

渔业科学进展

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES



第38卷 VOL.38 第3期 NO.3



中国水产科学研究院黄海水产研究所 主办
中国水产学会



科学出版社 出版
Science Press

渔业科学进展

YUYE KEXUE JINZHAN

第 38 卷 第 3 期

2017 年 6 月

中国科技核心期刊
中文核心期刊
全国优秀农业期刊

中国科学引文数据库(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

目 次

研究论文

- 桑沟湾养殖海域营养盐时空分布特征及富营养化评价 徐东会 陈碧鹃 江涛 朱琳 夏斌 韩倩 古彬 崔毅 柴超 (1)
- 运用 SS3 评估东太平洋大眼金枪鱼(*Thunnus obesus*)资源——复杂模型和简化模型比较 朱江峰 (12)
- 唐山附近海域春季表层沉积物重金属含量年际变化及污染评价 胡琴 郭静 尹晓娜 曲亮 曹静 (22)
- 北黄海虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)定居群体的生态适应性研究 杨钰 倪守胜 刘毅 柳淑芳 庄志猛 (31)
- 牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)家系生长性状遗传效应分析 李祥孔 田永胜 李洪 宋莉妮 高进 段会敏 戴欢 陈张帆 陈松林 王秀利 (39)
- 基于转录组测序对翘嘴鲈(*Siniperca chuatsi*) 2 种肌球蛋白重链基因的克隆与分析 陈之航 董浚键 孙成飞 田园园 叶星 (51)
- 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)真、伪雄鱼群体表型和遗传性状分析 李洪 田永胜 李祥孔 陈张帆 宋莉妮 段会敏 (62)
- 牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) CD59 基因的原核表达与功能探究 周纳宇 曹丹丹 王志刚 张全启 齐洁 王旭波 于海洋 (70)
- 美洲黑石斑鱼(*Centropristis striata*)消化系统胚后发育的组织学观察 张廷廷 陈超 邵彦翔 陈建国 孙涛 (78)
- 饲料中不同水解蛋白对鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)幼鱼鱼体及组织脂肪含量的影响 曹林 张婷婷 徐后国 郑珂珂 梁萌青 (86)
- 不同蛋白水解物对花鲈(*Lateolabrax japonicus*)生长性能及非特异性免疫的影响 张婷婷 陈效儒 梁萌青 王成强 郑珂珂 徐后国 陈齐勇 (96)
- 小麦蛋白替代鱼粉及大豆蛋白对日本黄姑鱼(*Nibea japonica*)和黑鲷(*Sparus macrocephalus*)血清生化指标及肝脏抗氧化指标的影响 成艳波 张月星 董智勇 路冰岩 王永超 (106)
- 饲料中大豆油替代鱼油对银鲳(*Pampus argenteus*)幼鱼血清溶菌酶活性及组织抗氧化能力的影响 张晨捷 彭士明 高权新 施兆鸿 王建钢 (115)
- 聚 β-羟基丁酸酯对中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)非特异性免疫相关酶的影响 张恒恒 孟宪红 孔杰 罗坤 栾生 曹宝祥 曹家旺 张莹雪 (124)
- 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)回交家系遗传变异的微卫星分析 刘九美 李吉涛 刘萍 窦全伟 王佳佳 李健 (133)
- 一株功能益生菌的简易发酵及其在凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)生物絮团养殖中的应用 高戈 朱开玲 张庆起 王志杰 黄捷 (140)
- 温度波动对不同规格虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)生理和免疫指标的影响 高振铨 张继红 李敏 马莎 郭晓亮 姜妮妮 吕旭宁 (148)
- 食用海带(*Saccharina japonica*)新品系遗传多样性研究 姚海芹 刘福利 王飞久 梁洲瑞 汪文俊 孙修涛 李晓蕾 (155)
- 豆粕的坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*)发酵工艺优化及其营养成分分析 孙静 宋晓玲 黄捷 (163)
- 氨氮胁迫对不同规格刺参(*Apostichopus japonicus*)存活及非特异性免疫酶活性的影响 徐松涛 赵斌 李成林 胡炜 韩莎 李琪 (172)
- 刺参(*Apostichopus japonicus*)大水面养殖池塘环境中优势益生菌筛选及其特性分析 杜佗 李彬 王印庚 廖梅杰 王金燕 刘志轩 王诗欢 (180)
- 刺参(*Apostichopus japonicus*)保苗期“肠炎病”及其治疗方法 逢慧娟 廖梅杰 李彬 荣小军 王印庚 张正 孙金生 孟繁林 (188)
- 2 种新型塑胶环保型网箱养殖褐牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)与大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)效果的评估 王腾腾 关长涛 公丕海 崔勇 李真真 (198)

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

CONTENTS

Vol.38 No.3 June 2017

Temporal and Spatial Variation Characteristics of Water Nutrients and Eutrophication Evaluation in Aquaculture Water Areas of Sanggou Bay.....	XU Donghui, CHEN Bijuan, JIANG Tao, ZHU Lin, XIA Bin, HAN Qian, GU Bin, CUI Yi, CHAI Chao	(1)
Stock Assessment of Big-Eye Tuna <i>Thunnus obesus</i> in Eastern Pacific Ocean: A Comparative Study of the Full and the Simplified SS3 Model.....	ZHU Jiangfeng	(12)
Inter-Annual Concentration Variations and Pollution Assessment of Heavy Metals in the Surface Sediments in the Adjacent Sea Water of Tangshan in Spring.....	HU Qin, GUO Jing, YIN Xiaona, QU Liang, CAO Jing	(22)
Ecological Adaptability of Different Geographical Populations of <i>Patinopecten yessoensis</i> in the Northern Yellow Sea.....	YANG Yu, NI Shousheng, LIU Yi, LIU Shufang, ZHUANG Zhimeng	(31)
Genetic Effect Analysis of Growth Traits in <i>Paralichthys olivaceus</i> Families.....	LI Xiangkong, TIAN Yongsheng, LI Hong, SONG Lini, GAO Jin, DUAN Huimin, DAI Huan, CHEN Zhangfan, CHEN Songlin, WANG Xiuli	(39)
cDNA Cloning and Analyses of Two Myosin Heavy Chain Isoforms of Mandarin Fish (<i>Siniperca chuatsi</i>) Based on Transcriptome Sequencing.....	CHEN Zhihang, DONG Junjian, SUN Chengfei, TIAN Yuanyuan, YE Xing	(51)
The Phenotypic and Genetic Traits Analysis of ZZ Males and ZW Males (Sex-Inverted Males) of <i>Cynoglossus semilaevis</i>	LI Hong, TIAN Yongsheng, LI Xiangkong, CHEN Zhangfan, SONG Lini, DUAN Huimin	(62)
Prokaryotic Expression and Functional Analysis of <i>CD59</i> of Japanese Flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>).....	ZHOU Nayu, CAO Dandan, WANG Zhigang, ZHANG Quanqi, QI Jie, WANG Xubo, YU Haiyang	(70)
Histological Observation on Post-Embryonic Development of Digestive System of <i>Centropristis striata</i>	ZHANG Tingting, CHEN Chao, SHAO Yanxiang, CHEN Jianguo, SUN Tao	(78)
Effects of Different Protein Hydrolysates in High Plant Protein Diets on the Lipid Accumulation of Juvenile Japanese Seabass (<i>Lateolabrax japonicus</i>).....	CAO Lin, ZHANG Tingting, XU Houguo, ZHENG Keke, LIANG Mengqing	(86)
Effects of Different Protein Hydrolysates on Growth Performance and Non-Specific Immunity of Japanese seabass (<i>Lateolabrax japonicus</i>).....	ZHANG Tingting, CHEN Xiaoru, LIANG Mengqing, WANG Chengqiang, ZHENG Keke, XU Houguo, CHEN Qiyong	(96)
Effects of Dietary Replacement of Fish Meal and Soy Protein by Wheat Gluten on Plasma Biochemical Indices and Liver Anti-Oxidative Indices of <i>Nibea japonica</i> and <i>Sparus macrocephalus</i>	CHENG Yanbo, ZHANG Yuexing, DONG Zhiyong, LU Bingyan, WANG Yongchao	(106)
Effects of Dietary Substitution of Fish Oil by Soybean Oil on the Serum Lysozyme Activity and Tissue Antioxidant Capacity in Juvenile Silver Pomfret (<i>Pampus argenteus</i>).....	ZHANG Chenjie, PENG Shiming, GAO Quanxin, SHI Zhaohong, WANG Jianguo	(115)
The Effect of Poly- β -Hydroxybutyrate on Enzyme Activities of Nonspecific Immunity in <i>Fenneropenaeus chinensis</i>	ZHANG Hengheng, MENG Xianhong, KONG Jie, LUO Kun, LUAN Sheng, CAO Baoxiang, CAO Jiawang, ZHANG Yingxue	(124)
Microsatellite Marker Analysis on Genetic Variation of the Ridgetail White Prawn <i>Exopalaemon carinicauda</i> Backcross Populations.....	LIU Jiumei, LI Jitao, LIU Ping, DOU Quanwei, WANG Jiajia, LI Jian	(133)
Simplified Fermentation of a Functional Probiotics and the Application in Prawn (<i>Litopenaeus vannamei</i>) Bio-Floc Breeding.....	GAO Ge, ZHU Kailing, ZHANG Qingqi, WANG Zhijie, HUANG Jie	(140)
Effects of Temperature Fluctuation on Physiological and Immune Parameters of Scallop (<i>Patinopecten yessoensis</i>).....	GAO Zhenkun, ZHANG Jihong, LI Min, MA Sha, GUO Xiaoliang, JIANG Weiwei, LÜ Xūning	(148)
Study on Genetic Diversity of Four New <i>Saccharina japonica</i> Cultivars.....	YAO Haiqin, LIU Fuli, WANG Feijiu, LIANG Zhourui, WANG Wenjun, SUN Xiutao, LI Xiaolei	(155)
Optimization of Fermentation Conditions and Analysis of the Nutrition Components of Soybean Meal Fermented with <i>Bacillus firmus</i>	SUN Jing, SONG Xiaoling, HUANG Jie	(163)
Effects of Ammonia Nitrogen Stress on the Survival and Activities of Non-Specific Immune Enzymes of Different-Sized Sea Cucumber (<i>Apostichopus japonicus</i>).....	XU Songtao, ZHAO Bin, LI Chenglin, HU Wei, HAN Sha, LI Qi	(172)
Screening and Characteristic Analysis of Potential Probiotics from Large Water Ponds Used for Sea Cucumber (<i>Apostichopus japonicus</i>) Farming.....	DU Tuo, LI Bin, WANG Yingeng, LIAO Meijie, WANG Jinyan, LIU Zhixuan, WANG Shihuan	(180)
Etiology and Treatment of Enteritis Disease in Cultured Junviles of <i>Apostichopus japonicus</i>	PANG Huijuan, LIAO Meijie, LI Bin, RONG Xiaojun, WANG Yingeng, ZHANG Zheng, SUN Jinsheng, MENG Fanlin	(188)
Assessment on the Culture Efficiency of <i>Paralichthys olivaceus</i> and <i>Scophthalmus maximus</i> in Two New Environment-Friendly Plastic Cages.....	WANG Tengting, GUAN Changtao, GONG Pihai, CUI Yong, LI Zhenzhen	(198)

桑沟湾养殖海域营养盐时空分布特征 及富营养化评价*



徐东会¹ 陈碧鹃¹ 江涛¹ 朱琳¹ 夏斌^{1,2①}
韩倩¹ 古彬¹ 崔毅^{1,2} 柴超³

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 山东省渔业资源与生态环境重点实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室
海洋生态与环境科学功能实验室 青岛 266071; 3. 青岛农业大学资源与环境学院 青岛 266109)

摘要 根据 2014 年 10 月、2015 年 3 月、5 月和 8 月在桑沟湾养殖水域开展的海洋调查所获取的营养盐状况调查数据,分析了营养盐含量的季节变化和平面分布,并对该水域营养水平状况进行了评价。结果显示,该海域秋季溶解无机氮(DIN)含量明显高于其他三个季节。夏季 NO₂-N 的平均含量最高,秋季 NO₃-N 的平均含量最高,春季 NH₄-N 的平均含量最高,冬季 PO₄-P 的平均含量最高。与海水水质标准相比,各季节 DIN 总体水平均低于海水一类标准值,春季和夏季 PO₄-P 总体水平低于海水一类标准值,秋季和冬季 PO₄-P 总体水平则高于海水一类标准值。从平面分布看,春季 DIN 含量呈湾内低、湾外高的趋势,夏季和秋季呈湾内高、湾外低的趋势,冬季呈自湾内南部水域向北逐渐降低的趋势。春季和冬季 PO₄-P 含量均呈自湾内中部水域向外逐渐下降的趋势,夏季呈自湾内中部水域向外逐渐上升的趋势;秋季则呈湾内高、湾外低的趋势。春季、夏季和冬季 N/P 比值均高于 Redfield 比值,无机磷相对缺乏,而秋季 N/P 比值与 Redfield 比值基本一致。根据潜在性富营养化评价模式,桑沟湾养殖海域四个季节的营养水平较低,均属贫营养水平。与 20 世纪八九十年代相比,桑沟湾浮游植物生长的主要限制性因素已由整体的氮限制转变为春、夏季磷限制为主。

关键词 桑沟湾; 营养盐; 季节变化; 分布

中图分类号 X821 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2017)03-0001-11

海洋中营养物质含量的高低可促进或限制海洋生态系统中的能量转化,是构成海洋生态系统物质循环的重要组成部分(孙耀等, 1996)。海水中的无机氮、无机磷等营养盐类是浮游植物生长的重要生源要素,在控制海洋初级生产力方面起着重要的作用(宋云利等, 1996; Klausmeier *et al.*, 2004; 郝林华等, 2012; 隋琪等, 2016)。

桑沟湾位于山东省荣成县东部沿海,北、西、南三面为陆地,总面积为 133.3 km²,通过宽 10 km 的湾口与黄海相连。自 20 世纪 80 年代起,人们开始在桑沟湾进行大规模的养殖活动,养殖品种主要包括海带(*Laminaria japonica*)、长牡蛎(*Crassostrea gigas*)和栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)等,桑沟湾已成为我国北方重要的半封闭型海湾规模化海水养殖示范区(尹相淳,

* 国家自然科学基金委-山东省联合基金项目(U1406403)和国家海洋局项目(DOMEP(MEA)-01-01; DOMEP(MEA)-02)共同资助[This work was supported by the Joint Fund Project of National Fund Committee and Shandong Province (U1406403), and the State Oceanic Administration Project of China (DOMEP(MEA)-01-01; DOMEP(MEA)-02)]

徐东会, E-mail: lvbaobei@sina.com

① 通讯作者: 夏斌, 副研究员, E-mail: xiabin@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-01-27, 收修改稿日期: 2016-02-22

1988; 张继红等, 2012; 夏斌等, 2013)。但随着工业污水的大量排海及海产品的过度养殖等, 桑沟湾水环境受损, 海区产量持续下降(石洪华等, 2008; 张继红等, 2011)。因此, 调查研究桑沟湾海域的营养盐, 对该区域养殖生产活动和生态环境保护具有重大指导意义。目前, 有关桑沟湾养殖海域的水环境特征, 主要是对桑沟湾营养盐的时空分布和营养盐限制的分析评价(乔聚海, 1988; 连岩等, 1998; 孙耀等, 1998; 刘慧等, 2003; 孙丕喜等, 2007; 曲克明等, 2008; 孙珊等, 2010; 张继红等, 2010、2012; 郝林华等, 2012)。关于桑沟湾近年来营养盐时空分布变化和全湾不同区域营养盐季节变化特征分析的研究报道较少。本研究根据 2014 年 10 月、2015 年 3 月、5 月和 8 月在桑沟湾养殖水域开展的海洋调查所获得的营养盐资料, 分析了桑沟湾养殖海区主要营养盐的季节变化及限制因子, 掌握桑沟湾最新的水质营养状况及时空分布变化特征, 为实现桑沟湾生态环境的有效保护和健康生态养殖管理提供科学依据, 并为推动我国生态系统水平的高效、持续海水养殖提供技术支撑。

1 材料与方 法

1.1 采样站位与时间

分别于 2014 年 10 月(秋季)、2015 年 3 月(冬季)、5 月(春季)和 8 月(夏季)在桑沟湾养殖水域布设 16 个调查站位(图 1), 采集水样, 其中, S1、S2、S3、S7、S11

号站位于近岸区域, S4、S8、S12 号站位于贝类养殖区, S5、S9、S13 号站位于贝藻混养区, S6、S10、S14 号站位于藻类养殖区, S15、S16 号站位于外海海域。

1.2 测定参数与分析方法

样品的测定分析参数包括亚硝酸盐($\text{NO}_2\text{-N}$)、硝酸盐($\text{NO}_3\text{-N}$)、氨氮($\text{NH}_4\text{-N}$)和磷酸盐($\text{PO}_4\text{-P}$)。 $\text{NO}_2\text{-N}$ 采用萘乙二胺分光光度法测定, $\text{NO}_3\text{-N}$ 采用镉柱还原法测定, $\text{NH}_4\text{-N}$ 采用次溴酸盐氧化法测定, $\text{PO}_4\text{-P}$ 采用磷钼蓝分光光度法测定。采样的层次为表、底层。样品的采集和现场处理及分析方法均参照《海洋监测规范》(GB17378.4-2007)执行。同时, 采用美国 YSI556 型多参数水质监测仪测定海水表层温度、盐度等环境参数。

1.3 富营养化评价方法

根据郭卫东等(1998)提出的潜在性富营养化评价模式, 对桑沟湾养殖海域四个季节总体富营养化水平进行评价, 营养级的划分见表 1。

2 结果与讨论

2.1 环境因子的季节变化

2.1.1 水温 春季桑沟湾调查海域表层水温范围为 $11.91\text{--}17.57^\circ\text{C}$, 平均值为 14.76°C 。其水平分布总体表现为由湾口向湾内逐渐递增的趋势(图 2-a)。夏

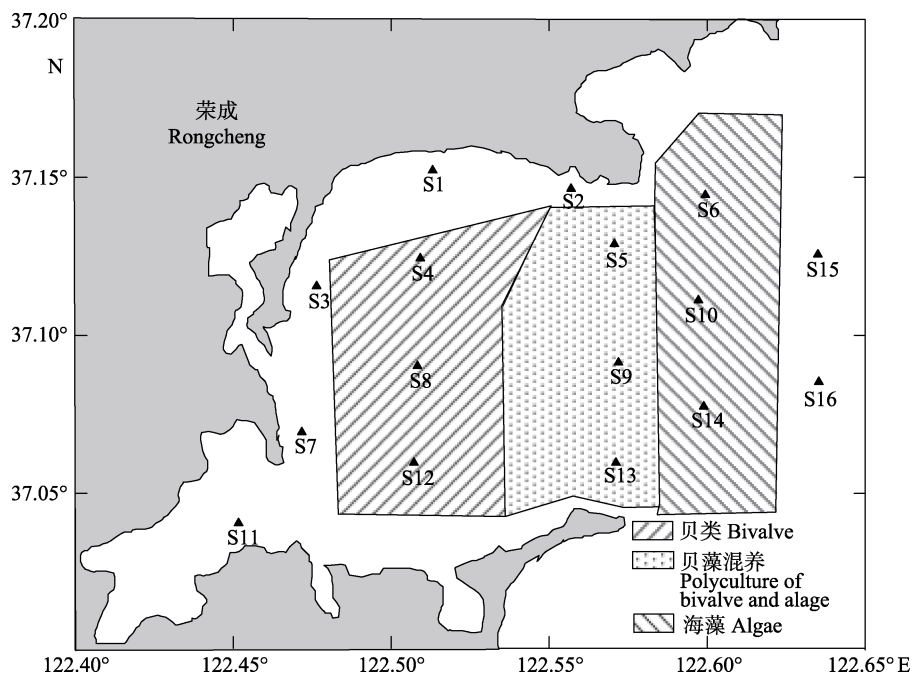


图 1 调查区域及站位

Fig.1 Investigation area and sampling stations

表 1 潜在性富营养化评价标准(郭卫东等, 1998)
Tab.1 Potential eutrophication assessment standards (Guo *et al.*, 1998)

级别 Grade	营养级 Nutrient level	溶解无机氮 DIN (mg/L)	磷酸盐 PO ₄ -P (mg/L)	氮磷比 N/P
I	贫营养 Poor nutrition	< 0.2	< 0.03	8–30
II	中度营养 Medium nutrition	0.2–0.3	0.03–0.045	8–30
III	富营养 Rich nutrition	> 0.3	> 0.045	8–30
IV _P	磷限制中度营养 Medium nutrition with limiting phosphorus	0.2–0.3	–	> 30
V _P	磷中等限制潜在性富营养 Potential rich nutrition with medium limiting phosphorus	> 0.3	–	30–60
VI _P	磷限制潜在性富营养 Potential rich nutrition with limiting phosphorus	> 0.3	–	> 60
IV _N	氮限制中度营养 Medium nutrition with limiting nitrogen	–	0.03–0.045	< 8
V _N	氮中等限制潜在性富营养 Potential rich nutrition with medium limiting nitrogen	–	> 0.045	4–8
VI _N	氮限制潜在性富营养 Potential rich nutrition with limiting nitrogen	–	> 0.045	< 4

季桑沟湾表层水温范围为 21.72–25.95℃, 平均值为 24.02℃, 其水平分布总体亦表现为由湾口向湾内逐渐递增的趋势(图 2-b)。秋季桑沟湾表层水温范围为 16.47–18.48℃, 平均值为 17.90℃, 其水平分布总体表现为由湾口向湾内逐渐递减的趋势(图 2-c)。冬季桑沟湾表层水温范围为 3.33–8.48℃, 平均值为 5.61℃, 其水平分布总体表现为由湾口向湾内逐渐递增的趋势(图 2-d)。调查期间, 桑沟湾养殖海域表层水温介于 3.33–25.95℃之间, 水温高值出现在 8 月, 低值出现在 3 月。桑沟湾湾内水深较浅, 水深自湾底向湾口递增, 由于湾内水深较浅, 水温易受气温、光照等环境因子的影响(乔聚海, 1988; 尹相淳, 1988; 张继红等, 2010)。春季和夏季湾内水温上升较快, 表现为湾内水温高于湾口; 秋季湾内水温下降较快, 表现为湾内水温低于湾口, 与同期文献报道基本一致(连岩等, 1998; 孙珊等, 2010; 张继红等, 2010、2012)。

2.1.2 盐度 春季桑沟湾调查海域表层盐度范围为 27.83–32.51, 平均值为 30.96, 其水平分布总体表现为由南向北逐渐递增的趋势(图 3-a)。夏季桑沟湾表层盐度范围为 30.94–32.29, 平均值为 31.68, 其水平分布总体表现为由南向北逐渐递减的趋势(图 3-b)。秋季桑沟湾表层盐度范围为 30.46–30.97, 平均值为 30.83, 其水平分布总体表现为由湾口向湾内逐渐递减的趋势(图 3-c)。冬季桑沟湾表层盐度范围为 31.91–33.08, 平均值为 32.18, 其水平分布总体亦表现为由湾口向湾内逐渐递减的趋势(图 3-d)。调查期间, 桑沟湾养殖海域盐度介于 27.83–33.08 之间, 盐度高值

出现在 3 月, 低值出现在 5 月。本研究结果与已有报道结果相似(连岩等, 1998; 孙珊等, 2010; 张继红等, 2010), 桑沟湾养殖海域盐度的总体趋势表现为湾外高于湾内, 这主要是由于陆地径流或降雨导致的。

2.2 桑沟湾营养盐的季节变化

桑沟湾调查海域, 春季 NO₂-N、NO₃-N、NH₄-N、PO₄-P 的表、底层平均浓度分别为 5.14、39.55、79.67、13.15 μg/L; 夏季 NO₂-N、NO₃-N、NH₄-N、PO₄-P 的表、底层平均浓度分别为 12.63、33.09、77.86、12.52 μg/L; 秋季 NO₂-N、NO₃-N、NH₄-N、PO₄-P 的表、底层平均浓度分别为 11.47、107.71、39.68、22.99 μg/L; 冬季 NO₂-N、NO₃-N、NH₄-N、PO₄-P 的表、底层平均浓度分别为 12.14、41.05、72.08、24.44 μg/L。桑沟湾水域 NO₂-N 的平均含量春季最低而夏季最高; NO₃-N 的平均含量夏季最低而秋季最高; NH₄-N 的平均含量秋季最低而春季最高; PO₄-P 的平均含量夏季最低而冬季最高(表 2)。从季节性变化来看, DIN 含量为秋季>冬季>春季>夏季, PO₄-P 含量为冬季>秋季>春季>夏季, 与现有报道的桑沟湾营养盐季节分布状况基本一致(张继红等, 2010; 郝林华等, 2012)。

在春季、夏季和冬季的调查中, NH₄-N 为溶解无机氮的主要存在形式, 所占比例分别为表层 64.3%、62.2%和 58.4%, 底层为 63.9%、63.8%和 56.8%; 表层秋季 NO₃-N 占无机氮的 66.7%, 底层占 69.4%; 春季、夏季、秋季和冬季表层 NO₂-N 分别占无机氮的

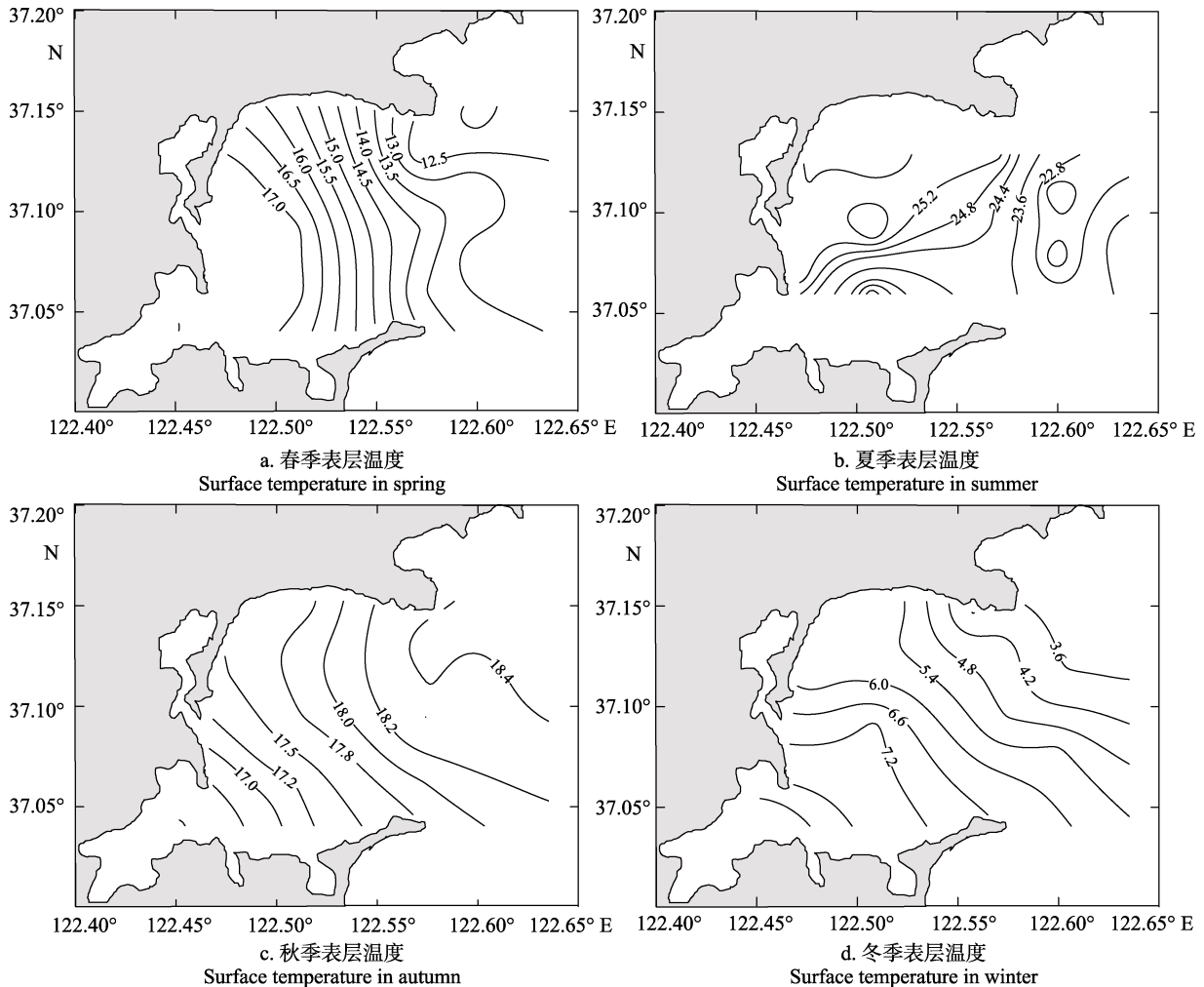


图2 桑沟湾四季水温的平面分布

Fig.2 Horizontal distribution of water temperature in Sanggou Bay during four seasons

4.1%、11.8%、5.9%和10.1%，底层分别占4.1%、8.7%、9.1%和9.3%。桑沟湾海域，无机氮总体水平低于海水一类标准值(200 $\mu\text{g/L}$)。其中，秋季表层有7个站位无机氮含量超过海水一类标准值，超标率为43.8%；春季、秋季和冬季底层分别有1、3和2个站位无机氮含量超过海水一类标准值，超标率分别为6.7%、18.8%和13.3%；春季和夏季 $\text{PO}_4\text{-P}$ 总体水平低于海水一类标准值(15 $\mu\text{g/L}$)，其中，表层均有5个测站 $\text{PO}_4\text{-P}$ 含量超过海水一类标准值，超标率均为33.3%，底层分别有5和3个站位 $\text{PO}_4\text{-P}$ 含量超过海水一类标准值，超标率分别为33.3%和18.7%；秋季和冬季 $\text{PO}_4\text{-P}$ 总体水平高于海水一类标准值(15 $\mu\text{g/L}$)，其中，表层分别有11和9个测站 $\text{PO}_4\text{-P}$ 含量超过海水一类标准值，超标率分别为68.8%和60.1%，底层有13和11个测站 $\text{PO}_4\text{-P}$ 含量超过海水一类标准值，超标率分别为81.3%和73.3%。虽然桑沟湾养殖贝类排泄的大量氮磷营养盐会导致养殖水域环境呈现富营

养化，但大规模养殖的大型藻类作为生物滤器能够吸收水体中多余的营养盐，并转化为具有较高价值的水产品，同时达到对环境的净化作用(Nelson *et al.*, 2001)。因此，桑沟湾贝藻养殖起到了一定程度的海水净化作用，故营养盐的浓度远远低于胶州湾和乳山湾等海湾(Shen, 2001; 幸福言等, 2004; 孙珊等, 2010; 张继红等, 2010)，水质能够达到国家一类或二类的海水水质标准。在桑沟湾实施的以贝藻为主体的多营养层次综合养殖能够更好地彰显水产养殖的生态服务功能，为环境友好型水产养殖业的代表性发展模式，可为推动我国生态系统水平的高效、持续海水养殖提供重要的技术支撑(蒋增杰等, 2012; 唐启升等, 2013)。

2.3 桑沟湾营养盐的平面分布特征

由图4可见，春季溶解无机氮(DIN)表、底层分布趋势基本一致，自湾外东北部向湾内西南方向逐渐降低，呈现湾内低、湾外高的趋势(图4-a、b)；夏季

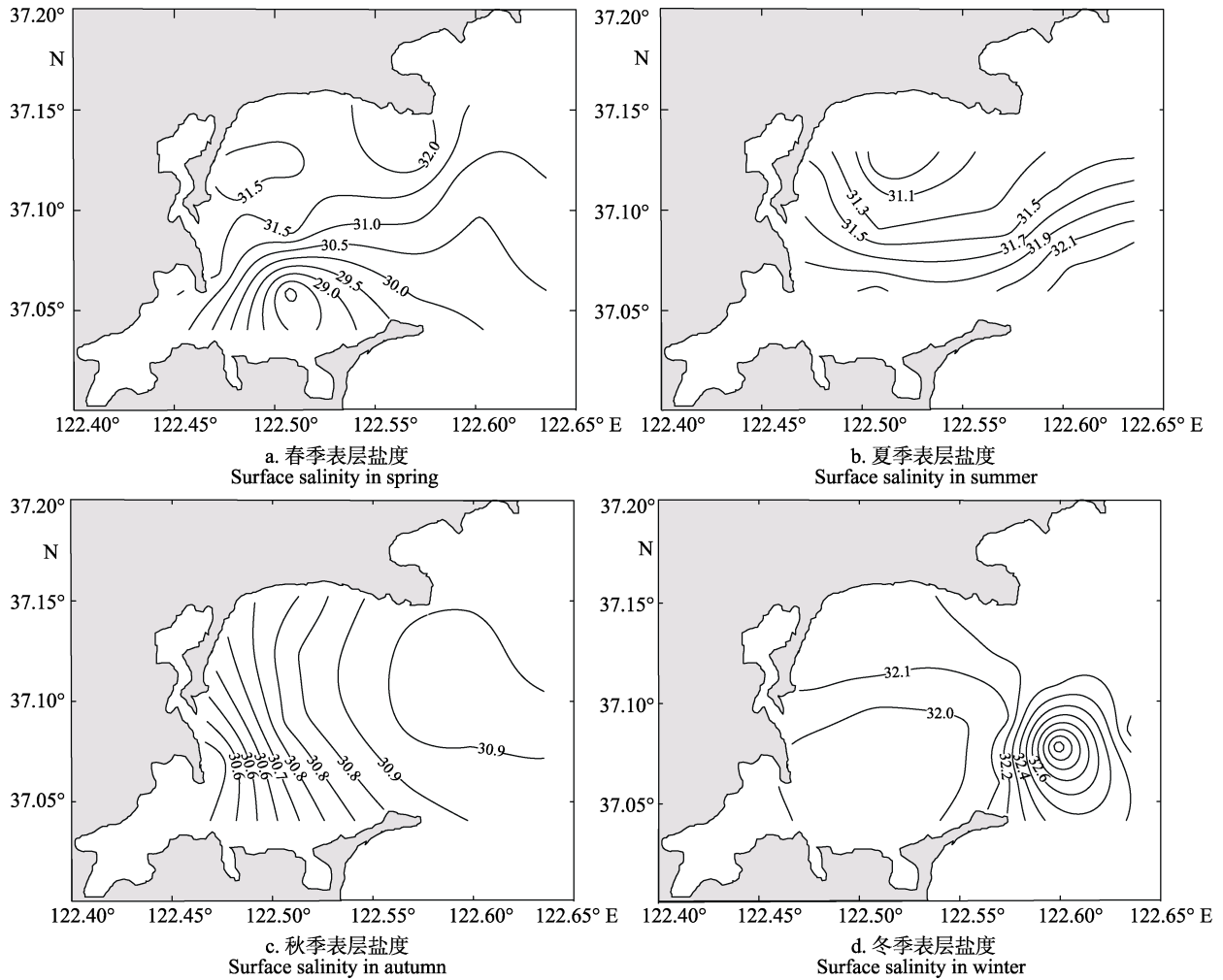


图 3 桑沟湾四季盐度的平面分布

Fig.3 Horizontal distribution of salinity in Sanggou Bay during four seasons

表 2 桑沟湾海区四季营养盐平均浓度

Tab.2 The average concentration of nutrients in Sanggou Bay during four seasons ($\mu\text{g/L}$)

季节 Season	水层 Water layer	亚硝酸氮 $\text{NO}_2\text{-N}$	硝酸氮 $\text{NO}_3\text{-N}$	氨氮 $\text{NH}_4\text{-N}$	溶解无机氮 DIN	磷酸盐 $\text{PO}_4\text{-P}$
春季 Spring	表层 Surface	5.08 (0.93–7.60)	38.69 (8.15–73.58)	78.69 (53.17–138.79)	122.46 (92.10–192.76)	12.73 (4.72–24.75)
	底层 Bottom	5.21 (1.21–13.71)	40.39 (17.51–63.78)	80.66 (54.77–155.67)	126.26 (93.91–233.16)	13.58 (4.72–33.85)
夏季 Summer	表层 Surface	14.33 (4.82–63.97)	31.74 (9.47–63.26)	75.68 (58.90–93.21)	121.75 (91.21–180.47)	13.06 (5.36–28.05)
	底层 Bottom	10.93 (7.04–15.93)	34.44 (15.17–57.12)	80.03 (55.47–96.64)	125.40 (73.36–158.35)	11.98 (5.36–24.81)
秋季 Autumn	表层 Surface	11.07 (0.06–56.13)	124.73 (37.01–227.15)	51.16 (0.23–149.55)	186.96 (70.28–403.44)	21.67 (7.06–42.12)
	底层 Bottom	11.87 (0.06–56.97)	90.70 (15.95–293.86)	28.20 (10.23–55.12)	130.77 (29.95–395.40)	24.32 (7.06–45.05)
冬季 Winter	表层 Surface	11.79 (2.28–33.37)	36.66 (15.32–60.38)	68.11 (34.86–103.57)	116.56 (68.84–145.00)	18.31 (4.72–32.03)
	底层 Bottom	12.49 (2.83–22.54)	45.44 (22.51–132.63)	76.05 (49.13–160.50)	133.98 (94.19–209.19)	30.58 (4.72–83.02)

注: 括号内数据为变化范围

Note: Data in brackets were variation ranges

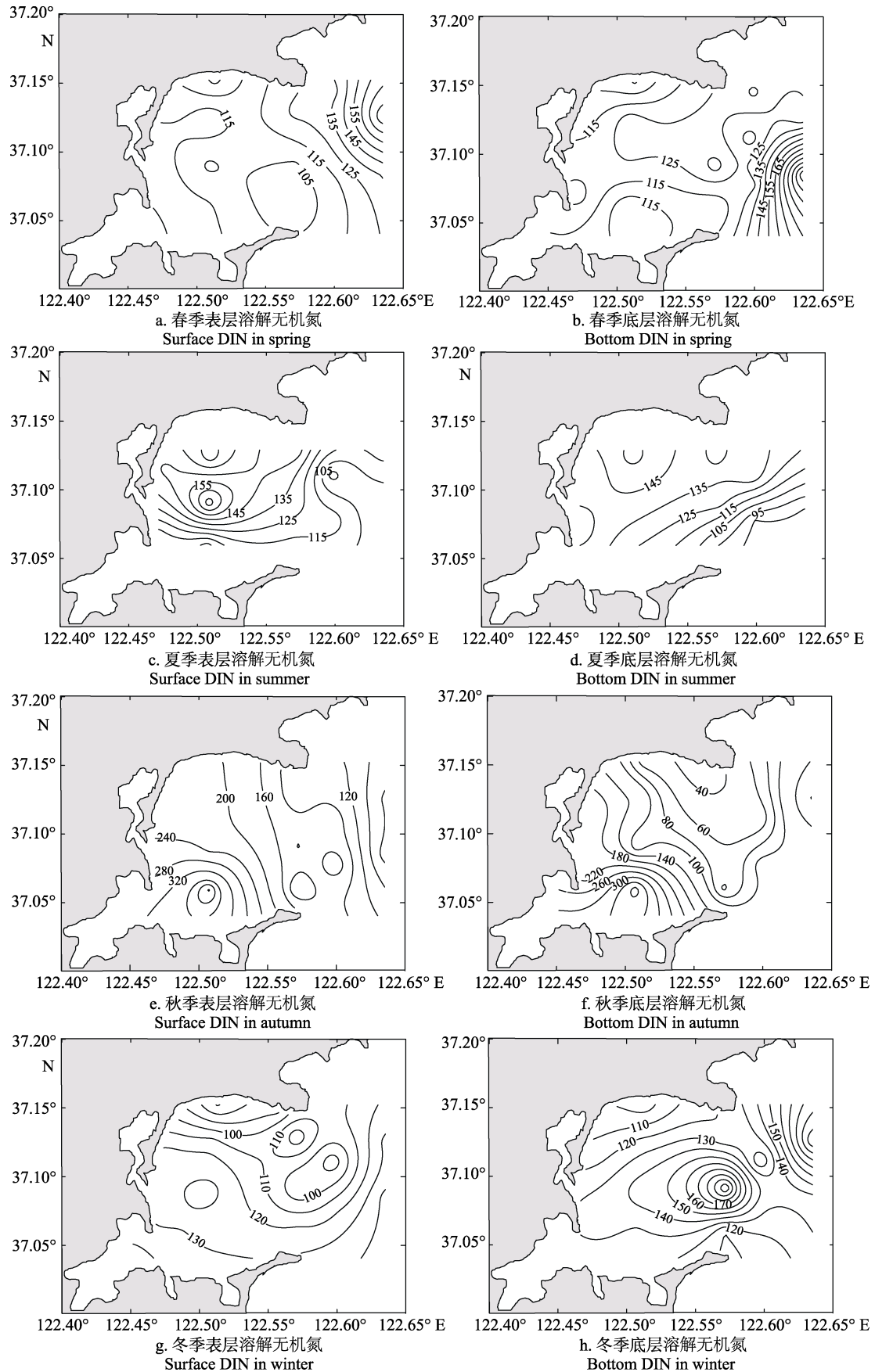


图4 桑沟湾四季溶解无机氮的平面分布

Fig.4 Horizontal distribution of dissolved inorganic nitrogen (DIN) in Sanggou Bay during four seasons

DIN 表、底层分布趋势亦基本一致, 自中部水域向湾外东南方向逐渐降低, 呈现湾内高、湾外低的趋势(图 4-c、d); 秋季 DIN 表、底层分布趋势基本一致, 自湾内南部水域向湾外东北方向逐渐降低, 呈现湾内高、湾外低的趋势(图 4-e、f); 冬季表层 DIN 呈现自湾内南部水域向北逐渐降低的趋势, 冬季底层 DIN 在湾内中部偏东水域形成一较密集闭合区, 并呈现由中心向外逐渐降低的趋势(图 4-g、h)。

桑沟湾不同区域营养盐的浓度受养殖活动和外界海水影响较大(孙珊等, 2010), 季节变化明显。同时, 由湾底向湾口依次排列的贝类养殖区、贝藻混养区、藻类养殖区等形成了桑沟湾特有的多元养殖模式, 导致湾内外海水的交换受到一定程度的制约(刘慧等, 2003; 郝林华等, 2012), 大大降低了湾内营养盐的补充量。春季外海区域表层 DIN 的平均浓度最高, 贝藻混养区域表层 DIN 的平均浓度最低; 夏季贝藻混养区域表层 DIN 的平均浓度最高, 藻类养殖区域表层 DIN 的平均浓度最低; 秋季贝类养殖区域表层 DIN 的平均浓度最高, 外海区域表层 DIN 的平均浓度最低; 冬季外海区域表层 DIN 的平均浓度最高, 藻类养殖区域表层 DIN 的平均浓度最低(图 5-a)。春季外海区域底层 DIN 的平均浓度最高, 近岸区域底层 DIN 的平均浓度最低; 夏季近岸区域底层 DIN 的平均浓度最高, 外海区域底层 DIN 的平均浓度最低; 秋季贝类养殖区域底层 DIN 的平均浓度最高, 贝藻混养区域底层 DIN 的平均浓度最低; 冬季外海区域底层 DIN 的平均浓度最高, 近岸区域底层 DIN 的平均浓度最低(图 5-b)。本研究中, 秋季贝类养殖区域 DIN 的浓度最高, 这是由于桑沟湾养殖水域滤食性贝类的排氮率在秋季达到最高所致(牛亚丽, 2014)¹⁾。

由图 6 可见, 春季表层 $PO_4\text{-P}$ 分别在湾内西北和西南部水域形成了 2 个较密集闭合区, 并呈现由中心向外逐渐降低的趋势, 春季底层 $PO_4\text{-P}$ 在湾内中部水域形成了一较密集闭合区, 并呈现由中心向外逐渐下降的趋势(图 6-a、b); 夏季 $PO_4\text{-P}$ 表、底层分布趋势基本一致, 均呈现自中部水域向外逐渐上升的趋势(图 6-c、d); 秋季 $PO_4\text{-P}$ 表、底层分布趋势亦基本一致, 自湾内西部水域向东逐渐降低, 呈现湾内高、湾外低的趋势(图 6-e、f); 冬季 $PO_4\text{-P}$ 表、底层分布趋势基本一致, 在湾内中部偏东水域形成一较密集闭合区, 并呈现由中心向外逐渐降低的趋势(图 6-g、h)。

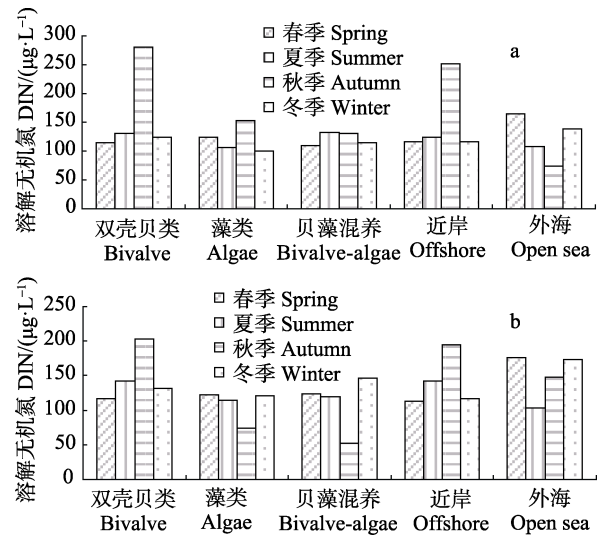


图 5 桑沟湾四季不同区域溶解无机氮浓度
Fig.5 Regional distribution of dissolved inorganic nitrogen (DIN) in Sanggou Bay during four seasons

a: 表层; b: 底层
a. Surface; b. Bottom

桑沟湾海域, 春季表层 $PO_4\text{-P}$ 的平均浓度在贝类养殖区域最高, 在贝藻混养区域最低; 夏季表层 $PO_4\text{-P}$ 的平均浓度在近岸和藻类养殖区域最高, 在贝类养殖区域最低; 秋季表层 $PO_4\text{-P}$ 的平均浓度在近岸区域最高, 在外海区域最低($P<0.05$); 冬季表层 $PO_4\text{-P}$ 的平均浓度在外海区域最高, 在贝类养殖区域最低(图 7-a)。春季底层 $PO_4\text{-P}$ 的平均浓度在外海区域最高, 在近岸区域最低(图 7-b); 夏季底层 $PO_4\text{-P}$ 的平均浓度在近岸和藻类养殖区域最高, 在贝藻混养区域最低; 秋季底层 $PO_4\text{-P}$ 的平均浓度在贝类养殖区域最高, 在外海区域最低; 冬季底层 $PO_4\text{-P}$ 的平均浓度在外海区域最高, 在贝类养殖区域最低($P<0.05$)。本研究中, 春季贝类养殖区域的 $PO_4\text{-P}$ 浓度最高, 这与万玲(2012)的研究结果相一致, 这主要是由于贝类排泄和沉积物释放所导致(孙丕喜等, 2007; 郝林华等, 2012)。春季海带正处于高速生长和繁殖期, 会大量吸收营养盐, 而在夏季海带收获后, 则大大缓解了营养盐的限制压力(吴文广等, 2015), 导致春季藻类养殖区域的 $PO_4\text{-P}$ 浓度低于夏季。夏季桑沟湾海域不同区域的 $PO_4\text{-P}$ 浓度较低, 这是由于夏季海带收获后, 大片海域成为空闲海区, 浮游植物缺乏营养盐的竞争而快速生长, 大量消耗营养盐所致(吴文广等, 2015)。

1) Niu YL. Study on seasonal variation of the C, N, P, Si budget of the bivalves in Sungo Bay. Master's Thesis of Zhejiang Ocean University, 2014, 28-40 [牛亚丽. 桑沟湾滤食性贝类碳、氮、磷、硅元素收支的季节变化研究. 浙江海洋学院硕士研究生学位论文, 2014, 28-40]

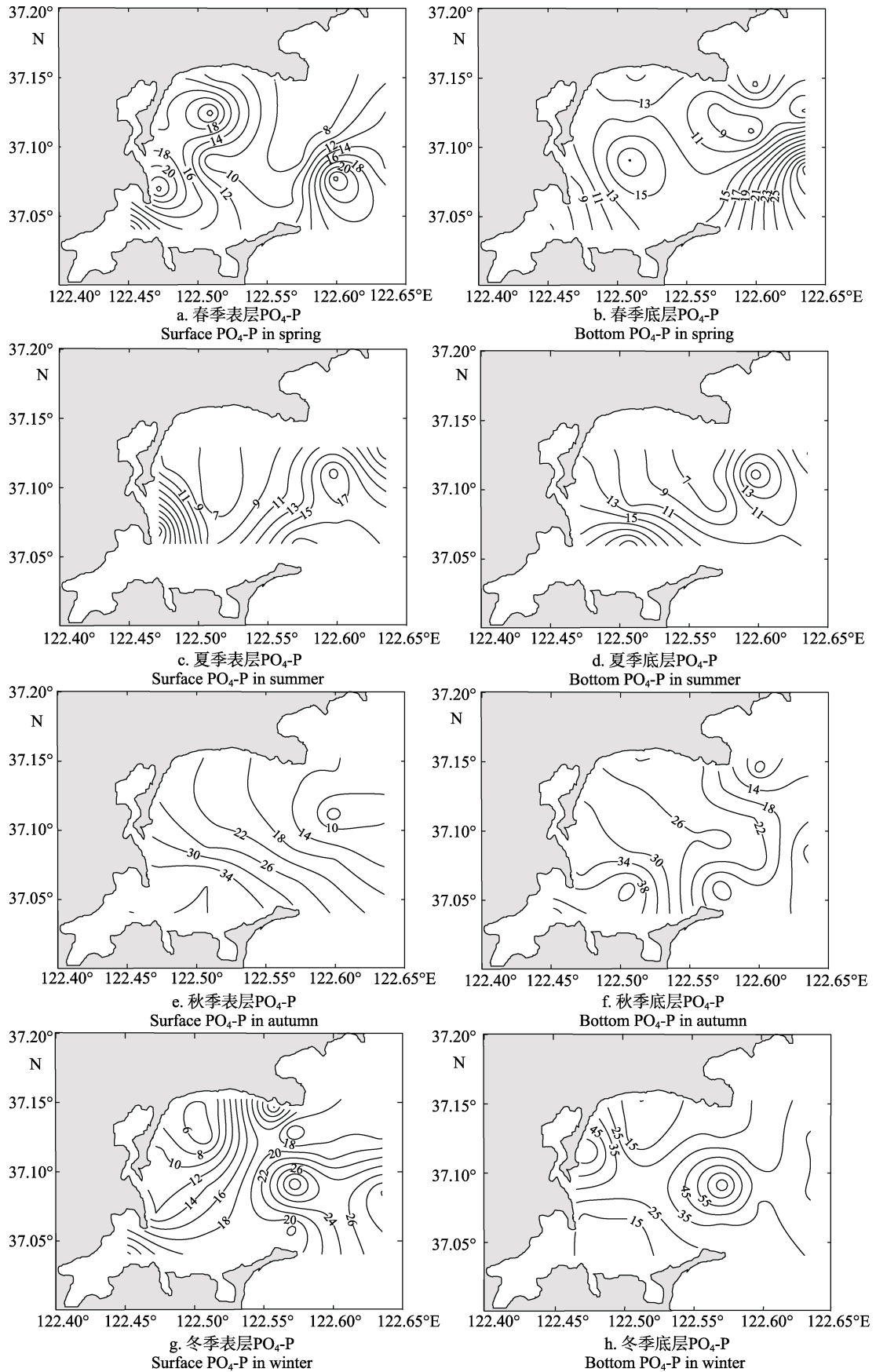
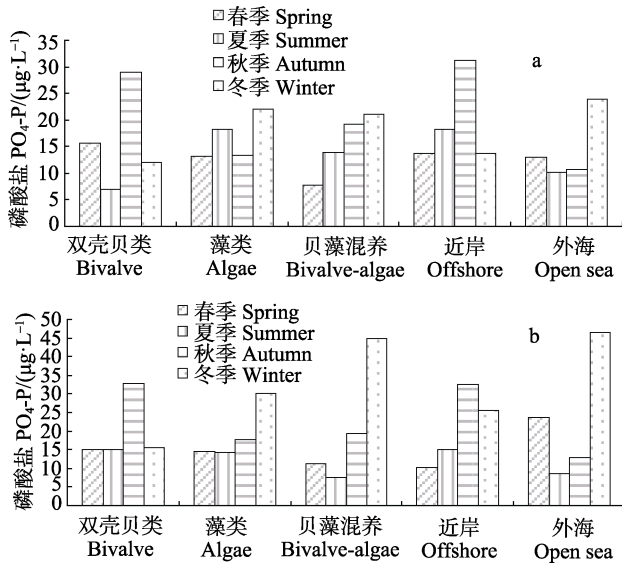


图 6 桑沟湾四季 PO₄-P 的平面分布

Fig.6 Horizontal distribution of PO₄-P in Sanggou Bay during four seasons

图 7 桑沟湾四季不同区域 PO₄-P 浓度Fig.7 Regional distribution of PO₄-P concentration in Sanggou Bay during four seasons

a: 表层; b: 底层

a: Surface; b: Bottom

2.4 营养盐结构及营养类型分析

有研究表明, 浮游植物通常以约为 16 : 1 的 N/P 比值自海水中摄取氮和磷, 过高或过低于 Redfield 比值, 均会引起浮游植物的生长受限(Redfield *et al*, 1963; Pilson, 1985; 郝林华等, 2012)。桑沟湾调查海域, 春季表底层 N/P 比值均高于 Redfield 比值, 分别比正常 N/P 比值高 1.71 倍和 1.57 倍, 春季无机磷显得相对缺乏, 为浮游植物生长的限制因子。夏季表、底层 N/P 比值亦均高于 Redfield 比值, 分别比正常 N/P 比值, 高 1.78 倍和 1.76 倍, 夏季无机磷亦显得相对缺乏, 为浮游植物生长的限制因子。秋季表层 N/P 比值高于 Redfield 比值, 比正常 N/P 比值高 1.28 倍, 底层 N/P 比值低于 Redfield 比值, 秋季营养盐结构总体水平与 Redfield 比值基本一致。冬季表层 N/P 比值高于 Redfield 比值, 比正常 N/P 比值高 1.14 倍, 底层 N/P 比值低于 Redfield 比值, 冬季营养盐结构总体水平略高于 Redfield 比值, 无机磷略显缺乏(表 3)。与 20 世纪八九十年代报道的数据相比(乔聚海, 1988; 宋云利等, 1996; 孙耀等, 1996), 本研究结果与近年的研究报道相一致, 桑沟湾浮游植物生长的主要限制性因素, 已由整体的氮限制转变为春、夏季磷限制为主(孙丕喜等, 2007; 孙珊等, 2010; 张继红等, 2010、2011; 万玲, 2012)。

富营养化评价结果显示, 桑沟湾养殖水域营养水平较低, 四个季节均属贫营养水平(表 4)。本研究结果与现有研究报道相一致(孙丕喜等, 2007; 张继红等, 2011; 万玲, 2012), 桑沟湾营养水平较低, 水质较好。

这主要是与桑沟湾养殖海域中构建的多营养层次综合养殖模式有关, 一方面该养殖模式促进了海洋生态系统的高效产出, 保障了水产品的持续供给; 另一方面, 其最大程度地挖掘了以碳汇扩增为特点的生态服务功能, 保障了生态系统健康(蒋增杰等, 2012; 唐启升等, 2013)。当然, 在今后桑沟湾养殖模式发展的过程中, 仍然需要特别关注养殖生态容纳量与养殖品种的搭配、营养物质循环与养殖生物的互补互益、系统产出与生态和社会经济效益等科学数据(唐启升等, 2013)。

表 3 桑沟湾海区四季营养盐相对组成

Tab.3 The relative composition of nutrients in Sanggou Bay

季节 Season	水层 Water layer	氮磷比 N/P
春季 Spring	表层 Surface	27.37
	底层 Bottom	25.09
夏季 Summer	表层 Surface	28.41
	底层 Bottom	28.12
秋季 Autumn	表层 Surface	20.42
	底层 Bottom	12.46
冬季 Winter	表层 Surface	18.28
	底层 Bottom	15.81

表 4 桑沟湾海区四季营养类型评价

Tab.4 Nutrient type assessment in Sanggou Bay during four seasons

季节 Season	DIN (mg/L)	PO ₄ -P (mg/L)	氮磷比 N/P	营养级 Nutrient level
春季 Spring	0.124	0.013	26.23	I
夏季 Summer	0.123	0.012	28.27	I
秋季 Autumn	0.159	0.023	16.44	I
冬季 Winter	0.125	0.024	17.05	I

3 结论

桑沟湾养殖海域秋季无机氮含量明显高于其他三个季节。NO₂-N 的平均含量夏季最高, 春季最低; NO₃-N 的平均含量秋季最高, 夏季最低; NH₄-N 的平均含量春季最高, 秋季最低; PO₄-P 的平均含量冬季最高, 夏季最低。相比海水水质标准, 各季节无机氮总体水平均低于海水一类标准值, 春季和夏季 PO₄-P 总体水平低于海水一类标准值, 秋季和冬季 PO₄-P 总体水平则高于海水一类标准值。

从水平分布看, 春季溶解无机氮含量呈现湾内低、湾外高的趋势, 夏季和秋季呈现湾内高、湾外低的趋势, 冬季呈现自湾内南部水域向北逐渐降低的趋势。春季和冬季 PO₄-P 含量均呈现自湾内中部水域向外逐渐下降的趋势, 夏季呈现自湾内中部水域向外逐渐上升的趋势; 秋季则呈现湾内高、湾外低的趋势。

春季、夏季和冬季,桑沟湾养殖海域营养盐结构总体水平高于 Redfield 比值,无机磷成为浮游植物生长的限制因子。而秋季营养盐结构总体水平与 Redfield 比值基本一致。

运用潜在性富营养化评价模式分析显示,桑沟湾养殖海域营养水平较低,四个季节均属贫营养水平。

参 考 文 献

- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. The specification for marine monitoring—Part 4: Seawater analysis (GB17378.4-2007). Beijing: China Standards Press, 2007 [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委员会. 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]
- Guo WD, Zhang XM, Yang YP, *et al.* Potential eutrophication assessment for Chinese coastal waters. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 1998, 17(1): 64–70 [郭卫东, 章小明, 杨逸萍, 等. 中国近岸海域潜在性富营养化程度的评价. 台湾海峡, 1998, 17(1): 64–70]
- Hao LH, Sun PX, Hao JM, *et al.* The spatial and temporal distribution of chlorophyll-a and its influencing factors in Sanggou Bay. *Ecology and Environmental Sciences*, 2012, 21(2): 338–345 [郝林华, 孙丕喜, 郝建民, 等. 桑沟湾海域叶绿素 a 的时空分布特征及其影响因素研究. 生态环境学报, 2012, 21(2): 338–345]
- Jiang ZJ, Fang JG, Mao YZ, *et al.* Environmental effect of marine fish cage aquaculture and integrated multi-trophic aquaculture. *Environmental Sciences and Management*, 2012, 37(1): 120–124 [蒋增杰, 方建光, 毛玉泽, 等. 海水鱼类网箱养殖的环境效应及多营养层次的综合养殖. 环境科学与管理, 2012, 37(1): 120–124]
- Klausmeier CA, Litchman E, Daufresne T, *et al.* Optimal nitrogen-to-phosphorus stoichiometry of phytoplankton. *Nature*, 2004, 429(6988): 171–174
- Lian Y, Wang LC, Li SK, *et al.* An investigation on chemistry of seawater of Sanggou Bay. *Journal of Oceanography of Huanghai & Bohai Seas*, 1998, 16(3): 60–66 [连岩, 王立超, 李胜宽, 等. 桑沟湾海水化学调查. 黄渤海海洋, 1998, 16(3): 60–66]
- Liu H, Fang JG, Dong SL, *et al.* Annual variation of major nutrients and limiting factors in Laizhou Bay and Sanggou Bay. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2003, 10(3): 227–234 [刘慧, 方建光, 董双林, 等. 莱州湾和桑沟湾养殖海区主要营养盐的周年变动及限制因子. 中国水产科学, 2003, 10(3): 227–234]
- Nelson SG, Glenn EP, Conn J, *et al.* Cultivation of *Gracilaria parvispora* (Rhodophyta) in shrimp-farm effluent ditches and floating cages in Hawaii: A two-phase polyculture system. *Aquaculture*, 2001, 193(3–4): 239–248
- Pilson MEQ. Annual cycles of nutrients and chlorophyll II in Narragansett Bay, Rhode Island. *Journal of Marine Research*, 1985, 43(4): 849–873
- Qiao JH. The geochemical characteristics of phosphorus in seawater of the Sanggou Bay. *Bulletin of Mineralogy, Petrology and Geochemistry*, 1988(1): 3–4 [乔聚海. 桑沟湾海水中磷的地球化学特征. 矿物岩石地球化学通报, 1988(1): 3–4]
- Qu KM, Song YL, Xu Y, *et al.* Experiment on nutrient limitations in cultured areas of Sanggou Bay *in situ* in spring and summer. *Marine Environmental Science*, 2008, 27(2): 124–127 [曲克明, 宋云利, 徐勇, 等. 桑沟湾养殖水域春季和夏季营养限制的现场实验. 海洋环境科学, 2008, 27(2): 124–127]
- Redfield AC. The influence of organisms on the composition of sea-water. *Marine Biology*, 1963, 40(6): 640–644
- Shen ZL. Historical changes in nutrient structure and its influences on phytoplankton composition in Jiaozhou Bay. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2001, 52: 211–224
- Shi HH, Zheng W, Ding DW, *et al.* Valuation of typical marine ecosystem services—A case study in Sanggou Bay. *Marine Environmental Science*, 2008, 27(2): 101–104 [石洪华, 郑伟, 丁德文, 等. 典型海洋生态系统服务功能及价值评估—以桑沟湾为例. 海洋环境科学, 2008, 27(2): 101–104]
- Song YL, Cui Y, Sun Y, *et al.* Study on nutrient state and influencing factors in Sanggou Bay. *Marine Fisheries Research*, 1996, 17(2): 41–51 [宋云利, 崔毅, 孙耀, 等. 桑沟湾养殖海域营养状况及其影响因素分析. 海洋水产研究, 1996, 17(2): 41–51]
- Sui Q, Xia B, Xie HB, *et al.* Study on temporal and spatial variation of nutrients and evaluation on eutrophication in the seawater of the Bohai Sea in winter and spring of 2014. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(2): 10–15 [隋琪, 夏斌, 谢寒冰, 等. 2014 年春季和冬季渤海海水营养盐时空变化特征及富营养化评价. 渔业科学进展, 2016, 37(2): 10–15]
- Sun PX, Zhang ZH, Hao LH, *et al.* Analysis of nutrient distributions and potential eutrophication in seawater of the Sanggou Bay. *Advances in Marine Science*, 2007, 25(4): 436–445 [孙丕喜, 张朝晖, 郝林华, 等. 桑沟湾海水中营养盐分布及潜在性富营养化分析. 海洋科学进展, 2007, 25(4): 436–445]
- Sun S, Liu SM, Ren JL, *et al.* Distribution features of nutrients and flux across the sediment-water interface in the Sanggou Bay. *Acta Oceanologica Sinica*, 2010, 32(6): 108–117 [孙珊, 刘素美, 任景玲, 等. 桑沟湾养殖海域营养盐和沉积物-水界面扩散通量研究. 海洋学报, 2010, 32(6): 108–117]
- Sun Y, Song YL, Cui Y, *et al.* Distribution and behavior of inorganic nitrogen nutrients in Sanggou Bay. *Marine Fisheries Research*, 1996, 17(2): 52–59 [孙耀, 宋云利, 崔毅, 等. 桑沟湾养殖海域无机氮营养盐的分布与行为. 海洋水产研究, 1996, 17(2): 52–59]
- Sun Y, Zhao J, Zhou SL, *et al.* Environmental features of cultural waters in Sanggou Bay. *Journal of Fishery Sciences of China*, 1998, 5(3): 69–75 [孙耀, 赵俊, 周诗贻, 等. 桑沟湾养殖海域的水环境特征. 中国水产科学, 1998, 5(3): 69–75]
- Tang QS, Fang JG, Zhang JH, *et al.* Impacts of multiple stressors on coastal ocean ecosystems and integrated multi-trophic aquaculture. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(1): 1–11 [唐启升, 方建光, 张继红, 等. 多重压力胁迫下近海生态系统与多营养层次综合养殖. 渔业科学进展, 2013, 34(1): 1–11]
- Wan L. Effect of shellfish farming on nutrient salts of seawater in Sanggou Bay in spring. *Environmental Science and Management*, 2012, 37(6): 62–66 [万玲. 春季桑沟湾海域贝类养殖对海水中营养盐的影响研究. 环境科学与管理, 2012, 37(6): 62–66]
- Wu WG, Zhang JH, Wang W, *et al.* Variation of Chl.a concentration and its control factors pre-and-post-the harvest of kelp in Sanggou Bay. *Journal of Fisheries of*

- China, 2015, 39(8): 1178–1186 [吴文广, 张继红, 王巍, 等. 桑沟湾水域叶绿素 *a* 在海带收获前后的变化及其影响因素. 水产学报, 2015, 39(8): 1178–1186]
- Xia B, Chen BJ, Cui Y, *et al.* Distribution and source of organic carbon in Sanggou Bay in summer. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(1): 44–49 [夏斌, 陈碧鹃, 崔毅, 等. 夏季桑沟湾养殖水域有机碳的平面分布特征及其来源分析. 渔业科学进展, 2013, 34(1): 44–49]
- Xin FY, Chen BJ, Qu KM, *et al.* The distributions of COD, nitrogen and phosphorous nutrients and nutrient status in Rushan Bay. *Marine Fisheries Research*, 2004, 25(5): 52–56 [辛福言, 陈碧鹃, 曲克明, 等. 乳山湾表层海水 COD 与氮、磷营养盐的分布及其营养状况. 海洋水产研究, 2004, 25(5): 52–56]
- Yin XC. The geochemical characteristics of nitrogen in seawater of the Sanggou Bay. *Bulletin of Mineralogy, Petrology and Geochemistry*, 1988, 7(1): 4–5 [尹相淳. 桑沟湾海水中氮的地球化学特征. 矿物岩石地球化学通报, 1988, 7(1): 4–5]
- Zhang JH, Jiang ZJ, Wang W, *et al.* Seasonal distribution and variation of nutrients and nutrients limitation in Sanggou Bay. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(4): 16–25 [张继红, 蒋增杰, 王巍, 等. 桑沟湾营养盐时空分布及营养盐限制分析. 渔业科学进展, 2010, 31(4): 16–25]
- Zhang JH, Ren LH, Xu D, *et al.* Analysis of water quality of abalone suspended long-line mariculture area of Sungo Bay. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(6): 897–904 [张继红, 任黎华, 徐东, 等. 桑沟湾筏式养鲍区水质分析. 水产学报, 2011, 35(6): 897–904]
- Zhang JH, Wang W, Han TT, *et al.* The distributions of dissolved nutrients in spring of Sungo Bay and potential reason of outbreak of red tide. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(1): 132–139 [张继红, 王巍, 韩婷婷, 等. 桑沟湾春季营养盐分布特征及赤潮暴发诱因. 水产学报, 2012, 36(1): 132–139]

(编辑 马璀艳)

Temporal and Spatial Variation Characteristics of Water Nutrients and Eutrophication Evaluation in Aquaculture Water Areas of Sanggou Bay

XU Donghui¹, CHEN Bijuan¹, JIANG Tao¹, ZHU Lin¹, XIA Bin^{1,2①},
HAN Qian¹, GU Bin¹, CUI Yi^{1,2}, CHAI Chao³

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Shandong Provincial Key Laboratory of Fishery Resources and Eco-Environment, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071; 3. College of Resource and Environment, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109)

Abstract In this study, based on the water nutrients data of Sanggou Bay surveyed in the autumn of 2014, and the spring, summer and winter of 2015, the seasonal variation and distribution of nutrients were analyzed and the nutrient levels were evaluated. The results showed that dissolved inorganic nitrogen (DIN) levels in the autumn of 2014 was the highest among four surveyed seasons. The average content of NO₂-N and NO₃-N was the highest during the summer and autumn, respectively. By comparison, the average contents of NH₄-N and PO₄-P were the highest during the spring and winter, respectively. Compared with the seawater quality standard, DIN contents in four seasons were lower than the levels in the first level of seawater standard. Active phosphate contents were lower than the first level of seawater standard in spring and summer, but were higher than first level of seawater standard in autumn and winter. From the perspective of horizontal distribution, the content of DIN of the inner bay was lower than that of the outer bay in spring, but was higher than those of the outer bay in summer and autumn. The content of DIN exhibited an increasing trend from the north to the south area during the winter. The content of PO₄-P showed an increasing trend from the outer bay to the central area in spring and winter. Furthermore, the content of PO₄-P showed a decreasing trend from the outer bay to the central area in summer, and the content of PO₄-P of the inner bay was higher than that of the outer bay in autumn. The N/P ratio was the same as the Redfield ratio in autumn of 2014, and the N/P ratio was higher than the Redfield ratio in spring, summer and winter of 2015, with relatively low levels of inorganic phosphorus. According to the potential eutrophication assessment model, nutrition levels were relatively poor in the autumn of 2014, and the spring, summer and winter of 2015. Compared with the 1980s and 1990s data of Sanggou Bay, the main limiting factor for phytoplankton growth has changed from nitrogen to phosphorus limitation in spring and summer.

Key words Sanggou Bay; Nutrients; Seasonal variation; Distribution

① Corresponding author: XIA Bin, E-mail: xiabin@ysfri.ac.cn

运用 SS3 评估东太平洋大眼金枪鱼(*Thunnus obesus*)资源——复杂模型和简化模型比较*

朱江峰^①



(农业部大洋渔业开发重点实验室 大洋渔业资源可持续开发教育部重点实验室
上海海洋大学海洋科学学院 上海 201306)

摘要 大眼金枪鱼(*Thunnus obesus*)是东太平洋最重要的商业性金枪鱼鱼种,其资源评估采用的是结构复杂的 Stock Synthesis 3 模型(SS3)。模型简化是提高资源评估效率的必要手段,但对大眼金枪鱼简化模型的效果尚未开展研究。本研究尝试从渔业数据结构的视角,将 SS3 复杂模型的 23 个渔业简化为仅含围网和延绳钓 2 个渔业,从而比较简化模型的评估能力。结果显示,简化模型能较为准确地描述大眼金枪鱼补充量、亲体量、捕捞死亡系数等主要时间序列的历史动态变化,对传统生物学参考点 F_{MSY} 的估计也较为准确,且受陡度和自然死亡系数的影响较小,但对其他参考点的估算误差较大。陡度参数对简化模型基于 Kobe 图判断资源状态的准确性有重要影响,陡度较低时,简化模型能较为准确地判断资源状态。研究表明,权衡模型的评估能力和降低模型结构的复杂性,是大眼金枪鱼资源评估今后需要重点研究的任务之一。此外,对模型简化的效果评价,与采用的生物学参考点和资源状况判断标准的选择有关。

关键词 大眼金枪鱼; 资源评估; Stock Synthesis 3 模型; 太平洋

中图分类号 S963.7 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)03-0012-10

大眼金枪鱼(*Thunnus obesus*)是热带东太平洋最主要的商业性金枪鱼鱼种,由区域性渔业管理组织——美洲间热带金枪鱼委员会(IATTC)负责管理。作为渔业管理的重要科学依据,其资源评估却存在很大的不确定性(Uncertainty),尽管最近的评估认为其资源状态已有所恢复,亲体量略高于最大持续产量相应的水平(Aires-da-Silva *et al.*, 2015)。种群结构、生物学参数、亲体-补充量关系、资源评估模型类型、模型结构假设等均会影响模型的参数估算,从而影响生物学参考点的估算和资源状态的判断(Aires-da-Silva *et al.*, 2014)。生物学参考点是从生物学的角度描述或衡量资源开发状态的指标,常以资源生物量和捕捞死亡系数来表示。在渔业资源评估实践中,考虑不确定性是不可或缺的重要环节(Patterson *et al.*, 2001)。一般

将不确定性分为 4 类误差:测量误差、过程误差、模型误差和操作误差(Chen *et al.*, 1998)。尽管 4 类误差常共存于一个渔业系统,为了简化研究,模型误差和操作误差通常不予考虑,在东太平洋大眼金枪鱼的历年评估中也是如此。

近 10 多年来,东太平洋金枪鱼类资源评估采用的主要模型有 A-SCALA (Maunder *et al.*, 2003)和 Stock Synthesis 3 (SS3)(Methot *et al.*, 2013)。A-SCALA 是在 Multifan-CL 模型(中西太平洋金枪鱼类资源评估的主要模型)(Fournier *et al.*, 1998)基础上创建的年龄结构模型。SS3 于 2007 年开始被用于东太平洋大眼金枪鱼资源评估。SS3 可以构建从简单的年龄结构生物量动态模型,到复杂的统计年龄结构模型(Methot *et al.*, 2013),可以利用渔获量、资源(相对)丰

* 国家自然科学基金(41676120)和上海市教委创新项目(12YZ134)共同资助[This work was supported by National Natural Science Foundation of China (41676120), and Innovation Program of Shanghai Municipal Education Commission (12YZ134)]

① 通讯作者:朱江峰,副教授, E-mail: jfzhu@shou.edu.cn

收稿日期: 2016-02-10, 收修改稿日期: 2016-03-29

度指数、渔获年龄结构组成和体长结构组成、标志放流数据等渔业资源调查和监测中获得的各项数据,能估算常用的渔业管理生物学参考点,并且能模拟各种捕捞策略对资源进行“管理”。此外,还可以用作操作模型(Operating model)进行计算机渔业模拟研究,实际上,SS3可认为是一个资源评估的模型平台,而非单一模型。由于包含的功能较多,SS3已成为运用最广泛的综合性资源评估模型之一,尤其在北美(Methot *et al.*, 2013),也逐渐被三大洋的金枪鱼渔业区域性管理组织接受(除中西部太平洋之外),成为其开展资源评估的主要模型。由于对渔业数据的要求较高,目前,SS3模型尚未在我国近海的鱼类资源评估中运用。

东太平洋大眼金枪鱼渔业结构复杂,主要作业类型为围网和延绳钓,围网分为主捕自由鱼群和人工集鱼群的不同方式。不同类型的作业区域、历史时期和捕捞效率不同(Aires-da-Silva *et al.*, 2014),近期大眼金枪鱼的SS3模型实际为“基于体长组成的统计年龄结构模型”(Length-based, statistical age-structured model),本研究称为复杂模型(Full model),共含23种渔业,模型结构庞大、参数多、解释复杂。对模型结构进行简化,将有助于提高资源评估工作的效率。虽然当前资源评估模型和方法的发展趋于复杂化,但研究者们仍致力于简单模型和方法的开发(Cotter *et al.*, 2004; Jardim *et al.*, 2015)。

近期,研究者尝试为大眼金枪鱼构建较为简单的SS3模型,但该类模型目前仅是用于模拟研究中的操作模型(Wang *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2016),能否用于评估实际的大眼金枪鱼资源,尚未有相应的研究。本研究尝试对东太平洋大眼金枪鱼SS3模型进行简化,通过对简化模型(Simplified model)的效果评价,考察简化模型对该资源的评估能力。由于真实的资源动态我们无法获知,为了简便,本研究假设复杂模型描述的资源动态最接近于“真实”情况,从而将简化模型的结果与复杂模型的结果进行比较,作为评价依据。

1 材料与方法

1.1 生物学资料

生物学参数的设置与近期的资源评估基本一致(Aires-da-Silva *et al.*, 2014),均假设为已知常数。假设东太平洋大眼金枪鱼为一个资源群体,群体内的个体处于完全、随机的混合状态(Maunders *et al.*, 2006)。年龄与生长采用 von Bertalanffy 生长模型,但考虑幼鱼和成鱼具有不同的生长变异,即相同年龄的体长不

同,大眼金枪鱼共分为40个“季龄组”,即最高年龄组为10龄组(为附加年龄组)。在SS3中,生长模型采用最小年龄和最大年龄(叉长分别为20.5 cm和185.5 cm,生长变异标准差分别为1.82 cm和12.04 cm)进行参数化,生长参数 $K=0.068/\text{年}$ 。自然死亡率系数(M)考虑幼鱼和成鱼、雌性和雄性的差异。

1.2 复杂模型的渔业数据结构

统计年龄结构模型所需的基本渔业数据包括每种渔业的渔获量(Catch)、代表性渔业的渔获年龄组成或体长组成(Age/size composition)、代表性渔业的相对资源丰度指数(Relative abundance index)。本研究复杂模型的渔业数据结构与近期的实际评估基本相同,包含23种渔业(表1),其中,涉及围网的为渔业1-11,涉及延绳钓的为渔业12-23。评估模型中的渔业一般根据资料来源和捕捞选择性(Selectivity)来定义,与生产中的实际渔业类型有所区别。

渔业数据时间跨度为1975年1月-2012年12月(2014年度评估的数据),模型中以季度为种群动态变化的时间单位(共148个季节)。由于本研究的目的是比较复杂模型和简化模型的评估差异,而非评估其最近资源状况(该工作由IATTC秘书处在相应的公约框架下开展),因此,未采用最新统计资料。资源丰度指数和体长组成资料来自主要的围网渔业(即人工集鱼作业)和延绳钓渔业(表2)。

1.3 评估模型

1.3.1 复杂模型 大眼金枪鱼复杂模型基于SS3平台(Methot *et al.*, 2013)构建。该模型平台初建于20世纪80年代,起初用于底层鱼类资源评估,在用AD Model Builder (Fournier *et al.*, 2012)重新编程后,改进了模拟拟合的效率。SS3模型平台分为3个子模型:种群动态模型,描述在生物学(生长、死亡、补充)和渔业共同作用下的资源变化;观测模型,描述渔业系统中不可观测变量与可观测变量的关系(如丰度指数与资源量关系);统计模型,描述模型预测值与观测值之间的误差结构,并通过极大似然法估算模型参数。此外,还有预测模块,根据参数值计算生物学参考点,并可模拟预测不同管理措施下的资源变化。由于SS3模型结构庞大,本研究仅对与大眼金枪鱼评估所采用的主要模型结构作简单描述,更多技术细节可参见Methot (2000)和Methot等(2013)。

1.3.1.1 种群动态模型 假设初始资源为平衡状态,则初始年(使用“年”为方便描述,实际为季节)性别为 γ 的 a 龄鱼资源量可表示为:

表 1 东太平洋大眼金枪鱼 SS3 复杂模型对渔业的划分
Tab.1 Fishery definition of full SS3 model for big-eye tuna in eastern Pacific Ocean

渔业 Fishery	渔具 Gear	年份 Year	渔获数据特点 Feature of the fishery data
1	PS(OBJ)	1975-1992	渔获量 Catch
2	PS(OBJ)	1993-2012	渔获量 + 丢弃量(渔业 2-5 的体长组成采样区域不同) Catch+Discards
3	PS(OBJ)	1993-2012	(size data for fishery 2-5 obtained from different sampling area)
4	PS(OBJ)	1993-2012	
5	PS(OBJ)	1993-2012	
6	PS(NOA, DEL), LP	1975-1989	渔获量 Catch
7	PS(NOA, DEL), LP	1990-2012	渔获量 + 丢弃量 Catch + Discards
8	PS(OBJ)	1993-2012	渔业 2 中丢弃的小个体 Discards of small fish from fishery 2
9	PS(OBJ)	1993-2012	渔业 3 中丢弃的小个体 Discards of small fish from fishery 3
10	PS(OBJ)	1993-2012	渔业 4 中丢弃的小个体 Discards of small fish from fishery 4
11	PS(OBJ)	1993-2012	渔业 5 中丢弃的小个体 Discards of small fish from fishery 5
12	LL	1975-1989	渔获尾数 Catch in number, 10°N 以北 North of 10°N
13	LL	1990-2012	
14	LL	1975-1989	渔获尾数 0°-10°N 之间 Catch in number, Between 0° and 10°N
15	LL	1990-2012	
16	LL	1975-1989	渔获尾数 0°以南 100°W 以西 Catch in number, South of 0°, West of 100°W
17	LL	1990-2012	
18	LL	1975-1989	渔获尾数 0°以南 100°W 以东 Catch in number, South of 0°, East of 100°W
19	LL	1990-2012	
20	LL	1990-2012	渔获量 10°N 以北 Catch, North of 10°N
21	LL	1990-2012	渔获量 0°-10°N 之间 Catch, Between 0° and 10°N
22	LL	1990-2012	渔获量 0°以南 100°W 以西 Catch, South of 0°, West of 100°W
23	LL	1990-2012	渔获量 0°以南 100°W 以东 Catch, South of 0°, East of 100°W

注: PS: 围网; LP: 竿钓; LL: 延绳钓; OBJ: 捕人工集鱼群的围网; NOA: 捕自由鱼群的围网; DEL: 捕海豚群的围网, 修改自 Aires-da-Silva 等(2014)

Note: PS: Purse seine; LP: Pole and line; LL: Longline; OBJ: Sets on floating objects; NOA: Sets on unassociated fish; DEL: Sets on dolphin schools, revised from Aires-da-Silva *et al* (2014)

$$N_{\gamma,a} = cR_0 e^{-aM_{\gamma,a}}, \quad 0 \leq a \leq 3A-1 \quad (1)$$

其中, $N_{\gamma,A} = \sum_{a=A}^{3A-1} N_{\gamma,a} + \frac{N_{\gamma,3A-1} e^{-aM_{\gamma,a}}}{1 - e^{-M_{\gamma,a}}}$, $a = A$

式中, c 为补充群体的性比, M 为自然死亡系数, A 为附加年龄组, 将资源量从 0 龄估算到 $3A-1$ 龄的目的是平衡初始年龄结构, 这是 SS3 模型的特殊之处。 R_0 为原始平衡状态的补充量。

在水温适合时, 成熟的雌性大眼金枪鱼几乎终年均可产卵(Schaefer *et al*, 2005), 因此, 模型里假设每年补充 1 次。初始年之后的补充量(0 龄鱼的资源尾数, R)由前一年的亲体量(产卵群体生物量, SSB)、根据亲体-补充量关系模型决定:

$$R_y = \frac{4hR_0SSB_y}{SSB_0(1-h) + SSB_y(5h-1)} e^{-0.5b_y\sigma_R^2 + \tilde{R}_y}, \quad (2)$$

$$\tilde{R}_y \sim N(0, \sigma_R^2)$$

式中, SSB_0 是与 R_0 对应的亲体量, SSB_y 为 y 年的亲体量, h 为陡度参数。 b_y 为补充量变化修正项, σ_R 为补充量对数转换后相对于各年平均值的标准差

(假设为 0.6), \tilde{R}_y 为由此得到的正态分布误差结构。补充量变化修正的目的是使平均补充量为无偏估计 (Methot *et al*, 2011)。初始年之后的资源量动态为:

$$N_{y+1,\gamma,a} = \begin{cases} cR_{y+1,\gamma,0}, & a = 0 \\ N_{y,\gamma,a-1} e^{-Z_{y,\gamma,a}}, & 1 \leq a \leq A-1 \\ N_{y,\gamma,A-1} e^{-Z_{y,\gamma,A-1}} + N_{y,\gamma,A} e^{-Z_{y,\gamma,A}}, & a = A \end{cases} \quad (3)$$

$$Z_{y,\gamma,a} = M_{\gamma,a} + \sum_f (S_{f,\gamma,a} F_{y,f}) \quad (4)$$

式中, $Z_{y,\gamma,a}$ 为 y 年的性别 γ 、年龄组 a 的总死亡系数, $F_{y,f}$ 为渔业 f 的选择性 $S=1$ (即“完全选择”) 时的捕捞死亡系数。大眼金枪鱼 SS3 模型的 F 估算采用混合算法(Hybrid method), 即设定初始年的 F 为自由参数, 根据渔获量方程(假设渔获量无误差), 通过反复迭代算法获得其他年份的 F 估计。捕捞死亡系数与体长结构的选择性的乘积、经体长-年龄转换, 得到各年龄组的捕捞死亡系数。在 23 种渔业中, 除渔业

表 2 大眼金枪鱼复杂模型和简化模型采用的资料和渔业选择性曲线
Tab.2 Fishery data and selectivity curve used in the full model and simplified model for big-eye tuna

复杂模型 Full model					简化模型 Simplified model				
渔业 Fishery	渔获量 Catch	丰度指数 Abundance index	体长组成 Size composition	选择性 Selectivity	渔业 Fishery	渔获量 Catch	丰度指数 Abundance index	体长组成 Size composition	选择性 Selectivity
1	○	○	○	B	围网	●		●	B
2	○	○	○	B	Purse seine	●	●	●	
3	○	○	○	B		●		●	
4	○	○	○	B		●		●	
5	○	○	○	B		●		●	
6	○		○	B		●			
7	○		○	B	●				
8	○			1	●				
9	○			1	●				
10	○			1	●				
11	○			1	●				
12	○	○	○	B	延绳钓 Longline	●			A
13	○	○	○	B		●			
14	○	○	○	B		●			
15	○	○	○	A		●			
16	○	○	○	B		●	●	●	
17	○	○	○	A		●	●	●	
18	○	○	○	B		●			
19	○	○	○	B		●			
20	○			B		●			
21	○			B		●			
22	○			B		●			
23	○			B	●				

注: A: 逻辑斯谛曲线; B: 钟形曲线; 1 表示选择性=1; ○、●分别表示复杂模型、简化模型利用了该项数据

Note: A: Logistic curve; B: Dome-shaped curve; 1 indicated selectivity=1; ○ and ● indicated the data were used in the full model and simplified model, respectively

15、17 为逻辑斯谛选择性曲线、渔业 8-11 为完全选择外, 其他渔业的选择性均假设为钟形曲线(表 2)。

1.3.1.2 观测模型 种群的许多变量(如绝对资源量)一般不能直接观测, 观测模型的作用是将不可观测变量与可观测变量建立起联系。大眼金枪鱼的可观测变量是丰度指数和体长组成, 相应的观测模型为:

$$\hat{I}_{y,f} = Q_f B_{y,f} \quad (5)$$

$$p_{y,f,\gamma,l} = \begin{cases} 0, & l = l_{1,\gamma} \\ \sum_{l \leq l_{1,\gamma}} p_{y,f,\gamma,l}, & l < l_{1,\gamma} \\ p_{y,f,\gamma,l}, & l_{1,\gamma} < l < l_{2,\gamma} \\ \sum_{l \leq l_{2,\gamma}} p_{y,f,\gamma,l}, & l = l_{2,\gamma} \\ 0, & l > l_{2,\gamma} \end{cases} \quad (6)$$

式中, Q_f 为渔业 f 的可捕系数, $B_{y,f}$ 为可捕资源量, I 为丰度指数预测值。 $l_{1,\gamma}$ 为最小体长组(Length bin)的下界, $l_{2,\gamma}$ 为最大体长组的上界, $p_{y,f,\gamma,l}$ 为体长组 l 的渔获(尾数)比例。

1.3.1.3 统计模型与参数估算 具有丰度指数观测资料的渔业, 其相应的对数正态分布似然函数(Lognormal likelihood)可表示为:

$$L = N(\ln(\sigma)) + \sum_{y=1}^{N_y} \frac{(\ln(I_{y,f}) - \ln(Q_f B_{y,f}))^2}{2\sigma^2} \quad (7)$$

式中, N 为观测值个数, I 为丰度指数观测值(即围网和延绳钓渔业 CPUE), σ 为 CPUE 对数化后的(正态分布)误差结构的标准差(衡量丰度指数观测误

差离散程度的指标, σ 越小, 表明丰度指数数据对模型参数估算的贡献越大)。根据以往的研究, 围网和延绳钓的 σ 分别设为 0.40 和 0.15。

具有体长组成观测资料的渔业, 其相应的多项分布似然函数(Multinomial likelihood) 可表示为:

$$L = \sum_{y=1}^{N_y} \sum_{f=1}^{A_y} \sum_{l=1}^{A_l} n_{y,f,\gamma} p_{y,f,\gamma,l} \ln(p_{y,f,\gamma,l} / \hat{p}_{y,f,\gamma,l}) \quad (8)$$

式中, n 是估算体长组成数据的有效年样本量(衡量取样精度的间接指标, n 越大, 表明体长组成数据越可信, 对模型参数估算的贡献越大), p 为渔获比例观测值, \hat{p} 为渔获比例的模型预测值。此外, SS3 模型将补充量估算值(自由参数)与由亲体-补充量模型预测的补充量, 建立对数正态分布的似然函数, 与丰度指数和体长组成数据的似然函数式(7)、(8)一起, 构成总的参数估算目标函数。

SS3 模型采用极大似然估算法进行参数估算, 大眼金枪鱼复杂模型估算的参数包括初始补充量、补充量变化时间序列, 每种渔业的捕捞死亡系数初始值、选择性曲线参数、可捕系数等。完成参数估算后, 模型计算资源量、捕捞死亡系数等时间序列, 接着运行预测模块, 通过最优化算法求得最大持续产量和相应的捕捞死亡系数、亲体量等生物学参考点。

1.3.2 简化模型

1.3.2.1 简化模型结构 模型简化的方式有多种, 如将年龄结构模型简化为生物量动态模型, 或调整模型的参数化方法。本研究考虑保持 SS3 年龄结构模型的基本结构不变, 即采用与复杂模型相同的种群动态模型、观测模型和统计模型及其误差结构, 以及生物学假设和模型的参数化方法, 唯一简化的是模型的渔业数据结构, 以利于复杂模型和简化模型的结果比较。

1.3.2.2 简化模型的渔业数据结构 考虑到捕捞大眼金枪鱼的基本渔具为围网和延绳钓(表 1), 因此, 本研究将复杂模型的渔业数据结构简化为“围网”和“延绳钓”2 种渔业, 即将包含 23 种渔业的复杂模型简化为只有 2 种渔业的 SS3 年龄结构模型。简化的具体方法: 对于渔获量, 将原渔业 1-11 和原渔业 12-23 分别求和, 作为简化模型的围网和延绳钓渔业的渔获量; 对于资源丰度指数, 采用东太平洋具有代表性的人工集鱼围网(原渔业 2)和延绳钓渔业(原渔业 16-17)的丰度指数(表 1), 作为简化模型中的围网渔业和延绳钓渔业的丰度指数; 对于体长组成数据, 选择人工集鱼围网(原渔业 1-5)和延绳钓渔业(原渔业 16-17)的体长组成, 然后根据渔获量进行加权平均, 作为简化模型的围网和延绳钓渔业的体长组成数据。渔业结构简化后, 渔业选择性也要相应的调整, 为此,

假设围网渔业的选择性模型符合钟形曲线, 延绳钓渔业的选择性模型为逻辑斯谛曲线(表 2), 其参数化方法与复杂模型相同。

1.4 效果评价

为了评价简化模型的评估效果, 采用 7 个关键生物学参考点和资源状态变量进行比较, 包括 MSY(最大持续产量)、 F_{MSY} (资源处在产出 MSY 时的捕捞死亡系数)、 $F_{multiplier}$ (以 MSY 为管理目标时, 当前捕捞死亡系数应调整的比例)、 SSB_{MSY}/SSB_0 (资源处在产出 MSY 时的 SSB 与原始种群的 SSB 之比)、 C_{curr}/MSY (当前渔获量与 MSY 之比)、 F_{curr}/F_{MSY} (当前捕捞死亡系数与产出 MSY 时的捕捞死亡系数之比)、 SSB_{curr}/SSB_{MSY} (当前 SSB 与 MSY 时的 SSB 之比)。其中, SSB_{MSY}/SSB_0 反映了捕捞引起的亲体量下降水平, F_{curr}/F_{MSY} 和 SSB_{curr}/SSB_{MSY} 是目前金枪鱼资源评估中判断资源过度捕捞状态的 2 个主要参考点。

由于资源评估模型的关键假设参数会影响结果, 对于大眼金枪鱼近期的研究表明(Aires-da-Silva *et al.*, 2014), 自然死亡系数和陡度是影响结果的最重要参数。因此, 本研究针对这 2 个参数做不确定性分析(即敏感性分析), 对复杂模型和简化模型的自然死亡系数和陡度参数均考虑 3 个不同水平, 自然死亡系数见图 1。从图 1 可以看出, 陡度 h 的 3 个水平分别为 1.0、0.9、0.8。不同 M 水平的模型(F4-F6, S4-S6), 其 h 均假设为 1.0; 不同 h 水平的模型(F1-F3, S1-S3), 其 M 均假设在较高水平。共得到 12 个具体的模型(表 3)。

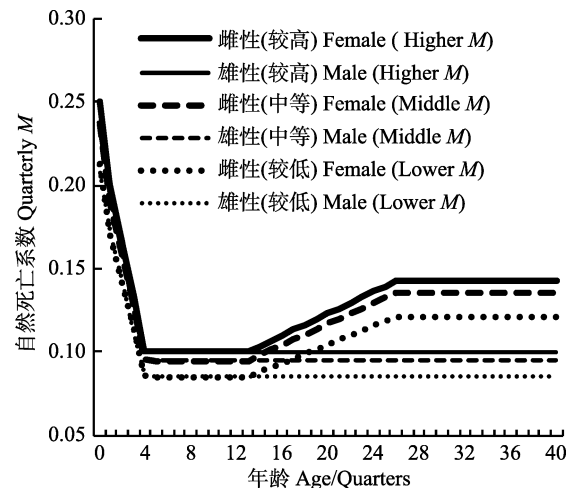


图 1 大眼金枪鱼自然死亡系数的 3 个水平
Fig.1 Three levels of natural mortality of big-eye tuna

2 结果

2.1 参数估算

复杂模型拟合估算的参数达 234 个, 简化后参数

表 3 大眼金枪鱼 SS3 模型参数个数及拟合时间比较
Tab.3 Comparison of numbers of parameters and the fitting time of SS3 model for big-eye tuna

模型 Model	假设 Assumption	参数个数 Number of parameters	拟合时间 Fit time (min)*	原始补充量(千尾) R_0 (Thousand fish)	原始亲体量 SSB_0 (t)	模型编号 Model code
复杂模型 Full model	陡度 $h=1.0$	234	48	5826	296905	F1
	陡度 $h=0.9$	234	47	6418	327116	F2
	陡度 $h=0.8$	234	45	7274	370705	F3
简化模型 Simplified model	陡度 $h=1.0$	176	27	6498	331161	S1
	陡度 $h=0.9$	176	8	7295	371774	S2
	陡度 $h=0.8$	176	12	8351	425615	S3
复杂模型 Full model	较高 M Higher M	234	50	5826	296905	F4
	中等 M Middle M	234	68	5336	317009	F5
	较低 M Lower M	234	88	4377	357304	F6
简化模型 Simplified model	较高 M Higher M	176	27	6498	331161	S4
	中等 M Middle M	176	28	5938	352740	S5
	较低 M Lower M	176	30	4926	402102	S6

*表示模型拟合的计算机处理器为 Intel Core i5 2.4 G

* indicated the processor of computer for model fit was Intel Core i5 2.4 G

个数降为 176 个, 总体来看, 拟合时间缩短 1/2 以上(表 3)。同样的模型结构, 陡度和自然死亡系数的不同水平对拟合时间影响不大, 除了 $h=0.9$ 时的简化模型(S2), 拟合时间也会受参数初始值的影响。表 3 同时给出了资源的 2 个重要尺度参数(Scaling parameter): 原始补充量和原始亲体量, 这 2 个变量反映了整个资源的最初资源量。相对于复杂模型, 在相同的 h 或 M 假设下, 简化模型对 R_0 、 SSB_0 均高估 11%–15% 左右。

2.2 主要时间序列

资源评估得到的主要变量时间序列包括资源量、补充量、亲体量、捕捞死亡系数、渔获量等。结果显示, 复杂模型和简化模型对这些变量的总体变化趋势

的“描述”是一致的, 即简化模型能较好地描述大眼金枪鱼资源动态的整体变化趋势, 但在一些具体年份的估算值有所不同。限于篇幅, 本研究仅给出 $h=1.0$ 时的补充量、亲体量和捕捞死亡系数(图 2–图 4)。简化模型未能更好地描述早期(1975–1983 年第 1 季度)的补充量变化, 但后期估算较好(图 2)。简化模型低估了 1991 年之前的亲体量, 而高估了 1991 年之后的亲体量, 但除了起始年之外, 简化模型基本上能较好地描述亲体量的动态变化(图 3)。对捕捞死亡系数的估算则与亲体量呈相反的趋势, 简化模型高估了 1991 年之前的捕捞死亡系数, 但低估了 1991 年之后多数年份的捕捞死亡系数(图 4), 这与亲体量的变化相吻合(图 3), 即高捕捞死亡系数导致了资源量的降低, 反之亦然。

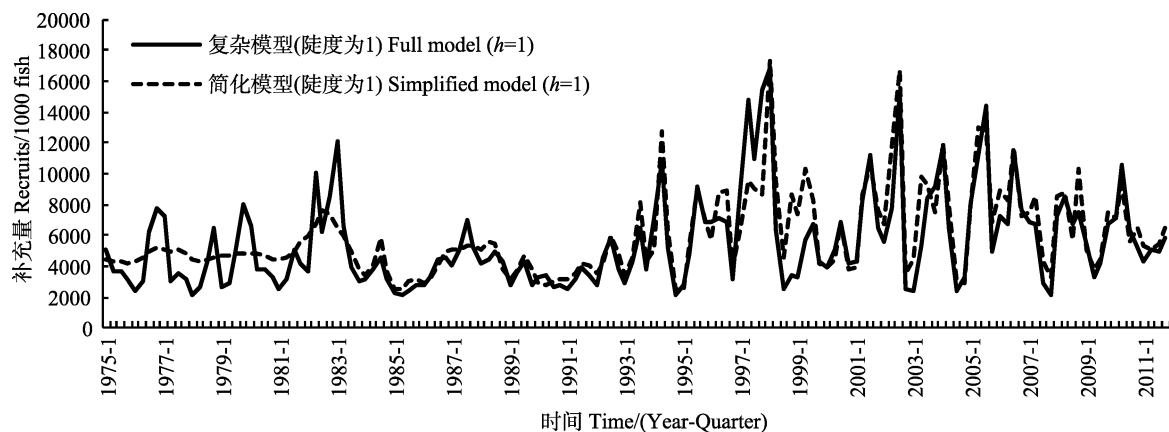


图 2 大眼金枪鱼补充量时间序列
Fig.2 Recruit time series of big-eye tuna

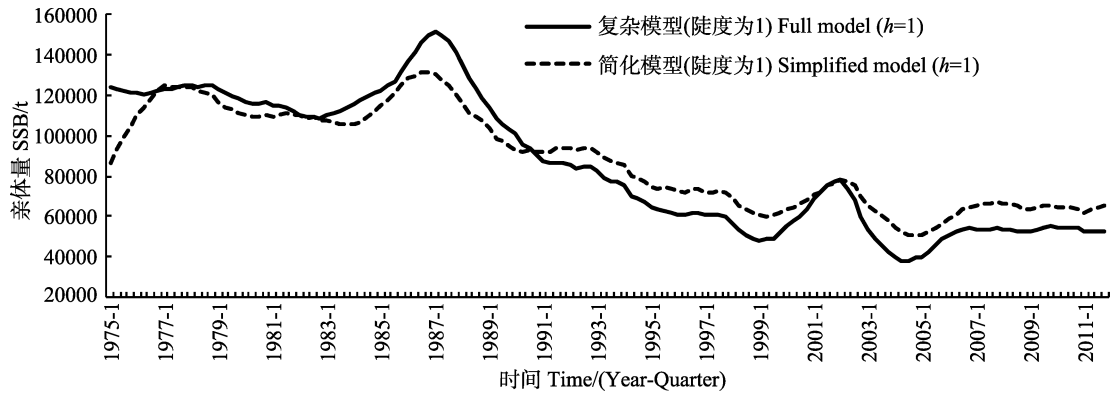


图 3 大眼金枪鱼亲体量时间序列
Fig.3 Spawning stock biomass (SSB) time series of big-eye tuna

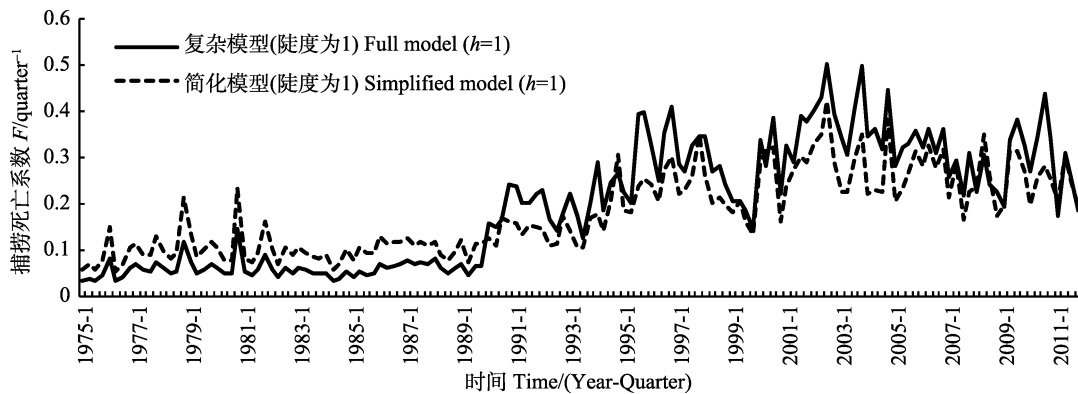


图 4 大眼金枪鱼捕捞死亡系数时间序列
Fig.4 Fishing mortality time series of big-eye tuna

2.3 生物学参考点与资源状态

从重要的生物学参考点看(表 4), 简化模型对 MSY 的低估较大(约 30%), 对 SSB_{MSY}/SSB_0 的低估量为 14%–37%, 对 F_{curr}/F_{MSY} 的低估量为 10%–21%。对 其余 4 个参考点均予高估, 其中, 对 F_{MSY} 高估 1%–20%, $F_{multiplier}$ 高估 11%–27%, C_{curr}/MSY 高估 41%–

53%, SSB_{curr}/SSB_{MSY} 高估 46%–84%。不同的 h 或 M 假设水平下, 简化模型对这些参考点的估算能力有差异, 但未改变“高估”或“低估”的趋势(表 4)。总体而言, 无论是复杂模型还是简化模型, 参考点估算值受 M 的影响略小于 h , 但也会受 h 和 M 不同假设水平变化的影响。

表 4 复杂模型和简化模型估计的生物学参考点比较
Tab.4 Comparison of biological reference points of the full model and the simplified model

模型 Model	假设 Assumption	MSY (t)	F_{MSY}	$F_{multiplier}$	SSB_{MSY}/SSB_0	C_{curr}/MSY	F_{curr}/F_{MSY}	SSB_{curr}/SSB_{MSY}
复杂模型	陡度 $h=1.0$	95636	0.25	1.69	0.23	0.79	0.59	0.77
Full model	陡度 $h=0.9$	95352	0.20	1.39	0.27	0.79	0.72	0.63
	陡度 $h=0.8$	96360	0.17	1.18	0.30	0.79	0.85	0.54
简化模型	陡度 $h=1.0$	67724	0.27	2.12	0.14	1.12	0.47	1.38
Simplified model	陡度 $h=0.9$	66204	0.20	1.59	0.21	1.14	0.63	0.94
	陡度 $h=0.8$	66320	0.17	1.31	0.26	1.14	0.76	0.79
复杂模型	较高 M Higher M	95636	0.25	1.69	0.23	0.79	0.59	0.77
Full model	中等 M Middle M	94552	0.23	1.67	0.23	0.80	0.60	0.73
	较低 M Lower M	93276	0.21	1.60	0.24	0.81	0.63	0.57
简化模	较高 M Higher M	67724	0.27	2.12	0.14	1.12	0.47	1.38
Simplified model	中等 M Middle M	65484	0.26	2.09	0.15	1.16	0.48	1.27
	较低 M Lower M	61252	0.26	2.03	0.16	1.24	0.49	1.05

由于参考点的类型较多,实践中常根据 F_{curr}/F_{MSY} 和 SSB_{curr}/SSB_{MSY} 绘制 Kobe 图来判断资源开发状态。大眼金枪鱼的 Kobe 图见图 5。从图 5 可以看出,简化模型 S1、S4、S5、S6 (表 3)落在右下区,该区内 $F_{curr}/F_{MSY} < 1$, 而 $SSB_{curr}/SSB_{MSY} > 1$, 因此,这 4 个模型认为资源处于“健康”状态;其他 8 个模型(包括全部复杂模型和 2 个简化模型)均落在左下区,该区内 $SSB_{curr}/SSB_{MSY} < 1$, 但 $F_{curr}/F_{MSY} < 1$, 可以解释为资源刚经历了过度捕捞,有效的管理措施已将 F 降低(但生物量未来得及恢复)。

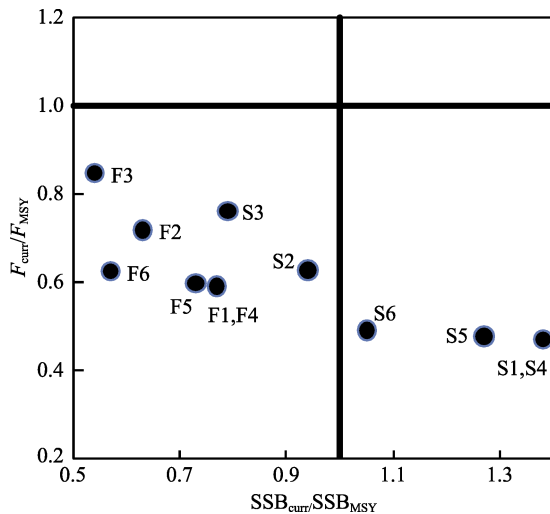


图 5 复杂模型和简化模型对大眼金枪鱼资源状态判断的 Kobe 图

Fig.5 Kobe plot of the evaluation of stock status for big-eye tuna by full models and simplified models

简化模型 S2、S3 与相应的复杂模型 F2、F3 对资源判断得出了相同的结论,但 S1 得出的结论与相应的 F1 不同(图 5)。这表明简化模型对资源判断的正确性受参数 h 的影响,在高 h 值(即补充量受亲体量的制约小)的情况下,简化模型未能准确判断资源状态。这也印证了简化模型 S4–S6 未能准确判断资源状态,即模型 F4–F6 和 S4–S6 均是在 $h=1.0$ 的假设条件下(S1 与 S4 实际上假设相同)。本研究并非严格意义上的“模拟–验证”试验,故未对 h 和 M 的相互影响做交叉试验。

3 讨论

本研究采用的资源评估方法目前称之为“综合分析法”(Integrated analysis)或“综合模型”(Integrated model)。综合分析法可以最大限度地利用源自同一渔业资源的不同类型的数据资料,其本质思想是构建各种不同数据资料的“联合似然”(Joint likelihood)

(Maunder *et al.*, 2013)。该数据资料常指年渔获量、渔获年龄组成、渔获长度组成、资源相对丰度指数(可以是商业性渔业或科学调查获得的 CPUE 等)、标志放流回捕数据等。与实际种群分析等传统方法不同,综合分析法可以允许数据在某些年份缺失。但是,运用该方法不可回避的问题是“划分多少个渔业最合适?”。渔业的划分应满足“相同渔业具有相同的选择性”这一条件。因此,一般趋向于划分较多的渔业,但这需要更多细分的数据支持,模型也就更复杂。即便是像东太平洋大眼金枪鱼这样已经评估几十年的资源,对渔业的划分仍无明确的标准,很多时候是依靠研究者的经验,其评估曾分别采用了 13 种渔业(Maunder *et al.*, 2003)和 23 种渔业(Aires-da-Silva *et al.*, 2014) 2 种方案。既然捕捞大眼金枪鱼的基本渔具类型是围网(产量极大部分来自人工集鱼作业)和延绳钓(产量大部分来自深水超低温延绳钓),那么应该可以将渔业类型减少到只有围网和延绳钓 2 种渔业。

因此,本研究尝试对大眼金枪鱼 SS3 模型的渔业类型减少到围网和延绳钓 2 种,从而简化了模型结构。结果显示,简化模型基本能够描述资源的历史变动,但对具体参数值的估计存在误差。SS3 模型估算的参数大部分是补充量变化(Deviation)和选择性曲线的参数,除补充量变化外,其他参数在复杂模型和简化模型里已无可比性。简化模型低估了原始补充量和亲体量这 2 个重要的尺度参数,这可能也导致了其他生物学参考点的估算误差。但简化模型对传统生物学参考点 F_{MSY} 的估计较为准确,且受 h 和 M 的影响较小(表 4)。参数 h 对简化模型基于 Kobe 图判断资源是否过度捕捞的准确性有重要影响。可以确定的是,模型简化的效果评价,与采用的渔业管理生物学参考点和资源状况判断标准的选择有关。

大眼金枪鱼 SS3 模型简化的主要误差来源有 2 个,一是简化模型仅采用了复杂模型中源自“渔业 2”的围网渔业丰度指数和“渔业 16–17”的延绳钓渔业丰度指数,虽然这 2 个渔业在产量和捕捞区域上具有代表性(即为主要渔场)(Aires-da-Silva *et al.*, 2015),但这 2 个指数显然并不能完全“指示”可捕资源量的时间动态;二是根据渔获量对体长组成数据进行加权平均,获得简化模型的体长组成。这样处理导致渔获量高的渔业对体长组成数据的影响越大,但渔获量高的渔业,其体长样本的采样代表性并不一定高。简化模型大大缩短了模型运行时间。在实践中,资源评估需要最大限度的考虑参数和模型结构的不确定性,因此单个模型的运行时间是研究者是必须考虑的问题。例如,近期中西太平洋大眼金枪鱼的资

源评估(Harley *et al.*, 2014), 构建了 108 个模型来比较不确定性因素(如最大体长、自然死亡系数、陡度参数、渔业数据的权重)对评估结果的影响。简化模型结构和提高准确性的权衡(Trade-off), 是今后大眼金枪鱼评估需要研究的问题。

计算机的运用使现代渔业资源评估的方法不断复杂化(Schnute *et al.*, 2007)。在欧洲和北美, 在数据资料满足的条件下, 综合分析法已成为资源评估的主流方法。综合分析法的优点是在一个模型中可以容纳多种类型的数据, 可以确保建模过程中不同假设的一致性(即传递不确定性), 对有关参数和数据权重的影响分析也较为容易(Maunders *et al.*, 2013); 但模型运算时间长、收敛性问题、模型选择、参数的假设和相互影响、结果的解释等问题, 也是综合分析法需要优化或解决的问题。况且, 当前渔业资源评估建模仍有许多过程问题没有完全解决, 即便对于生长与死亡、渔业动态、渔具选择性等最基本问题, 仍然需要不断的研究(Maunders *et al.*, 2015)。因此, 对综合分析法的简化, 将是今后渔业资源评估的重要方向之一。Cotter 等(2004)通过对欧洲北海渔业资源的多模型比较评估认为, 并非模型越复杂越有利于准确评估, 并发现仅利用分年龄组 CPUE 数据的“年龄组渔获曲线法”(Year-class curve), 其评估的综合表现要优于实际种群分析、状态空间模型等更复杂的模型。Jardim 等(2015)甚至提出用简单的线性模型进行多鱼种评估的大胆设想, 并已构建了初步的方法框架。

致谢: 大眼金枪鱼复杂模型是在美洲间热带金枪鱼委员会(IATTC)资源评估项目组的原 SS3 模型基础上构建的。模型简化过程中, 得到了 Mark Maunders、Alexandre Aires-da-Silva 和 Carolina Minte-Vera 博士的指导和帮助。

参 考 文 献

- Aires-da-Silva A, Maunders MN. Status of bigeye tuna in the eastern Pacific Ocean in 2012 and outlook for the future. Inter-American Tropical Tuna Commission, Stock Assessment Report, 2014, 14: 31–185
- Aires-da-Silva A, Maunders MN. Status of bigeye tuna in the eastern Pacific Ocean in 2014 and outlook for the future. Inter-American Tropical Tuna Commission, Stock Assessment Report, 2015, 16: 3–17
- Chen Y, Paloheimo JE. Can a more realistic model error structure improve parameter estimation in modelling the dynamics of fish populations? *Fisheries Research*, 1998, 38(1): 9–17
- Cotter AJR, Burt L, Paxton CGM, *et al.* Are stock assessment methods too complicated? *Fish and Fisheries*, 2004, 5(3): 235–254
- Fournier DA, Hampton J, Sibert JR. Multifan-cl: A length-based, age-structured model for fisheries stock assessment, with application to south pacific albacore, *Thunnus alalunga*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1998, 55(9): 2105–2116
- Fournier DA, Skaug HJ, Ancheta J, *et al.* AD model builder: Using automatic differentiation for statistical inference of highly parameterized complex nonlinear models. *Optimization Methods and Software*, 2012, 27(2): 233–249
- Harley S, Davies N, Hampton J, *et al.* Stock assessment of bigeye tuna in the western and central Pacific Ocean. Western and Central Pacific Fisheries Commission, WCPFC-SC10-2014/SA-WP-01, Majuro, Republic of the Marshall Islands, 2014, 6–14
- Jardim E, Millar CP, Mosqueira, *et al.* What if stock assessment is as simple as a linear model? The a4a initiative. *ICES Journal Marine Science*, 2015, 72(1): 232–236
- Maunders M, Watters G. A-SCALA: An age-structured statistical catch-at-length analysis for assessing tuna stocks in the eastern Pacific Ocean. *Inter-American Tropical Tuna Commission Bulletin*, 2003, 22(5): 435–582
- Maunders MN, Hoyle SD. Status of bigeye tuna in the eastern Pacific Ocean in 2004 and outlook for 2005. *Inter-American Tropical Tuna Commission, Stock Assessment Report*, 2006(6): 103–206
- Maunders MN, Piner KR. Contemporary fisheries stock assessment: Many issues still remain. *ICES Journal Marine Science*, 2015, 72(1): 7–18
- Maunders MN, Punt AE. A review of integrated analysis in fisheries stock assessment. *Fisheries Research*, 2013, 142(6): 61–74
- Methot RD Jr, Taylor IG. Adjustment for bias due to variability of estimated recruitments in fishery assessment models. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2011, 68(10): 1744–1760
- Methot RD Jr, Wetzel C. Stock synthesis: A biological and statistical framework for fish stock assessment and fishery management. *Fisheries Research*, 2013, 142(2): 86–99
- Methot RD Jr. Technical description of the stock synthesis assessment program. US Department of Commerce, NOAA Technical Memorandum, NMFS-NWFSC-43, 2000, 46
- Patterson K, Cook R, Darby C, *et al.* Estimating uncertainty in fish stock assessment and forecasting. *Fish and Fisheries*, 2001, 2(2): 125–157
- Schaefer KM, Fuller DW, Miyabe N. Reproductive biology of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) in the eastern and central Pacific Ocean. *Inter-American Tropical Tuna Commission Bulletin*, 2005, 23(1): 1–31
- Schnute JT, Maunders MN, Ianelli JN. Designing tools evaluate fishery management strategies: Can the scientific community

- deliver? ICES Journal of Marine Science, 2007, 64(6): 1077–1084
- Wang SP, Maunder MN, Piner KR, *et al.* Evaluation of virgin recruitment profiling as a diagnostic for selectivity curve structure in integrated stock assessment models. Fisheries Research, 2014(158(5): 158–164
- Zhu J, Maunder MN, Aires-da-Silva AM, *et al.* Estimation of growth within stock synthesis models: management implications when using length-composition data. Fisheries Research, 2016, 180: 87–91

(编辑 马瑾艳)

Stock Assessment of Big-Eye Tuna *Thunnus obesus* in Eastern Pacific Ocean: A Comparative Study of the Full and the Simplified SS3 Model

ZHU Jiangfeng^①

(Key Laboratory of Oceanic Fisheries Exploration, Ministry of Agriculture; Key Laboratory of Sustainable Exploitation of Oceanic Fisheries Resources, Ministry of Education; College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract The big-eye tuna (*Thunnus obesus*) is the most commercially important tuna species in eastern Pacific Ocean. The fishery of this species has been managed by Inter-American Tropical Tuna Commission (IATTC). IATTC evaluates the stock of big-eye tuna annually using Stock Synthesis 3 (SS3). SS3 is one of the most commonly used models that assess age-structured fishery stock based on biological parameters and fishery data such as the annual catch, the age-composition, the length composition of catch and abundance indices. A recent assessment of the big-eye tuna stock in eastern Pacific Ocean indicated a small recovery of the spawning stock biomass (SSB) and the fishing mortality (F) with respect to biological reference points (BRPs). The integrated model effectively combines multiple data with various sources into single analysis, and propagates the uncertainties associated with model parameters and structures into model outputs such as the biomass time series and BRP. However, it is time-consuming to use full SS3 model to analyze the big-eye tuna stock as it has as many as 23 fisheries. Therefore, model simplification has become necessary to improve the analysis efficiency. In this study, we tried to simplify the SS3 modeling process by using 2 fisheries (purse seine and longline fisheries) instead of 23. Representative abundance index and size composition from the purse seine fisheries and longline fisheries of the full model were used in the simplified one. The outputs of the simplified model were compared to that of the full model to evaluate the performance of the former. The results showed that the simplified model effectively captured the historical trends of stock time series (e.g., recruitments, SSB and F) and estimated F_{MSY} with little interference from the steepness and natural mortality parameters. The reduced interference from steepness allowed the simplified model to correctly analyze the stock status based on the Kobe plot. However, the simplified model increased errors in the estimation of other BRPs. This study implied that selecting BRPs and defining stock status of big-eye tuna could affect the evaluation of the performance of the simplified model. Further studies are needed to achieve a balance between high performance and reduced complexity of the model.

Key words *Thunnus obesus*; Stock assessment; Stock Synthesis 3 model; Pacific Ocean

① Corresponding author: ZHU Jiangfeng, E-mail: jfzhu@shou.edu.cn

唐山附近海域春季表层沉积物重金属含量年际变化及污染评价*



胡琴¹ 郭静¹ 尹晓娜¹ 曲亮² 曹静¹

(1. 中海油研究总院 北京 100028; 2. 国家海洋局北海环境监测中心 青岛 266033)

摘要 根据2006–2015年4个航次对唐山附近海域共70个采样站位的表层沉积物调查资料,分析了沉积物中Hg、Cu、Pb、Cd、Cr、Zn和As 7种重金属的含量和年际变化特征,并利用超标率统计法、地累积指数法和潜在生态风险指数法对其污染状况进行了评价。结果显示,调查海域表层沉积物中重金属含量总体水平较低,除个别站位的Cu和As超过第I类标准值外,其他调查站位的重金属含量均符合第I类标准。2006–2015年调查海域表层沉积物中7种重金属含量的年际变化略有不同,其中,Cu、Pb、Cd和Zn 4种重金属含量相对比较稳定,Hg和Cr的含量表现为先升高后降低的趋势,而As的变化趋势不明显。地累积指数法评价结果显示,7种重金属的地累积指数(I_{geo})多年平均值为Hg>Cd>Pb>Cu>As>Cr>Zn;而潜在生态风险评价结果显示,7种重金属的潜在生态风险系数(E_r^i)多年平均值为Hg>Cd>As>Pb>Cu>Cr>Zn;两种污染评价结果一致,均显示Hg是唐山附近海域表层沉积物的主要污染因子,潜在生态风险最大。综合潜在风险指数(RI)年际变化范围为44.26–153.18,平均值为89.92,属于低生态风险水平;RI年际变化基本表现为先升高后降低的趋势,表明近年来调查海域表层沉积物重金属的污染状况有所改善。

关键词 唐山;表层沉积物;重金属;年际变化;污染评价

中图分类号 S931.3 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)03-0022-09

唐山附近海域地处滦河口的南部、海河入海口的北部,受地表径流影响较大。随着近年来工农业的飞速发展,重金属排放不断增加,各种重金属污染物最终汇入海洋。唐山附近海域是河北省重要的海水养殖场所,重金属易被鱼、虾、蟹和贝等海洋生物吸收,进入到食物链中,从而对人体健康造成危害(史国媛,2012)¹⁾。

重金属由于其特殊的化学特性和毒性效应,成为海洋环境中具有潜在危害的重要污染物。而海洋

沉积物作为重金属的源和汇,其重金属的含量是水动力条件变化、沉积物的吸附作用和析出作用等共同影响的结果,表现为比水体含量高、较稳定,且有明显的时空分布规律(薛彬等,2015)。近年来,针对海域表层沉积物中重金属的分布及污染状况等已开展了大量的工作。郑懿珉等(2015)研究表明,莱州湾表层沉积物重金属高值区在莱州湾西部海域,受莱州湾西部的陆源性输入和湾内潮流运动规律等影响。林曼曼等(2013)对环渤海海域的研究结果显示,

* 中海石油(中国)有限公司科技项目(YXKY-2016-ZY-07)资助[This work was supported by the project of study on the marine environmental impact of offshore oil and gas field development (YXKY-2016-ZY-07)]

① 通讯作者: 胡琴, 工程师, E-mail: huqin7321@163.com

收稿日期: 2016-03-22, 收修改稿日期: 2016-04-14

1) Shi GY. Distribution of heavy metals and migration characteristics in surface sediments of Tangshan. Master's Thesis of Hebei United University, 2012, 1–2 [史国媛. 唐山近海表层沉积物重金属分布特征及迁移规律. 河北联合大学硕士研究生学位论文, 2012, 1–2]

秦皇岛-唐山近岸海域是污染最轻的区域, 重污染地区主要分布在辽东湾葫芦岛近岸海域, 主要因素是物源和沉积物粒度等。吴斌等(2013)研究表明, 黄河口表层沉积物中重金属含量均处于较低水平, 重金属含量与细颗粒物、总有机碳之间无显著相关关系, 表明其受汛期黄河上游复杂来源的影响, 而粒度和总有机碳皆非主控因素。

目前, 不少学者对渤海海域的渤海湾(周笑白等, 2015; 王小静等, 2015; 何荣等, 2015)、渤海中部(刘明等, 2012)、莱州湾(郑懿珉等, 2015; 胡宁静等, 2011)以及辽东湾(孙钦帮等, 2015; 张现荣等, 2012)等沉积物中重金属的污染进行了研究, 但对唐山附近海域沉积物重金属的污染状况报道较少, 对其年际变化趋势的分析研究则更少。本研究根据 2006–2015 年共计 4 个航次的调查数据, 对唐山附近海域表层沉积物中重金属含量进行了年际变化分析, 并采用超标率统计法、地累积指数法和潜在生态风险指数法对其进行了污染综合评价, 为该海域生态环境的健康发展和可持续利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 调查站位与时间

本研究分别于 2006 年 5 月、2011 年 5 月、2012 年

6 月和 2015 年 6 月对唐山附近海域进行了 4 个航次采集了共计 70 个表层沉积物样品; 其中 4 个航次的表层沉积物调查站位数分别为 10、21、21 和 18 个。调查海域覆盖范围在 35°30′–39°30′N、119°00′–119°50′E 之间; 调查海域水深为 12–31 m。4 个航次调查站位分布见图 1。

1.2 调查项目与分析方法

对采集的表层沉积物样品中总汞(Hg)、铜(Cu)、铅(Pb)、镉(Cd)、铬(Cr)、锌(Zn)和砷(As) 7 种重金属元素的含量进行分析。沉积物样品的采集、贮存、运输、预处理和分析方法等均严格按照《海洋监测规范》(GB17378-2007)中所规定的要求执行。Pb、Cu、Cd 和 Cr 用无火焰原子吸收分光光度法测定; Zn 用火焰原子吸收分光光度法测定; As 和 Hg 用原子荧光法测定。

1.3 评价方法

国内外目前有关沉积物中重金属评价的方法有很多, 主要有综合指数法、修正综合指数法、地累积指数法、污染指数法、单因子标准指数法、沉积物富集系数法和潜在生态风险指数法等(刘宏伟等, 2015)。其中, 应用最广的为 Hakanson (1980)提出的重金属潜在生态风险指数评价法(柴小平等, 2015; 陈燕等,

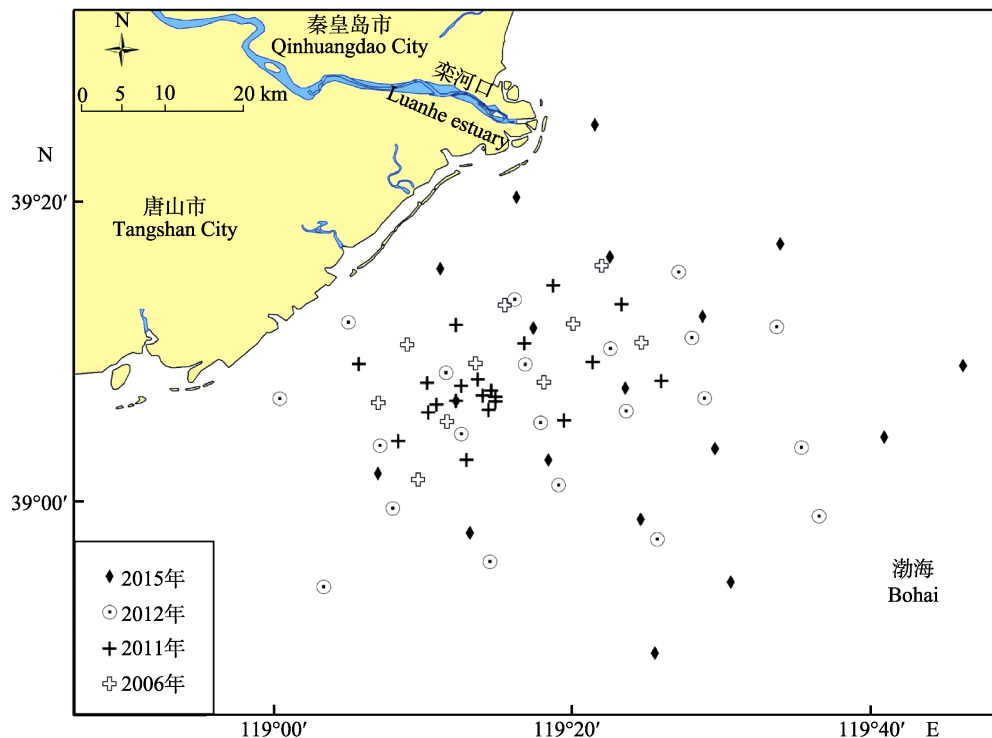


图 1 4 个航次调查站位分布
Fig.1 Distribution of survey stations in four cruises

2014; 刘宏伟等, 2015)。基于现有评价方法, 本研究采用单因子超标率统计法、地累积指数法和潜在生态风险指数法, 对调查海域表层沉积物重金属的污染状况进行评价。

1.3.1 超标率统计法 根据《海洋沉积物质量》(GB18668-2002)中第 I 类标准值, 对调查海域表层沉积物重金属的含量状况进行超标率统计, 其计算公式为:

$$I_i = C_i / S_i$$

式中, I_i 为第 i 种重金属的标准指数; C_i 为第 i 种重金属的实测值; S_i 为第 i 种重金属的第 I 类标准值。当 $I_i \leq 1$ 时, 符合第 I 类标准; $I_i > 1$ 时, 含量超标。其中, 海洋沉积物质量第 I 类标准值为: $Hg \leq 0.20 \times 10^{-6}$ 、 $Cu \leq 35.0 \times 10^{-6}$ 、 $Pb \leq 60.0 \times 10^{-6}$ 、 $Cd \leq 0.50 \times 10^{-6}$ 、 $Zn \leq 150.0 \times 10^{-6}$ 、 $Cr \leq 80.0 \times 10^{-6}$ 、 $As \leq 20.0 \times 10^{-6}$ 。

1.3.2 地累积指数法 地累积指数法是由德国学

者 Muller 教授提出的, 综合考虑了自然地质过程造成的背景值的影响及人为活动对重金属污染的影响, 是一种研究水环境沉积物中重金属污染的定量指标。目前被广泛应用于现代沉积物中重金属污染的评价(孙钦帮等, 2015; 江洪友等, 2013)。其计算公式如下:

$$I_{geo} = \log_2 [C_i / (kC_n^i)]$$

式中, I_{geo} 为地累积指数; C_i 为第 i 种重金属的实测值; C_n^i 为第 i 种重金属背景参考值; k 为考虑到造山运动可能引起背景值波动而设定的常数, 通常取 1.5。 I_{geo} 用于沉积物中重金属污染程度评价分为 7 个等级(表 1)。重金属背景值的选定对评价结果影响较大, 而结合区域研究现状能更好地反映重金属地球化学背景值(罗先香等, 2010), 因此, 本研究采用刘宪斌等(2008)研究的渤海沉积物的重金属环境背景值上限作为本研究海域的背景值进行污染评价, 7 种重金属元素的环境背景值见表 2。

表 1 重金属的地累积指数及其污染级别

Tab.1 Index of geo-accumulation (I_{geo}) of the heavy metals and the pollution degree

污染程度 Pollution degree	清洁 Clean	轻度污染 Slight pollution	偏中度污染 Lower moderate pollution	中度污染 Moderate pollution	偏重污染 Lower heavy pollution	重污染 Heavy pollution	严重污染 Serious pollution
地累积指数 I_{geo}	≤ 0	0-1	1-2	2-3	3-4	4-5	>5
级别 Grade	0	1	2	3	4	5	6

表 2 沉积物中重金属的毒性系数和背景参考值

(刘宪斌等, 2008)

Tab.2 Toxicity coefficients and reference values of heavy metals in the sediments (Liu *et al.*, 2008)

项目 Items	重金属元素 Heavy metal elements						
	Hg	Cu	Pb	Cd	Cr	Zn	As
T_r^i	40	5	5	30	2	1	10
$C_n^i (\times 10^{-6})$	0.05	25.86	16.63	0.136	60	75	13

1.3.3 潜在生态风险指数法 潜在生态风险指数法是一套应用沉积学原理评价重金属污染及生态危害的方法。该方法通过分析沉积物中不同重金属污染物的释放能力和生物毒性强度, 将沉积物中污染物的含量折算为生物毒性风险。当多种重金属共存时, 采取加和的方式来衡量重金属的生物毒性。潜在生态风险指数计算公式如下:

$$E_r^i = T_r^i \times C_f^i = T_r^i \times C^i / C_n^i$$

$$RI = \sum_{i=1}^7 E_r^i$$

式中, E_r^i 为重金属 i 潜在生态风险系数; T_r^i 为

重金属 i 的毒性响应系数, 用于反映重金属 i 的毒性水平和生物对污染物的敏感程度; C_f^i 为重金属 i 的污染系数; C^i 为重金属 i 的实测浓度; C_n^i 为重金属 i 的背景参考值; RI 为重金属污染物的综合潜在风险指数。在计算 Hakanson 潜在生态风险指数时, 一般以全球工业化以前沉积物中重金属含量为背景值, 但受地质条件、水文状况、生物活动等多种因素的影响, 重金属背景值往往具有很强的区域性, 如在评价时仍以前者作为参照往往会判断结果出现较大的偏差, 因此, 本研究参考渤海海域沉积物中重金属环境背景值上限(刘宪斌等, 2008)作为本研究海域的背景参考值(表 1)。Hakanson (1980)提出的潜在生态风险指数法包括多氯联苯(PCB)、Hg、Cu、Pb、Cd、Cr、Zn 和 As 共 8 种监测项目。由于本研究未考虑 PCB, 主要针对 7 种重金属进行分析评价, 因此, 需要对综合潜在风险指数值范围进行调整(马德毅等, 2003; 刘成等, 2002)。单个重金属潜在生态风险系数 (E_r^i) 和调整后的综合潜在风险指数值所对应的污染评价等级划分见表 3。

表 3 潜在生态风险指数法的污染评价等级划分
Tab.3 Classification and evaluation of heavy metal pollution based on the potential ecological risk index

E_r^i 范围 Ranges of E_r^i	单个重金属污染物生态风险程度分级 Degree classification of ecological risk for single heavy metal	综合潜在风险指数范围 Ranges of RI	综合潜在生态风险程度分级 Degree classification of the comprehensive potential ecological risk
$E_r^i < 40$	低 Low	RI < 130	低 Low
$40 \leq E_r^i < 80$	中 Moderate	$130 \leq \text{RI} < 260$	中 Moderate
$80 \leq E_r^i < 160$	较高 Considerable	$260 \leq \text{RI} < 520$	较高 Considerable
$160 \leq E_r^i < 320$	高 High	RI ≥ 520	高 High
$E_r^i \geq 320$	很高 Very high		

2 结果与讨论

2.1 表层沉积物中重金属含量分析

2006–2015 年唐山附近海域表层沉积物中重金属含量的调查统计结果见表 4。由表 4 可知, 4 个航次调查海域沉积物中重金属 Hg、Cu、Pb、Cd、Cr、Zn 和 As 的含量变化范围分别为 $(0.016-0.136) \times 10^{-6}$ 、 $(3.1-41.9) \times 10^{-6}$ 、 $(3.3-28.8) \times 10^{-6}$ 、 $(0.062-0.343) \times 10^{-6}$ 、 $(3.5-33.7) \times 10^{-6}$ 、 $(3.1-34.0) \times 10^{-6}$ 和 $(2.0-21.5) \times 10^{-6}$, 4 次调查重金属多年平均含量分别为 0.056×10^{-6} 、 17.3×10^{-6} 、 16.2×10^{-6} 、 0.134×10^{-6} 、 21.6×10^{-6} 、 22.2×10^{-6} 和 7.6×10^{-6} , 调查海域表层沉积物中重金属含量总体水平较低。超标率统计结果显示, 与《海洋沉积物质量》(GB18668-2002) 中第 I 类标准值相比, 除 2006 年和 2012 年分别有 1 个站位的 Cu、2011 年有

1 个站位的 As 超过第 I 类标准值外, 其他调查站点的重金属含量均符合第 I 类标准; 超标站位的 Cu 和 As 含量均符合第 II 类标准。

林曼曼等(2013)调查了环渤海海域沉积物重金属分布特征, 分析结果显示, 秦皇岛-唐山近岸海域沉积物中的重金属 Hg、Cu、Pb、Cd、Cr、Zn 和 As 的平均值分别为 0.018×10^{-6} 、 14.83×10^{-6} 、 18.93×10^{-6} 、 0.092×10^{-6} 、 45.02×10^{-6} 、 45.25×10^{-6} 和 6.87×10^{-6} 。本研究 4 个航次调查结果与之相比, 各金属元素含量基本处于同一数量级水平; 其中, Hg、Cu、Cd 和 As 含量略大, Pb 含量略小, 而 Cr 和 Zn 含量降低明显。

从重金属含量平面分布角度分析, 不同重金属同一个航次的平面分布有较大差异, 而同一种重金属不同航次调查的平面分布也略有差异。本研究以重金属 Hg 和 Cd 为例进行描述。2006 年和 2011 年调查海域

表 4 2006–2015 年调查海域表层沉积物重金属含量的统计特征

Tab.4 Statistical characteristics of heavy metal contents in surface sediments of the survey area from 2006 to 2015

年份 Year	统计值 Statistic	Hg	Cu	Pb	Cd	Cr	Zn	As
2006	最小值 Minimum ($\times 10^{-6}$)	0.018	7.0	10.2	0.093	8.1	10.8	5.3
	最大值 Maximum ($\times 10^{-6}$)	0.075	36.5	28.8	0.343	20.4	26.0	8.6
	均值 Average ($\times 10^{-6}$)	0.051	15.4	17.6	0.158	12.0	16.4	7.0
	超标率 Over-standard rate (%)	0	10	0	0	0	0	0
2011	最小值 Minimum ($\times 10^{-6}$)	0.017	3.1	3.3	0.062	3.5	3.1	9.0
	最大值 Maximum ($\times 10^{-6}$)	0.136	20.6	23.4	0.234	27.3	34.0	21.5
	均值 Average ($\times 10^{-6}$)	0.062	14.7	15.6	0.137	20.3	22.7	11.9
	超标率 Over-standard rate (%)	0	0	0	0	0	0	5
2012	最小值 Minimum ($\times 10^{-6}$)	0.053	11.1	11.1	0.082	20.2	16.5	2.0
	最大值 Maximum ($\times 10^{-6}$)	0.116	41.9	24.6	0.147	33.7	30.0	5.8
	均值 Average ($\times 10^{-6}$)	0.083	20.3	18.2	0.118	27.4	23.1	3.3
	超标率 Over-standard rate (%)	0	5	0	0	0	0	0
2015	最小值 Minimum ($\times 10^{-6}$)	0.016	12.7	9.2	0.062	14.3	16.8	6.3
	最大值 Maximum ($\times 10^{-6}$)	0.027	23.7	17.8	0.227	28.3	30.2	9.9
	均值 Average ($\times 10^{-6}$)	0.022	17.8	13.7	0.136	21.5	24.0	8.0
	超标率 Over-standard rate (%)	0	0	0	0	0	0	0
多年平均 Multi-year average		0.056	17.3	16.2	0.134	21.6	22.2	7.6

重金属 Hg 的平面分布特征表现为由北向南逐渐降低；2012 年调查海域 Hg 的平面分布呈西低东高；2015 年调查海域 Hg 的平面分布呈中部高、四周低的趋势。而重金属 Cd 的平面分布表现为：2006 年为四周高中部低；2011 年和 2012 年为四周低中部高；2015 年呈北部向南部逐步升高的趋势。从重金属 Hg 和 Cd 的平面分布可以看出，Hg 和 Cd 在近岸处的含量并没有明显高于其他海域，因此，推测陆源排污不是 Hg 和 Cd 的主要来源。重金属 Hg 和 Cd 的含量分布受人类活动影响较小，其含量分布可能主要受地质构造活动、岩石风化、侵蚀及水动力作用等自然过程的影响(陈燕等, 2014)。

2.2 表层沉积物中重金属含量的年际变化特征

为统一尺度对比 2006–2015 年唐山海域表层沉积物各重金属元素含量的年际变化特征，以《海洋沉积物质量》(GB18668-2002)第一类标准值为参考标准，对各航次 7 种重金属元素进行单因子标准指数评价，其年际变化情况见图 2。从图 2 可以看出，7 种重金属含量的年际变化略有不同。其中，Cu、Pb、Cd 和 Zn 4 种重金属含量相对比较稳定，4 个航次调查结果基本持平；而重金属 Hg 和 Cr 的含量表现为先升高后降低的趋势，特别是 2015 年 Hg 的含量明显低于前 3 个航次；重金属 As 在 2011 年监测值最大，2012 年监测值最小，而 2006 年和 2015 年的监测值基本持平。

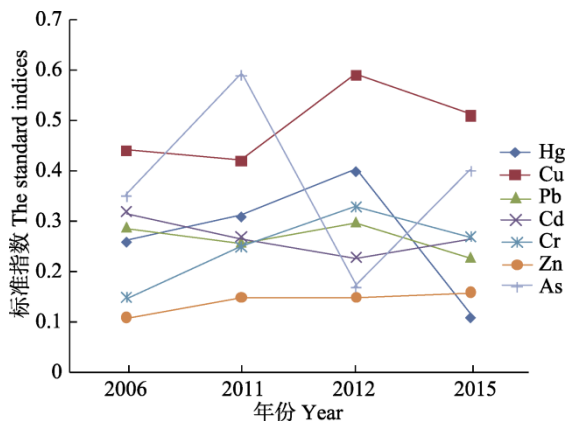


图 2 调查海域表层沉积物中重金属标准指数的年际变化
Fig.2 The inter-annual variations of the standard indices of heavy metals in surface sediments of the survey area

总体来说，近 10 年来调查海域及其沿岸区域的人类活动并未引起该海域表层沉积物中重金属含量明显增加，这可能归因于该海域表层沉积物中重金属的累积受到物理、化学和生物等多途径的影响，重金

属可以沉积在海底表层沉积物上，又可以通过解吸与再悬浮等过程重新进入水体，或者通过生物摄食的方式在高营养级生物体内富集(吴斌等, 2013)，从短时间尺度上看，该海域表层沉积物中重金属的年际变化不显著。

2.3 表层沉积物重金属污染评价

2.3.1 重金属地累积指数(I_{geo})评价 将 2006–2015 年 4 个航次各重金属元素的实测值代入地累积指数计算公式，得出唐山附近海域表层沉积物的 I_{geo} (表 5)。由表 5 可见，唐山附近海域表层沉积物中重金属的 I_{geo} 年际变化趋势与其标准指数的年际变化趋势一致。所有航次的 Cr 和 Zn 的 I_{geo} 均为负值，属于清洁级别，表明调查海域未受到这 2 种重金属元素的污染。 $0 < I_{geo} < 1$ 的重金属有：2006 年 1 个站位的 Pb 和 2 个站位的 Cd、2011 年 6 个站位的 Hg、1 个站位的 Cd 和 1 个站位的 As、2012 年 11 个站位的 Hg 和 1 个站位的 Cu、2015 年 2 个站位的 Cd，这些站点污染属于轻度污染级别；其他调查站位的 I_{geo} 均为负值，属于清洁级别。除 2012 年 Hg 的 I_{geo} 均值大于 0 外，其他各航次的 7 种重金属的 I_{geo} 均值均小于 0。总体而言，调查海域各重金属元素的 I_{geo} 多年平均值为 $Hg > Cd > Pb > Cu > As > Cr > Zn$ ，Hg 的 I_{geo} 最大，是唐山附近海域表层沉积物的主要污染因子。

2.3.2 重金属潜在生态风险评价 2006–2015 年调查海域 4 个航次表层沉积物重金属的潜在生态风险系数(E_r^i)和综合潜在生态风险指数(RI)两项指标见表 6。4 次调查 7 种重金属的多年平均 E_r^i 大小为 $Hg > Cd > As > Pb > Cu > Cr > Zn$ ；其中，Hg 的 E_r^i 为 44.87 (> 40)，属中等生态风险水平，是唐山附近海域主要的生态风险因子；其他 6 种重金属的 E_r^i 均小于 40，属于低生态风险水平。

2006 年调查海域 60% 站位中 Hg 以及 20% 站位中 Cd 的潜在生态风险均处于中等水平，其他 5 种重金属的潜在生态风险处于低水平；2011 年调查海域 62% 站位中 Hg 以及 10% 站位中 Cd 的潜在生态风险均处于中等水平，其他 5 种重金属的潜在生态风险处于低水平；2012 年调查海域 100% 站位中 Hg 的 E_r^i 均大于 40，处于中等生态风险水平，其他 6 种重金属的潜在生态风险处于低水平；2015 年调查海域 17% 站位中 Cd 的 E_r^i 处于中等生态风险水平，其他 6 种重金属的潜在生态风险处于低水平。

表 5 2006–2015 年调查海域表层沉积物重金属的地累积指数

Tab.5 I_{geo} of heavy metals in surface sediments of the survey area from 2006 to 2015

年份 Year	统计值 Statistic	地累积指数 I_{geo}						
		Hg	Cu	Pb	Cd	Cr	Zn	As
2006	最小值 Minimum	-2.06	-2.46	-1.29	-1.13	-3.47	-3.38	-1.88
	最大值 Maximum	0	-0.09	0.21	0.75	-2.14	-2.11	-1.18
	均值 Average	-0.56	-1.33	-0.50	-0.37	-2.91	-2.78	-1.48
2011	最小值 Minimum	-2.15	-3.65	-2.92	-1.72	-4.68	-5.18	-1.12
	最大值 Maximum	0.86	-0.91	-0.09	0.20	-1.72	-1.73	0.14
	均值 Average	-0.27	-1.40	-0.68	-0.57	-2.15	-2.31	-0.71
2012	最小值 Minimum	-0.50	-1.81	-1.17	-1.31	-2.16	-2.77	-3.29
	最大值 Maximum	0.63	0.11	-0.02	-0.47	-1.42	-1.91	-1.75
	均值 Average	0.15	-0.93	-0.45	-0.79	-1.72	-2.28	-2.56
2015	最小值 Minimum	-2.23	-1.61	-1.44	-1.72	-2.65	-2.74	-1.63
	最大值 Maximum	-1.47	-0.71	-0.49	0.15	-1.67	-1.90	-0.98
	均值 Average	-1.77	-1.12	-0.86	-0.58	-2.07	-2.23	-1.29
多年平均 Multi-year average		-0.41	-1.17	-0.62	-0.61	-2.06	-2.34	-1.36

表 6 2006–2015 年调查海域表层沉积物重金属的潜在生态风险系数和综合潜在风险指数

Tab.6 The potential ecological risk factor (E_r^i) and comprehensive potential ecological risk index (RI) of heavy metals in surface sediments of the survey area from 2006 to 2015

年份 Year	统计值 Statistic	潜在生态风险系数 E_r^i							综合潜在风险指数 RI
		Hg	Cu	Pb	Cd	Cr	Zn	As	
2006	最小值 Minimum	14.32	1.36	3.07	20.45	0.27	0.14	4.09	52.06
	最大值 Maximum	59.76	7.06	8.66	75.66	0.68	0.35	6.63	123.29
	均值 Average	41.01	2.99	5.28	34.75	0.40	0.22	5.39	90.04
2011	最小值 Minimum	13.52	0.60	1.00	13.63	0.12	0.04	6.92	48.10
	最大值 Maximum	108.80	3.98	7.04	51.62	0.91	0.45	16.54	153.18
	均值 Average	49.71	2.85	4.69	30.31	0.68	0.30	9.14	97.67
2012	最小值 Minimum	42.08	2.15	3.34	17.98	0.67	0.22	1.55	81.66
	最大值 Maximum	92.80	8.10	7.40	32.43	1.12	0.40	4.44	136.00
	均值 Average	65.00	3.97	5.58	26.30	0.93	0.31	2.59	104.68
2015	最小值 Minimum	12.96	2.46	2.77	13.59	0.48	0.22	4.85	44.26
	最大值 Maximum	21.76	4.58	5.35	50.07	0.94	0.40	7.62	80.39
	均值 Average	17.99	3.44	4.11	29.97	0.72	0.32	6.19	62.74
多年平均 Multi-year average		44.87	3.31	4.90	30.03	0.69	0.29	5.83	89.92

2006–2015 年调查海域综合潜在风险指数(RI)年际变化范围为 44.26–153.18, 平均值为 89.92。根据表 3 的综合潜在生态风险程度分级, 从整体来说, 调查海域的综合潜在生态风险属于低生态风险水平; 其中, Hg 在 RI 中的平均贡献率达到 50%。2011 年和 2012 年调查结果显示, 有少数调查站位的 RI 大于 130, 小于 260, 属于中等生态风险水平。从年际变化趋势来看, 2012 年 RI 最高, 为 104.18; 2015 年 RI 最低, 为 62.74; RI 年际变化基本表现为先升高后降低, 表明近年来调查海域表层沉积物重金属的污染

状况有所改善。从空间分布上看, RI 处于中等生态风险水平的站位主要分布在调查海域的西南部近岸海域; 根据《河北省海洋功能区划(2011-2020)》, 该处海域主要海洋功能区类型为港口航运区和农渔业区, 这可能与近岸的港口航运区的污水排放以及船舶的燃油污染等有关, 排海污染物中大量重金属通过吸附、沉降等物理、化学过程, 最终沉积于海底, 从而影响该处海域表层沉积物中重金属的潜在生态风险。

重金属地累积指数法和潜在生态风险指数法的评价结果均显示, Hg 是唐山附近海域表层沉积物主

要的污染因子,潜在生态风险最大;而 Cd 在重金属污染排序中排在第 2 位,调查海域主要受到 Hg、Cd 这两种重金属的影响。两种评价结果对 7 种重金属的污染排序略有不同,这主要是因为地累积指数法仅仅评价重金属富集的程度,而潜在生态风险指数法还综合考虑了重金属生物毒性的差异,不同重金属元素在生态风险评价中具有不同的贡献值(张晓举等, 2014)。

3 结 论

2006–2015 年对唐山附近海域表层沉积物中重金属进行的 4 个航次调查结果显示,重金属 Hg、Cu、Pb、Cd、Cr、Zn 和 As 的多年平均含量分别为 0.056×10^{-6} 、 17.3×10^{-6} 、 16.2×10^{-6} 、 0.134×10^{-6} 、 21.6×10^{-6} 、 22.2×10^{-6} 和 7.6×10^{-6} , 调查海域表层沉积物中重金属含量总体水平较低。除个别站位的 Cu 和 As 超过第 I 类标准值外,其他调查站位的重金属含量均符合第 I 类标准;超标站位的 Cu 和 As 含量均符合第 II 类标准。

2006–2015 年调查海域表层沉积物中 7 种重金属含量的年际变化略有不同。其中, Cu、Pb、Cd 和 Zn 4 种重金属含量相对比较稳定,而 Hg 和 Cr 的含量表现为先增大后降低, As 的变化趋势不明显。总体来说,近 10 年来调查海域及其沿岸区域的人类活动并未引起该海域表层沉积物中重金属含量明显增加。

地累积指数法评价结果显示,2006–2015 年调查海域 7 种重金属元素的 I_{geo} 多年平均值排序为 $Hg > Cd > Pb > Cu > As > Cr > Zn$, 其中, Cr 和 Zn 均属于清洁级别,其他指标少数站位受到轻度污染。潜在生态风险评价结果显示,7 种重金属的潜在生态风险系数 E_i^i 多年平均值排序为 $Hg > Cd > As > Pb > Cu > Cr > Zn$ 。综合潜在风险指数 RI 年际变化范围为 44.26–153.18, 平均值为 89.92, 属于低生态风险水平; RI 年际变化基本表现为先升高后降低的趋势,表明近年来调查海域表层沉积物重金属的污染有所改善。采用地累积指数法和潜在生态风险指数法得出的评价结果具有一致性,污染评价结果显示, Hg 是唐山附近海域表层沉积物主要的污染因子,潜在生态风险最大。

参 考 文 献

Chai XP, Hu BL, Wei N, *et al.* Distribution, sources and assessment of heavy metals in surface sediments of the Hangzhou Bay and its adjacent areas. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2015, 35(12): 3906–3916 [柴小平, 胡宝兰,

魏娜, 等. 杭州湾及邻近海域表层沉积物重金属的分布、来源及评价. *环境科学学报*, 2015, 35(12): 3906–3916]
 Chen Y, Xu ZZ, Hu YY, *et al.* Distribution and ecological risk assessment of heavy metals in the surface sediments along coast of Qinhuangdao. *Marine Environmental Science*, 2014, 33(1): 66–70 [陈燕, 许自舟, 胡莹莹, 等. 秦皇岛海域表层沉积物重金属含量分布特征及生态风险评价. *海洋环境科学*, 2014, 33(1): 66–70]
 Hakanson L. An ecological risk index for aquatic pollution control. A sedimentological approach. *Water Research*, 1980, 14(8): 975–1001
 He R, Liu Y. Investigation and assessment of heavy metal pollution in the nearshore aquaculture area of northern Tianjin City. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2015(4): 149–154 [何荣, 刘洋. 天津北部近岸增殖养殖区重金属污染的调查与评价. *海洋湖沼通报*, 2015(4): 149–154]
 Hu NJ, Shi XF, Liu JH, *et al.* Distributions and impacts of heavy metals in the surface sediments of the Laizhou Bay. *Advances in Marine Science*, 2011, 29(1): 63–72 [胡宁静, 石学法, 刘季花, 等. 莱州湾表层沉积物中重金属分布特征和环境影响. *海洋科学进展*, 2011, 29(1): 63–72]
 Jiang HY, Liu XB, Zhang QF, *et al.* Distribution and risk analysis of heavy metals and as in the surface sediment of Tianjin offshore area. *Marine Sciences*, 2013, 37(9): 82–89 [江洪友, 刘宪斌, 张秋丰, 等. 天津近岸海域沉积物重金属及砷分布与生态风险分析. *海洋科学*, 2013, 37(9): 82–89]
 Lin MM, Zhang Y, Xue CT, *et al.* Distribution pattern of heavy metals in the surface sediments of the area of circum-Bohai Bay and ecological environment assessment. *Marine Geology & Quaternary Geology*, 2013, 33(6): 41–46 [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]
 Liu C, Wang ZY, He Y, *et al.* Evaluation on the potential ecological risk for the river mouths around Bohai Bay. *Research of Environmental Sciences*, 2002, 15(5): 33–37 [刘成, 王兆印, 何耘, 等. 环渤海湾诸河口潜在生态风险评价. *环境科学研究*, 2002, 15(5): 33–37]
 Liu HW, Du D, Ma Z, *et al.* Distribution pattern and contamination assessment of heavy metals in surface sediments of Beidaihe near-shore area. *Marine Geology Frontiers*, 2015, 31(7): 47–51 [刘宏伟, 杜东, 马震, 等. 北戴河近岸海域表层沉积物重金属分布特征及污染评价. *海洋地质前沿*, 2015, 31(7): 47–51]
 Liu M, Zhang AB, Fan DJ, *et al.* Environmental quality of heavy metals in surface sediments in the central region of the Bohai Sea. *China Environmental Science*, 2012, 32(2): 279–290 [刘明, 张爱滨, 范德江, 等. 渤海中部底质沉积物重金属环境质量. *中国环境科学*, 2012, 32(2): 279–290]
 Liu XB, Jiang ZP, Zhang GY, *et al.* Potential ecological risk evaluation of heavy metals in the inter tidal zone sediments of Tanggu, Tianjin. *Journal of Agro-Environment Science*, 2008, 27(2): 731–735 [刘宪斌, 姜中鹏, 张光玉, 等. 天津

- 塘沽潮间带沉积物中重金属的潜在生态危害评价. 农业环境科学学报, 2008, 27(2): 731-735]
- Luo XX, Zhang R, Yang JQ, *et al.* Distribution and pollution assessment of heavy metals in surface sediment in Laizhou Bay. *Ecology and Environmental Sciences*, 2010, 19(2): 262-269 [罗先香, 张蕊, 杨建强, 等. 莱州湾表层沉积物重金属分布特征及污染评价. 生态环境学报, 2010, 19(2): 262-269]
- Ma DY, Wang JY. Evaluation on potential ecological risk of sediment pollution in main estuaries of China. *China Environmental Science*, 2003, 23(5): 521-525 [马德毅, 王菊英. 中国主要河口沉积物污染及潜在生态风险评价. 中国环境科学, 2003, 23(5): 521-525]
- Sun QB, Chen YZ, Sun LY, *et al.* Concentration distribution and pollution assessment of heavy metals in surface sediments in the western waters of Liaodong Bay. *Journal of Applied Oceanography*, 2015, 34(1): 73-79 [孙钦帮, 陈燕珍, 孙丽艳, 等. 辽东湾西部海域表层沉积物重金属的含量分布与污染评价. 应用海洋学学报, 2015, 34(1): 73-79]
- Wang XJ, Li L, Gao JJ, *et al.* Geochemical speciation and environmental assessment of heavy metals in surface sediments in functional zones of southwest Bohai sea, China. *Oceanaologia Et Limnologia Sinica*, 2015, 46(3): 517-525 [王小静, 李力, 高晶晶, 等. 渤海西南部近岸功能区表层沉积物重金属形态分析及环境评价. 海洋与湖沼, 2015, 46(3): 517-525]
- Wu B, Song JM, Li XG. Environmental characteristics of heavy metals in surface sediments from the Huanghe estuary. *Environmental Science*, 2013, 34(4): 1324-1332 [吴斌, 宋金明, 李学刚. 黄河口表层沉积物中重金属的环境地球化学特征. 环境科学, 2013, 34(4): 1324-1332]
- Xue B, He YN, Hu HM, *et al.* Research on the distribution characteristic and potential ecological risks of heavy metal pollution in the surface sediments of Jintang Islands. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)*, 2015, 34(3): 238-243 [薛彬, 何依娜, 胡红美, 等. 金塘岛海域表层沉积物重金属分布特征与潜在生态风险研究. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2015, 34(3): 238-243]
- Zhang XJ, Yu HY, Ding L, *et al.* Pollution of heavy metals in the surface sediments and potential ecological risk from Shihe Rivers in Qinhuangdao. *Environmental Monitoring in China*, 2014, 30(1): 1-5 [张晓举, 于海洋, 丁龙, 等. 秦皇岛石河口海域沉积物重金属污染及生态风险评价. 中国环境监测, 2014, 30(1): 1-5]
- Zhang XR, Zhang Y, Ye Q, *et al.* Environment quality of Liaodong Bay and pollution evolution of heavy metals. *Marine Geology & Quaternary Geology*, 2012, 32(2): 21-29 [张现荣, 张勇, 叶青, 等. 辽东湾北部海域沉积物重金属环境质量和污染演化. 海洋地质与第四纪地质, 2012, 32(2): 21-29]
- Zheng YM, Gao MS, Liu S, *et al.* Distribution patterns and ecological assessment on heavy metals in the surface sediments of Laizhou Bay. *Marine Environmental Science*, 2015, 34(3): 354-360 [郑懿珉, 高茂生, 刘森, 等. 莱州湾表层沉积物重金属分布特征及生态环境评价. 海洋环境科学, 2015, 34(3): 354-360]
- Zhou XB, Mei PW, Peng LL, *et al.* Contents and potential ecological risk assessment of selected heavy metals in the surface sediments of Bohai Bay. *Ecology and Environmental Sciences*, 2015, 24(3): 452-456 [周笑白, 梅鹏蔚, 彭露露, 等. 渤海湾表层沉积物重金属含量及潜在生态风险评价. 生态环境学报, 2015, 24(3): 452-456]

(编辑 马瑾艳)

Inter-Annual Concentration Variations and Pollution Assessment of Heavy Metals in the Surface Sediments in the Adjacent Sea Water of Tangshan in Spring

HU Qin¹Ⓐ, GUO Jing¹, YIN Xiaona¹, QU Liang², CAO Jing¹

(1. China National Offshore Oil Corporation Research Institute, Beijing 100028;

2. North China Sea Environmental Monitoring Center, State Oceanic Administration, Qingdao 266033)

Abstract Current study surveyed 70 sampling stations through four cruises in the adjacent seawater near Tangshan between 2006 and 2015. The contents and inter-annual variation characteristics of seven heavy metals: Hg, Cu, Pb, Cd, Cr, Zn and As in the surface sediment were analyzed. The single-factor exceeding rate, geo-accumulation index (I_{geo}) and the comprehensive potential ecological risk index (RI) were used to evaluate the pollution degree. The results showed that the overall levels of the heavy metal contents in the surface sediment were low in the survey areas. Specifically, Cu and As contents in several stations exceeded the first class standard value, whereas the contents of other heavy metals accorded with the first class standard. The inter-annual content variations of the surveyed heavy metal were fluctuant slightly between 2006 and 2015. The contents of Cu, Pb, Cd, and Zn were relatively stable throughout the years, but the inter-annual variation of Hg and Cr increased initially followed by decrease. There was no significant change in As contents between the years. The I_{geo} evaluation results showed that the multi-year average of I_{geo} for the seven heavy metals was Hg>Cd>Pb>Cu>As>Cr>Zn, while the potential ecological risk assessment results showed that the multi-year average of the potential ecological risk factor E_r^i for the seven heavy metals was Hg>Cd>As>Pb>Cu>Cr>Zn. Hg was the main pollution factor in surface sediments in the adjacent sea water of Tangshan based on the consistent results from two pollution evaluation methods, indicating that it has the highest ecological risk level. The inter-annual variations of RI ranged from 44.26 to 153.18 and the inter-annual average value was 89.92, belonging to the low ecological risk level. The trend of the inter-annual variations of RI was increasing and then decreasing, suggesting that the heavy metal pollution in surface sediments has been reduced in recent years.

Key words Tangshan; Surface sediments; Heavy metals; Inter-annual variations; Pollution assessment

Ⓐ Corresponding author: HU Qin, E-mail: huqin7321@163.com

北黄海虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*) 定居群体的生态适应性研究*



杨 钰^{1,2,3} 倪守胜^{2,3,4} 刘 毅² 柳淑芳^{2,3①} 庄志猛²

(1. 大连海洋大学水产与生命学院 大连 116023; 2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 青岛海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; 4. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 本研究选取山东长岛、辽宁海洋岛和獐子岛底播的虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)群体、人工选育的“獐子岛红”品种养殖群体、辽宁旅顺自然群体以及原产地日本青森县陆奥湾自然群体,运用稳定同位素技术探究虾夷扇贝不同地理群体的特征。结果显示,(1)虾夷扇贝各群体的闭壳肌和内脏团 $\delta^{13}\text{C}$ 值分别为 $-20.47\% \pm 0.66\%$ 和 $-24.13\% \pm 2.41\%$; 闭壳肌和内脏团 $\delta^{15}\text{N}$ 值分别为 $8.52\% \pm 1.32\%$ 和 $7.26\% \pm 0.49\%$ 。(2)基于 $\delta^{13}\text{C}$ 值和 $\delta^{15}\text{N}$ 值的单因素方差分析(One-way ANOVA)显示,群体间各个取样点闭壳肌和内脏团的碳、氮稳定同位素比值差异显著($P < 0.05$); 基于地理位置构建所有群体的碳氮稳定性同位素散点分布图,可以明显地区别中国群体和日本群体。(3)中国 8 个虾夷扇贝群体之间,只有长岛群体的碳、氮稳定同位素比值明显低于其他群体,而其余群体之间差异不显著($P > 0.05$)。研究表明,虾夷扇贝中国群体与日本群体间已经存在较大的差异,且中国群体间因生长海域、水文环境的不同也呈现出分群现象。说明虾夷扇贝定居群体在不同的生态环境下已产生了不同程度的适应性改变。

关键词 虾夷扇贝; 地理群体; 稳定性同位素; 生态适应性

中图分类号 S931.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)03-0031-08

虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)为冷水性双壳贝类,原主要分布于日本北海道及本洲北部、朝鲜、俄罗斯千岛群岛南部水域。1982年,辽宁省海洋水产研究所从日本北海道引入虾夷扇贝(王庆成等,1982),并在辽宁、山东等北方沿海展开大范围、规模化人工增养殖(张福绥等,1984)。因其品质好、价值高,经过 30 多年的养殖推广,虾夷扇贝已成为我国重要海洋经济贝类之一,并逐步适应渤海及黄海北部海域的生存环境且繁衍定居下来(常亚青等,2007;

李文姬等,2007; 周界衡,2012¹⁾)。

虾夷扇贝在引进和本地化过程中,其栖息环境和群体间关系发生较大变化。其原产地为日本青森、北海道及宫城等,地处 41°N 左右(刘永丰,1983),水温范围为 $5\text{--}20^\circ\text{C}$,最适生长温度为 $10\text{--}15^\circ\text{C}$ 。虾夷扇贝在中国的主要定居地山东长岛、獐子岛、海洋岛及旅顺等,地处 $37^\circ\text{--}39^\circ\text{N}$,该海域水温范围较大($1\text{--}27^\circ\text{C}$) (袁有宪等,2000; 张绪东等,2015)。栖息环境的变化直接影响贝类的摄食习性和生长发育(李文姬等,

* “十二五”农村领域国家科技计划课题(2012BAD18B03)和山东省泰山学者建设工程专项共同资助 [This work was supported by the National Scientific and Technological Projects in Rural Areas in 12th Five-Year (2012BAD18B03), and the Special Funds for Taishan Scholars Project of Shandong Province]. 杨 钰, E-mail: yy081521@163.com

① 通讯作者: 柳淑芳, 研究员, E-mail: liusf@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-04-05, 收修改稿日期: 2017-04-08

1) Zhou JH. Preliminary study on structure and characteristic of yesso scallop industry in Liaoning. Master's Thesis of Ocean University of China, 2012 [周界衡. 辽宁虾夷扇贝产业结构与特征的初步研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2012]

2012), 为了在新的生态环境中生存, 虾夷扇贝势必产生一系列的适应性进化, 但国内外尚无关于生态环境适应性研究报道。因此, 全面了解作为外来种的虾夷扇贝的生态适应过程, 摸清养殖过程中定居地满足其生长发育所需要的生态环境条件, 才能够更好地保障中国虾夷扇贝养殖业的健康可持续发展。

动物组织的碳、氮稳定同位素结果可以反映动物在生命过程中由于摄取的不同食物经过新陈代谢、消化吸收的累积, 及其所处海域环境因素的差异对其自身产生的影响(蔡德陵等, 2002、2005)。稳定同位素示踪技术(Stable isotope tracer technique)已经广泛用于人类和动物的营养学、临床医学和生态系统学研究等诸多领域(Deniro *et al.*, 1977; 蔡德陵等, 2002; 李忠义等, 2005; Benstead *et al.*, 2006)。大量研究表明, 碳稳定同位素与群体的可食用性代谢源有直接的关系, 消费者的 $\delta^{13}\text{C}$ 值与其食物源相似, 平均富集度约为 0–1‰, 可用作食物来源的良好示踪参数(Peterson *et al.*, 1987; 蔡德陵等, 2005; 郭旭鹏等, 2007); 氮稳定同位素每经一个营养级的传递将发生 2‰–4‰ 的富集, 可用作分析食物来源的参考(Peterson *et al.*, 1987; Hobson *et al.*, 1992)。因此, 研究不同群体间的碳、氮稳定同位素水平, 不仅能反映出生物体本身的食物来源, 也能间接体现出其生活环境的差异乃至摄食习性的不同(Hobson *et al.*, 1992), 就如同天然的标签, 直接代表了该群体生活海域的生态环境(纪炜炜等, 2013)。本研究拟通过测定中国虾夷扇贝定居群体、底播增殖群体、人工选育群体及原产地日本群体的碳、氮稳定同位素值, 分析不同生活海域的

虾夷扇贝群体间的食性差异和环境条件差异, 以期阐明虾夷扇贝在中国北黄海定居的生态适应过程, 为提升中国虾夷扇贝养殖产业的经济效益和促进产业的可持续发展提供有益借鉴。

1 材料与方 法

1.1 样品采集及处理

虾夷扇贝样品分别取自中国北黄海海域的辽宁獐子岛、山东长岛、辽宁海洋岛等地的底播群体, 辽宁旅顺自然群体以及“獐子岛红”人工选育群体, 原产地日本青森县陆奥湾自然群体(表 1)。样本采集后, 冰冻保存、运输至实验室, -20°C 保存。每个取样地点随机选取 10 个虾夷扇贝样品进行解剖处理, 取闭壳肌及内脏团组织, 分别放入 5 ml EP 管中, -20°C 保存, 以备后续实验使用。

每个取样点取 20 mg 闭壳肌, 并将 10 份样品混合, 经蒸馏水清洗后, 60°C 烘干 48 h 脱水, 干燥样品用研钵充分研磨成粉状(可过 100 目筛), 于干燥器中常温保存待测。虾夷扇贝内脏团样品做相同处理。

1.2 碳、氮稳定同位素的测定

本研究采用相对测量法检测样品中的稳定同位素, 所测样品的同位素比值与国际标准做比较, 结果为样品的同位素比率, 定义为样品与标准物之间偏差的千分数(‰), 并以国际通用的 δ 值形式($\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$)表示(金鑫, 2011)¹⁾。样品的稳定性同位素分析采用 Isoprime-100 稳定同位素质谱仪进行测定, 待测样

表 1 虾夷扇贝样品的基本信息

Tab.1 Basic information of *P. yessoensis* samples

序号 Number	代码 Code	采样地点 Sampling place	采样时间 Sampling time	年龄 Age	样品类型 Sample type	样品数量(个) Sample size(ind)
1	CD1	长岛 Changdao	2015-08	4	底播增殖 Bottom sowing culture	10
2	CD2	长岛 Changdao	2015-08	3	底播增殖 Bottom sowing culture	10
3	HYD	海洋岛 Haiyangdao	2015-07	3	底播增殖 Bottom sowing culture	10
4	ZZD1	獐子岛 Zhangzidao	2015-07	5	底播增殖 Bottom sowing culture	10
5	ZZD2	獐子岛 Zhangzidao	2015-07	4	底播增殖 Bottom sowing culture	10
6	ZZD3	獐子岛 Zhangzidao	2015-07	2	底播增殖 Bottom sowing culture	10
7	ZZH	獐子岛 Zhangzidao	2015-07	3	人工选育 Artificial breeding	10
8	LS	旅顺 Lvshun	2015-07	2	自然定居 Natural colonized	10
9	JP	日本 Japan	2016-03	4	原产地 Origin	10

1) Jin X. Plankton food web analysis of the East China Sea and the Yellow Sea using analyses of fatty acids and stable isotopes. Master's Thesis of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2011 [金鑫. 黄东海浮游食物网的初步研究——基于脂肪酸标记法和碳氮稳定同位素比值法. 中国科学院研究生院(海洋研究所)硕士研究生学位论文, 2011]

品在仪器中经气化、纯化、电离等分析,每份样品均重复测定5次作为平行实验:

$$\delta X(\%) = [(R_{\text{样品}} - R_{\text{标准}}) / R_{\text{标准}}] \times 10^3$$

式中, X 为 ^{13}C 或 ^{15}N , $R_{\text{样品}}$ 为所测样品的 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 或 $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $R_{\text{标准}}$ 为标准物同位素比值。

1.3 数据分析与处理

对各个取样点虾夷扇贝闭壳肌及内脏团稳定同位素数据分别进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 采用 SNK (Student-Newman-Keuls) 检验, 判别各个群体间的关系, 并以碳、氮同位素比值为指标进行聚类分析, 判别各站位的相关关系, 以获得聚类分析的结果。所有数据分析均由 SPSS 17.0 软件完成, $P < 0.05$ 为差异显著。本研究中, 日本和中国虾夷扇贝生长海域环境因素差异情况参考已有文献报道(陈思行, 1988; 张雪, 2013¹⁾; 张绪东等, 2015), 本研究未测定其实际的环境因子。

2 结果与分析

2.1 不同取样部位的碳、氮稳定同位素含量

本研究对虾夷扇贝定居地及其原产地不同群体分别进行了碳、氮稳定同位素比值的测定, 结果发现(表 2 和表 3), 虾夷扇贝各群体的闭壳肌 $\delta^{13}\text{C}$ 值为 $-20.47\% \pm 0.66\%$, 内脏团的 $\delta^{13}\text{C}$ 值为 $-24.13\% \pm 2.41\%$; 闭壳肌的 $\delta^{15}\text{N}$ 值为 $8.52\% \pm 1.32\%$, 内脏团的 $\delta^{15}\text{N}$ 值为 $7.26\% \pm 0.49\%$ 。

2.2 群体间碳、氮稳定同位素差异

依据 HSD 检验法(忠实显著性差异)检验分析结果, 对虾夷扇贝 9 个地理群进行群组划分。结果显示, 依据内脏团 $\delta^{13}\text{C}$ 值, 9 个取样点可以明显的分为 5 个群组, 第 1 群组包括 HYD 群体、ZZD1 群体和 LS 群体, 该组的 $\delta^{13}\text{C}$ 值最低。第 2 群组的 2 个群体中, LS 群体为与第 1 群组所共有, ZZD2 群体为与第 3 群组所共有。第 3 群组包括 ZZD2 群体、ZZH 和 ZZD3 群体。CD1 和 CD2 群体单独划分为第 4 群组, 为中国群体中 $\delta^{13}\text{C}$ 值最高的群组。JP 群体单独成为第 5 群组, 其 $\delta^{13}\text{C}$ 值显著高于其余群组。依据内脏团 $\delta^{15}\text{N}$ 值可以将 9 个取样点划分为 6 个群组, CD1 群体单独为第 1 群组, 为所有群体中 $\delta^{15}\text{N}$ 值最小的群体, 其余包含 JP 群体在内的 8 个群体, 相互差异均较小,

虽然在 0.05 显著性水平下呈现为 5 个不同的群组, 但是各个群组相互间均有同质性的群体交叉于 2 个群组存在(表 2)。

根据闭壳肌碳稳定同位素划分, JP 群体独自为群组 1, 为所有群体内 $\delta^{13}\text{C}$ 值最小的群体, 中国 8 个群体间则呈现出较高的一致性, 仅 CD1 群体、ZZD1 群体分别与其余各群体间差异显著($P < 0.05$), 各自形成单独的群组, 其余的 6 个中国群体间差异不显著($P > 0.05$), 形成 1 个群组。闭壳肌氮稳定同位素的群体间差异相对较明显, 9 个群体在 0.05 的显著性水平下可划分为 6 个群组, 群组 1 仅有 JP 群体 1 个群体, 且其 $\delta^{15}\text{N}$ 值最低。CD1 和 CD2 2 个群体间没有明显差异, 为第 2 群组。ZZD3 和 LS 群体间没有明显差异, 为第 3 群组, HYD 群体单独为第 4 群组, ZZH 群体和 ZZD2 群体为第 5 群组, ZZD1 群体为第 6 群组, 且其 $\delta^{15}\text{N}$ 值最高(表 3)。

2.3 基于地理位置的群体间 ANOVA 分析

基于地理位置对 9 个群体进行单因素方差分析, 结果显示, 虾夷扇贝闭壳肌和内脏团碳、氮稳定性同位素比值的变化受到地理位置的影响较大(表 4 和表 5)。99.23% 的内脏团碳稳定同位素比值的差异可以由地理位置来解释, 地理位置因素的主效应显著($F = 579.068$, $P < 0.001$); 94.36% 的内脏团氮稳定同位素比值差异可以由地理位置因素解释, 地理位置因素的主效应显著($F = 75.218$, $P < 0.001$)。97.89% 的闭壳肌稳定同位素比值差异可以由地理位置因素解释, 地理位置的主效应显著($F = 259.914$, $P < 0.05$); 99.57% 的闭壳肌稳定同位素氮比值差异可以由地理位置因素解释, 地理位置的主效应显著($F = 1043.140$, $P < 0.001$)。说明虾夷扇贝样品测得的碳氮稳定同位素比值体现的差异性呈现明显的地理相关性, 各虾夷扇贝群体具有明显的地理群体差异。

2.4 虾夷扇贝的群体划分和地理判别

根据虾夷扇贝每个取样点所测得数据, 构建碳、氮稳定同位素比值的散点分布图(图 1 和图 2)。闭壳肌和内脏团碳、氮分析中, 日本群体均独自形成明显的分群, 说明日本群体和中国群体间的群体结构差别较大。综合 $\delta^{13}\text{C}$ 值和 $\delta^{15}\text{N}$ 值分析(表 2 和表 3), 日本群体和中国群体间的内脏团稳定性同位素的差异性在 $\delta^{13}\text{C}$ 值上表现较为明显, 而闭壳肌稳定同位素在 $\delta^{13}\text{C}$ 值和 $\delta^{15}\text{N}$ 值上与中国群体间差异均较为明显。

1) Zhang X. Study on phytoplankton community structure and the relationship with feeding habits of *Patinopecten yessoensis* in the waters adjacent to Zhangzidao Island. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2013 [张雪. 獐子岛邻近水域浮游植物群落结构及其与虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)食性关系的研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2013]

表 2 虾夷扇贝内脏团碳氮稳定同位素及 HSD 检测

Tab.2 Stable isotopes in the visceral mass of *P. yessoensis* and its HSD determination

内脏团碳稳定同位素 $\delta^{13}C$ of visceral mass						内脏团氮稳定同位素 $\delta^{15}N$ of visceral mass									
代码 Code	范围 Range	标准差 Standard deviation	平均值 Mean value					标准差 Standard deviation	平均值 Mean value						
			1	2	3	4	5		1	2	3	4	5	6	
HYD	-25.84~-25.56	0.12	-25.706	**					6.324	**					
ZZD1	-25.31~-24.73	0.24	-25.598	**				6.802	**						
LS	-24.92~-24.59	0.13	-25.450	**	**			6.984	**	**					
ZZD2	-25.96~-25.00	0.42	-25.016	**	**	**		7.158	**	**	**				
ZZH	-25.55~-25.25	0.12	-24.776	**	**	**		7.386	**	**	**	**			
ZZD3	-24.80~-24.47	0.12	-24.662	**	**	**		7.588	**	**	**	**	**		
CD2	-24.58~-23.72	0.34	-24.146	**	**	**		7.694	**	**	**	**	**	**	
CD1	-24.28~-23.80	0.2	-23.920	**	**	**		7.698	**	**	**	**	**	**	
JP	-17.99~-17.86	0.05	-17.910	**	**	**		7.736	**	**	**	**	**	**	
Significance			0.679	0.087	0.268	0.802	1.000		1.000	0.375	0.434	0.131	0.247	0.643	

注：同一列**标注为同一分组，下同

Note: The same column marked with ** indicated the same group, the same as below

表 3 虾夷扇贝闭壳肌碳氮稳定同位素及 HSD 检测

Tab.3 Stable isotopes in the adductor muscle of *P. yessoensis* and its HSD determination

闭壳肌碳稳定同位素 $\delta^{13}C$ of adductor muscle						闭壳肌氮稳定同位素 $\delta^{15}N$ of adductor muscle									
代码 Code	范围 Range	标准差 Standard deviation	平均值 Mean value				标准差 Standard deviation	平均值 Mean value							
			1	2	3	4		1	2	3	4	5	6		
JP	-22.26~-21.74	0.21	-21.922	**				5.398	**						
CD1	-21.28~-21.15	0.05	-21.226	**				7.980	**	**					
CD2	-20.32~-20.22	0.05	-20.270	**	**			8.158	**	**	**				
LS	-20.24~-20.13	0.04	-20.266	**	**	**		8.676	**	**	**	**			
ZZD2	-19.91~-19.87	0.02	-20.198	**	**	**		8.734	**	**	**	**	**		
HYD	-20.30~-20.09	0.08	-20.182	**	**	**		9.036	**	**	**	**	**	**	
ZZH	-20.32~-20.21	0.04	-20.168	**	**	**		9.300	**	**	**	**	**	**	
ZZD3	-20.27~-20.06	0.09	-20.142	**	**	**		9.478	**	**	**	**	**	**	
ZZD1	-20.27~-20.08	0.08	-19.886	**	**	**		9.908	**	**	**	**	**	**	**
Significance			1.000	1.000	0.254	1.000		1.000	0.083	0.983	1.000	0.083	1.000	0.83	1.000

表 4 虾夷扇贝内脏团碳稳定性同位素 ANOVA 分析

Tab.4 ANOVA analysis of stable isotopes in the visceral mass of *P. yessoensis*

Source	内脏团稳定性同位素碳 $\delta^{13}\text{C}$ of visceral mass					内脏团稳定性同位素氮 $\delta^{15}\text{N}$ of visceral mass				
	Type III sum of square	df	Mean square	<i>F</i>	Sig.	Type III sum of square	df	Mean square	<i>F</i>	Sig.
Corrected model	232.996 ^a	8	29.125	579.068	0	9.513 ^a	8	1.189	75.218	0
Intercept	26204.939	1	26204.939	521018.975	0	2374.021	1	2374.021	150169.978	0
Places	232.996	8	29.125	579.068	0	9.513	8	1.189	75.218	0
Error	1.811	36	0.050			0.569	36	0.016		
Total	26439.746	45				2384.103	45			
Corrected total	234.807	44				10.082	44			

a. adjusted $R^2=0.992$ a. adjusted $R^2=0.931$

表 5 虾夷扇贝闭壳肌碳稳定性同位素 ANOVA 分析

Tab.5 ANOVA analysis of stable isotopes in the adductor muscle of *P. yessoensis*

Source	闭壳肌碳稳定性同位素 $\delta^{13}\text{C}$ of adductor muscle					闭壳肌稳定性同位素氮 $\delta^{15}\text{N}$ of adductor muscle				
	Type III sum of square	df	Mean square	<i>F</i>	Sig.	Type III sum of square	df	Mean square	<i>F</i>	Sig.
Corrected model	17.291a	8	2.161	259.914	0	69.793a	8	8.724	1043.140	0
Intercept	18862.082	1	18862.082	2268288.860	0	3265.546	1	3265.546	390459.826	0
Places	17.291	8	2.161	259.914	0	69.793	8	8.724	1043.140	0
Error	0.299	36	0.008			0.301	36	0.008		
Total	18879.672	45				3335.640	45			
Corrected total	17.590	44				70.094	44			

a. adjusted $R^2=0.983$ a. adjusted $R^2=0.995$

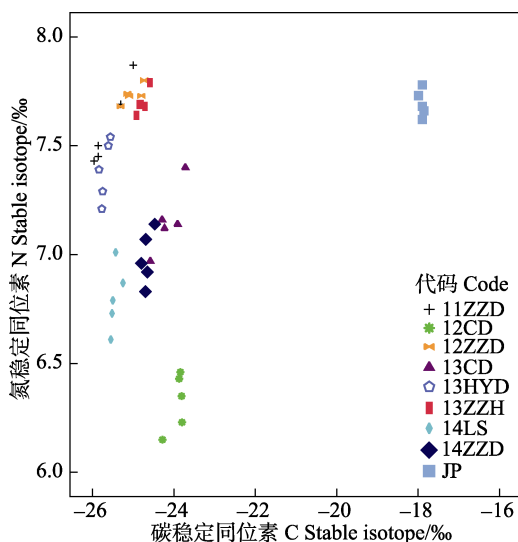


图 1 内脏团碳、氮稳定同位素散点图
Fig.1 $\delta^{13}\text{C}$ versus $\delta^{15}\text{N}$ of the visceral mass of *P. yessoensis* across all locations

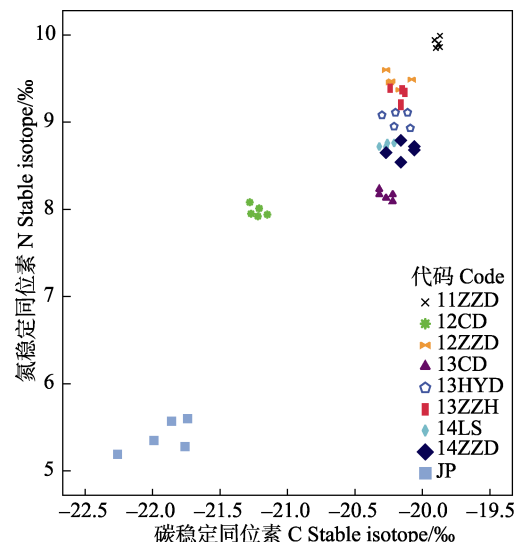


图 2 闭壳肌碳、氮稳定同位素散点图
Fig.2 $\delta^{13}\text{C}$ versus $\delta^{15}\text{N}$ of the adductor muscle of *P. yessoensis* across all locations

说明虾夷扇贝日本群体与中国群体在相应的生活海域其食性已经发生较大改变。对于中国各群体而言, 群体间的差异性较小, 呈现较高的混杂性, 旅顺自然群体相对于中国各养殖群体并未出现明显的差别, 且与獐子岛海域养殖群体相似度较高。

3 讨论

3.1 稳定同位素技术对群体划分和地理判别的有效性

本研究分析了中国定居的虾夷扇贝的 7 个人工增殖养殖群体及 1 个自然群体的群体稳定性同位素组

成, 并对比其原发群(日本自然群体)。经单因素方差分析、样本 SNK 检验, 结果显示, 在 0.05 的显著性水平下, 9 个虾夷扇贝群体间的差异性相对较为明显, 数值上呈现出一定的分组现象, 且组内呈现较高的同质性($P>0.05$)、组间则具有明显的差异性($P<0.05$)。基于地理位置对 9 个群体的碳、氮稳定同位素值分别进行单因素方差分析, 以确定群体间稳定性同位素值出现差异是否由地理位置不同所导致, 确定地理位置作为效应因素时的效应性。结果表明, 无论是闭壳肌还是内脏团的碳、氮稳定性同位素比值, 其地理位置因素的主效应性均表现为显著水平($P<0.05$), 最少 94.36% 的差异性可由地理位置不同来解释。Wang 等(2016)对小黄鱼(*Larimichthys polyactis*)群体的地理位置识别研究得出相同的结论; Killingley 等(1980)利用 $\delta^{18}\text{O}$ 研究加利福尼亚灰鲸(*Eschrichtius gibbosus*)在不同海域的生活情况, 也得出类似的结论。然而, 本研究的虾夷扇贝闭壳肌和内脏团稳定同位素比值却并非完全呈现一致的规律性。其主要原因可能是: 一方面稳定同位素测定过程中容易受取样时所摄入未来得及消化的食物影响, 从而对测定结果产生一定的影响; 另一方面, 内脏团组织更新时间短, 而闭壳肌组织更新时间长, 能够反应生物体较长时间甚至一生中食物中稳定同位素的同化率(颜云榕等, 2012)。

3.2 原发群与定居群碳、氮稳定同位素组成差异

针对虾夷扇贝闭壳肌和内脏团, 分别构建碳、氮稳定同位素分布散点图(图 1 和图 2), 从图中可以看出, 虾夷扇贝日本群体和中国群体间的稳定同位素碳、氮的差异显著, 可以明显区分二者。已有研究表明, 动物组织的同位素组成除受食物来源的影响外, 气候、生活环境和代谢类型等因素同样会对同位素营养富集度产生较大的影响, 从而导致不同地域来源的动物组织同位素组成存在差异, 这些差异直接代表群体间的生活环境的差异(Adams *et al.*, 2000; McCutchan *et al.*, 2003)。据此可推断, 虾夷扇贝在引入中国后其摄食习性已经发生了改变。姜涛等(2015)采用稳定同位素碳、氧分析长江口不同群体的刀鲚(*Coilia nasus*)时得出结论表明, $\delta^{13}\text{C}$ 值的不同反映不同群体的个体在生活史过程中饵料组成条件上有所不同, 分析认

为, 这可能是由于其生长海域水体饵料组成和丰度的差异以及地理位置的不同所导致的。

3.3 定居地各群体间碳、氮稳定同位素组成规律

在中国 8 个群体中, 仅长岛 2 个群体稳定性同位素比值与其他 6 个群体有较大差异, 其闭壳肌碳、氮稳定同位素比值均明显低于其余中国群体。这可能与实际地理位置分布中相应的水文环境的差异有着直接的关系, 长岛海域与獐子岛和旅顺相比, 纬度较低, 水温较高, 在面对高温的长期本地化过程中, 一定程度上会导致其摄食速率及代谢速率的降低。而獐子岛 3 个群体、海洋岛养殖群体、“獐子岛红”人工选育品种养殖群体以及旅顺自然群体在稳定性同位素比值上并未呈现明显的差别, 究其原因, 一方面, 獐子岛 3 个群体生长海域相近, 水文环境相同, 且“獐子岛红”人工选育品种的养殖区就位于獐子岛海域, 旅顺海域与獐子岛海域纬度相似、水温相近, 两处海域海流活动密切、海洋环境相似(李文姬等, 2008); 另一方面, 旅顺自然群体虽然在地理位置上与长岛、獐子岛、海洋岛海区有一定的差别, 但是旅顺海区原非虾夷扇贝产区、无虾夷扇贝苗种存在, 现有的虾夷扇贝自然群体本质上来源于附近的养殖海域(李文姬等, 2008)。

3.4 虾夷扇贝在迁移和定居过程的生态适应

虾夷扇贝从其原产地进入中国, 并逐渐演变成为定居种, 面对不同的生存环境, 在适者生存、优胜劣汰的过程中, 为了更好的在定居地实现定居过程, 其生理生化特征也相应发生了一系列的改变。据报道, 獐子岛海域 2011–2012 年浮游植物的浮游细胞数量平均值为 1.1×10^4 个/L, 其中, 硅藻(Bacillariophyta)和甲藻(Dinoflagellate)占浮游植物总数量的大多数(张雪, 2013)¹⁾, 而虾夷扇贝中国群体目前主要摄食硅藻(姜绪, 2013)²⁾, 所以虾夷扇贝定居群体可以较为容易的获得所需营养水平的饵料。研究表明, 虾夷扇贝定居群体内脏团碳稳定同位素低于其原发群, 而闭壳肌碳稳定同位素则呈现为定居群高于原发群的现象。究其原因, 可能是由于定居地环境温度相对高于原产地, 导致其摄食率、代谢水平下降, 而在适应性进化中, 其吸收率却出现了一定程度的上升, 以保证足够的营养来源。有研究认为, 温度变化会对虾夷扇

1) Zhang X. Study on phytoplankton community structure and the relationship with feeding habits of *Patinopecten yessoensis* in the waters adjacent to Zhangzidao Island. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2013 [张雪. 獐子岛邻近水域浮游植物群落结构及其与虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)食性关系的研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2013]

2) Jiang X. Study on the growth, food source, oxygen consumption and ammonia excretion of scallop *Patinopecten yessoensis* Jay. Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2013 [姜绪. 底播虾夷扇贝的生长、食物来源及呼吸代谢研究. 南京农业大学硕士研究生学位论文, 2013]

贝的耗氧率、氨氮排泄率及代谢水平产生影响, 当超过 23℃ 时虾夷扇贝基本处于不摄食状态(徐东等, 2010a; 郝振林等, 2014); 然而温度升高会促使其体内消化酶活性增强, 生理代谢处于较高水平, 相应地导致吸收率的增加(徐东等, 2010b)。另外, 个体较小的扇贝具有更强的高温耐受性(袁有宪等, 2000), 这也可能是虾夷扇贝中国定居群体在适应性进化过程中表现出个体小型化的原因。

本研究结果显示, 虾夷扇贝定居地群体与原发地群体相比, 其闭壳肌氮稳定同位素较高, 且均接近已有报道中不同营养级间的 $\delta^{15}\text{N}$ 富集度平均值(3.4‰)(宋固等, 2014), 表明作为定居种的虾夷扇贝在中国海域其营养生态位已经发生了较大的改变。究其原因, 一方面, 定居地初级生产力的营养组成、饵料组成与原发地不同, 导致其营养层次发生改变; 另一方面, 虾夷扇贝定居群体面对不同的生态环境, 其食性改变、生态效率较低, 也会导致其营养等级的变化。

参 考 文 献

- Adams TS, Sterner RW. The effect of dietary nitrogen content on trophic level ^{15}N enrichment. *Limnology and Oceanography*, 2000, 45(3): 601–607
- Benstead JP, March JG, Fry B, *et al.* Testing isosource: Stable isotope analysis of a tropical fishery with diverse organic matter sources. *Ecology*, 2006, 87(2): 326–333
- Cai DL, Li HY, Tang QS, *et al.* The continuous nutrition spectrum of ecosystem food web in the Yellow Sea and the East Sea. *Science in China Ser. C Life Sciences*, 2005, 35(2): 123–130 [蔡德陵, 李红燕, 唐启升, 等. 黄东海生态系统食物网连续营养谱的建立: 来自碳氮稳定同位素方法的结果. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2005, 35(2): 123–130]
- Cai DL, Zhang SF, Zhang J. Applications of stable carbon and nitrogen isotope methods in ecological studies. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 2002, 32(2): 287–295 [蔡德陵, 张淑芳, 张经. 稳定碳、氮同位素在生态系统研究中的应用. *青岛海洋大学学报*, 2002, 32(2): 287–295]
- Chang YQ, Chen XX, Ding J, *et al.* Genetic diversity in five scallop populations of the Japanese scallop (*Patinopecten yessoensis*). *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(3): 1145–1152 [常亚青, 陈晓霞, 丁君, 等. 虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*) 5个群体的遗传多样性. *生态学报*, 2007, 27(3): 1146–1152]
- Chen SX. The culture of scallop in Mutsu Bay. *China Fisheries*, 1988(5): 40 [陈思行. 日本陆奥湾的扇贝养殖. *中国水产*, 1988(5): 40]
- Deniro MJ, Epstein S. Mechanism of carbon isotope fractionation associated with lipid synthesis. *Science*, 1977, 197(4300): 261–263
- Guo XP, Li ZY, Jin XS, *et al.* Feeding habit study of anchovy (*Engraulis japonicus*) in the central and southern part of the Huanghai Sea with stable isotope techniques. *Acta Oceanologica Sinica*, 2007, 29(2): 98–104 [郭旭鹏, 李忠义, 金显仕, 等. 采用碳氮稳定同位素技术对黄海中部鲱鱼食性的研究. *海洋学报*, 2007, 29(2): 98–104]
- Hao ZL, Tang XJ, Ding J, *et al.* Survival rate, oxygen consumption rate and immune enzymatic activity of *Mizuhopecten yessoensis* at high temperature. *Chinese Journal of Ecology*, 2014, 33(6): 1580–1586 [郝振林, 唐雪娇, 丁君, 等. 不同高温水平对虾夷扇贝存活率、耗氧率和体腔液免疫酶活力的影响. *生态学杂志*, 2014, 33(6): 1580–1586]
- Hobson KA, Welch HE. Determination of trophic relationships within a high Arctic marine food web using $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ analysis. *Marine Ecology Progress Series*, 1992, 84(1): 9–18
- Ji WW, Jiang YZ, Ruan W, *et al.* Stable isotope analysis on the feeding character of representative fishes during spring in central and northern East China Sea and South Yellow Sea. *Marine Fisheries*, 2013, 35(4): 415–422 [纪炜炜, 姜亚洲, 阮雯, 等. 基于稳定同位素方法分析东海中北部及黄海南部春季主要鱼类的食性特征. *海洋渔业*, 2013, 35(4): 415–422]
- Jiang T, Liu HB, Yang J. Characteristics of C and O stable isotope in otolith of juvenile *Coilia nasus* from the Changjiang River Estuary. *Marine Sciences*, 2015, 39(6): 48–53 [姜涛, 刘洪波, 杨健. 长江口刀鲚幼鱼耳石碳、氧同位素特征初报. *海洋科学*, 2015, 39(6): 48–53]
- Killingley JS. Migrations of California gray whales tracked by oxygen-18 variations in their epizoic barnacles. *Science*, 1980, 207(4432): 759–760
- Li WJ, Teng WM, Wang XY, *et al.* The gonadal development and life cycle in Japanese scallop *Patinopecten yessoensis* in northern Yellow Sea. *Fisheries Science*, 2012, 31(12): 703–707 [李文姬, 滕炜鸣, 王笑月, 等. 黄海北部虾夷扇贝性腺发育及繁殖规律研究. *水产科学*, 2012, 31(12): 703–707]
- Li WJ, Xue ZF, Li HL, *et al.* Research on the source of yesso scallop *Patinopecten yessoensis* larvae along the coast of Bohai in Dalian. *Fisheries Science*, 2008, 27(11): 588–591 [李文姬, 薛真福, 李华琳, 等. 大连旅顺渤海侧沿海虾夷扇贝幼虫来源调查. *水产科学*, 2008, 27(11): 588–591]
- Li WJ, Xue ZF, Li HL, *et al.* Scallop (*Patinopecten yessoensis*) larva collection from sea. *Fisheries Science*, 2007, 26(5): 259–262 [李文姬, 薛真福, 李华琳, 等. 虾夷扇贝海区采苗技术初步研究. *水产科学*, 2007, 26(5): 259–262]
- Li ZY, Jin XS, Zhuang ZM, *et al.* Applications of stable isotope techniques in aquatic ecological studies. *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(11): 3052–3060 [李忠义, 金显仕, 庄志猛, 等. 稳定同位素技术在水域生态系统研究中的应用. *生态学报*, 2005, 25(11): 3052–3060]
- Liu YF. The culture of *Patinopecten yessoensis* in Japan. *Fisheries Science*, 1983, (1): 14–19 [刘永丰. 日本的虾夷扇贝养殖. *水产科学*, 1983(1): 14–19]
- McCutchan JH, Lewis WM, Kendall C, *et al.* Variation in trophic shift for stable isotope ratios of carbon, nitrogen, and sulfur. *Oikos*, 2003, 102(2): 378–390
- Peterson BJ, Fry B. Stable isotopes in ecosystem studies. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1987(18): 293–320
- Song G, Hu MH, Liu QG. Study on the feeding habits and trophic levels of the gillnet catches of Qiandao Lake in autumn by stable isotope technology. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2014, 23(1): 117–122 [宋固, 胡梦红, 刘其根. 运用稳定同位素技术研究千岛湖秋季刺网渔获物的食性和营养级. *上海海洋大学学报*, 2014, 23(1): 117–122]
- Wang QC, Liu YF. The artificial seed-rearing of *Patinopecten yessoensis*. *Fisheries Science*, 1982(2): 1–9 [王庆成, 刘永峰. 虾夷扇贝人工育苗的试验. *水产科学*, 1982(2): 1–9]
- Wang Y, Huang J, Tang X, *et al.* Stable isotopic composition of otoliths in identification of stock structure of small yellow croaker (*Larimichthys polyactis*) in China. *Acta Oceanologica Sinica*, 2016, 35(6): 29–33

- Xu D, Zhang JH, Wang WQ, *et al.* Effects of temperature elevation on oxygen consumption rate and ammonia excretion rate of *Patinopecten yessoensis*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010a, 17(5): 1101–1106 [徐东, 张继红, 王文琪, 等. 温度变化对虾夷扇贝耗氧率和排氨率的影响. *中国水产科学*, 2010a, 17(5): 1101–1106]
- Xu D, Zhang JH, Wang WQ, *et al.* Research on feeding physiology of scallop *Patinopecten yessoensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2010b, 31(4): 85–91 [徐东, 张继红, 王文琪, 等. 虾夷扇贝的摄食生理研究. *渔业科学进展*, 2010b, 31(4): 85–91]
- Yan YR, Zhang WK, Lu HS, *et al.* Using stable isotopes to analyze feeding habits and trophic position of Hairtail (*Trichiurus lepturus*) from the Beibu Gulf, South China Sea. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012, 43(1): 192–200 [颜云榕, 张武科, 卢伙胜, 等. 应用碳、氮稳定同位素研究北部湾带鱼(*Trichiurus lepturus*)食性及营养级. *海洋与湖沼*, 2012, 43(1): 192–200]
- Yuan YX, Qu KM, Chen JF, *et al.* Adaptability of *Chlymys farreri* to environment—Effects of temperature on survival, respiration, ingestion and digestion. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2000, 7(3): 24–27 [袁有宪, 曲克明, 陈聚法, 等. 栉孔扇贝对环境变化适应性研究——温度对存活、呼吸、摄食及消化的影响. *中国水产科学*, 2000, 7(3): 24–27]
- Zhang FS, He YC, Ma JH, *et al.* The introduction of the Japanese scallop, *Patinopecten yessoensis* (Jay), into China, its spat-rearing and experimental cultivation. *Marine Sciences*, 1984, 8(5): 38–45 [张福绥, 何义朝, 马江虎, 等. 虾夷扇贝的引种、育苗及试养. *海洋科学*, 1984, 8(5): 38–45]
- Zhang XD, Zhang WL, Li YB. Characteristics of the sea temperature in the North Yellow Sea. *Marine Forecasts*, 2015, 32(5): 89–97 [张绪东, 张菀伦, 李云波. 北黄海海温分布变化的数值模拟分析. *海洋预报*, 2015, 32(5): 89–97]

(编辑 马瑾艳)

Ecological Adaptability of Different Geographical Populations of *Patinopecten yessoensis* in the Northern Yellow Sea

YANG Yu^{1,2,3}, NI Shousheng^{2,3,4}, LIU Yi², LIU Shufang^{2,3①}, ZHUANG Zhimeng²

(1. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071; 4. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract *Patinopecten yessoensis* is a cold-water bivalve commonly found in northwestern Pacific area including northern Japan, the Far East of Russian and the northern Korean Peninsula. It was introduced to China from the Mutsu Bay (Aomori Prefecture, Japan) and was aqua-farmed in the coast of the Bohai Sea and the north of the Yellow Sea in 1982. In this study, we applied stable isotope tracer technique on samples from different geographical populations of *P. yessoensis* to characterize their ecological adaptability in the northern Yellow Sea of China. Samples were collected from the bottom sowing population from Shandong Changdao, Liaoning Haiyangdao and Zhangzidao, the artificial population of Zhangzidao-Red, the natural colonized population in Liaoning Lvshun and the original natural population in the Aomori Mutsu Bay of Japan. The results showed that the $\delta^{13}\text{C}$ value of the adductor muscle and the visceral mass of *P. yessoensis* were $-20.47\text{‰}\pm 0.66\text{‰}$ and $-24.13\text{‰}\pm 2.41\text{‰}$ respectively; the $\delta^{15}\text{N}$ values of the two tissues were $8.52\text{‰}\pm 1.32\text{‰}$ and $7.26\text{‰}\pm 0.49\text{‰}$ respectively. Analysis of variance (ANOVA) indicated significant variances in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of the visceral mass and the adductor muscle among different populations; the scatter plot of $1\delta^{13}\text{C}$ versus $\delta^{15}\text{N}$ for the two tissues across all samples showed apparent difference between the Chinese and Japanese populations. Among the 8 populations in China, the value of $\delta^{13}\text{C}$ versus $\delta^{15}\text{N}$ of the Changdao population was lower than those of other groups. These results indicated that significant divergences emerged between the Chinese and Japanese populations of *P. yessoensis*, as well as between different populations in China. This phenomenon could be explained by the ecological adaptability developed during the settlement in different environments. Our study helped understand the ecological adaptation process of the scallop *P. yessoensis* in the Yellow Sea, and provided useful information for promoting the economic benefits and sustainable development of the scallop culture industry in China.

Key words *Patinopecten yessoensis*; Geographical population; Stable isotope; Ecological adaptability

① Corresponding author: LIU Shufang, E-mail: liusf@ysfri.ac.cn

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)家系生长 性状遗传效应分析*



李祥孔^{1,2} 田永胜^{2,4①} 李洪^{2,3} 宋莉妮^{2,3} 高进^{2,5}
段会敏^{2,3} 戴欢^{1,2} 陈张帆^{2,4} 陈松林^{2,4} 王秀利¹

(1. 大连海洋大学水产与生命学院 大连 116023; 2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院
黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 4. 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; 5. 南京农业大学 无锡渔业学院 无锡 214081)

摘要 牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)优良养殖新品种培育是防止其品种退化和提高经济效益的主要途径,数量性状遗传评估是牙鲆育种的主要方法之一。本研究利用已建立的牙鲆核心群体建立 42 个牙鲆家系,分别测量 140、170、200、380 日龄各家系生长相关性状(体重、全长和体宽),通过 MINQUE、REML 和 BLUP 方法对其进行数量遗传分析。结果显示,不同时期生长性状的变异系数为 10.56%–38.62%,其中,体重的变异系数最大,全长和体宽的变异系数都较小,不同性状的变异系数均随着日龄的增加而减小。3 个性状的加性方差分量比率为(0.13±0.01)–(0.29±0.06),随机方差分量比率为(0.71±0.06)–(0.87±0.01),狭义遗传力为(0.13±0.01)–(0.29±0.06),广义遗传力为(0.15±0.01)–(0.54±0.06),以上遗传参数均达极显著性水平($P<0.01$)。综合比较 3 个性状在不同时期的遗传效应,结果发现, F0990、F1005、KS 和 F0719 这 4 个群体亲本都为极显著正向效应, F0751、F0768、F0780、F09121、F0927 和 RS 这 6 个群体亲本都为极显著负向效应($P<0.01$),其余的亲本均为一般效应。表型相关系数在 0.82–0.96 之间,遗传相关系数在 0.72–0.97 之间。利用 BLUP 方法对 380 日龄测量的数据进行育种值估算,结果发现,亲鱼体重育种值为 14.63–100.05,其中,体重育种值最高的亲鱼个体为 F1005-8、F09119-11、F09125-4、F0915-57、F09104-12、F1264、F0908-38、F0927-20、F1005-53、F0990-6、F09125-7、F0751-14 和 F1005-42。家系平均体重育种值为 20.87–35.60,其中,平均体重育种值最高的家系为 F1416、F1428、F1442、F1418、F1427、F1408、F1402、F1412 和 F1446。以体重育种值为依据选留的家系育种值与根据表型值选留的家系育种值比较可得:体重育种值选择比其表型值的选择效率高 81.91%,育种值选育更好。本研究为牙鲆优良家系的建立及新品种的培育筛选出了性状优良的家系,同时为牙鲆育种计划的制定提供了重要理论依据。

关键词 牙鲆; 家系; 遗传力; 生长性状; 育种值

中图分类号 S961.2 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2017)03-0039-12

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)是中国、日本和韩国等国家的重要海水经济养殖鱼类之一,为冷温水性的底栖鱼类。世界牙鲆产量达到 4.5 万 t,在渔业生产

中具有重要的地位(杨正勇等, 2009; 田永胜等, 2015)。然而,随着牙鲆养殖业的迅猛发展,其种质资源的保护被忽视,近亲交配情况日益严重,导致牙

* “863”高技术研究发展计划项目(2012AA10A408)资助[This work was supported by the National High Technology Development Program of China (863)]. 李祥孔, E-mail: 13937313571@163.com

① 通讯作者: 田永胜, 研究员, E-mail: tianys@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-03-02, 收修改稿日期: 2016-03-29

鲟养殖群体的遗传多样性降低、种质退化严重,主要表现为生长速度缓慢、亲鱼繁殖力下降、养殖个体抗病力降低等(徐田军等, 2010)。因此,培育生长快、抗逆力强的牙鲟养殖新品种成为产业发展的迫切需求。

选择育种已经在众多鱼类育种中应用并取得了显著的育种效果,如荷包红鲤(*Cyprinus carpio* L.)、兴国红鲤(*Cyprinus carpio* var. *singunensis*)、选育系 F₄团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)、“浦江1号”、大黄鱼(*Pseudosciaenacrocea*)、大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)等鱼类(楼允东, 1999; 赵广泰等, 2010; 马爱军等, 2012)。选择育种也是牙鲟最主要的育种手段,“鲟优1号”就是利用选择育种、家系间杂交等技术,培育出的生长快、成活率高的牙鲟新品种,产量增加20%–30%(刘峰等, 2013)。除了传统的育种方法,目前国内外已有使用数量遗传学、分子标记等现代生物学育种方法对牙鲟的生长、抗病、抗逆等一系列性状进行研究,并取得了一定进展,如关于牙鲟耐盐性(Shimada *et al*, 2007),饥饿对牙鲟形态特征的影响(Park *et al*, 2007),3个牙鲟群体 ISSR 遗传多样性分析(Liu *et al*, 2006),对牙鲟体重和体长的遗传和表型参数估计(Tian *et al*, 2011),牙鲟不同家系生长性能比较及优良亲本选择(田永胜等, 2009),牙鲟抗病群体和家系的建立及其生长和抗病性能初步测定(陈松林等, 2008)等。

数量遗传学是将数学与统计的方法应用到生物群体数量性状的遗传规律分析过程中(盛志廉等, 1999),通过人工定向选择的方式提高群体中目标基因的频率,从而大幅度提高亲体的育种性能。数量遗传学是育种的一个重要手段,通过数量遗传分析,估算遗传力、遗传相关、育种值等参数,这些参数不仅能够指导选择育种工作,也是估计其他参数的重要前提。而遗传参数估计的准确程度会直接影响选择育种的进展,准确合理的遗传参数是制定育种计划的理论基础和前提(李健等, 2013)。刘峰等(2013)对450日龄的“鲟优1号”生长和育种性能分析,田永胜等(2015)对196日龄的牙鲟 F₃代遗传参数评估等,都只是选取了1个时间点,且时间点不同,尚未明确进行牙鲟遗传分析的最佳时间点。本研究利用本实验室2014年建立的牙鲟家系,通过对4个不同时期的生长性状进行遗传分析,以期探索牙鲟发育过程中的遗传变化规律,为牙鲟育种工作提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 家系建立

实验使用牙鲟抗鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)感染

群体(RS)、韩国牙鲟群体(KS)、F₁代家系(田永胜等, 2009; 陈松林等, 2008)、F₂代家系和 F₃代家系群体(田永胜等, 2015)。F₁代家系中选择生长快、抗逆性强的优良家系 F0719、F0751、F0768、F0780; F₂代家系中选择生长快、成活率高的优良家系 F0908、F09104、F09119、F09121、F09125、F0915、F0917、F0927、F0990、F1005和 F1010; F₃代家系中选择生长快、遗传力高的优良家系 F1264、F1206、F1226和 F1211。2014年4月20日在黄海水产有限公司,通过人工挤压鱼体腹部法分别采集未受精的卵和精液,每个家系采集成熟雌鱼未受精的卵100 ml和对应雄鱼精液1 ml,干法受精,采用不完全多系交配方式建立家系42个。按照受精先后的顺序依次编号,如 F1401、F1402、F1403等。

1.2 家系培育

将受精卵置于50 cm×50 cm×100 cm的孵化网箱中,在14–17℃的水中孵化约24 h,采集上浮卵,转移至容积为3 m³的玻璃缸中进行人工孵化,每缸对应一个家系,初始放卵量为20 ml。孵化后,随着鱼苗成长,随时做好苗种标准化工作,鱼苗达5 cm时调整至2000尾,达10 cm时调整至1000尾,尽量保证每个缸的家系鱼量保持一致(田永胜等, 2015)。鱼苗全部生长到约15 cm时,进行荧光标记,每个家系随机标记200尾鱼,平均放入容积为30 m³的5个水池中培育。

1.3 家系生长性状数据测定及采集

在鱼苗生长到140、170、200日龄时,分别从每个家系中随机采样50尾个体,准确测量生长相关性状,包括全长、体宽和体重。前3次数据采集时,牙鲟的每个家系单独喂养,200日龄时,测量后进行荧光标记。标记后,混池喂养,生长到380日龄时,对所有鱼苗准确测量生长相关性状,同时记录所在的养殖池编号。对数据进行回归分析,通过线性拟合和残差图剔除个别异常数据。

1.4 遗传参数估计方法

使用基因型与环境互作的加性遗传模型(Zhu, 1995; Atchley *et al*, 1997)对牙鲟数量性状进行分析,表型值的剖分如下式:

$$Y = \mu + E + G + GE + e$$

式中, Y 为表现型观测值, μ 为总的群体均值, E 为环境效应, G 为基因的遗传效应值, GE 为基因与环境的互作效应值, e 为机误。使用最小范数(最小欧几里得范数)二次无偏估计法(MINQUE)估计各项方差组分(Rao, 1971)。

利用约束极大似然法(Restricted maximum

likelihood, REML) 和 BLUP (Best linear unbiased prediction)估计遗传参数, 模型等式为:

$$Y_i = u + a_i + t_k + b_1 x_i + e_i$$

式中, Y_i 为第 i 个个体表现型观测值, u 表示总体均值, a_i 为第 i 个个体育种值, t_k 为第 k 个水泥池效应(5 个水泥池), x_i 为上一次测量时的平均值, b_1 为回归系数, e_i 为随机残差效应。矩阵形式表示为:

$$y = Xb + Zu + e$$

式中, y 为表型值向量; b 为固定效应向量, 包含群体均值; u 为随机效应向量, 包含每个个体加性效应和 42 个家系共同环境效应; e 为随机残差向量, X, Z 分别为对应于固定效应向量 b 和随机效应向量 u 的关联矩阵。关联矩阵中包括没有表型记录的父母和所有表型记录的后代个体。

2 结果与分析

2.1 描述性统计

42 个不同日龄的牙鲈家系的生长性状数据描述性统计结果见表 1。变异系数为 10.56%–38.62%, 其中, 体重的变异系数最大, 全长和体宽的较小。不同性状的变异系数随着日龄的增加而减小。结果显示, 140 日龄的选育效果最好。

2.2 生长性状的方差分量和遗传力

对牙鲈家系不同时期生长性状的方差分量、方差分量比率和遗传力估计结果见表 2。结果显示, 体重、全长和体宽的加性方差分量、方差分量比率均达到极显著水平($P < 0.01$)。

4 个时期牙鲈体重、全长和体宽 3 个性状的加性方差分量比率在(0.13±0.01)–(0.29±0.06)之间, 随机方差分量比率在(0.71±0.06)–(0.87±0.01)之间, 狭义遗传

力在(0.13±0.01)–(0.29±0.06)之间, 3 个性状都显示低遗传力, 广义遗传力在(0.15±0.01)–(0.54±0.06)之间, 均达到极显著水平($P < 0.01$)。

2.3 亲本加性效应

表 3–表 5 分别列出了 18 个牙鲈亲本群体体重、全长和体宽 3 个生长性状不同时期的加性效应估计值。体重加性效应在(−33.88±2.55)–(28.27±2.13)之间, >0 为正向效应, <0 为负向效应, 结合 4 次数据估算结果发现, F0719、F0908、F0915、F0917、F0990、F1005 和 KS 这 7 个群体亲本均为极显著正向效应(4 个时期最少有 3 个时期为>0), RS、F0751、F0768、F0780、F09121 和 F0927 这 6 个群体亲本均为极显著负向效应(4 个时期最少有 3 个时期<0), 其余均为一般效应。全长加性效应在(−1.78±0.26)–(1.14±0.22)之间, 结合 4 次结果发现, F0915、KS、F1005、F09119、F0908、F0719 和 F0990 这 7 个群体亲本均为极显著正向效应(4 个时期最少有 3 个时期>0), RS、F09121、F0751、F0768、F0780 和 F0927 这 6 个群体亲本均为极显著负向效应(4 个时期最少有 3 个时期<0), 其余均为一般效应。体宽加性效应在(−0.67±0.03)–(0.73±0.14)之间, 结合 4 次结果发现, F0990、F1005、F0917、KS 和 F0719 这 5 个群体亲本均为极显著正向效应(4 个时期最少有 3 个时期>0), F0751、F0768、RS、F09121、F09119、F0927、F0780、F09125 和 F1264 这 9 个群体亲本均为极显著负向效应(4 个时期最少有 3 个时期<0), 其余均为一般效应。综合不同时期 3 个性状的结果发现, F0990、F1005、KS 和 F0719 这 4 个群体亲本均为极显著正向效应, F0751、F0768、F0780、F09121、F0927 和 RS 这 6 个群体亲本均为极显著负向效应。

表 1 不同日龄牙鲈生长性状数据的描述性统计
Tab.1 Descriptive statistics of growth traits data of *P. olivaceus* at different day age

性状 Traits	日龄 Day age (d)	数量 Number	极小值 Minimum	极大值 Maximum	均值 Mean±SD	变异系数 CV
体重 Body weight (g)	140	2197	3.7	59.6	21.04±8.12	0.38
	170	2183	7.4	115.2	39.81±14.30	0.35
	200	2037	12.0	161.7	65.52±21.91	0.33
	380	5324	43.0	527.8	231.76±76.08	0.33
全长 Total length (cm)	140	2197	6.2	17.7	12.84±1.60	0.12
	170	2183	10.0	22.4	16.35±1.82	0.11
	200	2038	11.8	24.8	18.65±1.96	0.11
	380	5324	16.2	38.3	28.47±3.09	0.11
体宽 Body width (cm)	140	2197	2.3	6.5	4.16±0.58	0.14
	170	2183	3.5	9.2	5.82±0.85	0.15
	200	2038	3.2	9.0	6.48±0.75	0.12
	380	5324	5.5	17.3	10.34±1.41	0.14

表 2 不同日龄牙鲆生长性状的遗传分析估计(平均值±标准误)

Tab.2 Estimation of the genetic analysis of growth characteristics of *P. olivaceus* at different day age (Mean±SE)

性状 Traits	日龄 Day Age (d)	方差分量 Variance components	估计值 Estimate value	方差分量比率 Variance component ratio	狭义遗传力 Narrow heritability	广义遗传力 Generalized heritability
体重 Body weight (g)	140	加性 Additivity	11.75±0.83**	0.21±0.01**	0.21±0.01**	0.36±0.01**
		机误 Random error	43.72±1.37**	0.79±0.01**		
		表型 Phenotype	55.47±1.78**			
	170	加性 Additivity	27.33±2.47**	0.15±0.01**	0.15±0.01**	0.17±0.01**
		机误 Random error	160.94±6.21**	0.85±0.01**		
		表型 Phenotype	188.27±6.43**			
	200	加性 Additivity	86.09±8.013**	0.19±0.02**	0.19±0.02**	0.23±0.02**
		机误 Random error	367.82±12.20**	0.81±0.02**		
		表型 Phenotype	453.90±17.20**			
380	加性 Additivity	1489.15±372.91**	0.29±0.06**	0.29±0.06**	0.54±0.06**	
	机误 Random error	3520.81±205.21**	0.71±0.06**			
	表型 Phenotype	5009.96±465.89**				
全长 Total length (cm)	140	加性 Additivity	0.43±0.03**	0.19±0.02**	0.19±0.02**	0.30±0.02**
		机误 Random error	1.89±0.07**	0.81±0.02**		
		表型 Phenotype	2.32±0.08**			
	170	加性 Additivity	0.44±0.04**	0.14±0.01**	0.14±0.01**	0.15±0.01**
		机误 Random error	2.79±0.12**	0.86±0.01**		
		表型 Phenotype	3.23±0.12**			
	200	加性 Additivity	0.67±0.07**	0.18±0.02**	0.18±0.02**	0.20±0.02**
		机误 Random error	3.13±0.09**	0.82±0.02**		
		表型 Phenotype	3.80±0.12**			
380	加性 Additivity	2.13±0.54**	0.25±0.06**	0.25±0.06**	0.38±0.06**	
	机误 Random error	6.25±0.31**	0.75±0.06**			
	表型 Phenotype	8.38±0.68**				
体宽 Body width (cm)	140	加性 Additivity	0.05±0.00**	0.19±0.01**	0.19±0.01**	0.39±0.01**
		机误 Random error	0.24±0.01**	0.81±0.01**		
		表型 Phenotype	0.29±0.01**			
	170	加性 Additivity	0.13±0.01**	0.19±0.01**	0.19±0.01**	0.20±0.01**
		机误 Random error	0.55±0.03**	0.81±0.01**		
		表型 Phenotype	0.68±0.04**			
	200	加性 Additivity	0.07±0.01**	0.13±0.01**	0.13±0.01**	0.14±0.01**
		机误 Random error	0.48±0.02**	0.87±0.01**		
		表型 Phenotype	0.55±0.02**			
380	加性 Additivity	0.62±0.15**	0.27±0.07**	0.27±0.07**	0.44±0.07**	
	机误 Random error	1.13±0.08**	0.73±0.07**			
	表型 Phenotype	1.75±0.19**				

表示差异极显著($P<0.01$); *表示差异显著($P<0.05$)。下同indicated highly significant differences ($P<0.01$); * indicated significant differences ($P<0.05$). The same as below

表3 不同日龄牙鲆体重加性效应预测(平均值±标准误)
Tab.3 Additive effect of prediction on body weight of *P. olivaceus* at different day age (Mean±SE)

亲本 Parent	背景 Background	140 d	170 d	200 d	380 d
F1005	F ₂ 代	1.14±0.21**	3.29±0.64**	5.30±0.76**	3.26±0.25**
F0917	F ₂ 代	4.32±0.30**	-0.30±1.34	15.32±1.15**	12.42±0.94**
F0915	F ₂ 代	1.00±0.36**	-3.14±0.74**	4.42±0.82**	5.15±0.39**
F09121	F ₂ 代	-2.78±0.31**	0.68±0.94	-2.92±0.84**	-33.88±2.55**
F09119	F ₂ 代	-0.70±0.29*	2.55±0.51**	-3.21±1.04**	1.47±0.11**
F09104	F ₂ 代	1.37±0.35**	-3.42±0.48**	4.74±0.96**	-2.99±0.23**
F0780	F ₁ 代	-3.12±0.56**	-3.32±0.39**	-2.55±1.40*	-5.90±0.45**
F0768	F ₁ 代	-1.88±0.42**	3.51±0.46**	-3.40±1.27*	-28.05±2.11**
F0751	F ₁ 代	-2.18±0.5**	6.09±0.64**	-10.9±1.36**	-30.03±2.26**
F0719	F ₁ 代	3.43±0.36**	4.85±0.68**	11.44±1.01**	23.48±1.77**
F0908	F ₂ 代	2.36±0.53**	-5.36±0.55**	2.20±1.21*	28.27±2.13**
F09125	F ₂ 代	-2.10±0.42**	-0.01±0.89	-7.87±1.12**	7.11±0.53**
F0990	F ₂ 代	4.61±0.5**	-7.83±0.47**	9.86±1.29**	19.62±1.48**
F0927	F ₂ 代	-5.47±0.37**	-1.35±0.94	-10.34±1.04**	-6.45±0.49**
F1264	F ₃ 代	-2.37±0.45**	8.74±1.44**	-6.15±1.29**	15.80±1.19**
RS	抗鳃弧菌感染群体 Population against <i>V. anguillarum</i> infection	-5.68±1.01**	-5.36±0.69**	-20.87±2.55**	-14.85±1.12**
KS	韩国群体 South Korea population	5.95±1.09**	8.68±1.94**	10.34±2.78**	13.02±0.98**
F1010	F ₂ 代	2.11±0.78**	-8.30±1.68**	4.57±1.93*	-7.44±0.56**

表4 不同日龄牙鲆全长加性效应预测(平均值±标准误)
Tab.4 Additive effect of prediction on total length of *P. olivaceus* at different day age (Mean±SE)

亲本 Parent	背景 Background	140 d	170 d	200 d	380 d
F1005	F ₂ 代	0.45±0.04**	0.26±0.09**	0.61±0.07**	0.32±0.02**
F0917	F ₂ 代	0.86±0.06**	-0.20±0.16	1.11±0.09**	0.41±0.03**
F0915	F ₂ 代	0.19±0.07*	-0.23±0.11*	0.43±0.07**	0.08±0.01**
F09121	F ₂ 代	-0.37±0.07**	-0.17±0.13	-0.24±0.08**	-1.35±0.09**
F09119	F ₂ 代	0.29±0.06**	0.28±0.08**	0.03±0.09	0.52±0.04**
F09104	F ₂ 代	0.26±0.07**	-0.05±0.08	0.27±0.09**	-0.01±0.00**
F0780	F ₁ 代	-0.49±0.13**	-0.46±0.06**	-0.24±0.14*	-0.42±0.03**
F0768	F ₁ 代	-0.31±0.09**	0.41±0.06**	-0.19±0.12	-0.73±0.05**
F0751	F ₁ 代	-0.32±0.11**	0.90±0.08**	-1.02±0.14**	-1.05±0.07**
F0719	F ₁ 代	0.48±0.08**	0.77±0.10**	0.64±0.09**	0.86±0.06**
F0908	F ₂ 代	0.18±0.11	-0.75±0.09**	0.24±0.11*	0.85±0.06**
F09125	F ₂ 代	-0.41±0.11**	0.29±0.05**	-0.85±0.13**	0.23±0.02**
F0990	F ₂ 代	0.88±0.10**	-1.00±0.08**	0.90±0.12**	0.87±0.06**
F0927	F ₂ 代	-1.05±0.08**	-0.28±0.12*	-0.87±0.10**	-0.10±0.01**
F1264	F ₃ 代	-0.83±0.11**	0.88±0.19**	-0.87±0.15**	0.41±0.03**
RS	抗鳃弧菌感染群体 Population against <i>V. anguillarum</i> infection	-1.21±0.23**	-0.81±0.12**	-1.78±0.26**	-1.00±0.07**
KS	韩国群体 South Korea population	0.99±0.19**	1.14±0.22**	0.95±0.23**	0.31±0.02**
F1010	F ₂ 代	0.41±0.16**	-0.98±0.25**	0.87±0.18**	-0.20±0.01**

表5 不同日龄牙鲆体宽加性效应预测(平均值±标准误)
Tab.5 Additive effect of prediction on body width of *P. olivaceus* at different day age (Mean±SE)

亲本 Parent	背景 Background	140 d	170 d	200 d	380 d
F1005	F ₂ 代	0.06±0.02**	0.38±0.04**	0.10±0.03**	-0.03±0.01**
F0917	F ₂ 代	0.28±0.02**	0.31±0.07**	0.34±0.04**	0.14±0.01**
F0915	F ₂ 代	-0.04±0.02*	-0.28±0.04**	0.04±0.03	0.04±0.00**
F09121	F ₂ 代	-0.10±0.02**	-0.24±0.04**	-0.04±0.03	-0.52±0.04**
F09119	F ₂ 代	-0.08±0.02**	0.15±0.03**	-0.26±0.04**	-0.10±0.01**
F09104	F ₂ 代	0.10±0.02**	-0.15±0.03**	0.18±0.03**	-0.09±0.01**
F0780	F ₁ 代	-0.10±0.04*	-0.30±0.02**	-0.03±0.05	-0.03±0.00**
F0768	F ₁ 代	-0.15±0.03**	-0.07±0.02**	-0.18±0.05**	-0.53±0.04**
F0751	F ₁ 代	-0.21±0.04**	0.53±0.04**	-0.34±0.05**	-0.55±0.04**
F0719	F ₁ 代	0.28±0.03**	0.52±0.04**	0.41±0.04**	0.56±0.04**
F0908	F ₂ 代	0.18±0.03**	-0.18±0.04**	0.20±0.04**	0.56±0.04**
F09125	F ₂ 代	-0.01±0.03	-0.07±0.02**	-0.17±0.05**	0.28±0.02**
F0990	F ₂ 代	0.33±0.03**	-0.67±0.03**	0.26±0.05**	0.41±0.03**
F0927	F ₂ 代	-0.39±0.03**	-0.37±0.05**	-0.30±0.04**	-0.08±0.01**
F1264	F ₃ 代	-0.25±0.04**	-0.05±0.06	-0.16±0.05**	0.32±0.02**
RS	抗鳃弧菌感染群体 Population against <i>V. anguillarum</i> infection	-0.40±0.08**	-0.15±0.05**	-0.54±0.11**	-0.52±0.04**
KS	韩国群体 South Korea population	0.32±0.06**	0.73±0.14**	0.22±0.09**	0.26±0.02**
F1010	F ₂ 代	0.17±0.05**	-0.10±0.11	0.28±0.06**	-0.11±0.01**

2.4 遗传相关和表型相关

不同时期牙鲆各性状之间的表型相关和遗传相关系数见表6。不同时期牙鲆体重、全长和体宽3个生长性状之间具有很高的表型和遗传相关,其中,表型相关系数在0.82-0.96之间,遗传相关在0.72-0.97之间。

2.5 育种值

通过BLUP分析方法对所有动物的育种值进行预测。雌雄亲本的育种值见表7和表8,雌性亲鱼体重的育种值为(-73.65±20.86)- (100.05±21.33),全长的

育种值为(-3.01±0.70)- (4.31±0.73),亲本体宽的育种值为(-1.51±0.39)- (1.59±0.39);雄性亲鱼体重的育种值为(-50.26±14.66)- (72.06±18.02),全长的育种值为(-2.17±0.58)- (2.89±0.71),亲本体宽的育种值为(-0.98±0.30)- (1.42±0.38)。其中,体重的育种值明显较大,可以做主要参考性状。3个性状综合比较发现,F1005-8、F09119-11、F09125-4、F0915-57、F09104-12、F1264、F0908-38、F0927-20、F1005-53、F0990-6、F09125-7、F0751-14和F1005-42这13尾亲鱼育种值最高,因此,可以将这13尾亲鱼保留,继续作为亲鱼。

表6 不同日龄牙鲆各性状之间的表型相关和遗传相关系数
Tab.6 Phenotypic and genetic correlation coefficient between the traits of *P. olivaceus* at different day age

性状 Traits	140 d		170 d		200 d		380 d	
	PC	GC	PC	GC	PC	GC	PC	GC
体重与全长 BW_TL	0.95**	0.96**	0.95**	0.97**	0.96**	0.97**	0.95**	0.95**
体重与体宽 BW_BL	0.94**	0.96**	0.83**	0.72**	0.92**	0.95**	0.95**	0.96**
全长与体宽 TL_BL	0.91**	0.94**	0.82**	0.75**	0.88**	0.91**	0.88**	0.92**

注: GC为遗传相关, PC为表型相关

Note: GC abbreviated for genetic correlation, PC abbreviated for phenotypic correlation

表7 雌性牙鲈亲鱼育种值(平均值±标准误)
Tab.7 Breeding values of female *P. olivaceus* parents (Mean±SE)

母本编号 Female parent number	体重 Body weight (g)	全长 Total length (cm)	体宽 Body width (cm)	母本编号 Female parent number	体重 Body weight (g)	全长 Total length (cm)	体宽 Body width (cm)
F0990-6	100.05±21.33	4.31±0.73	1.59±0.39	F0719-105	-4.76±27.5	-0.23±1.07	0.06±0.57
F1005-42	64.73±23.57	-0.03±0.82	0.83±0.47	F0719-8	-5.31±27.69	-0.21±1.07	0.26±0.57
F1005-53	42.98±22.85	1.65±0.83	1.01±0.42	F09119-6	-8.18±22.74	-0.28±0.82	-0.66±0.44
F0927-20	30.91±27.52	1.04±1.07	0.60±0.57	F0917-13	-8.98±23.51	-0.06±0.83	-0.35±0.47
F09119-11	27.63±27.63	0.95±1.07	0.44±0.57	F1005-27	-9.28±23.58	-0.72±0.86	-1.01±0.50
F09104-12	25.03±20.34	0.50±0.66	0.53±0.38	F1005-66	-15.32±21.89	-0.57±0.75	-0.33±0.42
F0751-14	22.14±25.79	0.20±0.95	-0.41±0.51	F0927-36	-15.68±21.06	-0.14±0.71	0.10±0.40
F1005-8	14.63±20.69	0.55±0.69	0.36±0.38	F0719-22	-16.31±24.94	-0.43±0.93	0±0.50
F0915-53	13.29±22.60	0.73±0.80	0.18±0.44	F0780-1	-19.09±24.94	-0.80±0.93	-0.49±0.50
F0719-97	13.18±27.72	0.32±1.08	0.02±0.57	F0915-30	-21.76±25.28	-0.83±0.94	-0.52±0.51
F09121-11	8.41±28.35	0.40±1.10	0.56±0.58	F0917-15	-25.35±25.84	-0.74±0.97	-0.08±0.51
F0719-100	7.80±27.65	0.77±1.07	0.26±0.57	F0917-29	-26.21±21.85	-2.00±0.77	-0.09±0.41
F1005-34	6.40±25.26	0.30±0.94	0.32±0.51	F0917-18	-28.01±25.09	-0.48±0.92	-0.06±0.49
F0719-10	2.77±27.60	0.41±1.07	-0.15±0.57	F0768-26	-32.70±23.05	-0.32±0.84	-0.20±0.45
F0719-14	1.31±27.54	0.40±1.07	0.15±0.57	F09104-6	-67.02±24.77	-1.93±0.93	-1.78±0.49
F0917-35	-0.20±25.77	0.25±0.96	0.61±0.51	F09121-3	-73.65±20.86	-3.01±0.70	-1.51±0.39
F0917-36	-3.46±25.25	0.03±0.94	-0.25±0.51				

表8 雄性牙鲈亲鱼育种值(平均值±标准误)
Tab.8 Breeding values of male *P. olivaceus* parents (Mean±SE)

父本编号 Male parent number	体重 Body weight (g)	全长 Total length (cm)	体宽 Body width (cm)	父本编号 Male parent number	体重 Bodyweight (g)	全长 Total length (cm)	体宽 Body width (cm)
F1264	72.06±18.02	2.89±0.71	1.42±0.38	F0751-129	1.31±27.54	0.40±1.07	0.15±0.57
F0908-17	40.49±22.71	1.23±0.90	0.34±0.47	F0751-36	-2.67±23.19	-0.07±0.92	0.11±0.48
F0908-38	30.91±27.52	1.04±1.07	0.60±0.57	F0915-8	-4.14±18.61	-0.92±0.75	0.13±0.37
F09125-4	27.63±27.63	0.95±1.07	0.44±0.57	F0780-56	-4.76±27.50	-0.23±1.07	0.06±0.57
F09125-7	21.94±23.60	0.44±0.91	0.20±0.48	ks-188	-5.31±27.69	-0.21±1.07	0.26±0.57
F0915-57	18.59±19.26	0.06±0.75	0.53±0.38	F09104-13	-7.17±21.77	0.02±0.85	0.14±0.43
F09119-33	14.26±15.37	1.37±0.61	0.03±0.31	F0768-33	-16.41±23.14	-0.73±0.91	-0.60±0.48
RS-45	13.18±27.72	0.32±1.08	0.02±0.57	F09119-20	-28.43±18.11	-1.40±0.74	-0.45±0.36
F1005-4	12.87±23.34	0.57±0.92	0.43±0.48	F0768-76	-29.19±23.14	-1.00±0.91	-0.43±0.48
F0915-42	8.41±28.35	0.40±1.10	0.56±0.58	F1010-82	-30.13±21.76	-1.22±0.86	-1.21±0.47
F0908-25	7.80±27.65	0.77±1.07	0.26±0.57	F0917-48	-47.11±24.07	-1.58±0.92	-0.59±0.49
F0908-23	2.94±23.62	0.33±0.91	0.08±0.48	F09121-26	-49.57±16.02	-1.68±0.63	-1.34±0.30
F0768-46	2.77±27.6	0.41±1.07	-0.15±0.57	F1005-23	-50.26±14.66	-2.17±0.58	-0.98±0.30

为了比较家系的育种性能差异,对家系的育种值进行计算和比较。分析结果发现,各个家系的育种性能也存在很大差异。从表9中可得出,体重的育种值在-62.88~35.60之间,全长的育种值在-2.62~1.45之间,体宽的育种值在-1.27~0.61之间。3个性状育种值均大于0的家系有F1402、F1408、F1415、F1416、F1423、F1427、F1428、F1439、F1440、F1441、F1442、F1444和F1446,3个性状育种值均小于0的家系有F1401、F1404、F1405、F1406、F1407、F1410、F1417、F1420、F1424、F1426、F1429、F1430、F1431、F1435、F1443和F1449。体重育种值明显大于全长和体宽育种值,可以把体重育种值作为主要参考因素,按照20%的留种率,最后得到的家系为F1416、F1428、F1442、F1418、F1427、F1408、F1402、F1412和F1446,可作为选育目标家系。

表10为380日龄牙鲆体重的描述性分析结果,体重平均值在(149.36±54.42)~(309.88±99.11)之间,变异系数为0.20~0.38。把体重的表型值作为参考因素,按照20%留种率,最后得到的家系为F1444、F1430、F1423、F1421、F1425、F1446、F1427、F1417和F1441。育种值选留家系与表型值选留家系中有2个相同,即2种选择结果具有22.22%的相同率。以育种值为依据选留的家系育种值与根据表型值选留的家系育种值比较可得:体重育种值选择比其表型值的选择效率高81.91%。

3 讨论

1960年Falconer发表了《数量遗传学导论》,系统介绍了数量遗传学的基本原理,从此数量遗传学作为一门系统的遗传学分支学科诞生了。数量遗传学原理已经广泛地应用在许多水产养殖品种中,如银鲤(*Carassius auratus gibelio*)(Gheyas *et al*, 2009)、大黄鱼(韦信键等, 2013)、罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)(Gall *et al*, 2002; Rezk *et al*, 2009)、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)(Thanh *et al*, 2009; Pillai *et al*, 2011)、小龙虾(*Cherax destructor*)(Jerry *et al*, 2005)、海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)(Chang *et al*, 2012)等。

在鱼类改良育种过程中,数量遗传分析是鱼类改良计划的核心,它的一项重要作用是估算亲本的遗传

参数,包括主要经济性状的遗传力、遗传相关、环境与基因型的互作等遗传参数,为进一步估算遗传增益和计算多性状综合选择指数提供基础(Eknath *et al*, 1993)。1971年Patterson和Thompson提出约束极大似然法(REML)估计遗传方差组分,国内外的大量研究证明,REML方法是目前动物育种中遗传参数估计比较理想的方法(杨泽明等, 2001)。

对牙鲆140、170、200、380日龄家系生长相关性状进行遗传分析,结果发现,牙鲆生长性状的遗传力分别为体重0.15~0.29,全长0.14~0.25,体宽0.13~0.27,均显示低遗传力,随着牙鲆不断生长,遗传力出现小范围的增减。380日龄时3个性状的遗传力均达到最高值,可以作为指标进行选择育种,能加快遗传进展。关于牙鲆生长性状遗传力的研究,刘永新(2009)¹⁾报道,牙鲆处于180、240和360日龄时,生长性状的遗传力分别为体重0.13~0.35、体长0.29~0.32、体高0.35~0.39,体高遗传力略高于体重和体长,180日龄时3个性状遗传力达最大;陈红林(2015)²⁾报道,牙鲆处于93、141和203日龄时,生长性状的遗传力分别为体重0.25~0.41,全长0.19~0.36,体宽0.23~0.39,141日龄时3个性状遗传力达到最大。综合比较发现,随着牙鲆不断生长,遗传力都出现小范围增减,但遗传力达到最大时的日龄都不相同,与本研究结果存在一定差异,其主要原因是实验群体的遗传背景、遗传结构和所处养殖环境不同,数据采集的时间点不同,以及采用的遗传参数估计方法不同。

与其他鱼类不同时期生长性状的遗传力研究相比,大菱鲆3、6、9、12和15月龄体重的遗传力范围是0.25~0.34,虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)1.5、2和4年龄体重的遗传力范围是0.38~0.46(McKay *et al*, 1986; Quinton *et al*, 2002; Perry *et al*, 2005),大西洋鲑(*Salmo salar*)2~3年龄体重的遗传力估计值是0.1~0.3(Standal *et al*, 1987);大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)4月龄和6月龄体重的遗传力是0.28~0.29(李镛, 2010)³⁾,与这些鱼类不同时期生长性状的遗传力相比较,遗传力的变化一样,都随着鱼类的不断生长出现小范围增减,但遗传力的大小都不相同,牙鲆体

1) Liu YX. Genetic analysis for growth traits in Japanese flounder selection and breeding family. Doctoral Dissertation of Northeast Agricultural University, 2009 [刘永新. 牙鲆选育家系生长性状的遗传分析. 东北农业大学博士研究生学位论文, 2009]

2) Chen HL. Quantity genetic analysis of *Paralichthys olivaceus* families and QTL mapping for metamorphosis direction. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2015 [陈红林. 牙鲆家系数量遗传分析及变态期偏转方向的QTL定位. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2015]

3) Li R. Estimates of genetic parameters and breeding values for growth traits and analysis for genetic structure during selection of largemouth bass (*Micropterus salmoides*). Master's Thesis of Guangdong Ocean University, 2010 [李镛. 大口黑鲈生长性状遗传参数和育种值估计及选育过程中遗传结构分析. 广东海洋大学硕士研究生学位论文, 2010]

表 9 牙鲈各家系育种值(平均值±标准误)

Tab.9 Breeding values of each family of *P. olivaceus* (Mean±SE)

家系编号 Family number	体重 Body weight (g)	全长 Total length (cm)	体宽 Body width (cm)	家系编号 Family number	体重 Body weight (g)	全长 Total length (cm)	体宽 Body width (cm)
F1416	35.6±12.63	1.45±0.42	0.57±0.28	F1445	-1.38±9.53	0.60±0.39	0.06±0.24
F1428	31.87±9.38	1.30±0.32	0.37±0.22	F1411	-1.59±10.13	0.08±0.35	0.22±0.20
F1442	31.17±9.57	1.05±0.31	0.61±0.22	F1403	-2.89±12.41	0.00±0.40	-0.15±0.27
F1418	30.87±11.50	-0.48±0.41	0.49±0.21	F1438	-4.80±10.31	-0.23±0.36	0.06±0.28
F1427	27.92±12.33	0.96±0.38	0.44±0.24	F1448	-5.35±14.08	-0.21±0.44	0.27±0.31
F1408	27.10±9.16	0.99±0.38	0.26±0.25	F1430	-6.65±16.11	-0.49±0.47	-0.12±0.36
F1402	25.59±11.35	1.10±0.40	0.31±0.25	F1417	-8.04±12.71	-0.35±0.38	-0.44±0.26
F1412	22.17±8.35	0.32±0.31	-0.11±0.21	F1426	-10.90±9.52	-0.43±0.35	-0.19±0.23
F1446	20.87±11.49	0.97±0.40	0.31±0.24	F1404	-12.88±8.93	-0.61±0.34	-0.41±0.21
F1440	13.31±10.43	0.32±0.37	0.02±0.27	F1449	-17.12±14.63	-0.55±0.53	-0.49±0.34
F1423	10.87±12.75	0.35±0.38	0.41±0.28	F1425	-17.85±11.57	-0.23±0.35	0.04±0.25
F1444	8.52±15.34	0.41±0.45	0.57±0.35	F1435	-17.90±10.76	-0.77±0.39	-0.55±0.25
F1441	7.87±9.17	0.78±0.29	0.26±0.23	F1406	-18.04±14.26	-0.83±0.49	-0.31±0.30
F1415	4.72±10.94	0.31±0.37	0.20±0.24	F1410	-18.76±10.70	-0.62±0.38	-0.04±0.24
F1422	4.30±10.16	-0.10±0.35	0.15±0.23	F1405	-19.94±12.82	-0.98±0.44	-1.12±0.27
F1414	2.79±8.54	0.41±0.34	-0.15±0.20	F1429	-22.99±14.23	-0.72±0.50	-0.22±0.33
F1421	2.21±14.24	-0.02±0.43	0.34±0.31	F1401	-24.59±10.03	-0.95±0.37	-0.63±0.25
F1439	1.32±8.51	0.40±0.33	0.15±0.20	F1443	-34.59±11.91	-1.21±0.42	-0.56±0.27
F1420	-0.24±11.37	-0.03±0.41	-0.03±0.26	F1424	-36.49±14.93	-1.17±0.51	-0.34±0.34
F1409	-0.29±10.46	0.18±0.36	-0.09±0.25	F1431	-38.15±11.49	-1.86±0.45	-0.72±0.29
F1419	-0.63±12.33	0.40±0.43	-0.15±0.26	F1407	-62.88±9.31	-2.62±0.38	-1.27±0.22

表 10 380 日龄牙鲈家系体重的描述性分析

Tab.10 Descriptive analysis of body weight of *P. olivaceus* family at 380 day age

家系 Family	数量 Number	极小值 Minimum (g)	极大值 Maximum (g)	均值 Mean±SD	变异系数 CV	家系 Family	数量 Number	极小值 Minimum (g)	极大值 Maximum (g)	均值 Mean±SD	变异系数 CV
F1444	77	82.0	459.2	309.88±99.11	0.32	F1438	140	115.0	423.4	241.83±61.01	0.25
F1413	72	97.2	532.8	309.38±95.71	0.31	F1429	132	65.8	421.6	236.48±79.95	0.34
F1430	107	68.8	567.2	296.76±101.16	0.34	F1410	104	64.0	382.6	236.41±65.26	0.28
F1423	131	48.2	493.4	286.85±79.21	0.28	F1406	111	83.4	438.0	232.99±85.70	0.37
F1421	119	113.4	527.8	284.41±84.14	0.3	F1409	136	99.8	398.2	231.34±63.69	0.28
F1425	116	56.0	473.8	282.84±72.91	0.26	F1440	102	76.6	396.4	229.71±61.94	0.27
F1446	114	80.0	465.6	279.44±73.44	0.26	F1402	194	84.6	399.0	226.89±67.31	0.30
F1427	103	136.8	520.2	273.84±74.17	0.27	F1405	134	62.0	428.6	225.07±77.98	0.35
F1417	120	95.8	417.0	272.32±75.81	0.28	F1449	115	65.6	423.4	221.81±83.19	0.38
F1441	114	95.4	387.8	271.67±54.53	0.20	F1412	171	61.4	349.0	215.93±51.36	0.24
F1448	134	75.6	429.6	271.18±85.00	0.31	F1443	141	63.6	427.0	209.29±68.09	0.33
F1442	129	99.4	437.8	268.42±58.72	0.22	F1419	158	81.6	413.4	207.83±73.02	0.35
F1434	105	117.8	459.6	267.70±75.32	0.28	F1445	153	43.0	360.0	206.47±59.12	0.29
F1418	119	39.6	402.2	264.61±71.10	0.27	F1435	115	65.4	427.4	204.61±64.12	0.31
F1416	136	72.8	457.4	262.99±78.86	0.30	F1420	145	64.4	399.6	203.18±67.67	0.33
F1411	106	91.8	428.8	262.87±61.49	0.23	F1414	169	61.6	414.6	203.17±54.96	0.27
F1403	110	70.4	488.8	257.21±70.05	0.27	F1426	134	56.2	435.6	196.64±61.97	0.32
F1428	119	84.4	404.6	254.96±54.84	0.22	F1408	195	44.0	403.0	192.69±55.54	0.29
F1415	134	90.0	405.2	250.41±64.02	0.26	F1431	110	57.4	352.4	185.14±65.08	0.35
F1424	111	52.2	448.4	249.95±90.98	0.36	F1401	184	66.0	463.2	175.86±59.07	0.34
F1422	101	79.8	425.6	247.95±60.86	0.25	F1404	178	49.8	391.2	173.62±55.50	0.32
F1439	124	135.2	383.8	243.55±51.73	0.21	F1407	167	55.4	336.0	149.36±54.42	0.36

重遗传力与大菱鲆基本相同,略低于虹鳟,略高于大西洋鲑和大口黑鲈。不同的鱼类遗传力估计值都存在差异,与鱼类品种的形态差异、生长时期以及采用不同的遗传参数估计方法都有一定关系。

加性效应在选择过程中可以累加并遗传给后代,具有较高加性效应的数量性状在下一代选择时较易取得育种效果。在当前的遗传效应研究中对加性效应研究较多,Pante等(2002)分析了虹鳟近交群体体重的加性效应;Winkelman等(1994)研究了大鳞大麻哈鱼(*Oncorhynchus tshawytscha* Walbaum) 9月龄的体重和体长的加性效应。本研究利用加性遗传模型对18个亲本群体的体重、全长和体宽3个性状的加性效应进行了分析,结果显示,体重的加性效应显著大于全长和体宽的加性效应,与田永胜等(2015)估计的196日龄牙鲆亲鱼的加性效应结果相同。不同日龄的加性效应结果大致相同,综合不同时期的3个性状的结果发现,F0990、F1005、KS和F0719这4个群体亲本都为极显著正向效应,说明以上亲本在育种中能够促进牙鲆以上性状的生长。

在实际育种工作中,相关分析可以排除一些不利的或者相关性小的性状,以达到目的性状的最佳选择进展。通过相关关系分析还可以协助解决物种的早期选择和间接选择(张庆文等,2008)。本研究中,体重、全长和体宽3个性状遗传相关在0.72–0.97之间,表型相关系数在0.82–0.96之间。刘峰等(2013)的研究结果显示,“鲆优1号”牙鲆全长和体重表型相关系数为0.643–0.967,都为极显著相关。

美国Henderson(1975)在20世纪40年代末提出的BLUP方法被认可并灵活运用于动植物遗传育种改良。BLUP方法的选择比群体选择效果高约20%–30%,选择效率明显(Hagger,1991)。本研究通过BLUP方法估计380日龄时牙鲆家系的育种值得出,体重的育种值为–62.88–35.60,全长的育种值为–2.62–1.45,体宽的育种值为–1.27–0.61,体重的育种值明显大于全长和体宽的育种值,这与刘永新(2009)¹⁾360日龄的牙鲆家系结果相同。

国内外许多学者对育种值选择与表型值选择效率进行了比较研究,Gall等(2002)得出98d雌性和雄性罗非鱼的育种值比表型值的选择效率分别高19%、27%。Gjøen等(1997)在大西洋鲑育种过程中,采用BLUP方法进行选种,个体的生长速度和收获时达到

性成熟的个体比例,每一代能够提高10%。张天时等(1997)对中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)145日龄体重育种值的分析中指出,育种值选择的留种家系或个体比表型值选择分别提高50%和80.59%。刘峰等(2013)对“鲆优1号”牙鲆的育种值分析得出,全长和体重育种值选择比其表型值的选择效率分别高35.38%和32.29%。研究表明进行个体选择或者家系选择,育种值选择效率都显著高于表型值选择。本研究对380日龄的牙鲆以体重育种值为依据选留的家系育种值与根据表型值选留的家系育种值比较可得:体重育种值选择比其表型值的选择效率高81.91%。因此,通过BLUP方法对牙鲆优良品种的选育进展明显,同时为牙鲆育种计划的制定和实施提供了充分的科学依据。

参 考 文 献

- Atchley WR, Zhu J. Developmental quantitative genetics, conditional epigenetic variability and growth in mice. *Genetics*, 1997, 147(2): 765–776
- Chang Y, Zhang W, Zhao C, *et al.* Estimates of heritabilities and genetic correlations for growth and gonad traits in the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *Aquaculture Research*, 2012, 43(2): 271–280
- Chen SL, Tian YS, Xu TJ, *et al.* Development and characterization for growth rate and disease resistance of disease-resistance population and family in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of Fisheries of China*, 2008, 32(5): 665–673 [陈松林, 田永胜, 徐田军, 等. 牙鲆抗病群体和家系的建立及其生长和抗病性能初步测定. *水产学报*, 2008, 32(5): 665–673]
- Eknath AE, Tayamen MM, Palada-de Vera MS, *et al.* Genetic improvement of farmed tilapias: The growth performance of eight strains of *Oreochromis niloticus* tested in different farm environments. *Aquaculture*, 1993, 111(1): 171–188
- Gall GAE, Bakar Y. Application of mixed-model techniques to fish breed improvement: Analysis of breeding-value selection to increase 98-day body weight in tilapia. *Aquaculture*, 2002, 212(1): 93–113
- Gheyas AA, Woolliams JA, Taggart JB, *et al.* Heritability estimation of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) harvest traits using microsatellite based parentage assignment. *Aquaculture*, 2009, 294(3–4): 187–193
- Gjøen HM, Bensten HB. Past, present and future of genetic improvement in salmon aquaculture. *ICES Journal of Marine Science*, 1997, 54(6): 1009–1014

1) Liu YX. Genetic analysis for growth traits in Japanese flounder selection and breeding family. Doctoral Dissertation of Northeast Agricultural University, 2009 [刘永新. 牙鲆选育家系生长性状的遗传分析. 东北农业大学博士研究生学位论文, 2009]

- Hagger C. Effects of selecting on phenotype on index or on breeding value on expected response, genetic relationships and accuracy of breeding values in an experiment. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 1991, 108(1-6): 102-110
- Henderson CR. Best linear unbiased estimation and prediction under a selection model. *Biometrics*, 1975, 31(2): 423-447
- Jerry DR, Purvis IW, Piper LR, *et al.* Selection for faster growth in the freshwater crayfish *Cherax destructor*. *Aquaculture*, 2005, 247(1-4): 169-176
- Li J, Liu P, Gao BQ, *et al.* The new variety of *Portunus trituberculatus* "Huangxuan No. 1". *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(5): 51-57 [李健, 刘萍, 高保全, 等. 三疣梭子蟹新品种“黄选1号”的选育. *渔业科学进展*, 2013, 34(5): 51-57]
- Liu F, Chen SL, Wang L, *et al.* Analysis of growth performance and breeding value of "Ping You No.1" Japanese flounder and selection of parents. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(3): 521-527 [刘峰, 陈松林, 王磊, 等. “鲆优1号”牙鲆生长和育种性能分析及亲本选留. *中国水产科学*, 2013, 20(3): 521-527]
- Liu YG, Chen SL, Li J, *et al.* Genetic diversity in three Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) populations revealed by ISSR markers. *Aquaculture*, 2006, 255(1-4): 565-572
- Lou YD. *Fish Breeding*. Beijing: China Agriculture Press, 1999, 36-50 [楼允东. *鱼类育种学*. 北京: 中国农业出版社, 1999, 36-50]
- Ma AJ, Wang XA, Huang ZH, *et al.* Response to selection and realized heritability for early growth in the second-generation bred line of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012, 43(1): 57-61 [马爱军, 王新安, 黄智慧, 等. 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)家系选育 F₂ 早期选择反应和现实遗传力估计. *海洋与湖沼*, 2012, 43(1): 57-61]
- Pante MJR, Gjerde B, McMillan I, *et al.* Estimation of additive and dominance genetic variances for body weight at harvest in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 2002, 204(3-4): 383-392
- Park IS, Woo SR, Song YC, *et al.* Effects of starvation on morphometric characteristics of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Ichthyological Research*, 2007, 54(3): 297-302
- Pillai BR, Mahapatra KD, Ponzoni RW, *et al.* Genetic evaluation of a complete diallel cross involving three populations of freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) from different geographical regions of India. *Aquaculture*, 2011, 319(3-4): 347-354
- Rao CR. Estimation of variance and covariance components—MINQUE theory. *Journal of Multivariate Analysis*, 1971, 1(3): 257-275
- Rezk MA, Ponzoni RW, Khaw HL, *et al.* Selective breeding for increased body weight in a synthetic breed of Egyptian Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: Response to selection and genetic parameters. *Aquaculture*, 2009, 293(3-4): 187-194
- Sheng ZL, Chen YS. *Quantitative genetics*. Beijing: Science Press, 1999, 1-7 [盛志廉, 陈瑶生. *数量遗传学*. 北京: 科学出版社, 1999, 1-7]
- Shimada Y, Murakami N, Tsuzaki T, *et al.* Changes in growth, higher salinity tolerance and behavioral traits in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* after repeated cross-breeding. *Fisheries Science*, 2007, 73(2): 364-370
- Thanh NM, Ponzoni RW, Nguyen NH, *et al.* Evaluation of growth performance in a diallel cross of three strains of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) in Vietnam. *Aquaculture*, 2009, 287(1): 75-83
- Tian YS, Chen HL, Qi WS, *et al.* Establishment and estimated genetic effects of *Paralichthys olivaceus* F₃ families. *Haiyang Xuebao*, 2015, 37(4): 40-51 [田永胜, 陈红林, 齐文山, 等. 牙鲆选育 F₃ 代家系的建立及遗传效应分析. *海洋学报*, 2015, 37(4): 40-51]
- Tian YS, Chen SL, Xu TJ, *et al.* The comparison of growth performances of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) families and selection of parents with good trait. *Journal of Fisheries of China*, 2009, 33(6): 901-911 [田永胜, 陈松林, 徐田军, 等. 牙鲆不同家系生长性能比较及优良亲本选择. *水产学报*, 2009, 33(6): 901-911]
- Tian YS, Xu TJ, Liang Y, *et al.* Estimates of genetic and phenotypic parameters for weight and length in *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Acta Oceanologica Sinica*, 2011, 30(6): 58-64
- Wei XJ, Liu XD, Wang ZY. The comparison of growth-related traits in the early stage and its genetic parameter estimation of 32 large yellow croaker families *Larimichthys crocea*. *Journal of Jimei University (Natural Science)*, 2013, 18(5): 321-328 [韦信键, 刘贤德, 王志勇. 32个大黄鱼家系早期阶段生长性状比较及遗传参数估计. *集美大学学报(自然科学版)*, 2013, 18(5): 321-328]
- Winkelman AM, Peterson RG. Heritabilities, dominance variation, common environmental effects and genotype by environment interactions for weight and length in chinook salmon. *Aquaculture*, 1994, 125(1-2): 17-30
- Xu TJ, Chen SL, Tian YS, *et al.* Comparative analysis of disease resistance among Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) families. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, 17(1): 59-68 [徐田军, 陈松林, 田永胜, 等. 牙鲆抗鳃弧菌病家系筛选及其分析. *中国水产科学*, 2010, 17(1): 59-68]
- Yang ZM, Xiong YZ, Yu CZ. The development of pig genetic evaluation. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2001, 20(6): 598-602 [杨泽明, 熊远著, 喻传洲. 影响猪遗传评估效果的主要因素研究. *华中农业大学学报*, 2001, 20(6): 598-602]
- Yang ZY, Wang CX. On the development of flatfish aquaculture industry of China: A global perspective. *Chinese Fisheries Economics*, 2009, 6(27): 115-121 [杨正勇, 王春晓. 全球视野下中国鲆鲽类养殖业的发展. *中国渔业经济*, 2009, 6(27): 115-121]
- Zhang QW, Kong J, Luan S, *et al.* Estimation of genetic parameters for three economic traits in 25 d turbot fry. *Marine Fisheries Research*, 2008, 29(3): 53-56 [张庆文, 孔杰, 栾生, 等. 大菱鲆25日龄3个经济性性状的遗传参数评估. *海洋水产研究*, 2008, 29(3): 53-56]
- Zhang TS, Kong J, Luan S, *et al.* Genetic gain for one generation BLUP selection of Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Marine Fisheries Research*, 2008, 29(3): 35-40 [张天时, 孔杰, 栾生, 等. 应用BLUP法对中国对虾一代选择的遗传进展. *海洋水产研究*, 2008, 29(3): 35-40]
- Zhao GT, Liu XD, Wang ZY, *et al.* Genetic structure and genetic diversity analysis of four consecutive breeding generations of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) using microsatellite markers. *Journal of Fisheries of China*, 2010,

34 (4): 501–507 [赵广泰, 刘贤德, 王志勇, 等. 大黄鱼连续 4 代选育群体遗传多样性与遗传结构的微卫星分析. 水产学报, 2010, 34 (4): 501–507]

Zhu J. Analysis of conditional genetic effects and variance components in developmental genetics. *Genetics*, 1995, 141(4): 1633–1639

(编辑 马瑾艳)

Genetic Effect Analysis of Growth Traits in *Paralichthys olivaceus* Families

LI Xiangkong^{1,2}, TIAN Yongsheng^{2,4}①, LI Hong^{2,3}, SONG Lini^{2,3}, GAO Jin^{2,5}, DUAN Huimin^{2,3},
DAI Huan^{1,2}, CHEN Zhangfan^{2,4}, CHEN Songlin^{2,4}, WANG Xiuli¹

(1. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 4. Laboratory of Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071; 5. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081)

Abstract Breeding new varieties is a main approach to prevent the genetic degradation and improve traits for the purpose of economic benefits. Quantitative genetics evaluation is one of the main methods used in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) breeding. By using the core populations from the established breeding program, this research evaluated three growth related traits (body weight, total length, and body width) among 42 newly-generated families on 140 d, 170 d, 200 d (before mixing pool) and 380 d (after mixing pool). The quantitative genetic analysis was carried out using MINQUE, REML and BLUP. The results showed that the variation coefficient of growth traits ranged between 10.56% and 38.62% at different day age. Among three growth traits, the variation coefficient was the largest in body weight, and was relatively small in total length and body width. The variation coefficient of different traits decreased with the increase of day age. The additive variance component ratio for the three traits was between (0.13±0.01) and (0.29±0.06), whereas the random variance component ratio was between (0.71±0.06) and (0.87±0.01). By contrast, the narrow sense heritability ranged between (0.13±0.01) and (0.29±0.06) and the generalized heritability was from (0.15±0.01) to (0.54±0.06). All of the above genetic traits were highly significant ($P<0.01$). Comparison of genetic effects on three growth traits during different developmental stages revealed that four parental groups (F0990, F1005, KS, and F0719) showed significant positive effects, whereas six groups of parental groups (F0751, F0768, F0780, F09121, F0927, and RS) showed significant negative effect ($P<0.01$). By contrast, the rest of 32 parental samples showed no significant effect. The correlation coefficient was between 0.82 and 0.96 in phenotype and between 0.72 and 0.97 in genotype. The phenotypic and genetic correlation coefficient of different day ages were maintained at a relatively stable level. Breeding value of the 380-day age was estimated using the BLUP method. The results showed that breeding value of the parental fish body weight was between 14.63 and 100.05. Among all the families, the highest breeding values for body weight were found in F1005-8, F09119-11, F09125-4, F0915-57, F09104-12, F1264, F0908-38, F0927-20, F1005-53, F0990-6, F09125-7, F0751-14 and F1005-42, average between 20.87 and 35.60. The families with the highest average weight breeding value were F1416, F1428, F1442, F1418, F1427, F1408, F1402, F1412 and F1446. Compared with the method of phenotypic selection, the breeding values obtained from growth-based selection were better for improving growth traits since the selection efficiency was up to 81.91%. In this study, parents and families with superior growth traits were selected to improve the genetic quality and new varieties of *P. olivaceus*. Meanwhile, it provides an important theoretical basis for the development of *P. olivaceus* breeding program.

Key words *Paralichthys olivaceus*; Family; Heritability; Growth traits; Breeding value

① Corresponding author: TIAN Yongsheng, E-mail: tianys@ysfri.ac.cn

基于转录组测序对翘嘴鲌(*Siniperca chuatsi*) 2 种肌球蛋白重链基因的克隆与分析*

陈之航^{1,2} 董浚键¹ 孙成飞¹ 田园园¹ 叶星^{1,2①}



(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所 广州 510380;
2. 上海海洋大学水产与生命技术学院 上海 201306)

摘要 肌球蛋白重链(Myosin heavy chain, MYH)是骨骼肌粗肌丝的重要组成单位,其表达量高低影响肌纤维的组成和肌肉生长。为了解其在翘嘴鲌(*Siniperca chuatsi*)早期生长过程中的作用,本研究从前期生长差异显著的 2 组(快长组和慢长组)翘嘴鲌幼鱼转录组差异表达 Unigene 中筛选出 2 个 MYH 基因, RACE (Rapid amplification of cDNA ends)克隆到其全长 cDNA(MYH-7a, MYH-7b)。MYH-7a 全长为 6071 bp, 开放阅读框为 5820 bp; MYH-7b 全长为 5896 bp, 开放阅读框为 5745 bp。序列分析显示, 2 个 MYH 均有 Loop1、Loop2 环、ATP 结合位点等关键结构域; 进化树聚类分析显示, MYH-7a 与 MYH-7b 均属于慢肌球蛋白。实时荧光定量 PCR 验证发现, 其在快长组样本中表达量显著高于慢长组, 与转录组测序结果一致; 检测其在翘嘴鲌心肌、红白肌和皮肤等 14 种组织的表达水平, 结果显示, MYH-7a 主要在心肌中表达, 而 MYH-7b 主要在红肌中表达; 在胚胎发育不同阶段, 二者随着胚胎发育的进行, 表达量不断增加; 在幼鱼早期生长过程(孵化出膜后 15 dph、30 dph 和 60 dph)的翘嘴鲌白肌中, 在 15 dph 和 30 dph 快长组的表达量显著高于慢长组, 而到 60 dph 时快长组的表达量均显著低于慢长组。翘嘴鲌 MYH-7a、MYH-7b 在快长组与慢长组鱼中的差异表达提示它们在翘嘴鲌胚胎及其早期生长发育过程中发挥重要作用。

关键词 翘嘴鲌; 转录组测序; 肌球蛋白重链; cDNA 克隆; 表达分析

中图分类号 S917.4 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2017)03-0051-11

肌球蛋白重链(Myosin heavy chain, MYH)的结构分为头区和尾区。常规 MYH 的 N 端头区通常与 1 个调节型肌球蛋白轻链(Regulatory myosin light chain, RLC)和 1 个必需轻链(Essential myosin light chain, ELC)结合, 折叠盘绕形成球状头部作为“马达”功能区; 2 个 MYH 的 C 端棒状区盘绕形成卷曲螺旋, 并聚集成束, 形成粗肌丝束主体。其中, 头部“马达”功能区有 ATP 结合位点, 可结合 ATP, 将其水解为

ADP 释放能量, 为肌肉收缩提供动力而影响运动、摄食等活动, 从而直接影响鱼类生长(Campion *et al.*, 2012)。MYH 也广泛存在于非肌细胞中, 是细胞骨架的组成成分, 参与细胞内的细胞器运动与有丝分裂, 细胞外的吞噬、运动、受精和吸收等生理过程, 充当非肌细胞生命活动的不同层次的调节者, 包括细胞间的信号传递、细胞形状改变等较高级的调节(Seb -Pedrós *et al.*, 2014)。

* 国家引智项目(国家外专局)(20140326016)、广东省海洋与渔业科技推广(A201601A06)、广东省科技计划项目(2015A020209034)和广州市科技计划项目(2014J4100087)共同资助[This work was supported by State Administration of Foreign Experts Affairs (20140326016), Ocean Fisheries Science and Technology Promotion Project of Guangdong Province (A201601A06), Science and Technology Project of Guangdong Province (2015A020209034), and Science and Technology Project of Guangzhou City (2014J4100087)]. 陈之航, E-mail: kevinchenaddress@163.com

① 通讯作者: 叶星, 研究员, E-mail: gzyexing@163.com

收稿日期: 2016-04-14, 收修改稿日期: 2016-04-27

哺乳动物肌肉生长只在未成年阶段涉及肌纤维增生和增粗,成体只有增粗而不再增生;而鱼类肌纤维始终存在增生和增粗,鱼类这种生长现象被称为非限制性生长。因 *MYH* 基因表达量高低影响肌纤维的增生,被认为与鱼类的非限制性生长有关(Biga *et al.*, 2006)。在鱼类中发现的 *MYH* 亚型远远多于哺乳动物,这也被认为是鱼类基因组倍化的可靠证据(Yasmin *et al.*, 2011; Asaduzzaman *et al.*, 2016)。在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、大西洋鲑(*Salmo salar*)和大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)等鱼类中发现, *MYH* 的表达量与鱼生长速度有显著相关性(Overturf *et al.*, 2001; Dhillon *et al.*, 2008; Churova *et al.*, 2015)。Hevrøy 等(2006)发现,投喂不同膳食水平 68 d 后,大西洋鲑肌肉 *MYH* 的表达量与肌肉蛋白总量和体重显著相关, *MYH* 的表达量可作为表征鱼类生长的重要标记。

为了解影响翘嘴鲌(*Siniperca chuatsi*)早期生长的关键基因,本研究从同批孵化、生长存在显著差异的翘嘴鲌的转录组差异表达谱数据中,筛选差异表达 *MYH* 基因,克隆获得 2 个表达量差异显著的 *MYH* 全长 cDNA,进行序列结构分析,并分析其组织分布及胚胎发育的表达规律;检测这 2 个基因在孵化出膜后不同阶段的(15、30、60 days post hatching, dph)快长组和慢长组翘嘴鲌白肌中的表达量,探讨其与生长的相关性,为后续翘嘴鲌快长品系的分子选育提供候选基因与位点。

1 材料与方法

1.1 材料

实验时间为 2014 年 5 月–2015 年 11 月,实验用翘嘴鲌取自广东省清新县宇顺农牧渔业科技服务有限公司养殖基地。转录组测序用翘嘴鲌选择同批孵化、培育 30 dph 的翘嘴鲌,从中选取生长快和生长慢的个体各 12 尾,取白肌组织;不同胚胎发育时期的翘嘴鲌源自同一对亲本的受精卵,显微镜下观察胚胎发育时期(刘希良等, 2013),分别取未受精卵、受精卵、囊胚期、神经胚期、体节出现期、尾芽期、肌肉效应期和出膜幼鱼各期样品 10 枚卵(尾)/组,各 3 组;随机选取 3 尾健康成鱼,取眼、鳃、皮肤、白肌、红肌、心肌、胃、肠、肝、脾、肾、性腺、脑及垂体共 14 个组织作为组织分布样品;取同批 15 dph、30 dph 和 60 dph 的快长组和慢长组的翘嘴鲌各 5 尾,测体重,取白肌组织作为不同生长时期快长组和慢长组样品(平均体重及差异见表 1)。上述样品置于盛有 1 ml TRIzol (Invitrogen, 美国)的 1.5 ml 离心管中并匀浆,随即液氮冻存。

表 1 孵化出膜后各时期翘嘴鲌的平均体重

Tab.1 The average body weight of *S. chuatsi* at different growth stages after hatching (g)

组别 Groups	生长时期 Growth stages (dph)		
	15	30	60
慢长组 Slow growing group	0.09	0.36	21.75
快长组 Fast growing group	0.17**	2.31*	38.60**

*表示差异显著($P<0.05$), **表示差异极显著($P<0.01$), 下同

* denoted significant difference ($P<0.05$), ** denoted highly significant difference ($P<0.01$), the same as below

1.2 RNA 提取及 cDNA 合成

将上述组织样品按照 TRIzol 试剂盒说明书提取总 RNA,总 RNA 用 DNase I (TaKaRa, 日本)去除基因组 DNA 后,用 Biophotometer (Eppendorf, 德国)及琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 浓度及纯度,样品浓度 ≥ 400 ng/ μ l,电泳检测条带清晰,样品 -70°C 保存备用。cDNA 合成,使用 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, 瑞士)反转录试剂盒,取 1 μ g 总 RNA 合成 cDNA 第 1 链, -20°C 保存备用,具体步骤参考说明书。将快长组和慢长组翘嘴鲌 RNA (12 个/组)各取 3 μ l 混合,形成快、慢 RNA 混池,送深圳华大基因公司,经随机打断、反转录、末端修复、加测序接头后,通过 Hiseq2000 (Illumina, 美国)平台,进行 RNA denovo 测序。

1.3 转录组表达量分析

测序后得到 clean reads,用短 reads 组装软件 Trinity 对 clean reads 进行从头组装和过滤后得到高质量的 Unigenes。用 FPKM (Fragments per kilobase of exon per million fragments mapped)法计算基因表达量(Mortazavi *et al.*, 2008)。通过错误发生率(False discovery rate, FDR)多重检验校正 P 值,并根据 FPKM 比较该基因在快长、慢长组中的差异表达倍数。筛选 $\text{FDR} \leq 0.001$ 且差异倍数不低于 2 倍(即 $|\log_2 \text{ration}| \geq 1$) 的基因为差异显著基因。

1.4 翘嘴鲌肌球蛋白重链基因 RACE 克隆

提取健康翘嘴鲌肌肉总 RNA,采用 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, 美国)合成 5'端 cDNA 第 1 链和 3'端 cDNA 第 1 链。根据转录组差异表达谱数据,从转录组表达量差异显著的 43 个的翘嘴鲌肌球蛋白重链基因中,选出表达量差异最大的 2 条 *MYH* 基因 (CL127.Contig1_All 和 Unigene19394_All),根据其序列片段,用 Primer Premier 5.0 软件设

计 5'、3'RACE 引物(5'-GSP/3'-GSP), 并与 UPM/UPS 通用引物进行 PCR 反应, 引物信息见表 2。反应体系: 5'/3'端 cDNA 2.5 μ l, 10 \times UPM 5 μ l, 5'/3'特异引物(5'/3' GSP-1) 1 μ l, 2 \times SeqAmp Buffer 25 μ l, SeqAmp DNA 酶 1 μ l, ddH₂O 补足至 50 μ l。扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 5 个循环: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 4 min; 5 个循环: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 70 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 4 min; 20 个循环: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 4 min。第 2 轮巢式 PCR 以第 1 轮

PCR 产物稀释 50 倍为模板, 用通用引物 UPS 与 5'/3'GSP-2 进行 PCR 反应, 扩增程序同第 1 轮 PCR。5'和 3'RACE 扩增产物经凝胶电泳检测目的带并切胶回收, PCR 产物克隆至 pEASY blunt zero 载体(全式金)中, 经菌液 PCR 鉴定后, 挑取阳性菌送广州艾基生物技术有限公司测序。测序结果利用 DNAMAN 8.0 软件将 5'RACE 片段、3'RACE 片段和 Unigene 片段序列进行拼接。

表 2 翘嘴鲌肌球蛋白重链基因的克隆及实时荧光定量 PCR 表达分析使用的引物
Tab.2 Primers for cloning and qRT-PCR analysis of *S. chuatsi* myosin heavy chain

目的片段 Target fragment	引物名 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	用途 Purpose
CL127.Contig1_All	5'GSP-1	GATTACGCCAAGCTTAGCAGCCATCTCCTCAGTCAGGTTCTT	5'RACE PCR
	5'NGSP-2	GATTACGCCAAGCTTACCCAGCAATCCAGCCTTGAAGAACA	5'RACE nested PCR
	3'GSP-1	GATTACGCCAAGCTTAGCTCCAAGTTCAAGCGGAGCAAGAT	3'RACE PCR
	3'NGSP-2	GATTACGCCAAGCTTGACTGAGGAGATGGCTGCTTTGGATGAA	3'RACE nested PCR
Unigene19394_All	5'GSP-1	GATTACGCCAAGCTTCTGCTCTCTGCTTCTCCACCTTGCC	5'RACE PCR
	5'NGSP-2	GATTACGCCAAGCTTGCGCTCCTCCAGCTGTTGCTTGTC	5'RACE nested PCR
	3'GSP-1	GATTACGCCAAGCTTGGACTGCTGGGTCAGCTAGAGGAGATG	3'RACE PCR
	3'NGSP-2	GATTACGCCAAGCTTCAGTGGAACATCCGTGCCTTCATGGG	3'RACE nested PCR
	UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	5'/3'RACE PCR
	UPS	CTAATACGACTCACTATAGGGC	5'/3'RACE nested PCR
	M13-F	GTAAAACGACGGCCAG	阳性克隆筛选 Screening positive clones
	M13-R	CAGGAAACAGCTATGACC	
MYH-7a	7a-F	GCTCAAGGCTGAGAGAGATTAC	qRT-PCR (109 bp)
	7a-R	GAAGGCGTAGTCATAGGGATTATT	
MYH-7b	7b-F	AAGCACAGATCCCCGATTTC	qRT-PCR (125 bp)
	7b-R	GCTTCTAGACGCTCCCTATCT	
β -actin	β -actinF	GATCTGGCATCACACCTTCTAC	qRT-PCR (104 bp)
	β -actinR	TCTTCTCCCTGTTGGCTTTG	

GSP: 基因特异引物; NGSP: 基因特异巢式引物; UPM: RACE 通用引物; UPS: RACE 巢式通用引物

GSP: Gene-specific primers; NGSP: Nested gene specific primers; UPM: Universal primer mix; UPS: Universal primer short

1.5 序列分析

用 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 对测序结果进行同源性检索。NCBI ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) 确定其开放阅读框并预测氨基酸序列。用 ProtParam 工具 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 对推测蛋白进行基本理化参数分析; 根据 PredictProtein 工具 (<https://www.predictprotein.org/>) 分析蛋白二级结构及功能; InterProScan 工具 (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/scan.html>) 分析结构域; 用 NLS Mapper (http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi) 在线预测核定位序列。用 ClustalW 软件将翘嘴鲌及其他物种肌球蛋白重链基因的氨基酸头区序列进行多重比对, 用 MEGA 5.0 软件构建 M-L(Maximum Likelihood) 系统发育树(Bootstraps 设为 1000 次)。

html)分析结构域; 用 NLS Mapper (http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi) 在线预测核定位序列。用 ClustalW 软件将翘嘴鲌及其他物种肌球蛋白重链基因的氨基酸头区序列进行多重比对, 用 MEGA 5.0 软件构建 M-L(Maximum Likelihood) 系统发育树(Bootstraps 设为 1000 次)。

1.6 翘嘴鲌 MYH-7s 基因表达分析

使用合成的 cDNA 第 1 链作为实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析的模板, 以 β -actin 为内参基因(Zhou

et al, 2010), 分别设计目的基因及内参基因的 qRT-PCR 引物(表 1)。

qRT-PCR 采用 ABI 7300 实时荧光定量 PCR 仪 (Life Technologies, 美国), 反应体系根据 SYBR Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa, 日本)说明书进行设置: cDNA 模板 2 μ l, 上、下游引物(10 μ mol/L) 各 0.4 μ l, 2 \times SYBR Premix Ex Taq 10 μ l, 50 \times ROX Reference Dye 0.4 μ l, ddH₂O 6.8 μ l。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环: 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s。熔解曲线: 95 $^{\circ}$ C 15 s, 55 $^{\circ}$ C 15 s, 95 $^{\circ}$ C 15 s。采用 2^{- Δ ACT} 方法计算目的基因相对表达量。用 SPSS 20.0 软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 利用 Origin

6.0 对统计结果进行作图。

2 结果

2.1 转录组差异表达基因筛选

使用 Hiseq 2000 测序平台分析快长组与慢长组翘嘴鲈的转录组, 共获 41641 条 Unigene (平均长度为 902 nt), 经数字基因表达谱 DGE 分析, 筛选出 549 个表达量有显著差异 Unigene, 其中 310 个上调(图 1)。这 549 个 Unigene 中, 有 43 条目的 annotation 注释为肌球蛋白重链, 其中, 快长组与慢长组相比, 有 32 个显著上调, 11 个显著下调。

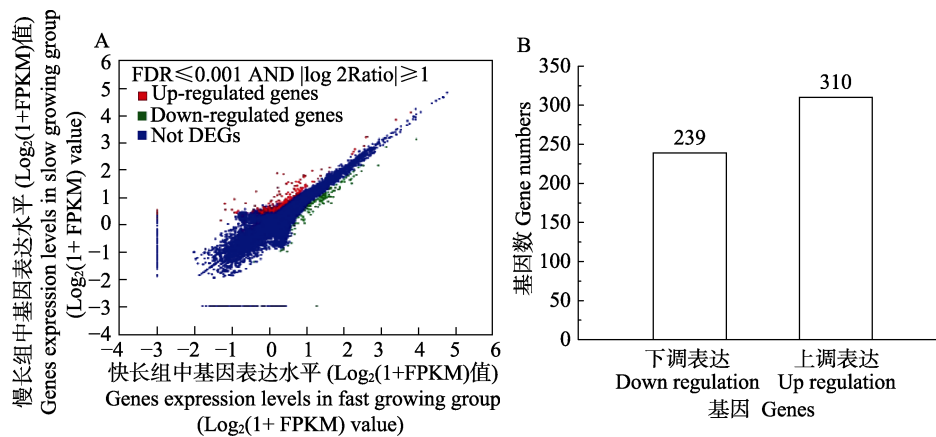


图 1 翘嘴鲈生长快、慢群体中差异表达基因分布

Fig.1 The distribution of differentially expressed genes in fast and slow growing groups of *S. chuatsi*

A: 所有的 Unigene 表达量分布; B: 表达量差异显著基因数统计

FDR: 错误发生率; FPKM: 每千个碱基的转录每百万映射读取的碎片, 表征表达量高低

A. The expression distribution of all unigenes; B. Genes number of significantly different expression

FDR: False discovery rate; FPKM: Fragments per kilobase of exon per million fragments mapped (represent the expression level)

2.2 翘嘴鲈肌球蛋白重链基因的克隆与序列结构分析

以 5'/3'RACE cDNA 为模板分别进行 5'/3'端 RACE, 获得 2 个 MYH 基因 cDNA 全长。NCBI BLAST 分析显示, 2 个基因均与 MYH-7 基因高度同源, 命名为 MYH-7a (以 Unigene9779_All 为模板, GenBank 登录号: KX085225)和 MYH-7b (以 CL2161.Contig6_All 为模板, GenBank 登录号: KX085226)亚型。MYH-7a 全长为 6071 bp, 5'UTR 为 107 bp, 3'UTR 为 143 bp; ORF 长为 5820 bp (109–5928), 编码 1939 个氨基酸, 推测分子量为 223 kDa, 等电点为 5.57。MYH-7b 全长为 5896 bp, 5'UTR 为 95 bp, 3'UTR 为 146 bp; ORF 长为 5745 bp (96–5840), 编码 1914 个氨基酸, 推测分子量为 220 kDa, 等电点为 5.62。二者核酸相似性为 83.71%, 氨基酸相似性为 89.12%。

核苷酸序列同源性比较显示, MYH-7a 与深裂眶

锯雀鲷(*Stegastes partitus*)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、斑马宫丽鱼(*Maylandia zebra*)、伯氏朴丽鱼(*Haplochromis burtoni*)、红丽鱼(*Pundamilia nyererei*)和红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)等的 MYH-7 的相似性极高, 均高于 90%。MYH-7b 与已报道的翘嘴鲈慢肌 MYH (KF601703.1)相似性最高(97%), 与大黄鱼(*Larimichthys crocea*) MYH-7 转录剪接体 1 和剪接体 2、布氏新亮丽鲷(*Neolamprologus brichardi*)、深裂眶锯雀鲷、斑马宫丽鱼和红丽鱼等的 MYH-7 的相似性均高于 90%。进一步与其他物种的 MYH-7a、MYH-7b 氨基酸序列推断的头区进行同源比对, 结果显示, 在头区中都有与“马达”功能相关的关键结构域 Loop1 和 Loop2 环。这 2 个 Loop 环区上各有 1 个 ATP 结合位点, 在氨基酸序列起始的 175 aa (MYH-7b 是 176)和 403 aa (MYH-7b 是 404)处还各有 1 个 ATP 结合位点(图 2)。

根据肌球蛋白重链头区氨基酸序列构建的系统

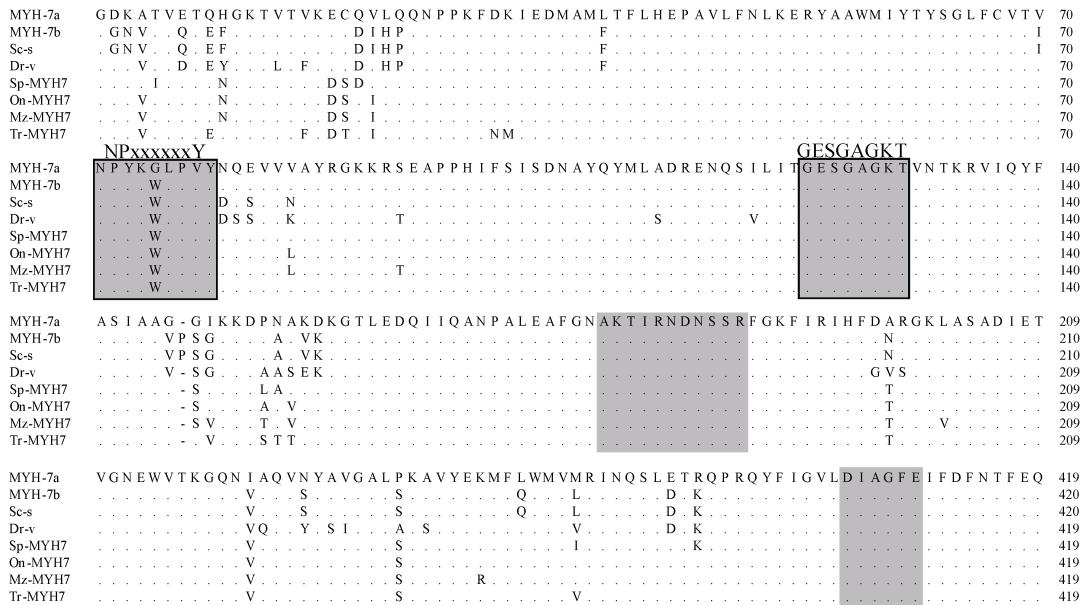


图 2 翘嘴鲌与其他鱼类 MYH-7s 的头区保守氨基酸位点的比对

Fig.2 Amino acid sequence alignments of the myosin head region of MYH-7s of *S. chuatsi* and other fish species

灰色区为 ATP 结合位点; 方框为 P-loop 环; 方框上为 loop 环的保守序列; Sc-s: 翘嘴鲌慢肌球蛋白重链亚型 1, AHB33632.1; Dr-v: 斑马鱼慢肌球蛋白亚型 1, AAI63721.1; Sp-MYH7: 深裂眶锯雀鲷 MYH-7, XP_008303539.1; On-MYH7: 尼罗罗非鱼 MYH-7, XP_013131789.1; Mz-MYH7: 斑马宫丽鱼 MYH-7, XP_012778396.1; Tr-MYH7: 红鳍东方鲀 MYH-7, XP_011614688.1

The gray regions represented ATP binding sites; the black box represented P-loop; the amino acids sequence above the box represented the conserved sequence of the P-loop; Sc-s: *S. chuatsi* slow skeletal muscle myosin heavy chain isoform 1, AHB33632.1; Dr-v: *D. rerio* slow myosin heavy chain 1, AAI63721.1; Sp-MYH7: *S. partitus* MYH-7, XP_008303539.1; On-MYH7: *O. niloticus* MYH-7, XP_013131789.1; Mz-MYH7: *M. zebra* MYH-7, XP_012778396.1; Tr-MYH7: *T. rubripes* MYH-7, XP_011614688.1

进化树, 形成快肌肌球蛋白重链组和慢肌(或心肌)肌球蛋白重链组两大分支。MYH-7a 先与红鳍东方鲀的 MYH-7 聚类, MYH-7b 则与鳊鱼、大黄鱼、短鳍花鲈(*Poecilia mexicana*)的慢肌球蛋白重链聚类, 二者同归慢肌球蛋白重链分支(图 3)。

2.3 蛋白理化性质及结构分析

采用 InterPro 分析蛋白结构域发现, MYH-7a 与 MYH-7b 主要结构域相似, 均可分为头区和尾区。头区均有一种选择性结合多脯氨酸配体的结构域 Src 同源区 3 (Src homology 3, SH3), 以及 MLC、钙调蛋白或 EF 手相蛋白超家族结合位点 IQ 基序(IQ motif)。

Predict Protein 分析发现, MYH-7a 和 MYH-7b 有相似的结构组成, 均有 77.2%的螺旋结构, 5.0%的直链, 17.8%的 loop 环(Loop), 未发现二硫键形成位点。2 个 MYH-7s 均在各自的 178–185 aa 处有 8 个氨基酸(GESGAGKT)为 ATP/GTP 结合活性位点 A [ATP/GTP-binding site motif A (P-loop)]; 942–971 aa 处 30 个氨基酸(KKRKLEDECSSELKDDIDLELTLAKV-EKEK)为核定位序列(Nuclear localization sequence,

NLS)。此外, MYH-7b 还在其 632–639 aa 处一段 8 个氨基酸(GGKGGKGGG)为核定位序列(图 4)。

进一步用 NLS Mapper 在线预测与 MYH-7a 相似性较高的伯氏朴丽鱼(XP_005938260.1)、斑马宫丽鱼(XP_012778396.1)和尼罗罗非鱼(XP_013131789.1)等的 MYH-7 序列, 以及与 MYH-7b 相似性较高的斑马宫丽鱼(XP_014266369.1)、非洲齿鲤(*Nothobranchius furzeri*)(XP_015812773.1)和斑马鱼(*Danio rerio*)(XP_009292203.1)等的 MYH-7 序列, 均在其 C 端对应位置找到 NLS 序列。

2.4 MYH-7s 基因的表达量变化分析

2.4.1 翘嘴鲌 MYH-7s 的表达验证 根据转录组数据计算 MYH-7a、MYH-7b 的 FPKM 值, 在快长组 2 个基因的表达量均显著高于慢长组($P < 0.01$)(图 5-A)。以用于转录组测序的同批 cDNA 为模板, qRT-PCR 检测验证这 2 个基因的表达量差异, 显示快长组表达量均显著高于慢长组(图 5-B)。qRT-PCR 结果与转录组差异表达谱分析结果一致。

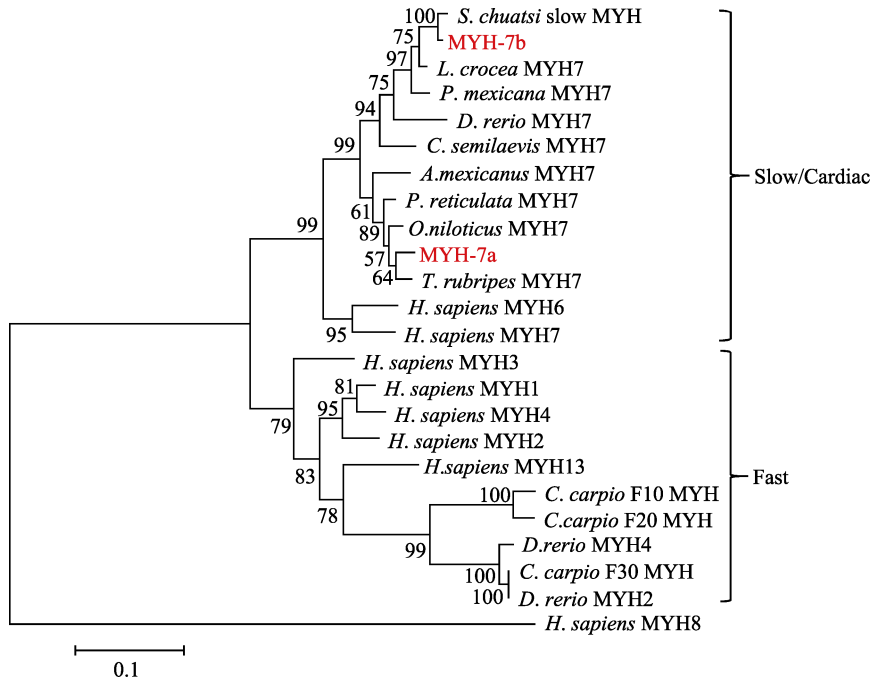


图 3 基于翘嘴鲌及其他物种 MYH-7s 头区序列的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree based on head domain amino acids of myosin of *S. chuatsi* and other species

图中氨基酸序列的物种名和相应的登录号分别为(The species and GenBank accession numbers of amino acid sequences were listed as follows): 翘嘴鲌慢肌 MYH (*S. chuatsi* slow MYH), KF601703.1; 大黄鱼 MYH-7 (*L. crocea* MYH-7), KKF11324.1; 短鳍花鲈 MYH-7 (*P. mexicana* MYH-7), XP_014864995.1; 半滑舌鲷 MYH-7 (*C. semilaevis* MYH-7), XP_008332930.1; 墨西哥脂鲤 MYH-7 (*A. mexicanus* MYH-7), XP_015456340.1; 网纹鲈 MYH-7 (*P. reticulata* MYH-7), XP_008431929.1; 尼罗罗非鱼 MYH-7 (*O. niloticus* MYH-7), XM_013276335.1; 红鳍东方鲀 MYH-7 (*T. rubripes* MYH-7), XM_011616386.1; 鲤 10℃、20℃、30℃ 适应型 MYH (*C. carpio* 10℃, 20℃, 30℃ acclimated MYH), D89990、D89991、D89992; 斑马鱼 MYH2、4、7 (*D. rerio* MYH2, 4, 7), NM_152982、AY921650、XP_009292203.1; 人 MYH 1-4, 6-8, 13 (*H. sapiens* MYH 1-4, 6-8, 13), AF111785、AF111784、NM_002470.3、AF11783、NM_002471、NM_000257、NM_002474、AF111782

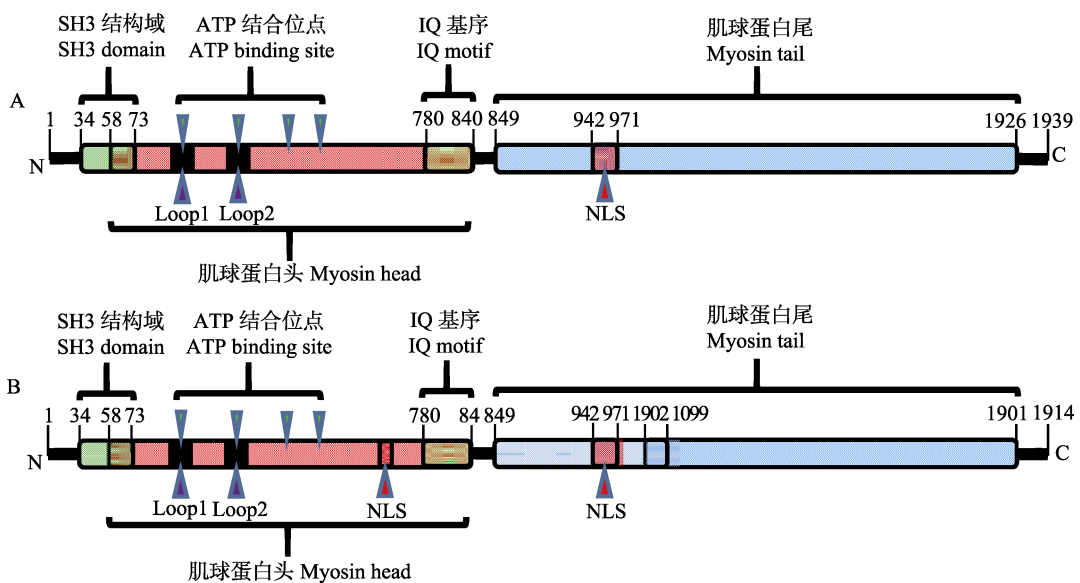


图 4 2 个翘嘴鲌 MYH-7s 氨基酸序列结构模式

Fig.4 Structure models of the two MYH-7s amino acid sequence of *S. chuatsi*

A: MYH-7a; B: MYH-7b

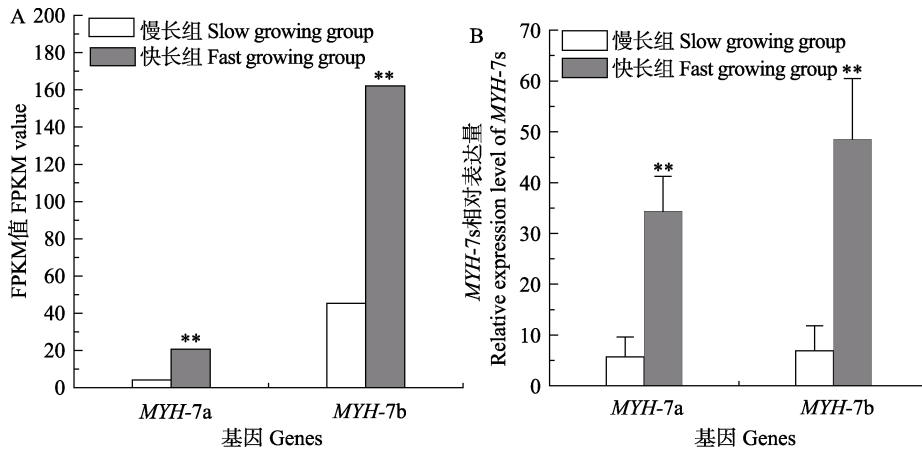


图 5 翘嘴鲈快长组和慢长组样本的 MYH-7s 表达量
Fig.5 Expression level of two MYH genes of *S. chuatsi* in fast and slow growing groups measured by transcriptome sequencing and qRT-PCR

A: 转录组测序; B: 实时荧光定量 PCR; **表示差异极显著($P<0.01$), 下同

A: Transcriptome sequencing; B: qRT-PCR; ** denoted highly significant difference ($P<0.01$), the same as below

2.4.2 翘嘴鲈 MYH-7s 在成鱼各组织中的表达 qRT-PCR 分析 2 个 MYH 基因在翘嘴鲈成鱼 14 个组织中的表达, 结果显示, MYH-7a 在心肌中表达量最高, 其次是红肌、眼和皮肤, 在肝、脾、肠和胃中低表达; MYH-7b 在红肌中表达量最高, 其次是皮肤、垂体和眼, 在鳃、性腺和心肌中低表达(图 6)。

况。MYH-7a 在未受精卵中有微量表达, 在尾芽期表达量明显上调, 并随着孵化出膜, 表达量不断增加。MYH-7b 在未受精卵中检测到表达, 从受精开始表达, 随着胚胎发育整体呈上升趋势(差异均不显著)。

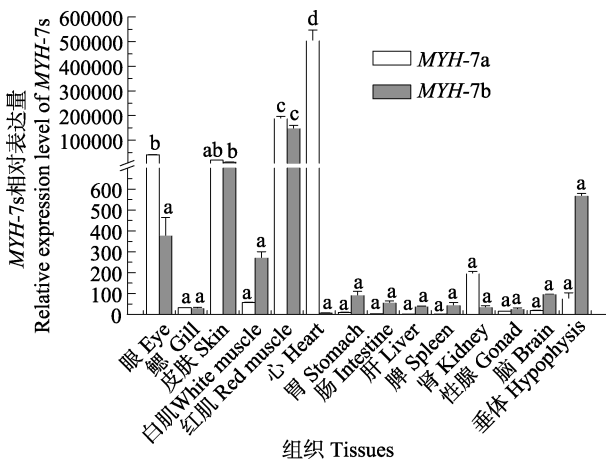


图 6 qRT-PCR 检测翘嘴鲈不同组织中 MYH-7s 的表达
Fig.6 qRT-PCR analysis of MYH-7s expression in tissues of adult *S. chuatsi*

同一基因中不同字母表示差异显著($P<0.05$), 相同字母表示差异不显著($P>0.05$), 下同

In the same gene expression feature, different letters represented significant difference ($P<0.05$), the same letter showed no significant difference ($P>0.05$), the same as below

2.4.3 翘嘴鲈 MYH-7s 在胚胎发育期的表达 图 7 显示在翘嘴鲈胚胎发育各时期 2 种 MYH-7s 的表达情

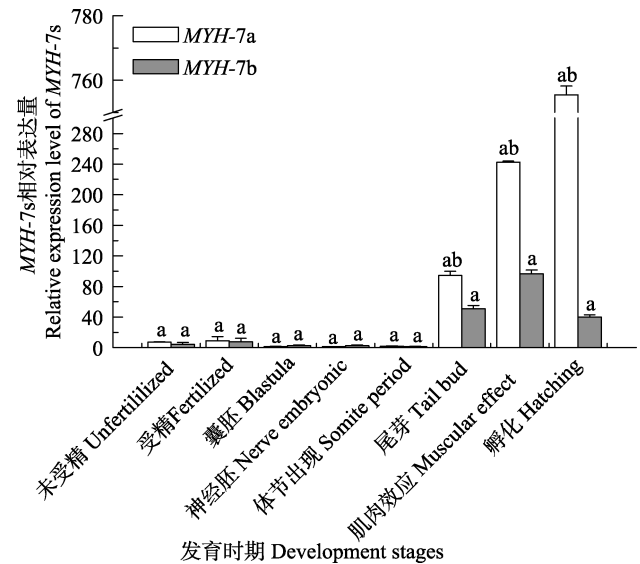


图 7 MYH-7s 在翘嘴鲈各发育时期中的表达水平
Fig.7 The expression levels of MYH-7s in *S. chuatsi* at different developing stages

2.4.4 MYH-7s 在翘嘴鲈早期生长阶段的表达情况 定量检测 2 个 MYH-7s 在孵化后 15、30 和 60 dph 快长组和慢长组的翘嘴鲈白肌中的表达, 2 个 MYH-7s 在 15 和 30 dph 快长组白肌中表达量均显著高于慢长组, 而到 60 dph 时, 快长组中的表达量均显著低于慢长组(图 8)。

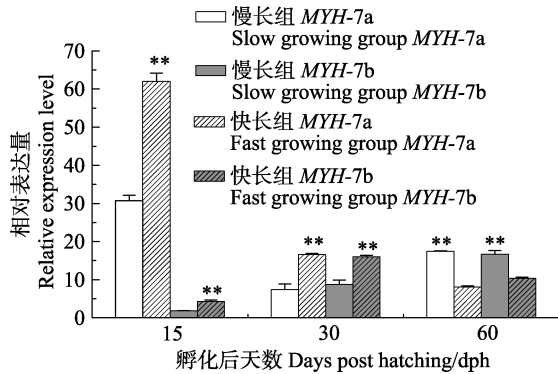


图8 孵化后不同生长时期的翘嘴鲈白肌中 MYH-7s 的表达

Fig.8 The expression pattern of MYH-7s in white muscle of *S. chuatsi* during different growth periods

3 讨论

3.1 翘嘴鲈 MYH-7s 蛋白结构分析

本研究克隆获得的翘嘴鲈 MYH-7a、MYH-7b 均具有 MYH 家族蛋白的典型结构:由头部和尾部组成,头部有 ATP 结合位点、Loop1 和 Loop2 环区以及头部末端的 IQ 基序等关键结构。MYH 主要由 N 端球状盘绕的头部和 C 端 α -螺旋型的尾部组成。头区是 Myosin 动力产生的主要区域,具有 ATP 酶活性位点,可与 ATP 结合,水解 ATP 为 ADP,释放能量,供头部迁移、滑动,是肌球蛋白“分子马达”功能的关键结构区,也是 MYH 家族中的重要保守区(Sebé-Pedrós *et al.*, 2014);头区的 2 个功能性表面环状结构 Loop1 和 Loop2, Loop1 表面环结构靠近 ATP 结合位点,决定肌纤维收缩速率和动力持续;Loop2 则可与肌动蛋白(actin)的非极性末端反应,影响 MYH 上由 actin 激活的 ATP 酶水解活性(Holmes *et al.*, 2002);IQ 基序是 MYH 与 MLC 以及钙调蛋白结合区,因其保守氨基酸 IQxxxRGxxxR(x 指任何一种氨基酸残基)的起始 2 个残基得名;Ca²⁺与 MYH 上 IQ 基序的结合可调节细胞定向运动(如肌细胞收缩),IQ 基序也是 MYH 家族蛋白的重要特征结构之一(Bähler *et al.*, 2002)。此外,在 2 个 MYH-7s 还发现 SH3 结构域和核定位序列等特殊结构。

SH3 是一种选择性结合多脯氨酸配体的结构域,在多种生物进程中有重要作用,包括分子内相互作用调节酶活性、调节信号通路中某些成员的局部浓度和亚细胞定位以及介导一些大型多重复合蛋白的组装,在低等的酵母菌到人等物种的数百种蛋白中广泛存在(Mayer, 2001)。含 SH3 结构的 MYH 可通过 SH3 与含有 Arp2/3 复合体和富脯氨酸区的蛋白结合,通

过其上的 Arp2/3 介导肌动蛋白丝的聚合,对细胞骨架维持和细胞的内吞作用等有重要作用(Okrut *et al.*, 2015)。酵母的 2 个 MYH1 亚型: Myo3p 和 Myo5p 的 SH3 结构域的缺失可导致肌动蛋白细胞骨架的严重缺陷(Evangelista *et al.*, 2000);鸡(*Gallus gallus*)胸肌中一种 MYH 的 SH3 可促进肌 ELC 的 N 端延伸与肌动蛋白结合,调节肌纤维运动(Lowey *et al.*, 2007)。SH3 是只在 MYH-1、2、4、7、15 等亚型中发现的特征结构之一(Sebé-Pedrós *et al.*, 2014)。本研究获得的 2 个翘嘴鲈 MYH-7s 均有 SH3 结构,其对细胞骨架维持和肌纤维运动等的功能尚待进一步研究。

核定位序列(NLS)作为蛋白质的一个结构域,与入核载体相互作用,使蛋白能被运进细胞核的特定位置发挥作用。已报道具有 NLS 的 MYH 有 NM1(myosin I C)、myosin VI、myosin X VI B 和 myosin X VIII B (Sobczak *et al.*, 2009)。本研究通过软件预测,在大多数鱼的 MYH-7 上也发现 NLS。Dzijak 等(2012)发现,在 NM1 的第 2 个 IQ 基序中,13 aa 的 GRRKAAKRK-WAAQ(754-766)是其必需的 NLS, NM1 可通过此结构进入细胞核,参与核内转录、染色质移动和染色质重塑等关键核运动。本研究所获得的 2 个 MYH-7s 的 C 端均有核定位序列,推测 MYH-7a、MYH-7b 蛋白也可能通过 NLS 入核参与核内运输与转录调控等过程,但具体作用还有待进一步研究验证。

3.2 翘嘴鲈 MYH-7s 基因的表达分析

MYH 具有组织和时期表达特异性。研究发现,MYH-7 主要在哺乳动物和鱼的胚胎、幼鱼期表达,在成体则主要是心室肌和慢肌中表达;而快肌中受甲状腺激素信号通路的抑制,表达量低(van Rooij *et al.*, 2009; Schiaffino *et al.*, 2015)。Spurgeon 等(2008)检测发现,人的 MYH-7 主要在心肌和慢肌中表达,在肠、脑、前列腺和睾丸中有一定表达。Ikeda 等(2007)将红鳍东方鲀基因组 DNA 序列与人 DNA 序列比较发现,红鳍东方鲀与人同源的 MYH-7 主要在慢肌、心肌和皮肤中高表达,此外也在眼、胚胎(168 hours post fertilization, hpf)和快肌中有表达。而 Akolkar 等(2010)在红鳍东方鲀成鱼快肌中未检测到 MYH-7 的表达,在外侧浅肌和深层的竖肌与降肌 2 种慢肌中有表达,在心肌中高表达。本研究中,MYH-7a、MYH-7b 在心肌、红肌等部位高表达,与上述 MYH-7 的组织分布情况相符。

Spurgeon 等(2008)发现,MYH-7 在人胎儿期的肝脏和肌肉中均有表达,且肌肉中表达量显著高于肝脏。在大鼠(*Rattus norvegicus*)和小鼠(*Mus musculus*)

胚胎发育中主要表达胚胎型的 *MYH-3*、神经型的 *MYH-8* 和慢肌型的 *MYH-7* (Schiaffino *et al*, 2015)。在小鼠胚胎发育中, 其 *MYH-7a* 在受精后第 9 天的胚胎期即见表达; 鸡的 *MYH-7* 则最早出现在神经分化早期(Schiaffino *et al*, 2015; Nguyen *et al*, 2015)。用 qRT-PCR 检测, 红鳍东方鲀 4–8 dph 的胚胎发育期均可见 *MYH-7* 表达, 幼鱼期的 8–16 dph 也有表达(Asaduzzaman *et al*, 2013)。在鲤中, 心肌型 *MYH* (也归为 *MYH-7*) 最早在 61 hph 检测到表达, 且随着胚胎发育表达量逐渐升高(Nihei *et al*, 2006)。本研究中, *MYH-7a*、*MYH-7b* 在未受精卵即有表达, 且随着胚胎发育, 表达量呈上升趋势, 提示 2 种 *MYH-7* 在翘嘴鲌胚胎发育过程具有重要作用。

MYH 基因从早期的慢型逐渐被快型 *MYH* 替代, 与动物早期生长有很大相关性。在大鼠早期发育中, 在出生几天后才能在腿部骨骼肌中检测到成体高表达的快肌型 *MYH* (*MYH-1*、2 和 4), 而在后续的几周内, 快肌型 *MYH* 大量表达并迅速替代胚胎型和慢型 *MYH* (*MYH-3*、7) (Schiaffino *et al*, 2015)。在小鼠 C2C12 成肌细胞系, 用低血清浓度诱导细胞分化, 首先表达 *MYH-7*、*MYH-3* 和 *MYH-8*, 3 种 *MYH* 在第 1 天即见表达, 到 2–4 d 达到峰值, 之后降低; 而快肌型的 *MYH-1* 和 *MYH-4* 在 2–4 d 才检测到表达, 但表达量不断增加(Brown *et al*, 2012)。鼠机体和细胞中这种 *MYH* 由慢型到快型的表达转变受甲状腺激素的调节(Soukup *et al*, 2015a)。在鱼类中, 特别是幼鱼生长阶段, *MYH* 快慢亚型表达量变化可能与肌肉类型在白肌(快肌)、红肌(慢肌)间的转变有关, 在斑马鱼、河鲈(*Perca fluviatilis*)幼鱼中均有发现(McGuigan *et al*, 2004)。Soukup 等(2015b)认为, 慢肌球蛋白在鱼胚胎期和幼鱼期表达量较高, 而随着鱼类生长, 身体其他部位的慢型 *MYH* 表达量逐渐降低, 被快型 *MYH* 取代, 而慢型 *MYH* 在成体慢肌存在的部位如心脏、红肌表达量持续增加。在孵化后 1 个月和 7 个月的鲤躯干肌肉中也能检测到 *MYH-7* 表达, 但 7 个月时的表达量低于 1 个月的(Nihei *et al*, 2006)。本研究结果显示, *MYH-7a*、*MYH-7b* 在孵化后 30–60 dph 的生长时期, 在白肌中表达量有明显的降低, 与鱼类中肌纤维由慢型向快型转变相符, 在对应时期中慢长组 *MYH-7* 表达量高于快长组, 说明 2 个 *MYH-7* 表达水平的变化与鱼生长进程以及生长速度有极大的相关性。

4 结论

本研究从翘嘴鲌快长组和慢长组的转录组差异

表达基因中筛选到 2 个 *MYH* Unigenes (*MYH-7a*、*MYH-7b*), 进行了 cDNA 序列克隆、结构分析以及 qRT-PCR 表达水平分析。这 2 个基因具有不同的组织分布, 在胚胎发育过程早期均有表达且随着发育的推进表达水平明显提高, *MYH-7a* 的表达量明显高于 *MYH-7b*; 在不同生长阶段的快长组与慢长组翘嘴鲌白肌中, 2 个基因的表达量在 15 dph 和 30 dph 快长组均显著高于慢长组, 而 60 dph 快长组显著低于慢长组。研究结果显示, 这 2 个基因在翘嘴鲌早期发育过程中发挥着重要的作用, 其表达量高低与翘嘴鲌生长快慢相关。

参 考 文 献

- Akolkar DB, Kinoshita S, Yasmin L, *et al*. Fibre type-specific expression patterns of myosin heavy chain genes in adult torafugu *Takifugu rubripes* muscles. *Journal of Experimental Biology*, 2010, 213(1): 137–145
- Asaduzzaman M, Ahammad AKS, Asakawa S, *et al*. 5'-flanking sequences of zebrafish fast myosin heavy chain genes regulate unique expression in the anterior, medial subsection and posterior tail somites of the skeletal muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2016, 191: 1–12
- Asaduzzaman MD, Akolkar DB, Kinoshita S, *et al*. The expression of multiple myosin heavy chain genes during skeletal muscle development of torafugu *Takifugu rubripes* embryos and larvae. *Gene*, 2013, 515(1): 144–154
- Bähler M, Rhoads A. Calmodulin signaling via the IQ motif. *FEBS Letters*, 2002, 513(1): 107–113
- Biga PR, Goetz FW. Zebrafish and giant danio as models for muscle growth: Determinate vs. indeterminate growth as determined by morphometric analysis. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2006, 291(5): R1327–R1337
- Brown DM, Parr T, Brameld JM. Myosin heavy chain mRNA isoforms are expressed in two distinct cohorts during C2C12 myogenesis. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 2012, 32(6): 383–390
- Campion LA, Choi S, Mistry HL, *et al*. Myosin heavy chain and parvalbumin expression in swimming and feeding muscles of *centrarchid* fishes: The molecular basis of the scaling of contractile properties. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2012, 163(2): 223–230
- Churova MV, Meshcheryakova OV, Veselov AE, *et al*. Activity of enzymes involved in the energy and carbohydrate metabolism and the level of some molecular-genetic characteristics in young salmon (*Salmo salar* L.) with

- different age and weight. *Russian Journal of Developmental Biology*, 2015, 46(5): 254–262
- Dhillon RS, Wang Y, Tufts BL. Using molecular tools to assess muscle growth in fish: Applications for aquaculture and fisheries management. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 2008, 148(4): 452
- Dzijak R, Yildirim S, Kahle M, *et al.* Specific nuclear localizing sequence directs two myosin isoforms to the cell nucleus in calmodulin-sensitive manner. *PLoS One*, 2012, 7(1): e30529
- van Rooij R, Quiat D, Johnson BA, *et al.* A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Developmental Cell*, 2009, 17(5): 662–673
- Evangelista M, Klebl BM, Tong AHY, *et al.* A role for myosin- I in actin assembly through interactions with Vrp1p, Bee1p, and the Arp2/3 complex. *Journal of Cell Biology*, 2000, 148(2): 353–362
- Hevrøy EM, Jordal AEO, Hordvik I, *et al.* Myosin heavy chain mRNA expression correlates higher with muscle protein accretion than growth in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, 2006, 252(2–4): 453–461
- Holmes JM, Whiteley NM, Magnay JL, *et al.* Comparison of the variable loop regions of myosin heavy chain genes from Antarctic and temperate isopods. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 131(3): 349–359
- Ikeda D, Ono Y, Snell P, *et al.* Divergent evolution of the myosin heavy chain gene family in fish and tetrapods: Evidence from comparative genomic analysis. *Physiological Genomics*, 2007, 32(1): 1–15
- Liu XL, Bin SY, Wang KZ, *et al.* Artificial propagation and embryonic development observation of mandarin fish. *Journal of Guangxi Normal University: Natural Science Edition*, 2013, 31(2): 100–106 [刘希良, 宾石玉, 王开卓, 等. 翘嘴鳊的人工繁殖与胚胎发育观察. *广西师范大学学报: 自然科学版*, 2013, 31(2): 100–106]
- Lowey S, Saraswat LD, Liu HJ, *et al.* Evidence for an interaction between the SH3 domain and the N-terminal extension of the essential light chain in class II myosins. *Journal of Molecular Biology*, 2007, 371(4): 902–913
- Mayer BJ. SH3 domains: Complexity in moderation. *Journal of Cell Science*, 2001, 114(7): 1253–1263
- McGuigan K, Phillips PC, Postlethwait JH. Evolution of sarcomeric myosin heavy chain genes: Evidence from fish. *Molecular Biology and Evolution*, 2004, 21(6): 1042–1056
- Mortazavi A, Williams BA, McCue K, *et al.* Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods*, 2008, 5(7): 621–628
- Nguyen K, Hall AL, Jones J M. Expression of myosin VIIA in the developing chick inner ear neurons. *Gene Expression Patterns*, 2015, 19(1): 36–44
- Nihei Y, Kobiyama A, Ikeda D, *et al.* Molecular cloning and mRNA expression analysis of carp embryonic, slow and cardiac myosin heavy chain isoforms. *Journal of Experimental Biology*, 2006, 209(1): 188–198
- Okrut J, Prakash S, Wu Q, *et al.* Allosteric N-WASP activation by an inter-SH3 domain linker in Nck. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015, 112(47): E6436–E6445
- Overturf K, Hardy RW. Myosin expression levels in trout muscle: A new method for monitoring specific growth rates for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) on varied planes of nutrition. *Aquaculture Research*, 2001, 32(4): 315–322
- Schiaffino S, Rossi AC, Smerdu V, *et al.* Developmental myosins: Expression patterns and functional significance. *Skeletal Muscle*, 2015, 5(1): 1–14
- Sebé-Pedrós A, Grau-Bové X, Richards TA, *et al.* Evolution and classification of myosins, a pan-eukaryotic whole-genome approach. *Genome Biology and Evolution*, 2014, 6(2): 290–305
- Sobczak M, Majewski Ł, Redowicz MJ. Myosins in nucleus. *Postepy Biochemii*, 2009, 55(2): 239–246
- Soukup T, Diallo M. Proportions of myosin heavy chain mRNAs, protein isoforms and fiber types in the slow and fast skeletal muscles are maintained after alterations of thyroid status in rats. *Physiological Research*, 2015a, 64(1): 111–118
- Soukup T, Smerdu V. Effect of altered innervation and thyroid hormones on myosin heavy chain expression and fiber type transitions: A mini-review. *Histochemistry and Cell Biology*, 2015b, 143(2): 123–130
- Spurgeon SL, Jones RC, Ramakrishnan R. High throughput gene expression measurement with real time PCR in a microfluidic dynamic array. *PLoS One*, 2008, 3(2): e1662
- Yasmin L, Kinoshita S, Asaduzzaman M, *et al.* A 5'-flanking region of embryonic-type myosin heavy chain gene, *MYH_{M743-2}*, from torafugu *Takifugu rubripes* regulates developmental muscle-specific expression. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2011, 6(1): 76–81
- Zhou RX, Meng T, Meng HB, *et al.* Selection of reference genes in transcription analysis of gene expression of the mandarin fish, *Siniperca chuatsi*. *Zoological Research*, 2010, 31(2): 141–146

cDNA Cloning and Analyses of Two Myosin Heavy Chain Isoforms of Mandarin Fish (*Siniperca chuatsi*) Based on Transcriptome Sequencing

CHEN Zhihang^{1,2}, DONG Junjian¹, SUN Chengfei¹, TIAN Yuanyuan¹, YE Xing^{1,2}①

(1. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380;
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract Myosin heavy chain (MYH) is the main component of the skeletal muscle thick filament. The expression levels of MYHs have significant influences on the formation of thick filaments and muscle development. To understand the roles of MYHs on growth during the early development of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*), the differentially expressed unigenes from the transcriptome sequencing data of the fast and slow growing fish were analyzed, and two highly expressed unigenes of *MYH* were screened. The full length cDNAs of these two *MYH*-7s, *MYH*-7a and *MYH*-7b were obtained by RACE method; they were 6070 bp and 5896 bp in length, with coding regions of 5820 bp and 5745 bp, respectively. Sequencing analysis showed that both *MYH*-7s contain the conserved regions such as Loop1 and Loop2, and ATP binding sites. The evolutionary tree clustering analysis showed that both *MYH*-7s genes belong to the slow muscle type *MYH*. The expression patterns of the two *MYH*-7s in different tissues were detected by qRT-PCR. The highest expression of *MYH*-7a was found in heart muscle while *MYH*-7b was highly expressed in red muscle. The expression levels of both *MYH*-7a and *MYH*-7b increased gradually in accordance with the embryonic development stages. The expression levels of the *MYH*-7s in the fast growing group were significantly higher than in the slow growing groups in 15, 30-day post hatching (dph), while both genes showed lower expression levels in fast growing group than in slow growing group in 60 dph. The different expression levels in tissues and early developmental stages of these two genes in the fast and slow growing groups suggested that they play important roles in the embryonic and early development of *S. chuatsi*.

Key words Mandarin fish (*Siniperca chuatsi*); Transcriptome sequencing; Myosin heavy chain; cDNA cloning; Expression analysis

① Corresponding author: YE Xing, E-mail: gzyexing@163.com

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)真、伪雄鱼群体表型和遗传性状分析*



李洪^{1,2} 田永胜^{1,4} 李祥孔^{1,3} 陈张帆¹ 宋莉妮^{1,2} 段会敏^{1,2}

- (1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 3. 大连海洋大学水产与生命学院 大连 116023;
4. 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 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)养殖群体中存在真雄鱼(ZZ)和伪雄鱼(ZW)现象,进行表型和遗传特征研究对其育种及优良苗种培育具有重要的意义。本研究以半滑舌鳎真、伪雄鱼群体及母系半同胞家系为研究对象,首先测定了性成熟半滑舌鳎的真、伪雄鱼群体的表型性状,对其性状进行了比较分析。结果显示,性成熟半滑舌鳎真、伪雄鱼的体重、全长、体长、体宽、头长、眼间距和眼径 7 个表型性状都存在极显著差异($P < 0.01$),伪雄鱼的生长速度比真雄鱼快。利用半滑舌鳎 22 对多态性微卫星标记,对 2 组半滑舌鳎真、伪雄鱼半同胞家系群体进行了遗传多样性分析。筛选出的 22 对引物扩增产物均具有多态性,4 个半同胞家系群体中共检测到 232 个等位基因,群体平均等位基因数(N_e)均大于平均有效等位基因数(N_e);平均观测杂合度(H_o)均小于平均期望杂合度(H_e);平均多态信息含量(PIC)分别为 0.4566、0.4254、0.5069、0.4795。22 个多态性位点在 4 个半同胞家系群体中分别有 3、3、4 和 5 个位点显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡。4 个半同胞家系群体间的 Nei's 遗传距离为 0.2101–0.5840,遗传相似性系数为 0.5577–0.8105。本研究表明,半滑舌鳎真、伪雄鱼在生长性状上存在明显差异,同母系的真、伪雄鱼半同胞家系群体间的遗传相似系数较高,遗传距离较小,遗传多样性指标相近。

关键词 半滑舌鳎;真雄鱼;伪雄鱼;表型性状;微卫星标记;遗传多样性

中图分类号 S961.2 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)03-0062-08

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)的性别决定机制为 ZW/ZZ 型(周丽青等, 2005),即雌性染色体核型为 ZW,雄性核型为 ZZ。半滑舌鳎还存在天然性逆转现象,ZW 雌性转化为生理雄性,即为伪雄鱼,性逆转的伪雄鱼(ZW)与正常雌鱼(ZW)交配会得到 75% 的雌性个体和 25% 的雄性个体(Chen *et al*, 2008)。同时,伪雄鱼后代中的雌性个体更易转化为伪雄鱼(陈松林等, 2013)。半滑舌鳎雌鱼生长速度是雄鱼的 4–6 倍,而养殖群体中雄性率可达 70%,雄鱼生长速度过慢会

导致半滑舌鳎养殖效益降低(Chen *et al*, 2009)。因此,开展养殖群体中半滑舌鳎真、伪雄鱼遗传性别鉴别及其后代性状的遗传评估具有重要的意义。

微卫星(Simple sequence repeat, SSR)是近年来发展迅速、应用广泛的分子标记之一,已被广泛应用于群体遗传结构分析、亲子鉴定、遗传图谱构建、QTL 定位等方面(Ferguson, 1994; Kocher *et al*, 1998; Daemen *et al*, 2001)。在半滑舌鳎群体遗传研究方面,常建波等(2011)利用微卫星标记对半滑舌鳎 4 个群体

* 国家自然科学基金项目(31372510)资助[This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31372510)]. 李洪, E-mail: 354294982@qq.com

① 通讯作者:田永胜,研究员, E-mail: tianys@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-03-04, 收修改稿日期: 2016-04-11

的遗传结构进行了分析,徐营等(2011)利用 24 对微卫星标记对半滑舌鲷的养殖群体和减数分裂雌核发育群体的遗传多样性进行了分析。此外,王美玉等(2012)通过检测半滑舌鲷半同胞家系的极端大群体和极端小群体,筛选出 12 个与全长、体高、体重相关的微卫星位点。但目前有关半滑舌鲷真、伪雄鱼的表型性状差异及其半同胞家系群体的遗传多样性未见报道。为此,本研究对半滑舌鲷性成熟真、伪雄鱼的表型性状进行了差异比较,同时以半滑舌鲷性成熟的雌鱼和真、伪雄鱼为材料建立真、伪雄鱼母系半同胞家系,采用微卫星标记对真、伪雄鱼半同胞家系群体的遗传结构进行了分析,为半滑舌鲷真、伪雄鱼种质资源分析以及半滑舌鲷选择育种提供一定的参考资料。

1 材料与方法

1.1 半滑舌鲷真、伪雄鱼群体的表型性状测定

实验所用性成熟半滑舌鲷亲鱼由山东海阳水产有限公司提供。实验测定了相同养殖条件下、同一池塘且相同孵化时间的 2 龄半滑舌鲷真雄鱼(20 尾)与伪雄鱼(12 尾)的体重、全长、体长、体宽、头长、眼间距、眼径、背鳍条数、腹鳍条数和臀鳍条数 10 个表型性状,其真、伪雄鱼的遗传性别采用半滑舌鲷微卫星标记 CseF382 进行鉴定(Chen *et al.*, 2007)。

1.2 半滑舌鲷真、伪雄鱼半同胞家系的建立和培育

利用 1.1 中筛选出的真、伪雄鱼进行家系的建立,从半滑舌鲷亲鱼中选取 2 尾 3+ 龄性成熟雌性个体(ZW♀)为母本,分别以 2 尾正常雄鱼(ZZ♂)和 2 尾伪雄鱼(ZW♂)为父本,分别建立 2 组母系半同胞家系。第 1 组半同胞家系是 108 号和 109 号家系,108 为正常雌鱼(ZW♀)×伪雄鱼(ZW♂)家系,109 为正常雌鱼(ZW♀)×正常雄鱼(ZZ♂)家系;第 2 组半同胞家系是 113 号和 114 号家系,113 为正常雌鱼(ZW♀)×伪雄鱼(ZW♂)家系,114 为正常雌鱼(ZW♀)×正常雄鱼(ZZ♂)家系。2 组母系半同胞家系子代在相同养殖条件下不同池塘中养殖培育。

1.3 样本采集和 DNA 提取

当家系鱼苗生长到 60 d 时,分别从 4 个半同胞家系采集 30 个个体肌肉样本,分别置于 1.5 ml 离心管中,加入无水乙醇,−20℃ 长期保存,用于提取 DNA。

采用标准酚-氯仿-异戊醇-酒精法提取基因组 DNA(Sambrook *et al.*, 1989)。1%的琼脂糖凝胶电泳和

核酸蛋白酶标仪检测提取 DNA 的质量和浓度,并将 DNA 浓度调整至 50 ng/μl, −20℃ 保存备用。

1.4 微卫星引物和 PCR 反应

参照半滑舌鲷遗传连锁图谱(Liao *et al.*, 2009; Sha *et al.*, 2011),在每个连锁群上各选取 2–3 个标记,21 个连锁群上共选取微卫星标记 50 个,由北京六合华大基因科技股份有限公司合成相应引物。实验所用试剂 10×*Taq* buffer、dNTPs、*Taq* 酶、DL2000 DNA Marker 以及 PBR 322/Msp I DNA Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司。

利用合成的 50 对引物对 4 个半同胞家系群体各 22 个个体的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,通过扩增出的目的条带多态性检测出其中 22 对引物具有多态性(表 1)。PCR 反应总体系(16 μl): 10×*Taq* buffer 1.6 μl, dNTPs (2 mmol/L) 0.8 μl, 模板 DNA 1.1 μl, 上下游引物(10 μmol/L)各 0.6 μl, *Taq* 酶(1 U) 0.15 μl, 加灭菌水至 16 μl。PCR 扩增反应程序: 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 30 s, 55–61℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共 40 个循环; 72℃ 延伸 7 min, 4℃ 保存。

1.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测和基因分型

将 PCR 扩增产物进行 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,电泳结束后参考 Cactano-Anolles 等(1997)报道的银染法对电泳凝胶进行染色,用相机照相保存,并记录基因型。

1.6 数据分析

用 SPSS 19.0 软件对半滑舌鲷真、伪雄鱼的表型性状采用独立样本 *t* 检验方法进行差异显著性分析。根据 PCR 扩增条带获得的基因型,利用 POPGEN32 (Nei, 1978)和 PIC-cal0.6(张涛等, 2009)软件进行统计分析。计算各家系群体内的平均等位基因数(Number of allele, N_a)、平均有效等位基因数(Effective number of allele, N_e)、平均观测杂合度(Observed heterozygosity, H_o)、平均期望杂合度(Expected heterozygosity, H_e)、多态信息含量(Polymorphism information content, PIC),以及群体间的遗传分化指数(*F*-statistics, F_{st})、Nei 氏遗传距离和遗传相似性,对各微卫星位点在每个家系群体中的哈迪-温伯格平衡(Hardy-Weinberg equilibrium, HWE)进行检验。Bonferroni 校正法(Rice, 1989)对 HWE 检验 *P* 值进行校正。用连锁不平衡检验软件进行微卫星位点间连锁不平衡分析。

表1 22对多态性微卫星引物信息
Tab.1 Information of twenty-two primer pairs of microsatellite markers

连锁群 Linkage	标记名称 Microsatellite marker name	退火温度 Annealing temperature (°C)	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
2	scaffold2104_64144	61	GGTTTGAAGTGATCTCTCAGTCTGG	ACGGCTCCTCCATTAATTACAGC
4	scaffold365_18009	55	TGTGGAATAAAAATATAAATACACCGC	TATGGACATTTATGTTTCATGCGA
5	scaffold170_8353	59	CACACGGGAAGTCACTATTCTTCA	CACTGAGGATGGATTTAGGCAGAT
6	scaffold3321_70434	59	TGAAGAAGCTTCAGTTGACAAACG	GGACTGAGCTGGAAAATGTCTGTT
8	scaffold767_34395	61	TTCAACTCCAGAAGATGTGCAGAC	AAACCTCTCTGATCCACCAGTACG
11	scaffold2585_68067	62	AGGGAGGAAGGCTAGTGAGAAGAG	AAGTGTAAGCCAAGGGGGTAAAG
11	scaffold1143_45424	60	CCTGCTTCATGGTGTCTTAGACT	GAAGTTCGAGAATCACTGATCAACAA
12	scaffold3931_70955	59	CTGATTTGGATTGACAGACGACAC	ACGACACTTTATGACGGCGTTTAT
14	scaffold224_10839	59	TCTGTGTGGGGTAAAATTGGAGTT	AGAGATGTATTCATGGCAGCAGGT
15	scaffold709_32811	59	GAAGAGAAGGATGCAACAAGAGGA	GCTGGATAGCAGGCATGTCTTAAT
18	scaffold414_19940	60	GGCTGTAAATCTGGTCACAGCACT	CAGATAATTGGTCCCCTGAAAACC
4	scaffold079499	58	CTTCTCCTGATGGAAGGTTCTGA	ACCTGCAGCCTCCTATCATC
18	scaffold1054_43419	59	CAGCAGTAGGTTGTTTGTCTTTGC	GGAGACACTTTGATGGATGGATCT
12	scaffold1785_59319	59	GTGAGTGTGTTGTGTTTGGAAAGC	TTCACATTCCTCCCTTTACTCGTC
11	scaffold426_14789	60	GCTTGACTTTAGGGCGAGG	AAGATGACGGATGGATGGTTCA
9	scaffold363_12291	58	GTTCTGGGTTAAAGGGTTGG	TGACTGCACTGATGGATAAGCA
18	scaffold4451_1100	60	CTGACGACCAGAGAACAGA	CTGTTGGACGTCATTGAACAT
19	scaffold1170_46055	60	CCCAGAAATGAGACAAGACGAGAT	TGTCCTCCGAGATGAGAGACAAG
19	scaffold2495_67575	60	TTCTCCATCGAAGATTGGCTTTAG	GAGGGAGAGGTTTGTCTGGATAAGT
20	scaffold2841_69827	60	GCATGTTACTACAGTGCTCTGGGA	TTGCAGTCAATGTGAAAACAGTCA
20	scaffold1797_59428	60	GCGATTAATGATAATCCGCCATA	GAGTGTCTGTTTAGGACGATGTCTG
6	scaffold954_39899	59	TGAGGAGCAGGTTGTTGATGTAAA	CCTTGATCCTGAGTGAGATGATGA

2 结果

2.1 半滑舌鲷真、伪雄鱼表型性状分析

半滑舌鲷真、伪雄鱼表型性状的差异分析结果见表2, 半滑舌鲷真、伪雄鱼的体重、全长、体长、体宽、头长、眼间距和眼径7个表型性状存在极显著差异($P < 0.01$), 显著性的差异性状占15个表型性状的46.67%; 背鳍条数、腹鳍条数和臀鳍条数3个表型性状以及全长/体长、体长/头长、体长/体宽、体长/眼间距和眼间距/眼径5个比例性状差异不显著($P > 0.05$)。对7个表型性状的差异比较显示, 半滑舌鲷伪雄鱼的生长速度快于真雄鱼, 但真、伪雄鱼间的比例性状无显著差异(表2)。

2.2 微卫星扩增图谱

在22对多态性引物扩增结果中, 引物 scaffold-079499 在4个半同胞家系群体中的扩增结果见图1。从图1可以看出, 相同引物伪雄鱼个体扩增出的目的条带多态性高于真雄鱼。

2.3 4个家系群体的遗传多样性与分化

根据PCR扩增条带获得的基因型, 对4个家系群体的遗传多样性进行分析。结果如表3所示, 4个半同胞家系群体的平均有效等位基因数(N_e)为2.2524–2.4714, 平均观测杂合度(H_o)为0.2690–0.3160, 平均期望杂合度(H_e)为0.5040–0.5467, 平均多态信息含量(PIC)为0.4254–0.5069; Shannon's 信息指数 I 为0.8040–0.8789, 从表3可看出, 108与109、113与114号家系间的各遗传多样性指标彼此相近。

对22个微卫星位点在不同家系群体中的HWE进行了检验。分析发现, 在108和109、113和114家系群体中分别有3和3、4和5个微卫星位点显著偏离HWE; 整体上, 在4个半同胞家系群体中, 除scaffold2104_64144、scaffold365_18009、scaffold3321_70434、scaffold767_34395、scaffold4451_1100、scaffold2495_67575、scaffold2841_69827、scaffold1797_59428符合HWE外, 其他14个位点均偏离HWE(表4), 连锁不平衡检测表明, 22个多态性位点之间不存在连锁不平

表 2 半滑舌鳎真、伪雄鱼表型性状的比较
Tab.2 Comparison of phenotypic traits between ZZ males and ZW males of *C. semilaevis*

性状 Traits	平均值±标准差(Mean±SD)		变化范围 Variation range	
	伪雄鱼 ZW	真雄鱼 ZZ	伪雄鱼 ZW	真雄鱼 ZZ
体重 Body weight (g)	427.85±133.01 ^a	278.47±51.47 ^b	274.4–748.0	189.2–360.8
全长 Full length (cm)	41.80±4.60 ^a	36.20±2.00 ^b	32.8–49.8	33.4–40.1
体长 Body length (cm)	40.53±4.40 ^a	34.67±1.79 ^b	32.2–48.1	32.0–38.6
体宽 Body width (cm)	10.58±1.00 ^a	8.77±0.56 ^b	9.0–12.7	7.7–9.8
头长 Head length (cm)	8.49±0.67 ^a	7.06±0.39 ^b	7.0–9.4	6.5–7.8
眼间距 Eye spacing (cm)	0.48±0.07 ^a	0.42±0.04 ^b	0.4–0.6	0.4–0.5
眼径 Eye diameter (cm)	0.58±0.05 ^a	0.50±0.00 ^b	0.5–0.6	0.5–0.5
背鳍条数 Dorsal fin ray number	125.50±10.80	125.80±8.30	114.0–145.0	111.0–144.0
腹鳍条数 Pelvic fin ray number	3.90±0.30	3.80±0.90	3.0–4.0	4.0–4.0
臀鳍条数 Anal fin ray number	101.90±17.20	109.30±15.20	79.0–126.0	88.0–130.0
全长/体长 Full length/Body length	1.03±0.03	1.04±0.01	1.0–1.1	1.0–1.1
体长/体宽 Body length/Body width	3.83±0.28	3.96±0.22	4.3–5.2	4.6–5.2
体长/头长 Body length/Head length	4.77±0.27	4.92±0.19	3.3–4.2	3.6–4.4
体长/眼间距 Body length/Eye spacing	84.70±9.22	84.05±7.51	67.8–100.5	64.6–96.5
眼间距/眼径 Eye spacing/Eye diameter	0.85±0.14	0.83±0.07	0.7–1.2	0.8–1.0

注: 不同字母表示差异极显著($P<0.01$)

Note: Different letters represented highly significant difference ($P<0.01$)

衡现象。

对 4 个半同胞家系群体两两之间在 22 个多态性位点的群体分化指数进行了计算(表 5), 22 个微卫星位点计算的 2 组同母系半同胞家系间的遗传分化指数(F_{st})平均值分别为 0.1211 和 0.0782; 不同母系家系间的 F_{st} 平均值在 0.1448–0.1737 之间, 这表明同母系的半同胞家系间的遗传分化程度低于不同母系家

系间的遗传分化程度。

表 3 4 个半滑舌鳎家系群体基于 22 个微卫星位点的遗传多样性指标

Tab.3 Genetic diversity indices for four family populations of *C. semilaevis* as revealed by twenty-two microsatellite loci

家系群体 Family populations	N_a	N_e	H_o	H_e	PIC	I
108	2.5909	2.2524	0.3160	0.5172	0.4566	0.8220
109	2.5455	2.2766	0.3699	0.5040	0.4254	0.8040
113	2.7727	2.4714	0.2810	0.5323	0.5069	0.8789
114	2.6818	2.3952	0.2690	0.5467	0.4795	0.8691

2.4 4 个家系群体间的遗传距离和遗传相似性系数

半同胞家系 108 与 109、113 与 114 间的遗传距离分别为 0.3215、0.2101, 低于 108 与 113、114 以及 109 与 113、114 家系群体间的遗传距离(0.4261–0.5840), 而半同胞家系 108 与 109、113 与 114 间的遗传相似性系数分别为 0.7250、0.8105, 高于 108 与 113、114 以及 109 与 113、114 家系群体间的遗传相似性系数(0.5577–0.6530)(表 6), 表明同母系的半滑舌鳎真伪雄鱼半同胞家系间存在较低的遗传距离和较高的遗传相似度。

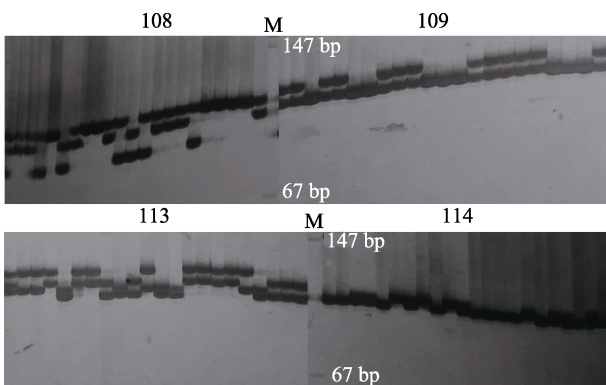


图 1 引物 scaffold079499 在 4 个半同胞家系群体中的扩增结果

Fig.1 The bands amplified by primer scaffold079499 in four half-sib family populations

M: PBR 322/Msp I DNA 分子量标准; 108、113: 伪雄鱼家系群体; 109、114: 真雄鱼家系群体
M: PBR 322/Msp I DNA Marker; 108, 113: ZW male family groups; 109, 114: ZZ male family populations

表 4 4 个半滑舌鲷家系群体中 22 个微卫星位点的哈迪-温伯格平衡检验
Tab.4 The probability of Hardy-Weinberg equilibrium of 22 microsatellite loci between four family populations of *C. semilaevis*

微卫星位点 Microsatellite loci	哈迪-温伯格平衡检验 P 值 Hardy-Weinberg equilibrium (P)				
	108	109	113	114	Total
scaffold2104_64144	0.0048	0.3340	0.0018	0.3395	0.0241
scaffold365_18009	0.2762	0.0642	0.0926	0.1362	0.0379
scaffold170_8353	0.0018	0.0946	0.7509	0.1391	0.0000*
scaffold3321_70434	0.2138	0.0933	0.0946	0.0001*	0.0005
scaffold767_34395	0.1391	0.0010	0.1943	0.0946	0.1043
scaffold2585_68067	0.1391	0.0001*	0.0001*	0.0361	0.0000*
scaffold1143_45424	/	0.3847	0.5945	0.0815	0.0000*
scaffold3931_70955	0.2632	0.0309	/	0.0309	0.0000*
scaffold224_10839	0.0098	0.8473	0.0292	0.0192	0.0004*
scaffold709_32811	0.0427	0.2153	0.0037	0.0002*	0.0000*
scaffold414_19940	0.0003*	0.0020	0.2153	0.0048	0.0000*
scaffold079499	0.2153	0.0620	0.0001*	0.0000*	0.0001*
scaffold1054_43419	0.4605	0.0861	/	0.0148	0.0000*
scaffold1785_59319	0.0605	/	0.0011	0.0355	0.0000*
scaffold426_14789	0.0001*	0.0000*	0.0427	0.0043	0.0000*
scaffold363_12291	0.0129	0.0018	0.0001*	0.0000*	0.0000*
scaffold4451_1100	0.5048	0.0605	0.0016	0.1391	0.0163
scaffold1170_46055	0.0000*	/	0.0001	0.0001*	0.0000*
scaffold2495_67575	0.0438	0.1391	0.0605	0.0168	0.6410
scaffold2841_69827	0.2213	0.0882	0.2278	0.4502	0.1511
scaffold1797_59428	0.2597	0.0001*	0.1043	0.0007	0.0022
scaffold954_39899	0.6706	0.0430	0.4158	/	0.0000*

“/”表示单态位点；*表示经过 Bonferroni 校正后显著偏离 HWE ($\alpha=0.05$)

“/” indicated a monomorphic locus; * indicated significant deviation from HWE after Bonferroni correction ($\alpha=0.05$)

3 讨论

半滑舌鲷养殖群体中,发现有一定数量的伪雄鱼(即遗传性别为雌性,生理性别为雄性)(季相山等, 2010), 这表明半滑舌鲷养殖群体中有两种雄鱼:一种为真雄鱼,另一种为伪雄鱼,伪雄鱼的存在大大降低了半滑舌鲷养殖群体中的雌性比例,进而对半滑舌鲷养殖生产产生不良影响。早前有报道指出,温度能够影响半滑舌鲷性别控制和性别分化机制(邓思平等, 2007);之后,半滑舌鲷人工诱导雌核发育技术获得了成功(Chen *et al*, 2009),并筛选出了其遗传性别鉴定微卫星标记 CseF783(马洪雨等, 2009),这说明半滑舌鲷在其性别控制、性别标记的筛选与应用等方面的研究已有一定进展,但目前还无法从遗传上控制养殖群体中雄鱼数量太多造成的生产效益低下的现象,因此,开展半滑舌鲷真、伪雄鱼生物学及遗传性状的研究具有重要意义。

表型性状是判断一个物种或品种区别于其他品种最直观的特征,对于鱼类育种群体的筛选和应用可提供直观信息。本研究对生长期相同的 2 龄半滑舌鲷

真、伪雄鱼群体 15 个生物学性状进行测量和比较分析,发现真、伪雄鱼的比例性状之间无显著性差异,这说明半滑舌鲷真、伪雄鱼的体型相似;而伪雄鱼体重、全长、体长、体宽、头长、眼间距和眼径 7 个性状的平均值显著大于真雄鱼,这为半滑舌鲷真、伪雄鱼的直观判别与筛选提供了可靠的表型性状。

遗传多样性是鱼类生物多样性的的重要组成部分,它是衡量生物所携带遗传信息的变异程度,而 DNA 是遗传信息的载体,所以 DNA 的变化可直接反映物种遗传变异程度。微卫星标记是研究群体遗传多样性的有效标记(林能峰等, 2008),一般用有效等位基因数、杂合度及多态信息含量等指标来衡量遗传标记的多态性程度及其应用价值(吴旭东等, 2011),其中,杂合度是度量群体遗传变异的一个最适参数(Valizadeh *et al*, 1996),它可以反映群体遗传多样性高低,平均期望杂合度值越高,群体遗传一致性越低,其遗传多样性越丰富(谭杰等, 2007)。本研究发现,半滑舌鲷真、伪雄鱼同母系的半同胞家系群体间的遗传多样性参数相近,而不同母系的半同胞家系群体间的遗传多样性参数略有差异。4 个半同胞家系群体的平均期望杂合度

表 5 4 个半滑舌鲷家系群体两两之间 22 个微卫星位点的遗传分化指数(F_{st})
Tab.5 Pair-wise comparison of the genetic differentiation index (F_{st}) of 22 microsatellite loci between four family populations of *C. semilaevis*

微卫星位点 Microsatellite loci	遗传分化指数 F_{st}					
	108 and 109	113 and 114	108 and 113	108 and 114	109 and 113	109 and 114
scaffold2104_64144	0.1429	0.0495	0.1346	0.0311	0.1918	0.0835
scaffold365_18009	0.0436	0.2258	0.5221	0.1544	0.5244	0.1993
scaffold170_8353	0.1733	0.0490	0.1629	0.0574	0.4022	0.2240
scaffold3321_70434	0.3333	0.0410	0.0723	0.1429	0.2339	0.2308
scaffold767_34395	0.0565	0.1447	0.1349	0.1686	0.0217	0.0979
scaffold2585_68067	0.1131	0.0969	0.0568	0.2284	0.0897	0.3373
scaffold1143_45424	0.0095	0.0670	0.0847	0.0185	0.0408	0.0128
scaffold3931_70955	0.0012	0.0252	0.0324	0.0625	0.0395	0.0670
scaffold224_10839	0.0526	0.1447	0.1722	0.1447	0.1020	0.0629
scaffold709_32811	0.1201	0.0601	0.1770	0.1314	0.0507	0.0336
scaffold414_19940	0.0084	0.0486	0.1380	0.1098	0.2070	0.1579
scaffold079499	0.0112	0.0410	0.0013	0.0506	0.0124	0.0285
scaffold1054_43419	0.0169	0.0379	0.1740	0.0682	0.0877	0.0194
scaffold1785_59319	0.1289	0.0667	0.0930	0.1597	0.3809	0.4432
scaffold426_14789	0.0518	0.2571	0.4667	0.0518	0.2571	0.0000
scaffold363_12291	0.2250	0.1076	0.0691	0.0953	0.1737	0.3581
scaffold4451_1100	0.0038	0.0429	0.0388	0.0953	0.0194	0.0778
scaffold1170_46055	0.2077	0.0264	0.2163	0.1015	0.0004	0.0225
scaffold2495_67575	0.1241	0.0028	0.0007	0.0007	0.1325	0.1167
scaffold2841_69827	0.2491	0.0864	0.5509	0.8182	0.0875	0.2727
scaffold1797_59428	0.1554	0.1511	0.0632	0.2827	0.1108	0.3511
scaffold954_39899	0.7021	0.0924	0.7959	0.6610	0.0076	0.0820
平均值 Mean	0.1211	0.0782	0.1737	0.1599	0.1448	0.1482

表 6 4 个家系群体间的 Nei's 遗传距离(对角线下)
和遗传相似性系数(对角线上)

Tab.6 Nei's genetic distances (below diagonal) and genetic identities (above diagonal) among four family populations of *C. semilaevis*

家系群体 Family populations	108	109	113	114
108	—	0.7250	0.5577	0.5872
109	0.3215	—	0.6530	0.6339
113	0.5840	0.4261	—	0.8105
114	0.5323	0.4559	0.2101	—

低于徐营等(2011)报道的半滑舌鲷养殖群体和减数分裂雌核发育群体的平均期望杂合度 0.7303 和 0.5608, 表明人工选育的半滑舌鲷半同胞家系群体的遗传多样性下降。多态信息含量(PIC)是指一个后代所获得的某个等位基因标记来自它亲代的同一个等位标记的可能性大小, 平均多态信息含量是衡量等位基因片段多态性的理想指标。Botstein 等(1980)提出了衡量基因变异程度高低的的多态信息含量指标, $PIC < 0.25$

为低度多态, $0.25 < PIC < 0.50$ 为中度多态, $PIC > 0.5$ 为高度多态。本研究中 4 个半同胞家系群体的平均多态信息含量分别为 0.4566、0.4254、0.5069、0.4795, 表明 4 个群体的遗传多样性处于中等水平。但与已报道的半滑舌鲷养殖群体的遗传多样性相比(徐营等, 2011), 半滑舌鲷真、伪雄鱼母系半同胞家系群体的遗传多样性明显下降。依据 Allendorf (1986)的研究, 群体遗传多样性每丧失 10%, 就会对其繁育能力、存活率、生长等重要性状产生很大的负面影响。

遗传距离是衡量群体间遗传变异程度的重要参数。群体间亲缘关系越近, 则遗传变异性越低, 相似系数值越大, 遗传距离越小(邵长伟等, 2009)。本研究中的半滑舌鲷真、伪雄鱼同母系的 2 组半同胞家系群体间的遗传距离为 0.2101–0.3215, 小于不同母系的 2 组家系群体间遗传距离 0.4261–0.5840, 这一点与人工养殖选育密切相关, 随着遗传多样性的减少, 群体间的遗传距离逐渐变小。

Wright (1951)对遗传分化系数(F_{st})大小与分化程

度的关系进行了界定：分化系数在 0–0.05 之间表示群体间分化很弱，0.05–0.15 之间表示分化中等，0.15–0.25 之间表示分化较大，大于 0.25 表示分化极大。本研究中的 4 个半滑舌鳎真、伪雄鱼母系半同胞家系群体间存在中等以上的遗传分化，这与半滑舌鳎群体中真、伪雄鱼个体生长性状存在较大的差异有密切关系。

本研究表明，半滑舌鳎真、伪雄鱼在生长性状上具有显著差异，同母本的真、伪雄鱼半同胞家系之间的遗传距离与遗传分化指数也显示真、伪雄鱼群体之间产生了一定程度的遗传分化。但其有效等位基因数、杂合度、多态信息含量、Shannon's 信息指数等遗传指标未出现显著性差异，表明半滑舌鳎真、伪雄鱼群体在遗传上存在一定的遗传分化，但其基本的遗传特征是稳定的。这也从另一个侧面说明了半滑舌鳎群体中同时存在真、伪雄鱼，而且能够稳定遗传的原因。关于这一奇特的遗传现象是遗传因素还是环境因素引起的，还有待于进一步深入研究。

参 考 文 献

- Allendorf FW. Genetic drift and the loss of alleles versus heterozygosity. *Zoo Biology*, 1986, 5(2): 181–190
- Botstein D, White RL, Skolnick M, *et al.* Construction of a genetic linkage map in man-using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32(3): 314–331
- Caetano-Anolles G, Bassam BJ, Gresshoff PM. DNA silver staining. *Biotechnology Advances*, 1997, 15(1): 175
- Chang JB, Lei GG, Li ZB, *et al.* The genetic structures of wild and cultivated populations of *Cynoglossus semilaevis*. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 2011, 42(1): 114–118 [常建波, 雷光高, 黎中宝, 等. 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)群体遗传结构的研究. *海洋与湖沼*, 2011, 42(1): 114–118]
- Chen SL, Deng SP, Ma HY, *et al.* Molecular marker-assisted sex control in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Aquaculture*, 2008, 283(1–4): 7–12
- Chen SL, Li J, Deng SP, *et al.* Isolation of female-specific AFLP markers and molecular identification of genetic sex in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Marine Biotechnology*, 2007, 9(2): 273–280
- Chen SL, Li YZ, Zhang J, *et al.* Selection of the families with high growth rate and high female proportion in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(4): 481–488 [陈松林, 李仰真, 张静, 等. 半滑舌鳎快速生长及高雌性家系的筛选. *水产学报*, 2013, 37(4): 481–488]
- Chen SL, Tian YS, Yang JF, *et al.* Artificial gynogenesis and sex determination in the half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Marine Biotechnology*, 2009, 11(2): 243–251
- Daemen E, Cross T, Ollevier F, *et al.* Analysis of the genetic structure of European eel (*Anguilla anguilla*) using microsatellite DNA and mtDNA markers. *Marine Biology*, 2001, 139(4): 755–764
- Deng SP, Chen SL, Tian YS, *et al.* Gonadal differentiation and effects of temperature on sex determination in half-smooth tongue sole, *Cynoglossus semilaevis*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, 14(5): 714–719 [邓思平, 陈松林, 田永胜, 等. 半滑舌鳎的性腺分化和温度对性别决定的影响. *中国水产科学*, 2007, 14(5): 714–719]
- Ferguson A. Molecular genetics in fisheries: Current and future perspective. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 1994, 4(3): 379–383
- Ji XS, Chen SL, Ma HY, *et al.* Natural sex reversal of female *Cynoglossus semilaevis* in rearing populations. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(2): 322–327 [季相山, 陈松林, 马洪雨, 等. 半滑舌鳎养殖群体中自然性逆转伪雄鱼的发现. *水产学报*, 2010, 34(2): 322–327]
- Kocher TD, Lee WJ, Sobolewski AH, *et al.* A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Genetics*, 1998, 148(3): 1225–1232
- Liao XL, Ma HY, Xu GB, *et al.* Construction of a genetic linkage map and mapping of a female specific DNA marker in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Marine Biotechnology*, 2009, 11(6): 699–709
- Lin NF, Su YQ, Ding SX, *et al.* Cross-species amplification of microsatellite markers from *Pseudosciaena crocea* in Sciaenidae. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2008, 15(2): 237–243 [林能峰, 苏永全, 丁少雄, 等. 大黄鱼微卫星标记引物在石首鱼科几个近缘种中的通用性研究. *中国水产科学*, 2008, 15(2): 237–243]
- Ma HY, Chen SL, Li J, *et al.* Development of female-specific AFLP marker CseF783 and its application in genetic sex identification in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Hereditas*, 2009, 31(1): 88–94 [马洪雨, 陈松林, 李静, 等. 半滑舌鳎雌性特异 AFLP 标记 CseF783 的克隆及其在遗传性别鉴定中的应用. *遗传*, 2009, 31(1): 88–94]
- Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 1978, 89(3): 583–590
- Rice WR. Analyzing tables of statistical test. *Evolution*, 1989, 43(1): 223–225
- Sambrook J, Maniatis TE, Fritsch EF. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 468–470
- Sha ZX, Luo XH, Liao XL, *et al.* Development and characterization of 60 novel EST-SSR markers in half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis*. *Journal of Fish Biology*, 2011, 78(1): 322–331
- Shao CW, Liao XL, Tian YS, *et al.* Microsatellite marker analysis of genetic structures of three populations of cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, 30(1): 41–46 [邵长伟, 廖小林, 田永胜, 等. 牙鲆 3 个养殖群体遗传结构的微卫星分析. *渔业科学进展*, 2009, 30(1): 41–46]
- Tan J, Sun HL, Liu P, *et al.* Microsatellites analysis of genetic variation between natural and culture populations of *Apostichopus japonicus*. *Marine Fisheries Research*, 2007, 28(3): 38–43 [谭杰, 孙慧玲, 刘萍, 等. 仿刺参自然群体和养殖群体间遗传变异的微卫星标记研究. *海洋水产研*

- 究, 2007, 28(3): 38–43]
- Valizadeh M, Kang K, Kanno A, *et al.* Analysis of genetic distance among nine *Medicago* species by using DNA polymorphisms. *Breeding Science*, 1996, 46(1): 7–10
- Wang MY, Liu HJ. Correlation analysis between growth-related traits and microsatellite markers in half smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Marine Fisheries*, 2012, 34(2): 121–129 [王美玉, 刘海金. 半滑舌鲷生长性状的微卫星标记筛选. *海洋渔业*, 2012, 34(2): 121–129]
- Wright S. Genetical structure of populations. *Annals Eugenics*, 1951, 15(4): 323–354
- Wu XD, Lian ZQ, Hou YX, *et al.* Application analysis of microsatellite markers from *Silurus meriaionalis* on three species of Siluriformes. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, 35(4): 638–645 [吴旭东, 连总强, 侯玉霞, 等. 大口鲶微卫星标记在三个鲶形目鱼类种群间适用性研究. *水生生物学报*, 2011, 35(4): 638–645]
- Xu Y, Shao CW, Deng H, *et al.* Genetic analysis of cultured and gynogenetic stocks of half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* by using SSR markers. *Progress in Fishery Sciences*, 2011, 32(4): 14–19 [徐营, 邵长伟, 邓寒, 等. 半滑舌鲷养殖群体和减数分裂雌核发育群体的微卫星标记遗传多样性分析. *渔业科学进展*, 2011, 32(4): 14–19]
- Zhang T, Lu HZ, Li XS. Genetic polymorphisms of 4 microsatellite loci in Guizhou Horse. *Acta Ecologiae Animalis Domastici*, 2009, 30(6): 19–21 [张涛, 路宏朝, 李新生. 贵州马4个微卫星位点遗传多态性研究. *家畜生态学报*, 2009, 30(6): 19–21]
- Zhou LQ, Yang AG, Liu XZ, *et al.* The karyotype of the tonguefish *Cynoglossus semilaevis*. *Journal of Fisheries of China*, 2005, 29(3): 417–419 [周丽青, 杨爱国, 柳学周, 等. 半滑舌鲷染色体核型分析. *水产学报*, 2005, 29(3): 417–419]

(编辑 马瑾艳)

The Phenotypic and Genetic Traits Analysis of ZZ Males and ZW Males (Sex-Inverted Males) of *Cynoglossus semilaevis*

LI Hong^{1,2}, TIAN Yongsheng^{1,4}①, LI Xiangkong^{1,3}, CHEN Zhangfan¹,
SONG Lini^{1,2}, DUAN Huimin^{1,2}

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023;

4. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071)

Abstract There are two kinds of male in the breeding populations of the half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis*, namely natural males (ZZ) and neomales (ZW). It is of great importance to study their phenotypic and genetic characteristics since the knowledge can improve its breeding techniques and seed cultivation. In this study, 15 phenotypic traits were measured between mature ZZ males and ZW males (sex-inverted males) of *C. semilaevis*. Analysis showed that highly significant differences between ZZ males and ZW males existed in seven traits, including body weight, full length, body length, body width, head length, eye spacing and eye diameter, with the growth rate of ZW males being higher than that of ZZ males. Furthermore, comparative analysis of the population genetic structures was processed among maternal half-sib families between ZZ and ZW males by using 50 pairs of specific microsatellite markers. Results showed that 22 out of 50 pairs of PCR amplified markers were polymorphic. Among four half-sib families, 232 alleles were identified with relatively higher mean allelic number (N_a) and mean expected heterozygosity (H_e) compared to mean effective allelic number (N_e) and observed heterozygosity (H_o) respectively. In addition, the average polymorphism information content (PIC) was 0.4566, 0.4254, 0.5069, 0.4795 among four half-sib families and there were 3, 3, 4 and 5 loci significantly deviated from Hardy-Weinberg expected genotypic frequencies. The Nei's genetic distance among the four families was 0.2101–0.5840, and the genetic similarity was 0.5577–0.8105. The current study indicated that there were significant differences among growth traits between ZZ and ZW males of *C. semilaevis*. Between the maternal half-sib families, there was relatively high genetic similarity, low genetic distance and similar genetic diversity index.

Key words *Cynoglossus semilaevis*; ZZ male; ZW male; Phenotypic traits; Microsatellite marker; Genetic diversity

① Corresponding author: TIAN Yongsheng, E-mail: tianys@ysfri.ac.cn

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) CD59 基因 的原核表达与功能探究*

周纳宇 曹丹丹 王志刚 张全启
齐洁 王旭波 于海洋^①

(中国海洋大学海洋生命学院 海洋生物遗传学与育种教育部重点实验室 青岛 266003)

摘要 本研究分析了 CD59 基因在牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)感染鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)前后的表达模式。结果显示,感染前,CD59 基因在检测的 4 种免疫器官中均不表达;感染后,该基因均有不同程度的表达,其中,肾脏的表达量最高。对牙鲆 CD59 基因进行原核表达,构建原核表达载体 pET-32a-CD59,并将其转化入大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21,使用异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导,获得约为 29 kDa 的重组蛋白 pET-32a-CD59。该蛋白以包涵体形式存在,通过 His 亲和层析柱纯化和超滤管浓缩目的蛋白后,经 SDS-PAGE 检测得到单一条带,纯化效果较好。Western blotting 分析结果显示,重组蛋白 pET-32a-CD59 可以与抗 His 单克隆抗体发生特异性反应,说明牙鲆 CD59 基因在大肠杆菌系统中成功表达。对重组蛋白进行透析复性,复性结束后,蛋白无析出或絮状沉淀,初步表明复性成功。选取嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、鳃弧菌、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和大肠杆菌 4 种致病指示菌,测定复性重组蛋白 pET-32a-CD59 的抑菌活性。研究表明,重组蛋白 pET-32a-CD59 对嗜水气单胞菌具有一定的抑菌活性。本研究旨在探究牙鲆免疫调节机制,并为提高牙鲆养殖效率提供一定的分子理论基础。

关键词 牙鲆; CD59; 原核表达; 抑菌活性

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)03-0070-08

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)是一种重要的海水养殖鱼类,主要分布于日本,韩国和中国的沿海地区(Seikai, 2002),其肉质细嫩、营养丰富,深受广大消费者的喜爱。在我国牙鲆养殖业蓬勃发展的同时,由于牙鲆人工养殖特别是高密度集约化养殖条件与天然环境差别很大,导致各种疾病时有发生。牙鲆养殖病害日趋严重,已成为制约其养殖发展的重大障碍。

牙鲆病害主要有病毒性和细菌性疾病,在我国细菌性疾病危害最为严重。牙鲆的病原细菌有许多种,主要包括鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)、迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、

链球菌(*Streptococcus*)等(周丽等, 1997)。其中,由鳃弧菌引起的鳃弧菌病是一种危害性较大的细菌性疾病,致死率较高,且在世界范围内流行(Egidius, 1987; 杨少丽等, 2005)。

由于牙鲆细菌性病害死亡率高,对养殖业存在严重危害,研制稳定、可靠的商品疫苗预防细菌性疾病的暴发,培育具有抗细菌性疾病的优良品种是牙鲆病害防治的主要途径。无论采用哪种途径,首先必须深入了解鲆鲽类受细菌感染的影响,研究牙鲆免疫相关分子机理。在脊椎动物中,免疫系统通常被分为两个相互独立又相互关联的亚系统,即先天性免疫和获得

* 国家自然科学基金项目(31101891)资助[This work was supported by National Natural Sciences Foundation of China (31101891)]. 周纳宇, E-mail: 15042443072@163.com

^① 通讯作者: 于海洋, 副教授, E-mail: yuhaiyang@ouc.edu.cn

收稿日期: 2016-04-11, 收修改稿日期: 2016-05-03

性免疫。而在鱼类中,虽然同时存在先天性免疫和获得性免疫,但其获得性免疫较原始,与哺乳动物和鸟类相比免疫应答时间较长,且免疫记忆弱,同时会受到水温的影响,二次应答与初次应答抗体价的比率一般较低,有的鱼类几乎没有区别(Sun *et al.*, 2014)。因此,在鱼类抵御外来病原体入侵等免疫过程中,先天性免疫的作用更为突出。补体系统是先天性免疫的重要组成部分,它能够帮助抗体和吞噬细胞清除病原微生物,是一套复杂高效而精密的防御系统,由30多种蛋白质组成。而在调节补体激活保护机体免受自身补体攻击的过程中,终末裂解途径又起到至关重要的作用。CD59蛋白,又称保护素(Protectin),是迄今为止唯一被鉴定出的研究最为透彻的可在终末裂解途径中起到调节作用的蛋白(Miwa *et al.*, 2001)。CD59是一个分子量为18–20 kDa的球状膜糖蛋白,它通过糖基化磷脂酰基醇(GPI)锚定在细胞膜上(Davies *et al.*, 1989)。CD59的主要功能是抑制终末裂解途径中攻膜复合体(MAC)的装配,且其抑制原理是通过阻止C9结合到C5b-8复合体上而完成的(Meri *et al.*, 1990)。在鱼类中,CD59的分子特征及功能已有报道。Sun等(2013)克隆了斑马鱼的CD59基因并进行了原核表达,且研究了其时空表达模式。结果发现,重组表达蛋白能够与革兰氏阴性和阳性细菌特有的细胞壁成分LPS和LTA结合,进而表现出抑菌活性;Gan等(2015)在尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)中也进行了CD59基因的克隆与表达分析,同样通过原核表达获得重组蛋白,该蛋白具有与PGN和LTA的结合能力,且对无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)具有一定的杀菌活性。此外,CD59基因在大黄鱼(*Pseudosciana crocea*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)和斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)等鱼类中均有研究(Liu *et al.*, 2007; Papanastasiou *et al.*, 2007; Yeh *et al.*, 2007)。

本研究以牙鲆为研究对象,研究了感染鳃弧菌后牙鲆CD59基因的表达模式,并进行了CD59基因在大肠杆菌系统中的原核表达,成功得到了重组蛋白并对其进行了纯化复性。同时,还研究了该重组蛋白对各类致病菌的抑菌活性,为进一步研究牙鲆CD59基因功能提供了一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 鳃弧菌的培养 实验所用鳃弧菌菌株来自中国海洋大学海洋微生物研究中心。将该菌株划线接种于2216E固体培养基(蛋白胨5.0 g/L,酵母提取物

1.0 g/L, FePO₄·4H₂O 0.1 g/L, 琼脂 20 g/L, pH 7.6)中,28℃活化培养12 h。活化后将单克隆菌落接种于2216E液体培养基(蛋白胨5.0 g/L,酵母提取物1.0 g/L, FePO₄·4H₂O 0.1 g/L, pH 7.6)中,28℃扩大培养12 h。用PBS缓冲液稀释至终浓度为10⁹ CFU/ml。

1.1.2 实验牙鲆来源 本研究所用牙鲆为6月龄,平均体长为20–22 cm,来源于山东省黄海水产有限公司(山东,海阳),实验前置于充气海水中,17–20℃暂养7 d。

1.2 实验方法

1.2.1 鳃弧菌攻毒实验 取12尾牙鲆,进行腹腔注射。其中,6尾作为对照组,注射生理盐水;6尾作为实验组,注射10⁹ CFU/ml的鳃弧菌菌液。注射剂量为1 ml/尾。随后,将注射组和对照组分别暂养于17–20℃的充气海水中,48 h后取样。取牙鲆的4种免疫器官:肝脏、脾脏、肾脏和鳃,用组织剪剪碎,液氮速冻后,于–80℃保存备用。

1.2.2 RNA的提取与反转录 采用TRIzol法(Invitrogen, 美国)进行牙鲆各组织RNA的提取。操作步骤严格按照厂家提供的说明书进行。采用1%琼脂糖凝胶电泳进行检测所提取的RNA质量和完整性,采用微量紫外分光光度计(NanoPhotometer Pearl, 德国)测定RNA浓度。随后,用DNase I (RNase free)(TaKaRa, 日本)去除可能存在的DNA残留。cDNA的合成采用M-MLV(TaKaRa, 日本)方法。操作步骤严格按照产品说明书进行,cDNA合成后于–20℃保存备用。

1.2.3 半定量 PCR 根据实验室前期克隆得到的牙鲆CD59基因序列(GenBank 登录号:EU224373)设计特异性引物(表1)进行半定量PCR,检测鳃弧菌感染前后各个免疫组织的CD59表达模式。实验组和对照组各取3条牙鲆,每条牙鲆均取4种免疫组织(肝脏、脾脏、肾脏和鳃),同一种组织的cDNA混合后进行检测。反应总体系为25 μl: cDNA 2 μl, 10×PCR Buffer (Mg²⁺) 2.5 μl, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.5 μl, dNTP (2.5 mmol/L) 2 μl, 引物(10 μmol/L)各0.5 μl, Taq酶(5 U/μl) 0.25 μl, ddH₂O补足至25 μl。选用牙鲆18S RNA基因作为内参基因。扩增条件为94℃ 4 min; 94℃ 30 s, 65℃ 30 s, 72℃ 30 s; 从20个循环开始,每2个循环取出1个PCR小管,直到28个循环,确定指数期在26个循环以内,由此各组织差异表达选定循环数为24个。目的基因CD59的扩增条件为94℃ 4 min; 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s; 从28个循环开始,每2个循环取出1个PCR

小管,直到40个循环,确定指数期在40个循环之内,各组织差异表达选定循环数为36个。PCR结束后,用1.5%的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

表1 本研究所用引物
Tab.1 Primer used in the study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
CD59-RT Fw	CAGGGACAAACCACCGAAG
CD59-RT Rv	TGGATCATCCAACATCATAATG
18s Fw	GGTAACGGGGAATCAGGGT
18s Rv	TGCCTTCCTTGATGTGGT
CD59-Fw1	<u>GAATTC</u> CTGACGTGCAACTACTGTTACTC
CD59-Rv1	CTCGAGTAAATGGCGCCAAGCTGAGGTG

注:下划线标注部分为酶切位点

Note: The restriction site was underlined

1.2.4 CD59的原核表达 设计1对引入*EcoR* I和*Xho* I两个酶切位点的引物(表1),对编码CD59成熟肽(氨基酸序列20-99)的cDNA进行PCR扩增。扩增得到的PCR产物用*EcoR* I和*Xho* I(TaKaRa,日本)进行双酶切,并连接入*EcoR* I和*Xho* I双酶切的pET-32a(+)(Invitrogen,美国)载体中。将构建好的pET-32a-CD59载体转化入克隆菌株trans 5 α (全式金,中国),通过菌落PCR挑取阳性克隆,送往生工生物工程(上海)有限公司进行测序鉴定。测序鉴定序列正确后,将pET-32a-CD59载体转化入表达菌株BL21(DE3)pLysS(全式金,中国)。绘制重组表达菌株的生长曲线:取16支试管,用含有50 μ g/ml氨苄霉素和34 μ g/ml氯霉素双抗的LB液体培养基(蛋白胨10 g/L,酵母提取物5 g/L,NaCl 10 g/L,pH 7.0)37 $^{\circ}$ C培养重组表达菌。每小时取1支试管,测定OD₆₀₀值,根据每小时所测得的菌液OD₆₀₀值,绘制重组表达菌株的生长曲线。根据测定的重组菌株的生长曲线(见结果2.2),在培养3 h时,加入诱导剂异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度为1 mmol/L。分别在37 $^{\circ}$ C诱导1 h、3 h和6 h后,收集菌液,用SDS-PAGE电泳进行检测。

1.2.5 CD59重组蛋白表达形式的确定 用上述条件进行重组蛋白的诱导表达,诱导3 h后,收集菌液。5000 \times g离心10 min,收集菌体,用预冷的裂解液(50 mmol/L Tris,100 mmol/L NaCl,pH 8.0)重悬菌体,冰浴进行超声破碎。12000 \times g离心20 min,分离上清液和沉淀,用SDS-PAGE电泳进行检测。

1.2.6 CD59重组蛋白的纯化 CD59重组蛋白以包涵体形式存在于超声破碎的沉淀中(见结果2.4)。因其含有His标签,使用Ni-Agarose His标签蛋白纯化

试剂盒(包涵体蛋白)(CW BIO,中国)进行纯化。用上述条件进行超声破碎后,12000 \times g离心20 min,收集沉淀(包涵体),充分溶解于Binding Buffer(Tris-HCl 20 mmol/L,咪唑5 mmol/L,NaCl 0.5 mmol/L,尿素8 mol/L)中,负载过Ni柱,最后用Elution Buffer(Tris-HCl 20 mmol/L,咪唑500 mmol/L,NaCl 0.5 mol/L,尿素8 mol/L)洗脱目的蛋白,得到纯化的CD59重组蛋白,用SDS-PAGE电泳进行检测。

1.2.7 Western blotting 通过SDS-PAGE分离蛋白样品,湿转法将蛋白样品转移至PVDF膜上,用含有4% BSA的10 mmol/L PBS封闭,室温孵育2 h。PBS洗涤PVDF膜后,孵育一抗(Anti-His Antibody, CW BIO),抗体浓度为0.2-1.0 μ g/ml,4 $^{\circ}$ C孵育过夜。PBS洗涤PVDF膜后,室温孵育1:400稀释的二抗(羊抗鼠IgG-HRP, CW BIO)40 min。最后,用DAB加0.03%双氧水进行显色。

1.2.8 CD59重组蛋白的复性及浓度测定 采用透析的方式进行CD59重组蛋白的复性。即将纯化后的CD59重组蛋白依次逐级经过以下透析液进行透析复性:透析液I(Tris 25 mmol/L,NaCl 200 mmol/L,尿素5 mmol/L,EDTA 1 mmol/L,DTT 5 mmol/L)、透析液II(Tris 25 mmol/L,NaCl 50 mmol/L,尿素4 mmol/L,EDTA 1 mmol/L,GSSG 0.2 mmol/L,GSH 2 mmol/L)、透析液III(Tris 25 mmol/L,NaCl 20 mmol/L,尿素2 mmol/L,EDTA 1 mmol/L,GSSG 0.5 mmol/L,GSH 1 mmol/L)、透析液IV(Tris 25 mmol/L,NaCl 10 mmol/L,尿素1 mmol/L,EDTA 1 mmol/L,DTT 5 mmol/L,GSSG 1 mmol/L,GSH 1 mmol/L,甘油25 ml)、透析液V(Tris 25 mmol/L,NaCl 10 mmol/L,尿素0.5 mol/L,EDTA 1 mmol/L,DTT 5 mmol/L,GSSG 1 mmol/L,GSH 1 mmol/L,甘油25 ml,甘氨酸5 g)、透析液VI(Tris 25 mmol/L,NaCl 10 mmol/L,DTT 5 mmol/L,甘油25 ml,甘氨酸5 g)和透析液VII(Tris 25 mmol/L,NaCl 10 mmol/L)。每一级均透析12 h,冰浴下搅拌进行。复性后的重组蛋白经超滤浓缩,用Super Bradford蛋白定量试剂盒(CW BIO,中国)测定蛋白浓度。

1.2.9 CD59重组蛋白的抑菌活性测定 采用菌落计数法(Wang et al, 2011)进行重组蛋白的抑菌实验。选取嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、鳃弧菌、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)4种致病指示菌与重组蛋白进行作用,检测其抑菌程度。CD59重组蛋白的抑菌活性计算公式为:

抑菌活性=(对照组菌落数-实验组菌落数)/对照组菌落数 \times 100%

2 结果

2.1 CD59 的表达模式

对鳗弧菌攻毒后牙鲆的 CD59 基因进行了半定量分析。分别取实验组和对照组牙鲆各 3 条, 检测 4 种免疫组织(肝脏、脾脏、肾脏、鳃)中 CD59 基因的相对表达量。成功扩增得到了 356 bp 的牙鲆 CD59 基因和 171 bp 的牙鲆 18S RNA 基因的片段(图 1)。由图 1 可知, 实验组中, 牙鲆的 CD59 基因在 4 种免疫器官中均有表达, 而对照组中该基因则均不表达。其中, 牙鲆肾脏的 CD59 表达量最高, 脾脏和鳃的表达量其次, 肝脏中该基因的表达量则较低。

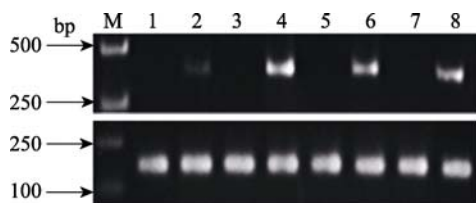


图 1 注射鳗弧菌后牙鲆的 CD59 基因在肝脏、肾脏、脾脏和鳃中的表达

Fig.1 Expression of CD59 in liver, kidney, spleen, and gill of Japanese flounder after *V. anguillarum* injection

M: DL2000; 1、3、5、7: 对照组肝脏、肾脏、脾脏和鳃; 2、4、6、8: 实验组肝脏、肾脏、脾脏和鳃

M: DL2000; 1, 3, 5, and 7: Liver, kidney, spleen and gill in control group; 2, 4, 6, and 8: Liver, kidney, spleen and gill in experimental group

2.2 CD59 重组菌株的生长曲线

通过构建原核表达载体, 获得了牙鲆 CD59 重组表达菌株, 并进行了牙鲆 CD59 基因的原核表达。为确定加入诱导剂 IPTG 的最佳时间, 即确定重组菌株的生长状态较好并对外源蛋白耐受力较高的时间, 绘制了 CD59 重组菌株的生长曲线(图 2)。发现在震荡培养 3 h 左右时, 重组菌株进入指数生长期的上升时期。由此可以判断, 在后续的诱导中, 可以选择在培养 3 h 左右时加入 IPTG, 此时菌体的生长状况最佳,

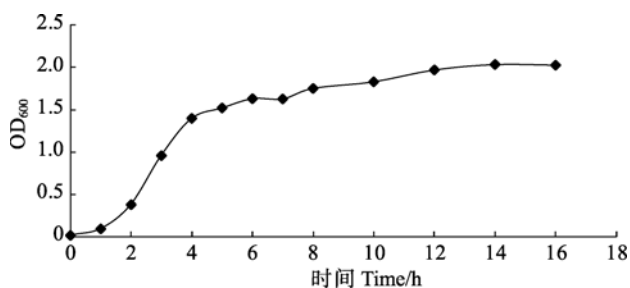


图 2 重组菌株 pET-32a-CD59 的生长曲线

Fig.2 The growth curve of recombinant pET-32a-CD59

对 IPTG 的加入及大量外源蛋白表达的耐受性也最高。因此, 在后续的实验中将该时间点作为加入诱导剂的最佳时机。

2.3 CD59 重组蛋白的诱导表达

根据 2.2 中确定的最佳诱导剂添加时间, 在重组菌株培养至 3 h 时, 加入 IPTG 诱导, 成功表达了牙鲆的 pET-32a-CD59 重组蛋白, SDS-PAGE 检测获得的重组蛋白(图 3)。从图 3 可以看出, 在诱导 1 h 时有约为 29 kDa 的目的蛋白的表达, 随着诱导时间的增加(3 h、6 h), 表达量也有所增加, 但在诱导 3 h 时蛋白的表达量就已经达到一定的丰度, 与诱导 6 h 的蛋白量相差不大。因此, 后续实验选择诱导 3 h。

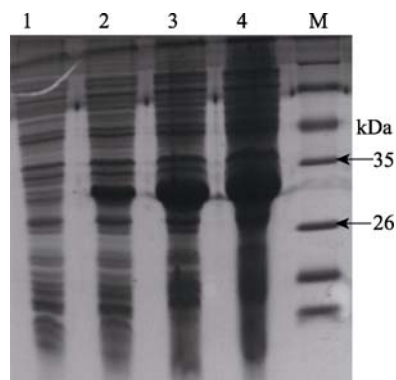


图 3 重组蛋白 pET-32a-CD59 在大肠杆菌中的诱导表达(目的蛋白约为 29 kDa)

Fig.3 Expression of recombinant protein pET-32a-CD59 (target protein was 29 kDa approximately)

M: 蛋白分子量标准; 1: 未诱导; 2: 诱导 1 h; 3: 诱导 3 h; 4: 诱导 6 h

M: Protein relative molecular mass marker; 1: Before induction; 2: 1 h induction; 3: 3 h induction; 4: 6 h induction

2.4 CD59 重组蛋白的表达形式

为了检测牙鲆 pET-32a-CD59 重组蛋白的表达形式, 超声波破碎重组表达菌体, 离心分离上清液和沉淀, 并进行 SDS-PAGE 分析(图 4), 发现 pET-32a-CD59 重组蛋白主要存在于沉淀中, 即该蛋白主要以不溶性包涵体的形式存在。包涵体蛋白结构致密、无活性、易以颗粒状沉淀存在于细胞中。对 CD59 重组蛋白功能的探究需进行蛋白复性。

2.5 CD59 重组蛋白的纯化

pET-32a-CD59 重组蛋白带有 His 标签, 本研究通过 Ni 离子亲和层析, 得到了纯化的 pET-32a-CD59 重组蛋白。纯化后的重组蛋白分子量大小与预测的一致, 条带单一, 主带清晰(图 5)。

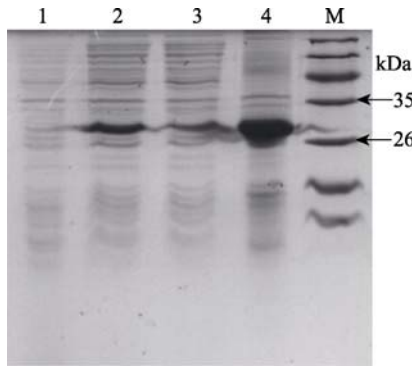


图 4 pET-32a-CD59 重组蛋白的表达形式
Fig.4 The expression form of pET-32a-CD59 recombinant protein

M: 蛋白分子量标准; 1: pET-32a 空载体; 2: pET-32a-CD59 全菌; 3: pET-32a-CD59 超声破碎上清; 4: pET-32a-CD59 超声破碎沉淀

M: Protein relative molecular mass marker; 1: Negative control of BL21 transferred by pET-32a; 2: Whole cell of BL21 transferred by pET-32a-CD59; 3: Supernatant of pET-32a-CD59 after ultra-sonication; 4: Precipitate of pET-32a-CD59 after ultra-sonication

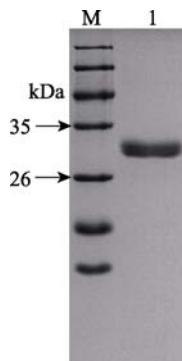


图 5 pET-32a-CD59 重组蛋白的纯化
Fig.5 The purification of pET-32a-CD59 recombinant protein

M: 蛋白分子量标准; 1: 纯化的 pET-32a-CD59 重组蛋白
M: Protein relative molecular mass marker; 1: Purified recombinant pET-32a-CD59

2.6 Western blotting

纯化后的 pET-32a-CD59 重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳后转印到 PVDF 膜上, 分别用 His 抗体和羊抗鼠 IgG-HRP 作为一抗和二抗进行 Western blotting。结果显示, pET-32a-CD59 重组蛋白在 29 kDa 处出现一条特异性条带, 表明诱导纯化后的 CD59 重组蛋白正确表达(图 6)。

2.7 CD59 重组蛋白的复性及浓度测定

透析复性后观察发现, 重组蛋白无絮状析出或沉淀, 复性成功。超滤后, 对得到的浓缩蛋白进行蛋白浓度的测定, 结果显示, 蛋白浓度为 1100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

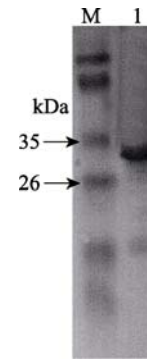


图 6 Western blotting 检测重组蛋白
Fig.6 Western blotting analysis of the recombinant protein

M: 蛋白分子量标准; 1: CD59 重组蛋白
M: Protein relative molecular mass marker; 1: Recombinant pET-32a-CD59

2.8 CD59 重组蛋白的抑菌活性

为了检测牙鲈 pET-32a-CD59 重组蛋白的抑菌活性, 本研究选择了 4 种致病指示菌, 通过菌落计数法探究其抑菌活性(表 2)。从表 2 可以看出, pET-32a-CD59 重组蛋白仅对嗜水气单胞菌具有一定的抑菌效果, 从 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 起, 其抑菌活性就已达 50%, 但随着浓度的升高, 其抑菌活性增幅不大。

表 2 重组蛋白 pET-32a-CD59 对嗜水气单胞菌的抑菌活性
Tab.2 Antimicrobial activity of recombinant pET-32a-CD59 against *A. hydrophila*

重组蛋白 pET-32a-CD59 Recombinant protein pET-32a-CD59 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	抑菌率 Antibacterial rate (%)
0	
100	50
250	52
500	54.1
1000	56.25

3 讨论

牙鲈生活在富含微生物的复杂水环境中, 长期地适应生活形成了高效的自我防御机制, 其先天性免疫系统高度发达。而补体系统是先天性免疫系统的重要组成部分。CD59 在补体系统中具有重要的调节作用, 对于该基因的研究, 有助于进一步了解牙鲈免疫系统的调节机制, 并为将来其在提高牙鲈免疫防御力方面的提供理论支持。

本研究通过半定量 PCR 技术检测了牙鲈 CD59 基因在肝脏、肾脏、脾脏和鳃 4 种免疫组织中的表达模式。结果显示, 牙鲈 CD59 基因在受到细菌感染之后的肾脏中表达量最高。而在其他鱼类中, 类似的研

究显示, 尼罗罗非鱼和虹鳟的 CD59 基因广泛分布于肾、肝、脾、心、脑、肠等, 其中, 脑中的表达量最高, 在肾中, 其表达量在对照组和实验组间也有显著差异(Gan *et al*, 2015; Papanastasiou *et al*, 2007)。斑马鱼中, CD59 基因表达分布广泛, 且在脑中具有最高丰度的表达(Sun *et al*, 2013)。这种差异可能与鱼的种类有关。脑和肾脏是鱼体神经内分泌系统中的重要组织, 且脑对免疫反应有调控作用(王文博等, 2002), 而肾脏是鱼类重要的免疫器官, 是鱼类抵御外来病原菌入侵过程中最先产生免疫调节作用的免疫器官之一; 肾脏也是脊椎动物合成补体的主要场所之一。当牙鲆受到细菌感染后, 补体系统激活产生膜攻击复合物(MAC), 导致细胞肿胀、坏死、细胞因子释放, 参与许多肾脏疾病的发病过程。而 CD59 基因可以通过抑制 C9 和 C5b-8 的结合及 C9 分子的延伸阻-断 MAC 的形成对肾脏上皮细胞系膜细胞起保护作用(王金泉等, 1996), 本研究在牙鲆中 CD59 的半定量结果也显示, CD59 基因在牙鲆免疫防御和补体系统激活/抑制中起重要作用, 揭示了 CD59 是牙鲆抵抗细菌感染的重要免疫基因。

原核表达结果显示, 牙鲆 CD59 重组蛋白是以包涵体形式存在的, 形成包涵体主要有两方面原因: 一方面, 由于原核表达系统中缺乏真核细胞中天然存在的辅助蛋白折叠的分子伴侣等小分子物质, 从而在空间上使来源于真核细胞的外源蛋白无法正确折叠。在本研究中, CD59 重组蛋白本身具有多个二硫键结构, 且其结构对于功能的发挥至关重要。因此, 二硫键无法正确配对, 无法形成正确的蛋白构象, 导致无活性包涵体的产生。另一方面, 高效的大肠杆菌表达系统使得表达菌株在加入诱导剂后几乎立即停止自身蛋白的表达, 转而高效地大量表达转化入细胞内的外源蛋白, 而这种蛋白合成速度往往过快, 从而在时间上使重组蛋白来不及进行正确的折叠, 进而导致重组蛋白以错误的折叠方式(结构致密的包涵体形式)存在。Sun 等(2013)报道了斑马鱼的 CD59 重组蛋白同样以包涵体形式存在, 且需要经过复性后才表现出一定的抑菌活性。

为了研究牙鲆 CD59 重组蛋白的生物活性, 作者对其进行了复性。复性过程采用透析方式, 首先加入足量的变性剂(尿素)使包涵体蛋白充分溶解, 致密的结构能够松散打开。随后, 通过逐量减少变性剂、加入 GSSG 与 GSH 等氧化还原体系, 使错误的二硫键打开, 进而重新配对结合, 形成正确的二硫键。最后一级的透析液中不添加变性剂, 只是单纯的 Tris-NaCl 缓冲液, 为重组蛋白提供一种适宜的生理环境, 确保

其生物活性的维持。

通过对牙鲆 CD59 重组蛋白的抑菌实验发现, 重组蛋白在浓度为 100 $\mu\text{g/ml}$ 时, 对嗜水气单胞菌具有近 50% 的抑菌活性, 随着蛋白浓度的提高最高可升至 56.25%。斑马鱼的 CD59 重组蛋白对大肠杆菌具有一定的抑菌活性, 对金黄色葡萄球菌具有轻微的抑菌活性(Sun *et al*, 2013), 且有一定的浓度依赖效应。有趣的是, 当重组蛋白浓度低于 100 $\mu\text{g/ml}$ 时, 对金黄色葡萄球菌反而起了促进生长的作用。这可能是由于低浓度的重组蛋白不但没有杀菌效果, 反而作为一种碳氮营养源为细菌的生长提供了养分。而尼罗罗非鱼的 CD59 重组蛋白在浓度为 100 $\mu\text{g/ml}$ 时, 对无乳链球菌产生了一定的抑菌活性, 且随着蛋白浓度的提高显示出明显的浓度依赖效应, 当浓度达到 800 $\mu\text{g/ml}$ 时, 其对无乳链球菌的抑菌活性可达到 44.2%(Gan *et al*, 2015)。Liu 等(2007)研究表明, 大黄鱼的 CD59 重组蛋白在体外溶血系统中能够抑制红细胞的裂解。但这种作用只对来源于大黄鱼和罗非鱼的血清起作用, 而对小鼠和鸡的血清无效果, 这表明 CD59 对于补体激活的调节过程具有物种选择性。

CD59 基因在牙鲆感染鳃弧菌前后的表达模式显示, 牙鲆 CD59 基因参与了牙鲆对鳃弧菌感染的免疫防御, 是牙鲆补体系统中重要的免疫基因。CD59 可抑制补体调节过程中 MAC 的形成, 这也意味着该基因可能在保护机体不受自身免疫系统攻击的同时, 对于已经产生细胞溶解反应的正常细胞具有修复作用。这也提供了一个新的 CD59 基因在免疫防御方面的研究方向。本研究利用原核表达的方法获得了重组表达蛋白 pET-32a-CD59, 纯化、复性后的重组蛋白 pET-32a-CD59 对嗜水气单胞菌具有抑菌活性, 且较低浓度(100 $\mu\text{g/ml}$)即具有一定的抑菌能力, 结果可进一步用于牙鲆抗菌肽的开发与应用。但本研究所获得的蛋白为包涵体, 表达后的蛋白纯化及复性过程复杂, 且蛋白得量较低, 这些因素限制了重组蛋白的大规模生产及应用。因此, 下一步的研究中需构建更加合适的融合表达载体, 并筛选大量表达且有活性的抗菌肽工程菌株, 简化纯化过程, 降低生产成本, 以实现大规模生产。

参 考 文 献

- Davies A, Simmons DL, Hale G, *et al*. CD59, an LY-6-like protein expressed in human lymphoid cells, regulates the action of the complement membrane attack complex on homologous cells. *Journal of Experimental Medicine*, 1989, 170(3): 637-654

- Egidius E. *Vibriosis: Pathogenicity and pathology. A review.* Aquaculture, 1987, 67(1-2): 15-28
- Gan Z, Wang B, Zhou W, *et al.* Molecular and functional characterization of CD59 from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) involved in the immune response to *Streptococcus agalactiae*. Fish and Shellfish Immunology, 2015, 44(1): 50-59
- Liu GZ, Zhang JZ, Chen XH. Molecular and functional characterization of a CD59 analogue from large yellow croaker *Pseudosciana crocea*. Molecular Immunology, 2007, 44(15): 3661-3671
- Meri S, Morgan BP, Davies A, *et al.* Human protectin (CD59), an 18,000-20,000 MW complement lysis restricting factor, inhibits C5b-8 catalysed insertion of C9 into lipid bilayers. Immunology, 1990, 71(1): 1-9
- Miwa T, Song WC. Membrane complement regulatory proteins: Insight from animal studies and relevance to human diseases. International Immunopharmacology, 2001, 1(3): 445-459
- Papanastasiou AD, Eleftheria G, Zarkadis IK. Cloning of a CD59-like gene in rainbow trout. Expression and phylogenetic analysis of two isoforms. Molecular Immunology, 2007, 44(6): 1300-1306
- Seikai T. Flounder culture and its challenges in Asia. Reviews in Fisheries Science, 2002, 10(10): 421-432
- Sun C, Wu J, Liu S, *et al.* Zebrafish CD59 has both bacterial-binding and inhibiting activities. Developmental and Comparative Immunology, 2013, 41(2): 178-188
- Sun JC, Ugolini S, Vivier E. Immunological memory within the innate immune system. The EMBO Journal, 2014, 33(12): 1295-1303
- Wang JQ. The relationship between CD59 and kidney disease. Foreign Medical Sciences(Urology and Nephrology Foreign Medical Sciences), 1996(6): 249-252 [王金泉. CD59 与肾脏疾病. 国外医学: 泌尿系统分册, 1996(6): 249-252]
- Wang SH, Wang Y, Ma J, *et al.* Phosvitin plays a critical role in the immunity of zebrafish embryos via acting as a pattern recognition receptor and an antimicrobial effector. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(25): 22653-22664
- Wang WB, Li AH. The effect of environmental stress to fish immune system. Journal of Fisheries of China, 2002, 26(4): 368-374 [王文博, 李爱华. 环境胁迫对鱼类免疫系统影响的研究概况. 水产学报, 2002, 26(4): 368-374]
- Yang SL, Wang YG, Dong SG. Progress of research on vibriosis in marine cultured fish. Marine Fisheries Research, 2005, 26(4): 75-83 [杨少丽, 王印庚, 董树刚. 海水养殖鱼类弧菌病的研究进展. 海洋水产研究, 2005, 26(4): 75-83]
- Yeh HY, Klesius PH. Molecular cloning and expression of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, complement membrane attack complex inhibitor CD59. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2007, 120(3-4): 246-253
- Zhou L, Gong QL, Yu KK. Diseases of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Journal of Ocean University of Qingdao, 1997, 27(2): 173-180 [周丽, 宫庆礼, 俞开康. 牙鲆的疾病. 青岛海洋大学学报, 1997, 27(2): 173-180]

(编辑 马璀璨)

Prokaryotic Expression and Functional Analysis of CD59 of Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*)

ZHOU Nayu, CAO Dandan, WANG Zhigang, ZHANG Quanqi,
QI Jie, WANG Xubo, YU Haiyang^①

(Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding, Collage of Marine Life Science, Ministry of Education,
Ocean University of China, Qingdao 266003)

Abstract CD59 is a glycoposphatidylinositol (GPI)-linked protein, identified as a regulator of the terminal pathway of complement membrane system. This study reported the gene expression patterns of CD59 of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) before and after challenged with *Vibrio anguillarum*. The results implied that few expression of CD59 was detected in all tissues before challenged with *V. anguillarum*. After being challenged, the expression levels of CD59 were significantly higher than the control group on different levels. And the most abundant expression was identified in kidney. Meanwhile the CD59 gene was inserted into the pET-32a to construct prokaryotic expression plasmid. The recombinant plasmid expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) cells through isopropyl- β -thiogalactopyranoside (IPTG) induction and approximate 29 kDa recombinant protein of pET-32a-CD59 was obtained. Through the analysis of ultra-sonication on recombinant expression strains, the recombinant pET-32a-CD59 was identified in precipitate. It implied that the recombinant pET-32a-CD59 existed as an inclusion body. Then the recombinant protein was purified and concentrated by Ni-chelating affinity chromatography and ultrafiltration. SDS-PAGE analysis revealed a single band implying successful purification. Western blotting analysis showed that the recombinant protein could be specifically combined with anti-His monoclonal antibody. So the expressed protein was confirmed as the target protein. The recombinant protein was refolded by dialysis because of its incapability in biological activity. There was no precipitate or separation after refolding, which suggested that the operation of refolding by dialysis on recombinant protein was successful. After purification and refolding, the antimicrobial activity of the recombinant CD59 was demonstrated in Japanese flounder. Four pathogens were chosen for the experiment including *Aeromonas hydrophila*, *V. anguillarum*, *Staphylococcus aureus* and *E. coli*. The results revealed that recombinant Japanese flounder CD59 displayed antimicrobial ability through the inhibition on the growth of *A. hydrophila*. This study explored the immune regulation mechanism in Japanese flounder and provided molecular theoretical basis for improving the efficiency of breeding in Japanese flounder.

Key words Japanese flounder; CD59; Prokaryotic expression; Antimicrobial activity

① Corresponding author: YU Haiyang, E-mail: yuhaiyang@ouc.edu.cn

美洲黑石斑鱼(*Centropristis striata*)消化系统 胚后发育的组织学观察*



张廷廷^{1,2} 陈超^{2①} 邵彦翔^{2,3} 陈建国^{1,2} 孙涛⁴

(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
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;
3. 大连海洋大学 大连 116023; 4. 烟台开发区天源水产有限公司 烟台 264000)

摘要 通过形态学与连续组织切片的方法,对美洲黑石斑鱼(*Centropristis striata*) 1–34 d 仔鱼消化系统的胚后发育进行系统观察,分析描述鱼体消化道(食道、胃与肠道)以及消化腺(肝脏与胰腺)的发育过程。对 1–15 d 仔鱼连续取样,每次取样 30 尾,15 d 后隔天取样,每次取样 15 尾。结果显示,在水温为(24±1)℃、盐度为 30–32 的条件下,初孵仔鱼卵黄囊体积很大,消化管为封闭的管状结构。美洲黑石斑鱼孵出 3 d 后,口裂形成、开始摄食,肛门与外界连通,消化道逐渐分化形成食道、胃及肠道,肝脏、胆囊和胰腺也逐渐形成。7 d 后,卵黄囊与油球基本消失,食道、胃部以及肠道黏膜褶皱开始形成,消化道黏膜上皮细胞逐渐分化,肝脏出现脂肪颗粒,仔鱼具备了基本的摄食能力。11 d 时,仔鱼食道可见黏液细胞,随日龄的增加上皮组织中黏液细胞数量迅速增多,褶皱日益丰富;胃部分化形成贲门部、胃本体与幽门部,胃壁褶皱不断增多、伸长;肝脏血窦与中央静脉明显。20 d 时,鱼体胃腺形成,说明胃部消化、吸收蛋白质的能力增强;肠道次级黏膜褶皱出现,肠圈与褶皱更加复杂化;胰脏分布有大量酶原颗粒。32 d 时,仔鱼消化道组织结构分明,自腔面向内依次为黏膜层、黏膜下层、肌层与浆膜层,消化道与消化腺结构和功能逐步完善。仔鱼 3–7 d 为内源性营养向外源性营养过渡期,应及时提供充足适口的生物饵料,仔鱼 20 d 后可以逐渐驯化投喂微型配合饲料。

关键词 美洲黑石斑鱼; 仔鱼; 消化系统; 组织学

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)03-0078-08

人工育苗条件下,海水鱼类在早期仔鱼的口裂形成阶段、后期仔鱼的饵料转换期以及稚鱼快速生长期都会出现较高的死亡率(于海瑞等, 2003; Dadzie *et al.*, 2000; 陈猛猛等, 2015),这与仔稚鱼的消化吸收密切相关。鱼体消化系统的不断发育与完善是其摄取外界营养与满足自身生长的基础(林强等, 2007)。分析研究鱼体消化系统的形态结构与组织特征有助于深入了解其对摄食饵料的分解、消化、吸收的内在机制,

对改进饵料的种类和形状,提高营养吸收都有极积的意义。国内外学者已对军曹鱼(*Rachycentron canadum*) (初庆柱等, 2010)、湘华鲮(*Sinilabeo decorus tungting*) (梁志强等, 2011)、鲇鱼(*Silurus asotus*) (蒲红宇等, 2004)、北美牙鲆(*Paralichthys californicus*) (Gisbert *et al.*, 2004a)、细鳞鲑(*Brachymystax lenok*) (徐革锋等, 2013) 及斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*) (吴金英等, 2003) 等不同鱼种早期发育阶段的消化道发育过程做了较

* 科技部国际合作项目(2012DFA30360)资助[This work was supported by Project of International Cooperation, Ministry of Science and Technology(2012DFA30360)]. 张廷廷, E-mail: 13256879033@163.com

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

收稿日期: 2016-04-18, 收修改稿日期: 2016-05-04

为细致的研究,为这些品种的苗种培育、仔稚幼鱼的饵料开发提供了有益的数据资料。

美洲黑石斑鱼(*Centropristis striata*),俗称黑石斑,生活于美国的缅因州到佛罗里达州北部的大西洋沿岸及墨西哥湾水域(Stuart *et al.*, 2003),该品种生长速度快、抗逆性强,2003年被引进中国(雷霖霖等,2007)。李海燕等(2011)通过解剖和光镜技术对美洲黑石斑鱼幼鱼的消化道结构进行了详细描述,但其早期生长阶段的形态学和组织学构造、功能与摄食饵料间的相关关系尚未有报道。本研究通过连续组织切片,对1-34 d 鱼苗的消化道及消化腺进行细致的观察分析,实验结果可为美洲黑石斑鱼早期生长阶段选择适口饵料、确定最佳投饵时间与最佳投饵量提供参考,为进一步提高苗种生长率及存活率提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 实验对象及培育条件

本研究于2015年6-8月在烟台开发区天源水产有限公司开展,美洲黑石斑鱼受精卵是养殖5年以上、经强化培育后的亲鱼自然产卵受精所获得的。将受精卵置于14 m³的水泥池中,微流水充气孵化,布卵密度为15 g 受精卵/m³,水温为(24±1)°C,盐度为30-32。美洲黑石斑鱼仔鱼孵出3 d后开口,以褶皱臂尾轮虫(*Brachionus plicatilis*)作为开口饵料,随着鱼苗的生长逐渐投喂桡足类、卤虫(*Artemia salina*)无节幼体以及适于不同生长时期鱼苗口径的配合饲料。生物饵料在投喂前用浓缩小球藻(*Chlorella vulgaris*)及营养强化剂进行强化。每天08:00和15:00投喂生物饵料,投饵密度为10-15个/ml。育苗前期,每天仅添加少量的新鲜海水。7 d后,每天定时更换少量的新鲜海水,随着日龄的增加,开始增加新鲜海水的换水量。自布池开始,每日向水池中均匀泼洒浓缩小球藻液改善水质。10 d后,每日上午吸底,清除排泄物、残饵及死鱼。

1.2 实验方法

自美洲黑石斑鱼仔鱼孵出后,开始连续取样,每次随机取样30尾;15 d后隔天取样,每次随机取样15尾。样品先经Bouin氏液固定24 h,次日用70%乙醇小心清洗样品后置于常温条件下保存。取样结束后,样品经常规脱水、石蜡包埋处理后,再用Leica RM 2135型切片机进行连续切片(切片厚度约为5-6 μm),切片经HE染色后,用中性树胶封片,用于显微观察。在Olympus BX 40型显微镜下,观察仔鱼消化系统

组织器官结构。同时,用Olympus PM20显微镜进行拍照。

2 结果与分析

2.1 消化道

美洲黑石斑鱼1 d仔鱼,消化道位于卵黄囊背侧,口和肛门未与外界连通,消化道尚未分化,中部略有凸起(图1-1)。3 d仔鱼,消化道逐渐分化形成口腔咽、食道和肠,口裂形成,肛门开通(图1-2)。

2.1.1 食道 1 d仔鱼的全长为(3.11±0.14) mm,食道细胞紧密排列,尚未分化。2 d仔鱼的全长为(2.89±0.25) mm,食道部位的细胞群中间观察到细小的腔隙,食道开始形成。3 d仔鱼的全长为(2.92±0.23) mm,食道中间可见明显空腔,食道上皮由多层立方细胞构成,细胞核呈圆形居于中央。此后,食道不断延伸,食道与胃交界处黏膜突起,纵向褶皱逐渐形成。11 d仔鱼的全长为(3.73±0.13) mm,食道黏膜上皮可见黏液细胞(图1-3)。仔鱼孵出18 d时,全长为(4.30±0.26) mm,食道肌层横纹肌纤维明显增多,上皮组织分布有大量黏液细胞(图1-4)。随着仔鱼的生长发育,食道褶皱更加丰富,仔鱼食道组织结构趋于完善,34 d仔鱼全长为(9.56±1.79) mm,可以观察到黏膜层、黏膜下层、肌层和浆膜层,肌肉层发达,以横纹肌为主(图1-5)。

2.1.2 胃 仔鱼孵出3 d时,位于食道后的胃部开始形成,胃上皮由单层的柱状上皮细胞构成,核多位于细胞中央或基底部。胃壁结构只能观察到黏膜层和浆膜,中间的肌肉层不明显(图1-6)。7 d仔鱼的全长为(3.51±0.13) mm,胃本体出现小的凸起,胃与前肠交接处开始显现幽门括约肌,贲门部括约肌尚不明显。11 d仔鱼的胃由贲门部、胃本体及幽门部构成,胃腔逐渐增大,胃内侧的黏膜褶皱不断加深。18 d仔鱼的纵向褶皱增高,胃壁增厚,并且胃壁厚度表现为幽门部>胃本体>贲门部(图1-7)。20 d仔鱼的全长为(4.58±0.17) mm,胃部上皮细胞由矮柱状细胞构成,贲门部上端可见黏液细胞,胃本体胃腺出现(图1-8)。27 d仔鱼的全长为(6.09±0.47) mm,黏膜柱状上皮细胞排列紧密,固有层胃腺数量明显增多,肌层逐渐增厚(图1-9)。随着日龄的增加,仔鱼贲门部和基底部黏膜褶皱逐渐增加、伸长,黏膜下层结缔组织进一步完善,34 d仔鱼胃部结构分明,肌肉层同食道一致,环形肌较厚,纵形肌相对较薄(图1-10)。

2.1.3 肠 仔鱼1 d时,消化道基本为实管状结构,黏膜上皮主要为单层柱状细胞,细胞排列较为紧密,

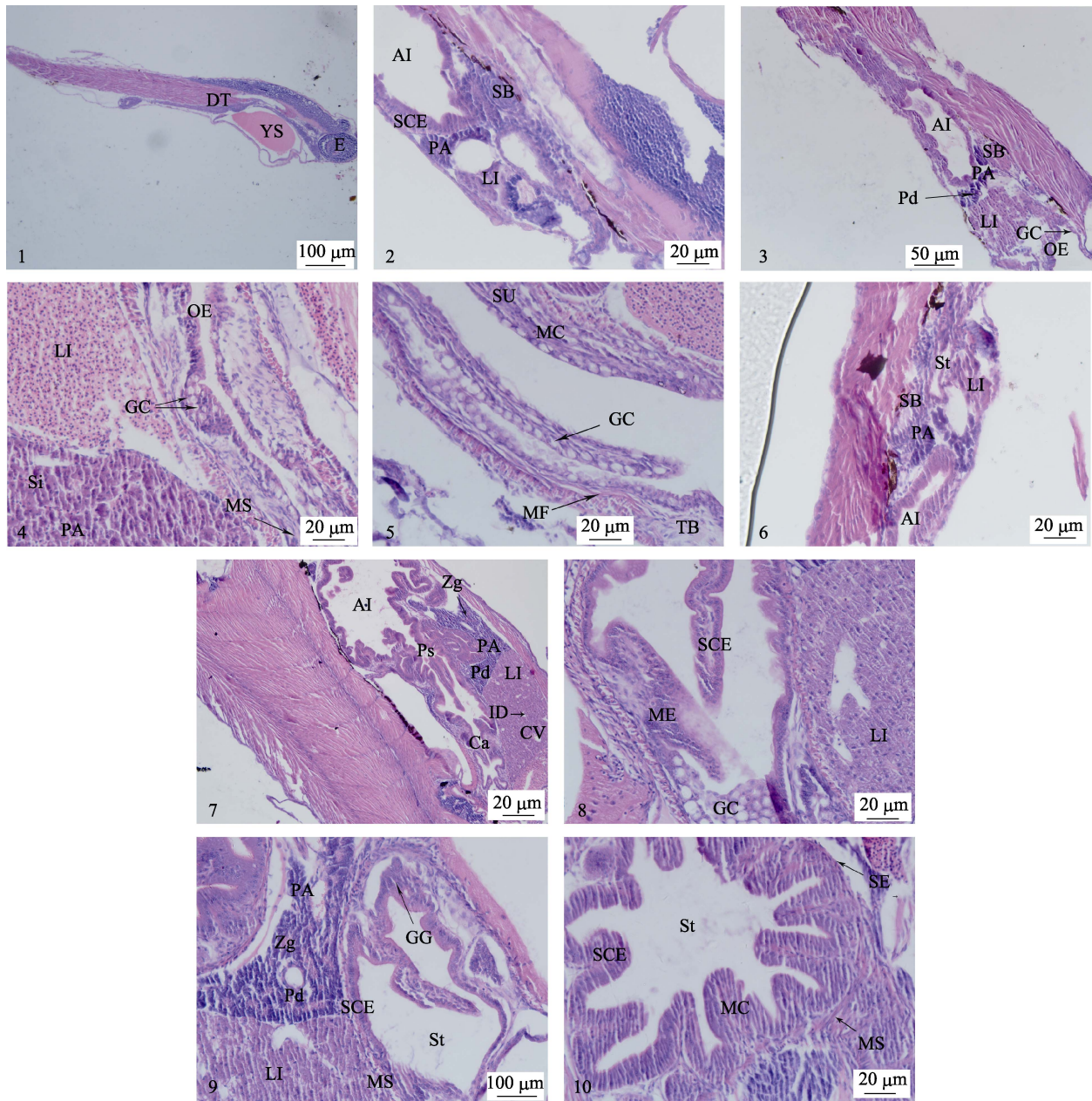


图1 美洲黑石斑消化系统胚后发育组织学观察

Fig.1 Histological observation on post-embryonic development of digestive tract of *C. striata*

1: 1 d 仔鱼消化道纵切; 2: 3 d 仔鱼腹部纵切; 3: 11 d 仔鱼肝胰脏与前肠纵切; 4: 18 d 仔鱼食道纵切; 5: 34 d 仔鱼食道纵切; 6: 3 d 仔鱼肝脏纵切; 7: 18 d 仔鱼腹部纵切; 8: 20 d 仔鱼贲门部纵切; 9: 27 d 仔鱼胰脏与胃部纵切; 10: 34 d 仔鱼胃部横切; AI: 前肠; Ca: 贲门括约肌; CV: 中央静脉; DT: 消化道; E: 眼睛; ID: 小叶间胆管; GC: 杯状细胞; GG: 胃腺; LI: 肝脏; MC: 黏膜层; ME: 复层上皮; MF: 黏膜褶皱; MS: 肌肉层; OE: 食道; PA: 胰脏; Pd: 胰管; Ps: 幽门括约肌; SB: 鱼鳔; SCE: 单层柱状细胞; SE: 浆膜层; Si: 血窦; St: 胃; SU: 黏膜下层; TB: 味蕾; YS: 卵黄囊; Zg: 酶原颗粒

1: Longitudinal section of 1 dph larva fish digestive tract; 2: Longitudinal section of 3 dph larva fish abdomen; 3: Longitudinal section of 11 dph larva fish liver, pancreas and anterior intestine; 4: Longitudinal section of 3 dph larva fish oesophagus; 5: Longitudinal section of 34 dph larva fish oesophagus; 6: Longitudinal section of 3 dph larva fish liver; 7: Longitudinal section of 18 dph larva fish abdomen; 8: Longitudinal section of 20 dph larva fish cardia; 9: Longitudinal section of 27 dph larva fish pancreas and stomach; 10: Cross section of 34 dph larva fish stomach; AI: Anterior intestine; Ca: Cardiac sphincter; CV: Central vein; DT: Digestive tract; E: Eye; ID: Interlobular bile duct; GC: Goblet cell; GG: Gastric gland; LI: Liver; MC: Mucosa; ME: Stratified epithelium; MF: Mucosal fold; MS: Muscle layer; OE: Oesophagus; PA: Pancreas; Pd: Pancreatic duct; Ps: Pyloric sphincter; SB: Swimbladder; SCE: Simple columnar epithelium; SE: Serosa; Si: Sinusoid; St: Stomach; SU: Submucosa; TB: Taste buds; YS: Yolk sac; Zg: Zymogen granules

核呈圆形多位于细胞基底部; 肠后端发生弯曲, 消化道仍处于封闭状态。3 d 仔鱼的肠道黏膜开始出现褶皱, 肠瓣形成, 将肠道隔开形成前肠与后肠, 前肠相对膨大(图 2-1)。7 d 仔鱼的黏膜柱状上皮细胞体积增大、排列紧密, 肠道褶皱加深, 出现纹状缘。仔鱼发育至 11 d, 肠道上皮出现杯状细胞。此外, 可以观察到近腹部肠道褶皱明显多于近背部肠道褶皱(图 1-3)。随着日龄增加, 肠道进一步分化发育, 肠腔扩大, 肠道褶皱逐渐延伸、增多, 18 d 仔鱼的肠道上皮出现一定数量的空泡细胞, 肠道卷曲程度更加复杂, 纹状缘密集排列(图 2-2)。20 d 仔鱼的前肠开始出现次级肠黏膜褶皱(图 2-3)。仔鱼 27 d 时, 肌肉层纤维明显, 肠壁加厚, 并且可以观察到后肠肠壁略薄于前肠与中肠(图 2-4)。32 d 仔鱼的全长为(8.91±0.90) mm, 肠道组织结构逐渐分明, 自肠腔表面向里依次为黏膜层、黏膜下层、肌层与浆膜层; 黏膜上皮细胞排列较为紧密、核大且圆, 多位于细胞的基底部, 细胞之间界限并不明显; 次级黏膜褶皱丰富(图 2-5)。此后, 肠道结构除了褶皱数量及长度的变化、杯状细胞的逐渐增加、肌层不断增厚外, 随着仔鱼的生长发育, 肠道组织学上没有显著性差异。

2.2 消化腺

2.2.1 肝脏 仔鱼孵出 3 d 时, 前肠外围的间充质细胞逐渐分化, 形成细胞簇, 此后, 细胞簇间逐渐形成许多大小不一、形状不规则的空腔, 产生导管与肝细胞索(图 1-2)。5 d 仔鱼的全长为(3.25±0.30) mm, 卵黄囊逐渐收缩, 产生的空间主要被肝组织填充, 肝细胞数量大量增加(图 2-6)。此后, 肝脏细胞迅速分裂, 仔鱼孵出 7 d 时, 可见脂肪颗粒分布于肝脏组织中。11 d 仔鱼的肝脏细胞紧密排列, 细胞核较大, 肝血窦与中央静脉明显, 血细胞充斥于血管腔, 可以看到肝脏开始分叶。仔鱼 18 d 的肝脏体积明显增大, 肝细胞染色加深, 小叶间动脉清晰, 肝脏两叶间隙明显(图 2-2)。22 d 仔鱼的全长为(4.71±0.22) mm, 仔鱼肝脏细胞间分布有大量脂肪小颗粒, 形状近似杯状的空泡结构(图 2-7)。仔鱼 27 d 时, 肝细胞体积变小, 数量进一步增多, 肝脏血管间分布有丰富的血细胞(图 2-4)。随着仔鱼的生长, 由肝细胞索形成的肝小叶排列更加紧密, 血管系统日趋发达, 窦状隙减少, 肝脏组织结构近似成鱼。

2.2.2 胰腺 胰腺是一个独立的消化腺, 仔鱼 3 d 时, 肝脏下方、卵黄囊背部出现胰腺细胞团, 切片染色后, 该部位呈现较深的蓝紫色, 比周围器官染色更深(图 1-2)。胰腺细胞多为长形或不规则形, 核膜与细胞界限明晰。仔鱼 11 d 时, 胰腺细胞排列更为紧密, 并可见血细胞与胰管分布于胰腺细胞之间(图 1-3)。仔鱼 18 d 后可以观察到胰脏中较多的酶原颗粒(图 2-2)。仔鱼发育至 20 d 时, 胰腺体积明显增大, 并逐渐向胃、肠方向延伸, 胰岛与胰管明显, 染色相对较浅, 胰管开口于前肠, 同胆管一样由立方上皮细胞组成(图 2-7)。仔鱼 27 d 时, 胰脏中胰管与酶原颗粒数量大量增加(图 2-8)。

3 讨论

3.1 美洲黑石斑鱼仔鱼消化系统的发育特征

3.1.1 仔鱼口裂与肛门的形成 美洲黑石斑鱼初孵仔鱼消化道为未分化的管状结构, 口和肛门均保持封闭的状态。孵出 3 d 后, 仔鱼口裂形成, 上下颌能上下活动, 肛门亦与外界打通, 仔鱼开始摄取外界食物。仔鱼发育过程中, 口裂及肛门的形成是其开口摄食的前提, 而其形成时间在不同鱼类中存在一定的差异(蒲红宇等, 2004; 朱成德, 1986)。吴金英等(2003)研究发现, 斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)孵化 4 d 后肛门形成, 同时口裂形成, 仔鱼能够摄食。棱鲮(*Mugil carinatus*)仔鱼孵化出膜 3 d 后, 肛门与外界连通, 而口裂形成的时间比肛门打通的时间延迟了 1 d, 摄食行为则出现在 5 日龄(高小强, 2015)¹⁾; 高露姣等(2007)指出, 3 日龄银鲳(*Pampus argenteus*)仔鱼口裂形成, 但肛门在仔鱼孵出 4 d 后才与外界连通, 仔鱼开始摄食。口裂与肛门形成时间的差异与不同鱼种的遗传特性、卵质以及外界条件(尤其是温度)等因素有关(殷名称, 1991b)。

3.1.2 消化道与消化腺的形成与完善 美洲黑石斑鱼仔鱼在口裂形成之前处于内源营养阶段, 该时期仔鱼生命活动所需能量依赖于卵黄囊提供。随着日龄的增加, 美洲黑石斑鱼仔鱼消化道逐渐发育分化, 3 d 后食道、原始胃以及肠道形成, 此时, 仔鱼口裂形成且肛门开通, 仔鱼开始摄食。这在其他鱼种的研究中亦得到了证实(Mai *et al*, 2005; Kato *et al*, 2004; Zaiss *et al*, 2006)。仔鱼开口后, 生命活动所需能量由卵黄

1) Gao XQ. Study on the histological observation of early development and the physiological property in American shad, *Alosa sapidissima*. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2015, 1-114 [高小强. 美洲鲈 *Alosa sapidissima* 早期发育组织学及相关生理特性研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2015, 1-114]

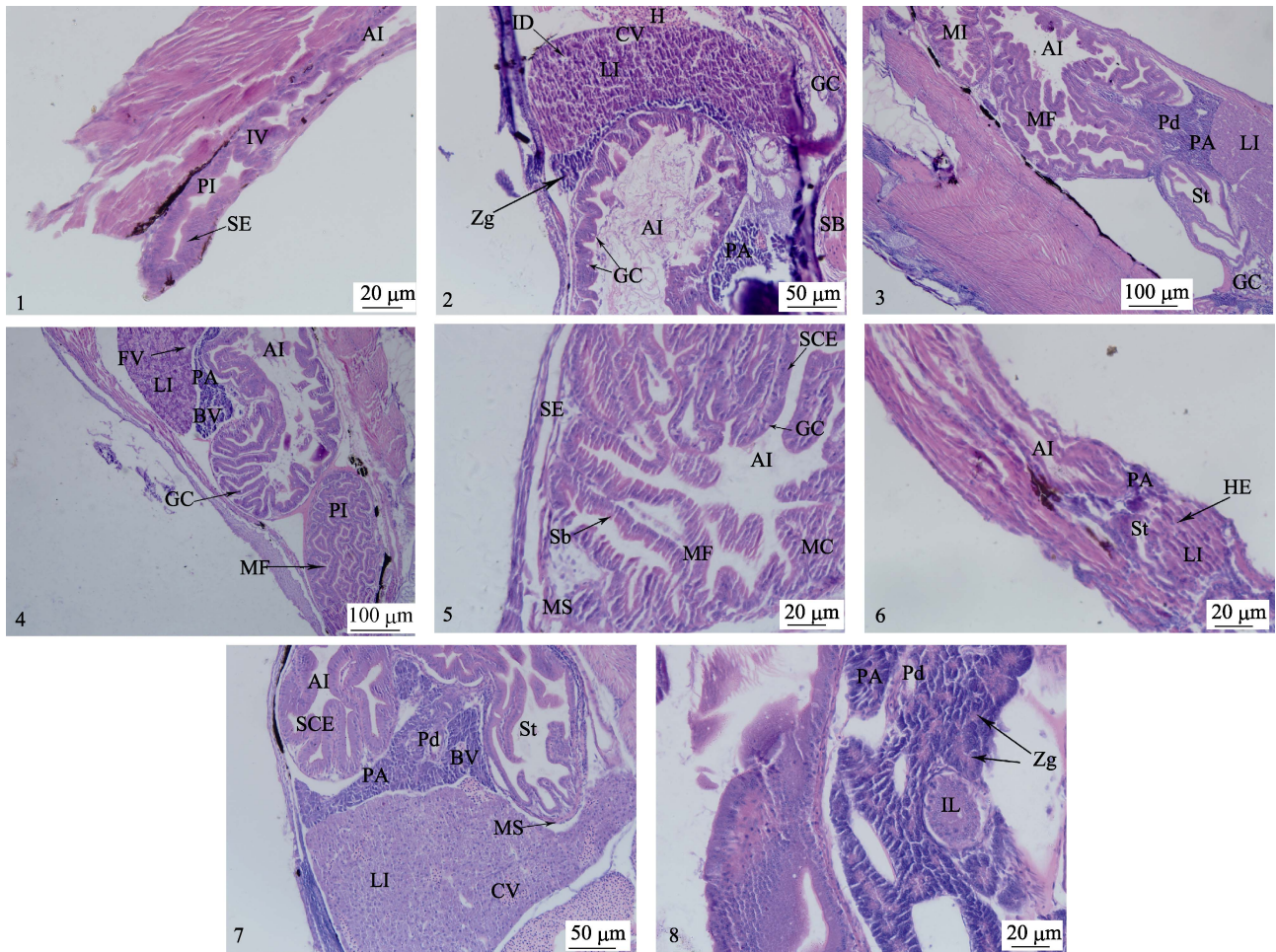


图2 美洲黑石斑仔鱼消化系统组织结构观察

Fig.2 Histological observation on the structure of digestive system of larva *C. striata*

- 1: 3 d 仔鱼肠道纵切; 2: 18 d 仔鱼肝脏纵切; 3: 20 d 仔鱼腹部纵切; 4: 22 d 仔鱼肠道纵切; 5: 32 d 仔鱼肠道纵切; 6: 6 d 仔鱼腹部纵切; 7: 20 d 仔鱼肝胰脏与前肠纵切; 8: 27 d 仔鱼胰脏纵切; AI: 前肠; BV: 血管; CV: 中央静脉; FV: 脂肪空泡; GC: 杯状细胞; H: 心脏; HE: 肝细胞; ID: 小叶间胆管; IL: 胰岛; IV: 瓣膜; LI: 肝脏; MC: 黏膜层; MF: 黏膜褶皱; MI: 中肠; MS: 肌肉层; PA: 胰脏; Pd: 胰管; PI: 后肠; Sb: 纹状缘; SB: 鱼鳔; SCE: 单层柱状细胞; SE: 浆膜层; St: 胃; Zg: 酶原颗粒

1: Longitudinal section of 3 dph larva fish digestive tract; 2: Longitudinal section of 18 dph larva fish liver; 3: Longitudinal section of 20 dph larva fish abdomen; 4: Longitudinal section of 22 dph larva fish digestive tract; 5: Longitudinal section of 32 dph larva fish digestive tract; 6: Longitudinal section of 6 dph larva fish abdomen; 7: Longitudinal section of 20 dph larva fish liver, pancreas and anterior intestine; 8: Longitudinal section of 27 dph larva fish pancreas; AI: Anterior intestine; BV: Blood vessel; CV: Central vein; FV: Fat vacuoles; GC: Goblet cell; H: Heart; HE: Hepatocyte; ID: Interlobular bile duct; IL: Islet; IV: Intestinal valvula; LI: Liver; MF: Mucosal fold; MI: Middle intestine; MS: Muscle layer; PA: Pancreas; Pd: Pancreatic duct; PI: Posterior intestine; Sb: Striated border; SB: Swimbladder; SCE: Simple columnar epithelium; SE: Serosa; St: Stomach; Zg: Zymogen granules

囊及外界食物共同提供, 即混合营养期。在此阶段, 食道、胃部以及肠道黏膜褶皱开始形成, 肝脏及胰脏的分化逐渐明显, 肝组织中血窦出现, 胰腺中已观察到酶原颗粒。这表明在卵黄囊完全吸收前, 美洲黑石斑鱼仔鱼已经具备了基本的摄食、消化及吸收外源性营养的能力, 实验结果与 Segner 等(1989)对白鲑 (*Coregonus lavaretus*) 的研究结论一致。卵黄囊消失

后, 后期仔鱼进行新陈代谢等生命活动所需的能量只能依赖于摄取外界营养物质, 仔鱼进入了外源型营养阶段。仔鱼食道及肠道中出现杯状细胞, Ribeiro 等(1999)研究发现, 杯状细胞可以分泌黏液物质, 在润滑消化道、保护表面黏膜以及防御外界细菌等多个方面具有重要作用。同时, 杯状细胞可以协助消化酶参与食物的消化分解过程(Hirji *et al*, 1983; Arellano *et al*,

2002; Gisbert *et al.*, 2004; Murray *et al.*, 2011)。随着仔鱼日龄的增加, 杯状细胞数量随之增加, 特别是在食道前端以及后肠部位, 这有利于食物的有效吞咽、消化产物的顺利运输以及排便。随着美洲黑石斑鱼仔鱼的发育, 消化组织结构分化分明, 食道、胃以及肠道黏膜褶皱逐渐增加、延长, 肠道卷曲日趋复杂, 这些结构以及组织发育分化, 使其消化道日益成熟, 仔鱼消化与吸收外界营养物质的能力逐渐提升(Hachero-Cruzado *et al.*, 2009; Comabella *et al.*, 2013)。同时, 肝脏结构与功能日益完善, 为美洲黑石斑鱼仔鱼对脂肪的高效吸收给予了重要保证。Zambonino-Infante等(2008)指出, 鱼类早期生长发育过程中, 肝脏贮存的脂肪含量呈先增加后减少的趋势, 表明了消化道的迅速发育及胰腺与肠道分解、吸收脂肪能力的完善。

3.2 仔鱼期苗种“死亡高峰”原因分析

苗种早期生长阶段是其发育过程中极为重要的时期, 该时期消化道对摄取饵料的分解、消化与吸收的能力、鱼苗成活率及生长速度有着紧密的联系。早期生长阶段, 鱼体消化系统的分化、发育以及逐渐完善是其将外界摄取物质转化为自身营养与能量的前提(殷名称, 1996)。本研究表明, 美洲黑石斑鱼仔鱼在温度为(24±1)℃、盐度为30–32的养殖环境中, 培育3 d后, 口裂形成, 仔鱼进入混合型营养阶段, 该阶段卵黄囊中贮存的营养物质用于鱼体的生长发育, 体积迅速减小。与此同时, 鱼体消化道与消化腺快速发育完善。本研究以褶皱臂尾轮虫作为仔鱼的开口饵料, 之后投喂大型轮虫, 随着日龄的增加, 逐渐投喂卤虫以及适合其口径的配合饲料等。饵料系列搭配合理, 符合其生长、发育需求, 鱼苗成活率较高。在海水鱼类养殖过程中, 仔鱼由内源性营养向外源性营养过渡时期死亡率较高。一方面该时期仔鱼消化系统结构与功能没有完善, 生物饵料大小、密度及质量与仔鱼器官发育阶段不协调, 仔鱼无法摄取足够的食物, 造成饥饿性死亡或从外界摄取生物饵料不能正常消化使消化道阻塞; 另一方面与内源性因素有关, 如卵的质量(取决于物种的遗传特性和母体经历的生存环境压力以及所产卵中的营养成分等)(殷名称, 1991a)。在此阶段, 应及时投喂适口、营养成分高、容易获得的饵料, 褶皱臂尾轮虫是其较为理想的开口饵料。Zambonino-Infante等(2001)指出, 早期仔鱼如果不能及时建立外源营养关系, 就会先消耗贮存于组织中的营养物质, 再利用重要组织器官以及运动系统的组成物质, 以满足其正常生命活动代谢所需能量。当鱼体贮存的能量无法满足其自身需求时, 仔鱼的生

长便会受到明显的抑制。随着仔鱼的生长, 其摄食与消化吸收的能力逐渐增强, 鱼体对营养物质需求增大。饵料的选择对仔鱼的生长发育有很大的影响, 饵料不适应会造成仔鱼新陈代谢能力下降, 使鱼苗死亡率大大增加。当轮虫不能满足仔鱼后期阶段生长与营养的需求时, 应当及时转换饵料, 逐渐添加卤虫幼体、卤虫等生物饵料, 以保证仔鱼对营养的需求(朱振乐, 2000)。

Sánchez-Amaya等(2007)和 Moyano等(2005)指出, 仔鱼胃腺的形成表明功能性胃的形成以及酸性消化的开始。Zambonino-Infante等(2008)指出, 胃腺形成后, 仔鱼开始具备分泌胃蛋白酶以及HCl的能力, 这是其消化与吸收配合颗粒饲料的前提。同时, Segner(1993)和 Verreth等(1992)也指出, 胃腺的形成可以在一定程度上作为养殖鱼类转化饵料的标准。本研究中, 在美洲黑石斑鱼培育30 d后开始驯化投喂微型配合饲料, 此时, 鱼体胃腺已经形成且结构与功能逐渐完善。可见, 美洲黑石斑鱼转化饵料的时间与其胃组织学变化一致。因此可以得出, 20 d后可以逐渐驯化美洲黑石斑鱼摄食配合饲料, 进行转饵。另外, 美洲黑石斑鱼胃腺的形成要晚于条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*) (16 d)(何滔等, 2012)、绿翅鲈鱼(*Thunnus thynnus*) (11 d)(Yúfera *et al.*, 2014)以及大菱鲆(*Scophthalmus maximus* L.) (23 d)(Hachero-Cruzado *et al.*, 2009), 但 Elbal等(2004)研究表明, 金头鲷(*Sparus aurata* L.)胃腺形成时间很晚(60 d)。在鱼类早期生长发育过程中, 仔鱼如果能够较早地具有功能性的胃, 就可以提前进行饵料的转化, 从而大幅度降低培育生物饵料的成本。

参 考 文 献

- Arellano JM, Storch V, Sarasquete C. Ultrastructural study on the intestine of Senegal sole, *Solea senegalensis*. *Journal of Applied Ichthyology*, 2002, 18(3): 154–158
- Chen MM, Luo J, Chen GH, *et al.* Embryonic development and morphologic observations of newly-hatched *Cheilinus undulatus* larvae. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(5): 38–44 [陈猛猛, 骆剑, 陈国华, 等. 波纹唇鱼(*Cheilinus undulatus*)的胚胎发育及初孵仔鱼形态观察. *渔业科学进展*, 2015, 36(5): 38–44]
- Chu QZ, Zhang JD, Chen G. Histological studies on postembryonic development of digestive system in *Rachycentron canadum*. *Journal of Hydroecology*, 2010, 3(4): 86–91 [初庆柱, 张健东, 陈刚, 等. 军曹鱼消化系统胚后发育的组织学研究. *水生生态学杂志*, 2010, 3(4): 86–91]
- Comabella Y, Franyutti AH, Hurtado A, *et al.* Ontogenetic development of the digestive tract in Cuban gar (*Atractosteus tristoechus*) larvae. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 2013, 23(2): 245–260
- Dadzie S, Abou-Seedo FS, Al-Shallal T. Reproductive biology of the silver pomfret, *Pampus argenteus* (Euphrasen), in

- Kuwait waters. *Journal of Applied Ichthyology*, 2000, 16(6): 247–253
- Elbal MT, Garcia Hernandez MP, Lozano MT, *et al.* Development of the digestive tract of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). Light and electron microscopic studies. *Aquaculture*, 2004, 234(1–4): 215–238
- Gao LJ, Shi ZH, Yan Y. Histological studies on development of digestive system in larval *Pampus argenteus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, 14(4): 540–544 [高露姣, 施兆鸿, 严莹. 银鲳仔鱼消化系统的组织学研究. *中国水产科学*, 2007, 14(4): 540–544]
- Gisbert E, Conklin DB, Piedrahita RH. Effects of delayed first feeding on the nutritional condition and mortality of California halibut larvae. *Journal of Fish Biology*, 2004a, 64(1): 116–132
- Gisbert E, Piedrahita RH, Conklin DE. Ontogenetic development of the digestive system in California halibut (*Paralichthys californicus*) with notes on feeding practices. *Aquaculture*, 2004b, 232(1–4): 455–470
- Hachero-Cruzado I, Ortiz-Delgado JB, Borrega B, *et al.* Larval organogenesis of flatfish brill *Scophthalmus rhombus* L.: Histological and histochemical aspects. *Aquaculture*, 2009, 286(1–2): 138–149
- He T, Xiao ZZ, Liu QH, *et al.* Histological observation of eye ontogeny in rock bream larvae (*Oplegnathus fasciatus*). *Marine Sciences*, 2012, 36(3): 49–53 [何滔, 肖志忠, 刘清华, 等. 条石鲷视觉器官早期发育的组织学观察. *海洋科学*, 2012, 36(3): 49–53]
- Hirji KN, Courtney WAM. Non-specific carboxylic esterase activity in the digestive tract of the perch, *Perca fluviatilis* L. *Journal of Fish Biology*, 1983, 22(1): 1–7
- Kato K, Ishimaru K, Sawada Y, *et al.* Ontogeny of digestive and immune system organs of larval and juvenile kelp grouper *Epinephelus bruneus* reared in the laboratory. *Fisheries Science*, 2004, 70(6): 1061–1069
- Lei JL, Lu JW. The breed predominance and culture prospects of *Centropristis striata* Linnaeus. *Marine Fisheries Research*, 2007, 28(5): 110–115 [雷霖霖, 卢继武. 美洲黑石斑鱼的品种优势和养殖前景. *海洋水产研究*, 2007, 28(5): 110–115]
- Li HY, Zhu JQ, Chen F, *et al.* The morphology of the digestive tract of *Centropristis striata*. *Journal of Biology*, 2011, 28(4): 31–34, 46 [李海燕, 竺俊全, 陈飞, 等. 美洲黑石斑鱼消化道的形态结构. *生物学杂志*, 2011, 28(4): 31–34, 46]
- Liang ZQ, Li CW, Liu MQ, *et al.* Morphological and histological observation of the digestive system in *Sinilabeo decorus tungting* (Nichols). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(5): 1051–1060 [梁志强, 李传武, 刘明求, 等. 湘华鲮消化系统的形态学与组织学研究. *中国水产科学*, 2011, 18(5): 1051–1060]
- Lin Q, Lv JY, Zhang B, *et al.* Histological studies on post-embryonic development of digestive system of seahorse *Hippocampus kuda*. *Journal of Tropical Oceanography*, 2007, 26(6): 46–51 [林强, 吕军仪, 张彬, 等. 大海马消化系统胚后发育的形态学及组织学研究. *热带海洋学报*, 2007, 26(6): 46–51]
- Mai K, Yu H, Ma H, *et al.* A histological study on the development of the digestive system of *Pseudosciaena crocea* larvae and juveniles. *Journal of Fish Biology*, 2005, 67(4): 1094–1106
- Moyano FJ, Barros AM, Prieto A, *et al.* Evaluación de la ontogenia de enzimas digestivas en larvas de hurta, *Pagrus auriga* (Pisces: Sparidae). *Revista AquaTIC*, 2005, 22(1): 39–47
- Murray HM, Wright G, Golf GP. A study of the posterior esophagus in the winter flounder, *Pleuronectes americanus*, and the yellowtail flounder, *Pleuronectes ferruginea*: A morphological evidence of pregastric digestion? *Canadian Journal of Zoology*, 2011, 72(7): 1191–1198
- Pu HY, Zhai BX, Liu HL. Histological studies on post-embryonic development of digestive system in larval catfish *Silurus asotus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2004, 11(1): 1–6 [蒲红宇, 翟宝香, 刘焕亮. 鲇仔、稚鱼消化系统胚后发育的组织学观察研究. *中国水产科学*, 2004, 11(1): 1–6]
- Ribeiro L, Sarasquete C, Dinis MT. Histological and histochemical development of the digestive system of *Solea senegalensis* (Kaup, 1958) larvae. *Aquaculture*, 1999, 171(3–4): 293–308
- Sánchez-Amaya MI, Ortiz-Delgado JB, García-López Á, *et al.* Larval ontogeny of redbanded seabream *Pagrus auriga* Valenciennes, 1843 with special reference to the digestive system. A histological and histochemical approach. *Aquaculture*, 2007, 263(1–4): 259–279
- Segner H, Rösch R, Schmidt H, *et al.* Digestive enzymes in larval *Coregonus lavaretus* L. *Journal of Fish Biology*, 1989, 35(2): 249–263
- Segner H, Rösch R, Verreth J, *et al.* Larval nutritional physiology: Studies with *Clarias gariepinus*, *Coregonus lavaretus* and *Scophthalmus maximus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 1993, 24(2): 121–134
- Stuart KR, Smith TIJ. Development of nursery systems for black sea bass *Centropristis striata*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2003, 34(3): 359–367
- Verreth JAJ, Torrelle E, Spazier E, *et al.* The development of a functional digestive system in the African catfish, *Clarias gariepinus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 1992, 23(4): 286–298
- Wu JY, Lin HR. Histological studies on post-embryonic development of the digestive system of *Epinephelus coioides*. *Journal of Fisheries of China*, 2003, 27(1): 7–12 [吴金英, 林浩然. 斜带石斑鱼消化系统胚后发育的组织学研究. *水产学报*, 2003, 27(1): 7–12]
- Xu GF, Liu Y, Li YF, *et al.* Organogenesis of the digestive system in *Brachymystax lenok* during early development. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(4): 733–742 [徐革锋, 刘洋, 李永发, 等. 细鳞鲑早期发育过程中的消化系统发生. *中国水产科学*, 2013, 20(4): 733–742]
- Yin MC. Advance and studies on early life history of fish. *Journal of Fisheries of China*, 1991a, 15(4): 348–358 [殷名称. 鱼类早期生活史研究与其进展. *水产学报*, 1991a, 15(4): 348–358]
- Yin MC. Feeding ability and growth of the yolk-sac larvae of North Sea herring. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1991b, 22(6): 554–560 [殷名称. 北海鲱卵黄囊期仔鱼的摄食能力和生长. *海洋与湖沼*, 1991b, 22(6): 554–560]
- Yin MC. Natural mortality of early life stages of fish. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1996, 20(4): 363–372 [殷名称. 鱼类早期生活史阶段的自然死亡. *水生生物学报*, 1996, 20(4): 363–372]
- Yu HR, Mai KS, Duan QY, *et al.* Feeding habits and growth performance of larvae and juveniles of *Pseudosciaena crocea* under artificial rearing conditions. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2003, 10(6): 495–501 [于海瑞, 麦康森, 段青源, 等. 人工育苗条件下大黄鱼仔、稚、幼鱼的摄食

- 与生长. 中国水产科学, 2003, 10(6): 495–501]
- Yúfera M, Ortiz-Delgado JB, Hoffman T, *et al.* Organogenesis of digestive system, visual system and other structures in Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) larvae reared with copepods in mesocosm system. *Aquaculture*, 2014, 3426–427: 126–137
- Zaiss MM, Papadakis IE, Maingot E, *et al.* Ontogeny of the digestive tract in shi drum (*Umbrina cirrosa* L.) reared using the mesocosm larval rearing system. *Aquaculture*, 2006, 260(1–4): 357–368
- Zambonino-Infante JL, Cahu CL. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 2001, 103(4): 477–487
- Zambonino-Infante JL, Gisbert E, Sarasquete C, *et al.* Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae. In: *Feeding and digestive functions of fishes*. Plymouth: Science Publishers, 2008, 281–348
- Zhu CD. Aspects on the first-feeding stage and foods of fish larvae. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1986, 10(1): 86–95 [朱成德. 仔鱼的开口摄食期及其饵料综述. *水生生物学报*, 1986, 10(1): 86–95]
- Zhu ZL. The artificial rearing technique of *Pseudosciaena crocea*. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2000, 9(2): 163–165 [朱振乐. 大黄鱼人工育苗技术. *上海水产大学学报*, 2000, 9(2): 163–165]

(编辑 马瑾艳)

Histological Observation on Post-Embryonic Development of Digestive System of *Centropristis striata*

ZHANG Tingting^{1,2}, CHEN Chao^{2①}, SHAO Yanxiang^{2,3}, CHEN Jianguo^{1,2}, SUN Tao⁴

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Key Laboratory of 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; 3. Dalian Ocean University, Dalian 116023; 4. Yantai Tianyuan Aquaculture Co., Ltd, Yantai 264000)

Abstract The development of the digestive system of *Centropristis striata* and its associated glands were examined histologically from the first day (first day post-hatch, dph) until 34th day after hatching. Sampling was performed daily between 1 dph and 15 dph with sampling size around 30 fish. After that, sampling frequency was reduced to once every other day until 34 dph with sampling size of 15 fish. The newly-hatched larvae were reared in tanks with continuous supply of oxygen. Meanwhile salinity was about 30–32 and water temperature was maintained at (24±1)°C. It was found that the yolk sac of newly-hatched larvae was relatively large, while the digestive tract was a closed straight tube with a smooth lumen dorsally attached to the yolk sac. The mouth and anus formed and opened on the 3 dph, and followed by a 4-day period of mixed endogenous-exogenous feeding. Most of the yolk sac reserves were consumed rapidly; during this period, prey capture began and the digestive system continued to develop. Specifically, the digestive tract of larvae was differentiated into esophagus, stomach and intestine, and the digestive glands (liver, gall-bladder and pancreas) began to form. Yolk sac and oil globule almost disappeared at 7 dph, and the nutritional requirements of the larvae has gradually made the transition from endogenous to exogenous. Mucous cells could be found in the epithelia of the oesophagus at 11dph, and the number of cells kept increasing during the larval development. Stomach was gradually differentiated into cardiacus, gastric body and pyloricus. At the same time, sinusoid and central veins of liver were clearly distinguishable. Gastric gland formed at 20 dph, which indicated the beginning of exogenous protein digestion. Increased wrinkles in the mucous layer and thicker muscles were detected in the intestine. Meanwhile, pancreas was abundant in zymogen granules spreading on the surrounding areas of the intestine. The structures and functions of digestive tract and digestive glands gradually became full-functional. It was concluded that *C. striata* larvae should be supplied with adequate and palatable food when they enter exogenous feeding period, and domesticated to feed formula feed after 20 dph. The findings on the development of the digestive system lead to a better understanding of the ontogeny of *C. striata*, which would be useful for improving the larval rearing techniques of this promising *Centropristis* species and therefore diversifying the freshwater aquaculture.

Key words *Centropristis striata*; Larval; Digestive system; Histology

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

饲料中不同水解蛋白对鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*) 幼鱼鱼体及组织脂肪含量的影响*



曹林^{1,2} 张婷婷^{1,4} 徐后国¹ 郑珂珂¹ 梁萌青^{1,3①}

(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. 上海海洋大学水产生命学院 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; 4. 大连海洋大学水产生命学院 大连 116023)

摘要 本研究通过 8 周的摄食生长实验来探讨高植物蛋白饲料中添加不同类型的水解蛋白对鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)幼鱼(初始平均体重为 31.99 g)鱼体及组织脂肪含量的影响。实验设 4 个等氮等能的饲料处理组, 对照组含有 30% 的鱼粉, 通过在对照组饲料基础上分别添加水解猪血蛋白、水解豆粕蛋白和水解酵母蛋白替代 10% 的鱼粉来获得不同类型的实验组饲料, 即水解猪血蛋白组、水解豆粕蛋白组和水解酵母蛋白组。养殖实验在近海浮式网箱中进行, 每组饲料投喂 3 个重复的养殖网箱, 每个网箱 30 尾鱼。实验结果显示, 高植物蛋白饲料中水解猪血蛋白、水解豆粕蛋白及水解酵母蛋白并没有对鲈鱼幼鱼的鱼体、肝脏、肌肉和内脏的脂肪含量产生显著影响。但与对照组相比, 添加水解酵母蛋白的处理组显著降低了鲈鱼幼鱼的血清甘油三酯、总胆固醇及低密度脂蛋白胆固醇含量($P < 0.05$)。水解酵母蛋白替代鱼粉显著提高了鲈鱼幼鱼肌肉中 C20:1n-9 的含量, 而水解豆粕蛋白和水解酵母蛋白显著降低了肌肉中 C22:5n-3 的含量($P < 0.05$)。与对照组相比, 水解酵母蛋白显著降低了血清中 C20:5n-3 的含量($P < 0.05$)。在腹部脂肪组织中, 与对照组相比, 猪血、豆粕及酵母蛋白水解物替代鱼粉极显著提高了饱和脂肪酸、十八碳及十六碳单不饱和脂肪酸、亚油酸及亚麻酸的含量, 而极显著降低了 C20:1n-9、C20:4n-6、C22:5n-3 和 C22:6n-3 的含量($P < 0.01$)。本研究表明, 高植物蛋白饲料中猪血、豆粕及酵母蛋白水解物替代 10% 的饲料鱼粉并未有效调节鲈鱼幼鱼鱼体、肝脏、肌肉及内脏的脂肪累积, 但水解酵母蛋白在一定程度上改善了血清甘油三酯和胆固醇的代谢。水解蛋白对鲈鱼幼鱼脂肪酸组成的调节因水解蛋白的类型及鱼体组织类型而异。本研究是国内外首次系统研究不同类型水解蛋白对养殖鱼类脂肪累积的调节作用, 对该领域相关研究具有重要借鉴和参考意义。

关键词 鲈鱼; 高植物蛋白饲料; 水解蛋白; 脂肪累积

中图分类号 S963 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2017)03-0086-10

在当今水产养殖行业中, 鱼体脂肪的过度沉积已经成为影响我国水产养殖业持续发展的一个重要因素(艾庆辉, 2015)。由于受水环境、土地等水产养殖资源的限制, 高密度养殖成为必然趋势, 鱼类游泳运动受到限制, 加上目前对人工配合饲料营养组成研究

仍然不够精确, 从而导致了鱼体脂肪的过度沉积。鱼体脂肪的过度沉积会严重损害鱼的健康, 不但引起脂肪肝等病变, 还会严重损害鱼类的免疫功能和抗病力。另外, 脂肪在鱼体腹部的过度沉积还会造成养殖鱼的“大肚子”现象, 大大降低市场价值, 同时, 肌

* 国家自然科学基金项目(31172423)和公益性行业(农业)专项(201303053)共同资助[This work was supported by National Natural Science Foundation (31172423) and Special Fund for Agro-Scientific Research in the Public Interest (201303053)].
曹林, E-mail: 879272902@qq.com

① 通讯作者: 梁萌青, 研究员, E-mail: liangmq@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-03-28, 收修改稿日期: 2016-04-20

肉中脂肪的过度沉积还会影响其营养价值和口感, 从而影响鱼的品质(Hillestad *et al.*, 1994; 梁洪等, 2007; 向泉等, 2013; 韩光明等, 2011; 孙瑞健等, 2015)。因此, 研究如何降低养殖鱼类的脂肪沉积已经成为当前水产养殖的一个迫切任务。采用“大体积低密度养殖”, 通过增强鱼类运动来降脂的方法受到目前养殖资源环境匮乏的制约, 因此, 改善饲料配方、调节饲料营养组成是调控养殖鱼类脂肪沉积的根本途径。

本实验室之前的研究工作发现, 以低值小杂鱼或水产品加工厂的下脚料为原料, 通过蛋白酶水解后得到的水解鱼蛋白, 不但具有诱食和促进鱼类生长的作用(Aksnes *et al.*, 2006; Kotzamanis *et al.*, 2007), 而且在高植物蛋白饲料中使用还具有调节鱼体脂肪沉积的作用(郑珂珂等, 2011; 卫育良等, 2014; 牟玉超等, 2016)。Xu 等(2016)对大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)幼鱼的研究发现, 在含 15%鱼粉的高植物蛋白饲料中, 以水解鱼蛋白替代饲料中 7%或者 14%的鱼粉, 能够有效降低鱼体、内脏及血清中的脂肪含量。而且, 高植物蛋白饲料中添加水解鱼蛋白降低动物体脂肪沉积的现象在哺乳动物及其他鱼类的研究中也类似发现。Espe 等(2012)对大西洋鲑(*Salmo salar*)的研究表明, 在高植物蛋白饲料中应用水解鱼蛋白能够降低大西洋鲑的腹部脂肪含量; 在哺乳动物中, Liasset 等(2009)也发现水解鱼蛋白具有类似的降低脂肪沉积的作用。

基于以上研究结果, 本实验设计的目的是在前期水解鱼蛋白研究结果的基础上, 继续探讨其他类型的水解蛋白(即水解猪血红蛋白、水解豆粕蛋白和水解酵母蛋白)在高植物蛋白饲料中的使用是否也同样具有降低鱼体脂肪沉积的作用。从而一方面为通过营养学途径调控鱼类脂肪沉积提供新的思路, 另一方面促进低值蛋白的高值化利用(通过蛋白酶解还可降低低值蛋白原料的营养抗性)。本研究选取我国重要的海水养殖种类鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)为研究对象, 以期为解决鲈鱼养殖过程中的脂肪过度沉积问题提供新的方法。

1 材料与方法

1.1 水解蛋白的制备

本研究水解蛋白的来源为猪血粉、豆粕及酵母粉, 水解蛋白的制备参考 Zheng 等(2012), 选用 2 种蛋白酶(碱性蛋白酶和风味蛋白酶)进行双酶水解, 离心得到粗滤酶解液。将所得酶解液用 Pellicon 2 超

滤膜堆装置(1000 Da)超滤, 得到低分子水解蛋白, 使用旋转蒸发仪(BUCHI)浓缩得到浓缩液, 然后将其冷冻干燥后保存备用。

1.2 实验饲料

本研究以鱼粉、植物蛋白(豆粕、玉米蛋白粉、谷朊粉)及蛋白水解物为蛋白源, 以鱼油为脂肪源, 制作成 4 种等氮等能的饲料(表 1)。以不添加水解蛋白的饲料为对照组(C)。在基础饲料中分别添加水解猪血红蛋白、水解豆粕蛋白及水解酵母蛋白来替代饲料中 10%鱼粉中的蛋白, 制作另外 3 种实验饲料。调整高筋粉的添加量来调平配方。

所有原料粉碎过 80 目筛, 按照饲料配方(表 1)将原料混合, 制成粒径为 3 mm 的饲料, 用烘箱 55℃下 12 h 烘干, -20℃保存备用。

1.3 实验鱼养殖管理

实验鱼为从宁波海湾育苗场购买的同一批孵化的鱼苗, 实验开始前, 在大网箱(3.0 m×3.0 m×3.0 m)中投喂对照组饲料暂养 7 d, 以适应养殖水环境和实验饲料。

实验开始前, 将实验鱼饥饿 24 h, 然后用丁香酚麻醉(1:10000), 称重。将大小均一的鱼(初始平均体重为 31.99 g)随机分到 12 个海水浮式网箱(1.5 m×1.5 m×2.0 m)中, 每箱 30 尾; 每组饲料投喂 3 个重复网箱; 每天早晚(06:00 和 18:00)各投喂 1 次; 实验持续 8 周; 实验期间, 水温保持在 28–29.5℃, 盐度为 29–31, 溶解氧为 6 mg/L。

1.4 样品采集及检测分析

实验结束时, 停食 24 h, 每桶随机取 3 尾鱼, 保存于-20℃, 用于鱼体脂肪及水分分析; 每桶另外随机取 3 尾鱼, 用 27 号针和 1 ml 注射器从尾静脉取血, 血液放入消过毒的离心管, 室温凝结 2 h 后, 4℃凝结 4–6 h; 4℃, 836 × g 离心 10 min, 将血清吸出, -80℃保存备用。取血结束后, 取肌肉、肝脏及内脏用于脂肪及脂肪酸成分分析, 样品保存于-80℃备用。

饲料和鱼体样品在 105℃烘干至恒重, 通过失重法测定水分含量。鱼体及部分组织脂肪使用索氏抽提法测定。样品量较少的组织采用氯仿-甲醇法测定。鱼体组织的脂肪酸含量测定方法参考 Mourente 等(1999), 气相色谱法(GS, HP6890, 美国)稍作改进。

1.5 数据计算与统计

肥满度、肝脏指数及内脏指数的计算公式如下:

表1 饲料配方组成(干物质, %)
Tab.1 Formulation and compositions of experimental diets (Dry matter, %)

原料 Ingredients	饲料处理 Dietary treatments			
	对照 Control	水解猪血蛋白 Pig blood protein hydrolysate	水解豆粕蛋白 Soy protein hydrolysate	水解酵母蛋白 Yeast protein hydrolysate
鱼粉 Fish meal	30	20	20	20
猪血水解蛋白 Pig blood protein hydrolysate		7		
豆粕水解蛋白 Soybean meal protein hydrolysate			12.5	
酵母水解蛋白 Yeast protein hydrolysate				14.5
豆粕 Soybean meal	13	13	13	13
玉米蛋白粉 Corn gluten meal	12	12	12	12
谷朊粉 Wheat gluten	9	9	9	9
高筋粉 High gluten flour	11.1	13.1	7.6	5.6
小麦粉 Wheat meal	10	10	10	10
鱼油 Fish oil	7.5	8.5	8.5	8.5
卵磷脂 Soybean lecithin	1	1	1	1
维生素预混料 Vitamin premix ¹	1.5	1.5	1.5	1.5
矿物质预混料 Mineral premix ²	1.5	1.5	1.5	1.5
磷酸二氢钙 CaH ₂ PO ₄	1.5	1.5	1.5	1.5
50%氯化胆碱 50% Choline chloride	1	1	1	1
维生素 C Vitamin C	0.5	0.5	0.5	0.5
乙氧基喹啉 Ethoxyquin	0.05	0.05	0.05	0.05
富马酸 Fumaric acid	0.05	0.05	0.05	0.05
甜菜碱 Betaine	0.15	0.15	0.15	0.15
甘氨酸 Glycine	0.15	0.15	0.15	0.15
营养水平 Proximate composition				
水分 Moisture	5.80	5.07	5.15	5.23
粗蛋白 Crude protein	44.20	43.88	43.97	43.95
粗脂肪 Crude lipid	10.99	11.25	11.27	11.30
灰分 Ash	10.41	8.73	10.36	10.63
总能 Gross energy (kJ/g)	19.70	20.15	19.87	19.81

1. 维生素混合料(mg/kg or g/kg 饲料): 维生素 D 5 mg; 核黄素 45 mg; 生物素 1.20 mg; 盐酸吡哆醇 20 mg; 维生素 A 32 mg; 维生素 E 120 mg; 维生素 B₁₂ 0.1 mg; 肌醇 800 mg; 烟酸 200 mg; 硫酸素 25 mg; 叶酸 20 mg; 泛酸 60 mg; 维生素 K₃ 10 mg; 次粉 18.67 g

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

1. Vitamin premix (mg/kg or g/kg diet): vitamin D 5 mg; riboflavin 45 mg; biotin 1.20 mg; pyridoxine 20 mg; vitamin A 32 mg; vitamin E 120 mg; vitamin B₁₂ 0.1 mg; inositol 800 mg; tocopherol acetate 200 mg; thiamine 25 mg; folic acid 20 mg; pantothenate 60 mg; menadione 10 mg; wheat flour 18.67 g

2. Mineral premix (mg/kg or g/kg diet): MgSO₄·4H₂O 1200 mg; ZnSO₄·7H₂O 50 mg; CoCl₂·6H₂O 50 mg; CuSO₄·5H₂O 10 mg; KI 0.8 mg; Ca (H₂PO₄)₂·H₂O 3000 mg; FeSO₄·7H₂O 80 mg; NaCl 100 mg; NaF 2 mg; Mordenzeo 15.51 g

肥满度(Condition factor, CF)=体重/体长³×100

肝体比(Hepatosomatic index, HSI, %)=肝脏湿重/鱼体湿重×100

脏体比(Viserosomatic index, VSI, %)=内脏湿重/鱼体湿重×100

用 SPSS 16.0 统计软件对实验各处理的数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 当不同处理之间存在显著差异时($P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异

极显著), 采用 Tukey 法进行均值间多重比较, 所有数值用平均值±标准误(Mean±SE)表示。

2 结果

2.1 不同类型的水解蛋白对鲈鱼幼鱼鱼体及组织脂肪的影响

不同类型的水解蛋白对鲈鱼幼鱼鱼体脂肪、鱼体

水分、肝脏脂肪、肌肉脂肪及内脏脂肪含量均没有产生显著影响($P>0.05$)(表 2)。肝体比、脏体比、肥满度等形体指标在各处理组间也没有显著差异($P>0.05$)。

与对照组相比, 水解酵母蛋白组鲈鱼的血清甘油三酯水平显著降低($P<0.05$), 但血清甘油三酯水平在对照组、水解猪血蛋白组及水解豆粕蛋白组之间及在添加水解蛋白的 3 个处理组之间没有显著差异($P>0.05$)。血清胆固醇与低密度脂蛋白胆固醇受饲料处理影响的趋势与血清甘油三酯类似, 但血清高密度脂蛋白胆固醇在各处理组间没有显著差异($P>0.05$)。

2.2 不同类型的水解蛋白对鲈鱼幼鱼鱼体及组织脂肪酸组成的影响

表 4、5、6、7 分别表示了鲈鱼幼鱼肝脏、肌肉、血清及脂肪组织的脂肪酸组成受饲料处理影响的情况。本研究中, 鲈鱼肝脏脂肪酸组织并未受到饲料处理的显著影响($P>0.05$)(表 3)。

对肌肉脂肪酸组成来说, 与对照组相比, 饲料中水解酵母蛋白替代鱼粉显著提高了鲈鱼肌肉中的 C20:1n-9 含量($P<0.05$)(表 4), 而肌肉 C22:5n-3 含量在对照组、水解猪血蛋白组、水解豆粕蛋白组及水解酵母蛋白组间依次显著下降($P<0.01$)。对照组 C22:5n-3 含量显著高于水解豆粕蛋白组及水解酵母蛋白组, 而

水解酵母蛋白组最低, 显著低于对照组及水解猪血蛋白组($P<0.01$)。肌肉其他脂肪酸含量并未受到饲料处理的显著影响($P>0.05$)。

对血清脂肪酸来说, 水解酵母蛋白组的 C20:5n-3 含量显著低于对照组($P<0.05$)(表 5), 而血清 C20:5n-3 含量在对照组、水解猪血蛋白组及水解豆粕蛋白组之间以及 3 种不同水解蛋白处理组之间均没有显著性差异($P>0.05$)。血清中其他脂肪酸含量并未受到饲料处理的显著性影响($P>0.05$)。

不同类型的水解蛋白对脂肪组织脂肪酸组成影响较为显著(表 6)。对照组的 C14:0 含量显著低于水解猪血蛋白组及水解豆粕蛋白组($P<0.05$), 而其 C16:0、C16:1n-7、C18:0、C18:1n-9、C18:1n-7、C18:2n-6 及饱和脂肪酸含量则显著低于添加水解蛋白的所有 3 个处理组($P<0.01$)。对照组的 C18:3n-3 含量显著低于水解猪血蛋白组及水解豆粕蛋白组($P<0.01$)。对照组的 C20:1n-9 含量显著高于添加水解蛋白的 3 个处理组($P<0.01$)。对照组的 C20:4n-6、C22:5n-3、C22:6n-3、n-3 脂肪酸、n-3 长链多不饱和脂肪酸含量及 n-3/n-6 比例显著高于其他 3 个处理组($P<0.01$), 水解猪血蛋白组和水解豆粕蛋白组的 C20:4n-6 含量显著低于对照组和水解酵母蛋白组, 而

表 2 不同类型的水解蛋白对鲈鱼幼鱼鱼体及组织脂肪的影响(平均值±标准误, $n=3$)

Tab.2 Effects of different types of protein hydrolysates on the lipid concentrations in whole body and tissues of juvenile *L. japonicus* (Mean±SE, $n=3$)

指标 Parameters	处理 Treatments				P 值 P value
	对照 Control	水解猪血蛋白 Pig blood protein hydrolysate	水解豆粕蛋白 Soy protein hydrolysate	水解酵母蛋白 Yeast protein hydrolysate	
鱼体脂肪 Lipid (Dry matter %)	23.29±1.14	23.60±0.77	25.71±1.21	25.66±1.45	0.360
鱼体水分 Moisture (%)	71.88±0.58	71.60±0.91	72.27±0.66	72.41±0.45	0.820
肝脏脂肪 Liver lipid (Dry matter %)	16.19±1.68	17.20±0.71	17.80±1.93	16.16±2.12	0.890
肌肉脂肪 Muscle lipid (Dry matter %)	3.65±0.28	4.27±0.23	3.86±0.29	3.85±0.38	0.540
内脏脂肪 Gut lipid (Dry matter %)	57.14±6.06	57.66±5.12	69.10±8.02	65.36±2.52	0.430
肝体比 HIS (%)	1.56±0.08	1.69±0.23	1.56±0.04	1.82±0.04	0.440
脏体比 VSI (%)	9.60±0.47	9.52±0.21	9.61±0.34	9.97±0.21	0.770
肥满度 CF	1.49±0.03	1.42±0.03	1.34±0.06	1.45±0.02	0.110
血清甘油三酯 Serum triglyceride (mmol/L)	1.88±0.11 ^a	1.82±0.12 ^{ab}	1.77±0.20 ^{ab}	1.31±0.06 ^b	0.030
血清胆固醇 Serum cholesterol (mmol/L)	5.54±0.30 ^a	4.94±0.22 ^{ab}	4.63±0.11 ^{ab}	4.39±0.13 ^b	0.020
血清 HDL-C ² (mmol/L)	1.20±0.06	1.08±0.21	1.05±0.10	1.03±0.09	0.780
血清 LDL-C ³ (mmol/L)	4.34±0.25 ^a	3.86±0.14 ^{ab}	3.58±0.13 ^{ab}	3.37±0.21 ^b	0.030

注: 同一行中, 标相同上标字母的数据间无显著性差异($P>0.05$); 2. HDL-C: 高密度脂蛋白胆固醇; 3. LDL-C: 低密度脂蛋白胆固醇

Note: Values in each row with same superscripts showed no significant differences ($P>0.05$); 2. HDL-C: High-density lipoprotein cholesterol; 3. LDL-C: Low density lipoprotein cholesterol

表3 不同类型的水解蛋白对鲈鱼幼鱼肝脏脂肪酸组成的影响(总脂肪酸, %)(平均值±标准误, n=3)

Tab.3 Effects of different types of protein hydrolysates on the liver fatty acid composition of juvenile *L. japonicus* (% of total fatty acids)(Mean±SE, n=3)

脂肪酸 Fatty acid	处理 Treatments				P 值 P value
	对照 Control	水解猪血蛋白 Pig blood Protein hydrolysate	水解豆粕蛋白 Soy protein hydrolysate	水解酵母蛋白 Yeast protein hydrolysate	
C 14: 0	2.49±0.05	2.46±0.14	2.91±0.06	2.68±0.25	0.198
C 16: 0	18.47±0.91	17.41±0.16	17.28±0.78	18.57±0.24	0.366
C 18: 0	4.43±0.39	3.93±0.21	3.84±0.23	4.00±0.13	0.419
∑SFA	25.39±1.25	23.80±0.30	24.03±0.94	25.25±0.36	0.442
C 16: 1n-7	6.57±0.20	6.78±0.28	6.53±0.35	6.73±0.25	0.900
C 18: 1n-9	22.07±0.53	21.89±0.11	20.41±0.99	20.38±0.55	0.172
C 18: 1n-7	3.20±0.01	2.80±0.13	3.13±0.09	3.15±0.08	0.053
C 20: 1n-9	1.77±0.10	1.64±0.08	1.67±0.09	1.77±0.11	0.684
∑MUFA	31.83±0.59	31.47±0.29	30.06±1.02	30.26±0.68	0.268
C 18: 2n-6	10.32±0.91	9.39±0.67	12.45±0.96	9.94±0.58	0.105
C 20: 4n-6	1.16±0.03	1.24±0.14	1.02±0.07	1.13±0.02	0.386
∑n-6	11.48±0.93	10.63±0.65	13.47±0.92	10.70±0.95	0.152
C 18: 3n-3	1.07±0.09	1.08±0.09	1.41±0.10	1.12±0.04	0.052
C 20: 5n-3	4.09±0.20	4.17±0.35	4.58±0.44	4.03±0.25	0.635
C 22: 5n-3	1.98±0.14	2.11±0.16	2.18±0.21	1.56±0.08	0.084
C 22: 6n-3	11.34±1.01	12.07±0.58	12.41±1.05	12.86±1.29	0.761
∑n-3	18.48±1.23	19.43±1.08	20.57±1.66	19.57±1.42	0.763
∑n-3/∑n-6	1.64±0.19	1.84±0.10	1.53±0.12	1.89±0.32	0.593
∑n-3 LC-PUFA	17.42±1.25	18.35±1.00	19.16±1.58	18.44±1.45	0.834

SFA: 饱和脂肪酸; MUFA: 单不饱和脂肪酸; n-6: n-6 系列不饱和脂肪酸; n-3: n-3 系列不饱和脂肪酸; LC-PUFA: 长链多不饱和脂肪酸。同一行中标相同上标字母的数据间无显著性差异($P>0.05$)。下表同

SFA: Saturated fatty acids; MUFA: Monounsaturated fatty acid; n-6: n-6 series unsaturated fatty acids; n-3: n-3 series unsaturated fatty acids; LC-PUFA: Long chain polyunsaturated fatty acids. Values in each row with same superscripts showed no significant differences ($P>0.05$). The same as following tables

表4 不同类型的水解蛋白对鲈鱼幼鱼肌肉脂肪酸组成的影响(总脂肪酸, %)(平均值±标准误, n=3)

Tab.4 Effects of different types of protein hydrolysates on the muscle fatty acid composition of juvenile *L. japonicus* (% of total fatty acids)(Mean±SE, n=3)

脂肪酸 Fatty acid	处理 Treatments				P 值 P value
	对照 Control	水解猪血蛋白 Pig blood protein hydrolysate	水解豆粕蛋白 Soy protein hydrolysate	水解酵母蛋白 Yeast protein hydrolysate	
C 14: 0	2.35±0.36	2.34±0.06	2.68±0.29	2.31±0.22	0.730
C 16: 0	19.09±0.29	19.17±0.20	18.65±0.22	19.38±0.29	0.296
C 18: 0	5.20±0.45	5.37±0.26	5.10±0.28	5.37±0.10	0.895
∑SFA	26.64±0.11	26.90±0.37	26.43±0.22	27.06±0.41	0.507
C 16: 1n-7	4.59±0.21	4.94±0.01	5.08±0.17	4.52±0.23	0.154
C 18: 1n-9	16.40±0.60	17.75±0.38	17.89±0.11	16.57±0.80	0.182
C 18: 1n-7	2.57±0.06	2.45±0.06	2.58±0.04	2.58±0.03	0.294
C 20: 1n-9	1.35±0.05 ^b	1.52±0.04 ^{ab}	1.54±0.06 ^{ab}	1.69±0.06 ^a	0.011
∑MUFA	23.56±0.80	25.15±0.41	25.54±0.32	23.68±1.06	0.190
C 18: 2n-6	9.96±0.75	9.96±0.34	10.36±0.52	9.69±0.21	0.825
C 20: 4n-6	2.11±0.44	1.74±0.22	1.52±0.17	2.10±0.39	0.538
∑n-6	12.07±0.56	11.70±0.50	11.88±0.35	11.79±0.33	0.945
C 18: 3n-3	1.07±0.13	1.14±0.03	1.23±0.09	1.21±0.04	0.529
C 20: 5n-3	5.46±0.19	5.66±0.48	5.86±0.24	5.78±0.11	0.774
C 22: 5n-3	2.62±0.10 ^a	2.27±0.10 ^{ab}	2.19±0.02 ^{bc}	1.81±0.12 ^c	0.002
C 22: 6n-3	15.28±1.01	14.95±0.84	15.87±1.02	17.78±0.79	0.212
∑n-3	24.42±1.08	24.02±1.29	25.15±1.16	26.58±0.87	0.431
∑n-3/∑n-6	2.03±0.14	2.07±0.18	2.13±0.15	2.26±0.07	0.701
∑n-3 LC-PUFA	23.36±1.17	22.88±1.26	23.92±1.24	25.37±0.89	0.492

表 5 不同类型的水解蛋白对鲈鱼幼鱼血清脂肪酸组成的影响(%总脂肪酸)(平均值±标准误, $n=3$)
Tab.5 Effects of different types of protein hydrolysates on the serum fatty acid composition of juvenile *L. japonicus* (% of total fatty acids) (Mean±SE, $n=3$)

脂肪酸 Fatty acid	处理 Treatments				P 值 P value
	对照 Control	水解猪血蛋白 Pig blood Protein hydrolysate	水解豆粕蛋白 Soy protein hydrolysate	水解酵母蛋白 Yeast protein hydrolysate	
C 14: 0	2.02±0.16	2.05±0.27	1.70±0.03	1.85±0.17	0.530
C 16: 0	18.40±0.18	18.57±0.30	17.89±0.27	18.05±0.22	0.267
C 18: 0	4.41±0.08	4.59±0.01	4.48±0.21	4.25±0.12	0.383
∑SFA	24.83±0.32	25.22±0.43	24.08±0.22	24.15±0.37	0.128
C 16: 1n-7	3.71±0.36	3.64±0.20	3.28±0.11	3.55±0.16	0.586
C 18: 1n-9	13.36±1.02	13.35±0.81	12.19±0.79	12.92±0.43	0.703
C 18: 1n-7	2.16±0.15	1.98±0.07	1.94±0.10	2.20±0.10	0.296
C 20: 1n-9	1.19±0.06	1.17±0.05	1.13±0.06	1.30±0.05	0.233
∑MUFA	19.23±1.52	18.98±1.08	17.41±1.00	18.67±0.68	0.673
C 18: 2n-6	7.28±0.39	6.29±0.34	6.55±0.46	6.39±0.36	0.336
C 20: 4n-6	1.66±0.15	1.67±0.08	1.90±0.10	1.81±0.11	0.411
∑n-6	8.94±0.26	7.96±0.27	8.46±0.42	8.20±0.25	0.220
C 18: 3n-3	0.84±0.05	0.73±0.06	0.78±0.04	0.77±0.06	0.530
C 20: 5n-3	8.41±0.32 ^a	7.71±0.24 ^{ab}	7.98±0.21 ^{ab}	7.34±0.04 ^b	0.049
C 22: 5n-3	2.47±0.09	2.26±0.12	2.35±0.18	2.00±0.04	0.118
C 22: 6n-3	24.24±2.10	23.80±1.04	26.68±0.75	25.91±0.89	0.407
∑n-3	35.96±2.29	34.50±1.10	37.79±0.81	36.02±0.83	0.469
∑n-3/∑n-6	4.04±0.37	4.35±0.26	4.49±0.26	4.41±0.22	0.710
∑n-3 LC-PUFA	35.12±2.34	33.77±1.15	37.02±0.84	35.25±0.86	0.500

表 6 不同类型的水解蛋白对鲈鱼幼鱼脂肪组织脂肪酸组成的影响(总脂肪酸, %)(平均值±标准误, $n=3$)
Tab.6 Effects of different types of protein hydrolysates on the adipose tissue fatty acid composition of juvenile *L. japonicus* (% of total fatty acids) (Mean±SE, $n=3$)

脂肪酸 Fatty acid	处理 Treatments				P 值 P value
	对照 Control	水解猪血蛋白 Pig blood protein hydrolysate	水解豆粕蛋白 Soy protein hydrolysate	水解酵母蛋白 Yeast protein hydrolysate	
C 14: 0	0.85±0.27 ^b	3.81±0.41 ^a	4.16±0.13 ^a	2.38±0.84 ^{ab}	0.017
C 16: 0	3.09±0.91 ^b	15.84±1.63 ^a	16.78±0.58 ^a	12.55±1.95 ^a	0.002
C 18: 0	0.57±0.18 ^b	2.94±0.32 ^a	3.03±0.11 ^a	2.33±0.25 ^a	0.002
∑SFA	4.52±1.36 ^b	22.60±2.36 ^a	23.97±0.81 ^a	18.08±2.56 ^a	0.002
C 16: 1n-7	1.23±0.40 ^b	6.07±0.65 ^a	6.60±0.20 ^a	4.31±0.81 ^a	0.002
C 18: 1n-9	3.28±0.93 ^b	16.77±1.85 ^a	18.46±0.59 ^a	12.31±1.87 ^a	0.002
C 18: 1n-7	0.49±0.14 ^b	2.19±0.30 ^a	2.27±0.07 ^a	1.84±0.25 ^a	0.005
C 20: 1n-9	6.01±0.30 ^a	2.30±0.49 ^b	1.99±0.18 ^b	2.44±0.56 ^b	0.002
∑MUFA	5.01±1.47 ^b	25.03±2.77 ^a	27.33±0.83 ^a	18.45±2.92 ^a	0.002
C 18: 2n-6	2.70±0.76 ^b	12.63±1.45 ^a	14.06±0.45 ^a	9.35±1.65 ^a	0.002
C 20: 4n-6	6.79±0.04 ^a	0.53±0.02 ^c	0.54±0.03 ^c	0.74±0.01 ^b	0.000
∑n-6	9.49±0.80	13.17±1.65	14.60±0.46	10.09±1.66	0.086
C 18: 3n-3	0.87±0.02 ^b	1.71±0.08 ^a	1.84±0.05 ^a	1.23±0.13 ^b	0.000
C 20: 5n-3	4.19±0.18	4.57±0.19	4.73±0.08	3.89±0.42	0.116
C 22: 5n-3	7.62±0.14 ^a	1.93±0.09 ^{bc}	2.20±0.07 ^b	1.49±0.14 ^c	0.000
C 22: 6n-3	14.61±0.24 ^a	5.91±0.76 ^b	6.92±0.35 ^b	4.80±0.71 ^b	0.000
∑n-3	27.29±0.09 ^a	14.12±0.99 ^b	15.69±0.46 ^b	11.41±1.40 ^b	0.000
∑n-3/∑n-6	2.87±0.17 ^a	1.09±0.09 ^b	1.08±0.03 ^b	1.14±0.05 ^b	0.000
∑n-3 LC-PUFA	26.42±0.07 ^a	12.41±0.91 ^b	13.85±0.45 ^b	10.18±1.27 ^b	0.000

C22:5n-3 含量在水解酵母蛋白组显著低于对照组和水解豆粕蛋白组($P<0.01$)。

3 讨论

养殖鱼类的脂肪过度沉积问题已经成为困扰水产养殖健康和可持续发展的重要因素,尤其是对一些脂肪含量相对较高的鱼类(如鲈鱼),养殖鲈鱼的脂肪过度沉积(“大肚子”现象)严重降低了其品质和价值。因此,如何通过营养学途径开发降低鱼体脂肪沉积的技术措施成为鲈鱼养殖产业一个迫切的问题。在这方面,本实验室之前对大菱鲆的研究取得了成功的经验,即利用高植物蛋白饲料中添加水解鱼蛋白的方式能够降低大菱鲆机体及组织脂肪含量。然而,本研究中,高植物蛋白饲料中利用其他水解蛋白进行鱼粉替代的尝试并未取得同水解鱼蛋白一样的降低鱼体脂肪累积的作用效果。仅仅是水解酵母蛋白对鲈鱼幼鱼的血清甘油三酯、胆固醇以及低密度脂蛋白胆固醇的含量起到了显著的降低作用。这与其他一些研究中观察到的水解低值蛋白原料对养殖鱼类体脂累积的影响结果类似,杨凡等(2015)研究发现,酵母水解物配合豆粕替代部分的鱼粉,不会对异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)的肥满度、肝体比产生影响。胡先勤等(2005)研究也发现,将不同量的大豆水解蛋白小肽添加到豆浆中投喂鲫鱼(*Carassius auratus*)苗,鱼体的粗脂肪含量没有发生明显的变化。

在哺乳动物及大西洋鲑等种类中进行的研究表明,水解鱼蛋白中调节脂肪代谢的物质主要是一些小分子物质,如牛磺酸、肉碱及肌酸等(Brosnan *et al.*, 2004; Arslan, 2006; Pegg, 2009; Liasset *et al.*; 2009)。本研究中水解猪血蛋白、水解豆粕蛋白及水解酵母蛋白并未降低机体主要脂肪累积指标的结果表明,这些水解蛋白中调节脂肪代谢的有效功能物质的含量跟水解鱼蛋白中可能存在很大的不同。而且,研究还表明,蛋氨酸也可能是水解鱼蛋白中调节脂肪代谢的主要功能物质,Espe 等(2010)对大西洋鲑的研究则表明,当给大西洋鲑投喂蛋氨酸缺乏的饲料时,其机体甘油三酯含量上升。蛋氨酸降低脂肪生成酶及甘油三酯含量的作用在 Dias 等(2005)对欧洲黑鲈(*Dicentrarchus labrax*)的研究中也得到了证明。Gaylord 等(2007)研究也表明,蛋氨酸能够调节虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)脂肪代谢及内脏脂肪含量。因为猪血蛋白、豆粕蛋白和酵母蛋白中普遍蛋氨酸含量较低,因此,本研究结果从侧面为上述理论提供了证据,即蛋氨酸可能是水解蛋白中调节动物脂肪累积的主要功能物质之一。不

过,本研究中,即便饲料中添加 3 种不同的水解蛋白均未对鲈鱼幼鱼的机体脂肪累积主要指标产生降低作用,水解酵母蛋白降低血清甘油三酯及胆固醇的结果仍然具有正面意义。Yun 等(2012)对大菱鲆的研究发现,在高植物蛋白饲料中添加 1.0%牛磺酸(水解鱼蛋白中调节鱼体脂肪代谢的主要功能物质之一),能够有效降低大菱鲆血浆总胆固醇、游离胆固醇及低密度脂蛋白胆固醇的含量,胆固醇合成代谢关键酶—3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(HMG-CoA)的 mRNA 表达量也显著降低。结合本研究的结果,表明水解酵母中可能存在其他能够调节鱼类胆固醇代谢的功能物质。而鱼类机体胆固醇尤其是低密度脂蛋白胆固醇的降低可以减少胆固醇在肝脏及血管中的累积,提高鱼类的机体健康水平。

本研究中,不同水解蛋白对鱼体组织脂肪组成的影响在鲈鱼各组织中差异较大。水解酵母蛋白降低了肌肉中 C22:5n-3 及血清中 C20:5n-3 的含量,但提高了肌肉中 C20:1n-9 的含量,这可能是水解酵母蛋白降脂能力有限的一个原因,因为通常 C20:1n-9 是用来氧化供能的主要脂肪酸(Tocher *et al.*, 1985),而 C20:1n-9 含量的升高表明水解酵母蛋白并未促进脂肪的氧化。而在鲈鱼的腹部脂肪组织中,猪血、豆粕及酵母蛋白水解物的添加极显著提高了饱和脂肪酸、十八碳及以下单不饱和脂肪酸、亚油酸及亚麻酸的含量,而极显著降低了 C20:1n-9、C20:4n-6、C22:5n-3 和 C22:6n-3 的含量。基于现有的结果,很难解释本研究中水解蛋白引起的腹部脂肪的脂肪酸组成变化,可能是水解蛋白中的某些未知活性物质造成了鲈鱼腹部脂肪中的长链多不饱和脂肪酸的选择性利用。然而,水解蛋白的添加造成的腹部脂肪组织中饱和脂肪酸含量的升高和长链多不饱和脂肪酸含量的下降对鲈鱼养殖业来说是一个利好因素,因为腹部脂肪组织是非食用部分,腹部脂肪组织中长链多不饱和脂肪酸的降低有利于节省饲料中长链多不饱和脂肪酸的供给。

目前,关于不同类型的水解蛋白(水解猪血蛋白、水解豆粕蛋白和水解酵母蛋白)对鱼类生长及生理机能影响的差异,相关研究非常少,仅有的一些研究主要关注了对其生长性能的影响。Skalli 等(2014)在最新的研究中使用不同梯度(6%和 12%)的水解酵母蛋白、水解猪血蛋白及水解猪血红球蛋白投喂欧洲黑鲈仔稚鱼,结果发现,当这些水解蛋白的添加量在 6%时,与对照组(添加 12%水解鱼蛋白)相比并没有降低实验鱼的生长及成活率。而且,这些水解蛋白处理组相互之间也没有显著性差异。本研究是国内外首次系

统地比较不同水解蛋白在高植物蛋白饲料中对鱼体脂肪的调节作用, 填补了该领域的空白。

除了水解蛋白的差异方面的原因, 养殖鱼种类的不同也可能是造成水解蛋白脂肪代谢调节功能差异的重要原因。虽然实验室之前的研究发现了在高水平的植物蛋白饲料中水解鱼蛋白对大菱鲆脂肪累积的调节作用(Xu *et al.*, 2016), 但在牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)及虹鳟上却并未发现水解鱼蛋白类似的作用(郑珂珂等, 2011; 刘峰等, 2006; Barrias, 2000)。另外, 曾本和等(2015)对草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)的研究以及牟玉超等(2016)对大菱鲆幼鱼的研究都发现了水解酵母对鱼体脂肪累积的调节作用, 但本研究对鲈鱼幼鱼使用类似的水解酵母蛋白却没有发现类似的作用, 这表明, 不同种类的养殖鱼类其脂肪代谢情况差异很大, 因此, 需要采取不同的营养策略调节其脂肪代谢和累积。

综上所述, 高植物蛋白饲料添加不同类型的水解蛋白(水解猪血红蛋白、水解豆粕蛋白及水解酵母蛋白)没有显著影响鲈鱼鱼体及组织脂肪累积。但是, 高植物蛋白饲料中水解酵母蛋白替代 10%鱼粉显著降低了鲈鱼幼鱼血清甘油三酯、总胆固醇及低密度脂蛋白胆固醇含量。水解蛋白对鲈鱼组织脂肪酸组成的影响因组织和水解蛋白的种类而异。高植物蛋白饲料中水解蛋白的添加降低了腹部脂肪组织中长链多不饱和脂肪酸的含量, 提高了十八碳及以下脂肪酸的含量。

参 考 文 献

- Ai QH. Ocean University of China Prof. Ai Qinghui: Fish fat deposition and regulation. *Current Fisheries*, 2015(11): 53–54 [艾庆辉. 中国海洋大学艾庆辉教授: 鱼类脂肪沉积以及调控研究. 当代水产, 2015(11): 53–54]
- 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*, 2006, 261(3): 1102–1110
- Arslan C. L-Carnitine and its use as a feed additive in poultry feeding a review. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 2006, 157(3): 134–142
- Barrias C, Oliva-Teles A. The use of locally produced fish meal and other dietary manipulations in practical diets for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*, 2000, 31(2): 213–218
- Brosnan JT, Jacobs RL, Stead LM, *et al.* Methylation demand: A key determinant of homocysteine metabolism. *Acta Biochimica Polonica*, 2004, 51(2): 405–413
- Dias J, Alvarez MJ, Arzel J, *et al.* Dietary protein source affects lipid metabolism in the European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A Molecular and Integrative Physiology*, 2005, 142(1): 19–31
- Espe M, Rathore RM, Du ZY, *et al.* Methionine limitation results in increased hepatic FAS activity, higher liver 18:1 to 18:0 fatty acid ratio and hepatic TAG accumulation in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Amino Acids*, 2010, 39(2): 449–460
- 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. *Aquaculture Nutrition*, 2012, 18(6): 599–609
- Gaylord TG, Barrows FT, Teague AM, *et al.* Supplementation of taurine and methionine to all-plant protein diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 2007, 269(1): 514–524
- Han GM, Wang AM, Xu P, *et al.* Effects of dietary lipid levels on fat deposition and fatty acid profiles of GIFT, *Oreochromis niloticus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(2): 338–349 [韩光明, 王爱民, 徐跑, 等. 饲料脂肪水平对吉富罗非鱼体脂沉积及脂肪酸组成的影响. 中国水产科学, 2011, 18(2): 338–349]
- Hillestad M, Johnsen F. High-energy/low-protein diets for Atlantic salmon: Effects on growth, nutrient retention and slaughter quality. *Aquaculture*, 1994, 124(1–4): 109–116
- Hu XQ, Han JH. Soybean peptide applications in the carp fry. *Scientific Fish Farming*, 2005(2): 67–68 [胡先勤, 韩继宏. 大豆小肽在鲫鱼鱼苗中的应用. 科学养鱼, 2005(2): 67–68]
- 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. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A Molecular and Integrative Physiology*, 2007, 147(1): 205–214
- Liang H, Qian YX. The effects of food on lipid metabolism in cultured fish. *Fishery Sciences*, 2007, 26(9): 521–524 [梁洪, 钱云霞. 食物对养殖鱼类脂肪代谢的影响. 水产科学, 2007, 26(9): 521–524]
- Liaset B, Madsen L, Qin H, *et al.* Fish protein hydrolysate elevates plasma bile acids and reduces visceral adipose tissue mass in rats. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2009, 1791(4): 254–262
- Liu F, Mai KS, Ai QH, *et al.* Effects of dietary fish protein hydrolysate levels on growth, survival and body composition of larvae in *Pseudosciaena crocea*. *Journal of Fisheries of China*, 2006, 30(4): 502–508 [刘峰, 麦康森, 艾庆辉, 等. 鱼肉水解蛋白对大黄鱼稚鱼存活、生长以及体组成的影响. 水产学报, 2006, 30(4): 502–508]
- Mourete G, Tocher DR, Diaz-Salvago E, *et al.* Study of the n-3 highly unsaturated fatty acids requirement and antioxidant status of *Dentex dentex* larvae at the Artemia feeding stage. *Aquaculture*, 1999, 179(1–4): 291–307

- Mu YC, Liang MQ, Zheng KK, *et al.* 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.). *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(3): 49–57 [牟玉超, 梁萌青, 郑珂珂, 等. 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. *渔业科学进展*, 2016, 37(3): 49–57]
- Pegg AE. Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB Life*, 2009, 61(9): 880–894
- Skalli A, Zambonino-infante JL, Kotzamanis Y, *et al.* Peptide molecular weight distribution of soluble protein fraction affects growth performance and quality in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture Nutrition*, 2014, 20(2): 118–131
- Sun RJ, Xu W, Mi HF, *et al.* Effects of dietary lipid level and feeding frequency on growth, body composition and lipid deposition in juvenile large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(3): 401–409 [孙瑞健, 徐玮, 米海峰, 等. 饲料脂肪水平和投喂频率对大黄鱼生长、体组成及脂肪沉积的影响. *水产学报*, 2015, 39(3): 401–409]
- Tocher DR, Fraser AJ, Sargent JR, *et al.* Fatty acid composition of phospholipids and neutral lipids during embryonic and early larval development in Atlantic herring (*Clupea harengus*, L.). *Lipids*, 1985, 20(2): 69–74
- Wei YL, Liang MQ, Zheng KK, *et al.* The effects of fish protein hydrolysate on the digestibility of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Acta Hydrobiology Sinica*, 2014, 38(5): 910–920 [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]
- Xiang X, Zhou XH, Chen J, *et al.* Effect of dietary lipid level on body index, fat deposition and lipid metabolic enzyme activities of juvenile *Onychostoma sima*. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(9): 1349–1358 [向泉, 周兴华, 陈建, 等. 饲料脂肪水平对白甲鱼幼鱼形体指数、脂肪沉积和脂肪代谢酶活性的影响. *水产学报*, 2013, 37(9): 1349–1358]
- Xu HG, Mu YC, Zhang Y, *et al.* Graded levels of fish protein hydrolysate in high plant diets for turbot (*Scophthalmus maximus*): Effects on growth performance and lipid accumulation. *Aquaculture*, 2016, 454: 140–147
- Yang F, Chen CF, Yi JH, *et al.* Effect of autolyzed yeast on the growth and immune function of silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). *Feed Industry*, 2015, 36(4): 60–64 [杨凡, 陈昌福, 易建华, 等. 酵母水解物对异育银鲫生长和免疫性能的影响. *饲料工业*, 2015, 36(4): 60–64]
- Yun B, Ai QH, Mai KS, *et al.* Synergistic effects of dietary cholesterol and taurine on growth performance and cholesterol metabolism in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) fed high plant protein diets. *Aquaculture*, 2012, 324(1): 85–91
- Zeng BH, Xiang X, Yang WJ, *et al.* Effects of yeast hydrolyzate on growth and body composition of juvenile *Ctenopharyngodon idellus*. *Feed Industry*, 2015, 36(16): 16–19 [曾本和, 向泉, 杨文娇, 等. 酵母水解物对草鱼生长性能和体成分的影响. *饲料工业*, 2015, 36(16): 16–19]
- 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*). *Aquaculture Nutrition*, 2012, 18(3): 297–303
- Zheng KK, Liang MQ, Yao HB, *et al.* Inclusion of size-fractionated fish protein hydrolysate in high plant protein diets for Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Acta Hydrobiology Sinica*, 2011, 35(5): 829–834 [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]

(编辑 马瑾艳)

Effects of Different Protein Hydrolysates in High Plant Protein Diets on the Lipid Accumulation of Juvenile Japanese Seabass (*Lateolabrax japonicus*)

CAO Lin^{1,2}, ZHANG Tingting^{1,4}, XU Houguo¹, ZHENG Keke¹, LIANG Mengqing^{1,3①}

(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. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071; 4. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023)

Abstract An 8-week feeding trial was conducted to investigate the effects of different types of protein hydrolysate in high plant protein diets on the lipid accumulation of juvenile Japanese seabass *Lateolabrax japonicus* (initial body weight 31.99 g). Four experimental diets were formulated. The control diet contained 30% fishmeal. Different types of protein hydrolysate, i.e., pig blood protein hydrolysate, soy protein hydrolysate and yeast protein hydrolysate was separately added to the basal diet to replace 10% fishmeal to formulate three experimental diets. The feeding trail was conducted in sea floating net cages. Each diet was assigned to triplicate groups of 30 fish. The results showed that compared to the control group, the supplementation of protein hydrolysates from pig blood, soybean meal and yeast did not significantly influence most indices of lipid accumulation in *L. japonicus*. However, compared to the control group, the yeast protein hydrolysate significantly reduced the concentrations of triglyceride, cholesterol, and low density lipoprotein cholesterol in serum ($P<0.05$). The fatty acid analysis showed that compared to the control group, the yeast protein hydrolysate significantly increased the C20:1n-9 content in muscle, while the soy protein hydrolysate and yeast protein hydrolysate significantly reduced the C22:5n-3 content in muscle ($P<0.05$). Compared to the control group, the yeast protein hydrolysate significantly reduced the C20:5n-3 content in serum ($P<0.05$). In adipose tissue, compared to the control group, the protein hydrolysates from pig blood, soy, and yeast significantly increased the contents of saturated fatty acids, 18C monounsaturated fatty acids, linoleic acid and linolenic acid, but significantly reduced the contents of C20:1n-9, C20:4n-6, C22:5n-3 and C22:6n-3 ($P<0.01$). These results suggested that in high plant protein diets the supplementation of protein hydrolysates from pig blood, soy, and yeast did not modulate the lipid accumulation in whole body, liver, muscle and gut of juvenile *L. japonicus*, but the yeast protein hydrolysate significantly reduced the concentrations of triglyceride, cholesterol, and low density lipoprotein cholesterol in serum. The modulation of fish fatty acid profiles by protein hydrolysates varied depending upon the type of protein hydrolysate and the type of fish tissue. This is the first study comprehensively investigating the effects of different types of protein hydrolysate on the lipid accumulation in aquaculture species, and the results were indicative for the relevant studies in the future.

Key words Japanese seabass *Lateolabrax japonicus*; High plant protein diet; Protein hydrolysate; Lipid accumulation

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

不同蛋白水解物对花鲈(*Lateolabrax japonicus*) 生长性能及非特异性免疫的影响*

张婷婷^{1,4} 陈效儒³ 梁萌青^{2,4①} 王成强⁴
郑珂珂⁴ 徐后国⁴ 陈齐勇³

(1. 大连海洋大学 大连 116021; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室

海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 3. 通威股份有限公司 成都 610063;

4. 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)

摘要 实验以基础饲料组[含 30%鱼粉蛋白(FM)]为对照组,用鱼蛋白水解物(FPH)、猪血蛋白水解物(PBPH)、酵母蛋白水解物(YPH)和豆粕蛋白水解物(SPH)分别替代配方中 10%的鱼粉蛋白,配制成 5 组等氮等脂的饲料,喂养初始平均体重为 31.99 g 的花鲈(*Lateolabrax japonicus*) 8 周,探讨饲料中不同蛋白水解物对花鲈生长、饲料利用、体组成成分及非特异性免疫的影响。结果显示:各处理组实验鱼存活率在 97.78%–98.89%之间,没有显著性差异($P>0.05$); FPH 组与 FM 组的末重和特定生长率最高,两者之间没有显著差异($P>0.05$),但显著高于 PBPH 组、SPH 组和 YPH 组($P<0.05$); FPH 组饲料效率高于 FM 组、PBPH 组和 YPH 组($P>0.05$),且显著高于 SPH 组($P<0.05$); 各实验处理组鲈鱼摄食率没有显著差异($P>0.05$); FPH 组蛋白效率比显著高于 FM 组、PBPH 组、SPH 组和 YPH 组($P<0.05$); FPH 组、FM 组和 YPH 组的蛋白质沉积率显著高于 PBPH 组和 SPH 组($P<0.05$)。饲料中添加 FPH 和 YPH 会显著增加花鲈肝脏和血清中碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、超氧化物歧化酶、溶菌酶活性和总抗氧化能力,显著高于 FM 组、PBPH 组和 SPH 组($P<0.05$)。FPH 组的花鲈鱼体粗蛋白含量高于 FM 组和 YPH 组,但差异不显著($P>0.05$),FPH 组显著高于 PBPH 组和 SPH 组($P<0.05$)。综上所述,4 种不同蛋白水解物替代鱼粉后投喂花鲈幼鱼,鱼蛋白水解物效果最好,其次是酵母蛋白水解物、猪血蛋白水解物和豆粕蛋白水解物。

关键词 花鲈; 蛋白水解物; 生长; 非特异性免疫

中图分类号 S963 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)03-0096-10

近几年,国内外鱼粉供应紧张,需求不断上涨,鱼粉价格攀高,导致养殖成本不断上升,严重制约了水产养殖业的发展,寻找合适的蛋白源替代鱼粉是解决目前鱼粉短缺问题的有效途径。研究表明,用价格低廉的动植物蛋白源替代部分鱼粉是解决这一问题的有效措施(Lim *et al.*, 2011; Suloma *et al.*, 2014; 梅琳

等, 2015)。但是,植物蛋白源存在影响饲料适口性、含有抗营养因子、氨基酸不平衡等问题,导致养殖鱼类尤其是肉食性鱼类对植物性蛋白源利用率很低;而动物蛋白源中脂肪的饱和度较高,影响了饲料的适口性,替代鱼粉的效果并不理想(艾庆辉等, 2005; 周歧存等, 2005; Kaushik *et al.*, 2010; Lee, 2002)。

* 通威股份有限公司项目和农业行业专项(201303053)共同资助[This work was supported by Tongwei Co., Ltd. and Agriculture Industry-Special Fund (201303053)]. 张婷婷, E-mail: 619044611@qq.com

① 通讯作者: 梁萌青, 研究员, E-mail: liangmq@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-02-29, 收修改稿日期: 2016-04-15

在大西洋鲑(*Salmo salar*)、欧洲鲈鱼(*Dicentrarchus labrax*)等研究中发现, 饲料中添加适量鱼蛋白水解物, 对鱼的生长及饲料利用有促进作用(Hevrøy *et al*, 2005; Kotzamanis *et al*, 2007)。Zheng 等(2012)发现小分子量鱼蛋白水解物能显著提高牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)幼鱼的特定生长率。猪血是一种非常重要的蛋白质资源, 其红细胞的蛋白含量高达 38%, 占全血蛋白总量的 75%以上, 传统制备血粉氨基酸采用酸水解法, 其缺点是反应剧烈, 严重破坏氨基酸(如色氨酸、半胱氨酸和丝氨酸)。采用酶水解法可以充分将大分子蛋白质分解为多肽和部分游离氨基酸的蛋白水解物, 不仅有效保留了猪血蛋白的营养特性, 而且与猪血蛋白相比较, 蛋白水解物相当于猪血经过预消化, 更易被机体快速吸收(卢寅泉等, 1995; 余奕珂等, 2004)。豆粕中含有抗营养因子和高含量的碳水化合物, 降低了水产动物对干物质和能量的消化吸收(Kaushik *et al*, 1995)。艾庆辉等(2005)发现豆粕经添加酶制剂可去除其中大部分抗营养因子、可溶性碳水化合物和粗纤维等。我国是啤酒生产大国, 每年因为酿酒都会产生大量的废酵母泥, 其蛋白质含量高, B 族维生素和色素以及多糖(如葡聚糖等)含量丰富, 开发和利用这些废弃资源具有重要的经济价值和现实意义(杨天骄等, 2008; Sanderson *et al*, 1994)。柳茜等(2015)发现, 饲料中添加酵母水解物可提高大菱鲆(*Scophalmus maximus*)幼鱼机体免疫能力、肝脏抗氧化性能和抗应激能力。本研究以花鲈(*Lateolabrax japonicus*)幼鱼为对象, 研究饲料中分别以鱼蛋白水解物(Fish protein hydrolysate, FPH)、猪血蛋白水解物(Pig blood protein hydrolysate, PBPH)、豆粕蛋白水解物(Soybean protein hydrolysate, SPH)、酵母蛋白水解物(Yeast protein hydrolysate, YPH)替代鱼粉(Fish meal, FM), 对其生长性能、饲料利用、体成分及非特异性免疫的影响, 为蛋白水解物在花鲈饲料中的应用提供技术数据。

1 材料与方法

1.1 蛋白水解物的制备

本研究以鳕鱼排、猪血粉、豆粕粉、啤酒酵母粉为原料, 参考 Zheng 等(2012)的方法, 采用双酶联合水解, 调节 pH 为 8.5–9.0, 55℃水解 5 h, 冷却过滤后, 离心得到水解液, 浓缩干燥后, 得到 FPH、PBPH、SPH 和 YPH。置于–20℃冰箱, 保存备用。

1.2 实验饲料

以鱼粉和豆粕为主要蛋白源, 鱼油为主要脂肪源, 高筋小麦粉为主要糖源, 实验组饲料分别以鱼蛋白水解物、猪血蛋白水解物、豆粕蛋白水解物、酵母蛋白水解物替代配方中 10% 的鱼粉蛋白, 即 FPH 组、PBPH 组、SPH 组和 YPH 组, 30% 鱼粉组设为对照组, 即 FM 组, 饲料配方和营养成分如表 1 所示, 实验饲料原料均粉碎过 80 目筛后, 充分混匀, 用饲料颗粒机加工制成直径为 3 mm 的 5 种等氮等脂的配合饲料, 55℃烘干, 置于–20℃冰箱中保存备用。

1.3 实验动物和养殖条件

实验在浙江省宁波市象山港湾水产苗种有限公司海水浮式网箱中进行。实验花鲈在海水网箱(3.0 m×3.0 m×3.0 m)中先暂养 1 周, 使其适应海域水体的变化和饲料的投喂频率。实验鱼在海水浮式网箱(1.5 m×1.5 m×2.0 m)中养殖, 实验鱼初始平均体重为 31.99 g, 每个网箱放养 30 尾, 每个处理组 3 个重复。实验期间, 每天投喂 2 次(06:00 和 18:00)至表现饱食, 养殖周期为 8 周。生长实验开始时, 实验鱼饥饿 24 h, 随机选取体质健康、规格均匀的实验鱼, 称重后随机放入实验网箱, 并随机分组。实验期间, 采用自然光照, 每天测定水温和 pH, 每周测定水体盐度、溶氧和氨氮。海水温度为 28–29.5℃, 盐度为 30 左右, pH 值为 7.2–7.5, 溶解氧含量约 7 mg/L, 氨氮<0.5 mg/L。

1.4 样品采集与生化分析

实验开始时, 随机取 5 尾鱼称重, 保存于–20℃冰箱, 供后续分析鱼体生化成分。生长实验结束后, 将实验鱼饥饿 24 h 后从网箱中捞出, 称取每个网箱中花鲈体重, 记录对应网箱中实验鱼尾数和终末总重, 计算存活率和增重率; 然后用丁香酚(1:10000)麻醉, 从每个处理组随机取出 6 尾鱼, 测量体长体重, 计算肥满度, 同时对应每尾鱼解剖得到内脏团和肝脏, 分别称重, 用于计算肝体比和脏体比; 每处理组另取 6 尾鱼, 用 1 ml 一次性无菌注射器自尾静脉取血, 解剖取肝脏, 血样在 4℃静置 4 h 后, 4℃条件下 4000 r/min 离心 10 min, 吸取上层血清, 上层血清与肝脏–80℃保存待测; 从每个网箱随机取 5 尾实验鱼, 保存于–20℃, 用于鱼体常规成分分析。

饲料和全鱼样品在 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测得(凯氏定氮仪 VELP UDK142, 意大

利); 粗脂肪采用索氏提取法测得(索氏抽提仪 SOXTEC™2050, 丹麦); 灰分测定: 先将样品炭化至无烟, 然后放入马福炉中 550℃燃烧 6 h, 失重法测定灰分含量; 饲料中氨基酸的含量测定: 样品均经冷冻干燥(冷冻干燥机 FDU-1100, 日本) 24 h 后, 采用氨基酸分析仪(日立 L-8900 型, 日本)测得; 血清和肝

脏中的酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)、超氧化物歧化酶(SOD)、总抗氧化能力(T-AOC)和肝脏蛋白浓度均采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒检测(Tecan Infinite M200 酶标仪, 瑞士), 溶菌酶(LZM)采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒通过分光光度计检测。

表 1 实验饲料配方和营养组成

Tab.1 Formulation and proximate chemical composition of experimental diets (%)

原料 Ingredient	组别 Group				
	FM	FPH	PBPH	SPH	YPH
鱼粉 Fish meal (FM)	30	20	20	20	20
鱼蛋白水解物 Fish protein hydrolysate (FPH) ¹		8.5			
猪血蛋白水解物 Pig blood protein hydrolysate (PBPH) ²			7		
豆粕蛋白水解物 Soybean protein hydrolysate (SPH) ³				12.5	
酵母蛋白水解物 Yeast protein hydrolysate (YPH) ⁴					14.5
豆粕 Soybean meal	13	13	13	13	13
谷朊粉 Wheat gluten meal	9	9	9	9	9
玉米蛋白粉 Corn gluten meal	12	12	12	12	12
高筋小麦粉 High-gluten wheat flour	21.4	21.9	23.4	17.9	15.9
磷脂 Phospholipid	1	1	1	1	1
胆碱 Choline chloride	1	1	1	1	1
鱼油 Fish oil	7.5	8.5	8.5	8.5	8.5
维生素混合物 Vitamin premix ⁵	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
矿物质混合物 Mineral premix ⁶	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
磷酸二氢钙 Ca(H ₂ PO ₄) ₂	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
维生素 C Vitamin C	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
抗氧化剂 Ethoxyquin	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
营养组成 Nutrition composition					
水分 Moisture	5.80	5.45	5.07	5.15	5.23
粗蛋白 Crude protein	46.53	46.65	46.82	46.41	46.72
粗脂肪 Crude lipid	10.75	10.97	11.01	11.02	11.07
灰分 Ash	10.41	9.41	8.73	10.36	10.63

1: 鱼蛋白水解物: 粗蛋白含量 76.98%, 粗脂肪含量 0.18%, 粗灰分含量 10.76%; 2: 猪血蛋白水解物: 粗蛋白含量 89.18%, 粗脂肪含量 0.17%, 粗灰分含量 6.57%; 3: 豆粕蛋白水解物: 粗蛋白含量 58.18%, 粗脂肪含量 0.16%, 粗灰分含量 17.23%; 4: 酵母蛋白水解物: 粗蛋白含量 52.37%, 粗脂肪含量 0.18%, 粗灰分含量 10.76%; 5: 维生素混合物(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 B12, 0.1 mg; 维生素 K3, 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; 6: 矿物质混合物(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; 硫酸亚铁, 80 mg; 硫酸锌, 50 mg; 硫酸镁, 1200 mg; 磷酸二氢钙, 3000 mg; 氯化钠, 100 mg; 沸石粉, 15.51 g

1: FPH, with 76.98% crude protein, 0.18% crude lipid, 10.76% crude ash; 2: PBPH, with 89.18% crude protein, 0.17% crude lipid, 6.57% crude ash; 3: SPH, with 58.18% crude protein, 0.16% crude lipid, 17.23% crude ash; 4: YPH, with 52.37% crude protein, 0.18% crude lipid, 10.76% crude ash; 5: Vitamin premix (mg/kg or g/kg diet): Thiamine 25 mg, Riboflavin 45 mg, Pyridoxine 20 mg, Vitamin B12 0.1 mg, Menadione 10 mg, Inositol 800 mg, Pantothenate 60 mg, Tocopherol acetate 200 mg, Folic acid 20 mg, Biotin 1.2 mg, Vitamin A 32 mg, Vitamin D 5 mg, Vitamin E 120 mg, Wheat flour 18.67 g; 6: Mineral premix (mg/kg or g/kg) diet: NaF 2 mg; KI 0.8 mg; CoCl₂·6H₂O 50 mg; CuSO₄·5H₂O 10 mg; FeSO₄·7H₂O 80 mg; ZnSO₄·7H₂O 50 mg; MnSO₄·4H₂O 1200 mg; Ca(H₂PO₄)₂·H₂O 3000 mg; NaCl 100 mg; Mordenzeo 15.51 g

表2 实验饲料氨基酸组成(%干物质)
Tab.2 The amino acid composition of experimental diets (% dry matter)

氨基酸组成 Amino acid composition	组别 Group				
	FM	FPH	PBPH	SPH	YPH
必需氨基酸 EAA					
苏氨酸 Thr	1.74	1.73	1.51	1.55	1.69
缬氨酸 Val	2.18	2.19	2.38	1.91	2.13
蛋氨酸 Met	0.75	0.79	0.60	0.78	0.93
异亮氨酸 Ile	1.95	1.97	1.21	1.97	1.88
亮氨酸 Leu	3.47	3.30	3.61	3.49	3.37
苯丙氨酸 Phe	3.89	3.98	4.02	2.97	2.70
赖氨酸 Lys	2.27	2.45	2.55	2.11	2.14
组氨酸 His	1.08	0.98	1.21	0.97	1.16
精氨酸 Arg	1.88	1.87	1.59	2.12	2.17
非必需氨基酸 NEAA					
天冬氨酸 Asp	2.71	3.13	2.52	2.52	2.39
丝氨酸 Ser	1.68	1.88	1.60	1.63	2.10
谷氨酸 Glu	8.04	8.54	7.25	7.80	7.73
甘氨酸 Gly	1.94	1.99	1.72	1.72	1.62
丙氨酸 Ala	2.32	2.93	2.28	2.20	2.32
半胱氨酸 Cys	0.60	0.59	0.55	0.61	0.65
酪氨酸 Tyr	1.47	1.29	1.24	1.33	1.27
牛磺酸 Tau	0.20	0.23	0.13	0.13	0.12
总氨基酸 ΣAA	38.19	39.84	35.99	35.80	36.38
必需氨基酸总和 ΣEAA	19.23	19.25	18.69	17.87	18.18
非必需氨基酸总和 ΣNEAA	18.96	20.59	17.30	17.93	18.20
ΣEAA/ΣTAA (%)	50.34	48.32	51.93	49.92	49.97
ΣEAA/ΣNEAA (%)	101.39	93.50	108.03	99.67	99.87

EAA: Essential amino acids; NEAA: Non-essential amino acids; ΣAA: Total amino acids; ΣEAA: Sum of essential amino acids; ΣNEAA: Sum of non-essential amino acids

1.5 计算及统计分析方法

花鲈的成活率、增重率、特定生长率、摄食率、饲料效率、蛋白效率比、蛋白质沉积率、肝体比、脏体比和肥满度参考以下公式:

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

$$\text{增重率(Weight gain rate, WGR, \%)} = 100 \times (W_t - W_0) / W_0$$

$$\text{特定生长率(Specific growth rate, SGR, \% / d)} = (\ln W_t - \ln W_0) / t \times 100$$

$$\text{摄食率(Feed intake, FI, \% / d)} = W / [(W_t + W_0) / 2 \times t] \times 100$$

$$\text{饲料效率(Feed efficiency, FE)} = (W_t - W_0) / W$$

$$\text{蛋白效率比(Protein efficiency ratio, PER)} = (W_t - W_0) / (W \times P)$$

$$\text{蛋白质沉积率(Protein productive value, PPV, \%)} = (W_t \times P_t - W_0 \times P_0) / (W \times P) \times 100$$

$$\text{肝体比(Hepatopancrea somatic index, HSI, \%)} = W_h /$$

$$W_d \times 100$$

$$\text{脏体比(Viscerosomatic index, VSI, \%)} = W_v / W \times 100$$

$$\text{肥满度(Condition factor, CF)} = W_t / L^3 \times 100$$

式中, N_0 和 N_t 分别为初始和死亡的鲈鱼尾数, W 、 W_0 和 W_t 分别为每尾鱼摄食的饲料干物质重(g)、实验开始时鲈鱼的体重(g)和实验结束时花鲈的体重(g), P 、 P_0 和 P_t 表示饲料粗蛋白含量(干重%), 实验开始时鱼体粗蛋白含量(湿重%)和实验结束时鱼体粗蛋白含量(湿重%), t 表示养殖实验天数(d)。 W_h 为样品鱼肝脏重(g), W_v 为样品鱼内脏重(g), W_d 为样品鱼体重(g), L 为样品鱼体长(cm)。

各组实验数据, 均采用 SPSS 16.0 统计软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 若差异显著进行邓肯多重比较(Duncan's multiple range tests), $P < 0.05$ 被认为差异显著, 所有数据均以平均值 \pm 标准误 (Mean \pm SE) 表示。

2 结果

2.1 不同蛋白水解物对花鲈生长和饲料利用的影响

不同蛋白水解物对花鲈生长和饲料利用的影响见表3。各处理组实验鱼存活率和摄食率没有显著差异($P>0.05$), 末期均重、增重率、特定生长率在 FPH 组和 FM 组最高, 两组之间没有显著性差异($P>0.05$), 但显著高于 PBPH 组、SPH 组和 YPH 组($P<0.05$); FPH 组饲料效率高于 FM 组、PBPH 组和 YPH 组($P>0.05$), 且显著高于 SPH 组($P<0.05$); FPH 组蛋白效率比显著高于 FM 组、PBPH 组、SPH 组和 YPH 组($P<0.05$); FPH 组蛋白质沉积率高于 FM 组和 PBPH 组($P>0.05$), 且显著高于 SPH 组($P<0.05$)。

2.2 不同蛋白水解物对花鲈鱼体组成的影响

各处理组花鲈鱼体中水分、粗蛋白、粗脂肪和灰分分析数据见表4。花鲈鱼体水分含量在 71.60%–72.75% 之间, 粗蛋白含量在 15.01%–16.57% 之间, 粗脂肪含量在 5.74%–7.41% 之间, 灰分含量在 4.27%–4.56% 之间。各处理组花鲈鱼体中水分和灰分含量没有显著性差异($P>0.05$); 粗蛋白在 FPH 组高于 FM 组和 YPH 组, 但差异不显著($P>0.05$), 在 FPH 组、FM 组和 YPH 组显著高于 SPH 组($P<0.05$); 粗脂肪在 FPH 组低于 PBPH 组和 SPH 组, 但没有显著性差异($P>0.05$), 在 FPH 组显著低于 YPH 组和 FM 组($P<0.05$)。

不同蛋白水解物对花鲈形态指标的影响见表5, 脏体比在各组之间差异不显著($P>0.05$); 肝体比在

表3 不同蛋白水解物对花鲈生长和饲料利用的影响(平均值±标准误)

Tab.3 Effects of different protein hydrolysates on the growth performance and feed utilization of *L. japonicus* (Mean±SE)

项目 Items	组别 Group				
	FM	FPH	PBPH	SPH	YPH
初期均重 Initial body weight (g)	31.99±0.05	32.00±0.05	32.00±0.10	32.00±0.02	31.95±0.05
末期均重 Final body weight (g)	116.23±1.01 ^b	118.79±1.65 ^b	106.05±2.09 ^a	104.82±1.74 ^a	109.45±1.49 ^a
增重率 Weight gain rate (%)	263.37±5.66 ^b	271.14±8.58 ^b	231.36±11.78 ^a	227.53±8.53 ^a	242.54±7.30 ^a
特定生长率 Specific growth rate (%/d)	2.30±0.02 ^b	2.34±0.02 ^b	2.14±0.04 ^a	2.12±0.03 ^a	2.20±0.02 ^a
存活率 Survival rate (%)	98.89±1.11	98.89±1.11	97.78±2.22	97.78±1.11	97.78±1.11
摄食率 Feed intake (%/d)	1.87±0.06	1.84±0.09	1.92±0.11	1.97±0.03	1.94±0.06
饲料效率 Feed efficiency	1.09±0.04 ^{ab}	1.12±0.04 ^b	1.00±0.09 ^{ab}	0.97±0.01 ^a	1.01±0.03 ^{ab}
蛋白效率比 Protein efficiency ratio	2.34±0.08 ^{ab}	2.39±0.09 ^c	2.13±0.10 ^a	2.09±0.01 ^a	2.16±0.05 ^{ab}
蛋白质沉积率 Protein productive value (%)	38.99±2.25 ^c	37.96±1.50 ^c	32.21±0.68 ^{ab}	31.18±1.49 ^a	36.59±1.35 ^{bc}

注: 同行数据中, 相同上标字母表示差异不显著($P>0.05$), 下同

Note: Values in the same column with the same superscripts were not significantly different ($P>0.05$), the same as below

表4 不同蛋白水解物对花鲈鱼体化学组成的影响(平均值±标准误)

Tab.4 Effects of different protein hydrolysates on the body chemical composition of *L. japonicus* (Mean±SE)

鱼体化学组成 Body chemical composition (%)	组别 Group				
	FM	FPH	PBPH	SPH	YPH
水分 Moisture	71.88±0.58	72.75±0.21	72.41±0.45	72.27±0.66	71.60±0.91
粗蛋白 Crude protein	16.27±0.35 ^{bc}	16.57±0.20 ^c	15.39±0.14 ^{ab}	15.01±0.24 ^a	16.19±0.44 ^{bc}
粗脂肪 Crude lipid	7.41±0.11 ^c	5.74±0.10 ^a	6.51±0.26 ^{ab}	6.28±0.35 ^{ab}	7.00±0.27 ^{bc}
灰分 Ash	4.41±0.21	4.51±0.17	4.46±0.08	4.56±0.05	4.27±0.04

表5 不同蛋白水解物对花鲈形态指标的影响(平均值±标准误)

Tab.5 Effects of different protein hydrolysates on the morphological indices of *L. japonicus* (Mean±SE)

形态指标 Morphological indices	组别 Group				
	FM	FPH	PBPH	SPH	YPH
脏体比 VSI (%)	9.60±0.82	8.99±0.52	9.52±0.35	9.97±0.37	9.62±0.58
肝体比 HSI (%)	1.56±0.14 ^{ab}	1.29±0.36 ^a	1.69±0.40 ^{ab}	1.82±0.07 ^b	1.56±0.08 ^{ab}
肥满度 CF	1.49±0.04 ^b	1.46±0.04 ^b	1.42±0.06 ^{ab}	1.34±0.10 ^a	1.45±0.04 ^b

FPH 组低于 PBPH 组、FM 组和 YPH 组, 但没有显著性差异。实验鱼体的氨基酸含量组成见表 6, 亮氨酸含量在 FPH 组、YPH 组、SPH 组低于 FM 组($P>0.05$), ($P>0.05$), 在 FPH 组显著低于 SPH 组($P<0.05$); 肥满度在 FPH 组、FM 组、YPH 组和 PBPH 组没有显著性差异($P>0.05$), 但在 FPH 组、FM 组和 YPH 组显著高于 SPH 组($P<0.05$)。但显著低于 PBPH 组($P<0.05$); 赖氨酸含量在 FM 组高于 FPH 组、YPH 组($P>0.05$), 且显著高于 SPH 组、PBPH 组($P<0.05$); 在鱼虾 10 种必需氨基酸中, 除色氨酸未测定之外, 鱼体中其他 7 种必需氨基酸均无显著性差异($P<0.05$)。

2.3 不同蛋白水解物对花鲈血清和肝脏非特异性免疫的影响

不同蛋白水解物对花鲈血清和肝脏中碱性磷酸酶(AKP)、酸性磷酸酶(ACP)、超氧化物歧化酶(SOD)、溶菌酶(LZM)活性和总抗氧化能力(T-AOC)的影响见

表 7。在血清中, AKP、ACP、SOD、LZM 活性和 T-AOC 在 FPH 组显著高于 YPH 组($P<0.05$), 在 FPH 组和 YPH 组显著高于 FM 组、PBPH 组和 SPH 组($P<0.05$); 在肝脏中, AKP、ACP、SOD、LZM 活性和 T-AOC 在 FPH 组显著高于 YPH 组($P<0.05$), 在 FPH 组和 YPH 组显著高于 FM 组、PBPH 组和 SPH 组($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 不同蛋白水解物对花鲈生长、饲料利用和鱼体氨基酸组成的影响

本研究表明, 在生长方面, 添加鱼蛋白水解物的 FPH 组末期均重和特定生长率与对照 FM 组无显著性差异($P>0.05$), 添加 PBPH、SPH 和 YPH 组的末期均重和特定生长率显著低于 FM 组($P<0.05$)。研究发现, 与 YPH 和 PBPH 相比, FPH 更有利于金头鲷(*Sparus aurata*)和欧洲鲈鱼幼鱼的生长(Gisbert *et al.*, 2012;

表 6 不同蛋白水解物对花鲈鱼体氨基酸组成的影响(%干物质)(平均值±标准误)

Tab.6 Effects of different protein hydrolysates on the amino acid composition of *L. japonicus* (% dry matter)(Mean±SE)

氨基酸组成 Amino acid composition	组别 Group				
	FM	FPH	PBPH	SPH	YPH
必需氨基酸 EAA					
苏氨酸 Thr	2.51±0.04	2.34±0.21	2.16±0.10	2.19±0.11	2.29±0.12
缬氨酸 Val	2.46±0.04	2.24±0.21	2.08±0.09	2.08±0.08	2.18±0.12
蛋氨酸 Met	1.29±0.09	1.23±0.13	0.94±0.09	1.14±0.06	1.20±0.16
异亮氨酸 Ile	2.21±0.06	1.99±0.20	1.85±0.08	1.85±0.09	1.95±0.13
亮氨酸 Leu	3.83±0.07 ^{ab}	3.57±0.07 ^a	3.97±0.05 ^b	3.63±0.09 ^a	3.61±0.10 ^a
苯丙氨酸 Phe	2.97±0.09	2.93±0.08	2.88±0.10	2.76±0.05	2.83±0.04
赖氨酸 Lys	4.57±0.09 ^b	4.39±0.33 ^{ab}	3.83±0.18 ^a	3.81±0.18 ^a	3.97±0.17 ^{ab}
组氨酸 His	1.20±0.09	1.18±0.12	1.29±0.08	1.17±0.05	1.13±0.06
精氨酸 Arg	3.53±0.07	3.31±0.31	3.08±0.13	3.13±0.13	3.29±0.21
非必需氨基酸 NEAA					
天冬氨酸 Asp	4.81±0.20	4.74±0.18	4.70±0.11	4.47±0.23	4.73±0.26
丝氨酸 Ser	2.42±0.01	2.29±0.19	2.09±0.08	2.15±0.12	2.33±0.20
谷氨酸 Glu	8.60±0.08 ^b	7.90±0.20 ^{ab}	7.28±0.36 ^a	7.37±0.35 ^a	7.77±0.41 ^{ab}
甘氨酸 Gly	4.29±0.09	4.43±0.24	4.16±0.12	4.22±0.12	4.38±0.31
丙氨酸 Ala	3.71±0.02	3.55±0.29	3.31±0.10	3.33±0.13	3.54±0.23
半胱氨酸 Cys	0.43±0.03	0.39±0.02	0.38±0.01	0.39±0.02	0.39±0.01
酪氨酸 Tyr	1.87±0.01	1.68±0.17	1.59±0.08	1.60±0.09	1.60±0.07
牛磺酸 Tau	0.28±0.04	0.24±0.04	0.22±0.03	0.21±0.01	0.23±0.04
总氨基酸 ΣAA	50.98±0.14	48.39±2.16	45.80±1.16	45.50±1.70	47.43±2.14
必需氨基酸总和 ΣEAA	24.59±0.20 ^b	23.18±1.28 ^{ab}	22.08±0.57 ^{ab}	21.77±0.72 ^a	22.45±0.63 ^{ab}
非必需氨基酸总和 ΣNEAA	26.39±0.05	25.21±0.91	23.72±0.62	23.73±0.99	24.97±1.53
ΣEAA/ΣTAA (%)	48.22±0.25	47.86±0.60	48.21±0.27	47.86±0.26	47.42±0.87
ΣEAA/ΣNEAA (%)	93.16±0.95	91.82±2.22	93.11±0.99	91.78±0.97	90.28±3.16

表7 不同蛋白水解物对花鲈血清和肝脏中 AKP、ACP、SOD、LZM 活性和 T-AOC 的影响(平均值±标准误)
Tab.7 Effects of different sources of protein hydrolysates on activities of AKP, ACP, SOD, LZM and T-AOC in serum and liver of *L. japonicus* (Mean±SE)

指标 Indices	组别 Group				
	FM	FPH	PBPH	SPH	YPH
血清 Serum					
碱性磷酸酶 AKP (U/100 ml)	16.11±0.30 ^b	23.99±0.22 ^d	15.68±0.65 ^b	11.29±0.28 ^a	19.94±0.77 ^c
酸性磷酸酶 ACP (U/100 ml)	14.85±0.25 ^b	24.66±0.27 ^d	14.49±0.69 ^b	12.14±0.58 ^a	20.30±0.45 ^c
超氧化物歧化酶 SOD (U/ml)	0.94±0.01 ^b	1.17±0.01 ^d	0.93±0.01 ^b	0.88±0.00 ^a	1.01±0.01 ^c
溶菌酶 LZM (U/ml)	129.20±2.41 ^b	149.87±1.41 ^d	121.87±2.97 ^{ab}	118.40±2.81 ^a	141.20±3.27 ^c
总抗氧化能力 T-AOC (U/ml)	0.29±0.01 ^b	0.37±0.02 ^d	0.28±0.01 ^b	0.24±0.01 ^a	0.33±0.06 ^c
肝脏 Liver					
碱性磷酸酶 AKP (U/g prot)	68.57±0.99 ^b	84.32±1.54 ^d	60.18±1.26 ^a	58.43±1.65 ^a	74.74±1.35 ^c
酸性磷酸酶 ACP (U/g prot)	819.98±29.12 ^b	1064.95±21.08 ^d	811.48±3.80 ^b	742.61±7.63 ^a	943.77±17.50 ^c
超氧化物歧化酶 SOD (U/g prot)	22.39±0.65 ^b	25.74±0.24 ^d	21.23±0.12 ^{ab}	19.98±0.47 ^a	24.01±0.36 ^c
溶菌酶 LZM (U/mg prot)	452.80±7.63 ^b	529.33±15.18 ^d	437.07±6.27 ^b	362.40±8.81 ^a	495.47±6.86 ^c
总抗氧化能力 T-AOC (U/mg prot)	0.34±0.01 ^b	0.41±0.01 ^d	0.34±0.01 ^b	0.31±0.01 ^a	0.37±0.00 ^c

Skalli *et al.*, 2014), 这与本研究结果基本一致, 添加鱼蛋白水解物和酵母蛋白水解物组的生长效果优于添加猪血蛋白水解物和豆粕蛋白水解物组。在饲料利用率方面, 添加鱼蛋白水解物的 FPH 组和添加酵母蛋白水解物的 YPH 组, 在摄食率、饲料效率和蛋白质沉积率方面均与 FM 组无显著性差异($P>0.05$), FPH 组和 YPH 组的蛋白效率比显著高于 FM 组($P<0.05$)。施用晖等(1992)用 PBPH 替代鱼粉, 肉鸭(0-6 周龄)体增重、饲料效率可达到与鱼粉组相同水平。也有研究表明, 猪血酶解添加到饲料中, 对仔猪的生长性能和蛋白质利用率无改善作用(郗文莉, 2007)。本研究中, 添加鱼蛋白水解物和酵母蛋白水解物组的饲料利用效果要优于添加猪血蛋白水解物和豆粕蛋白水解物组。推测影响鱼体生长的主要原因可能是氨基酸平衡破坏, 产生“水桶效应”, 导致鱼体生长缓慢、蛋白质效率降低(窦秀丽, 2014)¹⁾。这一推测在鱼体氨基酸中得到部分证明, 本研究鲈鱼摄食不同饲料引起显著变化的必需氨基酸主要为亮氨酸和赖氨酸, 亮氨酸在 PBPH 组中含量最高, 而在 FPH 组中含量最低, 这一变化趋势与饲料中亮氨酸含量一致, 表明饲料中亮氨酸的含量影响鱼体组织中亮氨酸的沉积。但是, 赖氨酸在 PBPH 组饲料中含量最高, 而鱼体中的亮氨酸含量显著低于 FM 组, 尽管精氨酸在各处理组中没有显著差异, 但在 PBPH 组中含量也

是所有实验组中最低的, 这表明 PBPH 替代 10%鱼粉可能恰好使赖氨酸和精氨酸发生拮抗作用。这一结果在大菱鲆的研究中得到证实, 代伟伟等(2015)在饲料中添加不同比例的赖氨酸(添加量 0、1.19%和 2.39%)和精氨酸(添加量 0、0.9%和 2.0%)后发现, 当饲料中赖氨酸和精氨酸的添加量分别为 2.39%和 0.9% (即实际含量分别为 3.45%和 2.23%)时, 产生显著的拮抗作用, 使得肌肉中赖氨酸和亮氨酸显著低于其他处理组, 但在不同添加量时, 都没有发现显著的拮抗作用, 因此, 赖氨酸和精氨酸在特定的比例会产生拮抗作用。

3.2 不同蛋白水解物对花鲈血清和肝脏非特异性免疫的影响

在本研究中, FPH 组、YPH 组肝脏和血清中的 ACP、AKP、LZM、SOD 活性和 T-AOC 显著高于 FM 组、PBPH 组和 SPH 组($P<0.05$)。Liang 等(2006)报道用添加不同水平的水解鱼蛋白饲料饲喂花鲈, 发现花鲈幼鱼的 LZM 活性与对照组相比有显著提高, 这与本研究是基本一致的, 说明 FPH 和 YPH 可以增强肝脏和血清中 ACP、AKP、LZM、SOD 活性和 T-AOC, 提高机体对外源微生物侵染的防御能力, 推测可能与水解过程中产生的生物活性肽有关。Gildberg 等(1998)报道低水平多肽对提高大西洋鳕鱼(*Gadus morhua*)鱼

1) Dou XL. The study on the optimum requirement of dietary valine, histidine and threonine of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus* in the middle and late growing stage. Master's Thesis of Dalian Ocean University, 2014, 41-46 [窦秀丽. 鲈鱼生长中后期缬氨酸、组氨酸和苏氨酸营养需求的研究. 大连海洋大学硕士研究生学位论文, 2014, 41-46]

苗的非特异性免疫有一定作用, 水解过程中产生的生物活性肽具有免疫增强和抗菌性(Kotzamanis *et al.*, 2007); YPH 在一定程度上能提高花鲈的免疫能力, 除了生物活性肽影响之外, 其丰富的核苷酸、B 族维生素也具有提高机体免疫力和抗氧化能力的作用(许丹丹等, 2011; 周小秋, 2009¹⁾)。许丹丹等(2011)研究表明, 饲料中添加酵母核苷酸可显著提高凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)肝胰腺 AKP 活性和 T-AOC。周小秋(2009)¹⁾指出, B 族维生素能够提高血清 LZM 和 ACP 活性, 增强鱼类非特异性免疫能力。本研究中, 添加猪血蛋白水解物和豆粕蛋白水解物的 PBPH 组和 SPH 组, 在血清和肝脏中, ACP、AKP、LZM、SOD 活性和 T-AOC 显著低于 FPH 组和 YPH 组。研究表明, 酶解技术将猪血水解获得猪血多肽或游离氨基酸, 猪血多肽具有抗氧化性、增强免疫功能活性等功能(董清平等, 2008), 有研究表明酶解猪血粉增强肉鸡抗病能力(周学文等, 1998), 而豆粕经酶解获得多肽及游离氨基酸等蛋白消化产物(Tsumura *et al.*, 2005), 同时大豆多肽可以增强水产动物免疫力, 具体表现在提高其成活率、调节动物免疫系统的功能(赵述森等, 2003), 分析本研究中 PBPH 和 SPH 组的 ACP、AKP、LZM、SOD 活性和 T-AOC 表现较低, 推测是因其生长效果不理想, 从而抑制了非特异性免疫的表达效果。

4 小结

在本研究条件下, 适量的 4 种不同蛋白水解物替代鱼粉后投喂鲈鱼幼鱼, 综合生长性能、饲料利用、体成分及血清和肝脏非特异性免疫结果, 鱼蛋白水解物替代鱼粉的效果最好, 其次是酵母蛋白水解物、猪血蛋白水解物和豆粕蛋白水解物。

参 考 文 献

- Ai QH, Xie XJ. Advance in utilization of plant proteins by aquatic animals. *Periodical of Ocean University of China*, 2005, 35(6): 929-935 [艾庆辉, 谢小军. 水生动物对植物蛋白源利用的研究进展. 中国海洋大学学报, 2005, 35(6): 929-935]
- Dai WW, Mai KS, Xu W, *et al.* Effects of lysine-arginine interaction on growth of performance, body composition, and muscle amino acid levels of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(6): 876-887 [代伟伟, 麦康森, 徐玮, 等. 饲料中赖氨酸和精氨酸含量对大菱鲆幼鱼生长, 体成分和肌肉氨基酸含量的影响. 水产学报, 2015, 39(6): 876-887]
- Dong QP, Fang J, Jiang HM, *et al.* Studies on enzymatic hydrolysis of porcine hemoglobin and the content of amino acids in the hydrolysate. *Progress in Modern Biomedicine*, 2008, 8(7): 1259-1261 [董清平, 方俊, 蒋红梅, 等. 猪血红蛋白的酶解及氨基酸含量的研究. 现代生物医学进展, 2008, 8(7): 1259-1261]
- Gildberg A, Mikkelsen H. Effects of supplementing the feed to Atlantic cod, *Gadus morhua* fry with lactic acid bacteria and immuno-stimulating peptides during a challenge trial with *Vibrio anguillarum*. *Aquaculture*, 1998, 167(1-2): 103-113
- Gisbert E, Skalli A, Fernández I, *et al.* Protein hydrolysates from yeast and pig blood as alternative raw materials in microdiets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture*, 2012, 338-341: 96-104
- Hevroy 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. *Aquaculture Nutrition*, 2005, 11(4): 301-313
- Kaushik SJ, Cravedi JP, Lalles JP, *et al.* Partial or total replacement of fish meal by soybean protein on growth, protein utilization, potential estrogenic or antigenic effects, cholesterolemia and flesh quality in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 1995, 133(3-4): 257-274
- Kaushik SJ, Seiliez I. Protein and amino acid nutrition and metabolism in fish: Current knowledge and future needs. *Aquaculture Research*, 2010, 41(3): 322-332
- 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. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2007, 147(1): 205-214
- Lee SM. Apparent digestibility coefficients of various feed ingredients for juvenile and grower rockfish (*Sebastes schlegeli*). *Aquaculture*, 2002, 207(1-2): 79-95
- Liang MQ, Wang JL, Chang Q, *et al.* Effects of different levels of fish protein hydrolysate in the diet on the nonspecific immunity of Japanese sea bass, *Lateolabrax japonicus* (Cuvieret Valenciennes, 1828). *Aquaculture Research*, 2006, 37(1): 102-106

1) Zhou XQ. Relationship progress of vitamin B with fish digestion and absorption, immune and antioxidant defense capacity. *China Animal Husbandry and Veterinary Association 2009 Annual Conference Proceedings (volume one)*, 2009, 963 [周小秋. B 族维生素与鱼类消化吸收、免疫和抗氧化防御能力的关系研究进展. 中国畜牧兽医学学会 2009 学术年会论文集(上册), 2009, 963]

- Lim SJ, Kim SS, Ko GY, *et al.* Fish meal replacement by soybean meal in diets for Tiger puffer, *Takifugu rubripes*. *Aquaculture*, 2011, 313(1-4): 165-170
- Liu X, Yang WJ, Wu Z, *et al.* Effects of yeast hydrolysate on non-specific immunity and anti-stress abilities of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*. *Feed Industry*, 2015, 36(18):33-37 [柳茜, 杨文娇, 吴振, 等. 酵母水解物对大菱鲂幼鱼非特异性免疫及抗应激能力的影响. *饲料工业*, 2015, 36(18): 33-37]
- Lu YQ, Liu ZM. Study on the development of multi-amino acids nutritional liquid by enzyme technology. *Food Science*, 1995, 16(7): 13-18 [卢寅泉, 刘昭明. 酶技术开发动物血制取复合氨基酸营养液的研究. *食品科学*, 1995, 16(7): 13-18]
- Mei L, Zhou HH, Mai KS, *et al.* Effects of dietary substitution of fishmeal by fermented silkworm pupae on the growth, feed intake, digestion and immunity of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(3): 85-92 [梅琳, 周慧慧, 麦康森, 等. 蛹肽蛋白替代鱼粉对大菱鲂(*Scophthalmus maximus* L.)幼鱼生长、饲料利用、消化代谢酶及免疫性能的影响. *渔业科学进展*, 2015, 36(3): 85-92]
- Qie WL. Study on the production performance and protein utilization value of pig blood hydrolyzed for piglets, *Sus scrofa*. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2007, 35(24): 7486-7488 [郗文莉. 酶解血粉对仔猪生产性能和蛋白质利用效果的研究. *安徽农业科学*, 2007, 35(24): 7486-7488]
- Sanderson GW, Jolly SO. The value of *Phaffia* yeast as a feed ingredient for ingredient for salmonid fish. *Aquaculture*, 1994, 124(1-4): 193-200
- Shi YH, Le GW. Pig blood protein hydrolysate on feeding value in the duck, *Anas platyrhynchos*. *China Feed*, 1992(8): 8-9 [施用晖, 乐国伟. 猪血水解蛋白饲喂肉鸭效果. *中国饲料*, 1992(8): 8-9]
- Skalli A, Zambonino-Infante JL, Kotzamanis Y, *et al.* Peptide molecular weight distribution of soluble protein fraction affects growth performance and quality in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture Nutrition*, 2014, 20(2): 118-131
- Suloma A, El-Husseiny OM, Hassane MI, *et al.* Complementary responses between hydrolyzed feather meal, fish meal and soybean meal without amino acid supplementation in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* diets. *Aquaculture International*, 2014, 22: 1377-1390
- Tsumura K, Saito T, Tsuge K, *et al.* Functional properties of soy protein hydrolysates obtained by selective proteolysis. *LWT-Food Science and Technology*, 2005, 38(3): 255-261
- Xu DD, Cao JM, Huang YH, *et al.* Effects of dietary nucleotides on growth performance, intestinal morphology and anti-oxidative activities of juvenile *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(5): 1115-1124 [许丹丹, 曹俊明, 黄燕华, 等. 饲料中添加核苷酸对凡纳滨对虾幼虾生长、肠道形态及抗氧化酶活力的影响. *中国水产科学*, 2011, 18(5): 1115-1124]
- Yang TJ, Sun YF, Wang YZ, *et al.* Progress on a novel antianginal agent ranolazine. *Progress in Veterinary Medicine*, 2008, 29(11): 92-95 [杨天骄, 孙英峰, 王英珍, 等. 啤酒酵母葡聚糖免疫调节作用及应用研究进展. *动物医学进展*, 2008, 29(11): 92-95]
- Yu YK, Hu JE, Bai XF, *et al.* Progress on research of bioactive peptides derived from the blood of pig. *Fine and Specialty Chemicals*, 2004, 12(18): 10-13 [余奕珂, 胡建恩, 白雪芳, 等. 以猪血为蛋白源的生物活性肽的研究进展精细与专用化学品, 2004, 12(18): 10-13]
- Zhao SM, Han JH. Soybean peptides nutrition and its application in aquaculture. *China Fisheries*, 2003(11): 66-67 [赵述森, 韩继宏. 大豆小肽的营养及其在水产养殖中的应用. *中国水产*, 2003(11): 66-67]
- 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*). *Aquaculture Nutrition*, 2012, 18(3): 297-303
- Zhou QC, Mai KS, Liu YJ, *et al.* Advances in animal and plant protein sources in place of fish meal. *Journal of Fisheries of China*, 2005, 29(3): 404-410 [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]
- Zhou XW, Zhu YL. Observation of pig blood hydrolyzed on raising value for mice, *Mus musculus* and chickens, *Gallus gallus*. *Feed Research*, 1998(2): 32-33 [周学文, 朱煜兰. 酶解猪血粉对小白鼠及肉鸡饲养效果观察. *饲料研究*, 1998(2): 32-33]

(编辑 马瑾艳)

Effects of Different Protein Hydrolysates on Growth Performance and Non-Specific Immunity of Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*)

ZHANG Tingting^{1,4}, CHEN Xiaoru³, LIANG Mengqing^{2,4}^①, WANG Chengqiang⁴,
ZHENG Keke⁴, XU Houguo⁴, CHEN Qiyong³

(1. Dalian Ocean University, Dalian 116021; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071; 3. Tongwei Co., Ltd., Chengdu 610063; 4. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

Abstract This study was conducted to investigate the effects of four protein hydrolysates for replacing fish meal protein of basal diets on growth performance and non-specific immunity of Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*). The control group included fish meal (FM) as the single protein source. The experimental groups were replaced 10% of fish meal protein with four protein hydrolysates, including fish protein hydrolysate (FPH), pig blood protein hydrolysate (PBPH), soy protein hydrolysate (SPH) and yeast protein hydrolysate (YPH). Five diets were formulated to be isonitrogenous and isolipidic. All diets were fed in triplicate groups of *L. japonicus* (initial weight 31.99 g) for 8 weeks. Results indicated that the final body weight and specific growth rate (SGR) were significantly improved when fish were fed the FM and FPH groups compared with the PBPH, SPH, and YPH groups ($P < 0.05$), but there was no significant effect on survival rate and feed intake among all groups ($P > 0.05$). There was no difference in feed efficiency (FE) among the FPH, FM, PBPH, and YPH groups ($P > 0.05$), while the FPH group was significantly higher than the SPH group ($P < 0.05$). The FPH group had significantly higher protein efficiency ratio (PER) than other dietary treatments ($P < 0.05$). The FPH, FM and YPH groups showed significantly higher protein productive value (PPV) than that of PBPH and SPH groups ($P < 0.05$), while PPV in the FPH, FM and YPH groups were not significantly different ($P > 0.05$). AKP, ACP, SOD, LZM activities and T-AOC in liver and serum of the FPH and YPH groups were significantly higher than other groups ($P < 0.05$). The FPH group showed significantly highest crude protein of fish body in all dietary treatments, but there were no significant different between the FPH, FM and YPH groups ($P > 0.05$). In conclusion, FPH had the best effects on growth and non-specific immunity of *L. japonicus* compared with other diets, followed by YPH, PBPH and SPH.

Key words *Lateolabrax japonicus*; Protein hydrolysate; Growth performance; Non-specific immunity

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

小麦蛋白替代鱼粉及大豆蛋白对日本黄姑鱼 (*Nibea japonica*)和黑鲷(*Sparus macrocephalus*) 血清生化指标及肝脏抗氧化指标的影响*

成艳波¹ 张月星^{1①} 董智勇¹ 路冰岩² 王永超¹

(1. 浙江海洋大学 国家海洋设施养殖工程技术研究中心 舟山 316022;

2. 广州市联鲲生物科技有限公司 广州 511483)



摘要 本研究通过在低鱼粉型膨化饲料中添加不同比例的混合型小麦蛋白(GWT, 由小麦蛋白、低筋面粉和牛磺酸分别以 77.5%、20.5%和 2.0%的比例混合而成), 逐步替代饲料中低温干燥鱼粉(LT-FM)或大豆浓缩蛋白(SPC), 饲喂日本黄姑鱼(*Nibea japonica*)[初始体重为(12.83±0.91) g]和黑鲷(*Sparus macrocephalus*)幼鱼[初始体重为(15.40±0.02) g] 59 d, 研究其对 2 种鱼类血清生化指标和肝脏抗氧化指标的影响。本研究配制 8 种等氮、等能饲料(粗蛋白: 44.1%–45.6%、总能: 21.5–22.0 MJ/kg), 其中, 对照组饲料以 LT-FM(20.0%)和 SPC(21.4%)为主蛋白源, 6 种实验饲料以 GWT 分别替代对照组饲料中 33.3%、66.7%和 100%的 LT-FM 或 SPC 蛋白, 另配制 1 种实验饲料(联合替代组), 用 GWT 替代对照组饲料中 50%的 LT-FM 和 SPC 蛋白。结果显示, 用 GWT 替代对照组饲料中的 LT-FM 对日本黄姑鱼血清总蛋白(TP)、甘油三酯(TG)和肝脏丙二醛(MDA)含量以及肝脏超氧化物歧化酶(SOD)活性均无显著影响($P>0.05$), 但显著降低了血清总胆固醇(TC)、葡萄糖(GLU)含量($P<0.05$)。相较对照组, GWT 高比例(66.7%和 100%)替代 LT-FM 引起日本黄姑鱼血清 SOD 活性的显著升高($P<0.05$)。GWT 替代对照组饲料中 LT-FM 或(和)SPC 均未对黑鲷幼鱼血清中的 TP、TG、TC、GLU 含量、肝脏 MDA 含量和血清 SOD 活性产生显著影响($P>0.05$), 而 GWT 完全替代 LT-FM 组、GWT 替代 33.3%和 66.7%SPC 组以及 GWT 联合替代组的黑鲷幼鱼肝脏 SOD 活性均显著上升($P<0.05$)。总之, 在本研究中, 日本黄姑鱼相较黑鲷对低鱼粉饲料中鱼粉用量的进一步下降更为敏感, GWT 高比例甚至完全替代 LT-FM 和 SPC, 未对黑鲷血清生化指标和肝脏抗氧化指标造成显著影响。本研究首次以小麦蛋白作为饲用蛋白源替代 LT-FM 和 SPC 在日本黄姑鱼和黑鲷中开展研究; 实验采用低鱼粉型(20%)膨化实用饲料作为对照组。

关键词 日本黄姑鱼; 黑鲷; 小麦蛋白; 低温干燥鱼粉; 大豆蛋白; 血清生化指标

中图分类号 S963 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)03-0106-09

日本黄姑鱼(*Nibea japonica*), 属鲈形目, 石首鱼科, 黄姑鱼属, 是一种摄食凶猛的肉食性鱼类, 主要分布于中国南海及日本的南部海域(柴学军等, 2009)。

黑鲷(*Sparus macrocephalus*), 属鲈形目, 鲷科, 棘鲷属, 主要分布于西太平洋海域, 如我国渤海、黄海、东海及台湾海峡等(马晶晶等, 2009)。2 种鱼类都是

* “海洋科学”浙江省重中之重学科开放课题(20130102)资助[This work was supported by the Open Foundation from Marine Sciences in the Most Important Subjects of Zhejiang Province (20130102)]. 成艳波, E-mail: yanbo198908@126.com

① 通讯作者: 张月星, 讲师, E-mail: yuexing.zhang@zjhou.edu.cn

收稿日期: 2016-04-26, 收修改稿日期: 2016-04-29

目前我国东海海区常见的网箱养殖及增殖放流品种(楼宝等, 2002; Ma *et al*, 2008)。

小麦蛋白是小麦淀粉加工后的副产品, 相较鱼粉和大豆浓缩蛋白有更高的粗蛋白含量和表观消化率(Draganovic *et al*, 2011; Apper-Bossard *et al*, 2013), 也具备 Gatlin 等(2007)提出的鱼粉替代蛋白源应具备的营养特性, 是一种理想的饲用优质植物蛋白源。相较鱼粉, 小麦蛋白具有产量大、供应稳定、价格经济等优点。因此, 探究小麦蛋白替代鱼粉作为具有一定养殖规模的名特优品种的饲用主蛋白, 具有重大的经济意义。相比大豆浓缩蛋白, 小麦蛋白还具有抗营养因子少和含硫氨基酸相对含量高等优点。本研究拟通过小麦蛋白替代鱼粉及大豆浓缩蛋白的研究, 以期对肉食性海水鱼类的低鱼粉型实用配方研发提供理论参考。

血液是鱼体内一种与自身代谢、营养组成和生理健康等密切相关的流体组织。其生化指标可反映出鱼体受环境和饵料营养等因子影响的状况。肝脏是鱼体重要的代谢器官, 与体内营养物质代谢密切相关。因此, 鱼类血液及肝脏生化指标常用作评估其代谢状况及器官病变的重要指标, 也可用于评估鱼粉替代蛋白源在饲料配方中应用的可行性及有效性。

小麦蛋白替代鱼粉对军曹鱼(*Rachycentron canadum*) (杨珺, 2010)¹⁾、欧洲鲈(*Dicentrarchus labrax*) (Robaina *et al*, 1999)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*) (Kaushik *et al*, 1995; de Francesco *et al*, 2004)等血清生化指标的影响均见报道, 而相关研究在日本黄姑鱼和黑鲷中却尚未开展。本研究通过在饲料中添加不同比例的混合型小麦蛋

白(GWT), 逐步替代优质低温干燥鱼粉(Low-temperature dried fish meal, LT-FM)或大豆浓缩蛋白(Soy protein concentrate, SPC), 研究其对日本黄姑鱼和黑鲷幼鱼血清生化指标和肝脏超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)含量的影响, 拟在生理生化水平上对小麦蛋白在 2 种肉食性鱼类膨化饲料中应用的可行性及有效性作出准确评估。

1 材料与方法

1.1 实验饲料

实验以低温干燥鱼粉(LT-FM)、大豆浓缩蛋白(SPC)和混合型小麦蛋白(GWT)为饲用主蛋白源, 其中, GWT 由小麦面筋蛋白(Vital wheat gluten, VWG)、低筋面粉和牛磺酸分别以 77.5%、20.5%和 2.0%的比例混合而成。LT-FM、SPC 和 VWG 3 种原料的营养组成详见表 1。实验配制了 8 种等氮等能饲料(粗蛋白为 44.1%–45.6%、总能为 21.5–22.0 MJ/kg)。其中, 对照组(V0)饲料以 LT-FM(20.0%)和 SPC(21.4%)为主蛋白源; 6 种实验饲料以 GWT 分别替代对照组饲料中 33.3%、66.7%和 100%的 LT-FM 蛋白(分别以 VF1、VF2、VF3 表示)或 SPC(分别以 VS1、VS2、VS3 表示); 另配制联合替代组(VFS), 用 GWT 同时替代对照组饲料中 50%的 LT-FM 和 50%的 SPC。饲料配方及其化学组成详见表 2。原料经粉碎、混匀后, 使用双螺杆挤压膨化机(牧羊 MY56X2A), 制成粒径为 3.5–3.8 mm 的膨化颗粒。实验饲料经干燥后, –20℃贮藏备用。

表 1 饲料原料营养组成(g/kg 干物质)

Tab.1 Composition of three feed ingredients used in the experiment(g/kg of the dry matter)

营养组成 Composition	低温干燥鱼粉 ¹ LT-FM	小麦面筋蛋白 ² VWG	大豆浓缩蛋白 ³ SPC
干物质 Dry matter (DM)	913.0	935.0	925.0
粗蛋白 Crude protein	748.0	837.0	694.0
粗脂肪 Crude fat	117.0	44.0	47.0
淀粉 Starch	–	74.0	–
灰分 Ash	122.0	10.0	58.0
总能 Gross energy (MJ/kg)	21.8	22.0	20.1

1: 丹麦 Triple nine 鱼粉公司; 2: 比利时 Syral Belgium N.V, AMYGLUTEN 110; 3: 益海嘉里集团秦皇岛金海粮油有限公司; “–”表示含量未检测

1: Triple nine®, Denmark; 2: AMYGLUTEN 110, Syral Belgium N.V, Belgium; 3: YIHAI®, Wilpromil, Glodensea Grain and Oil Industry Co., Ltd, Wilmar, Qinquangdao, China; Dash indicated data were not analyzed

1) Yang J. Study on utilization of four plant protein sources for juvenile cobia, *Rachycentron canadum*. Master's Thesis of Guangdong Ocean University, 2010, 21 [杨珺. 军曹鱼(*Rachycentron canadum*)对四种植物蛋白源的利用研究. 广东海洋大学硕士研究生学位论文, 2010, 21]

表2 饲料配方及化学组成(g/kg 干物质)
Tab.2 Feed formulation and chemical composition (g/kg of the dry matter)

原料 Ingredients	实验饲料 Diets							
	V0	VF1	VF2	VF3	VS1	VS2	VS3	VFS
混合型小麦蛋白 GWT ¹	—	69.0	138.0	207.0	69.0	138.0	207.0	207.0
鱼粉 LT-FM	200.0	133.0	66.0	—	200.0	200.0	200.0	100.0
大豆浓缩蛋白 SPC	214.0	214.0	214.0	214.0	142.0	71.0	—	107.0
其他混合蛋白 ² Other protein combination	190.0	190.0	190.0	190.0	190.0	190.0	190.0	190.0
面粉 Wheat flour	266.4	250.4	234.6	217.8	262.9	259.1	255.4	236.3
鱼油 Fish oil	84.0	89.0	94.0	99.0	84.0	84.0	84.0	92.0
大豆卵磷脂 Soy lecithin	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
预混料 Premix ³	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
磷酸二氢钙 Ca(H ₂ PO ₄) ₂	14.0	17.0	20.0	23.0	14.5	14.5	14.5	19.0
氯化胆碱 Choline chloride	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
晶体氨基酸混合物 ⁴ Crystalline amino acid mixture	—	6.0	11.8	17.6	6.0	11.8	17.5	17.1
成分分析 Analyzed content								
水分 Moisture	49.0	46.0	43.0	44.0	43.0	43.0	43.0	45.0
粗蛋白 Crude protein	441.0	447.0	444.0	449.0	447.0	451.0	456.0	454.0
粗脂肪 Crude fat	135.0	136.0	139.0	142.0	140.0	141.0	131.0	140.0
灰分 Ash	76.0	69.0	61.0	54.0	72.0	68.0	64.0	59.0
总能 Gross energy (MJ/kg)	21.5	21.6	21.6	22.0	21.5	21.7	21.8	22.0

1: 由小麦蛋白、面粉和牛磺酸分别以 77.5%、20.5%和 2.0%的比例混合而成; 2: 豆粕、花生粕和南极磷虾粉按 70 : 70 : 50 比例混合; 3: 预混料中, 多维和多矿的混合比例为 2 : 1, 多维组成(每千克饲料含量): 维生素 A 20 mg, 维生素 B₁ 12 mg, 维生素 B₂ 10 mg, 维生素 B₆ 15 mg, 维生素 B₁₂ 8 mg, 烟酰胺 100 mg, 抗坏血酸 1000 mg, 泛酸钙 40 mg, 生物素 2 mg, 叶酸 10 mg, 维生素 E 400 mg, 维生素 K₃ 20 mg, 维生素 D₃ 10 mg, 肌醇 200 mg, 玉米蛋白粉 150 mg; 多矿组成(每千克饲料含量): CuSO₄·5H₂O 10 mg, FeSO₄·H₂O 300 mg, ZnSO₄·H₂O 200 mg, MnSO₄·H₂O 100 mg, KI (10% I) 80 mg, Na₂SeO₃ (10% Se) 67 mg, CoCl₂·6H₂O (10% Co) 5 mg, NaCl 100 mg, 沸石 638 mg; 4: 晶体氨基酸混合物: VF1、VF2、VF3 中添加混合氨基酸为 L-赖氨酸、DL-蛋氨酸、L-精氨酸、L-苏氨酸(37 : 4 : 11 : 8); VS1、VS2、VS3 中添加混合氨基酸为 L-赖氨酸、L-精氨酸、L-苏氨酸(61 : 21 : 8); VFS 中添加混合氨基酸为 L-赖氨酸、DL-蛋氨酸、L-精氨酸、L-苏氨酸(100 : 2 : 47 : 22); “—”表示该原料组分在对应饲料中无添加

1: Mixture of vital wheat gluten, wheat flour and taurine (mixing ratio: 77.5%, 20.5% and 2.0%); 2: Mixture of soybean meal, peanut meal and krill meal (70 : 70 : 50); 3: Vitamin premix (mg/kg diet): Vitamin A 20 mg, Vitamin B₁ 12 mg, Vitamin B₂ 10 mg, Vitamin B₆ 15 mg, Vitamin B₁₂ 8 mg, Niacin amide 100 mg, Ascorbic acid 1000 mg, Calcium pantothenate 40 mg, Biotin 2 mg, Folic acid 10 mg, Vitamin E 400 mg, Vitamin K₃ 20 mg, Vitamin D₃ 10 mg, Inositol 200 mg, Corn protein powder 150 mg; Mineral premix (mg/kg diet): CuSO₄·5H₂O 10 mg, FeSO₄·H₂O 300 mg, ZnSO₄·H₂O 200 mg, MnSO₄·H₂O 100 mg, KI (10% I) 80 mg, Na₂SeO₃ (10% Se) 67 mg, CoCl₂·6H₂O (10% Co) 5 mg, NaCl 100 mg, Zeolite 638 mg. Vitamin premix: mineral premix=2 : 1; 4: Amino acid mixtures added in VF1, VF2, and VF3 were L-lysine, DL-Methionine, L-Arginine, and L-Threonine mixed with the ratio of 37 : 4 : 11 : 8; Amino acid mixtures added in VS1, VS2, and VS3 were L-lysine, L-Arginine, and L-Threonine mixed as the ratio of 61 : 21 : 8; Amino acid mixtures added in VFS were L-lysine, DL-Methionine, L-Arginine, and L-Threonine mixed with the ratio of 100 : 2 : 47 : 22; Dash indicated no addition of ingredient in diet

1.2 实验鱼

日本黄姑鱼幼鱼由浙江省海洋水产研究所西轩岛增殖基地提供, 黑鲷幼鱼购自浙江舟山登步岛黑鲷苗种场。暂养 2 周后, 禁食 1 d, 用 MS-222 轻微麻醉, 选取健康和体格匀称的个体, 随机分配至 48 个 250 L 圆形玻璃纤维养殖缸(每种鱼 24 个养殖缸)。养殖密度分别为日本黄姑鱼 26 条/缸, 初始体重为(12.83±0.91) g, 黑鲷 35 条/缸, 初始体重为(15.40±0.02) g。

1.3 养殖系统与饲料投喂

养殖实验在浙江省海洋水产研究所中挪海水鱼类营养与饲料联合实验室进行。采用室内流水养殖系统, 实验用水为沉淀砂滤后的海水, 盐度约为 28, 每缸进水速率为 2 L/min, 缸中放置 1 个纳米气石, 保证溶氧>6.0 mg/L。实验期间, 平均水温为 28℃, 采用自然光照, 养殖时间为 59 d, 每种饲料喂养 3 个缸的实验鱼。采用人工投喂, 每天 4 次(06:40, 09:50,

13:00 和 16:10), 每次 30 min, 确保实验鱼明显饱食。投喂前 5 min, 停水停气以便观察摄食状况, 投喂结束后, 用虹吸法收集残饵并定量, 再进行缸底吸污。

1.4 样品采集与分析

养殖结束后, MS-222 轻度麻醉所有实验鱼, 称重。每缸随机取 5 条鱼, 进行血液样本(尾静脉抽血)和肝脏样品采集。将采集有血样的 EP 管置于冰盒中, 待其完全凝固后, 4000×g、4℃, 离心 10 min, 取上清, 液氮速冻, -80℃保存待分析。肝脏样品在冰盘上充分研磨后, 迅速转移至 1.8 ml 的冻存管中, 液氮速冻后, -80℃保存待分析。

血清总蛋白(TP)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)和葡萄糖(GLU)等含量, 谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)活性均使用美国 Beckman Coulter AU5800 系列全自动生化分析仪及该公司总蛋白(双缩脲法)、甘油三酯(GPO-POD 法)、总胆固醇(酶法)、葡萄糖(氧化酶法)、丙氨酸氨基转移酶(速率法)和天冬氨酸氨基转移酶(速率法)等试剂盒测定。血清和肝脏 SOD 活性

(WST-1 法)及肝脏丙二醛(MDA, TBA 法)含量采用南京建成试剂盒测定。

1.5 统计方法

使用 SPSS 17.0 软件对实验鱼各指标进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 若差异显著($P < 0.05$), 则进行 Duncan 多重比较分析。对联合替代组和对照组实验鱼的各指标进行独立样本 t 检验, 显著性水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 GWT 替代 LT-FM 或 SPC 对日本黄姑鱼的影响

本研究分析了用 GWT 按不同比例替代饲料中的 LT-FM 或 SPC, 对日本黄姑鱼血清生化指标(TP、TG、TC、GLU 含量及 ALT、AST、SOD 活性)、肝脏 MDA 含量和 SOD 活性的影响见表 3。从表 3 可以看出, 养殖结束时, GWT 替代 LT-FM 对黄姑鱼血清中的 TP 和 TG 含量、ALT 和 AST 活性、肝脏 SOD 活性和

表 3 GWT 替代 LT-FM 或 SPC 对日本黄姑鱼血清生化指标及肝脏抗氧化指标的影响

Tab.3 Effects of dietary LT-FM or SPC replaced by GWT on plasma biochemical indices, liver anti-oxidative indices of *N. japonica*

项目 Items	替代水平 Replacing level (%)				P	Pooled S.E.M
	0	33.3	66.7	100		
GWT 替代 LT-FM LT-FM replaced by GWT						
血清生化指标 Biochemical indices in plasma						
TP (g/L)	30.50	34.30	36.30	36.90	0.16	1.43
TG (mmol/L)	10.14	8.07	7.08	6.22	0.23	1.82
TC (mmol/L)	4.02 ^a	3.22 ^{ab}	3.39 ^{ab}	3.07 ^b	0.04	0.27
GLU (mmol/L)	14.42 ^a	8.03 ^b	7.86 ^b	6.81 ^b	0.01	1.78
ALT (U/L)	59.00	36.50	72.80	42.80	0.71	22.30
AST (U/L)	170.00	151.00	183.00	131.00	0.90	52.30
SOD (U/ml)	19.80	19.60 ^{ab}	21.50 ^b	21.50 ^b	0.01	0.34
肝脏抗氧化指标 Anti-oxidative indices in liver						
MDA (nmol/mg prot)	15.74	5.47	7.69	6.06	0.12	3.40
SOD (U/mg prot)	462.00	431.00	435.00	442.00	0.94	27.50
GWT 替代 SPC SPC replaced by GWT						
血清生化指标 Biochemical indices in plasma						
TP (g/L)	30.50	34.80	33.30	34.40	0.09	1.43
TG (mmol/L)	10.14	10.50	8.86	5.64	0.21	1.82
TC (mmol/L)	4.02	3.79	3.68	3.26	0.56	0.27
GLU (mmol/L)	14.42	8.56	9.03	10.69	0.13	1.78
ALT (U/L)	59.00	40.00	28.80	59.20	0.66	22.30
AST (U/L)	170.00	131.00	109.00	174.00	0.76	52.30
SOD (U/ml)	19.80	19.70	19.00	20.20	0.18	0.34
肝脏抗氧化指标 Anti-oxidative indices in liver						
MDA (nmol/mg prot)	15.74	6.16	4.63	14.48	0.19	3.40
SOD (U/mg prot)	462.00	459.00	408.00	440.00	0.06	27.50

注: 结果用平均值表示($n=3$), 相同字母者表示差异不显著($P > 0.05$), 表 5 同

Note: Data were the mean of 3 individual samples, same letter indicated no significant different ($P > 0.05$), the same as Tab.5

MDA 含量均无显著影响($P>0.05$),但对血清中的 TC 和 GLU 含量及 SOD 活性等均影响显著($P<0.05$)。其中, GWT 100%替代 LT-FM 组的血清 TC 和 GLU 含量最低, SOD 活性最高。GWT 替代 SPC, 对黄姑鱼血清生化指标和肝脏抗氧化指标的影响均不显著($P>0.05$)。

2.2 GWT 替代 50% LT-FM 和 SPC 对日本黄姑鱼的影响

用 GWT 同时替代饲料中 50% LT-FM 和 50% SPC, 对日本黄姑鱼血清生化指标及部分肝脏指标的影响见表 4。从表 4 可以看出, 替代组除 TG 和 GLU 含量显著低于对照组($P<0.05$)外, 其他指标较对照组均无显著差异($P>0.05$)。

2.3 GWT 替代 LT-FM 或 SPC 对黑鲷的影响

用 GWT 按不同比例替代饲料中 LT-FM 或 SPC 对黑鲷血清生化指标及部分肝脏指标的影响见表 5。

表 4 GWT 替代 50% LT-FM 和 SPC 对日本黄姑鱼血清生化指标及肝脏抗氧化指标的影响(平均值±标准差, $n=3$)
Tab.4 Effects of 50% replacement of LT-FM and SPC by GWT on plasma biochemical indices, liver anti-oxidative indices of *N. japonica* (Mean±SD, $n=3$)

项目 Items	V0	VFS	$P> t $
血清生化指标 Biochemical indices in plasma			
TP (g/L)	30.50±2.50	36.00±2.40	0.05
TG (mmol/L)	10.14±3.15	3.98±2.06	<0.05
TC (mmol/L)	4.02±0.47	2.56±1.07	0.10
GLU (mmol/L)	14.42±3.09	7.50±1.19	0.02
ALT (U/L)	59.00±38.50	78.80±75.00	0.70
AST (U/L)	170.00±91.00	193.00±120.00	0.81
SOD (U/ml)	19.80±0.60	21.40±0.90	0.07
肝脏抗氧化指标 Anti-oxidative indices in liver			
MDA (nmol/mg prot)	15.74±5.89	8.65±0.85	0.11
SOD (U/mg prot)	462.00±39.0	365.00±45.00	0.09

表 5 GWT 替代 LT-FM 或 SPC 对黑鲷血清生化指标及肝脏抗氧化指标的影响
Tab.5 Effects of dietary LT-FM or SPC replaced by GWT on plasma biochemical indices, liver anti-oxidative indices of *S. macrocephalus*

项目 Items	替代水平 Replacing level (%)				P	Pooled S.E.M
	0	33.3	66.7	100		
GWT 替代 LT-FM LT-FM replaced by GWT						
血清生化指标 Biochemical indices in plasma						
TP (g/L)	40.00	39.10	38.40	44.00	0.25	1.38
TG (mmol/L)	17.08	17.83	15.05	21.36	0.60	3.43
TC (mmol/L)	10.46	10.40	9.59	10.77	0.88	1.15
GLU (mmol/L)	4.49	4.14	5.16	4.48	0.68	0.16
ALT (U/L)	14.80	12.80	19.70	21.00	0.59	3.18
AST (U/L)	57.00	57.00	100.00	92.00	0.50	11.40
SOD (U/ml)	19.30	21.00	20.50	18.80	0.21	1.04
肝脏抗氧化指标 Anti-oxidative indices in liver						
MDA (nmol/mg prot)	1.41	1.04	0.97	0.76	0.32	0.42
SOD (U/mg prot)	199.00 ^a	201.00 ^{ab}	203.00 ^{ab}	223.00 ^b	0.02	3.99
GWT 替代 SPC SPC replaced by GWT						
血清生化指标 Biochemical indices in plasma						
TP (g/L)	40.00	41.20	35.50	40.70	0.58	1.38
TG (mmol/L)	17.08	17.66	15.93	20.86	0.87	3.43
TC (mmol/L)	10.46	10.32	8.37	10.60	0.60	1.15
GLU (mmol/L)	4.49	4.40	5.43	4.99	0.69	0.16
ALT (U/L)	14.80	16.70	16.20	14.70	0.97	3.18
AST (U/L)	57.00	75.00	89.00	65.00	0.67	11.37
SOD (U/ml)	19.30	17.50	19.00	18.30	0.96	1.04
肝脏抗氧化指标 Anti-oxidative indices in liver						
MDA (nmol/mg prot)	1.41	0.93	0.86	0.74	0.36	0.42
SOD (U/mg prot)	199.00 ^a	221.00 ^b	235.00 ^b	219.00 ^{ab}	<0.01	3.99

注: GWT 替代 LT-FM 组 ALT、AST 平均值分别为 17.8、83 U/L; GWT 替代 SPC 组 ALT、AST 平均值分别为 15.9、76 U/L

Note: Means of ALT and AST activities in the group of dietary LT-FM replaced by GWT were 17.8 U/L and 83 U/L respectively; Means of ALT and AST activities in the group of dietary SPC replaced by GWT were 15.9 U/L and 76 U/L, respectively

由表5可知, 养殖实验结束时, 除肝脏SOD活性外, 其余指标均无显著影响($P>0.05$)。其中, GWT替代LT-FM时, 肝脏SOD活性随替代比例增加而显著升高, 100%替代组的肝脏SOD活性最高, 显著高于对照组($P<0.05$), 但较33.3%和66.7%替代组无显著差异($P>0.05$)。GWT替代SPC时, 33.3%和66.7%替代组的肝脏SOD活性显著高于对照组和100%替代组($P<0.05$)。

2.4 GWT替代50%LT-FM和50%SPC对黑鲷的影响

用GWT同时替代50%LT-FM和50%SPC对黑鲷血清生化指标及部分肝脏指标的影响见表6。从表6可以看出, 替代组除肝脏SOD酶活显著高于对照组($P<0.05$)外, 其他指标较对照组均无显著差异($P>0.05$)。

3 讨论

3.1 小麦蛋白对日本黄姑鱼和黑鲷血清TP、TG、TC和GLU含量的影响

鱼类可通过改变自身代谢模式(包括蛋白质和能量代谢方式), 以适应不同营养特性的饵料及摄入水平。在正常生理状态下, 鱼体可通过合成及分解代谢的调节, 使自身营养指标处于相对稳定状态。TP、TG和GLU是蛋白质、脂质和糖类三大营养物质消化吸收后在鱼体血液里的最主要存在形式。血液中一定

含量的营养物质是维持鱼类生存所必需的。同时, 血液中营养物质含量的变化也可反应出机体三大营养物质代谢的基本情况。因此, 鱼类的血清生化指标通常用作判定鱼体健康与否的标准。肝脏是蛋白质合成的主要场所, 鱼血清中的TP和鱼体肝脏功能密切相关, 血清中TP含量一定程度上可以反映肝脏的健康程度和饲料的质量状况(宋文新, 2009)¹⁾。也有研究指出, 血清中蛋白质的含量与免疫补体的含量有一定的关联(Sitjà-Bobadilla *et al*, 2005)。本研究中小麦蛋白替代鱼粉或大豆蛋白的所有处理对日本黄姑鱼、黑鲷幼鱼均未产生显著影响。孙宏等(2014)、黎慧等(2014)和彭翔等(2012)的研究也发现, 在饲料中添加植物性蛋白不会引起黑鲷TP的显著改变。

血清中TG和TC含量与鱼体内脂肪代谢相关, 而GLU则与糖类代谢密不可分。本研究中, 小麦蛋白替代鱼粉或大豆蛋白的处理对黑鲷血清中TG、TC和GLU均无显著影响, 相同的替代处理在赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)研究中也有相似的结果(未发表)。高比例小麦蛋白替代LT-FM会引起日本黄姑鱼TC的显著下降。植物蛋白替代鱼粉引起养殖动物血清TC含量下降的现象在虹鳟(de Francesco *et al*, 2004; Kaushik *et al*, 1995)、欧洲鲈(Robaina *et al*, 1999)、金头鲷(*Sparus aurata*) (Gómez-Requeni *et al*, 2004)、大菱鲆(*Psetta maxima*) (现命名为*Scophthalmus maximus*) (Regost *et al*, 1999)等研究中也报道。Kaushik等

表6 GWT替代50%LT-FM和SPC对黑鲷血清生化指标及肝脏抗氧化指标的影响(平均值±标准差, $n=3$)
Tab.6 Effects of 50% replacement of LT-FM and SPC by GWT on plasma biochemical indices, and liver anti-oxidative indices of *S. macrocephalus* (Mean±SD, $n=3$)

项目 Items	V0	VFS	$P> t $
血清生化指标 Biochemical indices in plasma			
TP (g/L)	40.00±2.40	42.10±4.50	0.51
TG (mmol/L)	17.08±5.93	20.61±4.07	0.44
TC (mmol/L)	10.46±2.00	9.47±0.77	0.45
GLU (mmol/L)	0.49±0.28	4.76±0.07	0.18
MDA (nmol/mg prot)	1.41±0.72	0.79±0.01	0.21
ALT (U/L)	14.80±5.50	17.70±4.10	0.51
AST (U/L)	57.00±20.00	93.00±23.00	0.11
SOD (U/ml)	19.30±1.80	19.70±0.90	0.75
肝脏抗氧化指标 Anti-oxidative indices in liver			
MDA (nmol/mg prot)	1.41±0.72	0.79±0.01	0.21
SOD (U/mg prot)	199.00±7.00	216.00±7.00	0.04

1) Song WX. Study on the partial replacement of fish meal by fermented soybean meal in the diet for juvenile black sea bream. Master's Thesis of Zhejiang University, 2009, 42 [宋文新. 黑鲷幼鱼饲料中发酵豆粕部分替代鱼粉的研究. 浙江大学硕士研究生学位论文, 2009, 42]

(2004)指出, 饲料中植物蛋白的添加可能促进了胆汁酸盐的排泄, 并抑制了肠道中胆固醇的重吸收, 进而表现为血清中 TC 含量的下降。也可能是鱼粉等高胆固醇物质在饲料中使用量的下降引起, 而与添加的植物蛋白类别无关。小麦蛋白替代 LT-FM 对日本黄姑鱼血清 TC 影响显著, 而相同替代对黑鲷 TC 则无显著影响, 这可能是不同鱼类的营养代谢机制不同所导致。血清 GLU 含量与动物的摄食水平和饲料中的营养因素相关(Nelssen *et al*, 1985)。在本研究中, 小麦蛋白替代 LT-FM 引起了日本黄姑鱼血清中 GLU 含量的显著下降。表明在饲料鱼粉含量已较低(20.0%)的情况下, 用小麦蛋白进一步替代鱼粉可能会导致不良效果, 也反应出日本黄姑鱼对饲料配方中鱼粉用量的减少较黑鲷更为敏感。

3.2 小麦蛋白对日本黄姑鱼和黑鲷血清 ALT、AST、SOD 活性和肝脏 SOD 活性、MDA 含量的影响

谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)是与体内三大营养(蛋白质、脂质和糖类)物质以及氨基酸代谢过程紧密相关的 2 种酶。ALT 主要参与谷氨酸和丙酮酸间的转氨作用, 而 AST 则主要与谷氨酸和草酰乙酸之间的转氨作用相关。2 种酶皆存在于鱼的肝脏中, 且其活性高低是鱼体内蛋白质合成和分解代谢强弱的重要体现。正常的生理状况下, 血清 ALT 活性极低, 只有在肝功能发生障碍或肝细胞受损时, ALT 才会被释放到血液中, 并表现出较高的血清 ALT 活性。当肝脏或者机体的肌肉组织发生障碍时, 血清中 AST 活性显著上升。血清中 ALT 和 AST 的活性可反映出鱼体肝脏的受损伤情况(Nyblom *et al*, 2004; 梅琳等, 2015)。本研究中, 不同替代处理对日本黄姑鱼和黑鲷血清 ALT、AST 均无显著影响。黑鲷 LT-FM 替代组的 ALT 和 AST 测定值分别为 17.8 U/L 和 83 U/L, 而 SPC 替代组的 ALT 和 AST 测定值分别为 15.9 U/L 和 76 U/L。以上测定值均低于刘颖等(2010)报道的黑鲷血清 ALT(42.7 U/L)、AST(86.0 U/L)值。此差异可能与黑鲷的规格和饲养条件(环境因素或饵料因素)有关。但有关日本黄姑鱼血清 ALT、AST 的数据尚无报道。

肝脏中 SOD 活性、MDA 含量及血清 SOD 活性, 常作为鱼类非特异性免疫指标, 其活性及含量与鱼体内存在的自由基相关(陈度煌等, 2013)。SOD 具有清除鱼体内自由基的能力, 可增强鱼体吞噬细胞的吞噬活性, 促进与免疫相关蛋白的合成(向泉等, 2012)。鱼肝脏 MDA 含量, 常用来指示机体内脂质的过氧化程度(宋志明等, 2015)。MDA 的测定常与 SOD 的测定同步, SOD 活力的高低间接反映机体清除自由基的能

力, 而 MDA 含量的高低则间接反应机体细胞受氧自由基攻击的程度。小麦蛋白含较高的谷氨酰胺, 可占粗蛋白的 35%—40%。谷氨酰胺可作为谷胱甘肽合成的前体, 在鱼体内氧自由基的清除中扮演重要角色(Trichet *et al*, 2010)。Zhu 等(2011)研究发现, 杂交鲟鱼(*Acipenser schrenckii*♀×*Huso dauricus*♂)的血清 SOD 活性随饲料中谷氨酰胺添加量的增加而升高。在饲料中添加适量的谷氨酰胺(0.9%—1.2%), 能显著提高杂交鲟幼鱼的血清非特异性免疫和抗氧化胁迫能力。Cheng 等(2012)以杂交条纹鲈(*Morone chrysops*×*Morone saxatilis*)为研究对象, 发现饲料中添加谷氨酰胺会显著增加细胞间超氧阴离子数量, 而后者能迅速刺激机体产生免疫应答, 从而起到疾病防御的作用(Siwicki *et al*, 1994)。本研究中, 小麦蛋白高比例替代 LT-FM 组(66.7% 和 100% 替代组)的日本黄姑鱼血清 SOD 活性显著升高, 小麦蛋白替代 LT-FM 组、SPC 组以及联合替代组黑鲷的肝脏 SOD 活性在较高替代水平平均表现出显著增长。因此, 小麦蛋白可能因其谷氨酰胺含量的较高, 在一定程度上促进了日本黄姑鱼和黑鲷非特异性免疫应答。小麦蛋白替代一定量的鱼粉对日本黄姑鱼血清 SOD 活性有显著提升, 而替代 SPC 对日本黄姑鱼血清 SOD 活性无影响, 表明血清 SOD 活性与饲料中蛋白源混合比例或小麦蛋白添加水平有关。小麦蛋白替代鱼粉会引起日本黄姑鱼血清 SOD 活性的提升, 而在黑鲷中表现为肝脏 SOD 活性的上升, 说明不同鱼类对同种植物蛋白原料在利用机制上可能存在差异。

4 结论

基于本研究结果, 小麦蛋白替代鱼粉能引起日本黄姑鱼血清 GLU 的显著下降, 但替代大豆浓缩蛋白时未发现类似现象。表明日本黄姑鱼较黑鲷对低鱼粉饲料中鱼粉用量的进一步下降更为敏感。小麦蛋白替代鱼粉或(和)大豆浓缩蛋白均未对黑鲷血清生化指标造成任何影响, 且饲料中适量添加小麦蛋白能一定程度上提高肝脏 SOD 的活性。

参 考 文 献

- Apper-Bossard E, Feneuil A, Wagner A, *et al*. Use of vital wheat gluten in aquaculture feeds. *Aquatic Biosystems*, 2013, 9: 21
- Chai XJ, Hu ZH, Xu JZ, *et al*. Effect of salinity and pH on oxygen consumption rate and ammonia excretion rate in juvenile *Nibea japonica*. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)*, 2009, 28(2): 146—150 [柴学军, 胡则辉, 徐君卓, 等. 盐度和 pH 对日本黄姑鱼幼鱼耗氧

- 率和排氨率的影响. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2009, 28(2): 146–150]
- Chen DH, Zheng LY, Lin JB, *et al.* Effects of different feed and coarse fish on growth and immunity of grouper (*Epinephelus coioides*). Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2013, 28(4): 309–314 [陈度煌, 郑乐云, 林建斌, 等. 不同饲料与小杂鱼对斜带石斑鱼生长和免疫力影响的研究. 福建农业学报, 2013, 28(4): 309–314]
- Cheng Z, Gatlin DM, Buentello A. Dietary supplementation of arginine and/or glutamine influences growth performance, immune responses and intestinal morphology of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*). Aquaculture, 2012, 362–363: 39–43
- de Francesco M, Parisi G, Médale F, *et al.* Effect of long-term feeding with a plant protein mixture based diet on growth and body/fillet quality traits of large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 2004, 236(1–4): 413–429
- Draganovic V, van der Goot AJ, Boom R, *et al.* Assessment of the effects of fish meal, wheat gluten, soy protein concentrate and feed moisture on extruder system parameters and the technical quality of fish feed. Animal Feed Science and Technology, 2011, 165(3–4): 238–250
- Gatlin DM, Barrows FT, Brown P, *et al.* Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: A review. Aquaculture Research, 2007, 38(6): 551–579
- Gómez-Requeni P, Mingarro M, Caldach-Giner JA, *et al.* Protein growth performance, amino acid utilisation and somatotropic axis responsiveness to fish meal replacement by plant protein sources in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Aquaculture, 2004, 232(1–4): 493–510
- Kaushik SJ, Coves D, Dutto G, *et al.* Almost total replacement of fish meal by plant protein sources in the diet of a marine teleost, the European seabass, *Dicentrarchus labrax*. Aquaculture, 2004, 230(1–4): 391–404
- Kaushik SJ, Cravedi JP, Lalles JP, *et al.* Partial or total replacement of fish meal by soybean protein on growth, protein utilization, potential estrogenic or antigenic effects, cholesterolemia and flesh quality in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture, 1995, 133(3): 257–274
- Li H, Hua Y, Lu J, *et al.* Effects of replacing fish meal with mixture of meat and bone meal and soy protein isolate on digestive function and serum biochemistry parameters of juvenile black sea bream, *Acanthopagrus schlegelii*. Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition), 2014, 35(1): 43–48 [黎慧, 华颖, 陆静, 等. 肉骨粉和大豆分离蛋白替代鱼粉对黑鲷幼鱼消化性能及血清指标的影响. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2014, 35(1): 43–48]
- Liu Y, Qiao WL, Wei D, *et al.* Study on serum biochemical indexes of *Sparus inacrocephalus*. Modern Agricultural Sciences and Technology, 2010(16): 307–308, 312 [刘颖, 乔伟亮, 魏东, 等. 黑鲷血清生化指标研究. 现代农业科技, 2010(16): 307–308, 312]
- Lou B, Xu JZ, Wu ZJ, *et al.* The initial report on the cultivation experiments of *Nibeia japonica*. Journal of Shanghai Fisheries University, 2002, 11(4): 324–328 [楼宝, 徐君卓, 吴祖杰, 等. 日本黄姑鱼养殖试验初报. 上海水产大学学报, 2002, 11(4): 324–328]
- Ma JJ, Shao QJ, Xu ZR, *et al.* Effects of dietary n-3 HUFA on growth performance and lipid metabolism in juvenile black sea bream, *Sparus macrocephalus*. Journal of Fisheries of China, 2009, 33(4): 639–649 [马晶晶, 邵庆均, 许梓荣, 等. n-3 高不饱和脂肪酸对黑鲷幼鱼生长及脂肪代谢的影响. 水产学报, 2009, 33(4): 639–649]
- Ma JJ, Xu ZR, Shao QJ, *et al.* Effect of dietary supplemental L-carnitine on growth performance, body composition and antioxidant status in juvenile black sea bream, *Sparus macrocephalus*. Aquaculture Nutrition, 2008, 14(5): 464–471
- Mei L, Zhou HH, Mai KS, *et al.* Effects of dietary substitution of fishmeal by fermented silkworm pupae on the growth, feed intake, digestion and immunity of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Progress in Fishery Sciences, 2015, 36(3): 85–92 [梅琳, 周慧慧, 麦康森, 等. 蛹肽蛋白替代鱼粉对大菱鲆(*Scophthalmus maximus* L.)幼鱼生长、饲料利用、消化代谢酶及免疫性能的影响. 渔业科学进展, 2015, 36(3): 85–92]
- Nelssen JL, Lewis AJ, Peo ER, *et al.* Effect of dietary energy intake during lactation on performance of primiparous sows and their litters. Journal of Animal Science, 1985, 61(5): 1164–1171
- Nyblom H, Berggren U, Balldin J, *et al.* High AST/ALT ratio may indicate advanced alcoholic liver disease rather than heavy drinking. Alcohol and Alcoholism, 2004, 39(4): 336–339
- Peng X, Song WX, Zhou F, *et al.* Effects of fermented soybean meal replacing fish meal on gastrointestinal tract and serum indexes in black sea bream. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2012, 28(5): 1096–1103 [彭翔, 宋文新, 周凡, 等. 发酵豆粕替代鱼粉对黑鲷胃肠道和血清指标的影响. 江苏农业学报, 2012, 28(5): 1096–1103]
- Regost C, Arzel J, Kaushik SJ. Partial or total replacement of fish meal by corn gluten meal in diet for turbot (*Psetta maxima*). Aquaculture, 1999, 180(1–2): 99–117
- Robaina L, Corraze G, Aguirre P, *et al.* Digestibility, postprandial ammonia excretion and selected plasma metabolites in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed pelleted or extruded diets with or without wheat gluten. Aquaculture, 1999, 179(1–4): 45–56
- Sitjà-Bobadilla A, Peña-Llopis S, Gómez-Requeni P, *et al.* Effect of fish meal replacement by plant protein sources on non-specific defence mechanisms and oxidative stress in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Aquaculture, 2005, 249(1–4): 387–400
- Siwicki AK, Anderson DP, Rumsey GL. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. Veterinary Immunology and Immunopathology, 1994, 41(1–4): 125–139
- Song ZM, Liu JY, Zhuang P, *et al.* Influence of low-temperature stress on the antioxidant enzymes activities and malondialdehyde contents in liver of juvenile *Siganus guttatus*. Marine Fisheries, 2015, 37(2): 142–150 [宋志明, 刘鉴毅, 庄平, 等. 低温胁迫对点篮子鱼幼鱼肝脏抗氧化酶活性及丙二醛含量的影响. 海洋渔业, 2015, 37(2): 142–150]

- Sun H, Ye YB, Yao XH, *et al.* Effects of partial replacement of fish meal by fermented cottonseed meal on growth performance, body composition and plasma biochemical indices of juvenile black sea bream. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2014, 26(5): 1238–1245 [孙宏, 叶有标, 姚晓红, 等. 发酵棉籽粕部分替代鱼粉对黑鲷幼鱼生长性能、体成分及血浆生化指标的影响. *动物营养学报*, 2014, 26(5): 1238–1245]
- Trichet VV. Nutrition and immunity: An update. *Aquaculture Research*, 2010, 41(3): 356–372
- Xiang X, Zhou XH, Chen J, *et al.* Effect of dietary replacement of fish meal protein with soybean meal protein on the growth, body composition and hematology indices of *Schizothorax prenanti*. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(5): 723–731 [向泉, 周兴华, 陈建, 等. 饲料中豆粕蛋白替代鱼粉蛋白对齐口裂腹鱼幼鱼生长性能、体成分及血液生化指标的影响. *水产学报*, 2012, 36(5): 723–731]
- Zhu Q, Xu QY, Xu H, *et al.* Dietary glutamine supplementation improves tissue antioxidant status and serum non-specific immunity of juvenile hybrid sturgeon (*Acipenser schrenckii*♀ × *Huso dauricus*♂). *Journal of Applied Ichthyology*, 2011, 27(2): 715–720

(编辑 马璀璨)

Effects of Dietary Replacement of Fish Meal and Soy Protein by Wheat Gluten on Plasma Biochemical Indices and Liver Anti-Oxidative Indices of *Nibea japonica* and *Sparus macrocephalus*

CHENG Yanbo¹, ZHANG Yuexing¹Ⓐ, DONG Zhiyong¹, LU Bingyan², WANG Yongchao¹

(1. National Engineering Research Center for Marine Aquaculture, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022;

2. Guangzhou Nutriera Biotechnology Co., Ltd, Guangzhou 511483)

Abstract GWT is an ingredient blend mixing vital wheat gluten, wheat flour and taurine with the ratio of 77.5%, 20.5%, and 2.0%, respectively. This study was conducted to evaluate GWT as a protein source to compare with low-temperature dried fish meal (LT-FM) and soy protein concentrate (SPC) in extruded practical diet to feed to juvenile giant croaker (*Nibea japonica*) and black sea bream (*Sparus macrocephalus*). Plasma biochemical indices and liver anti-oxidative indices of the two fish species were tested as fish health indicators in this study. Eight diets had been formulated, including a control diet with LT-FM (20%) and SPC (21.4%), six diets with decreasing percentages of LT-FM or SPC replaced by GWT (replacing levels were 33.3%, 66.7% and 100%, respectively, on protein basis) and one diet with both 50% of LT-FM and SPC was replaced by GWT. Each diet was fed to triplicate tanks of giant croaker with an initial weight of (12.83±0.91) g (26 fish per tank) and black sea bream with an initial weight of (15.40±0.02) g (35 fish per tank). All fish were reared in a sea-water flow-through system for 59 days. The results showed that there was no significant effect of replacing LT-FM by GWT on total protein (TP) content, plasma triglyceride (TC), and MDA content and liver SOD activity in giant croaker ($P>0.05$). However, total cholesterol (TG) and glucose (GLU) contents in plasma were significantly decreased ($P<0.05$), whereas the plasma SOD activity of juvenile giant croaker increased significantly ($P<0.05$) when 66.7% and 100% of dietary LT-FM was replaced by GWT. Partial or total replacement of LT-FM or SPC by GWT had no significant effect on plasma levels of TP, TG, TC and GLU, liver MDA content and plasma SOD activity of black sea bream ($P>0.05$). In contrast, significant increase of liver SOD activity was found when total LT-FM, 33.3% and 66.7% of SPC, and 50% of LT-FM and SPC in both were replaced by GWT in diet of black sea bream. To conclude, giant croaker was more sensitive than black sea bream to the significant reduction of LT-FM in the low fish meal based diet, with the changes of plasma biochemical indices and liver anti-oxidative indices. Highlights of the present study: firstly, it is the first study using GWT as main protein source in extruded diets for giant croaker and black sea bream; secondly, a low fishmeal (20%) containing extruded practical diet was used as the control.

Key words *Nibea japonica*; *Sparus macrocephalus*; Wheat gluten; Low-temperature dried fish meal; Soy protein concentrate; Plasma biochemical indices

Ⓐ Corresponding author: ZHANG Yuexing, E-mail: yuexing.zhang@zjou.edu.cn

饲料中大豆油替代鱼油对银鲳(*Pampus argenteus*)幼鱼血清溶菌酶活性及组织抗氧化能力的影响*



张晨捷 彭士明 高权新 施兆鸿^① 王建钢

(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)

摘要 银鲳(*Pampus argenteus*)是沿海重要的经济鱼类,本研究针对养殖银鲳幼鱼进行人工配合饲料研发,降低饲料成本、增强鱼体体质、提高存活率等。通过配制以 100%鱼油(FO)、70%鱼油和 30%大豆油(FSO)、30%鱼油和 70%大豆油(SFO)、100%大豆油(SO)为脂肪源的 4 组饲料,检测银鲳幼鱼血清溶菌酶(LZM)和组织抗氧化性能的变化情况,以探究饲料大豆油替代鱼油对银鲳幼鱼健康的影响。结果显示, SFO 组血清 LZM 水平最高, SO 组最低,但各组间差异不显著($P>0.05$)。FSO 和 SFO 组的肌肉丙二醛(MDA)含量显著高于 FO 和 SO 组($P<0.05$),肝脏 MDA 含量则是 FO 和 FSO 组较高($P<0.05$)。血清和肌肉超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活力最高的均为 SFO 组,而 SO 组活力较低。相对地,肝脏 SOD 和 CAT 活力均是 FO 组最高($P<0.05$)。肌肉和肝脏总抗氧化能力(T-AOC)均是 FO 和 FSO 组较高,而血清 T-AOC 是 SO 组较高。研究表明,豆油替代 30%和 70%鱼油,对银鲳幼鱼免疫和抗氧化能力都略有促进作用,但完全使用豆油会对机体产生负面影响。

关键词 长链多不饱和脂肪酸; 银鲳; 肝脏; 肌肉; 抗氧化

中图分类号 Q963 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)03-0115-09

长链多不饱和脂肪酸(LC-PUFA)是动物维持正常生长发育和生理功能的重要营养物质,具有细胞膜磷脂组分、类花生酸前体和调节基因表达等功能(Xie *et al.*, 2015)。根据第 1 个双键距离烃链尾的碳原子数目,可将 LC-PUFA 分为 n-3 和 n-6 系列。其中, n-3 LC-PUFA 主要包括亚麻酸(ALA)、二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA); n-6 系主要包括亚油酸(LA)和花生四烯酸(AA)(左然涛等, 2015)。鱼油中的 n-3 LC-PUFA 含量较高,而大部分植物油中的 n-6 系含量较高, n-3 系含量较低甚至没有(如葵花油、花生油)(Turchini *et al.*, 2009)。不同鱼类 LC-PUFA 合成能

力不同,一般认为,淡水鱼和鲑鳟类具有将 C18 PUFA 转化为 LC-PUFA 的能力,而海水鱼类,除少数种类外,大多从食物中获取 LC-PUFA,特别是养殖种类,故 LC-PUFA 被称为必需脂肪酸(EFA)(Geay *et al.*, 2015)。

海洋鱼类资源有限,导致鱼油原料短缺且价格昂贵,严重制约水产养殖业可持续发展。植物油资源较丰富,且价格低廉,是较适宜的鱼油替代品(梅琳等, 2015)。但由于植物油中含有大量的 n-6 LC-PUFA,而相对缺乏 n-3 LC-PUFA,用植物油取代鱼油会导致饲料中的 n-6/n-3 LC-PUFA 比例发生改变(谢帝芝等,

* 上海市科技兴农重点攻关项目(沪农科攻字 2013-2-1)和中央级公益性科研院所基本科研业务费(东 2014Z02)共同资助[This work was supported by the Science and Technology Start Agriculture Plan of Shanghai (Hunongkegongzi 2013-2-1) and the Central Nonprofit Basic Scientific Research Project for the Scientific Research Institutes of China (East 2014Z02)]. 张晨捷, E-mail: zhangchenjie1989@sina.com

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

收稿日期: 2016-02-22, 收修改稿日期: 2016-04-07

2015)。配合饲料中利用植物油替代鱼油虽然对生长性能影响不大,但因鱼体自身的 LC-PUFA 合成能力较弱,会导致鱼肉品质显著下降。n-6/n-3 LC-PUFA 摄入比例不均衡,会影响脂类代谢,造成某些脂类大量积累,势必增加鱼体组织中发生脂质过氧化的风险,进而会影响组织的抗氧化水平。细胞膜磷脂结构中的 LC-PUFA 对脂类过氧化反应十分敏感(Villasante *et al*, 2015),并且 n-3 LC-PUFA 比 n-6 LC-PUFA 更容易发生脂质过氧化反应(田晶晶等, 2015)。而脂类过氧化产物,如丙二醛(MDA)会损害细胞膜的结构与功能,削弱机体抗氧化与免疫功能。因此,适当的 LC-PUFA 配比既可节约饲料成本,又能提高饲料转化率、促进鱼类健康生长。

银鲳(*Pampus argenteus*)在中国各海域均有分布(刘静等, 2002),以东海北部近海(江苏吕四和浙江舟山渔场)的资源量最高,是沿海重要的经济鱼类,具有较高的养殖开发潜力(孙鹏飞等, 2015)。自 21 世纪初,国内陆续开展针对银鲳人工繁育及养殖技术方面的研究,尽管取得了一定科技成果(施兆鸿等, 2011; 彭士明等, 2010a),但也存在着饲料成本过高、生长速度较慢、发育不均衡等问题(彭士明等, 2010b; Peng

et al, 2013),尚未实现其稳定且规模化的人工繁育及养殖推广技术。本研究通过在饲料中添加不同比例鱼油与大豆油,分析大豆油替代鱼油对银鲳幼鱼血清溶菌酶和组织抗氧化性能的影响,以期对养殖银鲳幼鱼人工配合饲料的研发、降低饲料成本、增强鱼体体质、提高存活率提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼及饲料制备

实验用鱼为人工培育的银鲳幼鱼(4 月龄),初始规格:体重为(17.2±6.7) g,叉长为(8.5±0.9) cm。饲养时间为 2013 年 7-9 月,整个实验期间水温为 24-29℃,盐度为 24-27。

分别以 100%鱼油(FO)、70%鱼油和 30%大豆油(FSO)、30%鱼油和 70%大豆油(SFO)、100%大豆油(SO)为脂肪源配制等氮、等能、等脂的 4 组饲料,其饲料组成见表 1,脂肪酸组成见表 2。饲料蛋白水平约为 50%,脂肪水平约为 16%。所有饲料原料经过充分混合后,用绞肉机制成 2 mm 的颗粒,于 25℃烘箱中烘干后,于-20℃冰箱中保存备用。

表 1 实验饲料的组成
Tab.1 Ingredients and proximate composition of the experimental diets

原料 Ingredients	饲料 Experimental diets			
	FO	FSO	SFO	SO
组成 Ingredients (g/kg)				
鱼粉 Fish meal ^a	610	610	610	610
豆粕 Soybean meal ^a	160	160	160	160
面粉 Wheat flour ^a	100	100	100	100
鱼油 Anchovy oil	100	70	30	0
大豆油 Soybean oil	0	30	70	100
复合维生素 Vitamin premix ^b	20	20	20	20
复合矿物质 Mineral premix ^c	10	10	10	10
营养成分 Proximate composition (%)				
粗蛋白 Crude protein	49.62	49.95	49.73	50.14
粗脂肪 Crude fat	16.29	16.36	16.46	16.02
灰分 Ash	10.43	9.98	10.12	10.01
n-3 LC-PUFA ^d	5.18	4.01	3.02	2.22

a. 蛋白与脂肪含量(%干物质): 鱼粉, 67%蛋白、10.0%脂肪; 豆粕, 43%蛋白、1.9%脂肪; 面粉, 12%蛋白、1.6%脂肪。b. 每 kg 饲料含: 肌醇 400 mg, 烟酸 150 mg, 泛酸钙 44 mg, 维生素 B₂ 20 mg, 维生素 B₆ 12 mg, 维生素 K₃ 10 mg, 维生素 B₁ 10 mg, 维生素 A 7.3 mg, 叶酸 5 mg, 生物素 1 mg, 维生素 D₃ 0.06 mg, 维生素 B₁₂ 0.02 mg, 维生素 C 400 mg, 维生素 E 500 mg。c. 每 kg 饲料含: KH₂PO₄ 22 g, FeSO₄·7H₂O 1.0 g, ZnSO₄·7H₂O 0.13 g, MnSO₄·4H₂O 52.8 mg, CuSO₄·5H₂O 12 mg, CoSO₄·7H₂O 2 mg, KI 2 mg。d. 依据饲料脂肪含量×总 n-3 LC-PUFA 百分比

a. Proximate composition as % dry weight. Fish meal: 67% crude protein, 10.0% crude lipid; Soybean meal: 43% crude protein, 1.9% crude lipid; Wheat flour: 12% crude protein, 1.6% crude lipid. b. Supplied (/kg diet): Myo-inositol, 400 mg; Nicotinic acid, 150 mg; Calcium pantothenate, 44 mg; Riboflavin, 20 mg; Pyridoxine hydrochloride, 12 mg; Menadione, 10 mg; Thiamine hydrochloride, 10 mg; Retinyl acetate, 7.3 mg; Folic acid, 5 mg; Biotin, 1 mg; Cholecalciferol, 0.06 mg; Cyanocobalamin, 0.02 mg; L-ascorbic acid, 400 mg; DL- α -tocopherol acetate, 500 mg. c. Supplied (/kg diet): KH₂PO₄, 22 g; FeSO₄·7H₂O, 1.0 g; ZnSO₄·7H₂O, 0.13 g; MnSO₄·4H₂O, 52.8 mg; CuSO₄·5H₂O, 12 mg; CoSO₄·7H₂O, 2 mg; KI, 2 mg. d. Calculated from lipid content × Σ n-3 LC-PUFA

表 2 饲料脂肪酸组成(%，占总脂肪酸比例)
Tab.2 Fatty acid composition of the experimental diets (% of total fatty acids)

脂肪酸 Fatty acids	实验饲料 Experimental diets			
	FO	FSO	SFO	SO
饱和脂肪酸 Saturated Fatty acids	29.10	28.86	27.01	25.06
单不饱和脂肪酸 Σ MUFAs	28.94	28.19	28.08	27.36
C18:2n6	7.41	11.15	20.75	27.71
C18:3n6	0.18	0.24	0.28	0.30
C20:4n6	3.13	1.69	0.71	0.63
n-6 多不饱和脂肪酸 Σ n-6 LC-PUFAs	10.72	13.08	21.74	28.64
C18:3n3	1.23	1.94	2.94	3.62
C20:3n3	0.23	0.20	0.16	0.14
C20:5n3	14.92	12.06	8.65	5.97
C22:5n3	1.81	1.51	1.18	0.92
C22:6n3	12.82	10.75	8.34	6.82
n-3 多不饱和脂肪酸 Σ n-3 LC-PUFAs	31.00	26.45	21.27	17.46
n-3/n-6	2.89	2.02	0.98	0.61
Σ n-3 LC-PUFAs	29.78	24.51	18.33	13.84

1.2 实验设计

挑选 600 条体表无伤、体色正常的银鲳幼鱼，平均分配于 16 m³ 的室内圆形水泥池中，每个饲料组设 3 个重复，共 12 个水泥池。以不添加大豆油饲料预饲 1 周，饲养时间为 2013 年 8–9 月，共计 60 d。饲养期间，24 h 不间断充气，每天饱食投喂 2 次(08:00 和 16:00)，日换水量为 40%。

每个水泥池取 3 尾鱼(样本数为 9)，经 100 mg/L MS-222 麻醉后，用 1 ml 无菌注射器尾静脉采血，置于无菌离心管中，4℃ 静止 12 h，4000 r/min 离心 15 min，取上清液。采血后，在碎冰上解剖，取两侧肌肉、肝脏组织。用生理盐水润洗，并用滤纸片吸干水分，血清、肌肉和肝脏置于 -70℃ 保存备用。

1.3 指标检测

血清溶菌酶(LZM)活力采用比浊法。肌肉和肝脏丙二醛(MDA)含量采用硫代巴比妥酸缩合比色法。超氧化物歧化酶(SOD)活力采用黄嘌呤氧化酶法，酶活单位(U/mg prot 或 U/ml)定义为：每毫克组织蛋白或每毫升血清在 1 ml 反应液中超氧自由基抑制率达 50%时所对应的 SOD 量。过氧化氢酶(CAT)活力采用比色法，酶活单位(U/mg prot 或 U/ml)定义为：每毫克组织蛋白或每毫升血清每秒钟分解 1 μ mol 量的 H₂O₂。总抗氧化能力(T-AOC)包括酶促和非酶促体系，单位 U/mg prot 或 U/ml 表示；每分钟每毫克组织或蛋白每分钟每毫升血清使反应体系吸光度(OD)

增加 0.01。各项指标由南京建成生物工程研究所试剂盒检测，按说明书要求操作并计算。

1.4 数据处理

数据以平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示，采用 SPSS 19.0 软件对银鲳幼鱼各项指标数据进行统计与分析，运用单因素方差分析(One-way ANOVA)，先进行方差齐性检验，不满足方差齐性时，对数据进行自然对数或平方根转换，采用 Duncan's 进行多重比较， $P < 0.05$ 为显著性差异。用 Excel 2007 绘制图表。

2 结果与分析

2.1 银鲳幼鱼血清 LZM 活力

饲料中，大豆油替代鱼油对银鲳幼鱼血清 LZM 活力影响见图 1。由图 1 可知，SFO 组(n-3 LC-PUFA, 3.02%) LZM 活力最高[(50.98 \pm 6.79) U/ml]，SO 组(n-3 LC-PUFA, 2.22%)最低[(35.29 \pm 11.77) U/ml]，但各组间差异不显著($P > 0.05$)。

2.2 银鲳幼鱼肌肉和肝脏 MDA 含量

如图 2 所示，银鲳幼鱼肌肉和肝脏 MDA 含量随饲料大豆油替代鱼油水平呈现不同变化趋势。肌肉 MDA 含量最高的是 FSO 组(n-3 LC-PUFA, 4.01%)，为(1.88 \pm 0.28) nmol/mg prot，含量最低的是 SO 组(n-3 LC-PUFA, 2.22%)，为(0.93 \pm 0.20) nmol/mg prot，FSO 和 SFO 组显著高于 FO 和 SO 组($P < 0.05$)。肝脏 MDA 含量最高的是

FO组(n-3 LC-PUFA, 5.18%),为(4.37±0.59) nmol/mg prot, 含量最低的是SFO组(n-3 LC-PUFA, 3.02%),为(1.48±0.28) nmol/mg prot, 各组间均存在显著差异($P<0.05$)。

2.3 银鲳幼鱼血清、肌肉和肝脏 SOD 活力

饲料大豆油替代鱼油水平对银鲳幼鱼血清、肌肉和肝脏 SOD 活力的影响见图3、图4。从图3可以看出,血清 SOD 活力最高的是SFO组(n-3 LC-PUFA, 3.02%),为(50.32±6.15) U/ml,活力最低的是SO组(n-3 LC-PUFA, 2.22%),为(29.81±6.60) U/ml ($P<0.05$)。从图4可以看出,SFO组肌肉 SOD 活力最高,为(27.14±6.57) U/mg prot,活力最低的为SO组,为(14.67±4.59) U/mg prot,SFO组显著高于FO和SO组($P<0.05$)。肝脏 SOD 活力最高的是FO组(n-3 LC-PUFA, 5.18%),为(166.06±24.21) U/mg prot,活力最低的是SFO组,为(52.40±4.82) U/mg prot,FO组显著高于其他3组,SFO组显著低于其他3组($P<0.05$)。

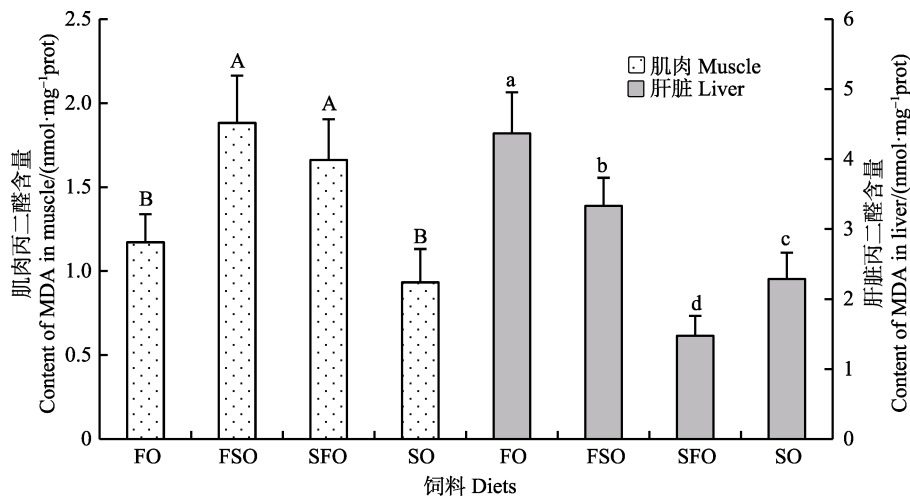


图2 饲料中大豆油替代鱼油对银鲳幼鱼肌肉和肝脏丙二醛含量的影响

Fig.2 The effects of dietary substitution of fish oil by soybean oil on MDA content in muscle and liver of juvenile *P. argenteus*

2.4 银鲳幼鱼血清、肌肉和肝脏 CAT 活力

饲料大豆油替代鱼油对银鲳幼鱼血清、肌肉和肝脏 CAT 活力的影响见图5、图6。从图5可以看出,血清CAT活力最高的是SFO组(n-3 LC-PUFA, 3.02%),为(1.79±0.25) U/ml,最低的是FSO组(n-3 LC-PUFA, 4.01%),为(1.28±0.09) U/ml, SFO组显著高于其他组($P<0.05$)。从图6可以看出,肌肉CAT活力最高的是SFO组,为(0.88±0.23) U/mg prot,最低的是FO组(n-3 LC-PUFA, 5.18%),为(0.36±0.10) U/mg prot, SFO组CAT活力显著高于其他组($P<0.05$)。肝脏CAT活力最高的是FO组,为(1.57±0.52) U/mg prot,最低的是SO组(n-3 LC-PUFA, 2.22%),为(0.41±0.09) U/mg prot, FO组CAT活力显著高于其他组($P<0.05$)。

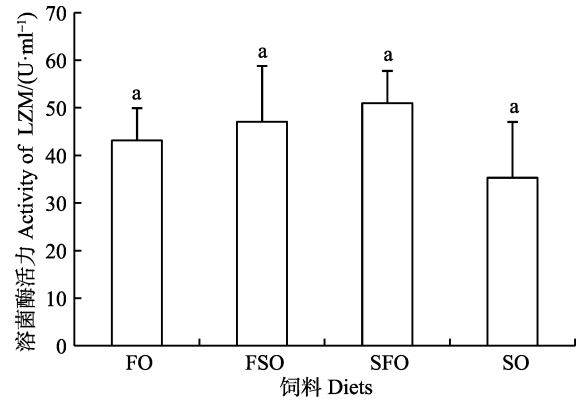


图1 饲料中大豆油替代鱼油对银鲳幼鱼血清溶菌酶活力的影响

Fig.1 The effects of dietary substitution of fish oil by soybean oil on LYM activity in serum of juvenile *P. argenteus*

不同字母表示差异显著($P<0.05$), 下同
Different letters indicated significant difference ($P<0.05$), the same as below

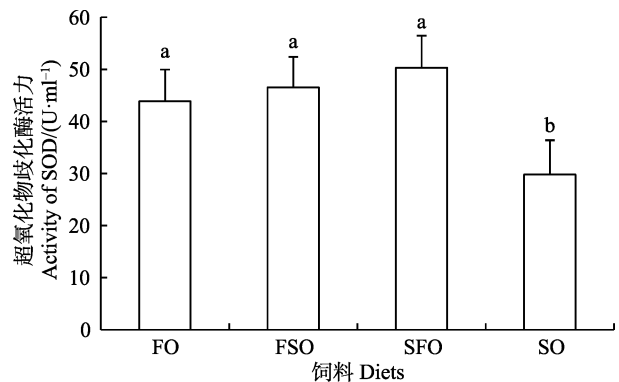


图3 饲料中大豆油替代鱼油对银鲳幼鱼血清 SOD 活力的影响

Fig.3 The effects of dietary substitution of fish oil by soybean oil on SOD activity in serum of juvenile *P. argenteus*

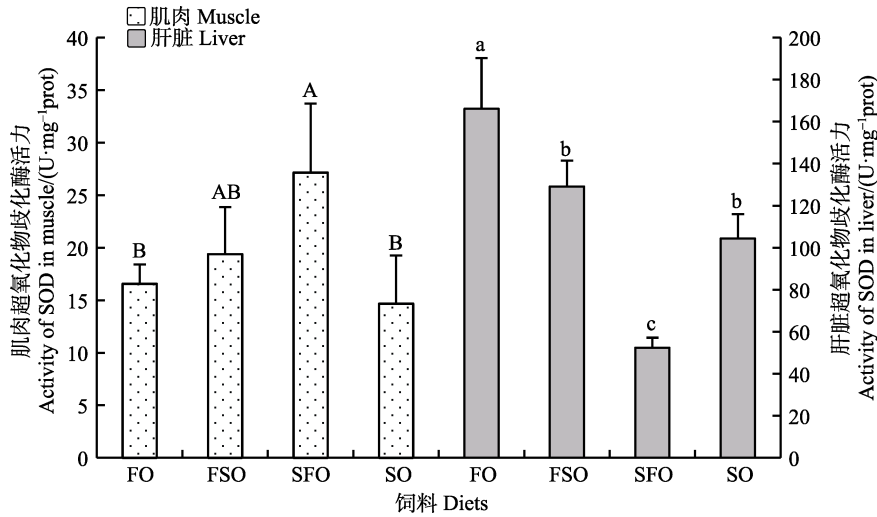


图 4 饲料中大豆油替代鱼油对银鲳幼鱼肌肉和肝脏 SOD 活力的影响

Fig.4 The effects of dietary substitution of fish oil by soybean oil on SOD activity in muscle and liver of juvenile *P. argenteus*

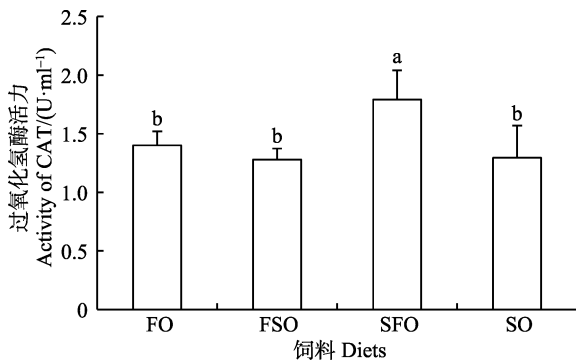


图 5 饲料中大豆油替代鱼油对银鲳幼鱼血清 CAT 活力的影响

Fig.5 The effects of dietary substitution of fish oil by soybean oil on CAT activity in serum of juvenile *P. argenteus*

2.5 银鲳幼鱼血清、肌肉和肝脏 T-AOC

饲料大豆油替代鱼油对银鲳幼鱼血清、肌肉和肝脏 T-AOC 影响情况见图 7、图 8。从图 7 可以看出，

血清 T-AOC 最高的是 SO 组 (n-3 LC-PUFA, 2.22%) : (11.22±5.97) U/ml, 最低的是 FO 组 (n-3 LC-PUFA, 5.18%), 为 (3.37±1.17) U/ml, SO 组显著高于 FO 组 ($P < 0.05$)。从图 8 可以看出, 肌肉 T-AOC 最高的是 FSO 组 (n-3 LC-PUFA, 4.01%), 为 (0.78±0.30) U/mg prot, 最低的是 SO 组, 为 (0.41±0.08) U/mg prot, 各组间差异不显著 ($P > 0.05$)。肝脏 T-AOC 最高的是 FO 组, 为 (2.26±0.17) U/mg prot, 最低的是 SFO 组 (n-3 LC-PUFA, 3.02%), 为 (1.18±0.13) U/mg prot, FO 组显著高于 SFO 和 SO 组, SFO 则显著低于其他组 ($P < 0.05$)。

3 讨论

养殖鱼类饲料中的脂肪成分会反映在鱼肉脂肪组成上。近年来, 鱼油资源短缺使相对低廉的植物油部分替代了饲料中的鱼油成分 (Pike, 2015)。但由于大

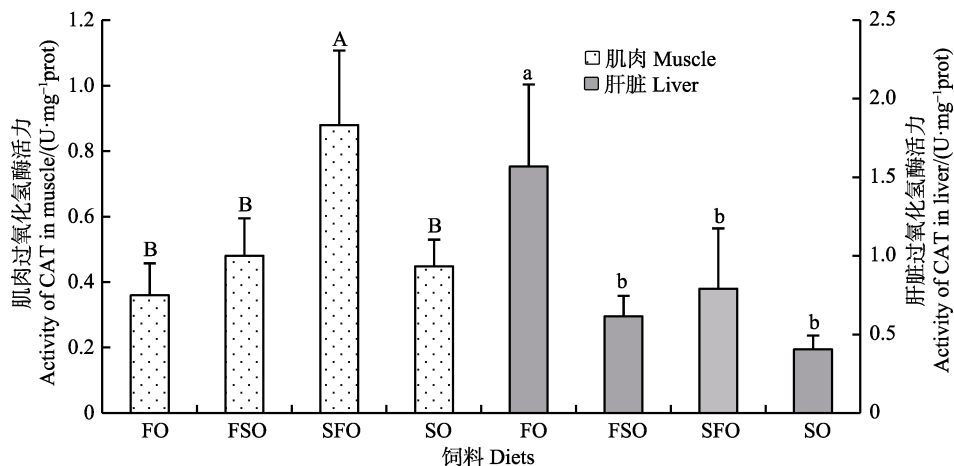


图 6 饲料中大豆油替代鱼油对银鲳幼鱼肌肉和肝脏 CAT 活力的影响

Fig.6 The effects of dietary substitution of fish oil by soybean oil on CAT activity in muscle and liver of juvenile *P. argenteus*

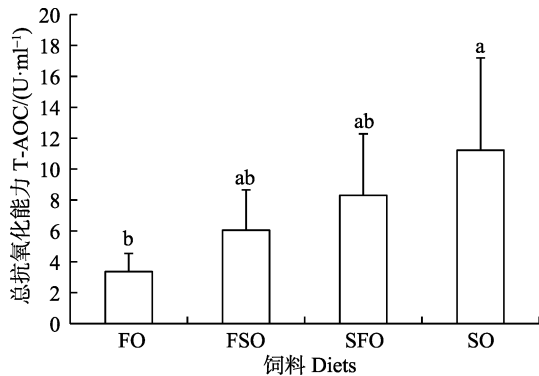


图7 饲料中大豆油替代鱼油对银鲳幼鱼血清 T-AOC 的影响

Fig.7 The effects of dietary substitution of fish oil by soybean oil on T-AOC in serum of juvenile *P. argenteus*

多数植物油中缺乏 n-3 LC-PUFA, 对一些养殖鱼类健康和鱼肉品质造成了负面影响(Zuo *et al.*, 2015)。本研究利用大豆油和鱼油不同配比作为饲料脂肪源, 通过分析血清溶菌酶、肝脏和肌肉中抗氧化指标的变化, 阐述大豆油替代鱼油对银鲳机体产生的影响。

3.1 饲料大豆油替代鱼油对银鲳幼鱼血清溶菌酶的影响

LZM 是重要的非特异性免疫因子, 主要来源于巨噬细胞, 对外源物有破坏作用, 可以反应鱼类机体对寄生虫、细菌以及病毒的抵抗能力(Reyes-Becerril *et al.*, 2014; 吕云云等, 2015)。适当的饲料营养配比能提高 LZM 水平, 增强免疫能力。梁萌青等(2005)发现, 鳀鱼(*Engraulis japonicus*)油作为脂肪源时, 维生素 E 的添加能显著提高大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)血清溶菌酶活性, 而大豆油则没出现这个现象, 提高 n-3 LC-PUFA 含量对脂溶性维生素吸收利用有促进

作用。杨鸾劫等(2008)发现, 在黄鳝(*Monopterus albus*)饲料中添加不同比例 PUFA, 血清溶菌酶含量有不同程度的提高。

本研究中, SFO 组的银鲳幼鱼血清 LZM 水平最高, 而 SO 组最低, FSO 和 SFO 组相对较高, 但各组差异并不显著。全鱼油组 LZM 水平不高, 可能是由于过量的 n-3 LC-PUFA 降低了鱼类免疫器官表面病原识别受体及其接头蛋白的表达所致(Zuo *et al.*, 2012)。而豆油部分替代鱼油, 对银鲳幼鱼免疫能力略有促进作用, 完全使用豆油则会对免疫能力产生负面影响。另外, 过量的 n-3 LC-PUFA 易发生过氧化反应, 超氧阴离子会攻击免疫细胞膜, 从而降低免疫性能(Gill *et al.*, 2010)。说明, 饲料维持一定的 n-3 与 n-6 配比, 对增强银鲳免疫性能有促进作用。

3.2 饲料大豆油替代鱼油对银鲳幼鱼抗氧化相关指标的影响

生物体组织中, 脂类营养特别是 PUFA 的大量聚集必然会在一定程度上引发脂质过氧化物的发生。PUFA 等脂类与氧化自由基反应时, 会引发脂质过氧化, 经分子内的环化、裂解等步骤作用, 最终降解产生 MDA, MDA 和体内脂质、蛋白质、核酸等大分子进行交错连结反应, 使鱼体清除自由基的能力降低, 进而对机体造成伤害(王奇等, 2010)。MDA 含量既可判定机体脂质过氧化程度, 也可间接反映自由基产生侵害的程度、生物活性及其抗氧化能力的强弱(Viarengo *et al.*, 1995)。

Mozanzadeh 等(2015)研究发现, 升高 n-3 LC-PUFA 水平会使矛鲷(*Sparidentex hasta*)肝脏和血清中 MDA 含量和 CAT 活力增加。本研究中, FSO

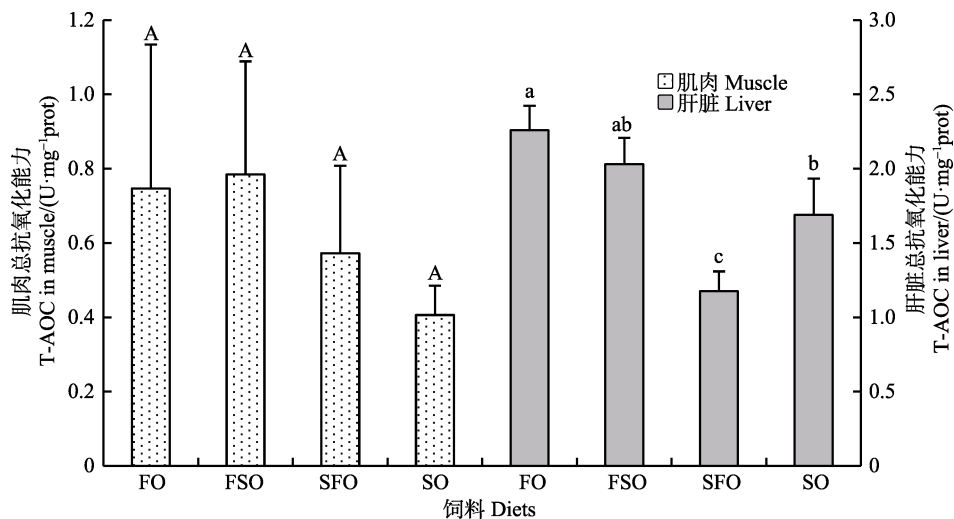


图8 饲料中大豆油替代鱼油对银鲳幼鱼肌肉和肝脏 T-AOC 的影响

Fig.8 The effects of dietary substitution of fish oil by soybean oil on T-AOC in muscle and liver of juvenile *P. argenteus*

和 SFO 组的银鲟肌肉 MDA 含量显著高于 FO 和 SO 组, 肝脏 MDA 含量则是 FO 和 FSO 组显著较高。说明, 较高的饲料 n-3 LC-PUFA 含量会使银鲟不同组织的 MDA 含量上升。

FO 组肌肉 MDA 的含量较低, 且肌肉 MDA 与 SOD、CAT 变化情况类似, 推测其原因与 FO 组肝脏 SOD、CAT 和 T-AOC 较高, 导致转运出的 MDA 量较少有关。另外, 肝脏是鱼类脂类吸收、代谢的主要器官, 营养不良会导致肝脏脂类代谢紊乱, 影响肝脏对脂类的吸收和转运(Mozanzadeh *et al*, 2015)。Moldal 等(2014)发现, 植物油替代鱼油会对大西洋鲑(*Salmo salar*)的肠道产生不良影响, 使肠壁变薄, 粘膜褶皱变少, 同样会影响脂肪酸的吸收。而饲料脂肪酸被吸收后, 通过一些组织、器官的转运与代谢后, 其脂肪酸组成对鱼类肝脏的影响比对肌肉的影响更显著(Peng *et al*, 2014)。

鱼类抗氧化防御系统分为酶促与非酶促两大部分, 其中, SOD 和 CAT 是 2 个重要的抗氧化酶, 它们能有效清除体内的超氧阴离子自由基(O_2^-)、游离氧(O)、羟自由基($-OH$)和 H_2O_2 等活性氧物质(鲁双庆等, 2002; Kanak *et al*, 2014)。Luo 等(2012)研究发现, 适宜的饲料 LC-PUFA 含量可有效提高矛尾复鰕虎鱼(*Synechogobius hasta*)的 SOD 和 CAT 活力, 但过高含量也会在一定程度上抑制 CAT 活力。Zuo 等(2015)发现, 适宜的 PUFA n-3/n-6 值(0.5)也可以提高大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)肝脏的 SOD 和 CAT 活力, 若该比值高于 0.5, 则酶活力反而有所下降。

本研究中, 银鲟血清和肌肉 SOD 和 CAT 活力最高的组均为 SFO 组, 而 SO 组活力较低。相对地, 肝脏 SOD 和 CAT 活力均是 FO 组最高($P < 0.05$)。说明, 饲料中 n-3/n-6 值过高会代谢更多(如 MDA 等)副产物, 需要肝脏提高抗氧功能予以消除, 同时, 消耗更多能量与营养储备, 而 n-3/n-6 值偏低又会抑制抗氧化酶活力。因此, 饲料中适当的鱼油添加量可以保持适宜的 n-3 和 n-6 配比, 有助于银鲟幼鱼的健康养殖。

T-AOC 表示各种抗氧化大分子、抗氧化小分子和酶促体系的抗氧化能力总和, T-AOC 变化可以反映机体内自由基的代谢情况, 对判断机体的健康状况及抗氧化防御能力具有重要意义(Martinez-Álvarez *et al*, 2005)。Villasante 等(2015)利用饲料增加虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)肌肉和肝脏 n-3 LC-PUFA 含量, 可以使血清 T-AOC 增强。适宜的饲料 n-3 LC-PUFA 含量可显著提高褐菖鲉(*Sebastes marmoratus*)机体的抗氧化能力(岳彦峰等, 2013)。本研究银鲟幼鱼肌肉和肝脏 T-AOC 均是 FO 和 FSO 组较高, 说明, 较高的饲料

n-3 LC-PUFA 含量可增强抗氧化能力, 而血清 T-AOC 在 SO 组较高, 可能与体内 MDA 含量较低, 非酶体系抗氧化能力消耗较小有关。

本研究中, FO、FSO、SFO 和 SO 组银鲟的终末体重分别为(37.84±3.82) g、(39.95±4.01) g、(34.64±3.75) g 和(26.63±2.97) g, 其他生长和营养数据另文发表。结合本研究中的 LZM 和抗氧化指标, 发现, FSO 和 SFO 组银鲟幼鱼机体状况较好, 尤其是 SFO 组 LZM 水平较高, 肌肉和肝脏 MDA 含量不高, 各项抗氧化能力指标也较强, 品质较好。考虑到鱼粉中含有一定量鱼油, 因此, 鱼油添加量多于 SFO 组(30%)少于 FSO 组(70%)效果可能较好。本研究表明, 用大豆油替代鱼油, 使饲料 n-3 LC-PUFA 含量占总脂肪酸的 18%–24%, 且 n-3 与 n-6 比例相对均衡(n3/n6 值为 1–2)时, 有利于银鲟的健康生长。

参 考 文 献

- Geay F, Wenon D, Mellery J, *et al*. Dietary linseed oil reduces growth while differentially impacting LC-PUFA synthesis and accretion into tissues in Eurasian Perch (*Perca fluviatilis*). *Lipids*, 2015, 50(12): 1219–1232
- Gill R, Tsung A, Billiar T. Linking oxidative stress to inflammation: Toll-like receptors. *Free Radical Biology and Medicine*, 2010, 48(9): 1121–1132
- Kanak EG, Dogan Z, Eroglu A, *et al*. Effects of fish size on the response of antioxidant systems of *Oreochromis niloticus* following metal exposures. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2014, 40(4): 1083–1091
- Liang MQ, Chang Q, Wang YG, *et al*. Influences of vitamin E and lipid sources on non-specific immunity of turbot (*Scophthalmus maximus* Linnaeus). *Marine Fisheries Research*, 2005, 26(5): 15–21 [梁萌青, 常青, 王印庚, 等. 维生素 E 及脂肪源对大菱鲆非特异性免疫的影响. *海洋水产研究*, 2005, 26(5): 15–21]
- Liu J, Li CS, Li XS. Studies on Chinese pomfret fishes of the genus *Pampus* (Pisces: Stromateidae). *Studia Marina Sinica*, 2002(40): 240–252 [刘静, 李春生, 李显森. 中国鲷属鱼类的分类研究. *海洋科学集刊*, 2002(40): 240–252]
- Lu SQ, Liu SJ, Liu HY, *et al*. Effects of Cu^{2+} on activities of protecting enzymes SOD, CAT and GSH-PX in liver tissue of *Monopterus albus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2002, 9(2): 138–141 [鲁双庆, 刘少军, 刘红玉, 等. Cu^{2+} 对黄鳝肝脏保护酶 SOD、CAT、GSH-PX 活性的影响. *中国水产科学*, 2002, 9(2): 138–141]
- Lü YY, Chen SQ, Yu CL, *et al*. The effects of the ratio of dietary protein to lipid on the growth, digestive enzyme activities and blood biochemical parameters in spotted halibut, *Verasper variegates*. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(2): 118–124 [吕云云, 陈四清, 于朝磊, 等. 饲料蛋白

- 脂肪比对圆斑星鲃(*Verasper variegates*)生长、消化酶及血清生化指标的影响. 渔业科学进展, 2015, 36(2): 118–124]
- Luo Z, Tan XY, Li XD, *et al.* Effect of dietary arachidonic acid levels on growth performance, hepatic fatty acid profile, intermediary metabolism and antioxidant responses for juvenile *Synechogobius hasta*. Aquaculture Nutrition, 2012, 18(3): 340–348
- Martinez-Álvarez RM, Morales AE, Sanz A. Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 2005, 15(1): 75–88
- Mei L, Zhou HH, Mai KS, *et al.* Effects of dietary substitution of fishmeal by fermented silkworm pupae on the growth, feed intake, digestion and immunity of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Progress in Fishery Sciences, 2015, 36(3): 85–92 [梅琳, 周慧慧, 麦康森, 等. 蛹肽蛋白替代鱼粉对大菱鲆(*Scophthalmus maximus* L.)幼鱼生长、饲料利用、消化代谢酶及免疫性能的影响. 渔业科学进展, 2015, 36(3): 85–92]
- Moldal T, Løkka G, Wiik-Nielsen J, *et al.* Substitution of dietary fish oil with plant oils is associated with shortened mid intestinal folds in Atlantic salmon (*Salmo salar*). BMC Veterinary Research, 2014(10): 60
- Mozanzadeh MT, Marammazi JG, Yavari V, *et al.* Dietary n-3 LC-PUFA requirements in silvery-black porgy juveniles (*Sparidentex hasta*). Aquaculture, 2015, 448: 151–161
- Peng SM, Shi ZH, Fei Y, *et al.* Effect of high-dose vitamin C supplementation on growth, tissue ascorbic acid concentrations and physiological response to transportation stress in juvenile silver pomfret, *Pampus argenteus*. Journal of Applied Ichthyology, 2013, 29(6): 1337–1341
- Peng SM, Shi ZH, Sun P, *et al.* Effects of breeding density on the growth and tissues biochemical indices of juvenile silver pomfret (*Pampus argenteus*). Chinese Journal of Ecology, 2010a, 29(7): 1371–1376 [彭士明, 施兆鸿, 孙鹏, 等. 养殖密度对银鲷幼鱼生长及组织生化指标的影响. 生态学杂志, 2010a, 29(7): 1371–1376]
- Peng SM, Yin F, Sun P, *et al.* Effects of different diets on weight gain, hepatic lipase and antioxidant enzyme of juvenile silver pomfret (*Pampus argenteus*). Journal of Fisheries of China, 2010b, 34(6): 769–774 [彭士明, 尹飞, 孙鹏, 等. 不同饲料对银鲷幼鱼增重率、肝脏脂酶及抗氧化酶活性的影响. 水产学报, 2010b, 34(6): 769–774]
- Peng SM, Yue YF, Gao QX, *et al.* Influence of dietary n-3 LC-PUFA on growth, nutritional composition and immune function in marine fish *Sebastes marmoratus*. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2014, 32(5): 1000–1008
- Pike IH. Fish oil: Supply and demand as a source of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids in the human diet. European Journal of Lipid Science and Technology, 2015, 117(6): 747–750
- Reyes-Becerril M, Asencio F, Gracia-Lopez V, *et al.* Single or combined effects of *Lactobacillus sakei* and inulin on growth, non-specific immunity and IgM expression in leopard grouper (*Mycteroperca rosacea*). Fish Physiology and Biochemistry, 2014, 40(4): 1169–1180
- Shi ZH, Peng SM, Wang JG, *et al.* Observation of embryonic, larval and juvenile development in *Pampus argenteus* offspring. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(2): 267–274 [施兆鸿, 彭士明, 王建钢, 等. 人工养殖银鲷子代胚胎发育及仔稚幼鱼形态观察. 中国水产科学, 2011, 18(2): 267–274]
- Sun PF, Dai FQ, Chen YL, *et al.* Seasonal variations in structure of fishery resource in the Yangtze River estuary and its adjacent waters. Progress in Fishery Sciences, 2015, 36(6): 8–16 [孙鹏飞, 戴芳群, 陈云龙, 等. 长江口及其邻近海域渔业资源结构的季节变化. 渔业科学进展, 2015, 36(6): 8–16]
- Tian JJ, Lei CX, Ji H, *et al.* Effects of dietary linoleic acid (18:2n-6) and α -linolenic acid (18:3n-3) ratio on the growth performance and health status of *Cyprinus Carpio* Songpu mirror. Freshwater Fisheries, 2015, 45(5): 76–82 [田晶晶, 雷彩霞, 吉红. 饲料亚油酸/亚麻酸比率对松江鲈生长和健康状况的影响. 淡水渔业, 2015, 45(5): 76–82]
- Turchini GM, Torstensen BE, Wing-Keong N. Fish oil replacement in finfish nutrition. Reviews in Aquaculture, 2009(1): 10–57
- Viarengo A, Canesi L, Garcia Martinez P, *et al.* Pro-oxidant processes and antioxidant defence systems in the tissues of the Antarctic scallop (*Adamussium colbecki*) compared with the Mediterranean scallop (*Pecten jacobaeus*). Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 1995, 111(1): 119–126
- Villasante A, Patro B, Chew B, *et al.* Dietary intake of purple corn extract reduces fat body content and improves antioxidant capacity and n-3 polyunsaturated fatty acid profile in plasma of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Journal of the World Aquaculture Society, 2015, 46(4): 381–394
- Wang Q, Fan CP, Chen KC, *et al.* Effects of three typical sulfonamides on GST activity and MDA content in liver tissue of *Oreochromis niloticus*. Ecology and Environmental Sciences, 2010, 19(5): 1014–1019 [王奇, 范灿鹏, 陈锟慈, 等. 三种磺胺类药物对罗非鱼肝脏组织中谷胱甘肽转移酶(GST)和丙二醛(MDA)的影响. 生态环境学报, 2010, 19(5): 1014–1019]
- Xie D, Wang S, You C, *et al.* Characteristics of LC-PUFA biosynthesis in marine herbivorous teleost *Siganus canaliculatus* under different ambient salinities. Aquaculture Nutrition, 2015, 21(5): 541–551
- Xie DZ, Chen F, Zhang QH, *et al.* Advance in the regulatory mechanisms of LC-PUFA biosynthetic metabolism of teleost. Journal of Shantou University (Natural Science), 2015, 30(2): 3–19 [谢帝芝, 陈芳, 张庆昊, 等. 鱼类 LC-PUFA 合成代谢调控机制研究进展. 汕头大学学报(自然科学版), 2015, 30(2): 3–19]
- Yang YJ, Bing XW, Xu ZH. Effects of unsaturated fatty acids on the growth and immunity indices of *Monopterus albus*. Journal of Anhui Agricultural University, 2008, 35(2): 224–228 [杨鸢劫, 邴旭文, 徐增洪. 不饱和脂肪酸对黄鳝生长及免疫指标的影响. 安徽农业大学学报, 2008, 35(2): 224–228]
- Yue YF, Peng SM, Shi ZH, *et al.* Effects of dietary n-3 HUFA

levels on serum biochemistry indices, main lipid metabolism enzyme activities and antioxidant ability of *Sebastes marmoratus*. Marine Fisheries, 2013, 35(4): 460–467 [岳彦峰, 彭士明, 施兆鸿, 等. 饲料 n-3 HUFA 水平对褐菖鲉血清生化指标、主要脂代谢酶活力及抗氧化能力的影响. 海洋渔业, 2013, 35(4): 460–467]

Zuo RT, Ai QH, Mai KS, *et al.* Effects of dietary n-3 highly unsaturated fatty acids on growth, nonspecific immunity, expression of some immune related genes and disease resistance of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) following natural infestation of parasites (*Cryptocaryon irritans*). Fish

and Shellfish Immunology, 2012, 32(2): 249–258

Zuo RT, Mai KS, Xu W, *et al.* Advance of studies on the effects of fatty acids on immune responses and nutritional regulation mechanism in fish species. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(7): 1079–1088 [左然涛, 麦康森, 徐玮, 等. 脂肪酸对鱼类免疫系统的影响及调控机制研究进展. 水产学报, 2015, 39(7): 1079–1088]

Zuo RT, Mai KS, Xu W, *et al.* Dietary ALA, but not LNA, increase growth, reduce inflammatory processes, and increase anti-oxidant capacity in the marine finfish *Larimichthys crocea*. Lipids, 2015, 50(2): 149–163

(编辑 马瑾艳)

Effects of Dietary Substitution of Fish Oil by Soybean Oil on the Serum Lysozyme Activity and Tissue Antioxidant Capacity in Juvenile Silver Pomfret (*Pampus argenteus*)

ZHANG Chenjie, PENG Shiming, GAO Quanxin, SHI Zhaohong^①, WANG Jiangang

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

Abstract Long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA) are essential fatty acids (EFA) and have important roles in growth, development and physiological function of fish. Fish oil is characterized by high content of n-3 LC-PUFA, but harvesting fish oil is controversial due to limited wild fish stock and increased production cost. Silver pomfret (*Pampus argenteus*) is an important economic species in coastal areas of China. There are many problems in the technological development of artificial breeding and aquaculture for silver pomfret. For the purpose of researching and developing artificial feed, reducing feed cost, improving fish health and survival rate, in this study, 4 experimental dietary groups were designed for the feeding trial: 100% fish oil (FO), 70% fish oil and 30% soybean oil (FSO), 30% fish oil and 70% soybean oil (SFO), and 100% soybean oil (SO). To explore the effect of substitution of dietary fish oil by soybean oil on silver pomfret, serum lysozyme (LZM) activity and tissue antioxidant capacity were measured. The results suggested that serum LZM activities were the highest in SFO group, and the lowest in SO group, although no significant difference was detected ($P>0.05$). Muscle malondialdehyde (MDA) contents of FSO and SFO group were significantly higher than that of FO and SO group ($P<0.05$). Liver MDA contents in FO and FSO groups were significantly higher than that of any other groups ($P<0.05$). The highest superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities of serum and muscle were in SFO group. By contrast, SO group had lower SOD and CAT activities than any other groups. The liver SOD and CAT activities were found significantly higher in FO group than other groups ($P<0.05$). T-AOC of muscle and liver in FO and FSO were higher than other groups, and group SO had the highest serum T-AOC. This experiment suggested that replacing dietary fish oil by soybean oil for 30% or 70% can promote immune and antioxidant function of juvenile silver pomfret. But replacing dietary fish oil by 100% soybean oil had negative effect on immunity and growth of silver pomfret.

Key words LC-PUFA; Silver pomfret; Liver; Muscle; Antioxidant

① Corresponding author: SHI Zhaohong, E-mail: shizh@eastfishery.ac.cn

DOI: 10.11758/yykxjz.20160304002

http://www.yykxjz.cn/

聚 β -羟基丁酸酯对中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)非特异性免疫相关酶的影响*

张恒恒^{1,2,3} 孟宪红^{1,2①} 孔杰^{1,2} 罗坤^{1,2}
栾生^{1,2} 曹宝祥^{1,2} 曹家旺^{1,2} 张莹雪^{1,2}



- (1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
2. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071;
3. 大连海洋大学水产与生命学院 大连 116023)

摘要 本研究以中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)为对象,探讨不同浓度的聚 β -羟基丁酸酯(Poly- β -hydroxybutyrate, PHB)对其非特异性免疫相关酶的影响。实验采用单因子浓度梯度法,对健康的中国明对虾投喂添加不同浓度 PHB (0、0.5%、1.0%、2.5%、5.0%、10.0%)的饲料,分别对应对照组 C 和实验组 E_{0.5}、E_{1.0}、E_{2.5}、E_{5.0}、E_{10.0} 组,饲喂 6 周,统计每组中国明对虾的死亡率和相对免疫保护率,检测总抗氧化能力(T-AOC)、酸性磷酸酶(ACP)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD) 5 种酶的活力及丙二醛(MDA)含量与时间、PHB 浓度的变化关系。结果显示,实验组的相对免疫保护率随 PHB 浓度的增加呈现先上升后下降的趋势。E_{1.0} 组为最高值,并且与其他各组相比差异显著($P < 0.05$)。随 PHB 浓度的增加,免疫酶活力整体变化趋势为先上升后下降。在时间分布上,饲喂 2-3 周时,酶活力呈现高水平表达,其中, T-AOC 在血清(E_{1.0}、E_{2.5}组)、肝胰腺(E_{1.0}组); ACP 在血清(E_{1.0}、E_{2.5}组)、肝胰腺(E_{1.0}组); CAT 在血清(E_{0.5}、E_{1.0}、E_{2.5}组)、肝胰腺(E_{0.5}、E_{1.0}、E_{10.0}组); POD 在血清和肝胰腺(E_{0.5}、E_{1.0}、E_{2.5}组); SOD 在血清和肝胰腺(E_{1.0}组)以及 MDA 在血清(E_{1.0}组)、肝胰腺(E_{0.5}、E_{1.0}组)较其他组均具有显著性差异($P < 0.05$)。研究表明, PHB 添加剂对中国明对虾免疫水平的提高具有促进作用。综合各组和各时间段免疫酶的变化, E_{1.0} 为最适浓度组,投喂 2-3 周时其免疫酶总体具有高水平活力值。

关键词 中国明对虾; 聚 β -羟基丁酸酯; 相对免疫保护率; 酶活力

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)03-0124-09

中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)属无脊椎动物,主要依赖非特异性免疫进行防御保护(段亚飞等, 2014)。体液免疫在甲壳动物非特异性免疫系统中占有最为重要的地位,酶原免疫是体液免疫的重要途

径,能够协助机体识别外源异物、催化吞噬和包被反应,控制机体的氧化代谢状态,实现对机体的免疫调节。超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)属于抗氧化酶系,通过维持机体的氧

* 中国水产科学研究院基本科研业务费(No.2016GH06)、国家自然科学基金(31372523)、青岛海洋科学与技术国家实验室鳌山科技创新计划项目(No.2015ASKJ01)和泰山学者良种工程项目共同资助[This work was supported by Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS(No.2016GH06); National Natural Science Foundation of China (31372523); The Scientific and Technological Innovation Project Financially Supported by Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology (No.2015ASKJ01), and Taishan Scholar Program for Seed Industry]. 张恒恒, E-mail: zhanghenghengyx@163.com

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

收稿日期: 2016-03-04, 收修改稿日期: 2016-05-23

化自由基产生和清理的动态平衡,调节甲壳动物的免疫保护和抵抗外界应激的能力(Holmblad *et al.*, 1999)。酸性磷酸酶(ACP)是动物体内重要的水解酶(Wu *et al.*, 2014),主要用于降解血细胞吞噬和包裹反应时表面带有磷酸酯的异物(王玥等, 2005)。丙二醛(MDA)是脂质过氧化的产物(梁忠秀等, 2013)。总抗氧化能力(T-AOC)是评价机体抗氧化能力的综合性指标,用于衡量机体对外来刺激的代偿能力和氧化代谢状态(崔惟东等, 2009)。

聚 β -羟基丁酸酯(Poly- β -hydroxybutyrate, PHB)是短链脂肪酸 β -羟基丁酸的聚合物(薛林贵等, 2010),在动物肠道内可通过酶解和化学水解的方式,降解为 β -羟基丁酸单体(Yu *et al.*, 2005),对肠道上皮细胞具有直接的营养作用(刘松珍等, 2013);还可以通过调节肠道环境的 pH 值,增加有益菌的丰度,以维持电解质的平衡(陈燕等, 2006),实现肠道的免疫调节。目前,有学者针对卤虫(*Artemia franciscana*) (孙慧贤等, 2011)、欧洲鲈鱼(*Dicentrarchus labrax*) (De Schryver *et al.*, 2010)、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*) (刘玉等, 2013)和凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) (邓康裕等, 2015)等物种进行了 PHB 对其生长和免疫性能影响的研究,证实其可以作为一种免疫增强剂和饲料添加剂。但是,PHB 作为一种新型的免疫增强剂,对中国明对虾免疫因子的影响尚未有细致的研究。本研究以中国明对虾“黄海 2 号”为实验材料,探究 PHB 作为饲料添加剂对机体提供的免疫保护以及引起机体免疫酶在时间和空间分布上的变化,为 PHB 在水产养殖行业中的应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

中国明对虾取自中国水产科学研究院黄海水产研究所遗传育种中心,共 540 尾,初始平均体重为 (9.99 ± 2.06) g,于 60 L 整理箱暂养 7 d,暂养期间,投喂不含 PHB 的基础饲料。海水经砂滤井过滤,盐度为 29 ± 1 ,自然水温为 $(23.0 \pm 1.2)^\circ\text{C}$ 。

1.2 实验饲料

基础饲料配方由中国水产科学研究院黄海水产研究所食品工程与营养研究室提供。PHB 纯品干粉由宁波天安生物材料有限公司提供。实验饲料是在基础饲料配方上添加不同质量百分比的 PHB 制成。基础饲料采用鱼粉(38%)、谷朊粉(2%)、酵母粉(5%)、豆饼(25%)、高筋粉(12.5%)、磷脂(1.5%)、胆碱(1%)、

鱼油(2%)、磷虾粉(10%)、 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ (1.5%)、维生素(多维)(0.5%)、矿物质(多矿)(0.5%)、黏合剂(0.5%)等原料预混。饲料原料经 60 目粉碎,搅拌混匀,制粒、切割、烘干,制成直径为 2 mm、长度为 3 mm 的颗粒。制成品密封袋储存,干燥通风环境条件下保存。

1.3 实验分组与管理

实验在中国水产科学院黄海水产研究所进行,共 6 周,将 540 尾暂养 7 d 的中国明对虾平均分为 6 组,每组 3 个平行,每个平行组 30 尾。实验设置 1 个对照组 C,对应 PHB 浓度为 0; 5 个实验组($E_{0.5}$ 、 $E_{1.0}$ 、 $E_{2.5}$ 、 $E_{5.0}$ 和 $E_{10.0}$),分别对应 PHB 浓度为 0.5%、1.0%、2.5%、5.0%、10.0%,每天投喂 4 次(06:00、12:00、18:00、24:00),饲料日投喂量占体重的 5%,随实验进行适度调整。

1.4 实验方法

1.4.1 相对免疫保护率 以 1 d 为时间单位,观察和记录个体生存状态,获得各组死亡率和相对免疫保护率(Relative percent survival, RPS):

$$\text{死亡率(Death rate, \%)} = \frac{\text{死亡对虾数}}{\text{初始对虾数} - \text{取样对虾数}} \times 100\%$$

$$\text{RPS} = \frac{\text{对照组死亡率} - \text{实验组死亡率}}{\text{对照组死亡率}}$$

1.4.2 实验取样 以开始饲喂不同浓度 PHB 饲料为时间起点,每周从各组随机取 3 尾对虾解剖,获得肝胰腺、肌肉和血液样品,迅速放入液氮,随后 -80°C 保存。

1.4.3 血清和匀浆液获取 血液在 4°C 、3500 r/min 离心 30 min,吸取上清液,获得血清。肌肉和肝胰腺按重量(g):体积(ml)为 1:9 的比例加入匀浆介质 $1 \times \text{PBS}$,使用全自动组织破碎仪(Precellys 24-Dual)在 5500 r/min、组织破碎 20 s 条件下进行组织破碎, 4°C 、2500 r/min 离心 10 min,获得 10%组织匀浆液。

1.4.4 免疫酶活检测 使用南京建成生物工程研究所提供的试剂盒,对获得的血清和匀浆液进行免疫酶活力检测。使用 IMARK 酶标仪(伯乐,日本)检测总抗氧化能力(T-AOC)、酸性磷酸酶(ACP)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)。

1.5 数据处理与统计分析

数据用 SPSS 19.0、Origin 8.0 处理,以平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示。采用单因素方差分析方法(One-way ANOVA)分析数据,显著水平设为 0.05,

$P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 PHB 对中国明对虾的相对免疫保护率

实验组死亡率随 PHB 浓度的增加呈现先下降后上升的趋势。E_{1.0} 组死亡率最低，并且与其他各组相比差异显著($P < 0.05$)。RPS 随 PHB 浓度的增加基本呈现先上升后下降的趋势。E_{10.0} 时 RPS 为负值，表明该浓度 PHB 促进个体死亡；E_{1.0} 组 RPS 最高；E_{1.0}、E_{2.5} 较其他组差异显著($P < 0.05$)(表 1)。

2.2 PHB 对 T-AOC 的影响

T-AOC 随着时间的变化整体呈现先上升后下降的趋势(图 1)。血清和肝胰腺 T-AOC 在饲喂第 2-4 周，水平较高。E_{1.0} 组血清 T-AOC 在第 2、4 周最高，较其他组具有显著差异($P < 0.05$)，E_{2.5} 组血清 T-AOC 在第 3 周水平最高，与 C、E_{5.0}、E_{10.0} 组差异显著($P < 0.05$)(图 1-A)。E_{1.0} 组肝胰腺 T-AOC 在第 4 周较其他组差异显著($P < 0.05$)，在第 2、3 周各组均具有较高 T-AOC 水平，组间无差异(图 1-B)。

2.3 PHB 对 ACP 酶活力的影响

ACP 酶活力随着时间的变化整体呈现先上升后

下降的趋势(图 2)。血清 ACP 在第 3 周、肝胰腺 ACP 在第 2-5 周具有较高酶活力。E_{1.0}、E_{2.5} 组的血清 ACP 酶活力在第 3 周与其他组差异显著($P < 0.05$)(图 2-A)。E_{1.0} 组肝胰腺 ACP 在第 3 周与其他组差异显著($P < 0.05$)(图 2-B)。

2.4 PHB 对 CAT 酶活力的影响

CAT 酶活力随着时间的变化整体呈现先上升后下降的趋势(图 3)。血清 CAT 酶活力在第 3-4 周、肝胰腺 CAT 酶活力在第 1-2 周，具有较高值。E_{1.0}、E_{2.5} 组的血清 CAT 酶活力在第 3 周与其他组差异显著($P < 0.05$)；E_{0.5}、E_{1.0}、E_{2.5} 组在第 4 周与其他组差异显著($P < 0.05$)(图 3-A)。E_{10.0} 组肝胰腺 CAT 酶活力第 1 周与其他组差异显著($P < 0.05$)，E_{0.5}、E_{1.0} 组在第 2 周与其他组相比差异显著($P < 0.05$)(图 3-B)。

2.5 PHB 对 POD 酶活力的影响

POD 酶活力随着时间的变化整体呈现先上升后下降的趋势(图 4)。血清 POD 酶活力在第 1-3 周，肝胰腺 POD 酶活力在第 2-5 周，具有较高值。E_{0.5}、E_{1.0}、E_{10.0} 组血清 POD 酶活力在第 1 周，E_{0.5}、E_{2.5} 组在第 2 周，E_{1.0} 组在第 3 周与同时间段其他组差异显著($P < 0.05$)(图 4-A)。E_{1.0} 组肝胰腺 POD 酶活力在第 2 周、E_{2.5} 组在第 3 周、E_{10.0} 组在第 4 周与同时间

表 1 PHB 对中国明对虾的相对免疫保护率的影响

Tab.1 The effect of PHB additives on relative percent survival of *F. chinensis*

项目 Items	组别 Groups					
	C	E _{0.5}	E _{1.0}	E _{2.5}	E _{5.0}	E _{10.0}
死亡率 Death rate (%)	40.00±10.58 ^a	26.67±4.62 ^{bc}	17.33±2.31 ^c	20.00±6.93 ^{bc}	34.67±12.22 ^{ab}	41.33±6.11 ^a
相对免疫保护率 Relative percent survival	0	0.33±0.12 ^{ab}	0.57±0.06 ^a	0.50±0.17 ^a	0.13±0.31 ^{bc}	-0.03±0.15 ^c

注：同行肩标字母相同或无字母表示差异不显著($P > 0.05$)，字母不同表示差异显著($P < 0.05$)

Note: In the same row, data with the same superscript and no superscripts denoted no significant difference ($P > 0.05$), different superscripts denoted significant differences ($P < 0.05$)

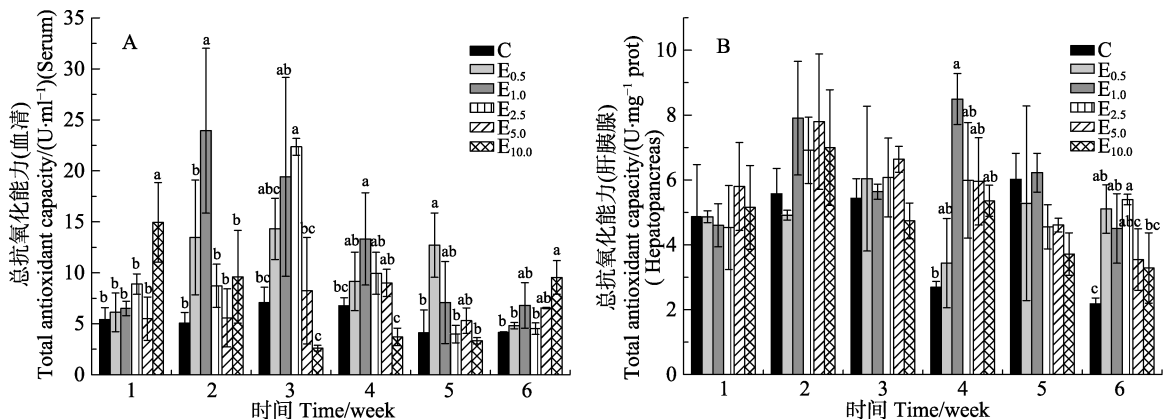


图 1 PHB 对中国明对虾总抗氧化能力(T-AOC)的影响

Fig.1 The effects of PHB on total antioxidant capacity of *F. chinensis*

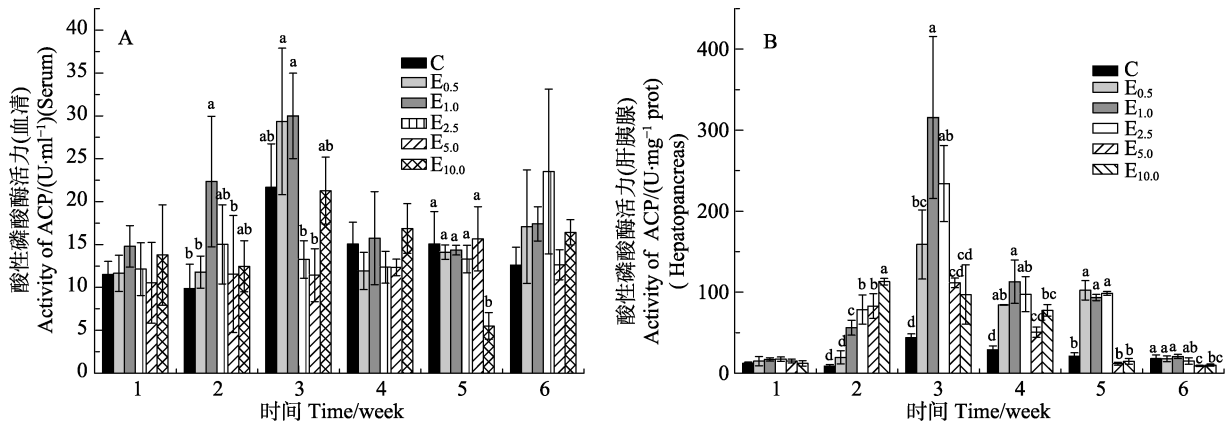


图2 PHB对中国明对虾 ACP 酶活力的影响

Fig.2 The effects of PHB on acid phosphatase activity of *F. chinensis*

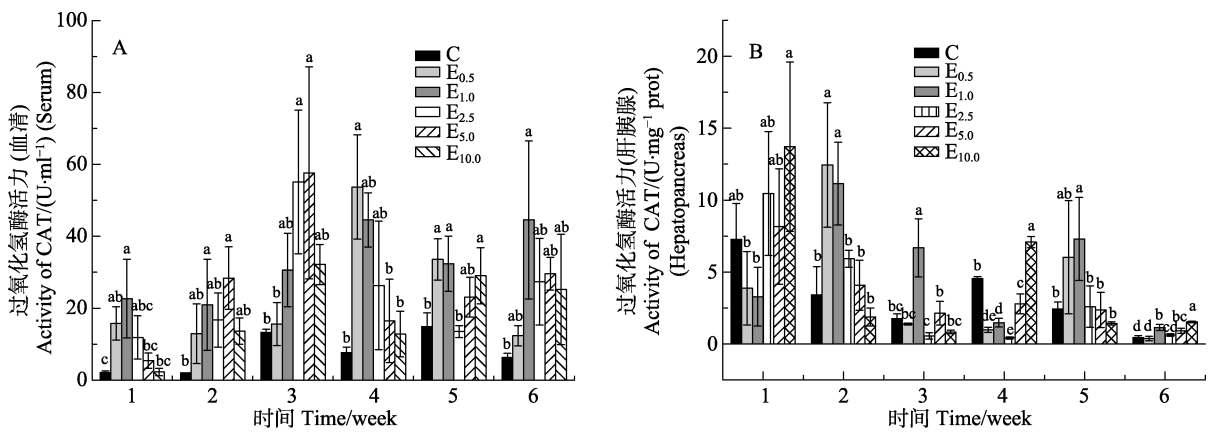


图3 PHB对中国明对虾 CAT 酶活力的影响

Fig.3 The effects of PHB on catalase activity of *F. chinensis*

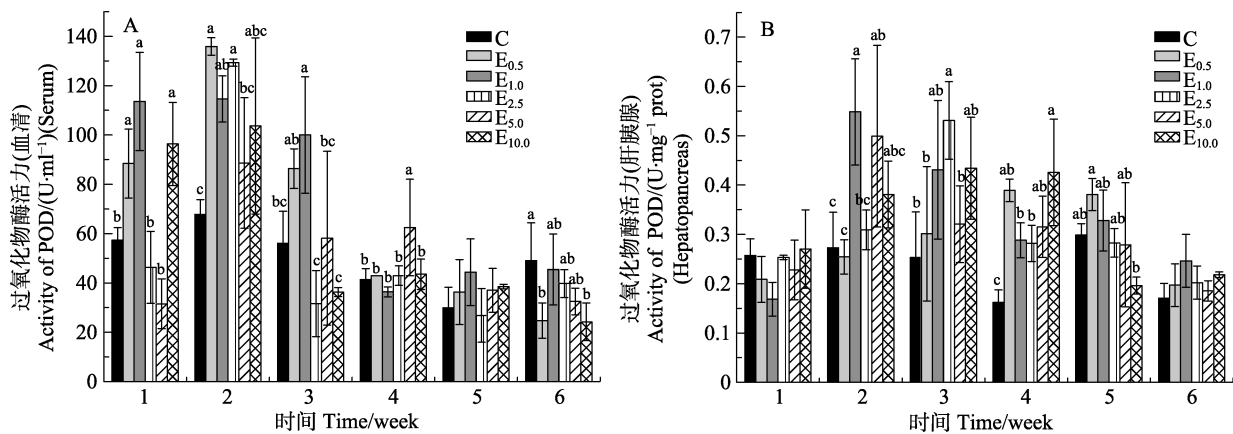


图4 PHB对POD酶活力的影响

Fig.4 The effects of PHB on peroxidase activity of *F. chinensis*

段其他组差异显著($P < 0.05$); $E_{0.5}$ 组胰腺 POD 酶活力在第5周与其他组差异显著($P < 0.05$), C、 $E_{1.0}$ 、 $E_{2.5}$ 、 $E_{5.0}$ 与 $E_{10.0}$ 组相比差异显著($P < 0.05$), 且 $E_{1.0}$ 组的均值大于 C、 $E_{2.5}$ 、 $E_{5.0}$ 组(图 4-B)。

2.6 PHB 对 SOD 酶活力的影响

SOD 酶活力随着时间的变化整体呈现先上升后

下降的趋势(图 5)。血清 SOD 酶活力在第 2-3 周、肝胰腺 SOD 酶活力在第 1-5 周, 具有较高值。 $E_{0.5}$ 、 $E_{1.0}$ 组血清 SOD 酶活力在第 2 周, $E_{1.0}$ 组在第 3 周与同时间段其他组差异显著($P < 0.05$)(图 5-A)。 $E_{0.5}$ 组肝胰腺 SOD 酶活力在第 1 周, $E_{1.0}$ 组在第 2 周, $E_{0.5}$ 、 $E_{1.0}$ 、 $E_{2.5}$ 、 $E_{5.0}$ 组在第 4 周, $E_{1.0}$ 组在第 5 周与同时间段其他组差异显著($P < 0.05$)(图 5-B)。

2.7 PHB 对 MDA 含量的影响

MDA 含量随着时间的变化整体呈现先下降后上升的趋势(图 6)。E_{0.5}、E_{1.0} 组血清中的 MDA 含量在第 3-6 周处于最低水平, 并且二者与同时间段其他组相比差异显著($P < 0.05$)(图 6-A)。肝胰腺中的 MDA 含量在第 2-5 周水平较低, E_{0.5} 组在第 2 周, E_{1.0} 组在第 3 周, E_{0.5}、E_{1.0}、E_{2.5} 组在第 4 周, E_{0.5}、E_{1.0}、E_{2.5} 组在第 5 周, 与同时间段其他组相比差异显著($P < 0.05$)(图 6-B)。

3 讨论

3.1 PHB 添加剂对中国明对虾的相对免疫保护率

研究 PHB 对中国明对虾的相对免疫保护率发现, E_{1.0}、E_{2.5} 相对于其他浓度组, 能显著提高中国明对虾的相对免疫保护率($P < 0.05$)。这与 PHB 在凡纳滨对虾、卤虫、中华绒螯蟹幼蟹免疫促进方面的研究结果一致(孙慧贤等, 2011; 刘玉等, 2013; 邓康裕等,

2015), 再次说明了 PHB 具有免疫保护的效果。PHB 实现免疫保护的作用, 可能是因为单体 β -羟基丁酸(Defoirdt *et al.*, 2006)穿越肠道或 G⁻细菌的细胞膜的同时释放质子, 降低细菌肠道环境或者细胞本身的 pH, 迫使细菌消耗较大的能量来维持微环境 pH 的稳定, 从而使其生长受到抑制(邓康裕等, 2014)。此外, 丁酸类短链脂肪酸可被动物肠道上皮细胞直接吸收, 实现营养供应; 还可以抑制肠炎发生(邓名荣等, 2009); 激活黏膜修复相关的酶(孙浪等, 2013), 保持肠道的完整性; 参与调节血液渗透压(石桂城等, 2014), 实现对机体的综合免疫保护。

本研究还发现, 高浓度组(E_{10.0})相对免疫保护率为负值, 即 PHB 促使中国明对虾死亡的现象。可能是由于过多摄入单一短链脂肪酸, 易导致过氧化反应的发生, 超氧阴离子会攻击免疫细胞膜, 从而大大降低其免疫性能(左然涛等, 2015); 进而使代谢系统紊乱, 导致机体组织器官受损, 影响生长和存活(石桂城等, 2014)。邓元告等(2016)研究发现, E_{10.0} 高

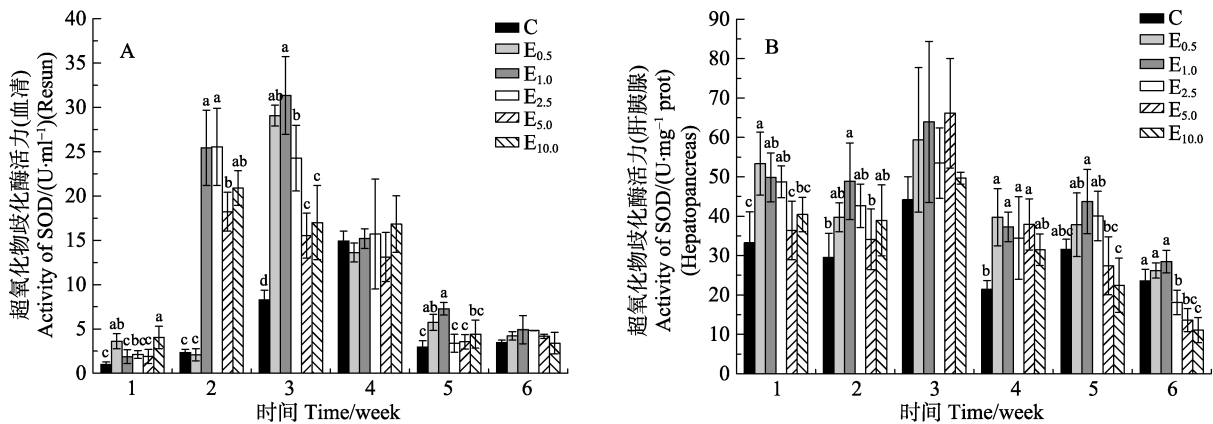


图 5 PHB 对中国明对虾 SOD 酶活力的影响

Fig.5 The effects of PHB on superoxide dismutase activities of *F. chinensis*

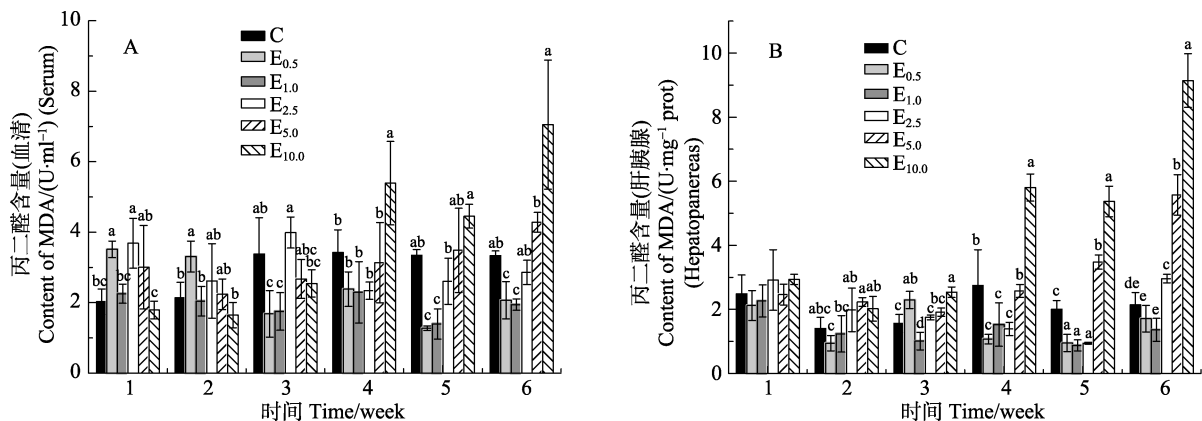


图 6 PHB 对中国明对虾丙二醛含量的影响

Fig.6 The effects of PHB on malonaldehyde content of *F. chinensis*

浓度 PHB 饲喂中华绒螯蟹幼蟹时, 肝胰腺脂肪含量显著高于其他组, 肝胰腺可溶性蛋白的比例减少, 导致生物的自我保护、调控和抗胁迫能力下降, 产生免疫副作用(孔祥会等, 2008)。

3.2 PHB 添加剂对免疫相关酶的影响

抗氧化酶活力是反映机体健康与否的重要指标。抗氧化酶在机体的生长发育、生化代谢和抵抗外界应激等方面具有重要作用(孟晓林等, 2015)。SOD、CAT、POD 属于抗氧化酶系。研究 PHB 作为短链丁酸类高聚体对免疫酶活性的作用发现, $E_{1.0}$ 组血清 SOD 酶活力在第 2-3 周、肝胰腺在 2、4、5 周, 较对照组均差异显著($P<0.05$)。这与 PHB 能提高中华绒螯蟹肝胰腺 SOD 活力和凡纳滨对虾血液 SOD 活力的研究结果相同(邓康裕等, 2015; 邓元告等, 2016)。但与邓康裕等(2015)研究的 PHB 对凡纳滨对虾肝胰腺 SOD 无显著影响的结果不一致, 结合其实验中氨氮应激时的 SOD 基因表达量存在显著变化, 说明 PHB 能够影响 SOD 活力。SOD 酶活力无显著差异可能是因为取样时间(21 d)处于肝胰腺 SOD 的高表达阶段, PHB 浓度可以影响高表达的时间点和高活性的时间长度, 但是不能改变 SOD 表达的阈值, 这与本研究中 21 d 取样时, SOD 在各个浓度组无显著性差异的结果保持一致。本研究中, 在适宜 PHB 浓度时, CAT 和 POD 酶活力均与对照组差异显著, 与 PHB 能显著提高氨氮胁迫条件下凡纳滨对虾 CAT 基因的表达量(邓康裕等, 2015), 进而调节酶的活性的研究一致。在不饱和脂肪酸方面, n-3 PUFA 能够提高大鼠(*Rattus norvegicus*)红细胞 CAT 活性, 降低氧化状态(Iraz *et al.*, 2005)。赵磊等(2016)研究发现, 鱼油等不饱和脂肪酸能提高中华绒螯蟹 POD 酶活力。由此说明 PHB 作为一种不饱和脂肪酸对免疫和抗氧化的作用。MDA 是油脂在体内发生过氧化的指标(姚仕彬等, 2015)。而 T-AOC 是衡量机体氧化程度的综合性指标(谭树华等, 2005)。研究中, 适宜浓度的 PHB 具有减少 MDA 积累, 提高 T-AOC 水平的效果。但是, PHB 作为短链脂肪酸, 长时间高浓度的使用会产生较大的氧化压力, 影响机体正常的代谢反应。本研究中, $E_{10.0}$ 组在饲喂的第 4-6 周, 血液和肝胰腺 MDA 含量显著高于同时间段其他组($P<0.05$)。同时, $E_{5.0}$ 、 $E_{10.0}$ 组 T-AOC 活性水平也整体较低。Park 等(2009)在大鼠中进行 DHA 饲料添加的研究发现, 低剂量短链脂肪酸的添加不会影响体内脂质的过氧化反应, 但是高浓度剂量添加会使机体产生极其敏感的反应的结论, 为本研究

结果提供了证据。结合 SOD、CAT、POD、MDA 和 T-AOC 的变化状态, 说明 PHB 可以调节抗氧化酶系的活性, 提高机体的抗氧化和抗应激能力。

ACP 是一种重要的水解酶, 在对甲壳动物的研究中, ACP 作为免疫功能性酶用作检测甲壳动物机体代谢状态的指标(何南海等, 2004)。本研究中, ACP 酶活力在第 3 周有最高均值, 并且 $E_{1.0}$ 组与其他组差异显著($P<0.05$)。关于脂肪酸对 ACP 酶活力的影响, 孙静秋等(2007)研究脂肪酸对凡纳滨对虾生理代谢影响时发现, ACP 阳性颗粒受到脂类水解代谢的影响, 且 ACP 颗粒数量与对虾的肝胰腺健康状况密切相关, 为 PHB 对 ACP 的调控提供了依据。

3.3 PHB 添加剂影响下酶的“免疫疲劳”现象

水产免疫增强剂, 具有增强个体非特异性免疫的能力, 在水产动物的疾病防治方面具有良好的效果。Chang 等(2000)在研究 β -1,3-葡聚糖对斑节对虾(*Penaeus monodon*)亲虾的影响时发现, 血液呼吸暴发随着时间变化出现高峰期, 随后降到与对照组相似水平, 将这种持续饲喂单一免疫增强剂产生的免疫指标由上升至高峰再下降的现象, 称为“免疫疲劳”。本研究中, 血清 T-AOC 在第 4-6 周、ACP 在第 4-6 周、CAT 在第 5-6 周及 POD 在第 4-6 周均产生活力值降低或接近初始水平的“免疫疲劳”现象。Zuo 等(2012)发现, 当饲料中添加适量多不饱和脂肪酸, 尤其是 n-3 PUFA 时, 长时间饲喂并不能进一步提高鱼类的免疫力, 反而会出现免疫抑制现象。这可能是由于过量的 n-3 PUFA 降低了鱼类免疫器官表面病原识别受体(TLR22)及其接头蛋白(MyD88)的表达所致。“免疫抑制”现象还有可能是机体中存在应对免疫刺激的负反馈调节系统, 最终使免疫水平回复到初始状态(Yoshida *et al.*, 1995)。

缓解“免疫疲劳”现象, 可以通过调节免疫增强剂给予途径和剂量, 达到有效地调节。Cuesta 等(2002)研究发现, 注射和口服醋酸维生素 A 会对金鲷(*Sparus aurata*)免疫体系产生不同的影响。刘群芳等(2013)将单一的免疫增强剂 β G、Se 联合添加, 能一定程度地提高凡纳滨对虾的免疫防御功能。复合免疫增强剂的使用, 可对疲劳现象的缓解产生积极的影响。免疫增强剂合理使用方式的研究对于其推广应用具有重要作用。

综上所述, PHB 添加剂可以提升中国明对虾的非特异性免疫力, $E_{1.0}$ 组具有最佳的免疫效果, 投喂第 2-3 周具有高水平的免疫酶活力, 为 PHB 做为添加剂使用提供了基础数据。

参 考 文 献

- Chang CF, Chen HY, Su MS, *et al.* Immunomodulation by dietary β -1,3-glucan in the brooders of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2000, 10(6): 505–514
- Chen Y, Cao YS, Liu XH. Short chain fatty acids and intestinal microflora. *Jiangxi Science*, 2006, 24(1): 38–40, 69 [陈燕, 曹郁生, 刘晓华. 短链脂肪酸与肠道菌群. *江西科学*, 2006, 24(1): 38–40, 69]
- Cuesta A, Ortuño J, Rodríguez A, *et al.* Changes in some innate defence parameters of seabream (*Sparus aurata* L.) induced by retinol acetate. *Fish and Shellfish Immunology*, 2002, 13(4): 279–291
- Cui WD, Leng XJ, Li XQ, *et al.* Effects of astaxanthin and canthaxanthin on pigmentation of muscle and total antioxidant capacity of liver in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Fisheries of China*, 2009, 33(6): 987–995 [崔惟东, 冷向军, 李小勤, 等. 虾青素和角黄素对虹鳟肌肉着色和肝脏总抗氧化能力的影响. *水产学报*, 2009, 33(6): 987–995]
- De Schryver P, Sinha AK, Kunwar PS, *et al.* Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) increases growth performance and intestinal bacterial range-weighted richness in juvenile European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86(5): 1535–1541
- Defoirdt T, Halet D, Sorgeloos P, *et al.* Short-chain fatty acids protect gnotobiotic *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*. *Aquaculture*, 2006, 261(2): 804–808
- Deng KY, Kong J, Meng XH, *et al.* Effects of poly- β -hydroxybutyrate on WSSV resistance in *Fenneropenaeus chinensis*. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(8): 1167–1174 [邓康裕, 孔杰, 孟宪红, 等. 聚 β -羟基丁酸酯对中国明对虾抗 WSSV 能力的影响. *水产学报*, 2014, 38(8): 1167–1174]
- Deng KY, Meng XH, Kong J, *et al.* Effects of poly- β -hydroxybutyrate on non-special immunity and expression of immune gene under the ammonia stress of *Litopenaeus vannamei*. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(6): 71–78 [邓康裕, 孟宪红, 孔杰, 等. 聚 β -羟基丁酸酯对凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 非特异性免疫力及氨氮胁迫后免疫基因表达量的影响. *渔业科学进展*, 2015, 36(6): 71–78]
- Deng MR, Guo J, Zhu HH. Progress on biotechnological production of butyric acid. *China Biotechnology*, 2009, 29(3): 117–122 [邓名荣, 郭俊, 朱红惠. 微生物催化生产丁酸研究进展. *中国生物工程杂志*, 2009, 29(3): 117–122]
- Deng YG, Huang QY, Ma GN, *et al.* Effect of dietary PHB dose and feeding duration on enzyme activities and gut microbial diversity in juvenile Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(1): 138–145 [邓元告, 黄琼叶, 马灌楠, 等. PHB 剂量和饲喂时间对中华绒螯蟹肝胰腺酶活力和肠道菌群多样性的影响. *中国水产科学*, 2016, 23(1): 138–145]
- Duan YF, Zhang JS, Dong HB, *et al.* The non-specific immune response of *Penaeus monodon* to *Vibrio parahaemolyticus* challenge. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(9): 1557–1564 [段亚飞, 张家松, 董宏标, 等. 副溶血弧菌对斑节对虾非特异性免疫酶活性的影响. *水产学报*, 2014, 38(9): 1557–1564]
- He NH. The establishment and application of immune indexes of penaeid shrimp. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2004, 43(3): 385–388 [何南海. 对虾免疫功能指标的建立及其应用. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2004, 43(3): 385–388]
- Holmblad T, Söderhäll K. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. *Aquaculture*, 1999, 172(1–2): 111–123
- Iraz M, Erdogan H, Ozyurt B, *et al.* Brief communication: Omega-3 essential fatty acid supplementation and erythrocyte oxidant/antioxidant status in rats. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 2005, 35(2): 169–173
- Kong XH, Zhang HX, Wang GZ, *et al.* Seasonal changes of soluble proteins and soluble saccharide in mud crab (*Scylla serrata*). *Journal of Henan Normal University (Natural Science)*, 2008, 36(1): 99–102 [孔祥会, 张红绪, 王桂忠, 等. 锯缘青蟹可溶性蛋白与可溶性糖的季节变化. *河南师范大学学报(自然科学版)*, 2008, 36(1): 99–102]
- Liang ZX, Li J, Tan ZJ, *et al.* Effects of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* on MDA, SOD and GST in hepatopancreas and gill of *Fenneropenaeus chinensis*. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(8): 1192–1197 [梁忠秀, 李健, 谭志军, 等. 塔玛亚历山大藻对中国明对虾肝胰腺及鳃 SOD、GST 和 MDA 的影响. *水产学报*, 2013, 37(8): 1192–1197]
- Liu QF, Cao JM, Huang YH, *et al.* Effects of β -glucan and selenium, vitamin E combined supplementation on tissue biochemical indexes and immune, antioxidant related enzyme mRNA expression of *Litopenaeus vannamei*. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2013, 25(5): 1045–1053 [刘群芳, 曹俊明, 黄燕华, 等. β -葡聚糖与硒、维生素 E 联合添加对凡纳滨对虾组织生化指标及免疫、抗氧化相关酶、mRNA 表达的影响. *动物营养学报*, 2013, 25(5): 1045–1053]
- Liu SZ, Zhang Y, Zhang MW, *et al.* Research progress on producing mechanism and physiological functions of intestinal short chain fatty acids. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2013(11): 99–103 [刘松珍, 张雁, 张名位, 等. 肠道短链脂肪酸产生机制及生理功能的研究进展. *广东农业科学*, 2013(11): 99–103]
- Liu Y, Sui LY, Deng YG, *et al.* Effect of poly- β -hydroxybutyrate on growth and hepatopancreatic enzyme activities of *Eriocheir sinensis* juveniles. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2013, 44(5): 1333–1338 [刘玉, 隋丽英, 邓元告, 等. 聚 β -羟基丁酸酯 (PHB) 对中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 幼蟹生长和肝胰腺酶活力的影响. *海洋与湖沼*,

- 2013, 44(5): 1333–1338]
- Meng XL, Tian X, Guo QQ, *et al.* Copper specific accumulation and its effect on the activity of antioxidant enzymes and metabolism of lipid in gill or hepatopancreas of *Patinopecten yessoensis*. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(6): 908–915 [孟晓林, 田雪, 郭倩倩, 等. 铜在虾夷扇贝鳃和肝胰腺中的累积及对抗氧化酶脂代谢的影响. *水产学报*, 2015, 39(6): 908–915]
- Park Y, Nam S, Yi HJ, *et al.* Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids increase oxidative stress in rats with intracerebral hemorrhagic stroke. *Nutrition Research*, 2009, 29(11): 812–818
- Shi GC, Dong XH, Chen G, *et al.* Effects of dietary lipid level on growth performance of genetic improvement of farmed tilapia (GIFT, *Oreochromis niloticus*) and its serum biochemical indices and fatty acid composition under cold stress. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2012, 24(11): 2154–2164 [石柱城, 董晓慧, 陈刚, 等. 饲料脂肪水平对吉富罗非鱼生长性能及其在低温应激下血清生化指标和肝脏脂肪酸组成的影响. *动物营养学报*, 2012, 24(11): 2154–2164]
- Sun HX, Sui LY. *Artemia* nauplii enrichment with poly- β -hydroxybutyrate. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2011, 20(3): 392–398 [孙慧贤, 隋丽英. 聚 β -羟基丁酸酯对卤虫幼体的强化作用. *上海海洋大学学报*, 2011, 20(3): 392–398]
- Sun JQ, Xu Y, Zhang HQ, *et al.* Study on cytochemical location of acid phosphatase and alkaline phosphatase of *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fudan University (Natural Science)*, 2007, 46(6): 947–951 [孙静秋, 许燕, 张慧琦, 等. 凡纳对虾体内 ACP、AKP 酶的细胞化学定位. *复旦学报(自然科学版)*, 2007, 46(6): 947–951]
- Sun L, Liu Z, Hao G, *et al.* Effects of sodium butyrate on growth and intestinal cell proliferation of *Carassius auratus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(4): 893–901 [孙浪, 刘臻, 郝光, 等. 丁酸钠对鲫鱼生长和肠细胞增殖的影响. *中国水产科学*, 2013, 20(4): 893–901]
- Tan SH, He DY, Yan F, *et al.* Effects of NaNO_2 on malondialdehyde content and total antioxidative capacity in the liver of *Carassius auratus*. *Journal of Agro-Environment Science*, 2005, 24(Supplement): 21–24 [谭树华, 何典翼, 严芳, 等. 亚硝酸钠对鲫鱼肝脏丙二醛含量和总抗氧化能力的影响. *农业环境科学学报*, 2005, 24(增刊): 21–24]
- Wang Y, Hu YB, Jiang NC. Effects of ammonia-N and nitrite-N on immune enzymes of *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Zhejiang University (Science Edition)*, 2005, 32(6): 698–705 [王玥, 胡义波, 姜乃澄. 氨态氮亚硝态氮对罗氏沼虾免疫相关酶类的影响. *浙江大学学报(理学版)*, 2005, 32(6): 698–705]
- Wu FJ, Xue Y, Liu XF, *et al.* The protective effect of eicosapentaenoic acid-enriched phospholipids from sea cucumber *Cucumaria frondosa* on oxidative stress in PC12 cells and SAMP8 mice. *Neurochemistry International*, 2014, 64(1): 9–17
- Xue LG, Zhao X, Chang SJ, *et al.* A strain of high PHB output by mutagenesis of 80 Me V/u C-12 ions. *Nuclear Techniques*, 2010, 33(4): 284–288 [薛林贵, 赵旭, 常思静, 等. 80MeV/u C-12 离子诱变选育 PHB 高产菌株. *核技术*, 2010, 33(4): 284–288]
- Yao SB, Ye YT, Cai CF, *et al.* Damage of MDA on intestinal epithelial cells *in vitro* of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(1): 133–141 [姚仕彬, 叶元土, 蔡春芳, 等. 丙二醛对离体草鱼肠道黏膜细胞的损伤作用. *水生生物学报*, 2015, 39(1): 133–141]
- Yoshida T, Kruger R, Inglis V. Augmentation of non-specific protection in African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), by the long-term oral administration of immunostimulants. *Journal of Fish Diseases*, 1995, 18(2): 195–198
- Yu J, Plackett D, Chen LXL. Kinetics and mechanism of the monomeric products from abiotic hydrolysis of poly [(R)-3-hydroxybutyrate] under acidic and alkaline conditions. *Polymer Degradation and Stability*, 2005, 89(2): 289–299
- Zhao L, Long XW, Wu XG, *et al.* Effects of fish oil replacement by blending vegetable oils in fattening diets on gonadal development, lipid metabolism, antioxidant and immune capacities of adult male Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2016, 28(2): 455–467 [赵磊, 龙晓文, 吴旭干, 等. 育肥饲料中混合植物油替代鱼油对中华绒螯蟹成体雄蟹性腺发育、脂质代谢、抗氧化及免疫性能的影响. *动物营养学报*, 2016, 28(2): 455–467]
- Zuo RT, Ai QH, Mai KS, *et al.* Effects of dietary n-3 highly unsaturated fatty acids on growth, nonspecific immunity, expression of some immune related genes and disease resistance of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) following natural infestation of parasites (*Cryptocaryon irritans*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2012, 32(2): 249–258
- Zuo RT, Mai KS, Xu W, *et al.* Advance of studies on the effects of fatty acids on immune responses and nutritional regulation mechanism in fish species. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(7): 1079–1088 [左然涛, 麦康森, 徐玮, 等. 脂肪酸对鱼类免疫系统的影响及调控机制研究进展. *水产学报*, 2015, 39(7): 1079–1088]

The Effect of Poly- β -Hydroxybutyrate on Enzyme Activities of Nonspecific Immunity in *Fenneropenaeus chinensis*

ZHANG Hengheng^{1,2,3}, MENG Xianhong^{1,2}①, KONG Jie^{1,2}, LUO Kun^{1,2}, LUAN Sheng^{1,2},
CAO Baoxiang^{1,2}, CAO Jiawang^{1,2}, ZHANG Yingxue^{1,2}

(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. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071; 3. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023)

Abstract In the present study, we explored the effect of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) on the performance of the immune system in *Fenneropenaeus chinensis*. This study used single factor concentration gradient method. *F. chinensis* were fed with baits containing PHB at different concentrations (0, 0.5%, 1.0%, 2.5% and 5.0%). After six weeks, the mortality and relative immune protective rate of each group was calculated. Moreover, enzyme activities of nonspecific immunity, including the total antioxidant capacity (T-AOC), the enzyme activities of acid phosphatase (ACP), peroxidase (POD) and catalase (CAT), and the content of malondialdehyde (MDA) in muscle, hepatopancreas and serum were analyzed and compared between groups on a weekly basis. The results showed that the PHB had a significant effect on immune performance. With the increase of PHB concentration, the relative immune protective rates in the experimental groups were elevated initially followed by a decline. The group of E_{1.0} had the highest relative immune protective rate compared with other groups ($P < 0.05$). The trend of the enzyme activities were similar to the changes of the relative immune protective rates. On the spatial distribution, the enzyme activities of T-AOC, POD, CAT in serum and ACP in hepatopancreas were the highest. On the temporary distribution, the total enzyme activities reached the highest level after 2–3 weeks of treatments. Among different groups, the groups of E_{1.0} and E_{2.5} in serum and E_{1.0} in hepatopancreas had significant different T-AOC from other groups ($P < 0.05$). The ACP activities in serum in the groups of E_{1.0} and E_{2.5}, and E_{1.0} in the hepatopancreas were significantly different from other groups ($P < 0.05$). During the high level expression period of CAT, serum CAT in E_{0.5}, E_{1.0}, E_{2.5} groups, hepatopancreas CAT in E_{0.5}, E_{1.0}, E_{10.0} groups were significantly different from other groups ($P < 0.05$). The serum and hepatopancreas POD activities in E_{0.5}, E_{1.0}, E_{2.5} groups were significantly different from other groups ($P < 0.05$). The SOD activities in serum and hepatopancreas in group E_{1.0} were significantly different from other groups ($P < 0.05$). And the content of MDA in serum in E_{1.0} group and that in hepatopancreas in group E_{0.5} and E_{1.0} were significantly different from other groups. Based on the results, it is concluded that the PHB can improve the immunity of *F. chinensis*. Furthermore, 1.0% PHB inclusion in feed had the best effect and the total enzyme activities reached the highest level after 2–3 weeks of treatment.

Key words *Fenneropenaeus chinensis*; Poly- β -hydroxybutyrate (PHB); Relative immune protective rates; Enzyme activities

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

脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)回交家系 遗传变异的微卫星分析*



刘九美^{1,2} 李吉涛² 刘萍^{2,3①} 窦全伟^{1,2} 王佳佳² 李健^{2,3}

(1. 大连海洋大学水产与生命学院 大连 116023; 2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 青岛海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 为解析脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)回交家系的遗传变异规律,本研究利用自行开发的25个微卫星标记对本实验室构建的A、B、C3个回交家系的遗传结构特征进行了分析。结果显示,回交家系A、B、C的平均等位基因数(N_a)分别为2.21、2.18、2.09,观测杂合度(H_o)分别为0.3805、0.3703、0.2489,期望杂合度(H_e)分别为0.3629、0.3998、0.2503,多态信息含量(PIC)分别为0.3257、0.3391、0.2585,相较于野生群体与杂交家系已有了大幅度的降低,属中度或低度多态。回交家系A、B、C在25个位点共得到62个等位基因,其中,A家系56个,B家系54个,C家系51个,3个回交家系共同存在的等位基因为39个,6个位点在回交家系中已经纯合(其中,ECL10在A、B、C中都已纯合),计算得出3个回交家系的纯合率分别达到了53.86%、56.53%、63.33%。由此可见,回交家系的基因纯化速率较快,适用于脊尾白虾重要经济性状的遗传解析和优良种质的选育。

关键词 脊尾白虾;回交家系;微卫星;遗传变异

中图分类号 S961.2 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)03-0133-07

脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)是我国沿海重要的中小型经济虾类之一,以黄、渤海产量最高,具有生长速度快、繁殖能力强、环境适应性广等优点。近年来其养殖面积迅速扩大,成为沿海滩涂地区主要的特色水产养殖品种(王兴强等,2008)。但是,目前脊尾白虾养殖的苗种主要依赖捕捞野生天然苗或投放抱卵亲虾自行繁殖,而上述方式无法避免种质来源不稳定和携带病源等问题的干扰(梁俊平等,2012;梁俊平,2013¹⁾)。影响脊尾白虾养殖产业可持续发展

的瓶颈问题是良种缺乏,培育生长速度快、抗逆性强的优良品种是产业亟需解决的问题(李吉涛等,2013;王有昆等,2015)。

回交作为杂交育种的重要手段,旨在通过杂交子代与亲本的再次杂交,从而使杂交后代进一步加强轮回亲本的某些优良性状,减少杂交后代性状的分离,同时保留非轮回亲本的某些优良性状。因此,回交更有利于提高品种的优越性、有利于正确选择具有某些特定性状的优良品种。回交育种已经在农作物中广泛

* 国家虾产业技术体系(CARS-47)、泰山产业领军人才工程项目(LJNY2015002)、国家自然科学基金项目(31472275)和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)共同资助[This work was supported by the earmarked fund for Modern Agro-Industry Technology Research System (CARS-47), the Program of Shandong Leading Talent (LJNY2015002), National Natural Science Foundation of China (31472275) and the Scientific and Technological Innovation Project Financially Supported by Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology (2015ASKJ02)]. 刘九美, E-mail: 358829479@qq.com

① 通讯作者:刘萍,研究员, E-mail: liuping@ysfri.ac.cn

收稿日期:2016-12-29,收修改稿日期:2017-01-18

1) Liang JP. Study on the technology of artificial breeding and expression of genes involving in reproducing of *Exopalaemon carinicauda*. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2013 [梁俊平. 脊尾白虾全人工繁育及繁殖相关基因的研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2013]

应用,何云霞等(2009)¹⁾应用回交育种和 QTL 聚合改良粳稻抗旱性;赵福宽等(2004)用高代回交材料筛选与番茄(*Lycopersicon*)耐冷性相关的 RAPD 分子标记。鱼类中也有相关报道(Sekino *et al.*, 2005; Ruan *et al.*, 2010),如利用微卫星技术对尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、萨罗罗非鱼(*Sarotherodon melanotheron*)及其正反杂交鱼的正反回交子代进行了遗传变异分析,探讨了回交的遗传效应(李腾云等, 2008; 吴俊伟等, 2015; 刘于信等, 2009); 储志远等(2011)利用 132 对 SSRs 标记和 63 对 EST-SSRs 标记对柏氏鲤(*Cyprinus pellegrini* Tchang)和荷包红鲤(*Cyprinus carpio* var. *wuyuanensis*)抗寒品系回交子代的 84 个个体进行检测,并与生长性状进行了相关性分析。

近年来,微卫星技术在脊尾白虾遗传育种研究中得到了广泛地应用(马朋等, 2011)。贾舒雯等(2012)、Jia 等(2013)利用微卫星对脊尾白虾 3 个不同地理群体的遗传多样性和遗传结构进行了分析。王日芳等(2016)²⁾利用微卫星对近交家系的遗传多样性分析,得出 3 个近交家系 7-9 世代的纯合率已经达到 56.21%-77.59%,并且家系间已呈分化趋势。由于虾类大多属于一年生,目前,在虾类中进行回交并开展相关研究较少。本研究利用脊尾白虾一年可多次性成熟的特性,首次构建了脊尾白虾的回交家系,采用 25 个微卫星标记对 3 个回交家系进行了遗传多样性分析,旨在分子水平上探讨回交家系的遗传特性,为脊尾白虾遗传育种工作提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 家系构建及样品采集

从浙江象山野生群体和山东日照野生群体中选择体型好、个体大、性成熟的个体作为原始亲本。3 个回交家系及杂交家系 F₁ 的构建方法:A. 象山♀ × (象山♀ × 日照♂)♂; B. 日照♀ × (日照♀ × 象山♂)♂; C. (象山♀ × 日照♂)♀ × 日照♂; F₁. 象山♀ × 日照♂。

1.1.1 回交群体的幼体培育和养殖 每个回交家系各取 500 尾 I 期蚤状幼体,单独放入 200 L 桶中,采用常规方法培育。不同家系同一阶段的培育条件一致。幼体以褶皱臂尾轮虫(*Brachinonus plicatilis*)、卤虫(*Artemia sinica*)为主要饵料,每天换水 10%,连续充气

培养。幼体转成仔虾后,每个家系各取 300 尾仔虾,转入 500 L 桶中,继续养殖,养殖条件保持一致。

待各家系个体养成成虾,各家系随机选取 30 尾,取肌肉,放入 95%乙醇保存,待提取 DNA。

1.2 基因组 DNA 的提取

基因组 DNA 的提取参照刘萍等(2000)传统酚氯仿方法,从脊尾白虾腹部肌肉中提取基因组 DNA,溶解于灭菌 ddH₂O 中,稀释至 60-80 ng/μl 备用。

1.3 脊尾白虾基因组 DNA 的微卫星分析

选取自行开发的多态性较好的 25 对微卫星标记引物(表 1),交由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR 扩增体系(20 μl): 2 μl 基因组 DNA (60-80 ng/μl),正、反向引物(100 μmol/ml)各 1 μl, 10 μl 2× TsingKe™ Master Mix, 6 μl 灭菌水。PCR 反应程序: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 40 s, 退火温度(49℃ -63℃) 40 s, 72℃ 延伸 40 s, 30-35 个循环, 72℃ 充分延伸 10 min。PCR 扩增产物用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离、银染检测,数码相机拍照。

1.4 微卫星数据统计

胶染色后,在灯照下通过与 DNA 分子量标准(PBR322 DNA marker)对比判读每尾个体的基因型大小及基因分型。其中,无扩增条带则为无效等位基因,1 条条带的为纯合子,2 条条带的为杂合子。利用群体遗传分析软件 PopGene 32,计算 3 个回交家系 25 个标记位点的等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、多态信息含量(PIC),遗传距离(D),并计算各家系间 Nei 氏标准遗传距离(1972),进行系统聚类分析。计算 3 个回交家系、野生群体、杂交家系在 25 个微卫星座位的平均基因纯合率(个体样本为纯合子的基因位点数占全部基因位点数的百分比)。

2 结果

2.1 遗传多样性

3 个回交家系各个位点的遗传多样性参数 N_a 、 H_o 、 H_e 、PIC 见表 2。25 个位点在 3 个家系中共检测到 62 个等位基因。各家系的等位基因数分别为 56、

1) He YX. Improving drought tolerance of japonica rice by BC breeding and QTL pyramiding. Doctoral Dissertation of Shenyang Agricultural University, 2009 [何云霞. 应用回交育种和 QTL 聚合改良粳稻抗旱性. 沈阳农业大学博士研究生学位论文, 2009]

2) Wang RF. Genetic diversity in inbred lines of *Exopalaemon carinicauda* based on microsatellite loci. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2016 [王日芳. 脊尾白虾近交系遗传多样性的微卫星分析. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2016]

表 1 脊尾白虾微卫星引物的序列
Tab.1 Microsatellite primers of *E. carinicauda* used in this study

位点 Locus	登录号 Accession Number	核心重复序列 Repeat motif	引物序列 Primer sequence(5'-3')	退火温度 Annealing temperature(°C)
ECL01	KX394743	(TG)6	F:AAGGGTGAAAAGGAGGAG R:AAGGGTGAAAAGGAGGAG	51
ECL02	KX394744	(TA)7	F:GGCGAACCAAAGAAGATA R:CACAGCAAAATAGCACCA	51
ECL03	KX394745	(TCA)5	F:AGTGTGGAATACCGTGGA R:GTGCCTCCCAAGTAAGAA	57
ECL04	KX394746	(TAG)13	F:ATTGCACAGGAGAGCTTAG R:CAACACAACTACTGAGCG	55
ECL05	KX394747	(TAT)5	F:ACCCTTATGGTACTCTGT R:GAGGCTCAATACTACACA	57
ECL06	KX394748	(TCC)5	F:TGTGGTGATTCTCTCCTG R:GACAGATTCTCAGCAGCA	57
ECL07	KX394749	(GAT)5	F:TAGGAGATGGTGAATGGA R:ACATCCTCAATGGCACTA	55
ECL08	KX394750	(ATT)7	F:AATGGTGGTGGGGTAGTT R:CTATTTGGAGCCCTTGTG	53
ECL09	KX394751	(T)12a(T)10	F:TCGCAATCAGACAAGCAG R:CCATACACAACCCCTCAA	53
ECL10	KX394752	(AT)9(GT)6	F:GCGGTGTTTCGGGATAGT R:GTGCTTGTGTGTGGGGT	53
ECL11	KX394753	(T)10ctag(T)10	F:CAGTCCTGGGGAAAATAG R:TCCTTGACCTCATCCTGT	51
ECL12	KX394754	(A)10tatt(A)10	F:CAAATCGGAAACAAGGCT R:GCACGCATTCAACAAAAC	54
ECL13	KX394755	(TG)7taca(TG)7	F:GTCACGGAAACGGCAACA R:TAGCGGACGGGTAGCATT	51
ECL16	KX394758	(T)14ctttatga(T)11	F:TGTGTTTCATACCAAGGGG R:ACCAATGTCCAGCAGTCA	53
ECL17	KX394759	(A)10cattgacgta(AC)7	F:GCTTCTCACAAAACCTCCC R:CTTAGGTGGTGGCTCTTT	51
ECL18	KX394760	(AC)7ttagatatac(CA)7	F:AGACGAAGCGAGATTGAG R:GGTGACTCCACAAAGCAT	54
ECL19	KX394761	(AT)6gcacacatctgta(TA)6	F:GCCAGACTTTACCAATGC R:CGAAGCAGATGAGGAATG	53
ECL20	KX394762	(GGGTTA)5ggattaggg(TTAGGA)5	F:GTGTTTCGTGCGTCGGTTT R:CGAAAAGGCTTCAGGCAC	53
ECL23	KX394765	(AC)6gcacatg(CA)8	F:ATCTTGTCCACGACCGCA R:AAACCCTAACCTTCCCCC	51
ECL24	KX394766	(GT)9a(TG)6	F:CCCCTGCGTAAGTTTCTG R:TGTAGTGCTCGTTGTGGC	53
ECL25	KX394767	(CA)7ac(A)10	F:GAGTGTTTCTGTTCCCATT R:CTTTCGTGTATGCGTTGAC	53
ECL26	KX394768	(T)11actgttgatttt(TG)7	F:ATGCTTTATGCGTCCTCT R:AAACAGAACCACAAAGGG	54
ECL27	KX394769	(ATA)5	F:TGAGAAGTTCAAACCTGC R:AGCCACGATTGTCATAAC	51
ECL29	KX394771	(GCA)6	F:CTTTGTTGGTCTGCGGTC R:GTTTGTGGAGGAGGGGAA	51
ECL31	KX394773	(AAC)5	F:GTTCTGACAAAAACCTCG R:CGTAAACGAAATCAGTCC	52

54、51, 3 个回交家系共同存在 39 个等位基因, 其中, A 家系的等位基因数最多。经进一步计算, 将 3 个回交家系、杂交家系、野生群体的 25 个位点的遗传多样性的相应指标平均值罗列在表 3, 可更直观的进行家系间的差异对比。由表 3 可知, A、B 和 C 家系的平均等位基因 N_a 分别为 2.21、2.18、2.09; 观

测杂合度 H_o 分别为 0.3805、0.3703、0.2489; 期望杂合度 H_e 分别为 0.3629、0.3998、0.2503; 多态信息含量 PIC 分别为 0.3257、0.3391、0.2585。A、B 回交家系呈现中度多态($0.5 < PIC < 0.25$), 而 C 回交家系为低度多态($PIC < 0.25$), 相较于野生群体与杂交家系显著降低。

表 2 各回交家系 25 微卫星位点的遗传多样性参数值
Tab.2 The genetic parameters of 25 microsatellite loci of each backcross family

位点 Locus	回交群体 A Backcross family A				回交群体 B Backcross family B				回交群体 C Backcross family C			
	N_a	H_o	H_e	PIC	N_a	H_o	H_e	PIC	N_a	H_o	H_e	PIC
ECL01	2	0.0491	0.0491	0.0467	2	0.4471	0.5089	0.3072	2	0.1221	0.0761	0.0700
ECL02	3	0.6365	0.7333	0.4600	3	0.5336	0.6356	0.4921	3	0.8007	0.7835	0.4921
ECL03	2	0.5221	0.4721	0.5683	3	0.6705	0.8705	0.6641	2	0.6154	0.6901	0.3550
ECL04	1	0.0000	0.0000	0.0000	1	0.0000	0.0000	0.0000	2	0.0000	0.0000	0.0061
ECL05	2	0.6027	0.5000	0.6111	2	0.3174	0.4079	0.3967	2	0.3332	0.3289	0.4410
ECL06	3	0.8996	0.9116	0.5539	2	0.7714	0.6740	0.5539	*	*	*	*
ECL07	2	0.1237	0.0222	0.0317	2	0.0000	0.0000	0.0018	2	0.0000	0.0000	0.0041
ECL08	4	0.5611	0.7000	0.6798	4	0.6373	0.7338	0.6853	3	0.4437	0.5698	0.6420
ECL09	3	0.6721	0.6333	0.6311	3	0.8251	0.7887	0.7378	2	0.1034	0.0244	0.1270
ECL10	1	0.0000	0.0000	0.0000	1	0.0000	0.0000	0.0000	1	0.0000	0.0000	0.0000
ECL11	2	0.3142	0.2000	0.1638	2	0.2221	0.1723	0.1638	2	0.0312	0.0151	0.1410
ECL12	2	0.1546	0.1079	0.2310	3	0.2135	0.3559	0.4499	2	0.1393	0.1339	0.2014
ECL13	2	0.3121	0.2000	0.1638	1	0.0000	0.0000	0.0000	1	0.0000	0.0000	0.0000
ECL16	3	0.6667	0.5667	0.6167	3	0.5774	0.6356	0.6030	3	0.7835	0.7835	0.6050
ECL17	2	0.2166	0.1667	0.1529	3	0.4907	0.4705	0.5312	3	0.3359	0.3359	0.3821
ECL18	2	0.1998	0.2667	0.1416	2	0.1392	0.2326	0.1410	2	0.0225	0.0225	0.1849
ECL19	2	0.2118	0.2000	0.2937	1	0.0000	0.0000	0.0000	1	0.0000	0.0000	0.0000
ECL20	3	0.5124	0.4667	0.5925	2	0.6831	0.6740	0.5814	3	0.4211	0.4211	0.5804
ECL23	2	0.0892	0.0333	0.0323	*	*	*	*	2	0.0517	0.0517	0.1167
ECL24	2	0.1007	0.1667	0.1411	2	0.1667	0.1338	0.1268	2	0.0037	0.0037	0.0603
ECL25	*	*	*	*	1	0.0000	0.0000	0.0000	1	0.0000	0.0000	0.0000
ECL26	2	0.5731	0.6000	0.6004	3	0.6221	0.6751	0.5896	3	0.6393	0.6393	0.5946
ECL27	4	0.6796	0.7333	0.7082	3	0.6387	0.6723	0.6820	3	0.5951	0.5951	0.7002
ECL29	3	0.9333	0.9667	0.3499	3	0.9333	0.9559	0.4292	3	0.5336	0.5336	0.5001
ECL31	2	0.1033	0.0134	0.0465	2	0.0000	0.0000	0.0021	1	0.0000	0.0000	0.0000

*表示无效等位基因位点

* indicated null allele loci

表 3 各群体在 25 个微卫星位点上的遗传多样性参数
Tab.3 Genetic diversity parameters of 25 microsatellite loci of each population

群体 Population	平均有效 等位基因数 N_e	平均等位 基因数 N_a	平均期望 杂合度 H_o	平均观测 杂合度 H_e	平均多态 信息含量 PIC
野生群体 Wild population	2.97	4.48	0.5891	0.6535	0.5821
杂交家系 Hybrid family	2.78	4.32	0.6138	0.7006	0.6123
回交家系 A Backcross family A	1.45	2.21	0.3805	0.3629	0.3257
回交家系 B Backcross family B	1.32	2.18	0.3703	0.3998	0.3391
回交家系 C Backcross family C	1.09	2.09	0.2489	0.2503	0.2585

2.2 纯合率

3 个家系 25 个位点中分别有部分位点发生纯合(表 4), 其中, ECL10 在 3 个回交家系中都发生了纯合, ECL13、ECL19、ECL25 位点在 B、C 家系中发生了纯合, ECL04 在 A、B 家系中发生纯合, ECL31 在 C 家系中表现为纯合。基因纯合率是每个个体的纯合座位占总检测座位的比率。各家系的平均纯合率分别为 53.86%、56.53%、63.33%, 显著高于野生群体基因纯合率(16.91%)和杂交家系的基因纯合率(15.38%)(表 4)。且在 3 个家系中各发现了一个无效等位基因位点(如表 4 所示, A 家系中的无效等位基

因位点 ECL25, B 家系中的无效等位基因位点 ECL23, C 家系中的无效等位基因位点 ECL06)。

2.3 家系间的遗传距离及遗传相似度

使用 PopGene 软件, 计算出脊尾白虾 3 个回交家系的 Nei 氏标准遗传距离和遗传相似系数(表 5), 遗传距离介于 0.0899–0.1649, 遗传相似度介于 0.8479–0.9140。B 家系和 C 家系之间的遗传距离最短, A 家系和 C 家系拥有相对长的遗传距离。通过 UPGMA 法构建的聚类图(图 1)显示, B 家系和 C 家系先聚为一支, 再与 A 群体聚为一支。

表 4 各群体的纯合位点及纯合率
Tab.4 Homozygous sites and homozygosity rates of each population

群体 Population	无效等位基因位点 Null allele loci	纯合位点 Homozygous site	纯合率 Homozygosity rate (%)
回交家系 A Backcross family A	ECL25	ECL04 ECL10	53.86
回交家系 B Backcross family B	ECL23	ECL04 ECL10 ECL13 ECL19 ECL25	56.53
回交家系 C Backcross family C	ECL06	ECL10 ECL13 ECL19 ECL25 ECL31	63.33
野生群体 Wild population			16.91
杂交家系 Hybrid family			15.38

表 5 3 个脊尾白虾回交家系间的遗传距离(D, 对角线下)及遗传相似性(I, 对角线上)

Tab.5 Nei's genetic distance (D, below diagonal) and genetic identity (I, above diagonal) among three backcross families

	回交家系 A Backcross family A	回交家系 B Backcross family B	回交家系 C Backcross family C
回交家系 A Backcross family A	**	0.8568	0.8479
回交家系 B Backcross family B	0.1545	**	0.9140
回交家系 C Backcross family C	0.1649	0.0899	**

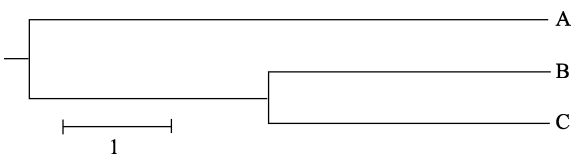


图 1 基于遗传距离的 UPGMA 聚类图

Fig.1 UPGMA clustering tree based on D genetic distance

3 讨论

3.1 脊尾白虾回交家系的遗传分析

本研究分析了 3 个回交家系在 25 个位点上的遗传多样性的相应指标(N_a 、 N_e 、 H_o 、 H_e 、PIC)的平均值见表 3, 等位基因数(N_a)平均值, 有效等位基因数(N_e)平均值, 平均多态信息含量 PIC, 平均杂合度(H_o 、 H_e)都有所降低, 与野生群体和杂交家系相比有了明显的降低, 这与王磊等(2011)所做的牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)回交家系与野生亲本家系的对比、朱晓平等(2012)所做线纹尖塘鳢(*Oxyeleotris lineolatus*)和云斑尖塘鳢(*Oxyeleotris marmoratus*)回交家系与亲本家系的对比结果相同。回交家系的遗传多样性整体降低符合孟德尔遗传定律, 证明随着回交的进行杂合度自然下降, 回交家系的杂合子减少, 纯合子增加, 但也不排除由于脊尾白虾回交家系构建过程中人工选择单一的亲本个体, 并由这些个体产生大量的后代, 造成部分等位基因的缺失。但也有些位点一直维持较高的杂合度(ECL02、ECL16、ECL29 等)。推测这些位点可能是脊尾白虾种质特有的, 而这些位点也不会随回交代数的递进而降低。王日芳(2016)¹⁾利用微卫星对

1) Wang RF. Genetic diversity in inbred lines of *Exopalaemon carinicauda* based on microsatellite loci. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2016 [王日芳. 脊尾白虾近交系遗传多样性的微卫星分析. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2016]

脊尾白虾近交家系进行遗传多样性的相关分析, 同样发现类似的位点, 这些位点被认为是脊尾白虾近交系特异的“生命基因”(李凯等, 2009), 但这些位点有待进一步验证。

3.2 家系基因纯合率分析

A 家系的纯合位点 3 个, B、C 的纯合位点都为 5 个, 3 个回交家系存在一个共同的纯合位点 ECL10。有些位点(ECL04、ECL24 在 C 家系中)虽然没有达到完全的纯合, 但杂合度已经减小, 这些位点可能随着回交代数的增加而表现为完全纯合(王日芳, 2016)¹⁾。同时, 在回交家系中发现了个别无效等位基因位点(如 A 家系中的 ECL06 位点), 这可能是由于微卫星两侧翼的序列保守性低发生了突变, 引物不能与之结合, 从而导致无扩增条带的结果, 也可能因为回交家系是由少量脊尾白虾亲本产生大量的子代, 导致其后代群体等位基因数量缺失, 从而产生了遗传漂变和偏离平衡。

基因的纯合率是每个个体的纯合座位占总检测座位的比率。本研究中所有回交家系回交一代的纯合率都达到了 50%以上, 与野生群体的纯合率(16.91%)和杂交家系的纯合率(15.38%)相比显著增高, 说明 3 个回交家系的基因纯合的速率都较快。与吴俊伟等(2015)在尼罗罗非鱼与萨罗罗非鱼的回交群体和刘于信等(2009)在耐盐罗非鱼的回交群体中所得到的回交家系的遗传多样性降低、基因纯合性升高的结论相似。同时, 经比较回交家系回交一代的基因纯合率与王日芳(2016)¹⁾所做的脊尾白虾 3 个近交系 7 世代结果相近, 说明回交相较于近交可更快的获得基因纯合的个体。

3.3 家系间的遗传距离及遗传相似度分析

由表 5 和图 1 可知, 3 个家系间的遗传距离相对较小, 在 0.0899–0.1649 之间, 与尼罗罗非鱼与萨罗罗非鱼各回交家系间的遗传距离(0.062–0.182)相似(李腾云等, 2008)。说明回交家系亲缘关系较近, 可能是由于 3 个家系的原始亲本都是来自相同的地理群体。其中, B、C 家系的遗传距离最小为 0.0899, 遗传相似度为 0.9140, 并且 B、C 家系最后聚为一支, 而吴俊伟等(2015)根据理论的基因频率和实验结果发现, 在尼罗罗非鱼和萨罗罗非鱼回交一代和回交二代中, 轮回亲本的遗传组成必定超过 50%。故推测, 此结果可能是由于 B、C 的轮回亲本都为日照野生个体。

综上所述, 脊尾白虾回交家系的基因纯合率较高, 更容易得到基因纯合的个体, 利用回交育种适合于选育具有生长速度快、环境适应性广、抗逆性强的

脊尾白虾优良品种, 为脊尾白虾的遗传改良提供了理论依据和技术支持。

参 考 文 献

- Chu ZY, Zhang XF, Cao Z, *et al.* Correlation analysis of the 4 growth traits in the common carp backcross population. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(1): 10–19 [褚志远, 张晓峰, 曹柱, 等. 鲤回交群体 4 种生长性状的相关性分析. *水产学报*, 2011, 35(1): 10–19]
- Jia SW, Liu P, Li J, *et al.* Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*. *Genetics and Molecular Research*, 2013, 12(3): 2816–2820
- Jia SW, Liu P, Li J, *et al.* Microsatellite analysis of genetic diversity in 3 wild populations of *Exopalaemon carinicauda*. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(12): 1819–1825 [贾舒雯, 刘萍, 李健, 等. 脊尾白虾 3 个野生群体遗传多样性的微卫星分析. *水产学报*, 2012, 36(12): 1819–1825]
- Li JT, Li J, Liu P, *et al.* Heritability of body length and weight for the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2013, 44(4): 968–972 [李吉涛, 李健, 刘萍, 等. 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)体长和体重遗传力的估计. *海洋与湖沼*, 2013, 44(4): 968–972]
- Li K, Feng ST, Mou YL, *et al.* Study on genetic regulation of microsatellite loci gene of three inbred families of Wuzhishan Miniature pig. *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, 42(5): 1751–1760 [李凯, 冯书堂, 牟玉莲, 等. 五指山猪 3 个近交家系内微卫星等位基因的遗传变化. *中国农业科学*, 2009, 42(5): 1751–1760]
- Li TY, Li SF. Microsatellite marker analysis of genetic variation in the backcross progenies from *Oreochromis niloticus* and *Sarotherodon melanotheron*. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2008, 17(4): 396–401 [李腾云, 李思发. 尼罗罗非鱼与萨罗罗非鱼回交子代遗传变异的微卫星分析. *上海水产大学学报*, 2008, 17(4): 396–401]
- Liang JP, Li J, Liu P, *et al.* Research progress of biological characteristics and artificial breeding of ridgetail white prawn, *Exopalaemon carinicauda*. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012, 28(17): 109–116 [梁俊平, 李健, 刘萍, 等. 脊尾白虾生物学特性与人工繁育的研究进展. *中国农学通报*, 2012, 28(17): 109–116]
- Liu P, Kong J, Shi T, *et al.* RAPD analysis of wild stock of penaeid shrimp (*Penaeus chinensis*) in the China's coastal waters of Huanghai and Bohai Seas. *Acta Oceanologica Sinica*, 2000, 22(5): 89–93 [刘萍, 孔杰, 石拓, 等. 中国对虾黄、渤海沿岸地理群的 RAPD 分析. *海洋学报*, 2000, 22(5): 89–93]
- Liu YX, Li SF, Cai WQ, *et al.* Evaluation of backcrossing breeding effect in selection of salt-tolerant tilapia. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2009, 16(3): 332–339 [刘于信, 李思发, 蔡完其, 等. 耐盐罗非鱼育种回交效应评估. *中国水产科学*, 2009, 16(3): 332–339]
- Ma P, Liu P, Li J, *et al.* The genetic diversity and phylogenetic analysis of COI gene in mitochondrial DNA of three

1) Wang RF. Genetic diversity in inbred lines of *Exopalaemon carinicauda* based on microsatellite loci. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2016 [王日芳. 脊尾白虾近交系遗传多样性的微卫星分析. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2016]

- populations of *Exopalaemon carinicauda*. Progress in Fishery Sciences, 2011, 32(6): 50–56 [马朋, 刘萍, 李健, 等. 脊尾白虾3个野生群体线粒体COI基因的遗传多样性及其系统发育分析. 渔业科学进展, 2011, 32(6): 50–56]
- Ruan XH, Wang WJ, Kong J, *et al.* Genetic linkage mapping of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) using microsatellite markers and its application in QTL analysis. Aquaculture, 2010, 308(3–4): 89–100
- Sekino M, Saido T, Fujita T, *et al.* Microsatellite DNA markers of Ezo abalone (*Haliotis discus hannai*): A preliminary assessment of natural populations sampled from heavily stocked areas. Aquaculture, 2005, 243(1–4): 33–47
- Wang L, Chen SL, Tian YS, *et al.* Genetic structure analysis for the backcross inbreeding and parents family of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* by microsatellite markers. Progress in Fishery Sciences, 2011, 32(3): 38–43 [王磊, 陈松林, 田永胜, 等. 牙鲆回交、全同胞近交及其亲本家系的微卫星研究. 渔业科学进展, 2011, 32(3): 38–43]
- Wang XQ, Cao M, Yan BF, *et al.* Techniques for the culture of ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*. Fisheries Science and Technology Information, 2008, 35(6): 265–269 [王兴强, 曹梅, 阎斌伦, 等. 脊尾白虾养殖技术研究. 水产科技情报, 2008, 35(6): 265–269]
- Wang YK, Liu P, Duan YF, *et al.* The cloning and expression of alpha2-macrogloblin gene of *Exopalaemon carinicauda*. Progress in Fishery Sciences, 2015, 36(2): 63–70 [王有昆, 刘萍, 段亚飞, 等. 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*) 2-巨球蛋白cDNA全长的克隆和表达分析. 渔业科学进展, 2015, 36(2): 63–70]
- Wu JW, Jia JH, Zhang YH, *et al.* Genetic characteristics of the first and the second backcross generations of *Oreochromis niloticus* and *Sarotherodon melanotheron* by microsatellite marker analysis. Freshwater Fisheries, 2015, 45(4): 10–14 [吴俊伟, 笪金华, 张艳红, 等. 尼罗罗非鱼与萨罗罗非鱼回交一代与回交二代群体遗传特征的微卫星分析. 淡水渔业, 2015, 45(4): 10–14]
- Zhao FK, Yang R, Lin C, *et al.* Selection of RAPD marker linked to tomato cold tolerance using higher progeny material of backcross. Biotechnology, 2004, 14(4): 8–9 [赵福宽, 杨瑞, 林成, 等. 用高代回交材料筛选与番茄耐冷性相关的RAPD分子标记. 生物技术, 2004, 14(4): 8–9]
- Zhu XP, Luo J, Yin SC, *et al.* Microsatellite marker analysis of genetic variation in hybrid progenies and backcross progenies from *Oxyeleotris lineolatus* (♀) and *Oxyeleotris marmoratus* (♂). Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(17): 147–153 [朱晓平, 骆剑, 尹绍武, 等. 线纹尖塘鳢(♀)、云斑尖塘鳢(♂)及其杂交、回交子代遗传变异的微卫星分析. 中国农学通报, 2012, 28(17): 147–153]

(编辑 马瑾艳)

Microsatellite Marker Analysis on Genetic Variation of the Ridgetail White Prawn *Exopalaemon carinicauda* Backcross Populations

LIU Jiumei^{1,2}, LI Jitao², LIU Ping^{2,3①}, DOU Quanwei^{1,2}, WANG Jiajia², LI Jian^{2,3}

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

Abstract In order to analyze genetic effect of the ridgetail white prawn (*Exopalaemon carinicauda*) backcross families, 25 microsatellite loci were selected to detect the genetic characteristics of three backcross family A, B, C, generated by our laboratory. The results showed that among A, B and C families, the average number of alleles (N_a) were 2.21, 2.18 and 2.09, the observed heterozygosity (H_o) were 0.3805, 0.3703 and 0.2489, the expected heterozygosity (H_e) were 0.3629, 0.3998 and 0.2503 and the polymorphism information content (PIC) were 0.3257, 0.3391 and 0.2585 respectively. Compared to the wild and hybrid population, the genetic diversities of the backcross families were greatly reduced which belonged to moderate or low polymorphism. 62 alleles were obtained in the three backcross families in total using 25 loci. Specifically, 56, 54 and 51 alleles were obtained in A, B and C backcross families, respectively. In addition, there were 39 common alleles in the three backcross families. Six loci have homozygosity in all backcross families (ECL10 in A, B and C families). The average homozygous rate was 53.86%, 56.53% and 63.33% respectively, which showed that the purification rate of gene was rapid and the backcross is suitable for selective breeding in *E. carinicauda*.

Key words *Exopalaemon carinicauda*; Backcross populations; Microsatellite; Genetic variation

① Corresponding author: LIU Ping, E-mail: liuping@ysfri.ac.cn

一株功能益生菌的简易发酵及其在凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)生物絮团养殖中的应用*

高戈^{1,2} 朱开玲^{2,4} 张庆起³ 王志杰^{2,4} 黄捷^{2,4}^①



(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
农业部海水养殖病害防治重点实验室 青岛市海水养殖流行病学与生物安保重点实验室 青岛 266071;
3. 连云港市启明水产有限公司 连云港 222100; 4. 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 对一株有脱氮作用的巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)进行简易发酵,以对虾饲料及赤砂糖为培养基,通过正交实验及发酵条件优化,在对虾饲料 3 g/L、赤砂糖 6 g/L、接种量 1×10^8 CFU/ml、发酵温度 31℃、装液量 40%条件下,发酵 24 h 可获得活菌数为 1.16×10^{10} CFU/ml 的发酵产物。使用发酵得到的巨大芽孢杆菌进行凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)生物絮团养殖实验。结果显示,添加芽孢杆菌和赤砂糖的增强絮团组的絮团形成速度较添加赤砂糖的絮团组及传统养殖的对照组明显提升($P < 0.05$),整体上增强絮团组的亚硝酸氮水平与絮团组和对照组差异显著($P < 0.05$)。养殖结束时,添加巨大芽孢杆菌组的对虾体长、体重水平均显著高于另 2 组。本研究建立了一种简单可行的功能益生菌发酵方式,并验证添加功能益生菌可提高生物絮团技术在对虾养殖中的效果。

关键词 生物絮团; 功能益生菌; 简易发酵; 巨大芽孢杆菌

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)03-0140-08

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)养殖业在全世界水产养殖业中占有十分重要的地位,凡纳滨对虾年产量在全球养殖水产品中位居第 6 位,其年总产值高居养殖水产品第 1 位,我国的凡纳滨对虾年产量占世界总产量的 40%左右(FAO, 2012)。对虾的传统养殖模式,以提高密度、加大投饵量来追求更高的产量,导致水体中的氨氮、亚硝酸氮及有机营养废物等的含量提高,养殖水体和底质富营养化,病原菌大量繁殖,造成对虾的发病和大量死亡(周鲜娇等, 2009; 葛红星

等, 2014; 孙舰军等, 1999)。

以色列科学家 Avnimelech(1999)分析养殖过程中无机氮的代谢通路,提出通过调节 C/N 来控制水体中无机氮的循环,以降低水体中无机氮的浓度,并首次将生物絮团技术应用在水产养殖中。之后,该技术被广泛应用于各类对虾养殖的各个时期(陈亮亮等, 2014),展现了巨大的推广前景。在对虾养殖中使用生物絮团,可以改善养殖水质,降低水体中的氨氮、亚硝酸盐及硝酸盐的浓度(Ray *et al*, 2011; Zhao *et al*,

* 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)、青岛海洋科学与技术国家实验室鳌山科技创新项目(2015ASKJ02)、山东省泰山学者建设工程专项经费、农业部科研杰出人才和创新团队专项经费和江苏省苏北科技专项(科技富民强县)项目(BN2016058)共同资助 [This work was supported by the Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (201103034), China Agriculture Research System (CARS-47), the Project of the Aoshan Sci. & Tech. Innovation Program of Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology (2015ASKJ02), the special foundation under the Construction Programme for 'Taishan Scholarship' of Shandong Province of China, the Programme for Chinese Outstanding Talents in Agricultural Scientific Research, and the Special Fund for Subei Sci. & Tech. of Jiangsu Province (BN2016058)]. 高戈, E-mail: gaoge1990@foxmail.com

① 通讯作者: 黄捷, 研究员, E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-08-05, 收修改稿日期: 2016-09-05

2012),改善水体微生物的群落结构(杨章武等,2015),抑制弧菌等有害病原的数量(Devaraja *et al*,2002),并且可以有效提高对虾产量(张许光,2012)¹⁾。

杨章武等(2015)研究表明,除简单添加有机碳源外,在絮团培养过程中添加适当的功能益生菌,可以调节水体微生物群落结构、提高水体中有益菌比例、提高对虾的免疫力,进而降低养殖过程中的发病率,使对虾的成活率明显提高。为了获得培养絮团所需的大量功能益生菌,本实验室前期研究使用秸秆、麦麸、花生粕等农业副产品进行简易发酵,得到一定数量的芽孢杆菌(*Bacillus*)发酵液(赵培,2011)²⁾,但发酵材料及发酵过程不适用于养殖现场使用。

本研究旨在探索一种适用于养殖现场的功能益生菌简易发酵及使用模式,降低益生菌使用成本,为更加有效地推广生物絮团技术提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 菌种与对虾

实验用巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*)由中国水产科学研究院黄海水产研究所养殖生物疾病控制与分子病理学研究室分离保藏。实验用凡纳滨对虾于2015年7月9日购自江苏连云港赣榆区某育苗场,暂养15d后进行实验,平均体重为(0.147±0.066)g。

1.2 实验场地及设施

实验于2015年7月-10月在连云港启明水产有限公司实验大棚中进行。养殖实验使用15个Ø0.8m×1.0m的水泥池,每池进注0.8m深的消毒海水,每池底部对称安装2个气石。42个气石连接一台0.3kW电磁式空气压缩机(海利,广东)。菌液的大量培养使用容积为30L(Ø0.3m×0.45m)的带盖塑料桶,每桶底部布置1个气石并使用气阀调节供气。

1.3 发酵材料的预处理

1.3.1 菌株种子液制备 将保存于-80℃的菌种转接到新鲜的2216E平板培养基上,28℃培养24h。挑取平板上的单菌落,接种于装有200ml 2216E液体培养基的500ml锥形瓶中,于28℃、180r/min摇床中震荡培养24h。

1.3.2 发酵用器材及海水消毒条件探索 发酵使

用盐度为29±2的砂滤海水,经黑暗沉淀15d,注入发酵塑料桶中,充气用气管、气阀及气石同时浸入水中。分别加入三氯异氰尿酸钠(中博生物,武汉,有效氯浓度≈50%)至终浓度为0、20、40、100、200、300mg/L,静置处理12h。取各浓度水样100μl,稀释为1/10¹-1/10³系列,取100μl涂布于2216E及TCBS固体平板培养基,28℃培养24h,进行平板计数。每个浓度重复3次。

1.4 发酵培养基配比及培养条件优化

本实验使用对虾0#颗粒饲料(三发普林,唐山,粗蛋白≥43%、粗脂肪≥4%、灰分≤16%、水分≤12%)及赤砂糖(蔗糖含量>98%)分别作为发酵培养的氮源和碳源,对培养基比例、发酵时间、温度及装液量等发酵条件逐一优化。采样平板稀释涂布法进行发酵产物的活菌计数与纯度检测。

1.4.1 培养基优化 使用L9(3³)正交设计方案,进行三因素三水平实验,因素及水平设置见表1。接种种子液浓度为2.0×10⁹CFU/ml,培养温度为28℃,装液量为20%,24h后取样,每组设置3个平行。数据使用SPSS 18.0进行分析。

表1 培养基优化正交设计

Tab.1 The orthogonal experiment design of culture medium

水平 Level	因素 Factor		
	A. 饲料 Feed (g/L)	B. 赤砂糖 Brown sugar (g/L)	C. 接种量 Inoculation (CFU/ml)
1	1	3	2×10 ⁷
2	3	6	6×10 ⁷
3	5	9	10×10 ⁷

1.4.2 温度 使用优化后条件,保持其他条件不变,温度分别设置为25℃、28℃、31℃、34℃及37℃,每个温度3个平行。于24h进行取样计数。

1.4.3 装液量 使用优化后条件,保持其他条件不变,装液量分别设定为20%、30%、40%、50%及60%,每个装液量设置3个平行。于24h进行取样计数。

1.4.4 发酵时间 使用优化后的最佳比例进行发酵,设置3个平行,从0h起,每隔12h进行取样计数,至72h。绘制生长曲线。

1.5 添加益生菌发酵液的凡纳滨对虾养殖实验

1.5.1 分组及日常管理 在15个Ø0.8m×1.0m的

1) Zhang XG. The application and research of bio-floc technology in factory farming systems of *Litopenaeus vannamei*. Master's Thesis of Ocean University of China, 2012, 34-38 [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, 34-38]

2) Zhao P. The study and application of bio-flocs technology in seawater aquaculture. Doctoral Dissertation of Shanghai Ocean University, 2011, 32-42 [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, 32-42]

水泥池中,每池注 0.8 m 深的消毒海水,按照 400 尾/m³ 密度放苗开始养殖实验。实验设置对照组、絮团组及增强絮团组,每组分别设置 3 个平行,研究发酵液添加对养殖水体水质及凡纳滨对虾生长的影响。对照组为常规换水养殖,前 25 d,每 3 d 换水 30 cm; 25 d 后,每 2 d 换水 30 cm。絮团组向水体中添加赤砂糖,前 7 d,每天按照 30 g/池进行添加; 7 d 后,每天赤砂糖按照前一天饲料投喂量的 70%进行添加(张许光, 2012)¹⁾。增强絮团组赤砂糖添加量同絮团组,发酵液(浓度约 1×10¹⁰ CFU/ml)每 5 d 按照 200 ml/池进行添加。根据养殖水体检测情况,絮团组及增强絮团组均于 30 d 及 43 d 换水 2 次,每次约 40 cm 水位的换水量。各组日常饲料投喂量根据预估的对虾存活情况维持在相同水平。各组每天进行吸底,定时观察对虾活动情况。

1.5.2 指标监测 养殖过程中,每 7 d 从各池中层取水 3 L,混匀后取 1 L 注入沉淀漏斗(1000-0010, Nalgene)中,静置 30 min,测量絮团量。每 5 d 从各池取中层水 500 ml,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后,进行水质指标测试,分别使用次溴酸盐氧化法(国家海洋局, 2007)及盐酸萘乙二胺分光光度法(国家海洋局, 1991)测定养殖水体的氨氮(NH₃-N)及亚硝酸氮(NO₂-N)含量。每天 06:00 使用水质检测仪(YSI-556, 维赛, 美国)测定各池的温度、pH、溶解氧及盐度。养殖周期为 52 d,其中, 30 d 及 52 d 测量对虾的体长及体重。

1.6 数据分析统计

使用 SPSS 18.0 设计正交实验,对数据进行单因

素方差分析(One-way ANOVA)、Turkey's 多重检验,以 $P < 0.05$ 作为差异显著水平判定条件。

2 结果

2.1 所需添加菌液大量培养条件的探索及优化

2.1.1 培养用海水的消毒处理 设置不同终浓度对发酵用海水及器材进行同步消毒处理,结果显示,未消毒海水中活菌数量达到 9×10⁵ CFU/ml,经 200 mg/L 及以上浓度的三氯异氰尿酸钠(有效氯约 50%)处理 12 h 后,水体中没有监测到可培养活菌(表 2)。因此,细菌培养用海水用 200 mg/L 三氯异氰尿酸钠进行消毒处理。

表 2 三氯异氰尿酸钠处理 12 h 对海水的消毒效果

Tab.2 Disinfection of seawater with sodium trichloroisocyanurate for 12 h

消毒剂浓度(mg/L) Disinfectant concentration	活菌数(CFU/ml) Bacteria concentration	
	2216E	TCBS
0	9.77×10 ⁵	2.33×10 ³
20	1.07×10 ⁵	6.67×10 ²
40	1.77×10 ⁴	1.67×10 ²
100	2.67×10 ²	0.00
200	0.00	0.00
300	0.00	0.00

2.1.2 简易培养基比例优化 通过 L9(3³)正交设计方案,对培养基参数中的饲料、赤砂糖添加量及菌种接种量进行优化,24 h 时取样检测活菌数(表 3),经

表 3 简易发酵培养基优化正交实验结果

Tab.3 The orthogonal experiment result for the optimization of simplified fermentation medium

编号 Group	A 饲料 Feed	B 赤砂糖 Brown sugar	C 接种量 Inoculation	菌浓度 Bacteria concentration (×10 ⁷ CFU/ml)
1	1	1	1	182.0±27.5
2	1	2	2	416.0±41.6
3	1	3	3	293.3±13.6
4	2	1	2	246.7±20.1
5	2	2	3	466.0±63.5
6	2	3	1	276.0±50.1
7	3	1	3	208.0±18.3
8	3	2	1	354.7±32.1
9	3	3	2	222.0±17.4
K1	297.1	212.2	270.9	
K2	329.6	412.2	294.9	
K3	261.6	263.8	322.4	
R	68.0	200.0	51.5	

1) Zhang XG. The application and research of bio-floc technology in factory farming systems of *Litopenaeus vannamei*. Master's Thesis of Ocean University of China, 2012, 9–21 [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, 9–21]

方差分析可以得出,饲料(A)、赤砂糖(B)、接种量(C)三个因素均对巨大芽孢杆菌的发酵产生显著影响($P < 0.05$) (表4)。极差(R)表明三个因素对发酵后菌液浓度的影响大小依次为赤砂糖 > 饲料 > 接种量。根据各因素K值可以得到最优组合为A2B2C3,此组合在正交实验结果中也得到验证。因此,培养基最优比例为饲料3 g/L、赤砂糖6 g/L、接种剂量 1×10^8 CFU/ml。

表4 正交实验方差分析

因素 Factor	偏差平方和 Deviation square	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F值 F value	显著性 Significance
饲料 Feed	6941	2	3470	40.64	0.024
赤砂糖 Brown sugar	64694	2	32347	378.8	0.003
接种量 Inoculation	3993	2	1997	23.39	0.041
误差 Deviation	170.8	2	85.4		

2.1.3 温度及装液量的优化 不同的发酵温度下,发酵液中菌浓度有显著差异(图1),在31℃时,巨大芽孢杆菌生长速度最快;在34℃时,菌浓度仍为最佳温度时的90%以上。故应将温度控制在31~34℃范围内。而25℃时,发酵效果只有31℃的50%,即在此条件下,发酵时间应该延长为2倍。

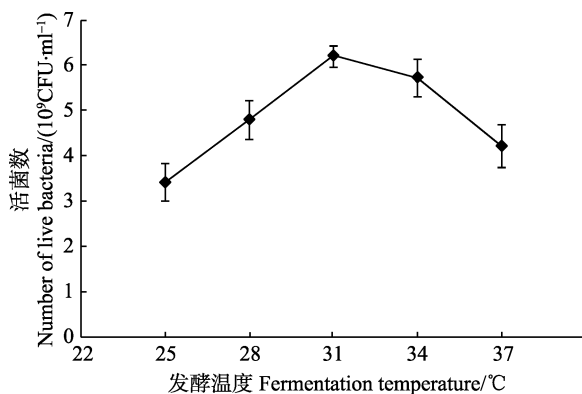


图1 发酵温度对巨大芽孢杆菌在简易发酵中活菌数的影响

Fig.1 Effects of temperature on the number of live *B. megaterium* during the simplified fermentation

装液量影响发酵液的搅拌力度和溶解氧水平。容量为30 L(Ø 0.3 m×0.45 m)的塑料桶中,装液量为20%、30%和40%,即装液深度为9 cm、13.5 cm和

18 cm时,经24 h培养后,巨大芽孢杆菌的浓度基本保持在同一水平(图2),随着装液量继续加大,菌浓度明显下降。在装液量为60%(装液深度为27 cm)时,发酵产物的活菌数为最适条件下的57%。

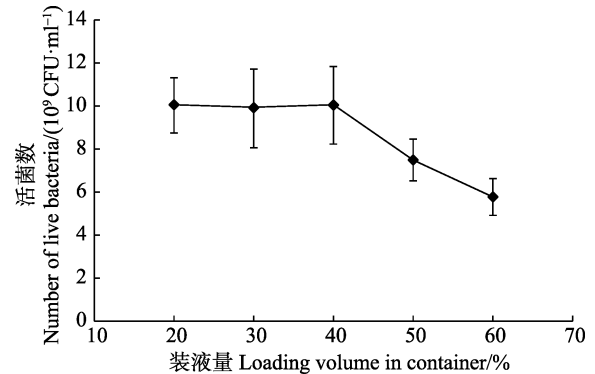


图2 装液量对巨大芽孢杆菌在简易发酵中的活菌数的影响

Fig.2 Effects of loading volume on the number of live *B. megaterium* during the simplified fermentation

2.1.4 发酵时间的优化 按照优化过的培养基配方:饲料3 g/L、赤砂糖6 g/L、接种量 1×10^8 CFU/ml,在31℃下按照40%装液量进行巨大芽孢杆菌发酵,从0 h开始,每12 h取样进行平板涂布,检测发酵液活菌数。如图3所示,菌株在前24 h内指数增速大量繁殖,在24 h时达到数量顶点,活菌数达到 1.16×10^{10} CFU/ml,总菌数比接种量提高了100倍以上。24 h之后到达平台期,其后活菌数基本维持在同一水平至少2 d以上。在实际生产中,随着发酵时间的延长,发酵液被杂菌污染的几率会逐渐增大。因此,应在发酵液活菌数达到平台期后尽快使用。

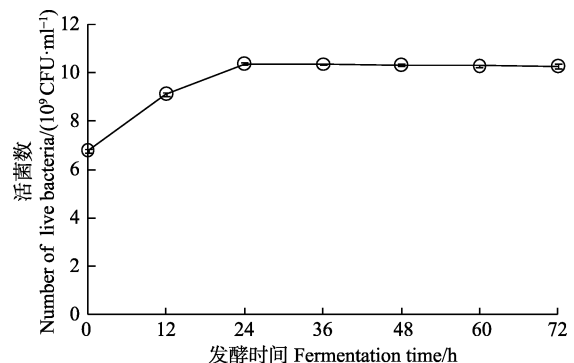


图3 发酵时间对巨大芽孢杆菌在简易发酵中的活菌数的影响

Fig.3 Effects of incubation time on the live number of *B. megaterium* during the simplified fermentation

2.2 凡纳滨对虾养殖实验结果

2.2.1 生物絮团的变化 在养殖开始时,絮团组和

巨大芽孢杆菌增强絮团组每天添加赤砂糖, 水色逐渐变为棕褐色, 并伴有絮状物产生, 透明度迅速降低。对照组水色无明显变化, 透明度较高(> 40 cm)。每7 d 观察各池中生物絮团的沉积量, 以获得整个养殖周期内絮团的变化情况(图4)。增强絮团组的水体中, 在第7天时就有明显的棕色絮状物生成且沉积量高于其他2组, 并保持较快的增长速度, 在整个养殖期内始终高于其他2组, 在中后期一直保持在5 ml/L 以上。絮团组中絮团量的增长速度显著高于对照组, 但低于增强絮团组, 且沉积量在后期才高于5 ml/L。对照组的絮团沉积量始终在2 ml/L 左右, 并且获得的沉积颜色较浅, 不同于另外2组的棕褐色。

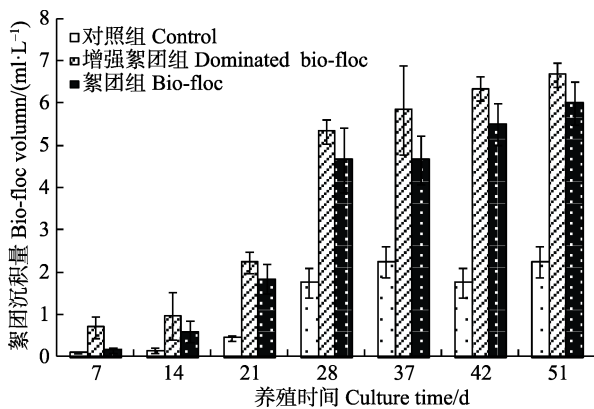


图4 养殖过程水体加糖和巨大芽孢杆菌对絮团量的影响
Fig.4 Effects of sugar and *B. megaterium* on the bio-floc biomass in pond water of farmed shrimp

2.2.2 水质参数变化 7月25日-9月15日的养殖过程中, 水温由(32.0 ± 1.0) $^{\circ}\text{C}$ 缓慢降至(25.9 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$, 溶解氧保持在(6.0 ± 1.5) mg/L, pH 由最初的 7.80 ± 0.15 逐步升高至 8.25 ± 0.25 。因异养菌的大量繁殖需要消耗氧气并产生二氧化碳, 造成2个培养絮团组的溶解氧水平较对照组低约0.5-1.5 mg/L, pH 较对照组低约0.3-0.5。

养殖期间每5 d 进行氨氮及亚硝酸氮浓度的监测, 以了解养殖水体水质的变化(图5和图6)。结果显示, 对照组虽然每2 d 换水30%, 放苗后10 d 其氨氮水平依然快速升高至1 mg/L 以上, 换水后, 氨氮水平依然维持在0.8 mg/L 左右达15 d 以上; 亚硝酸氮也在第15天增加到1 mg/L 以上, 且呈持续增长的趋势。而2个实验组在前期不换水的情况下, 总氨氮浓度只是缓慢上升, 亚硝酸氮浓度到第30天才达到1 mg/L 左右的水平。在养殖30 d 后, 氨氮浓度在各组均出现明显下降, 保持在0.5-0.2 mg/L 的较低水平。

增强絮团组及絮团组在30 d 及43 d 时进行换水

处理, 第1次换水时, 2组的氨氮浓度均有大幅下降(图5), 第2次时亚硝酸氮浓度下降明显(图6)。增强絮团组亚硝酸氮浓度始终低于絮团组(在25 d、30 d、36 d 及51 d 差异显著, $P < 0.05$)。

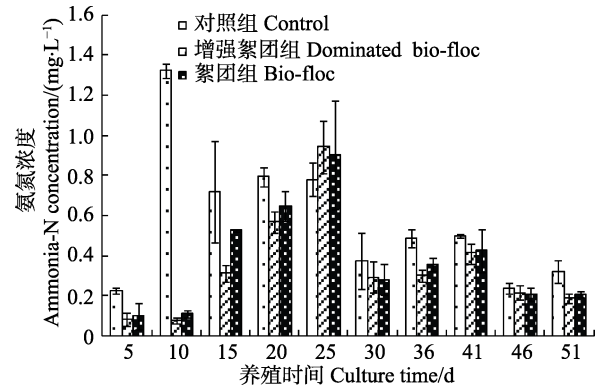


图5 养殖过程中水体加糖和巨大芽孢杆菌对氨氮浓度变化的影响

Fig.5 Effects of sugar and *B. megaterium* on the ammonia-N concentration in pond water of farmed shrimp

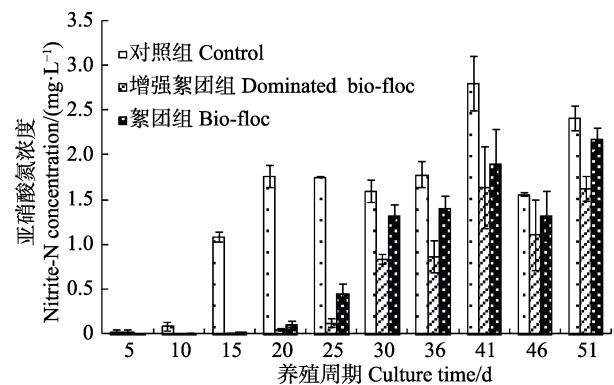


图6 养殖过程中水体加糖和巨大芽孢杆菌对亚硝酸氮浓度变化的影响

Fig.6 Effects of sugar and *B. megaterium* on the nitrite-N concentration in pond water of farmed shrimp

2.2.3 对虾生长情况 本实验中, 放苗时凡纳滨对虾的平均体长为(2.24 ± 0.34) cm, 平均体重为(0.15 ± 0.07) g。经养殖51 d, 对照组对虾平均体长为(5.6 ± 0.1) cm, 平均体重为(2.0 ± 0.1) g; 絮团组平均体长为(5.5 ± 0.2) cm, 平均体重为(2.0 ± 0.2) g; 增强絮团组平均体长为(5.7 ± 0.3) cm, 平均体重为(2.2 ± 0.3) g (图7)。而在养殖过程中, 30 d 时的增强絮团组对虾的体长与体重增长速度具有更大的差异, 显著高于对照组与絮团组, 分别较对照组高约16%和45%。统计的51 d 存活率显示, 增强絮团组为(56.4 ± 3.2)%, 絮团组为(47.3 ± 2.1)%, 显著高于对照组的(37.1 ± 4.1)%。养殖过程中, 由于苗种质量问题以及水体偏小, 对虾整体生长速度较为缓慢, 对虾在35 d 时发生白斑病,

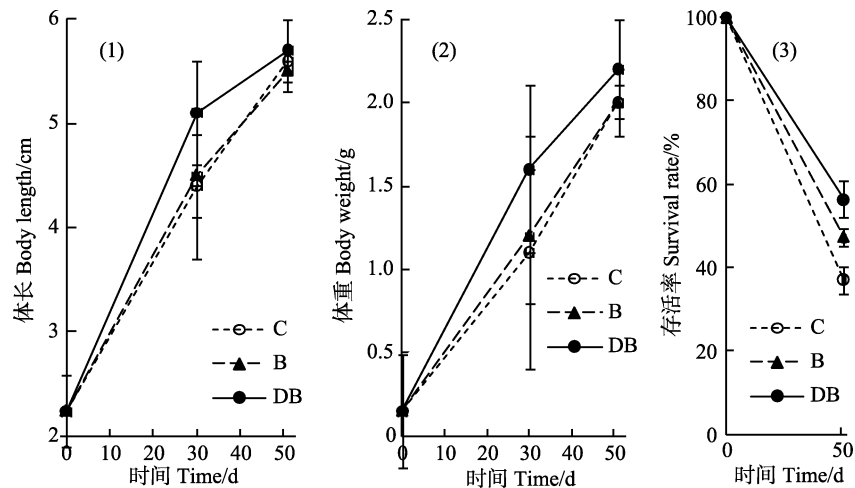


图7 养殖凡纳滨对虾生长和存活情况

Fig.7 The growth and survival of the farmed *L. vannamei*

(1) 体长变化; (2) 体重变化; (3) 存活率

C: 对照组; B: 絮团组; DB: 增强絮团组

(1) Change of body length; (2) Change of body weight; (3) Survival rate

C: Control; B: Bio-floc group; DB: Dominated bio-floc group

对照组发病最重,日常检查时偶现对虾残体,导致最终存活率普遍偏低,同批次虾苗的常规养殖生产出现同样情况,于40 d时停止养殖。

3 讨论

生物絮团技术强调对水体 C/N 的调节,对添加碳源的种类和数量进行了研究(邓应能等, 2012),但功能益生菌添加对生物絮团应用影响方面的研究较少。本研究探索优化了一种便捷的功能益生菌大量培养方式,将之用于凡纳滨对虾生物絮团养殖过程,并与对照组养殖效果相比较,以探究功能益生菌的添加对生物絮团养殖效果的影响。不同于实验室条件下生物絮团养殖添加的少量益生菌,工厂化生物絮团养殖过程中所需添加的菌量较大,因此,益生菌加强的生物絮团工厂化养殖技术,需要一种简易快速培养所需微生物的方法和工艺。

因养殖厂环境较为简陋,要使菌液的大量培养既简便易行又低成本进行,需要使用取材容易又方便可行的方法和工艺,其中,细菌培养使用的器具及海水的消毒灭菌,使用了养殖场用来日常消毒的三氯异氰尿酸钠,培养基营养成分则使用就地取材的对虾饲料与赤砂糖。本研究中使用的巨大芽孢杆菌为芽孢杆菌科一种好氧的革兰氏阳性菌,因其对氮磷钾等营养元素具有较好的代谢作用,被广泛应用于水体净化、微

生物复合肥、畜牧养殖及原核表达系统等领域(Claudia *et al.*, 2012; 王琳等, 2009)。在对巨大芽孢杆菌培养基的配比进行优化的基础上,对影响细菌生长的培养温度、生长时间、发酵用塑料桶的装液量及充气情况进行了优化。

温度对细菌的生长速度影响较大,每种细菌均可在一定温度范围内生长。随着温度升高,细菌因酶活力升高而加速生长,但超过最适温度,细菌就会因酶活力降低而加速衰老,使生长速度减慢。Kanjachumpol 等(2013)选择 30℃ 为巨大芽孢杆菌的最佳发酵温度,陈凯等(2010)研究确定的最适发酵温度范围为 32–34℃,这与本研究确定的最适范围为 31–34℃ 的结果相接近。装液量影响发酵系统内的溶解氧水平及体系内搅拌强度,进而影响菌株的生长。章四平等(2010)对枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)的发酵实验显示,装液量达到 50% 时,发酵产物的活菌数会有显著下降。本研究中优化的最佳装液量为 40%。

优化培养条件后,巨大芽孢杆菌的最终发酵产物中的活菌数可达到 1.16×10^{10} CFU/ml。相较于张媛媛等(2012)在实验室条件下使用废糖蜜、玉米粉、豆粕等材料对 2 株复合芽孢杆菌进行发酵获得的活菌浓度 6.62×10^{10} CFU/ml,本实验条件优化后的发酵结果可达到相同数量级。同样在养殖现场条件下发酵,较赵培(2011)¹⁾使用秸秆、麦麸等农业副产品发酵坚强芽

1) Zhao P. The study and application of bio-flocs technology in seawater aquaculture. Doctoral Dissertation of Shanghai Ocean University, 2011, 32–42 [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, 32–42]

孢杆菌(*B.firmus*)获得的活菌浓度(4×10^7 CFU/ml)高3个数量级。这种在养殖现场简易快速大量培养微生物的方法,可以满足微生物增强絮团养殖模式所需要的生物量与低成本的要求,易于推广应用。

生物絮团技术应用中,同时添加碳源和益生菌,能有效控制水体中氨氮及亚硝酸氮的积累(葛红星等,2013)。相较于单纯的添加益生菌或碳源,同时添加益生菌及碳源可提高对虾的存活率、降低饵料系数(张欢欢等,2016)。本研究中,增强絮团组同时添加益生菌和赤砂糖,其亚硝酸氮的浓度始终显著低于单纯絮团组,因亚硝酸氮有毒害作用,絮团组对虾的体长、体重及成活率均明显低于增强絮团组。本研究的结果表明,对虾生物絮团养殖技术结合功能性益生菌的适量添加,可以更大程度地提高生物絮团养殖技术的效率。本研究中的生物絮团只添加了一株益生菌,虽然增强组各指标明显优于单纯絮团组,但由于所用虾苗质量问题,养殖实验在50 d就停止,在一定程度上影响了实验结果的显著性。随着后期更多不同功能的潜在益生菌的获得和在絮团养殖中的应用探索,有望通过在絮团养殖技术中添加不同功能的微生物,建立更加高效的生物絮团养殖模式。

参 考 文 献

- Avnimelech Y. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture*, 1999, 176(3-4): 227-235
- Chen K, Li JS, Yang HT, *et al.* Phosphate solubilizing abilities of *Bacillus megaterium* strain P1 and its fermentation conditions. *Soil and Fertilizer Science in China*, 2010(4): 73-76 [陈凯, 李纪顺, 杨合同, 等. 巨大芽孢杆菌 P1 的解磷效果与发酵条件研究. *中国土壤与肥料*, 2010(4): 73-76]
- Chen LL, Dong HB, Li ZJ, *et al.* Review of the application and perspective of biofloc technology in shrimp culture. *Marine Science*, 2014, 38(8):103-108 [陈亮亮, 董宏标, 李卓佳, 等. 生物絮团技术在对虾养殖中的应用及展望. *海洋科学*, 2014, 38(8): 103-108]
- Claudia K, Josef BC, Thibault G. Debottlenecking recombinant protein production in *Bacillus megaterium* under large-scale conditions — targeted precursor feeding designed from metabolomics. *Biotechnology & Bioengineering*, 2012, 109(6): 1538-1550
- Deng YN, Zhao P, Sun YZ, *et al.* Conditions for bio-floc formation and its effects in closed culture system of *Litopenaeus vannamei*. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(2): 69-75 [邓应能, 赵培, 孙运忠, 等. 生物絮团在凡纳滨对虾封闭养殖试验中的形成条件及作用效果. *渔业科学进展*, 2012, 33(2): 69-75]
- Devaraja TN, Yusoff FM, Shariff M. Changes in bacterial populations and shrimp production in ponds treated with commercial microbial products. *Aquaculture*, 2002, 206(3-4): 245-256
- FAO. FAO yearbook. *Fishery and Aquaculture Statistics*, 2012
- Ge HX, Li J, Chen P, *et al.* The immune response of *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus* under stress caused by ammonia nitrogen at different concentrations. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(6): 76-82 [葛红星, 李健, 陈萍, 等. 氨氮胁迫下凡纳滨对虾对副溶血弧菌的易感性. *渔业科学进展*, 2014, 35(6): 76-82]
- Ge HX, Li J, Chen P, *et al.* Effects of the fermentation solution of wheat bran, cane sugar and *Bacillus subtilis* on water quality and growth performance of cultured *Penaeus vannamei* in indoor industrial facilities. *Chinese Fishery Quality and Standards*, 2013, 3(4): 55-62 [葛红星, 李健, 陈萍, 等. 麦麸、蔗糖和芽孢杆菌发酵液对室内工厂化养殖凡纳滨对虾水质和生长的影响. *中国渔业质量与标准*, 2013, 3(4): 55-62]
- Kanjanachumpol P, Kulpreecha S, Tolieng V. Enhancing polyhydroxybutyrate production from high cell density fed-batch fermentation of *Bacillus megaterium* BA-019. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2013, 36(10): 1463-1474
- Ray AJ, Dillon KS, Lotz JM. Water quality dynamics and shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production in intensive, mesohaline culture systems with two levels of biofloc management. *Aquacultural Engineering*, 2011, 45(3): 127-136
- Sun JJ, Ding ML. Effect of ammonia-N on anti-disease ability of *Penaeus chinensis*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1999, 30(3): 267-72 [孙舰军, 丁美丽. 氨氮对中国对虾抗病力的影响. *海洋与湖沼*, 1999, 30(3): 267-272]
- Wang L, Li J, Zhang PY. Laboratory study on treatment of eutrophicated scenery water body by *Bacillus megaterium*. *Ecology and Environmental Sciences*, 2009, 18(1): 75-78 [王琳, 李季, 张鹏岩. 巨大芽孢杆菌对富营养化景观水体的净化效果. *生态环境学报*, 2009, 18(1): 75-78]
- Yang ZW, Yang K, Zhang Z, *et al.* Research on the biofloc bacterial community structure during larval rearing of *Litopenaeus vannamei* using metagenome sequencing. *Journal of Fujian Fisheries*, 2015, 37(2): 91-97 [杨章武, 杨铿, 张哲, 等. 基于宏基因组测序技术分析凡纳滨对虾育苗中生物絮团细菌群落结构. *福建水产*, 2015, 37(2): 91-97]
- Zhang HH, Wang XH, Li C, *et al.* Isolation and identification of a *Bacillus* sp. and application in bioflocs technology shrimp culture system. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(2): 111-118 [张欢欢, 王秀华, 李晨, 等. 一株芽孢杆菌的分离鉴定及在生物絮团对虾养殖中的应用. *渔业科学进展*, 2016, 37(2): 111-118]
- Zhang SP, Liu SM, Wang JX, *et al.* Optimizing fermentation condition for the antagonistic *Bacillus subtilis* NJ-18 strain. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2010, 33(2): 58-62 [章四平, 刘圣明, 王建新, 等. 枯草芽孢杆菌生防

- 菌株 NJ-18 的发酵条件优化. 南京农业大学学报, 2010, 33(2): 58–62]
- Zhang YY, Zhao M, Zhang N. Optimization of culture medium and fermentation conditions for compound probiotics of *Bacillus*. Journal of Northeast Forestry University, 2012, 40(3): 93–97 [张媛媛, 赵敏, 张宁. 复合益生菌芽孢杆菌发酵培养基及条件的优化. 东北林业大学学报, 2012, 40(3): 93–97]
- Zhao P, Huang J, Wang XH. The application of bioflocs technology in high-intensive, zero exchange farming systems of *Marsupenaeus japonicus*. Aquaculture, 2012, 354–355(2): 97–106
- Zhou XJ, Qiu DQ. Effects of nitrite nitrogen and *Vibrio parahaemolyticus* on some immunity indicators of *Litopenaeus vannamei*. Journal of Hydroecology, 2009, 2(1): 49–53 [周鲜娇, 邱德全. 亚硝酸氮和副溶血弧菌对凡纳滨对虾部分免疫指标的影响. 水生态学杂志, 2009, 2(1): 49–53]

(编辑 冯小花)

Simplified Fermentation of a Functional Probiotics and the Application in Prawn (*Litopenaeus vannamei*) Bio-Floc Breeding

GAO Ge^{1,2}, ZHU Kailing^{2,4}, ZHANG Qingqi³, WANG Zhijie^{2,4}, HUANG Jie^{2,4}①

(1. Shanghai Ocean University, College of Fisheries and Life Science, Shanghai 201306; 2. Qingdao Key Laboratory of Mariculture Epidemiology and Biosecurity, Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. Lianyungang Ganyu Marine Fishery Technical Guidance Station, Lianyungang 222100; 4. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071)

Abstract Shrimp aquaculture, as one of the main components of the aquaculture industry, has produced enormous economic benefits and social benefits. But the sustainable development of the shrimp aquaculture has been affected and restricted by the discharge of the waste and the frequent occurrence of diseases. Bio-floc technology by adding brown sugar, molasses and other carbon source in breed pool to promote heterotrophic microbial growth and reproduction to control the water pollution, shows great prospects for development in shrimp culture. In this study, we established a method of simplified fermentation that used a strain of *Bacillus megaterium* with the activity of denitrification. And we used prawn feed and brown sugar as the medium. Results showed that the best ratio of medium was prawn feed 3 g/L, brown sugar 6 g/L and inoculation volume 1×10^8 CFU/ml through the orthogonal experiment. And the other conditions were optimized by single experiment. We got the fermentation products with the viable cell number was 1.16×10^{10} CFU/ml that fermented with 31°C, 40% liquid volume and 24 hours. Then we fed the *Litopenaeus vannamei* through the bio-floc technology by using the fermentation products. The result showed that the volume of bio-floc was formed more quickly in dominated bio-floc group (added bacillus and sugar) than bio-floc group (just added sugar) and control (traditional culture pattern) ($P < 0.05$), and the overall concentration level of nitrite-N in dominated bio-floc group was much lower than the other groups ($P < 0.05$). At the end of the culture, the highest of the average body length and weight in prawns was obtained in dominated bio-floc group, and Bio-floc group and control were significantly lower ($P < 0.05$). This study established a simplified and feasible method for the fermentation of probiotic bacteria. And the results showed the effectiveness of the bio-floc technology in prawn culture is verified by the additiong probiotics.

Key words Bio-floc technology (BTF); Functional probiotics; Simplified fermentation; *Bacillus megaterium*

① Corresponding author: HUANG Jie, E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn

温度波动对不同规格虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)生理和免疫指标的影响*



高振锟^{1,2} 张继红^{2,3①} 李敏^{1,2} 马莎^{1,2}
郭晓亮^{1,2} 姜妮妮² 吕旭宁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 为探讨黄海冷水团锋面温度波动对底播虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)的影响,采用室内模拟的方法,研究了温度波动对虾夷扇贝生理和免疫指标的影响。实验温度波动范围为 15-10-15℃,升降温幅度为 5℃/2 h,共进行了 4 次温度波动,分别测定了 3 个规格虾夷扇贝死亡率、耗氧率、排氮率以及血液中超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活力等生理、免疫指标的变化情况。结果显示,温度波动 4 次后,大、中、小 3 个规格虾夷扇贝的死亡率均较低,分别为 4%、6%、6%,其中,大规格虾夷扇贝的死亡率低于中、小规格,并且大规格虾夷扇贝在前 2 次温度波动时出现死亡,第 3 次温度波动后,不再出现死亡。3 个规格组在 B1(波动 1 次)时的耗氧率与初始相比,均为降低;随着波动次数的增加,耗氧率逐渐增加而高于初始水平。除小规格组的 B1 外,排氮率均随温度波动次数的增加而降低;多重比较分析结果显示,大规格组的 B3(波动 3 次)显著低于波动初始($P<0.05$);中规格组的 B4(波动 4 次)显著低于波动初始($P<0.05$)。虾夷扇贝的免疫指标对温度波动更为敏感:温度波动 1 次或者 2 次时,3 个规格组的 SOD 和 CAT 活性显著降低($P<0.05$)。上述结果表明,适宜温度范围内的温度波动,也会对虾夷扇贝的生理、免疫指标产生不同程度的影响。

关键词 虾夷扇贝; 温度波动; 生理指标; 免疫指标

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)03-0148-07

虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)属软体动物门、瓣鳃纲,为冷水性贝类。自从 20 世纪 80 年代从日本引入中国后,已经在辽宁、山东等地进行规模化养殖。辽宁省长海县是虾夷扇贝底播增殖的主要区域,到 2011 年底,长海县的底播面积达到 43.3 万 hm^2 。随着养殖规模的扩大,底播区域逐渐从 10 m 水深的区域向 40-50 m 水深的区域扩展。黄海冷水团是位于

黄海中部洼地深层及底部的低温高盐季节性水团,是我国陆架浅海的一个重要的海洋现象。夏季,黄海冷水团几乎控制着整个黄海海域,对生物群落分布、渔业资源的获得有重要的影响(李昂等, 2015)。长海县地处黄海海域,底播增殖区域受黄海冷水团锋面的影响,水温波动较大。温度异常波动可能是底播虾夷扇贝养殖过程中所面临的一个重要威胁。虾夷扇贝为冷

* 国家自然科学基金(41276172)、“十二五”国家支撑计划(2011BAD13B06)和中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(2060302201517102-2)共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (41276172), National Science & Technology Pillar Program during the 12th Five-year Plan Period(2011BAD13B06); Special Scientific Research Funds for Central Non-profit Institutes, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences (2060302201517102-2)]. 高振锟, E-mail: gaozhenkunlong@163.com

① 通讯作者: 张继红, 研究员, E-mail: zhangjh@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-04-08, 收修稿日期: 2016-04-27

水性种类,已有的关于水温对虾夷扇贝胁迫的研究多集中于高温的影响(王如才等, 1993; 郝振林等, 2014; 吴彪等, 2016)。那么, 温度波动尤其是温度在适温范围的波动是否会对虾夷扇贝产生影响? 影响程度如何? 不同规格的虾夷扇贝对温度波动的反应是否有差异? 目前, 仅有 Jiang 等(2016)关于温度波动对虾夷扇贝免疫酶活性的研究报道, 未见对虾夷扇贝呼吸代谢以及不同规格间的比较研究。

呼吸、排泄是反映扇贝生理状况的重要指标, 而超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)是反映贝类体液免疫能力以及健康状态的重要指标。SOD 和 CAT 能够增强贝类吞噬细胞的防御能力和机体的免疫功能, 保护机体免受过氧化氢的损伤(姚翠鸾等, 2003)。因此, 本研究以不同规格的虾夷扇贝为实验材料, 根据长海县冷水团锋面区域水温的波动情况, 采用室内模拟的方式, 模拟海域中的温度波动时间和幅度, 研究温度波动对虾夷扇贝的生理、生化指标的影响, 为探讨底播增殖海域虾夷扇贝大量死亡的原因以及为底播增殖虾夷扇贝的选址提供基础数据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验于 2015 年 10 月在桑沟湾南岸的楮岛水产有限公司的水实验室进行。虾夷扇贝取自国家海洋贝类研究中心的寻山养殖海域, 按照壳长将其分为大(82.71±3.49) mm、中(65.76±4.20) mm、小(32.36±2.38) mm 3 个实验组。暂养水温为 15℃, 暂养期间每天定量投喂三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum* Bohlin)。暂养 5 d 后, 分别选择大、中、小 3 个规格的健康、活力较强的虾夷扇贝各 50 粒进行实验。

1.2 水温波动的设置

黄海冷水团的核心区域位于 38.5°N、122.5°E, 冷水团覆盖海域面积约 13 万 km²。而獐子岛海洋牧场的位置为 38.8–39.2°N、122.4–123.1°E, 处于黄海冷水团的影响范围内。獐子岛海域的潮流为半日潮, 12 h 涨落潮 1 次。因此, 水温波动有一定的周期性, 即 12 h 波动 1 次。水温波动范围和幅度参照獐子岛集团股份有限公司 12 号潜标 2014 年 6 月 28 日 24 h 监测的水温变化情况设置(图 1)。

温度波动的设置如下: 由暂养的水温 15℃快速降至 10℃, 降低速度为 2.5℃/h; 然后, 在 10℃条件下持续 10 h 后, 再快速升至 15℃, 升温速度也为 2.5℃/h。这样温度升降 1 次称为波动 1 次, 用 B1 表示, 波动

第 2 次为 B2, 以此类推, 本实验水温共波动 4 次。每波动 1 次, 测 1 次虾夷扇贝的生理、免疫指标。另外, 测定实验初始值。记录整个实验过程中虾夷扇贝的死亡数量。

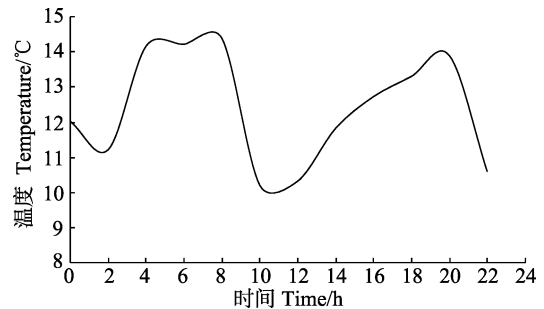


图 1 獐子岛海域夏季 12 号潜标昼夜温度变化

Fig.1 Variation of water temperature within 24 h from #12 subsurface mooring system of Zhangzidao Island in summer

1.3 测定的指标及其测定方法

1.3.1 耗氧率和排氨率的测定 测定耗氧率和排氨率时, 3 个规格虾夷扇贝分别设置 3 个平行、3 个空白对照组。实验所用容器为 2.9 L 的白色塑料瓶, 大、中规格扇贝, 每个塑料瓶中放置 1 个扇贝, 小规格扇贝每个塑料瓶中放置 2 个。用保鲜膜密封, 实验持续 2 h, 虹吸法取水样进行耗氧率和排氨率的测定。

溶解氧(DO)测定采用(Winkler)碘量法计算单位耗氧率(OR, mg·g⁻¹·h⁻¹):

$$OR = [(DO_0 - DO_t) \times V] / (W \times t)$$

式中, DO₀ 和 DO_t 分别为实验开始和结束时实验水中的溶解氧含量(mg/L), V 为实验用水的体积(L), W 为实验贝的软组织干重(g), t 为实验持续时间(h)。

氨氮(NH₄-N)采用次溴酸钠氧化法测定, 根据实验前后氨氮浓度变化计算单位干重排氨率(NR, μmol·g⁻¹·h⁻¹):

$$NR = [(N_t - N_0) \times V] / (W \times t)$$

式中, N₀ 和 N_t 分别为实验开始和结束时实验水中的氨氮浓度(μmol/L), V 为实验用水的体积(L), W 为实验贝的软组织干重(g), t 为实验持续时间(h)。

1.3.2 血液酶活的测定 采用南京建成生物工程研究所的试剂盒测量血液的 SOD、CAT 的活性, 测量时严格按照试剂盒的说明书进行操作。

SOD 的检测采用黄嘌呤氧化酶法, 原理为: 通过黄嘌呤以及黄嘌呤氧化酶反应体系产生 O₂, 后者氧化羟胺形成亚硝酸盐, 在显色剂的作用下呈现紫红色, 分光光度计比色, 计算公式:

$$SOD \text{活力} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 2 \times a \times b$$

式中, A_0 和 A_t 分别为对照管和测定管的吸光度值, a 为反应体系的稀释倍数, b 为样本测试前的稀释倍数。本实验测定中, $a=166$, $b=1$ 。

CAT 的测定原理: CAT 分解 H_2O_2 的反应可通过加入钼酸铵而迅速中止, 剩余的 H_2O_2 与钼酸铵作用生成一种淡黄色的络合物, 分光光度计比色, 计算公式:

$$\text{CAT活力} = (B_0 - B_t) \times 271 \times \frac{1}{60 \times c} \times d$$

式中, B_0 和 B_t 分别为对照管和测定管的吸光度值, c 为取样量(ml), d 为样本测试前的稀释倍数。本实验测定中, $c=10$, $d=1$ 。

1.4 数据分析

采用 SPSS 16.0 统计软件进行单因子方差分析

(One-way ANOVA)和组间多重比较分析(LSD), $P < 0.05$ 视为差异显著。

2 结果

2.1 虾夷扇贝的死亡率

实验中 3 个规格虾夷扇贝的基础生物学指标见表 1。实验期间的水体盐度为 30 ± 1 。

不同波动次数时, 不同规格组的死亡数量见表 2。温度波动 4 次后, 大、中、小 3 个规格虾夷扇贝的总死亡数量分别为 2、3 和 3 个, 死亡率分别为 4%、6% 和 6%。其中, 大规格虾夷扇贝的死亡率低于中、小规格, 且大规格扇贝在波动前 2 次时出现死亡, 波动第 3 次后, 不再出现死亡。

表 1 实验所用虾夷扇贝的基础生物学数据
Tab.1 The basal biological data of *P. yessoensis*

项目 Items	大规格 Big size	中规格 Medium size	小规格 Small size
壳长 Shell length (mm)	82.71±3.49	65.76±4.20	32.36±2.38
壳高 Shell height (mm)	81.44±3.25	65.32±3.77	33.48±2.76
壳宽 Shell width (mm)	20.12±1.90	15.43±1.23	7.84±1.34
总湿重 Total wet weight (g)	65.89±9.51	32.27±6.26	4.64±1.21
软组织干重 Dry weight of soft tissues (g)	2.70±0.87	1.12±0.09	0.30±0.04

表 2 不同规格虾夷扇贝在温度波动过程中的死亡情况
Tab.2 Mortality of different sized *P. yessoensis* under temperature fluctuation

规格 Size	波动 Fluctuation				总死亡数量 Total died numbers	死亡率 Mortality rate (%)
	B1	B2	B3	B4		
大 Big	1	1	0	0	2	4
中 Medium	2	0	1	0	3	6
小 Small	1	1	0	1	3	6

2.2 温度波动对虾夷扇贝耗氧率和排氨率的影响

温度波动对 3 个规格虾夷扇贝耗氧率的影响见图 2。3 个规格组在 B1 时的耗氧率与初始相比, 均为降低。随着波动次数的增加, 耗氧率逐渐增加而高于初始水平。单因素方差分析显示, 对 3 个规格组来说, 波动至不同次数时的耗氧率与初始相比, 均未达到显著差异 ($P > 0.05$)。温度波动次数相同时, 大规格和中规格组耗氧率不存在显著差异 ($P > 0.05$); B0、B1、B2 时, 大规格组的耗氧率显著低于小规格组 ($P < 0.05$); B3、B4 时, 大规格组和小规格组的耗氧率无显著差异 ($P > 0.05$)。

温度波动对虾夷扇贝排氨率的影响如图 3。3 个规格组的排氨率除小规格组的 B1 外, 都随着温度波

动次数的增加而降低。组间多重比较分析结果显示, 大规格组的 B3 显著低于 B0 ($P < 0.05$); 中规格组的 B4 显著降低 B0 ($P < 0.05$); 而对于小规格组, 不同的波动次数之间没有达到显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.3 温度波动对虾夷扇贝血液免疫酶活性的影响

温度波动对 3 个规格组血液的 SOD 活性的影响见图 4。温度波动 1 次时, 大规格和小规格虾夷扇贝的 SOD 活性显著降低; 波动 2 次时, 3 个规格虾夷扇贝的 SOD 活性均显著低于初始值 ($P < 0.05$)。当温度波动第 3 次和第 4 次时, 3 个规格虾夷扇贝的 SOD 活性与初始没有显著差异 ($P > 0.05$), 但均低于初始值。

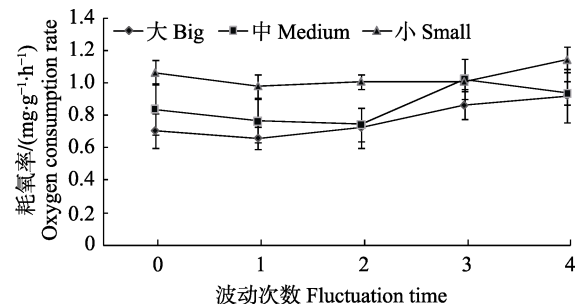


图 2 温度波动对 3 个规格虾夷扇贝耗氧率的影响
Fig.2 Effects of temperature fluctuation on the oxygen consumption rate of different sized *P. yessoensis*

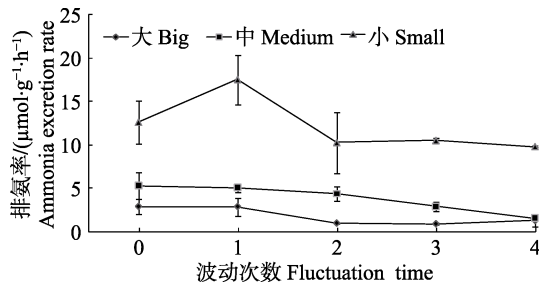


图3 温度波动对3个规格虾夷扇贝排氨率的影响

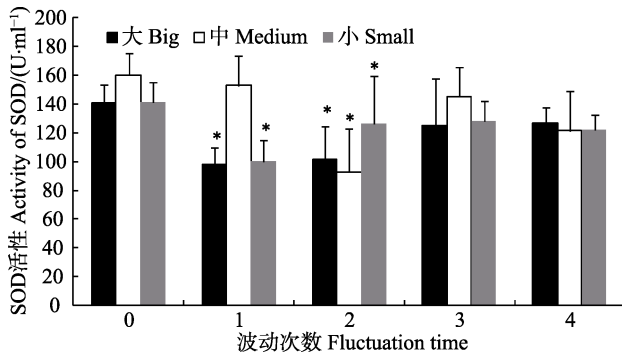
Fig.3 Effects of temperature fluctuation on the ammonia excretion rate of different sized *P. yessoensis*

图4 温度波动对3个规格虾夷扇贝血液SOD活性的影响

Fig.4 Effects of temperature fluctuation on the activity of superoxide dismutase in blood of different sized *P. yessoensis*

*表示波动组与B0差异显著($P < 0.05$), 图5同

* Represented significant difference with B0 at $P < 0.05$ level, the same as in Fig.5

温度波动对3个规格组血液CAT活性的影响见图5。单因素方差分析显示, 温度波动对3个规格组血液CAT活性影响显著($P < 0.05$)。B1时, 3个规格组的CAT活性均显著降低($P < 0.05$)。B3、B4时, 3个规格组的CAT活性与初始相比, 无显著差异($P > 0.05$), 但均低于初始值。

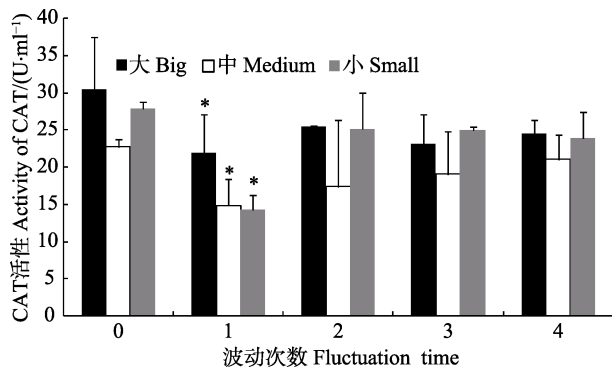


图5 温度波动对3个规格虾夷扇贝血液CAT活性的影响

Fig.5 Effects of temperature fluctuation on the activity of catalase in blood of different sized *P. yessoensis*

3 讨论

3.1 温度波动对虾夷扇贝存活的影响

温度是影响水生动物等变温动物生长、发育和代谢强度的一个非常重要的因子(王青林等, 2011)。本研究结果显示, 在适温范围内的温度波动也会导致虾夷扇贝不同程度的死亡。大、中、小3个规格虾夷扇贝的死亡率没有显著性差异, 中规格和小规格的死亡率略高于大规格。周玮等(1992)在研究水温异常波动与栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)死亡的关系中指出, 扇贝大量死亡的海域常常伴有水温异常波动, 而无明显水温波动的海域扇贝死亡率偏低, 将正常养殖海域内的栉孔扇贝运到海水温度出现异常波动海域, 30 d后, 扇贝死亡率达到20%, 大幅度以及跳跃性的水温波动是导致栉孔扇贝死亡的主要原因。

3.2 温度波动对虾夷扇贝呼吸代谢的影响

呼吸排泄是贝类重要的新陈代谢过程, 是衡量贝类生理状态是否健康的主要指标之一。温度对贝类呼吸排泄等生理活动有很大的影响(His *et al*, 1989; He *et al*, 1999; You *et al*, 2001; Wang *et al*, 2005; Verween *et al*, 2007; Rico-Villa *et al*, 2009)。许多学者把耗氧率和排氨率作为评估水产动物在环境胁迫中利用蛋白和能量的重要有效指标(曹善茂等, 2012; 刘青等, 2012)。本研究中, 随着温度波动次数的增加, 3个规格虾夷扇贝的耗氧率无显著变化, 小规格虾夷扇贝的排氨率无显著变化, 但大规格和中规格虾夷扇贝的排氨率在B3、B4时出现降低。实验结果说明, 15-10-15℃的温度波动对虾夷扇贝的生理状态影响不大, 此范围内的温度波动并没有破坏虾夷扇贝正常的呼吸代谢, 说明虾夷扇贝能够适应此范围内的水温波动。

Bayne(1983)提出贝类单位体重耗氧率和排氨率与个体大小成反比。在本研究中, 小规格的虾夷扇贝单位软组织干重耗氧率和排氨率较大, 说明小规格虾夷扇贝的代谢率较高, 代谢作用较强。这与郝振林等(2014)对虾夷扇贝的研究结果一致。贝类单位组织干重耗氧率和排氨率与个体大小成反比这一规律可能与贝类组织结构和内脏器官有关, 贝类直接维持生命的组织和内脏器官的新陈代谢强度高于非直接维持生命的其他组织。在贝类生长过程中, 这两种组织的比率随之减小, 即肌肉和脂肪等积累增多, 从而引起贝类个体的增大, 但单位组织耗氧率和排氨率有降低现象(王雅倩等, 2009)。

3.3 温度波动对虾夷扇贝免疫指标的影响

当受到外界不良刺激时,会导致生物体内活性氧自由基增多,从而使细胞膜损害(柴学良等, 2005),生物体内活性氧代谢平衡就会被破坏,从而造成生物体受到伤害(Winston, 1991),甚至会引起生物的死亡。在长期的进化过程中,为了适应环境,生物体内都形成了一套能够及时且有效的清除活性氧自由基的机制,使其的生成与消除处于动态平衡中。SOD 和 CAT 是这个机制中重要的 2 种酶(Fearman *et al.*, 2010; 王好等, 2011)。SOD 清除自由基的能力与其活力有关。当生物体受到轻度逆境胁迫时,其体内的 SOD 活力往往会升高(文春报等, 2009; 时少坤等, 2013),当生物体受到重度和长时间逆境胁迫时, SOD 活性通常降低(唐学玺等, 2000),这促使生物体内蓄积活性氧,从而对生物体造成损害(张培玉等, 2007)。CAT 是以铁卟啉为辅基的酶类,能将因 SOD 歧化反应而产生的大量 H_2O_2 及时消除,同时,也避免了因 H_2O_2 与 O_2 在铁络合物的作用下,而生成比 O_2 更具危害性的 $OH\cdot$ 自由基(温扬敏等, 2008)。同生理指标相比,虾夷扇贝的免疫指标对温度波动更为敏感。

本研究发现,在适宜温度范围内的温度波动(15-10-15 $^{\circ}C$)对虾夷扇贝的免疫指标(SOD 和 CAT)产生显著影响,之后,随着波动次数的增加,虾夷扇贝的免疫指标逐渐恢复。B1 时 CAT 活性的下降和 B2 时 SOD 活性的下降可能是因为,温度波动初始,虾夷扇贝体内产生了大量的活性氧,活性氧的含量已经超过其抗氧化系统的清除能力,发生了氧化损伤,造成体内抗氧化酶的活性降低。B4 时 SOD 和 CAT 的活性与初始相比,无显著差异,可能是因为此时虾夷扇贝已经适应了此范围内的温度波动, SOD 和 CAT 活性又恢复到正常水平,这时体内活性氧的产生与消除可以达到动态平衡。孙学亮等(2010)研究急性温度胁迫对半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)血液的影响时也发现,温度胁迫 12 h 后,其血液的 SOD 活性显著低于初始,而当温度胁迫 96 h 后,其血液的 SOD 活性与初始相比无显著差异。时少坤等(2013)对近江牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)的研究显示,高盐胁迫 24 h 时, SOD 活性显著低于对照组,而 48 h 后,与对照组无显著差异。蒋风华等(2012)研究发现,当栉孔扇贝受到原油水溶性成分污染 24 h 时, 0.21 mg/L 和 0.88 mg/L 浓度组的鳃组织 SOD 和 CAT 活性显著下降。40 $\mu g/L$ 的 Cu^{2+} 胁迫缢蛭(*Sinonovacula constricta*)稚贝 48 h 后,其体内的 CAT 活性显著抑制(刘浩明等, 2012)。这些结果均与本研究的结果相似。本研究结

果表明,适宜温度范围内的波动在短时期内会降低虾夷扇贝 SOD 和 CAT 活力,但长时间波动的影响不大。

综上所述,适宜温度范围内的温度波动也会对虾夷扇贝的生理、免疫指标产生不同程度的影响。温度波动会造成 3 个规格虾夷扇贝的死亡; 虾夷扇贝对长时间的温度波动有一定的适应能力。因此,在自然海域中,黄海冷水团锋面的温度波动在波动初始期会对虾夷扇贝有较大的影响,可能导致虾夷扇贝死亡,但虾夷扇贝适应之后,这种温度波动的影响就会降低了。

参 考 文 献

- Bayne BL. The biology energetics of marine mollusks. Academic Press, New York, 1983, 407-515
- Cao SM, Zhang CY, Zuo X. The effect of different ecological factors on oxygen consumption in ascidian *Molgula manhattensis*. Journal of Dalian Ocean University, 2012, 27(3): 210-214 [曹善茂, 张丛尧, 左骁. 不同生态因子对曼氏皮海鞘耗氧率的影响. 大连海洋大学学报, 2012, 27(3): 210-214]
- Chai XL, Fang J, Lin ZH, *et al.* Effects of temperature on filtration, oxygen consumption and ammonia excretion of *Mercenaria mercenaria*. Marine Sciences, 2005, 29(8): 33-36 [柴学良, 方军, 林志华, 等. 温度对美国硬壳蛤滤食率、耗氧率和排氨率的影响. 海洋科学, 2005, 29(8): 33-36]
- Fearman J, Moltschaniwskij NA. Warmer temperatures reduce rates of gametogenesis in temperate mussels, *Mytilus galloprovincialis*. Aquaculture, 2010, 305: 20-25
- Hao ZL, Tang XJ, Ding J, *et al.* Survival rate, oxygen consumption rate and immune enzymatic activity of *Mizuhopecten yessoensis* at high temperature. Chinese Journal of Ecology, 2014, 33(6): 1580-1586 [郝振林, 唐雪娇, 丁君, 等. 不同高温水平对虾夷扇贝存活率、耗氧率和体腔液免疫酶活性的影响. 生态学杂志, 2014, 33(6): 1580-1586]
- He YC, Zhang FS, Li BQ. Effect of temperature on embryo and larval development of the scallop *Argopecten irradians concentricus* Say. Oceanologia Sinica, 1999, 30(3): 284-289
- His E, Robert R, Dinot A. Combined effects of temperature and salinity on fed and starved larvae of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and the Japanese oyster *Crassostrea gigas*, Marine Biology, 1989, 100: 455-463
- Jiang FH, Gao W, Zhao ML, *et al.* Effect of crude oil activity of antioxidant enzyme of scallop *Chlamys farreri*. Marine Sciences, 2012, 36(7): 28-33 [蒋风华, 高伟, 赵美丽, 等. 原油污染对栉孔扇贝抗氧化酶活性的影响. 海洋科学, 2012, 36(7): 28-33]
- Jiang WW, Li JQ, Gao YP, *et al.* Effects of temperature change on physiological and biochemical responses of Yesso scallop, *Patinopecten yessoensis*. Aquaculture, 2016, 451: 463-472

- Li A, Yu F, Diao XY, *et al.* Interannual variability of temperature of the northern Yellow Sea cold water mass. *Haiyang Xuebao*, 2015, 37(1): 30–42 [李昂, 于非, 刁新源, 等. 北黄海冷水团温度年际变化研究. *海洋学报*, 2015, 37(1): 30–42]
- Liu HM, Dong YH, Huo LH, *et al.* Acute toxicity of Cu^{2+} and its effects on antioxidant enzymes in *Sinonovacula constricta* juveniles. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, 19(1): 182–187 [刘浩明, 董迎辉, 霍礼辉, 等. Cu^{2+} 对缢蛏稚贝的急性毒性及对抗氧化酶活力和丙二醛含量的影响. *中国水产科学*, 2012, 19(1): 182–187]
- Liu Q, Song YY, Xing Y, *et al.* Effects of temperature and salinity on oxygen consumption rate and asphyxia point in copepod *Eurytemora affinis*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2012, 27(3): 205–209 [刘青, 宋莹莹, 邢勇, 等. 温度和盐度对近亲真宽水蚤耗氧率与窒息点的影响. *大连海洋大学学报*, 2012, 27(3): 205–209]
- Rico-Villa B, Pouvreau S, Robert R. Influence of food density and temperature on ingestion growth and settlement of Pacific oyster larvae *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 2009, 287(3–4): 395–401
- Shi SK, Wang RX, Wang JY, *et al.* Effects of salinity stress on immune factors of *Crassostrea hongkongensis*. *South China Fisheries Science*, 2013, 9(3): 26–30 [时少坤, 王瑞旋, 王江勇, 等. 盐度胁迫对近江牡蛎几种免疫因子的影响. *南方水产科学*, 2013, 9(3): 26–30]
- Sun XL, Xing KZ, Chen CX, *et al.* The effects of acute temperature stress on blood parameters in half-smooth tongue-sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Fisheries Science*, 2010, 29(7): 387–392 [孙学亮, 邢克智, 陈成勋, 等. 急性温度胁迫对半滑舌鳎血液指标的影响. *水产科学*, 2010, 29(7): 387–392]
- Tang XX, Zhang PY. Effects of anthracene on the active of Superoxide dismutase of *Gymnocorymbus ternetzi*. *Journal of Fisheries of China*, 2000, 24(3): 217–220 [唐学玺, 张培玉. 蒽对黑鲷超氧化物歧化酶活性的影响. *水产学报*, 2000, 24(3): 217–220]
- Verween A, Vincx M, Degraer S. The effect of temperature and salinity on the survival of *Mytilopsis leucophaea* larvae: The search for environmental limits. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2007, 348(1–2): 111–120
- Wang DL, Xun SL, You ZJ, Lin SZ. The effects of temperature and salinity on the incubation of *Cyclina sinensis* and survival growth and metamorphosis of *C. sinensis* larvae and juveniles. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, 29(5): 495–501
- Wang QL, Dong YW, Dong SL, *et al.* Effects of heat shock in pelagic stages on survival and Hsp70 expression of juvenile sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka. *Periodical of Ocean University of China*, 2011, 41(3): 47–51 [王青林, 董云伟, 董双林, 等. [高温刺激对刺参浮游期幼体存活 Hsp70 表达量的影响. *中国海洋大学学报*, 2011, 41(3): 47–51]
- Wang RC, Wang ZP, Zhang JZ. The cultivation of seawater shellfish. Qingdao: Qingdao Ocean University Press, 1993 [王如才, 王召平, 张建忠. 海水贝类养殖学. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1993]
- Wang S, Zhuang P, Zhang LZ, *et al.* Effects of salinity on survival, growth and antioxidant defense system of *Siganus guttatus*. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(1): 66–73 [王好, 庄平, 章龙珍, 等. 盐度对点篮子鱼的存活、生长抗氧化防御系统的影响. *水产学报*, 2011, 35(1): 66–73]
- Wang YQ, Zhao W, Cheng FJ, *et al.* Effects of body weight and temperature on oxygen consumption and ammonia excretion in clam *Macra chinensis*. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2009, 24(6): 544–548 [王雅倩, 赵文, 程芳晋, 等. 体重和温度对中国蛤蜊耗氧率及排氨率的影响. *大连水产学院学报*, 2009, 24(6): 544–548]
- Wen CG, Zhang LH, Hu BQ, *et al.* Effects of pH on the five immune factors of *Anodonta woodiana*. *Journal of Nanchang University*, 2009, 33(2): 172–176 [文春根, 张丽红, 胡宝庆, 等. pH 对背角无齿蚌 5 种免疫因子的影响. *南昌大学学报*, 2009, 33(2): 172–176]
- Wen YM, Gao RC, Wang S, *et al.* Effect of Cu^{2+} on the activities of immune enzyme and survival rate of *Coelomacra antiquate*. *Shandong Fisheries*, 2008, 25(4): 1–5 [温扬敏, 高如承, 王帅, 等. Cu^{2+} 对西施舌免疫酶活性及成活率的影响. *齐鲁渔业*, 2008, 25(4): 1–5]
- Winston GW. Oxidants and antioxidants in aquatic animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 1991, 100(1–2): 173–176
- Wu B, Yang AG, Sun XJ, *et al.* Effects of acute temperature stress on genome-wide DNA methylation profiles in *Patinopecten yessoensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(5): 140–146 [吴彪, 杨爱国, 孙秀俊, 等. 急性温度胁迫对虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)基因组 DNA 甲基化的影响. *渔业科学进展*, 2016, 37(5): 140–146]
- Yao CL, Wang WN, Wang AL. Progress of studies on superoxide dismutase in the body of aquatic animals. *Marine Sciences*, 2003, 27(10): 18–21 [姚翠鸾, 王维娜, 王安利. 水生动物体内超氧化物歧化酶的研究进展. *海洋科学*, 2003, 27(10): 18–21]
- You ZJ, Xun SL, Bian JP, *et al.* The effect of sea water temperature and salinity on the growth and survival of *Tegillarca granosa* larvae and juveniles. *Acta Oceanologica Sinica*, 2001, 23(6): 108–113
- Zhang PY, Tang XX, Dong SL. Effects of anthracene on differences of antioxidant enzymes activities and peroxide of membrane lipid of different tissues of *Crassostrea gigas*. *Marine Environmental Science*, 2007, 26(5): 434–437 [张培玉, 唐学玺, 董双林. 蒽对太平洋牡蛎不同组织抗氧化酶活性差异性影响与膜脂质过氧化研究. *海洋环境科学*, 2007, 26(5): 434–437]
- Zhou W, Xue ZF, Wang YJ, *et al.* The relation between the abnormal change of water temperature and the scallop death in Haiyang Island sea area. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 1992(4): 56–62 [周玮, 薛真福, 王有君, 等. 海洋岛海域水温异常波动与养殖栉孔扇贝死亡的关系. *海洋湖沼通报*, 1992(4): 56–62]

Effects of Temperature Fluctuation on Physiological and Immune Parameters of Scallop (*Patinopecten yessoensis*)

GAO Zhenkun^{1,2}, ZHANG Jihong^{2,3①}, LI Min^{1,2}, MA Sha^{1,2}, GUO Xiaoliang^{1,2},
JIANG Weiwei², LÜ Xūning²

(1. College of Fisheries and Life Science, 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. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071)

Abstract The influence of temperature fluctuation on physiological parameters and immune activity of three different sized scallop (*Patinopecten yessoensis*) was studied in this work. Temperature fluctuated in the range of 15-10-15°C, with increasing or decreasing 5°C per 2 h. Temperature was totally fluctuated four times in the experiment, which named as B1, B2, B3 and B4. Results showed that the mortality rates of big, medium and small sized *P. yessoensis* were 4%, 6% and 6%, respectively. The mortality rate of big sized *P. yessoensis* was relatively lower, and the mortality only appeared in B1 and B2. Oxygen consumption rates of three different sized scallop were lower at B1 than the initial value of B0. With temperature fluctuation, oxygen consumption rates gradually increased and then were higher than B0 in the end. Ammonium excretion rates (AER) decreased with temperature fluctuation, except B1 of the small sized scallop. For the big sized scallop, the AER in B3 was significantly lower than that in B0 ($P<0.05$), where for medium sized scallop, AER in B4 was significantly lower than that in B0 ($P<0.05$). Comparing with physiological parameters, the immune activities were more sensitive to temperature fluctuation. Activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) decreased significantly as the temperature fluctuated 1 or 2 times (ANOVA, $P<0.05$). In conclusion, the temperature fluctuation in optimum range had impact on the physiological parameters and immune activities of scallop *P. yessoensis* to a certain extent.

Key words *Patinopecten yessoensis*; Temperature fluctuation; Physiological parameter; Immune activity

① Corresponding author: ZHANG Jihong, E-mail: zhangjh@ysfri.ac.cn

食用海带(*Saccharina japonica*)新品系 遗传多样性研究*

姚海芹^{1,2} 刘福利^{2,3} 王飞久^{2①} 梁洲瑞²
汪文俊² 孙修涛² 李晓蕾^{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 为获取 3 个食用海带(*Saccharina japonica*)新品系(“海天 1 号”、“海天 2 号”、“海天 3 号”)和“黄官 1 号”海带的遗传多样性和遗传结构信息,为海带种质保存及新品系培育提供理论依据,本研究采用 SSR 分子标记技术,从 20 对 SSR 引物中筛选出 8 对扩增效果好的引物,对 4 个海带品系的 120 个样本进行了种群遗传分析。结果显示,8 对引物共检测到 28 个具有多态性的等位基因,9 个特异性等位基因,平均每对引物检测到等位基因数为 4.6250 个。4 个海带品系的 Nei's 基因多样性(H)和香农指数(I)平均值分别为 0.3809 和 0.6702,遗传多样性水平偏低,且亲缘关系较近。其中,“海天 1 号”海带的 H 、 I 值最高,多态性位点最多,遗传多样性优于其他 3 个海带品系。“海天 2 号”、“海天 3 号”和“黄官 1 号”海带遗传多样性水平依次降低。聚类分析结果显示,“海天 1 号”与“海天 3 号”海带亲缘关系最近,而与“黄官 1 号”海带亲缘关系最远。AMOVA 分析显示,4 个海带品系 92.06% 的变异来源于品系内部,7.94% 的变异来源于品系间。“黄官 1 号”海带的遗传多样性在 4 个海带品系中最低,以其作为亲本培育新品种时,应注意提高子代的遗传多样性。遗传多样性最高的是“海天 1 号”,可充分利用其优点培育优良的新品系。

关键词 海带;遗传多样性;SSR;聚类分析;AMOVA

中图分类号 Q943;S917 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2017)03-0155-08

海带(*Saccharina japonica*)是重要的经济褐藻,富含碘、褐藻胶和甘露醇等(刘福利等,2012),在食品加工、化工、医药等领域都有广泛的应用(李林等,2001)。自 20 世纪 50 年代起,我国就开展了海带遗传育种研究与应用的工作,先后培育出许多新品种(Liu *et al*, 2012a),在海带养殖的增产、增效中发挥了

重要作用。目前,海带仍存在种质退化、混杂、抗逆性差等问题(方宗熙,1963),影响着海带产业的可持续发展。因此,加强对海带品系间的遗传关系和群体遗传多样性研究意义重大。

分析海带遗传多样性的分子标记方法很多,如 RAPD(Random-amplified polymorphic DNA)标记,检

* 国家“863”子课题(2012AA10A406)、山东省科技发展计划(2013GHY11505)、山东省农业良种工程项目(抗逆功能性海带种质的基因开发与利用)和国家青年自然科学基金项目(41306176)共同资助[This work was supported by National High Technology Research and Development Program (2012AA10A406), the Development Program of Science and Technology of Shandong Province (2013GHY11505), Agricultural Seed Project of Shandong Province (The development and utilization of resistance gene functional of *Laminaria* germplasm), and National Natural Science Foundation of China (41306176)]. 姚海芹, E-mail: yaohaiqin19@163.com

① 通讯作者:王飞久,研究员, E-mail: wangfj@ysfri.ac.cn

收稿日期:2016-03-02, 收修改稿日期:2016-03-26

测速度快、DNA 用量少,但稳定性和重复性不高(夏鹏等, 2003; 周志刚等, 2003); AFLP(Amplified fragment length polymorphism)标记具有较高的稳定性、可用少量的引物短时间内检测大量的位点,但对基因组纯度和反应条件要求较高(Shan *et al.*, 2009; 张全胜等, 2008; 李世国等, 2009); ISSR(Inter-simple sequence repeat)标记实验操作简单、快速、高效,但需要时间摸索最适条件,且不能区分显性纯合和杂合基因型(Wang *et al.*, 2005)以及 SSR(Simple sequence repeat)等方法(罗兵等, 2013; 张荣良等, 2016)。RAPD、ISSR 和 AFLP 的标记引物属于通用引物,是非特异性标记。SSR 分子标记技术具有以下特点:共显性、特异性高(刘岩等, 2006; 石媛嫒等, 2008; 丛义周等, 2009¹⁾),能大大降低非目标生物的干扰;涵盖范围广、揭示多态性高。Gerber 等(2000)发现, AFLP 标记的多态性远远小于 SSR 标记的多态性;样本 DNA 的质量要求低、成本低。Chamberlain 等(1998)首次引入多重 PCR 技术,将 SSR 的稳定性与多重 PCR 的高通量特点相结合,大大提高了 SSR 分型效率,从而降低了遗传分析的时间与成本,另外,新一代测序技术的发展,也降低了微卫星位点的开发成本,开发出大量的微卫星标记(刘福利等, 2013; Song *et al.*, 2013)。据此,本研究采用 SSR 标记技术对食用海带新品系的遗传多样性进行分析。

“海天 1 号”、“海天 2 号”和“海天 3 号”海带是中国水产科学研究院黄海水产研究所与山东荣成寻山集团共同选育的 3 个食用海带新品系,具有产量高、耐高温、成熟较早等特点。其中,“海天 1 号”为北方高产海带与南方海带杂交获得,“海天 2 号”是“奔牛”紫外处理选育获得,“海天 3 号”是“黄官 1 号”紫外处理选育所得。为了解 4 个海带群体遗传多样性和遗传关系,本研究选用 SSR 分子标记,从 20 对引物中(Zhang *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2012b; Shi *et al.*, 2007)筛选出 8 对扩增效果较好的引物,对每个品系的 30 个样本进行分析评价,为海带品系的遗传关系和群体遗传多样性研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究用的“海天 1 号”、“海天 2 号”、“海天 3 号”和“黄官 1 号”4 个海带品系采自山东威海市荣成寻山集团青鱼滩养殖场,每个品系取 30 个个体(幼

孢子体长约 10 cm),做好标记后放入自封袋,用冰盒带回实验室。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 提取 采用天根植物基因组 DNA 提取试剂盒提取 4 个海带品系共 120 个样品的基因组 DNA。使用琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 的完整性和纯度,于-20℃冰箱保存备用。

1.2.2 微卫星引物筛选 随机取 4 个样品进行引物筛选,通过预实验筛选出多态性较高的引物进行正式的实验。PCR 反应体系为 10× Ex *Taq* Buffer 2.5 μl, dNTP(2.5 mmol/L)2 μl, Mix primer 1 μl, DNA 1 μl, Ex *Taq* 0.2 μl, H₂O 18.3 μl, 总体积 25 μl。PCR 反应程序为 95℃ 2 min, 95℃ 30 s, 56℃ 20 s, 72℃ 30 s, 25 个循环, 72℃ 5 min, 12℃ 保温。

1.2.3 数据统计和分析 用预实验筛选出的 8 对特异性、多态性较好的引物,对 120 个样本进行扩增、上机分型检测。将上机结果原始文件导入 Genemarker,选用 LIZ500 内标准进行数据分析,按位点导出峰图、Excel 位点信息表。

根据 Excel 原始数据,去除非特异性条带,对特异性条带片段大小的相关信息进行整理。记录每对引物所有片段的大小,形成原始数据表征阵。并使用 Convert 软件将其转换成特定的格式。

用软件 Popgen 32 对 4 个海带品系的遗传多样性进行评估,选择的参数包括香农指数(I),多态位点比率(P),等位基因数(N_a)和有效等位基因(N_e),Nei's 基因多样性指数(H),表观杂合度(H_o)和期望杂合度(H_e)等。

品系间的遗传分化用 Popgen 32 计算遗传进化系数(G_{st})和基因流(N_m);用 Mega 4.1 根据遗传距离采用 UPGMA(Unweighted pair group method with arithmetic mean)方法构建品系间的聚类分析图。使用 Arlequin version 3.11 对 4 个海带品系进行 AMOVA (Analysis of molecular variance)分析,计算遗传变异来源及品系间的遗传分化系数。

2 结果与分析

2.1 引物筛选

随机抽取 4 个海带样品的基因组 DNA,按照 SSR-PCR 反应体系进行筛选引物,结果见表 1。扩增出 2 个条带的引物有 SSR261、DQ978345、DQ978340、

1) Cong YZ. Germplasm analysis of Dongfang No.3 hybrid *Laminaria*. Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2009 [丛义周. 东方 3 号杂交海带种质分析. 中国农业科学院硕士研究生学位论文, 2009]

Unigene8756、Unigene15777, 扩增出 3 个条带的引物有 CS55、Unigene95068、Unigene17168, 其他引物只扩增出 1 个条带或条带比较弥散。选用扩增出 2 个或 3 个条带的这 8 对引物, 对 4 个品系的 120 个样本进行毛细管电泳, 部分 SSR 引物筛选的琼脂糖凝胶电泳结果和毛细管电泳结果分别见图 1 和图 2, 引物信息见表 2。

由图 2 可以看出, 引物 DQ978340 在“海天 1 号”的 4 个个体中的扩增结果显示其具有较好的多态性, 扩增的基因型分别为(362、377), (377、377), (368、368), (350、362), 多态性等位基因的片段大小分别为 350、362、368 和 377。这些等位基因的峰值较高且无杂峰, 具有较高的可信度。该引物与其他 7 对引物分型效果相

表 1 20 对引物筛选结果
Tab.1 Screening of twenty pair of published primers

引物名称 Primer name	片段 1 Fragment 1	片段 2 Fragment 2	片段 3 Fragment 3
CN468232	杂带 Nonspecific banding		
AW401303	杂带 Nonspecific banding		
SSR261	212	214	
DQ978345	238	240	
CN467174	杂带 Nonspecific banding		
CS55	266	287	289
CN467886	杂带 Nonspecific banding		
DQ978342	282		
SSR278	394		
DQ978340	361	377	
Unigene3299	119		
Unigene1084	156		
Unigene83950	119		
Unigene93270	141		
Unigene95068	154	157	160
Unigene8756	152	158	
Unigene15777	125	128	
Unigene17168	151	156	159

似, 均能较好地对不同海带品系进行遗传分析。

2.2 引物多态性和扩增结果

8 对引物的扩增结果见表 3。由表 3 可知, 8 对引物共检测出 37 个等位基因, 观察等位基因数为 2–8 个, 平均为 4.6250 个; 有效等位基因数为 1.1353–3.3431 个。其中, SSR261 观察等位基因、有效等位基因数最多分别为 8、3.3431 个, CSS55 观察等位基因、有效等位基因数最少分别为 2、1.1353 个。8 对 SSR 引物均具有多态性, Unigene15777、Unigene17168 和 Unigene8756 的多态率最好, 达到 100%, 最低的是 DQ978340 引物(42.86%), 几对引物的平均多态位点百分率是 77.86%。

8 对引物共扩增出 9 个特异性基因, 片段大小为 156–368 bp (表 4)。“海天 1 号”海带具有 6 个特异等位基因, 数目最多; “海天 2 号”和“黄官 1 号”分别具有 2 个和 1 个特异等位基因。由于本研究只选用了 8 对引物及每个品系的 30 个样本, 不能确切的说这些特异性基因专属于某个品系, 可通过选用更多的样品进行验证。

2.3 品系间的遗传分析

各品系的遗传参数见表 5, 4 个海带品系的等位基因(N_a)为 2.6250–3.6250, Nei's 基因多样性(H)为 0.2943–0.4705, 香农指数(I)为 0.5072–0.8583, 说明这 4 个海带品系的遗传多样性呈中等程度。其中, “海天 1 号”和“海天 2 号”海带的观察杂合度和期望杂合度较高; “黄官 1 号”海带的最低。“海天 1 号”海带的 Nei's 基因多样性(H)、香农指数(I)和多态性位点均最高, “黄官 1 号”对应的这 3 个参数最低。

由表 6 知, “海天 2 号”和“海天 3 号”海带的遗传距离最大为 0.9707, “海天 1 号”和“海天 3 号”海带的遗传相似系数最低, 为 0.0297。4 个海带品系间的遗传相似系数和遗传距离分别位于 0.8732–

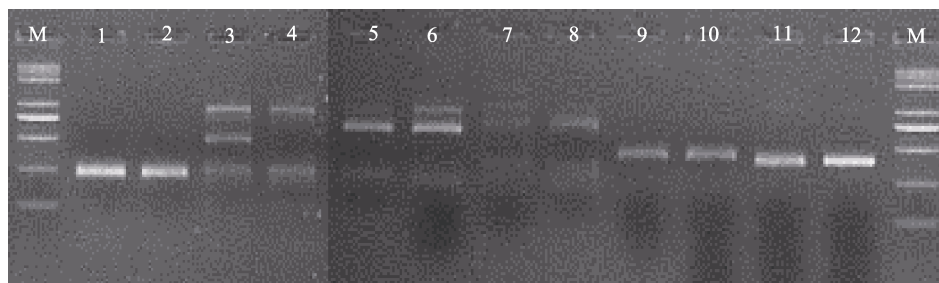


图 1 部分 SSR 引物预实验扩增结果

Fig.1 The results of pre-experiment amplification using partial SSR primers

M: DNA Marker; 1, 2: DQ978345; 3, 4: CS55; 5, 6: AW401303; 7, 8: CN468232; 9, 10: DQ98342; 11, 12: DQ978340

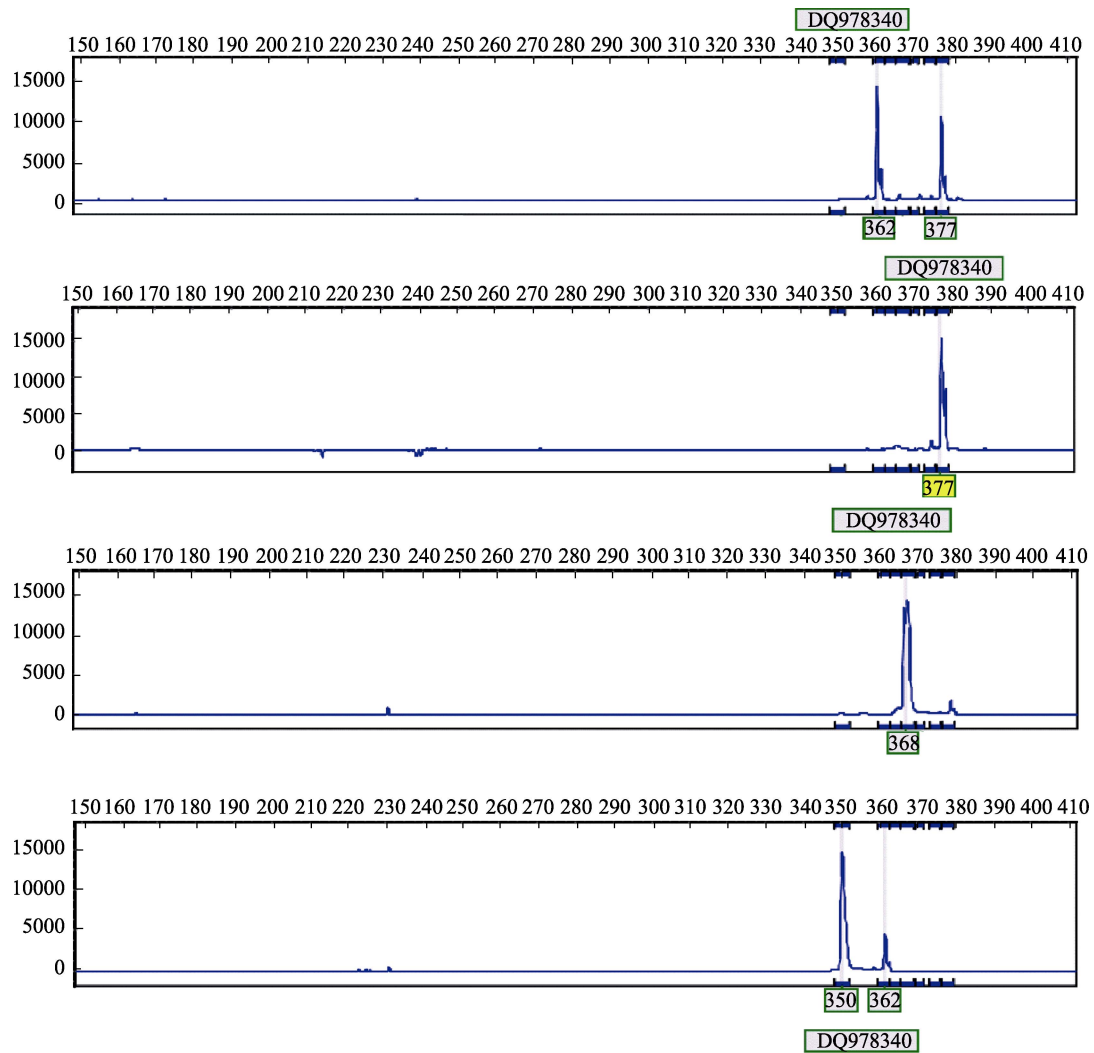


图 2 引物 DQ978340 在“海天 1 号”海带的 4 个个体中的扩增结果

Fig.2 Results of four individual *S.japonica* “Haitian No.1” amplified by primer DQ978340

表 2 8 对海带 SSR 引物特征

Tab.2 Characteristics of eight pairs of SSR primers of *S. japonica*

引物编号 Primer code	引物序列 Primer sequence (5'-3')	重复序列 Repetitive sequence	退火温度 Annealing temperature (°C)	片段大小 Fragment size (bp)
CS55	F: CTCTAAGGAGGACGTGACCAC R: CCGAACATGTCCAATGCC	(GAG) 7	56	280
DQ978340	F: TATCCCGTTCGTTCCACTC R: CGACCCTAATAAGCTCTACCT	(CAA)9	56	380
DQ978345	F: AAAAGGTGAAGGGATTCGTCG R: CTGAGCAGATTTATGTGGAGCG	(AC)9	56	240
SSR261	F: AGATGGAAGAAGACCTCG R: ACATGAACCAAACCTACAGT	(GA)23	56	226
Unigene15777	F: TTGGGAACAGGTAGCCAAC R: AGGGGTACCAGGAGAACTAGGAG	(CCT)11	56	129
Unigene17168	F: GAGATGACCTTTTACCCCTACGC R: GTGGTGCTGATCATAAACCAAG	(CCT)10	56	160
Unigene8756	F: CAAATCTCCTTTTCCATTGACAT R: CGGGGGTTAAATGAATAAAAATG	(GAG)7	56	156
Unigene95068	F: ATGTAAGTGTGACGCTCCTAGC R: CTCAACGCTACCTCCTCCTCT	(AGG)5	56	155

表 3 不同 SSR 位点的遗传参数

Tab.3 Genetic parameters of different SSR loci

引物 Primer	观察等位基因数 N_a Number of observed alleles	多态位点百分比 Percentage of polymorphic loci (%)	有效等位基因数 N_e Number of effective alleles	观察杂合度 H_o Observe heterozygosity	期望杂合度 H_e Expected heterozygosity	Nei's 基因多样性 指数 H Nei's gene diversity
CS55	2	50.00	1.1353	0.0000	0.1197	0.1192
DQ978340	5	80.00	2.2592	0.5598	0.5598	0.5574
DQ978345	7	42.86	1.9446	0.4174	0.4879	0.4857
SSR261	8	75.00	3.3431	0.9224	0.7039	0.7009
Unigene15777	4	100.00	2.5878	0.4583	0.6161	0.6136
Unigene17168	4	100.00	1.3485	0.2917	0.2590	0.2579
Unigene8756	3	100.00	1.4263	0.2069	0.3002	0.2989
Unigene95068	4	75.00	1.6708	0.4500	0.4032	0.4015

表 4 特异等位基因统计

Tab.4 Unique alleles in four cultivars of *S. japonica*

引物 Primer	片段大小 Fragment size (bp)	特异性标记所在品系 Cultivar with unique alleles
CS55	256	海天 1 号 Haitian No.1
DQ978340	368	海天 1 号 Haitian No.1
DQ978345	230	海天 1 号 Haitian No.1
DQ978345	232	海天 1 号 Haitian No.1
DQ978345	241	海天 2 号 Haitian No.2
DQ978345	242	黄官 1 号 Huangguan No.1
SSR261	210	海天 1 号 Haitian No.1
SSR261	218	海天 1 号 Haitian No.1
Unigene95068	156	黄官 1 号 Huangguan No.1

0.9707 和 0.0297–0.1356 范围内, 说明 4 个海带品系亲缘关系较近。根据品系间的遗传距离, 利用 UPGMA 法构建了 4 个海带品系的系统进化树(图 3)。4 个海带品系被分为 2 个大枝, “黄官 1 号”海带单独构成了 1 个分枝。另外 3 个海带品系又被分成了 2 枝, 其中, “海天 1 号”和“海天 3 号”为 1 个分枝, “海天 2 号”为另一分枝。

4 个海带品系间的基因分化系数(G_{st})值为 0.082, 基因流(N_m)为 2.797。表明 4 个海带品系的遗传分化程度较低, 但有一定的基因交流。AMOVA 分析表明, 7.13%的遗传变异存在于不同的品系间, 而 98.94%存在于品系内部(表 7), 品系间和品系内的遗传变异存在显著差异($P < 0.05$, 1000 次重复)。

表 5 4 个海带品系的遗传参数

Tab.5 Genetic parameters in four cultivars of *S. japonica*

遗传参数 Genetic parameters	海天 1 号 Haitian No.1	海天 2 号 Haitian No.2	海天 3 号 Haitian No.3	黄官 1 号 Huangguan No.1
观察等位基因数 N_a Number of observed alleles	3.6250	3.1250	2.6250	2.7500
有效等位基因数 N_e Number of effective alleles	2.1358	1.7959	1.8339	1.6351
观察杂合度 H_o Observe heterozygosity	0.4245	0.4780	0.4307	0.3720
期望杂合度 H_e Expected heterozygosity	0.4785	0.4044	0.3855	0.2998
Nei's 基因多样性 H Nei's gene diversity	0.4705	0.3976	0.3791	0.2943
多态性位点数 Nnumber of polymorphic	8.0000	7.0000	7.0000	6.0000
多态性位点比率 P Percentage of polymorphic loci (%)	100.0000	87.5000	87.5000	75.0000
香农指数 I Shannon Index	0.8583	0.6781	0.6372	0.5072

表 6 4 个海带品系的遗传相似系数(右上角)和遗传距离(左下角)

Tab.6 Nei's unbiased measures of genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) among four *S. japonica* cultivars

种源 Cultivar code	海天 1 号 Haitian No.1	海天 2 号 Haitian No.2	海天 3 号 Haitian No.3	黄官 1 号 Huangguan No.1
海天 1 号 Haitian No.1	****	0.9415	0.9707	0.9005
海天 2 号 Haitian No.2	0.0603	****	0.9654	0.8732
海天 3 号 Haitian No.3	0.0297	0.0352	****	0.9458
黄官 1 号 Huangguan No.1	0.1048	0.1356	0.0557	****

3 讨论

3.1 引物筛选

开发海带微卫星引物的研究已有较多报道, Billot 等(1998)用掌状海带(*Laminaria digitata*)基因组 DNA 开发出 10 个具有多态性的微卫星位点, 芮凤平(2013)¹⁾从海带转录组(EST-SSR)和基因组 DNA 中开发出 143 对具有多态性的引物。本研究从已开发的 SSR 引物中挑选了 20 对, 其中, 只有 8 对能够进行稳定的 PCR 扩增并具有清晰的条带。毛细管电泳结果显示, 8 对引物均具有较高的多态性, 其余的 12 对引物 PCR 扩增条带弥散, 无法进行等位基因的判读或多态性较低。主要原因可能包括海带 DNA 存在干扰 PCR 扩增反应的物质(Patwary *et al.*, 1994; Varela-Álvarez *et al.*, 2006)和海带微卫星引物区域变异较大, 产生基因逃逸(Buchan *et al.*, 2005; Hoffman *et al.*, 2005)。其次, 与物种个体间的差异和 PCR 扩增程序以及毛细管电泳等有关。如毛细管电泳检测结果较灵敏, 碱基的插入或缺失都会影响其结果的判定。

3.2 不同海带品系间的遗传多样性和遗传关系

与陆生作物相比, 海带育种经过长期的人工干预, 连续多代自交或近交, 某些重要的经济性状产生分离或丢失, 使其呈现较低的遗传多样性。通过分析发现, “海天 1 号”海带具有较高的遗传多样性, 而“黄官 1 号”海带的遗传多样性相对较低。另外, “黄官 1 号”海带的杂合度、Nei's 基因多样性和香

农指数均低于李涛等(2012)的研究结果。作者认为, 这主要是因为“黄官 1 号”海带是经过杂交后, 又经历多代自交选育而出, 在自交的过程中存在性状分离、基因丢失等现象。理论上, 随着时间的积累其杂合度呈下降趋势, 具有较低的遗传多样性。

通过对不同海带品系间的基因流、遗传距离以及相似系数的分析发现, 3 个海带新品系之间的遗传分化呈中等水平, 遗传相似系数最高达到 0.9707, 遗传距离最小为 0.0297。UPGMA 法构建的系统树结果显示, “海天 1 号”和“海天 3 号”海带亲缘性最近, 与“黄官 1 号”海带较远。“海天 3 号”是“黄官 1 号”紫外处理后自交获得, 理论上与“黄官 1 号”海带应具有较小的遗传距离和较高的遗传相似性。这说明, 紫外处理在一定程度上改变了“海天 3 号”海带的遗传物质, 使其表现出与“黄官 1 号”遗传物质上存在一定的变异。

AMOVA 分析表明, 4 个海带品系的变异主要来自品系内部, 来自品系间的变异仅占总变异的 7.94%, 说明这 4 个海带品系的亲缘关系较近。主要是因为选育过程中, 定向选择优良性状如高产、耐高温、高碘、高醇等, 使具有目标性状的个体在选育的过程中保留下来, 这也导致了遗传多样性降低(李涛等, 2012)。

物种遗传多样性是长期进化的产物, 是生物适应、生存、发展和进化的前提, 物种的遗传多样性越高或遗传变异越丰富, 对环境变化的适应能力就越强(刘坤等, 2013), 反之对环境的适应能力就会降低。

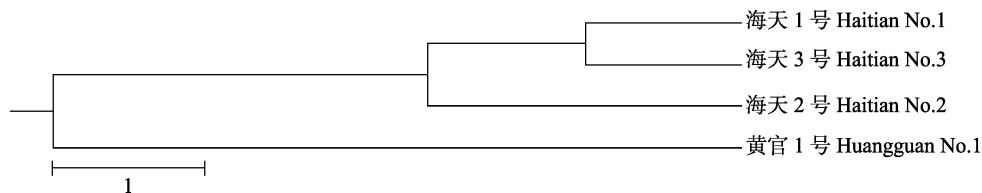


图 3 根据遗传距离采用 UPGMA 法构建的 4 个海带品系的系统进化树

Fig.3 Dendrogram of four cultivars of *S. japonica* by UPGMA clustering based on genetic distance

表 7 4 个海带品系的 AMOVA 分析
Tab.7 AMOVA analysis among and within four cultivars of *S. japonica*

变异的来源 Source of Variation	自由度 Degree of freedom	平方和 Sum of squares	变异组成成分 Variance components	变异率 Percentage of variation
品系间 Among populations	3	27.729	0.12911	7.94
品系内 Within individuals	236	353.167	1.49647	92.06
总变异 Total variation	239	380.896	1.62558	

1) Rui FP. Development of EST-SSR markers from *Saccharina japonica* and the study of the genetic diversity. Master's Thesis of Ocean University of China, 2013, 22-23 [芮凤平. 海带 EST-SSR 标记的开发及其遗传多样性研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2013, 22-23]

我国养殖的海带遗传多样性普遍较低, 种群基因多样性为 0.451, 香农指数在 0.18–0.55 之间(王莹等, 1999), 本研究中的 3 个海带的遗传多样性也在这一范围内。通过分析与评价, 对 4 个海带品系的遗传多样性有了一定的了解, 也为将来海带种质创新、杂交亲本选择、保护种群遗传多样性等提供可靠的依据。

参 考 文 献

- Billot C, Rousvoal S, Estoup A, *et al.* Isolation and characterization of microsatellite markers in the nuclear genome of the brown algae *Laminaria digitata* (Phaeophyceae). *Molecular Ecology*, 1998, 7(12): 1778–1780
- Buchan JC, Archie EA, van Horn RC, *et al.* Locus effects and sources of error in noninvasive genotyping. *Molecular Ecology Notes*, 2005, 5(3): 680–683
- Chamberlain JS, Gibbs RA, Rainer JE, *et al.* Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16(23): 11141–11156
- Fang ZX. Plant breeding in *Laminaria* and the basic principles. *Journal of Shandong College of Oceanology*, 1963(2): 109–119 [方宗熙. 从海带的遗传育种工作谈育种的一般原理. *山东海洋学院学报*, 1963(2): 109–119]
- Gerber S, Mariette S, Streiff R, *et al.* Comparison of microsatellites and amplified fragment length polymorphism markers for parentage analysis. *Molecular Ecology*, 2000, 9(8): 1037–1048
- Hoffman JI, Amos W. Microsatellite genotyping errors: Detection approaches, common sources and consequences for paternal exclusion. *Molecular Ecology*, 2005, 14(2): 599–612
- Li L, Luo Q, Zhang SH. Analysis on composition of fucoidin in *Laminaria japonica* Aresch. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2001, 1(1): 46–49 [李林, 罗琼, 张声华. 海带中褐藻糖胶的组成分析. *中国食品学报*, 2001, 1(1): 46–49]
- Li SG, Shan TF, Hou HS, *et al.* Genetic analyses of principal farmed cultivars of *Laminaria japonica* in China: AFLP analyses of selfbreeding F₁ of nine cultivars. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2009, 16(2): 214–220 [李世国, 单体锋, 侯和胜, 等. 9 个海带栽培品种自交系后代遗传多样性和亲缘关系的 AFLP 分析. *中国水产科学*, 2009, 16(2): 214–220]
- Li T, Liu FL, Wang FJ, *et al.* The genetic analysis and evaluate of *Saccharina Huanguan* No.1. *Journal of Qingdao Agricultural University (Natural Science)*, 2012, 29(3): 212–217 [李涛, 刘福利, 王飞久, 等. 黄官 1 号海带的遗传学分析与评价. *青岛农业大学学报(自然科学版)*, 2012, 29(3): 212–217]
- Li XJ, Liu JL, Cong YZ, *et al.* Breeding and trial cultivation of Dongfang No.3, a hybrid of *Laminaria* gametophyte clones with a more than intraspecific but less than interspecific relationship. *Aquaculture*, 2008, 280(1–4): 76–80
- Liu FL, Liu K, Wang FJ, *et al.* EST-SSR marker development and its application in population genetic diversity analysis of *Zostera marina*. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(4): 91–97 [刘福利, 刘坤, 王飞久, 等. 大叶藻 EST-SSR 标记开发及其在大叶藻群体遗传多样性研究中的应用. *渔业科学进展*, 2013, 34(4): 91–97]
- Liu FL, Wang FJ, Duan DL. EST-SSR markers derived from *Laminaria digitata* and its transferable application in *Saccharina japonica*. *Journal of Applied Phycology*, 2012a, 24(3): 501–505
- Liu FL, Wang FJ, Sun XT, *et al.* Molecular breeding and its research advances and prospects in *Laminaria japonica* breeding. *Marine Sciences*, 2012, 36(9): 128–134 [刘福利, 王飞久, 孙修涛, 等. 分子育种及其在海带育种中的研究进展. *海洋科学*, 2012, 36(9): 128–134]
- Liu FL, Yao JT, Wang XL, *et al.* Genetic diversity and structure within and between wild and cultivated *Saccharina japonica* (Laminariales, Phaeophyta) revealed by SSR markers. *Aquaculture*, 2012b, 358–359: 139–145
- Liu K, Liu FL, Wang FJ, *et al.* Analysis of genetic diversity and structure of *Zostera marina* populations in Shandong peninsula. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2013, 22(3): 334–340 [刘坤, 刘福利, 王飞久, 等. 山东半岛大叶藻不同地理种群遗传多样性和遗传结构分析. *上海海洋大学学报*, 2013, 22(3): 334–340]
- Liu Y, Cui JZ, Shen XY, *et al.* The application of DNA molecular marker technique to heritable breeding of *Laminaria*. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2006(1): 75–81 [刘岩, 崔建洲, 申雪艳, 等. DNA 分子标记技术在海带遗传育种研究中的应用. *海洋湖沼通报*, 2006(1): 75–81]
- Luo B, Sun HY, Xu GM, *et al.* Research progress of SSR molecular marker. *Journal of Anhui Agriculture Science*, 2013, 41(12): 5210–5212, 5246 [罗兵, 孙海燕, 徐港明, 等. SSR 分子标记研究进展. *安徽农业科学*, 2013, 41(12): 5210–5212, 5246]
- Patwary MU, van der Meer JP. Application of RAPD markers in an examination of heterosis in *Gelidium vagum* (Rhodophyta). *Journal of Phycology*, 1994, 30(1): 91–97
- Shan TF, Pang SJ. Assessing genetic identity of sporophytic offspring of the brown alga *Undaria pinnatifida* derived from mono-crossing of gametophyte clones by use of amplified fragment length polymorphism and microsatellite markers. *Phycological Research*, 2009, 57(1): 36–44
- Shi Y, Yang G, Liu Y, *et al.* Development of 18 polymorphic microsatellite DNA markers of *Laminaria japonica* (Phaeophyceae). *Molecular Ecology Notes*, 2007, 7(4): 620–622
- Shi YY, Yang GP, Liao MJ, *et al.* Comparative study on the microsatellite DNA polymorphism of the gametophytes of *L. japonica* and *L. longissima*. *Periodical of Ocean University of China*, 2008, 38(1): 303–308 [石媛媛, 杨官品, 廖梅杰, 等. 海带和长海带配子体无性繁殖系微卫星 DNA 多态性比较分析. *中国海洋大学学报*, 2008, 38(1): 303–308]
- Song SL, Lim PE, Phang SM, *et al.* Microsatellite markers from expressed sequence tags (ESTs) of seaweeds in differentiating various *Gracilaria* species. *Journal of Applied Phycology*, 2013, 25(3): 839–846
- Varela-Álvarez E, Andreakis N, Lago-Lestón A, *et al.* Genomic DNA isolation from green and brown algae (*Caulerpa* and *Fucales*) for microsatellite library construction. *Journal of Phycology*, 2006, 42(3): 741–745
- Wang XL, Liu CL, Li XJ, *et al.* Assessment of genetic diversities of selected *Laminaria* (Laminariales, Phaeophyta) gametophytes by inter-simple sequence repeat analysis. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2005, 47(6): 753–758
- Wang Y, Dai JX. Comparison of genetic diversity in *Laminaria japonica* gametophytes. *Chinese Biodiversity*, 1999, 7(3): 197–201 [王莹, 戴继勋. 海带(*Laminaria japonica*)丝状体

- 遗传多样性的比较研究. 生物多样性, 1999, 7(3): 197–201]
- Xia P, Yang YX, Liu SP, *et al.* Optimization of randomly amplified reaction conditions for gametophyte DNA of *Laminaria* “901” strain. *Marine Sciences*, 2003, 27(5): 22–26 [夏鹏, 杨迎霞, 刘升平, 等. 海带“901”配子体 DNA 随机扩增反应条件的优化. *海洋科学*, 2003, 27(5): 22–26]
- Zhang J, Li W, Qu JQ, *et al.* Development and characterization of microsatellite markers from an enriched genomic library of *Saccharina japonica*. *Journal of Applied Phycology*, 2015, 27(1): 479–487
- Zhang QS, Shi YY, Cong YZ, *et al.* AFLP analysis of the gametophyte clones derived from introduced *Laminaria* (Phaeophyta) and cultured varieties of China. *Periodical of Ocean University of China*, 2008, 38(3): 429–435 [张全胜, 石媛媛, 丛义周, 等. 我国引种海带和栽培品种(系)来源配子体克隆的 AFLP 分析. *中国海洋大学学报*, 2008, 38(3): 429–435]
- Zhang RL, Wang WJ, Feng YW, *et al.* Assessment of genetic variability and microsatellite analysis of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) after artificial selection of the shell width. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(4): 90–96 [张荣良, 王卫军, 冯艳微, 等. 长牡蛎(*Crassostrea gigas*)壳宽快速生长选育群体遗传多样性及遗传结构的微卫星标记分析. *渔业科学进展*, 2016, 37(4): 90–96]
- Zhou ZG, Shi XZ, Hu YJ, *et al.* Genetic relationship among brown seaweed *Laminaria longissima* and various cultivars of *L. japonica* in China revealed by isozyme and RAPD markers. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2003, 10(6): 474–480 [周志刚, 史西志, 胡远皆, 等. 中国不同养殖品系海带与长海带之间的遗传关系. *中国水产科学*, 2003, 10(6): 474–480]

(编辑 马瑾艳)

Study on Genetic Diversity of Four New *Saccharina japonica* Cultivars

YAO Haiqin^{1,2}, LIU Fuli^{2,3}, WANG Feijiu^{2①}, LIANG Zhourui²,
WANG Wenjun², SUN Xiutao², LI Xiaolei^{1,2}

(1. College of Fisheries and Life Science, 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. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071)

Abstract In order to provide reliable theoretical basis for high-efficiency utilization of *Saccharina japonica* germplasm resources in its breeding practice, the information of genetic diversity and structure of three new edible *S. japonica* cultivars (including “Haitian No.1”, “Haitian No.2” and “Haitian No.3”) and “Huangguan No.1” were explored in this study. We selected eight pairs of primers for the simple sequence repeat (SSR) molecular marker technique to test the genetic diversity of 120 samples of the four *S. japonica* cultivars. From 20 pairs of SSR primers published online, eight pairs were identified because of their good amplification patterns on the majority of 120 DNA templates. The results showed that 28 polymorphic alleles and 9 specific alleles were detected by eight SSR markers, and the average alleles per primers detected were about 4.6250. The Nei’s gene diversity (H) and the Shannon index (I) of the four *S. japonica* cultivars were 0.3809 and 0.6702, respectively. It indicated that the genetic diversity of the four *S. japonica* was relatively low and four species were genetically related. Among them, the Nei’s gene diversity (H), Shannon’s information index (I) and the number of polymorphic alleles were the highest in “Haitian No.1”. This indicated that the genetic diversity of *S. japonica* of “Haitian No.1” was higher than other three *S. japonica* cultivars. The levels of genetic diversity of “Haitian No.2”, “Haitian No.3” and “Huangguan No.1” decreased successively. Cluster analysis demonstrated that the relationship between “Haitian No.1” and “Haitian No.3” was close, but the relationship between “Haitian No.1” and “Huangguan No.1” was not. AMOVA analysis showed that about 92.06% of the variation was derived from individuals of the four *S. japonica* cultivars, and 7.94% of the variation was derived among the four *S. japonica* cultivars. The genetic diversity of “Huangguan No.1” was the lowest, suggesting the need of strengthening the biodiversity protection; the highest genetic diversity was the “Haitian No.1”, and could be used for developing new cultivars.

Key words *Saccharina japonica*; Genetic diversity; SSR; Cluster analysis; AMOVA

① Corresponding author: WANG Feijiu, E-mail: wangfj@ysfri.ac.cn

豆粕的坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*) 发酵工艺优化及其营养成分分析*



孙 静^{1,2} 宋晓玲¹ 黄 捷^{1①}

(1. 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 农业部海水养殖病害防治重点实验室 青岛市海水养殖流行病学与生物安保重点实验室 中国水产科学研究院 黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*) PC024 是一株分离自中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) 养殖环境,且能够提高对虾免疫力和抗病力的益生菌。本研究优化其发酵豆粕的工艺条件,单因素优化结果:最佳接种量为 2×10^6 CFU/g,最佳料水比为 1:0.8,最佳发酵时间为 90 h,最佳发酵温度为 37℃。在单因素实验结果的基础上,采用响应面法对 4 个因素进行了优化,最终确定最佳发酵条件:发酵温度为 39.0℃,发酵时间为 100 h 18 min,料水比为 1:0.96,接种量为 3.84×10^6 CFU/g。经此条件发酵后,发酵产物中的菌浓度可达 1.23×10^{10} CFU/g,验证值与预测值相差 5.13%,优化模型可靠。豆粕经发酵后发生感官变化,豆粕发酵的得率为 $(93.89 \pm 0.01)\%$,可溶性蛋白含量由发酵前的 $(39.16 \pm 0.01)\%$ 增加到 $(58.80 \pm 4.54)\%$,豆粕粗蛋白质由发酵前的 50.71% 增加到 55.03%,15 种氨基酸的总含量增加到原来的 132.30%,增加比例最大的 5 种为精氨酸(168.60%)、赖氨酸(157.20%)、丝氨酸(152.50%)、苏氨酸(139.04%)和甘氨酸(138.40%)。经 SDS-PAGE 显示,蛋白大分子得到有效降解。本研究可为益生菌的利用和对虾疾病防控提供新思路。

关键词 坚强芽孢杆菌; 响应面法; 豆粕; 固态发酵

中图分类号 S917.1 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2017)03-0163-09

配合饲料是对虾养殖中的主要食物来源,价格随着捕鱼量的减少和鱼粉价格上升而大幅增长。近年来,不断从植物中开发能够替代鱼粉的原料(Hardy, *et al* 1995; Cheng *et al*, 2013),在众多被考察的植物性饲料原料中,豆粕凭借其稳定的供给、合理的价格和丰富的营养成分,成为了最具潜力的鱼粉替代物(Lemos *et al*, 2000),在多种水产动物中已有豆粕替代鱼粉的研究,如大西洋鲑(*Salmo salar*)(Refstie *et al*,

1998)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)(Lim *et al*, 1990)、美洲龙虾(*Homarus americanus*)(Floreto *et al*, 2000)等。

豆粕含有多种抗营养因子(Rumsey *et al*, 1994; Anderson *et al*, 1995),氨基酸组成不平衡(Floreto *et al*, 2000),限制了豆粕替代鱼粉的量。豆粕经过微生物发酵后,具有较高的养分消化率和营养价值,如维生素 A 和 B (Kim *et al*, 1999)以及必需氨基酸(Weng *et al*,

* 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、青岛海洋科学与技术国家实验室鳌山科技创新计划(2015ASKJ02)和农业部科研杰出人才计划和创新团队专项经费共同资助[This work was supported by the Special Fund for Agro-Scientific Research in the Public Interest (201103034), China Agriculture Research System (CARS-47), the Special Foundation under the Construction Programme for Taishan Scholarship of Shandong Province of China, the Scientific and Technological Innovation Project Financially Supported by Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology (2015ASKJ02), and the Programme for Chinese Outstanding Talents in Agricultural Scientific Research]. 孙 静, E-mail: 18954296265@163.com

① 通讯作者:黄 捷,研究员, E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-02-26, 收修改稿日期: 2016-03-24

2010);能够有效去除抗营养因子,提高小肽含量(吴胜华等,2009)。柴鹏程等(2013)研究表明,在饲料中添加坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*)可显著提高凡纳滨对虾的免疫力。本研究采用的坚强芽孢杆菌PC024,是经抗病功能筛选得到的抗病微生物,添加到对虾饲料能有效提高对虾抗白斑综合征病毒(WSSV)感染的的能力,对注射WSSV的凡纳滨对虾的相对保护率可达33.7%(孙艳等,2013)。采用该菌种对豆粕进行发酵,有望获得具有提高对虾抗病力的发酵豆粕,同时改善豆粕的营养特征。

1 材料与方法

1.1 菌种

坚强芽孢杆菌PC024为中国水产科学研究院黄海水产研究所养殖生物疾病控制与分子病理学研究室于2010年3月28日从健康中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)养殖环境中分离(孙艳等,2013)。菌种经平板划线活化,挑取单菌落接入100 ml 2216E海水液体培养基,28℃、150 r/min过夜培养至菌浓度为 10^8 CFU/ml。

1.2 豆粕的平板浅层发酵

市售豆粕的蛋白含量为45%。在高速万能粉碎机中经25000 r/min粉碎1 min,过80目筛,于121℃高压灭菌20 min,50℃、12 h烘干。取5.00 g烘干的豆粕置于平皿中,加入适量无菌水,接种适量菌液,摊开成1.5 cm的薄层,于28℃恒温培养一定时间,取发酵产物测定其菌浓度。

1.3 菌浓度的测定

将发酵产物充分搅拌均匀,称取2.00 g于50 ml无菌离心管中,加磷酸盐缓冲液(PBS)至20 ml,超声波振荡25 min后取出,用装有PBS的1.5 ml无菌离心管中进行10倍梯度稀释,稀释到 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} 共3个梯度,取100 μ l涂布于2216E固体海水培养基,每个梯度涂3个平板,置于28℃恒温培养箱中过夜培养,24 h后进行平板菌落计数。

1.4 单因素实验

1.4.1 接种量单因素实验 采用平板浅层发酵,每个平皿装料量(灭菌烘干后豆粕粉)为5.00 g,料水比[豆粕质量(g)/无菌水体积(ml)]为1:0.6,加水4 ml,发酵温度为28℃,接种量设置 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 和 4×10^6 CFU/g共4个梯度,每个梯度设置3个平行,平板浅层发酵64 h后,取样稀释涂平板测定菌浓度。

1.4.2 料水比单因素实验 采用平板浅层发酵,每个平皿装料量(灭菌烘干后豆粕粉)为5.00 g,接种量为 2×10^6 CFU/g,发酵温度为28℃,料水比(1:n),n分别为0.4、0.5、0.6、0.7、0.8,每个梯度设置3个平行,平板浅层发酵64 h后,取样稀释涂平板测定菌浓度。

1.4.3 发酵时间单因素实验 采用平板浅层发酵,每个平皿装料量(灭菌烘干后豆粕粉)为5.00 g,接种量为 2×10^6 CFU/g,发酵温度为28℃,料水比为1:0.8,发酵时间分别设为24 h、42 h、48 h、66 h、72 h和90 h,每个梯度设置3个平行,取样稀释涂平板测定菌浓度。

1.4.4 发酵温度单因素实验 采用平板浅层发酵,每个平皿装料量(灭菌烘干后豆粕粉)为5.00 g,接种量为 2×10^6 CFU/g,料水比为1:0.8,设置4个实验组,每组3个平行,分别在28℃、32℃、37℃和42℃4个温度下发酵96 h后取样稀释涂布测定菌浓度。

1.5 响应面实验

根据Box-Behnken中心组合设计的原理(Saha *et al.*, 2011),对接种量、料水比、发酵时间、发酵温度4个影响因素进行四因素三水平响应面分析实验(Response surface methodology, RSM),以菌浓度为响应值,各因素及水平见表1。

表1 响应面优化的因素及水平设计
Tab.1 Factors and levels for response surface methodology

编号 Code	因素 Factor	水平 Level		
		-1	0	1
X ₁	发酵温度(℃) Fermentation temperature	30	37	44
X ₂	发酵时间(h) Fermentation time	66	96	126
X ₃	料水比 Ratio of SBM and water	0.6	0.8	1.0
X ₄	接种量($\times 10^6$ CFU/g) Inoculation amount	2	4	6

1.6 豆粕发酵得率及可溶性固形物含量的测定

称取100.00 g的豆粕6份,3份在105℃烘箱内经5-6 h烘干后取出,放入干燥器中冷却30 min,再重复烘干1 h,待2次称重差小于0.002 g,即为恒重状态,记录烘干后质量(n_1)。其余3份用于发酵,发酵条件采用最终优化的接种量、料水比、发酵时间和发酵温度,发酵产物采用相同烘干操作后称重(n_2)。

$$\text{豆粕发酵得率(\%)} = \frac{n_2}{n_1} \times 100\%$$

采用水溶法测定可溶性固形物含量:将粉碎过80目筛的豆粕粉末采用如上相同烘干操作。称取等

量干燥至恒重的2种豆粕粉末于烧杯中,加入100 ml水不断搅拌至均匀,采用布氏漏斗进行抽滤。将滤纸片和滤纸片上的不溶物放进烘箱烘干至恒重,冷却称量为 m_1 ,滤纸片称量为 m 。

豆粕中可溶性固形物含量(%)=

$$\frac{2.000-(m_1-m)}{2.000} \times 100\%$$

1.7 粗蛋白和氨基酸测量

豆粕和发酵豆粕中粗蛋白以及15种氨基酸经国家水产品质量检测中心测定,分别按照标准方法 GB/T 6432-1994 和 GB/T 18246-2000 进行测定。

1.8 豆粕和发酵豆粕的可溶性蛋白组成

称取粉碎烘干后的样品0.20 g,充分溶解于5 ml PBS中,4℃条件下4000 r/min离心10 min,采用Pierce BCA蛋白定量分析试剂盒测定上清液的蛋白浓度,加PBS稀释到同一浓度,用于SDS-PAGE分析。可溶性蛋白的分析采用欧阳亮等(2008)的方法:取上清液40 μl,加入10 μl 5×上样缓冲液,沸水浴3 min后取出冷却即为液体样品。采用15%的下胶和5%的上胶,70 V电泳30 min,待样品进入分离胶后,将电压调至110 V。采用考马斯亮蓝R250染色液染色1 h,脱色过夜至蛋白质区带清晰。

1.9 统计分析

响应面实验设计及结果分析采用 Design-Expert 8.0.5b 软件,采用 SPSS 16.0 软件进行数据分析和统计,单因素方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 作为差异显著水平。

2 结果与分析

2.1 豆粕发酵前后的状态和感官变化

豆粕发酵前呈浅黄色,松散状粉末,有淡淡的豆腥味;经平板浅层发酵后,随着发酵时间的延长,豆粕黏着性增加,颜色变得更深,逐渐呈现为褐色,散发出浓烈的豆豉香味,略带酸味。

2.2 单因素实验结果分析

2.2.1 接种量对菌浓度的影响 不同接种量组豆粕中,坚强芽孢杆菌数在 3.15×10^9 – 5.33×10^9 CFU/g之间,从平均值来看,最佳接种量为 2×10^6 CFU/g,且各组间差异不显著($P > 0.05$)(图1-A)。

2.2.2 料水比对菌浓度的影响 不同料水比组豆粕中坚强芽孢杆菌数在 4.76×10^6 – 1.76×10^{10} CFU/g之

间,最佳料水比为1:0.8,且各组间差异显著($P < 0.05$)(图1-B)。

2.2.3 发酵时间对菌浓度的影响 不同发酵时间组豆粕中,坚强芽孢杆菌数在 1.05×10^9 – 2.36×10^{10} CFU/g之间,从平均值来看,最佳发酵时间为90 h,并且90 h和24 h发酵豆粕中菌浓度与其他发酵时间组具有显著性差异($P < 0.05$),42 h与48 h之间无显著性差异($P > 0.05$),但二者与其他发酵时间组均具有显著性差异($P < 0.05$),66 h与72 h组之间也无显著性差异($P > 0.05$),但与其他组均具有显著性差异($P < 0.05$)(图1-C)。

2.2.4 发酵温度对菌浓度的影响 不同发酵温度组豆粕中,坚强芽孢杆菌数在 1.12×10^{10} – 2.82×10^{10} CFU/g之间,从平均值来看,最佳发酵温度为37℃,并且37℃发酵温度下菌浓度与其他各发酵温度组具有显著性差异($P < 0.05$),28℃与32℃之间无显著性差异($P > 0.05$),但二者与其他发酵时间组均具有显著性差异($P < 0.05$),42℃发酵温度与其他组均具有显著性差异($P < 0.05$)(图1-D)。

2.3 响应面实验

2.3.1 响应面实验设计组及结果 选取发酵温度(X_1)、发酵时间(X_2)、料水比(X_3)和接种量(X_4)为自变量,发酵产物的菌浓度(Y)为响应值,响应面法实验设计方案及结果见表2。

2.3.2 多元二次回归方程的建立及显著性检验 使用 Design-Expert 8.0.5b 软件对实验结果进行多元回归拟合,从而得到总芽孢杆菌浓度(Y)与发酵温度(X_1)、发酵时间(X_2)、料水比(X_3)、接种量(X_4)之间的二次多元回归模型:

$$Y = -178.80227 + 5.45219X_1 + 0.31789X_2 + 113.15821X_3 + 7.26961X_4 + 0.00692857X_1X_2 + 0.68214X_1X_3 - 0.033929X_1X_4 - 0.085417X_2X_3 - 0.00520833X_2X_4 - 1.45000X_3X_4 - 0.085643X_1^2 - 0.00242111X_2^2 - 65.31875X_3^2 - 0.52444X_4^2$$

回归方程方差分析见表3,由表3可知,该模型的 $P < 0.0001$,表明模型极显著,且失拟项为0.1407,不显著,从而说明方程对实验的拟合较好。模型中一次项 X_3 和二次项 X_1^2 、 X_3^2 差异极显著,一次项 X_1 和二次项 X_2^2 、 X_4^2 差异高度显著。在所选取的因素水平范围内,各因素对结果的影响排序为 $X_3 > X_1 > X_2 > X_4$ 。

2.3.3 相应曲面分析 通过 Design-Expert 8.0.5b 软件对实验结果进行处理,得到响应曲面图(图2)。三维曲面图直接反映了各因素对芽孢杆菌发酵浓度的影响,位点越凸表示响应值越大。

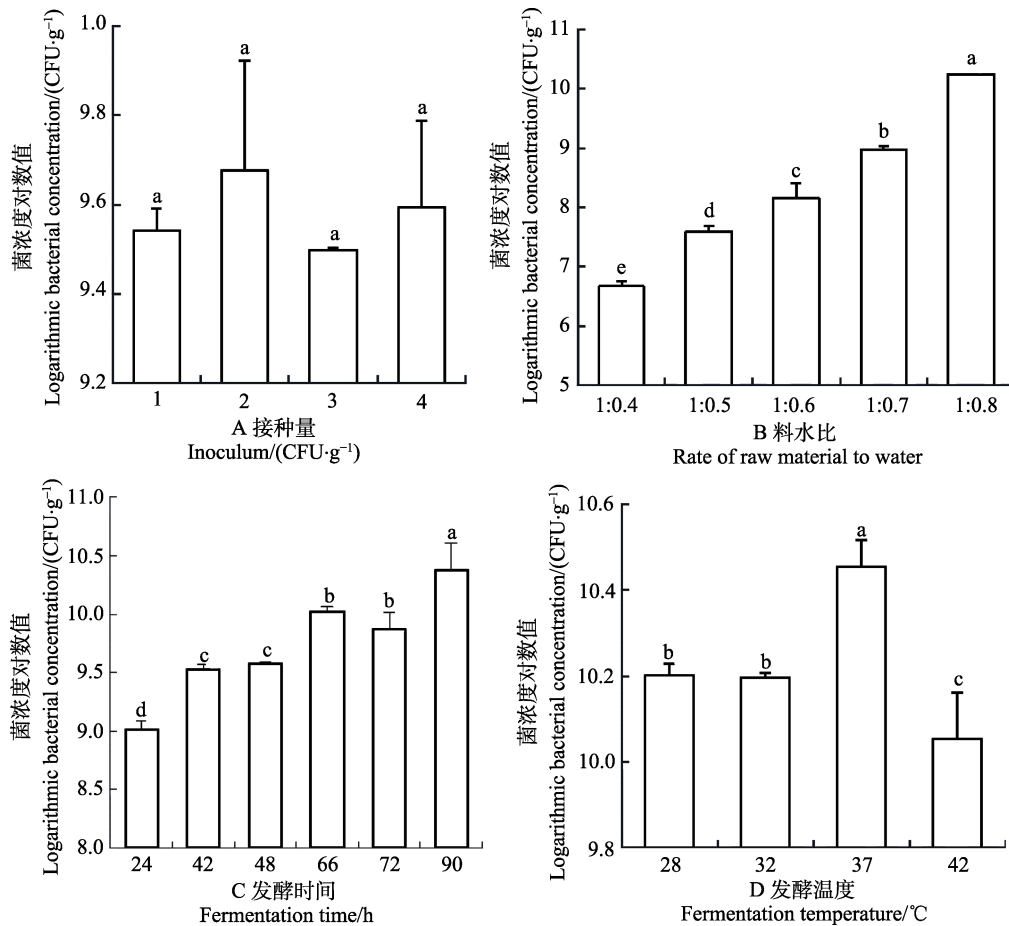


图 1 不同因素对发酵后豆粕中菌浓度的影响

Fig.1 Effects of four factors on bacterial concentration in fermented soybean meal

相同字母代表差异不显著($P>0.05$), 不同字母代表差异显著($P<0.05$)

Same letter indicated no significant difference ($P>0.05$), different letters indicated significant differences ($P<0.05$)

表 2 响应面设计及实验结果
Tab.2 Experimental design and results of RSM

实验号 No.	X_1	X_2	X_3	X_4	$Y(\times 10^9 \text{ CFU/g})$	实验号 No.	X_1	X_2	X_3	X_4	$Y(\times 10^9 \text{ CFU/g})$
1	0	-1	0	1	6.40	16	1	0	0	1	5.10
2	0	1	-1	0	0.43	17	0	1	0	1	7.75
3	-1	1	0	0	2.33	18	-1	0	0	1	2.43
4	0	0	0	0	10.25	19	0	-1	0	-1	3.68
5	0	0	0	0	10.65	20	1	1	0	0	7.65
6	0	0	-1	1	0.38	21	0	1	0	-1	6.28
7	0	0	0	0	8.30	22	-1	-1	0	0	1.95
8	1	-1	0	0	1.45	23	0	0	0	0	9.96
9	0	-1	-1	0	1.03	24	0	0	1	-1	10.80
10	0	-1	1	0	10.23	25	0	0	1	1	8.55
11	0	1	1	0	7.58	26	0	0	0	0	10.23
12	0	0	-1	-1	0.31	27	-1	0	0	-1	0.58
13	1	0	1	0	8.60	28	-1	0	-1	0	0.30
14	1	0	-1	0	0.33	29	-1	0	1	0	4.75
15	1	0	0	-1	5.15						

Y: 发酵后豆粕中**芽孢杆菌** PC024 的浓度

Y: Concentrations of the *B. firmus* PC024 in the fermented soybean meal

表3 方差分析
Tab.3 Analysis of variance (ANOVA)

变异来源 Sources of variation	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方差 Mean square error	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
模型 Model	382.48	14	27.32	12.88	< 0.0001	***
X ₁	21.17	1	21.17	9.98	0.0070	**
X ₂	4.42	1	4.42	2.08	0.1710	
X ₃	189.85	1	189.85	89.50	< 0.0001	***
X ₄	1.21	1	1.21	0.57	0.4627	
X ₁ X ₂	8.47	1	8.47	3.99	0.0655	
X ₁ X ₃	3.65	1	3.65	1.72	0.2108	
X ₁ X ₄	0.90	1	0.90	0.43	0.5248	
X ₂ X ₃	1.05	1	1.05	0.50	0.4931	
X ₂ X ₄	0.39	1	0.39	0.18	0.6744	
X ₃ X ₄	1.35	1	1.35	0.63	0.4391	
X ₁ ²	114.23	1	114.23	53.85	< 0.0001	***
X ₂ ²	30.80	1	30.80	14.52	0.0019	**
X ₃ ²	44.28	1	44.28	20.87	0.0004	***
X ₄ ²	28.54	1	28.54	13.46	0.0025	**
残差 Residual	29.70	14	2.12			
失拟项 Loss of quasi item	26.34	10	2.63	3.14	0.1407	
纯误差 Pure error	3.36	4	0.84			
总变异 Total variation	412.17	28				

***为差异极显著($P < 0.001$); **为差异高度显著($P < 0.01$)

***: Extremely significant differences ($P < 0.001$); **: Highly significant differences ($P < 0.01$)

发酵温度、发酵时间、料水比和接种量四因素两两之间均与豆粕发酵后产物中芽孢杆菌浓度呈抛物线型关系(图 2), 并且存在极大值点, 回归方程中的所有二次项 $P > 0.05$, 两两因素之间的交互作用不显著; 当发酵温度为 39.0℃、发酵时间为 100 h 18 min、料水比为 1 : 0.96、接种量为 3.84×10^6 CFU/g 时得到极大值点。

2.3.4 验证实验 采用上述结果所得的坚强芽孢杆菌 PC024 发酵豆粕的最佳条件(发酵温度为 39.0℃、发酵时间为 100 h 18 min、料水比为 1 : 0.96、接种量为 3.84×10^6 CFU/g)进行发酵, 设置 3 个平行, 发酵后, 菌浓度分别为 1.22×10^{10} CFU/g、 1.38×10^{10} CFU/g、 1.10×10^{10} CFU/g, 均值为 1.23×10^{10} CFU/g, 与预测值 1.17×10^{10} CFU/g 十分接近, 误差仅为 5.13%, 说明响应面法分析所得的优化模型是可靠的。

2.4 豆粕发酵得率及可溶性固形物含量测定

豆粕为细菌的生长繁殖提供多种有机物、蛋白质和糖类等, 微生物在繁殖过程即发酵豆粕的过程中产生蛋白酶等降解大分子蛋白, 去除抗营养因子, 但同时也将一部分营养物质转化成了 CO₂ 和水分释放到外界。等质量的豆粕发酵前烘干至恒重 n_1 为 (91.60±1.43) g, 采用上述条件发酵 100 h 18 min 后,

产物烘干至恒重 n_2 为(86.00±0.57) g, 豆粕发酵的得率为(93.89±0.01)%。

可溶性固形物含量的变化能够反映微生物发酵豆粕的能力, 发酵后可溶性固形物含量越高, 越利于养殖动物的消化吸收。豆粕经芽孢杆菌 PC024 发酵后, 可溶性固形物含量有了明显提高, 由发酵前的 (39.16±0.01)% 增加到 (58.80±4.54)%。芽孢杆菌在发酵过程中分泌一些酶类作用于豆粕, 蛋白质和碳水化合物等大分子物质得到不同程度的降解, 可望提高豆粕的消化和吸收利用率。

测定豆粕发酵前后的粗蛋白含量, 结果显示, 豆粕经过发酵, 粗蛋白增加到原有的 108.50%, 结合发酵得率可知, 100.00 g 豆粕经发酵得到 93.89 g 发酵产物, 其中, 蛋白质由发酵前的 50.71 g 增加到 51.67 g。

测定豆粕发酵前后的 15 种氨基酸含量, 结果显示(表 4), 发酵后各种氨基酸比例均有所增加, 15 种氨基酸的总含量增加到原来的 132.30%, 与原来氨基酸含量相比, 增加比例最大的 5 种氨基酸为精氨酸(168.60%)、赖氨酸(157.20%)、丝氨酸(152.50%)、苏氨酸(139.04%)和甘氨酸(138.40%)。其中, 6 种必需氨基酸(赖氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、亮氨酸和缬氨酸)的含量平均增加到原来的 133.20%。

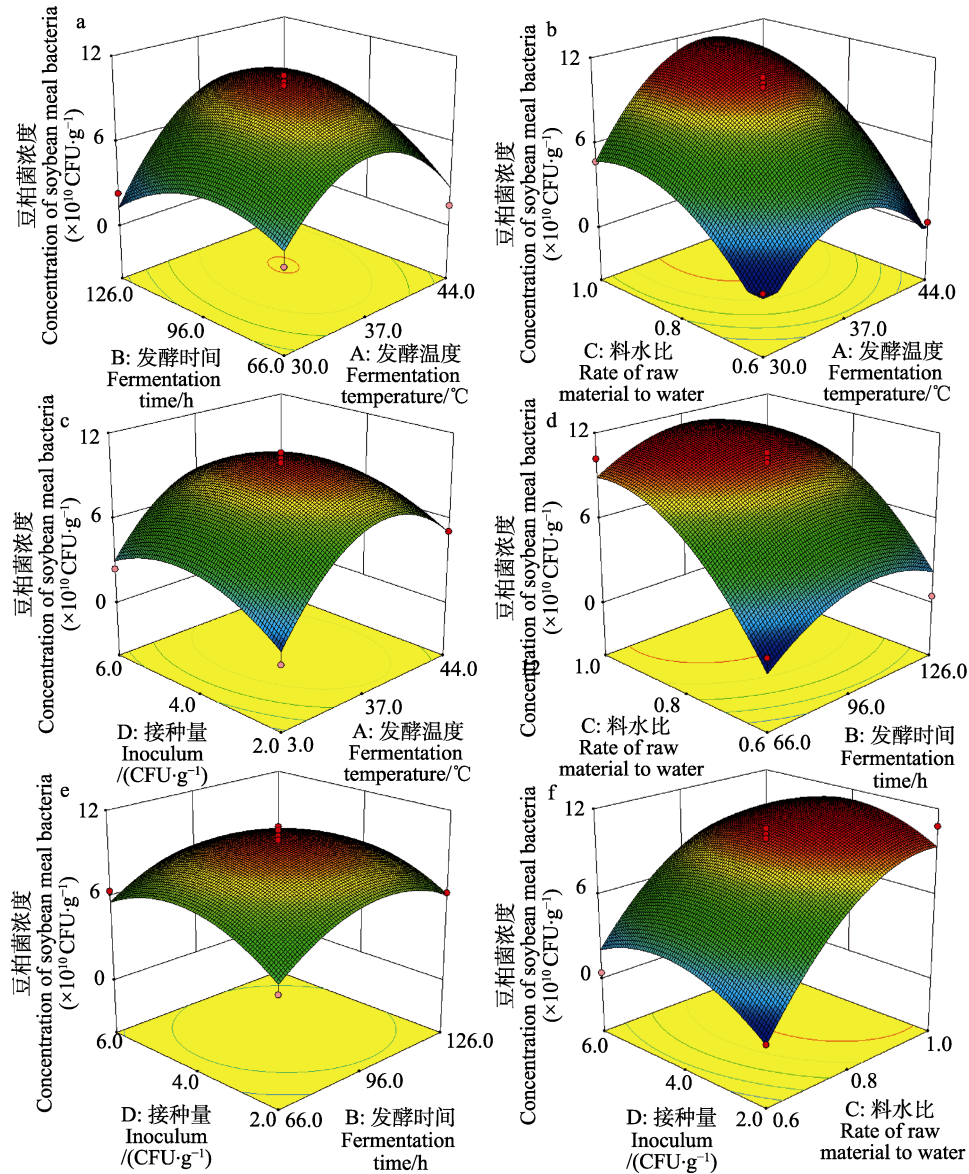


图 2 不同因素对豆粕菌浓度响应值的影响

Fig.2 The influence of four factors on the response value of soybean meal bacteria concentration

2.5 SDS-PAGE 分析

比较发酵前后豆粕的 SDS-PAGE (图 3), 结果显示, 发酵前豆粕可溶性蛋白带较多, 而且多数集中在 35 kDa 以上, 发酵之后, 豆粕中分子量在 35 kDa 以上的大分子蛋白大部分被降解, 蛋白带出现在 20–30 kDa 之间, 表明坚强芽孢杆菌 PC024 的发酵豆粕, 能够使其中的蛋白质发生降解。

3 讨论

近年来, 益生菌在水产养殖中的应用越来越广泛, 取得了很好的养殖防病效果, 大大降低了抗生素的使用。芽孢杆菌属具有对热、pH 和盐等耐受性高的生理特性, 在豆粕发酵的应用中倍受青睐。马文强

等(2008)利用枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、乳酸菌(*Lactic acid bacteria*)、酿酒酵母菌(*Brewing yeast*)发酵豆粕, 豆粕中的胰蛋白酶抑制因子和其他抗营养因子得到了有效消除。吴胜华等(2008)利用枯草芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*, Frankland)、植物乳酸菌和酵母菌两两结合固态发酵豆粕, 发现用枯草芽孢杆菌和植物乳酸菌混菌发酵时, 产物中小肽含量达到 12.01%。戚薇等(2008)采用纳豆芽孢杆菌(*Bacillus natto*)、凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*) TQ33 固态发酵豆粕, 胰蛋白酶抑制剂因子 TI 降解率高达 95%。除此之外, 芽孢杆菌是一类能够提高对虾的抗病力的益生菌, Rengpipat 等(2003)将芽孢杆菌 S11 作为饲料补充剂投喂斑节对虾(*Penaeus monodon*), 不仅提高了对虾的生长率, 而且对虾抵抗发光细菌鳃弧菌(*Vibrio*

表 4 豆粕和发酵豆粕中 15 种氨基酸的组成

Tab.4 Amino acid composition of soybean meal and fermented soybean meal (%)

氨基酸 Amino acids	豆粕 Soybean meal	发酵豆粕 Fermented soybean meal
天门冬氨酸 Asp	3.85	5.22
苏氨酸 Thr	1.46	2.03
丝氨酸 Ser	2.23	3.40
谷氨酸 Glu	3.70	3.84
甘氨酸 Gly	2.16	2.99
丙氨酸 Ala	3.46	4.20
缬氨酸 Val	3.69	4.38
异亮氨酸 Ile	1.68	2.32
亮氨酸 Leu	3.12	4.22
酪氨酸 Tyr	1.42	1.79
苯丙氨酸 Phe	2.18	2.72
赖氨酸 Lys	2.01	3.16
组氨酸 His	1.49	1.90
精氨酸 Arg	2.39	4.03
脯氨酸 Pro	1.13	1.38
总计 Total	35.97	47.59

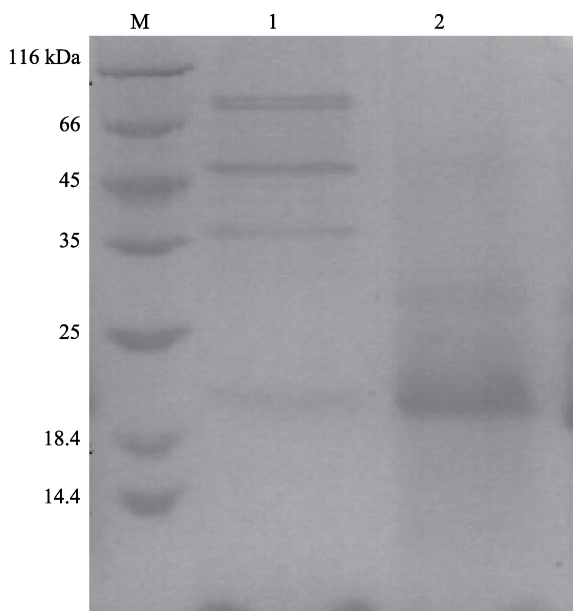


图 3 豆粕发酵前后的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of soybean meal and fermented soybean meal

M: 蛋白分子量标准; 1: 豆粕; 2: 发酵豆粕
M: Protein marker; 1: Soybean meal;
2: Fermented soybean meal

anguillarum)的能力也得以增强。Li 等(2009)将芽孢杆菌 OJ 添加到饲料中也能够提高凡纳滨对虾抵抗 WSSV 的能力。本研究采用经过安全性实验和免疫实验验证的坚强芽孢杆菌 PC024(孙艳等, 2013)对豆粕进行发酵, 将坚强芽孢杆菌 PC024 在发酵产物中的浓

度作为评价发酵工艺的优化指标。

人们关注并研究发酵豆粕, 目的是通过发酵这种温和的生物技术解决豆粕抗营养因子含量高的问题, 减轻和消除对动物消化和吸收的不利影响, 降低胰蛋白酶抑制因子含量(吴胜华等, 2009), 减轻对蛋白质消化和利用的阻碍; 提高肽含量(吴胜华等, 2008; 何勇锦等, 2011)、肽转化率(吴宝昌等, 2010)和水解度(姚小飞等, 2010)等, 使豆粕具有更好的溶解性, 在动物体内小肽更容易被吸收, 转化利用率高; 提高蛋白质含量(何勇锦等, 2011; 胡瑞等, 2013), 使氨基酸组成更加平衡合理。本研究旨在建立一种高效可行又经济实用的抗病微生物在饲料中的添加技术, 首先对坚强芽孢杆菌 PC024 发酵豆粕的发酵因素进行优化, 该菌株首次作为发酵菌种应用到发酵豆粕中, 各发酵参数不明, 故参考其他菌种发酵因素进行发酵温度、时间、接种量和料水比的优化。结果显示, 该菌能够充分利用豆粕中的营养成分, 并在发酵过程中迅速繁殖, 发酵约 100 h 的菌浓度可达到 10^{10} CFU/g, 不仅能够起到降解豆粕大分子蛋白的作用, 而且能提高豆粕可溶性成分及粗蛋白的含量, 这与 Teng 等(2012)用枯草芽孢杆菌 BS102 和米曲霉(*Aspergillus oryzae*) AO3042 发酵豆粕后粗蛋白和可溶性蛋白含量提高的结果相符。Weng 等(2010)研究发现: 豆粕经发酵 36 h 后的半胱氨酸含量减少 22%, 所有的氨基酸含量减少 46%以上, 其中, 谷氨酸和丝氨酸下降 71%; 当豆粕发酵 48 h 时, 大多数必需氨基酸除组氨酸外含量均显著增加, 其中, 缬氨酸增加 93.60%, 甘氨酸增加 50%。这与本研究结果不同, 本研究豆粕发酵前测定的 6 种必需氨基酸中含量最高的是缬氨酸, 其次是亮氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、异亮氨酸和苏氨酸; 非必需氨基酸含量最高的是天门冬氨酸, 其次是谷氨酸、丙氨酸、精氨酸、丝氨酸、甘氨酸、组氨酸、酪氨酸和脯氨酸, 经过约 100 h 的发酵后, 15 种氨基酸比例均有所增加。推断发酵约 100 h 增加了豆粕的营养价值和功能。

本研究采用的芽孢杆菌 PC024 在豆粕发酵过程中生长快速, 提高豆粕可溶性成分及粗蛋白含量, 降解豆粕大分子蛋白, 提高必需氨基酸含量, 这些指标均对发酵豆粕作为水生动物饲料原料提高豆粕营养利用率十分有利, 为获得具有提高对虾抗病力的发酵豆粕, 同时改善豆粕的营养特征提供了可能。

参 考 文 献

Anderson RL, Wolf WJ. Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to

- soybean processing. *Journal of Nutrition*, 1995, 125(3 Supplement): 581S–588S
- Chai PC, Song XL. Effects of *Bacillus* PC465 added in feed on the grow rate and expression of STAT gene of *Litopenaeus vannamei*. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(3): 97–103 [柴鹏程, 宋晓玲. 饲料中添加芽孢杆菌 PC465 对凡纳滨对虾生长和 STAT 基因表达的影响. *渔业科学进展*, 2013, 34(3): 97–103]
- Cheng W, Chiu CS, Guu YK, *et al.* Expression of recombinant phytase of *Bacillus subtilis* E20 in *Escherichia coli* HMS 174 and improving the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, juveniles by using phytase-pretreated soybean meal-containing diet. *Aquaculture Nutrition*, 2013, 19(2): 117–127
- Floreto EA, Bayer RC, Brown PB. The effects of soybean-based diets, with and without amino acid supplementation, on growth and biochemical composition of juvenile American lobster, *Homarus americanus*. *Aquaculture*, 2000, 189(3–4): 211–235
- Hardy RW, Lim C, Sessa DJ. Current issues in salmonid nutrition. *Nutrition and Utilization Technology in Aquaculture*, 1995: 26–35
- He YJ, Wu MQ, Cai CY, *et al.* Study on the production of new protein feeds by fermentation of soybean meal power of *Bacillus subtilis* KJ. *Journal of Yunnan University of Nationalities (Natural Sciences Edition)*, 2011, 20(6): 462–465, 475 [何勇锦, 吴美琼, 蔡聪育, 等. 枯草芽孢杆菌 KJ 发酵豆粕制备新型蛋白肽饲料的研究. *云南民族大学学报(自然科学版)*, 2011, 20(6): 462–465, 475]
- Hu R, Chen Y, Wang ZS, *et al.* Optimization of process parameters of probiotics-fermented soybean meal and effects of coordination action between compound probiotics and enzyme on fermentation quality. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2013, 25(8): 1896–1903 [胡瑞, 陈艳, 王之盛, 等. 复合益生菌发酵豆粕生产工艺参数的优化及酶菌联合发酵对豆粕品质的影响. *动物营养学报*, 2013, 25(8): 1896–1903]
- Kim BN, Yang JL, Song YS. Physiological functions of chungkukjang. *Food Industry and Nutrition*, 1999, 4: 40–46
- Lemos D, Ezquerro JM, Garcia-Carreño FI. Protein digestion in penaeid shrimp: Digestive proteinases, proteinase inhibitors and feed digestibility. *Aquaculture*, 2000, 186(1–2): 89–105
- Li J, Tan B, Mai K. Dietary probiotic *Bacillus* OJ and isomaltooligosaccharides influence the intestine microbial populations, immune responses and resistance to white spot syndrome virus in shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 2009, 291(1–2): 35–40
- Lim C, Dominy W. Evaluation of soybean meal as a replacement for marine animal protein in diets for shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*, 1990, 87(1): 53–63
- Ma WQ, Feng J, Liu X. Nutritional characteristics of microbe fermented soybean meal. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2008, 23(1): 121–124 [马文强, 冯杰, 刘欣. 微生物发酵豆粕营养特性研究. *中国粮油学报*, 2008, 23(1): 121–124]
- Ouyang L, Li L, Cai YF. Study on the anti-nutritional factors in soybean meal using vertical SDS-PAGE analysis. *Feed Industry*, 2008, 29(21): 43–45 [欧阳亮, 李亮, 蔡源锋. 垂直型 SDS-PAGE 分析发酵豆粕中蛋白类抗营养因子的研究. *饲料工业*, 2008, 29(21): 43–45]
- Qi W, Tang XY, Wang JL. Study on preparation of bioactive feed by probiotics-fermented soybean meal. *Feed Industry*, 2008, 29(5): 15–19 [戚薇, 唐翔宇, 王建玲, 等. 益生菌发酵豆粕制备生物活性饲料的研究. *饲料工业*, 2008, 29(5): 15–19]
- Refstie S, Storebakken T, Roem AJ. Feed consumption and conversion in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with fish meal, extracted soybean meal or soybean meal with reduced content of oligosaccharides, trypsin inhibitors, lectins and soya antigens. *Aquaculture*, 1998, 162(3–4): 301–312
- Rengpipat S, Tunyanun A, Fast AW, *et al.* Enhanced growth and resistance to *Vibrio* challenge in pond-reared black tiger shrimp *Penaeus monodon* fed a *Bacillus* probiotic. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2003, 55(2): 169–173
- Rumsey GL, Siwicki AK, Anderson DP, *et al.* Effects of soybean protein on serological response, non-specific defense mechanism, growth and protein utilization in rainbow trout. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1994, 41(3–4): 323–339
- Saha J, Biswas A, Chhetri A, *et al.* Response surface optimisation of antioxidant extraction from kinema, a *Bacillus*-fermented soybean food. *Food Chemistry*, 2011, 129(2): 507–513
- Sun Y, Song XL, Liu F, *et al.* Isolation and identification of *Bacillus* sp. and evaluation of its effect on WSSV disease resistance in *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(4): 574–583 [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]
- Teng D, Gao M, Yang Y, *et al.* Bio-modification of soybean meal with *Bacillus subtilis* or *Aspergillus oryzae*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2012, 1(1): 32–38
- Weng TM, Chen MT. Changes of protein in natto (a fermented soybean food) affected by fermenting time. *Food Science and Technology Research*, 2010, 16(6): 537–542
- Wu BC, Song JM. *Bacillus Subtilis* and *Aspergillus niger* mixing fermentation to make bean pulp feedstuffs. *Journal of Shandong Institute of Light Industry*, 2010, 24(1): 54–57 [吴宝昌, 宋俊梅. 枯草芽孢杆菌与黑曲霉混合发酵制备豆粕饲料. *齐鲁工业大学学报*, 2010, 24(1): 54–57]
- Wu SH, Li LM, Zhang BH, *et al.* Single strain yeast solid-state fermentation of soybean meal. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2009, 24(7): 41–44 [吴胜华, 李吕木, 张邦辉, 等. 酵母菌单菌固态发酵豆粕研究. *中国粮油学报*, 2009, 24(7): 41–44]
- Wu SH, Li LM, Zhang BH, *et al.* Studies on oligopeptides

feedstuff by solid-stated fermented with manifold strains. Food and Fermentation Industries, 2008, 34(10): 113–115
[吴胜华, 李吕木, 张邦辉, 等. 多菌种固态发酵豆粕生产小肽饲料. 食品与发酵工业, 2008, 34(10): 113–115]
Yao XF, Ye L, Zhao SM. Study on breeding of *Bacillus subtilis*

and its fermentation process on soybean meal. Journal of Anhui Agriculture Science, 2010, 38(16): 8476–8478, 8490
[姚小飞, 叶璐, 赵世敏. 枯草芽孢杆菌的选育及其发酵豆粕的工艺条件研究. 安徽农业科学, 2010, 38(16): 8476–8478, 8490]

(编辑 马瑾艳)

Optimization of Fermentation Conditions and Analysis of the Nutrition Components of Soybean Meal Fermented with *Bacillus firmus*

SUN Jing^{1,2}, SONG Xiaoling¹, HUANG Jie^{1①}

(1. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology; Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture; Qingdao Key Laboratory of Mariculture Epidemiology and Biosecurity; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract *Bacillus firmus* strain PC024, isolated from Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) rearing environment, has demonstrated its ability to increase shrimp resistance to white spot syndrome virus (WSSV) infection and to ferment dietary soybean meal. The purpose of this current study is to optimize the processing conditions for the fermentation of soybean meal using *B. firmus*. Considering single factor trials, results indicated that the optimum bacterial concentration for inoculation, water ratio, fermentation time and temperature were 2×10^6 CFU/g, 1:0.8, 90 h, and 37°C, respectively. However, on the basis of univariate tests, the response surface methodology (RSM) was applied to optimize four fermentation factors when they were combined, including temperature, time, water ratio, and amount of bacteria required for inoculation. The optimum fermentation conditions were as follow: fermentation temperature, 39.0°C; fermentation time, 100 h 18 min; water ratio, 1:0.96; and amount of bacteria for inoculation, 3.84×10^6 CFU/g. Under the optimized conditions, the bacterial concentration reached 1.23×10^{10} CFU/g after fermentation and it was 5.13% deviated from the predicted value using the RSM model. The quality of soybean meal improved significantly after fermentation. Firstly, the yield of the fermented soybean meal reached (93.89±0.01)%. Secondly, after fermentation, the soluble protein content in the soybean meal increased from (39.16±0.01)% to (58.80±4.54)%, and crude protein content in the soybean meal increased from 50.71% to 55.03%. Finally, the total amount of amino acids (15 types) had 132.30% increase compared to the original content; the most significant increases in the proportion amino acids were arginine (168.60%), lysine (157.20%), serine (152.50%), threonine (139.04%) and glycine (138.40%). It showed that the protein molecules were effectively degraded in SDS-PAGE. This study provides theoretical support for the application of probiotics in shrimp plant-basis diet and disease control in aquatic animals.

Key words *Bacillus firmus*; Response surface methodology; Soybean meal; Solid fermentation

① Corresponding author: HUANG Jie, E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn

氨氮胁迫对不同规格刺参(*Apostichopus japonicus*) 存活及非特异性免疫酶活性的影响*



徐松涛^{1,2} 赵斌² 李成林^{2①} 胡炜² 韩莎² 李琪¹

(1. 中国海洋大学水产学院 青岛 266003; 2. 山东省海洋生物研究院 青岛 266014)

摘要 本实验以小[(6.05±0.44) g/头]、中[(14.68±1.76) g/头]、大[(25.64±3.27) g/头]的 3 种不同规格刺参(*Apostichopus japonicus*)为研究对象,研究了氨氮胁迫浓度为 0、2、4、6、8、10 mg/L 时对刺参体腔液中溶菌酶(LSZ)、过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响。结果显示,在氨氮浓度为 8 mg/L 时,第 10 天后,3 种不同规格刺参均出现吐肠、化皮,直至死亡。氨氮浓度为 10 mg/L 时中规格刺参存活率最低,为 86.7%。在氨氮浓度为 2 mg/L 和 4 mg/L 时,小、中、大规格刺参的 3 种非特异性免疫酶活性在第 4 天显著升高,与对照组(氨氮浓度低于 0.05 mg/L)差异显著($P<0.05$);第 7、10、13 天时,LSZ、CAT、SOD 酶活性与第 4 天相比,差异不显著($P>0.05$)。在氨氮浓度为 6、8、10 mg/L 时,LSZ、CAT、SOD 酶活性在第 7 天达到最高,与对照组差异性显著($P<0.05$)。氨氮胁迫对 3 种不同规格刺参的非特异性免疫酶活性的影响存在差异,在同一氨氮浓度胁迫下,敏感性依次为中规格>大规格>小规格。研究表明,氨氮胁迫会对刺参存活与免疫产生一定影响,在刺参养殖过程中,水环境中氨氮浓度最好控制在 6 mg/L 以内。

关键词 刺参;氨氮胁迫;溶菌酶;过氧化氢酶;超氧化物歧化酶

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)03-0172-08

刺参(*Apostichopus japonicus*),又称仿刺参,极具营养保健作用,有较高的经济价值。在我国,刺参养殖主要分布在山东、辽宁等地的沿海地区(李成林等,2010)。近年来,随着刺参养殖规模的迅猛发展,其养殖环境尤其是池塘养殖环境不断恶化,刺参的池塘养殖遭遇了瓶颈(常亚青等,2006;赵艳芳等,2010;刘锡胤等,2012)。

氨氮是养殖水体中重要的环境指标之一。池塘高密度养殖模式下,水中残饵、排泄物的氨化作用提高了水体中的氨氮浓度,导致水产养殖动物长期处于氨氮胁迫的生长环境中(罗鸷等,2013)。秦传新(2009)¹⁾发现,氨氮胁迫对水产养殖动物的生长产生不利影响。氨氮浓度过高会导致水产动物的摄食率降低、死亡率升高(Rodríguez-Ramos *et al*, 2008; 胡毅等,2012)。

* 山东省现代农业产业技术体系刺参产业创新团队建设项目(SDAIT-22-01; SDAIT-22-05)、泰山产业领军人才工程(LJNY201613)、山东省科技发展计划(2014GNC111022)、山东省农业良种工程项目(2014-2016)和山东省星火科技示范项目(2015XH006)共同资助 [This work was supported by Sea cucumber Innovation Team of Shandong Province Agriculture Research System (SDAIT-22-01, SDAIT-22-05), Taishan Industry Leading Talents Project (LJNY201613), Science and Technology Development Project of Shandong Province (2014GNC111022), Agriculture Seed Project of Shandong Province (2014-2016), and Spark Program of Shandong Province (2015XH006)]. 徐松涛, E-mail: jm.zb@163.com

① 通讯作者:李成林,研究员, E-mail: lcl_xh@hotmail.com

收稿日期:2016-03-28, 收修改稿日期:2016-05-21

1) Qin CX. Research on structure of culturing sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka and its optimization in pond. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2009, 15-23 [秦传新. 刺参(*Apostichopus japonicus* Selenka)的池塘养殖结构及其优化研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2009, 15-23]

非特异性免疫酶活性降低(刘洪展等, 2012)。臧元奇等(2012)、刘洪展等(2012)研究了氨氮胁迫对同等规格刺参生理生态学的影响。本实验通过为期 13 d 的氨氮胁迫, 研究了氨氮胁迫对不同规格刺参非特异性免疫酶活性的影响, 以期对刺参养殖水体环境的有效调控和刺参健康养殖的免疫机制提供基础数据和理论支持。

1 材料与方法

1.1 实验刺参

实验刺参采自山东省莱阳市养殖池塘, 选用体表正常、活力旺盛、肉刺坚挺、摄食正常的个体。按体重分为小(S)、中(M)、大(B) 3 个规格, 分别为(6.05±0.44) g、(14.68±1.76) g、(25.64±3.27) g。实验于 2014 年 4 月在山东省海洋生物研究院种质资源研究中心鳌山卫实验室进行。

1.2 刺参暂养

实验刺参在容积为 0.5 m³ 的圆形玻璃钢水槽中暂养, 小规格刺参 200–300 头/槽, 中规格刺参 120–160 头/槽, 大规格刺参 60–100 头/槽。养殖用水为经沉淀砂滤的自然海水, 盐度为 31.0±0.2, 水温为(15.0±1.5)°C, pH 为 8.1±0.2, 氨氮 < 0.05 mg/L。实验期间, 日换水 1 次, 连续充气, 每天投喂配合饲料 1 次, 暂养适应 7 d 后进行实验。

1.3 实验设计

根据实验暂养的不同规格刺参急性氨氮毒性预实验结果, 以 96 h LC₅₀ 平均值的 10% 为基础, 设置 2、4、6、8、10 mg/L 共 5 个氨氮浓度梯度, 通过计算得出非离子氨浓度分别为 0.066、0.131、0.197、0.263、0.328 mg/L。各组氨氮浓度用 1000 mg/L 的 NH₄Cl 母液进行调节。同时, 以氨氮浓度低于 0.05 mg/L 自然海水为对照组。各实验组与对照组实验刺参为 30 头, 放养在整理箱(80 cm×60 cm×48 cm)中, 每实验组设 3 组平行。养殖条件与日常管理同暂养期, 每天换水后用纳氏试剂法测定并及时校正水中氨氮浓度, 氨氮波动范围 < 0.1 mg/L, 实验共进行 13 d。

1.4 样品采集、处理

在第 4、7、10、13 天时分别对实验刺参进行取样, 每次取样时每个整理箱随机各取 3 头, 将刺参擦干并排净体内海水后放入玻璃培养皿中, 用解剖刀在刺参腹部切开 1 cm, 立即用无菌注射器从切口处收

集体腔液于细胞培养皿中, 每个整理箱 3 头刺参体腔液混匀, 用灭菌枪头取混合体腔液 1.0 ml 于 1.5 ml 离心管中, 10000 r/min 离心 10 min, 取上清液分装于 0.5 ml Eppendorf 管中, -80°C 超低温冰箱保存待测。

1.5 数据测定与处理

刺参存活率采用以下公式计算:

$$\text{存活率}(\%) = S/S_0 \times 100$$

式中, S₀ 为实验开始时刺参数量-取样刺参数量, S 为实验结束取样完成后存活的刺参数量。

非离子态氨采用以下公式计算:

$$\text{NH}_3 = [\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+] / [1 + 10^{(\text{pKa} - \text{pH})}]$$

式中, pKa 为离解常数, pKa = 0.09018 + 2729.92/T; T 为开尔文温度, T = 273 + t(°C)。

溶菌酶(LSZ)、过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)活力的测定均用南京建成生物有限公司生产的试剂盒。LSZ 的活性定义: 在特定的实验条件下, 每分钟使底物溶液的 OD 值下降 0.001 为 1 个活性单位, 以 mg/ml 表示; 体腔液 CAT 活性单位定义: 每毫升样品每秒分解 1 μmol 的 H₂O₂ 的量为 1 个活性单位, 以 mmol/L 表示; 体腔液 SOD 活性单位定义: 每毫升反应液中 SOD 抑制率达到 50% 时所对应的 SOD 量为 1 个酶活性单位, 以 U/ml 表示。

运用 SPSS 18.0 及 Excel 软件进行数据分析统计, 以 P < 0.05 为显著性差异的标志。

2 结果与分析

2.1 氨氮胁迫对不同规格刺参存活率的影响

实验结束时统计各组刺参的存活率, 结果见表 1。在氨氮浓度为 0–6 mg/L 时, 除小规格刺参在氨氮浓度为 6 mg/L 时存活率为(97.8±3.1)% 外, 其余所有实验组存活率均达 100%, 3 种规格刺参均能正常活动、摄食、生长未表现出异常状况; 当氨氮浓度为 8 mg/L 时, 在第 10 天后, 3 种不同规格刺参均出现了吐肠、化皮, 实验结束时的存活率分别为(91.1±3.1)%、(95.6±3.1)%、(95.6±3.1)%; 氨氮浓度为 10 mg/L 时, 实验结束时平均存活率最高的是大规格刺参, 为(91.1±3.1)%, 中规格刺参存活率最低, 为(86.7±5.4)%, 小规格刺参存活率为(88.9±6.2)%。

2.2 氨氮胁迫对不同规格刺参 LSZ 活性的影响

由图 1(A)可知, 第 4 天时, 3 种不同规格刺参在不同氨氮浓度环境中的 LSZ 活性较对照组显著升高(P < 0.05), 随着氨氮浓度的升高, LSZ 活性呈现升高

表 1 氨氮胁迫下不同规格刺参存活率(%)
Tab.1 The survival rate of different sized sea cucumber under ammonia stress(%)

规格 Size	氨氮浓度 Ammonia nitrogen concentration (mg/L)					
	0	2	4	6	8	10
S	100.0	100.0	100.0	97.8±3.1	91.1±3.1	88.9±6.2
M	100.0	100.0	100.0	100.0	95.6±3.1	86.7±5.4
B	100.0	100.0	100.0	100.0	95.6±3.1	91.1±3.1

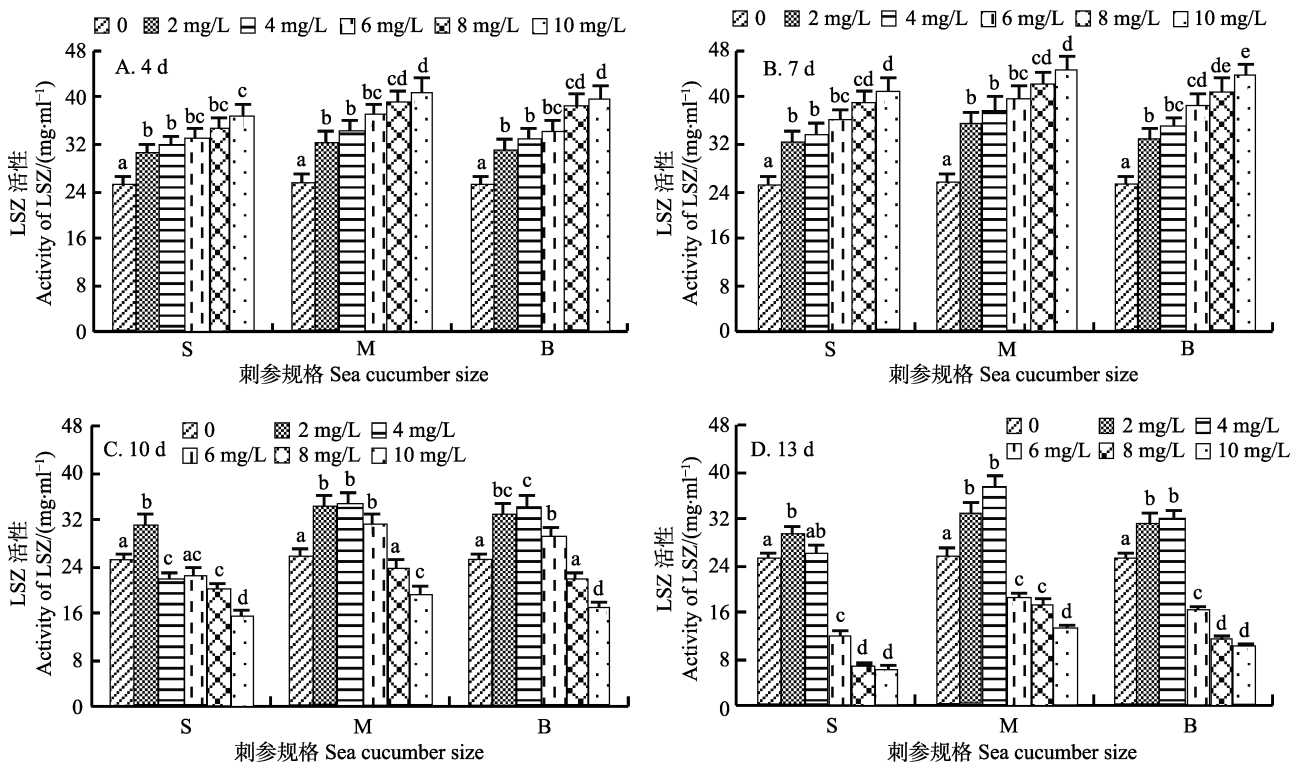


图 1 不同浓度的氨氮处理对 3 种不同规格刺参 LSZ 活性影响

Fig.1 Effect of different ammonia nitrogen concentration on the activity of LSZ of three sized sea cucumber

图中标注有不同字母的表示显著性差异($P<0.05$), 下图同
Different letters on the graph indicated significant difference($P<0.05$). The same as below

的趋势。在氨氮浓度为 10 mg/L 时, 小、中、大规格刺参 LSZ 活性最高, 分别为对照组的 146.2%、159.8%、158.5%, 与对照组差异性显著($P<0.05$)。相同氨氮浓度下, 中规格刺参的 LSZ 活性高于小、大规格刺参。

由图 1(B)可知, 第 7 天时, 除对照组外, 3 种不同规格刺参的 LSZ 活性高于第 4 天, 与对照组差异显著($P<0.05$)。与第 4 天相比, 氨氮浓度为 2、4、6、8、10 mg/L 时, 3 种不同规格刺参的 LSZ 活性分别升高: 小规格 5.8%、5.9%、9.3%、12.3%、11.7%, 中规格 9.4%、10.7%、8.3%、7.8%、8.9%, 大规格 5.9%、5.6%、12.5%、6.3%、9.2%。相同氨氮浓度下, 中规格刺参的 LSZ 活性高于小、大规格刺参。

由图 1(C)可知, 第 10 天时, 3 种不同规格刺参的 LSZ 活性较第 7 天呈现降低的趋势, 分别降低: 小规格 3.8%、34.5%、37.3%、48.4%、61.2%, 中规格 3.4%、8.1%、21.5%、43.5%、56.2%, 大规格 0.1.8%、23.8%、46.3%、60.6%, 氨氮浓度为 6、8、10 mg/L 时的 LSZ 活性降幅大于 2、4 mg/L。相同氨氮浓度下, 中规格刺参的 LSZ 活性高于小、大规格刺参。

由图 1(D)可知, 第 13 天时, 随着氨氮浓度的升高, 3 种不同规格刺参的 LSZ 活性呈现降低的趋势。在氨氮浓度为 2、4 mg/L 时, 3 种不同规格刺参的 LSZ 活性高于对照组($P<0.05$); 氨氮浓度为 6、8、10 mg/L 时, LSZ 活性显著低于对照组($P<0.05$), 小规格刺参 LSZ 活性下降幅度最大, 分别为对照组的 51.2%、

70.7%、73.2%，与对照组差异性显著($P<0.05$)。相同氨氮浓度下，中规格刺参的 LSZ 活性高于小、大规格刺参。

2.3 氨氮胁迫对不同规格刺参 CAT 活性的影响

由图 2(A)可知，第 4 天时，3 种不同规格刺参在不同浓度氨氮环境中的 CAT 活性较对照组显著升高($P<0.05$)。相同规格的实验组中，刺参的 CAT 活性随氨氮浓度增大而升高。相同氨氮浓度下，中规格刺参的 CAT 活性高于小、大规格刺参。

由图 2(B)可知，第 7 天时，3 种不同规格刺参的 CAT 活性高于第 4 天，小规格分别升高 5.1%、12.5%、17.1%、20.9%、19.1%，中规格分别升高 11.9%、13.6%、8.5%、7.8%、5.4%，大规格分别升高 10.5%、12.2%、

20.9%、22.2%、16.0%，与对照组差异显著($P<0.05$)。相同氨氮浓度下，中规格刺参的 CAT 活性高于小、大规格刺参。

由图 2(C)可知，第 10 天时，3 种不同规格刺参的 CAT 活性随氨氮浓度增大呈现降低的趋势，氨氮浓度为 2、4 mg/L 时的 CAT 活性降幅比 6、8、10 mg/L 小，与对照组间差异显著($P<0.05$)。相同氨氮浓度下，中规格刺参的 CAT 活性高于小、大规格刺参。

由图 2(D)可知，第 13 天时，3 种不同规格刺参的 CAT 活性大幅降低。氨氮浓度为 2、4、6 mg/L 时，3 种不同规格刺参的 CAT 活性高于对照组($P<0.05$)；氨氮浓度为 8、10 mg/L 时，CAT 活性与对照组差异不显著($P>0.05$)。相同氨氮浓度下，中规格刺参的 CAT 活性高于小、大规格刺参。

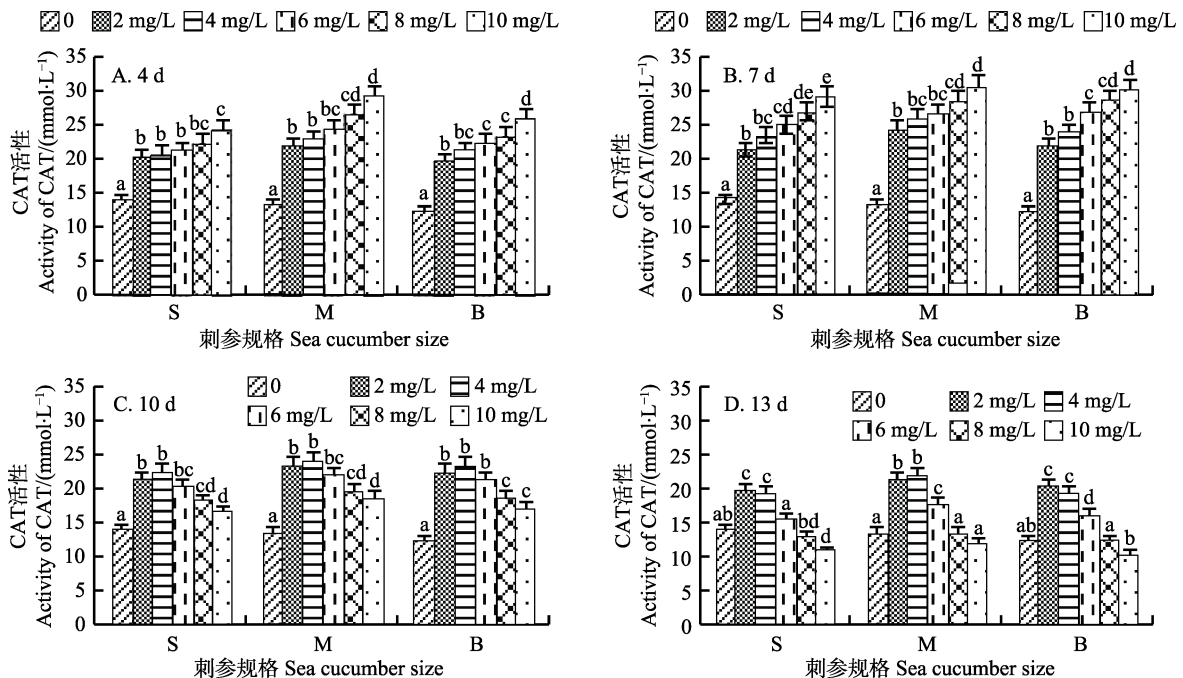


图 2 不同浓度的氨氮处理对 3 种不同规格刺参 CAT 活性影响

Fig. 2 Effect of different ammonia nitrogen concentration on the activity of CAT of three sized sea cucumber

2.4 氨氮胁迫对不同规格刺参 SOD 活性的影响

由图 3(A)可知，第 4 天时，氨氮浓度为 2、4 mg/L 时，3 种不同规格刺参在不同浓度氨氮环境中的 SOD 平均活性高于对照组，分别升高：小规格 10.3%、11.4%，中规格 3.8%、6.1%，大规格 5.7%、9.7%；氨氮浓度为 6、8、10 mg/L 时，小、中、大规格刺参 SOD 活性呈现升高的趋势，分别为对照组的 128%、142%、155%，125%、142%、151%，118%、140%、148%，与对照组差异显著($P<0.05$)。相同氨氮浓度下，中规格刺参的 SOD 活性高于小、大规格刺参。

由图 3(B)可知，第 7 天时，3 种不同规格刺参的 SOD 活性较对照组显著升高($P<0.05$)。氨氮浓度为 10 mg/L 时，3 种不同规格刺参的 SOD 活性最高，分别为对照组的 160%、161%、151%($P<0.05$)。相同氨氮浓度下，中规格刺参的 SOD 活性高于小、大规格刺参。

由图 3(C)可知，第 10 天时，3 种不同规格刺参的 SOD 活性呈现降低的趋势。与第 7 天相比，氨氮浓度为 2、4 mg/L 时的 SOD 活性降幅比 6、8、10 mg/L 小；氨氮浓度为 6、8、10 mg/L 时，SOD 活性分别降低：小规格 10.7%、19.7%、30.2%，中规格 16.8%、

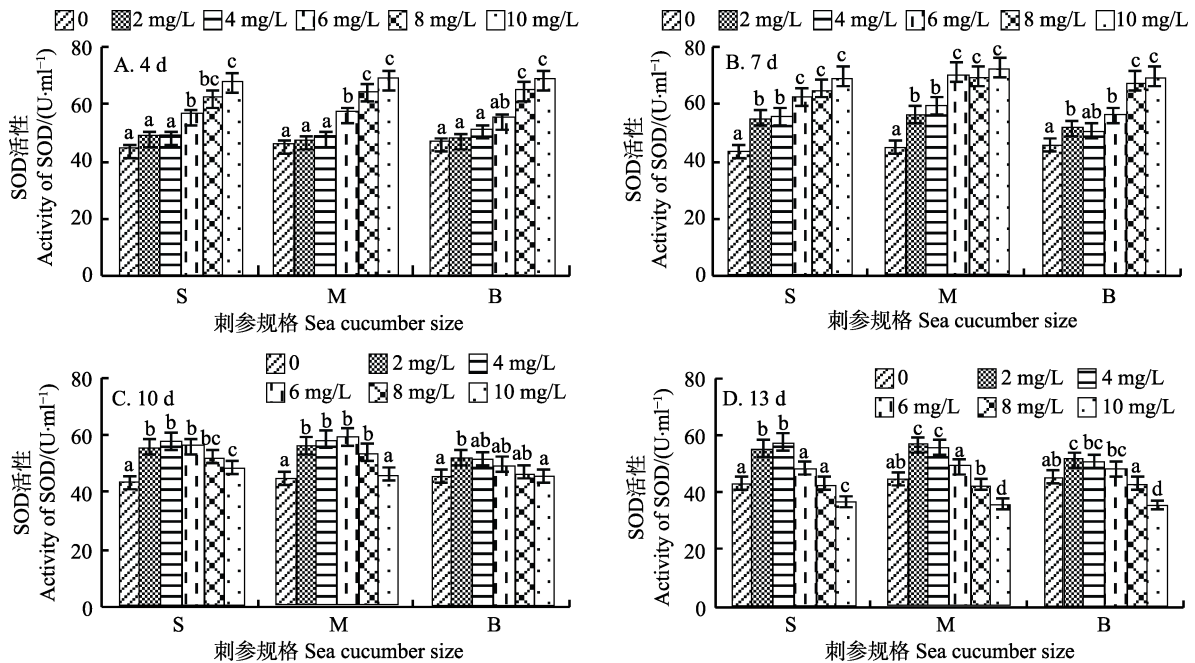


图 3 不同浓度的氨氮处理对 3 种不同规格刺参 SOD 活性影响

Fig.3 Effect of different ammonia nitrogen concentration on the activity of SOD of three sized sea cucumber

22.7%、35.8%，大规格 11.5%、30.5%、34.3%。相同氨氮浓度下，中规格刺参的 SOD 活性高于小、大规格刺参。

由图 3(D)可知，第 13 天时，3 种不同规格刺参的 SOD 活性有所降低。氨氮浓度为 2、4 mg/L 时，SOD 活性维持平稳水平且显著高于对照组 ($P < 0.05$)；氨氮浓度为 6 mg/L 时，SOD 活性虽有所降低但仍高于对照组；氨氮浓度为 8、10 mg/L 时，小、中、大规格刺参 SOD 活性低于对照组，分别为对照组的 99.8%、85.1%、95.1%、79.7%、95.1%、77.8%。

3 讨论

3.1 氨氮胁迫对刺参存活的影响

在水产养殖中，残饵、粪便以及动植物尸体等含氮有机物的分解是水体中氨氮的主要来源，其非离子态具有较高脂溶性，容易透过细胞膜使养殖动物中毒，还会降低其能量代谢活动(任海等, 2014)。本研究中，当养殖水环境中的氨氮浓度 ≤ 6 mg/L 时，实验期间，3 种规格刺参均能正常活动、摄食，未表现出异常状况；但当氨氮浓度超过 8 mg/L 时，实验后期，3 种不同规格刺参均出现了吐肠、化皮，直至死亡，8 mg/L 的氨氮浓度为 3 种规格刺参耐受的极限值。另外，不

同规格刺参对氨氮的耐受能力不同(臧元奇等, 2012)，本研究中，当氨氮浓度为 10 mg/L 时，至实验结束，不同规格刺参的存活率存在一定差异，大规格刺参存活率最高，中规格最低，但单因素方差分析显示，其差异不显著 ($P > 0.05$)，表明当氨氮浓度超过刺参耐受极限时，对其造成的不利影响无体重规格上的差别。

3.2 氨氮胁迫对刺参 3 种非特异性免疫酶活性影响

刺参属于无脊椎动物，不具备脊椎动物所具有的特异性免疫，在抵抗外界病原的过程中，非特异性免疫发挥了巨大作用(臧元奇, 2012)¹⁾。体液免疫属于非特异性免疫，在无脊椎动物免疫防御过程中有着至关重要的作用，体液性免疫因子包括天然形成或诱导产生的各种生物活性分子以及各种免疫活性的酶类(刘洪展等, 2012)。

LSZ 是一种碱性蛋白酶，存在于动物组织和体液中，其作用原理是分解微生物的细胞壁，对消除外来病原微生物起着重要作用，它的活性是反映非特异性免疫水平的指标之一(李鑫等, 2014)，养殖环境中氨氮的突然升高往往也伴随着水环境恶化、致病菌丛生，因此，本研究选择 LSZ 作为首先测定对象。在实验中，随着氨氮胁迫时间的延长，LSZ 活性呈现先升高后降低的趋势。在第 7 天，氨氮浓度为 10 mg/L

1) Zang YQ. Ecological and physiological mechanisms on typical environmental factors in sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2012, 4-6 [臧元奇. 刺参(*Apostichopus japonicus* Selenka)对典型环境胁迫的生理生态学响应及其机制研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2012, 4-6]

时, LSZ 活性最高, 但当氨氮胁迫到第 10、13 天时, LSZ 活性显著降低。

CAT 和 SOD 是生物体内两种相互关联的抗氧化酶, 两者能够协同清除自由基(洪美玲等, 2007)。CAT 能催化 H_2O_2 分解成氧和水(Bakala *et al.*, 2012), 而且存在于所有已知的动物的各组织中。SOD 是能够催化超氧化物通过歧化反应转化为 O_2 和 H_2O_2 , 保护细胞免受氧化损伤(徐钢春等, 2007), 基因工程改造后缺乏该酶的小鼠(*Mus musculus*)会患上严重的疾病(Huang *et al.*, 2001)。刘洪展等(2012)研究表明, 适宜浓度的氨氮可减轻活性氧对刺参造成的机体损伤, 促进刺参的免疫水平, 因此, 研究氨氮胁迫中 CAT 和 SOD 的变化具有重要意义。在本研究中, 氨氮胁迫对刺参 CAT 和 SOD 两种酶的影响呈现明显的相似性。氨氮胁迫到第 7 天, CAT 和 SOD 的活性与氨氮浓度呈正相关性, 当氨氮浓度为 10 mg/L 时, 2 种酶活性最高; 到第 10 天时, 2 种酶的活性显著降低且低于对照组, 芦光宇等(2014)、任海等(2014)在氨氮胁迫对甲壳动物免疫指标影响的研究中指出, 长时间的氨氮胁迫会使动物机体免疫活性降低甚至低于正常水平, 与本研究结果基本一致, 可见刺参在维持非特异性免疫酶的持续高活性存在一个时间极限值。氨氮作为胁迫刺激, 能引起甲壳动物血细胞数量变化, 促使免疫力升高(Chen *et al.*, 2012; Rodríguez-Ramos *et al.*, 2008)。本研究中, 氨氮胁迫到第 4、7 天, 3 种不同规格刺参非特异性免疫酶呈现显著升高, 免疫力明显增强。但在第 10、13 天时, 3 种不同规格刺参非特异性免疫酶活性显著降低, 免疫力明显减弱。其原因可能是随着氨氮胁迫时间的延长, 刺参的非特异免疫调节已经达到极限, 并超出了刺参非特异性免疫酶的正常调控范围, 从而不能维持 LSZ、CAT、SOD 的高活性, 进而不能维持刺参正常的生理状态, 最终使刺参出现吐肠、化皮等疾病。

3.3 氨氮胁迫对不同规格刺参非特异性免疫酶活性影响的差异

刺参的生长发育分为胚胎发育期、浮游幼体期和底栖生长期, 底栖生长期包括稚参、幼参和成参 3 个阶段。本实验以 3 种不同规格的幼参为研究对象, 结果表明, 中规格刺参对氨氮胁迫较为敏感, 相同氨氮

浓度时, 中规格刺参的 LSZ、CAT 和 SOD 活性始终高于小、大规格刺参, 小、大规格刺参 3 种酶活性略有差异并呈现大规格活性高于小规格。朱江艳等(2013)研究表明, 氨氮胁迫对不同规格刺参非特异性免疫酶活性影响存在差异, 但差异不显著。同时, 不同规格刺参对外界的胁迫刺激反应不同(赵斌等, 2015; 李根瑞等, 2016), 最明显的是温度对不同规格刺参的影响。小规格刺参对温度的敏感性显著低于中、大规格刺参, 在刺参夏眠过程中, 小规格刺参夏眠阈值温度明显高于中、大规格刺参(纪婷婷, 2009)¹⁾。本实验中, 不同规格刺参在相同强度的氨氮胁迫时非特异性免疫酶活性略有差异, 原因可能是: 小规格刺参的非特异性免疫调节相对较弱, 不能有效利用体内能量维持 3 种非特异性免疫酶的高活性, 导致整个实验过程中非特异性免疫酶活性最低; 中、大规格刺参的非特异性免疫调节能力相当, 但与大规格刺参相比, 中规格刺参面临更大的生存压力, 并且观察到其运动、摄食行为等均高于大规格刺参, 因此, 中规格刺参在面对胁迫环境时更能有效地利用体内能量并提高自身免疫水平, 从而在氨氮胁迫时使非特异性免疫酶长时间处于高活性。

目前, 池塘养殖是刺参养殖的主要模式之一, 随着池塘养殖规模的扩大, 出现了池塘的养殖年限过长、养殖密度过大、池底清理不及时等问题, 导致池塘环境污染严重, 使水环境指标急剧变化, 氨氮含量往往处在较高水平(迟爽等, 2013), 而长时间的高氨氮含量会导致刺参免疫力降低, 扰乱刺参正常生理状态, 最终出现病害、死亡。本研究结果表明, 在刺参养殖过程中, 当氨氮浓度 ≤ 6 mg/L 时, 刺参能够很好地维持正常生理状态; 当氨氮浓度 ≥ 8 mg/L 时, 短时间内(≤ 10 d), 刺参基本处于较正常生理状态, 但其运动、摄食及自然伸展状态均不同程度地受到影响, 长时间(≥ 13 d)胁迫会导致刺参吐脏、化皮, 甚至死亡。因此, 在刺参养殖过程中, 水环境中氨氮浓度最好控制在 6 mg/L 以内, 以保证刺参正常生长和生存, 不可长时间高于 8 mg/L, 尤其不能高于 10 mg/L, 长时间(≥ 13 d)高浓度氨氮会导致刺参生理状态紊乱, 增加刺参患病和死亡风险。本研究结果在一定程度上可为刺参池塘水质调控与高效健康养殖提供基础数据和理论支持。

1) Ji TT. Ecological and physiological mechanisms on temperature change in sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2009, 14–19 [纪婷婷. 刺参(*Apostichopus japonicus*)对温度变化的生态生理学响应机制. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2009, 14–19]

参 考 文 献

- Bakala H, Hamelin M, Mary J, *et al.* Catalase, a target of glycation damage in rat liver mitochondria with aging. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012, 1822(10): 1527–1534
- Chang YQ, Sui XL, Li J. The current situation, problem and prospect on the *Apostichopus japonicus* aquaculture. *Fisheries Science*, 2006, 25(4): 198–201 [常亚青, 隋锡林, 李俊. 刺参增殖业现状、存在问题与展望. *水产科学*, 2006, 25(4): 198–201]
- Chen YY, Sim SS, Chiew SL, *et al.* Dietary administration of a *Gracilaria tenuistipitata* extract produces protective immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* in response to ammonia stress. *Aquaculture*, 2012, 370–371(2): 26–31
- Chi S, Zeng Y, Zhao ZJ, *et al.* Variation of water quality in culture ponds for *Apostichopus japonicus*. *Journal of University of Jinan (Science and Technology)*, 2013, 27(3): 239–244 [迟爽, 曾勇, 赵振军, 等. 刺参养殖池塘的水质变化. *济南大学学报(自然科学版)*, 2013, 27(3): 239–244]
- Hong ML, Chen LQ, Gu SZ, *et al.* Effects of ammonia exposure on immunity indicators of haemolymph and histological structure of hepatopancreas in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, 14(3): 412–418 [洪美玲, 陈立侨, 顾顺樟, 等. 氨氮胁迫对中华绒螯蟹免疫指标及肝胰腺组织结构的影响. *中国水产科学*, 2007, 14(3): 412–418]
- Hu Y, Huang Y, Zhong L, *et al.* Effects of ammonia stress on the gill Na^+/K^+ -ATPase, microstructure and some serum physiological-biochemical indices of juvenile black carp (*Mylopharyngodon piceus*). *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(4): 538–545 [胡毅, 黄云, 钟蕾, 等. 氨氮胁迫对青鱼幼鱼鳃丝 Na^+/K^+ -ATP 酶、组织结构及血清部分生理生化指标的影响. *水产学报*, 2012, 36(4): 538–545]
- Huang TT, Carlson EJ, Kozy HM, *et al.* Genetic modification of prenatal lethality and dilated cardiomyopathy in Mn superoxide dismutase mutant mice. *Free Radical Biology & Medicine*, 2001, 31(9): 1101–1110
- Li CL, Song AH, Hu W, *et al.* Status analysis and sustainable development strategy of sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka aquaculture industry in Shandong Province. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(4): 126–132 [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]
- Li GR, Ren LH, Sun GH, *et al.* Effects of hypoxic stress on oxidative stress indices in *Apostichopus japonicus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(5): 133–139 [李根瑞, 任利华, 孙国华, 等. 低溶氧胁迫对刺参(*Apostichopus japonicus*)氧化应激指标的影响. *渔业科学进展*, 2016, 37(5): 133–139]
- Li X, Tan ZJ, Ling XH, *et al.* Application of lysozyme in aquaculture. *Veterinary Orientation*, 2014(4): 51–53 [李鑫, 谭志坚, 凌欣华, 等. 溶菌酶在养殖中的应用. *兽医导刊*, 2014(4): 51–53]
- Liu HZ, Zheng FR, Sun XQ, *et al.* Effect of exposure to ammonia nitrogen stress on immune enzyme of holothurian *Apostichopus japonicus*. *Marine Sciences*, 2012, 36(8): 47–52 [刘洪展, 郑风荣, 孙修勤, 等. 氨氮胁迫对刺参几种免疫酶活性的影响. *海洋科学*, 2012, 36(8): 47–52]
- Liu XY, Jiang CJ, Wang GH, *et al.* Strategic thoughts on promoting the sustainable development of sea cucumber aquaculture. *China Fisheries*, 2012(2): 76–78 [刘锡胤, 姜成嘉, 王国华, 等. 推进刺参养殖业可持续发展的战略思考. *中国水产*, 2012(2): 76–78]
- Lu GY, Liu GX, Li JJ, *et al.* Effect of ammonia nitrogen on function of antioxidant system in *Procambarus clarkia*. *Acta Agriculture Jiangxi*, 2014, 26(2): 129–133 [芦光宇, 刘国兴, 李佳佳, 等. 氨氮对克氏原螯虾抗氧化功能的影响. *江西农业学报*, 2014, 26(2): 129–133]
- Luo Z, Zhai YY, Chen JX. High density aquaculture research technology in *Penaeus vannamei* pond. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2013(16): 266–270 [罗鹭, 翟拥艳, 陈进喜. 南美白对虾池塘高密度养殖技术研究. *现代农业科技*, 2013(16): 266–270]
- Ren H, Li J, Li JT, *et al.* Effects of acute ammonia stresses on antioxidant enzyme activities and GPx gene expression in *Exopalaemon carinicauda*. *Journal of Agro-Environment Science*, 2014, 34(4): 647–655 [任海, 李健, 李吉涛, 等. 急性氨氮胁迫对脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)抗氧化系统酶活力及 GPx 基因表达的影响. *农业环境科学学报*, 2014, 34(4): 647–655]
- Rodríguez-Ramos T, Espinosa G, Marrero J, *et al.* Effects of *Echerichia coli* lipopolysaccharides and dissolved ammonia on immune response in southern white shrimp *Litopenaeus schmitti*. *Aquaculture*, 2008, 274(1): 118–125
- Xu GC, Gu RB, Wen HB, *et al.* Effects of environmental stress on lysozyme and superoxide dismutase of *Corbicula fluminea* (Müller). *Journal of Anhui Agricultural University*, 2007, 34(1): 74–78 [徐钢春, 顾若波, 闻海波, 等. 环境胁迫对河蚬溶菌酶和超氧化物歧化酶活性的影响. *安徽农业大学学报*, 2007, 34(1): 74–78]
- Zang YQ, Tian XL, Dong SL, *et al.* The activities of immunoenzymes and heat shock protein 70 content of sea cucumber, *Apostichopus japonicus* (Selenka) to chronic stress of ammonia nitrogen. *Periodical of Ocean University of China*, 2012, 42(Z1): 60–66 [臧元奇, 田相利, 董双林, 等. 氨氮慢性胁迫对刺参免疫酶活性及热休克蛋白表达的影响. *中国海洋大学学报*, 2012, 42(Z1): 60–66]
- Zhao B, Hu W, Li CL, *et al.* The effects of low salinity on the growth and activities of digestive enzymes in sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(1): 91–96 [赵斌, 胡炜, 李成林, 等. 低盐环境对 3 种规格刺参(*Apostichopus japonicus*)幼参生长与消化酶活力

的影响, 渔业科学进展, 2015, 36(1): 91-96]

Zhao YF, Ma GW, Wang PP, *et al.* Investigation report on Jiaonan sea cucumber aquaculture. Shandong Fisheries, 2010, 27(4): 53-55 [赵艳芳, 马广文, 王萍萍, 等. 关于胶南市刺参养殖业的调研报告. 齐鲁渔业, 2010, 27(4): 53-55]

Zhu JY, Zhang HC, Chen ZQ, *et al.* Comparisons of innate immune activity among different-sized members of the sea cucumber species *Apostichopus japonicas*. Journal of Jimei University (Natural Science), 2013, 18(6): 408-412 [朱江艳, 张洪彩, 陈政强, 等. 不同规格刺参的非特异性免疫活性研究. 集美大学学报(自然科学版), 2013, 18(6): 408-412]

(编辑 冯小花)

Effects of Ammonia Nitrogen Stress on the Survival and Activities of Non-Specific Immune Enzymes of Different-Sized Sea Cucumber (*Apostichopus japonicus*)

XU Songtao^{1,2}, ZHAO Bin², LI Chenglin^{2①}, HU Wei², HAN Sha², LI Qi¹

(1. Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003;
2. Marine Biology Institute of Shandong Province, Qingdao 266014)

Abstract In intensive culture system, accumulation of ammonia nitrogen, which is the principal end-product of nitrogenous metabolism, has deleterious effects on aquatic animals. However, there is little information about the effects of ammonia nitrogen on the immunity function of sea cucumber *Apostichopus japonicus*. This study was conducted to evaluate the effects of ammonia nitrogen stress (concentration gradient: 0, 2, 4, 6, 8, 10 mg/L) on the activities of lysozyme(LSZ), catalase(CAT), superoxide dismutase (SOD) of different-sized sea cucumber with initial body weight of (6.05±0.44) g, (14.68±1.76) g and (25.64±3.27) g. The results were as follow: When the ammonia-N level was 8 mg/L, mortality occurred in three-sized sea cucumber on the 10th day; When the ammonia-N level was 10 mg/L, the medium-sized sea cucumber had the lowest survival rate of 86.7%. When the ammonia-N level was 2 mg/L and 4 mg/L, on the 4th day, three non-specific immune enzymatic activities of three-sized sea cucumber increased, significantly different with the control group ($P<0.05$). There were no significant differences in enzymatic activities between the 4th, 7th, 10th and 13th day. While the ammonia-N level was 6 mg/L, 8 mg/L, 10 mg/L, three non-specific immune enzymatic activities reached the maximum value on the 7th day, significantly different with the control group ($P<0.05$). Under the same ammonia nitrogen stress level, the activities of three non-specific immune enzymes of three-sized sea cucumber were different. The sensitivity order of three-sized sea cucumber under ammonia nitrogen stress was: Medium-sized>Big-sized>Small-sized ($P>0.05$). These results indicated that ammonia nitrogen stress can affect the survival rate and immunity function of sea cucumbers, which will provide the theoretical basis for the mechanism of ammonia stress on sea cucumbers.

Key words Sea cucumber *Apostichopus japonicus*; Ammonia nitrogen stress; Lysozyme; Catalase; Superoxide dismutase

① Corresponding author: LI Chenglin, E-mail: lcl_xh@hotmail.com

刺参(*Apostichopus japonicus*)大水面养殖池塘 环境中优势益生菌筛选及其特性分析*

杜 佗^{1,2} 李 彬^{2,3} 王印庚^{2,3①} 廖梅杰^{2,3}
王金燕^{1,2} 刘志轩^{1,2} 王诗欢⁴



(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; 4. 大连壹桥海参股份有限公司 瓦房店 116312)

摘要 2014 年 12 月–2015 年 12 月, 在大连地区刺参(*Apostichopus japonicus*)大水面养殖池塘进行了春、夏、秋、冬四季有益菌分离筛选, 从其水体和底泥中共分离得到 66 株细菌。以刺参“腐皮综合征”主要病原菌——灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)和假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas nigrifaciens*)为指示菌进行拮抗作用实验, 利用选择培养基对菌株产淀粉酶和蛋白酶的能力进行测定, 最后通过安全性实验得到潜在益生菌株 YQ-2。结果显示, 该菌株对灿烂弧菌和假交替单胞菌有较强的抑制作用, 抑菌圈分别达到 22 mm 和 24 mm; 对淀粉和蛋白选择培养基水解圈的直径达到 22 mm 和 36 mm。安全性实验显示, 该菌株无论是在 10^8 CFU/ml 浸浴还是投喂 10^8 CFU/g 的粉末饲料感染, 30 d 内供试刺参没有发病和死亡现象, 健康程度好, 且相对于对照组的体重明显增长, 10^8 CFU/g 粉末饲料投喂组的相对增长率达到 39.31%。此外, 本研究对 YQ-2 菌株的生理生化指标、16S rDNA 序列进行了分析, 其同源性与枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* strain KLP2015 相似度达 99%, 故将该菌株鉴定为枯草芽孢杆菌。该株枯草芽孢杆菌在大水面刺参池塘四季水体中数量为 140–280 CFU/ml, 高于其他菌株; 同时, 该菌株在水体中还具有较高的优势度, 优势度分别为 4.2%、3.5%、2.6%、4.6%, 冬、春季的优势度明显高于夏、秋季; 它属于土著分离菌株, 对引起刺参腐皮综合征的 2 株病原菌具有较强的抑制作用, 这对刺参大水面生态养殖具有较大的应用潜力。

关键词 刺参; 大水面池塘; 腐皮综合征; 益生菌; 枯草芽孢杆菌; 拮抗菌

中图分类号 S966 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)03-0180-08

近年来, 刺参(*Apostichopus japonicus*)养殖业迅猛发展, 形成了池塘养殖、工厂化养殖、浅海底播增养殖、围堰养殖、浮筏吊笼养殖、浅海沉箱养殖等多元化增养殖模式(王印庚等, 2014), 其中, 池塘养殖是刺参的主要养殖模式。传统刺参养殖池塘的大小为

0.67–4.67 hm², 水体较小, 水深较浅, 便于人工管理和水质条件控制, 但存在水体稳定性差、环境易恶化、养殖刺参易产生应激或病害等缺点。刺参大水面养殖是随着刺参养殖业的发展出现的一种新型养殖模式, 在辽宁、河北、山东和江苏地区均有试点应用, 池塘

* 中央级科研院所基本科研业务费专项资金项目(20603022015015)、山东省自主创新成果转化专项(2013ZHGX2A0801)和青岛市海洋经济创新发展区域示范项目(海水健康养殖专用微生态制剂的开发应用与产业化项目)共同资助 [This work was supported by Special Fund for Basic Scientific Research Business of Central Public Research Institutes (20603022015015), Independent Innovation and Achievements Transformation of Shandong Province (2013ZHGX2A0801), and Regional Demonstration Project of Marine Economy Innovation and Development in Qingdao City (Development and Application of Micro Ecological Agent Special for Sea Water Health Cultivation and Industrialization Project)]. 杜 佗, E-mail: dutuo1990@163.com

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

收稿日期: 2016-05-05, 收修改稿日期: 2016-05-17

面积一般为 66.7–333.3 hm², 具有面积大、水体稳定性好、人为干扰小等特点。目前, 大水面刺参池塘存在人工水质调控弱、清淤困难等缺点, 长期养殖易造成底部有机物堆积、池底腐败并导致刺参疾病的发生, 尤其是“腐皮综合征”。该病是刺参冬、春季养殖过程中的常见疾病, 此病传染性强, 波及面积广, 死亡率高, 严重影响刺参养殖业的稳定发展。有研究表明, 灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)和假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas nigrfaciens*)是该病的主要病原菌(王印庚等, 2006; 张春云等, 2006)。刺参大水面池塘养殖发生疾病, 多数是由池塘生态环境遭到破坏引发的, 菌群和藻相失衡, 同时养殖池塘面积较大, 难以施用药物防控。因此, 利用益生菌剂改良池塘养殖环境、拮抗病原菌是刺参大水面池塘养殖病害防控的最佳途径。

益生菌剂是基于微生物学原理发展起来的, 自 Kozasa(1986)将益生菌剂应用到水产养殖以来, 微生物制剂在水产中的应用越来越广泛, 并成为生态养殖模式的研究热点。水产养殖中有关益生菌的研究起初集中在幼鱼养殖, 后慢慢应用到虾、贝、甲壳类、活饵料生物、海参等养殖动物, 其中, 益生菌的筛选和应用在刺参养殖中起步较晚, 部分益生菌剂沿用了其他水产养殖动物环境调控的益生菌菌种, 但难以适应刺参养殖环境, 无法达到抑制刺参病原的效果。刺参益生菌的研究多集中在对养殖水环境的净化、产酶能力、改善免疫力等研究, 如赵留群等(2014)研究了 3 种微生物制剂对幼刺参养殖水体水质的影响, 董春光等(2015)研究了枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)在刺参养殖中的作用, 田良(2015)¹⁾筛选鉴定了肠道产酶益生菌并在饲料中进行了应用。关于益生菌在池塘养殖环境中病害防控的研究较少。本研究从刺参大水面池塘养殖环境中筛选产酶能力强、拮抗病原菌的益生菌株, 通过土著益生菌在池塘中快速繁殖生长、拮抗病原菌达到病害防控的效果, 降低养殖成本, 为刺参池塘健康养殖提供优良的益生菌株和应用技术参数。

1 材料与方 法

1.1 池塘条件

实验在大连瓦房店某大型刺参养殖场进行, 大水面池塘有 3 个, 每个池塘面积约 333.3 hm², 水深 5–7 m; 水源来自近海海水, 池塘无闸门设置, 仅靠池坝里外透水功能, 利用潮汐的潮差进水和排水。池内附着基由石块堆砌而成, 放养刺参密度为 4.5 万头/hm², 规

格约 100 头/kg; 全年不投喂饲料、不投放益生菌, 保证刺参在自然条件下生长。

1.2 样品采集

分别在 2014 年 12 月 24 日、2015 年 4 月 16 日、2015 年 8 月 10 日、2015 年 10 月 25 日 4 个时间点采集池塘水样和泥样。利用调查船驶到池塘中预先标记好的采样点, 按照《国家海洋调查规范》海洋生物调查中规定的方法进行采样, 使用击开式采水器(2.5 L)采集水体底层(距底表 5 cm)水样。用采泥器采集池塘底部表层底泥, 每个池塘设置 3 个采样点。

1.3 培养基的配制

TSB 培养基: 胰蛋白胨大豆肉汤(TSB) 30 g, NaCl 15 g, 琼脂 15 g, H₂O 1000 ml, pH 为 7.4–7.6。

淀粉培养基: 营养琼脂 33 g, 淀粉 2 g, NaCl 15 g, H₂O 1000 ml。

酪蛋白琼脂培养基: 酪蛋白琼脂 35 g, NaCl 15 g, H₂O 1000 ml。培养基经 121℃、20 min 灭菌。

1.4 细菌的分离与培养

将采集的样品用 1.5% 灭菌生理盐水稀释至 10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵, 每个浓度取 100 μl, 涂布于 TSB 平板上, 每个浓度 2 个平行, 28℃ 倒置培养 24–48 h, 选择合适的稀释浓度(30–300 CFU/平板)进行细菌分离、计数, 计算细菌优势度:

细菌优势度=某一特定类型菌落数量/总菌落数量

根据菌落大小、颜色、边缘光滑程度等形态学特征进行划线分离, 分离纯化 3 次。纯化后的菌株置于 20% 甘油生理盐水制备的保种液中, -80℃ 保存。

1.5 拮抗菌的筛选

实验以假交替单胞菌和灿烂弧菌为指示菌。首先, 将指示菌接种于 TSB 平板上, 28℃ 培养 24 h, 再进行一次转接以确保得到纯菌株。用接种环刮取少量指示菌, 将指示菌用灭菌的 1.5% 生理盐水稀释, 然后将指示菌均匀涂布于牛津杯打孔的 TSB 平板上。用接种环刮取活化 24 h 的供试菌株, 同样用生理盐水稀释后吸取 100 μl 置于小孔内, 在 28℃ 培养 24–48 h 后, 观察小孔周围是否出现明显的抑菌圈并测量抑菌圈的直径。

1.6 细菌产酶能力测定

选取抑菌作用较好的菌株进行实验。用淀粉培养基和酪蛋白琼脂培养基制作牛津杯平板。将筛选得到

1) Tian L. To select strains with higher enzyme activity from the distinguishment of *Apostichopus japonicus* and its application in feed. Master's Thesis of Jimei University, 2015 [田良. 仿刺参消化道中产酶菌株的筛选鉴定及其在仿刺参饲料中的应用. 集美大学硕士研究生学位论文, 2015]

的菌株用灭菌 1.5%生理盐水稀释后, 取 100 μl 置于牛津杯培养基的小孔内, 在 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24–48 h 后观察小孔周围是否出现明显的水解圈, 并测量水解圈的直径。

1.7 候选菌株对刺参生长及安全性评价

实验用刺参来自山东青岛黄岛区某养殖场, 规格约为 10 g/头, 室内暂养 3 d 后随机分组, 每组 15 头, 各设 2 个平行。实验分为浸浴组和投喂组, 浸浴组利用麦氏比浊法将筛选的菌株分为 3 个浸浴浓度, 分别为 1×10^9 、 1×10^8 、 1×10^7 CFU/ml。投喂组中将菌液与粉状饲料混合, 饲料中菌液浓度配置为 1×10^{10} 、 10^9 、 10^8 CFU/g。同时设立空白对照组, 只投喂基础饲料(豆粕 10%, 鱼粉 8%, 马尾藻 25%, 脱胶海带粉 30%, 麦饭石 10%, 贝壳粉 16.5%, 多维预混料 0.5%)。

实验共进行 30 d, 实验水槽为长方形, 有效容积为 15 L。实验期间, 水温为 12–14 $^{\circ}\text{C}$ 、盐度为 29, 保持充气, 每天投喂 1 次, 投喂量为刺参体重的 4%, 每天利用虹吸法去除实验槽内的残饵和粪便, 日换水量为 1/5, 换水后浸浴组补充相应浓度的菌液。实验期间每天观察并记录刺参的活动、摄食、排便、死亡等情况。

分别在实验开始和结束时, 按照廖梅杰等(2010)的方法测定 15 头刺参的总重, 分别记为 W_0 和 W_T , 计算实验开始时刺参个体平均体重($w_0=W_0/15$), 和实验结束时刺参个体平均体重($w_T=W_T/15$), 各数据以平均数 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示, 计算相对增重率:

相对增重率(%)=(终末体重-初始体重)/初始体重 \times 100

1.8 细菌的生理生化鉴定

参照麦氏比浊法制备浓度约为 1×10^5 CFU/ml 的菌悬液, 以细菌微量检定管进行生理生化指标的测定。参照《Bergey's manual of determinative bacteriology》(Williams *et al.*, 1994)和《常见细菌系统鉴定手册》(东秀珠等, 2002)进行归类判定。

1.9 细菌的 16S rDNA 测序分析

1.9.1 PCR 模板的制备 利用无菌去离子水将纯培养的细菌制成菌悬液, 采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生物)提取所纯化细菌的 DNA。

1.9.2 16S rDNA 序列的 PCR 扩增和序列测定 利用细菌 16S rDNA 基因通用引物对细菌总 DNA 的相应序列进行扩增, 引物为 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGGCTACCTTGT-TACGACTT-3')。25 μl 的 PCR 扩增反应体系, 扩增程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min, 30 个循环, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 温育 10 min, 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检验后, 送至测序公司测序。

1.9.3 序列分析和系统发育树构建 将测序结果在 NCBI 基因库中序列比对, 并通过 MEGA 5.1 软件构建系统发育树。

2 结果

2.1 拮抗菌的筛选

经过分离纯化从刺参大水面养殖池塘中获得 66 株细菌, 筛选出具有拮抗作用的 6 株菌株, 如表 1 所示,

表 1 拮抗菌的筛选
Tab.1 Selection of antagonistic bacteria

菌株编号 Strain No.	季节 Season	温度 Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	细菌数量 Bacterial population (CFU/ml)	细菌总数 Total Plate Count (CFU/ml)	优势度 Dominance (%)	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone(mm)	
						假交替单胞菌 <i>P. nigrifaciens</i>	灿烂弧菌 <i>V. splendidus</i>
YQ-1	春季 Spring	9.48 \pm 0.15	80	5.0×10^3	1.6	22	22
YQ-2*	春季 Spring	9.48 \pm 0.15	210	5.0×10^3	4.2	24	22
	夏季 Summer	27.77 \pm 0.33	280	8.0×10^3	3.5	24	22
	秋季 Autumn	12.33 \pm 0.07	170	6.5×10^3	2.6	24	22
	冬季 Winter	0.23 \pm 0.03	140	3.0×10^3	4.6	24	22
YQ-3	夏季 Summer	27.77 \pm 0.33	90	8.0×10^3	1.1	25	12
YQ-4	秋季 Autumn	12.33 \pm 0.07	80	6.5×10^3	1.2	25	12
YQ-5	冬季 Winter	0.23 \pm 0.03	170	3.0×10^3	5.7	24	28
YQ-6	冬季 Winter	0.23 \pm 0.03	110	3.0×10^3	3.7	0	12

*: YQ-2 菌株是通过病原菌拮抗实验、产酶能力实验以及安全性实验综合评价筛选出的潜在益生菌, 因此, 对该菌在大水面刺参池塘四季变化进行分析

*: YQ-2 is a potential probiotic bacterium screened through the methods of pathogen antagonism, enzyme production ability and safety testing, so its seasonal changes of the bacteria in the large water pond for *A. japonicus* farming was analyzed

其中,春季和冬季分别获得2株,夏季和秋季分别获得1株。冬季获得的YQ-5菌株和春季获得的YQ-1、YQ-2菌株对2株指示菌均具有较强的抑制性,而冬季获得的YQ-6对假交替单胞菌无拮抗作用。夏季和秋季获得的YQ-3、YQ-4对假交替单胞菌有较好的拮抗作用,而对灿烂弧菌拮抗作用较弱。

获得拮抗菌在环境中的优势度如表1所示,春季和冬季所获得的拮抗菌在环境中所占的优势较高,优势度分别为1.6%、4.2%、5.7%、3.7%,而夏季和秋季获得拮抗菌的优势度较低,优势度分别为1.1%和1.2%。YQ-2菌株在大水面刺参池塘四季水体中数量为140~280 CFU/ml,高于其他菌株,同时,该菌株在水体中还具有较高的优势度,优势度分别为4.2%、3.5%、2.6%、4.6%,冬、春季节,该菌株的优势度明显高于夏、秋季节。

2.2 产酶能力实验

实验对有拮抗作用6株菌进行产酶能力测试,结果见表2。从表2可以看出,菌株YQ-1、YQ-2、YQ-3、YQ-4和YQ-5菌株均具有产蛋白酶和淀粉酶的能力,不同的菌株产酶能力差异较大,其中,YQ-2产蛋白酶的能力最强,YQ-3产蛋白酶和淀粉酶能力均较强,冬季筛选的菌株YQ-6只产蛋白酶,YQ-5产蛋白酶

能力较弱。

表2 候选菌株的产酶能力比较
Tab.2 Comparison of the ectoenzyme-producing ability of the candidate strains

细菌编号 Strain No.	产酶水解圈直径 Diameter of enzymatic hydrolysis (mm)	
	蛋白酶 Protease	淀粉酶 Amylase
YQ-1	28	28
YQ-2	36	22
YQ-3	32	32
YQ-4	28	22
YQ-5	14	22
YQ-6	24	0

2.3 安全性实验

综合以上实验结果,选取YQ-1、YQ-2和YQ-3菌株对刺参进行安全性实验,结果见表3。由表3可以看出,刺参在YQ-1高浓度(10^9 CFU/ml)浸浴组出现了死亡现象,其他实验组没有出现死亡,在高浓度浸浴组和投喂组不同程度出现吐肠情况,整个实验过程中刺参状态较差。YQ-3在 10^7 CFU/ml浓度下浸浴,没有发生排脏和死亡现象,相对增重率达到了33.19%,说明 10^7 CFU/ml浓度浸浴对刺参相对安全。YQ-2菌株

表3 候选菌株的安全性实验结果
Tab.3 Results of the safety tests of the candidate strains

菌株编号 Strain No.	浓度 Concentration	方式 Method	初始体重 Initial weight (g)	终末体重 Final weight (g)	相对增重率 Relative growth rate (%)	排脏数量(头) Evisceration number	死亡数量(头) Mortality
YQ-1	10^7 CFU/ml	浸浴 Dipping bath	10.53±0.17	13.83±0.07	31.39±2.2	0	0
	10^8 CFU/ml	浸浴 Dipping bath	10.77±0.12	12.77±0.09	18.51±1.3	0	0
	10^9 CFU/ml	浸浴 Dipping bath	10.53±0.14	12.66±0.21	15.04±1.0	0	1
	10^8 CFU/g	投喂 Feeding	10.67±0.36	12.68±0.52	18.86±0.9	0	0
	10^9 CFU/g	投喂 Feeding	10.97±0.22	12.56±0.09	14.48±1.5	3	0
	10^{10} CFU/g	投喂 Feeding	10.48±0.11	11.53±0.20	10.00±2.9	2	0
YQ-2	10^7 CFU/ml	浸浴 Dipping bath	10.39±0.21	14.40±0.17	38.53±1.1	0	0
	10^8 CFU/ml	浸浴 Dipping bath	10.38±0.15	13.42±0.19	29.28±1.2	0	0
	10^9 CFU/ml	浸浴 Dipping bath	10.37±0.09	12.66±0.10	22.08±0.8	2	0
	10^8 CFU/g	投喂 Feeding	10.45±0.14	14.55±0.20	39.31±0.7	0	0
	10^9 CFU/g	投喂 Feeding	10.44±0.07	13.35±0.12	27.83±0.8	0	0
	10^{10} CFU/g	投喂 Feeding	10.57±0.11	11.82±0.04	11.83±0.8	0	0
YQ-3	10^7 CFU/ml	浸浴 Dipping bath	10.41±0.11	13.86±0.07	33.19±1.1	0	0
	10^8 CFU/ml	浸浴 Dipping bath	10.33±0.10	12.87±0.10	24.60±2.1	1	0
	10^9 CFU/ml	浸浴 Dipping bath	10.40±0.06	12.25±0.09	17.80±1.3	1	0
	10^8 CFU/g	投喂 Feeding	10.48±0.14	13.18±0.03	25.82±1.8	3	0
	10^9 CFU/g	投喂 Feeding	10.45±0.07	12.56±0.09	20.12±0.7	2	0
	10^{10} CFU/g	投喂 Feeding	10.55±0.06	11.49±0.13	8.88±0.9	2	0

在 10^8 CFU/ml 浸浴和投喂 10^8 CFU/g 粉末饲料, 养殖 30 d 内刺参无发病和死亡现象, 整个过程刺参状态良好, 而且随着菌株浓度的降低, 刺参的相对增重率升高, 10^8 CFU/g 粉末饲料投喂组相对增重率达到 39.31%。

2.4 生理生化鉴定

对候选菌株 YQ-2 进行后期的生理生化鉴定 (表 4)。从表 4 可知, 菌株 YQ-2 在低盐度的胰胨水中可以正常生长, 10% NaCl 胰胨水中该菌株不能生长, 能够分解葡萄糖, 不能分解蔗糖、甘露醇、肌醇、阿拉伯糖、乳糖、山梨醇、鼠李糖、蜜二糖、木糖; 苦杏仁苷、丙二酸盐、3% NaCl 鸟氨酸脱羧酶、3% NaCl 赖氨酸脱羧酶、3% NaCl 精氨酸双水解酶、3% NaCl 明胶、西蒙氏枸橼酸盐呈阳性; 3% NaCl ONPG、3% NaCl 尿素酶、Kovacs 试剂、3% NaCl MR-VP、3% NaCl 硫化氢、氧化酶呈阴性。依据《Bergey's manual of determinative bacteriology》(Williams *et al.*, 1994)和 Gordon(1983)《芽孢杆菌属》中芽孢杆菌属的特征对上述菌株进行分类地位的鉴定, 它们均属于芽孢杆菌科(Bacillaceae)的芽孢杆菌属(*Bacillus*)。通过比较该菌株在不同温度下的生长情况, 结果显示, 该菌株在 10–40℃ 都能生长, 对温度的适应性较强。

2.5 16S rDNA 序列测定分析以及系统发育树的构建

采用通用引物对菌株 YQ-2 的 16S rDNA PCR 扩增, 产物的长度为 1420 bp, 采用 Blast 对所获得的测序结果在 NCBI 数据库进行序列相似性比对分析, 系统发育树如图 1 所示。结果表明, 本研究分离所获得的菌株均属于芽孢杆菌科(Bacillaceae)的芽孢杆菌属(*Bacillus*)。YQ-2 与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* strain KLP2015)相似性为 99%。

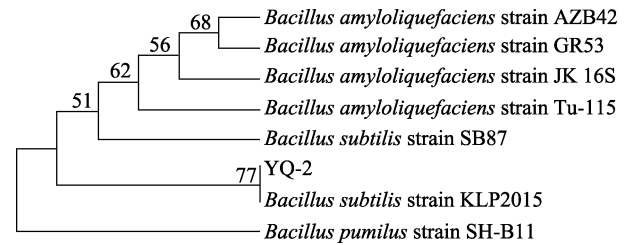


图 1 菌株 YQ-2 16S rDNA 序列的系统发育树
Fig.1 The 16S rDNA gene sequence clustering results of the strain YQ-2

3 讨论

本研究利用细菌的形态学特征, 从不同季节的大水面刺参养殖池塘环境中分离获得 66 株细菌, 通过对病原菌的拮抗实验, 初步筛选出 6 株对刺参病原菌

表 4 候选菌株 YQ-2 的生理生化特征

Tab.4 Physiological and biochemical characteristics of the candidate strain YQ-2

项目 Items	YQ-2	项目 Items	YQ-2
5℃	-	3% NaCl 葡萄糖 3% NaCl Glucose	+
10℃	+	3% NaCl 蔗糖 3% NaCl Sucrose	-
15℃	+	3% NaCl 甘露醇 3% NaCl Mannitol	-
20℃	+	3% NaCl 阿拉伯糖 3% NaCl Arabionse	-
25℃	+	蜜二糖 Melibiose	-
30℃	+	3% NaCl ONPG	-
35℃	+	3% NaCl 尿素酶 3% NaCl Urease	-
40℃	+	木糖 Xylose	-
无盐胰胨水 No salt tryptone water	+	3% NaCl 鸟氨酸脱羧酶 3% NaCl Ornithine decarboxylase	+
3% NaCl 胰胨水 3% NaCl Tryptone water	+	3% NaCl 赖氨酸脱羧酶 3% NaCl Lysine decarboxylase	+
6% NaCl 胰胨水 6% NaCl Tryptone water	+	3% NaCl 精氨酸双水解酶 3% NaCl Arginine dihydrolase	+
10% NaCl 胰胨水 10% NaCl Tryptone water	-	Kovacs 试剂 Kovacs reagent	-
3% NaCl 乳糖 3% NaCl Lactose	-	3% NaCl MR-VP	-
山梨醇 Sorbitol	-	3% NaCl 明胶 3% NaCl Gelatine	+
苦杏仁苷 Amygdalin	+	西蒙氏枸橼酸盐 Simmons Citrate	+
肌醇 Inositol	-	3% NaCl 硫化氢产生 3% NaCl Hydrothion produce	-
丙二酸盐 Malonate	+	氧化酶试纸 Oxidase Strips	-
鼠李糖 Rhamnose	-	半固体琼脂 Semi-solid agar	-

注: +表示阳性, -表示阴性

Note: +: Positive; -: Negative

具有较强抑制作用的拮抗菌。从获得的拮抗菌种类和优势度可以看出,春季和冬季具有优势的拮抗菌种类较多,且呈现较高的优势度,春季 YQ-1、YQ-2 菌株的优势度分别为 1.6%和 4.2%;冬季 YQ-5、YQ-6 菌株的优势度分别为 5.7%和 3.7%,均高于夏季和秋季。张春云等(2006)报道冬、春季节是刺参“腐皮综合征”的多发季节;李彬等(2012)发现,冬、春季弧菌(*Vibrio*)的比例较高,这与冬、春刺参疾病发生相关。本研究中,春季和冬季拮抗菌种类和优势度均较高,推测这些益生菌与冬、春季节致病弧菌相互制衡形成了生态系统的稳定。

本研究筛选出的拮抗病原菌、产酶能力强、且对刺参安全的菌株 YQ-2,经过生理生化和分子鉴定,确定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。该菌在大水面刺参池塘四季水体中数量在 140–280 CFU/ml 之间,具有较高的优势度,而且冬、春的优势度明显高于夏、秋,说明该菌能够适应低温环境,这对低温期刺参疾病的防控有重要意义。有报道枯草芽孢杆菌还具有提高养殖动物免疫力、净化水质的作用,如刘克琳等(2000)研究发现,枯草芽孢杆菌投喂鲤鱼(*Cyprinus carpio*)能显著提高鲤鱼的巨噬细胞呼吸爆发活力和抗嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)的能力,促进鲤鱼免疫器官的成熟;Salinas 等(2005)研究发现,枯草芽孢杆菌和乳酸菌单独或复合投喂能提高金头海鲷(*Sparus aurata*)非特异性免疫力;王月霞等(2016)研究表明,适量投放枯草芽孢杆菌可以降低水体中氨氮和亚硝酸氮的含量;杭小英等(2008)研究表明,使用枯草芽孢杆菌后可以显著降低罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)池塘 COD、氨氮和亚硝酸盐的含量。

芽孢杆菌属细菌是一类好氧或兼性厌氧细菌,在肠道中能分泌蛋白酶、淀粉酶、维生素等,能够提高动物消化机能,促进营养物质的消化和吸收(吴秀红等, 2007),张涛等(2009)研究表明,饲料中添加芽孢杆菌可以显著提高刺参肠道蛋白酶、淀粉酶、溶菌酶的活性;袁成玉等(2006)研究表明,微生态制剂对刺参肠道淀粉酶和蛋白酶活性有显著促进作用;沈斌乾等(2013)研究表明,饲料中添加枯草芽孢杆菌可以显著提高青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)的生长率。本研究获得的枯草芽孢杆菌具有较好的产淀粉酶和蛋白酶能力,说明该菌株可以高效分解食物中的淀粉和蛋白质,应用在刺参养殖中将提高刺参肠道淀粉酶和蛋白酶的活力,增加刺参对营养物质的吸收作用,从而促进刺参的生长。本研究中筛选菌株以 10^8 CFU/ml 浸浴和投喂 10^8 CFU/g 粉末饲料感染刺参,供试刺参均未发病和死亡现象,整个过程刺参健康、活力较好,

说明该菌株对刺参是安全的,且粉末饲料投喂组刺参增长效果较好。田相利等(2015)研究表明,水体中泼洒 10^6 CFU/m³ 和拌饵投喂 10^9 CFU/kg 的芽孢杆菌可显著促进刺参生长,与本研究结果一致。本研究还发现,在细菌浓度较高时,刺参有不同程度的吐肠现象,可能是刺参在高浓度细菌侵染下的应激反应,因此,刺参养殖过程中益生菌的投放量不宜过大。

刺参大水面池塘养殖过程的生态环境较为稳定,很难人为操控,一旦生态平衡破坏,不仅难以通过清淤等方法恢复,而且也难以利用药物进行疾病控制,因此,利用益生菌改良池塘养殖环境、拮抗病原菌的过度繁殖是维持养殖生态平衡以及病害防控的最佳途径。本研究在冬、春低温季节筛选得到优势度较大的枯草芽孢杆菌,属于土著分离菌株,不仅能够抑制病原菌生长,并具有较强的产酶能力,它对低温季节水域生态的维护、菌群构成、防治疾病发生具有重要的作用。今后将深入研究该菌在养殖水域中的四季数量变化规律、相关菌群结构特征、在刺参肠道中定植特点以及对刺参生长的影响等。

参 考 文 献

- Dong CG, Yang AG, Sun XJ, *et al.* The health-promoting effects of *Bacillus subtilis* in the culture of sea cucumber. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(3): 109–115 [董春光, 杨爱国, 孙秀俊, 等. 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)在刺参养殖中的益生作用. *渔业科学进展*, 2015, 36(3): 109–115]
- Dong XZ, Cai MY. *Common bacterial system identification manual*. Beijing: Science Press, 2002 [东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2002]
- Gordon RE, Haynes WC, *et al.* *Bacillus* genus. *Agricultural press*, 1983
- Hang XY, Ye XP, Shi WD, *et al.* Effect of the biological preparation on the shrimp (*Macrobrachium rosenbergii*) pond's water quality. *Journal of Zhejiang Institute of Ocean (Natural Science Edition)*, 2008, 27(2): 197–200 [杭小英, 叶雪平, 施伟达, 等. 枯草芽孢杆菌制剂对罗氏沼虾养殖池塘水质的影响. *浙江海洋学院学报(自然科学版)*, 2008, 27(2): 197–200]
- Holt JG, Krieg NR, Pha S, *et al.* *Bergey's manual of determinative bacteriology* 9th Ed. Williams & Wilkins Company, 1994: 520–521
- Kozasa M. Toyocerin (*Bacillus toyoi*) as growth promotor for animal feeding. *Microbiologie Aliment Nutrition*, 1986(4): 121–135
- Li B, Rong XJ, Liao MJ, *et al.* Annual changes of total heterotrophic bacteria and *Vibrios* in the intestine of *Apostichopus japonicus* and its culture pond. *Marine Sciences*, 2012(4): 63–67 [李彬, 荣小军, 廖梅杰, 等. 刺

- 参肠道与养殖池塘环境中异养细菌和弧菌数量周年变化. 海洋科学, 2012(4): 63–67]
- Liao MJ, Wang YG, Hao ZK, *et al.* Method for measuring body weight of live *Apostichopus japonicus*. ZL 201010100781. 3, 2010 [廖梅杰, 王印庚, 郝志凯, 等. 活体刺参体重测量方法. 专利号: ZL 201010100781. 3, 2010]
- Liu KL, He MQ. Research on the effects of probiotics on the immune function of carp. Feed Industry, 2000, 21(6): 24–25 [刘克林, 何明清. 益生菌对鲤鱼免疫功能影响的研究. 饲料工业, 2000, 21(6): 24–25]
- Liu XY, Zhang Y, Qi Q, *et al.* Effect of *Bacillus subtilis* on growth, digestive enzyme activity, and non-specific immunity in hybrid sturgeon (*Acipenser baeri*♂×*Acipenser schrenkii*♀) juveniles. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(6): 1315–1320 [刘晓勇, 张颖, 齐茜, 等. 枯草芽孢杆菌对杂交鲟幼鱼生长性能、消化酶活性及非特异性免疫的影响. 中国水产科学, 2011, 18(6): 1315–1320]
- Salinas I, Cuesta A, Esteban MÁ, *et al.* Dietary administration of *Lactobacillus delbrueckii* and *Bacillus subtilis*, single or combined, on gilthead seabream cellular innate immune responses. Fish & Shellfish Immunology, 2005, 19(1): 67–77
- Shen BQ, Chen JM, Guo JL, *et al.* Effect of adding *Bacillus subtilis* to diets on growth performance, digestive enzymes activity and body composition of fingerling black carp (*Mylopharyngodon piceus*). Acta Hydrobiologica Sinica, 2013, 37(1): 48–53 [沈斌乾, 陈建明, 郭建林, 等. 饲料中添加枯草芽孢杆菌对青鱼生长、消化酶活性和鱼体组成的影响. 水生生物学报, 2013, 37(1): 48–53]
- Wang YG, Fang B, Zhang CY, *et al.* Etiology of skin ulcer syndrome in cultured juveniles of *Apostichopus japonicus* and analysis of reservoir of the pathogens. Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(4): 610–616 [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]
- Wang YG, Rong XJ, Liao MJ. Sea cucumber culture and disease control technology. Beijing: China Agriculture Press, 2014 [王印庚, 荣小军, 廖梅杰. 刺参健康养殖与病害防控技术丛解. 北京: 农业出版社, 2014]
- Wang YX, Yang XL, Du RB, *et al.* Effect of *Bacillus subtilis* on the ecological factors in marine fish pond. Fishery Modernization, 2016, 43(1): 1–6 [王月霞, 杨秀兰, 杜荣斌, 等. 枯草芽孢杆菌对海水鱼塘生态因子的影响. 渔业现代化, 2016, 43(1): 1–6]
- Wu XH, Zhang XZ, Zhou YC, *et al.* Outline of related *Bacillus* spp. Modern Fisheries Information, 2007, 22(7): 16–18 [吴秀红, 张新中, 周永灿, 等. 关于芽孢杆菌(*Bacillus*)应用概述. 现代渔业信息, 2007, 22(7): 16–18]
- Yuan CY, Zhang H, Wu Y, *et al.* Effect of microecological preparation on growth and activities of digestive enzymes of sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Fisheries Science, 2006, 25(12): 612–615 [袁成玉, 张洪, 吴垠, 等. 微生态制剂对幼刺参生长及消化酶活性的影响. 水产科学, 2006, 25(12): 612–615]
- Zhang CY, Wang YG, Rong XJ. Isolation and identification of causative pathogen for skin ulcerative syndrome in *Apostichopus japonicus*. Journal of Fisheries of China, 2006, 30(1): 118–123 [张春云, 王印庚, 荣小军. 养殖刺参腐皮综合征病原菌的分离与鉴定. 水产学报, 2006, 30(1): 118–123]
- Zhang T, Bai L, Li L, *et al.* Effect of different combinations of probiotics on digestibility and immunity index in sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Journal of Dalian Fisheries University, 2009(S1): 64–68 [张涛, 白岚, 李蕾, 等. 不同添加量的益生菌组合对仿刺参消化和免疫指标的影响. 大连水产学院学报, 2009(S1): 64–68]
- Zhao LQ, Xiao S, Liu T, *et al.* Effect of three probiotics on cultured water quality for sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Journal of Dalian University of Technology, 2014(6): 391–394 [赵留群, 肖珊, 刘彤, 等. 3种微生态制剂对幼刺参养殖水体水质的影响. 大连工业大学学报, 2014(6): 391–394]

(编辑 冯小花)

Screening and Characteristic Analysis of Potential Probiotics from Large Water Ponds Used for Sea Cucumber (*Apostichopus japonicus*) Farming

DU Tuo^{1,2}, LI Bin^{2,3}, WANG Yingeng^{2,3①}, LIAO Meijie^{2,3}, WANG Jinyan^{1,2},
LIU Zhixuan^{1,2}, WANG Shihuan⁴

(1. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao 266071; 4. Dalian Keybridge Marine Seeds Co., Ltd. Wafangdian 116312)

Abstract From December 2014 to December 2015, the flora population structural analysis and beneficial bacteria isolation and screening were carried out in large water ponds of a sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) farm. Sixty-six bacterial strains were isolated from the water body and pond sediment. Two bacterial strains *Pseudoalteromonas nigrifaciens* and *Vibrio splendidus* associated with the “skin ulcerative syndrome” disease were used as indicators in the antagonistic effect trials. Based on the bacterial extracellular amylase, protease activities and challenge tests, one potential probiotic bacterium YQ-2 was obtained. The results showed that this strain had good ability to inhibit the proliferation of *P. nigrifaciens* and *V. splendidus*, evident by the diameter of inhibition zones, 22 mm and 24 mm, respectively; while the diameter of amylase and protease hydrolysis was 22 mm and 36 mm; In addition, the challenge tests revealed that the strain YQ-2 was safe to sea cucumber when it was challenged by bathing the bacterial strain at the concentration of 10^8 CFU/ml, or fed the food inoculated with the bacterial cells at the concentration of 10^8 CFU/g once daily for one month. The present study also found that among the sea cucumbers fed the food containing 10^8 CFU/g bacterial cells, the body weight increased significantly compared with the control group, with the relative growth rate as high as 39.31%. Homogenous analysis using 16S rDNA sequences indicated that the strain YQ-2 had 99% similarity with the *Bacillus subtilis* strain KLP2015. Thus, the strain YQ-2 was tentatively identified as *Bacillus subtilis*. The number of *B. subtilis* in the rearing water was counted in all four seasons and the year-round concentration was about 140–280 CFU/ml, which was higher than other strains. Meanwhile the dominance of YQ-2 was 4.2%, 3.5%, 2.6%, and 4.6% corresponding to Spring, Summer, Autumn and Winter. Furthermore, the dominance of YQ-2 was higher in Spring and Winter compared to Summer and Autumn. Nevertheless, the strain YQ-2 exhibited a strong antibacterial effect on the pathogens *P. nigrifaciens* and *V. splendidus* which were the main pathogenic agents causing the “skin ulcer syndrome” disease. Hence, the strain YQ-2 has great application for farming *A. japonicus* in large water ponds.

Key words *Apostichopus japonicus*; Large water pond; Skin ulcerative syndrome; Probiotic bacterium; *Bacillus subtilis*; Antagonistic bacteria

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

刺参(*Apostichopus japonicus*)保苗期 “肠炎病”及其治疗方法*

逢慧娟^{1,2} 廖梅杰^{2①} 李 彬² 荣小军² 王印庚²
张 正² 孙金生¹ 孟繁林³

(1. 天津师范大学生命科学学院 天津 300387; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室
海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 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. 青岛中仁动物药品有限公司 青岛 266408)

摘要 对 2014 年 3 月山东省蓬莱某刺参(*Apostichopus japonicus*)保苗场患“肠炎病”的刺参进行了临床症状和组织病理学观察以及病原菌分离与鉴定,利用氟苯尼考为治疗药品,以脏壁比、增重率和特定生长率为评判指标,探讨了 3 种不同用药方式(口服、药浴、口服+药浴)对刺参保苗期“肠炎病”的治疗效果。结果显示,刺参“肠炎病”症状表现为体色发黑,附着能力弱,摄食和活动能力差,解剖后可见肠道内食物不连续,肠腔内有大量黄白色粘液或浓状物质,肠道壁变脆、韧性差且易断裂,显微镜下观察到肠道存在大量细菌;组织病理学显示,患病刺参肠道绒毛膜散乱、粘膜层溃散,结缔组织散乱,且与肌肉层分离较明显。自刺参肠道处分离出优势度最高的细菌 In-1 菌株,人工感染实验证实,该菌为刺参“肠炎病”致病菌,该致病菌主要来源于饲料藻粉。利用细菌形态观察、生理生化和分子生物学方法(16S rDNA 和 *gyrB*)鉴定该菌株为哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)。该菌株对头孢三嗪、阿奇霉素、强力霉素和氟苯尼考等 12 种药物高度敏感。不同用药方式的治疗效果显示,使用氟苯尼考药浴可获得最佳治疗效果,刺参经药浴治疗后增重率达(24.23±0.41)%,特定生长率达(0.77±0.01)%/d。本研究可为刺参疾病防控和健康养殖提供理论依据和技术参考。

关键词 刺参; 肠炎病; 哈维氏弧菌; 氟苯尼考; 治疗方法

中图分类号 S947.9 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)03-0188-10

自 20 世纪 80 年代刺参(*Apostichopus japonicus*)苗种规模化繁育技术突破以来,我国刺参养殖业迅猛发展。然而,随着刺参集约化养殖的扩展,刺参育苗、保苗和养殖过程中病害问题也日益严重。目前,已报道的育苗期刺参疾病主要有烂边病、烂胃病和化板症等,而保苗期和养成期则以腐皮综合征的危害最为严

重(王印庚等, 2006、2012),目前尚未见刺参“肠炎病”及其病因的相关报道。2014 年 3 月,山东省蓬莱某刺参育苗场保苗期刺参出现滞长现象,解剖后发现刺参肠道几乎为空肠,肠腔内有大量白色粘液或者脓状物质,肠道壁变脆、韧性差且易断裂,根据其发病症状,将此病命名为“肠炎病”。为了查找刺参“肠

* 中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022016008)、山东省农业良种工程重大项目、山东省自主创新成果转化专项(2013ZHGX2A0801)和青岛市民生科技计划项目(14-9-3-3-hy)共同资助[This work was supported by Special Scientific Research Funds for Central Non-profit Institutes, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences (20603022016008), Agriculture Seed Improvement Project of Shandong Province, Special Research Funds for Independent Innovation and Scientific & Technology Achievements Transformation of Shandong Province (2013ZHGX2A0801), and Science and Technology Program of Qingdao (14-9-3-3-hy)]. 逢慧娟, E-mail: huijuanpang@126.com

① 通讯作者: 廖梅杰, 副研究员, E-mail: liaomj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-07-20, 收修改稿日期: 2016-08-18

炎病”的病原并探讨其治疗方法,作者对该保苗场患病刺参进行了病理学观察和病原分离鉴定,并以对病原有明显抑制作用的水产用氟苯尼考为治疗药物,开展了不同用药方式对“肠炎病”治疗效果的评价,以期对刺参“肠炎病”的防治、健康养殖提供理论依据和技术参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2014年5月,患病刺参苗种取自山东省蓬莱某刺参保苗场,参苗平均规格为(8.25±1.57)g/头。选取发病症状明显的幼参30头,低温水运带回实验室,同时采集养殖池水源水、波纹板附着基沉积物以及投喂的饲料原料(藻粉、干海泥),用于致病来源分析。

人工回接感染所用的健康刺参苗种采自青岛市某刺参育苗场,药敏纸片购自杭州微生物试剂有限公司,治疗实验所用水产用氟苯尼考药品购自青岛中仁动物药品有限公司,藻粉是该养殖场以海带(*Laminaria japonica*)、鼠尾藻(*Sargassum thunbergii*)、马尾藻(*Sargassum*)和石莼(*Ulva pertusavar*)为原料自行加工而成。

1.2 实验方法

1.2.1 病样检查与组织病理学观察 肉眼观察病参的临床表现,在无菌条件下对病参进行解剖,取参苗体表、肠道、呼吸树等器官组织,制作水浸片,进行显微观察和记录,确定是否有寄生虫、霉菌和细菌。

取患病刺参的肠道组织,Davidson's固定液固定24h后,经脱水、浸蜡、石蜡包埋、切片、苏木精-伊红(HE)染色等步骤,使用Nikon公司的Eclipse E800 Olympus显微镜观察,用Nikon DS-Fi1摄像头结合Nikon NIS-Elements图像分析软件对组织进行显微拍照(郝继光等,2015)。

1.2.2 病原菌分离 在无菌条件下,剪取少许肠道组织,研磨后取研磨液,在胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB培养基)上,用平板划线法进行细菌分离,于28℃恒温生化培养箱培养24h。挑取培养基上优势菌落,重复3次分离纯化培养,获得纯化菌株。

分别取养殖池水源水、池水、附着基沉积物、饵料(藻粉和干海泥)、肠道研磨液,用无菌海水进行10倍梯度稀释涂板,28℃培养24h后,取合适稀释度的平板进行菌落形态特征观察,分类、计数,分离纯化优势度高的菌株。

1.2.3 人工感染实验 实验用刺参苗暂养7d后,选取健康、大小均匀的个体进行实验。将肠道中分离

纯化的2株优势菌株分别接种于TSB液体培养基中,28℃培养24h,离心获得菌泥,用无菌生理盐水按照比浊法配制成 1.0×10^{11} CFU/ml的菌悬液,与消毒后的刺参藻粉和干海泥一起配制成含菌量为 1.0×10^6 CFU/g的饲料(细菌浓度按照藻粉和干海泥总重计算),进行投喂攻毒实验。以投喂不添加分离优势菌的消毒藻粉和干海泥配制的饲料作为对照组,每组设3个平行,每个平行水槽(5L)中放养20头刺参。实验期间,水温保持在18~20℃,盐度为30,每天换水量为50%,连续投喂15d(感染组需补充细菌,维持感染浓度),观察并记录刺参的活动、摄食及死亡情况,从感染后出现症状的苗种肠道再次分离优势细菌,进行菌落形态观察,确定病原菌。

1.2.4 病原菌的分类鉴定 将纯培养的细菌于28℃培养24h后,按常规方法进行革兰氏染色和显微观察。采用青岛海博生物的细菌微量生化鉴定管对分离纯化的菌株进行生理生化指标测试。分子生物学鉴定流程为:挑取纯培养的单菌落于纯水中制备菌悬液,于100℃金属浴加热10min,离心后,取上清液作为模板DNA。采用细菌16S rDNA通用引物(27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1492R: 5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3')和 *gyrB* 通用引物(UP-1: 5'-GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGC-NGGNGGNAARTTYGA-3', UP-2r: 5'-AGCAGGGT-ACCGATGTGCGAGCCRTCNCACRTCNCRCNCNGT-CAT-3')(Yamamoto *et al*, 1995),对纯培养的细菌16S rDNA和 *gyrB* 进行PCR扩增,扩增产物交由青岛擎科梓熙生物技术有限公司进行测序。测序的结果登录GenBank进行Blast比对,从RDP数据库(http://rdp.cme.msu.edu/hierarchy/hb_intro.jsp)和GenBank数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)中选取与待分类菌株序列相似或相近的菌株,采用ClustalX2.1(<http://www.clustal.org/download/current/>)软件进行多序列匹配分析后,用MEGA6(www.megasoftware.net)构建该菌的系统发育树。

1.2.5 病原菌的药敏实验 选择常见的36种药物,采用药敏纸片扩散法进行药敏测试:配置浓度约为 1×10^9 CFU/ml的菌悬液,取0.1ml均匀涂布于TSB培养基上,用无菌镊子将药敏纸片贴于该培养基表面,28℃恒温培养24h后,观察有无抑菌圈产生,并测量抑菌圈直径。

1.2.6 不同用药方式对刺参“肠炎病”治疗效果对比 选取该养殖场患刺参“肠炎病”的12个养殖池,将患病池苗种收集称重后,按照 2.5 kg/m^3 的密度布池。用药方式共分为4组:药浴组、口服组、口服+

药浴组、对照组, 每组设3个平行。其中, 药浴组的用药方法为: 将氟苯尼考粉溶解后, 按照 15 g/m^3 的浓度进行全池泼洒, 药浴2 h后, 进行正常投饵, 每日换水后, 补加药物使药物浓度维持在 15 g/m^3 ; 口服组的用药方法为: 将氟苯尼考粉溶解后, 添加到经煮沸消毒的干海泥和海藻粉中, 充分混匀后, 投喂刺参苗种, 药物浓度为 30 g/kg 饲料(按照海藻粉和干海泥总重计算); 口服+药浴组为口服方法和药浴方法同时使用; 对照组为投喂未添加药物的正常消毒饲料, 养殖用水也未添加药物。用药周期为3 d, 药浴或口服用药结束后, 所有实验组按照与对照组相同的养殖操作工艺进行养殖。养殖期间, 3 d倒池1次, 28 d换片前实验结束。实验期间, 养殖用水为砂滤水, 水温为 $16\text{--}21^\circ\text{C}$, 盐度为 $28\text{--}32$, 每天换水量50%, 充气, $\text{DO} \geq 5 \text{ mg/L}$, 每天投喂2次, 日投喂量(以藻粉计)为刺参体重的2%, 干海泥和海藻粉的配比为 $1:1$ 。实验期间, 每天巡池检查相应实验组刺参的生理状态和摄食情况。

实验结束后, 自每个实验池中随机选取30头刺参, 解剖后, 称量体壁和内脏质量。计算脏壁比(Rate of viscera to body wall, RVBW), 公式如下:

$$\text{RVBW} = W_v / W_w \times 100\%$$

式中, W_v 为内脏质量(g), W_w 为体壁质量(g)。

换片前停食1 d, 使刺参苗种排空肠道内食物,

收集养殖池内海参苗种, 参照廖梅杰等(2010)方法进行称重, 计算不同用药方式实验组刺参苗种的增重率(Weight gain rate, WGR)和体重特定生长率(Specific growth rate, SGR), 公式如下:

$$\text{WGR} = (w_T - w_0) / w_0 \times 100\%$$

$$\text{SGR} = (\ln w_T - \ln w_0) / t \times 100\%$$

式中, w_T 为实验池终末刺参的总体重, w_0 为实验池初始刺参的总体重, t 为实验时间。

1.2.7 数据统计分析 实验结果采用平均值±标准误(Mean±SE)表示, 采用SPSS 17.0软件进行统计分析。经方差分析之后, 有显著差异的做Duncan's多重比较, 进行组间显著性差异的两两比较, 显著水平 P 为0.05。

2 结果

2.1 刺参“肠炎病”发病症状与病理学观察

刺参“肠炎病”的症状表现为摄食能力差、生长速度缓慢、附着力弱, 苗种大部分脱落于池底, 波纹板附着基上附着数量较少, 发病率达到90%以上, 但无化皮死亡现象。解剖观察后发现, 刺参肠道内食物不连续, 肠腔内有大量黄白色粘液或者脓状物质, 肠道壁变脆、韧性差且易断裂(图1)。显微镜下, 所有病样体表、肠道、呼吸树等器官组织的水浸片均未发现霉菌和寄生虫, 在肠道水浸片中存在大量细菌。

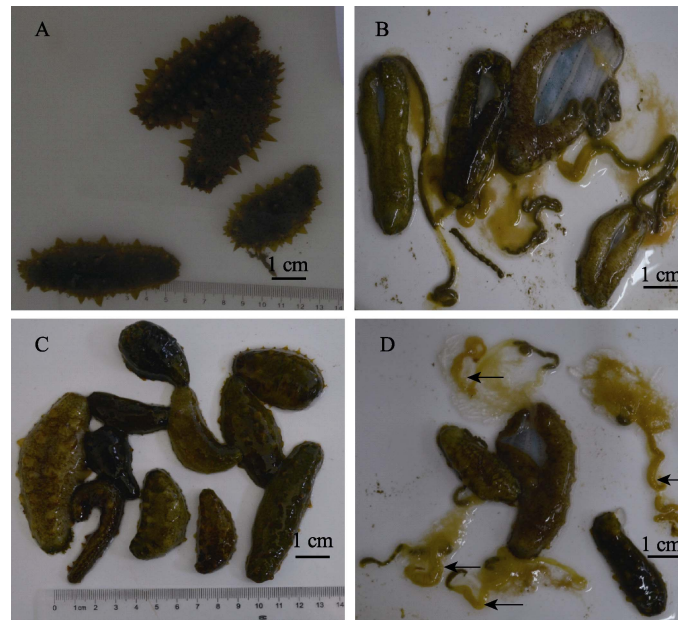


图1 正常及患“肠炎病”刺参外观及解剖图

Fig.1 The appearance and anatomic image of healthy and enteritis disease infected sea cucumbers (*A. japonicus*)

A: 正常刺参外观; B: 正常刺参解剖图; C: 患病刺参外观; D: 患病刺参解剖图; 箭头示患病肠道
A: Appearance of healthy sea cucumber; B: Anatomic image of healthy sea cucumber; C: Appearance of sick sea cucumber; D: Anatomic image of sick sea cucumber; Arrows indicated infected intestine

组织病理学观察显示,患病刺参肠腔游离面的绒毛膜散乱,分泌消化酶的能力减弱,染色较浅,消化道的粘膜层和粘膜下层发生组织分离,结缔组织层增生,外层肌肉层发生溃散,并且结缔组织与肌肉层分离较明显(图2)。

2.2 病原菌分离

从患病刺参肠道组织分离出2株优势菌 In-1 和 In-2 (表1), 其中 In-1 的优势度为78%, 在 TSB 培养基上的菌落形态为圆形, 半透明, 菌落光滑, 中心部呈乳白色, 菌落大小为 1.0–1.2 mm, 菌台呈米黄色; In-2 的优势度为20%, 在 TSB 培养基上的菌落形态为圆形, 菌台与菌落均为透明至半透明, 菌落 ≤ 1.0 mm,

浅白色, 表面光滑, 圆润, 边缘不规则。

对养殖系统中养殖池水源水、养殖池水、附着基沉积物、干海泥和藻粉等组成部分的细菌培养结果可知(表1), 养殖饲料原料——藻粉中含有大量的细菌(可达 3.10×10^6 CFU/g), 且藻粉中所分离得到的2株优势菌 AP-1 和 AP-2 的特征与患病刺参肠道组织中分离的优势细菌 In-1 和 In-2 以及养殖池水和附着基沉积物中的优势菌一致。养殖池水源水和干海泥中的细菌含量分别为 150 CFU/ml 和 4.90×10^3 CFU/g, 且这2个样本中均没有优势菌落, 所分离的菌落与病灶处的优势菌不同。由此推测, 水源和干海泥不是病原菌的来源, 饵料所用藻粉可能是此次“肠炎病”病原菌的来源。

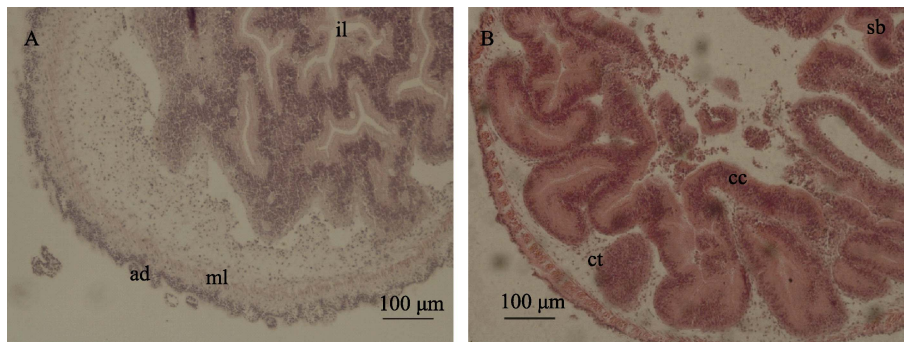


图2 患病刺参和正常刺参肠道组织结构的显微观察(横切)

Fig.2 Microscopic observation of the intestine of sick and healthy sea cucumbers (*A. japonicus*)(transverse sections)

A: 患病刺参; B: 正常刺参

A: Sick sea cucumber; B: Healthy sea cucumber

ml: 肌肉层(Muscular layer); ad: 外膜层(Adventitia); il: 肠腔(Intestine lumen);

sb: 纹状缘(Striated border); cc: 柱状细胞(Columnar cell); ct: 结缔组织(Connective tissue)

表1 患“肠炎病”刺参及其养殖系统的细菌分析

Tab.1 Bacterial analysis of the enteritis disease infected sea cucumber (*A. japonicus*) and its rearing system

细菌来源 Source of bacteria	细菌数量 Quantity of bacteria	优势菌编号 Code of dominant bacteria	菌落特征 Characteristics of bacterial colony	优势度 Percentage of dominant bacteria (%)
肠道组织 Intestine	5.37×10^5 CFU/g	In-1	圆形, 半透明, 菌落光滑, 中心部呈乳白色, 菌落大小为 1.0–1.2 mm, 菌台呈米黄色	78
		In-2	菌台与菌落均为透明至半透明, 菌落 ≤ 1.0 mm, 浅白色, 表面光滑, 圆润, 边缘不规则	20
养殖池水源水 Water supply	1.50×10^2 CFU/ml	—	多种不同形态的菌落, 无 In-1 和 In-2	—
养殖池水 Pond water	1.54×10^5 CFU/ml	PW-1	同 In-1	88
		PW-2	同 In-2	10
附着基沉积物 Substrate sediments	5.40×10^5 CFU/cm ²	SS-1	同 In-1	60
		SS-2	同 In-2	35
干海泥 Dry sea mud	4.90×10^3 CFU/g	—	多种不同形态的菌落, 无 In-1 和 In-2	—
藻粉 Algae powder	3.10×10^6 CFU/g	AP-1	同 In-1	80
		AP-2	同 In-2	15

2.3 人工感染实验

In-1 和 In-2 采用投喂攻毒的方式进行人工感染。攻毒实验期间, 对照组在 15 d 内表现正常, 未出现病变和死亡现象; In-1 攻毒投喂组刺参苗种自攻毒感染后第 3 天开始, 出现拖便现象、摄食量下降, 到第 5 天参苗伸展和附着能力下降、聚集于池底、活动能力减弱, 解剖可见肠道内食物不连续、肠腔内有黄白色脓状物质、肠道壁变脆易断裂, 攻毒感染实验 15 d 内, 参苗未出现化皮、死亡现象; In-2 菌株攻毒投喂组刺参苗种, 未出现病变和死亡现象。从 In-1 人工感染实验发病的肠道组织中再次分离到与 In-1 菌落形态完全一致的细菌, 符合科赫法则, 证明所分离的 In-1 细菌为引起本次刺参“肠炎病”的致病菌。

2.4 病原菌的分类鉴定

In-1 的革兰氏染色及观察结果显示(图 3), 该菌为革兰氏阴性菌, 短杆状, 略有弯曲, 长约为 1.8–2.3 μm 。In-1 的生理生化测定结果显示(表 2), 该菌株能在 TCBS 培养基上生长, 能在 3%和 6% NaCl 胰胨水中生长, 在 0 和 10% NaCl 胰胨水中不生长, 不能在半固体琼脂上生长; 能分解葡萄糖、蔗糖、甘露醇、阿拉伯糖、肌醇、鼠李糖和蜜二糖和西蒙氏枸橼酸盐, 不分解乳糖、山梨醇、木糖、苦杏仁苷和丙二酸盐; 鸟氨酸脱羧酶反应阳性; 邻硝基苯- β -D-半乳糖苷(ONPG)、尿素酶、赖氨酸脱羧酶反应阴性。利用 PCR 扩增得到 In-1 菌株的 16S rDNA 序列和 *gyrB* 基因序

列可信区长度分别为 1364 bp 和 1145 bp。将测序结果与 NCBI 核酸数据库进行比对分析发现, 该菌株与哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)同源性最高, 同源性分别为 99.92%和 98.05%, 系统发育树显示, In-1 菌株与哈维氏弧菌聚为一支(图 4 和图 5)。因此, 将 In-1 菌株鉴定为哈维氏弧菌。

2.5 药敏实验

In-1 菌株的药敏实验结果显示(表 3), 该菌对氯霉素、头孢三嗪、四环素、氧氟沙星、头孢他啶、环丙沙星、罗美沙星、氟罗沙星、阿奇霉素、新生霉素、强力霉素和氟苯尼考 12 种抗菌素高度敏感; 对利福平、红霉素、氟哌酸、克拉霉素、美满霉素、头孢唑肟、恩诺沙星、多黏霉素 B 和头孢氨噻肟 9 种抗菌素

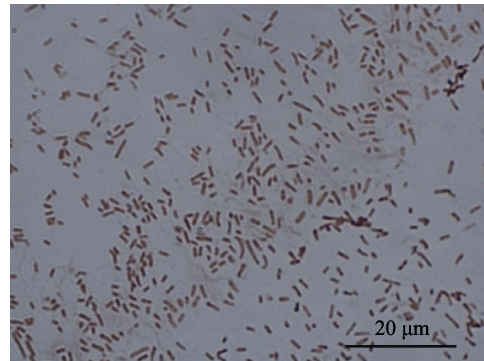


图 3 菌株 In-1 的革兰氏染色
Fig.3 Gram-stain of bacterial strain In-1

表 2 In-1 菌株生理生化特征
Tab.2 Physiological and biochemical characteristics of bacterial strain In-1

检测项目 Test items	结果 Results	检测项目 Test items	结果 Results
革兰氏染色 Gram stain	-	苦杏仁苷 Laetrole	-
运动性 Motility	-	肌醇 Inositol	+
TCBS 生长 Growth on TCBS	+	丙二酸盐 Sodium malonate	-
0 NaCl 胰胨水 0 NaCl pancreatic peptone water	-	鼠李糖 L-rhamnose monohydrate	+
3% NaCl 胰胨水 3% NaCl pancreatic peptone water	+	蜜二糖 Melibiose	+
6% NaCl 胰胨水 6% NaCl pancreatic peptone water	+	3% NaCl ONPG	-
10% NaCl 胰胨水 10% NaCl pancreatic peptone water	-	3% NaCl 尿素酶 3% NaCl urease	-
3% NaCl 葡萄糖 3% NaCl glucose	+	木糖 Xylose	-
3% NaCl 蔗糖 3% NaCl sucrose	+	3% NaCl 鸟氨酸脱羧酶 3% NaCl ornithine	+
3% NaCl 甘露醇 3% NaCl mannitol	+	3% NaCl 赖氨酸脱羧酶 3% NaCl lysine decarboxylase	-
3% NaCl 阿拉伯糖 3% NaCl L-arabinose	+	西蒙氏枸橼酸盐 Simmons citrate salt	+
3% NaCl 乳糖 3% NaCl lactose	-	3% NaCl 硫化氢产生 3% NaCl to produce hydrogen sulfide	-
山梨醇 Sorbitolum	-	半固体琼脂 Semi-solid AGAR	-

“+”表示阳性;“-”表示阴性

“+” denoted positive;“-” denoted negative

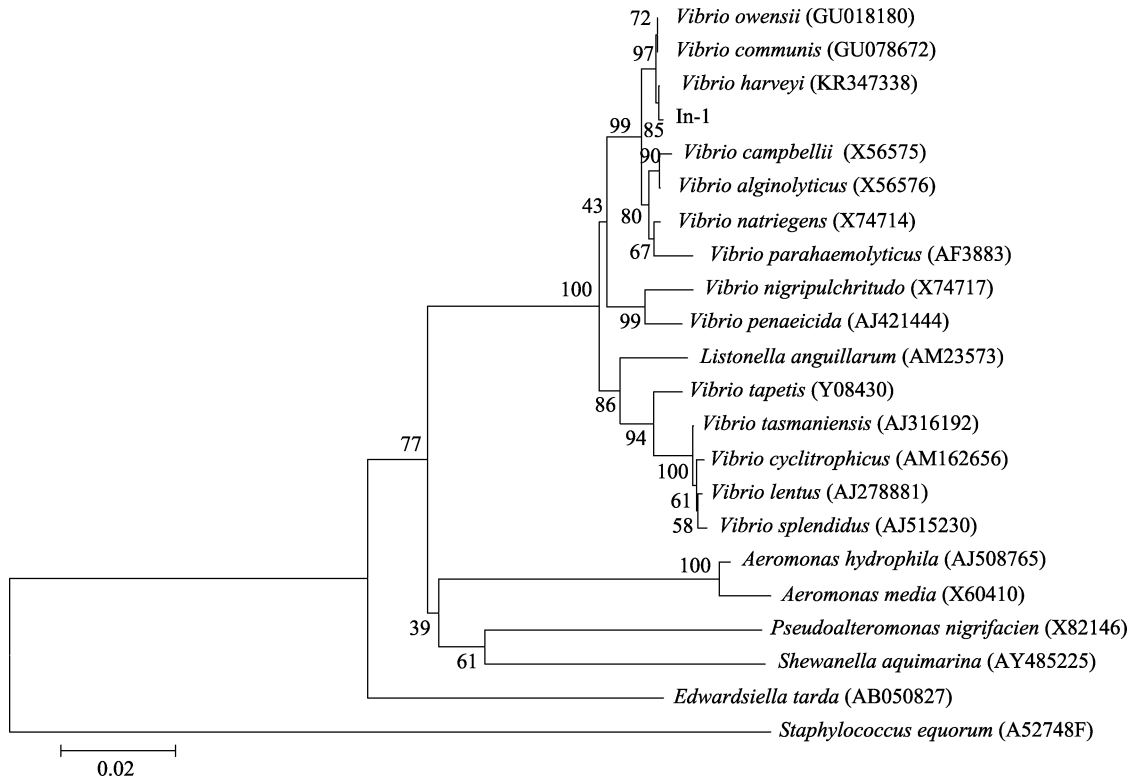


图 4 菌株 In-1 的 16S rDNA 基因序列聚类分析

Fig.4 Clustering analysis of bacterial strain In-1 based on the gene sequence of 16S rDNA

菌株后的编号为 GenBank 中的序列读取号, 标尺表示每个碱基的替换率为 0.02, 下同
Numbers in parenthesis represented the sequences' accession number in GenBank and the scale bar indicated 0.02 substitutions per nucleotide position, the same as below

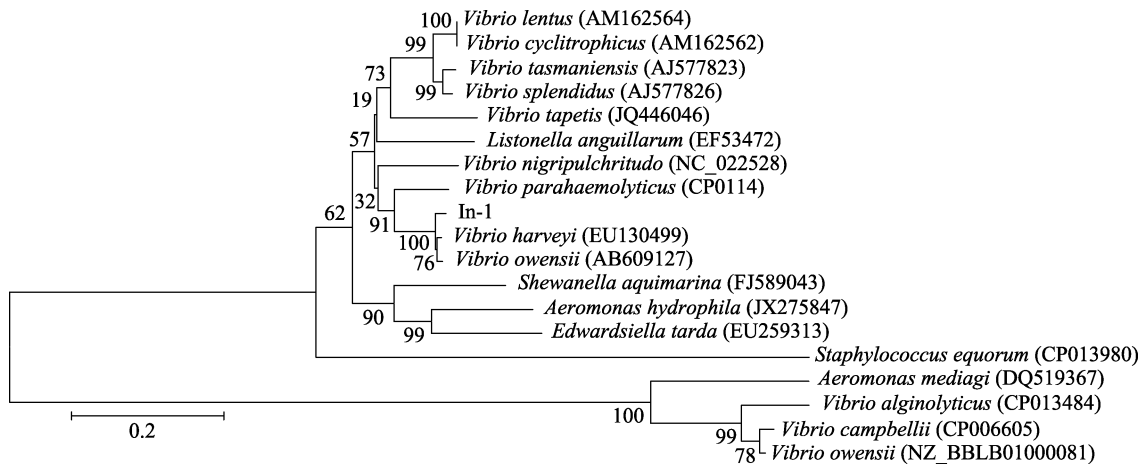


图 5 菌株 In-1 的 gyrB 基因序列聚类分析

Fig.5 Clustering analysis of bacterial strain In-1 based on the gene sequence of gyrB

中度敏感; 而对青霉素、新霉素、链霉素、吡哌酸、痢特灵、头孢氨苄、头孢拉定、丁胺卡那、庆大霉素、卡那霉素、苯唑青霉素、氨苄青霉素、复方新诺明、乙酰螺旋霉素、头孢哌酮 15 种抗菌素具有抗性。

2.6 不同用药方式对刺参“肠炎病”的治疗效果

根据病原菌药敏实验结果, 选取水产养殖常用药

物——氟苯尼考作为本次“肠炎病”防治药物, 以 3 d 为药物使用周期, 测定了药浴、口服、口服+药浴 3 种不同用药处理方式对刺参“肠炎病”防治效果的差异。对参苗生理活动观察结果显示: 在用药 3 d 后, 各用药处理组参苗的生理状态均有所改善, 参体伸展, 肉刺舒张, 爬行摄食情况良好, 波纹板上参苗附着量增加。未进行药物处理的对照组刺参患病状

表3 In-1菌株的药敏实验结果
Tab.3 Sensitivity of the bacterial strain In-1 to some antibiotics

抗菌素 Antibiotics	含量 Contents ($\mu\text{g}/\text{片}$)	药敏直径 Sterilizing diameter (mm)	敏感性 Sensitivity
青霉素 Penicillin	10	7	R
氯霉素 Chloramphenicol	30	29	S
头孢三嗪 Rocephin	30	21	S
利福平 Rifampicin	15	17	M
红霉素 Erythromycin	15	20	M
新霉素 Neomycin	30	12	R
链霉素 Streptomycin	10	9	R
吡哌酸 Pipemidic acid	30	18	R
痢特灵 Furazolidone	300	11	R
四环素 Tetracycline	30	25	S
氧氟沙星 Ofloxacin	5	27	S
头孢他啶 Ceftazidime	30	19	S
氟哌酸 Norfloxacin	10	14	M
头孢氨苄 Cephalexin	30	7	R
头孢拉定 Cephadrine	30	7	R
环丙沙星 Ciprofloxacin	5	26	S
罗美沙星 Lomefloxacin	18	23	S
氟罗沙星 Fleroxacin	5	28	S
克拉霉素 Clarithromycin	15	15	M
丁胺卡那 Amikacin	30	12	R
庆大霉素 Gentamycin	10	12	R
阿奇霉素 Azithromycin	15	24	S
新生霉素 Novobiocin	30	22	S
卡那霉素 Kanamycin	30	9	R
美满霉素 Minocycline hydrochlorid	30	24	M
强力霉素 Doxycycline	30	19	S
头孢唑肟 Ceftizoxime	30	18	M
恩诺沙星 Enrofloxacin	10	25	M
苯唑青霉素 Oxacillin	1	7	R
氨苄青霉素 Ampicillin	10	9	R
多黏菌素 B Polymyxin B	300 U	10	M
复方新诺明 Sulfamethoxazole	25	24	R
头孢氨噻肟 Cefotaxime sodium	30	19	M
乙酰螺旋霉素 Acetyl spiramycin	30	9	R
氟苯尼考 Florfenicol	30	30	S
头孢哌酮 Cefoperazone	75	19	R

R: 耐药(Resistant); S: 敏感(Sensitive); M: 中度敏感(Intermediately sensitive)

况没有改观, 依然表现出运动摄食状况差、附着力弱等症状。3 d 用药结束后, 转为正常的生产管理, 经过 28 d 的养殖周期, 收集各实验养殖池苗种, 进行

称重和脏壁比计算。随机选取实验组的参苗个体, 解剖观察到药物处理组刺参苗种肠道内均有食物。其中, 药浴组和药浴+口服组刺参肠道食物充盈, 说明刺参摄食旺盛; 口服组刺参肠道有食物, 但肠道不饱满; 而未经药物处理的对照组刺参肠道内基本无食物, 肠道内充有黄白色脓状液体。通过计算不同用药处理组参苗脏壁比可以看出(表 4), 药浴组刺参苗种的脏壁比最高, 达到 $(9.62\pm 1.28)\%$, 药浴+口服组为 $(8.23\pm 0.58)\%$, 口服组为 $(5.66\pm 0.48)\%$, 对照组为 $(4.33\pm 0.36)\%$ 。对各处理组苗种的增重率统计结果显示(表 5), 药浴处理组的平均增重最高, 达 $(24.23\pm 0.41)\%$, 其次是药浴+口服处理组[平均增重为 $(19.96\pm 0.61)\%$]和口服组[平均增重为 $(14.69\pm 0.52)\%$], 用药处理组的平均增重均显著高于对照组[平均增重为 $(2.90\pm 0.39)\%$]。对各处理组苗种的特定生长率计算结果同样显示, 药浴处理组的特定生长率最高达 $(0.77\pm 0.01)\%/d$ 。由此可见, 利用氟苯尼考作为治疗药物可以有效控制刺参保苗期“肠炎病”, 不同药物使用方法对该疾病的治疗效果具有较大差异, 对于刺参“肠炎病”的治疗, 药浴处理可获得最佳治疗效果。

3 讨论

3.1 刺参保苗阶段“肠炎病”致病原

目前已报道的刺参疾病主要有育苗阶段的烂边症、烂胃症, 保苗阶段的化板症、腐皮综合征、纤毛虫病、霉菌病、后口虫病(王印庚等, 2014)。由于“肠炎病”只会引起刺参苗种的滞长, 在表观上患病苗种不会出现化皮的现象, 且该病不会引起刺参苗种的大规模死亡, 因此, 前期未引起养殖业者的重视。本研究发现, 刺参“肠炎病”会导致刺参苗种的“滞长”现象, 而且会水平传播, 给养殖生产带来了较大影响。本研究对保苗期的“肠炎病”进行病原病理分析, 解剖发现肠道发生炎症, 推测由于肠道炎症影响到苗种的摄食、消化和吸收是苗种发生“滞长”现象的根本原因。病原学检查排除了寄生虫和真菌的可能性, 从其肠道组织水浸片观察到大量细菌, 对所分离的优势菌株的人工攻毒感染实验证明, In-1 菌株符合科赫法则, 由此确定“肠炎病”为细菌性病原。

近年来, 由于 *gyrB* 基因既弥补了 16S rDNA 的高保守性, 也克服了 16S-23S rDNA 序列高变异性及复杂性, 成为细菌系统发育及分类鉴定的新力量, 目前已在细菌鉴定等方面得到广泛应用(毕建飞等, 2016; Nazina *et al*, 2015)。本研究同时利用 16S rDNA 和 *gyrB* 基因进行分子系统学分析, 将该病原鉴定为

表4 不同用药方式对患“肠炎病”刺参脏壁比的影响

Tab.4 Effects of different therapeutic methods on the ratio of viscera to body wall of enteritis disease infected *A. japonicus*

	对照 Control	药浴 Medicated bath	药浴+口服 Medicated bath and feed	口服 Medicated feed
脏壁比 Ratio of viscera to body wall (%)	4.33±0.36 ^a	9.62±1.28 ^b	8.23±0.58 ^c	5.66±0.48 ^d

注: 不同字母表示具有显著差异($P<0.05$)

Note: Different letters indicated significant differences ($P<0.05$)

表5 不同用药方式对患“肠炎病”刺参生长的影响

Tab.5 Effects of different therapeutic methods on the growth of enteritis disease infected *A. japonicus*

评价指标 Evaluation indices	对照 Control	药浴 Medicated bath	药浴+口服 Medicated bath and feed	口服 Medicated feed
单池起始体重 Initial body weight of single pond (kg)	59.77±0.15 ^a	59.70±0.26 ^a	59.97±0.26 ^a	60.13±0.34 ^a
单池最终体重 Final body weight of single pond (kg)	61.5±0.29 ^a	74.17±0.15 ^b	71.93±0.12 ^c	68.97±0.88 ^d
增重率 WGR (%)	2.90±0.39 ^a	24.23±0.41 ^b	19.96±0.61 ^c	14.69±0.52 ^d
特定生长率 SGR (%/d)	0.10±0.01 ^a	0.77±0.01 ^b	0.65±0.02 ^c	0.49±0.02 ^d

注: 同一行中, 不同上标字母表示组间有显著性差异($P<0.05$)

Note: Different letters within each row represented significant differences among groups ($P<0.05$)

哈维氏弧菌。哈维氏弧菌是一种常见的条件致病菌, 它有广泛的寄主范围, 曾引起世界范围海水养殖虾类疾病(Pizzutto *et al.*, 1995; Alvarez *et al.*, 1998), 也曾引起鲈鱼(*Micropterus salmoides*)(王保坤等, 2002)、大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)(徐晓津等, 2010)、石斑鱼(*Epinephelus coioides*)(李宁求等, 2005)、鲆鲽鱼类(宋靖芳等, 2004)等海水养殖鱼类的流行性疾病暴发, 给海水养殖业造成了巨大的经济损失。在刺参病害方面, 杨求华(2015)报道该菌可引起南移刺参体表溃疡症, 谭德猛(2011)¹⁾证明该菌可引起刺参“肠炎病”, 表明该菌可引起刺参多组织发生病变。

3.2 刺参“肠炎病”传播途径分析

刺参养殖系统包括养殖池水源水、养殖池水、附着基沉积物、干海泥和藻粉等部分, 养殖系统污染是疾病发生和传播的重要原因。本研究对养殖系统进行了细菌学分析, 通过各系统细菌总量和优势菌形态特征对比发现, 藻粉、养殖池水和附着基沉积物中细菌菌量非常高, 且优势菌特征与致病菌相同, 可以推测饵料所用藻粉是病原菌的主要来源, 病原菌随着饲料投喂过程被引入养殖系统。水产养殖中所暴发的多种疾病是由饲料引入的, 刘朝阳等(2009)研究表明, 颗粒饲料携带的细菌是大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)白便症的直接病原; 养殖者投喂消毒不彻底的海产小

杂鱼携带的致病性诺卡氏菌(*Nocardia serioleae*)是导致乌鳢(*Channa argus*)患病的原因(Edgerton *et al.*, 1999); 王印庚等(2006)研究表明, 饵料是养殖刺参育苗期重大疾病“腐皮综合征”病原菌的主要来源。刺参食性为沉积性食性, 可通过摄食沉积到附着基上的含有大量病原菌的饲料而导致“肠炎病”, 同时刺参苗种排泄物中含有的大量病原菌也在养殖池内沉积, 进一步增加了养殖池水和附着基沉积物中致病菌的含量, 导致了疾病的传播和蔓延。因此, 在养殖期间, 提供优质饵料是预防该疾病的重要措施; 经常清理池底并保证水质清新, 切断病原引入和传播途径是预防疾病发生的重要途径。

3.3 刺参“肠炎病”治疗药物选择

在进行细菌性疾病治疗时, 必须选择对病原有针对性的抗菌素, 以避免滥用抗生素引发病原耐药性等问题, 同时也必须选择农业部允许使用的药物进行疾病防治。综合药敏实验结果和农业部渔药固定及用药经济成本, 本研究最终选择对该病原菌有良好抑菌效果的氟苯尼考作为防治药品。氟苯尼考具有抗菌谱广、吸收快、体内分布广、半衰期长、有效血药浓度时间长、无潜在的致再生障碍性贫血作用, 无致畸、致癌和致突变等缺点, 是国家二类新兽药, 在国内外畜牧业和水产养殖业上有广泛应用(李梦影等, 2014)。本研究结果显示, 与未用药组相比, 用氟苯尼考治疗

1) Tan DM. Isolation and characterization of pathogenic bacteria and lytic bacteriophages from skin ulcer syndrome sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). Master's Thesis of Dalian University of Technology, 2011, 1-73 [谭德猛. 刺参腐皮综合征病原菌及其裂解性噬菌体的分离和鉴定. 大连理工大学硕士研究生学位论文, 2011, 1-73]

刺参“肠炎病”的实验组状况均有明显好转。治疗后,刺参增重率、特定生长率和脏壁比均显著高于未用药组,证明氟苯尼考在刺参哈维氏弧菌引起的疾病治疗中具有应用前景。

3.4 药物使用工艺对刺参“肠炎病”治疗效果差异

在水产养殖疾病防控过程中,药物的使用工艺对疾病防控效果具有决定性作用。尽管刺参“肠炎病”属于刺参体内组织发生的疾病,本研究表明单纯药浴治疗的效果却显著优于药浴+口服组和口服组,究其原因,可能与刺参特殊的摄食习性、致病菌病来源及饲料质量等因素密切相关。在保证饵料清洁的前提下,通过药浴控制养殖系统病原菌传播,无需进行口服用药即可达到高效治疗的目的。因此,在水产动物疾病防治过程中,要根据养殖动物生理习性、疾病发生原因、疾病病理特征进行综合分析,确定最适的给药方式,达到少量用药、精准治疗的效果(汪建国, 2014)。此外,随着中草药、微生态制剂、噬菌体等细菌性病原控制方法相关研究的深入,利用这些新兴技术进行细菌性疾病预防也取得了良好进展(王印庚等, 2009; Li *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2016)。

本研究完成了刺参保苗阶段“肠炎病”的病理、病原和治疗方法初步研究,然而在养殖过程中,刺参疾病病原种类具有多样性和复杂性,今后仍需深入综合分析刺参“肠炎病”的致病菌种类。

参 考 文 献

- Alvarez JD, Austin B, Alvarez AM, *et al.* *Vibrio harveyi*: A pathogen of penaeid shrimps and fish in Venezuela. *Journal of Fish Diseases*, 1998, 21(21): 313–316
- Bi JF, Kang YH, Chen HL, *et al.* Isolation and identification of man-animal-fish pathogenic *Aeromonas hydrophila*. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2016, 52(3): 118–121 [毕建飞, 康元环, 陈亨利, 等. 1 株人兽鱼共患病原菌嗜水气单胞菌的分离鉴定. *中国兽医杂志*, 2016, 52(3): 118–121]
- Edgerton BF, Prior HC. Description of a hepatopancreatic rickettsia-like organism in the redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1999, 36(1): 77–80
- Hao JG, Wang YG, Liao MJ, *et al.* The effects of three types of feed supplements on the growth of *Apostichopus japonicus* cultured in cages. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(5): 102–110 [郝继光, 王印庚, 廖梅杰, 等. 饲料中添加 3 种不同投入品对筏式浅海网箱刺参(*Apostichopus japonicus*) 养殖生长的影响. *渔业科学进展*, 2015, 36(5): 102–110]
- Li MY, Xu LJ, Lu LQ. Integrated pharmacokinetics/pharmacodynamics parameters of florfenicol in crucian carp (*Carassius auratus*) and grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and their significances in drawing medication regimen. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(6): 892–900 [李梦影, 徐丽娟, 吕利群. 氟苯尼考在鲫和草鱼体内的药代/药效动力学联合参数及其临床给药方案的研究. *水产学报*, 2014, 38(6): 892–900]
- Li NQ, Bai JJ, Wu SQ, *et al.* Molecular classification of three kinds of pathogenic *Vibriosis* in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Journal of Fisheries of China*, 2005, 29(3): 356–361 [李宁求, 白俊杰, 吴淑勤, 等. 斜带石斑鱼 3 种致病性弧菌的分子生物学鉴定. *水产学报*, 2005, 29(3): 356–361]
- Li Z, Li XY, Zhang JC, *et al.* Use of phages to control *Vibrio splendidus*, infection in the juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 54: 302–311
- Liao MJ, Wang YG, Hao ZK, *et al.* New method for weighting living sea cucumber. ZL 201010100781.3 [廖梅杰, 王印庚, 郝志凯, 等. 活体刺参体重测量方法. ZL 201010100781.3]
- Liu ZY, Wang YG, Sun XQ. Correlation between bacteria associated with pellets and diseases of cultured turbot *Scophthalmus maximus*. *South China Fisheries Science*, 2009, 5(4): 13–21 [刘朝阳, 王印庚, 孙晓庆. 颗粒饲料携带细菌与大菱鲆疾病发生的相关性. *南方水产*, 2009, 5(4): 13–21]
- Nazina TN, Shumkova ES, Sokolova DS, *et al.* Identification of hydrocarbon-oxidizing *Dietzia* bacteria from petroleum reservoirs based on phenotypic properties and analysis of the 16S rRNA and *gyrB* genes. *Microbiology*, 2015, 84(3): 377–388
- Pizzutto M, Hirst RG. Classification of isolates of *Vibrio harveyi* virulent to *Penaeus monodon* larvae by protein profile analysis and M13 DNA fingerprinting. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1995, 21(1): 61–68
- Song JF, Huang WF, Zhang JY. Study on the pathogen of hemorrhage disease of *Paralichthys olivaceus*. *Journal of Microbiology*, 2004, 24(2): 51–53 [宋靖芳, 黄文芳, 张剑英. 牙鲆出血病病原的初步研究. *微生物学杂志*, 2004, 24(2): 51–53]
- Wang BK, Yu JH, Li Y, *et al.* Isolation and identification of pathogen (*Vibrio harveyi*) from sea perch, *Lateolabrax japonicus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2002, 9(1): 52–55 [王保坤, 余俊红, 李筠, 等. 花鲈弧菌病病原菌(哈维氏弧菌)的分离与鉴定. *中国水产科学*, 2002, 9(1): 52–55]
- Wang JG. Progress and application of fishery drugs in China (47). *Fishery Guide to be Rich*, 2014(23): 63–66 [汪建国. 我国渔药研究与应用综述(47). *渔业致富指南*, 2014(23): 63–66]
- Wang YG, Fang B, Zhang CY, *et al.* Etiology of skin ulcer syndrome in cultured juveniles of *Apostichopus japonicus* and analysis of reservoir of the pathogens. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(4): 610–616 [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]
- Wang YG, Guo WL, Rong XJ, *et al.* Isolation and identification of a pathogenic bacterium associated with off-plate syndrome from *Apostichopus japonicus* cultured in Liaoning Province. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(6): 81–86 [王印庚, 郭伟丽, 荣小军, 等. 养殖刺参“化板症”病原菌的分离与鉴定. *渔业科学进展*, 2012, 33(6): 81–86]
- Wang YG, Leng M, Chen X, *et al.* *In vitro* bacteriostatic effect of Chinese herbs against causative pathogens of skin ulcer syndrome in sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Progress in*

- Fishery Sciences, 2009, 30(2): 1-7 [王印庚, 冷敏, 陈霞, 等. 中草药对刺参腐皮综合征病原菌的体外抑菌实验. 渔业科学进展, 2009, 30(2): 1-7]
- Wang YG, Rong XJ, Liao MJ, *et al.* Sea cucumber culture and disease control technology. China Agriculture Press, 2014, 120-127 [王印庚, 荣小军, 廖梅杰, 等. 刺参健康养殖与病害防控技术丛解. 中国农业出版社, 2014, 120-127]
- Xu XJ, Xu B, Wang J, *et al.* Studies on blood chemistry indices and histopathology of *Pseudosciaena crocea* artificially challenged with *Vibrio harveyi*. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(4): 618-625 [徐晓津, 徐斌, 王军, 等. 大黄鱼感染哈维氏弧菌后血液生化指标的变化及组织病理学观察. 水产学报, 2010, 34(4): 618-625]
- Yamamoto S, Harayama S. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. Applied & Environmental Microbiology, 1995, 61(3): 1104-1109
- Yang QH. Isolation, identification and antibiotic sensitivity analysis of bacterial pathogen from skin ulcer disease in *Apostichopus japonicus* cultured in South China. Journal of Fujian Fisheries, 2015, 37(2): 98-106 [杨求华. 南移仿刺参体表溃疡症病原菌的分离鉴定及药敏分析. 福建水产, 2015, 37(2): 98-106]
- Zhao Y, Yuan L, Wan J, *et al.* Effects of potential probiotic *Bacillus cereus*, EN25 on growth, immunity and disease resistance of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 49: 237-242

(编辑 马瑾艳)

Etiology and Treatment of Enteritis Disease in Cultured Junviles of *Apostichopus japonicus*

PANG Huijuan^{1,2}, LIAO Meijie^{2①}, LI Bin², RONG Xiaojun², WANG Yingeng²,
ZHANG Zheng², SUN Jinsheng¹, MENG Fanlin³

(1. College of Life Sciences, Tianjin Normal University, Tianjin 300387; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology; 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 Zhongren Animal Pharmaceutical Co., Ltd., Qingdao 266408)

Abstract The cultured juvenile sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) suffered from "enteritis disease" in a breeding farm in Penglai in March 2014. In this study, the clinical symptoms and histopathology of enteritis disease were investigated. To provide reliable means to control this disease, the pathogen was isolated and identified, and its sensitivity to different antibiotics were tested. The effects of different therapeutic methods (oral, bath, oral with bath) were evaluated using three indices, including the ratio of viscera to body wall (RVBW), weight gain rate (WGR) and specific growth rate (SGR). The results showed that the sea cucumber infected with the enteritis disease displayed dark body color, poor feeding rate, weak motility and adhesion ability. The ingested food in the intestine of sick sea cucumber was discontinuous, and large amount of yellow-white mucus was found in the intestine. The intestinal wall was brittle, poor toughness and easy to fracture. A large amount of bacteria was detected in the intestinal tract under the microscope. The histopathological analysis on infected sea cucumbers revealed the scattered intestinal villus, dispersed mucous layer, scattered connective tissue and obviously separated muscle layers. One dominant bacterium (In-1) was isolated from the infected sea cucumber intestine and was confirmed as the causative pathogen using the artificial infection experiment. The bacteriological analysis indicated that the deteriorated feed (algae powder) was most likely the origin of the pathogen. The pathogen was identified as *Vibrio harveyi* using morphology observation, physiological and biochemical, and molecular methods (16S rDNA and *gyrB*). The strain was highly sensitive to 12 kinds of drugs such as ceftriaxone, azithromycin, doxycycline and florfenicol. The medication treatment using florfenicol with three different methods showed that medicated bath treatment was the most effective and achieved the best results of the WGR of (24.23±0.41)% and SGR of (0.77±0.01) %/d. The study provides the theoretical basis and technical reference for disease prevention and control in sea cucumber culture and its healthy breeding.

Key words *Apostichopus japonicus*; Enteritis disease; *Vibrio harveyi*; Florfenicol; Therapeutic method

① Corresponding author: LIAO Meijie, E-mail: liaomj@ysfri.ac.cn

2 种新型塑胶环保型网箱养殖褐牙鲈 (*Paralichthys olivaceus*)与大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*)效果的评估*



王腾腾^{1,2} 关长涛^{2①} 公丕海² 崔勇² 李真真^{1,2}

(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
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)

摘要 以褐牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)和大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)为养殖对象,设计了 2 种新型的鲆鲽类网箱,即新型塑胶环保型单、双层网箱。通过褐牙鲈和大菱鲆网箱养殖实验来验证 2 种新型的网箱在实际生产中的可行性。结果显示,褐牙鲈传统木箱养殖组的商品鱼成活率为 92.73%,单位面积产量为 16.42 kg/m²;塑胶单层网箱养殖组的成活率为 96.37%,单位面积产量为 17.42 kg/m²。2 个组的成活率、单位面积产量均存在显著差异($P<0.05$),单位面积产量同比增产 6.10%。小规格大菱鲆传统网箱商品鱼成活率为 92.50%,单位面积产量为 8.09 kg/m²;塑胶单层网箱组的商品鱼成活率为 92.50%,单位面积产量为 8.02 kg/m²;塑胶双层网箱组的商品鱼成活率为 92.00%,单位面积产量为 10.53 kg/m²,与传统网箱、单层塑胶网箱存在显著差异($P<0.05$),且同比增产分别为 30.00%、31.00%。大规格大菱鲆单、双层塑胶环保型网箱养殖的成活率达到 95.00%以上,单位面积产量均为 14.52–16.32 kg/m²;大规格大菱鲆双层网箱实验组平均尾重与单层网箱示范组差异显著($P<0.05$),单位养殖面积产量同比单层网箱示范组增产 11.00%。研究表明,新型塑胶环保网箱养殖褐牙鲈效果良好。新型网箱相对于传统木制网箱除了具有节能环保、节约资源、操作便利的特点外,双层网箱养殖可提高有效利用面积,增加养殖效益。

关键词 褐牙鲈;大菱鲆;塑胶环保型网箱;网箱养殖

中图分类号 S953 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)03-0198-07

随着海产品消费需求的增加以及海捕量的减少,水产养殖业开始发挥积极作用。海水鱼类养殖主要有陆基工厂化、海上网箱和岸带池塘三大养殖模式。以 2013 年为例,网箱养殖的产量所占比例较其他 2 种养殖方式高,占水产养殖总产量的 42%。网箱养殖能否成功,除考虑到养殖规模、海区条件和保障措施等因素,前期的设计规划至关重要。其中,鱼类的生活

习性是网箱设计时需要考虑的关键因素。传统养殖网箱为多个小型养殖网箱组成的渔排(姜秀凤等, 2001; 黄德波, 2002; 王文建, 2006; 王兴春, 2006),具有离岸近、管理方便等特点。但其抗风浪能力弱、水体交换差、网箱沉积严重、易对海区环境造成污染,导致养殖鱼类成活率降低、经济及社会效益下降(周游等, 2014),严重阻碍了网箱养殖业的发展。

* 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-50)、国家自然科学基金(31101938; 51239005)和山东省科技发展计划项目(2009GG10005005)共同资助 [This work was supported by Modern Agricultural Industry Technology System (CARS-50), Natural Science Foundation of China (31101938; 51239005), and Science and Technology Development Plan of Shandong Province (2009GG10005005)]. 王腾腾, E-mail: minghuawang1226@163.com

① 通讯作者: 关长涛, 研究员, E-mail: guanct@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-03-03, 收修改稿日期: 2016-04-20

因此,发展节能环保、高效的网箱养殖模式是海水养殖的趋势。

鱼类的的生活习性不同,养殖所用的网箱类型也不同。目前,大多数网箱的养殖对象为游泳性鱼类,如石斑鱼(*Epinephelus*)、红鳍东方鲀(*Fugu rubripes*)等的网箱养殖已陆续开展,并取得了较好的效果(黄滨等,2013),而关于底栖鱼类的专用网箱较少(谌志新等,2007)。针对鲆鲽类习性,我国主要研发出方形金属框架鲆鲽类网箱、高密度聚乙烯(HDPE)方形浮式鲆鲽类网箱、升降式鲆鲽类网箱、PDW350型多层结构沉式鲆鲽类网箱等。但在某些海域,仍以传统木质网箱为主。为了解决南方鲆鲽类网箱养殖产业化持续发展问题,探索开发具有高抗风浪性能的环境友好型鲆鲽类专用养殖网箱,本研究设计了2种新型塑胶环保类网箱,以褐牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)和大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)为养殖对象,进行养殖效果评价。旨在验证该新型塑胶环保类网箱养殖的可行性,为海水鱼类大规模网箱养殖的可持续发展提供技术支持和科学依据。

1 材料与方法

1.1 新型塑胶环保类网箱结构

1.1.1 设计依据 新型网箱(渔排)走道及浮球均采用 HDPE 可回收再利用的塑胶注塑成型模块材料制作,替代传统泡沫浮球木质网箱,减少对养殖海域环境的破坏,节约资源。渔排纵横向走道采取同一平面点的可拆卸结构设计,以增强渔排的抗风浪能力,便于日常养殖操作。环保型塑胶双层网箱是在单层网箱内套挂一层平板网箱架,增加有效养殖面积。

1.1.2 主要参数 网箱结构系统主要由框架系统、网衣系统、抛锚系统组成。本研究针对设计的新型塑胶网箱材料、框架等进行重点介绍。

1.1.2.1 主框架系统 双层塑胶网箱由网箱主框架、网箱走道、挂绳、系绳、浮子、平底框架、平板网箱架、网筋构成(图1)。其中,主框架材料为 HDPE 管;网箱走道采用 HDPE 可回收再利用的塑胶注塑成型模块材料制作,为若干小块,利用系绳系绑在主框架上,便于拆卸。单层塑胶网箱是在双层网箱的基础上摘去平板网箱架。图2为该网箱整体结构效果图和实物图。

1.1.2.2 网衣系统 网衣材料为聚乙烯,网目尺寸为 15 mm、方形,平底框架为 2 根镀锌无缝钢管组成的“川”字形平台。

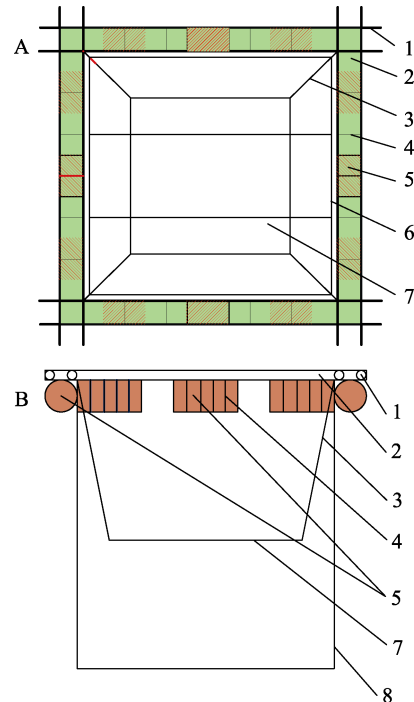


图1 环保型塑胶双层网箱结构
Fig.1 Structure of the environment-friendly plastic bilayer cage

- A: 俯视图; B: 主视图与侧视图; 1: 主框架; 2: 走道(渔排); 3: 挂绳; 4: 系绳; 5: 浮子; 6: 平底框架; 7: 平板框架; 8: 网筋
A: Planform; B: Elevation and side elevation; 1: Main frame; 2: Aisle (Raft); 3: Lanyard; 4: Tether; 5: Buoy; 6: Flat-bottomed frame; 7: Slab frame; 8: Net reinforcement

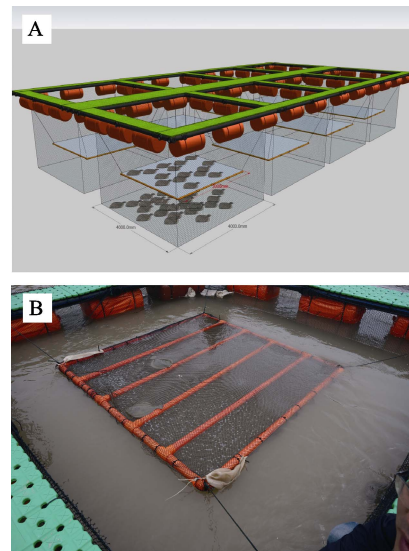


图2 环保型塑胶双层网箱结构效果(A)和实物(B)
Fig.2 Vertical structure (A) and physical picture (B) of the environment-friendly plastic bilayer cage

1.1.2.3 网箱浮力系统 浮子共 12 个,均匀分布在网箱四周,中空圆柱形,材料与网箱走道相同,采

用 HDPE 可回收再利用的塑胶注塑成型模块材料制作而成。规格与普通浮子大小相同,为 $\Phi 0.6 \text{ m} \times 1.0 \text{ m}$, 每个浮子承重 200 kg。

1.2 实验条件

2013 年大菱鲂养殖实验在福建省宁德市三都澳青山海域的养殖示范地开展,2014 年大菱鲂和褐牙鲂养殖实验在三都澳龟鼻网箱养殖区进行。其中,龟鼻网箱养殖区平均水深为 10–15 m,最大潮流流速在 0.6m/s 以内,为历年南北接力鲆鲽类网箱集中区。区域内共有鲆鲽类传统木质养殖网箱 5000 多口,水质较好、水流较缓慢、交通便利,适合鲆鲽类网箱养殖。养殖海域水温适宜,2013 年 12 月 23 投放鱼苗时的水温为 13.8℃,结束时的水温为 22.7℃,中间多次测量水温(图 3-A);2014 年 12 月 28 日投放鱼苗时的水温为 14.2℃,实验结束时的水温为 18.3℃,中间多次测量水温(图 3-B)。

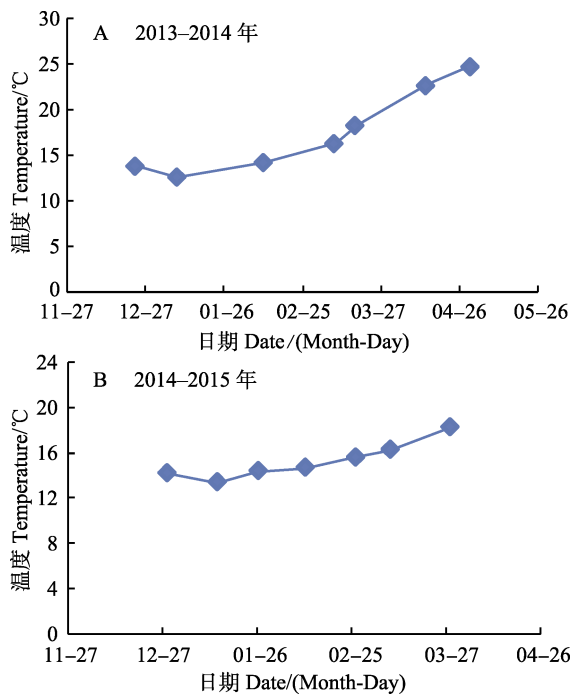


图3 三都澳网箱养殖区海水温度变化

Fig.3 Temperature variation of mariculture area in Sanduao

1.3 实验设计

本次新型环保塑胶网箱养殖选用南方网箱养殖的主要鲆鲽类品种大菱鲂和褐牙鲂作为养殖示范品种,采用塑胶单层网箱、塑胶双层网箱和传统木制网箱,3种不同的养殖模式进行养殖效果评价。

1.3.1 褐牙鲂养殖实验 褐牙鲂养殖网箱为 21 口塑胶环保型单层网箱与 4 口传统木质网箱,2 种网箱

规格为 $5.6 \text{ m} \times 3.7 \text{ m}$,网箱深度为 1.5 m,每口网箱放养牙鲂鱼种 550 尾,共 13750 尾,平均体重为 420 g,平均放养密度为 26.54 尾/ m^2 ,养殖时间为 2014 年 12 月 28 日–2015 年 3 月 28 日,为期 120 d。

1.3.2 大菱鲂养殖实验 大菱鲂养殖实验分为 2 次,第 1 次养殖实验地点是宁德三都澳青山海域,养殖网箱为 2 口传统木质网箱、2 口塑胶环保单层网箱和 2 口塑胶环保双层网箱,这 3 种网箱的规格均为 $4 \text{ m} \times 4 \text{ m}$,网箱深度均为 3 m。其中,塑胶双层网箱是在单层网箱内套挂 1 层规格为 $3.3 \text{ m} \times 3.3 \text{ m}$ 的平板网箱架,四角用聚乙烯绳子吊挂于离网箱底部约 1 m 处。3 种网箱放养尾数依次为 300、300、400 尾,平均体重为 165 g,平均放养密度依次为 18.75、18.75、25 尾/ m^2 ,养殖时间为 2013 年 12 月 23 日–2014 年 4 月 13 日,共 112 d。第 2 次养殖实验地点是宁德三都澳龟鼻养殖区,养殖网箱为 2 口塑胶单层网箱与 2 口塑胶双层网箱。塑胶单层网箱规格为 $5.6 \text{ m} \times 3.7 \text{ m}$,网箱深度为 1.5 m,每口放养尾数 600 尾,平均放养密度为 28.96 尾/ m^2 ;塑胶双层网箱规格为 $5.6 \text{ m} \times 3.7 \text{ m}$,网箱深度为 1.5 m,箱内套挂一层规格为 $3.3 \text{ m} \times 3.3 \text{ m}$ 的平板网箱架,四角用聚乙烯绳子吊挂于离网箱底部约 0.5 m 处,每口放养尾数为 680 尾,平均放养密度为 32.82 尾/ m^2 ,养殖时间为 2015 年 1 月 30 日–2015 年 3 月 28 日,共 55 d。

1.4 养殖管理

不同养殖方式采用相同的投饵和管理模式。实验中,每天定时(07:30、16:30)投饵,所投喂饵料为冰鲜鳀鱼(*Engraulis japonicas*)或玉筋鱼(*Ammodytes personatus*),投喂饵料量以鱼摄食情况而定,以饱食为准。如初入池、遇大风、冷空气等特殊时期,饵料量应视情况而定。每天定时(07:30、16:30)做好投饵量、养殖鱼死亡情况、水温、水流以及天气情况等的记录,观察鱼的活动及摄食情况,定期监测鱼体的生长情况,做好数据的收集。

1.5 计算及统计分析方法

成活率(Survival rate, %)= $100 \times (\text{商品鱼数量} - \text{初始放养数量}) / \text{初始放养数量}$

平均体重增长率(Growth rate of average weight, %)= $100 \times (\text{商品鱼体重} - \text{初始鱼体重}) / \text{初始鱼体重}$

单位面积产量(Yield per unit area, kg/m^2)= $100 \times \text{商品鱼总重} / \text{放养面积}$

采用 SPSS 17.0 软件对实验数据进行分析。其中,对 2014 年牙鲂、2015 年大菱鲂养殖进行独立样本的

t 检验; 对 2013 年大菱鲈养殖进行单因素方差分析 (One-way ANOVA), 当差异达到显著水平 ($P < 0.05$) 时, 进行 Tukey's 检验方法, 数据表示为平均值±标准差 (Mean±SD)。

2 结果与分析

2.1 褐牙鲈养殖结果

2014 年, 大规格褐牙鲈鱼种投放到网箱养殖 120 d 后, 每个组随机抽取 2 口网箱, 对其中的大规格褐牙鲈进行随机测量, 测得褐牙鲈生长情况见表 1。从表 1 可以看出, 在放养密度相同的情况下, 塑胶单层网箱牙鲈的终末平均体重大于传统木质网箱, 但差异不显著; 塑胶单层网箱牙鲈成活率 (96.37%) 显著高于传统木质网箱 (92.73%) ($P < 0.05$); 塑胶单层网箱牙鲈平均体重增长率、单位面积产量均显著高于传统木质网箱 ($P < 0.05$), 单位面积产量同比增产 6.10%。结果显示, 在相同条件下进行大规格褐牙鲈网箱养殖, 塑胶单层网箱养殖效果优于传统木质网箱。

2.2 大菱鲈养殖结果

2013 年, 大菱鲈鱼种投放到 3 种网箱进行示范养殖, 养殖 112 d 后, 对网箱内小规格大菱鲈进行随

机测量, 测得大菱鲈生长情况见表 2。从表 2 可以看出, 养殖 112 d 后, 传统木质网箱与塑胶单层网箱在商品鱼平均尾重、成活率、平均体重增长率、单位面积产量上无显著性差异; 但在相同养殖海域, 双层塑胶网箱单位面积产量 (10.53 kg/m²) 要显著高于传统网箱及单层网箱 (8.09、8.02 kg/m²) ($P < 0.05$), 单位面积产量相对于传统网箱及塑胶单层网箱分别增产 30.00%、31.00%, 双层网箱养殖密度也高于单层网箱。

2015 年对 2 种新型网箱投放大规格大菱鲈进行养殖, 养殖 55 d 后, 随机抽取 2 口网箱对大规格大菱鲈进行随机测量, 测得数据见表 3。从表 3 可以看出, 双层塑胶网箱中大规格大菱鲈平均体重增长率显著高于单层塑胶网箱 ($P < 0.05$); 单位面积产量同比单层网箱增产 11.03% ($P < 0.05$)。结果显示, 塑胶环保双层网箱养殖大菱鲈, 除了节能环保、便于管理之外, 能最大限度利用养殖面积, 增加养殖收益。

3 讨论

3.1 养殖鱼类放养时间的界定

鲈鳕鱼类生长状况与海水温度密切相关 (姜秀凤等, 2001; 线薇薇等, 2002)。从图 3 可以看出, 2 次实验时, 三都澳海域水温为 13–25℃, 与姜秀凤 (2001)

表 1 2014 年宁德离岸网箱养殖褐牙鲈生长情况 (平均值±标准差)

Tab.1 The growth of offshore net cage cultured *P. olivaceus* in Ningde in 2014 (Mean±SD)

项目 Items	实验组 Groups	
	传统木质网箱 Traditional wooden cage	塑胶单层网箱 Plastic monolayer cage
初始平均体重 Average initial weight (g)	432.00±4.02	420.00±3.56
终末平均体重 Average finial weight (g)	667.24±3.06	671.00±15.17
成活率 Survival rate (%)	92.73±0.52 ^b	96.37±0.26 ^a
平均体重增长率 Growth rate of average weight (%)	54.45±0.71 ^b	62.13±0.60 ^a
单位面积产量 Yield per unit area (kg/m ²)	16.42±0.01 ^b	17.42±0.01 ^a

注: 同行数据中, 上标字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同

Note: Values in the same row with different superscripts were significantly different ($P < 0.05$). The same as below

表 2 2013 年宁德离岸网箱养殖大菱鲈生长情况 (平均值±标准差)

Tab.2 The growth of offshore net cage cultured *S. maximus* in Ningde in 2013 (Mean±SD)

项目 Items	实验组 Groups		
	传统木质网箱 Traditional wooden cage	塑胶单层网箱 Plastic monolayer cage	塑胶双层网箱 Plastic bilayer cage
初始平均体重 Average initial weight (g)	170.00±7.07	166.50±4.95	168.50±13.44
终末平均体重 Average finial weight (g)	466.50±29.99	462.00±32.53	458.00±18.38
成活率 Survival rate (%)	92.50±2.12	92.50±0.71	92.00±1.41
平均体重增长率 Growth rate of average weight (%)	174.30±5.64	177.31±11.29	172.30±10.87
单位面积产量 Yield per unit area (kg/m ²)	8.09±0.32 ^b	8.02±0.63 ^b	10.53±0.25 ^a

表 3 2015 年宁德离岸网箱养殖大菱鲂生长情况(平均值±标准差)
Tab.3 The growth of offshore net cage cultured *S. maximus* in Ningde in 2015(Mean±SD)

项目 Items	实验组 Groups	
	塑胶单层网箱 Plastic monolayer cage	塑胶双层网箱 Plastic bilayer cage
初始平均体重 Average initial weight (g)	362.00±5.02	354.00±7.05
终末平均体重 Average final weight (g)	521.45±1.52	522.34±1.67
成活率 Survival rate (%)	96.20±0.52	95.09±0.53
平均体重生长率 Growth rate of average weight (%)	44.05±0.04 ^b	47.55±0.47 ^a
单位面积产量 Yield per unit area (kg/m ²)	14.52±0.04 ^b	16.32±0.13 ^a

报道的牙鲆最适生长温度(15–25℃)和雷霖霖(2005)研究报道的大菱鲂最适生长温度(14–18℃)相近。因此,可选择 12 月放养至翌年 4 月。在本研究中,褐牙鲆网箱养殖实验期间的海水温度为 14.2–23.1℃,褐牙鲆生长情况较好,表明实验期间的海水温度在褐牙鲆的适宜生长温度范围内。大菱鲂 2 次养殖实验期间的海水温度分别为 13.8–22.7℃、14.2–18.3℃,2 次大菱鲂生长情况均良好,表明实验期间的海水温度在大菱鲆的适宜温度范围内。

3.2 2 种新型塑胶网箱应用前景分析

3.2.1 塑胶环保单层网箱优势 首先,传统网箱采用木排式走道,使用年限较短,回收利用率低下,对海域环境造成污染严重(林德芳等, 2005)。浮球多采用泡沫式浮球,废弃后变成白色垃圾漂浮在养殖海域,对养殖海域的水况产生很大的破坏,影响水体环境,对养殖生物生长不利,从而间接造成养殖户经济损失(吴常文等, 2006)。相对于传统木质网箱,新型塑胶网箱(渔排)走道与浮球均采用 HDPE 可回收再利用的塑胶注塑成型模块材料制作,HDPE 材质使用年限较长、折旧率低(关长涛等, 2005; 黄滨等, 2005),养殖户可利用同一网箱进行多次养殖,节约养殖成本,提升养殖效益。此外,HDPE 材质可回收利用率高,养殖户可整体回收网箱,利于保护海域环境。

其次,传统网箱的抗风浪能力相对较弱,而新型塑胶网箱渔排纵向走道采取同一平面点的可拆卸结构,增强了抗风浪能力,同时,HDPE 材料可在恶劣海况环境下使用,具有较好的抗风浪能力。有关研究显示,HDPE 网箱抗风浪能力可达最大风力十级、抗浪高达 6 m、抗流速 1.0 m/s (黄六一等, 2006; 吴常文等, 2007)。而可拆卸结构的设计,则便于携带、安装、置换,利于日常管理。

最后,通过养殖数据分析发现,新型塑胶网箱的褐牙鲆养殖效果优于传统木质网箱。从表 1 可以看出,新型塑胶网箱中的褐牙鲆成活率、平均体重增长

率、单位面积产量均显著高于传统木质网箱。其原因是褐牙鲆作为底栖鱼类,对养殖环境以及日常管理要求较严格。新型塑胶网箱具有抗风浪能力强、便于管理等特点,给褐牙鲆生长提供了更好的保障。

3.2.2 塑胶双层网箱优势分析 养殖户为获得更高的养殖经济效益则会提升养殖密度,但是过高的养殖密度会影响鱼体的活动、呼吸等,不利于养殖鱼体生长,甚至会造成死亡(Irwin *et al.*, 1999; 常忠岳等, 2001; 乔玮等, 2014)。塑胶双层网箱是在单层网箱的基础上,在网箱内部悬挂 1 层平板网箱架,以此增加有效水体空间利用率,提升养殖单位面积产量,提高经济效益。

塑胶双层网箱在塑胶单层网箱内部套挂一层平板网箱架,为鲆鲽鱼类额外提供了一个活动、摄食、呼吸场所。因此,养殖户可适当的增加鱼苗投放数量,提高单位面积产量。从表 2、表 3 数据可以看出,针对小规格大菱鲆养殖,双层网箱中的大菱鲆在成活率、平均体重生长率与单层网箱中的鱼体无显著差异,但是单位面积产量显著高于单层网箱。而针对大规模大菱鲆养殖,双层网箱中的鱼体成活率与单层网箱的成活率无显著差异,在平均体重生长率、单位面积产量上则显著高于后者。2 次不同规格大菱鲆养殖结果显示,塑胶双层网箱相对于塑胶单层网箱具有重要的现实意义和发展前景。

4 结论

利用塑胶单层网箱与塑胶双层网箱开展牙鲆与大菱鲆养殖实验,通过其养殖结果可知,塑胶环保型网箱相对于传统木质网箱在养殖效果、日常管理、节能环保方面具有明显优势;塑胶环保型双层网箱在大规模大菱鲆养殖效果上与塑胶单层网箱无明显差距,单位面积产量却有显著提高。其中,塑胶双层网箱可适当提高养殖密度,增加养殖效益,但具体放养最适密度有待进一步研究。

参 考 文 献

- Chang ZY, Lu Y, Hu ZW. The study of the influence factors on the growth and survival rate of factory-cultured *Paralichthys olivaceus*. Journal of Aquaculture, 2001(3): 26–28 [常忠岳, 卢岩, 胡志伟. 牙鲈工厂化养殖生长及成活率影响因素探讨. 水产养殖, 2001(3): 26–28]
- Chen ZX, Zhou J, Yu WS. The experiment on a multilayer submersible anti-wave cage for flatfish culture. China Fisheries, 2007(7): 70–71 [湛志新, 周江, 于文松. 多层结构鲆鲽鱼类沉式抗风浪网箱养殖实验. 中国水产, 2007(7): 70–71]
- Guan CT, Lin DF, Yang CH, et al. Research and development of the deep-sea anti-waves cage with 2-ring HDPE pipes in circular shape. Marine Fisheries Research, 2005, 26(1): 61–67 [关长涛, 林德芳, 杨长厚, 等. HDPE 双管圆形深海抗风浪网箱的研制. 海洋水产研究, 2005, 26(1): 61–67]
- Huang B, Guan CT, Liang Y, et al. The land-sea relay efficient breeding experiment for *Epinephelus moara* in the northern sea area. Fishery Modernization, 2013, 40(2): 1–5 [黄滨, 关长涛, 梁友, 等. 北方海域云纹石斑鱼的陆海接力高效养殖实验. 渔业现代化, 2013, 40(2): 1–5]
- Huang B, Guan CT, Lin DF. The cost-performance analysis and selection on the HDPE deep-sea anti-waves cage. Fishery Modernization, 2005, 6: 8–9 [黄滨, 关长涛, 林德芳. HDPE 深海抗风浪网箱的性价比分析与选择. 渔业现代化, 2005, 6: 8–9]
- Huang DB. Mariculture technology of *Paralichthys olivaceus* in the net cages. Fishery Guide to be Rich, 2002(8): 35–36 [黄德波. 海水网箱养殖牙鲈鱼技术. 渔业致富指南, 2002(8): 35–36]
- Huang LY, Liang ZL, Wan R, et al. Study on the maximum inclined angle of a HDPE circle submersible net cage. Periodical of Ocean University of China, 2006, 36(6): 953–958 [黄六一, 梁振林, 万荣, 等. HDPE 圆形升降式网箱下沉时最大倾角的研究. 中国海洋大学学报, 2006, 36(6): 953–958]
- Irwin S, O'Halloran J, Fitzgerald RD. Stocking density growth and growth variation in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* (Rafinesque). Aquaculture, 1999, 178(1): 77–88
- Jiang XF, Duan XY, Wang YF, et al. Indoor overwintering and marine cage culture of *Paralichthys olivaceus*. Fisheries Science and Technology Information, 2001, 28(4): 163–164 [姜秀凤, 段晓英, 王玉芬, 等. 牙鲈室内越冬和海上网箱养成试验. 水产科技情报, 2001, 28(4): 163–164]
- Lei JL. New situation and developing direction of turbot and flounders. Scientific Fish Farming, 2005(1): 34–35 [雷霖霖. 鲆鲽类养殖新形势和合发展动向. 科学养鱼, 2005(1): 34–35]
- Lin DF, Guan CT, Huang B, et al. Discussion on anti-wave measures of mariculture cage. Marine Fisheries Research, 2005, 26(6): 55–60 [林德芳, 关长涛, 黄滨, 等. 海水养殖网箱抗风浪措施的探讨. 海洋水产研究, 2005, 26(6): 55–60]
- Qiao W, Song XF, Gao CR, et al. Effects of stocking density on the growth and physiology of adult turbot and changes in water quality. Progress in Fishery Sciences, 2014, 35(5): 76–82 [乔玮, 宋协法, 高淳仁, 等. 养殖密度对循环水系统中大菱鲈(*Scophthalmus maximus*)生长的影响. 渔业科学进展, 2014, 35(5): 76–82]
- Wang WJ. Discussion of atlantic flounder feeding technique in net cage on the Southern Sea. Journal of Fujian Fisheries, 2006, 3(1): 33–35 [王文建. 美国大西洋牙鲈南方海上网箱养成技术探讨. 福建水产, 2006, 3(1): 33–35]
- Wang XC. South domestication and mariculture of turbot in the net cages. Journal of Fujian Fisheries, 2006, 3(1): 45–47 [王兴春. 大菱鲈南移网箱养殖试验. 福建水产, 2006, 3(1): 45–47]
- Wu CW, Chang KM. The development direction of modern fish farming in deep-sea cage aquaculture. Chinese Fisheries Economics, 2006(1): 67–69 [吴常文, 常抗美. 深水网箱养殖—现代耕海牧渔的发展方向. 中国渔业经济, 2006(1): 67–69]
- Wu CW, Zhu AY, Shen JL. Experiment on validating the capability of HDPE offshore cage to go against wind, wave and current in the sea. The Ocean Engineering, 2007, 25(2): 84–90, 97 [吴常文, 朱爱意, 沈建林. HDPE 深水网箱抗风浪流性能的海区验证实验. 海洋工程, 2007, 25(2): 84–90, 97]
- Xian WW, Zhu XH. Influences of body weight and temperature on standard metabolic rate of *Paralichthys olivaceus*. Chinese Journal of Applied Ecology, 2002, 13(3): 340–342 [线薇薇, 朱鑫华. 体重和温度对褐牙鲈标准代谢的影响. 应用生态学报, 2002, 13(3): 340–342]
- Zhou Y, Huang B, Wu F, et al. The influence of UV location on recirculating aquaculture *Cynoglossus semilaevis*'s water environment and its growth. Engineering Sciences, 2014, 16(9): 78–85 [周游, 黄滨, 吴凡, 等. 紫外线位置对循环水养殖半滑舌鳎水环境及生长影响. 中国工程科学, 2014, 16(9): 78–85]

(编辑 马瑾艳)

Assessment on the Culture Efficiency of *Paralichthys olivaceus* and *Scophthalmus maximus* in Two New Environment-Friendly Plastic Cages

WANG Tengting^{1,2}, GUAN Changtao^{2①}, GONG Pihai², CUI Yong², LI Zhenzhen^{1,2}

(1. College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. 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)

Abstract Two types of new-styled cages, monolayer cage and bilayer cage, which made of environment-friendly plastic, were developed for *Paralichthys olivaceus* and *Scophthalmus maximus* culture. The new culture systems were tested to explore if they affect the survival rate and growth of two important aquaculture species in fish breeding. In the *P. olivaceus* culture experiment, the survival rate of the traditional wooden cage group was 92.73%, with production yield of 16.42 kg/m², while the survival rate of the new monolayer plastic cage group significantly increased to 96.37% with yield up to 17.42 kg/m² ($P<0.05$). Furthermore, the yield per unit area of the new monolayer plastic cage group was 6.10% higher than that in the traditional wooden cage ($P<0.05$). In the culture of small sized *S. maximus*, the traditional wooden cage group had a survival rate of 92.50% with a yield of 8.09 kg/m² and the new monolayer plastic cage group had a survival rate of 92.50% with a yield of 8.02 kg/m². By contrast, the bilayer plastic cage group had a similar survival rate of 92.00%, but with an increased yield of 10.53 kg/m². The bilayer plastic cage had significantly improved the yield per unit area, which was 30.00% and 31.00% higher than the traditional wooden cage group and the monolayer plastic cage group respectively ($P<0.05$). In the culture of big sized *S. maximus*, the survival rate was over 95.00% and the yield was between 14.52 kg/m² and 16.32 kg/m² in both new-styled plastic cage groups. However, there was significant difference in the average weight of fish between the two new plastic cage groups ($P<0.05$). The yield per unit area of bilayer cage group was 11.00% higher than that in monolayer cage. The results demonstrated that using new plastic environment-friendly cage can significantly benefit *P. olivaceus* aquaculture. Compared with the traditional wooden cage, the new-type plastic cage has advantages such as energy-saving, environment-friendly and operation-convenient. Above all, the bilayer plastic cage can promote the effective use of rearing space, and increase the production yield.

Key words *Paralichthys olivaceus*; *Scophthalmus maximus*; Environment-friendly plastic cages; Cage culture

① Corresponding author: GUAN Changtao, E-mail: guanct@ysfri.ac.cn

《渔业科学进展》编辑委员会

THE EDITORIAL BOARD OF *PROGRESS IN FISHERY SCIENCES*

- 主 编 Editor-in-Chief 唐启升 TANG Qisheng
- 副主编 Associate Editors-in-Chief 金显仕 JIN Xianshi 麦康森 MAI Kangsen 孙 松 SUN Song 孔 杰 KONG Jie
- 顾 问 Advisors (以姓名笔画为序)
- 苏纪兰 SU Jilan 林浩然 LIN Haoran 赵法箴 ZHAO Fazhen 徐 洵 XU Xun
曹文宣 CAO Wenxuan 雷霖霖 LEI Jilin 管华诗 GUAN Huashi
- 编 委 Editorial Committee (以姓名笔画为序)
- | | | | |
|-------------------|---------------------|--------------------|-------------------|
| 于志刚 YU Zhigang | 戈贤平 GE Xianping | 方建光 FANG Jianguang | 王清印 WANG Qingyin |
| 王新鸣 WANG Xinming | 包振民 BAO Zhenmin | 司徒建通 SITU Jiantong | 关瑞章 GUAN Ruizhang |
| 刘占江 LIU Zhanjiang | 刘海金 LIU Haijin | 孙效文 SUN Xiaowen | 孙 谧 SUN Mi |
| 庄 平 ZHUANG Ping | 曲克明 QU Keming | 江世贵 JIANG Shigui | 何建国 HE Jianguo |
| 吴常文 WU Changwen | 吴淑勤 WU Shuqin | 张士瑾 ZHANG Shicui | 张全启 ZHANG Quanqi |
| 张国范 ZHANG Guofan | 张显良 ZHANG Xianliang | 李来好 LI Laihao | 李杰人 LI Jieren |
| 李 健 LI Jian | 李家乐 LI Jiale | 杨红生 YANG Hongsheng | 邹桂伟 ZOU Guiwei |
| 陈立侨 CHEN Liqiao | 陈松林 CHEN Songlin | 陈雪忠 CHEN Xuezhong | 周永灿 ZHOU Yongcan |
| 林 洪 LIN Hong | 俞志明 YU Zhiming | 姚 杰 YAO Jie | 相建海 XIANG Jianhai |
| 赵宪勇 ZHAO Xianyong | 徐 皓 XU Hao | 桂建芳 GUI Jianfang | 殷邦忠 YIN Bangzhong |
| 秦 松 QIN Song | 贾晓平 JIA Xiaoping | 常亚青 CHANG Yaqing | 常剑波 CHANG Jianbo |
| 黄 健 HUANG Jie | 董双林 DONG Shuanglin | 翟毓秀 ZHAI Yuxiu | 魏宝振 WEI Baozhen |

渔 业 科 学 进 展

YUYE KEXUE JINZHAN

(双月刊, 1980年创刊)

第38卷 第3期 2017年6月

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

(Bimonthly, founded in 1980)

Vol.38 No.3 Jun . 2017

主管单位	中华人民共和国农业部	Administrated	by	Ministry of Agriculture, P.R.China
主办单位	中国水产科学研究院黄海水产研究所 中国水产学会	Sponsored	by	Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences China Society of Fisheries
出版单位	科 学 出 版 社 地址: 北京东黄城根北街16号, 邮编: 100717	Published	by	Science Press Add:16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China
编辑单位	中国水产科学研究院黄海水产研究所 地址: 青岛市南京路106号 邮编: 266071 电话: 0532-85833580 http://www.yykxjz.cn E-mail:yykxjz@ysfri.ac.cn	Edited	by	Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences Add:106 Nanjing Road, Qingdao, 266071, China; Tel: 0532-85833580 http://www.yykxjz.cn; E-mail:yykxjz@ysfri.ac.cn
主 编	唐启升	Editor-in-Chief		Tang Qisheng
印 刷	青岛国彩印刷有限公司	Printed	by	Qingdao Guocai Printing Co., Ltd.
国内发行	中国邮政集团公司山东省分公司	Domestic Distributed	by	China Post Group Corporation Shandong Branch
订 购	全国各地邮政局	Subscription		Post Offices All Over China
国外发行	中国国际图书贸易总公司 地址: 北京339信箱 邮编: 100044	Overseas Distributed	by	China International Book Trading Corporation P.O.Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号

ISSN 2095-9869

CN 37-1466/S

国内邮发代号: 24-153

国外发行代号: 4578Q

国内外公开发行

定 价: 30.00元

ISSN 2095-9869



9 772095 986170