

中国科技核心期刊 中文核心期刊

2016

ISSN 2095-9869
CN 37-1466/S

渔业科学进展

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES



第37卷 VOL.37 第4期 NO.4



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 37 卷 第 4 期

2016 年 8 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 录

渤海生态环境监测专题研究论文

- 渤海中部海域低氧区的发生记录.....江涛 徐勇 刘传霞 张艳 丁东生 孙雪梅 陈聚法 陈碧鹃 赵俊 曲克明 (1)
- 渤海中部浮游动物的生态特征.....徐东会 孙雪梅 陈碧鹃 夏斌 崔正国 赵俊 江涛 刘传霞 曲克明 (7)
- 渤海中部网采浮游植物种类组成和季节变化.....孙雪梅 徐东会 夏斌 崔正国 曲克明 江涛 赵俊 陈聚法 陈碧鹃 (19)
- 近年渤海中部海域活性磷酸盐的时空变化特征.....陈聚法 赵俊 过锋 曲克明 崔正国 孙雪梅 朱建新 丁东生 刘传霞 (28)
- 基于欧拉-拉格朗日方法的某溢油事故天然渔业资源损失评估方法案例研究.....丁东生 马绍赛 陈碧鹃 崔正国 赵俊 刘传霞 张旭志 曲克明 (36)
- 渤海中部 COD 的时空分布特征及其对富营养化的贡献分析.....张艳 李秋芬 赵俊 崔正国 周明莹 朱建新 丁东生 过锋 刘传霞 曲克明 (43)
- 渤海中部海域沉积物中 Hg 的校正及其空间分布特征.....杨茜 夏斌 杨庶 孙耀 周明莹 朱建新 过锋 刘传霞 曲克明 赵俊 崔正国 (49)
- 渤海中部海域水体中 Hg、As 的时空分布特征.....杨茜 夏斌 孙耀 陈聚法 张艳 曲克明 赵俊 崔正国 (54)
- 19-3 油田溢油对辽东湾浮游植物群落的影响.....宋广军 李爱 吴金浩 王召会 (60)
- 蓬莱 19-3 溢油后莱州湾浮游植物群落结构.....程玲 王月霞 马元庆 何健龙 刘爱英 宋秀凯 由丽萍 (67)
- 2013 年春季莱州湾海域理化环境及水质状况分析.....赵玉庭 苏博 李佳蕙 王立明 齐延民 孙珊 (74)

研究论文

- 盐度对云纹石斑鱼(*Epinehelus moara* ♀) × 鞍带石斑鱼(*Epinehelus lanceolatus* ♂) 受精卵孵化的影响及杂交仔稚幼鱼形态发育观察.....张梦淇 陈超 李炎璐 孔祥迪 刘莉 翟介明 (81)
- 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.....张荣良 王卫军 冯艳微 杨建敏 唐海田 纪仁平 (90)
- 日本枪乌贼(*Loligo japonica*) 不同温度冻藏过程中的品质变化.....曹荣 王凤玉 赵玲 刘淇 刘玉川 (97)
- 中草药复合微生态制剂对吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) 生长、肠道菌群及抗病力的影响.....汤菊芬 黄瑜 蔡佳 丘金珠 孙建华 徐中文 简纪常 (104)
- 引起半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis* Günther) 鱼苗大规模死亡的神经坏死病毒病.....粟子丹 李晋 史成银 (110)
- 半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*) *Nramp* 基因克隆与表达分析及 SNP 筛选.....邢贺飞 高峰涛 张永珍 董忠典 陈松林 (116)
- 同步检测 7 种鱼类病毒的扩增子拯救多重 PCR(Arm-PCR) 方法的建立和应用.....王胜强 耿伟光 史成银 李晋 粟子丹 (128)
- 对虾白斑综合征病毒囊膜蛋白 VP28 和 VP26 的毕赤酵母组成型分泌表达.....耿小雪 王小霞 周怡 徐玮 张文兵 麦康森 (135)
- 2014 年中国不同地区对虾白斑综合征病毒 ORF14/15 和 ORF23/24 缺失区序列比较.....孙新颖 刘庆慧 万晓媛 黄捷 (140)
- 中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) *coat-ε* 基因全长 cDNA 克隆及组织分布.....王修芳 刘庆慧 吴垠 黄捷 (147)

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

CONTENTS

Vol.37 No.4 August 2016

Report on the Occurrence of Hypoxia in the Central Bohai Sea	JIANG Tao, XU Yong, LIU Chuanxia, ZHANG Yan, DING Dongsheng, SUN Xuemei, CHEN Jufa, CHEN Bijuan, ZHAO Jun, QU Keming	(1)
The Ecological Characteristics of Zooplankton in the Central Bohai Sea	XU Donghui, SUN Xuemei, CHEN Bijuan, XIA Bin, CUI Zhengguo, ZHAO Jun, JIANG Tao, LIU Chuanxia, QU Keming	(7)
Species Composition and Seasonal Variation of Netz-Phytoplankton in the Central Bohai Sea	SUN Xuemei, XU Donghui, XIA Bin, CUI Zhengguo, QU Keming, JIANG Tao, ZHAO Jun, CHEN Jufa, CHEN Bijuan	(19)
Recent Temporal and Spatial Variation in Active Phosphate Concentration in Seawater of the Central Bohai Sea CHEN Jufa, ZHAO Jun, GUO Feng, QU Keming, CUI Zhengguo, SUN Xuemei, ZHU Jianxin, DING Dongsheng, LIU Chuanxia	(28)
Evaluation of the Natural Fishery Resources Loss Caused by an Oil Spill Accident in the Central Bohai Sea Based on Euler-Lagrange MethodDING Dongsheng, MA Shaosai, CHEN Bijuan, CUI Zhengguo, ZHAO Jun, LIU Chuanxia, ZHANG Xuzhi, QU Keming	(36)
Temporal and Spatial Distribution of COD and Its Source and Contribution to Eutrophication in the Central Bohai Sea ZHANG Yan, LI Qiufen, ZHAO Jun, CUI Zhengguo, ZHOU Mingying, ZHU Jianxin, DING Dongsheng, GUO Feng, LIU Chuanxia, QU Keming	(43)
Normalization and Spatial Distribution of Mercury in the Sediments and Seawater of the Central Bohai SeaYANG Qian, XIA Bin, YANG Shu, SUN Yao, ZHOU Mingying, ZHU Jianxin, GUO Feng, LIU Chuanxia, QU Keming, ZHAO Jun, CUI Zhengguo	(49)
The Temporal and Spatial Distribution of Mercury and Arsenic in the Central Bohai SeaYANG Qian, XIA Bin, SUN Yao, CHEN Jufa, ZHANG Yan, QU Keming, ZHAO Jun, CUI Zhengguo	(54)
Influence of 19-3 Oil Spill Accident on Phytoplankton Community in the Liaodong BaySONG Guangjun, LI Ai, WU Jinhao, WANG Zhaohui	(60)
The Structure of the Phytoplankton Community in the Laizhou Bay After the Oil Spills in Penglai 19-3 Oilfield CHENG Ling, WANG Yuexia, MA Yuanqing, HE Jianlong, LIU Aiyong, SONG Xiukai, YOU Liping	(67)
Evaluation of Physicochemical Environment and Water Quality in the Laizhou Bay in Spring of 2013 ZHAO Yuting, SU Bo, LI Jiahui, WANG Liming, QI Yanmin, SUN Shan	(74)
Effects of Salinity on the Hatching of the Fertilized Eggs of <i>Epinephelus moara</i> (♀) × <i>Epinephelus lanceolatus</i> (♂) and the Observation of the Morphological Development of Larvae, Juvenile and Young FishZHANG Mengqi, CHEN Chao, LI Yanlu, KONG Xiangdi, LIU Li, ZHAI Jieming	(81)
Assessment of Genetic Variability and Microsatellite Analysis of Pacific Oyster (<i>Crassostrea gigas</i>) After Artificial Selection of the Shell Width	ZHANG Rongliang, WANG Weijun, FENG Yanwei, YANG Jianmin, TANG Haitian, JI Renping	(90)
Qualitative Changes of Squid (<i>Loligo japonica</i>) Under Different Frozen Storage TemperaturesCAO Rong, WANG Fengyu, ZHAO Ling, LIU Qi, LIU Yuchuan	(97)
Effects of a Compound Probiotics Combined with Chinese Herbal Medicine on Growth Performance, Intestinal Flora and Resistance to Diseases of GIFT Strain of Nile Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>) TANG Jufen, HUANG Yu, CAI Jia, QIU Jinzhu, SUN Jianhua, XU Zhongwen, JIAN Jichang	(104)
Preliminary Study on Massive Mortality of Hatchery-Reared Half-Smooth Tongue Sole, <i>Cynoglossus semilaevis</i> , Associated with Viral Nervous Necrosis SU Zidan, LI Jin, SHI Chengyin	(110)
Molecular Cloning, Expression and SNP Screening of Natural Resistance-Associated Macrophage Protein (Nramp) Gene cDNA from Half Smooth Tongue Sole (<i>Cynoglossus semilaevis</i>) XING Hefei, GAO Fengtao, ZHANG Yongzhen, DONG Zhongdian, CHEN Songlin	(116)
Amplicon Rescue Multiplex PCR (Arm-PCR): a Novel Tool for Simultaneous Detection of Seven Types of Fish Viruses WANG Shengqiang, GENG Weiguang, SHI Chengyin, LI Jin, SU Zidan	(128)
Secretive Expression of White Spot Syndrome Virus Envelope Proteins VP28 and VP26 in <i>Pichia pastoris</i> Induced by Constitutive PromoterGENG Xiaoxue, WANG Xiaoxia, ZHOU Yi, XU Wei, ZHANG Wenbing, MAI Kangsen	(135)
Comparison of the Missing Sequences of ORF14/15 and ORF23/24 of WSSV from Different Regions of China in 2014SUN Xinying, LIU Qinghui, WAN Xiaoyuan, HUANG Jie	(140)
cDNA Cloning of Coat-Epsilon Gene and Its Tissue Distribution in <i>Fenneropenaeus chinensis</i> WANG Xiufang, LIU Qinghui, WU Yin, HUANG Jie	(147)

渤海中部海域低氧区的发生记录*

江涛 徐勇 刘传霞 张艳 丁东生 孙雪梅
陈聚法 陈碧鹃 赵俊 曲克明^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)

摘要 2014年8月对渤海中部海域的水文(温度、盐度)、化学(溶解氧 DO、营养盐和化学耗氧量 COD)和生物要素(叶绿素 *a* Chl-*a*)的空间分布进行了调查。研究了该海域底层水体低氧(DO < 3.0 mg/L)的分布特征,深入分析了低氧区发生的关键因素。结果显示,底层水体 DO 浓度最小值为 2.30 mg/L,低氧面积达 1200 km²,呈西北-东南走向。调查海域的西部和西南海域呈现出明显的温度层化,尤其在低氧区附近形成了一个表层与底层水体温度差(δT) > 5°C 的区域, δT 最高值达到 7.3°C。水体密度层化与温度层化特征相似,在低氧区附近形成了一个底表层密度差($\delta\rho$) > 2 g/L 的等值线闭合圈。温度层化是低氧产生的主要物理因素。表层水体 COD 高值区主要分布在调查海域的西部,覆盖大部分的低氧海域。表层水体中的 Chl-*a* (> 4 $\mu\text{g/L}$)和 PO₄³⁻-P (> 6 $\mu\text{g/L}$)浓度高值区主要分布在调查海域的西南部,部分与低氧区重合。本研究可为探索渤海海域富营养化演变过程提供借鉴。

关键词 渤海中部海域; 溶解氧; 低氧; 富营养化

中图分类号 X83 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)04-0001-06

海洋中的溶解氧(DO)对生态系统来说极其重要,大多数生命都需要溶解氧来维持。水体中的溶解氧浓度过低,会对生态系统造成不良影响。有些鱼类在溶解氧值低于 3 mg/L 时就开始有所反应(Anderson *et al.*, 2001),当水体中溶解氧值低于 2 mg/L 时,底层拖网的渔获量几乎为零,因为水中溶解氧低于此值后,鱼类等游泳动物就开始转移栖息地(Rabalais *et al.*, 2002)。

通常情况下,底栖动物能很快地摄食上层水中沉降下来的有机物,因此,不会堆积过多的有机物被细菌分解,底层水体较少出现低氧状态(本研究将 DO < 3.0 mg/L 定义为低氧)。但如果上层水体集中了高密度的藻类,其大量死亡后向底层转移,有机物在底层腐烂过程中会消耗大量的氧(Rabalais *et al.*, 2002)。所以,在某些水体交换差的海域,由于底层溶解氧的大量损耗,产生了低氧区。海洋水体发生低氧,可能同时伴

随着有毒气体(如 H₂S 等)的产生,引起底栖生物的大量死亡。海域的第 1 次低氧环境对底栖大型生物的破坏尤为严重,它可以使经过多年才建立起来的底栖生态系统严重受损(林荣根等, 1997)。

渤海是中国最大的内海。随着环渤海地区经济的快速发展和城市规模的扩大,污染物的入海通量也不断增加,渤海的生态环境正面临着巨大压力,富营养化日益严重,赤潮灾害时有发生(张志锋等, 2012)。但迄今为止,仅在大辽河口出现过小面积的低氧区(李艳云等, 2006)。本研究于 2014 年 8 月对渤海中部海域进行调查,发现该海域存在一定面积的低氧区,这是渤海中部海域低氧区的首次发现。本研究通过综合分析水文、化学和生物因素,阐明该海域低氧区的分布特征和发生机制,为今后对渤海的科学研究和管理提供借鉴。

* 农业部专项“渤海生态环境监测评估”(13-Q52201302)和黄海水产研究所级基本科研业务费项目(20603022015002)共同资助。江涛, E-mail: jiangtao@ysfri.ac.cn

^① 通讯作者: 曲克明, 研究员, E-mail: qukm@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-06-18, 收修改稿日期: 2015-07-21

1 材料与方法

1.1 调查海域与采样方法

调查海域位于渤海中部, 共设 40 个站位(图 1), 采样时间为 2014 年 8 月 28–30 日。调查海域水深为 20–31 m, 最大水深海域分布于东部至中部。水体采样分为 3 层: 表层(0.5 m)、中层(10 m)和底层(离底 1 m)。水体温度、盐度和溶解氧采用溶解氧传感器(型号: YSI556, 美国 YSI 公司)现场测定。YSI 溶解氧传感器在每天使用前, 采用水饱和和空气法进行标定。

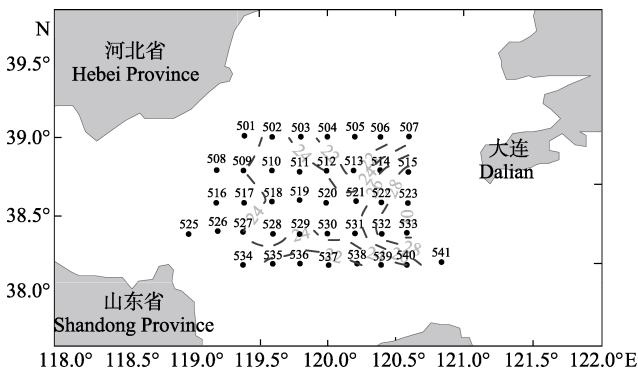


图 1 渤海中部海域采样站位(虚线为水深)

Fig. 1 Sampling stations in the central Bohai Sea (The dashed isohaline denoted the water depth, m)

1.2 样品分析测定

水体的 COD 测定采用碱性高锰酸钾法, 参照海洋调查规范(GB/T12763.6–2007)(2008)。用于营养盐和叶绿素 *a* (Chl-*a*) 测定的水样, 经 0.45 μm GF/F 玻璃纤维膜现场过滤后, 置于 -20°C 冰箱保存, 冷藏运至实验室测定。营养盐(磷酸盐、硝酸盐、亚硝酸盐和铵盐)分析方法参照海洋调查规范(GB/T12763.6–2007)(2008)进行。Chl-*a* 采用分光光度法测定。总溶解无机氮(DIN)为 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 、 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 三者之和。

2 结果与分析

2.1 水文特征

调查海域表层水温为 $24.1\text{--}25.9^{\circ}\text{C}$, 东部水温较低, 西部水温较高, 最高温度出现在 517 站位(图 2-A), 为 25.9°C 。在中层水体中, 低温水团出现在调查海域的东南部, 与表层低温呈现出一定的重叠; 在西部水体中存在 1 个冷水团, 位于 517 站位(18.7°C , 为中层水体最低水温)(图 2-B)。在底层水体中, 西部区域(517 站位附近)的低温水团面积进一步扩大(图 2-C)。中层和底层水体中的高温水团均出现在调查海域的北部。

调查海域盐度变化范围很小, 全部水层的水体盐度为 $29.5\text{--}30.7$ (图 2-D–图 2-F)。受黄河径流的影响, 盐度低值区位于调查海域的西南部和南部, 高值区位于调查海域的中东部。

2.2 水体层化特征

在调查海域的中北部, 表底层温度差(δT , 表层温度减底层温度)、盐度差(δS , 底层盐度减表层盐度)和密度差($\delta \rho$, 底层密度减表层密度)都非常小(图 3-A–图 3-C)。这表明, 该海域表底层水体对流强烈。东部和西部海域 δT 则相对较高, 尤其在西部海域形成了 1 个 $\delta T > 5^{\circ}\text{C}$ 的区域, δT 最高值达到 7.3°C (517 站位)。在西部海域存在 $\delta S > 0.5$ 的区域, 在调查海域的东南部也存在小面积 $\delta S > 0.5$ 的区域。表底层密度差与温度差分布特征相似, 在西部海域存在 1 个 $\delta \rho > 1.5$ 的区域, 表明该海域具有较强的密度层化。

2.3 低氧区分布特征

表层水体 DO 浓度较高, 为 $6.53\text{--}8.56 \text{ mg/L}$, 呈现出从东北向西南逐渐增大的变化趋势(图 3-D)。与此相反, 底层水体 DO 呈现出从东北至西南逐渐降低的趋势。底层水体低氧区主要分布于调查海域西南部, 呈西北–东南走向, 并可能继续向西北方向蔓延(超出本次调查海域范围)(图 3-F)。底层水体 DO 浓度最小值为 2.30 mg/L , 出现在 527 站位; 低氧区面积为 1200 km^2 。调查海域的西南部 DO 普遍偏低, $\text{DO} < 4.0 \text{ mg/L}$ 的面积超过 1800 km^2 。调查海域中层 DO 浓度明显高于底层, DO 浓度分布趋势也表现为从东北向西南递减的趋势(图 3-E)。在中层, 517、527 站位 DO 浓度低于 3.0 mg/L , 分别为 2.70 、 2.87 mg/L 。

2.4 化学要素分布特征

表层水体的 COD 高值区主要分布在调查海域的西部(图 4-A), 低氧海域表层水体 COD 大于或接近 0.9 mg/L , 明显高于周边海域。表层水体 Chl-*a* 浓度高值区主要分布在调查海域的西南部和东北部(图 4-B)。其中, 西南部海域的 Chl-*a* 浓度高值区部分与低氧区重叠。 $\text{PO}_4^{3-} \text{-P}$ 浓度高值区($> 6 \mu\text{g/L}$)主要分布在西南部海域低氧区附近, 次高值区分布于东南部(图 4-C)。DIN 浓度高值区出现在南部海域(图 4-D), 低氧区发生海域浓度较低($< 100 \mu\text{g/L}$)。

3 讨论

低氧现象形成的原因主要有两种, 天然存在的和在人类活动影响下形成的低氧区。前者主要分布在相

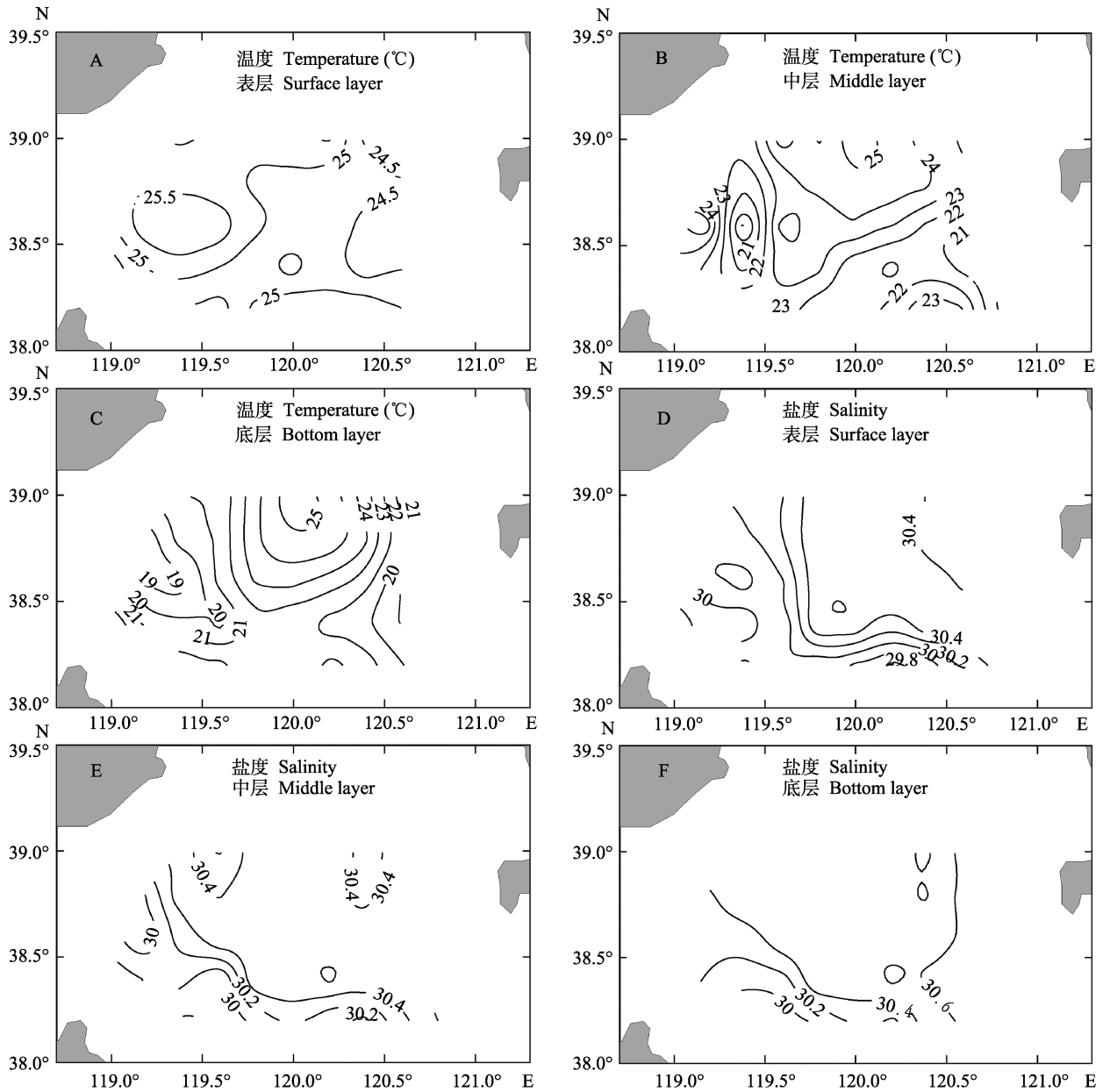


图 2 渤海中部海域温度和盐度的空间分布
Fig.2 Spatial distribution of temperature and salinity in the central Bohai Sea

对较深的大洋海域, 在上升流的影响下形成密度跃层, 导致底部缺氧(如太平洋东岸、大西洋和印度洋北部海域)(Helly *et al*, 2004); 后者是在人类活动的影响下, 水体出现富营养化, 表层水体滋生的大量浮游植物在衰亡后沉降到水底, 腐败过程中消耗水体中的氧, 从而为低氧区的形成奠定生物因素基础, 在物理条件成熟的情况下形成低氧区。相对来讲, 后者受到更大的关注。

近几十年来, 我国沿海富营养化程度日益加剧, 赤潮暴发频率剧增。我国海域的低氧现象时有发生, 主要分布在河口和封闭海湾, 例如长江口及其邻近

海域(Wei *et al*, 2007)、大辽河口(李艳云等, 2006)、大亚湾(彭云辉等, 1996)等。我国沿海低氧区主要发生在富营养化严重的海域, 且有很强季节性, 在温度较高时形成长时间的水体层化后, 底层水体才会发生低氧。

海洋低氧区的发生受多种因素的影响, 包括盐度层化(主要是上层冲淡水)、温度层化、富营养化、风速风向、地貌地形、海流和潮汐等(Rabalais *et al*, 2002)。夏季是黄海冷水团势力最强盛的时期(林霄沛等, 2002), 黄海冷水团通过渤海海峡北部进入渤海后分为两支。南支向西延伸至渤海南部洼地(本调查海域的中部, 38.4°-38.8°N), 从而维持春、夏季渤海

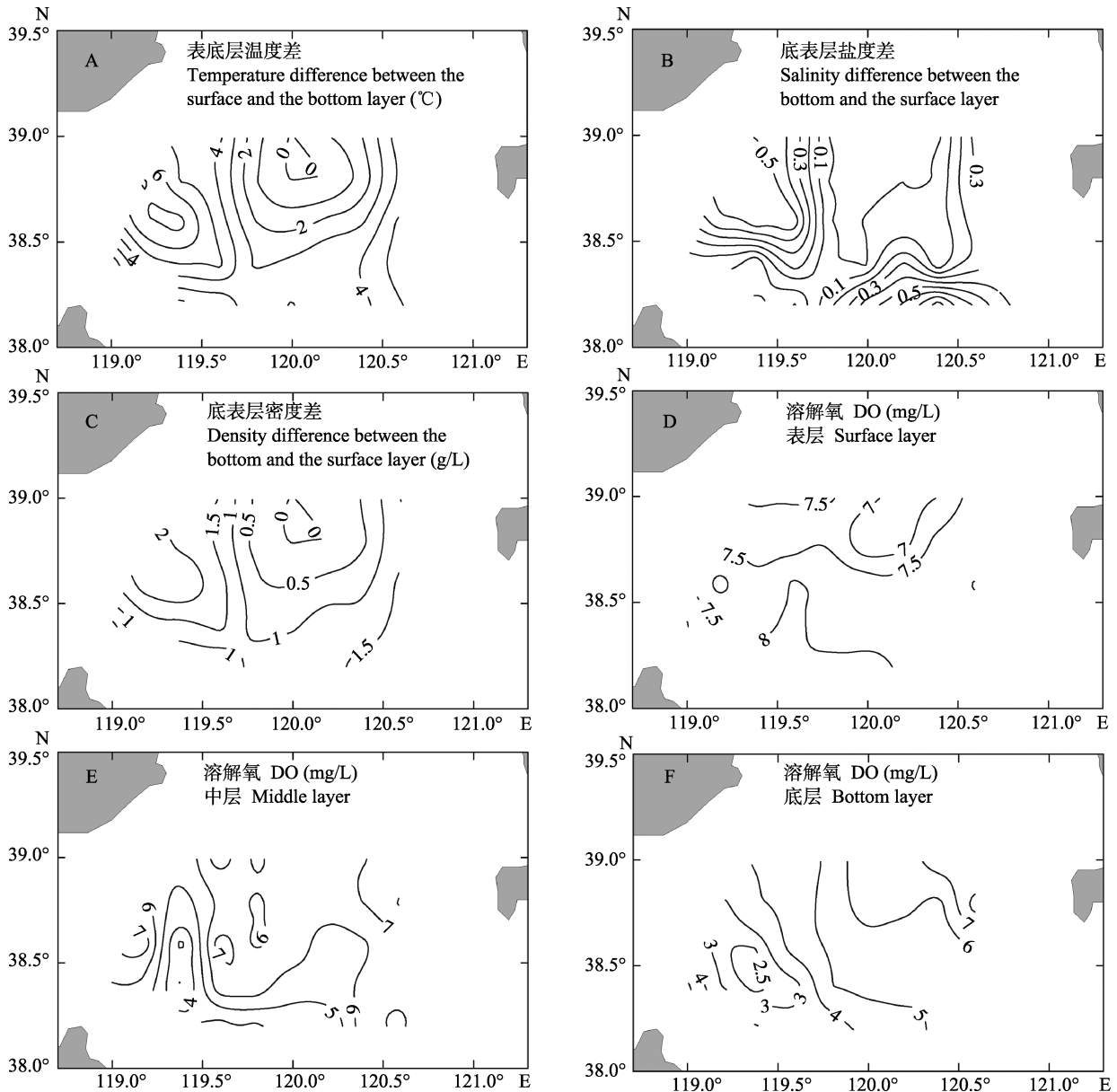


图 3 渤海中部海域水体层化与溶解氧分布

Fig.3 Water column stratification and distribution of dissolved oxygen in the central Bohai Sea

南部洼地冷水团的持续存在(周锋等, 2009)。低氧区所处的位置恰好是渤海南部洼地的西部, 地形呈上升趋势, 冷水团的前端存在小规模的上流流(图 2-B, 517 站位中层的 21℃等值线闭合圈)。但黄海冷水团侵入流量不大(林霄沛等, 2002)。从本研究来看, 小于 20℃的冷水团难以到达中层(图 2-B), 所以更难对表层水体的温度产生影响。而低氧区表层水体温度较高, 形成一个大于 25.5℃的高温水团, 从而造成了较强的水体温度层化。

在水体层化过程中, 温度和盐度在不同的海域可能具有不同的作用。在北墨西哥湾、切萨皮克湾和基尔湾, 温度和盐度具有同等重要的作用(Rabalais *et al.*,

2002), 但在纽约湾和长岛湾温度对于层化起到主要作用(Falkowski *et al.*, 1980; Welsh *et al.*, 1991)。本研究表明, 渤海中部海域出现低氧区, 也与温度层化有关。另外, 夏季海面风速很小, 海面风应力对层化结构的破坏作用在全年中最小(刘浩等, 2007), 这也为低氧的发生创造了气象条件。

海洋低氧区的产生除了具备物理条件(密度层化)外, 还要具备生物和化学条件。本研究结果显示, 调查海域的 COD、Chl-*a* 和 $PO_4^{3-}-P$ 浓度高值区主要分布于低氧区及邻近海域(图 4), COD 反映了水体有机污染程度, 而 Chl-*a* 则反映了水体的浮游植物生物量。周锋等(2009)研究表明, 在 7 月中旬, 渤海中部海域

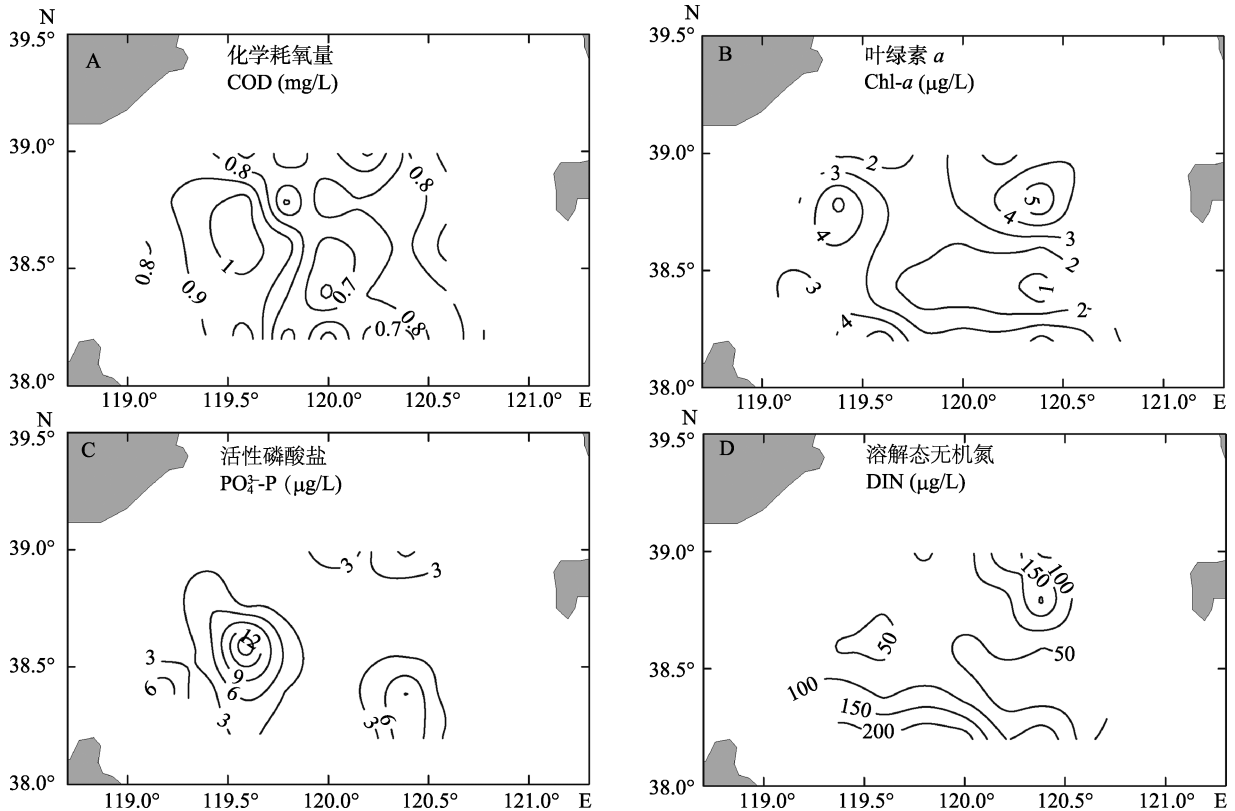


图4 渤海中部海域表层水体化学要素分布

Fig.4 Distribution of chemical factors in the surface water of the central Bohai Sea

跃层最厚, 层化达到最强; 8月下旬, 跃层已明显减弱。本研究调查时间为8月下旬, 与周锋等(2009)研究结果相似。处于调查海域北部的浅滩海域已无水体层化, 但调查海域的西南方(低氧海域)依然存在较强的温跃层。由于水体中存在较多的有机质, 加上长时间的水体层化, 为低氧区的生成奠定了基础。

渤海是我国富营养化程度最严重的海域之一。自20世纪80年代以来, 渤海水体溶解态无机氮浓度一直呈现快速增加的趋势, 但活性磷酸盐则无明显增加, 水体营养盐结构发生了较大变化。如1982年渤海平均N/P值为2.5, 到1992年和1998年分别升为10.8、23.7, 更接近Redfield值(N/P值为16)(蒋红等, 2005)。自20世纪90年代以来, 赤潮发生次数持续增多, 可能与氮浓度的升高和营养盐结构的变化有关。虽然20世纪90年代中期以后, 渤海氮、磷浓度呈现出下降的趋势, 但赤潮发生次数依然居高不下。2002年共发现赤潮20次, 2004、2009年赤潮暴发面积超过5000 km² (张志锋等, 2012)。张志锋等(2012)比较了2004年和2008年渤海全海域富营养化指数(NQI)分布, 认为近年来渤海近岸表层海水的NQI总体呈显著上升趋势。值得关注的是, 崔毅等(1994)、唐启升等(1997)、翟惟东等(2012)在夏季对渤海中

部海域的DO进行了多次调查, 均没有发现低氧区的存在。本调查在渤海中部发现的低氧区面积达1200 km², 最低DO浓度仅为2.30 mg/L, 底层水体大面积低氧反映了渤海富营养化程度的进一步加剧。在今后的研究中, 有关渤海低氧区的发展趋势值得关注。

致谢 “振华轮”全体船员在调查过程中给予的帮助, 费聿涛、褚瑶瑶、古彬和隋琪等研究生参加了本次调查, 在此一并感谢。

参 考 文 献

- 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. GB/T12763.6-2007 海洋监测规范 第6部分: 海洋生物调查. 北京: 中国标准出版社, 2008
- 刘浩, 潘伟然. 渤海层化结构及潮汐锋面季节变化的数值研究. 水科学进展, 2007, 18(3): 398-403
- 李艳云, 王作敏. 大辽河口和辽东湾海域水质溶解氧与COD、无机氮、磷及初级生产力的关系. 中国环境监测, 2006, 22(3): 70-72
- 张志锋, 贺欣, 张哲, 等. 渤海富营养化现状、机制及其与赤潮的时空耦合性. 海洋环境科学, 2012, 31(4): 465-468
- 林荣根, 邹景忠. 近海富营养化的结果与对策. 海洋环境科学, 1997, 16(3): 71-75

- 林霄沛, 吴德星, 鲍献文, 等. 渤海海峡断面温度结构及流量的季节变化. 青岛海洋大学学报(自然科学版), 2002, 32(3): 355–360
- 周锋, 黄大吉, 苏纪兰. 夏季渤海温跃层下的双中心冷水结构的数值模拟. 科学通报, 2009, 54(11): 1591–1599
- 唐启升, 孟田湘. 渤海生态环境和生物资源分布图集. 青岛: 青岛出版社, 1997
- 崔毅, 杨琴芳, 宋云利. 夏季渤海无机磷酸盐和溶解氧分布及其相互关系. 海洋环境科学, 1994, 13(4): 31–35
- 彭云辉, 陈浩如, 陈玲娣. 大亚湾大鹏澳海区水化学特征. 海洋通报, 1996, 15(6): 27–34
- 蒋红, 崔毅, 陈碧鹃, 等. 渤海近 20 年来营养盐变化趋势研究. 海洋水产研究, 2005, 26(6): 61–67
- 翟惟东, 赵化德, 郑楠, 等. 2011 年夏季渤海西北部、北部近岸海域的底层耗氧与酸化. 科学通报, 2012, 57(9): 753–758
- Anderson TH, Taylor GT. Nutrient pulse, plankton blooms, and seasonal hypoxia in western Long Island Sound. *Estuaries*, 2001, 24(2): 228–243
- Falkowski PG, Hopkins TS, Walsh JJ. An analysis of factors affecting oxygen depletion in the New York Bight. *J Mar Res*, 1980, 38(3): 479–506
- Helly JJ, Levin LA. Global distribution of naturally occurring marine hypoxia on continental margins. *Deep-Sea Res I*, 2004, 51(9): 1159–1168
- Rabalais NN, Turner RE, Wiseman WJ. Gulf of Mexico hypoxia, A.K.A. “the dead zone”. *Annu Rev Ecol Syst*, 2002, 33: 235–263
- Wei H, He Y, Li Q, *et al.* Summer hypoxia adjacent to the Changjiang Estuary. *J Mar Syst*, 2007, 67(3–4): 292–303
- Welsh BL, Eller FC. Mechanisms controlling summertime oxygen depletion in western Long Island Sound. *Estuaries*, 1991, 14(3): 265–278

(编辑 马瑾艳)

Report on the Occurrence of Hypoxia in the Central Bohai Sea

JIANG Tao, XU Yong, LIU Chuanxia, ZHANG Yan, DING Dongsheng, SUN Xuemei, CHEN Jufa, CHEN Bijuan, ZHAO Jun, QU Keming^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)

Abstract Hypoxia in the central areas of the Bohai Sea was reported for the first time in this study. The survey in August 2014 suggested that the hypoxic zone was 1200 km² in area and the minimum DO concentration was 2.30 mg/L. The hypoxic zone was on the southwest side of the investigated area (119.1°–119.6°E, 38.3°–38.8°N). The DO (4 mg/L) isoline indicated that the hypoxic layer reached 10 m under the water. There were differences in the temperature and density between the surface and the bottom layer (δT and $\delta\rho$), implying the formation of strong pycnocline in the hypoxic zone. The δT isoline of 5°C mainly occurred in the vicinity of hypoxic zone with the highest δT value of 7.3°C. The density difference between the bottom and the surface layer has a similar spatial pattern with δT . By contrast, the salinity difference between the bottom and the surface layer was small (< 0.8) in the investigated areas. These results suggested that thermal stratification could be more influential than saline stratification in controlling the occurrence of hypoxia. The COD concentration was high (< 0.9 mg/L) on the southwest side of the investigated area that accounted for the majority of the hypoxic zone. In addition, high level of Chl-*a* (> 4 $\mu\text{g/L}$) and $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ (> 6 $\mu\text{g/L}$) was also observed in this area. We proposed that the formation of hypoxia could be a result of combined factors including the inflow from the Yellow Sea, the topography, and especially, the thermal stratification and *in situ* production.

Key words The central Bohai Sea; Dissolved oxygen; Hypoxia; Eutrophication

① Corresponding author: QU Keming, E-mail: qukm@ysfri.ac.cn

渤海中部浮游动物的生态特征*

徐东会 孙雪梅 陈碧鹃^① 夏 斌 崔正国
赵 俊 江 涛 刘传霞 曲克明



(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)

摘要 本研究针对 2013 年 5 月(春季)、8 月(夏季)、11 月(秋季)和 12 月(冬季)在渤海中部海域以浅水 I 型浮游生物网采集的浮游动物样品,分析了浮游动物的种类组成、丰度分布和多样性;通过结合现场环境参数,探讨了环境因子与浮游动物之间的关系。结果显示,4 个季节共鉴定浮游动物 74 种(含浮游幼虫 21 类),桡足类为绝对优势的类群,在浮游动物的物种丰富度中占 25.7%。渤海中部海域全年均出现的浮游动物优势种类共 2 个,分别为中华哲水蚤(*Calanus sinicus*)和强壮箭虫(*Sagitta crassa*)。春季共鉴定浮游动物 29 种(含浮游幼虫 6 类),浮游动物平均丰度为 782.0 ind/m³,平均湿重生物量为 157.1 mg/m³,香农-威纳指数(H')和物种丰富度指数(D)分别为 2.36 和 1.02;夏季共鉴定浮游动物 45 种(含浮游幼虫 18 类),浮游动物平均丰度为 199.6 ind/m³,平均湿重生物量为 135.8 mg/m³, H' 和 D 分别为 1.75 和 1.78;秋季共鉴定浮游动物 42 种(含浮游幼虫 14 类),浮游动物平均丰度为 42.1 ind/m³,平均湿重生物量为 122.5 mg/m³, H' 和 D 分别为 1.83 和 2.08;冬季共鉴定浮游动物 33 种(含浮游幼虫 12 类),浮游动物平均丰度为 72.1 ind/m³,平均湿重生物量为 151.1 mg/m³, H' 和 D 分别为 1.63 和 1.53。浮游动物丰度与环境因子间的相关性分析表明,春季影响渤海中部海域浮游动物分布的主要环境因子组合为表盐、底溶解氧和水深;夏季影响渤海中部海域浮游动物分布的主要环境因子组合为底温、底盐和叶绿素;秋季影响渤海中部海域浮游动物分布的主要环境因子组合为表温、表 pH 和底 pH;冬季影响渤海中部海域浮游动物分布的主要环境因子组合为底 pH 和叶绿素。与同期历史数据相比,浮游动物的种类数、丰度和生物量均有所下降。

关键词 渤海;浮游动物;种类组成;多样性

中图分类号 S931 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)04-0007-12

渤海是陆岸环抱的半封闭性内海,沿岸多条大、小河流入海。因此,渤海具有水质肥沃,饵料生物丰富的特点,并构成我国北方经济鱼虾类的主要产卵场和索饵场(白雪娥等,1991)。浮游动物作为海洋生态系统中的重要组成部分,其动态变化控制着初级生产

力的节律、规模和归宿;同时,浮游动物作为经济鱼类的饵料来源,在很大程度上决定了鱼种的补充机制(Cushing, 1972¹⁾; Froneman, 2004; 齐衍萍等, 2010; 徐东晖, 2010²⁾。

目前,关于渤海海域浮游动物的种类组成、数量

* 农业部溢油专项“渤海生态环境监测与评估”(农办渔[2012]117号)和“应对溢油关键技术专项研究”(2012-NZ-5739)共同资助。徐东会, E-mail: lvbaobei@sina.com

^① 通讯作者: 陈碧鹃, 研究员, E-mail: chenbj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-06-11, 收修改稿日期: 2015-08-11

1) Cushing DH. The production cycle and the numbers of marine fish. Symposium Zoological Society of London, 1972, 29: 213-232

2) 徐东晖. 自然和人为因子对黄、东海几种桡足类优势种生理活动的影响. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2010, 9-15

变动的研究较多,但一般是针对整个渤海水域大尺度的研究(白雪娥等,1991;毕洪生等,2000;王克等,2002;张武昌等,2002),或仅局限于渤海部分水域小范围的研究(王彬等,2010;马静,2011¹⁾;李自尚,2012²⁾;马静等,2012;彭荣等,2012;高文胜等,2014;王宇等,2014),针对渤海中部水域的调查研究较为少见。本研究利用2013年5、8、11、12月在渤海中部水域开展的海洋调查所获得的浮游动物资料,分析了浮游动物的种类组成和数量变化,对该水域浮游动物的生态特征进行研究,探讨了浮游动物与环境因子之间的关系。以期为渤海中部水域浮游动物的长期变化研究提供基础资料,并对该水域生物资源的合理利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 调查海区及方法

分别于2013年5月(春季)、8月(夏季)、11月(秋季)和12月(冬季),在渤海中部水域(图1)进行浮游动物调查。使用美国YSI556型多参数水质监测仪测定海水温度、盐度、溶解氧、pH及水深等环境参数,叶绿素的测定采用荧光分光光度法《海洋监测规范》(GB17378.4-2007)。采用浅水I型浮游生物网采集浮游动物样品,用5%福尔马林海水溶液固定保存,参照《海洋调查规范——海洋生物调查》(GB12763.6-2007)完成浮游动物样品的处理和分析。

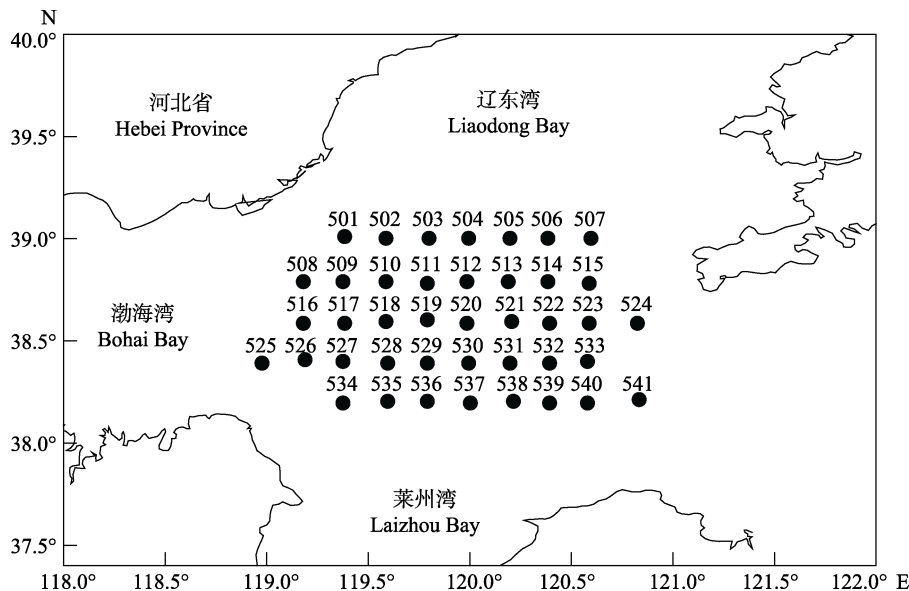


图1 调查区域及站位分布

Fig.1 Investigated area and the sampling stations

1.2 数据处理与分析

1.2.1 丰度和生物量 浮游动物丰度为每立方米水体中的个体数,生物量为固定样品后称得的湿重。

1.2.2 优势种 根据每个种的优势度值(Y)来确定浮游动物的优势种,将 $Y \geq 0.02$ 的种类作为优势种(徐兆礼等,1989)。

1.2.3 生物多样性 浮游动物多样性指数使用香农-威纳指数(H')(Shannon *et al*, 1949)和 Margalef 丰富度指数(D)(Margalef, 1958)表示。根据《海洋监测规范》(GB17378.7-2007)的评价标准,当 $H' < 1$ 时,为重污染;当 $H'=1-2$ 时,为中度污染;当 $H'=2-3$ 时,为轻度污染;当 $H'=3-4$ 时,为清洁区域。

1.2.4 浮游动物与环境因子关系 应用多元统计软件 PRIMER V6.1 中的 BIOENV 和 RELATE 程序(Souissi *et al*, 2001)分析浮游动物丰度与环境因子间的关系。

2 结果与分析

2.1 种类组成及优势种

2013年渤海中部水域调查共鉴定各类浮游动物53种、浮游幼虫21类,合计种类数为74(表1)。其中,浮游动物成体分别包括刺胞动物16种,栉水母2种,枝角类2种,介形类1种,桡足类19种,等足类1种,端足类4种,糠虾类2种,磷虾类1种,十足类1种,毛颚类2种,被囊类2种。春季渤海中部水域调查共

- 1) 马静. 夏、秋季黄河口及其邻近海域大中型浮游动物群落生态学研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2011, 22-70
- 2) 李自尚. 春季黄河口及其邻近水域浮游动物群落特征与粒径谱的初步研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2012, 20-61

表 1 渤海中部水域浮游动物种类组成
Tab.1 The composition of zooplankton in the central Bohai Sea

种类 Species	丰度 Abundance (%)			
	春季 Spring	夏季 Summer	秋季 Autumn	冬季 Winter
束状高手水母 <i>Bougainvillia ramose</i>	—	—	0.06	—
高手水母 <i>Bougainvillia</i> sp.	—	—	0.01	—
八束水母 <i>Koellikerina</i> sp.	—	—	0.03	—
日本长管水母 <i>Sarsia japonica</i>	—	0.01	—	—
单肢水母 <i>Nubiella</i> sp.	—	0.01	—	—
小介穗水母 <i>Podocoryne minima</i>	—	0.01	—	—
真囊水母 <i>Euphysora</i> sp.	—	0.04	—	—
杜氏外肋水母 <i>Ectopleura dumortieri</i>	—	0.09	—	—
马来触丝水母 <i>Helgicirra malayensis</i>	2.14	—	—	—
六辐枝管水母 <i>Willsia mutabllis</i>	0.12	—	—	—
八斑芮氏水母 <i>Rathkea octopunctata</i>	8.31	—	—	—
多管水母 <i>Aequorea coerulescens</i>	0.03	—	—	—
锡兰和平水母 <i>Eirene ceylonensis</i>	—	—	0.10	0.06
半球美螳水母 <i>Clytia hemisphaerica</i>	—	0.02	0.06	0.06
四枝管水母 <i>Proboscidactyla flavicirrata</i>	—	0.03	1.17	1.15
五角水母 <i>Muggiaea atlantica</i>	—	—	0.83	0.51
球形侧腕水母 <i>Pleurobrachia globosa</i>	—	—	0.55	0.17
瓜水母 <i>Beroe cucumis Fabricius</i>	—	—	—	0.01
鸟喙尖头蚤 <i>Penilia avirostris</i>	—	1.72	0.01	—
肥胖三角蚤 <i>Evadne tergestina</i>	—	0.01	—	—
格氏星萤 <i>Asteropina grimaldi</i>	—	—	—	0.01
中华哲水蚤 <i>Calanus sinicus</i>	19.48	38.14	42.33	50.33
小拟哲水蚤 <i>Paracalanus parvus</i>	11.65	0.87	0.87	1.08
强额拟哲水蚤 <i>Paracalanus crassirostris</i>	—	0.07	0.02	0.07
腹针胸刺水蚤 <i>Centropages abdominalis</i>	5.68	0.01	—	—
瘦尾胸刺水蚤 <i>Centropages tenuiremis</i>	1.51	0.01	—	—
背针胸刺水蚤 <i>Centropages dorsispinatus</i>	2.28	—	0.05	—
平头水蚤 <i>Candacia</i> sp.	0.01	—	—	—
真刺唇角水蚤 <i>Labidocera euchaeta</i>	—	0.01	1.33	0.70
双刺唇角水蚤 <i>Labidocera bipinnata</i>	—	0.40	0.49	0.55
双毛纺锤水蚤 <i>Acartia bifilosa</i>	5.36	0.04	0.10	0.01
克氏纺锤水蚤 <i>Acartia clausi</i>	0.02	—	—	—
太平洋纺锤水蚤 <i>Acartia pacifica</i>	18.91	—	0.01	0.03
瘦尾筒角水蚤 <i>Pontellopsis tenuicauda</i>	0.49	—	—	—
海洋伪镖水蚤 <i>Pseudodiaptomus marinus</i>	0.28	—	—	—
刺尾歪水蚤 <i>Tortanus spinicaudatus</i>	1.96	—	—	—
拟长腹剑水蚤 <i>Oithona similis</i>	—	—	0.10	0.12
近缘大眼剑水蚤 <i>Corycaeus affinis</i>	1.73	0.17	1.26	0.52
挪威小毛猛水蚤 <i>Microsetella norvegica</i>	2.94	—	—	—
怪水蚤 <i>Monstrilla</i> sp.	—	0.01	—	—
小寄虱 <i>Microniscus</i> sp.	—	0.03	0.09	0.07
细足法虫戎 <i>Themisto gracilipes</i>	0.04	0.67	0.52	1.08
螺赢斐 <i>Corophium</i> sp.	0.15	—	—	—
麦杆虫 <i>Caprella</i> sp.	—	—	0.01	—

续表 1 Continued Tab.1

种类 Species	丰度 Abundance (%)			
	春季 Spring	夏季 Summer	秋季 Autumn	冬季 Winter
钩虾 <i>Gammaridea</i>	—	0.01	0.10	0.03
长额刺糠虾 <i>Acanthomysis longirostris</i>	—	0.02	0.14	—
儿岛囊糠虾 <i>Gastrosaccus kojimansis</i>	0.05	—	0.05	—
太平洋磷虾 <i>Euphausia pacifica</i>	—	0.01	—	—
中国毛虾 <i>Acetes chinensis</i>	0.02	—	—	—
拿卡箭虫 <i>Sagitta nagae</i>	—	0.03	0.03	—
强壮箭虫 <i>Sagitta crassa</i>	7.32	37.43	39.59	39.30
异体住囊虫 <i>Oikopleura dioica</i>	—	0.08	0.64	0.20
小齿海樽 <i>Doliolum denticulatum</i>	—	—	0.02	—
帚虫类辐轮幼虫 <i>Actinotrocha larva</i>	—	—	0.07	0.08
柱头幼虫 <i>Tornaria larva</i>	—	8.12	0.01	0.02
多毛类幼体 <i>Polychaeta larva</i>	—	0.03	1.07	0.29
双壳类幼体 <i>Bivalve larvae</i>	—	1.49	6.60	2.47
腹足类幼体 <i>Gastropoda larva</i>	—	0.25	0.19	0.02
桡足类无节幼虫 <i>Nauplius larva (Copepoda)</i>	8.35	0.01	—	0.02
桡足幼体 <i>Copepodite larva</i>	—	0.01	—	—
磷虾节胸幼虫 <i>Calyptopis larva</i>	—	0.01	0.14	0.02
糠虾幼体 <i>Mysidacea larvae</i>	0.07	—	—	—
阿利玛幼虫 <i>Alima larva</i>	—	0.16	—	—
蔓足类藤壶幼体 <i>Balanus larva</i>	0.01	—	—	—
长尾类幼体 <i>Macrura larva</i>	0.01	1.43	0.92	0.79
短尾类溞状幼虫 <i>Brachyura zoea larva</i>	0.01	0.61	0.14	0.06
短尾类大眼幼体 <i>Brachyura megalopa larva</i>	—	0.01	—	—
歪尾类溞状幼虫 <i>Porcellana zoea larva</i>	—	0.01	0.03	0.10
海蛇尾长腕幼虫 <i>Ophiopluteus larva</i>	1.10	0.95	0.02	—
海胆长腕幼虫 <i>Echinopluteus larva</i>	—	5.80	0.07	0.03
海星羽腕幼虫 <i>Bipinnaria larva</i>	—	1.00	—	—
棘皮动物幼体 <i>Echinodermata larva</i>	—	0.13	0.15	—
仔稚鱼 <i>Fish larva</i>	—	0.02	0.03	—
鱼卵 <i>Fish eggs</i>	—	0.06	0.06	0.07

— 表示该种类未出现

— denoted unobserved species or taxon

鉴定各类浮游动物 23 种、浮游幼虫 6 类，合计种类数为 29。夏季渤海中部水域调查共鉴定各类浮游动物 27 种、浮游幼虫 18 类，合计种类数为 45。秋季渤海中部水域调查共鉴定各类浮游动物 28 种、浮游幼虫 14 类，合计种类数为 42。冬季渤海中部水域调查共鉴定各类浮游动物 21 种、浮游幼虫 12 类，合计种类数为 33。

渤海中部水域浮游动物的生态特征可划分为 4 个类群：(1)近岸低盐类群：该类群适应的盐度较低，代表种类有真刺唇角水蚤(*L. euchaeta*)、双刺唇角水蚤(*L. bipinnata*)、太平洋纺锤水蚤(*A. pacifica*)、八斑芮氏

水母(*R. octopunctata*)等。(2)低温高盐类群：该类群代表种类有细足法虫戎(*T. gracilipes*)、太平洋磷虾(*E. pacifica*)等。(3)广温广盐类群：该类群适温性强，主要有中华哲水蚤(*C. sinicus*)、小拟哲水蚤(*P. parvus*)、腹针胸刺水蚤(*C. abdominalis*)、背针胸刺水蚤(*C. dorsispinatus*)、拟长腹剑水蚤(*O. similis*)、近缘大眼剑水蚤(*C. affinis*)、强壮箭虫(*S. crassa*)、球形侧腕水母(*P. globosa*)、五角水母(*M. atlantica*)等。(4)高温高盐类群：该类群代表种类为小齿海樽(*D. denticulatum*)。

春季渤海中部海域浮游动物共有 7 个优势种类，

分别为中华哲水蚤($Y=0.17$)、小拟哲水蚤($Y=0.05$)、腹针胸刺水蚤($Y=0.02$)、双毛纺锤水蚤($Y=0.04$)、太平洋纺锤水蚤($Y=0.15$)、八斑芮氏水母($Y=0.02$)和强壮箭虫($Y=0.07$)。夏季渤海中部海域浮游动物共有 3 个优势种类, 分别为中华哲水蚤($Y=0.38$)、强壮箭虫($Y=0.37$)和海胆长腕幼虫($Y=0.04$)。秋季渤海中部海域浮游动物共有 3 个优势种类, 分别为中华哲水蚤($Y=0.41$)、强壮箭虫($Y=0.40$)和双壳类幼体($Y=0.06$)。冬季渤海中部海域浮游动物共有 3 个优势种类, 分别为中华哲水蚤($Y=0.50$)、强壮箭虫($Y=0.39$)和双壳类幼体($Y=0.02$)。2013 年渤海中部海域全年均出现的浮游动物优势种类共 2 个, 分别为中华哲水蚤和强壮箭虫。

2.2 浮游动物丰度及生物量水平分布特征

浮游动物总丰度的平面分布见图 2。从图 2-a 可以看出, 春季渤海中部海域浮游动物总丰度很高, 平均值为 782.0 ind/m^3 。总丰度最高值出现在调查水域南部 537 号站(8509.6 ind/m^3), 总丰度最小值出现在调查水域西南部 527 号站(15.4 ind/m^3)。夏季渤海中部海域浮游动物总丰度较高, 其平均值为 199.6 ind/m^3 。总丰度最高值出现在调查水域西南部 525 号站(907.6 ind/m^3), 总丰度最小值出现在调查水域西南部 534 号站

(16.0 ind/m^3) (图 2-b)。秋季渤海中部海域浮游动物总丰度较低, 其平均值为 42.1 ind/m^3 。总丰度最高值出现在调查水域西南部 534 号站(254.8 ind/m^3), 总丰度最小值出现在调查水域西北部 501 号站(3.3 ind/m^3) (图 2-c)。冬季渤海中部海域浮游动物总丰度较低, 其平均值为 72.1 ind/m^3 。总丰度最高值出现在调查水域东南部 539 号站(300.3 ind/m^3), 总丰度最小值出现在调查水域中部 520 号站(13.0 ind/m^3) (图 2-d)。

浮游动物生物量的平面分布见图 3。春季渤海中部海域浮游动物湿重生物量的分布格局与丰度存在一定的差异。平均湿重生物量为 157.1 mg/m^3 。生物量的最高值出现在调查水域南部 537 号站(917.9 mg/m^3), 最小值出现在调查水域中部 512 号站(3.8 mg/m^3) (图 3-a)。夏季渤海中部海域浮游动物的平均湿重生物量为 135.8 mg/m^3 。生物量的最高值出现在调查水域西部 517 号站(507.2 mg/m^3), 最小值出现在调查水域东南部 541 号站(40.2 mg/m^3) (图 3-b)。秋季渤海中部海域浮游动物的平均湿重生物量为 122.5 mg/m^3 。生物量的最高值出现在调查水域中部 511 号站(499.6 mg/m^3), 最小值出现在调查水域东南部 532 号站(31.0 mg/m^3) (图 3-c)。冬季渤海中部海域浮游动物的平均湿重生物量为 151.1 mg/m^3 。生物量的最高值出现在调查水域东南部

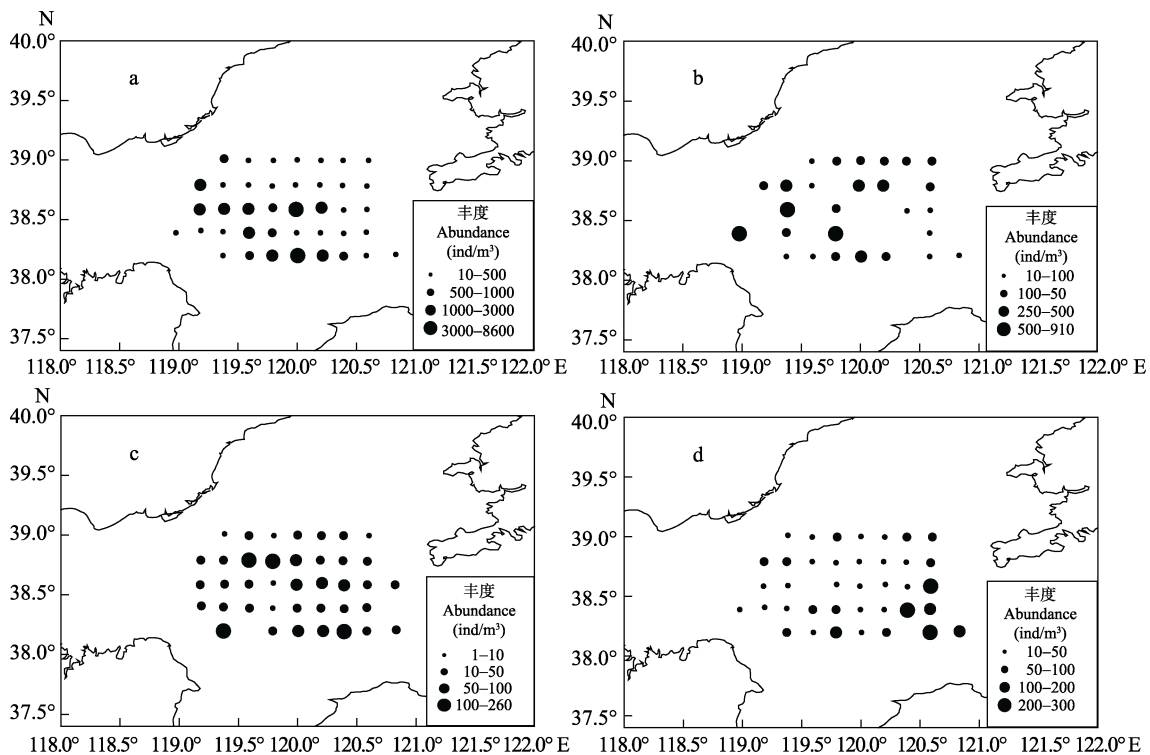


图 2 浮游动物丰度平面分布

Fig.2 Horizontal distribution of zooplankton abundance

a: 春季; b: 夏季; c: 秋季; d: 冬季

a: spring; b: summer; c: autumn; d: winter

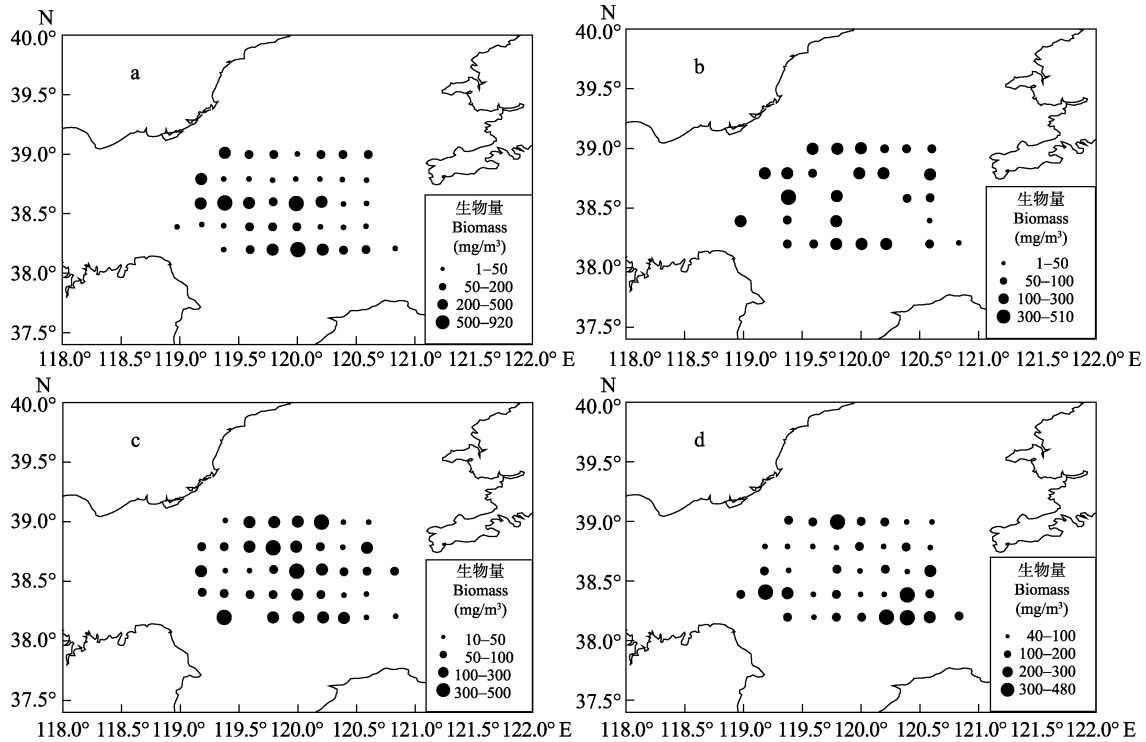


图 3 浮游动物生物量平面分布

Fig.3 Horizontal distribution of zooplankton biomass

a: 春季; b: 夏季; c: 秋季; d: 冬季

a: spring; b: summer; c: autumn; d: winter

539 号站(476.4 mg/m^3), 最小值出现在调查水域中部 520 号站(45.0 mg/m^3)(图 3-d)。

2.3 浮游动物优势种丰度分布特征

2.3.1 中华哲水蚤 中华哲水蚤的平面分布见图 4, 从图 4 可以看出, 该种在渤海中部研究水域的平面分布并不均匀。春季渤海中部水域中华哲水蚤的平均丰度为 152.3 ind/m^3 , 其对浮游动物总丰度的贡献率达到 19.5%。丰度最高值出现在调查水域南部 537 号站, 丰度值为 1923.1 ind/m^3 (图 4-a)。夏季渤海中部水域中华哲水蚤的平均丰度为 76.1 ind/m^3 , 其对浮游动物总丰度的贡献率达到 38.1%。丰度最高值出现在调查水域南部的 529 号站, 丰度值为 384.0 ind/m^3 (图 4-b)。秋季渤海中部水域中华哲水蚤的平均丰度为 17.8 ind/m^3 , 其对浮游动物总丰度的贡献率达到 42.3%。丰度最高值出现在调查水域西南部的 534 号站, 丰度值为 177.1 ind/m^3 (图 4-c)。冬季渤海中部水域中华哲水蚤的平均丰度为 36.3 ind/m^3 , 其对浮游动物总丰度的贡献率达到 50.3%。丰度最高值出现在调查水域东部的 523 号站, 丰度值为 173.8 ind/m^3 (图 4-d)。

2.3.2 强壮箭虫 强壮箭虫的平面分布见图 5。春

季渤海中部水域强壮箭虫的平均丰度为 57.3 ind/m^3 , 其对浮游动物总丰度的贡献率达到 7.3%。最大值出现在调查水域西北部的 501 号站, 丰度高达 559.6 ind/m^3 , 最小值出现在 527 号站(2.6 ind/m^3)(图 5-a)。夏季渤海中部水域强壮箭虫的平均丰度为 74.7 ind/m^3 , 其对浮游动物总丰度的贡献率达到 37.4%。最大值出现在调查水域西南部的 525 号站, 丰度高达 259.0 ind/m^3 , 最小值出现在 535 号站(7.9 ind/m^3)(图 5-b)。秋季渤海中部水域强壮箭虫的平均丰度为 16.7 ind/m^3 , 其对浮游动物总丰度的贡献率达到 39.6%。最大值出现在调查水域东南部的 539 号站, 丰度高达 55.3 ind/m^3 , 最小值出现在 501 和 528 号站(2.3 ind/m^3)(图 5-c)。冬季渤海中部水域强壮箭虫的平均丰度为 28.3 ind/m^3 , 对浮游动物总丰度的贡献率达到 39.3%。最大值出现在调查水域东南部的 539 号站, 丰度高达 125.0 ind/m^3 , 最小值出现在 520 号站(5.4 ind/m^3)(图 5-d)。

2.4 生物多样性分布特征

浮游动物香农-威纳指数的平面分布见图 6。春季渤海中部海域浮游动物 H' 平均值为 2.36, 最高值出现在调查水域西南部的 535 号站, 为 3.06; 而最低值出

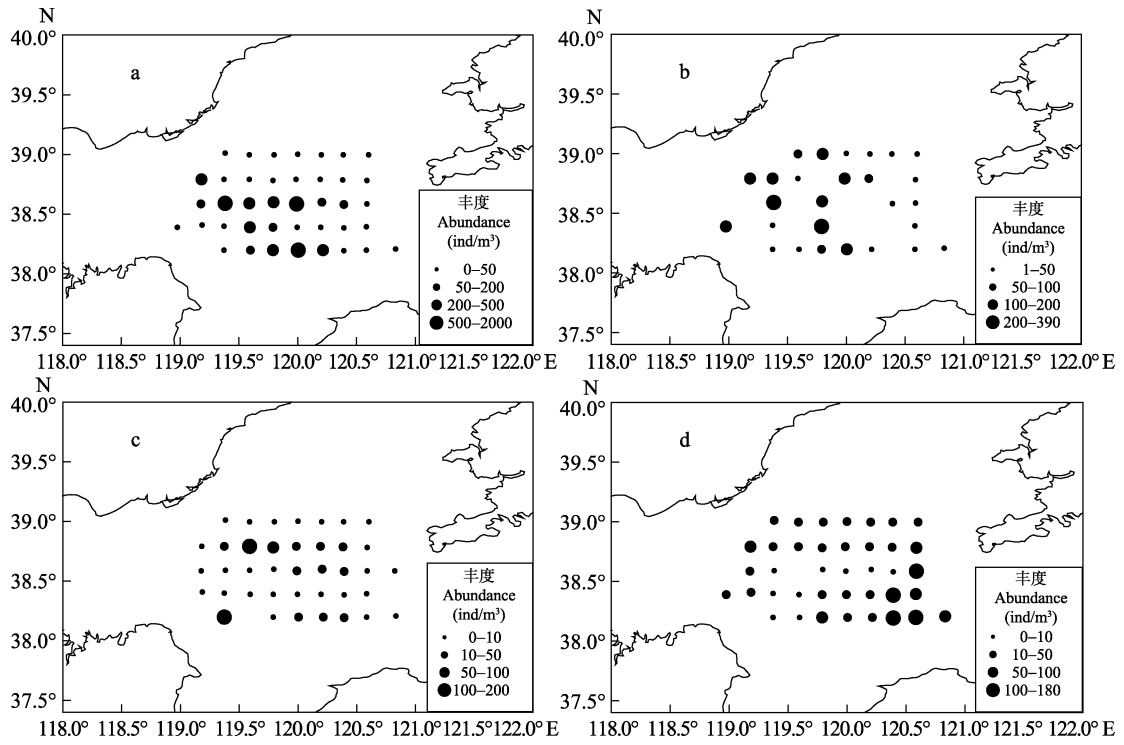


图 4 中华哲水蚤丰度平面分布

Fig.4 Horizontal distribution of *C. sinicus* abundance

a: 春季; b: 夏季; c: 秋季; d: 冬季

a: spring; b: summer; c: autumn; d: winter

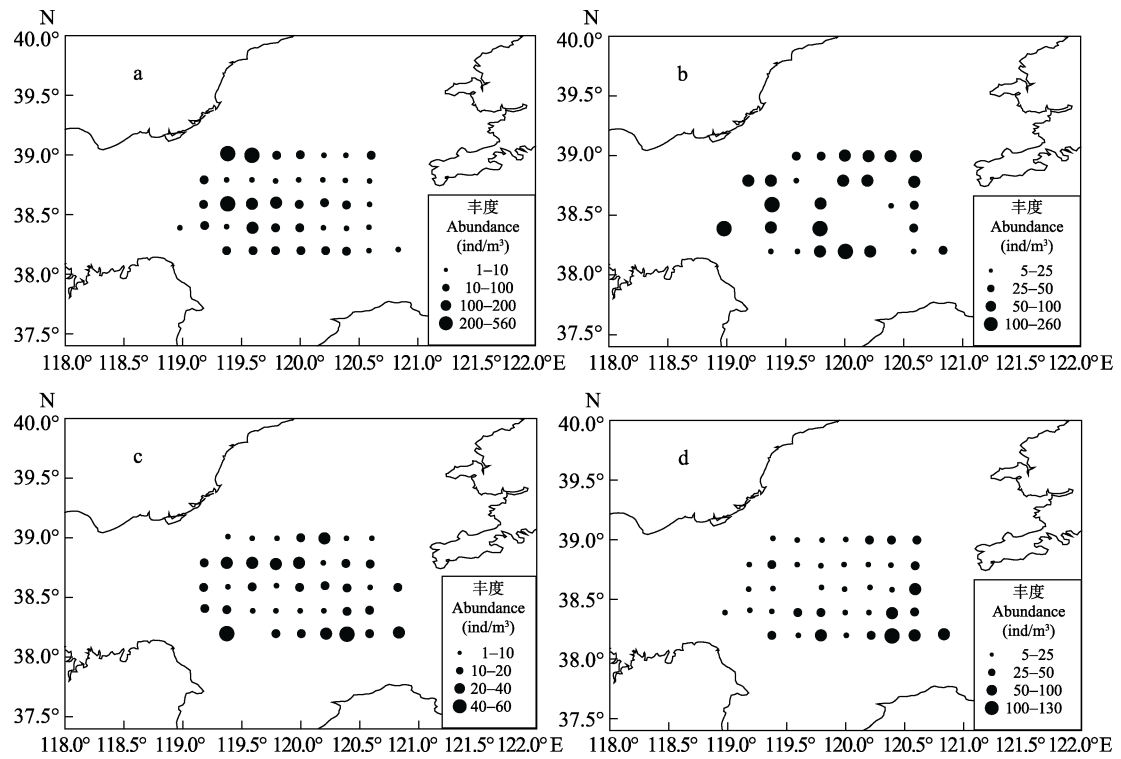


图 5 强壮箭虫丰度平面分布

Fig.5 Horizontal distribution of *S. crassa* abundance

a: 春季; b: 夏季; c: 秋季; d: 冬季

a: spring; b: summer; c: autumn; d: winter

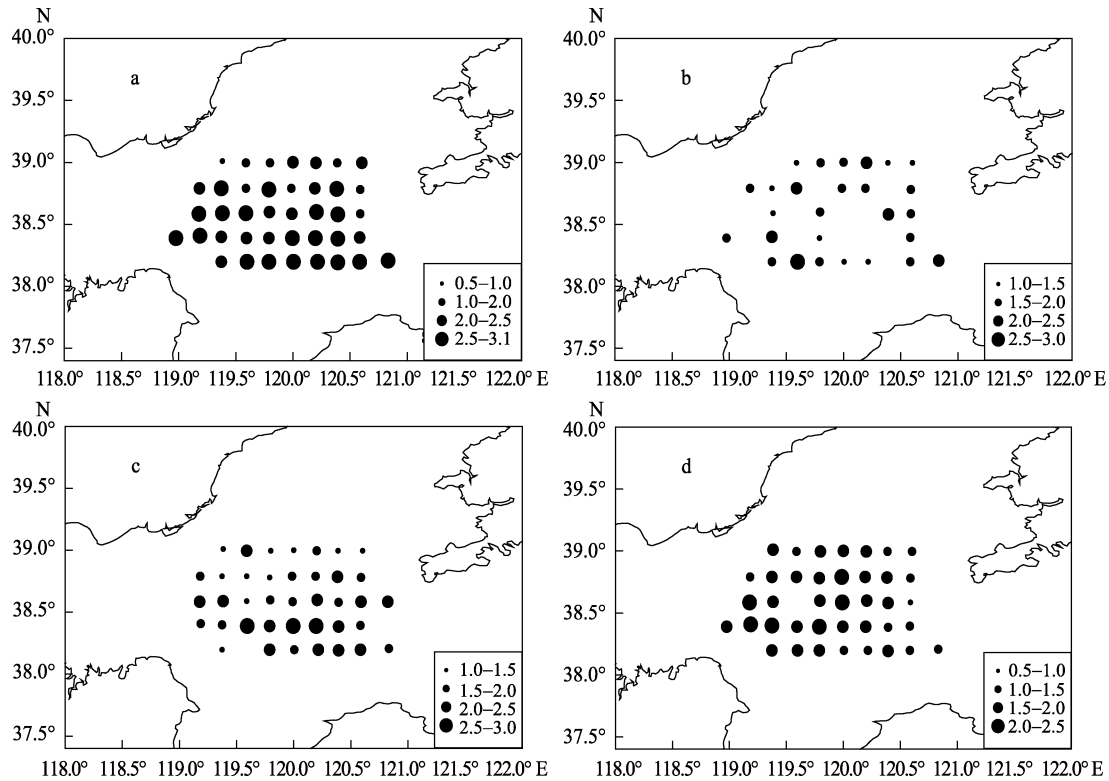


图 6 浮游动物香农-威纳指数平面分布

Fig.6 Horizontal distribution of zooplankton Shannon-Wiener index

a: 春季; b: 夏季; c: 秋季; d: 冬季

a: spring; b: summer; c: autumn; d: winter

现在研究水域西北部的 501 号站, 为 0.58 (图 6-a)。夏季渤海中部海域浮游动物 H' 平均值为 1.75, 最高值出现在调查水域西南部的 535 号站, 为 2.71; 而最低值出现在研究水域东北部的 506 号站, 为 1.15 (图 6-b)。秋季渤海中部海域浮游动物 H' 平均值为 1.83, 最高值出现在调查水域西南部的 528 号站, 为 2.96; 而最低值出现在研究水域西北部的 510 号站, 为 1.13 (图 6-c)。冬季渤海中部海域浮游动物 H' 平均值为 1.63, 最高值出现在调查水域南部的 529 号站, 为 2.34; 而最低值出现在研究水域东部的 523 号站, 为 0.92 (图 6-d)。

浮游动物物种丰富度指数的平面分布见图 7。春季浮游动物 D 平均值为 1.02, 最高值出现在调查水域东南部的 532 号站, 为 1.66; 而最低值出现在研究水域西南部的 528 号站, 为 0.59 (图 7-a)。夏季浮游动物 D 平均值为 1.78, 最高值出现在调查水域西南部的 535 号站, 为 2.77; 而最低值出现在研究水域东北部的 513 号站, 为 1.07 (图 7-b)。秋季浮游动物 D 平均值为 2.08, 最高值出现在调查水域东南部的 531 号站, 值为 3.28; 而最低值出现在研究水域西北

部的 501 号站, 为 1.18 (图 7-c)。冬季浮游动物 D 平均值为 1.53, 最高值出现在调查水域南部的 529 号站, 值为 2.96; 而最低值出现在研究水域西北部的 510 号站, 值为 0.76 (图 7-d)。

2.5 浮游动物分布与环境因子的相关性

浮游动物与环境因子间的相关性系数见表 2。单因子分析结果显示, 春季, 浮游动物丰度与水深的相关性最高 ($P < 0.05$); 夏季, 浮游动物丰度与底层盐度的相关性最高 ($P < 0.01$); 秋季, 浮游动物丰度与表层温度的相关性最高 ($P < 0.01$); 冬季, 浮游动物丰度与叶绿素的相关性最高 ($P < 0.05$)。双因子分析结果显示, 春季, 浮游动物丰度与表层盐度、水深的相关性最高 ($P < 0.05$); 夏季, 浮游动物丰度与底层温度、底层盐度的相关性最高 ($P < 0.01$); 秋季, 浮游动物丰度与表层温度、表层 pH 的相关性最高 ($P < 0.01$); 冬季, 浮游动物丰度与底层 pH、叶绿素的相关性最高 ($P < 0.01$)。三因子分析结果显示, 春季, 浮游动物丰度与表层盐度、底层溶解氧、水深的相关性最高 ($P < 0.05$); 夏季, 浮游动物丰度与底层温度、底层盐

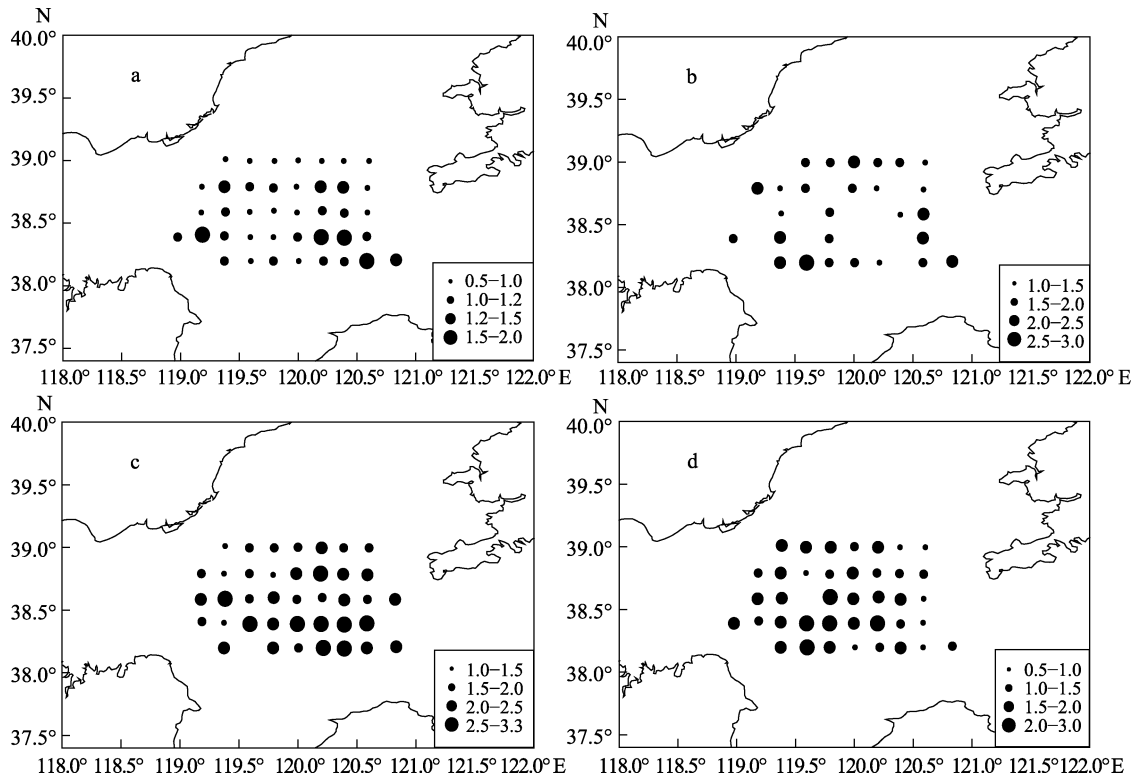


图 7 浮游动物物种丰富度指数平面分布

Fig.7 Horizontal distribution of zooplankton Margalef's index

a: 春季; b: 夏季; c: 秋季; d: 冬季

a: spring; b: summer; c: autumn; d: winter

度、叶绿素的相关性最高($P < 0.01$); 秋季, 浮游动物丰度与表层温度、表层 pH、底层 pH 的相关性最高($P < 0.01$); 冬季, 浮游动物丰度与底层盐度、底层 pH、叶绿素的相关性最高($P < 0.05$)。四因子分析结果显示, 春季, 浮游动物丰度与表层盐度、底层盐度、底层溶解氧、水深的相关性最高($P < 0.05$); 夏季, 浮游动物丰度与底层温度、底层盐度、表层 pH、叶绿素的相关性最高($P < 0.01$); 秋季, 浮游动物丰度与表层温度、底层温度、表层 pH、底层 pH 的相关性最高($P < 0.01$); 冬季, 浮游动物丰度与底层盐度、底层 pH、水深、叶绿素的相关性最高($P < 0.05$)。在所涉及的影响因子中, 春季对浮游动物分布最重要的影响因子包括表层盐度、底层溶解氧和水深; 夏季对浮游动物分布最重要的影响因子包括底层温度、底层盐度和叶绿素; 秋季对浮游动物分布最重要的影响因子包括表层温度、表层 pH 和底层 pH; 冬季对浮游动物分布影响最重要的因子包括底层 pH 和叶绿素。

3 讨论

本研究共记录浮游动物 53 种, 浮游幼虫 21 类,

合计 74 个种类。其中, 浮游甲壳动物 28 种, 为绝对优势类群; 其次为水螅水母 15 种和浮游幼虫 21 类。毕洪生等(2000)分析了 1959 年全国海洋普查渤海海域周年的中网浮游动物样品, 共记录浮游动物 87 种, 浮游幼虫 17 类, 桡足类(30 种)是浮游动物的主要组成部分, 水母类(29 种)次之。王克等(2002)对 1998 年秋季和 1999 年春季渤海中南部海域的大网浮游动物样品进行分析, 分别记录浮游动物 46 种和 23 种, 浮游幼虫 13 类和 10 类。张武昌等(2002)对 1998 年秋季和 1999 年春季渤海中南部海域的浮游动物中网样品进行研究, 分别记录了浮游动物 47 种和 27 种。杜明敏等(2013)对渤海 2006–2007 年 908 专项调查 4 个航次的浮游动物样品进行分析, 春季, 共记录浮游动物 21 种, 浮游幼虫 4 类; 夏季, 共记录浮游动物 59 种, 浮游幼虫 16 类; 秋季, 共记录浮游动物 39 种, 浮游幼虫 9 类; 冬季, 共记录浮游动物 22 种, 浮游幼虫 3 类。本研究结果与同期历史数据相比(毕洪生等, 2000; 王克等, 2002; 杜明敏等, 2013), 浮游动物成体种类数有所下降, 但种类组成仍是以桡足类和水螅水母为主, 且浮游幼虫的种类数差别不大。

王克等(2002)分析 1998 年和 1999 年渤海中南部

表 2 浮游动物与环境因子的相关性
Tab.2 Correlation between zooplankton abundance and environmental variables

因子 Variable	非生物参数 Abiotic parameters	Spearman 相似性系数 ρ_s			
		春季 Spring	夏季 Summer	秋季 Autumn	冬季 Winter
单因子 Single variable	表层温度 Temperature of surface layer	0.051	0.013	0.235**	-0.046
	底层温度 Temperature of bottom layer	0.007	0.139	0.134	-0.065
	表层盐度 Salinity of surface layer	0.060	0.056	0.007	0.028
	底层盐度 Salinity of bottom layer	0.009	0.270**	-0.016	0.048
	表层溶解氧 DO of surface layer	0.116	-0.132	0.004	-0.086
	底层溶解氧 DO of bottom layer	0.062	-0.111	0.064	-0.114
	表层 pH pH of surface layer	-0.033	0.111	0.235	-0.025
	底层 pH pH of bottom layer	0.037	-0.078	0.206	0.067
	水深 Water depth	0.128*	-0.023	-0.030	0.038
	叶绿素 Chlorophyll	0.053	0.070	0.010	0.156*
双因子 Two variables	表层温度/表层 pH Temperature/pH of surface layer			0.320**	
	表层盐度/水深 Salinity of surface layer/Water depth	0.146*			
	底层温度/底层盐度 Temperature/salinity of bottom layer		0.371**		
三因子 Three variables	底层 pH/叶绿素 pH/chlorophyll of bottom layer				0.199**
	表层温度/表层 pH/底层 pH Temperature/pH of surface layer and pH of bottom layer			0.344**	
	表层盐度/底层溶解氧/水深 Salinity of surface layer/DO of bottom layer/Water depth	0.150*			
	底层温度/底层盐度/叶绿素 Temperature and salinity of bottom layer/chlorophyll		0.421**		
	底层盐度/底层 pH/叶绿素 Salinity and pH of bottom layer/chlorophyll				0.167*
四因子 Four variables	表层温度/底层温度/表层 pH/底层 pH Temperature and pH of surface layer and bottom layer			0.319**	
	表层盐度/底层盐度/底层溶解氧/水深 Salinity of surface layer/salinity and DO of bottom layer/water depth	0.140*			
	底层温度/底层盐度/表层 pH/叶绿素 Temperature and salinity of bottom layer/pH of surface layer/chlorophyll		0.419**		
	底层盐度/底层 pH/水深/叶绿素 Salinity and pH of bottom layer/water depth/chlorophyll				0.146*

* 表示 $P < 0.05$; ** 表示 $P < 0.01$

* denoted $P < 0.05$; ** denoted $P < 0.01$

海域大网的浮游动物样品,发现桡足类和强壮箭虫是春季和秋季渤海中南部海域的优势种类。本研究结果与其相似,浮游动物优势种类主要有中华哲水蚤和强壮箭虫等。2013 年全年浮游动物总丰度与主要优势种的丰度趋势大体相同,说明浮游动物总丰度的分布主要受中华哲水蚤和强壮箭虫等优势种的影响。本研究中,秋季渤海中部海域浮游动物总丰度较低,其平均值仅为 42.1 ind/m^3 ,这主要是由于夜光虫(*Noctiluca scientillans*)广泛、大量地分布所导致。根据秋季航次的同步调查数据显示,夜光虫在调查站位出现的频率为 100%,其最大值出现在调查水域东南部的 539 号站,丰度高达 5120.0 ind/m^3 ,该物种的平均丰度达到

501.6 ind/m^3 。渤海中部海域春季和秋季的浮游动物湿重生物量分别为 157.1 、 122.5 mg/m^3 。本研究结果与同期历史数据相比(白雪娥等, 1991; 王克等, 2002),渤海中部浮游动物的丰度和生物量均有所下降。

渤海中部浮游动物 H' 在春季为 2.36、夏季为 1.75、秋季为 1.83、冬季为 1.63,多样性指数全年大部分时间均低于 2,说明渤海中部调查海域处于中度污染状态。主要是由于渤海属于封闭性内海,三面环陆,长期受陆源污染物排放的影响。同时,2011 年发生的渤海蓬莱 19-3 油田重大溢油事故,污染海域达到了 6200 km^2 ,溢油油污沉积物污染面积达到了 1600 km^2 ,该事故对渤海海区生态环境影响显著

(陈涛, 2013)。国家应继续大力推进渤海生态环境修复治理工作, 争取使渤海早日恢复为昔日的海上粮仓。

浮游动物的种类组成和分布特征与水温、盐度、水团、溶解氧、叶绿素和 pH 等生态因子密切相关(郑重等, 1984、1992; Froneman, 2004; 陈洪举, 2007¹⁾; 朱延忠, 2008²⁾; 朱延忠等, 2008; 杜明敏等, 2013)。渤海是半封闭的内海, 黄河、海河和其他河流均注入渤海, 由于地处温带, 渤海具有明显的季节变化(张武昌等, 2002; 曾呈奎等, 2003)。渤海水团常年分布于渤海中部及渤海海峡, 是黄海混合水进入渤海与沿岸低盐水混合变性而成, 该水团在渤海的范围最大, 盐度最高, 温度季节变化明显。因此, 渤海海水和淡水的混合与温度的季节变化是影响浮游动物群落的重要因子(王克等, 2002; 曾呈奎等, 2003)。杜明敏等(2013)根据中国近海 2006–2007 年 908 专项调查总计 4 个航次的浮游动物样品鉴定结果分析发现, 春季水温和盐度是解释浮游动物群落结构的最佳环境因子组合; 夏季水温、盐度和水深是解释浮游动物群落结构的最佳环境因子组合; 秋季水温、盐度、水深和 pH 等均对中国近海浮游动物群落结构造成一定程度的影响; 冬季水温和盐度是解释浮游动物群落结构的最佳环境因子组合。本研究结果与其类似, 浮游动物丰度和环境因子的相关性分析结果显示, 春季影响渤海中部海域浮游动物分布的主要环境因子组合为表盐、底溶解氧和水深; 夏季影响渤海中部海域浮游动物分布的主要环境因子组合为底温、底盐和叶绿素; 秋季影响渤海中部海域浮游动物分布的主要环境因子组合为表温、表 pH 和底 pH; 冬季影响渤海中部海域浮游动物分布的主要环境因子组合为底 pH 和叶绿素。

参 考 文 献

- 马静, 陈洪举, 刘光兴. 2007 年夏季黄河口及其邻近水域浮游动物的群落特征. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2012, 42(5): 74–80
- 王宇, 房恩军, 郭彪, 等. 渤海湾天津海域春季浮游动物群落结构及其与环境因子的关系. 海洋渔业, 2014, 36(4): 300–305
- 王克, 张武昌, 王荣, 等. 渤海中南部春秋季节浮游动物群落结构. 海洋科学集刊, 2002(44): 34–42
- 王彬, 董婧, 刘春洋, 等. 夏初辽东湾海蜇放流区大型水母和主要浮游动物. 渔业科学进展, 2010, 31(5): 82–90
- 白雪娥, 庄志猛. 渤海浮游动物生物量及其主要种类数量变动的研究. 海洋水产研究, 1991, 12: 71–92
- 毕洪生, 孙松, 高尚武, 等. 渤海浮游动物群落生态特点 I. 种类组成与群落结构. 生态学报, 2000, 20(5): 715–721
- 朱延忠, 陈洪举, 刘光兴. 福建沙埕港浮游动物群落特征及影响因子. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2008, 38(6): 943–950
- 齐衍萍, 陈洪举, 朱延忠, 等. 福建罗源湾浮游动物群落特征. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2010, 40(1): 39–46
- 杜明敏, 刘镇盛, 王春生, 等. 中国近海浮游动物群落结构及季节变化. 生态学报, 2013, 33(17): 5407–5418
- 张武昌, 王克, 高尚武, 等. 渤海春季和秋季的浮游动物. 海洋与湖沼, 2002, 33(6): 630–639
- 陈涛. 渤海溢油事件的社会影响研究. 中国海洋大学学报(社会科学版), 2013(5): 28–33
- 郑重, 李少菁, 许振祖. 海洋浮游生物学. 北京: 海洋出版社, 1984, 139–571
- 郑重, 李少菁, 连光山. 海洋桡足类生物学. 厦门: 厦门大学出版社, 1992, 126–163
- 徐兆礼, 陈亚瞿. 东黄海秋季浮游动物优势种聚集强度与鲈鳕渔场的关系. 生态学杂志, 1989, 8(4): 13–15
- 高文胜, 刘宪斌, 张秋丰, 等. 渤海湾近岸海域浮游动物多样性. 海洋科学, 2014, 38(4): 55–60
- 彭荣, 左涛, 万瑞景, 等. 春末夏初莱州湾浮游动物生物量谱及潜在鱼类生物量的估算. 渔业科学进展, 2012, 33(1): 10–16
- 曾呈奎, 徐鸿儒, 王春林. 中国海洋志. 郑州: 大象出版社, 2003, 145–146
- Froneman PW. Zooplankton community structure and biomass in a southern African temporarily open/closed estuary. Estuar Coast Shelf S, 2004, 60(1): 125–132
- Margalef R. Information theory in ecology. Int J Gen Syst, 1958 (3): 36–71
- Shannon CE, Weaver W. The mathematical theory of communication. IL: The University of Illinois Press, 1949, 1–125
- Souissi S, Ibanez F, Hamadou RB, et al. A new multivariate mapping method for studying species assemblages and their habitats: example using bottom trawl surveys in the Bay of Biscay (France). Sarsia, 2001, 86(6): 527–542

(编辑 马瑾艳)

1) 陈洪举. 长江口及其邻近海域浮游动物群落生态学研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2007, 53–68

2) 朱延忠. 夏、冬季北黄海大中型浮游动物群落生态学研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2008, 43–72

The Ecological Characteristics of Zooplankton in the Central Bohai Sea

XU Donghui, SUN Xuemei, CHEN Bijuan^①, XIA Bin, CUI Zhengguo,

ZHAO Jun, JIANG Tao, LIU Chuanxia, QU Keming

(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)

Abstract Studies on the species, abundance and distribution of zooplankton have been extensive and mainly focused on either the entire or certain small parts of the Bohai Sea. In this study, we analyzed the composition, abundance, dominant species, and biodiversity of zooplankton based on samples collected in the central Bohai Sea in 2013. The distribution and its influencing factors were explored with multivariate analysis according to the sampling date and environmental parameters. A total of 74 zooplankton species/taxa (including 21 pelagic larvae) were identified in four surveys. Copepods were the most abundant species. The numbers of pelagic copepod and medusa species accounted for 25.7% and 24.3% of the total species respectively. The composition of the dominant species was consistent with previous reports. The *Calanus sinicus* and *Sagitta crassa* were the dominant species. The abundance of *C. sinicus* and *S. crassa* explained 19.5%–50.3% and 7.3%–39.6% of the total zooplankton abundance respectively. In spring, the average abundance, the average biomass, the Shannon-Wiener index (H'), and the Margalef's index (D) were 782.0 ind/m³, 157.1 mg/m³, 2.36, and 1.02 respectively. In summer, the values of parameters above were 199.6 ind/m³, 135.8 mg/m³, 1.75, and 1.78. In autumn, they were 42.1 ind/m³, 122.5 mg/m³, 1.83, and 2.08 respectively. In winter, they were 72.1 ind/m³, 151.1 mg/m³, 1.63, and 1.53 respectively. The abundance and biomass fluctuated and showed distinct heterogeneity in the central part of the Bohai Sea. There was a seasonal variation in the primary environmental factors that affected the distribution of zooplankton. In spring, they were surface salinity, bottom DO, and water depth. In summer, they were bottom temperature, bottom salinity, and chlorophyll. In autumn, they were surface temperature, surface pH, and bottom pH. In winter, they were bottom pH and chlorophyll. Our research provided the fundamental information on the long-term observation of zooplankton ecology in the central part of the Bohai Sea. Compared to the data collected in 1959, 1998, and 2006, the number of species, abundance and biomass of zooplankton have decreased.

Key words Bohai Sea; Zooplankton; Species composition; Diversity

① Corresponding author: CHEN Bijuan, E-mail: chenbj@ysfri.ac.cn

渤海中部网采浮游植物种类组成和季节变化*

孙雪梅 徐东会 夏 斌 崔正国 曲克明 江 涛
赵 俊 陈聚法 陈碧鹃^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)

摘要 利用 2013 年 5 月、7 月、11 月和 12 月渤海中部 41 个站位的 4 次综合海上调查所获资料,分析其浮游植物群落结构的季节变化特征。共鉴定出浮游植物 3 门 42 属 87 种。其中,硅藻门 33 属 72 种,甲藻门 9 属 15 种,金藻门 1 属 1 种。渤海中部浮游植物优势种多为硅藻,部分甲藻也表现为优势类群。与历史资料比较发现,主要优势种发生了演替现象,往年优势种浮动弯角藻(*Eucampia zodiacus*)本次调查并未出现,斑点海链藻(*Thalassiosira punctigera*)首次以优势种出现,浮游甲藻的优势地位与往年相比日趋明显。浮游植物细胞丰度 5 月、7 月、11 月和 12 月平均为 200.14×10^4 、 16.32×10^4 、 7.43×10^4 、 12.77×10^4 cell/m³,与同期历史资料相比,5 月偏高,这与菱软几内亚藻(*Guinardia delicatula*)的暴发有关,其他月份相对比较稳定。其群落结构特征中的多样性指数(*H'*)和均匀度指数(*J*)均呈现 7 月>11 月>5 月>12 月的趋势。Spearman 相关性分析结果显示,与浮游植物细胞丰度相关度较高的环境因子是无机氮、磷酸盐、石油烃和 N/P。

关键词 渤海中部;浮游植物;优势种;群落结构

中图分类号 S932.7 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)04-0019-09

渤海是一个半封闭式的内海,它包括辽东湾、莱州湾、渤海中部、渤海湾、渤海海峡 5 个部分,其四周几乎被陆地包围,仅东南部的渤海海峡与黄海相通。渤海沿岸入海河流较多,黄河、小清河、辽河等向其注入了大量的淡水和泥沙以及丰富的营养,对浮游植物的生长和繁殖起到重要作用。多年的调查结果显示,渤海的浮游植物物种十分丰富。王家楫 1936 年曾多次对渤海浮游植物种类进行调查和研究(孙军等, 2005),发现其有 400 多个物种,主要是近岸硅藻。近年来,受人类活动的影响,包括城市污水排放、开采石油带来的溢油污染等,渤海的生态环境变得极其脆弱(卞少伟等, 2015)。浮游植物是海洋生态系统中的重要初级生产者,在维护整个生态系统的稳定方面发挥着不可替代的作用,当生态环境发生变化时,其

浮游植物的群落结构可能也会发生相应的改变,分析海洋浮游植物群落结构变化特征成为海洋生态环境监测的一项重要指标。

渤海浮游植物的群落结构变化研究起始于 20 世纪 30 年代,主要集中在物种分类和其生态分布习性方面(王俊等, 2003; 孙萍等, 2008; 尹翠玲等, 2013)。孙军等(2002、2005)的研究表明,渤海的浮游植物群落结构比 40 余年前发生了较大的变化,浮游植物群落由硅藻占绝对优势逐渐转变为硅藻/甲藻共存为主的群落。近年来,研究者开始陆续对其浮游植物群落结构与环境因子的相关性进行综合分析(郭术津等, 2014)。

本研究基于 2011 年发生的渤海溢油事故对渤海浮游植物群落结构的影响,对 2013 年渤海中部浮游植物群落结构的物种组成、优势种演替、细胞丰度以

*农业部溢油专项“渤海生态环境监测与评估”(农办渔[2012]117号)和“应对溢油关键技术专项研究”(2012-NZ-5739)共同资助。孙雪梅, E-mail: sunxm@ysfri.ac.cn

^① 通讯作者: 陈碧鹃, 研究员, E-mail: chenbj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-05-26, 收修改稿日期: 2015-10-14

及多样性等的季节变化特征进行大面积跟踪调查,该研究结果为更好地了解溢油对渤海浮游植物群落的变化及其对生态系统的影响提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 调查区域

2013年5月、7月、11月和12月分别对渤海中部进行4个航次的水文、化学和生物的综合嵌套式外业调查,共设41个站位,站位分布见图1。

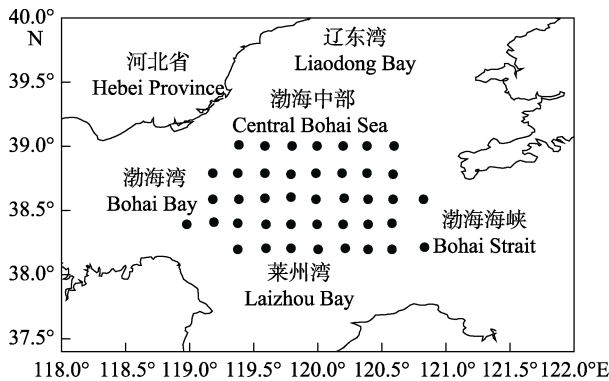


图1 调查区域及站位分布

Fig.1 Surveyed area and sampling stations

1.2 采集方法

样品的采集采用国际标准号20的筛绢缝制的浅水Ⅲ型浮游生物网(网口直径37 cm,网口面积0.1 m²,网身长270 cm,网目76 μm),在每个站位,自底至表垂直拖网取样,将样品固定在2%的甲醛溶液中。在实验室内对浮游植物样品进行浓缩。然后于实验室显微镜下进行种类鉴定和数量统计。水温、盐度、溶解氧(DO)、pH、化学需氧量(COD)等指标多参数水质监测仪进行现场测定。具体操作方法均按中华人民共和国国家标准《海洋调查规范》(GB/T12763.6-2007)和《海洋监测规范》(GB/T17378-2007)中规定的方法执行。

1.3 浮游动物分布与环境因子关系

采用多元统计软件PRIMER V7.0 (Plymouth Routines In Multivariate Ecological Research)软件中的BIOENV程序分析浮游植物细胞丰度与环境因子间的关系(Souissi *et al.*, 2001),用Spearman相关性系数(ρ_s)表示(薛雄志等, 2004)。本研究的环境因子主要有温度、盐度、溶解氧、pH、化学需氧量、磷酸盐、无机氮、氮磷比(N/P)和石油烃。

1.4 数据处理

浮游植物多样性(H')和均匀度(J)的分析方法参

照Shannon等(1963)、Pielou(1969)和孙军等(2004)的方法。

物种多样性指数的计算采用香农-威纳指数(H' , Shannon-Wiener index),其计算公式为:

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

物种均匀度指数(J)采用Pielou的计算公式为:

$$J = \frac{H'}{\log_2 S}$$

浮游植物优势度(Y)计算公式为:

$$Y = \frac{n_i}{N} f_i$$

式中, N 为采集样品中所有物种的总个体数; S 为样品中的物种总数; P_i 为第*i*种的个体数与样品中的总个数的比值; n_i 为第*i*种的总个体数; f_i 为该种在各样品中出现的频率,其中以优势度>0.02确定为优势种(徐兆礼等, 1989)。

2 结果与分析

2.1 物种组成

本次调查共鉴定出浮游植物3门42属87种(不包括未定名物种),其中,硅藻门33属72种,甲藻门9属15种,金藻门仅1属1种。硅藻在物种和数量上都占有优势,甲藻在个别站位的数量中占优势。浮游植物的生态类型以温带近岸性物种为主,少数为广温广盐性沿岸种和暖温带浮游性种等,与历史调查资料相符。

5月调查海域共检出浮游植物19属49种(表1),其中硅藻门15属42种,甲藻门4属7种。本次调查的优势种为菱软几内亚藻(*Guinardia delicatula*)(温带近岸种)和刚毛根管藻(*Rhizosolenia setigera*)(广温广盐性沿岸种),优势度见表2。7月调查海域共检出浮游植物36属70种(表1),其中,硅藻门28属56种,甲藻门8属13种,金藻门1属1种。本次调查的优势种包括(1)温带近岸性种:具槽帕拉藻(*Melosira sulcata*)、菱软几内亚藻、洛氏角毛藻(*Chaetoceros lorenzianus*)、密连角毛藻(*Chaetoceros densus*)、布氏双尾藻(*Ditylum brightwellii*);(2)暖温带浮游性种:翼根管藻印度变型(*Rhi. acuminata*);(3)广温广盐性种:斑点海链藻(*Thalassiosira punctigera*)、刚毛根管藻、三角角藻(*Ceratium tripos*)、锥形原多甲藻(*Protoperidinium conicum*)、夜光藻(*Noctiluca scientillans*),优势度见表2。11月调查海域共检出浮游植物30属63种(表1),其

表 1 调查海域浮游植物种类名录
Tab.1 List of phytoplankton in the surveyed area

种类 Species	5 月 May	7 月 July	11 月 November	12 月 December	种类 Species	5 月 May	7 月 July	11 月 November	12 月 December
具槽帕拉藻 <i>M. sulcata</i>	+	+	+	+	泰晤士旋鞘藻 <i>Helicotheca tamesis</i>		+	+	
中心圆筛藻 <i>Coscinodiscus centralis</i>	+		+	+	针杆藻 <i>Synedra</i> spp.			+	+
偏心圆筛藻 <i>Cos. excentricus</i>	+	+	+	+	佛氏海线藻 <i>Thalassionema frauenfeldii</i>			+	+
虹彩圆筛藻 <i>Cos. oculus-iridis</i>	+	+	+	+	菱形海线藻 <i>Thalassionema nitzschioides</i>			+	
栉氏圆筛藻 <i>Cos. granii</i>		+	+	+	舟形藻 <i>Navicula</i> spp.	+			
威利圆筛藻 <i>Cos. weilexii</i>	+	+	+	+	舟形藻 <i>Navicula</i> sp.		+	+	
星脐圆筛藻 <i>Cos. asteromphalus</i>	+	+	+	+	双壁藻 <i>Diploneis</i> sp.				+
琼氏圆筛藻 <i>Cos. coscinodiscus jonesianus</i>	+	+			唐氏藻 <i>Donkinia</i> sp.		+	+	
辐射圆筛藻 <i>Cos. radiatus</i>	+	+	+	+	羽纹藻 <i>Pinnularia</i> sp.			+	+
蛇目圆筛藻 <i>Cos. argus</i>	+				长菱形藻 <i>Nitzschia longissima</i>	+	+	+	+
明壁圆筛藻 <i>Cos. debilis</i>	+		+	+	弯端长菱形藻 <i>Nitzschia longissima</i>	+	+		
巨圆筛藻 <i>Cos. gigas</i>		+	+	+	洛氏菱形藻 <i>Nitzschia lorenzina</i>			+	
圆筛藻 <i>Coscinodiscus</i> sp.	+	+	+	+	菱形藻 <i>Nitzschia</i> sp.	+			
爱氏辐射环藻 <i>Actinocyclus octonarius</i>	+		+	+	尖刺拟菱形藻 <i>Pseudo-nitzschia pungens</i>		+	+	+
海链藻 <i>Thalassiosira</i> sp.		+	+	+	柔弱拟菱形藻 <i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i>	+	+	+	+
斑点海链藻 <i>T. punctigera</i>	+	+	+	+	派洛棍形藻 <i>Bacillaria paxillifera</i>		+		
圆海链藻 <i>Thalassiosira rotula</i>	+	+			冰河拟星杆藻 <i>Asterionellopsis glacialis</i>	+	+	+	+
太平洋海链藻 <i>Thalassiosira pacifica</i>	+		+	+	六辐辐射藻 <i>Actinopterychus hexagonus</i>		+		
中肋骨条藻 <i>Skeletonema costatum</i>		+	+		中华齿状藻 <i>Odontella sinensis</i>		+	+	+
丹麦细柱藻 <i>Leptocylindrus danicus</i>	+	+	+	+	高齿状藻 <i>Odontella regia</i>		+	+	+
翼根管藻印度变型 <i>Rhi. acuminata</i>	+	+	+	+	豪猪棘冠藻 <i>Corethrom hystrix</i>	+	+	+	+
刚毛根管藻 <i>Rhi. setigera</i>	+	+	+	+	掌状冠盖藻 <i>Stephanopyxis palmeriana</i>		+		
粗根管藻 <i>Rhi. robusta</i>		+			中华半管藻 <i>Hemiaulus sinensis</i>		+		
笔尖根管藻 <i>Rhizosolenia styliformis</i>	+	+	+	+	布氏双尾藻 <i>D. brightwellii</i>	+	+	+	+
卡氏根管藻 <i>Rhizosolenia castracanei</i>		+	+		太阳双尾藻 <i>Pleurosigma sol</i>	+	+	+	+
根管藻 <i>Rhizosolenia</i> sp.		+			尖端曲舟藻 <i>Pleurosigma acutum</i>	+	+	+	+
薄壁几内亚藻 <i>Guinardia flaccida</i>	+	+		+	海洋曲舟藻 <i>Pleurosigma pelagicum</i>	+	+	+	+
柔软几内亚藻 <i>G. delicatula</i>	+	+	+	+	窄细曲舟藻 <i>Pleurosigma affine</i>	+	+	+	+
斯氏几内亚藻 <i>Guinardia striata</i>	+	+		+	波状石丝藻 <i>Lithodesmium undulatum</i>		+		
透明辐杆藻 <i>Bacteriastrum hyalinum</i>		+	+		膜状缪氏藻 <i>Meuniera membranacea</i>		+	+	+

续表 1 Continued Tab. 1

种类		5 月	7 月	11 月	12 月	种类		5 月	7 月	11 月	12 月
Species		May	July	November	December	Species		May	July	November	December
密连角毛藻	<i>Ch. densus</i>	+	+	+	+	短楔形藻	<i>Licmophora abbreviata</i>			+	
圆柱角毛藻	<i>Ch. teres</i>	+	+	+	+	三角角藻	<i>C. tripos</i>	+	+	+	+
窄隙角毛藻	<i>Ch. affinis</i> var. <i>affinis</i>		+	+	+	粗刺角藻	<i>Ceratium horridum</i>		+	+	
洛氏角毛藻	<i>Ch. lorenzianus</i>	+	+	+	+	大角角藻	<i>Ceratium macroceros</i>	+	+	+	+
并基角毛藻	<i>Ch. decipiens</i>		+	+	+	梭角角藻	<i>Ceratium fusus</i> var. <i>schuitii</i>	+	+	+	+
并基角毛藻单胞变型	<i>Ch. decipiens</i>	+	+	+	+	叉状角藻	<i>Ceratium furca</i>			+	+
拟旋链角毛藻	<i>Ch. pseudocurvisetus</i>		+			夜光藻	<i>N. scientillans</i>	+	+	+	+
旋链角毛藻	<i>Ch. curvisetus</i>	+	+	+	+	海洋原多甲藻	<i>Protoperidinium micans</i>	+	+	+	+
柔弱角毛藻	<i>Ch. debilis</i>	+	+	+		扁平原多甲藻	<i>Protoperidinium depressum</i>	+	+	+	+
窄面角毛藻	<i>Ch. paradoxus</i>		+	+		光原多甲藻	<i>Protoperidinium pellucidum</i>	+	+	+	+
扭角毛藻	<i>Ch. hirundinellus</i>	+				五角原多甲藻	<i>Protoperidinium pentagonum</i>	+	+	+	+
丹麦角毛藻	<i>Ch. danicus</i>	+	+	+	+	锥形原多甲藻	<i>Protoperidinium conicum</i>		+	+	
卡氏角毛藻	<i>Ch. castracanei</i>	+	+	+	+	原多甲藻	<i>Protoperidinium</i> sp.	+	+	+	+
奇异角毛藻	<i>Ch. Paradoxus</i>	+	+	+		斯氏扁甲藻	<i>Pyrophacus steinii</i>		+		
短孢角毛藻	<i>Ch. brevis</i>	+	+	+		裸甲藻	<i>Gymnodinium</i> sp.		+	+	
暹罗角毛藻	<i>Ch. Siamense</i>		+			膝沟藻	<i>Gonyaulax</i> sp.		+		
冕孢角毛藻	<i>Ch. diadema</i>			+	+	具尾鳍藻	<i>Dinophysis caudata</i>				+
角毛藻	<i>Ch</i> sp.	+	+	+	+	链状亚历山大藻	<i>Alexandrium catenella</i>			+	
蜂窝三角藻	<i>Triceratium favus</i>		+	+	+	小等刺硅鞭藻	<i>Dictyocha fibula</i>			+	+
短角弯角藻	<i>E. zodiacus</i>		+	+	+						

表 2 调查海区浮游植物优势种
Tab.2 Dominant phytoplankton species in the surveyed sea

5月 May		7月 July		11月 November		12月 December	
优势种 Dominant species	优势度 Dominant degree	优势种 Dominant species	优势度 Dominant degree	优势种 Dominant species	优势度 Dominant degree	优势种 Dominant species	优势度 Dominant degree
菱软几内亚藻 <i>G. delicatula</i>	0.87	具槽帕拉藻 <i>M. sulcata</i>	0.04	虹彩圆筛藻 <i>Cos. Oculus iridis</i>	0.03	斑点海链藻 <i>T. punctigera</i>	0.69
刚毛根管藻 <i>Rhi. setigera</i>	0.05	斑点海链藻 <i>T. punctigera</i>	0.12	斑点海链藻 <i>T. punctigera</i>	0.66	梭角角藻 <i>C. fusus var.schuttii</i>	0.04
		菱软几内亚藻 <i>G. delicatula</i>	0.23	三角角藻 <i>C. tripos</i>	0.04	大角角藻 <i>C. macroceros</i>	0.04
		洛氏角毛藻 <i>Ch.lorenzianus</i>	0.03	梭角角藻 <i>C. fusus var.schuttii</i>	0.04	夜光藻 <i>N.scientillans</i>	0.09
		密连角毛藻 <i>Ch. densus</i>	0.03				
		翼根管藻印度变型 <i>Rhi. acuminata</i>	0.08				
		刚毛根管藻 <i>Rhi..setigera</i>	0.03				
		布氏双尾藻 <i>D. brightwellii</i>	0.03				
		三角角藻 <i>C. tripos</i>	0.04				
		锥形原多甲藻 <i>P. conicum</i>	0.05				
		夜光藻 <i>N. scientillans</i>	0.03				

中硅藻门 26 属 52 种, 甲藻门 4 属 11 种。本次调查的优势种为(1)广温外洋性种: 虹彩圆筛藻; (2)广温广盐性种: 斑点海链藻、三角角藻、梭角角藻(*C.fusus var.schuttii*), 优势度见表 2。12 月调查海域共检出浮游植物 22 属 50 种(表 1), 其中硅藻门 19 属 41 种, 甲藻门 3 属 9 种。本次调查的优势种为(1)沿岸广布性种: 爱氏辐环藻(*Actinocyclus octonarius*); (2)近岸浮游性种: 扁平原多甲藻(*P. depressum*); (3)广温广盐性种: 三角角藻、梭角角藻, 优势度见表 2。

从表 1、表 2 可以看出, 4 次大面调查过程中浮游植物群落结构有所变化, 但变化不大。优势种多为硅藻, 部分优势种与往年调查结果有所不同。其中, 菱软几内亚藻、布氏双尾藻、三角角藻和梭角角藻在近 20 年的调查中优势度一直很高。斑点海链藻作为一种广温外源性物种, 首次在渤海调查结果中以优势种出现, 其在 7 月、11 月和 12 月中均以优势种大量出现, 在各监测站位中, 占总细胞丰度的均值分别为 11.60%、33.62%、65%。1984—1985 年, 林更铭等(2007)在福建海岸带和台湾海峡调查中, 发现斑点海链藻。

1995 年中国厦门海关在船舶的压舱水中也检测到。研究者认为它是由通过压舱水或者自然扩散引入, 其在适宜条件下可以暴发性的繁殖。另外, 菱软几内亚藻, 作为一种外源性赤潮种, 在 5 月和 7 月均大量出现, 在各站位出现频率高达 87.81%和 65.85%, 占细胞丰度的 0—99.22%和 0—80.21%, 其均值分别为 33.62%和 11.86%。本次调查中的优势种同往年浮游植物优势种资料(康元德等, 1991; 孙军等, 2002; 孙萍等, 2008)相比, 渤海秋季浮游植物的优势种变化趋势主要表现在角毛藻属的衰退和浮游甲藻角藻属、圆筛藻属、根管藻属和斑点海链藻的兴起。其中, 硅藻门的圆筛藻属和角毛藻属中的优势种以及甲藻门角藻属中的优势种均为体积大、生物量高的物种, 对整个浮游植物的碳库影响较大。

2.2 细胞丰度的平面分布

5 月调查海域浮游植物的平面分布不均, 浮游植物的数量范围为(2.09—530.10)×10⁴ cell/m³, 平均值为 200.14×10⁴ cell/m³。浮游植物平面分布的格局是数量

密集区出现在 513 号和 514 号站, 占整个调查区域总细胞丰度的 43.02%和 29.02%; 505 号站数量最低, 占总细胞丰度的 0.02%(图 2)。在各监测站点上, 硅藻占细胞丰度的 41.80%–100.00%, 平均为 86.62%; 甲藻占细胞丰度的 0–58.25%, 平均为 13.38%。5 月的浮游植物细胞丰度均值为本年度调查的最高值, 而 1992 年的调查结果显示(王俊等, 1998), 5 月的渤海中部浮游植物细胞丰度基本为全年最低, 约为几十万个/m³, 分析认为这可能与 5 月的赤潮种菱软几内亚藻暴发有关, 其占每个站点细胞数量的 0–99.22%。其中, 有 11 个站点达到 50%以上, 因而增加了这个月的浮游植物细胞丰度值。

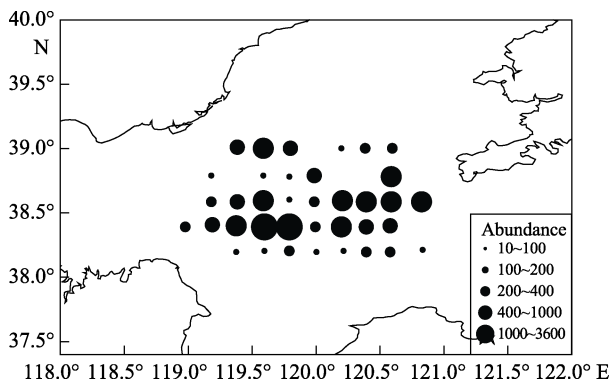


图 2 5 月调查海区表层浮游植物细胞丰度平面分布
Fig.2 Horizontal distribution of phytoplankton cell abundances ($\times 10^4 \text{ cell/m}^3$) in the surface water in May

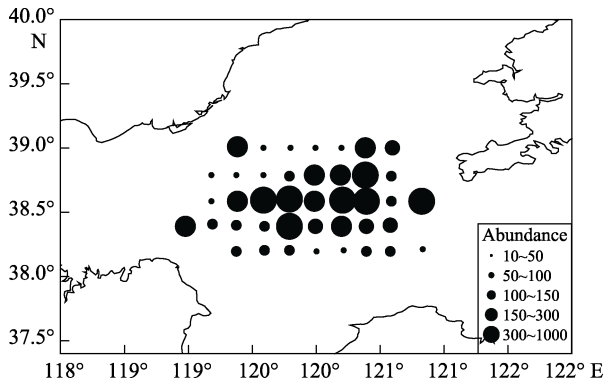


图 3 7 月调查海区表层浮游植物细胞丰度平面分布
Fig.3 Horizontal distribution of phytoplankton cell abundances ($\times 10^4 \text{ cell/m}^3$) in the surface water in July

7 月调查海域浮游植物的数量范围为(1.6–90.46) $\times 10^4 \text{ cell/m}^3$, 平均值为 $16.32 \times 10^4 \text{ cell/m}^3$ 。浮游植物平面分布的格局是数量密集区出现在 518 号和 519 号站点, 占整个调查区域总细胞丰度的 9.23%和 13.52%; 504 号站数量最低, 占总细胞丰度的 0.24%。在各监测站点上, 硅藻占细胞丰度的 37.87%–95.32%, 平均为 77.65%; 甲藻占细胞丰度的 4.66%–63.46%, 平均

为 22.28%。7 月的细胞丰度与王俊等(1998)1992 年的调查结果很相近, 渤海浮游植物数量从 7 月开始逐渐增多, 到 8 月达到 $66 \times 10^4 \text{ cell/m}^3$ 。1998 年 9 月调查结果显示(孙军等, 2004), 渤海中部浮游植物细胞丰度均值为 $168.86 \times 10^4 \text{ cell/m}^3$ 。可见, 在没有发生赤潮等异常生态变化时, 渤海中部浮游植物的细胞丰度变化相对比较稳定, 这可能与渤海中部水体相对比较稳定, 受沿岸人类活动影响较小有关。

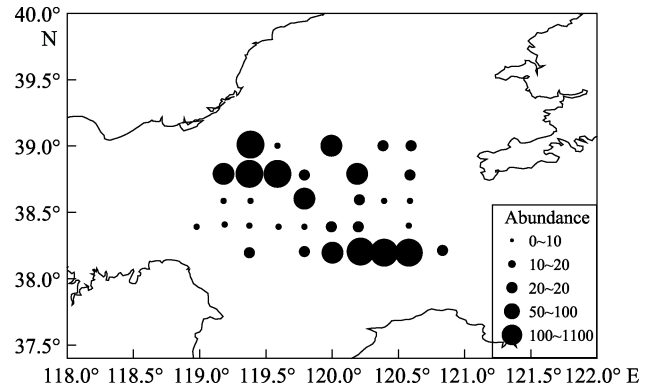


图 4 11 月调查海区表层浮游植物细胞丰度平面分布
Fig.4 Horizontal distribution of phytoplankton cell abundances ($\times 10^4 \text{ cell/m}^3$) in the surface water in November

11 月调查海域浮游植物的数量范围为(0.11–102) $\times 10^4 \text{ cell/m}^3$, 平均值为 $7.43 \times 10^4 \text{ cell/m}^3$ 。数量密集区出现在 539 号和 540 号站点, 占整个调查区域总细胞丰度的 33.39%和 11.12%。522 号站数量最低, 占总细胞丰度的 0.04%(图 4)。在各监测站点上, 硅藻占细胞丰度的 23.26%–100.00%, 平均为 64.29%; 甲藻占细胞丰度的 1.24%–81.40%, 平均为 35.71%。该月甲藻在浮游植物中的比率较其他有所升高。2011 年 11 月渤海的浮游植物细胞丰度调查结果显示均值为 $4.36 \times 10^3 \text{ cell/m}^3$ (郭术津等, 2014), 可见, 2013 年比 2011 年的细胞丰度有了显著增加。

12 月调查海域浮游植物的数量范围为(0.36–55.53) $\times 10^4 \text{ cell/m}^3$, 平均值为 $12.77 \times 10^4 \text{ cell/m}^3$ 。数量密集区出现在 535 号、536 号、537 号和 538 号站点, 占整个调查区域总细胞丰度的 10.60%、5.28%、6.11%和 6.89%。503 号站数量最低, 占总细胞丰度的 0.07%。在各监测站点上, 硅藻占细胞丰度的 40.78%–98.38%, 平均为 83.41%; 甲藻占细胞丰度的 2.76%–59.75%, 平均为 16.59%。

浮游植物群落结构中甲藻和硅藻所占的比率是一个重要的结构指数, 甲藻中的赤潮种较多, 高的甲藻比率预示着甲藻可以大量生长而导致赤潮的暴发(孙军等, 2004)。本研究调查结果显示, 5 月甲藻/硅

藻比率为 0-1.39, 平均值为 0.21; 7 月甲藻/硅藻比率为 0.05-1.68, 平均值为 0.34; 11 月甲藻/硅藻比率为 0.01-3.50, 平均值为 0.72; 12 月甲藻/硅藻比率为 0.03-1.47, 平均值为 0.23。11 月甲藻/硅藻比率较高, 虽然没有出现甲藻赤潮, 可能是整个浮游植物群落的细胞丰度还未达到赤潮暴发的浓度, 但这种群落结构预示一旦条件成熟, 此区域就有可能发生赤潮。

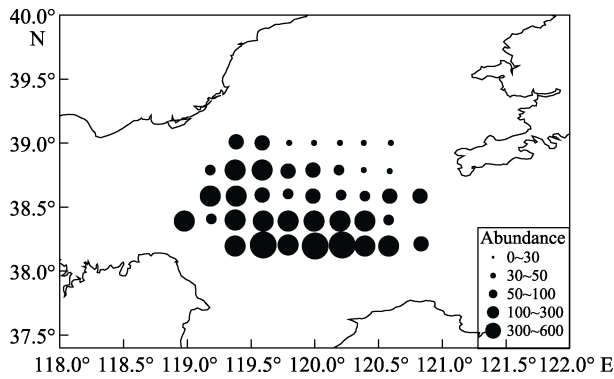


图 5 12 月调查海区表层浮游植物细胞丰度平面分布
Fig.5 Horizontal distribution of phytoplankton cell abundances ($\times 10^4$ cell/ m^3) in the surface water in December

2.3 群落多样性特征

浮游植物的多样性和均匀度能够反映浮游植物群落结构的特征, 为研究海域内浮游植物与生态环境的关系提供依据。多样性指数通常用于反映群落结构的复杂程度。越复杂的群落, 对环境的反馈功能越强, 从而使群落结构得到较大的缓冲, 趋于稳定(徐宗军等, 2011)。均匀度指数(Pielou index) 代表群落内物种分布的均匀程度, 是群落是否成熟和稳定的特征之一。

5 月调查海域浮游植物多样性指数的变化范围为 0.17-2.45, 平均值为 1.49; 均匀度为 0.02-0.90, 平均值为 0.59。7 月调查海区浮游植物多样性指数的变化范围为 0.94-3.01, 平均值为 2.45; 均匀度为 0.31-0.92, 平均值为 0.79。11 月调查海域浮游植物多样性指数的变化范围为 0.27-2.81, 平均值为 1.77; 均匀度为 0.09-0.86, 平均值为 0.63。12 月调查海域浮游植物多样性指数的变化范围为 0.64-2.13, 平均值为 1.34; 均匀度为 0.25-0.77, 平均值为 0.49。从分析结果可以看出, 7 月的浮游植物多样性最高, 其次是 11 月、5 月和 12 月。2000 年秋季渤海浮游植物多样性结果为 0.47-4.04(孙军等, 2005), 2005 年夏末渤海湾浮游植物的多样性结果为 1.59-2.98, 均值为 2.32(孙萍等, 2008), 本次调查的多样性结果较 2000 年偏低, 比 2005 年调查结果稍高, 说明渤海浮游植物群落结构在本年度调查中存在一定的波动, 但整体变化不大。均匀度指数和多样性指数具有非常相似的整体分布特征, 也是呈现 7 月 > 11 月 > 5 月 > 12 月的趋势, 这一趋势与 2005 年的调查结果相吻合。

2.4 浮游植物丰度与环境因子关系

将 5 月、7 月、11 月和 12 月每个站位的 9 个环境因子[温度、盐度、DO、pH、COD、磷酸盐(Dissolved inorganic phosphorus, DIP)、无机氮(Dissolved inorganic nitrogen, DIN)、氮磷比 N/P 和石油烃含量(Petroleum Hydrocarbons, PHCS)]与细胞丰度进行 Spearman 相关性分析。结果显示, 单因子环境参数中, 5 月、7 月、11 月、12 月与细胞丰度相关度最高的均为无机氮, Spearman 相似性系数(ρ_s)见表 3。双因子参数中 4 个月相关度最高的分别是无机氮/石油烃组、无机氮/石油

表 3 浮游植物细胞丰度与环境因子的 Spearman 相关性分析
Tab.3 Spearman analysis of correlation between phytoplankton abundance and environmental factors

月份 Month	因子 Factor	相关性最高因子 Most relevant factor	Spearman 相似性系数 ρ_s
5 月 May	单因子组 Single factor group	无机氮 DIN	0.536
7 月 July		无机氮 DIN	0.606
11 月 November		无机氮 DIN	0.598
12 月 December		无机氮 DIN	0.760
5 月 May	双因子组 Two-factor group	无机氮/石油烃 DIN/PHCS	0.552
7 月 July		无机氮/石油烃 DIN/PHCS	0.819
11 月 November		磷酸盐/无机氮 DIP/DIN	0.639
12 月 December		磷酸盐/无机氮 DIP/DIN	0.800
5 月 May	三因子组 Three-Factor group	磷酸盐/无机氮/石油烃 DIP/DIN/PHCS	0.569
7 月 July		无机氮/氮磷比/石油烃 DIN/N/P/PHCS	0.837
11 月 November		磷酸盐/无机氮/氮磷比 DIP/DIN/N/P	0.642
12 月 December		磷酸盐/无机氮/氮磷比 DIP/DIN/N/P	0.802

烃组、磷酸盐/无机氮组以及磷酸盐/无机氮组,三因子参数中4个月相关度最高的分别是磷酸盐/无机氮/石油烃组、无机氮/(N/P)石油烃组、磷酸盐/无机氮/(N/P)组和磷酸盐/无机氮/(N/P)组。可见,与本次调查的4个月的细胞丰度相关度最高的是无机氮含量,在双环境因子和三环境因子组合中均出现了石油烃、磷酸盐和N/P。张翠霞等(2014)曾在文中指出,营养盐是影响浮游植物优势物种丰度的主要因素,本次相关性分析结果也显示,影响浮游植物群落结构的主要环境因子是无机氮。另外,在双因子组合中出现石油烃含量,说明石油烃含量与细胞丰度的相关性也很高,其对群落结构的形成能够发挥一定的作用。

3 结论

(1) 2013年渤海的浮游植物以硅藻为主,其生态类型多为温带近岸种和广布种,少数为暖海性物种和大洋性物种。从浮游植物的细胞丰度和多样性分析结果可以看出,该年度调查的浮游植物群落结构比较稳定,说明2011年的渤海溢油污染并没有对其造成影响。

(2) 渤海中部5月浮游植物细胞丰度最高,与历史资料相比也有所偏高,这与菱软几内亚藻急剧增多有关,其他月份浮游植物的细胞丰度值整体比较稳定。

(3) 与历史同期相比,浮游植物优势种的组成发生了变化。往年优势种浮动弯角藻本次调查并未出现,三角角藻和菱软几内亚藻再次成为优势种;近些年来浮游甲藻类的优势地位越来越明显,本次调查中,甲藻中的三角角藻、梭角角藻、大角角藻、锥形原多甲藻和夜光藻成为渤海中部的优势种,这些种类均为赤潮种,一旦条件合适随时可能暴发甲藻赤潮。

(4) Spearman相关性分析结果显示,与浮游植物细胞丰度相关度较高的环境因子是无机氮、磷酸盐,石油烃和N/P。

参 考 文 献

- 王俊,康元德. 渤海浮游植物种群动态的研究. 海洋水产研究, 1998, 19(1): 43-52
- 卞少伟,孙韧,梅鹏蔚,等. 2013年春夏季天津近岸海域浮游植物的群落结构. 水生态学杂志, 2015, 36(1): 47-52
- 尹翠玲,张秋丰,石海明,等. 2011年渤海湾近岸海域网采浮游植物群落. 海洋湖沼通报, 2013(3): 152-160
- 孙军,刘东艳,杨世民,等. 渤海中部和渤海海峡及邻近海域浮游植物群落结构的初步研究. 海洋与湖沼, 2002, 33(5): 461-471
- 孙军,刘东艳. 2000年秋季渤海的网采浮游植物群落. 海洋学报, 2005, 27(3): 124-132
- 孙军,刘东艳. 多样性指数在海洋浮游植物研究中的应用. 海洋学报, 2004, 26(1): 62-75
- 孙萍,李瑞香,李艳,等. 2005年夏末渤海网采浮游植物群落结构. 海洋科学进展, 2008, 26(3): 354-363
- 张翠霞,陈婷,黄晓,等. 2011年夏季北黄海浮游植物群落. 海洋湖沼通报, 2014(1): 81-93
- 林更铭,杨清良. 台湾海峡小型浮游植物的物种多样性和分布特征. 生物多样性, 2007, 15(1): 31-45
- 徐兆礼,陈亚瞿. 东黄海秋季浮游动物优势种聚集强度与鲈砵渔场的关系. 生态学杂志, 1989, 8(4): 13-15
- 徐宗军,孙萍,朱明远,等. 南海北部春季网采浮游植物群落结构初步研究. 海洋湖沼通报, 2011(2): 100-106
- 郭木津,李彦翘,张翠霞,等. 渤海浮游植物群落结构及与环境因子的相关性分析. 海洋通报, 2014, 33(1): 95-105
- 康元德. 渤海浮游植物的数量分布和季节变化. 海洋水产研究, 1991(12): 31-44
- 薛雄志,杨喜爱. 近岸海域污染的生态效应评价. 海洋科学, 2004, 28(10): 75-81
- Margalef, DR. Perspectives in ecological theory. Chicago: University of Chicago Press, 1968, 1-111
- Pielou, EC. An introduction to mathematical ecology. New York: Wiley-Inter-Science, 1969
- Shannon CE, Weaver W. The mathematical theory of communication Urbana. IL: University of Illinois Press, 1949, 144
- Wang CC. Dinoflagellata of the gulf of Pê-Hai. Sinensia, 1936, 7(2): 128-171

(编辑 江润林)

Species Composition and Seasonal Variation of Netz-Phytoplankton in the Central Bohai Sea

SUN Xuemei, XU Donghui, XIA Bin, CUI Zhengguo, QU Keming, JIANG Tao,
ZHAO Jun, CHEN Jufa, CHEN Bijuan^①

(Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture,
Shandong Provincial Key Laboratory for Fishery Resources and Eco-environment,
Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

Abstract The community structure of phytoplankton could be affected by environmental factors, such as water temperature, salinity, total nitrogen, and total phosphorus. Changes in environmental factors may be associated with alteration in the community structure of phytoplankton. To investigate the consequences of oil spill in the Bohai Sea in 2011, here we analyzed features of phytoplankton community structure using data obtained in the comprehensive investigation at 41 stations within the central Bohai Sea in May, July, November and December 2013. The sampling and measuring methods followed the Specifications for Oceanographic Surveys and Specifications for Marine Monitoring. A total of 87 phytoplankton species were found, including 72 species of diatom in 33 genera and 15 species of pyrrhophyta in 9 genera. There was another species of chrysophyta in 1 genus. Diatoms were the dominant phytoplankton species, while some dinoflagellates species also accounted for a large portion in the community. Compared to the historical data in the same season, there was an obvious shift in the community structure. *Eucampia zodiacus*, a previous dominant species, were not found in this survey; however, *Thalassiosira punctigera* appeared for the first time as a dominant species. The dominance of planktonic dinoflagellate became increasingly evident. The average cell abundance was 200.14×10^4 cell/m³, 16.32×10^4 cell/m³, 7.43×10^4 cell/m³ and 12.77×10^4 cell/m³ in May, July, November and December respectively. The cell abundance in May was higher compared to the historical data probably due to the outbreak of *Guinardia delicatula*, and in other month it was relatively stable. The diversity index and evenness index of the community structure followed the order July > November > May > December. The Spearman analysis revealed that changes in the nutrient structure of the central Bohai Sea was responsible for the shift in community structure, and that the spilled petroleum also might have affected the community structure. Because the phytoplankton community structure was generally consistent with results from other investigations, it was most likely unchanged after the oil spill in 2011.

Key words Central Bohai Sea; Phytoplankton; Dominant species; Community structure

^① Corresponding author: CHEN Bijuan, E-mail: chenbj@ysfri.ac.cn

近年渤海中部海域活性磷酸盐的时空变化特征*

陈聚法[#] 赵俊[#] 过锋 曲克明 崔正国
孙雪梅 朱建新 丁东生 刘传霞



(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)

摘要 渤海封闭性强,水动力条件和自净能力较弱,其生态系统较为敏感和脆弱。2011年位于渤海中部的蓬莱 19-3 油田发生重大溢油事故,对渔业生态环境和渔业资源造成了严重影响。为了解和掌握该起溢油污染事故发生后渔业生态环境的变化状况,分别于 2012–2014 年在渤海中部海域进行了 9 个航次的生态环境跟踪调查。利用其中部分调查资料,作者对渤海中部活性磷酸盐的时空变化特征及其影响因素进行了分析探讨。结果显示,(1) 2012–2014 年春季和夏季渤海中部海域活性磷酸盐含量符合第二类海水水质标准要求,秋、冬季部分海域已受到活性磷酸盐的污染。(2) 不同季节渤海中部海域活性磷酸盐的平面分布趋势各异,垂直分布也存在季节差异。春季和夏季活性磷酸盐呈现由表层至底层递减的趋势,秋季和冬季接近呈垂直分布均匀状态。(3) 渤海中部海域活性磷酸盐平均含量季节变化明显,其含量顺序由高到低依次为冬季、秋季、春季、夏季,冬季明显高于夏季。2014 年渤海中部海域活性磷酸盐含量低于 2013 年,呈逐年降低趋势。(4) 渤海中部海域活性磷酸盐时空变化受到诸多因素的影响,营养盐的外源补充、内源再生和生物消耗是影响活性磷酸盐时空变化的最重要因素。

关键词 活性磷酸盐; 时空变化; 影响因素; 渤海中部海域

中图分类号 X824 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)04-0028-08

渤海为我国半封闭的内海,三面环陆,仅东部通过渤海海峡与黄海相通。渤海海域面积为 77284 km²,大陆海岸线长 2668 km,平均水深 18 m。渤海沿岸有人海河流 100 余条,其中主要入海河流 40 余条,较大河流包括黄河、小清河、海河、滦河、大辽河等,形成渤海沿岸三大水系和三大海湾生态系统。渤海封闭性较强,水动力条件和自净能力不强,其生态系统较为敏感和脆弱。一旦受到污染,渤海生态系统受损程度要重于水动力条件强的开阔海域,受损生态系统的恢复也需要更长的时间。

从 2011 年 6 月 4 日开始,位于渤海中部的蓬莱 19-3 油田发生重大溢油事故,事故持续时间之长,影

响范围之广在渤海前所未有的,对渔业生态环境和渔业资源造成了严重影响。为了解和掌握该起溢油污染事故发生后渔业生态环境的变化状况,分别于 2012 年春季、2013 年和 2014 年春、夏、秋、冬四季在渤海中部海域进行了 9 个航次的生态环境跟踪调查。作者利用海水中活性磷酸盐的调查结果,对渤海中部活性磷酸盐的时空变化特征及其影响因素进行了分析探讨,既可实时了解研究海域营养盐的现状,又可评估蓬莱 19-3 油田溢油事故对污染海域生态环境的短期和中期影响。本研究内容属于海洋溢油生态影响研究的范畴,也是溢油污染海域生态修复研究的基础。

有关渤海海域海水营养盐的分布变化特点与营

*农业部溢油专项“渤海生态环境监测与评估”(农办渔[2012]117号)和“应对溢油关键技术专项研究”(2012-NZ-5739)共同资助

[#] 共同第一作者: 陈聚法, 研究员, E-mail: chenjf@ysfri.ac.cn; 赵俊, 研究员, E-mail: zhaojun@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-05-27, 收修改稿日期: 2015-08-10

养状况已有诸多分析研究结果(于春艳等, 2013; 石强 2013; 张乃星等, 2011; 张继民等, 2008; 蒋红等, 2005; 赵骞等, 2004; 赵亮等, 2002; 崔毅等, 1996; 陈淑珠等, 1991; 林庆礼等, 1991; 吕小乔等, 1985), 但近年对渤海中部海水营养盐的系统研究未见报道。作者通过分析 2012–2014 年渤海中部活性磷酸盐调查资料, 对该海域活性磷酸盐的时空变化进行了研究, 对于渤海生态环境的保护和受损生态系统的恢复具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 调查方法

1.1.1 调查区域与站位设置 调查区域为渤海中部海域(图 1), 设置生态环境调查站位 41 个, 水样采集层次为表层、10 m 层、底层。调查时间分别为 2012 年春季; 2013 年春季、夏季、秋季、冬季; 2014 年春季、夏季、秋季、冬季, 共计 9 个航次。

1.1.2 调查项目与分析方法 调查项目包括水温、盐度、pH、DO、COD、亚硝酸盐氮、硝酸盐氮、氨氮、无机氮、活性磷酸盐、石油类、重金属(铜、锌、铅、镉、汞)、砷等。本研究仅对活性磷酸盐数据进行分析。活性磷酸盐样品的采集、处置和检测均按《海洋监测规范》(中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局等, 2007)的规定和要求进行。

1.2 评价方法

采用单因子污染指数法, 单因子污染指数计算公式: $P_i = C_i / C_{i0}$ 。式中, P_i 为某项因子的污染指数, C_i 为某项因子的实测值, C_{i0} 为某项因子的评价标准值。

以污染指数值 1.0 作为该因子是否对海水产生污染的基本界线, 大于 1.0 说明海水已被该因子污染。

依据《海水水质标准》(国家环境保护局等, 1997)中的第一类标准(活性磷酸盐 ≤ 0.015 mg/L)和第二类标准(活性磷酸盐 ≤ 0.030 mg/L), 分别对调查海域活性磷酸盐的污染状况进行评价。

2 结果与分析

2.1 近年渤海中部海域活性磷酸盐的含量与空间分布

2.1.1 活性磷酸盐的含量状况 对 2012–2014 年 9 个航次活性磷酸盐调查结果进行统计分析。结果显示, 2012 年春季渤海中部海域活性磷酸盐含量范围为 4.43–22.07 $\mu\text{g/L}$, 表层、10 m 层和底层的含量平均值分别为 11.12、10.94、10.45 $\mu\text{g/L}$ (表 1)。

2013 年春季渤海中部海域活性磷酸盐含量范围为 4.52–19.96 $\mu\text{g/L}$, 表层、10 m 层和底层含量平均值分别为 11.03、11.09、10.51 $\mu\text{g/L}$; 夏季活性磷酸盐含量为 2.12–9.70 $\mu\text{g/L}$, 表层、10 m 层和底层含量平均值分别为 5.51、4.97、4.77 $\mu\text{g/L}$; 秋季活性磷酸盐含量范围为 3.03–47.35 $\mu\text{g/L}$, 表层、10 m 层和底层含量平均值分别为 23.57、25.05、26.16 $\mu\text{g/L}$; 冬季活性磷酸盐含量为 8.57–38.12 $\mu\text{g/L}$, 表层、10 m 层和底层含量平均值分别为 22.33、23.25、22.19 $\mu\text{g/L}$ (表 1)。2014 年春季渤海中部海域活性磷酸盐含量为 1.20–24.93 $\mu\text{g/L}$, 表层、10 m 层和底层含量平均值分别为 9.13、8.25、8.99 $\mu\text{g/L}$; 夏季活性磷酸盐含量为 0.45–18.23 $\mu\text{g/L}$, 表层、10 m 层和底层含量平均值分

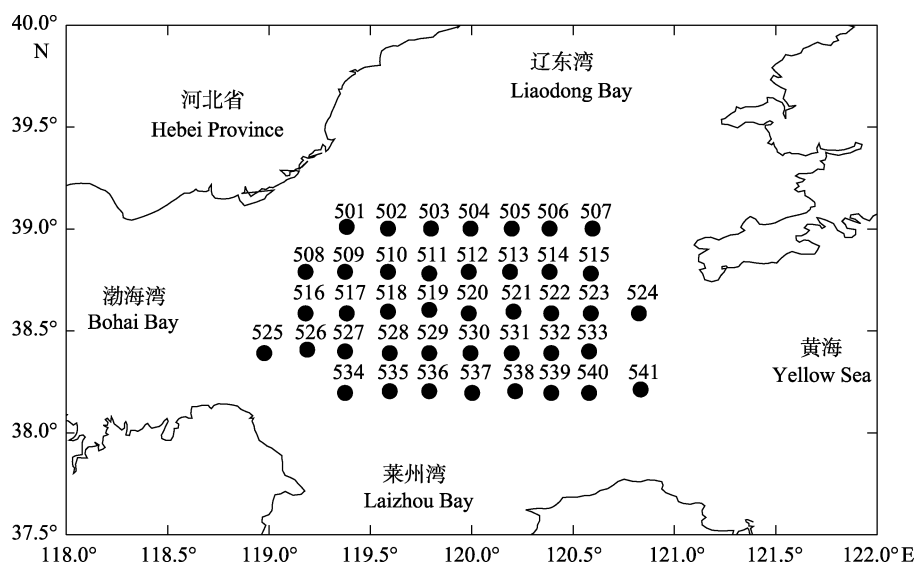


图 1 调查海域和站位分布

Fig.1 Surveyed areas and sampling stations

别为 3.26、3.04、2.90 $\mu\text{g/L}$ ；秋季活性磷酸盐含量在 4.14–33.36 $\mu\text{g/L}$ ，表层、10 m 层和底层含量平均值分别为 15.00、13.52、15.64 $\mu\text{g/L}$ ；冬季活性磷酸盐含量为 18.75–55.27 $\mu\text{g/L}$ ，表层、10 m 层和底层含量平均值分别为 33.85、32.87、32.63 $\mu\text{g/L}$ (表 1)。

2012–2014 年各个调查航次渤海中部海域表层、10 m 层和底层活性磷酸盐含量范围列入表 1。

2.1.2 活性磷酸盐的空间分布 平面分布趋势：渤海中部海域表层、10 m 层和底层活性磷酸盐的平面分布趋势相似，作者以表层为例来分析其平面分布趋

势。春季调查海域表层活性磷酸盐高含量区主要位于渤海湾湾口附近和 38.5°N 附近的東西向带状区域，其他区域活性磷酸盐含量相对较低。夏季表层活性磷酸盐高含量区主要集中在调查海域的西北部，其他区域活性磷酸盐含量相对较低。秋季表层活性磷酸盐高含量区主要集中在调查海域的北部，其他区域活性磷酸盐含量相对较低。冬季表层活性磷酸盐高含量区主要集中在调查海域的东北部，调查海域东南角和西南角也存在活性磷酸盐高含量区，其他区域活性磷酸盐含量相对较低(图 2)。垂直分布趋势：春季和夏季渤海

表 1 2012–2014 年渤海中部海域活性磷酸盐含量状况
Tab.1 Concentrations of active phosphate in the central Bohai Sea during 2012–2014

调查时间 Survey time	含量范围 DIP scope ($\mu\text{g/L}$)		
	表层 Surface	10 m 层 10 m depth	底层 Bottom
2012 年春季 Spring, 2012	4.43–22.07	4.43–20.60	5.90–19.13
2013 年春季 Spring, 2013	5.93–18.56	4.52–18.59	4.52–19.96
2013 年夏季 Summer, 2013	2.12–9.70	2.12–8.70	2.12–8.18
2013 年秋季 Autumn, 2013	3.03–38.12	8.57–39.96	8.57–47.35
2013 年冬季 Winter, 2013	14.11–36.27	8.57–32.57	8.57–38.12
2014 年春季 Spring, 2014	1.20–22.14	1.20–17.95	1.20–24.93
2014 年夏季 Summer, 2014	0.45–18.23	0.45–17.12	0.45–8.23
2014 年秋季 Autumn, 2014	4.14–33.36	4.14–24.59	7.06–23.13
2014 年冬季 Winter, 2014	27.51–39.20	27.51–43.59	18.75–55.27

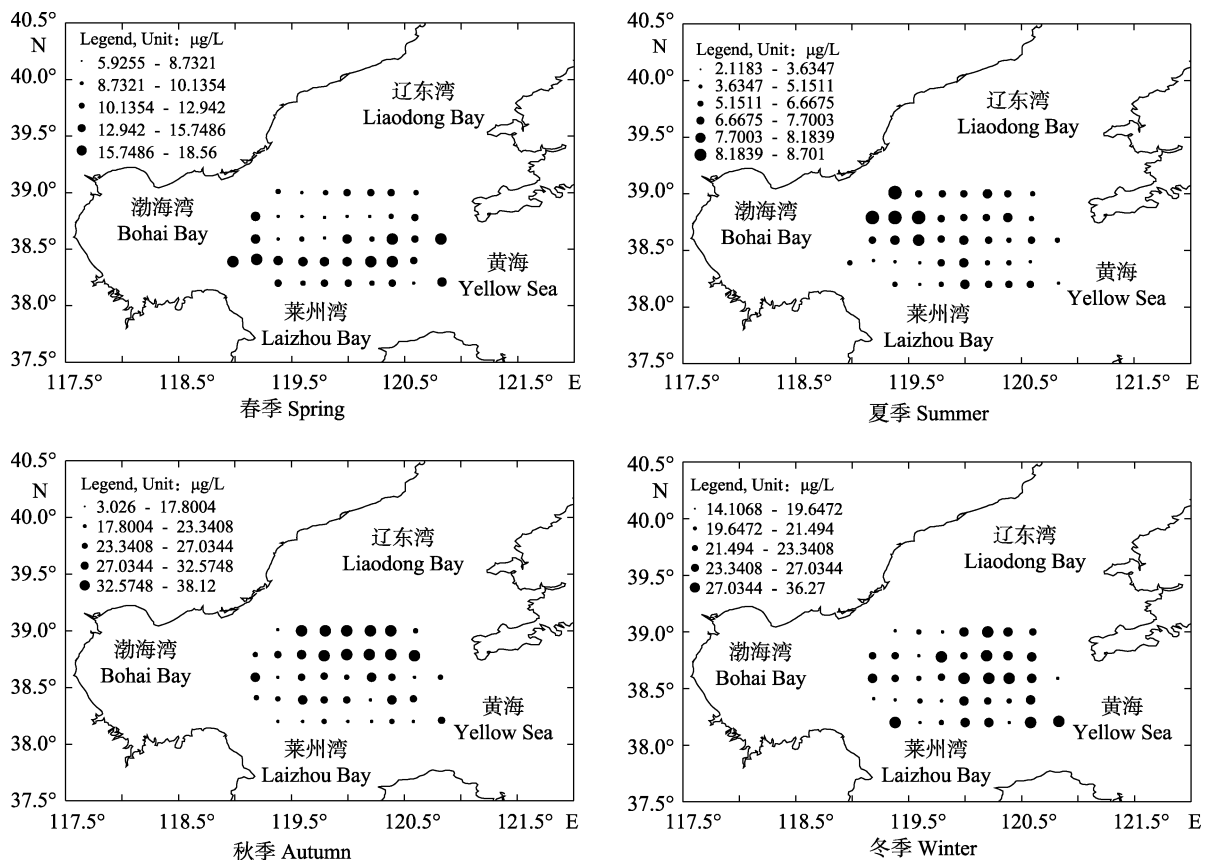


图 2 渤海中部海域表层活性磷酸盐平面分布

Fig.2 Horizontal distribution of active phosphate concentration in the surface layer of the central Bohai Sea ($\mu\text{g/L}$)

中部海域活性磷酸盐平均含量以表层最高, 10 m 层次之, 底层最低, 呈由表层至底层递减的变化趋势。秋季渤海中部海域活性磷酸盐平均含量表层至 10 m 层分布均匀, 10 m 层至底层呈现增高趋势。冬季渤海中部海域活性磷酸盐平均含量接近呈现垂直分布均匀状态(表 2)。

表 2 渤海中部海域不同层次活性磷酸盐含量变化
Tab.2 Variation of active phosphate concentration at different depths in the central Bohai Sea

季节 Season	平均含量 Average of concentration/ $\mu\text{g/L}$		
	表层 Surface	10 m 层 10 m depth	底层 Bottom
春季 Spring	10.43	10.09	9.98
夏季 Summer	4.39	4.01	3.84
秋季 Autumn	19.29	19.29	20.90
冬季 Winter	28.09	28.06	27.41

2.2 渤海中部海域活性磷酸盐的时间变化特征

2.2.1 活性磷酸盐的季节变化 调查结果显示, 渤海中部海域活性磷酸盐平均含量季节变化明显。表层、10 m 层和底层活性磷酸盐含量季节变化趋势相同, 3 个层次其含量顺序均为冬季 > 秋季 > 春季 > 夏季, 冬季明显高于夏季(图 3)。

2.2.2 活性磷酸盐的年际变化 调查和分析结果显示, 2014 年渤海中部海域表层、10 m 层和底层活性磷酸盐平均含量均低于 2013 年, 呈下降趋势(图 4)。

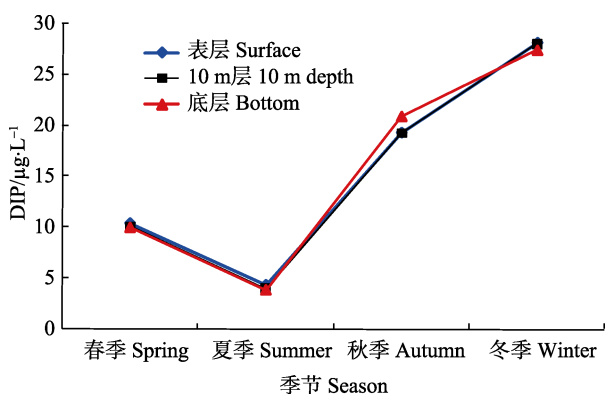


图 3 渤海中部海域活性磷酸盐季节变化

Fig.3 Seasonal variation of active phosphate concentration in the central Bohai Sea

2.3 渤海中部海域活性磷酸盐的污染状况

依据单因子污染指数法对调查海域活性磷酸盐的含量状况进行评价, 按照第一类海水水质标准计算得出的污染指数和超标率列入表 3, 按照第二类海水水质标准计算得出的污染指数和超标率列入表 4。

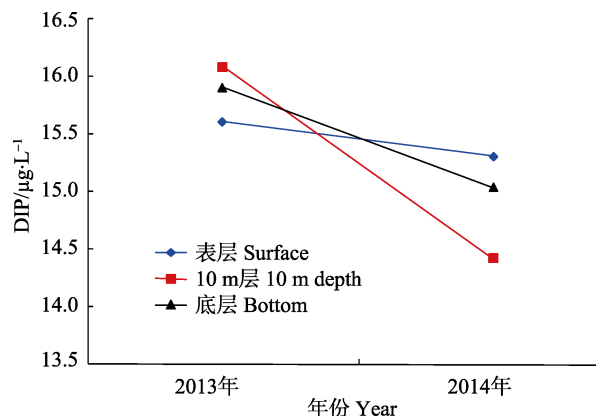


图 4 渤海中部海域活性磷酸盐年际变化

Fig.4 Inter-annual variation of active phosphate concentration in the central Bohai Sea

评价结果显示, 2012 年春季渤海中部调查海域全部站位活性磷酸盐含量均符合第二类海水水质标准(表 4), 部分站位超过第一类海水水质标准, 表层、10 m 层和底层超标率分别为 28.57%、19.05%和 9.52%(表 3)。

2013 年春季渤海中部调查海域全部站位活性磷酸盐含量均符合第二类海水水质标准(表 4), 部分站位超过第一类海水水质标准, 表层、10 m 层和底层超标率分别为 14.63%、14.63%和 17.07%(表 3)。

2013 年夏季渤海中部调查海域全部站位活性磷酸盐含量均符合第一类海水水质标准, 无超标情况出现(表 3 和表 4)。

2013 年秋季渤海中部调查海域大部分站位活性磷酸盐含量符合第二类海水水质标准, 少部分站位超过第二类海水水质标准, 表层、10 m 层和底层超标率分别为 29.27%、26.83%和 29.27%(表 4); 调查海域少部分站位活性磷酸盐含量符合第一类海水水质标准, 大部分站位超过第一类海水水质标准, 表层、10 m 层和底层超标率分别为 82.93%、87.80%和 92.68%(表 3)。

2013 年冬季渤海中部调查海域大部分站位活性磷酸盐含量符合第二类海水水质标准, 少部分站位超过第二类海水水质标准, 表层、10 m 层和底层超标率分别为 7.32%、9.76%和 4.88%(表 4); 调查海域少部分站位活性磷酸盐含量符合第一类海水水质标准, 大部分站位超过第一类海水水质标准, 表层、10 m 层和底层超标率分别为 90.24%、92.68%和 87.80%(表 3)。

2014 年春季渤海中部调查海域全部站位活性磷酸盐含量均符合第二类海水水质标准(表 4), 部分站位超过第一类海水水质标准, 表层、10 m 层和底层超标率分别为 12.20%、12.20%和 14.63%(表 3)。

2014 年夏季渤海中部调查海域全部站位活性磷酸盐含量均符合第二类海水水质标准(表 4), 个别站位

表3 2012–2014年渤海中部海域活性磷酸盐污染指数与超标率

Tab.3 Pollution index and exceeding limit rate of active phosphate in the central Bohai Sea during 2012–2014

调查时间 Surveyed time	表层 Surface		10 m层 10 m depth		底层 Bottom	
	P_i 范围	超标率	P_i 范围	超标率	P_i 范围	超标率
	P_i scope	Exceeding limit rate (%)	P_i scope	Exceeding limit rate (%)	P_i scope	Exceeding limit rate (%)
2012年春季 Spring, 2012	0.30–1.47	28.57	0.30–1.37	19.05	0.39–1.28	9.52
2013年春季 Spring, 2013	0.40–1.24	14.63	0.30–1.24	14.63	0.30–1.33	17.07
2013年夏季 Summer, 2013	0.14–0.65	0	0.14–0.58	0	0.14–0.55	0
2013年秋季 Autumn, 2013	0.20–2.54	82.93	0.57–2.66	87.80	0.57–3.16	92.68
2013年冬季 Winter, 2013	0.94–2.42	90.24	0.57–2.17	92.68	0.57–2.54	87.80
2014年春季 Spring, 2014	0.08–1.48	12.20	0.08–1.20	12.20	0.08–1.66	14.63
2014年夏季 Summer, 2014	0.03–1.22	2.44	0.03–1.14	2.44	0.03–0.55	0
2014年秋季 Autumn, 2014	0.28–2.22	41.46	0.28–1.64	36.59	0.47–1.54	53.66
2014年冬季 Winter, 2014	1.83–2.61	100.00	1.83–2.91	100.00	1.25–3.68	100.00

注：按照第一类海水水质标准计算

Note: The P_i value was calculated according to the first class limit of sea water quality standard

超过第一类海水水质标准，表层、10 m层和底层超标率分别为2.44%、2.44%和0(表3)。

2014年秋季渤海中部调查海域大部分站位活性磷酸盐含量符合第二类海水水质标准，仅个别站位超过第二类海水水质标准，表层、10 m层和底层超标率分别为4.88%、0、0(表4)；调查海域部分站位活性磷酸盐含量符合第一类海水水质标准，部分站位超过第一类海水水质标准，表层、10 m层和底层超标率分别为41.46%、36.59%、53.66%(表3)。

2014年冬季渤海中部调查海域大部分站位活性磷酸盐含量符合第二类海水水质标准，少部分站位超过第二类海水水质标准，表层、10 m层和底层超标率分别为26.83%、21.95%和17.07%(表4)；调查海域全部站位活性磷酸盐含量超过第一类海水水质标准，表层、10 m层和底层超标率均为100%(表3)。

由此可见，虽然调查海域地处渤海中部、非近岸海域，受陆源污染的影响较小，但秋、冬季部分海域活性磷酸盐含量仍然超过第二类海水水质标准。该调查区域为进出渤海的主要航道，船舶生活污水和压舱水的大量排放应该是导致该海域活性磷酸盐超标的原因之一。

3 讨论

海水中的营养盐是海洋浮游植物生长繁殖所必需的营养物质，氮和磷是组成生物细胞原生质的重要元素，而硅则是硅藻等海洋浮游植物的骨架和介壳的主要组成部分。它们在控制海洋植物的生长和海洋初级生产力等方面起着相当重要作用。大量的研究表明，海水中的氮、磷、硅等营养盐的水平及其结构极大地影响着浮游植物的初级生产水平及生态系统结构(Lagus *et al.*, 2004)。由于这些元素参与生物生命活动的整个过程，他们的存在形态与分布受到生物的制约，同时受到化学、地质和水文等因素的影响(张乃星等, 2011)，因此，研究营养盐的分布变化规律对于海洋生态环境保护具有重要的意义。

3.1 影响渤海中部活性磷酸盐空间分布的主要因素

影响渤海中部海域活性磷酸盐平面分布的因素众多，影响机制错综复杂，沿岸径流携带营养盐入海、浮游植物的生长繁殖、海水层化的区域差异、环流场的分布、研究海域与莱州湾、渤海湾、辽东湾以及黄海

表4 2012–2014年渤海中部海域活性磷酸盐污染指数与超标率

Tab.4 Pollution index and exceeding limit rate of active phosphate in the central Bohai Sea during 2012–2014

调查时间 Surveyed time	表层 Surface		10 m 层 10 m depth		底层 Bottom	
	P_i 范围 P_i scope	超标率 Exceeding limit rate (%)	P_i 范围 P_i scope	超标率 Exceeding limit rate (%)	P_i 范围 P_i scope	超标率 Exceeding limit rate (%)
2012年春季 Spring, 2012	0.15–0.74	0	0.15–0.69	0	0.20–0.64	0
2013年春季 Spring, 2013	0.20–0.62	0	0.15–0.62	0	0.15–0.67	0
2013年夏季 Summer, 2013	0.07–0.32	0	0.07–0.29	0	0.07–0.27	0
2013年秋季 Autumn, 2013	0.10–1.27	29.27	0.29–1.33	26.83	0.29–1.58	29.27
2013年冬季 Winter, 2013	0.47–1.21	7.32	0.29–1.09	9.76	0.29–1.27	4.88
2014年春季 Spring, 2014	0.04–0.74	0	0.04–0.60	0	0.04–0.83	0
2014年夏季 Summer, 2014	0.02–0.61	0	0.02–0.57	0	0.02–0.27	0
2014年秋季 Autumn, 2014	0.14–1.11	4.88	0.14–0.82	0	0.24–0.77	0
2014年冬季 Winter, 2014	0.92–1.31	26.83	0.92–1.45	21.95	0.62–1.84	17.07

注: 按照第二类海水水质标准计算

Note: The P_i value was calculated according to the second class limit of sea water quality standard

北部海域营养盐的交换; 水动力因子和生物扰动作用下海水–沉积物界面营养盐的交换、生物的代谢等因素均对活性磷酸盐的平面分布产生影响(张乃星等, 2011; 蒋红等, 2005; 崔毅等, 1996)。

渤海中部海域活性磷酸盐垂直分布结构主要受到渤海沿岸入海径流、海水层化、垂直对流作用、涡动混合作用和海水–沉积物界面交换等因素的影响。富含氮、磷营养盐的陆源径流入海, 首先作用于上层海水, 使上层海水中活性磷酸盐含量增高。春季和夏季海水层化现象明显, 受跃层的阻隔, 上下层海水混合强度较弱, 使磷酸盐含量较高的上层海水难以交换至下层, 再加上春、夏季风浪较小、表层沉积物难以悬浮进入水体, 通过海水–沉积物界面释放至底层海水中的营养盐很少, 因此, 形成春、夏季表层至底层活性磷酸盐递减的变化趋势。与夏季相比, 秋季陆源径流入海量减少, 海水层化现象逐渐消失, 浪流作用下的沉积物再悬浮强度加大, 通过海水–沉积物界面释放至底层海水中的营养盐增多, 因此, 形成秋季活性磷酸盐的这种垂直分布格局。冬季水温下降, 表层海水密度变大下沉, 海水垂直对流作用加强, 再加上冬季大风过程的影响, 风生涡动的混合作用强烈

(鲍献文等, 2004), 上下层海水充分混合, 使得冬季渤海中部海域活性磷酸盐含量近呈垂直分布均匀状态(张乃星等, 2011; 赵骞等, 2004)。

3.2 影响渤海中部活性磷酸盐时间变化的主要因素

影响渤海中部海域活性磷酸盐季节变化的主要因素包括受到渤海沿岸入海径流量、浮游植物生长繁殖和海水垂直混合作用等因素的影响。春季, 随着光照时间的延长, 水温的回升, 浮游植物的光合作用加强。在经历了春季浮游植物的生长高峰后, 海水中的营养盐被大量消耗。到了夏季, 海水中的营养盐含量显著降低。之后随着水温下降和光照时间缩短, 浮游植物繁殖能力减弱, 再加上径流输入的补充, 秋季营养盐水平逐步回升(赵骞等, 2004; 赵亮等, 2002)。冬季, 水温降至一年中的最低值, 光照差, 不利于浮游植物的生长繁殖, 对营养盐的消耗大幅减少, 此时营养盐的再生补充较为充分(张乃星等, 2011), 使得冬季渤海中部海域活性磷酸盐含量达到最高。虽然冬季随陆源径流入海的营养盐减少, 但沉积物再悬浮强度达到最大, 通过海水–沉积物界面释放至海水中的营养盐明显增多, 部分抵消了营养盐入海量减少对磷酸盐含量的影

响。2013年春、夏、秋、冬季渤海中部海域浮游植物调查结果显示,浮游植物种类数以春季最多(67种),夏季次之(63种),秋季第三(59种),冬季最少(48种);浮游植物丰度以春季最高($200.14 \times 10^4 \text{ cell/m}^3$),夏季次之($16.32 \times 10^4 \text{ cell/m}^3$),秋季第三($12.77 \times 10^4 \text{ cell/m}^3$),冬季最低($7.43 \times 10^4 \text{ cell/m}^3$)。调查海域浮游植物种数和丰度的这种季节变化趋势证实了浮游植物生长繁殖是影响活性磷酸盐季节变化的主要因素之一。

造成渤海中部海域活性磷酸盐含量年际变化的原因错综复杂,沿岸入海径流变化、浮游植物丰度变化、环流特征变化、气象条件变化、温度、盐度和pH值变化等均对研究海域活性磷酸盐年变化产生影响。《2013年中国海洋环境状况公报》(国家海洋局,2014)和《2014年中国海洋环境状况公报》(国家海洋局,2015)(以下简称公报)显示,2013年渤海主要入海河流黄河、小清河、大辽河和双台子河径流携带入海的总磷量为3708 t,而2014年上述4条河流径流携带入海的总磷量为2842 t,比2013年下降866 t,降幅达到23.35%。2014年渤海中部海域活性磷酸盐含量低于2013年,与渤海沿岸主要河流径流携带入海的总磷量大幅下降明显相关。另外,浮游植物调查结果显示,2013年渤海中部四季调查共鉴定出浮游植物87种,2014年调查海域浮游植物种类数与2013年基本持平(85种);2014年浮游植物平均丰度由2013年的 $59.16 \times 10^4 \text{ cell/m}^3$ 增至 $65.45 \times 10^4 \text{ cell/m}^3$,生物多样性指数均值由2013年的1.76增至2.02。由此可见,与2013年相比,2014年调查海域浮游植物平均丰度和生物多样性增加也是造成2014年渤海中部海域活性磷酸盐含量低于2013年的重要原因之一。

3.3 渤海中部活性磷酸盐的长期变化

蒋红等(2005)研究了渤海1982–1998年营养盐的变化趋势,结果显示,20世纪90年代渤海中部海域活性磷酸盐含量比80年代显著下降,由1982年的 $30.97 \mu\text{g/L}$ 降至1998年的 $9.92 \mu\text{g/L}$ 。本研究结果显示,2013年和2014年渤海中部海域活性磷酸盐含量分别为 15.87 、 $14.92 \mu\text{g/L}$,比1998年有所增高,但仍处于较低水平,磷有可能成为研究海域浮游植物生长繁殖的限制因子。

3.4 本研究结果与其他研究结果比较

赵亮等(2002)在研究渤海氮磷营养盐的循环和收支时发现,渤海4–9月为营养盐消耗期,10月到翌年3月为营养盐补充期,这与本研究关于渤海中部海域活性磷酸盐季节变化趋势的分析结果一致。

2013年公报显示,2013年夏季渤海中部调查海域活性磷酸盐含量符合第一类海水水质标准,与本研究评价结果一致。

2014年公报显示,2014年春季渤海中部调查海域活性磷酸盐含量符合第一类海水水质标准。本研究评价结果为大部分站位活性磷酸盐含量符合第一类海水水质标准,少数站位活性磷酸盐含量超过第一类海水水质标准,表层、10 m层和底层超标率分别为12.20%、12.20%和14.63%,二者存在一定差异。

公报显示,2014年夏季渤海中部调查海域活性磷酸盐含量符合第一类海水水质标准。本研究评价结果为绝大部分站位活性磷酸盐含量符合第一类海水水质标准,仅个别站位活性磷酸盐含量超过第一类海水水质标准,表层、10 m层和底层超标率分别为2.44%、2.44%和0,二者基本一致。

公报显示,2014年秋季渤海中部的东北部海域活性磷酸盐含量符合第二、三类海水水质标准,无第四类水质海域。本研究评价结果为绝大部分站位活性磷酸盐含量符合第二、三类海水水质标准,仅个别站位活性磷酸盐含量超标,表层、10 m层和底层超标率分别为4.88%、0和0,二者基本一致。

4 结语

(1) 2012–2014年春季和夏季渤海中部海域活性磷酸盐含量符合第二类海水水质标准要求,秋、冬季部分海域已受到活性磷酸盐的污染。

(2) 不同季节渤海中部海域活性磷酸盐的平面分布趋势各异,垂直分布也存在季节差异。春季和夏季活性磷酸盐呈由表层至底层递减的趋势,秋季和冬季近呈垂直分布均匀状态。

(3) 渤海中部海域活性磷酸盐平均含量季节变化明显,其含量为冬季>秋季>春季>夏季,冬季明显高于夏季。2014年渤海中部海域活性磷酸盐含量低于2013年,呈降低趋势。

(4) 渤海中部海域活性磷酸盐时空变化受到诸多因素的影响,外源补充、内源再生和浮游植物吸收消耗是影响活性磷酸盐时空变化的最重要因素。

参 考 文 献

- 于春艳,梁斌,鲍晨光,等.渤海富营养化现状及趋势研究.海洋环境科学,2013,32(2):175–177
- 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
- 石强.渤海夏季海水磷酸盐年际时空演变.海洋通报,2013,

- 32(4): 395–402
- 吕小乔, 祝陈坚, 张爱斌, 等. 夏季渤海西南部及黄河口海域营养盐分布特征. 山东海洋学院学报, 1985, 15(1): 146–158
- 张乃星, 任荣珠, 吴凤丛, 等. 渤海海峡冬季营养盐的分布特征及影响因素. 海洋通报, 2011, 30(6): 607–614
- 张继民, 刘霜, 张琦, 等. 黄河口附近海域营养盐特征及富营养化程度评价. 海洋通报, 2008, 27(5): 65–72
- 陈淑珠, 顾郁翘, 刘敏光, 等. 黄河口及其邻近海域营养盐分布特征. 中国海洋大学学报(自然科学版), 1991, 21(1): 32–41
- 林庆礼, 宋云利, 杨琴芳, 等. 渤海增殖水化学环境. 海洋水产研究, 1991(12): 11–30
- 国家环境保护局, 国家技术监督局. (GB3097–1997). 海水水质标准. 北京: 中国标准出版社, 1997
- 国家海洋局. 2013 年中国海洋环境状况公报. 2014
- 国家海洋局. 2014 年中国海洋环境状况公报. 2015
- 赵亮, 魏皓, 冯士筭. 渤海氮磷营养盐的循环和收支. 环境科学, 2002, 23(1): 78–81
- 赵骞, 田纪伟, 赵仕兰, 等. 渤海冬夏季营养盐和叶绿素 a 的分布特征. 海洋科学, 2004, 28(4): 34–39
- 崔毅, 宋云利. 渤海海域营养现状研究. 海洋水产研究, 1996, 17(1): 57–62
- 蒋红, 崔毅, 陈碧鹃, 等. 渤海近 20 年来营养盐变化趋势研究. 海洋水产研究, 2005, 26(6): 61–67
- 鲍献文, 万修全, 吴德星, 等. 2000 年夏末和翌年初冬渤海海水水文特征. 海洋学报, 2004, 26(1): 14–24
- Lagus A, Suomela J, Weithhoff G, *et al.* Species-specific differences in phytoplankton responses to N and P enrichments and the N:P ratio in the Archipelago Sea, northern Baltic Sea. *J Plankton Res*, 2004, 26(7): 779–798

(编辑 江润林)

Recent Temporal and Spatial Variation in Active Phosphate Concentration in Seawater of the Central Bohai Sea

CHEN Jufa[#], ZHAO Jun[#], GUO Feng, QU Keming, CUI Zhengguo, SUN Xuemei, ZHU Jianxin, DING Dongsheng, LIU Chuanxia

(Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Shandong Provincial Key Laboratory of Fishery Resources and Ecological Environment; Yellow Sea Fisheries Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

Abstract The Bohai Sea is a semi-closed gulf with weak hydrodynamic condition and self-purification capacity. Therefore its eco-system is more sensitive and fragile than open seas. A serious oil spill accident occurred in the Penglai 19-3 oil field located in the central Bohai Sea in 2011, which severely affected the marine ecological environment and fishery resources. To determine the aftermath in fishery ecological environment, nine surveys were carried out in the central Bohai Sea in 2012–2014. Based on part of the survey data, we analyzed the temporal and spatial variation in active phosphate and the corresponding factors in the central Bohai Sea. The results showed that the levels of active phosphate met the second class of sea water quality standard in spring and summer from 2012 to 2014, but the pollution caused by active phosphate was observed in part of the survey in autumn and winter; the horizontal and vertical distribution of active phosphate varied in different seasons, and in spring and summer the concentration of active phosphate gradually decreased along with the increase in depth, while in autumn and winter it was almost constant from the surface to the bottom; the seasonal mean concentration of active phosphate followed the order winter>autumn>spring>summer, and it was obviously higher in winter than in summer, plus the mean concentration was lower in 2014 than in 2013; The distribution and variation of active phosphate in the central Bohai Sea was affected by many factors, and key ones included exogenous supplement, endogenous release of nutrients, and biological consumption.

Key words Active phosphate; Temporal and spatial variation; Influencing factors; Central Bohai Sea

[#] Joint first author: CHEN Jufa, E-mail: chenjf@ysfri.ac.cn; ZHAO Jun, E-mail: zhaojun@ysfri.ac.cn

基于欧拉-拉格朗日方法的某溢油事故天然渔业资源损失评估方法案例研究*

丁东生 马绍赛 陈碧鹃 崔正国 赵俊
刘传霞 张旭志 曲克明^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)

摘要 本研究针对渤海中部某船舶碰撞溢油事故, 基于欧拉-拉格朗日方法, 对事故发生后的油膜漂移扩散和油膜消失后的溶解态分布趋势, 分别进行了数值模拟。在此基础上, 界定事故溢油对渤海天然渔业资源的影响范围, 进而估算天然渔业资源损失。结果显示: 溢油量按 13 m^3 计算, 油膜存在期约为 72 h, 累加油膜扫海面积约为 69.19 km^2 ; 油膜消失后, 事故溢油仍会以溶解态、乳化态或悬浮颗粒态在海水中扩散, 水体中的石油烃含量符合渔业水质标准, 溢油在第 11 天中午即可抵岸; 油膜会造成渔业资源损失, 油膜消失后, 悬浮颗粒态和乳化态石油在岸滩等因素影响下会形成凝聚态石油, 并对潮间带生物造成影响。其影响面积结合溶解态抵岸区域内自然岸线长度予以估算, 经评估, 在油膜扫海区域及受影响潮间带范围内, 事故经济损失额合计为 631.9 万元。本研究对数值模型方法在溢油事故天然渔业资源损失评估中的应用方面做了有益尝试, 为无现场观测数据支撑的海洋溢油事故天然渔业资源损失评估提供了一个可行的方法。

关键词 欧拉-拉格朗日方法; 溢油事故; 天然渔业资源损失评估

中图分类号 X824 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)04-0036-07

近年来, 海洋溢油事故频发, 已对渔业资源和生态环境产生严重危害。准确界定溢油事故影响范围, 是合理开展渔业资源损失评估、科学制定渔业资源养护措施、有效保护海洋渔业环境的前提。目前, 确定溢油影响范围的方法可归纳为现场观测技术、遥感观测技术和数值模型技术, 但是只有现场观测结果可作为司法鉴定的依据。遥感观测技术可分为卫星遥感、航空遥感、船舶遥感和闭路电视(Closed-Circuit Television, CCTV)监视系统。其中, 卫星遥感在实际使用中受到其空间分辨率的限制, 航空遥感和船舶遥感均受气候条件限制, 而 CCTV 监视系统只能用于特殊管控区, 如钻井平台附近的溢油观测。而数值模型技术在环境

影响评价中却已广泛使用。

数值模型技术已成为解决海洋环境中各种复杂问题的有效手段。溢油数值模型常用于事故发生后的油膜漂移轨迹、油膜扫海面积预报或事故现场还原(张珞平等, 1988; 娄安刚等, 1994; 张存智等, 1997; 余加艾等, 1999; 刘钦政等, 2005; 龙绍桥等, 2006; Azevedo *et al*, 2009; Badri *et al*, 2010; 廖国祥等, 2010; Berry *et al*, 2012; 黄成等, 2013; 宋泽坤等, 2013)。

现有模型对海洋中石油迁移转化过程关注的侧重点为油膜漂移扩散(Berry *et al*, 2012; Deng *et al*, 2013; Li *et al*, 2013)和水体中石油烃迁移转化(Nepstad *et al*, 2015; 李克强, 2003、2007¹⁾、2009; 郭良波等,

* 农业部专项“应对溢油关键技术专项研究”(2012-NZ-5739)、农业部专项“渤海生态环境监测评估”(13-Q52201302)和黄海水产研究所级基本科研业务费项目(2060302481; 2060302201516058)共同资助。丁东生, E-mail: dingds@ysfri.ac.cn

^① 通讯作者: 曲克明, 研究员, E-mail: qukm@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-08-18, 收修改稿日期: 2015-10-19

1) 李克强. 胶州湾主要化学污染物海洋环境容量研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2007

2005¹⁾、2007; 王修林等, 2006)。溢油模型重点关注前者且相关研究已较为成熟, 甚至已开始与 GIS 或 Google Earth 等结合进行业务化应用相关研究(Nelson *et al*, 2015; Helle *et al*, 2015; Chen *et al*, 2004; 牟林等, 2011; 焦俊超等, 2011; 刘文全等, 2011), 但甚少关注油膜破碎后的相关迁移转化过程。

实际溢油事故发生后, 在岸滩、潮间带等区域常见到块状石油。这些凝聚态石油通常是在岸滩、地形等因素共同作用下, 由随水体迁移至近岸的乳化态和悬浮颗粒态石油凝聚形成。此种情况下, 水体中石油烃浓度一般都符合水质标准, 这也是溢油模型甚少关注该过程的原因。考虑到此类凝聚态石油对潮间带生物体的损害, 在天然渔业资源损失评估中有必要同时掌握油膜扫海面积以及溶解态向岸分布趋势。

本研究针对渤海中部的某船舶碰撞漏油事故, 采用欧拉-拉格朗日方法, 对事故溢油的油膜漂移轨迹、扩散面积以及溶解态溢油影响范围, 进行了数值模拟, 核定了事故影响范围, 进而评估了天然渔业资源损失。

1 溢油轨迹与溶解态向岸分布趋势模拟

2012 年两艘轮船在渤海中部海域(图 1)发生碰撞。事故造成其中一艘船舶燃油舱破损, 约 13 m³ 船用重质燃料油(180CST)泄漏(简称“溢油事故”)。

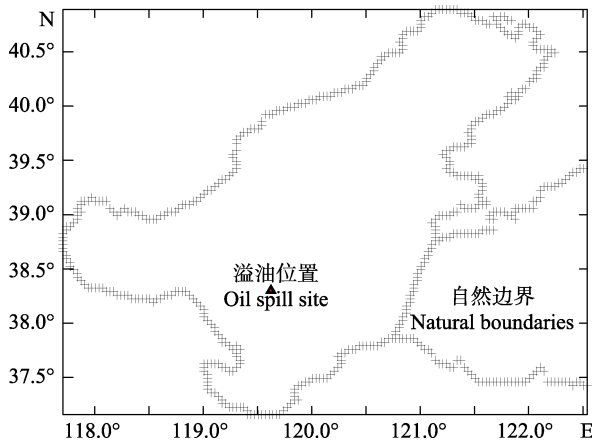


图 1 溢油点位置(38°18'N, 119°37.5'E)

Fig.1 Oil spill site (38°18'N, 119°37.5'E)

1.1 水动力模式

水动力模式为汉堡陆架海模式(Hamburg shelf ocean model, HAMSOM), 是由德国汉堡大学海洋研

究所 Backhaus 等(1983、1985)及其同事构建的 1 种三维分层平均的半隐式数值模式。

1.2 油膜扩散模型

溢油入海后在海面形成油膜, 并不断扩散, 其扩展半径由 PC Blokker 公式计算(许文彬, 2011; 娄厦等, 2008):

$$D_t^3 = D_0^3 + \frac{24}{\pi} k (r_w - r_0) \frac{r_0}{r_w} V_0 t \quad (1)$$

式中, D_t , D_0 分别为 t 时和初始油膜的直径(m)。根据事故漏油实际情况, 燃油舱破损且破口较小, 为计算方便, D_0 初始值取 1 m; r_w , r_0 为水和油的密度, 前者取 1.025 (许文彬, 2011), 后者为 180CST 的实测数据, 为 0.987; V_0 为溢油量(m³), 取 13 m³; k 为系数, 根据胜利原油与 180CST 现场实验模拟结果(尚未发表)并参照文献(许文彬, 2011), 取 3000; π 为圆周率; t 为时间。

1.3 油膜漂移模型

在潮流场计算的基础上, 用欧拉-拉格朗日方法, 对溢油油膜漂移轨迹进行跟踪模拟。投放初始, 即 $t=t_0$ 时, 标识质点的初始位置为 \bar{x}_0 , 其拉格朗日速度与欧拉速度的关系为:

$$(\bar{U}_1)(\bar{x}_0, t) = \bar{U}[\bar{y}(\bar{x}_0, t), t] \quad (2)$$

式中, $\bar{y}(\bar{x}_0, t)$ 是水质点的运动轨迹。(2)式表明, 只有在质点运动的轨迹 \bar{y} 上, 拉格朗日速度 \bar{U}_1 才能与欧拉速度 \bar{U} 相等。 \bar{y} 可由下式确定:

$$\bar{y}(\bar{x}_0, t) = \bar{x}_0 + \int_{t_0}^t \bar{U}[\bar{y}(\bar{x}_0, t'), t'] dt' \quad (3)$$

$$\bar{y}(\bar{x}_0, t) = \bar{x}_0 + \oint \bar{U}(\bar{x}_0, t) dt' \quad (4)$$

拉格朗日平均余流是水质点在 1 个潮周期 T 内的漂移距离与潮周期 T 之商:

$$\bar{U}_r(\bar{x}_0, t) = \frac{1}{T} [\bar{y}(\bar{x}_0, t+T) - \bar{y}(\bar{x}_0, t)] = \frac{1}{T} \oint \bar{U}(\bar{x}, t) dt' \quad (5)$$

拉格朗日的平均余流为:

$$\bar{U}_{lr}(\bar{x}_0, t) = \frac{\bar{y}_n - \bar{y}_0}{nt} \quad (6)$$

在拉格朗日余流基础上, 同时考虑实时风场对油膜漂移轨迹的影响。油膜漂移模型实时风场采用的风力、风向由历史天气网查询得到。事故当日, 风力为 5 级, 风向为东北风; 次日, 风力为 4 级, 风向为东南-西北风各 12 h; 第 3 天, 风力为 6 级, 风向为北风。

1) 郭良波. 渤海环境动力学数值模拟及环境容量研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2005

1.4 溶解态迁移转化模型

模型为基于 HAMSOM 原始方程构建的三维斜压模式, 垂向采用 Z 坐标, 水平方向采用平面直角坐标, 以 Arakawa C 网格进行离散, 水平网格分辨率为 $2' \times 2'$ (图 2), 垂向分 20 层, 层厚分别为 $4 \text{ m} \times 1$ 、 $2 \text{ m} \times 13$ 、 $3 \text{ m} \times 1$ 、 $4 \text{ m} \times 1$ 、 $5 \text{ m} \times 1$ 、 $6 \text{ m} \times 1$ 、 $7 \text{ m} \times 1$ 和 $15 \text{ m} \times 1$, 为防止计算时“露底”溢出, 表层取 4 m (王强, 2004¹⁾。

为了使目标海域流场计算准确, 水动力模型计算范围比目标海域范围略大(图 3), 其开边界设于 $122^\circ 30' \text{E}$ 。

模型初始条件, 如温度、盐度、流场、云层初始值(王强, 2004¹; 王修林等, 2006; Zhao *et al.*, 2011)和水动力参数(赵亮等, 2002; 王强, 2004¹)主要参考文献中的值。

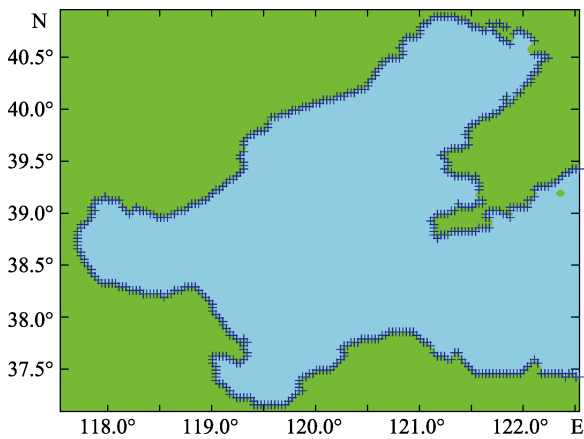


图 2 模型水平网格划分

Fig.2 Dividing of the horizontal grids

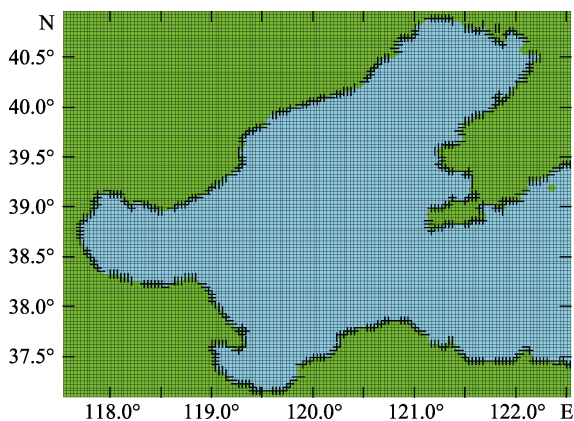


图 3 模型边界

Fig.3 Model boundary

溶解态输入通量为动态, 输入网格随着油膜漂移

轨迹及油膜实时面积变动, 输入通量取 13 m^3 , 为获取溶解态溢油最大影响范围, 模拟时将其视为保守物质, 随着油膜减少而同步输入模型进行模拟运算。

2 模拟结果与分析

2.1 油膜漂移轨迹

2.1.1 油膜扩散面积 180CST 油膜各时间点扩散半径及面积见表 1。

表 1 180CST 前 12 h 的扩散半径及面积
Tab.1 Diffusion radius and areas in the first twelve hours of 180CST

时间 Time (h)	半径 Radius (m)	面积 Area (km ²)
1	171	0.092
2	215	0.146
3	247	0.191
4	271	0.231
5	292	0.268
6	311	0.303
7	327	0.336
8	342	0.367
9	356	0.397
10	368	0.426
11	380	0.454
12	391	0.481

2.1.2 油膜漂移距离 根据拉格朗日余流场与实时风生流场叠加结果, 180CST 油膜漂移距离见表 2, 油膜漂移轨迹见图 4。

表 2 各时间段油膜漂移距离
Tab.2 Floating distance of oil film in certain time course

时间 Time (h)	漂移距离 Floating distance (km)
0-12	19.93
12-24	10.47
24-36	13.34
36-48	15.26
48-72	11.70

因现场实时风力、风向无直接观测值, 为求风力、风向更接近实际, 本研究取目标海域周边陆域山东东营市、莱州市和长岛县的实时风场数据, 对此次溢油事故海域实时风力、风向参数取值予以矫正。其中, 东营市位于目标海域西南方向, 长岛县位于目标海域

1) 王强. 渤海环流的季节变化及浮游生态动力学模拟. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2004

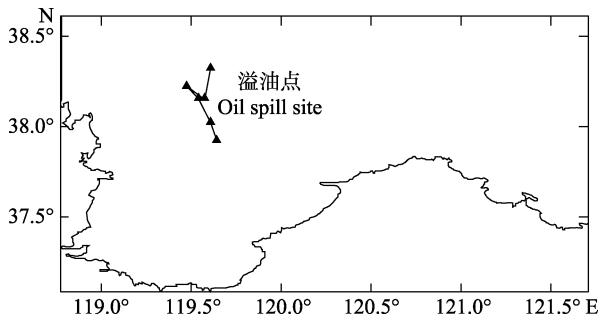


图4 油膜漂移轨迹

Fig.4 Floating route of oil film

东方, 莱州市位于目标海域东南方向。

油膜漂移轨迹主要受溢油区海面实时风场和潮流场影响, 本案例中因风力较强, 实时风生流场的驱动贡献更大。

2.1.3 油膜扫海面积 以 13 m^3 溢油量计算, 模拟得到累加扫海面积共计 69.19 km^2 (表 3)。

表3 各时间段油膜扫海面积

Tab.3 Floating area of oil film in certain time course

时间 Time (h)	累加扫海面积 Accumulated floating area (km^2)
0-12	12.19
12-24	9.43
24-36	14.23
36-48	18.19
48-72	15.16
合计 Total	69.19

2.2 溶解态向岸分布

室内试验测得 180CST 极限饱和浓度为 $100000\text{--}150000 \text{ mg/L}$, 油膜在海上存在时间 $\leq 72 \text{ h}$, 但事故溢油仍会以溶解态在海水中扩散, 向岸分布情况见图 5。由图 5 可知, 溶解态溢油在第 11 天 11:00 即可抵岸, 随着时间的推移其溶解态油品主体将逐渐抵岸, 溶解态覆盖区域石油含量均未超过《渔业水质标准》(GB11607-89) (0.05 mg/L)。

3 损失评估

3.1 海洋生物资源受损面积

油膜扫海区域的污染水平达到《海水水质标准》规定的四类或超四类水平, 远超《渔业水质标准》, 会损害海洋生物资源。溶解态向岸分布趋势模拟结果显示事故溢油潜在的影响范围, 虽然该区域石油烃含量均未超过《渔业水质标准》, 但乳化态和悬浮颗粒态石油

抵岸后会在地形等影响下凝聚成团, 从而对潮间带生物造成不良影响。

油膜扫海面积 69.19 km^2 需全部评估。潮间带受损面积核定过程如下: 根据溶解态向岸分布模拟结果, 该事故潜在潮间带影响范围为山东龙口和蓬莱两市。根据海岸线长度, 两市潮间带面积约为 193 km^2 , 扣除海岸防护工程用海、港口建设工程用海、船舶工业用海、旅游娱乐用海、造地工程用海以及渔业基础设施用海与围海养殖用海等, 天然潮间带剩余 20% 左右, 按 20% 计算, 为 38.6 km^2 ; 根据两市近岸块状油污指纹比对结果(占比 37.8%)折算, 受影响潮间带面积约为 14.6 km^2 。

3.2 渔业资源损失评估方法及参数

由于溢油污染发生于渤海中部, 影响区域为山东省的烟台沿海, 故采用《山东省海洋生态损害赔偿和损失补偿评估方法》, 损失评估参数见表 4。

根据《山东省海洋生态损害赔偿和损失补偿评估方法》(DB37/T1448-2009), 在渔业资源损失评估工作中, 油膜扫海区域属严重污染。故鱼类、无脊椎动物和浮游动物的损害系数均取上限值, 分别为 0.4、0.6 和 0.8; 仔稚鱼的损害系数取 1.0; 潮间带生物损害系数取中值, 为 0.5。生物量按照“我国近海海洋综合调查和评价专项”冬季调查结果换算得到。海洋生物价格采用“烟台市价格认证中心出具的《山东省价格认证结论书》(烟价认字【2011】6 号)”中所列各种近海水产品价格, 将价格在 20 元/kg 以上的种类定为优质经济类, 价格在 20 元/kg 以下的种类定为低值小型类。其中, 优质经济类为 12 种。优质经济类价格确定为 44.25 元/kg , 低值小型类价格确定为 11.25 元/kg 。仔稚鱼换算为商品苗种, 按平均价格 1.0 元/尾 计算; 浮游动物转化为低级游泳动物生物量, 其价格取低值小型类价格 11.25 元/kg ; 潮间带底栖生物主要由多毛类、软体动物、甲壳动物和棘皮动物组成, 其经济价值较低, 经综合考虑, 按 0.8 万元/t 计算, 即 8 元/kg 。

3.3 渔业资源损失评估结果

经评估, 油膜扫海区域内渔业资源损失额为 137.0 万元 , 潮间带生物损失额为 73.7 万元 , 一次性损失额共计 210.6 万元 (表 4)。

根据《山东省海洋生态损害赔偿和损失补偿评估方法》, 生物资源的损害赔偿为一次性损害额的 3 倍, 据此, 该事故生物资源的损害赔偿额共计 631.9 万元 。

据《蓬莱 19-3 油田溢油事故联合调查组关于事

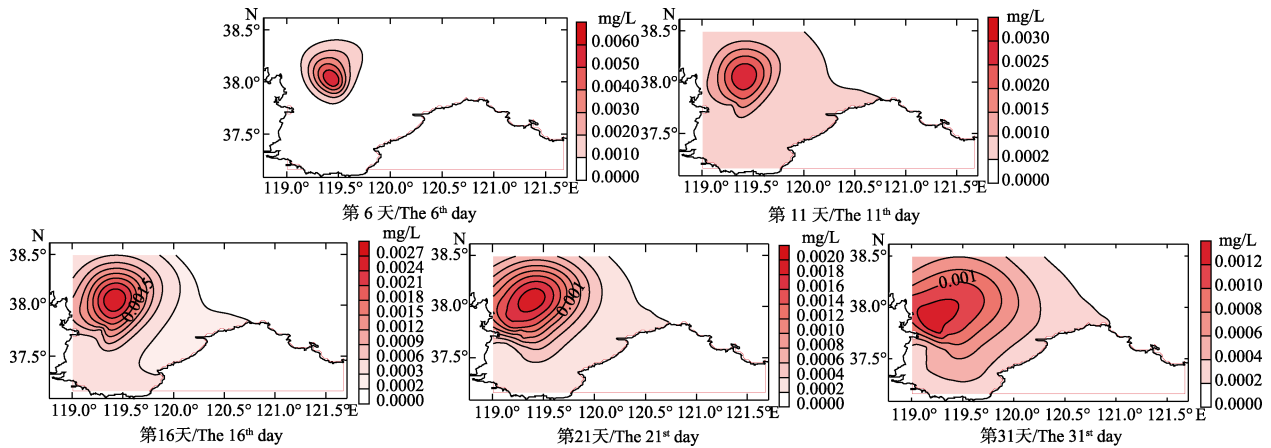


图5 溶解态油品分布

Fig.5 Distribution of the dissolved oil

表4 经济损失评估

Tab.4 Evaluation of the economic loss

项目 Items	种类 Species				
	鱼类 Fish	无脊椎动物 Invertebrates	浮游动物 Zooplankton	潮间带生物 Intertidal organism	仔稚鱼 Fish larvae and juvenile
生物量 Biomass	644 kg/km ²	244 kg/km ²	560 kg/km ²	13400 kg/km ²	206000 ind
损害系数 Impairment ratio	0.4	0.6	0.8	0.5	1.0
受损生物量 Biomass of the impaired	257.6 kg/km ²	146.4 kg/km ²	448 kg/km ²	6700 kg/km ²	10300 ind
污染面积 Polluted area (km ²)	69.19	69.19	69.19	14.6	69.19
价格 Price	优质经济类 High quality and expensive species: 44.25 yuan/kg 低值小型类 Cheap and miniature species: 11.25 yuan/kg		11.25 yuan/kg	8 yuan/kg	1 yuan/ind
一次性损失额 Direct economic loss (10 k yuan)	优质经济类 High quality and expensive species: 41.2 低值小型类 Cheap and miniature species: 21.0		3.5	73.7	71.2
一次性损失额合计 Total direct economic loss (10 k yuan)			210.6		

故调查处理报告》，蓬莱 19-3 溢油事故造成油田周边及其西北部面积约 6200 km² 的海域污染，溢油事故造成的海洋生态损害补偿额为 10.9 亿元人民币。仅根据污染水体面积及海洋生态补偿金额估算单位面积补偿金额，蓬莱 19-3 油田溢油事故为 17.6 万元/km²，本研究所选案例为 9.1 万元/km²，前者要高于后者，但考虑到前者持续污染时间要远高于后者，本研究的评估结果可信度较高。

4 结论

(1) 以 13 m³ 溢油量计算，油膜存在期约为 72 h，

模拟得到累加扫海面积共计 69.19 km²；油膜消失后，事故溢油仍会以溶解态、乳化态或悬浮颗粒态在海水中扩散，溶解态溢油在第 11 天的 11:00 即可抵岸，随着时间的推移其溶解态溢油主体将逐渐抵岸，溶解态覆盖区域石油含量均未超过《渔业水质标准》(0.05 mg/L)。

(2) 油膜会造成渔业资源损失，油膜消失后，悬浮颗粒态和乳化态石油在岸滩等因素影响下会形成凝聚态石油，并对潮间带生物造成影响。根据《山东省海洋生态损害赔偿和损失补偿评估方法》(DB37/T1448-2009)，经评估，在油膜扫海区域及受影响潮间带范围内，事故经济损失合计为 631.9 万元。本

研究对数值模型方法在溢油事故天然渔业资源损失评估中的应用方面做了有益尝试, 为评估无现场观测数据支撑的海洋溢油事故所造成的天然渔业资源损失, 提供了一个可行的方法。

参 考 文 献

- 王修林, 李克强. 渤海主要化学污染物海洋环境容量. 北京: 科学出版社, 2006, 237-250, 265-278
- 龙绍桥, 娄安刚, 谭海涛, 等. 海上溢油粒子追踪预测模型中的两种数值方法比较. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2006, 36(Sup.): 157-162
- 刘文全, 贾永刚, 卢芳. 渤海石油平台溢油生态环境损害评估系统开发研究. 海洋环境科学, 2011, 30(5): 673-676, 685
- 刘钦政, 张存智, 刘煜, 等. 渤海溢油数值预报研究. 海洋预报, 2005, 22(Supplement): 70-76
- 许文彬. 福州港福泰码头海上溢油事故影响预测. 福建水产, 2011, 33(2): 44-49
- 牟林, 邹和平, 武双全, 等. 海上溢油数值模型研究进展. 海洋通报, 2011, 30(4): 473-480
- 李克强, 王修林, 石晓勇, 等. 石油烃在胶州湾多介质中迁移-转化模型研究. 海洋环境科学, 2009, 28(1): 12-16
- 李克强, 王修林, 阎菊, 等. 胶州湾石油烃污染物环境容量计算. 海洋环境科学, 2003, 22(4): 13-17
- 余加艾, 张波, 陈伟斌, 等. 渤海结冰海区溢油行为数值模拟. 海洋与湖沼, 1999, 30(5): 552-557
- 宋泽坤, 程和琴, 刘昌兴, 等. 长江口溢油数值模拟及对水源地影响. 长江流域资源与环境, 2013, 22(8): 1055-1063
- 张存智, 窦振兴, 韩康, 等. 三维溢油动态预报模式. 海洋环境科学, 1997, 16(1): 22-39
- 张珞平, 王隆发, 吴瑜端. 河口港湾海水中石油烃的自然风化模式. 海洋学报(中文版), 1988, 10(1): 117-121
- 国家海洋局. 蓬莱 19-3 油田溢油事故联合调查组关于事故调查处理报告. 2012. http://www.soa.gov.cn/xw/hyyw_90/201211/t20121109_884.html
- 赵亮, 魏皓, 冯士筭. 渤海氮磷营养盐的循环和收支. 环境科学, 2002, 23(1): 78-81
- 娄安刚, 奚盘根, 黄祖珂, 等. 海面溢油轨迹的分析与预报. 青岛海洋大学学报, 1994, 24(4): 477-484
- 娄厦, 刘曙光. 溢油模型理论及研究综述. 环境科学与管理, 2008, 33(10): 33-37, 61
- 郭良波, 江文胜, 李凤岐, 等. 渤海 COD 与石油烃环境容量计算. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2007, 37(2): 310-316
- 黄成, 赵利平, 肖剑. 广西近海溢油扩散数值模拟. 水道港口, 2013, 34(2): 174-179
- 焦俊超, 马安青, 娄安刚, 等. GIS 和 Google Earth 开发在溢油预测中的整合应用. 遥感技术与应用, 2011, 26(2): 215-219
- 廖国祥, 高振会, 熊德琪. 水下油气溢漏事故污染物输移预测模型. 大连海事大学学报, 2010, 36(4): 115-120
- Azevedo A, Oliveira A, Fortunato AB, *et al.* Application of an Eulerian-Lagrangian oil spill modeling system to the Prestige accident: trajectory analysis. J Coastal Res, 2009(SI 56): 777-781
- Backhaus JO. A three-dimensional model for the simulation of shelf sea dynamics. Deutsche Hydrografische Zeitschrift, 1985, 38(4): 165-187
- Backhaus, JO. A semi-implicit scheme for the shallow water equations for application to shelf sea modeling. Cont Shelf Res, 1983, 2(4): 243-254
- Badri, MA, Azimian, AR. Oil spill model based on the kelvin wave theory and artificial wind field for the Persian Gulf. Indian J Mar Sci, 2010, 39(2): 165-181
- Berry A, Dabrowski T, Lyons K. The oil spill model OILTRANS and its application to the Celtic Sea. Mar Pollut Bull, 2012, 64(11): 2489-2501
- Chen F, Yapa PD. Three-dimensional visualization of multi-phase (oil/gas/hydrate) plumes. Environ Modell Softw, 2004, 19(7-8): 751-760
- Deng Z, Yu T, Jiang X, *et al.* Bohai Sea oil spill model: a numerical case study. Mar Geophys Res, 2013, 34(2): 115-125
- Helle I, Ahtiainen H, Luoma E, *et al.* A probabilistic approach for a cost-benefit analysis of oil spill management under uncertainty: A Bayesian network model for the Gulf of Finland. J Environ Manage, 2015, 158: 122-132
- Li Y, Zhu J, Wang H. The impact of different vertical diffusion schemes in a three-dimensional oil spill model in the Bohai Sea. Adv Atmos Sci, 2013, 30(6): 1569-1586
- Nelson JR, Grubestic TH, Sim L, *et al.* Approach for assessing coastal vulnerability to oil spills for prevention and readiness using GIS and the Blowout and Spill Occurrence Model. Ocean Coast Manage, 2015, 112: 1-11
- Nepstad R, Størdal IF, Brønner U, *et al.* Modeling filtration of dispersed crude oil droplets by the copepod *Calanus finmarchicus*. Mar Environ Res, 2015, 105: 1-7
- Zhao X, Wang X, Shi X, *et al.* Environmental capacity of chemical oxygen demand in the Bohai Sea: modeling and calculation. CJOL, 2011, 29(1): 46-52

(编辑 马瑾艳)

Evaluation of the Natural Fishery Resources Loss Caused by an Oil Spill Accident in the Central Bohai Sea Based on Euler-Lagrange Method

DING Dongsheng, MA Shaosai, CHEN Bijuan, CUI Zhengguo, ZHAO Jun,
LIU Chuanxia, ZHANG Xuzhi, QU Keming^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)

Abstract In recent years, marine oil spill accidents occurred frequently, which has become a major concern on the marine environment and biological resources. To better understand the aftermath of an oil spill in a ship collision accident in the central Bohai Sea, here we modeled the floating and diffusion of oil film as well as the distribution of dissolved oil (petroleum hydrocarbon) using Euler-Lagrange method. The size of affected area and loss of fishery resources were also evaluated based on this model. We found that the volume of spilled oil was about 13,000 L, and the oil film lasted for 72 hours. The sea area affected by accumulated floating oil was about 69.19 km². As the film broke down, oil droplets could be dissolved in the seawater in the form of emulsified and suspended particulate, and diffused to the coastal in 11 days, although the water quality would still meet the standard for fisheries. The oil film resulted in reduced fisheries resources, and the emulsified and suspended particulate could re-condense at the coast, which would harm the intertidal benthos. The affected area was determined based on the model and the length of coastline. It was estimated that the total economic loss in the oil film zone and the intertidal coastal zone was ¥ 6.319 million. Our study demonstrated that the numerical model, especially in the absence of observed data, could be a valuable tool in evaluating the change in natural fishery resources caused by oil spill accidents.

Key words Euler-Lagrange method; Oil spill accident; Loss evaluation of the natural fishery resources

① Corresponding author: QU Keming, E-mail: qukm@ysfri.ac.cn

渤海中部 COD 的时空分布特征及其对富营养化的贡献分析*



张 艳 李秋芬 赵 俊 崔正国 周明莹 朱建新
丁东生 过 锋 刘传霞 曲克明^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)

摘要 以 2013 年春、夏、秋、冬 4 个季节对渤海中部海区的调查数据为依据,对调查海域表、中、底层水体的化学耗氧量(Chemical oxygen demand, COD)的时空分布、来源及其对富营养化的贡献等进行了分析。结果显示,调查海域 COD 平均含量以夏季最高,秋季次之,春季最低。垂直分布差异表现为春季表层最高,中层最低;夏季表层最高,底层最低;秋季和冬季均为中层最高,底层最低。各站位 COD 平均浓度水平分布在春季无明显的高值出现,含量分布较均匀,夏季 COD 从西向东呈降低趋势,高值主要分布于西部海域;秋季和冬季 COD 从北向南呈递减趋势,高值分布于调查海域北部。调查海域各站位营养指数 E 值变化范围为 0.088–2.995,平均值为 0.337 ± 0.403 ,大于 1 的站位有 25 个,其中,秋季 20 个,冬季 5 个,表明大部分调查海域水质未达到富营养化状态,处于较低营养水平。COD 对调查海域富营养化的贡献率为 46.15%–141.41%,平均值为 $(71.36 \pm 14.98)\%$,表明 COD 在渤海海区富营养化中占据了主要地位。

关键词 渤海; COD; 分布特征; 富营养化贡献

中图分类号 X145 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)04-0043-06

渤海是一个半封闭型海域,水体交换能力差,环境容纳量有限。周边区域工农业较发达,城市人口密集,大量的陆源污染物直接入海,导致海域污染日益严重。据《2008 年渤海海洋环境质量公报》(国家海洋局, 2009)的数据显示,渤海沿岸实时监测的陆源入海排污口有 100 个左右,超标排放现象严重,导致其邻近海域生态环境有所恶化,海水受到不同程度污染。

有机物是海洋中一类重要的污染物质,人们通常将化学耗氧量(Chemical oxygen demand, COD)等作为表征水体中有机物含量的有效指标,来间接反映水体中有机物污染程度, COD 值越大,说明水体中有机物污染越严重(Kawabe *et al.*, 1997)。化学耗氧有机物

是可能引起海水富营养化的重要因子,它可以为海洋浮游植物生长提供碳源,直接促进浮游植物生长,因而, COD 与赤潮之间也存在密切的联系(王颢等, 2008)。因此,有必要对整个渤海海区的 COD 含量分布、影响因素及其对海水富营养化的贡献进行深入研究,从而为渤海发生富营养化、有害赤潮等海洋生态环境问题的预警和防治提供必要的科学依据。

本研究依托于农业部溢油专项课题,以 2013 年春、夏、秋、冬 4 个季节对渤海中部海区的调查数据为依据,对表、中、底层水体中 COD 含量在海域中的水平分布及随季节的变化特征,与其他环境因子的关系及对富营养化的贡献等进行了探讨,以期了解

*农业部溢油专项“渤海生态环境监测评估”(农办渔【2012】117号)和“应对溢油关键技术专项研究”(2012-NZ-5739)共同资助。张 艳, E-mail: yanzhang@ysfri.ac.cn

^①通讯作者: 曲克明, 研究员, E-mail: qukm@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-05-26, 收修改稿日期: 2015-08-27

当前渤海的有机污染情况,解决富营养化等问题等提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集及分析

2013年春季(5月13-15日)、夏季(7月31日-8月2日)、秋季(11月1-6日)、冬季(11月30日-12月5日)对渤海中部海域生态环境进行了4个航次的跟踪调查。设置调查站位41个(图1)。采集水样深度包括表层、10 m层和底层;5、7月采集水样41个,11、12月采集水样40个;采集的水样装入2.5 L塑料桶中,带回实验室进行分析。

COD测定方法参照《海洋监测规范》(GB12378.4-2007)中的碱性高锰酸钾法;无机氮(IN)为亚硝酸氮、硝酸氮和氨氮含量的总和,3种形态氮的测定方法分别参照《海洋监测规范》(GB12378.4-2007)中的萘乙二胺分光光度法、锌-镉还原法和次溴酸盐氧化法;活性磷酸盐(IP)测定方法参照《海洋监测规范》(GB12378.4-2007)中的磷钼蓝分光光度法;水温、盐度采用YSI水质分析仪测定。

1.2 评价方法

1.2.1 COD 污染评价 COD 污染评价通常采用周爱国等(1998)提出的单因子污染指数(P_i)法,其计算公式如下:

$$P_i = \frac{C_i}{S_i} \quad (1)$$

式中, C_i 和 S_i 分别为COD实测数据和评价标准值,COD评价标准值参考《海水水质标准》(GB3097-2002)I类要求($COD \leq 2 \text{ mg/L}$)进行评价。当 $P_i > 1$ 时,视为超标准,水质已经受到污染;当 $P_i \leq 1$ 时,表明水质未受到污染,水体受污染程度随 P_i 值的增大而加重。

1.2.2 营养指数(E)值 目前,广泛应用于中国近岸海域富营养化现状评价的方法为冈市友利(1972)提出的营养指数(E)法。其计算公式为:

$$E = \frac{IN(\mu\text{g/L}) \times IP(\mu\text{g/L}) \times COD(\text{mg/L})}{4500} \quad (2)$$

式中, E 为营养指数,IN为无机氮,IP为无机磷,COD为化学耗氧量。

当 $E \leq 1$ 时,为贫营养;当 $E > 1$ 时,为富营养; E 值越高,富营养化程度越严重。

1.2.3 COD 对富营养化贡献 根据杨斌等(2014)营养指数(E)计算公式进行改进并提出COD对富营养化贡献计算公式进行计算:

$$E_{\text{COD}}(\%) = \frac{\lg 100 C_{\text{COD}}}{\lg 4500 E} \times 100\% \quad (3)$$

式中, C_{COD} 为化学耗氧量浓度含量。

1.2.4 数据处理 COD限量标准参考《海水水质标准》I类要求($\leq 2.0 \text{ mg/L}$)。

1.2.5 统计分析 采用Surfer8.0软件绘制COD水

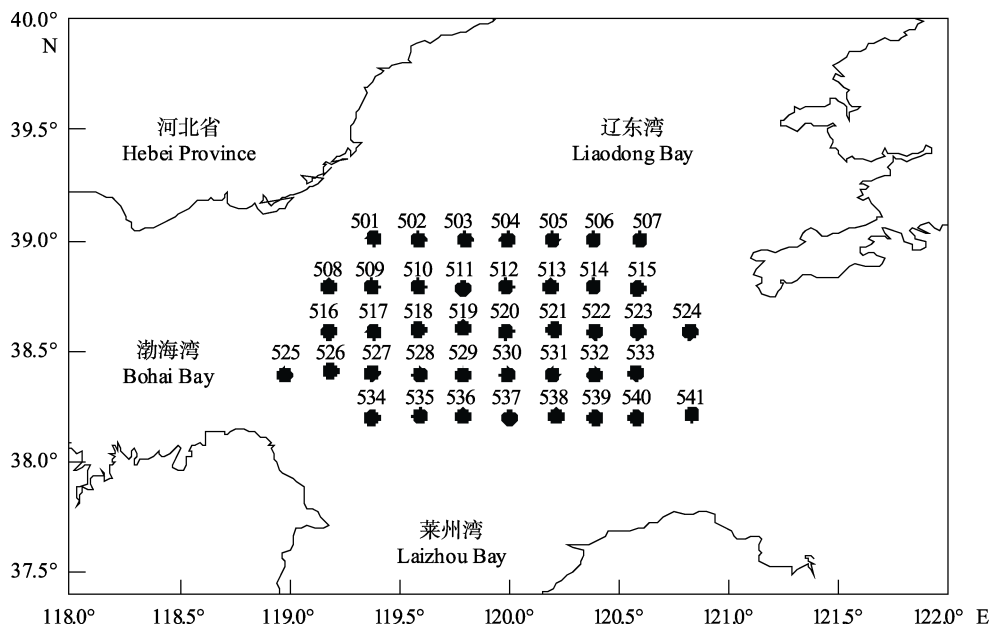


图1 调查区域和站位分布

Fig.1 Sampling stations in the Bohai Sea

平分布图。采用 SPSS13.0 进行显著性及相关性分析。

2 结果与分析

2.1 COD 的水平分布特征

调查结果表明(图 2), 春季各站位 COD 平均含量较低, 调查海域分布较均匀, 无明显高值出现; 夏季 COD 高值主要分布于西部海域靠近渤海湾口附近, 从西向东呈递减的变化趋势; 秋季和冬季 COD 高值主要分布于北部海域, 靠近辽东湾口附近, 南部海域含量较低, COD 从北向南呈递减趋势。从以上结果可以看出, 不同季节 COD 浓度梯度有一定的差异, 其中, 春季调查海区各站位无明显浓度差异, 夏季 COD 含量从西向东呈降低趋势, 而秋季和冬季则是从北向南呈降低趋势。其共同点是在湾口即渤海湾口和辽东湾口附近, COD 含量偏高, 原因可能与地表径流有关, 渤海湾口和辽东湾口附近工业废水和生活污水入海较多, 大量的有机质导致湾口附近海域 COD 含量较高。

2.2 COD 的空间分布特征

2013 年渤海中部水体中 COD 变化范围为 0.37-

1.59 mg/L, 所有站位 COD 含量符合《海水水质标准》I 类要求(≤ 2.0 mg/L)。从图 3 可以看出, 在 4 个季节中, 夏季 COD 含量最高, 其次为秋季, 春季含量最低。COD 垂直分布结果显示, 春季表层 COD 含量最高, 中层最低; 夏季为表层最高, 底层含量最低; 秋季和冬季为中层最高, 底层最低。*T* 检验结果显示, 除夏季中层和底层及表层和底层水体 COD 含量有显著性差异外($P < 0.05$), 其余季节水层之间 COD 含量无显著性差异。

2.3 渤海中部 COD 污染评价结果

从图 4 可以看出, 该调查海域 COD 单因子污染指数(P_i)夏季最高, 其次为秋季, 春季最低。各站位污染指数变化范围为 0.11-1.40, 平均值为 0.53 ± 0.21 。其中, 春季各站位 COD 污染指数范围为 0.18-0.80, 平均值为 0.36 ± 0.11 ; 夏季 COD 污染指数范围为 0.24-1.05, 平均值为 0.63 ± 0.15 ; 秋季 COD 污染指数范围为 0.11-1.40, 平均值为 0.59 ± 0.26 ; 冬季 COD 污染指数范围为 0.24-1.10, 平均值为 0.54 ± 0.16 。在调查中, 个别站位如夏季 502 站表层, 秋季 513 站表层、中层, 514 站底层, 冬季底层的 COD 污染指数大于 1, 说明这些调查站位所

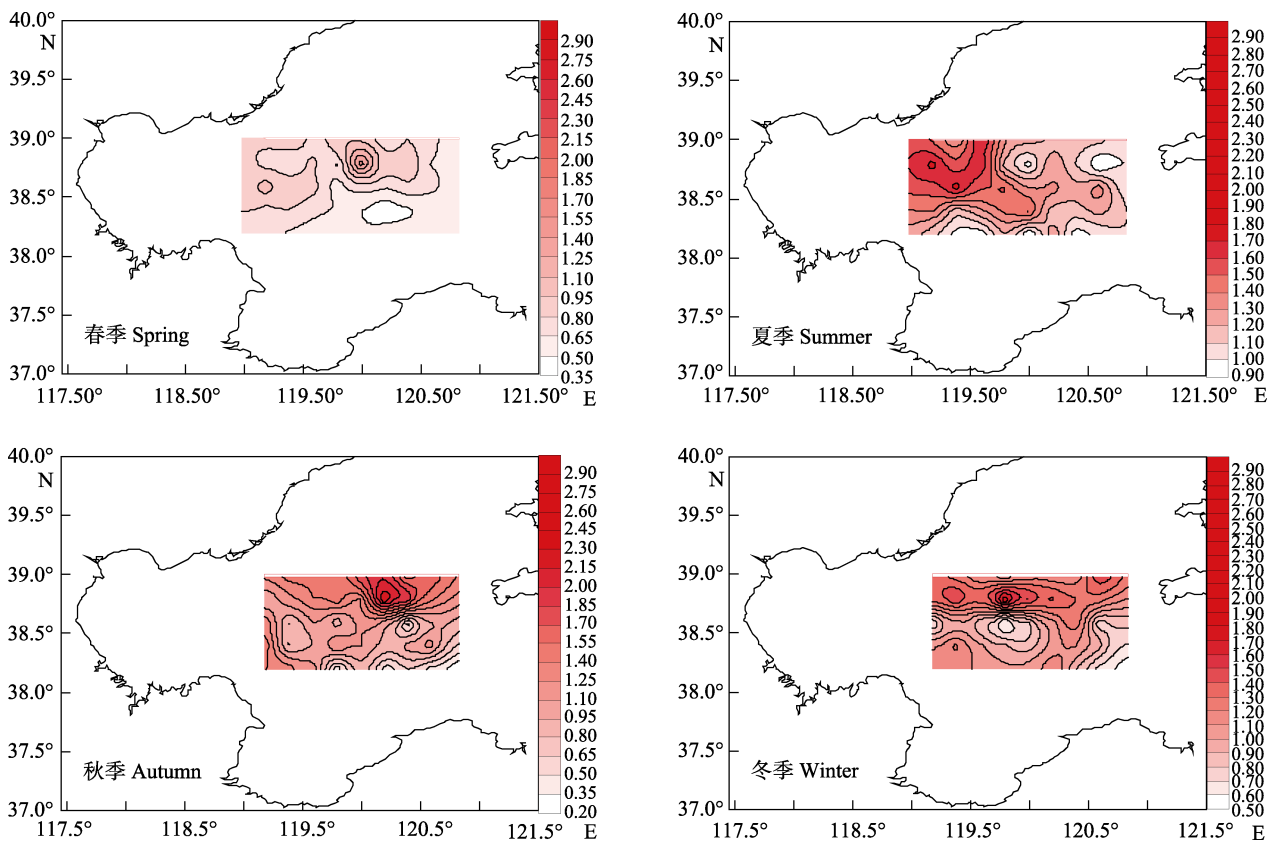


图 2 渤海中部海域 COD 平面分布

Fig.2 The horizontal distribution of COD in different seasons in the central Bohai Sea

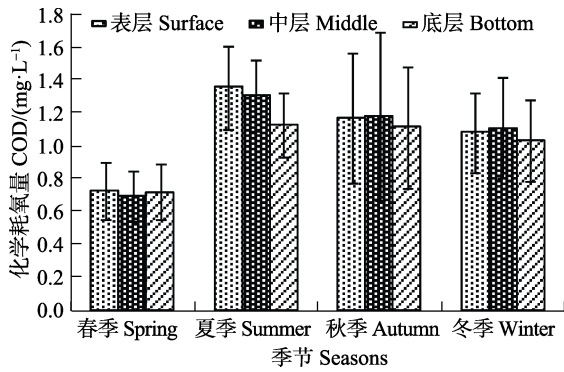


图3 渤海中部海域水体中 COD 含量变化
Fig.3 The content of COD in the central Bohai Sea

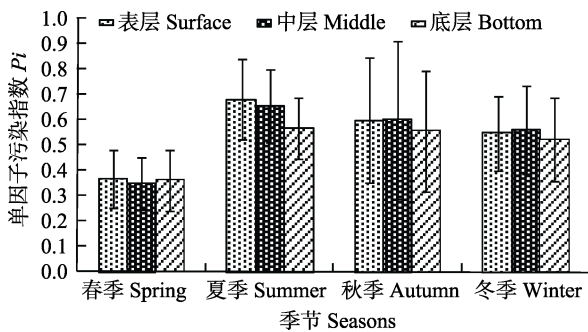


图4 渤海中部海域 COD 单因子污染指数(P_i)
Fig.4 The pollution indexes of COD in the central Bohai Sea
在海域已经受到有机物的污染。

2.4 营养指数 E 值结果

从图5可以看出,秋季水体中 E 值平均值最高,其次为冬季,夏季最低。渤海中部海域各调查站位水体营养指数 E 值变化范围为0.088–2.995,平均值为 0.337 ± 0.403 。其中,春季 E 值变化范围为0.005–0.620,平均值为 0.096 ± 0.110 ;夏季 E 值变化范围为0.012–0.292,平均值为 0.082 ± 0.050 ;秋季 E 值变化范围为0.045–2.995,平均值为 0.710 ± 0.548 ;冬季 E 值变化范围为0.117–1.559,平均值为 0.475 ± 0.250 。

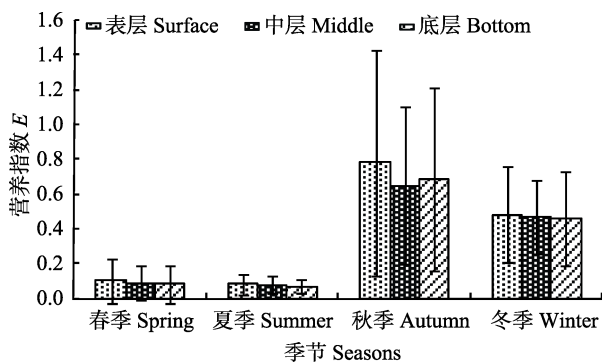


图5 渤海中部海域水体中营养指数比较
Fig.5 The variation of E value of COD in the central Bohai Sea

从调查结果可以看出,春季和夏季各调查站位 E 值均 <1 ,表明该调查海域无富营养化现象出现;秋季和冬季水质状况略差,有部分站位的 E 值 >1 ,有富营养化现象出现。其中,秋季 E 值 >1 的站位表层有15个、中层8个、底层9个;冬季 E 值 >1 的站位表层有3个、中层和底层均为1个。

2.5 COD 对富营养化的贡献

从图6可以看出,水体中COD对富营养化的贡献率夏季最高,春季次之,秋季最低。渤海中部海域各调查站位COD对富营养化的贡献 E_{COD} 变化范围为46.15%–141.41%,平均值为 $(71.36 \pm 14.98)\%$ 。其中,春季贡献率范围为49.79%–141.41%,平均值为 $(78.80 \pm 17.25)\%$;夏季贡献率范围为65.62%–123.82%,平均值为 $(84.86 \pm 9.27)\%$;秋季贡献率范围为46.15%–79.95%,平均值为 $(59.61 \pm 4.75)\%$;冬季贡献率范围为51.57%–75.89%,平均值为 $(61.58 \pm 4.11)\%$ 。

春季COD贡献率为底层 $>$ 中层 $>$ 表层;夏季为中层 $>$ 表层 $>$ 底层,秋季为表层 $>$ 中层 $>$ 底层,冬季为中层 $>$ 底层 $>$ 表层,各层海水富营养化贡献率无显著性差异($P > 0.05$)。

COD对富营养化贡献率与营养指数进行相关性分析,相关系数为 -0.954 ,二者之间存在显著的负相关性,从而表明COD对富营养化贡献率随着营养指数升高而降低。

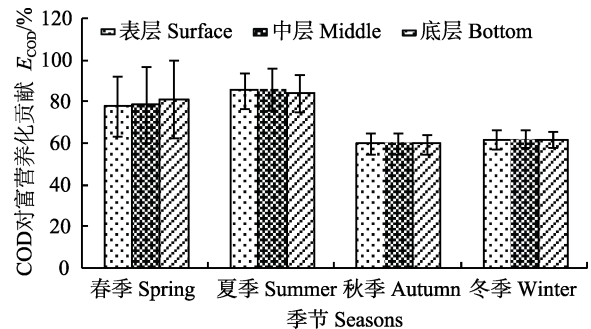


图6 渤海中部海域水体中 COD 对富营养化的贡献
Fig.6 The contribution of COD to the eutrophication in the central Bohai Sea

2.6 影响 COD 分布的主要环境因子

对COD与温度、盐度、DO、pH、无机氮、活性磷酸盐和石油类等指标进行相关性分析。结果表明,在上述因子中,温度、盐度和DO与水体中COD呈明显的相关关系,其中,温度与COD具有显著正相关,盐度和DO与COD具有显著负相关;另外,无机氮与COD有一定的正相关性,表明COD与无机氮具有一定的同源性,其余因子无明显相关性。具体相关系数见表1。

表 1 COD 与环境因子的相关关系

Tab.1 The correlation of COD content and the environmental factors ($n=41$)

水层 Layers	温度 Temperature(°C)	盐度 Salinity	DO(mg/L)	pH	DIP(mg/L)	DIN(mg/L)	石油类 Oil(mg/L)
表层 Surface	0.807	-1.00	-0.713	0.047	-0.051	0.306	0.087
中层 Middle	0.865	-0.97	-0.797	-0.547	0.025	0.566	0.116
底层 Bottom	0.861	-0.99	-0.741	-0.797	0.261	0.789	-0.526

3 讨论

3.1 COD 含量影响因素

渤海中部海域 COD 与盐度之间的相关分析显示, 水体中 COD 含量与盐度之间存在显著负相关性, 表明陆源排放及陆地河流输入对该调查海域 COD 分布具有重要影响, 该结果与杨斌等(2014)和杨美兰等(2005)研究一致。另外, 在 COD 水平分布方面, 调查海域西部和北部靠近滦河和辽河入海口, 夏季和秋季 COD 含量较高, 这也说明 COD 分布受陆源排放的影响。

COD 作为陆源排海的主要污染物之一, 主要来自排海量大、处理率低的沿岸工农业废水和生活污水(蓝文陆等, 2012)。渤海沿岸工业发达, 人口密集, 京津唐工业区更是位于渤海的西北部区域, 工业废水入海量较大; 另外, 在渤海西北部区域, 海河和滦河自此入海, 夏季、秋季多雨季节, 会携带了大量的有机污染物入海, 导致海水中的 COD 含量增加(李立青等, 2009; 袁宇等, 2008; 胡敦欣等, 2001; Shen, 1993)。王修林等(2009)研究发现, 渤海 COD 主要来源于陆源, 即河流、排污口和面源, 三者共占入海总通量的 72.3%, 河流所占的比例最大, 平均可占陆源排放的 80.2%, 说明渤海 COD 排海总量主要来源于以入海河流为主的陆源排放。

除了陆源排放外, COD 含量与温度也有一定的关系。本研究结果显示, COD 与水温之间存在一定的正相关性, 说明 COD 含量变化受温度的影响较大, 在高温季节, 如夏季和秋季, COD 含量较高, 在温度较低的春季和冬季, COD 含量较低。分析原因可能是由于水温较高, 浮游植物腐烂降解时引起水体中的化学耗氧有机物含量增加(张艳等, 2012; 张运林等, 2008)。

3.2 COD 污染及其对富营养化的贡献

随着渤海周边区域经济的高速发展, 每年排入海中的有机污染物逐年增加(杨树珍, 1997)。过多的有机物和营养盐超过了水体的自净能力, 导致海水富营

养化现象出现。在本研究中, 调查海域 COD 对富营养化的贡献平均值为(71.36±14.98)%, 说明造成渤海海域富营养化的主要原因是 COD。这与郭全等(2005)和苏一兵等(2003)认为造成渤海海区富营养化的主要原因是氮和磷而不是 COD 的结论不同。本研究发现, 2013 年渤海中部海域有机污染要高于往年, 这也说明化学好氧有机物已经成为主要污染因素之一。

COD 对富营养化的贡献值与营养指数 E 值相比较可以看出, 夏季 E 值最低, 这可能是由于浮游植物大量生长, 消耗了无机氮和无机磷, 因此, COD 对富营养化的贡献最高; 而秋季虽然 E 值最高, 但 COD 对富营养化的贡献率却最低。这表明在水体富营养化程度较低时, COD 对其贡献较大, 而当富营养化程度加重时, 来自营养盐的贡献更为突出。这也说明 COD 是影响海域富营养化的重要因素, 但并非决定性因子, 单纯的有机物污染加重, 并不能使海水的富营养程度加重, 只有营养盐含量也增加时, 才会导致严重富营养化。

4 结论

4.1 渤海 COD 含量夏季最高, 其次为秋季, 春季含量最低; 水平分布及垂直分布之间均有一定的差异, 同时还有一定的季节差异。

4.2 COD 单因子污染指数(P_i)夏季最高, 其次为秋季, 春季最低; 夏季、秋季和冬季各有 1 个调查站位 $P_i > 1$, 其所在海域已经受到有机物的污染。

4.3 渤海水体营养指数 E 值秋季最高, 其次为冬季, 夏季最低; 秋季和冬季有部分站位的 E 值 > 1 , 有富营养化现象出现。

4.4 水体中 COD 对富营养化的贡献率夏季最高, 秋季最低, 贡献率随着营养指数 E 值的升高而降低。

参 考 文 献

- 冈市友利. 浅海的污染与赤潮发生—内湾赤潮的发生机制. 日本水产资源保护协会, 1972, 58-72
- 王颖, 石晓勇, 张传松, 等. 2004 年春季东海赤潮高发区 COD 及其与赤潮关系的初步研究. 海洋科学, 2008, 32(12): 82-86

- 王修林, 崔正国, 李志强, 等. 渤海 COD 入海通量估算及其分配容量优化研究. 海洋环境科学, 2009, 28(5): 497-500
- 苏一兵, 雷坤, 孟伟. 陆域活动对渤海海岸带的影响. 中国水利, 2003(3B): 75-80
- 李立青, 尹澄清. 雨、污合流制城区降雨径流污染的迁移转化过程与来源研究. 环境科学, 2009, 30(2): 368-375
- 张艳, 李秋芬, 孙雪梅, 等. 浒苔腐烂过程中水体细菌群落结构变化的 PCR-DGGE 分析. 中国水产科学, 2012, 19(5): 872-880
- 张运林, 杨龙元, 秦伯强, 等. 太湖北部湖区 COD 浓度空间分布及与其它要素的相关性研究. 环境科学, 2008, 29(6): 1457-1462
- 杨斌, 钟秋平, 鲁栋梁, 等. 钦州湾海域 COD 时空分布及对富营养化贡献分析. 海洋科学, 2014, 38(3): 20-25
- 杨美兰, 林钦, 黄洪辉, 等. 珠江口水域化学耗氧量(COD)的分布特征. 海洋通报, 2005, 24(4): 22-26
- 杨树珍. 渤、黄海海域环境不容乐观. 海洋信息, 1997(1): 27-28
- 周爱国, 蔡鹤生. 地质环境质量评价理论与应用. 武汉: 地质大学出版社, 1998
- 胡敦欣, 韩舞鹰, 章申. 长江、珠江口及邻近海域陆海相互作用. 北京: 海洋出版社, 2001, 10-14
- 袁宇, 朱京海, 侯永顺, 等. 辽东湾入海污染物调查及海域水质安全分析. 中国安全科学学报, 2008, 18(2): 12-16
- 郭全, 王修林, 韩秀荣, 等. 渤海海区 COD 分布及对海水富营养化贡献分析. 海洋科学, 2005, 29(9): 71-75
- 国家海洋局. 2008 年渤海海洋环境质量公报. 2009
- 蓝文陆, 杨绍美, 苏伟. 环钦州湾河流入海污染物通量及其对海水生态环境的影响. 广西科学, 2012, 19(3): 257-262
- Kawabe M, Kawabe M. Factors determining chemical oxygen demand in Tokyo Bay. J Oceanogr, 1997, 53(5): 443-453
- Shen ZL. A study on the relationships of the nutrients near the Changjiang River Estuary with the flow of the Changjiang River water. Chin J Oceanol Limnol, 1993, 11(3): 260-267

(编辑 陈严)

Temporal and Spatial Distribution of COD and Its Source and Contribution to Eutrophication in the Central Bohai Sea

ZHANG Yan, LI Qiufen, ZHAO Jun, CUI Zhengguo, ZHOU Mingying, ZHU Jianxin, DING Dongsheng, GUO Feng, LIU Chuanxia, QU Keming^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)

Abstract The temporal and spatial distribution of chemical oxygen demand (COD) in different water layers, and its source and contribution to eutrophication were analyzed in this study based on data collected in the Bohai Sea in all 4 seasons of 2013. The results showed that the highest average concentration of COD appeared in summer, followed by autumn; while the lowest concentration appeared in spring. The analysis about vertical distribution of COD showed that the highest and lowest concentrations of COD appeared in the surface and middle layers in spring, and they appeared in the surface and bottom layers respectively in summer; in autumn and winter they were observed in the middle and bottom layers. As for the horizontal distribution the average COD concentration was distributed quite evenly in spring; in summer COD concentration was the highest in the western sea area and displayed a gradual decrease from the west to the east; in winter the highest concentration was detected in the northern area and it dropped from the north to the south. During the survey period, the COD level in most stations met the first-class seawater quality standard. The *E* value ranged from 0.088 to 2.995, and the average was 0.337 ± 0.403 . There were 25 stations in which the *E* values were above 1, including 20 stations in autumn and 5 stations in winter. These results indicated that the surveyed regions might not undergo eutrophication. The contribution of COD to eutrophication ranged from 46.15% to 141.41%, and the average was $(71.36 \pm 14.98)\%$, which suggested that COD played an important role in the eutrophication of the Bohai Sea.

Key words The Bohai Sea; COD; Distribution characteristics; Contribution to eutrophication

① Corresponding author: QU Keming, E-mail: qukm@ysfri.ac.cn

渤海中部海域沉积物中 Hg 的校正 及其空间分布特征*

杨茜 夏斌 杨庶 孙耀 周明莹 朱建新
过锋 刘传霞 曲克明 赵俊 崔正国^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)

摘要 以 2013 年 5 月从渤海采集到的表层沉积物及水样为研究对象,对渤海中部海域汞(Hg)的空间分布规律进行分析。结果显示,沉积物中, Hg 的含量为 $(1.058-9.256) \times 10^{-3}$ mg/kg, 平均值为 4.781×10^{-3} mg/kg; 水体中, Hg 的含量为 0.005-0.240 $\mu\text{g/L}$, 平均值为 0.090 $\mu\text{g/L}$ 。由于沉积物的粒度组成是影响重金属元素沉积中最显著的影响因素之一,故本研究采用归一化法对 Hg 的“粒度效应”进行校正,并以水体中的 Hg 作为参照与校正结果进行对比,来分析沉积物中的 Hg 对周边环境造成的影响。将校正后沉积物与水体中的 Hg 进行相关性分析,二者相关性显著($R=0.634, P<0.001, n=29$)。推测,水体中的 Hg 主要来自于沉积物中 Hg 的释放。由此可见,这种“二次污染”会对周边环境造成长期的危害,在治理的过程中需要引起重视。

关键词 渤海; 沉积物; 水体; 汞; 二次污染

中图分类号 X824 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)04-0049-05

渤海是我国唯一的半封闭型内海,该海域的产卵场、育幼场和渔场集中,素有“黄渤海渔业资源摇篮”之称。自“环渤海经济圈发展战略”确立以来,环渤海经济的高速发展和渤海海洋开发活动的持续加强,导致渤海所承受的环境压力不断加重(高之国, 2011; 李永琪, 2012)。重金属元素作为近海主要的污染物,其污染水平的变化是衡量环境变化的一项重要指标。汞(Hg)作为一种持久性污染物,具有累积性效应(Bing *et al*, 2013),能通过物理、化学或生物的途径在水相和固相中相互运移,并通过食物链的富集作用危害人类健康。为了保护近岸生态系统和确保食品安全,对我国近岸陆架海域 Hg 的空间变化进行系统的研究非常重要(Fang *et al*, 2009; Sun *et al*, 2012; 郭福星等, 2011; Sheng *et al*, 2013)。沉积物常被看作

是海洋环境中 Hg 的主要储库(Udayakumar *et al*, 2014),其中的 Hg 受粒度影响较大(张志锋等, 2013)。Ackermann 等(1983)研究显示,多数重金属污染物主要富集于 20 μm 以下的沉积物中。本研究利用粒度指标对表层沉积物中的 Hg 进行校正,并讨论 Hg 在沉积物中的分布特点及对周边环境造成的影响。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2013 年 5 月 13-15 日在渤海中部海区(118.61°-120.83°E, 38.20°-39.21°N)进行表层沉积物和水样采集,调查站位见图 1。调查船为海监船只。利用抓斗式采泥器采集沉积物样品,沉积物样品数量为 33 个;

* 农业部溢油专项“渤海生态环境监测与评估”(农办渔[2012]117号)和“应对溢油关键技术专项研究”(2012-NZ-5739)共同资助。杨茜, E-mail: yangqian@ysfri.ac.cn

^① 通讯作者: 崔正国, 副研究员, E-mail: cuizg@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-06-02, 收修改稿日期: 2015-07-02

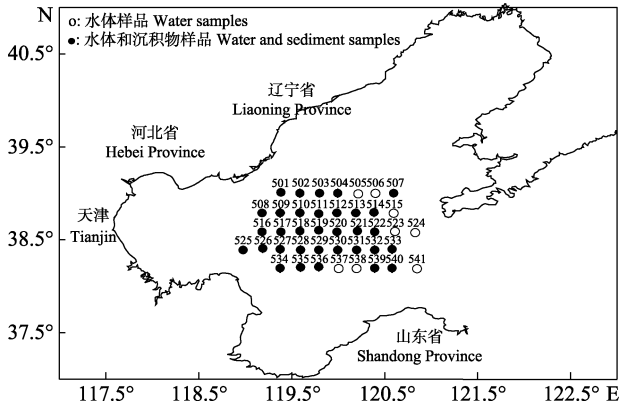


图1 渤海调查站位

Fig.1 Investigated stations in the Bohai Sea

利用采水器取采集水样,水样数量为41个。将沉积物样品和水体样品分别用聚乙烯封口袋和聚乙烯瓶低温保存,随后进行分析。

1.2 实验方法

1.2.1 Hg的分析方法 将沉积物样品经自然风干,研磨过筛后,参照海洋监测规范第5部分(GB17378.5-2007)(2007),于硝酸-盐酸体系中加热消化,Hg以离子态全部进入提取液。

参照海洋监测规范第4部分(GB17378.4-2007)(2007),采用原子荧光法,在 KBH_4 的作用下将水样及沉积物提取液还原,Hg离子被还原成单质Hg。以氩气为载气,将Hg蒸气带入原子荧光光度计的原子

化器中,测定Hg原子荧光强度,检出限为 $0.007 \mu\text{g/L}$ 。

1.2.2 粒度的分析方法 取适量未过筛的沉积物样品,放入50 ml烧杯中,用英国Malvern 2000E型激光粒度仪测定沉积物的粒径分布特征。

1.3 异常值的判别

为最大限度的保证本研究的真实性和可信性,采用Grubbs法来检验测定存在的异常值。

1.4 数据统计与分析

采用Surfer 8.0绘制图片,Excel 2010软件进行相关性分析, $P < 0.001$ 为显著性水平。

2 结果与讨论

2.1 异常值的判别结果

对水样以及沉积物样品中的Hg含量进行Grubbs检验。除沉积物中Hg的测量结果有4个存在异常值外,其他数据的偏差均在允许误差范围内(表1)。

2.2 粒度的平面分布特征

本研究对渤海中部海域沉积物的中值粒度进行分析。如图2所示,研究海域沉积类型复杂,中值粒径为 $7.064\text{--}189.204 \mu\text{m}$ 。从分布趋势看,西北部和东南部海域中值粒径较小,沉积类型以粘土和淤泥为

表1 Hg的浓度异常分析

Tab.1 Analysis of abnormal concentration of Hg element

统计参数 Parametric statistics	分析数据量 Amount of analytical data	异常数据量 Amount of outliers	异常率 Percentage of outliers (%)
Hg-水体Hg in water column	40	0	0
Hg-沉积物Hg in the sediment	33	4	12.1

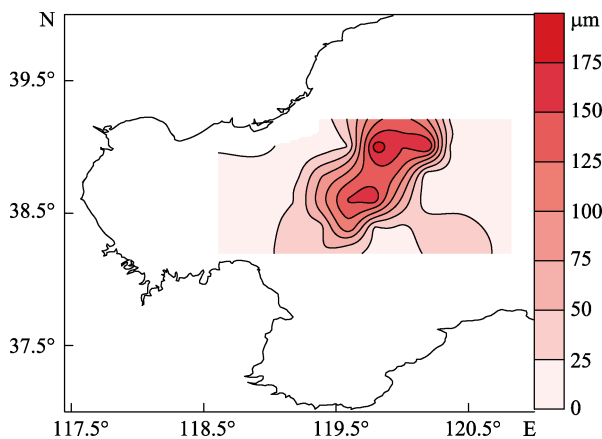


图2 中值粒度的平面分布

Fig.2 Horizontal distribution of the grain size

主;东北部海域中值粒径最大并向西南部沿线过渡,以粗粉砂和细砂为主相贯通,调查区域的东南角,粒度梯度变化明显。

2.3 Hg的平面分布特征

2.3.1 校正前Hg的平面分布特征及影响因素 渤海中部海域,表层沉积物中Hg的含量为 $(1.058\text{--}9.256) \times 10^{-3} \text{ mg/kg}$,平均值为 $4.781 \times 10^{-3} \text{ mg/kg}$ 。从分布趋势看(图3),最高值出现在529站位,而粒度较大的东北部海区,Hg的含量普遍偏低。

2.3.2 校正后Hg的平面分布特征及影响因素 早期研究指出重金属污染物主要富集于中值粒径小于

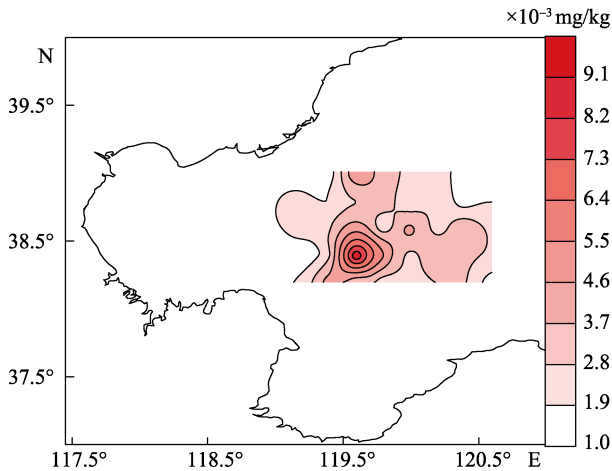


图 3 沉积物中 Hg 的平面分布

Fig.3 Horizontal distribution of Hg in the sediment

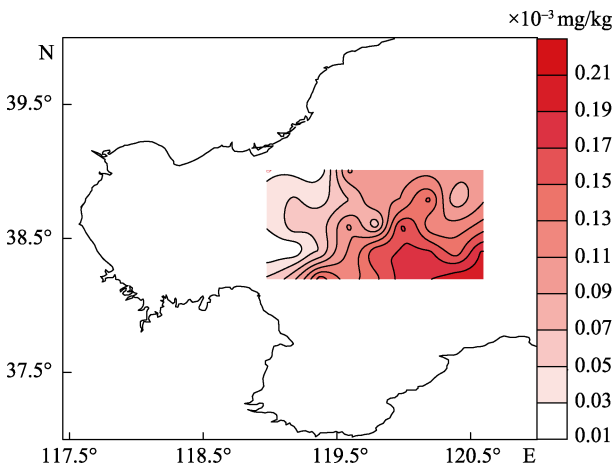


图 4 修正后中值粒径<20 μm 的沉积物中 Hg 的平面分布

Fig.4 Horizontal distribution of normalized Hg concentration in the sediment grains size <20 μm

20 μm 的沉积物中(Ackermann *et al*, 1983), 所以, 本研究对中值粒径小于 20 μm 的沉积物百分含量进行归一化校正。归一化的目的是为了减小沉积物中值粒径改变引起的沉积物中重金属含量的波动, 以确定沉积物中重金属的污染程度。校正后, 每单位中值粒径小于 20 μm 的沉积物中 Hg 的含量为 $(0.015\text{--}0.266)\times 10^{-3}$ mg/kg, 平均含量为 0.111×10^{-3} mg/kg。分布趋势如图 4 所示, 校正后, Hg 的浓度呈现西北低东南高的特点, 该特点与 2009 年渤海污染监测网资料数据(霍素霞, 2011)¹⁾ 显示分布趋势差异明显, 而最大值为 530 站位与

2011 年于 120.09°E, 38.37°N 附近发生过的重大溢油事故相对应(王欣颖, 2013)²⁾。故推测, 渤海中部表层沉积物中的 Hg 主要来源于溢油事故。在溢油事故中, 富含 Hg 的石油因比重大、难溶于水而沉淀于油田附近, Hg²⁺在迁移过程中被悬浮颗粒物吸收, 进而沉降到水底被埋藏保存(Zhang *et al*, 2013; Liu *et al*, 2011), 从而表现出以上的分布趋势。

2.4 沉积物中的 Hg 含量与水体中 Hg 含量的相关性

对渤海中部海域水体中 Hg 的含量进行分析。结果显示, 其含量为 0.0047–0.24 μg/L, 平均值为 0.09 μg/L。有 36 个站位的 Hg 含量超过国家 I 类海水水质标准, 超标率为 87.80%。其中, 位于油田附近的 530 站位 Hg 含量最高(超过 II 类海水水质标准)。Hg 在水体中的分布趋势见图 5。从图 5 可以看出, Hg 的浓度从西北向东南方向呈上升趋势。该分布趋势与修正以后沉积物中 Hg 的浓度分布趋势相近。对水体和沉积物中的 Hg 进行相关性分析, 结果如图 6 所示, 虽然在修正以前二者的相关性不显著($R=0.319$, $P<0.001$, $n=29$), 但是在修正以后二者相关性显著($R=0.634$, $P<0.001$, $n=29$)。由于渤海中部海域水体的平均存留时间为 400–500 d (马倩, 2014)³⁾, 远小于调查时间与溢油事故的间隔, 所以推测水体中的 Hg 并非直接来源于溢油事故。但是, 在溢油事故中赋存于沉积物中的 Hg 可能转化为 Hg²⁺, 并在微生物的作用下转化为 CH₃Hg 和 (CH₃)₂Hg (沈国英等, 2002; Sin *et al*, 2001)。

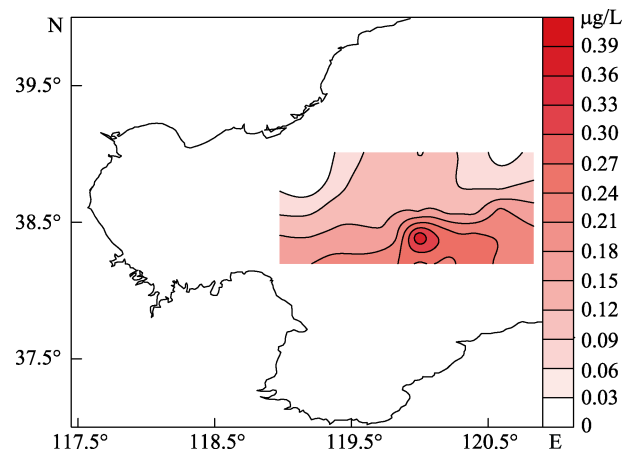


图 5 水体中 Hg 的平面分布

Fig.5 Horizontal distribution of Hg in water column

1) 霍素霞. 渤海沉积物重金属分布特征及生态风险研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2011

2) 王欣颖. 海上石油开发污染损害赔偿法律制度研究——以墨西哥湾溢油事故和渤海湾溢油事故为视角. 内蒙古大学硕士研究生学位论文, 2013

3) 马倩. 大风作用下渤海环流和水交换的数值模拟研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2014

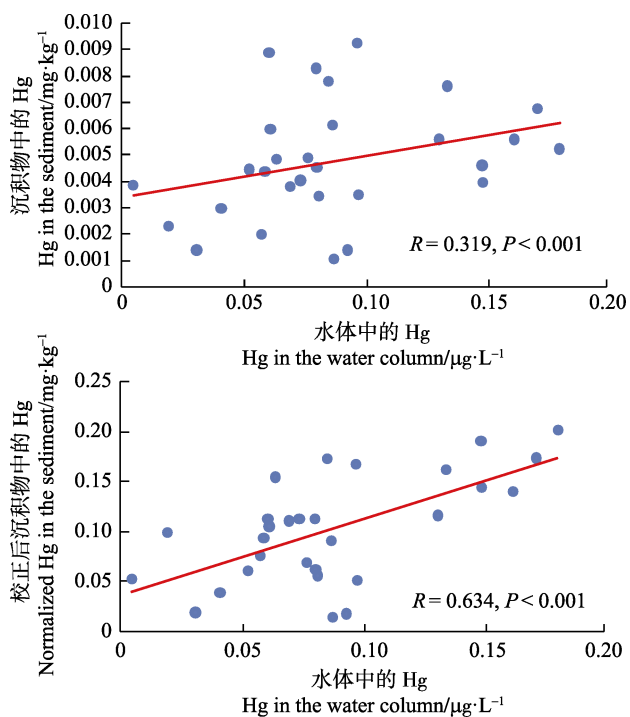


图 6 水体中与沉积物中 Hg 的相关性分析
Fig.6 Linear regression analysis of Hg in water column and sediment

甲基汞可溶于水,并借助春季较为强烈的上升流作用,扩散开来,造成水体“二次污染”(廖永志等,2014)。

3 结论

由于沉积物中 Hg 的含量受粒度影响较大,为得到较为真实的平面分布特征,需要利用粒度数据进行校正。从校正的结果看, Hg 的浓度呈现西北低东南高的特点,最高值附近曾在 2011 年发生过重大溢油事故,推测沉积物中的 Hg 来自于石油污染。将校正后沉积物中 Hg 的平面分布特征与水体中 Hg 的分布特征进行比较,发现二者相关性显著。说明该海域水体中的 Hg 主要来自于沉积物的溶出,即由溢油事故造成的 Hg 污染在短期治理之后仍然会对周边海域造成影响。这种“二次污染”会对周边环境造成长期危害,在治理的过程中需要引起重视。

参 考 文 献

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

- 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 5 部分: 沉积物分析(GB17378.5-2007). 北京: 中国标准化出版社, 2007
- 李永琪. 中国区域海洋学——海洋生态环境学. 北京: 海洋出版社, 2012, 49
- 沈国英, 施并章. 海洋生态学. 北京: 科学出版社, 2002, 387
- 张志锋, 王燕, 韩庚辰, 等. 北部湾沉积物中重金属元素的地球化学特征及物源初探. 海洋学报, 2013, 35(2): 72-81
- 高之国. 中国海洋发展报告. 北京: 海洋出版社, 2011, 311-315
- 郭福星, 吕颂辉, 滕德强, 等. 黄海表层沉积物中重金属的分布特征与生态风险评价. 安徽农业科学, 2011, 39(15): 9212-9216, 9313
- 廖永志, 冯少波, 冯钊, 等. 广西合浦廉州湾贝类养殖区表层沉积物重金属汞和砷污染评价. 南方农业学报, 2014, 45(2): 305-308
- Ackermann F, Bergmann H, Schleichert U. Monitoring of heavy metals in coastal and estuarine sediments: a question of grain size: <20 μm versus <60 μm . Environ Tech Lett, 1983, 4:317-328
- Bing H, Wu Y, Nahm WH, *et al.* Accumulation of heavy metals in the lacustrine sediment of Longgan Lake, middle reaches of Yangtze River, China. Environ Earth Sci, 2013, 69(8): 2679-2689
- Fang TH, Li JY, Feng HM, *et al.* Distribution and contamination of trace metals in surface sediments of the East China Sea. Mar Environ Res, 2009, 68(4), 178-187
- Liu S, Shi X, Liu Y, *et al.* Concentration distribution and assessment of heavy metals in sediments of mud area from inner continental shelf of the East China Sea. Environ Earth Sci, 2011, 64(2): 567-579
- Sheng Y, Sun Q, Bottrell SH, *et al.* Anthropogenic impacts on reduced inorganic sulfur and heavy metals in coastal surface sediments, north Yellow Sea. Environ Earth Sci, 2013, 68(5): 1367-1374
- Sin SN, Chua H, Lo W, *et al.* Assessment of heavy metal cations in sediments of Shing Mun River, Hong Kong. Environ Int, 2001, 26(5-6): 297-301
- Sun QL, Liu DY, Liu T, *et al.* Temporal and spatial distribution of trace metals in sediments from the northern Yellow Sea coast, China: implications for regional anthropogenic processes. Environ Earth Sci, 2012, 66(3): 697-705
- Udayakumar P, Jose JJ, Krishnan KA, *et al.* Heavy metal accumulation in the surficial sediments along southwest coast of India. Environ Earth Sci, 2014, 72(6): 1887-1900
- Zhang R, Zhang F, Ding Y, *et al.* Historical trends in the anthropogenic heavy metal levels in the tidal flat sediments of Lianyungang, China. J Environ Sci, 2013, 25(7): 1458-1468

(编辑 马瑾艳)

Normalization and Spatial Distribution of Mercury in the Sediments and Seawater of the Central Bohai Sea

YANG Qian, XIA Bin, YANG Shu, SUN Yao, ZHOU Mingying, ZHU Jianxin, GUO Feng, LIU Chuanxia, QU Keming, ZHAO Jun, CUI Zhengguo^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)

Abstract To study the spatial distribution of mercury (Hg) in the central Bohai Sea, the surface sediment and the seawater were sampled in the survey in May of 2013. The result showed that the concentration of Hg in the sediment was $(1.058-9.256) \times 10^{-3}$ mg/kg with an average of 4.781×10^{-3} mg/kg. In seawater it varied between 0.005 and 0.240 $\mu\text{g/L}$ with a mean value of 0.090 $\mu\text{g/L}$. According to the national water quality standards (GB3097-1997) the concentration of Hg often failed the first (0.05 $\mu\text{g/L}$) and the second (0.20 $\mu\text{g/L}$) water quality standards, which demonstrated noticeable water pollution in the central Bohai Sea. There was no significant correlation between the Hg concentrations in the sediment and in the seawater at investigation stations ($R=0.319$, $P<0.001$, $n=29$). Grain size of solids was one of the most impactful factors that control the sedimentary variability of heavy metals; hence we normalized Hg concentration by the percentage of grains $<20 \mu\text{m}$. A significant correlation was then observed between the normalized Hg concentrations in the sediment and in the seawater ($R=0.634$, $P<0.001$, $n=29$). This suggested that Hg in the seawater came from the deposit Hg in the sediment. This “secondary pollution” in the sediment may cause long-term harm to the surroundings in the central Bohai Sea. Therefore we suggest policy makers should fully evaluate the environmental risks and bioavailability in the future economic activities in the central Bohai Sea.

Key words Bohai Sea; Sediment; Water column; Mercury (Hg); Secondary pollution

^① Corresponding author: CUI Zhengguo, E-mail: cuizg@ysfri.ac.cn

渤海中部海域水体中 Hg、As 的时空分布特征*

杨茜 夏斌 孙耀 陈聚法 张艳
曲克明 赵俊 崔正国^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)

摘要 本研究分析了 2013 年 5 月(春季)、7 月(夏季)、11 月(秋季)、12 月(冬季)渤海中部海域表、中、底层海水中汞(Hg)、砷(As)两种元素的时空分布特征。结果显示, Hg 的含量范围为 0.0029–0.3926 μg/L, 平均含量为 0.0676 μg/L。从垂直分布来看, 水体中 Hg 的含量呈现底层>中层>表层的分布特点; 从四季的变化特点看, 水体中 Hg 的含量呈现春季>冬季>秋季>夏季的变化规律, 其中, 仅有夏季表层水体达到国家海水水质标准(GB3097–1997), 其余水体中 Hg 的含量均有超标现象发生。As 的含量范围为 0.65–10.83 μg/L, 平均含量为 1.50 μg/L, 除夏季表层水体中的 As 含量较高外, 水体中的 As 均呈现均匀的分布模式。从垂直分布来看, As 在四季的平均含量均表现为表层>中层>底层, 且均未超出国家海水水质标准。研究表明, 渤海中部海域水体中, As 的含量均达到 I 类水质标准(20 μg/L), 而 Hg 含量却频频超出 I 类水质标准(0.05 μg/L)或 II 类水质标准(0.20 μg/L)。渤海中部海域水质已经受到了重金属的污染, 推测该现象主要源于人类活动的影响。

关键词 渤海中部; 汞; 砷; 影响因素

中图分类号 X824 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)04-0054-06

近年来, 随着工农业的发展, 重金属对海洋环境带来的污染也日益加重, 汞(Hg)元素和砷(As)元素因具有累积性效应(Bing *et al*, 2013), 能够通过食物链的富集作用危害人类健康。柴松芳(1998)对胶州湾海水中的总 Hg 含量进行分析, 发现 Hg 的含量无明显季节性差异, 且各个站位及表、底层含 Hg 量基本一致; 贺志鹏等(2008)对南黄海表层海水中 Hg、As 等重金属的变化特征及影响因素进行了分析, 认为重金属在水体中的分布与人类输入有着密切的关系, 呈现近岸高、离岸低的特点; 杨东方等(2008)对胶州湾水体重金属 Hg 进行分析, 发现四季中 Hg 含量呈现春季>冬季>秋季>夏季的变化规律。通过以上研究发现, 水体中 Hg、As 等重金属元素在水体中的分布时效性较强, 即使在相同的研究海域, 因调查时间的差异, 也会表现出不同的分布规律。而渤海作为我国海上油气开发

的重要海区, 曾发生过多起溢油事故。由于石油中含有大量的 Hg、As, 能通过物理、化学或生物途径在水相和固相中相互运移, 并通过食物链的富集作用危害人类健康。为了保护渤海渔业生态系统和确保食物安全, 必须对水体中 Hg、As 的空间变化进行系统的研究(Fang *et al*, 2009; 郭福星等, 2011; Sun *et al*, 2012; Sheng *et al*, 2013)。本研究于 2013 年分 4 个季节对渤海中部海区进行调查, 分析了 Hg、As 在海水表、中、底层的分布特点, 为了解和掌握周边海域实时渔业水域生态环境变动情况提供重要数据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

调查海域为整个渤海中部海区(118.61°–

* 农业部溢油专项“渤海生态环境监测与评估”(农办渔[2012]117号)和“应对溢油关键技术专项研究”(2012-NZ-5739)共同资助。杨茜, E-mail: yangqian@ysfri.ac.cn

^① 通讯作者: 崔正国, 副研究员, E-mail: cuizg@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-06-02, 收修改稿日期: 2015-07-02

120.83°E, 38.20°–39.21°N), 调查站位见图 1。采集时间为 2013 年春季(5 月 13–15 日)、夏季(7 月 31 日–8 月 2 日)、秋季(11 月 1–6 日)、冬季(11 月 30 日–12 月 5 日), 采用的调查船为海监船只, 利用采水器

取水。0–10 m 的水样为表层水体, 10–25 m 的水样为中层水体, 大于 25 m 水深的为底层水体。所取站位为 41 个, 总样品数为 123 个。将水体封装于聚乙烯瓶中, 低温保存并带回实验室进行分析。

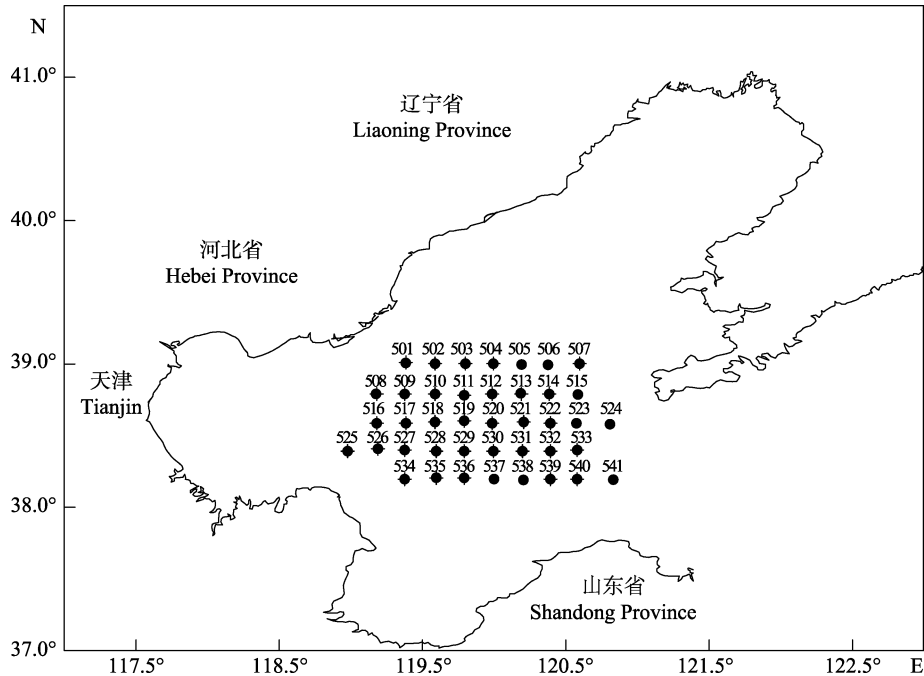


图 1 渤海调查站位

Fig.1 Investigated stations in the Bohai Sea

1.2 实验方法

1.2.1 Hg 的分析方法 本研究参照海洋监测规范(GB17378.4–2007)(2007), 采用原子荧光法, 在硼氢化钾的作用下将水样还原, Hg 离子被还原成单质 Hg, 以氩气为载气将 Hg 蒸气带入原子荧光光度计的原子化器中, 测定 Hg 原子荧光强度, 检出限为 0.007 $\mu\text{g/L}$, 准确度为 5.5%。

1.2.2 As 的分析方法 本研究参照海洋监测规范(GB17378.4–2007)(2007), 采用原子荧光法, 在酸性介质中, As^{5+} 被硫脲抗坏血酸还原成 As^{3+} , 用 KBH_4 将 As^{3+} 转化为 AsH_3 气体, 由氩气做载气将其导入原子荧光光度计的原子化器, 进行原子化, 测定 As 原子的荧光强度, 检出限为 0.5 $\mu\text{g/L}$ 。

1.3 评价方法

采用单因子污染指数法, 依据《海水水质标准》(GB3097–1997)(1997), 对溢油区域生态环境质量进行评价。其中, 第一类标准适用于海洋渔业水域, 海上自然保护区和珍稀濒危海洋生物保护区, 标准分别为 0.05 $\mu\text{g/L}$ (Hg)、20 $\mu\text{g/L}$ (As); 第二类标准适用于海水

养殖区, 海水浴场, 人体直接接触的海上运动或娱乐区, 标准分别为 0.20 $\mu\text{g/L}$ (Hg) 和 30 $\mu\text{g/L}$ (As)。

2 结果与讨论

2.1 Hg 的水平变化特征及影响因素

春季, 调查水域表层水体中的 Hg 含量为 0.005–0.240 $\mu\text{g/L}$, 平均值为 0.090 $\mu\text{g/L}$, 有 36 个站位的 Hg 含量超过国家 I 类海水水质标准, 超标率为 87.80%, 表层 530 站位的 Hg 含量超过 II 类海水水质标准; 中层的 Hg 含量为 0.006–0.190 $\mu\text{g/L}$, 平均值为 0.100 $\mu\text{g/L}$, 有 35 个站位的 Hg 含量超过国家 I 类海水水质标准, 超标率为 85.37%; 底层的 Hg 含量为 0.012–0.390 $\mu\text{g/L}$, 平均值为 0.100 $\mu\text{g/L}$, 有 35 个站位的 Hg 含量超过国家 I 类海水水质标准, 超标率为 85.37%, 底层 529 站位的 Hg 含量超过 II 类海水水质标准。

夏季, 调查水域表层海水中的 Hg 浓度为 0.029–0.030 $\mu\text{g/L}$, 平均值为 0.030 $\mu\text{g/L}$, 所有站位的 Hg 含量均符合国家 I 类海水水质标准; 中层的 Hg 浓度为 0.010–0.14 $\mu\text{g/L}$, 平均值为 0, 有 14 个站位的 Hg 含量超过国家 I 类海水水质标准, 超标率为 34.15%;

底层的 Hg 浓度 0.010–0.130 $\mu\text{g/L}$, 平均值为 0, 有 18 个站位的 Hg 含量超过国家 I 类海水水质标准, 超标率为 43.90%。

秋季, 调查水域表层水体中的 Hg 含量为 0.014–0.096 $\mu\text{g/L}$, 平均值为 0.052 $\mu\text{g/L}$, 有 19 个站位的 Hg 含量超过国家 I 类海水水质标准, 超标率为 47.50%; 中层的 Hg 含量为 0.014–0.101 $\mu\text{g/L}$, 平均值为 0.054 $\mu\text{g/L}$, 有 22 个站位的 Hg 含量超过国家 I 类海水水质标准, 超标率为 55%; 底层的 Hg 含量为 0.019–0.118 $\mu\text{g/L}$, 平均值为 0.055 $\mu\text{g/L}$, 有 21 个站位的 Hg 含量超过国

家 I 类海水水质标准, 超标率为 52.50%。

冬季, 调查水域表层水体中的 Hg 含量为 0.054–0.153 $\mu\text{g/L}$, 平均值为 0.075 $\mu\text{g/L}$, 有 23 个站位的 Hg 含量超过国家 I 类海水水质标准, 超标率为 57.50%; 中层的 Hg 含量为 0.003–0.153 $\mu\text{g/L}$, 平均值为 0.075 $\mu\text{g/L}$, 有 23 个站位的 Hg 含量超过国家 I 类海水水质标准, 超标率为 57.5%; 底层的 Hg 含量为 0.004–0.155 $\mu\text{g/L}$, 平均值为 0.077 $\mu\text{g/L}$, 有 24 个站位的 Hg 含量超过国家 I 类海水水质标准, 超标率为 60.00%。

从图 2 可以看出, Hg 的最大值位于 120.09°E,

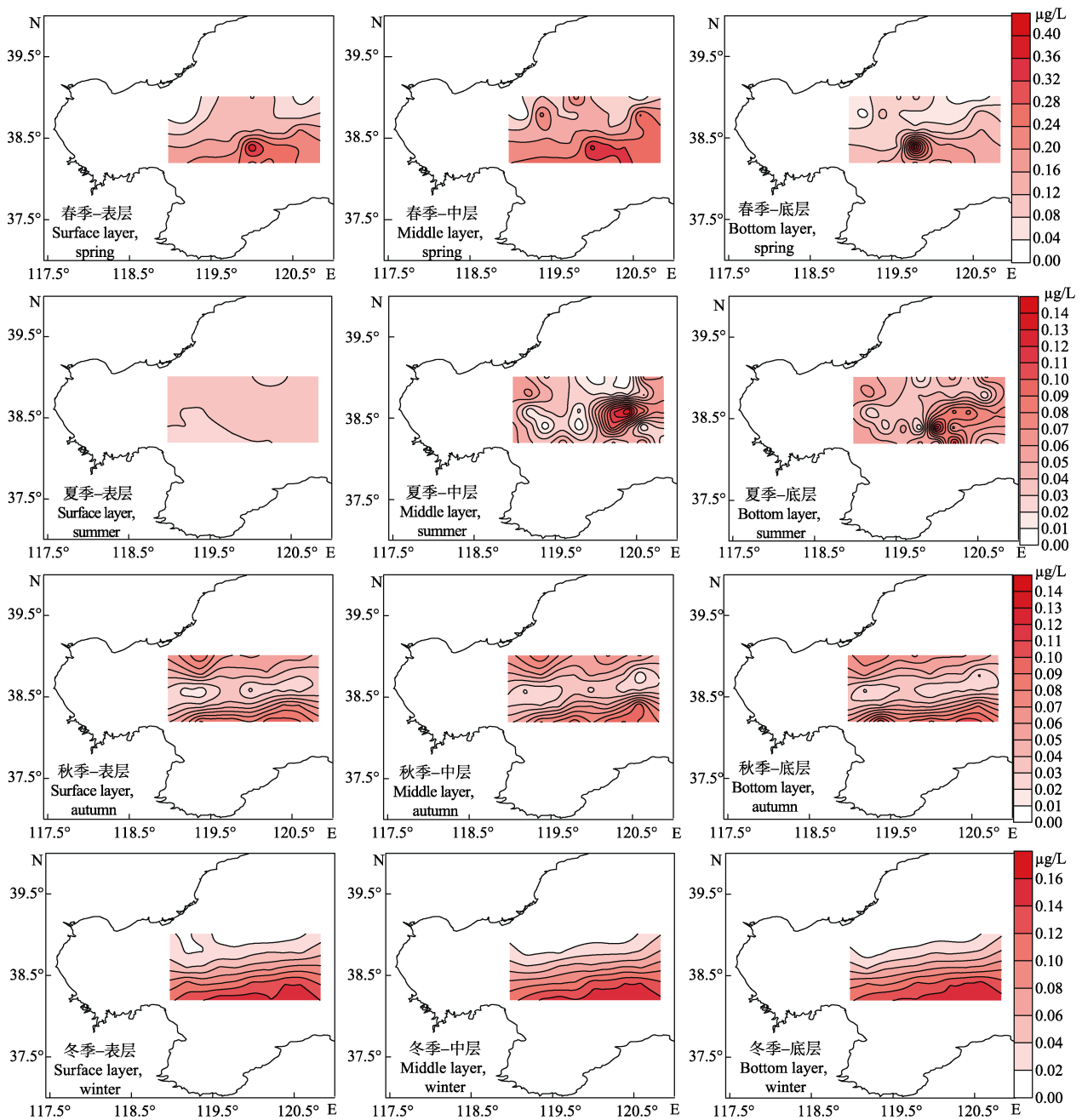


图 2 Hg 的四季平面分布

Fig.2 Horizontal distribution of Hg in four seasons

38.37°N 附近, 推测该海域由于曾发生过重大溢油事故, 事故中富含 Hg 的石油污染物, 因比重大、难溶于水而沉淀于油田附近。Hg²⁺在迁移过程中也能被底泥和悬浮物中的微粒所吸附沉淀下来, 从水相进入沉积相(胡宁静等, 2010)。赋存于沉积物中的各种形态的 Hg 可能转化为 Hg²⁺, 其在微生物的作用下可转化为 CH₃Hg 和(CH₃)₂Hg(沈国英等, 2002; Sin *et al.*, 2001)。CH₃Hg 可以溶于水中, 借助风场的混匀作用, 将 Hg 离子带入水体中, 并随着水流扩散向上输送。Hg 在四季的平均含量均呈现底层>中层>表层的特点(图3), 推断 Hg 污染主要来源于沉积物中 Hg 的释放(廖永志等, 2014)。

比较四季 Hg 的平均含量(图3)发现, 春季>冬季>秋季>夏季, 该趋势与杨东方等(2008)及张正斌(2004)对周边海域的研究结果相似。这可能与四季降水量有关(李月等, 2010), 春季为枯水期, 海水中 Hg 的浓度较高。夏季为丰水期, 故海水中 Hg 的浓度受到稀释, 含量相对较低; 再者夏季由于温度跃层的存在(马倩, 2014)¹⁾, 底层污染物无法向表层输送故夏季表层水体中 Hg 含量未见超标。而秋季温度跃层逐渐消失, 底层的污染物质持续向上输送, 故秋季表层水体的超标现象较夏季严重。

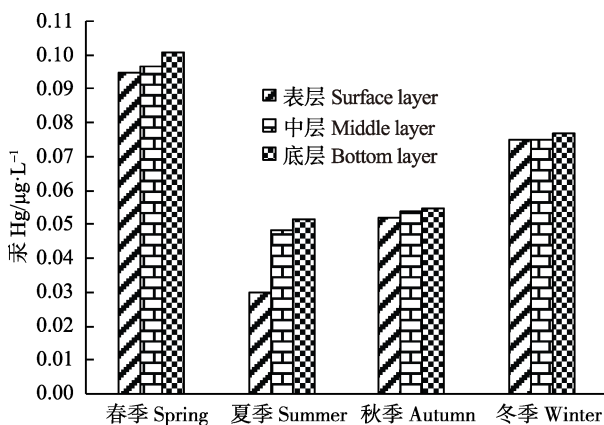


图3 Hg的平均值

Fig.3 Average values of Hg concentration

2.2 As 的水平变化特征及影响因素

春季, 调查水域表层水体中的 As 含量为 0.39–2.01 μg/L, 平均值为 0.99 μg/L; 中层水体中的 As 含量为 0.16–2.16 μg/L, 平均值为 0.91 μg/L; 底层的 As 含量为 0.31–1.99 μg/L, 平均值为 0.90 μg/L。

夏季, 调查水域表层海水中的 As 浓度为 4.19–

10.83 μg/L, 平均值为 5.66 μg/L; 中层水体中的 As 浓度为 0.34–3.51 μg/L, 平均值为 1.53 μg/L; 底层的 As 浓度为 0.57–4.06 μg/L, 平均值为 1.38 μg/L。

秋季, 调查水域表层水体中的 As 含量为 0.31–2.49 μg/L, 平均值为 1.19 μg/L; 中层水体中的 As 含量为 0.42–2.06 μg/L, 平均值为 1.13 μg/L; 底层的 As 含量为 0.43–1.50 μg/L, 平均值为 1.06 μg/L。

冬季, 调查水域表层水体中的 As 含量为 0.73–1.73 μg/L, 平均值为 1.05 μg/L; 中层水体中的 As 含量为 0.69–1.68 μg/L, 平均值为 1.09 μg/L; 底层的 As 含量为 0.65–1.65 μg/L, 平均值为 1.04 μg/L。

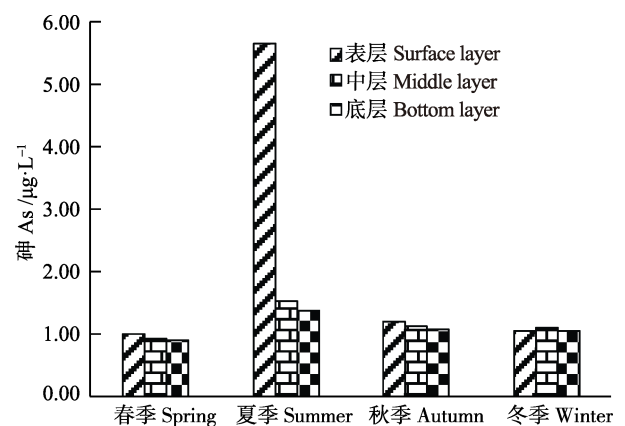


图4 As的平均值

Fig.4 Average values of As concentration

比较 As 的平均含量(图4), 除冬季外, 均表现出表层>中层>底层的变化规律。其中, 夏季渤海表层水体中 As 的含量最高, 曾一度达到 10.83 μg/L。该现象与第2次全国海洋污染基线调查数据一致(陈江麟等, 2004), 这可能与 As 的陆源输入有关。据调查, 环渤海地区每年陆源入海的 As 高达 5.3 万 t(张小林, 2001)。由农村发展起的小城镇基础设施建设较差, 绝大多数没有排污管网, 大多数由农用杀虫剂带来的 As 从污水沟直接排入河道, 或者通过降雨径流进入河道(Sun *et al.*, 2012; 黄现民等, 2008)。从而造成生活垃圾、生产污水在夏季的丰水期大量进入渤海, 并随着水流扩散到渤海中部, 造成污染。整体而言, As 在渤海中部海域水体中分布均匀(图5), 且该海域各站位及水层均未出现 As 含量超标现象。

3 结论

通过对渤海中部海域四季的表、中、底层水体中

1) 马倩. 大风作用下渤海环流和水交换的数值模拟研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2014

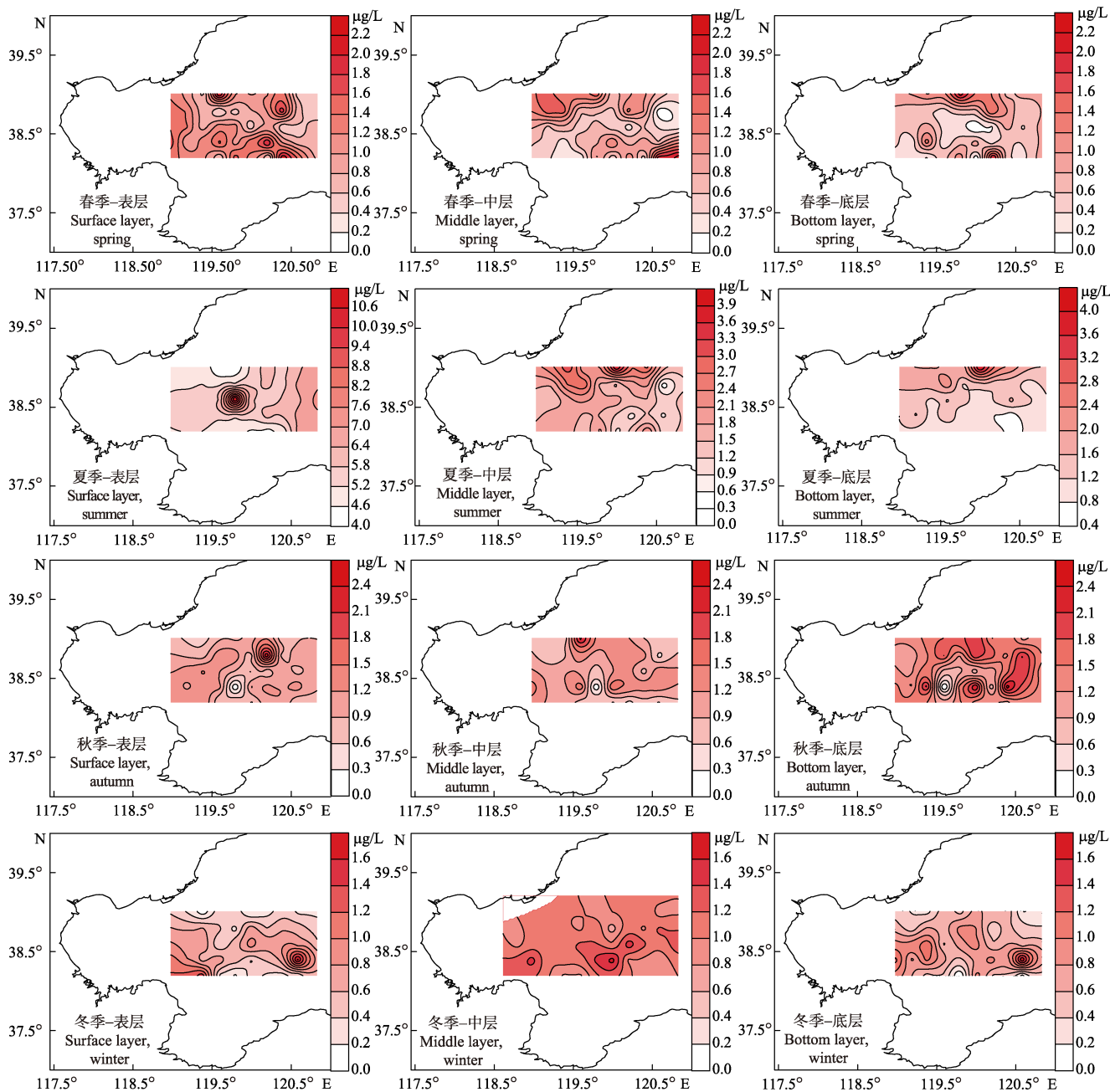


图5 As 的四季平面分布

Fig.5 Horizontal distribution of As in four seasons

Hg、As 的变化特点的分析发现, Hg 的污染较为严重, 在水体中的平均含量为底层>中层>表层, 除夏季的表层水体外, 均超出 I 类或 II 类海水水质标准, 整体呈现春季>冬季>秋季>夏季的变化规律; As 并未表现出超标现象, 除夏季表层水体中含 As 量较高外, 均呈现均匀分布模式, As 的平均含量为表层>中层>底层。

参 考 文 献

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

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 5 部分: 沉积物分析 (GB17378.5-2007). 北京: 中国标准出版社, 2007

李月, 谭丽菊, 王江涛. 山东半岛南部近海表层海水中镉、铅、汞、砷的时空变化. 中国海洋大学学报, 2010, 40(Sup.): 179-184

杨东方, 曹海荣, 高振会, 等. 胶州湾水体重金属 Hg I. 分布和迁移. 海洋环境科学, 2008, 27(1): 37-39

沈国英, 施并章. 海洋生态学. 北京: 科学出版社, 2002, 387

张小林. 渤海海域海水、沉积物中铅、镉、汞、砷污染调查. 黑

- 龙江环境通报, 2001, 25(3): 87-90
- 张正斌. 海洋化学. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2004, 164
- 陈江麟, 刘文新, 刘书臻, 等. 渤海表层沉积物重金属污染评价. 海洋科学, 2004, 28(12): 16-21
- 国家环境保护局. 海水水质标准(GB3097-1997). 北京: 中国环境科学出版社, 1997
- 胡宁静, 石学法, 黄朋, 等. 渤海辽东湾表层沉积物中金属元素分布特征. 中国环境科学, 2010, 30(3): 380-388
- 贺志鹏, 宋金明, 张乃星, 等. 南黄海表层海水重金属的变化特征及影响因素. 环境科学, 2008, 29(5): 1153-1162
- 柴松芳. 胶州湾海水总汞含量及其分布特征. 黄渤海海洋学报, 1998, 16(4): 60-63
- 郭福星, 吕颂辉, 腾德强, 等. 黄海表层沉积物中重金属的分布特征与生态风险评价. 安徽农业科学, 2011, 39(15): 9212-9216, 9313
- 黄现民, 王洪涛. 山东省环渤海地区农业面源污染防治对策研究. 安徽农业科学, 2008, 36(15): 6300-6303
- 廖永志, 冯少波, 冯钊, 等. 广西合浦廉州湾贝类养殖区表层沉积物重金属汞和砷污染评价. 南方农业学报, 2014, 45(2): 305-308
- Bing H, Wu Y, Nahm WH, *et al.* Accumulation of heavy metals in the lacustrine sediment of Longgan Lake, middle reaches of Yangtze River, China. *Environ Earth Sci*, 2013, 69(8): 2679-2689
- Fang TH, Li JY, Feng HM, *et al.* Distribution and contamination of trace metals in surface sediments of the East China Sea. *Mar Environ Res*, 2009, 68(4): 178-187
- Sheng Y, Sun Q, Bottrell SH, *et al.* Anthropogenic impacts on reduced inorganic sulfur and heavy metals in coastal surface sediments, north Yellow Sea. *Environ Earth Sci*, 2013, 68(5): 1367-1374
- Sin SN, Chua H, Lo W, *et al.* Assessment of heavy metal cations in sediments of Shing Mun River, Hong Kong. *Environ Int*, 2001, 26: 297-301
- Sun Q, Liu D, Liu T, *et al.* Temporal and spatial distribution of trace metals in sediments from the northern Yellow Sea coast, China: implications for regional anthropogenic processes. *Environ Earth Sci*, 2012, 66(3): 697-705

(编辑 马瑾艳)

The Temporal and Spatial Distribution of Mercury and Arsenic in the Central Bohai Sea

YANG Qian, XIA Bin, SUN Yao, CHEN Jufa, ZHANG Yan,
QU Keming, ZHAO Jun, CUI Zhengguo^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)

Abstract To study the temporal and spatial distribution of Mercury (Hg) and Arsenic (As) in the central Bohai Sea, we collected water samples of the surface, middle, and bottom layers in four survey cruises in May (spring), July (summer), November (autumn) and December (winter) in 2013. The results showed that the content of Hg was in the range of 0.0029-0.3926 $\mu\text{g/L}$ with an average of 0.0676 $\mu\text{g/L}$. The vertical distribution of Hg concentration followed the order: bottom layer > middle layer > surface layer; the seasonal distribution showed the pattern: spring > winter > autumn > summer. Except for the surface layer in summer, Hg concentration in all water samples failed to meet the national water quality standard (GB3097-1997). The concentration of As ranged from 0.65 to 10.83 $\mu\text{g/L}$ with the mean value of 1.50 $\mu\text{g/L}$, which met the requirement for the national water quality standard (GB3097-1997). The vertical distribution of As followed the order: surface layer > middle layer > bottom layer, and the seasonal distribution displayed an even pattern. The limit of As concentration is 20 $\mu\text{g/L}$ according to the national water quality standards, thus the As level met the first water quality standard. However, the Hg level was readily higher than the first (0.05 $\mu\text{g/L}$) or second water quality national water quality standard (0.20 $\mu\text{g/L}$). These data suggested that the overall water quality of the central Bohai Sea was unsatisfying, and there was obvious pollution probably caused by human activities. Therefore the environmental risks in the Bohai Sea should be carefully evaluated in the future economic activities.

Key words The central Bohai sea; Mercury; Arsenic; Influence factor

① Corresponding author: CUI Zhengguo, E-mail: cuizg@ysfri.ac.cn

19-3 油田溢油对辽东湾浮游植物群落的影响*

宋广军^① 李 爱 吴金浩 王召会

(辽宁省海洋水产科学研究院 辽宁省海洋生物资源与生态学重点实验室 辽宁 大连 116023)



摘要 根据 2012–2014 年对辽东湾浮游植物群落的调查, 分析了 19-3 油田溢油事故发生后辽东湾浮游植物种类、细胞丰度、生物多样性和优势种的变化以及影响因素。调查发现, 辽东湾浮游植物种类数在 2012 年有明显的降低, 而在 2013 年和 2014 年浮游植物种类数明显上升。辽东湾浮游植物细胞丰度在夏季异常升高, 中肋骨条藻(*Skeletomema costatum*) 出现爆发性繁殖, 这可能与海水中油类含量的升高有一定关系。

关键词 石油污染; 辽东湾; 浮游植物; 群落结构; 多样性指数

中图分类号 Q948.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)04-0060-07

近年来, 由于石油工业、海上运输业的迅速发展, 海上油田泄露、船舶溢油事故不断发生, 对海域生态环境造成了严重影响。在海洋生态环境中, 海洋浮游植物作为最主要的初级生产力, 海洋食物链的起点, 研究石油污染后期浮游植物群落结构的变化至关重要。国内外学者已就石油污染对浮游植物的短期影响做了大量相关研究(Djomo *et al.*, 2004; Parab *et al.*, 2008; 王君丽等, 2011; 黄逸君等, 2011), 但是对石油污染后海洋中浮游植物群落结构的长期影响报道较少。2011 年 6 月蓬莱 19-3 油田发生溢油事故, 造成渤海约 620 km² 的海域污染, 使渤海中部蓬莱 19-3 油田周边海域和西北部海域, 以及辽东湾绥中沿岸水域环境和生物群落受到影响。作者通过对 2012–2014 年辽东湾海域连续 3 年的浮游植物以及相关环境因子监测数据分析, 研究了石油污染发生后 3 年时间辽东湾海域浮游植物群落结构的变化, 以及石油污染对浮游植物群落结构是否产生后续影响, 也为今后相关的研究工作提供参考。

1 材料与方法

1.1 调查海区和监测方法

调查范围在渤海(辽东半岛南端)老铁山角至(绥

中)止锚湾连线以北辽东湾全部海域, 调查站位 38 个(图 1)。自 2012–2014 年, 连续 3 年对该海域浮游植物和相关影响环境因子(石油类、DIN、DIP、温度、DO 和 COD)进行监测。监测时间为每年 5 月、8 月和 10 月。

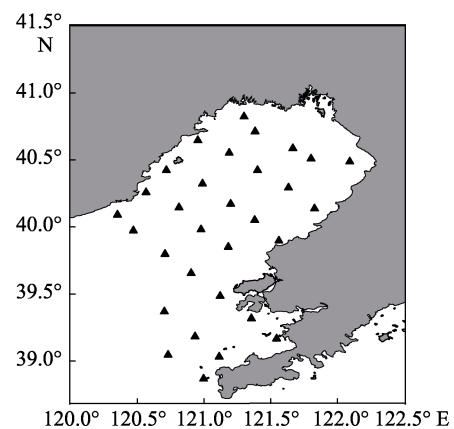


图 1 监测站位

Fig.1 Sampling stations in the Liaodong Bay

浮游植物采集使用国际标准 20 号(孔径 0.076 mm)筛绢制成的浅水Ⅲ型浮游生物网(网口直径为 37 cm, 网长 1.4 m), 由底至表垂直拖网, 采集到的样品装到采样瓶中, 加入 5% 浓度为 40% 的甲醛进行固定, 带回实验室进行分类和计数。

* 辽宁省海洋与渔业厅科研项目(201418)、辽宁省海洋与渔业厅科研项目(201303)和辽宁省海洋与渔业厅科研项目(201416)共同资助。

^① 通讯作者: 宋广军, 副研究员, E-mail: sgi666@qq.com

收稿日期: 2015-08-17, 收修改稿日期: 2015-11-09

石油类、DIN、DIP、温度、DO 和 COD 等环境影响因子的样品采集、保存及分析方法均按《海洋监测规范》(GB17378-2007)和《海洋调查规范》(GB/T12763-2007)进行。

1.2 数据处理

浮游植物群落指数采用香农-威纳指数 H' (Shannon-Wiener index), 计算公式为:

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

物种优势度 Y 的计算: 根据各物种出现的频率及丰度来计算, 计算公式为:

$$Y = \frac{n_i}{N} f_i$$

式中, N 为采集样品中所有物种的总体个数; S 为样品中的物种个数; P_i 为第 i 种的个体数与样品中的总个数的比值; n_i 为第 i 种的总体个数; f_i 为第 i 种在各样品中出现的频率。以优势度 $Y > 0.02$ 的标准来确定优势种(徐兆礼等, 1989)。

采用 SPSS19 统计软件对浮游植物种类、细胞丰度以及生物多样性与环境影响因子做 Pearson 相关性分析。

2 结果

2.1 浮游植物群落结构的变化

2.1.1 浮游植物种类与细胞丰度的变化 2012-2014 年调查海域 3 个季节浮游植物种类与细胞丰度的变化见表 1。调查结果显示, 辽东湾浮游植物种类最低值出现在 2012 年 5 月, 最高值出现在 2013 年 10 月, 2012 年 3 个季节浮游植物种类分别为 26 种、32 种和 38 种, 均低于 2013 年和 2014 年同期水平。浮游植物细胞丰度最高值出现在 2012 年 8 月, 最低值出现在 2012 年 5 月。从 3 年总体结果来看, 2012 年辽东湾海域浮游植物

表 1 2012-2014 年辽东湾海域 3 个季节的浮游植物平均丰度和种类数

Tab.1 Number of species and average abundance of phytoplankton in three seasons in the Liaodong Bay from 2012 to 2014

调查时间(年-月) Sampling time (Y-M)	种类数 Amount of species	细胞丰度 Average abundance ($\times 10^4$ ind/ m^3)
2012-05	26	27
2012-08	32	3072
2012-10	38	242
2013-05	43	168
2013-08	35	142
2013-10	59	75
2014-05	39	63
2014-08	55	465
2014-10	56	34

种类数处于低水平, 细胞丰度波动最大(图 2)。

2.1.2 浮游植物优势种的变化 2012-2014 年调查海域 3 个季节浮游植物优势种变化情况见表 2。表 2 中列出各季节优势度前三位的优势物种。从调查结果来看, 辽东湾 5 月浮游植物优势种主要为具槽帕拉藻 (*Melosira sulcata*), 角毛藻属 (*Chaetoceros* spp.) 和夜光藻 (*Noctiluca scintillans*), 8 月中肋骨条藻 (*Skeletonema costatum*) 优势度明显, 10 月主要优势种为圆筛藻属 (*Coscinodiscus* spp.), 具槽帕拉藻和角毛藻属, 连续 3 年的调查结果基本一致。所不同的是, 2012 年 5 月和 8 月两种易引发赤潮的藻类夜光藻和中肋骨条藻优势度非常高。

2.1.3 浮游植物多样性的变化 2012 年 5 月辽东湾海域浮游植物多样性指数的范围在 0.66-3.77 之间, 多样性指数平均值为 2.58, 辽东湾近岸海域多样性指数较高, 辽东湾中部多样性指数低(图 3-a); 8 月多样性指数的范围在 0.13-3.41 之间, 多样性指数平均值为 1.34, 多样性指数由湾外向湾内递减, 湾顶部多样性最低(图 3-b); 10 月多样性指数的范围在 1.35-3.79

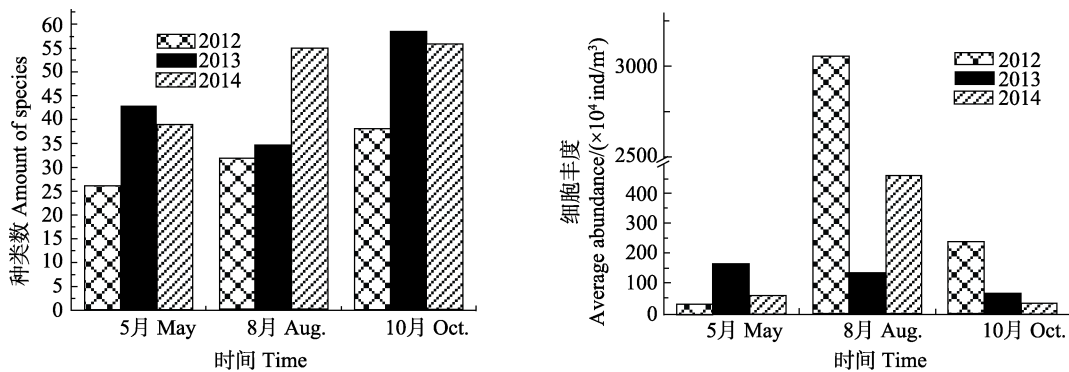


图 2 2012-2014 年辽东湾海域 3 个季节的浮游植物的平均丰度和种类数

Fig.2 Number of species and average abundance of phytoplankton in three seasons in the Liaodong Bay from 2012 to 2014

之间,多样性指数平均值为 2.99,整个湾内多样性指数较高,在湾外呈递减趋势(图 3-c)。

2013 年 5 月辽东湾海域浮游植物多样性指数变化范围在 1.14–3.66 之间,均值为 2.52(图 3-d); 8 月多样性指数变化范围在 1.81–3.61 之间,均值为 2.76(图 3-e); 10 月多样性指数变化范围在 1.70–3.72 之间,均值为 2.94(图 3-f)。2013 年各季节浮游植物多样性指数平面分布状况与 2012 年基本一致,2013 年 8 月多样性指数要明显好于 2012 年同期。

2014 年 5 月辽东湾海域浮游植物多样性指数变化范围在 0.56–3.22 之间,均值为 1.76(图 3-g); 8 月多样性指数变化范围在 0.76–3.48 之间,均值为 2.47(图 3-h); 10 月多样性指数变化范围在 0.91–4.05 之间,均值为 2.50(图 3-i)。2014 年 3 个季节浮游植物多样性指数平面分布与 2012 年和 2013 年变化不大,多样性指数略低。

2.2 浮游植物群落结构与水环境因子的相关性分析

2.2.1 辽东湾油类及营养结构的变化 图 4 分别

给出了辽东湾海域 2012–2014 年各项环境因子总体平均值的季节变化情况。从连续 3 年整体结果来看,辽东湾油类含量最高监测值达到 2889 $\mu\text{g/L}$,最低值为 5 $\mu\text{g/L}$ 。其中,2012 年油类的监测均值 8 月最高,达到 36 $\mu\text{g/L}$,10 月最低,为 16 $\mu\text{g/L}$ 。2013 年 5 月和 10 月油类监测均值为 3 年监测中最高,分别为 39 $\mu\text{g/L}$ 和 38 $\mu\text{g/L}$,2014 年油类监测最高均值出现在 5 月,为 25 $\mu\text{g/L}$ 。从区域分布来看,油类浓度高值区出现在辽东湾西部和北部近岸海域,低值区出现在辽东湾中部和东南部海域。

无机氮和活性磷酸盐监测值呈明显季节性变化,无机氮监测值 5 月和 10 月高,8 月有明显降低,活性磷酸盐监测值 5 月和 8 月低,在 10 月监测值有明显升高。从年际变化来看,2013 年无机氮的监测值要高于 2012 年和 2014 年同期水平,活性磷酸盐 2014 年最高,2012 年最低。调查区域 N/P 比值平均值在 12.8:1–4.3:1 之间,除 2014 年 10 月 N/P 比值平均值低于大洋海水和浮游生物体的 Redfield 比值 16:1 外

表 2 2012–2014 年辽东湾海域 3 个季节浮游植物的优势种及优势度

Tab.2 The dominant species and the corresponding dominance degrees in three seasons in the Liaodong Bay from 2012 to 2014

调查时间(年-月) Sampling time (Y-M)	优势种 Dominant species	优势度 Dominance degree
2012-05	夜光藻 <i>N. scintillans</i>	0.372
	窄隙角毛藻 <i>Chaetoceros affinis</i>	0.092
	具槽帕拉藻 <i>M. sulcata</i>	0.063
2012-08	中肋骨条藻 <i>S. costatum</i>	0.840
2012-10	圆筛藻 <i>Coscinodiscus</i> spp.	0.156
	角毛藻 <i>Chaetoceros</i> spp.	0.115
	密联角毛藻 <i>Chaetoceros densus</i>	0.063
2013-05	具槽帕拉藻 <i>M. sulcata</i>	0.204
	柔弱几内亚藻 <i>Guinardia delicatula</i>	0.153
	角毛藻 <i>Chaetoceros</i> spp.	0.102
2013-08	角毛藻 <i>Chaetoceros</i> spp.	0.362
	中肋骨条藻 <i>S. costatum</i>	0.102
	窄隙角毛藻 <i>Chaetoceros affinis</i>	0.079
2013-10	圆筛藻 <i>Coscinodiscus</i> spp.	0.179
	具槽帕拉藻 <i>M. sulcata</i>	0.131
	角毛藻 <i>Chaetoceros</i> spp.	0.102
2014-05	角毛藻 <i>Chaetoceros</i> spp.	0.271
	具槽帕拉藻 <i>M. sulcata</i>	0.196
	夜光藻 <i>N. scintillans</i>	0.070
2014-08	中肋骨条藻 <i>S. costatum</i>	0.212
	短角弯角藻 <i>Eucampia zodiacus</i>	0.091
	泰晤士扭鞘藻 <i>Streptotheca tamesis</i>	0.045
2014-10	具槽帕拉藻 <i>M. sulcata</i>	0.384
	圆筛藻 <i>Coscinodiscus</i> spp.	0.119
	布氏双尾藻 <i>Ditylum brightwelli</i>	0.056

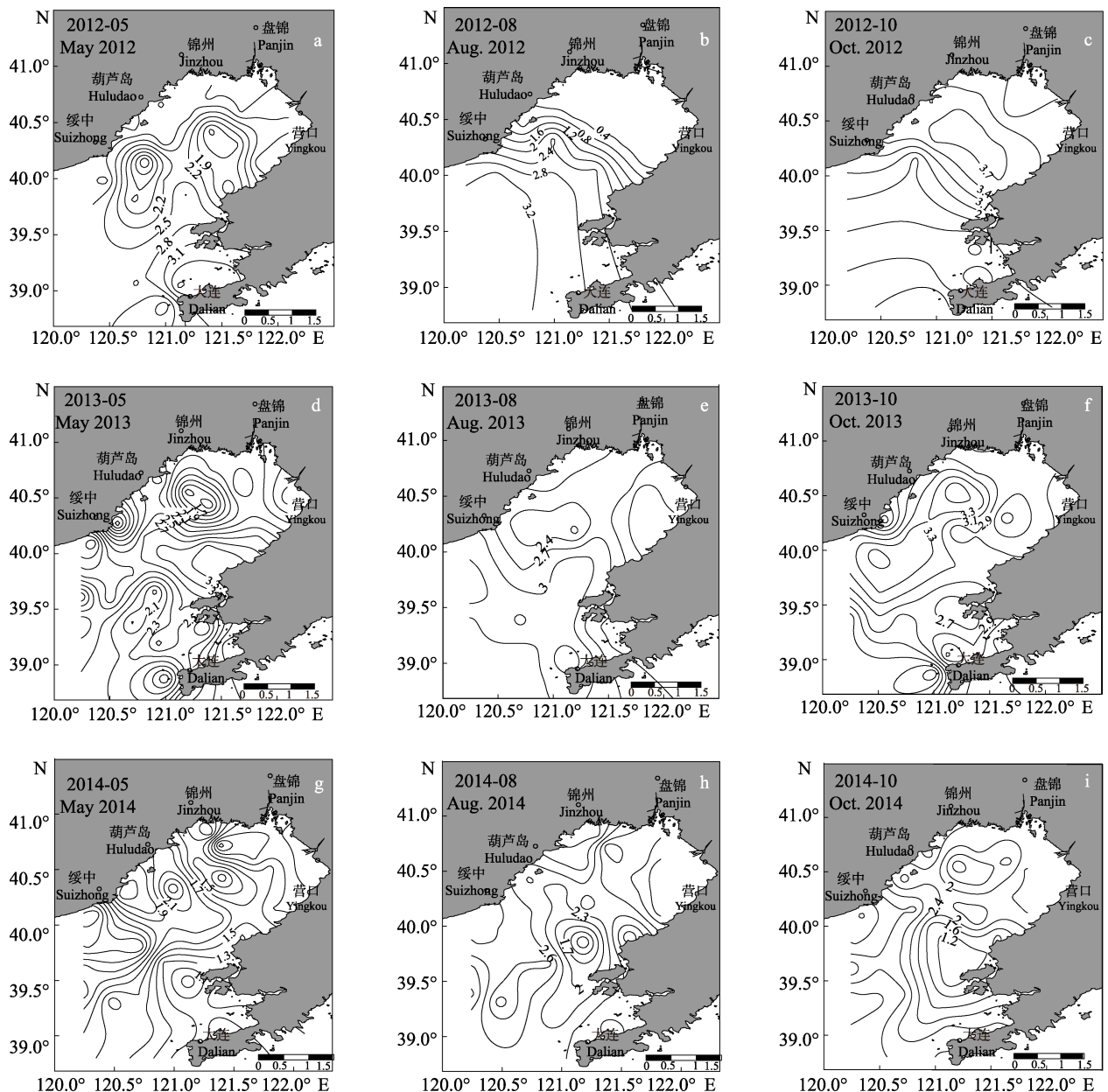


图 3 2012–2014 年辽东湾浮游植物多样性指数季节性分布

Fig.3 Seasonal distribution of the diversity index of phytoplankton in the Liaodong Bay from 2012 to 2014

(Redfield, 1958), 其他航次 N/P 比值远高于 16 : 1。营养盐结构呈现明显的 P 限制。

2.2.2 浮游植物群落结构数据与环境因子的 Pearson 相关性分析 调查海域浮游植物群落结构数据与环境因子的 Pearson 相关性分析结果见表 3。从表 3 可以看出, 浮游植物群落结构的变化受多种环境因子的影响。2012 年辽东湾浮游植物群落结构的变化与水温、COD、溶解氧以及油类相关性显著; 2013 年浮游植物群落结构变化与 COD、无机氮、活性磷酸盐相关性显著; 2014 年浮游植物群落结构变化与水温、溶解氧、活性磷酸盐以及油类相关性显著。

3 讨论

2011 年 6 月蓬莱 19-3 油田发生的溢油事故, 对辽东湾直接污染区域较小, 但是考虑到渤海属于半封闭海域, 海水交换能力差, 渤海大面积溢油污染造成的水质和生物群落的影响, 是否波及整个辽东湾海域浮游植物群落结构, 有必要进行系统性研究。

本次调查辽东湾浮游植物群落结构在种类组成上, 2012 年 5 月、8 月、10 月 3 个航次浮游植物种类数分别为 26 种、32 种和 38 种, 均低于 2013 年和 2014 年同期水平。而宋伦等(2007)对辽东湾 2005 年 7–9 月浮游植

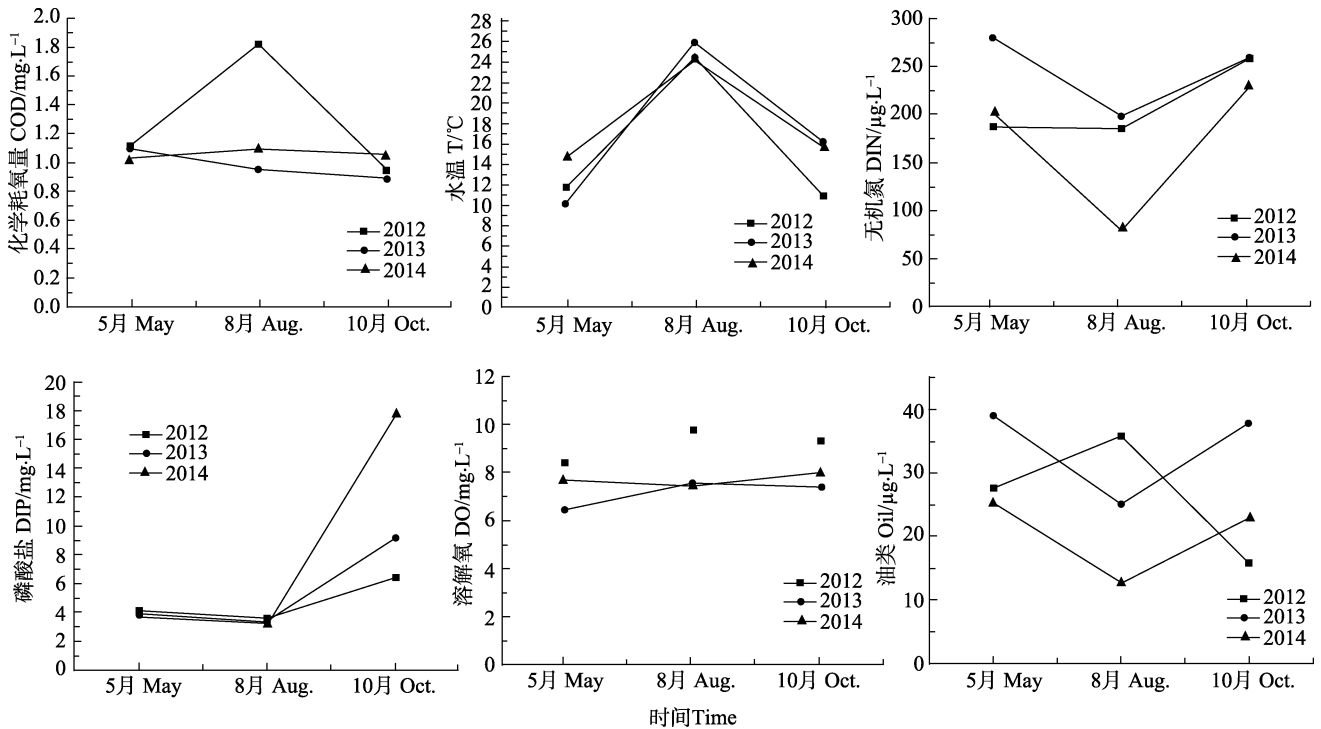


图4 2012–2014年辽东湾海域环境因子季节性变化

Fig.4 Seasonal variation of environmental factors in the Liaodong Bay from 2012 to 2014

表3 浮游植物群落结构与环境因子的 Pearson 相关系数

Tab.3 Pearson correlation between the phytoplankton community structure and the environmental factors (*R*)

年份 Year	项目 Item	DIN	DIP	Oil	T	DO	COD
2012	种类数 Amount of species	-0.162	-0.188	0.284*	0.389**	-0.087	0.599**
	细胞丰度 Cell abundance	-0.037	-0.030	-0.218	-0.324**	-0.320*	0.360
	多样性指数 Diversity index	0.217	0.066	-0.376**	-0.383**	0.097	-0.279
2013	种类数 Amount of species	-0.275**	0.308**	0.079	-0.192	-0.062	-0.311**
	细胞丰度 Cell abundance	0.013	-0.058	0.059	-0.114	0.174	-0.105
	多样性指数 Diversity index	-0.277**	0.099	0.080	0.126	-0.084	-0.127
2014	种类数 Amount of species	-0.108	0.326**	-0.148	0.278**	-0.385**	-0.044
	细胞丰度 Cell abundance	0.052	-0.147	-0.203*	0.311**	-0.043	0.091
	多样性指数 Diversity index	0.032	0.242*	-0.005	0.268**	-0.323**	0.086

**为在 0.01 水平(双侧)上显著相关, *为在 0.05 水平(双侧)上显著相关

**denoted significant correlation at 0.01 level (double side), * denoted significant correlation at 0.05 level (double side)

物调查, 辽东湾浮游植物种类数为 56 种, 以及栉莎等 (2012)、高伟等(2012)2009 年对辽东湾西部春、夏、冬

季网采浮游植物群落结构进行的分析结果为浮游植物种类春季(5月)32种, 夏季(8月)82种, 冬季(12月)60

种。从上述结果看,溢油发生后一年的2012年,辽东湾浮游植物种类数在各季节均有明显的降低,而2013年和2014年浮游植物种类数的上升,表明了浮游植物群落很强的自我修复能力。

从优势种组成上看,连续3年的调查结果基本一致。辽东湾5月浮游植物优势种均为具槽帕拉藻,角毛藻属和夜光藻,8月中肋骨条藻优势度明显,10月主要优势种以圆筛藻属、具槽帕拉藻和角毛藻属为主。其中5月和10月优势种的组成,与以往有关该海域的文献报道结果差异不大(孙军等,1998;栾莎等,2012;高伟等,2012;傅明珠等,2014)。而8月航次连续3年均以中肋骨条藻为主要优势种,这在溢油发生前的文献报道中是罕见的。中肋骨条藻的大量繁殖使整个辽东湾浮游植物细胞丰度分布和生物多样性指数均产生了严重影响。尤其是2012年8月整个辽东湾海域中肋骨条藻的优势度达到0.840、浮游植物细胞丰度均值达 $3072 \times 10^4 \text{ ind/m}^3$,生物多样性指数均值降低到1.34,浮游植物群落结构受到了明显的影响。

通过浮游植物种类、细胞丰度以及生物多样性指数与环境因子的Pearson相关性分析结果发现,浮游植物群落结构的变化,除与水温、COD、溶解氧以及营养盐的相关性显著外,与海水中油类含量的变化也有显著相关性。

从连续3年的调查结果来看,调查区域N/P比值平均值在12.8:1-74.3:1之间,除2014年10月N/P比值平均值低于16:1外,其他航次N/P比值均高于16:1,大量的氮源有利于中肋骨条藻的大量繁殖(霍文毅等,2001)。溢油事故发生后,导致辽东湾海域油类的监测值整体升高,高值区主要集中在辽东湾西部和北部近岸海域。根据黄逸君等(2010、2011)对浮游植物进行原油污染慢性毒性效应研究发现,高浓度的原油胁迫对浮游植物的生长有极显著抑制作用,而低浓度的原油污染不会抑制浮游植物生长,反而可促进其生长。在高浓度WAF($\geq 2.28 \text{ mg/L}$)和低浓度WAF($\leq 1.16 \text{ mg/L}$)胁迫下,各季节浮游植物群落中中肋骨条藻的优势度均呈升高趋势,而其他优势种大都呈下降趋势。本次调查中油类监测值虽有所升高,但整体低于 1.16 mg/L 的水平,

符合促进中肋骨条藻生长的条件。因此中肋骨条藻能暴发性繁殖可能与海水中油类含量的升高也有一定关系。

综上所述,19-3油田溢油事故发生后,辽东湾浮游植物种类数在2012年有明显的降低,而2013年和2014年浮游植物种类数的上升,表明了浮游植物群落很强的自我修复能力。中肋骨条藻在夏季出现暴发性繁殖,可能与海水中油类含量的升高有一定关系。除此之外,溢油后浮游植物主要物种没有出现较大变化,浮游植物群落较稳定,生物多样性变化不大。

参 考 文 献

- 王君丽,刘春光,冯剑丰,等. 石油烃对海洋浮游植物生长的影响研究进展. 环境污染与防治, 2011, 4(4): 81-86
- 宋伦,周遵春,王年斌,等. 辽东湾浮游植物多样性及与海洋环境因子的关系. 海洋环境科学, 2007, 26(4): 365-368
- 栾莎,宫相忠,双秀芝,等. 2009年春季辽东湾网采浮游植物群落结构. 海洋科学, 2012, 36(5): 57-64
- 高伟,宫相忠,双秀芝,等. 2009年夏、冬季辽东湾网采浮游植物群落结构分析. 海洋湖沼通报, 2012 (4): 162-169
- 黄逸君,陈全震,曾江宁,等. 石油污染对海洋浮游植物群落生长的影响. 生态学报, 2011, 31(2): 513-521
- 傅明珠,孙萍,孙霞,等. 锦州湾浮游植物群落结构特征及其对环境变化的响应. 生态学报, 2014, 34(13): 3650-3660
- 黄逸君,江志兵,曾江宁,等. 石油烃污染对海洋浮游植物群落的短期毒性效应. 植物生态学报, 2010, 34(9): 1095-1106
- 徐兆礼,陈亚瞿. 东黄海秋季浮游动物优势种聚集强度与鲐鱼渔场的关系. 生态学杂志, 1989, 8(4): 13-15
- 霍文毅,俞志明,邹景忠,等. 胶州湾中肋骨条藻赤潮与环境因子的关系. 海洋与湖沼, 2001, 32(3): 311-318
- Djomo JE, Dauta A, Ferrier V *et al.* Toxic effects of some major polyaromatic hydrocarbons found in crude oil and aquatic sediments on *Scenedesmus subspicatus*. Water Res, 2004, 38(7): 1817-1821
- Parab SR, Pandit RA, Kadam AN, *et al.* Effect of Bombay high crude oil and its water-soluble fraction on growth and metabolism of diatom *Thalassiosira* sp. Indian J Mar Sci, 2008, 37(3): 251-255
- Redfield AC. The biological control of chemical factors in the environment. Am Sci, 1958, 46(11): 150-170

(编辑 江润林)

Influence of 19-3 Oil Spill Accident on Phytoplankton Community in the Liaodong Bay

SONG Guangjun^①, LI Ai, WU Jinhao, WANG Zhaohui

(Liaoning Ocean and Fisheries Science Research Institute, Liaoning Key Laboratory of Marine Biological Resources and Ecology, Dalian, Liaoning 116023)

Abstract In this study we investigated the changes and contributing factors of species composition, cell abundance, biological diversity and dominant species of phytoplankton community in the Liaodong Bay, with emphasis on their correlation with the 19-3 oil spill accident in Penglai. Our analysis was based on the field data about phytoplankton community collected in the Liaodong Bay in May (Spring), August (Summer) and October (Autumn) from 2012 to 2014. It was found the number of phytoplankton species was the lowest in May 2012, and the highest in October 2013. Overall the number in 2012 was lower than those in 2013 and 2014. The cell abundance of the phytoplankton community rose unexpectedly in all three summer seasons. The maximum reached 3072×10^4 ind/m³ in August 2012, and the minimum (27×10^4 ind/m³) appeared in May 2012. The dominant species in different seasons were nearly unchanged between 2012 and 2014. The dominant species in May were *Paralia sulcata*, *Chaetoceros*, *Noctiluca scintillans*, and it was *Skeletonema costatum* in August. In October *Coscinodiscus*, *P. sulcata*, and *Chaetoceros* gained the dominance. Interestingly, *S. costatum*, a dominant microalga, underwent explosive reproduction in August 2012, which might be associated with the increased oil concentration in surface seawater in the Liaodong Bay. Correlation analysis was performed to explore the links between the environmental factors and parameters such as species composition, cell abundance, and biological diversity index. The results indicated that the alteration in phytoplankton community structure was significantly correlated with water temperature, COD, dissolved oxygen and nutrients. Furthermore, the community structure was also strongly affected by the oil concentration in surface seawater.

Keywords Oil pollution; Liaodong Bay; Phytoplankton; Community structure; Biological diversity index

^① Corresponding author: SONG Guangjun, E-mail: sgj666@qq.com

蓬莱 19-3 溢油后莱州湾浮游植物群落结构*

程 玲 王月霞 马元庆^① 何健龙 刘爱英 宋秀凯 由丽萍

(山东省海洋资源与环境研究院 山东省海洋生态修复重点实验室 烟台 264006)



摘要 2012–2014 年,对莱州湾浮游植物进行了 9 个航次调查,并同步监测其他环境因子。共鉴定浮游植物 125 种,隶属 5 大门类,以硅藻和甲藻为主,优势种主要为硅藻;浮游植物丰度和种类数均在 8 月达到最高值,多样性指数和丰富度指数年际变化趋势基本一致。春季(5 月)浮游植物种类数与透明度呈显著负相关($P < 0.01$),与 COD 呈显著正相关($P < 0.01$);夏季(8 月)与表层水温和无机氮呈显著负相关($P < 0.01$);秋季(11 月)浮游植物丰度与水深、盐度、溶解氧呈显著负相关($P < 0.01$),与石油类呈显著正相关($P < 0.01$)。

关键词 莱州湾;浮游植物;环境因子;相关性分析;溢油

中图分类号 S932.7 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)04-0067-07

莱州湾位于山东半岛西北、渤海南部,总面积 6966.93 km²(夏东兴等,1993),海底平坦,水浅滩阔,有黄河、小清河、潍河和胶莱河等众多河流汇入湾内,是黄渤海渔业生物的主要产卵场、栖息地和传统渔场(邓景耀等,2000)。曾是渤海初级生产力最高的区域,也是我国初级生产力最高的海域之一,渔业资源十分丰富。2011 年蓬莱 19-3 油田溢油事故发生后,莱州湾内 3400 km² 海域水质由第一类下降为第三、四类。其中,870 km² 海水受到严重污染(超第四类海水水质标准)(刘慧敏等,2012)。

浮游植物是海洋食物链的基础环节,对栖息生境中的各种环境因子有着较强的依赖性,其种类组成和数量分布等生态特征在一定程度上反映了海域生态环境的基本特征(Lalli *et al*, 1993),同时环境条件的改变也直接或间接地影响到浮游植物的群落结构。石油在水中不易分解,会较长时间存在于海水中,持续改变海洋环境质量,影响海洋生物食物链和群落结构,损害海洋生态系统。作者通过 2012–2014 年连续 3 年共 9 个航次的浮游植物调查,分析了溢油事故发生后莱州湾内浮游植物群落变化及其与环境因子关系,以期为莱州湾生态环境保护 and 渔业资源修复等提供基础资料。

1 材料与方 法

1.1 采样时间与地点

2012–2014 年,每年的 5 月、8 月和 11 月,在莱州湾海域(118.3°–120.6°E, 37.1°–38.3°N)进行 9 个航次监测,共设 35 个监测站位(图 1)。

按《海洋调查规范》(GB12763.6–2007)规定,用浅水 III 型浮游生物网自底层至表层垂直拖网采集浮

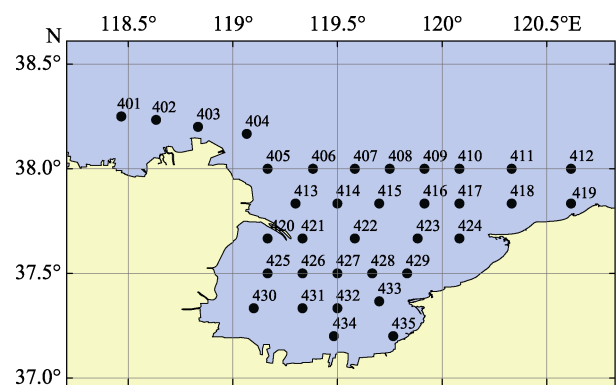


图 1 调查海域和站位分布

Fig.1 The studied area and sampling stations

*山东省科技发展计划(2014GSF117030)和山东省渤海海洋生态修复及能力建设项目(20140601)共同资助。程 玲, E-mail: linger19891028@126.com

^①通讯作者: 马元庆, 高级工程师, E-mail: erma0402@163.com

收稿日期: 2015-05-25, 收修改稿日期: 2015-07-27

游植物,样品用鲁格氏溶液固定,实验室内进行分类、鉴定、计数和统计。同步调查水温(Water Temperature, WT)、盐度(Salinity)、透明度(Trans Parency)、溶解氧(Dissolved Oxygen, DO)、化学耗氧量(Chemical Oxygen Demand, COD)、pH、石油类(Oil)、总氮(Total Nitrogen, TN)及总磷(Total Phosphorus, TP)等环境参数,所有操作均按照《海洋监测规范》(GB17378.4-2007)进行。

1.2 数据分析

浮游植物丰度以每立方米出现的个体数表示(cells/m³)。

优势种的优势度: $Y = (n_i / N') \times f_i$

式中, n_i 为第 i 种的丰度, f_i 为该种在各站位中出现的频率, N' 为总丰度。根据种类优势度公式计算各种生物的优势度, 将 $Y > 0.02$ 的生物定为优势种(钱迎情等, 1994)。

物种多样性指数 H' 的计算采用 Shannon-Winner 指数(Shannon *et al*, 1949):

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

物种丰度指数 d_{Ma} 采用 Margalef 指数计算公式(Margalef *et al*, 1968): $d_{Ma} = (S - 1) / \log_2 N$

均匀度指数 J 采用 Pielou 指数计算公式(Pielou *et al*, 1969):

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

式中, N 为采集样品中所有物种的总个体数, S 为样品中的种类总数, P_i 为第 i 种的个体数与样品中的总个体数的比值。

数据用 PRIMER6.0 软件统计分析, 浮游植物丰度平面分布图用 Surfer11.0 软件绘制, 浮游植物密度及种类数与环境因子相关关系用 SPSS19.0 软件分析。

2 结果

2.1 浮游植物种类组成及优势种

9 个航次共鉴定浮游植物 125 种(包含 1 个变种, 2 个变型), 隶属于硅藻(Bacillariophyceae)、甲藻(Pyrrophyta)、金藻(Chrysophyta)、蓝藻(Cyanophyta)、绿藻(Chlorophyta)5 大门类, 以硅藻(101 种)和甲藻(21 种)居多, 优势种大多为硅藻, 主要包括圆筛藻属(*Coscinodiscus* sp.)、角毛藻属(*Chaetoceros* sp.)、尖刺拟菱形藻(*Pseudo-nitzschia pungens*)、斯氏几内亚藻(*Guinardia striata*)等(表1)。按其生态特征可分为五类。

2.1.1 广温、广盐的广布种 如尖刺拟菱形藻、丹麦细柱藻(*Leptocylindrus danicus*)、派格棍形藻

(*Bacillaria paxillifera*)、中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)、柔弱角毛藻(*Chaetoceros debilis*)、冕孢角毛藻(*Chaetoceros diadema*)、中心圆筛藻(*Coscinodiscus centralis*)、星脐圆筛藻(*Coscinodiscus asteromphalus* var. *asteromphalus*)、布氏双尾藻(*Ditylum brightwellii*)、刚毛根管藻(*Rhizosolenia setigera*)、斯氏几内亚藻和扁多甲藻(*Protoperdinium depressum*)等。

2.1.2 温带内湾种和沿岸种 如中华半管藻(*Hemiaulus sinensis*)、中华齿状藻(*Odontella sinensis*)、窄隙角毛藻(*Chaetoceros affinis*)、丹麦角毛藻(*Chaetoceros danicus*)、卡氏角毛藻(*Chaetoceros castracanei*)、短角弯角藻(*Eucampia zodiacus*)、绕孢角毛藻(*Chaetoceros coarctatus*)、柔弱几内亚藻(*Guinardia delicatula*)和翼根管藻印度变型(*Proboscia indica*)等。

2.1.3 热带近岸种 如拟旋链角毛藻(*Chaetoceros pseudocurvisetus*)、旋链角毛藻(*Chaetoceros curvisetus*)、劳氏角毛藻(*Chaetoceros lorenzianus*)和窄面角毛藻(*Chaetoceros paradoxus*)等。

2.1.4 远洋性种 如密连角毛藻(*Chaetoceros densus*)、虹彩圆筛藻(*Coscinodiscus oculus-iridis*)和伏氏海线藻(*Thalassionema frauenfeldii*)等。

2.1.5 半咸水种 如波罗的海布纹藻(*Gyrosigma balticum*)。

浮游植物种类组成呈现较为明显的单峰型季节变化规律(图2), 8月种类数最多, 11月次之, 5月最少。2012-2014年年际间变化不大, 种类数相对稳定, 种类组成上硅藻均占绝对优势, 其次为甲藻, 偶尔出现金藻、蓝藻等。

2.2 浮游植物群落参数变化

图3为2012-2014年浮游植物群落结构参数(细胞丰度、多样性指数、丰富度指数和均匀度指数)变化情况。浮游植物丰度年际变化与种类数的变化趋势基本一致, 均呈现单峰型。5月细胞丰度均值较低, 8月有大幅升高, 11月又有所回落, 但依然远高于同年5月浮游植物丰度; 2013年8月细胞丰度是其他年份的近20倍, 主要源自大量出现的拟旋链角毛藻和旋链角毛藻, 平均细胞丰度分别达到 2.30×10^7 、 1.75×10^7 cells/m³, 接近赤潮阈值。

多样性指数与丰富度指数年际变化趋势相似。2012年呈单峰型, 8月多样性指数和丰富度指数均为最高, 分别为2.51和0.82; 2013年和2014年指数均呈上升趋势, 5月最低, 11月最高。2012年与2013年均均匀度指数呈现下降趋势, 5月均为同年最高值, 分别为0.69和0.75; 2014年均均匀度指数与同年的多样

表 1 2012–2014 年莱州湾浮游植物主要优势种
Tab.1 Dominant species of phytoplankton collected in the Laizhou Bay from 2012 to 2014

航次(年-月) Time (Y-M)	优势种 Dominant species	拉丁名 Latin name	优势度 Dominance
2012-05	短柄曲壳藻	<i>Achnanthes brevipes</i>	0.313
	舟形藻属	<i>Navicula</i> sp.	0.068
	具槽直链藻	<i>Melosira sulcata</i>	0.022
2012-08	旋链角毛藻	<i>C. curvisetus</i>	0.213
	小环藻属	<i>Cyclotella</i> sp.	0.069
	舟形藻属	<i>Navicula</i> sp.	0.048
2012-11	圆筛藻属	<i>Coscinodiscus</i> sp.	0.209
	丹麦细柱藻	<i>L. danicus</i>	0.154
	三角角藻	<i>Ceratium tripos</i>	0.102
2013-05	舟形藻属	<i>Navicula</i> sp.	0.050
	辐射圆筛藻	<i>Coscinodiscus radiatus</i>	0.034
	圆筛藻属	<i>Coscinodiscus</i> sp.	0.032
2013-08	拟旋链角毛藻	<i>C. pseudocurvisetus</i>	0.190
	旋链角毛藻	<i>C. curvisetus</i>	0.107
2013-11	丹麦细柱藻	<i>L. danicus</i>	0.264
	尖刺拟菱形藻	<i>P. pungens</i>	0.213
	旋链角毛藻	<i>C. curvisetus</i>	0.021
	斯氏几内亚藻	<i>G. striata</i>	0.748
2014-05	夜光藻	<i>Noctiluca scintillans</i>	0.046
	伏氏海线藻	<i>T. frauenfeldii</i>	0.280
2014-08	角毛藻属	<i>Chaetoceros</i> sp.	0.081
	卡氏角毛藻	<i>C. castracanei</i>	0.045
	尖刺拟菱形藻	<i>P. pungens</i>	0.218
2014-11	短角弯角藻	<i>E. zodiacus</i>	0.147
	旋链角毛藻	<i>C. curvisetus</i>	0.040

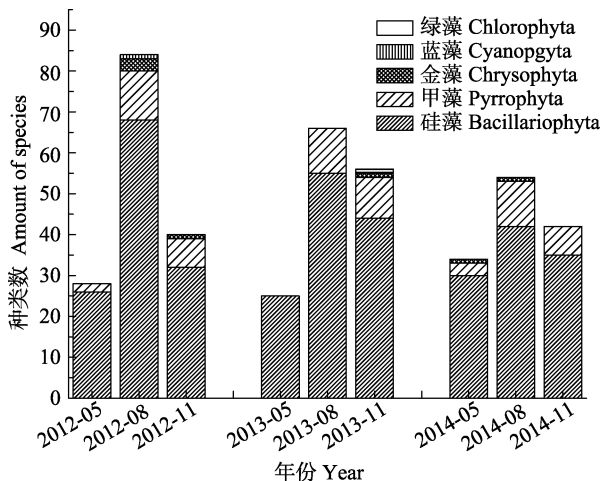


图 2 浮游植物种类变化

Fig.2 Variation of phytoplankton species from 2012 to 2014

性指数及丰富度指数趋势一致, 随季节呈上升趋势。

综合浮游植物各群落参数, 2014 年 8 月及 11 月

莱州湾浮游植物多样性指数、丰富度指数及均匀度指数均相对较高, 浮游植物群落结构稳定。

2.3 浮游植物平面分布

莱州湾浮游植物的平面分布极不均匀。河口及近岸海域浮游植物丰度远大于远海。黄河口近岸海域各季节浮游植物细胞丰度均较高, 其次为广利河、老弥河和小清河口附近海域, 莱州湾北部海域相对较低(图 4)。

2012 年 5 月, 浮游植物丰度最高值出现在黄河口附近海域的 413 站位, 丰度为 23.25×10^5 cells/m³; 8 月最高值出现在湾底近岸海域的 435 站位, 丰度为 89.53×10^5 cells/m³; 黄河口附近海域次之, 丰度为 44.41×10^5 cells/m³; 11 月最高值同样出现在 435 站位(丰度为 14.83×10^6 cells/m³)。黄河口附近海域浮游植物丰度依然较高, 丰度为 1.65×10^6 cells/m³。

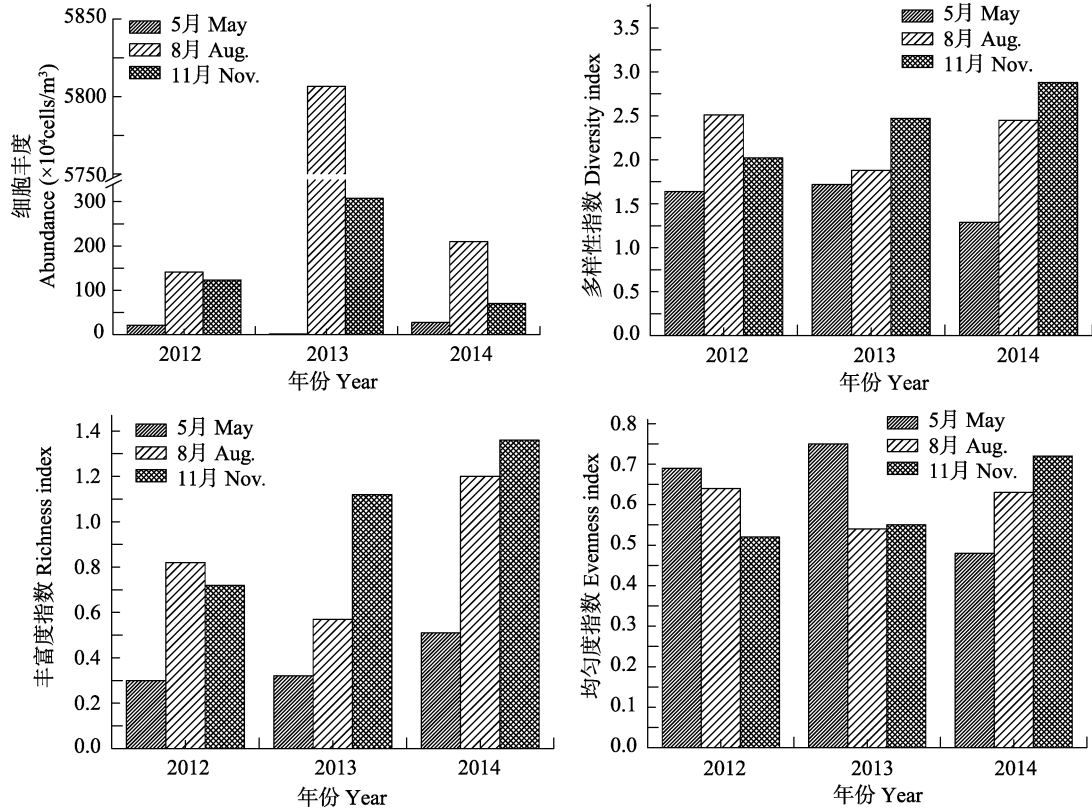


图3 浮游植物群落参数年际变化(细胞丰度、丰富度指数、多样性指数、均匀度指数)

Fig.3 Annual variation of the phytoplankton community (cell abundance, richness index, diversity index and evenness index)

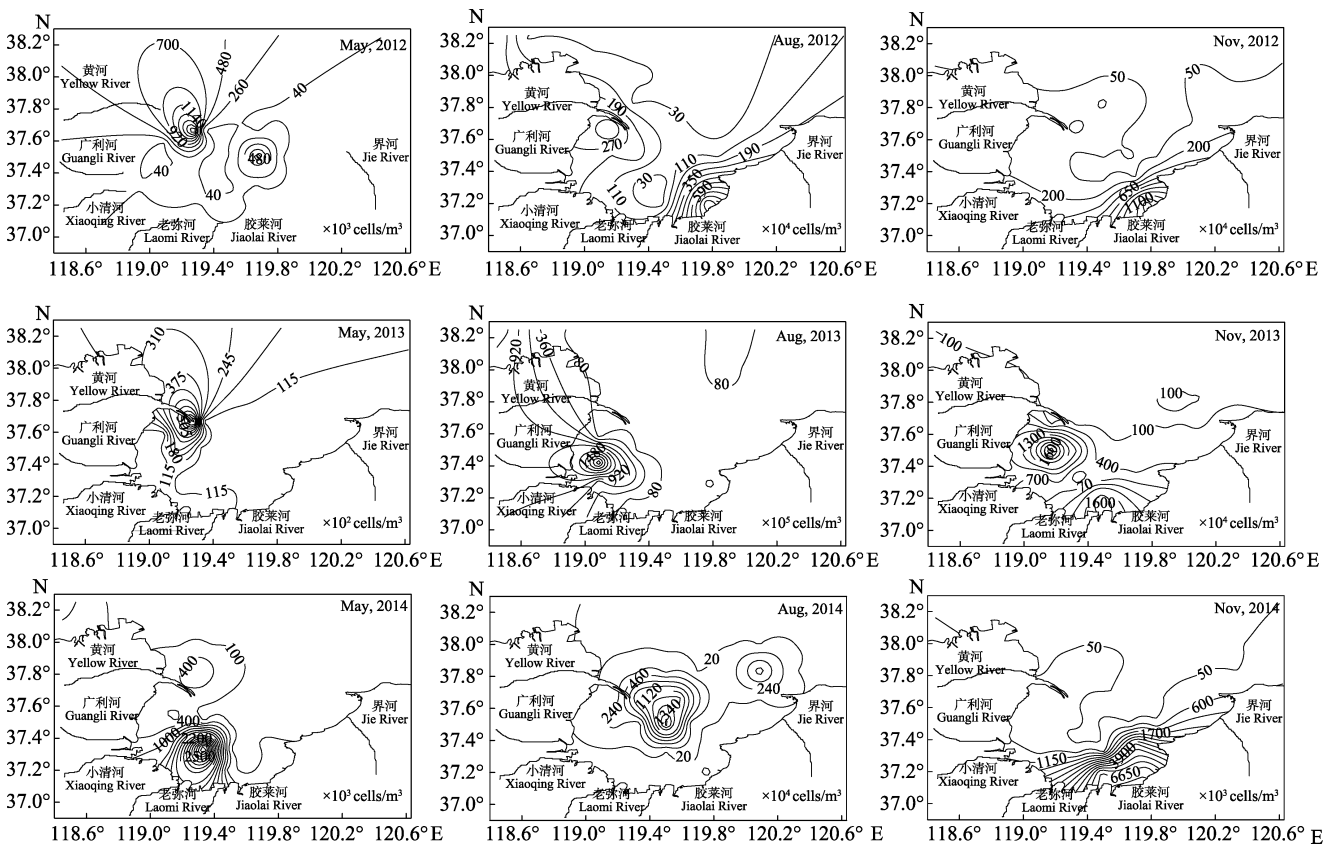


图4 莱州湾浮游植物平面分布

Fig.4 Horizontal distribution of phytoplankton in the Laizhou Bay

2013年依然是黄河口和广利河口附近海域浮游植物丰度较高,5月、8月、11月丰度分别为 3.36×10^4 、 10.37×10^7 、 3.93×10^5 cells/m³,8月浮游植物丰度最高。

2014年5月和8月丰度最高值均出现在莱州湾中部远岸海域,分别为 54.87×10^5 和 21.57×10^6 cells/m³。11月最高值出现在湾底东南部近岸海域,丰度为 70.70×10^5 cells/m³,远高于黄河口附近海域(丰度为 8.42×10^4 cells/m³),最低值出现在湾中部海域,丰度为 1.69×10^4 cells/m³。

2.4 浮游植物群落结构与环境因子关系

浮游植物丰度和种类数与水深、表层水温、盐度、

营养盐等环境因子相关关系见表2。春季,浮游植物丰度与水深呈负相关($P < 0.05$),种类数与水深、表层水温呈负相关($P < 0.05$),与透明度呈显著负相关($P < 0.01$),与化学需氧量(COD)呈显著正相关($P < 0.01$);夏季,浮游植物丰度与pH呈负相关($P < 0.05$),与无机氮、石油类含量呈正相关($P < 0.05$),种类数与溶解氧呈正相关($P < 0.05$),与表层水温、无机氮含量呈显著负相关($P < 0.01$);秋季,浮游植物丰度与COD呈正相关($P < 0.05$),与石油类含量呈显著正相关($P < 0.01$),与水深、盐度、溶解氧呈显著负相关($P < 0.01$),浮游植物种类数与石油类呈正相关($P < 0.05$),与COD呈负相关($P < 0.05$),与pH呈显著负相关($P < 0.01$)。

表2 莱州湾浮游植物群落结构与环境因子的相关关系

Tab.2 Pearson correlation between the phytoplankton community and environmental factors in the Laizhou Bay

理化指标 Environment factors	春季 Spring		夏季 Summer		秋季 Autumn	
	丰度 Abundance	种类数 Species	丰度 Abundance	种类数 Species	丰度 Abundance	种类数 Species
水深 Water depth	-0.246*	-0.262*	-0.174	0.098	-0.481**	0.138
表层水温 Surface temperature	-0.066	-0.339*	0.125	-0.439**	-0.179	0.088
透明度 Transparency	-0.221	-0.440**	-0.118	-0.141	0.105	0.042
盐度 Salinity	-0.186	-0.352	-0.054	0.189	-0.422**	-0.032
酸碱度 pH	0.126	0.030	-0.244*	0.092	-0.015	-0.335**
溶解氧 DO	-0.035	0.196	-0.013	0.229*	-0.277**	-0.155
化学需氧量 COD	0.132	0.327**	-0.102	-0.009	0.234*	-0.220*
磷酸盐 Phosphate	0.114	0.133	0.097	0.006	-0.129	-0.374
无机氮 DIN	0.085	0.019	0.240*	-0.298**	0.078	0.070
石油类 Oil	0.147	0.149	0.270*	0.108	0.576**	0.251*

**表示相关置信度水平 < 0.01 , *表示相关置信度水平 < 0.05

** denoted confidence level < 0.01 , * denoted confidence level < 0.05

3 讨论

3.1 浮游植物群落结构及其参数变化

本次调查共鉴定浮游植物 125 种(包含变型和变种),分属 5 大门类。其中,硅藻门无论是种类还是丰度均占绝对优势,这与刘慧等(2003)、王俊(2003)关于莱州湾浮游植物的调查结果一致。由于硅藻形成的硅质化外壳对其自身生存具有保护作用,同时在不良情况下,硅藻可产生休眠孢子度过不良环境,对环境适应能力较强,使其在整个浮游植物种类组成中占绝对优势。2012年共鉴定浮游植物 90 种,2013年共鉴定浮游植物 88 种,2014年共鉴定浮游植物 69 种。由此可见,浮游植物种类数在溢油后呈现逐年下降趋势,但总种类数仍高于 2009 年的 58 种(宁璇璇等, 2011)。

莱州湾海域浮游植物种类主要以温带近岸种和浮游广布种为主,溢油发生后浮游植物的种类组成未

发生明显变化(李广楼等, 2006; 宁璇璇等, 2011)。

浮游植物的种类和丰度均呈明显的季节变化特征,2012-2014年最高值均在夏季(8月),最低值在秋季(11月)。历史资料显示,1998年莱州湾浮游植物数量高峰出现在春季(5月),最低值出现在夏季(8月)(王俊, 2000);2003年莱州湾浮游植物数量均值最高值出现在8月,最低值出现在5月(李广楼等, 2006);说明15年间莱州湾浮游植物群落结构的季节演替发生了变化。

浮游植物的群落参数显示,以多样性指数小于1、均匀度小于0.3为多样性较差的标准(李广楼等, 2006),莱州湾浮游植物的多样性指数均大于1,均匀度指数均大于0.3。因此可以认为,莱州湾的生物多样性和丰富度均较好,浮游植物群落结构比较稳定,种类和数量分布比较均匀。

3.2 环境因子对浮游植物群落结构的影响

海洋环境是海洋生物赖以生存的基础,海洋生物

的活动分布、繁殖和生长都与海洋环境密不可分。浮游植物丰度的平面分布显示莱州湾河口区及近岸海域浮游植物丰度远大于远海。其中黄河口近岸海域各季节浮游植物细胞丰度均较高,河流汇入湾内海水的盐度一般较低,营养盐类比较丰富,有利于浮游植物的繁殖生长(王俊等,1998;康元德,1981;朱树屏等,1966)。

浮游植物的数量丰度变化与表层水温、透明度、溶解氧、营养盐、石油类等环境因子密切相关。冬季水温低,浮游植物繁殖能力弱、丰度低,营养消耗少,使得春季海水中营养盐积累较多,所以春季营养盐一般不会成为浮游植物生长繁殖的限制因子,而水深、透明度和水温是影响浮游植物丰度和种类数的环境因子。随着气温逐渐升高以及沿岸河流输送营养盐的增加,浮游植物生长繁殖速度加快,夏季浮游植物丰度大幅升高,此时浮游植物丰度与无机氮等营养盐呈正相关,与郝彦菊等(2005)关于莱州湾营养盐与浮游植物多样性的调查研究结果一致;浮游植物丰度大幅度增加时,为了争夺有限的营养物质和生存空间,种间竞争加剧,浮游植物种类数下降,因而8月浮游植物种类数与无机氮呈现显著负相关。而随着水温的下降以及营养盐的消耗,秋季浮游植物丰度又再次下降,此时影响浮游植物丰度的环境因子为水深、盐度和溶解氧。Parab等(2008)、王修林等(2004)研究显示,低浓度石油烃对旋链角毛藻的生长表现为促进作用。本调查中春、秋季莱州湾浮游植物优势种均有旋链角毛藻,所以夏、秋季莱州湾浮游植物丰度与石油类含量呈正相关。在一定条件下,低浓度的石油烃污染物可能导致大量赤潮类浮游植物在短时间内大量繁殖,这可能是诱发赤潮的因素之一(黄逸君等,2011)。2013年8月,莱州湾调查海域拟旋链角毛藻和旋链角毛藻的大量繁殖可能与此时海水中低浓度石油烃有关。到目前,关于低浓度的石油烃能促进浮游植物生长的原因尚未确定,可能与石油烃中含有与浮游植物生长所需营养相同的成分有关(王君丽等,2011)。

本调查结果显示,溢油发生后莱州湾浮游植物群落结构比较稳定,种类和丰度分布相对较均匀,溢油未明显改变浮游植物的自然习性。但石油烃与海洋环境及浮游植物群落的相互作用是一个长期复杂的过程。目前,有关石油烃对海洋浮游植物的致毒机理和生物学效应研究仍不够深入,需要获取更多资料进行

更深入的研究。

参 考 文 献

- 王君丽,刘春光,冯剑丰,等.石油烃对海洋浮游植物生长的影响研究进展.环境污染与防治,2011,33(4):81-86
- 王修林,杨茹君,祝陈坚.石油烃污染物存在下旋链角毛藻生长的粒度效应初步研究.中国海洋大学学报(自然科学版),2004,34(5):849-853
- 王俊,康元德.渤海浮游植物种群动态的研究.海洋水产研究,1998,19(1):43-52
- 王俊.莱州湾浮游植物种群动态研究.海洋水产研究,2000,21(3):33-38
- 王俊.渤海近岸浮游植物种类组成及其数量变动的研究.海洋水产研究,2003,24(4):44-50
- 邓景耀,金显仕.莱州湾及黄口水域渔业生物多样性及其保护研究.动物学研究,2000,21(1):76-82
- 宁璇璇,纪灵,王刚,等.2009年莱州湾近岸海域浮游植物群落的结构特征.海洋湖沼通报,2011(3):97-104
- 朱树屏.黄河口附近海区浮游植物的季节变异.太平洋西部渔业研究委员会第九次全体会议论文集.北京:科学出版社,1966,1-10
- 刘慧,方建光,董双林,等.莱州湾和桑沟湾养殖海区浮游植物的研究II.海洋水产研究,2003,24(2):9-17
- 刘慧敏,刘广为.浅析蓬莱19-3溢油事故的环境及政治经济影响.学理论,2012(35):81-82
- 李广楼,陈碧鹃,崔毅,等.莱州湾浮游植物的生态特征.中国水产科学,2006,13(2):293-299
- 郝彦菊,王宗灵,朱明远,等.莱州湾营养盐与浮游植物多样性调查与评价研究.海洋科学进展,2005,23(2):197-204
- 夏东兴,王文海,刘传信,等.中国海湾志(第八分册).北京:海洋出版社,1993,69
- 钱迎倩,马克平.生物多样性研究的原理和方法.北京:中国科学技术出版社,1994,141-165
- 黄逸君,陈全震,曾江宁,等.石油污染对海洋浮游植物群落生长的影响.生态学报,2011,31(2):513-521
- 康元德.渤海浮游植物的数量分布和季节变化.海洋水产研究,1991(12):31-54
- Lalli CM, Parsons TR. Biological oceanography: An Introduction. New York: Pergamon Press, 1993, 45-79
- Margalef DR. Perspectives in ecological theory. Chicago: University of Chicago press, 1968, 1-111
- Pielou EC. An introduction to mathematical ecology. New York: Wiley-Interscience, 1969
- Parab SR, Pandit RA, Kadam AN, et al. Effect of Bombay high crude oil and its water-soluble fraction on growth and metabolism of diatom *Thalassiosira* sp.. Indian J Mar Sci, 2008, 37(3): 251-255
- Shannon CE, Weaver W. The mathematical theory of communication. Urbana: University of Illinois Press, 1949, 144

The Structure of the Phytoplankton Community in the Laizhou Bay After the Oil Spills in Penglai 19-3 Oilfield

CHENG Ling, WANG Yuexia, MA Yuanqing^①, HE Jianlong,
LIU Aiyong, SONG Xiukai, YOU Liping

(Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Shandong Key Laboratory of
Marine Ecological Restoration, Yantai 264006)

Abstract Ecosystems in the coastal water display high complexity and have been of great human and ecological interest. Interaction of physical, chemical and ecological factors determines the abundance and specific structures of biological communities, particularly the phytoplankton community, which comprise the lower levels of the oceanic food chain. To better understand the structure of the coastal phytoplankton community as well as its relationship with various environmental factors, a phytoplankton survey was carried out in the Laizhou Bay after the oil spills in Penglai 19-3 oilfield. At thirty-five selected sampling sites the water temperature, salinity, transparency, COD, pH, total nitrogen, and total phosphorus were investigated in May, August, and December from 2012 to 2014. Our sampling and testing methods followed the Specifications for Oceanographic Surveys and Specifications for Marine Monitoring. Correlation analysis (SPSS) was applied in determining the relationships between zooplankton communities and various environmental factors. Phytoplankton was collected using the standing net type III (mesh size 76 μm , the standard sampling tool in Chinese marine phytoplankton studies) with a vertical haul at each grid station. Five classes including 125 species were commonly found in the surveyed area. Diatoms were the dominant species and dinoflagellates also shared importance in the phytoplankton community. Both the abundance and the diversity of phytoplankton reached the maximum in August, and the annual variation of diversity index and richness index tended to be consistent. The diversity of phytoplankton was positively correlated to the chemical oxygen consumption (COD, $P < 0.01$) and negatively correlated to the transparency ($P < 0.01$) in spring. There were negative correlations between the phytoplankton diversity and the surface temperature of seawater and inorganic nitrogen ($P < 0.01$) in summer. As for the abundance of phytoplankton, it was negatively correlated to the depth of water, salinity, and dissolved oxygen ($P < 0.01$) in autumn, and positively correlated to the petroleum content. These results showed that after the oil spilled, no obvious changes in the abundance and the community structure of the phytoplankton were present in the Laizhou Bay.

Key words Laizhou Bay; Phytoplankton; Environmental factors; Correlation analysis; Oil spill

① Corresponding author: MA Yuanqing, E-mail: erma0402@163.com

2013 年春季莱州湾海域理化环境 及水质状况分析*

赵玉庭^① 苏 博 李佳蕙 王立明 齐延民 孙 珊

(山东省海洋资源与环境研究院 山东省海洋生态修复重点实验室 烟台 264006)

摘要 依据 2013 年 6 月对莱州湾海域的调查资料,分析了该海域盐度(S)、pH、溶解氧(DO)、化学耗氧量(COD)、溶解无机氮(DIN)和活性磷酸盐(PO₄-P)等理化因子的分布特征,并采用潜在性富营养化评价模式和有机污染指数分别对该海域的营养水平和有机污染状况进行了评价。结果显示,2013 年春季莱州湾所有站位溶解氧、化学耗氧量均符合 I 类海水水质标准;DIN 污染严重,31% 站位的 DIN 含量超 IV 类海水水质标准;PO₄-P 含量较低,所有站位 PO₄-P 含量均符合 I 类海水水质标准。由评价结果来看,2013 年春季莱州湾海域 N/P 比值总体处于高值,P 相对缺乏,营养水平处于磷限制潜在性富营养(VI_P)水平,有机污染程度属于 II 级,表明该调查海域开始受到有机污染,但有机污染程度轻于 2007 年夏季。

关键词 莱州湾; DIN; PO₄-P; N/P 比值; 潜在富营养化; 有机污染

中图分类号 X145 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)04-0074-07

莱州湾是渤海三大海湾之一,位于山东半岛西北部,总面积为 6966.93 km²,约占渤海的 10%,沿岸有黄河、小清河、胶莱河等 10 余条河流注入(刘义豪等, 2011; 刘慧等, 2003)。莱州湾三面环陆,入海径流带来了丰富的营养物质,是黄、渤海渔业生物的主要产卵场(米铁柱等, 2001)。近 20 年来,伴随着海水养殖排污增大、入湾陆源排污量的迅猛增加及河流入海量的锐减(高会旺等, 2003)等原因,莱州湾海域海洋环境生态系统明显恶化(郝彦菊等, 2005),从而给莱州湾生态环境和生物群落造成严重危害(沈志亮等, 1989; 李永琪等, 1991)。因此,本研究基于 2013 年 6 月在莱州湾进行的生态环境调查,分析了该海域盐度(S)、pH、溶解氧(DO)、化学耗氧量(COD)、溶解无机氮(DIN)和活性磷酸盐(PO₄-P)等理化因子的平面分布特征,并对该海域的营养水平和有机污染状况进行了评价,旨在了解莱州湾及附近海域的环境质量状况,为该海域资源开发和环境保护提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 调查时间与站位设置

2013 年 6 月对莱州湾海域进行调查,调查船为鲁昌渔 64193,调查海域内布设 16 个站位(图 1)。

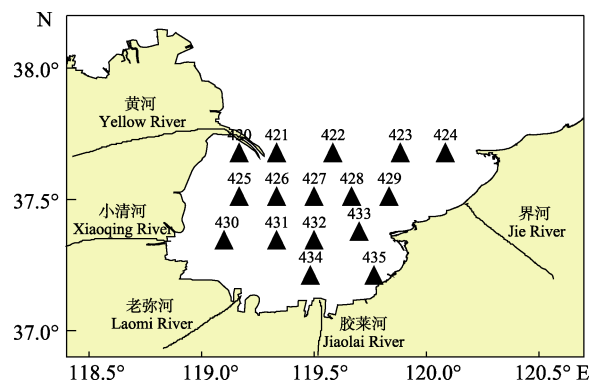


图 1 莱州湾调查站位

Fig.1 Location of sampling stations in the Laizhou Bay

* 山东省科技发展计划课题(2014GSF117030)资助

① 通讯作者: 赵玉庭, E-mail: zhaoyutingnihao@126.com

收稿日期: 2015-08-22, 收修改稿日期: 2015-10-28

1.2 调查项目及分析评价方法

调查项目包括盐度、pH、溶解氧、化学耗氧量、硝酸盐(NO₃-N)、亚硝酸盐(NO₂-N)、氨氮(NH₄-N)和活性磷酸盐。采样层次为表底层。样品的采集、现场处理及分析方法均按照海洋监测规范(GB17378.4-2007)中所规定的方法进行。

海水富营养化评价采用郭卫东等(1998)提出的以氮、磷营养盐作为评价参数的潜在性富营养化评价

模式(表 1)对莱州湾海域营养状况进行评价。水质有机污染风险评价采用蒋岳文等(1991)提出的有机污染指数(式 1)及有机污染等级(表 2)对有机污染状况进行评价。

$$A = \text{COD}_i / \text{COD}_s + \text{IN}_i / \text{IN}_s + \text{IP}_i / \text{IP}_s - \text{DO}_i / \text{DO}_s \quad (1)$$

式中, A 为有机污染指数; COD_i、IN_i、IP_i和 DO_i分别为实测值; COD_s、IN_s、IP_s和 DO_s分别为相应要素 I 类海水水质标准, 分别为 2.0、0.2、0.015、6.0 mg/L。

表 1 潜在性富营养化评价标准
Tab.1 Potential eutrophication assessment standards

等级 Grade	营养级 Nutrient level	DIN (μg/L)	PO ₄ -P (μg/L)	N/P 值 N/P value
I	贫营养 Poor nutrient	<200	<30	8-30
II	中度营养 Medium nutrient	200-300	30-45	8-30
III	富营养 Rich nutrient	>300	>45	8-30
IV _P	磷限制中度营养 Medium nutrient with phosphorous limiting	200-300	/	>30
V _P	磷中等限制潜在性富营养 Potential eutrophication with medium phosphorous limiting	>300	/	30-60
VI _P	磷限制潜在性富营养 Potential eutrophication with phosphorous limiting	>300	/	>60
IV _N	氮限制中度营养 Medium nutrient with nitrogen limiting	/	30-45	<8
V _N	氮中等限制潜在性富营养 Potential eutrophication with medium nitrogen limiting	/	>45	4-8
VI _N	氮限制潜在性富营养 Potential eutrophication with nitrogen limiting	/	>45	<4

表 2 有机污染评价分级
Tab.2 Grading of organic pollution

A 值 A value	有机污染程度分级 Organic pollution level	水质质量评价 Water quality evaluation
< 0	0	良好 Good
0-1	1	较好 Preferable
1-2	2	开始受到污染 Began to be polluted
2-3	3	轻度污染 Slightly polluted
3-4	4	中度污染 Moderately polluted
4-5	5	严重污染 Seriously polluted

2 结果与分析

2.1 理化环境状况

2.1.1 盐度 海水盐度是海洋水文学的最基本要素之一, 盐度决定水质的理化性质(夏斌等, 2008)。海水盐度一般受降水、蒸发、径流和水系影响, 盐度主要通过水的密度和渗透压影响海洋生物的形态、生长、发育和繁殖。

调查海域表层盐度的变化范围为 27.253-30.058, 平均值为 28.672±0.965; 底层盐度的变化范围为 27.329-30.236, 平均值为 29.005±0.964。由平面分布来看, 表

底层高盐度区均位于莱州湾的东北部海域。表底层低盐度区位于黄河口和小清河口附近海域, 表层在胶莱河河口海域也存在一个低盐度区。分布趋势呈现自西南向东北方向递增趋势, 这与黄河、小清河等入海河流的淡水注入和黄海的高盐水混合有关(张洪亮等, 2006)(图 2)。

2.1.2 pH pH 是海水中氢离子活度的一种度量, 海水正常的 pH 在 7.5-8.2 之间, 各种生物都有其生长发育的最适 pH 范围, 过高或过低的 pH 对海洋生物活动均有害。

调查海域表层 pH 的变化范围为 7.82-8.09, 平均

值为 7.94 ± 0.07 ; 底层 pH 的变化范围为 7.91–8.04, 平均值为 7.97 ± 0.04 。由水平分布看, 表层 pH 低值区位于黄河口和小清河口附近海域, 变化梯度较大, 逐渐向东北部递增, 高值区出现在东北部海域; 底层 pH 分布相对较均匀, 北部海域略高于其他海域(图 3)。

2.1.3 溶解氧 海水溶解氧的分布变化与大气分压、海水物理、化学、生物因子有着密切联系, 是进行海洋环境评价的重要指标之一。海水中充足的溶解氧是海洋生物生存的必要条件, 其含量的高低是评价水体质量的重要指标(夏斌等, 2009)。

调查海域表层 DO 的浓度变化范围为 8.18–9.85 mg/L, 平均值为 (8.95 ± 0.46) mg/L; 底层 DO 的

浓度变化范围为 8.01–9.60 mg/L, 平均值为 (8.80 ± 0.42) mg/L, 调查站位表层 DO 含量均符合 I 类海水水质标准。由水平分布来看, 表底层 DO 均呈自西南部沿岸海域向东北部递增趋势, 等值线较为密集, 变化梯度较大; 表底层 DO 均在湾口处出现一个低值区, 该海域缺氧区形成的主要原因可能是由于有机物的降解耗氧或者水体的层化作用所致(李绪录等, 1992; Tian *et al.*, 1993)(图 4)。

2.1.4 化学耗氧量 化学耗氧量是表示海水中还原性物质多少的 1 个指标。化学耗氧量越大, 说明水体受有机物的污染越严重。

调查海域表层 COD 的浓度变化范围为 1.05–

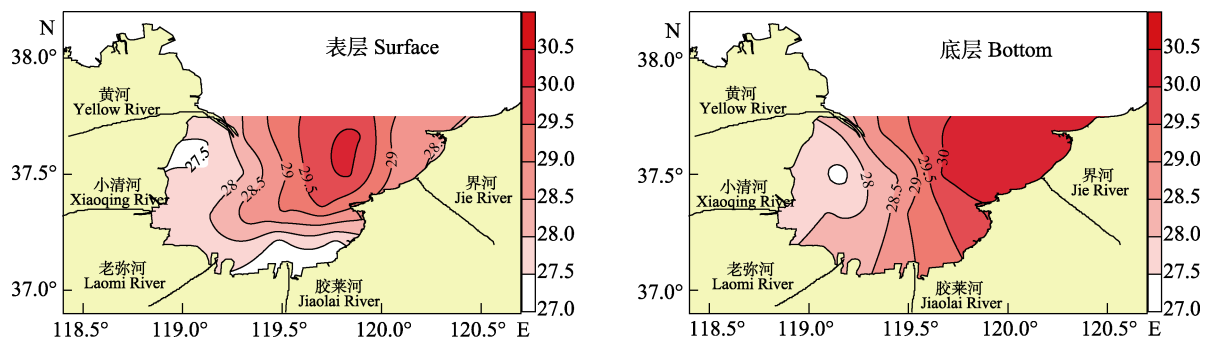


图 2 盐度平面分布
Fig.2 Horizontal distribution of salinity

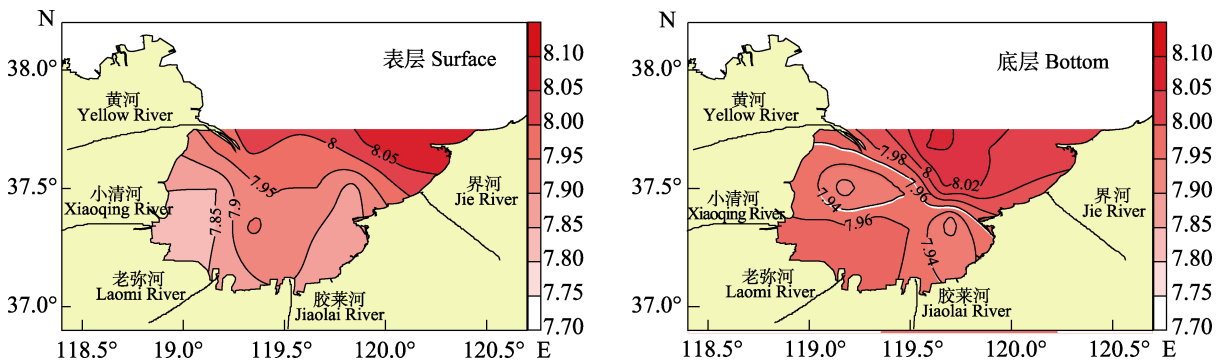


图 3 pH 平面分布
Fig.3 Horizontal distribution of pH

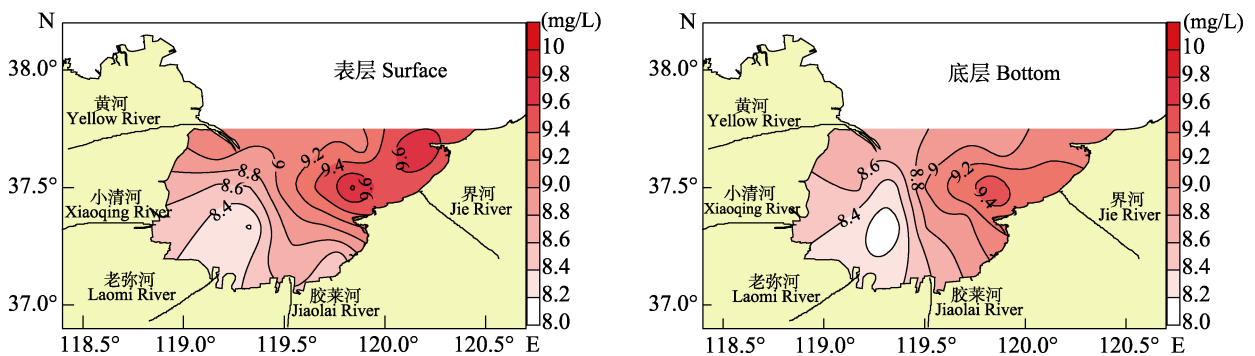


图 4 DO 平面分布
Fig.4 Horizontal distribution of dissolved oxygen

1.76 mg/L, 平均值为(1.45±0.22) mg/L; 底层 COD 的浓度变化范围为(1.05–1.76) mg/L, 平均值为(1.37±0.21) mg/L, 调查站位表层 COD 含量均符合 I 类海水水质标准。由水平分布看, 表层 COD 呈斑块状分布特征, 西南部、东北部和中部部分海域浓度较低, 其他海域浓度较高; 底层西南部和东南部海域浓度较低, 中部海域浓度较高(图 5)。

2.1.5 溶解无机氮 无机氮是海洋生物繁殖、生长所必需的营养物质, 与海洋初级生产力有着密切的关系(Ketchum *et al*, 1958), 在正常情况下, 海水中的 DIN 含量远远达不到引起海洋生物受危害程度。然而, 由于陆源排污的增加, 富营养化水域在适宜的条件下有可能发生赤潮。

调查海域表层 DIN 的浓度变化范围为 0.281–0.584 mg/L, 平均值为(0.429±0.106) mg/L; 底层 DIN 的浓度变化范围为 0.248–0.585 mg/L, 平均值为(0.398±0.108) mg/L。由水平分布来看, 表层 DIN 平面分布基本呈中西部近岸高、东部近岸低, 沿岸向离岸方向逐渐降低的特征, 西部海域明显高于东部海域。高值区主要位于小清河河口、老弥河口附近海域, 呈舌状向外延伸, 其 DIN 含量逐渐降低, 其主要受小清河等径流输入的影响(刘义豪等, 2011); 底层 DIN 平面分布与表层相似, 基本呈中西部近岸高、东部近岸低,

沿岸向离岸方向逐渐降低的特征(图 6)。

2.1.6 活性磷酸盐 活性磷酸盐是海洋生物必不可少的营养元素。海水中磷的含量太低将抑制浮游植物的正常生长, 从而妨碍海洋生产力的发展。如果水中磷酸盐含量超过一定限度, 会刺激藻类生长, 引发赤潮。水体中浮游植物的生长受磷酸盐的含量限制更为明显, 磷污染对水体富营养化影响更大。

调查海域表层 PO₄-P 的浓度变化范围为(2.32–5.22)×10⁻³ mg/L, 平均值为(3.50±1.09) ×10⁻³ mg/L。底层 PO₄-P 的浓度变化范围为(2.32–5.22)×10⁻³ mg/L, 平均值为(3.46±1.01) ×10⁻³ mg/L。由水平分布来看, 表层 PO₄-P 平面分布特征仍呈近岸高离岸低的分布特征, 调查海域没有明显的 PO₄-P 高值区, 只在莱州湾中部海域出现一个 PO₄-P 的低值区, 整个莱州湾海域 PO₄-P 含量整体较低; 底层 PO₄-P 平面分布与表层相似(图 7)。

2.2 营养状况分析

2.2.1 富营养化状况分析 2013 年春季莱州湾海域水质 DIN、PO₄-P 浓度和 N/P 值及营养类型评价见表 3。从表 3 可以看出, 2013 年春季莱州湾海域 DIN 污染较重, 所有站位 DIN 含量均超 I 类海水水质标准, 表层有 31% 的站位 DIN 含量超 IV 类海水水质标准, 底层有 21% 的站位 DIN 含量超 IV 类海水水质标

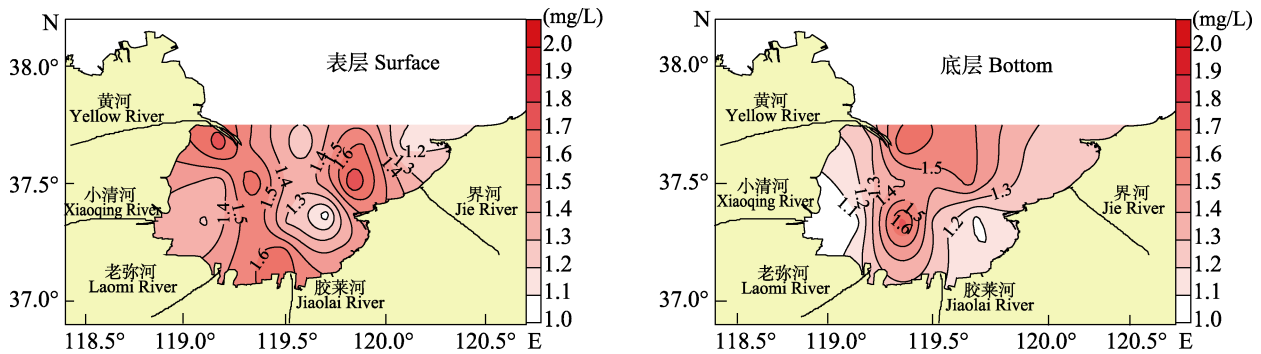


图 5 COD 平面分布
Fig.5 Horizontal distribution of chemical oxygen demand

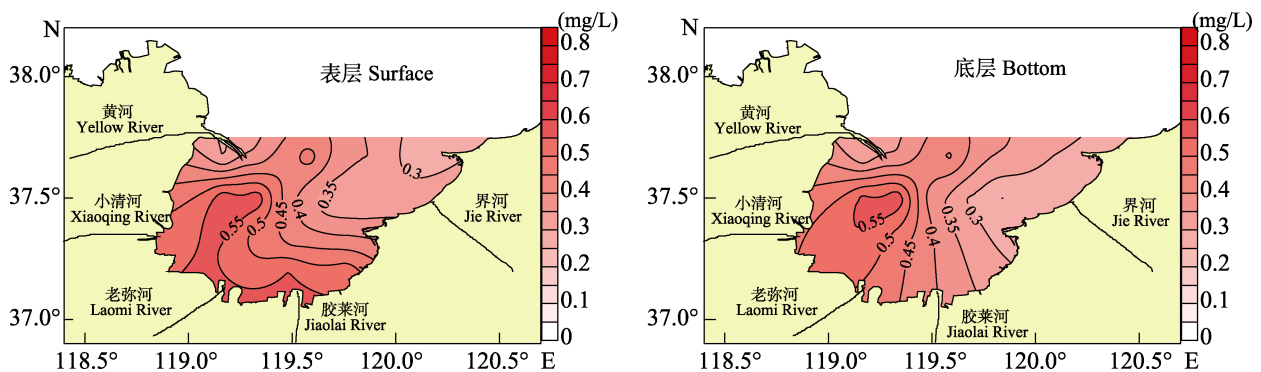


图 6 DIN 平面分布
Fig.6 Horizontal distribution of dissolved inorganic nitrogen

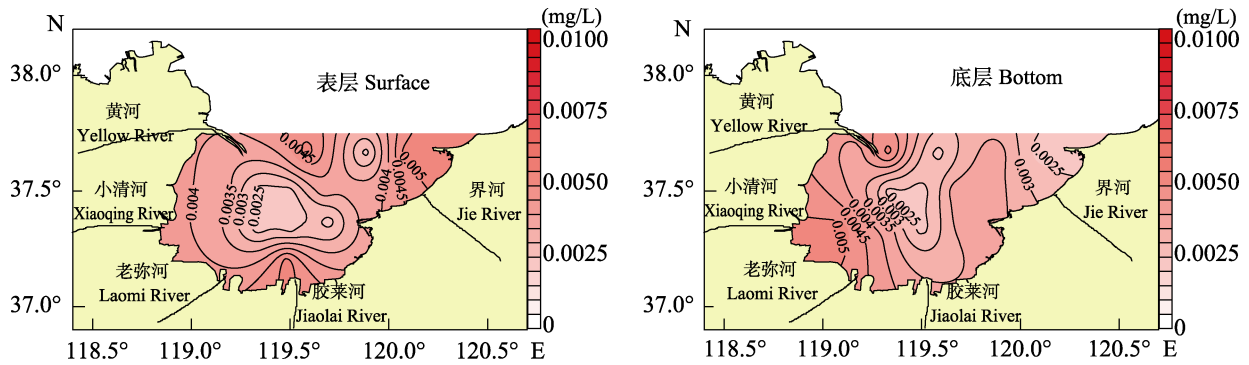
图 7 $\text{PO}_4\text{-P}$ 平面分布

Fig.7 Horizontal distribution of phosphorus concentration

表 3 2013 年春季莱州湾海域 DIN、 $\text{PO}_4\text{-P}$ 含量、N/P 比值及营养类型评价Tab.3 Concentrations of DIN, $\text{PO}_4\text{-P}$, and N/P and evaluation of nutritional type in the Laizhou Bay in spring 2013

水层 Water layer	DIN (mg/L)	$\text{PO}_4\text{-P}$ ($\times 10^{-3}$ mg/L)	N/P 值 N/P value	级别 Grade
表层 Surface	0.429 \pm 0.106	3.50 \pm 1.09	299 \pm 118	IV _p
底层 Bottom	0.398 \pm 0.108	3.46 \pm 1.01	279 \pm 122	IV _p
平均 Average	0.415 \pm 0.106	3.48 \pm 1.04	289 \pm 118	IV _p

准；整个莱州湾海域 $\text{PO}_4\text{-P}$ 含量整体较低，表底层所有站点 $\text{PO}_4\text{-P}$ 含量均符合 I 类海水水质标准；表底层所有站点 N/P 比值(原子比, 以下同)总体处于高值, 根据表 1 的划分标准, 对莱州湾海域的总体富营养化水平评价结果显示, 2013 年春季莱州湾海域营养水平基本属于磷限制潜在性富营养(VI_p)水平。

2.2.2 有机污染状况分析 根据有机污染综合指数公式计算, 2013 年春季莱州湾海域各站点表层有机污染指数见图 8。从图 8 可以看出, 表层有 31% 的站点有机污染程度为 III 级, 主要位于黄河、小清河和胶莱河河口区域, 受到轻度污染; 有 56% 的站点有机污染程度为 II 级, 开始受污染; 有 2% 的站点有机污

染程度为 I 级, 主要位于东北部海域, 水质较好。莱州湾调查海域表层的有机污染指数平均为 1.61, 属有机污染程度 II 级, 表明该调查海域开始受到有机污染, 但有机污染程度轻于 2007 年夏季(夏斌等, 2009)。

3 讨论

按照 Redfield 公式, 浮游植物按 N/P 比为 16/1 的比例从海水中吸收生源元素(Redfield, 1958)。莱州湾海水中氮磷比值近 30 年总体呈升高趋势, 从 1982 年的 4.2 (5、8、10 月表底层平均值)上升到 2009 年的 199 (5、8 月表层平均值)(刘义豪等, 2011), 到 2013 年的 289(6 月表底层平均值), 远远超过 Redfield

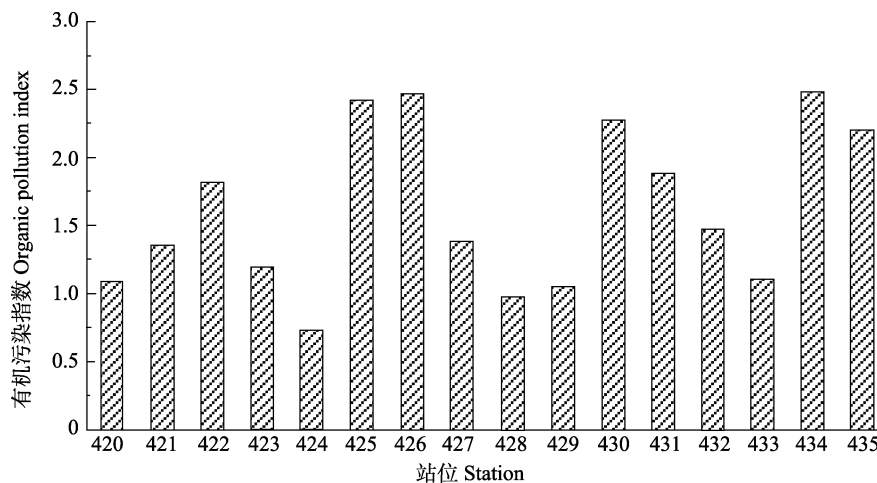


图 8 莱州湾各站点表层有机污染指数

Fig.8 The organic pollution index of surface water in the Laizhou Bay

公式正常 N/P 比的 16/1, 莱州湾海域营养盐结构由氮限制演化为现今的磷限制, 较高的 N/P 比值可能会引起浮游植物种群结构变化, 影响整个生态系统。研究发现, 造成氮磷比值不断升高的原因, 一方面是氮肥在农业中大量使用, 导致陆源氮输入量的增加(王修林等, 2008), 氮成为我国陆源排污的主要污染物(国家海洋局, 2009)。相关性分析表明, 表层 DIN 含量与盐度呈显著负相关, 相关系数 R 为 0.61 ($P < 0.05$, $n=16$), 表明 DIN 主要来自河流径流的输送; 另一方面是浮游植物间的藻间竞争作用和化感效应(彭喜春等, 2007; 康燕玉等, 2006; Chen *et al.*, 2004; Nuccio *et al.*, 2003)等引起种类和优势种的改变, 需磷浮游植物数量和种类受到限制, 噬氮浮游植物大量繁殖; 另外渤海 1 年净营养盐收支为 DIN 含量增加而 $PO_4\text{-P}$ 含量降低(赵亮等, 2002), 也是造成氮磷比值不断升高的原因之一。

中国近岸海域普遍具有营养盐限制的特征, 只是表现为一种潜在性的富营养化(郭卫东等, 1998), 因此, 本研究采用潜在性富营养化评价模式和有机污染综合指数公式对莱州湾海域状况进行评价, 评价结果表明, 2013 年春季莱州湾海域营养水平处于磷限制潜在性富营养(VI_P)水平, 有机污染程度属于 II 级, 表明该调查海域开始受到有机污染, 但有机污染程度轻于 2007 年夏季, 污染状况有所好转。

4 结论

(1) 2013 年春季莱州湾所有站位溶解氧、化学耗氧量均符合 I 类海水水质标准; DIN 污染严重, 31% 的站位 DIN 含量超 IV 类海水水质标准, 主要受陆源输入显著影响; $PO_4\text{-P}$ 含量较低, 所有站位 $PO_4\text{-P}$ 含量均符合 I 类海水水质标准。

(2) N/P 比值总体处于高值, P 相对缺乏; 2013 年春季整个莱州湾海域营养水平处于磷限制潜在性富营养水平, 有机污染程度属于 II 级, 表明该调查海域开始受到有机污染, 但有机污染程度轻于 2007 年夏季, 污染状况有所好转。

参 考 文 献

王修林, 崔正国, 李克强, 等. 环渤海三省一市溶解态无机氮容量总量控制. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2008, 38(4): 619-622
刘义豪, 杨秀兰, 靳洋, 等. 莱州湾海域营养盐现状及年际变

化规律. 渔业科学进展, 2011, 32(4): 1-5
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
米铁柱, 于志刚, 姚庆祯, 等. 春季莱州湾南部溶解态营养盐研究. 海洋环境科学, 2001, 20(3): 14-18
李永琪, 丁美丽. 海洋污染生物学. 北京: 海洋出版社, 1991, 404-415
李绪录, 吴英霞. 夏季珠江口海区贫氧现象的初步分析. 广东海岛调查研究文集. 广州: 广东科学出版社, 1992
沈志亮, 陆家平, 刘兴俊, 等. 黄河口及附近海域的无机氮和磷酸盐. 海洋科学集刊, 1989(30): 51-79
张洪亮, 杨建强, 崔文林, 等. 莱州湾盐度变化现状及其对海洋环境与生态的影响. 海洋环境科学, 2006, 25(增刊): 11-14
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
国家海洋局. 2009 年中国海洋环境质量公报. 海洋开发与管理, 2010, 27(4): 3-6
赵亮, 魏皓, 冯士筵. 渤海氮磷营养盐的循环和收支. 环境科学, 2002, 23(1): 78-81
郝彦菊, 王宗灵, 朱明远, 等. 莱州湾营养盐与浮游植物多样性调查与评价研究. 海洋科学进展, 2005, 23(2): 197-204
高会旺, 吴德星, 白洁, 等. 2000 年夏季莱州湾生态环境要素的分布特征. 青岛海洋大学学报(自然科学版), 2003, 33(2): 185-191
夏斌, 张晓理, 崔毅, 等. 夏季莱州湾及附近水域理化环境及营养现状评价. 渔业科学进展, 2009, 30(3): 103-111
康燕玉, 梁君荣, 高亚辉, 等. 氮、磷比对两种赤潮藻生长特性的影响及藻间竞争作用. 海洋学报, 2006, 28(5): 117-122
蒋岳文, 王永强, 尚龙生, 等. 大连湾海水营养盐的含量及有机污染状况分析. 海洋学报, 1991, 10(1): 100-103
彭喜春, 杨维东, 刘洁生. 赤潮期间藻类的化感效应. 海洋科学, 2007, 31(2): 84-88.
Chen YLL, Chen HY, Karl DM, *et al.* Nitrogen modulates phytoplankton growth in spring in the South China Sea. Cont Shelf Res, 2004, 24(4-5): 527-541
Ketchum BH, Vaccaro R F, Corwin N. The annual cycle of P and N in new England coastal waters. J Mar Res, 1958, 17: 282-301
Nuccio C, Melillo C, Massi L, *et al.* Phytoplankton abundance, community structure and diversity in the eutrophicated Orbetello lagoon (Tuscany) from 1995 to 2001. Oceanol Acta, 2003, 26(1): 15-25
Redfield AC. The biological control of chemical factors in the environment. Sci Prog, 1960(11): 150-170
Tian RC, Hu PX, Martin JM. Summer nutrient fronts in the Changjiang (Yangtze River) Estuarine. Coast Shelf Sci, 1993, 37(1): 27-41

(编辑 陈严)

Evaluation of Physicochemical Environment and Water Quality in the Laizhou Bay in Spring of 2013

ZHAO Yuting^①, SU Bo, LI Jiahui, WANG Liming, QI Yanmin, SUN Shan

(Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Shandong Key Lab of
Marine Ecological Restoration, Yantai 264006)

Abstract In recent years, the marine environment and ecosystem in the Laizhou Bay have obviously deteriorated, which caused serious damage to the ecological environment and biological community. In order to understand the environmental qualities of the Laizhou Bay and the adjacent sea areas, we analyzed the distribution of salinity, pH, dissolved oxygen (DO), chemical oxygen demand (COD), dissolved inorganic nitrogen (DIN) and PO₄-P based on field data obtained from the Laizhou Bay in June 2013. The nutrition level and organic pollution in this area were also evaluated with potential eutrophication assessment standards and grading of organic pollution respectively. The results showed that DO and COD concentrations at all surveyed stations met the first class seawater quality standard. DIN pollution was serious mainly caused by the terrestrial input. At approximate 31% of investigated stations the DIN concentration exceeded the limit of the fourth class seawater quality standard. The level of PO₄-P was lower and satisfied the first class seawater quality standard at all investigated stations. Our results suggested that the N/P ratio was higher than the Redfield value 16, and that phosphate was the limiting factor in the growth of phytoplankton. The nutritional pattern in the Laizhou Bay had evolved from nitrogen limiting to phosphorus limiting. The higher N/P ratio may alter the phytoplankton population, which will consequently affect the whole ecosystem. The nutrition status in the Laizhou Bay was phosphorus limiting potential eutrophication, and the organic pollution remained at the second level in spring 2013. These indicated organic pollution in this sea area; however, the pollution was alleviated compared to the summer 2007.

Key words Laizhou Bay; Dissolved inorganic nitrogen; Phosphorus; N/P ratio; Potential eutrophication; Organic pollution

^① Corresponding author: ZHAO Yuting, E-mail: zhaoyutingnihao@126.com

盐度对云纹石斑鱼(*Epinehelus moara* ♀) × 鞍带石斑鱼(*Epinehelus lanceolatus* ♂)受精卵孵化的影响及杂交仔稚幼鱼形态发育观察*

张梦淇^{1,2} 陈超^{2①} 李炎璐² 孔祥迪^{1,2} 刘莉^{1,2} 翟介明³

(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 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室 青岛 266071; 3. 莱州明波水产有限公司 烟台 261400)

摘要 以云纹石斑鱼(*Epinehelus moara*)为母本、鞍带石斑鱼(*Epinehelus lanceolatus*)为父本进行种间杂交,观察比较了不同盐度(5、10、15、20、25、30、35、40、45)条件下受精卵的孵化率、初孵仔鱼畸形率,以及仔、稚、幼鱼的生长发育及形态变化;测定了盐度为 30 时,正常初孵仔鱼的不投饵存活系数(SAI)。结果显示,受精卵孵化的最适盐度范围是 35–37,初孵仔鱼最适生存盐度为 20–30。盐度为 20–35 时,仔鱼不投饵存活系数值较高(均在 30 以上);盐度为 5、10、45 时,仔鱼的 SAI 值较低。胚后发育根据卵黄囊的有无、第 2 背鳍棘和腹鳍棘的伸长与收缩、鳞片及体色的变化,分为仔、稚、幼鱼 3 个时期。在本研究条件下,初孵至 2 日龄为前期仔鱼,初孵仔鱼全长为(1.959±0.152) mm,主要特征为卵黄囊和油球未被吸收消化;3–30 日龄为后期仔鱼,3 日龄仔鱼全长为(2.765±0.108) mm,主要特征是第 2 背鳍棘与腹鳍棘的绝对长度已达到仔、稚鱼阶段的最大值;31–45 日龄为稚鱼期,31 日龄稚鱼全长为(18.130±1.565) mm,主要特征为内脏器官发育完善、鱼体呈透明状;46 日龄后进入幼鱼期,此时全长为(39.850±2.565) mm,体色形成、开始被鳞、体表布满细小的棕色斑点。

关键词 云纹石斑鱼; 鞍带石斑鱼; 杂交; 形态观察; 盐度胁迫

中图分类号 S961.2 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)04-0081-09

杂交作为一种有效的选育手段在鱼类育种中已得到广泛应用(刘筠, 1993)。通过杂交以获得亲本(或超出亲本)的优良性状也是杂交育种的首要目的之一。Glamznina 等(2001)进行了地中海石斑鱼(*Epinehelus costae*) × 东大西洋石斑鱼(*Epinehelus marginatus*)的杂交研究;刘付永忠等(2007)进行了斜带石斑鱼(*Epinehelus coioides* ♀) × 赤点石斑鱼(*Epinehelus akaara* ♂)的杂交。为探究云纹石斑鱼

(*Epinehelus moara*) 与 鞍 带 石 斑 鱼 (*Epinehelus lanceolatus*)杂交的可行性,以期使杂交种具有前者的耐低温性能和后者的快速生长特性。作者尝试进行了云纹石斑鱼♀ × 鞍带石斑鱼♂的杂交实验,并获得成活子代。本研究对云纹石斑鱼♀ × 鞍带石斑鱼♂杂交 F₁ 仔稚幼鱼的发育和形态变化进行了系统的记录和观察,旨在为石斑鱼的杂交育种增添参考资料。

盐度是制约鱼类在自然水体中分布的重要环境

* 科技部国际合作项目(2012DFA30360)、农业部东海海水健康养殖重点实验室 ESHML07 项目和青岛市市南区科技发展资金项目(2014-14-011-SW)共同资助。张梦淇, E-mail: 502883675@qq.com

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

收稿日期: 2015-03-12, 收修改稿日期: 2015-06-30

因子,直接影响着水产动物的生长和繁殖(叶金聪,1997)。石斑鱼在胚胎发育阶段及仔鱼期对盐度的变化极其敏感,若水体盐度超出其自身的耐受范围,将导致胚胎发育异常、孵化率下降、初孵仔鱼畸形率升高、鱼苗活力下降(曲焕韬等,2009;赵明等,2011;李炎璐等,2013)。研究石斑鱼受精卵的适宜孵化盐度,对于指导石斑鱼的生产 and 推广具有重要意义(蔡文超等,2010)。本研究通过观察云纹石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交 F₁ 受精卵在不同盐度梯度海水中的沉浮情况,测定不同盐度海水中受精卵的孵化率、初孵仔鱼的畸形率以及仔鱼不投饵存活系数(Survival activity index, SAI),为在今后的苗种培育过程中,拓展环境条件、提高成功率,提供可借鉴的资料。

1 材料与方法

1.1 受精卵获得及孵化

实验于 2014 年 5 月在山东省莱州明波水产有限公司进行,所用的亲鱼均为驯养多年、发育成熟的种鱼。在繁殖季节,挑选性腺发育良好的亲鱼进行催产,催产剂采用人绒毛膜促性腺激素(HCG)和促黄体激素释放激素类似物(LHRH-A₂)混合注射。40–48 h 后挑选成熟度较好的亲鱼,用 MS-222 麻醉,轻压亲鱼腹部,收集成熟精卵进行人工授精。授精后,经冲洗、过滤、上浮后去除沉卵,挑选部分上浮的受精卵进行不同盐度下的孵化实验。其余上浮受精卵放入孵化桶中孵化,孵化水温为 24–25℃,盐度为 30,微充气、流水孵化。

1.2 不同盐度条件下受精卵的胚胎发育观察

在盐度为 5–45 范围内,共设置 9 个盐度梯度组,每个盐度梯度为 5,低盐度海水用过滤后的海水添加曝气后的淡水配制而成;高盐度海水用过滤后的海水添加海水晶配制而成,待充分溶解后,用手持数字式盐度计测定并进行盐度的微调,保证各实验组盐度数值准确。盐度 30 为经过滤后的自然海水组,设为对照组,每个盐度梯度设置 3 个平行。实验容器为 1 L 烧杯,每个烧杯放入挑选好的 100 粒受精卵,然后将烧杯置于恒温(24–25℃)室内静水孵化。记录受精卵在不同盐度海水中的分布状态。待仔鱼全部孵出后,记录不同盐度下每个烧杯中孵出的仔鱼数和畸形仔鱼数。畸形仔鱼标准:油球数多于 1 个或不位于卵黄囊中央、鳍膜破裂、脊柱弯曲、尾部呈 Z 或 W 形等。

1.3 不同盐度条件下仔鱼 SAI 值的测定

仔鱼活力以 SAI 值作为衡量指标(Kamler, 2002)。

盐度条件设计与 1.2 相同。待孵化桶中的仔鱼正常孵化出膜后,取肉眼观察无异常的仔鱼放入已配置好不同盐度海水的烧杯中,每个平行组烧杯中放入仔鱼的数量为 100 尾。培育中不投饵、无充气、阴凉通风,温度为 24–25℃。发现死鱼,及时用吸管吸除。每天记录死亡的仔鱼数,直至仔鱼全部死亡,比较各组的 SAI 值。仔鱼不投饵存活系数 SAI 值计算公式如下:

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

式中, N 为起始的仔鱼数; k 为仔鱼全部死亡所需的天数; h_i 为第 i 天时仔鱼的累积死亡数。

1.4 仔稚幼鱼培育条件

仔鱼全部孵化出膜后,将其转入长、宽均为 6.85 m,深 1 m 的方形水泥池中培育。水温控制在 25–27℃,盐度为 29–31,溶解氧 ≥ 5 mg/L。育苗期间,每天向池内定量泼洒浓度为 2.5×10^{10} /ml 的小球藻(*Chlorella vulgaris*)液 200 ml、乳酸菌酶素溶液(江苏沃纳生物科技有限公司) 200 ml。仔鱼孵出后 10 d 内不换水,每天适量添加经过处理的新鲜海水。10 d 后开始换水,根据仔鱼的生长状况逐渐增大充气量和换水量。出膜 3 d 后仔鱼开口,开口饵料为 SS 型褶皱臂尾轮虫(*Brachionus plicatilis*);出膜 5 d 后,过渡到投喂 S 型褶皱臂尾轮虫;出膜 16 d 后,混合投喂经小球藻强化过的 L 型褶皱臂尾轮虫;仔鱼培育至 19 d 后,交叉投喂卤虫(*Artemia* sp.)无节幼体。此后,逐渐过渡到投喂卤虫成体及微囊饲料。

1.5 取样和观察

在盐度实验中,一个平行组用于定期取样,观察不同盐度下受精卵的发育情况,并显微拍照。从仔鱼孵化出膜后开始,每天直接从育苗池中取生长发育较快的个体,进行测量和拍照观察,详细记录其生长发育状况和形态变化。1–17 d 的仔鱼在 Nikon E200 显微镜下观察并拍摄,18–38 d 的仔、稚鱼在 Olympus 解剖镜下观察并拍摄,38 d 以后的稚、幼鱼直接用数码相机近距离拍摄。每次取样 15 尾,测量全长、肛前距、卵黄囊长径、卵黄囊短径、油球直径、第 1 腹鳍棘长和第 2 背鳍棘长。本研究中,仔、稚、幼鱼的划分参照张海发等(2006b)的划分标准。

1.6 数据处理

仔鱼孵化率(Hatching rate, HR)=孵出总仔鱼数/总受精卵数

仔鱼畸形率(Deformity rate, DR)=畸形仔鱼数/总

仔鱼数

孵化率和畸形率数据均用 SPSS17.0 软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA)及 Duncan 多重比较, 结果用平均值±标准差(Mean±SD)形式表示。

2 结果

2.1 不同盐度对受精卵孵化的影响

2.1.1 不同盐度水体中受精卵的分布状态 云纹石斑鱼(♀) × 鞍带石斑鱼(♂)杂交 F₁ 受精卵为透明、无色的浮性卵, 中央具油球 1 个。不同盐度条件下受精卵的发育状态见图 1。在相对静止的水体中, 盐度为 5-25 组的受精卵, 全部沉于烧杯底; 盐度为 30 的自然海水中, 3/4 漂浮在水表层, 1/4 悬浮于中上层; 盐度为 35-45 组的受精卵, 全部漂浮在水表层。

2.1.2 不同盐度胁迫下受精卵的孵化率和畸形率

从表 1 可以看出, 当盐度低于 20 时, 受精卵不能正常孵化出仔鱼; 在 20-35 盐度范围内, 随着盐度升高, 孵化率增加; 受精卵的适宜孵化盐度为 30-35, 盐度为 35 时的孵化率为 31.33%; 盐度为 40、45 时, 孵化率较低, 仅为 7.33%、4.33%。孵化率对盐度的回归曲线呈抛物线型分布(图 2), 其回归关系为:

$$y = -0.131x^2 + 7.368x - 84.810, R^2 = 0.700$$

式中, y 为孵化率, x 为盐度。

从表 1 可以看出, 盐度为 20-30、40-45 时, 仔鱼畸形率较高, 都在 50% 以上; 盐度为 35 时畸形率相对最低, 为 43%。盐度在 20-35 条件下, 随着盐度的升高, 仔鱼畸形率降低; 盐度为 35-45 时反之。对仔鱼畸形率进行多项式回归分析, 得到回归方程为:

$$y = 0.004x^3 - 0.300x^2 + 2.753x + 117, R^2 = 0.907$$

式中, y 为仔鱼畸形率, x 为盐度。

因此, 以受精卵孵化率和仔鱼畸形率为指标, 杂

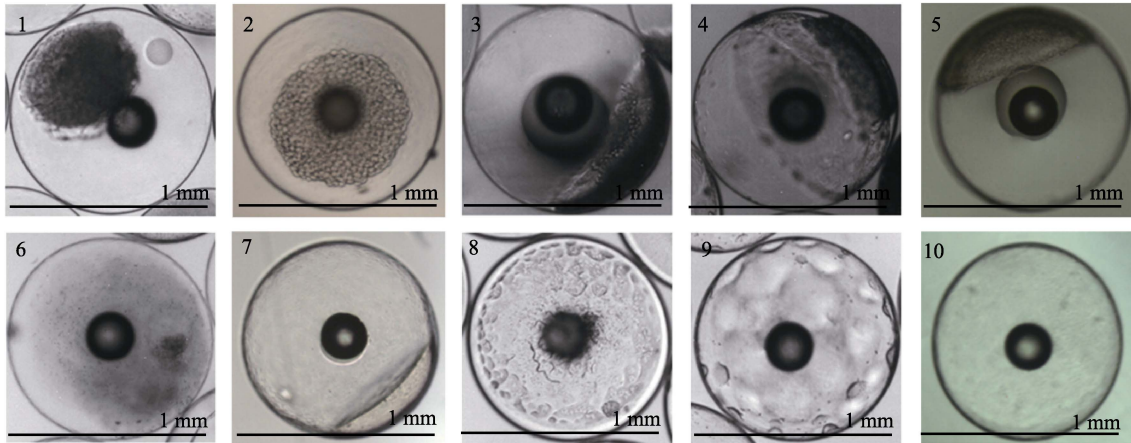


图 1 不同盐度条件下受精卵的发育

Fig.1 The development of fertilized eggs at different salinities

1. 盐度为 20 时, 发育至桑椹期的死亡胚胎, 动物极呈絮团状; 2. 盐度为 30 时, 发育至桑椹期的正常胚胎;
- 3-4. 盐度为 15 时, 发育至原肠早期的死亡胚胎, 卵的颜色为乳白色; 5. 盐度为 30 时, 发育至原肠早期的正常胚胎;
6. 盐度为 45 时, 未分裂的死亡胚胎, 原生质集中变得模糊; 7. 盐度为 30 时, 即将开始分裂的正常胚胎;
- 8-9. 盐度为 45 时, 未分裂的死亡胚胎, 失水皱缩; 10. 盐度为 30 时, 刚受精结束后的正常胚胎

表 1 不同盐度条件下杂交 F₁ 受精卵的孵化

Tab.1 Hatching of fertilized eggs of the hybrid F₁ at different salinities (Mean±SD)

项目 Items	盐度 Salinity								
	5	10	15	20	25	30	35	40	45
孵化率 Hatching rate (%)	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	13.0±2.6 ^c	18.7±1.5 ^d	21.7±2.1 ^d	31.3±3.0 ^e	7.3±2.5 ^b	4.3±1.1 ^b
畸形率 Deformity rate (%)	—	—	—	88.7±7.6 ^d	72.7±10.8 ^c	60.3±6.2 ^{bc}	40.0±7.4 ^a	55.7±5.1 ^b	62.2±3.8 ^{bc}

注: 同行数值右上角标有不同字母表示有显著差异, $P < 0.05$

Note: Data in the same row with different superscript were significantly different, $P < 0.05$

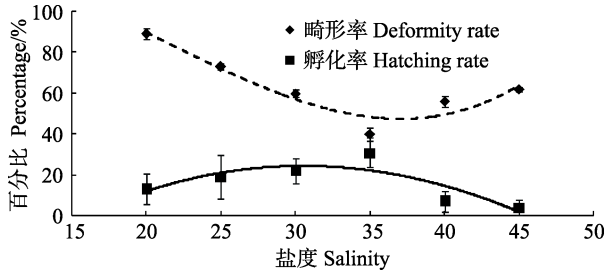


图2 不同盐度条件下杂交 F₁ 胚胎孵化率和畸形率
Fig.2 The hatching rate and deformity rate of the hybrid F₁ embryo at different salinities

交 F₁ 受精卵孵化的适宜盐度为 30–35, 此时的孵化率相对较高, 畸形率相对较低。

2.2 仔稚幼鱼形态观察

2.2.1 前期仔鱼

初孵仔鱼平均全长为(1.959±0.152) mm, 刚孵出的仔鱼身体透明, 中间有 1 条细长的脊索横贯全身。鱼体前端有 1 个卵黄囊, 卵黄囊长径为(1.210±0.039) mm, 短径为(0.655±0.045) mm。卵黄囊后端有油球 1 个, 油球直径为(0.182±0.020) mm。鱼体头部可见少量黑色素聚集, 消化道细长, 肛门尚未与外界相通。此时的仔鱼无游泳能力, 仅靠尾部的摆动在水中旋转。

1 d 仔鱼(图 3-1)全长为(2.652±0.160) mm, 鱼体变得更加细长, 脊索逐渐伸直, 肌节变清晰。头部增大, 黑色素变多。消化道稍变粗, 末端呈 90° 弯曲。随着卵黄囊等营养物质的消耗, 体积变小, 卵黄囊长径为(0.900±0.025) mm, 短径为(0.442±0.035) mm, 油球变化不大, 直径为(0.180±0.019) mm。仔鱼在池中均匀分布, 多悬浮于水中。

2 d 仔鱼(图 3-2)全长为(2.922±0.085) mm, 眼部黑色素增多, 胸鳍膜出现, 背鳍、腹鳍和尾鳍褶基本相连。卵黄囊体积明显变小, 长径缩短为(0.427±0.020) mm, 短径变为(0.332±0.017) mm, 油球直径为(0.177±0.015) mm。仔鱼运动能力加强, 可做垂直于水面的上下运动。

2.2.2 后期仔鱼

3 d 仔鱼(图 3-3)全长为(2.765±0.108) mm, 仔鱼口裂形成, 吻端突出, 腹部黑色素变多。消化道明显膨胀变粗, 有时可见胃蠕动, 肛门与外界相通。卵黄囊消耗完全, 油球仍可见, 油球直径为(0.127±0.016) mm, 仔鱼开始由内源性营养向外源性营养过渡, 进入后期仔鱼。由于食性的转变, 仔鱼出现了负增长。仔鱼活动能力增强, 开始集群游动。

4 d 仔鱼(图 3-4)全长为(2.840±0.127) mm, 口裂逐渐增大, 上下颌可做开闭动作。眼囊内黑色素明显

加深, 消化道上端以及尾部前端脊索上出现大量深黑色分枝状色素团。油球消失, 胸鳍变大, 仔鱼可借助胸鳍的扇动做水平游动, 消化道进一步缩短变粗。此时开始向池中投放充足的开口饵料, 仔鱼摄食良好, 镜检可见肠道呈饱满状态。

6 d 仔鱼(图 3-5)全长为(2.940±0.165) mm, 头部鳃盖骨分化明显, 背鳍原基出现, 尾部前端脊索上的黑色素细胞团逐渐扩展为半圆形。背鳍膜和腹鳍膜变窄, 胸鳍进一步发育呈扇形, 仔鱼游泳能力增强, 在池中可清晰的看到黑点状的集群仔鱼。

8 d 仔鱼(图 3-6)全长为(3.085±0.207) mm, 口裂明显增大, 心脏跳动快速、有力。腹鳍原基出现, 腹部树枝状黑色素区域扩大, 消化道呈圆筒状, 尾鳍上出现透明状鳍条原基。仔鱼游泳速度加快, 反应灵敏, 摄食能力增强。

10 d 仔鱼(图 3-7)全长为(3.527±0.305) mm, 鱼体颜色变深, 黑色素已覆盖至整个消化道及其上端, 消化道结构逐渐完善。下颌骨明显发达, 主动捕食能力增强。仔鱼生长差异显著, 生长速度快慢不一。第 2 背鳍棘和腹鳍棘长出, 背鳍棘长为(0.200±0.105) mm, 腹鳍棘长为(0.387±0.120) mm, 鳍棘末端布有点状色斑并长有许多倒钩状尖刺。仔鱼集群明显, 多在池角和池壁活动。

14–16 d 仔鱼(图 3-8)全长为(6.512±0.520) mm, 背鳍棘、腹鳍棘明显伸长, 背鳍棘增长至(3.644±0.360) mm, 腹鳍棘增长至(2.724±0.385) mm。第 2 背鳍棘的增长速度加快, 绝对长度已超过腹鳍棘。仔鱼的口裂进一步增大, 开始摄食 L 型褶皱臂尾轮虫。头部明显发达, 骨骼轮廓清晰。镜检腹部呈褐色, 消化道已容易观察。尾下骨开始形成, 脊索末端尾椎上弯。头背部以及肛门前的鳍膜消退。

20–25 d 仔鱼(图 3-9)生长迅速, 至 25 d 仔鱼全长已达到(12.497±1.170) mm, 第 2 背鳍棘长为(6.597±0.0455) mm, 腹鳍棘长为(3.852±0.265) mm。仔鱼开鳃, 消化道部位的黑色素已基本消退, 镜检观察到腹部更加透亮。眼眶上缘出现锯齿状突起, 头部上端及鳃盖处开始出现黑色素细胞。第 1 背鳍及第 3 背鳍棘已长出, 长棘上长有许多倒钩状小刺, 末端长有 1 根细长尖刺。仔鱼在池中游动迅速, 不易捕捞。

30 d 仔鱼(图 3-10)全长为(18.130±1.565) mm, 第 2 背鳍棘长为(6.603±1.120) mm, 腹鳍棘长为(4.427±0.850) mm, 鳍棘末端的黑色斑点消退, 第 2 背鳍棘与腹鳍棘的绝对长度已达到仔、稚鱼阶段的最大值。

头部发育完善, 鼻孔清晰可见, 眼球圆滑、外突。鱼体大部分器官已发育成型, 头腹部、体背部以及尾柄部色斑增多, 胸鳍与尾鳍的鳍条清晰可见。仔鱼体型已与稚鱼相似, 进入稚鱼期。

2.2.3 稚鱼期 36 d 稚鱼(图 3-11)全长为(23.642±1.783) mm, 第 2 背鳍棘和腹鳍棘的绝对长度变小, 开始收缩, 长度分别为(5.055±0.862) mm 和(4.170±

0.960) mm, 鳍棘上的钩状小刺数目也逐渐减少。鱼体体型为梭型, 尾部摆动强劲有力, 能在水中做快速游动。

40–45 d 稚鱼(图 3-12)生长明显加快, 体表形态特征变化明显, 至 45 d 时全长已达到(39.850±2.565) mm。第 2 背鳍棘和腹鳍棘再次伸长, 长度分别为(4.095±0.185) mm 和(5.755±1.020) mm, 腹鳍棘长度再次超过

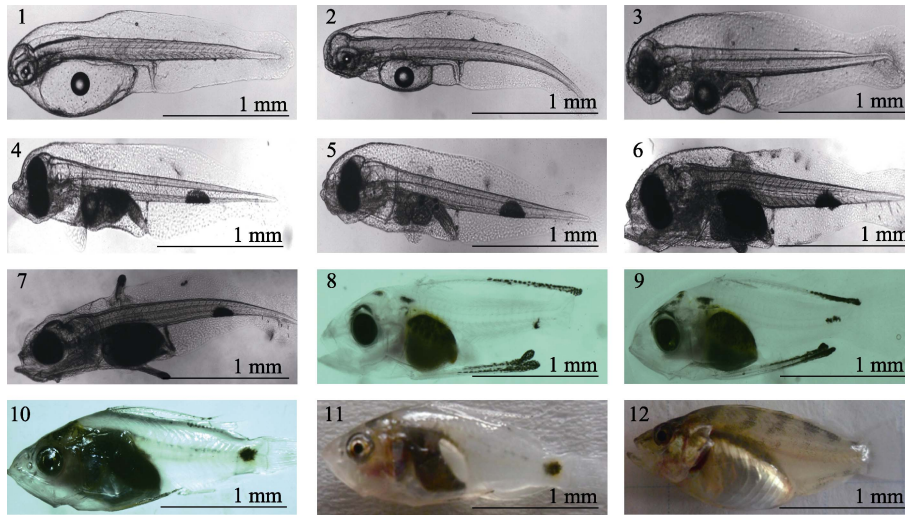


图 3 云纹石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交 F₁ 仔、稚、幼鱼发育形态

Fig.3 Morphological development of the larvae, juvenile, and young fish of the hybrid F₁ from *E.moara* ♀ × *E.lanceolatus* ♂

1. 1 d; 2. 2 d; 3. 3 d; 4. 4 d; 5. 6 d; 6. 8 d; 7. 10 d; 8. 16 d; 9. 25 d; 10. 30 d; 11. 36 d; 12. 45 d

第 2 背鳍棘, 鳍棘上的小刺已完全消退。内脏器官发育完善, 肉眼观察腹部表层反光性变强。尾柄处的黑色斑块消失, 体表色素加深, 体色形成, 为淡褐色。鱼体背部可清楚地看到 6 条黑色斑带, 镜检可见鱼体表面有鳞片形成。此时, 稚鱼的活动水层转入中下层, 开始寻找躲避物, 已基本具备幼鱼的特征, 进入幼鱼期。

2.2.4 幼鱼期 50 d 幼鱼全长为(43.080±3.255) mm, 第 2 背鳍棘和腹鳍棘继续伸长。眼球突出, 鳞片长齐, 体表布满细小、棕色斑点。取样时, 因胁迫鱼体体色

稍有加深。幼鱼各器官发育相对完善, 形态已接近于成鱼, 投饵时集群抢食。

2.3 仔、稚、幼鱼的生长

育苗期间 F₁ 的仔、稚、幼鱼全长及肛前距与孵化后天数的关系见图 4。从图 4 可以看出, 1–13 d 的仔鱼全长变化较小, 14–45 d 是仔鱼发育成稚鱼的变态期, 此期间生长迅速, 46 d 起进入幼鱼期, 全长稳定增长。

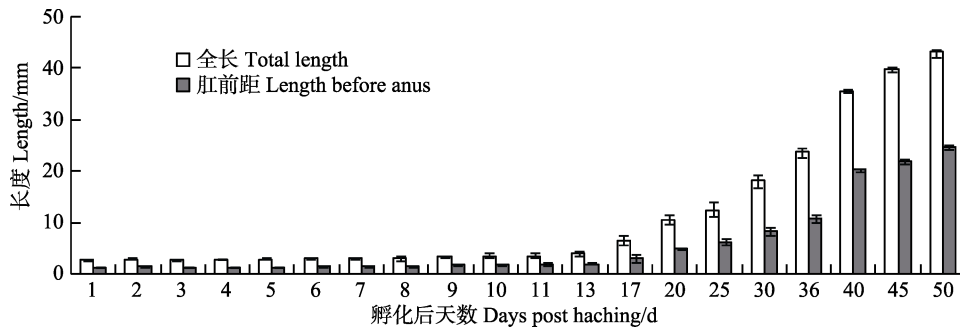


图 4 云纹石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交 F₁ 仔、稚、幼鱼的生长

Fig.4 Growth of the larvae, juvenile, and young fish of the hybrid F₁ *E.moara* ♀ × *E.lanceolatus* ♂

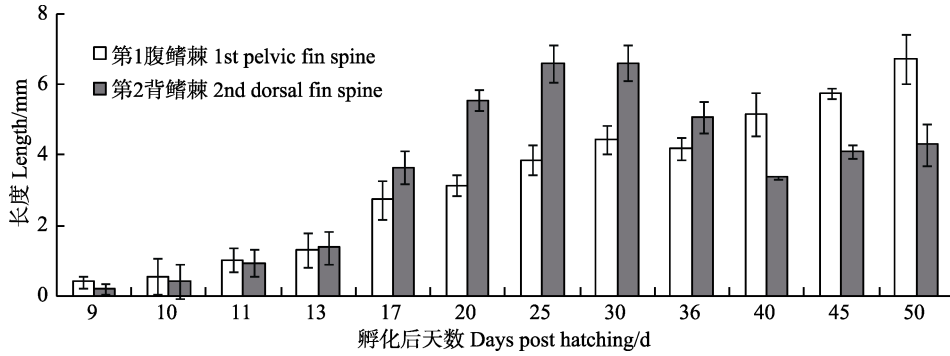


图 5 第 1 腹鳍棘和第 2 背鳍棘长度的变化

Fig.5 Changes in the length of the first pelvic fin spine and the second dorsal fin spine

表 2 不同盐度条件下杂交 F₁ 初孵仔鱼的存活率及 SAI 值Tab.2 The survival rate and SAI of newly-hatched the hybrid F₁ larvae at different salinities (Mean±SD)

盐度 Salinity	饥饿条件下仔鱼孵化后的成活率 Survival rate of larval cobia after hatching in a state of starvation (%)											SAI	
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d	11 d		
5	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0 ^a
10	87±2.6	75.7±1.1	71.3±0.6	63.3±3.8	60.0±3.0	49.0±2.6	14.3±2.9	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	14.0±0.4 ^c
15	83.7±3.2	81.7±3.5	79.3±3.0	78.7±2.5	77.7±2.3	72.3±3.5	67.3±2.0	24.7±3.7	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	22.9±0.9 ^d
20	96.7±2.3	95.7±1.5	95.0±2.0	92.7±2.5	92.3±3.0	92.0±2.6	91.3±3.0	87.0±3.5	43.7±1.5	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	36.8±0.9 ^e
25	98.0±1.7	94.0±1.0	93.3±0.6	93.0±1.0	92.3±1.5	91.0±1.0	88.7±2.3	75.7±5.5	53.3±4.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	36.5±1.1 ^e
30	96.0±2.6	95.0±1.7	90.7±0.6	89.7±0.6	89.3±0.6	86.7±1.1	77.7±2.3	69.3±3.5	62.0±2.6	29.3±1.5	0.0±0.0	0.0±0.0	38.3±0.7 ^b
35	95.7±1.1	94.0±1.0	91.3±2.3	86.3±3.0	83.0±3.6	82.0±2.6	80.0±3.0	76.0±1.7	20.3±6.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	31.6±0.8 ^f
40	93.7±3.5	89.7±3.8	87.0±1.7	84.3±2.1	81.7±1.1	77.3±3.2	71.3±1.1	39.0±2.6	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	25.5±0.3 ^e
45	89.7±3.5	85.7±1.5	78.3±1.5	72.3±2.5	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	7.8±0.1 ^b

第 2 背鳍棘和腹鳍棘的变化过程见图 5。从图 5 可以看出, 孵化后 9 d 鳍棘长出, 此时腹鳍棘长度长于背鳍棘。随后, 背鳍棘发育迅速, 至 13 d 时长度超过腹鳍棘。第 2 背鳍棘和腹鳍棘的绝对长度在第 30 天时达到最大, 随后逐渐收缩, 分别在 40 d 和 36 d 时缩到最短。此后腹鳍棘长度再次超过背鳍棘, 进入幼鱼期后增长较为缓慢。

2.4 盐度对饥饿条件下仔鱼存活的影响

不同盐度条件下初孵仔鱼存活率和 SAI 值测定见表 2。从表 2 可以看出, 初孵仔鱼在不投饵条件下存活的时间越长, 其 SAI 值就越高。结果显示, 在盐度为 5–45 范围内, 随着盐度的升高, 仔鱼的 SAI 值呈先上升后下降的变化趋势。盐度为 5 时仔鱼的 SAI 值为 0, 活力最弱; 盐度为 10、45 时, 仔鱼的 SAI 值偏低, 分别为 14.0、7.8; 仔鱼的 SAI 值最高的盐度组为 30, 达到了 38.3, 活力最强, 生存时间最长。

3 讨论

3.1 盐度对杂交 F₁ 胚胎发育的影响

海水鱼类的胚胎发育需要适宜的盐度条件, 盐度

不适则会造成胚胎发育过程的异常。在实际生产中, 由于盐度过高或过低, 造成发育过程中胚胎不能正常分裂或者存活, 引起胚胎死亡或者仔鱼畸形的现象时有发生, 给生产造成严重损失。有文献报道, 海水鱼类受精卵的原生质层是调节渗透压平衡和保持胚胎正常发育的重要物质(麦贤杰等, 2005), 在胚胎的耐受范围之内会随着外界盐度的变化做出相应的功能性调整抵御对自身的迫害, 超出调节能力之外都会使渗透压调节失衡造成卵细胞损伤或破损(王宏田等, 1998)。本研究中出现低盐度时胚体模糊现象、高盐度时胚胎发育停止等异常, 都是由于盐度的胁迫超出了胚胎自身调节范围所致。

产浮性卵的海水鱼类, 其卵的沉浮性对于这类鱼的产卵和孵化有着重要的意义(Nissling *et al.*, 1994)。杂交 F₁ 受精卵是典型的硬骨鱼类浮性卵, 从受精卵的沉浮性判断适宜孵化盐度为 30。此时, 仔鱼主要分布在水体中上层, 在生产中对于吸除池底残饵粪便是有利的。要注意仔鱼集中分布容易造成局部缺氧, 在苗种培育过程中要调整好用水的盐度、给予足够氧气, 使受精卵悬浮于水体中上层, 有助于提高孵化率。同时, 受精卵的孵化率和仔鱼畸形率是反映受精卵孵

化好坏最直接的两个衡量指标。为求杂交 F_1 的最适孵化盐度, 在盐度为 25–40 范围内对孵化率和畸形率再做多项式回归分析(图 6), 求得孵化率回归方程为:

$$y = -0.052x^3 + 4.800x^2 - 145.100x + 1459, R^2 = 1.000$$

式中, y 为孵化率, x 为盐度;

畸形率回归方程为:

$$y = 0.057x^3 - 5.300x^2 + 158.400x - 1472, R^2 = 1.000$$

式中, y 为孵化率, x 为盐度。根据这两个方程求得当孵化率最高时的盐度为 35; 畸形率最低时的盐度为 37。对两个盐度数值取平均数再取 ± 1 (施兆鸿等, 2009), 得出 35–37 是杂交 F_1 受精卵孵化的最适盐度。

不同石斑鱼种在最适盐度下的孵化率和仔鱼畸形率也大不相同, 如点带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)受精卵在最适盐度 30–33 时的孵化率为 55.65%, 仔鱼畸形率为 19.88%(施兆鸿等, 2008); 斜带石斑鱼在最适盐度 25–30 时的孵化率为 76.40%, 仔鱼畸形率为 0(张海发等, 2006a); 赤点石斑鱼在最适盐度 30–32 时的孵化率为 85.20%, 仔鱼畸形率为 21.60%(王涵生等, 2002)。杂交 F_1 与上述几种石斑鱼相比, 最适孵化盐度与点带石斑鱼相近, 较斜带石斑鱼对高盐度的适应性强, 在最适孵化盐度下的孵化率较低, 仔鱼畸形率较高, 这可能与孵化的条件、亲鱼的培育条件以及杂交的亲本性有关, 具体原因有待进一步研究。

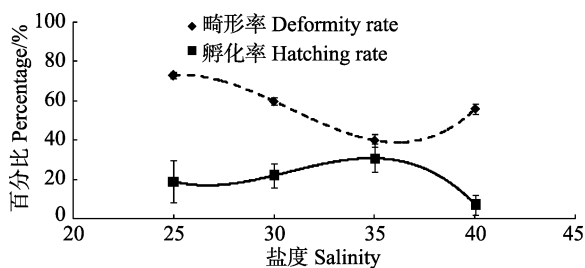


图 6 25–40 盐度条件下杂交 F_1 胚胎孵化率和畸形率
Fig.6 The hatching rate and deformity rate of the hybrid F_1 embryo at salinities of 25–40

3.2 盐度对杂交 F_1 仔鱼生存活力的影响

SAI 值反映的是仔鱼的活力, 可以用来判断受精卵的卵质, 仔鱼存活时间越长, SAI 值就越高。仔鱼孵出后, 在不投饵的情况下, 依靠卵黄囊和油球的营养可以存活一段时间。仔鱼开口前处于内源性营养期, 生长发育所需的营养全部由卵黄囊和油球供给; 仔鱼从开口至卵黄囊和油球未完全消失之前, 处于混合营养期, 依靠自主觅食和残留卵黄生活; 待卵黄囊和油球完全消失后, 仔鱼进入外源性营养期, 所需的营养物质完全从外界环境摄取。若仔鱼在卵黄囊和油

球消失前, 还未得到充足的营养, 仔鱼就会因营养缺失死亡。仔鱼营养期的过渡也是苗种培育过程中的危险期, 生产上要求及时供给适口、营养全面的饵料。研究中观察到, 盐度为 20–35 时, SAI 值较高, 均在 30 以上。与其亲本云纹石斑鱼在最适盐度 25–30 条件下的 SAI 值 24.52(宋振鑫等, 2013)相比, 杂交 F_1 初孵仔鱼的活力要好。

综上所述, 在实际育苗生产中, 结合不同盐度下受精卵的沉浮性、孵化率、仔鱼畸形率以及不投饵存活系数, 建议杂交 F_1 受精卵孵化和仔鱼培育的盐度最好控制在 35, 并且加强水质调控, 以保证较高的育苗成功率。

3.3 杂交 F_1 与亲本生长发育的比较

同其他石斑鱼一样(张海发等, 2006b; 郭仁湘等, 2011; 陈超等, 2014; 张梦淇等, 2014), 杂交 F_1 在苗种培育过程中也出现了第 2 背鳍棘和腹鳍棘的伸长与收缩, 这无疑是石斑鱼仔稚幼鱼培育过程中最显著的特征。目前, 关于鳍棘的生长特性对于鱼体本身的意义尚无明确定论。陈国华等(2001)认为鳍棘有增加浮力和惊吓敌害生物的作用; 郭仁湘等(2011)认为鳍棘能够保持自身的平衡, 从而有利于对食物的捕获, 鳍棘的出现对鱼体本身的摄食和生长具有积极作用。通过 2.3 中仔稚幼鱼的生长可以看出, 1–13 d 的仔鱼全长变化不大, 生长较为缓慢, 从第 13 天开始, 仔鱼生长明显加快, 而此时也正是第 2 背鳍棘和腹鳍棘迅速伸长的时期。在此期间, 由于饵料的转变增加了仔、稚鱼对桡足类个体的捕食难度, 而鳍棘的伸长有助于鱼体在水体中保持稳定, 增加了对桡足类的捕食成功率, 也使得仔鱼能够在这一时期快速生长。进入幼鱼期后, 由于习性的改变, 鱼苗开始聚集于池底的遮蔽物中, 过长的鳍棘反而不利于其躲藏, 遂逐渐收缩。

生长速度、成活率以及对环境的适应能力等指标, 常被用来比较杂交后代与亲本的差别(王新成等, 2003)。通过与亲本云纹石斑鱼(宋振鑫等, 2012)和鞍带石斑鱼(郭仁湘等, 2011)的早期发育比较(表 3–表 4), 可以得出杂交 F_1 的生长特点。鞍带石斑鱼早期发育过程中进入各个阶段的时间点最早, 杂交 F_1 仅在进入幼鱼期的时间比云纹石斑鱼提前。尽管培育的水温有差异, 但提前进入幼鱼期对于提高育苗成功率、降低成本从而提高经济效益有很大的帮助。从生长速度比较, 鞍带石斑鱼最快, 杂交 F_1 从进入后期仔鱼生长速度超过云纹石斑鱼, 表现出明显的生长优势;

云纹石斑鱼的生长速度最慢。不同苗种对生长环境的需求不同,其生长会出现差异。对于杂交种是否能在今后的养殖中体现亲本的优势还有待于进一步实验。

杂交 F_1 还未发育为成鱼,所以体型无法与其亲

本进行准确比较,就幼鱼的体型来说,介于云纹石斑鱼和鞍带石斑鱼之间,头部和尾部与鞍带石斑鱼类似,躯干部接近于云纹石斑鱼。杂交 F_1 幼鱼的体色更偏向于鞍带石斑鱼,为棕褐色,受胁迫后体色变深。

表 3 杂交 F_1 与云纹石斑鱼、鞍带石斑鱼早期发育各阶段经历的时间比较

Tab.3 The comparison of early development of the hybrid F_1 with its parents, *E. moara* and *E. lanceolatus*

种类 Species	培育水温 Cultivation temperature (°C)	卵黄囊仔鱼期, 开口时间 Yolk sac larvae (d) and the time of starting eating(d)	后期仔鱼期 Post larvae (d)	稚鱼期 Juvenile (d)	幼鱼期 Young fish (d)	参考文献 Reference
云纹石斑鱼 <i>E.moara</i>	22-24	1-4, 5	5-30	31-65	66	宋振鑫等, 2012
鞍带石斑鱼 <i>E.lanceolatus</i>	27-30	1-2, 4	3-21	22-30	31	郭仁湘等, 2011
杂交 F_1 The ybrid F_1	25-27	1-2, 4	3-30	31-45	46	本研究 This study

表 4 杂交 F_1 与云纹石斑鱼、鞍带石斑鱼早期进入各发育阶段的时间点及此时全长的比较

Tab.4 The comparison of early development and overall length of the hybrid F_1 with its parents, *E. moara*, and *E. lanceolatus*

种类 Species	初孵仔鱼全长 Average length of newly hatched larvae (mm)	进入后期仔鱼的时间, 全长 Time (d) and average length (mm) of post larvae began	进入稚鱼期的时间, 全长 Time (d) and average length (mm) of juvenile began	进入幼鱼期的时间, 全长 Time (d) and average length (mm) of young fish began	参考文献 Reference
云纹石斑鱼 <i>E.moara</i>	1.739	5, 2.640	31, 9.992	66, 25.000	宋振鑫等, 2012
鞍带石斑鱼 <i>E.lanceolatus</i>	2.075	3, 3.050	22, 18.185	31, 32.500	郭仁湘等, 2011
杂交 F_1 The hybrid F_1	2.059	3, 2.765	31, 18.130	46, 39.850	本研究 This study

参 考 文 献

王涵生, 方琼珊, 郑乐云. 盐度对赤点石斑鱼受精卵发育的影响及仔鱼活力的判断. 水产学报, 2002, 26(4): 344-350

王宏田, 张培军. 环境因子对海产鱼类受精卵及早期仔鱼发育的影响. 海洋科学, 1998, 22(4): 50-52

王新成, 尤锋, 倪高田, 等. 石鲮与牙鲆人工杂交的研究. 海洋科学, 2003, 27(1): 33-38

叶金聪. 温、盐度对鲈鱼早期仔鱼生长及存活率的影响. 福建水产, 1997(1): 14-18

刘筠. 中国养殖鱼类繁殖生理学. 北京: 农业出版社, 1993, 109-124

刘付永忠, 赵会宏, 刘晓春, 等. 赤点石斑鱼♂与斜带石斑鱼♀杂交初步研究. 中山大学学报(自然科学版), 2007, 46(3): 72-75

曲焕韬, 李鑫渲, 何庆, 等. 温度和盐度对鞍带石斑鱼受精卵发育及仔鱼成活率的影响. 河北渔业, 2009(8): 6-9

陈超, 孔祥迪, 李炎璐, 等. 棕点石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交子代胚胎及仔稚幼鱼发育的跟踪观察. 渔业科学进

展, 2014, 35(5): 135-144

陈国华, 张本. 点带石斑鱼仔、稚、幼鱼的形态观察. 海南大学学报(自然科学版), 2001, 19(2): 151-156

张梦淇, 陈超, 李炎璐, 等. 驼背鲈(*Chromileptes altivelis*)的胚胎发育及仔、稚、幼鱼形态观察. 渔业科学进展, 2014, 35(5): 145-153

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

张海发, 刘晓春, 刘付永忠, 等. 斜带石斑鱼胚胎发育及仔稚幼鱼形态发育. 中国水产科学, 2006b, 13(5): 689-696

麦贤杰, 黄伟健, 叶富良, 等. 海水鱼类繁殖生物学和人工繁育. 北京: 海洋出版社, 2005

李炎璐, 王清印, 陈超, 等. 盐度对云纹石斑鱼(♀)×七带石斑鱼(♂)杂交子一代胚胎发育和仔鱼活力的影响. 渔业科学进展, 2013, 34(5): 17-22

宋振鑫, 陈超, 吴雷明, 等. 盐度与 pH 对云纹石斑鱼胚胎发育和仔鱼活力的影响. 渔业科学进展, 2013, 34(6): 52-58

宋振鑫, 陈超, 翟介明, 等. 云纹石斑鱼胚胎发育及仔、稚、幼鱼形态观察. 渔业科学进展, 2012, 33(3): 26-34

- 施兆鸿, 陈波, 彭士明, 等. 盐度胁迫下点带石斑鱼(*Epinephelus malabaricus*)胚胎及卵黄囊仔鱼的形态变化. 海洋与湖沼, 2008, 39(3): 222–227
- 施兆鸿, 彭士明, 尹彦强, 等. 不同盐度下条石鲷胚胎及卵黄囊仔鱼的形态变化. 生态学杂志, 2009, 28(3): 471–476
- 赵明, 陈超, 柳学周, 等. 盐度对七带石斑鱼胚胎发育和卵黄囊仔鱼生长的影响. 渔业科学进展, 2011, 32(2): 16–21
- 郭仁湘, 符书源, 杨薇, 等. 鞍带石斑鱼仔稚(幼)鱼的发育和生长研究. 水产养殖, 2011, 32(4): 8–13
- 蔡文超, 区又君, 李加儿. 盐度对条石鲷胚胎发育的影响. 生态学杂志, 2010, 29(5): 951–956
- Glamznina B, Glavić N, Skaramaca B, et al. Early development of the hybrid *Epinephelus costae*×*E. marginatus*. Aquaculture, 2001, 198(1–2): 55–61
- Kamler E. Ontogeny of yolk-feeding fish: an ecological perspective. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 2002, 12(1): 79–103
- Nissling A, Kryvi H, Vallin L. Variation in egg buoyancy of Baltic cod *Gadus morhua* and its implications for egg survival in prevailing conditions in the Baltic Sea. Mar Eco Prog Ser, 1994, 110: 67–74

(编辑 马瑾艳)

Effects of Salinity on the Hatching of the Fertilized Eggs of *Epinephelus moara* (♀) × *Epinephelus lanceolatus* (♂) and the Observation of the Morphological Development of Larvae, Juvenile and Young Fish

ZHANG Mengqi^{1,2}, CHEN Chao^{2①}, LI Yanlu², KONG Xiangdi^{1,2}, LIU Li^{1,2}, ZHAI Jieming³

(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. Laizhou Mingbo Aquatic Co. Ltd., Yantai 261400)

Abstract In this study the hybridization between *Epinephelus moara* (♀) and *Epinephelus lanceolatus* (♂) were manipulated in the laboratory. The hybrid F₁ larvae were hatched at salinity 30. The hatching and deformity rates of fertilized eggs and the survival activity index of newly hatched larvae was observed at salinities 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, and 45. The growth and morphological characteristics of larvae, juveniles, and young fish was recorded. The results suggested that salinity 35–37 was optimum for the hatching of the hybrid F₁, and salinity 20 to 30 was optimum for larval survival. SAI values of larvae became higher when the salinity was between 20 and 35, and they were lower when the salinity was 5, 10, and 45. The post embryonic development could be divided into the larval stage, the juvenile stage and the young fish stage, based on the features of the yolk-sac, the second dorsal fin spine, the pelvic fin spine, the scale and the body color. The embryo developed into pre-larvae in 2 days, and the average length of newly-hatched larvae was (1.959±0.152) mm. This stage was featured by yolk-sac and unabsorbed oil ball. The post-larvae stage lasted from Day 3 to Day 30, and the average length of 3-day larvae was (2.765±0.108) mm. At this stage the absolute length of the second dorsal fin spine and pelvic fin spine reached the maximum for larvae and juvenile fish. It entered into the juvenile stage starting from Day 31 after hatching and the average length was (18.130±1.565) mm. At this stage the visceral organs had been fully developed and the fish color became transparent. Starting from Day 46 after hatching it entered into the young fish stage when the average length was (39.850±2.565) mm and the body color turned light brown. At this stage brown spots appeared on the body surface and scales could be observed under microscope.

Key words *Epinephelus moara*; *Epinephelus lanceolatus*; Hybridization; Morphological observation; Salinity stress

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

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*

张荣良^{1,2} 王卫军² 冯艳微² 杨建敏^{2①} 唐海田³ 纪仁平^{1,2}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 山东省海洋资源与环境研究院 山东省海洋生态修复重点实验室 烟台 264006; 3. 国家海洋局烟台海洋环境监测中心站 烟台 264006)

摘要 为了监测长牡蛎(*Crassostrea gigas*)在选育过程中的遗传变异、分析选育对其遗传结构的影响,本研究以选育目标为壳宽快速生长的长牡蛎为实验材料,利用微卫星(Simple Sequence Repeats)标记技术,对长牡蛎基础群体(P0)和连续两代选育群体(F1 和 F2)进行遗传多样性评估。结果发现,所有微卫星位点在 3 个群体中都表现出了较高的多态性,P0、F1 和 F2 代群体的平均等位基因数分别为 16.5、12.2 和 12.8;P0、F1 和 F2 代群体多态性信息含量(Pic)的平均数值分别为 0.9068、0.8982 和 0.8836。所有群体 10 个位点的观测杂合度值(H_o)均小于期望杂合度值(H_e),观测杂合度平均值的大小范围为 0.5775–0.6484,期望杂合度范围为 0.8594–0.9279。哈迪-温伯格平衡(HWE)结果显示,3 个群体在 10 个位点上有 24 个群体的位点组合显著偏离 HWE($P<0.05$),说明人工选育对选育群体的遗传结构有一定的影响。3 个群体在 10 个位点上的 F_{is} 值均为正值,平均范围为 0.1541–0.2341,表明群体内各位点上的杂合子比例有所下降;各群体间 F_{st} 值范围为 0.0093–0.0245,遗传分化程度较弱。此研究表明,以壳宽快速生长为选育目的,长牡蛎连续选育群体仍具有很高遗传多样性,人工选育过程中保持一定选择压力,仍然会使长牡蛎的优良生长性状得到不断提高。

关键词 长牡蛎;微卫星;遗传结构;遗传多样性

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)04-0090-07

长牡蛎(*Crassostrea gigas*)也称太平洋牡蛎,属瓣鳃纲、珍珠贝目、牡蛎科,广泛分布于西北太平洋海域,是世界上第一大养殖贝类,也是我国四大养殖贝类之一。随着牡蛎养殖规模的扩大,我国牡蛎养殖产量逐渐跃居到世界首位,但就牡蛎产业创造的价值而言,我国远远落后于欧美等发达国家,尤其近年来,养殖长牡蛎出现品质下降、种质退化等现象,表现为出肉率低、死亡率高、肉质下降等,严重影响我国牡蛎的国际竞争力。为维护行业的健康发展、保护长牡蛎种质资源,开展优良群体的选育工作已成为必然。

牡蛎具有繁殖力高、繁殖周期短、野生群体遗传

变异水平高的优点,非常适合开展选育工作(Newkirk, 1983)。有研究表明,通过家系选育或群体选育能实现长牡蛎的快速生长,降低长牡蛎的夏季死亡率,提高生产性能等(Hershberger *et al*, 1984; Dégremont *et al*, 2007; Beattie *et al*, 1980; Ward *et al*, 2000; Langdon *et al*, 2003)。Li 等(2006)发现,我国长牡蛎的养殖群体仍保持着较丰富的遗传多样性,这为实施长牡蛎的选择育种计划提供了有利条件。

群体遗传结构的研究是遗传资源利用和物种保护的基础(李昂等, 2002)。进行人工选育时,一定的人工选择压力或者外部环境会使群体的遗传结构产

* 国家自然科学基金青年项目(31402298)和山东省农业良种工程项目—大宗经济贝类新品种选育及应用共同资助。张荣良, E-mail: zrl11598@163.com

① 通讯作者: 杨建敏, 研究员, E-mail: ladderup@126.com

收稿日期: 2015-05-26, 收修改稿日期: 2015-07-10

生变化,近交几率增加以及有效亲本数的减少,导致选育群体的遗传多样性下降,甚至出现性状衰退的现象。虽然一些研究报道了贝类养殖群体的遗传多样性与野生群体相比未发生明显变化(Li *et al.*, 2006; English *et al.*, 2000; Durand *et al.*, 1993; Zhao *et al.*, 2009),但在贝类的种苗培育和群体选育过程中,常因亲本数量过少、亲本贡献不均、雌雄比例不当、配子质量差异、人工选择交配等因素,引起有效群体的数量的降低,从而降低选育群体的遗传多样性(Hedgecock *et al.*, 1990; Boudry *et al.*, 2002; Taris *et al.*, 2006; Appleyard *et al.*, 2006)。因此,将分子标记技术应用于长牡蛎遗传育种的研究,对养殖群体的遗传变异进行监测,对群体间的各遗传参数进行评估,显得尤其重要。

微卫星(Simple Sequence Repeats)技术亦称为简单重复序列,它由1-6个碱基组成的基本序列串联而成,由于具有多态位点多、信息量大、每个位点的多态性呈共显性遗传、易与PCR技术结合、多态性检测快捷等优点,被广泛应用于水产动物遗传多样性分析和遗传图谱构建等研究中。本研究以壳宽快速生长为选育目标的长牡蛎选育群体为材料,利用微卫星(SSR)分子标记技术,对基础群体(P0)和两代选育群体(F1和F2)的遗传多样性进行跟踪监测,分析人工定向选育对养殖群体遗传结构的影响,为我国长牡蛎资源的保护和健康发展及更有效开展选育提供数据和资料。

1 材料与方法

1.1 样品采集

本研究采集的样本为长牡蛎烟台崆峒岛选育基础群体(P0)和连续两代选育群体(F1和F2),共3个群体(表1)。基础群体系2012年采自烟台崆峒岛近海的半人工采苗野生群体,2013-2014年连续两年从壳宽快速生长的个体中留选亲本进行群体选育,保证雌雄亲本数目皆不少于50。亲本自海上采集后,经过暂养促熟阶段后,人工采集精子和卵子,并使之按一定比例混合,待受精卵孵化后进入幼苗培育及养成阶段,具体方法参见Li等(2011)和Wang等(2012)的报

道,每个世代的样品分别从连续选育群体的成体个体中随机选择。样品采集完之后,取长牡蛎的闭壳肌保存于95%的酒精中,存放于-20℃低温冰柜中保存。

1.2 DNA提取

DNA的提取采用常规酚/氯仿法,具体操作参照Li等(2006)的方法,DNA浓度的检测通过紫外分光光度计Ultrospec 2100 pro UV/visible spectrophotometer(Amersham Inc.)来完成。用灭菌水稀释成100 μg/ml的模板DNA,-20℃备用。

1.3 微卫星分析

本研究共选用了10个长牡蛎多态性较高的微卫星位点进行分析:ucdCg-149、ucdCg-138、ucdCg-194、ucdCg-157、ucdCg-160、ucdCg-162、ucdCg-109、ucdCg-177、ucdCg-175和ucdCg-140(Li *et al.*, 2003)(表2)。

PCR反应体系为10 μl,包含100 ng模板DNA、1×PCR buffer、0.2 mmol/L dNTP混合液、1 μmol/L引物、1 mmol/L MgCl₂和0.25 U *Taq* DNA聚合酶(TaKaRa Inc.)。

PCR反应条件:94℃预变性3 min;35个循环为94℃ 1 min,退火1 min,72℃ 1 min;72℃延伸5 min。PCR反应于GeneAmp® RCR System 9700上进行。

PCR产物在6%变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳,硝酸银法染色。为避免不同凝胶之间条带位置的误差,用同一个参照样在每一块胶上进行电泳作为对照。用10 bp DNA ladder (Invitrogen)作为Marker检测等位基因位置。

1.4 统计分析

使用软件POPGENE Version 1.32计算各微卫星位点在3个群体中的等位基因数 N ,多态性信息含量(Pic)(Botstein *et al.*, 1980)、期望杂合度(H_e),观测杂合度(H_o),哈迪温伯格平衡(HWE)的偏离情况(Raymond *et al.*, 1995)以及遗传分化(F_{st}),固定系数(F_{is})(Levene *et al.*, 1949)。用Genepop 1.4软件计算Nei(1987)群体间的相似性系数(I)和群体间遗传距离(D_A)。

表1 长牡蛎群体的取样时间、地点、群体类型和样本数
Tab.1 The sampling location, population, time and size of *C. gigas*

群体 Population	采样地点 Sampling location	采样时间 Sampling time	群体类型 Type of population	样本数 Sample size
P0	中国烟台 Yantai, China	20130525	基础群体 Basic population	40
F1	中国烟台 Yantai, China	20140529	F1 选育群体 F1 population	40
F2	中国烟台 Yantai, China	20151226	F2 选育群体 F2 population	40

表 2 10 对长牡蛎微卫星位点特征

Tab.2 Characteristics of the ten microsatellite loci of *C. gigas*

位点 Locus	GenBank 登录号 GenBank accession No.	重复位点数 Repeat array	引物序列 Primer sequence (5'-3')	退火温度 $T_m(^{\circ}\text{C})$
ucd-Cg149	AF468551	(GA) _n (GACA) _N	TGATTAACGTGGGTGATTCAG TTTCTGACTGTCCGTCTGTGA	60
ucd-Cg138	AF468542	(GA) _N	CCTCGAACAGCACTCCAAAT TTCAGTTCAACGCTCTTGCT	57
ucd-Cg194	AF468592	(GAT) _n (GAG) _N	CCCAGTGAAAACCTGGAGACA TTTCGAATCGGGAAAATACG	52
ucd-Cg157	AF468558	(GA) _N (TAGA) _N	GGGGGATGTCCGAGAAGTAT AACAGAGAAAGGTGGATTTTAGGA	58
ucd-Cg160	AF468560	(GA) _n (GACA) _n	GGAGCCATTAACAACACCACA TCTCTCCCTCCCCCTCTTA	57
ucd-Cg162	AF468562	(TTCA) _N (AT-CT) _n (GTCT) _N	CCAAATCACCGTTTTAGTTTGT AGCGACACAGAGACCACCTT	52
ucd-Cg109	AF468525	(CAT) _n	GCTATGGTTGTCATCCTCGAA TGCCTTTATCGGTTTTGCTT	53
ucd-Cg177	AF468575	(GA) _n	GCTCCGGGAATTAACCAT TCAAGAAAAAGTCGACGGGTA	57
ucd-Cg175	AF468573	(CAT) _n	GGGCATGGATCAACTCCTAA CCAACCAGCCCTAGTCTGTG	55
ucd-Cg140	AF468544	(CT) _N	TGCTCAATTCACAGCAATCAG TCTGACTGCTGAACAGCAAAT	60

2 结果

2.1 群体内的遗传多样性

运用 10 对微卫星引物, 对长牡蛎基础群体以及连续选育两代群体的所有采集样本, 进行多样性分析, 10 个位点在所有群体中均表现出较高的多态性, P0 的平均等位基因数为 16.5, F1 代和 F2 代选育群体的平均等位基因数为 12.2、12.8。3 个群体的多态信息含量(Pic)平均值依次为 0.9068、0.8982、0.8836。所有群体在 10 个位点的观测杂合度均小于期望杂合度, 观测杂合度平均值范围 0.5775–0.6484, 期望杂合度范围为 0.8594–0.9279。经过 Bonferroni (Rice, 1989)校正后, HWE 平衡结果显示, 3 个群体在 10 个位点仍有 24 个群体的位点组合显著偏离 HWE 平衡。固定系数 F_{is} 均为正值, 平均范围为 0.1541–0.2341, 表明 3 个群体在所有位点上, 表现出了一定程度的杂合子缺失(详见表 3)。

2.2 群体间的遗传变异分析

计算不同群体配对比较的 F_{st} 值, 均小于 0.05, 遗传分化仍属于较低的弱分化水平, 所有 10 个微卫星位点计算群体间总的遗传分化系数为 0.0487, 表明只有 4.87%的遗传变异来自群体间, 95.2%的遗传变

异来自于群体内(表 4)。运用 Genepop1.4 软件计算长牡蛎 3 个群体间的遗传相似性系数(I)和遗传距离(D_A), 不同世代群体间的相似性系数为 0.8814–0.9132, 遗传距离为 0.27121–0.5203, 群体间遗传距离大的遗传相似性低(表 5)。

3 讨论

遗传多样性是生物多样性的基础, 与其生存繁衍和进化潜力密切联系。人工群体选育的目的是在维持选育群体具有一定遗传多样性的基础上, 获得具有目标性状的选育新品种。在长期累代选育过程中需要保持足够的遗传变异水平及一定的遗传响应, 这就需要对选育群体的遗传结构的研究与监测。本研究结果中, 选育群体较野生基础群体, 等位基因数及多态信息含量均略有下降, 但二者都保持在较高水平上; 同样, 在杂合度方面, 选育群体也未出现明显下降的现象, 各群体都表现出了较高的遗传多样性。有很多学者认为, 选育群体较野生群体会出现遗传多样性下降的现象。王庆志等(2012)在对以快速生长为选育目标的长牡蛎连续三代选育群体进行研究发现, 选育群体与野生群体和基础群体比较, 等位基因丰富度下降了 14.5%和 8.7%。赵广泰等(2010)在对大黄鱼连续 4 代选育群体遗传多样性与遗传结构的微卫星分析时发

表 3 长牡蛎基础群体和连续选育世代的遗传多样性分析
 Tab.3 Genetic diversity of the wild population and successive selection stocks of *C. gigas*

位点 Locus		基础群体 P0 (n=40)	选育群体 F1 (n=40)	选育群体 F2 (n=40)
ucdcg-157	<i>N</i>	16	11	15
	<i>Pic</i>	0.9088	0.8169	0.9093
	<i>H_o</i>	0.7188	0.7273	0.6563
	<i>H_e</i>	0.9276	0.8462	0.9301
	<i>F_{is}</i>	0.2145	0.1321	0.2832
	<i>P</i>	0*	0.0711	0*
ucdcg-160	<i>N</i>	15	11	12
	<i>Pic</i>	0.9027	0.8807	0.8705
	<i>H_o</i>	0.8438	0.6667	0.7005
	<i>H_e</i>	0.9241	0.9044	0.8942
	<i>F_{is}</i>	0.0725	0.2611	0.5421
	<i>P</i>	0.1670	0.0030*	0.0020*
ucdcg-162	<i>N</i>	16	11	17
	<i>Pic</i>	0.8912	0.8651	0.9220
	<i>H_o</i>	0.3871	0.6970	0.6563
	<i>H_e</i>	0.9173	0.8909	0.9415
	<i>F_{is}</i>	0.5697	0.4197	0.2919
	<i>P</i>	0*	0*	0*
Ucdcg-194	<i>N</i>	18	12	8
	<i>Pic</i>	0.9206	0.8772	0.8344
	<i>H_o</i>	0.2000	0.3939	0.4063
	<i>H_e</i>	0.9412	0.9012	0.8651
	<i>F_{is}</i>	0.7839	0.5759	0.5229
	<i>P</i>	0*	0*	0*
ucdcg-177	<i>N</i>	20	11	13
	<i>Pic</i>	0.9161	0.8651	0.8945
	<i>H_o</i>	0.7188	0.6970	0.8438
	<i>H_e</i>	0.9360	0.8907	0.9167
	<i>F_{is}</i>	0.2199	0.2134	0.0649
	<i>P</i>	0*	0*	0.2724
ucdcg-138	<i>N</i>	19	10	12
	<i>Pic</i>	0.9161	0.8526	0.8681
	<i>H_o</i>	0.4688	0.5758	0.8750
	<i>H_e</i>	0.9360	0.8802	0.8938
	<i>F_{is}</i>	0.4913	0.3477	0.0055
	<i>P</i>	0*	0*	0.1095
ucdcg-140	<i>N</i>	16	11	11
	<i>Pic</i>	0.9004	0.8461	0.8732
	<i>H_o</i>	0.5000	0.3939	0.3438
	<i>H_e</i>	0.9221	0.8727	0.8983
	<i>F_{is}</i>	0.4492	0.5626	0.6113
	<i>P</i>	0*	0*	0*
ucdcg-109	<i>N</i>	16	12	14
	<i>Pic</i>	0.9176	0.8715	0.8903
	<i>H_o</i>	0.7813	0.8788	0.7188
	<i>H_e</i>	0.9375	0.8965	0.9132
	<i>F_{is}</i>	0.1534	0.0050	0.2004
	<i>P</i>	0*	0.5421	0.0015*

续表 3 Continued Tab. 3

位点 Locus		基础群体 P0 (n=40)	选育群体 F1 (n=40)	选育群体 F2 (n=40)
ucdcg-149	<i>N</i>	12	14	15
	<i>Pic</i>	0.8762	0.9067	0.9157
	<i>H_o</i>	0.7188	0.6970	0.8438
	<i>H_e</i>	0.8998	0.9273	0.9360
	<i>F_{is}</i>	0.1885	0.2446	0.0843
	<i>P</i>	0.0070*	0.0025*	0.0204
ucdcg-175	<i>N</i>	17	15	11
	<i>Pic</i>	0.9181	0.9108	0.8448
	<i>H_o</i>	0.4375	0.7273	0.4688
	<i>H_e</i>	0.9380	0.9310	0.8735
	<i>F_{is}</i>	0.5262	0.2145	0.4549
	<i>P</i>	0*	0.0040*	0*
MEAN	<i>N</i>	16.5	12.2	12.8
	<i>Pic</i>	0.9068	0.8982	0.8836
	<i>H_o</i>	0.5775	0.6188	0.6484
	<i>H_e</i>	0.9279	0.8954	0.9066
	<i>F_{is}</i>	0.1547	0.2078	0.2341

注: 哈迪-温伯格平衡偏离水平: * $P < 0.05 / 10$

Note: Degree of deviation of Hardy-Weinberg equilibrium: * $P < 0.05 / 10$

表 4 不同群体配对比较的 F_{st} 值Tab.4 F_{st} values of pairwise comparison among all populations

Pop ID	P0	F1	F2
P0			
F1	0.0245		
F2	0.0149	0.0093	

表 5 长牡蛎 3 个群体的 Nei's 相似性系数和遗传距离

Tab.5 Nei's genetic identity and genetic distance in three populations of *C. gigas*

Pop ID	P0	F1	F2
P0		0.5944	0.6599
F1	0.5203		0.7625
F2	0.4175	0.2712	

注: 对角线以上为相似性系数, 以下为遗传距离

Note: Nei's genetic identity was shown above the diagonal, and genetic distances were shown below the diagonal

现, 4 个世代群体遗传多样性指标值渐次下降, F1-F4 代 13 个微卫星位点的平均多态信息含量从 0.638 下降到 0.524, 平均等位基因数从 5.462 下降到 4.308。类似报道在合浦珠母贝 (*Pinctada margaritifera*) (Durand *et al.*, 1993)、大珠母贝 (*Pinctada maxima*) (Lind *et al.*, 2009) 和长牡蛎 (English *et al.*, 2000; Hedgecock *et al.*, 1990) 等种类也出现过。本研究中的各代群体的遗传多样性程度并

未出现显著性下降, 分析原因可能是繁育亲本的数目较多, 而且选育初期经历的世代数比较少的缘故。此外, 本研究未对选育群体自幼虫至成员养成的各阶段中的长势弱小的个体进行人工淘汰也是遗传多样性水平保持相对稳定的原因。

本研究中, 在对各位点进行 F_{is} 值分析时发现, 各群体出现了一定程度的杂合子缺失现象, 并导致几乎所有位点显著偏离 HWE 平衡, 分析原因可能是在选育过程中由于人工选择的压力过分注重生长性状, 使得与这些性状有关的基因保留下来, 一些无关的基因丢失了, 导致基因纯化加快从而产生杂合子缺失的现象, 另外, 实验取样数目过少或者取样不均匀也可能与之有关联。此外, 无效等位基因的存在 (Ball *et al.*, 1987; 张志伟等, 2006) 也可能对结果产生干扰。

遗传分化指数 F_{st} 是反映群体之间的亲缘关系的重要参数, 本研究中两两比较所得 F_{st} 值均小于 0.05, 3 个世代群体间遗传分化较弱, 群体间总的遗传分化系数为 0.0487, 根据 Wright (1978) 对遗传分化指数的界定, F_{st} 值介于 0-0.05 之间, 表示群体遗传分化较弱, 表明经过连续人工选育, 群体间的遗传结构差异不明显, 群体仍保持了足够的选育潜力。究其原因, 可能与人工选育过程中亲本数较多, 雌雄比例平衡或者没有将生长迟缓的个体剔除有关, 此外, 选育的世代太短也是影响因素 (Li *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012)。由 Nei (1987) 方法计算的 3 个群体的遗传相似系数为

0.8814–0.9132, 群体间的遗传距离 0.2712–0.5203, 相邻世代的遗传距离逐步减小, 遗传相似性逐步增大(详见表 4), 说明随着选育时间的推进, 选育群体的遗传背景趋于一致, 遗传结构也在逐步趋向稳定。以上结果表明, 选育群体的遗传结构在选择压力下会发生一定程度上的改变, 朝向目标性状一致的方向变化, 并逐步趋向稳定, 而这恰恰正是选择育种期望取得的结果。

本研究中的长牡蛎亲本来源于山东烟台崆峒岛野捕的自然野生个体, 具备很高的遗传多样性, 是开展良种选育的理想材料。在继代选育过程中, 每一代都是从上一代中挑选壳宽生长快且体质健壮的优良个体繁育而来, 故选育的后代在生长性状方面有着较为优良的表现。本研究结果表明, 持续的人工选育对长牡蛎壳宽选育群体的遗传结构产生了显著影响, 继续保持一定的选择压力不会对群体产生不良影响, 虽然人工选育带来的必然结果是遗传多样性的下降, 但此程度处于较低水平, 长牡蛎选育群体仍有较大的选育潜力。在今后的选育工作中, 完善各项管理工作的同时, 还应充分考虑增加有效群体数量, 以防止近交几率的提高, 以保证长牡蛎良种选育工作的顺利进行。

参 考 文 献

- 王庆志, 李琪, 孔令峰. 长牡蛎 3 代人工选育群体的微卫星分析. 水产学报, 2012, 36(10): 1529–1536
- 李昂, 葛颂. 植物保护遗传学研究进展: 生物多样性, 2002, 10(1): 61–71
- 张志伟, 曹哲明, 杨弘, 等. 草鱼野生和养殖群体间遗传变异的微卫星分析. 动物学研究, 2006, 27(2): 189–196
- 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): 500–508
- Appleyard SA, Ward RD. Genetic diversity and effective population size in mass selection lines of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Aquaculture, 2006, 254(1–4): 148–159
- Ball AO, Leonard S, Chapman RW. Characterization of (GT)_n microsatellite from native white shrimp *Penaeus setiferus*. Mol Ecol, 1987, 7(7): 1251–1253
- Beattie JH, Chew KK, Hershberger WK. Differential survival of selected strains of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) during summer mortality. Proc Natl Shellfish Assoc, 1980, 70: 184–189
- Botstein D, White RL, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restricted fragment length polymorphisms. Am J Human Gen, 1980, 32(3): 314–331
- Boudry P, Collet B, Cornette F, et al. High variance in reproductive success of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) Thunberg revealed by microsatellite-based parentage analysis of multifactorial crosses. Aquaculture, 2002, 204(3–4): 283–296
- Dégremont L, Ernande B, Bédier E, et al. Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). I. Estimation of genetic parameters for survival and growth. Aquaculture, 2007, 262(1): 41–53
- Durand P, Wada KT, Blanc F. Genetic variation in wild and hatchery stocks of the black pearl oyster, *Pinctada margaritifera*, from Japan. Aquaculture, 1993, 110(1): 27–40
- English LJ, Maguire GB, Ward RD. Genetic variation of wild and hatchery populations of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in Australia. Aquaculture, 2000, 187(3–4): 283–298
- Hedgecock D, Sly F. Genetic drift and effective population sizes of hatchery-propagated stocks of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Aquaculture, 1990, 88(1): 21–38
- Hershberger WK, Perdue JA, Beattie JH. Genetic selection and systematic breeding in Pacific oyster culture. Aquaculture, 1984, 39(1–4): 237–245
- Langdon C, Evans F, Jacobson D, et al. Yields of cultured Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) Thunberg improved after one generation of selection. Aquaculture, 2003, 220(1–4): 227–244
- Levene H. On a matching problem in genetics. Ann Math Stat, 1949, 20(1): 91–94
- Li G, Hubert S, Bucklin K, et al. Characterization of 79 microsatellite DNA markers in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Mol Ecol Notes, 2003, 3(2): 228–232
- Li Q, Wang QZ, Liu SK, et al. Selection response and realized heritability for growth in three stocks of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Fisheries Sci, 2011, 77(4): 643–648
- Li Q, Yu H, Yu RH. Genetic variability assessed by microsatellites in cultured populations of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in China. Aquaculture, 2006, 259(1–4): 95–102
- Li RH, Li Q, Yu RH. Parentage determination and effective population size estimation in mass spawning Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) based on microsatellite loci analysis. J World Aquacult Soc, 2009, 40(5): 667–677
- Lind CE, Evans BS, Knauer J, et al. Decreased genetic diversity and a reduced effective population size in cultured silver-lipped pearl oysters (*Pinctada maxima*). Aquaculture, 2009, 286(1–2): 12–19
- Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 1978, 89(3): 583–590
- Newkirk GF. Applied breeding of commercially important molluscs: a summary of discussion. Aquaculture, 1983, 33(1–4): 415–422
- Raymond M, Rousset F. GENEPOP (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. J Hered, 1995, 86(3): 248–249
- Rice WR. Analyzing tables of statistical tests. Evolution, 1989, 43(1): 223–225
- Taris N, Ernande B, McCombie H, et al. Phenotypic and genetic

- consequences of size selection at the larval stage in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). J Exp Mar Biol Ecol, 2006, 333(1): 147–158
- Wang QZ, Li Q, Kong LF, *et al.* Response to selection for fast growth in the second generation of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Journal of Ocean University of China, 2012, 11(3): 1–6
- Ward RD, English LJ, McGoldrick DJ, *et al.* Genetic improvement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Australia. Aquaculture Research, 2000, 31(1): 35–44
- Wright S. Variability within and among natural populations. Chicago: The University of Chicago Press, 1978: 121–124
- Zhao C, Li Q, Kong LF. Inheritance of AFLP markers and their use for genetic diversity analysis in wild and farmed scallop (*Chlamys farreri*). Aquaculture, 2009, 287(1–2): 67–74

(编辑 冯小花)

Assessment of Genetic Variability and Microsatellite Analysis of Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) After Artificial Selection of the Shell Width

ZHANG Rongliang^{1,2}, WANG Weijun², FENG Yanwei², YANG Jianmin^{2①}, TANG Haitian³, JI Renping^{1,2}

(1. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Shandong Provincial Key Laboratory of Restoration for Marine Ecology, Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Yantai 264006; 3. Yantai Marine Environment Monitoring Central Station, State Oceanic Administration, Yantai 264006)

Abstract In this study we investigated how mass selection would affect the genetic properties of the successive strains such as the fast growth in the shell width. Ten polymorphic microsatellite loci were analyzed to examine the genetic variation within a population, in one base stock, and in two successive mass selection lines of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). All microsatellite loci in the three groups showed high polymorphism, demonstrated by a large number of alleles per locus ($N_{F_0}=16.5$; $N_{F_1}=12.2$; $N_{F_2}=12.8$) and high polymorphism information contents ($Pic_{F_0} = 0.9068$, $Pic_{F_1} = 0.8982$, $Pic_{F_2} = 0.8836$). In all population-locus cases (3 populations \times 10 loci), the observed heterozygosity values (H_o) of the 10 loci were lower than the expected values (H_e) ($He=0.8954-0.9297$, $Ho=0.5775-0.6484$). Twenty-four cases deviated from the Hardy-Weinberg equilibrium ($P<0.05$). The values of F_{is} ranged from 0.152 to 0.233, resulting in heterozygote deficiencies at the 10 loci in each population. F_{st} ranged from 0.0093 to 0.0245, indicating a weak genetic differentiation among the populations. The results suggested that the successive selection for rapid growing shell width might not reduce the genetic diversity. Therefore, the growth traits of *C. gigas* could be improved over generations under successive selection strains.

Key words *Crassostrea gigas*; Microsatellite; Genetic structure; Genetic diversity

① Corresponding author: YANG Jianmin, E-mail: ladderup@126.com

日本枪乌贼(*Loligo japonica*)不同温度冻藏过程中的品质变化*

曹 荣¹ 王凤玉^{1,2} 赵 玲¹ 刘 淇^{1①} 刘玉川³

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 大连海洋大学食品工程学院 大连 116023;
3. 蓬莱中柏京鲁船业有限公司 蓬莱 265601)

摘要 选取-20℃、-30℃和-50℃ 3 个冻藏温度,以 TVB-N 值、肌原纤维蛋白含量、Ca²⁺-ATPase 活性、巯基含量、TBARS 值及肌肉组织微观结构为指标,结合感官评分,对比分析 90 d 内日本枪乌贼(*Loligo japonica*)的品质变化规律。结果显示,在不同冻藏温度下,随着时间的延长,Ca²⁺-ATPase 活性和感官评分不断下降;肌原纤维蛋白和巯基含量,则先略微上升而后快速下降;TVB-N 值和 TBARS 值呈不断上升的趋势,且温度越高上升速率越快;肌肉组织微观结构分析表明,枪乌贼肌纤维结构在冻藏过程中逐渐变得松散。相比-20℃,-30℃和-50℃冻藏温度条件下更能长久地保持枪乌贼品质,且品质无显著差异。综合分析认为,冻藏温度低于-30℃时,可较好地保持枪乌贼品质。

关键词 枪乌贼; 温度; 冻藏; 品质

中图分类号 S986 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)04-0097-07



日本枪乌贼(*Loligo japonica*),又称小鱿鱼,头足纲软体动物,广泛分布于我国黄、渤海等沿海地区。枪乌贼具有典型的高蛋白、低脂肪特点,且富含多种人体必需氨基酸。因此,枪乌贼这种大宗渔业资源的开发利用具有广阔的市场前景。

水产鲜品的品质不易保持,极易腐败变质。大宗水产品原料一般采用冷冻贮藏的方式。大量研究表明,水产品冷冻贮藏过程中,由于水渗透力的改变、肌球蛋白变性、机械损伤及肌原纤维蛋白的交联和聚合,使得水产品原料的一些品质发生劣变(Xia *et al.*, 2003)。国内外对鱿鱼冻藏过程中生化变化进行了一定的研究,Atayeter 等(2011)在-20℃、-40℃和-80℃条件下,对冻藏欧洲鱿鱼触手和胴体的基本成分及脂质氧化进行了对比分析;路钰希等(2013)研究发现,秘鲁鱿鱼在-30℃下冻藏能更好保持品质且经济成本低。

虽然研究的鱿鱼种类很多,但目前针对日本枪乌贼冻藏的研究报道较少。

作为远洋渔获物,枪乌贼一般需要经历较长时间的冷冻贮藏和运输。对枪乌贼在该冷链环节中品质变化规律进行研究,有助于监测、控制及预测其品质变化的程度。本研究以 TVB-N 值、肌原纤维蛋白含量、Ca²⁺-ATPase 活性、巯基含量、TBARS 值等为指标,结合感官评定和组织结构观察,研究了不同冻藏温度下枪乌贼品质的变化情况,以期枪乌贼冷链流通过程中的品质控制提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

鲜活枪乌贼由捕捞船在黄、渤海海域捕获,靠岸后冰藏条件下 3 h 内运至实验室。

* 工信部高技术船舶计划【工信部联装(2012)534 号】资助。曹 荣, E-mail: caorong@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 刘 淇, 研究员, E-mail: liuqi@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-06-16, 收修改稿日期: 2015-07-24

1.2 方法

1.2.1 样品前处理 将新鲜枪乌贼放入保鲜袋中,随机分为3组,模拟工厂冻藏模式,分别直接置于-20℃、-30℃和-50℃的条件下恒温冻藏,每隔15 d进行一次测定。

原料的解冻采用流水解冻的方式:冷冻枪乌贼经流水(约18℃)解冻15 min后,去头去皮去内脏,备用。

1.2.2 感官评定 参考 Vaz-Pires 等(2008)方法评价,将枪乌贼制备成5 cm×5 cm×0.5 cm的薄片,依据表1的标准,经10名专业的感官评定员对枪乌贼的气味、色泽、质地三方面进行感官评分。运用加权平均的方法,设定权重分别为0.4、0.4、0.3,计算加权平均分,满分为30分,18分以上为新鲜度良好,10分以下为腐败不可接受。

表1 枪乌贼感官评定(满分30)
Tab.1 Sensory evaluation of squid (full score 30)

指标 Index	感官评分 Sensory evaluation	分值 Score
气味 Smell	新鲜无异味	8-10
	略微变腥,有轻微异味	4-7
	腐败腥臭味	0-3
色泽 Color	体表色正常,鱼肉苍白透明	8-10
	体表色出现斑点,鱼肉暗淡半透明	4-7
	体表出现大量红斑,鱼肉黄色不透明	0-3
质地 Texture	坚实有弹性	8-10
	比较有弹性,指压后恢复慢	4-7
	肉质很软,几乎没有弹性	0-3

1.2.3 挥发性盐基氮(TVB-N)的测定 根据 GB/T5009.44-2003《肉与肉制品卫生标准分析方法》,采用微量扩散法测定。

1.2.4 肌原纤维蛋白的提取及含量的测定 准确称取5.00 g枪乌贼样品,加入0.1 mol/L KCl-20 mmol/L Tris-HCl缓冲液50 ml,匀浆机均质1 min,4℃条件下8000 r/min离心5 min,弃上清液,重复操作3次。沉淀中加入0.5 mol/L KCl-20 mmol/L Tris-HCl缓冲液50 ml,浸提1 h,8000 r/min离心10 min,取上清液即为肌原纤维蛋白溶液,用双缩脲法测定含量。

1.2.5 Ca²⁺-ATPase 活性的测定 参照万建荣等(1993)方法,稍作修改。在离心管中分别加入0.5 mol/L

Tris-Maleate 5 ml、0.1 mol/L CaCl₂ 0.5 ml、2 mol/L KCl 2.25 ml、肌原纤维蛋白液1 ml,混合完全后,加入ATP开始反应2 min,最后加入15%三氯乙酸(TCA)终止反应。6000 r/min离心10 min后,取上清液1 ml,加入2.5 ml H₂O、1 ml 2.5%硫酸钼酸、0.5 ml Elon试剂,充分混合,常温放置45 min,在640 nm处比色。空白组为加入ATP之前先加入TCA。以磷酸二氢钠溶液系列浓度(0.0-1.0 mmol/L)制备标准曲线,计算Ca²⁺-ATPase活性值。

1.2.6 活性巯基含量的测定 根据 Benjakul 等(2003)的方法,将2.0 ml肌原纤维蛋白溶液加入8.0 ml 8.0 mol/L尿素,充分混合。取3.0 ml混合液于试管中,加入0.02 ml DTNB溶液,混匀,放置15 min,412 nm比色。以未加入DTNB的混合液为空白组。根据下式计算活性巯基含量:

$$C_0 = \frac{A}{\varepsilon} \times \frac{D}{C_1}$$

式中,C₀为活性巯基含量(mol/g),A为412 nm处吸光度,ε为分子吸光系数13600(mol·cm/L),D为稀释倍数,C₁为肌原纤维蛋白含量(mg/ml)。

1.2.7 脂肪氧化(TBARS)的测定 参照 Paola (2014)的方法,称取10.00 g研匀后的样品,加入50 ml 5% TCA溶液。振荡2 min后静置10 min,8000 r/min离心10 min,上清液过滤。滤液适度稀释后,取5 ml于25 ml具塞试管中,加入5 ml 0.02 mol/L TBA溶液。95℃水浴45 min后,冷却。532 nm测定吸光度值。以1,1,3,3-四乙氧基丙烷(TEP)为标准液绘制标准曲线,并计算TBARS值。

1.2.8 肌肉组织结构的切片制作 将枪乌贼样品切成5 mm×5 mm×1.5 mm的薄片,放入10%的甲醛溶液固定12-24 h,流水冲洗4-6 h,用浓度梯度分别为70%(2 h)、80%(2 h)、90%(2 h)、95%(1.5 h)和100%(1.5 h)的乙醇溶液进行脱水处理,再用二甲苯溶液对样品透明处理(30 min),最后石蜡包埋,用切片机切成厚度为5 μm的切片,染色后光学显微镜下观察(邓敏,2013)¹⁾。

1.2.9 数据处理 采用SPSS 11.0对实验数据进行统计分析,结果以平均值±标准差表示,组间分析采用t检验,显著性界值以P<0.01为极显著,P<0.05为显著。

1) 邓敏. 浸渍冻结流速及冻藏对草鱼块品质影响的研究. 华南理工大学硕士研究生学位论文, 2013, 17-18

2 结果与讨论

2.1 枪乌贼冻藏过程中感官评分变化

枪乌贼的感官评分随冻藏时间的延长呈下降的趋势,且冻藏温度越高,感官评分下降速率越快(图1)。在冻藏第15天时,-20℃、-30℃和-50℃条件下贮藏的枪乌贼样品感官评分无显著差异($P>0.05$)。第30天时,-20℃组样品的评分明显下降,显著低于-50℃组($P<0.05$),而-30℃组与其他两组无显著差异。从第60天开始,-20℃组、-30℃组和-50℃组的样品在感官评分上呈现出明显差异($P<0.05$)。冻藏第90天时,-20℃、-30℃、-50℃下枪乌贼感官评分分别为20.2、23.7和26.0,3组之间有极显著差异($P<0.01$)。

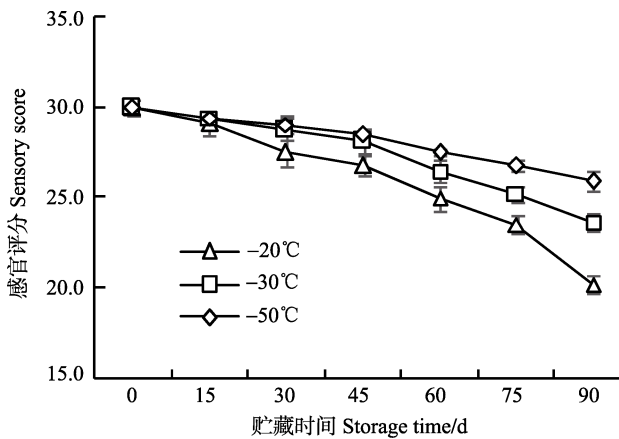


图1 枪乌贼冻藏过程中感官评分变化

Fig.1 Changes in the sensory scores of squid at different storage temperatures

Nurkhoeriyati 等(2012)研究发现,冻藏过程中,肌原纤维蛋白发生变性及凝聚,导致肌肉功能特性的改变,脂肪氧化则影响了肉的气味和颜色,从而降低了鱼肉的感官品质。另外,冻藏温度越低,冻结速度越快,鱼肉品质越好,冻结速率对鱼肉的光泽度、气味、质地等有着显著影响(Ruiz-Capillas *et al*, 2005)。

2.2 枪乌贼冻藏过程中 TVB-N 含量变化

TVB-N 是衡量水产品及其肉类制品新鲜度的常用指标。新鲜捕获鱼类的 TVB-N 值一般在 5–20 mg/100 g 之间,而冷冻贮藏鱼类的可接受极限为 30–35 mg/100 g (Özogul *et al*, 2007)。根据 GB 2733-2005《鲜、冻动物性水产品卫生标准》,头足类 TVB-N \leq 30 mg/100 g 为合格品。

新鲜枪乌贼的 TVB-N 值为 10.91 mg/100 g,这与路钰希等(2013)的研究结果基本一致。枪乌贼的 TVB-N 值较其他水产品高,这可能是由于枪乌贼中

蛋白质含量较高,内源性蛋白酶分解蛋白生成更多的氨类及三甲胺等挥发性含氮化合物,使得 TVB-N 值升高(李艳萍等, 2014)。不同冻藏温度条件下,枪乌贼 TVB-N 值均呈上升的趋势(图 2)。冻藏第 30 天时,3 个温度组的 TVB-N 值变化不大,无显著性差异($P>0.05$)。-20℃组冻藏枪乌贼的 TVB-N 值从第 30 天开始快速增大。而-30℃组和-50℃组的 TVB-N 值则从第 60 天开始明显增大。第 45 天时,3 组之间差异显著($P<0.05$)。至冻藏第 90 天时,-20℃、-30℃、-50℃ 3 组对应的 TVB-N 值分别为 18.28 mg/100 g、14.93 mg/100 g 和 13.97 mg/100 g,均小于 30 mg/100 g,符合国家标准。

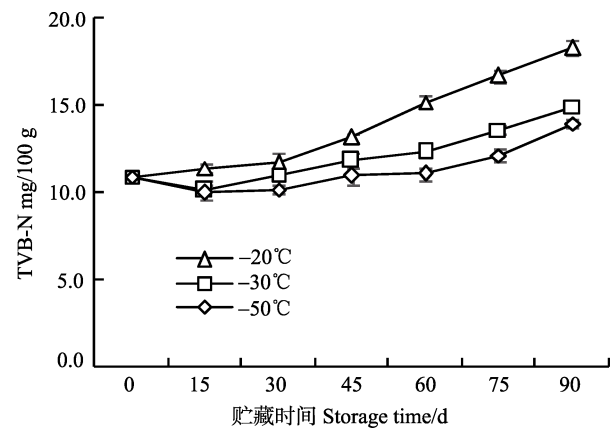


图2 枪乌贼冻藏过程中 TVB-N 值的变化

Fig.2 Changes in the TVB-N values of squid at different storage temperatures

2.3 枪乌贼冻藏过程中肌原纤维蛋白含量的变化

随着冻藏时间的延长,枪乌贼肌原纤维蛋白含量总体呈下降趋势。水产品冻藏过程中,肌原纤维蛋白含量的下降与多种因素有关。Pan 等(2010)认为,巯基氧化成二硫键,使蛋白质重链聚合,导致了肌原纤维蛋白含量降低。此外,Striket 等(2007)研究表明,蛋白质三级结构被破坏,分子间产生交联,也是蛋白变性的原因之一。

由图 3 所示,与-20℃条件下枪乌贼肌原纤维蛋白含量一直下降略有不同,-30℃条件下冻藏的枪乌贼样品,肌原纤维蛋白含量在前 15 d 无明显变化,第 30 天时略有增加,-50℃条件下的枪乌贼样品,前 15 d 也出现肌原纤维蛋白含量略微增加现象。这一现象与曾名勇等(2003)的研究结果类似,认为这是由肌原纤维蛋白提取过程中的实验误差引起的。而陶欢等(2010)则认为,动物死后肌肉中 ATP 逐渐消耗,使得肌球蛋白和肌动蛋白发生不可逆的结合,形成大分子物质沉降所导致。在冻藏第 45 天时,-30℃组与-50℃组

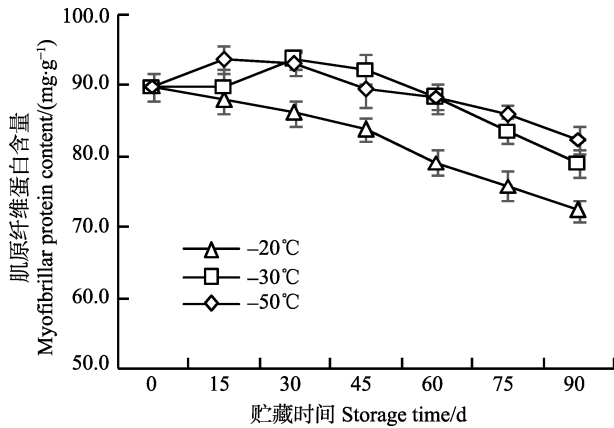


图3 枪乌贼冻藏过程中肌原纤维蛋白含量的变化
Fig.3 Changes in the myofibrillar protein content of squid at different storage temperatures

肌原纤维蛋白含量差异不大, 极显著高于 -20°C 组 ($P<0.01$)。至第90天时, -20°C 、 -30°C 、 -50°C 对应的肌原纤维蛋白含量分别为72.33 mg/g、79.12 mg/g和82.44 mg/g, 3组之间存在显著差异 ($P<0.05$)。

2.4 枪乌贼在冻藏过程中 Ca^{2+} -ATPase 活性的变化

水产动物的肌球蛋白头部具有 ATPase 活性, 而 Ca^{2+} 可以激活酶活性(郭园园等, 2011)。冻藏中肌球蛋白头部构象发生变化, 蛋白质分子之间相互作用使得其空间结构重新排列, 造成了 Ca^{2+} -ATPase 失活。Eymard 等(2009)研究发现, 脂质在冻藏中产生的过氧化物会与蛋白质发生反应, 导致蛋白变性, 从而使 Ca^{2+} -ATPase 失活。因此, 冻藏过程中, Ca^{2+} -ATPase 活性可以表征肌原纤维蛋白的完整性和变性程度。

由图4可知, 在冻藏期90 d内, 3个温度条件下, 枪乌贼肌原纤维蛋白 Ca^{2+} -ATPase 活性不断下降, 这与 Benjakul 等(1997)的研究结果类似。冻藏前15 d内,

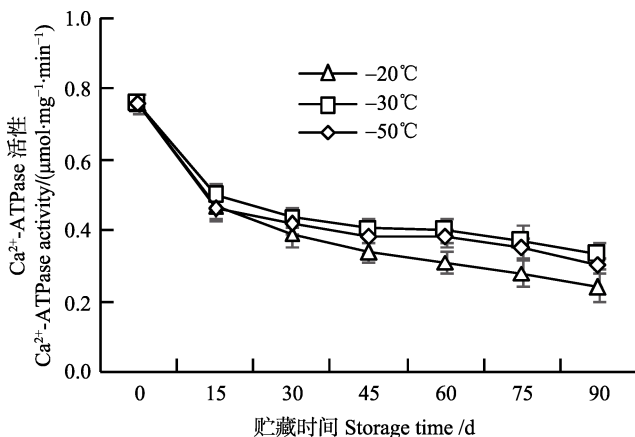


图4 枪乌贼冻藏过程中 Ca^{2+} -ATPase 活性的变化
Fig.4 Changes in the Ca^{2+} -ATPase activity of squid at different storage temperatures

Ca^{2+} -ATPase 活性下降的速率最快, -20°C 组、 -30°C 组和 -50°C 组由新鲜鱿鱼的 $0.74 \mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$ 分别下降到 $0.47 \mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$ 、 $0.50 \mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$ 、 $0.46 \mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$, 降幅分别达36.48%、32.43%、37.84%, 但3个温度之间 Ca^{2+} -ATPase 活性无显著差异 ($P>0.05$)。冻藏45 d后, -20°C 下枪乌贼 Ca^{2+} -ATPase 活性显著低于其他两个温度组 ($P<0.05$), 而 -30°C 与 -50°C 相比, Ca^{2+} -ATPase 活性在冻藏过程中始终无显著差异 ($P>0.05$)。

2.5 枪乌贼在冻藏过程中活性巯基含量的变化

蛋白质结构中的巯基是所有蛋白质氨基酸残基中最活泼的基团, 在体内抗氧化、亚硝基化等多种重要生理反应中具有重要作用(Wedemeyer *et al*, 2000)。通过测定活性巯基含量, 可以直观表明蛋白质内部结构的变化。从图5可以看出, 冻藏第15天时, 3个温度组活性巯基含量无明显变化。冻藏第30天时, 鱿鱼在 -30°C 和 -50°C 下的活性巯基含量由最初的 $5.56 \times 10^{-5} \text{ mol/g}$ 分别增加到 $5.61 \times 10^{-5} \text{ mol/g}$ 、 $5.85 \times 10^{-5} \text{ mol/g}$ 。这可能是在冻藏初期, 过低的温度影响了蛋白质空间结构, 隐藏的巯基暴露出来所造成的。随后, 活性巯基含量快速下降, 从第60天开始, 3个温度组的活性巯基含量出现显著差异 ($P<0.05$)。至冻藏第90天时, -20°C 、 -30°C 和 -50°C 下活性巯基含量分别下降至 $4.75 \times 10^{-5} \text{ mol/g}$ 、 $4.99 \times 10^{-5} \text{ mol/g}$ 和 $5.07 \times 10^{-5} \text{ mol/g}$ 。

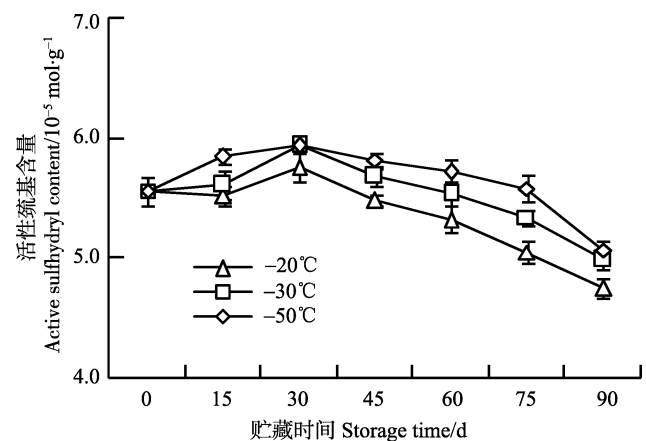


图5 不同冻藏温度对巯基含量的影响
Fig.5 Effects of different frozen temperatures on the sulfhydryl content

活性巯基与肌原纤维蛋白、 Ca^{2+} -ATPase 活性有着密切的联系。Benjakul 等(2003)认为, 巯基含量下降是由于蛋白内部结构改变, 巯基暴露氧化成二硫键所致。由于大量巯基和二硫键的存在, 使得蛋白分子

间的网络结构得到加强,肌原纤维蛋白发生变性,影响了肌原纤维蛋白的溶解性。此外,冻藏过程中巯基的氧化特别是位于肌球蛋白头部巯基的氧化进一步导致了 Ca^{2+} -ATPase 活性的下降(Badii *et al*, 2002)。

2.6 枪乌贼在冻藏过程中 TBARS 含量的变化

脂肪氧化酸败是冻藏过程中水产品发生品质劣变的主要原因之一。硫代巴比妥酸还原值(TBARS 值)可以准确反映脂质氧化程度。由图 6 可知,3 个温度下,枪乌贼 TBARS 值随冻藏时间的延长显著升高($P<0.05$)。冻藏第 15 天时, -20°C 条件下冻藏的枪乌贼 TBARS 值显著高于 -30°C 和 -50°C 条件下的样品($P<0.01$)。这可能是由于冻藏过程中, -20°C 冻结速率要远低于其他两个温度,形成的冰晶较大且分布不均匀,造成肌纤维细胞破裂氧化剂释放,加快了脂肪氧化。冻藏至第 45 天时, -30°C 组和 -50°C 组冻藏鱿鱼的 TBARS 值有明显的增加,分别上升了 82.46%、49.52%,但均极显著低于 -20°C 组($P<0.01$)。第 90 天时,在 -20°C 、 -30°C 和 -50°C 条件下枪乌贼 TBARS 值分别增长至 0.58 mg/kg、0.42 mg/kg 和 0.37 mg/kg,均没有超过脂肪酸败临界值 1–2 mg/kg(迟海等, 2011)。

枪乌贼 TBARS 值在冻藏过程中的变化规律与其他研究(Hong *et al*, 2013)一致。肌肉纤维中冰晶逐渐升华,增加了氧气与脂肪的接触面积,促进了脂肪氧化的发生。胡亚芹等(2014)研究表明,冻藏的温度不

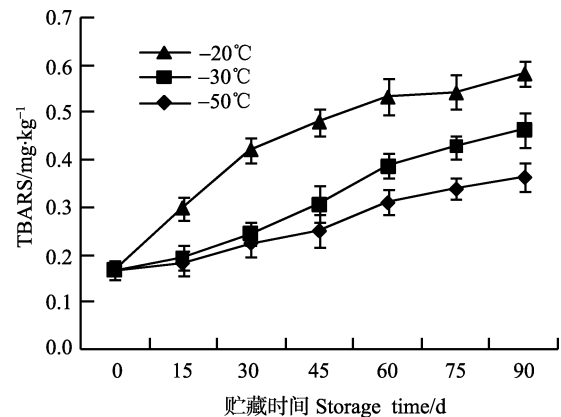


图 6 不同冻藏温度对 TBARS 值的影响
Fig.6 Effects of different frozen temperatures on the TBARS values

同,脂肪氧化速率存在显著差异;温度越低,对脂肪氧化的抑制效果越好。

2.7 枪乌贼在冻藏过程中肌肉组织形态变化

从图 7 可以看出,冻藏 30 d 内, -30°C 、 -50°C 组枪乌贼肌肉的组织结构与新鲜枪乌贼样品相比,变化相差不大,肌纤维几乎没有间隙,肌纤维束结合紧密,无断裂现象存在, -20°C 组,肌纤维间隙开始加大,肌纤维束发生轻微松散。到冻藏第 60 天, -20°C 组的肌纤维间隙继续增大,与此同时, -30°C 组的肌纤维束开始松散,但 -50°C 组肌肉组织结构依旧完好。冻藏第 90 天时, -20°C 组枪乌贼的肌纤维分离程

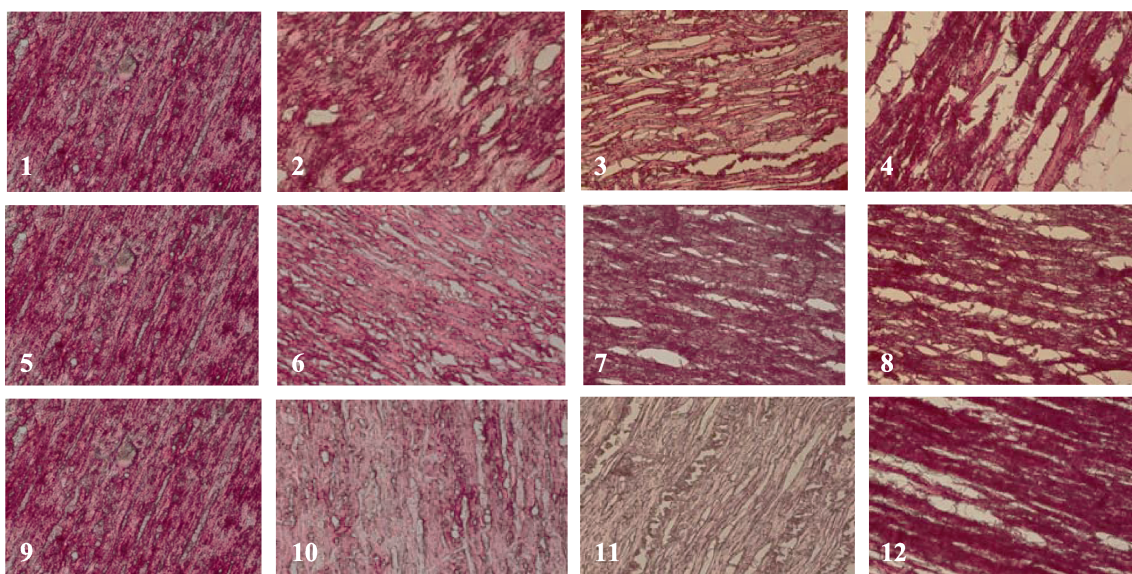


图 7 不同冻藏温度对肌肉组织结构的影响

Fig.7 Effects of different frozen temperatures on the structure of muscle tissues

冻藏温度和时间 Storage temperature and time: 1. -20°C , 0 d; 2. -20°C , 30 d; 3. -20°C , 60 d; 4. -20°C , 90 d; 5. -30°C , 0 d; 6. -30°C , 30 d; 7. -30°C , 60 d; 8. -30°C , 90 d; 9. -50°C , 0 d; 10. -50°C , 30 d; 11. -50°C , 60 d; 12. -50°C , 90 d

度进一步变大,轮廓变得模糊,且出现了一定程度的断裂;−50℃组的枪乌贼,其肌纤维也发生了轻微的分,但−30℃和−50℃组的肌纤维并没有出现断裂现象,肌纤维形状较为完整。

杨利艳(2012)¹⁾对凡纳滨对虾在不同冻结方式下的肌肉组织结构进行研究时发现,不同的冻结方式对肌肉组织的影响较大,研究表明,在冻结过程中,冻结速率对肌肉组织结构产生较大影响,速率越慢,对肌肉结构的破坏程度越大。

3 结 论

在冻藏过程中,随着时间的延长,枪乌贼的TVB-N值、TBARS值不断上升,肌原纤维蛋白含量、Ca²⁺-ATPase活性、巯基含量和感官评分呈不断下降趋势。在冻藏初期45 d内,除枪乌贼Ca²⁺-ATPase活性外,其他品质指标变化趋势较为平缓,而在60 d后,冻藏枪乌贼的各项指标有迅速变化。此外,冷冻贮藏枪乌贼对其肌肉组织结构和理化特性有显著影响。在不同的温度下,冻藏肌肉中冰晶均逐渐增大,脂质发生氧化,降低了枪乌贼的感官品质和营养价值,破坏了肌肉组织的微观结构,导致枪乌贼品质发生劣变。

不同冻藏温度对枪乌贼各项指标有不同程度的影响。总体上,冻藏的温度越低,枪乌贼的品质保持越好。在冻藏90 d内,−30℃和−50℃下冻藏枪乌贼的各项指标均优于−20℃。在相同的冻藏时间内,−20℃与其他两个温度相比,加速了枪乌贼脂质和蛋白质的氧化,使肉质变色,改变了肌原纤维蛋白的结构,降低了肌原纤维蛋白的功能特性,表明−30℃冻藏枪乌贼可较好地保持其品质,与−50℃相比又可降低能耗。

参 考 文 献

- 万建荣,洪玉菁,奚印慈,等.水产食品化学分析手册.上海:上海科学技术出版社,1993,198–202
- 李艳萍,李振兴,郭晓华,等.鱿鱼丝质构及鲜度指标在加工中的动态变化.中国渔业质量与标准,2014,4(5):1–5
- 迟海,杨峰,杨宪时,等.不同解冻方式对南极磷虾品质的影响.现代食品科技,2011,27(11):1291–1295
- 胡亚芹,胡庆兰,杨水兵,等.不同冻结方式对带鱼品质影响的研究.现代食品科技,2014,30(2):23–30
- 陶欢,陈舜胜.3种淡水对虾在冻藏过程中蛋白质特性的变化.水产学报,2010,34(3):389–394
- 郭园园,孔保华.冷冻贮藏引起的鱼肉蛋白质变性及其物理化学特性的变化.食品科学,2011,32(7):335–340
- 曾名勇,黄海,李八方.不同冻藏温度对鲈鱼肌肉蛋白质生化特性的影响.青岛海洋大学学报(自然科学版),2003,33(4):525–530
- 路钰希,李学英,杨宪时,等.贮藏温度对鱿鱼品质变化的影响及其货架期分析.食品工业科技,2013,34(14):318–321
- Atayeter S, Ercoşkun H. Chemical composition of European squid and effects of different frozen storage temperatures on oxidative stability and fatty acid composition. J Food Sci Technol, 2011, 48(1): 83–89
- Badii F, Howell NK. Changes in the texture and structure of cod and haddock fillets during frozen storage. Food Hydrocolloids, 2002, 16(4): 313–319
- Benjakul S, Seymour TA, Morrissey MT, et al. Physicochemical changes in Pacific whiting muscle proteins during iced storage. J Food Sci, 1997, 62(4): 729–733
- Benjakul S, Visessanguan W, Thongkaew C, et al. Comparative study on physicochemical changes of muscle proteins from some tropical fish during frozen storage. Food Res Int, 2003, 36(8): 787–795
- de Gonzalez MTN, Hafley BS, Boleman RM, et al. Antioxidant properties of plum concentrates and powder in precooked roast beef to reduce lipid oxidation. Meat Sci, 2008, 80(4): 997–1004
- Eymard S, Baron CP, Jacobsen C. Oxidation of lipid and protein in horse mackerel (*Trachurus trachurus*) mince and washed minces during processing and storage. Food Chem, 2009, 114(1): 57–65
- Hong H, Luo Y, Zhou Z, et al. Effects of different freezing treatments on the biogenic amine and quality changes of bighead carp (*Aristichthys nobilis*) heads during ice storage. Food Chem, 2013, 138(2): 1476–1482
- Nurkhoeriyati T, Huda N, Ahmad R. Physicochemical properties and sensory analysis of duck meatballs containing duck meat surimi-like material during frozen storage. J Food Sci, 2012, 77(1): S91–S98
- Özogul Y, Özogul F, Olgunoglu IA, et al. Bacteriological and biochemical assessment of marinating cephalopods, crustaceans and gastropoda during 24 weeks of storage. Int J Food Sci Nutr, 2007, 59(6): 465–476
- Pan J, Shen H, Luo Y. Changes in salt extractable protein and Ca²⁺-ATPase activity of mince from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) during frozen storage: a kinetic study. J Muscle Foods, 2010, 21(4): 834–847
- Paola AS, Isabel YM. Effect of frozen storage on biochemical changes and fatty acid composition of mackerel (*Scomber japonicus*) muscle. J Food Res, 2014, 4(1): 135
- Ruiz-Capillas C, Moral A. Sensory and biochemical aspects of

1) 杨利艳.冻结方式对凡纳滨对虾贮藏特性的影响.广东海洋大学硕士研究生学位论文,2012,37–40

- quality of whole bigeye tuna (*Thunnus obesus*) during bulk storage in controlled atmospheres. *Food Chem*, 2005, 89(3): 347–354
- Sriket P, Benjakul S, Visessanguan W, *et al.* Comparative studies on the effect of the freeze–thawing process on the physicochemical properties and microstructures of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and white shrimp (*Penaeus vannamei*) muscle. *Food Chem*, 2007, 104(1): 113–121
- Vaz-Pires P, Seixas P, Mota M, *et al.* Sensory, microbiological, physical and chemical properties of cuttlefish (*Sepia officinalis*) and broadtail shortfin squid (*Illex coindetii*) stored in ice. *LWT-Food Sci Technol*, 2008, 41(9): 1655–1664
- Wedemeyer WJ, Welker E, Narayan M, *et al.* Disulfide bonds and protein folding. *Biochemistry*, 2000, 39(15): 4207–4216
- Xia X, Kong B, Liu J, *et al.* Influence of different thawing methods on physicochemical changes and protein oxidation of porcine longissimus muscle. *LWT-Food Science and Technology*, 2012, 46(1): 280–286

(编辑 刘丛力)

Qualitative Changes of Squid (*Loligo japonica*) Under Different Frozen Storage Temperatures

CAO Rong¹, WANG Fengyu^{1,2}, ZHAO Ling¹, LIU Qi^{1①}, LIU Yuchuan³

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;

2. Department of Food Engineering, Dalian Ocean University, Dalian 116023;

3. Penglai Zhongbai Jing Ship Industry Co., Ltd., Penglai 265601)

Abstract Because squid (*Loligo japonica*) is not one of the traditional food sources in many countries, systematic studies on its nutrition and frozen storage, even in countries where there is a long history of squid consumption, have been lacking. In this study the squids were frozen at -20°C , -30°C , and -50°C for 90 days to investigate the change in the meat quality and stability under different temperatures. The quality was evaluated every 15 days during the frozen storage according to the sensory evaluation and parameters such as the total volatile basic (TVB-N), the myofibrillar protein content, Ca^{2+} -ATPase activity, the sulfhydryl content, and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). The results showed that Ca^{2+} -ATPase activity and mouth feel decreased with the prolonged time of frozen storage at different temperatures. In the first 15 days, decline in the Ca^{2+} -ATPase activity of both samples was the fastest, and it slowed down afterward. The contents of myofibrillar protein and sulfhydryl was first slightly increased and then decreased. The values of TVB-N and TBARS were elevated in frozen storage at all temperatures; the higher the storage temperature, the more rapidly these values rose. The values of TVB-N and TBARS were increased at a much higher rate after about 45 days, which indicated the deterioration in meat quality. Microstructural analysis of squid showed that the muscle fiber bundles became loose during the frozen storage. The storage temperature significantly affected the rate of decline in squid quality. Storage at -30°C and -50°C better preserved the quality compared to -20°C . Therefore, -30°C or below could be the recommended storage temperature.

Key words Squid *Loligo japonica*; Temperature; Frozen storage; Quality

① Corresponding author: LIU Qi, E-mail: liuqi@ysfri.ac.cn

中草药复合微生态制剂对吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)生长、肠道菌群及抗病力的影响*

汤菊芬^{1,2} 黄瑜^{1,2} 蔡佳^{1,2} 丘金珠^{1,2}
孙建华³ 徐中文³ 简纪常^{1,2①}



(1. 广东海洋大学水产学院 湛江 524088; 2. 广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室 湛江 524088; 3. 广东绿百多生物科技有限公司 湛江 524022)

摘要 通过在饲料中分别添加 2×10^7 CFU/g 的芽孢杆菌制剂、中草药芽孢杆菌制剂、复合微生态制剂和中草药复合微生态制剂, 研究 4 种微生态制剂对吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)生长、肠道菌群及抗病力等的影响。结果显示: (1) 饲料中添加 4 种微生态制剂均可显著提高罗非鱼的增重率($P < 0.05$), 对成活率和饲料利用率也有一定程度的提高($P > 0.05$), 而中草药复合微生态制剂对罗非鱼促进生长效果最佳。(2) 饲料中添加 4 种微生态制剂可以显著提高罗非鱼肠道中的细菌总数、芽孢杆菌、乳酸杆菌和双歧杆菌数量($P < 0.05$), 大肠杆菌数量显著低于对照组($P < 0.05$), 说明饲料中添加一定量的 4 种微生态制剂均可改善罗非鱼的肠道菌群结构, 以中草药复合微生态制剂的改善效果最佳。(3) 经人工感染无乳链球菌后, 罗非鱼对照组全部死亡, 4 个实验组只有部分死亡。鉴定发现, 吉富罗非鱼的死亡均由感染无乳链球菌所致, 试验组罗非鱼的免疫保护率分别为 51.42% (B 组)、58.62% (C 组)、58.62% (D 组) 和 68.93% (E 组), 以中草药复合微生态制剂组的免疫保护率最高。综上所述, 在饲料中添加一定比例的中草药复合微生态制剂可以提高吉富罗非鱼生长指标、改善其肠道菌群结构和增加抗病力。

关键词 中草药复合微生态制剂; 吉富罗非鱼; 生长; 肠道菌群; 抗病力

中图分类号 S932.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)04-0104-06

正常生理状态下, 鱼类的消化道中寄生着数量庞大、种类多样的菌群, 它们形成复杂的微生态系统, 与鱼体之间形成互利共生的关系, 这是各种生物在漫长进化过程中相互适应的结果。鱼体消化道中各菌群比例的相对平衡, 对维持其内环境稳态和应答病原入侵等都起着重要的作用(宋增福等, 2007)。益生菌制剂以其无毒性、无残留、无耐药性、低成本, 并可有效补充动物消化道内的有益菌群、调节微生态平衡, 从而促进养殖动物生长、提高其抗病力等特点, 被认为是理想的抗生素替代品(向泉等, 2000)。而中草

药含有多种营养成分, 如蛋白质、氨基酸、维生素、多糖类、常量和微量元素等, 能够提高机体的特异性和非特异性免疫力, 在一定程度上会影响肠道菌群组成和数量(田海军等, 2005), 还有一些未知的促生长活性物质。因此, 中草药制剂在水产养殖领域具有广阔的应用前景(向泉等, 2000)。而有关中草药益生菌联合使用在畜禽上的研究较多(王永芬等, 2011; 赵乐乐等, 2013; 田浪等, 2015), 在水产方面的研究报道仅见于凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) (文国樑等, 2009; 于明超等, 2010; 马良骁等, 2013; 王振怀等, 2005)、吉富

* 广东省科技计划项目(2015A020209181)和湛江市科技计划项目(2012A0302)共同资助。汤菊芬, E-mail: tjf10002000@163.com

① 通讯作者: 简纪常, 教授, E-mail: jianjc@gmail.com

收稿日期: 2015-08-10, 收修改稿日期: 2015-10-27

罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) (汤保贵等, 2007)和建鲤(*Cyprinus carpio* var. Jian) (肖拉, 2012)¹⁾, 但上述研究均为在饲料中联合添加益生菌和中草药, 而用复合益生菌发酵中草药, 形成中草药复合微生态制剂产品添加到饲料中, 应用到罗非鱼养殖中的研究尚未见报道。本研究即采用此种方法, 获得中草药复合微生态制剂后, 添加到罗非鱼基础饲料中, 经过一段时间的投喂, 测定其对吉富罗非鱼生长、肠道菌群和抗病力等指标的影响, 为中草药复合微生态制剂在罗非鱼养殖业中的推广应用提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 吉富罗非鱼与无乳链球菌

吉富罗非鱼苗由高州朗业畜牧渔业科技养殖公司提供。挑选同批同龄、体格健硕、规格整齐、平均体重为 19.5 ± 0.5 g 的鱼苗作为试验用鱼。暂养与养殖实验均在高州朗业畜牧渔业科技养殖公司提供的 15 个水泥池中进行, 每个水泥池的规格为 8.0 m (长) × 5 m (宽) × 1.0 m (高), 水深 0.8 m。暂养期间投喂商品罗非鱼饲料, 7 d 后进行随机分组实验。无乳链球菌由本实验室提供。

1.2 中草药复合微生态制剂

中草药(ZL 200910132065.0)由本实验室提供, 菌种由广东绿百多生物科技有限公司提供。芽孢杆菌制剂由 3 株芽孢杆菌(纳豆、枯草、地衣)组成, 中草药芽孢杆菌制剂由中草药经 3 株芽孢杆菌发酵而成, 复合微生态制剂由 3 株芽孢杆菌、粪肠球菌和嗜酸乳杆菌等比例混合而成, 中草药复合微生态制剂由中草药经混合菌发酵而成(混合菌由 3 株芽孢杆菌、粪肠球菌和嗜酸乳杆菌组成)。

1.3 实验设计

将暂养后的吉富罗非鱼随机分到 15 个水泥池

中, 每池 200 尾; 实验共分为 5 组, 标记为 A、B、C、D、E 组, 每组 3 个重复, 分别饲喂基础饲料和实验饲料(表 1)。

1.4 饲养管理方法

按 1.3 设计的方案投喂相应饲料, 早晚各投饵 1 次, 每天饲料投喂量按罗非鱼体重的 3%–5% 计。根据实验鱼的实际生长情况, 每 7 d 对投喂量进行适当调整。全过程不间断充气增氧, 使用经消毒、过滤处理的地下水, 每 7 d 换水清污 1 次, 水温为 $(28.5 \pm 1.5)^\circ\text{C}$, 试验周期为 56 d。

1.5 样品采集和处理

养殖实验结束后(第 57 天), 先对各个池中的罗非鱼进行计数、称重, 然后从每个池中随机挑取 10 尾鱼, 用酒精对其体表进行消毒处理后, 在超净工作台上采集肠道。各池中采集 10 尾鱼肠道混合成一个样品, 放入灭菌的 10 ml 离心管中待测。

1.6 生长指标测定

生长指标按下面公式计算:

成活率(%) = 试验结束时收鱼尾数 × 100 / 试验开始时放鱼尾数

增重率(%) = (终末体重 - 初始体重) × 100 / 初始体重

饲料系数(FCR) = 摄食量 / (终末体重 - 初始体重)

1.7 肠道细菌测定

肠道菌群测定以及方法如表 2 所示。

1.8 免疫保护率测定

养殖实验结束后(第 57 天), 分别从 A、B、C、D 和 E 组的每个池中随机抽取 20 尾鱼, 用浓度为 1×10^8 CFU/ml 无乳链球菌活菌悬液进行腹腔注射感染, 注射剂量为 0.1 ml/尾, 观察 14 d, 同时记录试验鱼在感染过程中的发病和死亡情况, 对濒临死亡的试验鱼进行解剖

表 1 实验饲料

Tab.1 Design of experimental feeds

组别 Group	饲料配制 Preparation of feed
A 组 Group A	基础饲料(商品罗非鱼饲料) Basic feed (commercial tilapia feed)
B 组 Group B	基础饲料+芽孢杆菌制剂 Basic feed+ <i>Bacillus subtilis</i> (2×10^7 CFU/g)
C 组 Group C	基础饲料+中草药+芽孢杆菌制剂 Basic feed+ Chinese Herbal Medicine+ <i>Bacillus subtilis</i> (2×10^7 CFU/g)
D 组 Group D	基础饲料+复合微生态制剂 Basic feed+compound Probiotics (2×10^7 CFU/g)
E 组 Group E	基础饲料+中草药复合微生态制剂 Basic feed+Chinese herbal medicine+compound probiotics (2×10^7 CFU/g)

1) 肖拉. 枯草芽孢杆菌 JS01 和黄芪多糖对建鲤生长及免疫功能的影响. 四川农业大学硕士研究生学位论文, 2012

表2 肠道菌群测定所用培养基及培养方法

Tab.2 Cultural mediums and methods for intestinal flora

培养基种类 Medium types	培养对象 Cultivate objects	培养条件 Cultivate conditions
TTC 培养基 TTC medium	细菌总数 Total number of bacteria	37℃需氧培养 48 h Aerobic culture for 48 h at 37℃
伊红美蓝培养基 Eosin-Methy Blue Agar Medium	大肠杆菌 Colibacillus	37℃需氧培养 48 h Aerobic culture for 48 h at 37℃
BBL 培养基 BBL Medium	双歧杆菌 Bifidobacterium	37℃厌氧培养 48 h Anaerobic culture for 48 h at 37℃
MRS 培养基 MRS medium	乳酸杆菌 Lactobacillus	37℃厌氧培养 48 h Anaerobic culture for 48 h at 37℃
甘露醇卵黄多粘菌素琼脂 Mannitol yolc polymyxin AGAR	芽孢杆菌 Bacillus	37℃需氧培养 48 h Aerobic culture for 48 h at 37℃

和病原分离，以确定实验鱼是否为感染无乳链球菌而死亡。

死亡率(%)=(死亡鱼体尾数/试验初鱼体尾数)×100%

免疫保护率(%)=(1-试验组死亡率/对照组死亡率)×100%

1.9 数据处理

用 SPSS 19.0 分析软件对试验数据进行单因素方差分析处理，实验结果均以平均值±标准差(Mean±SD)表示，若存在显著性差异，则进行多重比较， $P<0.05$ 为差异显著， $P<0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 中草药复合微生态制剂对吉富罗非鱼生长性能指标的影响

中草药复合微生态制剂对吉富罗非鱼生长性能指标的影响见表3。B、C、D、E 4 个实验组罗非鱼成活率分别比对照组 A 提高了 2.33%、3.12%、3.38%和 3.90%，增重率分别比对照组 A 提高了 20%、46%、39.03%、46.20%和 63.50%，饲料系数分别比对照组 A 降低了 1.65%、3.31%、4.96%和 7.44%。研究表明，饲料中添加一定量的芽孢杆菌制剂、中草药芽孢杆菌制剂、复合微生态制剂和中草药复合微生态制剂均可以显著提高罗非鱼的增重率($P<0.05$)，成活率、饲料利用率也有一定程度的提高，但影响不显著($P>0.05$)。中草药复合微生态制剂对罗非鱼的促生长效果最佳。

2.2 中草药复合微生态制剂对吉富罗非鱼肠道菌群的影响

中草药复合微生态制剂对吉富罗非鱼肠道菌群的影响见表4。B、C、D、E 4 个实验组罗非鱼肠道中的

细菌总数、芽孢杆菌数量、乳酸杆菌数量和双歧杆菌数量均显著高于对照组 A($P<0.05$)，大肠杆菌数量显著低于对照组($P<0.05$)。说明饲料中添加一定量的微生态制剂、中草药微生态制剂均可以改善罗非鱼的肠道菌群结构，以中草药复合微生态制剂的改善效果最佳。

2.3 中草药复合微生态制剂对吉富罗非鱼感染无乳链球菌后免疫保护率的影响

经腹腔注射感染无乳链球菌后，对照组 A 的罗非鱼全部死亡，B、C、D、E 4 个实验组的吉富罗非鱼有部分死亡(图 1)。通过鉴定发现，吉富罗非鱼的死亡都是由于感染无乳链球菌所致，因此，数据可以用于免疫保护率的计算。最终得出免疫保护率：E 组(68.93%)> D 组>C 组(58.62%)>B 组(51.42%)，E 组免疫保护率最高。

表3 中草药复合微生态制剂对吉富罗非鱼的生长及饲料利用的影响

Tab.3 Effects of probiotics combined with Chinese herbal medicine on the growth and feed utilization of Nile tilapia

组别 Groups	成活率 Survival rate (%)	增重率 Weight gain rate (%)	饲料系数 Feed coefficient
A 组 Group A	96.25	181.23±8.86 ^a	1.21±0.04
B 组 Group B	98.50	218.31±7.53 ^b	1.19±0.09
C 组 Group C	99.25	251.96±9.80 ^{bc}	1.17±0.05
D 组 Group D	99.50	264.96±2.61 ^{bc}	1.15±0.03
E 组 Group E	100	296.31±2.68 ^c	1.12±0.02

注：表中的值为平均值±标准差($n=3$)，同一列中肩注字母不同表示差异显著($P<0.05$)。下同

Note: The values in the table were represented as Mean ± SD ($n=3$). Significant differences ($P<0.05$) were denoted by different letters. The same applied to the follows

表4 中草药复合微生态制剂对吉富罗非鱼肠道菌群的影响

Tab.4 Effects of probiotics combined with Chinese herbal medicine on the intestinal flora of Nile tilapia

组别 Groups	细菌总数 Total number of bacteria ($\times 10^8$)	大肠杆菌 Colibacillus ($\times 10^5$)	芽孢杆菌 Bacillus ($\times 10^7$)	乳酸杆菌 Lactobacillus ($\times 10^6$)	双歧杆菌 Bifidobacterium ($\times 10^6$)
A组 Group A	1.48 \pm 0.03 ^a	5.92 \pm 0.06 ^a	1.60 \pm 0.15 ^a	3.33 \pm 0.08 ^a	2.67 \pm 0.07 ^a
B组 Group B	1.69 \pm 0.05 ^b	5.63 \pm 0.02 ^b	2.16 \pm 0.08 ^b	3.71 \pm 0.06 ^b	2.82 \pm 0.05 ^b
C组 Group C	1.82 \pm 0.07 ^{bc}	5.41 \pm 0.03 ^{bc}	2.84 \pm 0.28 ^{bc}	3.92 \pm 0.09 ^{bc}	2.98 \pm 0.03 ^{bc}
D组 Group D	1.89 \pm 0.04 ^{bc}	5.36 \pm 0.04 ^{bc}	2.95 \pm 0.15 ^{bc}	4.03 \pm 0.15 ^{bc}	3.03 \pm 0.04 ^{bc}
E组 Group E	1.98 \pm 0.06 ^c	5.01 \pm 0.03 ^c	3.57 \pm 0.04 ^c	4.53 \pm 0.20 ^c	3.39 \pm 0.03 ^c

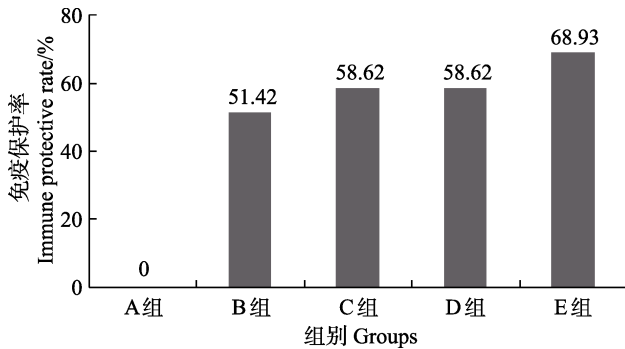


图1 中草药复合微生态制剂对吉富罗非鱼感染无乳链球菌后免疫保护率的影响

Fig.1 Effects of probiotics combined with Chinese herbal medicine on the immune protective rate of Nile tilapia after infection with *Streptococcus agalactiae*

3 讨论

3.1 中草药复合微生态制剂对吉富罗非鱼生长指标的影响

于明超等(2010)在饲料中添加中草药和芽孢杆菌能促进对虾的生长,且二者联合应用的效果好于单独使用。汤保贵等(2007)发现,微生物和中草药联合制剂能显著促进罗非鱼幼鱼生长和提高饲料的利用率。韩亚超等(2014)在饲料中添加中草药复合微生态制剂后,仔猪的增重率和料肉比等指标均优于抗生素组和复合益生菌组。本研究结果显示,饲料中添加芽孢杆菌制剂、中草药芽孢杆菌制剂、复合益生菌制剂和中草药复合微生态制剂均能够促进吉富罗非鱼的生长性能,且添加中草药复合微生态制剂组的促生长效果最好。此结果与汤保贵等(2007)、于明超等(2010)和韩亚超等(2014)的研究结果相符,也进一步证明中草药和益生菌联合使用可以产生协同增效作用(丁轲等,2004)。中草药富含多种营养物质和一些未知的诱食因子,可以增强养殖动物的食欲,促进机体代谢和

消化酶的分泌,提高营养物质的利用率,从而加速养殖动物的生长发育、降低饲料系数(宋世民,2013)。另一方面,益生菌制剂中的芽孢杆菌和乳酸杆菌可以产生多种消化酶类(肖拉,2012)¹⁾,可提高动物消化道内消化酶的生物活性,促使动物机体可以更好地消化和吸收胃肠道中的营养物质,提高饲料利用率。此外,乳酸杆菌还可分解转化饲料中一些机体难以吸收的有机物质,将一些糖类发酵成乳酸,使动物肠道中的pH值降低,进而形成酸性的内部环境,有利于动物机体对钙、铁等矿物质和维生素的吸收和利用,从而促进了罗非鱼的生长。

3.2 中草药复合微生态制剂对吉富罗非鱼肠道菌群的影响

正常肠道微生物菌群在机体内构成了一道天然屏障,对动物的营养、生长、健康、防病、免疫等方面起着重要作用(郭兴华,2002)。而芽孢杆菌的生长繁殖需求大量氧气,能够在水生动物的肠道中形成利于优势菌(双歧杆菌和乳酸杆菌)繁殖的厌氧环境,从而有利于厌氧菌(乳酸杆菌、双歧杆菌)的生长繁殖,并减少好氧致病菌如大肠杆菌的数量。本研究在饲料中添加4种微生态制剂后可以明显提高罗非鱼肠道乳酸杆菌、双歧杆菌和芽孢杆菌的数量,而大肠杆菌的数量明显减少,这与其他学者在鲫鱼、草鱼和凡纳滨对虾上的研究结果相符(尹军霞等,2007;沈涛等,2012;胡毅等,2008)。中草药复合微生态制剂对罗非鱼肠道菌群的改善效果最为明显,这可能与所选择的中草药为补益类药物,富含双歧生长因子有关;此外,芽孢杆菌的生长会耗尽罗非鱼肠道中的氧气,有利于乳酸杆菌和双歧杆菌的生长繁殖,中药发酵过程产生的一些有机酸也能促进乳酸杆菌生长,抑制病原菌的生长繁殖。因此,推测中草药复合微生态制剂产生了比单一使用中草药或益生菌更好的效果。

1) 肖拉. 枯草芽孢杆菌 JS01 和黄芪多糖对建鲤生长及免疫功能的影响. 四川农业大学硕士研究生学位论文, 2012

3.3 中草药复合微生态制剂对吉富罗非鱼抗病力的影响

肠道细菌可提高宿主免疫机能,能在宿主肠道内表面形成生物保护膜,抵抗外来病原菌的入侵、定植,可刺激机体产生“自然抗体”拮抗作用,减少宿主对有害物质的吸收。此外,乳酸菌的一些代谢产物对抑制病原菌及腐败菌、提高免疫力等也有重要作用(胡毅等, 2008)。李桂英等(2011)研究发现,在饲料中添加肠道益生菌及其灭活菌体,能提高南美白对虾的免疫应答水平和抗病力。Salinas 等(2008)在饲料中添加灭活的德式乳酸杆菌和枯草芽孢杆菌可以显著增加乌颊鱼体液中自然补体含量,增强非特异性免疫功能,提高其抗病力。温俊(2008)在基础饲料配方中分别添加黄霉素和合生素后,罗非鱼机体的吞噬活力和血清补体活力均显著高于对照组($P<0.05$)。本研究结果表明,在饲料中添加 4 种益生菌制剂后均可提高吉富罗非鱼的抗病能力,这与李桂英等(2011)、Salinas 等(2008)和温俊(2008)的研究结果相符,且中草药复合微生态制剂组的免疫保护率要好于其他实验组,表明中草药联合益生菌群发酵后的使用效果对罗非鱼的免疫保护率更优。本研究首次使用复合益生菌发酵中草药后在罗非鱼中进行试验应用,该种制剂对罗非鱼的生长性能、肠道菌群和抗病力方面都有很好的效果,这为中草药复合微生态制剂在水产养殖领域的应用提供了一定的理论与实践基础。

参 考 文 献

- 丁轲,倪学勤,潘康成,等. 益生菌与协同剂的协同效应研究. 兽药与饲料添加剂, 2004, 9(4): 17-19
- 于明超,李卓佳,林黑着,等. 饲料中添加芽孢杆菌和中草药制剂对凡纳滨对虾生长及肠道菌群的影响. 热带海洋学报, 2010, 29(4): 132-137
- 马良骁,冯宪斌,韦新兰,等. 微生态制剂联合中草药制剂在南美白对虾高位池养殖应用. 海洋与渔业, 2013(9): 98-100
- 王永芬,乔宏兴,席磊,等. 益生菌-黄芪复合生物制剂的制备及其对肉仔鸡的影响. 中国农业大学学报, 2011, 16(1): 54-59
- 王振怀,高才全,李春岭,等. 微生物和中药制剂在南美白对虾养殖中的应用试验. 河北渔业, 2005(2): 30
- 文国樑,于明超,李卓佳,等. 饲料中添加芽孢杆菌和中草药制剂对凡纳滨对虾免疫功能的影响. 上海海洋大学学报, 2009, 18(2): 181-186
- 尹军霞,陈瑛,孟丽丽. 益生菌剂对鲫鱼肠道菌群影响的初步研究. 水产科学, 2007, 26(11): 610-613
- 田海军,郑曙明. 中草药与鱼体肠道菌群的相互影响. 水利渔业, 2005, 25(4): 94-95
- 田浪,魏文康,魏堂鸿,等. 中草药-益生菌复合制剂对断奶仔猪生产性能的影响. 黑龙江畜牧兽医, 2015(5): 197-199
- 向泉,周兴华. 中草药添加剂在水产养殖上的作用. 粮食与饲料工业, 2000(3): 27-29
- 汤保贵,孙建华. 微生物和中草药联合制剂对罗非鱼生长和水质的影响. 水利渔业, 2007, 27(4): 62-63
- 李桂英,宋晓玲,孙艳,等. 几株肠道益生菌对凡纳滨对虾非特异免疫力和抗病力的影响. 中国水产科学, 2011, 18(6): 1358-1367
- 沈涛,邓斌,陈南南. 饲料中添加复合芽孢杆菌对草鱼消化道酶活性及肠道菌群的影响. 淡水渔业, 2012, 42(1): 41-46
- 宋世民. 中草药饲料添加剂在水产养殖中的应用. 农村养殖技术, 2013(6): 37
- 宋增福,吴天星. 鱼类肠道正常菌群研究进展. 水产科学, 2007, 26(8): 471-474
- 赵乐乐,陈鲁勇,陈颖超,等. 益生菌和中草药添加剂对北京油鸡屠体性状和肉品质的影响. 上海交通大学学报(农业科学版), 2013, 31(2): 40-43
- 胡毅,谭北平,麦康森,等. 饲料中益生菌对凡纳滨对虾生长、肠道菌群及部分免疫指标的影响. 中国水产科学, 2008, 15(2): 245-251
- 郭兴华. 益生菌基础与应用. 北京: 北京科学技术出版社, 2002, 2-124
- 韩亚超,何永高,张新红,等. 中草药复合微生态制剂对断奶仔猪生长性能指标和血液生化指标的影响. 江苏农业科学, 2014, 42(8): 218-221
- 温俊. 合生素对罗非鱼非特异性免疫力的影响. 饲料研究, 2008(8): 69-70
- Salinas I, Abelli L, Bertoni F. Monospecies and multispecies probiotic formulations produce different systemic and local immunostimulatory effects in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Fish Shellfish Immunol, 2008, 25(1-2): 114-123

(编辑 冯小花)

Effects of a Compound Probiotics Combined with Chinese Herbal Medicine on Growth Performance, Intestinal Flora and Resistance to Diseases of GIFT Strain of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

TANG Jufen^{1,2}, HUANG Yu^{1,2}, CAI Jia^{1,2}, QIU Jinzhu^{1,2}, SUN Jianhua³,
XU Zhongwen³, JIAN Jichang^{1,2}①

(1. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088; 2. Guangdong Province Key Laboratory of Pathogen Biology and Epidemiology of Aquatic Economic Animals, Zhanjiang 524088; 3. Guangdong Lvbaiduo Biotechnology Company, Zhanjiang 524022)

Abstract Here we studied the effects of four kinds of probiotics on the growth performance, intestinal flora, and resistance to diseases of GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Bacillus subtilis*, Chinese herbal medicine compound *Bacillus subtilis*, compound probiotics, and Chinese herbal medicine compound probiotics were added into feed at the concentration of 2×10^7 CFU/g to form four treatment groups. The results were shown below: (1) All four probiotics obviously improved the weight gain rate of Nile tilapia ($P < 0.05$). Probiotics also insignificantly promoted the survival rate and feed efficiency ($P > 0.05$), and Chinese herbal medicine compound probiotics exhibited the best effect. (2) All four types of probiotics caused an increase in the total amounts of bacteria, bifidobacterium, lactobacillus, and bacillus in the guts of Nile tilapia ($P < 0.05$), whereas the number of *Escherichia coli* was significantly reduced compared to the control group ($P < 0.05$). These results indicated that all four probiotics in the feed could improve the structure of intestinal flora in Nile tilapia, and among them Chinese herbal medicine compound probiotics was the most effective. (3) After the *Streptococcus agalactiae* infection administered with artificial intraperitoneal injection, all the Nile tilapia in the control group died, but the infection was only fatal to some individuals in the treatment groups. Further tests confirmed streptococcus infection as the reason of death of Nile tilapia. The immune protection rates of the four probiotics were 51.42% (Group B), 58.62% (Group C), 58.62% (Group D) and 68.93% (Group E), again Chinese herbal medicine compound probiotics (Group E) showed the highest efficiency. In conclusion, adding a proper portion of Chinese herbal medicine compound probiotics into feed could effectively improve the growth index, the structure of intestinal flora, and the disease resistance of Nile tilapia.

Key words Chinese Herbal Medicine compound with probiotics; *Oreochromis niloticus*; Growth; Microflora of intestinal; Resistance to diseases

① Corresponding author: JIAN Jichang, E-mail: jianjc@gmail.com

引起半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis* Günther) 鱼苗大规模死亡的神经坏死病毒病*



粟子丹^{1,2,3} 李 晋^{1,2,3} 史成银^{1,2①}

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. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 2012 和 2013 年, 山东某育苗场 15–20 日龄的半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis* Günther) 鱼苗出现暴发性大规模死亡, 7 d 内死亡率高达 90%–100%。本研究调查了疾病的发生情况和临床特征, 采集病鱼样品进行了组织病理学检查, 并运用 RT-PCR 方法进行了病原的检测和基因序列分析。结果发现, 半滑舌鳎鱼苗一般在 7 月和 8 月发病, 发病时养殖水温为 22–24℃。病鱼游泳行为异常, 表现为上下翻游、螺旋性游动、全身大幅度波浪状浮动症状, 但病鱼体表无出血和溃疡症状。组织病理检查发现, 病鱼脑和视网膜组织出现严重的空泡化及坏死。病鱼样品的 RT-PCR 检测结果全部呈鱼类神经坏死病毒阳性。对得到的 RT-PCR 产物测序, 进行 BLAST 比对, 发现该病毒与鱼类神经坏死病毒的赤点石斑鱼神经坏死病毒(Red-spotted grouper nervous necrosis virus, RGNNV)基因型的相似性达 98%以上, 而与鱼类神经坏死病毒的其他 3 个基因型: 黄带拟鲆神经坏死病毒(Striped jack nervous necrosis virus, SJNNV)、红鳍东方鲀神经坏死病毒(Tiger puffer nervous necrosis virus, TPNNV)和条斑星鲆神经坏死病毒(Barfin flounder nervous necrosis virus, BFNNV)的相似性仅为 71%–78%。由此可以判定, 本研究发现的引起半滑舌鳎鱼苗大规模死亡的神经坏死病毒为 RGNNV 基因型, 半滑舌鳎也是鱼类神经坏死病毒的天然宿主。该发现在半滑舌鳎疾病防治和鱼类神经坏死病毒的流行机制研究方面都具有重要意义。

关键词 半滑舌鳎; 赤点石斑鱼神经坏死病毒; RT-PCR; 检测

中图分类号 S941 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)04-0110-06

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis* Günther)是我国北方常见的大型底栖鱼类, 主要分布于我国的渤海、黄海海域, 其活动范围小、营养等级低、生长快, 鱼肉营养丰富、口感细腻, 具有较高的经济价值, 已成为我国沿海地区海水养殖鱼类的优良品种之一。随着半滑舌鳎人工繁殖技术取得成功, 养殖规模不断扩大, 并逐步开始了集约化养殖(姜言伟等, 1993)。但是, 由于养殖密度过大、养殖环境恶化和病原传播等原因, 各种疾病也不断增多。其中, 大部分疾病为细菌性疾病,

病毒性疾病报道较少(Tang *et al*, 2008; 张晓君等, 2009; Zhang *et al*, 2011; 陈政强等, 2012)。

2012 年和 2013 年, 山东某育苗场的半滑舌鳎鱼苗先后发生大规模死亡, 患病半滑舌鳎鱼苗呈现身体畸形弯曲、狂游或螺旋型游动等临床症状, 但体表及内脏无出血、溃烂等现象, 疑为感染了鱼类神经坏死病毒。已有的研究表明, 鱼类神经坏死病毒可以分为 4 种基因型, 即: 黄带拟鲆神经坏死病毒(Striped jack nervous necrosis virus, SJNNV)、红鳍东方鲀神经坏死病毒(Tiger

* 国家科技支撑计划课题(2012BAD17B01)资助。粟子丹, E-mail: suzidan08@163.com

① 通讯作者: 史成银, 研究员, E-mail: shicy@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-06-10, 收修改稿日期: 2015-06-15

puffer nervous necrosis virus, TPNNV)、赤点石斑鱼神经坏死病毒(Red-spotted grouper nervous necrosis virus, RGNNV)和条斑星鲷神经坏死病毒(Barfin flounder nervous necrosis virus, BFNNV) (Nishizawa *et al.*, 1997)。据报道, 鱼类神经坏死病毒可以感染 10 目 33 科 50 余种鱼类(Munday *et al.*, 2002; Sano *et al.*, 2011), 对海水养殖鱼类尤其是鱼类育苗造成了极大的威胁。然而, 未见半滑舌鲷感染鱼类神经坏死病毒报道。

本研究运用组织病理学和分子生物学方法, 对上述患病鱼苗进行病原分析, 首次证实半滑舌鲷是鱼类神经坏死病毒的天然宿主, 该发现在半滑舌鲷疾病防治和鱼类神经坏死病毒的流行机制研究方面都具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 样品采集与处理

2012 年和 2013 年, 山东某育苗场培育的半滑舌鲷鱼苗出现大规模死亡, 本研究对发病情况调查, 记录病鱼的临床特征, 采集具有典型临床症状的 15–20 日龄半滑舌鲷鱼苗。一部分鱼苗用 RNAlater (Qiagen, 北京) 保存, 用于 RNA 提取和病毒检测。一部分鱼苗用 Davidson's AFA 固定液固定, 用于组织病理研究。

1.2 组织病理切片

对 Davidson's AFA 固定液固定的病鱼, 剪取鱼苗头部组织, 进行石蜡组织切片和苏木精-伊红染色, 封片后用光学显微镜(Nikon E800, 日本)观察病理变化。

1.3 RNA 的提取

取 RNAlater 保存的病鱼头部组织约 30 mg, 采用 GB 核酸释放试剂盒(诺晶生物公司, 上海), 参照说明书步骤提取组织总 RNA。

1.4 RT-PCR 检测

根据 GenBank 中已经公布的鱼类神经坏死病毒的基因序列, 选取保守区设计 RT-PCR 引物, F1: CTG GTC GGC TGA TAC TCCT, R1: CAA CGC CAT CTG TGA ACG, 目标扩增片段大小为 399 bp。

以 1.3 中提取的组织总 RNA 为模板, 采用 TransScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix (TransGen, 北京) 进行反转录, 合成 cDNA 模板。20 μ l 反转录体系: 0.1 μ g/ μ l 随机引物 1 μ l、反转录酶 1 μ l、2 \times TS 反转录缓冲液 10 μ l、组织总 RNA 3 μ l、DEPC 水 5 μ l。反转录程序: 25 $^{\circ}$ C 10 min, 42 $^{\circ}$ C 30 min, 85 $^{\circ}$ C 5 min。

取上述合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。25 μ l PCR 反应体系: 10 μ mol/L F1 和 R1 引物各 0.5 μ l、2 \times GB-Direct PCR Mix 12.5 μ l、cDNA 模板 2 μ l、DEPC 水 9.5 μ l。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 然后 94 $^{\circ}$ C 30 s; 58 $^{\circ}$ C 30 s; 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 5 min。取扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 观察结果并拍照。

1.5 序列比对与相似性分析

PCR 产物由生工生物工程(上海)有限公司进行双向测序, 拼接后的序列输入计算机, 用 BioEdit 软件和 BLAST 软件进行序列相似性分析。

2 结果

2.1 发病情况和临床特征

调查发现, 半滑舌鲷鱼苗发病时的养殖水温一般在 22–24 $^{\circ}$ C, 养殖水体盐度为 30, pH 为 7–8。1–12 日龄以及 30 日龄以上的鱼苗发病较轻。13–30 日龄的鱼苗发病严重, 死亡率高达 90%–100%。50 日龄以上的鱼苗不发病。患病鱼苗呈现上下翻游、螺旋性游动或全身大幅度波浪状浮动等症状。鱼体无力, 随着水流漂动, 部分鱼苗有短暂的狂游现象。患病严重的鱼苗脊柱出现弯曲畸形, 但病鱼体表无出血、溃烂等现象(图 1)。



图 1 水中患病的半滑舌鲷鱼苗
Fig.1 The diseased fry of half-smooth tongue sole *C. semilaevis* in water

2.2 组织病理观察

对采集的患病半滑舌鲷鱼苗进行组织病理学观察, 可以看到典型的病毒性神经坏死病理特征, 即病

鱼的脑和视网膜组织大量空泡化。在患病半滑舌鲷鱼苗的头部组织切片中,最明显的空泡化病变主要出现在视网膜的视细胞层、双极细胞层以及节细胞层,中枢神经组织的空泡化病变主要出现在脑灰质部位,并且在空泡周围有大量的嗜碱性的病毒包涵体(图 2)。

2.3 病原的 RT-PCR 扩增结果

采用 RT-PCR 方法对于采集的半滑舌鲷鱼苗进行鱼类神经坏死病毒的检测。电泳结果显示,采集到的 4 批样品,病毒检测结果均为强阳性(图 3)。

2.4 序列比对与相似性分析

对上述 RT-PCR 产物测序并进行 BLAST 比对,结果显示,感染半滑舌鲷的神经坏死病毒(CsCN NNV)

与 RGNNV 基因型的代表种——七带石斑鱼神经坏死病毒(Seven-band grouper nervous necrosis virus)(GenBank 检索号: AY324870.1)的序列相似性为 98%,与感染白星笛鲷(*Lutjanus stellatus*)、东大西洋石斑鱼(*Epinephelus marginatus*)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)和布氏鲳鲆(*Trachinotus blochii*)的几种鱼类神经坏死病毒的序列相似性均在 98%以上。另一方面, CsCN NNV 与分别隶属于 SJNNV、TPNNV、BFNNV 基因型的黄带拟鲳(*Pseudocaranx dentex*)神经坏死病毒、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)神经坏死病毒和条斑星鲈(*Verasper moseri*)神经坏死病毒的序列相似性仅在 71%–78%之间(图 4)。测定的半滑舌鲷的神经坏死病毒基因序列已经提交到 GenBank, 检索号 KJ541748.2。

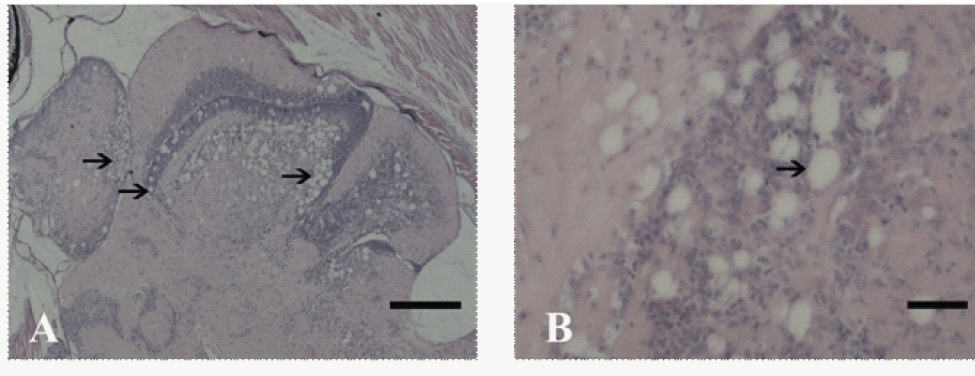


图 2 患病半滑舌鲷的组织病理变化

Fig.2 The histopathological characteristics of diseased half-smooth tongue sole

A. 脑组织空泡化(标尺, 100 μm); B. 视网膜组织空泡化(标尺, 20 μm)

A. vacuolation of brain (Scale bar = 100 μm); B. vacuolation of retina (Scale bar = 20 μm)

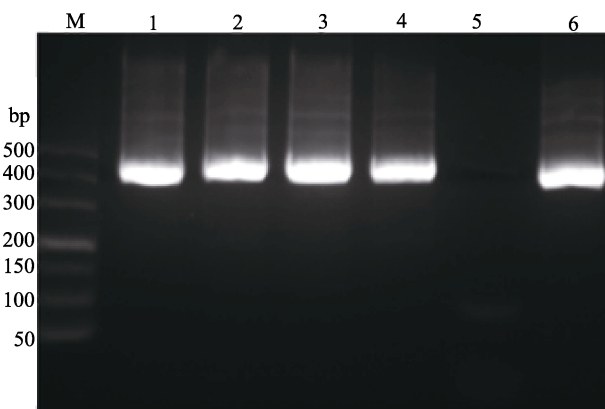


图 3 半滑舌鲷样品的 RT-PCR 检测结果

Fig.3 The RT-PCR results of diseased half-smooth tongue sole

M: DL 500TM DNA Marker; 1–4: 病鱼样品;

5: 阴性对照; 6: 阳性对照

M: DL 500TM DNA Marker; 1–4: diseased fish;

5: Negative control; 6: Positive control

3 讨论

半滑舌鲷为我国新兴的海水养殖鱼类品种,由于其较高的经济效益,使得半滑舌鲷的养殖规模日益扩大。育苗场多为工厂化育苗模式,集约化程度高,养殖密度大,在管理不善、隔离不严时,爆发性流行病容易发生,造成鱼苗的大规模死亡。通过对发病鱼苗的临床症状、组织病理观察及病原的 RT-PCR 检测,可以初步确定该养殖场 2012 年和 2013 年半滑舌鲷鱼苗的大规模死亡是由鱼类神经坏死病毒的感染引起的。

调查发现, 13–30 日龄的患病半滑舌鲷鱼苗死亡率极高。据报道, 13–35 日龄的半滑舌鲷鱼苗正处于变态期, 此阶段鱼苗的中枢神经系统开始迅速发育, 神经细胞大量增加, 同时鱼苗的视网膜结构和视觉特性发生明显改变, 以适应底栖生活(Ma *et al*, 2006、2007; 卢艳艳等, 2011)。如果鱼苗此时感染了鱼类神

CsCN NNV	CTGGTCGGCT GATACTCCTG TGTGTCGGCA ACAACACTGA TGTGGTCAAC GTGTCGGTGC TGTGTCGCTG	70
Sevenband grouper NNVA.....	70
<i>Epinephelus marginatus</i> NNVA.....	70
Golden pompano NNV	70
White star snapper NNV	70
<i>Paralichthys olivaceus</i> NNV	.C.....	70
Barfin flounder NNV	.G.C...T.....C.C.....A...A.....	70
Tiger puffer NNV	.G.C.....G.....	70
Striped jack NNV	...C...G.....T...G.....T.....A..CA.....	70
CsCN NNV	GAGTGTTCGA CTGAGCGTTC CATCTCTTGA GACACCTGAA GAGACCACCG CTCCCATCAT GACACAAGGT	140
Sevenband grouper NNV	140
<i>Epinephelus marginatus</i> NNVT.....A.....T.....	140
Golden pompano NNVT.....	140
White star snapper NNV	140
<i>Paralichthys olivaceus</i> NNV	140
Barfin flounder NNVG.T.C.T.....C.....T.ATT.....A.C.A.CTTG.A	140
Tiger puffer NNVG.C.T.T.C.T.T.G.A.....G.A.ATT.....A.C.A.GC.G.A	140
Striped jack NNV	...C...C.T.T.T.C.G.C.....G.C.....A.T.C.T.C.G.CG	140
CsCN NNV	TCCCTGTACA ACGATTCCCT TT-----C CACAAATGAC TTCAAGTCCA TCCTCCTAGG ATCCACACCA	203
Sevenband grouper NNV	203
<i>Epinephelus marginatus</i> NNV	203
Golden pompano NNVA.....	203
White star snapper NNV	203
<i>Paralichthys olivaceus</i> NNV	203
Barfin flounder NNV	C.A.C...C...G-----AG.C...T...A.A.A.T.T.C.T.C.AG	203
Tiger puffer NNV	C.G.....A.CA-CAACTG...TTC.GG.TCGT...T.C.TGGT.AG	209
Striped jack NNV	C.A..CC...A.AACAACGGT T...-C.GA.TCGT...T.T.G.G.C.G..C.A	209
CsCN NNV	CTGGATATTG CCCCTGATGG AGCAGTCTTC CAGCTGGACC GTCCGCTGTC CATTGACTAC AGCCTTGAA	273
Sevenband grouper NNVC.....	273
<i>Epinephelus marginatus</i> NNVC.....	273
Golden pompano NNV	273
White star snapper NNV	273
<i>Paralichthys olivaceus</i> NNV	273
Barfin flounder NNV	..T.C.C.C.....A...C...ATTCAT.A.T.G.....T.G.C	273
Tiger puffer NNV	..T.C.C.C.T...CCA.CA.T...ATTC.A.T...A.A.A...T.C.T...A.G...G	279
Striped jack NNV	..C..CC.C.T...CAA.C.T...TGCACT...A.AA...T.C.....T...AT...G	279
CsCN NNV	CTGGAGATGT TGATCGTGCT GTTTATTGGC ACCTCAAGAA GTTTGCTGGA AATGCTGGCA CACCTGCAGG	343
Sevenband grouper NNVC.....	343
<i>Epinephelus marginatus</i> NNVC.....A.....	343
Golden pompano NNVC.....	343
White star snapper NNVC.....	343
<i>Paralichthys olivaceus</i> NNVC.....	343
Barfin flounder NNV	...T...C.C...C...C...TG.G...AG.....C...TG.A...G...G	343
Tiger puffer NNV	T...T.C...C...G.C...GCTC...AAGAAA.T.G.C.AAA.AC.....	349
Striped jack NNV	TG..C..C..C.C..G..C...GCG...AAA...G.CA..CAGT...T...T..	349
CsCN NNV	CTGGTTTCGC TGGGGCATCT GGGACAACCT TAATAAGACG TTCACAGATG GCGTTG	399
Sevenband grouper NNVC.C.....G.....	399
<i>Epinephelus marginatus</i> NNVC.....	399
Golden pompano NNVC.....	399
White star snapper NNVC.....	399
<i>Paralichthys olivaceus</i> NNVC.....	399
Barfin flounder NNV	G....C.AT....GC.A....T.T.C..C.A.A....C.G.....	399
Tiger puffer NNV	..TC.GGAT....AT.G....TG.T.C....AGTA....GAC...C	405
Striped jack NNV	G.AC..GA....AC.G....TG....C....A.....T...G.CAC	405

图 4 CsCN NNV 与 8 株鱼类神经坏死病毒基因序列的比较

Fig.4 Comparison of the amplicon nucleotide sequence among nine strains of nervous necrosis viruses

CsCN NNV: 半滑舌鲷神经坏死病毒(KJ541748.2); Sevenband grouper NNV: 七带石斑鱼神经坏死病毒(AY324870.1); *Epinephelus marginatus* NNV: 东大西洋石斑鱼神经坏死病毒(KF748942.1); Golden pompano NNV: 布氏鲷神经坏死病毒(GQ904199.1); White star snapper NNV: 白星笛鲷神经坏死病毒(AY835642.1); *Paralichthys olivaceus* NNV: 牙鲆神经坏死病毒(KF841612.1); Barfin flounder NNV: 条斑星鲽神经坏死病毒(EU236147.1); Tiger puffer NNV: 红鳍东方鲀神经坏死病毒(EU236149.1); Striped jack NNV: 黄带拟鲷神经坏死病毒(AB056572.1)

CsCN NNV: *Cynoglossus semilaevis* NNV (KJ541748.2); Sevenband grouper NNV: AY324870.1; *Epinephelus marginatus* NNV: KF748942.1; Golden pompano NNV: GQ904199.1; White star snapper NNV: AY835642.1; *Paralichthys olivaceus* NNV: KF841612.1; Barfin flounder NNV: EU236147.1; Tiger puffer NNV: EU236149.1; Striped jack NNV: AB056572.1

经坏死病毒,病毒容易随着神经细胞的生长而大量复制,引起鱼苗脑部及视网膜的病变和空泡化,最终造成鱼苗的大量死亡(Tanaka *et al*, 2004; Manin *et al*, 2011)。

本研究通过 RT-PCR 技术和序列测定,得到了感染半滑舌鲷的神经坏死病毒 CsCN NNV 的部分基因序列。序列的比对与分析结果显示,该病毒与分离自七带石斑鱼、东大西洋石斑鱼等鱼体中的 5 株鱼类神经坏死病毒(全部为 RGNNV 基因型)的相似性超过 98%,而与其他 3 种基因型的鱼类神经坏死病毒的相似性仅为 71%~78%,因此,感染半滑舌鲷的神经坏死病毒 CsCN NNV 应属于 RGNNV 基因型(Nishizawa *et al*, 1997; Toffolo *et al*, 2007)。考虑到该育苗场同时进行多种石斑鱼鱼苗的繁育,且曾发生过病毒性神经坏死病,推测感染半滑舌鲷鱼苗的神经坏死病毒很可能来源于同场的其他石斑鱼鱼苗,随着育苗器具及人员的流动而水平传播。由于半滑舌鲷也是鱼类神经坏死病毒的敏感宿主,且鱼苗对病毒的抵抗力弱,因而出现了大规模死亡。这种在同一育苗场中养殖多种鱼苗,造成鱼类神经坏死病毒交叉感染的现象也发生在石斑鱼和尖吻鲈(*Lates calcarifer*)之间(Hick *et al*, 2011; Manin *et al*, 2011)。因此,在育苗过程中必须严格进行器具消毒,并加强隔离措施,从而阻断鱼类神经坏死病毒的水平传播途径。

鱼类神经坏死病毒宿主广泛,包括 50 余种海淡水鱼类(Munday *et al*, 2002; Sano *et al*, 2011),但半滑舌鲷并不在其中。本研究首次证实半滑舌鲷是鱼类神经坏死病毒的天然敏感宿主,这一发现在半滑舌鲷疾病防治和鱼类神经坏死病毒的流行机制研究方面都具有重要的意义。

参 考 文 献

- 马爱军,王新安,庄志猛,等. 半滑舌鲷仔、稚鱼视网膜结构与视觉特性. 动物学报, 2007, 2(53): 354-363
- 卢艳艳,张雅芝,常建波,等. 半滑舌鲷的育苗效果及生物学特征的观察. 集美大学学报(自然科学版), 2011, 16(1): 7-13
- 张晓君,秦国民,阎斌伦,等. 半滑舌鲷病原鳃利斯顿氏菌表型及分子特征研究. 海洋学报, 2009, 31(5): 112-122
- 陈政强,姚志贤,林茂,等. 半滑舌鲷皮肤溃疡病原研究. 水产学报, 2012, 36(5): 764-771
- 姜言伟,万瑞景,陈瑞胜,等. 渤海半滑舌鲷人工育苗工艺技术的研究. 海洋水产研究, 1993(14): 25-33
- Hick P, Schipp G, Bosmans J, *et al*. Recurrent outbreaks of viral nervous necrosis in intensively cultured barramundi (*Lates calcarifer*) due to horizontal transmission of betanodavirus and recommendations for disease control. Aquaculture, 2011, 319(1-2): 41-52
- Ma AJ, Liu XZ, Xu YJ, *et al*. Feeding rhythm and growth of the tongue sole, *Cynoglossus semilaevis* Günther, during its early life stages. Aquac Res, 2006, 37(6): 586-593
- Manin BO, Ransangan J. Experimental evidence of horizontal transmission of Betanodavirus in hatchery-produced Asian seabass, *Lates calcarifer* and brown-marbled grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* fingerling. Aquaculture, 2011, 321(1-2): 157-165
- Munday BL, Kwang J, Moody N. Betanodavirus infections of teleost fish: a review. J Fish Dis, 2002, 25: 127-142
- Nishizawa T, Furuhashi M, Nagai T, *et al*. Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene. Appl Environ Microbiol, 1997, 63(4): 1633-1636
- Sano M, Nakai T, Fijan N. Viral diseases and agents of warm water fish. In: Fish Diseases and Disorders, Vol. 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections, 2nd edition, Woo PTK & Bruno DW, eds. CABI, London, UK, 2011, 166-244
- Tanaka S, Takagi M, Miyazaki T. Histopathological studies on viral nervous necrosis of seven-band grouper, *Epinephelus septemfasciatus* Thunberg, at the grow-out stage. J Fish Dis, 2004, 27(7): 385-399
- Tang XQ, Zhou Li, Zhan WB, *et al*. Isolation and characterization of pathogenic *Listonella anguillarum* of diseased half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther). J Ocean Uiver China, 2008, 7(3): 343-351
- Toffolo V, Negrisolo E, Maltese C, *et al*. Phylogeny of betanodaviruses and molecular evolution of their RNA polymerase and coat proteins. Mol Phylogenet Evol, 2007, 43(1): 298-308
- Zhang XJ, Qin GM, Bing XW, *et al*. Phenotypic and molecular characterization of *Photobacterium damsela*, a pathogen of the cultured tongue sole *Cynoglossus semilaevis* in China. New Zeal J Mar Fresh, 2011, 45(1): 1-13

(编辑 冯小花)

Preliminary Study on Massive Mortality of Hatchery-Reared Half-Smooth Tongue Sole, *Cynoglossus semilaevis*, Associated with Viral Nervous Necrosis

SU Zidan^{1,2,3}, LI Jin^{1,2,3}, SHI Chengyin^{1,2}①

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

Abstract In the years of 2012 and 2013, there was an outbreak of disease and massive death of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) 15–20 days post-hatching (dph 15–20) in a hatchery of northern China, and the cumulative mortality reached 90%–100% within one week. The outbreak occurred in July and August when the water temperature was 22–24°C. The symptoms included erratic swimming behaviors such as spiraling movement and fast swimming in circles, without hemorrhaging and ulceration on body surfaces. The histopathological examination revealed typical signs of viral nervous necrosis. The nerve cells of brain and retina underwent severe vacuolation and necrosis. RT-PCR with primers of nervous necrosis virus showed positive results in all samples from moribund half-smooth tongue soles. The RT-PCR products were then sequenced and the sequence alignment was carried out with BLAST. It was found that the sequence similarity was above 98% between the nervous necrosis virus in half-smooth tongue sole (CsCN NNV) and five strains of red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV). In contrast, the similarities between CsCN NNV and other three genotype strains of NNV: Striped jack nervous necrosis virus (SJNNV), Barfin flounder nervous necrosis virus (BFNNV), and Tiger puffer nervous necrosis virus (TPNNV), were only 71%–78%. Therefore, we inferred that CsCN NNV was a new strain with RGNNV genotype. It was the first case of naturally occurred RGNNV infection of half-smooth tongue sole. Our findings provided insights into the epidemic mechanism of RGNNV infection as well as the prevention of viral nervous necrosis in half-smooth tongue sole.

Key words Half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis*; Red-spotted grouper nervous necrosis virus; RT-PCR; Detection

① Corresponding author: SHI Chengyin, E-mail: shicy@ysfri.ac.cn

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) *Nramp* 基因 克隆与表达分析及 SNP 筛选*

邢贺飞^{1,2,3} 高峰涛^{1,2,4} 张永珍^{1,2,3} 董忠典^{1,2,4} 陈松林^{1,2}^①

1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
2. 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. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 4. 中国海洋大学海洋生命学院 青岛 266003)

摘要 天然抗性相关巨噬细胞蛋白(Natural resistance-associated macrophage protein, *Nramp*)属于膜整合转运蛋白,具有抑制胞内寄生菌侵染、调节巨噬细胞的抗菌活性等作用。本研究对半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) *Nramp* 基因进行了克隆和表达分析,并对其与抗鳃弧菌感染相关的单核苷酸多态性(Single Nucleotide Polymorphism, SNP)位点进行了筛选。该基因 cDNA 序列全长 3717 bp,其中开放阅读框(Open reading frame, ORF)1677 bp,所编码蛋白含有 558 个氨基酸,该蛋白具有 *Nramp* 家族的典型特征,包括 10 个跨膜区(Transmembrane, TM)、1 个由 20 个氨基酸残基组成的胞质内转运蛋白特征结构域(Consensus Transport Motif, CTM)。半滑舌鳎 *Nramp* 的 ORF 末端有 1 个类似于脊椎动物 *Nramp2* 中的铁反应控制蛋白结合位点(Iron-responsive regulatory protein-binding site, IRE)。半滑舌鳎 *Nramp* 与其他 14 个物种的 *Nramp* 氨基酸序列同源性在 63%–91%之间,系统进化分析表明,半滑舌鳎 *Nramp* 和所有鱼类 *Nramp* 聚集为一簇,与其他物种 *Nramp2* 的亲缘关系较近。实时荧光定量 PCR 分析显示, *Nramp* 基因在半滑舌鳎脾脏和肾脏中的表达量最高,而在肌肉和性腺中的表达量最低;在哈维氏弧菌感染的半滑舌鳎肾脏、脾脏和肝脏中表达量呈升高趋势,而在鳃中则表现为下调趋势。利用直接测序法检测感染鳃弧菌后同一家系的 233 个个体(抗病个体 165 个,感病个体 68 个),共检测到 15 个 SNP 位点,对其中 3 个 SNP 位点即 SNP-g.3113(T→C)、SNP-g.3125(A→G)和 SNP-g.3164(A→T)进行测序分型后发现,SNP-g.3125(A→G)的等位基因(G)频率和基因型(GG)频率与半滑舌鳎抗鳃弧菌疾病呈极显著相关($P < 0.01$)。研究结果表明, *Nramp* 基因不同基因型对半滑舌鳎的抗病能力有着极其重要的影响,SNP-g.3125(A→G)可作为潜在的抗性遗传标记位点。本研究将为半滑舌鳎抗性品系培育提供技术支持。

关键词 半滑舌鳎;天然抗性相关巨噬细胞蛋白(*Nramp*);基因克隆;RT-PCR;单核苷酸多态性(SNP)
中图分类号 S965 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)04-0116-12

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)隶属于鲽形目(Pleuronectiformes)、舌鳎科(Cynoglossidae)、舌鳎属(*Cynoglossus*),主要分布在我国黄、渤海海域,是暖温性近海大型底栖鱼类,具有广温、广盐和适应环境多变的特点,其生长速度快、肉味鲜美、口感爽滑、出肉率高,深受广大消费者喜爱(邓景耀等,1988)。

近年来,高密度、集约化的养殖模式以及环境污染等原因,致使半滑舌鳎的腹水、烂鳍、烂尾等细菌性感染问题日益突出,严重制约了半滑舌鳎工厂化养殖产业的发展。因此,开展半滑舌鳎抗病相关基因的分析研究,筛选其抗病相关的分子标记,对于半滑舌鳎抗性品系培育以及该养殖产业的健康可持续发展具有

* 国家自然科学基金项目(31530078)和“山东省泰山学者攀登计划项目”共同资助。邢贺飞, E-mail: xinghf710@126.com

① 通讯作者: 陈松林, 研究员, E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-03-11, 收修改稿日期: 2015-04-15

十分重要的意义。

天然抗性相关巨噬细胞蛋白(*Nramp*)属于膜整合转运蛋白,具有抑制胞内寄生菌感染、调节巨噬细胞的抗菌活性等作用(Blackwell *et al*, 1995),在物种间保持着高度的保守性(Skamene *et al*, 1991),由于其编码蛋白具有转运质子和二价阳离子的功能,因此,又将其称为溶质转运家族 11 成员 1 (Solution carrier family 11 member 1, *SLC11A1*)(Blackwell *et al*, 1996)。该家族一般具有 10–12 个典型的跨膜结构,含有 1 个胞质内转运蛋白特征结构域,以及 1–2 个糖基化的胞质外环状结构(Bairoch, 1993)。*Nramp* 基因最早由 Vidal 等(1993)在近交小鼠的研究中发现,该基因可影响宿主对杜氏利什曼原虫、分支杆菌、伤寒沙门氏菌等胞内寄生菌的早期免疫反应。目前,已在人和小鼠等哺乳动物中发现两种天然抗性相关巨噬细胞蛋白即 *Nramp1* 和 *Nramp2*(Vidal *et al*, 1993; Kishi, 1994; Grunheid *et al*, 1995; Kishi *et al*, 1997)。*Nramp1* 是一个较为保守的基因,主要在网状内皮细胞器官如吞噬细胞、脾脏、肝脏、外周血白细胞中特异表达(Cellier *et al*, 1994; Feng *et al*, 1996),而 *Nramp2* 则在绝大多数组织和细胞中均表达(Grunheid *et al*, 1995),在哺乳动物体内对铁的吸收转运和重新利用起到决定性的调控作用(Gunshin *et al*, 1997; Fleming *et al*, 1998)。目前,鱼类中已在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)(Dorschner *et al*, 1999)、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)(Saeij *et al*, 1999)、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)(Chen *et al*, 2002)、鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)(Burge *et al*, 2004)、真鲷(*Pagrosomus major*)(Chen *et al*, 2004)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)(Chen *et al*, 2006)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)(Chen *et al*, 2007)、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)(范玉顶等, 2011)等物种中进行了 *Nramp* 基因克隆,并对该基因的特征序列及病原菌刺激后的组织和细胞系表达进行了研究,但有关 *Nramp* 基因多态性与疾病的关联分析报道较少。本研究对半滑舌鳎 *Nramp* 基因进行了克隆、序列比对、组织表达分析,并首次在鱼类中进行 *Nramp* 基因多态性与抗病分子标记的筛选,为半滑舌鳎抗性家系的分子标记辅助育种提供了技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

健康 1 龄半滑舌鳎,体重为(145.01±60.02) g,体长为(27.68±5.53) cm,来自山东省海阳市黄海水产有限公司,于实验室暂养 7 d 无异常后使用。取半滑舌

鳎的肝、脾、肾、肠、鳃、血、脑、心、皮肤、肌肉、性腺等组织,迅速放入液氮中,−80℃保存备用。半滑舌鳎感染鳃弧菌家系(1 龄)由本实验室 2012 年于山东省昌邑市三新苗种研究所建立。哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)菌种由本实验室保存。

1.2 基因组 DNA 和总 RNA 提取及 cDNA 合成

采用常规的酚-氯仿法(Sambrook *et al*, 2001)提取基因组 DNA,双蒸水溶解后,利用紫外分光光度计(Biophotometer, Eppendorf)测定 DNA 浓度,并经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性,−20℃保存备用;利用总 RNA 极速抽提试剂盒(上海飞捷生物有限公司)提取各样品总 RNA,紫外分光光度计测定 RNA 浓度,并经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性;用 TaKaRa 反转录试剂盒合成 cDNA 链,−20℃保存备用。

1.3 引物设计及 PCR 扩增

提取半滑舌鳎脾脏中的总 RNA,并反转录 cDNA (TaKaRa),根据本实验室半滑舌鳎转录组测序得到 *Nramp* 转录本信息合成引物 *Nramp-F/Nramp-R*(表 1),以半滑舌鳎脾脏 cDNA 为模板,经 PCR 扩增、克隆、测序进行序列验证,根据验证无误后的基因片段序列设计 4 条特异性引物(表 1),分别进行 5' RACE 和 3' RACE 反应,获得的片段经过克隆、测序拼接后,得到 cDNA 全长[具体方法参见 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit(Clontech)说明书]。

表 1 PCR 扩增所用引物序列

Tab.1 PCR amplification primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')
<i>Nramp-F</i>	CTGTGCCATAGCCCTCAAC
<i>Nramp-R</i>	AGTGCCAAACCAGGTAGCC
β -actin-F	GCTGTGCTGTCCCTGTA
β -actin-R	GAGTAGCCACGCTCTGTC
RT-F	ATCGCTCTCTTCATCTCATTCTC
RT-R	CACCTCCAGTGTGCCGTTGT
3' F	CTGACTTTCACCAGCCTGACCTCTA
3' Fn	TGCCCTCCTGTCCTTAGCCTATCTG
5' F	CCTGGTCTGGCTTACAAGGACATAC
5' Fn	CAAAGGTGTCGGTGATGGTGATGAG
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
UPM-L	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCA GTGGTATCAACGCAGAGT
UPM-S	CTAATACGACTCACTATAGGGC
<i>Nramp-GF</i>	TAACAAACCGCTCACCTTCTG
<i>Nramp-GR</i>	CGACTATTCCCACCGCCT

实时荧光定量 PCR: 以 β -actin(KF932267)为内参, 用基因特异性引物 RT-F 和 RT-R 检测哈维氏弧菌感染前后, 鱼的不同组织在不同时间的 *Nramp* 表达, 实验样本重复数为 5(具体方法参见 TaKaRa 定量试剂盒)。

1.4 目的片段纯化、克隆及测序

克隆 *Nramp* 基因的 PCR 产物经 1%的琼脂糖凝胶电泳检测, 将目的片段切胶回收[具体方法参照 Gel Extraction Kit(OMEGA)试剂盒说明书]。将回收产物与 pMD-18T 载体(TaKaRa)按摩尔数 5:1 的比例混合, 加入等体积的 Solution I 于 16℃连接, 取连接产物 10 μ l 转化至 TOP10 大肠杆菌(*Escherichia coli*)感受态细胞, 菌液 PCR 鉴定出阳性克隆后, 送上海英潍捷基贸易有限公司测序。

用于筛选 *Nramp* 基因 SNP 的 PCR 产物, 取 5 μ l 经 1%的琼脂糖凝胶电泳检测, 将条带清晰单一的 PCR 产物直接送上海英潍捷基贸易有限公司测序。

1.5 序列分析和数据统计

利用 NCBI 网站 BLAST 工具对测序后拼接结果进行同源性比对; 用 Signal P(Nielsen *et al.*, 1997)分析信号肽序列; 利用 ScanProsite 在线服务器(<http://prosite.expasy.org/scanprosite>)分析蛋白的二级结构; 用 DNASTAR 5.0 软件分析 cDNA 序列和开放阅读框; 用 Clustal W 软件(Kyte *et al.*, 1982)进行多重序列比对; 利用 MEGA 4.0(Tamura *et al.*, 2007)中的邻位相联法(Neighbor-Joining, NJ)(Saitou *et al.*, 1987)构建系统进化树; 采用 Kyte and Doolittle 算法(Kyte *et al.*, 1982), 通过 ProtScale 在线工具(<http://web.expasy.org/protscale>)分析蛋白的亲水性特征; 运用 PopGene 32 分析基因型频率、等位基因频率、Hardy-Weinberg 平衡检验等; 利用 SPSS 17.0 和 SAS(Version 9.1)软件对 SNP 位点与性状关联性进行卡方检验。

2 结果与分析

2.1 半滑舌鳎 *Nramp* 基因全长 cDNA 的克隆

利用引物 *Nramp*-F/*Nramp*-R, 以半滑舌鳎脾脏 cDNA 为模板, PCR 扩增得到长度为 1085 bp 的目的条带, 经测序及 BLAST 比对分析, 确定该条带为 *Nramp* 基因片段; 根据此片段设计合成 4 条特异性引物进行 RACE 扩增, 分别得到 5' RACE 772 bp 和 3' RACE 2068 bp。用软件 DNASTAR 拼接得到半滑舌鳎 *Nramp* 基因全长 cDNA 序列为 3717 bp (GenBank 序列号: KP878556)。半滑舌鳎 *Nramp* 全长 cDNA 由

1677 bp 的开放阅读框(ORF)、较短的 172 bp 5'末端非翻译区(Untranslated Regions, UTR)和一个相对较长的 1868 bp 的 3' UTR 组成。3'末端含有 1 个典型的加尾信号 AATAAA 和 30 bp 的 Poly(A)尾; 此外, 在 ORF 末端上发现了 1 个铁反应控制蛋白结合位点(IRE)的特征序列(CNNNNNCAGTG)(Casey *et al.*, 1988)(图 1)。

2.2 半滑舌鳎 *Nramp* 蛋白的结构分析

根据得到的半滑舌鳎 *Nramp* 基因 cDNA 序列推导其相应的氨基酸序列, 结果分析显示, 1677 bp 的 ORF 序列编码 1 个含 558 个氨基酸的蛋白, 预测相对分子量为 61.9 kDa, 等电点为 4.95。利用 ScanProsite 分析该蛋白的二级结构(图 1), 发现该蛋白具有 *Nramp* 家族的典型特征: 10 个跨膜区(TM), 1 个由 20 个氨基酸残基组成的、高度保守的胞质内转运结构域(CTM)介于 TM6 和 TM7 之间, 3 个潜在的 N-糖基化作用位点(N-X-S/T-X), 且均位于 TM5 和 TM6 之间, 两个蛋白激酶 C 磷酸化作用位点(S/T-X-R/K), 分别位于 TM1 之前的 N 端和 TM10 之后的 C 端; 该蛋白还含有 1 个位于 TM4 和 TM5 之间的酪氨酸激酶磷酸化作用位点(R/K-X-X-X-D/E-X-X-X-Y), 13 个 N-豆蔻酰化作用位点(G-[EDRKHPYFW]-X-X-[STAGCN]-P)以及 6 个酪蛋白激酶 II 磷酸化作用位点(S/T-X-X-D/E)(图 1)。从蛋白的氨基酸组成上看, Leu、Val、Ile、Ala、Phe、Pro、Met 以及 Trp 等非极性氨基酸占 52.6%, 表明该蛋白具有较强的疏水性, 通过 ProScale 亲水性分析的结果也进一步验证了这一典型特征(图 2), 鱼类 *Nramp* 的亲水性分布图与小鼠和人 *Nramp2* 几乎一致, 半滑舌鳎 *Nramp* 与牙鲆、大菱鲆、斑点叉尾鲷等鱼类的 *Nramp* 在胞质内外环的间隔大小上也高度保守。

2.3 *Nramp* 序列比对和系统进化分析

利用 Clustal W 软件对半滑舌鳎 *Nramp* 的氨基酸序列同人、小鼠、牛、绵羊、原鸡及其他鱼类 *Nramp* 氨基酸序列进行了比对分析(图 3), 发现所比对物种的氨基酸序列在 CTM 和 TM 区均相对保守, 尤其是 TM4 区, 所有鱼类中 *Nramp* 完全保守, 和其他物种 *Nramp* 也只有 1 个氨基酸的差异; 鱼类的 *Nramp* 在 TM1、TM2、TM6、TM8 区氨基酸的保守性要显著高于 TM3、TM5、TM7、TM9、TM10 区。在 CTM 区, 除小鼠、人 1、绵羊和野猪中有 1 个氨基酸残基(A)的差异外, 在其他的鱼类、两栖类和哺乳类 *Nramp* 中高度保守(图 3)。此外, 位于 TM5 和 TM6 之间的两个 N-糖基化作用位点在所比较的物种间保守性较高, 其中, 靠近 TM5 区的 N-糖基化作用位点在所有

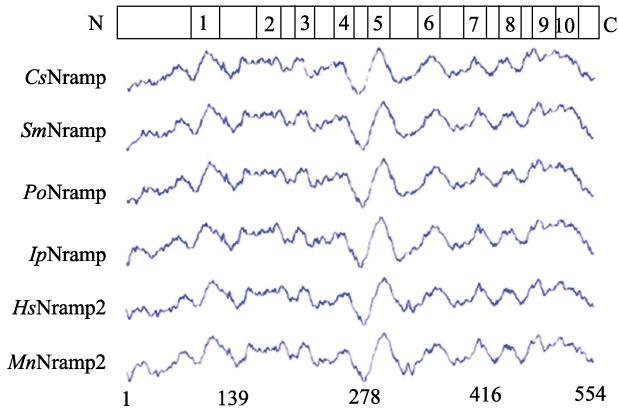


图 2 几种脊椎动物 Nramp 蛋白的亲水性分布 (Kyte 和 Doolittle 算法)

Fig.2 Hydropathy profile conservation among selected vertebrates' Nramp proteins (Kyte and Doolittle algorithm)

CsNramp: 半滑舌鲷 Nramp; SmNramp: 大菱鲆 Nramp; PoNramp: 牙鲆 Nramp; IpNramp: 斑点叉尾鲷 Nramp; HsNramp2: 人 Nramp2; MnNramp2: 小鼠 Nramp2; 上面一行数字代表半滑舌鲷 Nramp 基因的跨膜区; 下面一行数字代表 6 个物种 Nramp 的氨基酸数目

CsNramp: *C. semilaevis* Nramp; SmNramp: *Scophthalmus maximus* Nramp; PoNramp: *Paralichthys olivaceus* Nramp; IpNramp: *Ictalurus punctatus* Nramp; HsNramp2: *Homo sapiens* Nramp2; MnNramp2: *Mus musculus* Nramp2.

Numbers above are the TMs of CsNramp. Numbers below are the amino acid numbers of six Nramp proteins

鱼类 Nramp 中高度保守, 而接近于 TM6 区的, 除虹鳟 Nramp alpha 外, 在所比较的其他物种间均表现为高度保守。同时本研究还发现, 位于 TM5 和 TM6 之间, 所比较物种的 Nramp1 均比 Nramp2 多 1 个氨基酸残基, 这与草鲤鱼和斑点叉尾鲷 Nramp 与其他物种 Nramp 氨基酸序列比对结果是一致的(Chen *et al.*, 2002; 范玉顶等, 2011)。

将半滑舌鲷 Nramp 的氨基酸序列与其他物种的 Nramp 氨基酸序列进行了比对分析, 并在此基础上构建了系统进化树(图 4)。系统进化树的分析结果表明, 半滑舌鲷 Nramp 和其他鱼类的 Nramp 聚为一簇, 又和鸟类与哺乳类 Nramp2 聚在一起形成一个分支, 而哺乳类 Nramp1 则单独构成另一个分支, 由此可知鱼类的 Nramp 与哺乳类和鸟类的 Nramp2 更为类似; 与半滑舌鲷 Nramp 亲缘关系最近的是大菱鲆和牙鲆。

2.4 半滑舌鲷 Nramp 基因在正常组织及感染后组织中的表达分析

对 Nramp 基因在半滑舌鲷的肝脏、脾脏、头肾、肠、鳃、血液、脑、心脏、皮肤、肌肉、性腺等 11 种组织进行实时荧光定量 PCR 表达分析, 发现在所

检测的 11 种组织中 Nramp 基因表达量差异明显, 脾脏和肾脏中的表达量最高, 其次是肝脏、皮肤、血液、鳃、肠、心脏和脑, 而肌肉和性腺中的表达量最低(图 5)。利用实时荧光定量 PCR 对哈维氏弧菌感染后半滑舌鲷不同组织 Nramp 基因表达量进行了分析, 结果显示, 与 PBS 对照组相比, 感染半滑舌鲷的脾脏、肾脏和肝脏中 Nramp 基因表达量呈升高趋势, 其中, 脾脏和肝脏均在感染哈维氏弧菌后 24 h 表达量最高(图 6、图 7), 而在肾脏中则是 6 h 达到最大值, 96 h 后表达量基本又回落至对照组的水平(图 8), 在鳃中则呈先降低后恢复至正常表达水平的趋势(图 9)。

2.5 半滑舌鲷 Nramp 基因抗病分子标记 SNP 筛选

利用直接测序法检测分析, 在 1402 bp Nramp 序列中, 共检测到 15 个 SNP 位点, 对其中位于第 2 内含子的 3 个 SNP[SNP-g.3113(T→C)、SNP-g.3125(A→G)和 SNP-g.3164(A→T)]位点成功测序分型。对所分型的 SNP 位点的基因型频率与等位基因频率记录并进行哈德温伯格平衡检验, 统计结果见表 2; 用软件 SPSS 17.0 和 SAS(Version 9.1)对其进行性状关联分析, 等位基因频率和基因型频率在抗性组及易感组中的卡方检验结果见表 3, 其中, SNP-g.3125(A→G)的等位基因频率和基因型频率与半滑舌鲷对于鳃弧菌的抗性显著相关($P < 0.01$)。

3 讨论

本研究克隆得到了半滑舌鲷 Nramp 基因的全长 cDNA。与已报道的脊椎动物 Nramp 氨基酸序列比对分析结果表明, 半滑舌鲷 Nramp 与其他鱼类 Nramp 的同源性在 83%–91%之间, 与其他脊椎动物 Nramp2 的同源性(74%–78%)要明显高于与 Nramp1 的同源性(63%–66%); 系统进化分析的结果也进一步表明, 鱼类的 Nramp 与其他脊椎动物 Nramp2 聚在一起, 因此, 半滑舌鲷 Nramp 基因与其他脊椎动物的 Nramp2 基因更为相似, 这与在其他鱼类中 Nramp 基因分析得到的结论是一致的(Chen *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2004、2006; Dorschner *et al.*, 1999; Saeij *et al.*, 1999)。

半滑舌鲷 Nramp 蛋白含有 10 个 TM、1 个 CTM、6 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点、13 个 N-豆蔻酰化位点、两个蛋白激酶 C 磷酸化位点、3 个 N-糖基化位点、1 个酪氨酸激酶磷酸化位点等, 这与人(Kishi, 1994; Kishi *et al.*, 1997)、小鼠(Grunheid *et al.*, 1995; Govoni *et al.*, 1997)、鲤(Saeij *et al.*, 1999)、斑点叉尾鲷(Chen *et al.*, 2002)、虹鳟(Chen *et al.*, 2004)、牙鲆(Chen *et al.*, 2006)、大菱鲆(Chen *et al.*, 2007)以及草鱼(范玉顶等, 2011)序

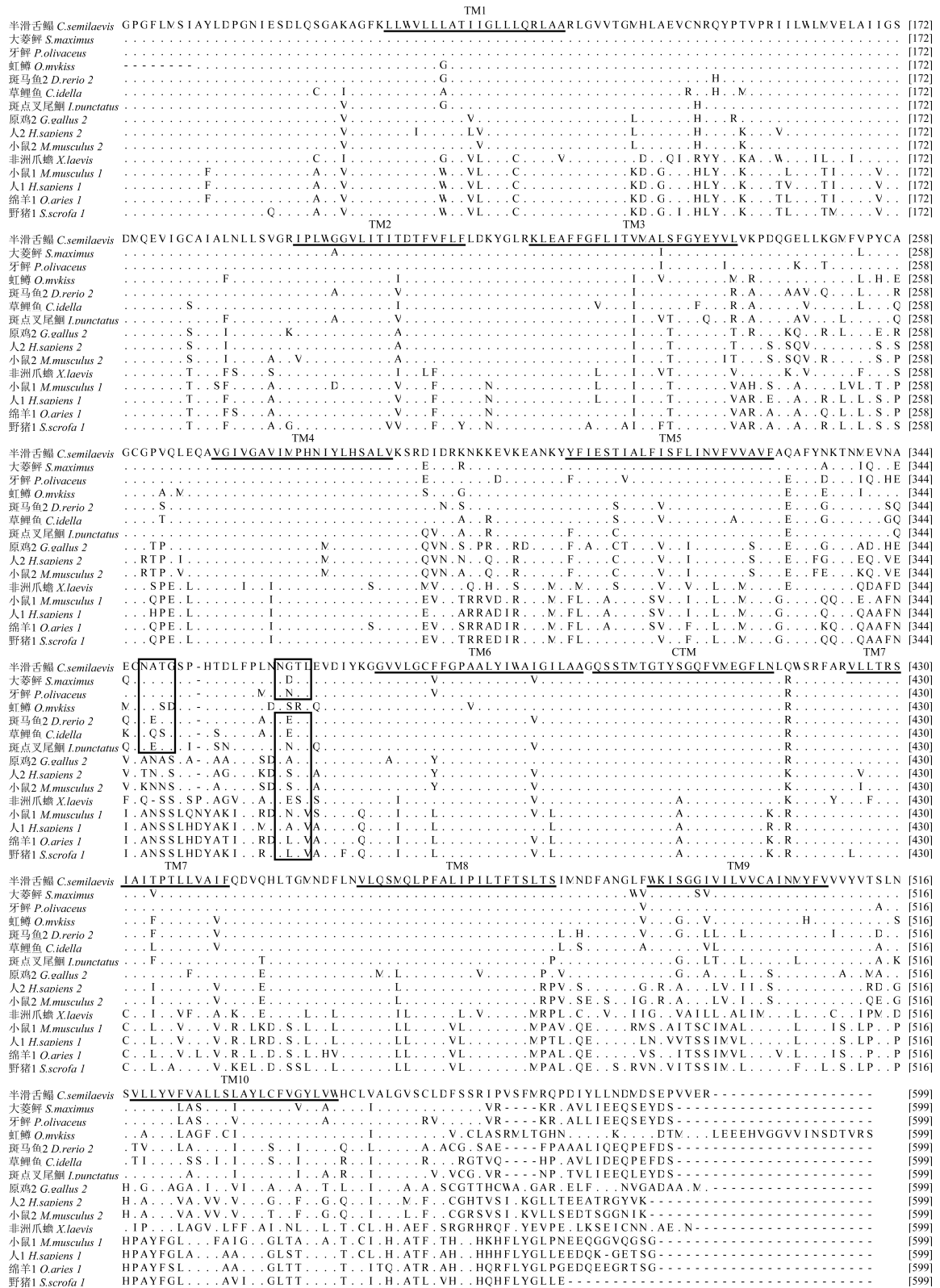


图 3 半滑舌鳎和其他物种 *Nramp* 氨基酸序列比对分析

Fig.3 Alignment of *Nramp*'s amino acid sequences between *C. semilaevis* and other vertebrates

半滑舌鳎 *Nramp* 的 10 个 TM 区及 CTM 区用下划线标出; 保守的 N-糖基化位点以方框标出;

“.”表示与半滑舌鳎氨基酸相同的位点;“-”表示此位点为空格

Putative transmembrane regions are underlined and numbered with TM 1-10. The consensus transport motif (CTM) is underlined. Conserved N-glycosylation sites are marked with boxes. Identical sites are indicated by dots(-), and gaps are shown by dashes(-)

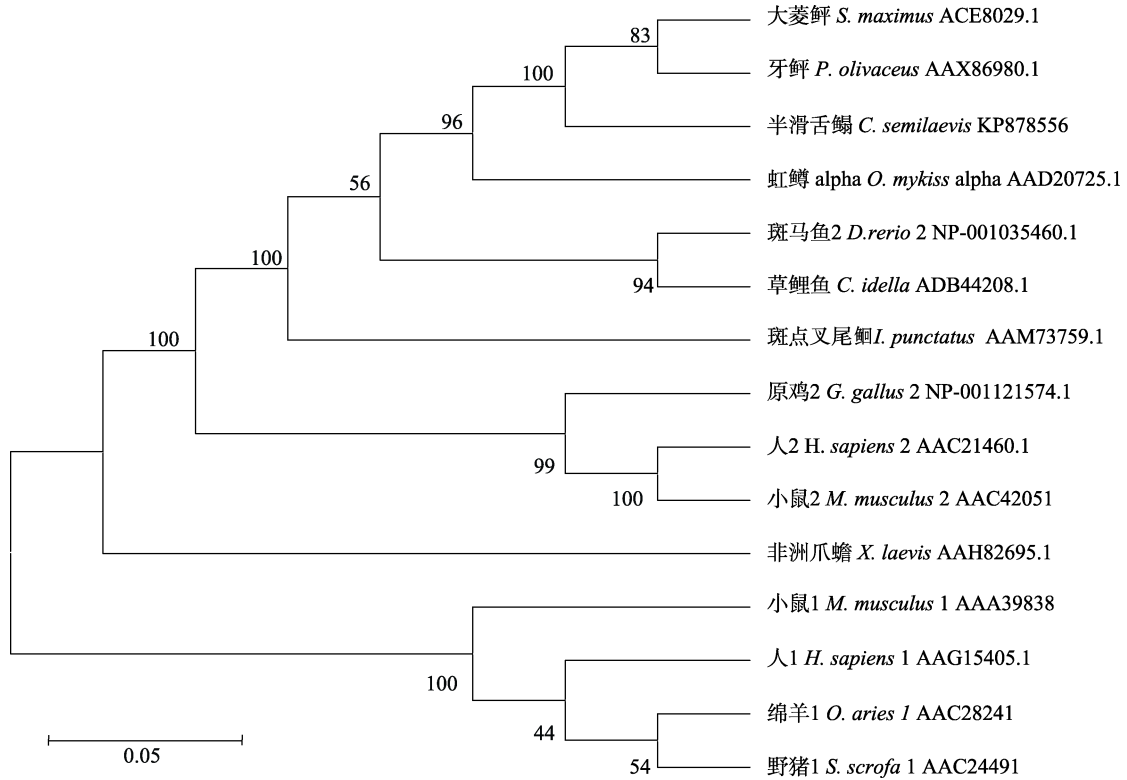


图 4 半滑舌鳎和其他物种 *Nramp* 氨基酸序列构建的系统发生树(利用 Bootstrap 法进行 1000 次评估)
 Fig.4 Construction of phylogenetic tree based on *Nramp* amino acids of *C. semilaevis* and other species (the parameter was evaluated 1000 degree via method of Bootstrap)

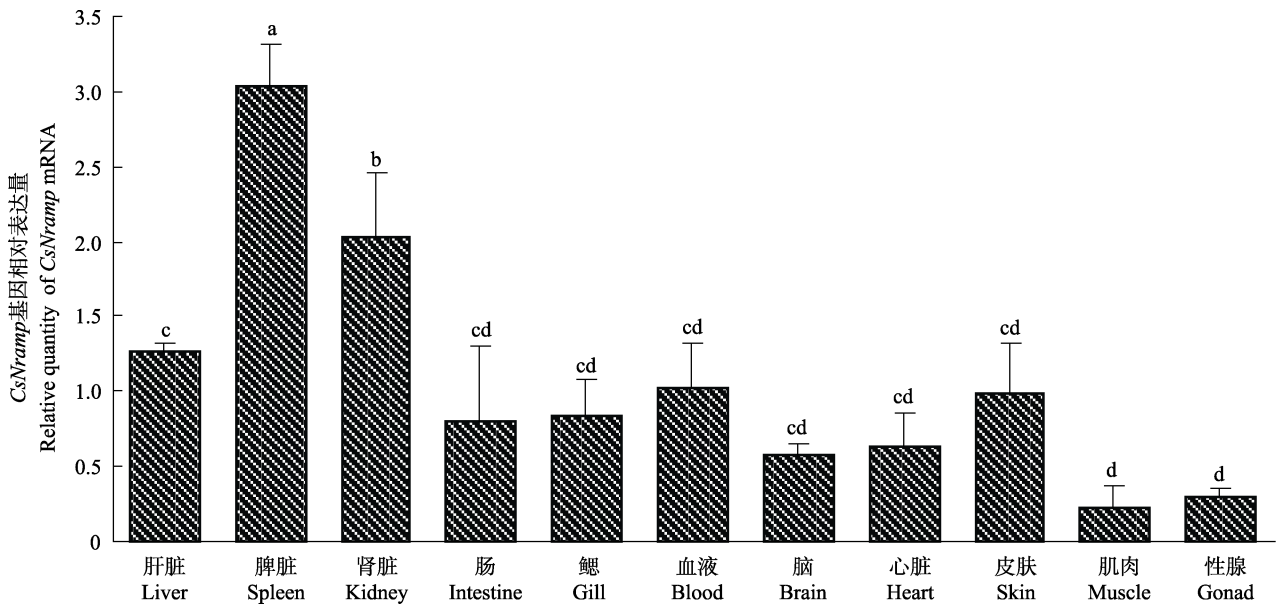


图 5 半滑舌鳎 *Nramp* 基因各组织相对表达量
 Fig.5 Quantitative relative expression of *CsNramp* in different tissues

各组织相对定量表达分析数据取自 5 条健康成鱼, 以血液中 *Nramp* 基因表达量为标准, 用单因素方差分析数据, 每个柱子上面的不同字母表示显著差异($P < 0.05$)
 Analysis of the relative tissue expression data are from five fish. All results were normalized by the blood *Nramp* expression levels. Statistical analysis was performed using One-Way ANOVA. Different letters above each bar denote significant differences ($P < 0.05$)

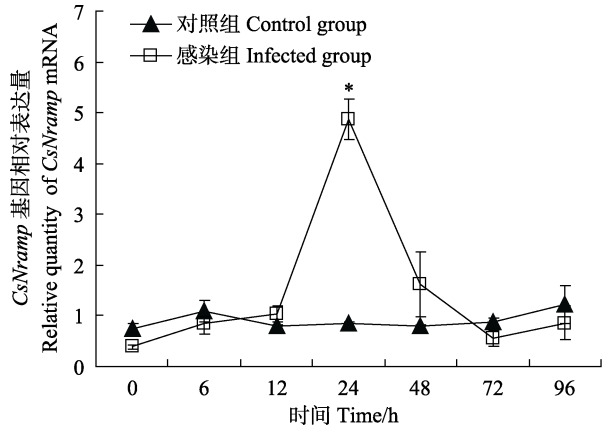


图 6 感染哈维氏弧菌后半滑舌鳎肝脏中 *Nramp* 基因相对表达量

Fig.6 Quantitative relative expression of *CsNramp* in liver after injected with *V. harveyi*

感染组: 腹腔注射哈维氏弧菌, 剂量为 30 $\mu\text{l/g}$, 滴度为 6.0×10^5 CFU/ml; 对照组: 腹腔注射等量的 PBS 溶液; 在感染后 0、6、12、24、48、72 和 96 h 共 6 个时间点, 随机选取感染组和对照组各 5 条半滑舌鳎, 解剖鱼体获得肝脏后立即放入液氮中暂存, 后转移至 -80°C 保存, 用于总 RNA 的提取; 利用单因素方差分析方法数据, * 差异表示显著 ($P < 0.05$); 下同

Injection group: *C. semilaevis* was injected intraperitoneally with *V. harveyi* (30 $\mu\text{l/g}$) or with equal dose of PBS. Five fish's liver tissues were collected at 0, 6, 12, 24, 48, 72, and 96 h after injection for RNA extraction. Statistical analysis was performed using One-Way ANOVA. * denotes significant difference ($P < 0.05$). The same as below

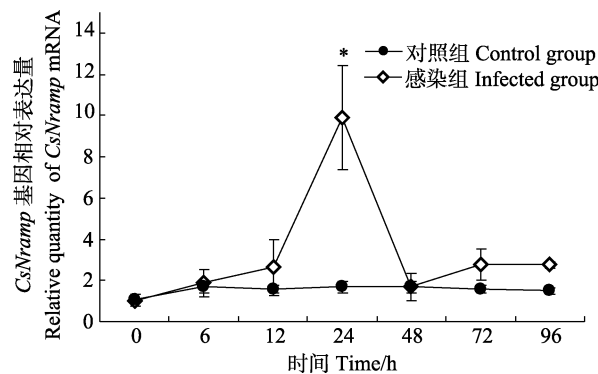


图 7 感染哈维氏弧菌后半滑舌鳎脾脏中 *Nramp* 基因相对表达量

Fig.7 Quantitative relative expression of *CsNramp* in spleen after injected with *V. harveyi*

列特征大致相似。此外, 本研究发现, 在半滑舌鳎 *Nramp* 基因 ORF 末端有 1 个 IRE 位点(CNNNNNCAGTG), 而草鱼 *Nramp* 基因 5' UTR 和 3' UTR 均发现 1 个 IRE 位点(范玉顶等, 2011), 以及鲤鱼的 3' UTR 发现 1 个 IRE 位点(Saeij *et al*, 1999)。已有研究表明, *Nramp*

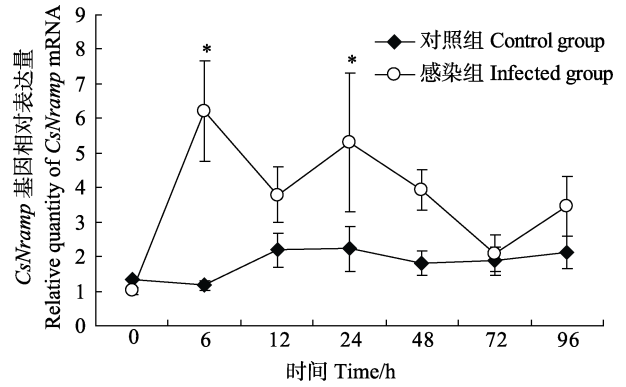


图 8 感染哈维氏弧菌后半滑舌鳎肾脏中 *Nramp* 基因相对表达量

Fig.8 Quantitative relative expression of *CsNramp* in kidney after injected with *V. harveyi*

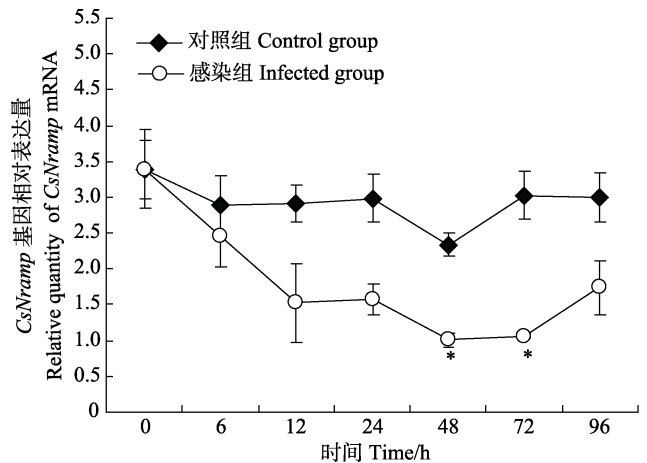


图 9 感染哈维氏弧菌后半滑舌鳎鳃中 *Nramp* 基因相对表达量

Fig.9 Quantitative relative expression of *CsNramp* in gill after injected with *V. harveyi*

基因 5' UTR 和 3' UTR 端 IRE 位点与细胞中铁离子的代谢紧密相关(Klausner *et al*, 1993), 在哺乳动物 *Nramp2* 基因的研究中, 发现该位点与铁离子的转运和吸收密切相关(Forbes *et al*, 2001; Gunshin *et al*, 1997)。据 Saeij 等(1999)推测, 在鲤鱼 *Nramp* 3' UTR 端发现的 IRE 位点可能通过与铁调控蛋白结合来调节鲤鱼 *Nramp* 的 mRNA 水平, 当铁调控蛋白和 *Nramp* 5' UTR 端 IRE 结合时, 可以组织 RNA 的翻译, 而当与 3' UTR 端的 IRE 位点结合时, 则可以保护 RNA 免受降解。但是, 鱼类 *Nramp* 基因中的 IRE 位点是否与哺乳类 *Nramp2* IRE 位点具有相似的作用, 以及 IRE 位于 ORF 与位于 UTR 区域是否具有类似的功能, 还需进一步的研究和探索。

Nramp2 基因在小鼠肝脏、脾脏、肾脏、心脏、肌肉、小肠等组织中广谱表达(Grunheid *et al*, 1995),

表 2 半滑舌鳎 *Nramp* 基因内含子 2 多态性的统计分析
Tab.2 Statistical analysis of polymorphism of *CsNramp* intron 2

位置 Location	状态 Status	基因型频率 Genotype frequencies			等位基因频率 Allele frequencies		哈迪温伯格平衡检验 Test for HWE	
		CC	TC	TT	C	T	卡方检验 Chi-square	概率 Probability
g.3113T→C	死亡 Dead	0.544(37)	0.456(31)	—	0.772	0.228	15.858	<0.01**
	存活 Survival	0.564(93)	0.430(71)	0.006(1)	0.779	0.221		
g.3125A→G	死亡 Dead	AG	GG	—	A	G	30.341	<0.01**
	存活 Survival	0.735(50)	0.265(18)	—	0.360	0.640		
g.3164A→T	死亡 Dead	AT	AA	—	A	T	18.549	<0.01**
	存活 Survival	0.456(31)	0.544(37)	—	0.772	0.228		
		0.436(72)	0.564(93)	—	0.782	0.218		

注：括号内数字为检测个体数；*表示差异显著($P<0.05$)；**表示差异极显著($P<0.01$)；下同

Note: Numbers in brackets are size of the tested population; * indicates significant difference at $P<0.05$; ** indicates highly significant difference at $P<0.01$; The same as below

表 3 半滑舌鳎 *Nramp* 基因 SNP 与鳃弧菌的关联分析
Tab.3 Association analysis of single SNP of *CsNramp* with *V. anguillarum*

编号 Code	位置 Location	作用 Effect	基因型卡方值 Chi Sq Genotype	等位基因卡方值 Chi Sq Allele	基因型概率值 Prob Genotype	等位基因概率值 Prob Allele
1	g.3113T→C	Intron	0.514	0.025	0.772	0.874
2	g.3125A→G	Intron	13.690	8.726	<0.01**	<0.01**
3	g.3164A→T	Intron	0.053	0.053	0.785	0.817

注：g.3113T→C 表示基因 3113 位置发生 T 到 C 的突变；g.3125A→G 表示基因 3125 位置发生 A 到 G 的突变；g.3164A→T 表示基因 3164 位置发生 A 到 T 的突变

Note: g.3113T→C means T to C mutation in the location 3113 of gene; g.3125A→G means A to G mutation in the location 3125 of gene; g.3164A→T means A to T mutation in the location 3164 of gene

而 *Nramp1* 基因的表达则呈组织特异性，如人的 *Nramp1* 可以在肝脏、肾脏和脾脏中检测到表达 (Cellier *et al*, 1997)，而小鼠的 *Nramp1* 基因则主要在脾脏中表达，肝脏中表达量相对较少 (Vidal *et al*, 1993)。本研究发现，半滑舌鳎 *Nramp* 基因在脾脏、肾脏和肝脏中表达量最高，其次是皮肤、血液、肠、鳃、心脏和脑，而在肌肉和性腺中的表达量最低。半滑舌鳎 *Nramp* 基因在器官中这种组成型表达方式与哺乳类 *Nramp2* 的表达方式较为相似 (Grunheid *et al*, 1995; Forbes *et al*, 2001)。此外，在大菱鲆、草鱼、鲤、鲈以及斑点叉尾鲷中也观察到了 *Nramp* 基因在脾脏和肾脏中的表达量较高，这种表达量变化说明了脾脏、肾脏是鱼类主要的免疫器官。

对半滑舌鳎进行哈维氏弧菌感染实验后研究发现，相较于 PBS 对照组，实验组 *Nramp* 基因表达量在脾脏、肾脏和肝脏中明显上调，随着时间推移又恢

复至正常表达水平。同样的现象在小鼠 (Govoni *et al*, 1997)、猪 (Zhang *et al*, 2000) 及真鲷 (Chen *et al*, 2004) 中有过报道，范玉顶等 (2011) 利用草鱼呼肠孤病毒感染草鱼肾脏细胞系，结果发现，在感染后 *Nramp* 基因表达量明显升高，3 h 表达量达到最大，24 h 后回落至正常表达水平；Chen 等 (2007) 利用鳃弧菌感染大菱鲆胚胎细胞系后发现，*Nramp* 基因表达量在感染 6–48 h 后显著升高，且在 12 h 达到最大表达量。这些结果表明，*Nramp* 基因与病原菌感染后机体的防御反应密切相关，但半滑舌鳎 *Nramp* 基因与哈维氏弧菌感染之间的相互作用机理以及 *Nramp* 基因在鱼体感染病原菌后在鱼类免疫系统中所扮演的角色还有待于进一步的研究。

Nramp 基因多态性与疾病相关性的研究已在哺乳动物上开展了一些工作。Liu 等 (2004) 研究发现，一个微卫星位于人 *SLC11A1* 基因的 5' 端，其多态性与

结核病易感性以及巨噬细胞调控的疾病有关; Sanchez-Robert 等(2005)对犬 *Nramp* 基因的研究表明, TAG-8-141 单倍型与利什曼原虫的易感性有关; Liu 等(2003)在鸡的 *Nramp1* 基因上的研究证明, *Nramp1* 基因高度保守区单核苷酸多态性与青年鸡 SE 疫苗接种及病原感染后的免疫应答相关; Paixiao 等(2006)利用 SSCA 法分析瘤牛、荷斯坦牛 *Nramp1* 基因 3' UTR 区的遗传变异,发现不同基因型对布鲁氏菌的抗病性和敏感性差异显著,且不同品种间基因频率差异显著;赵生国等(2013)研究猪 *Nramp1* 基因遗传变异与仔猪腹泻的相关性发现,外显子 2 的 AA 基因型个体腹泻评分值显著高于 TT 基因型个体($P<0.05$),并极显著高于 AT 基因型个体($P<0.01$);内含子 6 的 CC 基因型个体腹泻评分值显著高于 CT 基因型个体($P<0.05$)。分子标记辅助选择育种(Marker-assisted selection, MAS)技术可以定向选育抗病新品种,且已在鱼类上取得了较好的效果(Xu *et al.*, 2008)。本研究在半滑舌鳎 *Nramp* 部分基因组 DNA(1042 bp)中筛选到 15 个 SNP 位点,对其中位于第 2 内含子区的 3 个 SNP[SNP-g.3113 (T→C)、SNP-g.3125(A→G)和 SNP-g.3164(A→T)]位点进行基因型分型,并对其 SNP 位点与抗病性的关联进行了分析。结果发现,在同一家系 233 个个体感染鳃弧菌后,存活个体 165 个视为抗病个体,死亡个体 68 个视为易感个体,其中, SNP-g.3125 的 AG 基因型(0.735)在死亡个体中为优势基因型,而 GG 基因型(0.546)在存活个体中为优势基因型,GG 基因型个体抗性评分极显著高于 AG 基因型个体($P<0.01$),G 等位基因抗性评分极显著高于 A 等位基因($P<0.01$),可见半滑舌鳎 *Nramp* 基因中的 SNP-g.3125 的等位基因(G)和基因型(GG)与半滑舌鳎对于鳃弧菌抗性呈显著相关性。因此, *Nramp* 基因该 SNP 位点可作为半滑舌鳎抗病育种的一个潜在的抗性遗传标记位点,为半滑舌鳎抗性品系培育的遗传分子标记提供基础研究资料。

参 考 文 献

- 邓景耀, 孟田湘, 任胜民, 等. 渤海鱼类种类组成及数量分布. 海洋水产研究, 1988(9): 10-98
- 范玉顶, 徐进, 罗晓松, 等. 草鱼天然抗性相关巨噬蛋白基因全长 cDNA 的克隆与表达分析. 中国水产科学, 2011, 18(1): 38-47
- 赵生国, 蔡原, 滚双宝, 等. 猪天然抗性相关巨噬细胞蛋白基因(*Nramp1*)多态性及其与仔猪腹泻相关性分析. 农业生物技术学报, 2013, 21(11): 1351-1357
- Bairoch A. The PROSITE dictionary of sites and patterns in proteins, its current status. Nucleic Acids Res, 1993, 21(13): 3097-3103
- Blackwell JM, Barton CH, White JK, *et al.* Genetic regulation of leishmanial and mycobacterial infections: the Lsh/Ity/Bcg gene story continues. Immunol Lett, 1995, 43(1-2): 99-107
- Blackwell JM. Structure and function of the natural resistance-associated macrophage protein(*Nramp1*), a candidate protein for infectious and autoimmune disease susceptibility. Mol Med Today, 1996, 2(5): 205-211
- Burge EJ, Gauthier DT, Ottinger CA, *et al.* Mycobacterium-inducible *Nramp* in striped bass (*Morone saxatilis*). Infect Immun, 2004, 72(3): 1626-1636
- Casey JL, Hentze MW, Koeller DM, *et al.* Iron-responsive elements: regulatory RNA sequences that control mRNA levels and translation. Science, 1988, 240(4854): 924-928
- Cellier M, Govoni G, Vidal S, *et al.* Human natural resistance-associated macrophage protein: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic organization, and tissue-specific expression. J Exp Med, 1994, 180(5): 1741-1752
- Cellier M, Shustik C, Dalton W, *et al.* Expression of the human *Nramp1* gene in professional primary phagocytes: studies in blood cells and in HL-60 promyelocytic leukemia. J Leukocyte Biol, 1997, 61(1): 96-105
- Chen H, Waldbieser GC, Rice CD, *et al.* Isolation and characterization of channel catfish natural resistance associated macrophage protein gene. Dev Comp Immunol, 2002, 26(6): 517-531
- Chen SL, Xu MY, Ji XS, *et al.* Cloning and characterization of natural resistance associated macrophage protein (*Nramp*) cDNA from red sea bream (*Pagrus major*). Fish Shellfish Immunol, 2004, 17(4): 305-313
- Chen SL, Wang ZJ, Xu MY, *et al.* Molecular identification and expression analysis of natural resistance associated macrophage protein (*Nramp*) cDNA from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Fish Shellfish Immunol, 2006, 20(3): 365-373
- Chen SL, Zhang YX, Xu JY, *et al.* Molecular cloning, characterization and expression analysis of natural resistance associated macrophage protein (*Nramp*) cDNA from turbot (*Scophthalmus maximus*). Comp Biochem Phys B, 2007, 147(1): 29-37
- Dorschner MO, Phillips RB. Comparative analysis of two *Nramp* loci from rainbow trout. DNA Cell Biol, 1999, 18(7): 573-583
- Feng J, Li Y, Hashad M, *et al.* Bovine natural resistance associated macrophage protein 1 (*Nramp1*) gene. Genome Res, 1996, 6(10): 956-964
- Fleming MD, Romano MA, Su MA, *et al.* *Nramp2* is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for *Nramp2* in endosomal iron transport. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(3): 1148-1153
- Forbes JR, Gros P. Divalent-metal transport by *NRAMP* proteins

- at the interface of host-pathogen interactions. *Trends Immunol*, 2001, 9(8): 397-403
- Govoni G, Gauthier S, Billia F, *et al.* Cell-specific and inducible *Nramp1* gene expression in mouse macrophages in vitro and in vivo. *J Leukoc Biol*, 1997, 62(2): 277-286
- Grunheid S, Cellier M, Vidal S, *et al.* Identification and characterization of a second mouse *Nramp* gene. *Genomics*, 1995, 25(2): 514-525
- Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, *et al.* Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*, 1997, 388(6641): 482-488
- Liu W, Kaiser MG, Lamont SJ. Natural resistance associated macrophage protein 1 gene polymorphisms and response to vaccine against or challenge with *Salmonella enteritidis* in young chicks. *Poultry Science*, 2003, 82(2): 259-266
- Liu W, Cao WC, Zhang CY, *et al.* *VDR* and *Nramp1* gene polymorphisms in susceptibility to pulmonary tuberculosis among the Chinese Han population: a case-control study. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2004, 8(4): 428-434
- Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, *et al.* Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng*, 1997, 10(1): 1-6
- Kishi F. Isolation and characterization of human *Nramp* cDNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 204(3): 1074-1080
- Kishi F, Tabuchi M. Complete nucleotide sequence of human *NRAMP2* cDNA. *Mol Immunol*, 1997, 34(12-13): 839-842
- Klausner RD, Rouault TA, Harford JB. Regulating the fate of mRNA: the control of cellular iron metabolism. *Cell*, 1993, 72(1): 19-28
- Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathy of a protein. *J Mol Biol*, 1982, 157: 105-132
- Paixiao TA, Ferreir AC, Borges AM, *et al.* Frequency of bovine *Nramp1*(*SLC11A1*) alleles in Holstein and Zebu breeds. *Vet Immunol Immunopathol*, 2006, 109(1/2): 37-42
- Saeij JPJ, Wiegertjes GF, Stet RJM. Identification and characterization of a fish natural resistance-associated macrophage protein (*NRAMP*) cDNA. *Immunogenetics*, 1999, 50(1): 60-66
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 1987, 4(4): 406-425
- Sanchez-Robert E, Altet L, Sanchez A, *et al.* Polymorphism of *SLC11A1*(*Nramp1*) gene and canine leishmaniasis in a case-control study. *J Heredity*, 2005, 96(7): 755-758
- Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- Skamene E, Pietrangeli CE. Genetics of the immune response to infectious pathogens. *Curr Opin Immunol*, 1991, 3(4): 511-517
- Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 2007, 24(8): 1596-1599
- Vidal SM, Malo D, Vogan K, *et al.* Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. *Cell*, 1993, 73(3): 469-485
- Xu TJ, Chen SL, Ji XS, *et al.* MHC polymorphism and disease resistance to *Vibrio anguillarum* in 12 selective Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) families. *Fish Shellfish Immunol*, 2008, 25(3): 213-221
- Zhang G, Wu H, Ross CR, *et al.* Cloning of porcine *NRAMP1* and its induction by lipopolysaccharide, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-1b: role of CD14 and mitogen-activated protein kinases. *Infect Immunol*, 2000, 68(3): 1086-1093

(编辑 冯小花)

Molecular Cloning, Expression and SNP Screening of Natural Resistance-Associated Macrophage Protein (*Nramp*) Gene cDNA from Half Smooth Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*)

XING Hefei^{1,2,3}, GAO Fengtao^{1,2,4}, ZHANG Yongzhen^{1,2,3}, DONG Zhongdian^{1,2,4}, CHEN Songlin^{1,2}①

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. National Laboratory for Ocean Science and Technology, Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao 266071;

3. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306;

4. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003)

Abstract Natural resistance-associated macrophage protein (*Nramp*) belongs to the integration of membrane transport proteins, which has the capacity of enhancing macrophages that are meant to kill pathogens and innate resistance to intracellular parasites. In present study, cDNA of *Nramp* gene was amplified from spleen of half smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) by SMART-RACE. The full-length cDNA of *Nramp* gene was 3717 bp, including 1677 bp open reading frame (ORF) encoding a protein with 558 amino acid residues, which contained the signature features of the *Nramp* protein family: 10 transmembrane (TM) domains, a consensus transport motif (CTM) with 20 amino acid residues. Compared with the other fish's *Nramp*, *C. semilaevis* *Nramp* was the presence of one iron-responsive regulatory (IRE) protein-binding site in the terminal of ORF, which was similar to the vertebrate *Nramp2*. The deduced amino acid sequence of *CsNramp* exhibited about 63%–91% homology with 14 other vertebrate *Nramp* sequences. Phylogenetic analysis revealed that the *CsNramp* was clustered with other fish *Nramp* and was closer to *Nramp2* of other species. RT-PCR results of the *CsNramp* transcripts in different tissues indicated that the *CsNramp* transcripts were highly abundant in spleen, kidney and low in muscle and gonad. The *C. semilaevis* challenged with the *Vibrio harveyi* could evidently elevate *Nramp* mRNA levels in spleen, kidney and liver, but the opposite phenomena were observed in the gills. To explore genetic variation and its relevant molecular markers in *CsNramp* gene, this research detected the polymorphisms of *Nramp* gene in one family of 233 individuals (68 infected individuals and 165 resistant individuals) by direct sequencing. Fifteen SNPs were detected in the partial of *Nramp* gene and 3 of them were genotyped successfully and SNP-g.3125(A→G) was significantly correlated to the resistance to *Vibrio anguillarum*. The results indicated that there were important effects on disease resistance of different *Nramp* genotypes, SNP-g.3125(A→G) can be used as potential genetic resistance marker loci, which can provide basic data for the genetic markers of *C. semilaevis* resistant breeding.

Key words Half smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*); *Nramp*; Gene clone; RT-PCR; Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

① Corresponding author: CHEN Songlin, E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

同步检测 7 种鱼类病毒的扩增子拯救多重 PCR (Arm-PCR) 方法的建立和应用*



王胜强^{1,3} 耿伟光¹ 史成银^{1,2①} 李晋¹ 栗子丹^{1,3}

(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. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 淋巴囊肿病毒(LCDV)、肿大细胞病毒属虹彩病毒(Mega)、赤点石斑鱼神经坏死病毒(RGNNV)、传染性造血器官坏死病毒(IHNV)、传染性胰脏坏死病毒(IPNV)、病毒性出血败血症病毒(VHSV)和传染性鲑鱼贫血症病毒(ISAV)是养殖鱼类主要的病毒性病原,危害巨大。为实现这 7 种病原的高通量、同步检测,本研究在分析这 7 种病毒基因序列的基础上,设计了 9 组扩增子拯救多重 PCR(Arm-PCR)引物,并对扩增体系中的 *Taq* 酶、 Mg^{2+} 、dNTP、Primer Mix 浓度及退火温度等参数进行调整和优化,结合基因芯片检测技术,建立了同步检测 7 种鱼类病毒的 Arm-PCR 方法。优化后的 Arm-PCR 方法第一步 PCR 体系为: *Taq* 酶(2.5 U/ μ l) 1.0 μ l, 10 \times PCR Buffer(含 20 mmol/L 的 Mg^{2+}) 5 μ l, dNTP(各 2.5 mmol/L) 5 μ l, 10 \times Primer Mix(各 2 μ mol/L) 9 μ l, 模板 1 μ l, ddH₂O 补足至 50 μ l, 退火温度为 56 $^{\circ}$ C。研究结果显示,该方法可以在 1 支反应管内对上述 7 种病毒的 9 个致病基因同步进行扩增和检测,检测灵敏度分别为 10¹ copies/ μ l (RGNNV、VHSV、ISAV-NS、ISAV-MA)、10² copies/ μ l (LCDV、Mega、IHNV、IPNV)和 10³ copies/ μ l (大菱鲆红体病虹彩病毒, TRBIV)。该方法特异性强,与半滑舌鲷、石斑鱼、大菱鲆和牙鲆基因组 DNA 不产生交叉反应。本研究建立的可同步检测 7 种鱼类病毒的 Arm-PCR 方法具有高通量、高灵敏度、高准确性的优势,能有效提高工作效率,在鱼类病毒的筛查和流行病学调查领域有广泛的应用前景。

关键词 鱼类病毒; 多重检测; 高通量; 多重 PCR

中图分类号 S943 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2016)04-0128-07

随着社会经济的快速发展,水产养殖业也呈现出养殖规模和养殖技术的空前提高,尤其在集约化养殖和工厂化养殖方面发展迅速。但在海水经济鱼类的养殖过程中,病毒性疾病的暴发往往会给养殖业带来巨大的危害。淋巴囊肿病毒(Lymphocystis disease virus, LCDV) (徐洪涛等, 2000)、肿大细胞病毒属虹彩病毒(*Megalocytivirus*, Mega) (Chao *et al*, 2004)、赤点石斑鱼神经坏死病毒(Red-spotted grouper nervous necrosis virus, RGNNV) (Lopez-Jimena *et al*, 2011; Choi *et al*, 2013)、传染性造血器官坏死病毒(Infectious haematopoietic necrosis virus, IHNV) (Rudakova *et al*, 2007)、传染性胰脏坏死

病毒(Infectious pancreatic necrosis virus, IPNV) (Wallace *et al*, 2008)、病毒性出血败血症病毒(Viral hemorrhagic septicemia virus, VHSV) (Isshiki *et al*, 2001)和传染性鲑鱼贫血症病毒(Infectious salmon anaemia virus, ISAV) (Lyngstad *et al*, 2012; Godoy *et al*, 2013)是养殖鱼类主要的病毒性病原,它们均能引起传染性、暴发性疾病,同时伴随着高死亡率,给养殖企业造成严重的经济损失。大菱鲆红体病虹彩病毒(Turbot reddish body iridovirus, TRBIV)是肿大细胞病毒属虹彩病毒的一个成员,主要感染我国养殖的大菱鲆(史成银等, 2005)。因此,建立这些病原的快速、有效、低成本的检测方法,对保

* 国家科技支撑计划课题(2012BAD17B01)资助。王胜强, E-mail: wsq098886@163.com

① 通讯作者: 史成银, 研究员, E-mail: shicy@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-06-06, 收修改稿日期: 2015-06-10

障养殖鱼类健康、防治疾病发生具有重要的意义。

多重 PCR(Multiplex PCR)技术是目前应用最为广泛的检测技术之一,最早由 Chamberlian 等(1988)提出。由于具有高通量、快速和成本低等优势,该检测技术很快被广泛应用在病原检测和临床诊断中(Edwards *et al*, 1994; Elnifro *et al*, 2000)。然而,多重 PCR 技术也存在引物设计困难、反应相互干扰、扩增效率和准确度差等缺点,其应用范围较为有限。有学者对其进行改进,发明了“扩增子拯救多重 PCR”(Amplicon rescue multiplex PCR, Arm-PCR)技术(Han *et al*, 2006),其工作原理是:在多重扩增体系中,设计靶序列特异性的套式 PCR 引物和通用性的超级引物,通过富集、加标签、拯救、扩增等步骤,实现对多种靶序列的同步、高灵敏、高特异性扩增。目前,该技术在临床病原检测领域已有较多的研究和报道,但在水生动物病原检测领域并不多见(耿伟光等, 2013)。

本研究在分析了水产动物 LCDV、TRBIV、Mega、RGNNV、IHNV、IPNV、VHSV、ISAV 的非结构蛋白(Non-structural protein of ISAV, ISAV-NS)、ISAV 的基质蛋白(Matrix protein of ISAV, ISAV-MA)相关基因核苷酸序列的基础上,依据 Arm-PCR 的原理设计了9套多重 PCR 引物,优化了反应条件,成功建立了可同步检测上述7种病原的 Arm-PCR 方法,结合基因芯片技术,实现了多种鱼类病毒性病原的高通量检测,具有较好的应用前景。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验克隆菌株 含有 LCDV、TRBIV、Mega、RGNNV、IHNV、IPNV、VHSV、ISAV-NS、ISAV-MA 等相关致病基因的 T-A 克隆质粒和菌株均由本实验室构建,用作检测体系构建的阳性模板。各基因的 GenBank 检索号见表1。

1.1.2 主要试剂、耗材 实验中用到的 *TransStartTM Top Taq DNA Polymerase*、*High Pure dNTPs* 购自全式金生物技术有限公司,海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司,质粒小量快速提取试剂盒购自博迈德生物技术有限公司,0.5 ml 50 kDa 超滤离心管购自德国 Millipore 公司。

1.2 方法

1.2.1 阳性模板的制备 分别将含有 LCDV、TRBIV、Mega、RGNNV、IHNV、IPNV、VHSV、ISAV-NS、

ISAV-MA 等病毒相关致病基因的克隆菌株过夜培养。对扩大培养的菌液提取质粒,用超微量核酸蛋白测定仪(NanoDrop2000, 美国)测定核酸的浓度和纯度,保存于-20℃备用。

1.2.2 靶基因的选择与 Arm-PCR 引物的设计 根据 GenBank 中已公布的 LCDV、TRBIV、Mega 和 RGNNV 的衣壳蛋白(CP)、IHNV 的核蛋白(N)、IPNV 的 VP5、VHSV 的糖蛋白(G)、ISAV 的非结构蛋白(NS)和基质蛋白(MA)等基因序列,使用 Primer Premier 5.0 分别设计特异性套式 PCR 引物,用于 Arm-PCR 第一步 PCR 的扩增,其中,内引物的 5' 端各有一段通用接头,正向接头的序列为 5'-CAG GCC ACG TTT TGT CAT GC-3', 反向接头序列为 5'-TTC TTT GCG TTA TGT CTC TG-3', 各引物序列及扩增片段大小见表1。各引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

1.2.3 Arm-PCR 10 × Primer Mix 的准备 取合成的各引物,分别稀释至 100 μmol/L; 然后各取等量,加入新的 EP 管中,调整每条引物的终浓度至 2 μmol/L, 分装、保存于-20℃备用。

1.2.4 Arm-PCR 反应体系和参数 第一步 PCR 体系: 2.5 U/μl *Taq DNA* 聚合酶 0.6 μl, 10×PCR Buffer (Mg²⁺ plus) 5 μl, 2.5 mmol/L dNTPs 5 μl, 2 μmol/L 10×Primer Mix 5 μl, 模板 1 μl, 补充 ddH₂O 至 50 μl。反应程序: 94℃ 5 min; 94℃ 15 s, 55℃ 15 s, 72℃ 15 s 15 个循环; 94℃ 15 s, 70℃ 15 s, 6 个循环; 72℃ 3 min; 4℃ 保存。

产物经超滤管(0.5 ml 50 kDa)离心,收集液作为第二步 PCR 模板。第二步 PCR 体系: 2.5 U/μl *Taq DNA* 聚合酶 0.6 μl, 10×PCR Buffer(Mg²⁺ plus) 5 μl, 2.5 mmol/L dNTPs 5 μl, 10 μmol/L 正向通用引物 Fs (5'-CAG GCC ACG TTT TGT CAT GC-3') 1 μl, 40 μmol/L 反向通用引物 Rs (5'-Cy3-TTC TTT GCG TTA TGT CTC TG-3') 1 μl, 模板(上述收集液) 10 μl, ddH₂O 至 50 μl。反应程序: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 30 个循环; 72℃ 3 min; 4℃ 保存。

1.2.5 Arm-PCR 扩增产物的基因芯片检测 由于各病毒的扩增产物大小相近,不能使用常用的琼脂糖凝胶电泳分析扩增结果。故本研究通过已建立的基因芯片技术对上述扩增产物进行杂交检测(王胜强等, 2015)。主要方法是:取病毒特异性的且与 Arm-PCR 扩增产物互补的 10 条寡核苷酸探针(25-30 mer)点样在醛基修饰玻片上,其中,针对 Mega 的扩增产物设计两条探针 Mega-1 和 Mega-2; 玻片上另设置表面化学质控(QC-1)和空白对照质控(QC-4),制作成基因芯

表 1 Arm-PCR 引物序列及目标产物长度
Tab.1 Sequences of Arm-PCR primers and products length

病毒 Virus	引物 Primers	序列 Sequences(5'-3')	大小 Size (bp)	检索号 GenBank No.
LCDV	LCDV-Fo	GCTGCTTTGCCTTATAATG	281	EF059991
	LCDV-Ro	GGACTTGGAATAGTTAGAGGTT		
	LCDV-Fi	CAGGCCACGTTTGTTCATGCGACTCTACCATCATGCCTTT	214	
	LCDV-Ri	TTCTTTGCGTTATGTCTCTGTACATGTTTAGGTGCTGTTTG		
TRBIV	TRBIV-Fo	CCACATAACATACTGCCCAAGC	399	GQ273492
	TRBIV-Ro	CATGCGCTGAAATAAAGACCAC		
	TRBIV-Fi	CAGGCCACGTTTGTTCATGCAACTCAGCAATGCCAACG	248	
	TRBIV-Ri	TTCTTTGCGTTATGTCTCTGTATCATGCCACTGCACAAC		
RGNNV	RGNNV-Fo	CTGGTCGGCTGATACTCCT	399	AF534998
	RGNNV-Ro	CAACGCCATCTGTGAACG		
	RGNNV-Fi	CAGGCCACGTTTGTTCATGCCAACGATTCCTTTCCAC	191	
	RGNNV-Ri	TTCTTTGCGTTATGTCTCTGATAAACAGCACGGTCAACAT		
Mega	Mega-Fo	GCCGTCAGCAATCTTCAT	299	AY590687
	Mega-Ro	TCCACCAGATGGGAGTAGA		
	Mega-Fi	CAGGCCACGTTTGTTCATGCATCTTCATGATGTTGTGGTTG	303	
	Mega-Ri	TTCTTTGCGTTATGTCTCTGACATCTGTGACCCCTACTA		
IHNV	IHNV-Fo	GAACGATGACAAGCGCACT	221	HM099906
	IHNV-Ro	AATGACGAACGCGCACA		
	IHNV-Fi	CAGGCCACGTTTGTTCATGCCGGTACGATAACCCTCCCT	170	
	IHNV-Ri	TTCTTTGCGTTATGTCTCTGAATGACGAACGCGCACA		
IPNV	IPNV-Fo	CAAACAAAGCAACCGCAAC	352	AF160258
	IPNV-Ro	GTCCCATTCAGGGCATAGAG		
	IPNV-Fi	CAGGCCACGTTTGTTCATGCCGACATAACGGAGAGACACAT	200	
	IPNV-Ri	TTCTTTGCGTTATGTCTCTGGAACCTAGTTCCGTCTGGTTC		
VHSV	VHSV-Fo	TCATCCATCTCCCGCTATC	425	AM086383
	VHSV-Ro	TCCTTCTAGTGTTCGACG		
	VHSV-Fi	CAGGCCACGTTTGTTCATGACAAACGAGGCAAGTAAG	202	
	VHSV-Ri	TTCTTTGCGTTATGTCTCTGTATGAAATCAGGGTTGAGAAA		
ISAV-NS	ISAV-NS-Fo	ACGATGACCCTCTACTGTGTG	382	AF315063
	ISAV-NS-Ro	TTCTTCTTCTCCGCTTCCATTC		
	ISAV-NS-Fi	CAGGCCACGTTTGTTCATGATGGGCAATGGTGTATGGT	217	
	ISAV-NS-Ri	TTCTTTGCGTTATGTCTCTGGATGCCGGAAGTCGATGAA		
ISAV-MA	ISAV-MA-Fo	AAGCGGATTGTGTGTAGAGTTC	284	Y10404
	ISAV-MA-Ro	GCCTTCAACATCGTCTTCTCC		
	ISAV-MA-Fi	CAGGCCACGTTTGTTCATGAGCGACGATGACTCTCTACTG	149	
	ISAV-MA-Ri	TTCTTTGCGTTATGTCTCTGTTGGCATCCTGACTCTTCCTT		

片微阵列(图 1)。将 Cy3 标记的 Arm-PCR 扩增产物与制作好的基因芯片微阵列在 47℃ 条件下杂交 1.5 h, 洗涤后在 LuxScan 10K 扫描仪上采集荧光信号、判断检测结果。

1.2.6 Arm-PCR 第一步 PCR 参数的优化 对 Arm-PCR 第一步 PCR 中影响扩增结果的 *Taq* 酶浓度、 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度、引物混合物(Primer Mix)浓度和

退火温度 5 个参数进行调整和优化。其中, *Taq* 酶终浓度为 0.045、0.050 和 0.055 U/ μ l, Mg^{2+} 终浓度为 2.0、2.8 和 3.6 mmol/L, dNTPs 终浓度为 0.15、0.25 和 0.35 mmol/L, 引物终浓度为 0.32、0.36 和 0.40 μ mol/L, 退火温度为 54℃、56℃ 和 58℃。通过多次实验从而确定最佳参数。

1.2.7 Arm-PCR 检测灵敏度的测定 对预备的质

粒进行拷贝数换算, 同时进行 10 倍梯度稀释。依照 1.2.4 和 1.2.5 所述方法, 采用 1.2.6 优化得到的参数进行 Arm-PCR 反应, 测定本方法的检测灵敏度。

1.2.8 检测特异性的验证 以每种病毒的质粒为模板, 依照 1.2.4 和 1.2.5 所述方法, 采用 1.2.6 优化得到的参数进行 Arm-PCR 反应, 测定本研究建立的 7 种病毒 Arm-PCR 检测方法的特异性。

1.2.9 应用 Arm-PCR 方法检测病鱼样品 先后收集了 19 批病鱼样品, 包括半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)、龙胆石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus*)、棕点石斑鱼(*E. fuscoguttatus*)、卵圆鲳鲈(*Trachinotus ovatus*)、斑石鲷(*Oplegnathus punctatus*)等, 采用本研究建立的 Arm-PCR 联合基因芯片检测方法进行相应病毒的检测, 同时使用套式 PCR 和套式 RT-PCR 方法进行检测, 作为对比。检测过程简述如下: 取患病样品鱼的鳃、肝、脾、肾、脑和眼等组织, 分别依照海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒说明书和 TRizol 法提取组织的总 DNA 和总 RNA。依照全式金的一步法反转录试剂盒说明书将提取的 RNA 反转录成 cDNA, 然后对提取的 DNA 和反转录得到的 cDNA 进行 Arm-PCR 扩增。将扩增产物依照 1.2.5 所述进行杂交、清洗和扫描, 然后对扫描的图片提取信号值分析并得出检测结果。

2 结果

2.1 Arm-PCR 第一步 PCR 参数的优化

图 1 为用于检测 Arm-PCR 扩增结果的基因芯片微阵列示意图, Arm-PCR 扩增产物与基因芯片微阵列杂交结果见图 2。图 2 中表面化学质控 QC-1 应呈阳性, 空白对照质控 QC-4 应呈阴性。杂交结果显示, 当 *Taq* 酶终浓度为 0.050 U/ μ l、 Mg^{2+} 终浓度为 2 mmol/L、dNTPs 终浓度为 0.25 mmol/L、Primer Mix 终浓度为 0.36 μ mol/L、退火温度为 56 $^{\circ}$ C 时, Arm-PCR 各扩增产物的量达到峰值。因此, 优化后 Arm-PCR 第一步 PCR 体系为: *Taq* 酶(2.5 U/ μ l) 1.0 μ l, 10 \times PCR Buffer(含 20 mmol/L 的 Mg^{2+}) 5 μ l, dNTPs(各 2.5 mmol/L) 5 μ l, 10 \times Primer Mix(2 μ mol/L) 9 μ l, 模板 1 μ l, ddH₂O 补至 50 μ l, 退火温度为 56 $^{\circ}$ C。

2.2 Arm-PCR 检测方法的灵敏度

依照 1.2.7 进行各病毒模板的 Arm-PCR 扩增、杂交、清洗和扫描, 结果如图 3 所示。本研究建立的 Arm-PCR 检测方法, 对 7 种鱼类病毒 9 个致病基因的检测灵敏度分别为: 10¹ copies/ μ l (RGNNV、VHSV、

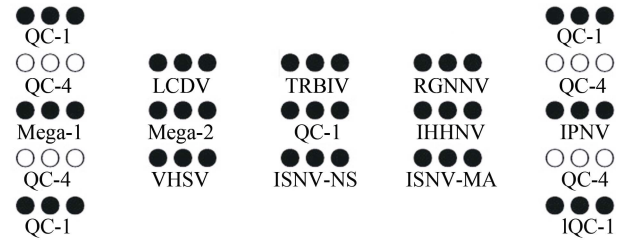


图 1 基因芯片微阵列示意

Fig.1 Schematic diagram of DNA microarray

QC-1: 表面化学质控; QC-4: 空白对照质控
QC-1: surface chemical quality control; QC-4: blank control

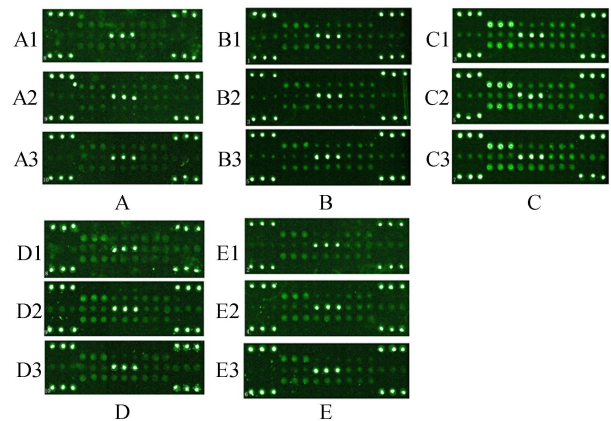


图 2 Arm-PCR 第一步 PCR 参数的优化

Fig.2 Amplification results under different conditions in the first step of Arm-PCR

A: *Taq* DNA 聚合酶浓度; B: Mg^{2+} 浓度; C: dNTP 浓度;
D: Primer Mix 浓度; E: 退火温度

A1-A3: *Taq* DNA 聚合酶终浓度分别为 0.045、0.050 和 0.055 U/ μ l; B1-B3: Mg^{2+} 终浓度分别为 2.0、2.8 和 3.6 mmol/L; C1-C3: dNTP 的终浓度分别为 0.15、0.25 和 0.35 mmol/L; D1-D3: Primer Mix 终浓度分别为 0.32、0.36 和 0.40 μ mol/L; E1-E3: 退火温度分别为 54、56 和 58 $^{\circ}$ C

A: Concentration of *Taq* enzyme; B: Concentration of Mg^{2+} ;
C: Concentration of dNTP; D: Concentration of Primer Mix;
E: Annealing temperature

A1-A3: The concentrations of *Taq* enzyme were 0.045, 0.050 and 0.055 U/ μ l respectively. B1-B3: The concentration of Mg^{2+} was 2.0, 2.8 and 3.6 mmol/L respectively. C1-C3: The concentration of dNTP was 0.15, 0.25 and 0.35 mmol/L respectively. D1-D3: The concentration of Primer Mix was 0.32, 0.36 and 0.40 μ mol/L respectively. E1-E3: The annealing temperature was 54, 56 and 58 $^{\circ}$ C respectively

ISAV-NS、ISAV-MA)、10² copies/ μ l (LCDV、Mega、IHHNV、IPNV)和 10³ copies/ μ l (TRBIV)。

2.3 Arm-PCR 检测方法的特异性

依照 1.2.8 进行相应的 Arm-PCR 扩增、杂交、清洗和扫描(图 4)。结果显示, 7 种病毒 9 个基因的反应

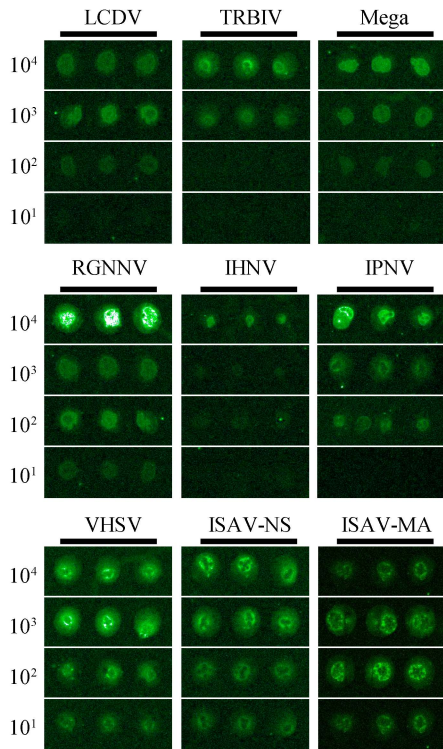


图 3 Arm-PCR 方法对 7 种病毒 9 个基因的
检测灵敏度

Fig.3 The sensitivity test of Arm-PCR for nine genes
of seven viruses of fish

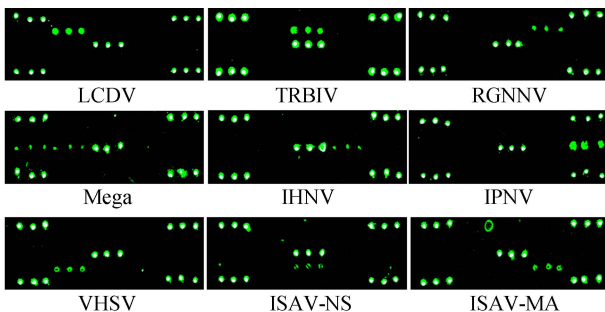


图 4 检测方法的特异性

Fig.4 The specificity test of Arm-PCR

体系中均得到了大量的特异性扩增产物,且杂交信号清晰可见。因此,本研究建立的 Arm-PCR 检测体系具有良好的扩增特异性。

2.4 对病鱼样品的检测结果

对 19 批病鱼样品的检测结果显示,有一批样品(牙鲆, 2013-11-15-001)检出 LCDV, 两批样品(大菱鲆, 2014-03-25-001、2014-12-23-001)检出 TRBIV, 两批样品(半滑舌鲷、龙胆石斑鱼精、卵, 2014-04-22-001-009、2014-05-19-001-007)检出 RGNNV, 3 份样品(棕点石斑鱼、卵圆鲷、斑石鲷, 2014-05-25-001、2014-05-27-001、2015-05-31-001)检出 *Megalocytivirus*(图 5)。

该检测结果与套式 PCR 和套式 RT-PCR 检测结果一致(结果未展示)。

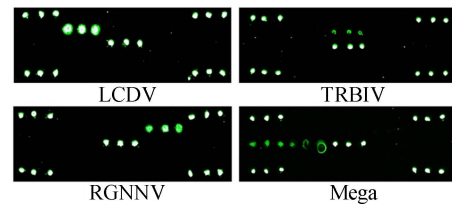


图 5 Arm-PCR 方法检测病鱼样品

Fig.5 Detection of viruses in fish samples using Arm-PCR

3 讨论

多重 PCR 技术可以快速、灵敏地同步扩增多个目标片段,已被越来越多地用于病原检测技术研究领域(Han *et al*, 2006; Zou *et al*, 2007; 曾伟伟等, 2013),但同时也因其反应体系组成的复杂性而在一定程度上影响其在检测灵敏度的提升。本研究在基因芯片技术的基础上,通过建立和优化扩增子拯救多重 PCR (Arm-PCR)的扩增体系,测定反应体系的检测灵敏度以及验证体系扩增的特异性,最终成功建立了灵敏度高、特异性好的 Arm-PCR 联合基因芯片检测鱼类病毒的方法。

在鱼类病毒的检测领域,多重 PCR 和基因芯片的联合应用目前并未见报道,但在鱼类、贝类的致病菌检测和分型以及对虾的相关病毒检测当中有相关的报道。Panicker 等(2004)建立的贝类致病菌多重 PCR 联合基因芯片检测方法在不富集的情况下检测灵敏度为 10^2-10^3 CFU/ml,通过多重 PCR 富集之后灵敏度可达单个拷贝每克组织匀浆,本研究建立的鱼类病毒检测方法与 Panicker 等(2004)的灵敏度相当。在鱼类致病菌检测领域, González 等(2004)针对海水鱼类 5 种致病菌中的 9 个基因所建立的多重 PCR 联合基因芯片检测方法,检测灵敏度在 20 fg 纯化基因组 DNA 以下,而本研究所建立的检测方法的灵敏度相当于在 $10^{-3}-10^{-1}$ fg 之间,较 González 等(2004)的检测方法高出 1-3 个数量级。Jeeva 等(2014)所建立的对虾病毒检测方法虽然灵敏度均保持在 10^1 copies/ μ l 左右,但其检测目标病毒的种类仅有对虾白斑病毒和肝胰腺细小病毒两种;刘飞等(2014)构建的对虾病毒多重检测方法,检测目标病毒的种类可达 6 种,但该方法的检测灵敏度在 10^2-10^5 copies/ μ l 之间,较本研究建立的检测方法低 1-2 个数量级。此外,本研究建立的检测方法采用了基于碱基配对原理的 DNA 芯片技术,与常规的琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物相比,

大大提高了检测结果的准确性和可靠性。

本研究建立的 Arm-PCR 联合基因芯片检测 7 种鱼类病毒的方法, 在预先制备好基因芯片的情况下, 经过核酸制备、Arm-PCR 扩增、芯片杂交、扫描观察等流程, 可以在 12 h 内完成 10 个样品 7 种病毒的高灵敏度、高准确性的同步检测, 相对于普通的 70 个套式 PCR 反应结合电泳检测过程, 更为高效。

总之, 本研究建立的可同步检测 7 种鱼类病毒的 Arm-PCR 方法具有高通量、高灵敏度、高准确性的优势, 能有效提高工作效率, 在鱼类病毒的筛查和流行病学调查领域有广泛的应用前景。

参 考 文 献

- 王胜强, 耿伟光, 李晋, 等. 基因芯片检测鱼类病毒的方法建立与优化. 中国动物检疫, 2015, 32(7): 77-81, 84
- 史成银, 王印庚, 黄健, 等. 中国大菱鲆虹彩病毒主要衣壳蛋白基因的 PCR 扩增及序列分析. 中国水产科学, 2005, 12(5): 588-593
- 刘飞, 张宝存, 张晓华, 等. 对虾 6 种病毒多重 PCR 检测方法的建立. 渔业科学进展, 2014, 35(1): 60-67
- 耿伟光, 史成银, 李晋, 等. 同步检测海水养殖动物 5 种病原菌的扩增子拯救多重 PCR(Arm-PCR)方法的建立与应用. 农业生物技术学报, 2013, 21(9): 1125-1134
- 徐洪涛, 朴春爱, 姜忠良, 等. 养殖牙鲆淋巴囊肿病原的研究. 病毒学报, 2000, 16(3): 223-226
- 曾伟伟, 王庆, 王英英, 等. 草鱼呼肠孤病毒三重 PCR 检测方法的建立及其应用. 中国水产科学, 2013, 20(2): 419-426
- Chamberlain JS, Gibbs RA, Rainer JE, *et al.* Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. Nucleic Acids Res, 1988, 16(23): 11141-11156
- Chao CB, Chen CY, Lai YY, *et al.* Histological, ultrastructural, and *in situ* hybridization study on enlarged cells in grouper *Epinephelus* hybrids infected by grouper iridovirus in Taiwan (TGIV). Dis Aquat Organ, 2004, 58(2-3): 127-142
- Choi YR, Kim HJ, Lee JY, *et al.* Chromatographically-purified capsid proteins of red-spotted grouper nervous necrosis virus expressed in *Saccharomyces cerevisiae* form virus-like particles. Protein Expres Purif, 2013, 89(2): 162-168
- Edwards MC, Gibbs RA. Multiplex PCR: advantages, development, and applications. Genome Res, 1994, 3(4): S65-S75
- Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, *et al.* Multiplex PCR: and application in diagnostic virology. Clin Microbiol Rev, 2000, 13(4): 559-570
- Godoy MG, Kibenge MJ, Suarez R, *et al.* Infectious salmon anaemia virus (ISAV) in Chilean Atlantic salmon (*Salmo salar*) aquaculture: emergence of low pathogenic ISAV-HPR0 and re-emergence of virulent ISAV-HPRΔ: HPR3 and HPR14. Virol J, 2013, 10(1): 1-17
- González SF, Krug MJ, Nielsen ME, *et al.* Simultaneous detection of marine fish pathogens by using multiplex PCR and a DNA microarray. J Clin Microbiol, 2004, 42(4): 1414-1419
- Han J, Swan DC, Smith SJ, *et al.* Simultaneous amplification and identification of 25 human papillomavirus types with templex technology. J Clin Microbiol, 2006, 44(11): 4157-4162
- Isshiki T, Nishizawa T, Kobayashi T, *et al.* An outbreak of VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) infection in farmed Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in Japan. Dis Aquat Organ, 2001, 47(2): 87-99
- Jeeva S, Kim NI, Jang IK, *et al.* Development of a multiplex PCR system for the simultaneous detection of white spot syndrome virus and hepatopancreatic parvovirus infection. Aquac Res, 2014, 45(6): 1073-1083
- Lopez-Jimena B, Alonso MC, Thompson KD, *et al.* Tissue distribution of Red Spotted Grouper Nervous Necrosis Virus (RGNNV) genome in experimentally infected juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax*). Vet Microbiol, 2011, 154(1-2): 86-95
- Lyngstad TM, Kristoffersen AB, Hjortaa MJ, *et al.* Low virulent infectious salmon anaemia virus (ISAV-HPR0) is prevalent and geographically structured in Norwegian salmon farming. Dis Aquat Organ, 2012, 101(3): 197-206
- Panicker G, Call DR, Krug MJ, *et al.* Detection of pathogenic *Vibrio* spp. in shellfish by using multiplex PCR and DNA microarrays. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(12): 7436-7444
- Rudakova SL, Kurath G, Bochkova EV. Occurrence and genetic typing of infectious hematopoietic necrosis virus in Kamchatka, Russia. Dis Aquat Organ, 2007, 75(1): 1-11
- Wallace IS, Gregory A, Murray AG, *et al.* Distribution of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in wild marine fish from Scottish waters with respect to clinically infected aquaculture sites producing Atlantic salmon, *Salmo salar* L. J Fish Dis, 2008, 31(3): 177-186
- Zou SM, Han J, Wen LY, *et al.* Human influenza A virus (H5N1) detection by a novel multiplex PCR typing method. J Clin Microbiol, 2007, 45(6): 1889-1892

(编辑 冯小花)

Amplicon Rescue Multiplex PCR (Arm-PCR): a Novel Tool for Simultaneous Detection of Seven Types of Fish Viruses

WANG Shengqiang^{1,3}, GENG Weiguang¹, SHI Chengyin^{1,2①}, LI Jin¹, SU Zidan^{1,3}

(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 Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract Major fish viruses that are severely harmful in aquaculture industry include Lymphocystis disease virus (LCDV), *Megalocytivirus* (Mega), red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV), infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV), infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) and infectious salmon anaemia virus (ISAV). Here we developed a specific amplicon rescue multiplex PCR (Arm-PCR) combined with gene microarray technique for the simultaneous detection of the seven types of fish viruses. First we optimized the conditions of Arm-PCR such as the annealing temperature and the concentrations of *Taq* DNA polymerase, Mg^{2+} , dNTP and Primer Mix shown as follows. Reaction mixture (50 μ l) consisted of 1.0 μ l *Taq* DNA polymerase (2.5 U/ μ l), 5 μ l 10 \times PCR Buffer (20 mmol/L Mg^{2+}), 5 μ l dNTP (2.5 mmol/L each), 9 μ l 10 \times Primer Mix (2 μ mol/L), and 1 μ l template. The annealing temperature was 56 $^{\circ}$ C. This method could simultaneously produce specific amplicons in one tube. The detection sensitivity of the Arm-PCR was 10¹ copies/ μ l for RGNNV, VHSV, non-structural protein of ISAV (ISAV-NS), and matrix protein of ISAV (ISAV-MA), 10² copies/ μ l for LCDV, Mega, IHNV, and IPNV, and 10³ copies/ μ l for TRBIV (Turbot reddish body iridovirus). The Arm-PCR did not cause cross reactions with genomic DNA from healthy fish such as half smooth tongue sole, grouper, turbot and flounder.

Key words Fish virus; Multiple detection; High throughput; Multiplex PCR

① Corresponding author: SHI Chengyin, E-mail: shicy@ysfri.ac.cn

对虾白斑综合征病毒囊膜蛋白 VP28 和 VP26 的毕赤酵母组成型分泌表达*



耿小雪 王小霞 周怡 徐玮 张文兵^① 麦康森

(水产动物营养与饲料农业部重点实验室 海水养殖教育部重点实验室 中国海洋大学水产学院 青岛 266003)

摘要 近年来,重组 VP28 和 VP26 蛋白作为蛋白亚单位疫苗,在增强对虾抗白斑综合征病毒(WSSV)感染的过程中具有重要作用。本研究根据 GenBank 中 WSSV 的基因序列设计引物,以 WSSV 粗提液为模板进行普通 PCR 扩增,得到 VP28 和 VP26 基因,再用引物悬挂法将 *EcoR* I 和 *Xba* I 酶切位点分别添加到 VP28 和 VP26 基因的 5'端和 3'端。目的基因经双酶切后插入到表达载体 pGAPZαA,转化 TOP10 大肠杆菌,经博莱霉素(Zeocin)抗性筛选阳性重组酵母表达载体。*Avr* II 酶切线性化之后,电击转化 X-33 毕赤酵母感受态细胞,经 Zeocin 抗性筛选得到阳性重组酵母。SDS-PAGE 电泳分析重组酵母表达上清液的目的蛋白,没有检测到 VP28 和 VP26 重组蛋白。随后,采用蛋白质银染法,结果显示,与空载 pGAPZαA 组相比,VP28 和 VP26 表达上清液组有明显的条带,证明 VP28 和 VP26 在毕赤酵母中成功表达,蛋白分子量大小约为 32 kDa。

关键词 白斑综合征病毒; VP28; VP26; 重组表达; 毕赤酵母

中图分类号 S945 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)04-0135-05

对虾白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)严重危害着全球对虾养殖业,造成巨大的经济损失。WSSV 致病宿主范围非常广,致病力也非常强,对虾感染该病毒后死亡率高达 100%。然而, WSSV 全基因组序列测序的完成,使研究者对 WSSV 的结构基因及其表达的蛋白的性质和功能有了全面的认识(陈文博等, 2009)。运用蛋白质组学的方法,已经鉴别出 40 多种 WSSV 的结构蛋白,其中 22 种是囊膜蛋白,主要的囊膜蛋白有 VP19、VP28、VP31、VP36B、VP38A、VP51B 和 VP53A 等,主要的囊膜被膜蛋白有 VP26、VP36A、VP39A 和 VP95 等(Tsai *et al*, 2006; Leu *et al*, 2009)。通过免疫共沉淀法和酵母双杂交法研究了 WSSV 结构蛋白之间的互相作用,发现 VP28、VP51A、VP19 和 VP37 这 4 种蛋白位于病毒颗粒的最外层,预测它们可能在识别宿主细胞表面的模式、识别受体方面具有重要的作用(Chang *et al*,

2010)。Yi 等(2004)研究发现, VP28 是 WSSV 侵入对虾细胞所必需的,而 VP26 负责将 VP28 蛋白与核衣壳蛋白连接起来(Wan *et al*, 2008)。

一般认为,对虾缺乏获得性免疫系统,只能依赖天然性免疫系统来抵抗外源病原体的入侵。然而,现在越来越多的研究发现,DNA 疫苗(Rajeshkumar *et al*, 2009; Mu *et al*, 2012)和蛋白质亚单位疫苗(丁晶等, 2013; Satoh *et al*, 2008)可以激活对虾的免疫系统、增强对虾抵抗病毒侵染的能力,这些研究颠覆了人们对对虾免疫认识的传统思维,为寻求防治 WSSV 的有效途径带来了希望。DNA 疫苗是在分子生物学技术基础上发展起来的特殊疫苗,它具有免疫效果好、生产成本低和临床应用方便等优点(杨海等, 2013)。但 DNA 疫苗的本质毕竟是核酸,存在着基因转移到宿主的可能性,其使用的安全性必须放在最关键的位置。蛋白质亚单位疫苗的本质是蛋白质,生物体利用

* 国家公益性行业(农业)专项经费项目(201103034)资助。耿小雪, E-mail: gengxue2013@163.com

① 通讯作者: 张文兵, 教授, E-mail: wzhang@ouc.edu.cn

收稿日期: 2015-05-22, 收修改稿日期: 2015-05-26

蛋白质并将其用于机体本身的生命活动,不会造成危害,是一种安全的疫苗。

本研究选取 VP28 和 VP26 这两种 WSSV 囊膜蛋白作为研究对象,利用毕赤酵母表达系统来组成分泌表达这两种目的蛋白,以期为规模化制备对虾免疫增强剂提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌种 表达质粒 pGAPZαA 和 X-33 毕赤酵母(Invitrogen)为本实验室-80℃保存。*E.coli* Competent Cells Top10 购自北京天根生物科技有限公司。WSSV 粗提液为本实验室-80℃保存。

1.1.2 实验试剂 pEASY-T1 simple Cloning Kit 和 T4 DNA Ligase 购于北京全式金生物技术有限公司; Zeocin 购自 Invitrogen 公司; 快速琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、2 kb/5 kb DNA Marker、高纯度质粒小提试剂盒、常规 PCR 用 2×Es Taq MasterMix 和蛋白银染试剂盒购自康为世纪生物公司(CWBIO, 北京); 限制性内切酶 *EcoR* I、*Xba* I 和 *Avr* II 购于 TaKaRa 公司; 葡萄糖为 AMRESCO 公司产品; 酵母提取物(Yeast Extract)、胰蛋白胨(Tryptone)和琼脂粉均购于 BBI 公司,其他均为国药分析纯。

1.1.3 引物设计 根据 NCBI 中提交的 WSSV 的全基因组 cDNA 序列(GenBank: AF332093.3), 设计含 *EcoR* I 和 *Xba* I 酶切位点的 VP28 基因引物 xVP28-F、xVP28-R, VP26 基因引物 xVP26-F、xVP26-R。根据 Invitrogen 公司 pGAPZαA 手册提供的引物序列 pGAP-F、AOX1-R, 委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成, xVP28-F(5'-3'): CCGGAATTC-ATGGATCTTTCTTTCAC, xVP28-R(5'-3'): GCTCTAG-ATTACTCGGTCTCAGTGC。xVP26-F(5'-3'): CCGGA-ATTCATGGAATTTGGCAACC, xVP26-R(5'-3'): GCTCTAGATTACTTCTTCTTGATTTTCG。pGAP-F(5'-3'): GTCCCTATTCAATCAATTGAA, AOX1-R(5'-3'): GCAAAATGGC ATTCTGACATCC。引物中加下划线部分序列分别为 *EcoR* I、*Xba* I 酶切识别位点,且在酶切位点前引入了保护碱基。

1.2 方法

1.2.1 VP28 和 VP26 基因的获得 取-80℃保存的 WSSV 粗提液作为模板,以引物对 xVP28-F/xVP28-R 和 xVP26-F/xVP26-R 分别进行普通 PCR 扩增,反应体积为 50 μl,反应条件为: 94℃预变性 5 min; 94℃

变性 30 s, 62℃/58℃退火 30 s(VP28/VP26), 72℃延伸 1 min, 35 个循环; 72℃延伸 10 min。采用快速琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收 VP28 和 VP26 目的片段。

1.2.2 pGAPZαA 目的基因重组表达载体的构建

使用 *EcoR* I 和 *Xba* I 对空载 pGAPZαA、VP28 和 VP26 基因进行双酶切,切胶回收后 T4 连接酶于 25℃连接 30 min。转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞,在含 25 μg/ml Zeocin LB 平板上进行抗性筛选,挑取阳性克隆委托生工生物工程(上海)股份有限公司测序,将测序正确的重组表达质粒分别命名为 pGAPZαA、pGAPZαA-VP28 和 pGAPZαA-VP26。

1.2.3 重组表达质粒电转化毕赤酵母 使用 *Avr* II 酶切线性化重组质粒 pGAPZαA、pGAPZαA-VP28 和 pGAPZαA-VP26。参照 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册制备 X-33 酵母感受态细胞。将线性化质粒电击转化 X-33 酵母,然后涂布于含 100 μg/ml Zeocin YPDS 平板上,30℃培养 3 d 左右,筛选阳性克隆。提取阳性酵母基因组 DNA 作为模板,以 pGAP-F 和 AOX1-R 作为上下游引物进行普通 PCR 扩增,阳性重组酵母分别为 X-33/pGAPZαA-VP28 和 X-33/pGAPZαA-VP26, X-33/pGAPZαA 作为空白对照。

1.2.4 重组酵母的表达与检测 挑取阳性重组酵母分别接种至 5 ml Zeocin 抗性的 YPD 液体培养基中,在 30℃、250 r/min 的条件下过夜培养。取 200 μl 上述活化菌液接种至装有 50 ml 新鲜 YPD 培养基的 250 ml 三角摇瓶中,30℃、250 r/min 振荡培养 72 h。4℃、12000×g 离心 3 min,上清液经液氮速冻后,保存于-80℃冰箱。

分别取 40 μl X-33/pGAPZαA-VP28、X-33/pGAPZαA-VP26 和 X-33/pGAPZαA 蛋白发酵上清液,加入 10 μl 5×蛋白质上样缓冲液,混匀后,99℃金属浴 10 min,然后 12000×g 离心 2 min,取离心后的上清液上样,取 5 μl 蛋白质分子量标准作为分子量参照,进行 SDS-PAGE 蛋白质电泳。电泳结束后,分别采用 R-250 考马斯亮蓝染色和蛋白质银染来检测目的蛋白。

2 结果

2.1 VP28 和 VP26 基因的扩增

VP28 和 VP26 的基因是以 WSSV 的 DNA 粗提液为模板,进行普通 PCR 扩增得到的,琼脂糖凝胶电泳结果如图 1 所示,在 500-750 bp 之间有明显的条带,这与预测的 VP28 和 VP26 基因的片段大小均为 632 bp 相符。

2.2 pGAPZαA-VP28 和 pGAPZαA-VP26 重组质粒的鉴定

用 T4 DNA Ligase 将酶切后的片段与具有相同黏

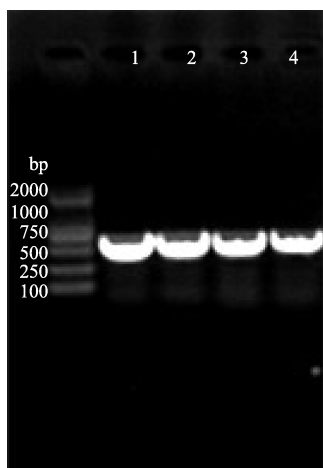


图 1 VP28 和 VP26 PCR 扩增结果
Fig.1 PCR amplification of VP28 and VP26 gene

1-2: VP28; 3-4: VP26

性末端的 pGAPZaA 表达载体连接, 从而构建好重组表达载体, 将得到的连接产物转化大肠杆菌 Top10, 经 Zeocin 抗性筛选后, 挑取抗性单克隆进行菌落 PCR 鉴定, PCR 产物电泳结果见图 2, 与目的条带应为 1172 bp 的理论值相符。取阳性克隆测序, 测序结果经 MEGA 5.05 软件分析, 可证明重组表达载体序列完全正确, 无移码错配。

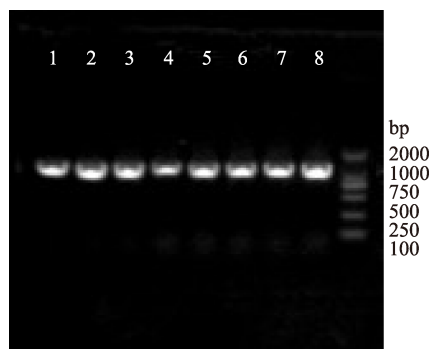


图 2 重组质粒菌落 PCR
Fig.2 PCR identification of the recombinant plasmid

1-4: pGAPZaA-VP28; 5-8: pGAPZaA-VP26

2.3 重组酵母发酵上清液 SDS-PAGE 电泳考染结果

挑取阳性酵母转化子进行发酵, 发酵上清液用于蛋白质凝胶电泳, 电泳结束后采用考马斯亮蓝 R-250 染色, 染色结果见图 3, 结果显示, 与空载 pGAPZaA 相比, 含有 VP28 和 VP26 目的基因的酵母上清液电泳没有特异的条带。因此, 需要采用更灵敏的检测方法来原因目的蛋白是否成功表达。

2.4 重组酵母发酵上清液 SDS-PAGE 电泳银染结果

利用蛋白质银染法来进一步检测酵母发酵上清液

中的目的蛋白, 银染结果见图 4, 与空载 pGAPZaA 酵母表达上清液组相比, pGAPZaA-VP28 和 pGAPZaA-VP26 酵母表达上清液组在箭头所指的平行位置有明显的特异性条带。根据蛋白分子量标准预测 VP28 和 VP26 的蛋白分子量在 32 kDa 左右。

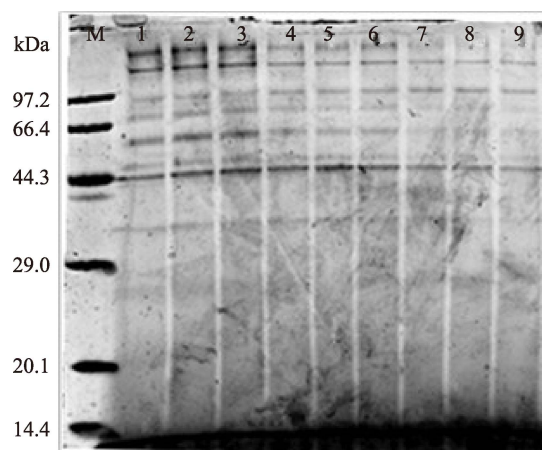


图 3 VP28、VP26 和空载重组酵母
SDS-PAGE 电泳考染结果
Fig.3 SDS-PAGE analysis (R-250 staining) of the VP28 and VP26 recombinant protein expressed in X-33

1-3: X-33/pGAPZaA-VP28; 4-6: X-33/pGAPZaA-VP26;
7-9: X-33/pGAPZaA

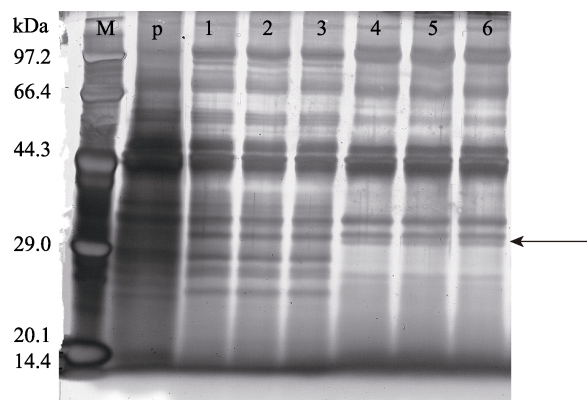


图 4 重组酵母 SDS-PAGE 电泳银染结果
Fig.4 SDS-PAGE analysis (silver staining) of the VP28 and VP26 recombinant protein expressed in X-33

P: X-33/pGAPZaA; 1-3: X-33/pGAPZaA-VP28;
4-6: X-33/pGAPZaA-VP26

3 讨论

随着基因工程和生物技术的发展, 在体外表达功能蛋白已经成为一种高效可行的获取蛋白疫苗的方法。在对虾白斑综合征防治的研究中, WSSV 重组蛋白可以诱发虾体产生抗 WSSV 侵染反应的结果已被许多研究者所证明, 而这些 WSSV 重组蛋白被称为

蛋白质亚单位疫苗,其中研究最多的是 VP28 病毒囊膜蛋白。魏克强等(2005)利用杆状病毒感染家蚕蛹来成功表达 VP28 蛋白, Fu 等(2008)构建了 pBS-H1-VP28 枯草芽孢杆菌表达载体,并在枯草芽孢杆菌成功表达 VP28 蛋白, Satoh 等(2008)利用大肠杆菌成功表达了 VP28 和 VP26 蛋白,养殖实验均证明 WSSV 重组蛋白具有增强虾体抗 WSSV 感染的能力。

本研究使用毕赤酵母表达系统分泌性表达 VP28 和 VP26 目的蛋白,选用的表达载体是 pGAPZaA,它属于组成型的表达载体,因为该表达载体的启动子是 pGAP(三磷酸甘油醛脱氢酶启动子),使用该启动子表达目的蛋白时不需要使用甲醇诱导。毕赤酵母表达系统属于真核表达系统,对翻译后的蛋白质可以进行一定的加工,有利于真核生物蛋白的表达和活性的保持,优于原核表达系统。此外,表达产物可以分泌到细胞外,便于目的蛋白的纯化与分离,适合规模化生产。目前,利用该表达系统已经成功表达很多功能蛋白,如 β -半乳糖苷酶、 β -葡萄糖醛酸酶、羧肽酶 B 和羧酸酯酶等(Waterham *et al*, 1997; Sears *et al*, 1998; 张平涛, 2008¹⁾; Delroisse *et al*, 2005)。使用组成型表达系统不需要更换碳源,发酵周期短,且可以采用连续发酵的方式进行大规模发酵,这些都给酵母发酵产业带来了新的视角和机遇。但是,使用毕赤酵母组成型表达系统外源蛋白时,有一个最主要的限制,就是本系统不能用于表达对酵母细胞有害的蛋白质。此外,毕赤酵母组成型表达系统能否高效分泌性表达外源蛋白,还与目的基因插入酵母基因组的位置与拷贝数、选用何种信号肽序列以及酵母培养条件(如温度、pH 值、溶氧和营养物等)等有密切关系。

本研究首次尝试在毕赤酵母中组成型分泌表达 VP28 和 VP26 目的蛋白,经检测成功表达,但目的蛋白的表达量较低,推测有以下原因:(1)发酵条件不合适:实验采用摇瓶小量发酵,无法控制发酵液的 pH 值、溶氧量以及营养物质的供给;(2)没有筛选到高效表达的菌株:目的基因不同拷贝数的插入,甚至不同的阳性菌株,目的蛋白的表达量都有可能不同,实验缺乏有效的检测高效表达菌株的方法;(3)信号肽选用不合适:本研究采用的是酵母本身的信号肽序列— α -交换因子,该信号肽可能不适合引导 VP28 和 VP26 分泌表达;(4)VP28 和 VP26 蛋白本身可能不适合在毕赤酵母中组成型分泌表达。因此,还需要大量相关的研究来解释这一现象的真实原因。尽管如此,

本研究还是能为研究 WSSV 蛋白亚单位疫苗的研究提供实践经验和基础数据,为 WSSV 蛋白亚单位疫苗的规模化使用的前景奠定一些基础。

参 考 文 献

- 丁晶, 彦波, 傅玲琳. 以枯草芽孢杆菌递呈 VP28 对南美白对虾免疫相关基因表达和细胞特异性吞噬的影响. 水生生物学报, 2013, 37(4): 705-711
- 陈文博, 侯林, 刘庆慧. 对虾白斑综合征病毒亚单位疫苗研究进展. 动物医学进展, 2009, 29(12): 73-76
- 杨海, 王芳宇. DNA 疫苗的研究进展. 中国畜牧兽医, 2013, 40(1): 72-76
- 魏克强, 许梓荣. 家蚕蛹表达的重组 VP28 疫苗对克氏原螯虾的抗病毒保护效应. 实验生物学报, 2005, 38(3): 190-198
- Chang YS, Liu WJ, Lee CC, *et al*. A 3D model of the membrane protein complex formed by the white spot syndrome virus structural proteins. PLoS One, 2010, 5(5): e10718
- Delroisse JM, Dannau M, Gilsoul JJ, *et al*. Expression of a synthetic gene encoding a *Tribolium castaneum* carboxylesterase in *Pichia pastoris*. Protein Express Purif, 2005, 42(2): 286-294
- Fu LL, Li WF, Du HH, *et al*. Oral vaccination with envelope protein VP28 against white spot syndrome virus in *Procambarus clarkii* using *Bacillus subtilis* as delivery vehicles. Lett Appl Microbiol, 2008, 46(5): 581-586
- Leu JH, Yang F, Zhang X, *et al*. Whispovirus/Lesser Known Large dsDNA Viruses. Springer Berlin Heidelberg, 2009: 197-227
- Mu Y, Lan JF, Zhang XW, *et al*. A vector that expresses VP28 of WSSV can protect red swamp crayfish from white spot disease. Dev Comp Immunol, 2012, 36(2): 442-449
- Rajeshkumar S, Venkatesan C, Sarathi M, *et al*. Oral delivery of DNA construct using chitosan nanoparticles to protect the shrimp from white spot syndrome virus (WSSV). Fish Shellfish Immunol, 2009, 26(3): 429-437
- Satoh J, Nishizawa T, Yoshimizu M. Protection against white spot syndrome virus (WSSV) infection in kuruma shrimp orally vaccinated with WSSV rVP26 and rVP28. Dis Aquat Organ, 2008, 82(2): 89-96
- Sears IB, O'Connor J, Rossanese OW, *et al*. A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris*. Yeast, 1998, 14(8): 783-790
- Tsai JM, Wang HC, Leu JH, *et al*. Identification of the nucleocapsid, tegument, and envelope proteins of the shrimp white spot syndrome virus virion. J Virol, 2006, 80(6): 3021-3029
- Wan Q, Xu L, Yang F. VP26 of white spot syndrome virus

1) 张平涛. 鼠羧肽酶原 B 和蛇毒金属蛋白酶 Alfineprase 两种蛋白在毕赤酵母中表达研究. 厦门大学硕士研究生学位论文, 2008

functions as a linker protein between the envelope and nucleocapsid of virions by binding with VP51. *J Virol*, 2008, 82(24): 12598–12601

Waterham HR, Digan ME, Koutz PJ, *et al.* Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene*, 1997, 186: 37–44

(编辑 冯小花)

Secretive Expression of White Spot Syndrome Virus Envelope Proteins VP28 and VP26 in *Pichia pastoris* Induced by Constitutive Promoter

GENG Xiaoxue, WANG Xiaoxia, ZHOU Yi, XU Wei, ZHANG Wenbing^①, MAI Kangsen

(Key Laboratory of Aquaculture Nutrition and Feeds, Ministry of Agriculture; Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education; Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003)

Abstract WSSV has been a globally recognized highly harmful pathogen in shrimp farming industry that causes tremendous economic loss. The envelope proteins of WSSV, VP28 and VP26, play important roles in interacting with host cells, initiating virus infection and mediating virus intrusion. In this study, we used pGAPZαA as the expression vector and X-33 *Pichia pastoris* as the host cell to express VP28 and VP26 in a secretive manner. The coding sequences of VP28 and VP26 (GenBank: AF332093.3) were amplified from WSSV using PCR, and the sequences of *EcoR* I (GAATTC) and *Xba* I (TCTAGA) were added to the 5' and 3' ends of the target genes. The purified PCR products were then cloned into the *EcoR* I/*Xba* I sites of the pGAPZαA vector. Sequencing analysis verified whether the target genes were correctly inserted into the reading frame. The construct was linearized by *Bln* I (*Avr* II) and then was integrated into *P. pastoris* X-33 through electroporation while being screened by Zeocin. The expressed proteins were identified with SDS-PAGE. The VP28 and VP26 recombinant proteins could not be detected by coomassie brilliant blue R250 staining, however, the bands of the fusion proteins appeared after silver staining. The sizes of VP28 and VP26 fusion proteins were about 32 kDa. These results suggest that the *P. pastoris* system was effective in expressing WSSV envelope proteins VP28 and VP26, although the expression level was not sufficient. Nonetheless, our study still established a novel tool for the study of subunit vaccine, and provided basic information for the large scale vaccine production.

Key words White spot syndrome virus; VP28; VP26; Recombinant expression; *Pichia pastoris*

① Corresponding author: ZHANG Wenbing, E-mail: wzhang@ouc.edu.cn

2014 年中国不同地区对虾白斑综合征病毒 ORF14/15 和 ORF23/24 缺失区序列比较*

孙新颖^{1,3} 刘庆慧^{1,2①} 万晓媛^{1,2} 黄 健^{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. 上海海洋大学 上海 201306)

摘要 对虾养殖面临诸多病害威胁,对虾白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)是养殖对虾主要病原之一,WSSV 不同地理株的变异可能导致 WSSV 毒力的变化。为了解 2014 年中国大部分地区 WSSV ORF14/15 和 ORF23/24 的变异情况,本研究选择 2014 年 1 月–8 月期间采集的 48 份 WSSV 阳性样本,用特异引物扩增 ORF14/15 和 ORF23/24 片段,连接于 T 载体,转化至 Top10 中,筛选阳性克隆,测序分析不同样本之间的缺失差异。结果显示,能够扩增 ORF14/15 和 ORF23/24 样品的比例分别为 43.75%和 33.33%。在 ORF14/15 扩增中,分别扩增出 1260 bp、1270 bp、1892 bp 和 2662 bp 片段,与 TH-96-II 比对共有 4 种缺失情况,即缺失 6540 bp、6530 bp、5908 bp 和 5138 bp。而在 ORF23/24 扩增中,分别扩增出 1140 bp 和 1146 bp 片段,与中国台湾株(TW)比对有两种缺失情况,即缺失 12070 bp 和 12064 bp。研究结果表明,WSSV 在中国大部分地区存在一定程度的变异,而不同毒株之间在 ORF14/15 可变区差异比较明显,在 ORF23/24 可变区差异不大,但均具有大片段缺失。

关键词 WSSV; ORF14/15; ORF23/24; 序列分析

中图分类号 S945 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)04-0140-07

对虾白斑综合征病毒(White Spot Syndrome Virus, WSSV)作为线头病毒科(Nimaviridae)、白斑病毒属(Whispovirus)的唯一成员(Vlak *et al.*, 2005),由其引起的白斑病已经成为对虾养殖中面临的最主要病害。在 1991–1992 年间,WSSV 首次被报道发现于中国台湾,之后迅速影响至东南亚其他地区(Flegel, 1997),而在 1994 年,在印度等南亚地区病害也呈暴发趋势(Anonymous, 1995; Pradeep *et al.*, 2008)。WSSV 自此开始在全球对虾养殖业中迅速传播,在过去的几十年中,对很多国家的对虾养殖产生很大的影响(Inouye *et al.*, 1994; Chou *et al.*, 1995; Cai *et al.*, 1995; Wongteerasupaya *et al.*, 1995; Kasornchandra *et al.*, 1998; Mohan *et al.*, 1998;

Nadala *et al.*, 1998; Park *et al.*, 1998; Magbanua *et al.*, 2000), 3–10 d 内可达 100%的致死率,造成巨大的经济损失(Lightner, 1996)。

目前,GenBank 上公布有 4 种不同 WSSV 病毒株的基因组全序列,分别是中国台湾株(TW, AF440570) (307287 bp)、泰国株(TH, AF369029) (292967 bp)、中国株(CN, AF332093) (305107 bp)和韩国株(KR, JX515788)。据报道,假定的祖先株约 312 kb,最大基因组的 WSSV-TH-96-II (AY753327)则起源于泰国株(Pradeep *et al.*, 2008)。各种基因组序列之间具有高度的相似度,而其差异主要体现在五个方面:大序列缺失;易于发生基因重组的可变区;同源重复区内重复

* 国家重点基础研究发展计划(2012CB114401)、山东省“泰山学者”建设工程专项经费和农业部科研杰出人才和创新团队专项经费共同资助。孙新颖, E-mail: sxy16@163.com

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

收稿日期: 2015-05-27, 收修改稿日期: 2015-06-29

序列的变化;转座酶基因序列只存在于中国台湾株;单核苷酸突变(童桂香等, 2014; Marks *et al*, 2004)。

由于 WSSV 地理范围、宿主类别和致病力的差异,导致不同的毒株之间具有差异。通过对 WSSV 基因组两多态性位点分析, ORF14/15 和 ORF23/24 更易于发生缺失和重组。据此,本研究针对中国明对虾养殖不同地区自 2014 年 1 月-8 月间采集的 48 份 WSSV 阳性样本,通过特定引物扩增目的片段,测序分析比较不同地区各分离株 ORF14/15 和 ORF23/24 序列缺失情况,探究中国不同地区 WSSV 分离株 ORF14/15 和 ORF23/24 的变异,为 WSSV 分子流行病学研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 样本来源

在 2014 年 1 月-8 月 WSSV 病害暴发期间,赴河北、浙江、山东、江苏、辽宁、福建和广东等地采集对虾样品,然后置于 -20°C 的冰箱冷冻保存,其来源信息见表 1。

1.2 WSSV 核酸提取

将保存的样本取出,取约 30 mg 鳃组织,按照海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)的说明进行 DNA 提取,最后加 30 μl 65°C 预热的无菌水溶解,将提取的 DNA 样本置于 -20°C 冷冻保存待用。

1.3 PCR 检测

对 WSSV DNA 样本的检测采用套式 PCR 方法,标准按照 GB/T 28630.2-2012 白斑综合征(WSD)诊断规程第 2 部分套式 PCR 检测法。PCR 产物通过用 $1\times\text{TAE}$ 电泳缓冲液配制的 1%的琼脂糖凝胶进行电泳分析。

1.4 WSSV 缺失区 ORF14/15 和 ORF23/24 扩增

将得到的 WSSV 核酸通过特定的引物进行 ORF14/15 和 ORF23/24 目的片段的扩增。实验中 25 μl 的体系包括: 17.3 μl 双蒸水, 2 μl 脱氧核酸混合物, 2.5 μl $10\times\text{PCR}$ 反应缓冲液(含 Mg^{2+}), 正向和反向引物各 1 μl , 0.2 μl Ex *Taq* DNA 聚合酶, 1 μl 待测核酸。目的片段扩增中的 PCR 条件以及引物序列见表 2 (Marks *et al*, 2005; Dieu *et al*, 2010; Tang *et al*, 2013)。

1.5 目的片段克隆及序列比对分析

扩增后的 PCR 产物经 $1\times\text{TBE}$ 电泳缓冲液配制的 1%琼脂糖凝胶电泳,将目的条带切下,用胶回收试剂盒获得目的 DNA,经 NanoDrop 2000 测定浓度后,

通过 pMD[®]18-T Vector 进行连接转化,将显示阳性、条带单一的菌液进行测序。测得的序列与 NCBI 数据库进行比对,其中,将 ORF14/15 与 TH-96-II 株比对, ORF23/24 与中国台湾株(TW)比对。

2 结果与分析

2.1 PCR 检测结果

对于提取的 WSSV 核酸,通过在套式 PCR 中的检测,6 份核酸样品在第一轮中呈阳性,42 份核酸样品在第二轮中呈阳性。

2.2 ORF14/15 扩增结果

通过对 WSSV 样本的扩增,共有 21 份(2#、3#、4#、5#、6#、7#、13#、23#、24#、27#、30#、31#、32#、33#、37#、40#、42#、44#、45#、46#和 47#) 样本出现了 ORF14/15 的检测条带,其能够成功扩增样品的比例为 43.75%。其中,13#、23#和 24#条带明显比较大,并且在 3#、44#和 47#一个泳道内均出现了两条大小不一的条带,这可能是由样品中 DNA 的断裂或片段不完整造成。来源于浙江宁波和湖州、山东即墨、日照和青岛、江苏如东、福建漳浦和广东湛江地区的样品未检出条带(图 1)。

2.3 ORF23/24 扩增结果

在 ORF23/24 扩增中,有 16 份(2#、3#、5#、6#、7#、23#、24#、27#、38#、39#、40#、41#、42#、44#和 48#)样本可以扩增出条带,能够成功扩增样品的比例为 33.33%,所有样本扩增中的条带大小基本没有差异。浙江湖州和宁波、山东日照、即墨和青岛、江苏如东和赣榆、福建漳浦未有 ORF23/24 扩出(图 2)。

2.4 序列比对

在所有样本的 ORF14/15 扩增中,共有 4 种大小不一的片段扩增出来,即 1260 bp (河北曹妃甸)、1270 bp (浙江温州、广州江门、河北黄骅)、1892 bp (河北曹妃甸、江苏南京)和 2662 bp (江苏赣榆、辽宁、福建厦门),同推测有最长序列的 TH-96-II 比对,分别缺失 6540 bp、6530 bp、5908 bp 和 5138 bp (图 4)。而在 ORF23/24 扩增中,片段大小只有微小差异,分别为 1140 bp (河北曹妃甸、黄骅)和 1146 bp (辽宁、福建厦门、江苏南京、广州湛江和江门、浙江温州)不等,两种序列中间对应位置相差 6 个碱基,即 GATATC (图 3)。同中国台湾株进行对比,缺失的片段大小分别为 12070 bp 和 12064 bp (图 5)。

表1 样本采集信息
Tab.1 Information of sampling

序号 Number	样品编号 Sample Number	产地 Site	品种 Species
1	JC140104001	河北曹妃甸 Caofeidian Hebei	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>
2	JC140104002	河北曹妃甸 Caofeidian Hebei	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
3	JC140104003	河北曹妃甸 Caofeidian Hebei	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
4	JC140104004	河北曹妃甸 Caofeidian Hebei	日本囊对虾 <i>Penaeus japonicus</i>
5	JC140104005	河北曹妃甸 Caofeidian Hebei	日本囊对虾 <i>P. japonicus</i>
6	JC140104006	河北曹妃甸 Caofeidian Hebei	日本囊对虾 <i>P. japonicus</i>
7	JC140104007	河北曹妃甸 Caofeidian Hebei	日本囊对虾 <i>P. japonicus</i>
8	JC140409002	浙江宁波 Ningbo Zhejiang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
9	JC140416001	山东即墨 Jimo Shandong	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
10	JC140418001	山东日照 Rizhao Shandong	日本囊对虾 <i>P. japonicus</i>
11	JC140418010	江苏如东 Rudong Jiangsu	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
12	JC140418013	江苏赣榆 Ganyu Jiangsu	中国明对虾 <i>Fenneropenaeus chinensis</i>
13	JC140418014	江苏赣榆 Ganyu Jiangsu	脊尾白虾 <i>Palaemon carinicauda</i>
14	JC140418015	江苏如东 Rudong Jiangsu	梭子蟹 <i>Portunidae</i>
15	JC140419001	浙江湖州 Huzhou Zhejiang	罗氏沼虾 <i>Macrobrachium rosenbergii</i>
16	JC140419002	浙江湖州 Huzhou Zhejiang	罗氏沼虾 <i>M. rosenbergii</i>
17	JC140419003	浙江湖州 Huzhou Zhejiang	罗氏沼虾 <i>M. rosenbergii</i>
18	JC140419004	浙江湖州 Huzhou Zhejiang	罗氏沼虾 <i>M. rosenbergii</i>
19	JC140419005	浙江湖州 Huzhou Zhejiang	罗氏沼虾 <i>M. rosenbergii</i>
20	JC140419009	浙江湖州 Huzhou Zhejiang	罗氏沼虾 <i>M. rosenbergii</i>
21	JC140419010	浙江湖州 Huzhou Zhejiang	罗氏沼虾 <i>M. rosenbergii</i>
22	JC140422002	辽宁 Liaoning	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
23	JC140422003	辽宁 Liaoning	中国明对虾 <i>L. vannamei</i>
24	JC140428002	福建厦门 Xiamen Fujian	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
25	JC140428003	福建漳浦 Zhangpu Fujian	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
26	JC140508001	山东青岛 Qingdao Shandong	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
27	JC140522002	江苏南京 Nanjing Jiangsu	克氏原螯虾 <i>Procambarus clarkii</i>
28	JC140522003	江苏南京 Nanjing Jiangsu	克氏原螯虾 <i>P. clarkii</i>
29	JC140522004	浙江温州 Wenzhou Zhejiang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
30	JC140522005	浙江温州 Wenzhou Zhejiang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
31	JC140522006	浙江温州 Wenzhou Zhejiang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
32	JC140522007	浙江温州 Wenzhou Zhejiang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
33	JC140522008	浙江温州 Wenzhou Zhejiang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
34	JC140522009	浙江温州 Wenzhou Zhejiang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
35	JC140522010	浙江温州 Wenzhou Zhejiang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
36	JC140522011	浙江温州 Wenzhou Zhejiang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
37	JC140522012	浙江温州 Wenzhou Zhejiang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
38	JC140522014	浙江温州 Wenzhou Zhejiang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
39	JC140522015	浙江温州 Wenzhou Zhejiang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
40	JC140522016	浙江温州 Wenzhou Zhejiang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
41	JC140625002	广东湛江 Zhanjiang Guangdong	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
42	JC140625008	广东江门 Jiangmen Guangdong	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
43	JC140716007	山东青岛 Shandong Qingdao	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
44	JC140801003	河北黄骅 Huanghua Hebei	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
45	JC140801004	河北黄骅 Huanghua Hebei	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
46	JC140801005	河北黄骅 Huanghua Hebei	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
47	JC140801006	河北黄骅 Huanghua Hebei	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
48	JC140801007	河北黄骅 Huanghua Hebei	中国明对虾 <i>F. chinensis</i>

表 2 PCR 引物与反应条件
Tab.2 PCR primers and cycling conditions

引物 Primer	序列 Sequence	预变性 Initial denaturation	变性 Denaturation	延伸 Extension
ORF-14/15F	AATATGGAACGACGGGTG	94℃ 5min	35 个循环: 94℃ 30 s,	72℃ 7 min
ORF-14/15R	GACCAGCGCCTCTTCAG		55℃ 30 s, 72℃ 2 min	
ORF-23/24F	GTAGTGCATGTTTCTCTAAC	94℃ 5min	35 个循环: 94℃ 30 s,	72℃ 7 min
ORF-23/24R	GTAAGTTTATTGCTGAGAAG		51℃ 30 s, 72℃ 1.5 min	

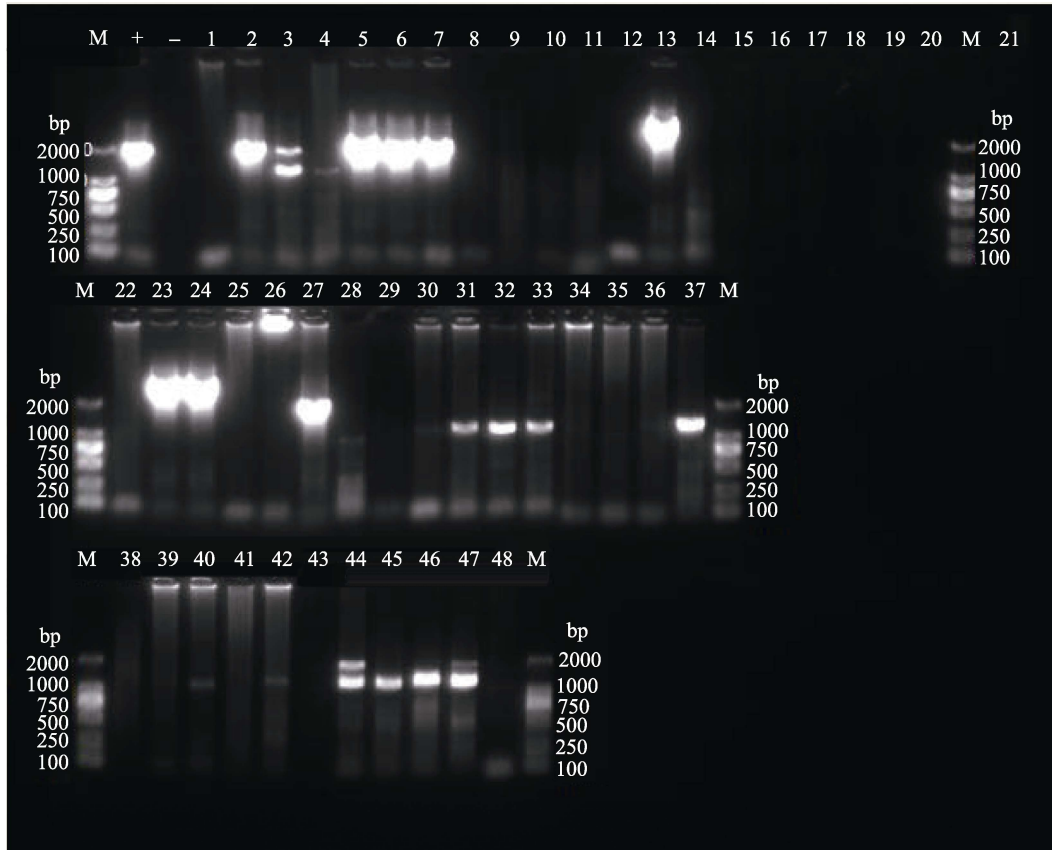


图 1 ORF14/15 扩增

Fig.1 ORF14/15 amplification

M: DNA Marker DL2000; +: 阳性对照; -: 阴性对照; 1-48: 样本编号

M: DNA Marker DL2000; +: positive control; -: negative control; 1-48: number of samples

3 讨论

比较 ORF14/15 和 ORF23/24 扩增结果, 可以看出, 在河北曹妃甸和黄骅、浙江温州、江苏南京、辽宁的部分样本和广东江门、福建厦门地区样本中, ORF14/15 和 ORF23/24 片段均有扩增, 江苏赣榆地区样本中只有 ORF14/15 的扩增片段。除此之外的浙江宁波和湖州、山东即墨、日照和青岛、江苏如东和福建漳浦地区的所有样本两次扩增均未有相应条带出现, 其一致性较高。

已报道亚洲 4 种毒株, 即中国台湾株、中国珠、

泰国株、韩国株的 ORF14/15 片段分别缺失 5138 bp、5132 bp、5316 bp 和 5721 bp。由于 TH-96-II 株 (AY753327) ORF14/15 片段最为完整, 所以通常将 ORF14/15 与 TH-96-II 株进行比对。在 ORF14/15 扩增中, 可扩增出的片段序列均含有前 732 个碱基, 说明这一段 732 bp 的序列有较高的保守性, 出现缺失差异的位置主要位于全长片段后段部分。河北黄骅、曹妃甸、浙江温州和广东江门地区的毒株出现较大片段的缺失, 最大缺失 6540 bp。在江苏赣榆、辽宁和福建厦门地区出现的部分缺失为 5138 bp 的毒株与中国台湾株缺失情况一致。在 Tang 等(2013)针对马达加



图 2 ORF23/24 扩增

Fig.2 ORF23/24 amplification

M: DNA Marker DL2000; +: 阳性对照; -: 阴性对照; 1-48: 样本编号

M: DNA Marker DL2000; +; positive control; -: negative control; 1-48: number of samples

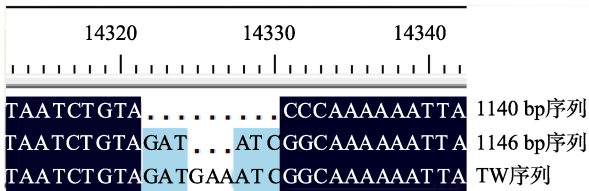


图 3 差异位置及碱基序列

Fig.3 Differing sites and nucleotide sequences

斯加岛、莫桑比亚和沙特阿拉伯地区毒株的实验中发现，序列缺失有 5950 bp，同样的缺失情况也出现在 Hoa 等(2012)对印度和越南南部地区毒株的调查中。稍微小一点的 5892 bp 缺失情况发现存在于印度 (IN-07, EF468499)和墨西哥(HQ257380, HQ257383, HQ257381)的分离株(Tang *et al*, 2013), 这与本研究中涉及到江苏南京和河北曹妃甸地区的样本缺失情况相近。在薛晖等(2011)对 2008-2010 年兴化等 6 个地区样本的调查中, 报道有 4 种缺失, 即 4751 bp、5138bp、5139 bp 和 5140 bp, 后 3 种相较于中国台湾株仅有 1 个或两个碱基的差异, 但后续的影响可能不仅如此。

在 ORF23/24 中, 共得到两种 PCR 扩增产物, 大

小分别为 1140 bp 和 1146 bp。已报道中国台湾株(TW) (AF440570)ORF23/24 片段最为完整, 因此, 通常将 ORF23/24 与中国台湾株(TW)进行比对。中国台湾株的 14322 到 14330 位置的碱基为 GATGAAATC, 在辽宁、福建厦门、江苏南京、广东湛江和江门、浙江温州地区样本扩增出的 1146 bp 的序列相较于中国台湾株缺失了 GAA 3 个碱基, 而河北曹妃甸和黄骅地区扩增出的 1140 bp 序列则缺失了 GATGAAATC 9 个碱基。二者与中国台湾株相比, 分别缺失了 12064 bp 和 12070 bp。目前, 已知的泰国株最大的缺失序列为 13120 bp, 韩国株具有中等程度的缺失, 为 5654 bp, 而中国株缺失最小, 仅 1169 bp, 本研究中的两种情况属于较大程度的片段缺失。童桂香等(2014)中的广西分离株、Tang 等(2013)中的分离株和两株印度株 (EU327499, EU327500)缺失均为 10971 bp, 在 Pradeep 等(2008)所采集的有关印度地区分离株有 8539 bp 的片段缺失。总的来说, ORF23/24 这段的缺失长度变异较多, 在 1-13 kb 之间不等。

目前为止, Marks 等(2005)以两株最大(约 312 kb)

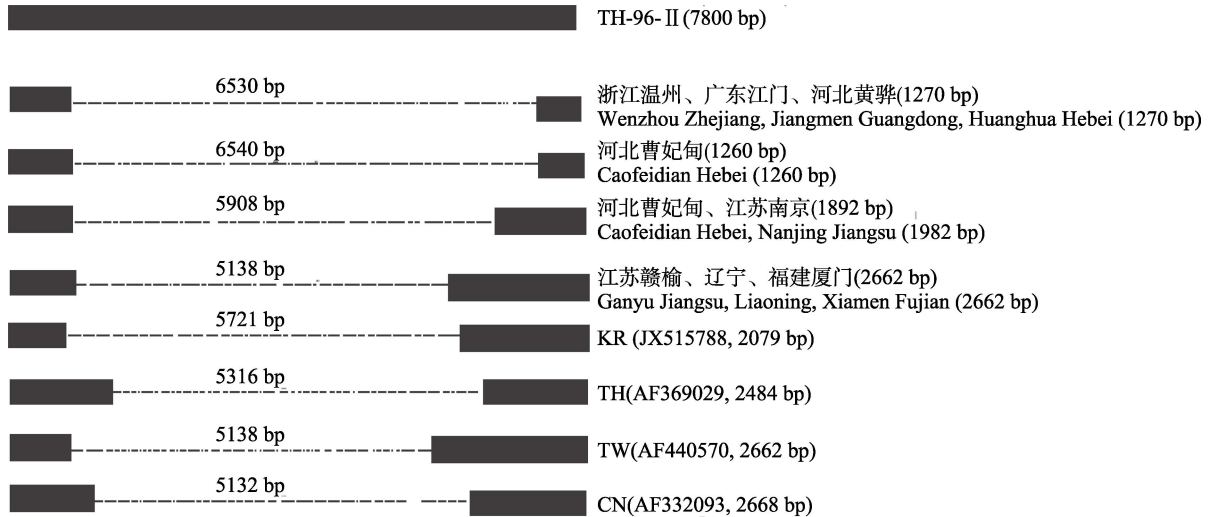


图 4 WSSV 不同毒株 ORF14/15 区域的序列比对

Fig.4 Comparison of missing regions of ORF14/15 of different WSSV strains

左右两边的矩形表示用引物扩增出的序列，中间的虚线表示与 TW- II 相比缺失的部分

Rectangles denoted amplified sequences. Dash lines denoted missing sequences compared to TH-96- II strain

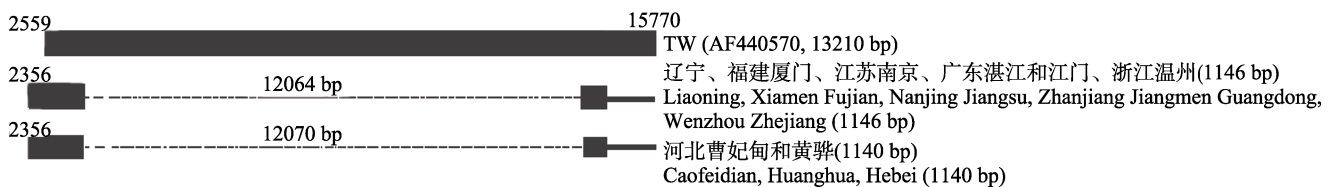


图 5 WSSV 不同毒株 ORF23/24 区域的序列比对

Fig.5 Comparison of missing regions of ORF23/24 of different WSSV strains

右边粗实线表示引物扩增之外的序列，左右两边的矩形表示用引物扩增出的序列，中间的细虚线表示与中国台湾株(TW, AF440570)相比缺失的部分，矩形两边的数字表示与 TW 对应的碱基位置

The right bold lines denoted the region outside the amplified fragments. The right and left rectangles denoted amplified sequences. Dash lines denoted missing sequences compared to the TW strain (AF440570). Numbers on top of the blocks showed the starting and ending positions corresponding to the TW strain (AF440570)

和最小(约 293 kb)的分离株为实验样本,用 RFLP 方法呈现出二者之间的差异,同时两分离株之间的毒性差异也已被观测到,即较小的分离株具有更强的毒性,Zwart 等(2010)也证明如此情况。本研究发现,WSSV 毒株在可变区 ORF14/15 和 ORF23/24 的进化表现出更大程度的缺失,ORF14/15 和 ORF23/24 的缺失没有必然联系,推测两区域的缺失进化是为使病毒基因组更加稳定,从而更好地适应外部环境。有关 ORF14/15 和 ORF23/24 变异与缺失的研究,对追溯 WSSV 毒株世系和发展起到一定帮助,同时为确定“基因组缺失导致更高毒性”是否正确提供了一定的材料依据。

参 考 文 献

童桂香,黎小正,韦信贤,等. 白斑综合征病毒广西株缺失区基因的比较分析. 上海海洋大学学报, 2004, 23(1): 8-13
薛晖,王晓丰,丁正峰,等. 白斑综合征病毒江苏分离株变异

区和缺失区基因的序列比较. 中国水产科学, 2011, 18(5): 1196-1201
Anonymous. SEMBV—an emerging viral threat to cultured shrimp in Asia. CP Shrimp New 3, 1995, 2-3
Cai SL, Huang J, Wang CM, *et al.* Epidemiological studies on the explosive epidemic disease of prawn in 1993-1994. J China Fish, 1995, 19(2): 112-117
Chou HY, Huang CY, Wang CH, *et al.* Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. Dis Aquat Org, 1995, 23(3): 165-173
Dieu BTM, Marks H, Zwart MP, *et al.* Evaluation of white spot syndrome virus variable DNA loci as molecular markers of virus spread at intermediate spatiotemporal scales. J Gen Virol, 2010, 91(5): 1164-1172
Flegel TW. Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. World J Microbiol Biotechnol, 1997, 13(4): 433-442
Hoa TTT, Zwart MP, Phuong NT, *et al.* Indel-II region deletion sizes in the white spot syndrome virus genome correlate with shrimp disease outbreaks in southern Vietnam. Dis Aquat Org, 2012, 99(2): 153-162
Inouye K, Miwa S, Oseko N, *et al.* Mass mortalities of cultured Kuruma shrimp, *Penaeus japonicus* in Japan in 1993,

- electron-microscope evidence of the causative virus. *Fish Pathol*, 1994, 29(2): 149–158
- Kasornchandra J, Boonyaratpalin S, Itami T. Detection of white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Asia, microscopic observation and polymerase chain reaction. *Aquaculture*, 1998, 164(1–4): 243–251
- Lightner DV. A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. Special publication of the World Aquaculture Society, LA, Baton Rouge, 1996
- Magbanua FO, Natividad KT, Migo VP, *et al.* White spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* in the Philippines. *Dis Aquat Org*, 2000, 42(1): 77–82
- Marks H, Goldbach RW, Vlak JM, *et al.* Genetic variation among isolates of white spot syndrome virus. *Arch Virol*, 2004, 149(4): 674–697
- Marks H, van Duijse JJA, Zuidema D, *et al.* Fitness and virulence of an ancestral white spot syndrome virus isolate from shrimp. *Virus Res*, 2005, 110(1): 9–20
- Mohan CV, Shankar KM, Kulkarni S, *et al.* Histopathology of cultured shrimp showing gross signs of yellow head syndrome and white spot syndrome during 1994 Indian epizootics. *Dis Aquat Org*, 1998, 34(1): 9–12
- Nadal ECB, Loh PC. A comparative study of three different isolates of white spot virus. *Dis Aquat Org*, 1998, 33(3): 231–234
- Park JH, Lee YS, Lee S, *et al.* An infectious viral disease of penaeid shrimp newly found in Korea. *Dis Aquat Org*, 1998, 34(1): 71–75
- Pradeep B, Shekar M Karunasagar I, *et al.* Characterization of variable genomic regions of Indian white spot syndrome virus. *Virology*, 2008, 376(1): 24–30
- Tang KJF, Marc LG, Lightner DV. Novel, closely related, white spot syndrome virus (WSSV) genotypes from Madagascar, Mozambique and the Kingdom of Saudi Arabia. *Dis Aquat Org*, 2013, 106(1): 1–6
- Vlak JM, Bonami JR, Flegel TW, *et al.* *Nimaviridae*. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (Eds.), *Virus Taxonomy*. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, Amsterdam, 2005, 187–192
- Wongteerasupaya C, Vickers JE, Sriurairalana S, *et al.* A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn, *Penaess monodon*. *Dis Aquat Org*, 1995, 21(2): 69–77
- Zwart MP, Dieu BTM, Hemerik L, *et al.* Evolutionary trajectory of white spot syndrome virus (WSSV) genome shrinkage during spread in Asia. *PLoS One*, 2010, 5(10): e13400

(编辑 冯小花)

Comparison of the Missing Sequences of ORF14/15 and ORF23/24 of WSSV from Different Regions of China in 2014

SUN Xinying^{1,3}, LIU Qinghui^{1,2}⊙, WAN Xiaoyuan^{1,2}, HUANG Jie^{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. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract White spot syndrome virus (WSSV) is one of the major pathogens that severely harm shrimp aquaculture. Different strains of WSSV display various virulence. In order to understand the geographic variation in fragments ORF14/15 and ORF23/24 of WSSV in China, we collected 48 samples of WSSV-infected shrimp from disease outbreak areas in 7 provinces of China between January and August in 2014. We identified the genotypes of WSSV-positive samples using PCR with ORF14/15 and ORF23/24 specific primers, and the amplified fragments were conjugated into T-vectors and transformed into the Top10 cells. We selected the positive clones and obtained their sequences. Then we compared the missing fragments of ORF14/15 and ORF23/24 from different samples with the sequences of TH-96-II and China Taiwan strain (TW, AF440570) respectively. There were 21 samples with the products of ORF14/15 amplification, and 16 samples with the products of ORF23/24 amplification. The amplification ratios of ORF14/15 and ORF23/24 were 43.75% and 33.33% respectively. There were only 4 types of ORF14/15 compared to TH-96-II. The lengths of the amplified fragments were 1260 bp, 1270 bp, 1892 bp and 2662 bp, corresponding to the missing 6540 bp, 6530 bp, 5908 bp and 5138 bp respectively compared to TH-96-II. There were two types of ORF23/24 compared to the TW strain. The lengths of the amplified fragments were 1140 bp and 1146 bp, corresponding to the missing 12070 bp and 12064 bp respectively compared to the TW strain. These results suggested a certain degree of prevalence and variation of WSSV in China. There was an obvious difference in ORF14/15 between different strains, but only a minimal difference in ORF23/24. It is most likely that the variation in the missing fragments correlates with divergent WSSV virulence in different regions, and this notion needs to be further tested.

Key words WSSV; ORF14/15; ORF23/24; Sequence analysis

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

中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) coat-ε 基因全长 cDNA 克隆及组织分布*



王修芳^{1,2} 刘庆慧^{2,3①} 吴 垠^{1①} 黄 健^{2,3}

(1. 大连海洋大学 大连 116023; 2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 青岛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 coat-ε 基因表达的蛋白是组成 COP I 的 coatomer 复合体的一个亚基, 为获得中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) coat-ε 基因全长序列, 采用 cDNA 末端快速扩增(Rapid amplification of cDNA end, RACE)技术, 扩增出 coat-ε 基因的 3'端和 5'端, 测序结果经 DNAMAN 比对拼接得出 coat-ε 基因全长, 基因全长 1402 bp, 5'非编码区(UTR) 84 bp, 3'非编码区(UTR) 310 bp, 开放阅读框 1008 bp, 预测编码 335 个氨基酸, 其中, 第 230–300 的氨基酸属于 TPR 超家族, SignalP 3.0 Server 预测氨基酸序列没有信号肽, TMHMM Server v. 2.0 分析此氨基酸不存在跨膜结构, PSORT II Prediction 预测该蛋白位于线粒体、细胞质、内质网中, 属胞内蛋白。系统进化树显示, 中国明对虾的 coat-ε 基因与节肢动物门的动物亲缘关系相近。采用实时荧光定量方法分析该基因在鳃、上皮、胃、肌肉、肝胰腺等不同组织中的相对表达, 结果显示, coat-ε 在肌肉中的相对转录表达量最高, 在鳃和附肢的表达次之。本研究获得的中国明对虾 coat-ε 全长序列, 可为该基因功能研究提供基础。

关键词 中国明对虾; coat-ε; 基因克隆; 组织分布

中图分类号 S945 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)04-0147-06

在细胞的胞吞和胞吐过程中, 会在膜上形成不同的包被小泡, 由不同的蛋白所包被, 从而特异性地完成大分子及颗粒物质的运输, 目前在细胞中发现 3 种不同类型的有被小泡: 网格蛋白有被小泡, COP II 被膜小泡, COP I 被膜小泡。它们具有不同的物质运输作用, 其中, COP I 被膜小泡主要负责将蛋白质由高尔基体运回到内质网中, 包括将外侧和内侧高尔基体中的蛋白质运回到内质网, COP I 被膜小泡在高尔基体表面的形成主要是胞浆中两大部分的聚集, 分别是 ARF 家族 G 蛋白和大小在 550 kDa 左右的 coatomer 复合体, 其中, coatomer 复合体由 α、β、β'、γ、δ、ε、ζ 7 个亚基共同组成(Waters *et al.*, 1991; Serafini *et al.*, 1991)。coatomer 复合体通过 ARF-GTP 附着于膜的表面, 然后组装形成笼型有被小泡(Bremser *et al.*, 1999;

Nickel *et al.*, 1998)。目前, COP I 笼型结构的电子显微重建以及 coatomer 复合体的晶体结构已经被报道, coatomer 复合体的 7 个亚基分别组合为两部分(βδ/γζ-COP 和 αβ'ε-COP), 而 coat-ε 是其中比较小的亚基, coat-ε 蛋白是酵母生长所必需的, 它的缺失会造成 coat-α 的不稳定(Duden *et al.*, 1998)。

研究发现, COP I 不仅在高尔基体的物质运输中发挥作用, 而且在细胞的内存作用或内存小泡的维持方面发挥作用(Styers *et al.*, 2008; Gabriely *et al.*, 2007)。COP I 在细胞表面受体的表达及细胞膜脂质成分的调节起到了重要作用(Misselwitz *et al.*, 2011)。Coatomer 复合体功能的多样性为病毒利用这一复杂蛋白提供了机会。本研究通过 cDNA 末端快速扩增(Rapid amplification of cDNA end, RACE)法扩增出中

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

① 通讯作者: 刘庆慧, 研究员, E-mail: liuqh@ysfri.ac.cn; 吴 垠, 教授, E-mail: wuyin@dlou.edu.cn

收稿日期: 2015-06-17, 收修改稿日期: 2015-07-29

国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) coat-ε 基因全序列,为进一步研究 coat-ε 基因表达蛋白甚至 COP I 被膜小泡在各种病毒侵染过程中的作用打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用中国明对虾购自山东昌邑水产养殖公司,体长 6 cm,经 PCR 检测不携带 WSSV,在(22±1)℃ 室温下的海水箱中暂养 3 d。TRIzol 试剂、pMD18-T 载体、PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒购自 TaKaRa,大肠埃希菌 Top10 感受态细胞购自 TIANGEN 公司,引物及测序均在上海生工生物技术有限公司完成,荧光定量 PCR 试剂盒购自 Roche 公司。

1.2 cDNA 合成

利用 RNAiso Plus(TaKaRa)提取中国明对虾总 RNA,经 1%琼脂糖凝胶电泳查看 RNA 的提取效果,根据 3'端 RACE 和 5'端 RACE 的不同,3'端加入 3'-CDS 合成 3' RACE cDNA 模板;5'端加入 5'-Adapter,5'-CDS 合成 5'RACE cDNA 模板。设计 3'-和 5'-RACE 特异性引物(表 1),3'端第一次扩增以混合的 UPM 和 Gsp1 为引物,反应条件:94℃,5 min;94℃ 30 s,72℃ 2 min,5 个循环;94℃ 30 s,70℃(68℃) 30 s,72℃ 2 min,5 个循环;94℃ 30 s,65℃ 30 s,72℃ 2 min,25 个循环;72℃ 5 min,4℃。以第一次 PCR 产物为模板,以 NUP 和 Gsp2 为引物,进行巢式 PCR,反应条件与第一步相同。5'端扩增在第一次扩增过程中以 UPM 和 Gsp3 为引物,巢式 PCR 扩增过程中以 UPM 和 Gsp4 为引物,反应条件与 3'端相同。

1.3 coat-ε 基因 cDNA 的克隆

3'-和 5'-RACE 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳后,条带按照 DNA 回收试剂盒(TIANGEN)说明书切胶回收,将目的片段 1 μl 与 pMD18-T(TaKaRa)载体 16℃连接 30 min,取 5 μl 连接产物加入 Top10 感受态细胞中,置于冰上 30 min,42℃热激 60 s,将连接产物转化入感受态细胞中,加入 750 μl LB 液体培养基,37℃摇菌 1 h,取 100 μl 菌液涂布在 LB(Amp+, 50 μg/ml)平板上,37℃培养 14 h,挑取单菌落,接种于 LB(Amp+, 50 μg/ml)液体培养基,在摇床上培养 4 h 后,进行菌落 PCR。经琼脂糖凝胶后,电泳条带正确的菌液送测序。

1.4 生物信息学分析

经测序获得的结果通过 DNAMAN 进行比对、拼接。完成拼接的序列通过在线 ORG Finder 找出开放阅读框,运用 Translate Tool 将开放阅读框的核苷酸序列翻译为氨基酸序列,应用 SignalP 3.0 Server 预测氨基酸序列有无信号肽,用 TMHMM Server v. 2.0 软件预测氨基酸序列有无跨膜结构,用在线软件 ProtParam tool 分析氨基酸序列组成以及等电点和分子量,用 PSORT II Prediction 预测蛋白的亚细胞定位,利用在线软件 NPS Network Protein Sequence Analysis 分析蛋白的二级结构,用三级结构预测软件 SWISS-MODEL 预测该蛋白的空间结构,应用 BLAST 比对同源氨基酸序列,并用 MEGA 5.05 构建系统发育树。

1.5 coat-ε 基因的各组织表达

分别取 3 只中国明对虾的附肢、肝胰腺、上皮、心脏、胃、肠、眼柄、肌肉、鳃、类淋巴、血淋巴组织,加入 RNAiso,依照 RNAiso 试剂盒说明书提取 RNA,采用 1.0%琼脂糖凝胶电泳与紫外分光光度计分析提取 RNA 质量和完整性。使用 PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒(TaKaRa)将提取的 RNA 反转录为 cDNA,-20℃保存备用。以得到的 cDNA 稀释 10 倍为模板,分别用 β-actin(内参)、coat 引物进行荧光定量 PCR(表 1)。qPCR 反应体系包括 SYBR Premix Ex Taq™(2×) 12.5 μl, cDNA 模板 1 μl,上下游引物各 0.5 μl(10 μmol/L),DEPC 处理水 10.5 μl。PCR 反应条件:94℃,5 min;94℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 30 s,40 个循环;65℃ 5 s,95℃ 50 s。

利用 Bio-Rad CFX Connect 自带软件,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 coat-ε 基因的相对表达量,以肝胰腺 coat-ε 转录表达作为标准 1。

表 1 引物序列
Tab.1 Sequences of the primers

名称 Name	序列 Sequence(5'-3')
Gsp1	AGTCAGATGCCCTTGAGTGCCG
Gsp2	GCAACACTCACACAGATGGCTC
Gsp3	CTCCTTACGGCAGCATCAAGACGC
Gsp4	ACGAAGTGCTCCCTCATAGTTATCC
β-actinF	CATCAAGGAGAACTGTGCT
β-actinR	GATGGAGTTGTAGGTGGTCT
CoatF	TCCTTCTATATCGGGAATTACC
CoatR	CACAATGGTTACCCTGTTACTG

2 结果

2.1 coat-ε 基因全序列分析

根据 3'端和 5'端 RACE 得到的目的片段测序结果拼接, 得出 coat-ε 基因序列全长为 1402 bp, 其中, 5'非编码区(UTR) 84 bp, 3'非编码区(UTR) 310 bp, 通过在线 ORF Finder 找出开放阅读框(ORF) 1008 bp, 编码 335 个氨基酸。在 3'非编码区内有加尾信号(AAATAA), 且 3'末端具有 polyA 尾巴。经过 DNAMAN 将 coat-ε 基因序列开放阅读框预测编码氨基酸序列(图 1)。全长序列提交 GenBank 数据库(No: KT253584)。

2.2 生物信息学分析

将中国明对虾 coat-ε 基因编码的氨基酸序列使用 BLAST 进行同源性分析, 发现其与欧洲熊蜂的同源性最高(图 2)。中国明对虾 coat-ε 基因编码的氨基

酸在 230–300 之间属于 TPR 超家族(图 3), 该蛋白质的等电点为 5.95, 分子量为 38143.25 Da, 此氨基酸序列没有信号肽和跨膜结构, 带负电荷的氨基酸(Asp+Glu)43 个, 占总蛋白的 12.8%, 带正电荷氨基酸(Arg + Lys)有 38 个, 占总蛋白的 11.3%, 蛋白序列中有 7 个半胱氨酸, 不稳定指数为 40.51, 是一种不稳定蛋白, 脂溶性为 87.4, 总平均亲水性为-0.468。预测蛋白质亚细胞定位于线粒体的可能性为 78.3%, 细胞质的可能性为 17.4%, 内质网的可能性为 4.3%, 内质网上的保留信号为: 在 C 末端有 KKXX-类似的序列, 而在该序列中 C 末端为 KQYA。二级结构分析显示, coat-εα 螺旋占比例很高, 为 55.52%, β-转角占 7.46%, 延伸链占 10.75% (图 4)。预测的中国明对虾 coat-ε 蛋白的空间结构模型见图 5。

2.3 系统进化树的构建

通过 coat-ε 全基因开放阅读框翻译, 得出预测

1	AAGCAGTGGTATCAACCCAGAGTACCGGGTGTGGTGGCCCTCTGATGCTGCCCGTAAGGAGCTGAAGACTCTCCACAGAAAGG
85	ATGCCAACACTCACACAGATGGCTCAGGCTTGGACCCACATTGCCACCGGGGGCTGACAAAAGCTGCCAGATGGCTACTACATATACC
169	AAGAGTGTGGACAAAGAACGTCTATCTGTCAACATGGCCAGCCAGGAGGTGGACGAGCTGTTCCAGGTCACGAATTCCTCTAT
253	ATCGGGCAATTAACCCAGCTGTATCAACCGCCGACGACTACAGGTCAGCTCAGCCAGGCTCCGACAGGAGGAGACAGATATCTTC
337	CTCTACCGGGCTCTCCTAGCTCAGCCGACAGTATGGAGTGGTTCAGAGTGAATAAAGGCATCGGCTCCAGCTCCACTACAGCT
421	TAAAGTGTGGTGGCTCAGTACTTCCAGTTCGCCAGTACAGGGTAAACCATTTGTGACAGGAGCTGAGTCTCAACTGAGCGGCAAT
505	CTTCATCTGTCCACACAGCCCTCTCATTGTGGCTCCAGCCATCTACTGCCATCAGGATACACTATCAGGAGGACACTTGTGGCC
589	CTCAGTCAGTCAGATGCCCTTCAAGTGGCTGGCTTGGTGGCCAGCTTACCTGAAGATGGAGGCTCTTGATGCTGGCCGTAAG
673	GAGCTCAAGACTCTCCACAGAGGAGTATGATGCAACACTCACACAGATGGCTCAGGCTTGGCCGCTGATTGCCACCGGGGCT
757	GACAACTGCAGGATGCCCTACTACTACATATACCAAGCTTGTGGACAAAGACCTCAGCACAGCCCTTCTCCTTAATGGCCAGGCA
841	CTCTGTCTTCCCTGGCCAGGCAAAATATCAAGAGGCTCAGAGTGGCCCTTCAAGAGCCCTTGATAAGGACCCCAAGCAACCCCTGAC
925	ACCCCTCATCACTTGTATGGTCCCTTTCACACCCACAGCCAAACCCACAGGCGTTCGCCAACCAGATATTAGTGCAGTTCCGAGAC
1009	GAACACAGGGCCACAGTTCGTAGAGACATCGCAACCAAGGAGGATGATTTCAACCCCTTGGTTAAGCAGTATGGCCATATA
1093	ACAGTGGTCTTGATATATATATATATCACTCTCTCTCTGATATATTTTGTGGACATTTTATTTTGAAGGTAATTC
1177	ATATAGAGCATATGTAAAACCCAGTACTTGTGTTTGCATCATTTTCTTTATCTTTTATTTTATGTAGATTTTTTAA
1261	AGATATTTTACTATTAACAAAAGCTGAAGACATGTTTACGGATGGCTAAGGAAATATTGGCATTGTGGCCACATTCCAA
1345	ATAACCTGTTGTTATATTTTGAATAAATGTTTAAAAAATTTTAAAAAATTTTAAAAAATTTTAAAAAATTTTAAAAAATTTTAAAAA

图 1 中国明对虾 coat-ε 基因全长 cDNA 序列及相应的氨基酸序列推测

Fig.1 Predicted amino acid sequences of coat-ε cDNA in *F. chinensis*

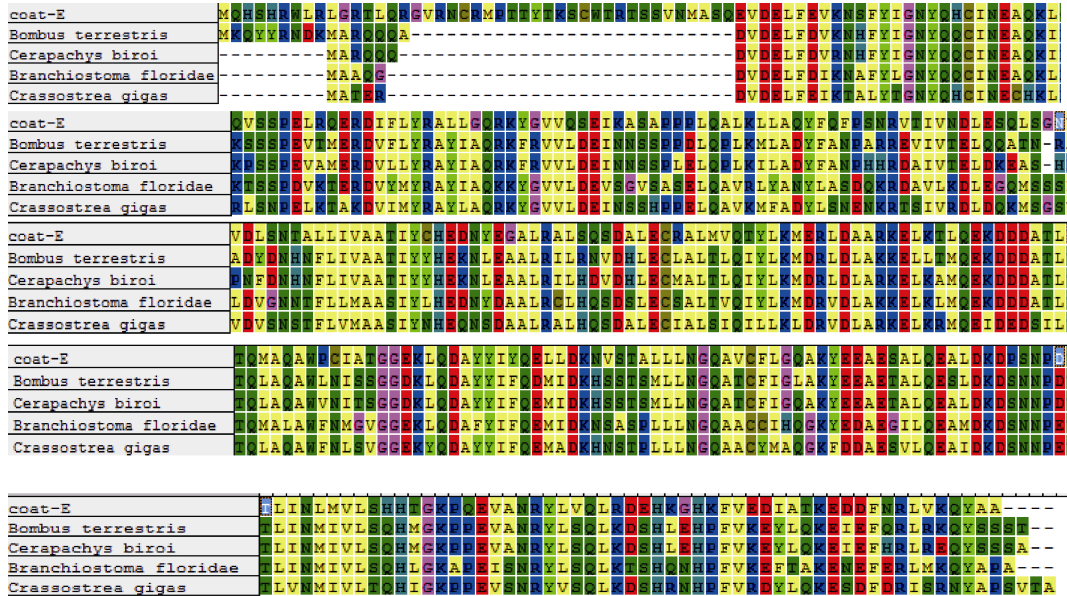


图 2 中国明对虾 coat-ε 氨基酸序列与其他物种 coat-ε 氨基酸序列的比较

Fig.2 Multiple alignments of amino acid sequences of coat-ε in *F. chinensis* and other species

各物种 coat-ε 序列登录号: 欧洲熊蜂(XP012169272.1)、毕氏粗角蚁(XP011333357.1)、
佛州文昌鱼(XP002586747.1)、长牡蛎(XP011436400.1)

The GenBank accession numbers of coat-ε: *Bombus terrestris* (XP012169272.1), *Cerapachys biroi* (XP012169272.1), *Branchiostoma floridae* (XP002586747.1), *Crassostrea gigas* (XP011436400.1)

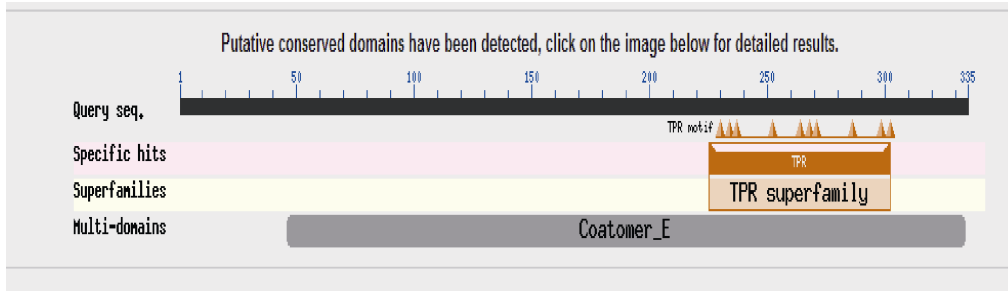


图 3 预测的中国明对虾 coat-ε 蛋白功能域

Fig.3 Putative conserved domains of coat-ε in *F. chinensis*

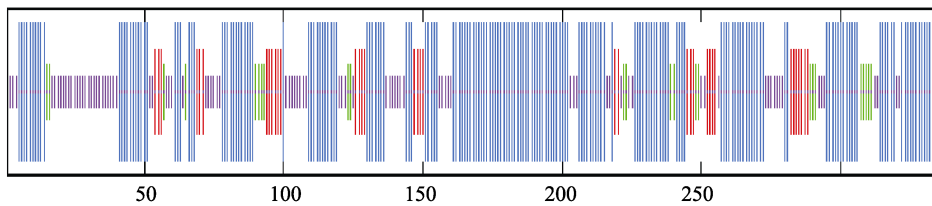


图 4 coat-ε 蛋白二级结构分析

Fig.4 Secondary structure analysis of coat-ε

的氨基酸序列, 将此序列输入到 NCBI 的 protein blast 序列框中, 比对得出同源的氨基酸序列。结果显示, 中国明对虾 coat-ε 氨基酸序列与欧洲熊蜂 (*Bombus terrestris*)、毕氏粗角蚁 (*Cerapachys biroi*)、木蚁 (*Camponotus floridanus*)、爪蟾 (*Xenopus laevis*)、佛州文昌鱼 (*Branchiostoma floridae*)、长牡蛎

(*Crassostrea gigas*) 等的相似性分别为 64%、63%、62%、59%、58%、57%。从基于 MEGA 5.05 建立的系统发育树可以看出(图 6), 该基因进化过程中与膜翅目的蜂、蚁的亲缘关系相近, 它们都属于节肢动物门, 而与野猪、骆驼等哺乳动物的亲缘关系相对远一些。

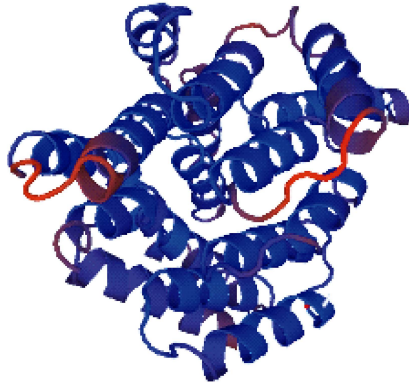


图 5 coat-ε 蛋白的空间结构模型
Fig.5 The spatial structure of coat-ε protein

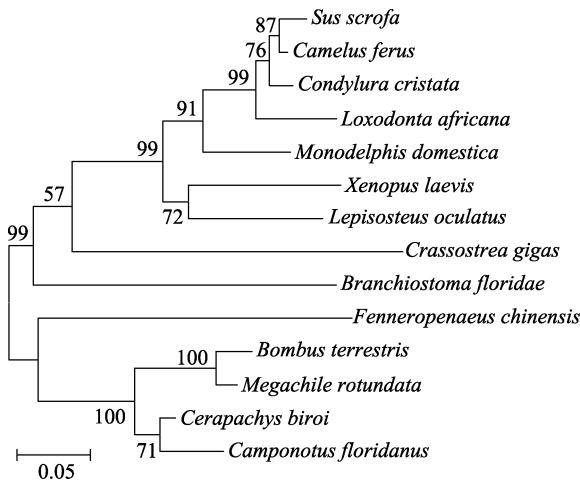


图 6 不同物种 coat-ε 氨基酸序列的系统进化树
Fig.6 Phylogenetic tree based on coat-ε amino acids of different species

野猪(XP003123584.1)、野骆驼(XP006186292.1)、星鼻鼹(XP004688653.1)、非洲象(XP003413572.1)、灰短尾负鼠(XP001363383.1)、爪蟾(NP001085327.1)、雀鳝(XP006640066.1)、佛罗文昌鱼(XP002586747.1)、中国明对虾、欧洲熊蜂(XP012169272.1)、苜蓿切叶蜂(XP003699284.2)、毕氏粗角蚁(XP011333357.1)、木蚁(XP011267506.1)
Sus scrofa (XP003123584.1), *Camelus ferus* (XP006186292.1), *Condylura cristata* (XP004688653.1), *Loxodonta Africana* (XP003413572.1), *Monodelphis domestica* (XP001363383.1), *Xenopus laevis* (NP001085327.1), *Lepisosteus oculatus* (XP006640066.1), *Crassostrea gigas* (XP011436400.1), *Branchiostoma floridae* (XP002586747.1), *Fenneropenaeus chinensis*, *Bombus terrestris* (XP012169272.1), *Megachile rotundata* (XP003699284.2), *Cerapachys biroi* (XP011333357.1), *Camponotus floridanus* (XP011267506.1)

2.4 中国明对虾 coat-ε 基因在各组织中的表达

通过 Real-time PCR 技术分析 coat-ε mRNA 在中国明对虾不同组织中的表达, 结果显示, coat-ε 基因在中国明对虾的这 11 个组织中均有表达(图 7), 其中, 在肌肉、鳃、附肢中的表达量最高。经统计分析, 除鳃之外, 肌肉与附肢中的表达量差异显著($P < 0.05$), 与其

他组织的差异均极显著($P < 0.01$)。

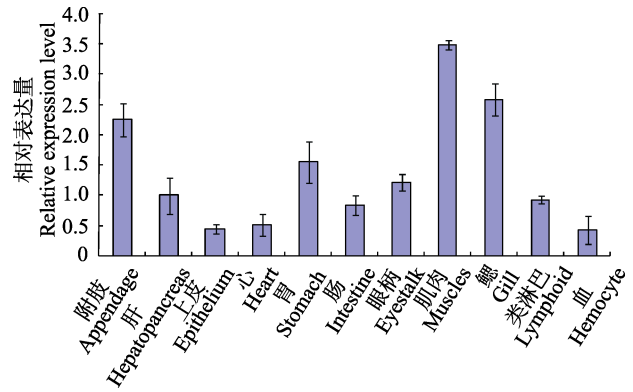


图 7 中国明对虾 coat-ε 基因在各组织的分布
Fig.7 Tissues distribution of *F. chinensis* coat-ε

3 讨论

目前, 在节肢动物门的蚂蚁、蜜蜂及脊椎动物亚门的野猪、野骆驼等的 coat-ε 基因的全长已经克隆, 而在甲壳动物中的报道非常少。本研究首次克隆出中国明对虾的 coat-ε 基因全长, 所表达的蛋白是 coatomer 复合体的一个小亚基, coat-ε 基因编码的蛋白无跨膜区和信号肽, 亚细胞定位预测其是一种胞内蛋白, 可能在细胞内发挥各种功能。从构建的系统发育树可以发现, 中国明对虾与欧洲熊蜂、苜蓿切叶蜂、毕氏粗角蚁、木蚁聚为一类, 它们都属于节肢动物门, 与其他脊索动物门的野骆驼、佛周文昌鱼等聚类关系都较远, 而且在同源性方面与其他种类的相似性均在 60%–50% 左右, 说明在进化过程中保守性不高。转录分析显示其在肌肉、鳃和附肢组织有较高的分布。

coat-ε 基因表达的蛋白是组成 coatomer 复合体的 $\beta\delta/\gamma\zeta$ -COP 必不可少的, 虽然对于 COP I 普遍认为是将内质网上的逃逸蛋白从高尔基体运回到内质网, 但是许多研究发现其还存在很多其他功能, 例如通过未感染细胞的 COP I 功能的研究发现, COP I 在病毒的复制中发挥着一定作用, 通过 siRNA 干扰实验发现, COP I 在牛痘、脊髓灰质炎和流感病毒的复制中起作用(Zhang *et al*, 2009; Cherry *et al*, 2006; Konig *et al*, 2010)。通过更深一步的研究发现, COP I 在病毒的生活周期中起着多种作用, 包括病毒的入侵、RNA 的复制和病毒的胞内运输。通过 COP I 的 4 个亚基的 RNA 干扰实验, 发现它们是流感病毒在体内复制的重要因素(Konig *et al*, 2010)。细胞中缺乏 coat-ε 会使疱疹性口炎(Vesicular stomatitis, VSV)和塞姆利基森林病毒(Semliki Forest viruses)的感染降低(Daro *et al*, 1997), 并且在进一步的 RNA 干扰试验中印证了这一

结论(Cureton *et al.*, 2012)。coat- ϵ 基因是否参加对虾病毒感染过程尚不清楚, 本研究获得的 coat- ϵ 基因全长为研究 COP I 在对虾病毒感染中的作用提供基础。

参 考 文 献

- Bremser M, Nickel W, Schweikert M, *et al.* Coupling of coat assembly and vesicle budding to packaging of putative cargo receptors. *Cell*, 1999, 96(4): 495–506
- Cherry S, Kunte A, Wang H, *et al.* COPI activity coupled with fatty acid biosynthesis is required for viral replication. *PLoS Pathogens*, 2006, 2(10): 900–912
- Cureton DK, Burdeinick-Kerr R, Whelan SPJ. Genetic inactivation of COPI coatomer separately inhibits vesicular stomatitis virus entry and gene expression. *J Virol*, 2012, 86(2): 655–666
- Daro E, Sheff D, Gomez M, *et al.* Inhibition of endosome function in CHO cells bearing a temperature-sensitive defect in the coatomer (COP I) component ϵ -COP. *J Cell Biol*, 1997, 139(7): 1747–1759
- Duden R, Kajikawa L, Wuestehube L, *et al.* ϵ -COP is a structural component of coatomer that functions to stabilize α -COP. *EMBO J*, 1998, 17(4): 985–995
- Fuhrman JA. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature*, 1999, 399(6736): 541–8
- Gabriely G, Kama R, Gerst JE. Involvement of specific COP I subunits in protein sorting from the late endosome to the vacuole in yeast. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(2): 526–540
- Konig R, Stertz S, Zhou Y, *et al.* Human host factors required for Influenza virus replication. *Nature*, 2010, 463(7282): 813–817
- Misselwitz B, Dilling S, Vonaesch P, *et al.* RNAi screen of Salmonella invasion shows role of COPI in membrane targeting of cholesterol and CDC42. *Mol Sys Biol*, 2011, 7(1): 474
- Nickel W, Malsam J, Gorgas K, *et al.* Uptake by COPI-coated vesicles of both anterograde and retrograde cargo is inhibited by GTPgammaS *in vitro*. *J Cell Sci*, 1998, 111(5): 3081–3090
- Serafini T, Orci L, Amherdt M, *et al.* ADP-ribosylation factor is a subunit of the coat of Golgi-derived COP-coated vesicles: a novel role for a GTP-binding protein. *Cell*, 1991, 67(2): 239–253
- Styers ML, O'Connor AK, Grabski R, *et al.* Depletion of beta-COP reveals a role for COP-I in compartmentalization of secretory compartments and in biosynthetic transport of caveolin-1. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008, 294(6): 1485–1498
- Waters MG, Serafini T, Rothman JE. 'Coatomer': a cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles. *Nature*, 1991, 349(6306): 248–251
- Zhang L, Lee SY, Beznoussenko GV, *et al.* A role for the host coatomer and KDEL receptor in early vaccinia biogenesis. *Proc Natl Acad Sci*, 2009, 106(1): 163–168

(编辑 冯小花)

cDNA Cloning of Coat-Epsilon Gene and Its Tissue Distribution in *Fenneropenaeus chinensis*

WANG Xiufang^{1,2}, LIU Qinghui^{2,3①}, WU Yin^{1①}, HUANG Jie^{2,3}

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

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

Abstract Coat-epsilon protein (coat- ϵ) is a subunit of the coatomer complex that forms COP I. To obtain the full-length sequence of coat- ϵ of *Fenneropenaeus chinensis*, we first acquired the sequences of 3' and 5' ends using rapid amplification of cDNA ends (RACE). The results were then spliced by DNAMAN to obtain the full-length 1402 bp sequence. The predicted 5' non-coding region (UTR) had 84 bp and the 3' non-coding region (UTR) had 310 bp. The open reading frame had 1008 bp that was supposed to encode 335 amino acids. The fragment including 230aa to 300aa belonged to the TPR superfamily. Signalp 3.0 server and TMHMM Server Version 2.0 analysis suggested that the amino acid sequence did not contain a signal peptide or a transmembrane structure. PSORT II Prediction showed that coat-epsilon was probably located in mitochondria, cytoplasm, and endoplasmic reticulum. The phylogenetic tree analysis showed that coat- ϵ of *F. chinensis* was closely related to that of Arthropoda. We also analyzed the mRNA expression of coat- ϵ in different tissues with quantitative real-time PCR, and found that it was expressed in all tested tissues including appendage, hepatopancreas, epithelium, heart, stomach, intestine, eyestalk, muscles, gill, lymphoid organ and hemocytes. The expression level was the highest in muscles, followed by the gill and appendage. Our results provided important information for the functional study of coat- ϵ .

Key words *Fenneropenaeus chinensis*; Coat- ϵ ; Gene clone; Tissue distribution

① Corresponding author: LIU Qinghui, E-mail: liuqh@ysfri.ac.cn; WU Yin, E-mail: wuyin@dlou.edu.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 捷 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37卷 第4期 2016年8月

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

(Bimonthly, founded in 1980)

Vol.37 No.4 Aug. 2016

主管单位 中华人民共和国农业部
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

出版单位 **科学出版社**
地址: 北京东黄城根北街16号, 邮编: 100717

编辑单位 中国水产科学研究院黄海水产研究所
地址: 青岛市南京路106号 邮编: 266071
电话: 0532-85833580
<http://www.yykxjz.cn>
E-mail: yykxjz@ysfri.ac.cn

主 编 唐启升

印 刷 青岛国彩印刷有限公司

国内发行 中国邮政集团公司山东省分公司

订 购 全国各地邮政局

国外发行 中国国际图书贸易总公司
地址: 北京339信箱 邮编: 100044

Administrated by Ministry of Agriculture, P.R.China
Sponsored by Yellow Sea Fisheries Research Institute,
Chinese Academy of Fishery Sciences
China Society of Fisheries
Published by Science Press
Add: 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China
Edited by Yellow Sea Fisheries Research Institute,
Chinese Academy of Fishery Sciences
Add: 106 Nanjing Road, Qingdao, 266071, China; Tel: 0532-85833580
<http://www.yykxjz.cn>; E-mail: yykxjz@ysfri.ac.cn
Editor-in-Chief Tang Qisheng
Printed by Qingdao Guocai Printing Co., Ltd.
Domestic Distributed by China Post Group Corporation Shandong Branch
Subscription Post Offices All Over China
Overseas Distributed by China International Book Trading Corporation
P.O.Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号
ISSN 2095-9869
CN 37-1466/S

国内邮发代号: 24-153
国外发行代号: 4578Q
国内外公开发刊

定 价: 30.00元

ISSN 2095-9869



9 772095 986163