

中国科技核心期刊  
中文核心期刊

ISSN 1000-7075  
CN 37-1466/S

# 渔业科学进展

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

第35卷

VOL. 35

第3期 NO. 4

# 2014

中国水产科学研究院黄海水产研究所  
中国水产学会  
科学出版社

主办  
出版

# 渔业科学进展

YUYE KEXUE JINZHAN

(海洋水产研究更名为渔业科学进展)

第35卷 第4期

2014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

中国水产核心期刊

中文科技期刊数据库来源期刊

中国期刊全文数据库(CJFD)来源期刊

中国科学引文数据库(CSCD)核心库来源期刊

中国科技论文统计源期刊

中国海洋文献数据库(CODS)来源期刊

中国生物学文献数据库来源期刊

英国《动物学记录》(ZR)收录期刊

《水科学和渔业文摘》(ASFA)收录期刊

## 目 录

### 研究论文

- 南海鳶乌贼(*Sthenoteuthis oualaniensis*)资源评估的新方法.....冯 波 颜云榕 张宇美 易木荣 卢伙胜 (1)
- 崂山湾人工鱼礁区浮游植物群落结构与环境因子的关系.....王 欣 盛化香 唐衍力 黄六一 万 荣 (7)
- 象山港南沙岛不同养殖模式沉积物微生物群落结构分析.....孙 超 朱 玲 毛玉泽 范艳君 周春娅 杨傲傲 朱 伟 庄志猛 (13)
- 漠斑牙鲆(*Paralichthys lethostigma*) LH  $\beta$  基因克隆及其在卵巢不同发育期的表达特征.....柳学周 臧 坤 徐永江 李春广 史 宝 王妍妍 (22)
- 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)育种核心群体在连续排污养殖模式下的生长和存活性能分析.....徐孝栋 栾 生 罗 坤 孔 杰 (32)
- 外源激素对花鲈(*Lateolabrax japonicus*)血清 IGF-1 含量及肝脏 IGF-1 和 IGFBP-1 mRNA 表达的影响.....钱 焜 温海深 迟美丽 倪 蒙 张冬茜 丁玉霞 (39)
- 尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) *cyp19a1a* 原核表达与蛋白纯化.....王金文 文春根 赵 燕 王 慧 王艺雅 季相山 (45)
- 传染性鲑鱼贫血症病毒实时荧光环介导等温扩增检测方法的建立.....史秀杰 于 力 王津津 何俊强 郑晓聪 贾 鹏 兰文升 杨锦舜 刘 荭 (51)
- 对虾肝胰腺细小病毒滚环扩增检测方法的建立.....王勤涛 张庆利 杨昊霖 刘天齐 刘 笋 杨 冰 黄 捷 (5)
- 肝胰腺细小病毒(HPV) PCR 检测及流行情况调查.....刘天齐 杨 冰 刘 笋 万晓媛 王秀华 黄 捷 (66)
- 饥饿胁迫对刺参(*Apostichopus japonicus*)免疫和生长的影响.....田 青 荣小军 李 彬 廖梅杰 姜 燕 范瑞用 王印庚 李 强 (71)
- 维生素 E 和硒对吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)幼鱼生长及血清抗氧化酶活性的影响.....覃 希 黄 凯 刘 康 蒋焕超 程 远 黄 清 黄秀芸 (77)
- 生物絮团对水质的调控作用及仿刺参(*Apostichopus japonicus*)幼参生长的影响.....李 斌 张秀珍 马元庆 王 斌 宋向军 刘义豪 刘爱英 白艳艳 靳 洋 任利华 孙玉增 邢红艳 王忠全 宋秀凯 (85)
- Pb<sup>2+</sup>和 Cd<sup>2+</sup>对刺参幼参的急性毒性及其富集.....邢红艳 马元庆 李 斌 刘爱英 靳 洋 孙 珊 白艳艳 赵 强 苏 博 任利华 (91)
- 碳酸氢铵对龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)污损生物多棘麦杆虫(*Caprella acanthogaster*)的防除效果.....魏龔伟 张继红 吴文广 (97)
- 一株海洋过氧化氢酶高产菌的鉴定及产酶条件优化.....陈世建 王 伟 孙 谧 (103)
- 低温活鱼运输箱监控系统研制.....聂少伍 洪苑乾 黄汉英 黎 煊 胡月来 熊善柏 赵思明 (110)
- 循环水养殖系统生物滤器负荷挂膜技术.....朱建新 刘 慧 徐 勇 陈世波 刘圣聪 张 涛 曲克明 (118)
- 波浪作用下筏式养殖结构的动力分析.....崔 勇 关长涛 黄 滨 李 娇 蒋增杰 (125)
- 响应面法优化丹参中抗无乳链球菌活性成分的提取工艺.....邓恒为 郭伟良 孙晓飞 谢珍玉 王世锋 胡文婷 周永灿 (132)
- 南极磷虾油软胶囊囊皮配方的设计与优化.....刘建君 冯迪娜 苏学锋 李宣廷 刘 洋 (141)

# PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

## CONTENTS

Vol.35 No.4 August 2014

A New Method to Assess the Population of <i>Sthenoteuthis oualaniensis</i> in South China Sea.....	(1)
..... FENG Bo, YAN Yunrong, ZHANG Yumei, YI Murong, LU Huosheng	
Relationships Between the Structure of Phytoplankton Community and Environmental Factors in Three Artificial Reef Areas of Laoshan Bay.....	(7)
..... WANG Xin, SHENG Huaxiang, TANG Yanli, HUANG Liuyi, WAN Rong	
Sediment Microbial Community Structure of Different Mariculture Models in Xiangshan Bay, China.....	(13)
..... SUN Chao, ZHU Ling, MAO Yuze, FAN Yanjun, ZHOU Chunya, YANG Aoao, ZHU Wei, ZHUANG Zhimeng	
Molecular Cloning and Differential Expression of LH $\beta$ Subunit During the Ovarian Maturation Cycle of <i>Paralichthys lethostigma</i> .....	(22)
..... LIU Xuezhou, ZANG Kun, XU Yongjiang, LI Chunguang, SHI Bao, WANG Yanyan	
Growth and Survival of the <i>Litopenaeus vannamei</i> Nucleus Selection Population in the Continuous Wastewater Discharge Mode.....	(32)
..... XU Xiaodong, LUAN Sheng, LUO Kun, KONG Jie	
Effects of Exogenous Hormone Injection on the Serum IGF-1 and the Expression of IGF-1 mRNA and IGFBP-1 mRNA in the Liver of Japanese Sea Bass ( <i>Lateolabrax japonicus</i> ).....	(39)
..... QIAN Kun, WEN Haishen, CHI Meili, NI Meng, ZHANG Dongqian, DING Yuxia	
The Prokaryotic Expression and the Protein Purification of Nile Tilapia <i>cyp19a1a</i> Gene.....	(45)
..... WANG Jin, WEN Chungen, ZHAO Yan, WANG Hui, WANG Yiya, JI Xiangshan	
The Detection of Infectious Salmon Anaemia Virus Using Real-Time Fluorescent Loop-Mediated Isothermal Amplification.....	(51)
..... SHI Xiujie, YU Li, WANG Jinjin, HE Junqiang, ZHENG Xiaocong, JIA Peng, LAN Wensheng, YANG Jinshun, LIU Hong	
Development and Evaluation of Rolling Circle Amplification Assay for the Detection of the Hepatopancreatic Parvovirus.....	(59)
..... WANG Qintao, ZHANG Qingli, YANG Haolin, LIU Tianqi, LIU Sun, YANG Bing, HUANG Jie	
PCR Detection and Studies on the Prevalence of Hepatopancreatic Parvovirus (HPV).....	(66)
..... LIU Tianqi, YANG Bing, LIU Sun, WAN Xiaoyuan, WANG Xiuhua, HUANG Jie	
Starvation Stress Effect on the Immunity and Growth of Sea Cucumber <i>Apostichopus japonicus</i> .....	(71)
..... TIAN Qing, RONG Xiaojun, LI Bin, LIAO Meijie, JIANG Yan, FAN Ruiyong, WANG Yingeng, LI Qiang	
Effects of Dietary Vitamin E and Selenium on the Growth and the Antioxidant Enzyme Activity in Serum of Juvenile Tilapia ( <i>Oreochromis niloticus</i> ).....	(77)
..... QIN Xi, HUANG Kai, LIU Kang, JIANG Huanchao, CHENG Yuan, HUANG Qing, HUANG Xiuyun	
Effects of Bioflocs on the Water Quality Control and the Growth of <i>Apostichopus japonicus</i> .....	(85)
..... LI Bin, ZHANG Xiuzhen, MA Yuanqing, WANG Bin, SONG Xiangjun, LIU Yihao, LIU Aiyong, BAI Yanyan, JIN Yang, REN Lihua, SUN Yuzeng, XING Hongyan, WANG Zhongquan, SONG Xiukai	
Acute Toxicity and Accumulation of Pb <sup>2+</sup> and Cd <sup>2+</sup> in Juvenile Sea Cucumber <i>Apostichopus japonicus</i> .....	(91)
..... XING Hongyan, MA Yuanqing, LI Bin, LIU Aiyong, JIN Yang, SUN Shan, BAI Yanyan, ZHAO Qiang, SU Bo, REN Lihua	
Removal of the Biofouling Organism <i>Caprella acanthogaster</i> Attached on Cultivated Seaweed <i>Gracilaria lemaneiformis</i> Using Ammonium Bicarbonate.....	(97)
..... WEI Yanwei, ZHANG Jihong, WU Wenguang	
Identification of a Marine Bacterium Producing High-Level Catalase and Optimization of Its Fermentation Conditions.....	(103)
..... CHEN Shijian, WANG Wei, SUN Mi	
The Development of a Monitoring System for Low-Temperature Live Fish Transportation.....	(110)
..... NIE Shaowu, HONG Yuanqian, HUANG Hanying, LI Xuan, HU Yuelai, XIONG Shanbai, ZHAO Siming	
Dual-Culture Techniques for the Rapid Start-up of Recirculating Aquaculture System.....	(118)
..... ZHU Jianxin, LIU Hui, XU Yong, CHEN Shibo, LIU Shengcong, ZHANG Tao, QU Ke-ming	
Dynamic Analysis of the Long-line Culture Facility Under Waves.....	(125)
..... CUI Yong, GUAN Changtao, HUANG Bin, LI Jiao, JIANG Zengjie	
Optimization of the Extraction Conditions of Active Components for Inhibition of <i>Streptococcus agalactiae</i> from <i>Salvia miltiorrhiza</i> Bge. Using Response Surface Methodology.....	(132)
..... DENG Hengwei, GUO Weiliang, SUN Xiaofei, XIE Zhenyu, WANG Shifeng, HU Wenting, ZHOU Yongcan	
Optimization of Formula of Antarctic Krill Oil Soft Capsules Shell.....	(141)
..... LIU Jianjun, FENG Dina, SU Xuefeng, LI Xuanyan, LIU Yang	

# 南海鸮乌贼(*Sthenoteuthis oualaniensis*) 资源评估的新方法\*



冯 波 颜云榕 张宇美 易木荣 卢伙胜

(广东海洋大学水产学院 湛江 524025)

**摘要** 为了解南海鸮乌贼(*Sthenoteuthis oualaniensis*)资源量与分布状况,本研究利用建立在灯光罩网船上的北斗星通渔业信息采集网络,搜集南海鸮乌贼生产数据,并根据灯光罩网作业特点,创建了光诱资源量评估模型,使用克里金插值法,绘制出南海鸮乌贼的分布密度图,估计其总资源量和年可捕量。研究表明,鸮乌贼在南海有着广泛的分布,以 110.5°–111.5°E、11°–12°N 之间的海域和 115.5°–116.5°E、9.5°–11.5°N 之间的海域资源密度最高,在 4 t/km<sup>2</sup> 以上;以 112°–112.5°E、14.5°–15°N 之间的海域和 113°–115°E、15°–16.5°N 之间的海域单位努力量渔获量(CPUE)最高,达 1 kg/(kW·d·km<sup>2</sup>)以上。根据克里金插值法估算,在南海 108°–118°E、9°–20°N 之间的 359 个渔区,鸮乌贼资源量为 204.94 万 t,总可捕量为 99.40 万 t。评估认为,南海鸮乌贼资源开发潜力大,是未来南沙渔业开发的主要种类。

**关键词** 鸮乌贼;资源;灯光罩网;光诱模型;南海

中图分类号 S931 文献标识码 A 文章编号 1000-7075(2014)04-0001-06

鸮乌贼(*Sthenoteuthis oualaniensis*)隶属柔鱼科(Ommastrephidae),广泛分布在印度洋、太平洋的赤道和亚热带海域,其中,在南海和印度洋西北部的数量较大。目前,对该资源的评估多为声学评估:1998–1999年,东南亚渔业发展中心的调查认为,菲律宾西部海域鸮乌贼资源量为 28.3 万 t(张鹏等,2010);2000年,中国大陆的声学调查认为,南海中部鸮乌贼资源量为 36.7 万 t,南海南部为 16 万 t(贾晓平等,2004);张引(2005)<sup>1)</sup>根据台湾地区 1998 年的声学调查数据推测,南海外海鸮乌贼资源量为 150 万 t。声学评估需要对回波信号进行识别,筛选出有效的目标信号,判断结果易出现误差(陈刚等,2003),因无其他评估方法作对照,评估结果仍有较大的不确定性。2011年,随着基于北斗星通南沙渔业生产信息采集

网络的建立,取得了大范围南海鸮乌贼的生产实时监测数据,对南海鸮乌贼的资源分布有了更深入细致的了解。本研究利用近几年所积累的南海灯光罩网船生产监测数据,提出了光诱模型评估资源量的新方法,绘制了南海鸮乌贼的密度分布图,推算了其总资源量和可捕量,为南海深海渔业的发展提供了参考依据。

## 1 数据来源与研究方法

### 1.1 数据来源

为了解南沙灯光罩网船的生产情况,2011年,广东海洋大学南海渔业资源监测与评估中心,着手建立了基于北斗星通的南海渔业生产信息采集网络,在 28 艘灯光罩网船上安装了北斗渔业信息采集器。生

\*国家自然科学基金(41376158)、国家科技支撑项目(2012BAD18B01)、广东省海洋渔业科技推广专项(A201108H01)、教育部特色专业建设重点项目(527001006)和广东海洋大学大学生创新实验项目(1056613038)共同资助。冯波, E-mail: fengb@gdou.edu.cn

通讯作者: 卢伙胜, 教授, E-mail: luhsh@gdou.edu.cn

收稿日期: 2013-09-30, 收修改稿日期: 2014-02-19

1) 张引. 南海产南鱿资源之渔业声学研究. 2005, 台湾大学海洋研究所学位论文, 1–87

产渔船利用北斗导航卫星的短信功能,每天向岸上的数据服务器发送渔业生产信息,实现了从以往单艘科研船的短期站点调查到数艘生产渔船长期大范围监测的突破。本研究利用2011至2013年2-7月,3年间所收到的1420条渔业监测信息,每条信息都包含了船名、作业地点、作业日期、各鱼种产量、主机功率等数据。

## 1.2 资源量的估算方法

对南海鳶乌贼资源量的评估,需要经过作业过程分析、数据处理、克里金插值法应用和总资源量估算等流程,如图1所示。首先,在作业过程分析中,需要说明灯光罩网作业的流程,然后建立光诱评估模型,估算出作业海域的资源密度;根据光诱影响的面积,将监测数据整理成按渔区汇总的鳶乌贼资源平均密度( $t/km^2$ )和CPUE [ $kg/(kW \cdot d \cdot km^2)$ ]两张表格;使用克里金插值法(Kriging)测算(杜世通,2004)出研究海

域内的鳶乌贼资源密度与CPUE的状况;最后根据以上测算的密度分布,估算出南海 $108^{\circ}-118^{\circ}E$ 、 $9^{\circ}-20^{\circ}N$ 之间海域鳶乌贼的总资源量和可捕量。

## 1.3 灯光罩网作业过程

光诱评估模型的建立是资源量评估的关键。建立模型,需要了解整个灯光罩网作业的过程。灯光罩网船驶入渔场后,会根据海流和风浪的强弱,抛下降落伞状的水锚,使渔船对水移动停止,渔船随海流漂移。然后,展开船舷两侧的4个支撑臂,待天黑后,19:00左右,打开渔船上方的全部集鱼灯,约2-3h后,将网衣四角通过绳索引引导至4个支撑臂顶端,使网衣撑开呈矩形。接下来,逐步熄灯,并点亮船舷两侧中部的4盏集鱼灯,诱使鱼群向渔船集中,随后关闭船舶上方全部灯光,鱼群即上浮,这时乘势拉开网衣四角的活扣,网衣随沉子迅速下沉,约5min到达下沉深度(约40m)后,开始收括纲,绞进网衣和网囊,在甲

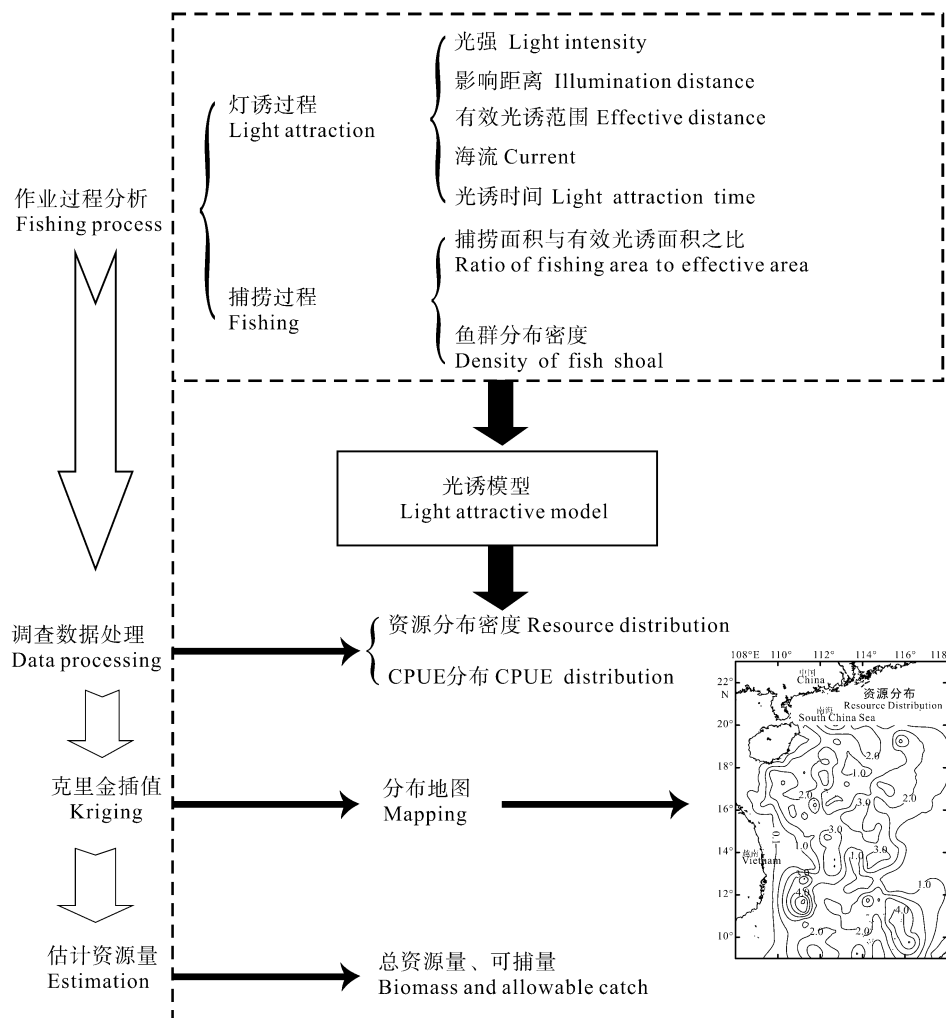


图1 评估流程

Fig.1 Estimation process

板上卸下渔获物, 分拣入舱。再重新整理展开网衣, 准备下一网次的捕捞。整个放网、起网过程的动作非常快, 在 30 min 内完成。罩网作业一直持续到 05:00 停止。整个晚上可操作 10-12 网, 相比灯光围网的每晚两网, 作业效率极高。

1.4 光诱评估模型

在光诱过程中, 鳶乌贼受光线吸引从深水及远处向光源游动、靠拢并集中。2010 年 6 月, 在海上观察发现, 水下光场分为有效光诱区和受光影响区(图 2), 鳶乌贼从远处的受光影响区游入有效光诱区, 然后逗留在有效光诱区, 绕船游动并随船移动, 从外围进入有效光诱区的鳶乌贼源源不断, 最后形成大的群体。

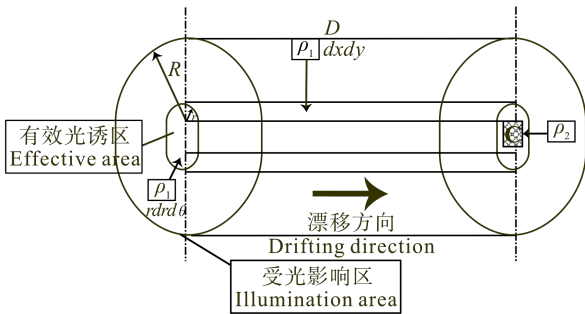


图 2 光诱捕捞过程

Fig.2 Process of light attraction fishing

假设鳶乌贼在未受光吸引时, 在海水里均匀分布,

$$\frac{\rho_2}{\rho_1} = \frac{\pi r^2 + 2rD + d_1(D + 2r) + \int_0^{2\pi} \left[ \int_r^R f(r) r dr \right] d\theta + 2 \int_0^D \left[ \int_r^R f(y) dy \right] dx + 2 \int_0^{d_1} \left[ \int_r^R f(x) dx \right] dy}{\pi r^2 + 2d_1 r} \quad (5)$$

$$\text{捕捞产量 } C = a\rho_2 \quad (6)$$

(6)式中的  $a$  为罩网面积, 该海区的资源密度估算成:

$$\rho_1 = \frac{\pi r^2 + 2d_1 r}{\pi r^2 + 2rD + d_1(D + 2r) + \int_0^{2\pi} \left[ \int_r^R f(r) r dr \right] d\theta + 2 \int_0^D \left[ \int_r^R f(y) dy \right] dx + 2 \int_0^{d_1} \left[ \int_r^R f(x) dx \right] dy} \cdot \frac{C}{a} \quad (7)$$

根据(7)式, 计算按渔区汇总的鳶乌贼密度分布表格, 然后用 Surfer9.0 软件之克里金插值功能计算出各渔区内的  $\rho_1$ 。

总资源量  $B$  的估算为:

$$B = \sum \rho_1 A_i \quad (8)$$

(8)式中  $A_i$  为渔区面积

最大可持续产量  $MSY$ 、年可捕量  $Y_{0.1}$  计算按王迎宾等(2010)的公式:

$$MSY = 0.5B, Y_{0.1} = 0.97MSY \quad (9)$$

资源密度为  $\rho_1(t/km^2)$ 。从开灯到撑开网衣的第一阶段, 有效光诱区域内的鳶乌贼质量为:

$$M_1 = \rho_1[\pi r^2 + 2rD + d_1(D + 2r)] \quad (1)$$

(1)式中,  $d_1$  为船侧灯排长度,  $r$  为有效光诱区半径,  $D$  为漂移距离。

从受光影响区游入有效光诱区的鳶乌贼质量, 采用二重积分来计算, 其中两个半圆环合并计算为:

$$M_2 = \iint \rho_1 f(r) r dr d\theta = \rho_1 \int_0^{2\pi} \left[ \int_r^R f(r) r dr \right] d\theta \quad (2)$$

(2)式中,  $R$  为受光影响区半径。鳶乌贼从受光影响区游入有效光诱区, 符合与距离相关的概率函数  $f(r)$ 。概率函数  $f(r)$  是与距离相关的指数衰减函数, 在  $r$  处的概率为 1, 而在  $R$  处的概率为  $10^{-6}$ 。

渔船漂移时, 由船两侧和上下方受光影响区之矩形区域, 游入有效光诱区的鳶乌贼的质量计算为:

$$M_3 = 2 \iint \rho_1 f(y) dx dy + 2 \iint \rho_1 f(x) dx dy = 2\rho_1 \int_0^D \left[ \int_r^R f(y) dy \right] dx + 2\rho_1 \int_0^{d_1} \left[ \int_r^R f(x) dx \right] dy \quad (3)$$

(3)式中,  $f(x)$ 、 $f(y)$  是与  $f(r)$  相同的概率函数。

从熄灯到捕捞的第一阶段, 假设进入有效光诱区的鳶乌贼均匀混合, 熄灭时未出现扩散, 其分布密度为:

$$\rho_2 = \frac{M_1 + M_2 + M_3}{\pi r^2 + 2d_1 r} \quad (4)$$

将(1)-(3)代入(4)得:

CPUE 分布密度  $\gamma$ , 按下式(10)计算:

$$\gamma = \frac{CPUE}{\pi R^2 + 2RD' + d_1(D' + 2R)} \quad (10)$$

(10)式中 CPUE 的单位为  $kg/(kW \cdot d)$ ;  $D'$  表示一个晚上渔船漂移的距离, 按 5 海里计算。

因作业海区的不同, 作业船只的大小有很大差别。在  $14^\circ N$  以北的中、西沙群岛海域作业的灯光罩网船多为中小型船只, 以粤阳西 96230 为参照; 在  $14^\circ N$  以南的南沙群岛海域作业的灯光罩网船多为大型船只, 以粤电白 46333 为参照。头足类能感受  $0.011 x$  的

弱光(钱卫国等, 2006), 这里定义有效光诱区的水下照度  $101x$ , 受光影响区的水下照度边界为  $0.011x$ , 光场计算按钱卫国等(2006)提出的公式。以第一网的产量作为计算依据, 通常第一网的光诱时间为 3 h, 南海 3-5 月外海表面平均流速约为 0.5 kn。表 1 为模型计算参数。

## 2 结果

克里金插值统计发现, 南海鳶乌贼在  $108^{\circ}$ - $118^{\circ}$ E、 $9^{\circ}$ - $20^{\circ}$ N 之间海域内的 359 个渔区都有分布, 总资源量约为 204.94 万 t。资源密度分布如图 3 所示, 鳶乌贼在西沙中部和南部、中沙北部和中部、南沙西北部

表 1 模型参数  
Tab.1 Model parameters

模型参数 Model parameters	渔船 Fishing vessel	
	粤阳西 96230 Yueyangxi 96230	粤电白 46333 Yuedianbai 46333
主机功率 Machine power(kW)	261	750
灯光功率 Light power(kW)	160	460
灯排长 Length of light row (m)	22.7	32
灯高 Height of light (m)	6.3	11
网具主尺度 Net size (m)	210×59.2	300×65.4
光诱影响半径 $R$ Illumination radius(m)	442.1	917.2
光诱有效半径 $r$ Effective radius(m)	74.2	155.1
3 h 漂移距离 $D$ Distance of 3-hour drifting(m)		2778
10 h 漂移距离 $D'$ Distance of 10-hour drifting(m)		9560

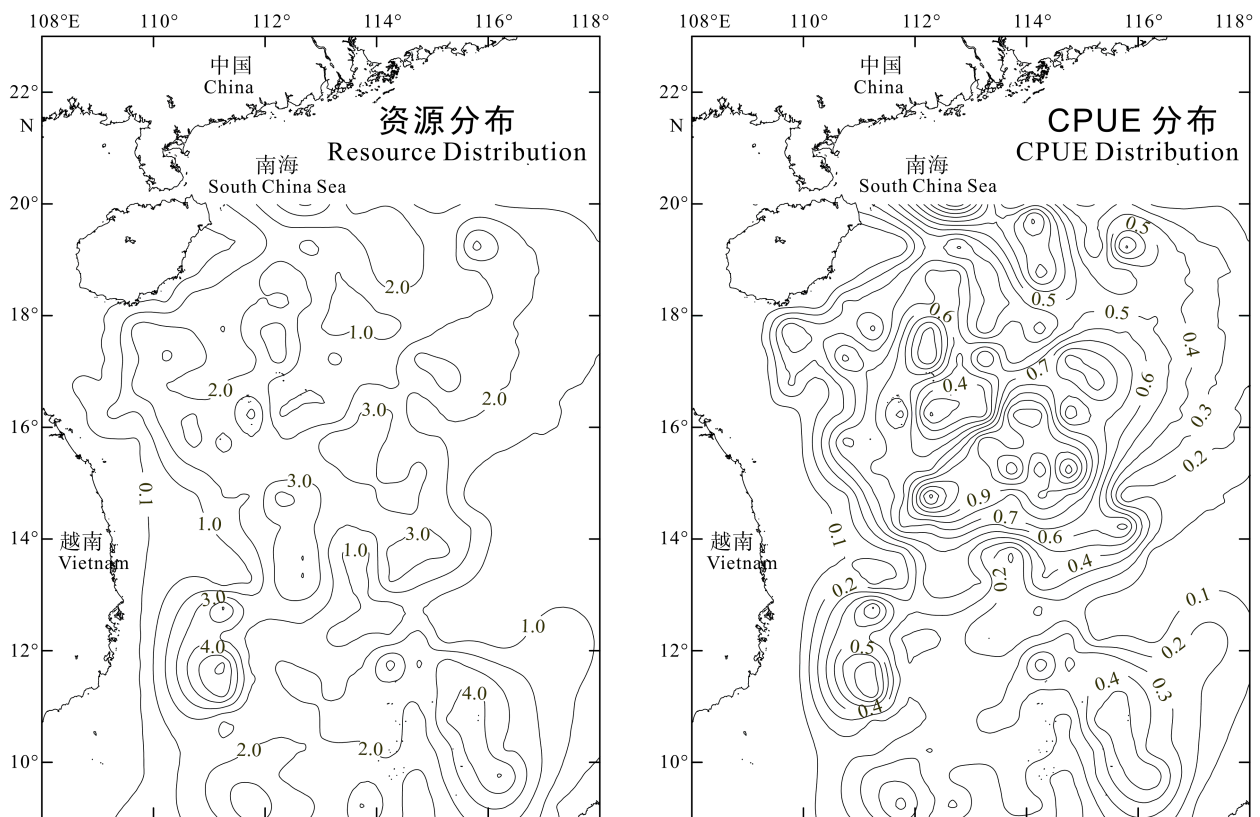


图 3 南海鳶乌贼资源密度( $t \cdot km^{-2}$ )与 CPUE [ $kg \cdot (kW \cdot d \cdot km^2)^{-1}$ ]分布  
Fig.3 Distribution of resource and CPUE of *Sthenoteuthis oualaniensis* in South China Sea

和中部等海域都有广泛分布,其中 110.5°–111.5°E、11°–12°N 之间的海域和 115.5°–116.5°E、9.5°–11.5°N 之间的海域的密度最高,达到 4 t/km<sup>2</sup> 以上; CPUE 分布基本与资源密度分布相似,其中, 112°–112.5°E、14.5°–15°N 之间的海域和 113°–115°E、15°–16.5°N 之间的海域的 CPUE 较高,平均在 1 kg/(kW·d·km<sup>2</sup>) 以上。

### 3 讨论

在本研究中,按密度分布推算得出的总资源量为 204.94 万 t, 年可捕量为 99.40 万 t, 比张引<sup>1)</sup>估算的鳶乌贼资源量 150 万 t 大。由于克里金插值估算的南海东、西两侧的数值偏低,所以按密度分布计算的结果仍显得保守。若以 CPUE 分布来推算,在 105 个具有经济开发价值渔区的年可捕量则为 39.20 万 t, 较按密度推算的年可捕量低些。按本研究的密度分布估计, 9°–12°N 间的南沙海域的鳶乌贼资源量为 63.07 万 t。2012 年,我国在南海的鳶乌贼产量约为 3.5 万 t, 其中来自南沙灯光罩网船的产量约为 6100 t<sup>2)</sup>。可见,南沙海域的鳶乌贼资源开发潜力很大,是我国未来南沙渔业开发的主要种类。

在本研究中,分别以粤阳西 96230 和粤电白 46333 的参数代替其他所有船的参数。实际上,各个灯光罩网船的灯光布置是不一样的,光场分布可能存在较大的差别。故本研究的算法,可能会使评估结果出现较大的误差。更精确的算法应该是,根据各个船的光场分布进行分析和计算。地理分布若能采用考虑鳶乌贼栖息环境条件的协克里金(CoKring)插值技术(石朋等, 2005),可以提高分布估计的精度。此外,目前靠近越南、菲律宾这两侧海域的调查数据还是空白,将来若能补充到这两个海域的调查数据,可使对南海鳶乌贼资源的分布与资源量的评估结果更加准确。

通过对南海渔船生产的经济学分析发现, 300 kW 以上的灯光罩网渔船每千瓦产值低于 250 kW 左右的渔船的产值<sup>2)</sup>。近年来,在南沙作业的灯光罩网渔船主机功率和灯光功率分别在 300 kW 和 400 kW 以上,作业时,在海上形成了强大的光场,但它们的集鱼效率,并未随着功率的增长而增长。例如,在本研究中,粤阳西 96230 和粤电白 46333 的  $\rho_2 / \rho_1$  分别为 31.977 和 17.111, 粤电白 46333 的船较大,但集鱼效果却不如粤阳西 96230。灯光功率大一些,集鱼灯安置得高一些,会扩大有效光诱面积,但臂杆却又不能为了扩大罩网面积无限延伸,这样就造成能源的浪费。今后,通过对本模型的扩展研究,还可对灯光罩网船的灯光配置、合适作业间距、生产成本效益等进行分析,为合理地安排好灯光罩网生产提供更合理的建议。

特别致谢 上海海洋大学钱卫国副教授在光场计算方面提供的帮助。

### 参 考 文 献

- 王迎宾, 虞聪达, 俞存根, 等. 浙江南部外海底层渔业资源资源量与可捕量的评估. 集美大学学报, 2010, 14(2): 8–12
- 石朋, 芮孝芳. 降雨空间插值方法的比较与改进. 河海大学学报, 2005, 33(4): 361–365
- 张鹏, 杨咨, 张旭丰, 等. 南海金枪鱼和鳶乌贼资源开发现状. 南方水产, 2010, 6(1): 68–74
- 杜世通. 地质统计学方法概要. 油气地球物理, 2004, 2(4): 31–38
- 陈刚, 陈卫忠. 渔业资源评估中声学方法的应用. 上海海洋大学学报, 2003, 12(1): 40–44
- 贾晓平, 李永振, 李纯厚. 南海专属经济区和大陆架渔业生态环境与渔业资源. 2004, 北京: 科学出版社, 389–394
- 钱卫国, 孙满昌. 大型专业鱿钓渔船合适作业间距的研究. 大连水产学院学报, 2006, 21(4): 311–315

(编辑 刘丛力)

1) 张引. 南海产南鱿资源之渔业声学研究. 2005, 台湾大学海洋研究所学位论文, 1–87

2) 卢伙胜. 2012 年南海渔业生产统计年报. 2013, 广东海洋大学技术报告, 1–21



## A New Method to Assess the Population of *Sthenoteuthis oualaniensis* in South China Sea

FENG Bo, YAN Yunrong, ZHANG Yumei, YI Murong, LU Huosheng

(Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025)

**Abstract** In this study we evaluated the biomass and distribution of *Sthenoteuthis oualaniensis* in South China Sea based on the data collected by Bdstar Navigation fishery information collection network that was mounted on the light falling net vessels. Considering the operation process of the light falling vessel, we built a light fishing stock assessment model and introduced a probability function to calculate the sweeping area and the biomass of *S. oualaniensis*. We then used kriging method to predict the density of *S. oualaniensis* and the CPUE. We subsequently generated a map of the distribution of *S. oualaniensis* and estimated the total biomass and the allowable catch. Our analysis showed that *S. oualaniensis* were widely distributed in South China Sea with high density ( $4 \text{ t/km}^2$ ) in the area of  $110.5^\circ\text{--}111.5^\circ\text{E}$ ,  $11^\circ\text{--}12^\circ\text{N}$  and  $115.5^\circ\text{--}116.5^\circ\text{E}$ ,  $9.5^\circ\text{--}11.5^\circ\text{N}$ ; in the area of  $112^\circ\text{--}112.5^\circ\text{E}$ ,  $14.5^\circ\text{--}15^\circ\text{N}$  and  $113^\circ\text{--}115^\circ\text{E}$ ,  $15^\circ\text{--}16.5^\circ\text{N}$ , the value of CPUE was as high as  $1 \text{ kg}/(\text{kW}\cdot\text{d}\cdot\text{km}^2)$ . The results of Kriging interpolation suggested that in the area of  $108^\circ\text{--}118^\circ\text{E}$ ,  $9^\circ\text{--}20^\circ\text{N}$  there was a biomass of 2.05 million tons and an allowable catch of 994,000 tons in 359 fishing areas. The annual allowable catch could be 392,000 tons in 105 fishing areas inferred from CPUE. We assessed that there were 630,700 tons of *S. oualaniensis* in the area of Nansha Islands and it could be one of the future target species in the deep-sea fisheries. Here we only provided a crude estimate because all the parameters in our model were obtained by the sample vessels. To make an accurate estimate, further investigation will be needed on fishing vessels and fishing ground. It was found that the enhanced machine and light power did not necessarily increase the fishing efficiency. Although a higher light power could enlarge the illuminated area, davits could not support a larger falling net. Moreover, our model could also be used to assess the light arrangement, practice distance, and cost effectiveness in light fisheries.

**Key words** *Sthenoteuthis oualaniensis*; Biomass; Light falling net; Light attractive model; South China Sea

# 崂山湾人工鱼礁区浮游植物群落结构 与环境因子的关系\*



王欣 盛化香 唐衍力 黄六一 万荣

(中国海洋大学水产学院 青岛 266003)

**摘要** 为研究崂山湾人工鱼礁区浮游植物群落结构与环境因子的关系,于 2011 年 3、6、9、12 月对崂山湾 3 个人工鱼礁区(峰山区、仰口区、港东区)进行取样调查。4 次采样共鉴定浮游植物 69 种,其中 3、9、12 月优势种都为甲藻门中的中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*),并且 9 月鱼礁区浮游植物密度远大于其他月份浮游植物密度。应用 Canoco for Windows 4.5 软件对获得的浮游植物数据和环境因子数据进行典范对应分析(Canonical correspondence analysis),作出物种与环境因子关系的二维排序图。结果表明,影响礁区浮游植物分布的主要环境因子依次为磷酸盐、温度、硅酸盐。

**关键词** 浮游植物;人工鱼礁;环境因子;典范对应分析

中图分类号 S931 文献标识码 A 文章编号 1000-7075(2014)04-0007-06

浮游植物不仅是水域生态系统中最重要初级生产者,而且是水中溶解氧的主要供应者,它启动了水域生态系统中的食物网,在水域生态系统的能量流动、物质循环和信息传递中起着至关重要的作用。虽然细胞构造简单,但却支撑了从浮游植物到鱼、虾、贝类等的庞杂食物链(孙军等,2013;孙雪梅等,2013)。与其他水生生物相比,浮游植物由于其生长周期短,对环境变化敏感,所以其生物量及群落结构动态变化能很好地反映海区现状及变化,特别是营养水平的变化;反之,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(王朝晖等,2001)。

目前,我国浮游植物的研究多数是针对内陆淡水湖泊,也有一部分为海洋中的浮游植物,但是关于人工鱼礁区浮游植物的研究很少。本研究通过对崂山湾 3 个人工鱼礁区(峰山区、仰口区、港东区)浮游植物和水质的取样调查,分析了该人工鱼礁区浮游植物的群落结构特征,并且进一步探究了该区浮游植物与环境因子的关系,从而为人工鱼礁建设以及评估提供参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 研究海区

山东省青岛崂山湾人工鱼礁区于 2008 年投放建成,礁区水深 7-8 m,分为峰山、仰口、港东 3 个礁区(图 1)。其中,峰山礁区有 20 个礁堆、港东礁区有 16 个礁堆、仰口礁区有 15 个礁堆,每个礁堆都是由石块堆积而成,长约 100 m,宽约 30 m,高约 1.5 m。

### 1.2 样品采集及处理

分别在峰山、仰口、港东 3 个人工鱼礁区采样,每个礁区随机设 3 个取样点(图 1)。调查时间为 2011 年 3、6、9、12 月,共分 4 次取样。采集浮游植物用国际标准 20 号(孔径 0.076 mm)筛绢制成的浅水型浮游生物网(网口直径为 37 cm,网长 1.4 m),将网放至海底(约 5 m),然后将网垂直拖起,采集到的样品装到实验瓶中,加注 2-3 滴浓度为 40%的甲醛,盖好盖子带回实验室进行计数观察。

采集浮游植物的同时,监测鱼礁区水温、盐度、

\*山东省科技发展计划项目(2011GHY11524)和国际合作项目(TEK1060)共同资助。王欣, E-mail: wx8866@yahoo.cn

通讯作者:唐衍力,教授, E-mail: tangyanli@ouc.edu.cn

收稿日期:2013-08-17, 收修改稿日期:2013-11-19

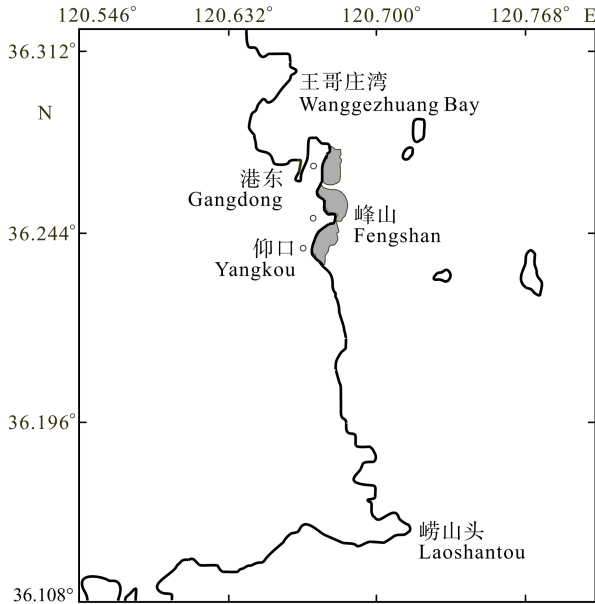


图 1 崂山湾 3 个人工鱼礁区位置

Fig.1 The geographic location of three artificial reef areas of Laoshan Bay

透明度、溶解氧、氨氮、硝酸氮、亚硝酸氮、磷酸盐、硅酸盐、COD、BOD<sub>5</sub>、pH 值等环境因子。样品的采集、保存及分析方法按《海洋监测规范》(GB17378-2007)和《海洋调查规范》(GB/T12763-2007)进行。

### 1.3 数据处理

**1.3.1 群落多样性确定** 采用 Primer 5.0 软件对崂山湾人工鱼礁区浮游植物群落的多样性指数(Shannon-Wiener)、丰富度指数(Margalef)、均匀度指数(Pielou)进行计算。并应用聚类分析(Cluster)研究浮游植物群落结构的季度变化格局(Clarke *et al*, 2001)。

**1.3.2 浮游植物与环境因子关系确定** 浮游植物和环境因子关系采用 Canoco for Windows 4.5 软件进行典范对应分析(Canonical correspondence analysis, CCA)。根据浮游植物出现频度和相对密度(该物种在各样点出现的频度 > 12.5%, 该物种在至少一个样点的相对密度 > 1%), 选取了 37 种浮游植物用于 CCA 分析(Muylaert *et al*, 2000; Lopes *et al*, 2005)。物种矩阵和环境数据需要进行  $\lg(x+1)$  转换(Flores *et al*, 1998), 最后应用 Canoco for Windows 4.5 进行运算, 并将生成的数据在 Canodraw for Windows 4.5 中作图, 排序结果用物种-环境因子关系的双序图表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 环境因子

崂山湾人工鱼礁区各次调查环境因子的平均值

变化如表 1 所示。其中, 水温、盐度、BOD<sub>5</sub>、透明度、叶绿素 9 月份达到最大值; 总无机氮变化范围为 50.46–73.73  $\mu\text{g/L}$ , 硅酸盐变化范围为 51.60–97.95  $\mu\text{g/L}$ , 磷酸盐变化范围为 3.10–11.61  $\mu\text{g/L}$ , 溶解氧变化范围为 6.8–9.6  $\text{mg/L}$ , 这些营养盐都是在 12 月份达到最大值; pH 在 3 月份达到最大值; COD 在 6 月达到最大值, 为 2.98  $\text{mg/L}$ 。

表 1 崂山湾人工鱼礁区环境因子  
Tab. 1 Variations of environmental factors in the artificial reef areas of Laoshan Bay

项目 Items	时间 Time(Y-M)			
	2011-03	2011-06	2011-09	2011-12
水温 Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	6.4	17.1	25.0	6.5
盐度 Salinity	33.04	33.42	34.60	32.92
pH	8.22	7.82	7.82	7.83
COD ( $\text{mg/L}$ )	1.80	2.98	2.49	1.95
BOD <sub>5</sub> ( $\text{mg/L}$ )	2.35	2.35	2.95	1.99
总无机氮 Total inorganic nitrogen ( $\mu\text{g/L}$ )	50.64	56.87	68.24	73.73
硅酸盐 Silicate ( $\mu\text{g/L}$ )	67.57	51.60	60.24	97.95
磷酸 Phosphate ( $\mu\text{g/L}$ )	11.61	7.27	3.10	11.07
溶解氧 Dissolved oxygen ( $\text{mg/L}$ )	7.6	6.8	7.7	9.6
透明度 Transparency (m)	2.13	1.17	3.20	1.27
叶绿素 Chlorophyll ( $\mu\text{g/L}$ )	6.5	8.1	9.2	3.3

### 2.2 浮游植物种类组成与数量分布

调查期间, 共检测到浮游植物 4 门, 69 种。其中, 硅藻门最多, 共 49 种, 占 71.01%; 其次为甲藻门, 18 种, 占 26.09%; 隐藻门和裸藻门各 1 种。3 月份优势种为中肋骨条藻, 亚优势种为新月菱形藻(*Nitzschia closterium*); 6 月份优势种为舟形藻(*Navicula* spp.), 亚优势种为斯氏几内亚藻(*Guinardia striata*); 9 月份优势种为中肋骨条藻, 亚优势种为裸甲藻(*Gymnodinium* sp.); 12 月份优势种为中肋骨条藻, 亚优势种为舟形藻。3 个人工鱼礁区的浮游植物密度如图 2 所示。由图 2 可以看出, 3 个礁区浮游植物密度变化趋势一致, 并且 9 月份鱼礁区浮游植物密度远大于其他月份浮游植物密度。图 3 显示了 3 个礁区浮

游植物密度平均值及温度的季节变化,从图 3 中可以看出,浮游植物密度均值与温度变化趋势一致,温度升高浮游植物密度增加,温度降低浮游植物密度减少,并且在温度最高的 9 月份,浮游植物密度均值达到了最大值。

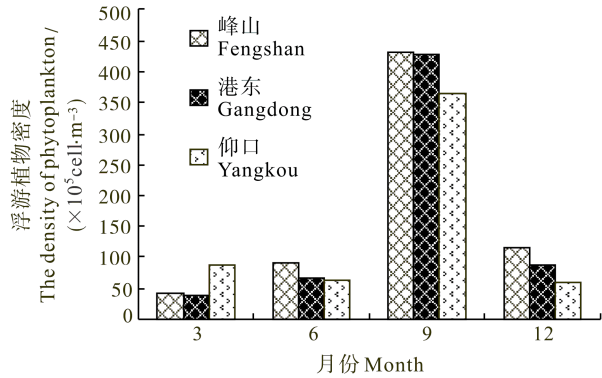


图 2 崂山湾 3 个人工鱼礁区浮游植物密度的季度变化

Fig.2 The seasonal variation of phytoplankton density of the three artificial reef areas of Laoshan Bay

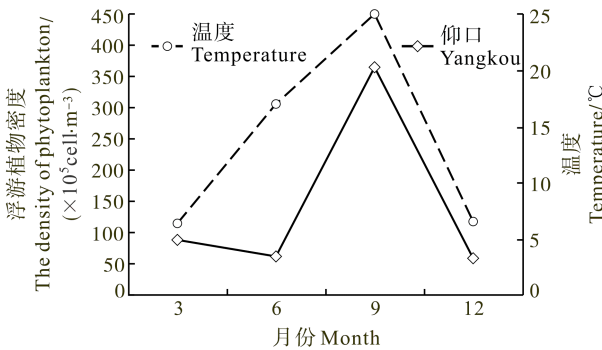


图 3 崂山湾 3 个人工鱼礁区浮游植物密度均值及温度的季节变化

Fig.3 The seasonal variation of average phytoplankton density and temperature of the three artificial reef areas of Laoshan Bay

### 2.3 群落物种多样性

4 个月份的群落多样性如图 4 所示, Shannon-Wiener 多样性指数( $H'$ )范围为 2.034–2.83,12 月份指数较低,9 月份最高。Margalef 丰富度指数( $d$ )范围为 5.27–7.25, 其变化规律与 Shannon-Wiener 指数相同。Pielou 均匀度指数( $J'$ )变幅为 0.58–0.78,12 月份最低,6 月份最高。

### 2.4 底栖藻类群落结构季节性变化的聚类分析

聚类分析结果表明,4 个月份的样本分成两组,其中,3 月和 6 月样本较为相似,相似程度为 43.02%,

9 月和 12 月样本为 42.38%(图 5)。

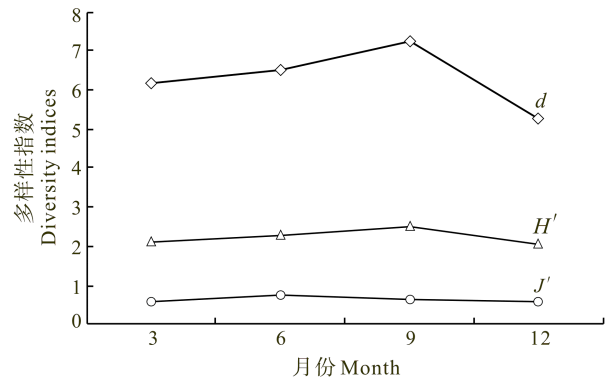


图 4 崂山湾人工鱼礁区浮游植物多样性指数的季度变化

Fig.4 The seasonal diversity indices of phytoplankton community of artificial reef areas of Laoshan Bay

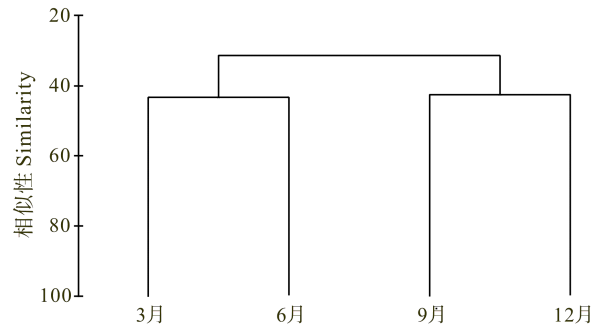


图 5 崂山湾人工鱼礁区浮游植物群落结构季节性变化聚类分析

Fig.5 Cluster analysis dendrogram for phytoplankton community in the artificial reef areas of Laoshan Bay

### 2.5 浮游植物群落结构与环境因子的关系

图 6 为浮游植物和环境因子关系的双序图,图 6 中带箭头的线段表示的是环境因子,小三角形代表浮游植物。其中,为了作图方便,将筛选出的浮游植物名称替换成代码(表 2)。将小三角形代表的点垂直投影到带箭头的线段上,通过投影点在线段上的位置可以得出该浮游植物与该环境因子的相关性,投影点离箭头越近,表示正相关性越大(Habib *et al*, 1997; 沈会涛等, 2008),处于另一端的则表示负相关性越大。在图 6 中,对于环境因子来讲,第一、第二排序轴间的相关系数都为 0,说明排序结果是可信的(郝占庆等, 2003)。从图 6 中可以看出,磷酸盐、温度、硅酸盐 3 个环境因子周围浮游植物最多,说明这 3 个环境因子影响的浮游植物最多,为浮游植物的主要影响因素。其中,优势种新月菱形藻、舟形藻、斯氏几内亚藻的主要影响因素为磷酸盐,中肋骨条藻的主要影响因素为 COD,裸甲藻的主要影响因素为水温。

表 2 CCA 分析中浮游植物种类代码  
Tab. 2 Codes of phytoplankton species for CCA

代码 Code	种类 Species	代码 Code	种类 Species
P1	加拉星平藻( <i>Asteroplanus karianus</i> )	P20	窄隙角毛藻( <i>Chaetoceros affinis</i> )
P2	扭链角毛藻( <i>Chaetoceros torttissimus</i> )	P21	劳氏角毛藻( <i>Chaetoceros lorenzianus</i> )
P3	辐射圆筛藻( <i>Coscinodiscus radiatus</i> )	P22	旋链角毛藻( <i>Chaetoceros curvisetus</i> )
P4	圆筛藻( <i>Coscinodiscus</i> sp.)	P23	角毛藻( <i>Chaetoceros</i> spp.)
P5	柔弱几内亚藻( <i>Guinardia delicatula</i> )	P24	菱形海线藻( <i>Thalassionema nitzschioides</i> )
P6	膜状缪氏藻( <i>Meuniera membranacea</i> )	P25	圆海链藻( <i>Thalassiosira rotula</i> )
P7	舟形藻( <i>Navicula</i> spp.)	P26	亚历山大藻( <i>Alexandrium</i> sp.)
P8	新月菱形藻( <i>Nitzschia closterium</i> )	P27	前沟藻( <i>Amphidinium</i> sp.)
P9	尖刺拟菱形藻( <i>Pseudonitzschia pungens</i> )	P28	短楔形藻( <i>Licmophora abbreviata</i> )
P10	中肋骨条藻( <i>Skeletonema costatum</i> )	P29	三角棘原甲藻( <i>Prorocentrum triestinum</i> )
P11	裸甲藻( <i>Gymnodinium</i> sp.)	P30	小等刺硅鞭藻( <i>Dictyocha fibula</i> )
P12	隐藻( <i>Cryptophyceae</i> spp.)	P31	派格棍形藻( <i>Bacillaria paxillifera</i> )
P13	斯氏几内亚藻( <i>Guinardia striata</i> )	P32	密连角毛藻( <i>Chaetoceros densus</i> )
P14	长菱形藻( <i>Nitzschia longissima</i> )	P33	丹麦细柱藻( <i>Leptocylindrus danicus</i> )
P15	长菱形藻弯端变种( <i>Nitzschia longissima</i> var. <i>reversa</i> )	P34	膜状缪氏藻( <i>Meuniera membranacea</i> )
P16	近缘曲舟藻( <i>Pleurosigma affine</i> )	P35	直舟形藻( <i>Navicula directa</i> )
P17	曲舟藻( <i>Pleurosigma</i> spp.)	P36	菱形藻( <i>Nitzschia</i> spp.)
P18	刚毛根管藻( <i>Rhizosolenia setigera</i> )	P37	叉状角藻( <i>Ceratium furca</i> )
P19	裸藻( <i>Eutreptia</i> sp.)		

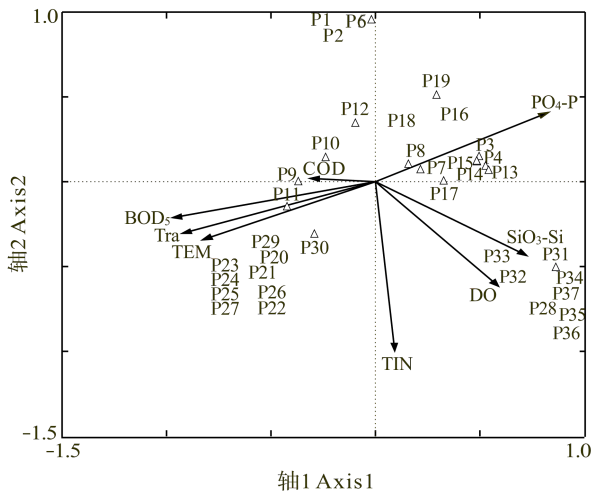


图 6 崂山湾人工鱼礁区浮游植物物种与环境关系的 CCA 排序

Fig.6 CCA biplot of phytoplankton species and environmental variables in the artificial reef areas of Laoshan Bay

### 3 讨论

通过 2011 年对崂山湾人工鱼礁区的 4 次采样，共观察到 69 种浮游植物，9 月份浮游植物密度达到  $408.65 \times 10^5 \text{cell/m}^3$ ，远高于其他月份，同时，水温、盐度、BOD<sub>5</sub>、透明度、叶绿素 a 都在 9 月份达到最大值，通过 CCA 排序图(图 5)也可以看出，劳氏角毛

藻、旋链角毛藻、角毛藻、菱形海线藻、圆海链藻、亚历山大藻、前沟藻、三角棘原甲藻、小等刺硅鞭藻这 9 种浮游植物与水温有很高的正相关，并且 9 月份水温为 25℃，这一水温适合许多浮游植物生长和繁殖，因此在水温最高的 9 月份这些浮游植物能够很好的生长繁殖，从而使 9 月份浮游植物密度达到最大值。中肋骨条藻为 6、9、12 月份最优种，这可能与中肋骨条藻属于近岸广温类群有关(林更铭等，1993；康元德，1991)。

3 个人工鱼礁区浮游植物密度的年变化趋势基本一致，虽然在 6 月、9 月、12 月中，浮游植物的密度都是峰山 > 港东 > 仰口，但是它们之间的差异并不大，统计它们的平均密度，其变化范围为  $49.78 \times 10^5 \text{cell/m}^3$ (12 月)– $408.65 \times 10^5 \text{cell/m}^3$ (9 月)。

从聚类分析中能够看出，在相似度大约为 40% 时，3 月份与 6 月份分在一组，9 月份与 12 月份分在一组。这表明 3 月份与 6 月份有很多相同的浮游植物种类，这可能是因为从 3 月份到 6 月份环境因子不断变化，一部分浮游植物由于不适应新的环境因子而减少或死亡，另一部分浮游植物能够继续存活到 6 月份，从而使 3 月份与 6 月份相似度达到了 43.02%；9 月份与 12 月份相似度达到了 42.38% 也可能是因为同样的原因；而 6 月份与 9 月份相似度不高可能也是因

为环境因子发生变化,大部分原有的浮游植物不适应新的环境而死亡,一些适应新环境的其他浮游植物迅速生长繁殖,从而使 6 月与 9 月相似度较低。

本研究对崂山湾人工鱼礁区浮游植物群落与环境因子进行了典范对应分析,结果表明,磷酸盐、水温和硅酸盐是影响这一区域物种分布格局的重要因素。其中磷酸盐和硅酸盐都是浮游植物赖以生存的物质基础,磷酸在浮游植物密度最高的 9 月份达到最低值,这表明磷酸盐与该礁区浮游植物呈负相关,图 5 也显示出大部分浮游植物与磷酸盐呈负相关,这也与崔毅等(2000)研究的浮游植物与环境因子关系的结果一致。浮游植物都需要有适合的水温才能生长繁殖。结果表明,该礁区浮游植物与水温有很强的正相关,从而在水温最高的 9 月份浮游植物密度达到最大值。这也与该礁区在这次调查中并未出现异常高温有关,最高水温为 25℃,没有超出该礁区 9 月份浮游植物优势种类生长繁殖适宜的温度(中肋骨条藻在水温 0–37℃之间均可生长,最适生长温度为 24–28℃,裸甲藻高密度、高频率出现的温度范围在 24–26℃)<sup>1)</sup>。

不同海域具有不同的主要影响因子,杨柳等(2011)阐明无机氮、水温和透明度对浮游植物群落影响较大,CCA 能够很好的展现浮游植物与环境因子的关系,同时从图 6 中也可以看出,不同浮游植物有不同环境影响因子,这也与浮游植物自身的生活习性有关。通过对崂山湾人工鱼礁区浮游植物的调查,能够监测人工鱼礁区浮游植物和水质情况,并且通过 CCA 探究了该人工鱼礁区浮游植物与环境因子的关系,从而为人工鱼礁建设以及评估提供参考。

## 参 考 文 献

孙雪梅,夏斌,过锋,等. 青岛崂山近岸海域浮游植物群落结构及其与环境因子的关系. 渔业科学进展, 2013, 34(2):

46–53

- 崔毅,陈碧鹃,马绍赛. 乳山湾浮游植物与环境因子的相关关系研究. 应用生态学报, 2000, 11(6): 935–938
- 郝占庆,郭水良,叶吉. 长白山北坡木本植物分布与环境关系的典范对应分析. 植物生态学报, 2003, 27(6): 733–741
- 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
- 国家技术监督局. 海洋监测规范(GB 17378), 2007, 北京: 中国标准出版社
- 国家技术监督局海洋调查规范(GB 12763), 2007, 北京: 中国标准出版社
- 林更铭,杨清良,林金美. 厦门岛周围海域浮游植物与环境因子的关系. 海洋通报, 1993, 12(6): 40–45
- 沈会涛,刘存歧. 白洋淀浮游植物群落及其与环境因子的典范对应分析. 湖泊科学, 2008, 20(1): 773–779
- 王朝晖,陈菊芳,徐宁,等. 大亚湾裸甲藻种群的季节变化与环境条件的关系. 生态学报, 2001, 21(11): 1825–1832
- 杨柳,张硕,孙满昌,等. 海州湾人工鱼礁区浮游植物与环境因子关系的研究. 上海海洋大学学报, 2011, 20(3): 445–450
- Clarke KR, Warwick RM. Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation (2nd Edition). PRIMER - E, Plymouth, 2001, 2–15
- Flores LN, Barone R. Phytoplankton dynamics in two reservoirs with different trophic state (Lake Rosamarina and Lake Arancio, Sicily, Italy). Hydrobiologia, 1998, 369/370: 163–178
- Habib OA, Tippett R, Murphy KJ. Seasonal changes in phytoplankton community structure in relation to physico-chemical factors in Loch Lomond, Scotland. Hydrobiologia, 1997, 350: 63–79
- Lopes MRM, Bicudo CEM, Ferragut MC. Short term spatial and temporal variation of phytoplankton in a shallow tropical oligotrophic reservoir, southeast Brazil. Hydrobiologia, 2005, 542 (1): 235–247
- Muylaert K, Sabbe K, Vyverman W. Spatial and temporal dynamics of phytoplankton communities in a freshwater tidal estuary (Schelde, Belgium). Estuarine, Coastal and Shelf Science, 2000, 50: 673–687

(编辑 刘丛力)

1) 林学政,王能飞,郝林华,等. 中肋骨条藻. 外表海洋物种数据库. 2006

## Relationships Between the Structure of Phytoplankton Community and Environmental Factors in Three Artificial Reef Areas of Laoshan Bay

WANG Xin , SHENG Huaxiang, TANG Yanli , HUANG Liuyi, WAN Rong

(College of Fisheries, Ocean University of China, Qingdao 266003)

**Abstract** In this study, we examined the phytoplankton community in the artificial reef areas of Laoshan Bay, and analyzed the relationships between phytoplankton and environment factors. Hence we provided references for the construction and evaluation of artificial reefs. The data and water samples were collected from four surveys in three artificial reef areas (Fengshan, Yangkou and Gangdong) of Laoshan Bay from March to December in 2011. By using Primer 5.0, we calculated the Shannon-Wiener, Margalef and Pielou of the phytoplankton community. We monitored the quarterly changes of phytoplankton community with cluster analysis, and applied Canonical Correspondence Analysis (CCA) to explore the relationship between phytoplankton species and the environmental factors using Canoco 4.5. In four surveys we identified a total of 69 species with microscope. We found that the dominant species was *Skeletonema costatum* in March, September and December, and it was *Navicula spp* in June. The density of phytoplankton in December was  $49.78 \times 10^5$  cell/m<sup>3</sup>, which was the lowest in this survey. The density of phytoplankton in September was up to  $408.65 \times 10^5$  cell/m<sup>3</sup>, which was the highest among all months. Shannon-Wiener and Margalef varied from 2.034 to 2.83, and from 5.27 to 7.25 respectively, both of which reached the maximum in September and the minimum in December. The range of Pielou was 0.58–0.78, and it reached the maximum in June and the minimum in December. According to the cluster analysis, the degree of similarity between March and June was 43.02%, and it was up to 42.38% between September and December. The species-environment bi-plots were drawn based on the results of CCA. The results showed that phosphate, temperature and silicate were the most important factors that influenced the distribution of phytoplankton species.

**Key words** Phytoplankton; Artificial reef; Environmental factors; Canonical correspondence

# 象山港南沙岛不同养殖模式沉积物 微生物群落结构分析\*



孙超<sup>1,2</sup> 朱玲<sup>1</sup> 毛玉泽<sup>1</sup> 范艳君<sup>1</sup> 周春娅<sup>1</sup>  
杨傲傲<sup>1</sup> 朱伟<sup>2</sup> 庄志猛<sup>1</sup>

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 山东省渔业资源与生态环境重点实验室 中国水产科学研究院  
黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 青岛农业大学生命科学学院 青岛 266109)

**摘要** 通过构建 16S rDNA 克隆文库对象山港南沙岛不同养殖模式(贝类养殖、藻类养殖及网箱养殖)表层沉积物微生物多样性和群落结构特征进行了比较和分析,共获取 136 个 OUT。其中,贝类养殖区、藻类养殖区和网箱养殖区 OTU 分别为 58、48 和 57 个。各站位 OTU 分布差异明显,表现出高度的多样性。基于 16S rDNA 序列的生物多样性和丰富度分析表明,网箱养殖区丰富度指数 ACE 为 739,香浓指数  $H'$  为 3.8,均为最高值,丰富度指数  $Chao$  为 245,略低于于贝类养殖区。贝类养殖区丰富度指数  $Chao$  为 303,在各养殖区中最高。藻类养殖区丰富度指数 ACE 为 174、 $Chao$  为 89,香浓指数  $H'$  为 3.6,均为最低值。系统发育分析表明,南沙岛各养殖区的优势种群均为变形菌门(Proteobacteria),但是藻类养殖区微生物群落结构与其他养殖区域相比,16S rDNA 克隆文库差异显著,其中根瘤菌属(*Rhizobium*)及其他光合细菌在藻类养殖区分布较多。网箱养殖区沉积物表层微生物群落中出现了与环境污染密切相关的菌群,如志贺氏菌属(*Shigella*)、埃希氏菌属(*Escherichia*)和  $\epsilon$ -变形菌纲的微生物种群,揭示网箱养殖对底质沉积物环境的影响较大。

**关键词** 网箱养殖; 贝类养殖; 藻类养殖; 微生物群落结构; 象山港

中图分类号 S963 文献标识码 A 文章编号 1000-7075(2014)04-0013-09

微生物作为养殖生态系统的重要组成部分,在生源要素的分解与转化、有机污染物降解、能量流动及生态系统稳定性维护等方面发挥重要作用(Boynton *et al.*, 2008; 郑天凌等, 2002; 范艳君等, 2012)。沉积物是养殖系统中碳、氮、磷等营养元素的主要富集场所(过锋等, 2012; 张继红等, 2013),也是微生物的重要栖息地。碳、氮、磷和硫等生源要素在养殖系统中的富集和再循环影响或决定着沉积物中微生物群落的组成及其多样性,而沉积物微生物群落积极参与调控这些生源要素的再循环,驱动养殖系统环境演

替过程,是表征海水养殖沉积环境现状的理想生物标志物(宋金明, 2000)。近海养殖作为我国沿海地区的主要支柱产业,在创造巨大经济效益的同时,所引发的环境问题也日益突出,但关于微生物群落结构对养殖压力下沉积环境变化响应的研究还缺乏相关报道。象山港作为浙江省主要的海水养殖基地,誉称国家级“大鱼池”(胡文翔等, 1991)。通过研究象山港南沙岛网箱养殖区、贝类养殖区和藻类养殖区的表层沉积物微生物群落组成及分布特征,探讨不同养殖模式下,沉积物微生物群落对沉积环境变化的响应,为建立不

\*国家自然科学基金(40976073, 40776090)、国家海洋局海洋公益性行业科研专项(201305043)、中央分成海域使用金支出项目(2013551)和中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费项目(20603022013005)共同资助。孙超, E-mail: sun215766@126.com

通讯作者: 朱玲, 副研究员, E-mail: zhuling@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2012-06-29, 收修改稿日期: 2014-03-05



同养殖模式的微生物环境指示作用提供依据,为养殖污染区的生物修复技术提供了参考。

## 1 采样区域概述

象山港南沙岛位于浙江省宁波市裘村镇,平均水深约 13 m。网箱养殖是南沙港最重要的水产养殖方式,养殖面积约 61.8 hm<sup>2</sup>,年产量约 1000 t,养殖品种主要为鲈鱼、大黄鱼、美国红鱼等,养殖周期一般为 2–3 yr。近年来,为促进该海域网箱养殖的健康发展,同时开展贝类和藻类养殖,贝类养殖品种为褶牡蛎为主,养殖面积约 5.1 hm<sup>2</sup>;藻类主要养殖品种为海带和龙须菜,养殖面积约为 74.7 hm<sup>2</sup>。

## 2 材料与方法

### 2.1 沉积物的采集及理化性质分析

2007 年 1 月,选取象山港南沙岛网箱养殖区(10 号-S10)、贝类养殖区(1 号-S1)和藻类养殖区(2 号-S2)为研究目标,采用无干扰多管柱状采泥器采集沉积物样品。收集上覆水后,将 0–2 cm 表层样品均匀混合,分别用灭菌的 50 ml 聚丙烯管收集,一份保存于 4℃ 冰箱中,用于沉积物样品的理化因子测定;另 1 份保存于–20℃ 冰箱中,用于沉积物基因组 DNA 提取。每个研究区域设置 3 个重复。

用 GF/F 玻璃纤维滤膜过滤各站位上覆水和 7000 r/min、20 min 离心后获得的沉积物上清液,后用于营养盐分析。营养盐测定方法参照《海洋监测规范》(GB17387.4, 2007)进行,磷酸盐(PO<sub>4</sub>-P)采用磷钼蓝法测定;氨氮(NH<sub>4</sub>-N)采用次溴酸盐氧化法测定;亚硝酸盐(NO<sub>2</sub>-N)采用萘乙二胺法测定;硝酸盐(NO<sub>3</sub>-N)采用镉柱还原法测定;表层酸挥发性硫化物(AVS)采用亚甲基蓝光度法测定。

### 2.2 沉积物 DNA 的提取

取 0.4 g 沉积物加入 0.6 ml 清洗液(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 200 mmol/L NaCl, 5 mmol/L Na<sub>2</sub>-EDTA, 1% PVP, 1% CTAB),充分振荡混匀后,55℃ 水浴 5 min,离心去上清液。重复以上操作两次后,向离心管中加入 0.4 ml DNA 提取液(100 mmol/L Tris-HCl pH 8, 100 mmol/L Na<sub>2</sub>-EDTA, 100 mmol/L Sodium phosphate pH 8, 1.5 mol/L NaCl, 1% CTAB),5μl 溶菌酶振荡混匀,于 37℃ 水浴 30 min 后,加入 80 μl 10% SDS 和 4 μl 蛋白酶 K,55℃ 水浴 2 h。然后加入 1/2 体积 4.5 mol/L 的 NaCl,混合均匀,再加入等体积的氯仿–

异戊醇(24:1),轻微震荡 15 min 后,12000 r/min 离心 5 min,取上清液。最后,加入 0.6 体积的异丙醇,混匀,室温静置 15 min 后,12000 r/min 离心 15 min,超纯水溶解。溶解的 DNA 经 1.5% 琼脂糖电泳检测。

### 2.3 16S rDNA 克隆文库构建

以溶解的 DNA 为模板,以 GC341F(5'- CCT ACG GGA GGC AGC AG -3')和 907R(5'- CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT -3')为引物进行 PCR 扩增。25 μl 的 PCR 反应体系包括:2.5 μl 10× PCR Buffer, 1.5 μl MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L), 2 μl dNTP (25 mmol/L), 1 μl 引物 (10 μmol/L), 0.2 μl (1U) Taq 酶, 1 μl DNA 模板, 15.8 μl PCR 水。PCR 反应条件为:94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 34 s, 54℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 45 s, 30 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。

将每个养殖区 3 个重复样品的 PCR 产物混合,切胶纯化,与 pMD18-T (TaKaRa)载体连接后,转化到大肠杆菌 TOP10 感受态细胞中,构建 16S rDNA 克隆文库。

### 2.4 测序与克隆文库分析

通过“蓝白斑”筛选,每个养殖区随机检出 130 个白色菌落,利用载体通用引物 M13F/M13R 进行菌落的 PCR 筛选,去除假阳性和非目标克隆后,选取 100 个阳性克隆进行测序。

利用 MOTHUR 软件将相似性 97% 的 16S rDNA 序列归为同一个操作分类单元(Operational Taxonomic Units, OTUs),估算每 16S rDNA 克隆文库的丰富度指数 *Chao* 和 *ACE* 和多样性指数 Shannon-Weiner (*H'*)。

覆盖百分率(Coverage, *C*)通过公式  $C = [1 - (n1/N)] \times 100\%$  计算

式中 *n1* 为克隆文库中仅出现一次的 OTU 数目, *N* 为每个克隆文库的克隆总数。

### 2.5 系统发育分析

序列相似性搜索通过 GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的 Blastx 程序进行,选取相似性最高的序列作为构建系统进化树的参照序列。利用 EBI 的 ClustalW2 程序(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)和 MEGA 4.0 软件,采用 Neighbor-Joining 方法构建系统发育树,进行系统发育分析。

## 3 结果与分析

### 3.1 采样区域的理化性质分析

采样区域沉积环境的理化性质见表 1。上覆水中

表 1 采样站位的理化性质  
Tab.1 Physical and biogeochemical characteristics of the sampling sites

站点 Station	NO <sub>2</sub> -N(μmol/L)		NO <sub>3</sub> -N(μmol/L)		NH <sub>4</sub> -N(μmol/L)		PO <sub>4</sub> -P(μmol/L)		AVS(μmol/g)
	上覆水 Overlying water	间隙水 Pore water	上覆水 Overlying water	间隙水 Pore water	上覆水 Overlying water	间隙水 Pore water	上覆水 Overlying water	间隙水 Pore water	
S10	1.11	0.23	50.00	142.05	3.96	96.31	9.05	103.66	12.625
S1	0.93	6.03	62.14	101.59	11.43	65.29	2.57	78.57	0.784
S2	0.93	0.45	61.07	452.38	7.64	51.28	2.36	4.55	0.088

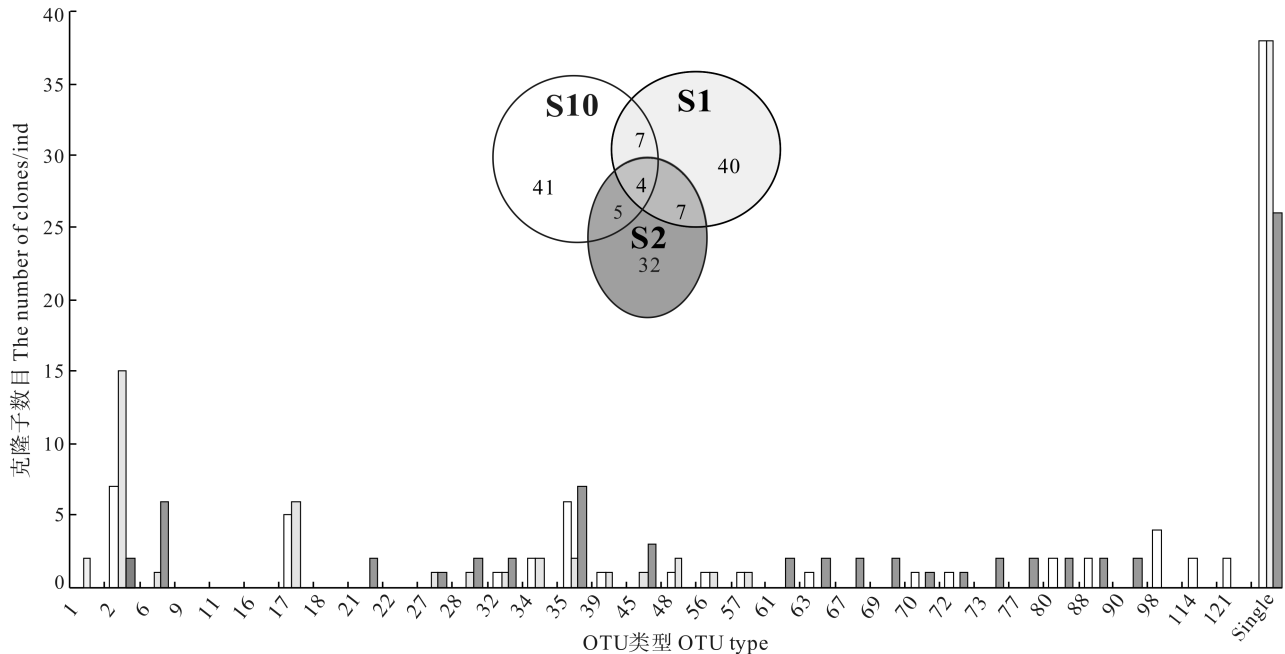


图 1 南沙岛不同养殖区域细菌 16S rDNA 基因克隆文库 OTUs 的分布

Fig.1 OTUs patterns of the 16S rDNA clone libraries from sediments of the Nansha Bay

NO<sub>2</sub>-N 和 NO<sub>3</sub>-N 在 3 个养殖区变化不明显。但在间隙水中, 贝类养殖区的 NO<sub>2</sub>-N 明显高于网箱养殖区和藻类养殖区, 分别是二者的 26.2 倍和 13.4 倍; 藻类养殖区的 NO<sub>3</sub>-N 最高, 是网箱养殖区的 3.18 倍, 贝类养殖区的 4.45 倍。上覆水 NH<sub>4</sub>-N 含量贝类养殖区最高, 网箱养殖区最低; 但在间隙水中, 网箱养殖区最高, 藻类养殖区最低。PO<sub>4</sub>-P 在上覆水和间隙水中表现出相同的变化趋势, 均是网箱养殖区最高, 藻类养殖区最低, 相差 3.83 倍和 22.78 倍。表层沉积物 AVS 含量网箱养殖区最高, 分别是贝类养殖区和藻类养殖区的 16.10 倍和 143.47 倍。

### 3.2 16S rDNA 克隆文库分析

3 个养殖区测序 300 个阳性克隆子共获得 240 个有效的 16S rDNA 序列, 每个站位 80 个。利用 Mothur 分析软件, 将序列相似性 97% 定义为同一 OTU, 可将 240 个 16S rDNA 序列归属于 136 个 OTU 类型。

不同养殖区克隆文库的 OTU 类型、分布及包含的克隆子数目如图 1 所示。S10 与 S1 所包含的 OTU 数目和单克隆 OTU 数目类似, 分别为 57/38 和 58/38, 均高于 S2(48/26)。尽管 3 个养殖区共有的 OTU 类型只有 4 个, 但所含克隆子比例却很高, 分别为 S10(23.74%)、S1(30%) 和 S2(15%), 其中 OTU2 是 S1 的主要优势种群(18.75%) 和 S10 的次优势种群(8.75%), OTU35 是 S1 和 S2 的次优势种群, 两者没有主要优势种群。

### 3.3 16S rDNA 克隆文库多样性分析

不同养殖区 OTUs 数目、文库覆盖百分率 *C*、丰富度指数 *Chao* 和 *ACE* 和多样性指数 *H'* 的分析结果见表 2。由表 2 可以看出, *C* 越高, 表明文库表达真实环境中 16S rDNA 基因群落结构的置信度越高; 相同库容下, *C* 越低, 说明真实环境中 16S rDNA 基因群落多样性越高。3 个养殖区 16S rDNA 克隆文库的覆盖百分率均没有达到饱和, 表明每个站位 80 个克

表 2 南沙岛沉积物 16S rDNA 克隆文库覆盖百分率、丰富度指数与多样性指数

Tab.2 The calculations of the coverage, richness index and diversity indices of 16S rDNA clone libraries from sediments of the Nansha Bay

站位 Station	16S rDNA clones 数目	OTUs 数目	C(%)	Chao	ACE	H
S10	80	57	28.75	245 (134/415)	739 (542/1015)	3.8 (3.6/4.0)
S1	80	58	27.5	313 (160/495)	330 (166/744)	3.6 (3.5/4.0)
S2	80	48	40	89 (65/149)	174 (125/253)	3.6 (3.4/3.8)

隆子的库容还不能完全反映各养殖区微生物的群落结构组成。S10 与 S1 的 *C* 远远低于 S2, 说明贝类养殖区和网箱养殖区沉积物微生物群落多样性远远高于藻类养殖区。丰富度指数和 *ACE* 分析也表明, 网箱养殖区和贝类养殖区微生物丰富度远高于藻类养殖区, *Chao* 指数是藻类养殖区的 2.75 和 3.52 倍; *ACE* 指数是藻类养殖区的 4.25 和 1.90 倍。

### 3.4 16S rDNA 的系统发育分析

将测序所得 16S rDNA 序列在 GenBank 中进行对比, 得到不同站位细菌的分类, 可以看出 S1、S2 和 S10 站位的优势种群均为变形菌门(Proteobacteria), 其克隆数分别占其克隆数的 58%、69%和 65%。拟杆菌门(Bacteroidetes)仅次于变形菌门, 在不同站位沉积物中大量分布, 都占克隆总数的 13%。此外 S1 站点厚壁菌门(Firmicutes)含量也超过 10%, 占克隆总数的 19%, 大于 S2 和 S10 站位 13%(图 2)。

象山港沉积物中微生物还包括绿弯菌(*Chloroflexi*), 放线菌(*Actinobacteria*), 酸杆菌(*Acidobacteria*), 硝化螺旋菌(*Nitrospirae*), 浮霉菌(*Planctomycetes*), 疣微菌(*Verrucomicrobia*), 它们在不同站位中的分布均比较少, 各细菌占总克隆数的比例都小于 10%。

在 GenBank 中选取部分相似性最高的序列与所有 OTU 类型随机序列一起, 利用 ClustalW2 程序和 MEGA 4.0 软件构建系统进化树如图 3a-图 3b 所示。从图 3a-图 3b 可以看出, 象山港不同养殖区沉积物 16S rDNA 细菌系统发育树可以划分为 9 个门类。其中变形菌门为各个站位的优势种群, 包括  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  和  $\epsilon$  亚纲。

$\gamma$ -变形菌亚纲包括 24 个 OTUs, 进化分支为 3 大支, 主要包括 S1 的优势种群 OTU2 和 S2、S10 的次优势种群 OTU17。OTU2 包括 23 个克隆子, 其中 15 个克隆子属于 S1, 2 个克隆子属于 S2, 7 个克隆子属

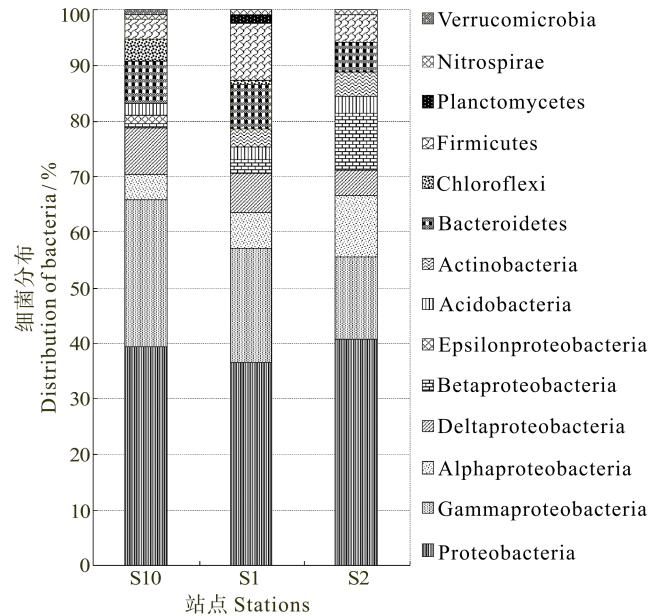


图 2 S1、S2 和 S10 站位细菌分布

Fig.2 Distribution of bacteria at S1, S2 and S10 stations

于 S10, 这些序列与已知的海岸养殖排放废水的假单胞菌 *Pseudomonas* AHJ1(JN834008)相似性较高; OTU17 包括 11 个克隆子, 其中有 6 个克隆子属于 S2, 10 个克隆子属于 S10, 这些序列与大肠杆菌 *Escherichia coli*(HE605049)相似性为 96%。

$\beta$ -变形菌包括 19 个 OTUs, 进化分支为两大支, 主要属于伯克氏菌目(*Burkholderiales*)和红环菌目(*Rhodocyclales*)。包括 S2 的次优势种群 OTU6。OTU6 共有 6 个克隆子, 全部属于 S2 克隆文库, 这些序列与珠江口富营养化水域中的细菌 *Methyloversatilis* sp.(JN177630)具有 97%的相似性。另外还发现 OTU59 与南极冰雪融水里的细菌 *Uncultured Curvibacter* sp.(FJ946584)具有 96%的相似性。不同站位之间细菌数量变化较为明显, 主要聚集在 S2 站位, S1 也稍有分布。

$\alpha$ -变形菌亚纲包括 18 个 OTUs, 进化分支分为 4 个大分支。实验得到 30 个克隆子属于这一类群, 占变形菌门的 19.6%。其中 7 个克隆子(S1:2; S2:1; S10:4)属于红杆菌目(*Rhodobacterales*), 7 个克隆子(S1:3; S2:4)属于根瘤菌目(*Rhizobiales*), 8 个克隆子(S1:1; S2:4; S10:7)属于鞘脂单胞菌目(*Sphingomonadales*), 8 个克隆子(S1:1; S2:7)属于柄杆菌目(*Caulobacterales*)。

放线菌在 S10 站点没有分布, 大量聚集在 S1 和 S2, 主要属于丙酸杆菌属(*Propionibacterium*)和棒杆菌属(*Corynebacterium*)。硝化螺旋菌只在 S2 有分布, 与 GenBank 登录序列 FJ484473(*Uncultured Nitrospirae* bacterium)有较高的相似率。酸杆菌大量聚集在

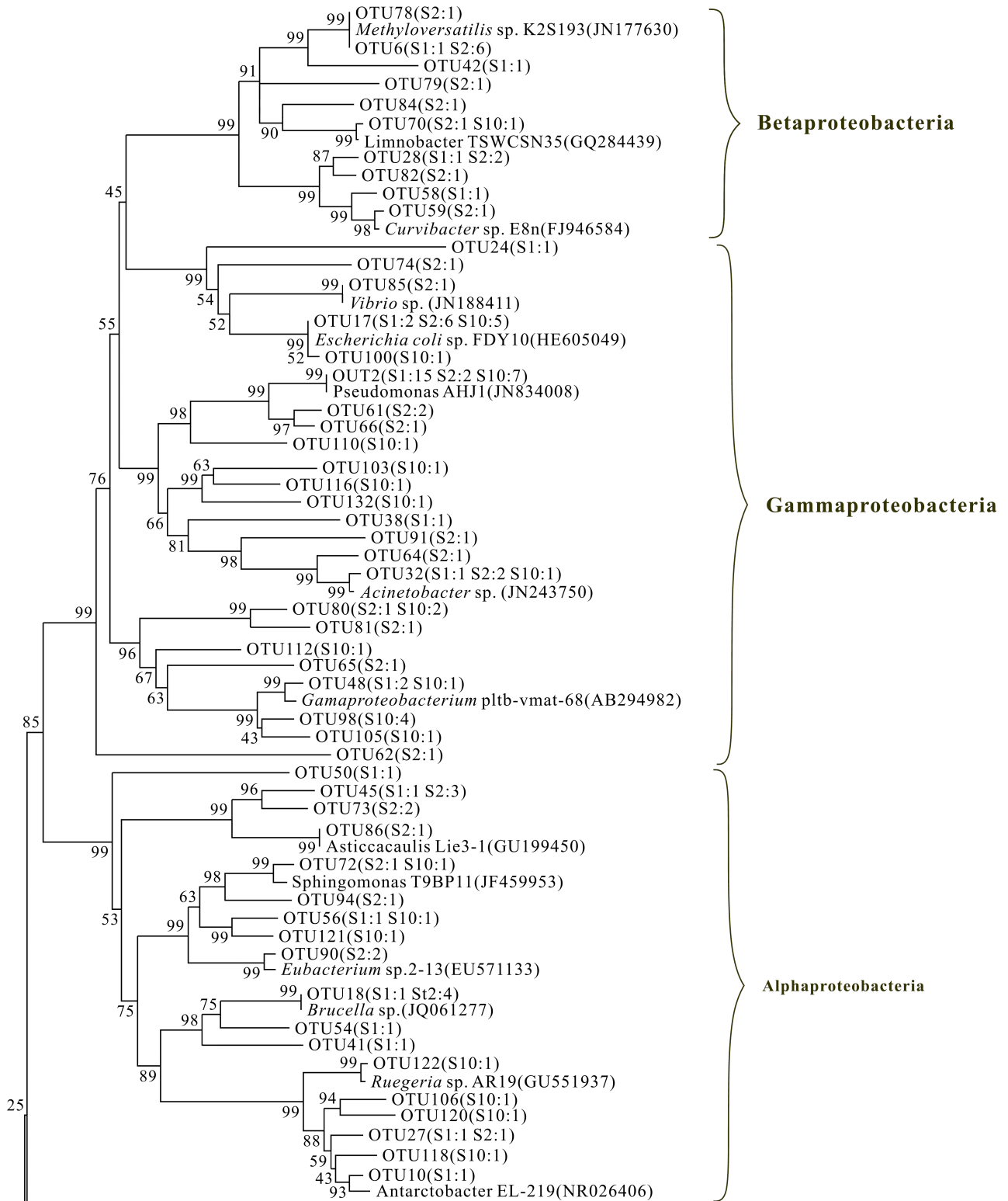


图 3a 南沙岛不同养殖区域细菌 16S rDNA 系统发育分析  
 Fig.3a Phylogenetic affiliation of 16S rRNA gene fragments at Nansha Bay

S1 和 S10 与 Genbank 登录序列 JF344475 (Uncultured *Acidobacteria* bacterium) 有较高的相似率。拟杆菌门 (Bacteroidetes) 组成, 主要包括 17 个 OTUs, 进化分

支为两个大分支。拟杆菌在不同养殖模式沉积物中的分布相对比较均匀, 主要与 *Cytophaga*(DQ070835)、*Robiginitalea* sp.(FJ872534) 和 *Salibacter*(AM712887) 聚

在一起。绿弯菌、疣微菌和浮霉菌在各站位的分布较少。

### 3.5 不同站点克隆文库之间比较

利用 LIBSHUFF 分析方法测定各处理克隆文

库之间的差异, 结果见表 3。从表 3 可以看出, 3 个站点两两比较, S1、S2 站点之间和 S2、S10 站点之间的 16S 克隆文库有显著变化( $P < 0.05$ ), 说明 S2 站点 16S 克隆文库与其他站点文库存在显著性差异。S1 和

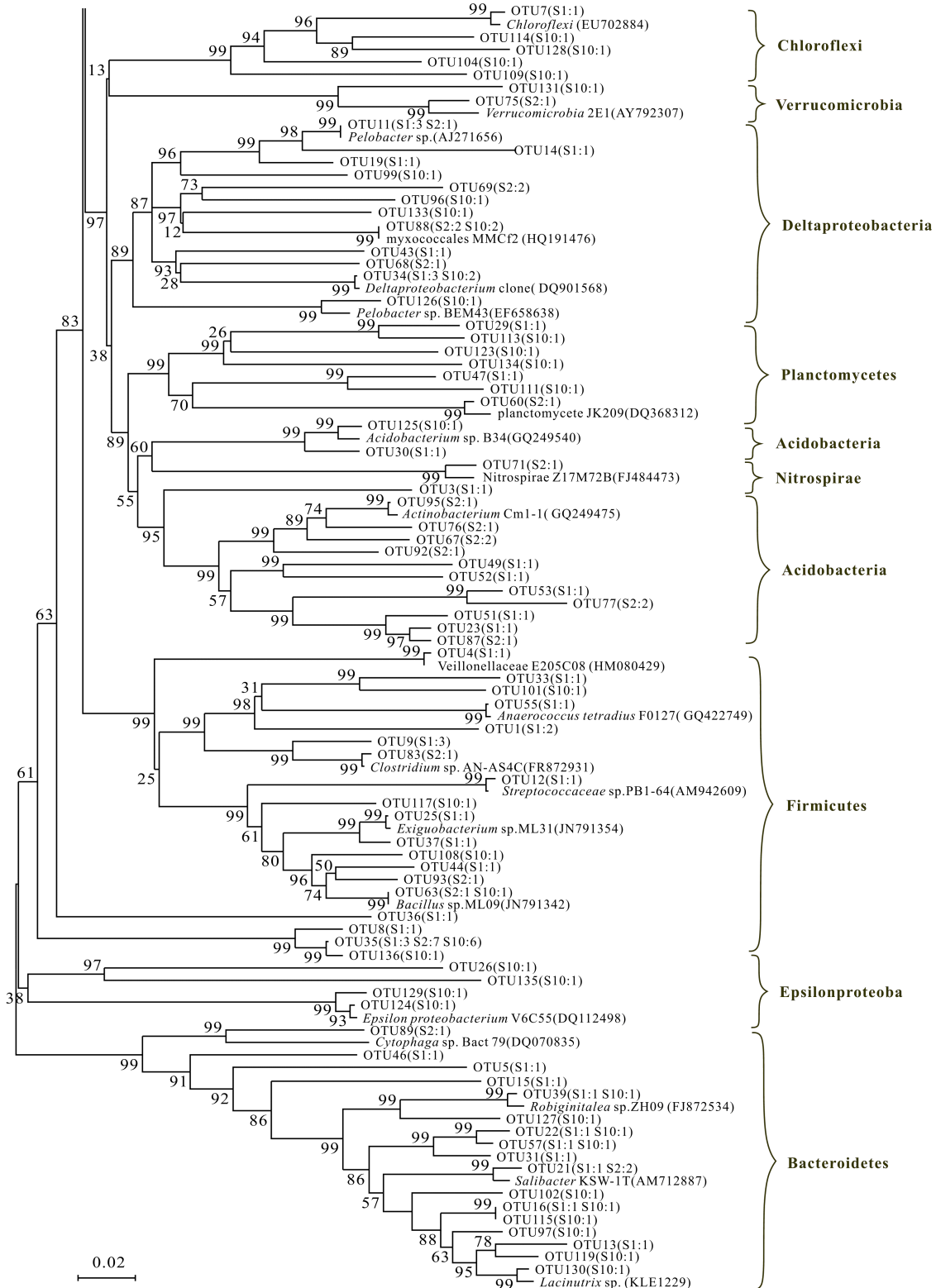


图 3b 南沙岛不同养殖区域细菌 16S rDNA 系统发育分析  
Fig.3b Phylogenetic affiliation of 16S rRNA gene fragments at Nansha Bay

表 3 不同站点 16S 克隆文库组成比较

Tab.3 Pairwise comparisons of phylotype compositions of 16S rDNA libraries

比对 Comparison	显著分析 Significance	比对 Comparison	显著分析 Significance
S1-S2	0.0195	S2-S1	0.0479
S1-S10	0.1953	S10-S1	0.1522
S2-S10	<0.0001	S10-S2	0.0104

S10 站点的 16S 克隆文库没有显著变化( $P>0.05$ ), 说明 S1 和 S10 站点 16S 克隆文库差异不显著。结合多样性分析来看, 养殖的不同类型对微生物的多样性和群落结构产生了显著影响, 网箱养殖微生物多样性较高, 群落结构与贝类养殖区相似, 藻类养殖区的多样性与群落结构与网箱和贝类养殖不同, 微生物多样性较低。

利用 Mouthur 软件进一步对 3 个站点细菌群落结构相似性聚类分析, 通过 16S 基因文库的序列相互比对分析发现 S2 站位不同于其他两个站位(图 4), S1 站位和 S10 站位群落结构相似, 进一步说明 S2(贝类养殖区)细菌群落结构不同于其他站位。

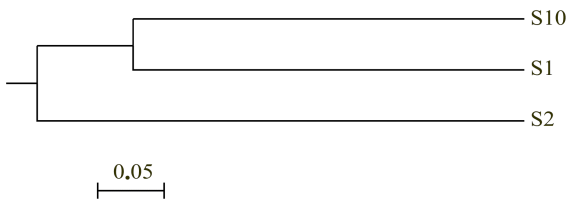


图 4 各个站位沉积物样品的细菌群落结构相似性聚类分析  
Fig.4 Similarity clustering analysis of bacterial community structure of different sites

#### 4 讨论

已有研究表明, 养殖业对环境影响往往会表现为沉积物微生物多样性的改变和群落结构的变化(薛恒平等, 1997; 刘晶晶等, 2006; 刘斌等, 2010)。Caruso 等(2003)研究表明, 鱼类养殖加剧了水体和底泥中微生物的活动, 养殖后水体中异氧细菌数量虽无较大改变, 但沉积物中变化显著, 并且这种影响还播及到远离养殖区的对照点。本研究通过克隆文库的方法对不同养殖区表层沉积物中微生物群落结构进行了对比分析, 研究发现, 系统进化树中 3 个文库的大部分克隆都集中在变形菌(*Proteobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)和厚壁菌门(*Firmicutes*)中, 存在分布差异的种群如绿弯菌门, 疣微菌, 放线菌门和浮霉菌, 它们在各站位的分布较少, 这表明象山港南沙岛不同

养殖区表层沉积物微生物群落结构相似。

16S rDNA 克隆文库分析表明, 优势种群变形菌门 3 个养殖区沉积物中均有分布, 包含 5 个亚纲( $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -和  $\epsilon$ -), 而且随着养殖模式的不同, 包含的克隆数量也不相同。 $\gamma$ -变形菌占网箱养殖区细菌总数的 41%, 大于其他养殖类型中这一比例。其中还在网箱养殖区检测到了大量病原菌贺氏菌属(*Shigella*)与埃希氏菌属(*Escherichia*)的存在, 推测  $\gamma$ -变形菌大量的分布同时伴有病原菌的增殖与网箱养殖区受有机污染较严重有关(La Rosa *et al.*, 2001; 郭芳等, 2006; Castine *et al.*, 2009)。 $\beta$ -变形菌和  $\alpha$ -变形菌亚纲在藻类养殖区大量分布, 而在贝类和网箱养殖区分布较少。 $\beta$ -变形菌纲( $\beta$ -proteobacteria)中 S2 的次优势种群 OTU6 是根瘤菌属(*Rhizobium*), 能够以硝酸盐作为氮源和电子受体进行固氮作用(Brümmer *et al.*, 2003; 侯建军等, 2005)。 $\alpha$ -变形菌门是海洋异养细菌中的一个优势种群, 一般在近海的富营养化海域  $\alpha$ -变形菌纲数量多意味着研究海域的初级生产力较高(Bowman *et al.*, 2003)。大型藻类的生物固氮及光合作用可能是造成这两种群分布差异的主要因素(Brümmer *et al.*, 2003)。 $\delta$ -变形菌在群落组成中占有很大比重, 分别占贝类、藻类和网箱养殖区细菌总数的 11%、8%和 15%。该细菌属于有机化能营养菌, 多数为硫酸盐还原细菌(SRB), 能够参与硫代谢反应(Mounier *et al.*, 2004; Mantzavrakosa *et al.*, 2007), 厌氧降解很多海洋环境中的有机污染物(Inagaki *et al.*, 2003)。研究结果显示, 网箱养殖区  $\delta$ -变形菌分布较多, 而藻类养殖区分布较少, 这一结果可能与网箱养殖区受硫污染较严重有关。上述结果表现出微生物对不同沉积物环境的适应, 说明虽然 3 种养殖区沉积物中微生物群落结构相似, 但其群落分布存在差异。

网箱养殖区表层沉积物还检测到独特的种群,  $\epsilon$ -变形菌纲克隆在文库中所占比例仅为 5%, 而且只在网箱养殖区出现, 这与 Asami 等(2005)研究的结果一致。 $\epsilon$ -变形菌纲最近被研究认为是一种混合自养性类群, 普遍存在与海洋和陆地生态系统中(Spring *et al.*, 2000), 在生物化学和地质学进程中起到重要的作用, 尤其是在硫循环中, 可以用来指示深海热泉及富含硫的区域(Nakagawa *et al.*, 2003)。结果显示,  $\epsilon$ -变形菌只在网箱养殖区有分布, 可能由于网箱养殖对底质硫化物贡献较大(表1)。值得注意的是, 在南沙岛贝类和网箱养殖区的表层沉积物中还监测到硝化螺旋菌门、疣微菌门和浮霉菌门的细菌, 这些类群广泛分布于海底沉积物及冷泉(Nancy *et al.*, 2007), 是氮循环中重要

的类群(李涛等, 2008), 这一结果可能与网箱养殖区和贝类养殖区氮含量较高有关。

通过对不同养殖区微生物群落多样性分析结果表明, 网箱养殖区(S10)的香浓指数值为 3.8, 高于贝、藻类养殖区, 丰富度指数 *Chao* (245)和 *ACE* (739)远远高于藻类养殖区(S2), 这可能与网箱养殖方式密切相关。网箱养殖多是采取高密度的投饵养殖, 致使得残饵、粪便等在养殖区大量积累, 加速了养殖水域的污染(王肇鼎等, 2003), 污染环境中沉积物微生物群落结构表现为多样性和丰富度指数较高, 这种趋势在以往的研究中也得到过论证(Snaird *et al.*, 1997)。Cetecioglu 等(2009)研究了 Marmara 湾高污染区沉积物环境中的微生物群落结构, 结果显示, 其物种丰富度和多样性要高于其他海域沉积物中的微生物群落。生态系统在中等污染程度下, 微生物丰度会随污染的产生和加重而改变, 这种变化有助于减少物种之间的竞争压力, 对生态系统的稳定有重要的意义(Hunter *et al.*, 2005), 因此不同养殖环境中微生物多样性改变是微生物群落适应环境变化的表现。

## 参 考 文 献

- 王肇鼎, 彭云辉, 孙丽华, 等. 大鹏澳网箱养鱼水体自身污染及富营养化研究. *海洋科学*, 2003, 27(2): 77–81
- 过锋, 赵俊, 陈聚法. 胶州湾湿地水体中总氮和总磷的分布及变化特征. *渔业科学进展*, 2012, 33(3): 108–114
- 李涛, 王鹏, 汪品先. 南海南部陆坡表层沉积物细菌和古菌多样性. *微生物学报*, 2008, 48(3): 323–329
- 刘晶晶, 陈全震, 曾江宁, 等. 海水养殖区微生物生态研究. *浙江海洋学院学报*, 2006, 25(1): 72–76
- 刘斌, 陶莹, 党晓霞. 滩涂养殖对海洋生态系统的影响. *创新*, 2010, 4(1): 58–60
- 宋金明. 海洋沉积物中的生物种群在生源物质循环中的功能. *海洋科学*, 2000, 24(4): 22–26
- 范艳君, 朱玲, 朱伟, 等. 珠江口颗粒附着微生物群落沿环境梯度的演替. *渔业科学进展*, 2012, 33(3): 8–14
- 张继红, 方建光, 唐启升, 等. 桑沟湾不同区域养殖栉孔扇贝的固碳速率. *渔业科学进展*, 2013, 34(1): 12–16
- 郑天凌, 王斐, 徐美珠. 台湾海峡海域细菌产量、生物量及其在微食物环中的作用. *台湾海峡*, 2002, 33(4): 415–423
- 胡文翔. 象山港赤潮调查报告. *海洋环境科学*, 1991, 10(4): 77–81
- 郭芳, 黄小平. 海水网箱养殖对近岸环境影响的研究进展. *水产科学*, 2006, 25(1): 27–40
- 侯建军, 黄邦钦. 海洋蓝细菌生物固氮的研究进展. *地球科学进展*, 2005, 20(3): 312–319
- 薛恒平, 薛彦青. 水产养殖同微生态与微生物生态之间关系初探. *饲料与工业*, 1997, 18(2): 23–25
- Asami H, Aida M, Watanabe K. Accelerated sulfur cycle in coastal marine sediment beneath areas of intensive shellfish aquaculture. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71: 2925–2933
- Bowman J, Mccuaig R. Biodiversity, community structural shifts, and biogeography of prokaryotes within Antarctic continental shelf sediment. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(5): 2463–2483
- Boynton WR, Kemp WM. Nitrogen in the Marine Environment, 2nd Edition. Elsevier Inc., Burlington, Massachusetts. Estuaries, In: Capone DG, Bronk DA, Mulholland MR and Carpenter EJ (ed), 2008, 809–856
- Brümmer IHM, Felske A, Wagner-Döbler I. Diversity and seasonal variability of  $\beta$ -proteobacteria in biofilms of polluted rivers: analysis by temperature gradient gel electrophoresis and cloning. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69: 4463–4473
- Caruso G, Genovise L, Mancuso M. Effects of fish farming on microbial enzyme activities and densities: comparison between three Mediterranean sites. *Lett Appl Microbiol*, 2003, 37(4): 324–328
- Castine SA, Bourne DG, Trott LA, *et al.* Sediment microbial community analysis: establishing impacts of aquaculture on a tropical mangrove ecosystem. *Aquaculture*, 2009, 297(2): 91–98
- Cetecioglu Z, Ince BK, Kolukirik M, *et al.* Biogeographical distribution and diversity of bacterial and archaeal communities within highly polluted anoxic marine sediments from the Marmara Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 2009, 58(3): 384–395
- Hunter-Cevera J, Karl D, Buckley M. Marine Microbial Diversity, the Key to Earth's Habitability. Washington DC: American Academy of Microbiology, 2005, 25: 1–22
- Inagaki F, Takai K, Kobayashi H, *et al.* *Sulfurimonas autotrophica* gen. nov., sp. nov., a novel sulfur-oxidizing  $\epsilon$ -proteobacterium isolated from hydrothermal sediments in the Mid-Okinawa Trough. *Inter J Syst Evol Microbiol*, 2003, 53(6): 1801–1805
- La Rosa T, Mirto S, Marino A, *et al.* Heterotrophic bacteria community and pollution indicators of mussel farm impact in the Gulf of Gaeta (Tyrrhenian Sea). *Mar Environ Res*, 2001, 52(4): 301–321
- Mantzavrakosa E, Kornaros M, Lyberatos G, *et al.* Impacts of a marine fish farm in Argolikos Gulf (Greece) on the water column and the sediment. *Desalination*, 2007, 210(1–3): 110–124
- Mounier E, Hallet S, Cheneby D, *et al.* Influence of maize mucilage on the diversity and activity of the denitrifying community. *Environ Microbiol*, 2004, 6: 301–312
- Nakagawa S, Takai K, Inagaki F, *et al.* Distribution, phylogenetic diversity and physiological characteristics of epsilon-Proteobacteria in a deep-sea hydrothermal field. *Environ*

- Microbiol, 2005, 7: 1619–1632
- Nancy NP, Dale TA, Wayne HP, *et al.* Characterization of the prokaryotic diversity in cold saline perennial springs of the Canadian high Arctic. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(5): 15332–15343
- Snaidr J, Amann R, Huber I, *et al.* Schleifer Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. *Microbiol*, 1997, 63(7): 2884–2894
- Spring S, Schulze R, Overmann J, *et al.* Identification and characterization of ecologically significant prokaryotes in the sediment of freshwater lakes : molecular and cultivation studies. *FEMS Microbiol*, 2000, 24: 573–590

(编辑 陈严)

## The Structures of Sediment Microbial Communities in Different Mariculture Models at Xiangshan Bay of China

SUN Chao<sup>1,2</sup>, ZHU Ling<sup>1</sup>, MAO Yuze<sup>1</sup>, FAN Yanjun<sup>1</sup>, ZHOU Chunya<sup>1</sup>,  
YANG Aoao<sup>1</sup>, ZHU Wei<sup>2</sup>, ZHUANG Zhimeng<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory for Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Key Laboratory for Fishery Resources and Eco-environment, Shandong Province, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. College of Life Science, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109)

**Abstract** Xiangshan Bay, the biggest marine aquaculture base in Zhejiang Province, is a semi-enclosed bay with slow water exchange rate. In the center of Xiangshan Bay lies Nansha Bay where a variety of mariculture models are applied. To better understand the structures and diversity of sediment microbial communities in different mariculture models, we constructed the 16S rDNA clone library for the analysis of samples from the shellfish culture, the seaweed culture and the fish cage culture. We obtained 136 OTUs from three sampling models that included 58 OTUs from the shellfish culture, 48 from the seaweed culture, and 57 from the fish cage culture. The distribution patterns of OTUs were highly different between the three sampling models which indicated the distinct microbial community structures. The calculation of species richness (Chao), evenness (ACE), and diversity (Shannon) were 245/739/3.8 (fish cage culture), 313/330/3.6 (shellfish culture) and 89/174/3.6 (seaweed culture) respectively. This suggested that the diversity of 16S rDNA gene clone libraries of seaweed culture model was the lowest among all three models. The results of the phylogenetic analysis showed that proteobacteria were the dominant microbes in all sampling models. The microbial community structure of the seaweed culture model differed obviously from those of the shellfish culture and the fish cage culture models. Rhizobium and some photosynthetic bacterial sequences were abundant in the seaweed culture clone library. Moreover, microbes closely related to sediment pollution were found in the fish cage culture model, such as *Shigella*, *Escherichia*, and  $\epsilon$ -Proteobacteria. This implied that the fish cage culture could be the major source of pollution in the sediment of Nansha Bay.

**Key words** Shellfish culture model; Seaweed culture model; Fish cage culture model; Microbial community structure; Xiangshan Bay



# 漠斑牙鲆(*Paralichthys lethostigma*) LH $\beta$ 基因 克隆及其在卵巢不同发育期的表达特征\*



柳学周<sup>1</sup> 臧坤<sup>1,2</sup> 徐永江<sup>1</sup> 李春广<sup>1</sup> 史宝<sup>1</sup> 王妍妍<sup>1</sup>

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

**摘要** 利用 cDNA 末端快速克隆(Rapid Amplification of cDNA Ends, RACE)方法获得了漠斑牙鲆(*Paralichthys lethostigma*)促黄体素(Luteinizing Hormone, LH)  $\beta$  亚基的 cDNA 全长序列,检测了 LH  $\beta$  亚基 mRNA 的组织表达水平,揭示了垂体、肝脏和卵巢中 LH  $\beta$  亚基 mRNA 在卵巢发育周期中的表达水平变化,利用酶联免疫技术(Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay, ELISA)测定了血浆 LH 和雌二醇(Estradiol, E<sub>2</sub>)表达水平的变化。结果表明,漠斑牙鲆为卵巢非同步发育分批产卵性鱼类, LH  $\beta$  亚基 cDNA 序列全长 597 bp,开放阅读框 (Open reading frame, ORF)长 438 bp,编码 145 个氨基酸, LH  $\beta$  亚基 mRNA 具有广泛的组织分布特性。与肝脏和卵巢相比,垂体中 LH  $\beta$  亚基 mRNA 表达水平在卵巢发育各个阶段都有较高表达水平,在 IV 期表达水平迅速升高至较高水平并保持至 VI 期。卵巢中 LH  $\beta$  亚基 mRNA 表达水平在 V 期达到峰值,而肝脏中 LH  $\beta$  亚基 mRNA 表达水平在 II 期时达到峰值,在 V 期也有相对较高的表达水平。血浆 LH 和 E<sub>2</sub> 表达水平在卵巢发育周期中均呈现趋势一致的规律性变化。研究结果可为认识漠斑牙鲆生殖调控机制提供基础资料。

**关键词** 漠斑牙鲆; LH  $\beta$  亚基; 卵巢发育周期; 表达特性; 血浆激素浓度  
中图分类号 S961 文献标识码 A 文章编号 1000-7075(2014)04-0022-10

硬骨鱼类的生殖受下丘脑-垂体-性腺(HPG)轴的调控,垂体中合成和分泌的卵泡刺激素(Follicle-stimulating hormone, FSH)、促黄体素(LH)等性激素与硬骨鱼类的性腺发育、配子发生以及排精产卵等过程密切相关。已有研究表明, LH 可通过促进雌鱼卵巢滤泡细胞产生促成熟激素(Maturation-inducing hormone, MIH)(如 17 $\alpha$ , 20 $\beta$ -二羟黄体酮)以及提高 MIH 受体含量而提高卵母细胞成熟能力,促进雌鱼卵母细胞最终成熟、排卵及产卵(Kagawa *et al*, 1998)。LH 属于糖蛋白二聚体家族,其  $\alpha$  亚基与 FSH 和促甲状腺激素(Thyrotropin, Thyroid-stimulating hormone, TSH)相同而  $\beta$  亚基表现出表达和调控特异性(Pierce *et al*, 1981)。硬骨鱼类的 LH  $\beta$  亚基首先在大鳞大麻哈鱼

(*Oncorhynchus tshawytscha*)(Trinh *et al*, 1986)中发现,之后学者们对大麻哈鱼(*Oncorhynchus chusketa*)(Sekine *et al*, 1989)、条纹狼鲈(*Morone saxatilis*)(Hassin *et al*, 1995)、日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)(Yoshiura *et al*, 1996)、金鱼(*Carassius auratus*)(Sohn *et al*, 1998)、真鲷(*Chrysophrys major*)(Gen *et al*, 2000)等 30 多种硬骨鱼类的 LH  $\beta$  亚基进行了研究,为认识鱼类生殖调控机制和突破调控产卵技术提供了理论和技术支撑。

漠斑牙鲆属鲽形目 Pleuronectiformes、鲆科 Bot-hidae、牙鲆属 *Paralichthys*, 自然分布于美国北卡罗来纳州至佛罗里达州北部大西洋沿岸,以及佛罗里达州南部海湾至德克萨斯州南部海峡沿岸。漠斑牙鲆具有较高的经济价值和养殖应用前景,我国 2001 年引

\* 鲆鲽类现代化产业技术体系(CARS-50)和国家 863 计划项目(2012AA10A413)共同资助。柳学周, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn  
收稿日期: 2013-11-18, 收修改稿日期: 2014-01-14

入漠斑牙鲈开展人工繁育技术研究, 2004 年以来突破了其苗种规模化繁育技术(柳学周等, 2007), 近期 Tubbs 等(2011)对一种 MIH(20 $\beta$ -S)受体在雄鱼生殖发育中的作用有初步报道, Picha 等(2012)对 IGF-II 在漠斑牙鲈卵母细胞成熟中的作用进行了研究, 但 LH 在漠斑牙鲈生殖调控机制方面的研究国内均属空白。本研究通过利用组织学手段、RACE 技术、半定量 RT-PCR 技术和 ELISA 技术对漠斑牙鲈的卵巢周期发育特征、LH 亚基的 cDNA 结构特征及其在卵巢发育周期中的作用及机制进行了探讨, 以期对漠斑牙鲈生殖调控机制研究提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验鱼及水处理

本研究用实验鱼于 2010 年 7 月–2011 年 2 月取自青岛忠海水产有限公司, 共取人工培育的 3 龄以上性成熟漠斑牙鲈雌鱼(全长 41–56 cm, 体重 880–2960 g) 25 尾。漠斑牙鲈雌鱼培育水温 14–23 $^{\circ}$ C, 盐度 27–31, pH 7.8–8.4, 溶解氧 6 mg/L 以上, 日换水率 300%–500%。

2010 年 10 月上旬–2011 年 1 月下旬对漠斑牙鲈亲鱼进行控温控光培育。培育用水以锅炉升温水、自然海水和地下水并水调兑, 温度由 18 $^{\circ}$ C 逐渐下降至 14 $^{\circ}$ C, 再由 14 $^{\circ}$ C 逐渐升至 18.5 $^{\circ}$ C。亲鱼培育池水面光照强度为 300 lx, 光照时间由 12 h 逐渐缩短至 10 h。

### 1.2 样品采集

根据肉眼观察雌鱼卵巢在体表的隆起程度, 利用本实验室开发的鲈鲷类性腺发育检测器(实用新型专利号: ZL200520086221.1)挑选处于不同卵巢成熟期的亲鱼。

根据卵巢成熟度, 在 2010 年 7、10、11、12 月和翌年 2 月分别取样, 每次取样 5 尾漠斑牙鲈亲鱼。实验鱼以 MS-222(180 mg/L)麻醉后, 尾静脉抽血 2–3 ml, 4 $^{\circ}$ C 静置 6 h 后 10000 r/min 离心 5 min 分离上层血浆, 放入–30 $^{\circ}$ C 保存以测定 LH 和 E<sub>2</sub> 的表达水平。快速取卵巢、肝脏、心脏、胃、肠、脾、肾、垂体、脑、鳃、肌肉组织投入液氮中, 后转入–80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱保存用于总 RNA 的提取。取卵巢前、中、后部于 Davidson 固定液中固定 24 h 后转入 70%酒精保存用于组织切片观察, 确定卵巢发育时期。

### 1.3 卵巢发育期的确定

卵巢样品自 70%酒精取出后, 首先经酒精梯度

(70%–100%)脱水, 石蜡包埋后, 切成 7  $\mu$ m 厚的切片, 苏木精–伊红染色后, 中性树脂封片, 在显微镜(NIKON 90i)下观察、拍照, 根据卵巢切面中所占面积超过 50%或居最高比例的卵母细胞时相确定卵巢发育时期, 统计视野为 30 个, 卵母细胞时相的确定参考刘筠等(1978)的分类方法。

### 1.4 漠斑牙鲈 LH 亚基克隆

用 RNAiso Plus(TaKaRa)抽提各组织的总 RNA。以微量核酸测定仪(Nanodrop ND2000)测定 RNA 浓度, 提取的 RNA 以 1%琼脂糖凝胶电泳检测质量。利用 SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA 合成试剂盒(Clontech)合成第一链 cDNA, 所有操作按照试剂盒说明书进行。

根据 GenBank 登记的鲈鲷类 LH 亚基的基因序列设计简并引物 LHF 和 LHR(表 1), 以垂体 cDNA 作为模板, 扩增漠斑牙鲈 LH 基因的核心序列, PCR 反应体系 25  $\mu$ l, 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 5 min, (94 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s)30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分离后, 切胶回收目的条带并纯化。回收 PCR 产物与 pEASY-T3 载体连接, 转化至 *Trans1-T1* 感受态细胞, LB 固体培养基 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 挑取阳性克隆送至北京华大公司测序。

根据扩增得到的核心序列设计 RACE 引物 LHGSP5、LHGSP3、LHNGSP5 和 LHNGSP3(表 1), 应用 SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA 扩增试剂盒(TaKaRa)扩增 LH 的 cDNA 全长序列。按照试剂盒操作说明, 合成用于 5'-RACE 及 3'-RACE 的第一链 cDNA, 合成的 cDNA 第一链分别用 Smart RACE Advantage 2 PCR 试剂盒(Clontech)进行 PCR 扩增。第一次梯度 PCR 使用引物 LHGSP5 和 LHGSP3, PCR 条件: 94 $^{\circ}$ C 30 s,

表 1 实验所用引物及其序列  
Tab.1 Primer sequences used for the PCR analysis in the present study

引物名称 Primers	引物序列 Nucleotide sequence(5'-3')
LHF	GTACCAGCATGTGTGCACGT
LHR	GTGGGCTGCAGGCTCT
LHGSP5	TGGACCCGACCGTCTCCTACCCTGTGG
LHGSP3	TGGAAGGTGCAGTCGGACGTGTTGAGT
LHNGSP5	CACTCAACACGTCCGACTGCACCTTCC
LHNGSP3	GCAGTAACAGCTCACGGCCACAGGGTAG
LHF1	GTACCAGCACGTGTGCACGT
LHR1	GTCTGGCTGCAGGCTCT
18S F	GGTAACGGGGAATCAGGGTT
18S R	TCGGGAGTGGGTAATTTGCC

71℃ 30 s, 16 个循环,  $T_m$  每个循环降低 0.5℃, 72℃ 延伸 1 min; 然后 94℃ 30 s, 63℃ 30 s, 72℃ 60 s, 28 个循环。

以第一次 PCR 的产物为模板, 使用引物 LHNGSP5 和 LHNGSP3 进行巢式 PCR, PCR 条件: 94℃ 30 s, 72℃ 60 s 进行 5 个循环; 然后 5 个循环(94℃ 30 s, 70℃ 30 s, 72℃ 60 s), 最后 25 个循环(94℃ 30 s, 68℃ 30 s, 72℃ 60 s)。取 5  $\mu$ l PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 对目的条带进行回收、与载体连接、转化、筛选阳性克隆并测序。

### 1.5 LH 亚基组织表达和卵巢发育周期表达特性分析

提取卵巢、肝脏、心脏、胃、肠、脾、肾、垂体、脑、鳃、肌肉组织的总 RNA, 分别取 1  $\mu$ g 每个组织的总 RNA, 按照 1.4 的操作反转录获得 cDNA。取等量各组织的 cDNA, 利用特异性引物 LHF1 和 LHF2 (表 1), 以 18S rRNA 为内参基因(18SF 和 18SR)进行半定量 PCR 分析, PCR 条件: 94℃ 5 min, (94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s)35 个循环, 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 对电泳结果进行分析以确定 LH 亚基 mRNA 在不同组织的表达情况与卵巢发育周期中垂体、肝脏和卵巢中 LH 亚基 mRNA 的表达水平变化。

### 1.6 血浆 LH 和 $E_2$ 表达水平测定

血浆 LH 和  $E_2$  的测定采用鱼源酶联免疫(ELISA)试剂盒(CUSABIO 公司, 上海)进行。以标准品浓度作横坐标, 对应 OD 值作纵坐标, 绘制出标准品线性回归曲线, 根据曲线方程计算各样品浓度值。LH 和  $E_2$  标准品线性回归方程的相关系数  $R^2$  值均大于等于 0.9900, 最低检测浓度分别小于 1.0 IU/L 和 1.0 pmol/L, 板内、板间变异系数均小于 15%。

### 1.7 序列及数据分析

利用 DAMBE(<http://aix1.uottawa.ca/>)对已知物种

LH 亚基序列进行比对分析。测序结果利用 Chromas (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>)进行序列拼接, BLAST 软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)进行基因序列的同源性分析。用 DNASTar 软件(<http://dnastar.com>)确定 LH 基因开放阅读框并翻译成氨基酸序列, 预测分子量、等电点等。用 Clustalx2.0.12(<http://www.clustal.org/download/current/>)和 MEGA 4.1(<http://www.megasoftware.net/mega41.html>)进行氨基酸序列对位排列、系统树构建和序列同源性分析。LH 亚基 mRNA 的组织表达和不同发育时期的表达水平, 使用 ImageJ2x 软件(版本: 2.1.4.7)对电泳图谱结果进行半定量分析。

对计算得出的数据进行单因素方差(ANOVA)统计分析(SPSS v 16.0), 差异显著性水平  $P$  设为 0.05, 当  $P < 0.05$  时认为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 漠斑牙鲆各卵巢发育时期的特征

本研究发现, 漠斑牙鲆雌性亲鱼 7 月份卵巢呈前部钝圆逐渐往后细长延伸的圆锥形, 切片发现卵巢中主要细胞类型为 时相卵母细胞(图 1a), 该期卵母细胞核膜清晰, 细胞核大呈圆形, 核仁较小, 确定为 II 期卵巢。人工温光调控条件下, 10 月漠斑牙鲆卵巢呈亮白色且前部呈膨胀延长的三角形, 卵巢内主要包含 时相、 时相(图 1b)和 时相卵母细胞(图 1c), 其中 时相卵母细胞以细胞膜内侧出现液泡层为主要特点, 此时其数量在卵巢中占主要地位, 说明卵巢发育至 期。11 月份卵巢呈丰盈三角形且在卵巢腔内向后延伸明显, 表面血管发达, 体表可见明显隆起, 卵巢内可见少量透明卵粒, 包含 时相、 时相、 时相和 时相卵母细胞(图 1d), 其中以包含卵黄颗粒为主要特征的 时相卵母细胞数量占优势地位, 此时卵巢为 IV 期卵巢; 12 月份卵巢极度发育, 体表可见

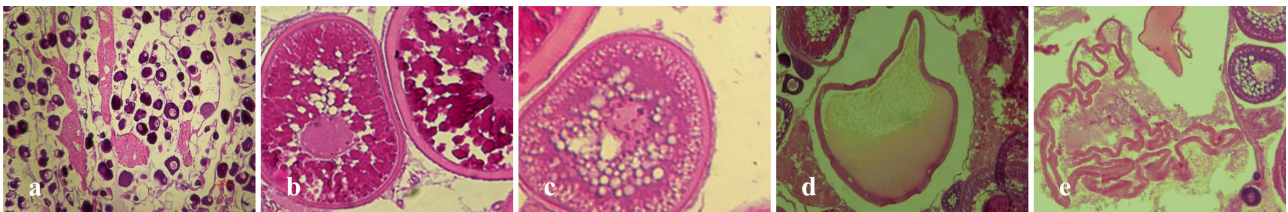


图 1 各时相卵母细胞形态

Fig.1 The morphology of oocytes at different developmental phases

a. 时相卵母细胞  $\times 40$ ; b. 时相卵母细胞  $\times 200$ ; c. 时相卵母细胞  $\times 200$ ; d. 时相卵母细胞  $\times 200$ ; e. 时相卵母细胞  $\times 200$   
a. Oocyte of stage II  $\times 40$ ; b. Oocyte of stage III  $\times 200$ ; c. Oocyte of stage IV  $\times 200$ ; d. Oocyte of stage  $\times 200$ ; e. Oocyte of stage VI  $\times 200$

圆柱形隆起, 卵巢内包含 时相、 时相、 时相和 时相卵母细胞, 且出现卵黄板的 时相卵母细胞占优势地位, 该期卵巢发育至 V 期。次年 2 月份卵巢退化, 体积和重量减小明显, 卵巢中可见卵母细胞排空后的滤泡膜(图 1e), 时相、 时相和 时相的卵母细胞也同时存在, 此时卵巢发育至 VI 期。图 1 所示为各时相卵母细胞形态特征。

## 2.2 漠斑牙鲈 LH 亚基的序列分析

LH 亚基的 cDNA 序列(GenBank 获取号: JX002656)(图 2)全长为 597 bp, 编码 145 个氨基酸, 包括一个长 438 bp 的开放阅读框(ORF), 一个 72 bp 的 5'非编码区, 一个 87 bp 的 3'非编码区, 一个终止密码子(TGA)。DNASTAR 预测漠斑牙鲈 LH 亚基蛋白分子量为 16383.31 Da, 等电点为 5.58。在 LH 亚基氨基酸序列中发现一个 N-糖基化位点, 靠近蛋白的 C 端。

同源性分析表明, 漠斑牙鲈 LH 基因与鲷形目鱼类中的牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)氨基酸同源性最高, 达到 97.9%, 与鲈形目鱼类中条纹狼鲈同源性为 74.5%, 与鲑形目鱼类氨基酸同源性下降至为 48.5%–51.8%, 而与鸡(*Gallus gallus*)的氨基酸同源性仅为 37.9%, 与马(*Equus caballus*)的氨基酸同源性为 35.2%(图 3)。

采用 Neighbor-joining 法构建漠斑牙鲈 LH 亚基, 与其他脊椎动物的系统进化树(图 4)对比发现, 漠斑牙鲈 LH 亚基与其他鲷形目鱼类聚为一个独立的分支, 漠斑牙鲈与牙鲈同源性最高, 在同一个分支上。与鲈形目、 鲑形目、 鲑形目鱼类同属一个大的分支。

## 2.3 LH 亚基在雌性漠斑牙鲈组织中的分布

LH 亚基在除肌肉以外的垂体、脑、卵巢、肝、心、脾、肾、胃、肠、鳃中均有表达。垂体中的表达量明显高于其他组织, 肝脏、心脏、胃、肠、鳃中也有较高表达, 而在脑、卵巢、肾脏、脾脏中表达量相对较低(图 5)。

## 2.4 LH 亚基在雌性漠斑牙鲈卵巢不同发育时期垂体、肝脏、卵巢中的表达水平

利用半定量 PCR 方法分析了漠斑牙鲈垂体、肝脏和卵巢中 LH mRNA 表达水平在不同卵巢发育时期的变化特性。与肝脏和性腺相比, 垂体中 LH 亚基 mRNA 表达水平在卵巢发育各个阶段都有较高表达水平, 在 7 月(II 期)时表达水平相对较低, 在 11 月(IV 期)表达水平迅速升高至较高水平并保持至 VI 期(图 6)。

卵巢中 LH mRNA 表达水平在 II、V 期表达水平平均较高, 且在 V 期达到峰值, 在 VI 期显著降低,

```

-108                                     ag tcc gtc tcc
-60 ggc tca acc acc agc agc tgt tga atc gat cgt gga cac aaa cac ttc atc tcc tgc agg
1  ATG TCG ATG CAG CTC AGC CTG AGA GTG AAG ATC CCT CTG ACG TTG ATT TTC TTT CTC TCG
   M S M Q L S L R V K I P L T L I F F L S
61  TCC ATG TGG CCC CTG GCC CCC GCA GAG GCC TTC CAG CTA CCG ACG TGT CTT CTC ATC AAG
   S M W P L A P A E A F Q L P T C L L I K
121 CAA ATG GTG TCT CTG GAG AAG GAG GGC TGT CCC AAG TGT CAC ACC GTG GAA ACC ACC ATC
   Q M V S L E K E G C P K C H T V E T T I
181 TGC AGT GGA CAC TGC AAA ACC AAG GAT CCC GTC GCC AAG ATC CCC TTC CTC AAC ATG TAC
   C S G H C K T K D P V A K I P F L N M Y
241 CAG CAC GTG TGC ACG TAC CAG GAG CTG TAC TAC AAG ACG TTT GAA CTT CCA GAC TGT CCT
   Q H V C T Y Q E L Y Y K T F E L P D C P
301 CCA GGC GTG GAC CCG ACC GTC TCC TAC CCT GTG GCC GTG AGC TGT TAC TGC GGC CGC TGT
   P G V D P T V S Y P V A V S C Y C G R C
361 GCA CTC AAC ACG TCC GAC TGC ACC TTC CAG AGC CTG CAG CCA GAC TTC TGC ATG AAC GAC
   A L N T S D C T F Q S L Q P D F C M N D
421 ATC CCC TTC TAC GAC TGA acg tta aac act gga gtc caa acc atg ttt aat aaa aga cag
   I P F Y D *
481 atc ttt aca ttc acc act gcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
  
```

图 2 LH 亚基的 cDNA 序列及推导的氨基酸序列

Fig.2 cDNA sequence and induced amino acid sequence of LH  $\beta$  subunit gene

终止密码子(TGA)以星号标注, 3'-UTR 端 aataa 序列以框标注, N-糖基化位点 NTSD 以下划线标注

The asterisk indicates the stop codon (TGA). The nucleotides corresponding to the polyadenylation signal in the 3'-untranslated region (aataa) are marked with rims. The potential N-glycosylation site (NTSD) in N-region was single underlined



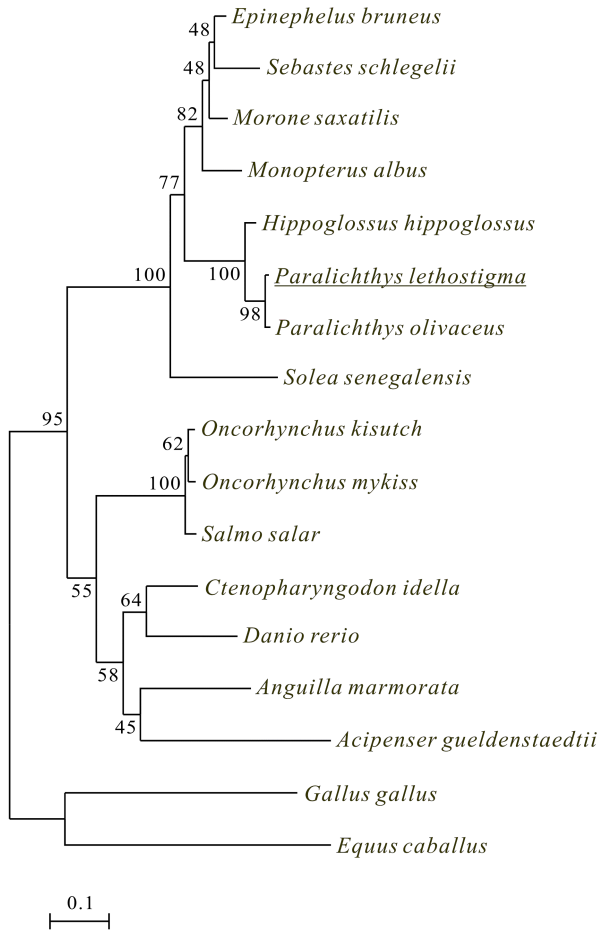


图 4 漠斑牙鲆 LH  $\beta$  亚基与其他脊椎动物 LH  $\beta$  亚基的系统进化树对比

Fig.4 Unrooted phylogenetic tree of LH  $\beta$  in vertebrates using Neighbor-Joining method (Mega 4.1 software) according to the amino acid sequence alignments of *Paralichthys lethostigma* with ClustalX.

Boot strap values are based on 1000 repeats. GenBank accession numbers: *Sebastes schlegelii*(AAU14142), *Epinephelusbruneus* (ABQ57400), *Morone saxatilis* (AAC38019), *Monoperus albus* (ACF70665), *Hippoglossus hippoglossus* (CAD10502), *Paralichthys olivaceus* (AAK58602), *Solea senegalensis* (ABU95600), *Oncorhynchus chuskisutch* (AAO72300), *Oncorhynchus chusmykiss* (NP001117677), *Salmo salar* (NP001167142), *Acipenser gueldenstaedtii* (AAP97490), *Anguilla anguilla*(ACK87153), *Ctenopharyngodon idella* (ABM73670), *Danio rerio* (AAV31153), *Equus caballus* (P08751), *Gallus gallus* (ADY03193)

漠斑牙鲆用下划线标注

*Paralichthys lethostigma* is underlined

在 II 期和 III 期保持较低水平(图 6)。

肝脏中 LH mRNA 表达水平在 II 期时达到峰值, 其后表达水平下降, 在 V 期也有相对较高的表达水平, 而在其它各期表达水平较低(图 6)。

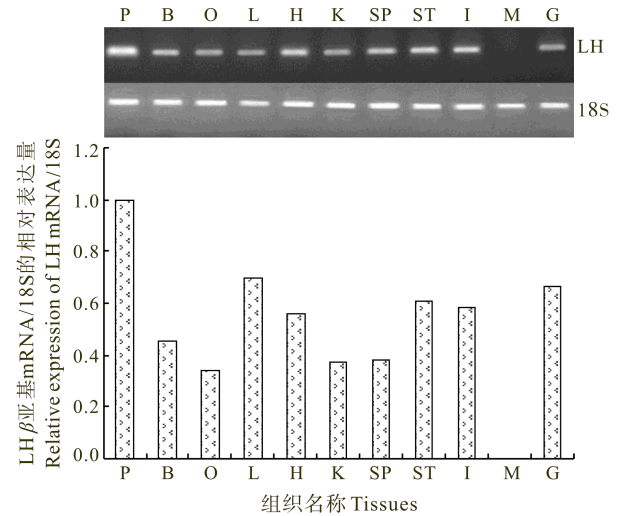


图 5 LH  $\beta$  亚基在漠斑牙鲆不同组织中的表达特性

Fig.5 Expression pattern of LH  $\beta$  subunit in various tissues of *Paralichthys lethostigma*

P: 垂体; B: 脑; O: 卵巢; L: 肝脏; H: 心脏; K: 肾; SP: 脾; ST: 胃; I: 肠; M: 肌肉; G: 鳃  
P: pituitary; B: brain; O: ovary; L: liver; H: heart; K: kidney; SP: spleen; ST: stomach; I: intestine; M: muscle; G: gill

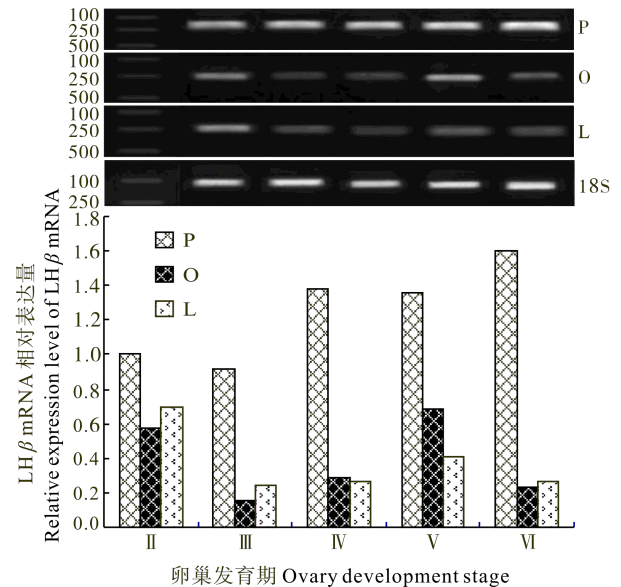


图 6 漠斑牙鲆雌鱼卵巢发育周期中垂体、卵巢和肝脏中 LH  $\beta$  亚基表达特性

Fig.6 Expression patterns of pituitary, ovary and liver LH  $\beta$  mRNA levels in *P. lethostigma* during ovarian maturation cycle

M: Marker; P: 垂体; O: 卵巢; L: 肝脏  
M: Marker; P: pituitary; O: ovary; L: liver

## 2.5 雌性漠斑牙鲆卵巢发育周期中血浆 LH 和 E<sub>2</sub> 的浓度变化

血浆中 LH 和 E<sub>2</sub> 表达水平测定结果显示, 血浆

LH 表达水平在卵巢发育至 II 期时较高, III 期、IV 期下降, 至 V 期显著升高, 而后在 VI 期下降(图 7); 血浆  $E_2$  表达水平变化与 LH 变化趋势一致(图 8)。

### 3 讨论

本研究首先利用组织学手段认识了漠斑牙鲈卵巢发育特征, 然后采用 RACE 和 RT-PCR 方法克隆了 LH 亚基序列, 分析了其表达特性, 并测定了卵巢发育周期中血浆 LH 和  $E_2$  浓度的变化情况, 为揭示漠斑牙鲈生殖调控机制提供了基础资料。

组织学观察表明, 漠斑牙鲈同一发育时期的卵巢中有不同时期相的卵母细胞存在, 表明其为非同步发育分批产卵性鱼种, 与同属鲈形目的圆斑星鲈(*Verasper variegatus*)(徐永江等, 2011)和半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)(柳学周等, 2009)等一致。此外, 在

期卵巢中均可见 时相卵母细胞, 验证了漠斑牙鲈卵巢内卵母细胞具有持续发育的潜质(柳学周等 2007)。

漠斑牙鲈 LH 亚基只有一个 N-糖基化位点, 这与多数硬骨鱼类 LH 亚基类似, 被认为是 LH 亚基的保守特征之一(Swanson *et al*, 2003)。LH 亚基的 N-糖基化位点主要作用是识别并与细胞受体结合(Miranda *et al*, 2007), 牙鲈 LH 亚基存在两个糖基化位点(Kajimura *et al*, 2001), 可能是由种间的特异性决定的, 其作用机制是否存在差异尚有待于深入研究。氨基酸比对分析显示漠斑牙鲈与其他鲈形目鱼类具有相同的氨基酸缺失, 系统进化树中漠斑牙鲈也与多数鲈形目鱼类在一个分支节点上, 分子进化研究得出的漠斑牙鲈分类地位与形态学上得出的分类进化地位一致。

LH mRNA 在雌性漠斑牙鲈中主要在垂体中表达, 该特征与其他硬骨鱼类相同(Jackson *et al*, 1999;

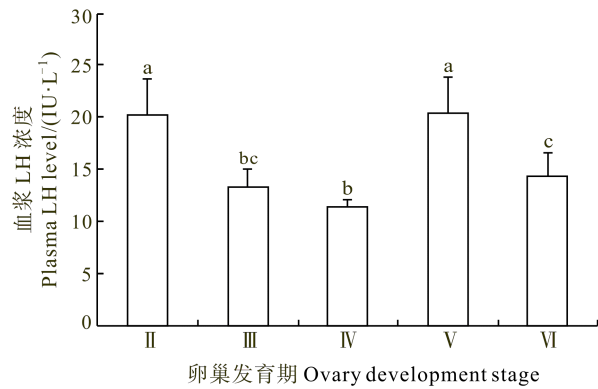
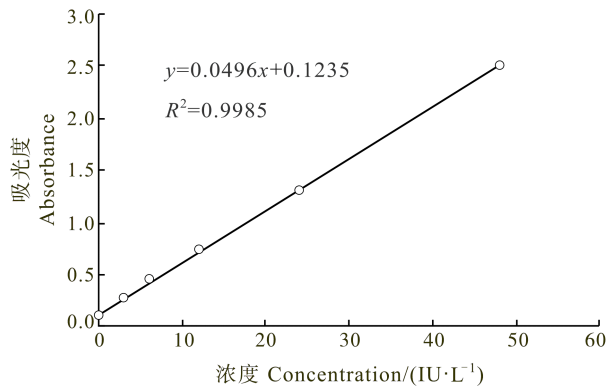


图 7 漠斑牙鲈卵巢发育周期中血浆 LH 的表达水平变化(左为标准曲线, 右为试验测定值)

Fig.7 Changes of plasma LH levels in female *P. lethostigma* during ovarian maturation cycle

\*不同字母表示在  $P=0.05$  水平上差异性显著( $P < 0.05$ ),  $n=5$

\*Different letters indicate significant difference at  $P=0.05$  level ( $P < 0.05$ ),  $n=5$

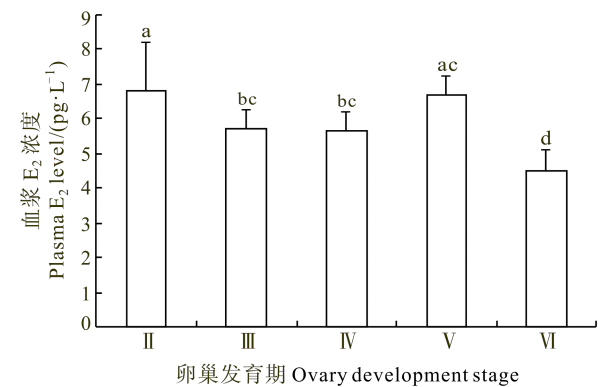
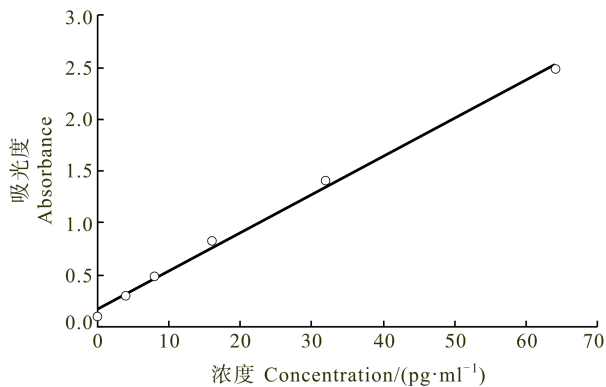


图 8 漠斑牙鲈卵巢发育周期中血浆  $E_2$  表达水平变化(左为标准曲线, 右为试验测定值)

Fig.8 Changes of plasma  $E_2$  levels in female *P. lethostigma* during ovarian maturation cycle

\*不同字母表示在  $P=0.05$  水平上差异显著( $P < 0.05$ ),  $n=5$

\*Different letters indicate significant differences at  $P=0.05$  level ( $P < 0.05$ ),  $n=5$

Gen *et al.*, 2000; Meiri *et al.*, 2004; Hellqvist *et al.*, 2006), 表明垂体是 LH 的主要分泌和表达作用器官。此外, 本研究还发现, LH 亚基在脑、卵巢、肝、心、脾、肾、胃、肠、鳃等组织中表达广泛, 与斑马鱼(*Danio rerio*)的 LH 亚基 mRNA 也有广泛组织分布的结果相同(So *et al.*, 2005)。这种多组织表达特性暗示 LH 除通过垂体分泌参与卵母细胞的发育成熟调控之外, 还可能更为广泛的生理功能, 其中, Hellqvist 等(2006)报道肝脏中 LH 可能涉及卵黄的合成和运输, 其他组织中 LH 亚基的表达有待进一步研究。

已有研究表明, 鱼类卵巢发育周期中垂体 LH 亚基 mRNA 的表达水平变化存在明显种间差异, 可将其分为 3 种表达模式。(1) 随着卵巢发育垂体中 LH 亚基的表达水平逐渐升高, 在排卵期达到峰值, 金鱼(Kobayashi *et al.*, 1997)、条纹狼鲈(Shimon *et al.*, 1999)和蓝攀鲈(*Trichogaster trichopterus*)(Jackson *et al.*, 1999)均属于这种模式。(2) 在卵黄生成期和卵母细胞成熟期垂体 LH 亚基表达水平一直较高, 到排卵结束后随卵巢退化而明显下降, 真鲷(Gen *et al.*, 2000)和三刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*)(Hellqvist *et al.*, 2006)属于这种类型。(3) 卵巢发育前期, LH 表达一直处于较低水平, 在卵母细胞最终成熟和排卵期会急剧升高, 虹鳟(Weil *et al.*, 1995)和金头鲷(Meiri *et al.*, 2004)均表现出这种特点。漠斑牙鲈垂体 LH mRNA 表达水平在卵巢发育 I 期和 II 期较低, 而在 IV 至 VI 期均较高, 与金鱼(Kobayashi *et al.*, 1997)、条纹狼鲈(Shimon *et al.*, 1999)和蓝攀鲈(Jackson *et al.*, 1999)等同属类似表达模式。

卵巢不同发育时期, 漠斑牙鲈性腺和肝脏中 LH 亚基 mRNA 表达水平的变化暗示, LH 除通过垂体合成和分泌调节卵巢发育外, 还可能通过旁分泌和(或)自分泌的途径参与调节。本研究发现, 漠斑牙鲈肝脏中 LH 亚基 mRNA 表达水平在卵巢成熟启动前期较高, 而在卵黄发生期处于较低水平, 表明漠斑牙鲈肝脏中 LH 可能因参与卵黄合成和运输而消耗(Hellqvist *et al.*, 2006)。而卵巢中 LH 亚基 mRNA 表达水平在性腺发育启动期(I 期)较高, 则可能暗示 LH 还直接参与了卵母细胞的早期发育。已有研究表明, 鱼类 LH 主要通过刺激卵巢滤泡细胞产生促成熟激素 MIH(如 17  $\alpha$ , 20  $\beta$ -二羟黄体酮)以及提高 MIH 受体含量而促进卵母细胞最终成熟、排卵及产卵(Kagawa *et al.*, 1998)。本研究中卵巢 LH 亚基 mRNA 表达水平在产卵期(III 期)达到峰值, 其可能原因为卵母细胞的最终成熟以及排卵和产卵等过程的顺利进行需要大

量 LH 的参与, 这种 LH 的表达特性是否具有物种特异性尚有待进一步研究。此外, 本研究发现肝脏中 LH 亚基 mRNA 表达水平变化与血浆 LH 浓度变化相一致, 从激素水平上暗示垂体外组织的 LH 合成和分泌对 LH 发挥作用有重要影响。垂体以外器官的 LH 亚基 mRNA 表达水平研究较少, 为深入理解 LH 在鱼类中的作用机制, 今后需要在这一方面加强相关研究。

本研究发现, 漠斑牙鲈卵巢不同发育时期血浆中 LH 水平变化与垂体 LH mRNA 的表达水平变化并不具有一致性, 对蓝攀鲈(Jackson *et al.*, 1999)、虹鳟(Weil *et al.*, 1995)和条纹狼鲈(Shimon *et al.*, 1999)的研究也出现类似结果。Halban 等(1994)认为这种情况可能与垂体 LH 分泌的调节方式有关。漠斑牙鲈雌鱼血浆 LH 浓度在卵黄生成前(II 期)表现出较高水平, 而此时垂体中 LH 亚基 mRNA 表达水平不高, 但 VI 期的 LH 亚基 mRNA 表达水平很高, 暗示连续两个生殖周期中 LH 合成和分泌的可能具有一定的迟滞现象, Gomez 等(1999)在虹鳟的研究中也发现了 LH 合成和分泌的延迟效应, 这种延迟可能与 LH 参与行使生理功能的时间顺序有关, 有待于深入研究。漠斑牙鲈雌鱼在卵母细胞发生启动(I 期)和卵黄发生期(IV 期)血浆中 LH 表达水平较低, 而垂体和卵巢中 LH mRNA 表达水平不断升高, 肝脏的 LH mRNA 表达水平较低, 表明血浆 LH 可能主要在肝脏 LH 基因的调节下参与了卵黄的发生和发育调控过程。漠斑牙鲈血浆 LH 在卵黄生成期(IV 期)的低表达水平与蓝攀鲈(Jackson *et al.*, 1999)等研究结果相似, 而与真鲷(Gen *et al.*, 2000)和尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)(Aizen *et al.*, 2007)卵黄生成期血浆 LH 就处于较高水平不同, 表明 LH 的促进卵黄生成作用具有物种差异性。在卵母细胞成熟期(V 期), 与多数鱼类相同, 漠斑牙鲈的血浆 LH 表达水平明显升高, 与垂体、卵巢和肝脏中 LH mRNA 的高表达水平一致, 表明其在卵母细胞最终成熟、排卵和产卵中共同发挥了重要生理调节作用。排卵期结束后(VI 期)血浆 LH 迅速下降到最低水平, 而此时垂体 LH mRNA 表达水平仍保持较高表达水平, 尽管未发现其他硬骨鱼类 VI 期有 LH 亚基 mRNA 高表达出现, 但近期对鲈鱼(*Scomber japonicus*)的免疫组化研究显示 LH 细胞在排卵后期仍有较高水平的免疫反应(Nyuji *et al.*, 2011), 可能与下一个生殖周期中 II 期血浆 LH 的升高有关, 但具体机制有待探究。

血浆 E<sub>2</sub> 和 LH 的表达水平在漠斑牙鲈雌鱼生殖周期中均表现出先下降后升高再下降的波动变化, 二



者变化基本一致的情况在虹鳟(Hirohiko *et al.*, 2003)的研究中也有出现, Hirohiko 等(2003)发现 LH 通过提高芳香化酶活力和芳香化酶基因 P450 的表达水平, 促进真鲷卵巢滤泡中  $E_2$  的合成, 而 Ando 等(2003)研究发现  $E_2$  能够通过刺激促性腺激素释放激素(Gonadotropin-releasing hormone, GnRH)产生而促进 LH 的分泌, LH 和  $E_2$  表现出相互促进的关系。 $E_2$  在卵巢发育 II 期时浓度较高, 表明在卵黄生成前期的  $E_2$  有重要作用, 徐永江等(2010)通过免疫组织化学方法发现在半滑舌鳎 II 时相卵母细胞  $E_2$  及其受体 ER $\alpha$  均有较强表达也说明这一点。在卵母细胞发生启动和卵黄生成期(III 期和 IV 期)漠斑牙鲆的血浆  $E_2$  浓度与 II 期相比稍有下降, 但仍处于较高水平, 与多数硬骨鱼相同, 表现出  $E_2$  在诱导肝脏的肝细胞合成卵黄蛋白原方面的作用(Lange *et al.*, 2003)。在卵母最终成熟和排卵期(V 期) $E_2$  水平稍有升高, 与其他多次产卵鱼类出现的随卵母细胞成熟而下降的结果不同(Methyen *et al.*, 1992), 可能与内分泌系统的环境适应机制有关。产卵结束卵巢退化期(VI 期) $E_2$  下降到最低水平。

## 参 考 文 献

- 刘筠, 陈淑群, 王义铄, 等. 草鱼产卵类型的研究. 水生生物学报, 1978, 6(3): 247-257
- 徐永江, 柳学周, 王清印, 等. 养殖圆斑星鲈血浆性类固醇激素表达与卵巢发育及温光调控的关系. 中国水产科学, 2011, 18(4): 836-846
- 徐永江, 柳学周, 温海深, 等. 性类固醇激素及其受体在半滑舌鳎性腺分化发育过程中的表达与生理功能. 中国海洋大学学报, 2010, 40(7): 66-72
- 柳学周, 孙中之, 田景波, 等. 漠斑牙鲆繁殖生物学及苗种繁育技术研究进展. 渔业现代化, 2007, 34(2): 14-17
- 柳学周, 徐永江, 刘乃真, 等. 半滑舌鳎卵巢发育的组织学和形态数量特征研究. 渔业科学进展, 2009, 33(6): 25-35
- Aizen J, Kasuto H, Levavi B. Development of specific enzyme-linked immune-osorbent assay for determining LH and FSH levels in tilapia, using recombinant gonadotropins. Gen Comp Endocrinol, 2007, 153(1-3): 23-332
- Ando H, Swanson P, Urano A. Regulation of LH synthesis and release by GnRH and gonadal steroids in masu salmon. Fish Physiol Biochem, 2003, 28(1-4): 61-63
- Gen K, Okuzawa K, Senthiekumaran B, *et al.* Unique expression of gonadotropin-I and-II subunit genes in male and female red seabream (*Pagrus major*) during sexual maturation. Biol Reprod, 2000, 63(1): 308-319
- Gomez JM, Weil C, Ollitrault M. Growth hormone (GH) and gonadotropin subunit gene expression and pituitary and plasma changes during spermatogenesis and oogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Gen Comp Endocrinol, 1999, 113(3): 413-428
- Halban PA, Irminger JC. Sorting and processing of secretory proteins. Biochem, 1994, 299(pt1): 1-18
- Hassin S, Elizur A, Zohar Y. Molecular cloning and sequence analysis of striped bass (*Morone axatilis*) gonadotrophin-I and -II subunits. Mol Endocrinol, 1995, 15(1): 23-35
- Hellqvist A, Schmitz M, Mayer I, *et al.* Seasonal changes in expression of LH- $\beta$  and FSH- $\beta$  in male and female three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. Gen Comp Endocrinol, 2006, 145(3): 263-269
- Hirohiko K, Koichiro G, Koichi O, *et al.* Effects of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor on aromatase activity and P450 aromatase gene expression in the ovarian follicles of red seabream, *Pagrus major*. Biol Reprod, 2003, 68(5): 1562-1568
- Jackson K, Goldberg D, Ofir M, *et al.* Blue gourami (*Trichogaster trichopterus*) gonadotropic  $\beta$  subunits (I and II) cDNA sequences and expression during oogenesis. J Mol Endocrinol, 1999, 23: 177-187
- Kagawa H, Tanaka H, Okuzawa K, *et al.* GTH II but not GTH I induces final maturation and the development of maturational competence of oocytes of red seabream in vitro. Gen Comp Endocrinol, 1998, 112(1): 80-88
- Kajimura S, Yoshiura Y, Suzuki M, *et al.* cDNA cloning of two gonadotropin b subunits (GTH-I b and -II b) and their expression profiles during gametogenesis in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Gen Comp Endocrinol, 2001, 122: 117-129
- Kobayashi M, Kato Y, Yoshiura Y, *et al.* Molecular cloning of the cDNAs encoding two gonadotropin  $\beta$  subunits (GTH-I  $\beta$  and -II  $\beta$ ) from the goldfish, *Carassius auratus*. Gen Comp Endocrinol, 1997, 105(3): 372-378
- Lange IG, Hartel A, Meyer HHD. Evolution of oestrogen function in vertebrates. J Steroid Biochem, 2003, 83(1-5): 219-226
- Meiri I, Knibb WR, Zohar Y, *et al.* Temporal profile of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, and growth hormone gene expression in the protandrous hermaphrodite, gilthead seabream, *Sparus aurata*. Gen Comp Endocrinol, 2004, 137(3): 288-299
- Methven DA, Crim LW, Norberg B, *et al.* Seasonal reproduction and plasma levels of sex steroids and vitellogenin in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). Can J Fish Aquat Sci, 1992, 49(4): 754-759
- Miranda LA, Strüssmann CA, Guilgur LG, *et al.* Cloning of FSH-b, LH-b and glycoprotein hormone subunits in pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes): expression profile and relationship with GnRH expression and plasma sex steroid levels in male fish. J Fish Biol, 2007, 71(6): 1571-1589
- Nyuji M, Shiraishi T, Selvaraj S, *et al.* Immunoreactive changes in pituitary FSH and LH cells during seasonal reproductive and spawning cycles of female chub mackerel *Scomber japonicas*. Fish Sci, 2011, 77(5): 731-739
- Picha ME, Shi B, Thomas P. Dual role of IGF-II in oocyte maturation in southern flounder *Paralichthys lethostigma*: Up-regulation of mPRA and resumption of meiosis. Gen

- Comp Endocrinol, 2012, 177(2): 220–230
- Pierce JG, Parsons TF. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem*, 1981, 50: 465–495
- Sekine S, Saito A, Itoh H, *et al.* Molecular cloning and sequence analysis of chum salmon gonadotropin cDNAs. *Proc Natl-Acad Sci USA*, 1989, 86(22): 8645–8649
- Shimon H, Claire HH, Yonathan Z. Ontogeny of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone gene expression during pubertal development in the female striped bass, *Morone saxatilis* (Teleostei). *Biol Reprod*, 1999, 61(6): 1608–1615
- So WK, Kwok HF, Ge W. Zebrafish gonadotropins and their Receptors: II. Cloning and characterization of zebrafish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone subunits—their spatial-temporal expression patterns and receptor specificity. *Biology of Reproduction*, 2005, 72(6): 1382–1396
- Sohn YC, Suetake H, Yoshiura Y, *et al.* Structural and expression analyses of gonadotropin I beta subunit genes in goldfish (*Carassius auratus*). *Gene*, 1998, 222(2): 257–267
- Swanson P, Dickey JT, Campbell B. Biochemistry and physiology of fish gonadotropins. *Fish Physiol Biochem*, 2003, 28(1–4): 53–59
- Trinh KY, Wang NC, Hew CL, *et al.* Molecular cloning and sequencing of salmon gonadotropin subunit. *Eur J Biochem*, 1986, 159(3): 619–624
- Tubbs C, Tan WX, Shi B, *et al.* Identification of 17, 20 beta, 21-trihydroxy-4-pregnen-3-one (20 beta-S) receptor binding and membraneprogesterone receptor alpha on southern flounder sperm (*Paralichthys lethostigma*) and their likely role in 20 beta-S stimulation of sperm hypermotility. *General and Comparative Endocrinology*, 2011, 170(3): 629–639
- Weil C, Bougoussa HM, Gallais C, *et al.* Preliminary evidence suggesting variations of GtH 1 and GtH 2 mRNA levels at different stages of gonadal development in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen Comp Endocrinol*, 1995, 100(3): 327–333
- Yoshiura Y, Suetake H, Aida K. Duality of gonadotropin in a primitive teleost, Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Mol Endocrinol*, 1996, 16(2): 171–181

(编辑 刘丛力)

## Molecular Cloning and Differential Expression of LH $\beta$ Subunit During the Ovarian Maturation Cycle of *Paralichthys lethostigma*

LIU Xuezhou<sup>1</sup>, ZANG Kun<sup>1,2</sup>, XU Yongjiang<sup>1</sup>, LI Chunguang<sup>1</sup>, SHI Bao<sup>1</sup>, WANG Yanyan<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;

2. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

**Abstract** The role of the endocrine pathway in the regulation of southern flounder *Paralichthys lethostigma* reproduction has been unclear. Here we aimed to explore the underlying mechanisms by investigating the expression pattern of luteinizing hormone  $\beta$  subunit (LH  $\beta$ ). Using samples isolated from pituitary of *P.* we obtained the full-length cDNA sequence of LH  $\beta$  with the RACE method. The spatial and temporal expression patterns of LH  $\beta$  mRNA in different tissues during an ovarian maturation cycle were analyzed using the qPCR assay. The levels of plasma LH and E<sub>2</sub> during an ovarian maturation cycle were also measured using the ELISA method. Our results revealed an asynchronous oocyte development and batch spawning in southern flounder. The cDNA sequence of LH  $\beta$  had a length of 597 bp and it encoded 145 amino acids. LH  $\beta$  expression was detected in all examined tissues except for muscle, which implied it could be involved in multiple physiological functions in southern flounder. The LH  $\beta$  mRNA level in pituitary was high through the entire ovarian maturation cycle, and peaked at stage V and VI. In the ovary the LH  $\beta$  mRNA level peaked at stage V. In the liver the LH  $\beta$  mRNA level was the highest at stage II and relatively high at stage V. The levels of plasma LH and E<sub>2</sub> fluctuated in a similar pattern during the ovarian maturation cycle. These results suggested that LH  $\beta$  might regulate the ovarian maturation cycle via endocrine, paracrine and autocrine pathways. Our study provided insights into the functions of the endocrine pathway in the reproduction of southern flounder.

**Key words** *Paralichthys lethostigma*; LH  $\beta$  subunit; Ovarian maturation cycle; Expression pattern; Plasma hormone levels

# 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)育种核心群体 在连续排污养殖模式下的生长和存活性能分析\*

徐孝栋<sup>1,2</sup> 栾生<sup>2</sup> 罗坤<sup>2</sup> 孔杰<sup>2</sup>

(1. 大连海洋大学水产与生命学院 大连 116023 ;

2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

**摘要** 利用配置连续排污系统的室外水泥池养殖凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) 2012 级育种核心群家系, 监测、分析 3 个生长阶段养殖环境的水质变化、育种群体的生长和存活性能, 为建立安全、高效的育种核心群体养殖模式提供基础数据。结果显示, 在较高养殖密度(180 ind/m<sup>2</sup>)条件下, 氨氮含量在 7 d 内从 0 达到 1.80 mg/L 的高峰值, 在随后的养殖过程中呈波浪式变化, 波动范围为 0.50–1.80 mg/L; 亚硝酸盐含量维持在低于 0.60 mg/L 的水平; pH 值在 7.2–8.2 之间; 溶藻弧菌、副溶血弧菌和哈维氏弧菌的含量分别为 500–6200、0–400 和 0–10 CFU/ml; 凡纳滨对虾的平均生长速率为 0.199 g/d, 养殖成活率达到 89.7%; 凡纳滨对虾体质量的生长符合 Boltzmann 和 Logistic 模型, 体质量观测值与模型拟合值的决定系数( $R^2$ )分别为 0.978 和 0.980, 预测体质量规格为 10–12 g 时, 为其体质量增长拐点。

**关键词** 凡纳滨对虾; 连续排污; 氨氮; 亚硝酸盐; 微生物; 生长存活

**中图分类号** Q959 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2014)04-0032-07

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)又名南美白对虾, 具有适应性广、抗逆性强、生长速度快、饲料蛋白质含量需求低、适合集约化养殖等特点, 是目前世界上养殖产量最高的对虾品种(王兴强等, 2004; 柴鹏程等, 2013; 张许光等, 2013)。我国自 1999 年开始大面积养殖凡纳滨对虾, 2012 年养殖产量超过 120 万 t, 占我国对虾养殖总产量的 80%以上。

目前国内凡纳滨对虾养殖模式多为土池、高位池等传统方式, 对养殖过程中产生的污物和高氨氮、高亚硝酸盐缺乏有效的处理, 系统缺乏稳定性, 养殖风险大(蔡强, 2010)。生物絮团技术作为一种新兴养殖模式, 通过向水体中添加有机碳源, 絮团中的微生物能够吸收养殖水体中的残饵、粪便并转化成对虾可以食用的饵料, 大大降低了水体的亚硝酸盐和氨氮水

平, 并提高了饲料利用率(Avnimelech, 2007)。但生物絮团中微生物种类繁多、数量庞大, 细菌群落、浮游动植物、有机碎屑和一些聚合物物质互相絮凝而成细菌团粒(Schryver *et al.*, 2008)。由于缺少有效的管理和控制措施, 生物絮团技术稳定性需要进一步验证和改良(Crab *et al.*, 2012)。生物絮团需要持续地供给氧气, 并且要求养殖系统温度控制在 30℃左右才能形成(Rosenberry, 2006), 在我国北方可以实施的时间段较短, 同时溶氧不足会引起生物絮团沉降, 从而引起水质恶化(邓应能等, 2012)。

中国水产科学研究院黄海水产研究所从 2011 年开展凡纳滨对虾选择育种研究, 目前已选育至第 3 代。为保证育种核心群体始终处于无特定病原(SPF)状态, 家系养殖和混合养殖系统必须为封闭工厂化养

\* 国家高技术研究发展计划项目(2012AA10A404)和农业部“引进国际先进农业科学技术”项目(2013-Z13)共同资助。

徐孝栋, E-mail: ddong\_xu@163.com

通讯作者: 孔 杰, 研究员, E-mail: kongjie@sina.com

收稿日期: 2013-12-20, 收修改稿日期: 2014-03-18

殖系统,应具备安全、稳定和高效等特点。本研究在配置连续排污系统的混养测试池养殖凡纳滨对虾 2012 级 G<sub>0</sub> 代家系,监测、分析 3 个生长阶段养殖水体中氨氮含量、亚硝酸盐含量、虾体致病菌数量,通过抽样分析育种群体的生长和存活性能,为建立安全、高效的养殖模式提供基础数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验地点及用虾

实验于 2012 年 6–9 月在中国水产科学研究院黄海水产研究所农业部海水遗传育种中心(山东省青岛市即墨市鳌山卫镇)进行,实验用 207 个凡纳滨对虾为 2 月龄 2012 级 G<sub>0</sub> 代家系可视嵌入性荧光标记(VIE)幼虾,平均体质量为 3.38 g。实验所用 4 个养殖池为 100 m<sup>2</sup> 的室外圆形混养测试水泥池。

### 1.2 实验设备

养殖池采用连续排污系统,该系统分为电动 PVC 蝶阀(D971PVC-10DN150)和电动执行器(济南科威纳阀门有限公司)两部分。电动 PVC 蝶阀安装于池中央底部的排水口处,电动执行器安装于操作室,该系统可实现随时开关阀门,并可设置自动开关时间。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 实验设计** 实验分为 3 个连续阶段,详见表 1。第 1 阶段实验结束后,将存活对虾分别移入 2 号池和 3 号池,开始第 2 阶段实验;第 2 阶段实验结束后,将 2 号池和 3 号池存活对虾分别移入 4 号池和 5 号池,开始第 3 阶段实验,各阶段分别统计存活率。

**1.3.2 日常管理** 实验开始之前用 12 mg/kg 强氯精对实验池水进行杀菌,充分曝气后,待余氯为 0 时方可使用。放苗前 3 h,施加 2 mg/kg 应激灵 Vc。池内水位保持在 80 cm,水温为自然水温。每天投喂 4 次配合饲料(04:00、10:00、16:00、22:00),日投饵

量控制在总体质量的 4%–5%之间,具体投喂量的调整以投饵 1.5 h 后观察饵料剩余情况而定,根据情况酌情增减,5 d 调整 1 次投喂量;整个实验周期每天自动排污 4 次(06:00、12:00、18:00、0:00),每次排污时间 1.5 min,每天换水量不超过 20%。

### 1.4 数据采集

实验周期内每天对养殖池中氨氮、亚硝酸盐、pH、微生物进行测定,其中氨氮采用苯酚次氯酸盐比色法,亚硝酸盐采用萘乙二胺法(723PC 可见分光光度计,上海现科分化仪器有限公司),pH 采用 Sartorius PB-10(赛多利斯科学仪器有限公司,北京)进行测定,微生物的检测采用 TCBS 选择培养基分析培养弧菌,包括溶藻弧菌、副溶血弧菌、哈维氏弧菌;每天统计排出的死亡对虾数量,并在每个阶段倒池时进行存活对虾总数的统计;每 10 d 随机选取池内 50 尾凡纳滨对虾测量体质量。

### 1.5 数据处理

采用 Excel 2010 进行数据整理,采用 Origin 8.0 进行图表绘制及生长模型分析,第 2、3 阶段的两个养殖池数据分别取其平均数作为本阶段的分析值。应用的两个体质量生长拟合曲线模型分别为:

$$\text{Boltzmann: } W = (A_1 - A_2) / [1 + e^{(x-x_0)/dx}] + A_2$$

式中, $W$  为凡纳滨对虾体质量; $A_1$ 、 $A_2$  分别为函数的最小、最大阈值; $x$  为实验开始后的天数; $x_0$  为函数的拐点,即凡纳滨对虾体质量增长最快时的天数; $dx$  为时间常数。

$$\text{Logistic: } W = (A_1 - A_2) / [1 + (x/x_0)^p] + A_2$$

式中, $W$  为凡纳滨对虾体质量; $A_1$ 、 $A_2$  分别为函数的最小、最大阈值; $x$  为实验开始后的天数; $x_0$ 、 $p$  为时间常数;其中,拐点  $x_1$  的计算公式如下:

$$(x/x_0)^p = (p-1)/(p+1)$$

表 1 3 个实验阶段起止时间、养殖历程、密度和温度范围

Tab.1 Starting and ending dates, culture days, density and temperature range in three experimental stages

养殖阶段 Culture stage	起止时间 Starting and ending dates	养殖历程 Culture days (d)	养殖密度 Culture density (ind/m <sup>2</sup> )	温度范围 Temperature range (°C)
第 1 阶段 First stage	1 号池 2012-06-29– 2012-07-29	31	180	22–27.5
第 2 阶段 Second stage	2 号池 3 号池 2012-07-30– 2012-09-06	39	74	24–28
第 3 阶段 Third stage	4 号池 5 号池 2012-09-07– 2012-09-28	22	70	18–23.5

## 2 结果与分析

### 2.1 养殖过程中水质因子变化

实验期间 3 个不同阶段氨氮、亚硝酸盐含量和 pH 值随时间的变化趋势见图 1。由图 1 可知, 氨氮含量呈波浪式变化, 实验各阶段均于开始的 7 d 内达到峰值, 其含量为 2 mg/L 左右; 亚硝酸盐含量在实验各阶段会出现峰值, 其含量分别为 0.56、0.29 和 0.11 mg/L, 在实验第 1、第 2 阶段 20 d 后, 亚硝酸盐含量迅速增长并维持在一定高度波动; pH 值在 3 个不同阶段的变化分别为先高后低、平衡波动、先低后高, 总体维持在 7.2–8.2 之间。

### 2.2 养殖过程中微生物指标变化

实验过程中, 3 种微生物的变化趋势分别见图 2。由图 2 可以看出, 溶藻弧菌和副溶血弧菌含量在第 2 阶段的 4–5 周达到最高值。本实验过程中也检测出了哈维氏弧菌, 在水中的含量为 0–10 CFU/ml。

### 2.3 养殖过程中凡纳滨对虾死亡率的变化

实验期间 3 个不同实验阶段的日均死亡率见图 3。3 个阶段的日均死亡率最高值均出现在实验开始的 7 d 内, 其后日均死亡率变化不大, 在 0.20% 以下浮动。实验开始时虾放养数量为 18246 尾, 实验结束后存活 16366 尾, 存活率达到 89.7%。

### 2.4 实验各阶段凡纳滨对虾生长状况分析

整个实验周期, 前两个阶段均进行了 3 次体质量测量, 详见表 2, 实验养殖的第 3 阶段由于时间的因素只进行了两次体质量的测量。4、5 号池体质量增长不明显, 甚至出现负增长, 实验全阶段凡纳滨对虾的体质量平均生长速率为 0.199 g/d, 应用 Boltzmann 和 Logistic 体质量生长拟合的曲线模型分别为:

$$W = (3.429 - 19.711) / [1 + e^{(t-37.040)/11.880}] + 19.711$$

$$W = (4.992 - 20.865) / [1 + (t/40.592)^{3.385}] + 20.865$$

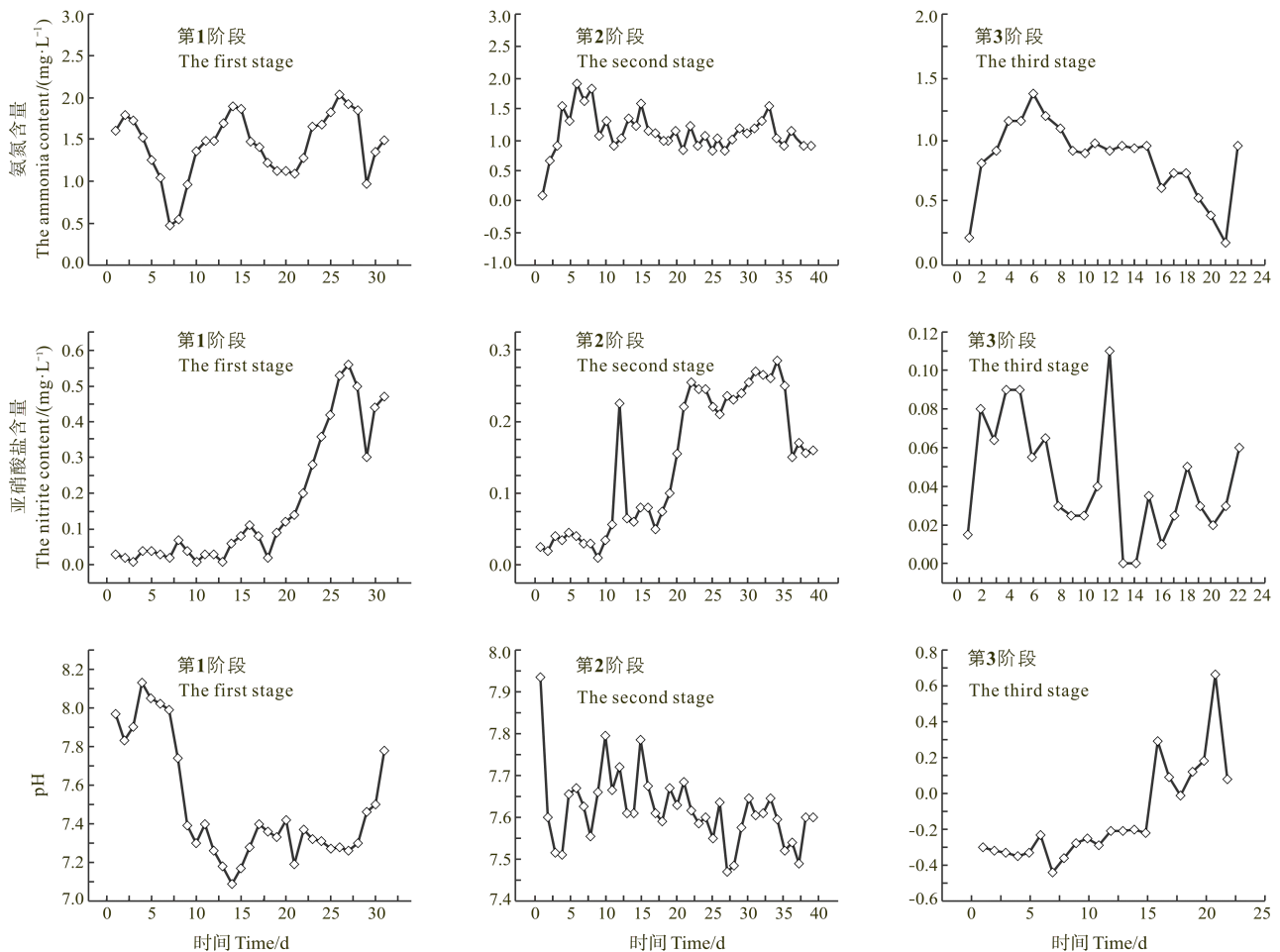


图 1 3 个实验阶段氨氮、亚硝酸盐含量和 pH 值的变化

Fig.1 The variation of ammonia, nitrite and pH in three experimental stages

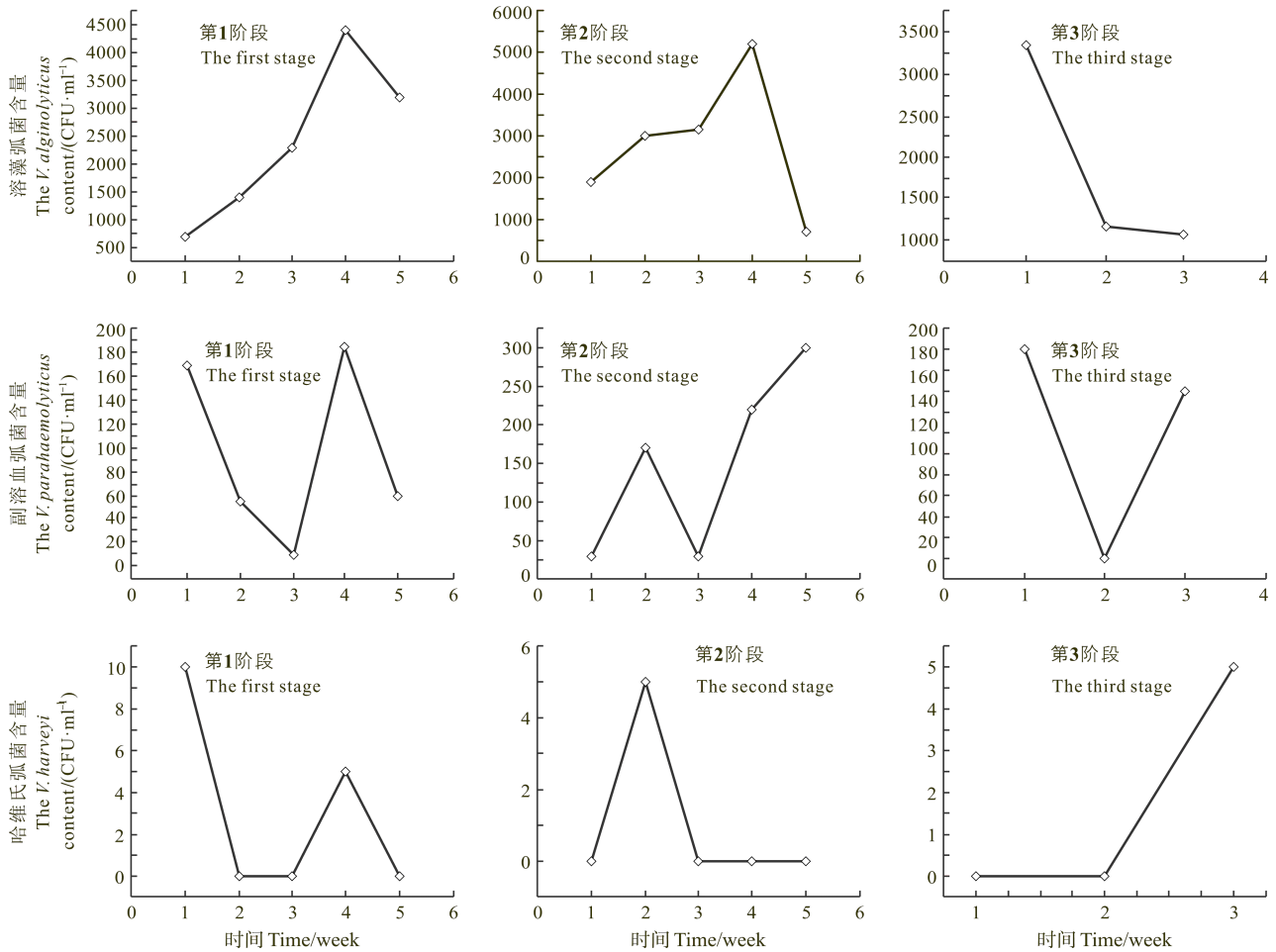


图 2 3 个实验阶段溶藻弧菌、副溶血弧菌和哈维氏弧菌的变化

Fig.2 The variation of *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* and *V. harveyi* in three experimental stages

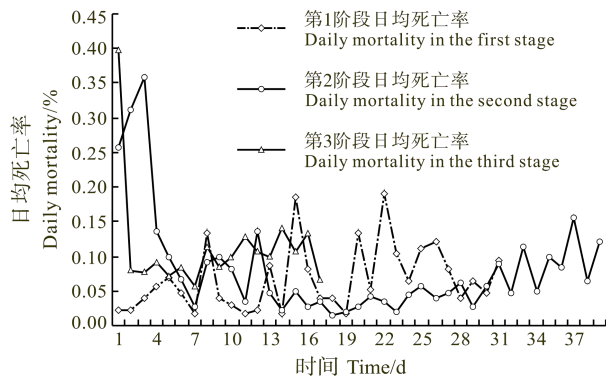


图 3 3 个实验阶段凡纳滨对虾日均死亡率变化

Fig.3 The variation of daily mortality rate of *L. vannamei* in three experimental stages

拟合曲线见图 4。模型显示, 凡纳滨对虾体质量生长前期比较缓慢, 中期加快, 后期趋于平缓。在 Boltzmann 模型中, 曲线的拐点出现在 37.040 的位置, 显示在本实验过程中, 第 37、38 天为凡纳滨对虾的体质量增长拐点, 此时的体质量为 11.57 g; Logistic

模型中曲线拐点为 33.908, 表明在此条件下, 凡纳滨对虾的最快生长速度出现在第 33、34 天, 此时的体质量为 10.59 g。由此可以认为在本系统条件下, 凡纳滨对虾在体质量达到 10–12 g 时为其体质量增长的拐点。统计检验表明, 两个模型拟合的  $R^2$  分别为 0.978 和 0.980,  $\chi^2$  检验值分别为 0.707 和 0.641, Boltzmann 和 Logistic 模型的拟合结果达到极显著水平。

### 3 讨论

国内外研究发现, 氨氮胁迫可以引起甲壳类免疫力下降, 并最终导致虾体患病死亡 (Verghese *et al*, 2007; 岳峰等, 2010), 因此水中氨氮浓度的突变幅度不应超过 0.5 mg/L 或长时间维持在较高氨氮水平 (> 0.5 mg/L) (姜令绪等, 2004)。本实验 3 个养殖阶段的氨氮含量都超过了 0.50 mg/L, 其中以第 1 阶段水平最高, 平均氨氮含量达到了 1.43 mg/L, 分析原因是较高的密度引起凡纳滨对虾的活动频率和个体间距明显增加, 导致耗氧率和排氨率升高(陈亚坤等, 2011; Ray *et al*,

表 2 实验各阶段凡纳滨对虾体质量数据  
Tab.2 Body weight of *L.vannamei* at different culture stages

养殖阶段 Culture stage	体质量 Body weight(g)			日均增重 Average daily weight gain(g/d)
	10 d	20 d	30 d	
第 1 阶段 First stage	5.03±1.42	6.62±1.58	8.74±2.49	0.179
第 2 阶段 Second stage	12.41±3.18	16.20±2.45	15.66±3.84	0.231
	13.56±3.14	16.08±3.35	17.05±4.74	0.277
第 3 阶段 Third stage	18.88±3.59	18.66±4.28	—	0.100
	20.00±4.36	19.94±5.47	—	0.096

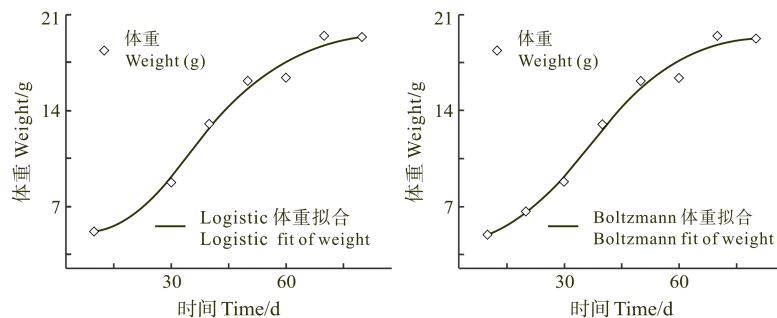


图 4 凡纳滨对虾 Boltzmann、Logistic 模型体质量生长拟合曲线

Fig.4 Regression curve of *L.vannamei* weight growth in Boltzmann and Logistic models

1992)。本实验采用连续排污系统，每天分 4 次定时排出沉积在底部的残饵、粪便和死虾，在一定程度上减少了因微生物的分解作用堆积有毒的气体和物质对虾体产生的危害。倒池后氨氮含量在 7 d 的时间内能迅速达到峰值，说明在水泥池中养殖凡纳滨对虾，水质调控较困难，维持水泥池中的稳定良好生态环境需要进行更多研究。

亚硝酸盐是氨转化成硝酸盐过程中的中间产物，其形成过程主要为残存在池底的饵料、粪便、死藻等物质分解成有毒性的氨氮，然后转化为亚硝酸盐。对虾中毒时表现为鳃部受伤变黑，同时亚硝酸盐含量的升高会导致水中弧菌对对虾的免疫力破坏性增大，引起对虾死亡(周鲜娇等, 2009)。实验过程中由于坚持每天连续排污，其中在第 3 阶段亚硝酸盐含量保持较低的水平，平均低于 0.10 mg/L，在养殖后期连续排污措施能更有效地防止亚硝酸盐的积累。工厂化养殖模式下水中的亚硝酸盐含量为 4.70 mg/L(何本茂等, 2005)，室内高密度养殖池内亚硝酸盐含量为 0.34 mg/L(张煜等, 2010)，高位池养殖模式条件下亚硝酸盐含量为 0.70 mg/L(李由明等, 2013)，本实验研究结果证明连续排污能有效控制亚硝酸盐的产生。

pH 是影响甲壳类渗透压调节机制的重要因素之一。凡纳滨对虾在 pH 7.5–8.5 的弱碱性水中生活较好

(王吉桥, 2002)，随着养殖时间的延长，养殖水体的 pH 有降低的趋势，主要是养殖中后期对虾的呼吸作用以及水中的有机质在微生物的分解作用下产生的有机酸等物质造成的。本实验中，第 1 阶段池中 pH 值呈降低趋势，这与高密度下凡纳滨对虾的总体代谢过高有关；第 2 阶段 pH 值的变化相对平稳；第 3 阶段 pH 值有回升趋势，这可能与较低温度下(19–20℃)凡纳滨对虾呼吸代谢较弱有关。克氏原螯虾代谢率随体质量的增大而减少，随温度升高而增大(温小波等, 2003)。pH 过高会使水中的离子氨转变为氨态氨，从而加剧氨氮的毒性；pH 过低会影响虾体内的离子平衡、改变其食欲而对生长起作用(董双林等, 1994)。因此，能够保证整个养殖过程 pH 的稳定至关重要，不但可以弱化氨氮带来的毒性作用，还可以保持虾体正常摄食和生长。

弧菌是影响对虾养殖业最为常见、危害较重的一类细菌性疾病，其适宜温度为 25–32℃，在 28℃ 以上时流行极为迅速(胡超群等, 2002)。溶藻弧菌是一种条件致病菌，环境恶化时容易暴发，会使凡纳滨对虾患红体病，表现为虾体变成红色、肝胰脏肿胀、头胸甲易剥离(陈强等, 2006)。副溶血弧菌的最适生长盐度为 32，最适 pH 为 7.2(胡兴娟等, 2011)，可引起对虾心脏、鳃、肝组织等的病变，导致虾体免疫机能下

降并引起死亡。本实验中溶藻弧菌和副溶血弧菌的含量在第2阶段的4-5周达到高峰,分析可能的原因与高温(27.5-28℃)有关。随着温度的升高,弧菌极易流行(胡超群等,2000),溶藻弧菌在20-35℃条件下成膜量较多(姚刚等,2012),从大黄鱼致病菌哈维氏弧菌GYC1108-1菌株中提取的胞外产物与偶氮酪蛋白作用的最适温度为28℃(沈锦玉等,2011),因此,在高温阶段控制水体中弧菌的数量可以有效控制虾体的患病率。在实验过程中检测出哈维氏弧菌,分析可能是由于室外养殖池受天气影响比较大,以及某些不可控制因素的变化和干扰导致水体受到污染。

本研究应用连续排污系统,实验最终存活率达到89.7%。3个阶段的日均死亡率最高值均出现在实验开始的7d内,这主要是由于倒池引起的对虾生活环境、理化因子的变化而导致的应激死亡,其后日均死亡率变化不大,在0.20%以下浮动,这显示水体理化因子的稳定对虾体存活的影响巨大,维持系统稳定、减少换水量可以从一定程度上降低对虾的刺激,增加养殖成活率。室内水泥池采用定期换水的养殖模式,其养殖成活率为61.4%-76.8%(兰国宝等,2003)。本研究养殖后期对虾出现负增长,分析原因可能与较低的水温(18-23.5℃)有关,导致对虾生长缓慢。体质量平均生长速率为0.199 g/d,低盐度(2-6)下,凡纳滨对虾体质量平均生长速率为0.169 g/d,体质量最佳拟合模型 Boltzmann 为  $W = (-0.621 - 16.541) / [1 + e^{-(t-54.809)/15.456}] + 16.541$  (查广才等,2006),在连续排污养殖模式下,3个实验阶段体质量的生长过程与模型拟合结果的吻合度非常高。本研究中应用 Boltzmann 和 Logistic 模型,在不考虑密度影响的前提下,凡纳滨对虾体质量增长的拐点分别出现在实验的第37、38天和第33、34天,对应此时的凡纳滨对虾体质量为11.57 g和10.59 g。

#### 4 结论

应用连续排污系统可降低水体中的亚硝酸盐水平、控制弧菌含量在一个很低的水平,系统具有较强的稳定性和可操作性,应用本套系统养殖最终成活率达到89.7%;发现 Boltzmann 模型和 Logistic 模型均能很好地估计凡纳滨对虾体质量的生长曲线,凡纳滨对虾体质量规格为10-12 g时,为其体质量增长拐点。

#### 参 考 文 献

王吉桥. 南美白对虾健康养殖技术. 水产科学, 2002, 21(5): 43-46

- 王兴强, 马姓, 董双林. 凡纳滨对虾生物学及养殖生态学研究进展. 海洋湖沼通报, 2004, (4): 94-100
- 邓应能, 赵培, 孙运忠, 等. 生物絮团在凡纳滨对虾封闭养殖试验中的形成条件及作用效果. 渔业科学进展, 2012, 33(2): 69-75
- 兰国宝, 阎冰, 廖思明. 南美白对虾集约化养殖产量与密度关系研究. 水产养殖, 2003, 24(4): 38-39
- 陈亚坤, 郭冉, 夏辉, 等. 密度胁迫对凡纳滨对虾生长、水质因子及免疫力的影响. 江苏农业科学, 2011, 39(3): 292-294
- 陈强, 鄢庆彬, 马姓. 溶藻弧菌致病性研究进展. 海洋科学, 2006, 30(8): 83-89
- 何本茂, 童万平, 韦蔓新. 不同模式对虾养殖水体中硝酸盐和亚硝酸盐的变化特征及其影响因素. 广西科学, 2005, 12(1): 76-79
- 李由明, 刘明, 王平, 等. 热带凡纳滨对虾养殖排泄废水水质分析研究. 水产养殖, 2013, 34(7): 42-45
- 沈锦玉, 李新华, 潘晓芝, 等. 哈维氏弧菌的主要致病因子及其特征分析. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2011, 37(2): 142-148
- 岳峰, 潘鲁青, 谢鹏, 等. 氨氮胁迫对三疣梭子蟹酚氧化酶原系统和免疫指标的影响. 中国水产科学, 2010, 17(4): 761-770
- 周鲜娇, 邱德全. 亚硝酸氮和副溶血弧菌对凡纳滨对虾部分免疫指标的影响. 水生态学杂志, 2009, 30(1): 49-53
- 查广才, 周昌清, 黄建荣, 等. 低盐度养殖的凡纳滨对虾体长和体重的增长规律. 水产学报, 2006, 30(4): 489-495
- 姜令绪, 潘鲁青, 肖国强. 氨氮对凡纳滨对虾免疫指标的影响. 中国水产科学, 2004, 11(6): 537-541
- 张许光, 赵培, 王国成, 等. 不同放苗密度对凡纳滨对虾生物絮团养殖的环境和产出效应. 渔业科学进展, 2013, 34(3): 111-119
- 张煜, 臧维玲, 刘永士, 等. 凡纳滨对虾室内外高密度养殖池水质状况比较. 江苏农业科学, 2010, (3): 299-302
- 胡兴娟, 沈飏, 张文斌. pH 值及盐度对副溶血弧菌与霍乱弧菌生长影响的研究. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(22): 4855-4857
- 胡超群, 陶保华. 对虾弧菌病及其免疫预防的研究进展. 热带海洋, 2002, 19(3): 84-94
- 姚刚, 覃映雪, 邹文政, 等. 致病性溶藻弧菌生物膜形成特性研究. 水产科学, 2012, 31(2): 73-78
- 柴鹏程, 宋晓玲. 饲料中添加芽孢杆菌 PC465 对凡纳滨对虾生长和 STAT 基因表达的影响. 渔业科学进展, 2013, 34(3): 97-103
- 温小波, 库天梅, 罗静波. 温度、体重及摄食状态对克氏原螯虾代谢的影响. 华中农业大学学报, 2003, 22(2): 152-156
- 董双林, 堵南山, 赖伟. pH 值和  $Ca^{2+}$  浓度对日本沼虾生长和能量收支的影响. 水产学报, 1994, 18(2): 118-123
- 蔡强. 南美白对虾高位池养殖模式探讨. 海洋与渔业: 技术前沿, 2010, (6): 35-37
- Avnimelech Y. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. Aquaculture,



- 2007, 264(1-4): 140-147
- Crab R, Defoirdt T, Bossier P. Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. *Aquaculture*, 2012, 356-357: 351-356
- Rosenberry B. World Shrimp Farming 2006, Number 19. Shrimp News International. 2006, San Diego, USA
- Ray WM, Chien YH. Effects of stocking density and aged sediment on tiger prawn, *Penaeus monodon*, nursery system. *Aquaculture*, 1992, 104(3-4): 231-248
- Schryver PD, Crab R, Defoirdt T, *et al.* The basics of bioflocs technology: The added value for aquaculture. *Aquaculture*, 2008, 277(3-4): 125-137
- Vergheze B, Radhakrishnan EV, Padhi A. Effect of environmental parameters on immune response of the Indian spiny lobster, *Panulirus homarus* (Linnaeus, 1758). *Fish Shellfish Immunol*, 2007, 23(5): 928-936

(编辑 冯小花)

## Growth and Survival of the *Litopenaeus vannamei* Nucleus Selection Population in the Continuous Wastewater Discharge Mode

XU Xiaodong<sup>1,2</sup>, LUAN Sheng<sup>2</sup>, LUO Kun<sup>2</sup>, KONG Jie<sup>2</sup>

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

**Abstract** In this study the nucleus families of *Litopenaeus vannamei* produced in 2012 were reared in the outdoor concrete tanks with continuous wastewater discharge. To establish a safe and efficient culture mode for the nucleus selection population, we analyzed their growth and survival at three growth stages in five concrete tanks with certain water qualities. Electric PVC butterfly valves installed in the center of the ponds were used to manage the timed water discharge. The shrimp were fed with commercial diets 4 times daily, and the wastewater was discharged 2 hours after the feeding. The concentrations of ammonia nitrogen and microorganism were monitored on daily and weekly basis respectively. The experiment lasted for 92 days. At every stage two ponds were in use except for the first one, which ended up dividing into two ponds. The shrimp were transferred into new ponds with freshwaters, and the survival rate was determined before entering into the next stage. Data collection, graphing, and the analysis of the growth model were done with Excel 2010 and Origin 8.0. Under the high cultural density (180 ind/m<sup>2</sup>) the ammonia concentration increased to 1.80 mg/L after the first week, and ranged from 0.50 mg/L to 1.80 mg/L in the whole experimental period. The nitrite concentration maintained at a low level of 0.60 mg/L; the pH varied from 7.2 to 8.2; the range of concentrations of *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* and *V. harveyi* were 500-6200 CFU/ml, 0-400 CFU/ml and 0-10 CFU/ml, respectively. During the three growth stages, the average growth and survival rate for the selected population were 0.199 g/d and 89.7% respectively. The growth of the selected population could fit in the Boltzmann and Logistic models. The  $R^2$  values of the actual and the predicted weights were 0.978 and 0.980 respectively. These results suggested that the inflection point of the growth was between 10 g and 12 g. The continuous wastewater discharge mode is viable and efficient in shrimp farming because of its low ammonia nitrogen toxicity, stable pH and low pathogenicity of the microorganisms.

**Key words** *Litopenaeus vannamei*; Wastewater continuous discharge; Ammonia; Nitrite; Microorganism; Growth and survival

DOI: 10.11758/yykxjz.20140406

http://www.yykxjz.cn/

# 外源激素对花鲈(*Lateolabrax japonicus*)血清 IGF-1 含量及肝脏 IGF-1 和 IGFBP-1 mRNA 表达的影响\*

钱 焜 温海深 迟美丽 倪 蒙 张冬茜 丁玉霞

(中国海洋大学水产学院 青岛 266003)



**摘要** 对花鲈(*Lateolabrax japonicus*)成鱼腹腔注射促黄体激素释放激素类似物(LHRH-A3)和人体绒毛膜促性腺激素(HCG),利用放射性免疫激素测定方法(RIA)检测了花鲈血清中类胰岛素生长因子(Insulin-like growth factor 1, IGF-1)在注射后 6、12、24、48 h 内的变化情况,同时还利用荧光实时定量 PCR 技术检测了花鲈肝脏中 IGF-1 和类胰岛素生长因子结合蛋白 1(Insulin-like growth factor-binding protein 1, IGFBP-1)mRNA 的相对表达量的变化情况。结果表明,注射 LHRH-A3 的花鲈血清中 IGF-1 的含量在 24 h 后出现了明显的降低( $P < 0.05$ ),而花鲈肝脏中 IGF-1 mRNA 的相对表达量在注射 6 h 后较对照组明显升高( $P < 0.05$ ),而肝脏中 IGFBP-1 mRNA 的相对表达量则呈现下降趋势。注射 HCG 的花鲈血清中 IGF-1 的含量在注射后 12 h 出现了明显降低( $P < 0.05$ ),24 h 后血清中 IGF-1 含量持续降低。肝脏中 IGF-1 mRNA 的相对表达量在注射后的 24 h 内均保持稳定,而在处理后的 48 h 出现了显著上升( $P < 0.05$ )。肝脏中 IGFBP-1 mRNA 的相对表达量在注射后 12 h 检测到显著升高( $P < 0.05$ )。研究结果表明,LHRH-A3 和 HCG 均可以通过直接或间接的刺激作用来触发花鲈 IGF 系统的应答反应,但是其中具体机制尚不明了。

**关键词** 花鲈; 类胰岛素生长因子 1; 类胰岛素生长因子结合蛋白 1; 促黄体激素释放激素; 人体绒毛膜促性腺激素

中图分类号 S917 文献标识码 A 文章编号 1000-7075(2014)04-0039-06

硬骨鱼类的生长发育与其他脊椎动物一样,主要是受到下丘脑-垂体-肝脏(Hypothalamus-Pituitary-Liver, HPL)这个中心轴的调控,围绕着这个中心轴的内分泌调节因子主要有生长激素(Growth hormone, GH)和类胰岛素生长因子 IGF 家族(Insulin-like growth factor, IGF)(林浩然, 1996; Peter *et al*, 1995; 邵明瑜等, 2010)。生长激素生长调节作用的发挥主要还是通过与 IGF 家族成员的配合来完成的,这其中最主要的因子是 IGF-1。IGF-1 是在结构和功能上与胰岛素相关的一种多肽,除了能够产生胰岛素代谢作用外,还具有调节生长发育的功能。人类的 IGF-1 具有

多种生物学效应,包括激发细胞分裂和分化、抑制蛋白质降解和细胞凋亡,作为内分泌因子调节生长过程(Humbel *et al*, 1984; Lowe, 1991; Parrizas *et al*, 1997)。而类胰岛素生长因子结合蛋白 1 (IGFBP-1)作为 IGFs 的载体,通过与其结合来调控 IGFs 的释放,从而达到调节 IGFs、促生长作用的效果(McLellan *et al*, 1992)。研究表明,促性腺激素释放激素(Gonadotrophin-releasing hormone, GnRH)能够促进鲤科鱼类生长激素的分泌(Lin, 2000)。促黄体激素释放激素类似物(LHRH-A3)是哺乳动物 GnRH 的类似物,它不仅可以促进垂体生成和释放促性腺激素(GtH),还能刺激垂体中 GH

\*国家“十二五”科技支撑计划重大项目课题(2011BAD13B03)资助。钱 焜, E-mail: qq320king@163.com

通讯作者: 温海深, 教授, E-mail: wenhaishen@ouc.edu.cn

收稿日期: 2013-04-19, 收修改稿日期: 2013-09-24

的释放,从而达到促生长的作用(Lin, 2000)。人体绒毛膜促性腺激素(Human Chorionic Gonadotrophin, HCG)具有促卵泡素(FSH)和促黄体素(LH)的生理作用,对于雌鱼能够促进卵泡成熟和诱导排卵,对于雄鱼能够促进雄激素的分泌(Malison *et al.*, 1998)。LHRH-A3 和 HCG 这两种激素主要用于实际生产中促进鱼体性腺分化和发育,但关于它们对鱼体生长的影响的相关报道较少。

本研究通过腹腔注射的方式给花鲈(*Lateolabrax japonicus*)注射 LHRH-A3 和 HCG 两种激素,观察了在注射之后的 48 h 内血清中 IGF-1 含量以及肝脏中 IGF-1 mRNA 和 IGFBP-1 mRNA 的表达情况。通过检测鱼类生长调控中枢的几个关键因子(血清中 IGF、肝脏中 IGF-1 和 IGFBP-1 mRNA)的含量变化情况,初步探索了 HCG 和 LHRH-A3 这两个在生产中广泛应用的催产剂对鱼体生长情况的影响,以期为实际生产提供一定的指导作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

2011 年 11 月采自山东省青岛市网箱养殖花鲈成鱼(海水温度 8–10℃,投喂商业饲料,每天 3 次),数量为 60 尾,体质量为 553.5–811.3 g,体长为 34.5–42.8 cm。

### 1.2 主要试剂与仪器

主要试剂:LHRH-A3、HCG(宁波第二激素厂),鱼用生理盐水(PS)为实验室自制,Trizol Reagent、氯仿、乙醇、异丙醇、PrimeScript® RT Reagent Kit with gDNA eraser (Perfect Real Time)、SYBR®Premix Ex Taq™ (TliRNaseH Plus)、盐酸、Tris Base、类胰岛素生长因子-1 检测试剂(天津九鼎生物)。

主要仪器:Biometra PCR 仪, Biodropsis BD-1000 核酸测定仪, SageCreation 电泳凝胶成像系统, Roche Light Cycler 480,  $\gamma$  免疫计数仪(SN695B6 型)。

### 1.3 激素注射实验及样品的采集

实验鱼暂养于实验室玻璃水箱中,每个水箱体积约 200 L,每个水箱养殖 4–5 尾花鲈,共 16 个水箱。气泵充氧(溶解氧 > 5 mg/L),人工调节光照(250 lx, 12 L:12 D),水温 8–10℃。暂养期间每天进行换水清池,每天换水量约为 120 L。暂养 3 d 后,开始进行激素注射。实验分为对照组(注射生理盐水)、LHRH-A3 处理组和 HCG 处理组,每组 20 尾,激素处理组每尾鱼腹腔注射 LHRH-A3(3  $\mu$ g/kg 鱼体重)或

HCG(1000 U/kg 鱼体重),而对照组注射同等体积的生理盐水。

激素注射开始前,采 3 尾普通实验鱼作为零点,注射完成后设置 4 个采样点,分别为 6、12、24、48 h。每次每组采集 3 尾鱼,尾静脉采血,并在无菌条件下获得花鲈的肝脏及其他组织用于后期的 mRNA 含量检测。

### 1.4 血清中 IGF-1 激素的测定

得到的血液样品在 4℃ 冰箱静置 6 h 后, 12000 r/min 离心 20 min,用移液器小心吸取上清液,得到花鲈血清样品。根据样品数量,提前配制酸醇混合液( $V_{\text{盐酸}}:V_{\text{无水乙醇}}=12.5:87.5$ ),利用 NaOH 调节 pH。配制 Tris Base(0.855 mol/L, pH=11.0)。

去结合蛋白:在离心管中取血清样品 80  $\mu$ l,酸醇液 720  $\mu$ l 混匀,室温放置 30 min,再以 4℃ 12000 r/min 离心 20 min,取上清液 400  $\mu$ l,加入 200  $\mu$ l Tris Base,混匀,室温放置 30 min,再以 4℃ 12000 r/min 离心 20 min,取上清液 100  $\mu$ l,待测。

利用放射性免疫激素测定方法(RIA)测定花鲈血清中 IGF-1 的含量。校准品为冻干品,浓度为 10、25、50、100、250、500 ng/ml,另外通过稀释增加一个 1 ng/ml 的标准点。标本和所测的样品存放于 2–8℃,并于 24 h 内测定。

### 1.5 肝脏中 IGF-1、IGFBP-1 mRNA 荧光实时定量 PCR 检测

提取对照组和两个激素处理组的肝脏组织的 mRNA(浓度为 500 ng/ $\mu$ l)为模板,按照 PrimeScript® RT Reagent Kit with gDNA eraser (Perfect Real Time)的说明书进行反转录,得到 cDNA 模板。

在 Roche Light Cycler 480 实时定量 PCR 仪上进行荧光实时定量 PCR 反应。按照 SYBR®Premix Ex Taq™(TliRNaseH Plus)试剂盒配制反应液,采用三步法,反应程序为:94℃, 30 s; 94℃ 5 s,  $T_M$ ℃ 20 s; 72℃, 40 s。18s、IGF-1 和 IGFBP-1 的表达引物见表 1

表 1 IGF-1 和 IGFBP-1 引物序列及其结合位置  
Tab.1 Primers for IGF-1 and IGFBP-1 mRNA and the positions of primers integrate

引物 Primer	序列 Sequence(5'-3')	位置 Position(bp)
IGF-1 EF	CGCAATGGAACAAAGTCGGAATAT	64–87
IGF-1 ER	GTGAGAGGGTGTGGCTACAGGAGA	256–279
IGFBP-1 ER	CAGGGCAGTCGTTGAGTT	187–204
18sF	GGGTCCGAAGCGTTTACT	—
18sR	TCACCTCTAGCGGCACAA	—

(其中 18s 和 IGF-1 引物的  $T_M$  值为  $58^{\circ}\text{C}$ , IGFBP-1 的  $T_M$  值为  $59^{\circ}\text{C}$ ), 并且提前已经对这 3 对引物进行优化, 符合实时定量反应的要求, 扩增效率均在 95%–105% 之间。每个样品设 3 个重复, 得到  $C_T$  值后, 根据  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法进行计算。

### 1.6 统计分析

数据的统计分析运用 SPSS 13.0 ANOVA 中的 Duncan's 多重检验, 数据均表示为平均数±标准误, 图中标有不同字母时表示存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

## 2 结果

### 2.1 血清中 IGF-1 的测定

图 1 显示了在各个处理组中花鲈血清中 IGF-1 的变化规律。花鲈血清中 IGF-1 的含量随着时间的延长均呈现下降的趋势。HCG 组和 LHRH-A3 组在处理 12 h 后, 花鲈血清中 IGF-1 含量较对照组有显著降低 ( $P < 0.05$ )。处理 24 h 和 48 h 后, HCG 组 IGF-1 含量较对照组仍降低 ( $P < 0.05$ ), 而 LHRH-A3 组中的 IGF-1 含量则一直保持在与对照组相近的水平。

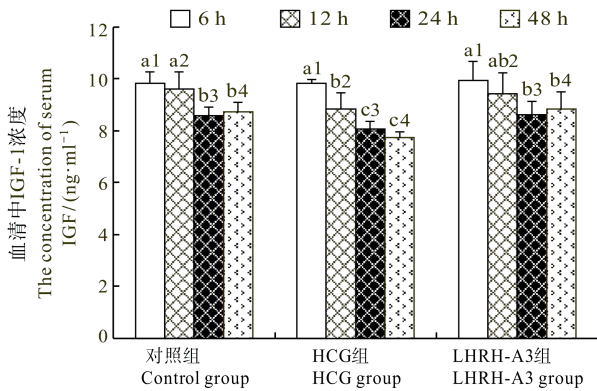


图 1 花鲈各处理组间血清 IGF-1 含量的变化情况

Fig.1 The variations of IGF-1 in serum of *L. japonicus* treated with hormones

不同的数字代表不同的处理时间, 不同的字母代表差异显著 ( $P < 0.05$ )

Dissimilar numbers indicate different testing points, different letters indicate significant differences at  $P < 0.05$

从各个处理组内部花鲈血清中 IGF-1 含量的变化可以看到, 对照组实验鱼血清中 IGF-1 的含量在注射 24 h 后出现明显的下降 ( $P < 0.05$ ); HCG 组实验鱼血清中 IGF-1 的含量在注射 12 h 后即出现了明显的降低 ( $P < 0.05$ ), 24 h 后血清中 IGF-1 含量持续降低, 之后一直保持在较低的水平。LHRH-A3 处理组在激

素注射后的 12 h 内, 血清中 IGF-1 的含量并无太大变化, 24 h 后出现了明显的降低 ( $P < 0.05$ ), 且保持在较低水平。

### 2.2 花鲈肝脏中 IGF-1 mRNA 的荧光实时定量 PCR 检测

运用荧光实时定量 PCR 方法检测花鲈肝脏中 IGF-1 mRNA 相对表达量的变化规律, 从图 2 可以看到, HCG 处理组实验鱼肝脏中 IGF-1 mRNA 的相对表达量在注射后的 24 h 内均保持稳定, 较对照组无明显差异, 而在处理后的 48 h 出现了显著的上升 ( $P < 0.05$ )。在注射后 6 h, LHRH-A3 处理组中, 实验鱼肝脏中 IGF-1 mRNA 的相对表达量较对照组明显升高 ( $P < 0.05$ ), 12 h 后降低到与对照组相当的水平, 之后的实验过程中一直保持稳定。

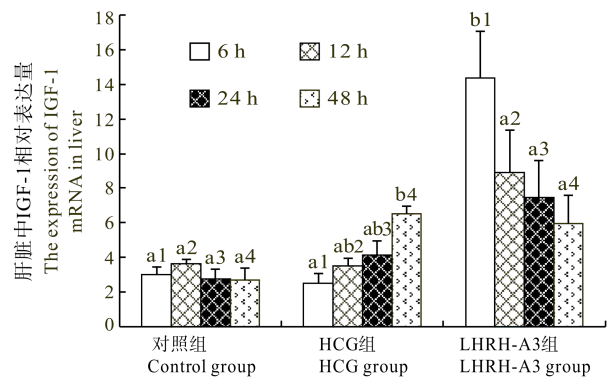


图 2 花鲈各处理组间肝脏 IGF-1 mRNA 的表达量变化  
Fig.2 The variations of IGF-1 mRNA expression in liver of *L. japonicus* treated with hormones

不同的数字代表不同的处理时间, 不同的字母代表差异显著 ( $P < 0.05$ )

Dissimilar numbers indicate different testing points, different letters indicate significant differences at  $P < 0.05$

从各个处理组内部花鲈肝脏中 IGF-1 mRNA 含量的变化可以看到, HCG 组实验鱼 IGF-1 mRNA 的含量在注射后一直呈上升的趋势, 而且在 48 h 后出现了显著的升高 ( $P < 0.05$ )。而 LHRH-A3 处理组在激素注射后却一直呈现下降趋势, 并且在 12、24 和 48 h 与 6 h 时相比差异显著 ( $P < 0.05$ )。

### 2.3 IGFBP-1 mRNA 含量的荧光实时定量 PCR 检测

由图 3 看到, 在不同的处理组之间, HCG 组的实验鱼在注射后 12、24、48 h, 其肝脏中 IGFBP-1 mRNA 的相对表达量与对照组相比显著升高 ( $P < 0.05$ ), 而 LHRH-A3 处理组中, 花鲈肝脏 IGFBP-1 mRNA 较对照组而言差异不显著。

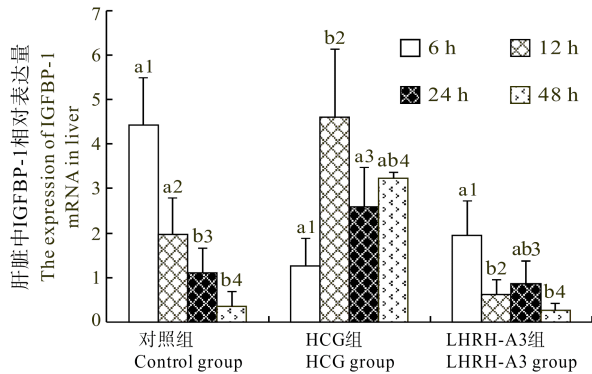


图 3 各组中花鲈肝脏 IGFBP-1 mRNA 的表达量变化  
Fig.3 The variations of IGFBP-1 mRNA expression in liver of *L. japonicus* treated with hormones

不同的数字代表不同的处理时间, 不同的字母代表差异显著 ( $P < 0.05$ )

Dissimilar numbers indicate different testing points, different letters indicate significant differences at  $P < 0.05$

各个处理组内部花鲈肝脏中 IGFBP-1 mRNA 含量的变化规律: 对照组实验鱼肝脏中 IGFBP-1 mRNA 的含量在注射后 24、48 h 出现显著降低 ( $P < 0.05$ ); HCG 组实验鱼 IGF-1 mRNA 的含量在注射 12 h 后显著升高 ( $P < 0.05$ ), 而后稍有下降。而 LHRH-A3 处理组在激素注射后却呈现下降趋势, 并且在 12、48 h 时检测到显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

促黄体激素释放激素类似物(LHRH-A3)是哺乳动物 GnRH 的类似物, 它不仅可以促进垂体生成和释放促性腺激素(GtH), 还能刺激垂体中 GH 的释放, 从而达到促生长的作用(Lin, 2000)。通过体腔注射 LHRH-A3, 发现花鲈成鱼肝脏中 IGF-1 mRNA 的相对表达量显著升高。有研究报道, GnRH 和它的类似物不仅具有促进 GH 释放的作用, 同时还能加强垂体中 GH mRNA 水平的升高(Lin *et al.*, 1993), 这种促进作用在其他鱼类, 如金鱼(*Carassius auratus*)(Marchant *et al.*, 1989)、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)(林信伟等, 1993)、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)(王黎等, 1997)、尼罗罗非鱼(*Tilapia nilotica*)(马细兰等, 2013)中也有报道。而在海水鱼黑鲷(*Sparus macrocephalus*)的研究中发现, LHRH-A3 同样可以刺激性成熟时期血清中 GH 的升高(邓利等, 2003)。此外, 在配合饲料中加入 LHRH-A3 也能促进黄鳍鲷(*Sparus latus*)GH 的生成以及 IGF-1 mRNA 的表达(石和荣等, 2005), 这种投喂方式同样也可以促进鲫鱼的生长(林信伟等, 1993)。本研究发现, 花鲈肝脏中 IGF-1 mRNA 表达水平在

LHRH-A3 的刺激下有所提高, 而 LHRH-A3 处理的花鲈成鱼血清中 IGF-1 的含量并无明显变化。可能是由于处理时间太短, 具体实验效果还需延长时间来进行验证。而肝脏中 IGFBP-1 mRNA 的表达量在 LHRH-A3 处理后有所降低, 但是较对照组无明显的差异(图 3)。马细兰等(2013)在 LHRH-A3 对罗非鱼生长轴相关基因影响的研究中发现, LHRH-A3 能够促进罗非鱼垂体 GH mRNA、肝脏 GHR mRNA 以及肝脏中 IGF-1 mRNA 的表达量增加。但是, 也有研究表明, LHRH-A3 并不能促进非洲鲇(*Clarias gariepinus*)(Bosma *et al.*, 1995)和革胡子鲶(*Ctarius leather*)(温海深等, 2002)脑垂体 GH 的释放。本研究显示了 LHRH-A3 对花鲈肝脏 IGF-1 mRNA 表达量的提升作用, 但是没有研究脑中 GH mRNA 表达量的变化规律, 但可以推测, 可能是由于 LHRH-A3 促进垂体分泌 GH, 从而间接影响了肝脏中 IGF-1 的表达量。

经过 HCG 处理的花鲈成鱼肝脏 IGF-1 mRNA 相对表达量有所增加, 但是较对照组的变化并不明显(图 4), 可能需要再加设几个采样点才能看到肝脏中 IGF-1 相对表达量的显著变化。有研究显示, 在人体的卵巢癌细胞中 HCG 处理能够显著增加 IGF-1 mRNA 的表达量, HCG 可能是通过上调 IGF 的表达来调控细胞凋亡抑制信号, 从而影响卵巢癌细胞的化学敏感性(Kuroda *et al.*, 1998)。这暗示着在鱼类中 HCG 可能也具有这种调节机制, 需要进一步研究 HCG 对于性腺中 IGF-1 mRNA 的表达影响, 才能得到较为全面的信息。IGFBP-1 mRNA 的相对表达量在处理 6 h 出现明显的升高之后有所下降, 相对表达量还是要显著高于对照组, 可以推测 HCG 对于花鲈生长的影响可能是通过增加 IGFBP-1 mRNA 的转录水平来完成的。这点不同于 LHRH-A3 处理组, 暗示着这两种催产激素对于花鲈生长的影响机制是有差异的。此外, HCG 处理后, 血清中 IGF-1 的含量持续下降, 且与对照组有较明显的差异。在金鱼中, HCG 被推测可能具有调节 IGF 表达的作用(Srivastava *et al.*, 1994), 对于花鲈 IGFs 的基因来说, HCG 同样具有这种作用, 但是具体作用机制并不明了。有报道称, 注射 HCG 能够促进南方鲇(*Silurus meridionalis*)血清中 GtH 的水平(邓思平等, 2003), 而 LHRH-A3 具有 GnRH 类似物的特性, 不仅可以促进垂体 GtH 的产生, 也可以促进垂体 GH 的产生, 推测 HCG 对花鲈 IGF-1 mRNA 的促进作用可能是间接的, 具体作用机制还有待进一步研究。

## 参 考 文 献

- 马细兰, 张勇, 周立斌, 等. LHRH-A 对尼罗罗非鱼生长及生长轴相关基因表达的影响. 水生生物学报, 2013, 37(1): 42-47
- 王黎, 林浩然. 促黄体素释放激素类似物和多巴胺对鲤鱼幼鱼和性成熟雌鱼生长激素分泌的作用. 动物学报, 1997, 43(3): 303-308
- 邓利, 林浩然. 腹腔注射 LHRH-A 对黑鲷生长激素及其受体的影响. 深圳大学学报(理工版), 2003, 20(2): 60-65
- 邓思平, 王德寿, 张耀光, 等. 外源激素对南方鲑血清促性腺激素水平的影响. 西南师范大学学报(自然科学版), 2003, 28(4): 614-617
- 石和荣, 张勇, 张为民, 等. 半胱胺盐酸盐和 LHRH-A 对黄鳍鲷 IGF-基因表达和生长的影响. 动物学报, 2005, 51(1): 108-116
- 林信伟, 林浩然, 张庆. 促性腺激素释放激素类似物促进鱼类生长激素分泌和生长. 水产学报, 1993, 17(4): 282-288
- 林浩然. 鱼类生长和生长激素分泌活动的调节. 动物学报, 1996, 42(1): 69-79
- 温海深, 林浩然, 肖东, 等. 野生鲑鱼生长激素分泌的季节变化及其神经内分泌调控. 动物学报, 2002, 48(2): 213-220
- Bosma PT, Van Dijk W, Van Haren S, *et al.* GnRH receptors are restricted to gonadotropes in male African catfish. In: Goetz FW, Thomas P (Eds.), Proceedings of the 5th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. 1995, Austin, Texas, USA, 55-57
- Humbel RE. Insulin-like growth factors, somatomedins, and multiplication stimulating activity: chemistry. Hormonal Proteins and Peptides. 1984, New York: CH Academic, 57-79
- Kuroda H, Mandai M, Konishi I. Human chorionic gonadotropin (hCG) inhibits cisplatin-induced apoptosis in ovarian cancer cells: Possible role of up-regulation of insulin-like growth factor-1 by hCG. *Int J Cancer*, 1998, 76(4): 571-578
- Lin HR. The interaction of neuroendocrine regulation on reproduction and growth in fish. *Zool Res*, 2000, 21(1): 12-16
- Lin XW, Lin HR, Peter RE. Growth hormone and gonadotropin secretion in the common carp (*Cyprinus carpio* L.): In vitro interactions of gonadotropin-releasing hormone, somatostatin, and the dopamine agonist apomorphine. *Gen Comp Endocr*, 1993, 89(1): 62-71
- Lowe WL Jr. Biological action of the insulin-like growth factors. In: LeRoith D, Editor. Insulin-like growth factors: molecular and cellular aspects. 1991, Boca Raton, FL: CRC Press, 49-85
- Malison JA, Procarione LS, Kayes TB, *et al.* Induction of out-of-season spawning in Walleye (*Stizostedion vitreum*). *Aquaculture*, 1998, 163(1-2): 151-161
- Marchant TA, Chang JP, Nahorniak CS, *et al.* Evidence that gonadotropin-releasing hormone also functions as a growth hormone-releasing factor in the goldfish. *Endocrinol*, 1989, 124(5): 2509-2518
- McLellan KC, Hooper SB, Bocking AD. Prolonged hypoxia induced by the reduction of maternal uterine blood flow alters insulin-like growth factor-binding protein-1(IGFBP-1) and IGFBP-2 gene expression in the ovine fetus. *Endocrinol*, 1992, 131(4): 1619-1628
- Parrizas M, LeRoith D. Insulin-like growth factor-I inhibition of apoptosis is associated with increased expression of the bcl-xl gene product. *Endocrinol*, 1997, 138(3): 1355-1358
- Peter RE, Marchant TA. The endocrinology of growth in carp and related species. *Aquaculture*, 1995, 129(1-4): 299-321
- Srivastava KR, van der Kraak G. Regulation of DNA synthesis in goldfish vitellogenic ovarian follicles by hormones and growth factors. *J Exp Zool Part A*, 1994, 270(3): 263-272

(编辑 冯小花)

## Effects of Exogenous Hormone Injection on the Serum IGF-1 and the Expression of IGF-1 mRNA and IGFBP-1 mRNA in the Liver of Japanese Sea Bass (*Lateolabrax japonicus*)

QIAN Kun, WEN Haishen , CHI Meili, NI Meng, ZHANG Dongqian, DING Yuxia  
(College of Fisheries, Ocean University of China, Qingdao 266003)

**Abstract** Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*) is a highly profitable fish in aquaculture industry. They are widely cultivated in the southern and northern coastal provinces in China. The mechanisms underlying the effects of steroids hormones on the growth of this fish are still unclear. In this study, we investigated the effects of luteinizing hormone releasing hormone-A3 (LHRH-A3) and human chorionic gonadotropin (HCG) on the insulin-like growth factor (IGF) family genes of Japanese sea bass. We measured the level of serum IGF-1 using Radiate Immuno Assay (RIA) at 6 h, 12 h, 24 h and 48 h after the intraperitoneal injection of the hormones. In the meanwhile, we also applied fluorescent real-time quantitative RT-PCR to examine the levels of IGF-1 mRNA and insulin-like growth factor-binding protein 1 (IGFBP-1) mRNA in the liver. We divided the subjects into three groups — the PS (Physiological Saline) group, the LHRH-A3 (3 µg/kg) group, and the HCG (1000 U/kg) group. In the LHRH-A3 group, the serum IGF-1 level decreased significantly at 24 h after the injection of LHRH-A3 ( $P < 0.05$ ), and the level of IGF-1 mRNA in the liver was higher than the PS group at 6 h ( $P < 0.05$ ); the level of IGFBP-1 mRNA showed a constant decreasing pattern in 6 h after the injection. In the HCG group, the serum IGF-1 level decreased significantly at 12 h after the injection ( $P < 0.05$ ); the level of IGF-1 mRNA dropped at 48 h after injection ( $P < 0.05$ ); the level of IGFBP-1 mRNA increased significantly at 12 h. In conclusion, our results showed that the injection of LHRH-A3 and HCG caused dramatic increase in the mRNA level in the liver and IGF-1 level in the serum. It is most likely that LHRH-A3 and HCG can trigger the response of IGFs system in Japanese sea bass directly or indirectly. Future study will be needed to reveal the underlying mechanisms.

**Key words** Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*); IGF-1; IGFBP-1; LHRH-A3; HCG

# 尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) *cyp19a1a* 原核表达与蛋白纯化\*



王 金<sup>1,2</sup> 文春根<sup>1</sup> 赵 燕<sup>2</sup> 王 慧<sup>2</sup> 王艺雅<sup>2</sup> 季相山<sup>2</sup>

(1. 南昌大学生命科学学院 南昌 330031; 2. 山东农业大学动物科技学院 泰安 271018)

**摘要** 为表达和纯化尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)*cyp19a1a* 蛋白,本研究从尼罗罗非鱼卵巢提取总 RNA,反转录获得 cDNA 模板后,利用设计的引物 PCR 扩增 *cyp19a1a* ORF 区 1200 bp 片段,双酶切后连接到 pET-28a(+)表达载体上,经酶切验证和 DNA 测序鉴定,证明成功构建了 pET-28a-*cyp19a1a* 原核表达载体。将表达载体转化到大肠杆菌(*E.coli*) BL21 中,优化 IPTG 诱导浓度和诱导时间。结果显示,在 0.5 mmol/L IPTG 诱导 8 h 后,*cyp19a1a* 重组蛋白大量表达,并以包涵体形式存在。通过 Ni<sup>2+</sup>-NTA 层析柱和切胶纯化,获得与预期片段大小一致的表达蛋白,并用 Western blotting 验证了纯化的蛋白为目的蛋白。本研究为制备 *cyp19a1a* 抗体和研究高温对 *cyp19a1a* 蛋白表达的影响提供了重要的基础。

**关键词** 尼罗罗非鱼; *cyp19a1a*; 原核表达; 蛋白纯化

中图分类号 S917 文献标识码 A 文章编号 1000-7075(2014)04-0045-06

尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)作为一种低等的脊椎动物,其性别分化和性腺发育除受基因决定外,还受外部环境因素的影响。在诸多环境因素中,温度是最重要的因子。有研究发现,高温可以诱导遗传型雌性尼罗罗非鱼发育为雄鱼。南平等(2005)在研究温度对泥鳅性腺分化的影响时,发现温度处理能同时影响芳香化酶基因的表达。在鱼类中,芳香化酶基因分为性腺型芳香化酶基因(*cyp19a1a*)和脑型芳香化酶基因(*cyp19a1b*)两种,它们分别编码性腺型芳香化酶(P450aromA)和脑型芳香化酶(P450aromB)(Tchoudakova *et al*, 1998; Tong *et al*, 2001)。*cyp19a1a* 编码的性腺型芳香化酶是细胞色素 P450 芳香化酶(P450arom)中的一种,主要在性腺中表达。已有研究发现,尼罗罗非鱼 *cyp19a1a* 基因在卵巢中的表达比在精巢中的表达强很多,高温诱导雌核发育群体性反转为雄性尼罗罗非鱼的过程中,该基因的表达变弱(Sudhakumari *et al*,

2005)。在其他鱼类,例如:青鳉(*Oryzias latipes*) (Zhou *et al*, 2007)、欧洲海鲈(*Dicentrarchus labrax*) (Blazquez *et al*, 2008)、赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*) (Huang *et al*, 2009)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) (文爱韵等, 2010)和大西洋庸鲽(*Hippoglossus hippoglossus*) (Matsuoka *et al*, 2006)等的 *cyp19a1a* 基因的表达情况也是类似的,这都说明了 *cyp19a1a* 在研究鱼类基因-温度性别决定调控中的重要作用。

尼罗罗非鱼繁殖周期短、繁殖力强,已成为联合国推荐养殖的优质水产品种之一。但是,由于雄鱼比雌鱼生长快,在养殖生产中,雌雄鱼混养易造成养成鱼规格不整齐。如果在相同条件下养殖全雄尼罗罗非鱼,可以大大提高单位面积产量。探讨尼罗罗非鱼性别分化机制,可为控制罗非鱼性别、培育全雄尼罗罗非鱼和提高商品鱼质量提供理论基础。因此,本研究在克隆得到尼罗罗非鱼 *cyp19a1a* 基因基础上,进行

\* 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金(BS2013NY002)和山东省现代农业产业技术体系共同资助。王 金, E-mail: wangjin9159@126.com

通讯作者: 季相山, 副教授, E-mail: xsji@sdau.edu.cn

收稿日期: 2013-11-10, 收修改稿日期: 2014-01-03



尼罗罗非鱼 *cyp19a1a* 基因的原核表达和蛋白纯化, 可为制备尼罗罗非鱼 *cyp19a1a* 抗体和研究高温诱导对 *cyp19a1a* 蛋白表达的影响奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

T4 DNA 连接酶、高保真 DNA 聚合酶(Phusion High-Fidelity DNA Polymerase)购自 Thermo Scientific 公司。大肠杆菌(*E.coli*)DH5 $\alpha$ 、大肠杆菌 BL21(DE3)、总 RNA 提取试剂盒(TRNzol Reagent TRNzol)、BCA 蛋白质定量试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。DNA Marker (DL2000、DL15000)、限制性内切酶(*Bam*H I、*Hind* III)、反转录试剂盒(PrimeScript<sup>®</sup> RT Reagent Kit with gDNA Eraser)购自 TaKaRa 公司。质粒小提试剂盒(E.Z.N.A. Endo-free Plasmid Mini Kit I)、胶回收试剂盒(E.Z.N.A. Gel Extraction Kit)均购自 Omega 公司。PageRuler<sup>™</sup> Prestained Protein Ladder 购自 Fermentas 公司。SDS-PAGE 凝胶试剂盒、考马斯亮蓝蛋白胶快速染色液购自 Solarbio 公司。Ni<sup>2+</sup>-NTA 柱购自南京金丝瑞生物科技有限公司。小鼠抗 His-Tag 的一抗、羊抗鼠 IgG-HRP 二抗购自杭州华安生物科技有限公司。ECL 发光试剂盒(BeyoECL Plus) 购自碧云天生物技术研究。其他试剂均为分析纯。

### 1.2 总 RNA 提取及 cDNA 合成

2012 年 10 月, 购自山东省淡水水产研究所的 4 月龄的尼罗罗非鱼暂养于实验室鱼缸内用于 RNA 提取。按照 TRNzol Reagent TRNzol 总 RNA 提取试剂说明书提取尼罗罗非鱼卵巢组织总 RNA。琼脂糖凝胶电泳分析 RNA 的提取效果, 紫外分光光度计(Eppendorf)测定其含量和纯度。

cDNA 第一链的合成 按照 TaKaRa RNA PCR Kit 方法合成 cDNA 第一链。第一步, 基因组 DNA 的除去反应: gDNA Eraser 1  $\mu$ l, 5 $\times$ gDNA Eraser Buffer 2  $\mu$ l, Total RNA 1  $\mu$ l, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 10  $\mu$ l。在 PCR 仪中 42 $^{\circ}$ C 2 min, 4 $^{\circ}$ C Hold。第二步, 反转录反应: 5 $\times$ PrimeScript<sup>®</sup> Buffer II 4  $\mu$ l, PrimeScript<sup>®</sup> RT Enzyme Mix\* $\times$ 4 1  $\mu$ l, 第一步反应液 10  $\mu$ l, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 20  $\mu$ l。在 PCR 仪中进行如下反应: 37 $^{\circ}$ C 15 min, 85 $^{\circ}$ C 5 s。

### 1.3 抗原性分析、引物设计与 *cyp19a1a* 基因的克隆

应用 DNASTAR 软件分析尼罗罗非鱼 *cyp19a1a* 基因的抗原性, 选择抗原性较强的氨基酸序列作为目的片段。从 NCBI 中查找尼罗罗非鱼 *cyp19a1a* (GenBank:

AF472620.1) 序列, 并根据载体 pET-28a(+) 序列设计引物, 上游引物含有 *Bam*H I 酶切位点(GGATCC), 下游引物含有 *Hind* III 酶切位点(AAGCTT), 每个酶切位点前都加有对应的保护性碱基。引物序列:

*cyp19a1a*-F:

5'-ACGCGGATCCGTGCCAGGTCCTTCTTCTGTTTG-3'

*cyp19a1a*-R:

5'-ATCCCAAGCTTATCACAAAATGGATTTTCATCATCAC-3'

以合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 反应体系: Phusion DNA Polymerase 0.5  $\mu$ l, 5 $\times$ Phusion HF Buffer 10  $\mu$ l, dNTP Mixture 4  $\mu$ l, cDNA 2  $\mu$ l, 引物各 2.5  $\mu$ l, H<sub>2</sub>O 28.5  $\mu$ l。反应条件: 98 $^{\circ}$ C 30 s, 98 $^{\circ}$ C 10 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后, 用 Omega 公司的胶回收试剂盒进行目的片段的回收。

### 1.4 原核表达质粒的构建

用 *Bam*H I 和 *Hind* III 分别双酶切 *cyp19a1a* 基因 cDNA 片段和 pET-28a(+) 表达载体质粒, 切胶回收纯化后, 将酶切后的片段和载体相连接, 构建重组表达载体 pET-28a-cyp19a1a, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 挑取单克隆摇床培养过夜, 并进行菌液 PCR 检测, 同时提质粒送上海英潍捷基有限公司测序。

### 1.5 不同诱导时间对目的蛋白在大肠杆菌中表达量的影响

将测序正确的重组表达载体 pET-28a-cyp19a1a 转化大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞。挑取含有重组质粒的单菌落于 5 ml LB 液体培养基(含 kana 50  $\mu$ g/ml), 37 $^{\circ}$ C 摇床培养过夜。将阳性重组菌按 1:100 的比例接种于含 50  $\mu$ g/ml kana 的 50 ml LB 培养液中, 37 $^{\circ}$ C 培养至 OD<sub>600 nm</sub> 为 0.4-0.6 时, 取 300  $\mu$ l 菌液作未诱导对照, 其他加异丙基- $\beta$ -D- 硫代半乳糖苷(Isopropyl- $\beta$ -D- thiogalactopyranoside, IPTG) 至终浓度为 0.5 mmol/L, 于 37 $^{\circ}$ C 继续振荡培养, 分别诱导 2、4、6、8 和 10 h 后各取 300  $\mu$ l 菌液, 用 PBS 洗菌液两次后, 加 30  $\mu$ l PBS 混匀, 加 10  $\mu$ l 4 $\times$ loading buffer, 3-5 min 沸水浴, -20 $^{\circ}$ C 冻存 5 min 以上, 采用 SDS-PAGE (浓缩胶浓度 50 mg/ml, 分离胶浓度 12 mg/ml), 考马斯亮蓝 G-250 染色检测蛋白表达情况, 分析目的蛋白表达情况。

### 1.6 不同浓度 IPTG 对目的蛋白在大肠杆菌中表达量的影响

按 1.5 所述培养细菌, 取 300  $\mu$ l 菌液作未诱导对

照, 分别加入不同体积的 IPTG, 使其终浓度分别为 0.1、0.3、0.5、0.7 和 1.0 mmol/L, 于 37℃ 继续剧烈振荡 4 h 后各取 300  $\mu$ l 菌液, 采用 SDS-PAGE(浓缩胶浓度 50 mg/ml, 分离胶浓度 12 mg/ml)、考马斯亮蓝 G-250 染色分析目的蛋白的表达情况。

### 1.7 蛋白表达形式的鉴定

将诱导表达的菌液离心(12000 g, 4℃), 收集菌体, 加 1×PBS 重悬, 超声破碎, 离心(12000 g, 4℃), 收集上清液与沉淀, 分别与 4×loading buffer 预混, 3–5 min 沸水浴, -20℃ 冻存 5 min 以上, 以 SDS-PAGE(浓缩胶浓度 50 mg/ml, 分离胶浓度 12 mg/ml)、考马斯亮蓝 G-250 染色分析目的蛋白的表达情况。

### 1.8 目的蛋白纯化与 Western blotting 鉴定

诱导后收集菌体, 进行超声波破碎, 离心后的沉淀用包涵体洗涤缓冲液重悬, 离心后上清液进行 His-tagged 镍柱亲和层析柱亲和纯化, 纯化结果用 SDS-PAGE 检测。将经 Ni<sup>2+</sup>-NTA 柱纯化过的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 用 KCl 染色法回收 *cyp19a1a* 蛋白, 使纯度达到接近 100%。根据 BCA 蛋白质定量试剂盒(天根)操作说明, 测定纯化后样品的蛋白浓度。

KCl 纯化的重组表达蛋白经 SDS-PAGE 电泳分离后, 在 4℃ 条件下经 108 mA 恒流转膜 1.5 h 至 PVDF 膜上。用含 5% 脱脂奶粉的 PBST 封闭 1 h, PBST 洗涤 3 次; 加入鼠抗 His-Tag 一抗, 室温孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次; 羊抗鼠 IgG-HRP 二抗室温孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次; ECL 显色, 暗室曝光, 观察结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 pET-28a-*cyp19a1a* 重组载体的构建

以提取的尼罗罗非鱼卵巢的总 RNA 为模板, 以 *cyp19a1a-F* 和 *cyp19a1a-R* 为引物, 经 RT-PCR 获得 *cyp19a1a* 基因目的片段, PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后, 在约 1221 bp 处可观察到一条清晰的 DNA 条带, 与预期的 *cyp19a1a* 基因大小一致(图 1, 泳道 1)。

*cyp19a1a* 基因目的片段与 pET-28a(+) 载体双酶切产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后, 结果见图 1(泳道 2 和泳道 3), 分别在约 1205 bp 和 5343 bp 处可清楚地观察到一条 DNA 条带。将两者连接后获得重组载体 pET-28a-*cyp19a1a*, 重组载体 pET-28a-*cyp19a1a* 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  菌株后, 随机挑取 4 个单克隆摇床培养过夜, 菌液 PCR 扩增经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 发现在约 1221 bp 处有一条清晰的 DNA 条带(图 1, 泳道 4–7), 说明 *cyp19a1a* 基因目的片段已成功插入 pET-28a(+) 载体中。随机挑取 4 个单克隆提取质粒送测序公司测序, 测序结果表明成功克隆到大小为 1200 bp 的 *cyp19a1a* 基因的目的片段。

### 2.2 融合蛋白的表达及蛋白表达形式的鉴定

转化 pET-28a(+) 的大肠杆菌 BL21(DE3) 经 IPTG 诱导未出现特异性蛋白条带, 重组载体 pET-28a-*cyp19a1a* 在大肠杆菌 BL21(DE3) 中经 IPTG 诱导后实现了特异性融合蛋白表达(图 2), 对收集的菌体超声破碎, 离心后得到的上清液和重悬沉淀分别进行电

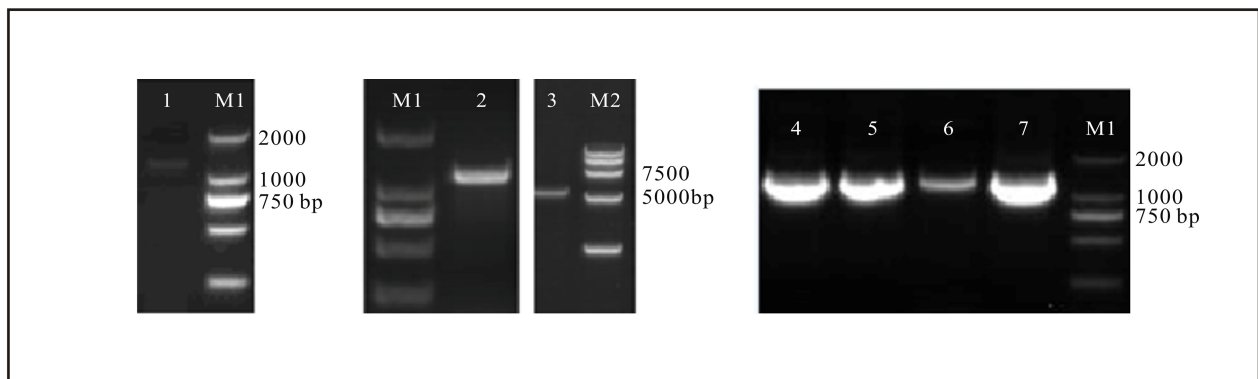


图 1 *cyp19a1a* 基因扩增及 pET-28a-*cyp19a1a* 重组载体构建

Fig.1 Amplification of *cyp19a1a* gene and construction of pET-28a-*cyp19a1a* recombinant vector

M1: DL2000 DNA Marker; M2: DL15000 DNA Marker; 1: *cyp19a1a* 基因 PCR 产物; 2: *cyp19a1a* 基因双酶切后琼脂糖凝胶回收产物; 3: pET-28a(+) 载体线性化后琼脂糖凝胶回收产物; 4–7: 菌液 PCR 鉴定

M1: DL2000 DNA Marker; M2: DL15000 DNA Marker; Lane 1: *cyp19a1a* gene PCR amplification products; Lane 2: double digestion product of *cyp19a1a* gene recovered by agarose gel; Lane 3: product of linearized pET-28a(+) vector recovered by agarose gel; Lane 4–7: PCR identification of bacteria

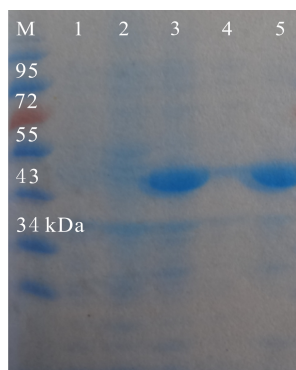


图2 融合蛋白的表达及蛋白表达形式的鉴定

Fig.2 Expression of fusion protein and identification of the protein expression pattern

M: 预染蛋白标记; 1. 空载体 pET-28a(+)在 BL21(DE3)中的诱导表达 2. 未诱导的 pET-28a-cyp19a1a 融合蛋白 3. 转化 pET-28a-cyp19a1a 在 BL21(DE3)的诱导表达; 4. 上清液中融合蛋白的表达; 5. 沉淀中融合蛋白的表达

M: Pre-stained Protein Ladder; Lane 1: Empty vector pET-28a(+) induced with IPTG in *E. coli* BL21(DE3); Lane 2: pET-28a-cyp19a1a vector in *E. coli* BL21 (DE3) without IPTG; Lane 3: pET-28a-cyp19a1a vector induced with IPTG in *E. coli* BL21 (DE3); Lane 4: Fusion protein supernatant; Lane 5: Fusion protein precipitate

高无明显变化(图 3B)。高浓度的 IPTG 不利于细胞的生长,因此,选择 0.5 mmol/L 的 IPTG 作为最佳诱导浓度。

#### 2.4 蛋白纯化及鉴定

将经 His-tagged 镍柱亲和和层析柱纯化的蛋白流出液依次分管盛装,经 SDS-PAGE 电泳检测后发现,除目的蛋白外,仍有一些杂蛋白(图 4A),这可能是由于杂蛋白的非特异性结合。经过 KCl 染色法回收的目的蛋白经 SDS-PAGE 电泳检测,可见纯度为接近 100% 的 cyp19a1a 蛋白单一条带(图 4B),KCl 纯化后蛋白的浓度为 0.82 μg/μl。

经 Western blotting 检测发现,所纯化的蛋白可以被 His 抗体特异性识别,并在 48 kDa 处有特异性条带(图 4C),说明纯化得到的蛋白是目的蛋白。

### 3 讨论

本研究应用 DNASTAR 软件分析 *cyp19a1a* 基因的

泳,可见经诱导后融合蛋白在上清液中的表达量很低(图 2,泳道 4),而在细胞破碎收集的沉淀中大量表达(图 2,泳道 5),因此确定 cyp19a1a 蛋白主要以包涵体的形式存在。

#### 2.3 不同诱导时间和诱导剂浓度对目的蛋白在大肠杆菌中表达的影响

含重组载体 pET-28a-cyp19a1a 的 BL21(DE3) 细胞经诱导表达后,在大约 48 kDa 处有一条清晰的条带,2、4、6、8 h 依次变大,10 h 时的表达量下降,所以确定 8 h 为最佳诱导时间(图 3A)。诱导剂 IPTG 浓度在 0.1–1.0 mmol/L 范围内,表达量随浓度的升

抗原性,选择抗原性较强的 61–460 氨基酸作为目的片段,采用 RT-PCR 的方法对尼罗罗非鱼 *cyp19a1a*

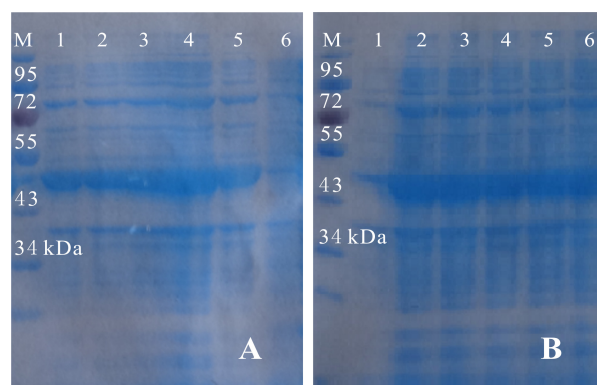


图3 不同诱导时间(A)和诱导剂浓度(B)对 cyp19a1a 蛋白在大肠杆菌中表达的影响

Fig.3 Influence of different induction time (A) and different concentration of inducer (B) on the expression of cyp19a1a protein in *E. coli*

M: 预染蛋白标记; A1-5: 转化 pET-28a-cyp19a1a 质粒的 BL21(DE3)工程菌分别诱导 2、4、6、8 和 10 h 后菌体蛋白; A6, B1: 未诱导的 *E. coli* BL21; B2-6: 终浓度分别为 0.1、0.3、0.5、0.7 和 1.0 mmol/L IPTG 诱导后菌体蛋白

M: Pre-stained Protein Ladder; Lane A1-5: Bacterial proteins from *E. coli* BL21 transformed by pET-28a-cyp19a1a for 2, 4, 6, 8 and 10 h respectively; Lane A6, B1: Uninduced *E. coli* BL21; Lane B2-6: Bacterial proteins from *E. coli* BL21 transformed by pET-28a-cyp19a1a induced with IPTG 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 and 1.0 mmol/L respectively

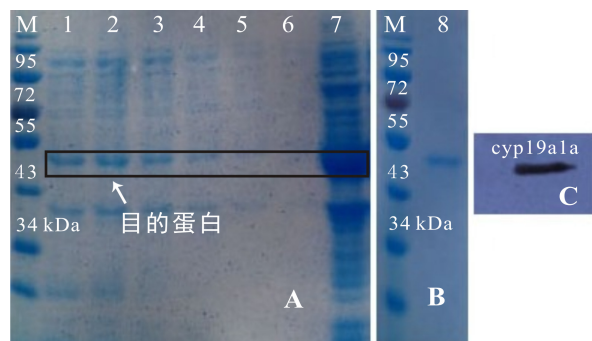


图4 蛋白纯化及 Western blotting 鉴定

Fig.4 Results of protein purification and identification by Western blotting

M: 预染蛋白标记; 泳道 1–6: 转化 pET-28a-cyp19a1a 质粒的 *E. coli* BL21 纯化产物; 泳道 7: pET-28a-cyp19a1a 质粒的 *E. coli* BL21 全蛋白; 泳道 8: 聚丙烯酰胺; C: 目的蛋白 Western blotting 检测

M: Prestained Protein Ladder; Lane 1–6: Purification products from *E. coli* BL21 transformed by pET-28a-cyp19a1a plasmid; Lane 7: pET-28a-cyp19a1a whole protein in *E. coli* BL21; Lane 8: polyacrylamide; C: identification of cyp19a1a by Western blotting

基因 ORF 区部分片段进行克隆, 获得 1200 bp 的片段。目前已从十几种鱼中克隆出 *cyp19a1a* 基因, 它们包括青鳉(*Oryzias latipes*)(Tanaka *et al.*, 1995)、斑马鱼(*Danio rerio*)(Kazeto *et al.*, 2001)、欧洲海鲈(*Dicentrarchus labrax*)(Galay-Burgos *et al.*, 2006)、鳗鲡(*Anguilla anguilla*)(Tzchori *et al.*, 2004)、罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)(Yoshiura *et al.*, 2003)等。近年来, 对 *cyp19a1a* 编码的芳香化酶的基因结构、功能进行了较多研究, 但是对鱼体内芳香化酶活性的研究主要集中在脑、脑垂体和脊髓, 在性腺和其他组织中芳香化酶活性的研究报道比较少。

本研究将 *cyp19a1a* 基因目的片段及 pET-28a(+) 载体双酶切片段连接后, 成功构建了 pET-28a-*cyp19a1a* 原核表达载体, 在大肠杆菌 BL21(DE3)中经 IPTG 诱导后高效表达相对分子质量约为 48 kDa 的融合蛋白, 经过 Ni<sup>2+</sup>-NTA 亲和层析纯化、KCl 染色、SDS-PAGE 胶回收, 获得接近 100%纯度的融合蛋白。韩俊英等(2011)优化了脊尾白虾 *hsp90* 基因原核表达条件, 发现诱导时间和 IPTG 浓度均对重组蛋白有较大影响, 这与本研究结果一致。吴任等(2006)和韩俊英等(2011)研究发现, 诱导剂 IPTG 浓度在 0.1–1.0 mmol/L 的范围内均适于重组蛋白的诱导表达。本研究中随着 IPTG 浓度的增加, 目的蛋白并没有显著变化, 但是高浓度 IPTG 对大肠杆菌 BL21 生长有不利影响, 因此, 本研究选用 0.5 mmol/L 的 IPTG 浓度。此外, 吴任等(2006)报道诱导 5 h 可获得最大含量的目的蛋白, 而陈大玮等(2011)报道诱导 4 h 可获得大量表达。但是在本研究中, 在诱导 8 h 时获得最大含量的 *cyp19a1a* 蛋白, 而后随着时间的推移其表达量下降。推测造成这种差异的原因, 可能是与细菌达到死亡期后菌体发生自溶, 释放的蛋白酶降解了一部分所表达的融合蛋白有关。

pET 系统标签小, 不用切割, 对蛋白活性一般没有影响, 纯化比较方便。pET-28a(+)表达载体 C 端有编码 6 个组氨酸标签的序列(6 × His-Tag), 可以用来鉴定重组蛋白, 还可以与 Ni-NTA 层析介质 Ni<sup>2+</sup>特异结合分离纯化表达的重组蛋白。因此本研究将克隆得到的 1200 bp *cyp19a1a* 目的片段插入到 pET-28a(+)表达载体, 构建了 pET-28a(+)-*cyp19a1a* 重组表达载体并成功表达重组蛋白。重组蛋白在大肠杆菌中有胞外分泌、胞内表达和周质空间表达三种表达形式。胞内表达的蛋白容易形成包涵体, 不利于融合蛋白的正确折叠, 且复性较难。环状或缺口的质粒 DNA, 以及

脂体、脂多糖等, 难溶于水, 易溶于尿素、盐酸胍等变性剂。pET-28a(+)-*cyp19a1a* 重组蛋白经表达特性分析显示主要以包涵体形式存在, 使用尿素裂解后成为可溶解的蛋白。经过 Ni<sup>2+</sup>-NTA 亲和层析纯化、SDS-PAGE、Western-blot 检测, 在分子量为 48 kDa 处有特异性条带, 且可被鼠抗 His-Tag 识别。

本研究通过原核表达技术大量表达出了 *cyp19a1a* 蛋白, 并利用亲和层析、KCl 染色、SDS-PAGE 胶回收法得到了纯化的 *cyp19a1a* 蛋白, 这为 *cyp19a1a* 抗体制备和利用免疫组化及免疫印迹研究高温诱导对尼罗罗非鱼 *cyp19a1a* 蛋白的影响奠定了基础。

## 参 考 文 献

- 文爱韵, 尤锋, 孙鹏, 等. 牙鲈 *dmrt1* 基因的克隆及其与 P450arom 基因的组织表达分析. 海洋科学, 2010, 34(11): 97–101
- 陈大玮, 邓利, 何凡, 等. 棕点石斑鱼 *Piscidin* 样肽基因的克隆及其成熟肽的原核表达. 渔业科学进展, 2011, 32(4): 126–133
- 吴任, 谢涛涛, 孙勇, 等. 凡纳滨对虾热休克蛋白 70 的原核高效表达. 中国水产科学, 2006, 13(2): 305–309
- 南平, 杜启艳, 燕帅国, 等. 温度对泥鳅和大鳞副泥鳅性腺分化的影响和 CYP19a 基因的克隆与时空表达. 中国水产科学, 2005, 12(4): 407–413
- 韩俊英, 李健, 李吉涛, 等. 脊尾白虾热休克蛋白 HSP90 基因的原核表达与鉴定. 渔业科学进展, 2011, 32(5): 44–50
- Blazquez M, Gonzalez A, Papadaki M, *et al.* Sex-related changes in estrogen receptors and aromatase gene expression and enzymatic activity during early development and sex differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Gen Comp Endocr, 2008, 158(1): 95–101
- Galay-Burgos M, Gealy C, Navarro-Martín L, *et al.* Cloning of the promoter from the gonadal aromatase gene of the European sea bass and identification of single nucleotide polymorphisms. Comp Biochem Physiol A. Mol Integr Physiol, 2006, 145(1): 47–53
- Huang W, Zhou L, Li Z, *et al.* Expression pattern, cellular localization and promoter activity analysis of ovarian aromatase (*Cyp19a1a*) in protogynous hermaphrodite red-spotted grouper. Mol Cell Endocr, 2009, 307(1–2): 224–236
- Kazeto Y, Ijiri S, Place AR, *et al.* The 5'-flanking regions of CYP19A1A1 and CYP19A1A2 in zebrafish. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 288: 503–508
- Matsuoka MP, van Nes S, Andersen Ø, *et al.* Real-time PCR analysis of ovary- and brain-type aromatase gene expression during Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) development. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2006, 144(1): 128–135
- Sudhakumari CC, Senthilkumaran B, Kobayashi T, *et al.*

- Ontogenic expression patterns of several nuclear receptors and cytochrome P450 aromatases in brain and gonads of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* suggests their involvement in sex differentiation. *Fish Physiol Biochem*, 2005, 31(2-3): 129-135
- Tanaka M, Fukada S, Matsuyama M, *et al.* Structure and promoter analysis of the cytochrome P-450 aromatase gene of the teleost fish, Medaka (*Oryzias latipes*). *J Biochem*, 1995, 117: 719-725
- Tchoudakova A, Callard GV. Identification of multiple CYP19 genes encoding different cytochrome P450 aromatase isozyms in brain and ovary. *Endocrinol*, 1998, 139(4): 2179-2189
- Tong SK, Chiang EF, Hsiao PH, *et al.* Phylogeny, expression and enzyme activity of zebrafish cyp19 (P450 aromatase) genes. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2001, 79(1-5): 299-303
- Tzchori I, Degani G, Hurvitz A, *et al.* Cloning and developmental expression of the cytochrome P450 aromatase gene (CYP19) in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Gen Comp Endocr*, 2004, 138(3): 271-280
- Yoshiura Y, Senthilkumaran B, Watanabe M, *et al.* Synergistic expression of Ad4BP/SF-1 and cytochrome P-450 aromatase (ovarian type) in the ovary of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, during vitellogenesis suggests transcriptional interaction. *Biol Reprod*, 2003, 68(5): 1545-1553
- Zhou LY, Wang DS, Shibata Y, *et al.* Characterization, expression and transcriptional regulation of P450c17-I and -II in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 362: 619-625

(编辑 冯小花)

## The Prokaryotic Expression and the Protein Purification of Nile Tilapia *cyp19a1a* Gene

WANG Jin<sup>1,2</sup>, WEN Chungeng<sup>1</sup>, ZHAO Yan<sup>2</sup>, WANG Hui<sup>2</sup>, WANG Yiya<sup>2</sup>, JI Xiangshan<sup>2</sup>

(1. Institute of Life Science, Nanchang University, Nanchang 330031; 2. College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018)

**Abstract** *Cyp19a1a* gene encodes aromatase, the key enzyme that converts androgens into estrogens. However little is known about the protein expression and purification of this gene. In this study, the total RNA was extracted from the ovary of Nile tilapia and was then reverse-transcribed to cDNA. The 1221 bp ORF partial region of *cyp19a1a* was amplified using RT-PCR, and the amplified fragments were purified for the following cloning. The amplified DNA fragments were ligated into pET-28a(+) expression vector for the construction of the prokaryotic expression vector pET-28a-cyp19a1a. The pET-28a-cyp19a1a vector was verified with restriction endonuclease digestion and DNA sequencing, and then transformed into *E.coli* BL21. IPTG was applied to induce the expression of pET-28a-cyp19a1a recombinant proteins. In order to optimize the protein expression we tested the inducing effects of IPTG at concentrations from 0.1 to 1.0 mmol/L. The results showed that the expression of pET-28a-cyp19a1a recombinant proteins started at 2 h after the induction with 0.5 mmol/L IPTG. The expression reached the highest level at 8 h after the induction, and began to decrease at 10 h. Nonetheless the expression levels were not significantly different at various IPTG concentrations. Therefore the optimal induction conditions were determined to be 0.5 mmol/L IPTG for 8 h. The expressed recombinant proteins were mainly found in collected cells but not in the supernatant, which indicated that these proteins formed inclusion bodies. After the purification with Ni<sup>2+</sup>-NTA agarose gel chromatography column we obtained the products with the expected size (48 kDa). Next the products were further purified into the specific recombinant proteins using the KCl staining method. The concentration of purified protein was 0.82 μg/μl. Western blotting results showed that the purified proteins can be detected by the His-tag antibody; hence they should be the target products. The successful expression and purification of the recombinant *cyp19a1a* protein would fundamentally improve the production of *cyp19a1a* antibody and provide insights into the effects of high-temperature on the sex differentiation in Nile tilapia.

**Key words** Nile tilapia; *Cyp19a1a*; Prokaryotic expression; Protein purification

# 传染性鲑鱼贫血症病毒实时荧光环介导等温 扩增检测方法的建立\*



史秀杰 于力 王津津 何俊强 郑晓聪  
贾鹏 兰文升 杨锦舜 刘荭

(深圳出入境检验检疫局动植物检验检疫技术中心 深圳 518045)

**摘要** 根据 ISAV 的基因保守序列,利用 LAMP Designer 软件设计了 6 条引物,采用新型的环介导等温扩增设备进行扩增和检测,优化了反应条件,分析了所建立方法的特异性和灵敏度,并与 RT-PCR 和实时荧光 RT-PCR 进行比较。研究表明,该方法最适反应温度为 64℃,反应 10 min 就可以观察到明显的扩增。该方法灵敏度高,检测限为 78.4 fg RNA,比常规 RT-PCR 灵敏度高 100 倍,与实时荧光定量 RT-PCR 灵敏度相当;特异性好,与传染性胰腺坏死病毒(IPNV)、鲤春病毒血症病毒(SVCV)、出血性败血症病毒(VHSV)、鱼类病毒性神经坏死病毒(VNNV)、鲑鱼腹水病毒(YAV)等 14 种主要鱼类病毒没有交叉反应。结果表明,本研究建立了 ISAV 的实时荧光环介导等温扩增检测方法,实验能对整个扩增过程进行实时监测,提高检测灵敏度的同时,防止由于开盖跑电泳或加染料而导致的污染。

**关键词** 传染性鲑鱼贫血症病毒;实时荧光环介导等温扩增;检测

中图分类号 S943 文献标识码 A 文章编号 1000-7075(2014)04-0051-08

传染性鲑鱼贫血症病毒(Infectious salmon anaemia virus, ISAV)是一种正粘病毒,直径 100–130 nm,由 8 条负链 RNA 片段组成,该病毒具有凝血、受体破坏和融合的活性(Falk *et al.*, 1997),主要感染大西洋鲑鱼(*Salmo salar*),可引起大西洋鲑鱼全身性和致死性的传染病——传染性鲑鱼贫血症(Infectious salmon anaemia, ISA) (Thorud *et al.*, 1988)。该病的显著特征是严重贫血、程度不同的出血和多组织坏死。20 世纪 80 年代中期,首次在挪威报道该病,随后 1996 年加拿大的新布朗斯维克省、1998 年苏格兰、2000 年法罗群岛、2001 年智利和美国的缅因州等地相继暴发该病(Rimstad *et al.*, 2002)。ISA 自然感染仅在养殖大西洋鲑鱼中有记录,但在 2002 年,爱尔兰虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)和智利银鲑(*Oncorhynchus*

*kisutch*)也有分离到 ISAV 的报道(Kibenge *et al.*, 2004)。近年来的资料显示,北极红点鲑(*Salvelinus alpinus*)、虹鳟、褐鳟(*Salmo trutta*)、大西洋鳕鱼(*Gadus morhua*)等均可以感染 ISAV,而且目前宿主有扩大的迹象(Olsen *et al.*, 2012)。

我国是渔业生产大国,2007 年水产养殖面积 563.321 万  $\text{hm}^2$ ,产量 3278.3 万 t,均位居世界第一,近年来水产养殖病害普遍加重(张家松等, 2010;盖春蕾等, 2013;蔡林婷等, 2013)。虽然目前我国尚未有 ISA 发病的报道,但随着我国鲑鳟鱼类养殖业的发展,进口大量的水生动物苗种,水生动物及其产品的进口贸易也急剧增加,特别是冰鲜大西洋鳕鱼大量进口到国内市场,ISA 随时会传入我国。

诊断 ISAV 的方法是细胞分离病毒后,用 RT-

\*国家质量监督检验检疫总局科研项目(2011IK014)资助。史秀杰, E-mail: sxiujie74@gmail.com

通讯作者: 刘荭, 研究员, E-mail: liuh@szciq.gov.cn

收稿日期: 2013-10-21, 收修改稿日期: 2014-03-07

PCR、实时荧光定量 RT-PCR 等分子生物学方法检测。环介导等温扩增(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术是日本荣研化学株式会社学者建立的一种新型核酸扩增方法(Notomi *et al*, 2000)。LAMP 技术具有高效、快速等特点,广泛应用于动植物、人类病原体的检测,近年来在水生动物病原检测方面也有一定的应用。本研究建立了 ISAV 的实时荧光 LAMP 检测技术,为 ISAV 的诊断提供了另一种快速、敏感、特异的检测方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒株

试验中所用到的病毒株共 16 株(表 1)。ISAV 采

用 ASK 细胞系进行扩增,其他病毒用相应敏感细胞系扩增。将出现病变的细胞反复冻融 3 次,分装于  $-80^{\circ}\text{C}$  冻存储用。

### 1.2 仪器、设备及试剂

LAMP 反应使用 Isothermal Master Mix 试剂,购自英国 OptiGene 公司;核酸抽提使用 QIAamp Viral RNA Mini Kit、DNeasy Blood & Tissue Kit 试剂盒,购自 QIAGEN 公司;AMV 逆转录酶、One Step RNA PCR Kit(AMV)、One Step PrimeScript RT-PCR Kit 等,购自 TaKaRa 公司。

RNA 浓度测定使用 Eppendorf BioPhotometer; LAMP 扩增使用英国 OptiGene 公司 GENIE 便携式基因荧光扩增仪;PCR 扩增使用德国 Biometra T3000

表 1 试验中使用的病毒、编号及来源

Tab.1 Viruses used in the study

缩写 Abbreviation	全称 Full name	编号及来源 Number and Source
ISAV	传染性鲑鱼贫血病病毒 Infectious salmon anaemia virus	Glesvaer/2/90, 挪威 ISAV 参考实验室赠送
ISAV	传染性鲑鱼贫血病病毒 Infectious salmon anaemia virus	VR1554, 购自 ATCC
BIV	饰纹汀蛙虹彩病毒 Bohle iridovirus	澳大利亚 Dr. Mark Crane 赠送
CCV	斑点叉尾鲷病毒 Channel catfish virus	CCV12665, 购自 ATCC
EHNV	流行性造血器官坏死病毒 Epizootic haematopoietic necrosis virus	86/8874, 澳大利亚 Dr. Mark Crane 赠送
GCRV	草鱼出血病病毒 Grass carp haemorrhagic virus	873, 中国科学院水生生物研究所赠送
HRV	牙鲆弹状病毒 Hirame rhabdovirus	20080113, 实验室分离
IHNV	传染性造血器官坏死病毒 Infectious haematopoietic necrosis virus	HV-90, 英国 CEFAS 赠送
IPNV	传染性胰脏坏死病毒 Infectious pancreatic necrosis virus	Sp, 德国慕尼黑大学
KHV	锦鲤疱疹病毒 Koi herpesvirus	vp1592, 购自 ATCC
PFRV	狗鱼幼鱼弹状病毒 Pike fry rhabdovirus	德国慕尼黑大学赠送
STIV	甲鱼虹彩病毒 Soft-shelled turtle iridovirus	9701, 实验室分离
SVCV	鲤春病毒血症病毒 Spring viraemia of carp virus	10/3, 英国 CEFAS 赠送
VERV	病毒性脑病和视网膜病病毒 Viral encephalopathy and retinopathy virus	参考株, 意大利 Dr. Bovo 赠送
VHSV	病毒性出血性败血症病毒 Viral haemorrhagic septicaemia virus	J167, 英国 CEFAS 实验室赠送
YAV	鳊鱼腹水病毒 Yellowtail ascites virus	Y6, 浙江大学张传溪教授赠送

表 2 引物序列  
Tab.2 Nucleotide sequences of the primers

引物名称 Primers	序列 Nucleotide sequences (5'-3')
F3	GAA GAG TCA GGA TGC CAA
B3	CCG GAA GTC GAT GAA CTG
FIP(F1c+F2)	CTT CAG GTC CTT CAA CAT CGT CGT GGG CAA TGG TGT ATG G
BIP(B1c+B2)	CAA TGC TAC ACA GCA GGA TGC AAG TTT CCA GGG CTT TCG
LoopF	TTC TCC TCC GCC ATG TCT
LoopB	TGT ATG CCC TAG GAG CGA

PCR 仪, 荧光 PCR 扩增使用德国 ABI 7500 荧光 PCR 仪。

### 1.3 引物设计

根据 GenBank 上的传染性鲑鱼贫血症病毒的基因序列(GenBank 登录号: GU830902.1), 分析比较后选取 ISAV 基因组中第 8 个基因片段的保守区域, 使用 LAMP Designer 软件(<http://www.optigene.co.uk/lamp-designer/>), 设计 6 条引物: 正向内引物(FIP)、反向内引物(BIP)、正向外引物(F3)、反向外引物(B3)、正向环引物(LoopF)及反向环引物(LoopB), 引物序列见表 2, 由宝生物工程(大连)有限公司合成。

### 1.4 方法

**1.4.1 病毒核酸的提取** 病毒核酸的提取使用 QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit、DNeasy Blood & Tissue Kit, 按照试剂盒使用说明书操作, 核酸浓度使用 Eppendorf BioPhotometer 测定。

#### 1.4.2 LAMP 反应体系的优化及扩增产物的检测

LAMP 使用 Isothermal Master Mix 反应试剂盒, 25  $\mu$ l 反应体系: 1 $\times$ 的 Isothermal Master Mix 15  $\mu$ l, 2.5 U 的 AMV 逆转录酶 0.5  $\mu$ l, 5  $\mu$ mol/L F3 和 B3 引物各 1  $\mu$ l, 40  $\mu$ mol/L FIP 和 BIP 引物各 1  $\mu$ l, 20  $\mu$ mol/L LF 和 LB 引物各 1  $\mu$ l, RNA 模板 3.5  $\mu$ l。利用 GENIE 便携式基因荧光扩增仪进行扩增, 设置 7 个反应温度(59–65 $^{\circ}$ C), 反应 1 h, 最后反应温度升高至 98 $^{\circ}$ C, 以 0.05 $^{\circ}$ C/s 的速度降温至 80 $^{\circ}$ C 作熔解曲线, 反应约 6 min 终止反应。

观察荧光信号的收集情况, 分析荧光扩增曲线, 确定最佳反应条件, 同时观察熔解曲线峰值图, 确认其特异性。最后取 5  $\mu$ l LAMP 反应产物, 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进一步确认。

**1.4.3 特异性分析** 抽提表 1 中的病毒核酸作为模板, 使用优化后的反应体系进行 LAMP 反应, 利用 GENIE 便携式基因荧光扩增仪进行扩增和检测, 最后取 5  $\mu$ l LAMP 反应产物, 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进一步确认。

**1.4.4 灵敏度分析** 抽提 ISAV(Glesvaer/2/90 株)的 RNA, 用 Eppendorf BioPhotometer 测定其浓度为 22.4 ng/ $\mu$ l, 10 倍梯度系列稀释后, 使用优化后的反应体系进行 LAMP 反应, 确定方法的检测灵敏度。利用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳对扩增结果进一步确认。取相同系列稀释后的核酸进行 RT-PCR、实时荧光定量 RT-PCR 反应, 比较 3 种方法的检测灵敏度。

RT-PCR、实时荧光定量 RT-PCR 反应体系和反应条件参照相关文献(Devold *et al.*, 2000; Snow *et al.*, 2006)。

#### 1.4.5 人工感染大西洋鲑鱼样品中 ISAV 的检测

将  $TCID_{50}=10^{5.17}/100 \mu$ l 的 ISAV (Glesvaer/2/90 株)病毒悬液, 5000 r/min 离心 30 min, 取上清液。无菌条件下取正常的大西洋鲑鱼肾、鳃等组织共 5 g, 加入 500  $\mu$ l 离心后的 ISAV 病毒悬液, 剪碎匀浆后, 1) 直接抽提核酸, 使用优化后的反应体系进行 RT-LAMP 扩增; 2) 加组织抚育液到 50 ml, 4 $^{\circ}$ C 过夜后, 5000 r/min 离心 30 min, 取上清液抽提核酸, 使用优化后的反应体系进行 RT-LAMP 扩增。抽提 ISAV 病毒悬液核酸作为阳性对照, 用未加病毒悬液的 5 g 鲑鱼组织, 剪碎匀浆抽提核酸作为阴性对照。

## 2 结果

### 2.1 反应体系的优化

利用 GENIE 扩增仪检测 LAMP 反应, 结果显示, LAMP 反应体系在 59 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C、61 $^{\circ}$ C、62 $^{\circ}$ C、63 $^{\circ}$ C、64 $^{\circ}$ C、65 $^{\circ}$ C 7 个温度下均有扩增(图 1), 出峰时间略有差异, 熔解温度为 86.64–86.79 $^{\circ}$ C, 表明扩增的特异性好。64 $^{\circ}$ C 时出峰时间最早, 为 9 min 25 s。经琼脂糖凝胶电泳后(图 2), 在 64 $^{\circ}$ C 时产生的梯形条带量最多, 两种方法结果一致, 因此, 确定 64 $^{\circ}$ C 作为最佳反应温度。从扩增曲线(图 1)可以看出, 反应在 10 min 左右就可见明显的扩增。为保证样品中低浓度模板也能被检出, 选择 60 min 作为优化后的 LAMP 反应时间。



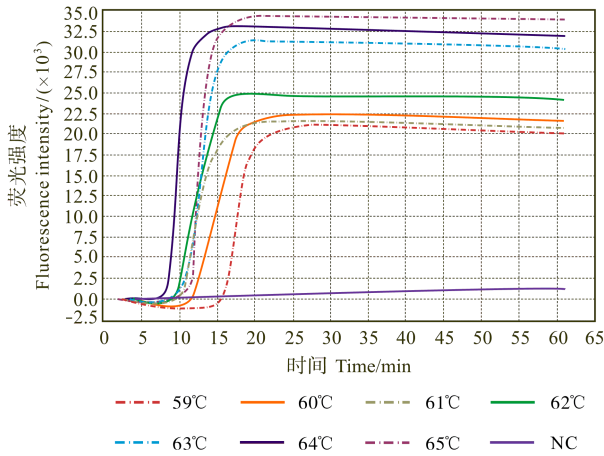
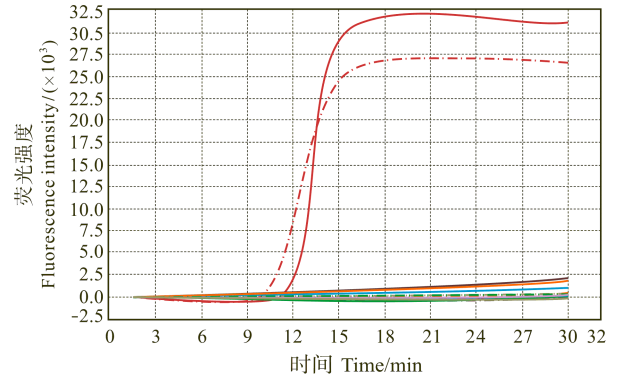


图 1 ISAV LAMP 不同反应温度的扩增曲线

Fig.1 Amplification plot of ISAV LAMP at different reaction temperatures



ISAV-2/90	ISAV-1554	SVC	YAV
IPNV	IHN	VNN	VHSV
PFRV	HRV	GCRV	CCV
EHN	BIV	STIV	NC

图 3 ISAV LAMP 特异性试验扩增曲线

Fig.3 Amplification plot of ISAV LAMP specificity test

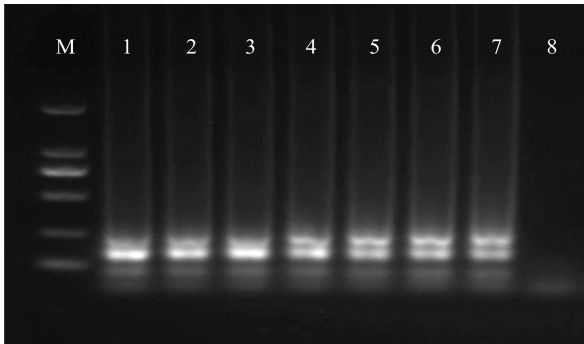


图 2 ISAV LAMP 不同反应温度扩增产物的电泳

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of ISAV LAMP products at different reaction temperatures

M: DNA Ladder, from top to bottom: 2000, 1500, 750, 500, 250, and 100 bp ; 1-7 : 59°C, 60°C, 61°C, 62°C, 63°C, 64°C, and 65°C ; 8 : 阴性对照 Negative control

### 2.2 特异性试验

使用优化后的 LAMP 检测方法对 15 种主要鱼类病毒进行检测, 结果发现只有两株 ISAV 有扩增, 其他 14 种病毒均无扩增。LAMP 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后, 只有两株 ISAV 出现梯形扩增条带, 而其他 14 种病毒没有出现梯形扩增条带。说明设计的 LAMP 引物特异性好。

ISAV LAMP 特异性试验的扩增曲线见图 3, LAMP 扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果见图 4。

### 2.3 灵敏度试验

利用 GENIE 扩增仪检测不同稀释度的 ISAV LAMP 反应, 结果见图 5。从图 5 可以看出, 从  $10^0$ - $10^{-6}$  稀释度, 出峰时间依次延后, 从 6 min 38 s-30 min 8 s,



图 4 ISAV LAMP 特异性试验扩增产物电泳

Fig.4 Agarose gel electrophoresis of products for ISAV LAMP specificity test

M: DNA Ladder, from top to bottom: 2000, 1500, 750, 500, 250, and 100 bp ; 1: ISAV-2/90; 2: ISAV-1554; 3-15 : SVCV, YAV, IPNV, IHN, VNN, VHSV, PFRV, HRV, GCRV, CCV, EHN, BIV, and STIV; 16: 阴性对照 Negative control

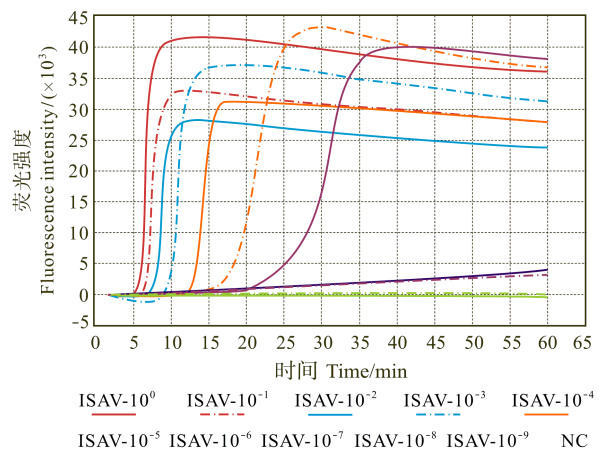


图 5 ISAV LAMP 灵敏度试验扩增曲线

Fig.5 Amplification plot of ISAV LAMP sensitivity test

$10^{-7}$ – $10^{-9}$  稀释度与阴性对照没有出现扩增曲线,说明 LAMP 能检测到  $10^{-6}$  稀释度,即  $22.4 \times 10^{-6}$  ng/ $\mu$ l ISAV RNA,与琼脂糖凝胶电泳结果(图 6)一致。利用文献中的试验条件进行 ISAV 的 RT-PCR 和实时荧光定量 RT-PCR 灵敏度试验,检测结果分别见图 7、图 8。结果显示,RT-PCR 能检测到  $10^{-4}$  稀释度,即  $22.4 \times 10^{-4}$  ng/ $\mu$ l ISAV RNA,实时荧光定量 RT-PCR 能检测到  $10^{-6}$  稀释度,即  $22.4 \times 10^{-6}$  ng/ $\mu$ l ISAV RNA,表明 LAMP 检测灵敏度与实时荧光定量 RT-PCR 的灵敏度相当,比 RT-PCR 高 100 倍。计算其检测限约为 78.4 fg ISAV RNA。

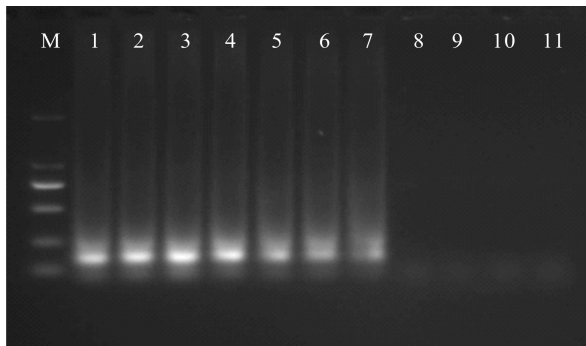


图 6 ISAV LAMP 灵敏度试验扩增产物电泳

Fig.6 Agarose gel electrophoresis of sensitivity test of ISAV LAMP products

M: 2000 bp DNA Ladder, 从上至下分别为 2000、1500、750、500、250、100 bp; 1–10: 10 倍系列稀释; 11: 阴性对照  
M: 2000 bp DNA Ladder, from top to bottom: 2000, 1500, 750, 500, 250, and 100 bp; 1–10: Serial 10-fold dilutions  $10^0$ – $10^{-9}$ ; 11: Negative control

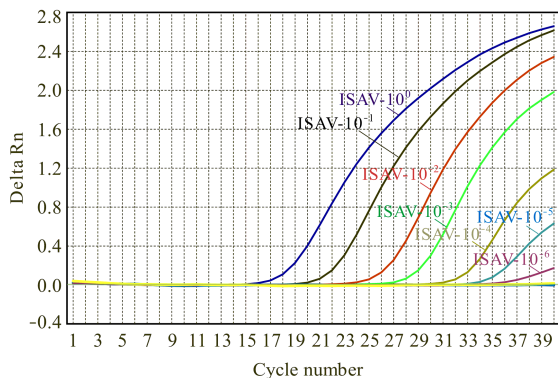


图 7 ISAV 实时荧光定量 RT-PCR 灵敏度试验扩增曲线  
Fig.7 Amplification plot of ISAV real-time RT-PCR sensitivity test

### 2.4 人工感染大西洋鲑鱼样品中 ISAV 的检测

用混有 ISAV 病毒悬液的大西洋鲑鱼肾、鳃组织,剪碎匀浆后,直接抽提核酸,或加组织抚育液过夜后

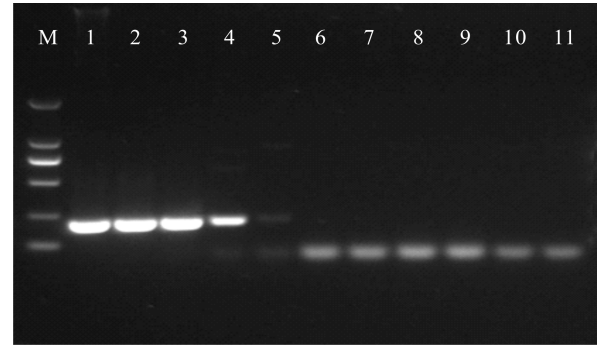


图 8 ISAV RT-PCR 灵敏度试验扩增产物电泳

Fig.8 Agarose gel electrophoresis of products for ISAV RT-PCR sensitivity test

M: 2000 bp DNA Ladder, 从上至下分别为 2000、1500、750、500、250、100 bp; 1–10: 10 倍系列稀释; 11: 阴性对照  
M: 2000 bp DNA Ladder, from top to bottom: 2000, 1500, 750, 500, 250, and 100 bp; 1–10: Serial 10-fold dilutions  $10^0$ – $10^{-9}$ ; 11: Negative control

取上清液抽提核酸,经 RT-LAMP 扩增,均有特征性的扩增曲线出现(图 9),LAMP 扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果见图 10。

### 3 讨论

传染性鲑鱼贫血症是世界动物卫生组织(OIE)水

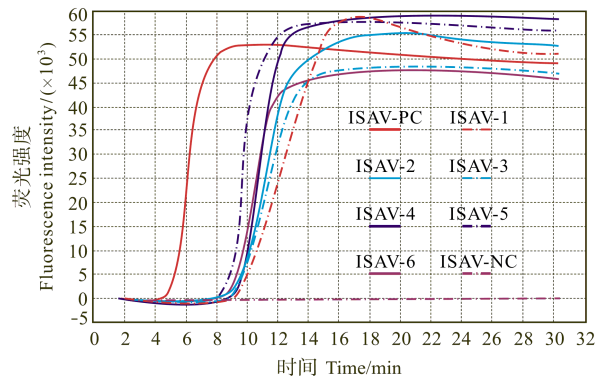


图 9 人工污染样品中 ISAV 的 LAMP 扩增曲线

Fig.9 Amplification plot of ISAV LAMP for fish tissue mixed with the suspension of ISAV

ISAV-PC: 阳性对照; ISAV-1–3: 混有 ISAV 的鱼组织抽提核酸经 LAMP 扩增的结果; ISAV-4–6: 混有 ISAV 的鱼组织抚育液过夜后的上清液抽提核酸经 LAMP 扩增的结果; ISAV-NC: 阴性对照

ISAV-PC: Positive control; ISAV-1–3: Amplification of LAMP for fish tissue mixed with the suspension of ISAV; ISAV-4–6: Amplification of LAMP for supernatant of fish tissue mixed with the suspension of ISAV incubated overnight; ISAV-NC: Negative control

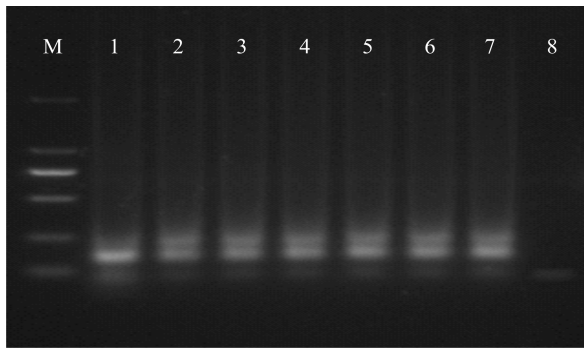


图 10 人工污染样品中 ISAV 的 LAMP 试验扩增产物电泳

Fig.10 Agarose gel electrophoresis of LAMP products for fish tissue mixed with the suspension of ISAV

M: 2000 bp DNA Ladder, 从上至下分别为 2000、1500、750、500、250、100 bp; 1: 阳性对照; 2-4: 混有 ISAV 的鱼组织抽提核酸经 LAMP 扩增的结果; 5-7: 混有 ISAV 的鱼组织抚育液过夜后的上清液抽提核酸经 LAMP 扩增的结果; 8: 阴性对照

M: 2000 bp DNA Ladder, from top to bottom: 2000, 1500, 750, 500, 250, and 100 bp; 1: Positive control; 2-4: Amplification of LAMP for fish tissue mixed with the suspension of ISAV; 5-7: Amplification of LAMP for supernatant of fish tissue mixed with the suspension of ISAV incubated overnight; 8: Negative control

生动物疫病名录中的重要疫病之一, 主要在欧洲、北美广泛流行, 被列入欧共体鱼类健康指令防治的重要病害之一(杜雄伟等, 2013)。2007 年该病在智利大规模暴发, 湖大区(Los Lagos)沿海地区 5 处半开放式海水养殖场发生 ISA(Martin *et al.*, 2012)。2013 年, 挪威大西洋鲑鱼养殖场暴发 ISA 疫情, 我国国家质检总局发出预警通报, 要求对来自挪威, 尤其是对来自诺尔兰郡、特罗姆斯区域养殖场的冰鲜或冰冻大西洋鲑鱼加强 ISA 的检疫。因此建立快速而准确的 ISAV 检测方法, 对保护我国的水产养殖业具有重要的意义。

目前报道的应用 LAMP 技术检测水生动物病原体的有迟钝爱德华氏菌病(Savan *et al.*, 2004)、白斑综合征病毒(WSSV) (Kono *et al.*, 2004)、虾黄头病毒(YHV) (Mekata *et al.*, 2006)、锦鲤疱疹病毒(KHV) (Gunimaladevi *et al.*, 2004)、真鲷虹彩病毒(RSIV) (Caipang *et al.*, 2004)、传染性造血器官坏死症病毒(IHNV) (Gunimaladevi *et al.*, 2005)、鲤春病毒血症病毒(SVCV) (Shivappa *et al.*, 2008)、病毒性出血性败血症病毒(VHSV) (Soliman, 2006)等, 水生动物寄生虫的检测也有应用 LAMP 技术的报道。近年来, 国内学者也逐渐将 LAMP 检测方法应用于水生动物病原体的检测中。孙颖杰等(2010)采用 LAMP 技术建立了检

测牙鲆弹状病毒的方法, 该方法的检测限为 30 fg RNA, 比常规 RT-PCR 灵敏度高 100 倍。陈进会等(2013)采用实时荧光 LAMP 方法检测病毒性出血性败血症病毒(VHSV), 63℃下反应 30 min 可得出结果, 其检测限可达到 4.5 pg/反应, 与几种重要的病原 RNA 均无交叉反应。

本研究根据传染性鲑鱼贫血症病毒的基因保守序列设计引物, 建立了 ISAV LAMP 检测方法。试验结果表明, 该方法灵敏度高, 检测限为 78.4 fg RNA, 与实时荧光定量 RT-PCR 灵敏度相当, 比常规 RT-PCR 灵敏度高 100 倍; 与传染性胰腺坏死病毒(IPNV)、鲤春病毒血症病毒(SVCV)、出血性败血症病毒(VHSV)、鱼类病毒性神经坏死病病毒(VNNV)、鲈鱼腹水病毒(YAV)等 14 种主要鱼类病毒没有交叉反应。用建立的方法检测人工污染的样品, 也有特异性的扩增, 而未添加 ISAV 病毒的鱼组织没有扩增, 说明建立的方法特异性好, 适用于无症状鱼的 ISA 监测, 或者是对可疑病鱼组织的检测。同时该方法操作简便、所需设备简单, 只要将样品和试剂一起放入 64℃环境中, 反应 10 min, 就可以观察到明显的扩增, 反应高效快速。根据血凝素基因 HE 基因 5' 端差异, ISAV 被分为欧洲群和北美群两个主要群, 本研究建立的方法, 可以特异性地扩增两株 ISAV: Glesvaer/2/90/和 VR1554, 分别属于欧洲株和北美株, 试验结果初步说明建立的方法适用于 ISAV 的检测。由于国内目前还没有该病的报道, 本实验室保存的毒株也仅有两株, 因此建立的方法有待于用更多的毒株做进一步的验证。

常用的检测 LAMP 扩增产物的方法有: 直接向扩增产物中加入嵌入剂 SYBR Green I, 无扩增反应的为橙色, 有扩增反应的为绿色; 琼脂糖凝胶电泳, LAMP 反应扩增产物为不同片段长度的茎环结构, 若有扩增, 则在电泳图谱中显示为从点样孔处开始的 smear 和梯形扩增条带。但这两种方法都需要开盖加染料或电泳, 容易造成气溶胶污染, 影响后续的试验。同时由于电泳时, LAMP 扩增的阳性结果表现为梯形扩增条带, 不能分辨是否发生了非特异性扩增。Mori 等(2001)发现, LAMP 反应的副产物焦磷酸离子和反应体系中的镁离子可以发生反应, 生成焦磷酸镁沉淀。这一反应结果不需开盖, 可以通过肉眼直接判断: 如果管内液体浑浊, 或者离心、静置后在管底有白色沉淀的为阳性, 或者利用浊度仪检测其在 400 nm 处的沉淀浊度, 判断是否有扩增(黄火清等, 2012)。有学者对 3 种判定方法进行了比较, 发现琼脂糖电泳和 SYBR Green I 的检测限相近, 直接沉淀观察法灵敏度

低 10 倍(Maeda *et al.*, 2005)。另一种不开盖检测 LAMP 扩增结果的方法是检查染料颜色的变化。常用的有钙黄绿素、HNB 等, 两者均可以在反应前加入体系, 避免了开盖污染, HNB 与 SYBR Green I 的检测灵敏度相当, 是钙黄绿素的 10 倍(Goto *et al.*, 2009)。

本研究采用英国 OptiGene 公司研发的等温扩增荧光检测试剂及检测仪器 GENIE 便携式基因荧光扩增仪, 进行 LAMP 反应及检测。该检测试剂中预先加入了荧光染料, 扩增仪使用 488 nm 激发光源、520 nm 发射热循环荧光监测, 实时收集记录 LAMP 反应扩增的荧光信号, 自动生成扩增曲线, 对扩增进行实时报告。该方法不需要开盖加染料或者电泳, 防止了气溶胶的形成, 避免了因污染环境而造成的假阳性。分析软件通过计算可以得出相当于荧光 PCR“ $C_T$  值”的出峰时间, 灵敏度更高, 避免了肉眼观察带来的人为误差, 结果判定更为客观。通过对软件派生的溶解曲线的分析, 可以进一步确认扩增的特异性, 有效区分了因非特异性扩增而引起的假阳性。另外, 便携式基因荧光扩增仪具有体积小、易携带、操作简单、具内置电池等特点, 非常适合现场使用。利用该设备建立的 ISAV LAMP 检测方法, 不仅适用于科研机构的检测研究, 更适用于基层养殖场的现场快速检测, 以及进出口口岸检疫部门的疫病监测, 为 ISAV 的检测提供了一种新的方法。

## 参 考 文 献

孙颖杰, 岳志芹, 刘荭, 等. 牙鲈弹状病毒环介导等温扩增检测方法的建立与应用. 华中农业大学学报, 2010, 29(2): 203-207

杜雄伟, 李叶, 庞艳华. ISAV 实时荧光 RT-PCR 检测方法的建立. 食品与发酵工业, 2013, 39 (6): 205-207

张家松, 王印庚, 陈义平, 等. 环介导等温扩增法(LAMP)在水生动物病害检测中的应用. 中国动物检疫, 2010, 27(2): 71-73

陈进会, 陈文, 黄伟, 等. 病毒性出血性败血症病毒(VHSV)实时荧光环介导等温扩增检测方法的建立. 中国动物检疫, 2013, 30(5): 42-45

黄火清, 郁昂. 环介导等温扩增技术的研究进展. 生物技术, 2012, 22 (3): 90-94

盖春蕾, 叶海斌, 许拉, 等. 鲍鱼常见病害初诊速查检索表. 渔业科学进展, 2012, 33(1): 177-180

蔡林婷, 李思源, 葛明峰, 等. 3 种致病弧菌感染对大黄鱼血液生化指标的影响. 渔业科学进展, 2012, 33(2): 65-72

Caipang CMA, Haraguchi I, Ohira T, *et al.* Rapid detection of a fish iridovirus using loop-mediated isothermal amplification (LAMP). J Virol Methods, 2004, 121(2): 155-161

Devold M, Krossoy B, Aspehaug V, *et al.* Use of RT-PCR for

diagnosis of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in carrier sea trout *Salmo trutta* after experimental infection. Dis Aquat Org, 2000, 41(1): 9-18

Falk K, Namork E, Rimstad E, *et al.* Characterization of infectious salmon anemia virus, an orthomyxo-like virus isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar* L). J Virol, 1997, 71(12): 9016-9023

Goto M, Honda E, Ogura A. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxyl anphthol blue. Biol Techniques, 2009, 46(3): 167-172

Gunimaladevi I, Kono T, Lapatra SE, *et al.* A loop mediated isothermal amplification (LAMP) method for detection of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Arch Virol, 2005, 150(5): 899-909

Gunimaladevi I, Kono T, Venugopal MN, *et al.* Detection of koi herpesvirus in common carp, *Cyprinus carpio* L., by loop-mediated isothermal amplification. J Fish Dis, 2004, 27(10): 583-589

Kibenge FSB, Munir K, Kibenge MJT, *et al.* Infectious salmon anemia virus: causative agent, pathogenesis and immunity. Anim Health Res Rev, 2004, 5(1): 65-78

Kono T, Savan R, Sakai M, *et al.* Detection of white spot syndrome virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification. J Virol Methods, 2004, 115(1): 59-65

Maeda H, Koekuchi S, Fujimoto C. Detection of periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* by loop-mediated isothermal amplification method. FEMS Immunol Med Microbiol, 2005, 43(2): 233-239

Martin CS, Rivas-Aravena A, Guajardo S. Simultaneous detection of the IPN and ISA viruses in outbreaks of clinical disease and mortality in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Chile. J Fish Dis, 2012, 35(6): 461-465

Mekata T, Koto T, Savan R. Detection of yellow head virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). J Virol Methods, 2006, 135(2): 151-156

Mori Y, Nagamine K, Tomita N. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 289(1): 150-154

Notomi T, Okayama H, Masub-uchi H. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): e63

Olsen CM, Braaen S, Falk K. Multiple passage of infectious salmon anaemia virus in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), did not induce increased virus load. J Fish Dis, 2012, 35(11): 827-838

Rimstad E, Mjaaland S. Infectious salmon anaemia virus. An orthomyxovirus causing an emerging infection in Atlantic salmon. APMIS, acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica, 2002, 110(4): 273-282

Savan R, Igarashi A, Matsuoka S. Sensitive and rapid detection of Edwardsiellosis in fish by a loop-mediated isothermal

- amplification method. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(1): 621–624
- Shivappa RB, Savan R, Kono T. Detection of spring viraemia of carp virus (SVCV) by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in koi carp, *Cyprinus carpio* L. *J Fish Dis*, 2008, 31(4): 249–258
- Snow M, McKay P, Mcbeatha JA, *et al.* Development, application and validation of a taqMan real-time RT-PCR assay for the detection of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in Atlantic salmon (*Salmo salar*), Vannier P & Espeseth D, eds. *New Diagnostic Technology: Applications in Animal Health and Biologics Controls*. 2006, Dev Biol, Basel, Karger, 126: 33–145
- Soliman H, El-Matbouli M. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for rapid detection of viral hemorrhagic septicaemia virus (VHS). *Vet Microbiol*, 2006, 114(3-4): 205–213
- Thorud KE, Djupvik HO. Infectious salmon anaemia in Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Bull Eur Assoc Fish Pathol*, 1988, 8: 109–111

(编辑 冯小花)

## The Detection of Infectious Salmon Anaemia Virus Using Real-Time Fluorescent Loop-Mediated Isothermal Amplification

SHI Xiujie, YU Li, WANG Jinjin, HE Junqiang, ZHENG Xiaocong, JIA Peng, LAN Wensheng, YANG Jinshun, LIU Hong

(The Animal and Plant Inspection and Quarantine Technical Center, Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 518045)

**Abstract** The infectious salmon anaemia virus (ISAV) is classified as an Orthomyxoviridae. Its genome consists of 8 single-stranded negative-sense RNA segments. ISAV is the pathogen of fatal ISA listed by the World Organization for Animal Health (OIE). It mainly affects salmon farming in Europe and Northern America, but there has been a high chance of its introduction into China due to the increased salmon importation. Therefore it is very important to establish a rapid and accurate method for ISAV detection. Conventional ISAV detection methods involve cell isolation followed by RT-PCR or real-time RT-PCR. Recently Japanese scientists have established a novel technique with high sensitivity and rapidity, namely Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. In this study, LAMP assay was developed for detecting infectious salmon anaemia virus (ISAV). Six specific primers were designed according to ISAV genes using LAMP Designer software. A novel LAMP instrument was applied for the amplification and detection. The reaction time and temperature were optimized, and the sensitivity and specificity of this method were analyzed and compared to those of RT-PCR and real-time RT-PCR. The results demonstrated that the optimal amplification temperature of LAMP assay was 64°C, and its detection limit for ISAV RNA was approximately 78.4 fg, which was 100-fold lower than that of traditional RT-PCR but similar to real-time RT-PCR. LAMP assay showed no cross reaction with 14 other fish viruses such as infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), spring viraemia of carp virus (SVCV), viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV), viral nervous necrosis virus (VNNV), and yellowtail ascites virus (YAV). This indicated that the primers were highly specific for ISAV. In this study we developed a LAMP assay for ISAV detection. Using specific LAMP assay equipment we could improve the sensitivity and monitor the amplification process. Furthermore this assay does not involve lid opening, hence it greatly reduces the risk of cross contamination.

**Key words** Infectious salmon anaemia virus (ISAV); Loop-mediated isothermal amplification (LAMP); Detection

# 对虾肝胰腺细小病毒滚环扩增检测方法的建立\*

王勤涛<sup>1,2</sup> 张庆利<sup>1</sup> 杨昊霖<sup>1,2</sup> 刘天齐<sup>1,2</sup>  
刘 笋<sup>1</sup> 杨 冰<sup>1</sup> 黄 捷<sup>1</sup>



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

**摘要** 根据对虾肝胰腺细小病毒(HPV)保守基因序列,设计特异性的锁式探针及其扩增引物,优化反应条件,建立了肝胰腺细小病毒超分支滚环扩增检测方法。实验中采用一步法连接,探针在 *Taq* DNA 连接酶作用下,58℃连接 40 min、62℃扩增 30 min 便可以扩增出明显条带。反应特异性验证实验表明,该体系能够特异性地检测出 HPV,而不与供试的其他对虾病原发生交叉反应;灵敏度分析结果显示该方法的检测极限为  $10^5$  copies/μl,与 PCR 检测方法相比,一步法连接的滚环扩增的灵敏度低两个数量级。该方法反应过程中温度变化次数少,基本都在等温条件下进行,不需要 PCR 仪,可发展成为在简便实验条件下使用的简易检测方法。

**关键词** 对虾;肝胰腺细小病毒;检测;滚环扩增

中图分类号 S917 文献标识码 A 文章编号 1000-7075(2014)04-0059-07

对虾肝胰腺细小病毒(Hepatopancreatic parvovirus, HPV)是一种无囊膜的二十面体的单链 DNA 病毒,平均直径为 22–23 nm (Phromjai *et al*, 2001),隶属于细小病毒科(Parvoviridae)、细小病毒亚科(Parvirinae)、细小病毒属(*Paevovirus*) (薛清刚等, 1996)。Chong 等(1984)从新加坡地区野生的墨吉明对虾(*Fenneropenaeus merguensis*)和印度明对虾(*F. indicus*)中首先发现了 HPV。感染该病毒使对虾厌食、行动不活泼、生长缓慢,鳃和体表有附着的共栖生物,偶尔发现腹部肌肉变白,严重时可导致幼虾死亡,死亡率高达 100% (Flegel *et al*, 1995; Lightner *et al*, 1985),造成较大的经济损失(Flegel, 1997)。因此,建立一种快速、特异、使用方便的检测技术对 HPV 的防治非常重要。检测 HPV 的 PCR 技术已经建立,但 PCR 技术需要 PCR 仪,不适合现场检测。

滚环扩增技术(Rolling Circle Amplification, RCA)是通过模拟自然界中某些病毒和质粒的滚环复制过

程实现的(Fire *et al*, 1995)。环形 DNA 模板在具有链置换活性的 DNA 聚合酶作用下,通过一条引物便可以实现环状 DNA 模板的体外扩增,这种方法被称为“单引物 RCA”。以此为基础,根据环状 DNA 模板部分合适序列设计另一条引物,便可以实现环状 DNA 模板的指数扩增,称为“指数 RCA”(Nilsson *et al*, 1994)。RCA 的指数扩增和线性扩增可对线性模板分别实现  $10^9$  倍(Lage *et al*, 2003)和  $10^5$  倍(Gusev *et al*, 2001)的信号放大。Nilsson 等(1994)首次报道了基于锁式探针(Padlock probe)的线性 RCA 技术及其应用。其基本原理是连接酶在只有锁式探针与检测靶 DNA 完全互补配对时,才能将锁式探针有效连接成环,而在没有靶序列时,锁式探针无法成环,以此来确定反应的特异性。对成环的探针进行扩增,短时间内可以扩增出大量产物,通过对扩增产物分析,可以判断是否有目的基因存在。RCA 有高特异性,可以进行单核苷酸多态性(SNPs)的检测(Qi *et al*, 2001)。此

\* 公益性行业(农业)科研专项经费(201103034)、现代农业产业技术体系(CARS-47)和中国水产科学研究院基本科研业务费(2012A05)共同资助。王勤涛, E-mail: qintwang@126.com

通讯作者: 黄 捷, 研究员, E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2013-04-28, 收修改稿日期: 2013-06-19

外,由于探针中间无关序列可以自己设计,因此可以在实现多重检测的同时,降低引物和扩增产物之间的相互干扰(Szemes *et al.*, 2005)。RCA 技术因其高特异性、高灵敏度、快速简便等优点,已经被广泛应用于检测和近缘种的鉴定(黄冠军等, 2008; 孔铖将等, 2011; Wu *et al.*, 2010; Macera *et al.*, 2011),但目前 RCA 技术很少用于水产动物病原的检测。

本研究依据肝胰腺细小病毒的保守基因序列,设计了特异的锁式探针及其扩增引物,优化超分支 RCA 条件,建立了特异、准确、高灵敏度的 HPV 超分支 RCA 检测方法,为对虾 HPV 的检测和控制提供了又一新的分子技术,同时为水产病害的多重滚环检测奠定了良好基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

分别带有肝胰腺细小病毒(Hepatopancreatic parvovirus, HPV)、传染性皮下及造血组织坏死病毒(Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, IHNV)、白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)的对虾组织样品和斑节对虾杆状病毒(Monodon baculovirus, MBV),以及培养的哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)菌株,均由中国水产科学研究院黄海水产研究所海水养殖生物疾病控制与分子病理学实验室收集并保藏。20 份 HPV 感染状况未知的中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)样品于 2012 年 7 月采集自山东省青岛市即墨。对上述组织样品和菌株,用 TIANamp Marine Animals DNA Kit(天根生化科技有限公司,北京)试剂盒,按照说明书方法提取核酸。

### 1.2 探针及其扩增引物设计

根据中国对虾 HPV 基因序列(GenBank: JN082231.1)保守区,设计锁式探针两端特异识别序列。根据使探针形成的二级结构尽量小的原则,设计探针序列以及相应的引物(引物 P1/引物 P2),同时在探针上设计了

*EcoR* V 酶切位点。探针和引物由上海生工生物技术公司合成,具体序列见表 1,其中探针的 5'端磷酸化。

### 1.3 HPV-RCA 反应体系优化

检测 HPV 的滚环扩增检测方法(HPV-RCA)分两步进行,第一步是锁式探针的环化,第二步是环化探针的扩增反应。滚环扩增连接体系 10  $\mu$ l,含 1 $\times$ Taq DNA 连接酶缓冲液、4 pmol/L 的锁式探针、0.6 U/ $\mu$ l Taq DNA 连接酶(New England Biolabs, 北京)、模板 1  $\mu$ l。连接反应条件:94 $^{\circ}$ C 4 min, 58 $^{\circ}$ C 60 min, 95 $^{\circ}$ C 15 min,冰上保温 5 min。取连接反应产物为模板,作为 RCA 的扩增反应模板,扩增反应体系 25  $\mu$ l,含 1 $\times$ Bst DNA 聚合酶缓冲液(New England BioLabs)、引物 P1 和 P2 各 0.4  $\mu$ mol/L、0.3  $\mu$ mol/L dNTPs、0.16 U/ $\mu$ l Bst DNA 聚合酶、连接反应产物 4  $\mu$ l。扩增反应条件为 62 $^{\circ}$ C 1 h,反应结束后,用由 GeneFinder(百维信,厦门)染色的 2%琼脂糖凝胶电泳进行分析。实验中对探针浓度(0.004–400 pmol/L)、扩增反应温度(53–66 $^{\circ}$ C,其中扩增反应时间 22 min)、连接反应温度(53–65 $^{\circ}$ C)、扩增反应时间(10–60 min)和连接反应时间(5–60 min,其中扩增反应 30 min)进行了优化。

### 1.4 HPV-RCA 灵敏度

用荧光定量 PCR 方法(另文报道)检测 HPV 阳性的对虾肝胰腺 DNA 中 HPV 的拷贝数为 1 $\times$ 10<sup>6</sup> copies/ $\mu$ l,用 ddH<sub>2</sub>O 进行连续 10 倍梯度稀释后(10<sup>6</sup>–10<sup>0</sup> copies/ $\mu$ l)作为模板,用上述优化好的反应体系进行灵敏度检测。

### 1.5 HPV-RCA 与 HPV-PCR 灵敏度比较

用 ddH<sub>2</sub>O 将 HPV 阳性的对虾肝胰腺 DNA 的浓度调整到 200 ng/ $\mu$ l,并进行连续 10 倍梯度稀释后分别作为模板,用 RCA 和常规 PCR 方法检测 HPV DNA(HPV-RCA),同时按《对虾肝胰腺细小病毒病诊断规程 第 1 部分:PCR 检测法》(中华人民共和国水产行业标准,2007),用 PCR 方法检测 HPV DNA

表 1 肝胰腺细小病毒滚环扩增引物及探针序列  
Tab.1 The padlock probe and primers used for HPV-RCA

引物和探针 Primers and probe	序列 Sequence (5'-3')
锁式探针 Padlock probe	pAGAGAATGTAACAATGCCTATGAAGTA <u>AGTCAGATGTCCGAAGCAGGTGCA</u> <u>GATATC TCGACACATTTCGCTTACTGGGAC</u> GGAAGGGATTATGTGGAGG
P1	CACCTGCTTCGGACATCTGACT
P2	CGACACATTTCGCTTACTGGGAC

注:序列中下划线为锁式探针的病原无关序列,斜体部分为 *EcoR* V 酶切位点

Note: The sequence underlined is unrelated sequence with HPV, and the italic sequence is the site of restriction endonuclease *EcoR* V

(HPV-PCR)。

### 1.6 HPV-RCA 的特异性

为确定 HPV-RCA 的特异性, 对扩增产物用 *EcoR V* (TaKaRa, 大连) 进行酶切(20  $\mu$ l 反应体系含 *EcoR V* 8–20 U、1 $\times$  H Buffer、1  $\mu$ l 扩增产物)。37 $^{\circ}$ C 保温 4 h, 用由 GeneFinder 染色的 2% 琼脂糖凝胶电泳进行分析。

用 1.1 中提取的 IHNV、WSSV、MBV 和哈维氏弧菌的阳性核酸样品, 检测 HPV-RCA 的特异性, 健康对虾组织的核酸为模板作阴性对照, 以水作空白对照, HPV 阳性的对虾肝胰腺核酸作阳性对照。扩增产物用由 GeneFinder 染色的 2% 琼脂糖凝胶电泳进行分析。

### 1.7 对虾样品的 HPV-RCA 检测

用优化好的 HPV-RCA 方法, 对 20 份 HPV 感染状况未知的中国对虾组织核酸样品进行检测, 同时用 HPV-PCR 方法对上述核酸样品检测。

## 2 结果

### 2.1 HPV-RCA 反应体系的优化

首先对 HPV-RCA 的锁式探针浓度进行了优化, 在连接反应中使用的锁式探针浓度为 0.004–400 pmol/L。

结果显示(图 1a), 随探针浓度降低, 反应效率逐渐下降, 探针浓度为 0.4 pmol/L 时, 反应有微弱扩增, 当探针浓度降低到 0.04 pmol/L 时, 无明显的扩增条带产生。在保证扩增效率的前提下, 从节约探针用量考虑, 选择 4 pmol/L 作为锁式探针的使用浓度。

扩增反应温度梯度优化使用的反应温度为 53–66 $^{\circ}$ C, 扩增反应时间为 22 min, 反应在 59–64 $^{\circ}$ C 条件下都可扩增出明显条带, 62 $^{\circ}$ C 效果最好, 选择 62 $^{\circ}$ C 为扩增温度(图 1b)。

连接反应温度梯度优化使用的反应温度为 53–65 $^{\circ}$ C, 反应在 53–65 $^{\circ}$ C 之间都有扩增条带产生, 连接反应温度对 RCA 影响不是很大, 选择 58 $^{\circ}$ C 进行连接(图 1c)。

扩增反应时间设置了 10–60 min 共 6 个时间梯度。扩增反应 10 min 时, 没有条带产生; 但当扩增反应 20 min 时, 有明显条带产生; 当扩增 30 min 之后, 扩增条带亮度基本不变, 反应进入平台期。选择扩增 30 min 作为扩增反应时间(图 1d)。

连接反应时间设置了 5–60 min 共 6 个时间梯度。62 $^{\circ}$ C 扩增 30 min, 从扩增结果看, 连接反应 5 min 时, 就有明显扩增, 连接 15–45 min, 连接反应效率有微弱上升。为实现连接效率, 最终选择连接 40 min(图 1e)。

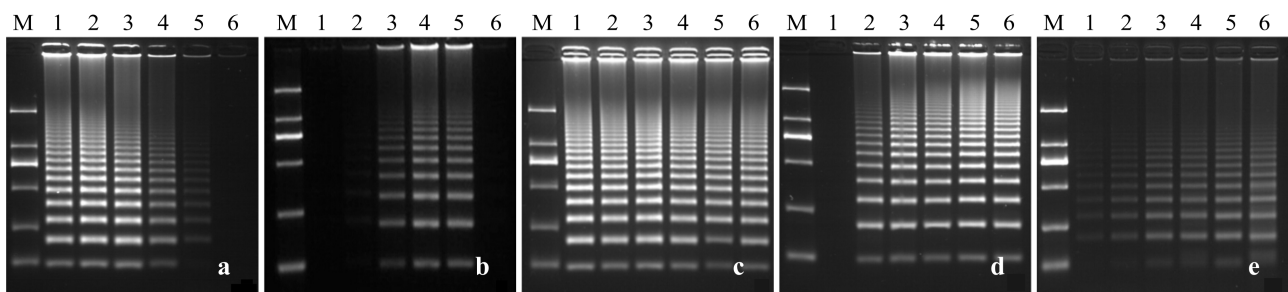


图 1 HPV-RCA 反应体系优化

Fig.1 Condition optimization for HPV-RCA

扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳分析, GeneFinder 染色。泳道 M: DL 2000 DNA marker (2000, 1000, 750, 500, 250, 100 bp, 下同)。(a) 泳道 1–6: 锁式探针浓度梯度分别为 400、40、4、0.4、0.04 和 0.004 pmol/L; (b) 泳道 1–6: 扩增反应温度梯度分别为 53、56、59、62、64 和 66 $^{\circ}$ C, 扩增时间 22 min; (c) 泳道 1–6: 连接反应温度梯度分别为 53、56、58、60、62 和 65 $^{\circ}$ C; (d) 泳道 1–6: 扩增反应时间梯度分别为 10、20、30、40、50 和 60 min; (e) 泳道 1–6: 连接反应时间梯度分别为 5、10、15、30、45 和 60 min, 62 $^{\circ}$ C 扩增 30 min

All the products were electrophoresed on 2% agarose gels and stained with GeneFinder. Lane M: DL2000 DNA marker (2000, 1000, 750, 500, 250, and 100 bp, same in the following figures). (a) Lane 1–6: The concentration of padlock probe in the reaction mixture was 400, 40, 4, 0.4, 0.04 and 0.004 pmol/L, respectively; (b) Lane 1–6: The amplification temperature was 53, 56, 59, 62, 64, and 66 $^{\circ}$ C, respectively; (c) Lane 1–6: The ligation temperature was 53, 56, 58, 60, 62 and 65 $^{\circ}$ C, respectively; (d) Lane 1–6: The amplification time was 10, 20, 30, 40, 50 and 60 min, respectively; (e) Lane 1–6: The ligation time was 5, 10, 15, 30, 45 and 60 min, respectively



## 2.2 HPV-RCA 灵敏度

将含有  $10^6$  copies/ $\mu\text{l}$  HPV DNA 的中国对虾组织 DNA 样品经 10 倍梯度稀释作为模板,进行灵敏度检测。结果显示,HPV-RCA 灵敏度检测限为  $10^5$  copies/ $\mu\text{l}$ (图2)。

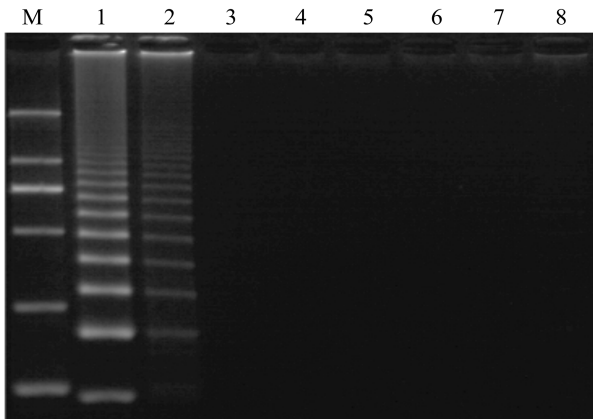


图2 HPV-RCA 灵敏度分析

Fig.2 The sensitivity analysis of HPV-RCA

提取感染 HPV 对虾肝胰腺核酸( $10^6$  copies/ $\mu\text{l}$ )作为模板,进行 10 倍梯度稀释。扩增产物用 2%琼脂糖凝胶电泳分析, GeneFinder 染色。泳道 M: DL2000; 泳道 1-7: 反应体系中病毒拷贝数分别为  $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10^1$  和  $10^0$  copies/ $\mu\text{l}$ ; 泳道 8: 阴性对照

The template was 10-fold diluted DNA ( $10^6$  copies/ $\mu\text{l}$ ) extracted from shrimp infected HPV. Products were electrophoresed on a 2% agarose gel and stained with GeneFinder. Lane M: DL2000 DNA marker; Lane 1-7: the template was  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$ , and  $10^0$  copies/ $\mu\text{l}$  respectively; Lane 8: Negative control

## 2.3 HPV-RCA 与 HPV-PCR 灵敏度比较

感染 HPV 中国对虾肝胰腺 DNA( $200$  ng/ $\mu\text{l}$ )经 10 倍梯度稀释后作为模板,分别进行 HPV-RCA 和 HPV-PCR(图 3)。当模板稀释至  $2$  ng/ $\mu\text{l}$  时,HPV-RCA 产物还有条带,但当模板稀释至  $0.2$  ng/ $\mu\text{l}$  时,无扩增产物产生(图 3a)。而 HPV-PCR 可以对  $20$  pg/ $\mu\text{l}$  的核酸样品进行检测(图 3b),HPV-RCA 比 HPV-PCR 的灵敏度低两个数量级。

## 2.4 HPV-RCA 特异性

选取了 IHNV、WSSV、MBV 和哈维氏弧菌等 4 种对虾常见病原阳性的核酸样品进行 HPV-RCA 的特异性验证,并以健康对虾组织提取的 DNA 作阴性对照,水作为空白对照。结果显示(图 4a),只有感染 HPV 的对虾肝胰腺核酸样品显阳性,其他均为阴性,

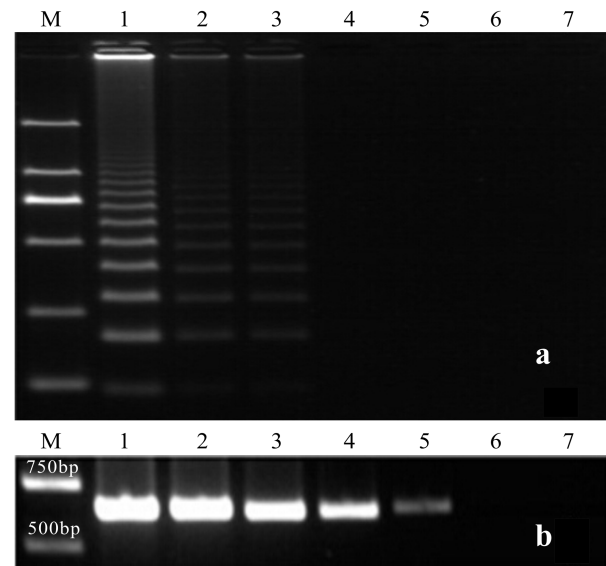


图3 HPV-RCA 与 HPV-PCR 灵敏度比较

Fig.3 Comparison of the sensitivity of HPV-RCA and HPV-PCR

提取感染 HPV 对虾肝胰腺核酸( $200$  ng/ $\mu\text{l}$ )作为模板,进行 10 倍梯度稀释。泳道 M: DL2000 DNA marker。(a) HPV-RCA 检测方法灵敏度分析,扩增产物用 2%琼脂糖凝胶电泳分析, GeneFinder 染色。泳道 1-6: 反应体系中将模板分别进行  $10^0$ 、 $10^1$ 、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$  和  $10^5$  倍稀释,泳道 7: 阴性对照。(b) HPV-PCR 检测方法灵敏度分析,扩增产物用 1.2%琼脂糖凝胶电泳分析, GeneFinder 染色。泳道 1-6: 反应体系中将模板分别进行  $10^0$ 、 $10^1$ 、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$  和  $10^5$  倍稀释,泳道 7: 阴性对照

The template was 10-fold diluted DNA ( $200$  ng/ $\mu\text{l}$ ) extracted from shrimp infected HPV. Lane M: DL2000 DNA marker; (a) Sensitivity of HPV-RCA. Products were electrophoresed on a 2% agarose gel and stained with GeneFinder. Lane 1-6: the template was  $10^0$ ,  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  and  $10^5$ -fold dilution, respectively; Lane 7: Negative control; (b) Sensitivity of HPV-PCR. Products were electrophoresed on a 1.2% agarose gel and stained with GeneFinder. Lane 1-6: the template was  $10^0$ ,  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ , and  $10^5$ -fold dilution, respectively; Lane 7: Negative control

说明 HPV-RCA 可以保证对 HPV 病毒的特异性检测。

设计的 HPV-RCA 锁式探针上包含有 *EcoR* V 酶切位点,预测 HPV-RCA 产物经 *EcoR* V 酶切将产生大小为  $99$  bp 的条带,酶切结果经琼脂糖电泳(图 4b)计算,其分子量约为  $99$  bp,与预测结果相符。

## 2.5 HPV-RCA 检测方法样品检测

将采集的 20 份中国对虾样品分别用 HPV-RCA 和 HPV-PCR 方法进行检测。HPV-RCA 对 20 份样品检测结果为 6 份阳性、14 份阴性,HPV-PCR 方法检

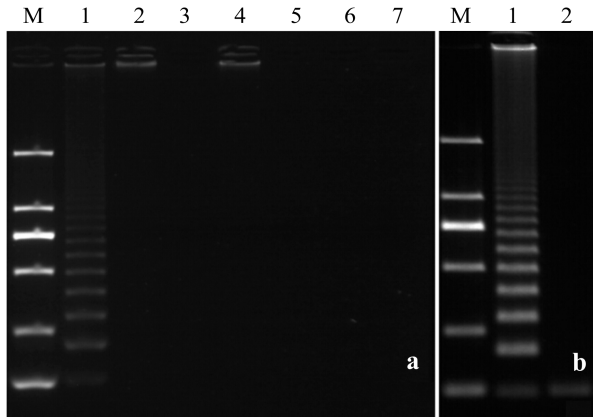


图 4 HPV-RCA 检测方法分析特异性检测结果

Fig.4 The specificity analysis of the HPV-RCA

产物用 2%琼脂糖凝胶电泳分析, GeneFinder 染色。泳道 M: DL2000 DNA marker, (a)用于 HPV-RCA 特异性检测病原及对照, 泳道 1-7: HPV、IHHNV、WSSV、*V. harveyi*、MBV、对虾组织、水; (b)泳道 1: 未酶切的 HPV-RCA 扩增产物; 泳道 2: HPV-RCA 扩增产物被 *EcoR V* 酶切后产物

Products were electrophoresed on 2% agarose gels and stained with GeneFinder. Lane M: DL2000 DNA marker. (a) Lane 1-7: The template used in the HPV-RCA was HPV, IHHNV, WSSV, *V. harveyi*, MBV, penaeid shrimp, and H<sub>2</sub>O, respectively. (b) Lane 1: Undigested products of the HPV-RCA; Lane 2: The *EcoR V* digested products of the HPV-RCA

表 2 HPV-RCA 和 HPV-PCR 对 20 份 HPV 感染情况未知样品的检测结果

Tab.2 The comparison of detection results of HPV-RCA and HPV-PCR

两种方法的比较 Comparison of two methods	PCR 阳性 PCR positive	PCR 阴性 PCR negative	总计 Total
HPV-RCA 阳性 HPV-RCA positive	6	0	6
HPV-RCA 阴性 HPV-RCA negative	13	1	14
总计 Total	19	1	20

测结果为 19 份阳性、1 份阴性(表 2)。

### 3 讨论

肝胰腺细小病毒感染在中国对虾养殖中较为常见, 危害育苗期或幼虾, 但难以通过外观症状判断该病毒的感染, 快速准确的检测方法对 HPV 病害的预警和防治必不可少。现有的 PCR 技术由于需要热循环仪, 不适合用于现场检测, 而 RCA 检测方法可以在等温条件下进行连接和扩增, 作为近年来新兴的一种病原检测技术, 具有高灵敏度、高特异性、多重性

等优点, 因此有潜力发展为一种现场检测技术。

考虑到 HPV-RCA 的实用性, 连接反应只采用了一步法连接, 而不是热循环连接方法(黄冠军等, 2008)。黄冠军等(2008)建立的柑桔溃疡病菌 RCA 检测方法对质粒的灵敏度检测极限为  $10^2$  copies/ $\mu$ l。本研究中反应灵敏度检测极限为  $10^5$  copies/ $\mu$ l 病毒 DNA, 灵敏度比 PCR 方法低两个数量级。本研究的检测方法灵敏度较低可能是由于采用一步法连接, 连接效率相对较低。此外, 由于模板为提取的感染 HPV 的中国对虾肝胰腺核酸, 因此, 在进行连接反应的时候, 会有大量的中国对虾核酸影响连接反应进行, 也可能在一定程度上降低了灵敏度。因此, HPV-RCA 比较适合于发病中后期的样品检测。

从特异性检测结果看, 该检测方法具有良好特异性。HPV-RCA 特异性扩增产物为梯状条带, 第一条条带大小为 93 bp, 相邻条带分子间差量为探针大小 (99 bp)。实验结果中出现过弥散结果现象, 弥散结果由于不知道其序列, 无法判断是否为特异性扩增产物。另外, 实验中对弥散扩增结果进行酶切后, 发现弥散结果没有被降解, 所以建议将弥散结果认为是阴性结果。作者认为其原因可能是探针和引物相互作用引起。此外, 弥散结果也有可能是由于 *Bst* DNA 聚合酶具有模板转换功能(Large *et al.*, 2003), 当扩增到模板末端之后, 会使用其他链作为模板继续进行扩增, 由此引发非特异性扩增产生的弥散结果。实验中发现, 当扩增体系中不加模板而是添加高浓度探针进行扩增时, 有时也可能出现弥散结果, Hafner 等(2001)将这种情况称为线性靶序列恒温多聚扩增, 其形成机制还未完全阐明。有的文献中建议在连接反应结束后进行酶切, 但经试验表明, 即使是酶切后的体系依然会有背景扩增, 且酶切时间较长, 不适合快速检测。

本研究根据 HPV 特异性序列设计探针, 进行反应体系优化, 成功建立了肝胰腺细小病毒滚环扩增检测方法, 最终确定探针浓度为 4 pmol/L, 58°C 连接 40 min, 62°C 扩增 30 min, 为肝胰腺细小病毒的检测提供了一种新的分子检测方法, 为今后水产病害滚环扩增多重检测方法奠定了基础。

### 参 考 文 献

中华人民共和国水产行业标准. 《对虾肝胰腺细小病毒病诊断规程 第 1 部分: PCR 检测法》(起草人: 黄捷, 杨冰, 陈爱平, 等). 中国农业出版社, 2007, SC/T 7203.1-2007  
孔铖将, 史雨红, 黎昊雁, 等. 超分支滚环扩增法检测传染

- 性脾肾坏死病毒. 水产科学, 2011, 30(9): 575-579
- 黄冠军, 殷幼平, 张仑, 等. 柑橘溃疡病菌滚环扩增检测体系的建立. 微生物学报, 2008, 48(3): 375-379
- 薛清刚, 宫云浩. 中国对虾肝胰腺细小病毒的纯化与鉴定. 海洋与湖沼, 1996, 27 (3): 308-313
- Chong YC, Loh H. Hepatopancreas chlamydial and parvoviral infections of farmed marine prawns in Singapore. Singapore Veterinary Journal, 1984, 9: 51-56
- Fire A, Xu SQ. Rolling replication of short DNA circles. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(10): 4641-4645
- Flegel TW, Sriurairatana S, Wongteerasupaya C, *et al.* Progress in characterization and control of yellow-head virus of *Penaeus monodon*. In: Browdy ECL, Hopkins JS. Swimming through troubled water, proceedings of the special session on shrimp farming. LA, USA: World Aquaculture SocBaton Rouge, 1995, 76-83
- Flegel TW. Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. World J Microbiol Biotechnol, 1997, 13(4): 433-442
- Gusev Y, Sparkowski J, Raghunathan A, *et al.* Rolling circle amplification: a new approach to increase sensitivity for immunohistochemistry and flow cytometry. Am J Pathol, 2001, 159(1): 63-69
- Hafner GJ, Yang IC, Wolter LC, *et al.* Isothermal amplification and multimerization of DNA by *Bst* DNA polymerase. BioTechniques, 2001, 30(4): 852-867
- Lage JM, Leamon JH, Pejovic T, *et al.* Whole genome analysis of genetic alterations in small DNA samples using hyperbranched strand displacement amplification and array-CGH. Gen Res, 2003, 13(2): 294-307
- Lightner DV, Redman RM. A parvo-like virus disease of penaeid shrimp. J Invert Pathol, 1985, 45(1): 47-53
- Macera L, Cortey M, Maggi F, *et al.* A novel rolling circle amplification assay to detect members of the family Anelloviridae in pig and human. Virus Res, 2011, 160(1-2): 424-427
- Nilsson M, Malmgren H, Samiotaki M, *et al.* Padlock probes: circularizing oligonucleotides for localized DNA detection. Science, 1994, 265(5181): 2085-2088
- Phromjai J, Sukhumsirichart W, Pantoja C, *et al.* Different reactions obtained using the same DNA detection reagents for Thai and Korean hepatopancreatic parvovirus of penaeid shrimp. Dis Aquat Organ, 2001, 46(2): 153-158
- Qi X, Bakht S, Devos KM, *et al.* L-RCA (ligation-rolling circle amplification): a general method for genotyping of single nucleotide polymorphisms (SNPs). Nucleic Acids Res, 2001, 29(22): e116-e116
- Szemes M, Bonants P, de Weerd M, *et al.* Diagnostic application of padlock probes—multiplex detection of plant pathogens using universal microarrays. Nucleic Acids Res, 2005, 33(8): e70-e70
- Wu L, Liu Q, Wu Z, *et al.* Detection of HIV cDNA point mutations with rolling-circle amplification arrays. Molecules, 2010, 15(2): 619-626

(编辑 冯小花)

## 《渔业科学进展》动态

(1) DOI 注册 《渔业科学进展》已加入“中文 DOI”服务, 获得出版机构会员资格。本刊可为 2013 年第 6 期以来已出版的论文注册 DOI。

(2) 版式改动 《渔业科学进展》的版式从 2014 年第 4 期开始, 由通栏改为双栏。

《渔业科学进展》编辑部

## Development and Evaluation of Rolling Circle Amplification Assay for the Detection of the Hepatopancreatic Parvovirus

WANG Qintao<sup>1,2</sup>, ZHANG Qingli<sup>1</sup>, YANG Haolin<sup>1,2</sup>, LIU Tianqi<sup>1,2</sup>,  
LIU Sun<sup>1</sup>, YANG Bing<sup>1</sup>, HUANG Jie<sup>1</sup>

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

**Abstract** Hepatopancreatic parvovirus (HPV), first isolated from *Fenneropenaeus merguensis*, is a single-stranded DNA virus that belongs to the Parvoviridae family. It has a spherical shape with an average diameter of 18–22 nm. HPV infects major aquacultured shrimp species, causes slow growth in penaeid shrimp, and consequently seriously threatens the penaeid shrimp farming. Therefore, rapid and cost-effective detection of HPV should help prevent or control disease outbreaks in penaeid shrimp. In this study we established the rolling circle amplification (RCA) assay for the detection of HPV in penaeid shrimp. We used a conservative sequence of a unique gene of HPV to design a padlock probe based on the genomes of all HPVs, and used an unrelated sequence as the primers of HPV-RCA. Using one-step ligation method, we obtained the best results at 4 pmol/L probe with 40 min ligation followed by 30 min amplification at 62°C. The detection limit of HPV-RCA assay was 10<sup>5</sup> copies/μl. HPV-RCA could detect HPV at the lowest concentration of 2 ng/μl in the hepatopancreas DNA in the shrimp samples, whereas the detection limit of HPV-RCA for PHV was 20 pg/μl. Compared to the conventional PCR, the sensitivity of HPV-RCA was 10<sup>2</sup> lower. However the HPV-RCA probe exhibited very high specificity to the HPV sequence, and showed no cross-reaction with either shrimp genomic DNA or the most common pathogens of shrimp (including infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, white spot syndrome virus, *Monodon baculovirus* disease, and *Vibrio harveyi*). Thus HPV-RCA could be established for the diagnosis of HPV infection under a practically isothermal condition. This is a simplified diagnosis method under farm-based experiment conditions, and thus has great potentials for the detection of HPV in both laboratories and the fields.

**Key words** Penaeid shrimp; HPV; Detection; RCA

# 肝胰腺细小病毒(HPV) PCR 检测 及流行情况调查\*



刘天齐<sup>1,2</sup> 杨冰<sup>2</sup> 刘笋<sup>2</sup> 万晓媛<sup>2</sup> 王秀华<sup>2</sup> 黄捷<sup>2</sup>

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306;

2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

**摘要** 采用水产行业标准《对虾肝胰腺细小病毒病诊断规程 第 1 部分:PCR 检测法》(SC/T 7203.1-2007)的方法,对 2011-2013 年期间我国沿海 7 个省市主要养殖对虾品种不同生长阶段的对虾样品进行该病毒携带情况的筛查。该方法的检测灵敏度为 0.07 fg,相当于大约 20 个病毒拷贝。结果显示,639 份样品的 HPV 阳性检出率为 18.47%。其中,在中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)和日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)中均有阳性检出,且仔虾、幼虾、成虾各个阶段均可检出 HPV,表明 HPV 已在我国养殖对虾中存在并流行。本研究结果为对虾养殖生产提供了疫病的科学数据,为我国养殖对虾中该病的流行情况提供了参考依据。

**关键词** 对虾;肝胰腺细小病毒(HPV);PCR;检测

中图分类号 S94 文献标识码 A 文章编号 1000-7075(2014)04-0066-05

肝胰腺细小病毒(Hepatopancreatic parvovirus, HPV)是引起对虾疾病的重要病原之一,最初于 1984 年在新加坡野生墨吉对虾(*Penaeus merguensis*)中被发现(Chong *et al.*, 1984),随后包括澳大利亚、中国、韩国、菲律宾、印度尼西亚、马来西亚、肯尼亚、以色列及南美洲地区均有该病的报道(Bonami, 2008)。HPV 感染可引起养殖对虾幼体或仔虾慢性死亡(Lightner *et al.*, 1993; Spann *et al.*, 1997),导致幼虾矮小、生长迟缓(Flegel *et al.*, 1992, 1999; Limuswan, 1999)。

HPV 为无囊膜二十面体,直径 22-23 nm,核酸为线性单链 DNA,属于细小病毒科(Parvoviridae)、浓核病毒亚科(Densovirinae) (Bonami *et al.*, 1995; Roekring *et al.*, 2002)。目前,已有包括印度、泰国、澳大利亚、韩国和中国的 5 个不同地理株 HPV 全基因序列的测定(Sukhumsirichart *et al.*, 2006; Safeena

*et al.*, 2010; La Fauce *et al.*, 2007a; Jeeva *et al.*, 2012; 张峥等, 2011)。基因序列比对显示,分离自中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)的 HPV 中国株(GU371276)与韩国株(AY008257)具有较高的相似性(Jeeva *et al.*, 2012)。

分子生物学诊断 HPV 的方法,包括 PCR(Sukhumsirichart *et al.*, 1999; Pantoja *et al.*, 2000; Phromjai *et al.*, 2001)、套式 PCR(Manjanaik *et al.*, 2005)、PCR-ELISA(Sukhumsirichart *et al.*, 2002)、LAMP(Nimitphak *et al.*, 2008)和 Real-time TaqMan PCR(La Fauce *et al.*, 2007b; Subbiah *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2010)等已相继报道,但大多数方法仅针对特定的 HPV 地理株,并不具备广泛适用性。本研究采用水产行业标准《对虾肝胰腺细小病毒病诊断规程 第 1 部分:PCR 检测法》(SC/T 7203.1-2007)对我国近年来养殖对虾感染 HPV 的情况进行筛查,以期为该病毒在国内的流行和分布

\*国家自然科学基金(31101935)、中央级公益性科研业务费专项资金(20603022011009)和国家虾产业技术体系建设任务(CARS-47)共同资助。刘天齐, E-mail: st.a@163.com

通讯作者: 杨冰, 副研究员, E-mail: yangbing@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2013-05-21, 收修改稿日期: 2013-06-06

提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 对虾及病毒样品

待检样品为 2011–2013 年间,在中国沿海主要对虾养殖地区采集的卵、仔虾、幼虾、成虾及亲虾样品。

健康凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)DNA、传染性皮下及造血组织坏死病毒(Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, IHNV) DNA、白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV) DNA、肝胰腺细小病毒(HPV) DNA 为本实验室提供。

### 1.2 引物与试剂

根据水产行业标准《对虾肝胰腺细小病毒病诊断规程 第1部分:PCR 检测法》(SC/T 7203.1-2007)引物序列为正向引物 F1: 5'-GGT-GAT-GTG-GAG-GAG-AGA-3',反向引物 R1 :5'-GTA-ACT-ATC-GCC- GCC-AAC-3', 由上海生工生物工程有限公司合成。

DNA 提取试剂盒购自 Tiangen 公司。25 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、10×PCR 缓冲液、5 U/μl Taq DNA 聚合酶、10 mmol/L dNTP 购自 TaKaRa 公司。

### 1.3 DNA 的提取

亲虾、成虾和幼虾样品取鳃丝,仔虾样品取头胸部或个体,卵取个体,样品重量约 25–50 mg,按照 DNA 提取试剂盒说明提取 DNA。

### 1.4 PCR 反应

25 μl 反应体系中包含:1×PCR 缓冲液 200 μmol/L dNTP 4.0 mmol/L MgCl<sub>2</sub> ,1 μmol/L 正向引物 F1 ,1 μmol/L 反向引物 R1 , 0.05 U/μl Taq DNA 聚合酶,样品模板 1 μl,用去离子水补足体积至 25 μl,立即进行 PCR 反应。PCR 扩增反应条件:94℃ 5 min;94℃ 1 min、60℃ 1 min、72℃ 1 min ,40 个循环 ;72℃ 延伸 7 min ,最后 4℃ 保温。

### 1.5 PCR 反应特异性和灵敏度

将 HPV DNA(浓度约 67 pg/μl 约 2×10<sup>7</sup> copies/μl)进行 10<sup>-1</sup>–10<sup>-7</sup> 梯度稀释,各取 1 μl 作为模板进行扩增。同时设立健康凡纳滨对虾的组织 DNA、WSSV DNA、IHNV DNA 作检测特异性分析。

## 2 结果

### 2.1 PCR 反应特异性和灵敏度

以 WSSV DNA、IHNV DNA 及健康虾组织

DNA 为模板的 PCR 反应电泳图谱见图 1A,未见目标条带及其他非特异性条带的出现。PCR 检测灵敏度结果见图 1B,模板 10<sup>-1</sup>–10<sup>-6</sup> 稀释度可见 628 bp 的目的片段,DNA 原液及 10<sup>-7</sup> 稀释度无扩增片段。最低检测灵敏度为 10<sup>-6</sup> 稀释度,即为 0.07 fg,相当于大约 20 个病毒拷贝。

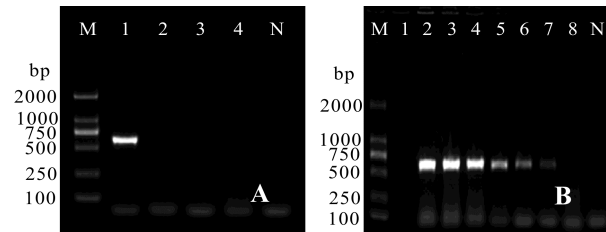


图 1 PCR 反应特异性(A)和灵敏度(B)分析电泳

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of PCR specificity and sensitivity

A: M. DL 2000 DNA Ladder; 1. HPV DNA, 2. WSSV DNA, 3. IHNV DNA, 4. SPF shrimp DNA, N: Blank control. B: M. DL 2000 DNA Ladder; Lane 1-8. Ten-fold serial dilution of HPV DNA template at 10<sup>0</sup>, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>, and 10<sup>-7</sup> respectively, N. Blank control

### 2.2 样品检测结果

对采集自 7 个省、直辖市的 639 份不同生长阶段的样品携带 HPV 情况进行统计(表 1、表 2),其中 555 份中国对虾、78 份凡纳滨对虾、6 份日本囊对虾(*Mar-supenaeus japonicus*)。结果显示,HPV 阳性率为 18.47%。其中,中国对虾共检出 113 份阳性,阳性率为 20.36%,其中,仔虾 5/52,阳性率为 9.62%;幼虾 100/493,阳性率为 20.28%;成虾 8/8,阳性率为 100%。凡纳滨对虾检出两份,均为幼虾,且阳性很弱,总阳性率为 2.56%,幼虾阳性率为 3.64%;日本囊对虾样品数较少,检出 3 份阳性,总阳性率 50%,幼虾阳性率 100%(2/2),成虾为 25%(1/4)。

## 3 讨论

分子生物学诊断技术在水产养殖疾病中的应用正在迅速发展(Lightner *et al*, 1994),PCR 技术相对经典的组织学方法因具有更高的灵敏度和特异性而被广泛应用。研究者对于 HPV 的 PCR 检测方法相继建立(Sukhumsirichart *et al*, 1999; Pantoja *et al*, 2000; Phromjai *et al*, 2001),其中 Phromjai 等(2001)的 PCR 方法对斑节对虾(*Penaeus monodon*)中 HPV 的检出限为 1 fg, Yan 等(2010)应用 Real-time PCR 技术可从中国对虾中检出低至近 1 个 HPV 病毒拷贝。本研究

表 1 2011–2013 不同品种养殖对虾样品 HPV 检测情况  
Tab.1 Detection results of HPV in different species of cultured shrimp by PCR during 2011–2013

省份 Province	样品 Samples	检测 数量 Total number	阳性 数量 Positive number
辽宁省 Liaoning	中国对虾 <i>F. chinensis</i> 幼虾 Juveniles	2	2
河北省 Hebei	中国对虾 <i>F. chinensis</i> 仔虾 Postlarvae	9	0
	幼虾 Juveniles	16	8
	亲虾 Broodstock	2	0
天津市 Tianjin	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i> 卵 Eggs	1	0
	幼虾 Juveniles	11	0
	亲虾 Broodstock	4	0
山东省 Shandong	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i> 仔虾 Postlarvae	3	0
	日本囊对虾 <i>M. japonicus</i> 仔虾 Postlarvae	1	1
	成虾 Adults	4	1
	中国对虾 <i>F. chinensis</i> 仔虾 Postlarvae	42	4
	幼虾 Juveniles	475	90
	成虾 Adults	8	8
江苏省 Jiangsu	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i> 幼虾 Juveniles	10	0
	日本囊对虾 <i>M. japonicus</i> 仔虾 Postlarvae	1	1
	中国对虾 <i>F. chinensis</i> 仔虾 Postlarvae	1	1
浙江省 Zhejiang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i> 仔虾 Postlarvae	10	0
	幼虾 Juveniles	5	0
广东省 Guangdong	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i> 幼虾 Juveniles	29	2
	成虾 Adults	5	0

采用的水产行业标准《对虾肝胰腺细小病毒病诊断规程 第 1 部分：PCR 检测法》(SC/T 7203.1-2007)检测灵敏度为 0.07 fg，相当于 20 个病毒拷贝，比本实验室建立的 Real-time PCR(Liu *et al.*, 2013)低一个数量级。该方法对 WSSV DNA、IHHNV DNA 及健康虾组织 DNA 均未出现扩增片段，同时组织病理观察本研究使用的 HPV 感染的中国对虾样品显示出典型的 HPV 包涵体，说明该标准方法对 HPV 具有较高的灵敏度和特异性。实验中，病毒原液组的浓度为 67 pg/μl，约  $2 \times 10^7$  copies/μl，PCR 检测没有条带，提示 PCR 过程中模板浓度过高会出现假阴性的结果，此现象也为病原筛查及研究工作提供了警示和参考。

HPV 自 30 年前在亚洲被发现以来(Chong *et al.*, 1984)，已在全球广泛分布。Manjanaik 等(2005)应用套式 PCR 技术对印度沿海的野生虾携带 HPV 情况进行筛查，检出率为 58%。Claydon 等(2010)应用 PCR

表 2 样品检测结果统计  
Tab.2 Statistic of detection results

样品 Samples	检测数量 Total number	阳性数量 Positive number	阳性率 Positive rate (%)
中国对虾 <i>F. chinensis</i> 仔虾 Postlarvae	52	5	9.62
幼虾 Juveniles	493	100	20.28
成虾 Adults	8	8	100.00
亲虾 Broodstock	2	0	0.00
合计 Subtotal	555	113	20.36
凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i> 卵 Eggs	1	0	0.00
仔虾 Postlarvae	13	0	0.00
幼虾 Juveniles	55	2	3.64
成虾 Adults	5	0	0.00
亲虾 Broodstock	4	0	0.00
合计 Subtotal	78	2	2.56
日本囊对虾 <i>M. japonicus</i> 仔虾 Postlarvae	2	2	100.00
成虾 Adults	4	1	25.00
合计 Subtotal	6	3	50.00
总计 Total	639	118	18.47

技术在文莱野生斑节对虾中调查 HPV，流行率为 3.8%，相比亚洲较低。近年来，越来越多的对虾病毒被证实已在中国大陆存在并流行，已有报道肝胰腺细小病毒(HPV)在中国大陆中国对虾中被发现(孙修勤等 1992；Yan *et al.*, 2010)，该病毒宿主范围广泛，主要对虾养殖品种中国对虾、斑节对虾(Flegel, 1997)、日本囊对虾、墨吉对虾(Chong *et al.*, 1984)、凡纳滨对虾(Paynter *et al.*, 1985)等都是 HPV 的自然宿主。目前，国内外尚未有我国 HPV 带毒及流行情况的数据，本研究首次针对近年来我国沿海 7 个省市主要养殖对虾品种不同生长阶段对虾样品进行该病毒携带情况的筛查，结果显示 639 份样品 HPV 阳性检出率为 18.47%。其中，中国对虾、凡纳滨对虾和日本囊对虾均有阳性检出，且仔虾、幼虾、成虾各个阶段均可检出 HPV，表明 HPV 已在我国养殖对虾中存在并流行。面对近几年来养殖生产中对虾幼体、仔虾慢性死亡、个体参差不齐、生长缓慢的现象，HPV 在病原携带及宿主和传播途径等方面的情况还有待进一步研究、探讨。

本研究样品采集于我国沿海部分对虾养殖地区，其抽样方法与系统的流行病学调查中随机样品的抽样方法不完全相同。在各养殖季节调研期间，针对养殖单位对虾健康状况和生产安排的需要，同时兼顾南北方对虾品种、发育时期、个体大小等因素，进行样品的采集。一般，除送检单位要求外，对于健康群体采

集份数为 5 份以下, 发病群体采集 5-10 份。此外, 应不同的现场情况增加或减少采集份数。若应用套式 PCR 或 Real-time PCR 方法, 本结果的阳性率可能会略有提高。该数据提供了针对病毒的定性检测, 有关组织细胞的感染程度及其分布可应用原位杂交方法评价。本研究对 HPV 的初步调查结果为对虾养殖生产提供了疫病的科学数据, 为我国养殖对虾中该病的流行情况提供了参考依据。同时, 本研究中采用的水产行业标准方法示范并规范了标准的应用, 为健康亲虾、虾苗和 SPF 种群的选育提供了技术保障。

### 参 考 文 献

- 孙修勤, 王文兴, 周惠民, 等. 中国对虾肝胰腺小病毒病的免疫诊断研究. 鱼类病害研究, 1992, 14(2): 22-26
- 张峥, 黄捷, 高强, 等. 中国对虾肝胰腺细小病毒全基因组的克隆及序列分析. 中国水产科学, 2011, 18(1): 59-65
- Bonami JR, Mari J, Poulos BP, *et al.* Characterization of hepatopancreatic parvo-like virus, a second unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimps. J Gen Virol, 1995, 76(4): 813-817
- Bonami JR. Shrimp viruses. In: BWJ Mahy and MHV van Regenmorte. Encyclopedia of Virology, 3rd Ed. Academic Press, Oxford. 2008, 567-576
- Chong Y, Loh H. Hepatopancreas clamydial and parvoviral infections of farmed marine prawns in Singapore. Singap. Vet J, 1984, 9: 51-56
- Claydon K, Tahir RAH, Said HM, *et al.* Prevalence of shrimp viruses in wild *Penaeus monodon* from Brunei Darussalam. Aquaculture, 2010, 308(3-4): 71-74
- Flegel TW. Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. World J Microbiol Biotechnol, 1997, 13(4): 433-442
- Flegel TW, Fegan DF, Kongsom S, *et al.* Occurrence, diagnosis and treatment of shrimp diseases in Thailand. Diseases of penaeid shrimp. In: Fulks W, Main KL, Diseases of cultured penaeid shrimp in Asia and the United States. The Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, 1992, 57-112
- Flegel TW, Thamavit V, Pasharawipas T, *et al.* Statistical correlation between severity of hepatopancreatic parvovirus infection and stunting of farmed black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Aquaculture, 1999, 174(3-4): 197-206
- Jeeva S, Kang SW, Lee YS, *et al.* Complete nucleotide sequence analysis of a Korean strain of hepatopancreatic parvovirus (HPV) from *Fenneropenaeus chinensis*. Virus Genes, 2012, 44(1): 89-97
- La Fauce KA, Elliman J, Owens L. Molecular characterization of hepatopancreatic parvovirus (PmergDENV) from Australian *Penaeus merguensis*. Virol, 2007a, 362(2): 397-403
- La Fauce, KA, Layton R, Owens L. TaqMan real-time PCR for detection of hepatopancreatic parvovirus from Australia. J Virol Methods, 2007b, 140(1-2): 10-16
- Lightner DV, Redman RM, Moore DW, *et al.* Development and application of a simple and rapid diagnostic method to studies on hepatopancreatic parvovirus of penaeid shrimp. Aquaculture, 1993, 116(1): 15-23
- Lightner DV, Poulos BT, Bruce L, *et al.* Development and application of genomic probes for use as diagnostic and research reagents for the penaeid shrimp parvoviruses IHHNV and HPV and the baculoviruses MBV and BP. USMSFP 10th Anniversary Review, GCRL Special Publication, 1994, 1: 59-85
- Limuswan CH. Shrimp culture in Thailand toward year 2000. In: Tonguthai K, Chinabut S, Somsiri T, *et al.* the AAHRI Newsletter, Department of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok, Thailand, 1999, 5-6
- Liu TQ, Yang B, Song XL, *et al.* Detection and quantification of hepatopancreatic parvovirus in penaeid shrimp by real-time PCR assay. J Invertebrate Pathol, 2013, 114(3): 309-312
- Manjanaik B, Umesha KR, Karunasagar I. Detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) in wild shrimp from India by nested polymerase chain reaction (PCR). Dis Aquat Organ, 2005, 63(2-3): 255-259
- Nimitphak T, Kiatpathomchai W, Flegel TW. Shrimp hepatopancreatic parvovirus detection by combining loop-mediated isothermal amplification with a lateral flow dipstick. J Virol Methods, 2008, 154(1-2): 56-60
- Pantoja CR, Lightner DV. A non-destructive method based on the polymerase chain reaction for detection of hepatopancreatic parvovirus of penaeid shrimp. Dis Aquat Organ, 2000, 39(3): 177-182
- Phromjai J, Sukhumsirichart W, Pantoja C, *et al.* Different reactions obtained using the same DNA detection reagents for Thai and Korean hepatopancreatic parvovirus of penaeid shrimp. Dis Aquat Organ, 2001, 46(2): 153-158
- Paynter JL, Lightner DV, Lester RJG. Prawn virus from juvenile *Penaeus esculentus*. In Second Australian National Prawn Seminar, 1985, 61-64
- Roekring S, Nielsen L, Owens L, *et al.* Comparison of penaeid shrimp and insect parvoviruses suggests that viral transfers may occur between two distantly related arthropod groups. Virus Res, 2002, 87(1): 79-87
- Safeena MP, Tyagi A, Rai P, *et al.* Complete nucleic acid sequence of *Penaeus monodon* densovirus (PmDENV) from India. Virus Res, 2010, 150(1-2): 1-11
- Spann KM, Adlard RD, Hudson DA, *et al.* Hepatopancreatic parvo-like virus (HPV) of *Penaeus japonicus* cultured in Australia. Dis Aquat Organ, 1997, 31(3): 239-241
- Subbiah J, Kim NI, Jang IK, *et al.* Development of two quantitative real-time PCR diagnostic kits for HPV isolates from Korea. J Microbiol Biotech, 2012, 22(10): 1350-1358
- Sukhumsirichart W, Attasart P, Boonsaeng V, *et al.* Complete nucleotide sequence and genomic organization of hepatopancreatic parvovirus (HPV) of *Penaeus monodon*. Virol,



- 2006, 346(2): 266–277
- Sukhumsirichart W, Kiatpathomchai W, Wongteerasupaya C, *et al.* Detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) infection in *Penaeus monodon* using PCR-ELISA. *Mol Cell Probe*, 2002, 16(6): 409–413
- Sukhumsirichart W, Wongteerasupaya C, Boonsaeng V, *et al.* Characterization and PCR detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) from *Penaeus monodon* in Thailand. *Dis Aquat Organ*, 1999, 38(1): 1–10
- Yan DC, Tang KF, Lightner DV. A real-time PCR for the detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) of penaeid shrimp. *J Fish Dis*, 2010, 33(6): 507–511

(编辑 冯小花)

## PCR Detection and Studies on the Prevalence of Hepatopancreatic Parvovirus (HPV)

LIU Tianqi<sup>1,2</sup>, YANG Bing<sup>2</sup>, LIU Sun<sup>2</sup>, WAN Xiaoyuan<sup>2</sup>, WANG Xiuhua<sup>2</sup>, HUANG Jie<sup>2</sup>

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

**Abstract** Hepatopancreatic parvovirus (HPV) is one of major pathogens responsible for shrimp diseases in the world. In recent years HPV disease has been found in coastal shrimp farming areas in China, however data about its prevalence has been unavailable. In this study, we examined shrimp samples at different developmental stages including egg, postlarvae, juvenile, adult and broodstock that were collected from the rearing ponds of seven coastal provinces in China (2011–2013). We detected the HPV in the samples using PCR according to the aquaculture industry standard “Diagnostic protocols for hepatopancreatic parvovirus disease of penaeid shrimp —Part 1: PCR method” (SC/T 7203.1-2007). Our data showed that the primers were specific for HPV, and they had no cross-reaction with other pathogens such as infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV), white spot syndrome virus (WSSV), and specific pathogen free (SPF) shrimp DNA. Under the PCR conditions, the primers could detect as little as 0.07 fg purified HPV DNA which contained only 20 copies of HPV. This detection limit was 10-fold lower than that of real-time PCR that was established in our laboratory. Histopathological sectioning of HPV-infected *Fenneropenaeus chinensis* verified the existence of HPV inclusion bodies in the infected tissues. Under the optimized PCR conditions, a single product with the expected size (628 bp) was detected. The positive rates were 18.47% (118 out of 639) for penaeid shrimp, 20.36% for *F. chinensis*, 2.56% for *Litopenaeus vannamei*, and 50% for *Marsupenaeus japonicus*. The positive rates were 9.62% (5 out of 52), 20.28% (100 out of 493) and 100% (8 out of 8) for *F. chinensis* postlarvae, juvenile, and adult respectively. Furthermore, HPV was detected in penaeid shrimp samples at different developmental stages including postlarvae, juveniles and adults. Our study demonstrated that HPV has been prevalent in the farmed penaeid shrimp in China, and provided data about the shrimp disease and its epidemic situation in aquaculture industry. Future studies on the disease will help us understand its geographic distribution and host species, and help evaluate its prevalence.

**Key words** Penaeid shrimp; Hepatopancreatic parvovirus (HPV); PCR; Detection

# 饥饿胁迫对刺参(*Apostichopus japonicus*) 免疫和生长的影响\*



田青<sup>1,2</sup> 荣小军<sup>1</sup> 李彬<sup>1</sup> 廖梅杰<sup>1</sup> 姜燕<sup>1</sup>  
范瑞用<sup>3</sup> 王印庚<sup>1①</sup> 李强<sup>2</sup>

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;

2. 大连海洋大学 大连 116023; 3. 青岛瑞滋海珍品发展有限公司 胶南 266400)

**摘要** 为了探究饥饿胁迫对刺参免疫和生长的影响,在 11–13℃ 条件下,研究体质量为(20±0.15) g 的刺参在不同时间(0、10、20、30、40、50、60 d),饥饿胁迫对体腔液中酸性磷酸酶(ACP)活性、溶菌酶(LZM)活性、超氧化物歧化酶(SOD)活性、呼吸爆发(RB)活性、吞噬活性以及对刺参体质量、脏壁比、存活率的影响。研究表明,随着饥饿时间的延长,刺参体腔液中的 ACP 活性、LZM 活性呈现降低的趋势,饥饿 60 d 后,比初始值分别下降 47.06%、17.57%; SOD 活性、RB 活性和吞噬活性呈现出先上升后下降的趋势,分别在饥饿胁迫第 20、20、10 天时达到最高值依次为 32.88、0.328、1.35 U/ml,其后显著下降,第 60 天时显著低于初始值,分别下降 27.87%、38.08%、53.43%;其体质量在第 60 天时为初始体质量的 68.08%,呈现负生长;脏壁比逐渐增大,第 60 天时为 0.56,显著高于初始值 0.44 ( $P < 0.05$ )。随着存储营养物质的消耗,刺参体质量损失率增加,存活率下降,存活率与体质量损失率之间存在着  $y = -0.0354x^2 + 0.4354x + 99.117$  的函数关系,呈二次曲线线性负相关。研究结果显示,饥饿时刺参通过消耗体内的营养物质来满足机体需要,长期的饥饿有可能降低刺参的免疫能力,直接影响刺参的健康和生长。

**关键词** 刺参; 饥饿胁迫; 免疫; 负生长; 存活率; 脏壁比

**中图分类号** S963 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2014)04-0071-06

刺参(*Apostichopus japonicus*)属棘皮动物门(Echinodermata)、海参纲(Holothuroidea)、楯手目(Aspidochirotrida)、刺参科(Stichopodidae)、仿刺参属(*Apostichopus*),具有较高的食用价值和药用价值,备受消费者青睐(廖玉麟,1997)。近年来,随着国民生活水平的提高,其需求量日益增多,刺参养殖业迅猛发展。据 2013 年中国渔业年鉴统计,刺参苗种年产量为 580 多亿头,总产量为  $17 \times 10^4$  t,已成为我国海水养殖的支柱性产业,取得了良好的经济和社会效益。

随着刺参养殖的深入发展,池塘、工厂化、浅海

网箱等养殖模式成为刺参重要的养殖方式,其高密度、集约化水平大大提高(姜燕等,2012;高菲等,2012)。在养殖过程中常常由于季节更替、食物分布不均以及人工投饵不足等原因,使刺参因食物短缺而引起饥饿胁迫和生长停滞。动物受到饥饿胁迫时,往往通过调节自身的代谢水平、能量分配及能量物质的消耗来维持基本的生理活动,从而影响其生长和免疫机能。仇明等(2011)研究表明,饥饿胁迫瓦氏黄颡鱼幼鱼 50 d 后,幼鱼的消化酶活力降低,并利用肝脏和肌肉中贮存的蛋白质来维持生理需求;郑桂红等

\*国家 863 计划(2012AA10A412-4)、山东省自主创新成果转化专项(2013ZHZX2A0801)和青岛市战略性新兴产业培育计划项目(13-4-1-65-hy)共同资助。田青, E-mail: 758342183@qq.com

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

收稿日期: 2013-06-28, 收修改稿日期: 2014-04-09

(2012)在研究斑点叉尾鲴的饥饿胁迫时指出, 饥饿对血液生理生化指标有显著性影响, 血液红细胞数量和红细胞压积随着饥饿时间的延长逐渐减少。另外, 李石磊等(2007)在对虾夷扇贝的研究中发现, 当饥饿超过 20 d 后, 机体的免疫系统受到较为严重的破坏, 血细胞吞噬水平、酸性磷酸酶活性、过氧化物歧化酶活性等均显著下降。

迄今为止, 关于水生动物饥饿胁迫的研究多集中在鱼类、虾蟹类和贝类, 有关饥饿胁迫对刺参免疫和生长的影响尚未见报道。本研究分析了不同时间饥饿胁迫对刺参体腔液中 SOD、ACP、LZM 等免疫活性以及刺参生长的影响, 以期对刺参的健康养殖提供依据, 也为揭示刺参的防御机能和免疫机理提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用刺参于 2012 年 11 月 15 日-2013 年 1 月 15 日购自青岛瑞滋海珍品发展有限公司, 实验前暂养 7 d, 暂养期间按照刺参体质量的 3% 投喂饲料(成分: 80% 商品饲料, 20% 海泥), 每天换水 1 次, 换水量为 1/2。暂养 7 d 后, 选取健康、附着力好、规格为 (20±0.15) g 的刺参随机分成 7 个处理组; 分别饥饿 0、10、20、30、40、50、60 d, 每处理组 3 个重复, 每个重复组 15 头刺参。不同饥饿时间的样品采集分别从对应实验组中随机选取, 每次选取 3 头刺参进行免疫活性和生长指标分析。养殖水族箱规格为 40 cm×30 cm×50 cm, 水温为 11-13℃, pH 为 7.5-8.2, 盐度为 28-30, 养殖过程中保持充氧, 溶解氧 5 mg/L。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 免疫活性的测定** 饥饿胁迫后 0、10、20、30、40、50、60 d, 分别从对应的实验组中随机取 3 头刺参抽取体腔液, 每只抽取 1 ml, 1500 r/min, 离心 10 min, 取上清液测定免疫活性。酸性磷酸酶(ACP)活性、溶菌酶(LZM)活性、超氧化物歧化酶(SOD)活性测定用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒, 呼吸爆发活性的测定参考 Song 等(1994)方法, 吞噬活性测定参考张琴等(2011)方法。

**1.2.2 刺参生长指标的测定和计算** 不同时间饥饿胁迫后, 测定刺参体质量、存活率、体质量损失率、脏壁比等指标。

体质量、体质量损失率、脏壁比的测定及计算: 把待测刺参在滤纸上放置 10 min 后用电子天平称量

体重(王印庚等, 2012), 并随机解剖 3 头刺参称量体壁和内脏质量。计算体质量损失率和脏壁比, 公式如下:

$$WLR(\%) = (W_0 - W_t) / W_0$$

$$R = W_v / W_w$$

式中,  $WLR$  为体质量损失率,  $R$  为实验刺参的脏壁比,  $W_0$  为刺参的初质量(g),  $W_t$  为取样时刺参质量(g),  $W_v$  为内脏质量(g),  $W_w$  为体壁质量(g)。

存活率的测定及计算: 试验期间, 统计不同饥饿时间死亡刺参的数量, 计算存活率, 公式如下:

$$SR(\%) = (Q_0 - Q_t) / Q_0$$

式中,  $SR$  为存活率,  $Q_0$  为每组刺参的总头数,  $Q_t$  为取样时间内每组死亡刺参的总头数。

**1.2.3 数据分析** 实验数据用 SPSS 19.0 统计软件进行单因素方差分析, Duncan 氏多重比较分析组间差异显著性, 以  $P < 0.05$  作为差异显著性水平。

## 2 结果与分析

### 2.1 饥饿胁迫对刺参免疫活性的影响

**2.1.1 对超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响** 随着饥饿时间的延长, SOD 活性先升高后逐渐下降, 如图 1 所示。饥饿 20 d 时 SOD 活性最高, 其值为 32.88 U/ml (金氏单位); 30 d 后 SOD 活性下降, 并显著低于第 20 天 ( $P < 0.05$ ); 但与初始值(第 0 天)差异不显著 ( $P > 0.05$ ); 第 40 天与第 50 天时 SOD 活性下降较为缓慢, 与第 30 天差异不显著, 但与初始值差异显著 ( $P < 0.05$ ), 第 60 天时 SOD 活性下降迅速, 显著低于其他组 ( $P < 0.05$ ), 为 20.54 U/ml, 比初始值下降了 27.87%。

**2.1.2 对酸性磷酸酶(ACP)活性的影响** 随着饥

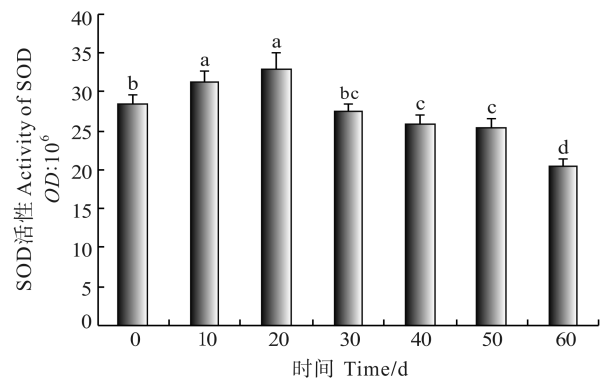


图 1 饥饿胁迫对刺参体腔液中 SOD 活性的影响

Fig.1 Effect of starvation stress on the activity of SOD in coelomic fluid of *A. japonicus*

注: 同一列上方参数字母不相同则有显著差异 ( $P < 0.05$ ) (以下同)  
Note: Different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ )

饥饿胁迫时间的延长, 刺参体腔液中的 ACP 活性呈现下降的趋势, 如图 2 所示。饥饿胁迫 10 d 时 ACP 活性下降不显著( $P>0.05$ ); 20 d 后随着时间的延长, 刺参 ACP 活性呈现阶梯状显著下降, 60 d 时刺参的 ACP 活性为 18.18 U/100ml, 显著低于其他组( $P<0.05$ ), 比初始值下降 47.06%。

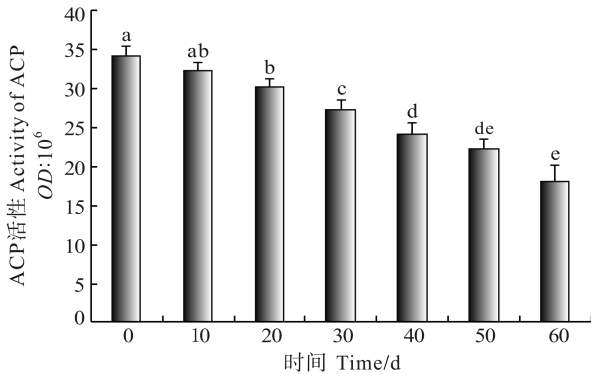


图 2 饥饿胁迫对刺参体腔液中 ACP 活性的影响

Fig.2 Effects of starvation stress on the activity of ACP in coelomic fluid of *A. japonicus*

**2.1.3 对溶菌酶(LZM)活性的影响** 随着饥饿时间的延长, 刺参体腔液中的 LZM 活性逐渐降低, 如图 3 所示。饥饿胁迫 10 d 时, LZM 活性下降较快, 与初始值差异显著( $P<0.05$ ); 20 d 时, LZM 活性下降较慢, 与第 10 天的值差异不显著( $P>0.05$ ); 20 d 以后, LZM

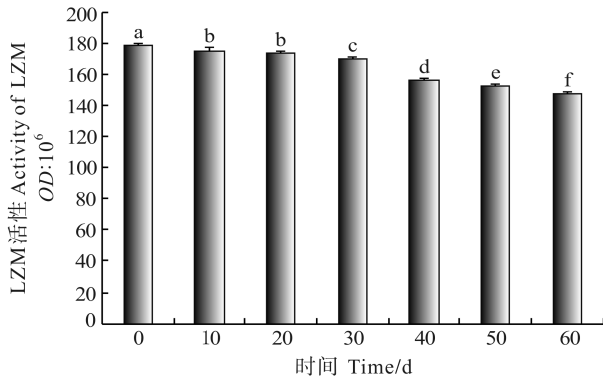


图 3 饥饿胁迫对刺参体腔液中 LZM 活性的影响

Fig.3 Effects of starvation stress on the activity of LZM in coelomic fluid of *A. japonicus*

活性均显著下降( $P<0.05$ ); 60 d 时刺参的 LZM 活性为 147.66 U/100ml, 比初始值 179.13 U/100ml 下降 17.57%。

**2.1.4 对刺参体腔液中呼吸爆发活性影响** 随着饥饿时间的延长, 刺参体腔液中呼吸爆发活性呈现先升高后下降的趋势, 如图 4 所示。饥饿胁迫 10 d 时, 呼吸爆发活性上升不显著; 第 20 天时显著上升, 并达

到最高值, 其值为 0.238, 与初始值差异显著( $P<0.05$ ); 30 d 后呼吸爆发活性显著下降, 与初始值差异不显著; 60 d 时其值为 0.126, 显著低于其他组( $P<0.05$ ), 比初始值下降 38.08%。

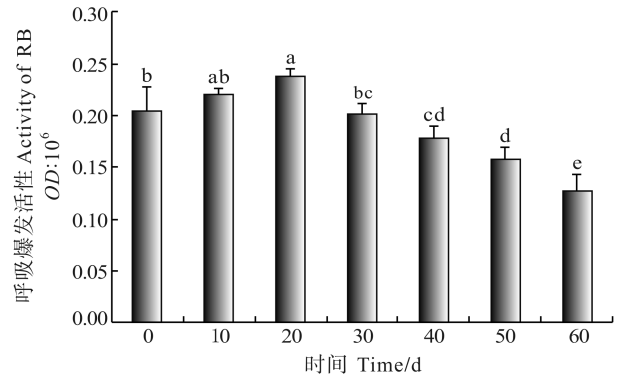


图 4 饥饿胁迫对刺参体腔液中呼吸爆发活力的影响

Fig.4 Effects of starvation stress on the activity of RB in coelomic fluid of *A. japonicus*

**2.1.5 对刺参体腔液中吞噬活性的影响** 随着饥饿胁迫时间的延长, 刺参体腔液中吞噬活性先升高后下降, 如图 5 所示。饥饿胁迫 10 d 时, 吞噬活性显著升高, 并达到最高值, 其值为 1.35; 10 d 后, 随着饥饿时间的延长, 刺参吞噬活性呈现阶梯状显著降低; 第 20 天时, 下降幅度较大, 并低于初始值, 但与初始值差异不显著( $P>0.05$ ), 与第 10 天差异显著( $P<0.05$ ); 60 d 时显著低于其他组( $P<0.05$ ), 其值为 0.57, 比初始值 1.23 下降 53.43%。

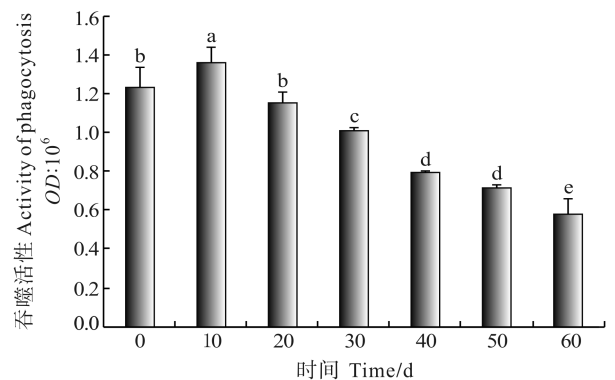


图 5 饥饿胁迫对刺参体腔液中吞噬活性的影响

Fig.5 Effects of starvation stress on the phagocytosis activity of coelomic fluid of *A. japonicus*

## 2.2 刺参的生长指标

**2.2.1 饥饿胁迫对刺参脏壁比的影响** 由表 1 可知, 随着饥饿胁迫时间的延长, 脏壁比逐渐增大。饥饿胁迫前 30 d, 脏壁比下降显著 ( $P<0.05$ ); 30 d 后脏壁比

表 1 饥饿胁迫对刺参生长指标的影响  
Tab.1 Effects of starvation stress on the growth parameter of *A. japonicus*

时间 Time(d)	0	10	20	30	40	50	60
脏壁比 Ratio of viscera to body wall	0.44±0.01 <sup>e</sup>	0.41±0.01 <sup>f</sup>	0.48±0.01 <sup>d</sup>	0.51±0.01 <sup>c</sup>	0.53±0.01 <sup>bc</sup>	0.54±0.02 <sup>ab</sup>	0.56±0.02 <sup>a</sup>

注：不同字母表示具有显著差异( $P<0.05$ )

Note: Different superscripts indicate significant difference ( $P<0.05$ )

下降缓慢；60 d 时脏壁比为 0.56，比初始值 0.44 提高 27.27%，显著高于其他各组( $P<0.05$ )。

**2.2.2 饥饿胁迫对刺参存活率和体质量损失率的影响** 研究期间，刺参体质量损失率随着饥饿胁迫时间的延长，呈现增高的趋势，如图 6 所示。第 20 天时体质量损失率上升，显著高于第 10 天( $P<0.05$ )；第 30 天时上升缓慢；第 40、50 天时体质量损失率又呈现显著上升趋势；60 d 时，刺参体重为 13.69 g，体质量损失率为 32.48%。随着刺参体质量损失率的增加，存活率逐渐降低，存活率与体质量损失率之间存在着  $y = -0.0354x^2 + 0.4354x + 99.117$  的函数关系，如图 7 所示，二次曲线线性负相关， $R^2=0.9913$ 。

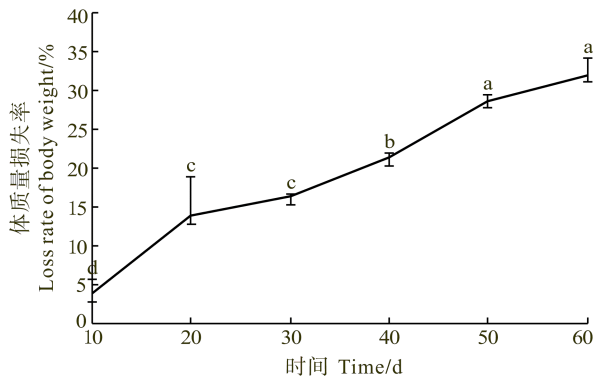


图 6 饥饿胁迫对体质量损失率的影响

Fig.6 Effects of starvation stress on the WLR of *A. japonicus*

注：不同字母表示具有显著差异( $P<0.05$ )

Note: Different superscripts indicate significant difference ( $P<0.05$ )

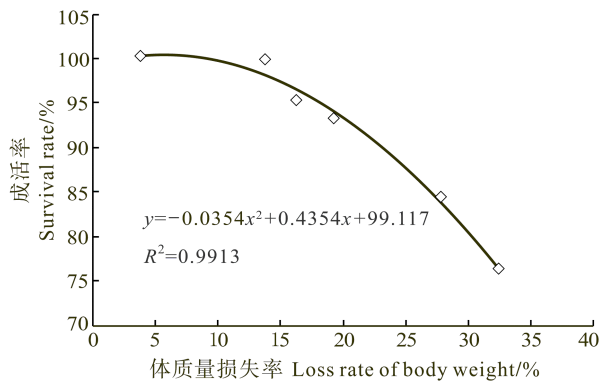


图 7 存活率与体质量损失率之间存在二次负相关性

Fig.7 Negative quadric linear correlation between loss rate of body weight and survival rate of *A. japonicus*

### 3 讨论

#### 3.1 饥饿胁迫对刺参超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响

SOD 是一种重要的抗氧化酶，它的主要功能是清除体内产生的超氧化阴离子自由基，其活性随超氧化阴离子自由基浓度的变化而变化(牟海津等，1999)。健康的生物机体内，SOD 处于较为稳定的水平，机体内自由基的产生与消除处于动态平衡状态。机体处于饥饿胁迫状态下，生物体的抗氧化能力会随着外界环境和机体免疫能力的变化而变化。如饥饿 25 d 方斑东方螺机体 SOD 活性增强，40 d 却会导致 SOD 活性下降(薛明等，2010)；饥饿胁迫褐牙鲆也出现同样的规律，短期(2 d)饥饿胁迫促使褐牙鲆肝脏的 SOD 活性显著增加，长期饥饿(20 d)胁迫却导致它的 SOD 活性显著下降(夏华等，2012)。本研究结果表明，短期饥饿胁迫可以刺激刺参 SOD 活性的增加，饥饿胁迫 30 d 后 SOD 活性下降，其结果与薛明等(2010)、夏华等(2012)研究结果一致。推测可能是由于刺参处于营养不足状态时，机体应对饥饿胁迫产生积极的免疫防御机制，促使体内超氧阴离子含量增加，为了保持体内氧化系统的平衡，SOD 活性增强，在氧化系统的调节过程中需要耗费大量能量，长时间饥饿，机体会因能量的消耗而处于不利的状态，SOD 活性也随之降低。

#### 3.2 饥饿胁迫对刺参酸性磷酸酶(ACP)活性的影响

ACP 是溶酶体酶的标志酶，在体内直接参与磷酸基团的转移和代谢(王鑫等，1995)，而且对细菌等异物在溶酶体内的消化降解起重要作用，可改变异物表面结构，增强其异己性，加快对异物的识别、吞噬和清除(Cheng *et al*，1992)，对机体的免疫有重要作用。饥饿胁迫后由于体内能量的消耗，机体免疫力降低，对体内 ACP 活性有重要的影响，李石磊等(2011)研究表明，饥饿胁迫可降低虾夷扇贝 ACP 活性。本研究中，饥饿胁迫刺参后，刺参机体内 ACP 活性随着饥饿时间的延长逐渐下降，其结果与李石磊等(2011)研究结果一致。

### 3.3 饥饿胁迫对刺参溶菌酶(LZM)活性的影响

LZM 是一种专门作用于微生物细胞壁的水解酶,它广泛存在于水产动物的各种组织、体液和分泌物中,通过水解革兰氏阳性细菌细胞壁中粘肽的乙酰氨基多糖,破坏和消除侵入体内的细菌,达到机体防御的功能(陈竞春等;1996)。由于动物溶菌酶的化学本质是蛋白质,当体内的蛋白质摄入不足时容易降低 LZM 活性, Kiron 等(1995)研究表明,当虹鳟鱼摄食的蛋白质不充足时,体内 LZM 活性降低。本研究中,刺参饥饿胁迫后 LZM 活性降低,由此推测刺参饥饿胁迫后 LZM 活性降低和蛋白的摄入不足密切相关。

### 3.4 饥饿胁迫对刺参呼吸爆发活性和吞噬活性的影响

吞噬细胞受到外源微生物刺激或进行吞噬作用后,会产生呼吸爆发现象,产生大量的  $O_2^-$ 、OH 和  $H_2O_2$  等具有杀菌作用的活性氧自由基(Bellavite *et al.*, 1988),从而发挥机体免疫。饥饿胁迫下,机体内的呼吸爆发和吞噬活性变化较大。有研究报道,短期饥饿时间内,可以刺激虾夷扇贝细胞吞噬能力的增强,而随着饥饿时间的延长则抑制细胞的吞噬能力(李石磊等,2011)。本研究饥饿胁迫刺参试验中,短时间的饥饿胁迫能够刺激增强刺参体内细胞吞噬能力,而产生的免疫防御机制。饥饿 20 d 时刺参细胞吞噬活性显著升高,由于吞噬活性的增强需要消耗大量的能量,长时间饥饿,机体会因能量的消耗而使体内的吞噬活性降低,饥饿胁迫 30 d 后,刺参体内的吞噬活性显著降低。呼吸爆发活力是吞噬细胞杀灭吞噬微生物的重要机制之一,一般伴随吞噬活性而产生作用(Neumann *et al.*, 2001)。本研究中,饥饿胁迫后刺参机体内的呼吸爆发活性与吞噬活性的变化规律一致,呈现出了先升高后降低的趋势。

有研究报道,ACP 能够改变异物表面结构,增强其异己性,与其吞噬活性密切相关(Pipe, 1990)。本实验条件下,饥饿胁迫对刺参吞噬活性、ACP 活性的影响规律不同,刺参吞噬活性呈现先增大后逐渐降低的趋势,而 ACP 活性则呈现逐渐下降的趋势。因此,刺参机体内 ACP 活性与吞噬活性的相关性有待研究。

### 3.5 饥饿胁迫对刺参生长的影响

动物机体需要不断从外界获得食物完成生长和代谢,当机体因食物短缺造成饥饿胁迫时,会通过消耗体内储存的蛋白质、脂肪等物质,维持机体的生长、代谢,从而使机体生长缓滞、消瘦等现象,如果长时间的饥饿胁迫,会因体内缺少代谢物质的更新和能量,引起生物死亡(王美琴等,2009)。王吉桥等(1993)

报道了水温为 18–23℃ 时,鲤、鲢、鳙、草鱼鱼苗的 50% 饥饿致死时间为 7–12 d。本研究结果表明,随着饥饿时间的延长,刺参体质量损失率逐渐增加,体质量出现负增长现象,主要是由于刺参饥饿后,需要消耗体内储存的营养物质维持机体营养代谢和能量供给。同时,刺参的存活率呈现显著下降的趋势,并且存活率与体质量损失率密切相关,呈二次曲线线性负相关。

脏壁比是衡量刺参机体可食部分生长速度的指标(王际英等,2009)。本研究中,随着饥饿胁迫时间的延长,脏壁比不断增加,说明长期饥饿的过程中,刺参内存储物质损失率增大,消耗的物质大部分来自于体壁。

综上所述,刺参在养殖过程中常常因季节更替、缺乏饵料投喂等问题,造成食物供给不足使刺参产生饥饿胁迫,由此刺参通过消耗体内的营养物质维持机体的生长和免疫,长期的饵料不足容易造成免疫力减弱、负生长、出皮率低、死亡率高等现象。因此,在刺参养殖过程中,应密切关注刺参的活动与摄食情况,提供充足的饵料,防止长时间饥饿现象的发生,从而提高刺参的生长速度和养殖效益。

## 参 考 文 献

- 王美琴,李勇,车向荣,等. 蛋白质与饱食度对工厂化养殖半滑舌鳎生长与免疫的影响. 渔业科学进展, 2009, 30(4): 27–37
- 王吉桥,毛连菊,姜静颖,等. 鲤、鲢、鳙、草鱼苗和鱼种饥饿致死时间的研究. 大连水产学院学报, 1993, 8(2/3): 58–65
- 王际英,宋志东,王世信,等. 刺参不同发育阶段对蛋白质需求量的研究. 水产科技情报, 2009, 36(5): 229–231
- 王鑫,马桂荣,郑宝灿,等. SL-1 益生菌对小白鼠体重及其单核吞噬细胞功能的影响. 微生物学报, 1995, 35(6): 455–459
- 王印庚,廖梅杰,郝志凯,等. 刺参体腔液穿刺抽取后细胞恢复过程的初步研究. 渔业科学进展, 2010, 33(5): 52–58
- 仇明,王爱民,吕林兰,等. 饥饿胁迫对瓦氏黄颡鱼幼鱼存活率、体成分及消化酶活性的影响. 甘肃农业大学学报, 2011, 46(6): 11–16
- 李石磊,李文姬,付成东,等. 饥饿胁迫对虾夷扇贝几种免疫因子的影响. 水产学报, 2011, 30(8): 441–444
- 牟海洋,江晓路,刘树青,等. 免疫多糖对栉孔扇贝酸性磷酸酶、碱性磷酸酶和超氧化物歧化酶活性的影响. 中国海大学学报, 1999, 29(3): 463–468
- 张琴,麦康森,张文兵,等. 饲料中添加硒酵母和维生素 E 对刺参生长免疫力及抗病力的影响. 动物营养学报, 2011, 23(10): 1745–1755
- 陈竞春,石安静,贝类免疫生物学研究概况. 水生生物学报, 1996, 20(1): 74–78
- 郑桂红,朱丰城,孙建梅,等. 饥饿胁迫对斑点叉尾鲷血液生理生化指标的影响. 江苏农业科学, 2012, 40(5): 199–201
- 夏华,陈阿琴,徐国成,等. 饥饿胁迫对褐牙鲆皮质醇激素和

- 非特异免疫的影响. 广东农业科学, 2012, 24: 134–137
- 盖春蕾, 叶海斌, 许拉, 等. 鲍鱼常见病害初诊速查检索表. 渔业科学进展, 2012, 33(1): 177–180
- 廖玉麟. 中国动物志: 棘皮动物门, 棘皮动物纲. 北京: 科学出版社, 1997, 148–150
- 蔡林婷, 李思源, 葛明峰, 等. 3 种致病弧菌感染对大黄鱼血液生化指标的影响. 渔业科学进展, 2012, 33(2): 65–72
- 薛明, 柯才焕, 王德祥, 等. 饥饿及恢复生长对方斑东风螺抗氧化体系的影响. 中国水产科学, 2010, 17(2): 281–288
- Bellavite P. The superoxide forming enzymatic system of phagocytes. Free Radic Biol Med, 1988(4): 225
- Cheng T C. Selective induction of release of hydrolases from *Crassostrea virginica* hemocytes by certain bacteria. Invertebr Pathol, 1992, 59(2): 197–200
- Kiron V, Fukuda H, Takeuchi T, *et al.* Essential fatty acid nutrition and defence mechanisms in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Comp Biochem Physiol, 1995, 111(3): 361–367
- Song YL, Hsieh YT. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species. Dev Comp Immunol, 1994, 18(3): 201–209
- Neumann NF, Stafford JL, Barreda D, *et al.* Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. Developmental and Comparative Immunology, 2001, 25: 807–825
- Pipe RK. Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. Histochem, 1990, 22(11): 595–603

(编辑 陈严)

## Starvation Stress Effect on the Immunity and Growth of Sea Cucumber *Apostichopus japonicus*

TIAN Qing<sup>1,2</sup>, RONG Xiaojun<sup>1</sup>, LI Bin<sup>1</sup>, LIAO Meijie<sup>1</sup>, JIANG Yan<sup>1</sup>,  
FAN Ruiyong<sup>3</sup>, WANG Yingeng<sup>1</sup>, LI Qiang<sup>2</sup>

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

**Abstract** In this study we investigated the effects of starvation on the growth and immunity of sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Sea cucumber seedlings with the initial weight of (20±0.15) g were exposed to starvation stress for different periods (0, 10, 20, 30, 40, 50, and 60 d). Non-specific immunity including activities of acidic phosphatase (ACP), lysozyme (LZM), superoxide dismutase (SOD), respiratory burst (RB), and phagocytic activity of coelomic fluid were examined to determine the effects of starvation on the immune responses. The body weight, the ratio of viscera to body wall (VBWR), and the survival rate were measured to determine the effects on the growth. The ACP and LZM activities decreased along with the starvation time: after a 60-day starvation the ACP and LZM activities decreased by 47.06% and 17.57% respectively. The activities of SOD, RB and phagocytosis first increased and then decreased during the 60-day starvation, and they reached their highest values on the 20th, 20th and 10th day respectively. On the 60th day the activities of SOD, RB, and phagocytosis were significantly lower and reached 27.87%, 38.08%, 53.43% of their initial values respectively. The body weights of the sea cucumbers constantly decreased along with the starvation time and reached 68.08% of the initial value on the 60th day. The VBWR increased gradually during the experiment and reached 0.56 on the 60th day which was significantly higher than the initial value 0.44 ( $P<0.05$ ). The loss rate of the body weight increased and the survival rate decreased along with the starvation time. There was a negative quadric linear correlation between the loss rate of the body weight and the survival rate. These results indicated that sea cucumbers could consume the nutrients in the body wall to meet their needs of energy during starvation. Long-term starvation might cause suppression of immune activities thus affect the health and growth of sea cucumbers.

**Key words** Sea cucumber; Starvation stress; Immunity; Negative growth; Survival rate; Ratio of viscera to body wall

# 维生素 E 和硒对吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) 幼鱼生长及血清抗氧化酶活性的影响\*



覃 希<sup>1</sup> 黄 凯<sup>1</sup> 刘 康<sup>1</sup> 蒋焕超<sup>2</sup> 程 远<sup>1</sup> 黄 清<sup>1</sup> 黄秀芸<sup>1</sup>

(1. 广西大学动物科学技术学院 南宁 530004; 2. 广东粤海饲料集团有限公司 湛江 524001)

**摘要** 本研究采用 2×5 双因子试验设计,即在基础饲料中分别添加 0 和 0.15 mg/kg 的 Se,每一 Se 水平下分别添加 0、30、60、90、120 mg/kg 的维生素 E(V<sub>E</sub>),共制成 10 种试验饲料,饲喂平均初始体质量为(0.37±0.01) g 的吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) 70 d,每组设 3 个重复,每个重复组 50 尾吉富罗非鱼,其中饲喂未添加 Se 和 V<sub>E</sub> 的基础饲料组为对照组。结果表明,(1) V<sub>E</sub> 对吉富罗非鱼幼鱼增重率、特定生长率、摄食量和饲料系数均有显著影响( $P<0.05$ ),就生长性能而言,单独添加 V<sub>E</sub> 的适宜范围是 63.86–70.58 mg/kg。Se 对吉富罗非鱼的增重率、特定生长率的影响不显著( $P>0.05$ ),但在 V<sub>E</sub> 添加量为 0 mg/kg 的试验组中,硒的添加使吉富罗非鱼增重率高于对照组。V<sub>E</sub> 和 Se 对吉富罗非鱼生长的交互作用没有显著影响( $P>0.05$ )。(2) V<sub>E</sub> 对谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)和过氧化氢酶(CAT)活性有显著影响( $P<0.05$ ),总超氧化物歧化酶(T-SOD)和 CAT 活性随 V<sub>E</sub> 添加量的增加呈上升趋势。而 Se 可显著影响 T-SOD 和 GSH-PX 的活性( $P<0.05$ ),在 V<sub>E</sub> 添加量范围 60–90 mg/kg 时,加 Se 试验组的 T-SOD、GSH-PX 和 CAT 活性较不加 Se 组有所上升。V<sub>E</sub> 和 Se 对 GSH-PX 活性的影响具有显著的交互作用( $P<0.05$ )。在本研究条件下,V<sub>E</sub> 和 Se 对吉富罗非鱼的生长及抗氧化有一定促进作用,二者联合使用,没有协同促生长作用,但抗氧化作用得到进一步加强。

**关键词** 吉富罗非鱼; 维生素 E; 硒; 生长; 抗氧化酶活性

中图分类号 S917 文献标识码 A 文章编号 1000-7075(2014)04-0077-08

维生素 E(V<sub>E</sub>)是一种对鱼类生长有重要作用的脂溶性维生素,作为生物组织抗氧化剂,具有保护含磷脂的生物膜免受脂质过氧化损伤的作用,通过限制超氧化物的生成和降低超氧化物水平而发挥其抗氧化作用。硒(Se)是水产动物正常生长和生理功能所必需的微量元素,在饲料中适量添加可以提高机体的免疫力与抗病力。Se 也是一种潜在的抗氧化剂,参与生物体中有机和无机过氧化物的清除过程,主要通过含硒酶类的酶促途径实现抗氧化作用(Wang *et al.*, 2007)。大量研究发现 V<sub>E</sub> 和 Se 在生物体生长和抗氧化方面有促进作用(Dandapat *et al.*, 2000; Yakaryilmaz

*et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007; Burk *et al.*, 2008)。

迄今为止,关于 V<sub>E</sub> 和 Se 单独添加对水生动物生长、酶活性等的研究已有不少,但在日粮中同时添加 V<sub>E</sub> 和 Se 的研究目前多局限于鸡、鸭、牛、老鼠等陆源动物上,在水产动物上很少有报道,见皱纹盘鲍(万敏等 2004)、牙鲆(常青等, 2010)、凡纳滨对虾(胡俊茹等, 2010)和刺参(张琴等, 2011)有类似的研究,国外在大鳞大麻哈鱼和大西洋鲑(Thorarinsson *et al.*, 1994; Salte *et al.*, 1988)上有研究。目前,在吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)上的研究尚未见有报道。吉富罗非鱼具有生长速度快、个体大、出肉率高、遗

\*国家科技支撑计划(2012BAD25B04)、广西重大科技专项(14121004-2-2)、广西科技攻关项目(0992014-2)、广西南宁市科技攻关项目(201102100G)共同资助。覃 希, E-mail: 13737093426@163.com

通讯作者: 黄 凯, 教授, E-mail: hkai110@163.com

收稿日期: 2013-10-26, 收修改稿日期: 2013-12-26



传性状稳定等优点,是我国罗非鱼养殖中一个新的重  
要品系(李思发, 2001)。因此,本研究以吉富罗非鱼  
幼鱼为研究对象,探讨了  $V_E$ 、Se 以及二者的交互作  
用对吉富罗非鱼幼鱼生长及血清抗氧化酶活性的影  
响,为进一步优化吉富罗非鱼饲料营养素的搭配,增  
强罗非鱼机体的抗病力,扩大罗非鱼饲料的生产开  
发,以及预防营养性疾病,降低饲养成本,提供一定  
的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验用鱼及饲料制备

吉富罗非鱼由广西水产研究所提供 挑选平均初始

体质量为 $(0.37\pm 0.01)$  g, 平均初始体长为 $(2.40\pm 0.04)$  cm,  
健康、活力较强、规格均匀的吉富罗非鱼幼鱼作为实  
验对象。饲料以鱼粉和豆粕为蛋白源,大豆油为脂肪  
源,以亚硒酸钠( $Na_2SeO_3$ )为 Se 源。在基础饲料中分  
别添加 0 和 0.15 mg/kg 的 Se,每一 Se 水平下分别添  
加 0、30、60、90、120 mg/kg 的  $V_E$ ,共制成 10 种试  
验饲料。饲料制成直径为 2 mm 的颗粒,40℃烘箱中  
烘干后,放在密封的塑料袋中,于低温干燥处保存备  
用。基础饲料组成及营养水平见表 1,  $V_E$  和 Se 的  
设计添加量及饲料中的实际测量值见表 2。

### 1.2 实验设计

采用  $2\times 5$  双因子试验设计,在基础饲料中分别添

表 1 基础饲料组成及营养水平(干物质基础)  
Tab.1 Composition and nutrient levels of the basal diet(DM basis)

项目 Items	含量 Content (%)	项目 Items	含量 Content (%)
原料 Ingredients		复合矿物质(不含 Se) Mineral premix (no Se)	0.5
豆粕 Soybean meal	35.0	大豆磷脂 Soybean lecithin	0.2
米糠 Rice bran	12.0	胆碱 Choline (50%)	0.2
面粉 Flour	12.0	防霉剂 Antiseptic	0.1
小麦麸 Wheat bran	10.0	抗氧化剂 Antioxidant	0.1
花生仁粕 Peanut meal	10.0	粘合剂 Binder	0.1
菜籽粕 Canola meal	12.0	合计 Total	100.0
进口鱼粉 Imported fish meal	4.0	营养水平 Nutrient levels	
大豆油 Soybean oil	2.0	粗蛋白质 Crude protein	33.43
磷酸二氢钙 Monocalcium phosphate	0.8	粗脂肪 Crude lipid	7.62
食盐 Salt	0.5	粗灰分 Crude ash	7.29
复合维生素(不含 $V_E$ ) Vitamin premix (no $V_E$ )	0.5		

注:每克复合维生素(不含维生素 E):维生素 A 2500 IU;维生素  $D_3$  1200 IU;维生素  $K_3$  60 IU;叶酸 5 mg;维生素  $B_1$  10 mg;维生素  $B_2$  10 mg;维生素  $B_6$  20 mg;维生素  $B_{12}$  0.15 mg;烟酸 40 mg;泛酸钙 20 mg;肌醇 150 mg;生物素 0.2 mg;维生素 C 150 mg

每 100 克无机盐混合物(不含硒):硫酸镁 3.0 g;氯化钾 0.7 g;碘化钾 0.015 g;硫酸锌 0.14 g;氯化铜 0.05 g;硫酸锰 0.03 g;氯化钴 0.005 g;硫酸亚铁 0.15 g;磷酸二氢钾 45.0 g;氯化钙 28.0 g

Note: Vitamin premix per gram (not including  $V_E$ ): vitamin A 2500 IU; vitamin  $D_3$  1200 IU; vitamin  $K_3$  60 IU; folic acid 5 mg; thiamin 10 mg; riboflavin 10 mg; pyridoxine 20 mg; vitamin  $B_{12}$  0.15 mg; nicotinic acid 40 mg; Ca-pantothenate 20 mg; inositol 150 mg; biotin 0.2 mg; ascorbic acid 150 mg

Mineral premix per 100 gram (not including Se):  $MgSO_4\cdot 7H_2O$  3.0 g; KCl 0.7 g; KI 0.015 g;  $ZnSO_4\cdot 7H_2O$  0.14 g;  $CuCl_2$  0.05 g;  $MnSO_4\cdot 4H_2O$  0.03 g;  $CoCl_2\cdot 6H_2O$  0.005 g;  $FeSO_4\cdot 7H_2O$  0.15 g;  $KH_2PO_4\cdot H_2O$  45.0 g;  $CaCl_2$  28.0 g

表 2 饲料中  $V_E$  和 Se 的添加量及实际测量值  
Tab.2 The addition amount and the measured values of  $V_E$  and Se

项目 Items	试验组 Group									
	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>4</sub>	A <sub>5</sub>	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	B <sub>4</sub>	B <sub>5</sub>
$V_E$ 添加量 $V_E$ addition level(mg/kg)	0	30	60	90	120	0	30	60	90	120
$V_E$ 的实测值 Measured values of $V_E$ (mg/kg)	30.91	56.22	85.73	117.36	143.98	30.58	56.20	85.25	117.86	143.40
Se 的实测值 Measured values of Se(mg/kg)	0.27	0.25	0.29	0.26	0.24	0.41	0.40	0.41	0.42	0.43

加 0 和 0.15 mg/kg 的 Se, 每一 Se 水平下分别添加 0、30、60、90、120 mg/kg 的  $V_E$ , 共制成 10 种试验饲料  $A_1(0, 0)$ 、 $A_2(0, 30)$ 、 $A_3(0, 60)$ 、 $A_4(0, 90)$ 、 $A_5(0, 120)$ 、 $B_1(0.15, 0)$ 、 $B_2(0.15, 30)$ 、 $B_3(0.15, 60)$ 、 $B_4(0.15, 90)$ 、 $B_5(0.15, 120)$  共 10 组, 每组设 3 个重复, 每个重复 50 尾鱼, 随机分配到 30 个规格为 100 cm×60 cm×60 cm 的水泥池中进行饲养实验。实验时间从 2011 年 6 月 10 日–8 月 19 日, 为期 70 d。每天分别在 09:00 和 17:00 各饱食投喂一次, 投食在 1 h 内吃完为基准。投喂 1 h 后, 若池内有残饵, 则结束投喂并捞出残饵, 记录每次残饵量与每天余料。实验用水为曝晒去氯后的自来水, 每天 08:00 换水 1/3 并记录水温。饲养期间平均水温(26.5±1.5)°C, pH(7.1±0.1), DO(6.0–8.0) mg/L,  $NH_4^+-N(0.03±0.01)$  mg/L。

### 1.3 样品采集和指标测定

试验结束后, 使鱼空腹 24 h 称重。从每个水泥池中随机抽取鱼 15 尾, 逐尾称重、测体长后尾静脉抽血, 加肝素抗凝。用台式离心机离心 10 min (4000 r/min), 取上清液冷藏待用, 采用南京建成生物工程研究所试剂盒测定血清中 T-SOD、GSH-PX 和 CAT 活性。粗蛋白的测定采用半微量凯氏定氮法, 粗脂肪采用乙醚索氏抽提法测定, 粗灰分测定采用 550°C 马弗炉高温灼烧法、水分的测定用常压干燥法, 用 HPLC 法检测饲料中  $V_E$  的实际含量(王安群等, 2005), 用荧光分光光度法检测饲料中 Se 的实际含量(丁在亮等, 2011)。

### 1.4 数据分析与统计

各实验参数通过以下公式计算求得:

$$(1) RS = 100 \times N_f / N_i$$

$$(2) RWG = 100 \times (W_t - W_0) / W_0$$

$$(3) RSG = 100 \times (\ln W_t - \ln W_0) / t$$

$$(4) FC = 100 \times W_t / L_t^3$$

$$(5) RFC = I_d / (W_t - W_0)$$

式中,  $RS$  为存活率(%);  $N_f$  为终末尾数;  $N_i$  为初始尾数;  $RWG$  为相对增重率(%);  $W_t$  为终末体重(g);  $W_0$  为初始体重(g);  $RSG$  为特定生长率(%);  $t$  为饲养天数(d);  $FC$  为肥满度( $g/cm^3$ );  $L_t$  为终末体长(cm);  $RFC$  为饲料系数;  $I_d$  为摄入干物质的总量(g)。

采用 SPSS19.0 软件进行双因素方差分析、回归分析和 Duncan's 多重检验( $P < 0.05$ )即认为显著差异, 数据用平均数±标准差表示。

## 2 结果

### 2.1 吉富罗非鱼生长性能

由表 3 可知, 各组罗非鱼存活率均较高, 在 90% 以上, 统计分析差异不显著( $P > 0.05$ )。饲料中添加  $V_E$  和 Se 均可显著影响吉富罗非鱼的总摄食量( $P < 0.05$ )。饲料中不添加 Se 时, 各添加水平的  $V_E$  均可显著提高吉富罗非鱼的增重率、特定生长率( $P < 0.05$ )。当饲料中添加 0.15 mg/kg 的 Se 时,  $B_1$  组吉富罗非鱼的增重率、特定生长率、总摄食量、肥满度均高于  $A_1$  对照组, 但 Se 的添加对吉富罗非鱼的增重率、特定生长率的影响不显著( $P > 0.05$ )。方差分析结果显示,  $V_E$  和 Se 对罗非鱼增重率、特定生长率、肥满度和饲料系数的交互作用不显著( $P > 0.05$ ),  $V_E$  和 Se 对总摄食量的交互作用显著( $P < 0.05$ )。

由图 1 可知, 饲料中不添加 Se 时, 吉富罗非鱼的增长率随着  $V_E$  添加量的升高呈先升高后降低的趋势。二者的关系可用二次方程来拟合,  $Y = -0.6404x^2 + 86.098x + 6409.4$  ( $R^2 = 0.9662$ ), 当饲料  $V_E$  水平为 67.22 mg/kg 时, 增重率达最高峰, 峰值  $V_E$  水平 95% 置信范围为 63.86–70.58 mg/kg。

### 2.2 吉富罗非鱼的血清抗氧化酶活性

由表 4 可知, 当饲料中不添加 Se 时,  $V_E$  对 GSH-PX 和 CAT 活性有显著影响( $P < 0.05$ )。当饲料中添加 0.15 mg/kg Se 时, Se 显著影响吉富罗非鱼 T-SOD 和 GSH-PX 的活性( $P < 0.05$ ), 但对 CAT 影响不显著( $P > 0.05$ )。方差分析结果显示,  $V_E$  和 Se 对 T-SOD、CAT 活性不存在显著的交互作用( $P > 0.05$ ), 但对 GSH-PX 活性存在显著的交互作用( $P < 0.05$ )。

由图 2 可知, 饲料中不添加 Se 时, 吉富罗非鱼血清 T-SOD 和 CAT 活力随  $V_E$  的添加呈上升趋势。在  $V_E$  添加量范围 60–90 mg/kg, 添加 Se 试验组的 T-SOD、GSH-PX 和 CAT 活性较不添加 Se 的试验组有所上升。

## 3 讨论

### 3.1 $V_E$ 和 Se 对吉富罗非鱼生长的影响

$V_E$  是一种脂溶性维生素, 在机体各生理和生化过程中起非常重要的作用, 很多研究表明  $V_E$  可提高水产动物的生长性能(何敏等, 2009; Kocabas *et al*, 1999; Huang *et al*, 2004b)。任维美(1991)指出奥尼罗非鱼饲料中  $V_E$  最低需求量为 25 mg/kg, 业已测定的尼罗罗非鱼适宜添加量为 25–50 mg/kg。本研究中, 伺

表 3 饲料中添加  $V_E$  和 Se 对吉富罗非鱼幼鱼生长的影响(平均值 $\pm$ 标准差,  $n=3$ )Tab.3 Effects of diet supplemented with vitamin E and selenium on the growth of juvenile tilapia (*O. niloticus*)(mean $\pm$ SD,  $n=3$ )

试验组别 Group	饲料组(mg/kg) Dietary treatments		初体重 Initial body Weight (g)	相对增重率 RWG(%)	特定增长率 RSG(%)	存活率 RS (%)	总摄食量 $I_d$ (g)	饲料系数 RFC	肥满度 FC (g/cm <sup>3</sup> )
	Se 添加量 Se addition level	$V_E$ 添加量 $V_E$ addition level							
A <sub>1</sub>	0	0	0.37 $\pm$ 0.01	6392.48 $\pm$ 318.66 <sup>c</sup>	6.10 $\pm$ 0.28 <sup>d</sup>	92 $\pm$ 1.03	1672.47 $\pm$ 70.86 <sup>c</sup>	1.46 $\pm$ 0.03 <sup>abc</sup>	1.68 $\pm$ 0.08
A <sub>2</sub>	0	30	0.37 $\pm$ 0.01	8550.98 $\pm$ 277.13 <sup>ab</sup>	6.37 $\pm$ 0.10 <sup>abc</sup>	91 $\pm$ 1.07	1927.16 $\pm$ 44.75 <sup>a</sup>	1.36 $\pm$ 0.03 <sup>abcd</sup>	1.89 $\pm$ 0.10
A <sub>3</sub>	0	60	0.36 $\pm$ 0.01	8967.15 $\pm$ 373.78 <sup>a</sup>	6.43 $\pm$ 0.16 <sup>ab</sup>	93 $\pm$ 1.03	1952.60 $\pm$ 32.14 <sup>a</sup>	1.29 $\pm$ 0.06 <sup>cd</sup>	2.33 $\pm$ 0.16
A <sub>4</sub>	0	90	0.36 $\pm$ 0.01	9240.48 $\pm$ 328.57 <sup>a</sup>	6.48 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	93 $\pm$ 1.06	1959.91 $\pm$ 48.61 <sup>a</sup>	1.26 $\pm$ 0.06 <sup>d</sup>	2.25 $\pm$ 0.10
A <sub>5</sub>	0	120	0.36 $\pm$ 0.01	7436.19 $\pm$ 381.47 <sup>bc</sup>	6.17 $\pm$ 0.13 <sup>cd</sup>	93 $\pm$ 1.04	1788.87 $\pm$ 67.10 <sup>bc</sup>	1.47 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>	2.26 $\pm$ 0.09
B <sub>1</sub>	0.15	0	0.37 $\pm$ 0.01	7352.48 $\pm$ 209.25 <sup>bc</sup>	6.16 $\pm$ 0.10 <sup>cd</sup>	98 $\pm$ 1.02	1930.08 $\pm$ 35.48 <sup>a</sup>	1.45 $\pm$ 0.09 <sup>abc</sup>	2.29 $\pm$ 0.12
B <sub>2</sub>	0.15	30	0.37 $\pm$ 0.01	8127.13 $\pm$ 247.13 <sup>abc</sup>	6.30 $\pm$ 0.04 <sup>abcd</sup>	95 $\pm$ 1.01	1927.76 $\pm$ 6.60 <sup>a</sup>	1.34 $\pm$ 0.07 <sup>bcd</sup>	1.70 $\pm$ 0.17
B <sub>3</sub>	0.15	60	0.37 $\pm$ 0.01	7526.40 $\pm$ 304.98 <sup>bc</sup>	6.19 $\pm$ 0.14 <sup>cd</sup>	91 $\pm$ 1.01	1888.67 $\pm$ 44.96 <sup>ab</sup>	1.53 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	2.14 $\pm$ 0.13
B <sub>4</sub>	0.15	90	0.37 $\pm$ 0.01	8630.43 $\pm$ 389.52 <sup>ab</sup>	6.38 $\pm$ 0.13 <sup>abc</sup>	93 $\pm$ 1.09	1968.78 $\pm$ 15.05 <sup>a</sup>	1.34 $\pm$ 0.09 <sup>bcd</sup>	2.13 $\pm$ 0.16
B <sub>5</sub>	0.15	120	0.37 $\pm$ 0.01	7654.58 $\pm$ 199.46 <sup>bc</sup>	6.22 $\pm$ 0.04 <sup>bcd</sup>	91 $\pm$ 1.08	1948.03 $\pm$ 67.66 <sup>a</sup>	1.52 $\pm$ 0.08 <sup>ab</sup>	2.11 $\pm$ 0.12
主效应 Main effects				P 值 P-value	P 值 P-value	P 值 P-value	P 值 P-value	P 值 P-value	P 值 P-value
双因素方差分析(ANOVA)									
硒	Se			0.161	0.232	0.678	0.021	0.109	0.939
维生素 E	$V_E$			0.009	0.010	0.874	0.018	0.028	0.175
硒 $\times$ 维生素 E	Se $\times$ $V_E$			0.343	0.345	0.558	0.013	0.259	0.238

注：同列数据不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )，下同

Note: Different small alphabets in the same column represent significant difference level ( $P<0.05$ ), the same in the following tables.

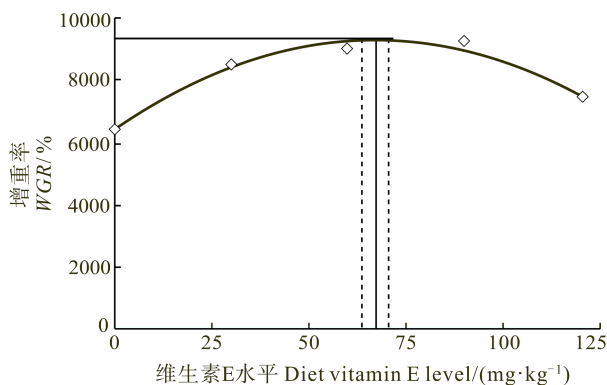
图 1 饲料不同  $V_E$  水平对吉富罗非鱼生长的影响

Fig.1 The effect of different diet vitamin E levels on the growth of tilapia

料  $V_E$  峰值水平为 67.22 mg/kg(95%置信范围为 63.86–70.58 mg/kg)时, 吉富罗非鱼生长最快, 这与朱钦龙(1994)的研究结果较为相似, 由此可见一定量的  $V_E$  对罗非鱼的生长性能有明显的促进作用。但本研究结论与 Huang 等(2004a)认为  $V_E$  对三文鱼生长的影响不大, Lim 等(2009)发现  $V_E$  对尼罗罗非鱼的增重、摄食

量及存活率均无显著差异的研究结果有差异, 可能由于实验方法、实验用鱼、规格、饲养周期、饲养管理的不同导致对  $V_E$  的需求不同。

Se 是大多数动物体所必需的微量元素, 已有大部分研究认为, 缺乏 Se 会导致鱼类的生长减缓, 充足的 Se 可促进生长(Gaber, 2008; Lin *et al*, 2005; 张琴等, 2011)。本研究在不添加  $V_E$  时, Se 的添加可一定程度提高吉富罗非鱼的增重率和特定增长率, 但 Se 与  $V_E$  联用, 没有明显促生长作用, 这与 Lorentzen 等(1994)对大西洋鲑的研究结果相似。原因可能是只有在  $V_E$  不足时, 尤其  $V_E$  缺乏时, Se 才能够补偿  $V_E$  的不足而发挥生物学效价, 增强鱼体的免疫力, 提高存活率及饲料转化率, 从而促进生长。随  $V_E$  添加量的增加, 额外再添加 Se 机体增重率下降, 原因可能是 Se 与  $V_E$  竞争受体活性靶位, 抑制了  $V_E$  的生物功能, 也可能是基础饲料中的硒已经能满足罗非鱼生长的需要, Se 是有毒元素, 额外添加 Se 阻碍了罗非鱼的快速生长。

目前, 有关  $V_E$  和 Se 二者同时添加尚未在罗非鱼

表 4 饲料中添加  $V_E$  和 Se 对吉富罗非鱼幼鱼血清抗氧化酶活性的影响(平均值±标准差,  $n=3$ )  
 Tab.4 Effects of diet supplemented with vitamin E and selenium on the antioxidant enzyme of juvenile tilapia (*O. niloticus*) (Mean±SD,  $n=3$ )

饲料组(mg/kg) Dietary treatments			T-SOD(U/ml)	GSH-PX(U/ml)	CAT(U/ml)
试验组别 Group	Se 添加量 Se addition level	$V_E$ 添加量 $V_E$ addition level			
A <sub>1</sub>	0	0	67.25±8.34 <sup>c</sup>	659.01±35.41 <sup>ab</sup>	10.25±1.40 <sup>c</sup>
A <sub>2</sub>	0	30	69.84±1.26 <sup>abc</sup>	564.49±45.07 <sup>cd</sup>	13.86±1.01 <sup>abc</sup>
A <sub>3</sub>	0	60	67.69±3.31 <sup>bc</sup>	576.37±18.34 <sup>bc</sup>	13.82±1.58 <sup>abc</sup>
A <sub>4</sub>	0	90	69.80±6.11 <sup>abc</sup>	417.16±16.14 <sup>c</sup>	13.84±1.53 <sup>abc</sup>
A <sub>5</sub>	0	120	73.49±3.77 <sup>abc</sup>	476.30±13.47 <sup>de</sup>	18.75±1.10 <sup>ab</sup>
B <sub>1</sub>	0.15	0	74.74±1.87 <sup>ab</sup>	650.56±25.38 <sup>abc</sup>	11.82±1.16 <sup>bc</sup>
B <sub>2</sub>	0.15	30	76.96±2.50 <sup>a</sup>	640.53±28.47 <sup>abc</sup>	9.76±0.98 <sup>c</sup>
B <sub>3</sub>	0.15	60	73.83±1.89 <sup>abc</sup>	577.19±28.91 <sup>bc</sup>	15.66±1.08 <sup>abc</sup>
B <sub>4</sub>	0.15	90	74.30±2.62 <sup>abc</sup>	593.00±14.21 <sup>bc</sup>	16.41±1.54 <sup>abc</sup>
B <sub>5</sub>	0.15	120	68.97±4.79 <sup>bc</sup>	696.24±25.89 <sup>a</sup>	21.38±1.05 <sup>a</sup>
主效应 Main effects			P 值 P-value	P 值 P-value	P 值 P-value
双因素方差分析(ANOVA)					
硒	Se		0.014	0.000	0.608
维生素 E	$V_E$		0.812	0.002	0.021
硒×维生素 E	Se× $V_E$		0.118	0.003	0.678

饲料中有应用效果。本研究结果显示,  $V_E$  和 Se 对吉富罗非鱼的生长无协同促进作用, 这与张琴等(2011)发现  $V_E$  和硒酵母对刺参生长有显著地协同促进作用的研究结果有差异, 可能由于实验对象不同, 饲料添加的外源硒不同, 机体的消化吸收不同, 从而对生长的影响也不同。

### 3.2 $V_E$ 和 Se 对吉富罗非鱼血清抗氧化酶活性的影响

在动物机体内, 氧化应激是经常发生的一种应激反应, 是动物体内氧化-抗氧化系统动态平衡失调, 产生大量氧自由基, 使机体处于过氧化状态, 从而导致脂质过氧化等一系列的损伤。本研究的 GSH-PX、CAT 和 T-SOD 在清除自由基的过程中发挥重要作用。T-SOD 和 CAT 分别作用于  $O_2^-$  和  $H_2O_2$ , GSH-PX 主要清除  $H_2O_2$  和脂质过氧化物(Fang *et al.*, 2002)。

本研究中, 不添加 Se 时, 添加  $V_E$  能显著提高 GSH-PX 和 CAT 活性,  $V_E$  的添加可使 T-SOD 活性有上升的趋势, 但随  $V_E$  添加量的增加, T-SOD 活性无显著差异。说明一定量  $V_E$  表现出抗氧化作用, 这与凡纳滨对虾(Liu *et al.*, 2007)、黑鲟(朱勇飞等, 2009) 和皱纹盘鲍(万敏等, 2004)的研究结果相似。当添加

0.15 mg/kg Se 时, 在  $V_E$  添加量范围 60–90 mg/kg, 从 GSH-PX, CAT 和 T-SOD 活性随饲料中 Se 的添加有上升的情况来看, 添加 0.15 mg/kg 的 Se 有提高抗氧化能力而降低氧化胁迫的趋势。在其他的一些研究中也发现 Se 具有抗氧化作用(赵宏等, 2008; 万敏等, 2004), 这主要取决于机体的生理状态及氧化应激形式。由于 Se 是有毒元素, 因此过量 Se 沉积对水产动物造成的潜在氧化胁迫机理值得进一步研究。

Se 与  $V_E$  的协同抗氧化作用是通过 GSH-PX 在细胞内对自由基的清除作用实现的。本研究结果显示,  $V_E$  和 Se 二者合用对 GSH-PX 活性存在显著的交互作用, 这与胡俊茹等(2010)和万敏等(2004)的研究结果一致。在相同  $V_E$  水平下( $V_E$  添加水平为 0 mg/kg 除外), 加入 Se 试验组的 GSH-PX 活性高于不加 Se 的试验组, 原因可能是  $V_E$  和 Se 发挥协同作用, 共同提高 GSH-PX 活性, 从而提高机体抗氧化能力。而不添加 Se、 $V_E$  的 A<sub>1</sub> 对照组 GSH-PX 活性较高的原因可能是饲料中未添加  $V_E$  和 Se, 机体氧化应激反应使氧自由基大量产生, 刺激了体内的自由基清除系统, 一定程度上激活了机体的抗氧化酶系统功能。CAT 也是重要的抗氧化酶之一, 与 CAT 相比, 哺乳动物

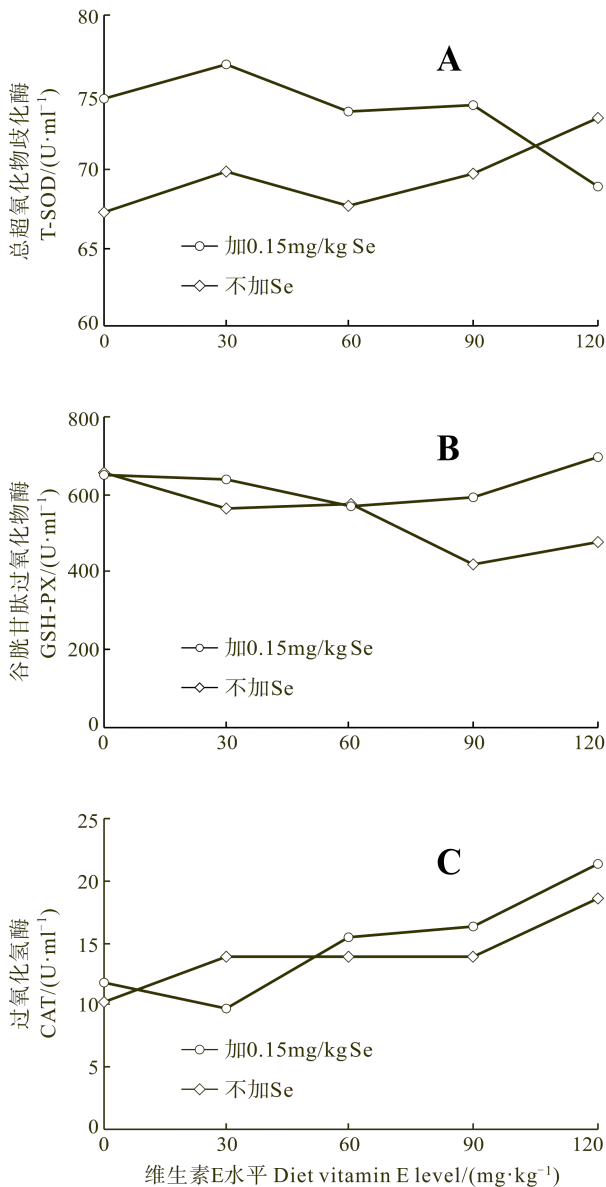


图2  $V_E$  和 Se 对吉富罗非鱼血清 T-SOD、GSH-PX、CAT 的影响

Fig.2 Effect of different vitamin E and selenium levels on the T-SOD, GSH-PX, and CAT in the serum of tilapia

体内的 GSH-PX 对  $H_2O_2$  更具亲和力(Avanzo *et al*, 2001; Reddy *et al*, 1998), 也就是说动物体内主要是 GSH-PX 完成清除  $H_2O_2$ 。本研究中, 不添加 Se, GSH-PX 活性随  $V_E$  的添加量的增加呈下降趋势时, CAT 活性呈上升趋势, 这与万敏等(2004)的研究结果一致, 说明当饲料中 Se 含量低而使得 GSH-PX 活性降低时, CAT 活性就会上升以弥补 GSH-PX 活性的下降, 证实了 GSH-PX 对  $H_2O_2$  更具亲和力这个结论。此外, 本研究还发现  $V_E$  和 Se 对 T-SOD 活性没有显著的交互作用, 这与万敏等(2004)在皱纹盘鲍上的研究结果基本一致。在  $V_E$  添加量为 0 mg/kg 时, 添加 0.15 mg/kg

的 Se 能显著提高 T-SOD 活性, 但随  $V_E$  添加量的增加, T-SOD 活性变化不显著, 可能是  $V_E$  与 Se 协同发挥生物功能, 保持了 T-SOD 活性的稳定。由此可见, 尽管  $V_E$  和 Se 对 T-SOD 活性的交互作用没有达到统计学上的显著性, 但表观数据显示存在潜在的交互作用。为了更好的揭示这种交互作用, 在今后的研究中应该增加饲料中  $V_E$  和 Se 的添加梯度。基于吉富罗非鱼抗氧化系统有别与其他物种, 对以上研究结果的异同, 今后还需要从通过营养因子的改变来调节相关基因的表达和免疫调控机理等方面入手, 进行更深入和全面的研究探讨。

## 参 考 文 献

- 丁在亮, 曾明华, 张莉, 等. 原子荧光分光光度法测定饲料中硒方法的研究. 现代农业科技, 2011, (13): 32-33
- 万敏, 麦康森, 马洪明, 等. 硒和维生素 E 对皱纹盘鲍血清抗氧化酶活力的影响. 水生生物学报, 2004, 28(5): 496-503
- 王安群, 邓益群, 彭凤仙. HPLC 法测定饲料中维生素 A、维生素  $D_3$  和维生素 E. 环境监测管理与技术, 2005, 17(2): 33-34
- 朱勇飞, 吴天星, 张晓东. 饲料维生素 E 水平对黑鲟抗氧化能力和鱼肉货架期的影响. 水生态学杂志, 2009, 2(3): 131-135
- 朱钦龙. 罗非鱼对维生素 E 的需要量. 饲料博览, 1994, 40-42(2): 42
- 李思发. 吉富品系尼罗罗非鱼引进史. 中国水产, 2001, (10): 52-53
- 任维美. 澳大利亚罗非鱼的维生素 E 和脂类需要量. 饲料研究, 1991, (12): 10
- 何敏, 汪开毓, 张宇, 等. 维生素 E 对斑点叉尾鲟生长性能和消化酶活性的影响. 水产学报, 2009, 33(2): 288-294
- 张琴, 麦康森, 张文兵, 等. 饲料中添加硒酵母和维生素 E 对刺参生长、免疫力及抗病力的影响. 动物营养学报, 2011, 23(10): 1745-1755
- 赵宏, 王宇. 维生素 E 和硒对大鼠血清中抗氧化酶活性的影响. 青海医学院学报, 2008, 29(3): 197-199
- 胡俊茹, 王安利, 曹俊明. 维生素 E 和硒互作对凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 抗氧化系统的调节作用. 海洋与湖沼, 2010, 41(1): 68-74
- 常青, 梁萌青, 关长涛, 等. 硒和维生素 E 对牙鲆生长和非特异性免疫力的影响. 渔业科学进展, 2010, 31(5): 91-96
- Avanzo JL, de Mendonça Jr CX, Pugine SMP, *et al*. Effect of vitamin E and selenium on resistance to oxidative stress in chicken superficial pectoralis muscle. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 2001, 129(2): 163-173
- Burk RF, Hill KE, Nakayama A, *et al*. Selenium deficiency activates mouse liver Nrf2-ARE but vitamin E deficiency does not. Free Radical Biology and Medicine, 2008, 44(8): 1617-1623

- Dandapat J, Chainy GB, Janardhana Rao K. Dietary vitamin E modulates antioxidant defence system in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 2000, 127(1): 101–115
- Fang YZ, Yang S, Wu GY. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 2002, 18: 872–879
- Gaber MM. Efficiency of selenium ion inclusion into common carp (*Cyprinus carpio* L.) diets. *African Journal of Agricultural Research*, 2009, 4(4): 348–353
- Huang CH, Higgs DA, Balfry SK, *et al.* Effect of dietary vitamin E level on growth, tissue lipid peroxidation, and erythrocyte fragility of transgenic coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 2004a, 139(2): 199–204
- Huang CH, Huang SL. Effect of dietary vitamin E on growth, tissue lipid peroxidation, and liver glutathione level of juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*, fed oxidized oil. *Aquaculture*, 2004b, 237(1): 381–389
- Kocabas AM, Gatlin DM. Dietary vitamin E requirement of hybrid striped bass (*Morone chrysops* female × *M. saxatilis* male). *Aquaculture Nutrition*, 1999, 5(1): 3–8
- Lim C, Yildirim-Aksoy M, Li MH, *et al.* Influence of dietary levels of lipid and vitamin E on growth and resistance of Nile tilapia to *Streptococcus iniae* challenge. *Aquaculture*, 2009(1), 298: 76–82
- Lin YH, Shiau SY. Dietary selenium requirements of juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Aquaculture*, 2005, 250(1): 356–363
- Liu Y, Wang WN, Wang AL, *et al.* Effects of dietary vitamin E supplementation on antioxidant enzyme activities in *Litopenaeus vannamei* exposed to acute salinity changes. *Aquaculture*, 2007, 265(1): 351–358
- Lorentzen M, Maage A, Julshamn K. Effects of dietary selenite or selenomethionine on tissue selenium levels of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 1994, 121(4): 359–367
- Reddy KV, Kumar TC, Prasad M, *et al.* Pulmonary lipid peroxidation and antioxidant defenses during exhaustive physical exercise: the role of vitamin E and selenium. *Nutrition*, 1998, 14(5): 448–451
- Salte R, Åsgård T, Liestøl K. Vitamin E and selenium prophylaxis against “Hitra disease” in farmed Atlantic salmon—a survival study. *Aquaculture*, 1988, 75(1): 45–55
- Thorarinsson R, Landolt ML, Elliott DG, *et al.* Effect of dietary vitamin E and selenium on growth, survival and the prevalence of *Renibacterium salmoninarum* infection in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture*, 1994, 121(4): 343–358
- Wang YB, Han JZ, Li WF, *et al.* Effect of different selenium source on growth performances, glutathione peroxidase activities, muscle composition and selenium concentration of allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). *Animal Feed Science and Technology*, 2007, 134(3): 243–251
- Yakaryilmaz F, Guliter S, Savas B, *et al.* Effects of Vitamin E treatment on peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  expression and insulin resistance in patients with non-alcoholic steatohepatitis: results of a pilot study. *Internal Medicine Journal*, 2007, 37(4): 229–235

(编辑 刘丛力)

## Effects of Dietary Vitamin E and Selenium on the Growth and the Antioxidant Enzyme Activity in Serum of Juvenile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

QIN Xi<sup>1</sup>, HUANG Kai<sup>1</sup>, LIU Kang<sup>1</sup>, JIANG Huanchao<sup>2</sup>, CHENG Yuan<sup>1</sup>,  
HUANG Qing<sup>1</sup>, HUANG Xiuyun<sup>1</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004;  
2. Guangdong Yuehai Feed Group Co. Ltd, Zhanjiang 524001)

**Abstract** In this study we investigated the effects of dietary vitamin E and selenium on the growth and the antioxidant enzyme activities in serum of juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*). A total of 1500 tilapias with an average initial body weight of (0.37±0.01) g were fed for 70 days with 10 different practical diets according to a 2×5 factorial design: selenium was added into a basal diet at two concentrations (0 and 0.15 mg/kg) to form two types of diets; in each type vitamin E was added at 0, 30, 60,

90 or 120 mg/kg separately to form 5 groups; there were 10 groups in total; there were 3 replicates per group with 50 tilapias; the basal diet without selenium or vitamin E served as the control. The results showed that dietary vitamin E had significant influence on the weight gain, the specific growth rate, feed intake, and the feed conversion ratio ( $P < 0.05$ ). According to the growth performance, the optimal level of vitamin E in the diet could be 63.86–70.58 mg/kg. Dietary selenium had no significant influence on the weight gain and the specific growth rate ( $P > 0.05$ ), but the weight gain was higher than the control group when the diet was supplemented with 0.15 mg/kg selenium and 0 mg/kg vitamin E. Dietary vitamin E and selenium had no significant influence on the growth performance ( $P > 0.05$ ). Dietary vitamin E significantly influenced the activities of glutathione peroxidase (GSH-PX) and catalase (CAT) ( $P < 0.05$ ). The activities of total superoxide dismutase (T-SOD) and CAT also appeared to increase along with the elevation of the vitamin E level. Selenium had significant influence on the activities of GSH-PX and T-SOD ( $P < 0.05$ ). When the added vitamin E was between 60 and 90 mg/kg, the groups with 0.15 mg/kg selenium show an increase in the activities of T-SOD, GSH-PX and CAT compared to the groups without selenium. Dietary vitamin E and selenium had significant interactive effect on the activity of GSH-PX ( $P < 0.05$ ). In conclusion vitamin E or selenium alone could improve the growth performance and the anti-oxidation activity in tilapias; the combination of the two may not further enhance the growth performance but could increase the anti-oxidation activity to a greater extent.

**Key words** *Oreochromis niloticus*; Vitamin E; Selenium; Growth; Antioxidant enzyme activity

---

## 关于 DOI

DOI, 即 Digital Object Identifier(数字对象标识符)的缩写, 是全球唯一的数字对象标识名称, 一个 DOI 名称一旦赋予给一条电子资源就不会再更改, 而成为该资源的永久性的一部分。无论在任何地方, 用户都可以链接到 DOI 的相应内容。

### DOI 解析示例:

已知 DOI 为: 10.11758/yykxjz.20140101, 可以通过多种解析方式链接到论文: 在浏览器中直接解析: <http://dx.doi.org/10.11758/yykxjz.20140101>; 在中文 DOI 网站(<http://www.chinadoi.cn/>)或国际 DOI 基金会网站(<http://www.doi.org/>)解析。

### DOI 的作用:

DOI 指向到原始文献 DOI 具有唯一性, 保证了在网络环境下对数字化对象的准确提取。通过 DOI 检索, 可以快速定位到原始的目标文献。

实现文献数据库的对接 许多二次文献数据库都通过 DOI 技术建立了引文与全文的链接, 使用者即可直接点击链接到目标文献的全文。

追踪“参考文献”的全文资源 中文 DOI 系统帮助用户实现了从相关文献或参考文献向全文数据库的链接, 简单快捷的追踪到文章的相应内容。

# 生物絮团对水质的调控作用及仿刺参 (*Apostichopus japonicus*)幼参生长的影响\*



李 斌 张秀珍 马元庆 王 斌 宋向军 刘义豪 刘爱英 白艳艳  
靳 洋 任利华 孙玉增 邢红艳 王忠全 宋秀凯

(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** 采用模拟实验与现场实验相结合的方法,通过添加 3 种微生物制剂及碳水化合物作为碳源,研究了其在生物絮团形成与水质调节中的作用,并分析了其对水中无机氮含量、悬浮物、细菌总数及幼参生长的影响,为阐明生物絮团在刺参工厂化苗种培育中的生态环境调控作用提供依据。结果表明,亚硝态氮易于在培育池水体中累积,可高达 0.25 mg/L;添加芽孢杆菌后,水中总悬浮物含量和细菌总数均为最高值,且未检测到弧菌和大肠菌群;第 20 天,仅添加蔗糖组幼参增重与特定生长率均明显高于其他复合碳源组和对照组( $P < 0.05$ ),分别为 44.34 g 和 2.19%/d;而添加蔗糖和芽孢杆菌组增重与特定生长率均明显高于其他处理组和对照组( $P < 0.05$ ),分别为 66.60 g 和 3.01%/d;复合碳源组幼参增重与特定生长率随着玉米淀粉含量增加而逐渐降低,但与对照差异均不显著( $P > 0.05$ )。结果显示,以蔗糖为碳源,添加芽孢杆菌形成的生物絮团不仅可以改善水体水质和微生态结构,还可以明显促进幼参的生长。

**关键词** 生物絮团;水质;调控作用;仿刺参;生长

中图分类号 S963 文献标识码 A 文章编号 1000-7075(2014)04-0085-06

近年来,仿刺参(*Apostichopus japonicus* Selenka)苗种工厂化培育得到了快速推广,大大促进了刺参产业发展。但这种高密度集约化养殖方式在产量大幅提高的同时也带来了一些负面影响,如养殖排放水中无机氮负荷过大,易造成水质恶化、病害流行等(姜红等,2000;李成林等,2010)。生物絮团技术(Biofloc technology, BFT)是一种新兴的改善养殖水体水质的生态养殖技术(Avnimelech, 2006),融合了高效和环境友好理念,在降低养殖成本和减轻养殖污染等方面具有明显优势。BFT 是指在可控条件下,将异养细菌和微藻共同培养形成不规则的絮团状微生物聚集体,

具有净化水质和为养殖动物提供饵料等作用(Avnimelech, 2012),在集约化水产养殖业中具有广泛的应用前景。近几年来,国内对生物絮团也开展了一些研究(张许光等,2013;胡修贵等,2013),在刺参苗种培育中对幼参生长、成活等方面的研究还极少(李爽等,2011),尤其是生物絮团的形成条件、水质调控效果以及对幼参生理和免疫的影响研究还鲜见报道。本文研究了生物絮团形成中菌群调控及其对水中无机氮含量、微生物数量及仿刺参幼参生长等的影响,为阐明生物絮团在工厂化刺参苗种培育中的生态环境调控作用提供依据。

\*山东省农业重大应用技术创新项目(2011-2013)、海洋公益性行业科研专项(201305005)、海洋经济创新发展区域示范项目(20130125)和水生动物营养与饲料“泰山学者”岗位项目(2007-2012)共同资助。李 斌, E-mail: albert0722@163.com

通讯作者: 张秀珍, 研究员, E-mail: zxz0535501@126.com

收稿日期: 2013-08-06, 收修改稿日期: 2013-09-25



## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料和试剂

刺参幼参由山东省海洋与渔业厅黄河三角洲海洋渔业科研推广中心提供,平均体重(0.9±0.4) g/头,实验于2012年7-8月在该中心进行。

试剂:实验用碳源(蔗糖和玉米淀粉)购自烟台家家悦超市;光合细菌(沼泽红假单胞菌 *Rhodospseudomonas palustris*,  $10^{11}$  CFU/ml)、海洋红酵母(*Rhodotarla benthica*,  $1.2 \times 10^{10}$  CFU/ml)和复合芽孢杆菌(枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*、地衣芽孢杆菌 *Bacillus licheniformis*,  $3 \times 10^9$  CFU/g)分别购自广东广州利健药业有限公司、大连蛟龙水产饲料开发中心和烟台大乐饲料有限公司。

### 1.2 实验设计

培育水体不同环境水质背景值分析。选择近岸自然海水(WH)、沉淀池水(CD)和培育池水(YZ1和YZ2,换水后24 h取样)共4组,取水样测定其pH和无机氮指标。

模拟试验,分析不同微生态制剂调节水质及形成絮团的作用。采用300 L塑料水槽进行微生态制剂调控水质和生物絮团形成实验,水体体积为250 L。开始时加入蔗糖和氯化铵溶液,使水体蔗糖与氮元素终浓度分别为3.43、0.2 mg/L(C/N值为20);添加3种微生态制剂(光合细菌、海洋红酵母和复合芽孢杆菌,分别记作Gh、Jm、Yb),使实验槽的终浓度达到 $10^4$  CFU/ml,持续充气。对照组(ctr)不添加蔗糖。分别在2、48、96、144、192 h取水样测定pH、无机氮,96、192 h时取样测定总悬浮物,192 h时测定细菌总数。

分析生物絮团对幼参培育池水体水质的调节作用。采用300 L塑料水槽进行刺参苗种培育试验。处理组(T)添加蔗糖(按4.0 mg/L的量添加)和芽孢杆菌(终浓度达到 $10^4$  CFU/ml)制备生物絮团,每两天添加1次;不添加碳源和芽孢杆菌的为对照组(B1)。每组设3个平行,每槽投放幼参(143.9±6.9) g。水体体积为250 L,整个实验期间盐度为30-32,持续充气。每天09:00、16:00按照幼参体重的2%和3%投喂配合饲料。研究进行7 d,分别在第1、3、5、7天取水样测定pH、无机氮。

分析生物絮团对幼参生长的影响。采用300 L塑料水槽进行生物絮团制备和刺参苗种培育试验。以蔗糖和玉米淀粉为基础成分,配制不同组成(蔗糖:玉米淀粉,10:0、6.7:3.3、5:5、3.3:6.7共4种,分别

记作Zt、6.7:3.3、5:5、3.3:6.7)的碳源;添加芽孢杆菌组(YB,以蔗糖为碳源)实验槽的终浓度达到 $10^4$  CFU/ml;每4 d抽底换水1次,每次换水量为1/2;每次换水后等量补充碳源或芽孢杆菌,碳源按4.0 mg/L的量进行添加。不添加碳源和芽孢杆菌的为对照组(ctr),每2 d全量换水1次。每组设3个平行,每槽投放幼参(80.5±0.2) g;水体体积为250 L,整个实验期间水温为18.2-21.9℃,盐度为30-32,持续充气。每天09:00、16:00按照幼参体重的2%和3%投喂配合饲料。第20天时,收集幼参并称重,计算其增重(g)和特定生长率(SGR,%/d)。

### 1.3 样品采集与测定

海水样品的采集、分析方法均参照《海洋监测规范》(GB17378-2007)进行。pH、无机氮、总悬浮物、细菌总数、大肠菌群和弧菌数量分别采用pH计法、分光光度法、重量法、平板计数法、发酵法和平板计数法。总悬浮物、细菌总数用以表征生物絮团的形成与状态,大肠菌群和弧菌数量用于指示水体中有害菌的数量。

### 1.4 数据处理

采用SPSS 17.0软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA),采用Duncan多重比较进行差异显著性分析, $P < 0.05$ 视为具有显著性差异,用小写字母或星号进行标注。特定生长率(SGR)计算公式为:

$$SGR(\%/d) = (\ln W_2 - \ln W_1) \times 100\%/t$$

式中, $W_1$ 、 $W_2$ 分别代表实验开始和结束时幼参的总重量(g), $t$ 代表实验进行的时间(d)。

## 2 结果与分析

### 2.1 培育水体不同环境水质pH和无机氮含量

对幼参育苗场不同地点水体pH分析结果表明,近岸自然海水pH值(8.06)经沉淀池(8.42)沉淀后明显升高,而通过换水进入幼参培育池24 h后则又降至8.0左右( $P < 0.05$ )(图1)。各采样点水体pH值均符合渔业水质标准。

对育苗场水体无机氮含量分析表明,近岸海水氨氮(0.0745 mg/L)经沉淀池(0.0258 mg/L)沉淀后明显降低,而进入幼参培育池后又随之显著升高( $P < 0.05$ );亚硝氮的变化趋势与氨氮类似,沉淀池中的亚硝态氮浓度(0.0151 mg/L)比近岸海水(0.0896 mg/L)降低了80%以上,而培育池换水后24 h水体中的亚硝态氮含量迅速升高至0.14-0.25 mg/L,其累积速率明显大于

氨氮(图2)。研究表明,在幼参苗种培育过程中,亚硝态氮易于在水中累积,应注意进行水质调节。

渔业水质标准要求,且处理组在 4 d 内较为稳定。

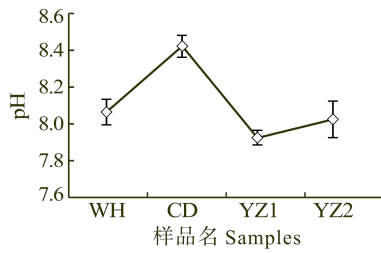


图 1 不同采样点水质 pH 值  
Fig.1 pH of water at different sites

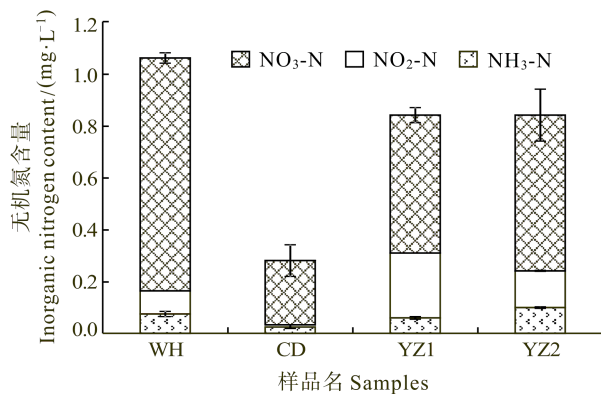


图 2 不同采样点水质无机氮含量  
Fig.2 Content of inorganic nitrogen in water at different sites

### 2.2 添加蔗糖和微生物剂对水质的调控作用

处理组水体 pH 值均呈先降低后升高的趋势,然后趋于稳定。对照组 Ctr 的 pH 值变化范围为 8.1–8.2,变化不大(图 3);96 h 内,3 个处理组 pH 值均呈逐渐降低趋势,但变化均不明显( $P > 0.05$ );第 144 小时,各组均明显升高至 8.4 以上( $P < 0.05$ ),第 192 小时时也均维持在同一水平。实验期间,各组 pH 值均符合

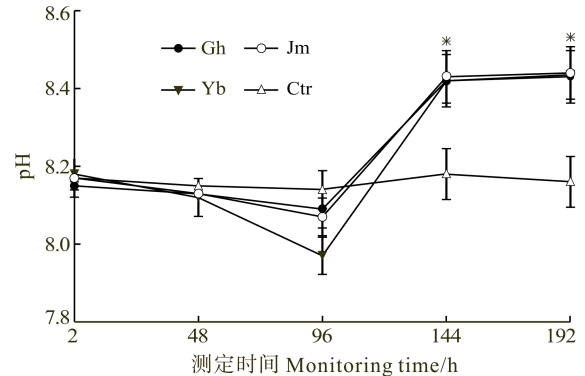


图 3 水质 pH 值随时间的变化  
Fig.3 Time-course of pH value of water at different sites

水体中的氨氮含量分析表明,48 h 时,Yb 组和 Jm 组的氨氮即明显降至 0.15 mg/L 以下,且 Yb 组为最低值(0.1414 mg/L),而 Gh 组和对照 Ctr 组则降低不明显(表 1);96 h 时,3 个处理组氨氮浓度均明显低于 Ctr 组( $P < 0.05$ );192 h 时,氨氮均又有所升高,但与第 144 小时相比变化并不显著( $P > 0.05$ )。4 d 内芽孢杆菌对氨氮的去除效果优于光合细菌,与海洋红酵母相当。亚硝态氮变化趋势显示,总体均呈逐渐升高的趋势。Gh 组从 96 h 开始逐渐升高,Jm 组在 144 h 后升高显著,而 Yb 组第 48 h 时明显降低至 0.01 mg/L,之后逐渐升高;第 192 小时时 3 组均升至最高值,但均明显低于对照( $P < 0.05$ )。芽孢杆菌组亚硝态氮的累积总体上比其他组慢。

### 2.3 添加蔗糖和微生物制剂在絮团形成中的作用

3 种微生物制剂对水体中总悬浮物含量的影响也存在差异。第 96 小时,3 个处理组水体中总悬浮物含

表 1 水质氨氮和亚硝态氮含量随时间的变化

Tab.1 Variation of ammonia and nitrite nitrogen versus time in water at different sites

无机氮含量 Inorganic nitrogen (mg/L)	组名 Group	测定时间 Monitoring time(h)				
		2	48	96	144	192
NH <sub>3</sub> -N	Gh	0.174	0.158	0.058	0.071	0.072
	Jm	0.173	0.144	0.051	0.046	0.069
	Yb	0.184	0.141	0.055	0.077	0.093
	Ctr	0.169	0.160	0.137	0.114	0.119
NO <sub>2</sub> -N	Gh	0.010	0.010	0.014	0.018	0.023
	Jm	0.007	0.009	0.008	0.016	0.019
	Yb	0.014	0.010	0.019	0.022	0.027
	Ctr	0.012	0.010	0.019	0.029	0.034

量由低到高为 Gh < Jm < Yb, 但 Gh 组与对照 Ctr 差异不显著( $P > 0.05$ )。第 192 小时个处理组均明显高于对照, Gh 组和 Jm 组差异不显著, 总悬浮物含量为 0.13 g/L 左右; 而 Yb 组最高( $P < 0.05$ ), 达 0.15 g/L 以上(图 4)。结果表明, 在水体中添加芽孢杆菌和碳源后总悬浮物含量升高, 添加芽孢杆菌 96 h 时即可形成一定量的生物絮团。

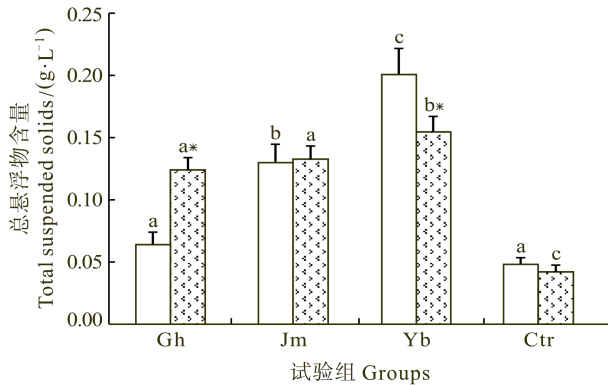


图 4 3 种微生态制剂对水体中的总悬浮物含量的影响

Fig.4 Effects of three probiotics on the content of total suspended solid in water

字母表示同一时间不同组间差异显著性, 星号表示同一组间不同时间的差异显著性

Letters indicate significances among different groups in the same period. Asterisks indicate significances among different sampling periods in the same group

3 种微生态制剂对水体中细菌总数的影响与总悬浮物含量的相似。Gh 组和 Jm 组细菌总数均为  $1.6 \times 10^4$  CFU/ml 左右, 与对照 Ctr 组差异均不显著( $P > 0.05$ ), 在 Gh 和 Ctr 组中还检测到大量的大肠菌群和弧菌; 而 Yb 组则明显高于其他两组和 Ctr 组( $P < 0.05$ ), 达到  $2.15 \times 10^4$  CFU/ml 以上(图 5), 且未检测到弧菌和大肠菌群。结果表明, 在水体中添加芽孢杆菌和碳源后,

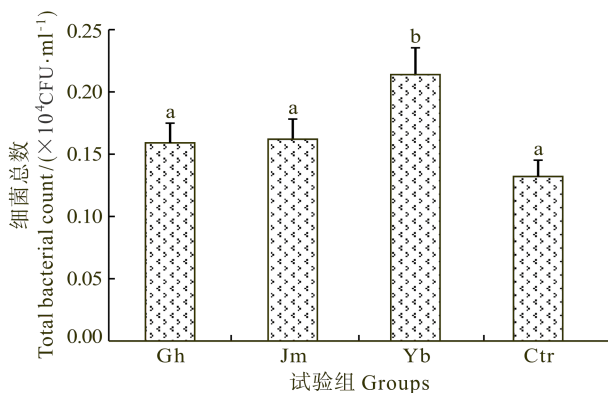


图 5 3 种微生态制剂对水体中的细菌总数的影响

Fig.5 Effects of three probiotics on the total bacterial count in water

有助于细菌总数升高和抑制有害菌的繁殖, 芽孢杆菌可能有助于改善生物絮团群落结构组成。

## 2.4 生物絮团系统中幼参培育池水质的变化

以蔗糖为碳源, 添加芽孢杆菌形成的生物絮团对幼参培育池中的水体水质具有明显的净化作用。两组 pH 均在 8.11–8.24 范围内, 差异不大。对水体氨氮和亚硝态氮连续监测结果表明, 处理组(T)与对照组(BI)氨氮均呈先升高后降低的趋势, 实验期间 T 组氨氮均低于 BI, 尤其 3 d 后差异显著( $P < 0.05$ ); 5 d 后, T 组水中氨氮含量均在 0.01 mg/L 以下。BI 组亚硝态氮浓度随时间呈升高趋势, 而 T 组呈波动性变化, 3 d 后 T 组显著低于 BI 组( $P < 0.05$ )。

## 2.5 碳源及芽孢杆菌在生物絮团系统中对幼参生长的影响

以蔗糖为碳源, 添加芽孢杆菌形成的生物絮团对幼参增重和 SGR 影响明显, YB 组增重与 SGR 均明显高于其他处理组和对照 Ctr( $P < 0.05$ ), 分别为 66.60 g 和 3.01%/d(表 3); 其次是仅添加蔗糖作为碳源的 Zt 组, 其增重与 SGR 也明显高于复合碳源组和对照( $P < 0.05$ ), 分别为 44.34 g 和 2.19%/d; 其他 3 组复合碳源组幼参增重与 SGR 均低于对照, 且随着玉米淀粉含量增加而逐渐降低, 但复合碳源 6.7 : 3.3 组与对照差异不显著( $P > 0.05$ )。这表明, 以蔗糖为碳源制备生物絮团能够促进幼参生长, 而定期添加以芽孢杆菌形成的生物絮团对幼参的促生长作用更加明显。

## 3 讨论

传统的集约化养殖都会引起水质 pH 下降, 排泄、残饵等溶出的营养盐和有机质是引起养殖自身污染的重要因素(计新丽等, 2000)。模拟养虾实验结果发现, 过量的虾饵在池底分解, 使水中 pH 由 8 降到 6(杨庆霄等, 1999)。本研究发现, 近岸自然海水经沉淀池沉淀后 pH 明显升高, 无机氮含量均显著降低; 幼参培育池中水体 pH 略低于自然海水, 而亚硝态氮含量明显升高(图 1、图 2), 结果与上述报道基本一致。沉淀池水体中总无机氮含量明显低于其他组, 这可能是因为水温较高, 浮游植物或微生物大量繁殖将无机氮吸收同化所致。刺参苗种培育池排放水中亚硝态氮含量增加, 一定程度上改变了近岸海水的营养盐结构, 可能对浮游生物生态结构产生一定影响(Cottingham, 1999)。

由乳酸菌群、酵母菌群、放线菌群和光合菌群等组成的复合微生态制剂可以稳定水体 pH, 降低无机

表 2 生物絮团对幼参培育池水质的影响  
Tab.2 Effects of bioflocs on the water quality of juvenile *A. japonicus* breeding tanks

实验组名 Groups	测定时间与浓度 Monitoring time and concentrations							
	NH <sub>3</sub> -N (mg/L)				NO <sub>2</sub> -N (mg/L)			
	1 d	3 d	5 d	7 d	1 d	3 d	5 d	7 d
BI	0.049 <sup>a</sup>	0.066 <sup>b</sup>	0.181 <sup>c</sup>	0.075 <sup>b</sup>	0.043 <sup>a</sup>	0.330 <sup>b</sup>	0.625 <sup>c</sup>	0.664 <sup>c</sup>
T	0.041 <sup>a</sup>	0.055 <sup>b*</sup>	0.009 <sup>c*</sup>	0.008 <sup>c*</sup>	0.046 <sup>a</sup>	0.138 <sup>b*</sup>	0.071 <sup>a*</sup>	0.158 <sup>b*</sup>

注: 上标字母表示同一组随时间变化的显著性, 星号表示不同组在同一时间的显著性

Note: Letters indicate significances among different sampling periods in the same group. Asterisks indicate significances among different groups in the same period

表 3 碳源及芽孢杆菌对生物絮团培育幼参的生长影响  
Tab.3 Effects of carbon source and *Bacillus* on the growth of juvenile *A. japonicus* cultured with bioflocs

试验组名 Groups	Ctr	Zt	6.7 : 3.3	5 : 5	3.3 : 6.7	YB
增重 Weight increase(g)	39.30 <sup>a</sup>	44.34 <sup>a</sup>	38.10 <sup>a</sup>	32.07 <sup>b</sup>	31.33 <sup>b</sup>	66.60 <sup>c</sup>
特定生长率 SGR(%/d)	1.99 <sup>a</sup>	2.19 <sup>b</sup>	1.93 <sup>a</sup>	1.67 <sup>c</sup>	1.65 <sup>c</sup>	3.01 <sup>d</sup>

氮、磷和 COD 等, 具有明显的净化水质的效果(黎建斌等, 2011); 而通过向水体中添加有机碳源以调节 C/N 值在适当范围时, 芽孢杆菌能更好的发挥水质调节作用(孙运忠等, 2012)。研究表明, 添加葡萄糖使 C/N 比达到 10 时, 水中 10 mg/L NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 在 5 h 内几乎全部被细菌所吸收, 且无硝酸盐和亚硝酸盐产生(Avnimelech, 1999)。本研究比较了 3 种益生菌对水质 pH、氨氮和亚硝态氮的调节作用。结果显示, 各组水体 pH 变化范围为 7.9–8.5, 均呈先降低后升高的趋势, 然后趋于稳定(图 3); 同时, 微生物制剂具有一定的无机氮去除作用(表 1), 与上述报道结果一致。通过向水体中添加蔗糖调节 C/N 值后, 3 种微生物制剂对水中总悬浮物和细菌总数的影响也存在差异, 表明其在生物絮团形成和结构等方面亦有不同。结果表明, 添加芽孢杆菌组的总悬浮物含量和细菌总数均明显高于其他组(图 4、图 5), 芽孢杆菌可能更利于生物絮团的快速形成和较高微生物活性, 并能改善菌群结构组成, 可能更有利于生物絮团发挥作用。刺参培育池水质监测结果也表明, 以蔗糖为碳源, 添加芽孢杆菌形成的生物絮团对幼参培育池水体水质具有明显的净化作用, 能快速去除水中的氨氮和亚硝态氮(表 2), 但其去除亚硝态氮的作用与效果有待进一步改善和提高。

微生物制剂能提高刺参消化酶活性和免疫活性(王娇等, 2012), 而由芽孢杆菌和光合细菌发酵制成的生物絮团不仅具有调节水质的作用, 还能明显促进虾类的生长和存活(孙运忠等, 2012)。本研究比较了芽孢杆菌及几种不同碳源对生物絮团促进幼参生长作用的差异, 结果表明, 仅添加蔗糖的 Zt 组增重与

SGR 明显高于其他复合碳源组和对照, 而 YB 组增重与 SGR 也均明显高于其他处理组和对照(表 3)( $P < 0.05$ )。因此, 以蔗糖为碳源, 并添加芽孢杆菌形成生物絮团能显著提高仿刺参幼参的生长。向养殖水体中添加益生菌不仅可以改善水体微生态结构, 还可以改良水质, 但是益生菌添加技术也存在难以形成优势菌等诸多问题。因此, 如何通过分离土著益生菌和促进其在水体中稳定繁殖成为一个研究的重点(刘忠颖等, 2010), 如何加强益生菌在生物絮团技术中的应用研究也是亟待解决的问题。结合益生菌技术, 生物絮团技术在刺参苗种培育与养成中将具有较广泛的应用前景, 而相关基础研究与技术集成优化等工作亟待加强。

## 参 考 文 献

- 计新丽, 林小涛, 许忠能, 等. 海水养殖自身污染机制及其对环境的影响. 海洋环境科学, 2000, 19(4): 66–71
- 王娇, 王寅, 梁晶晶, 等. 益倍康对刺参生长、消化和免疫相关指标的影响. 河北渔业, 2012, (5): 1–4
- 刘忠颖, 刘洋, 鲍相渤, 等. 水产养殖益生菌的研究进展. 水产科学, 2010, 29(8): 500–504
- 孙运忠, 赵培, 王彦怀, 等. 添加红糖和芽孢杆菌对日本囊对虾室内集约化养殖水质的调控作用. 渔业科学进展, 2012, 33(3): 70–76
- 李成林, 宋爱环, 胡炜, 等. 山东省刺参养殖产业现状分析与可持续发展对策. 渔业科学进展, 2010, 31(4): 126–133
- 李爽, 李耕, 潘玉洲, 等. 生物絮团技术对工厂化养殖海参生长及存活率的影响. 科学养鱼, 2011, (11): 65–66
- 杨庆霄, 蒋岳文, 张昕阳, 等. 虾塘残饵腐解对养殖环境影响的研究( ). 海洋环境科学, 1999, 18(2): 11–15
- 国家质检总局, 国家标准化委员会. 海洋监测规范. 北京: 中

- 国标准出版社, 2007
- 姜红, 李月红, 黄权. 养殖水体的有机物负荷及其减轻对策. 中国水产, 2000, (2): 32–33
- 黎建斌, 何为, 周宇, 等. 底改型微生物净水剂对对虾养殖水体的修复作用. 南方农业学报, 2011, 42(2): 209–212
- 张许光, 赵培, 王国成, 等. 不同放苗密度凡纳滨对虾生物絮团养殖的环境和产出效应. 渔业科学进展, 2013, 34(3): 111–119
- 胡修贵, 赵培, 李玉宏, 等. 生物絮团中异养亚硝化菌的分离鉴定及其特性. 渔业科学进展, 2012, 34(5): 97–103
- Avnimelech Y. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture*, 1999, 176(3–4), 227–235
- Avnimelech Y. Bio-filters: The need for a new comprehensive approach. *Aquacultural Engineering*, 2006, 34(3), 172–178
- Avnimelech Y. *Biofloc Technology—Practical Guide Book*, 2d Edition. Baton Rouge: The World Aquaculture Society, 2012, 81
- Cottingham KL. Nutrients and zooplankton as multiple stressors of phytoplankton communities: Evidence from size structure. *Limnol Oceanogr*, 1999, 44(3): 810–827

(编辑 陈严)

## Effects of Bioflocs on the Water Quality Control and the Growth of *Apostichopus japonicus*

LI Bin, ZHANG Xiuzhen, MA Yuanqing, WANG Bin, SONG Xiangjun, LIU Yihao, LIU Aiyang, BAI Yanyan, JIN Yang, REN Lihua, SUN Yuzeng, XING Hongyan, WANG Zhongquan, SONG Xiukai  
(Shandong Provincial Key Laboratory of Marine Ecology Restoration, Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Yantai 264006)

**Abstract** Due to a rapid development in artificial breeding of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka), excessive inorganic nitrogen and organic matters in the discharged water greatly increases the eco-environmental pressure. Bioflocs technology could be a solution to this issue. In this study, we first examined the water quality in breeding ponds of juvenile sea cucumber. Then we added carbohydrates as carbon source and three probiotics into the water, and explored the effects of these additives on biofloc formation and the water quality. We also analyzed the inorganic nitrogen content, the total suspended solids content, the total bacterial count, and the growth of *A. japonicus* in the presence of the additives. The goal of our study was to provide references about the effects of bioflocs on the ecology and environment in juvenile sea cucumber culture industry. In accordance to the Specification for Marine Monitoring periodical analysis of the water quality was conducted through simulation tests and field experiments. The body weight gain and the special growth rate of juvenile sea cucumbers were also evaluated in the bioflocs system. The results showed that the nitrite nitrogen was readily to accumulate up to 0.25 mg/L. After the addition of *Bacillus*, the total suspended solids and the total bacterial count in the water both reached their highest values, and *Vibrio* and coliforms were not detected. On the 20th day, the body weight gain (44.34 g) and the special growth rate (2.19%/d) of *A. japonicus* treated with pure sucrose were significantly higher than those with mixed carbon sources and those in the control group; The weight gain and the special growth rate in the *Bacillus* and sucrose group were the highest among all treatments, up to 66.60 g and 3.01%/d respectively ( $P < 0.05$ ). The two parameters in groups treated with mixed carbon sources decreased gradually with the increase in corn starch content. In conclusion, in the presence of sucrose as the carbon source, bioflocs formed with *Bacillus* could improve the water quality, the structure of the microbial community, and the growth of juvenile sea cucumber.

**Key words** Bioflocs; Water quality; Regulation; *Apostichopus japonicus* (Selenka); Growth

# Pb<sup>2+</sup>和 Cd<sup>2+</sup>对刺参幼参的急性毒性及其富集\*

邢红艳<sup>1</sup> 马元庆<sup>1</sup> 李 斌<sup>1</sup> 刘爱英<sup>1</sup> 靳 洋<sup>1</sup> 孙 珊<sup>1</sup>  
白艳艳<sup>1</sup> 赵 强<sup>2</sup> 苏 博<sup>1</sup> 任利华<sup>1</sup>

(1. 山东省资源与环境研究院 山东省海洋生态修复重点实验室 烟台 264006 ;  
2. 烟台海益苗业有限公司 蓬莱 265619)

**摘要** 采用静水试验法,研究了 Pb<sup>2+</sup>(0.1、0.25、0.5、1.0、2.5、5.0 mg/L 共 6 个浓度梯度)与 Cd<sup>2+</sup>(0.2、0.4、0.8、1.0、2.5、5.0 mg/L 共 6 个浓度梯度)对刺参幼参的急性毒性,并分析了其在幼参体内的富集状况。研究表明,幼参死亡率随暴露时间和 Pb<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>浓度增加总体呈升高趋势,而附壁率则反之。暴露于两组低浓度 Pb<sup>2+</sup>的幼参死亡率差异不显著( $P > 0.05$ ),其他组死亡率均随暴露时间和 Pb<sup>2+</sup>浓度增加而显著升高;最高浓度组在 72 h 时死亡率已达 100%,在 24 h 时其附壁率低至 6.7%,与其他浓度组差异均显著( $P < 0.01$ )。暴露于 Cd<sup>2+</sup>的幼参在 72 h 后的死亡率比 48 h 内明显升高,96 h 时 0.8 mg/L 浓度组的幼参死亡率即达 100%;暴露于 Cd<sup>2+</sup>的幼参附壁率均较低。Pb<sup>2+</sup>和 Cd<sup>2+</sup>对幼参的安全浓度分别为 0.061、0.018 mg/L。随着水体中 Pb<sup>2+</sup>和 Cd<sup>2+</sup>浓度的增加,幼参体内的重金属含量和累积速率均呈升高趋势,但富集系数呈波动性变化,幼参对 Cd<sup>2+</sup>的富集系数和累积速率均高于 Pb<sup>2+</sup>。结果表明,Cd<sup>2+</sup>对幼参的急性毒性作用强于 Pb<sup>2+</sup>,且幼参对 Cd<sup>2+</sup>的富集能力明显强于 Pb<sup>2+</sup>。本研究将为阐明刺参在生态环境修复中的作用提供理论依据,并为刺参健康养殖与食用安全提供重要参考。

**关键词** Pb<sup>2+</sup>; Cd<sup>2+</sup>; 刺参; 急性毒性; 富集

**中图分类号** S963 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2014)04-0091-06

刺参(*Apostichopus japonicus*), 属棘皮动物门, 海参纲, 刺参科, 为典型的沉积食性动物(Choe, 1963; Kang *et al*, 2003), 主要摄食底栖单细胞藻类、有机碎屑、细菌和腐殖质等。因具有较高的营养价值, 刺参已成为我国北方沿海水产养殖中重要的品种, 养殖方式逐步由传统方法发展成大棚工厂化养参(Chen, 2004; Dong *et al*, 2007; Qin *et al*, 2009)。刺参的人工养殖规模不断扩大, 然而, 由于沿岸工业废水和生活污水大量的排入近海, 环境污染问题尤为突出, 对沿海地区刺参养殖带来了较大危害(李成林等, 2010; Chang *et al*, 2010)。我国多条河流、河口近岸海域环境中铅、镉等含量呈上升趋势, 铅为主要污染元素之

一(Wang *et al*, 2001; 刘明等, 2012)。铅、镉等元素不易降解, 脂溶性强, 被生物摄入体内产生富集, 不易分解排泄(Rainbow, 2002; Lin *et al*, 1993)。关于重金属的急性毒性研究多集中在对刺参生长、存活、酶活性等方面, 而有关铅和镉对刺参的行为等影响及其生物富集过程研究较少(刘铁钢等, 2011; 赵元凤等, 2008)。因此, 研究重金属铅、镉对刺参幼参的急性毒性作用, 及其在刺参体内的富集过程是非常必要的。本研究探讨了铅(Pb<sup>2+</sup>)、镉(Cd<sup>2+</sup>)两种海洋中常见的重金属污染元素对幼参的行为、存活等急性毒性作用, 并探讨了两种重金属在幼参体内的富集作用, 旨在为评价刺参在生态环境修复中的作用提供理论

\* 烟台市科技发展计划项目(2011457)、国家自然科学基金项目(41206094)和“水生动物营养与饲料泰山学者岗位”课题共同资助。邢红艳, E-mail: xinghongyan08@126.com

收稿日期: 2012-09-12; 收修改稿日期: 2013-10-25

依据,并为刺参养殖与食用安全提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验用幼参取自山东省蓬莱某养殖场,为人工培育的150 d的幼参,个体体重为(0.5±0.1) g。幼参在室内水泥池中暂养3 d后用于试验。急性毒性及富集试验于2012年4月在烟台海益苗业有限公司完成。

### 1.2 试剂与海水

试验用硝酸铅[Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]、氯化镉(CdCl<sub>2</sub>)均为国产分析纯,先用双蒸水配成含Pb<sup>2+</sup>离子和Cd<sup>2+</sup>离子分别为1.0、5.0 g/L的母液,使用时稀释至所需浓度。根据预试验结果,Pb<sup>2+</sup>浓度设置0.1、0.25、0.5、1.0、2.5、5.0 mg/L共6组,Cd<sup>2+</sup>浓度设置0.2、0.4、0.8、1.0、2.5、5.0 mg/L共6组。空白组不加试剂,其他条件与处理组相同。试验用海水取自养殖场蓄水池,Pb<sup>2+</sup>离子和Cd<sup>2+</sup>离子的本底值分别为(0.66±0.07)、(0.38±0.01) μg/L,pH为8.1左右,盐度范围为33.6–34.6。

### 1.3 试验设计及测定分析方法

采用静水试验法,在2 L的玻璃烧杯中进行,每个烧杯中放30只幼参。每组设双平行。试验期间不投喂、不充气,水温为19.5–20.3℃,每隔24 h全量换水1次,换水后将各烧杯中的相关离子浓度调整到原始浓度。分别在24、48、72、96 h记录各组的死亡数和附着在杯壁的个体数。刺参幼参的死亡判断标准是身体自然卷曲,管足及触手收缩回体内,疣刺收缩,无附着、活动及摄食能力,以玻璃棒轻碰之无反应(吕豪等,2005)。死亡个体及时从水中移出。

96 h时,将每组所有存活个体用去离子水冲洗干净,沥水5–10 min,充分匀浆后装入密封袋内,-20℃冷冻保存用于测定幼参体内铅、镉含量。铅、镉分析测定方法见《海洋监测规范》(GB17378.6-2007),重金属含量均以湿重表示。

### 1.4 数据处理

实验组死亡率按公式 $P=(p'-C)/(1-C)$ 进行校正。

式中, $P$ 为经校正后的实验组的死亡率, $p'$ 为实验组的死亡率, $C$ 为空白组死亡率均值;附壁率( $AR$ )用以评价幼参的附着和活动能力,其计算公式为:

$$AR = 100\% \times N_A/30$$

式中, $N_A$ 为附着在杯壁上的幼参个体数。

重金属的富集系数( $BCF$ )和累积速率( $RA$ )的计算公式分别为:

$$BCF = (C_e - C_i)/C_s$$

式中, $C_e$ 指试验结束时幼参体内的重金属的含量, $C_i$ 指试验开始前幼参中重金属的背景值, $C_s$ 指水体中重金属的试验浓度;

$$RA = (C_e - C_i)/t$$

式中, $t$ 为暴露时间(Taylor, 1983)。

采用SPSS19.0作回归分析和显著性分析,并求得浓度-死亡率直线回归方程;采用概率单位法,根据死亡百分数-概率单位换算表,将死亡百分数换算成死亡概率单位,分别求出各种重金属对幼参48、72、96 h的半致死浓度( $LC_{50}$ )及其95%置信区间,并计算安全浓度( $SC$ )(周永欣等,1989), $SC = 96 h LC_{50} \times 0.1$ 。

## 2 结果

### 2.1 Pb<sup>2+</sup>对幼参死亡率及附壁率的影响

幼参死亡率具有随暴露时间和Pb<sup>2+</sup>浓度增加而升高的趋势(图1)。由图1可以看出,暴露24 h时,0.1–1.0 mg/L的4个浓度组间死亡率均为3.3%,而2.5、5.0 mg/L两个浓度组则明显升高至10.0%( $P < 0.01$ )。暴露48 h,0.1、0.25 mg/L两组死亡率增至6.7%,至试验结束(96 h)未发生变化;而0.5–5.0 mg/L的4个浓度组死亡率由6.7%依次显著升至83.3%。暴露72、96 h,除0.1、0.25 mg/L两组外,其他组死亡率均随浓度增加而依次显著升高,最高浓度组在72 h时死亡率已达100%。两个低浓度组的Pb<sup>2+</sup>对幼参死亡率影响差异不显著( $P > 0.05$ ),当浓度高于0.5 mg/L时,幼参死亡率随暴露时间和Pb<sup>2+</sup>浓度增加明显升高,浓度为5 mg/L时最高( $P < 0.01$ )。

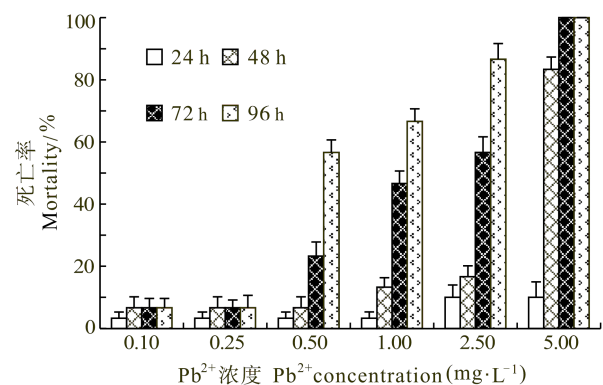


图1 重金属Pb<sup>2+</sup>对幼参的死亡率的影响

Fig.1 Effects of Pb<sup>2+</sup> exposure on the mortality of juvenile *A. japonicus*

表 1 重金属 Pb<sup>2+</sup>对幼参的急性毒性作用  
Tab.1 Analysis of acute toxicity of Pb<sup>2+</sup> to *A. japonicus*

暴露时间 Time(h)	回归方程(y, 死亡率; x, 浓度) Regression equation (y, mortality; x, concentration)	R	F 检验 F test	LC <sub>50</sub> (mg/L)	LC <sub>50</sub> 的 95%置信区间(mg/L) 95% confidence interval of LC <sub>50</sub>	SC (mg/L)
48	y = 15.682x - 3.882	0.951	P < 0.010	3.468	1.783-19.311	
72	y = 18.239x + 11.578	0.966	P = 0.025	1.178	0.576-3.066	
96	y = 17.228x + 27.042	0.826	P = 0.101	0.612	0.475-0.783	0.061

幼参死亡率(%)与 Pb<sup>2+</sup>浓度(mg/L)具有正相关关系(表 1)。暴露 48、72 h, 幼参死亡率与 Pb<sup>2+</sup>浓度均呈显著正相关(P < 0.01) 其 LC<sub>50</sub> 分别为 3.468、1.178 mg/L; 96 h 时, 其 LC<sub>50</sub> 为 0.612 mg/L, 计算得 Pb<sup>2+</sup>对幼参的安全浓度为 0.061 mg/L。

与死亡率相似, 幼参附壁率具有随暴露时间和 Pb<sup>2+</sup>浓度增加而降低的趋势(图 2)。整个试验期间, 空白组附壁率为 93%–95%, 变化不大。暴露 24 h 时, 0.10–0.25 mg/L 的两组间及 0.5–1.0 mg/L 的 3 个浓度组间附壁率差异均不显著(P > 0.01); 浓度高于 5.0 mg/L 时附壁率显著降低, 暴露超过 24 h 后附壁率为 0, 3 个低浓度组幼参附壁率随暴露时间呈波动性变化, 但均在 24 h 出现低值。暴露 96 h, 0.5 mg/L 组附壁率明显降至 26.7%, 2.5 mg/L 组则降至 13.3%(P < 0.01)。

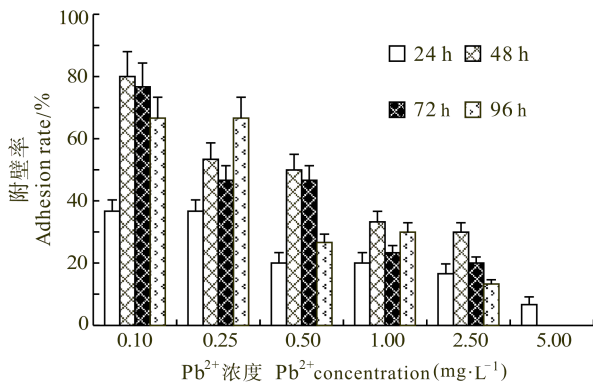


图 2 重金属 Pb<sup>2+</sup>对幼参的附壁率的影响

Fig.2 Effects of Pb<sup>2+</sup> exposure on the adhesion rate of juvenile *A. japonicus*

2.2 Cd<sup>2+</sup>对幼参死亡率及附壁率的影响

幼参死亡率具有随暴露时间和 Cd<sup>2+</sup>浓度增加而

升高的趋势(图 3)。暴露 24、48 h, 4 个低浓度组幼参死亡率变化均不显著(P > 0.01), 2.5、5.0 mg/L 两组死亡率分别升高至 23.3%、33.3%(P < 0.01)。72、96 h, 除 0.4 mg/L 组死亡率比 0.2 mg/L 组低之外, 其他组随着暴露时间和 Cd<sup>2+</sup>浓度增加而升高。72 h 时暴露于浓度高于 2.5 mg/L 的幼参死亡率达 100%, 96 h 时浓度高于 0.8 mg/L 的幼参死亡率即可达 100%。

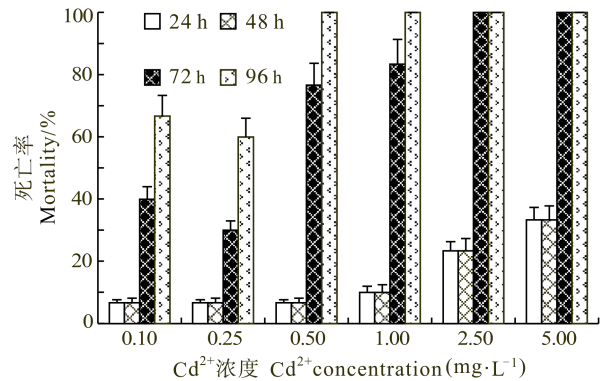


图 3 重金属 Cd<sup>2+</sup>对幼参的死亡率的影响

Fig.3 Effects of Cd<sup>2+</sup> exposure on the mortality of juvenile *A. japonicus*

整个研究期间, 空白组附壁率为 93%–95%, 变化不大。暴露于 Cd<sup>2+</sup>的幼参附壁率较低。其中, 两个低浓度组幼参附壁率明显高于其他浓度组(P < 0.01) (图 4)。0.2 mg/L 浓度组在暴露 48 h 时附壁率最高, 达 66.7%, 其他均低于 40%; Cd<sup>2+</sup>浓度高于 0.8 mg/L 时幼参附壁率即明显下降, 尤其浓度高于 2.5 mg/L 组附壁率均为 0。72、96 h, 两个低浓度组附壁率均在 23%–30%之间, 且组间差异均不显著, 但随着暴露时间的延长均有所降低。

表 2 重金属 Cd<sup>2+</sup>对幼参的急性毒性作用分析  
Tab.2 Analysis of acute toxicity of Cd<sup>2+</sup> to juvenile *A. japonicus*

暴露时间 Time(h)	回归方程(y, 死亡率; x, 浓度) Regression equation (y, mortality; x, concentration)	R	F 检验 F test	LC <sub>50</sub> (mg/L)	LC <sub>50</sub> 的 95%置信区间(mg/L) 95% confidence interval of LC <sub>50</sub>	SC(mg/L)
48	y = 6.05x + 4.47	0.981	P = 0.810	17.585	7.798-106.950	
72	y = 27.75x + 38.79	0.846	P = 0.041	0.387	0.130-0.660	
96	y = 61.90x + 46.66	0.882	P = 0.010	0.183	0.066-0.267	0.018



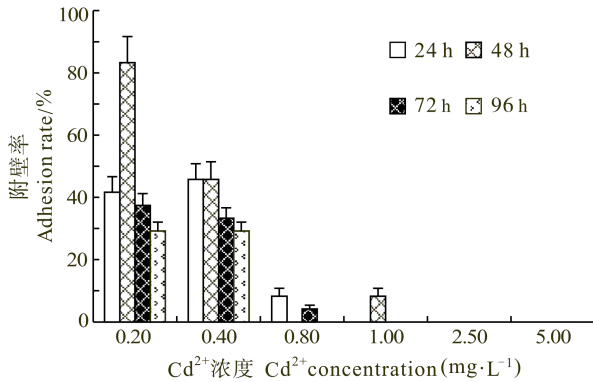


图4 重金属 Cd<sup>2+</sup>对幼参的附壁率的影响

Fig.4 Effects of Cd<sup>2+</sup> exposure on the adhesion rate of juvenile *A. japonicus*

表3 Pb<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>在暴露96 h的幼参体内的富集系数和积累速率  
Tab.3 Accumulation of Pb<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> by juvenile *A. japonicus* at 96 h

项目 Items	离子种类 Ions							
	Pb <sup>2+</sup>	Pb <sup>2+</sup>	Pb <sup>2+</sup>	Pb <sup>2+</sup>	Pb <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup>	
初始暴露浓度 Initial exposing concentration (mg/L)	0.10	0.25	0.50	1.00	2.50	0.20	0.40	
幼参体内含量 Final content(mg/kg)	1.18	2.74	3.46	15.50	27.10	8.03	10.50	
富集系数 BCF	11.55	10.86	6.87	15.48	10.83	37.49	24.92	
累积速率 RA [mg/(kg·d)]	0.29	0.68	0.86	3.87	6.77	1.87	2.49	

注：试验开始前幼参体内 Pb<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>含量分别为 0.025、0.532 mg/kg

Note: Before the experiments, the content of Pb<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> in juvenile *A. japonicus* is 0.025 mg/kg and 0.532 mg/kg, respectively

对比 Pb<sup>2+</sup>和 Cd<sup>2+</sup>在幼参体内的富集系数和积累速率发现,幼参对 Cd<sup>2+</sup>的富集系数和累积速率均高于 Pb<sup>2+</sup>,表明幼参对 Cd<sup>2+</sup>的富集能力明显强于 Pb<sup>2+</sup>。

### 3 讨论

重金属对刺参幼体的毒性效应取决于重金属在海水中的化学性质和存在形式。一般情况下,重金属可以直接抑制生物体内的酶活性,从而影响整个生命的代谢过程,造成中毒死亡(刘铁钢等,2011; George *et al*, 1996; Basha *et al*, 2003)。然而各种金属的性质不同,其对幼参的毒性效应也有很大差异。

4种重金属对刺参幼参的单一急性毒性强弱表现为: Cu<sup>2+</sup> > Cd<sup>2+</sup> > Zn<sup>2+</sup> > Cr<sup>6+</sup> (孙振兴等,2007)。本研究发现, Pb<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>对幼参存活、活动能力均产生影响。一般幼参死亡率随暴露时间和 Pb<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>浓度增加而升高,而附壁率则反之。当水体中 Pb<sup>2+</sup>浓度高于 0.5 mg/L 时,幼参死亡率随暴露时间和 Pb<sup>2+</sup>浓度增加明显升高(图 1); 当在 Cd<sup>2+</sup>浓度高于 0.2 mg/L 的环境中暴露超过 72 h,幼参死亡率即可达 30%以上,且随着暴露时间和浓度的增加迅速升高(图 3)。幼参附壁率

### 2.3 Pb<sup>2+</sup>和 Cd<sup>2+</sup>在幼参体内的富集

随着水体中 Pb<sup>2+</sup>和 Cd<sup>2+</sup>浓度的增加,幼参体内的重金属含量和累积速率均呈升高趋势,但富集系数呈波动性变化。96 h 时, Pb<sup>2+</sup>暴露试验中 2.50 mg/L 组幼参体内 Pb<sup>2+</sup>的含量由最低浓度组的 1.18 mg/kg 增加达 66.7%,其他均低于 40%; Cd<sup>2+</sup>浓度高于 0.8 mg/L 至 27.1 mg/kg,累积速率也增长了 23 倍多,而其富集系数则由 11.55 先降至 6.87,在升至 15.5 后又降为 10.83 ( $P < 0.01$ ) (表 3)。Cd<sup>2+</sup>在幼参体内的富集规律同 Pb<sup>2+</sup>类似,幼参体内 Cd<sup>2+</sup>的含量及其累积速率均显著增长 25%以上,分别达到 10.50、2.49 mg/(kg·d),而富集系数则由 37.49 明显降为 24.92 ( $P < 0.01$ )。

在暴露初期(24 h)时较低,原因可能是随着幼参对环境胁迫的适应,活动能力有所恢复,但总体上随暴露时间和重金属离子浓度增加而呈降低趋势(图 2、图 4)。经研究, Pb<sup>2+</sup>和 Cd<sup>2+</sup>对幼参的安全浓度分别为 0.061、0.018 mg/L, Cd<sup>2+</sup>对幼参的急性毒性作用强于 Pb<sup>2+</sup>。张晓燕(1994)研究也发现,在幼参和稚参两个发育阶段重金属毒性均表现为 Cd<sup>2+</sup> > Pb<sup>2+</sup>,与本研究结果一致。Pb<sup>2+</sup>在刺参组织中的分布为内脏组织 > 纵肌 > 体壁,而通过在饵料中添加海藻多糖可以明显促进 Pb<sup>2+</sup>的排出(赵元凤等,2008)。因此,应加强刺参对不同金属元素差异性累积的机理研究,并对影响有害重金属元素排出的因素进行深入分析,将为增强刺参的生态环境修复作用提供理论依据,并为刺参食用安全性提供重要参考。

海洋动物对重金属的累积明显受暴露浓度、时间及环境条件的影响(Lin *et al*, 1993; Allen, 1995; Christine, 1999; 苑旭洲等,2012; 张聪等,2012; 孙元芹等,2013),不同生物种类、组织器官对重金属的富集能力存在差异(Mcgeer *et al*, 2000; Subathra *et al*, 2008),不同重金属在生物体内的富集能力也有差异

(Najiah *et al.*, 2008); 而幼参对  $Zn^{2+}$  的累积速率也随着暴露浓度的增加而升高, 其富集系数呈相反的变化(李君丰等, 2011), 温度明显影响  $Zn^{2+}$  在幼参中的组织分布和富集(丁君等, 2008)。本研究表明, 随着环境中  $Pb^{2+}$  和  $Cd^{2+}$  浓度的增加, 幼参体内的重金属含量和累积速率均呈升高趋势, 但富集系数呈波动性变化。暴露 96 h 时, 幼参体内  $Pb^{2+}$  含量和  $Pb^{2+}$  累积速率与环境  $Pb^{2+}$  浓度的变化相当, 而其富集系数由 11.55 先降至 6.87, 再升至 15.5 后又降为 10.83 ( $P < 0.01$ ) (表 3)。 $Cd^{2+}$  在幼参体内的富集规律同  $Pb^{2+}$  类似, 幼参体内  $Cd^{2+}$  的含量及其累积速率均显著增长 25% 以上, 分别达到 10.50、2.49 mg/(kg·d), 而富集系数则由 37.49 明显降为 24.92 ( $P < 0.01$ )。幼参对  $Cd^{2+}$  的富集系数和累积速率均高于  $Pb^{2+}$ , 表明幼参对  $Cd^{2+}$  的富集能力明显强于  $Pb^{2+}$ 。这与牡蛎对  $Pb^{2+}$  和  $Cd^{2+}$  不同的富集能力相似, 原因可能是环境中 Cd 元素的直接生物可给性或生物大分子的结合活性比 Pb 强, Cd 与金属硫蛋白(Metallothioneins, MTs)的结合能力更强(王新伟等, 2002; Roesijadi, 1994), 在刺参中是否存在类似结构的 MTs, 其对不同金属离子的亲和力差异性如何, 具体影响因素及机理有待进一步验证。

#### 4 结论

重金属  $Pb^{2+}$  和  $Cd^{2+}$  对刺参的毒性效应与其生长阶段、个体大小、环境条件等多种因素有关。幼参死亡率随暴露时间和  $Pb^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$  浓度增加而升高, 而附壁率则反之, 幼参附壁率总体上随暴露时间和重金属离子浓度增加而呈降低趋势。 $Pb^{2+}$  和  $Cd^{2+}$  对幼参的安全浓度分别为 0.061、0.018 mg/L,  $Cd^{2+}$  对幼参的急性毒性作用强于  $Pb^{2+}$ 。

随着环境中  $Pb^{2+}$  和  $Cd^{2+}$  浓度的增加, 幼参体内的重金属含量和累积速率均呈升高趋势, 但富集系数呈波动性变化。幼参对  $Cd^{2+}$  的富集系数和累积速率均高于  $Pb^{2+}$ , 表明幼参对  $Cd^{2+}$  的富集能力明显强于  $Pb^{2+}$ 。应加强刺参对不同金属元素差异性累积的机理研究, 并对影响有害重金属元素排出的因素进行深入探讨, 以期增强刺参的生态环境修复作用提供理论依据, 并为刺参食用安全提供重要参考。

#### 参 考 文 献

丁君, 张学辉, 丁鸣, 等. 幼刺参不同部位对  $Zn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$  的蓄积动力学研究. 海洋环境科学, 2008, 27(4): 359–362  
王新伟, 何江, 李朝生. 黄河包头段沉积物中生物可给态重金属分布研究. 环境科学研究, 2002, 15(1): 20–24

刘明, 张爱滨, 范德江, 等. 渤海中部底质沉积物重金属环境质量. 中国环境科学, 2012, 32(2): 279–290  
刘铁钢, 赵文. 刺参养殖过程中毒物的毒理及毒性研究概况. 中国水产, 2011, (7): 62–63  
孙元芹, 吴志宏, 孙福新, 等. 文蛤对重金属 Cu 的富集与排出特征. 渔业科学进展, 2013, 33(1): 126–132  
孙振兴, 陈书秀, 陈静, 等. 四种重金属对刺参幼参的急性致毒效应. 海洋通报, 2007, 26(5): 80–85  
吕豪, 周伯文. 2005. 四种药物对刺参幼参毒性的初步研究. 水产科学, 24(6): 28–31  
李成林, 宋爱环, 胡炜, 等. 山东省刺参养殖产业现状分析与可持续发展对策. 渔业科学进展, 2010, 31(4): 126–133  
李君丰, 张丛尧, 杨辉, 等.  $Zn(II)$  在仿刺参幼参体内的蓄积及其对生长和存活的影响. 大连海洋大学学报, 2011, 26(1): 35–40  
张晓燕.  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  对刺参幼虫的毒性试验. 海洋科学, 1994(2): 9–12  
张聪, 陈聚法, 马绍赛, 等. 褶牡蛎对水体中重金属铜和镉的富集动力学特性. 渔业科学进展, 2012, 33(5): 64–72  
苑旭洲, 崔毅, 陈碧鹃, 等. 菲律宾蛤仔对 6 种重金属的生物富集动力学. 渔业科学进展, 2012, 33(4): 49–56  
赵元凤, 吴益春, 吕景才, 等. 重金属铅在刺参组织的蓄积、分配、排放规律研究. 农业环境科学学报, 2008, 27(4): 1677–1680  
周永欣, 章宗涉. 水生生物毒性试验方法. 1989. 北京: 农业出版社, 75–106  
Allen P. Soft—tissue accumulation of lead in the blue tilapia, *Oreochromis aureus* (Steindachner), and the modifying effects of lead and mercury. Biol Trace Elem Res, 1995, 50(3): 193–208  
Basha PS, Rani AU. Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). Ecotox Environ Safe, 2003(56): 218–221  
Chang J, Zhang WB, Mai KS, *et al.* Effects of dietary  $\beta$ -glucan and glycyrrhizin on non-specific immunity and disease resistance of the sea cucumber (*Apostichopus japonicus* Selenka) challenged with *Vibrio splendidus*. J Ocean Univ China, 2010, 9(4): 389–394  
Chen JX. Present status and prospects of sea cucumber industry in China. In: Lovatelli A, Conand C, Purcell S, *et al.* Advances in sea cucumber aquaculture and management (463). Rome: FAO, 2004, 25–38  
Choe S. Study of sea cucumber: morphology, ecology and propagation of sea cucumber. Tokyo: Kaibundou Publishing House, 1963, 219  
Christine de CC. Kinetics of cadmium accumulation and elimination in carp *Cyprinus carpio* tissues. Comp Biochem Phys, 1999, 122(3): 345–352  
Dong YW, Ji TT, Dong SL. Stress responses to rapid temperature changes of the juvenile sea cucumber (*Apostichopus japonicus* Selenka). J Ocean Univ China, 2007, 6(3): 275–280  
George S, Hodgson P, Todd K, *et al.* Metallothionein protects against cadmium toxicity—proof from studies developing

- turbot larvae. *Mar Environ Res*, 1996, 42(1): 52–52
- Kang KH, Kwon JY, Kim YM. A beneficial culture: charm abalone *Haliotis discus* Hannai and sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Aquaculture*, 2003, 216: 87–93
- Lin HC, Dunson WA. The effect of salinity on the acute toxicity of cadmium to the tropical, estuarine, hermaphroditic fish, *Rivulus marmoratus*: a comparison of Cd, Cu, and Zn tolerance with *Fundulus heteroclitus*. *Arch Environ Contam Toxicol*, 1993, 25(1): 41–47
- McGeer JC, Szebedinszky C, McDonalde DG, *et al.* Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow-trout: 2. Tissue specific metal accumulation. *Aquat Toxicol*, 2000, 50(3): 245–256
- Najiah M, Nadirah M, Lee KL, *et al.* Bacteria flora and heavy metals in cultivated oysters *Crassostrea iredalei* of Setiu Wetland, East Coast Peninsular Malaysia. *Vet Res Commun*, 2008, 32(5): 377–381
- Qin CX, Dong SL, Tan FY, *et al.* 2009. Optimization of stocking density for the sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka, under feed-supplement and non-feed-supplement regimes in pond culture. *J Ocean Univ China*, 8(3): 296–302
- Rainbow PS. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what?. *Environ Pollut*, 2002, 120(3): 497–507
- Roesijadi G. Behavior of metallothionein-bound metals in a natural population of an estuarine mollusca. *Mar Environ Res*, 1994, 38(4): 147–168
- Subathra S, Karuppasamy R. Bioaccumulation and depuration pattern of copper in different tissues of *Mystus vittatus*, related to various size groups. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2008, 54(2): 236–244
- Taylor D. The significance of the accumulation of Cadmium by aquatic organisms. *Ecotox Environ Safe*, 1983, 7(1): 33–42
- Wang A, Barder D, Pfeiffer CJ. Protective effects of selenium against mercury toxicity in cultured atlantic spotted dolphin (*Stenella plagiodon*) renal cells. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2001, 41(4): 403–409

(编辑 陈严)

## Acute Toxicity and Accumulation of $Pb^{2+}$ and $Cd^{2+}$ in Juvenile Sea Cucumber *Apostichopus japonicus*

XING Hongyan<sup>1</sup>, MA Yuanqing<sup>1</sup>, LI bin<sup>1</sup>, LIU Aiyang<sup>1</sup>, JIN Yang<sup>1</sup>, SUN Shan<sup>1</sup>,  
BAI Yanyan<sup>1</sup>, ZHAO Qiang<sup>2</sup>, SU Bo<sup>1</sup>, REN Lihua<sup>1</sup>

(1. Shandong Provincial Key Laboratory of Marine Ecology Restoration, Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Yantai 264006; 2. Yantai Haiyi Aquatic Seeding Co., Ltd, Penglai 265619)

**Abstract** To improve the quality of the aquaculture of sea cucumber *Apostichopus japonicus* and to enhance the environmental restoration, we studied the acute toxicity of  $Pb^{2+}$  and  $Cd^{2+}$  on sea cucumber and the bio-accumulation of these two heavy metals. Using static bio-assay we divided the experimental subjects into groups exposed to each heavy metal at a different concentration —  $Pb^{2+}$  (0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5 and 5.0 mg/L), and  $Cd^{2+}$  (0.2, 0.4, 0.8, 1.0, 2.5 and 5.0 mg/L), as well as the blank control. We found that mortality rate of *A. japonicus* increased along with the exposing period or ion concentration, and the adhesion rate showed an opposite pattern. There was no significant difference in the mortality rates between the two groups exposed to low concentrations of  $Pb^{2+}$  ( $P > 0.05$ ), but the mortality rates of other groups rose along with the increase in exposing periods or  $Pb^{2+}$  concentration. When exposed to 5.0 mg/L of  $Pb^{2+}$ , the mortality rate reached 100% in 72 h and the adhesion rate decreased to 6.7% in 24 h, which were significantly different from other  $Pb^{2+}$  groups ( $P < 0.01$ ). When exposed to  $Cd^{2+}$ , the mortality rate of *A. japonicus* treated for 72 h was apparently higher than that after the 48 h treatment; in 96 h the mortality rate reached 100% in the group treated with 0.8 mg/L  $Cd^{2+}$ . Generally the adhesion rate of *A. japonicus* was lower after the  $Cd^{2+}$  treatment. The safe concentrations of  $Pb^{2+}$  and  $Cd^{2+}$  were 0.061 mg/L and 0.018 mg/L respectively. The concentrations of the heavy metals and their accumulation rates in *A. japonicus* were elevated along with the increase in concentrations of  $Pb^{2+}$  and  $Cd^{2+}$  in the water, with a remarkable fluctuation in the concentration factor. Both the concentration factor and the accumulation rate of  $Cd^{2+}$  in juvenile sea cucumber were much higher than those of  $Pb^{2+}$ . Therefore, the acute toxicity and the accumulation of  $Cd^{2+}$  may be higher than those of  $Pb^{2+}$ . This study should provide insights into the ecological restoration of *A. japonicus*, and scientific references for the aquaculture quality and seafood safety.

**Key words**  $Pb^{2+}$ ;  $Cd^{2+}$ ; *Apostichopus japonicus*; Acute toxicity; Accumulation

# 碳酸氢铵对龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*) 污损生物多棘麦秆虫(*Caprella acanthogaster*) 的防除效果\*



魏龔伟<sup>1,2</sup> 张继红<sup>2</sup> 吴文广<sup>2</sup>

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306 ;

2. 农业部海洋渔业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** 2012 年夏季在爱莲湾,对采用碳酸氢铵防除养殖龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)上的污损生物多棘麦秆虫(*Caprella acanthogaster*)的效果进行了研究,探讨了碳酸氢铵浓度及处理时间对多棘麦秆虫脱落率和死亡率的影响。实验的 3 个处理时间分别为 5、10、15 min,碳酸氢铵浓度分别为 0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 g/L。结果表明,碳酸氢铵浓度、处理时间对多棘麦秆虫脱落率或死亡率均有显著影响( $P < 0.05$ )。随着浓度的升高、处理时间的延长,多棘麦秆虫脱落率及死亡率都呈逐渐增加的趋势。多棘麦秆虫脱落率( $D$ )或死亡率( $M$ )与浓度( $C$ )之间的关系均符合 S 型曲线模型  $\ln D = a + (b/C)$  或  $\ln M = c + (d/C)$ 。在 5、10、15 min 时,碳酸氢铵对麦秆虫的致死浓度分别为 7.36、6.17、3.68 g/L,对应的非离子氨浓度分别为 37.72、21.32、14.25 mg/L。

**关键词** 多棘麦秆虫;防除效果;碳酸氢铵;龙须菜

中图分类号 S946 文献标识码 A 文章编号 1000-7075(2014)04-0097-06

在海洋水产养殖过程中,污损生物不仅会附着于网箱、笼具、围网等水上设施,缩短其使用寿命,而且会直接附着或栖居在养殖生物表面,降低水产品的产量和品质(Ross *et al*, 2002; 严涛等, 2008)。目前,我国对污损生物的防除方法主要是利用高压水枪冲洗网衣(黄宗国等, 1984)、曝晒网箱网具(吕振明, 2002)、用化学涂料等涂抹在水上设施表面(Evans, 1999; Rittschof *et al*, 2003; Shi *et al*, 2006; 林秀雁等, 2008; 闫雪峰等, 2013)。然而传统的防除方法,在一定程度上,可以减少污损生物的附着,但对直接附着或栖居在养殖生物表面的污损生物防除效果并不明显。寻找高效的可直接防除附着或栖居在养殖生物

表面污损生物的防污剂,是目前亟待解决的主要问题。

多棘麦秆虫(*Caprella acanthogaster*),隶属节肢动物门(Arthropoda)、甲壳纲(Crustacea)、端足目(Amphipoda)(黄宗国, 2008),常栖居于浅海的海藻上,以海藻为食,是一种小型污损生物。近年来,在龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)的养殖过程中发现麦秆虫大量栖居在龙须菜枝条上,严重影响龙须菜正常生长。在龙须菜养殖区,龙须菜的枝条成为多棘麦秆虫栖居的场所,多棘麦秆虫不仅可以直接摄食龙须菜,而且,经咬噬的龙须菜因出现伤口,更容易在风浪流的作用下而脱落,给龙须菜的养殖带来极大的影响。因此,有效的控制多棘麦秆虫,毒杀或者阻止多棘麦

\*国家“十二五”支撑计划课题(2011BAD13B06)和国家自然科学基金课题(41076111; 41276172)共同资助。魏龔伟, E-mail: tvrwfnh521@126.com,

通讯作者: 张继红, 研究员, E-mail: zhangjh@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2013-10-28, 收修改稿日期: 2013-11-27

秆虫在龙须菜上栖居,是防治多棘麦秆虫对龙须菜危害的重要措施。

关于氨氮的毒性研究,目前多聚焦于氨氮及非离子氨对养殖生物的危害作用(王娟等,2007;朱大世等,2010;王芸等,2013),而利用其毒性作用进行污损生物防除的研究未见报道。高浓度的氨氮会对生物产生毒害或致死效应,同时,氨氮作为营养盐可以被养殖的龙须菜所吸收利用,从而减少环境污染。借鉴渔民用“挂肥袋”的方法对养殖海带(*Laminaria japonica*)、裙带菜(*Undaria pinnatifida*)幼苗敌害生物进行毒杀或驱除,本研究采用碳酸氢铵作为防除剂。碳酸氢铵易分解生成非离子氨(NH<sub>3</sub>),可能是龙须菜上污损生物多棘麦秆虫理想防除剂。有鉴于此,本研究探讨了不同浓度的碳酸氢铵对多棘麦秆虫的防除效果以及剂量与处理时间的效应关系,为多棘麦秆虫的防除提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

于2012年8月多棘麦秆虫采自山东荣成爱莲湾龙须菜养殖区。带回实验室后,与龙须菜在盛有海水的流水槽中混养。温度为(22.0±0.5)℃、pH为8.03±0.01、盐度为31.0±0.5。碳酸氢铵化肥购自山东荣成市崖头镇,总氮含量17.7%。

### 1.2 实验设计与实施

实验设11个处理组,包括10个碳酸氢铵浓度梯度组,分别为0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 g/L,和1个空白组,每个处理组设3个重复。取附有多棘麦秆虫的龙须菜,湿重均为(25.0±5.0)g,浸泡在不同浓度的碳酸氢铵溶液中。分别浸泡5、10、15 min,记录多棘麦秆虫脱落个数、死亡个数及个体总数。按照《海洋监测规范》的方法测定不同浓度梯度的总氨氮(TNH<sub>3</sub>-N)浓度。水环境温度、盐度由美国YSI Professional Plus 便携式水质分析仪测定,pH由pH计PHSJ-3F(上海雷磁)测定。

从龙须菜苗脱落的麦秆虫以玻璃棒多次触及无任何反应即判定为死亡,有回缩反应即判定为脱落。

### 1.3 计算方法

多棘麦秆虫脱落率及死亡率的计算公式如下:

$$D\% = \frac{n_1}{N} \times 100\%, \quad M\% = \frac{n_2}{N} \times 100\%$$

式中, $D$ 为多棘麦秆虫的脱落率, $M$ 为多棘麦秆虫的死亡率, $n_1$ 、 $n_2$ 分别为多棘麦秆虫的脱落个数及死亡个数, $N$ 为多棘麦秆虫总数。

非离子氨氮浓度 $C_{(\text{NH}_3\text{-N})}$ 按下公式(雷衍之,1993)计算:

$$C_{(\text{NH}_3\text{-N})} = \frac{C_T}{1 + 10^{(\text{pKa} - \text{pH} + \text{pr}_{\text{H}^+})}}$$

式中, $C_{(\text{NH}_3\text{-N})}$ 为非离子氨氮浓度, $C_T$ 为总氨氮浓度。在温度22℃、盐度31时,pKa值为9.33, $\text{pr}_{\text{H}^+}$ 为0.753。

### 1.4 统计分析方法

采用SPSS 17.0软件对碳酸氢铵浓度及处理时间的防除效果进行双因子方差分析。差异显著组采用Duncan进行多重比较。 $P < 0.05$ 为差异显著。采用SPSS 17.0软件的Probit模块计算碳酸氢铵对多棘麦秆虫的100%致死浓度( $LC_{100}$ )。

## 2 结果

### 2.1 碳酸氢铵不同浓度组水体中TNH<sub>3</sub>-N、pH及非离子氨浓度

不同浓度组的TNH<sub>3</sub>-N、非离子氨(UIA)浓度及pH值见表1。随着碳酸氢铵浓度的增加,水体pH值逐渐下降,由初始的8.03降至7.59。

### 2.2 碳酸氢铵浓度与处理时间对多棘麦秆虫脱落率的影响

多棘麦秆虫的脱落表现出明显的时间、剂量关系(图1),碳酸氢铵的浓度越高,处理时间越长,脱落率越大。当碳酸氢铵的浓度为0.5 g/L时,短时间组(5 min)多棘麦秆虫未出现脱落现象,中、长时间组多

表1 不同浓度碳酸氢铵的总氨氮浓度、非离子氨浓度及pH  
Tab.1 The concentration of TNH<sub>3</sub>-N, UIA and pH at different concentrations of NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>

水质因子 Quality factor	空白 Blank	碳酸氢铵浓度 Concentration of NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> (g/L)									
		0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
pH	8.03	7.74	7.72	7.70	7.69	7.68	7.67	7.61	7.60	7.59	7.59
TNH <sub>3</sub> -N (mg/L)	0.13	49.68	58.37	60.48	72.67	81.59	93.79	218.50	256.98	336.51	416.20
UIA (mg/L)	0.02	3.00	3.36	3.33	3.91	4.28	4.28	9.76	11.22	14.36	17.76

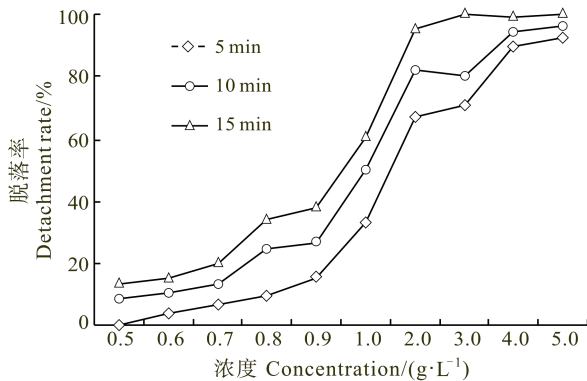


图1 碳酸氢铵对多棘麦杆虫脱落率的影响

Fig.1 Detachment rate of *C. acanthogaster* exposed to different concentrations of  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 

图中脱落率是减去空白对照的相对值

Detachment rate is the subtraction from blank group

棘麦杆虫虽出现脱落现象,但是脱落率比较低。当浓度达 0.6 g/L 时,短时间组的多棘麦杆虫开始出现脱落。当碳酸氢铵浓度增至 3.0 g/L 时,长时间组的多棘麦杆虫全部脱落。双因素方差分析结果显示,碳酸氢铵浓度与处理时间对麦杆虫脱落率有显著影响( $P < 0.05$ ),且浓度对脱落率的影响大于处理时间对脱落率的影响。

多棘麦杆虫脱落率( $D$ )与浓度( $C$ )的回归关系可以表示为  $\ln D = a + (b/C)$ 。回归方程的参数  $a$ 、 $b$  及复数相关系数见表 2。其中  $a$  的范围为 0.370–0.524,平均值为 0.438,  $b$  的范围为 -2.212 – -1.276,平均值为 -1.657。

表 2 多棘麦杆虫脱落率与碳酸氢铵浓度回归方程的参数  
Tab.2 Parameters related to the regression equation between detachment rate of *C. acanthogaster* and concentration of  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  at different treatment time

时间 Time (min)	系数 $a$ Coefficient $a$	系数 $b$ Coefficient $b$	$R^2$	$P$
5	0.524	-2.212	0.962	0.000
10	0.370	-1.484	0.955	0.000
15	0.421	-1.276	0.951	0.000

### 2.3 碳酸氢铵浓度与处理时间对多棘麦杆虫死亡率的影响

碳酸氢铵浓度和处理时间对多棘麦杆虫死亡率的影响见图 2。当碳酸氢铵浓度低于 0.6 g/L 时,3 个时间组的多棘麦杆虫均未出现死亡现象。当浓度达 0.7 g/L 时,中、长时间组的多棘麦杆虫出现死亡,但死亡率较低。短时间组,在碳酸氢铵浓度达到 0.9 g/L 时,才对多棘麦杆虫有致死作用。浓度在 0.9–2.0 g/L

范围时,多棘麦杆虫的死亡率较低,仅为 5%。随着碳酸氢铵浓度的增加,毒性作用不断增强,死亡率逐渐增大,且同一处理组内,死亡率随着处理时间的延长而增高。当浓度达 2.0 g/L 时,中、长时间组的死亡率迅速增高。双因素方差分析结果显示,碳酸氢铵浓度与处理时间对多棘麦杆虫死亡率均有显著影响( $P < 0.05$ ),且浓度对死亡率的影响大于处理时间对死亡率的影响。

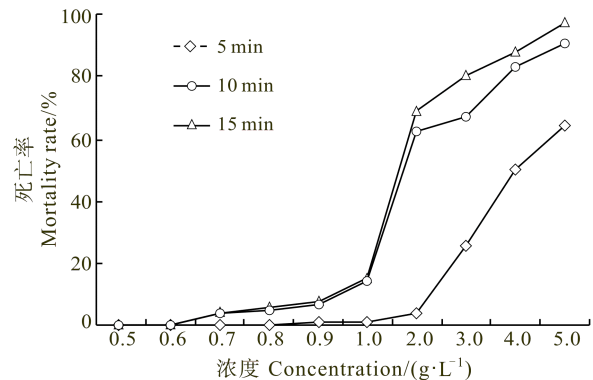


图2 碳酸氢铵对多棘麦杆虫的死亡率的影响

Fig.2 Mortality rate of *C. acanthogaster* exposed to different concentrations of  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 

图中死亡率是减去空白对照的相对值

Mortality rate is the subtraction from blank group

多棘麦杆虫死亡率( $M$ )与碳酸氢铵浓度( $C$ )的回归关系可以表示为  $\ln M = c + (d/C)$ 。回归方程的参数  $c$ 、 $d$  及复数相关系数见表 3。其中系数  $c$  的范围为 0.529–3.267,平均值为 2.217;系数  $d$  的范围为 -8.977– -3.307,平均值为 -6.469。

碳酸氢铵对多棘麦杆虫 100%致死浓度( $LC_{100}$ )见表 4。处理 5、10 min 的  $LC_{100}$  浓度分别为 7.36 g/L 和 6.17 g/L,二者比较接近,而处理 15 min  $LC_{100}$  仅为 3.68 g/L。

表 3 多棘麦杆虫死亡率与药物浓度回归方程的参数  
Tab.3 Parameters related to the regression equation between mortality rate of *C. acanthogaster* and concentration of  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  at different treatment time

时间 Time (min)	系数 $c$ Coefficient $c$	系数 $d$ Coefficient $d$	$R^2$	$P$
5	0.529	-8.977	0.789	0.000
10	2.856	-7.124	0.728	0.005
15	3.267	-3.307	0.731	0.000

### 3 讨论

目前,养殖过程中污损生物的防除问题已经成为

表 4 碳酸氢铵对多棘麦秆虫的 100%致死浓度和 95%可信限  
Tab.4 The  $LC_{100}$  of  $NH_4HCO_3$  for *C. acanthogaster* at different treatment time

时间 Time(min)	项目 Items	碳酸氢铵浓度 Concentration of $NH_4HCO_3$ (g/L)	UIA 浓度 Concentration of UIA (mg/L)
5	致死浓度 $LC_{100}$	7.36	37.72
	95%置信区间 95% CI	7.00–7.81	30.56–52.97
10	致死浓度 $LC_{100}$	6.17	21.32
	95%置信区间 95% CI	5.56–6.99	20.01–22.93
15	致死浓度 $LC_{100}$	3.68	14.25
	95%置信区间 95% CI	2.90–5.61	13.19–16.19

世界上普遍存在和面临的问题。本研究发现,化肥碳酸氢铵对直接栖居在生物表面的多棘麦秆虫有很强的急性毒性作用,在短时间内有很高的脱落率和致死率,且表现出很好的时间、剂量关系。可以通过增大药物的浓度,减少浸泡的时间,达到有效去除多棘麦秆虫以及增加可操作性的目的。该方法不仅可以用于龙须菜,也可用于其他养殖大型藻类上麦秆虫的防除。碳酸氢铵还可以提供龙须菜等大型藻类生长所需的 N,促进藻类的光合作用,起到增产的效果(程丽巍等, 2011)。

UIA 为非极性化合物,半径较小,易穿透细胞膜毒害生物(曲克明等, 2007),其毒性是离子氨的 50 倍(Alabaster *et al*, 1980)。近年来,UIA 对甲壳纲动物毒性效应的研究有不少报道,研究显示,甲壳纲动物 24 h 的  $LC_{50}$  通常介于 1.43–7.74 mg/L,如脊尾白虾(Ridgetail White Prawn) 幼体 24 h 的  $LC_{50}$  为 4.97 mg/L(梁俊平等, 2012)、斑节对虾(*Penaeus monodon*) 为 3.23 mg/L(李永等, 2012)、南美白对虾(*Litopenaeus schmitti*) 为 1.49–1.67 mg/L(彭自然等, 2004; Barbieri, 2010)。死亡率都随着 UIA 的升高和处理时间的延长而逐渐增加,这与本实验的结果一致,即 UIA 的毒性效应和胁迫时间与其浓度呈正相关。

大量防除剂对端足目动物毒性效应的研究也有相关报道,如有机化合物和重金属化合物等。硫酸铜、五氯苯酚及重铬酸钾 3 种药物对双眼钩虾(*Ampelisca* sp.) 48 h 的  $LC_{50}$  分别为(305.5±58.21)  $\mu$ g/L、(0.09±0.045) mg/L 和(56.89±9.76) mg/L(Soto *et al*, 2000)。麦秆虫(*Caprellap* spp.)对三丁基锡(TBT)及其衍生物特别敏感(Ohji *et al*, 2002; Monteiro *et al*, 2011), 48 h 的  $LC_{50}$  浓度为 1.2–8.6  $\mu$ g/L(Ohji *et al*, 2005), 而钩虾(*Gammarus* spp.)为 17.8–23.1  $\mu$ g/L(Ohji *et al*, 2002)。虽然微量有机化合物或重金属化合物对麦秆虫有绝对的致死作用,但不易降解或易在生物体内富集,均

不是理想的防除剂。碳酸氢铵作为一种防除剂对污损生物防除效果尚没有相关报道,但与其他防除剂相比,碳酸氢铵具有价格便宜、对龙须菜还有促进生长的优点。

由于多棘麦秆虫具有很强的繁殖能力(Bynum, 1980),如若不使其致死,在适宜条件下,多棘麦秆虫会大量繁殖,并快速增长。因此,在龙须菜的养殖生产中,最好采用 100%致死浓度。考虑到高浓度、短时间的浸泡在养殖生产上的可操作性比低浓度、长时间的浸泡更为可行,建议在养殖生产上采用碳酸氢铵浓度为 7.36 g/L(对应的 UIA 为 37.72 mg/L),浸泡时间为 5 min,可以对多棘麦秆虫达到 100%的致死效应。

当然,本实验结果尚需进一步的验证和完善,(1)该结果仅是室内可控条件的实验结果,能否在养殖实践中有效应用尚需验证。(2)UIA 的毒性效应受水体的 pH 值、溶解氧、盐度、水温等因子的影响,在具体应用中应加以注意。(3)在富营养化海域,施用氮肥可能会使富营养化水平加剧,因此在生产中需根据具体海域情况而定。

## 参 考 文 献

- 王芸,李健,张喆,等. pH、氨氮胁迫对中国对虾 HSP90 基因表达的影响. 渔业科学进展, 2013, 34(5): 43–50
- 王娟,曲克明,刘海英,等. 不同溶氧条件下亚硝酸盐和氨氮对中国对虾的急性毒性效应. 海洋水产研究, 2007, 28(6): 1–6
- 吕振明. 海水养殖网具污损生物的防除技术. 中国水产, 2002, 7: 67–68
- 曲克明,徐勇,马绍赛,等. 不同溶解氧条件下亚硝酸盐和非离子氨对大菱鲆的急性毒性效应. 海洋水产研究, 2007, 28(4): 83–88
- 朱大世,罗静波,吴宇略. 不同溶氧条件下  $NO_2^-$ -N 和  $NH_3$ -N 对青虾的急性毒性效应. 长江大学学报, 2010, 7(3): 40–42

- 闫雪峰, 于良民, 姜晓辉. 新型防污剂辣素衍生物的合成、抑菌性及防污性能研究. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2013, 1: 64–67
- 严涛, 刘姗姗, 曹文浩. 中国沿海水产设施污损生物特点及防除途径. 海洋通报, 2008, 27(1): 102–110
- 李永, 杨其彬, 苏天凤, 等. 氨氮对斑节对虾的毒性及免疫指标的影响. 上海海洋大学学报, 2012, 21(3): 274–278
- 林秀雁, 卢昌义. 6 种陆生植物提取物对白脊藤壶无节幼体的毒杀活性比较. 植物资源与环境学报, 2008, 17(2): 22–27
- 梁俊平, 李健, 李吉涛, 等. 氨氮对脊尾白虾幼虾和成虾的毒性试验. 水产科学, 2012, 31(9): 526–529
- 黄宗国, 蔡如星. 海洋污损生物及其防除(上). 北京: 海洋出版社, 1984, 3–19
- 黄宗国. 中国海洋生物种类与分布(增订版). 北京: 海洋出版社, 2008, 612–613
- 彭自然, 臧维玲, 高杨, 等. 氨和亚硝酸盐对凡纳滨对虾幼虾的毒性影响. 上海海洋大学学报, 2004, 13(3): 274–278
- 程丽巍, 邹定辉, 刘兆普, 等. 不同 N、P 水平对龙须菜生长及生理生化特性的影响. 海洋环境科学, 2011, 30(2): 211–215
- 雷衍之. 淡水养殖水化学. 南宁: 广西科学技术出版社, 1993, 96–99
- Alabaster JS, Lloyd R. Water quality criteria for freshwater fish [in Europe]. London: Butterworths, 1980, 297
- Barbieri E. Acute toxicity of ammonia in white shrimp (*Litopenaeus schmitti*) (Burkenroad, 1936, Crustacea) at different salinity levels. Aquaculture, 2010, 306(1): 329–333
- Bynum KH. Multivariate assessment of morphological variation in *Caprella penantis* Leach, 1814 (Amphipoda: Caprellidae). Estuarine and Coastal Marine Science, 1980, 10(2): 225–237
- Evans SM. TBT or not TBT: that is the question. Biofouling, 1999, 14(2): 117–129
- Monteiro HR, Esteves AC, Correia A, et al. Bioremediation of TBT contaminated marine waters by bacteria and ecotoxicological evaluation of its by-products. Current Opinion in Biotechnology, 2011, 22: S38
- Ohji M, Arai T, Miyazaki N. Acute toxicity of tributyltin to the Caprellidea (Crustacea: Amphipoda). Marine Environmental Research, 2005, 59(3): 197–201
- Ohji M, Takeuchi I, Takahashi S, et al. Differences in the acute toxicities of tributyltin between the Caprellidea and the Gammaridea (Crustacea: Amphipoda). Marine Pollution Bulletin, 2002, 44(1): 16–24
- Rittschof D, Lai CH, Kok LM, et al. Pharmaceuticals as antifoulants: concept and principles. Biofouling, 2003, 19(S1): 207–212
- Ross KA, Thorpe JP, Norton TA, et al. Fouling in scallop cultivation: help or hindrance? Journal of Shellfish Research, 2002, 21(2): 539–548
- Shi H, Wang LM. Nontoxic marine anti-fouling coating containing capsaicin. Marine Science Bulletin, 2006, 8(1): 92–96
- Soto E, Larrain A, Bay-Schmith E. Sensitivity of *Ampelisca araucana* juveniles (Crustacea: Amphipoda) to organic and inorganic toxicants in tests of acute toxicity. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2000, 64(4): 574–578

(编辑 刘丛力)



## Removal of the Biofouling Organism *Caprella acanthogaster* Attached on Cultivated Seaweed *Gracilaria lemaneiformis* Using Ammonium Bicarbonate

WEI Yanwei<sup>1,2</sup>, ZHANG Jihong<sup>2</sup>, WU Wenguang<sup>2</sup>

(1. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306;

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

**Abstract** Biofouler *Caprella acanthogaster*, a subtype of Crustacea Amphipoda, feed on cultivated macroalgae *Gracilaria lemaneiformis* and resultantly affect the survival and growth of the latter. Ammonia could be a potential antifoulant to biofouler *C. acanthogaster* due to its toxic effects at high concentrations.  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  may be an efficient source of the ammonia-based antifoulant—as a common agricultural fertilizer, it could provide nitrogen nutrient for *G. lemaneiformis*; moreover, it is readily to be reduced into water and carbon dioxide. In our experiments, *C. acanthogaster* was exposed to  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  solution at different concentrations ( $C$ ) including 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 and 5.0 g/L, with 0 g/L as the blank control. The detachment rate ( $D$ ) and mortality rate ( $M$ ) of *C. acanthogaster* was measured after three treatments separately—short time (5 min), medium time (10 min), and long time (15 min). The results showed that both the  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  concentration and the length of treatment had significant effects on the detachment rate ( $D$ ) and the mortality rate ( $M$ ) ( $P < 0.05$ ). The saturating lethal concentrations of  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  for the 5 min, 10 min and 15 min treatments were 7.36 (7.00–7.81), 6.17 (5.56–6.99), and 3.68 (2.90–5.61) g/L, respectively.  $D$  and  $M$  increased along with the elevation of the  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  concentration and the exposure time. In the same exposure time, the relationship between  $D$  or  $M$  and the  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  concentration could fit in the S-shaped curve equation:  $\ln D = a + (b/C)$ , or  $\ln M = c + (d/C)$ . Given that *C. acanthogaster* has a short reproduction time that short-term operation is more plausible in aquaculture, we suggested that *G. lemaneiformis* should be soaked in 7.36 g/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  solution for 5 min. However, more caution should be exercised when  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  is applied in eutrophication areas.

**Key words** *Caprella acanthogaster*; Antifouling efficiency; Ammonium bicarbonate; *Gracilaria lemaneiformis*

# 一株海洋过氧化氢酶高产菌的鉴定 及产酶条件优化\*



陈世建<sup>1,2</sup> 王 伟<sup>1</sup> 孙 谧<sup>1①</sup>

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市海洋酶工程重点实验室  
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 上海海洋大学食品学院 上海 201306)

**摘要** 对来自青岛近海海域底泥的一株产过氧化氢酶菌株 YS0810 进行形态学观察、16S rDNA 序列同源性分析及生理生化特性的鉴定,在 250 ml 摇瓶中进行发酵产酶条件优化。初步确定该菌属于不动杆菌属 *Acinetobacter*。发酵培养的最佳碳、氮源分别为蔗糖 20 g/L 和蛋白胨 15 g/L,无机盐  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、NaCl、 $KH_2PO_4$  最佳浓度分别为 0.9、5.0 和 1.0 g/L;菌株在培养基起始 pH=7.0、4%接种量、50 ml 装液量和 25℃的条件下发酵 24 h 获得较高的酶产量。在最佳培养条件下酶产量为 2469 U/ml,是优化前的 5 倍。

**关键词** 海洋微生物;过氧化氢酶;不动杆菌属;鉴定;培养条件优化

**中图分类号** S932 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2014)04-0103-07

微生物过氧化氢酶(EC 1.11.1.6),又称触酶(Catalase, CAT),普遍存在于好氧微生物体内。作为一种酶类清除剂,其主要功能是催化过氧化氢分解成氧气和水,防止体内羟基自由基的过量积累。基于其高效的催化活性,现已被广泛应用于临床分析、食品加工、纺织、造纸、医械器具的消毒及抗肿瘤药物的研究。近年来,过氧化氢酶由于其在纺织工业中的应用而倍受关注。多数的过氧化氢酶的应用是在碱性、高温条件下进行的,而商品化的过氧化氢酶很少具有这一特性,因而限制了过氧化氢酶更多的推广应用,仍需开发更适高温和碱性的过氧化氢酶(张东旭等, 2010)。

目前,市售的过氧化氢酶主要来源于动物组织提取和部分微生物发酵,其生产主要由几家外企和合资公司所控制。尽管国内外已有许多关于微生物过氧化氢酶的报道(张东旭等, 2010; 赵志军等, 2007; Paar *et al*, 2001; Wang *et al*, 2008; Zeng *et al*, 2011), 国内目前商品过氧化氢酶以动植物源和微生物发酵为主,

其研究主要集中在菌株的筛选,培养基和培养条件的优化。张增祥等(2010)从保存的水样中筛选出一株过氧化氢酶高产菌株,酶活性达 1356.2 U/ml。洪海军等(2004)通过对溶壁微球菌培养基和发酵工艺的优化,过氧化氢酶生产水平由 290 U/ml 提高到 1100 U/ml。陆挺等(2001)采用摇瓶发酵法优化溶壁微球菌的产过氧化氢酶活性,发酵 12 h 获得酶浓度 292 U/ml。国内微生物过氧化氢酶仍处于应用开发阶段,目前还没有高产过氧化氢酶菌株在规模化生产中获得广泛应用,开发新型、性质优良的微生物过氧化氢酶迫在眉睫。随着人们对微生物过氧化氢酶的日益关注,以及研究技术和方法的不断完善成熟,微生物过氧化氢酶必将成为过氧化氢酶工业化发展的重要方向,过氧化氢酶产生菌的筛选及应用研究应持续开展。

本研究以实验前期已筛选获得的一株过氧化氢酶产生菌为出发菌,对其进行鉴定,并进一步研究其发酵产酶工艺,为后续研究开发奠定基础。

\* 国家“十二五”863 项目(2011AA090703)和国家自然科学基金(41006119)共同资助。陈世建, E-mail: csjworld123@126.com

通讯作者: 孙 谧, 研究员, E-mail: sunmi@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2013-03-19, 收修改稿日期: 2014-02-22

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株及培养基

2011年3月从山东青岛近海采集的多份活性底泥样本中分离微生物菌种并由本实验室保存。

活化培养基：蛋白胨 1%、牛肉膏 0.3%、NaCl 0.5%，pH=7.0；基础发酵培养基：蛋白胨 1%、牛肉膏 0.3%、NaCl 0.5%，pH=7.0。固体培养基添加 2% 琼脂粉。

### 1.2 菌株的鉴定

**1.2.1 形态特征观察及生理生化试验** 将活化后的菌株适当稀释，涂布于含基础培养基的平板上，30℃倒置培养，每隔一定时间进行一次形态学观察，待培养至 24 h，插片法(姜云等，2007)制备样品后，送中国科学院海洋研究所进行扫描电镜观察并拍照。生理生化实验按照文献(东秀珠等，2001；Bouvet *et al.*, 1986)进行。

#### 1.2.2 16S rDNA 基因扩增及系统发育树的构建

细菌总 DNA 的提取及 16S rDNA 分析参考文献(Rousseaux *et al.*, 2001)进行。PCR 扩增采用引物 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGTCAG-3')和 1492R(5'-CGGCTACCTTGTACGAC-3')。PCR 反应条件：95℃ 5 min；95℃ 40 s，55℃ 1 min，72℃ 1.5 min，循环次数 30；最后 72℃ 10 min。扩增产物用琼脂糖电泳鉴定，获得一条 1.5 kb 的条带。PCR 产物送生工生物工程(上海)有限公司完成纯化与测序工作。在 EzBioCloud 网站的 EzTaxon 数据库中检索与 PCR 测序结果相似度较高的菌株(Chun *et al.*, 2007)，下载对应菌株的 16S rDNA 序列，用 MEGA 5.1 软件按照最大似然法(Maximum-likelihood method)构建系统发育树(Tamura *et al.*, 2011)。

### 1.3 培养方法

在 250 ml 三角瓶中进行单因素实验，分别考察氮源、碳源、无机盐、接种量、装液量、培养基起始 pH、发酵温度和发酵时间对发酵产酶的影响。

### 1.4 酶活的测定

取适量的发酵液，10000 r/min 离心 10 min，沉淀重悬于预冷的 pH=7.0 的 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液中，冰浴中超声波间歇破碎 10 min，镜检破碎效果，10000 r/min 离心 10 min，上清液即为胞内酶活(曾化伟等，2011)。酶活的测定在 25℃ 条件下进行，采用紫外分光光度法(Beers *et al.*, 1952)。反应体系为 50 mmol/L

pH 7.0 的磷酸钾缓冲液，H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度 20 mmol/L。活性以 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 在 240 nm 处分解速率计算。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 摩尔吸光系数为 43.6 L/(mol·cm)。

## 2 结果与分析

### 2.1 高产过氧化氢酶菌株的鉴定

**2.1.1 菌株 YS0810 的形态特征** 菌株 YS0810 为革兰氏阴性杆菌，无芽孢，无运动性，平板培养 24 h 形成 2–3 mm 乳白色的菌落，表面光滑，边缘规则，有粘性，易挑起。从该菌扫描电镜图(图 1)可以明显看出，该菌为短杆菌，菌体体型较小，长度在 1 μm 左右，宽度在 0.5 μm 左右。

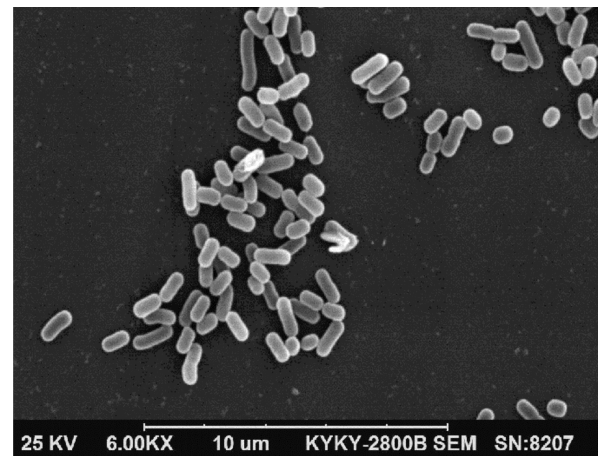


图 1 扫描电子显微镜下的菌株 YS0810

Fig.1 Scanning electron microscope photograph of strain YS0810

**2.1.2 系统发育树** PCR 产物测序获得菌株 YS0810 的 16S rDNA 部分序列，长度为 1443 bp，GenBank 登录号为 JX221556。应用 BLAST 程序与 EzTaxon 数据库(<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>)中已有细菌的 16S rDNA 序列进行相似性比较，发现菌株 YS0810 与溶血不动杆菌 *Acinetobacter haemolyticus* 具有很高的相似性(98.68%)，选取了相似性较高的 16 株菌，以 *Pseudomonas reinekei* Mt-1<sup>T</sup>(AM293565)作为属外细菌，应用 MEGA 5.1 软件进行系统发育树分析(图 2)，结合形态学观察结果，可初步确定该菌属于不动杆菌属。

**2.1.3 菌株 YS0810 的生理生化特征** 由表 1 结果显示，菌株 YS0810 与溶血不动杆菌的分类学特征不完全一致，结合菌株的形态学观察和 16S rDNA 序列分析结果，可确定菌株 YS0810 属于不动杆菌属。

### 2.2 产酶条件初步研究

#### 2.2.1 氮源对菌株 YS0810 产过氧化氢酶的影响

从基础发酵培养基出发，研究不同氮源(10 g/L)

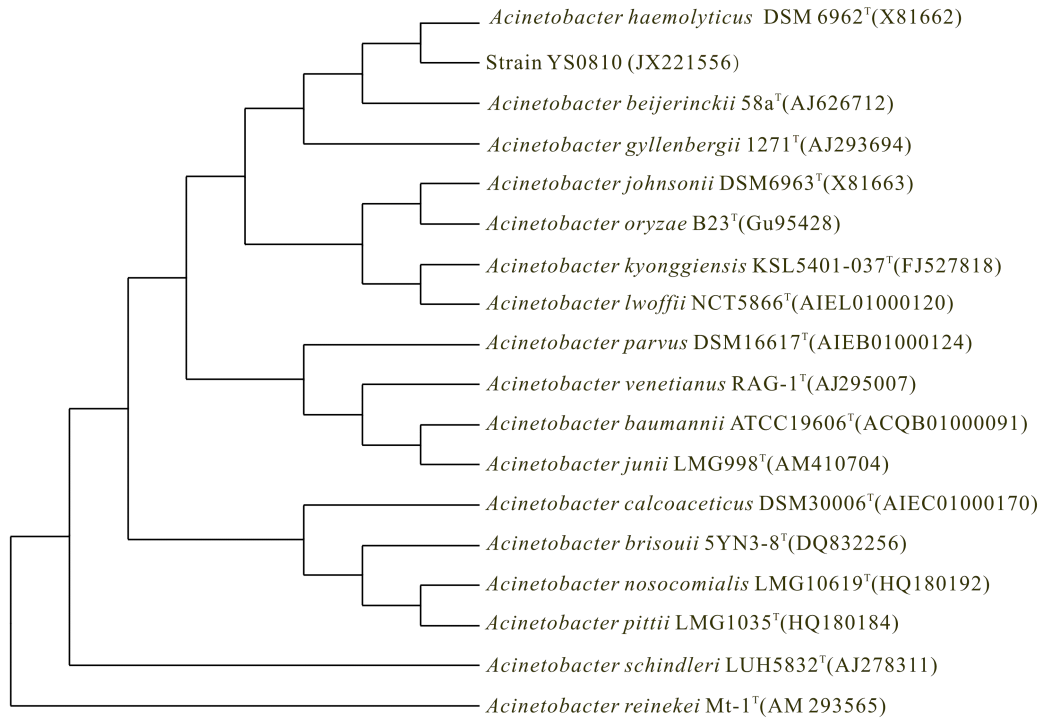


图 2 菌株 YS0810 16S rDNA 序列同源性构建的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree derived from 16S rDNA sequence of strain YS0810 and other species within the *Acinetobacter* genus

表 1 菌株 YS0810 与不动杆菌属各个种的分类学特征比较(东秀珠等, 2001)

Tab.1 Comparison of taxonomic characteristics between strain YS0810 and *Acinetobacter* sp.

特性 Characteristics	鲍氏不动杆菌 <i>A. baumannii</i>	乙酸钙不动杆菌 <i>A. calcoaceticus</i>	溶血不动杆菌 <i>A. haemolyticus</i>	约氏不动杆菌 <i>A. johnsonii</i>	琼氏不动杆菌 <i>A. junii</i>	鲁氏不动杆菌 <i>A. lwoffii</i>	YS0810
生长温度 44℃	+	-	-	-	-	-	+
Growth temperature 41℃	+	-	-	-	90	-	+
37℃	+	+	+	-	+	+	+
明胶水解 Gelatin hydrolysis	-	-	96	-	-	-	-
溶血性 Hemolysis	-	-	+	-	-	-	-
柠檬酸盐 Citrate test	+	+	91	+	82	-	+
葡萄糖产酸 Acid from glucose	95	+	52	-	-	6	+
利用 乳酸钠 Utilization Sodium lactate	+	+	-	+	+	+	+
L-苯丙氨酸 L-Phenylalanine	87	+	-	-	-	-	+
L-组氨酸 L-Histidine	98	+	96	-	+	ND	+
D-苹果酸钠 D-Malate	98	-	96	22	+	76	+
L-天冬氨酸 L-Aspartate	+	+	64	61	40	-	-
L-亮氨酸 L-Leucine	97	38	96	-	11	-	+

续表 1  
Continued Tab.1

特性 Characteristics	鲍氏不动杆菌 <i>A. baumannii</i>	乙酸钙不动杆菌 <i>A. calcoaceticus</i>	溶血不动杆菌 <i>A. haemolytius</i>	约氏不动杆菌 <i>A. johnsonii</i>	琼氏不动杆菌 <i>A. junii</i>	鲁氏不动杆菌 <i>A. hwoffii</i>	YS0810
L-酪氨酸 L-Tyrosine	+	+	5	70	60	3	+
β-丙氨酸 β-Alanine	95	+	-	-	-	-	-

+, 阳性; -, 阴性。数值为阳性百分比; ND, 未测

+, positive; -, negative. The numbers are percentages of positive strains; ND, not determined

对菌株 YS0810 产过氧化氢酶的影响, 结果如图 3A 所示。其发酵产酶的最佳氮源为蛋白胨, 随后, 进行了不同浓度的蛋白胨对产酶的影响(图 3B), 当蛋白胨在较低浓度(15 g/L)时, 相对酶活力最高。

### 2.2.2 碳源对菌株 YS0810 产过氧化氢酶的影响

在氮源为蛋白胨(15 g/L)的基础上, 研究不同碳源(10 g/L)对产酶的影响。由图 4A 可以看出, 在相同条件下, 蔗糖作为碳源时, 产酶效果最好。其后的浓度单因素结果(图 4B)显示, 当蔗糖浓度为 20 g/L 时, 获得较高的酶活。

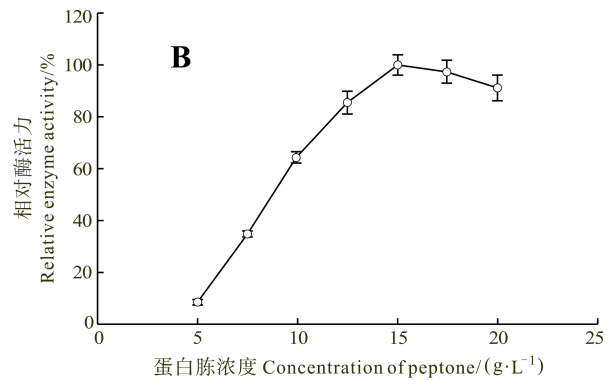
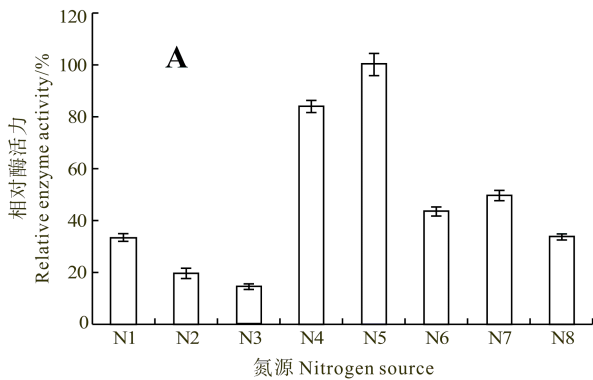


图 3 不同氮源对产酶的影响

Fig.3 Effects of different nitrogen sources on the production of catalase

N1: 酵母抽提物, N2: 牛肉膏, N3: 尿素, N4: 玉米浆, N5: 蛋白胨, N6: KNO<sub>3</sub>, N7: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, N8: NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>  
N1: yeast extract, N2: beef extract, N3: urea, N4: corn paste, N5: peptone, N6:KNO<sub>3</sub>, N7: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, N8: NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>

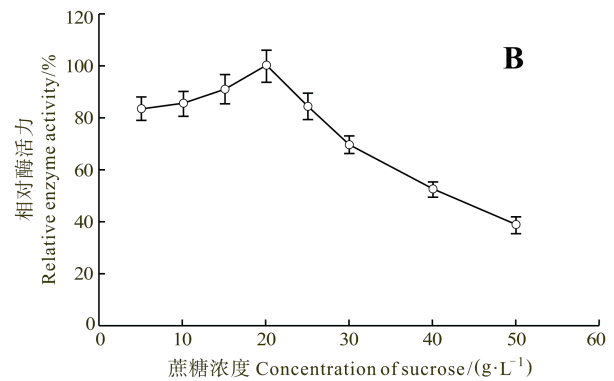
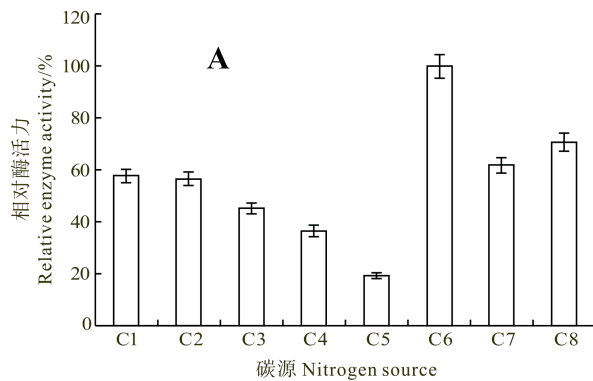


图 4 不同碳源对产酶的影响

Fig.4 Effects of different carbon sources on the production of catalase

C1: 麦芽糖, C2: 可溶性淀粉, C3: 葡萄糖, C4: β-环糊精, C5: 乙醇, C6: 蔗糖, C7: 甘油, C8: 麦麸  
C1: maltose, C2: soluble starch, C3: glucose, C4: β-cyclodextrin, C5: ethanol, C6: sucrose, C7: glycerol, C8: bran

### 2.2.3 无机盐对菌株 YS0810 产过氧化氢酶的影响

主要考察  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $KH_2PO_4$ 、 $NaCl$  不同添加量对产酶量的影响。由图 5—图 7 可知,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $KH_2PO_4$ 、 $NaCl$  分别在添加量为 0.9、1.0、5.0 g/L 时, YS0810 产酶量达到最高; 高浓度  $NaCl$  对 YS0810 产酶具有抑制作用。

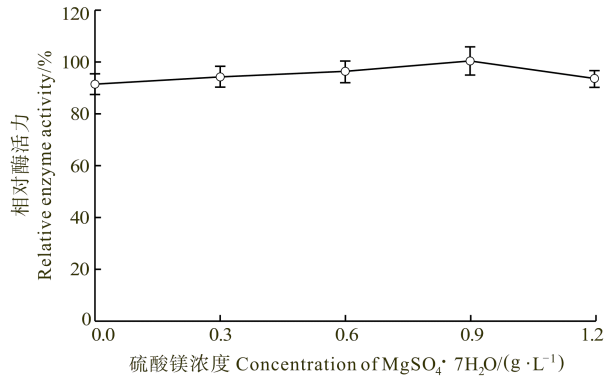


图 5 硫酸镁浓度对产酶的影响

Fig.5 Effects of  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  on the production of catalase

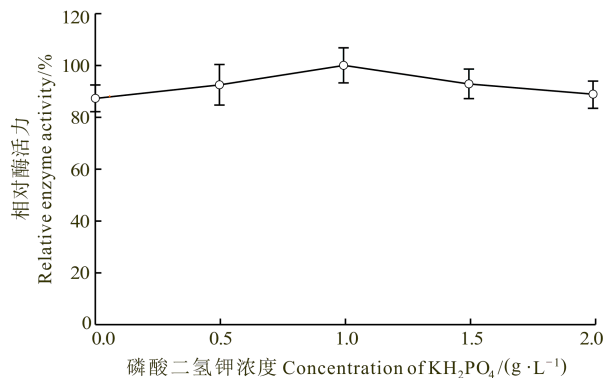


图 6 磷酸二氢钾浓度对产酶的影响

Fig.6 Effects of  $KH_2PO_4$  on the production of catalase

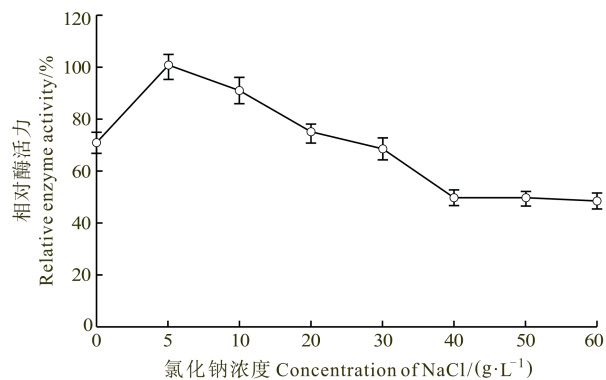


图 7 氯化钠浓度对产酶的影响

Fig.7 Effects of  $NaCl$  on the production of catalase

### 2.2.4 接种量对菌株 YS0810 产过氧化氢酶的影响

在 250 ml 的发酵培养基中分别按照体积分数 2%、

4%、6%、8%、10%、12% 接入种子培养液, 酶产量在接种量 2%—4% 之间呈上升趋势, 在 4%—12% 时呈现下降趋势, 由图 8 可知, 发酵最佳接种量为 4%。

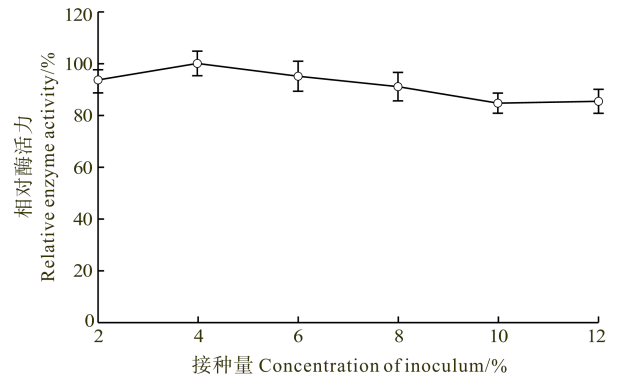


图 8 接种量对产酶的影响

Fig.8 Effects of amount of inoculum on the production of catalase

### 2.2.5 装液量对菌株 YS0810 产过氧化氢酶的影响

在 250 ml 三角瓶中考察不同装液量对 YS0810 产酶的影响。由图 9 可知, 装液量对酶产量的影响相对较小。在较低装液量水平(50 ml), 酶产量相对稳定; 在较高的装液量水平时, 酶产量减少, 这主要是由于溶氧较低、供氧不足而造成的。

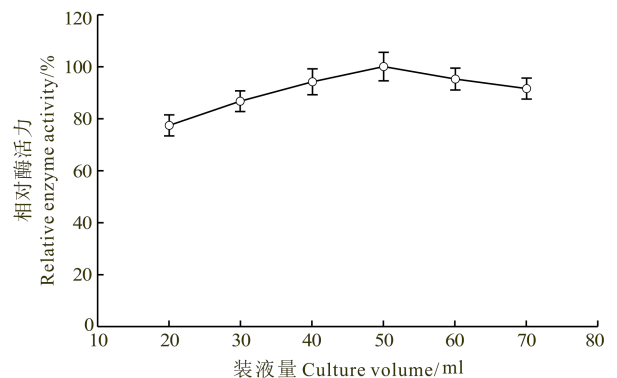


图 9 装液量对产酶的影响

Fig.9 Effects of culture volume on the production of catalase

### 2.2.6 起始 pH 对菌株 YS0810 产过氧化氢酶的影响

其他条件不变, 考察发酵培养基的起始 pH 对菌株产酶的影响。由图 10 可知, 起始 pH 为 7.0 时, 酶产量相对较高。

### 2.2.7 发酵温度对菌株 YS0810 产过氧化氢酶的影响

考察不同温度(25℃、30℃、33℃、37℃和 40℃)对产酶的影响, 从图 11 可以看出, 该菌在相对较低温度(25℃)下, 产酶较高; 较高温度条件下(>33℃), 产酶量明显下降。这与菌株 YS0810 来自海洋环境并长期适应低温环境有关。

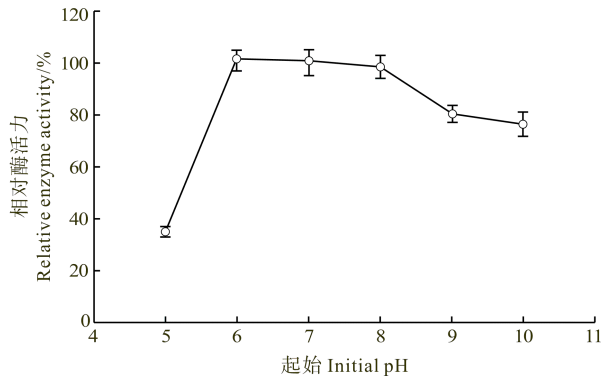


图 10 起始 pH 对产酶的影响

Fig.10 Effects of initial pH on the production of catalase

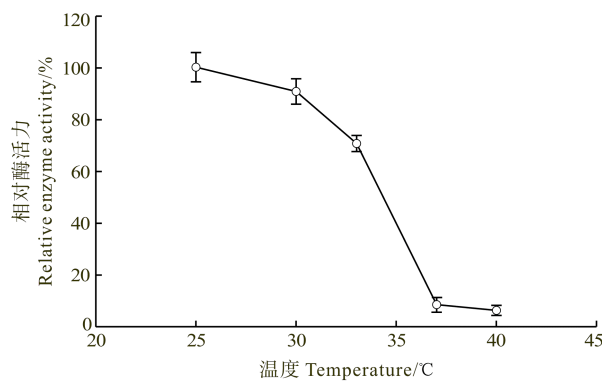


图 11 发酵温度对产酶的影响

Fig.11 Effects of temperature on the production of catalase

### 2.2.8 发酵时间对菌株 YS0810 产过氧化氢酶的影响

从种子培养液中按 2%(v/v)接种入 50 ml/250 ml 三角瓶中, 25°C、200 r/min 培养, 每 4 h 取样测定过氧化氢酶活力。结果如图 12 所示, YS0810 在培养 24 h 后, 过氧化氢酶产量达到最大。因此, 在实验条件下, YS0810 最佳培养时间为 24 h。与此同时, 可以看到 YS0810 在培养 24–48 h 内活性稳定、产量较高, 培养 48 h 后酶产量为 24 h 的 65%。

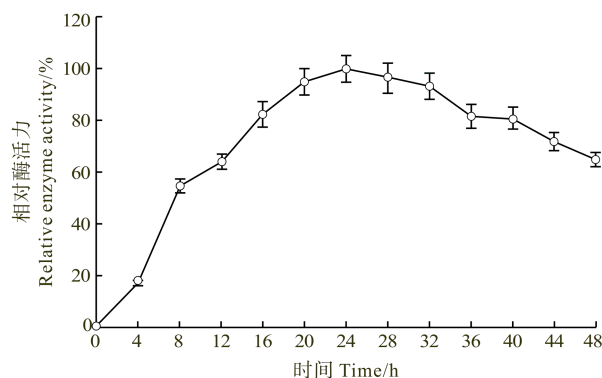


图 12 发酵时间对产酶的影响

Fig.12 Effects of culturing time on the production of catalase

### 3 结语

本研究对已筛选的野生菌菌株 YS0810 进行鉴定, 经 16S rDNA 分析和菌株的部分生理生化实验, 可确定其为不动杆菌属 *Acinetobacter*。通过摇瓶发酵对其培养基和培养条件的考察, 确定了发酵培养的最佳碳氮源蔗糖和蛋白胨的浓度分别为 20 g/L 和 15 g/L, 无机盐  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、NaCl 和  $KH_2PO_4$  最适浓度分别为 0.9、5.0 和 1.0 g/L; 在培养基起始 pH=7.0、4%接种量、50 ml 装液量和 25°C 的条件下发酵 24 h 获得较高的酶产量。在最适培养条件下, 获得的酶产量为 2469 U/ml, 与未优化的 560 U/ml 相比, 优化效果显著。目前实验室正在进行 YS0810 过氧化氢酶的产酶胁迫诱导、分离纯化、序列分析和酶学性质的研究工作。从现有的研究结果看, 该酶具有在工业中获得应用的潜力, 有进一步研究的价值。这也为下一步该酶的异源表达(为获得高产、耐受高温、高 pH 的酶)、产酶过程数学模型的建立和该酶的放大生产及利用奠定基础。

### 参 考 文 献

- 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 2001. 北京: 科学出版社, 188–189
- 张东旭, 堵国成, 陈坚. 微生物过氧化氢酶的发酵生产及其在纺织工业的应用. 生物工程学报, 2010, 26(11): 1473–1481
- 张增祥, 王伟, 郝建华, 等. 产过氧化氢酶菌株 CE-1 的筛选与鉴定. 海洋科学, 2010, 34(11): 54–58
- 陆挺, 汪成富, 戴英, 等. 过氧化氢酶发酵性能的研究. 苏州大学学报(自然科学), 2001, (3): 95–97
- 赵志军, 华兆哲, 刘登如, 等. 碱性过氧化氢酶高产菌的筛选、鉴定及发酵条件优化. 微生物学通报, 2007, 34(4): 667–671
- 姜云, 黄丽丽, 陈长卿, 等. 一株拮抗番茄叶霉病菌的放线菌筛选、鉴定及发酵条件研究. 微生物学报, 2007, 47(4): 622–627
- 洪海军, 许贇荣. 产过氧化氢酶菌株培养条件的优化. 无锡轻工大学学报, 2004, 23(6): 85–89
- 曾化伟, 张峰, 蔡宇杰, 等. 菌株 *Serratia marcescens* SYBC08 产过氧化氢酶液态发酵工艺的优化及酶性质研究. 食品与生物技术学报, 2011, 30(3): 410–416
- Beers RJ, Sizer IW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. J Biol Chem, 1952, 195(1): 133–140
- Bouvet PJM, Grimont PAD. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter*

- lwoffii*. Int J Syst Bacteriol, 1986, 36(2): 228–240
- Chun J, Lee JH, Jung Y, *et al.* EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. Int J Syst Evol Microbiol, 2007, 57(10): 2259–2261
- Paar A, Costa S, Tzanov T, *et al.* Thermo-alkali-stable catalases from newly isolated *Bacillus* sp. for the treatment and recycling of textile bleaching effluents. J Biotechnol, 2001, 89(2–3): 147–153
- Rousseaux S, Hartmann A, Soulas G. Isolation and characterisation of new Gram-negative and Gram-positive atrazine degrading bacteria from different French soils. FEMS Microbiol Ecol, 2001, 36(2–3): 211–222
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, *et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol, 2011, 28(10): 2731–2739
- Wang W, Sun M, Liu W, *et al.* Purification and characterization of a psychrophilic catalase from Antarctic *Bacillus*. Can J Microbiol, 2008, 54(10): 823–828
- Zeng H, Cai Y, Liao X, *et al.* *Serratia marcescens* SYBC08 catalase isolated from sludge containing hydrogen peroxide shows increased catalase production by regulation of carbon metabolism. Eng Life Sci, 2011, 11(1): 37–43

(编辑 冯小花)

## Identification of a Marine Bacterium Producing High-Level Catalase and Optimization of Its Fermentation Conditions

CHEN Shijian<sup>1,2</sup>, WANG Wei<sup>1</sup>, SUN Mi<sup>1</sup>Ⓐ

- (1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Qingdao Key Laboratory of Marine Enzyme Engineering, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;  
2. College of Food Science & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

**Abstract** Catalases are a type of enzymes that can effectively decompose hydrogen peroxide into water and oxygen. Because of their ubiquitous distribution in all aerobic microorganisms, plants and animals, they are widely used in food, pharmaceutical, chemical industries and environmental protection. In this study we examined the bacterial strain YS0810 collected from the sediment in Yellow Sea that produces catalase at a high level. We determined the growth conditions of this strain which is optimal for the catalase production. Phylogenetic analysis of the 16S rDNA of this strain was applied to determine its taxonomic rank. The conventional morphological, physiological and biochemical methods of taxonomy were also applied to differentiate the YS0810 from its phylogenetic relatives. We used 250 ml shake flasks to carry out the single factor experiments to identify the important growth factors for the strain YS0810. The phylogenetic tree indicated that strain YS0810 belonged to the genus *Acinetobacter*, with the highest sequence similarity to *Acinetobacter haemolyticus* DSM 6962<sup>T</sup> (98.7%). However, YS0810 was not a strain of *A. haemolyticus*. This was consistent with the results of the comparison between YS0810 and other *Acinetobacter* species in terms of their morphological, physiological and biochemical characteristics. Peptone and sucrose were determined as the optimal nitrogen and carbon sources from several candidates. Our experimental results indicated that the maximum yield of the catalase was generated by YS0810 under the conditions shown below: peptone 15 g/L, sucrose 20 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.9 g/L, NaCl 5.0 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 g/L, broth content at 50 ml, the inoculum at 4%, initial pH 7.0, the temperature at 25°C and the culture time of 24 h. The verification experiment carried out in the optimal conditions above showed that the highest catalase activity was 2469 U/ml, which is five-time higher than before the optimization. In conclusion, the yield of catalase was markedly raised in the optimized fermentation conditions.

**Key words** Marine microorganism; Catalase; *Acinetobacter*; Identification; Culture optimization



# 低温活鱼运输箱监控系统研制\*



聂少伍<sup>1</sup> 洪苑乾<sup>1</sup> 黄汉英<sup>1</sup> 黎焯<sup>1</sup> 胡月来<sup>1</sup> 熊善柏<sup>2</sup> 赵思明<sup>2</sup>

(1. 华中农业大学工学院 武汉 430070; 2. 华中农业大学食品科技学院 武汉 430070)

**摘要** 目前市场上应用的活鱼运输装置大都采用人工控制或单片机控制系统,自动化水平低或抗干扰性差,不能满足长途运输的要求。为了提高低温活鱼运输箱系统的自动化水平,改善活鱼运输条件,提高活鱼运输的存活率,采用 PLC 为核心控制器,触摸屏为人机界面,通过对系统的硬件和软件进行设计,实现了设备的启停控制,运用 PID 控制算法和脉冲定时器建立的 PPI 通信网络,实现了温度、pH 值和 DO 的自动采集与控制。系统温度、pH 值和 DO 控制范围分别为 3–35℃、8–13 mg/L 和 6.5–8.0,箱体内水温分布均匀,升温 and 降温速率平缓。试验结果表明,空载时,箱体内水体温度分布偏差为 1℃,温度上升和下降速率分别为 2.5、2.3℃/h;按鱼水质量比 1:2 运输,水温控制在 6.7–7.3℃、DO 在 8.9–12.8 mg/L, pH 在 6.5–7.5 的水体条件下,运输时间约为 72 h 时,武昌鱼的存活率达到 96.7%。系统性能稳定、可靠性高、人机界面友好、使用灵活,能适应不同地区 and 不同鱼种的运输要求。

**关键词** PLC; 活鱼运输; 监控系统; 触摸屏

中图分类号 S24 文献标识码 A 文章编号 1000-7075(2014)04-0110-08

活鱼运输是鱼类移殖、引种和供应市场鲜活商品鱼等过程中的一种活体运输方式(赵丹等, 2012)。现在已经应用的活鱼运输装置大多停留在人工控制状态,只是在运输箱上加了增氧措施,人工观察鱼的状态并进行调整(黄海等, 2009; 史建华等, 2007)。随着自动化技术的广泛应用,人们对活鱼运输的自动化程度的要求也越来越高。目前已经有以单片机为核心的活鱼运输自动监控系统,实现了活鱼运输过程中 DO、温度等的监测(朱健康等, 2005; 陈郡等, 2009; King, 2009),但是单片机控制系统抗干扰能力差,不能满足长途运输的要求。

针对上述问题,本研究开发了一套基于 PLC 的全自动活鱼运输装置,实现了对活鱼长途运输过程的参数监控。

## 1 活鱼运输系统的组成

该系统主要由 PLC 控制器、触摸屏、箱体、增氧系统、水循环系统、过滤系统以及冷热水机组等部分组成,各部分的相互关系如图 1 所示。

控制系统采用 PLC 作为控制器,利用触摸屏实现鱼箱内水质的监测。

增氧系统采用气流增氧、喷淋增氧相结合的方法对箱内水体进行增氧。喷淋增氧由安装与箱体上部 150 mm 处贴紧箱体壁的喷头来完成,气流增氧由增氧泵以及安装于箱体底部的纳米微孔曝气管来完成。通过控制增氧泵的启停,即可实现对 DO 的自动控制。

水循环系统和过滤系统的作用是保证箱体内的水体温度均匀并对水体 pH 值进行调节,以提高鱼的成活率(李利等, 2009; 田朝阳, 2003; Farrell, 2006;

\* “十二五”国家科技支撑计划(2013BAD19B10)和“鲜活水产品物流过程品质维持与质量安全控制技术集成应用与示范”共同资助。聂少伍, E-mail: nsw19910707@163.com; 共同第一作者, 洪苑乾, E-mail: hongyuanqian1987@163.com

通讯作者: 黎焯, 讲师, E-mail: lx@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2014-01-20, 收修改稿日期: 2014-03-25

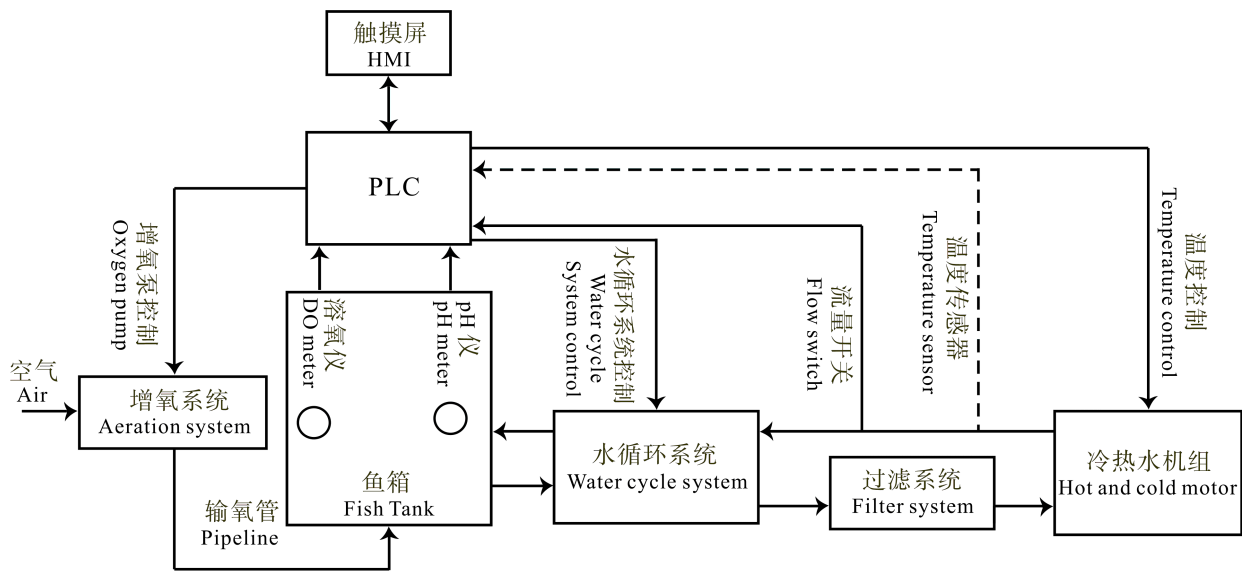


图 1 活鱼运输系统组成结构

Fig.1 Scheme of live fish transport system

周德强, 2005)<sup>1)</sup>。水循环系统包括水泵、旁路电磁阀、水管、出水嘴、喷淋头等。水泵将水箱内的水抽出, 通过过滤器、输水管道, 进入过滤系统, 过滤后的水再经过蒸发器输入到水箱, 以保证箱体内水质适合鱼的生存。过滤系统安装在水泵和制冷机组之间, 过滤系统采用两级串联过滤的方式, 另外, 再与过滤系统并联安装一个旁路水管, 两管道上均安装有电磁阀, 用来选择是否需要水质过滤。

冷热水机组由压缩机、蒸发器、冷凝器、风机、电磁阀等组成, 用来实现鱼箱内水体温度的调节, 以满足低温保活运输的要求。

## 2 控制系统设计

### 2.1 硬件设计

控制系统采用在线式溶氧仪 SJG-208 及 pH 仪 PHG-217D 检测鱼箱内水体的 DO、pH, 在冷热水机组的出水口处采用 PT100 温度传感器检测水温。

PLC 控制器的接线原理如图 2 所示, 系统有增氧泵、水泵、压缩机等共 8 个控制对象。其中, 增氧泵、水泵、压缩机通过交流接触器控制, 电磁阀由 PLC 直接驱动。系统需要 8 个数字量输出控制点、1 个数字量输入点(流量开关)、1 个模拟量输入(温度)。pH 仪、溶氧仪及触摸屏需要通过串口与 PLC 通信, 本系统将 pH 仪与溶氧仪组成一个网络, 通过一个串口

与 PLC 相连, 分时采集信号, 实现 pH 值和 DO 的交替检测。故选用西门子的 CPU224XP 作为 PLC 控制器, 它具有 14 个数字量输入, 10 个数字量输出, 两个模拟量输入, 两个 RS485 串行通信端口, 可以满足控制要求。

### 2.2 系统参数控制

**2.2.1 温度** 温度控制由冷热水机组及循环水泵实现, 在系统运行过程中, 压缩机及循环水泵一直处于运行状态, 即 KM1、KM2 接通, 系统通过控制制冷电磁阀及旁通电磁阀的开启实现温度的控制。

若水温( $T$ )高于设定温度( $T_0$ ), 接通制冷阀 YV3, 给水箱降温。当水温降至高于设定值不超过  $2^{\circ}\text{C}$ , 系统进入温度微调控制。

若水温( $T$ )低于设定温度( $T_0$ ), 关闭制冷阀 YV3, 接通四通阀 YV1, 给水箱供热。当水温升至低于设定值不超过  $2^{\circ}\text{C}$ , 系统进入温度微调控制。

温度微调控制时首先调用 PID 调节算法, 计算旁通阀 YV2 与制冷阀 YV3 的开、关时间, 从而调整系统的供冷量, 保持水温在设定温度附近。

温度的微调控制采用脉宽调制的方法, 通过 PID 算法, 计算制冷电磁阀与旁通电磁阀的开关时间, 并生成一个阀门控制脉冲。PID 参数采用自整定的方法来获得, 其中比例系数为 10, 微分时间  $0.7\text{ min}$ , 积分时间  $10\text{ min}$ , 温度控制流程见图 3。

1) 周德强. 水产养殖环境参数自动监控系统的研究. 华中农业大学硕士学位论文, 2005, 1-54

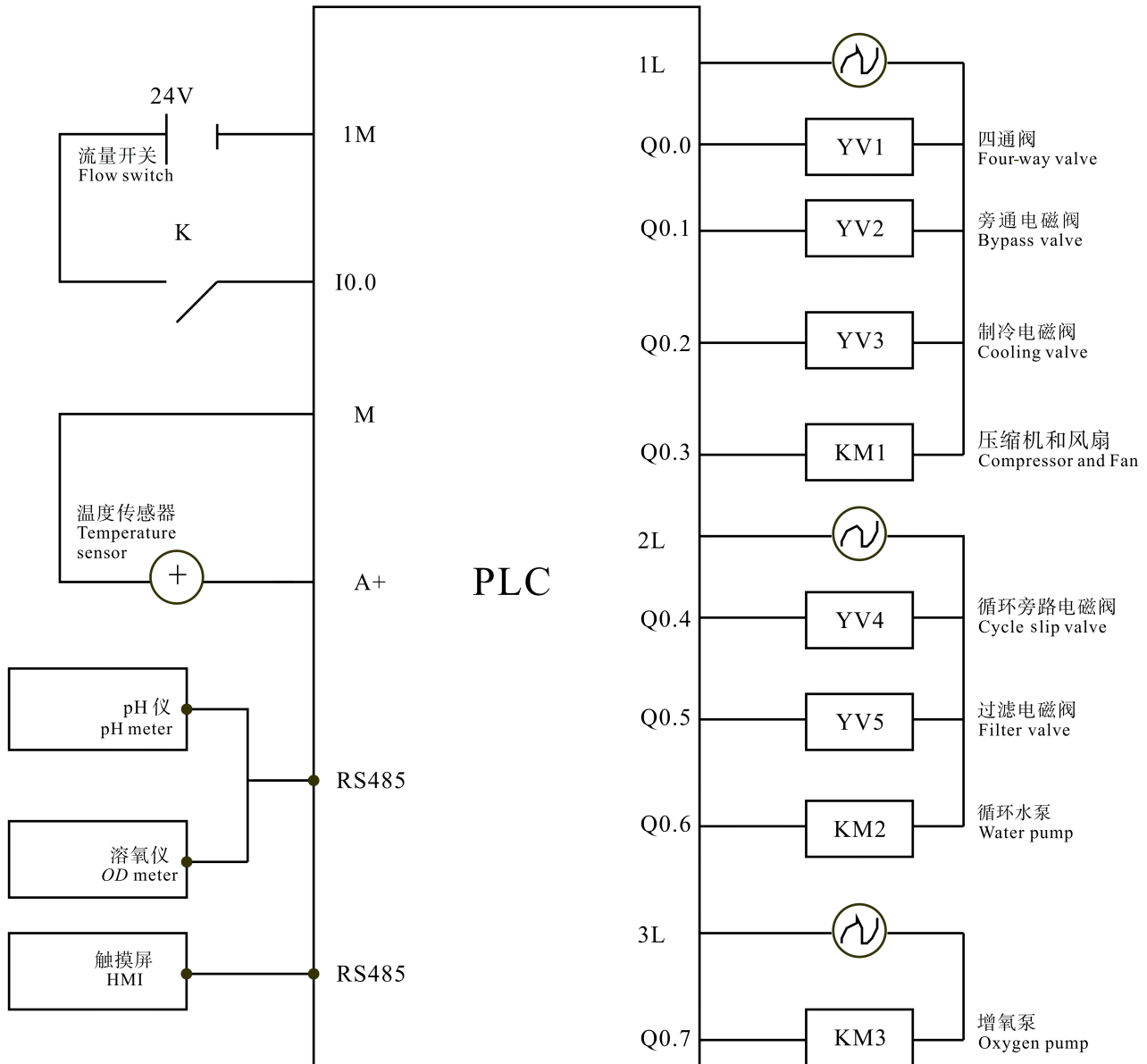


图 2 PLC 接线原理

Fig.2 Circuit of PLC control

**2.2.2 DO** 淡水鱼低温保活运输适宜的  $DO$  为 8–13 mg/L(朱明瑞等, 2007a; 丁永良等, 2003)。本系统通过溶氧仪检测鱼箱内水体的  $DO$  并送到 PLC 控制器。当鱼箱内水体  $DO$  低于设定值时, 系统启动增氧泵, 实现增氧; 当  $DO$  达到设定值时, 系统控制增氧泵停止运行。

**2.2.3 pH** 本系统采用沸石过滤的方法对 pH 进行调节, pH 仪检测鱼箱内水体的 pH 值并送到 PLC 控制器。当鱼箱内水体 pH 值高于设定值上限时, 系统启动水泵和过滤电磁阀, 鱼箱内的水经过过滤系统进行过滤后, 再回到鱼箱, 从而改善鱼箱内水的 pH 值, 直到 pH 值达到设定值; 当 pH 值低于设定值下

限时, 系统关闭过滤电磁阀而开启水循环系统中的循环旁路电磁阀, 循环水直接通过旁路水管回到鱼箱, 不进行过滤。最终使箱体内水的 pH 值控制在 6.5–8.0 之间, 以满足鱼的存活要求(朱明瑞等, 2007b)。

### 2.3 控制程序设计

PLC 控制主程序框图如图 4 所示。程序中首先对 PLC 有关变量及串口通讯参数进行初始化设置, 然后生成一个周期为 10 s、占空比为 50% 的方波时间脉冲, 在脉冲的上升沿及下降沿, 分别调用不同的中断程序与传感器通讯, 从而获得  $DO$ 、pH 值、温度的实测数据, 并对这些数据进行处理, 将其转换为 10 进制数据。中断调用返回后, 主程序会根据时间脉冲电

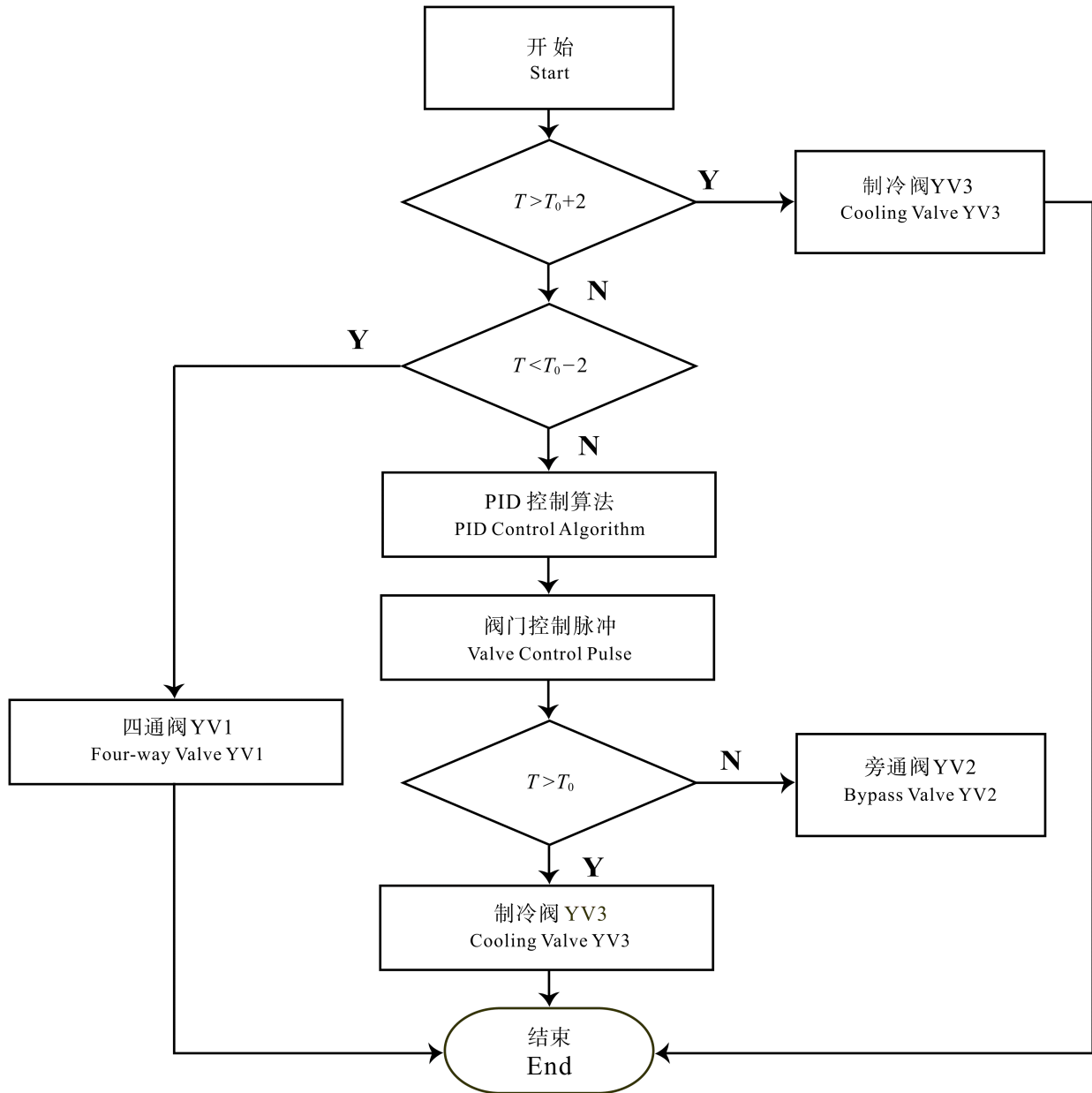


图 3 温度控制流程

Fig.3 Algorithm chart of temperature control

平的高低调用 DO 控制子程序或 pH 值控制子程序。DO 控制子程序是根据 DO 的高低来启、停增氧泵，并对增氧泵的启与停之间的时间间隔进行设定。pH 值控制子程序是根据 pH 值的大小来开、关过滤阀，并对阀门的开与关之间的时间间隔进行设定。程序最后调用温度控制子程序控制冷热水机组的运行。

#### 2.4 人机界面设计

人机界面选用 Siemens 7 寸彩色触摸屏，利用 WinCC Flexible 2008 进行工程组态，主要实现对各设备的启停控制、参数的设定和实时显示以及报警等功能。

### 3 运行试验

#### 3.1 试验材料与方法

**3.1.1 试验材料** 试验时间为 2013 年冬。武昌鱼，购于华中农业大学农贸市场。低温活鱼运输箱，总容积 0.8 m<sup>3</sup>；暂养箱，总容积 0.8 m<sup>3</sup>。DO-995 型溶解氧传感器，PC-2WS 型多通道温度测试仪(精度为 ±0.3℃)，FG-991 型 pH 仪。环境温度 5-15℃，相对湿度 45.0%-64.0% RH。

**3.1.2 试验方法** 温度均匀性检测方法：在水体内部选取 4 个不同点，采用 PC-2WS 型多通道温度测试

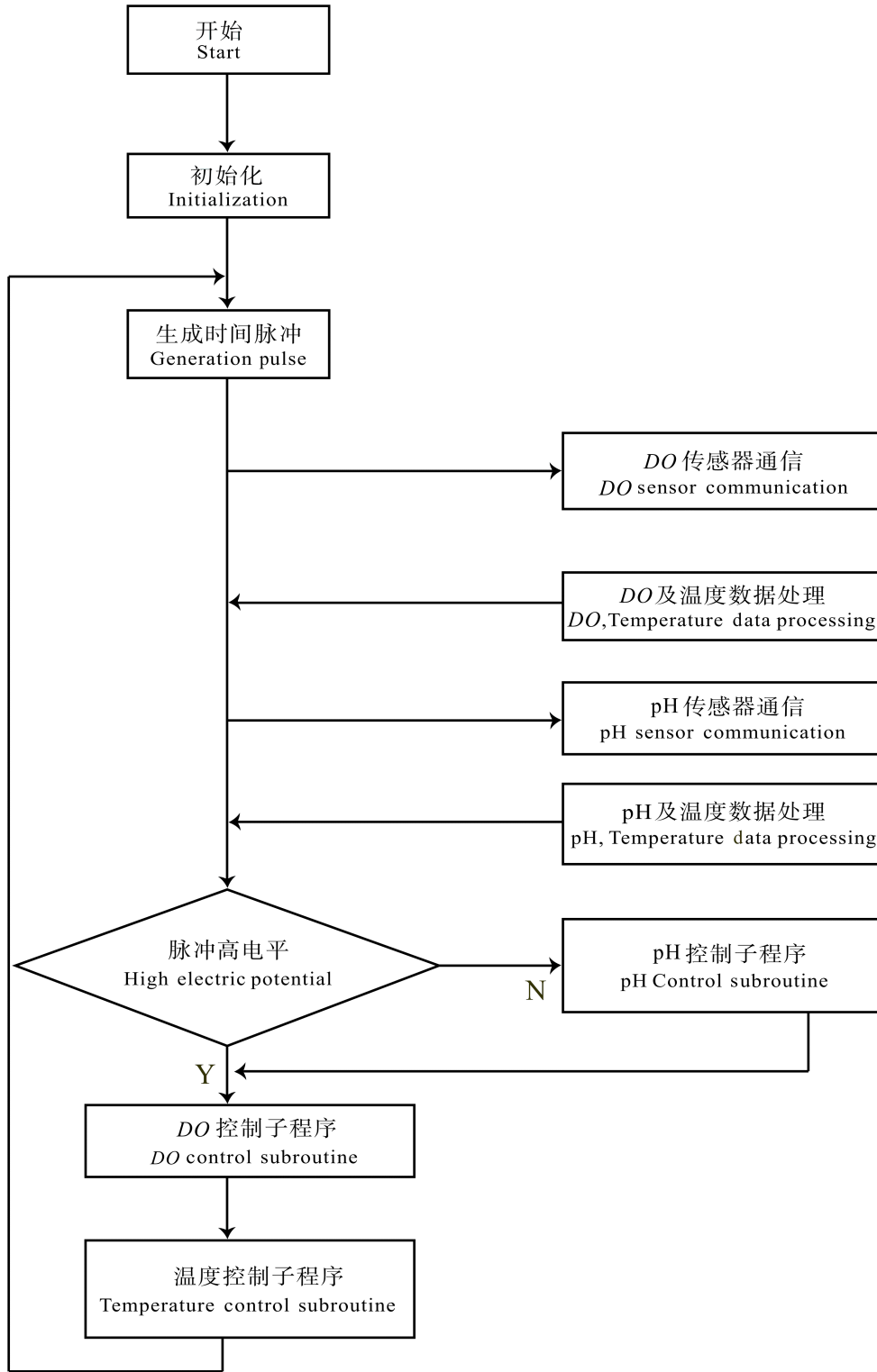


图 4 PLC 主程序

Fig.4 Chart of PLC main program

仪，每分钟对水体的温度采集 1 次，运行时间 3-4 h，箱体内测温点位置分布图如图 5 所示。

pH 检测方法 选取距离水面 35 cm 和 60 cm 的两个深度，采用 FG- 991 型 pH 仪，每 5 min 对水体的

pH 值进行 1 次采集。

DO 检测方法：选取距离水面 35 cm 和 60 cm 的两个深度，采用 DO-995 型溶解氧传感器，每 5 min 对水体的 DO 进行 1 次采集。

空载试验：鱼箱内无鱼，仅装入 0.6 m<sup>3</sup>自来水，水深约 76 cm。

鱼水质量比 1:2 试验：将武昌鱼停食，暂养在暂养箱 24 h，保持供氧，再进行试验。武昌鱼质量 136 kg，水的质量为 272 kg，水深约 65 cm。

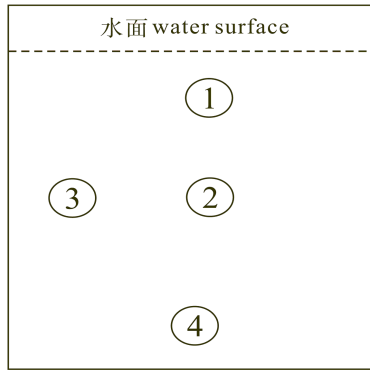


图 5 测温点位置分布  
Fig.5 Distribution diagram of the thermometry points

### 3.2 结果与分析

3.2.1 温度 对系统进行了温度均匀性试验。在环境温度为 12℃的条件下，将水温降至 5℃。温度均匀性响应曲线如图 6 所示。

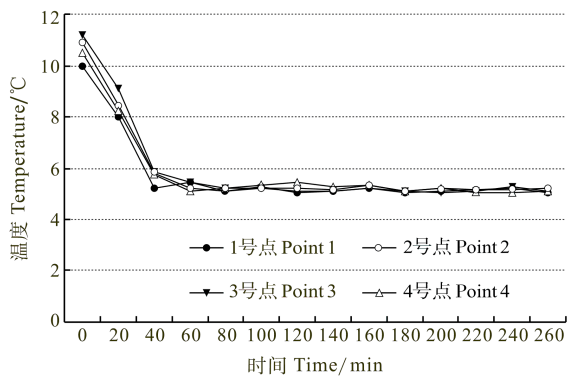


图 6 温度均匀性响应曲线  
Fig.6 Curves of temperature uniformity response

由图 6 可知，随着时间的推移，箱内水体的温度呈下降的趋势，箱体内 1 号测试点和 4 号测试点的温差为 0.5℃左右，2 号测试点和 3 号测试点的温差也为 0.5℃左右，均匀性良好。

空载降温试验中初始水温 13.8℃，设定水温 8℃，升温试验中初始水温 8℃，设定水温 13℃，温度响应曲线如图 7 所示。鱼水质量比 1:2 的降温试验中初始水温 14℃，设定水温 10℃；升温试验中初始水温 12℃，设定水温 15℃，温度响应曲线如图 8 所示。

由图 7、图 8 可知，系统空载运行时降温速率为 2.3℃/h，升温速率为 2.5℃/h；在鱼水质量比为 1:2 时，降温速率为 1.15℃/h，升温速率为 1.0℃/h。当温度达到设定温度±2℃以内时，系统进入微调状态，其稳态误差为±0.3℃。

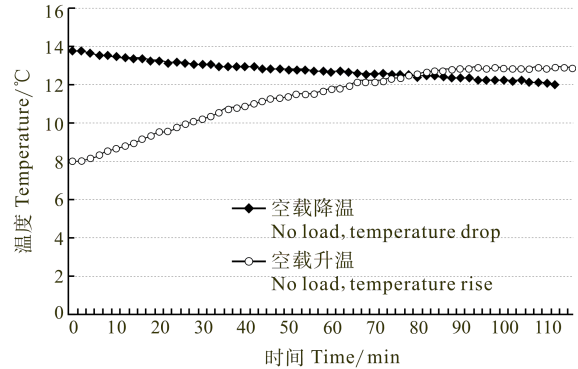


图 7 空载温度响应曲线  
Fig.7 Temperature response curves without fish

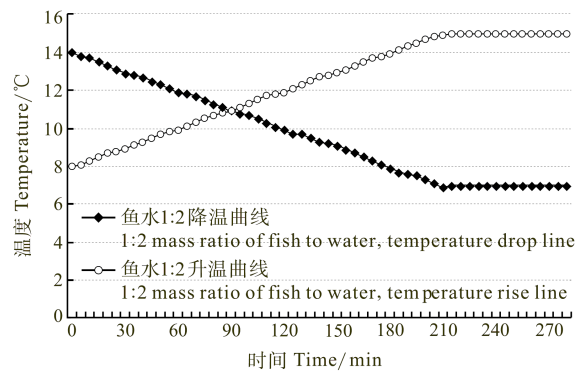


图 8 鱼水比例 1:2 温度响应曲线  
Fig.8 Temperature response curves against time with 1:2 ratio between fish and water

3.2.2 DO 鱼水质量比 1:2，将鱼暂养 24 h 后，不同深度的 DO 分别为 11.8 mg/L 和 8.9 mg/L。设定 DO 值为 12.8 mg/L，启动增氧泵后，水体中的 DO 开始上升，经过约 200 min，DO 稳定在 12.8 mg/L， $\Delta DO < 1$  mg/L，DO 曲线如图 9 所示。

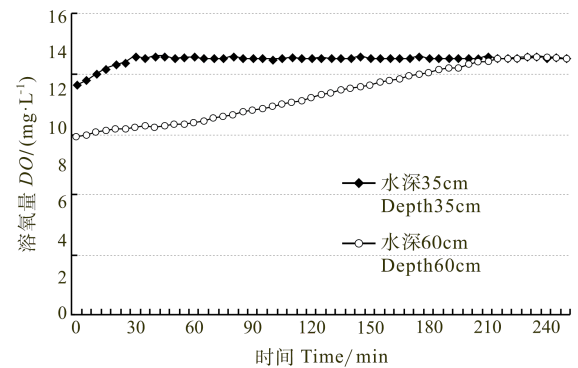


图 9 水深 60 cm 和 35 cm 的溶氧曲线  
Fig.9 Curve of dissolved oxygen in water at depth of 60 cm and 35 cm

3.2.3 pH 鱼水质量比 1:2，将鱼暂养 24 h 后，

水体 pH 达到 9.1。设定 pH 值为 7.0，过滤系统开启，水体中的 pH 值开始下降，经过约 180 min，pH 值达到 7.0，pH<0.4，pH 曲线如图 10 所示。

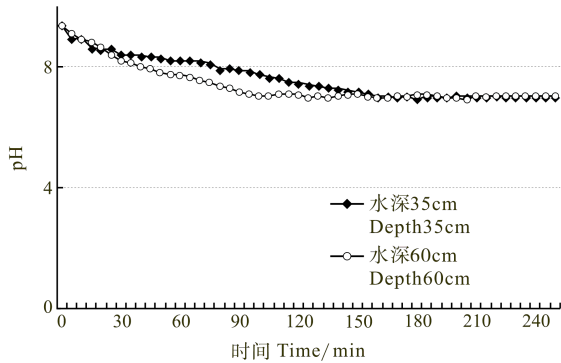


图 10 水深 60 cm 和 35 cm 的 pH 曲线

Fig.10 pH curve of water at depth of 60 cm and 35 cm

### 3.3 存活率

另取 210 条，约 140 kg 武昌鱼进行鱼水质量比 1:2 的存活率试验，试验水温设定为 7℃，DO 设定值为 12 mg/L，pH 值设定为 7。设备运行时间 72 h，死亡 7 条，鱼的存活率达到 96.7%。

## 4 结论

本系统主要由鱼箱、水循环系统、冷热水机组、增氧系统、过滤系统和 PLC 控制系统组成，实现了温度、pH 值和 DO 的全自动控制，控制范围广，其中温度、pH 值和 DO 控制范围为 3–35℃、6.5–8.0、8–13 mg/L，可以满足不同地区和不同鱼种的运输要求。

箱体内水温分布均匀，升温 and 降温速率平缓，pH 值和 DO 在合理的范围内，满足鱼体存活的需要。实验结果表明，空载时，箱体内水体温度分布偏差值为 1℃，温度上升和下降速率分别为 2.5℃/h、2.3℃/h，

按鱼水质量比 1:2 运输，在温度 6.7–7.3℃、DO 为 8.9–12.8 mg/L，pH 为 6.5–7.5 的水体条件下，运输时间约为 72 h 时，武昌鱼的存活率达 96.7% 以上。

该系统以 PLC 为核心控制器，触摸屏为人机界面，功能全、结构紧凑，实现了多种控制参数的设置、读取、存储和显示，使用灵活。

## 参 考 文 献

- 丁永良, 曲善庆. 回眸工业化养鱼 30 年. 现代渔业信息, 2003, 18(1): 9–14
- 田朝阳. 大力推广海水鱼闭式循环保活运输技术. 渔业现代化, 2003, (2): 35
- 史建华, 徐琴英, 李建忠, 等. 名贵水生动物活体运输箱的研制. 渔业现代化, 2007, 34(3): 40–41, 39
- 朱明瑞, 曹广斌, 蒋树义, 等. 工厂化水产养殖水体的 pH 值在线自动控制系统. 水产学报, 2007b, 31(3): 335–342
- 朱明瑞, 曹广斌, 蒋树义, 等. 工厂化水产养殖溶解氧自动监控系统的研究. 大连水产学院学报, 2007a, 22(3): 226–230
- 朱健康, 卢俊杰, 游远新, 等. 海水活鱼运输装置及应用效果试验. 农业工程学报, 2005, 21(10): 187–189
- 李利, 江敏, 马允, 等. 水产品保活运输方法综述. 安徽农业科学, 2009, 37(15): 7303–7305
- 陈郡, 王涛. 鱼塘溶氧量自动监控系统的设计. 河北渔业, 2009, (7): 56–58
- 赵丹, 姜永江. 降低活鱼水体氨氮的技术. 渔业科学进展, 2012, 33(4): 107–112
- 黄海, 苑德顺, 张宝欣. 水产品保活运输技术研究进展. 河北渔业, 2009, (9): 45–47
- Farrell AP. Bulk oxygen uptake measured with over 60,000 kg of adult salmon during live-haul transportation at sea. Aquaculture, 2006, 254(1-4): 646–652
- King HR. Fish transport in the aquaculture sector: An overview of the road transport of Atlantic salmon in Tasmania. J Vet Behav: Clinic App Res, 2009, 4(4): 163–168

(编辑 冯小花)

## The Development of a Monitoring System for Low-Temperature Live Fish Transportation

NIE Shaowu<sup>1</sup>, HONG Yuanqian<sup>1</sup>, HUANG Hanying<sup>1</sup>, LI Xuan<sup>1</sup>, HU Yuelai<sup>1</sup>,  
XIONG Shanbai<sup>2</sup>, ZHAO Siming<sup>2</sup>

(1. College of Engineering and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070;

2. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

**Abstract** The most of current live fish transportation devices are designed using single chip microcomputer control system or manual control system. These devices cannot meet the need for long-distance transportation due to their low level of automation and poor anti-interference ability. To improve the automatic control of the low-temperature live fish transportation and the survival rate of live fish, we designed a special control system with a PLC as the core controller and a touch screen as the human-computer interface. The software and hardware of this system were designed for the start/stop control. The PPI communication network, based on the PID algorithm and the pulse timer, could conduct automatic and reliable data collection and the feedback control of key parameters such as the temperature, *DO*, and pH. The control ranges of the three parameters were 3–35°C, 8–13 mg/L, and 6.5–8.0 respectively. The temperature was uniform in the tank, and rose and dropped slowly and gently. When the system was unloaded, the deviation of temperature was only 1°C, and temperature rose and dropped at 2.5°C/h and 2.3°C/h respectively. After 72-hour transportation, the survival rate of *Megalobrama amblycephala* was as high as 96.7% under conditions below: the mass ratio of fish to water was 1:2, the temperature was 6.7–7.3°C, the pH was 6.5–7.5, and *DO* was 8.9–12.8 mg/L. The system had the advantage of stable performance, high reliability, friendly human-machine interface, and flexible operation. These enabled this system to meet the requirement of the water quality during the transportation of different fish species in different regions.

**Key words** PLC; Live fish transport; Monitoring system; Touch screen



# 循环水养殖系统生物滤器负荷挂膜技术\*



朱建新<sup>1</sup> 刘慧<sup>1</sup> 徐勇<sup>1</sup> 陈世波<sup>1,2</sup> 刘圣聪<sup>3</sup> 张涛<sup>3</sup> 曲克明<sup>1</sup>

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266041;  
2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 3. 大连天正实业发展有限公司 大连 116011)

**摘要** 循环水养殖系统启动运行前往往需要经过一段时间的生物膜预培养,使生物膜达到成熟稳定,从而保证系统的水质净化功能。本研究通过养殖试验,研究了生物滤器负荷挂膜的技术方法,以期实现生物膜的快速成熟和系统的快速启动。为此,构建了6组循环水系统组成的养殖车间,建成后立即投入试验生产。试验为期120 d,养殖种类为红鳍东方鲀,初始放养平均体重(632.5 ± 2.26) g。期间,红鳍东方鲀平均增重29.91%,养殖成活率98.7%,养殖密度由(19.34 ± 1.89) kg/m<sup>3</sup>增加到(32.17 ± 3.40) kg/m<sup>3</sup>,投饵率由0.2%增加到0.5%–0.7%,每日换水量由50%逐渐减至10%。结果表明,在生物膜的生长期,通过对投饵量及新水补充量的有效调节,可以把养殖水体中的氨氮和亚硝氮浓度控制在安全范围以内,以保证养殖鱼类的生长。生物膜在50天左右达到完全成熟,此后便可依靠生物膜的净化作用将氨氮浓度控制在0.5–1.2 mg/L、亚硝氮浓度控制在0.2–0.5 mg/L、pH值控制在6.5–7.5、COD值低于4 mg/L、细菌总数控制在800–2100 cell/ml的安全范围内。利用生物滤器负荷挂膜技术,在合理调控水质指标的条件下,循环水养殖系统建成后可以立即投入生产,实现生物滤器挂膜与养殖生产的同步进行。

**关键词** 循环水养殖系统; 负荷挂膜; 水质指标; 红鳍东方鲀

中图分类号 S969 文献标识码 A 文章编号 1000-7075(2014)04-0118-07

循环水养殖兴起于20世纪80年代末,是一种把养殖水经过多级物理净化和生物净化,经过增氧、脱气及杀菌消毒处理后得以循环利用的新型养殖模式,具有节水、节地、节能、减排和高效等突出优点,代表了工厂化养殖未来发展方向(刘鹰,2011; Abbink *et al*, 2012; 王印庚等,2013)。近年来,我国的海水鱼类循环水养殖发展迅速,开展循环水养殖的企业有70多家,养殖面积近50万m<sup>2</sup>(国家鲆鲽类产业技术体系年度报告,2012)。

在循环水养殖中,氨氮和亚硝氮是制约鱼类正常生长的主要因子之一,养殖密度越大影响越明显(Mook *et al*, 2012),是循环水养殖的潜在威胁因素(曲克明等,2007),需要通过生物净化环节予以降解。生物净化是由附着在生物填料表面的生物膜完成的,

生物膜是指由微生物、原生动物、多糖组成,具有生物降解、硝化功能、亚硝化功能及硫代谢功能的生物絮团(高喜燕等,2009)。前期研究表明,在启动循环水养殖系统前,为了使生物膜的水处理功能达到稳定和高效,往往需要经过一个为期70 d左右的预培养过程,生物膜培养分为定向菌接种挂膜法、活性污泥挂膜法和自然挂膜法3种<sup>1)</sup>(齐巨龙等,2010)。3种方法费时、费力,特别是用人工氮源培养的生物膜,在系统启动以后还会出现“脱膜”的现象(王冠平等,2003),显著影响水处理效果。

本研究基本思路是利用一系列技术调控,在养鱼的同时培养生物膜,达到循环水系统稳定、快速启动的目的。实验利用新建成的循环水系统进行红鳍东方鲀养殖,探讨了在不同水温、养殖密度、投饵量及新

\* 国家科技支撑计划课题(2011BAD13B04)、(2011BAD13B07)共同资助。朱建新, E-mail: zhujx@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2013-09-23, 收修改稿日期: 2014-01-24

1) 曹涵. 循环水养殖生物滤池滤料挂膜及其水处理效果研究. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 2008

水补充量的条件下, 生物膜的增长情况和成熟时间, 同时监测了实验过程中养殖生物的生长和存活情况。研究结果可以为建立生物滤器负荷挂膜的新技术提供支撑, 为实现循环水养殖系统的快速启动、改进和完善提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 循环水养殖系统工艺流程

实验在新建成的 6 套循环水养殖系统中进行, 工艺流程如图 1 所示。每套系统包括 9 个有效养殖水体为  $48.4 \text{ m}^3$  的养殖池、过水面积为  $5 \text{ m}^2$  的国产 316 L 不锈钢材料制作的弧形筛、流量为  $400 \text{ m}^3/\text{h}$  的离心式提水泵、产气量为  $35 \text{ m}^3/\text{h}$  的潜水式气浮泵、产气量为  $50 \text{ g/h}$  臭氧发生器、容积为  $144 \text{ m}^3$  的生物滤池、 $10 \text{ m}^3$  的曝气池和功率为  $2 \text{ kW}$  的悬挂式紫外消毒器。以 PVC 刷状立体弹性填料作为生物膜的附着基, 用罗兹鼓风机向生物滤池和曝气池供气。氧源为工业用液态氧, 液氧供向增氧池和养殖池, 分别作为循环水养殖时的集中供氧和停电、停水情况下的应急增氧之用。养殖用水为盐度 30 的地下深井海水, 分别在养殖池、泵池和一级生物滤池设置了补充用水点。该系统结构简单、运行管理方便。

### 1.2 实验用鱼

实验用鱼为红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*), 取自大连天正实业有限公司养殖二厂, 初始规格为体重  $(632.5 \pm 2.26) \text{ g}$ , 初始放养密度为  $(19.34 \pm 1.89) \text{ kg}/\text{m}^3$ 。从 2011 年 12 月 31 日实验开始, 到 2012 年 4 月 30 日实验结束, 每隔 30 d 对实验鱼进行抽样称重; 每

次从养殖池中随机抽取 20 尾, 用毛巾拭干体表水分后, 用精密电子天平称重。抽样比例约为 1:75。

### 1.3 日常水质指标监测

日常水质指标的监测是循环水养殖管理的重要内容。每天早晨投饵之前从每套系统的回水管口取水样分析, 监测指标主要有水温、溶氧、pH 值、氨氮浓度、亚硝氮浓度、COD 和细菌总数。为了保证监测数据的准确性, 测定依据《海洋监测规范》(GB 17378.4-2007)标准(国家质量技术监督局, 2007), 采用仪器监测和手动监测交叉进行。

**1.3.1 溶解氧、水温、pH 值的监测** 采用 YSI550A 便携式野外溶氧仪测定各套系统养殖池水温和进出水口的溶解氧浓度, pH 值采用 Aquastar 全能水质检测仪检测。

**1.3.2 氨氮、亚硝氮的监测** 每天早 8:00 在各套系统弧形筛溢水槽取水样, 及时送检。氨氮浓度的检测采用次氯酸盐氧化法, 亚硝氮浓度的检测采用萘乙二胺分光光度法。

**1.3.3 COD 的检测** 每隔 7 d 在各系统弧形筛溢水槽取样, 检测各系统的 COD 值, 检测方法为碱性高锰酸钾法。

**1.3.4 细菌总数检测** 每隔 15 d 在各系统弧形筛溢水槽取样, 检测各系统的细菌总数。培养基配方为: 每 100 ml 培养基含 0.5 g 牛肉膏, 1 g 蛋白胨, 0.5 g NaCl, 2 g 琼脂粉。培养温度为  $37^\circ\text{C}$ , 培养时间为 48 h。

### 1.4 生物膜培养与生产管理

**1.4.1 生物膜培养** 本研究采用自然挂膜工艺。生物滤池内生物填料是用直径为 0.5 mm, 比表面积为

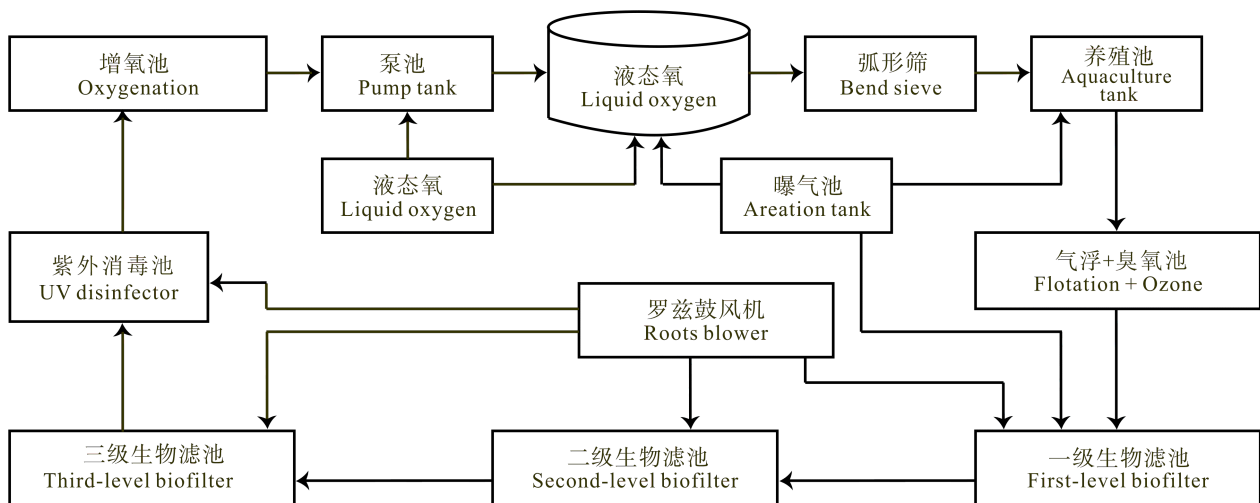


图 1 循环水养殖系统工艺流程

Fig.1 Flow chart of RAS

360 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup> 的聚乙烯及聚丙烯纤维丝条加工而成的弹性刷状载体。生物填料在水中呈均匀辐射状伸展,具有一定的柔韧性和刚性,使净化微生物能均匀地附着在每一根纤维丝条上,使气、水、净化微生物之间充分接触。生物填料以竖向的方式悬挂在各级生物滤池中,并且通过池底充气增加生物滤池中的溶氧量,以满足微生物生长代谢所需。

**1.4.2 投饵率** 实验用饲料采用“海旗牌”河鲢鱼专用饲料。养殖期间,每天分别在 06:00 和 17:00 投饵两次。系统运行前 60 d 左右,投饵率控制在鱼体重的 0.2%–0.6%。随着生物膜的逐渐成熟,为了促进鱼的生长,投饵率逐渐增加至 0.5%–0.7%。期间连续进行水质监测。当水中氨氮和亚硝氮指标明显升高时,减少投饵或停止投饵。

**1.4.3 换水率** 适时补充新水是循环水养殖过程中调节水质指标最直接、最有效的方法。本研究在生物膜的生长潜伏期补充新水量控制在 50%,然后根据生物膜的生长及水质指标变化情况逐渐减少换水量,最终在系统各项指标趋于稳定时,换水量控制在 10% 水平。具体换水情况见图 2。

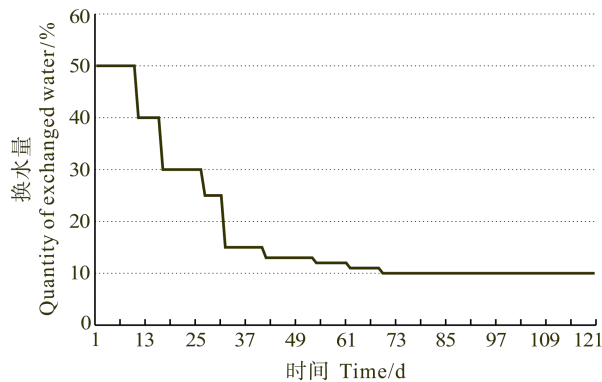


图2 养殖系统换水量变化

Fig.2 Water exchange rate of the culture system

## 2 结果

### 2.1 生物膜形成及形态变化观察

在循环水养殖系统启动初期的 1–8 d, 生物填料

的表面慢慢形成一层无色透明状黏液层,生物膜处于生长的潜伏期。9–20 d, 生物膜增长速度加快,生物滤池进水端的生物填料表面逐渐出现零散絮状的浅褐色附着物。21–29 d, 生物膜处于线性增长期,浅褐色附着物的覆盖范围顺水流方向向下游延伸,进水端的生物膜接近成熟期。29–40 d, 生物膜不断积累并且布满载体表面,进水端生物膜增长速度开始减慢,进入减速增长期。第 40 天之后,生物膜生长处在稳定期和再生期。第 50 天,载体表面形成一层浅黄色绒毛状物质,用手触摸有滑腻感且附着牢固,水体各项指标趋于稳定,生物膜培养工作结束,进入生物膜日常维护阶段。

### 2.2 红鳍东方鲀养殖效果

系统运行期间红鳍东方鲀生长情况见表 1。实验结束时,平均增重(189.2±0.93) g, 平均增重率为 29.91%, 养殖密度从 (19.34±1.89) kg/m<sup>3</sup> 增加到 (32.17±3.40) kg/m<sup>3</sup>。系统运行第 29 天,红鳍东方鲀体重下降了(9.2±0.34) g。随着生物膜逐渐成熟,第 60 天后鱼开始稳定生长,且增长速度不断加快;第 90 天以后,进入快速生长阶段。60–90 d 生物膜从线性生长期进入成熟期。90 d 以后,生物膜的各项功能已经成熟,氨氮、亚硝酸盐等各项水体指标稳定,红鳍东方鲀生长速度明显加快,第 120 天的增重率达到 29.91%。

### 2.3 循环水系统内部水质变化

**2.3.1 亚硝酸氮和氨氮浓度** 如图 3 所示,在系统运行初期,因生物膜未成熟,各实验养殖系统亚硝酸氮和氨氮浓度变化剧烈,且无明显的规律。至 60 d 左右时,亚硝氮浓度 0.5 mg/L,氨氮浓度 1 mg/L,二者均在一个相对安全的范围内呈小幅度波动,表明系统内的残饵和粪便等残留物与水体的综合消氮作用达到了一个相对平衡,此时,可视为生物膜培养成熟,系统进入稳定运行。总之,在 60 d 左右生物膜进入成熟期以后,养殖水体中的氨氮浓度始终在 0.5–1.2 mg/L 之间,亚硝氮浓度始终在 0.2–0.5 mg/L 之间,并无剧烈波动。

表 1 红鳍东方鲀生长情况

Tab.1 Growth of *Takifugu rubripes* during the experiment

项目 Items	日期 Date (M-D)				
	12-31	01-31	02-29	03-31	04-30
体重 Body weight (g)	632.52±2.26	623.31±2.27	643.60±2.39	678.42±2.64	821.72±3.26
净增重 Net weight gain (g)		-9.20±0.34	11.08±0.51	45.9±0.55	189.20±0.93
增重率 Percentage weight gain(%)		-1.45	1.75	7.26	29.91

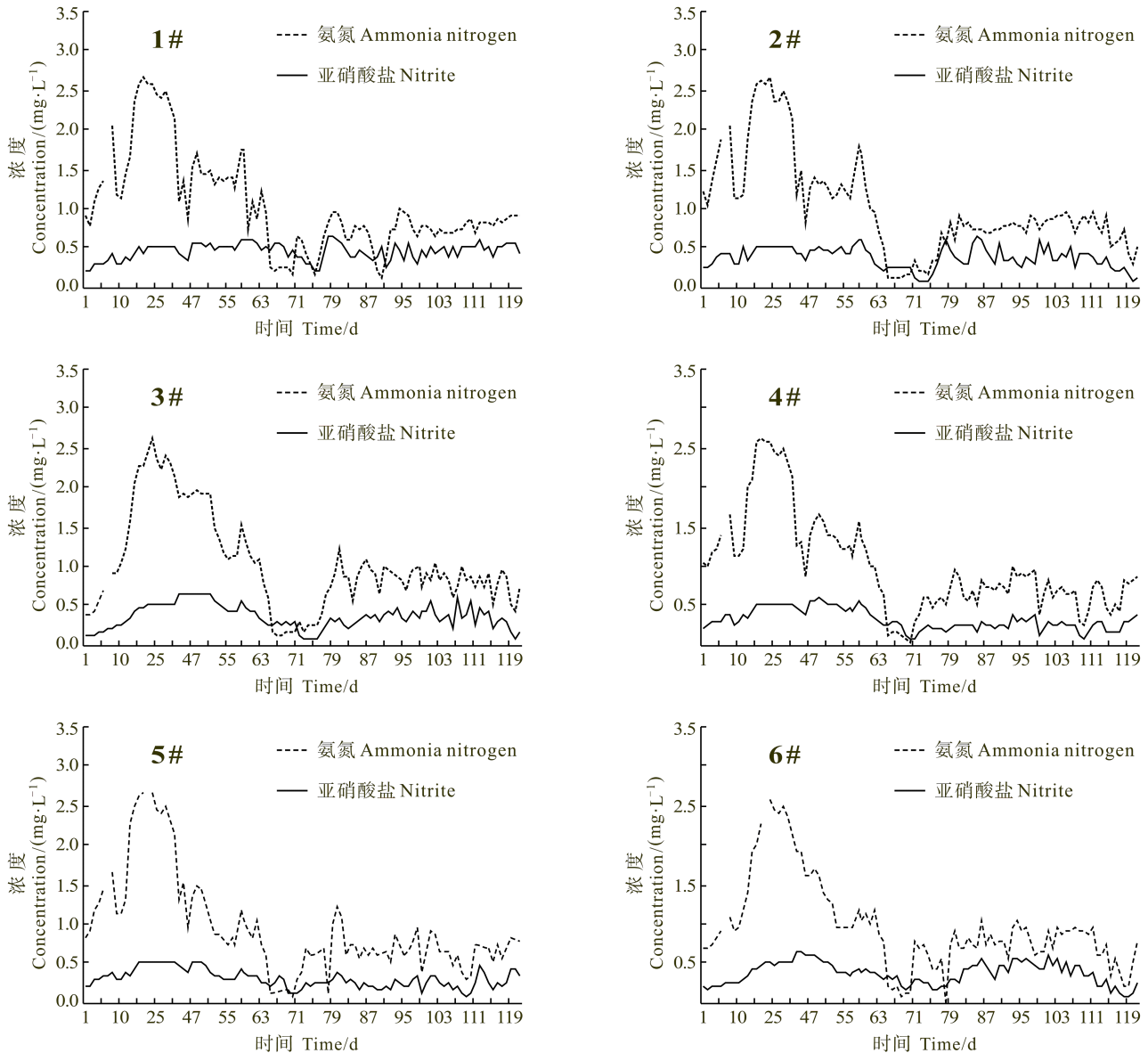


图3 试验期间各系统氨氮、亚硝酸盐变化情况

Fig.3 Variation of ammonia and nitrite concentrations in respective RAS during the experiment

**2.3.2 pH 值** 实验期间,随着鱼类养殖密度的增大, pH 值表现为缓慢下降趋势。采用适当补充新水来调节 pH 值,各实验养殖系统水体 pH 值波动区间处于 6.8–7.5 之间(图 4),虽然偏低,但养殖的红鳍东方鲀生长正常,生物膜也能有效去除水体中的亚硝酸盐与氨氮。

**2.3.3 COD(化学耗氧量)** COD反映了水体中有机物的污染程度。COD 值越高,水体受有机物污染程度越重。本研究各循环水系统的 COD 值始终小于 4 mg/L (图 5),说明该系统养殖池流态、弧形筛过滤及生物滤池截污净化等方面设计合理,养殖期间,水体保持较高洁净度。

**2.3.4 细菌浓度与养殖成活率** 本研究前后持续 4

个月,期间养殖的河鲀鱼除入池时由于运输过程操作损伤和不适应新环境造成的死亡外,未发生任何因致病菌或寄生虫引发的病损,养殖成活率高达 98.7%。细菌浓度检测结果显示,系统内的臭氧与紫外线消毒杀菌器很好地控制了水体的游离细菌数量,水体中的游离细菌浓度绝大多数时间维持在 2000 cell/ml 以下的极低水平(图 6)。

### 3 讨论

#### 3.1 生物滤器负荷挂膜与养殖效果分析

在实验规模的海水循环水养殖系统中,生物滤器的挂膜时间一般需要 45 d 以上(傅雪军等, 2011),而

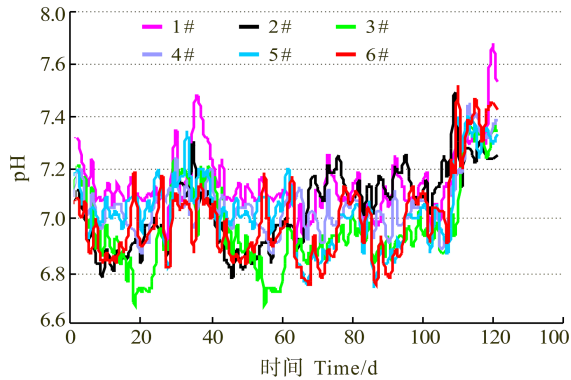


图4 试验期间各系统 pH 值波动情况

Fig.4 Variation of pH in respective RAS during the experiment

1#, 2#, 3#, 4#, 5#, 6#为实验循环水系统编号

1#, 2#, 3#, 4#, 5#, and 6# are the serial number of the experiment systems

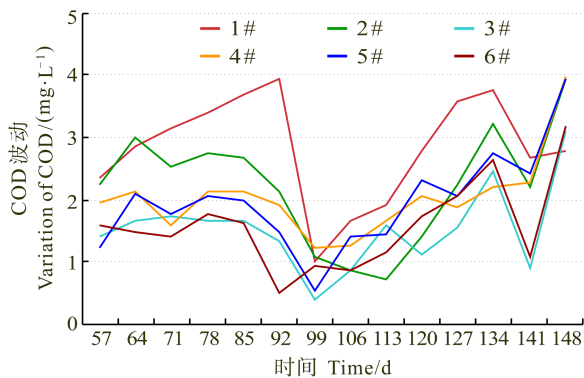


图5 试验期间各系统 COD 波动情况

Fig.5 Variation of COD in respective RAS during the experiment

1#, 2#, 3#, 4#, 5#, 6#为实验循环水系统编号

1#, 2#, 3#, 4#, 5#, and 6# are the serial number of the experiment systems

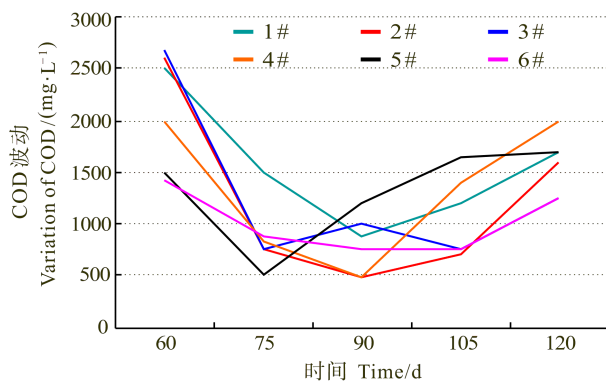


图6 试验期间各系统内游离细菌浓度

Fig.6 Variation of free bacteria concentrations in respective RAS during the experiment

1#, 2#, 3#, 4#, 5#, 6#为实验循环水系统编号

1#, 2#, 3#, 4#, 5#, and 6# are the serial number of the experiment systems

在实际生产中,获得成熟生物膜的时间会更长。本研究采用负荷挂膜技术,在生产性循环水养殖系统建成以后,不经过生物膜预培养环节,直接投入生产运行,边养鱼边培养生物膜,既节省了系统启动前的准备时间和前期培养生物膜的费用,又避免了因使用人工氮源培养的生物膜在系统运行后发生的“脱膜”现象。其技术要点是,通过调节新水补充量、养殖密度、投喂量来控制早期水质指标,使其既能满足生物膜培养所需要的高营养,又不至于对养殖鱼类的生长构成太大影响。在系统运行第50天,载体表面即形成一层浅黄色的团状物质,水体各项指标趋于稳定,新水补充量显著下降,生物膜逐渐趋于成熟。在整个实验期间,养殖密度由 $(19.34 \pm 1.89) \text{ kg/m}^3$ 增加到 $(32.17 \pm 3.40) \text{ kg/m}^3$ ,投喂率由0.2%增加到0.5%–0.7%,每日换水量由50%逐渐减至10%,红鳍东方鲀平均增重29.91%,养殖成活率98.7%。结果表明负荷挂膜简单、实用,具有很高推广价值。

本研究用红鳍东方鲀取自海上养殖网箱,试验初始水温 $16^\circ\text{C}$ 左右,逐渐把温度提升至 $21\text{--}22^\circ\text{C}$ ,由于海上网箱养殖与室内水泥池养殖环境差异较大,鱼进入室内后有一段时间的适应过程,另外,试验初期由于生物膜尚未产生,为了维持水质,对投喂量进行了严格控制,导致第一个月的鱼体重下降。随着生物膜的逐步形成与成熟,水质指标、投喂量均有了较大提高,鱼的生长速度呈逐渐加快之势。红鳍东方鲀越冬一直是困扰养殖发展的制约因素之一,传统的河鲀鱼越冬多采用流水或换水方式,需要大量高温海水,能耗高。以流水或换水方式越冬,河鲀鱼还面临丝状菌、车轮虫、小瓜虫、淀粉裸甲藻等众多病害生物侵扰。所以一般情况下,越冬期鱼不生长,成活率只有40%左右(王如才等,2001)。本研究采用循环水养殖,由于系统中以生物膜上的硝化菌占据优势,有害微生物受到抑制,且其他各项水环境指标都控制在最适状态。因此,整个试验过程未发生任何疾病,保持快速生长的同时,获得了98.7%的较高成活率。

### 3.2 氨氮浓度与挂膜速度的控制

在生物滤池中,生物膜上细菌数量及优势菌种的形成受水中初始氨氮浓度影响,初始氨氮浓度越高,越有利于硝化细菌在生物膜上聚集,生物膜上细菌数量及优势菌也越多(李秋芬等,2011)。本研究挂膜过程中,水质监测的数据显示,初始氨氮浓度越高的生物滤池,氨氮的去除率越高,达到氨氮浓度稳定的时间越短。

从另一角度来看,循环水养殖系统氨氮和亚硝氮等水质指标的控制是依据养殖鱼类的生理生态要求,必须以不影响鱼类正常生活和生长为前提。因此,加强对不同养殖鱼类生理适应性的研究,找到负荷挂膜的最适氮化合物指标,或者采用对氨氮等营养盐耐受能力比较强的鱼类作为系统启动阶段的养殖品种,是获得养殖效果与快速挂膜双赢的合理选择。

### 3.3 pH 值与生物净化效果的关系

在循环水养殖过程中,生物净化系统内的微生物代谢产生大量的  $\text{CO}_2$ , 容易导致养殖水体 pH 值下降。研究发现,当养殖海水 pH 值低于 7.5 时,不但会影响鱼类的摄食与生长(Abbink *et al*, 2012),而且会抑制生物膜的净化效果(Chen *et al*, 2006)。pH 值变化与系统的生物承载量密切相关,如何有效控制循环水养殖系统的 pH 值是目前国际循环水养殖研究的重点。当前最有效的调控手段是脱气和补充新水。本研究过程中,随着养殖密度的增大,pH 值表现为缓慢下降趋势,但通过适当换水(大约 10%),可以把养殖水 pH 值维持在 6.8~7.5 之间。本研究结果显示,虽然 pH 值始终低于 7.5,但养殖的红鳍东方鲀生长正常,生物膜也能有效去除水体中的亚硝酸盐和氨氮,说明红鳍东方鲀对低 pH 值有很强的适应能力。因此,把循环水系统的 pH 值临界值定为 7.5 有待商榷。

### 3.4 COD 和初始氨氮浓度与生物净化效果的关系

COD 反映了水体中有机物的污染程度,其值越高,水体受有机物污染程度越重。在循环水养殖系统中,一定浓度的有机物会充当微生物碳源,有利于异养细菌繁殖(王以尧等,2011)。生物膜属于一个微生物生态系统,异养细菌和硝化菌存在着生长竞争(李秋芬等,2011),当 COD 含量过高时异养细菌的竞争优势比硝化细菌明显,从而导致系统消氮能力下降。氨氮和亚硝氮含量的升高,会促进硝化细菌的生长,形成一种动态平衡。本研究循环水系统的 COD 值均小于 4 mg/L,在此浓度下异养细菌和硝化细菌数量维持在平衡状态,系统运行稳定。

## 4 结论

负荷挂膜操作简单、实用,既节省了单独培养生物膜的时间及一系列繁复的培养环节,加快循环水养殖系统的启动速率,且系统运行中后期生物膜及水质指标稳定,所养殖的红鳍东方鲀生长健康快速。本研究的结果可为构建循环水养殖系统生物膜培养与快速启动运行提供有力的技术支持。

## 参 考 文 献

- 王以尧, 罗国强, 张哲勇, 等. 投喂频率对循环水养殖系统氨氮浓度的影响. 渔业现代化, 2011, 38(1): 7-11
- 王印庚, 陈君, 潘传燕. 鲆鲽类循环水养殖系统中病原菌的分布及杀灭工艺. 渔业科学进展, 2013, 34(3): 81-97
- 王如才, 俞开康, 姚善成, 等. 海水养殖技术手册. 上海科学技术出版社, 2001: 39-47
- 王冠平, 谢曙光, 施汉昌, 等. 预处理生物滤池挂膜的影响因素. 中国给水排水, 2003, 19(z1): 41-43
- 刘鹰. 海水工业化循环水养殖技术研究进展. 中国农业科技导报, 2011, 13(5): 50-53
- 曲克明, 徐勇, 马绍赛, 等. 不同溶解氧条件下亚硝酸盐和非离子氨对大菱鲆的急性毒性效应. 海洋水产研究, 2007, 28(4): 83-88
- 齐巨龙, 赖铭勇, 谭洪新, 等. 预培养生物膜法在海水循环水养殖系统中的应用效果. 渔业现代化, 2010, 37(2): 14-18
- 李秋芬, 傅雪军, 张艳, 等. 循环水养殖系统生物滤池细菌群落的 PCR-DGGE 分析. 水产学报, 2011, 35(4): 579-586
- 高喜燕, 傅松哲, 刘纓, 等. 循环海水养殖中生物滤器生物膜研究现状与分析. 渔业现代化, 2009, 36(3): 75
- 傅雪军, 马绍赛, 朱建新, 等. 封闭式循环水养殖系统水处理效率及半滑舌鲷养殖效果分析. 环境工程学报, 2011, 5(4): 745-751
- Abbink W, Garcia AB, Jonathan AR. The effect of temperature and pH on the growth and physiological response of juvenile yellowtail kingfish *Seriolalalandi* in recirculating aquaculture systems. Aquaculture, 2012, 330(17): 130-135
- Chen S, Jian L, Jean-Paul B. Nitrification kinetics of biofilm as affected by water quality factors. Aquacultural Engineering, 2006, 34(3): 179-19
- Mook WT, Chakrabarti MH, Aroua MK. Removal of total ammonia nitrogen (TAN), nitrate and total organic carbon (TOC) from aquaculture wastewater using electrochemical technology: A review. Desalination, 2012, 285(31): 1-13

(编辑 刘丛力)

## Dual-Culture Techniques for the Rapid Start-up of Recirculating Aquaculture System

ZHU Jianxin<sup>1</sup>, LIU Hui<sup>1</sup>, XU Yong<sup>1</sup>, CHEN Shibo<sup>1,2</sup>, LIU Shengcong<sup>3</sup>, ZHANG Tao<sup>3</sup>, QU Keming<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266041; 2. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. Dalian Tianzheng Industrial Development Co., Ltd., Dalian 116011)

**Abstract** Recently recirculating aquaculture system (RAS) has become popular in large scale land-based aquaculture in China because of its high productivity, less water consumption, better control on the effluent and pollutants, and lower demand for land space. The function of RAS relies largely on the efficiency and stability of the bio-filters which need to be carefully cultured and maintained throughout the culture period. The conventional start-up of RAS usually takes about 70 days before the pre-cultured biofilm matures for the steady high-capacity water purification. In this study, a technique for the rapid maturation of a bio-filter and RAS start-up was developed through dual-culture of the biofilm and finfish *Takifugu rubripes*. The experiment was carried out in a newly-built workshop with 6 separate RASs. Each RAS consisted of 9 fish culture tanks. Each tank had a volume of 48.4 m<sup>3</sup> and included parts shown below: 1) a model 316 L stainless steel bend sieve with a surface area of 5 m<sup>2</sup>; 2) a centrifugal pump with a water flow volume of 400 m<sup>3</sup>/h; 3) a submersible air pump with an air-production volume of 35 m<sup>3</sup>/h; 4) an ozone generator with an ozone-production capacity of 50 g/h; 5) three bio-filters with a volume of 144 m<sup>3</sup> each; 6) a suspended UV disinfectant with the power of 2 kW; 7) an aeration tank with a volume of 10 m<sup>3</sup>. *T. rubripes* with the initial body weight of (632.5±2.26) g were transferred into the tanks with the density of (19.34±1.89) kg/m<sup>3</sup> in the beginning and were cultured for 120 days. During this period, their body weight increased by 29.91% to a final value of (821.72±3.26) g; the survival rate was 98.7%; the stocking density of the fish increased to (32.17±3.40) kg/m<sup>3</sup>; daily feeding rate increased from 0.2% to 0.5%–0.7%; and the daily water exchange rate decreased from 50% to 10%. Observations mentioned above indicated the good growth and maturation of the bio-filters. Through the proper control of daily feeding rate and water exchange rate, good water quality in the culture tanks can be maintained during the culture of the bio-filter. After the bio-filter became mature around day 50, water quality can be maintained by the purification function of the bio-filter, with the concentrations of ammonia and nitrite at 1.2–0.5 mg/L and 0.5–0.2 mg/L respectively, pH at 6.5–7.5, COD value below 4 mg/L, and the total bacterial count of 800–2100 cell/ml. These results suggested that with effective water quality control, a newly-built RAS could be put into operation immediately by using biofilm dual-culture technique, and the biofilm culture and fish culture could be carried out simultaneously. This technique will provide valuable supports for the operation of newly-built RAS by lowering both the time consumption and the operation costs.

**Key words** Recirculating aquaculture system; Biofilm dual-culture techniques; Water quality; *Takifugu rubripes*

# 波浪作用下筏式养殖结构的动力分析\*



崔 勇 关长涛 黄 滨 李 娇 蒋增杰

(农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室  
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

**摘要** 针对筏式养殖设施结构的特点,基于有限元商业软件 ANSYS 对其进行数学建模,通过数值计算,对不同位置浮标与吊笼的位移和最大锚绳力进行分析。数值模拟研究表明,筏式养殖设施整体结构在波浪作用下呈现周期性的运动趋势,但并未发生浮标或吊笼相互缠绕的现象,说明此筏式结构在波浪作用下能够安全使用。不同位置的浮标与吊笼,由于受到锚绳与筏绳相互牵引的作用,其位移随时间变化的趋势有所不同。两侧锚绳受力变化周期与波浪周期基本一致,迎浪侧锚绳受力明显大于背浪侧,锚绳力最大值约为 1000 N。研究表明,通过对比不同的波浪工况条件,发现各个浮标和吊笼在水平与垂直方向的位移幅度均随着波高的增加而增大,且垂直方向位移幅度大于水平方向。

**关键词** 筏式养殖;有限元;波浪;数值模拟

**中图分类号** S969 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2014)04-0125-07

筏式养殖属于天然水域增养殖工程的一种,是在自然海区利用具有特定功能的设施或装备制成各种类型的筏架,进行大型藻类、贝类及其他海产生物的养殖,从而实现海洋经济作物的人工养殖、自然增殖以及海洋生态环境和生物资源的修复与保护(张立斌 2010)<sup>1)</sup>。目前,我国的筏式养殖系统基本建立在水流清澈、盐度较高、无工业污染、淡水径流较少、浮泥较少和冬季无冰冻水层的浅海海区,随着近海海域盲目的扩大人工养殖规模,现今近海区养殖已趋近饱和,将筏式养殖向深水海域延伸已成为必然(邓推 2010)<sup>2)</sup>。因此,根据深水海域的特点,研究筏式养殖结构的抗风浪性能,就成为构建适合高海况作业的筏式养殖工程设施系统亟需解决的关键问题。

目前国内外有关筏式养殖的研究多集中于养殖容量、养殖模式和生态机制方面,对筏式养殖结构的水动力性能、设计计算理论方面的基础研究相对较

少,对设计方面的理论和技术研究积累也比较欠缺。国内学者王经坤等(2008)利用三维模型对筏架结构进行了动力学建模和分析,计算结构表明,PVC 材料的缆索可以抵抗深水风浪流的影响。台湾学者李冠颖等(2009)运用集中质量法对外海浮筏式蚶架的水动力特性进行了仿真计算,并通过水槽模型试验对计算结果进行对比验证。邓推等(2010)针对目前我国常用的延绳式筏式养殖结构,计算了波浪作用下浮标的运动特性,分析了梗绳材料和配重对锚绳力的影响。崔勇等(2012)通过建立浮标与绳索整体结构的有限元数学模型,对筏式养殖系统在流场中的运动受力进行分析。国外学者 Stevens 等(2008)介绍了一种在开阔水域的贝类养殖模式,并且通过海上实测与数值模拟对养殖结构与波流间作用机制进行了研究。本研究基于 ANSYS 提供的参数化建模技术,对波浪作用下筏式养殖结构的动态响应进行数值模拟,以期对深水筏式

\* 国家自然科学基金(30972256, 51239002)、国家科技支撑计划(2011BAD13B05)和国家海洋局专项[DOME(P(MEA)-02]共同资助。崔 勇, E-mail: cuiyong@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2013-09-27; 收修稿日期: 2013-11-21

1) 张立斌. 几种典型海域生境增养殖设施研制与应用. 见: 中国科学院研究生院博士研究生学位论文, 2010

2) 邓推. 筏式养殖系统在波浪作用下的数值模拟. 见: 大连理工大学硕士研究生学位论文, 2010



结构工程设计提供理论参考。

## 1 计算方法

### 1.1 有限元分析方法

筏式养殖整体结构在波浪作用下的有限元离散方程可由下式来表示(Tsukrov *et al*, 2003):

$$M\ddot{a}(t) + Ka(t) = F(t) + R(t) \quad (1)$$

式中,  $a(t)$ 是节点位移向量,  $M$ 是与时间无关的质量矩阵,  $K$ 是系统总体刚度矩阵,  $F(t)$ 和  $R(t)$ 分别是流体静载荷和动载荷效应引起的等效节点力矢量,  $\ddot{a}(t)$ 是节点加速度矢量。由上述的有限元动力分析方程可以看出,筏式养殖结构离散后每个单元的质量矩阵、刚度矩阵和节点力矢量是求解方程的关键。筏式养殖结构主要由浮标、吊笼、筏绳、锚绳和养殖吊绳组成,其离散后以柔性的绳索单元为主体,在波浪作用下绳索形状和张力的变化与受到的水动力相互影响,所以要对其整体结构运动和受力进行精确分析存在较大难度。本研究借助于有限元建模商业软件 ANSYS,利用其内置的 PIPE59 管单元来模拟筏式养殖结构单元。ANSYS 中的管单元是一种可承受拉、压、弯作用,并且能够模拟海洋波浪的单轴单元,可以用来计算位于水中的圆管形构件的浮力和波浪力的静载荷与动载荷(图 1)。PIPE59 单元的每个结点有 3 或 6 个自由度,即沿  $x, y, z$  方向的线位移及绕  $X, Y, Z$  轴的角位移。当消除抗弯刚度时可以将管单元转换为缆索单元,因此可用于模拟柔性结构。

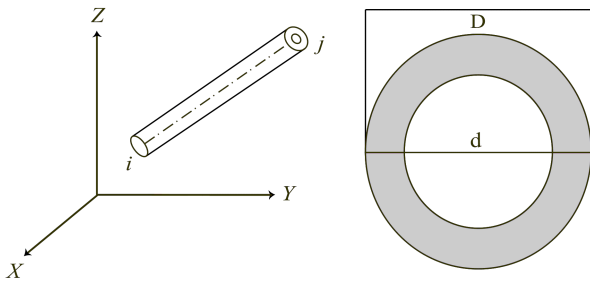


图 1 管单元模型

Fig.1 The scheme of the pipe

### 1.2 管单元特性

浮标和吊笼结构用管单元来模拟,其单元质量矩阵采用与三维梁单元相同的形式,其中,

$$A = \frac{\pi}{4}(D^2 - d^2) \quad (2)$$

$$I = \frac{\pi}{64}(D^4 - d^4) \quad (3)$$

式中,  $A$  和  $I$  分别为单元的横截面积和惯性矩,  $D$  和  $d$  分别为单元的外径和内径;其单元刚度矩阵采用与三维梁单元相同的形式,其中,

$$T_T = \frac{G_T(D^3 - d^3)}{L} \quad (4)$$

式中,  $T_T$  为与扭转自由度相关的单元刚度系数,  $G_T$  为扭转刚度常数,  $L$  为单元长度。

管单元模拟筏绳、吊绳和锚绳结构时,均作为缆索单元来计算,仅考虑轴向拉伸效应,其单元质量矩阵和刚度矩阵均采用与三维杆单元相同的形式。

### 1.3 管单元载荷向量

管单元载荷向量包括静载荷和动载荷,对于完全浸没于水下的单元沿  $z$  轴方向浮力为:

$$\{R/L\} = C_b \rho_w \frac{\pi}{4} D^2 \{g\} \quad (5)$$

式中,  $\{R/L\}$  为浮力引起的单位长度载荷向量,  $C_b$  为浮力系数,  $\{g\}$  为重力加速度向量,  $\rho_w$  为水的密度。单元动载荷是由于筏式结构在波浪中运动产生。计算程序在施加波浪载荷时,对于第一载荷步后的加速度进行纠错来确保其值保持不变。计算采用 Airy 波理论,积分点的水质点速度是水深的函数,按下式计算:

$$\vec{V}_X = \sum_{i=1}^{N_w} \frac{\cos h(k_i \bar{Z} f)}{\sin h(k_i h)} \frac{2\pi}{\tau_i} \eta_i \quad (6)$$

$$\vec{V}_Z = \sum_{i=1}^{N_w} \frac{\sin h(k_i \bar{Z} f)}{\sin h(k_i h)} \frac{2\pi}{\tau_i} \dot{\eta}_i \quad (7)$$

式中,  $\vec{V}_X$  为  $X$  向质点速度,  $\vec{V}_Z$  为  $Z$  向质点速度,  $k_i = 2\pi/\lambda_i$ ,  $\bar{Z}$  为海底以上积分点的高度,  $\bar{Z} = Z + h$ ,  $h$  为水深,  $\dot{\eta}_i$  为  $\eta_i$  对时间的导数,  $f = h/(h + \eta_s)$ ,  $\eta_s$  和  $\lambda_i$  分别为总波高和波长。水质点的加速度通过对  $\vec{V}_X$  和  $\vec{V}_Z$  的时间求微分获得。通过 Morison 方程来计算波浪作用下单元上的分布载荷:

$$\begin{aligned} \{F/L\} = & C_d \rho_w \frac{D}{2} \left\{ \dot{u}_n \right\} \left\{ \dot{u}_n \right\} + C_m \rho_w \frac{\pi}{4} D^2 \left\{ \dot{v}_n \right\} \\ & + C_t \rho_w \frac{D}{2} \left\{ \dot{u}_t \right\} \left\{ \dot{u}_t \right\} \end{aligned} \quad (8)$$

式中,  $\{F/L\}$  为水动力效应产生的单位长度上的载荷向量,  $C_d$  和  $C_t$  为法向和切向拖曳力系数,  $C_m$  为惯性力系数,  $\{\dot{u}_n\}$ 、 $\{\dot{v}_n\}$ 、 $\{\dot{u}_t\}$  分别为质点法向相对速度、法向加速度和切向相对速度向量。流体质点的速度通过式(6)和(7)得到,单元结点的速度通过 Newmark 时间积分得到,两者相减计算得到相对速度

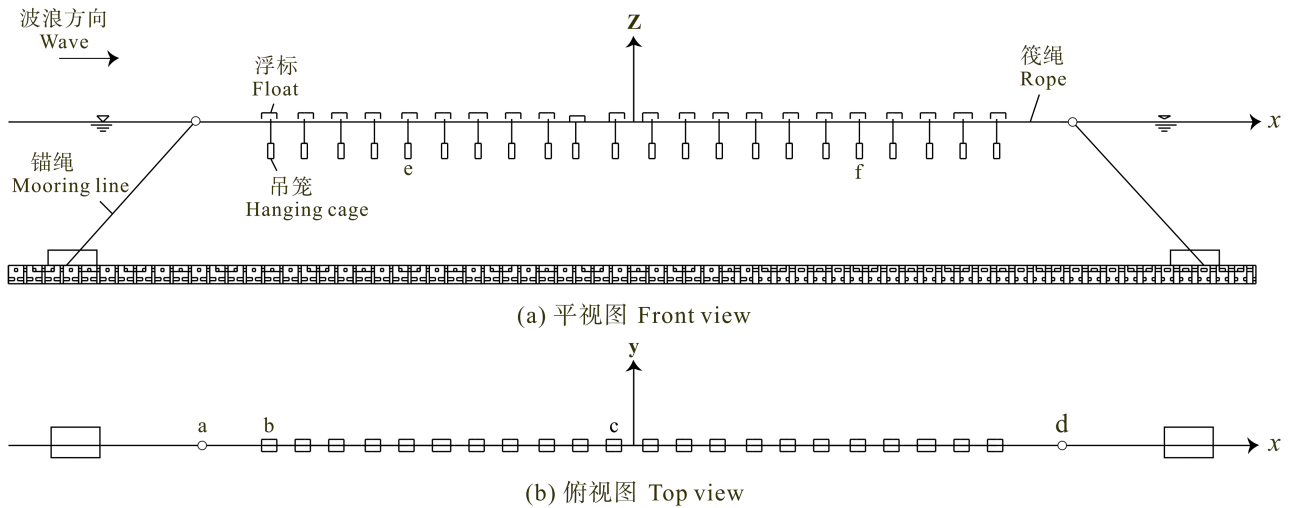


图 2 计算模型结构

Fig.2 Structure diagram of the model

$\{u_n\}$  和  $\{u_r\}$ 。

## 2 算例

本研究算例如图 2 所示。该筏式结构由 22 个柱形浮标、2 个球形浮标、吊笼、锚绳和筏绳组成。其中,左右两端的球形浮标与相邻的柱形浮标之间距离为 3.5 m,各柱形浮标间距为 1.3 m,所有的浮标通过筏绳互相连接。各柱形浮标直径 0.2 m,长度为 0.3 m。吊笼直径 0.3 m,高度为 1.2 m。各吊笼通过养殖吊绳悬挂于柱形浮标下方,吊绳长度为 1 m。水深为 10 m,锚绳长度 15 m,材料为尼龙(崔勇等,2012)。

## 3 计算结果与讨论

### 3.1 波浪周期内筏式结构形态变化

图 3 为筏式养殖结构在一个波浪周期内形态变化的数值模拟结果,由上往下每幅图片时间间隔为 1/4 周期。波浪要素以我国北方海区为例,根据桑沟湾波浪统计资料,波高设为 1.5 m,周期为 5 s,其中波浪入射方向为  $x$  正向。从图 3 中可以看出,筏式养殖设施整体结构在波浪作用下呈现周期性的运动趋势,每个浮标与吊笼在水平方向与垂直方向均产生较为明显的位移。本研究算例中,由于对浮标和吊笼结构加载了一定的刚度,其自身的形状并没有发生改变,而筏绳和吊绳则由于波浪力的作用而产生了明显的弯曲,但并未发生浮标或吊笼相互缠绕的现象,说明此筏式结构在波浪作用下能够保持一定形态从而达到安全使用的目的。本研究采

用的有限元模型将筏式养殖结构分成不同的管单元来计算单元载荷,在计算浮于水面上的结构单元的水动力时,程序对每一载荷步的各个单元位置进行校验。如果单元位于水中,其静载荷和动载荷自动施加;如果单元位于水面以上,则只有重力载荷和惯性载荷。因此,数值模型可针对结构单元的位置对其载荷进行自动调节。

### 3.2 位移与受力分析

图 4 为浮标位移历时曲线,图 4a-图 4d 分别代表不同位置的浮标(图 2b)。通过这 4 个浮标的位移变化可大致反应筏式结构浮标系统的运动情况。由图 4 中可以看出,各个浮标的位移呈现周期性变化,且与波浪周期基本一致。由于不同浮标所处位置不同,受到锚绳及筏绳相互牵引的作用,其位移变化的趋势有所不同。图 4a-图 4c 这 3 个浮标同处迎波侧,其水平位移始终为正值,最大不超过 0.6 m,而相邻柱形浮标的间距为 1 m,因此可有效避免相互缠绕的情况。同时,这 3 个浮标的垂直位移基本为负值,这是由于受到左侧锚绳的限制以及浮标下挂有吊笼所致。d 浮标位于背浪侧,其两个方向的位移与波高变化趋势相接近。

图 5 为吊笼位移历时曲线,图 5e、图 5f 分别为迎波侧和背波侧的吊笼(图 2a)。两个位置的吊笼水平与垂直方向的位移随着时间的变化均呈现较为规律的波形,这是由于吊笼通过吊绳悬挂于浮标之下,相互间影响比浮标要小。其中,迎波侧吊笼

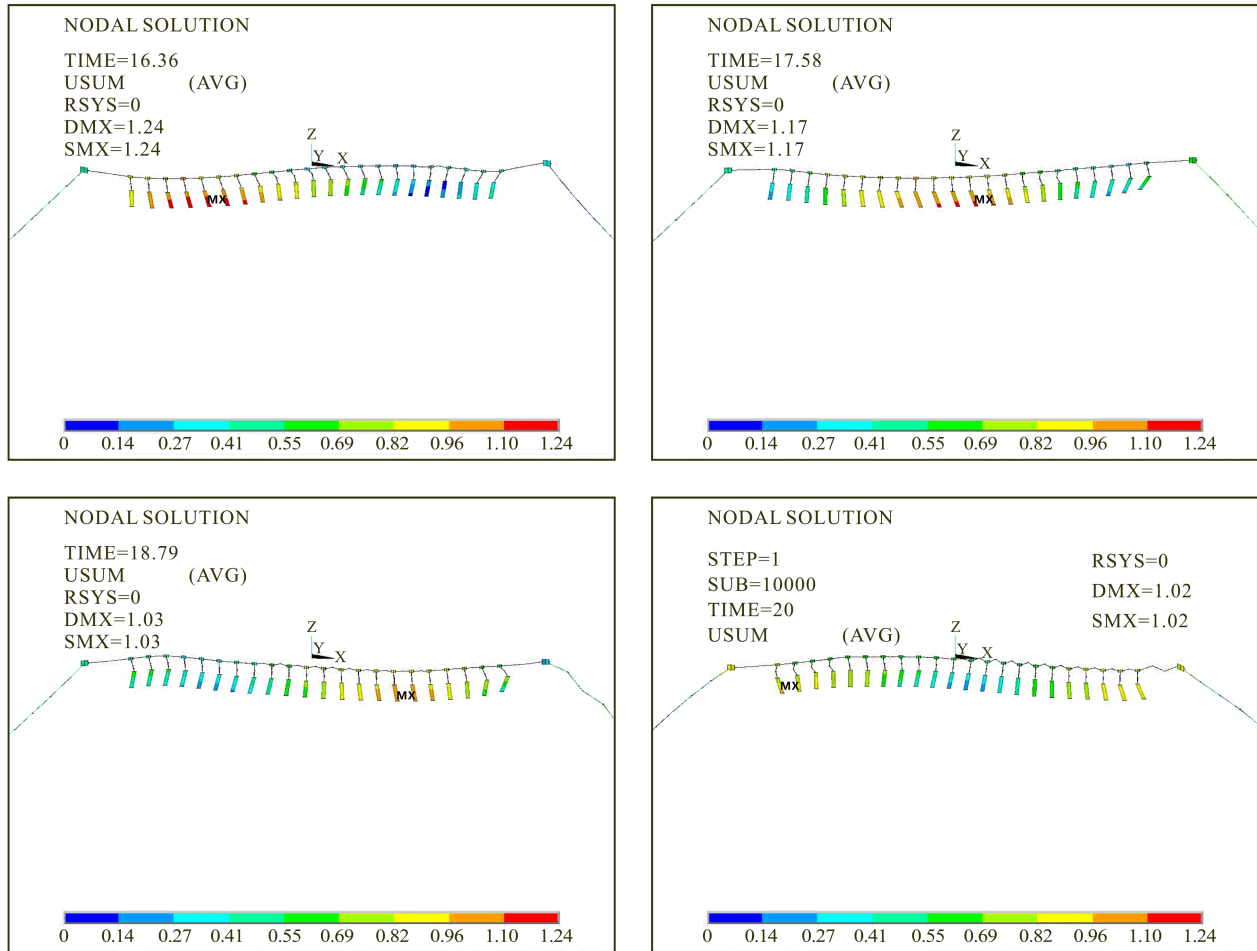


图 3 筏式结构在一个波浪周期内形态变化

Fig.3 Simulation of the dynamic motion of the long-line culture facility during one wave period

的水平位移基本为正值，最大位移接近 1 m，而背波侧吊笼水平位移出现负值，其最大位移为 0.5 m 左右；两个位置吊笼的垂直位移大部分为负值，这与其自身的重力载荷有关。

图 6 为锚绳受力历时曲线。图 6a、图 6b 分别为迎波侧和背波侧锚绳，两侧锚绳受力变化周期与波浪周期基本一致。其中，迎浪侧锚绳受力明显大于背浪侧，锚绳力最大值约为 1000 N。邓推等(2010)的模拟结果显示，背浪侧锚绳受力曲线中有双峰出现，这与本研究模拟结果有所不同，究其原因可能与计算的筏式养殖结构不同有关。

### 3.3 波高对浮标吊笼位移的影响

本节算例选取 3 组波浪来分析波高对浮标与吊笼位移幅度及锚绳受力的影响，波高  $H$  分别为 0.5、1、2 m，对应波浪周期  $T$  分别为 4、5、6 s，波浪入射方向为沿  $x$  轴正向。图 7a-图 7f 代表不同位置

的浮标与吊笼。由图 7 可以看出，各个浮标以及吊笼在水平与垂直方向的位移幅度均随着波高的增加而增大，且垂直位移幅度大于水平方向。其中，a、b、c 三个浮标的水平位移幅度均小于 1 m，可能是受到迎浪侧锚绳牵引所致。两个吊笼的水平位移幅度较大，这是由于其通过吊绳自由悬挂于浮标之下，水平移动不受浮标限制的原因。各个位置浮标与吊笼的垂直位移幅度和对应的波幅相差不大。

## 4 结语

本研究基于有限元商业软件 ANSYS，通过建立数值模型分析了筏式养殖结构在波浪作用下运动及受力情况，计算求解过程稳定，数值解法收敛性良好。借助于计算机 3D 可视化技术，可对波浪中筏式养殖结构的运动过程进行虚拟呈现。模拟结果显示，浮标及吊笼的位移大小与其所处位置密切相关；迎波侧锚

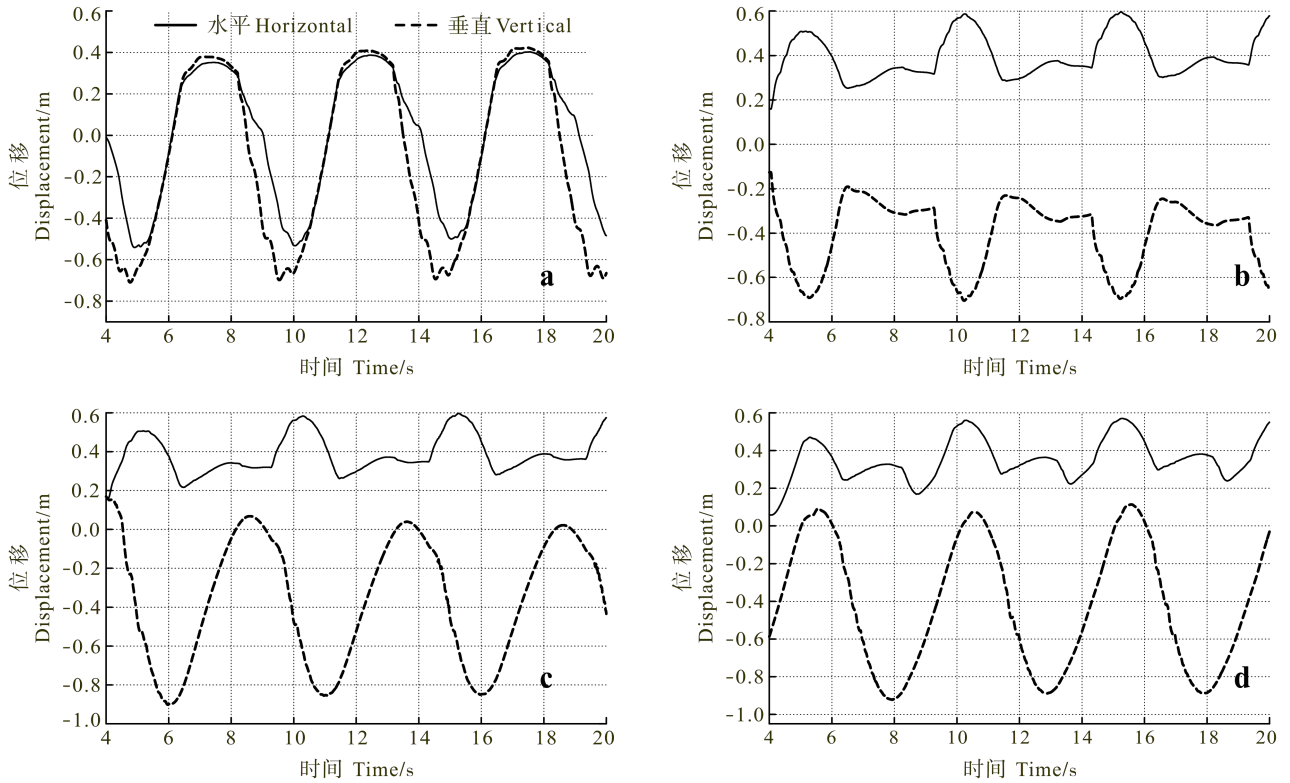


图 4 浮标位移历时曲线

Fig.4 Duration curve of displacement of the floats

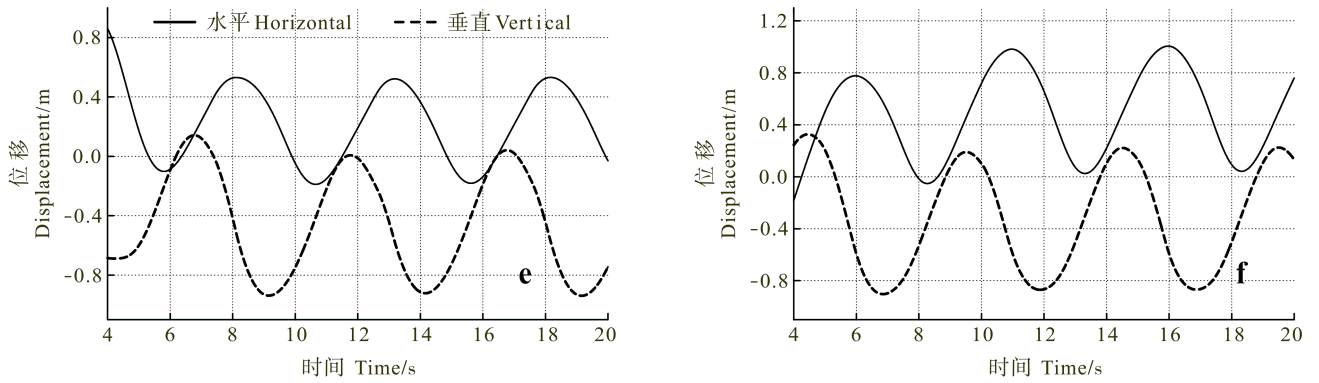


图 5 吊笼位移历时曲线

Fig.5 Duration curve of displacement of the hanging cages

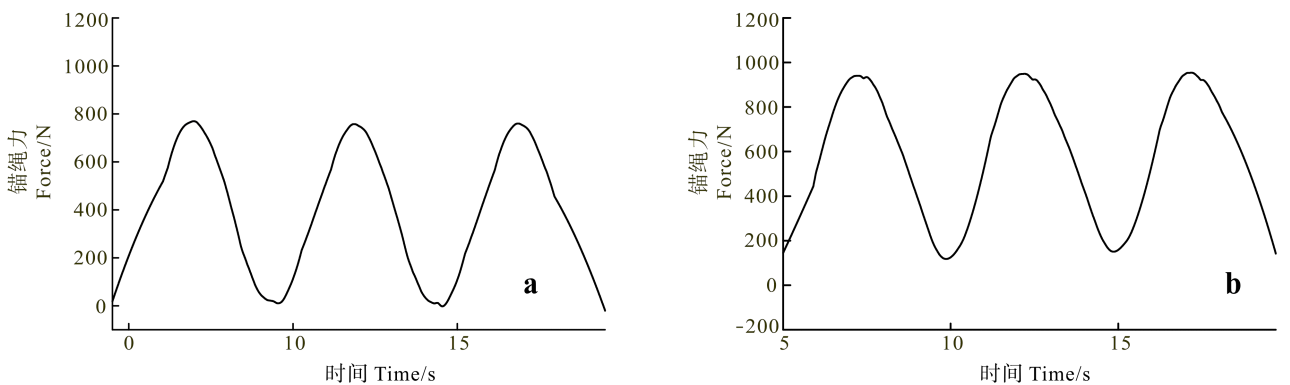


图 6 锚绳受力历时曲线

Fig.6 Duration curve of mooring line force

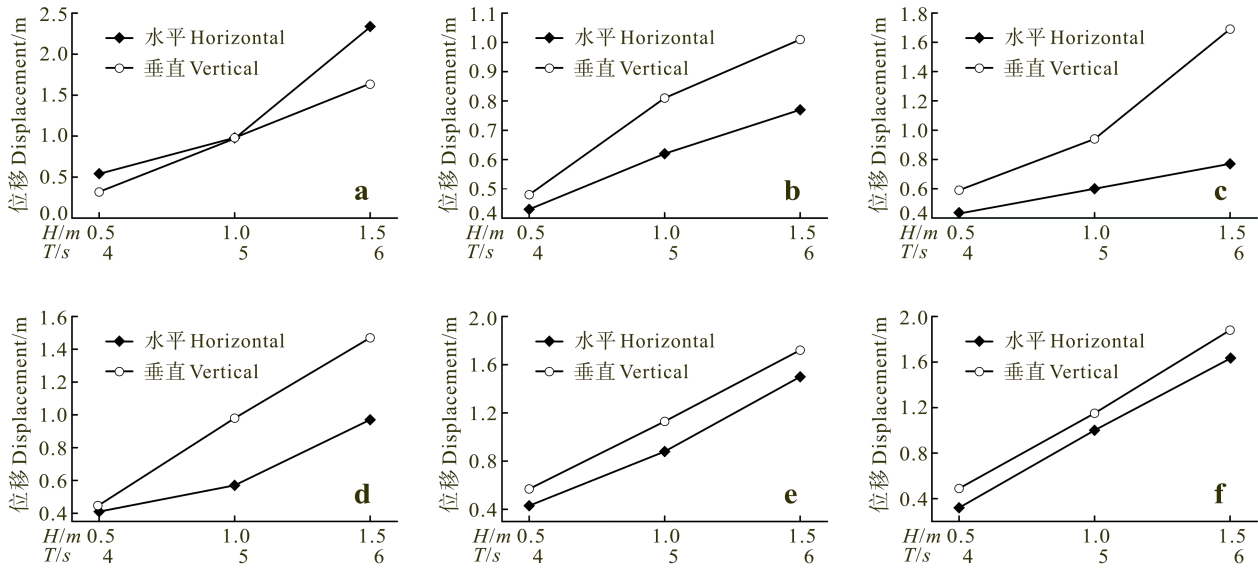


图 7 波高对位移幅度的影响

Fig.7 Effect of wave height on displacement amplitude

绳受力高于背波侧。此外,浮标与吊笼的位移幅度与波高基本成正比关系。本研究有待于进一步的海上实测验证,以期为实际工程设计提供理论依据。在实际海域中筏式养殖结构通常受到波浪与水流的共同作用,因此,今后在数值模拟中将加入水流与波浪的联合作用来分析,从而进一步完善数值模型,使模拟结果能够更加精确。

### 参 考 文 献

王经坤,刘镇昌,杨红生.筏式养殖设施虚拟设计及仿真研

- 究.渔业现代化,2008,35(1):32-35  
 邓推,董国海,赵云鹏,等.波浪作用下筏式养殖设施的数值模拟.渔业现代化,2010,37(2):26-30  
 李冠颖,黄材成.外海浮筏式蚧架动力分析.见:第31届海洋工程研讨会论文集.台湾,中山大学,2009,553-560  
 崔勇,蒋增杰,关长涛,等.水流作用下筏式养殖设施动力响应的数值模拟.渔业科学进展,2012,33(3):102-107  
 Stevens C, Plew D, Hartstein N, *et al.* The physics of open-water shellfish aquaculture. *Aquacultural Engineering*, 2008, 38(3): 145-160  
 Tsukrov I, Eroshkin O, Fredriksson D, *et al.* Finite element modeling of net panels using a consistent net element. *Ocean Engineering*, 2003, 30(2): 251-270

(编辑 陈严)

## Dynamic Analysis of the Long-line Culture Facility Under Waves

CUI Yong, GUAN Changtao, HUANG Bin, LI Jiao, JIANG Zengjie

(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)

**Abstract** The long-line culture has been playing a more and more important role in fish industry in both China and the whole world due to the increase in seafood market demands. The long-line culture facility should sustain a high-energy environment with a full range of loading conditions because high speed ocean currents and strong sea storms are frequent events in the open ocean area. Therefore studies on hydrodynamic characteristics of the facility in the waves are necessary. ANSYS is a commercial program for finite element modeling and simulation. Here we used this program to establish a mathematical model for the long-line culture facility, and analyzed the displacements of the buoy and hanging cage and the maximum mooring line forces at different positions. The simulation results showed that the buoys and hanging cages at different positions displayed different patterns of displacements because of the pulling forces of the float ropes and the mooring line. The three buoys had positive horizontal displacements with the maximum value less than 0.6 m. The periodic changes of the mooring line force were consistent with the period of the waves. The mooring line force on the front side was larger than that on the back side, with the maximum value of ~1000 N. We also compared the displacement amplitudes of the buoys and hanging cages under different wave conditions. We found that the displacement amplitudes of the buoys and hanging cages increased along with the wave height in both horizontal and vertical directions; the amplitudes in the vertical direction were larger than that in the horizontal direction. These results suggested that the long-line culture facility in the waves had periodic motion; the buoys and hanging cages did not intertwine with each other, hence the long-line culture facility could be operated safely in the waves.

**Key words** Lone-line culture; Finite element method; Wave; Numerical simulation

# 响应面法优化丹参中抗无乳链球菌 活性成分的提取工艺\*



邓恒为 郭伟良 孙晓飞 谢珍玉 王世锋 胡文婷 周永灿

(海南大学海洋学院 热带生物资源可持续利用省部共建国家重点实验室培育基地 海口 570228)

**摘要** 在单因素提取工艺优化的基础上,选取液料比、浸润时间、提取时间和提取温度进行四因素三水平的 Box-behnken 实验设计,并结合响应面分析法进一步优化丹参中抗无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*, SA)活性成分提取工艺。优化所得最佳提取工艺为液料比 37.8:1.0(ml:g)、浸润时间 104 min、提取温度 86.7°C、提取时间 182 min。响应面模型预测在该提取工艺下抗 SA 活性成分提取得率极值为 25.95%,经 4 次平行验证实验的实际提取得率为(25.87±0.03)%,为优化前的 2.59 倍,表明优化方法高效可靠。

**关键词** 无乳链球菌;丹参;提取工艺;响应面法

中图分类号 S948 文献标识码 A 文章编号 1000-7075(2014)04-0132-09

无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*, SA)是人畜共患的条件致病菌,能引起女性生殖系统感染(Usein *et al*, 2009)、婴儿败血症和脑膜炎(Lindahl *et al*, 2005; Verani *et al*, 2010)、牛羊等畜禽乳腺炎(Naccari *et al*, 2009; Elizondo-Salazar *et al*, 2010)以及多种海水和淡水养殖鱼类链球菌病等(张新艳等, 2008; 柯剑等, 2010)。尤其是 2007 年以来,我国南方各地养殖罗非鱼链球菌病暴发和蔓延,对我国罗非鱼养殖造成了毁灭性打击,成为当前制约我国罗非鱼养殖可持续发展的最主要因素之一(柯剑等, 2010)。

为了控制养殖罗非鱼链球菌病的危害,近年来主要使用磺胺类、青霉素类等抗菌药物,该类药物在使用初期虽具有较好的效果,但由于 SA 能利用宿主巨噬细胞逃避抗生素类的杀伤作用,存在较严重的停药反弹现象,影响疾病控制效果(Zimmerman *et al*, 1975),并且,使用这类抗菌药物还存在耐药性和药物残留等严重缺陷,迫切需要寻找其他安全高效的罗非鱼链球菌病防治药物与方法。中草药具有天然、多

功能性、无耐药性和毒副作用小等特点,被认为是替代抗生素类药物用于水产疾病控制的良好选择(Jian *et al*, 2003; 梁利国等, 2010)。不过,由于中草药成分复杂,因不同来源不同种中草药的有效成分含量波动较大,导致使用时难以量化,为此,本研究在采用琼脂扩散法筛选出具有良好抗 SA 活性的中草药丹参的基础上,对丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)中抗 SA 活性的提取工艺进行优化,为鉴定丹参有效成分、研究其作用机制以及建立罗非鱼链球菌病的安全高效控制方法等奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

丹参:2012 年 5 月购于海南海口市源安隆大药房,于 60°C 烘箱烘烤 48 h,用小型高速粉碎机粉碎,过 60 目筛,制成粉末样品备用。

无乳链球菌:分离自海南患病罗非鱼,经鉴定并保存于热带生物资源可持续利用省部共建国家重点

\* 海南省重点科技计划项目(ZDXM20120005)、海口市重点科技项目、海南大学地方服务项目和海南大学青年基金(qnj1206)共同资助。邓恒为, E-mail: hengweideng@163.com; 郭伟良, E-mail: guowl07@mails.jlu.edu.cn。共同第一作者

通讯作者: 周永灿, 教授, E-mail: zychnu@163.com

收稿日期: 2013-09-02, 收修改稿日期: 2013-11-23

实验室的致病菌强毒株。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 SA 菌悬液的制备** 将保存的 SA 菌种液平板划线, 32℃培养 24 h, 挑取一单菌落于装有 2 ml 灭菌脑心浸液(BHI)液体培养基的 5 ml 无菌 EP 管中, 32℃、180 r/min 培养 16 h, 将培养的菌悬液按照 1%的接种量接入 100 ml 的无菌脑心浸液(BHI)液体培养基中, 32℃、180 r/min 培养 16 h 制成最终的 SA 菌悬液。

**1.2.2 抗 SA 活性成分含量的测定** 琼脂扩散法测定丹参抗 SA 活性成分含量: 以用无菌生理盐水将 SA 菌悬液稀释至  $A_{630nm}$  为 0.8 的菌悬液, 按 2%接种量接入低于 50℃而未凝固的 BHI 半固体培养基, 快速倒入已冷凝的 BHI 固体培养基表面, 摇匀后平放, 制成 BHI 双层培养基; 凝固后用直径 5 mm 的打孔器在双层培养基上均匀打 3 个孔, 在每个孔中加入 57  $\mu$ l 待测样品液, 32℃培养 18 h 后以游标卡尺测量抑菌圈直径。

**1.2.3 标准曲线的绘制** 采用热水提取法提取丹参中抗 SA 活性成分, 将丹参粉末按照液料比 30.0 : 1.0 (ml:g)混合于 EP 管中, 静置浸润 30 min, 然后于 50℃水浴中静置提取 60 min, 提取 1 次, 然后用旋转蒸发器将提取液浓缩 12 倍作为标准曲线的母液。因抗 SA 活性成分未经分离纯化鉴定, 其含量尚未得知。本研究假定标准曲线母液中抗 SA 活性成分浓度为 0.04 g/ml, 则其提取得率初始为 10.00%, 抗 SA 活性成分提取得率计算公式为:

$$\begin{aligned} & \text{抗无乳链球菌活性成分提取得率} / \% \\ &= \frac{\text{抗无乳链球菌活性成分质量}}{\text{丹参质量}} \times 100\% \end{aligned}$$

将丹参提取液母液分别与去离子水按 6 : 0、5 : 1、4 : 2、3 : 3、2 : 4 和 1 : 5 (ml : ml)混匀, 即药液中抗 SA 活性成分浓度分别为 0.0400、0.0333、0.0267、0.0200、0.0133、0.0067 g/ml, 以琼脂扩散方法测定各标准液的抑菌圈直径, 以抗 SA 活性成分浓度的对数为横坐标, 抑菌圈直径为纵坐标, 绘制标准曲线。

将样品液稀释或浓缩至生药量为 0.0400 g/ml, 以琼脂扩散法测定其抑菌圈直径, 根据标准曲线计算抗 SA 活性成分浓度和抗 SA 活性成分得率。

### 1.2.4 单因素法优化丹参抗 SA 活性成分的提取工艺

**提取溶剂的选择:** 按照标准曲线母液制备方法提取丹参抗 SA 活性成分, 提取溶剂分别用 0、20%、40%、60%、80%和 100%的乙醇水溶液, 提取完成后,

用 40℃烘箱烘干, 加等量的去离子水将析出物完全溶解, 过 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜, 制成无菌样品液, 测定其抗 SA 活性成分含量并计算其得率, 确定提取溶剂中乙醇的合适浓度。

**提取次数的选择:** 采用上述选择合适的溶剂, 以提取液料比 30.0 : 1.0 (ml : g)、温度 50℃、浸润时间 30 min 和提取时间 60 min 处理后, 过滤得第 1 次提取液, 向滤渣中加等量的溶剂, 用相同的提取方法再提取 2 次, 依此分别获得 3 次提取的提取液, 提取液以 1.2.2 方法测定其抗 SA 活性成分含量与得率, 以确定选择合适提取次数。

**其他提取条件的优化:** 采用单因素法分别研究提取液料比、浸润时间、提取温度和时间等因素对抗 SA 活性成分得率的影响, 其中, 研究某个影响因子时, 已研究的因子采用其已优化的结果, 未研究的因子采用其在制作标准曲线时设定的数值, 以此逐一优化丹参抗 SA 活性成分的合适提取条件。

**1.2.5 Box-Behnken 试验设计及响应面的分析** 在单因素优化的基础上进行四因素三水平的 Box-Behnken 设计试验, 因素水平如表 1 所示, 实验设计方案和结果如表 2 所示, 采用响应面对结果进行分析, 获得最优提取条件, 在最优条件下进行 4 次平行验证试验, 以验证模型的可靠性。

## 2 结果与分析

### 2.1 丹参抗 SA 活性成分测定标准曲线

图 1 为测定丹参抗 SA 活性成分含量的标准曲线, 其曲线方程为  $Y = 4.842X + 16.707$ , 相关系数  $R^2$  为 0.9873, 表明丹参抗 SA 活性成分含量对数值与其抑菌圈直径间有较好的相关性, 该曲线适合用于测定丹参提取液中抗 SA 活性成分的含量。

### 2.2 丹参抗 SA 活性成分提取条件的单因素优化

**2.2.1 溶剂中乙醇体积分数对丹参抗 SA 活性成分提取得率的影响** 提取溶剂中所含不同乙醇体积分数对丹参抗 SA 活性成分提取得率影响的研究结果表明(图 2), 提取溶剂中乙醇体积分数为 20%时, 得率最高, 乙醇体积分数超过 20%后, 得率随乙醇体积分数的升高而下降, 乙醇体积分数为 100%时提取液没有表现出抗 SA 活性, 因此, 根据相似相溶原理推断, 丹参中抗 SA 活性成分的极性与 20%乙醇溶液的极性相当。



表 1 丹参抗 SA 活性成分提取工艺优化的 Box-Behnken 试验设计因素水平

Tab.1 The factors and levels of Box-Behnken experiment for optimizing the process of the active components against SA extraction from *S. miltiorrhiza*

因素 Factor	液料比 Ratio of liquid to solid ( $X_1$ ) (ml:g)	浸润时间 Infiltration time( $X_2$ ) (min)	提取温度 Extraction temperature( $X_3$ ) ( $^{\circ}$ C)	提取时间 Extraction time( $X_4$ ) (min)
-1	20.0 : 1.0	60	80	60
0	30.0 : 1.0	90	90	120
1	40.0 : 1.0	120	100	180

“0”表示该单因素优化获得的最优条件，“1”表示按照单因素步长和实验结果设计的高水平，“-1”表示按照单因素步长和实验结果设计的低水平

“0” is the best condition of the single factor optimization, “1” is high levels of design according to step length of the single factor and the experiment results, “-1” is low levels of design according to step length of the single factor and the experiment results

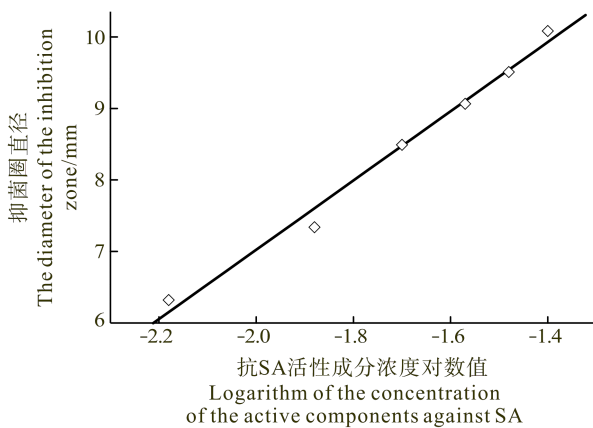


图 1 丹参抗 SA 活性成分含量对数值与抑菌圈直径的标准曲线

Fig.1 The standard curve of relationship between the concentration of the active components against SA and the diameter of the inhibition zone

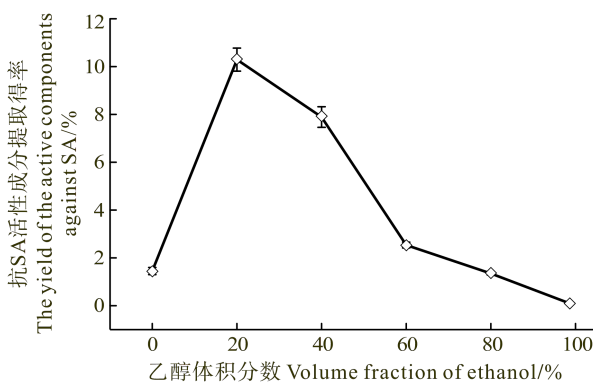


图 2 溶剂中乙醇体积分数对丹参抗 SA 活性成分提取得率的影响

Fig.2 The effect of volume fraction of ethanol in the solvent on the yield of the active components against SA

2.2.2 提取次数对丹参抗 SA 活性成分提取得率的影响 如 1.2.4 方法考察不同提取次数提取丹参中抗

SA 活性成分提取得率结果表明, 仅第 1 次提取的提取液中表现出较强的抗 SA 活性, 而第 2 次和第 3 次提取的丹参提取液均未出现明显抑菌活性, 说明仅经过 1 次提取就可较好地析出丹参中的抗 SA 活性成分。

### 2.2.3 液料比对丹参抗 SA 活性成分提取得率的影响

提取液料比对丹参抗 SA 活性成分提取得率的影响研究结果表明(图 3), 随着液料比增加, 提取得率随液料比增加而增加, 而液料比达到 25.0 ml/g 后其增幅明显变缓, 综合考虑提取效果和节省溶剂原则, 选择丹参提取的合适液料比为 30.0 : 1.0(ml : g)。

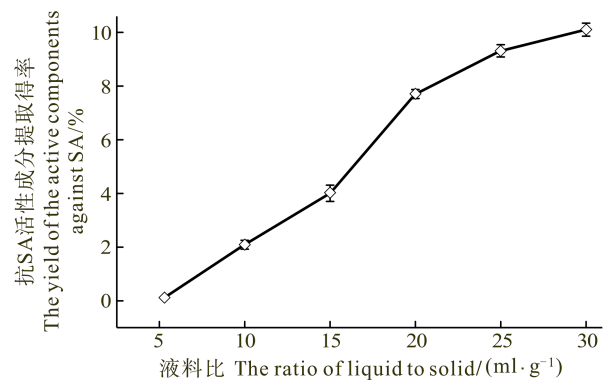


图 3 液料比对丹参抗 SA 活性成分提取得率的影响

Fig.3 The effect of the ratio of liquid to solid on the yield of the active components against SA

### 2.2.4 温度对丹参抗 SA 活性成分提取得率的影响

提取温度对丹参抗 SA 活性成分提取得率的影响研究结果表明(图 4), 提取温度低于 90 $^{\circ}$ C 时, 得率与温度呈正相关; 而温度高于 90 $^{\circ}$ C 时, 得率与温度呈负相关, 因此, 丹参中抗 SA 活性成分的最适提取温度为 90 $^{\circ}$ C。

### 2.2.5 浸润时间对丹参抗 SA 活性成分得率的影响

浸润时间对丹参抗 SA 活性成分提取得率影响的研究结果表明(图 5), 浸润时间为 90 min 时, 得率最

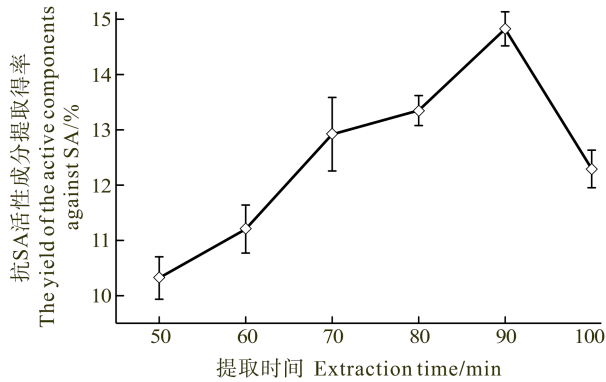


图 4 提取温度对丹参抗 SA 活性成分提取得率的影响  
Fig.4 The effect of extraction temperature on the yield of the active components against SA

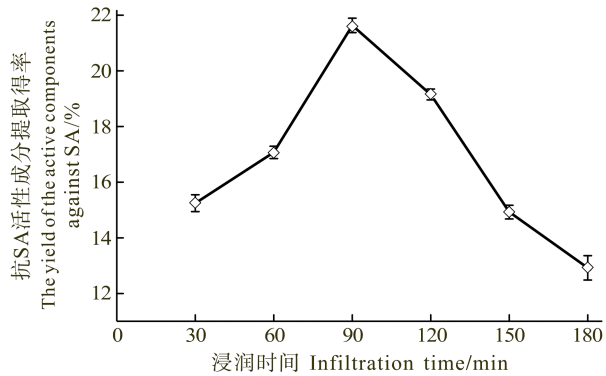


图 5 浸润时间对丹参抗 SA 活性成分得率的影响  
Fig.5 The effect of infiltration time on the yield of the active components against SA

高, 据此确定提取丹参中抗 SA 活性成分的最佳浸润时间为 90 min。

2.2.6 提取时间对丹参抗 SA 活性成分提取得率的影响 提取时间对丹参抗 SA 活性成分提取得率影响的研究结果表明(图 6), 提取时间为 120 min 时得率最高, 因此选择其最适的提取时间为 120 min。

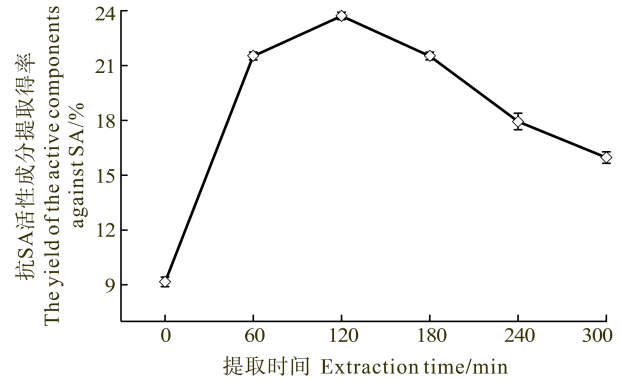


图 6 提取时间对丹参抗 SA 活性成分提取得率的影响  
Fig.6 The effect of extraction time on the yield of the active components against SA

2.3 Box-Behnken 设计试验结果及响应面的分析

采用多元二次回归方程对表 2 中的试验结果进行拟合, 得到回归方程如下:  $Y=16.145+0.345X_1+0.972X_2+0.486X_3+1.633X_4-2.354X_1^2-0.074X_1X_2+0.037X_1X_3-1.114X_1X_4-0.839X_2^2+0.452X_2X_3+0.694X_2X_4-3.501X_3^2-0.070X_3X_4-2.003X_4^2$ 。该回归方程的相关系数( $R^2$ )为 0.870, 预测均方根误差(RMSE)为 2.458, 表明有 87.0%信息来自所选自变量, 多元二次回归模型有较好的拟合度和预测性能。以 F 检验对模型进行显著性检验, 其 F 值为 5.765, P 值为 0.002, 表明该模型显著可靠。

表 2 Box-Behnken 试验设计方案和结果  
Tab.2 The design scheme and results of Box-Behnken experiments

试验号 Experiment numbers	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$Y \pm SE^*$	试验号 Experiment numbers	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$Y \pm SE$
1	-1	-1	0	0	16.705±0.000	15	0	1	-1	0	17.521±0.363
2	-1	1	0	0	19.489±0.175	16	0	1	1	0	10.949±0.305
3	1	-1	0	0	17.938±0.252	17	-1	0	-1	0	16.724±0.250
4	1	1	0	0	22.674±0.492	18	-1	0	1	0	10.644±0.225
5	0	0	-1	-1	20.035±0.145	19	1	0	-1	0	22.306±0.257
6	0	0	-1	1	20.139±0.679	20	1	0	1	0	15.053±0.395
7	0	0	1	-1	11.064±0.268	21	0	-1	0	-1	11.736±0.389
8	0	0	1	1	11.125±0.305	22	0	-1	0	1	14.632±0.224
9	-1	0	0	-1	18.963±0.151	23	0	1	0	-1	21.904±0.659
10	-1	0	0	1	15.424±0.536	24	0	1	0	1	22.757±0.704
11	1	0	0	-1	22.528±0.181	25	0	0	0	0	24.060±0.422
12	1	0	0	1	21.878±0.298	26	0	0	0	0	24.219±0.276
13	0	-1	-1	0	11.737±0.218	27	0	0	0	0	24.140±0.338
14	0	-1	1	0	14.164±0.600	—	—	—	—	—	—

$Y \pm SE^*$  为丹参中抗 SA 活性成分提取得率±平行试验间的标准差

$Y \pm SE^*$  is the yield of the active components against SA ± the standard deviation between the parallel test

表3 回归分析结果  
Tab.3 The results of the regression analysis

项目 Items	$DF^{1)}$	$SS^{2)}$	$F$	$P_r > F$	项目 Items	$DF$	$SS$	$F$	$P_r > F$
$X_1$	1.	49.713	8.227	0.014	$X_1X_4$	1.	2.085	0.345	0.568
$X_2$	1	67.133	11.111	0.006	$X_2^2$	1	76.929	12.732	0.004
$X_3$	1	104.811	17.346	0.001	$X_2X_3$	1	20.246	3.351	0.092
$X_4$	1	0.006	0.001	0.975	$X_2X_4$	1	1.043	0.173	0.685
$X_1^2$	1	12.527	2.073	0.175	$X_3^2$	1	217.810	36.048	0.000
$X_1X_2$	1	0.952	0.158	0.698	$X_3X_4$	1	0.000	0.000	0.993
$X_1X_3$	1	0.342	0.057	0.816	$X_4^2$	1	34.693	5.741	0.034
回归 Model	14	487.701	5.765	0.002	一次项 Linear	4	221.663	9.171	0.001
二次项 Quadratic	4	241.369	9.987	0.001	交互项 Cross product	6	24.670	0.680	0.669
残差 Error	12	72.507	—	—	失拟项 Lack of fit	10	72.4945	1147.1	0.001

1)  $DF$  为自由度；2)  $SS$  为方差总和

1)  $DF$  is the degree of freedom；2)  $SS$  is the sum of variance

采用  $F$  检验对回归模型中各项目进行显著性检验的结果表明(表 3), 浸润时间( $X_2$ )和提取温度( $X_3$ )项的  $P < 0.01$ , 表明其对丹参抗 SA 活性成分提取得率的影响极其显著; 液料比( $X_1$ )项的  $P < 0.05$ , 表明其对得率有显著影响; 这 3 个因素在拟合方程中系数符号为正号, 表明它们对得率的影响是正效应; 而浸润时间( $X_2$ )、提取温度( $X_3$ )和提取时间( $X_4$ )的平方项的  $P < 0.05$ , 系数符号为负号, 表明这 3 个因素对得率的影响是呈开口向下的抛物线状, 它们的抛物线开口口径较小, 曲面弯度较为明显。模型中的交互项的  $P > 0.1$ , 表明各提取条件之间的交互作用不显著。

为了直观提取条件与丹参抗 SA 活性成分提取得率之间以及不同提取条件之间的交互作用, 绘制两两提取条件之间的响应曲面图(图 7a-图 7f)。结果表明, 6 个响应曲面均为开口向下的凸面, 极值区域(曲面的顶端)在实验设计考察的范围内, 表明得率极值在考察范围内。此外, 图 7c、图 7e 和图 7f 的形成较为趋于正球面形, 表明液料比( $X_1$ )与提取温度( $X_3$ )、浸润时间( $X_2$ )与提取温度( $X_3$ )、浸润时间( $X_2$ )与提取时间( $X_4$ )之间交互影响不显著; 在考察的范围内, 抛物曲线的口径小, 弯曲度大, 与平方项统计分析结果显著相吻合。

通过对模型的多元二次回归方程偏导, 解方程组, 求极值, 获得丹参中抗 SA 活性成分提取的最佳条件为: 液料比 37.8 : 1.0 (ml : g), 浸润时间 104 min、提取温度 86.7°C 和提取时间 182 min, 该模型预测最优条件下得率最高值为 25.95%。在最佳条件下进行 4 次平行验证, 结果得率为(25.87±0.03)%, 与预测值间

相对误差为 0.31%, 表明模型预测准确可靠。提取方法优化后, 得率显著提高, 为优化前的 2.59 倍, 表明该优化方法有效可行。

### 3 讨论

药用丹参是双子叶唇形科植物丹参的根和茎, 其有效成分主要为脂溶性的二萜化合物和水溶性的酚酸类化合物, 以及黄酮类、三萜类、甾醇类等成分, 如丹参酮、二氢丹参酮 A、丹参酮 B、丹参素、丹酚酸等(李家实等, 1998)。已有研究表明, 丹参具有祛瘀止血、降血脂、抗血栓、改善微循环以及抗肿瘤、抗氧化和抗菌消炎等药理活性(浦锡娟等, 2009)。特别在抗菌消炎方面, 国内已有较多的报道, 周静等(2008)研究认为, 丹参水溶性成分和脂溶性成分对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)均有抑制作用, 且其水溶性成分的抑菌效果强于脂溶性成分; 王庆银等(2010)研究表明, 丹参醇提液对短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)、大肠埃希菌(*Escherichia coli*)和铜绿假单胞杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)等均有明显抑制作用; 邓婧等(2006)研究了丹参水煎液对口腔常驻菌抑菌效果, 结果显示, 其对金黄色葡萄球菌和变形链球菌(*Streptococcus mutans*)等有较强抑制作用; 王政军等(2011)研究丹参根甲醇提取物体外抑菌试验表明, 其对枯草芽孢杆菌和表皮葡萄球菌(*S.epidermidis*)等 10 种常见细菌均有较强抑菌活性, 且对表皮葡萄球菌的抑菌活性最强, 其 MIC 和 MBC 均为 1.52 mg/ml。不过, 已有的研究主要集中于丹参对人类病原菌的作

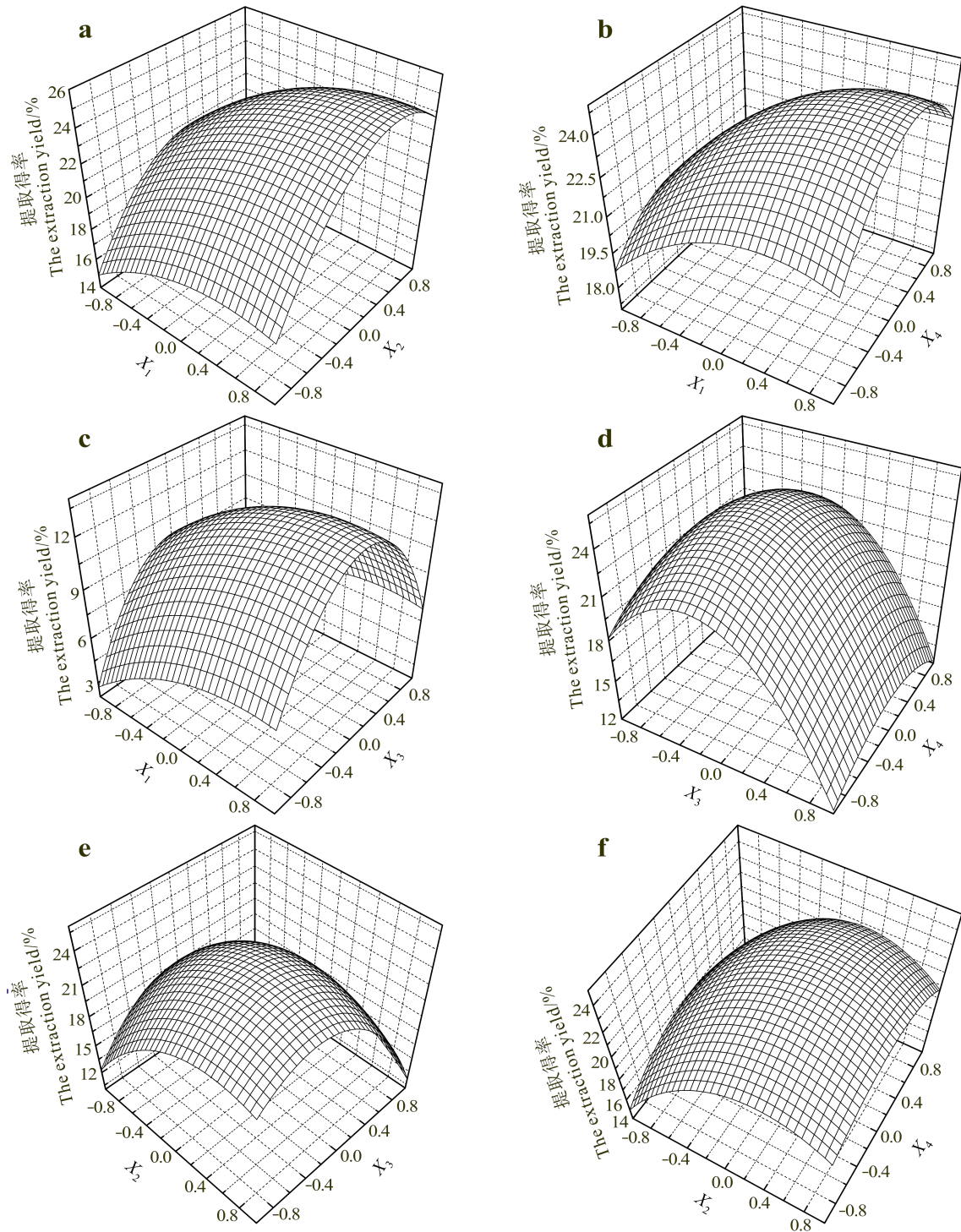


图 7 响应曲面

Fig.7 The figures of response surface

a :  $Y=f(X_1, X_2)$  的响应面图 ; b :  $Y=f(X_1, X_4)$  的响应面图 ; c :  $Y=f(X_1, X_3)$  的响应面图 ;  
 d :  $Y=f(X_3, X_4)$  的响应面图 ; e :  $Y=f(X_2, X_3)$  的响应面图 ; f :  $Y=f(X_2, X_4)$  的响应面图

a: Response surface figure of  $Y=f(X_1, X_2)$ ; b: Response surface figure of  $Y=f(X_1, X_4)$ ; c: Response surface figure of  $Y=f(X_1, X_3)$ ;  
 d: Response surface figure of  $Y=f(X_3, X_4)$ ; e: Response surface figure of  $Y=f(X_2, X_3)$ ; f: Response surface figure of  $Y=f(X_2, X_4)$ .

用效果，有关丹参对水产病原的抑制作用鲜有报道。  
 本研究采用单因素法对丹参抗 SA 活性成分提取

的乙醇体积分数、浸润时间、液料比、提取温度和提取时间等因子进行初步优化的基础上，再利用

Box-Behnken 试验设计和响应面分析法对其提取工艺进一步优化。其中,响应面法是集试验设计、数学统计和计算机科学为一身的优化方法,它不仅可以搜寻出各因素的最优水平区域,还可考察各因素对响应值及各因素之间的交互作用,具有试验点数少、实验信息量大、全局性高等优点,已广泛应用于化工、医药、生物和农业等研究领域的工艺优化(逯家辉等, 2008a、b; Avishek *et al.*, 2009; 孙元芹等, 2013)。本研究结果表明,采用 Box-Behnken 试验设计结合响应面分析法,以较少的试验次数获得了提取条件与抗 SA 活性成分之间的相关信息,较好地描述提取条件与抗 SA 活性成分得率之间的相关性以及提取条件之间的交互作用,通过该方法优化提取工艺显著提高了丹参中抗 SA 活性成分提取得率,在渔用中草药活性成分的分析以及推动丹参等中草药在水产病害防控中的研究与应用等方面具有良好前景。

本文对丹参抗 SA 活性成分的提取工艺进行了研究,但其中活性成分的具体种类尚未确定,不过,本研究结果表明,丹参以 20%乙醇作为其提取溶剂时其提取物的抗 SA 活性最强,根据相似相溶原理(Du *et al.*, 2004; 赵磊等, 2006),可以推测丹参中抗 SA 的活性成分应为极性较强物质,如丹参酮、丹参酮-A、隐丹参酮二氢丹参酮等。有研究认为(储茂泉等, 2002),中草药的浸提过程由 3 步组成:1)溶剂向药材内部渗透;2)依靠溶质的溶剂化将溶质溶解到固液界面上;3)溶质从固液界面向溶剂主体扩散。因此,中草药提取前的浸润时间和提取时间都是影响提取得率的重要因素。同时从单因素试验和响应面分析二次项统计的显著结果显示,浸润时间和提取时间对丹参中抗 SA 活性成分提取得率的影响呈显著的抛物线状,即提取得率随着浸润的时间和提取时间的延长,得率先是上升而后下降,提取温度也有相似地变化规律。由于丹参中抗 SA 活性成分并未明确,其得率是根据双层平板的抑菌圈直径计算而得,仅是表明随着浸润时间和提取时间的延长,提取液的抗 SA 活性先是上升而下降,按溶出理论,随着浸润和提取时间的延长,会促进活性物质快速溶出,抗 SA 活性也会随着增强,但过长的浸润和高温下过长的提取时间会促进并加剧一些化学反应的发生,造成待提取组分发生裂解、水解、氧化等反应,而造成待测组分的损失(陈益乐, 2011)<sup>1)</sup>。李有润等(1997)研究了中草药成分的浸提过程也认为,中草药中有效成分在高温下长时间提

取会造成有效成分的分解与挥发。对于丹参中活性成分因高温和长时间提取而下降的文献也有报道过,如对丹参药材进行试用流通蒸汽灭菌 30 min,丹参酮 A 含量下降 15.19%(黄泰康 1994);曾元儿等(1997)的研究表明,丹参乙醇浸膏中丹参酮 A 损失的程度随温度的升高和时间的延长而增加,100℃烘干 5 h,丹参酮 A 损失均达 50%以上。当然丹参为复杂体系,其中含有多种活性成分,而且相似性活性成分含量之间存在显著相关性(曾令杰等, 2008),其中有抗 SA 活性成分,可能也存在抑制抗 SA 活性的成分或溶出物通过改变体系中的 pH 而加速了抗 SA 活性成分发生化学变化,随着浸润和提取时间的延长,这些成分溶出增多,而降低提取液的活性成分。分析结果为丹参抗 SA 活性成分的进一步纯化和应用奠定了基础。

## 参 考 文 献

- 王庆银,姚庆强. 丹参提取液体外抑菌活性研究. 食品与药品, 2010, (05): 184-187
- 王政军, 库里满·恰里甫, 苗德艳, 等. 丹参提取物抑菌活性的初步评价. 食品工业科技, 2011, (07): 65-66, 70
- 邓婧, 许晓燕, 袁昌青, 等. 丹参水煎液对几种口腔常驻菌的体外抑菌实验. 实用口腔医学杂志, 2006, (4): 553-555
- 孙元芹, 李翘楚, 卢璐, 等. 响应面法优化苕苔鱼松的加工工艺. 渔业科学进展, 2013, 34(1): 166-171
- 李有润, 郑青. 中草药提取过程的数学模拟与优化. 中草药, 1997, (7): 399-401
- 李家实. 中药鉴定学. 上海: 上海科学技术出版社, 1998, 172
- 张新艳, 樊海平, 钟全福, 等. 罗非鱼无乳链球菌的分离-鉴定及致病性研究. 水产学报, 2008, 32(5): 772-779
- 柯剑, 赵飞, 罗理, 等. 广东省罗非鱼主养区无乳链球菌的分离-鉴定与致病性. 广东海洋大学学报, 2010, 3(30): 22-27
- 周静, 李惠芬, 王洪志, 等. 丹参水溶性成分与脂溶性成分抑菌作用的考察. 时珍国医国药, 2008, 19(9): 2130-2131
- 赵磊, 蒲小平. 丹参粉针剂对大鼠心肌缺血/再灌注损伤的保护作用. 中国新药杂志, 2006, 15(14): 39-41
- 浦锡娟, 徐凯琳. 丹参的药理作用研究进展. 临床医学工程, 2009, (08): 154-155
- 梁利国, 阎斌伦, 张晓君, 等. 常用中草药对 4 种病原弧菌体外抗菌效果的研究. 渔业科学进展, 2010, 31(2): 114-119
- 黄泰康. 常用中药成分与药理手册. 北京: 中国医药科技出版社, 1994. 254
- 逯家辉, 王迪, 郭伟良, 等. 响应面法优化八角茴香中莽草酸的超声波提取工艺. 林产化学与工业, 2008a, 28(1): 87-91
- 逯家辉, 李国庆, 张华飞, 等. 八角茴香油提取工艺优化. 农业工程学报, 2008b, 24(6): 254-256

1) 陈益乐. 红外辅助提取技术在丹参等中药有效成分提取分析中的应用研究. 见: 复旦大学硕士研究生学位论文, 2011. 17

- 曾元儿, 徐晖. 烘干温度和时间对丹参乙醇浸膏中丹参酮 A 含量的影响. 中药新药与临床药理, 1997, 8(1): 38-39
- 曾令杰, 林文雄, 梁晖, 等. 丹参中活性成分的同时定量分析及其相关性研究. 中成药, 2008, (6): 892-896
- 储茂泉, 刘国杰. 中药提取过程的动力学. 药学学报, 2002, (7): 559-562
- Avishek M, Angad S, Arun G, *et al.* Application of response surface methodology for glucan production from *Leuconostoc dextranicum* and its structural characterization. Carbohydrate Polymers, 2009, 75(1): 150-156
- Du GH, Zhang JT. The general situation and progress of the modern research of red sage root (*Radix Salviae miltiorrhizae*). Herald of Medicine, 2004, 23(7): 435-440
- Elizondo-Salazar JA, Jayarao BM, Heinrichs AJ. Effect of heat treatment of bovine colostrum on bacterial counts, viscosity, and Immunoglobulin G concentration. J Dairy Sci, 2010, 93(3): 961-967
- Jian J, Wu Z. Effects of traditional Chinese medicine on non-specific immunity and disease resistance of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* (Richardson). Aquaculture, 2003, 218(1-4): 1-9
- Lindahl G. Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens. Clin Microbiol Rev, 2005, 18(1): 102-127
- Naccari C, Niutta PP, Trombetta D, *et al.* Pharmacokinetics and efficacy of teicoplanin against intramammary infections in sheep. Vet Rec, 2009, 165(1): 19-22
- Usein CR, Petrini A, Georgescu R, *et al.* Group B *Streptococcus* colonization of Romanian women: phenotypic traits of isolates from vaginal swabs. Roum Arch Microbiol Immunol, 2009, 68(4): 235-239
- Verani JR, MPH, Schrag SJ. Group B streptococcal disease in infants: progress in prevention and continued challenges. Clin Perinatol, 2010, 37(2): 375-392
- Zimmerman, RA, Klesius PH, Krushak DH, *et al.* Effect of penicillin on the humoral and cellular immune response following group A streptococcal pharyngitis. Can J comp Med, 1975, 39(2): 227-230

(编辑 陈严)

## Optimization of the Extraction Conditions of Active Components for Inhibition of *Streptococcus agalactiae* from *Salvia miltiorrhiza* Bge. Using Response Surface Methodology

DENG Hengwei, GUO Weiliang, SUN Xiaofei, XIE Zhenyu, WANG Shifeng, HU Wenting, ZHOU Yongcan

(College of Marine Science, Hainan University, State Key Laboratory Breeding Base for Sustainable Exploitation of Tropical Biotic Resources; Haikou 570228)

**Abstract** In recent years *Streptococcus agalactiae* (SA) has become the most harmful pathogen to cultured tilapia in Hainan and many southern provinces of China. *Salvia miltiorrhiza* Bge is highly resistant to SA, but it contains complex components and which component is responsible for the resistance to SA has not been reported. Here we investigated the effects of extraction conditions on the yield of anti-SA components in *S. miltiorrhiza* Bge and optimized the extraction method. We first developed the agar diffusion method for the quantitative analysis of extracted anti-SA components; then we used the yields of anti-SA components from *Salvia miltiorrhiza* Bge as the responsive values to study the effects of extraction conditions on the yield of the anti-SA components, including the extraction solvent, extraction times, the ratio of liquid to solid, infiltration time, temperature and extraction time in single-factor experiments; finally we further optimized the ratio of liquid to solid, infiltration time, temperature and extraction time using the four-factor-three-level Box-Behnken experimental design with

response surface method. The results of the agar diffusion showed that the standard equation for the determination of anti-SA components from *S. miltiorrhiza* Bge was  $Y = 4.842X + 16.707$  ( $R^2 = 0.9873$ ). The results of the single-factor experiments showed that the most suitable extraction solvent and times was 20% ethanol aqueous solution for 1 time. The results of the Box-Behnken experimental design with response surface method showed that the infiltration time, the extraction temperature, and the ratio of liquid to solid had extremely vital effects on the responsive values. The optimum extraction conditions were as follows: the ratio of liquid to solid was 37.8:1.0 (ml:g), the infiltration time was 104 min, the extraction temperature was 86.7°C and the extraction time was 182 min. The predicted maximum yield of anti-SA components was 25.95%, under the RSM model-generated optimal extraction conditions. The results of four parallel validation experiments showed that the actual yield of anti-SA components was (25.87 ± 0.03)%, and the relative error between predicted and actual values was 0.31%. The yield of anti-SA components was 2.59 times higher than before. These demonstrated that our optimization method was efficient and reliable. Furthermore, our study provided important clues to future research on the anti-SA components of *S. miltiorrhiza* Bge, and significantly contributed to the safe and efficient control of diseases caused by *S. agalactiae*.

**Key words** *Streptococcus agalactiae*; *Salvia miltiorrhiza* Bge; Extraction conditions; Response surface methodology

---

## 《渔业科学进展》期刊订阅启事

《渔业科学进展》是由中华人民共和国农业部主管、中国水产科学研究院黄海水产研究所和中国水产学会共同主办的国家级学术期刊，科学出版社出版发行。该刊创刊于1980年，原刊名为《海洋水产研究》，2009年更名为《渔业科学进展》，中国工程院院士、中国科协副主席唐启升担任主编。

主要报道内容为渔业生物学、渔业海洋学、水产增养殖学、水产种质资源与遗传育种、水生野生生物保护、渔业生物病害及其防治、渔业生态环境保护、渔业设施与捕捞技术、渔业装备制造技术，水产品综合利用与质量安全等领域的新发现、新技术和新成果。

《渔业科学进展》现为中文核心期刊、中国科技核心期刊、全国优秀农业期刊。目前已被英国《动物学记录》(ZR)、《水科学与渔业文摘(ASFA)》收录。在国内被中国科学引文数据库、中国学术期刊综合评价数据库、中国期刊全文数据库、中国生物学文献数据库、中国海洋文献数据库、中国学术期刊(光盘版)收录。

《渔业科学进展》为双月刊，国内邮发代号：24-153；国外发行代号：4578Q。每册定价30元，全年180元(含邮费)。

敬请读者订阅

《渔业科学进展》编辑部

# 南极磷虾油软胶囊囊皮配方的设计与优化\*



刘建君 冯迪娜 苏学锋 李宣延 刘洋

(辽宁省大连海洋渔业集团公司 大连 116113)

**摘要** 南极磷虾油不仅含有丰富的 $\omega$ -3 脂肪酸(如 EPA、DHA), 而且富含虾青素, 可以开发成高附加值的保健食品南极磷虾油软胶囊。软胶囊囊皮配方的设计与优化, 是软胶囊研制过程中的重要环节。本研究利用正交设计的实验方法, 以柠檬黄为指示剂, 考察了不同配方胶囊囊皮的溶出速率, 筛选出最佳的囊皮配方。结果表明, 当水:甘油:明胶为 0.8:1:0.5、山梨醇用量为 3%、富马酸用量为 0.7%时, 胶皮的溶解速率最大。该研究结果对南极磷虾油等油性软胶囊类产品的开发具有指导意义。

**关键词** 南极磷虾油;软胶囊;囊皮配方;溶出速率

**中图分类号** S986 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2014)04-0141-04

南极磷虾资源由于其本身巨大的生物量和潜在的商业开发价值(苏学锋等, 2012; 张吉昌等, 2012), 日益受到世界各国的关注。南极磷虾属于寒带海洋生物, 具有较为特殊的营养学特征(孔凡华等, 2012), 其体内 $\omega$ -3 脂肪酸(如 EPA 和 DHA)的含量很高, 并富含虾青素。因此, 可以将南极磷虾油加工成高附加值的南极磷虾油软胶囊保健食品。目前, 软胶囊剂型是油脂类保健产品普遍使用的剂型。在软胶囊产品的开发过程中, 软胶囊囊皮配方的设计与优化是十分关键的, 不仅影响软胶囊的外观形状, 而且胶囊囊皮的崩解时限或溶出度要达到药典所规定的要求(齐惠敏等, 1997)。

本研究以柠檬黄为指示剂, 以胶皮的溶解速率为考察指标, 针对南极磷虾油磷脂含量高、黏度较大、易吸水、囊皮不易崩解的特点, 利用正交设计的实验方法筛选出适合南极磷虾油的最佳囊皮配方, 即明胶、甘油、水的比例以及山梨醇、富马酸的添加量, 使得软胶囊质量符合相关规定。本研究不仅可以为南极磷虾油等油性产品的软胶囊研制提供科学的原始数据, 而且也可为其他软胶囊剂型的保健食品开发提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器

UV1800 紫外可见分光光度计、BS110S 型电子天平、HH-6 数字恒温水浴锅、ZRS-8G 智能溶出仪和 HU1026B 超声波清洗器。

### 1.2 试剂

明胶(药用级)、甘油(分析纯)、柠檬黄(食用级)、山梨醇(食用级)、富马酸(食用级)、超纯水。

### 1.3 标准曲线的绘制

**1.3.1 柠檬黄最大吸收波长的确定** 称取柠檬黄 0.05 g 于 100 ml 容量瓶中, 加水至刻度线, 吸取 1 ml 于 50 ml 容量瓶中, 加水至刻度, 在 200–700 nm 波长范围内扫描吸收光谱。另称取明胶 1.2 g、甘油 0.6 g、山梨醇 0.09 g 于 1000 ml 容量瓶中, 加水约 800 ml, 75℃水浴溶解, 冷却后加水至刻度, 吸取 10 ml 于 500 ml 容量瓶中, 加水至刻度, 在 200–700 nm 波长范围内扫描吸收光谱(刘建平等, 2005)。

**1.3.2 线性回归方程的确定** 以柠檬黄溶液的浓

\* 国家 863 高技术研究发展计划项目“南极磷虾快速分离与深加工关键技术”(2011AA090800)资助。刘建君, E-mail: ljjs@vip.sina.com

通讯作者: 冯迪娜, 工程师, E-mail: fengdn@dicp.ac.cn

收稿日期: 2014-06-25, 收修改稿日期: 2014-07-10



度(mg/ml)为横坐标,以柠檬黄吸光度为纵坐标进行线性回归,确定二者之间的线性回归方程。

#### 1.4 明胶胶片的制备工艺

称取 0.8 g 柠檬黄,将其溶解在 120 ml 的水中,待柠檬黄充分溶解后放入 100 g 明胶浸泡 24 h,然后将其置于 60℃ 水浴锅中充分搅拌溶解,再按正交试验中的各试验比例加入甘油、水、山梨醇和富马酸,搅拌均匀,超声波排尽气泡,趁热制成厚度为 0.50–0.65 mm 的胶皮,将所得胶皮置于温度为 25℃、相对湿度为 30% 的房间中干燥。然后将胶皮用刀片切制成 2 cm×2 cm 的胶皮片,保存待测定(马昆等,2005)。

#### 1.5 明胶胶皮溶解速率的测定

胶皮的溶出速率是通过胶皮中含有的柠檬黄的溶出速率来进行测定的。明胶胶皮的溶出过程符合 Noyes-Whitney 方程,根据 Noyes-Whitney 方程计算溶解速率常数 K。具体测定方法参见白阳等(2011)。

#### 1.6 胶囊皮最佳配方的筛选

通过单因素试验,根据不同配方所制得的胶皮的溶解速率,初步确定甘油与明胶之比、水与明胶之比,山梨醇、富马酸的添加量的范围后,进一步用 L9 (3<sup>4</sup>) 正交试验设计(表 1)进行优化,以确定囊皮的最佳配方,并对最优配方进行验证。

表 1 胶囊皮配方四因素三水平考察  
Tab.1 Factors and levels of the orthogonal test

水平 Level	因素 Factors			
	A	B	C	D
	甘油/明胶 Water/gelatin (g/g)	水/明胶 Water/gelatin (g/g)	山梨醇 Sorbitol (%)	富马酸 Fumaric acid (%)
1	0.4	0.7	2	0.5
2	0.5	0.8	3	0.6
3	0.6	0.9	4	0.7

## 2 结果

### 2.1 柠檬黄的最大吸收波长

由扫描光谱可知(图 1),柠檬黄在 241 nm 与 424 nm 下有最大吸收,胶液在 241 nm 下有最大吸收,而在 424 nm 下无吸收。从二者的吸收图谱上看,柠檬黄与胶液均无干扰,柠檬黄的吸收光谱在 424 nm 处出现的吸收峰平稳,因此选择 424 nm 为柠檬黄测定吸收波长。

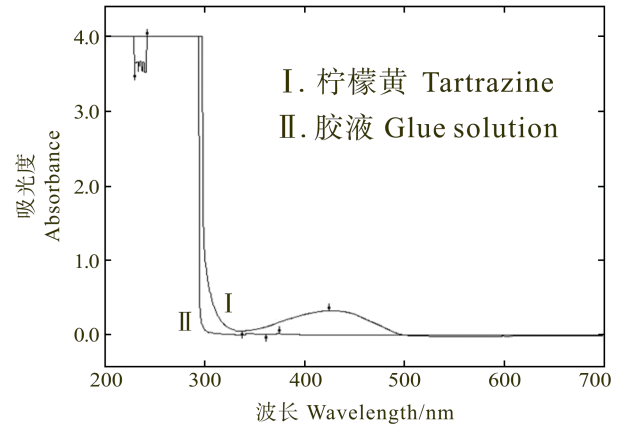


图 1 柠檬黄与胶液吸收光谱的比较

Fig.1 Comparison of the absorption spectrum of tartrazine and glue solution

### 2.2 线性回归方程

以柠檬黄浓度(mg/ml)为横坐标、以吸光度为纵坐标得到线性回归方程,结果表明,柠檬黄浓度在 0.01–0.05 mg/ml 范围内线性关系良好,线性回归方程为:

$$y = 39.42x - 0.041, \quad R^2 = 0.9963$$

### 2.3 囊皮配方的最佳比例

从表 2 中的正交试验结果和极差分析可以得出,影响胶皮溶解速率的因素依次为甘油/明胶>水/明胶>山梨醇的添加量>富马酸的添加量,软胶囊囊皮的最佳配方为 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>D<sub>3</sub>。

表 2 正交试验结果  
Tab.2 Results of the orthogonal test

试验号 Number	A	B	C	D	K[mg/(min·cm <sup>2</sup> )]
1	1	1	1	1	3.835
2	1	2	2	2	4.847
3	1	3	3	3	3.918
4	2	1	2	3	6.120
5	2	2	3	1	5.993
6	2	3	1	2	5.279
7	3	1	3	2	4.488
8	3	2	1	3	5.617
9	3	3	2	1	4.693
K <sub>1</sub>	4.200	4.813	4.910	4.840	
K <sub>2</sub>	5.797	5.486	5.220	4.871	
K <sub>3</sub>	4.933	4.630	4.800	5.218	
R	1.597	0.856	0.420	0.378	

由于 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub> 组合在正交试验中没有,所以需要进行验证试验。按照配方 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub> 制成胶皮,测定后得到胶皮的溶解速率,结果见表 3。

表 3 验证实验结果  
Tab.3 The results of the validation experiment

试验号 Number	因素 Factors				K[mg/(min·cm <sup>2</sup> )]
	A	B	C	D	
1	2	2	2	3	6.025
2	2	2	2	3	6.018

从表 3 可以看出, 验证试验与预测结果比较接近, 这说明试验拟合情况较好, 实验误差小。因此, 配方 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 即甘油: 明胶为 0.5:1; 水: 明胶为 0.8:1; 山梨醇用量为 3%; 富马酸用量为 0.7%, 是软胶囊囊皮的最佳配方。

### 3 讨论

目前大多数软胶囊制剂的囊皮均采用明胶为主要材料, 水作为溶剂, 甘油为增溶剂(乔雷等, 2007)。软胶囊壳较硬、较厚, 且弹性大、可塑性强。软胶囊的弹性大小取决于囊壳中明胶、甘油及水三者之间的重量比(周银龙, 1993)。甘油: 明胶之比为 0.3:1.0 时胶壳发硬; 若为 1.8:1.0 时胶壳变软; 当水与明胶的比例大于 1.6 时, 形成的胶液稀薄, 胶皮弹性差, 一触即破。小于 0.9 时囊皮浸泡后, 明胶易膨胀(Bigi *et al.*, 2004)。本研究优化配方中甘油与明胶的比例为 0.5:1, 正介于 0.3-1.8 之间, 而水与明胶的比例为 0.8:1, 小于 0.9, 这可能是由于配方中添加了一定量的山梨醇, 山梨醇可以起到保水作用, 代替一部分水。

在囊壳中使用少量崩解剂可以提高软胶囊的溶出速度(李亚冰等, 2010)。据报道, 软胶囊的崩解迟缓与明胶中氨基酸残基的含量有关, 加入丙二醇或山

梨醇可使明胶中氨基酸残基的含量显著下降。若加入适量有机酸, 如富马酸, 可以缩短胶片的崩解时间(刘建平等, 2005)。本研究通过正交试验方法优化了囊皮配方中甘油与明胶、水与明胶的配比, 以及山梨醇、富马酸的最适添加量, 提高了软胶囊剂型的质量, 为南极磷虾油软胶囊保健食品的开发提供了技术支持。

### 参 考 文 献

- 马昆, 赵文惠, 高晓黎. 均匀实验设计优选软胶囊胶皮处方. 医药导报, 2005, 24(11): 1046-1047
- 孔凡华, 梁萌青, 吴立新, 等. 南极磷虾粉对大菱鲆生长、非特异性免疫及氟残留的影响. 渔业科学进展, 2012, 33(1): 54-60
- 白阳, 吴红棉, 范秀萍, 等. 软胶囊囊壳配方的研制. 现代食品科技, 2011, 27(9): 1113-1115
- 李亚冰, 周本杰. 中药软胶囊制剂处方筛选与稳定性研究进展. 中国药师, 2010, 13(5): 731-733
- 刘建平, 马旭, 翁凌骧. 软胶囊崩解迟缓现象机理的初步研究. 中国医药工业杂志, 2005, 36(2): 81-83
- 齐惠敏, 赵晓东, 李静. 软胶囊剂的工艺研究现状. 天津药学, 1997, 9(4): 32-33
- 乔雷, 王剑波, 王四旺. 软胶囊囊材的配比与胶皮溶解速率关系的研究. 解放军药学报, 2007, 23(4): 284-286
- 苏学锋, 冯迪娜. 南极磷虾产业开发特点及发展趋势. 食品研究与开发, 2012, 33(12): 214-217
- 张吉昌, 赵宪勇, 王新良, 等. 商用探鱼仪南极磷虾声学图像的数字化处理. 渔业科学进展, 2012, 33(4): 64-71
- 周银龙. 软胶丸的生物利用度和崩解. 中国药学杂志, 1993, 28(7): 427-430
- Bigi A, Panzavolta S, Rubini K, *et al.* Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. Biomaterials, 2004, 25(25): 5675-5680

(编辑 冯小花)

## Optimization of Formula for Antarctic Krill Oil Soft Capsules Shell

LIU Jianjun, FENG Dina , SU Xuefeng, LI Xuanyan, LIU Yang

(Liaoning Province Dalian Ocean Fishery Group Corporation, Dalian 116113)

**Abstract** Antarctic krill oil is rich in astaxanthin and Omega-3 fatty acids such as EPA and DHA therefore can be used as highly profitable diet supplements. Recently soft capsules have been commonly used to contain oil-soluble health-care food, and the optimization of the formula for soft capsule shell is one of the key factors in the product development. In this study we measured the dissolution rate as a parameter to determine the optimal formula for the soft-gelatin capsule shell. We used tartrazine as the indicator and selected 424 nm as the absorption wavelength. We then established a linear regression equation between the concentration of tartrazine and its absorbance. The orthogonal method was employed to test four factors in the formula of soft capsule shell: the ratio of gelatin to glycerol, the ratio of water to gelatin, the percentage of sorbitol, and the percentage of fumaric acid. In each factor three levels were set up and tested. The dissolution rates of various soft-gelatin capsule shells were obtained according to the Noyes-Whitney equation. The results showed that the dissolution rate reached the maximum value when the ratio of water, glycerol and gelatin was 0.8 : 1 : 0.5 and the percentages of sorbitol and fumaric acid were 3% and 0.7% respectively. The verification test also revealed that the dissolution rate of this formula was very close to the maximum dissolution rate in the orthogonal experiment. Our optimized formula will provide important scientific data for the design of Antarctic krill oil soft capsules and other oil-soluble soft capsules.

**Key words** Antarctic krill oil; Soft gel; Formula of capsule shell; Dissolution rate

# 《渔业科学进展》编辑委员会

THE EDITORIAL BOARD OF *PROGRESS IN FISHERY SCIENCES*

主 编 Editor-in-Chief 唐启升 TANG Qisheng

副主编 Associate Editors-in-Chief 金显仕 JIN Xianshi 麦康森 MAI Kangsen 孙 松 SUN Song 孔 杰 KONG Jie

顾 问 Advisors (以姓名笔画为序)

苏纪兰 SU Jilan 林浩然 LIN Haoran 赵法箴 ZHAO Fazhen 徐 洵 XU Xun

曹文宣 CAO Wenxuan 雷霖霖 LEI Jilin 管华诗 GUAN Huashi

编 委 Members (以姓名笔画为序)

于志刚 YU Zhigang

戈贤平 GE Xianping

方建光 FANG Jianguang

王清印 WANG Qingyin

王新鸣 WANG Xinming

包振民 BAO Zhenmin

司徒建通 SITU Jiantong

关瑞章 GUAN Ruizhang

刘占江 LIU Zhanjiang

刘海金 LIU Haijin

孙效文 SUN Xiaowen

孙 谧 SUN Mi

庄 平 ZHUANG Ping

曲克明 QU Keming

江世贵 JIANG Shigui

何建国 HE Jianguo

吴常文 WU Changwen

吴淑勤 WU Shuqin

张士瑾 ZHANG Shicui

张全启 ZHANG Quanqi

张国范 ZHANG Guofan

张显良 ZHANG Xianliang

李来好 LI Laihao

李杰人 LI Jieren

李 健 LI Jian

李家乐 LI Jiale

杨红生 YANG Hongsheng

邹桂伟 ZOU Guiwei

陈立侨 CHEN Liqiao

陈松林 CHEN Songlin

陈雪忠 CHEN Xuezhong

周永灿 ZHOU Yongcan

林 洪 LIN Hong

俞志明 YU Zhiming

姚 杰 YAO Jie

相建海 XIANG Jianhai

赵宪勇 ZHAO Xianyong

徐 皓 XU Hao

桂建芳 GUI Jianfang

殷邦忠 YIN Bangzhong

秦 松 QIN Song

贾晓平 JIA Xiaoping

常亚青 CHANG Yaqing

常剑波 CHANG Jianbo

黄 捷 HUANG Jie

董双林 DONG Shuanglin

翟毓秀 ZHAI Yuxiu

魏宝振 WEI Baozhen

编辑部 Editorial Office 沙珍霞 (编辑部主任) SHA Zhenxia (Chief)

江润林 (责任编辑) JIANG Runlin (Responsible Editor)

冯小花 FENG Xiaohua

刘 慧 LIU Hui

刘丛力 LIU Congli

陈 严 CHEN Yan

## 渔业科学进展

YUYE KEXUE JINZHAN

(双月刊, 1980年创刊)

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

(Bimonthly, founded in 1980)

第35卷 第4期 2014年8月

Vol.35 No.4 Aug. 2014

主管单位 中华人民共和国农业部

Supervised by Ministry of Agriculture, P.R.China

主办单位 中国水产科学研究院黄海水产研究所 中国水产学会

Sponsored by Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences

出版单位 科学出版社

地址: 北京东黄城根北街16号, 邮编: 100717

China Society of Fisheries

Published by Science Press

Add: 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China

编辑单位 中国水产科学研究院黄海水产研究所

地址: 青岛市南京路106号 邮编: 266071

Edited by Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences

电话: 0532-85833580

http://www.yyqxjz.cn

E-mail: yyqxjz@ysfri.ac.cn

Add: 106 Nanjing Road, Qingdao, 266071, China; Tel: 0532-85833580

http://www.yyqxjz.cn E-mail: yyqxjz@ysfri.ac.cn

主 编 唐启升

Editor-in-Chief Tang Qisheng

印 刷 青岛星球印刷有限公司

Printed by Qingdao Xingqiu Printing Co., Ltd.

国内发行 青岛市邮政局

Domestic Distributed by Post Office of Qingdao

订 购 全国各地邮政局

Subscription Post Offices All Over China

国外发行 中国国际图书贸易总公司

Overseas Distributed by China International Book Trading Corporation

地址: 北京339信箱邮编: 100044

P.O.Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号

国内邮发代号: 24-153

ISSN 1000-7075

ISSN 1000-7075

国外发行代号: 4578Q

定 价: 30.00元

CN 37-1466/S

国内外公开发行



9 771000 707145