的萱藻(*Scytosiphon lomentarius*)多糖细微结构研究. 海洋科学, 2011, 35(1): 40–43
吴健, 薛依婷, 赵峡, 等. 柱前衍生液相色谱法测定藻酸双酯钠的含量. 中国海洋药物, 2013, 32(4): 1–7
陈利梅, 李德茂, 赵玉山, 等. 海带不同部位褐藻胶含量及其凝胶性能的研究. 中国食品添加剂, 2010, 2: 124–126
金骏, 林美娇. 海藻利用与加工. 北京: 科学出版社, 1993, 37–38
郑瑞津, 吕志华, 于广利, 等. 褐藻胶 M/G 比值测定方法的比较. 中国海洋药物杂志, 2003, 6: 35–39
黄来英, 洪文生, 黄恺. 食品增稠剂. 北京：中国轻工业出版社, 2000, 25–26
隋战鹰. 褐藻胶用途多. 植物杂志, 1993, 2: 17–19
Clark RAF. Wound repair: overview and general considerations. The molecular and cellular biology of wound repair, 2nd ed. New York, London: Plenum Press, 1996, 3–50
Fujihara M, Nagumo T. The effect of the content of D-mannuronic acid and L-guluronic acid blocks in alginates on antitumor activity. Cabohydr Res, 1992, 224(3): 343–347
Gacesa P, Squire A, Winterburn PJ. The determination of the uronic acid composition of alginate by anion-exchange liquid chromatography. Carbohydr Res, 1993, 118(1): 1–8
Sellimi S, Younes I, Ayed HB, *et al*. Structural, physicochemical and antioxidant properties of sodium alginate isolated from a Tunisian brown seaweed. Int J Biol Macromol, 2015, 72: 1358–1367

(编辑 刘丛力)

Determining the Ratio of Mannuronic Acid to Guluronic Acid(M/G) of Five Species of Brown Algae

QU Yanyan①, WANG Weiwei, CAO Zengmei, WANG Na, LI Xiaojie, ZHANG Zhuangzhi, LIANG Guangjin

(*Shandong Oriental Ocean Group Co. Ltd., National Algae and Sea Cucumber Engineering Technology Research Center, Key Laboratory of Algae Genetic Breeding and Cultivation Techniques of Shandong Province, Yantai* 264003)

Abstract In this study we compared the ratios of mannuronic acid to guluronic acid (M/G) in different brown algae species of *Costaria costata, Scytosiphon lomentarius*, *Sargassum pallidum*, *Undaria pinnatifida, Saccharina japonica*, and monitored the change of M/G during the growth of *S. japonica*. The M/G ratio was determined with a high performance liquid chromatography (HPLC) with pre-column derivatization technique. The results showed that *C. costata* had the highest M/G ratio (2.22), which was followed by *S. japonica* (2.10), and *S. lomentarius* had the lowest value (0.60). These demonstrated that algin of *C. costata* and *S. japonica* had small intensity but excellent water-holding capacity, and that algin of *S. lomentarius* had the opposite properties. The M content showed the order as *C. costata* (18.84%) > *S. japonica* (14.83%) > *S. lomentarius* (8.77%). The algin of *S. lomentarius* had the lowest level of M (14.58%) and the highest G content. The characteristics including fast growth rate, high yield, and commercial cultivation would make *S. japonica* as suitable material in food industry that requires excellent elasticity and water-holding capacity, such as food coating and thickener. They could also be largely applied in medicine that demands high M content. The algin of *S. lomentarius*, owning to its high G content and combination with Ca^{2+} and other metal cations to form compact structures, can be applied to the removal of toxic metal ions as well as calcium in foods. Algin with high G content could also be used as gelatinizers, additives in the food industry, textile and rubber industries. M/G ratios of different species of *S. japonica* were similar, and they declined over time and reached the minimum at maturity, which was caused by the transformation from M to G during the growth. Our study provided more information for both industrial production and scientific research.

Key words Brown algae; Mannuronic acid; Guluronic acid; M/G; HPLC

① Corresponding author: QU Yanyan, E-mail: quyanchn@163.com