

中国科技核心期刊  
中文核心期刊

ISSN 2095-9869  
CN 37-1466/S

# 渔业科学进展

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

第36卷

VOL. 36

第4期 NO. 4

# 2015

中国水产科学研究院黄海水产研究所  
中国水产学会  
科学出版社

主办  
出版

# 渔业科学进展

YUYE KEXUE JINZHAN

(海洋水产研究更名为渔业科学进展)

第 36 卷 第 4 期

2015 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

- 2012/2013 渔季 CCAMLR 48 区南极磷虾(*Euphausia superba*)资源时空分布 ..... 李显森  
张吉昌 赵宪勇 左涛 朱建成 王新良 徐国栋 孟涛 徐玉成 张鹏 应一平 孙珊 (1)
- 基于贝叶斯的鲈鱼(*Scomber japonicus*)生物经济模型及管理策略 ..... 王从军 汪金涛 陈新军 官文江 (10)
- 鄱阳湖翘嘴鲈(*Siniperca chuatsi*)的生物学参数及资源量的估算 .....  
..... 吴斌 方春林 张燕萍 傅培峰 陈文静 熊小英 周辉明 贺刚 王生 王庆萍 (21)
- 崂山湾中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)增殖放流的效果评价 ..... 袁伟 林群 王俊 孙坚强 陈瑞盛 (27)
- 獐子岛海域浮游植物的粒径结构及碳流途径 .....  
..... 蒋增杰 杜美荣 姜绪 梁峻 赵学伟 刘毅 张媛 张晓芳 方建光 (35)
- 黄岛区南部海域营养水平和有机污染状况分析与评价 ..... 过锋 陈聚法 张艳 陈碧鹏 (44)
- 半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis* Günther) IGF- II 的体外重组表达 .....  
..... 徐永江 柳学周 张凯 武宁宁 刘芝亮 李春广 (51)
- 长鳍吻鲈(*Rhinogobio ventralis*)胚胎发育和仔鱼发育 .....  
..... 管敏 肖衍 胡美宏 刘勇 鲁雪报 倪勇 郭文韬 曲焕韬 李莎 (57)
- 北部湾鲮(*Euthynnus affinis*)的摄食习性及其随生长发育的变化 ..... 宿鑫 李永东 何雄波 卢伙胜 颜云榕 (65)
- 大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)仔稚鱼发育期消化道可培养细菌的菌群特征分析 .....  
..... 史秀清 张正 王印庚 于永翔 邓威 李华 (73)
- 罗非鱼(*Tilapia nilotica*)简达气单胞菌病的病原分离鉴定及药敏试验 ..... 杨宁 姜芳燕 黄海 焦健 (83)
- 白斑综合征病毒感染凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) TRx、LvP38、CAT、POD 基因的表达 .....  
..... 刘鹏飞 刘庆慧 吴垠 黄捷 (89)
- 温度对中华原钩虾(*Eogammarus possjeticus*)摄食率和消化酶活力的影响 .....  
..... 薛素燕 毛玉泽 赵法箴 方建光 (94)
- 罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)幼体病原肠杆菌 PCR 检测技术的建立与应用 .....  
..... 陈雪峰 杨国梁 高强 夏正龙 濮剑威 慎佩晶 黄振远 (99)
- 养殖密度、饵料种类和丰度对日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)争胜行为的影响 .....  
..... 秦浩 王仁杰 来守敏 李娜 李玉全 (105)
- 中国刺参(*Apostichopus japonicus*)与韩国刺参杂交子一代生长和抗病力比较 .....  
..... 谭杰 王亮 高菲 邹安格 孙慧玲 李凤辉 范超晶 左之良 燕敬平 (109)
- 温度和盐度对红刺参(*Apostichopus japonicus*)耗氧率与排氨率的影响 ..... 包杰 姜宏波 田相利 董双林 (116)
- 穗花狐尾藻(*Myriophyllum spicatum* L.)饲喂对刺参(*Apostichopus japonicus*)幼参生长、体成分及消化酶的  
影响 ..... 何舟 宋坚 常亚青 程龙 宁军号 庞云龙 马里 (122)
- 恩诺沙星和环丙沙星在泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)体内的残留和消除规律 .....  
..... 孙慧宇 陈君义 王云飞 顾开朗 (128)
- 气相色谱-质谱法测定渔业水质中 8 种除草剂的残留量 .....  
..... 罗方方 王艳君 叶玫 余颖 刘海新 姜琳琳 (132)
- 闽南地区水产品中邻苯二甲酸酯类(PAEs)的分布特征及风险评价 ..... 姜琳琳 (139)
- 复合酶提取法对浒苔(*Enteromorpha* sp.)膳食纤维吸附能力的影响 ..... 李月欣 刘楠 周德庆 (145)
- 基于电子鼻技术的鱼露与鱼酿酱油的品质分析 ..... 赵玲 刘淇 曹荣 (150)

# PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

## CONTENTS

Vol.36 No.4 August 2015

- Spatiotemporal Distribution of *Euphausia superba* in CCAMLR Area 48 During 2012/2013 Fishing Season .....  
..... LI Xiansen, ZHANG Jichang, ZHAO Xianyong, ZUO Tao,  
ZHU Jiancheng, WANG Xinliang, XU Guodong, MENG Tao, XU Yucheng, ZHANG Peng, YING Yiping, SUN Shan (1)
- Bayesian Bio-economic Model and Management Strategy of Chub Mackerel (*Scomber japonicus*) in the East China Sea  
and the Yellow Sea .....WANG Congjun, WANG Jintao, CHEN Xinjun, GUAN Wenjiang (10)
- The Assessment of Biological Parameters and Stock Biomass of *Siniperca chuatsi* in the Poyang Lake.....  
..... WU Bin, FANG Chunlin, ZHANG Yanping,  
FU Peifeng, CHEN Wenjing, XIONG Xiaoying, ZHOU Huiming, HE Gang, WANG Sheng, WANG Qingping (21)
- Assessment of Enhancement Effectiveness of Chinese Shrimp *Fenneropenaeus chinensis* Stock in the Laoshan Bay .....  
.....YUAN Wei, LIN Qun, WANG Jun, SUN Jianqiang, CHEN Ruisheng (27)
- Size-fraction of Phytoplankton and Photosynthetic Carbon Flow Pathway in the Coastal Area of Zhangzidao Island .....  
.....JIANG Zengjie, DU Meirong,  
JIANG Xu, LIANG Jun, ZHAO Xuewei, LIU Yi, ZHANG Yuan, ZHANG Xiaofang, FANG Jianguang (35)
- Analysis and Evaluation on Nutritional Status and Organic Pollution Condition in the Southern Offshore Area of  
Huangdao District of Qingdao City .....GUO Feng, CHEN Jufa, ZHANG Yan, CHEN Bijuan (44)
- In vitro* Recombinant Expression of Insulin-Like Factor from *Cynoglossus semilaevis* Günther.....  
.....XU Yongjiang, LIU Xuezhou, ZHANG Kai, WU Ningning, LIU Zhiliang, LI Chunguang (51)
- Study on the Embryonic and Early Larval Development of *Rhinogobio ventralis* .....  
..... GUAN Min, XIAO Kan, HU Meihong, LIU Yong, LU Xuebao, NI Yong, GUO Wentao, QU Huantao, LI Sha (57)
- Feeding Habits and Ontogenetic Diet Shifts of Mackerel Tuna (*Euthynnus affinis*) in the Beibu Gulf, South China Sea ...  
.....SU Xin, LI Yongdong, HE Xiongbo, LU Huosheng, YAN Yunrong (65)
- The Characteristics of Culturable Bacterial Microflora in the Gastrointestinal Tract of Turbot (*Scophthalmus maximus*) Larvae  
..... SHI Xiuqing, ZHANG Zheng, WANG Yingeng, YU Yongxiang, DENG Wei, LI Hua (73)
- Isolation, Identification and Drug Sensitive Test of *Aeromonas jandaei* from Tilapia (*Tilapia nilotica*) .....  
..... YANG Ning, JIANG Fangyan, HUANG Hai, JIAO Jian (83)
- Expression of *TRx*, *LvP38*, *CAT*, and *POD* Gene of *Litopenaeus vannamei* Response to WSSV Infection .....  
..... LIU Pengfei, LIU Qinghui, WU Yin, HUANG Jie (89)
- Effects of Temperature on the Feeding Rate and the Digestive Enzymes Activities of *Eogammarus possjeticus* .....  
..... XUE Suyan, MAO Yuze, ZHAO Fazhen, FANG Jianguang (94)
- Development and Application of the PCR Detection Method of Pathogenic Enterobacters in the Larvae of the Giant  
Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii* .....  
..... CHEN Xuefeng, YANG Guoliang, GAO Qiang, XIA Zhenglong, PU Jianwei, SHEN Peijing, HUANG Zhenyuan (99)
- Effects of Stocking Density and Food on Agonistic Behavior of *Marsupenaeus japonicus*.....  
..... QIN Hao, WANG Renjie, LAI Shoumin, LI Na, LI Yuquan (105)
- Comparative Study on Growth and Disease Resistance of Hybrids between Chinese and Korean Stocks of Sea Cucumber  
*Apostichopus japonicus* ..... TAN Jie,  
WANG Liang, GAO Fei, ZOU Ange, SUN Huiling, LI Fenghui, FAN Chaojing, ZUO Zhiliang, YAN Jingping (109)
- Effects of Temperature and Salinity on Oxygen Consumption Rate and Ammonia-N Excretion Rate of Red *Apostichopus*  
*japonicus* (Selenka) ..... BAO Jie, JIANG Hongbo, TIAN Xiangli, DONG Shuanglin (116)
- Effects of Adding *Myriophyllum spicatum* L. Meal in Diets on the Growth, Body Composition and Digestive Enzymes  
Activities of Juvenile Sea Cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) .....  
.....HE Zhou, SONG Jian, CHANG Yaqing, CHENG Long, NING Junhao, PANG Yunlong, MA Li (122)
- The Residues and Elimination of Enrofloxacin and Ciprofloxacin in Loach *Misgurnus anguillicaudatus* .....  
..... SUN Huiyu, CHEN Junyi, WANG Yunfei, GU Kailang (128)
- Determination of Eight Herbicides in Fishery Water by Gas Chromatography-Mass Spectrometry .....  
..... LUO Fangfang, WANG Yanjun, YE Mei, YU Ying, LIU Haixin, JIANG Linlin (132)
- The Distribution Characteristics and Risk Assessment of Phthalic Acid Esters (PAEs) in Aquatic Products in Minnan Region  
..... JIANG Linlin (139)
- Effects of Complex Enzymes Extraction on Adsorption Capabilities of Dietary Fiber from *Entenmorpha* sp.....  
..... LI Yuexin, LIU Nan, ZHOU Deqing (145)
- The Quality Analysis of Fish Sauce and Fish Soy Sauce using Electronic Nose.....ZHAO Ling, LIU Qi, CAO Rong (150)

# 2012/2013 渔季 CCAMLR 48 区南极磷虾 (*Euphausia superba*)资源时空分布\*



李显森<sup>1</sup> 张吉昌<sup>1</sup> 赵宪勇<sup>1</sup> 左涛<sup>1</sup> 朱建成<sup>1</sup> 王新良<sup>1</sup> 徐国栋<sup>2</sup>  
孟涛<sup>3</sup> 徐玉成<sup>4</sup> 张鹏<sup>1</sup> 应一平<sup>1</sup> 孙珊<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. 中国水产科学研究院东海水产研究所 上海 200090;  
3. 上海海洋大学海洋科学学院 上海 201306; 4. 辽宁远洋渔业有限公司 大连 116113)

**摘要** 根据2013年1-9月辽宁远洋渔业有限公司“福荣海”轮南极磷虾拖网调查数据,以3n mile/h拖曳获得的产量作为CPUE指标,对南极磷虾资源时空分布进行了分析。结果显示,1-6月的月均CPUE值相对稳定,7-9月逐月下降。各渔区中平均CPUE值以48.1区最高,为(25.12±31.04)t/h;48.3区最低,为(11.49±12.06)t/h;CPUE值的波动幅度48.1区大于48.2和48.3区。48.1区的南极磷虾群主要分布于0-100m水层,CPUE值以25-50m水层为最高;48.2区虾群主要分布于50-150m水层,CPUE值以100-150m水层最高;48.3区虾群主要分布于100-250m水层,CPUE值以200-250m水层最高。海底深度<500m的近岸海域是磷虾主要集群分布区和商业捕捞渔场,以水深<250m的浅水区渔场虾群密度最大,平均CPUE值为(17.54±35.26)t/h,水深250-1500m的深水区渔场平均CPUE值变化较小,在12.0-14.0t/h之间波动,但水深>1500m时,平均CPUE值降到(9.62±9.54)t/h。作业渔场的表温SST主要集中在-1-2℃,当SST为-1-0℃时,平均CPUE值最高。探捕调查发现发现了5个主要的磷虾集群,集群时间可达30d以上,但集群密度随时间发生变化。调查结果可为研究南极磷虾渔场形成机制和渔业管理提供基础数据,并为商业捕捞提供参考。

**关键词** 南极磷虾;拖网调查;CPUE指数;时空分布

**中图分类号** S931.41 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)04-0001-09

南极磷虾(*Euphausia superba*)是目前查明可供人类直接利用的、储量最为丰富的海洋生物资源(孙松, 2002; 黄洪亮等, 2004)。作为南大洋生态系统的关键物种之一,南极磷虾是浮游植物的主要摄食者,同时也是高营养级动物(鲸类、海豹、鱼类、企鹅及其他海鸟)的主要饵料来源(Everson, 2000; Nicol *et al.*, 2008; 孙松等, 2009)。南极磷虾巨大的渔业资源开发潜力以及在南极生态系统中的重要地位被各国所重视(黄洪亮等, 2007; 陈雪忠等, 2009; 李显森等, 2010;

Nicol *et al.*, 2003)。我国于2009/2010年度正式开始南极磷虾资源商业性探捕,至今已有8艘渔船先后获得南极海洋生物资源养护委员会(CCAMLR)捕捞许可。

南极磷虾主要分布于南大西洋海域,而南印度洋区磷虾丰度较低(Miller, 1986; Krafft *et al.*, 2010)。南极半岛,尤其是南奥克尼群岛和南设得兰群岛水域为南极磷虾最大密度分布区和渔业的主要作业区(黄洪亮等, 2007; 朱国平等, 2011; Atkinson *et al.*, 2001; Reiss *et al.*, 2008)。近几年,随着新型高效捕捞技术的

\* 公益性行业(农业)科研专项(201203018)和农业部“南极海洋生物资源开发利用”项目共同资助。李显森, E-mail: lixs@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-07-29, 收修改稿日期: 2014-12-03

应用,使南极磷虾的作业时间、作业渔场和捕捞产量发生了较大的变化(苏学锋等,2012;朱国平等,2013)。受综合环境因素和新的渔业管理措施影响,CCAMLR 48.1、48.2和48.3区渔获产量年间波动变大,渔场选择难度增大。我国渔船在2009–2012年入渔期间,由于受捕捞装备的限制,作业时间为1–5月,作业渔场为CCAMLR 48.1和48.2区的南极半岛和南奥克尼群岛周围水域,利用同期进行的探捕调查资料开展的南极磷虾集群分布研究(朱国平等,2010a、2011、2012、2013;左涛等,2012;张吉昌等,2012)具有一定的时空局限性。2013年辽宁远洋渔业有限公司利用从日本引进的南极磷虾专业捕捞船,首次实现了1–9月的全渔季探捕生产,作业区覆盖了CCAMLR 48.1、48.2和48.3区的主要渔场,捕捞产量和效益发生了本质性的提升。本研究利用2013年辽宁远洋渔业有限公司“福荣海”轮探捕调查的渔捞数据和渔业科学观察员随船收集的相关资料,对南极磷虾资源时空分布进行分析,旨在研究南大西洋海域南极磷虾渔场形成机制和南极磷虾资源管理提供基础数据,也为我国的相关企业进行渔场调度和制定产业发展规划提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 调查海域与时间

本次调查为生产性探捕调查。生产范围为大西洋

南极海域 CCAMLR 48.1 区的南设得兰群岛、48.2 区的南奥克尼群岛和 48.3 区的南乔治亚岛周边水域(图 1),由调查船根据南极磷虾资源分布状况选择作业渔场。调查时间为 2013 年 1 月 8 日–9 月 3 日。

### 1.2 调查船和网具

调查船为辽宁远洋渔业有限公司南极磷虾专业捕捞船“福荣海”轮,主要参数为:总吨 5306 t,全长 103.6 m,型宽 17.8 m,型深 11.0 m,主机功率 4189.5 kW,冷冻仓容 1200 t,冷藏仓容 250 t,巡航速度 13.0 kn,定员 100 人。调查网具为四片式单船中层拖网,主要参数分别为:上纲 41.8 m,下纲 41.8 m,网囊网目尺寸 18 mm,网口周长 185.4 m。拖曳时的网口最大伸张高度约 30 m,网口面积约 645 m<sup>2</sup>。

### 1.3 调查方法和内容

调查船根据鱼探仪显示的南极磷虾集群映像和分布水层,对磷虾群实行瞄准捕捞。作业时,拖速为 2.5–3.5 kn,拖曳时间为 0.5–2.5 h,视海流和虾群密度而定。按照 CCAMLR 要求,记录起放网的时间和位置、开始和结束捕捞的时间和位置、拖曳深度、拖速、起放网时的表层水温(SST)和海底深度等参数。采用鱼槽体积法测定网产量,每月或转换渔场时测定一次单位体积的南极磷虾重量。

### 1.4 数据处理

根据每次作业的实际拖曳速度和拖曳时间,对网

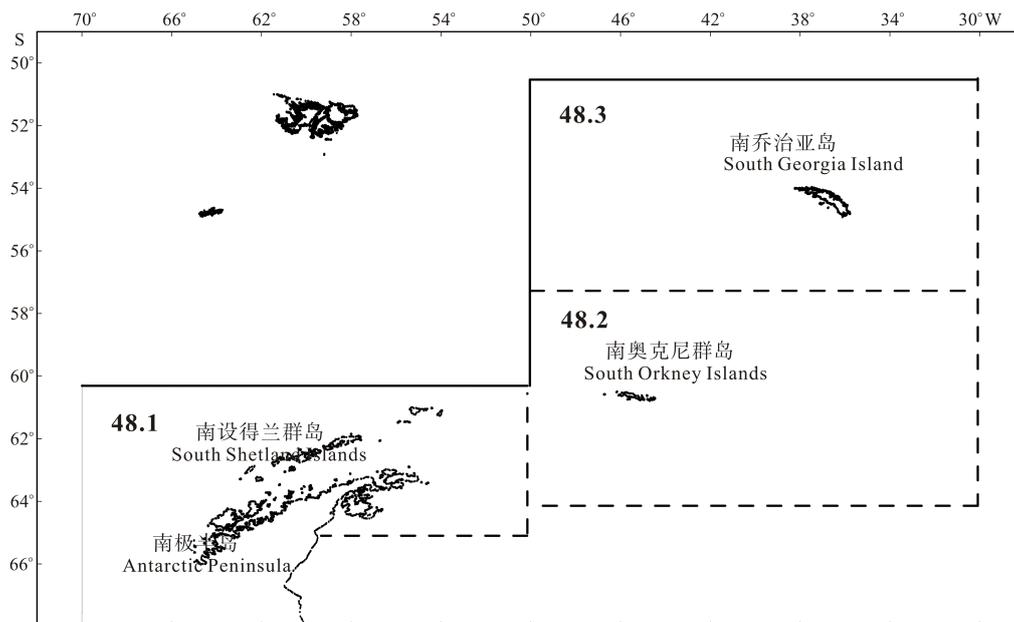


图1 调查海域  
Fig.1 Survey area

产量进行标准化处理, 换算成 3.0 kn 拖速的单位时间产量(t/h), 以此作为相对密度指标(CPUE), 分析南极磷虾资源时空分布。

$$CPUE = \frac{C}{T \times V} \times 3$$

式中,  $C$  为网产量(t);  $T$  为拖曳时间(h),  $V$  为拖曳速度(kn)。

**1.4.1 表温(SST)** 由于不同作业时间和渔场的 SST 不同, 为分析 SST 对 CPUE 的影响, 将船载 MS-2 型海水温度计现场测定的 SST 划分为 5 个区间, 分别为  $<-1.0^{\circ}\text{C}$ 、 $-1.0-0^{\circ}\text{C}$ 、 $0-1.0^{\circ}\text{C}$ 、 $1.0-2.0^{\circ}\text{C}$  和  $>2^{\circ}\text{C}$ 。

**1.4.2 水深** 由于作业渔场的水深变化较大, 将海底深度划分为  $<250\text{ m}$ 、 $250-500\text{ m}$ 、 $500-1000\text{ m}$ 、 $1000-1500\text{ m}$  和  $>1500\text{ m}$  共 5 个深度范围, 分析水深与 CPUE 之间的关系。

**1.4.3 拖曳深度** 南极磷虾分布和集群水层会因季节和海区而有所不同, 为分析网具取样的拖曳深度

与 CPUE 之间的关系, 将拖曳深度划分成 7 个等级, 分别为  $<25\text{ m}$ 、 $25-50\text{ m}$ 、 $50-100\text{ m}$ 、 $100-150\text{ m}$ 、 $150-200\text{ m}$ 、 $200-250\text{ m}$  和  $>250\text{ m}$ 。

**1.4.4 显著性差异检验** 利用单因子方差分析(ANOVA)检验不同月、不同渔区、不同渔场水深、不同拖曳深度和表层水温的 CPUE 分布是否存在显著性差异( $P = 0.05$ )。

## 2 结果

### 2.1 渔获量

“福荣海”轮在大西洋南极海域探捕作业 203 d, 拖网 1968 次, 总渔获量 25918.88 t。1-7 月平均网产量大于 12.0 t/网, 平均日产量大于 118.0 t/d。从表 1 可以看出, 1-6 月的产量较为稳定, 7 月开始下降, 9 月产量低, 渔季结束。渔获量以 48.1 区为主, 占总渔获量的 74.5%, 48.2 区占 20.7%, 48.3 区仅占 4.8%。

表 1 渔获量的月间变化

Tab.1 Monthly change of yields in the Antarctic krill survey

月份 Months	作业时间 Fishing time (d)	拖网次数 Trawling number (net)	平均网产量 Average yield per net (t/net)	平均日产量 Average yield per day (t/d)	月产量 Monthly yield (t)
1 月 Jan.	24	199	15.48±7.41	128.38±58.02	3081.23
2 月 Feb.	19	172	15.28±8.06	138.33±52.22	2628.42
3 月 Mar.	29	337	14.57±6.43	169.39±63.16	4912.35
4 月 Apr.	16	162	13.46±6.45	136.32±58.65	2181.17
5 月 May	29	286	14.57±6.84	143.75±79.81	4168.97
6 月 Jun.	26	262	13.62±7.40	137.34±98.01	3570.90
7 月 Jul.	26	255	12.10±10.35	118.75±79.68	3087.67
8 月 Aug.	31	272	8.07±7.88	70.87±56.51	2197.22
9 月 Sep.	3	23	3.95±3.34	30.31±27.19	90.95

### 2.2 CPUE

1-6 月的平均月 CPUE 值虽有波动, 但总体相对稳定, 7-9 月则逐月下降(图 2)。CPUE 的月平均值以 6 月最高, 达到(24.75±55.15) t/h; 9 月最低, 为(4.44±3.70) t/h。CPUE 值的波动以 6 月最为明显, 这与作业渔场的转移有关, “富荣海”轮 6 月上半月在 48.1 区作业, 下半月在 48.2 区作业。ANOVA 检验表明, 不同月份的网次 CPUE 分布存在显著性差异( $F = 116.55$ ,  $df = 1968$ ,  $P < 0.001$ )。

不同渔区的平均 CPUE 值变化较大, 以 48.1 区最高, 为(25.12±31.04) t/h; 48.3 区最低, 为(11.49±12.06) t/h; 48.1 区平均 CPUE 值的波动幅度大于 48.2 和 48.3 区(图 3)。ANOVA 检验表明, 不同渔区的网次 CPUE 分布存在显著性差异( $F = 58.26$ ,  $df = 1968$ ,  $P < 0.001$ )。

### 2.3 磷虾集群水层

南极磷虾在不同渔场的集群水层差异较大, 虾群

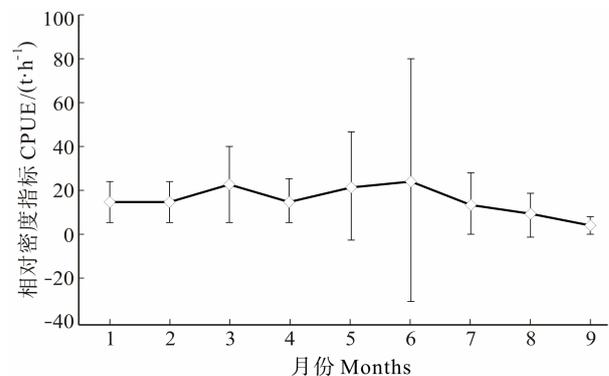


图 2 平均 CPUE 值的月间变化  
Fig.2 Monthly change of average CPUE

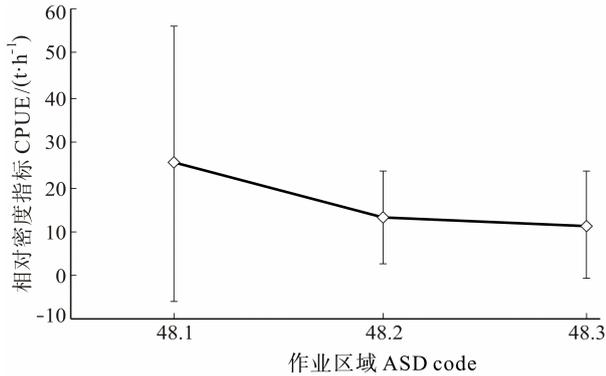


图3 平均 CPUE 值的渔场变化  
Fig.3 Regional change of average CPUE

探查和捕捞作业结果显示(表 2), 48.1 区虾群主要分布于水深 < 100 m 水层, 当水深 > 100 m 时, 虾群的数量和集群密度减少。拖网作业以 0–25 m 浅表层的次数最多, 占 59.66%; CPUE 值以 25–50 m 水层为最高, 当拖曳深度 > 100 m 时, CPUE 值则明显下降。48.2 区虾群主要分布于 50–150 m 水层, 浅表层的集群密度较低。拖网作业以 50–100 m 水层的次数最多, 占 70.40%; CPUE 值以 100–150 m 水层为最高。48.3 区虾群主要分布于 100–250 m 水层, 当水深 < 100 m 时, 磷虾集群密度很低。拖网作业以 150–200 m 水层的次数最多, 占 41.82%; CPUE 值以 200–250 m 水层的最

表 2 不同拖曳水层的平均 CPUE 值  
Tab.2 Average CPUE in different trawling layer

渔区 ASD code	< 25 m	25–50 m	50–100 m	100–150 m	150–200 m	200–250 m	> 250 m
48.1							
拖网次数 Trawling operations (net)	772	228	245	29	2	4	14
平均 CPUE Average CPUE (t/h)	19.75±15.29	43.38±51.42	27.55±38.16	13.21±8.12	10.74±11.61	10.77±5.54	11.74±4.26
48.2							
拖网次数 Trawling operations (net)	2	6	93	19	4	1	
平均 CPUE Average CPUE (t/h)	8.23±0.52	9.72±9.92	12.81±9.69	15.23±14.34	11.84±6.72	14.39	
48.3							
拖网次数 Trawling operations (net)			10	131	230	149	30
平均 CPUE Average CPUE (t/h)			2.37±1.46	8.60±11.64	11.23±11.46	15.66±13.20	7.09±6.95

高。ANOVA 检验表明, 不同拖曳水层的网次 CPUE 分布存在显著性差异( $F = 36.17$ ,  $df = 1968$ ,  $P < 0.001$ )。

#### 2.4 渔场水深与磷虾集群

南极磷虾的集群密度受渔场水深影响较大, 海底深度 < 250 m 的浅水渔场集群密度较大, 平均 CPUE 值为(17.54 ± 35.26) t/h, 250–1500 m 水深的渔场平均 CPUE 值变化较小, 在 12.0–14.0 t/h 之间波动, 但水深 > 1500 m 时, 平均 CPUE 值降到(9.62 ± 9.54) t/h(图 4)。ANOVA 检验表明, 不同渔场水深的网次 CPUE 分布存在显著性差异( $F = 20.77$ ,  $df = 1968$ ,  $P < 0.001$ )。

从拖网次数和产量的组成(图 5)可以看出, 海底深度 < 500 m 的海域是磷虾主要集群分布区, 成为商业捕捞的主要渔场; 当水深 > 1000 m 时, 磷虾集群少, 不利于商业捕捞。

#### 2.5 渔场表温(SST)与 CPUE 的关系

南极磷虾作业渔场的 SST 分布范围主要集中在 -1–2 °C 之间, 当渔场 SST 处于 -1–0 °C 时, 平均

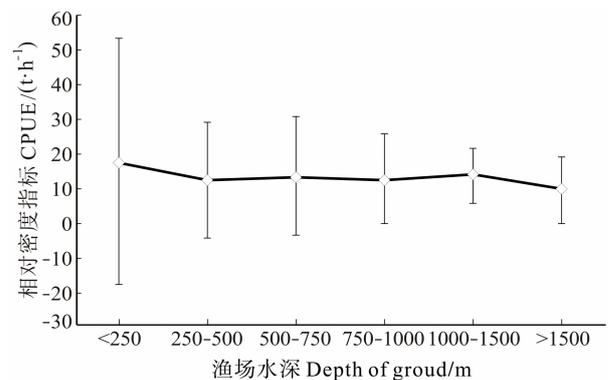


图4 不同水深渔场的平均 CPUE 值  
Fig.4 Average CPUE in different depth ground

CPUE 值最高, 为(17.08±40.66) t/h, 而当 SST 处于 1 °C–2 °C 时, 平均 CPUE 值最低, 为(11.96 ± 40.63) t/h。SST 在 -1–0 °C 和 1–2 °C 时, CPUE 值的波动幅度较大(图 6)。ANOVA 检验表明, 不同 SST 范围的网次 CPUE 分布存在显著性差异( $F = 37.57$ ,  $df = 1968$ ,  $P < 0.001$ )。

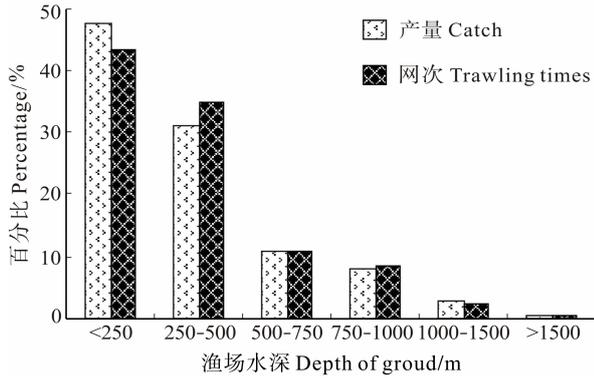


图 5 不同水深渔场的拖网次数和产量组成  
Fig.5 Composition of trawling operation and yield in different depth ground

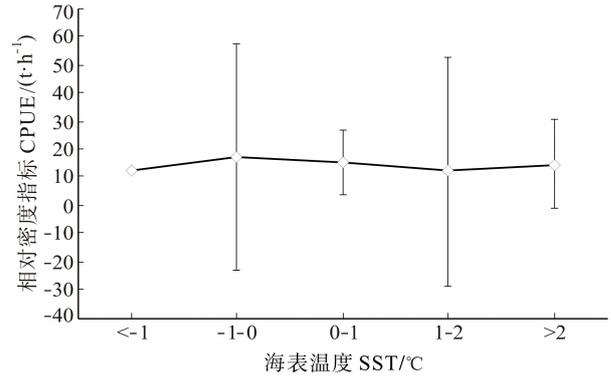


图 6 平均 CPUE 值与表温之间的关系  
Fig.6 The relationship between SST and average CPUE

### 2.6 不同渔区的 CPUE 分布

1-3 月, 作业渔场为 48.1 区的南设得兰群岛南北两侧水域。CPUE 值以 10-30 t/h 为主, 占网次比例的 50.0% 以上; 3 月的虾群密度大于 1 月和 2 月, 表现为 CPUE 值小于 10 t/h 的比例减少, 30-100 t/h 的比例增加, 资源密度以南设得兰群岛西部海域相对较高。

4-6 月上半月, 作业渔场主要在 48.1 区的南设得兰群岛南侧水域。4 月和 5 月的 CPUE 值仍以 10-30 t/h 为主, 占网次比例的 50% 以上; 6 月上半月的资源密度明显增加, CPUE 值大于 50 t/h 的高产网次占 56.9%, 虾群密度区位于南设得兰群岛的中南部海域。

6 月下半月, 作业渔场在 48.2 区的南奥克兰群岛西侧水域。虾群密度比 6 月上半月的南设得兰群岛中南部海域明显下降, CPUE 值小于 10 t/h 的网次比例占 50.4%。

7-9 月, 作业渔场主要在 48.3 区的南乔治亚岛东北部水域。7 月的虾群密度比 6 月上半月南设得兰群岛中南部海域相似, CPUE 值小于 10 t/h 的网次比例

占 51.7%。8 月和 9 月磷虾集群密度下降, 9 月 CPUE 值小于 10 t/h 的网次比例达到 87.0%, 平均 CPUE 值仅为  $(4.44 \pm 3.70)$  t/h, 已无法满足商业捕捞的密度要求。

## 3 讨论

### 3.1 CPUE 的标准化处理

CPUE 指数作为反映渔业种群相对资源密度的指标, 在分析南极磷虾丰度和时空分布中得到广泛应用 (朱国平等, 2010a; Fedoulov *et al*, 1996)。CPUE 指数可以用日产量、网产量和单位时间产量作为划分标准。南极磷虾的商业捕捞, 由于受到渔船加工能力的制约, 作业时会根据鱼探仪的虾群映像情况来控制拖曳时间以调控网产量, 并根据网产量来控制拖网次数以调控日产量。因此, 以网产量和日产量作为相对资源密度指标, 无法真实反映磷虾的集群密度和资源丰度。以同一渔船单位时间的捕捞产量作为 CPUE 指数, 具有一定的可比性, 常被用来分析南极磷虾的资源丰度 (Siegel *et al*, 1998)。但影响 CPUE 的作业参数除拖曳时间外, 拖曳速度也是重要参数, 作业时的拖

表 3 网次 CPUE 百分比组成的月间变化  
Tab.3 Monthly change of percentage composition of net CPUE

渔区 ASD code	月份 Month	<10 t/h	10-30 t/h	30-50 t/h	50-100 t/h	100-200 t/h	>200 t/h
48.1	1 月 Jan.	31.6	61.7	6.7			
	2 月 Feb.	37.3	56.8	5.3	0.6		
	3 月 Mar.	18.3	58.6	16.8	6.0	0.3	
	4 月 Apr.	29.5	63.0	5.6	1.9		
	5 月 May	28.6	56.5	6.4	6.7	1.4	0.4
	6 月上半月 First half of Jun.	3.7	22.6	16.8	29.9	20.4	6.6
48.2	6 月下半月 Second half of Jun.	50.4	43.2	4.8	1.6		
	7 月 Jul.	51.7	34.9	11.4	2.0		
48.3	8 月 Aug.	70.6	22.8	5.5	1.1		
	9 月 Sep	87.0	13.0				

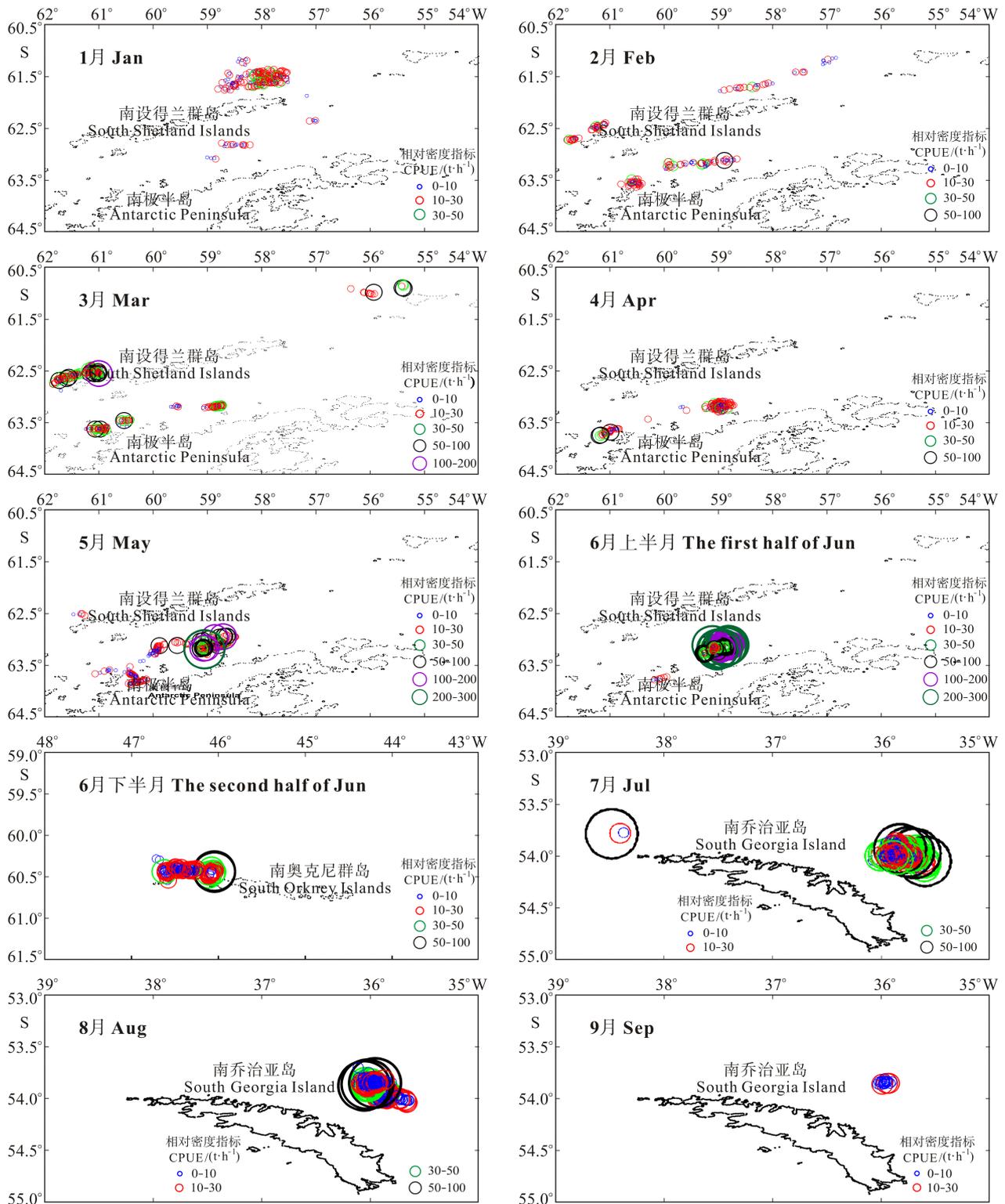


图7 调查期间的网次 CPUE 分布

Fig.7 Distribution of net CPUE in the Antarctic krill survey

速差异会对单位时间的实际拖曳距离造成重大影响,在对网产量进行 CPUE 标准化处理时,应以单位时间内统一的拖曳距离为基准。Kawaguchi 等(1997)利用日本南极磷虾渔业数据分析磷虾种群数量长期波时,

就采用了单位拖曳水体的 CPUE 估算南极磷虾资源丰度的变化。本研究将 CPUE 换算成 3.0 kn 拖速的单位时间产量(即 3.0 n mile 拖曳距离产量),便于直接反映渔船的实际作业情况。在对不同渔船的网产量进

行 CPUE 标准化处理时,还应考虑和评估网口伸张高度及网口周长等渔具参数对 CPUE 的影响,这是今后开展南极磷虾渔业研究所面临的问题。

### 3.2 南极磷虾集群的时空变化

在南极磷虾渔场内,拖网作业时覆盖的水面要远远大于南极磷虾的集群范围,这就表明作业区域并非仅仅为传统意义上的渔场,同时还可直接定义为捕捞特定的南极磷虾集群(Fedoulov *et al.*, 1996)。2013 年的调查主要针对 5 个磷虾集群进行捕捞,从作业位置和 CPUE 指标(图 7、表 3)可以看出,南极磷虾在某个水域的集群时间可长达 30 d 以上,但集群密度随时间发生变化。48.1 区,南设得兰群岛东北侧水域的磷虾集群,1 月的密度指数大于 2 月;西部水域的虾群密度指数则由 2-3 月呈增加趋势,但在 5-6 月虾群基本消失;南部水域的磷虾集群,密度指数从 1-6 月呈递增趋势,5 月和 6 月上半月的 CPUE 值高,渔场周边冰山多。48.2 区,6 月下半月南奥克尼群岛西侧水域冰山多,磷虾集群密度基本保持稳定。48.3 区的南乔治亚岛东北部水域的磷虾集群,密度指数从 7-9 月呈递减趋势,9 月的 CPUE 值为全年最低。与 2010-2012 年中国渔船的作业渔场(朱国平等, 2013)相比,2013 年南极磷虾在南设得兰群岛周边水域形成集群的时间基本相似,但汛期延续时间长,6 月中旬资源密度达到最高值。

2000 年的 CCAMLR 调查结果显示(Siegel *et al.*, 2004; Hewitt *et al.*, 2004), 南极磷虾高密度区出现在 48.3 区的南乔治亚岛东南部水域、48.2 区的南奥克尼群岛北部陆架和 48.1 区南设得兰群岛东侧的象岛(Elephant Island)附近水域,以南奥克尼群岛的密度最高,为  $150.4/\text{gm}^2$ , 而南设得兰群岛西部和南极半岛周边水域的资源密度较低,分别为  $24.5/\text{gm}^2$  和  $11.2/\text{gm}^2$ 。48.1 区的南极磷虾生物量自 20 世纪 80 年代以来经历了巨大的波动,而这种波动具有明显的时间周期,是由南极磷虾的种群动力学特征所决定的,体现在补充群体发生量的周期性变化(Reiss *et al.*, 2008), 全球气候变化对南极磷虾生物量的波动和资源分布状态也产生了重要影响(Priddle *et al.*, 1988; Siegel *et al.*, 2004)。2006-2011 年,48.1 区拖网渔船的 CPUE 较过去的 25 年有所提高(Gasyukov *et al.*, 2013), 作业渔场由 1986-1991 年南设得兰群岛东侧的象岛水域向西转移到南设得兰群岛北部水域(Drake Passage)和南极半岛北部的海峡水域(Bransfield Strait), 与本次调查的高密度分布区基本一致(图 7)。

南极磷虾的集群密度受渔场水深影响较大。本次

探捕调查结果(表 2、图 4、图 5)表明,海底深度<500 m 的海域是磷虾主要集群分布区,水深<250 m 的浅水区渔场集群密度较高,250-1500 m 水深的渔场平均 CPUE 值变化较小,当水深>1500 m 时,磷虾集群密度降低。不同渔区的虾群分布水层差别较大,48.1 区拖网作业水层主要为 0-100 m,以 25-50 m 水层 CPUE 值最高;48.2 区作业水层主要为 50-150 m 水层,以 100-150 m 水层 CPUE 值最高;48.3 区作业水层为 100-250 m 水层,以 200-250 m 水层 CPUE 值最高,0-100 m 水层的磷虾集群密度很低。48.1 区和 48.2 区的渔场水深及虾群分布水层与朱国平等(2010b; 2013)和张吉昌等(2012)研究结果基本一致,说明南极磷虾的空间分布是相对稳定的。48.1 区和 48.2 区的磷虾高密度区周边水域冰山较多,验证了樊伟等(2010)认为冰山对磷虾集群具有重要影响的分析。

由于本次调查在 48.2 区和 48.3 区的探捕范围较小,对南奥克尼群岛和南乔治亚岛周边水域的南极磷虾集群分布状况还不甚了解,有待于进一步调查。

**致谢:** 辽宁远洋渔业有限公司和“福荣海”轮船长、全体船员对本次调查给予了大力支持,谨致谢忱。

### 参 考 文 献

- 左涛, 赵宪勇, 黄洪亮, 等. 南极半岛邻近水域南极大磷虾商业捕捞群体的年龄结构时空变化. 渔业科学进展, 2012, 33(4): 1-10
- 朱国平, 冯春雷, 吴强, 等. 南极磷虾调查 CPUE 指数变动的影响因素初步分析. 海洋渔业, 2010a, 32(4): 368-373
- 朱国平, 冯春雷, 吴强, 等. 夏季南奥克尼群岛西部水域南极磷虾资源时空分布及其与表温之间的关系. 海洋环境科学, 2011, 30(5): 636-639
- 朱国平, 朱小艳, 夏辉, 等. 2011 年夏秋季南奥克尼群岛水域南极磷虾集群时空分布. 生态学杂志, 2010b, 2(4): 912-919
- 朱国平, 徐怡瑛, 夏辉, 等. 2009/2010-2011/2012 渔季中国南极磷虾渔业渔场时空变动. 上海海洋大学学报, 2013, 22(3): 425-431
- 孙松, 刘永芹. 南极磷虾与南大洋生态系统. 自然杂志, 2009, 31(2): 88-90
- 孙松. 南极磷虾. 世界科技研究与发展, 2002, 24(4): 57-60
- 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
- 李显森, 左涛, 赵宪勇, 等. 南极磷虾商业捕捞动态. 齐鲁渔业, 2010, 27(1): 8-12
- 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值化处理. 渔业科学进展, 2012, 33(4): 64-71
- 陈雪忠, 徐兆礼, 黄洪亮. 南极大磷虾资源利用现状与中国

- 的开发策略分析. 中国水产科学, 2009, 16(3): 451–458
- 黄洪亮, 陈雪忠, 冯春雷. 南极磷虾资源开发现状分析. 渔业现代化, 2007, 34(1): 48–51
- 黄洪亮, 陈雪忠. 南极磷虾资源开发利用现状及发展趋势. 中国水产科学, 2004, 11(z1): 114–119
- 樊伟, 伍玉梅, 陈雪忠, 等. 南极磷虾的时空分布及遥感环境监测研究进展. 2010, 海洋渔业, 32(1): 95–101
- Atkinson A, Whitehouse MJ, Priddle J, *et al.* South Georgia, Antarctica: A productive, coldwater, pelagic ecosystem. Marine Ecology Progress Ser, 2001, 216: 279–308
- Everson I. Role of krill in marine food webs 7. 3 the Southern Ocean//Everson I. Krill: biology, ecology and fisheries. Oxford: Blackwell, 2000, 194–201
- Fedoulov PP, Murphy E, Shulgovsky KE. Environment-krill relations in the South Georgia marine ecosystem. CCAMLR Sci, 1996, 3: 13–30
- Gasyukov P, and Kasatkina S. Dynamic of the krill fishery in the Area 48 and its relation to climate variability and changes in fishing technology. Document WG-EMM: 13–25
- Hewitt R, Watkins J, Naganobu M, *et al.* Biomass of Antarctic krill in the Scotia Sea in January/February 2000 and its use in revising an estimate of precautionary yield. Deep-Sea Res, 2004, 2 (51): 1215–1236
- Kasatkina S, Shnar V, Burikin S. 2013. The dynamic of krill fishery and the environment in the Antarctic Peninsula Subarea (48.1). Document WGEMM: 13–32
- Kawaguchi S, Ichii T, Naganobu M. Catch per unit effort and proportional recruitment indices from Japanese krill fishery data in sub-area 48. 1. CCAMLR Sci, 1997, (4): 47–63
- Krafft BA, Melle W, Knutaen T, *et al.* Distribution and demography of Antarctic krill in the Southeast Atlantic sector of the Southern Ocean during the austral Summer 2008. Polar Bio, 2010, 33: 957–968
- Miller DGM. Results from biological investigations of krill (*Euphausia superba*) in the southern Indian Ocean during SIBEX I-Mem Nail Inst Polar Res, 1986, 40: 117–139
- Nicol S, Clarke J, Romaine SJ, *et al.* Krill (*Euphausia superba*) abundance and Adélie penguin (*Pygoscelis adeliae*) breeding performance in the waters off the Béchervaise Island colony, East Antarctica in 2 years with contrasting ecological conditions. Deep-Sea Res Part II, 2008, 55: 540–557
- Nicol S, Foster J. Recent trends in the fishery for Antarctic krill. Aquatic Living Res, 2003, 16(1): 42–45
- Priddle J, Croxall JP, Everson I, *et al.* Large-scale fluctuations in distribution and abundance of krill—a discussion of possible causes. In: Sahrhage, D. (Ed.), Antarctic Ocean and Resources Variability. Springer, Berlin, 1988, 169–182
- Reiss CS, Cossio AM, Loeb V, *et al.* Variations in the biomass of Antarctic krill (*Euphausia superba*) around the South Shetland Islands, 1996–2006. ICES Jour of Mar Sci, 2008, 65(4): 497–508
- Siegel V, Sushin V, Damm U. Catch per unit effort (CPUE) data from the early years of commercial krill fishing operations in the Atlantic sector of the Antarctic. CCAMLR Science, 1998(5): 31–50
- Siegel V, Kawaguchi S, Ward P, *et al.* Krill demography and large-scale distribution in the southwest Atlantic during January/February 2000. Deep-Sea Res, 2004, 2(51): 1253–1273

(编辑 江润林)

## Spatiotemporal Distribution of *Euphausia superba* in CCAMLR Area 48 During 2012/2013 Fishing Season

LI Xiansen<sup>1</sup>Ⓐ, ZHANG Jichang<sup>1</sup>, ZHAO Xianyong<sup>1</sup>, ZUO Tao<sup>1</sup>, ZHU Jiancheng<sup>1</sup>, WANG Xinliang<sup>1</sup>, XU Guodong<sup>2</sup>, MENG Tao<sup>3</sup>, XU Yucheng<sup>4</sup>, ZHANG Peng<sup>1</sup>, YING Yiping<sup>1</sup>, SUN Shan<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Shandong Provincial Key Laboratory for Fishery Resources and Eco-Environment, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090; 3. College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 4. Liaoning Pelagic Fishery Co., Ltd, Dalian 116113)

**Abstract** Based on the trawl survey data of krill (*Euphausia superba*) fishery from the vessel “FURONGHAI” in 2012/2013 fishing season, the temporal and spatial distribution of krill resources were analyzed with the index of CPUE which was standardized as the yield of 3 n mile drag distance in one hour. The results showed that the monthly average of CPUE was relatively stable from January to June, but declined after July. The mean CPUE on sub-area 48.1 was the highest with  $(25.12 \pm 31.04)$  t/h, and the lowest mean CPUE was on sub-area 48.3 with  $(11.49 \pm 12.06)$  t/h. The change of net CPUE was greater in sub-area 48.1 than those in sub-area 48.2 and 48.3. Antarctic krill aggregated mainly in the depth of 0–100 m in sub-area 48.1 with the highest CPUE in 25–50 m layer, but they gathered in sub-area 48.2 mainly in 50–150 m layer with the highest CPUE in 100–150 m layer and in sub-area 48.3 mainly in 100–250 m layer with the highest CPUE in 200–250 m layer. Antarctic krill aggregations were mainly found in the coastal areas less than 500 m in depth which were formed as commercial fishing grounds, and the highest population density was in shallow water of 250 m with the CPUE of  $(17.54 \pm 35.26)$  t/h. The average CPUE was lightly changed between 12–14 t/h in the grounds of 250–1500 m in depth, and the average CPUE was decreased to  $(9.62 \pm 9.54)$  t/h while the grounds was more than 1500 m in depth. The ground SST was mainly between  $-1$ – $2^{\circ}\text{C}$ , and the average CPUE was higher when the SST was in the range of  $-1$ – $0^{\circ}\text{C}$ . There were 5 major aggregations found in this survey, which could last more than 2 months with various densities over time. These results provide the basic data for searching Antarctic krill fishing ground and fisheries management, and provide some reference for commercial fishing as well.

**Key words** Antarctic krill; Trawl survey; CPUE index; Spatiotemporal distribution

Ⓐ Corresponding author: LI Xiansen, E-mail: lixs@ysfri.ac.cn

# 基于贝叶斯的鲈鱼(*Scomber japonicus*)



## 生物经济模型及管理策略\*

王从军<sup>1,4</sup> 汪金涛<sup>1,2,3,4</sup> 陈新军<sup>1,2,3,4①</sup> 官文江<sup>1,2,3,4</sup>

(1. 上海海洋大学海洋科学学院 上海 201306; 2. 国家远洋渔业工程技术研究中心 上海 201306;  
3. 大洋渔业资源可持续开发省部共建教育部重点实验室 上海 201306; 4. 远洋渔业协同创新中心 上海 201306)

**摘要** 根据 2000–2011 年中国、日本以及韩国三国的鲈鱼大型灯光围网渔业生产统计数据以及相关经济数据,运用贝叶斯方法构建东、黄海鲈鱼贝叶斯生物经济模型,分别以剩余产量模型参数  $r$ 、 $K$ 、 $q$  的均匀分布、正态分布和对数正态分布 3 种方案,来模拟不同管理策略下鲈鱼资源量及渔业短期、中期和长期利润变动规律,并对其管理策略进行风险分析。结果显示,参数  $r$ 、 $K$ 、 $q$  为正态分布和对数正态分布方案下估算出的管理参考点期望值(正态方案下的  $B_{MSY}$  除外)均小于均匀分布方案估算出来的期望值。研究认为,如果单从生物学角度来看,若将管理策略设定为收获率 0.4 以上,则 2031 年以后资源量可能存在着资源崩溃的风险。较为保守的管理策略应将收获率设定在 0.3 左右,此时概率( $B_{2031} > B_{MSY}$ )大于 0.85,最大可持续产量  $MSY$  约为 35 万 t。同样地,如果仅从经济学角度考虑,将收获率控制在 0.1 时,概率( $B_{2031} > B_{MEY}$ )都为 1,且概率( $B_{2031} < B_{BE}$ )都是 0,即能够实现渔业经济效益最大化,且其经济无效益的概率为 0。基于贝叶斯的鲈鱼生物经济模型为渔业资源管理提供了分析手段。

**关键词** 鲈鱼; 贝叶斯方法; 生物经济模型; 管理策略; 东、黄海

**中图分类号** S93 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)04-0010-11

鲈鱼(*Scomber japonicus*)属沿岸性中上层鱼类(Kiparissis *et al*, 2000; 李纲, 2008<sup>①</sup>)。分布在我国近海的鲈鱼,是目前中国(包括台湾省)、日本和韩国三国的重点捕捞对象,也是东、黄海生态系统中重要的种类(张晶等, 2005)。近年来,东、黄海鲈鱼资源出现波动,捕捞产量变化较大,可能正在遭受过度捕捞或已处在过度捕捞状态(李纲, 2008<sup>①</sup>)。有关东、黄海域鲈鱼的生物经济模型已有相应的研究(李纲等, 2010; 张广文等, 2009、2010; 王雅丽等, 2011),但均没有考虑各种评估参数和经济因素的不确定性。在渔业资源评估与管理中,由于资源量补充、数据采集

与观测、参数估算等的不确定性,导致管理决策中也可能存在诸多不确定性因素。贝叶斯理论能够充分考虑与模型及其参数有关的不确定性,并结合传统的资源评估模型(李纲, 2008<sup>①</sup>),将模型参数的先验概率分布合并到评估模型中(Punt *et al*, 2001),结合渔业生产数据和模型参数的先验分布来计算模型参数的后验概率分布,从而减少模型评估结果的不确定性(Punt, 1997),为渔业资源管理提供相应的管理策略,并降低管理策略的实施风险。

为此,本研究根据 2000–2011 年中国、日本以及韩国三国的鲈鱼大型灯光围网生产统计数据以及相

\* 国家自然科学基金(NSFC41276156)、国家 863 计划(2012AA092303)、国家发改委产业化专项(2159999)和上海市科技创新行动计划(12231203900)共同资助。王从军, E-mail: wangjintao0510@163.com

① 通讯作者: 陈新军, 教授, E-mail: xjchen@shou.edu.cn

收稿日期: 2014-07-19, 收修改稿日期: 2014-12-14

1) 李纲. 我国近海鲈鱼资源评估及风险评价. 上海海洋大学博士研究生学位论文, 2008

关经济数据,运用贝叶斯方法来构建东、黄海鲈鱼贝叶斯生物经济模型,模拟不同管理策略下,鲈鱼资源量及渔业短期、中期和长期利润变动规律,并对其中的不确定性及管理策略的风险进行量化分析,以此来为科学管理近海鲈鱼资源提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 数据来源

鲈鱼渔获量数据来源于中国远洋渔业协会上海海洋大学鱿钓技术组以及日本和韩国的生产统计数据,时间段为 2000–2011 年(表 1)。单位捕捞努力量的渔获量(CPUE,  $t/\text{网}$ )以 2000–2011 年我国大型灯光围网渔业为基准,其数据采用广义加性模型(Generalized Additive Model, GAM)进行标准化处理(李纲等, 2010),以此作为鲈鱼资源丰度指数(Nishida *et al.*, 2004),其标准化的数据来自文献(王从军等, 2014)。

### 1.2 剩余产量模型及似然函数

剩余产量模型以 Schaefer 模型应用最为广泛,其表达式见文献(陈新军等, 2011)。在资源评估中,通常假设最初一年的资源量等于  $K$ ,这样剩余产量模型中的需要被估算的参数就从 4 个减少到 3 个(McAllister *et al.*, 1998),但这种情形只有在渔业开始的前一年其资源

量已知情况下才有意义。由于我国围网渔业早在 20 世纪 50 年代就已经开始捕捞鲈鱼,而日本、韩国等国的围网渔业有完整鲈鱼产量数据的最早记录也始于 20 世纪 70 年代(李纲等, 2010),因此,本研究中不能将最初一年的资源量设为  $K$ 。根据李纲(2008)<sup>1)</sup>的研究结果,假定 2000 年的鲈鱼初始资源量  $B_0$  为 82.73 万  $t$ 。

假设 CPUE 和资源量成正比,且观测误差服从对数正态分布(李纲, 2008<sup>1)</sup>; 李纲等, 2010),似然函数的表达式为:

$$L(I|\theta) = \prod_{t=2000}^{2011} \frac{1}{I_t \sigma \sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{[\ln(I_t) - \ln(qB_t)]^2}{2\sigma^2}\right)$$

式中,  $I_t$  为  $t$  年的 CPUE,假定  $I_t$  与  $B_t$  成正比,  $\sigma$  为 CPUE 的标准差,  $q$  为可捕系数,  $B_t$  为  $t$  年的资源量。

由于本研究仅采用了 2000–2011 年的渔获量和 CPUE 数据,其时间序列太短而无法估算标准差  $\sigma$ ,因此设定  $\sigma$  为 0.2(McAllister *et al.*, 1998)。

### 1.3 模型参数先验分布的设定

根据所有已知的信息对模型参数的先验分布提出 3 种方案(表 2),分别为均匀分布(基准方案)、正态分布和对数正态分布(李纲, 2008<sup>1)</sup>)。其设定具体可参照文献(李纲等, 2010)。

表 1 东、黄海鲈鱼灯光围网渔业渔获量和标准化的 CPUE

Tab.1 Catch and standardized CPUE data for Chub mackerel purse seine fishery in the East China Sea and the Yellow Sea

年份 Year	渔获量 Catch (10 thousands tonnes)					标准化的 CPUE Standardized CPUE (ton/net)
	中国大型灯光围网 Chinese large purse-seine	浙江传统群众渔业 Traditional local fisheries in Zhejiang Province	日本 Japan	韩国 South Korea	合计 Total	
2000	3.44	1.37	8.90	11.80	25.52	8.3
2001	4.10	2.96	7.80	19.10	33.96	16.7
2002	3.73	2.78	8.60	13.80	28.92	16.5
2003	4.28	6.56	8.30	11.50	30.64	17.4
2004	4.72	8.52	8.30	17.40	38.94	16.7
2005	4.24	8.41	8.70	12.00	33.36	11.7
2006	3.31	9.10	9.00	10.00	31.41	14.0
2007	2.83	8.94	10.60	14.30	36.67	13.5
2008	4.47	15.46	12.10	18.10	50.13	16.5
2009	3.52	12.93	13.10	16.80	46.35	16.6
2010	3.24	10.97	11.80	8.90	34.91	14.1
2011	2.34	17.15	11.10	13.90	44.49	12.1

1) 李纲. 我国近海鲈鱼资源评估及风险评价. 上海海洋大学博士研究生学位论文, 2008

表2 剩余产量模型参数  $r$ 、 $K$ 、 $q$  的先验概率分布设定(李纲等, 2010)

Tab.2 Scenarios for different settings of prior distributions for parameters of the surplus production model

方案 Scenarios	内禀增长率 $r$ Intrinsic rate of increase	负载容量 $K$ Carrying capacity	$\log(q)$
均匀分布(I) Uniform distribution	U(0.1, 2)	U(50, 300)	U(-20, 0)
正态分布(II) Normal distribution	N(0.88, 0.44 <sup>2</sup> )	N(150, 50 <sup>2</sup> )	U(-20, 0)
对数正态分布(III) Log-normal distribution	LogN(-0.17, 0.71 <sup>2</sup> )	U[log(50), log(300)]	U(-20, 0)
上、下边界 Upper and lower limits	[0.1, 2]	[50, 300]	[-20, 0]

#### 1.4 模型参数后验概率分布的计算

利用马尔可夫链蒙特卡罗(Markov Chain Monte Carlo, MCMC)算法计算剩余产量模型的参数  $r$ 、 $K$ 、 $q$  的后验概率分布(李纲等, 2010; 陈新军等, 2011)。模型各参数的初始值设定见表3。计算时, 先舍弃前10000次运算结果, 以后每运算40次对结果进行一次储存, 再运算40000次, 共进行50000次运算。

#### 1.5 确定备选管理策略

以收获率(Harvest rate)作为东、黄海鲈鱼的资源管理策略(李纲等, 2010)。收获率是一种捕捞控制规则(McAllister *et al*, 1998)。备选收获率分别设定为0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6和0.7。

#### 1.6 Gordon-Schaefer 生物经济模型

在 Gordon-Schaefer 生物模型的基础上, 构建生

物经济模型(Hill *et al*, 2003)。由此模型推出各管理策略下最大可持续产量(MSY)、最大经济产量(MEY)和生物经济平衡点(BE)时的渔获产量和经济利润。计算公式见表4。

#### 1.7 生物学参考点和经济学参考点的选择

本研究中选择生物学参考点包括  $F_{MSY}$ 、 $B_{MSY}$ 、 $F_{0.1}$  和 MSY 本身, 其中,  $F_{MSY}$  和  $B_{MSY}$  分别为达到 MSY 管理平时所对应的捕捞死亡系数和资源量,  $F_{0.1}$  为平衡渔获量和捕捞死亡系数关系曲线最大斜率的10%对应的捕捞死亡系数(Hoggarth *et al*, 2006; Caddy *et al*, 1995)。公式见文献(Hoggarth *et al*, 2006; Caddy *et al*, 1995)和表4。

在经济学上, 通常把实现最大经济产量(MEY)作为其管理目标, 而把生物经济平衡点(BE)作为其管理的限制参考点。因此, 本研究选择的经济学参考点

表3 MCMC 计算剩余产量模型参数  $r$ 、 $K$ 、 $q$  的初始值设定(李纲等, 2010)Tab.3 Initial value for  $r$ ,  $K$ ,  $q$  of surplus production model of MCMC iterations

3种方案	内禀增长率 $r$ Intrinsic rate of increase	负载容量 $K$ Carrying capacity	可捕系数 $q$ Catchability coefficient
均匀分布(I) Uniform distribution	0.7	150	0.00001
正态分布(II) Normal distribution	0.7	150	0.00001
对数正态分布(III) Log-normal distribution	0.7	150	0.00001

表4 生物学参考点和经济学参考点的计算公式

(陈新军等, 2011; Hill *et al*, 2003; 陈新军, 2005; Hoggarth *et al*, 2006; Caddy *et al*, 1995)

Tab.4 The formula of the biological reference points and the economical reference points

管理参考点 Management reference point	产量 Catch	捕捞死亡系数 Fishing mortality coefficient	生物量 Biomass
生物学参考点 Biological reference point	$MSY = \frac{rK}{4}$	$F_{MSY} = \frac{r}{2}$ $F_{0.1} = 0.45r$	$B_{MSY} = \frac{K}{2}$
经济学参考点 Economic reference point	$MEY = \frac{rKmn}{4}$	$F_{MEY} = \frac{rm}{2}$	$B_{MEY} = \frac{nK}{2}$
生物经济平衡点 Bio-economic equilibrium	$BE = \frac{rcm}{pq}$	$F_{BE} = rm$	$B_{BE} = \frac{c}{pq}$

注:  $m = 1 - \frac{c}{pqK}$ ,  $n = 1 + \frac{c}{pqK}$ 。  $r$  为内禀增长率,  $K$  为负载容量,  $q$  为可捕系数,  $p$  为价格,  $c$  为单船作业成本

Note:  $m = 1 - \frac{c}{pqK}$  and  $n = 1 + \frac{c}{pqK}$ .  $r$  is intrinsic rate of increase,  $K$  is carrying capacity,  $q$  is catchability coefficient,  $p$  is price of fish,  $c$  is the fishing cost per vessel

分别为  $MEY$  和  $Y_{BE}$ , 及其分别对应的  $F_{MEY}$ 、 $B_{MEY}$  和  $F_{BE}$ 、 $B_{BE}$ 。

### 1.8 资源管理效果评价及风险分析指标的选择

利用建立指标和模拟管理策略来评估备选管理策略的实施效果及其风险, 模拟管理策略的时间段为 2012—2031 年, 共计 20 年。建立的指标分别为:

指标 1: 实施管理策略后 2031 年鲈鱼资源量的期望值( $B_{2031}$ );

指标 2: 实施管理策略期间观察到的最低资源量  $B_{min}$ ;

指标 3: 实施管理策略后 2031 年鲈鱼资源量( $B_{2031}$ )与负载容量( $K$ ) 的比值( $B_{2031}/K$ ), 即鲈鱼资源量的衰减率;

指标 4: 实施管理策略后 2031 年鲈鱼资源量( $B_{2031}$ )与最大可持续产量时的资源量( $B_{MSY}$ )的比值( $B_{2031}/B_{MSY}$ )的期望值;

指标 5: 管理策略实施后 2031 年鲈鱼资源量( $B_{2031}$ )大于管理策略实施前鲈鱼资源量( $B_{2012}$ )的概率  $P(B_{2031} > B_{2012})$ , 它表示管理措施实施后的资源较管理措施实施前资源恢复的概率;

指标 6: 实施管理策略后 2031 年鲈鱼资源量( $B_{2031}$ )大于资源量生物学目标参考点( $B_{MSY}$ )的概率  $P(B_{2031} > B_{MSY})$ , 它表示管理措施实施后的资源恢复到健康水平的概率;

指标 7: 管理策略实施后 2031 年鲈鱼资源量( $B_{2031}$ )小于资源量生物学限制参考点( $B_{MSY}/4$ )的概率  $P(B_{2031} < B_{MSY}/4)$ , 它表示管理措施实施后的资源崩溃的概率;

指标 8: 实施管理策略后 2031 年鲈鱼资源量( $B_{2031}$ )大于资源量经济学目标参考点( $B_{MEY}$ )的概率  $P(B_{2031} > B_{MEY})$ , 它表示管理措施实施后经济效益最大化的概率;

指标 9: 管理策略实施后 2031 年鲈鱼资源量( $B_{2031}$ )小于资源量经济学限制参考点( $B_{BE}$ )的概率  $P(B_{2031} < B_{BE})$ , 它表示管理措施实施后经济无效益的概率;

指标 10: 比较不同备选管理策略下的短期(2012—2017 年, 5 年)、中期(2012—2021 年, 10 年)和长期(2012—2031 年, 20 年)的累计产量及累计经济效益。

根据上述定义的 10 个指标建立管理决策表和风险分析表, 以对不同的备选管理策略进行分析评价。评价备选管理策略的优劣时, 应在资源保护( $B_{min}$  和  $B_{2031}$ )和资源利用(总渔获量、经济效益及社会效益, 社会效益以捕捞努力量来表征)之间取得平衡, 渔业管理决策的选择可以依据“期望收益最高、且风险最小”的原则。

## 2 结果

### 2.1 模型参数的后验分布及期望

不同假设方案下模型参数的抽样过程及其后验概率分布见图 1。在基准方案(均匀分布)下(图 1-a), 假设的  $K$ 、 $q$  的先验概率服从均匀分布, 但其后验概率是一条曲线, 即后验概率分布与其先验概率分布相差很大, 这表明数据对参数  $K$ 、 $q$  的后验概率分布产生了很大影响。对于正态分布方案(图 1-b)和对数正态分布方案(图 1-c), 参数  $K$ 、 $q$  的后验概率分布与其先验概率分布差异不大(图 1-b 和图 1-c), 即后验概率分布基本服从正态分布( $P < 0.05$ )。在 3 种方案中, 参数  $r$  的后验概率分布与先验概率分布差异较大。

不同假设方案下模型参数的预测值(即参数后验概率分布的均值)见表 5。参数  $r$  的范围为 0.86—1.01, 其中, 对数正态分布方案下最小, 基准方案下最大; 参数  $K$  的范围为 161.0—165.3(万 t)。其中, 对数正态分布方案下最小, 正态分布方案下最大; 而 3 种方案下参数  $q$  的大小几乎一致, 为  $0.13 \times 10^{-4}$ 。

### 2.2 生物学参考点和经济学参考点的期望及其不确定性

对于均匀分布方案, 估算的  $MSY$  为 40.52 万 t, 其对应的资源量  $B_{MSY}$  为 81.90 万 t; 估算的  $MEY$  和  $Y_{BE}$  分别为 23.54 万 t 和 35.97 万 t, 其对应的资源量  $B_{MEY}$ 、 $B_{BE}$  分别为 132.36 万 t 和 100.92 万 t(表 6)。对于正态分布方案, 估算的  $MSY$  为 35.47 万 t, 其对应的资源量  $B_{MSY}$  为 82.64 万 t; 估算的  $MEY$  和  $Y_{BE}$  分别为 22.11 万 t 和 32.90 万 t, 其对应的资源量  $B_{MEY}$ 、 $B_{BE}$  分别为 131.54 万 t 和 97.81 万 t(表 7)。对于对数正态分布方案, 估算的  $MSY$  为 33.69 万 t, 其对应的资源量  $B_{MSY}$  为 80.52 万 t; 估算的  $MEY$  和  $Y_{BE}$  分别为 21.60 万 t 和 31.59 万 t, 其对应的资源量  $B_{MEY}$ 、 $B_{BE}$  分别为 126.67 万 t 和 92.30 万 t(表 8)。可以发现, 正态分布和对数正态分布方案下估算出的多数管理参考点的期望值(正态方案下的  $B_{MSY}$  除外)基本都小于均匀分布方案估算出来的期望值。3 种方案下估算的  $F_{0.1}$ 、 $F_{MSY}$ 、 $F_{MEY}$  和  $F_{BE}$  结果略有差异(表 6、表 7 和表 8), 均匀分布方案下估算的  $F_{0.1}$ 、 $F_{MSY}$ 、 $F_{MEY}$  和  $F_{BE}$ , 结果都略大于其他两种方案估算的结果, 其均匀分布方案下估算的结果分别为 0.456、0.506、0.184 和 0.368,  $F_{0.1}$ 、 $F_{MSY}$  最小值出现在对数正态方案(分别为 0.387、0.430), 而  $F_{MEY}$ 、 $F_{BE}$  最小值出现在正态方案下(分别为 0.171、0.342)。

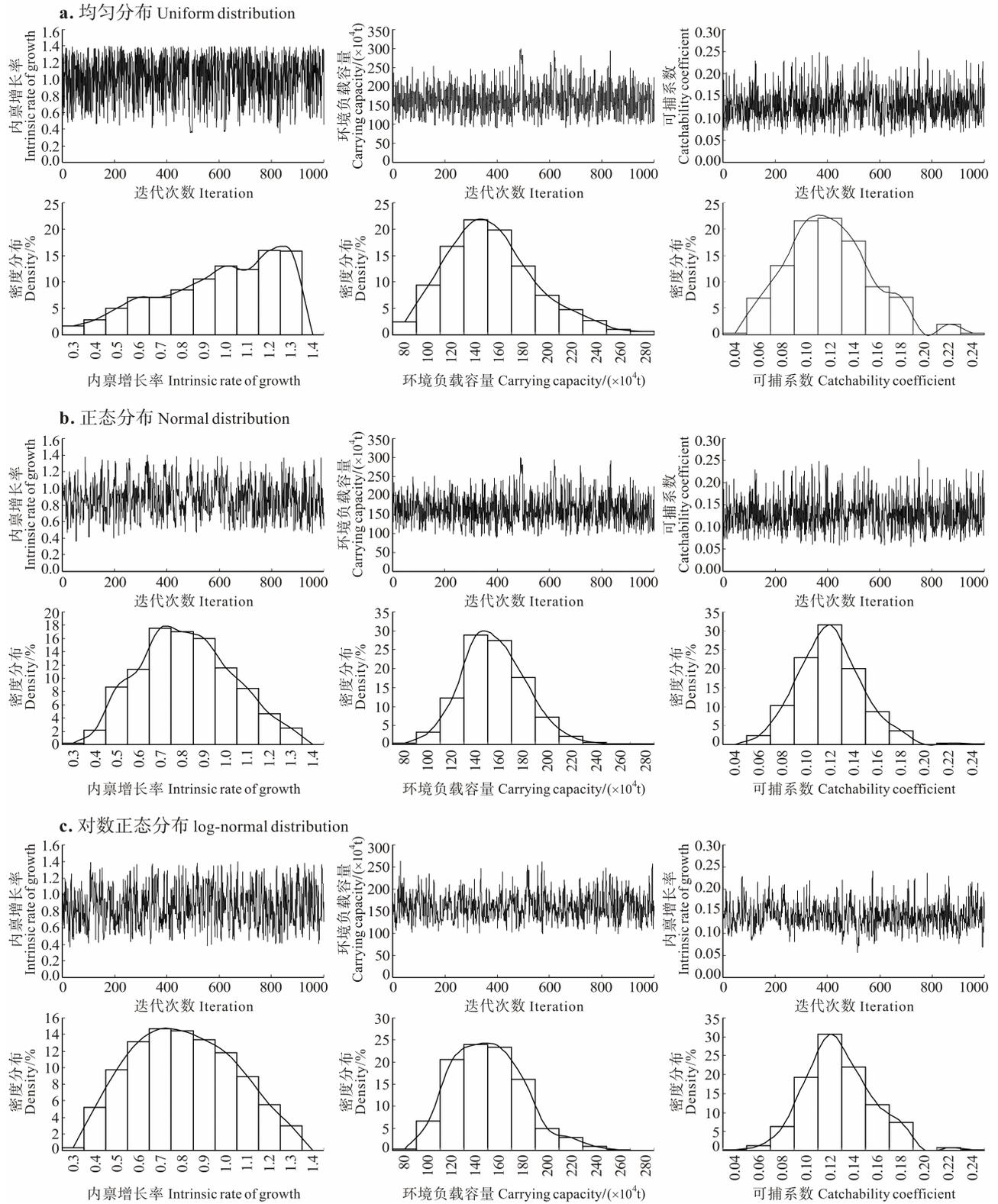


图1 不同方案下参数  $r$ 、 $K$ 、 $q$  的样本(上)及其密度分布(下)

Fig.1 Plot of Markov-chain Monte Carlo traces (up) and density (low) for  $r$ ,  $K$ ,  $q$  under scenario of random effect

(a) 均匀分布; (b) 正态分布; (c) 对数正态分布

(a) Uniform distribution; (b) Normal distribution; (c) Log-normal distribution

表 5 不同方案下模型参数的后验概率分布和渔业管理参数的均值  
Tab.5 Posterior means and coefficient of variations (CV) for model parameters for the three prior scenarios and the parameters of the fishery management

方案 Scenarios	内禀增长率 $r$ Intrinsic rate of increase	负载容量( $K/10^4$ t) Carrying capacity	可捕系数( $q/10^{-4}$ ) Catchability coefficient	$MSY$	$MEY$	$Y_{BE}$
均匀分布(基准)Uniform distribution	1.01(0.27)	163.8(0.24)	0.13(0.28)	40.52(0.33)	23.54(0.19)	35.97(0.25)
正态分布 Normal distribution	0.87(0.24)	165.3(0.16)	0.13(0.28)	35.47(0.26)	22.11(0.15)	32.90(0.20)
对数正态分布 Log-normal distribution	0.86(0.27)	161.0(0.18)	0.14(0.21)	33.69(0.26)	21.60(0.14)	31.59(0.20)

注: 括号内为变异系数 Note: Coefficient of variation are shown in brackets

表 6 均匀分布方案下估算的渔业管理参考点的统计量  
Tab.6 The statistics of estimated fishery management reference points for the uniform distribution scenario

参数/参考点 Parameters/ Reference points	平均值 Average	中值 Median	5%分位数 5% quantile	95%分位数 95% quantile
$r$	1.012	1.051	0.519	1.369
$K$	163.80	159.63	106.58	234.32
$q$	0.131	0.127	0.076	0.202
$F_{0.1}$	0.456	0.473	0.233	0.616
$F_{MSY}$	0.506	0.525	0.259	0.684
$MSY(\times 10^4$ t)	40.52	36.87	25.38	69.04
$B_{MSY}(\times 10^4$ t)	81.90	79.81	53.29	117.16
$F_{MEY}$	0.184	0.178	0.131	0.255
$MEY(\times 10^4$ t)	23.54	22.12	18.85	33.07
$B_{MEY}(\times 10^4$ t)	132.36	129.91	83.36	194.09
$F_{BE}$	0.368	0.355	0.263	0.509
$Y_{BE}(\times 10^4$ t)	35.97	33.84	24.94	54.82
$B_{BE}(\times 10^4$ t)	100.92	96.08	60.19	160.81

表 8 对数正态分布方案下估算的渔业管理参考点的统计量  
Tab.8 The statistics of estimated fishery management reference points for the log-normal distribution scenario

参数/参考点 Parameters/ Reference points	平均值 Average	中值 Median	5%分位数 5% quantile	95%分位数 95% quantile
$r$	0.860	0.847	0.498	1.259
$K$	161.05	158.72	116.11	214.69
$q$	0.138	0.136	0.095	0.189
$F_{0.1}$	0.387	0.381	0.224	0.566
$F_{MSY}$	0.430	0.424	0.249	0.629
$MSY(\times 10^4$ t)	33.69	31.16	24.60	50.43
$B_{MSY}(\times 10^4$ t)	80.52	79.36	58.05	107.34
$F_{MEY}$	0.175	0.170	0.131	0.234
$MEY(\times 10^4$ t)	21.60	20.87	18.47	27.34
$B_{MEY}(\times 10^4$ t)	126.67	125.70	91.68	163.85
$F_{BE}$	0.349	0.339	0.262	0.468
$Y_{BE}(\times 10^4$ t)	31.59	30.14	24.23	43.41
$B_{BE}(\times 10^4$ t)	92.30	89.83	64.49	128.66

表 7 正态分布方案下估算的渔业管理参考点的统计量  
Tab.7 The statistics of estimated fishery management reference points for the normal distribution scenario

参数/参考点 Parameters/ Reference points	平均值 Average	中值 Median	5%分位数 5% quantile	95%分位数 95% quantile
$r$	0.870	0.864	0.537	1.236
$K$	165.27	163.13	125.28	210.77
$q$	0.130	0.129	0.088	0.178
$F_{0.1}$	0.392	0.389	0.242	0.556
$F_{MSY}$	0.435	0.432	0.269	0.618
$MSY(\times 10^4$ t)	35.47	33.11	25.13	54.76
$B_{MSY}(\times 10^4$ t)	82.64	81.57	62.64	105.39
$F_{MEY}$	0.171	0.168	0.133	0.225
$MEY(\times 10^4$ t)	22.11	21.23	18.50	28.62
$B_{MEY}(\times 10^4$ t)	131.54	129.60	97.70	171.51
$F_{BE}$	0.342	0.335	0.265	0.449
$Y_{BE}(\times 10^4$ t)	32.90	31.41	24.90	45.72
$B_{BE}(\times 10^4$ t)	97.81	94.64	68.49	137.90

### 2.3 决策分析和风险分析

由表 9 可知, 在 3 种方案中, 基准方案下模拟的各项指标最大, 其次为正态分布, 而对数正态分布方案下的各项指标最小, 以收获率水平 0.3 为例, 管理措施实施结束时 3 种方案下的东、黄海鲈鱼的资源量的期望值  $B_{2031}$  分别为 108.15 万 t、103.49 万 t 和 98.11 万 t。

单从生物学角度来看, 当收获率设定为 0.3 时, 对其风险指标进行分析可知, 从观测到的管理策略实施期间的最低资源量来看, 以基准方案为最低(49.38 万 t), 正态分布方案最高(60.50 万 t)。3 种方案下估算出的管理策略实施后 2031 年鲈鱼资源量( $B_{2031}$ )与最大可持续产量时的资源量( $B_{MSY}$ )的比值  $B_{2031}/B_{MSY}$  期望值都大于 1, 其中基准方案的期望值最大为 1.34, 正态方案的期望值为 1.27, 对数正态方案的期望值最低为 1.24。管理措施实施后的资源较管理措施实施前资源恢复的概率  $P(B_{2031} > B_{2012})$ , 3 种方案分别为 0.51、0.33 和 0.39。而对于资源恢复到健康水平的概率

$P(B_{2031} > B_{MSY})$ 的估算结果, 3种分布方案都较高, 其中均匀分布方案下 2031 年资源量大于  $B_{MSY}$  的概率  $P$  为 0.91, 而正态分布和对数正态分布方案则  $P$  分别为 0.89 和 0.85; 与此同时, 出现资源崩溃的概率  $P(B_{2031} < B_{MSY}/4 =$  的估算结果都较为乐观, 3种方案都为 0。

若从经济学角度来看, 在收获率设定为 0.3 时, 3种方案下其经济学风险指标的估计值就尤为严峻, 管理实施策略后 2031 年鲈鱼资源量( $B_{2031}$ )大于其经济学目标参考点( $B_{MEY}$ )的概率  $P(B_{2031} > B_{MEY})$ 都为 0, 这说明在此种收获率下, 管理措施实施后能够经济效益最大化的概率为 0; 与此同时, 此种管理策略实施后 2031 年鲈鱼资源量( $B_{2031}$ )小于其经济学限制参考点( $B_{BE}$ )的概率  $P(B_{2031} < B_{BE} =$  却都存在, 其管理措施实施后经济无效益的概率  $P$  分别为 0.21、0.25 和 0.26。而当收获率为 0.1 时, 3种方案下其经济学风险指标的估计值就非常乐观, 从表 9 中可以看出, 管理实施策略后 2031 年鲈鱼资源量( $B_{2031}$ )大于其经济学目标

参考点( $B_{MEY}$ )的概率  $P(B_{2031} > B_{MEY})$ 都为 1, 与此同时, 此种管理策略实施后 2031 年鲈鱼资源量( $B_{2031}$ )小于其经济学限制参考点( $B_{BE}$ )的概率  $P(B_{2031} < B_{BE} =$  都为 0。

不同备选管理策略下的短期(5 年)、中期(10 年)和长期(20 年)的累计产量及累计利润见图 2。在基准方案下, 当收获率为 0.5 时, 其累计产量和累计利润达到最大, 其短期、中期和长期的累计产量及累计利润分别为 201.97 万 t 和 111.07 亿元、436.04 万 t 和 239.80 亿元、762.86 万 t 和 419.52 亿元(图 2-I); 而对于正态分布方案和对数正态分布方案, 其累计产量和累计利润的最大值均出现在当收获率为 0.4 时, 其中正态分布方案下短期、中期和长期的累计产量及累计利润分别为 177.96 万 t 和 97.87 亿元、391.17 万 t 和 215.12 亿元、680.19 万 t 和 374.06 亿元(图 2-II); 对数正态分布方案下短期、中期和长期的累计产量及累计利润分别为 168.07 万 t 和 92.43 亿元、371.14 万 t 和 204.10 亿元、638.59 万 t 和 351.19 亿元(图 2-III)。

表 9 不同收获率时 3 种方案得到的资源管理效果评价以及风险分析指标

Tab.9 The probability of projected stock biomass from 2007 to 2011 lower or higher than defined reference points for alternative harvest rates for Chub mackerel stock in the East China Sea and the Yellow Sea

	收获率 Harvest rate	$B_{2031}$ ( $\times 10^4$ t)	$B_{min}$ ( $\times 10^4$ t)	$B_{2031}/K$	$B_{2031}/B_{MSY}$	$B_{2031}/B_{MEY}$	$P(B_{2031} > B_{2012})$	$P(B_{2031} > B_{MSY})$	$P(B_{2031} < B_{MSY}/4)$	$P(B_{2031} > B_{MEY})$	$P(B_{2031} < B_{BE})$
Uniform distribution 基准方案	0	163.80	89.14	1.00	2.00	1.24	0.71	1.00	0	1.00	0
	0.1	145.20	82.33	0.89	1.78	1.10	0.73	1.00	0	1.00	0
	0.2	126.60	75.53	0.78	1.56	0.97	0.81	0.98	0	0.32	0
	0.3	108.15	49.38	0.67	1.34	0.83	0.51	0.91	0	0	0.21
	0.4	90.39	12.22	0.57	1.14	0.70	0.35	0.76	0.02	0	0.68
	0.5	73.85	1.80	0.47	0.93	0.57	0.31	0.57	0.07	0	0.93
	0.6	58.86	0.17	0.37	0.75	0.45	0.29	0.32	0.15	0	1.00
Normal distribution 正态分布方案	0	165.27	93.75	1.00	2.00	1.26	0.92	1.00	0	1.00	0
	0.1	144.67	86.64	0.88	1.76	1.10	0.92	1.00	0	1.00	0
	0.2	124.06	79.37	0.76	1.51	0.95	0.84	1.00	0	0.15	0
	0.3	103.49	60.50	0.63	1.27	0.79	0.33	0.89	0	0	0.25
	0.4	83.17	17.02	0.51	1.02	0.64	0.11	0.60	0.01	0	0.85
	0.5	63.73	2.80	0.40	0.79	0.49	0.09	0.27	0.07	0	0.99
	0.6	46.18	0.29	0.29	0.58	0.36	0.09	0.07	0.19	0	1.00
Log-normal distribution 对数正态分布方案	0	161.04	97.98	1.00	2.00	1.27	0.92	1.00	0	1.00	0
	0.1	140.05	89.07	0.87	1.75	1.11	0.93	1.00	0	1.00	0
	0.2	119.05	80.15	0.75	1.50	0.95	0.87	1.00	0	0.22	0
	0.3	98.11	56.79	0.62	1.24	0.79	0.39	0.85	0	0	0.26
	0.4	77.66	16.33	0.50	1.00	0.63	0.14	0.57	0.02	0	0.78
	0.5	58.69	2.75	0.38	0.76	0.48	0.09	0.29	0.10	0	0.98
	0.6	42.23	0.29	0.28	0.56	0.35	0.08	0.09	0.24	0	1.00
0.7	28.84	0.02	0.19	0.39	0.24	0.08	0	0.40	0	1.00	

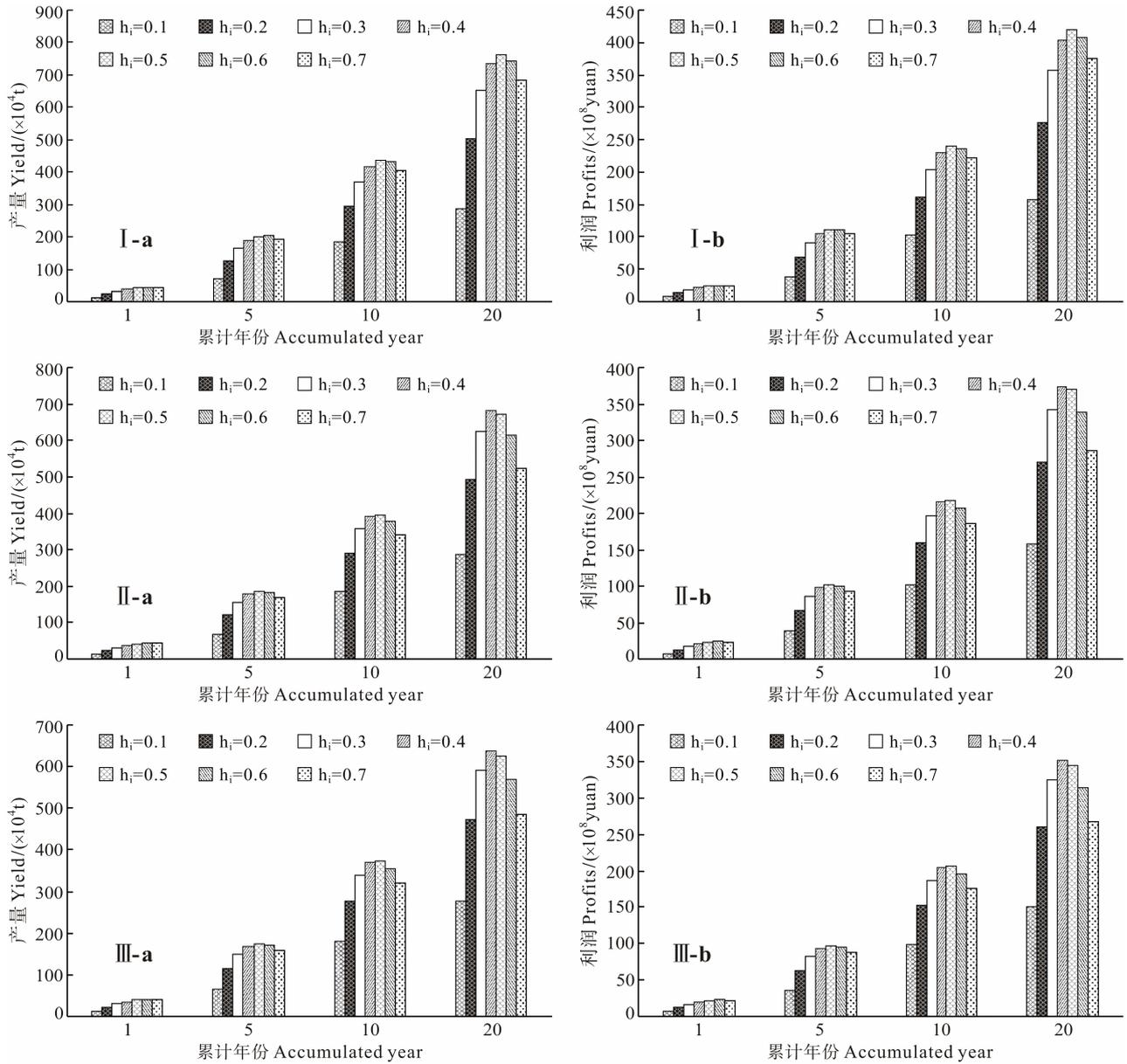


图 2 不同备选管理策略下的短期(5 年)、中期(10 年)和长期(20 年)的累计产量及累计利润  
 Fig.2 The accumulative catches and profits in short, medium and long-term under the scenarios of uniform distribution, normal distribution and log-normal distribution

I、II、III 分别代表方案 1、2、3；a、b 分别代表累计产量和累计利润

I: Uniform distribution, II: Normal distribution, III: Log-normal distribution; a: Accumulative catches, b: Accumulative profits

但若将管理策略定为收获率为 0.4 或 0.5, 则 2031 年以后资源量存在着一定风险。研究认为, 较为保守的管理策略应将收获率控制在 0.3 左右, 此时, 其  $MSY$  在 35 万 t 左右。

综上所述, 通过分析表 9 中的风险指标数据, 可以发现, 当收获率为 0.3 时, 概率  $P(B_{2031} > B_{MSY})$  都大于 0.85, 所以, 如果单从生物学角度来看, 将鲈鱼渔业的收获率控制在 0.3 左右时, 能够实现最大可持续产量的资源量。同样地, 如果从经济学角度考虑, 将

收获率控制在 0.1 时, 3 种方案下概率  $P(B_{2031} > B_{MEY})$  都为 1, 且概率  $P(B_{2031} < B_{BE})$  都是 0, 即此管理措施实施后, 能够实现渔业经济效益最大化, 且其经济无效益的概率为 0。所以, 如果单从经济学角度来说, 收获率控制在 0.1 可作为其最适的渔业管理策略。

### 3 分析与讨论

贝叶斯方法是利用先验概率分布或后验概率分布来帮助选择渔业管理决策的一个重要方法, 模型参

数先验概率分布的假设和选择对其后验概率分布的估算有重要影响。目前,对如何推断先验概率分布仍存在很多争议(Nishida *et al.*, 2004),这是因为对先验概率分布不同的选择,有可能会影响到资源评估的结果(Caddy *et al.*, 1995; Walters *et al.*, 1994),更有甚者会导致评估结果错误(张广文等, 2009)。例如,如果采用的数据不是有信息的,那么,先验概率分布完全可能影响甚至主导对后验概率的估算结果(Punt *et al.*, 2001; Stobberup *et al.*, 2006)。本研究中,模型参数  $r$ 、 $K$ 、 $q$  的先验概率分布的设定主要根据已有的研究结果(李纲等, 2010),并将其先验概率分布设定为3种方案,分别为均匀分布方案(基准方案)、正态分布方案和对数正态分布方案。研究结果表明,在基准方案下,假设的  $K$ 、 $q$  的先验概率分布与估算的后验概率分布相差很大,这表明数据对参数  $K$ 、 $q$  的后验概率分布产生了很大影响;对于正态分布方案和对数正态分布方案,参数  $K$ 、 $q$  的后验概率分布与它们的先验概率分布差异不大,后验概率分布基本服从正态分布,表明该参数在基于贝叶斯方法的生物经济模型中具有较小的不确定性,其估算的结果对参数  $K$ 、 $q$  的先验概率分布可能存在不敏感的因素。在3种方案中,参数  $r$  的后验概率分布与先验概率分布差距较大,这表明在本研究的数据下,参数  $r$  并不完全服从假设的分布类型,即参数  $r$  给模型带来的不确定性较大。

东、黄海鲈鱼资源自20世纪90年代开始下降,特别是在90年代后期(唐启升, 2006; 由上龍嗣等, 2007),日本水产研究机构的资源评估结果也显示,1999–2006年东、黄海鲈鱼资源量处于历史最低水平(由上龍嗣等, 2007)。作为一种中上层鱼类,鲈鱼资源变动受到水温等环境因素的影响(Yatsu *et al.*, 2005; Hiyama *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2006; Akihikoyatsu *et al.*, 2002),但影响鲈鱼群体数量变动的主要原因可能是捕捞。根据中国、日本和韩国三国鲈鱼灯光围网渔业2000–2011年间的渔业统计数据,鲈鱼的年产量基本上稳定在25–50万t之间,年均产量约为36万t,2008年渔获产量最高,约为50.13万t,其次为2009年渔获产量,约为46.35万t,最低的为2000年的25.52万t。本研究中,3种方案估算出来的鲈鱼  $MSY$  最小值为35.47万t,从2007年至今(2010年除外)的渔获量均大于  $MSY$ 。因此,就目前东、黄海鲈鱼的资源状况而言,本研究认为其资源或许正遭受过度捕捞,这一结果与李纲等(2010)的研究结果相一致。本研究认为,东、黄海鲈鱼的  $MSY$  为35万t左右,与前人的研究结果(张广文等, 2009, 2010; 王雅丽等, 2011; McAllister *et al.*, 2001)存在一定的差异,其误差可能来自于模型

的选择、参数的设定等。

当前,世界渔业资源面临的首要问题之一仍是由于过度捕捞造成的资源衰退,因而保护渔业资源是渔业管理的目标之一。渔业资源管理的基本目标是实现从渔业资源中获得可持续的最佳利益,这就要求渔业管理者在选择渔业管理策略时,应当综合权衡产量、利润与保持渔业资源可持续开发利用之间的关系。因此,管理者可以通过设定不同方案,从而得到不同的备选管理策略。研究表明,如果单从生物学角度来看,若将管理策略设定为收获率0.4或0.5,则2031年以后资源量可能存在着资源崩溃的风险,较为保守的管理策略应将收获率设定在0.3左右,此时的  $MSY$  约为35万t。同样地,如果仅从经济学角度考虑,将收获率控制在0.1时,能够实现渔业经济效益最大化,且其经济无效益的概率  $P$  为0。

在渔业管理中,决策中的不确定性来源于多种可能,如渔业数据的收集、过程误差以及模型或参数的不确定性等(Punt *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1998; Patterson *et al.*, 2001)。贝叶斯方法正因为充分考虑了与模型及其有关参数的不确定性,而广泛应用到渔业资源评估中(李纲等, 2010; 陈新军等, 2011)。本研究相关的不确定性包括如下方面:首先是原始数据收集过程中的不确定性,本研究的渔获数据来自中国、日本和韩国三国的鲈鱼灯光围网渔业统计数据,虽然经过修正但可能依然存在一定的误差;其次是中国、日本和韩国三国围网船队捕捞能力之间存在着差异,其差异影响了模型研究结果的差异。同时,不确定性还来源于模型参数的设定,本研究中对模型参数初始资源量进行了假设,即假定鲈鱼初始资源量  $B_0$  为82.73万t,初始资源量的取值对资源量的估算结果存在一定的影响。今后的研究中,需要建立完善的渔业、生物、经济等方面的数据库,以及海洋环境数据,开展系统的渔业资源评估及管理策略研究。

## 参 考 文 献

- 王从军, 陈新军, 李纲. 东、黄海鲈鱼生物经济社会综合模型的优化配置研究. 上海海洋大学学报, 2013, 22(4): 623–628
- 王从军, 邹莉瑾, 李纲, 等. 1999–2011年东、黄海鲈资源丰度年间变化分析. 水产学报, 2014, 38(1): 56–64
- 王雅丽, 陈新军, 李纲. 基于贴现率的东、黄海鲈鱼动态生物经济模型分析. 资源科学, 2011, 33(11): 2157–2161
- 李纲, 陈新军, 官文江. 基于贝叶斯方法的东、黄海鲈资源评估及管理策略风险分析. 水产学报, 2010, 34(5): 740–750
- 陈新军. 渔业资源经济学. 北京: 中国农业出版社, 2004,

- 62-105
- 陈新军, 曹杰, 刘必林, 等. 基于贝叶斯 Schaefer 模型的西北太平洋柔鱼资源评估与管理. 水产学报, 2011, 35(10): 1572-1581
- 张晶, 韩士鑫. 黄、东海鲈鱼渔场环境分析. 海洋渔业, 2005, 26(4): 321-325
- 张广文, 陈新军, 李思亮, 等. 基于多船队作业的东、黄海鲈鱼生物经济模型及管理策略. 资源科学, 2010, 32(8): 1627-1633
- 张广文, 陈新军, 李纲. 东、黄海鲈鱼生物经济模型及管理策略探讨. 上海海洋大学学报, 2009, 18(4): 447-452
- 唐启升. 中国专属经济区海洋生物资源与栖息环境. 北京: 科学出版社, 2006
- 由上龍嗣, 檜山義明, 依田真里等. 平成 18 年マサバ対馬暖流系群の資源評価. 西海区水産研究所, 2007.
- Akihikoyatsu TM, Watanabe C, Nishida H. Current stock status and management of chub mackerel, *Scomber japonicus*, along the Pacific coast of Japan-an example of allowable biological catch determination. Fish Sci, 2002, 68(1): 93-96
- Caddy JF, Refk R, Do-chi T. Productivity estimates for the mediterranean: Evidence of accelerating ecological change. Ocean and Coastal Management, 1995, 26(1): 1-18
- Chen Y, Paloheimo JE. Can a more realistic model error structure improve the parameter estimation in modelling the dynamics of fish populations. Fish Res, 1998, 38(1): 9-17
- Chen Y, Breen PA, Andrew NL. Impacts of outliers and mis-specification of priors on Bayesian fisheries-stock assessment. Can J Fish Aquat Sci, 2000, 57(11): 2293-2305
- Hill KT, Bergen DR, Crone PR. Stock assessment of Pacific mackerel with recommendations for the 2003-2004 management season (Executive Summary). Pacific Fishery Management Council, June 2003 Briefing Book, Exhibit G.3, Attachment, 15
- Hiyama Y, Yoda M, Ohshimo S. Stock size fluctuations in chub mackerel (*Scomber japonicus*) in the East China Sea and the Japan/East Sea Fish Oceanogr, 2002, 11(6): 347-353
- Hoggarth DD. Stock Assessment for Fishery Management: A Framework Guide to the Stock Assessment Tools of the Fisheries Management and Science Programme. Food & Agriculture Organ. 2006
- Kiparissis S, Tserpes G, Tsimenidis N. Aspects on the demography of Chub Mackerel (*Scomber japonicus* Houuttuyn, 1782) in the Hellenic Seas. Belg J Zool, 2000, 130(1): 3-7
- McAllister MK, Kirkwood GP. Bayesian stock assessment: a review and example application using the logistic model. ICES J Mar Sci: Journal du Conseil, 1998, 55(6): 1031-1060
- McAllister MK, Pikitch EK, Babcock EA. Using demographic methods to construct Bayesian priors for the intrinsic rate of increase in the Schaefer model and implications for stock rebuilding. Can J Fish Aquat Sci, 2001, 58(9): 1871-1890
- Nishida T, Chen DG. Incorporating spatial autocorrelation into the general linear model with an application to the yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) longline CPUE data. Fish Res, 2004, 70(2): 265-274
- Patterson K, Cook R, Darby C, et al. Estimating uncertainty in fish stock assessment and forecasting. Fish and Fish, 2001, 2(2): 125-157
- Punt AE, Hilborn R. BAYES-SA. Bayesian stock assessment methods in fisheries. User's Manual. FAO, 2001
- Punt AE. The performance of VPA-based management. Fish Res, 1997, 29(3): 217-243
- Punt AE, Hilborn RAY. Fisheries stock assessment and decision analysis: the Bayesian approach. Fish Biol Fish, 1997, 7(1): 35-63
- Stobberup KA, Erzini K. Assessing mackerel scad, *Decapterus macarellus*, in Cape Verde: Using a Bayesian approach to biomass dynamic modelling in a data-limited situation. Fish Res, 2006, 82(1): 194-203
- Sun CH, Chiang FS, Tsoa E, et al. The effects of El Niño on the mackerel purse-seine fishery harvests in Taiwan: An analysis integrating the barometric readings and sea surface temperature. Ecol Econ, 2006, 56(2): 268-279
- Walters C, Ludwig D. Calculation of Bayes posterior probability distributions for key population parameters. Can J Fish Aquat Sci, 1994, 51(3): 713-722
- Yatsu A, Watanabe T, Ishida M, et al. Environmental effects on recruitment and productivity of Japanese sardine (*Sardinops melanostictus*) and chub mackerel (*Scomber japonicus*) with recommendations for management. Fish Oceanogr, 2005, 14(4): 263-278

(编辑 江润林)

## Bayesian Bio-economic Model and Management Strategy of Chub Mackerel (*Scomber japonicus*) in the East China Sea and the Yellow Sea

WANG Congjun<sup>1,4</sup>, WANG Jintao<sup>1,2,3,4</sup>, CHEN Xinjun<sup>1,2,3,4</sup>①, GUAN Wenjiang<sup>1,2,3,4</sup>

(1. College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2 National Distant-water Fisheries Engineering Research Center, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. The Key Laboratory of Sustainable Exploitation of Oceanic Fisheries Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 4. Collaborative Innovation Center for Distant-water Fisheries, Shanghai 201306)

**Abstract** According to the fishery data of light purse seine fisheries of China, Japan and South Korea and the associated economic data during 2000 to 2011, the Bayesian method was used to construct the bio-economic models of Chub mackerel (*Scomber japonicus*) in the East China Sea and the Yellow Sea under three assumptions (uniform distribution, normal distribution and log-normal distribution). The resource status and economic benefits under three different management strategies (short-term, medium-term and long-term) were compared and the suitable management strategies were evaluated. The results showed that the most estimated expectation (except for  $B_{MSY}$  under the normal distribution scenario) of management reference points under the normal distribution and log-normal distribution was less than that under the uniform distribution. It suggested that from the biological perspective, if the harvest rate is settled to more than 0.4, the biomass after 2031 may collapse, and the more conservative management strategy should be settled the harvest rate at 0.3. The probability of  $B_{2031} > B_{MSY}$  is greater than 0.85, and  $MSY$  is about 350 thousand tons. Likewise, if only from the economics perspective, the harvest rate is controlled at 0.1, the probability of  $B_{2031} > B_{MEY}$  is 1, and the probability of  $B_{2031} < B_{BE}$  is 0, it is able to maximize the economic benefits of fisheries and minimize the probability of economic inefficiency. This bio-economic model based on Bayesian method will be a useful tool for management strategy analysis for Chub mackerel.

**Key words** *Scomber japonicus*; Bayesian approach; Bio-economic model; Management strategy; East China Sea and Yellow Sea

① Corresponding author: CHEN Xinjun, E-mail: xjchen@shou.edu.cn

# 鄱阳湖翘嘴鳊(*Siniperca chuatsi*)的生物学 参数及资源量的估算\*



吴 斌<sup>1</sup> 方春林<sup>1①</sup> 张燕萍<sup>1</sup> 傅培峰<sup>1</sup> 陈文静<sup>1</sup>  
熊小英<sup>2</sup> 周辉明<sup>1</sup> 贺 刚<sup>1</sup> 王 生<sup>1</sup> 王庆萍<sup>1</sup>

(1. 江西省水产科学研究所 农业部湖泊渔业资源环境科学观测实验站 南昌 330000;  
2. 江西师范大学地理与环境学院 鄱阳湖湿地与流域研究教育部重点实验室 南昌 330000)

**摘要** 研究基于鄱阳湖渔业资源调查数据,运用软件 FiSAT II 对翘嘴鳊的生物学参数及其资源量进行了初步估算。结果显示,鄱阳湖翘嘴鳊体长范围为 77–526 mm;体长和体重的关系式为  $W = 1.888 \times 10^{-5} L^{3.042}$  ( $R^2=0.951, n=577$ ), von Bertalanffy 生长方程的各参数为:渐进体长  $L_{\infty} = 551.25$  mm, 生长系数  $K = 0.210$ , 理论生长起点年龄  $t_0 = -0.601$ 。总死亡系数  $Z=1.06/a$ , 自然死亡系数  $M=0.44/a$ , 捕捞死亡系数  $F=0.62/a$ , 最适开捕体长为 150 mm。鄱阳湖翘嘴鳊开发率  $E = 0.58$ , 处于资源过度利用状态。鄱阳湖翘嘴鳊的初始资源量估算高达  $1.92 \times 10^4$  t, 最大可持续产量  $MSY$  为 4384.93 t。鄱阳湖翘嘴鳊群体中补充群体和低龄剩余群体的比例明显增加,低龄化和小型化趋势凸显,资源衰退问题突出,但生长潜力依然存在。应采取降低对鄱阳湖翘嘴鳊繁殖群体的捕捞强度、保护产卵场等积极措施来保护这一珍贵的渔业资源。

**关键词** 翘嘴鳊; FiSAT II; 生物学参数; 资源量; 鄱阳湖

**中图分类号** Q178 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)04-0021-06

翘嘴鳊(*Siniperca chuatsi*)属鲈形目、鲈科、鳊属,是一种名贵的经济鱼类,分布于青藏高原外的全国各地,如江苏、上海、浙江、江西、湖北、湖南、广东、安徽等是其主要的产地(李思忠, 1981)。关于翘嘴鳊的生物学、养殖、繁殖、发育、育种和遗传多样性等均有最新报道(卢薛等, 2013; 张进等, 2013; 杨凯等, 2013; 王乾等, 2014; 方刘等, 2014),但鄱阳湖翘嘴鳊的生物学参数和资源量估算尚未见报道。近年来,由于过度捕捞、水生态恶化导致鄱阳湖翘嘴鳊资源破坏。因此,建立科学高效的推算鄱阳湖翘嘴鳊的生物学参数和资源量的方法有利于其资源的开发、利用和评价。江西省水产科学研究所鄱阳湖科考课题

组从 2012 年 8 月–2013 年 12 月先后对鄱阳湖及湖口八里江江段进行了实地渔业资源调查。

基于鄱阳湖翘嘴鳊的调查数据,构建了鄱阳湖翘嘴鳊的体长频率数据库,为了保护鄱阳湖翘嘴鳊资源,对鄱阳湖翘嘴鳊的生物学参数进行了估算,并进一步推算了其资源量。近年来,FAO 开发的 FiSAT II 软件在国内鱼类研究中得到了较为广泛运用(Lawrence *et al*, 2002; Geronimo *et al*, 2004; 杨少荣等, 2010; 吴金明等, 2011; 叶金清等, 2012; 吴斌等, 2013; 刘元文等, 2014; 高春霞等, 2014)。该研究运用 FiSAT II 软件中的相关模块估计了翘嘴鳊的生物学参数和资源量,旨在为管理者制定开发利用渔业资源的政策

\* 鄱阳湖湿地与流域研究教育部重点实验室开放基金(PK2012003)、赣鄱英才 555 工程刀鲚调查专项基金、农业部长江中上游渔业资源环境重点野外科学观测试验站(YWTZ/2014-01)和江西省科技重大专项(20114ABG01100-02-2)共同资助。吴斌, E-mail: wubin@163.com

① 通讯作者: 方春林, 研究员, E-mail: chunlinf@163.com

收稿日期: 2014-08-30, 收修改稿日期: 2014-11-26

提供基础资料,从而实现鄱阳湖翘嘴鳊资源的可持续开发和保护。

## 1 材料与方法

### 1.1 数据来源

2012年8月-2013年12月对鄱阳湖及湖口八里江江段进行了实地渔业资源调查(表1)。随机抽样测定

定置网、流刺网和拖网采集的鄱阳湖翘嘴鳊,力求采样对象为整船次或者整网次的全部渔获数据。共测量了翘嘴鳊 158.8 kg、577 尾,对其进行体长和体重测定,分别精确到 1 mm 和 0.1 g。以采集的翘嘴鳊样品的平均体重为基础,以三峡工程生态与环境监测系统 2013 年度报告中鄱阳湖翘嘴鳊的捕捞产量 320.98 t 为依据,初步推算鄱阳湖翘嘴鳊的捕捞尾数。

表 1 鄱阳湖及湖口八里江江段渔业资源调查概况  
Tab.1 Survey of fishery resources in Poyang Lake and Hukou Bali jiang River

	采样点 Sampling site	编号 Serial number	调查频率 Survey frequency
鄱阳湖 Poyang Lake	都昌 Duchang	01、02	常规网具各 3 次 Conventional nets three times
	瑞洪 Ruihong	03、04	常规网具各 3 次 Conventional nets three times
	莲子湖 Lotus Lake	05	常规网具各 3 次 Conventional nets three times
保护区 Conservation area	星子 Xingzi	06、07	常规网具各 3 次 Conventional nets three times
	程家池湖 Chengjiachi Lake	08	常规网具各 3 次 Conventional nets three times
长江 Yangtze River	湖口八里江 Hukou Bali jiang River	09	常规网具各 3 次 Conventional nets three times

### 1.2 计算方法

采用 Excel(2003)进行数据整理。

**1.2.1 体长和体重关系** 采用 SPSS16.0 对体长和体重相关性进行显著检验,显著性水平为  $P < 0.01$ , 然后采用幂函数拟合体长和体重关系,表达式为:  $W = aL^b$ 。

式中,  $W$  为体重(g);  $L$  为体长(mm);  $a$  为肥满度;  $b$  为幂指数。

**1.2.2 生物学参数** 以 10 mm 为组距(海洋调查规范, 2007), 本研究将体长分为 46 组, 依次为 70-80 mm, 80-90 mm ..... 510-520 mm, 520-530 mm。采用 FiSAT II 软件中的 Shepherd's 法, 对鄱阳湖翘嘴鳊的生长参数  $L_{\infty}$ 、 $K$  进行估算(Gayanilo *et al*, 2005), 理论生长起点年龄  $t_0$  是根据 Pauly(1980)的经验公式获得。

$$\ln(-t_0) = -0.3922 - 0.2752 \ln L_{\infty} - 1.038 \ln K$$

式中,  $t_0$  为理论生长起点年龄;  $L_{\infty}$  为渐进体长;  $K$  为生长系数。

运用 FiSAT 软件中的体长变换渔获曲线法估算总死亡系数( $Z$ ), 采用 FiSAT 中自然死亡率估算模块估算自然死亡率( $M$ ) (Pauly, 1987; 詹秉义, 1995)。

**1.2.3 资源量的估算** 将翘嘴鳊的年渔获尾数按照体长分组录入 FiSAT 软件中的 VPA 模型中, 并输入极限体长( $L_{\infty}$ ), 生长参数( $K$ )、自然死亡系数( $M$ )、最大体长组的捕捞死亡系数( $F_t$ )以及体长与体重关系式中的肥满度( $a$ )和幂指数( $b$ )。最大体长组的捕捞死亡系数以生物学参数推算所得捕捞死亡系数为初始值, 运行软件后即可得出各体长组的捕捞死亡系数与资源尾数, 各体长组的资源尾数之和即为该种在这一水域的年资源尾数, 也称初始资源尾数, 根据体长和

体重关系可以换算得到年资源重量, 也称初始资源重量(詹秉义, 1995)。

### 1.2.4 最大可持续产量和单位补充量渔获量分析

最大可持续产量  $MSY$  采用 Cadima 的经验公式估算:  $MSY = 0.5(Y + MW)$ 。式中,  $Y$  为年均渔获量;  $M$  为自然死亡系数;  $W$  为同一年的年均资源重量(詹秉义, 1995)。

采用 FiSAT II 软件中的 Beverton-Holt 模块中的刀刃式选择假设模型(Knife-edge model)进行相关单位补充量渔获量分析。在 FiSAT II 软件中开发率  $E$  包括以下几种水平: 1)  $E_{max}$ , 指获得最大渔获量的开发率; 2)  $E_{10}$ , 指  $Y/R$  边际增长减少 10% 时的开发率; 3)  $E_{50}$ , 指资源量下降到原始水平 50% 时的开发率。

## 2 结果

### 2.1 鄱阳湖翘嘴鳊体长分布

调查发现, 鄱阳湖翘嘴鳊体长范围为 77-526 mm, 其中 170-260 mm 是优势体长组, 占总个体数的 51.8%, (图 1)。

### 2.2 鄱阳湖翘嘴鳊体长与体重关系

将鄱阳湖翘嘴鳊体长( $L$ , mm)和体重( $W$ , g)进行幂指数曲线拟合, 结果显示, 其体长和体重关系的最优回归方程为  $W = 1.888 \times 10^{-5} L^{3.042}$  ( $R^2 = 0.951$ ;  $P < 0.01$ ;  $n = 577$ ), 即其幂指数值为 3.042, 接近 3, 为等速生长(图 2)。

### 2.3 鄱阳湖翘嘴鳊生长参数及生长方程

鄱阳湖翘嘴鳊为等速生长的鱼类(其幂指数值接

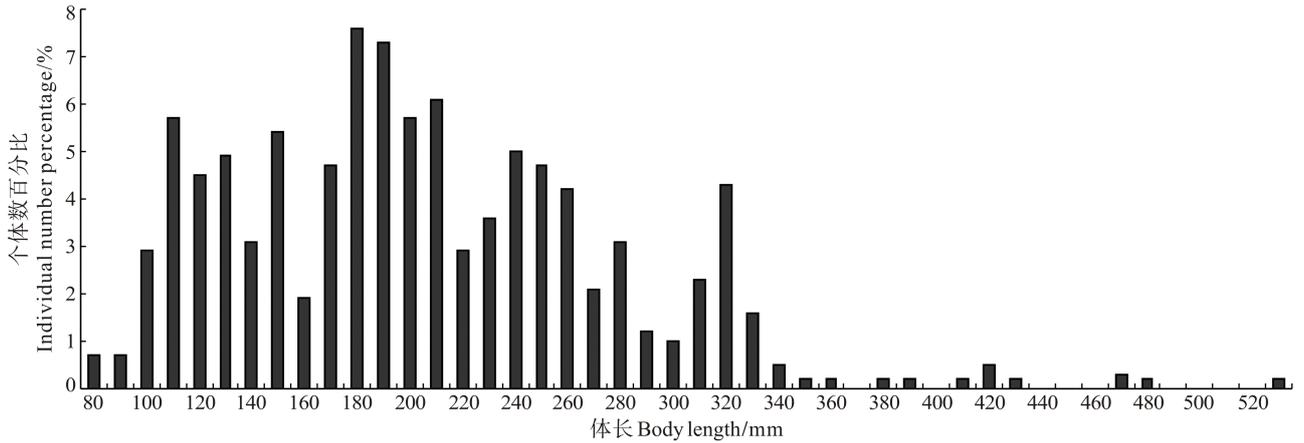


图 1 翘嘴鳊体长分布(mm)  
Fig.1 Distributions of the body length of *S. chuatsi*

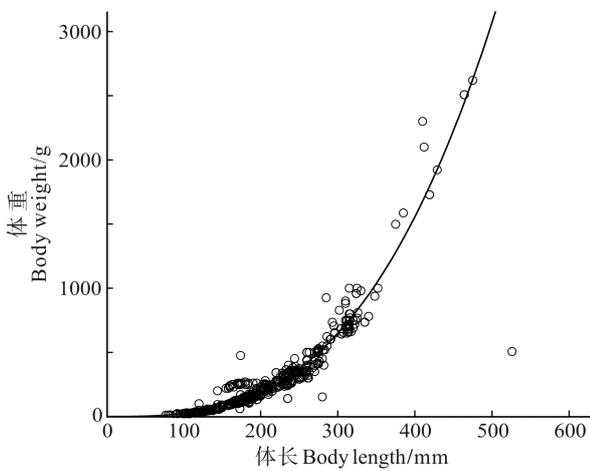


图 2 翘嘴鳊体长和体重关系式  
Fig.2 Length-weight relationship of *S. chuatsi*

近 3), 因此, 可以用 VBGF 生长方程来描述其生长规律。输入体长频率分布数据后, 运行 FiSAT II 软件中的 Shepherd's 法中的  $K$  扫描模块可以自动得到其渐近体长  $L_{\infty}=551.25$  mm, 生长参数  $K=0.210$ 。进一步将上述结果代入公式, 得到鄱阳湖翘嘴鳊理论生长起点年龄  $t_0=-0.601$ , 因此, 其体长、体重生长方程分别为:  $L=551.25(1-e^{-0.210(t+0.601)})$ ;  $W=9807.30(1-e^{-0.210(t+0.601)})^{3.042}$ 。

根据体长变换渔获曲线法估算鄱阳湖翘嘴鳊的总死亡系数, 回归数据点的选取以“未全面补充年龄段和全长接近渐近全长的年龄段不能用来回归”为原则, 选择了 30 个点进行线性回归, 拟合的直线方程为  $\ln(N/t) = -1.06t + 7.64$  ( $R^2=0.890$ ), 该方程的斜率为  $-1.06$ , 95%的置信区间为  $-1.20 - -0.92$ , 鄱阳湖翘嘴鳊的总死亡系数  $Z=1.06$ , 95%的置信区间为  $0.92-1.20$ 。

根据体长频率数据估算的生长参数  $L_{\infty}=55.125$  cm,  $K=0.210$ ,  $T=18.0^{\circ}\text{C}$  (本研究采用鄱阳湖多年平均水温), 代入 Pauly(1980)经验公式计算得出:

鄱阳湖翘嘴鳊的自然死亡系数  $M=0.44$ 。总死亡系数  $Z$  为自然死亡系数  $M$  和捕捞死亡系数  $F$  之和, 体长变换渔获曲线法所得鄱阳湖翘嘴鳊总死亡系数  $Z=1.06$ , 计算出其捕捞死亡系数  $F=0.62$ ; 由  $E= F/Z$  得出鄱阳湖翘嘴鳊的开发率  $E=0.58$ 。

#### 2.4 鄱阳湖翘嘴鳊的初始资源量

为了减少计算的系统误差, 采用的是由估算最大体长组的资源尾数为计算起点, 然后按顺序从大到小逐一算出各体长组的资源尾数, 所得各体长组的资源尾数之和即为该种在这一水域的年资源尾数, 也称初始资源尾数, 根据体长和体重关系可以换算得到年资源重量。输入鄱阳湖翘嘴鳊相关参数, 运用软件中的实际种群分析模块可以得出: 鄱阳湖翘嘴鳊的初始资源尾数(记为  $N$ )为 4977.44 万尾, 初始资源重量(记为  $W$ )为  $1.92 \times 10^4$  t(表 2)。

#### 2.5 鄱阳湖翘嘴鳊的最大可持续产量和相对单位补充量渔获量

采用 Gulland(1997)经验公式估算得 2013 年鄱阳湖翘嘴鳊最大可持续产量  $MSY$  为 4384.93 t。从鄱阳湖翘嘴鳊体长分布来看, 从 110 mm 开始出现峰值, 200 mm 达到最大值。因此, 分别以 110-200 mm 为开捕体长, 通过软件中相对单位补充量渔获量  $Y/R$  与开发率  $E$  的二维分析, 从而得到不同的  $Y/R$  边际增长减少 10%时的开发率  $E_{10}$ , 资源量下降到原始水平 50%时的开发率  $E_{50}$ , 最大渔获量的开发率  $E_{\max}$  (表 3)。当开捕体长为 150 mm 时比较适宜, 其在最适开发率左右, 即  $E=0.508$  时可以达到最大渔获量, 且此时,  $E_{\max}$  与  $E_{10}$  差值处于较低水平, 而  $E_{\max}$  与  $E_{50}$  差值处于中等水平, 表明此状态下, 随着开发率的增加, 其渔获边际量递减水平处于较低水平, 而资源量下降处于中等水平。

表2 翘嘴鳊的初始资源量  
Tab.2 Initial stock biomass of *S. chuatsi*

体长组 Body length (mm)	样品尾数 Sample size	捕捞尾数 Fishing size	初始资源 尾数 N	初始资源 重量 W(t)
1	71-80	4	8084	3924843
2	81-90	4	8084	3748001
3	91-100	17	34356	3575392
4	101-110	33	66691	3381334
5	111-120	26	52544	3161104
6	121-130	28	56586	2961574
7	131-140	18	36377	2764309
8	141-150	31	62649	2593135
9	151-160	11	22230	2401736
10	161-170	27	54565	2256387
11	171-180	44	88921	2084149
12	181-190	42	84879	1884803
13	191-200	33	66691	1697541
14	201-210	35	70733	1535839
15	211-220	17	34356	1377054
16	221-230	21	42440	1260567
17	231-240	29	58607	1141066
18	241-250	27	54565	1011240
19	251-260	24	48502	891660.1
20	261-270	12	24251	783978.2
21	271-280	18	36377	705268.6
22	281-290	7	14147	618746.4
23	291-300	6	12126	558320.2
24	301-310	13	26272	502844.7
25	311-320	25	50523	436664
26	321-330	9	18188	351330.1
27	331-340	3	6063	302899.4
28	341-350	1	2021	269150.6
29	351-360	1	2021	241226.5
30	361-370	0	0	214879.5
31	371-380	1	2021	192011.3
32	381-390	1	2021	168581.3
33	391-400	0	0	146717.6
34	401-410	1	2021	128299.7
35	411-420	3	6063	109289.3
36	421-430	1	2021	88100.7
37	431-440	0	0	72764.7
38	441-450	0	0	60757.11
39	451-460	0	0	49875.98
40	461-470	2	4042	40111.23
41	471-480	1	2021	27890.09
42	481-490	0	0	19428.5
43	491-500	0	0	14152.28
44	501-510	0	0	9741.58
45	511-520	0	0	6181.75
46	521-530	1	2021	3455.26
Σ	577	1166081	49774399	19202

表3 翘嘴鳊的开捕体长与开发率的关系  
Tab.3 Relationship between the catchable size and  
exploitation rate of *S. chuatsi*

开捕体长(mm) Lc	$E_{10}$	$E_{\max}-E_{10}$	$E_{50}$	$E_{\max}-E_{50}$	$E_{\max}$
110	0.369	0.079	0.272	0.176	0.448
120	0.364	0.098	0.277	0.185	0.462
130	0.351	0.125	0.282	0.194	0.476
140	0.407	0.085	0.287	0.205	0.492
150	0.420	0.088	0.293	0.215	0.508
160	0.406	0.119	0.298	0.227	0.525
170	0.457	0.086	0.304	0.239	0.543
180	0.470	0.093	0.310	0.253	0.563
190	0.453	0.131	0.316	0.268	0.584
200	0.506	0.099	0.322	0.283	0.605

### 3 讨论

FAO 开发的体长频率数据分析软件 FiSAT II 中相关模块的运用克服了在推算年龄和生长参数中存在的主观性误差。与传统的以年龄鉴定为基础的研究方法相比, FiSAT II 支持的体长频率法为鱼类的生长参数估算提供了高效路径(高春霞等, 2014)。翘嘴鳊的生长发育较快, 达到渐进体长的速度相对较快, 生长参数是决定鱼类达到其渐进体长的速度的曲率参数, 生命周期与生长参数值呈负相关(Pauly, 1980)。但已有研究也表明, 鄱阳湖鳊鱼生长速度存在减慢的趋势(李达等, 1998)。因此, 理论上说鄱阳湖翘嘴鳊的生长参数应当处于中等水平, 该研究中得出的鄱阳湖翘嘴鳊的生长参数值为 0.210, 大于同时期的鄱阳湖鲤和鲢鱼的生长参数(本课题组待发表资料), 而小于早期鄱阳湖翘嘴鳊的生长参数(陈军等, 2003)。当然, 早期鄱阳湖翘嘴鳊的生长参数估算是基于年龄频率数据, 而该研究是基于体长频率数据。此外, 该研究所得鄱阳湖翘嘴鳊渐进体长远大于早期研究, 这与生长参数相对较小是相一致的, 所得渐进体长与洋圻湖鳊鱼的结果接近(杨代勤等, 1999)。提示标本收集的完整性对于生物学参数估算尤为重要, 这也是该研究的主要优势, 由于地理和时间上的优势, 本课题组获得了相对比较完整的鄱阳湖翘嘴鳊体长体重数据, 取得的样本体长更接近鄱阳湖翘嘴鳊的真实渐进体长, 因此估算出的渐进体长也就更接近其真实体长。

近 10 余年来, 鄱阳湖鱼类种群持续表现为低龄化、小型化, 种群资源不断受到破坏(张堂林等, 2007; 张志永等, 2011; 胡茂林等, 2011)。从捕捞强度来看, 按照 Gulland(1971)提出的关于一般鱼类最适利

用率为 0.5 来判断, 鄱阳湖翘嘴鳊开发率  $E=0.58$ , 资源过度利用的趋势明显。鄱阳湖翘嘴鳊的长江三峡工程生态与环境监测系统中鄱阳湖渔业资源历年监测数据显示: 鄱阳湖鳊鱼产量由 2009 年的 2192.55 t, 到 2013 年的 320.98 t。估算得到 2013 年鄱阳湖翘嘴鳊最大可持续产量为 4384.93 t, 初始资源量为 1.92 万 t, 表明鄱阳湖依然是翘嘴鳊的良好种质资源库。但是, “渔湖”、电捕鱼、密网眼定置网等对湖区渔业资源危害极大的非法网具大范围掠夺性作业, 目前定置网, 甚至电捕鱼已成为鄱阳湖渔民最主要的捕鱼方法, 且网目越来越小, 网具越来越大、越来越多, 非法网具屡禁不止。此外, 根据 2011 年 10 月江西省政协人口资源环境委员会和省科学院、省农业厅有关专家所做的《鄱阳湖渔业资源利用与保护专题调研报告》统计, 2011 年鄱阳湖区有捕捞渔船 3 万艘, 渔业人口 16 万人, 其中, 持证渔船 1 万艘, 渔业人口近 7 万人, 其捕捞强度已经大大超过了鄱阳湖的承受能力。翘嘴鳊捕捞产量的走低, 可能是这些不合理捕捞方式综合影响的结果, 处于快速生长阶段的小规格翘嘴鳊以及作为其饵料的小鱼虾被大量捕捞, 这样翘嘴鳊就得不到充足的生长时间。同时, 近年来, 长期极端的低水位改变了鄱阳湖的生态环境, 入湖水量减少, 使局部江湖水交换不畅, 削弱了湖泊对污染的净化能力, 使鄱阳湖湖区部分水体难以保持良好的水质, 湖区灾害损失承载能力变弱, 难以保证最小生态需水量, 自净能力下降。鉴于水位下降对鄱阳湖洲滩显露的影响, 极端低水位对鄱阳湖湿地结构和功能的长期效应不容忽视。同时, 大量吸螺采蚌不但吸走了大量螺蚌, 也严重破坏了湖底的水草和水质, 导致鱼虾数量急剧减少, 是鄱阳湖翘嘴鳊种群动态变化的另一重要影响因子。

## 参 考 文 献

王乾, 梁旭方, 刘奕鸿, 等. 摄食水平对翘嘴鳊幼鱼体组成、生长、排粪、排泄及氮收支的影响. 华中农业大学学报, 2013, 32(5): 89-94

方刘, 梁旭方, 郭小泽, 等. 多级分养策略对翘嘴鳊幼鱼生长及水质的影响. 淡水渔业, 2014, 44(5): 108-112

叶金清, 徐兆礼, 陈佳杰, 等. 基于生长和死亡参数变化的官井洋大黄鱼资源现状分析. 水产学报, 2012, 36(2): 238-246

刘元文, 薛莹, 魏邦福, 等. 海州湾 5 种主要鱼类种群参数估算. 中国水产科学, 2014, 21(1): 125-133

卢薛, 孙际佳, 王海芳, 等. 大眼鳊与翘嘴鳊正反交及其正交子代自交的胚胎发育观察. 中国水产科学, 2013, 20(5):

975-981

杨代勤, 陈芳, 方长琰, 等. 洋圻湖鳊鱼的食性及生长特性. 水利渔业, 1999, 19(3): 11-13

杨少荣, 马宝珊, 孔焰, 等. 三峡库区木洞江段圆口铜鱼幼鱼的生长特征及资源保护. 长江流域资源与环境, 2010, 19(2): 52-57

杨凯, 高银爱, 丹成, 等. 翘嘴鳊养殖与野生群体及其家系的遗传多样性分析. 淡水渔业, 2013, 43(3): 3-8

吴金明, 姜必云, 赵海涛, 等. 赤水河鱼类资源量的初步估算. 水生态学杂志, 2011, 32(3): 99-103

吴斌, 方春林, 贺刚, 等. FiSAT II 软件支持下的体长股分析法探讨. 南方水产科学, 2013, 10(4): 94-98

李思忠. 中国淡水鱼类分布区划. 北京: 科学出版社, 1981

李达, 杨春, 徐光龙, 等. 鄱阳湖鳊鱼的生物学. 江西农业学报, 1998, 10(4): 14-22

陈军, 郑文彪, 伍育源, 等. 鳊鱼和大眼鳊鱼年龄生长和繁殖力的比较研究. 华南师范大学学报(自然科学版), 2003(1): 110-114

张堂林, 李钟杰. 鄱阳湖湖鱼类资源及渔业利用. 湖泊科学, 2007, 19(4): 434-444

张志永, 刘枚, 彭安成, 等. 胡鄱阳湖鱼类生境面临的主要问题及修复措施探讨. 水生态学杂志, 2011, 32(1): 136-138

张进, 梁旭方, 郭小泽, 等. 翘嘴鳊形态性状对体质量的影响. 华中农业大学学报, 2013, 32(5): 100-105

胡茂林, 吴志强, 刘引兰. 鄱阳湖湖口水域鱼类群落结构及种类多样性. 湖泊科学, 2011, 23(2): 246-250

高春霞, 田思泉, 戴小杰. 淀山湖刀鲚的生物学参数估算及其单位补充量渔获量. 应用生态学报, 2014, 25(5): 1506-1512

海洋调查规范, 第 6 部分: 海洋生物调查 GB/T 12766. 6-2007 詹秉义. 渔业资源评估. 北京: 中国农业出版社, 1995, 312-315

Gulland JA. Fish stock assessment: A manual of basic methods. New York: FAO/ Wiley Ser 1, 1971, 223

Geronimo TS, Len RG. Population parameters and exploitation rate of demersal fishes in Brunei Darussalam (1989-1990). Fish Res, 2004, 69: 73-90

Gayanilo F, Sparre P, Pauly D. The FAO-ICLARM Stock Assessment Tools II (User's Guide). Rome: FAO Computerized Information Series (Fisheries), 2005

Lawrence E, Richard PK, Mfon TU. Breeding, growth, mortality and yield of the mudskipper *Periophthalmus barbarus* (Linnaeus 1766) (Teleostei: Gobiidae) in the Imo River estuary, Nigeria. Fish Res, 2002, 56: 227-238

Pauly D. On the interrelationships between natural mortality, growth parameters, and mean environmental temperature in 175 fish stocks. Jour du Cons, 1980, 39(2): 175-192

Pauly D, Morgan GR. Length-based methods in fisheries research. ICLARM Conference proceedings, 1987

## The Assessment of Biological Parameters and Stock Biomass of *Siniperca chuatsi* in the Poyang Lake

WU Bin<sup>1</sup>, FANG Chunlin<sup>1</sup>①, ZHANG Yanping<sup>1</sup>, FU Peifeng<sup>1</sup>, CHEN Wenjing<sup>1</sup>, XIONG Xiaoying<sup>2</sup>,  
ZHOU Huiming<sup>1</sup>, HE Gang<sup>1</sup>, WANG Sheng<sup>1</sup>, WANG Qingping<sup>1</sup>

(1. Fisheries Research Institute of Jiangxi Province, Scientific Observing and Experimental Station of  
Fishery Resources and Environment in Poyang Lake, Ministry of Agriculture, Nanchang 330000;

2. Key Laboratory of Poyang Lake Wetland and Watershed Research, Ministry of Education, School of  
Geography and Environment, Jiangxi Normal University, Nanchang 330000)

**Abstract** Mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) is a rare and precious economic species of freshwater fish with a long standing reputation because of its fast growth, meat delicate, delicious and nutrient rich. The mature artificial propagation technology has created good conditions for *Siniperca chuatsi* large-scale cultivation since 1980 s. However, the wild *Siniperca chuatsi* population is declining due to over exploitation and environmental pollution in their habitat, which may cause the decline of genetic diversity. Mandarin fish is one of abundant species in Poyang Lake and plays an important role in the lake ecosystem. Based on Poyang Lake fishery resources investigation data, we assessed biological parameters and stock biomass of *Siniperca chuatsi* using FiSAT II software. The results indicated that the length of *Siniperca chuatsi* population ranged from 77 to 526 mm, and that the relationship between body length (mm) and body weight (g) can be expressed as  $W = 1.888 \times 10^{-5} L^{3.042}$  ( $R^2=0.951$ ,  $n = 577$ ). The estimated parameter for von Bertalanffy growth equation was  $L_{\infty}= 551.25$  mm,  $K= 0.210$ , and  $t_0 = -0.601$ . Total mortality ( $Z$ ) was  $1.06 \text{ a}^{-1}$ ; natural mortality was ( $M$ )  $0.44 \text{ a}^{-1}$ ; fishing mortality ( $F$ ) was  $0.62 \text{ a}^{-1}$ ; the optimum catchable size was 150 cm. The exploitation rate was 0.58, which is in the situation of over exploitation. The initial stock of *Siniperca chuatsi* in the Poyang Lake was up to  $1.92 \times 10^4$  tons, and the Maximum sustainable yield ( $MSY$ ) was 4384.93 tons. The recruitment and young surplus populations of the spawning stock increased significantly in the reproductive population. Low-age and miniaturization tendency was obvious; however, the growth potential was still high based on the growth equation. The results suggest that active strategies such as reducing fishing intensity of the reproductive population and protecting the spawning grounds are imperative to maintain this precious fishery resources.

**Key words** *Siniperca chuatsi*; FiSAT II; Biological parameters; Resource; Poyang Lake

① Corresponding author: FANG Chunlin, E-mail: chunlinf@163.com

# 崂山湾中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) 增殖放流的效果评价\*



袁伟 林群 王俊<sup>①</sup> 孙坚强 陈瑞盛

(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** 为了评价崂山湾中国对虾的增殖效果,2012年5月在崂山湾分两批次放流中国对虾15673万尾。2012年7-9月开展了中国对虾跟踪与回捕调查,进行了中国对虾放流苗种存活生长状况、洄游分布及回捕情况的研究,并应用“Bhattacharya”法区分了中国对虾的自然群体与放流群体。结果显示,8月中旬中国对虾放流苗种主要生活在崂山湾中部海域,第1、2批放流苗种的平均体长分别达到144.9、130.5 mm,随着水温的降低,作季节性短距离的由浅水向深水区移动,放流种群和自然种群分别占总群体的92%和8%;由于受到竞争生物及栖息地环境因素的影响,中国对虾放流群体的回捕率仅为0.58%。虽然相比其他海域中国对虾的回捕率较低,但是崂山湾中国对虾增殖放流仍然取得了一定的生态、经济和社会效益。

**关键词** 中国对虾;崂山湾;自然群体;放流群体;回捕率

**中图分类号** S931.5 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)04-0027-08

崂山湾北起山东青岛市崂山区与即墨交界处(36°19'24"N, 120°38'23"E)外延3000 m;南至崂山头(36°08'07"N, 120°42'48"E)外延1000 m,包括鳌山湾和小岛湾。整个湾长约30.6 km,宽约9.5 km,域内面积115.5 km<sup>2</sup>,水深8-10 m,最深处19 m,崂山湾基础生产力较高,生物资源丰富。由于渔业资源的过度捕捞以及海洋生态环境的不断恶化,近几年来崂山湾渔业资源开始衰退。多年实践证明,渔业资源增殖已经成为修复水域生态环境和恢复渔业资源的重要手段(姜浪波,2005)。为了改善崂山湾渔业资源结构,促进当地渔业经济的增长,山东省及青岛市渔业部门在此进行了中国对虾等放流品种的增殖工作。

中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)隶属于十足目、对虾科、对虾属,为一年生暖温性、长距离洄游的大型虾类,经济价值高。本研究选取黄海近海典型

渔业水域崂山湾作为研究海域,研究放流中国对虾个体的生长和洄游分布,探讨中国对虾放流群体和自然群体的判别方法,科学地进行中国对虾增殖放流的效果评价,为保护崂山湾海洋生物多样性、提高增殖放流群体的资源利用效率、优化中国对虾增殖放流策略提供科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 增殖放流及调查方法

中国对虾放流苗种由青岛水产种苗产业化基地(鳌山)提供,平均个体体长为11 mm。该苗种2012年5月1日孵化,5月25日投放第1批次;5月10日孵化,6月6日投放第2批次,放流地点位于青岛鳌山镇柴岛头,放流尾数总计15673万尾。

\* 国家科技支撑计划项目(2012BAD18B01)、国家重点基础研究发展计划项目(2011CB409805)、公益性行业(农业)科研专项项目(201003068)、农业部黄渤海渔业资源环境科学观测实验站和山东省泰山学者专项基金共同资助。袁伟, E-mail: yuanwei@ysfri.ac.cn

<sup>①</sup> 通讯作者: 王俊, 研究员, E-mail: wangjun@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-05-25, 收修改稿日期: 2014-07-23

2012年7-9月,进行了5次中国对虾的跟踪和回捕调查,调查船为14.7 kW单拖渔船,每站拖网1 h,拖速2.5 kn。共设置20个调查站位(图1),调查网具:底拖网,网口高为10 m,宽为10 m,囊网网目尺寸为13 mm。中国对虾回捕统计,采用社会走访和海上调查相结合的方法。依据海洋调查规范,记录数据并用直尺和天平测量中国对虾样品,进行体长、体重等生物学测定。

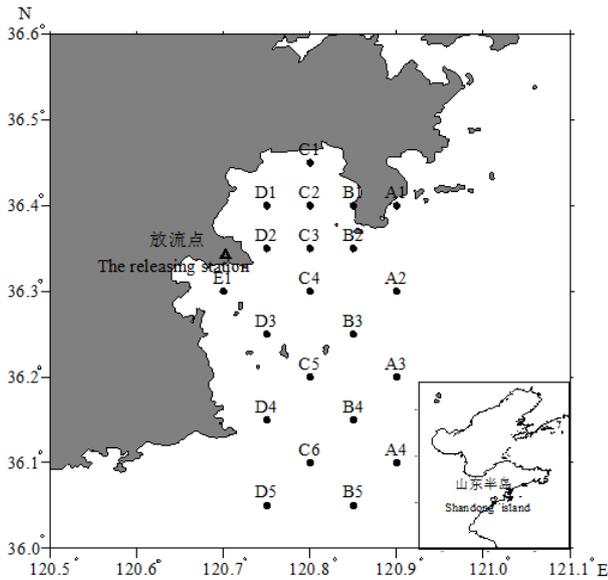


图1 崂山湾调查站位

Fig.1 Sampling stations in the Laoshan Bay

## 1.2 增殖群体和自然群体的属性判别

增殖群体和自然群体的判别区分目前还是增殖放流效果评价中的一个难点。在渔业资源本底调查中发现,崂山湾水域确有中国对虾自然群体分布,有效判别中国对虾的自然群体和增殖群体有利于更好的评估崂山湾中国对虾的增殖效果。中国对虾自然群体的产卵期为5月上、中旬,6月初发育成仔虾,仔虾快速生长,于6月下旬逐渐成为补充群体,并为渔业所利用(唐启升等,1990)。崂山湾中国对虾增殖苗种的孵化时间与自然群体存在一定时间间隔。鉴于对虾早期发育较为迅速,较短时间间隔即可形成明显体长差异,本研究利用“Bhattacharya”分析法对调查渔获物中对虾的自然群体和增殖苗种进行区分,其具体方法如下:

首先,假设不同群体的体长频率分布呈正态分布,利用体长分布确定可能的年龄,对连续频度去自然对数( $\ln[N_{i+1}/N_i]$ )并对对应的体长频率组( $L_i$ )上界作图,所形成的直线斜率应为负值,然后利用线性回归

(式1)分析该直线:

$$\ln\left(\frac{N_{i+1}}{N_i}\right) = a_j + b_j \cdot L_i \quad (1)$$

式中, $N_i$ 和 $N_{i+1}$ 为第 $j$ 个年龄组分的连续个体长频次, $L_i$ 为 $N_i$ 的上界。第 $j$ 个正态分布的平均值为:

$$L_j = -\frac{a_j}{b_j} \quad (2)$$

其标准差( $\sigma$ )为:

$$\sigma_j = \left(-\frac{\Delta L}{b_j}\right)^{1/2} \quad (3)$$

式中, $\Delta L$ 为体长组群。

体长频度组分离为一个迭代过程,其中,每个已经确定的组分将通过高斯函数(式4)从剩余组分中剔除:

$$N_{2i+1} = N_{i+1} - \left\{ \left( \frac{1}{\sigma_j \sqrt{2\pi}} \right) \cdot \exp \left[ -\frac{(L_i - L_j)^2}{2\sigma_j^2} \right] \right\} \quad (4)$$

式中, $N_{i+1}$ 为前一个频度组, $N_{2i+1}$ 为新的频度组。

重复执行上述步骤,直到无正态分布可以确定为止(Hasselblad,1966; Bhattacharya,1967; Pauly *et al*,1985; Sparre *et al*,1998)。最后,利用最大似然法(NORMSEP)改善“Bhattacharya”法获得平均体长、种群规模和标准差数据。上述程序均利用 FiSAT II 软件计算(Gayanilo *et al*,1994)。

“Bhattacharya”法可以将几个混合正态体长频度分布分离出来,同时可以得到各组分平均体长、种群数量及各组群标准差,并最终得出不同群体占总渔获的比例。依据种群分离指数(Separation index,  $SI$ )可判断“Bhattacharya”法结果的可信度, $SI > 2$ 可信度高;反之,则相对较低(Garcia *et al*,1981)。

## 2 结果与分析

### 2.1 中国对虾放流群体和自然群体的判别

崂山湾增殖放流中国对虾5次跟踪调查的资源状况如表1所示。中国对虾的捕捞系数参照叶昌臣等(1987)预报渤海区秋汛对虾渔获量时所采用的0.75,8月1日调查中国对虾的相对丰度最高为374.37 ind./km<sup>2</sup>,8月17日调查中国对虾的相对资源量最高为10.94 kg/km<sup>2</sup>,7月13日调查捕获的中国对虾相对丰度和相对资源量均为最低,分别为14.4 ind./km<sup>2</sup>和0.29 kg/km<sup>2</sup>。

7月13日进行第1次跟踪调查,捕获中国对虾3尾,主要分布在鳌山湾湾口附近,不分雌雄群体,平均体长和体重分别为(116.7±12.3) mm和(13.5±3.5) g。根据中国对虾的 von Bertalanffy 生长方程(雌虾为:

表 1 崂山湾中国对虾 5 次跟踪调查的资源状况  
Tab.1 The stock assessment of fleshy prawn in the Laoshan Bay through five surveys

调查日期 Survey date	相对尾数 Relative number (ind./km <sup>2</sup> )	相对资源量 Relative biomass (kg/km <sup>2</sup> )	体长范围 Range of body length (mm)	体重范围 Range of body weight (g)
07-13	14.40	0.29	103-127	9.60-16.30
08-01	374.37	9.22	114-157	12.20-40.50
08-17	331.17	10.94	131-172	23.40-54.30
09-05	57.60	2.30	128-183	31.10-58.70
09-26	19.29	1.15	150-207	29.20-86.10

$L_t=201.3[1-e^{-0.018(t-25)}]$ ,  $W_t=91.8[1-e^{-0.018(t-25)}]^3$ ; 雄虾为:  $L_t=163.5[1-e^{-0.0168(t-9)}]$ ,  $W_t=49.1[1-e^{-0.0168(t-9)}]^3$ , 式中,  $t$  为日龄,  $L_t$ 、 $W_t$  分别为  $t$  龄的体长和体重进行估算(邓景耀等, 2000), 放流对虾苗种尚未达到调查网具的捕捞规格, 因此, 判断本航次捕获的 3 只中国对虾为自然群体。

8 月 1 日实施了第 2 次跟踪调查, 捕获中国对虾 78 尾, 雌性群体平均体长和体重分别为(138.9±8.6) mm 和(27.2±4.9) g; 雄性群体平均体长和体重分别为(129.6±6.7) mm 和(20.8±3.4) g; 不分雌雄群体平均体长和体重分别为(135.2±9.1) mm 和(24.7±5.3) g。运用“Bhatt-

acharya”分析法进行分析, 此次调查捕获的中国对虾分为两个群体, 两个群体的平均体长分别为 129.6、141.8 mm, 占渔获的比例分别为 48.5%和 32.2%, 体长频率分布如图 2 所示, 种群分离指数( $SI$ )最大值为 1.98 小于 2, 参考中国对虾的生长方程进行的估算值(表 2), 仅能初步判断这两个群体分别为放流群体和自然群体, 尚不能具体区分放流群体的批次。

8 月 17 日实施了第 3 次跟踪调查, 捕获中国对虾 93 尾, 雌性群体平均体长和体重分别为(155.2±10.6) mm 和(36.7±6.8) g; 雄性群体平均体长和体重分别为(144.8±8.4) mm 和(29.6±5.7) g; 不分雌雄群体平均体长和体重分别为(149.6±10.8) mm 和(32.9±7.2) g。运用“Bhattacharya”分析法, 结果显示, 捕获的中国对虾呈现 3 个不同的体长群体, 体长分别为 144.9、130.5、166.6 mm, 3 个群体的种群分离指数( $SI$ )均大于 2, 参考中国对虾的生长方程进行的估算值(表 2), 可以判断这 3 个群体分别为第 1、2 批放流群体和自然群体, 其中, 放流群体所占比例总和约为 92%(第 1 批放流群体占 75.4%, 第 2 批放流群体占 16.6%), 自然群体为 8%, 中国对虾放流群体所占的比重远高于自然群体。

中国对虾开捕后, 9 月 5 日实施了第 4 次跟踪调

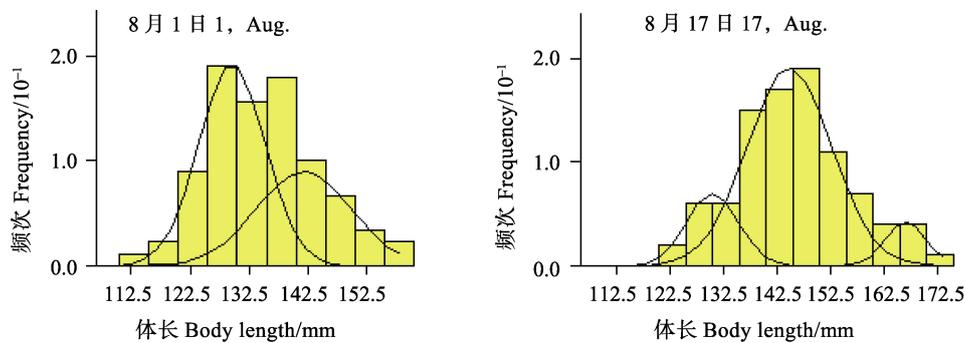


图 2 8 月崂山湾中国对虾渔获的体长频率分布  
Fig.2 The length-frequency distribution of fleshy prawn in the Laoshan Bay in August

表 2 中国对虾实际体长和理论计算体长  
Tab.2 The measured and theoretical body length of fleshy prawn

调查时间 Survey date	第 1 批对虾理论体长 Theoretical body length of the first group(mm)		第 2 批对虾理论体长 Theoretical body length of the second group(mm)		捕捞对虾实际体长 Measured body length(mm)	
	雌 Female	雄 Male	雌 Female	雄 Male	雌 Female	雄 Male
07-13	99.7	97.5	79.7	85.4	123±4.9	103
08-01	138.8	121.6	126.5	113.9	138.9±8.6	129.6±6.7
08-17	155.3	131.9	146.2	126.2	155.2±10.6	144.8±8.4
09-05	168.0	140.2	161.5	135.9	176.5±11.8	152.1±10.1
09-26	178.5	147.1	178.5	144.1	202.3±5.0	131.7±31.8

查, 捕获中国对虾 18 尾, 平均体长和体重分别为  $(160.2 \pm 15.7)$  mm 和  $(40.5 \pm 11.4)$  g; 9 月 26 日实施了第 5 次跟踪调查, 捕获中国对虾 6 尾, 平均体长和体重分别为  $(183.6 \pm 26.4)$  mm 和  $(60.5 \pm 23.7)$  g。由于两个航次捕获的中国对虾数量较少, 无法用 “Bhattacharya” 分析法进行区分放流群体和自然群体。

## 2.2 放流中国对虾的移动扩散规律

根据跟踪与回捕调查以及生产船捕捞记录, 崂山

湾放流中国对虾作季节性短距离的浅水区-深水区移动。图 3 为 7-9 月中国对虾在崂山湾的移动分布图。调查结果显示: 7 月中旬, 中国对虾放流苗种和野生群体共同栖息于放流点沿岸海域。8 月初, 中国对虾已经迁移到崂山湾中部的大管岛、马儿岛附近海域; 8 月下旬, 对虾继续向南向东迁移扩散, 南部已经移动到崂山头附近海域, 栖息密度也在不断增加, 最高值为  $1.21 \times 10^3$  ind./km<sup>2</sup>。9 月开始, 主要在水深大于 15 m 的海区捕获到中国对虾, 此时底层水温相对较高。8 月

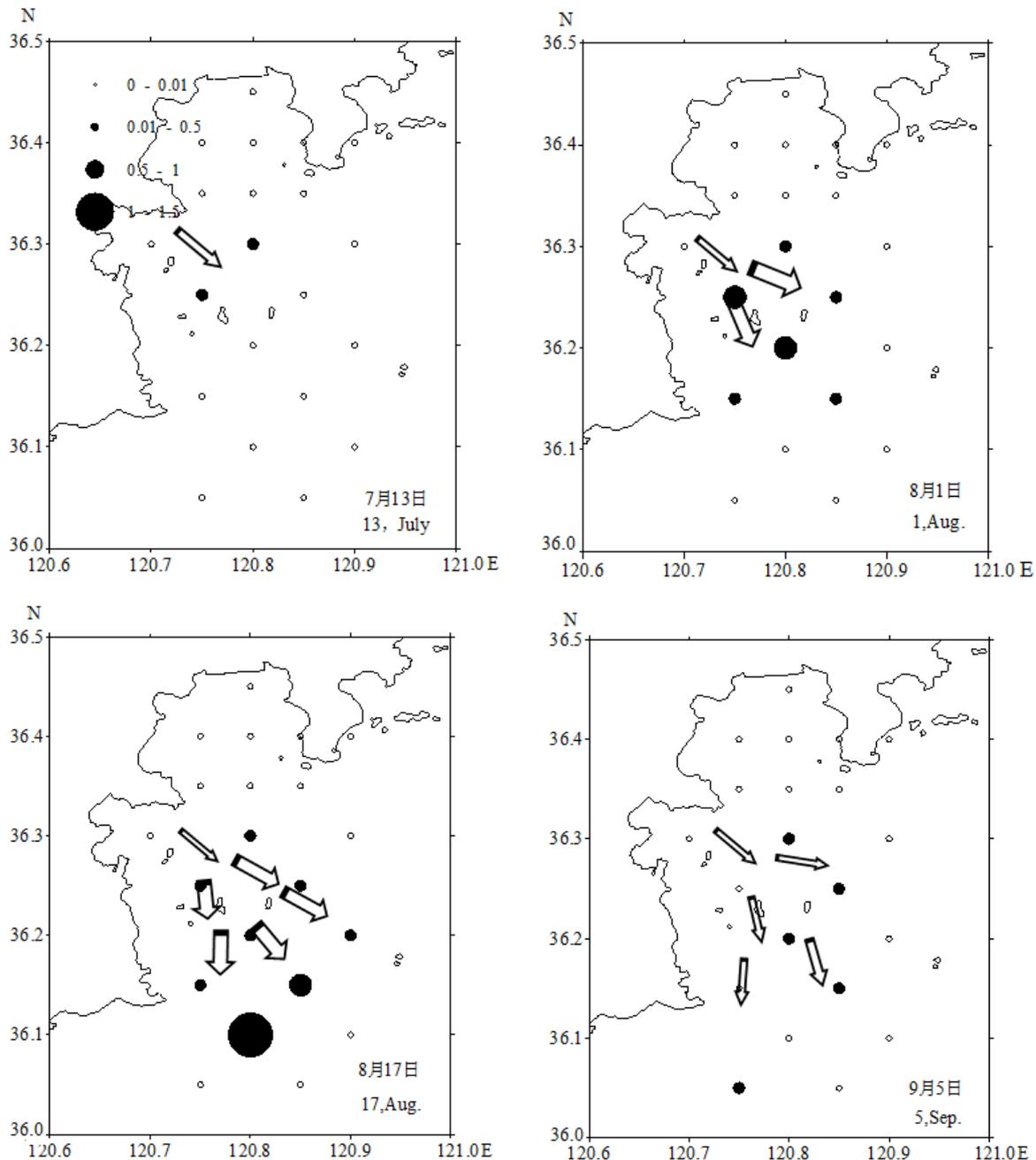


图 3 崂山湾中国对虾移动分布(图例:  $\times 10^3$  ind./km<sup>2</sup>)

Fig.3 Spatial distribution of fleshy prawn in the Laoshan Bay(Legend:  $\times 10^3$  ind./km<sup>2</sup>)

底禁渔期结束,大量中国对虾作业船只进入崂山湾海域,9月中国对虾的数量急剧减少。在放流点以东的鳌山湾内未能发现中国对虾,可能受到湾内筏式养殖的影响。

### 2.3 放流中国对虾的存活率与回捕率

研究对虾放流后在崂山湾海域的存活率是评估增殖放流效果的一个重要内容,影响放流对虾苗种存活的因素包括放流计数时的机械损伤、放流海域海洋环境的突然变化、敌害生物和竞争生物的存在、渔业生产活动的影响等。崂山湾是典型的渔业生物产卵场,5-8月的渔获物中均出现大量的叫姑鱼、短吻红舌鳎、虾虎鱼幼鱼,以及口虾蛄、日本鼓虾等,这些渔业生物基本上与对虾存在食物及生存空间上的竞争关系,同时在放流地点附近有筏式养殖,对放流对虾种苗的存活生长构成了不小的压力。

8月中国对虾的主要分布区位于崂山湾的中部海域,没有对虾进入鳌山湾,利用扫海面积法(Gulland, 1965)对湾区中国对虾放流群体的资源量进行估算,结果显示,8月中旬崂山湾中国对虾放流苗种的资源量为3.53万尾,放流对虾苗种的数量为15673万尾,存活率为0.02%。

增殖放流的回捕率是放流苗种的渔获尾数与放流数量的比值,据调查统计,自8月20日开捕至10月底,崂山湾放流海域捕捞中国对虾的作业渔船约450艘,累计捕获中国对虾约39674 kg,各月按回捕调查中8月17日、9月5日和9月26日样品的平均体重分布计算,回捕尾数合计99.66万尾(表3),以临近开捕前8月17日调查中国对虾放流群体占总渔获的比例计算,捕获中国对虾放流苗种91.69万尾,根据中国对虾回捕渔获量和放流群体在混合群体中所占比例计算回捕率,回捕率约为0.58%。

表3 中国对虾回捕数据  
Tab.3 Recapture statistic data of fleshy prawn

项目 Items	时间 Time			合计 Total
	8月 August	9月 September	10月 October	
渔获量 Catches(kg)	10989	23825	4860	39674
渔获尾数 Number(ind.)	395288	523626	77698	996612

注: 渔获尾数按8月17日、9月5日和9月26日调查的平均体重换算

Note: the numbers of recapture were calculated by the average body weight of the survey on 17th August, 5th September and 26th September, respectively

## 3 讨论

### 3.1 放流群体和自然群体的判别

有效区分放流种类的放流群体和自然群体是评估增殖放流效果的基础,目前的方法主要包括:

(1) 传统方法 通过耳石、鳞片等生物体部分组织的特征进行年龄鉴定(朱国平, 2011a; 沈建忠等, 2000), 脂褐质(Lipofuscin)也能准确反映年龄的大小(Sohal *et al*, 1986; Kodama *et al*, 2005), 这种方法工作量比较大, 进行群体年龄鉴定十分困难。

(2) 数学模型法 通过计算体长频率来估算种群年龄组成。其中,最常用的方法是基于最小二乘法的 Solver 方法, Aizawa 等(1999)和 Gorie 等(2002)通过改进,后发展为 MS-Excel Solver 法,依据此种方法, Okuda 等(2005)等对日本水生海发光鲷的年龄组成和种群特征进行了分析,姜亚洲等(2012)对日本对虾的种群进行了区分。另外一个主要方法是基于极大似然法的 Hasselblad(1996)方法,通过学者的不断改进以及应用软件平台的不同,又衍生出混合分布分析(Fitting mixture distribution to length-density)(左涛等, 2012)、“Bhattacharya”分析法(朱国平等, 2011b)、基于 ELEFAN 技术的体长频率分析法(Bellido *et al*, 2000; Jaiswar *et al*, 2003)等,这些方法已经被广泛用于南极磷虾、鲑等渔业生物上。

“Bhattacharya”分析法采用了最大似然手段分离体长频度数据的正态分布组分,估算结果更准确,本研究采用了此方法进行分析。结果显示,8月17日航次对虾种群  $SI$  大于2,此时,中国对虾群体可以分为3个不同的种群,分别为第1、2批放流群体和自然群体,其中,放流群体占比例92%,自然群体比例为8%;8月1日航次所求得结果中分离指数小于2,可信度相对较低;由于9月的两个航次捕获的中国对虾数量较少,无法用“Bhattacharya”分析法进行区分放流群体和自然群体。叶昌臣等(2002)估算了黄海北部混合虾群中放流虾和野生虾的比例,二者所占比例分别为88.7%和11.3%;刘海映等(1994)也估算了黄海北部野生对虾的比例,平均约为7%。可见中国对虾的自然群体的数量不多,所占比例基本维持在10%这个水准。“Bhattacharya”分析法用于分析种群年龄结构可行。

基于理论体长和实际捕获体长的“Bhattacharya”法要受到崂山水域的个体生长差异、自然对虾群体的产卵时间、批次问题以及区分两类群体的理论体长和实际体长差异标准等诸多因素的影响,为了增加方法的可靠性和准确性,还需要做进一步的研究工作,比如除

了在自然群体产卵集中期放流外,尽量早或晚适当地增加放流批次,提高理论体长和实际体长的可对比性。

### 3.2 对虾迁移分布特征

中国对虾喜栖息在泥沙质海底,其幼苗有返滩习性,体长小于70 mm时,主要栖息于5 m水深以内的浅水区,生长至50–80 mm时,开始向较深水域移动,由于本研究是在7月中旬开始调查,调查水域水深均大于5 m,故没有捕获放流对虾,得到的对虾为自然个体,可见在放流开始至7月中旬,中国对虾一直栖息于放流点附近沿岸海域。

8月初,崂山湾中国对虾开始迁移到5–10 m水深区域,此时,对虾个体长度为120–160 mm,马儿岛、大管岛附近出现数量较多的对虾,至8月中下旬,对虾向东向南移动,数量众多的对虾群体最南端已经到达崂山头,这个海域水深20 m余,流速较大,少量的对虾群体最东端到达南岛附近。

8月底–9月初,禁渔期结束,大量船只开始捕捞对虾,在较短的时间内中国对虾资源量急剧下降,导致对虾的迁移速度减缓,迁移数量锐减。9月初,南向迁移的中国对虾已经脱离崂山湾海域,进入北黄海,东向迁移的对虾在强大的捕捞压力下已经所剩无几。

### 3.3 回捕效果

放流群体的回捕率大小是评价放流效果的主要指标,本研究根据青岛市海洋与渔业局的统计资料及现场回捕调查统计数据,去掉野生群体的数量,得出崂山湾中国对虾的回捕率为0.58%。以往调查研究,中国对虾的回捕率为2%–20%(刘瑞玉等,1993),本课题组还在胶州湾进行了对虾分子家系标志放流的工作,通过计算求得在胶州湾对虾的回捕率为2.70%。结果显示,崂山湾对虾的回捕率要远低于以往的调查结果,造成回捕率较低的原因可能有以下4个方面:(1)崂山湾海域叫姑鱼、短吻红舌鲷、口虾蛄、三疣梭子蟹、日本鲟、双斑鲟、鹰爪虾、日本鼓虾等底栖食性生物与中国对虾存在着不同程度的食物竞争,尤其是作为优势种的口虾蛄和双斑鲟,其数量最高占总渔获量的40.3%。(2)近几年,青岛沿海频繁发生浒苔灾害。崂山湾为半开放海域,大量浒苔进入湾内。作者在7–8月调查期间,拖网渔获物中出现大量浒苔。沉入海底的浒苔腐败变质,造成底层水体缺氧,影响渔业生物的生长,也可能导致中国对虾的死亡率增加。(3)崂山湾为半开放性的海湾,中国对虾的活动范围较大,在湾内停留时间较短,然后容易迁移到湾外。(4)休渔期期间非法偷捕现象时有发生,加之

回捕统计数量的误差,也是造成回捕率较低的原因之一。影响放流对虾回捕率的因素是多方面的,其他原因有待于进一步分析研究。

### 3.4 放流效果

崂山湾内基础生产力高,生物种类繁多,在此进行中国对虾的增殖放流,能产生较好的经济、生态效益和社会效益。中国对虾放流苗种8月集中在崂山湾中部进行索饵育肥,形成较大的渔业生物群体,8月中旬第1、2批放流对虾的平均体长分别达到130.5 mm和144.9 mm,均达到拖网作业的捕捞规格,至开捕时,对虾已经成为经济价值最高的渔业生物种类,给当地渔民带来了较大的经济利益。截止到10月底,在崂山湾及附近海域作业船只共捕获中国对虾约39674 kg,按平均售价180元/kg计算,经济收益为714.13万元左右。

在崂山湾放流对虾可以增加渔业生物的多样性,丰富青岛沿海捕捞品种的资源量,在形成一定规模的捕捞群体的同时,还能形成繁殖群体及补充群体,7月调查发现的3尾对虾及8月中旬对虾群体中的自然群体均为补充群体。对虾的增殖放流生态效益明显,对于保护崂山湾海洋生物多样性与海洋生态平衡,促进海洋渔业资源的可持续利用具有重要意义。

增殖放流是一项公益性事业,通过放流仪式、媒体的报道、张贴宣传画等多种宣传方式,使全民自觉保护资源的意识得到进一步加强;同时增殖放流使捕捞渔民的收入明显增加,从而促进渔区社会稳定。增殖渔业的发展将会带动捕捞业、水产品加工业、船舶维修业、商业及餐饮业的发展,增加就业人员,提高渔民收入,具有较高的社会效益。

**致谢:**感谢中国水产科学研究院黄海水产研究所王伟继老师在中国对虾分子标记家系培育方面所做的工作。

## 参 考 文 献

- 叶昌臣, 邓景耀, 韩光祖. 用世代分析方法估算秋汛渤海对虾世代数量. 海洋与湖沼. 1987, 18(6): 540–548
- 叶昌臣, 宋辛, 韩德武. 估算混合虾群中放流虾与野生虾比例的报告. 水产科学, 2002, 21(4): 31–33
- 左涛, 赵宪勇, 黄洪亮, 等. 南极半岛邻近水域南极大磷虾商业捕捞群体的年龄结构时空变化. 渔业科学进展, 2012, 33(4): 1–10
- 邓景耀, 叶昌臣. 渔业资源学. 重庆: 重庆出版社, 2000, 304
- 朱国平. 金枪鱼类耳石微化学研究进展. 应用生态学报, 2011a, 22(8): 2211–2218
- 朱国平, 吴强, 冯春雷, 等. 基于渔业调查的南极半岛北部水

- 域南极磷虾种群年龄结构分析. 生态学报, 2011b, 31(6): 4620–4627
- 刘海映, 王文波. 黄海北部中国对虾放流增殖回捕率研究. 海洋水产科学, 1994(15): 1–7
- 刘瑞玉, 崔玉珩, 徐风山. 胶州湾对虾标志放流回捕率分析. 海洋科学, 1993, 6: 39–42
- 刘瑞玉, 崔玉珩, 徐风山. 胶州湾中国对虾增殖效果与回捕率的研究. 海洋与湖沼, 1993, 24(2): 137–142
- 沈建忠, 曹文宣, 崔奕波. 用鳞片 and 耳石鉴定鲫年龄的比较研究. 水生生物学报, 2001, 25(5): 462–466
- 姜亚洲, 凌建忠, 林楠, 等. 象山港日本对虾增殖放流的效果评价. 生态学报, 2012, 32(9): 2651–2658
- 姜浪波. 浅析渔业资源增殖放流. 中国水产, 2005, (12): 72–75
- 唐启升, 叶懋中. 山东近海渔业资源开发与保护. 北京: 农业出版社, 1990
- Aizawa Y, Takiguchi N. Consideration of the methods for estimating the age-composition from length frequency data with MS-Excel. Bull Jpn Soc Fish Oceanogr, 1999, 63: 205–214 (in Japanese)
- Bellido JM, Pierce GJ, Romero JL, *et al.* Use of frequency analysis methods to estimate growth of anchovy (*Engraulis encrasicolus* L. 1785) in the Gulf of Cadiz (SW Spain). Fisher Res, 2000, 48(2): 107–115
- Bhattacharya CG. A simple method of resolution of a distribution into Gaussian components. Biometrics, 1967, 23(1): 115–135
- Garcia S, Reste LL. Life cycle, dynamics, exploitation and management of coastal penaeid shrimp stocks. FAO Fish. Tech. Paper, 1981, 203: 215–216
- Gayanilo FCJr, Sparre P, Pauly D. FAO-ICLARM stock assessment tools (FISAT) user's guide//FAO Computerized Information Series (Fisheries), No 8. Rome: FAO, 1994: 124–124
- Gorie S. Estimation of parameters in a mixture of normal distributions from length frequency composition and growth formula by MS-Excel. Suisanzoshoku, 2002, 50: 243–249 (in Japanese)
- Gulland JA. Manual of methods for fish stock assessment. Part 1. Fish population analysis. FAO Fish Tech Pap, 1965, 68
- Hasselblad V. Estimation of parameters for a mixture of normal distributions. Technometrics, 1966, 8(3): 431–444
- Jaiswar AK, Chakraborty SK, Raja Prasad R, *et al.* Population dynamics of lizard fish *Saurida tumbil* (*Teleostomi/Synodontidae*) from Mumbai, west coast of India. Indian J Mar Sci, 2003, 32(2): 147–150
- Kodama K, Yamakawa T, Shimizu T, *et al.* Age estimation of the wild population of Japanese mantis shrimp *Oratosquilla oratoria* (Crustacea: Stomatopoda) in Tokyo Bay, Japan, using lipofuscin as an age marker. Fisheries Science, 2005, 71(1): 141–150
- Okuda N, Hamaoka H, Omori K. Life history and ecology of the glowbelly *Acropoma japonicum* in the Uwa Sea, Japan. Fisheries Science, 2005, 71(5): 1042–1048
- Pauly D, Caddy JF. A modification of Bhattacharya's method for the analysis of mixtures of normal distributions. FAO Fisheries, 1985
- Sohal RS, Wolfe LS. Lipofuscin: characteristics and significance. In: Swaab DF, Fliers E, Mirmiran M, Van Gool WA, Van Haaren F (eds). Progress in Brain Research, 1986, 170: 171–183
- Sparre P, Ursin E, Venema SC. Introduction to tropical fish stock assessment. FAO Fisheries Technical Paper. Rome: Food and Agricultural Organization of the United Nations, 1998, 306(1): 337–337

(编辑 陈严)

## Assessment of Enhancement Effectiveness of Chinese Shrimp *Fenneropenaeus chinensis* Stock in the Laoshan Bay

YUAN Wei, LIN Qun, WANG Jun<sup>①</sup>, SUN Jianqiang, CHEN Ruisheng

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

**Abstract** Fleshy prawn *Fenneropenaeus chinensis* is one of the most important species for stock enhancement in the Laoshan Bay. To evaluate the potential effectiveness of releasing fleshy prawn stock enhancement, we analyzed the survival rate, growth rate, migratory pattern, and recapture rate of the released fleshy prawn using the Bhattacharya method based on the monitoring and recapture survey of fleshy prawn from July to September 2012 in the Laoshan Bay. We found that the released prawn mainly inhabited in inner or middle part of the Laoshan Bay, in which the sediments were sandy or sand-mud substratum. In mid-August, the mean body length of the first and second batch released fleshy prawn were 144.9 mm and 130.5 mm, respectively. The ratios of the released and wild fleshy prawns to the total population were 92% and 8%, respectively. The fleshy prawn moved from shallow water to deep water when the water temperature decreased. During the study period (from late August to early October), a total of 0.996 million released prawns were collected with the 0.58% mean recapture rate of fleshy prawn in the Laoshan Bay, which might be explained by the food competition, enemy creature and habitat destruction. Although the recapture rate of fleshy prawn was low, the ecological, economic and social benefits were still gained from the stock enhancement of fleshy prawn in the Laoshan Bay.

**Key words** *Fenneropenaeus chinensis*; Laoshan Bay; Natural population; Stock population; The recapture rate

---

① Corresponding author: WANG Jun, E-mail: wangjun@ysfri.ac.cn

# 獐子岛海域浮游植物的粒径结构及碳流途径\*

蒋增杰<sup>1</sup> 杜美荣<sup>1</sup> 姜 绪<sup>1</sup> 梁 峻<sup>2</sup> 赵学伟<sup>2</sup>  
刘 毅<sup>1</sup> 张 媛<sup>2</sup> 张晓芳<sup>2</sup> 方建光<sup>1①</sup>



(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所  
碳汇渔业实验室 青岛 266071; 2. 獐子岛集团股份有限公司 大连 116001)

**摘要** 根据2011年6月、10月、12月和2012年4月4个航次对獐子岛海域水温、分粒径Chl *a*浓度、透明度等参数的调查数据,分析了该海域Chl *a*浓度的时空变化特征,探讨了浮游植物的粒径结构、光合固碳能力及碳流途径。研究结果显示,獐子岛海域表、底层Chl *a*浓度年变化范围分别为0.07–6.28 μg/L和0.16–5.28 μg/L,年平均浓度分别为(1.60 ± 1.38) μg/L和(1.31 ± 1.10) μg/L,存在显著的季节差异( $P < 0.05$ )和空间分布的不均匀性,表、底层Chl *a*含量秋、春季节差异极显著( $P < 0.01$ )。表、底层浮游植物粒径组成均以微型浮游植物(Nano-phytoplankton)为主,贡献率分别为50.85%和44.64%。典范对应分析(CCA)结果表明,NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>和NH<sub>4</sub><sup>+</sup>的3种形态无机营养盐对微型浮游植物有显著的影响,而水温和NO<sub>2</sub><sup>-</sup>对微微型浮游植物(Pico-phytoplankton)影响显著。该海域初级生产力变化范围为40.31–1017.64 mg C/(m<sup>2</sup>·d),平均为(386.07 ± 281.80) mg C/(m<sup>2</sup>·d)。超过38.3%的总初级生产通过微食物环向高营养级传递并入经典食物链,微食物环在獐子岛虾夷扇贝养殖生态系统中扮演着重要角色。

**关键词** 粒径结构; 浮游植物; 微食物环; 虾夷扇贝; 獐子岛

**中图分类号** S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)04-0035-09

浮游植物是海洋生态系统的重要组成部分,是海洋食物网的基础环节,在生态系统的物质循环和能量流动过程中起到了至关重要的作用(Falkowski *et al.*, 1998)。獐子岛海域地处黄海北部外长山列岛最南端,是我国北方重要的海珍品生态养殖基地之一,拥有全国最大的虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)养殖基地。作为虾夷扇贝主要的食物来源,浮游植物的相关研究引起了科研工作者的关注,如张继红等(2008)、尹洁慧等(2013)<sup>1</sup>分别对獐子岛海域不同季节Chl *a*浓度变化情况进行了调查研究,张雪等(2013)<sup>2</sup>对獐子岛

海域浮游植物的群落结构及其与虾夷扇贝的食性关系进行了研究,但迄今为止,尚未见有关浮游植物粒径结构方面的研究报道。研究表明,不同粒径的浮游植物具有不同的生态学意义,在生态系统中担负着不同的生态功能(宁修仁, 1997; Froneman *et al.*, 2004)。本研究根据2011年6月、10月、12月和2012年4月4个航次对獐子岛海域的调查数据,分析了该海域Chl *a*浓度的时空变化特征,探讨了浮游植物的粒径结构及其对微食物环的碳流贡献,研究结果对于准确评估虾夷扇贝的养殖容量、揭示微食物环在养殖生态

\* 国家科技支撑计划课题(2011BAD13B05)、中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金獐子岛碳汇专项(20603022011003)和国家贝类产业技术体系(CARS-48)共同资助。蒋增杰, E-mail: jiangzj@ysfri.ac.cn

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

收稿日期: 2014-06-19, 收修改稿日期: 2014-07-30

1) 尹洁慧. 獐子岛海域浮游动物群落时空变化特征及其与环境因子之间的关系. 中国科学院海洋研究所博士研究生学位论文, 2013, 11–15

2) 张雪. 獐子岛邻近水域浮游植物群落结构及其与虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)食性关系的研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2013, 55–69

系统中的贡献、保障虾夷扇贝产业的健康可持续发展提供了数据支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 站位设置

2011年6月、10月、12月在獐子岛海域设置14个站位进行调查,2012年4月将调查区域向南适当扩大,调查站位调整为12个(图1)。

### 1.2 样品采集及分析方法

样品的采集与保存按照《海洋调查规范》(GB/T 12763-2007)进行。用Niskin采水器在各站采集表层(水下1.0 m)、底层(底上1.0 m)水样,迅速导入2 L取样桶中,4℃冷藏保存、备用。表、底层水温(T)、盐度(S)、溶解氧(DO)、pH等水质参数利用便携式水质分析仪(美国YSI公司,Professional Plus)现场测定。透明度的测定采用透明度盘。

水样带回实验室后,准确量取500 ml水样过滤到0.45 μm的醋酸纤维素滤膜上,用于测定各站位Chl *a*总浓度;另取500 ml水样依次过滤于孔径为20 μm筛绢、2 μm、0.45 μm的醋酸纤维素滤膜上,用于测定3个不同粒级浮游植物的Chl *a*浓度,即>20 μm的小型浮游植物(Micro-phytoplankton)、2-20 μm的微型浮游植物(Nano-phytoplankton)和<2 μm的微微型浮游植物(Pico-phytoplankton)。滤膜用铝箔包裹后,置于-20℃冰箱内冷冻保存,低温避光条件下,用90%的丙酮萃取24 h,取上清液,用Turner Designs荧光光度计测定Chl *a*浓度。

初级生产力采用叶绿素估算法中的经验模式法,具体方法参照蒋增杰等(2012)。不同季节的日出、日落时间由中国天气网 <http://www.weather.com.cn/weather/101121304.shtml> 获得。

### 1.3 数据处理及统计分析

差异显著性检验及相关性分析采用SPSS 17.0软件, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著;根据方差齐次性检验结果,选择多重比较方法(当方差具有齐次性时,选择“LSD”,当方差不具有齐次性时选择“Tamhane's T2”)。等值线的绘制采用Surfer 7.0软件。粒径分级Chl *a*含量与主要环境因子间的关系采用典范对应分析(Canonical Correspondence Analysis, CCA),分析过程使用Canoco for windows 4.5按照国际通用标准完成。

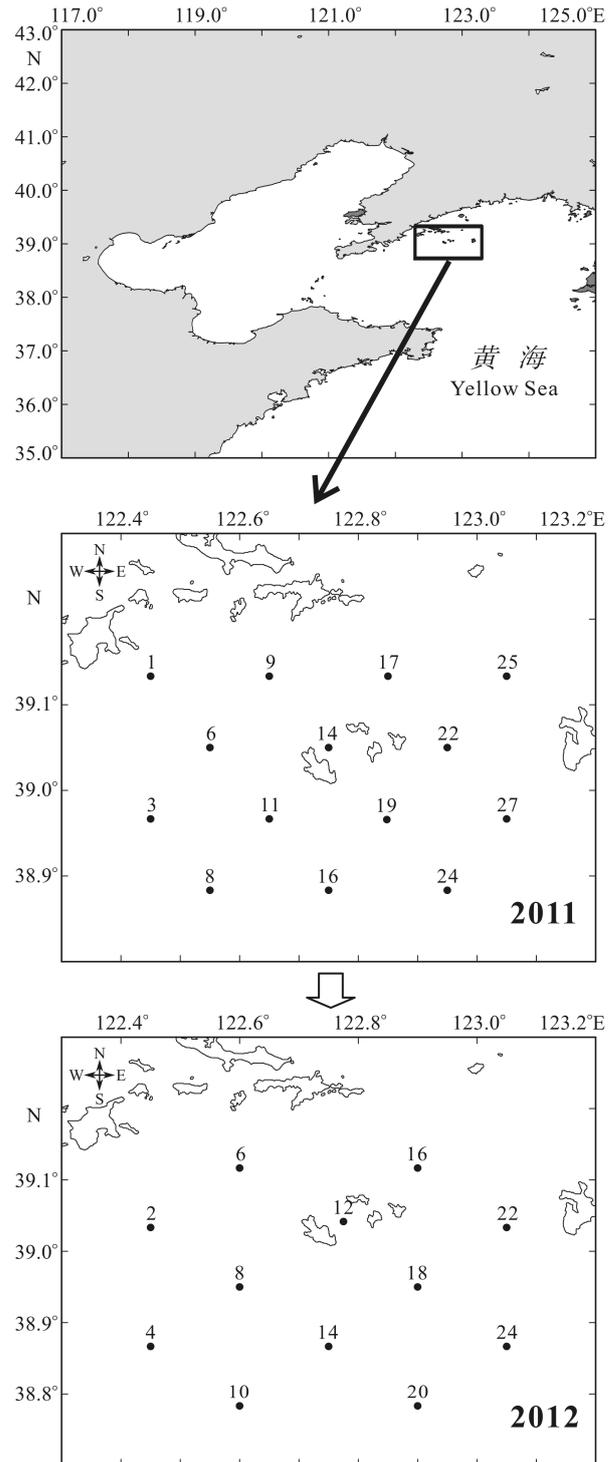


图1 獐子岛海域调查站位

Fig.1 Investigation stations in the coastal area of Zhangzidao Island

## 2 结果

### 2.1 水温、透明度的时空变化特征

獐子岛海域表、底层水温时空分布特征见图2。从图2中可以看出,各个季节水温的平面分布较为均

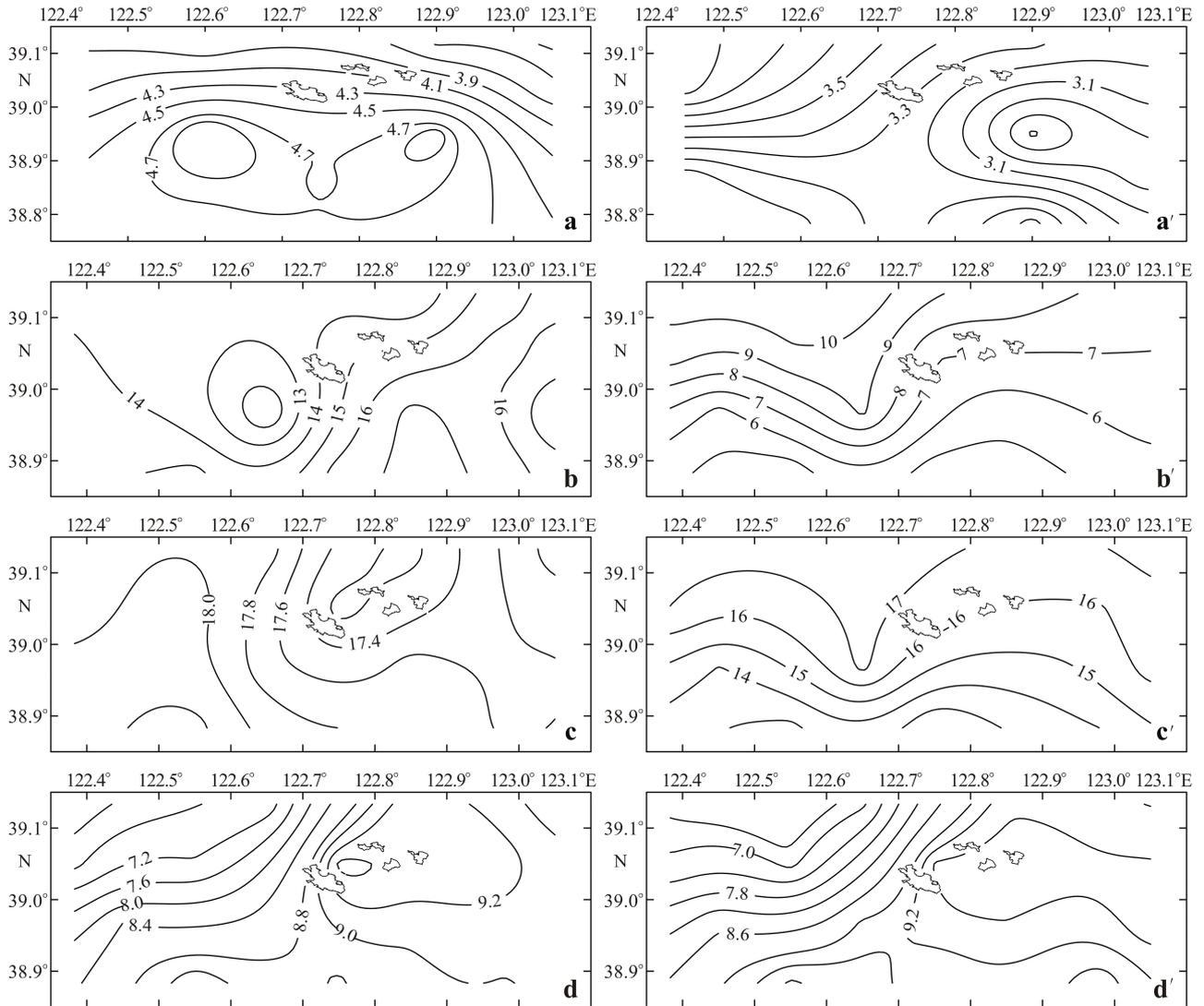


图 2 獐子岛海域表层(水下 1.0m)、底层(底上 1.0m)水温平面分布特征

Fig.2 Seasonal and spatial distribution of seawater temperature (°C) for the surface water (1.0 m beneath the surface) and bottom water (1.0 m above the seabed) in the coastal area of Zhangzidao Island

表层: a) 春季, b) 夏季, c) 秋季, d) 冬季, 底层: a') 春季, b') 夏季, c') 秋季, d') 冬季

Surface: a) spring, b) summer, c) autumn, d) winter, bottom: a') Spring, b') Summer, c') Autumn, d') Winter

匀,但从垂直分布来看,夏季表层水温显著高于底层 ( $P < 0.01$ ),温差达  $7.5^{\circ}\text{C}$  左右,秋、冬、春季节表层水温虽高于底层,但差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

獐子岛海域透明度的平面分布见图 3。从图 3 中可以看出,该海域的透明度较高,变化范围在 2.1–8.3 m 内,均值为  $(4.7 \pm 1.3)$  m,透明度均值春季最大,达 5.3 m,季节差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

## 2.2 Chl a 浓度及初级生产力的时空变化特征

獐子岛海域表、底层 Chl a 浓度的时空变化特征见图 4、图 5。獐子岛海域表、底层 Chl a 浓度的年变化范围分别为  $0.07\text{--}6.28 \mu\text{g/L}$  和  $0.16\text{--}5.28 \mu\text{g/L}$ , 均值

分别为  $(1.60 \pm 1.38) \mu\text{g/L}$  和  $(1.31 \pm 1.10) \mu\text{g/L}$ , 季节差异显著 ( $P < 0.05$ ), 秋季表层海水的 Chl a 浓度最高。

Chl a 的空间分布呈现不均匀特征,秋季表层 Chl a 浓度显著高于底层 ( $P < 0.01$ ), 而春季表层 Chl a 浓度显著低于底层 ( $P < 0.01$ )。夏季表层 Chl a 浓度虽高于底层但差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 冬季表、底层 Chl a 浓度相近。从平面分布来看,夏季表层 Chl a 浓度高值区出现在獐子岛与裕链岛、大耗子岛的中间海域,秋、冬、春季表层 Chl a 浓度高值区出现在獐子岛西北侧海域,夏季底层 Chl a 浓度高值区出现在獐子岛正北偏西海域,而秋、冬季节底层 Chl a 浓度高值区出现在獐子岛南偏西海域,春季底层 Chl a 浓度在獐

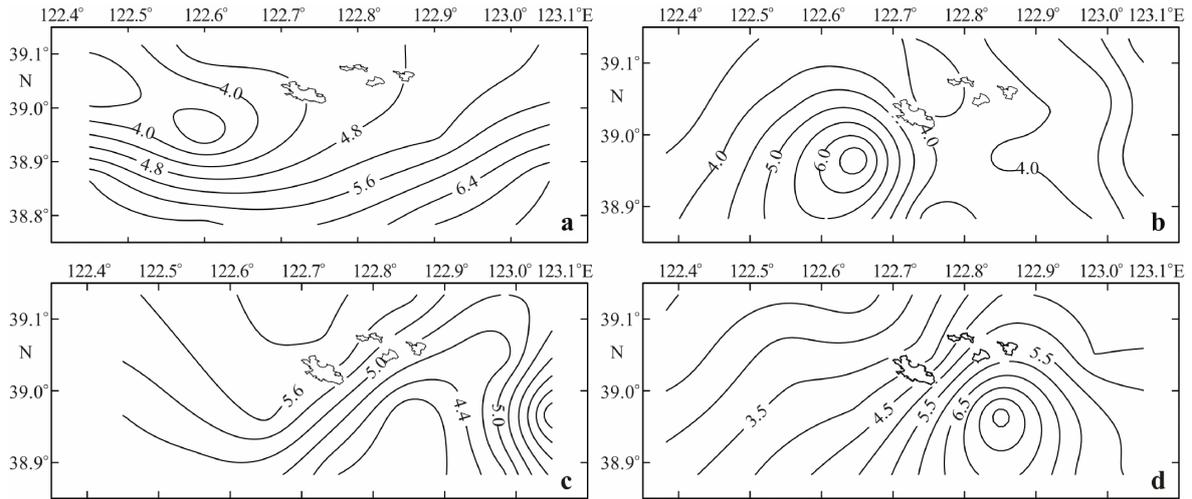


图 3 獐子岛海域透明度时空变化特征 a) 春季, b) 夏季, c) 秋季, d) 冬季

Fig.3 Seasonal and spatial variations of transparency in the coastal area of Zhangjizdao Island: a) spring, b) summer, c) autumn, d) winter

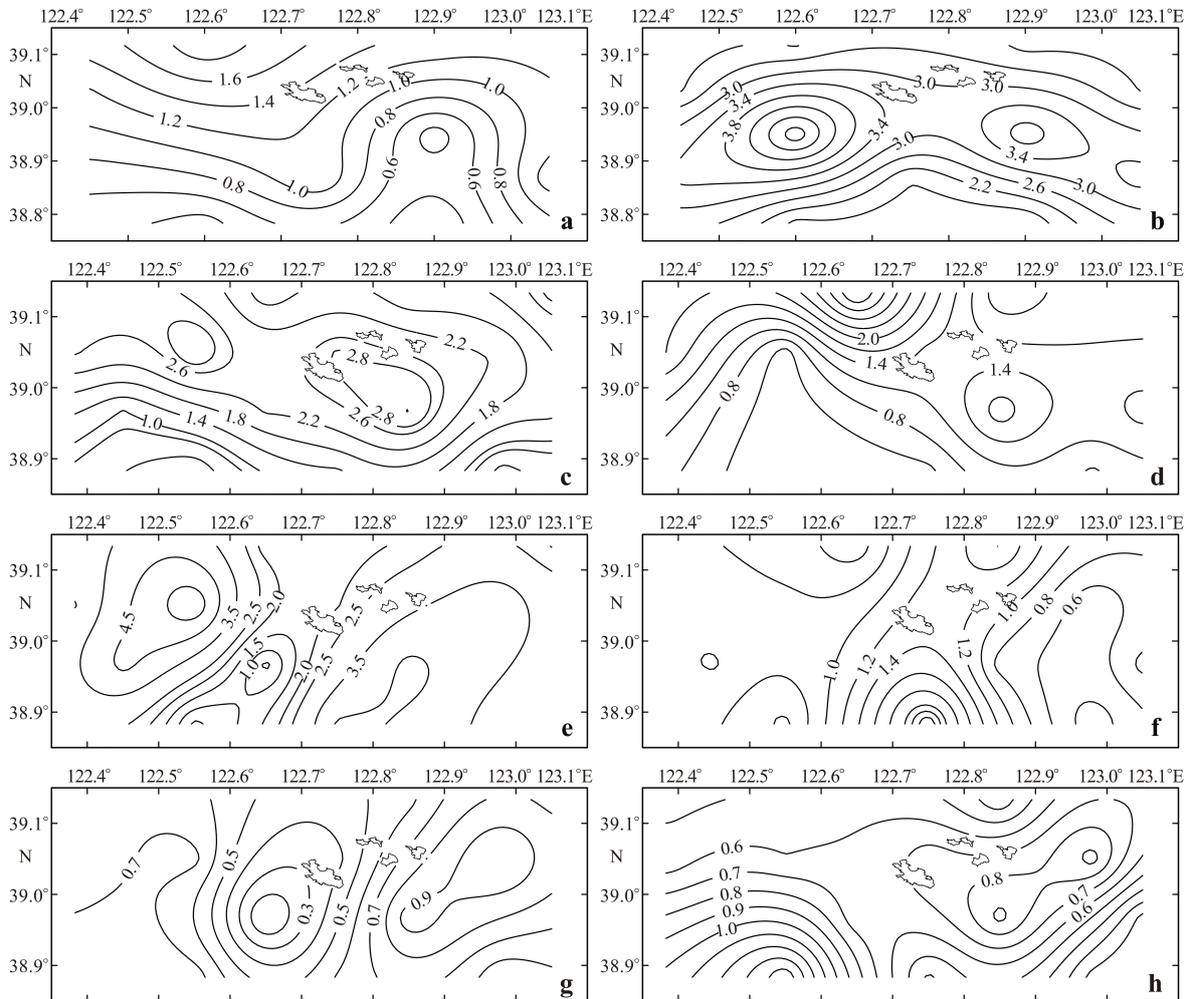


图 4 獐子岛海域表层(水下 1.0 m)、底层(底上 1.0 m)叶绿素 a ( $\mu\text{g/L}$ ) 平面分布特征

Fig.4 Spatial distribution of Chl a concentration ( $\mu\text{g/L}$ ) for the surface water (1.0 m beneath the surface) and bottom water (1.0 m above the seabed) in the coastal area of Zhangjizdao Island

表层: a) 春季, c) 夏季, e) 秋季, g) 冬季, 底层: b) 春季, d) 夏季, f) 秋季, h) 冬季

Surface: a) spring, c) summer, e) autumn, g) winter, bottom: b) spring, d) summer, f) autumn, h) winter

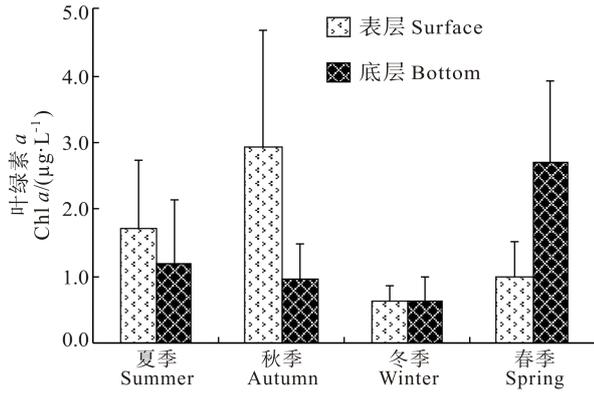


图 5 獐子岛海域表、底层 Chl a 浓度的季节变化  
Fig.5 Seasonal variations of Chl a concentration in the coastal area of Zhangzidao Island

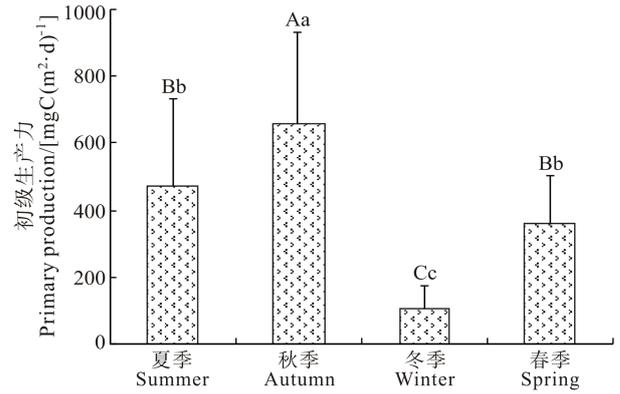


图 6 獐子岛海域初级生产力的季节变化  
Fig.6 Seasonal variations of primary production in the coastal area of Zhangzidao Island

子岛南偏东和南偏西方位形成两个“漩涡状”高值区, 表、底层高值区的分布不一致。

獐子岛海域初级生产力变化范围为 40.31–1017.64 mg C/(m²·d), 平均为 386.07 mg C/(m²·d), 不同季节间存在极显著差异( $P < 0.01$ ) (图 6)。其中, 秋季初级生产力最高, 平均为 655.69 mg C/(m²·d); 夏、春季次之, 分别为 472.15、363.06 mg C/(m²·d); 冬季初级生产力水平最低, 为 106.22 mg C/(m²·d)。LSD 多重比较结果显示, 秋季与冬、春季之间差异极显著( $P < 0.01$ ), 与夏季差异显著( $P < 0.05$ ), 冬季与夏、秋、春季间差异均极显著( $P < 0.01$ )。

### 2.3 浮游植物的粒径结构

獐子岛海域表、底层浮游植物粒径结构见图 7、图 8。从图 7、图 8 中可以看出, 表、底层浮游植物粒径组成均以 nano-浮游植物为主, 年平均贡献率分别为 50.85%和 44.64%, pico-浮游植物在表、底层浮游植物中所占的份额均为最少, 分别为 21.29%和 19.71%(图 7)。从不同季节浮游植物粒径结构来看, 夏季, 表层 nano-和 pico-浮游植物的贡献率相当, 分别占 40.08%和 40.50%, 底层 micro-浮游植物贡献率

注: LSD 检验法进行多重比较, 大写字母表示差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )

Notes: LSD tests for multiple comparisons, capital letter means the significant difference  $P < 0.01$ ; lowercase letter means highly significant difference  $P < 0.05$

略高于 pico-浮游植物和 nano-浮游植物, 三者的贡献率分别为 41.98%、33.41%、24.62%; 秋季, 表、底层均以 nano-浮游植物为主, 贡献率分别达 56.34%和 53.08%; 冬季, 浮游植物粒径结构组成与秋季类似, 表、底层均以 nano-浮游植物为主, 贡献率分别达 56.14%和 56.23%; 春季, 表层 nano-浮游植物占优势地位, 贡献率达 70.07%, 底层 nano-和 micro-浮游植物的贡献率相当, 分别占 43.91%和 45.23%(图 8)。

## 3 讨论

### 3.1 獐子岛海域浮游植物的粒径结构特征

浮游植物的粒径结构与环境(如光照、营养盐水平、海流、温度等)、生物因子(生物摄食强度等)的关系密切(Agawin *et al*, 2000; Kormas *et al*, 2002)。研究表明, 浮游植物在不同环境条件下的竞争优势主要决

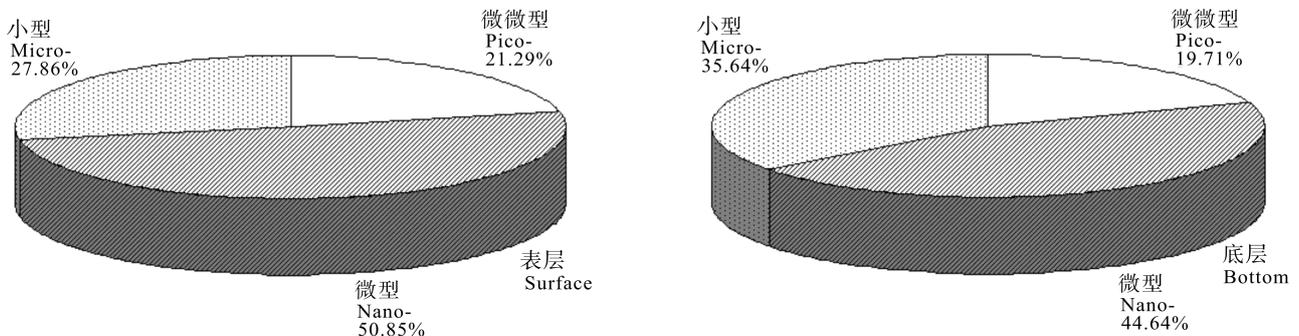


图 7 獐子岛海域表、底层海水不同粒径浮游植物的贡献

Fig.7 Composition of size-fractionated phytoplankton in surface and bottom seawater in the coastal area of Zhangzidao Island

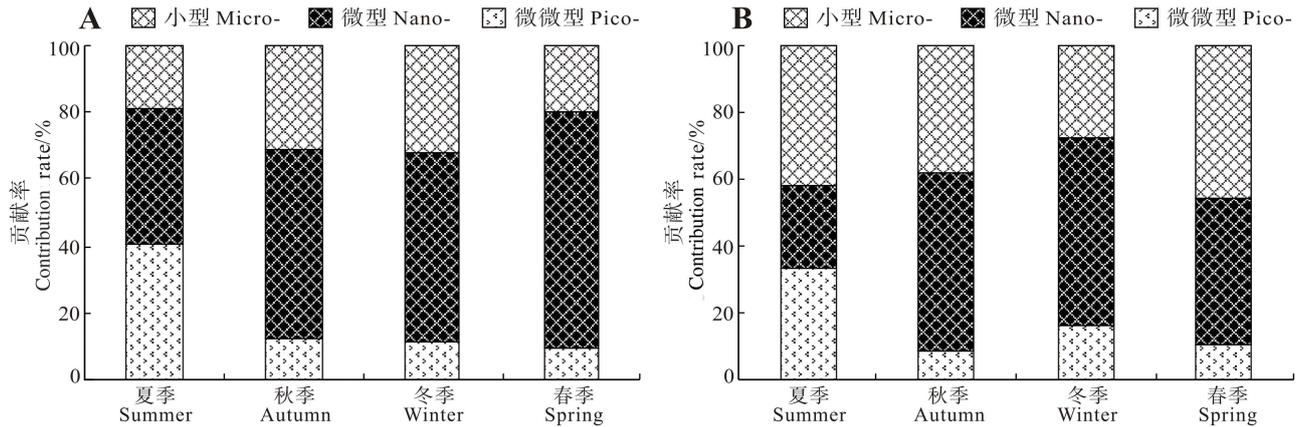


图8 不同季节獐子岛海域表(A)、底层(B)浮游植物的粒径结构  
Fig.8 Seasonal variation of size-fractionated phytoplankton in surface (A) and bottom (B) seawater in the coastal area of Zhangzidao Island

定于粒径差异。在光照、营养盐适宜条件下,粒径较大的浮游植物由于具有较高的内禀增长率,从而在浮游植物群落中具有竞争优势(Cerme *et al*, 2005);在光线较弱、营养盐匮乏条件下,粒径较小的浮游植物由于具有较大的比表面积,吸收营养盐和获取光量子的效率较高,从而在寡营养海域表现出竞争优势(Chen *et al*, 2000; 黄邦钦等, 2006)。獐子岛海域的营养盐水平属于贫营养型(张继红等, 2009),从浮游植物的粒径结构特点来看,秋、冬、春季表、底层浮游植物的粒径结构均表现为 nano-浮游植物占优势,符合学者们普遍认为的浮游植物粒径结构特征。底层水体不同粒径浮游植物叶绿素 *a* 与底层水温、悬浮颗粒有机物(POM)、营养盐等(未发表数据)环境因子典范对应分析(CCA)结果显示,  $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{PO}_4^{3-}$ 、 $\text{NH}_4^+$  的 3 种形态无机营养盐对 nano-浮游植物有显著的影响,而水温、 $\text{NO}_2^-$  对 pico-浮游植物有显著的影响(图 9)。在獐子岛养殖海域,浮游植物粒径结构除了受到营养盐、温度等环境因子的影响外,虾夷扇贝的生理活动也是非常重要的控制因素。研究表明,浮游植物的群落结构受滤食性贝类摄食作用的下行控制(Top-down control)效应和营养盐等因素的上行控制(Bottom-up control)效应影响(Prins *et al*, 1995; 董双林等, 1999; Souchu *et al*, 2001),秋、冬、春季是虾夷扇贝的适宜生长季节,虾夷扇贝的摄食压力及其代谢产物对浮游植物生长的刺激作用两个过程,共同促成了该区域 nano-浮游植物占优势的特点。但值得注意的是,夏季,表、底层微微型浮游植物所占的比例较大,分别达到 40.50%和 33.41%,这种现象可能与该季节北黄海冷水团的消长及其对虾夷扇贝摄食行为的影响(杜兵等, 1996)有关。北黄海冷水团引起的水温急剧波动导致虾夷扇贝生理活动异常,虾夷扇贝对浮游植

物的摄食压力减弱,水温成为控制浮游植物的主要影响因素,傅明珠等(2010)对南黄海 124°E 以西黄海冷水团水域 4 个季节的航次调查也发现,黄海冷水团水域浮游植物群落始终由粒径较小的 nano-和 pico-浮游植物占主导,但这种推测尚需要更多的研究加以证实。

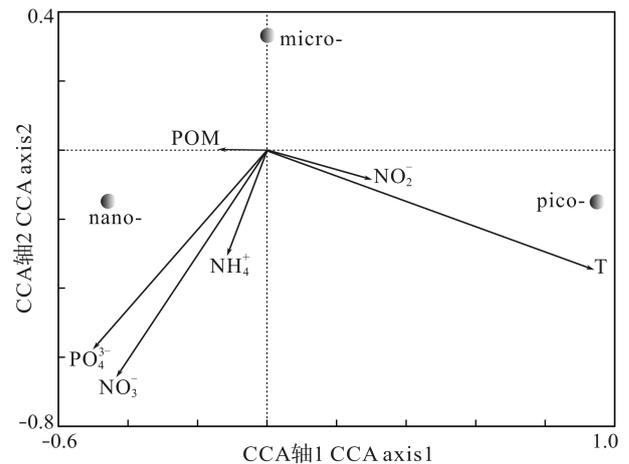


图9 獐子岛海域叶绿素 *a* 粒径与主要环境因子的典范对应分析

Fig.9 CCA analysis of size-fractionated Chl *a* and main environmental factors in the coastal area of Zhangzidao Island

### 3.2 獐子岛海域浮游植物光合固碳的碳流途径

研究表明,浮游植物光合作用形成颗粒态光合有机产物(Photosynthetically produced Particulate Organic Carbon, PPOC)的同时,还释放出一定数量的溶解态光合有机产物(Photosynthetically produced Dissolved Organic Carbon, PDOC)(焦念志等, 1994),通常用 PER(Percentage of Extracellular Release)来表征 PDOD 在总初级生产力中所占的比例。随着“微食物环”概念的提出,浮游植物光合作用过程中释放出的溶解态

有机物的归宿引起了人们的关注。在微食物环中, 溶解有机物被异养细菌利用, 并通过异养浮游细菌、原生动物、桡足类等的摄食关系使离开食物链的溶解有机物通过微食物环并入主食物链(Azam *et al*, 1983; Dupuy *et al*, 2000), 浮游植物释放的溶解有机物对细菌所需营养物质的贡献可达 73%(Peterson 1984)。已有的研究表明, 黄海海域 PER 约为 23.1%(刘诚刚, 2012)<sup>1)</sup>。根据本研究的结果, 獐子岛海域颗粒态光合有机产物 (PPOC) 约为(386.07±281.80) mg C/(m<sup>2</sup>·d), 底层 micro-、nano-、pico-组分对 PPOC 的平均贡献率分别为 35.64%、44.64%和 19.71%。假设虾夷扇贝在与浮游动物竞争摄食 nano-浮游植物方面占据绝对优势, 估算得出, 獐子岛海域光合作用产生的碳有 23.1%经过异养细菌利用进入微食物环, 15.16%的碳通过原生动物的摄食进入微食物环, 超过 38.3%的总初级生产通过微食物环

向高营养级传递并入经典食物链(图 10), 微食物环在獐子岛虾夷扇贝养殖生态系统中扮演着重要角色。但需要指出的是, 该估算是基于 nano-浮游植物全部被扇贝摄食的假设下得出的, 在复杂的生态系统食物链中, 虾夷扇贝与浮游动物在对 nano-浮游植物的摄食分配方面尚需进一步研究加以明确。此外, PDOC 和 pico-浮游植物初级生产要有效传递给虾夷扇贝, 需要经过原生动物这一中间环节(Le *et al*, 1997; Wong *et al*, 2003)。研究表明, 异养鞭毛虫、纤毛虫等原生动物具有较高的营养价值(碳氮比约等于 4), 可作为双壳类的食物来源(Kreeger *et al*, 1996; Dupuy *et al*, 1999; Takashi, 2011)。在这种情况下, 獐子岛海域虾夷扇贝对原生动物的摄食能力及利用效率对于实现碳在不同营养层次生物功能群间的高效流动至关重要, 虾夷扇贝与原生动物之间的摄食关系将是下一步的研究重点。

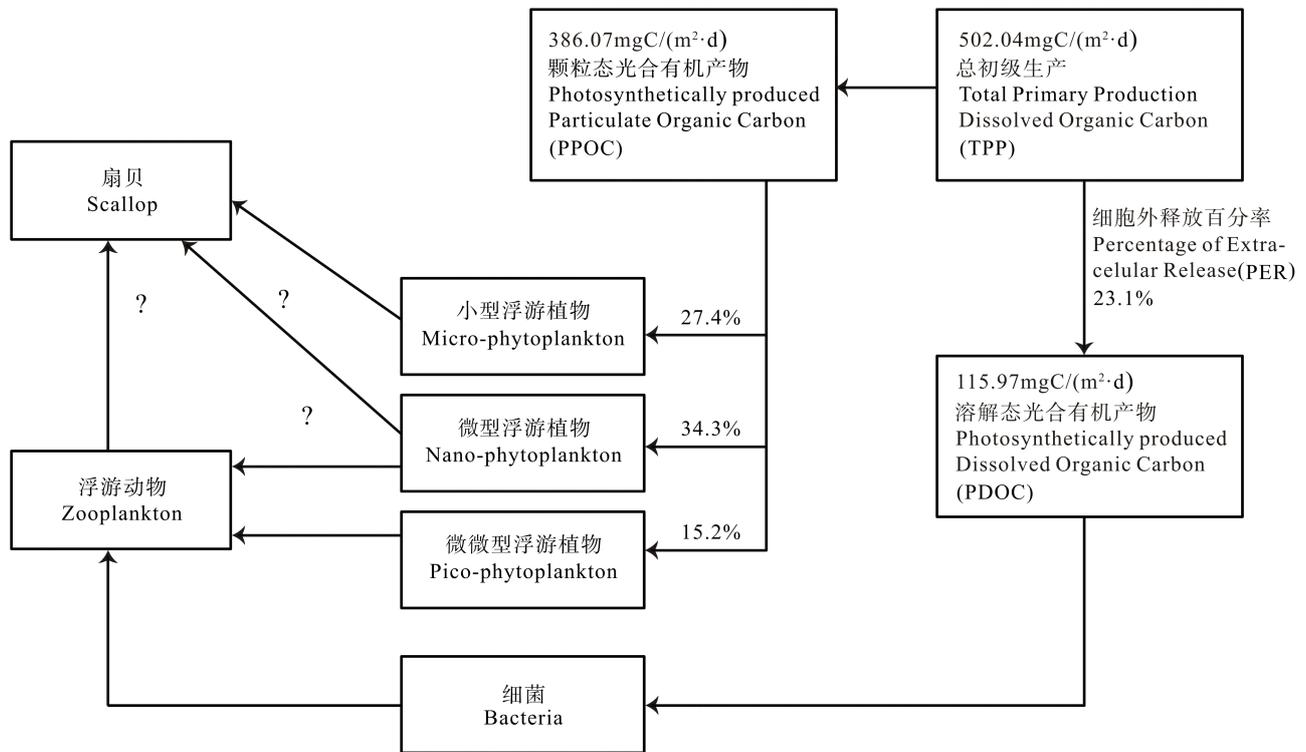


图 10 獐子岛海域浮游植物光合作用碳流途径

Fig.10 Photosynthetic carbon flow pathway in the coastal area of Zhangzidao Island

参 考 文 献

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 12763-2007 海洋调查规范. 北京: 中国标准出版社, 2008  
 宁修仁. 海洋微型和微微型浮游生物. 东海海洋, 1997, 15(3):

60-64  
 张继红, 方建光, 蒋增杰, 等. 獐子岛养殖水域叶绿素含量时空分布特征及初级生产力季节变化. 海洋水产研究, 2008, 29(4): 22-28  
 张继红, 王巍, 蒋增杰, 等. 獐子岛养殖海域氮磷的分布特征. 渔业科学进展, 2009, 30(6): 88-96

1) 刘诚刚. 中国近海浮游植物光合溶解有机碳生产研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2012, 80-99

- 杜兵, 张义钧, 单毅春, 等. 北黄海底层冷水团的变化特征及其对外长山岛海区养殖扇贝死亡的影响. 海洋通报, 1996, 15(4): 17-28
- 黄邦钦, 刘媛, 陈纪新, 等. 东海、黄海浮游植物生物量的粒级结构及时空分布. 海洋学报, 2006, 28(2): 156-164
- 傅明珠, 孙萍, 王宗灵, 等. 黄海冷水团水域浮游植物群落粒级结构的季节变化. 海洋学报(中文版), 2010, 32(1): 120-129
- 焦念志, 王荣. 海洋初级生产光动力学及产品结构. 海洋学报, 1994, 18(5): 85-91
- 董双林, 王芳, 王俊, 等. 海湾扇贝对海水池塘浮游生物和水质的影响. 海洋学报, 1999, 21(6): 138-144
- 蒋增杰, 方建光, 王巍, 等. 乳山官家岛以东牡蛎养殖水域秋季海-气界面 CO<sub>2</sub> 交换通量研究. 水产学报, 2012, 36(10): 1592-1598
- Agawin NRS, Duarte CM, Agusti, S. Nutrient and temperature control of the contribution of picoplankton to phytoplankton biomass and production. Limnol Oceanogr, 2000, 45(3): 591-600
- Azam F, Fenchel T, Field JG, *et al.* The ecological role of water-column microbes in the sea. Mar Ecol Prog Ser, 1983, 10(3): 257-263
- Cerme OP, Mara NE, Rodriguez J, *et al.* Large-sized phytoplankton sustain higher carbon-specific photosynthesis than smaller cells in a coastal eutrophic ecosystem. Mar Ecol Prog Ser, 2005, 297: 51-60
- Chen YLL. Comparisons of primary productivity and phytoplankton size structure in the marginal regions of southern East China Sea. Cont Shelf Res, 2000, 20(4): 437-458
- Dupuy C, Le Gall S, Hartmann HJ, *et al.* Retention of ciliates and flagellates by the oyster *Crassostrea gigas* in French Atlantic coastal ponds: protists as a trophic link between bacterioplankton and benthic suspension-feeders. Mar Ecol Prog Ser, 1999, 177: 165-175
- Dupuy C, Pastoureaud A, Ryckaert M, *et al.* Impact of the oyster *Crassostrea gigas* on a microbial community in Atlantic coastal ponds near La Rochelle. Aquat Microb Ecol, 2000, 22(3): 227-242
- Falkowski PG, Barber RT, Smetacek V. Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production. Science, 1998, 281(5374): 200-206
- Froneman PW, Pakhomov EA, Balarin MG. Size fractionated phytoplankton biomass, production and biogenic carbon flux in the eastern Atlantic sector of the Southern Ocean in late austral summer 1997-1998. Deep-Sea Research II, 2004, 51: 2715-2729
- Kormas KA, Garametsi V, Nicolaidou A. Size-fractionated phytoplankton chlorophyll in an Eastern Mediterranean coastal system(Maliakos Gulf, Greece). Helgol Mar Res, 2002, 56: 125-133
- Kreeger DA, Newell RIE. Ingestion and assimilation of carbon from cellulolytic bacteria and heterotrophic flagellates by the mussels *Geukensia demissa* and *Mytilus edulis*(Bivalvia, Mollusca). Aquat Microb Ecol, 1996, 11: 205-214
- Le Gall S, Hassen MB, Le Gall P. Ingestion of a bacterivorous ciliate by the oyster *Crassostrea gigas*: protozoa as a trophic link between picoplankton and benthic suspension-feeders. Mar Ecol Prog Ser, 1997, 152: 301-306
- Peterson BJ. Synthesis of carbon stocks and flows in the open ocean mixed layer.//Hobbie JE, Williams PJ L, eds. 1984. Heterotrophic Activity in the Sea. New York: Plenum Press: 547-554
- Prins TC, Escaravage VL, Smaal AC, *et al.* Nutrient cycling and phytoplankton dynamics in relation to mussel grazing in a mesocosm experiment. Ophelia, 1995, 41: 289-315
- Souchu P, Vaquer A, Collos Y, *et al.* Influence of shellfish farming activities on the biogeochemical composition of the water column in Thanlagoon. Mar Ecol Prog Ser, 2001, 218: 141-152
- Takashi K. Microzooplankton as a food source for the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: seasonal variation in gut contents and food availability. Fisheries Sci, 2011, 77(6): 961-974
- Wong WH, Levinton JS, Twining BS, *et al.* Assimilation of micro- and mesozooplankton by zebra mussels: a demonstration of the food web link between zooplankton and benthic suspension feeders. Limnol Oceanogr, 2003, 48(1): 308-312

(编辑 江润林)

## Size-fraction of Phytoplankton and Photosynthetic Carbon Flow Pathway in the Coastal Area of Zhangzidao Island

JIANG Zengjie<sup>1</sup>, DU Meirong<sup>1</sup>, JIANG Xu<sup>1</sup>, LIANG Jun<sup>2</sup>, ZHAO Xuewei<sup>2</sup>, LIU Yi<sup>1</sup>,  
ZHANG Yuan<sup>2</sup>, ZHANG Xiaofang<sup>2</sup>, FANG Jianguang<sup>1①</sup>

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

2. Zhangzidao Group CO., LTD, Dalian 116001)

**Abstract** To investigate the seasonal and spatial distribution of phytoplankton in terms of Chlorophyll *a* (Chl *a*) in the scallop *Patinopecten yessoensis* aquaculture area of Zhangzidao island, northern China, four field investigations were conducted in June 2011, October 2011, December 2011 and April 2012. Chl *a* was further divided into pico-phytoplankton (< 2 μm), nano-phytoplankton (2–20 μm) and micro-phytoplankton (>20 μm) size fractions. Results showed that the concentration of Chl *a* in the surface and bottom seawater of Zhangzidao area ranged from 0.07–6.28 μg/L and 0.16–5.28 μg/L, respectively, and the related average was (1.60±1.38) and (1.31±1.10) μg/L. There were significant differences in the concentration of Chl *a* among different seasons ( $P<0.05$ ). The differences of Chl *a*'s concentration between surface and bottom seawater were highly significant during autumn and spring ( $P<0.01$ ). Nano-phytoplankton was the most important size-fraction regardless of surface and bottom seawater and accounted for 50.85% and 44.64% of the total phytoplankton, respectively. CCA analysis of the main environmental factors showed that  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  and  $\text{NH}_4^+$  contributed greatly to nano-phytoplankton while seawater temperature and  $\text{NO}_2^-$  gave a great contribution to pico-phytoplankton. The annual photosynthetically produced particulate organic carbon (PPOC) in this area ranged from 40.31 to 1017.64 mg C/(m<sup>2</sup>·d) with an average value of (386.07±281.80) mg C/(m<sup>2</sup>·d). More than 38.3% of the fixed carbons by the photosynthesis were taken by the classical food web via the microbial food loop. These results highlight the important role of the microbial loop in aquaculture system of Zhangzidao coastal area.

**Key words** Size-fraction; Phytoplankton; Microbial food loop; *Patinopecten yessoensis*; Zhangzidao Island

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

# 黄岛区南部海域营养水平和有机 污染状况分析与评价\*



过 锋 陈聚法<sup>①</sup> 张 艳 陈碧鹃

(农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 山东省渔业资源与生态环境重点实验室  
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

**摘要** 利用 2008–2013 年水质调查资料, 分析了青岛市黄岛区南部海域营养盐分布与变化特征, 并采用营养指数(*E*)法和有机污染综合指数(*A*)法对该海域海水的营养状况和有机污染状况进行了评价。结果显示, (1) 2012–2013 年调查期间, 无机氮含量范围为 20.82–197.62 μg/L, 活性磷酸盐为 4.52–52.91 μg/L, COD 为 0.39–1.25 mg/L。除个别站点活性磷酸盐含量超标外, 其余站点活性磷酸盐含量以及全部站点无机氮和 COD 含量均符合二类海水水质标准要求。(2) 调查海域无机氮以春季最高(86.42 μg/L), 秋季次之, 夏季最低(38.59 μg/L); 活性磷酸盐以秋季最高(18.68 μg/L), 春季次之, 夏季最低(9.10 μg/L); COD 以夏季最高(0.962 mg/L), 秋季次之, 春季最低(0.682 mg/L)。(3) 调查海域无机氮和 COD 含量 2008–2011 年呈逐年降低的变化趋势, 2012 年又有所增高; 活性磷酸盐含量 2008–2010 年呈逐年降低的变化趋势, 2010–2012 年呈逐年增高的变化趋势。研究表明, 调查海域海水的营养水平较低, 未达到富营养化水平, 发生赤潮的可能性较小。调查海域水质状况良好, 未受到有机污染。

**关键词** 营养盐; 营养状况; 有机污染状况; 黄岛区近岸海域

**中图分类号** X824 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)04-0044-07

青岛市黄岛区海域位于黄海中部, 北起胶州湾西岸的红石崖街道沿海, 南至黄家塘湾口北侧。海岸线长, 海湾较多, 自北向南依次为胶州湾、唐岛湾、灵山湾、古镇口湾、龙湾、琅琊台湾(内有陈家贡湾)、棋子湾和黄家塘湾; 较大的河流有风河和白马河; 区域内有灵山岛、斋堂岛和沐官岛等。该海域滩涂贝类资源较为丰富, 礁石区有海参、鲍鱼等生物资源。黄岛沿海水产养殖业比较发达, 主要有浅海筏式养殖、浅海底播杂色蛤仔养殖、浅海珍品增养殖以及网箱鱼类养殖等。本研究所称的黄岛区南部海域是指唐岛湾以南、日照市以北海域, 该海域是黄岛区重要的海水养殖区, 也是青岛市海岸和海洋开发活动最为活跃的区域之一。选择该海域进行生态环境调查研究, 既可

了解养殖环境的质量现状, 又可分析评价海岸和海洋开发活动对海域生态环境的影响。研究结果为制定和实施海洋开发规划和调整海水养殖生产布局提供基础资料, 旨在促进海洋开发和环境保护的和谐统一。

有关胶州湾和唐岛湾海水营养盐的分布变化与富营养化状况已有诸多研究结果(过锋等, 2005、2012; 赵俊等, 2011; 孙丕喜等, 2005; 姚云等, 2004、2007; 沈志良, 2002; 张均顺等, 1997; 张哲等, 2009; 周艳荣等, 2008; 沈春宁等, 2007; 李成高等, 2006), 黄岛区南部海域海流和生物环境状况也有报道(刘伟峰等, 2006; 曲静等, 2009), 但黄岛区南部海域营养盐、海水营养状况和有机污染状况系统研究结果未见报道。本研究依据 2008–2013 年水质调查资料, 对黄

\* 农业部贝类专项课题(13-Q52201302)资助。过 锋, E-mail: guofeng@ysfri.ac.cn

<sup>①</sup> 通讯作者: 陈聚法, 研究员, E-mail: chenjf@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-07-25, 收修改稿日期: 2014-08-26

岛区南部海域营养盐和化学需氧量的分布及其变化特征进行了系统分析, 并对海水营养状况和有机污染状况进行了评价, 便于及时了解该海域的环境质量现状及其动态变化特征, 并为制定近岸海域生态环境保护措施提供技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 调查方法

**1.1.1 调查区域与站位设置** 调查区域为青岛市黄岛区南部近岸海域(图 1), 水深为 5–23 m, 调查海域面积 500 km<sup>2</sup> 左右。2008–2012 年调查共设置 14 个站位(图 2A, 表 1), 调查时间为每年 11 月。2013 年调查共布设 12 个调查站位(图 2B, 表 2), 调查时间为 5 月和 9 月。

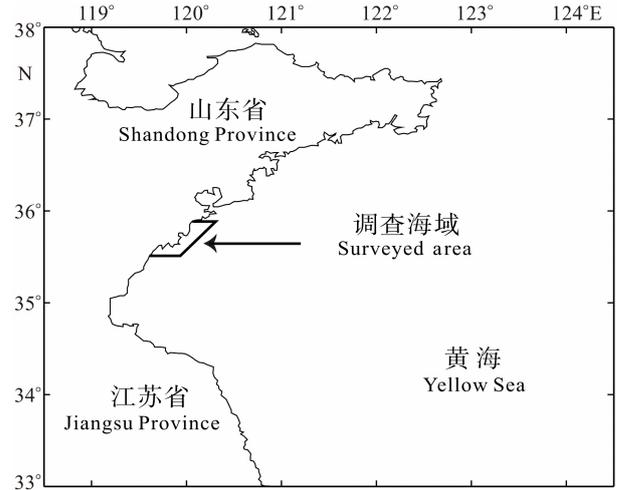


图 1 调查海域

Fig.1 Sketch map of the surveyed area

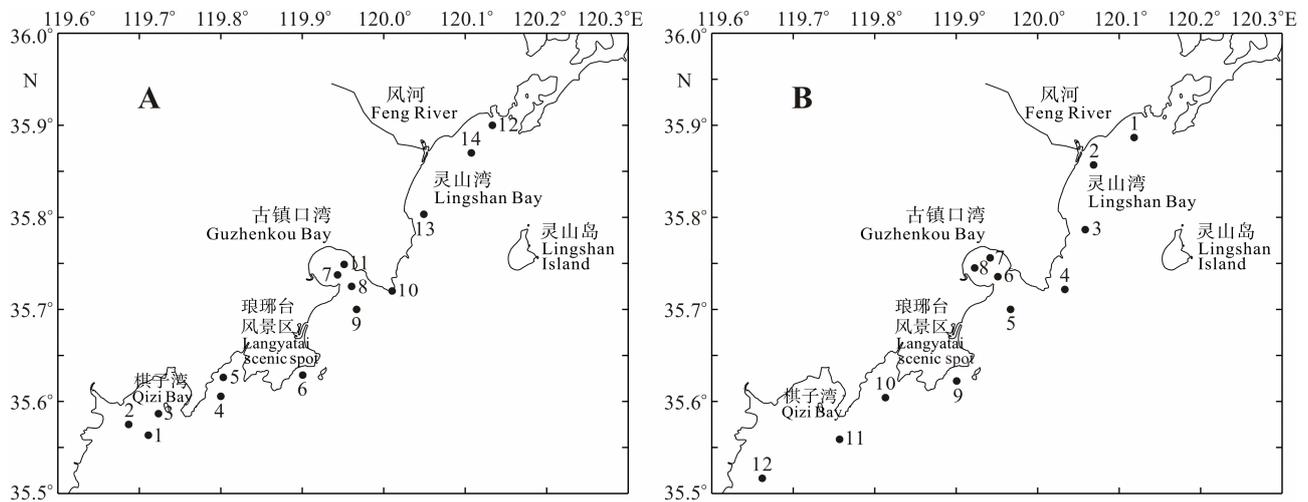


图 2 采样点分布

Fig.2 Location of the sampling stations

表 1 2008–2012 年采样点位置

Tab.1 Position of the sampling stations from 2008 to 2012

站号 St. No.	位置 Position	站号 St. No.	位置 Position
1	35°33'48"N, 119°42'40"E	8	35°43'30"N, 119°57'38"E
2	35°34'30"N, 119°41'13"E	9	35°42'00"N, 119°58'00"E
3	35°35'13"N, 119°43'24"E	10	35°43'18"N, 120°00'37"E
4	35°36'20"N, 119°48'00"E	11	35°44'56"N, 119°57'05"E
5	35°37'34"N, 119°48'11"E	12	35°54'00"N, 120°08'00"E
6	35°37'43"N, 119°54'02"E	13	35°48'12"N, 120°02'57"E
7	35°44'15"N, 119°56'36"E	14	35°52'12"N, 120°06'27"E

**1.1.2 调查项目与分析方法** 调查项目包括水温、盐度、透明度、pH、DO、COD、亚硝酸盐氮、硝酸盐氮、氨氮、无机氮、活性磷酸盐、悬浮物、石油类、重金属(铜、锌、铅、镉、汞)、砷等。本研究仅对 DO、COD 和营养盐数据进行分析。样品采集和检测均按

《海洋监测规范》(GB 17378-2007)规定的方法进行。

### 1.2 评价方法

**1.2.1 单项指标评价** 采用单项指数法, 依据《海水水质标准》(GB 3097-1997)中的第二类标准(表 3),

表2 2013年采样点位置

Tab.2 Position of the sampling stations in 2013

站号 St. No.	位置 Position	站号 St. No.	位置 Position
1	35°53'12"N, 120°07'06"E	7	35°45'22"N, 119°56'30"E
2	35°51'25"N, 120°04'07"E	8	35°44'42"N, 119°55'21"E
3	35°47'12"N, 120°03'30"E	9	35°37'20"N, 119°54'02"E
4	35°43'18"N, 120°02'00"E	10	35°36'15"N, 119°48'47"E
5	35°42'00"N, 119°58'00"E	11	35°33'32"N, 119°45'25"E
6	35°44'08"N, 119°57'04"E	12	35°34'53"N, 119°41'60"E

表3 水质指标评价标准

Tab.3 Assessment standard of water quality indices

指标 Index	无机氮 DIN	活性磷酸盐 DIP	化学需氧量 COD
标准值 Standard value(mg/L)	≤0.30	≤0.030	≤3

对调查海域无机氮、活性磷酸盐和化学需氧量的含量状况进行评价。

**1.2.2** 海水营养状况进行评价 采用营养指数( $E$ )法, 对监测海域营养状况进行评价。其计算公式(邹景忠等 1983)为:

$$E = \frac{DIN(\mu\text{g/L}) \times DIP(\mu\text{g/L}) \times COD(\text{mg/L})}{4500} \quad (1)$$

式中,  $E$  为营养指数,  $DIN$  为无机氮,  $DIP$  为活

性磷酸盐,  $COD$  为化学需氧量。

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

**1.2.3** 海水有机污染状况评价 采用有机污染综合指数法, 对该海域的有机污染状况进行评价, 其计算公式(邹景忠等, 1983)为:

$$A = \frac{COD_i}{COD_s} + \frac{DIN_i}{DIN_s} + \frac{DIP_i}{DIP_s} - \frac{DO_i}{DO_s} \quad (2)$$

式中,  $A$  为有机污染指数,  $COD_i$ 、 $DIN_i$ 、 $DIP_i$ 、 $DO_i$  分别为化学耗氧量、无机氮、无机磷和溶解氧实测值,  $COD_s$ 、 $DIN_s$ 、 $DIP_s$ 、 $DO_s$  分别为相应要素的一类海水水质标准, 其值依次为 2.0、0.2、0.015、6.0 mg/L。按照有机污染分级标准(表4)来评价其有机污染程度。

表4 有机污染评价分级标准

Tab.4 Classification standard for organic pollution evaluation

A 值 A value	< 0	0-1	1-2	2-3	3-4	4-5
有机污染级别 Organic pollution level	0	1	2	3	4	5
水质状况 Water quality condition	良好 Excellent	较好 Good	开始受污染 Primarily polluted	轻度污染 Slightly polluted	中度污染 Moderately polluted	严重污染 Seriously polluted

## 2 结果与分析

### 2.1 调查海域营养盐和化学需氧量分布

海洋中溶解态无机氮是浮游植物的主要营养盐之一, 是浮游植物生长繁殖不可缺少的化学成分, 由亚硝酸盐氮、硝酸盐氮和氨氮三部分组成。氮和磷是细胞原生质的重要组成部分, 它们按一定比例被浮游植物所摄取, 当任何一种要素含量低于或高于一定比值时, 都会抑制生物的生长和繁殖甚至中毒死亡。海水中氮和磷主要由沿岸径流带入, 其次是降雨和海洋生物的排泄以及尸体腐解, 因此, 具有明显的季节性和区域性变化。

**2.1.1** 无机氮 2012年11月调查海域无机氮含量范围为 42.80-128.32  $\mu\text{g/L}$ , 平均值为 74.65  $\mu\text{g/L}$ , 其中,

2号站无机氮含量最高, 4号站含量最低(图3)。亚硝酸盐含量范围为 7.04-12.87  $\mu\text{g/L}$ , 平均值为 10.31  $\mu\text{g/L}$ , 最高值出现在3号和9号站, 最低值出现在4号站; 硝酸盐含量范围为 32.96-116.76  $\mu\text{g/L}$ , 平均值为 61.88  $\mu\text{g/L}$ , 最高值出现在2号站, 最低值出现在8号站; 氨氮含量范围为 0.49-8.21  $\mu\text{g/L}$ , 平均值为 2.46  $\mu\text{g/L}$ , 最高值出现在1号站, 最低值出现在11号站。

2013年5月无机氮含量范围为 47.64-197.62  $\mu\text{g/L}$ , 平均值为 86.42  $\mu\text{g/L}$ , 最高值出现在7号站, 最低值出现在9号站(图3)。其中, 亚硝酸盐含量范围为 2.88-8.71  $\mu\text{g/L}$ , 平均值为 4.38  $\mu\text{g/L}$ , 最高值出现在12号站, 最低值出现在3号站; 硝酸盐含量范围为 4.39-58.78  $\mu\text{g/L}$ , 平均值为 18.26  $\mu\text{g/L}$ , 最高值出现在7号站, 最低值出现在1号站; 氨氮含量范围为 37.97-133.47  $\mu\text{g/L}$ , 平均值为 63.79  $\mu\text{g/L}$ , 最高值出现在7

号站, 最低值出现在 9 号站。

2013 年 9 月无机氮含量范围为 20.82–82.28  $\mu\text{g/L}$ , 平均值为 38.59  $\mu\text{g/L}$ , 最高值出现在 7 号站, 最低值出现在 6 号站(图 3)。其中亚硝酸盐含量范围为 0.65–9.82 $\mu\text{g/L}$ , 平均值为 3.97  $\mu\text{g/L}$ , 最高值出现在 12 号站, 最低值出现在 2 号站; 硝酸盐含量范围为 0.39–11.61  $\mu\text{g/L}$ , 平均值为 4.74  $\mu\text{g/L}$ , 最高值出现在 12 号站, 最低值出现在 2 号站; 氨氮含量范围为 15.07–67.51  $\mu\text{g/L}$ , 平均值为 29.88  $\mu\text{g/L}$ , 最高值出现在 7 号站, 最低值出现在 5 号站。

以上 90 d 调查海域所有站点无机氮含量均符合二类海水水质标准要求。

**2.1.2 活性磷酸盐(DIP)** 2012 年 11 月活性磷酸盐含量范围为 8.08–52.91  $\mu\text{g/L}$ , 平均值为 18.68  $\mu\text{g/L}$ , 其中, 3 号站含量最高, 8 号站含量最低。2013 年 5 月调查海域活性磷酸盐含量范围为 4.52–28.38  $\mu\text{g/L}$ , 平

均值为 11.07  $\mu\text{g/L}$ , 最高值出现在 12 号站, 最低值出现在 4、6、7、11 号站。2013 年 9 月活性磷酸盐含量范围为 3.69–21.27  $\mu\text{g/L}$ , 平均值为 9.10  $\mu\text{g/L}$ , 最高值出现在 11 号站, 最低值出现在 8 号站(图 4)。

2013 年 5 月和 9 月调查海域所有站点活性磷酸盐含量均符合二类海水水质标准要求。2012 年 11 月除 3 号站活性磷酸盐含量超标(超标倍数为 0.76 倍)外, 其余站点活性磷酸盐含量均符合二类海水水质标准要求, 站位超标率为 7.14%。

**2.1.3 化学需氧量(COD)** 2012 年 11 月 COD 含量范围为 0.61–0.86  $\text{mg/L}$ , 平均值为 0.74  $\text{mg/L}$ , 其中 10 号站含量最高, 6 号站含量最低。2013 年 5 月调查海域 COD 含量范围为 0.39–0.90  $\text{mg/L}$ , 平均值为 0.68  $\text{mg/L}$ , 最高值出现在 7 号站, 最低值出现在 3 号站。2013 年 9 月 COD 含量范围为 0.73–1.25  $\text{mg/L}$ , 平均值为 0.96  $\text{mg/L}$ , 最高值出现在 5 号站, 最低值出现在 3 号站(图 5)。2012

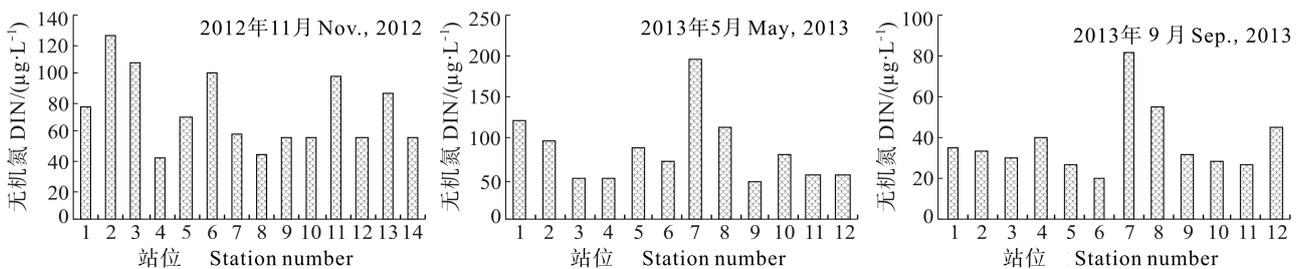


图 3 调查海域无机氮含量分布  
Fig.3 Distribution of DIN content in seawater of surveyed area

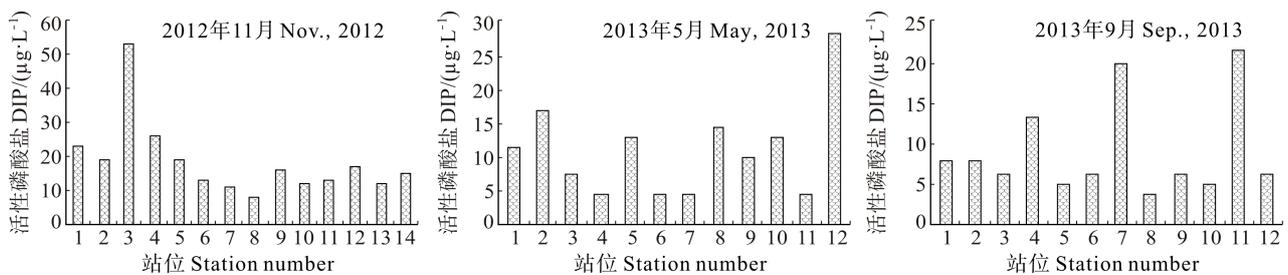


图 4 调查海域活性磷酸盐含量分布  
Fig.4 Distribution of DIP content in seawater of surveyed area

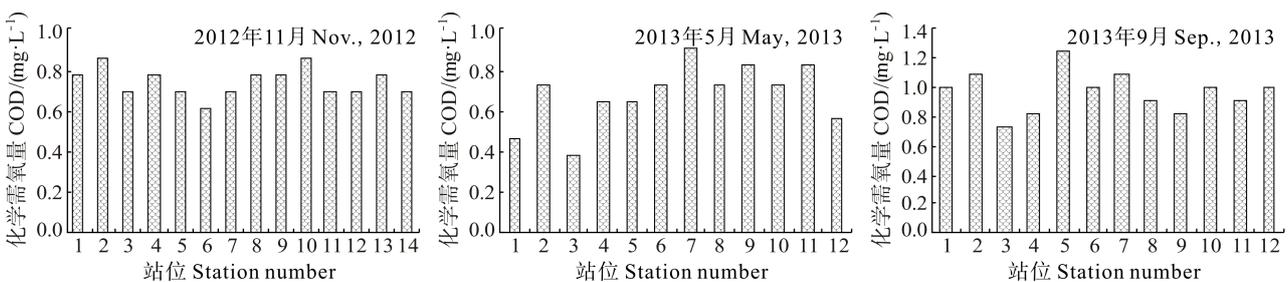


图 5 调查海域 COD 含量的分布  
Fig.5 Distribution of COD in seawater of surveyed area

年11月, 2013年5月和9月调查海域所有站点COD含量均符合二类海水水质标准要求。

## 2.2 调查海域营养盐和化学需氧量季节变化

黄岛区南部海域无机氮、活性磷酸盐和COD平均含量均具有较为明显的季节变化(图6)。无机氮平均含量以春季最高(86.42  $\mu\text{g/L}$ ), 秋季次之, 夏季最低(38.59  $\mu\text{g/L}$ ), 3个季节总平均值为66.55  $\mu\text{g/L}$ 。其中, 亚硝酸盐平均含量以秋季最高(10.31  $\mu\text{g/L}$ ), 春季次之, 夏季最低(3.97  $\mu\text{g/L}$ ), 3个季节总平均值为6.22  $\mu\text{g/L}$ ; 硝酸盐平均含量以秋季最高(61.88  $\mu\text{g/L}$ ), 春季次之, 夏季最低(4.74  $\mu\text{g/L}$ ), 3个季节总平均值为28.29  $\mu\text{g/L}$ ; 氨氮平均含量以春季最高(63.79  $\mu\text{g/L}$ ), 夏季次之, 秋季最低(2.46  $\mu\text{g/L}$ ), 3个季节总平均值为32.04  $\mu\text{g/L}$ 。活性磷酸盐平均含量以秋季最高(18.68  $\mu\text{g/L}$ ), 春季次之, 夏季最低(9.10  $\mu\text{g/L}$ ), 3个季节总平均值为12.95  $\mu\text{g/L}$ 。COD平均含量以夏季最高(0.962  $\text{mg/L}$ ), 秋季次之, 春季最低(0.682  $\text{mg/L}$ ), 3个季节总平均值为0.795  $\text{mg/L}$ 。

影响海水中营养盐含量的因素很多, 其季节变化机制比较复杂。对研究海域而言, 影响营养盐含量及其变化的主要因素包括浮游生物繁殖消耗、沿岸径流输入和沉积物再悬浮释放等。夏季浮游植物繁殖旺盛会消耗大量的氮、磷营养盐, 而研究海域为扇贝、贻贝和蛤仔等滤食性贝类养殖区, 在贝类滤食的压力下, 促使浮游植物再度繁殖并消耗营养盐, 使水体中营养盐含量降低。另外, 夏季风力较弱, 沉积物再悬

浮向海水中释放的营养盐要少于风力较大的春、秋季。虽然夏季携带营养物质的径流入海量要大于春、秋季, 但夏季营养盐的消耗量要大于补充量。在上述因素的综合作用下, 形成研究海域营养盐含量夏季低于春、秋两季的变化格局。研究海域COD季节变化的原因也比较复杂, 陆源输入是首位影响因素。夏季为降水量最大的季节, 导致入海径流量增加; 而春、秋季降水量和入海径流量要小于夏季, 受径流携带有机污染物入海的影响, 使得夏季研究海域海水中COD含量略高于春、秋两季。

## 2.3 调查海域营养盐和化学需氧量年际变化

黄岛区南部海域无机氮、活性磷酸盐和COD平均含量均具有较明显的年际变化(图7), 其中, 无机氮平均含量以2008年11月最高, 2009年11月次之, 2011年11月最低, 2008–2011年呈逐年降低的变化趋势, 2012年又有所增高。活性磷酸盐平均含量以2012年11月最高, 2008年11月次之, 2010年11月最低, 2008–2010年呈逐年降低的变化趋势, 2010–2012年呈逐年增高的变化趋势。COD平均含量以2008年11月最高, 2012年11月次之, 2011年11月最低, 2008–2011年呈逐年降低的变化趋势, 2012年又有所增高。

研究海域海水中无机氮、活性磷酸盐和COD含量的年际变化机制复杂, 影响因素众多。2008–2011年氮磷营养盐和COD含量呈逐年降低的变化趋势, 这与多年以来当地海洋、渔业和环保主管部门采取的

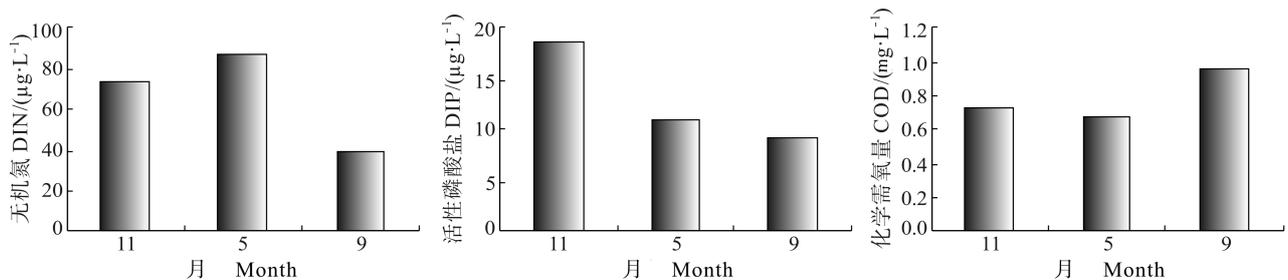


图6 调查海域营养盐和COD季节变化

Fig.6 Seasonal variation of DIN, DIP and COD in seawater of surveyed area

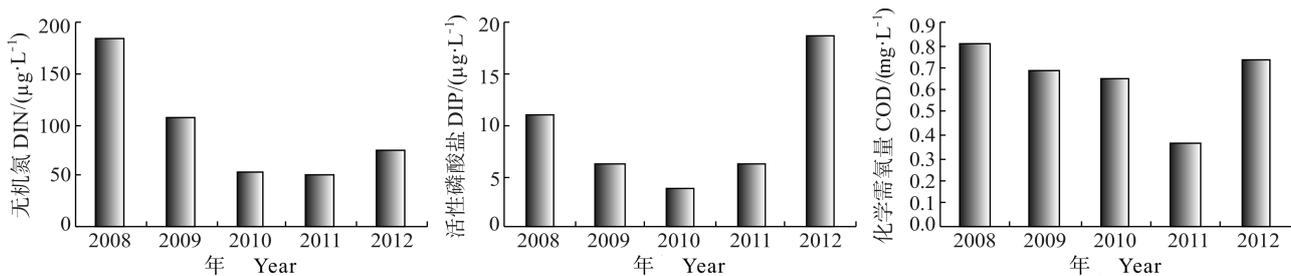


图7 调查海域营养盐和COD年际变化

Fig.7 Interannual variation of DIN, DIP and COD in seawater of surveyed area

陆源污染控制、推广生态养殖和清洁生产等一系列环保措施密切相关。2012年研究海域上述3项水质指标的含量增高反弹,与2012年入海径流量增大有关。2012年9月21日该海域出现200年一遇的特大降水(12h降水量高达429mm),导致营养物质和有机污染物的入海量增大,使得无机氮、活性磷酸盐和COD含量增高。另外,近年黄岛区海岸与海洋开发力度加大,填海、航道和港池疏浚等施工作业对海洋生态环境产生了一定程度的影响,也是造成2012年营养盐和COD含量增高的原因之一。

## 2.4 水质状况评价

**2.4.1 海水营养状况分析** 采用公式(1)计算海水营养指数 $E$ ,计算结果见表5。由表5可以看出,各调查航次黄岛区南部海域海水营养指数变化范围在0.026–0.370,平均值为0.138。7个调查航次该海域 $E$ 值均小于1,海水均未达到富营养化水平,说明该海域发生赤潮的可能性较小。从营养指数量值来看,2008年11月 $E$ 值最高,2012年11月次之,2011年11月 $E$ 值最低。从同一月(11月) $E$ 值年际变化来看,2008–2011年 $E$ 值呈逐年下降的趋势,2012年 $E$ 值又有所增高。

表5 各调查月份海水营养指数( $E$ )均值与营养状况

Tab. 5 Average of eutrophication index ( $E$ ) and nutritional status of seawater in different months from 2008 to 2013

调查年月 Survey time	$E$ 值 $E$ value	营养状况 Nutritional status	调查年月 Survey time	$E$ 值 $E$ value	营养状况 Nutritional status
2008–11	0.370	未达到富营养化水平 Oligotrophic level	2012–11	0.230	未达到富营养化水平 Oligotrophic level
2009–11	0.099	未达到富营养化水平 Oligotrophic level	2013–05	0.140	未达到富营养化水平 Oligotrophic level
2010–11	0.029	未达到富营养化水平 Oligotrophic level	2013–09	0.075	未达到富营养化水平 Oligotrophic level
2011–11	0.026	未达到富营养化水平 Oligotrophic level			

**2.4.2 海水有机污染状况分析** 采用公式(2)计算海水有机污染指数 $A$ ,计算与评价结果见表6。由表6可以看出,各调查航次黄岛区南部海域海水有机污染指数变化范围为0.09–0.62,平均值为0.34。7个调查航次中,海水污染程度均为1级,水质状况为较好,未受到有机污染。从有机污染指数量值来看,2008年11月 $A$ 值最高,2012年11月次之,2009年11月 $A$ 值最低。从同一月(11月) $A$ 值年际变化来看, $A$ 值呈先降后增的变化趋势。

表6 各调查月份海水有机污染指数( $A$ )均值与污染状况  
Tab.6 Average of organic pollution index ( $A$ ) and pollution status of seawater in different months from 2008 to 2013

调查年月 Survey time	$A$ 值 $A$ value	污染程度分级 Pollution level	有机污染状况 Pollution status
2008–11	0.62	1	较好 Good
2009–11	0.09	1	较好 Good
2010–11	0.31	1	较好 Good
2011–11	0.47	1	较好 Good
2012–11	0.61	1	较好 Good
2013–05	0.10	1	较好 Good
2013–09	0.18	1	较好 Good

## 3 讨论与结语

营养盐是生物生存的必需物质,对海洋生产力有决定性的影响(崔毅等,2013)。本研究利用2008–2013

年水质调查资料,分析青岛市黄岛区南部海域营养盐分布与变化特征,并对该海域海水的营养状况和有机污染状况进行了评价。结果表明,黄岛区南部海域氮、磷营养盐和COD含量较低,仅个别站点活性磷酸盐含量超标。海水的营养水平较低,未达到富营养化水平,发生赤潮的可能性较小。海水的有机污染程度较低,水质状况良好。

黄岛区南部海域水质状况良好与该区所处的地理环境密切相关。(1)研究区地处黄海中部,海域开阔,海洋水动力与自净能力强,污染物可以较快地被稀释和运移;(2)该区无大的入海河流,风河等沿岸河流径流量较小,入海径流携带的污染物质和营养物质对海域环境的影响较轻。(3)随着生态养殖模式的不断推广,海水养殖自身污染得以控制,对生态环境的影响也逐年减轻。优越的地理环境加上环境保护措施的实施,使得该海域可以持续保持良好的水质状况。

2014年国务院已正式批准建立青岛西海岸新区,经济新区建立后,不可避免地要加大黄岛区海岸和海域开发力度,存在环境污染的风险。必须严格控制海岸和海域工程建设可能对海洋环境造成的污染,有效保护黄岛区海洋生态环境。

## 参 考 文 献

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准

- 化管理委员会. 海洋监测规范—第 4 部分: 海水分析 (GB17378.4-2007). 北京: 中国标准出版社, 2007
- 孙丕喜, 张朝晖, 郝林华, 等. 桑沟湾海水中营养盐分布及潜在性富营养化分析. 海洋科学进展, 2007, 25(4): 436-445
- 曲静, 宫相忠, 庄会富, 等. 胶南近海及邻近海域夏、冬季浮游植物群落结构. 海洋湖沼通报, 2009(3): 143-154
- 过锋, 陈聚法, 陈碧鹃, 等. 胶州湾北部氮、磷营养盐的分布及变化特征. 海洋水产研究, 2005, 26(6): 34-38
- 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
- 刘伟峰, 孙英兰, 张学庆. 胶南近岸海域海流实测资料分析及数值模拟计算. 海洋通报(英文版), 2006, 8(2): 1-11
- 沈志良. 胶州湾营养盐结构的长期变化及其对生态环境的影响. 海洋与湖沼, 2002, 33(3): 322-331
- 沈春宁, 蒋增杰, 崔毅, 等. 唐岛湾网箱养殖区水体氮、磷含量特征及潜在性富营养化评价. 海洋水产研究, 2007, 28(3): 98-104
- 李成高, 崔毅, 陈碧鹃, 等. 唐岛湾网箱养殖区底层水营养盐变化及营养状况分析. 海洋水产研究, 2006, 27(5): 56-61
- 张哲, 王江涛. 胶州湾营养盐研究概述. 海洋科学, 2009, 33(11): 90-94
- 张均顺, 沈志良. 胶州湾营养盐结构变化的研究. 海洋与湖沼, 1997, 28(5): 529-535
- 国家环境保护局, 国家技术监督局. 海水水质标准(GB3097-1997). 北京: 中国标准出版社, 1997
- 周艳荣, 马文斋, 高振会. 唐岛湾海域营养状态及有机污染状况分析. 海洋环境科学, 2008, 27(Supp. 2): 70-73
- 姚云, 沈志良. 胶州湾海水富营养化水平评价. 海洋科学, 2004, 28(6): 14-22
- 姚云, 郑世清, 沈志良. 胶州湾营养盐及富营养化特征. 海洋通报, 2007, 26(4): 91-98
- 赵俊, 过锋, 张艳, 等. 胶州湾湿地海水中营养盐的时空分布与富营养化. 渔业科学进展, 2011, 32(6): 107-114
- 邹景忠, 董丽华, 秦保平. 渤海湾富营养化和赤潮问题的初步探讨. 海洋环境科学, 1983, 2(2): 42-55
- 崔毅, 夏斌, 马菲菲, 等. 靖海湾松江鲈鱼种质资源保护区海水环境质量年际变化趋势及综合评价. 渔业科学进展, 2013, 34(6): 1-8

(编辑 陈严)

## Analysis and Evaluation on Nutritional Status and Organic Pollution Condition in the Southern Offshore Area of Huangdao District of Qingdao City

GUO Feng, CHEN Jufa<sup>①</sup>, ZHANG Yan, CHEN Bijuan

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

**Abstract** The current study analyzed the distributional and variational feature of nutrients of seawater in the southern offshore area of Huangdao District based on the environmental data collected by surveys from 2008 to 2013. The methods of Eutrophication Index (*E*) and Organic Pollution Comprehensive Index (*A*) were used to assess nutritional status and organic pollution condition of seawater. Based on the surveys from 2012 to 2013, the concentrations of dissolved inorganic nitrogen(DIN), dissolved inorganic phosphate(DIP) and chemical oxygen demand (COD) varied within 20.82–197.62 μg/L, 4.52–52.91 μg/L and 0.39–1.25 mg/L, respectively. Except one station that the concentration of DIP was above the standard limit, all other concentration including DIP, DIN and COD met the second class of national standard. In three seasons, the highest concentration of DIN (86.42 μg/L) was in the spring, and the lowest (38.59 μg/L) was in the summer. The highest concentration of DIP (18.68 μg/L) was in the autumn, and the lowest (9.10 μg/L) was in the summer. The highest concentrations of COD (0.962 mg/L) was in the summer, and the lowest (0.682 mg/L) was in the spring. The concentrations of DIN and COD was gradually decreased from 2008 to 2011 and then was increased in 2012. The concentration of DIP was gradually decreased from 2008 to 2010 and then was gradually increased from 2010 to 2012. The seawater of the surveyed area was at oligotrophic level, showing the low possibility of red tide occurrence. The water quality in the surveyed area was good, indicating that seawater was not polluted by organic matters.

**Key words** Nutrients; Nutritional status; Organic pollution condition; Offshore area of Huangdao District

① Corresponding author: CHEN Jufa, E-mail: chenjf@ysfri.ac.cn

# 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis* Günther) IGF- II 的体外重组表达\*



徐永江<sup>1</sup> 柳学周<sup>1①</sup> 张 凯<sup>2</sup> 武宁宁<sup>3</sup> 刘芝亮<sup>1</sup> 李春广<sup>4</sup>

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;  
2. 青岛贝宝海洋科技有限公司 青岛 266400; 3. 青岛市海洋与渔业局渔业技术推广站 青岛 266071;  
4. 绍兴市鸿港农业开发有限公司 绍兴 312000)

**摘要** 为在蛋白水平认识半滑舌鳎类胰岛素生长因子 II (IGF- II) 的生理功能, 将 IGF- II 成熟肽序列克隆到原核表达载体 pET-28a 中, 成功构建了重组半滑舌鳎 IGF- II /pET28a 质粒, 导入到 *E. coli* BL21(DE3) 菌株后经 IPTG 诱导, 获得了大小为 11.4 kDa 的重组 IGF- II 蛋白, N 端含 6 个组氨酸, 可特异性地被 6×His 抗体识别。重组 IGF- II 蛋白在最优诱导条件 37℃ 诱导 2 h, 目的蛋白表达量占重组表达菌总蛋白的 43.7%, 重组蛋白主要以包涵体存在。将获得的重组蛋白包涵体经变性、纯化和复性后, 获得了纯化的 IGF- II 重组蛋白, 其可在体外显著促进人乳腺癌 MDA231 细胞的增殖, 表明 IGF- II 重组蛋白具有体外细胞水平的生物活性。本研究结果可为认识鱼类 IGF- II 生理功能及半滑舌鳎生长调控机制提供理论支撑。

**关键词** 半滑舌鳎; IGF- II; 原核表达; 生物活性

**中图分类号** S961 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)04-0051-06

类胰岛素生长因子- II (IGF- II) 是一种单链小分子多肽, 在动物机体生长和发育过程中具有重要生理调节作用。先前对哺乳动物的研究表明, IGF- II 是一种胎儿生长激素, 主要对早期胚胎的生长发育起重要调节作用(Erhardt *et al*, 2003; Antonazzo *et al*, 2008)。但后续研究表明, IGF- II 与动物的生长速度、背部肌肉厚度和瘦肉率等生产性状密切相关(王丁科等, 2008; Vykoukalová *et al*, 2006; 刘桂兰等, 2003; Sánchez *et al*, 2013), 表明其在胚后生长发育阶段也起着重要的调控作用。近年来对鱼类的研究表明, IGF- II 与 IGF-1R 的结合能力同 IGF-I 相似(Fruchtman *et al*, 2002), 表明其与 IGF-I 在胚胎和胚后期具有同等重要的生长调控作用(Peterson *et al*, 2004、2008)。另外, 还有研究证明, 在鱼类生长发育过程中, IGF- II

在血液中一直保持较高的表达水平, 而啮齿类动物在出生后血液中 IGF- II 水平明显下降(Shamblott, 1998; Tse *et al*, 2002), 这些差异提示, 与哺乳动物相比, IGF- II 在鱼类生长发育过程中可能承担着更重要的角色。但一直以来, 由于缺乏鱼类 IGF- II 蛋白和相应的抗体, 对鱼类 IGF- II 的功能研究主要集中在 mRNA 水平上, 在蛋白层面对其生长调控机能方面的研究少有报道。

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis* Günther) 是一种大型底栖比目鱼类, 是我国理想的近海增养殖对象(邓景耀等, 1988), 近年来已成为我国三大鲆鲽类主导养殖品种之一。半滑舌鳎具有生长的性别二态性, 即雌性生长速度远远大于雄性, 养殖雄性的经济效益低, 国内学者(季相山, 2009<sup>1)</sup>; Ma *et al*, 2011) 已对该现

\* 鲆鲽类现代产业技术体系(CARS-50)、山东省自然科学基金项目(ZR2012CQ025)、中央级公益性事业单位基本科研业务费项目(20603022012022)和绍兴市院校科技合作项目(2012704)共同资助。徐永江, E-mail: xuyj@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 柳学周, 研究员, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-04-16, 收修改稿日期: 2014-06-17

1) 季相山. 半滑舌鳎雌核发育诱导、遗传分析及生长相关基因雌雄差异表达研究. 山东农业大学博士研究生学位论文, 2009, 97-106

象的形成机制开展了相关研究,但目前对这种生长差异现象的机制认识尚不足,因此,未能建立起有效的养殖生长调控技术,不利于养殖产业的持续发展。鉴于 IGF- II 在鱼类生长发育中的重要调控作用,为深入认识半滑舌鳎生长调控机制,中国水产科学研究院黄海水产研究所鱼类养殖与设施渔业实验室构建了半滑舌鳎 IGF- II 体外重组表达系统,获得了具有生物活性的重组 IGF- II 蛋白,为从蛋白水平深入认识鱼类 IGF- II 生理功能及半滑舌鳎生长调控机制提供理论支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验用鱼

试验用鱼(全长为 25–33 cm, 体重为 490–680 g)于 2012 年 5 月取自山东青岛忠海水产有限公司,以 MS-222 (300 mg/L)麻醉处死,迅速取肝脏置于液氮(–196℃)保存,用于总 RNA 提取。

### 1.2 成熟肽的克隆

利用 TRIzol 法提取肝脏总 RNA, 反转录合成第一链 cDNA。根据半滑舌鳎 IGF- II (GenBank 获取号: FJ608668) cDNA 序列, 设计特异性引物 P1 和 P2 扩增其成熟肽序列。在 P1 和 P2 的 5'端分别添加 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点(方框标注), 在 P2 中添加了终止密码子 TAA(下划线标注)。

P1: 5'-ATA GGATCC GAAATGGCCTCGGCG-3'

P2: 5'-ATA AAGCTT TTACGTGGACTTGGGCGG -3'

PCR 条件: 94℃ 5 min 变性, 34 个循环(94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 50 s), 72℃ 延伸 10 min。将目的片段切胶回收后连接到 pEASY-T1 Simple 载体上, 挑选阳性克隆测序验证。

### 1.3 重组质粒的构建

提取重组的 IGF- II 克隆质粒, 与表达载体 pET-28a 混合, 用 *Bam*H I 和 *Hind* III (TaKaRa) 双酶切, 以 T4 连接酶连接得到表达重组质粒 IGF- II /pET28a, 转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞(Invitrogen)中, 菌液培养后 PCR 验证并测序。

### 1.4 重组质粒在表达菌株中的表达

测序正确的表达重组质粒转化到表达菌株 BL21 (DE3)中, 在液体 LB 培养基中(含卡那霉素)培养至  $OD_{600\text{nm}}$  达 0.6–0.7(37℃), 添加异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG, 1 mmol/L)继续培养。为分析目的蛋白的表达效率, 在添加 IPTG 诱导 0、1、2、3、4 h 时分别吸取 2 ml 表达菌液, 离心收集菌体(8000 r/min 10 min, 4℃),

以 PBS 洗涤并重悬, 以 SDS-PAGE 电泳(15%分离胶)和 SigmaScan pro 5 软件分析目的蛋白的表达效率。

将菌液分别在 18℃、28℃、37℃ 条件下以 IPTG (1 mmol/L)诱导 2 h, 取样进行 SDS-PAGE 电泳分析, 研究不同温度下重组蛋白表达量的差异。

### 1.5 重组蛋白的 Western-blotting 验证

收集以 IPTG 诱导 2 h 的表达菌体, 沉淀经 SDS-PAGE 电泳后, 利用半干电转印法将蛋白转移至 PVDF 膜上, 并用 5% BSA 封闭, 以 6 $\times$ His 单抗为一抗、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 为二抗, 室温下分别孵育 1 h, 利用 HRP-DAB 试剂盒(Bio-Rad)显色, 观察拍照。

### 1.6 重组蛋白的纯化和复性

取 37℃ 条件下 IPTG 诱导表达 2 h 的重组菌, 离心(8000 r/min 10 min, 4℃), PBS 洗涤沉淀, 按照刘芝亮等(2013)的方法纯化和复性, 获得重组 IGF- II 蛋白。获得的纯化融合蛋白经 SDS-PAGE 检测, 置入透析袋, 分别用 8、6、4、2 mol/L 尿素梯度复性液和 PBS 充分透析复性, 用 3 kDa 超滤管(Millipore)进行超滤浓缩, SDS-PAGE 电泳检测后于 –80℃ 保存备用。

### 1.7 融合蛋白的生物活性检测

利用 MTT 法检测获得的纯化复性的 IGF- II 融合蛋白的生物活性。设置半滑舌鳎 IGF- II 融合蛋白浓度分别为 0.35、3.5 和 35  $\mu$ g/ml, 3 个试验组, 1 个空白对照组, 每组设 4 个平行, 以人乳腺癌细胞 MDA231(上海若谷生物科技有限公司)为载体, 具体操作方法参考刘芝亮等(2013)。

细胞增殖率( $GSR$ ) (% control) =  $A_{\text{sample}}/A_{\text{control}} \times 100$

式中,  $A_{\text{sample}}$  为加入重组蛋白组,  $A_{\text{control}}$  为未加重组蛋白组。 $GSR$  用平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)来表示, 采用 SPSS 16.0 软件对各试验组的细胞增殖率进行单因素方差分析(ANOVA), 设置显著性水平  $P=0.05$ , 当  $P<0.05$  时为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 半滑舌鳎 IGF- II 成熟肽的克隆

半滑舌鳎 IGF- II 成熟肽序列长为 210 bp, 由 B、C、A、D 共 4 个结构域组成, 编码 70 个氨基酸(图 1)。氨基酸同源性分析显示, 半滑舌鳎 IGF- II 编码氨基酸序列与塞内加尔鳎(*Solea senegalensis*)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、大西洋庸鲽(*Hippoglossus hippoglossus*)和点带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)同源性分别为 93%、94%、90%和 93%, 具有较高的序列保守性。

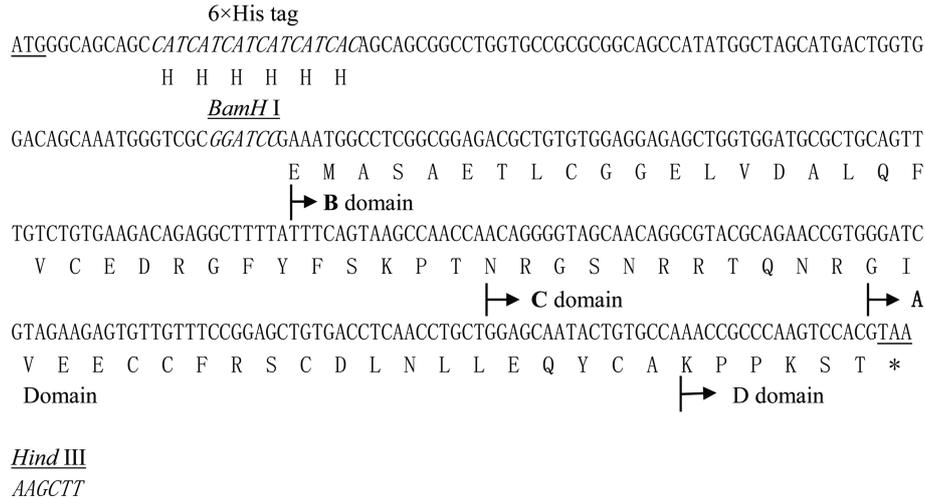


图1 半滑舌鳎 IGF- II 成熟肽序列

Fig.1 The mature peptide sequence of IGF- II in *C. semilaevis* Günther

起始密码子 ATG 以下划线标注, \*示终止密码子 TAA

The start codon (ATG) is underlined and the asterisk indicates the stop codon

## 2.2 IGF- II/pET28a 重组质粒的构建

将 IGF- II 成熟肽序列插入到原核表达质粒 pET-28a, 获得了重组质粒 IGF- II/pET28a, 转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中培养, 测序验证目的基因插入正确(图 1), 获得的重组质粒由 104 个氨基酸组成, 包括 IGF- II 成熟肽和 N 端的 6×His 标签, 等电点为 7.69。

## 2.3 重组质粒在大肠杆菌 BL21(DE3)中的表达

将重组质粒 IGF- II/pET28a 转化入大肠杆菌 BL21(DE3)中构成重组菌, 经 IPTG 诱导后电泳检测, 出现的大小为 11.4 kDa 的特异性条带为重组 IGF- II 蛋白。

温度诱导试验结果显示, 不同诱导温度下, 重组菌的目的蛋白表达量各不相同(图 3), 37℃、IPTG 诱导 2 h 重组蛋白表达量最大, 占表达菌总蛋白含量的 43.7%。

## 2.4 重组 IGF- II 蛋白的 Western-blotting 验证

Western-blotting 检测显示, 获得的重组表达菌在 PVDF 膜上可见单一印迹, 且大小为 11.4 kDa (图 4), 说明重组表达菌正确表达了目的蛋白, 且能特异性地被 6×His 抗体识别, 具有抗原活性, 验证了半滑舌鳎 IGF- II 蛋白体外重组表达成功。

## 2.5 IGF- II/pET28a 融合蛋白的纯化

将重组菌进行超声破碎, SDS-PAGE 电泳检测菌液沉淀和上清液, 显示融合蛋白主要以包涵体形式存在于沉淀中(图 2)。收集包涵体, 变性处理后过

Ni<sup>2+</sup>-NTA 亲和层析柱进行分离纯化, 纯化的融合蛋白再经过尿素梯度复性后以 SDS-PAGE 检测, 可见大小为 11.4 kDa 的单一一条带(图 2)。

## 2.6 重组蛋白的生物活性检测

MTT 法检测结果显示, 浓度为 0.35  $\mu\text{g/ml}$  和 3.5  $\mu\text{g/ml}$  的重组半滑舌鳎 IGF- II 蛋白均能显著促进

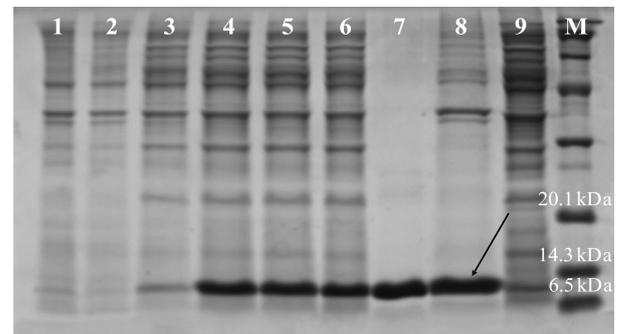


图2 半滑舌鳎重组 IGF- II 蛋白的表达分析

Fig.2 Expression of the recombinant IGF- II protein in BL21(DE3) cells

M: 蛋白 Marker; 1: IPTG 诱导 2 h 对照菌;  
2-6: IPTG 诱导 0、1、2、3、4 h 的重组菌;  
7: 纯化 IGF- II 融合蛋白; 8-9: IPTG 诱导 2 h 后表达菌裂解液沉淀和上清液(箭头示 11.4 kDa 融合蛋白)  
M: Protein marker; 1: Control; 2-6: Expression of recombinant IGF- II post 0, 1, 2, 3, and 4 h of induction;  
7: Purified recombinant IGF- II protein;  
8-9: Precipitation and supernatant of bacterial lysates post 2 h of induction (arrow indicates 11.4 kDa recombinant IGF- II protein)

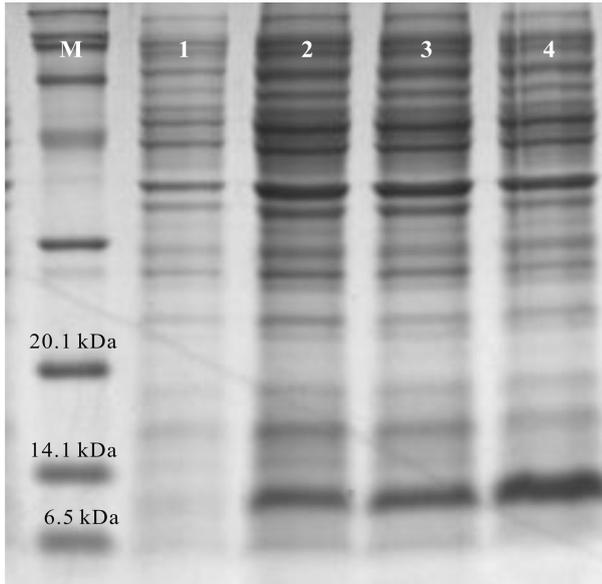


图3 温度对重组半滑舌鲷 IGF- II 蛋白表达效率的影响  
Fig.3 Effects of temperature on the recombinant IGF- II protein from *C. semilaevis* Günther

M: 蛋白 Marker; 1: 对照菌 37°C下 IPTG 诱导 2 h; 2-4: 重组表达菌 18°C、28°C、37°C下 IPTG 诱导 2 h  
M: Protein marker; 1: Control at 37°C; 2-4: Recombinant IGF- II at 18°C, 28°C and 37°C post 2 h of induction

人乳腺癌细胞 MDA231 增殖, 与对照组差异显著 ( $P < 0.05$ )。但当蛋白浓度增加至 35  $\mu\text{g/ml}$  时, 细胞增殖率减小(图 5), 表明高浓度的 IGF- II 蛋白反而不利于细胞增殖。上述结果表明本研究获得的半滑舌鲷 IGF- II 融合蛋白具有细胞水平的生物活性。

### 3 讨论

IGF- II 被认为是迄今为止功能最复杂的生长调控因子, 除了促生长作用外, 还与家畜的脂肪沉积、瘦肉率、腹脂率等多种经济性状密切相关(Lamberson *et al*, 1996), 因而在家畜育种工作中已作为辅助选择育种标记应用, 增加了性状育种的准确性(李志辉等, 2004), 而在鱼类中 IGF- II 的多种功能及其作用机制尚需深入研究。半滑舌鲷为我国重要海水养殖品种, 具有雌雄个体生长差异的特性, 但其机制不明。季相山(2009)<sup>1)</sup>研究表明, IGF- II 在半滑舌鲷胚胎、脑、眼、鳃、头肾、肠、肝、肌肉、垂体、皮肤、脾等组织中均有表达, 表明其在半滑舌鲷胚胎发育、生长和生殖中均具有重要的生理功能。同时还发现, 8 月龄前,



图4 半滑舌鲷重组 IGF- II 蛋白的 Western-blotting 验证  
Fig.4 The detection of recombinant IGF- II protein from *C. semilaevis* Günther by Western-blotting

M: Marker; 1: 诱导 2 h 重组表达菌  
M: Protein Marker; 1: Recombinant IGF- II /pET28a post 2 h of induction

雌雄舌鲷间 IGF- II mRNA 表达量无显著差异, 但 9 月龄和 12 月龄的雌性舌鲷 IGF- II mRNA 表达量显著高于雄性, 这说明 IGF- II 在半滑舌鲷雌雄生长差异中可能起着重要的调控作用, 对其具体的机制研究需要从 mRNA、激素和蛋白水平进行深入开展。本研究利用 pET-28a 表达载体成功构建了半滑舌鲷 IGF- II 体外原核重组表达体系, 优化了蛋白表达条件, 获得了高效表达且具有细胞水平生物活性的重组 IGF- II 蛋白, 结果为在蛋白水平研究半滑舌鲷生长调控机制提供了理论依据。

基因体外重组蛋白的表达受多种因素影响,

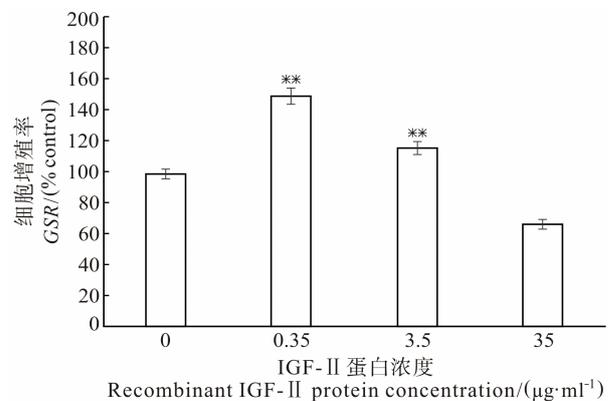


图5 重组半滑舌鲷 IGF- II 蛋白对人乳腺癌细胞 MDA231 增殖率的影响

Fig.5 The effect of recombinant IGF- II protein on the proliferation of human breast cancer cell MDA231

GSR 用平均值 $\pm$ 标准差表示( $n=4$ );  
\*\* : 与对照组差异极显著( $P < 0.01$ )  
GSR are shown as Mean $\pm$ S.D. ( $n=4$ );  
\*\* : Highly significant difference from control ( $P < 0.01$ )

1) 季相山. 半滑舌鲷雌核发育诱导、遗传分析及生长相关基因雌雄差异表达研究. 山东农业大学博士研究生学位论文, 2009, 97-106

如载体选择、表达菌株选择及诱导条件等(宁俊凯等, 2012)。本研究利用原核表达系统获得了体外重组的 IGF- II 蛋白,但由于原核表达产物主要以包涵体形式存在,需经变性、复性后才具有生物活性,其生产效率较低,且不具备在养殖生产中大量应用的经济性。比较而言,真核表达体系产物具有高效表达、表达后无需变性和复性处理,且更具安全性(Li *et al*, 2012),因而可用于重组蛋白的体外大规模生产。下一步将开展半滑舌鳎 IGF- II 真核表达技术研究,为研制绿色高效的半滑舌鳎专用促生长制剂提供技术支撑。

人乳腺癌细胞由于自身没有 IGF- II mRNA 的表达(Chatzistamou *et al*, 2001),而成为研究外源 IGF- II 功能的良好载体。因此,本研究选用了人乳腺癌细胞 MDA231 来检验获得的半滑舌鳎 IGF- II 重组蛋白的生物活性,无需考虑自身 IGF- II 对外源 IGF- II 蛋白的干扰作用。结果显示,0.35  $\mu\text{g/ml}$  和 3.5  $\mu\text{g/ml}$  浓度的重组半滑舌鳎 IGF- II 蛋白均能显著促进 MDA231 的增殖,表明其具有良好的体外生物活性。对青海湖裸鲤(*Gymnocypris przewalskii*)重组 IGF- II 蛋白的研究表明,其在一定浓度条件下可显著促进人乳腺癌细胞 MDA-MB-435 的增殖,但超过一定浓度时可能起抑制作用(曹诣斌等, 2010)。

本课题组先期已利用原核表达系统体外成功表达并制备获得半滑舌鳎 IGF-I (刘芝亮等, 2013)和 GH,以细胞增殖和注射方式验证了 IGF-I 和 GH 对半滑舌鳎生长的促进作用(另文发表)。本研究获得了具有生物活性的半滑舌鳎 IGF- II 融合蛋白,可为在蛋白水平认识其生理作用及研究半滑舌鳎雌雄生长的性别二态性提供新的基础资料。下一步本课题组将深入开展 IGF- II 的生理功能研究,以期揭示其在半滑舌鳎生长调控中的生理作用及其机制。

## 参 考 文 献

- 王丁科, 阎萍, 梁春年, 等. 胰岛素样生长因子 2 研究进展. 动物医学进展, 2008, 29(7): 67-70
- 邓景耀, 孟田湘, 任胜民, 等. 渤海鱼类种类组成及数量分布. 海洋水产研究, 1988(9): 10-89
- 宁俊凯, 俞昌喜. 胰岛素样生长因子-I(IGF-I)原核制备工艺进展. 海峡药学, 2012, 24(6): 7-11
- 刘芝亮, 徐永江, 史宝, 等. 半滑舌鳎类胰岛素生长因子-I 的原核表达及活性分析. 中国水产科学, 2013, 20(4): 706-712
- 刘桂兰, 蒋思文, 熊远著, 等. IGF2 基因 PCR-RFLP 多态性与脂肪沉积相关性状的关联分析. 遗传学报, 2003, 30(12): 1107-1112
- 李志辉, 王启贵, 赵建国, 等. 类胰岛素生长因子 2(IGF2)基因多态性与鸡体脂性状的相关研究. 中国农业科学, 2004, 37(4): 600-604
- 曹诣斌, 吴兰亲, 邵邻相, 等. 青海湖裸鲤类胰岛素生长因子 IGF- II 的原核表达. 水生生物学报, 2010, 34(2): 1-5
- Antonazzo P, Alvino G, Cozzi V, *et al*. Placental IGF2 expression in normal and intrauterine growth restricted (IUGR) pregnancies. Placenta, 2008, 29(1): 99-101
- Chatzistamou I, Schally AV, Varga JL, *et al*. Inhibition of growth and metastases of MDA-MB-435 human estrogen independent breast cancers by an antagonist of growth hormone-releasing hormone. Anti-cancer Drugs, 2001, 12(9): 761-768
- Erhardt S, Lyko F, Ainscough JF, *et al*. Polycomb-group proteins are involved in silencing processes caused by a transgenic element from the marine imprinted H19/Igf2 region in *Drosophila*. Dev Genes Evol, 2003, 213(7): 336-344
- Fruchtman S, McVey DC, Borski RJ. Characterization of pituitary IGF-I receptors: modulation of prolactin and growth hormone. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2002, 283(2): 468-476
- Lamberson WR, Sterle JA, Matteri RL. Relationships of serum insulin-like growth factor-2 concentrations to growth, compositional, and reproductive traits of swine. J Anim Sci, 1996, 74: 1753-1756
- Li YY, Wu SG, Ouyang J, *et al*. Expression of insulin-like growth factor-1 of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) in yeast *Pichia pastoris*. Protein Expr Purif, 2012, 84(1): 80-85
- Ma Q, Liu SF, Zhuang ZM, *et al*. Molecular cloning, expression analysis of insulin-like growth factor-I (IGF-I) gene and IGF-I serum concentration in female and male tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2011, 160(4): 208-214
- Peterson BC, Small BC. Endocrine responses of fast- and slow-growing families of channel catfish. N Am J Aquacult, 2008, 70(2): 240-250
- Peterson BC, Waldbieser GC, Bilodeau AL. IGF-I and IGF- II mRNA expression in slow- and fast-growing families of USDA103 channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2004, 139(3): 317-323
- Sánchez Del Pulgar J, Carrapiso AI, Reina R, *et al*. Effect of IGF- II genotype and pig rearing system on the final characteristics of dry-cured Iberian hams. Meat Sci, 2013, 95(3): 586-592
- Shamblott MJ. Characterization of a teleost IGF- II gene: evidence for promotor CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) sites, and the presence of hepatic C/EBP. Mol Mar Biol Biotechnol, 1998, 7(3): 181-190
- Tse MC, Vong QP, Cheng CH, *et al*. PCR-cloning and gene expression studies in common carp (*Cyprinus carpio*) insulin-like growth factor- II. Biochim Biophys Acta, 2002, 1575(1-3): 63-74

Vykoukalová Z, Knoll A, Dvorák J, *et al.* New SNPs in the IGF2 gene and association between this gene and back fat

thickness and lean meat content in large white pigs. *J Anim Breed Genet*, 2006, 123(3): 204–207

(编辑 冯小花)

## ***In vitro* Recombinant Expression of Insulin-Like Factor II from *Cynoglossus semilaevis* Günther**

XU Yongjiang<sup>1</sup>, LIU Xuezhou<sup>1</sup>①, ZHANG Kai<sup>2</sup>, WU Ningning<sup>3</sup>, LIU Zhiliang<sup>1</sup>, LI Chunguang<sup>4</sup>

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Qingdao Beibao Marine Science and Technology Co., Ltd., Qingdao 266400; 3. Fishery Technology Extension Center of Qingdao, Qingdao 266071; 4. Shaoxing Honggang Agricultural Development Co., Ltd., Shaoxing 312000)

**Abstract** To explore the role of insulin-like factor II (IGF-II) in growth regulation of *Cynoglossus semilaevis* Günther, the IGF-II gene was expressed *in vitro* and the bioactivity was determined by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT method). The mature peptide domain of IGF-II gene of *C. semilaevis* Günther was cloned by PCR amplification and sequenced for verification. The obtained mature peptide fragment was then subcloned into the prokaryotic expression vector pET-28a (IGF-II/pET28a). The recombinant plasmid was expressed in *E.coli* BL21 (DE3) cells and the recombinant IGF-II protein containing 6×His tag at N-terminus was induced by IPTG. SDS-PAGE analysis indicated that the obtained IGF-II protein was found in the form of inclusion bodies with molecular weight of 11.4 kDa, which accounted for 43.7% of the whole bacterial protein post 2-hour induction with IPTG. Western blotting analysis indicated that the recombinant IGF-II protein had the antigenicity to 6×His antibody. The inclusion bodies containing recombinant protein were denaturalized, purified and annealed. The recombinant IGF-II protein significantly promoted the proliferation of human breast cancer cells MDA231. Results could provide basic information on the role of IGF-II in fish and be helpful to better understand the endocrine mechanism of sex-based dimorphic growth performance of *C. semilaevis* Günther.

**Key words** *Cynoglossus semilaevis* Günther; IGF-II; Prokaryotic expression; Bioactivity

① Corresponding author: LIU Xuezhou, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

# 长鳍吻鮡(*Rhinogobio ventralis*)胚胎发育 和仔鱼发育\*



管 敏 肖 衍 胡美宏 刘 勇 鲁雪报  
倪 勇 郭文韬<sup>①</sup> 曲焕韬 李 莎

(三峡工程鱼类资源保护湖北省重点实验室 中国长江三峡集团公司 中华鲟研究所 宜昌 443100)

**摘要** 利用显微电子成像技术对长鳍吻鮡(*Rhinogobio ventralis*)胚胎发育和仔鱼形态进行了观察与研究,详细描述了各发育期的形态特征和发育时间。结果显示,长鳍吻鮡卵子的卵径为 1.7–1.9 mm、卵膜径为 6.6–7.0 mm、卵粒质量为 0.0059–0.0077 g,精子的寿命为 96.56–119.12 s、激烈运动时间为 25.43–31.43 s。长鳍吻鮡的胚胎发育可分为受精卵、胚盘期、卵裂期、囊胚期、原肠期、神经胚期、器官形成期和出膜期 8 个阶段,在水温为 17.6–18.3℃流水孵化条件下,其受精卵历时 56 h 孵化出膜,在水温为 18.5–22.0℃的条件下,长鳍吻鮡仔鱼的卵黄囊在 5 日龄时基本消失,6 日龄时完全消失,进入后期仔鱼阶段,30 日龄的长鳍吻鮡仔鱼鳍条基本形成,鳞片开始形成,结束仔鱼期,进入稚鱼期。

**关键词** 长鳍吻鮡; 胚胎发育; 仔鱼发育

**中图分类号** S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)04-0057-08

长鳍吻鮡(*Rhinogobio ventralis*)隶属鲤形目(Cypriniforme)、鲤科(Cyprinidae)、鮡亚科(Gobioninae),俗称洋鱼、土耗子,是长江上游特有的底栖性鱼类(邓辉胜等, 2005)。近年来,由于水质污染、水利工程建设以及过度捕捞等原因,长鳍吻鮡的资源量急剧下降,从受威胁程度、遗传多样性、物种价值等方面定量评估发现,长鳍吻鮡已达 3 级急切保护状态(刘军, 2004)。

目前,针对长鳍吻鮡的研究主要集中在生物学、种群生态学以及资源量调查等方面(辛建峰等, 2010; 徐念等, 2009)。关于长鳍吻鮡胚胎发育和仔鱼发育的研究尚未见报道,作者在中国长江三峡集团公司的资助下在国内首次成功实现了长鳍吻鮡的人工催产繁殖,并对其胚胎、仔鱼发育进行了较为详细的观察和描述,以期能为长鳍吻鮡的批量繁殖生产提供理论依据和科学参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 受精卵来源

2014 年 3–5 月,在中国长江三峡集团公司中华鲟研究所金沙江溪洛渡向家坝珍稀特有鱼类增殖放流站,采用驯养成年的长鳍吻鮡亲鱼,经催情、诱导促熟后,人工采集精卵,并采用半干法授精。先挤卵至清洁干燥的容器,再挤压雄鱼腹部使其排精,一旦有精液流出立即用水冲洗至盛有卵的容器,重复几次,用羽毛轻轻搅拌 2–3 min,完成授精后,漂清杂质,将受精卵转入孵化器孵化。前后共 5 次成功实现长鳍吻鮡的人工繁殖,共获受精卵 9.8 万余粒,初孵仔鱼 3.15 万尾。

### 1.2 受精卵的孵化及仔鱼培育

根据漂流性卵特性选用流水孵化方式,孵化器为

\* 中国长江三峡集团公司“野生长鳍吻鮡驯养和人工繁殖技术研究”项目资助。管 敏, E-mail: guanmin\_888@163.com

① 通讯作者: 郭文韬, 高级工程师, E-mail: realgwt2008@163.com

收稿日期: 2014-06-28, 收修改稿日期: 2014-10-24

不锈钢锥形桶,载水量 140 L,流量为 0.5–0.8 t/h。孵化期间,水温为 17.6–18.3℃,溶解氧为 7–9 mg/L,氨氮、亚硝氮均小于 0.05 mg/L。

仔鱼孵出后转入直径 6.0 m 的玻璃纤维缸(以下简称为玻纤缸)中培育,水温为 18–24℃,苗种培育采用“前期静水、后期微流水”的方式。苗种培育过程仔鱼的开口饵料为轮虫和小球藻,11 日龄后开始投喂枝角类、桡足类幼体,20 日龄后开始投喂枝角类、桡足类成体。育苗期间,养殖用水的 pH 在 6.8–7.5 范围内,溶解氧>5 mg/L,并定期向水体中泼洒芽孢杆菌、光合细菌等有益菌以保持氨氮和亚硝氮均<0.05 mg/L。养殖过程中及时清除死苗,定期取样,进行生长指标测定并做好记录。

### 1.3 观察方法

利用显微电子成像系统将 NIKON 解剖镜与电脑相连,通过计算机拍摄胚胎和仔鱼发育的照片,并记录其发育的时间和发育阶段,定时记录胚胎和早期仔鱼发育的形态变化特征。

## 2 结果

### 2.1 卵子和精子特性

长鳍吻鲈产漂流性卵,成熟鱼卵呈圆球形,无油球,内含大量卵黄,淡黄色,略透明,卵径为 1.7–1.9 mm,平均卵径为 1.8 mm,平均单卵质量为 0.0068 g(图 1-1)。受精后 34 min,在动物极形成隆起的胚盘,为半透明状,受精卵处于“侧卧”状态。

长鳍吻鲈精液呈乳白色,光镜下观察到精子由头部和尾部组成,头部呈圆球形,尾部细长。精子激烈运动时间平均为 28.43 s(范围为 25.43–31.43 s),缓慢运动时间平均为 33.15 s(范围为 30.05–36.25 s),摇尾运动时间为 46.11 s(范围为 41.08–51.04 s),精子寿命平均为 108.09 s(范围为 96.56–119.12 s)。

### 2.2 胚胎发育

长鳍吻鲈的胚胎发育分为受精卵、胚盘期、卵裂期、囊胚期、原肠期、神经胚期、器官形成期和出膜期 8 个阶段。在水温为 17.6–18.3℃流水孵化条件下,长鳍吻鲈卵受精 34 min 后胚盘形成,50 min 后进入 II 细胞期,2.2 h 后进入多细胞期,4 h 后发育至囊胚前期,从囊胚前期至囊胚后期需 4 h,囊胚后期 1.5 h 后达到原肠早期,再经过 1.6 h 发育至原肠中期,原肠中期和原肠晚期间隔 2.5 h,受精 14.5 h 后发育至神经胚期,神经胚期 1.6 h 后胚孔封闭,神经胚期至尾芽期需要经历 8.5 h,受精后 30.8 h 后可发育至肌肉效应期,56 h 后孵化出膜。长鳍吻鲈胚胎发育及特征如下:

**2.2.1 受精卵** 长鳍吻鲈受精卵呈圆球形,淡黄色,卵膜光滑,无特殊结构,无油球,卵黄均匀。受精卵遇水后卵膜迅速膨胀,卵周隙扩大,卵黄因受精而活动起来(图 1-1)。

**2.2.2 胚盘形成期** 从受精到胚盘形成需要 34 min,此时,受精卵卵周隙进一步增大,卵膜径增大至 6.6–7.0 mm,平均为 6.8 mm,两极逐渐分化,细胞质向动物极集中,并逐渐隆起,形成胚盘。

**2.2.3 卵裂期** 受精 50 min 后,胚盘开始第 1 次卵裂,形成两个大小相等的细胞,进入 II 细胞期,随着细胞的继续发育,细胞数目按照 2、4、8、16、32、64 几何级数分裂。受精后 2.2 h,多层细胞叠加如桑椹,动物极隆起呈小丘状,细胞大小不一,界限模糊,发育到多细胞期(图 1-2–图 1-6)。

**2.2.4 囊胚期** 细胞分裂至 4 h 时,分裂球隆起达最高,形成高囊胚,囊胚层外层凸出,内层稍凹下,进入囊胚前期。随着细胞的不断分裂,囊胚的高度不断下降,囊胚层逐渐变薄、变扁,8 h 后进入囊胚晚期(图 1-7–图 1-8)。

**2.2.5 原肠期** 囊胚层边缘细胞继续从四面向植

表 1 长鳍吻鲈卵子和精子的部分特征  
Tab.1 Some characteristics of *R. ventralis* egg and sperm

内容 Content	平均值 Mean	范围 Range
卵径 Egg diameter(mm)	1.8	1.7–1.9
卵膜径 Egg membrane diameter(mm)	6.8	6.6–7.0
卵粒质量 Egg weight(g)	0.0068	0.0059–0.0077
精子激烈运动时间 Swirling movement time of sperm(s)	28.43	25.43–31.43
精子缓慢运动时间 Slow movement time of sperm(s)	33.15	30.05–36.25
精子摇尾运动时间 Tail wag movement time of sperm(s)	46.11	41.08–51.04
精子寿命 Sperm life(s)	108.09	96.56–119.12

物极下包扩展,受精后 9.5 h,胚盘下包至卵黄 1/3 左右时形成胚环,进入原肠早期。随着胚盘细胞的进一步下包,球形胚胎逐渐变为椭球形,包至卵黄 1/2-1/3 左右时,胚环更加明显,胚盾出现,进入原肠中期。胚层细胞下包至 4/5 时,裸露在外的卵黄为卵黄栓,胚盾明显延长,胚体雏形形成,进入原肠晚期(图 1-9-图 1-11)。

**2.2.6 神经胚期** 受精 14.5 h 后,胚盘细胞继续分裂,当下包至 6/7 时,进入神经胚期,胚孔形成,胚胎出现增厚的神经板,胚体前部逐渐隆起,形成脑泡原基。随着细胞继续分裂发育,胚孔收缩合拢,受精后 16.1 h 时胚孔封闭,此时胚体形状明显,附着在卵黄一侧,头部脑泡膨大,尾基收缩变粗(图 1-12-图 1-13)。

**2.2.7 器官形成期** 随着胚体的发育,胚体肌节继续分化增多,胚体头部前端抬高,头部结构越来越复杂,在脑泡两侧出现眼囊,呈长椭圆形。随着受精时间的延长,眼囊下方出现嗅板,受精 24.6 h 时,尾尖脱离卵黄囊,在胚体后端伸出芽状突起,并逐渐与卵黄囊分离,形成尾芽。随着尾芽的伸长,尾芽的边缘

表皮外突形成不明显的鳍褶,尾部开始增长。约 27.6 h 时,眼杯中出现晶体,在 30.8 h 时胚体出现缓慢而轻微的收缩,胚体进入肌肉效应期,随着胚体的发育,尾部不断伸长。41.8 h 可以看到长鳍吻鮡胚体有明显的心脏跳动,进入心脏跳动期,随着时间的推移,跳动频率加快。胚体经过持续的发育,头部逐渐隆起与卵黄囊分离,尾鳍开始伸展,卵黄囊被拉长,尾部卵黄囊逐渐缩小。在受精约 52 h 时,胚体在卵膜内灵活转动,尾部延伸变长,头部明显抬起(图 1-14-图 1-16)。

**2.2.8 出膜期** 出膜前期,尾鳍继续延长,胚体在卵膜内翻滚摆动明显加快,在受精 56 h 时,卵膜变软变薄,胚体剧烈摆动出膜(图 1-17)。

### 2.3 仔鱼形态发育特征

在温度为 18.5-22℃、溶解氧为 6.0 mg/L 的条件下,长鳍吻鮡仔鱼的卵黄囊在 5 日龄时基本消失,6 日龄时完全消失。长鳍吻鮡苗种全长与日龄的相关关系式为:  $y=5.8208e^{0.1535x}$ ,  $R^2=0.9846$ 。式中,  $y$  为仔鱼全长,  $x$  为日龄。

表 2 长鳍吻鮡胚胎发育特征

Tab.2 Typical characteristics of embryonic development of *R.ventralis*

胚胎发育时期		受精后时间	主要特征
Embryonic development stage		Time after fertilization(h)	Typical characteristics
未受精卵	Unfertilized egg	-	球形、淡黄色、略透明,卵膜紧贴于卵质的表面
受精卵	Fertilized egg	0	卵质分布均匀,极性不明显
胚盘形成期	Germinal disk formation stage	0.57	原生质集中动物极,隆起形成胚盘
2 细胞期	2-cell stage	0.83	第 1 次卵裂,两个细胞大小相等
4 细胞期	4-cell stage	1.2	第 2 次卵裂,分裂面与第 1 次卵裂垂直,形成 4 个大小相等的细胞
8 细胞期	8-cell stage	1.45	第 5 次卵裂,分裂面与第一次卵裂平行,形成 8 个大小相等的细胞
16 细胞期	16-cell stage	1.65	第 4 次卵裂,分裂面与第一次卵裂垂直,形成 16 个大小相等的细胞
多细胞期	Morula stage	2.2	细胞越分越小并开始重叠,由单层变为多层
囊胚早期	Early blastocyst stage	4	多层细胞形成的囊胚高而集中,隆起在卵黄上
囊胚晚期	Late blastocyst stage	8	囊胚层边缘变薄,细胞下包,向卵黄扩展
原肠早期	Early gastrula stage	9.5	胚盘细胞向卵黄下包 1/3,背面观可见胚环
原肠中期	Midgastrula stage	11.1	胚盘下包 2/3,胚盾形成
原肠晚期	Late gastrula stage	13.6	胚盘下包 3/4,胚盾变得细长
神经胚期	Neurula stage	14.5	胚盘下包 4/5,形成神经管
胚孔封闭期	Blastopore closed stage	16.1	胚层下包,胚孔闭合
尾芽期	End teeth stage	24.6	尾尖脱离卵黄囊,在胚体后端伸出芽状突起,并逐渐与卵黄囊分离,即形成尾芽
肌肉效应期	Muscle effector phase	30.8	胚体开始出现微弱的、有节律的收缩
心脏跳动期	Heart-beating stage	41.8	心脏呈管状,开始跳动微弱,逐渐加快
出膜期	Hatching stage	56	胚胎在卵周隙内不停地转动,陆续破膜而出

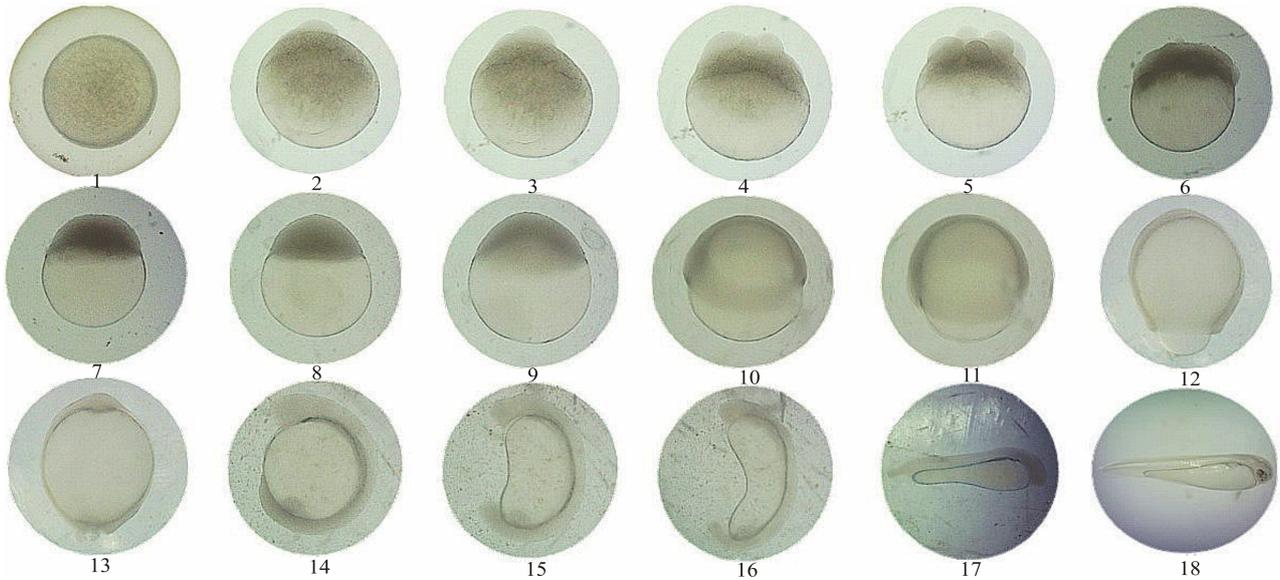


图1 长鳍吻鲈胚胎发育时期

Fig. 1 Embryonic development stages of *R. ventralis*

1. 受精卵; 2. 2细胞期; 3. 4细胞期; 4. 8细胞期; 5. 16细胞期; 6. 多细胞期; 7. 囊胚早期; 8. 囊胚晚期;  
9. 原肠早期; 10. 原肠中期; 11. 原肠晚期; 12. 神经胚期; 13. 胚孔封闭期; 14. 尾牙期; 15. 肌肉效应期;  
16. 心脏跳动期; 17. 出膜期; 18. 初孵仔鱼

1. Fertilized egg; 2. 2-cell stage; 3. 4-cell stage; 4. 8-cell stage; 5. 8-cell stage; 6. Morula stage; 7. Early blastocyst stage;  
8. Late blastocyst stage; 9. early gastrula stage; 10. Midgastrula stage; 11. Late gastrula stage; 12. Neurula stage; 13. Blastopore closed stage; 14. End teeth stage; 15. Muscle effector phase; 16. Heart-beating stage; 17. Hatching stage; 18. The larva

### 2.3.1 前期仔鱼发育(从孵化出膜至卵黄囊完全消失)

初孵仔鱼通体透明, 脊索细长, 位于体上侧, 全长为 $(6.07 \pm 0.28)$  mm; 卵黄囊呈长囊袋状, 前部钝圆, 后端尖细, 占鱼体的大部分; 消化管隐约可见, 背部、胸部及尾部出现鳍褶雏形, 游动能力较差, 随着孵化器中水流的涌动而做上下窜游(图 1-17)。

1 日龄仔鱼全长为 $(6.57 \pm 0.32)$  mm, 头部稍弯向下方, 吻端紧贴卵黄囊; 体无色透明, 眼球出现黑色素, 心脏附近出现少量血液, 呈淡红色; 胸鳍鳍褶增高, 仔鱼尾部活动加强。在水中, 仔鱼偶尔向上窜游, 窜游一小段距离后停止摆动身体, 在水中自由落下, 每分钟重复此运动 20-30 次(图 2-1)。

2 日龄仔鱼全长为 $(7.02 \pm 0.33)$  mm, 头部向上抬起, 吻端离开卵黄囊, 并向前突出, 脊索平直, 卵黄囊消耗 1/3 左右, 体无色透明, 眼球黑色素增多, 心脏附近红色颜色略有加深(图 2-2)。

3 日龄仔鱼全长为 $(7.51 \pm 0.24)$  mm, 脊索平直, 清晰可见, 卵黄囊消耗超过 1/2; 体无色透明, 体表开始出现少量黑色素沉积, 眼球黑色素进一步增多; 心脏附近红色颜色加深, 体表上方和尾鳍褶附近有红色; 背鳍、胸鳍及尾鳍鳍褶增大、增高, 腹鳍褶和尾鳍褶连成一体, 仔鱼尾部活动进一步加强; 鳃弓原基

出现, 下颌开始出现(图 2-3)。

4 日龄仔鱼全长为 $(7.93 \pm 0.26)$  mm, 体无色透明, 体表黑色素增多, 特别是卵黄囊上缘、尾鳍褶和脊索上缘黑色素沉积较多; 卵黄囊消耗超过 3/4; 心脏附近红色颜色加深, 体表上方和尾鳍褶附近有红色; 鳃原基出现, 仔鱼活动能力加强, 持续做上下窜游运动; 口裂形成, 但不摄食(图 2-4)。

5 日龄仔鱼全长为 $(8.51 \pm 0.21)$  mm, 体表黑色素增多, 除了卵黄囊上缘、尾鳍褶和脊索上缘黑色素沉积较多之外, 心脏周围也有黑色素沉积; 卵黄囊消耗超过 8/9; 心脏周围红色血液的颜色清晰可见, 体表上方和尾鳍褶附近有红色; 鳃已开始充气, 仔鱼可以在水体中上层平游; 吻部更加突出; 尾鳍呈扇形; 消化道明显变粗并弯曲(图 2-5)。

2.3.2 后期仔鱼发育(从卵黄囊完全消失至各鳍鳍条基本形成) 6 日龄仔鱼全长为 $(9.45 \pm 0.24)$  mm, 体表黑色素继续增多, 除了尾鳍褶、脊索上缘和心脏周围黑色素沉积较多之外, 头部也有黑色素沉积, 鳃上缘黑色素沉积最多; 卵黄囊完全消失; 鳃原基进一步发育; 鳃进一步充气, 胸鳍出现, 身体可以保持平衡, 游泳能力大大增强; 仔鱼肠道和肛门贯通, 沉入池底开始摄食小球藻和轮虫等生物饵料(图 2-6)。

8 日龄仔鱼全长为(10.51±0.29) mm, 体表黑色素进一步增多; 尾椎骨开始上翘, 尾鳍鳍条开始发育; 鳔继续充气增大, 呈长椭圆形, 只有一个腔室; 消化道内可见明显的食物; 颅骨变厚, 呈淡黄色, 略透明(图 2-8)。

14 日龄仔鱼全长为(14.11±0.18) mm, 鱼体呈半透明, 淡黄色; 体表黑色素进一步沉积, 头部黄色颜色加深, 吻端、鳃盖边缘和头部上方黑色素明显增多;

鳃盖骨清晰可见; 心脏明显发红, 清晰可见; 尾鳍逐渐由圆形尾向叉形尾分化; 鳔仍为一室, 其上方黑色素已覆盖 1/2 左右; 消化道内充满食物; 肌节清晰可见 42-43 对(图 2-12)。

25 日龄仔鱼全长为(20.32±0.15) mm, 鱼体呈半透明, 淡黄色; 体表黑色素继续沉积, 头部黄色颜色继续加深, 吻端、鳃盖边缘和头部上方黑色素继续增多, 并出现较大的黑色素斑点; 心脏贯通到背主动脉

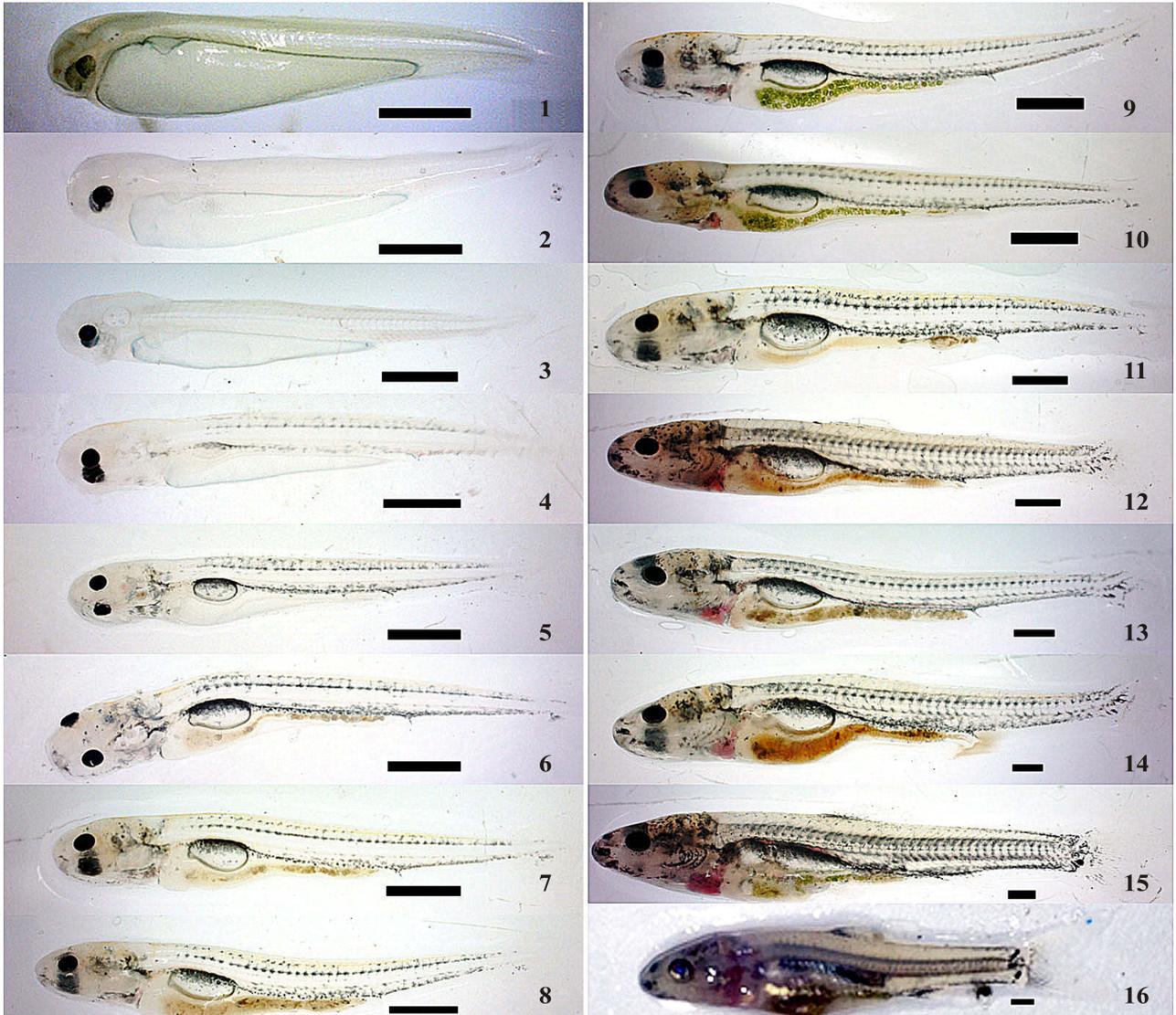


图 2 长鳍吻鮡仔鱼发育  
Fig.2 Larvae development of *R.ventralis*

1. 1 日龄仔鱼; 2. 2 日龄仔鱼; 3. 3 日龄仔鱼; 4. 4 日龄仔鱼; 5. 5 日龄仔鱼; 6. 6 日龄仔鱼; 7. 7 日龄仔鱼;  
8. 8 日龄仔鱼; 9. 11 日龄仔鱼; 10. 12 日龄仔鱼; 11. 13 日龄仔鱼; 12. 14 日龄仔鱼; 13. 17 日龄仔鱼;  
14. 23 日龄仔鱼; 15. 25 日龄仔鱼; 16. 30 日龄仔鱼

1. 1-day larva; 2. 2-day larva; 3. 3-day larva; 4. 4-day larva; 5. 5-day larva; 6. 6-day larva; 7. 7-day larva; 8. 8-day larva;  
9. 11-day larva; 10. 12-day larva; 11. 13-day larva; 12. 14-day larva; 14. 23-day larva; 15. 25-day larva; 16. 30-day larva

注: 图中横线长度(比例尺)为 1 cm

Note: The length of the horizontal lines in the figure is 1 cm

和尾主动脉,红色血液清晰可见;尾鳍鳍条上沉积黑色素,并由圆形尾分化为叉形尾,鳍条数 24;臀鳍开始出现;鳔在腹腔背部,发育为两室,鳔长约占体长的 1/4,其上方黑色素覆盖鳔表面积的 2/3 左右;消化道内充满食物(图 2-15)。

30 日龄仔鱼全长为(23.25±0.26) mm,鱼体呈暗黄色,腹部呈亮黄色,透明度降低;头部发育完善,黄色颜色加深;胸鳍、背鳍、臀鳍及尾鳍的鳍条形成,各鳍条上均有黑色素沉积,鳞片形成,进入稚鱼期(图 2-16)。

### 3 讨论

#### 3.1 长鳍吻鲈精子和受精卵的特点

长鳍吻鲈精子的激烈运动时间平均为 28.43 s,缓慢运动时间平均为 33.15 s,摇尾运动时间为 46.11 s,精子寿命平均为 108.09 s,这与罗芬等(2011)对长鳍吻鲈精子活力观察结果相一致。精子活力会受到一些生物和非生物因素的影响,如基因、环境、养殖密度、光周期、渗透压、离子类型、pH、激素等(Alavi *et al.*, 2005; Sansone *et al.*, 2002),这些因素对长鳍吻鲈精子活力的影响有待研究。

长鳍吻鲈的受精卵为漂流性卵,其比重略大于水,吸水后卵膜迅速膨胀,形成较大的卵周隙,随流水漂流发育最终孵出鱼苗(周春生等, 1980)。漂流性鱼卵的卵膜径一般在 3.0–7.0 mm 范围内,因种属不同卵膜径也有显著差异。如草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、鲢鱼(*Hypophthalmichthys molitrix*)、铜鱼(*Coreius heterodon*)、圆筒吻鲈(*Rhinogobio cylindricus* Gunther)、吻鲈(*Rhinogobio typus*)以及鳅(*Elopichthys bambusa*)等卵膜径为 5.0–6.5 mm,属大型鱼卵;蒙古红鲌(*Erythroculter mongolicus*)、翘嘴红鲌(*Erythroculter ilishaeformis*)、赤眼鲮(*Spualioabarus curriculus*)、花斑副沙鳅(*Parabotia fasciata* Dabry)以及长春鳊(*Parabramis pekinensis*)等鱼类卵膜径一般为 4.0–5.0 mm,属中型鱼卵;银鲈(*Squalidus argentatus*)、银鲷(*Xenocypris argentea* Gunther)以及蛇鲈(*Saurogobio dabryi*)等小型鱼类卵膜径通常为 3.0–4.0 mm(周春生等, 1980)。长鳍吻鲈受精卵的卵膜径为 6.6–7.0 mm,平均为(6.86±0.31) mm,属于大型鱼卵。Lake 等(1967)和 Martell 等(2005)认为,鱼卵受精吸水膨胀后形成的较大卵周隙可以有效抗击外界环境的冲击,提高受精卵的成活率。据此分析,长鳍吻鲈受精卵吸水后,形成的较大卵周隙,一方面可以为胚胎发育提供安全的内部环境,另一方面受精卵吸水膨胀,扩大了卵的体积,使其密度减小,可以实现漂流发育,鱼卵吸水后的这一

系列生理变化是其繁殖策略的重要体现。

#### 3.2 长鳍吻鲈的胚胎发育

在水温为 17.6–18.3℃流水孵化条件下,长鳍吻鲈受精卵历时 56 h 完成整个胚胎发育的过程。长鳍吻鲈的胚胎发育与大多数鲤科鱼类胚胎发育期的划分基本一致。长鳍吻鲈的胚胎发育时间较似刺鳊鲈(*Paracanthobrama guichenoti* Bleeker) 78 h 7 min (23–26℃)、蛇鲈 81–82 h (15.0–18.3℃)等鲈亚科鱼类历时较短(卢敏德等, 1996; 何雪福等, 1996),较中华沙鳅(*Botia superciliaris*) 34–37 h (21–23℃)、花斑副沙鳅 12 h 30 min (28℃)、长薄鳅(*Leptobotia elongata*) 34 h (22.3–23.5℃)等鳅科鱼类历时长(李强等, 2011; 杨明生等, 2007; 梁银铨等, 2001),明显短于青海湖裸鲤(*Gymnoocypris eckloni* Herzensten) 132 h (18–21℃)、四川裂腹鱼(*Schizothorax kozlovi* Nikolsky) 130 h (11–21℃)以及尖裸鲤(*Oxygymnocypris stewarti*) 265 h (9.5–11.8℃)等裂腹鱼亚科鱼类(史建全等, 2000; 陈永祥等, 1997; 许静等, 2011)。这种胚胎发育时间的差异主要是由鱼类种属遗传特性决定的,同时受到孵化水温条件的显著影响。

温度是影响鱼类胚胎发育的主要环境因素(谢仰杰等, 2001),长鳍吻鲈的胚胎发育速度很大程度上取决于温度。研究中发现,长鳍吻鲈受精卵在水温为 17.6–18.3℃时孵化,经 56 h 即可出膜,而在水温为 16.4–17.2℃时孵化,则需 72 h 才能出膜。由此可见,温度影响长鳍吻鲈的胚胎发育的速度,在一定温度范围内,水温升高可以促进胚胎发育,相反水温降低会延缓发育。长鳍吻鲈胚胎发育的适宜水温为 16.4–18.3℃,与其自然繁殖水温 16–19℃相一致,水温过高或过低都会造成胚胎发育畸形、死亡,孵化率降低。

#### 3.3 长鳍吻鲈仔鱼的生长发育

长鳍吻鲈的鱼苗卵黄囊吸收的特点是首先吸收身体前段膨大部分,之后卵黄囊变成条状直至消失,这种现象是大多数鲤科鱼类卵黄囊被吸收时的共有特点。

在温度为 18.5–22℃的条件下,长鳍吻鲈苗种全长与日龄的相关关系式为:  $y=5.8208e^{0.1535x}$  ( $R^2=0.9846$ ),从初孵仔鱼到 6 日龄仔鱼,长鳍吻鲈的生长速度较为缓慢,7–30 日龄,生长速度逐渐加快,并在 11–30 日龄进入快速生长期,分析其原因可能长鳍吻鲈的仔鱼在 1–6 日龄时,处于内源营养阶段,营养供给主要依靠卵黄囊,6 日龄以后,卵黄囊完全消失,进入外源营养阶段,营养供给主要依靠外源物质。此时,投喂

的轮虫、枝角类等生物饵料,营养充足,保证了仔鱼生长发育对营养的需求。随着仔鱼各个器官发育逐步完善,仔鱼的游泳能力不断增强,捕食能力大大提高,摄食量不断加大,加之仔鱼的消化系统发育完全,消化吸收能力显著提高,使得仔鱼在7日龄以后生长发育速度逐渐加快,并在11日龄后进入一个快速生长期。30日龄的仔鱼鳍条基本形成,鳞片开始出现,进入稚鱼期。

第1批长鳍吻鮡鱼苗在出膜后7-10d左右时,每天均出现大量死亡,观察发现,鱼苗身体瘦弱,肠道内无食物。分析其原因,可能是因为长鳍吻鮡鱼苗在卵黄囊耗尽前的短期内开始转向外界摄食,此时为内源性和外源性营养共存的混合营养期,而在此阶段,长鳍吻鮡仔鱼没有获得足够的营养,导致其卵黄营养耗尽后一直处于饥饿状态,尽管还能生存较长一段时间,但很难恢复摄食能力,导致鱼苗死亡。

### 参 考 文 献

- 邓辉胜,何学福.长江干流长鳍吻鮡的生物学研究.西南农业大学学报(自然科学版),2005,27(5):704-708
- 史建全,祁洪芳,杨建新,等.青海湖裸鲤人工繁殖及鱼苗培育技术的研究.淡水渔业,2000,30(2):3-6
- 卢敏德,杨彩根,葛志亮,等.似刺鲃胚胎发育的研究.水产养殖,1996(6):15-18
- 刘军.长江上游特有鱼类受威胁及优先保护顺序的定量分析.中国环境科学,2004,24(4):395-399.
- 许静,谢从新,邵俭,等.雅鲁藏布江尖裸鲤胚胎和仔稚鱼发育的研究.水生态学杂志,2011,32(2):86-95.
- 陈永祥,罗泉笙.乌江上游四川裂腹鱼的胚胎发育.四川动物,1997,16(4):163-167
- 何雪福,宋昭彬,谢恩义.蛇鮡的产卵习性及其胚胎发育.西南师范大学学报(自然科学版),1996,21(3):276-281
- 辛建峰,杨宇峰,段中华,等.长江上游长鳍吻鮡的种群特征及其物种保护.生态学杂志,2010,29(7):1377-1381
- 李强,姚明予,周波,等.中华沙鳅人工繁殖技术初探.淡水渔业,2011,41(5):92-94
- 罗芬.长鳍吻鮡精子活力的观察.泉州师范学院学报,2011,29(6):25-28
- 杨明生,李建华,黄孝湘.渭河花斑副沙鳅的繁殖生态学研究.水利渔业,2007,27(5):84-85
- 周春生,梁秩燊,黄鹤年.兴修水利枢纽后汉江产漂流性卵鱼类的繁殖生态.水生生物学学报,1980,7(2):175-188
- 徐念,史方,熊美华,等.三峡库区长鳍吻鮡种群遗传多样性的初步研究.水生态学杂志,2009,30(2):113-116
- 梁银铨,胡小建.长薄鳅人工繁殖技术的研究.水生生物学报,2001,25(4):422-424
- 谢仰杰,翁朝红,管延华,等.温度对花尾胡椒鲷胚胎发育的影响.集美大学学报(自然科学版),2001,6(2):138-143
- Alavi SMH, Cosson J. Sperm motility in fishes. Effects of temperature and PH:A review. Cell Biol Int, 2005, 29(2): 101-110
- Lake JS. 1967. Rearing experiments with five species of Australian freshwater fishes. II. Morphogenesis and ontogeny. Australian J Mar Freshwat Res, 2005, 18: 155-176
- Martell DJ, Kieffer JD, Trippel EA. Effects of temperature during early life history on embryonic and larval development and growth in haddock. J Fish Biol, 2005, 66(6): 1558-1575
- Sansone G, Fabbrocini A, Leropoli S, et al. Effects of extender composition, cooling rate, and freezing on the motility of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) spermatozoa after thawing. Cryobiology, 2002, 44(3): 229-239

(编辑 陈严)

## Study on the Embryonic and Early Larval Development of *Rhinogobio ventralis*

GUAN Min, XIAO Kan, HU Meihong, LIU Yong, LU Xuebao,  
NI Yong, GUO Wentao<sup>①</sup>, QU Huantao, LI Sha

(Hubei Province Key Laboratory of the Three Gorges Project Fish Resources Protection, China Yangtze  
Three Gorges Group Company, the Chinese Sturgeon Research Institute, Yichang 443100)

**Abstract** The current study investigated the embryonic and early larval development of *Rhinogobio ventralis* using the micro electronic imaging technology. The running-water hatching way was used to incubate the fertilized egg. The hatching water temperature was 17.6–18.3°C and DO was 7–9 mg/L. The results showed that the range of *R.ventralis* egg diameter, egg membrane diameter and egg weight was 1.7–1.9 mm, 6.6–7.0 mm and 0.0059–0.0077 g, respectively, and that the life and swirling movement time of sperm were 96.56–119.12 s and 25.43–31.43 s, respectively. The time period for embryonic development was 56 h at 17.6–18.3°C. Eight embryo development stages of *R.ventralis* were described, which included fertilized egg, blastoderm, cleavage, blastula, gastrula, neurula, organogenesis, and hatching period. The yolk-sac of larvae disappeared after being reared for 5 days in the water at 18.5–22°C. The yolk-sac of 6-days age larvae disappeared completely, and the late larval stage began. The fin of 30-days age larva was basically formed and scales began to form. The growing larvae further developed into juvenile stage after 30 days. Our study provides theoretical basis and scientific reference for the mass reproduction of *R.ventralis*.

**Key words** *Rhinogobio ventralis*; Embryonic development; Larvae development

---

① Corresponding author: GUO Wentao, E-mail: realgwt2008@163.com

# 北部湾鲷(*Euthynnus affinis*)的摄食习性 及其随生长发育的变化\*



宿鑫<sup>1</sup> 李永东<sup>1</sup> 何雄波<sup>1</sup> 卢伙胜<sup>1,2</sup> 颜云榕<sup>1,2①</sup>

(1. 广东海洋大学水产学院 湛江 524088; 2. 广东海洋大学南海渔业资源监测与评估中心 湛江 524088)

**摘要** 基于2008年9月–2009年9月在北部湾逐月采集的435尾鲷(*Euthynnus affinis*)生物学数据,对鲷生长、摄食习性及其随生长发育的变化进行了分析。结果显示,北部湾鲷属于广食性鱼类,主要摄食中上层小型鱼类,另外还包括底栖鱼类、甲壳类和头足类等。少鳞犀鲷(*Bregmaceros rarisquamosus*, 45.50%)、青带小公鱼(*Stolephorus zollingeri*, 11.81%)和长颌棱鯧(*Theyssa setirostris*, 5.89%)为鲷优势饵料生物种类,并且其主要饵料生物种类随采样时间的不同而有所差异,如金色小沙丁鱼(*Sardinella aurita*, 1月)、未能鉴定鱼类(4–7月)、长颌棱鯧(8月)、条鲷(*Leignathus riviulatus*, 9月)、青带小公鱼(10月)、少鳞犀鲷(11–翌年3月)。体长小于340 mm的鲷个体随体长的增加其平均摄食饵料生物的个数与质量呈上升趋势;体长在341–520 mm范围内的鲷个体,随着体长的增加其平均摄食饵料生物的个数与质量总体上呈现下降趋势。鲷产卵主要集中在4–8月,根据雌性GSI(性腺成熟度指数)分析,具有两个产卵高峰期(6月、8月),产卵高峰期和中上层水温的升高有密切关系。鲷的摄食强度在性腺发育过程中波动较大,但在产卵期间,其摄食强度并未明显降低。

**关键词** 北部湾; 鲷; 摄食习性; 性腺发育

**中图分类号** S931.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)04-0065-08

鲷(*Euthynnus affinis*)属于鲈形目(Perciformes)、鲷科(Scombroidei)、鲷属(*Euthynnus*),为海洋中上层高度洄游性鱼类,主要分布在印度洋、太平洋与大西洋中部,属于热带–亚热带大洋性经济价值较高的种类(FAO, 2003)。鲷作为高营养级捕食者,在中上层海洋生态系统的食物链中扮演重要角色(Korsmeyer *et al.*, 2001),其相关的研究也引起了国内外学者的普遍关注。目前,这些研究主要集中在摄食习性的变化、洄游和繁殖特征等(Muthiah, 1985; Ommann, 1953; Williamson, 1970; Blaber *et al.*, 1990; Chiou *et al.*, 2004a、b; Shane *et al.*, 2009)方面。北部湾位于我国南海西北部,为中越两国共用的重要渔场,鲷为北部湾渔业中主要的中上层渔获种类,在北部湾渔业生态系统中占有非常重要的地位(卢伙胜等, 2009),关于北部湾鲷摄食习性及其相关的研究尚未见报道。

本研究基于2008年9月–2009年9月逐月采集的北部湾鲷样品的生物学数据,研究了其摄食习性及其随生长发育的变化,旨在为北部湾鲷资源的可持续性开发提供理论依据,也为北部湾鱼类的生态学提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集和分析

**1.1.1 样品采集** 样品取自2008年9月–2009年9月北部湾海域的渔获物。采样地点为广西北海、海南三亚、八所以及广东江洪(图1),对在北部湾内中方海域及湾口海域作业的流刺网和拖网渔获物进行随机抽样。采集的样品按照海洋调查规范(GB/T12763)进行体长(精确到1 mm)、体重和纯体重(精确到1 g)、

\* 国家自然科学基金项目(41376158)和(30771653)共同资助。宿鑫, E-mail: xinsu\_gdou@126.com

① 通讯作者: 颜云榕, 教授, E-mail: yanyr@gdou.edu.cn

收稿日期: 2014-08-18, 收修改稿日期: 2014-12-20

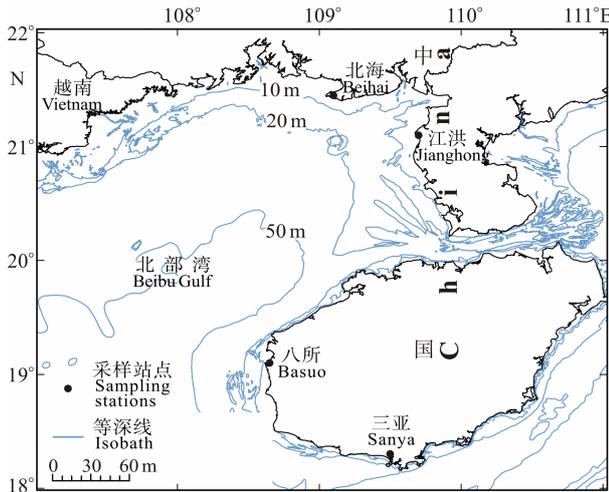


图1 北部湾鲷样品采集地点分布

Fig.1 The location of sampling fishing ports in the Beibu Gulf

性腺重量(精确到 0.1 g)等生物学参数的测定。

**1.1.2 样品胃含物及性腺的分析** 鲷的胃样品在接近口部的食道处剪断,采用低温速冻保存后带回实验室,进行胃含物分析,主要将胃分为5个等级。使用双筒解剖镜(Leica Zoom 2000 Z45V)进行胃含物分析,参考海洋生物分类资料(成庆泰等, 1987; 宋海棠等, 2006; 黄宗国, 2008),依据形态特征尽可能鉴定到最低分类阶元,用滤纸吸干表面水后,用精度为 0.001 g 的电子天平称重。样品性腺成熟度分为 I 期、II 期、III 期、IV 期、V 期、VI 期共 6 个等级(福建水产学校, 1985; 陈新军, 2004)。

## 1.2 数据统计和分析

**1.2.1 体长与体重关系** 通过鲷体长( $L$ , mm)与体重( $W$ , g)的关系式  $W=aL^b$ ,研究鲷体重与体长的生长关系(詹秉义, 1995)。

**1.2.2 数据分析** 每种食物的出现率( $F\%$ )、个数百分比( $N\%$ )、重量百分比( $W\%$ )(Hyslop, 1980)和空胃率(Weitkamp *et al.*, 2008)分别采用以下公式计算:

$$F\% = \frac{\text{该食物成分出现的次数}}{\text{各食物成分出现的总次数}} \times 100 \quad (1)$$

$$N\% = \frac{\text{该食物成分的尾数}}{\text{食物团中食物组成的总尾数}} \times 100 \quad (2)$$

$$W\% = \frac{\text{该食物成分的更正重量}}{\text{食物团的更正重量}} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{空胃率} = \frac{\text{空胃数}}{\text{总胃数}} \times 100$$

每种食物成分的重要性(Hacunda, 1981)用相对重要性指标( $IRI$ )(Field *et al.*, 1982)和相对重要性指数百分比( $IRI\%$ )(Pinkas *et al.*, 1971)来衡量,计算公式如下:

$$IRI = (N\% + W\%) \times F\% \quad (4)$$

$$IRI\% = (IRI / \sum IRI) \times 100 \quad (5)$$

用饱满指数(Repletion Index,  $RI$ )(Figueiredo *et al.*, 2005)、空胃率和摄食率评估鲷的摄食强度,其公式如下:

$$RI = \frac{\text{饵料重量}}{\text{纯体重}} \times 100 \quad (6)$$

用雌性的性成熟指数(Gonad Somatic Index,  $GSI$ )(Htun-Han, 1978)分析鲷的繁殖情况,研究其食性随繁殖阶段的变化。

$$GSI = \frac{\text{卵巢重量}}{\text{纯体重}} \times 100 \quad (7)$$

采用 Brillouin 指数  $H_k$  评估营养多样性(Pielou, 1969)。

$$H_k = \frac{1}{N} \log_{10} \frac{N!}{N_1! N_2! \dots N_k!} \quad (8)$$

式中,  $N$  为  $k$  种饵料生物种类的总个数,  $N_k$  为第  $k$  种饵料生物的个体数。计算最大营养多样性指数  $H_z$  和处于  $H_z \pm 0.05H_z$  范围内的个数,判断各月样本数量是否满足评估营养多样性的要求(Koen *et al.*, 2002)。

北部湾中上层水温(表层、20 m、30 m)数据来源于法国 CATSAT(凯撒)系统海洋环境数据。数据统计分析应用 SPSS 17.0 软件对鲷不同体长组、月份的摄食变化进行单因素方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 鲷群体结构及摄食随个体生长的变化

共采集 435 尾(表 1)鲷(实胃数 338 尾),体长范围为 165–520 mm。除 2009 年 6 月由于胃含物中的鱼类未能鉴定而导致营养多样性指数( $H_z$ )为 0 外,其余各月的  $H_z$  变化较小[方差  $D(X)=0.14$ ],且各月样品  $H_z$  落在  $H_z \pm 0.05H_z$  范围内的个数均超过两个。

北部湾鲷群体最小体长为 165 mm,最大体长为 520 mm;优势体长为 220–370 mm,占总体样本的 66.67%(图 2)。最大体重为 2580 g,最小体重为 24.7 g;优势体重为 171–920 g,占总体样本的 63.91%(图 3)。其体长与体重的关系式为  $W_1 = 8.002 \times 10^{-6} L^{3.16}$ ,  $R_1^2 = 0.9709$ 。

北部湾鲷在 311–340 mm 体长组中平均饵料生物个数最多,达 6.58 个;在 491–520 mm 体长组中,平均饵料生物个数最少,只有 0.7 个。平均饵料生物重量最大值为 11.14 g,最小值为 1.0 g(图 4)。

### 2.2 食物组成及其月变化

**2.2.1 食物组成** 北部湾鲷的摄食对象包括鱼类(少鳞犀鲂 *Bregmaceros rarisquamosus*, 青带小公鱼 *Stolephorus zollingeri*, 长颌棱鯧 *Theyssa setirostris* 和金色小沙丁鱼 *Sardinella aurita* 等),甲壳类(对虾类、蟹类和毛虾类)和头足类,共 21 种(表 2),属于广食性鱼类。

表 1 北部湾鲷胃含物样品  
Tab.1 Samples for analysis of stomach content of *E. affinis* in the Beibu Gulf

采样时间(年-月) Sampling time (Year-Month)	体长范围 Range of SL(mm)	平均体长 Average SL(mm)	总胃数 Number of stomachs	空胃数 Empty stomachs	营养多样性指数 Trophic diversity $H_z$	$H_z \pm 0.05 H_z$ 数据个数 Samples number within $H_z \pm 0.05 H_z$
2008-09	165-285	229±6	35	7	0.47	22
2008-10	224-325	282±6	32	8	0.18	27
2008-11	304-355	330±3	21	0	0.44	18
2008-12	269-390	324±4	45	14	0.26	38
2009-01	283-355	330±2	51	34	0.37	19
2009-02	232-304	258±3	50	3	0.53	28
2009-03	274-444	374±11	15	2	0.59	8
2009-04	408-435	421±2	12	4	0.47	4
2009-05	216-425	279±7	50	11	0.47	19
2009-06	343-441	417±11	8	0	-	-
2009-07	345-520	460±7	30	4	0.45	11
2009-08	205-466	295±7	47	9	0.52	31
2009-09	290-333	303±4	39	1	0.60	25

-表示无; - . No data

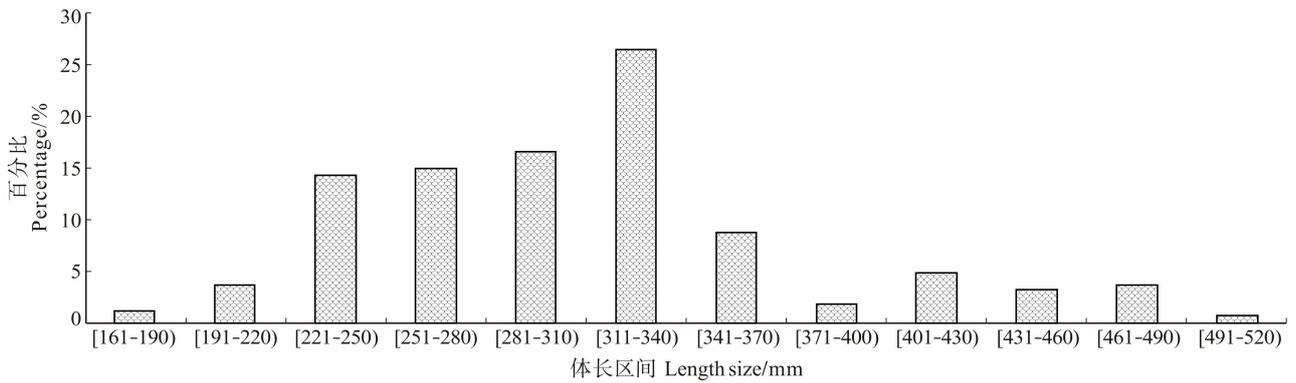


图 2 鲷体长组成

Fig.2 The body length distribution of *E. affinis*

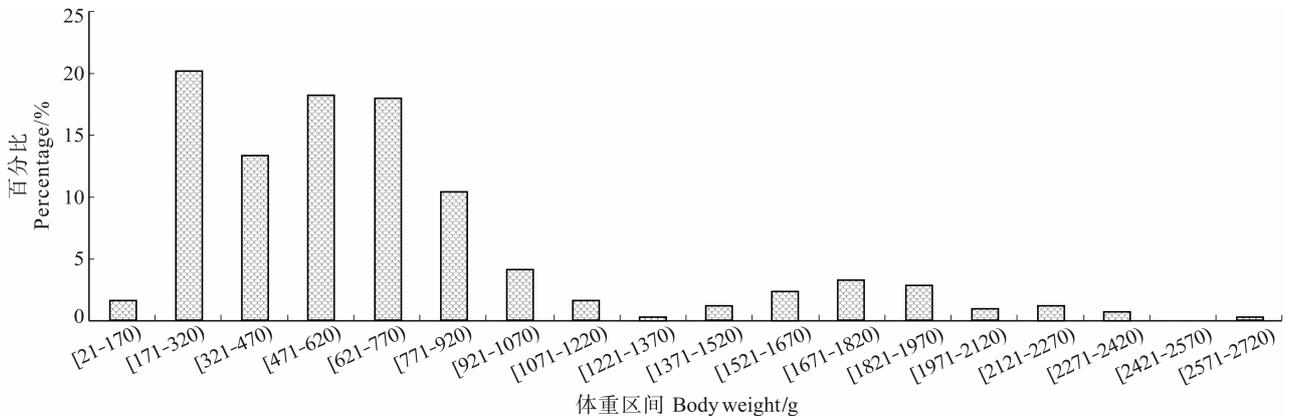


图 3 鲷体重组

Fig.3 The body weight distribution of *E. affinis*

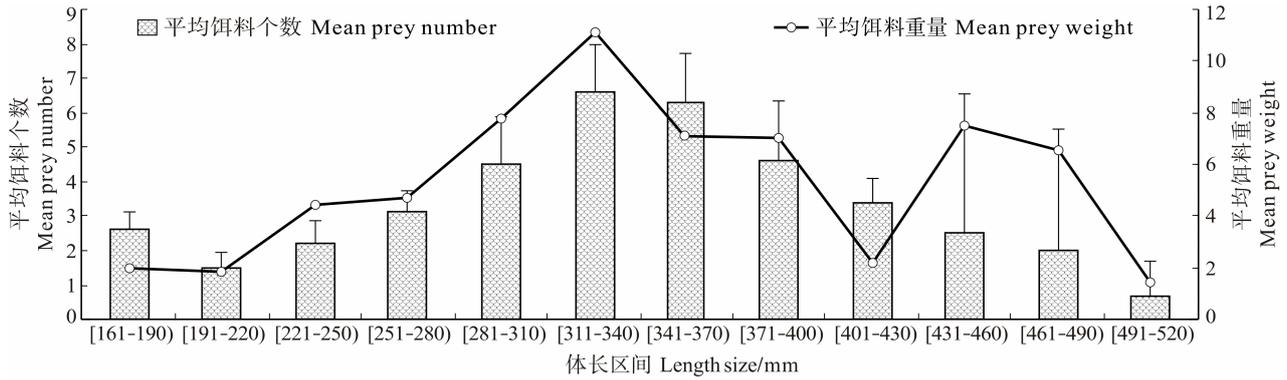


图4 北部湾鲷摄食饵料生物个数及体重随体长的变化

Fig.4 Comparative mean prey numbers and prey weight of *E. affinis* in different body length groups

表2 北部湾鲷食物组成

Tab.2 Diet composition of *Euthynnus affinis* in the Beibu Gulf

饵料种类 Prey category	个数 No.	个体数 百分比(%) <i>N</i>	体重 百分比(%) <i>W</i>	出现 频率 <i>F</i>	出现频率 百分比(%) <i>F</i>	相对重要性 指数 <i>IRI</i>	<i>IRI</i> %
蟹类 (Crabs)	9	0.48	—	4	0.76	0.36	0.02
口虾蛄( <i>Oratosquilla oratoria</i> )	1	0.05	—	1	0.19	0.01	—
大管鞭虾( <i>Solenocera crassicomis</i> )	7	0.37	0.52	4	0.76	0.68	0.04
中国毛虾( <i>Acetes chinensis</i> )	5	0.27	0.22	3	0.57	0.27	0.01
滑脊等腕虾( <i>Heterocarpoides laevis</i> )	68	3.61	1.21	19	3.60	17.35	0.91
不可辨认虾类(Unidentified shrimps)	33	1.75	0.54	9	1.70	3.90	0.20
多齿蛇鲻( <i>Saurida tumbil</i> )	2	0.11	0.66	2	0.38	0.29	0.02
少鳞犀鲑( <i>Bregmaceros rarisquamosus</i> )	600	31.86	16.43	95	17.99	868.85	45.50
银腰犀鲑( <i>Bregmaceros nectabanus</i> )	4	0.21	0.29	2	0.38	0.19	0.01
金色小沙丁鱼( <i>Sardinella aurita</i> )	178	9.45	10.97	29	5.49	112.18	5.88
裘氏小沙丁鱼( <i>Sardinella jussieu</i> )	23	1.22	3.63	9	1.70	8.27	0.43
青带小公鱼( <i>Stolephorus zollingeri</i> )	145	7.70	16.60	49	9.28	225.50	11.81
尖吻小公鱼( <i>Stolephorus heteroboba</i> )	25	1.33	1.76	13	2.46	7.61	0.40
康氏小公鱼( <i>Stolephorus commersoni</i> )	16	0.85	1.93	8	1.52	4.21	0.22
小公鱼属( <i>Stolephorus</i> sp.)	48	2.55	4.15	28	5.30	35.50	1.86
长颌棱鯧( <i>Thryssa setirostris</i> )	250	13.28	6.53	30	5.68	112.56	5.90
蓝圆鲹( <i>Decapterus maruadsi</i> )	24	1.27	1.55	11	2.08	5.89	0.31
大甲鲹( <i>Megalapis cordyla</i> )	6	0.32	2.12	5	0.95	2.31	0.12
竹荚鱼( <i>Trachurus japonicus</i> )	8	0.42	2.64	6	1.14	3.49	0.18
条鲷( <i>Leignathus riviulatus</i> )	111	5.89	2.25	28	5.30	43.18	2.26
粗纹鲷( <i>Leignathus lineolatus</i> )	32	1.70	2.01	13	2.46	9.13	0.48
黄斑鲷( <i>Leignathus bindus</i> )	94	4.99	5.84	23	4.36	47.18	2.47
带鱼( <i>Trichiurus japonicus</i> )	6	0.32	7.28	5	0.95	7.20	0.38
不可辨认鱼类(Unidentified Pisces)	153	8.13	9.72	115	21.78	388.60	20.35
不可辨认头足类(Unidentified Cephalopod)	1	0.05	0.11	1	0.19	0.03	—
中国枪乌贼( <i>Uroteuthis chinensis</i> )	26	1.38	0.53	10	1.89	3.62	0.19
枪乌贼属( <i>Uroteuthis</i> sp.)	8	0.42	0.50	6	1.14	1.05	0.06

—表示所占比例&lt;0.01%

— means the value was &lt;0.01%

在饵料生物组成中, 以 *IRI%*(相对重要性指数百分比)为指标, 鲷的主要摄食对象为鱼类(98.57%), 其次为甲壳类(1.18%)和头足类(0.25%)。优势饵料生物为少鳞犀鲂(45.50%)、青带小公鱼(11.81%)和长颌棱鯧(5.89%)。

**2.2.2 食物组成的月变化** 北部湾鲷以鱼类为主要摄食对象, *IRI%*达 98.57%(表 3)。在不同月, 其主要饵料生物种类也有差别: 2008 年 9 月以条鲷(*Leignathus riviulatus*)为主; 10 月以青带小公鱼为主; 11、12 月及 2009 年 2 月以少鳞犀鲂、黄斑鲷和青带小公鱼为主; 2009 年 1 月以金色小沙丁鱼为主; 3 月以少鳞犀鲂、青带小公鱼和蓝圆鲹为主; 4-7 月以未能鉴定鱼类为主; 8 月以长颌棱鯧为主。在饵料生物中,

少鳞犀鲂的相对重要性指数百分比(*IRI%*)最高, 为 17.64%, 其次为青带小公鱼和长颌棱鯧, 分别为 12.27% 和 7.19%。饵料生物在不同月份出现的频数有显著差异, 如少鳞犀鲂、青带小公鱼、长颌棱鯧、金色小沙丁鱼等分别在不同月份出现, 而蟹类、口虾蛄、大管鞭虾、多齿蛇鲻、银腰犀鲂和裘氏小沙丁鱼仅在个别月出现。

**2.3 摄食随性腺发育的变化**

**2.3.1 性腺发育的月变化** 北部湾鲷在 4 月开始性成熟, 其中, 性腺为 IV 期的个体占 39.56%, V 期的个体占 17.6%; 5 月性腺为 V 期的个体比例明显增加, 达到 37.89%; 6 月性腺全部为 V 期, 进入产卵高峰期。从 2008 年 10 月-2009 年 3 月, 性腺为 I 期的个体

表 3 北部湾鲷食物组成 *IRI%*月变化  
Tab.3 Monthly variation of *IRI%* of *E. affinis* in the Beibu Gulf

饵料种类 Prey category	2008.9	2008.10	2008.11	2008.12	2009.1	2009.2	2009.3	2009.4	2009.5	2009.6	2009.7	2009.8	2009.9
蟹类(Crabs)								12.45					
口虾蛄( <i>O. oratoria</i> )								0.56					
大管鞭虾( <i>S. crassicomis</i> )											1.34		
中国毛虾( <i>A. chinensis</i> )							0.12						0.38
滑脊等腕虾( <i>H. laeivarinata</i> )			8.63										0.74
不可辨认虾类(Unidentified shrimps)								31.82	1.87		1.67		
多齿蛇鲻( <i>S. tumbil</i> )			0.25										
少鳞犀鲂( <i>B. rarisquamosus</i> )	3.43		55.67	54.45	3.73	79.47	30.31		2.34				
银腰犀鲂( <i>B. nectabanus</i> )												0.38	
金色小沙丁鱼( <i>S. aurita</i> )		15.40			51.84	8.23	10.28						
裘氏小沙丁鱼( <i>S. jussieu</i> )													17.67
青带小公鱼( <i>S. zollingeri</i> )		84.24		45.30			30.02						
尖吻小公鱼( <i>S. heteroboba</i> )											4.05		10.76
康氏小公鱼( <i>S. commersoni</i> )												8.34	
小公鱼属( <i>Stolephorus</i> sp.)	18.77		4.33		7.67	0.38							
长颌棱鯧( <i>T. setirostris</i> )	2.44	0.36										57.45	33.22
蓝圆鲹( <i>D. maruadsi</i> )							29.12		0.76		1.35		
大甲鲹( <i>M. cordyla</i> )			0.03						6.16				
竹荚鱼( <i>T. japonicus</i> )	1.39										12.23		
条鲷( <i>L. riviulatus</i> )	73.97				2.78	1.42							
粗纹鲷( <i>L. lineolatus</i> )									0.10			16.00	
黄斑鲷( <i>L. bindus</i> )			31.09	0.25									
带鱼( <i>T. japonicus</i> )						0.04						2.04	3.47
不可辨认鱼类(Unidentified Pisces)					29.62	6.17		47.88	88.77	100.00	80.70	14.46	33.73
不可辨认头足类(Unidentified Cephalopod)						0.04							
中国枪乌贼( <i>U. chinensis</i> )						4.24							0.04
枪乌贼属( <i>Uroteuthis</i> sp.)					4.35		0.16	7.28					

均占当月总样本含量的30%以上,其中2008年10月最高,为93.56%。

**2.3.2 摄食与性腺发育及水温变化的关系** 鲭的摄食强度在不同月份具有明显差异,月摄食率与平均饱满指数(RI)曲线的波动趋势基本一致(图5)。鲭的平均性成熟指数在6月最高(6.44),此时摄食率为100%,饱满指数较低;8月平均性成熟指数又出现一次小高峰(2.08)。摄食率在1月最低,为33%;在3月、6月和11月最大,为100%。饱满指数在10月最大,为3.79;在4月最低,为0.0003。单因素方差检验表明,各月摄食强度差异显著( $P < 0.05$ )。

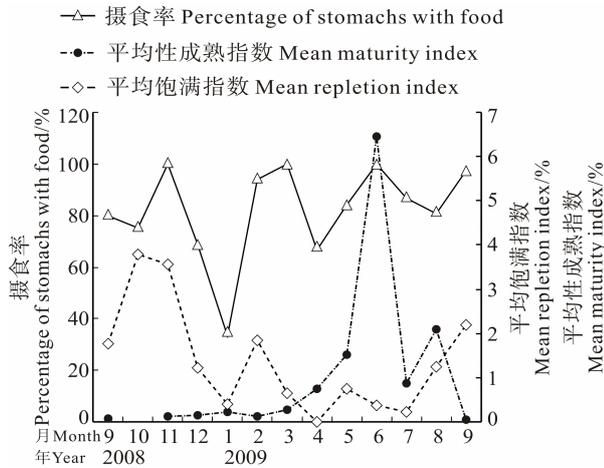


图5 北部湾鲭摄食强度及成熟系数的月变化  
Fig.5 Monthly variation of feeding intensity and maturity coefficient of *E. affinis* in the Beibu Gulf

北部湾表层(SST)、20 m和30 m水深水温变化趋势大致相同,每年6-9月水温相对较高,这与鲭的性成熟指数GSI值的变化相吻合,相关性分析显示二者显著相关( $P > 0.05$ ),表明鲭产卵高峰期的出现与中上层水温的变化有密切关系。北部湾鲭雌性个体的GSI值在1-5月增长,6月达到最高值,进入产卵高峰期,此时雌雄个体的GSI值最高,分别为6.44和4.15;从7月开始下降,至8月出现较高值(2.08);9月则开始下降至最低值(图6)。

### 3 讨论

#### 3.1 鲭的摄食习性

北部湾鲭的摄食对象包括中上层小型鱼类、底栖鱼类、甲壳类和头足类,主要以鱼类为主(IRI%为98.57%),甲壳类(1.18%)和头足类(0.25%)比例较低,其优势饵料生物为少鳞犀鲭(IRI%为45.50)、青带小公鱼(11.81)和长颌棱鲳(5.89%)。在不同的海域环境

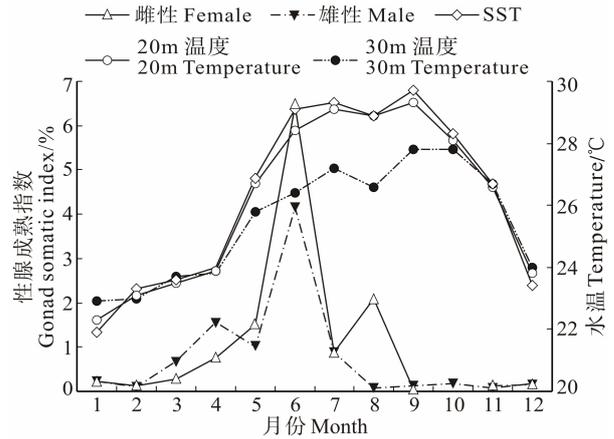


图6 北部湾鲭的性腺成熟指数与中上层水温变化的关系曲线  
Fig.6 Monthly variation of different layers water temperature and *E. affinis* GSI in the Beibu Gulf

中,由于饵料生物种类及丰度的差异,鲭的摄食对象及其优势饵料生物种类有所差异:在所罗门群岛海域,鲭的饵料生物中90%以上是鱼类,其优势饵料生物为小公鱼属(Blaber *et al.*, 1990);台湾岛附近海域鲭摄食对象包括鱼类和软体动物类,主要以鳀科和灯笼鱼科幼鱼为主(Chiou *et al.*, 2004);澳大利亚东部近岸海域鲭的优势饵料生物是中上层鲱科鱼类,而小公鱼属仅占8.7%(Shane *et al.*, 2009)。鲭在其分布海域属于中上层捕食者,而其摄食对象包含底栖鱼类、甲壳类和头足类,这可能与鲭属于广食性鱼类有关,当中上层饵料生物减少时,鲭可选择性地摄食底栖生物。

北部湾鲭的饵料生物种类随采样时间不同具有明显差异,少鳞犀鲭、金色小沙丁鱼、青带小公鱼等在各月份出现频率较高,蟹类、口虾蛄、大管鞭虾、多齿蛇鲻、银腰犀鲭等饵料生物仅在个别月份出现,这种变化与饵料生物种类和丰度的季节变化直接相关,也可能与不同月份鲭优势个体体长的差异有关(Chen *et al.*, 1986)。

#### 3.2 鲭摄食随个体生长的变化

鱼类摄食习性随体长变化是一个普遍现象(Takahashi, 1974),北部湾鲭也不例外,体长小于340 mm的鲭个体随体长的增加其平均摄食饵料生物的个数与重量呈上升趋势;体长在341-520 mm范围内的鲭个体,随着体长的增加其平均摄食饵料生物的个数与重量总体上呈现下降趋势。Yesaki(1994)研究发现,在印度洋-大西洋海域,体长250-350 mm的鲭个体为未达到性成熟的1龄个体,因此,北部湾体长在340 mm以下的鲭个体可能属于未达到性成熟的1龄个体,这种个体由于其快速发育的形态和运动特征,

捕食饵料生物的数量和体重随体长的增加而增加。本研究中体长较大的鲷个体(体长大于 341 mm)主要采集于 2009 年 4、6、7 和 8 月(表 1), 性成熟比例较高, 性成熟个体的体腔绝大部分被性腺占据, 大大压缩胃的空间, 促使个体捕食的饵料生物质量减小, 同时减少单次进食饵料生物的数量。

### 3.3 鲷摄食随性腺发育的变化

水温变化是影响鱼类性成熟的一个重要因素(Takahashi, 1974)。北部湾鲷产卵主要集中在 4–8 月, 此时该海域水温较高(表层水温高达 29.7°C), 表明鲷的繁殖与水温的变化有着密切关系。雌性个体的 *GSI* 值在一年中出现两个峰值, 与其平均性成熟指数的峰值吻合, 反映北部湾鲷有一个主要产卵高峰期(6 月)和一个次要产卵高峰期(8 月)。在其他研究中也类似发现, 如在坦桑尼亚沿岸海域, 鲷具有两个产卵期, 分别为 6–7 月和 11–翌年 2 月(Buñag, 1956), 芒格洛尔近岸海域鲷的产卵高峰期出现在 9–10 月(Muthiah, 1985), 西印度洋鲷的产卵期从 11、12 月一直延伸到翌年 4、5 月(Ommann, 1953)。

北部湾鲷在产卵高峰期, 其摄食率仍保持在一个较高水平(80%以上), 表明鲷的摄食强度并不会随产卵高峰期的出现而明显降低, 这与澳大利亚东部近岸海域鲷的摄食习性不同(Shane *et al.*, 2009), 但与北部湾鱼类如宝刀鱼(颜云榕等, 2011)、带鱼(颜云榕等, 2010b)和多齿蛇鲻(颜云榕等, 2010a)等摄食情况相似。这可能与北部湾鲷的洄游习性有关, 鲷具有明显的生殖洄游和索饵洄游(Chiou *et al.*, 2004a、b), 广东省沿岸海域的鲷在每年 6–8 月洄游到香港东部海域进行产卵(Williamson, 1970), 因此, 为了补充洄游过程中的能量消耗, 这一时期北部湾内的鲷仍强烈索饵。同时, 6 月鲷的采集受到南海禁渔期的影响, 样品采集数量相对偏少, 且样品均采集于单片表层刺网, 这可能也会对其摄食强度造成影响。

鲷在产卵前(3–4 月)会大量摄食, 为产卵期积累营养。产卵后, 通过增加食物量来补充在产卵期消耗的能量。但是, 鲷的食物组成伴随其性腺的发育没有显著变化, 都是以鱼类为主要摄食对象。

## 参 考 文 献

- 中华人民共和国国家标准. 海洋调查规范, 第 6 部分: 海洋生物调查. GB/T12763. 6–2007, 2007
- 成庆泰, 郑葆珊. 中国鱼类系统检索. 北京: 科学出版社, 1987
- 卢伙胜, 颜云榕, 侯刚, 等. 2009 年度南海渔业资源调查报告. 湛江: 广东海洋大学, 2010
- 陈新军. 渔业资源与渔场学. 北京: 科学出版社, 2004
- 宋海荣, 俞存根, 薛利建, 等. 东海经济虾蟹类. 北京: 海洋出版社, 2006
- 黄宗国. 中国海洋生物种类及分布. 北京: 海洋出版社, 2008
- 福建水产学校. 渔业资源与渔场. 北京: 农业出版社, 1985
- 詹秉义. 渔业资源评估. 北京: 中国农业出版社, 1995
- 颜云榕, 王田田, 侯刚, 等. 北部湾多齿蛇鲻摄食习性及其随生长发育的变化. 水产学报, 2010a, 34(7): 89–98
- 颜云榕, 杨厚超, 卢伙胜, 等. 北部湾宝刀鱼的摄食生态. 生态学报, 2011, 31(3): 654–665
- 颜云榕, 陈骏岚, 侯刚, 等. 北部湾带鱼的摄食习性. 应用生态学报, 2010b, 21(3): 749–755
- Blaber SJM, Milton DA, Rawlinson NJF. Diets of lagoon fishes of the Solomon Islands: predators of tuna baitfish and trophic effects of baitfishing on the subsistence fishery. *Fish Res*, 1990, 8: 263–286
- Buñag DM. Spawning habits of some Philippine tuna based on diameter measurements of the ovarian ova. *J Philipp Fish*, 1956, 4: 145–177
- Chiou WD, Lee LK. Migration of Kawakawa *Euthynnus affinis* in the waters near Taiwan. *Fish Sci*, 2004a, 70: 746–757
- Chiou WD, Cheng LZ, Chen KW. Reproduction and food habits of kawakawa *Euthynnus affinis* in Taiwan. *J Fish Soc Taiwan*, 2004b, 31: 23–38
- Chen YU, Tsay CT. Food and feeding habits of oceanic bonito, *Euthynnus affinis yaito* (Kishinouye) in eastern waters of Taiwan. *Bull Taiwan Fish Res Inst*, 1986, 42: 51–56
- FAO. FISHSTAT Plus: Universal Software for fishery Statistical Time Series, version 2.3. FAO Fisheries Department, Fishery Information, Data and Statistics Unit, 2003
- Field JG, Clarke KR, Warwick RM. A practical strategy for analysis of multispecies distribution patterns. *Mar Ecol Prog Ser*, 1982, 8: 37–52
- Figueiredo M, Morato T, Barreiros JP, *et al.* Feeding ecology of the white seabream, *Diplodus sargus*, and the ballan wrasse, *Labrus bergylta*, in the Azores. *Fish Res*, 2005, 75(1–3): 107–119
- Hacunda JS. Trophic relationships among demersal fishes in a coastal area of the Gulf of Maine. *Fish Bull*, 1981, 79: 775–788
- Htun-Han M. The reproductive biology of the dab *Limanda limanda* (L.) in the North Sea: Seasonal changes in the ovar. *Jour of Fish Biol*, 1978, 13(3): 351–359
- Hyslop EJ. Stomach contents analysis—a review of methods and their application. *Journal of Fish Biology*, 1980, 17: 411–429
- Johnson MG, Tamatamah AR. Length frequency distribution, mortality rate and reproductive biology of kawakawa (*Euthynnus affinis*-Cantor, 1894) in the coastal waters of Tanzania. *Pakistan Jour Biol Sci*, 2013, 16(21): 1270–1278
- Koen AM, Alberto CE, Anbal GN, *et al.* Fishery and ontogenetic driven changes in the diet of the spiny dogfish, *Squalus acanthias*, in Patagonian Waters, Argentina. *Env Biol Fish*, 2002, 63(2): 193–202
- Korsmeyer KE, Dewar H. Tuna metabolism and energetics. In *Tuna Physiology, Ecology and Evolution*, pp. 35–78. Ed by

- Block BA, and Stevens ED. Academic Press, San Diego. 2001
- Muthiah C. Maturation and spawning of *Euthynnus affinis*, *Auxis thazard* and *Auxis rochei* in the Mangalore Inshore Area during 1979–82. Central Mar Fish Res Ins, 1985, 36: 71–85
- Ommanne FD. The pelagic fishes. Note on tow nettings: Part II: Distribution of macroplankton, fish eggs and young fish. In Report on the Mauritius-Seychelles Fisheries Survey 1948–49. G B Colon Off Fish Publ, 1953, 1(3): 58–104
- Pielou EC. An Introduction to Mathematical Ecology. New York: Wiley-Interscience, 1969, 286
- Pinkas L, Oliphant M S, Iverson L K. Food habits of albacore, bluefin tuna, and bonito in California waters. State of California The Resources Agency Department of Fish and Game. Fish Bulletin, 1971, 152: 1–105
- Shane PG, Petra MK, Gary FF, *et al.* Temporal and size-related variation in the diet, consumption rate, and daily ration of mackerel tuna (*Euthynnus affinis*) in neritic waters of eastern Australia. ICES Jour Mar Sci, 2009, 66(4): 720–733
- Takahashi S. Sexual maturity of isaza (*Chaenogobius isaza*) -I. The seasonal changes of growth and sexual maturation. Bull Jpn Soc Sci Fish, 1974, 40: 847–857
- Weitkamp LA, Sturdevant MV. Food habits and marine survival of juvenile Chinook and coho salmon from marine waters of Southeast Alaska. Fish Oceanog, 2008, 17(5): 380–395
- Williamson GR. Little tuna *Euthynnus affinis* in the Hong Kong area. Bull Jpn Soc Sci Fish, 1970, 36(1): 9–18
- Yesaki M. A review of the biology and fisheries for kawakawa (*Euthynnus affinis*) in the Indo-Pacific region. Interactions of Pacific tuna fisheries, vol. 2: papers on biology and fisheries, processing of the first FAO expert consultation on interactions of Pacific tuna fisheries. 1994, 3–11

(编辑 江润林)

## Feeding Habits and Ontogenetic Diet Shifts of Mackerel Tuna (*Euthynnus affinis*) in the Beibu Gulf, South China Sea

SU Xin<sup>1</sup>, LI Yongdong<sup>1</sup>, HE Xiongbo<sup>1</sup>, LU Huosheng<sup>1,2</sup>, YAN Yunrong<sup>1,2</sup>①

(1. College of Fisheries, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088; 2. Center of South China Sea Fisheries Resources Monitoring and Assessment, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088)

**Abstract** To study the mackerel tuna (*Euthynnus affinis*) feeding habits and its ontogenetic diet shifts, 435 mackerel tuna were collected for an annual research from September 2008 to September 2009 in the main fishing ports such as Beihai, Basuo, Sanya and Jianghong of the Beibu Gulf, South China Sea. Results showed that the mackerel tuna of the Beibu Gulf was omnivorous and it predated not only the small pelagic fish but also the benthic fish, crustaceans and cephalopods. Pisces were dominant in the diets with the percentage of Index of Relative Importance (IRI%) of 98.57%. Among these, 21 species were identified. As indicated with IRI%, *Bregmaceros rarisquamosus* (45.50%), *Stolephorus zollingeri* (11.81%), *Theyssa setirostris* (5.89%), and *Sardinella aurita* (5.87%) were principal in the food constituent. The main species changed monthly and it was *Sardinella aurita* in January; *Bregmaceros rarisquamosus* in February, March, November, December; Unidentified Pisces from April to July; *Sardinella aurita* in August; *Leignathus riviulatus* in September; *Stolephorus zollingeri* in October. The prey weight and numbers increased when body size of mackerel tuna was less than 340 mm (SL<340 mm), but there were decreased when body size of mackerel tuna was from 341 to 520 (341–520 mm). The spawning periods of the mackerel tuna were spring and summer, mainly from April to August. There were two spawn peaks, June and August, which were recognized by the female gonad somatic index (GSI) that maintained strong feeding intensity during the reproduction periods. Moreover, the peak periods were consistent with the water temperature of pelagic layers provided by France CATSAT fisheries remote sensing system.

**Key words** Beibu Gulf; *Euthynnus affinis*; Feeding habits; Gonadal development

① Corresponding author: YAN Yunrong, E-mail: yanyr@gdou.edu.cn

# 大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)仔稚鱼发育期 消化道可培养细菌的菌群特征分析\*



史秀清<sup>1,2</sup> 张正<sup>2①</sup> 王印庚<sup>2</sup> 于永翔<sup>2</sup> 邓威<sup>3</sup> 李华<sup>1</sup>

(1. 大连海洋大学 大连 116023; 2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 天津市水生动物疫病预防控制中心 天津 300221)

**摘要** 采用传统的细菌培养方法, 对大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)育苗生产过程中不同发育时期仔稚鱼的消化道、投喂饵料和养殖水源中的可培养细菌进行了菌群结构分析和优势菌株的 16S rDNA 同源性比较, 揭示其形成过程和演替规律。结果显示, 在大菱鲂仔稚鱼 5–36 日龄的不同发育时期, 消化道中的细菌数量呈现了先升高后降低的变化趋势, 在 17–26 日龄期间, 仔稚鱼消化道可培养细菌数量级在  $10^5$ – $10^6$  CFU/g 以上, 并且与其他时期存在极显著差异( $P < 0.01$ )。弧菌总量呈现先升高后稳定的变化趋势, 17 日龄之前与之后存在显著差异( $P < 0.05$ )。至投喂颗粒饵料期, 细菌总量和弧菌总量均稳定在  $10^4$  CFU/g 数量级, 弧菌成为大菱鲂仔稚鱼消化道中的优势菌种。本研究发现, 大菱鲂仔稚鱼发育早期消化道中的优势菌群变化明显, 并且生物饵料中的细菌对消化道中的菌群结构影响较大, 其中的 *Vibrio ichthyenteri* 最终成为仔稚鱼消化道中的优势菌种。

**关键词** 大菱鲂; 苗种繁育; 消化道菌群; 细菌培养

**中图分类号** S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)04-0073-10

大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)是适应低温的优良海水鱼类, 自欧洲引入我国以来, 其养殖产业经过 20 多年的发展, 目前年产量稳定在 8 万 t 左右(农业部渔业局, 2012), 成为我国陆基工厂化海水鱼类养殖的典型代表。在养殖产量增长的同时, 病害也始终是大菱鲂养殖产业中的一个突出问题。特别是近几年来, 大菱鲂苗种培育期间的病害尤为严重, 已经对正常的苗种生产和苗种产出质量构成威胁, 进而影响了整个产业链的安全生产。

目前, 我国大菱鲂养殖生产中对病害的主要防治方法仍然依靠传统的药物治疗。但对苗种繁育时期的大菱鲂仔稚鱼而言, 这个时期各个器官尚处于发育时期, 频繁的使用药物不仅会影响仔稚鱼免疫系统的发育(Lundén *et al*, 1998), 同时也会打破养殖环境和仔稚鱼体内的微生态平衡, 对仔稚鱼的健康生长和发育

造成一定副作用。而消化道菌群作为动物体内最主要的微生物菌群, 参与了机体的消化、吸收、免疫等很多重要的生理活动, 是动物生命体的有机组成部分(Schrijver *et al*, 2000)。在正常情况下, 由于正常菌群的拮抗作用或机体免疫屏障等方面的作用, 病原菌不能大量繁殖, 但当环境恶化时, 消化道菌群的平衡失调(余贺, 1983)。蒋长苗等(1992)研究了草鱼消化道正常菌群与肠炎病原菌间的关系, 观察到患细菌性肠炎的草鱼消化道内菌群失调, 肠道内点状气单胞菌、大肠杆菌、肠球菌等致病菌显著多于健康草鱼, 而乳酸杆菌、双歧杆菌则数量减少。因此, 使用益生菌调控和优化养殖环境来防控疾病的发生成为水产病害防控研究的一个热门方向。Kumar 等(2008)和 Picchiatti 等(2009)研究表明, 通过添加益生菌来调控和优化鱼类的消化道菌群, 可以有效提高鱼类对疾病的抵抗力。

\* 国家自然科学基金项目(31302206)、中国水产科学研究院黄海水产研究所级基本科研业务费课题(20603022013006)和天津市农业科技成果转化与推广项目(201104080)共同资助。史秀清, E-mail: xiuqing\_shi@163.com

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

收稿日期: 2014-01-12, 收修改稿日期: 2014-03-11

Chabrilón 等(2005)研究发现,在塞内加尔鰽(*Solea senegalensis*)的仔稚鱼时期,益生菌可抑制哈维氏弧菌在肠黏膜的粘附,通过与病原菌竞争营养、粘附位点以及改善宿主的免疫耐受力等为宿主提供有效的保护。Huys 等(2001)分离培养了野生大菱鲂消化道内的细菌,将其中的两种细菌以浸浴的方式用于3-9日龄仔稚鱼的培育,证实了这两种细菌可显著提高仔稚鱼的成活率,并且对5日龄时期的成活率影响最大。

本研究中,对一个大菱鲂苗种繁育厂家的正常生产流程进行了连续的跟踪取样,通过传统的细菌培养方法,分离并鉴定了大菱鲂仔稚鱼不同发育时期消化道的可培养细菌,分析了消化道细菌与水环境及饵料中可培养菌群的相关性。本研究通过深入解析影响大菱鲂消化道菌群形成的主要因素,采用微生态调控方法,为防控仔稚鱼时期的疾病提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品取样

实验大菱鲂仔稚鱼、水样和饵料样本取自山东省烟台市某大菱鲂育苗场,取样时间为2013年4-6月。该育苗场用于大菱鲂苗种繁育的育苗池为5 m×5 m的水泥池,水深约1 m,育苗用水为自然海水经砂滤过滤后入池。育苗生产期间水温稳定在19-20℃,盐度稳定在28-30。

在育苗生产车间中随机选取3个养殖池进行取样,分别标记为A池、B池和C池。从大菱鲂仔稚鱼5日龄起进行跟踪取样,平均每隔5 d取样1次,直至36日龄,每次取样包括仔稚鱼、水样和饵料样品。

仔稚鱼样品为每个育苗池在当天首次投喂前从育苗池中随机挑选的5条空腹仔稚鱼。将每个育苗池的5条仔稚鱼在灭菌海水中浸泡约1 h后,再用灭菌海水反复滴洗鱼体表数次,在解剖镜下小心摘取全部消化道并将其转入已灭菌的10 ml离心管中。饵料则根据不同的培育阶段进行取样,包括小球藻液、轮虫、卤虫和颗粒饲料,将消化道、生物饵料和颗粒饲料在无菌条件下称取各样本湿重并加入9倍的灭菌海水,匀浆均匀后再用灭菌海水进行梯度稀释。水样为育苗池进水口水样,直接进行梯度稀释。然后将各样品分别涂布于含1.5% NaCl的胰蛋白胨大豆(TSB)琼脂平板培养基和硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖(TCBS)琼脂培养基。

所有的TSB和TCBS琼脂培养基经28℃培养24-48 h,出现细菌单菌落后择机进行菌落计数,并挑选TSB琼脂培养基上的优势菌落纯化培养。TSB琼脂培养基上生长菌落数量视为样品中的细菌总数,TCBS

琼脂培养基上生长的菌落数量视为样品中的弧菌总数。

### 1.2 细菌16S rDNA的序列测定和同源性比对分析

用天根生化科技有限公司生产的细菌基因组DNA提取试剂盒,提取纯化菌株的总DNA,并扩增菌株的16S rDNA序列,扩增引物为细菌16S rDNA的通用引物,正向引物27F: 5'-AGAGTTTGATC(C/A)TGGCTCAG-3',反向引物1492R: 5'-TACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT-3'。反应体系: 10×PCR缓冲液2.5 μl, 10×dNTP混合物0.5 μl, 正向引物0.5 μl, 反向引物0.5 μl, 2.5 U/L的Taq DNA聚合酶0.2 μl, 细菌DNA模板1 μl, 灭菌去离子水20 μl。PCR反应条件: 94℃变性4 min,之后94℃平衡30 s, 55℃退火30 s, 72℃延伸1 min 20 s, 30个循环后, 72℃温育10 min。

将扩增后的16S rDNA序列进行切胶回收和连接转化,转化后的阳性克隆送交商业测序公司进行测序。测序后的菌株16S rDNA序列提交NCBI的16S Ribosomal RNA Sequences (Bacteria and Archaea)数据库中进行BLAST同源性比对(相似性高于99%确定为同一个种),比对结果采用ClustalX软件进行多序列匹配排列,用Mega 5.1软件进行统计和聚类分析,以Neighbor-joining方法构建细菌的系统发育树(戴欣等, 2000; 王国良等, 2008)。

### 1.3 数据处理

菌落计数结果用SPSS 19.0软件统计,用单因子方差分析和Duncan's多重比较进行差异显著性检验,结果用“平均值±标准差”(Mean±SD)表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同发育期可培养细菌菌落的定量分析

在28℃下,经过24-48 h的培养,大菱鲂仔稚鱼不同发育时期消化道、饵料和水样中可培养细菌TSB琼脂平板的培养结果见图1, TCBS琼脂平板的培养结果见图2。对TSB、TCBS琼脂平板上细菌菌落定量计数的结果分别见表1、表2。

从TSB琼脂平板的生长结果和表1的计数结果来看,小球藻液、轮虫和卤虫中可培养的细菌总量较大,达到 $10^5$  CFU/ml或 $10^5$  CFU/g以上;颗粒饲料中也有细菌存在,数量级为 $10^4$ - $10^5$  CFU/g,与生物饵料中菌量相比,差异极显著( $P<0.01$ );水样中的可培养细菌数量相对较少,为 $10^2$ - $10^3$  CFU/ml,明显低于饵料中可培养细菌总量。另外,对不同发育时期大菱

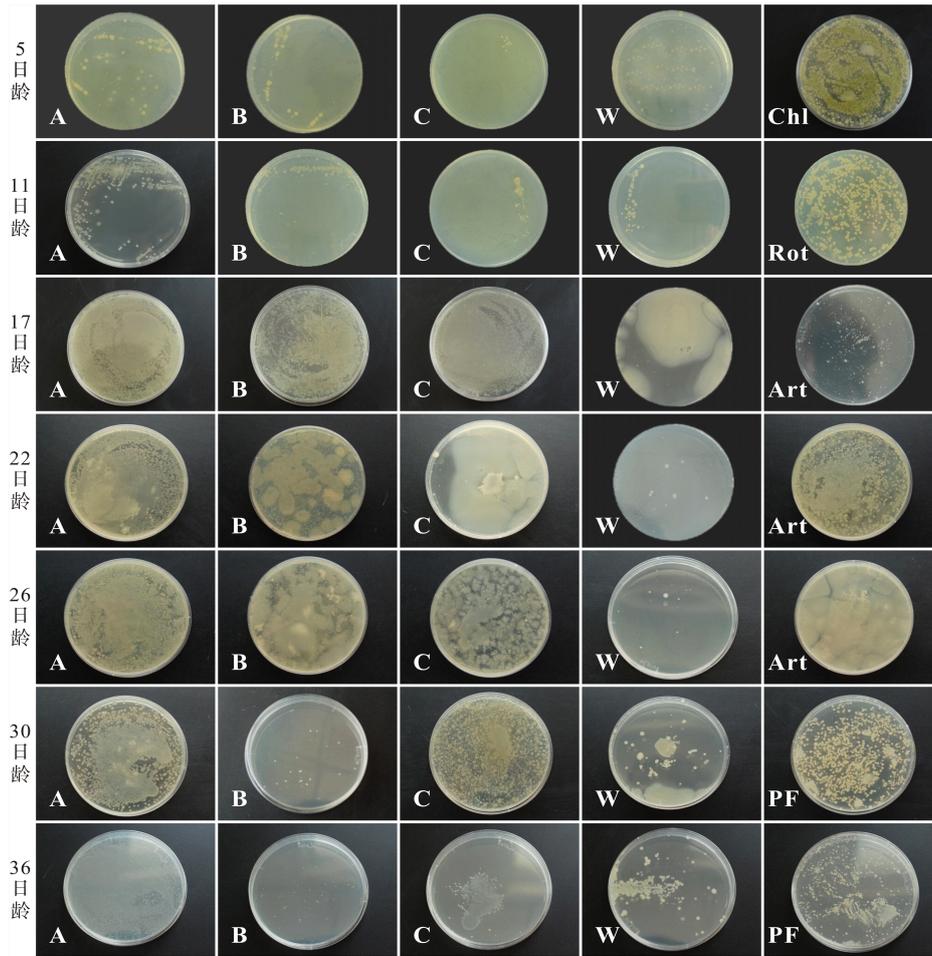


图 1 大菱鲂仔稚鱼不同发育时期各样品中细菌 TSB 琼脂平板的培养结果

Fig.1 The results of bacteria from different developmental stages of turbot larvae cultured on TSB agar plate

A: A 池中仔稚鱼消化道; B: B 池中仔稚鱼消化道; C: C 池中仔稚鱼消化道; W: 进水口水样;

Chl: 小球藻液; Rot: 轮虫; Art: 卤虫; PF: 颗粒配合饲料

A: Gastrointestinal tract of turbot larvae in pond A; B: Gastrointestinal tract of turbot larvae in pond B; C: Gastrointestinal tract of turbot larvae in pond C; W: Water sample of intake; Chl: Chlorella; Rot: Rotifer; Art: Artemia; PF: Pellet feed

表 1 TSB 琼脂平板培养的计数结果

Tab.1 Count of bacteria colonies on TSB agar plate

日龄 Day	A 池 Tank A ( $\times 10^4$ CFU/g)	B 池 Tank B ( $\times 10^4$ CFU/g)	C 池 Tank C ( $\times 10^4$ CFU/g)	水样 Water ( $\times 10^2$ CFU/ml)	藻液 Chlorella ( $\times 10^4$ CFU/ml)	轮虫 Rotifer ( $\times 10^4$ CFU/g)	卤虫 Artemia ( $\times 10^4$ CFU/g)	颗粒料 Pellet feed ( $\times 10^4$ CFU/g)
5	0.62±0.05 <sup>dC</sup>	0.57±0.12 <sup>dD</sup>	0.22±0.01 <sup>cC</sup>	31.40±1.01 <sup>aA</sup>	—	—	—	—
11	2.32±0.12 <sup>dC</sup>	1.22±0.12 <sup>dD</sup>	1.10±0.10 <sup>cC</sup>	3.80±0.29 <sup>cC</sup>	—	39.30±1.37 <sup>cC</sup>	—	—
17	—	365.33±16.50 <sup>aA</sup>	372.33±10.02 <sup>aA</sup>	1.50±0.12 <sup>dD</sup>	—	—	53.20±2.07 <sup>bB</sup>	—
22	235.67±3.51 <sup>bB</sup>	26.50±1.36 <sup>cC</sup>	—	1.20±0.09 <sup>dD</sup>	—	—	73.60±1.86 <sup>aA</sup>	—
26	252.67±5.51 <sup>aA</sup>	57.20±1.00 <sup>bB</sup>	13.90±0.59 <sup>bB</sup>	1.87±0.06 <sup>dD</sup>	—	—	—	—
30	5.16±0.07 <sup>cdC</sup>	0.18±0.01 <sup>dD</sup>	7.45±0.27 <sup>bcBC</sup>	18.00±0.53 <sup>bB</sup>	—	—	—	8.86±0.33 <sup>dD</sup>
36	7.32±0.06 <sup>cC</sup>	0.35±0.04 <sup>dD</sup>	1.82±0.07 <sup>cC</sup>	18.60±1.07 <sup>bB</sup>	—	—	—	8.32±0.14 <sup>dD</sup>

注: “—”表示无此项样品; “—”表示不可计, 无法进行统计学分析; 同一列上标小写字母不同表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 上标大写字母不同表示差异极显著 ( $P < 0.01$ ) (不同时期饵料视为同一列)

Note: “—”Sample absence; “—”Not counted; Different lowercase superscripts mean significant difference ( $P < 0.05$ ), Different uppercase superscripts mean extremely significant difference ( $P < 0.01$ ) (Different feed as the same column)

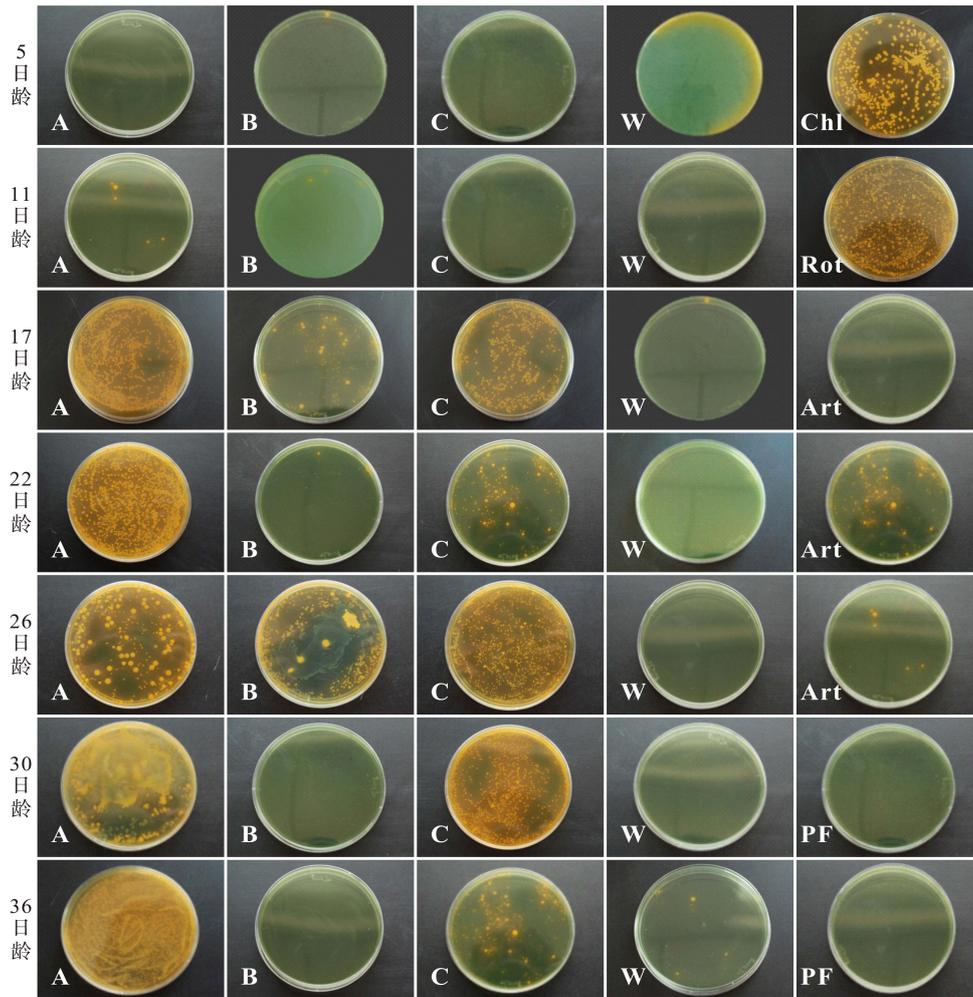


图2 大菱鲆仔稚鱼不同发育时期各样品中细菌 TCBS 琼脂平板的培养结果

Fig.2 The results of bacteria from different developmental stages of turbot larvae cultured on TCBS agar plate

A: A 池中仔稚鱼消化道; B: B 池中仔稚鱼消化道; C: C 池中仔稚鱼消化道; W: 进水口水样;  
Chl: 小球藻液; Rot: 轮虫; Art: 卤虫; PF: 颗粒配合饲料

A: Gastrointestinal tract of turbot larvae in pond A; B: Gastrointestinal tract of turbot larvae in pond B; C: gastrointestinal tract of turbot larvae in pond C; W: Water sample of intake; Chl: Chlorella; Rot: Rotifer; Art: Artemia; PF: Pellet feed

表2 TCBS 琼脂平板培养的计数结果

Tab.2 Count of bacteria colonies on TCBS agar plate

日龄 Day	A 池 Tank A ( $\times 10^3$ CFU/g)	B 池 Tank B ( $\times 10^3$ CFU/g)	C 池 Tank C ( $\times 10^3$ CFU/g)	水样 Water (CFU/ml)	藻液 Chlorella ( $\times 10^4$ CFU/ml)	轮虫 Rotifer ( $\times 10^4$ CFU/g)	卤虫 Artemia ( $\times 10^2$ CFU/g)	颗粒料 Pellet feed (CFU/g)
5	---	0.10 $\pm$ 0.01 <sup>cC</sup>	---	530.00 $\pm$ 13.23 <sup>aA</sup>	32.70 $\pm$ 0.64 <sup>bB</sup>	—	—	—
11	0.60 $\pm$ 0.10 <sup>eE</sup>	0.30 $\pm$ 0.13 <sup>cC</sup>	---	---	—	37.20 $\pm$ 0.35 <sup>aA</sup>	—	—
17	56.50 $\pm$ 2.02 <sup>bB</sup>	4.75 $\pm$ 0.12 <sup>bB</sup>	48.50 $\pm$ 2.16 <sup>bB</sup>	100.00 $\pm$ 17.69 <sup>bB</sup>	—	—	---	—
22	108.00 $\pm$ 7.09 <sup>aA</sup>	0.30 $\pm$ 0.04 <sup>cC</sup>	13.50 $\pm$ 1.18 <sup>dC</sup>	---	—	—	53.80 $\pm$ 1.21 <sup>cC</sup>	—
26	32.60 $\pm$ 1.41 <sup>dD</sup>	46.50 $\pm$ 2.95 <sup>aA</sup>	76.30 $\pm$ 3.42 <sup>aA</sup>	---	—	—	5.00 $\pm$ 0.16 <sup>cC</sup>	—
30	43.50 $\pm$ 1.77 <sup>cC</sup>	---	43.60 $\pm$ 1.96 <sup>cB</sup>	---	—	—	—	---
36	53.50 $\pm$ 1.38 <sup>bB</sup>	---	10.50 $\pm$ 0.76 <sup>dC</sup>	40.00 $\pm$ 5.69 <sup>cC</sup>	—	—	—	---

注：“—”表示无此项样品；“---”表示未培养出菌落；同一列上标小写字母不同表示差异显著( $P < 0.05$ )，上标大写字母不同表示差异极显著( $P < 0.01$ ) (不同时期饵料视为同一列)

Note: “—”Sample absence; “---”None bacterial colony was cultured; Different lowercase superscripts mean significant difference ( $P < 0.05$ ), Different uppercase superscripts mean extremely significant difference ( $P < 0.01$ ) (Different feed as the same column)



对表3的结果进行分析可以看出,不同发育阶段仔稚鱼消化道中可培养的优势细菌以弧菌为主。在投喂小球藻液和轮虫期,仔稚鱼消化道中代表性的优势菌种有 *V. tasmaniensis*、*V. splendidus* 和 *L. anguillarum*。在投喂卤虫和颗粒饵料后,代表性的优势菌株由 *V. ichthyoenteri* 代替。饵料和水样中的菌群则非常丰富,11日龄、22日龄和26日龄时期的水样中没有出现占绝对优势的优势细菌菌落。生物饵料中的绝大多数优势细菌为弧菌属细菌,在同时期仔稚鱼消化道中占优势的 *V. tasmaniensis*、*L. anguillarum* 等菌株也是生物饵料中的优势细菌,而颗粒饵料中的优势细菌则不是弧菌属细菌。

### 2.3 不同发育期可培养优势菌的同源性分析

以邻位相连法(Neighbor-joining)用 Bootstrap method 进行1000次重复,基于16S rDNA序列对大菱鲆仔稚鱼不同发育时期消化道、水样和饵料中分离得到的优势菌进行系统发育树的构建(图3)。

对可培养优势菌种的16S rDNA同源性比对结果进行分析,可以划分为5个区域(图3)。第1区中聚类的细菌是 *V. tasmaniensis* 和 *V. splendidus*,在不同时期的仔稚鱼消化道、水样和饵料中都曾是优势菌,但相互之间没有表现出明显的相关性和规律性。第2区中为 *L. anguillarum*,主要是5日龄和11日龄的仔稚鱼消化道中的优势菌种,其中5日龄的消化道中分离的0429A01菌株与小球藻液中的0429Z01菌株聚为一支。第3区为 *V. ichthyoenteri*,是17-36日龄仔稚鱼消化道中可培养菌群中占据优势地位的菌种,但不是池水和饵料中的优势细菌。第4区主要为不同时期卤虫和水样中的优势菌种,可以看出菌种的多样性较高,但均不是仔稚鱼消化道中的优势细菌。11日龄时,仔稚鱼消化道中有一株优势菌株0505B01和轮虫中的优势菌株0505L02单独聚为一支。第5区主要是颗粒饲料中分离到的优势菌种,从整体上看,颗粒饲料中的优势菌种与仔稚鱼消化道的优势菌株相关性不大,仅30日龄时颗粒饲料中的一株优势细菌0524K01与36日龄时仔稚鱼消化道中的一株优势细菌0530B01单独聚为一支,这可能是实验过程中存在的偶然性造成的。

## 3 讨论

### 3.1 大菱鲆仔稚鱼不同发育时期消化道可培养细菌的种类和数量变化

Jensen 等(2004)和 Munro 等(1993、1995)研究表

明,在海水鱼类仔稚鱼发育阶段,消化道细菌的种类和数量都处于动态变化当中。本研究通过经典的细菌培养方法对大菱鲆仔稚鱼不同发育时期消化道中可培养细菌进行了定量分析,在仔稚鱼刚刚开口的5日龄,消化道中的细菌总量在  $2.1 \times 10^3$ – $6.4 \times 10^3$  CFU/g 之间。随着投喂饵料的变化和仔稚鱼的发育,消化道中可培养细菌的数量逐渐增加,至投喂卤虫时期达到最高,与其他各个时期差异极显著( $P < 0.01$ )。当投喂人工配合饵料后,消化道中的细菌总量开始下降,并最终稳定在  $10^4$  CFU/g 数量级。而从 TCBS 琼脂培养基的培养结果看,在开口初期的5日龄仔稚鱼消化道中几乎没有弧菌,随着生物饵料的投喂,消化道中的弧菌数量迅速增加至  $10^4$  CFU/g 数量级并趋于稳定,从17日龄投喂卤虫之后,与其他时期之间存在显著差异( $P < 0.05$ )。将 TSB 培养基和 TCBS 培养基的结果进行对比分析,可以推断出仔稚鱼后期消化道中占绝对数量的优势菌群已经变成弧菌,与国外学者的以下研究结果非常相似。Munro 等(1995)对大菱鲆仔稚鱼消化道菌群的研究发现,在开口摄食饵料后,消化道菌群数量迅速上升,并且当开始投喂卤虫时消化道中的优势菌群由之前多种不同的细菌逐渐变成弧菌属细菌。Verner-Jeffreys 等(2003)对大西洋庸鲽(*Hippoglossus hippoglossus* L.)仔稚鱼消化道菌群的研究也发现了类似的规律,通过观察3个不同孵化场的大西洋庸鲽仔稚鱼消化道菌群的演替,在仔稚鱼开口摄食后,消化道菌群的数量呈稳定型增长,随着仔稚鱼生长,弧菌属细菌逐渐取代假交替单胞菌属细菌成为消化道中的优势菌种。Bergh 等(1994)发现大西洋庸鲽仔稚鱼在未摄食前,消化道中的优势菌是非发酵型的黄杆菌属和屈挠杆菌属细菌,开始投喂饵料以后,变为发酵型的弧菌属和气单胞菌属的细菌。

弧菌是海洋环境中最常见的细菌种类,广泛分布于海水和海洋动物体表与消化道中,当在养殖环境中数量积累过多或宿主免疫力低下时就会诱发疾病。弧菌属中的很多细菌是公认的水产动物强致病性病原菌,如鳃弧菌(Bricknell *et al*, 2000)、灿烂弧菌(Diggles *et al*, 2000)、哈维氏弧菌(Gauger *et al*, 2006; Zorrilla *et al*, 2003)。从本研究结果看,鳃弧菌和灿烂弧菌等病原菌一度占据大菱鲆初孵仔鱼的消化道优势菌群地位,而后期其他弧菌也成为大菱鲆幼鱼消化道内的优势菌群。因此,如何有效控制环境和仔稚鱼消化道内弧菌的数量,降低疾病发生的概率,应该成为大菱鲆育苗生产中值得重视的问题。另外,对本研究结果分析发现,在26日龄之后,肠道细菌数量有所减少,推断可能是由于食性从生物饵料到人工饲料的转变引

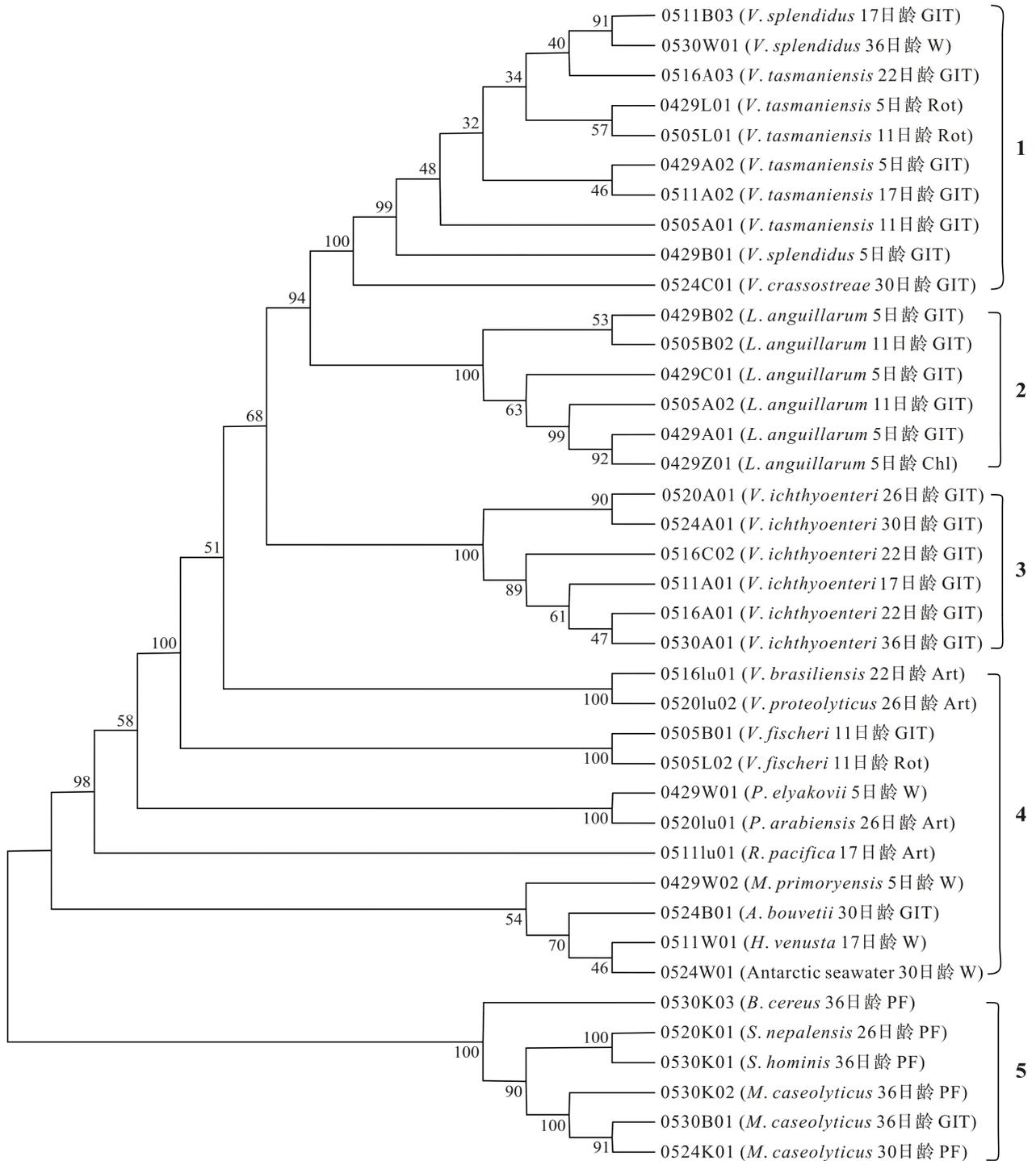


图 3 优势菌种的 16S rDNA 序列构建的系统进化树

Fig.3 The phylogenetic tree of dominant strains in different samples constructed by 16S rDNA sequence

括号内为不同发育期的样品种类及种属名称; GIT: 仔稚鱼的消化道; W: 进水口水样;  
 Chl: 小球藻液; Rot: 轮虫; Art: 卤虫; PF: 颗粒配合饲料  
 The samples of different developmental stages and specific names are shown in brackets;  
 GIT: Gastrointestinal tract of turbot larvae; W: Water sample of intake;  
 Chl: Chlorella; Rot: Rotifer; Art: Artemia; PF: Pellet feed

起的。Tanasomwang 等(1988)研究了两个渔场的牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)仔稚鱼期的肠道好氧细菌群

落,同时对鱼所摄入食物的菌群进行研究,结果发现,仔鱼期体长为 10–14 mm 时,肠道细菌的数量基本保

持不变,当食性转换,体长达到 15–19 mm 后,牙鲆肠道细菌数量减少。本研究中,在食性转换后,B 池中细菌数量减少最为明显,可能由生产过程中换水、投饵、消毒等操作的差异所引起,其中的原因尚需进一步研究确认。

### 3.2 大菱鲆仔稚鱼不同发育时期消化道优势菌群的来源分析

鱼类的消化道是和水环境直接相通的,因此其菌群组成不仅和鱼类的种类、生存环境有关,更受到水环境和饵料中微生物种类的影响(Maria *et al.*, 2007; Tatsuro *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2007; 覃映雪等, 2007)。本研究中,大菱鲆初孵仔鱼消化道中的细菌总量从投喂轮虫开始迅速增加,到投喂卤虫期消化道菌群数量达到最高值,而投喂颗粒饲料期又下降至较稳定的数值。弧菌数量则是从投喂卤虫期开始上升直至较稳定的数值,到后期所投喂的颗粒饲料中不含弧菌,没有对仔稚鱼消化道中弧菌数量产生明显的影响。Blanch 等(1997)对 1–90 日龄大菱鲆仔稚鱼消化道菌群进行研究,发现仔鱼后期消化道中的优势菌群也是弧菌属细菌,并且消化道菌群主要来源于鲜活饵料。牙鲆仔稚鱼摄食活饵时以气单胞菌属、莫拉克氏菌属及弧菌属为主,而在摄食人工饲料后,则以气单胞菌属、芽孢杆菌、莫拉克氏菌属、假单胞菌属及弧菌属为主,仔稚鱼消化道细菌的种类和数量的研究也发现消化道菌群会随着投喂的不同饵料而变化,受水体中菌群的影响较小(Sugita *et al.*, 2002)。在本研究中,根据样品中优势细菌基于 16S rDNA 建立的系统发育树分析,在整个育苗生产过程中,生物饵料中的细菌对仔稚鱼消化道中可培养菌群结构的形成产生的影响相对较大,水中的细菌似乎没有对仔稚鱼的消化道菌群产生影响,与上述这些学者的研究结果相似,但也有学者认为水中的微生物菌群也会影响鱼类消化道的菌群结构。Tanaasomwang 等(1989)研究牙鲆仔稚鱼时发现,水中的菌群组成会明显影响仔稚鱼的消化道菌群组成。周金敏等(2010)对黄颡鱼肠道和养殖水体中的微生物菌群进行研究,发现黄颡鱼肠道与养殖水体中的优势菌基本相同,均为肠杆菌科、气单胞菌属和不动杆菌属细菌。

对本研究结果进一步分析发现,在大菱鲆仔稚鱼摄食轮虫期间, *L. anguillarum*、*V. tasmaniensis* 和 *V. splendidus* 等弧菌一度成为消化道中的优势菌种,并且在不同的生物饵料中也是优势菌种。至投喂卤虫和颗粒饵料期, *V. ichthyoenteri* 逐渐取而代之成为仔稚鱼消化道中的优势菌群,在整个取样过程中, *V.*

*ichthyoenteri* 并不是水体或饵料中的优势菌种。根据各时期样品中可培养优势菌种的 16S rDNA 建立的系统发育树结果进行分析,17 日龄之前和之后的大菱鲆仔稚鱼消化道菌群中的优势细菌都分开聚类,而且并没有显现出与水中和饵料中的优势细菌很强的关联性。因此推断,大菱鲆仔稚鱼消化道对定植的细菌种类可能有选择性和阶段性。Thomson 等(2005)在研究大菱鲆仔稚鱼消化道菌群的过程中发现,占卤虫中优势菌群地位的溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)在仔稚鱼的消化道中数量很少,而在卤虫体内含量很低的灿烂弧菌(*V. splendidus*)却成为仔稚鱼后期消化道中的优势菌。大西洋庸鲽消化道细菌在仔稚鱼卵黄囊阶段以假单胞菌属为主,而在开口仔稚鱼阶段以灿烂弧菌和溶藻弧菌为主,主要来源于所投喂活饵中的细菌,但是另外的一些机会菌也会定植消化道,到成鱼阶段消化道中的优势菌也有发光杆菌(Verner-Jeffreys *et al.*, 2003)。

### 3.3 思考

近几年来,随着大菱鲆苗种培育期疾病发生日趋频繁,越来越多的养殖场尝试在大菱鲆仔稚鱼培育阶段添加各种有益微生物来调控体内和体外的微生态环境,以达到防控疾病的目的。从本研究的结果分析,与水体中的细菌相比,生物饵料中的细菌对大菱鲆仔稚鱼消化道定植菌群的影响更大,并且仔稚鱼消化道对定植菌种具有一定的选择性。Picchiatti 等(2007)的研究也发现,将轮虫和卤虫作为载体,能够有效地帮助益生菌进入舌齿鲈的消化道内定植、繁殖。因此,对于大菱鲆的苗种生产而言,益生菌的使用既要选择合适的时机和方式,同时也要筛选更易定植仔稚鱼的消化道原籍菌种。另一方面,加强对鲜活饵料的消毒处理工艺研究,控制仔稚鱼发育时期弧菌特别是病原弧菌的数量也可能是预防疾病的有效措施之一。

## 参 考 文 献

- 王国良,徐益军,金珊. 乌鳢致病诺卡氏菌的鉴定及其系统发育分析. 水产学报, 2008, 32(3): 449–454
- 农业部渔业局. 中国渔业年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2012
- 余贺. 医学微生物. 北京: 人民卫生出版社, 1983
- 周金敏,吴志新,曾令兵,等. 黄颡鱼肠道及养殖水体中菌群的分析. 华中农业大学学报, 2010, 29(5): 613–617
- 蒋长苗,鲍传和,马元山. 草鱼肠道正常菌群与肠炎病原菌关系的初步研究. 吉林农业大学学报, 1992, 14(1): 55–58
- 覃映雪,王晓林,鄢庆彬,等. 青石斑鱼消化道菌群研究. 海洋水产研究, 2007, 28(5): 18–23
- 戴欣,陈月琴,周惠,等. 海洋细菌的分子鉴定分类. 中山大学学报(自然科学版), 2000, 39(1): 68–71

- Bergh Ø, Naas KE, Harboe T. Shift in the intestinal microflora of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) larvae during first feeding. *Can J Fish Aqu Sci*, 1994, 51(8): 1899–1903
- Blanch AR, Alsina M, Simón M, *et al.* Determination of bacteria associated with reared turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae. *J Appl Microbiol*, 1997, 82(6): 729–734
- Bricknell IR, Bowden TJ, Verner JDW, *et al.* Susceptibility of juvenile and sub-adult Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) to infection by *Vibrio anguillarum* and efficacy of protection induced by vaccination. *Fish & Shellfish Immunol*, 2000, 10(4): 319–327
- Chabrilón M, Rico RM, Arijo S, *et al.* Interactions of microorganisms isolated from gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., on *Vibrio harveyi*, a pathogen of farmed Senegalese sole, *Solea senegalensis*(Kaup). *J Fish Dis*, 2005, 28(9): 531–537
- Diggles BK, Carson J, Hine PM, *et al.* *Vibrio* species associated with mortalities in hatchery-reared turbot(*Colistium nudipinnis*) and brill (*C.guntheri*) in New Zealand. *Aquaculture*, 2000, 183(1–2): 1–12
- Gauger E, Smolowitz R, Uhlinger K, *et al.* *Vibrio harveyi* and other bacterial pathogens in cultured summer flounder, *Paralichthys dentatus*. *Aquaculture*, 2006, 260(1–4): 10–20
- Huys L, Dhert P, Robles R, *et al.* Search for beneficial bacterial strains for turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larviculture. *Aquaculture*, 2001, 193(1–2): 25–37
- Jensen S, Øvreås L, Bergh Ø, *et al.* Phylogenetic analysis of bacterial communities associated with larvae of the Atlantic halibut propose succession from a uniform normal flora. *Syst Appl Microbiol*, 2004, 27(6): 728–736
- Kim DH, Brunt J, Austin B. Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Appl Microbiol*, 2007, 102(6): 1654 – 664
- Kumar R, Mukherjee SC, Ranjan R, *et al.* Enhanced innate immune parameters in *Labeo rohita* (Ham.) following oral administration of *Bacillus subtilis*. *Fish Shellfish Immunol*, 2008, 4(2): 168–172
- Lundén T, Miettinen S, Lönnström LG, *et al.* Influence of oxytetracycline and oxolinic acid on the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol*, 1998, 8(3): 217–230
- Maria BH, Bjørn TL, Ramon F. Molecular characterization of the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 2007, 272(1–4): 581–588
- Munro PD, Barbour A, Birkbeck TH. Comparison of the growth and survival of larval turbot in the absence of culturable bacteria with those in the presence of *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, or a marine *Aeromonas* sp. *Appl Microbiol*, 1995, 61(12): 4425–4428
- Munro PD, Birkbeck TH, Barbour A. Bacterial flora of rotifers (*Brachionus plicatilis*): evidence for a major location on the external surface and methods for reducing the rotiferbacterial load. In *Fish Farming Technology*, 1993, 93–100
- Picchietti S, Fausto AM, Randelli E, *et al.* Early treatment with *Lactobacillus delbrueckii* strain induces an increase in intestinal T-cells and granulocytes and modulates immune-related genes of larval *Dicentrarchus labrax* (L.). *Fish Shellfish Immunol*, 2009, 26(3): 368–376
- Picchietti S, Mazzini M, Taddei AR, *et al.* Effects of administration of probiotic strains on GALT of larval gilthead seabream: immunohistochemical and ultrastructural studies. *Fish Shellfish Immunol*, 2007, 22(1–2): 57–67
- Schrijver RD, Ollevier F. Protein digestion in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) and effects of dietary administration of *Vibrio proteolyticus*. *Aquaculture*, 2000, 186(1–2): 107–116
- Sugita H, Okano R, Suzuki Y, *et al.* Antibacterial abilities of intestinal bacteria from larval and juvenile Japanese flounder against fish pathogens. *Fisheries Science*, 2002, 68(5): 1004–1011
- Tanaasomwang V, Maroga K. Intestinal microflora of rockfish *Sebastes schlegeli*, tiger puffer *Takrfugu rubripes* and red grouper *Epinephelus akaara* at their larvae and juvenile stages. *Bull Jap Soc Sci Fish*, 1989, 55(8): 1371–1377
- Tanasomwang V, Muroga K. Intestinal microflora of larval and juvenile stages in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Pathol*, 1988, 23(2): 77–83
- Tatsuro H, Daichi T, Yasutada I, *et al.* Diversity and seasonal changes in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish. *Aquaculture*, 2004(1–4), 234: 335–346
- Thomson R, Macpherson H, Riaza A, *et al.* Characterization of haemolytic bacteria associated with rearing of larval turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *J Appl Microbiol*, 2005, 99: 243–250
- Verner-Jeffreys DW, Shields RJ, Bricknell IR, *et al.* Changes in the gut-associated microfloras during the development of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae in British hatcheries. *Aquaculture*, 2003(1–4), 219: 21–42
- Zorrilla I, Arijo S, Chabrilón M, *et al.* *Vibrio* species isolated from diseased farmed sole, *Solea senegalensis* (Kaup), and evaluation of the potential virulence role of their extracellular products. *J Fish Dis*, 2003, 26(2): 103–108

## The Characteristics of Culturable Bacterial Microflora in the Gastrointestinal Tract of Turbot (*Scophthalmus maximus*) Larvae

SHI Xiuqing<sup>1,2</sup>, ZHANG Zheng<sup>2①</sup>, WANG Yingeng<sup>2</sup>, YU Yongxiang<sup>2</sup>, DENG Wei<sup>3</sup>, LI Hua<sup>1</sup>

(1. Dalian Ocean University, Dalian 116023; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. Tianjin Aquatic Animal Infectious Disease Control and Prevention Center, Tianjin 300221)

**Abstract** Turbot (*Scophthalmus maximus*) breeding, especially the larval breeding, has been seriously affected by the bacterial diseases that were caused by the interactions of fish, pathogens and the environment. The gastrointestinal flora is the dominant location for the occurrence of diseases. This study is to analyze the gastrointestinal microflora of turbot larvae and expound their formation and succession. Using conventional bacteriological culture techniques, we isolated and quantified the bacteria from the gastrointestinal tract of turbot larvae, tank inlet water and feed in a turbot breeding farm. The dominant strains were identified by sequencing their 16S rDNA for alignment with NCBI 16S rDNA sequences database. The results showed that the total bacteria count in turbot larvae GI tract was increased and then decreased from Day 5 to Day 36. From Day 17 to Day 26, the culturable bacteria in GI tract were approximately  $10^5$ – $10^6$  CFU/g, which showed extremely significant difference compared to the other stages ( $P < 0.01$ ). Similarly, vibrio counts were increased initially and then tended toward stable. Day 17 is the cutoff for the significant differences ( $P < 0.05$ ). Ultimately, the numbers of total bacteria and vibrio remained stable at  $10^4$  CFU/g in GI tract. Naturally, Vibrios were the dominant strains in the GI tract of turbot larvae. These results indicated that the dominant bacterial strains in the GI tract changed significantly at different developmental stages of turbot larvae. The bacteria in biological feeding could obviously impact the microflora formation in GI tract in the early stage of turbot, and that *Vibrio ichthyoenteri* was the dominant strain in the GI tract.

**Key words** *Scophthalmus maximus*; Larvae breeding; Gastrointestinal tract microflora; Bacteria culture

① Corresponding author: ZHANG Zheng, E-mail: zhangzheng@ysfri.ac.cn

# 罗非鱼(*Tilapia nilotica*)简达气单胞菌病的病原分离鉴定及药敏试验\*



杨宁<sup>1</sup> 姜芳燕<sup>2</sup> 黄海<sup>1①</sup> 焦健<sup>3</sup>

(1. 三亚市南繁科学技术研究院 三亚 572000; 2. 琼州学院 三亚 572022;  
3. 邯郸市永年县农牧局水产技术服务站 邯郸 057150)

**摘要** 从患病罗非鱼(*Tilapia nilotica*)体内分离得到细菌 NL05, 通过回归感染试验确定 NL05 为致病菌, 并测出 NL05 对罗非鱼的半致死量(LD<sub>50</sub>)为  $1 \times 10^3$  CFU/g。结合细菌形态学特征、生理生化指标和 16S rRNA 基因同源分析, 鉴定 NL05 为简达气单胞菌(*Aeromonas jandaei*)。形态学观察发现, NL05 为革兰氏阴性、短杆状; 生理生化试验中麦芽糖、甘露醇、葡萄糖、水杨素、硫化氢等 13 种指标为阳性, 蔗糖、阿拉伯糖、木糖、肌醇、卫矛醇等 10 种指标为阴性。药敏试验显示, NL05 对奥复星、丙氟哌酸、丁胺卡那霉素、多粘菌素 B、氟哌酸、利福平、洁霉素等 13 种抗生素敏感, 对阿奇霉素、菌必治、卡那霉素、链霉素、美满霉素 5 种抗生素中介, 对氨苄青霉素、阿莫西林、恩诺沙星、复方新诺明、甲氧苄啶等 13 种抗生素耐药。

**关键词** 罗非鱼; 简达气单胞菌; 致病性; 分离鉴定; 药敏试验

**中图分类号** S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)04-0083-06

罗非鱼(*Tilapia nilotica*)因生长快、肌间刺少、肉质好等优点, 已成为我国重要的水产养殖品种之一。随着罗非鱼养殖规模的不断扩大, 病害时有发生, 给养殖户造成巨大经济损失, 特别是细菌性疾病尤为严重。其中, 无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)是罗非鱼常见致病菌之一(郭玉娟等, 2012; 柴家前等, 2002; 邓恒为, 2013<sup>1)</sup>)。嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)也是常见的罗非鱼致病菌(刘加波等, 2006; 杨宁等, 2014)。除以上两种常见致病菌外, 蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)也是致病菌之一(王忠敏等, 2012)。2011年海南省三亚市某罗非鱼养殖场发生细菌性疾病, 罗非鱼死亡率达 30%, 本研究对这次罗非鱼病的病原进行分离、纯化, 同时进行药敏试验, 为罗非鱼简达气单胞菌病的病害防治提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

发病罗非鱼和健康罗非鱼于 2011 年 10 月取自海南省某水产养殖场, 体长为(11.22±0.74) cm, 体重为(22.03±1.30) g。细菌分离试验中的琼脂培养基配方: 牛肉膏 3 g、酵母浸膏 1 g、蛋白胨 5 g、氯化钠 5 g、琼脂 20 g, 定容至 1000 ml, pH 为 7.2。细菌鉴定微量生化发酵管购自广东环凯微生物科技有限公司; 16S rRNA 试验试剂购自宝生物工程(大连)有限公司; 抗生素药敏纸片购自杭州天和微生物试剂有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 细菌的分离** 选择患病个体, 用 75%酒精

\* 三亚市院地科技合作项目(2011YD115; 2012YD73)和三亚市重点实验室建设项目(L1209)共同资助。杨宁, E-mail: dayangning@163.com

① 通讯作者: 黄海, 研究员, E-mail: huanghai74@126.com

收稿日期: 2014-06-23, 收修改稿日期: 2014-08-26

1) 邓恒为. 海南罗非鱼链球菌病原分离鉴定及防治中草药筛选. 海南大学硕士研究生学位论文, 2013, 18-25

严格消毒,剪开腹部,在无菌操作台内用接种环分别从腹水、肝脏、肠道、脾脏等器官取样,接种于琼脂培养基上。恒温 30℃ 培养 24 h,挑取优势菌落二次纯化培养,挑取单菌落划线于营养琼脂斜面,4℃ 短期储存备用,15%甘油、-80℃ 长期保种。

**1.2.2 致病菌的筛选** 将试验用健康罗非鱼在室内暂养 7 d 后,选取健康个体用于感染试验。分设试验组和对照组,每组两个平行组,每个平行组用鱼 10 尾。将分离到的细菌用生理盐水配成  $10^7$  CFU/ml 菌液,采用腹腔注射方式感染,每尾注射量为 0.2 ml,对照组注射同剂量的灭菌生理盐水。试验期间正常投饵,气石充气,每 2 d 更换 1/2 体积的水,水温为 28–30℃,溶氧保持在 5.0 mg/L 以上。观察记录 10 d 内各组的死亡情况,及时捞出死亡个体,减少死鱼对水质的恶化。观察病死罗非鱼特征,分离内脏细菌,比较分离到的细菌与原病原菌形态和理化特性是否一致。

**1.2.3 病原菌对罗非鱼半致死量的测定** 半致死量的测定参考沈建忠(2002)和徐叔云等(2002)的方法,采用腹腔注射感染罗非鱼测定病原菌的半致死量( $LD_{50}$ ),试验方法同 1.2.2,试验组分为 6 组,每组病原菌浓度分别为  $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^4$  和  $1 \times 10^3$  CFU/ml,对照组注射无菌生理盐水,观察记录 10 d 内的死亡情况,用 SPSS 19 计算  $LD_{50}$ 。

**1.2.4 致病菌的形态观察和生理生化反应** 对细菌革兰氏染色,显微镜下观察形态特征,并观察培养 24 h 的固体培养基上的菌落特征。根据生化鉴定管说明书来判断细菌生化反应阴阳性,参照《伯杰细菌鉴定手册》(布坎南,1994)、《常见细菌系统鉴定手册》(东秀珠等,2001)中的标准菌株对致病菌进行物种鉴定。

**1.2.5 致病菌 16S rRNA 扩增** 通过煮沸法获得细菌模板 DNA:将细菌用液体培养基 30℃ 培养 24 h,取 150  $\mu$ l 菌液和等体积水,100℃ 煮沸 10 min,然后 12000 r/min 离心 10 min,所得上清液即为模板 DNA。上游引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3',下游引物 1492R: 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'。PCR 采用 50  $\mu$ l 反应体系:模板 DNA 1  $\mu$ l, dNTP Mixture 3  $\mu$ l,上下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ l, 10 $\times$  Buffer ( $Mg^{2+}$ ) 5  $\mu$ l, Taq DNA 聚合酶(5 U/ $\mu$ l) 0.5  $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O 38.5  $\mu$ l。PCR 反应条件:94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 45 s, 55℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 90 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 7 min, 4℃ 保存。将 PCR 产物用 2% 琼脂糖在 100 V 电泳约 40 min,在凝胶成像系统中观察记录,并切胶回收目的片段,送至深圳华大基因有限公司测序。将测序结果提交 NCBI,获取登录号,并用 BLAST 软件进行比对,构建系统发育树。

**1.2.6 病原菌的药敏试验** 采用药敏纸片扩散法,先将菌悬液用生理盐水稀释至  $1.0 \times 10^8$  CFU/ml,取 100  $\mu$ l 均匀涂布于琼脂培养基上,用无菌镊子将药敏纸片贴在培养基表面,28℃ 恒温培养 24 h 后,测定抑菌圈直径,根据药敏纸片生产厂家的抑菌圈判断标准来判断药物敏感性。

## 2 结果与分析

### 2.1 病原菌的分离与鉴定

**2.1.1 患病鱼体症状和细菌的分离** 患病鱼体侧部分鳞片脱落,鳍条腐烂,部分鱼体肛门处红肿,解剖后发现腹腔有大量积水,胆囊肿大,空肠。从胆囊、肝脏、脾脏中未分离到细菌,肠道和腹腔积水中分离到大量细菌,从菌落形态初步判断分离到的细菌菌种较复杂,挑取其中形态特征明显的 6 个菌落纯化培养,其中从肠道分离的细菌编号为 NL03、NL04 和 NL05,从腹腔积水中分离到的细菌编号为 NL06、NL07 和 NL08。

**2.1.2 细菌感染试验** 将分离到的 6 个菌株扩大培养,对健康罗非鱼进行腹腔注射感染试验,注射浓度为  $1.0 \times 10^7$  CFU/ml。试验组 NL03、NL04、NL06、NL07 和 NL08 及对照组死亡率均为 0。试验组 NL05 死亡率为 100%,罗非鱼病症与原发病罗非鱼相似,说明 NL05 是引起这次罗非鱼死亡的病原菌。

**2.1.3 病原菌对罗非鱼的半致死量** 当病原菌 NL05 浓度为  $1.0 \times 10^7$  CFU/ml 时,罗非鱼死亡率为 100%,当病原菌浓度为  $1.0 \times 10^3$  CFU/ml 时,罗非鱼死亡率为 0 (表 1)。当菌液浓度为  $1 \times 10^{5.14}$  CFU/ml 时,出现半致死量,经换算  $LD_{50}$  为  $1 \times 10^3$  CFU/g。

**2.1.4 病原菌形态特征和生理生化鉴定** NL05 在琼脂培养基上经 28℃ 恒温培养 24 h 后,菌落呈圆形、淡黄色、透明,周围整齐、光滑,直径约 1 mm,革兰氏阴性,短杆状。生理生化结果显示, NL05 能分解利用麦芽糖、甘露醇、葡萄糖、水杨素、硫化氢等,不发酵蔗糖、阿拉伯糖、木糖、乳糖、肌醇、卫矛醇等,VP、氧化酶和接触酶阳性(表 2)。所测 23 项指标与简达气单胞菌的生理生化特性完全一致。

**2.1.5 病原菌 16S rRNA 鉴定结果** 病原菌 NL05 的 16S rRNA 扩增产物测序结果提交 GenBank,获得登录号为 KC916744。在 MEGA 5.1 软件中构建系统发育树,采用 Neighbor-joining 法,自举分析(Bootstrap) 1000 次,从系统进化树可见(图 1),NL05 和简达气单胞菌属同一分支,同源率为 99%,结合细菌形态特征和生理生化反应最终鉴定 NL05 为简达气单胞菌。

2.2 药敏试验

病原菌 NL05 对 31 种抗生素的药敏试验结果见表 3。该病原菌对奥复星、丙氟哌酸、丁胺卡那霉素、多粘菌素 B、氟哌酸、利福平、洁霉素等 13 种抗生素敏感;对阿奇霉素、茵必治、卡那霉素、链霉素、美满霉素 5 种抗生素中介;对氨苄青霉素、阿莫西林、恩诺沙星、复方新诺明、甲氧苄啶等 13 种抗生素耐药。

3 讨论

3.1 简达气单胞菌的分离和鉴定

简达气单胞菌在分类地位上属于气单胞菌科(Aeromonadaceae)、气单胞菌属(*Aeromonas*),在 1984 年的《伯

杰细菌鉴定手册》中,气单胞菌属还未收录简达气单胞菌,Carnahan 等(1991)确定了简达气单胞菌的最终分类定位。

本研究从患病罗非鱼腹腔积水和肠道中分离得到细菌,通过人工回归感染试验确定 NL05 为病原菌。经过形态学观察、生理生化测定和 16S rRNA 同源性分析等,确定 NL05 为简达气单胞菌。在细菌鉴定方法中,16S rRNA 基因序列分析法现广泛应用于细菌鉴定中,可将大部分细菌鉴定到属,再结合细菌生理生化和形态学特征可将细菌进一步鉴定至种,较传统细菌鉴定方法,此方法具有省时、准确、高效等特点。

3.2 简达气单胞菌的危害性

简达气单胞菌生存范围较广,在淡水和海水中均

表 1 病原菌 NL05 对罗非鱼腹腔注射感染结果  
Tab.1 Effects of pathogenic bacteria NL05 on tilapia via intraperitoneal infection

菌液浓度 Bacteria concentration (CFU/ml)	组别 Batch	感染后每天死亡数 Mortality on each day (ind.)										死亡总数 Total mortality	平均死亡率 Average mortality rate (%)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1.0×10 <sup>7</sup>	1	0	2	4	4	0	0	0	0	0	0	10	100
	2	1	2	5	1	1	0	0	0	0	0	10	
1.0×10 <sup>6</sup>	1	0	1	4	2	0	0	0	0	0	0	7	75
	2	0	2	2	3	1	0	0	0	0	0	8	
1.0×10 <sup>5</sup>	1	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0	4	40
	2	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	4	
1.0×10 <sup>4</sup>	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	2	20
	2	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	2	
1.0×10 <sup>3</sup>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
对照 Control	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

表 2 病原菌 NL05 的生理生化指标  
Tab.2 Physiological and biochemical indexes of pathogen NL05

项目 Items	NL05	简达气单胞菌 <i>A. jandaei</i>	项目 Items	NL05	简达气单胞菌 <i>A. jandaei</i>
蔗糖 Sac	-	-	硫化氢 H <sub>2</sub> S	+	+
麦芽糖 Mal	+	+	VP	+	+
甘露醇 Man	+	+	七叶苷 Esc	-	-
阿拉伯糖 Ara	-	-	鸟氨酸 Orn	-	-
木糖 Xyl	-	-	赖氨酸 Lys	+	+
乳糖 Lac	-	-	精氨酸 Arg	+	+
葡萄糖 Glu	+	+	赖氨酸脱羧酶 Ldc	+	+
肌醇 Ino	-	-	鸟氨酸脱羧酶 Odc	-	-
卫矛醇 Dul	-	-	氧化酶 Ox	+	+
吡啶 Ind	+	+	接触酶 Cat	+	+
水杨素 Sal	+	+	葡萄糖产气	+	+
纤维二糖 Cel	-	-	Gas from glucose		

+. 阳性 Positive; -. 阴性 Negative

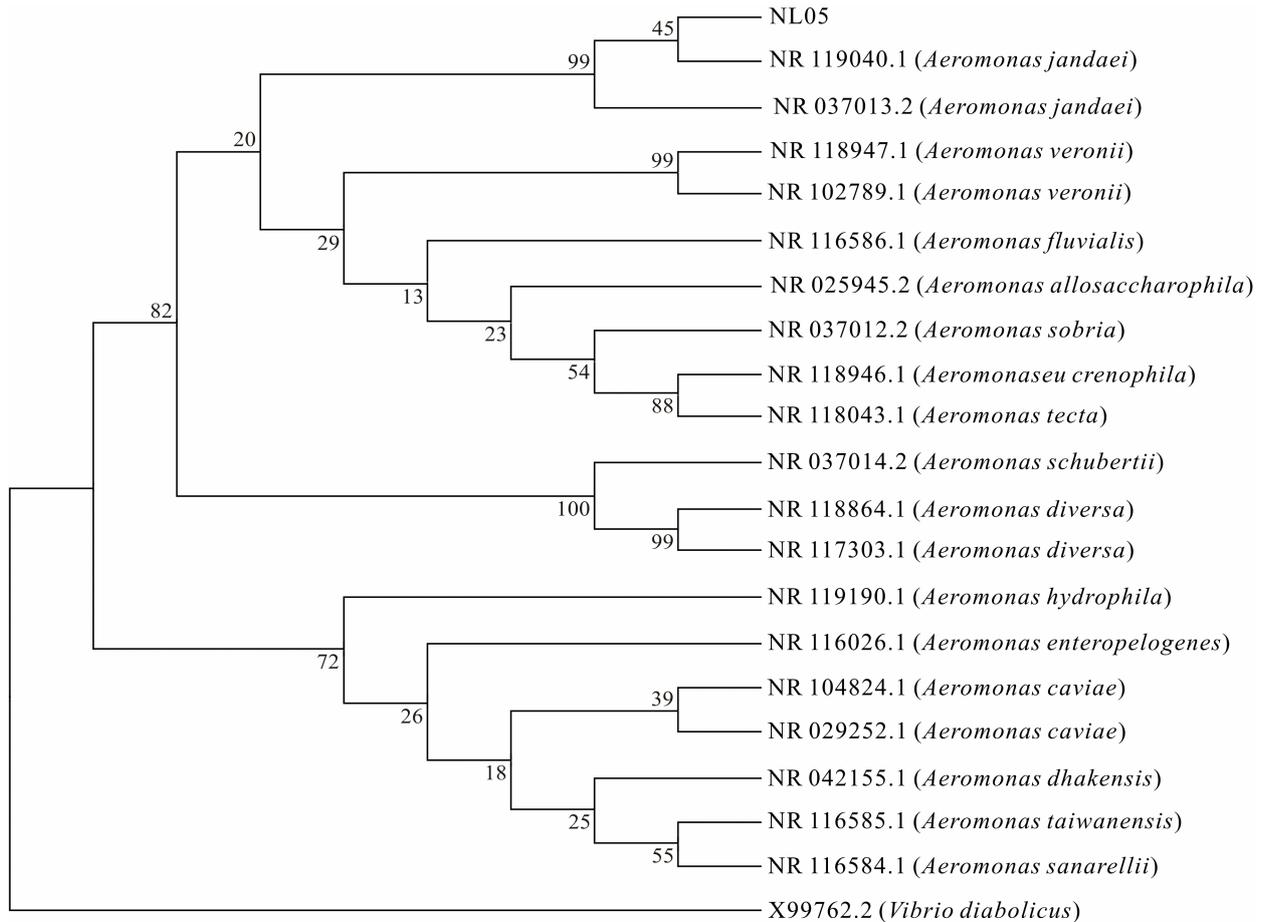


图1 病原菌 NL05 的 16S rRNA 系统进化树  
Fig.1 The phylogenetic tree of pathogen NL05

表3 病原菌 NL05 对抗生素的敏感性  
Tab.3 Antibiotic sensitivity of pathogen NL05

抗生素 Antibiotics	含量 Concentration ( $\mu\text{g}/\text{piece}$ )	抑菌圈直径 Diameter of the inhibitory zone (mm)	敏感度 Sensitivity
奥复星 Ofloxacin	5	18	S
氨苄青霉素 Ampicillin	10	10	R
阿莫西林 Amoxicillin	10	15	R
阿奇霉素 Azithromycin	15	17	I
丙氟哌酸 Ciprofloxacin	10	21	S
丁胺卡那霉素 Amikacin	30	17	S
多粘菌素 B Polymyxin B	300	12	S
恩诺沙星 Enrofloxacin	10	21	R
氟哌酸 Orfloxacin	10	23	S
复方新诺明 SMZ/TMP Cotrimoxazole	3.75/1.25	17	R
呋喃妥因 Nitrofurantion	300	19	S
利福平 Rifampicin	5	20	S
洁霉素 Lincomycin hydrochloride	2	18	S
菌必治 Ceftriaxone	30	19	I
卡那霉素 Kanamycin	30	16	I
甲氧苄啶 Trimethoprim	5	10	R
氯洁霉素 Chlorodeoxy lincomycin	2	12	R

续表 3

抗生素 Antibiotics	含量 Concentration ( $\mu\text{g}/\text{piece}$ )	抑菌圈直径 Diameter of the inhibitory zone (mm)	敏感度 Sensitivity
先锋必素 Cefoperazone	75	21	S
乙基西梭霉素 Netilmicin	30	21	S
链霉素 Streptomycin	10	12	I
美满霉素 Minocycline	30	15	I
青霉素 Penicillin	10 U	15	R
强力霉素 Doxycycline	30	12	R
庆大霉素 Gentamicin	10	17	S
四环素 Tetracyclin	30	10	R
妥布霉素 Tobramycin	10	18	S
头孢噻吩 Cefalotin	30	10	R
先锋霉素 V Cephazolin	30	8	R
先锋霉素 VI Cephalosporinum	30	8	R
万古霉素 Vancocin	30	8	R
新霉素 Neomycin	30	17	S

S. 敏感 Sensitive; I. 中介 Intermediate; R. 耐药 Resistant

有发现,为条件致病菌。王一娟(2010)<sup>1)</sup>和胡萌(2012)<sup>2)</sup>在江苏省部分淡水鱼养殖池塘内检测出简达气单胞菌。简达气单胞菌还可以存活于部分水生生物体内, Siddall 等(2007)在北美水蛭(*Macrobodella decora*)体内检测到与该宿主有寄生关系的简达气单胞菌。李瑾年(1995)在田螺体内分离到4种气单胞菌,其中之一是简达气单胞菌。徐景野等(2002)检测8种市售海产品,其中5种海产品中检测到简达气单胞菌。杨求华(2012)<sup>3)</sup>采用 *cpn60* 和 *dnaJ* 两个功能基因对养殖鳗鲡(*Anguilla japonica*)体内分离到的病原菌进行聚类分析,鉴定为简达气单胞菌。温贵兰等(2012)采用 16S rRNA 基因检测方法,从患病瓯江彩鲤(*Cyprinus carpio* var. color)的肝脏中分离到简达气单胞菌。简达气单胞菌不仅可以感染水生生物,还可以感染牲畜,甚至感染人类,是一种人畜共患病原菌(王永贤等, 2003; Joseph *et al*, 1991; 王晓萍等, 1997; 李岷, 1999)。可见,简达气单胞菌感染对象较广、致病性较强,本研究注射感染试验中 NL05 在 4 d 内可将罗非鱼 100%致死,可见该菌的强致病性。气单胞菌属的大部分细菌是导致水产养殖动物病害的主要致病菌,其致病性与其产生的胞外酶类、胞外毒素和黏附因子等毒力因子密切相关,但有关各因子之间的作用

方式和机制研究较少,简达气单胞菌感染罗非鱼的致病机理有待进一步研究。

### 3.3 简达气单胞菌的防治

针对简达气单胞菌引起的疾病,目前主要以抗生素防治为主。本研究药敏试验结果表明,简达气单胞菌对奥复星等13种抗生素敏感,可为该菌引起的罗非鱼病害防治提供参考。同时发现对先锋霉素 V 和先锋霉素 VI 等13种抗生素耐药,要提倡科学合理使用抗生素,严禁滥用抗生素,减少病原菌耐药性的产生。

## 参 考 文 献

- 王永贤, 张文东, 张应国, 等. 水牛简达气单胞菌和拉氏普罗威登斯菌的分离与鉴定. 云南畜牧兽医, 2003(4): 1-3
- 王忠敏, 黄惠莉. 一株罗非鱼出血病致病菌的分离与鉴定及组织病理观察. 华侨大学学报(自然科学版), 2012, 33(6): 660-666
- 王晓萍, 陈拱立, 郭维植. 从腹泻患者中检出简达和舒伯特气单胞菌. 海峡预防医学杂志, 1997, 3(1): 26-27
- 布坎南. 伯杰细菌鉴定手册(第九版). 北京: 科学出版社, 1994, 482-486
- 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册(第一版). 北京: 科学出版社, 2001, 117-119

1) 王一娟. 江苏地区大宗淡水鱼养殖池塘气单胞菌分离、鉴定和遗传多样性研究. 南京农业大学硕士研究生学位论文, 2010, 34-37

2) 胡萌. 江苏地区气单胞菌分离鉴定及强毒株生物学特性分析. 南京农业大学硕士研究生学位论文, 2012, 39-49

3) 杨求华. 养殖鳗鲡致病性气单胞菌的分离与鉴定. 集美大学硕士研究生学位论文, 2012, 36-50

- 刘加波, 谢芝勋, 邓显文, 等. 罗非鱼嗜水气单胞菌的分离鉴定. 水利渔业, 2006, 26(4): 100-103
- 李岷. 急性腹泻弧菌科细菌鉴定及药敏试验. 南通医学院学报, 1999, 19(2): 203
- 李槿年. 从田螺中分离出四种气单胞菌. 肉品卫生, 1995(7): 8-9
- 杨宁, 黄海, 张希, 等. 尼罗罗非鱼嗜水气单胞菌病的病原分离鉴定和药敏实验. 水产科学, 2014, 33(5): 306-610
- 沈建忠. 动物毒理学. 北京: 中国农业出版社, 2002, 84-95
- 郭玉娟, 张德锋, 樊海平, 等. 中国南方地区罗非鱼无乳链球菌的分子流行病学研究. 水产学报, 2012, 36(3): 399-406
- 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学. 北京: 人民卫生出版社, 2002, 1651-1654
- 柴家前, 丁巧玲, 王振龙, 等. 罗非鱼链球菌的分离鉴定. 中国预防兽医学报, 2002, 24(1): 18-20
- 徐景野, 傅小红, 于梅, 等. 用直接分离法检测贝(甲)壳类海产品中的致病性气单胞菌. 海峡预防医学杂志, 2002, 8(1): 54-55
- 温贵兰, 袁子婵, 张毅, 等. 瓯江彩鲤简达气单胞菌的 16S rDNA 分子鉴定与药敏分析. 黑龙江畜牧兽医, 2012(12): 78-80
- Carnahan A, Fanning GR, Joseph SW. *Aeromonas jandaei* (formerly genospecies DNA group 9 *A. sobria*), a new sucrose negative species isolated from clinical specimens. J Clin Microbiol, 1991, 29: 560-564
- Joseph SW, Carnahan AM, Brayton PR, et al. *Aeromonas jandaei* and *Aeromonas veronii* dual infection of a human wound following aquatic exposure. J Clin Microbiol, 1991, 29(3): 565-569
- Siddall ME, Worthen PL, Johnson M, et al. Novel role for *Aeromonas jandaei* as digestive-tract symbiont of North American medicinal leech. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(2): 655-658

(编辑 冯小花)

## Isolation, Identification and Drug Sensitive Test of *Aeromonas jandaei* from *Tilapia (Tilapia nilotica)*

YANG Ning<sup>1</sup>, JIANG Fangyan<sup>2</sup>, HUANG Hai<sup>1①</sup>, JIAO Jian<sup>3</sup>

(1. Sanya Sci-Tech Academy of Hainan National Breeding and Multiplication, Sanya 572000; 2. Qiongzhou College, Sanya 572022; 3. Agricultural Technical Service Station of Agricultural and Animal Husbandry Bureau of Yongnian County, Handan 057150)

**Abstract** *Tilapia* is a very important freshwater aquacultural species in China; however, bacterial disease caused huge economic losses in recent years with the continuous expansion of *tilapia* aquaculture. The aim of this research was to isolate, identify, and test drug sensitivity of bacteria pathogen found in diseased *Tilapia nilotica*. Six bacteria were isolated from diseased *T. nilotica* as suspected pathogenic bacteria. The bacteria (NL05) isolated from intestine of diseased *T. nilotica* was determined as pathogenic bacteria by infection experiment. The  $LD_{50}$  was  $1 \times 10^3$  CFU/g. Bacteria NL05 was identified as *Aeromonas jandaei*. Morphology observation indicated that NL05 was gram-negative, rod-shaped. Thirteen physiological and biochemical indexes were positive including maltose, mannitol, glucose, salicin, and hydrogen sulfide. Ten indexes were negative including saccharum, arabinose, xylose, inositol, and dulcitol. There was 1442 bp in the sequence of 16S rRNA, which was submitted into GenBank (Accession number: KC916744). The phylogenetic tree based on 16S rRNA showed that NL05 was *A. jandaei*. Drug sensitivity test indicated that NL05 was sensitive to 13 antibiotics including ofloxacin, ciprofloxacin, amikacin, polymyxin B, norfloxacin, rifampicin, and lincomycin, and intermediate sensitive to 5 antibiotics including azithromycin, ceftriaxone, kanamycin, streptomycin and minocycline, and resistant to 13 antibiotics including ampicillin, amoxicillin, enrofloxacin, sulfamethoxazole, and trimethoprim. The results will provide references for the prevention and treatment of diseases caused by *T. nilotica*.

**Key words** *Tilapia nilotica*; *Aeromonas jandaei*; Pathogenicity; Isolation and identification; Sensitivity test

① Corresponding author: HUANG Hai, E-mail: huanghai74@126.com

# 白斑综合征病毒感染凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) *TRx*、*LvP38*、*CAT*、*POD* 基因的表达\*

刘鹏飞<sup>1,2</sup> 刘庆慧<sup>2,3①</sup> 吴 垠<sup>1①</sup> 黄 健<sup>2,3</sup>



(1. 大连海洋大学 大连 116023;

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

3. 青岛国家海洋科学重点实验室 青岛 266071)

**摘要** 为比较凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)的氧化反应和信号转导相关基因在白斑综合征病毒(WSSV)感染中的变化情况,采用实时荧光定量PCR,分析WSSV感染凡纳滨对虾6、12、24、48、72 h后,鳃和类淋巴组织中硫氧还原蛋白(*TRx*)、p38信号通路(*LvP38*)、过氧化氢酶(*CAT*)及过氧化物酶(*POD*)在mRNA转录水平的变化。结果显示,感染对虾的类淋巴组织中,*TRx*、*LvP38*、*CAT*、*POD*在72 h时表达量最高,与对照组差异显著( $P < 0.05$ );而在鳃组织中,该4种基因在12 h时表达量最高,呈先升高后下降的趋势。推断*TRx*、*LvP38*、*CAT*、*POD*与WSSV感染密切相关。

**关键词** 凡纳滨对虾; WSSV; 硫氧还原蛋白; *LvP38*; 过氧化氢酶; 过氧化物酶

**中图分类号** S945 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)04-0089-05

硫氧还原蛋白(Thioredoxin, *TRx*)是一种广泛存在于原核生物及真核生物、大小为12 kDa的多功能蛋白质,其含量在氧化反应中会升高(Miwa *et al.*, 2003),它与许多细胞反应相关,包括基因表达/调控、细胞增殖、细胞信号传导和细胞凋亡途径等(Holmgren, 1985)。丝裂酶原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinases, MAPKs)是细胞内重要的信号转导系统之一(Antoniak *et al.*, 2013)。过氧化氢酶(Catalase, *CAT*)是一类广泛存在于动物、植物和微生物体内的抗氧化酶,具有催化 $H_2O_2$ 分解、防止羟自由基的形成、保护生物体组织免受毒害的重要作用(Wang *et al.*, 2013)。过氧化物酶(Peroxidase, *POD*)是一类从生物体中提取的氧化酶,通过氧化多种有害底物而防止羟自由基的形成(宋林生等, 2003)。

白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)每年都会给对虾养殖业带来巨大的经济损失(Zhou, 1999; Lightner, 1996)。Tavares-Sánchez等(2004)研究

发现,WSSV感染导致对虾产生呼吸暴发并释放活性氧分子,但与氧化反应和信号转导相关基因在WSSV感染中的变化情况尚不十分清楚。

本研究采用实时定量PCR方法,从mRNA的转录水平来研究凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)感染WSSV后不同时间*TRx*、*LvP38*、*CAT*及*POD*在类淋巴及鳃组织中的表达变化情况,从而为凡纳滨对虾对WSSV感染的抗氧化防御及相关信号通路研究提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 WSSV和实验对虾

WSSV为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保存。凡纳滨对虾于2013年10月4日购自山东省青岛市崂山区沙子口对虾养殖厂,平均体长为(13.55±1.00) cm,

\* 国家重点基础研究发展计划(2012CB114401)、国家自然科学基金(30871942)和泰山学者"建设工程专项经费"共同资助。刘鹏飞, E-mail: 845171392@qq.com

① 通讯作者: 刘庆慧, 研究员, E-mail: liuqh@ysfri.ac.cn; 吴 垠, 教授, E-mail: wuyin@dlou.edu.cn

收稿日期: 2014-07-02, 收修改稿日期: 2014-07-31

平均体重为(14.23±1.00) g, 经 PCR 检测不携带 WSSV, 在室温为(22±1)°C 的海水箱中暂养 7 d。

### 1.2 对虾感染

取 36 尾凡纳滨对虾, 其中 15 尾于腹部第 2 节注射 30  $\mu$ l PBS 作为对照组, 另取 15 尾于腹部第 2 节注射 30  $\mu$ l WSSV( $10^7$  个病毒粒子/ $\mu$ l)作为感染组。分别于处理前(即 0 h)和处理后的 6、12、24、48 和 72 h 取对照组和感染组各 3 尾虾, 分别装入无 RNA 酶的 EP 管中, 用液氮速冻, 置于-80°C 冰箱中保存, 备用。

### 1.3 总 RNA 的提取

分别提取对虾的鳃和肝胰腺的总 RNA。采用 TRIzol 法提取组织中的总 RNA。在各组织研磨后提取的上清液中加入 TRIzol(宝生物, 大连), 振荡混匀后静置 5 min; 加入 600  $\mu$ l 氯仿, 摇匀, 静置 5 min; 4°C、12000 r/min 离心 15 min; 取上清液, 加入等体积异丙醇, 静置 10 min; 4°C、12000 r/min 离心 10 min, 弃上清液; 沉淀中加入 1 ml DEPC 水配制的 75%乙醇溶液洗涤, 搅碎沉淀, 4°C、12000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 室温放置干燥; 加入 20  $\mu$ l DEPC 水溶解, 分光光度计(Nano Drop 2000)测其纯度和浓度。

### 1.4 cDNA 的合成

按照 PrimeScript® RT Regent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real-Time)(TaKaRa)的说明书操作, 在 10  $\mu$ l 的体系中分别加入 5 $\times$ g DNA Eraser Buffer 2  $\mu$ l、g DNA Eraser 1  $\mu$ l、Total RNA 1  $\mu$ l、RNA Free dH<sub>2</sub>O 加至总体积 10  $\mu$ l, 42°C 变性 2 min, 4°C 冷却。在上述反应管中加入反转录反应体系, 包括 5 $\times$ Prime Script® Buffer 2 (for real-time) 4  $\mu$ l、PrimeScript® RT Enzyme Mix I 1  $\mu$ l、RT Prime Mix 1  $\mu$ l、RNase Free dH<sub>2</sub>O 4  $\mu$ l, 共 20  $\mu$ l 反应体系, 37°C、15 min, 85°C、5 s, 得到 cDNA, 以 NanoDrop 2000 测定浓度, 用 DEPC 水稀释为 50 ng/ $\mu$ l, 储存于-20°C 冰箱中。

### 1.5 引物

根据已报道的  $\beta$ -actin、TRx、LvP38、CAT、POD 引物序列(表 1), 送交生工生物工程(上海)有限公司合成。

### 1.6 Real-time PCR 分析

以得到的 cDNA 为模板, 分别用  $\beta$ -actin(内参)、TRx、LvP38、CAT、POD 引物进行荧光定量 PCR(表 1)。25  $\mu$ l 反应体系包括 SYBR Premix Ex Taq™ (2 $\times$ ) 12.5  $\mu$ l、cDNA 模板 1  $\mu$ l、上下游引物各 0.5  $\mu$ l (10  $\mu$ mol/L)、

表 1 引物序列

引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')
$\beta$ -actinF	CATCAAGGAGAACTGTGCT
$\beta$ -actinR	GATGGAGTTGTAGGTGGTCT
TRxF(Tavares-Sánchez <i>et al</i> , 2004)	TTAACGAGGCTGGAAACA
TRxR	AACGACATCGCTCATAGA
P38F	TGCTGAACTCAAAGGGCTACAC
P38R	AGTGGACGGTTGGATAACATTTC
CATF(Tavares-Sánchez <i>et al</i> , 2004)	CAAGTGGCGATTACCCCTCAT
CATR	CCCATGAGGCCATACTTTGGT
PODF(Liu <i>et al</i> , 2005)	TGGACCTCGCGGGAGAT
PODR	GACCGATAGCCACCATGCTT

DEPC 水 10.5  $\mu$ l。在 Bio-Rad CFX Manager 荧光定量 PCR 仪的反应条件: 94°C 预变性 30 s; 94°C 变性 30 s, 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 45 个循环; 72°C 延伸 10 min。 $\beta$ -actin(内参)、TRx、LvP38、CAT 的退火温度为 60°C, POD 的退火温度为 61°C。

### 1.7 统计分析

根据 Rotor Gene 3000 仪器自带软件采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup> 法, 以 0 h 的实验组为基准, 以 PBS 组为对照组, 进行 PCR 结果分析, 采用 SPSS 17.0 进行单因素方差分析, 组间数比较用 LSD *t* 检验, 显著性检验水平为  $P < 0.05$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 TRx、LvP38、CAT 和 POD 在类淋巴组织中的表达

TRx、LvP38、CAT 和 POD 在凡纳滨对虾 WSSV 感染组中的基因表达量均在 72 h 时达到最高值, 分别为对照组表达量的 5.4 倍、9.5 倍、37 倍和 18.5 倍, 两组间存在显著性差异; 而在 6、12、24、48 h 时, WSSV 感染组与对照组间的基因表达量无显著性差异(图 1-A、图 1-B、图 1-C、图 1-D)。

### 2.2 TRx、LvP38、CAT 和 POD 在鳃组织中的表达

TRx 在凡纳滨对虾 WSSV 感染组中的表达量在 12 h 达到最高值, 约为对照组表达量的 13 倍, 两组间存在显著性差异; 在 24 h 时, 其基因表达量显著下降, 而在 48 h 与 72 h 时又逐步升高, 且在该时间段, 感染组与对照组之间存在显著性差异(图 1-E)。

LvP38 在凡纳滨对虾 WSSV 感染组中的表达量在 12 h 达到最高值, 约为对照组表达量的 9.3 倍, 两

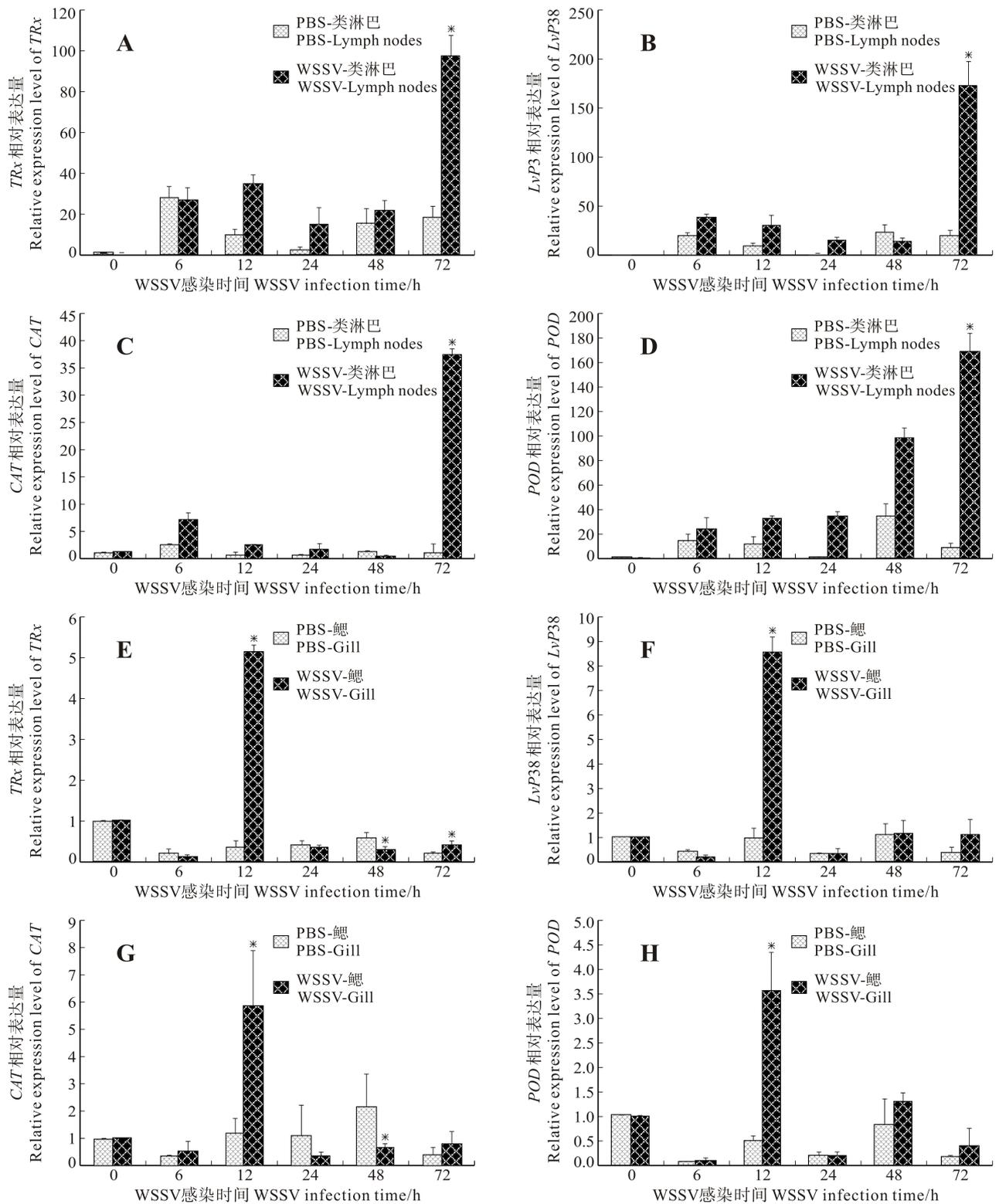


图 1 凡纳滨对虾类淋巴和鳃中 *TRx*、*LvP38*、*CAT*、*POD* 的表达量  
Fig.1 Relative expression levels of *TRx*, *LvP38*, *CAT*, and *POD* in lymph nodes and gill of *L. vannamei*

星号(\*)表示各 WSSV 感染组与对照组比较差异显著( $P < 0.05$ )

Asterisks denote statistically significant differences between WSSV infection groups and the control ( $P < 0.05$ )

组间存在显著性差异; 在 24 h 时, 其基因表达量显著下降, 而在 48、72 h 时又逐步升高, 但两组间不

存在显著性差异(图 1-F)。

*CAT* 在凡纳滨对虾 WSSV 感染组中的表达量在

12 h 达到最高值, 约为对照组表达量的 5.2 倍, 两组间存在显著性差异; 在 24 h 时, 其基因表达量显著下降, 而在 48、72 h 时又逐步升高, 且在 48 h 时, 对照组的基因表达量约为 WSSV 感染组的 3.2 倍, 两组间存在显著性差异(图 1-G)。

*POD* 在凡纳滨对虾 WSSV 感染组中的表达量在 12 h 达到最高值, 约为对照组的 7.1 倍, 两组间存在显著性差异; 其他时刻两组间无显著性差异(图 1-H)。

### 3 讨论

鳃是对虾等甲壳动物的主要呼吸器官, WSSV 主要通过鳃及口腔进入到虾体内, 而类淋巴组织是对虾机体的主要免疫器官, 因此, 本研究选取对虾的鳃和类淋巴组织作为研究样品(Lei *et al*, 2002; Rameshthangam *et al*, 2006; Alday-Sanz *et al*, 2002)。本研究发现, *TRx*、*LvP38*、*CAT* 及 *POD* 在感染 WSSV 的对虾类淋巴与鳃中的表达量不尽相同, 而在对照组中无显著变化, 表明这 4 种基因与 WSSV 感染密切相关。在感染 72 h 时, 对虾类淋巴组织中的 *TRx*、*LvP38*、*CAT* 及 *POD* 的 mRNA 转录表达量显著高于对照组。而在感染的鳃组织中, *TRx* 的转录表达量在 12、48、72 h 时, 与对照组间存在显著性差异。实验组与对照组 *POD* 与 *LvP38* 在 12 h 时的转录表达量存在显著性差异, 而 *CAT* 在 12 和 48 h 时的转录表达量存在显著性差异。比较类淋巴与鳃组织各基因 mRNA 含量及变化可以看出, *TRx*、*LvP38*、*CAT* 及 *POD* 在类淋巴组织的含量显著高于鳃组织, 且 4 种基因在类淋巴组织中对 WSSV 响应变化在 72 h 达到最高, 而在鳃组织中 4 种基因对 WSSV 响应变化在 12 h 达到最高, 说明类淋巴组织是对虾氧化反应的一个重要器官。

Ren 等(2010)研究表明, 在感染对虾 6–24 h 期间, *TRx* 在鳃组织中含量升高, 这与本研究感染组对虾鳃组织中 *TRx* 表达量的变化类似。但在感染对虾的类淋巴组织中, *TRx* 的表达量在 72 h 达到最高, 说明类淋巴与鳃组织的免疫响应不同。

Antoniak 等(2013)研究表明, p38 在宿主的免疫防护过程中可以通过产生细胞因子而抵御病毒的侵袭。通过激活 p38 MAPK 通路, 可以促进仙台病毒诱导 I IFNs 和 IL-12 基因表达量的增加, 从而在抗病毒中起到重要作用(Mikkelsen *et al*, 2009)。本研究表明, *LvP38* 的表达量在感染 WSSV 的病虾的类淋巴组织中 72 h 时达到最高, 而在鳃组织中 12 h 时达到最高, 表明 *LvP38* 参与 WSSV 的感染并起到了一定作用。

刘庆慧等(2005)认为, 对虾群体在 WSSV 感染初期 *CAT* 迅速增加, 而后随着 WSSV 的增殖, *CAT* 逐

渐下降, 这可能是因为一方面 WSSV 的增殖可抑制 *CAT* 的表达量, 另一方面对虾肌体中 *CAT* 可能也参与免疫反应。本研究结果表明, *CAT* 的表达量在感染 WSSV 的病虾鳃组织中 12 h 时达到最高, 而在之后的时间段内逐渐下降且表达量很低, 这与该结论相符合。但其在感染 WSSV 的病虾类淋巴组织中却是 72 h 时达到最高, 说明类淋巴与鳃组织的免疫响应不同。

本研究表明, 在感染 WSSV 对虾的类淋巴组织中, *POD* 的表达量在 72 h 达到最高, 这与王专伟等(2011)报道的感染 WSSV 的斑节对虾血清 *POD* 活性在 60 h 达到最大值的观点相似, 而在感染 WSSV 对虾的鳃组织中, *POD* 的表达量则是在 12 h 达到最高, 之后又逐渐降低, 这与雷质文等(2001)、邱德全等(2007)认为感染后期 *POD* 活性降低的观点相同。由此可知, 这既可能与对虾种类不同有关, 也可能与所取对虾的不同组织有关。

综上所述, 本研究通过荧光定量 PCR 的方法分析了 *TRx*、*LvP38*、*CAT* 及 *POD* 在感染 WSSV 的对虾类淋巴与鳃组织中, 72 h 内转录表达量的变化趋势, 说明这 4 种基因与 WSSV 感染密切相关。该研究可为探讨凡纳滨对虾的氧化反应和信号转导相关因子参与 WSSV 过程提供依据。

### 参 考 文 献

- 王专伟, 黄建华, 杨其彬, 等. 感染白斑综合征病毒的斑节对虾免疫酶变化特征. 湖北农业科学, 2011, 50(9): 1851–1854
- 刘庆慧, 黄健, 杨冰, 等. 人工选育中国对虾两个群体 WSSV 感染相关免疫与生化因子的变化. 海洋水产研究, 2005, 26(6): 22–27
- 邱德全, 杨士平, 邱明生. 氨氮促使携带白斑综合症病毒凡纳滨对虾发病及其血细胞、酚氧化酶和过氧化氢酶变化. 渔业现代化, 2007, 34(1): 36–39
- 宋林生, 苏建国, 蔡中华, 等. 正常与感染白斑病的凡纳滨对虾几项免疫指标变化的初步研究. 北京: 科学出版社, 2003, 335–340
- 雷质文, 黄健, 杨冰, 等. 感染白斑综合征病毒(WSSV)对虾相关免疫因子的研究. 中国水产科学, 2001, 8(4): 46–51
- Alday-Sanz V, Roque A, Turnbull JF. Clearing mechanisms of *Vibrio vulnificus* biotype I in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Dis Aquat Org, 2002, 48(2): 91–99
- Antoniak S, Owens AP 3rd, Baunacke M, *et al*. PAR-1 contributes to the innate immune response during viral infection. J Clin Invest, 2013, 123(3): 1310–1322
- Holmgren A. Thioredoxin. Annu Rev Biochem, 1985, 54: 237–271
- Lei ZW, Huang J, Mo ZL. Pathological research on white spot syndrome virus (WSSV) of *Exopalaemon carinicauda* artificially infected by WSSV. Chin J Vet Sci Technol, 2002, 32(10): 23–25

- Lightner DV. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. Baton Rouge, Louisiana, USA: World Aquaculture Society, 1996, 304–307
- Liu CH, Cheng W, Chen JC. The peroxinectin of white shrimp *Litopenaeus vannamei* is synthesized in the semi-granular and granular cells, and its transcription is up-regulated with *Vibrio alginolyticus* infection. *Fish Shellfish Immunol*, 2005, 18(5): 431–444
- Mikkelsen SS, Jensen SB, Chiliveru S, *et al.* RIG-I-mediated activation of p38 MAPK is essential for viral induction of interferon and activation of dendritic cells: dependence on TRAF2 and TAK1. *J Biol Chem*, 2009, 284(16): 10774–10782
- Miwa K, Kishimoto C, Nakamura H, *et al.* Increased oxidative stress with elevated serum thioredoxin level in patients with coronary spastic angina. *Clin Cardiol*, 2003, 26(4): 177–181
- Rameshthangam P, Ramasamy P. Antioxidant and membrane bound enzymes activity in WSSV-infected *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquaculture*, 2006, 254(1–4): 32–39
- Ren Q, Zhang RR, Zhao XF, *et al.* A thioredoxin response to the WSSV challenge on the Chinese white shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2010, 151(1): 92–98
- Tavares-Sánchez OL, Gómez-Anduro GA, Felipe-Ortega X, *et al.* Catalase from the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*: molecular cloning and protein detection. *Comp Biochem Physiol B*, 2004, 138(4): 331–337
- Wang C, Yue X, Lu X, *et al.* The role of catalase in the immune response to oxidative stress and pathogen challenge in the clam *Meretrix meretrix*. *Fish Shellfish Immunol*, 2013, 34(1): 91–99
- Zhou HM. Study of morphology and tissue pathology of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in *Penaeus monodon*. *J Xuzhou Normal Univ (Natural Science Edition)*, 1999, 17(4): 59–62

(编辑 冯小花)

## Expression of *TRx*, *LvP38*, *CAT*, and *POD* Gene of *Litopenaeus vannamei* Response to WSSV Infection

LIU Pengfei<sup>1,2</sup>, LIU Qinghui<sup>2,3①</sup>, WU Yin<sup>1①</sup>, HUANG Jie<sup>2,3</sup>

(1. Dalian Ocean University, Dalian 116023; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. National Oceanographic Center, Qingdao 266071)

**Abstract** In order to understand the change in the expression of genes associated with the oxidation and the signaling pathway, we infected the shrimp with the white spot syndrome virus, then we used quantitative real-time PCR to analyze the mRNA expression of thioredoxin (*TRx*), *Litopenaeus vannamei* p38 (*LvP38*), catalase (*CAT*), and peroxidase (*POD*) genes in the lymph nodes and gill of the shrimp at different time points after the infection (0, 6, 12, 24, 48 and 72 h). The shrimps were divided into two groups (the WSSV-injected group and the PBS-injected group), and we collected 3 shrimps from each group at 0, 6, 12, 24, 48, and 72 h after the injection, and isolated individual samples of the lymph nodes and gills. After the extraction of the total RNA, we synthesized and quantified the first-strand cDNAs with a kit and NanoDrop 3000 respectively, and performed quantitative real-time PCR using Rotor Gene 3000. The results showed that in the WSSV-injected group, the expression levels of *TRx*, *LvP38*, *CAT*, and *POD* in lymph nodes reached the maximum at 72 h post infection, and there was no significant difference between the WSSV-injected group and the PBS-injected group during the period of 6–48 h. The expression level in the gill of the WSSV-injected group was the highest at 12 h post infection, and then decreased over time. Significant differences in *TRx* mRNA expression were observed at 48 h and 72 h, and there was a significant difference in *CAT* mRNA expression at 48 h between the WSSV-injected group and the PBS-injected group. Our data indicated that *TRx*, *LvP38*, *CAT*, and *POD* might be correlated with the WSSV infection.

**Key words** *Litopenaeus vannamei*; White spot syndrome virus; *TRx*; *LvP38*; *CAT*; *POD*

① Corresponding author: LIU Qinghui, E-mail: liuqh@ysfri.ac.cn; WU Yin, E-mail: wuyin@dlou.edu.cn

# 温度对中华原钩虾(*Eogammarus possjeticus*)

## 摄食率和消化酶活力的影响\*



薛素燕 毛玉泽 赵法箴 方建光<sup>①</sup>

(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** 采用生理生态学和酶学分析方法,测定了不同温度下中华原钩虾的摄食率和消化酶活力。结果显示,温度对中华原钩虾幼体消化酶活力的影响差异极显著( $P<0.01$ )。在 15–25℃ 范围内,胃蛋白酶、类胰蛋白酶及淀粉酶的活力随培养温度的升高而增加;在 20–25℃ 范围内,胃蛋白酶、类胰蛋白酶和淀粉酶活力均处于较高水平,说明中华原钩虾幼体在此温度范围内具有较好的消化吸收能力。作为甲壳动物食性指标的淀粉酶/类胰蛋白酶活力(A/T)比值在 1.2–1.5 之间,说明此阶段中华原钩虾幼体偏植物食性。中华原钩虾日摄食率受温度影响显著( $P<0.05$ ),在水温 20–25℃ 之间,中华原钩虾幼体具有最大摄食率,其回归方程为:  $y = -0.754x^2 + 33.297x - 277.57$  ( $R^2=0.958$ ),最大日摄食率为 89.84%。成体在 20℃ 左右达到日摄食率的最大值,其回归方程为:  $y = -0.247x^2 + 10.463x - 78.287$  ( $R^2=0.998$ ),最大日摄食率为 32.47%;中华原钩虾幼体和成体饵料吸收率均随温度升高呈先上升后下降的趋势,各温度处理组幼体的饵料吸收率均高于成体。根据饵料吸收率回归方程,可得到最大饵料吸收率,幼体为 59.86%,成体为 56.86%,对应的温度分别为幼体 21.30℃、成体 21.24℃。因此,20–25℃ 是培育中华原钩虾的适宜水温范围。

**关键词** 中华原钩虾; 温度; 消化酶活力; 摄食率

**中图分类号** S96 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)04-0094-05

中华原钩虾(*Eogammarus possjeticus*)隶属于节肢动物门(Arthropoda)、甲壳纲(Crustacea),主要分布于中国渤海、黄海,常栖息于潮间带海藻间或岩石下(任先秋, 2002),是山东半岛潮间带及养殖池塘等端足类的优势种之一,是对虾、鱼类等经济水产动物的优质生物活饵。近年来,山东等地已出现规模化培养,但是关于该种的基础生物学方面的报道很少。规模化人工培养中华原钩虾首先要掌握各环境因子对其生长发育等生理学指标的影响,而温度较大程度控制着其生长发育。本研究对中华原钩虾在不同温度下主要消化酶活性以及摄食率、饵料吸收率进行了测定,试图从消化酶活力角度探索温度对中华原钩虾的生长以

及生理调节机制的抑制或促进作用,有助于确定中华原钩虾适宜的培育条件,为提高养殖产量提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

中华原钩虾连同与其生活的藻类群落一并以筛孔直径为 2 mm 的采样器于山东省青岛城阳上马镇浅海养殖池塘采集,转运至实验室自然海水暂养,水温为 10.23–13.12℃,盐度为 31–33, pH 为 7.74–8.03。

试验开始前,分别筛选个体大小均匀的雌、雄中华原钩虾培养。雄性体长为(16.98±0.66) mm,体重为

\* 中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022013022)资助。薛素燕, E-mail: xuesy@ysfri.ac.cn

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

收稿日期: 2014-08-29, 收修改稿日期: 2014-10-16

(47.43±4.64) mg; 雌性体长为(12.26±0.66) mm, 体重为(33.41±5.70) mg。将同批次交尾雌雄体若干对移入培养箱(40 cm×40 cm×30 cm)中培养, 待交尾结束后, 将雄性移除, 挑选50只抱卵的雌性继续培养。待幼体孵出后, 将雌性中华原钩虾移除, 幼体备用。

## 1.2 幼体消化酶活力及蛋白含量测定

本试验设置15、20、25、30℃共4个温度梯度。实验开始时, 为避免剧烈温差对体长为(1.83±0.14) mm的受试中华原钩虾幼体造成伤害, 以驯养水温为基础, 以每2 h改变3℃的速率渐次升温至实验所需温度, 在各处理温度条件下适应3 d后开始试验, 试验持续7 d。试验容器为控温水族箱(20 cm×30 cm×20 cm), 水体9 L, 连续充气。在试验过程中, 每天08:00、12:00、16:00、20:00测水温, 校正培养箱温度, 每天换水约1/4, 新加入的海水预先调节至相应温度。

**1.2.1 粗酶液的制备** 试验结束后, 将试验中华原钩虾幼体饥饿24 h, 各组幼体分别取约0.2 g置于冰浴中, 加入10倍体积(W/V)预冷重蒸水, 在玻璃匀浆器中匀浆, 将匀浆物离心(TGL-16G型冷冻离心机)30 min (4℃, 10000 r/min)。上清液用于淀粉酶、胃蛋白酶和类胰蛋白酶活力测定, 保存于-80℃冰箱备用。

**1.2.2 淀粉酶活性测定** 加入以0.067 mol/L磷酸缓冲液(pH 6.9)配好的1%淀粉溶液0.5 ml, 中华原钩虾粗酶提取液0.5 ml, 摇匀后25℃水浴保温3 min; 加入2 ml指示剂(3, 5-二硝基水杨酸), 沸水浴中保温5 min, 取出迅速冷却, 定容至10 ml, 以酶标仪测定490 nm的吸光度, 计算麦芽糖的含量, 从而确定淀粉酶的活力。淀粉酶活性定义: 在25℃下, 每分钟催化淀粉生成1 μg麦芽糖为1个酶活力单位(μg/min)。

**1.2.3 胃蛋白酶活性测定** 胃蛋白酶活性测定参照刘玉梅等(1991)。在干燥的玻璃试管中, 加入0.5%干酪素溶液2 ml、0.04 mol/L EDTA-Na<sub>2</sub> 0.1 ml、0.2 mol/L柠檬酸缓冲液(pH 3.0) 0.4 ml、中华原钩虾粗酶液0.4 ml, 重蒸水定容至3.5 ml, 混匀后37℃水浴保温15 min, 加入30%三氯乙酸1 ml, 离心, 收集上清液, 以福林-酚试剂比色测定酪氨酸的生成, 确定胃蛋白酶活性。胃蛋白酶活性定义: 在37℃下, 每分钟水解干酪素产生1 μg酪氨酸为1个酶活力单位(μg/min)。

**1.2.4 类胰蛋白酶活性测定** 类胰蛋白酶活性测定基本同胃蛋白酶, 除将0.2 mol/L柠檬酸缓冲液(pH 3.0)换成0.05 mol/L硼砂-氢氧化钠缓冲液(pH 9.8)外, 其他步骤同胃蛋白酶活性测定相同。以福林-酚试剂比色测定酪氨酸的生成, 从而确定类胰蛋白酶活性。类胰蛋白酶活性定义: 在37℃下, 每分钟水解干酪素

产生1 μg酪氨酸为1个酶活力单位(μg/min)。

**1.2.5 蛋白含量的测定** 酶粗提液蛋白含量的测定采用考马斯亮蓝法, 根据Bradford的方法稍作改进。考马斯亮蓝G-250显色液的组成为0.01% (w/v)考马斯亮蓝G-250、5%(v/v)无水乙醇、10%(v/v)正磷酸。过滤后, 4℃避光保存。以牛血清蛋白(BSA)为标准蛋白(1 mg/ml)绘制蛋白浓度与OD值之间的标准曲线(表1), 然后取待分析的蛋白溶液于显色液中, 室温放置5 min后, 读取紫外可见分光光度仪上OD<sub>595 nm</sub>值, 3次重复求平均值。

表1 工作液成分配比  
Tab.1 Components of the working solution

溶液 Solution	编号 Number					
	1	2	3	4	5	6
100 μg/ml 标准蛋白 BSA (ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
0.15 mol/L NaCl (ml)	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5
考马斯亮蓝试剂 Bradford solution (ml)	5	5	5	5	5	5

测定步骤: 摇匀, 1 h内以1号管为空白对照, 测定595 nm处比色值。以A<sub>595 nm</sub>为纵坐标、标准蛋白含量为横坐标(10、20、30、40、50 μg), 绘制标准曲线。根据标准曲线, 得到线性回归方程: A<sub>595 nm</sub>=aX+b。测出样品的A<sub>595 nm</sub>, 利用标准曲线或回归方程求出样品蛋白质含量。最后, 按照标准曲线求得待分析样品溶液中蛋白的浓度, 计算样品蛋白浓度。

## 1.3 摄食率和饵料吸收率测定

本试验设置15、20、25、30℃4个温度梯度, 每个梯度设3个平行, 对照组未放置中华原钩虾。中华原钩虾设大[体长为(14.32±0.22) mm, 湿重为(36.62±5.35) mg]、小[体长为(7.83±0.11) mm, 湿重为(8.52±1.16) mg]两个规格, 大、小规格每个培养箱分别放30、50个。试验开始时, 以驯养水温为基础, 以每2 h改变3℃的速率渐次升温至实验所需温度, 在各温度条件下适应3 d, 试验进行14 d。试验容器为塑料箱(20 cm×30 cm×20 cm), 水体9 L, 连续充气, 每天换水约1/4, 新加入的海水预先调节至相应温度, 在试验过程中, 每天08:00、12:00、16:00、20:00测水温, 校正培养箱温度。每天10:00投喂新鲜绿藻浒苔 *Enteromorpha* sp. (2.09±0.07) g, 每次投喂之前, 采用虹吸法分别收集残饵及粪便, 仔细筛选、区分收集的粪便及残饵, 将未吃完的藻用滤纸吸干, 分析天平称重, 浒苔残饵量通过溶失试验进行校正。将粪便、残饵分别以锡箔纸包封, 70℃烘干24 h至恒重, 分析天平称重。同

时,将每个培养箱中的中华原钩虾用滤纸吸干后测定湿重。日摄食率、饵料吸收效率分别按如下公式计算:

$$\text{日摄食率}(\%) = \text{日摄食量}(\text{湿重}) \times 100 / \text{中华原钩虾湿重}$$

$$\text{饵料吸收率}(\%) = (\text{摄食量干重} - \text{排便量干重}) \times 100 / \text{摄食量干重}$$

### 1.4 数据统计与分析

运用 Excel 2010 和 SPSS 18.0 对实验数据进行统计分析。采用 ANOVA 单因子方差分析,并作 S-N-K 多重比较,以  $P < 0.05$  作为不同处理间差异显著标准。

## 2 结果

### 2.1 蛋白质含量测定

测定酶粗提液 595 nm 的吸光度,利用标准蛋白质绘制的标准曲线(图 1),计算得到 15、20、25、30℃样品的蛋白质浓度分别为 3.18、3.19、4.18、3.46 mg/ml。

### 2.2 不同温度下中华原钩虾的消化酶活力

在 15–25℃ 范围内,中华原钩虾的胃蛋白酶、类胰蛋白酶及淀粉酶随培养温度的升高而呈现增加的

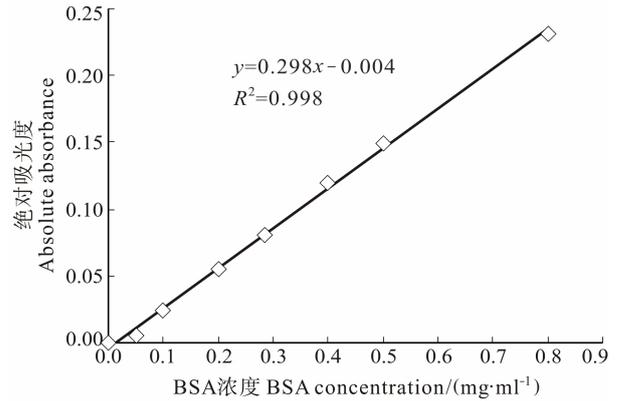


图 1 蛋白质含量的标准曲线  
Fig.1 Standard curve for protein quantification

趋势(图 2),其中蛋白酶和类胰蛋白酶在 25℃ 时达到最大值,分别为 0.45、0.83 U/mg prot; 淀粉酶在 20℃ 时达到最大值,为 0.97 U/mg prot。但温度达到 30℃ 时,消化酶的比活力均出现较大降低。消化酶各温度处理组之间差异显著( $P < 0.05$ )。作为甲壳动物食性指标的淀粉酶/类胰蛋白酶活力(A/T)比值,在不同温度处理下波动较小,均在 1.2–1.5 之间。

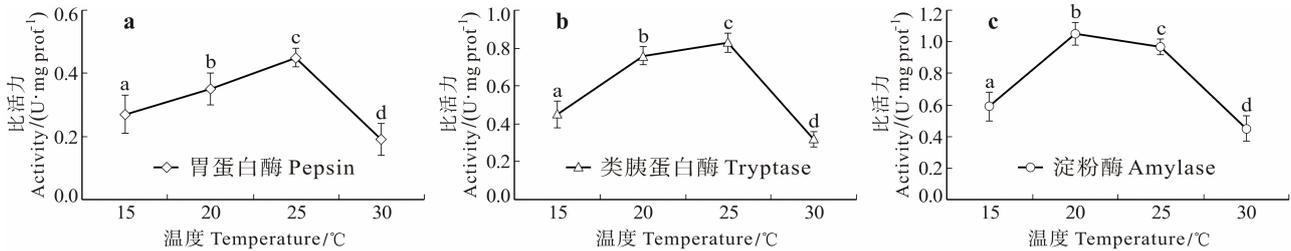


图 2 温度对中华原钩虾幼体消化酶活力的影响  
Fig.2 Effects of temperature on the activities of pepsin, trypsin, and amylase of *E. possjeticus* larva

不同上标字母表示各处理组之间差异显著( $P < 0.05$ )

Different letters mean significant difference among treatments ( $P < 0.05$ )

### 2.3 不同温度下中华原钩虾的摄食率和饵料吸收率

中华原钩虾摄食率与温度的关系如图 3 所示,幼体和成体日摄食率随温度升高呈先升后降的趋势,各温度处理组幼体的日摄食率均高于成体,且各处理组间差异显著( $P < 0.05$ )。幼体日摄食率受温度影响较大,根据回归方程( $y = -0.754x^2 + 33.297x - 277.57$ ,  $R^2 = 0.958$ )推出,在水温为 20–25℃ 范围内具有最大日摄食率,计算得到最大日摄食率为 89.84%;成体在 20℃ 达到最大日摄食率,根据回归方程( $y = -0.247x^2 + 10.463x - 78.287$ ,  $R^2 = 0.998$ ),计算得到最大日摄食率为 32.47%。

由图 4 可知,中华原钩虾幼体和成体饵料吸收率均随温度升高而呈现先升后降的趋势,各温度处理组

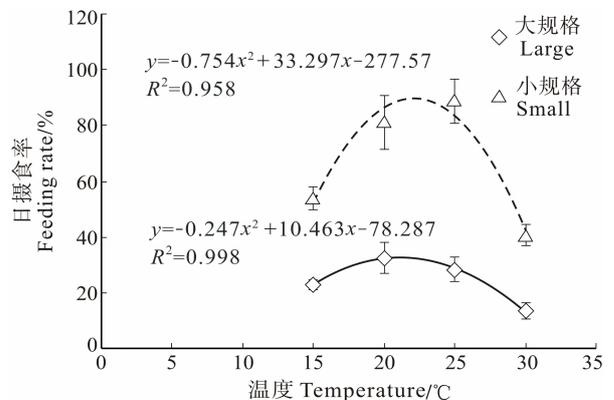


图 3 不同温度中华原钩虾的日摄食率  
Fig.3 Feeding rate of *E. possjeticus* under different temperature

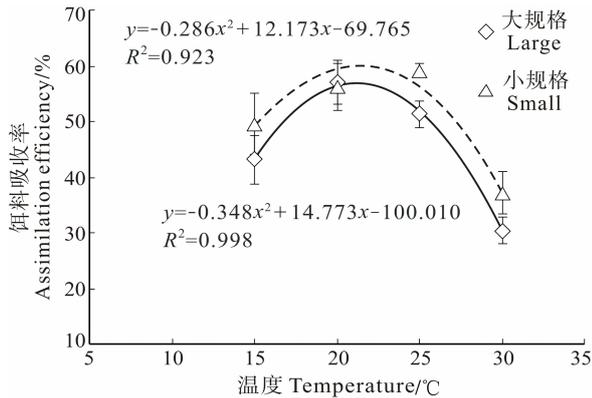


图4 不同温度中华原钩虾的饵料吸收率

Fig.4 Assimilation efficiency of *E. possjeticus* under different temperature

幼体的吸收率均高于成体,且各处理组间差异显著( $P < 0.05$ )。根据饵料吸收率回归方程,计算得到幼体、成体的最适饵料吸收的温度分别为 $21.30^{\circ}\text{C}$ 、 $21.24^{\circ}\text{C}$ ,最大饵料吸收率分别为 $59.86\%$ 、 $56.86\%$ 。

### 3 讨论

#### 3.1 温度对消化酶活力的影响

动物的消化酶活力被认为是反映其消化机能的一项重要指标,决定着动物对营养物质消化吸收的能力,从而决定动物的生长发育速度。甲壳动物消化酶活力在营养生理方面有重要作用,直接影响甲壳动物的生长、蜕皮和摄食(van Wormhoudt, 1973; Lovett *et al.*, 1990; Galgani, 1985; van Wormhoudt *et al.*, 1988; Jones *et al.*, 1997)。消化酶属于蛋白质,温度是影响消化酶活力的最重要因素之一。研究表明,不同温度对中华原钩虾幼体消化酶活力有显著影响,在 $15\text{--}25^{\circ}\text{C}$ 水温范围内,随着温度的升高,中华原钩虾整体的呼吸代谢和能量消耗增加,对相关营养物质的需求也相应增加,中华原钩虾可能会调动其内在的补偿协调机制,加速对摄入食物中能量物质的分解和吸收,使消化酶活力增强。

不同消化酶活力的差别可以直接反映动物对不同营养物质吸收利用的能力。Biesiot 等(1990)提出采用淀粉酶活力/蛋白酶活力(A/P)或淀粉酶活力/类胰蛋白酶活力(A/T)的比值作为甲壳动物幼体的食性指标。比值高,则表示淀粉酶含量相对较高,该动物为植食性或偏植食性;比值低,则表示蛋白酶含量较高,为肉食性或偏肉食性。本研究中,中华原钩虾幼体的A/T值大于1,表明其淀粉酶活力较高,对淀粉具有较高的消化能力,为偏植物食性钩虾,这与潘鲁青等(2006)的研究结果一致。

国内外学者对甲壳动物消化酶活力的研究,尤其

是对幼体消化酶变化及摄食的研究也比较多,主要集中在对虾、龙虾、蟹等经济水产动物(杨蕙萍等, 1998; Biesiot *et al.*, 1990)。甲壳纲的白滨对虾(*Litopenaeus setiferus*) (Lovett *et al.*, 1990)、中国对虾(*P. chinensis*) (Bernfeld, 1955; 潘鲁青等, 1997a、b)和日本对虾(*P. japonicus*)、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)、锯缘青蟹(*Scylla serrate*) (潘鲁青, 1997)等消化酶的测定结果有一定的相似性,说明甲壳纲动物食性相近,其幼体发育过程中消化酶活力的变化具有类似的规律:摄食对象由浮游植物向浮游动物转化,同时伴随着淀粉酶活性的降低和蛋白酶活性的相应增加。研究发现,随着发育的进行,中华原钩虾的食性也发生一定转变,由植食性向杂食性转变。

#### 3.2 温度对摄食率和饵料吸收率的影响

由于中华原钩虾属于变温动物,环境温度变化直接影响钩虾机体内的生理生化过程(杨蕙萍等, 1998),又由于酶催化反应的特性,温度直接影响消化酶的催化能力(陈昌生等, 2001),消化酶的催化速率直接影响钩虾对营养物质的消化、吸收和利用。在 $20\text{--}25^{\circ}\text{C}$ 范围内,中华原钩虾的消化酶活力处于较高水平,对营养物质消化吸收较快,具有较高的摄食率和饵料吸收率,因而能够获得较快的生长速度。而当水温超过 $25^{\circ}\text{C}$ ,过高的水温抑制了消化酶的活力,致使其摄食和饵料吸收率降低,影响了中华原钩虾的正常生理机能,从而降低了生长速度,这与潘鲁青(1997)研究中国对虾幼体的结果相一致。

实验结果显示,中华原钩虾幼体的摄食率和饵料吸收率均高于成体,说明幼体的基础代谢速率更快,生长速度相应也高于成体。中华原钩虾幼体的最大摄食率和饵料吸收率对应的温度也高于成体,说明培育幼体的水温可以适当高于成体。水温 $20\text{--}25^{\circ}\text{C}$ 范围内,中华原钩虾的摄食率和饵料吸收率均保持在较高水平,其胃蛋白酶、类胰蛋白酶和淀粉酶活力均处于较高水平,表明 $20\text{--}25^{\circ}\text{C}$ 是培育中华原钩虾的适宜温度。

### 参 考 文 献

- 任先秋. 中国动物志. 北京: 科学出版社, 2002, 252  
 刘玉梅, 朱谨钊, 吴厚余. 中国对虾幼体和仔虾消化酶活力及氨基酸组成的研究. 海洋与湖沼, 1991, 22(6): 571-575  
 杨蕙萍, 童圣英, 王子臣. 国内外关于水产动物消化酶研究的概况. 大连水产学院学报, 1998, 13(3): 64-71  
 陈昌生, 黄标, 叶兆弘, 等. 南美白对虾摄食、生长及存活与温度的关系. 集美大学学报, 2001, 6(4): 296-300  
 潘鲁青, 马牲, 王克行. 温度对中国对虾幼体生长发育与消

- 化酶活力的影响. 中国水产科学, 1997a, 4(3): 17-22
- 潘鲁青, 王克行. 中国对虾幼体消化酶活力的试验研究. 水产学报, 1997b, 21(1): 26-31
- 潘鲁青. 四种虾蟹类幼体消化酶活力的比较研究. 青岛海洋大学学报, 1997, 27(3): 313-318
- 潘鲁青, 刘泓宇, 肖国强. 甲壳动物幼体消化酶研究进展. 中国水产科学, 2006, 13(3): 492-501
- Bernfeld P. Methods in Enzymology. New York: Academic Press, 1955, 149
- Biesiot PM, Capuzzo JM. Change in digestive enzyme activities during early development of the American lobster *Homarus americanus*. Mar Biol Ecol, 1990, 136(2): 107-122
- Galgani F. Radioimmunoassay of shrimp trypsin: application to the larval development of *Penaeus japonicus* Bate. Mar Biol Ecol, 1985, 87: 145-151
- Jones DA, Kumlu M, Vay LL, *et al.* The digestive physiology of herbivorous, omnivorous and carnivorous crustacean larvae: a review. Aquaculture, 1997, 155(1-4): 285-295
- Lovett DL, Filder DL. Ontogenetic change in digestive enzyme activity of larval and postlarval white shrimp *Penaeus setiferus*. Biol Bull, 1990, 178(2): 144-159
- van Wormhoudt A, Favrel P. Electrophoretic characterization of *Palaemon elegans* (Crustacea, Decapoda)  $\alpha$ -amylase system: study of amylase polymorphism during the intermoult cycle. Comp Biochem Physiol, 1988, 89(2): 201-207
- van Wormhoudt A. Variation des protéases, des amylases et des protéines solubles au cours du développement larvaire chez *Palaemon serratus*. Mar Biol, 1973, 19(3): 245-248

(编辑 冯小花)

## Effects of Temperature on the Feeding Rate and the Digestive Enzymes Activities of *Eogammarus possjeticus*

XUE Suyan, MAO Yuze, ZHAO Fazhen, FANG Jianguang<sup>①</sup>

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

**Abstract** The amphipod crustacean *Eogammarus possjeticus* is an ideal live feed for fish and shrimp. However, little is known about the optimal aquaculture conditions for this species. Here we investigated the effects of temperature on the feeding rate and digestive enzymes activities of *E. possjeticus* using physiological ecology method and enzymatic analysis. Our results demonstrated that there were significant differences in digestive enzymes activities between groups treated at different temperatures ( $P < 0.01$ ). In the range of 15-25°C the activities of pepsin, trypsin and amylase in *E. possjeticus* were elevated along with the increase of temperature, especially higher above 20°C. Thus, the optimal temperature for digestive enzymes activities should be 20-25°C. The amylase/trypsin (*A/T*) value was used to evaluate the feeding habits of crustacean. The *A/T* values were between 1.2 and 1.5 with small fluctuation, which indicated that the larvae of *E. possjeticus* had preference to plant diets. The feeding rate of *E. possjeticus* juveniles was largely affected by temperature ( $P < 0.05$ ), and the predicted maximal feeding rate was 89.84% according to the correlation equation ( $y = -0.754x^2 + 33.297x - 277.57$ ,  $R^2 = 0.958$ ) between 20°C and 25°C. The predicted maximal feeding rate of adults was 32.47% according to the correlation equation ( $y = -0.247x^2 + 10.463x - 78.287$  ( $R^2 = 0.998$ )) at around 20°C. The assimilation rates were similar between the juveniles and the adults of *E. possjeticus*. The maximal assimilation efficiency was 59.86% for juveniles, and 56.86% for adults, and the corresponding optimal temperatures were 21.30°C and 21.24°C respectively. These data suggested that 20-25°C could be an appropriate temperature range for the cultivation of *E. possjeticus*.

**Key words** *Eogammarus possjeticus*; Temperature; Digestive enzyme activities; Feeding rate

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

# 罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)幼体病原肠杆菌 PCR 检测技术的建立与应用\*



陈雪峰 杨国梁<sup>①</sup> 高强 夏正龙 濮剑威 慎佩晶 黄振远

(浙江省淡水水产研究所 国家罗氏沼虾遗传育种中心 浙江省淡水水产遗传育种重点实验室 湖州 313001)

**摘要** 根据罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)幼体培育期主要细菌性病原阴沟肠杆菌 *omp A* 基因序列、产气肠杆菌 *gry B* 基因序列设计特异性引物,通过对 PCR 扩增产物进行测序鉴定与特异性和敏感性试验,建立了两种病原菌的 PCR 快速检测方法,并对发病样品进行了检测。结果显示,设计的阴沟肠杆菌与产气肠杆菌检测引物能分别扩增出与预计大小一致的 385 bp 和 201 bp 的特异性片段,与其余供试菌株无交叉反应。两种检测方法的灵敏度分别为  $10^3$  CFU/ml 和  $10^2$  CFU/ml。罗氏沼虾幼体样品的检测结果与实际发病情况一致,建立的检测方法也可直接对样品进行 PCR 检测,而无需细菌分离培养。本研究建立的阴沟肠杆菌与产气肠杆菌 PCR 检测方法具有较高的特异性和灵敏度,可缩短检测时间,该方法的建立对罗氏沼虾幼体病原的快速诊断、分子流行病学的调查及无特定病原(SPF)群体的建立具有重要意义。

**关键词** 罗氏沼虾; 阴沟肠杆菌; 产气肠杆菌; PCR 检测

中图分类号 S941 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2015)04-0099-06

罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)为世界最大淡水虾类,具有重要的经济价值,它是世界上许多热带和亚热带地区内陆水产养殖中最重要的经济甲壳动物之一(杨国梁等,2008)。目前,我国是全球罗氏沼虾产业最大国,相关产值在 60 亿元以上(Yang *et al.*, 2012)。浙江省湖州市是我国最大的罗氏沼虾育苗基地,年育苗量占全国罗氏沼虾虾苗生产量的 60%以上。2009 年,我国罗氏沼虾养殖产量达 14.4 万 t,创历史新高。然而,在罗氏沼虾产业快速发展的同时,因苗种供不应求而出现的跨省、跨区域的调苗所带来的疫病风险于 2010 年在全国罗氏沼虾育苗场暴发,此病危害特别严重,90%以上的罗氏沼虾育苗场因相继感染发病而停产,造成主要育苗区的直接经济损失达 2 亿元。该病主要表现为:幼体培育到第 7 天时,食欲和活力下降,空胃,颜色发黑。情况特别严重时,

在幼体培育至 3-4 d 即表现出明显病症,在培育到第 7 天,幼体倒池后发生大量死亡,故该病亦被形象称为“7 日病”。在随后几年的流行病学调查中,该病在部分育苗场依然时有暴发。浙江省淡水水产遗传育种重点实验室通过反复的人工回感实验,发现导致罗氏沼虾幼体发病的主要细菌性病原为阴沟肠杆菌和产气肠杆菌(结果待发表)。为有效遏制疾病发生、减少经济损失,迫切需要建立一种特异、敏感的检测方法,以实现病原的快速诊断与针对性防治。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株** 本实验所用菌株阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*) 315B 株、产气肠杆菌(*Enterobacter*

\* 国家科技支撑计划项目(2012BAD26B04)、浙江省重大科技专项(2012C12907)、浙江省淡水养殖重点科技创新团队项目(2010R50026-02)和湖州市重大科技专项(2011ZD2005)共同资助。陈雪峰, E-mail: chenfenghailan@126.com

<sup>①</sup> 通讯作者: 杨国梁, 研究员, E-mail: yg10572@163.com

收稿日期: 2014-08-05, 收修改稿日期: 2015-01-07

*aerogenes*) NTH01 株、大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 株、阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*) CX1 株、弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*) CX2 株、粘质沙雷菌(*Serratia marcescens*) NTH03 株、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*) NTH071 株、温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*) NTH072 株、腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*) NTH04 株均为本实验室保存。其中大肠杆菌、阪崎肠杆菌、弗氏柠檬酸杆菌、粘质沙雷菌与阴沟肠杆菌、产气肠杆菌为同属于肠杆菌科的近缘种,嗜水气单胞菌、温和气单胞菌、腐败希瓦氏菌与阴沟肠杆菌、产气肠杆菌亲缘关系较远。上述菌株的选择有利于验证检测引物的特异性。所有菌株均保存在含 15%甘油缓冲液的保种管中, -80℃ 冰箱保存。

**1.1.2 试剂** 10×PCR Buffer(含  $Mg^{2+}$ )、2.5 mmol/L 的 dNTPs、5 U/μl *rTaq* 酶、DL2000 Marker、PCR 产物纯化试剂盒、TA 克隆试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司,琼脂糖、Gelsafe 核酸染料购自上海捷瑞生物工程有限公司。

**1.1.3 引物** 通过生物信息学分析,从阴沟肠杆菌基因组 DNA 序列中筛选出保守且特异的 *omp A* 基因,以其为阴沟肠杆菌检测靶基因;从产气肠杆菌基因组 DNA 序列中筛选出保守且特异的 *gry B* 基因,以其为产气肠杆菌检测靶基因。将基因序列导入 Primer 5.0 软件中进行引物设计,要求 GC 含量在 40%–60%之间,扩增产物长度为 150–500 bp。引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。设计阴沟肠杆菌检测引物 F: 5'-CAT GAC ACC GGT GTT TCC CCA GT-3'; R: 5'-CGG TCG GTG AAG CCC AGA ACC ACT A-3'。设计产气肠杆菌检测引物 F: 5'-GTA ACC GGT GAA ACC GAA AGC-3'; R: 5'-GAT GCC GCC TTC GTA GTG GAA ATG G-3'。

## 1.2 方法

**1.2.1 细菌基因组 DNA 提取** 将检测菌株接种于 5 ml 营养肉汤液体培养基中,于 35℃ 恒温摇床中振荡培养 12 h 增菌后,取 1 ml 菌液,放入 1.5 ml 无菌离心管中;12000 r/min 离心 15 min,弃上清液,加入 500 μl 灭菌双蒸水,用移液器轻轻吹打,重悬菌体,12000 r/min 离心 15 min,弃上清液,收集细菌;加入 100 μl 灭菌双蒸水,用移液器轻轻吹打,重悬菌体,置于沸水中煮 15 min,立即取出,在 -20℃ 放置 30 min。随后 35℃ 解冻,12000 r/min 离心 15 min,取上清液置于 4℃ 备用或 -20℃ 保存。

**1.2.2 PCR 反应体系与条件** 20 μl 反应体系:10×PCR Buffer(含  $Mg^{2+}$ ) 2 μl,2.5 mmol/L 的 dNTP 1.6 μl,5 U/μl *rTaq* 酶 0.16 μl,20 μmol/L 引物对 0.8 μl,模板 DNA 1–2 μl,最后用灭菌双蒸水补至 20 μl;PCR 反应程序:94℃ 预变性 4 min;进入循环,94℃ 变性 30 s,58℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 45 s,30 个循环;72℃ 延伸 5 min,降温至 4℃,结束。PCR 扩增产物,用 1.5% 琼脂糖凝胶在 120 V 电压下电泳 30 min,凝胶成像系统观察并照相记录。

**1.2.3 PCR 产物克隆测序及同源性检索** 扩增产物经电泳分离,切下目的条带,用胶回收试剂盒(TaKaRa)纯化,与 pMD18-T 载体(TaKaRa)连接,16℃ 过夜,转化到 DH5α 感受态细胞中,采用蓝白斑挑选阳性克隆,使用 *EcoR* I、*Hind* III (TaKaRa) 双酶切验证,阳性克隆送上海捷瑞生物公司测序。所测序列用 DNASTar 软件包中的 EditSeq 进行序列拼接,将拼接好的序列用 NCBI 服务器上的 Blast 软件进行同源性检索。

**1.2.4 特异性检测** 以所有供试菌株提取的基因组 DNA 为模板,DNA 模板统一稀释至 50 ng/μl。用设计的阴沟肠杆菌与产气肠杆菌特异性引物分别对供试菌株进行 PCR 扩增,扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,检验扩增引物的特异性。

**1.2.5 灵敏度检测** 接种阴沟肠杆菌、产气肠杆菌于 3 ml 营养肉汤液体培养基中,置于 35℃ 恒温摇床中振荡培养 12 h 增菌后,平板法计数得到细菌浓度为  $10^8$  CFU/ml,用灭菌双蒸水以 10 倍稀释法进行倍比稀释,提取各梯度菌液 DNA 模板进行 PCR 扩增,凝胶电泳检测扩增产物,紫外灯照射下观察凝胶电泳结果。

**1.2.6 发病罗氏沼虾幼体病原检测** 采集发病幼体 5 尾,用无菌生理盐水反复冲洗其表面 3–5 次后,匀浆处理,无菌操作条件下,取匀浆液涂布于普通营养肉汤琼脂培养基,于 30℃ 培养箱中过夜培养,挑取优势菌株,增菌培养后,按 1.2.1 的方法提取细菌基因组 DNA 作为 PCR 检测模板,以灭菌双蒸水为阴性对照,阴沟肠杆菌(产气肠杆菌)菌株为阳性对照,进行 PCR 扩增。

将检测到病原阳性的幼体匀浆液置于沸水中煮 15 min,立即取出,在 -20℃ 放置 30 min。随后 35℃ 解冻,12000 r/min 离心 15 min,取上清液作为 PCR 检测模板,进行 PCR 扩增。

## 2 结果

### 2.1 引物扩增结果验证

用扩增阴沟肠杆菌 *omp A* 基因序列的引物对罗

氏沼虾幼体阴沟肠杆菌的基因组 DNA 进行扩增, PCR 产物经纯化、克隆、测序, 所得序列结果见图 1。序列长度为 385 bp, Blast 比对表明, 该片段为预期靶标片段, 属于阴沟肠杆菌 *omp A* 基因序列的一部分。

```
CGGTCGGTGAAGCCCAGAACCCTACGGAACCGTCTTTAGG
ATCCAGGTTGCTCAGCTGGGTGTACAGCTGATCCAGTGCCTG
CTGGCCTTCTGGTTTCAGAGTCGCTTTGTTGAAGTTGAACAG
AACGTCAGACTTCAGAGTAAAGTGCTTGGTCTGTACTTCTGG
AGCTGGAGCCGGCGCTGGAGCAACAACCTGGTGTGCATCTT
CCTGCTGCCGAAACGGTAGGAAACACCTACGCTCAGCATGC
CGTTGTCTGGACGAACGCCAACGGTAGCACCGTCGCCGATG
TTGTTAACCCACTGGTATTCCAGACGGGTAGCGATGTCACGG
GTCATAGCCCACTCAACGCCACCAGCGAATACTGGGGAAAC
ACCGGTGTCATG
```

图 1 阴沟肠杆菌 PCR 扩增产物测序结果

Fig.1 The sequence result of PCR product for *E. cloacae*

用扩增产气肠杆菌 *gry B* 基因序列的引物对罗氏沼虾产气肠杆菌的基因组 DNA 进行扩增, PCR 产物经纯化, 克隆测序, 所得序列结果见图 2, 序列长度为 201 bp, Blast 比对表明该片段为预期靶标片段, 属于产气肠杆菌 *gry B* 基因序列的一部分。

```
GTAACCGGTGAAACCGAAAGCACCGGTACCATGGTGCCTT
CTGGCCAAGCCTGGAACCTTTACCAGCGTCACTGAATTCGA
ATACGAAATCCTGGCGAAACGCTGCGCGAGCTGTCGTTCT
CAACTCCGGGGTCTCTATCCGCTGCGGATAAGCGCGACGG
CAAAGAAGACCATTTCCTACTCGAAGGCGGCATC
```

图 2 产气肠杆菌 PCR 扩增产物测序结果

Fig.2 The sequence result of PCR product for *E. aerogenes*

### 2.2 方法特异性

用设计的阴沟肠杆菌特异引物对所有供试菌株进行 PCR 扩增, 结果见图 3, 仅阴沟肠杆菌出现目的片段, 其余菌株无扩增结果。同样, 用设计的产气肠杆菌特异引物对所有供试菌株进行 PCR 扩增, 结果见图 4, 仅产气肠杆菌出现目的片段, 其余菌株无扩增结果。本研究建立的两种病原菌 PCR 检测方法特异性均较强。

### 2.3 方法灵敏度

阴沟肠杆菌检测方法的灵敏度测试结果见图 5, 相应检测细菌浓度为  $10^3$  CFU/ml。产气肠杆菌检测方法灵敏度测试结果见图 6, 相应检测细菌浓度为  $10^2$  CFU/ml。

### 2.4 样品 PCR 检测

2011 年 3 月, 对湖州两个发病严重的育苗场进

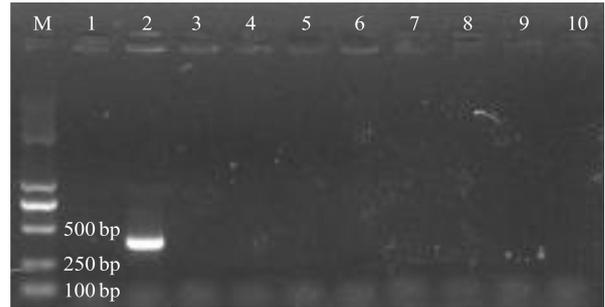


图 3 阴沟肠杆菌引物特异性检测

Fig.3 The specificity of *E. cloacae* primers

M. Marker; 1. 阴性对照; 2. 阴沟肠杆菌; 3. 产气肠杆菌; 4. 大肠杆菌; 5. 阪崎肠杆菌; 6. 弗氏柠檬酸杆菌; 7. 粘质沙雷菌; 8. 嗜水气单胞菌; 9. 温和气单胞菌; 10. 腐败希瓦氏菌

M. Marker; 1. Negative control; 2. *E. cloacae*; 3. *E. aerogenes*; 4. *E. coli*; 5. *E. sakazakii*; 6. *C. freundii*; 7. *S. marcescens*; 8. *A. hydrophila*; 9. *A. sobria*; 10. *S. putrefaciens*

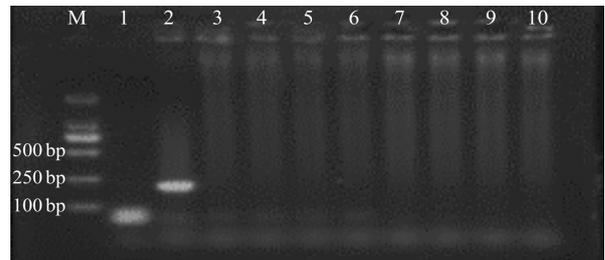


图 4 产气肠杆菌引物特异性检测

Fig.4 The specificity of *E. aerogenes* primers

M. Marker; 1. 阴性对照; 2. 产气肠杆菌; 3. 阴沟肠杆菌; 4. 大肠杆菌; 5. 阪崎肠杆菌; 6. 弗氏柠檬酸杆菌; 7. 粘质沙雷菌; 8. 嗜水气单胞菌; 9. 温和气单胞菌; 10. 腐败希瓦氏菌

M. Marker; 1. Negative control; 2. *E. aerogenes*; 3. *E. cloacae*; 4. *E. coli*; 5. *E. sakazakii*; 6. *C. freundii*; 7. *S. marcescens*; 8. *A. hydrophila*; 9. *A. sobria*; 10. *S. putrefaciens*

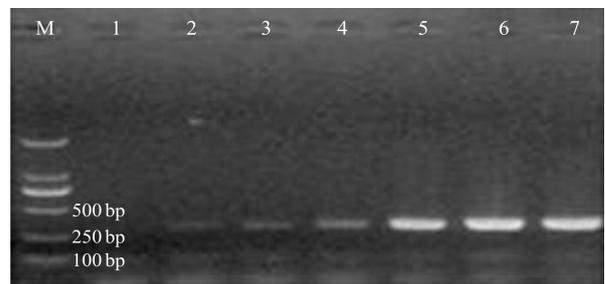


图 5 阴沟肠杆菌 PCR 检测体系的灵敏度

Fig.5 The sensitivity of PCR detection for *E. cloacae* DNA

M. Marker; 泳道 1-7. 菌液浓度梯度分别为  $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$  和  $10^8$  CFU/ml

M. Marker; Lane 1-7. The gradient concentrations of DNA templates of *E. cloacae*  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  and  $10^8$  CFU/ml, respectively

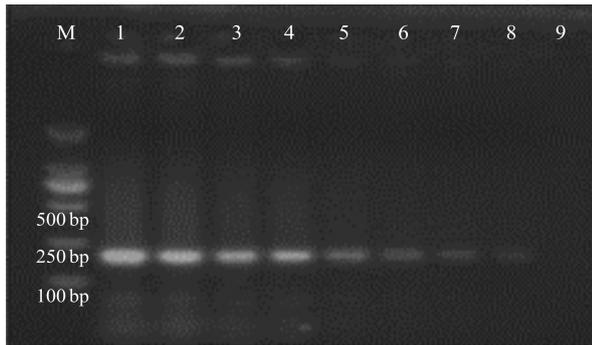


图6 产气肠杆菌 PCR 检测体系的灵敏度

Fig.6 The sensitivity of PCR detection for *E. aerogenes* DNA

M. Marker; 泳道 1-9. 菌液浓度梯度分别为  $10^8$ 、 $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10^1$  和  $10^0$  CFU/ml

M. Marker; Lanes 1-9. The gradient concentrations of DNA templates of *E. aerogenes*  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  and  $10^0$  CFU/ml, respectively

行病原检测。随机选择来自育苗场 A 编号为 304a、304b、304c、304d、304e 的幼体与育苗场 B 编号为 W1、W2、W3、W4 的幼体，每个编号幼体取样 5 尾，幼体匀浆后涂板，细菌分离后，进行两种病原菌的检测(表 1)。不经细菌分离，PCR 直接检测上述幼体中病原菌携带情况的结果见图 7。PCR 检测的结果与出现临床症状的结果相吻合，同时，生理生化鉴定、16S rRNA 基因序列同源性均与 PCR 检测结果一致(结果待发表)。本研究建立的检测方法能快速、准确地确定病原，为临床的对症治疗奠定基础。

### 3 讨论

#### 3.1 检测方法特异性

病原的快速、特异检测能够为临床针对性防控提

表 1 罗氏沼虾幼体样品病原检测结果

Tab.1 Results of pathogen detection in *M. rosenbergii* larvae samples

育苗场 Hatcheries	幼体编号 Larval code	优势菌株 Predominant strain	生理生化鉴定 Biochemistry test	16S rRNA 基因同源结果 Bacterial identification by 16S rRNA gene	PCR 检测结果 Result of PCR test	
					阴沟肠杆菌 <i>E. cloacae</i>	产气肠杆菌 <i>E. aerogenes</i>
A	304a	4a1	阴沟肠杆菌 <i>E. cloacae</i>	阴沟肠杆菌 <i>E. cloacae</i>	+	-
	304b	4b1	阴沟肠杆菌 <i>E. cloacae</i>	阴沟肠杆菌 <i>E. cloacae</i>	+	-
	304c	4c1	阴沟肠杆菌 <i>E. cloacae</i>	阴沟肠杆菌 <i>E. cloacae</i>	+	-
	304d	4d1	产气肠杆菌 <i>E. aerogenes</i>	产气肠杆菌 <i>E. aerogenes</i>	-	+
	304e	4e1	阴沟肠杆菌 <i>E. cloacae</i>	阴沟肠杆菌 <i>E. cloacae</i>	+	-
B	W1	W11	产气肠杆菌 <i>E. aerogenes</i>	产气肠杆菌 <i>E. aerogenes</i>	-	+
	W2	W21	产气肠杆菌 <i>E. aerogenes</i>	产气肠杆菌 <i>E. aerogenes</i>	-	+
	W3	W31	阴沟肠杆菌 <i>E. cloacae</i>	阴沟肠杆菌 <i>E. cloacae</i>	+	-
	W4	W41	阴沟肠杆菌 <i>E. cloacae</i>	阴沟肠杆菌 <i>E. cloacae</i>	+	-

供可靠的信息，避免防治的盲目性(倪梦丽等, 2013)。在水产动物病害的研究中，建立了许多病原微生物的快速 PCR 检测方法(李晨等, 2010; 许拉等, 2008)，对水产动物的病害防治与病害预警起到了积极的作用。邓冠华等(2011)、李宝明等(2009)以 16S rRNA 基因为靶基因，建立了阴沟肠杆菌 Real-time PCR 检测方法与产气肠杆菌基因芯片检测方法。本研究分别以 *omp A* 与 *gry B* 基因作为阴沟肠杆菌、产气肠杆菌的检测靶基因，建立了 PCR 检测方法，经过特异性验证，与同属近缘种间菌种的扩增无交叉性；PCR 产物经过克隆测序，所测序列经 Blast 同源搜索后，证实为检测靶基因序列的一部分，表明本方法的引物特异性强。相对已经建立的基于 Real-time PCR 和基因芯片的检测方法，本研究建立的普通 PCR 检测方法，实

验成本与实验技术要求都相对较低，检测时效高，非常适合在基层罗氏沼虾育苗场使用。

#### 3.2 检测方法灵敏性

在水产动物病原菌的研究中，病原菌的数量级是引起疾病暴发的关键因素之一，当病原菌在水产动物体内或养殖环境中达到一定数量级后，就会表现出致病性，因而检测方法灵敏度的高低直接影响能否实现对病害的提前防控。本研究建立的阴沟肠杆菌与产气肠杆菌 PCR 检测方法，灵敏度测定显示，该两种菌的最低检出下限分别为  $10^3$  CFU/ml 和  $10^2$  CFU/ml，灵敏度较高。在水产动物中，尚无病原菌数量级在  $10^2$ – $10^3$  CFU/ml 即导致病害发生的报道，将该两种菌对罗氏沼虾幼体进行感染试验，在育苗水体中阴沟肠杆菌

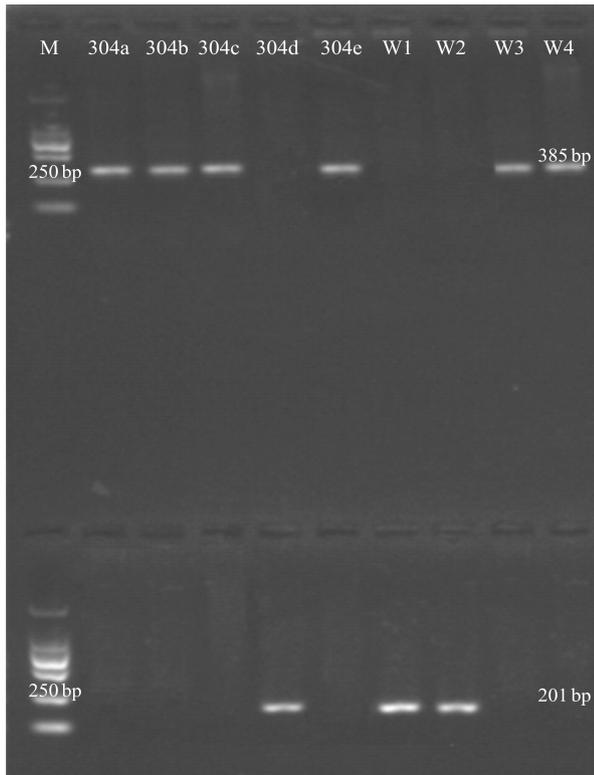


图 7 阴沟肠杆菌与产气肠杆菌阳性样品直接 PCR 结果  
Fig.7 PCR results of *E. cloacae* and *E. aerogenes* positive samples

与产气肠杆菌浓度达  $10^5$  CFU/ml 时, 幼体开始出现与生产中一致的病症, 而本研究建立的检测方法检出下限为  $10^3$  CFU/ml 和  $10^2$  CFU/ml, 可以实现病害的提前预警。此外, PCR 产物条带的强弱与细菌的浓度成正比, 因此, 检测结果也可以用来初步判断幼体感染病原菌程度的强弱。

### 3.3 检测方法快速性

一般常规的细菌分离鉴定方法需要经过细菌分离、形态学鉴定、生理生化鉴定乃至细菌 16S rRNA 基因序列的扩增与测序, 至少需要 5-7 d 的时间, 诊断时间长, 贻误病害的防控时机(梁万文等, 2007)。通过建立目标病原的快速 PCR 方法, 根据目的产物的有无进行病原快速诊断, 已成为水产动物病原诊断的重要手段(张世秀等, 2006)。刘天强等(2013)建立了鲷爱德华氏菌 PCR 快速诊断方法, 可在 5 h 内对患病鱼进行精准的诊断。张凤萍等(2008)建立了养殖刺参腐皮综合征病原灿烂弧菌 PCR 检测方法, 可以在不分离细菌的情况下, 直接检测病灶组织病原感染情况。用本研究建立的阴沟肠杆菌与产气肠杆菌 PCR 检测方法, 对两个育苗场的患病幼体进行检测, 直接水煮法提取样品中细菌基因组 DNA 而后检测, 与通

过先分离细菌、提取细菌基因组 DNA 再检测的结果一致, 前者仅需约 3 h 左右, 而后者得出检测结果的时间需 2 d。该方法在缩短了检测时间与简化检测步骤的同时, 特异性、精准度不变, 为罗氏沼虾育苗期幼体病害的防控赢得充足的时间。

### 3.4 检测方法的现实意义

病害已经成为罗氏沼虾产业进一步发展的主要瓶颈, 病害的发生时常使育苗、养殖生产遭受巨大的经济损失(Li *et al*, 2005; Chen *et al*, 2001), 同时对罗氏沼虾育种、保种工作也具有较大的危害。阴沟肠杆菌与产气肠杆菌为革兰氏阴性菌, 是重要的条件致病菌。目前, 对该菌的研究主要集中在该菌对人类与动物的致病性以及该菌耐药机制(Robicsek *et al*, 2006; Zhou *et al*, 2012)。有关它们对水产动物的致病性报道还非常少, 仅见 Thillai 等(2008)报道了阴沟肠杆菌对健康鲮鱼(*Mugil cephalus*)具有较强的致病性, 鲮鱼感染该菌会造成大量死亡。在罗氏沼虾育苗中, 这两种菌都会造成幼体的大量死亡, 影响虾苗培育的成活率, 在对该两种细菌防控的过程中发现, 早期诊断出病原菌的存在是防控的关键, 通过早发现, 及时治疗, 能够保障育苗成活率, 对虾苗场提高出成率和虾苗质量意义重大, 对遗传育种中心和良种场建立 SPF 群体意义更大。

## 参 考 文 献

- 邓冠华, 郑璇, 胡一敏, 等. 应用基因芯片快速检测临床常见细菌. 中华检验医学杂志, 2011, 34(11): 1012-1016
- 许拉, 黄健, 杨冰. 病原检测基因芯片应用及在水产病害检测的前景. 海洋水产研究, 2008, 29(1): 109-114
- 刘天强, 黄冠军, 刘衍鹏, 等. 鲷爱德华氏菌常规 PCR 检测体系的建立. 淡水渔业, 2013, 43(4): 76-79
- 李晨, 王秀华, 黄健. 3 种主要水产病原菌多重 PCR 检测方法的建立. 渔业科学进展, 2010, 31(3): 100-105
- 李宝明, 高丽娟, 李小鹏, 等. 肠道菌群多重实时荧光定量 PCR 检测体系的建立. 中国微生物学杂志, 2009, 18(4): 266-269
- 张世秀, 张新中, 谢珍玉, 等. PCR 技术在水产养殖动物细菌性病原检测中的应用. 现代渔业信息, 2006, 21(7): 11-13, 17
- 张凤萍, 王印庚, 李胜忠, 等. 应用 PCR 方法检测刺参腐皮综合征病原——灿烂弧菌. 海洋水产研究, 2008, 29(5): 101-106
- 杨国梁, 罗坤, 孔杰, 等. 罗氏沼虾不同养殖条件下的生长和存活率相关分析. 海洋水产研究, 2008, 29(3): 74-79
- 倪梦丽, 杨冰, 王春德, 等. 贝类中不同种类病原生物的快速检测方法. 生命科学研究, 2013, 17(2): 156-162

- 梁万文, 陈明, 余晓丽, 等. 斑点叉尾鲴肠败血症病原菌的分离与鉴定. 西南农业学报, 2007, 20(5): 1124–1129
- Chen SC, Lin YD, Liaw LL, *et al.* *Lactococcus garvieae* infection in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing. Dis Aquat Org, 2001, 45(1): 45–52
- Li JT, Lee PP, Chen OC, *et al.* Dopamine depresses the immune ability and increases susceptibility to *Lactococcus garvieae* in the freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Fish Shellfish Immun, 2005, 19(3): 269–280
- Robicsek A, Jacoby GA, Hopper DC. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. The Lancet Infectious Diseases, 2006, 6(10): 629–640
- Thillai SV, Santiago TC, Vijayan KK, *et al.* Involvement of *Enterobacter cloacae* in the mortality of the fish, *Mugil cephalus*. Lett Appl Microbiol, 2008, 46(6): 667–672
- Yang GL, Finsko M, Chen XF, *et al.* Current status of the giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) industry in China, with special reference to live transportation. Aquac Res, 2012, 43(7): 1049–1055
- Zhou Q, Zhang M, Wang AL, *et al.* Eight-year surveillance of antimicrobial resistance among *Enterobacter cloacae* isolated in the first Bethune hospital. Physics Procedia, 2012, 33: 1194–1196

(编辑 冯小花)

## Development and Application of the PCR Detection Method of Pathogenic Enterobacters in the Larvae of the Giant Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii*

CHEN Xuefeng, YANG Guoliang<sup>①</sup>, GAO Qiang, XIA Zhenglong, PU Jianwei, SHEN Peijing, HUANG Zhenyuan

(National Genetic Breeding Center for *Macrobrachium rosenbergii*, Key Laboratory of Freshwater Animal Genetic Breeding of Zhejiang Province, Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001)

**Abstract** The current study was to develop a PCR-based method to detect *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes* in *Macrobrachium rosenbergii*. Two pairs of primers targeted sequences located within the *omp A* gene of *E. cloacae* and *gyr B* gene of *E. aerogenes* were used to detect *E. cloacae* and *E. aerogenes*. Samples collected from infected larvae were detected with the developed PCR method. The expected DNA fragments of 385 bp and 201 bp were from *E. cloacae* and *E. aerogenes*, respectively, and no PCR products were amplified from other bacterium. The sensitivity test showed that the detection limits of PCR were  $10^3$  CFU/ml for *E. cloacae* and  $10^2$  CFU/ml for *E. aerogenes*. In addition, the detection results of larval samples were consistent with the actual case of the infectious disease. In summary, the PCR diagnostic method was specific and sensitive and is a reliable tool for identification of *E. cloacae* and *E. aerogenes* in infected samples with a little time and cost, which would play an important role in quick diagnose, epidemiology investigation and SPF populations construction of the giant freshwater prawn.

**Key words** *Macrobrachium rosenbergii*; *Enterobacter cloacae*; *Enterobacter aerogenes*; PCR detection

① Corresponding author: YANG Guoliang, E-mail: yg10572@163.com

# 养殖密度、饵料种类和丰度对日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*)争胜行为的影响\*



秦浩 王仁杰 来守敏 李娜 李玉全<sup>①</sup>

(青岛农业大学海洋科学与工程学院 青岛 266109)

**摘要** 本研究设置 10、25、50 尾/m<sup>2</sup> 3 个养殖密度,人工饵料、鲜菲律宾蛤仔肉两种饵料,不喂(N)、少喂(L)、饱喂(F) 3 个处理,分别于投喂前 1 h、投喂时、投喂后 1 h 测定日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)的争斗次数、平均优势指数等指标,分析养殖密度、饵料种类及丰度对日本囊对虾争胜行为的影响。结果显示,随着养殖密度的增加,对虾的争胜行为逐渐增强,投喂时与投喂前、投喂后对虾的争胜行为差异显著( $P<0.05$ );投喂时对虾的争斗次数最多;饵料种类和丰度显著影响日本囊对虾的争胜行为,投喂菲律宾蛤仔肉的争胜行为强于投喂人工饵料( $P<0.05$ ),少喂与不喂、饱喂处理间差异显著( $P<0.05$ )。研究表明,养殖密度、饵料种类及丰度均显著影响日本囊对虾的争胜行为。

**关键词** 日本囊对虾;养殖密度;饵料;争胜行为

**中图分类号** S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)04-0105-04

日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)具有适温范围广、生长迅速、养殖周期短、市场价格高等优点,是我国海水养殖的重要对虾种之一。研究日本囊对虾的种内行为,可以优化养殖工艺、提高养殖产量、增加经济效益,为促进日本囊对虾养殖健康可持续发展提供依据。陈学雷等(2003)、臧维玲等(2003)认为,日本囊对虾具有同类相残、底质选择、潜沙、分散活动等生物学特性。饥饿是影响虾类摄食行为最重要的因子之一,随着饥饿时间的延长,日本囊对虾摄食行为减弱,摄食指数下降(李静等,2005)。沈辉等(2010)研究表明,脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)在饥饿或个体规格差异较大情况下,具有一定的相残行为,但攻击频率不高。然而,目前的研究报道很少涉及日本囊对虾的争胜行为。李玉全等(2013)对水生动物的争胜行为进行了综述,争胜行为普遍存在于鱼类、甲壳类等水生动物中,是一种典型的社会行为,其目的是确定优势(统治)地位和从属关系。研究对虾

的争胜行为有助于深刻了解对虾行为学和基础生物学,为改进养殖措施提供理论参考。因此,本研究拟探讨养殖密度、饵料种类及丰度对日本囊对虾争胜行为的影响,以期丰富日本囊对虾的行为生物学基础,为日本囊对虾养殖提供技术参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验于 2013 年 8 月在青岛农业大学海洋科学与工程学院水循环实验室进行,实验所用人工养殖的日本囊对虾购自山东省青岛市城阳区某水产品市场,暂养 3 d,挑选附肢完整、健康活泼、规格一致者进行实验,体长为(9.15±1.03) cm,实验历时 10 d。

### 1.2 实验设计

对虾养殖于蓝色塑料箱(长×宽×高: 50 cm×40 cm×30 cm)中,水深 15 cm,分别进行密度实验和饵料实验。

\* 国家自然科学基金项目(31101916)、山东省现代农业产业技术体系虾蟹类创新团队(SDAIT-15-011)和山东省自然科学基金项目(ZR2010CM060)共同资助。秦浩, E-mail: 365671711@qq.com

<sup>①</sup> 通讯作者: 李玉全, 副教授, E-mail: jiangfangqian@163.com

收稿日期: 2014-06-05, 收修改稿日期: 2014-09-04

密度实验设置 10 尾/m<sup>2</sup>(DL)、25 尾/m<sup>2</sup>(DA)、50 尾/m<sup>2</sup>(DH) 3 个梯度, 每个处理 3 个平行, 期间投喂人工颗粒饲料。饵料实验设置人工饵料、新鲜菲律宾蛤仔肉, 养殖密度为 50 尾/m<sup>2</sup>, 包括不喂(N)、少喂人工饵料(LA, 人工颗粒饲料投喂量为对虾湿重的 2%)、饱喂人工饵料(FA, 人工颗粒饲料投喂量为对虾湿重的 8%)、少喂蛤仔肉(LC, 菲律宾蛤仔肉投喂量为对虾湿重的 2%)和饱喂蛤仔肉(FC, 菲律宾蛤仔肉投喂量为对虾湿重的 15%), 每个处理设 3 个平行。

### 1.3 日常管理

实验所用海水为经沉淀、消毒、砂滤后的自然海水, 水温为(23.0±1.0)℃, pH 为 8.0±0.3; 自然光照, 充气泵连续充气, 日换水 1/3, 每天清理粪便; 每天 09:00 投喂, 08:00、09:00、10:00 观察。

### 1.4 指标测定

每个平行随机选取 1 尾对虾作为观察对象, 测定时间分别为投喂前 1 h、投喂时、投喂后 1 h, 各观察 10 min, 记录争斗次数、争斗强度等行为, 计算平均优势指数。获胜者为在打斗过程中未逃跑的个体, 失败者为打斗过程中先逃跑的个体。

### 1.5 数据处理与统计分析

记录对虾投喂前、投喂时、投喂后的争斗总次数、胜利次数、平均优势指数。

平均优势指数: 实验过程中总获胜次数与争斗总数(获胜次数+失败次数)的比值。

使用 SPSS 17.0 进行数据处理, 利用单因子方差分析比较养殖密度实验处理间的差异, 利用多因素方差分析比较饵料种类和丰度实验处理间的差异,  $P<0.05$  为显著水平,  $P<0.01$  为极显著水平。

## 2 结果与分析

### 2.1 养殖密度对争斗总次数的影响

图 1 为养殖密度对日本囊对虾争斗总数的影响。由图 1 可以看出, 投喂时对虾之间由于争抢食物引发的争斗次数最多, 投喂前、投喂时、投喂后对虾之间的争斗次数均随着养殖密度的增加而逐渐增加, DL、DA、DH 处理间差异显著( $P<0.05$ ), 投喂后对虾之间的争斗次数低于投喂前与投喂时。

### 2.2 养殖密度对平均优势指数的影响

图 2 为养殖密度对对虾平均优势指数的影响。从图 2 可以看出, 投喂前和投喂时各处理之间平均优势指数差异不显著( $P>0.05$ ), 而投喂后, 各处理之间平

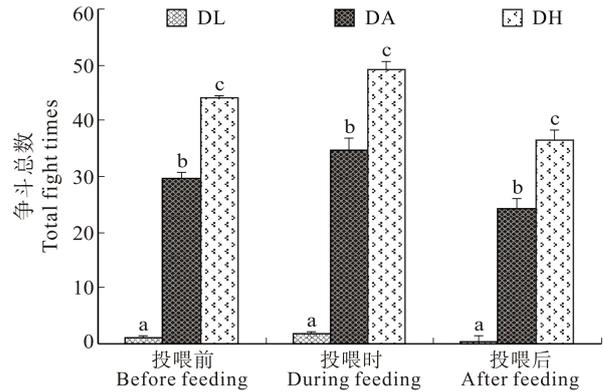


图 1 养殖密度对日本囊对虾的争斗总次数的影响

Fig.1 Effects of stocking density on the fight times of *M. japonicus*

不同英文字母表示差异显著( $P<0.05$ ), 下同同;  
Different letters represent significant difference ( $P<0.05$ ), same in the following figures

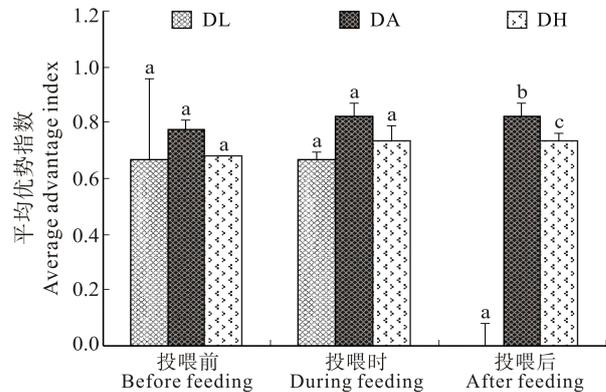


图 2 养殖密度对日本囊对虾的平均优势指数的影响

Fig.2 Effects of stocking density on the average advantage index of *M. japonicus*

均优势指数差异显著( $P<0.05$ )。投喂后对虾争胜行为中的胜利次数所占比例高于投喂前和投喂时。

### 2.3 饵料种类及丰度对争斗总数的影响

图 3 为饵料种类及丰度对日本囊对虾争斗总数的影响。由图 3 可以看出, 投喂时对虾之间由于争抢食物引发的争斗次数最多。投喂前, N 与 LA、LC, LA、LC 与 FA、FC, N 与 FA、FC 之间差异显著( $P<0.05$ ), LA 与 LC、FA 与 FC 差异不显著( $P>0.05$ )。投喂时, LA、LC、FA、FC 之间相互差异显著( $P<0.05$ )。投喂后, LA 与 LC 差异不显著( $P>0.05$ ), FA、FC 差异不显著( $P>0.05$ ), 其他处理间差异显著( $P<0.05$ )。多重比较发现, 投喂前和投喂后, 饵料种类与饵料丰度间交互作用不明显( $F=1.779$ ,  $P=0.210$ ;  $F=1.167$ ,  $P=0.344$ ); 投喂时, 饵料种类与饵料丰度间存在显著交互作用( $F=18.050$ ,  $P<0.001$ )。投喂新鲜菲律宾蛤仔

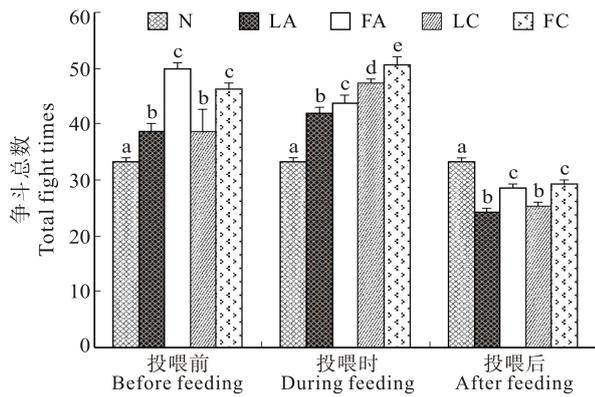


图3 饵料种类及丰度对日本囊对虾争斗总数的影响  
Fig.3 Effects of food types and abundance on the total fight times of *M. japonicus*

肉处理组对虾的争斗总次数显著高于人工饵料处理组。

#### 2.4 饵料种类及丰度对平均优势指数的影响

饵料种类对平均优势指数的影响表现为: 投喂前, LA 与 LC、FA 与 FC 间差异显著( $P < 0.05$ ), 其他处理间差异不显著( $P > 0.05$ ); 投喂时和投喂后, LA 与 LC 间差异不显著( $P > 0.05$ ), FA 与 FC 间差异不显著( $P > 0.05$ ), 其他处理间差异显著( $P < 0.05$ )。

饵料丰度对平均优势指数的影响表现为: 投喂前, N 与 LA 差异不显著( $P > 0.05$ ), N 与 FA、FC 与 LC 间差异显著( $P < 0.05$ ); LA 与 FA 差异不显著( $P > 0.05$ ), LA 与 FC 差异显著( $P < 0.05$ ); LC 与 FC 差异不显著( $P > 0.05$ )。投喂时, LA 与 FA、FC 之间差异显著( $P < 0.05$ ); LC 与 FC 差异不显著( $P > 0.05$ )。投喂后, LA 与 LC 差异不显著( $P > 0.05$ ); FA 与 FC 差异不显著( $P > 0.05$ ), 其他处理间差异显著( $P < 0.05$ )。多重比较发现, 投喂前、投喂时和投喂后, 饵料种类与饵料丰度间交互作用均不明显( $F = 2.814$ ,  $P = 0.100$ ;  $F = 0.627$ ,  $P = 0.551$ ;  $F = 3.034$ ,  $P = 0.86$ )。

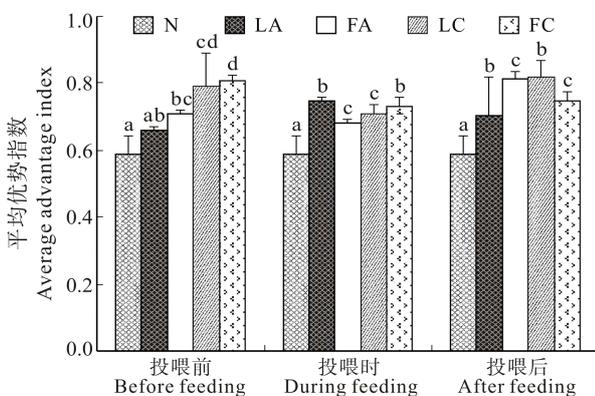


图4 饵料种类及丰度对日本囊对虾平均优势指数的影响  
Fig.4 Effects of food types and abundance on the average advantage index of *M. japonicus*

### 3 讨论

#### 3.1 养殖密度对对虾争胜行为的影响

王克行(1997)研究发现, 凡纳滨对虾养殖密度会影响对虾的行为。衣萌萌等(2012)研究发现, 随养殖密度增加, 对虾的自残行为增加。陈学雷等(2003)研究发现, 日本囊对虾仔虾的自残率随饵料密度的上升而下降, 随放养密度的增加而上升, 不同体长混养时自残现象严重。空间可获得性对一些水生动物的相残存在显著影响(陈学雷等, 2003; 傅萃长等, 2003)。本研究发现, 随养殖密度增大, 对虾的争胜行为增强, 争斗性越强烈, 争斗次数越多。投喂前, 养殖密度显著影响日本囊对虾的争斗总数; 摄食过程中对虾的争斗比较强烈, 明显高于投喂前; 投喂 1 h 后, 大部分对虾已饱食, 静止于底部, 偶尔于底部游动, 少数未饱食的对虾依然频繁游动。投喂饵料的不同时期, 对虾的争胜行为也不同, 投喂时对虾间的争胜次数最多。

平均优势指数反映了对虾在争斗过程中争斗胜利次数占总争斗次数的比例。从本研究结果来看, 投喂前和投喂时, 对虾争斗的平均优势指数差异不显著, 但投喂时的总争斗次数多于投喂前, 说明对虾摄食期间争斗更为频繁。投喂后对虾各处理间的平均优势指数差异显著, 投喂后对虾的总争斗次数降低, 说明摄食后日本囊对虾争斗欲望降低, 但争斗能力增强。中等密度下, 对虾之间的生活空间较高密度大, 打斗胜利次数较多, 呈现出投喂前、投喂时和投喂后的平均优势指数均为最高。

#### 3.2 饵料种类和丰度对争胜行为的影响

对虾同类相残的机制尚不清楚, Moksnes(1998)、华元渝等(1998)、邹桂伟等(2001)研究均认为, 饥饿是导致鱼类和甲壳类自相残杀最主要的诱因。本研究中, 投喂菲律宾蛤仔肉比投喂人工饵料对虾争斗更为强烈; 饱喂组的争斗程度高于饥饿组, 饥饿组的对虾运动减缓, 争胜行为降低; 投喂新鲜菲律宾蛤仔肉提高了对虾的争胜行为。本研究结果与上述研究结果相反, 其原因可能在于投饵可以刺激对虾产生争胜行为, 不投饵时缺乏刺激因素, 从而降低了争胜行为的发生。孙成波等(2010)分析了日本囊对虾的饵料习性, 发现其以动物性饵料为主, 尤其是底栖动物, 兼食底层浮游生物及游泳动物。同样, Schwamborn 等(2000)、Chu 等(1986)、Heales 等(1996)、Kapiris(2004)发现, 自然生境中, 大部分对虾的食性偏向于肉食性, 但在养殖条件下, 对虾的食性受环境的影响较大。从本研究结果来看, 日本囊对虾更喜欢摄食新鲜的蛤仔肉, 偏肉食性, 引起的争斗行为强于投喂人工饵料。这与

孙成波等(2010)、Schwamborn 等(2000)、Chu 等(1986)、Heales 等(1996)、Kapiris (2004)的结论一致。

投喂前和投喂时, 饵料种类会影响对虾争斗的平均优势指数, 投喂后饵料种类对平均优势指数无显著影响, 表明投喂前与投喂时对虾由于饵料不同于投喂后产生不同的争斗行为; 饵料丰度对平均优势指数的影响表现为: 投喂前影响显著, 投喂时和投喂后影响较小, 饵料丰度对对虾的平均优势指数影响较小。

## 参 考 文 献

- 王克行. 虾蟹类增养殖学. 北京: 中国农业出版社, 1997, 60-61
- 华元渝, 陈亚芬, 钱林峰. 暗纹东方鲀苗种同类相残的研究. 水生生物学报, 1998, 22(2): 195-197
- 孙成波, 王平, 李义军. 日本对虾健康养殖. 海口: 海南出版社, 2010, 1-7
- 衣萌萌, 于赫男, 林小涛, 等. 密度胁迫下凡纳滨对虾的行为与生理变化. 暨南大学学报, 2012, 33(1): 81-86
- 李玉全, 孙霞. 水生动物的争胜行为. 动物学研究, 2013, 34(3): 214-220
- 陈学雷, 林琼武, 李少菁, 等. 日本对虾仔虾相残的实验研究. 厦门大学学报(自然科学版), 2003, 42(3): 358-362
- 邹桂伟, 罗相忠, 潘光碧. 大口鲈苗种同类相残的研究. 中国水产科学, 2001, 8(2): 55-58
- 沈辉, 万夕和, 许璞, 等. 脊尾白虾的行为学观察研究. 海洋科学, 2010, 34(10): 53-56, 61
- 李静, 马牲. 饥饿对日本囊对虾幼体发育、摄食及存活的影响. 海洋湖沼通报, 2005(5): 61-65
- 傅萃长, 饶韧, 吴纪华, 等. 密度和饵料投放量对安吉小鲈幼体生长与同种相残率的影响. 动物学研究, 2003, 24(3): 186-190
- 臧维玲, 戴习林, 姚庆祯, 等. 底质对日本对虾幼虾生长的影响. 上海水产大学学报, 2003, 12(1): 72-75
- Chu KH, Shing CK. Feeding behaviour of the shrimp, *Metapenaeus ensis*, on *Artemia* nauplii. Aquaculture, 1986(3-4), 58: 175-184
- Heales DS, Vance DJ, Lonragan NR. Field observation of moult cycle, feeding behavior, and diet of small juvenile tiger prawns *Penaeus semisulcatus* in the Embley River, Australia. Mar Ecol Prog Ser, 1996, 145: 43-51
- Kapiris K. Feeding ecology of *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846) (Decapoda: Penaeidae) from the Ionian Sea (Central and Eastern Mediterranean Sea). Sci Mar, 2004, 68(2): 247-256
- Moksnes PO. Predation on postlarvae and juveniles of the ore crab *Carcinus maenas* importance of shelter, size and cannibalism. Mar Ecol Prog Ser, 1998, 166: 211-225
- Schwamborn R, Griaes MM. Feeding strategy and daily ration of juvenile pink shrimp (*Farfantepenaeus durarum*) in a south Florida seagrass bed. Mar Biol, 2000, 137(1): 139-147

(编辑 冯小花)

## Effects of Stocking Density and Food on Agonistic Behavior of *Marsupenaeus japonicus*

QIN Hao, WANG Renjie, LAI Shoumin, LI Na, LI Yuquan<sup>①</sup>

(College of Marine Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109)

**Abstract** Cannibalism is one characteristic of *Marsupenaeus japonicus* with little understanding, which affects the survival rate and the production of *M. japonicus*. The current study was designed to investigate the effects of the stocking density, food types and abundance on the agonistic behavior of *M. japonicus*. Three stocking densities (10, 25 and 50 ind/m<sup>2</sup>) and three food amounts (full food, less food, and no food) were designed. Agonistic behavior were observed and recorded one hour before feeding, during feeding and 1 hour after feeding. The results showed that the agonistic behavior increased with the increasing stocking density. There were significant differences between “before feeding”, “during feeding” and “after feeding” ( $P < 0.05$ ). Feeding time significantly improved the agonistic behavior. Food types and abundance significantly affected the agonistic behavior ( $P < 0.05$ ). Clam meat had better improvement in agonistic behavior than artificial feed. The stocking density did not impact the agonistic behavior before feeding and during feeding, but it had significant effect after feeding ( $P < 0.05$ ). These results revealed that stocking density, food type and abundance could impact the agonistic behavior of *M. japonicus*.

**Key words** *Marsupenaeus japonicus*; Stocking density; Food; Agonistic behavior

① Corresponding author: LI Yuquan, E-mail: jiangfangqian@163.com

# 中国刺参(*Apostichopus japonicus*)与韩国刺参杂交子一代生长和抗病力比较\*



谭杰<sup>1</sup> 王亮<sup>2,3</sup> 高菲<sup>1</sup> 邹安格<sup>3</sup> 孙慧玲<sup>1</sup>  
李凤辉<sup>1,4</sup> 范超晶<sup>1,4</sup> 左之良<sup>1,4</sup> 燕敬平<sup>1①</sup>

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;  
2. 烟台市水产研究所 烟台 264003; 3. 山东安源水产股份有限公司 蓬莱 265600;  
4. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

**摘要** 采用完全双列杂交法对刺参中国群体(C)和韩国群体(K)进行群体间杂交和群体内自繁, 获得 C(♀)×C(♂)、K(♀)×K(♂)、K(♀)×C(♂)和 C(♀)×K(♂) 4 个交配组合的子一代。分析了各交配组受精率、孵化率、附着变态率、浮游幼体和幼参阶段的生长和抗病能力以及杂交子代的杂种优势。结果显示, 杂交组与自繁组在受精率和孵化率等方面不存在显著性差异, 杂交组附着变态率高于自繁组。C(♀)×K(♂)组在幼参期体长平均值均大于其他 3 个组, 并表现出显著性差异, 其体长杂种优势率在 9.43%–23.75% 之间; 其体重从 150 日龄后表现出杂种优势, 在 4.09%–34.96% 之间。而 K(♀)×C(♂)组在幼参期体长和体重除在 150 日龄时表现为杂种优势, 其他时间均表现为杂种劣势。K(♀)×C(♂)组抗灿烂弧菌病能力最强, 杂种优势率为 26.21%。

**关键词** 刺参; 杂交; 生长; 抗病力; 杂种优势

中图分类号 Q32; S965 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2015)04-0109-07

杂种优势(Heterosis)是指遗传基础不同的亲本杂交后所产生的 F<sub>1</sub> 代在生长、繁殖及抗逆等性状优于双亲的现象(李思发等, 2006)。通过人工杂交来获得优良品种是生物遗传育种的有效途径之一。水生生物种间杂交成功的例子较少, 而通过种内群体间杂交提高后代生长速度、存活率及饵料系数等经济性状的品种已有很多, 包括鱼类(Bryden *et al.*, 2004; Tymchuk *et al.*, 2005)、海胆(Rahman *et al.*, 2000、2001)、扇贝(Cruz *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2003)、贻贝(Miguel *et al.*, 2000)和虾类(Benzie *et al.*, 1995; Bierne *et al.*, 2000)等。

刺参(*Apostichopus japonicus*)在我国的自然分布主要包括山东、辽宁、河北等沿海水域, 在国外则主要分布于朝鲜半岛、日本以及俄罗斯远东沿海(廖玉麟

等, 1997)。随着对海参需求的不断增长, 我国刺参养殖迅猛发展, 2012 年全国刺参苗种生产能力超过 500 亿头, 养殖面积超过 18 万 hm<sup>2</sup>, 产量超过 17 万 t (农业部渔业局, 2013)。刺参是目前我国单一经济总量最大的水产养殖对象之一。现阶段, 国内的刺参育苗厂家在进行苗种生产时大多使用养殖刺参作为亲参, 存在着近亲交配等问题, 后代出现生长速度缓慢、疾病频发和存活率降低等现象。因此, 有必要利用不同的亲参群体, 针对刺参的某些重要经济性状进行遗传改良, 确保刺参养殖产业的可持续发展。

以刺参中国群体和韩国群体为亲本, 通过杂交进行遗传改良已有报道(常忠岳等, 2005; 孙灵毅等, 2013), 但都没有对杂交子代的生长、抗病能力以及

\* 国家高技术研究发展计划(2012AA10A412)、山东省科技发展计划项目(2012GGA06021)和农业部北方海水增养殖重点实验室基金(2014-MSENC-KF-03)共同资助。谭杰, E-mail: tanjie@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 燕敬平, 副研究员, E-mail: yanjp@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-05-21, 收修改稿日期: 2014-07-21

杂种优势率进行详细分析。本研究以刺参中国群体及引进的韩国群体作为育种材料,采用完全双列杂交法进行种内群体间杂交以及群体内自繁,在各发育阶段对受精率、孵化率、附着变态率以及生长指标进行统计,并进行灿烂弧菌感染实验获得了子一代的抗病力数据,对杂交和自繁组合进行比较分析,分析杂交组合的杂种优势率,以期对刺参的遗传改良提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与设计

亲参于2013年5月在山东省蓬莱市安源水产股份有限公司进行养殖,两个群体分别为中国群体(简称C)和韩国群体(简称K)。韩国刺参引自韩国江原道,运回后暂养于14~16℃的海水中;中国本地刺参取自山东安源水产股份有限公司,为人工选育的快速生长的F<sub>2</sub>代刺参,在12~14℃海水中暂养;控制水温,使亲参性腺逐步成熟。

按照2×2完全双列杂交方案建立4个交配组合。其中,杂交组为K(♀)×C(♂)(正交)和C(♀)×K(♂)(反交),自交组为C(♀)×C(♂)和K(♀)×K(♂)。

### 1.2 苗种培育

**1.2.1 人工采卵、授精与孵化** 选择体重大于250 g的个体作亲参,阴干1 h后流水刺激15 min进行人工采卵。当发现雌参在池内产卵时,及时将雌参取出,用干净的砂滤海水冲洗干净后移到产卵箱内继续产卵,在产卵的同时添加由多头雄参排放的混合精液。控制添加精液的量,达到在每个卵周围一个视野面可见3~5个精子即可。亲参排放结束后,受精卵转至20 m<sup>3</sup>的培育池中孵化,孵化密度为3个/ml,水温控制在21℃。

**1.2.2 浮游幼体培育** 受精卵发育到小耳幼体后,进行分池,幼体的培育密度为0.15个/ml。幼体培育时期投喂由角毛藻、小新月菱形藻和海洋红酵母组成的混合饵料,日投喂4次,小耳幼体日投喂量为25000~30000 cell/ml;中耳幼体日投喂量为35000 cell/ml;大耳幼体日投喂量为35000~40000 cell/ml。每天换水1次,换水量为1/2,幼体培育期间保持充气,当樽形幼体出现时投放附着基。

**1.2.3 稚幼参培育** 稚幼参培育期间投喂马尾藻粉、海带粉等人工配合饲料,搭配海泥,配合饲料与海泥投喂重量比例为1:4。每天投喂两次,投喂量占池中稚幼参重量的5%~8%,根据稚参摄食情况及时调整。每天换水两次,每次换水1/2。稚参附着45 d

后换1次附着基,以后根据池底和附着基上的粪便和残饵量进行倒池和换附着基。

### 1.3 性状测定与分析

**1.3.1 受精率、孵化率和附着变态率** 在卵子受精至孵化为耳状幼体过程中,随机抽样观察200个个体,统计受精率、孵化率,其计算公式为:

$$\text{受精率}(\%) = \frac{\text{卵裂数}}{\text{总卵数}} \times 100\%$$

$$\text{孵化率}(\%) = \frac{\text{耳状幼体个数}}{\text{受精卵数}} \times 100\%$$

当出现樽形幼体时,进行附着变态实验。实验容器为体积3L的塑料桶,试验前经消毒处理。试验采用透明塑料薄膜作为附着基。使用前,塑料薄膜先浸泡于海水中,经 $20 \times 10^{-6}$ 高锰酸钾消毒30 min,清水冲洗晾干后使用,塑料薄膜置于桶底。每种交配组合设置3个平行对照。幼体培育密度为0.15个/ml,充气培育。实验过程中,每天换水1次,每次换水1/2。实验开始的前3 d,投喂角毛藻和小硅藻组成的混合饵料,日投喂量为20000 cell/ml。3 d后,开始投喂由海带粉和马尾藻粉混合制成的配合饲料。10 d后,观察统计幼体附着变态的情况,计算幼体附着变态率。

**1.3.2 生长性状测定** 分别在授精后第5、7、9天每组随机抽样60个耳状幼体在显微镜下用目微尺测定其体长;幼参期分别在90、120、150、180、210日龄时每组随机取30个个体,测量其体长、体重。体长测量方法是把幼参放在加有适量海水的培养皿中静置,测量幼参的最大伸展长;体重的测量是把幼参从培养皿中取出后,置于干纱布上10 s后再进行称量。实验过程中体长和体重的测量由一固定实验人员完成。

**1.3.3 攻毒试验** 采用中国水产科学研究院黄海水产研究所提供的灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)进行攻毒试验。细菌用胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB)添加1.5% NaCl,28℃下培养24 h,然后用无菌生理盐水冲洗菌落,并调整浓度至 $10^7$  CFU/ml。每种组合内5个重复,对每个重复内20头刺参进行攻毒试验。每头刺参通过体壁注射 $1 \times 10^7$  CFU/ml的灿烂弧菌活菌溶液0.1 ml。攻毒期间,照常投喂基础饲料,每日定时记录刺参的死亡头数,14 d后结束攻毒试验,计算刺参的存活率。

**1.3.4 杂种优势率** 计算杂交子代各性状的杂种优势率( $H$ ),其公式为:

$$H(\%) = \frac{(F_1 - P) \times 100}{P} \text{ (Falconer et al, 1996)}.$$

式中, $F_1$ 为杂交子代性状的平均值, $P$ 为两自交组子代性状的平均值。

**1.3.5 统计分析** 结果用平均值±标准差(Mean±SE)表示, 并采用 SPSS11.5 统计分析软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA)及 Tukey's 多重比较分析, 水平为显著性差异( $P < 0.05$ )。

**2 结果**

**2.1 受精率、孵化率和附着变态率**

各交配组合的受精率、孵化率和附着变态率见表 1。从表 1 可以看出, 自交组 C(♀)×C(♂)和 K(♀)×K(♂)的受精率分别为(94.12±3.33)%和(92.38±2.72)%, 杂交组 K(♀)×C(♂)和 C(♀)×K(♂)的受精率分别为(93.63±

3.59)%和(95.50±2.65)%; 自交组 C(♀)×C(♂)和 K(♀)×K(♂)的孵化率分别为(87.38±2.43)%和(84.75±2.22)%, 杂交组 K(♀)×C(♂)和 C(♀)×K(♂)的孵化率分别为(85.13±2.14)%和(86.25±2.99)%; 自交组 C(♀)×C(♂)和 K(♀)×K(♂)的附着变态率分别为(38.52±9.66)%和(35.20±9.10)%, 杂交组 K(♀)×C(♂)和 C(♀)×K(♂)的附着变态率分别为(41.48±8.87)%和(46.60±11.65)%。经方差分析, 杂交组和自交组的受精率及孵化率没有显著性差异( $P > 0.05$ )。反交组 C(♀)×K(♂)附着变态率为(46.60±11.65)%, 显著高于其他 3 组, 韩国自交组附着变态率最低, 为(35.2±9.10)%, 显著低于其他 3 个组。

表 1 刺参中国群体与韩国群体杂交与自繁组受精率、孵化率和附着变态率比较

Tab.1 Fertilization rate, hatch rate and settlement for cross groups and self-fertilized groups within and between Chinese stock and Korean stock of *A. japonicus*

项目 Items	中国自交组 Chinese self-fertilization group C(♀)×C(♂)	韩国自交组 Korean self-fertilization group K(♀)×K(♂)	正交组 Hybridization group K(♀)×C(♂)	反交组 Hybridization group (%) C(♀)×K(♂)
受精率 Fertilization rate(%)	94.12±3.33 <sup>a</sup>	92.38±2.72 <sup>a</sup>	93.63±3.59 <sup>a</sup>	95.50±2.65 <sup>a</sup>
孵化率 Hatch rate(%)	87.38±2.43 <sup>a</sup>	84.75±2.22 <sup>a</sup>	85.13±2.14 <sup>a</sup>	86.25±2.99 <sup>a</sup>
附着变态率 Settlement(%)	38.52±9.66 <sup>bc</sup>	35.20±9.10 <sup>c</sup>	41.48±8.87 <sup>b</sup>	46.60±11.65 <sup>a</sup>

注: 同一行数值右上角不同字母表示具有显著差异,  $P < 0.05$

Note: Data within the same row with different superscript are significantly different ( $P < 0.05$ )

**2.2 浮游幼体的生长**

C(♀)×C(♂)、K(♀)×K(♂)、K(♀)×C(♂)、C(♀)×K(♂)组 5 日龄体长分别为(575.0±65.9) μm、(548.8±96.6) μm、(544.4±88.3) μm、(560.2±104.6) μm, 方差分析表明, 4 个组之间没有显著性差异( $P > 0.05$ ) (表 2)。幼体发育至 7 日龄时, 反交组 C(♀)×K(♂)的平均体长为(682.40±87.2) μm, 显著高于正交组 K(♀)×C(♂)(634.97±80.9) μm 和中国自交组 C(♀)×C(♂)(651.53±61.3) μm, 三者显著高于韩国自交组 K(♀)×K(♂)(595.63±100.1) μm。9 日龄时, 反交组 C(♀)×K(♂)平均体长最高, 为(857.87±

98.7) μm, 显著高于中国自交组 C(♀)×C(♂)(759.57±108.3) μm 和韩国自交组 K(♀)×K(♂)(706.77±96.8) μm, 正交组 K(♀)×C(♂)(802.03±116.9) μm 和反交组 C(♀)×K(♂)之间差异不显著。

**2.3 幼参的生长**

各交配组合幼参在 90、120、150、180、210 日龄的体长和体重的生长变化如图 1 和图 2。从图 1 可以看出, 反交组 C(♀)×K(♂)的体长始终高于其他 3 个组。90 日龄时, 两自交组和正交组的体长没有显著差异, 120、180、210 日龄时, 中国自交组体长显著高于韩国自交组和正交组。210 日龄时, C(♀)×C(♂)、K(♀)×K(♂)、K(♀)×C(♂)、C(♀)×K(♂)组体长分别为(65.4±12.3) mm、(58.7±11.7) mm、(55.7±13.9) mm、(70.2±13.2) mm。从图 2 可以看出, 90、120 日龄时, 中国自交组体重显著高于其他 3 个组。150 日龄时, 韩国自交组体重显著低于其他 3 个组。210 日龄时, 反交组体重为(4.13±1.5) g, 显著高于其他 3 个组, 正交组体重最低, 为(2.51±0.98) g, 显著低于其他 3 个组。

表 2 各实验组浮游幼体的生长

Tab.2 Larval growths in various experimental groups at day 5, 7 and 9 after fertilization

组合 Group	幼体体长 Body length of the larvae(μm)		
	5 d	7 d	9 d
C(♀)×C(♂)	575.0±65.9 <sup>a</sup>	651.53±61.30 <sup>b</sup>	759.57±108.3 <sup>b</sup>
K(♀)×K(♂)	548.8±96.6 <sup>a</sup>	595.63±100.10 <sup>c</sup>	706.77±96.80 <sup>c</sup>
K(♀)×C(♂)	544.4±88.3 <sup>a</sup>	634.97±80.90 <sup>b</sup>	802.03±116.90 <sup>ab</sup>
C(♀)×K(♂)	560.2±104.6 <sup>a</sup>	682.40±87.20 <sup>a</sup>	857.87±98.70 <sup>a</sup>

注: 同一列数值右上角不同字母表示具有显著差异,  $P < 0.05$

Note: Data within the same column with different superscript are significantly different ( $P < 0.05$ )

**2.4 幼参抗灿烂弧菌感染能力**

灿烂弧菌攻毒 14 d 后, 正交组与韩国自交组成

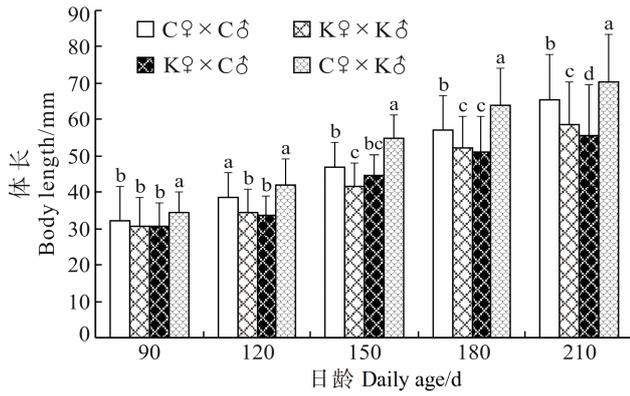


图 1 各交配组合幼参体长生长速度比较  
Fig.1 Body length of juveniles in cross groups and self-fertilized groups

不同字母表示组合间有显著差异( $P < 0.05$ )  
Different letters indicate significant difference in mean body length among four groups ( $P < 0.05$ )

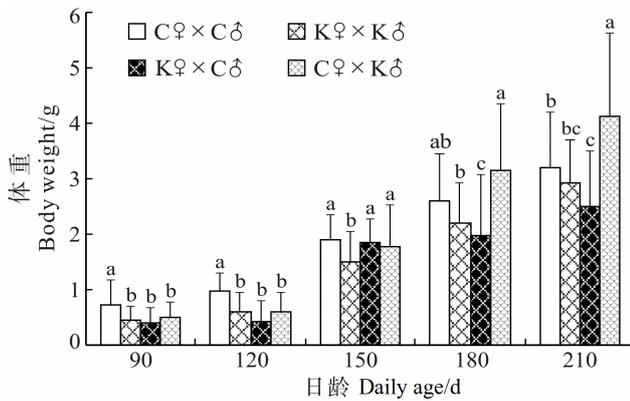


图 2 各交配组合幼参体重生长速度比较  
Fig.2 Body weight of juveniles in cross groups and self-fertilized groups

不同字母表示组合间有显著差异( $P < 0.05$ )  
Different letters indicate significant difference in mean body length among four groups ( $P < 0.05$ )

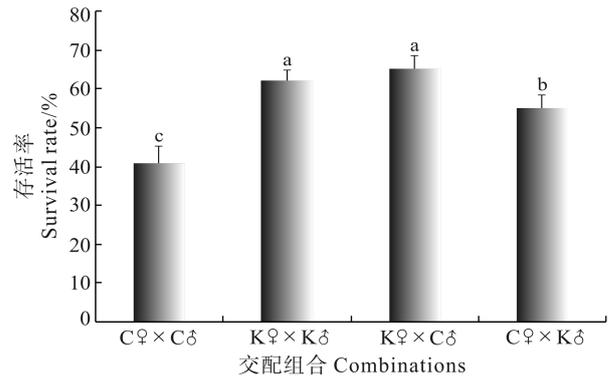


图 3 灿烂弧菌攻毒后刺参的存活率  
Fig.3 Survival rate of *A. japonicus* after being challenged by *V. splendidus*

不同字母表示组合间有显著差异( $P < 0.05$ )  
Different letters indicate significant difference in mean body length among four groups ( $P < 0.05$ )

活率分别为(65.0 ± 3.54)%和(62.0 ± 2.74)%, 显著高于反交组(55.0 ± 3.54)%和中国自交组(41.0 ± 4.19)%, 中国自交组的成活率最低(图 3)。

### 2.5 杂种优势

正交和反交两个杂交组的杂种优势率比较见表 3。反交组 C(♀)×K(♂)在体长和体重指标上表现出明显的杂种优势, 其 7 日龄和 9 日龄体长的杂种优势率为 9.43%和 17.00%, 幼参阶段体长的杂种优势率为 13.04%–23.75%, 210 日龄时, 体重的杂种优势率最高, 为 34.96%。正交组 K(♀)×C(♂)在抗病力上表现出更明显的杂种优势, 经 14 d 攻毒试验后, 幼参存活率的杂种优势率为 26.21%。正交组 K(♀)×C(♂)在 90、120、180、210 d 在体长和体重性状上呈现杂种劣势。反交组 C(♀)×K(♂)在 90、120d 在体重性状上呈现杂种劣势。

表 3 杂交组的杂种优势率  
Tab.3 Heterosis for two hybrid groups

实验组 Group	性状 Traits	杂种优势率 Heterosis(%)							
		5 d	7 d	9 d	90 d	120 d	150 d	180 d	210 d
K(♀)×C(♂)	体长 Body length	0.44	1.82	9.39	-1.99	-7.48	1.13	-6.73	-10.29
	体重 Body weight				-29.91	-45.91	8.77	-17.32	-17.97
	存活率 Survival								26.21
C(♀)×K(♂)	体长 Body length	-0.30	9.43	17.00	9.98	14.63	23.75	16.70	13.04
	体重 Body weight				-14.53	-9.43	4.09	17.32	34.96
	存活率 Survival								6.80

注: C 为中国刺参; K 为韩国刺参  
Note: C, Chinese *A. japonicus*; K, Korean *A. japonicus*

### 3 讨论

杂种优势在水产育种中具有非常大的利用价值。利用杂交进行遗传改良已经在多种水产动物如三疣梭子蟹(*Portunus tritubercatus*)、中国对虾(*Penaeus chinensis*)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)、菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)等中得到应用,并产生了巨大的经济效益(张跃环等, 2009; 徐田军等, 2009; 孔杰等, 2012; 隋延鸣等, 2012)。在刺参中, 目前已开展了一些群体间的杂交研究, 如“水院1号”(Chang *et al.*, 2011)。张黎黎等(2013)利用来自俄罗斯和中国的亲参进行群体内自繁及群体间杂交, 对4个交配组合后代的存活率和特定生长率等指标进行了杂交优势的分析, 不同的性状体现了不同程度的杂种优势, 杂交刺参  $F_1$  幼参的存活率及生长有一定的优越性。胡美艳等(2009)以日本红刺参和中国刺参为材料, 进行了杂交和自交实验, 比较了各交配组合后代的生长发育以及杂交子代的杂种优势, 结果显示, 中国刺参( $\delta$ ) $\times$ 日本红刺参( $\eta$ )组的幼体和稚参的生长性状均大于其他3个组, 表现出明显的杂种优势。本研究中, 中韩刺参正反杂交子代分别在生长和抗病能力上表现出杂种优势, 就生长性状而言, 无论是在幼体阶段还是在幼参阶段, 反交组都比自交组生长快, 杂种优势非常明显。

本研究从受精率和孵化率上来看, 自交组和正反杂交组的受精率和孵化率都较高, 受精率在90%以上, 孵化率在80%以上, 并且组间差异不显著, 说明刺参不同地理群体间进行杂交不存在种间杂交常出现的授精时配子不亲和和胚胎发育障碍等问题。而两杂交组的附着变态率明显高于两自交组, 这与九孔鲍(*Haliotis diversicolor aquatilis*)和杂色鲍(*Haliotis diversicolor diversicolor*)的研究结果相同。游伟伟等(2005)研究表明, 杂交显著提高了杂色鲍幼体的附着率和变态率。蒋湘等(2013)研究表明, 杂交显著提高了九孔鲍幼体附着率与变态率。反交组  $C(\eta)\times K(\delta)$  随着生长发育阶段的推进, 在体重上的杂种优势越来越明显。相同现象也见于其他水产动物报道。刘小林等(2003)研究表明, 栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)俄罗斯种群与中国种群的杂交子一代在160日龄表现出比60、90日龄更显著的杂种优势。季士治等(2006)的研究表明, 大菱鲆杂交  $F_1$  代70日龄体长和体重的杂种优势率高于30日龄的杂种优势率。

本研究中, 刺参正反交配组合的杂种优势具有明显的正负不对称性, 这种不对称现象在杂交育种中是

广泛存在的(高鑫等, 2013)。一些研究表明, 杂交子一代在某些性状上表现为杂种优势, 在另一些性状上表现为杂种劣势(Gjerde *et al.*, 1984; Ferguson *et al.*, 1985; Bryden *et al.*, 2004)。从生长结果来看, 反交组  $C(\eta)\times K(\delta)$  和中国自交组  $C(\eta)\times C(\delta)$  明显地优于正交组  $K(\eta)\times C(\delta)$  和韩国自交组  $K(\eta)\times K(\delta)$ , 这说明以中国种群为母本产生了良好的杂交效果, 这可能与母本效应有关。作为母本的中国群体为人工选育的快速生长的  $F_2$  代刺参, 本身就在生长性状上具有优势。常亚青等(2006)分别以栉孔扇贝中国养殖种群和栉孔扇贝中国野生种群为母本与俄罗斯种群杂交, 结果显示, 以养殖种群为母本的杂交子一代的生长性能高于以野生种群为亲本的杂交子一代。本研究选择的韩国刺参都是未经选育的自然群体, 其基因型是非常混杂和不纯的, 某些等位基因间的互作产生负的显性效应, 可能是用这些亲本进行杂交所得的  $F_1$  代在体长和体重性状上出现杂种劣势的主要原因。反交组  $C(\eta)\times K(\delta)$  在90、120 d 在体重性状上出现负的杂种优势, 可能是因为个体太小, 测定误差较大造成的。在抗病能力上, 韩国自交组  $K(\eta)\times K(\delta)$  和正交组  $K(\eta)\times C(\delta)$  优于中国自交组  $C(\eta)\times C(\delta)$  和反交组  $C(\eta)\times K(\delta)$ , 这可能是由于中国群体在选育过程中发生近交衰退。

本研究分析了刺参中国群体和韩国群体杂交及自繁子一代的生长、发育和抗病力数据。从研究结果来看, 正反交子代分别在生长和抗病能力性状上得到改良。不过, 杂交育种有一定的局限性, 杂种优势通常只能利用一代, 子二代可能出现基因型的分离, 进而失去在生产性能上的优势。若要使杂交后代的性状稳定, 还需对杂交后代进行定向选育, 筛选出优良的品系并进行大量繁殖, 培育出优良性状能稳定遗传的刺参新品系。而经过人工选择形成的新品系, 其基因型纯合程度进一步提高, 可以作为基础群体, 并以此为基础进行系统的家系选育, 最终才能培育出符合育种期望的稳定的新品种。

### 参 考 文 献

- 孔杰, 罗坤, 栾生, 等. 中国对虾新品种“黄海2号”的培育. 水产学报, 2012, 36(12): 1854-1862
- 刘小林, 常亚青, 相建海, 等. 栉孔扇贝不同种群杂交效果的初步研究 I. 中国种群与俄罗斯种群的杂交. 海洋学报, 2003, 25(1): 93-99
- 农业部渔业局. 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2013
- 孙灵毅, 赵强, 任利华, 等. 中国刺参与韩国红刺参杂交及子

- 代发育特性的研究. 大连海洋大学学报, 2013, 28(3): 281-286
- 李思发, 王成辉, 刘志国, 等. 3 种红鲤生长性状的杂种优势与遗传相关分析. 水产学报, 2006, 30(2): 176-180
- 张跃环, 闫喜武, 王艳, 等. 不同壳型菲律宾蛤仔杂交家系的建立及早期生长发育比较. 渔业科学进展, 2009, 30(2): 71-77
- 张黎黎, 曹学彬, 李君华, 等. 俄罗斯仿刺参与中国仿刺参杂交 F<sub>1</sub> 幼参的早期生长比较. 水产科学, 2013, 32, (2): 68-72
- 季士治, 雷霖霖, 王伟继, 等. 双列杂交法分析 2 个大菱鲆养殖群体的杂交效果. 中国水产科学, 2006, 13(6): 1001-1005
- 徐田军, 王磊, 陈松林, 等. 双列杂交分析比较两个养殖群体杂交牙鲆抗病力. 渔业科学进展, 2009, 30(5): 34-39
- 高鑫, 闫喜武, 张辉, 等. 蛤仔南北方养殖群体杂交子代早期生长发育的研究. 大连海洋大学学报, 2013, 28(1): 39-43
- 常亚青, 刘小林, 相建海, 等. 栉孔扇贝不同种群杂交效果 III. 中国种群与俄罗斯种群及其杂种 1-2 龄的生长发育. 海洋学报, 2006, 28(2): 114-120
- 常忠岳, 肖培华. 刺参中国与韩国种群杂交育苗技术研究课题顺利通过鉴定. 河北渔业, 2005(6): 55
- 隋延鸣, 高保全, 刘萍, 等. 三疣梭子蟹“黄选 1 号”盐度耐受性分析. 渔业科学进展, 2012, 33(2): 63-71
- 游伟伟, 柯才焕, 蔡明夷, 等. 杂色鲍日本群体与台湾群体杂交的初步研究. 厦门大学学报(自然科学版), 2005, 44(5): 701-705
- 蒋湘, 刘建勇, 赖志服. 九孔鲍养殖群体与野生群体杂交一代生长比较. 广东海洋大学学报, 2013, 33(1): 22-27
- 廖玉麟. 中国动物志, 棘皮动物门, 海参纲. 北京: 科学出版社, 1997
- Benzie JAH, Kenway M, Ballment E, *et al.* Interspecific hybridization of the tiger prawns *Penaeus monodon* and *Penaeus esculentus*. Aquaculture, 1995, 133(2): 103-111
- Bierne N, Beuzart I, Vonan V, *et al.* Microsatellite-associated heterosis in hatchery-propagated stocks of the shrimp *Penaeus stylirostris*. Aquaculture, 2000, 184(3-4): 203-219
- Bryden CA, Heath JW, Heath DD. Performance and heterosis infarmed and wild Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) hybrid and their parents crosses. Aquaculture, 2004, 235(1-4): 249-261
- Chang YQ, Shi SB, Zhao C, *et al.* Characteristics of papillae in wild, cultivated and hybrid sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*). Afr J Biotechnol, 2011, 10(63): 13780-13788
- Cruz P, Ibarra AM. Larval growth and survival of two Catarina scallop (*Argopecten circularis*, Sowerby, 1835) populations and their reciprocal crosses. J Exp Marine Biol Ecol, 1997, 212(1): 95-110
- Falconer DS, Mackay TF. Introduction to Quantitative Genetics, 4th edition. Longman Group, Essex, England, 1996
- Ferguson MM, Danzmann RG, Allendorf FW. Developmental divergence among hatchery strains of rainbow trout (*Salmo gairdneri*): II. Hybrids. Can J Genet Cytol, 1985, 27(3): 298-307
- Gjerde B, Refstie T. Complete diallel cross between five strains of Atlantic salmon. Livest Prod Sci, 1984, 11(2): 207-226
- Liu XL, Chang YQ, Xiang JH, *et al.* Studies on hybridization effects of different geographic population of *Chlamys farreri*. Acta Oceanologica Sinica, 2003, 22(2): 255-263
- Miguel A, Rio-Portilla D, Andy RB. Larval growth, juvenile size and heterozygosity in laboratory reared mussels, *Mytilus edulis*. J Exp Marine Biol Ecol, 2000, 254(1): 1-17
- Rahman MA, Uehara T, Aslan LM. Comparative viability and growth of hybrids between two sympatric species of sea urchins(*Genus echinometra*) in Okinawa. Aquaculture, 2000, 183(1-2): 45-56
- Rahman MA, Uehara T, Pearse JS. Hybrids of two closely related tropical sea urchins (*Genus echinometra*): Evidence against postzygotic isolating mechanisms. Biol Bull, 2001, 200(1): 97-106
- Tymchuk WE, Devlin RH. Growth differences among first and second generation hybrids of domesticated and wild rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 2005, 245(1-4): 295-300

(编辑 陈严)

## Comparative Study on Growth and Disease Resistance of Hybrids between Chinese and Korean Stocks of Sea Cucumber *Apostichopus japonicus*

TAN Jie<sup>1</sup>, WANG Liang<sup>2,3</sup>, GAO Fei<sup>1</sup>, ZOU Ange<sup>3</sup>, SUN Huiling<sup>1</sup>, LI Fenghui<sup>1,4</sup>,  
FAN Chaojing<sup>1,4</sup>, ZUO Zhiliang<sup>1,4</sup>, YAN Jingping<sup>1①</sup>

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

2. Yantai Fishery Research Institute, Yantai 264003; 3. Shandong Anyuan Aquaculture Co., Ltd, Penglai 265617;

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

**Abstract** The sea cucumber *Apostichopus japonicus* is a major aquaculture species in China. The fast development of sea cucumber culture in China has generated some problems such as genetic degradation, frequent diseases outbreak and natural resource depletion, which have impacted the sustainable development of agro industry of sea cucumber. Heterosis resulting from crosses between different populations is an important component of breed improvement in marine animals. The objective of this study is to determine if heterosis exists between China and Korea populations of *A. japonicus*. The first generation of four combinations, C(♀)×C(♂), K(♀)×K(♂), K(♀)×C(♂), and C(♀)×K(♂), were obtained from mating and crossing within and between Chinese population (C) and Korean population (K) of *A. japonicus*. The fertilization rate, hatch rate, settlement rate, growth, disease resistance and heterosis at larval and juvenile stages were compared among four combinations in this study. The results indicated that fertilization and hatch rates were not significantly different between the hybridization groups and self-fertilized groups. The settlement rates of hybridization groups were significantly higher than those of self-fertilized groups ( $P < 0.05$ ). The body length of C(♀)×K(♂) group at juvenile stages was longer than other three groups, showing marked heterosis 9.43%–23.75%. Compared with other three groups, heterosis on body weight of C(♀)×K(♂) group ranged from 4.09% to 34.96% since 150 days after fertilization. In contrast, the K(♀)×C(♂) group did not show positive heterosis except at Day 150. The K(♀)×C(♂) group showed the best resistance against *V. splendidus*, and the heterosis reached 26.21%. These results indicated that the crosses between different populations might be effective for genetic improvement in *A. japonicus*.

**Key words** *Apostichopus japonicus*; Hybrid; Growth; Disease resistance; Heterosis

① Corresponding author: YAN Jingping, E-mail: yanjp@ysfri.ac.cn

# 温度和盐度对红刺参(*Apostichopus japonicus*)

## 耗氧率与排氨率的影响\*



包杰<sup>1,2</sup> 姜宏波<sup>2</sup> 田相利<sup>1</sup> 董双林<sup>1①</sup>

(1. 中国海洋大学水产学院 教育部海水养殖重点实验室 青岛 266003;

2. 沈阳农业大学畜牧兽医学院 沈阳 110866)

**摘要** 采用室内实验生态学方法,研究了不同温度(7、12、17、22、27℃)、盐度(23、26、29、32、35、38)对两种体重S组(1.68–3.48 g)和L组(15.78–20.79 g)红刺参(*Apostichopus japonicus*)耗氧率(OCR)和排氨率(AER)的影响。结果显示,温度对红刺参OCR和AER均有极显著影响( $P<0.01$ );体重对红刺参OCR无显著影响( $P>0.05$ ),而对AER有极显著影响( $P<0.01$ )。温度和体重交互作用对红刺参OCR和AER有极显著影响( $P<0.01$ )。S组红刺参的OCR和AER随温度的升高而增加;L组红刺参OCR和AER均随温度的升高而升高,而在22℃有所降低后又升高。盐度、体重对红刺参OCR和AER均有显著影响( $P<0.05$ )。盐度和体重交互作用对红刺参OCR和AER均无显著影响( $P>0.05$ )。S组和L组红刺参的OCR和AER均随盐度的升高而呈M形变化,在盐度为29和32时较低,而在盐度为26和35时较高。红刺参OCR和AER与体重呈负相关的幂函数方程 $R=aW^b$ 。不同温度下S组和L组红刺参O:N范围分别为4.75–11.74和10.71–15.52;不同盐度S组和L组红刺参O:N范围分别为6.37–12.29和8.24–12.10。综上所述,L组红刺参对高温的耐受能力较S组弱;S组和L组红刺参对低盐和高盐的耐受性较差,其最适盐度范围为29–32。

**关键词** 红刺参; 温度; 盐度; 体重; 耗氧率; 排氨率

中图分类号 Q493 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2015)04-0116-06

在日本,天然刺参(*A. japonicus*)存在红刺参、青刺参和黑刺参3个品系。青刺参是我国重要的海水养殖种类,红刺参仅分布在日本部分岛屿的岩礁地带。红刺参在形态学(体色、波里氏囊、疣足、消化管、骨片等)、生理学(产卵期、体壁生化组成等)和生态学习性(夏眠特性、繁殖季节和栖息环境等)方面与青刺参存在较大差异(Choe *et al.*, 1961; 梁森, 2010<sup>1</sup>);在遗传上红刺参与青刺参也存在显著差异(Kanno *et al.*, 2002、2003、2005、2006; Kang *et al.*, 2011);最近研

究发现,红刺参与青刺参属种内关系,可能为两个独立的群体(胡美燕等, 2009; Sun *et al.*, 2010)。

由于体壁较厚,价格较高,红刺参于2007年从日本引入国内,并在国内开展人工育苗和养殖技术的研究。李莉(2009)<sup>2</sup>以中国当地刺参为母本,日本红刺参为父本进行单对杂交,采用微卫星和 AFLP 两种分子标记技术,验证了日本红刺参与中国当地青刺参杂交的可行性,这为改良刺参养殖品种,有效促进刺参养殖产业的持续和健康发展提供了基础。呼吸和排

\* 国家海洋公益项目(200905020)、国家科技支撑计划(2011BAD13B03)和沈阳农业大学校青年教师科研基金(20101005)共同资助。包杰, E-mail: yh\_baojie@163.com

① 通讯作者: 董双林, 教授, E-mail: dongsl@ouc.edu.cn

收稿日期: 2014-07-22, 收修改稿日期: 2014-08-22

1) 梁森. 刺参(*Apostichopus japonicus*)个体生长差异的实验研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2010

2) 李莉. 中国青刺参和日本红刺参苗种培育的生物学研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2009

泄是动物生理生态学的重要组成部分,可反映动物的生理状态,关于青刺参呼吸和排泄的研究已有一些报道(李宝泉等, 2002; Yang *et al.*, 2006; 董云伟等, 2005)。而关于红刺参的研究目前主要集中在其苗种生物学和遗传特性方面(Kanno *et al.*, 2002、2003、2005、2006; Kang *et al.*, 2011; 胡美燕等, 2009)。由于红刺参与青刺参在生理学、遗传学、分布区和栖息环境的不同可能会导致它们对环境的适应性存在差异,本实验旨在研究红刺参在不同温度和盐度下的耗氧率和排氮率,可为进一步开展红刺参育苗和养殖技术提供基础理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

红刺参是 2007 年从日本九州引进亲参的子一代。将运回的健康红刺参随机置于 11 个 100 L 水槽中暂养 15 d, 暂养期间 24 h 充气, 每天换水 1/2-2/3, 投喂过量配合饲料(粗蛋白 16.56%, 粗脂肪 5.40%, 灰分 47.42, 能量 8.92 kJ/g)。驯养和实验期间, 温度为(17±0.5)℃, 盐度为 32, 光强为(200±30) lx(自然光), 光照周期为 10 L : 14 D。

### 1.2 实验设计

**1.2.1 温度实验设计** 实验设置 7、12、17、22、27℃ 5 个温度梯度。实验开始前, 每天升高或降低水温 1-2℃, 将红刺参驯化至实验温度并稳定 10 d。根据红刺参大小选择 250 和 1000 ml 三角锥形瓶测定其耗氧率和排氮率, 每个瓶中放 1 个个体, 每组设 10 个重复, 3 个空白呼吸瓶(不放红刺参)作为对照。实验采用静水法, 水浴控温, 每次实验均从 09:00 开始, 实验进行 4-6 h。实验红刺参体重分 S 组(1.68±0.23) g 和 L 组(20.79±1.34) g。

**1.2.2 盐度实验设计** 实验设置 23、26、29、32、35、38 6 个盐度梯度。实验开始前, 每天升高或降低 1-2 个盐度, 将红刺参驯化至实验盐度并稳定 10 d。根据红刺参大小选择 250 和 1000 ml 三角锥形瓶测定其耗氧率和排氮率, 每个瓶中放 1 个个体, 每组设 10 个重复, 3 个空白呼吸瓶(不放红刺参)作为对照。实验采用静水法, 每次实验均从 09:00 开始, 实验进行 4-6 h。实验红刺参体重分 S 组(3.48±0.50) g 和 L 组(15.78±1.81) g。

### 1.3 测定方法

实验结束后, 利用虹吸法取水样, 然后用碘量法测定呼吸瓶及对照瓶中 DO; 用次溴酸钠氧化法测定

NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 浓度。所有样品测定均在 3-5 h 内完成。

耗氧率(OCR)和排氮率(AER)分别以下式来计算:

$$OCR = (DO_0 - DO_1) V / (W \cdot t)$$

$$AER = (N_1 - N_0) V / (W \cdot t)$$

式中, OCR、AER 为耗氧率和排氮率, DO<sub>0</sub>、DO<sub>1</sub> 分别为实验初始、结束时对照瓶中 DO 含量(μg/L), N<sub>0</sub>、N<sub>1</sub> 分别为实验初始、结束时对照瓶中 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 含量(μg/L), V 为呼吸瓶体积, W 为实验刺参体重, t 为实验持续时间。

### 1.4 统计分析

数据以平均值±标准差(Mean±SD)表示。所得数据用 SPSS 11.0 软件进行双因子方差分析以及 Duncan 多重比较, 以 P<0.05 作为差异显著水平。

## 2 结果

### 2.1 温度和体重对红刺参耗氧率与排氮率的影响

方差分析表明, 温度对红刺参 OCR 和 AER 均有极显著影响( $F_{T_0}=61.314$  和  $F_{T_a}=135.720$ ,  $P<0.01$ ); 体重对红刺参 OCR 无显著影响( $F_{W_0}=1.381$ ,  $P>0.05$ ), 而对 AER 有极显著影响( $F_{W_a}=132.824$ ,  $P<0.01$ )。温度和体重交互作用对红刺参 OCR 和 AER 有极显著影响( $F_o=9.669$  和  $F_a=7.307$ ,  $P<0.01$ )。温度对红刺参耗氧率和排氮率的影响见图 1、图 2。S 组红刺参的 OCR 和 AER 均随温度的升高而增加, 在 27℃ 时达到最高, 分别为 25.94 μg/g·h 和 2.57 μg/g·h; L 组 OCR 和 AER 均随温度的升高而增加, 而后在 22℃ 有所降低后在 27℃ 时达到最高, 分别为 26.52 μg/g·h 和 2.09 μg/g·h。

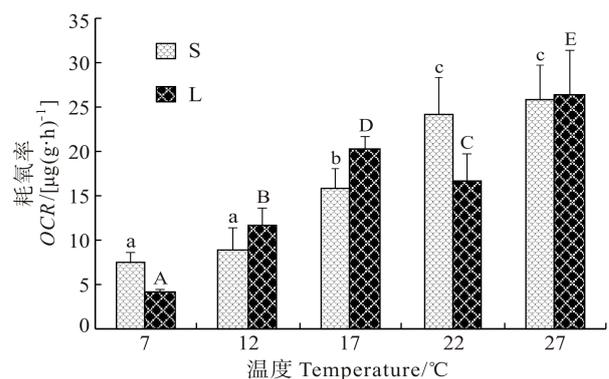


图 1 不同温度条件下红刺参耗氧率  
Fig.1 Oxygen consumption rate of red type *A. japonicus* at different temperatures

不同温度处理下带有不同字母的数据表示相互之间差异显著( $P<0.05$ )  
Data with different superscripts at different temperatures are significantly different ( $P<0.05$ )

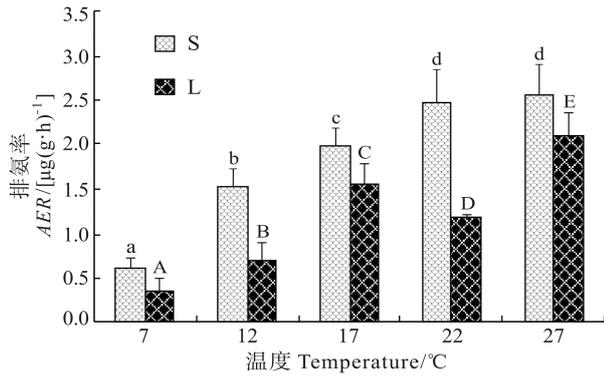


图2 不同温度条件下红刺参排氨率  
Fig.2 Ammonia-N excretion rate of red type *A. japonicus* at different temperatures

不同温度处理下带有不同字母的数据表示相互之间差异显著( $P < 0.05$ )  
Data with different superscripts at different temperatures are significantly different ( $P < 0.05$ )

红刺参单位个体耗氧率和排氨率与体重呈负相关的幂函数关系： $R = aW^b$ (表1)，式中， $R$ 为红刺参单位个体耗氧率， $W$ 为体重， $a$ 、 $b$ 为参数。 $R_{OCR}$ 的 $a$ 取值范围为7.988–25.914， $b$ 取值范围为0.755–1.141； $R_{AER}$ 的 $a$ 取值范围为0.713–2.723， $b$ 取值范围为0.540–0.909。

2.2 盐度和体重对红刺参耗氧率与排氨率的影响

方差分析表明，盐度、体重对红刺参OCR和AER均有显著影响( $F_{So}=11.361$ 和 $F_{Wo}=1.381$ ， $F_{Sa}=4.193$ 和 $F_{Wa}=16.070$ ， $P < 0.05$ )。盐度、体重交互作用对红刺参OCR和AER均无显著影响( $F_o=0.575$ 和 $F_a=0.481$ ， $P > 0.05$ )。盐度对红刺参耗氧率和排氨率的影响见图3、图4。S组和L组红刺参的OCR和AER均随盐度的升高而呈M形变化，在盐度为26和35时较高，而在盐度为29和32时较低。红刺参单位个体耗氧率和排氨率与体重呈负相关的幂函数关系： $R = aW^b$ (表2)。其中， $R_{OCR}$

表1 不同温度下红刺参单位个体耗氧量和排氨量与体重的回归方程  
Tab.1 Regressive relationship between weight and individual oxygen consumption rate/ammonia-N excretion rate of red *A. japonicus* at different temperatures

温度 Temperature(°C)	单位个体耗氧量 Individual oxygen consumption rate (μg/ind·h)	单位个体排氨量 Individual ammonia-N excretion rate (μg/ind·h)
7	$8.612W^{0.775}$ ( $R^2 = 0.973$ , $n=20$ )	$0.713W^{0.770}$ ( $R^2 = 0.945$ , $n=20$ )
12	$7.988W^{1.141}$ ( $R^2 = 0.970$ , $n=20$ )	$2.243W^{0.540}$ ( $R^2 = 0.928$ , $n=20$ )
17	$15.067W^{1.098}$ ( $R^2 = 0.996$ , $n=20$ )	$2.068W^{0.901}$ ( $R^2 = 0.991$ , $n=20$ )
22	$25.894W^{0.888}$ ( $R^2 = 0.989$ , $n=20$ )	$2.640W^{0.738}$ ( $R^2 = 0.992$ , $n=20$ )
27	$25.914W^{0.979}$ ( $R^2 = 0.992$ , $n=20$ )	$2.723W^{0.909}$ ( $R^2 = 0.992$ , $n=20$ )

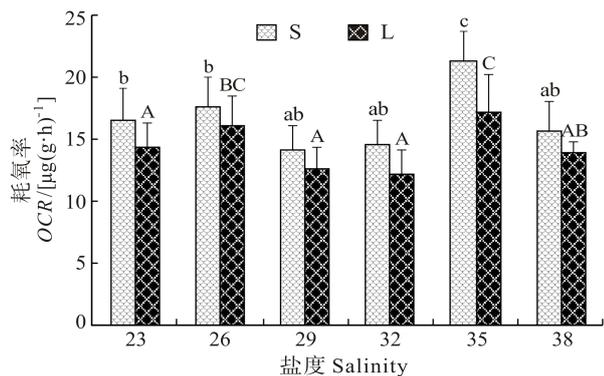


图3 不同盐度条件下红刺参耗氧率  
Fig.3 Oxygen consumption rate of red type *A. japonicus* at different salinities

不同盐度处理下带有不同字母的数据表示相互之间差异显著( $P < 0.05$ )  
Data with different superscripts at different salinities are significantly different ( $P < 0.05$ )

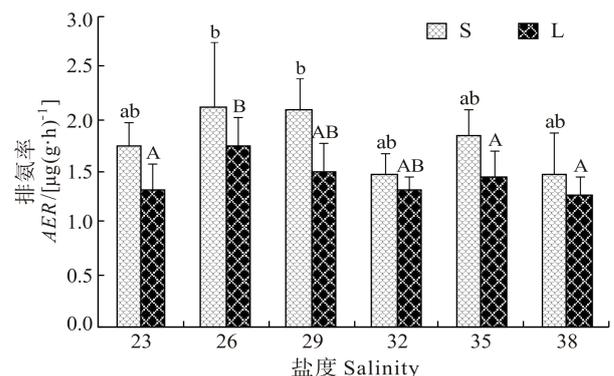


图4 不同盐度条件下红刺参排氨率  
Fig.4 Ammonia-N excretion rate of red type *A. japonicus* at different salinities

不同盐度处理下带有不同字母的数据表示相互之间差异显著( $P < 0.05$ )  
Data with different superscripts at different salinities are significantly different ( $P < 0.05$ )

表2 不同盐度下红刺参单位个体耗氧量和排氨量与体重的回归方程  
Tab.2 Regressive relationship between weight and oxygen consumption rate/ammonia-N excretion rate of red *A. japonicus* at different salinities

盐度 Salinity	单位个体耗氧量	单位个体排氨量
	Individual oxygen consumption rate ( $\mu\text{g}/\text{ind}\cdot\text{h}$ )	Individual ammonia-N excretion rate ( $\mu\text{g}/\text{ind}\cdot\text{h}$ )
23	$16.9584W^{0.9024}$ ( $R^2 = 0.984, n=20$ )	$2.0829W^{0.8176}$ ( $R^2 = 0.979, n=20$ )
26	$14.3743W^{1.0288}$ ( $R^2 = 0.959, n=20$ )	$1.4993W^{0.9716}$ ( $R^2 = 0.959, n=20$ )
29	$12.1769W^{1.0018}$ ( $R^2 = 0.942, n=20$ )	$2.5884W^{0.7138}$ ( $R^2 = 0.798, n=20$ )
32	$10.5613W^{1.0382}$ ( $R^2 = 0.972, n=20$ )	$2.1580W^{0.8208}$ ( $R^2 = 0.932, n=20$ )
35	$21.9678W^{0.8713}$ ( $R^2 = 0.917, n=20$ )	$3.7767W^{0.5499}$ ( $R^2 = 0.835, n=20$ )
38	$10.0925W^{1.1023}$ ( $R^2 = 0.937, n=20$ )	$1.1926W^{1.0289}$ ( $R^2 = 0.913, n=20$ )

表3 不同温度、盐度下红刺参的 O:N 值  
Tab.3 O : N ratio of red *A. japonicus* at different temperatures and salinities

温度 Temperature( $^{\circ}\text{C}$ )	体重 Weight		盐度 Salinity	体重 Weight	
	S	L		S	L
7	$11.74\pm 0.97^c$	$14.40\pm 1.78^a$	23	$7.21\pm 0.87^a$	$8.80\pm 1.77$
12	$4.75\pm 1.15^a$	$15.52\pm 3.53^{b*}$	26	$8.09\pm 1.65^{ab}$	$8.24\pm 1.45$
17	$7.55\pm 1.01^b$	$11.96\pm 1.60^{ab*}$	29	$6.37\pm 0.77^a$	$9.03\pm 1.67$
22	$8.69\pm 1.34^b$	$13.11\pm 2.29^{ab*}$	32	$8.33\pm 1.71^{ab}$	$8.91\pm 1.37$
27	$8.57\pm 0.62^b$	$10.71\pm 0.87^{ab}$	35	$10.00\pm 1.26^{bc}$	$11.25\pm 1.68$
			38	$12.29\pm 1.21^c$	$12.10\pm 1.19$

注: 同一列中标有不同字母的表述不同温度或盐度处理间差异显著( $P<0.05$ ); \*表示不同体重处理组间差异显著( $P<0.05$ )

Note: Values with different letters in the same column are significantly different among temperature/salinity treatments ( $P<0.05$ ). Values with \* are significantly different between the two weight groups of sea cucumbers ( $P<0.05$ )

的  $a$  取值范围为 10.0925–21.9678,  $b$  的取值范围为 0.8713–1.1023;  $R_{AER}$  的  $a$  取值范围为 1.1926–3.7767,  $b$  的取值范围为 0.5499–1.0289。

### 2.3 温度、盐度和体重对红刺参 O : N 的影响

不同温度、盐度对红刺参 O : N 的影响见表 3。从表 3 可以看出, 不同温度下 S 组和 L 组红刺参 O : N 范围分别为 4.75–11.74 和 10.71–15.52; 不同盐度 S 组和 L 组红刺参 O : N 范围分别为 6.37–12.29 和 8.24–12.10。

## 3 讨论

体重是影响动物呼吸排泄的重要因素之一。与许多水生动物一样, 本研究中不同温度、盐度下红刺参单位个体耗氧量和排氨量与其体重的关系也呈负相关的幂函数关系( $R = aW^b$ )。  $b$  值为体重指数, 可反映动物耗氧率对体重变化的敏感程度, 棘皮动物  $b$  值受环境因素的影响较大, 其变化范围在 -0.055–1.3123 (李宝泉等, 2002; 袁秀堂等, 2006; 包杰, 2008<sup>1)</sup>)。本研

究中红刺参在温度为 7–27 $^{\circ}\text{C}$  范围内的  $b$  取值范围为 0.540–1.141, 在盐度为 23–38 范围内的  $b$  取值范围为 0.5499–1.0289, 这与其他棘皮动物的  $b$  值范围基本相同。

在一定温度范围内, 大多数水生生物的耗氧率随温度的升高而增加, 而当温度超过生物的适宜或耐受范围时则会显著下降。李宝泉等 (2002) 研究发现, 在温度为 10–30 $^{\circ}\text{C}$  内, 青刺参 (17 g < 体重 < 50 g) 的  $OCR$  和  $AER$  随温度的升高而增加, 而体重大于 50 g 的青刺参  $OCR$  和  $AER$  随温度的升高, 在 20 $^{\circ}\text{C}$  前呈上升趋势, 而后随温度的增加则缓慢下降, 可能是刺参在 20 $^{\circ}\text{C}$  后进入夏眠导致其代谢水平下降。本研究发现, 红刺参也具有类似现象。在本研究温度范围内, 体重在 1–3 g 的 S 组红刺参  $OCR$  和  $AER$  均随温度的升高而增加, 但体重 20 g 左右的 L 组红刺参  $OCR$  和  $AER$  则随温度的升高在 22 $^{\circ}\text{C}$  有所下降后在 27 $^{\circ}\text{C}$  复又升高 (图 1 和图 2), 这反映了 S 组的红刺参耐受高温的能力要强于 L 组。本研究中, S 组红刺参的  $OCR$  和  $AER$  随温度的升高而增加, 并未出现类似 L 组红刺参的类

1) 包杰. 环境因子对青刺参和红刺参(*Apostichopus japonicus*)代谢与生长及其机制的影响. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2006

似波动,这也许意味着 S 组的红刺参出现夏眠的温度更高或不会出现夏眠现象;而 L 组红刺参 OCR 和 AER 在温度超过 17℃ 后受到影响,这一现象是否与夏眠机制有关还需进一步研究。

棘皮动物为随渗动物,主要通过管足、体壁对盐度和水分较高的渗透性来完成体腔内离子浓度随环境盐度的适应。由于棘皮动物对离子调节方式的差异可引起耗氧率和排氨率的明显差异(Lewis *et al*, 1968; Ellington *et al*, 1974; Emerson, 1969)。一般来讲,水生动物在最适盐度时代谢耗能较少,随着盐度的升高或降低而偏离其栖息适宜环境则代谢率增加。本研究中 S 组和 L 组红刺参 OCR 和 AER 随盐度的升高呈 M 形变化,OCR 和 AER 均在盐度为 29 和 32 时较低,当盐度继续升高或降低时,红刺参的代谢耗能明显增加。可以看出,在盐度为 29–32 范围内可能接近其等渗点,为其最适盐度,这与李莉(2009)<sup>1)</sup>研究的红刺参幼体和张鹏(2012)<sup>2)</sup>研究红刺参最适盐度为 30 的结果基本一致。然而,当盐度进一步升高至 38 或降低至 23 时,红刺参 OCR 反而开始下降,表明盐度过低和盐度过高不利于红刺参生长,其代谢受到明显抑制,这可能是其保持细胞内渗透压的平衡,减少耗能的生理策略(Shirley *et al*, 1982)。

O : N 比值可评估海洋无脊椎动物的能量需求和对营养物质的利用特性。O : N 比值低时(小于 10),动物以蛋白质代谢为主;O : N 比值高时(大于 10)时则以脂肪和碳水化合物代谢为主。从表 3 中可以看出,L 组红刺参主要以脂肪和碳水化合物代谢为主,而 S 组红刺参在低温(7℃)条件下主要以脂肪和碳水化合物代谢为代谢底物,而随着温度的增加它们代谢的蛋白质也在增加。可见,不同温度下红刺参能量代谢特征会随个体发育而发生变化,因此,在研究红刺参营养生理时应考虑这一点。在盐度为 23–38 条件下,S 组和 L 组间红刺参 O : N 比值并无显著差异,但红刺参代谢底物中脂肪和碳水化合物所占的比例随盐度的升高逐渐增加。

体重、温度和盐度是影响红刺参呼吸排泄的重要环境因子。红刺参主要栖息于环境相对稳定的外洋性海域,对于环境的波动较为敏感(Nishimura, 1995)。本研究中,L 组红刺参对高温的耐受能力较 S 组弱;红刺参最适盐度范围为 29–32,其对低盐和高盐的耐受性较差。因此,在红刺参养殖过程中,尤其是池塘

养殖过程中,应注意养殖环境的调控,以期对红刺参健康养殖提供重要的指导意义。

## 参 考 文 献

- 李宝泉,杨红生,张涛,等. 温度和体重对刺参呼吸和排泄的影响. 海洋与湖沼, 2002, 33(2): 182–187.
- 胡美燕,李琪,孔令锋,等. 中国刺参与日本红刺参杂交子一代的早期生长比较. 中国海洋大学学报, 2009, 39(增刊): 375–380
- 袁秀堂,杨红生,周毅,等. 盐度对刺参(*Apostichopus japonicus*)呼吸和排泄的影响. 海洋与湖沼, 2006, 37(4): 348–354.
- 董云伟,董双林,田相利,等. 不同水温对刺参幼参生长、呼吸及体组成的影响. 中国水产科学, 2005, 12(1): 33–37.
- Choe S, Oshima Y. On the morphological and ecological differences between two commercial forms, 'green' and 'red', of the Japanese common sea cucumber, *Stichopus japonicus* Selenka. Nippon Suisan Gakkaishi, 1961, 27(2): 97–105
- Ellington WR, Lawrence JM. 1974. Coelomic fluid volume regulation and isosmotic intracellular regulation by *Luidia clathrata* (Echinodermata: Asteroidea) in response to hyposmotic stress. Biol Bull, 1974, 146(1): 20–31
- Emerson DN. Influence of salinity on ammonia excretion rates and tissue constituents of euryhaline invertebrates. Comp Biochem Physiol, 1969, 29(3): 1115–1133
- Kang JH, Yu KH, Park JY, *et al*. Allele-specific PCR genotyping of the HSP70 gene polymorphism discriminating the green and red color variants sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). J Genetics Genomics, 2011, 38(8): 351–355
- Kanno M, Kijima A. Genetic differentiation among three color variants of Japanese sea cucumber *Stichopus japonicus*. Fish Sci, 2003, 69: 806–812
- Kanno M, Kijima A. Quantitative and qualitative evaluation on the color variation of the Japanese sea cucumber *Stichopus japonicus*. Suisanzoshoku, 2002, 50: 63–69
- Kanno M, Li Q, Kijima A. Isolation and characterization of twenty microsatellite loci in Japanese sea cucumber (*Stichopus japonicus*). Mar Biotech, 2005, 7(3): 179–183
- Kanno M, Suyama Y, Li Q, *et al*. Microsatellite analysis of Japanese sea cucumber, *Stichopus* (*Apostichopus japonicus*), supports reproductive isolation in color variants. Mar Biotech, 2006, 8(6): 672–685
- Lewis JB. Respiration in the tropical sea urchin *Diadema antillarum* Philippi. Physiol Zool, 1968, 41(4): 476–480

1) 李莉. 中国青刺参和日本红刺参苗种培育的生物学研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2009

2) 张鹏. 盐度、光照强度、温度对青色系、红色系仿刺参(*Apostichopus japonicus*)生长和能量分配的影响. 中国海洋大学博士学位研究生学位论文, 2012

- Nishimura S. Guide to seashore animals of Japan with color pictures and keys. Hoikusha Press, Japan, 1995
- Shirley TC, Stickle WB. Responses of *Leptasterias hexactis* (Echinodermata: Asteroidea) to low salinity II. Nitrogen metabolism, Respiration and Energy budget. Mar Biol, 1982, 69: 155–163
- Sun XJ, Li Q, Kong LF. Comparative mitochondrial genomics within sea cucumber (*Apostichopus japonicus*): Provide new insights into relationships among color variants. Aquaculture, 2010, 309(1–2): 280–285
- Yang HS, Zhou Y, Zhang T *et al.* Metabolic characteristics of sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) during aestivation. J Exp Mar Biol Ecol, 2006, 330(2): 505–510

(编辑 陈严)

## Effects of Temperature and Salinity on Oxygen Consumption Rate and Ammonia-N Excretion Rate of Red *Apostichopus japonicus* (Selenka)

BAO Jie<sup>1,2</sup>, JIANG Hongbo<sup>2</sup>, TIAN Xiangli<sup>1</sup>, DONG Shuanglin<sup>1①</sup>

(1. Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003;  
2. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866)

**Abstract** The current study investigated the effects of temperature (7, 12, 17, 22, and 27°C) and salinity (23, 26, 29, 32, 35, and 38) on oxygen consumption rate (*OCR*) and ammonia-N excretion rate (*AER*) of small group (S) (1.68–3.48 g) and large group (L) (15.78–20.79 g) red *Apostichopus japonicus*. The results showed that temperature had significant effect on *OCR* and *AER* of red *A. japonicus*, and that body size significantly affected the *AER* but not *OCR*. There was significant interaction between body size and temperature ( $P < 0.01$ ). *OCR* and *AER* of S group was increased with the increasing of temperature; however, *OCR* and *AER* of L group were enhanced when temperature ranged from 7 to 17°C, and diminished at 22°C, and then increased at 27°C. Salinity and body size had significant effect on *OCR* and *AER* ( $P < 0.05$ ), and there was no significant interaction between body size and salinity ( $P < 0.01$ ). The effects of salinity on *OCR* and *AER* of two body groups of red *A. japonicus* showed a shape of ‘M’, which was lower at salinity of 29 and 32 and higher at salinity of 26 and 35. There is a negative regressive function  $R = aW^b$  between the *OCR/AER* and body size. O:N ratios in different temperatures were covered range of 4.75–11.74 for S group and 10.71–15.52 for L group, respectively; O:N ratios in different salinities were covered range of 6.37–12.29 for S group and 8.24–12.10 for L group, respectively. These results demonstrated that the large group red type *A. japonicus* could not tolerate higher temperature and two group sea cucumbers were sensitive to lower and higher salinity. The study indicated that the optimum salinity range for red type *A. japonicus* was 29–32.

**Key words** Red *A. japonicus*; Temperature; Salinity; Body weight; Oxygen consumption rate; Ammonia-N excretion rate

① Corresponding author: DONG Shuanglin, E-mail: dongsl@ouc.edu.cn

# 穗花狐尾藻(*Myriophyllum spicatum* L.)饲喂对刺参(*Apostichopus japonicus*)幼参生长、体成分及消化酶的影响\*



何舟 宋坚<sup>①</sup> 常亚青 程龙 宁军号 庞云龙 马里

(农业部北方海水增殖重点实验室 大连海洋大学 大连 116023)

**摘要** 为了探究穗花狐尾藻(*Myriophyllum spicatum* L.)替代鼠尾藻(*Sargassum thunbergii*)饲喂刺参(*Apostichopus japonicus*)幼参的效果,探讨了穗花狐尾藻添加量依次为0(对照)、15%(A1)、30%(A2)、45%(A3)和60%(A4)的5种饲料对刺参幼参[(1.66±0.61)g]生长、体成分和消化酶活性的影响。结果显示,A4组刺参的增重率(GR)显著高于其他4个组( $P<0.05$ ),刺参成活率最高,达到了97.78%;A4组刺参的粗蛋白含量最高(50.92%),显著高于A0、A1和A2组( $P<0.05$ );A3组刺参的淀粉酶活力最高(0.83 U/g prot),显著高于A0、A1与A2组( $P<0.05$ );A4组刺参的蛋白酶活力最高(1.62 U/g prot),显著高于其他4个组( $P<0.05$ )。结果显示,穗花狐尾藻能够促进刺参生长。因此在刺参饲料中添加穗花狐尾藻,以替代资源日益匮乏的鼠尾藻是经济可行的。

**关键词** 穗花狐尾藻;刺参;生长;体成分;消化酶

中图分类号 S968 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2015)04-0122-06

刺参又名仿刺参(*Apostichopus japonicus*),具有很高的营养和药用价值,其经济价值可称之为“参”中之冠(廖玉麟,1997;王际英等,2014;常亚青等,2004,2009)。刺参是温带海洋中最常见的无脊椎动物之一,广泛分布于中国、俄罗斯、日本和韩国等西北太平洋沿岸,海参很早就被开发为重要的渔业资源(Okorie *et al.*, 2008)。

穗花狐尾藻(*Myriophyllum spicatum* L.),在分类学上属于小二仙草科(Haloragaceae)、狐尾藻属(*Myriophyllum*),广泛分布于欧亚大陆沿岸(于延球,2008)。穗花狐尾藻是一种在中国有广泛分布的沉水草本植物。由于其具有生长迅速、再生和适应能力强等特点,在各种水体环境中均能生长良好,因此被广泛应用于各种富营养化水体的修复(钟爱文等,2013;焦立新等,2010)。

作为刺参苗种饲料的鼠尾藻(*Sargassum thunbergii*)等大型藻类因自然资源不断减少,价格逐渐上涨,饲料

开始成为限制刺参养殖产业发展的重要因素。因此,寻求充足廉价的替代品已成为当务之急(郭娜等,2011;袁成玉,2005;王吉桥等,2010)。有研究者采用浒苔(*Enteromorpha prolifera*)、海带(*Laminaria japonica*) (郭娜等,2011;朱建新等,2007)和陆生植物(王吉桥等,2010;樊月居等,2010)等进行了替代性研究,但将穗花狐尾藻作为饲料应用于刺参养殖的研究尚未见报道。本研究探讨了饲料中添加穗花狐尾藻以替代鼠尾藻,并对刺参幼参生长、体成分以及消化酶活性的影响,确定了刺参的生长具有促进作用的穗花狐尾藻的适宜添加比例,为刺参营养学和生产海参专用配合饲料提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

实验用刺参购自辽宁省大连市某养殖场。刺参

\* 辽宁省农业攻关计划重大项目(2011203003)资助。何舟, E-mail: dlou2013@163.com

① 通讯作者: 宋坚, 副研究员, E-mail: dlmel@163.com

收稿日期: 2014-07-04, 收修改稿日期: 2014-08-14

的初始体重为(1.66±0.61) g。试验前,用弗苯尼考溶液消毒,于 1 t 水槽中驯化暂养 14 d。待刺参摄食、排泄等规律后,挑选 450 头规格整齐、体质健壮个体进行实验。

实验用基础饲料鲜穗花狐尾藻采自江苏自然水域,经自然干燥后,100 目粉碎加工。经测定,穗花狐尾藻中含有的营养成分为:粗蛋白(Crude protein) 13.82%,粗脂肪(Crude lipid) 1.77%,粗灰分(Crude ash) 18.74%。海泥粉和鼠尾藻粉购自大连海洋大学海珍苗种培育基地。测得鼠尾藻的营养成分为粗蛋白 17.99%、粗脂肪 3.07%、粗灰分 19.34%。

### 1.2 试验设计和饲养管理

试验于 2013 年 11 月–2014 年 1 月在大连海洋大学农业部北方海水增殖重点实验室进行。采用单因子随机化完全区组设计,设 5 个处理组。每组设 3 个平行重复,每个水槽(50.5 cm×40 cm×38 cm)中饲养 30 头刺参。试验前将各基础原料成分过 100 目筛,充分混合后配制成 5 种不同比例的饲料。饲料成分配比及主要营养成分见表 1。

实验用海水经过砂滤器过滤,盐度为 30 左右, pH 为 8.0 左右,水温保持在 18℃左右。实验期间持续曝气,每天更换 1/3 的新鲜海水,保持溶解氧在 6.0 mg/L 以上。每天 16:00 投喂,投喂的干饲料量为刺参体重的 8%左右,视刺参的摄食、体增重及水温变化等情况及时调整,稍过量投喂。养殖试验持续 75 d。

### 1.3 刺参增重率与存活率的测定

开始与结束时,对各组刺参计数。试验开始前及试验中每 15 d 测定各水槽刺参体重。测定刺参体重前停喂 24 h,将幼参取出,用干滤纸或干毛巾快速吸体表水分至微干,用电子分析天平(感量 0.01 g)称重(Dong *et al.*, 2006)。在整个实验过程中,刺参生长指

标的测定均由同一固定实验人员完成,减小实验误差。按以下公式计算各试验组刺参的增重率(*GR*)和存活率(*SR*):

$$GR = (W_t - W_0) / W_0 \times 100\%$$

$$SR = \frac{N_t}{N_0} \times 100\%$$

式中,  $N_0$  为实验开始时头数,  $N_t$  为实验结束时刺参头数,  $W_0$  为刺参初始体重(g),  $W_t$  为刺参最终体重(g)。

### 1.4 粗酶液的制备及样品粗成分的测定

试验结束时,从各试验组随机选取 15–20 头刺参。将刺参置于冰盘中,用剪刀沿腹部剪开,用镊子将与消化道相连的呼吸树和肠系膜上的脂肪组织小心去除,并用 pH 为 7.2 的磷酸盐缓冲溶液冲洗消化道内含物,获得完整的消化道。将肠表面的水分用滤纸吸干后称重,置于玻璃匀浆器中,加入 0–4℃ 预冷的 pH 为 7.5 的磷酸缓冲液(肠道组织 10 倍重量),于冰浴下充分匀浆(研磨 10–15 min)。将匀浆液置于高速冷冻离心机中,在 4℃ 下以 7000 r/min 离心 30 min,所得上清液即为粗酶液,置于–80℃ 下保存。该提取液必须在 24 h 内进行测定分析(周玮等, 2010; 白燕等, 2012)。

去除肠道及其他组织后,用液氮迅速将体壁冷冻,置于–80℃ 冰箱中保存待测。饲料营养成分和刺参体成分的测定采用 AOAC(1995)的方法。分别用凯氏定氮法、索氏抽提法和马福炉高温灼烧法测定粗蛋白、粗脂肪和粗灰分含量(国标 GB 9695.7-88)。将刺参体壁样品置于烘箱中,于 105℃ 条件下烘干 24 h 以测定水分含量(国标 GB 9695.15-88)(桂远明, 2004)。

### 1.5 刺参消化酶活性和蛋白质浓度的测定

分别采用淀粉-碘显色法、福林-酚法和 3, 5-二

表 1 不同处理组的饲料配方及营养成分  
Tab.1 Dietary composition and general nutritional ingredients of different treatments (%)

原料 Ingredients	组别 Groups					
	A0	A1	A2	A3	A4	
饲料配方 Dietary composition	海泥 Sea mud	40	40	40	40	40
	鼠尾藻粉 <i>S. thunbergii</i> powder	60	45	30	15	0
	穗花狐尾藻粉 <i>M. spicatum</i> powder	0	15	30	45	60
营养成分 General nutritional ingredients	粗蛋白 Crude protein	11.97	11.35	10.76	10.13	9.54
	粗脂肪 Crude lipid	2.95	2.75	2.56	2.36	2.17
	粗灰分 Crude ash	47.22	47.13	47.04	46.95	46.86

注: 饲料的粗蛋白、粗脂肪和灰分含量均基于饲料的干重所得

Note: Contents of protein, lipid and ash were shown with their percentage in dry diet

硝基水杨酸法测定刺参肠道的淀粉酶、蛋白酶和纤维素酶的活性(王吉桥等, 2007)。每种酶重复测定3次, 取其平均值。具体测定方法参考白燕等(2012)。

刺参肠道粗酶液中的蛋白浓度采用南京建成生物技术公司生产的考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒进行测定。其原理、测定方法及酶活力单位定义均参照试剂盒说明书。各个酶活力以比活力表示, 其单位为U/g prot, 表示所用的粗酶液中每毫克酶蛋白所含的活力单位数。

## 1.6 数据处理与分析

对所测得的数据用平均值±标准差(Mean±SD)表示。分别用Excel 2007和SPSS 19.0软件对所得数据进行初步数据处理、图表制作和进一步统计分析。所有数据进行单因子方差分析(One-way ANOVA)后, 并进行Duncan组间多重比较。如果 $P < 0.05$ , 则认为统计学上差异性显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同饲料对刺参生长的影响

摄食不同饲料对刺参GR和SR的影响见表2。

表2 不同饲料对刺参增重率(GR)和成活率(SR)的影响

Tab.2 The growth rate (GR) and survival rate (SR) of *A. japonicus* fed with different diets

生长性能 Growth performance	组别 Groups				
	A0	A1	A2	A3	A4
初始体重 $W_0$ (g)	1.70±0.18	1.67±0.05	1.65±0.07	1.72±0.13	1.69±0.12
15 d 体重 $W_{15}$ (g)	1.94±0.18	1.83±0.10	1.79±0.07	2.01±0.09	2.01±0.18
30 d 体重 $W_{30}$ (g)	2.53±0.18 <sup>ab</sup>	2.27±0.09 <sup>b</sup>	2.27±0.21 <sup>b</sup>	2.47±0.18 <sup>ab</sup>	2.66±0.25 <sup>a</sup>
45 d 体重 $W_{45}$ (g)	2.97±0.13 <sup>b</sup>	2.95±0.08 <sup>b</sup>	2.93±0.13 <sup>b</sup>	3.23±0.16 <sup>ab</sup>	3.49±0.24 <sup>a</sup>
60 d 体重 $W_{60}$ (g)	3.61±0.23 <sup>a</sup>	3.69±0.04 <sup>a</sup>	3.74±0.16 <sup>ac</sup>	4.41±0.24 <sup>bc</sup>	4.47±0.30 <sup>b</sup>
终末体重 $W_t$ (g)	4.08±0.22 <sup>d</sup>	4.18±0.04 <sup>cd</sup>	4.47±0.18 <sup>c</sup>	5.16±0.25 <sup>b</sup>	5.64±0.25 <sup>a</sup>
增重率 GR(%)	140.83±21.63 <sup>d</sup>	150.61±9.53 <sup>cd</sup>	171.61±16.95 <sup>c</sup>	200.55±8.61 <sup>b</sup>	235.02±8.95 <sup>a</sup>
成活率 SR(%)	94.44	95.56	93.33	95.56	97.78

注: 同一行上方参数有一个字母相同则表示无显著差异( $P > 0.05$ )。反之, 则有显著差异( $P < 0.05$ )

Note: The same letters in the same line indicate no statistically significant differences ( $P > 0.05$ ). The different letters indicate statistically significant differences ( $P < 0.05$ )

表3 不同饲料对刺参体成分的影响

Tab.3 The body composition of *A. japonicus* fed with different diets(%)

体成分 Body composition	组别 Groups				
	A0	A1	A2	A3	A4
粗蛋白 Crude protein	45.79±1.21 <sup>b</sup>	46.72±0.28 <sup>b</sup>	47.09±0.84 <sup>b</sup>	49.02±0.12 <sup>a</sup>	50.92±0.28 <sup>a</sup>
粗脂肪 Crude lipid	6.87±1.00 <sup>b</sup>	7.12±0.03 <sup>b</sup>	6.86±0.27 <sup>b</sup>	8.45±0.73 <sup>a</sup>	8.68±0.37 <sup>a</sup>
粗灰分 Crude ash	29.86±1.60	29.40±1.22	28.95±0.61	30.17±1.00	31.21±0.98
水分 Moisture	89.54±0.45	89.78±0.33	90.06±0.27	89.93±0.21	90.32±0.19

注: 同一行中标有不同字母的数据表示处理组差异显著( $P < 0.05$ )

Note: Different letters in the same line indicate statistically significant difference ( $P < 0.05$ )

各处理组中刺参的初始湿重无显著差异( $P > 0.05$ )。在整个实验过程中, 各处理组刺参表现出了不同的生长状况。实验开始的前15 d, A3与A4组刺参的体重增加较快, 但各组间差异不显著( $P > 0.05$ )。实验结束时, A4组刺参的体重显著高于其他4个组( $P < 0.05$ )。经过75 d的试验, 刺参的GR因穗花狐尾藻替代水平的不同而有显著差异( $P < 0.05$ )。各组刺参幼参的GR呈现出了随着替代水平的提高而逐渐增大的趋势。实验结束时, A4组刺参的GR值显著高于其他4个组( $P < 0.05$ ); A3组刺参次之。在成活率方面, A4组刺参最高, 达到了97.78%。

### 2.2 不同饲料对刺参体成分的影响

刺参体壁中粗蛋白、粗脂肪和粗灰分含量是以刺参干重为基础测定的。实验结束时, 饲料中添加不同水平的穗花狐尾藻对粗蛋白和粗脂肪含量有显著影响( $P < 0.05$ )。从表3可以看出, A4组刺参的粗蛋白和粗脂肪含量分别达到了50.92%和8.68%, 都显著高于A0、A1与A2组( $P < 0.05$ ); A3组次之, 其值也分别显著高于A0、A1与A2组( $P < 0.05$ )。但摄食穗花狐尾藻对刺参的粗灰分和水分含量没有显著影响( $P > 0.05$ )。

### 2.3 不同饲料对刺参消化酶的影响

经过 75 d 投喂含不同水平穗花狐尾藻的饲料, 各处理组幼参的 3 种肠道消化酶活性统计情况如表 4 所示。实验结束时, 不同水平的穗花狐尾藻饲料对刺参淀粉酶、蛋白酶活性影响显著( $P < 0.05$ )。其中,

A3 组刺参测得的淀粉酶活性最高(0.83 U/mg prot), 显著高于 A0、A1 与 A2 组( $P < 0.05$ )。5 个处理组刺参的蛋白酶活性与穗花狐尾藻的添加比例呈现正比例关系。其中, A4 组刺参的蛋白酶活力最高(1.62 U/mg prot), 显著高于其他处理组( $P < 0.05$ )。

表 4 不同饲料对刺参消化酶活性的影响  
Tab.4 The enzyme activities of *A. japonicus* fed with different diets(U/mg prot)

消化酶 Digestive enzymes	组别 Groups				
	A0	A1	A2	A3	A4
淀粉酶 Amylase	0.67±0.04 <sup>b</sup>	0.66±0.03 <sup>b</sup>	0.73±0.04 <sup>b</sup>	0.83±0.04 <sup>a</sup>	0.82±0.05 <sup>a</sup>
蛋白酶 Protease	1.12±0.04 <sup>d</sup>	1.20±0.04 <sup>d</sup>	1.32±0.05 <sup>c</sup>	1.49±0.05 <sup>b</sup>	1.62±0.05 <sup>a</sup>
纤维素酶 Cellulase	0.66±0.04	0.65±0.04	0.69±0.02	0.70±0.03	0.68±0.03

注: 同一行中标有不同字母的数据表示数值间差异显著( $P < 0.05$ )

Note: Different letters in the same line indicate statistically significant difference ( $P < 0.05$ )

摄食不同水平的穗花狐尾藻饲料刺参的纤维素酶活性呈现出一定差异性, 但不同饲料对其活性不具有显著性影响( $P > 0.05$ )。其中, A3 组刺参的纤维素酶活性最高, 其值达到了 0.70 U/mg prot, 与 A1 组相比接近显著。

## 3 讨论

### 3.1 不同饲料对刺参生长的影响

刺参的生长与水温、水质、pH、盐度和光照等因素有着密切联系, 在保证这些条件基本一致的情况下, 刺参的生长主要受到饲料营养成分和饲料适口性的影响, 因此, 刺参食用饲料将直接影响到刺参育苗与养殖生产的成败。朱伟等(2005)研究表明, 实验刺参的最佳蛋白质和脂肪需要量分别为 18.21%–24.18%和 5%。Sun 等(2004)报道饲料中蛋白含量在 21.49%时刺参生长较好。与前者研究结果相比, 本研究中饲料蛋白含量有些偏低。但是, 一些海洋食草动物对营养含量越低的饲料摄食的频率越大(Perry *et al*, 1997)。摄食模式显示, 采食者会通过优化其摄入的能量或限制某些过度营养化的营养素, 以便保证自身的健康生长(Perry *et al*, 1997)。因此, 虽然穗花狐尾藻的蛋白质含量不高, 但由于其适口性较好, 刺参的摄食量较大。这与 Liu 等(2009)的研究结果相同, 认为当混合饲料中海藻的比例降低时, 刺参的摄食率增长显著。

### 3.2 不同饲料对刺参体成分的影响

研究结果显示, 刺参体壁蛋白质含量与饲料中穗花狐尾藻的添加量成正比例关系。蛋白质的消化吸收与适宜的纤维素含量有关, 纤维物质可以刺激动物的

胃肠蠕动, 促进消化酶的分泌, 进而提高动物对蛋白质的吸收效率, 但过高的纤维素含量对饲料中蛋白质的消化和吸收还有一定的阻碍作用, 会加快蛋白质在消化道中的排空速度, 缩短蛋白质在肠道中被消化吸收的作用时间和机率(胡喜峰等, 2005)。本研究结果显示, 穗花狐尾藻的适口性较好, 其蛋白质易吸收, 可能与穗花狐尾藻纤维素含量较为适宜有关, 不仅能刺激消化酶的产生, 促进对各种营养物质的消化和吸收, 同时蛋白质的排空速度也较为适宜, 提高了蛋白质的沉积率。

### 3.3 不同饲料对刺参消化酶的影响

研究发现, 在所测的 3 种肠道消化酶活性中, 蛋白酶的活性明显高于淀粉酶和纤维素酶, 淀粉酶次之。研究表明, 在所测得消化酶中蛋白酶和淀粉酶是刺参肠道的主要消化酶, 这与王吉桥等(2007)的研究结果相一致。

Hassett 等(1990)研究认为, 动物可以通过调节自身的酶活性以提高从周围环境中获取营养成分的能力。本研究中, 刺参的蛋白酶活力水平较其他酶高, 说明刺参对蛋白质有较高的需求量, 因此其对蛋白质的消化能力也较强。另外, 研究结果显示, 鼠尾藻的蛋白质含量高于穗花狐尾藻, 饲料蛋白质含量为 A0>A1>A2>A3>A4, 而刺参肠道蛋白酶的活性与饲料蛋白质含量呈相反趋势。首先, 刺参蛋白酶活性的升高说明其摄入的蛋白质含量在逐渐增加, 即刺参逐渐提高了摄食率(Jones *et al*, 1997; 杨代勤等, 2003)。因为动物的消化酶对不同的饲料具有一定的适应性(Gangadhara *et al*, 1997)。饲料中某种营养成分的改

变会引起消化该成分的消化酶的变化,以便能够更好地消化所摄取的食物(Sabat *et al.*, 2005)。虽然鼠尾藻的蛋白质含量高于穗花狐尾藻,但如 3.2 中所分析的,由于穗花狐尾藻的适口性更好,且纤维素含量较为适宜,其蛋白质被吸收及被利用率更高一些,导致刺参体内蛋白酶活性及体成分中蛋白质的含量随着穗花狐尾藻含量的增加而呈递增趋势。因此,刺参的食性与肠道消化酶的种类及活力是密切相关的(王吉桥等, 2007)。

本研究中,刺参消化道中的纤维素酶活性较低,而幼参在自然环境中的食物组成中大部分是藻类的碎屑,其纤维素含量相对较高。但是,刺参的肠道菌群环境为其生存所必需(Dybas *et al.*, 2002)。在刺参的消化管中存在着大量的以弧菌属细菌和假单胞菌属细菌为主的不同菌群,而刺参肠道中微生物主要来源于所吞食的泥沙中。由此推想,刺参消化道中的纤维素酶可能不是自身分泌的,而是消化管中的微生物产生的,这与王吉桥等(2007)的研究结果相同。所以,将海泥粉作为重要的饲料原料之一,在刺参的实际生产中是必不可少的。因此,在养殖水体中加入生态制剂或在海参饲料中添加有益微生物(付鑫等, 2011),或将植物性饲料经发酵等(朱建新等, 2009; 姜燕等, 2012)处理后再使用,便可很好地被刺参所吸收利用,从而提高饲料的饲料系数,促进刺参的生长。

#### 4 结 语

对于试验刺参来说,添加 60%的穗花狐尾藻粉,即完全替代鼠尾藻时,养殖水体水质清澈,刺参的消化酶活性高,提高了刺参的生长率。添加比例低于 60%,刺参的 GR 会降低。同时添加 60%左右穗花狐尾藻后,刺参体成分中的粗蛋白含量明显增加,表明适当比例的藻粉(60%左右)能够显著促进刺参的生长。相比资源锐减的鼠尾藻,穗花狐尾藻在中国具有分布广泛、生长迅速、再生能力强等特点,因此,在刺参规模化养殖中以穗花狐尾藻替代自然资源日益匮乏的鼠尾藻是经济可行的。本研究为刺参营养学和生产刺参专用的配合饲料提供了参考。

#### 参 考 文 献

- 于延球. 江苏沿海地区原色种子植物志: 裸子植物和双子叶植物离瓣花类. 北京: 科学出版社, 2008, 287-288
- 王吉桥, 于红艳, 姜玉声, 等. 饲料中用陆生植物淀粉替代鼠尾藻粉对仿刺参幼参生长和消化的影响. 大连海洋大学学报, 2010, 25(6): 535-541
- 王吉桥, 唐黎, 许重, 等. 仿刺参消化道的组织学及其 4 种消化酶活力的周年变化. 水产科学, 2007, 26(9): 481-484
- 王际英, 宋志东, 李培玉, 等. 饲料添加半乳甘露寡糖对刺参幼参生长、体壁营养组成及免疫力的影响. 中国水产科学, 2014, 21(2): 310-319
- 白燕, 王维新. 刺参肠道蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶与纤维素酶活性的测定方法. 饲料工业, 2012, 33(20): 28-32
- 付鑫, 吴垠, 苏显屹, 等. 添加微生态制剂及投饲模式对幼刺参生长的影响. 水产科学, 2011, 30(12): 739-743
- 朱伟, 麦康森, 张百刚, 等. 刺参稚参对蛋白质和脂肪需求量的初步研究. 海洋科学, 2005, 29(3): 54-58
- 朱建新, 曲克明, 李健, 等. 不同处理方法对浒苔饲喂稚幼刺参效果的影响. 渔业科学进展, 2009, 30(5): 108-112
- 朱建新, 刘慧, 冷凯良, 等. 几种常用饲料对稚幼参生长影响的初步研究. 海洋水产研究, 2007, 28(5): 48-53
- 杨代勤, 严安生, 陈芳, 等. 不同饲料对黄鳍消化酶活性的影响. 水产学报, 2003, 27(6): 558-563
- 周玮, 田甲申, 黄俊鹏, 等. 不同生长阶段仿刺参肠道内含物及消化酶活性的变化. 大连海洋大学学报, 2010, 25(5): 460-464
- 钟爱文, 曹特, 张萌, 等. 光照和黑暗条件下苦草(*Vallisneria natans*)和穗花狐尾藻(*Myriophyllum spicatum*)对铵态氮的吸收. 湖泊科学, 2013, 25(2): 289-294
- 胡喜峰, 王成章, 张春梅, 等. 不同水平苜蓿草粉对团头鲂生长性能及肉品质的影响. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2005, 33(11): 49-56
- 姜燕, 王印庚, 薛太山, 等. 刺参池塘养殖系统中发酵饲料的制作与投喂. 渔业科学进展, 2012, 33(1): 66-71
- 袁成玉. 海参饲料研究的现状与发展方向. 水产科学, 2005, 24(12): 54-56
- 桂远明. 水产动物机能学实验. 北京: 中国农业出版社, 2004, 113-120
- 郭娜, 董双林, 刘慧. 几种饲料原料对刺参幼参生长和体成分的影响. 渔业科学进展, 2011, 32(1): 122-128
- 常亚青, 丁君, 宋坚, 等. 海参、海胆生物学研究与养殖. 北京: 海洋出版社, 2004, 3
- 常亚青, 于金海, 马悦欣. 刺参健康增殖实用新技术. 北京: 海洋出版社, 2009, 1: 87
- 焦立新, 王圣瑞, 金相灿. 外源  $\text{NH}_4^+$  对穗花狐尾藻根系形态和养分吸收的影响. 生态学报, 2010, 30(7): 1817-1824
- 樊月居, 李晓东, 罗智, 等. 饲料中用豆粕替代鱼粉对仿刺参幼参生长、体成分及消化酶活性的影响. 大连水产学院学报, 2010, 25(1): 71-75
- 廖玉麟. 中国动物志·棘皮动物门·海参纲. 北京: 科学出版社, 1997, 50
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official methods of analysis of official analytical chemists international, 16th Edn. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA, 1995
- Dong YW, Dong SL, Tian XL, *et al.* Effects of diet temperature fluctuations on growth, oxygen consumption and proximate body composition in the sea cucumber *Apostichopus*

- japonicus* Selenka. Aquacult, 2006, 255(1-4): 514-521
- Dybas L, Fankboner PV. Holothurian survival strategies: Mechanisms for the maintenance of a bacteriostatic environment in the coelomic cavity of the sea cucumber. Aquacult Res, 2002(33): 112-116
- Gangadhara B, Nandeesha MC, Varghese TJ, et al. Effect of varying protein and lipid levels on the growth of Rohu, *Labeo rohita*. Asian Fish Sci, 1997, 10(2): 139-147
- Jones DA, Kumlu M, Vay LLE, et al. The digestive physiology of herbivorous, omnivorous and carnivorous crustacean larvae: a review. Aquacult, 1997, 155(1): 285-295
- Liu Y, Dong S, Tian X, et al. Effects of dietary sea mud and yellow soil on growth and energy budget of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka). Aquacult, 2009, 286(3-4): 266-270
- Okorie OE, Ko SH, Go S, et al. Preliminary study of the optimum dietary ascorbic acid level in sea cucumber, *Apostichopus japonicus* (Selenka). J World Aquacult Soc, 2008, 39(6): 758-765
- Perry G, Pianka ER. Animal foraging: past, present and future. Trends Ecol & Evol, 1997, 12(9): 360-364
- Sabat P, Riveros JM, López-Pinto C. Phenotypic flexibility in the intestinal enzymes of the African clawed frog *Xenopus laevis*. Comp Biochem Physiol, 2005, 140(1): 135-139
- Sun HL, Liang MQ, Yan JP, et al. Nutrient requirements and growth of the sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. In: Advances in Sea Cucumber Aquaculture and Management. FAO, Rome, 2004, 327-331

(编辑 冯小花)

## Effects of Adding *Myriophyllum spicatum* L. Meal in Diets on the Growth, Body Composition and Digestive Enzymes Activities of Juvenile Sea Cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka)

HE Zhou, SONG Jian<sup>①</sup>, CHANG Yaqing, CHENG Long, NING Junhao, PANG Yunlong, MA Li

(Key Laboratory of Mariculture and Stock Enhancement in North China's Sea, Ministry of Agriculture, Dalian Ocean University, Dalian 116023)

**Abstract** To investigate whether *Myriophyllum spicatum* can substitute *Sargassum thunbergii* in sea cucumber culture industry, five diets containing 0(A0), 15%(A1), 30%(A2), 45%(A3) and 60% (A4) *Myriophyllum spicatum* meal were formulated to identify the effect of substituting *M. spicatum* L. in growth performance, body composition and digestive enzymes activities. The results showed that the growth rate (GR) of sea cucumbers in group A4 was significantly higher than other groups, and that sea cucumbers in group A4 showed the best survival rate (SR) (97.78%). Significantly higher crude protein content was observed in group A4 (50.92%) compared with other groups ( $P<0.05$ ). The amylase activity of group A3 (0.83 U/g prot) was significantly higher than other groups ( $P<0.05$ ). The protease activity in group A4 (1.62 U/g prot) was significantly higher than all other groups ( $P<0.05$ ). The results of this study provide strong evidence to replace *S. thunbergii* with *M. spicatum* L. in the sea cucumber culture industry.

**Key words** *Myriophyllum spicatum* L.; *Apostichopus japonicus*; Growth; Body composition; Digestive enzymes

① Corresponding author: SONG Jian, E-mail: dlmel@163.com

# 恩诺沙星和环丙沙星在泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)体内的残留和消除规律\*



孙慧宇<sup>1①</sup> 陈君义<sup>1</sup> 王云飞<sup>1</sup> 顾开朗<sup>2</sup>

(1. 徐州出入境检验检疫局 徐州 221006; 2. 徐州生物工程职业技术学院 徐州 221006)

**摘要** 通过研究恩诺沙星与环丙沙星在泥鳅体内的残留和消除规律,为水产养殖业提供合理的给药方案和休药期。试验前,从养殖场购买的泥鳅在试验水质条件下暂养7 d后,分成3组投放入不同水温的养殖系统中。以恩诺沙星与环丙沙星作为目标化合物,以拌料给药的方式,按20 mg/kg鱼体重的剂量每天投喂1次,连续投喂7 d后,对15、20、25℃3种水温条件下,目标化合物在泥鳅体内的残留和消除规律进行了研究。试验结果显示,恩诺沙星与环丙沙星均按一级动力学过程从泥鳅体内消除,且水温对喹诺酮类药物的代谢衰减消除速率有很大影响,在25、20、15℃水温条件下,泥鳅体内的恩诺沙星代谢至10.0 μg/kg以下分别需要25、32、50 d,环丙沙星则分别需要27、31、33 d。由于徐州及周边地区的泥鳅主要输往韩国,其对喹诺酮类药物的限量要求是不超过10 μg/kg,因此,在本试验条件下,建议合理的休药期应不少于32 d。

**关键词** 恩诺沙星;环丙沙星;泥鳅;残留;消除

**中图分类号** S948 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)04-0128-04

喹诺酮类药物因其抗菌谱广、抗菌力强、作用迅速、毒副作用小、价格低廉等特点,被广泛应用于畜禽和水产养殖业,用于防治动物的细菌性疾病(陈辉等,2003;刘艳辉等,2001)。由于缺乏相应的理论指导,为使用过程中普遍存在药物滥用的现象,从而使得喹诺酮类药物对畜禽和水产动物产生毒副作用,并且影响生态环境。目前,国内已有不少关于动物源性食品中喹诺酮类药物残留超标的报道(鹿文婷等,2014;张秋萍等,2012a、b)。此外,欧盟、美国、加拿大、日本、澳大利亚等许多国家和地区已将其列为禁用或限用药物,我国于2002年颁布的《无公害食品渔用药物使用准则》(N5071-2002)中,也已明确将环丙沙星列为禁用药。目前,国内外已对恩诺沙星及环丙沙星在水产动物体内的药物动力学和残留情况进行了研究(李娜等,2009;张德云等,2007;郭海燕等,2008;高爱欣等,2007;简纪常等,

2005; Dario *et al*, 2004; Emmerson *et al*, 2003; Intorre *et al*, 2000),但有关恩诺沙星(ENR)及环丙沙星(CIP)在养殖活泥鳅体内的残留及消除规律尚未见报道。

泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)是我国水产品出口的重要品种之一,每年的出口额达数千万美元。作为江苏地区出口的优势品种,泥鳅出口一直占据着韩国绝大部分市场份额。自我国加入WTO后,韩国等主要进口国对泥鳅体内的药物残留要求越来越高,输往韩国的养殖水产品中恩诺沙星与环丙沙星的限量曾一度要求均不得超过10 μg/kg,使泥鳅养殖产业和出口检测均面临巨大的挑战。因此,研究喹诺酮类药物在泥鳅体内的残留和消除特点,具有重要的经济效益和社会效益。本研究以泥鳅为受试对象,探索了恩诺沙星和环丙沙星在15、20、25℃的水体中在泥鳅体内的衰减消除规律,为水产养殖业提供相应的给药方案、确定合理的休药期,为食品安全监管提供科学支持。

\* 徐州出入境检验检疫局科研计划项目(2013XZKJ01)资助

① 通讯作者:孙慧宇,工程师, E-mail: sunhuiyu\_1984@126.com

收稿日期:2014-06-24, 收修改稿日期:2014-07-30

## 1 材料与方法

### 1.1 试验对象与养殖条件

试验用泥鳅于2013年9月购自江苏省徐州市睢宁某泥鳅养殖厂,平均体长为(15±1) cm,平均体重为(13±2) g。实验前在养殖系统内暂养7 d,试验用水为曝气水,持续充氧,保持水中溶氧>8.0 mg/L,保证水中的pH为7.5–8.5。暂养期间,养殖密度低于10尾/10 L,每天09:00–10:00虹吸排污并换水50%,16:00投喂饲料1次。饲喂不加抗菌药物的泥鳅配合饲料,日投喂量为泥鳅体重的1%。投药试验前经确认泥鳅无恩诺沙星和环丙沙星残留。

### 1.2 仪器与试剂

API4000型液质联用仪(LC-MS/MS,美国AB公司,配ESI源)。

试验用恩诺沙星与环丙沙星购自浙江国邦药业有限公司(纯度≥98.5%);恩诺沙星与环丙沙星标准品购自Dr. Ehrenstorfer公司。乙腈、甲酸为色谱纯,正己烷、乙酸、异丙醇为分析纯,去离子水。

### 1.3 饲养与样品采集

恩诺沙星和环丙沙星分两批进行试验。每批试验设置3个对照组,分别控制温度为15、20、25℃。试验鱼需预先分别投喂含2‰恩诺沙星或2‰环丙沙星的药饵,给药方式为拌料给药,投喂量为鱼体重的1%,即按20 mg/kg鱼体重的剂量,每天投喂1次,

连续投喂7 d,然后投喂不含喹诺酮类药物的一般饵料。在最后一次投喂药饵后的3 h、6 h、12 h、1 d、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d、8 d、10 d、15 d、20 d、30 d、40 d、50 d,分别采集泥鳅肌肉组织样品(可食部分),置于-20℃冰箱中备用。每次采集泥鳅30尾,5尾为1组,共6个平行。

### 1.4 样品处理

称取5.00 g均匀样品于50 ml离心管中,加15 ml乙腈(含1%乙酸),涡旋1 min后超声提取5 min,3500 r/min离心5 min,收集上清液。重复上述提取步骤1次,合并上清液。加入15 ml正己烷,混合,离心,弃去正己烷层。将乙腈层转移入鸡心瓶中,加5 ml异丙醇,旋转蒸干。用流动相定容,过0.45 μm滤膜,待测定(陈君义等,2013)。

### 1.5 色谱与质谱条件

**1.5.1 液相色谱参数** 色谱柱为Eclipse XDB-C18 (Agilent, 150 mm×4.6 mm×5 μm),柱温为30℃,流速为600 μl/min,进样量为25 μl,流动相为水(含0.1%的甲酸, A)和乙腈(含0.1%的甲酸, B)。梯度洗脱程序:0–5.5 min, A相从87%线性降至10%,保持2 min; 7.5–7.6 min内A相快速恢复至87%, 7.6–14 min, A相恒定为87%。

**1.5.2 质谱参数** 采用电喷雾离子源,通过正离子模式、5500 V电压、多反应监测(MRM)方式对恩诺沙星和环丙沙星进行测定。参数详见表1。

表1 恩诺沙星和环丙沙星的质谱参数

Tab.1 Mass spectrometric parameters of enrofloxacin and ciprofloxacin

化合物 Compounds	母离子 Precursor ion	子离子 Product ion	DP(V)	CE(V)	定量离子对 Quantitative ions
恩诺沙星 Enrofloxacin	360.1	342.1	79	30	360.1/316.2
		316.2	84	28	
环丙沙星 Ciprofloxacin	332.2	314.1	75	29	332.2/231.1
		231.1	70	48	

## 2 结果与讨论

### 2.1 标准工作曲线

试验采用外标法定量,用流动相配制1000、400、100、50、10、5 μg/L的混合标准溶液系列,以LC-MS/MS法分别测定峰面积,绘制标准曲线。该方法检出限为1.0 μg/L。

### 2.2 回收率及精密度试验

以阴性泥鳅样品作为测试样品,并向其中加入标

准溶液,放置40 min以上,使药物充分渗入样品中,分别制成含恩诺沙星/环丙沙星为5.0、10.0和20.0 μg/kg的样品。按1.4步骤处理样品后进行检测,所得浓度数值与标准溶液测定的浓度数值相比,即为回收率,每个浓度6个平行,结果见表2。

### 2.3 泥鳅体内的药物消除

试验显示,在3个温度条件下,随休药时间的延长,泥鳅体内恩诺沙星及环丙沙星的浓度均逐渐下降(图1、图2)。

表2 回收率和方法精密度测定

Tab.2 Determination of the recovery rate and RSD of the method

化合物 Compounds	5.0 µg/kg		10.0 µg/kg		20.0 µg/kg	
	回收率 Recovery rate (%)	RSD (%)	回收率 Recovery rate (%)	RSD (%)	回收率 Recovery rate (%)	RSD (%)
恩诺沙星 Enrofloxacin	59.2–78.4	8.88	81.8–86.9	2.23	61.8–78.3	9.85
环丙沙星 Ciprofloxacin	62.0–73.2	6.53	90.6–105.8	5.19	75.4–88.9	7.32

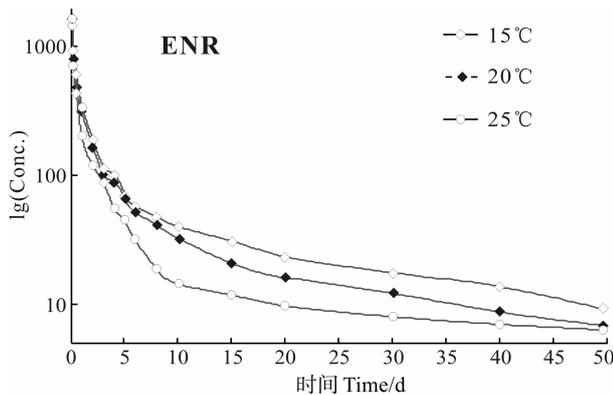


图1 不同温度条件下恩诺沙星在泥鳅体内的药-时曲线  
Fig.1 The concentration of enrofloxacin in *M. anguillicaudatus* under different experimental conditions

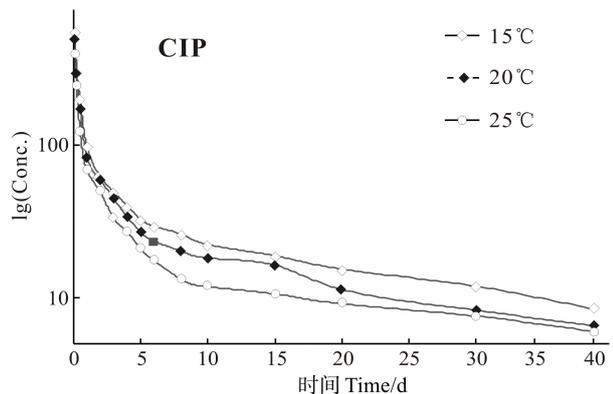


图2 不同温度条件下环丙沙星在泥鳅体内的药-时曲线  
Fig.2 The concentration of ciprofloxacin in *M. anguillicaudatus* under different experimental conditions

从图1和图2可以看出,在代谢的前5 d,恩诺沙星与环丙沙星均保持较快的消除速率,从第5天起,3个温度条件下的代谢浓度均保持稳定下降,但下降速度缓慢。

#### 2.4 休药期的确定

休药期是根据食用组织中药物允许残留量及药物的消除速度来确定的,绝大多数药物的体内吸收、分布、代谢和消除符合或近似一级动力学过程,目标物的消除曲线可拟合成指数方程  $C_t = C_i e^{-t}$  (式中,  $C_i$  为初始浓度)。通过统计分析,本研究中恩诺沙星与

环丙沙星在泥鳅体内的消除也近似一级动力学过程,消除方程见表3。根据公式计算,在25、20、15°C水温条件下,泥鳅体内的恩诺沙星代谢至10.0 µg/kg以下分别需要25、32、50 d,环丙沙星分别需要27、31、33 d,说明水温对代谢衰减消除速率有很大影响。黄金田等(2011)、湛嘉等(2003)研究发现,25°C的水温环境更接近动物体内相关代谢酶的适温条件,因此药物消除更快。另外,在适宜温度范围内,泥鳅的生长速率、摄食量以及排泄量都会有所提高,从而加速其体内残留药物的代谢过程。

表3 目标化合物的消除曲线方程及参数

Tab.3 The equation and the parameters of elimination curves of enrofloxacin and ciprofloxacin

组别 Group	消除曲线方程 Equation of elimination curve	$R^2$	$\beta$ ( $h^{-1}$ )	$T_{1/2}$ (d)
ENR-15°C	$c = 2885.6 e^{-0.114 t}$	0.968	0.114	6.08
ENR-20°C	$c = 2583.1 e^{-0.174 t}$	0.959	0.174	3.98
ENR-25°C	$c = 1793.6 e^{-0.213 t}$	0.976	0.213	3.25
CIP-15°C	$c = 782.8 e^{-0.132 t}$	0.970	0.132	5.25
CIP-20°C	$c = 689.0 e^{-0.135 t}$	0.981	0.135	5.13
CIP-25°C	$c = 574.5 e^{-0.145 t}$	0.982	0.145	4.78

由于出口韩国养殖水产品中恩诺沙星与环丙沙星的限量均不得超过10.0 µg/kg,根据研究结果中恩诺沙星与环丙沙星在泥鳅体内的消除规律,建议在20°C左右的水温下,以20 mg/kg剂量连续饲喂7 d,恩诺沙星与环丙沙星在泥鳅体内的临床休药期应不小于32 d。

由于药物消除受许多因素影响,除水温之外,给药剂量、给药方式、光照条件、水质条件、种属等也会对消除速度产生一定的影响(Palominos *et al*, 2008; Nieto *et al*, 2008)。因此,临床休药期还要根据具体养殖种类、实际养殖环境分别进行研究确定。

### 3 结论

恩诺沙星和环丙沙星在泥鳅体内的消除近似为一级动力学过程,25°C水温下消除较快。考虑实际养

殖水温和施药因素, 建议休药期不少于 32 d。

## 参 考 文 献

- 刘艳辉, 张雅斌, 祖岫杰, 等. 第三代喹诺酮类药物及其在淡水鱼类病害防治中的应用. 河北渔业, 2001(3): 11-12
- 李娜, 李健, 王群. 恩诺沙星在养殖大菱鲆体内的残留及消除规律. 渔业科学进展, 2009, 30(2): 26-33
- 张秋萍, 王春民, 李建. 苏州市动物性食品中喹诺酮类抗生素的残留状况. 职业与健康, 2012a, 28(18): 2257-2258
- 张秋萍, 李建, 王春民. 苏州市水产品中喹诺酮类抗生素残留水平及安全性评价. 中国卫生检验杂志, 2012b, 22(10): 2417-2418, 2422
- 张德云, 匡维华, 郑映钦. 恩诺沙星在日本鳗鲡体内残留消除规律研究. 水产科学, 2007, 26(4): 210-213
- 陈君义, 孙慧宇, 高翔, 等. 液相色谱-串联质谱法同时测定泥鳅中 6 种喹诺酮类药物残留. 食品科技, 2013, 38(3): 324-327
- 陈辉, 杨先乐. 渔用药无公害使用技术. 北京: 中国农业出版社, 2003, 151-158
- 高爱欣, 李健, 王群, 等. 恩诺沙星在菲律宾蛤仔体内的消除规律研究. 海洋科学, 2007, 31(7): 32-36
- 郭海燕, 马跃岗, 朱林, 等. 氟喹诺酮类药物在水产动物体内的药动学和残留规律. 水生态学杂志, 2008, 29(1): 34-41
- 黄金田, 丁涛, 郑浩, 等. 盐酸环丙沙星在中华绒螯蟹体内的衰减研究. 渔业科学进展, 2011, 32(2): 66-69
- 鹿文婷, 刘萍, 焦海涛, 等. 济南市售肉制品中喹诺酮类兽药残留调查. 中国公共卫生, 2014, 30(1): 122-124
- 湛嘉, 李佐卿, 康继韬, 等. 影响水产动物药代动力学的因素. 中国兽药杂志, 2003, 37(12): 38-41
- 简纪常, 吴灶和, 陈刚. 恩诺沙星在眼斑拟石首鱼体内的药物代谢动力学. 中国兽医学报, 2005, 25(2): 195-197
- Dario L, Laura F, Emilio G, *et al.* Long depletion time of enrofloxacin in rainbow trout. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(10): 3912-3917
- Emmerson AM, Jones AM. The quinolones: decades of development and use. J Antimicrob Chemother, 2003, 51(Z1): 13-20
- Intorre L, Cecchini S, Bertini S, *et al.* Pharmacokinetics of enrofloxacin in the sea bass. Aquaculture, 2000, 182(1): 49-59
- Nieto J, Freer J, Contreras D, *et al.* Photo catalyzed degradation of flumequine by doped TiO<sub>2</sub> and simulated solar light. J Hazard Mater, 2008, 155(1-2): 45-50
- Palominos R, Freer J, Mondaca MA, *et al.* Evidence for hole participation during the photocatalytic oxidation of the antibiotic flumequine. J Photochem Photobiol A: Chem, 2008, 193(2-3): 139-145

(编辑 冯小花)

## The Residues and Elimination of Enrofloxacin and Ciprofloxacin in Loach *Misgurnus anguillicaudatus*

SUN Huiyu<sup>1</sup>⊙, CHEN Junyi<sup>1</sup>, WANG Yunfei<sup>1</sup>, GU Kailang<sup>2</sup>

(1. Xuzhou Entry-Exit Inspection & Quarantine Bureau, Xuzhou 221006;  
2. Xuzhou Vocational College of Bioengineering, Xuzhou 221006)

**Abstract** In recent years, with the rigorous limits on drug residues in the loach *Misgurnus anguillicaudatus* from importing countries, the *M. anguillicaudatus* exporting enterprises and the export inspections are facing enormous challenges in drug use and control. The current study investigated the residues and elimination of enrofloxacin (ENR) and ciprofloxacin (CIP) in *M. anguillicaudatus* to provide a reasonable dosing plan and withdrawal period for the aquaculture industry. The loach *M. anguillicaudatus* purchased from an aquaculture farm were fed 7 days to adapt the experimental water quality and then divided into three groups at different temperatures, and fed with enrofloxacin or ciprofloxacin at a dosage of 20 mg/kg per day for 7 consecutive days. Samples were collected at various time points to measure the contents of ENR and CIP by the high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). The results showed that both the elimination of ENR and CIP were complied with the first-order kinetics, and the water temperature significantly affected the elimination rate of both drugs. At 25°C, 20°C and 15°C, it took 25, 32 and 50 days, respectively, for the enrofloxacin compound metabolized to less than 10.0 μg/kg in the body of *M. anguillicaudatus*. It took 27, 31 and 33 days for ciprofloxacin to metabolize to less than 10.0 μg/kg. Based on the South Korea limits of no more than 10 μg/kg for quinolones in *M. anguillicaudatus*, a withdrawal period of 32 days is recommended for the *M. anguillicaudatus* exporters by considering the actual culturing environments in Xuzhou and nearby area.

**Key words** Enrofloxacin; Ciprofloxacin; *Misgurnus anguillicaudatus*; Residue; Elimination

⊙ Corresponding author: SUN Huiyu, E-mail: sunhuiyu\_1984@126.com

# 气相色谱-质谱法测定渔业水质中 8种除草剂的残留量\*



罗方方 王艳君 叶玫<sup>①</sup> 余颖 刘海新 姜琳琳

(福建省水产研究所 厦门 361012)

**摘要** 本研究建立了测定渔业水质中氟乐灵、二甲戊灵、甲草胺、乙草胺、丁草胺、西玛津、莠去津、扑草净 8 种除草剂残留量的气相色谱-质谱法。样品用氯化钠调节盐度至 20–30, 二氯甲烷提取, 无水硫酸钠除水, 过弗罗里硅土固相萃取小柱净化, 利用气相色谱-质谱法, 以选择离子监测模式检测, 外标法进行定量分析。采用基质匹配标准溶液校准法, 8 种除草剂在 0.010–1.000  $\mu\text{g/L}$  范围内线性良好,  $R^2$  均大于 0.990; 方法检出限以信噪比  $\geq 3$  估算, 检出限分别为: 氟乐灵 0.022  $\mu\text{g/L}$ 、西玛津 0.031  $\mu\text{g/L}$ 、莠去津 0.028  $\mu\text{g/L}$ 、乙草胺 0.038  $\mu\text{g/L}$ 、甲草胺 0.041  $\mu\text{g/L}$ 、扑草净 0.035  $\mu\text{g/L}$ 、二甲戊灵 0.025  $\mu\text{g/L}$ 、丁草胺 0.020  $\mu\text{g/L}$ 。选择 0.05、0.5 和 2.0  $\mu\text{g/L}$  3 个不同浓度水平做加标回收, 平均回收率为 74.7%–97.7%, 相对标准偏差在 12.0% 以内。方法检出限分别为: 氟乐灵 0.022  $\mu\text{g/L}$ 、西玛津 0.031  $\mu\text{g/L}$ 、莠去津 0.028  $\mu\text{g/L}$ 、乙草胺 0.038  $\mu\text{g/L}$ 、甲草胺 0.041  $\mu\text{g/L}$ 、扑草净 0.035  $\mu\text{g/L}$ 、二甲戊灵 0.025  $\mu\text{g/L}$ 、丁草胺 0.020  $\mu\text{g/L}$ , 最低定量限均为 0.05  $\mu\text{g/L}$ 。该方法具有操作简便、准确性好、灵敏度高、重现性好等优点, 可为渔业水质中这 8 种除草剂残留的监测提供技术支持。

**关键词** 除草剂; 渔业水质; 气相色谱-质谱法; 检测

**中图分类号** S949 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)04-0132-07

除草剂广泛长期的大量使用, 对渔业生态环境和水产健康养殖造成直接或间接危害。除草剂直接影响浮游、底栖植物光合作用、固氮作用, 破坏和改变渔业初级生态种群结构及生物链(沈国兴等, 1999)。除草剂在水中通过鳃直接进入鱼类的代谢循环, 对鱼类、甲壳类的急、慢毒性和积蓄性比对哺乳动物大得多(Kovriznych *et al.*, 1998)。近年来, 因水源除草剂污染引发的渔业污染事故时有发生, 造成养殖水产品的除草剂残留超标, 引起业内外的高度关注(<http://news.foodmate.net>, 2013; 李庆鹏等, 2014)。欧盟规定水中单种除草剂的最大残留限量为 0.1  $\mu\text{g/L}$ , 美国环保局(EPA)规定水中莠去津最大残留限量为 3  $\mu\text{g/L}$ , 我国饮用水标准规定莠去津最大残留限量为 2  $\mu\text{g/L}$ (聂志强等, 2008), 但我国尚无水产养殖环境中除草剂

残留的限量标准, 在检测项目方面, 仅做单类除草剂的残留检测(董茂峰等, 2008; 马又娥等, 2011; 郑和辉等, 2001; 李竺等, 2006; 任晋等, 2001; GB/T 21925-2008, 2008; 杨梅等, 2008; 潘文碧等, 2010; 李伶俐等, 2012), 满足不了水产养殖对除草剂的监控要求。

目前, 国内外水质除草剂的检测方法主要有气相色谱法(董茂峰等, 2008; 马又娥等, 2011)、高效液相色谱法(郑和辉等, 2001; 李竺等, 2006)、液相色谱-质谱法(任晋等, 2001; GB/T 21925-2008, 2008)、气相色谱-质谱法(杨梅等, 2008; 潘文碧等, 2010)和免疫胶体金法(李伶俐等, 2012)。其中, 气相色谱法和高效液相色谱法仅以保留时间来定性, 容易出现假阳性结果。液相色谱-质谱联用法和气相色谱-质谱法利用被测样品离子质荷比, 定性定量更加准确, 检测灵敏度

\* 福建省省属公益类科研院所基本科研专项(2012R1101-5)资助。罗方方, E-mail: lzxdlfu2007@aliyun.com

① 通讯作者: 叶玫, 研究员, E-mail: yemei808@sohu.com

收稿日期: 2014-06-27, 收修改稿日期: 2014-11-03

更高,对复杂基质中痕量除草剂残留检测有技术优势。

本研究建立了适用于渔业水质除草剂残留的气相色谱-质谱检测方法,该方法可同时检测在渔业环境和水产品质量安全方面存在较大风险的二硝基苯胺类、酰胺类和三嗪类这3类除草剂残留,分别是氟乐灵、二甲戊灵、甲草胺、乙草胺、丁草胺、西玛津、莠去津、扑草净。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 仪器** Thermo Trace DSQ 单四极杆气相色谱-质谱仪(美国热电公司); DB-5MS 色谱柱(30 m×0.25 μm×0.25 mm, 美国 Agilent 公司); 多参数分析仪 Multi 3430 A235J (德国 WTW 公司); KQ-600DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); DT5-5 离心机(北京时代北利离心机有限公司); W201 型恒温水浴锅(上海申生科技有限公司); R 系列旋转蒸发器(上海申生科技有限公司); 固相萃取装置(美国奥泰科技中国有限公司)。

**1.1.2 试剂** 氟乐灵、二甲戊灵、甲草胺、乙草胺、丁草胺、西玛津、莠去津、扑草净 100 μg/ml (溶剂为正己烷)(农业部环境保护科研检测所研制)置于 4℃ 冰箱中避光保存; 正己烷、丙酮色谱纯(美国 Tedia 公司); 二氯甲烷、乙酸乙酯色谱纯(美国 Honeywell 公司); 无水硫酸钠(西陇化工有限公司)450℃ 下烘干 4 h 备用; 氯化钠(国药集团化学试剂有限公司); 弗罗里硅土固相萃取柱(1000 mg/6 ml, 美国 Sepax-UCT 公司)。

**1.1.3 标准溶液的配制** 8 种除草剂的混合标准中间液以正己烷为溶剂配制, 其中每种目标物的浓度为 1000 μg/L, 置于 4℃ 冰箱中避光保存。实验时, 由混合标准中间液用空白基质提取液逐级稀释成浓度为 0.010、0.020、0.040、0.100、0.200、0.500、1.000 μg/L 的系列标准工作液。

**1.1.4 试样制备** 实验所用淡水、海淡水、海水水样分别采自福建龙海罗非鱼养殖基地、福建漳江渔业水域、福建漳浦海鳗养殖基地, 水质较清。若水样混浊含泥沙、藻类, 需经垫有少量玻璃纤维的漏斗过滤; 用氢氧化钠或盐酸溶液调节 pH 至 6.0–8.5。

### 1.2 方法

**1.2.1 样品前处理** 准确量取 200 ml 水样, 经多参数分析仪测定盐度值, 盐度为 20–30 时, 不需调节盐度; 盐度低于 20 时, 则加入氯化钠调节, 根据每 1 L 淡水添加 10 g 氯化钠时盐度增加 10 计算。将符

合盐度要求的水样移入分液漏斗中, 加入 20 ml 二氯甲烷萃取, 有机相过无水硫酸钠(约 10 g), 收集于梨形瓶中。用 20 ml 二氯甲烷重复萃取 1 次, 合并有机相, 于 40℃ 水浴减压浓缩近干。固相萃取小柱用两倍柱体积的正己烷活化备用, 6 ml 正己烷分 3 次洗涤梨形瓶, 洗涤液并入小柱, 控制流速为 1 滴/s, 收集流出液。用 14 ml 正己烷: 乙酸乙酯(V: V=1: 1)洗脱, 流出液转入梨形瓶中, 于 40℃ 旋转减压浓缩至干, 残渣用 1 ml 正己烷溶解定容, 供气相色谱-质谱分析。

**1.2.2 气相色谱-质谱分析条件** 进样口温度为 270℃; 载气为氦气(纯度≥99.999%), 流速为 1.0 ml/min; 不分流进样, 进样量为 1 μl。升温程序: 初始温度 70℃, 保持 1 min; 以 20℃/min 升至 200℃, 保持 4 min; 再以 15℃/min 升至 250℃, 保持 1 min; 然后以 10℃/min 升至 280℃, 保持 3 min。离子源为 EI 源, 电离能量为 70 eV; 离子源温度为 250℃; 传输线温度为 300℃。检测方式为全扫描模式(SCAN)和选择离子检测模式(SIM); 质量扫描范围为 50–650 amu; 溶剂延迟时间为 6 min; 驻留时间为 100 ms。定性离子和定量离子见表 1。

表 1 8 种除草剂的定性离子、定量离子  
Tab.1 The qualitative ions and quantitative ion of eight herbicides

化合物 Compound	定性离子 Qualitative ions	定量离子 Quantitative ion
氟乐灵 Trifluralin	306, 290, 335	306
西玛津 Simazine	201, 186, 173	201
莠去津 Atrazine	200, 215, 173	200
甲草胺 Alachlor	160, 237, 288	160
乙草胺 Acetochlor	146, 162, 223	146
丁草胺 Butachlor	176, 160, 188	176
二甲戊灵 Pendimethalin	252, 281, 162	252
扑草净 Prometryn	241, 184, 226	241

## 2 结果与讨论

### 2.1 样品提取

**2.1.1 样品提取方法和提取试剂的选择** 水质中除草剂残留检测的样品前处理通常采用液-液萃取(马又娥等, 2011; 郑和辉等, 2001; GB/T 21925-2008, 2008)和固相萃取(董茂峰等, 2008; 李竺等, 2006; 任晋等, 2001)。对大体积水样, 用固相萃取富集, 需要借助专用自动化萃取设备, 且批量检测的稳定性对操作者的技术要求较高。液-液萃取试剂用量相对较大, 但样品容量大、操作简单、成本较低, 因此, 在实

际大批量样品的检测中，液-液萃取仍是目前较为实用的方法(郑和辉等, 2001; GB/T 21925-2008, 2008)。

8种除草剂均属于非极性或弱极性化合物，通常选用的提取试剂主要有正己烷、二氯甲烷和石油醚。本研究比较了这3种试剂对提取效果的影响(表2)，3种提取试剂中二氯甲烷的回收率最高，提取效率最好，故最终选定二氯甲烷作为提取剂。此外，本研究分析了提取次数对提取结果的影响，提取1次时，各组分提取率达90%左右，提取两次，各组分提取率达99%以上，已能满足提取回收率的要求。

表2 8种除草剂在不同提取试剂中的回收率

Tab.2 The recovery rate of eight herbicides in different extraction reagents

化合物 Compound	回收率 Recovery rate (%)		
	正己烷 Hexane	二氯甲烷 Dichloro- methane	石油醚 Petroleum ether
氟乐灵 Trifluralin	72.3	92.2	85.0
西玛津 Simazine	77.3	95.6	93.8
莠去津 Atrazine	77.4	96.7	81.9
乙草胺 Acetochlor	74.5	94.5	76.7
甲草胺 Alachlor	76.4	91.9	81.1
扑草净 Prometryn	73.5	94.0	90.3
二甲戊灵 Pendimethalin	73.9	97.5	84.1
丁草胺 Butachlor	73.2	91.1	90.7

**2.1.2 基质盐度的影响** 用液-液萃取法提取水样品中有机农药目标物，通常在水样中加入适量的氯化钠来改善分层效果，以减少或避免乳化现象，同时，盐析作用可提高有机目标物的萃取回收效率(李俊锁等, 2002)。实验采用氯化钠添加法比较了盐度分别为5、10、20、30、40的水样对目标检测物的影响。以盐浓度为横坐标、回收率为纵坐标，制作盐度曲线(图1)，结果显示，盐度在20-30范围内，回收率均在90%以上，变化不大；当盐度超过30时，目标物的回收率明显下降；盐度达40时，氟乐灵和莠去津的回收率已低于70%。实际操作中，淡水或海淡水样品，用氯化钠调节样品盐度至20-30，海水样品的盐度基本在此范围内，不需再做调整。

**2.1.3 基质 pH 的影响** pH可能改变待测物在水相和有机相中的分配系数(李俊锁等, 2002)，同时，水质的pH对除草剂的稳定性有较大影响，多数除草剂在酸性或碱性条件下，水解代谢的速率明显加快(徐会娟等, 2009)。因此，pH是影响液-液萃取中目标物回收率的一个重要因素。本研究用氢氧化钠和盐酸溶液调整加标水样pH值分别为5.0、6.0、7.0、8.0、

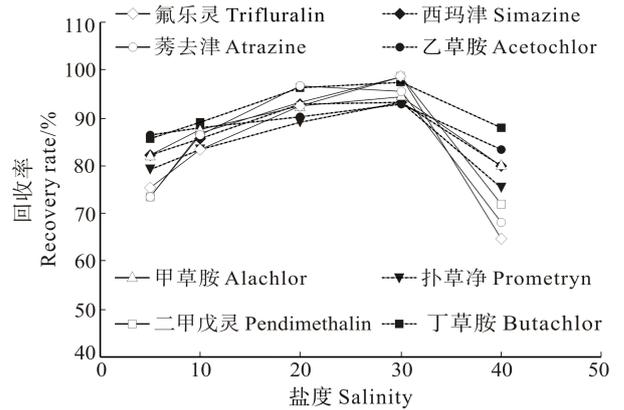


图1 8种除草剂的盐度曲线  
Fig.1 The salinity curves of eight herbicides

9.0，考察pH值对回收率的影响。以回收率为纵坐标、pH为横坐标制作pH曲线(图2)。pH在5.0-8.0范围内，目标物回收率随pH的增大而增大，在pH为8.0-9.0范围内，目标物回收率随着pH的增大而降低，莠去津和二甲戊灵的回收率在pH=9.0时已低于80%。因此，较低或较高pH均不利于目标物质的测定。pH在7.0-8.0范围内，目标物回收率无明显变化。渔业水环境的pH值通常为6.0-8.5(GB 11607-1989, 1990)，在处理实际水样品时一般不需调整pH，但在特殊情况下，如出现渔业污染事故，水质pH超出此范围时，则需要进行调整。

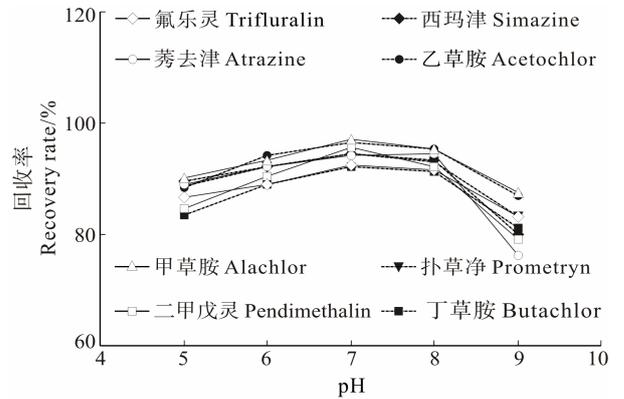


图2 8种除草剂的pH曲线  
Fig.2 The pH curves of eight herbicides

**2.2 样品净化**

渔业水质，特别是水产养殖环境水，基质复杂，类脂物、色素等比一般环境水高得多，若未进行有效净化，将影响待测物的定性和定量。弗罗里硅土吸附剂对亲脂性的化合物有吸附作用，在酰胺类(郑和辉等, 2001)和二硝基苯胺类(Engelbreton *et al*, 2001)除草剂检测中的样品净化应用有良好的效果。本研究探

讨论了佛罗里硅土固相萃取小柱对渔业水质中8种目标除草剂残留检测的净化条件并进行了优化。

**2.2.1 固相萃取小柱的选择** 本研究比较了两种不同的固相萃取柱: 佛罗里硅土小柱(1000 mg/6 ml)和石墨碳黑-佛罗里硅土复合小柱(250 mg/2000 mg/6 ml)的净化效果。两种固相萃取小柱的净化效果相当, 峰型、基质干扰均没有太大差别。考虑到成本因素, 一般的水质可用佛罗里土固相萃取小柱, 但一些基质成分较为复杂、色素含量较高的水样要选用活性炭-佛罗里硅土固相萃取复合小柱净化。

**2.2.2 洗脱溶剂的选择和洗脱体积的优化** 实验先比较了3种洗脱溶剂(二氯甲烷-正己烷、乙酸乙酯-正己烷和乙腈-正己烷)的洗脱效果。结果显示, 乙酸乙酯-正己烷洗脱效果最好, 目标物质回收率最高, 净化效果好。二氯甲烷-正己烷洗脱的8种除草剂回收率普遍较乙酸乙酯-正己烷低。乙腈-正己烷作为洗脱溶剂, 杂质峰干扰较二氯甲烷-正己烷和乙酸乙酯-正己烷多, 且氟乐灵回收率不足70%, 不能满足回收率的要求。

比较了不同比例(1:1、1:4、1:9, V/V)的乙酸乙酯-正己烷的洗脱效果, 结果显示, 乙酸乙酯-正己烷(1:1, V/V)洗脱获得回收率最高, 杂质干扰少。

以乙酸乙酯-正己烷(1:1, V/V)为洗脱液, 间隔2 ml收集流出液, 上机分析检测目标物含量, 以峰面积为纵坐标、洗脱体积为横坐标绘制洗脱曲线(图3)。当洗脱体积为12 ml时, 洗脱效率基本达100%。为了充分将目标物洗脱下来, 选择14 ml的乙酸乙酯-正己烷(1:1, V/V)作为最终的洗脱体积。

按优化的样品提取和净化方法分析, 所得的空白海水样品、标准溶液和空白海水样品加标的总离子流(图4), 结果显示, 样品基本净化完全, 目标峰附近无

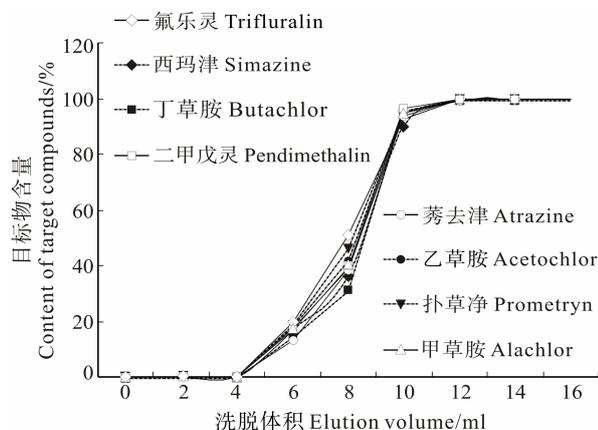


图3 8种除草剂的洗脱曲线

Fig.3 The elution curves of eight herbicides

杂质峰干扰。

### 2.3 基质效应的消除

样品中除目标分析物以外的其他成分对待测物测定值的影响, 称为基质效应(NCCLS, 1998), GC-MS分析中大多数农药表现出不同程度基质增强效应(贺利民等, 2008)。为了考察基质对待测除草剂的影响程度, 比较了正己烷溶剂(第1组)和按照样品前处理方法提取的空白海水基质溶液(第2组)中相同含量除草剂组分分析响应值(表3)。结果显示, 试样基质对8种除草剂均表现为不同程度的增强作用, 基质效应在142.1%~160.5%之间。通过逐步分析排查发现, 样品的提取、净化过程所用的试剂均引入了基质增强效应, 样品本身的基质特性不同, 产生的基质效应也各异, 海水样品的基质增强效应比淡水样品大得多(罗方方, 2014)。因此, 本研究采用空白样品提取液作为标准液的稀释溶液, 也就是基质匹配标准溶液校准法, 可有效消除基质效应对检测结果准确性的影响。

### 2.4 方法的回收率和精密度

采用标准添加法, 分别以空白的淡水、海淡水和海水样品为测试对象, 进行加标回收实验, 以验证方法的准确度和精密度。8种除草剂的添加浓度分别为0.05、0.5、2.0  $\mu\text{g/L}$  3个水平, 每个添加水平设6个平行(表4)。在3个添加水平下, 8种除草剂的平均回收率为74.7%~98.2%, 相对标准偏差在12.00%以内。该方法适用性、重现性良好, 符合药残检测技术要求。

### 2.5 方法的线性范围、检出限和最低定量

以目标物的峰面积为纵坐标、系列标准工作液的质量浓度为横坐标绘制标准曲线, 计算线性回归方程、线性相关系数( $R^2$ ) (表5)。方程线性相关系数均大于0.990, 该方法在0.010~1.000  $\mu\text{g/L}$  浓度范围内线性良好。方法检出限以信噪比 $\geq 3$ 估算; 最低定量限的确定依据是样品的实际加标回收率在70%~120%之间、信噪比 $\geq 10$ 、相对标准偏差15%。如表4所示, 8种除草剂的加标量为0.05  $\mu\text{g/L}$  时, 实际回收率在80.3%~98.2%之间, 相对标准偏差为2.06%~11.2%, 且信噪比均大于10, 因此, 确定本方法8种除草剂的最低定量限均为0.05  $\mu\text{g/L}$ 。

### 2.6 实际样品测定

采集泉州地区鲍鱼养殖海水水样、罗非鱼和草鱼养殖淡水水样、对虾养殖海淡水水样共8个样品, 进行8种除草剂检测。样品加标水平为0.05  $\mu\text{g/L}$ , 加标

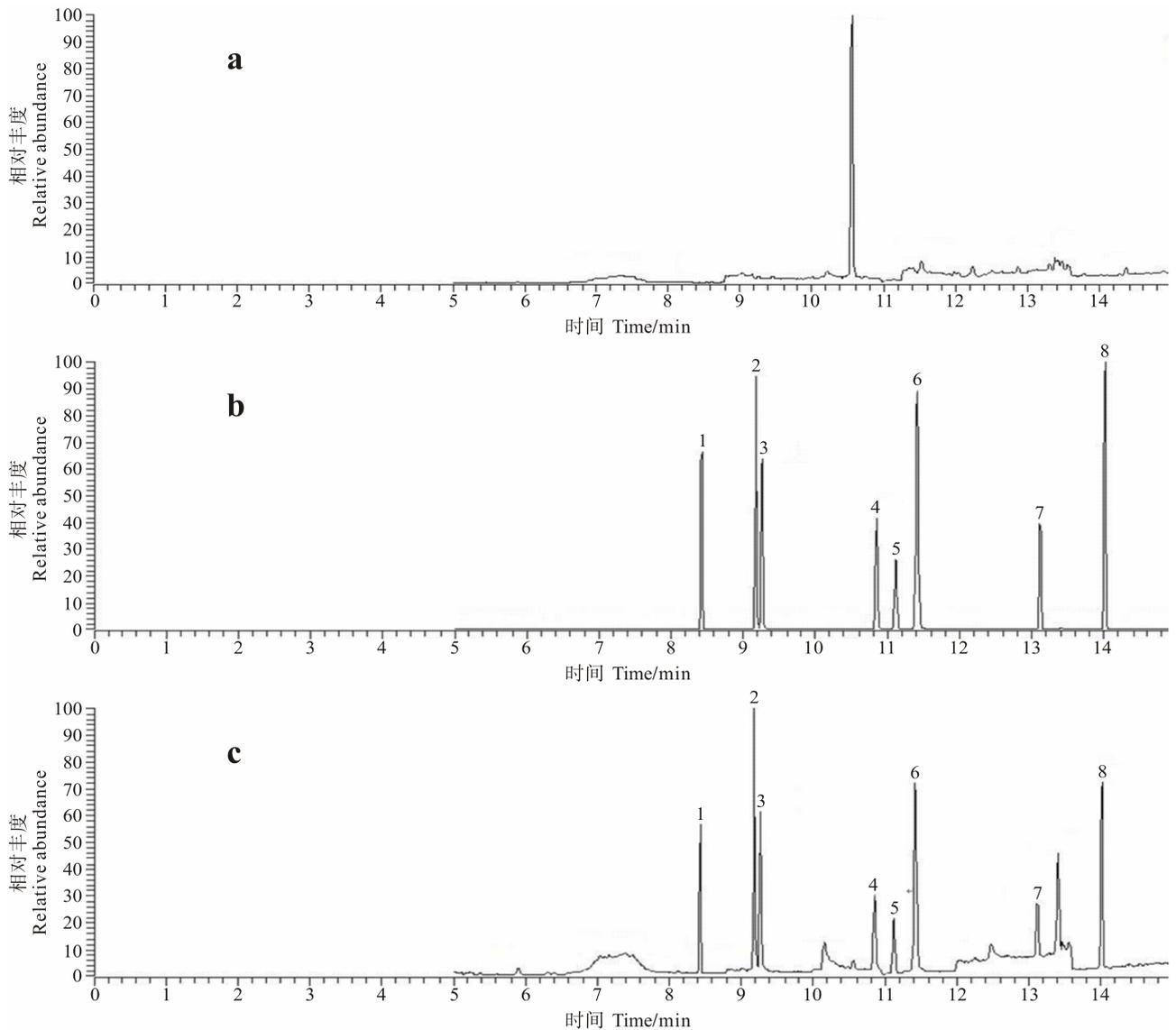


图4 8种除草剂的总离子流

Fig.4 SRM chromatograms of eight herbicides

A. 空白海水; B. 标准溶液(50 ng/ml); C. 空白海水加标(0.05  $\mu\text{g/ml}$ )

1. 氟乐灵; 2. 西玛津; 3. 莠去津; 4. 乙草胺; 5. 甲草胺; 6. 扑草净; 7. 二甲戊灵; 8. 丁草胺

A. Blank matrix; B. Standard (50 ng/ml); C. Matrix with standard (0.05  $\mu\text{g/ml}$ )

1. Trifluralin; 2. Simazine; 3. Atrazine; 4. Acetochlor; 5. Alachlor; 6. Prometryn; 7. Pendimethalin; 8. Butachlor

回收率为 89.5%，8 个样品中 8 种除草剂均未检出。

### 3 结论

本研究建立了渔业水质中氟乐灵、二甲戊灵、甲草胺、乙草胺、丁草胺、西玛津、莠去津、扑草净残留的气相色谱-质谱检测方法，样品前处理采用二氯甲烷液-液萃取、弗罗里硅土固相萃取小柱净化，对基质

较为复杂的渔业水质样品中待测目标除草剂的提取和净化效果好；以基质匹配标准溶液校准法，有效地消除了基质效应对检测结果准确性的影响。本方法样品前处理的仪器配置较低，可操作性强，适用面广，结果稳定灵敏，适合实验室开展对淡水、海淡水、海水等渔业水质中酰胺类、二硝基苯胺类、三嗪类 8 种除草剂残留的日常监控检测。

表 3 8 种除草剂的基质效应  
Tab.3 Matrix effects of eight herbicides residues

化合物 Compound	峰面积 Peak area		基质效应 Matrix effect (%)
	第 1 组 Set 1	第 2 组 Set 2	
氟乐灵 Trifluralin	137899	217742	157.9
西玛津 Simazine	222676	319762	143.6
莠去津 Atrazine	232564	338380	145.5
乙草胺 Acetochlor	120781	183708	152.1
甲草胺 Alachlor	64039	102783	160.5
扑草净 Prometryn	220303	324286	147.2
二甲戊灵 Pendimethalin	144856	226555	156.4
丁草胺 Butachlor	196285	278921	142.1

注: 基质效应的计算公式: 基质效应(%)=B/A×100 (A: 在纯溶剂中除草剂组分的响应值; B: 样品基质中添加的相同含量除草剂组分响应值)

Note: The formula of matrix effects: matrix effect (%)= B/A×100 (A: the response of herbicides component in pure solvent; B: the response of the same herbicides component content added to the sample matrix)

表 4 方法的回收率与精密度(n=6)  
Tab.4 The recovery rate and precision of the method (n=6)

化合物 Compound	项目 Items	添加水平 Spiked level (μg/L)								
		淡水 Freshwater			海淡水 Sea and fresh water			海水 Seawater		
		0.05	0.5	2.0	0.05	0.5	2.0	0.05	0.5	2.0
氟乐灵 Trifluralin	回收率 Recovery rate (%)	93.2	92.2	74.7	84.6	78.2	80.3	82.8	84.7	80.3
	RSD (%)	10.1	8.96	3.89	6.78	3.74	6.34	5.02	11.9	7.30
西玛津 Simazine	回收率 Recovery rate (%)	81.8	83.6	78.7	80.3	93.2	95.8	85.0	92.4	90.6
	RSD (%)	10.2	6.65	1.66	2.22	2.26	2.24	11.2	11.3	6.20
莠去津 Atrazine	回收率 Recovery rate (%)	80.7	86.5	84.2	84.7	92.8	91.8	87.5	92.5	90.0
	RSD (%)	4.32	5.26	7.09	3.08	2.62	4.93	10.30	10.8	4.92
乙草胺 Acetochlor	回收率 Recovery rate (%)	92.0	89.7	89.0	87.4	83.4	88.4	91.7	89.4	89.7
	RSD (%)	6.86	6.96	7.78	4.96	3.18	3.67	8.22	9.44	6.29
甲草胺 Alachlor	回收率 Recovery rate (%)	95.4	97.7	94.2	91.4	91.4	82.7	90.2	89.4	91.3
	RSD (%)	2.46	3.21	2.24	4.29	3.02	5.13	2.95	8.52	2.53
扑草净 Prometryn	回收率 Recovery rate (%)	90.3	91.4	88.4	89.0	87.8	86.6	88.1	89.9	91.2
	RSD (%)	6.12	7.33	7.94	3.31	2.59	4.21	7.26	6.19	5.82
二甲戊灵 Pendimethalin	回收率 Recovery rate (%)	92.7	90.8	82.5	90.3	88.7	89.0	94.3	91.6	87.5
	RSD (%)	3.50	3.45	7.77	6.07	2.29	5.28	5.73	8.74	7.33
丁草胺 Butachlor	回收率 Recovery rate (%)	98.2	94.1	95.4	89.3	85.3	88.9	92.2	90.6	90.4
	RSD (%)	2.24	4.11	1.91	2.06	3.31	3.65	5.87	5.64	4.70

表 5 8 种除草剂的线性方程、相关系数、检出限和定量限  
Tab.5 Linear equation, correlation coefficient, detection limit and quantification limit of eight herbicides

化合物 Compound	线性方程 Linear equation	相关系数 R <sup>2</sup>	检出限 LOD (μg/L)	定量限 LOQ (μg/L)
氟乐灵 Trifluralin	Y=-12349+345866X	0.9992	0.022	0.05
西玛津 Simazine	Y=2862.69+443790X	0.9993	0.031	0.05
莠去津 Atrazine	Y=-657+471362X	0.9992	0.028	0.05
乙草胺 Acetochlor	Y=-2757+296902X	0.9994	0.038	0.05
甲草胺 Alachlor	Y=21037+65832X	0.9942	0.041	0.05
扑草净 Prometryn	Y=-2095+461575X	0.9991	0.035	0.05
二甲戊灵 Pendimethalin	Y=-10262+385659X	0.9992	0.025	0.05
丁草胺 Butachlor	Y=-21022+468507X	0.9991	0.020	0.05

## 参 考 文 献

- 马又娥, 刘宝峰. 环境中 7 种酰胺类和磺酰胺类除草剂残留检测方法研究. 现代农药, 2011, 10(4): 44-46
- 日本对我国产鳗鱼及其加工品中的氟乐灵实施命令检查. <http://news.foodmate.net/2013/06/233684.html>
- 任晋, 黄翠玲, 赵国栋, 等. 固相萃取-高效液相色谱-质谱联用在线分析水中痕量除草剂. 分析化学, 2001, 29(8): 876-880
- 李庆鹏, 秦达, 崔文慧, 等. 我国水产品中扑草净残留超标的警示分析. 食品安全检测学报, 2014, 5(1): 108-112
- 李伶俐, 张琳, 那宇, 等. 除草剂扑草净胶体金免疫层析检测试纸条的研制. 现代食品科技, 2012, 28(4): 424-426
- 李竺, 陈玲, 郜洪文, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定环境水样中的三嗪类化合物. 色谱, 2006, 24(3): 267-270
- 李俊锁, 邱月明, 王超. 兽药残留分析. 上海: 上海科学技术出版社, 2002, 67-69
- 杨梅, 马永安, 林忠胜, 等. 环境水体中三嗪和酰胺类除草剂的固相萃取/气相色谱-质谱测定. 分析测试学报, 2008, 27(1): 38-41
- 沈国兴, 严国安, 彭金良, 等. 农药对藻类的生态毒理学研究. 环境科学进展, 1999, 7(6): 131-136
- 罗方方. 气相色谱-质谱法测定渔业水质中 8 种除草剂残留的基质效应探讨. 福建水产, 2014, 36(3): 211-218
- 郑和辉, 叶常明. 环境样品中乙草胺和丁草胺的残留分析. 中国环境科学, 2001, 21(3): 217-220
- 贺利民, 刘祥国, 曾振灵. 气相色谱分析农药残留的基质效应及其解决方法. 色谱, 2008, 26(1): 98-104
- 聂志强, 李卫建, 刘潇威, 等. 凝胶渗透色谱净化-气质联用法测定土壤中三嗪类除草剂. 分析试验室, 2008, 27(12): 80-83
- 徐会娟, 何红波, 武叶叶, 等. 氯乙酰胺类除草剂的环境行为和生态效应研究. 土壤通报, 2009, 40(5): 1226-1232
- 董茂峰, 刘丰茂, 潘灿平, 等. 采用固相萃取-气相色谱测定水中唑啉草酯的残留. 农药学学报, 2008, 10(4): 460-463
- 潘文碧, 孙雅峰, 井晶, 等. SPE-GC/MS 法快速检测水体中多组分内分泌干扰物. 广州化工, 2010, 38(11): 139-143
- 水中除草剂残留的测定. 液相色谱/质谱法. GB/T 21925-2008. 北京: 中国标准出版社, 2008, 1-6
- 渔业水质标准. GB 11607-1989. 北京: 国家环保局, 1990, 2
- Engelbreton J, Hall G, Hengel M, *et al.* Analysis of pendimethalin residues in fruit, nut, vegetables, grass and mint by gas chromatography. J Agric Food Chem, 2001, 49: 2198-2206
- Kovriznych JA, Urbancikova M. Acute toxicity of acetochlor for zebrafish (*Danio rerio*) and guppy (*Poecilia reticulata*). Ekol-Bratislava, 1998, 17: 449-456
- NCCLS. NCCLS document EP14-P Evaluation of Matrix Effects; Proposed Guideline. Wayne, PA: NCCLS, 1998

(编辑 冯小花)

## Determination of Eight Herbicides in Fishery Water by Gas Chromatography-Mass Spectrometry

LUO Fangfang, WANG Yanjun, YE Mei<sup>①</sup>, YU Ying, LIU Haixin, JIANG Linlin

(Fisheries Research Institute of Fujian, Xiamen 361012)

**Abstract** To measure herbicides residues in fishery water, gas chromatography-mass spectrometry was developed to determine trifluralin, pendimethalin, alachlor, acetochlor, butachlor, simazine, atrazine, and prometryn. The samples were adjusted to salinity 20-30 with NaCl, extracted by dichloromethane, and cleaned up with Florisil solid phase extraction (SPE) column. The analytes were detected by gas chromatography-mass spectrometry under the selected reaction monitoring mode and quantified by external standard method. The peak area was linear to the concentration of eight herbicides residues (0.010-1.000  $\mu\text{g/L}$ ), and the correlation coefficients ( $R^2$ ) were all more than 0.990. According to  $S/N \geq 3$ , the detection limit of trifluralin, simazine, atrazine, acetochlor, alachlor, prometryn, pendimethalin, and butachlor were 0.022, 0.031, 0.028, 0.038, 0.041, 0.035, 0.025, and 0.020  $\mu\text{g/L}$ , respectively. The limit of quantification was 0.05  $\mu\text{g/L}$  for all eight herbicides based on the actual samples spiked recoveries between 70% and 120%,  $S/N \geq 10$ , and the relative standard deviation  $\leq 15\%$ . The average recovery of the eight herbicides fortified in different negative samples at 0.05, 0.5, and 2.0  $\mu\text{g/L}$  were in the range of 74.7%-97.7%, and the relative standard deviations were less than 12.00%. These results indicated that the method has the advantage of simplicity, sensitivity and repeatability, which could provide technical support for the detection of these eight herbicides residues in fishery water.

**Key words** Herbicides; Fishery water; Gas chromatography-mass spectrometry; Detection

① Corresponding author: YE Mei, E-mail: yemei808@sohu.com

# 闽南地区水产品中邻苯二甲酸酯类(PAEs)的分布特征及风险评价\*



姜琳琳

(福建省水产研究所 厦门 361012)

**摘要** 根据2013年1月和7月对闽南沿海地区(厦门、漳州、泉州)水产品中邻苯二甲酸酯类(PAEs)的调查,探讨该地区不同类型水产品中PAEs的残留水平和分布特征,并对PAEs的污染状况及其生态风险进行了评价。结果显示,海水鱼类PAEs总量为 $2.45 \times 10^2 - 1.13 \times 10^3 \mu\text{g/kg}$ (湿重,下同),均值为 $6.78 \times 10^2 \mu\text{g/kg}$ ;淡水鱼类PAEs含量范围为 $4.36 \times 10^2 - 1.37 \times 10^3 \mu\text{g/kg}$ ,均值为 $8.73 \times 10^2 \mu\text{g/kg}$ ;虾类PAEs含量范围为 $3.22 \times 10^2 - 1.27 \times 10^3 \mu\text{g/kg}$ ,均值为 $7.76 \times 10^2 \mu\text{g/kg}$ ;蟹类PAEs含量范围为 $6.17 \times 10^2 - 1.20 \times 10^3 \mu\text{g/kg}$ ,均值为 $7.91 \times 10^2 \mu\text{g/kg}$ ;贝类PAEs含量范围为 $9.77 \times 10^2 - 1.35 \times 10^3 \mu\text{g/kg}$ ,均值为 $1.22 \times 10^3 \mu\text{g/kg}$ 。所有水产品中均未检测出邻苯二甲酸丁基苄基酯(BBP)和邻苯二甲酸二正辛酯(DNOP)残留,其他4种PAEs的残留量按邻苯二甲酸二-(2-乙基己基)酯(DEHP)、邻苯二甲酸二正丁酯(DBP)、邻苯二甲酸二乙酯(DEP)、邻苯二甲酸二甲酯(DMP)的顺序递减。PAEs在不同类型水产品中均有不同程度的残留,表明环境中PAEs在水产品体内的富集已是一个较为普遍的现象。针对食用水产品进入人体的DEHP和DBP,进行健康风险评价,结果显示,该地区水产品中的接触风险指数ERI均小于1,表明闽南地区通过食用水产品途径暴露于PAEs的接触风险是可接受的。

**关键词** 闽南地区; PAEs; 分布特征; 风险评价

**中图分类号** S96 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)04-0139-06

邻苯二甲酸酯(PAEs)是一类常用的塑料增塑剂。我国增塑剂消费量约占世界总消费量的1/4,目前,增塑剂仍是以邻苯二甲酸酯类为主体,其中邻苯二甲酸二正丁酯(DBP)、邻苯二甲酸二-(2-乙基己基)酯(DEHP)生产和消费较大,尤以DEHP为最多,占总产量的70%以上(陶刚等,2008)。PAEs很容易从塑料中迁移到外环境中(Fromme *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2005),在环境中稳定持久,可通过食物链的传输给人体带来潜在危害。PAEs具有急性毒性、致癌性和致畸性等多种生物毒性(van Wezel *et al.*, 2000; Andrade *et al.*, 2006; Pogribny *et al.*, 2008; Penalver *et al.*, 2000; Kondo *et al.*, 2006)。

各个国家对PAEs制定了法律法规,如中国、欧盟、美国、日本等制定了玩具、儿童用品和食品材料中PAEs的限量要求(张静等,2011)。美国环保局(EPA)

将邻苯二甲酸二甲酯(DMP)、邻苯二甲酸二乙酯(DEP)、DBP、邻苯二甲酸二正辛酯(DNOP)、邻苯二甲酸丁基苄基酯(BBP)和DEHP列入129种重点控制污染物名单(Yuan *et al.*, 2010)。我国也将DMP、DBP、邻苯二甲酸二辛酯(DNOP)列入环境优先控制污染物黑名单(Wang *et al.*, 2003; 刘庆等, 2012)。

闽南地区(厦门、漳州、泉州)位于福建省东南沿海,濒临台湾,海洋水产资源丰富,居民日常饮食中水产品占有重要比例,其消费量也在逐年增长,目前尚未见到关于闽南地区PAEs的分布特征及风险评估的报道。因此,本研究选择闽南沿海地区主要消费的水产品作为研究对象,以美国EPA优先控制污染物名单中的PAEs作为目标物,在建立了PAEs污染物分析方法的基础上,探讨了该区域PAEs的残留水平、污染特征,并对其生态风险进行评价。

\* 福建省省属公益类科研院所基本科研专项(2012R1101-3)资助。姜琳琳, E-mail: jllhzau@163.com

收稿日期: 2014-08-27, 收修改稿日期: 2014-12-10

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

**1.1.1 仪器** Trace DSQ 气质联用仪(美国 Thermo Fisher 公司), DB-5MS 毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm), AB204-E 电子分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司), 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), R205 旋转蒸发器(上海申生科学仪器有限公司), 80-2B 低速离心机(上海安亭科学仪器厂), 固相萃取装置(上海安谱科学仪器有限公司)。

**1.1.2 试剂** 环己烷、乙酸乙酯、正己烷、丙酮、乙腈等为色谱纯(美国 Tedia 公司); 无水硫酸钠为分析纯(中国医药集团上海化学试剂公司), 于 650℃ 高温炉中烘干 4 h, 冷至室温后, 收集于广口玻璃瓶中, 密封贮存于干燥器中备用; 实验用水为 Milli-Q 制备的超纯水(Milli-Q 超纯水制备系统)。

6 种 PAEs 标准物质包括 DMP(纯度≥98.0%)、DEP(纯度≥99.9%)、DBP(纯度≥99.1%)、BBP(纯度≥99.0%)、DEHP(纯度≥99.6%)、DNOP(纯度≥99.5%), 购于美国 AccuStandard 公司, 用正己烷配制成 1.0 g/L 的储备液, 于 4℃ 冰箱中保存, 使用前用正己烷稀释成适宜浓度的混合标准工作液。

### 1.2 样品采集与制备

于 2013 年 1 月和 7 月在漳州、泉州、厦门采集水产样品, 包括海水鱼(龙胆石斑、青斑、鲈、大黄鱼、黄鳍鲷、斜带髯鲷和美国红鱼)、淡水鱼(鲫、草鱼、罗非鱼、鲤、鲢、鳙、淡水白鲳)、南美白对虾、蟹(锯缘青蟹和梭子蟹)和贝类(僧帽牡蛎、菲律宾蛤仔、缢蛏、波纹巴非蛤), 采样数量见表 1 和表 2, 每个样品采样量为 2–6 kg。样品采集按照《海洋监测规范》(GB17378.3-2007 第 3 部分: 样品的采集、贮存与运输)所规定的方法(GB 17378.3-2007, 2007)进行。

鱼类去除鳞和皮部分, 沿脊背取肌肉; 虾、蟹类去除头、壳、肠腺部分, 取肌肉; 贝类等去除壳, 取可食部分。样品用均质机绞碎混匀, 装入玻璃瓶, 暂存于-18℃ 冰箱, 待测。

### 1.3 分析方法

准确称取 5.0 g 肉样, 用环己烷-乙酸乙酯(V/V, 1:1)混合溶液超声提取 15 min, 离心 5 min, 再提取 1 次, 合并两次提取液, 旋转蒸干。用 5 ml 乙腈饱和的正己烷除脂, 再用 10 ml 正己烷饱和的乙腈反提两次, 合并提取液, 蒸干。用 3 ml 正己烷溶解, 过 PAE30006-C 固相萃取小柱, 用 5 ml 正己烷活化小柱,

将浓缩液过柱, 用 10 ml 含 1% 乙酸乙酯的正己烷淋洗, 再用正己烷-乙酸乙酯(V/V, 1:1)混合溶液进行洗脱, 洗脱液经氮气吹干, 用 1 ml 正己烷定容, 供 GC-MS 测定。

### 1.4 气相色谱-质谱测定条件

气相色谱条件: 进样口温度为 280℃, 采用不分流进样模式。初始柱温为 60℃, 保持 1.0 min, 以 15℃/min 升至 280℃, 保持 5 min。载气为高纯氮气, 流速为 1.5 ml/min, 采用恒流模式。

质谱条件: 采用 EI 离子源(70 eV), 离子源温度为 250℃, 传输线温度为 280℃, 溶剂延迟时间为 6 min, 选择离子监测(SIM)采集模式。

### 1.5 质量控制

操作过程中避免使用塑料制品, 所用玻璃器皿清洗干净后, 用 350℃ 马弗炉灼烧 2 h, 待冷却后用正己烷冲洗, 降低空白值。分析过程中, 每批样品做试剂空白、标准曲线、样品平行样和加标回收实验, 结果均扣除空白值。6 种 PAEs 的检出限(LOD)为 0.62–2.96 μg/kg, 平均加标回收率在 70%–120% 之间, 相对标准偏差小于 15%。

## 2 结果与分析

### 2.1 海水鱼、淡水鱼、虾、蟹中 PAEs 的残留特征

对厦门、漳州、泉州等地区海水鱼、淡水鱼、虾、蟹中的 PAEs 残留量进行分析, 结果见图 1。从图 1 可以看出, 海水鱼类 PAEs 的总量为  $2.45 \times 10^2$ – $1.13 \times 10^3$  μg/kg(湿重, 均扣除空白值, 下同), 均值为  $6.78 \times 10^2$  μg/kg, DEHP 均值为  $6.03 \times 10^2$  μg/kg; 淡水

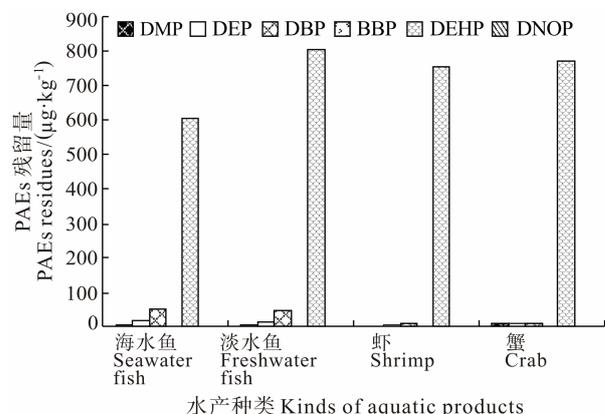


图 1 闽南地区水产品(海水鱼、淡水鱼、虾类、蟹类)中 PAEs 的残留量

Fig.1 The PAEs residues in seawater fish, freshwater fish, shrimp, and crab in Minnan region

鱼类 PAEs 的含量范围为  $4.36 \times 10^2$ – $1.37 \times 10^3$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 均值为  $8.73 \times 10^2$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ , DEHP 均值为  $8.06 \times 10^2$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; 虾类 PAEs 的含量范围为  $3.22 \times 10^2$ – $1.27 \times 10^3$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 均值为  $7.76 \times 10^2$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ , DEHP 均值为  $7.56 \times 10^2$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; 蟹类 PAEs 的含量范围为  $6.17 \times 10^2$ – $1.20 \times 10^3$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 均值为  $7.91 \times 10^2$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ , DEHP 均值为  $7.70 \times 10^2$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。所有水产品均未有 BBP 和 DNOP 残留, 其他 4 种 PAEs 的残留量按照 DEHP、DBP、DEP、DMP 的顺序递减, 其中 DEHP 的残留量最高, 其次是 DBP, 环境中 PAEs 的来源以 DEHP 和 DBP 居多, 这可能与两类物质在生产、生活中的使用情况有关。

此外, 海水鱼、淡水鱼、虾、蟹中 PAEs 残留量差异不大, 但残留总量呈现淡水鱼>虾~蟹>海水鱼的规律, 这可能与养殖环境、生物的生活习性和摄食习性有关。淡水鱼中 PAEs 的残留量较之其他品种相对较高, 可能由于淡水养殖水环境受到工业化程度和 PAEs 污染较严重的影响。虾、蟹多为杂食性的生物, 其生活环境比较固定, 更容易摄入附着大量 PAEs 的颗粒物质, 因此, 虾、蟹类水产品比游动性强的海水鱼类更易受到 PAEs 的影响, 这一结果与林钦等 (2014) 的报道一致。

## 2.2 贝类中 PAEs 的残留特征

在同样的测定条件下, 测定了贝类样品中的 PAEs

含量(表 1)。结果显示, 所有采集的贝类样品中均未检测到 BBP 和 DNOP, 除缢蛭未检出 DMP 外, 僧帽牡蛎、菲律宾蛤仔和波纹巴非蛤均检出 DMP、DEP、DBP 和 DEHP, DMP 含量范围为 ND–20.4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 均值为 18.7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , DEP 含量范围为 8.76–9.42  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 均值为 9.15  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , DBP 含量范围为 18.7–25.7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 均值为 20.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , DEHP 含量范围为  $8.50 \times 10^2$ – $1.30 \times 10^3$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 均值为  $1.11 \times 10^3$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。研究结果显示, 贝类中僧帽牡蛎 PAEs 总量及 DEHP 残留量稍高于其他贝类, 这可能与其生活习性、养殖模式以及 PAEs 的结构特性有关, 僧帽牡蛎主要摄食硅藻类和有机碎屑等, 对饵料无选择性。由于 DEHP 在水中的溶解度较低, 有较高的辛醇/水分配系数( $K_{ow}$ ), 在水环境中易吸附于有机碎屑等悬浮颗粒上, 这可能是导致僧帽牡蛎体内 PAEs 含量高的原因之一。

与其他品种相比, 贝类中 PAEs 的残留量总体上偏高, 除了与生物的生活习性、食性有关外, 还受到养殖模式的影响。波纹巴非蛤和菲律宾蛤仔的养殖采用浅海底播和滩涂底播方式, 僧帽牡蛎和缢蛭采用滩涂棚架式和滩涂底播方式, 属于潮间带底栖养殖贝类, 由于潮间带受陆源污染影响程度较大, 往往是陆源污染物迁移转化的归宿地, 这可能是导致贝类 PAEs 的残留量高于游动性强、肉食性鱼类的主要原因之一。

表 1 闽南地区贝类中的 PAEs 残留量

Tab.1 The PAEs residues in shellfish in Minnan region

种类 Species	样品数 Sample number	项目 Items	DMP ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	DEP ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	DBP ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	BBP ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	DEHP ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	DNOP ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
僧帽牡蛎 <i>Saccostrea cucullata</i>	9	范围 Range	ND–20.2	ND–9.6	17.4–33.4	ND	$1.02 \times 10^3$ – $1.79 \times 10^3$	ND
		均值 Mean	18.1	9.42	25.7		$1.30 \times 10^3$	
菲律宾蛤仔 <i>Ruditapes philippinarum</i>	7	范围 Range	ND–21.8	ND–9.78	15.1–24.8	ND	$9.73 \times 10^2$ – $1.61 \times 10^3$	ND
		均值 Mean	20.4	9.28	20.0		$1.21 \times 10^3$	
缢蛭 <i>Sinonovacula constricta</i>	6	范围 Range	ND	8.68–8.84	16.4–27.2	ND	$1.18 \times 10^3$ – $1.37 \times 10^3$	ND
		均值 Mean		8.76	20.1		$1.26 \times 10^3$	
波纹巴非蛤 <i>Paphia undulata</i>	8	范围 Range	ND–18.9	ND–9.32	12.0–23.2	ND	$8.38 \times 10^2$ – $1.03 \times 10^3$	ND
		均值 Mean	18.2	9.04	18.7		$9.31 \times 10^2$	

## 3 讨论

### 3.1 生态环境中 PAEs 的污染状况

目前, 我国将 DMP、DBP、DNOP 列入环境优先控制污染物黑名单中, 但对水产品中 PAEs 的残留限量尚未有规定。欧盟指令 2007/19/EC 规定, DBP 和 DEHP 在食品中的迁移限量分别为 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  和 1500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。卫办监督函[2011]551 号公告说明, 食品及食品添加剂中 DEHP、DINP 和 DBP 的最大残留量

分别为 1500、900 和 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。可见, 我国与欧盟对食品中 PAEs 残留量的规定基本一致, 因此, 可以参考该限量值对 DEHP 和 DBP 的污染状况进行评价。从闽南地区采集样品中 DEHP 的污染指数可以看出(表 2), 海水鱼、淡水鱼、虾、蟹中 DEHP 的残留量均低于此限量要求, 所有水产品中 DBP 均未超出限量值, 污染指数均小于 1, 而贝类的污染指数在 0.559–1.190 之间, 其中部分僧帽牡蛎和菲律宾蛤仔样品中 DEHP 残留量较高。

表2 水产品中 DEHP 和 DBP 的污染指数

Tab.2 The contamination index of DEHP and DBP in aquatic products

项目 Items	海水鱼 Seawater fish		淡水鱼 Freshwater fish		虾 Shrimp		蟹 Crab		贝类 Shellfish	
	DEHP	DBP	DEHP	DBP	DEHP	DBP	DEHP	DBP	DEHP	DBP
样品数 Sample No.	15		16		13		20		30	
$P_i$ 范围 $P_i$ range	0.143-0.659	0.092-0.377	0.264-0.840	0.079-0.291	0.211-0.827	0.018-0.085	0.402-0.787	0.017-0.069	0.559-1.190	0.040-0.111
$P_i$ 均值 $P_i$ mean	0.402	0.174	0.537	0.149	0.504	0.041	0.513	0.038	0.787	0.070

$P_i=C_i/C_s$ , 式中,  $P_i$  为 DEHP 和 DBP 的污染指数,  $C_i$  为生物样品中 DEHP 和 DBP 的测值,  $C_s$  为生物体中 DEHP 和 DBP 的残留限值

$P_i=C_i/C_s$ ,  $P_i$ : Contamination index of DEHP and DBP;  $C_i$ : Content of DEHP and DBP in aquatic product;  $C_s$ : Residue limit of DEHP and DBP

表3 国内其他地区的水产品中 PAEs 含量

Tab.3 The PAEs contents in aquatic products in other regions of China

地区 Region	样品 Sample	残留的 PAEs PAEs residues	PAEs 含量 Content of PAEs(mg/kg)	DEHP 含量 Content of DEHP(mg/kg)
广东 Guangdong (马保华等, 2012)	养殖罗非鱼	DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP	1.0-60.9 (干样计 Dry matter)	0.2-12.8 (干样计 Dry matter)
上海、扬州、绍兴 Shanghai, Yangzhou, Shaoxing (郑力行等, 2003)	鱼, 虾, 蟹, 田螺	DEP, DBP, DEHP	1.62-4.86	1.2-3.73
珠江三角洲地区 Delta Region of Pearl River (李潇等, 2008)	草鱼, 鲫, 罗非鱼	DMP, DEP, DBP, BOP, DEHP, DNOP	4.48-30.10 (干样计 Dry matter)	0.06-12.46 (干样计 Dry matter)
香港地区 Hong Kong (李潇等, 2008)	草鱼, 鲫, 罗非鱼	DMP, DEP, DBP, BOP, DEHP, DNOP	9.99-82.40 (干样计 Dry matter)	2.25-37.60 (干样计 Dry matter)
长江朱杨段 Zhuyang section of Yangtze River (邓冬富等, 2012)	鲫, 铜鱼, 鲤, 黄颡, 大眼鳊, 鲇等	DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP	0.54-1.82	0.06-0.26
沱江富顺段 Fushun segment of Tuojiang River (邓冬富等, 2012)	鲤, 鲫, 黄颡, 大眼鳊 等	DEP, DBP, BBP, DEHP	0.54-0.79	0.08-0.13
大亚湾大鹏澳海域 Dapengao waters of Daya Bay (石凤琼等, 2013)	斑鲈, 黑鲷, 银牙鱼, 黄姑鱼, 对虾, 蟹	DMP, DEP, DBP, DEHP, DIBP, DNOP, DNP	0.07-2.14	0.02-1.86

从表3可以看出,与国内其他地区相比,闽南地区淡水鱼中PAEs的残留量低于珠江三角洲地区等工业化程度较高和人口较为密集的城市,与长三角地区水产品中PAEs的残留量相当,但PAEs在水产品中均有不同程度的残留,表明环境中PAEs在水产品体内的富集已是一个较为普遍的现象,应引起有关部门的重视。

### 3.2 PAEs 的生态风险评价

PAEs 为持久性有机污染物,会产生神经毒性、免疫毒性和生殖毒性等,具有潜在的三致效应(致癌、致畸、致突变)(Gaudin *et al*, 2008),这类物质造成的环境问题以及对人体健康的威胁越来越受到关注。目前,针对食物中有机污染物对人体健康影响的风险评

估主要有接触风险评估和可疑致癌物的致癌风险评估,一般采用美国国家科学院(NAS)提出的健康风险评估“四步法”,即危害鉴别(Hazard identification)、剂量-反应分析(Dose-response analysis)、暴露评价(Exposure assessment)以及风险表征(Risk characterization)的评价模式(梁庆香, 2011)。根据闽南地区PAEs残留量的调查,DBP和DEHP在所有水产品中均有残留,本研究针对摄食途径对暴露于DBP和DEHP这两种有机污染物进行健康风险评估。

根据公式(1)和(2),估算通过食用水产品的每日暴露量  $EDI$  和接触风险指数  $ERI$ 。当  $ERI \leq 1$ , 接触风险被认为可以接受,相反则说明暴露量会对人体产生危险(甘居利等, 2008、2007)。美国环保局推荐的

DBP 和 DEHP 危害参考剂量  $RfD$ (Reference dose)分别为 10、20  $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ (Song *et al.*, 2013)。

$$EDI=C_i\times CR/BW \quad (1)$$

$$ERI=EDI/RfD \quad (2)$$

式中,  $C_i$  为水产品中 DEHP 和 DBP 的残留量;  $CR$  为水产品的消费量, 根据中国卫生部《中国居民营养与健康现状》统计, 2002 年中国城市居民鱼虾类的平均摄入量为 44.9 g/d, 考虑闽南地区多属于沿

海城市, 居民的水产品消费量较高, 本研究以 50 g/d 估算水产品的人均摄入量;  $BW$  为体重, 成年人的平均体重以 60 kg 计。

本研究根据式(1)和(2), 估算闽南地区海水鱼、淡水鱼、虾类、蟹类和贝类中 DBP 和 DEHP 的残留量、每日暴露量  $EDI$  和接触风险指数  $ERI$  (表 4)。从表 4 可以看出, 所有水产品中 DBP 和 DEHP 的  $ERI$  均小于 1, 表明闽南地区通过摄食水产品途径暴露于 PAEs 的接触风险是可接受的。

表 4 DBP 和 DEHP 的每日暴露量  $EDI$  和接触风险指数  $ERI$

Tab.4 The  $EDI$  and  $ERI$  of DBP and DEHP

水产品种类 Aquatic products	DBP( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	$EDI$ (DBP) ( $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{d}$ )	$ERI$ (DBP)	DEHP( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	$EDI$ (DEHP) ( $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{d}$ )	$ERI$ (DEHP)
海水鱼 Seawater fish	52.3	$4.36\times 10^{-2}$	$4.36\times 10^{-3}$	603	0.503	$2.51\times 10^{-2}$
淡水鱼 Freshwater fish	44.6	$3.72\times 10^{-2}$	$3.72\times 10^{-3}$	806	0.672	$3.36\times 10^{-2}$
虾类 Shrimp	12.2	$1.02\times 10^{-2}$	$1.02\times 10^{-3}$	756	0.630	$3.15\times 10^{-2}$
蟹类 Crab	11.4	$9.50\times 10^{-3}$	$9.50\times 10^{-4}$	770	0.642	$3.21\times 10^{-2}$
贝类 Shellfish	21.1	$1.76\times 10^{-2}$	$1.76\times 10^{-3}$	1180	0.983	$4.92\times 10^{-2}$

## 4 结论

闽南沿海地区抽查的水产品均未有 BBP 和 DNOP 残留, 其他 4 种 PAEs 的残留量按照 DEHP、DBP、DEP、DMP 的顺序递减, 其中 DEHP 的残留量较高。不同品种生物体内 PAEs 的残留量呈现贝类>淡水鱼>虾~蟹>海水鱼的规律, 这可能与养殖区域、生物的生活习性、摄食习性和养殖模式等有关。PAEs 在水产品中均有不同程度的残留, 表明环境中 PAEs 在水产品体内的富集已是一个较为普遍的现象, 应引起有关部门的重视。针对摄食途径暴露于 DBP 和 DEHP 进行健康风险评价, 其中, DBP 和 DEHP 的接触风险指数  $ERI$  均小于 1, 表明闽南地区通过摄食水产品途径暴露于 PAEs 的接触风险是可接受的。

**致谢:** 福建省水产研究所海水鱼类科研繁育中试基地钟建兴场长及课题组成员对本研究给予了大力支持和帮助, 在此表示感谢。

## 参 考 文 献

- GB 17378.3-2007, 海洋监测规范第 3 部分: 样品的采集、贮存与运输. 北京: 中国标准出版社, 2007, 1-12
- 马保华, 王兆梅, 李娜, 等. 养殖罗非鱼肉中邻苯二甲酸酯残留分析. 食品工业科技, 2012, 33(4): 56-60
- 邓冬富, 闫玉莲, 谢小军. 长江朱杨段和沱江富顺段鱼类体内 6 种邻苯二甲酸酯的含量. 淡水渔业, 2012, 42(2): 55-60
- 甘居利, 林钦, 贾晓平, 等. 广东近江牡蛎(*Crassostrea*

- rivalaris*)有机氯农药残留与健康风险评估. 农业环境科学学报, 2007, 26(6): 2323-2328
- 甘居利, 贾晓平, 林钦, 等. 应用重金属和有机污染物对人体健康的风险评价理论反推牡蛎安全消费量. 南方水产, 2008, 4(6): 17-25
- 石凤琼, 柯常亮, 林钦, 等. 气相色谱-质谱法测定水产品中 15 种邻苯二甲酸酯类塑化剂的残留量. 分析测试学报, 2013, 32(8): 915-922
- 刘庆, 杨红军, 史衍玺, 等. 环境中邻苯二甲酸酯类(PAEs)污染物研究进展. 中国生态农业学报, 2012, 20(8): 968-975
- 李潇, 聂湘平, 潘德博, 等. 养殖鱼体邻苯二甲酸酯含量与分布特征. 环境与健康杂志, 2008, 25(3): 202-205
- 张静, 陈会明. 邻苯二甲酸酯类增塑剂的危害及监管现状. 现代化工, 2011, 31(12): 1-6
- 林钦, 石凤琼, 柯常亮, 等. 水产品中邻苯二甲酸酯残留与健康风险评价研究进展. 南方水产科学, 2014, 10(1): 92-99
- 郑力行, 诸建辉, 张蕴辉, 等. 水产品中 3 种邻苯二甲酸酯类物质的测定. 复旦学报(医学版), 2003, 30(2): 158-159, 163
- 陶刚, 梁诚. 国内外增塑剂市场分析与发展趋势. 塑料科技, 2008, 36(6): 78-81
- 梁庆香. 健康风险评价国内外研究进展. 中外健康文摘, 2011, 8(31): 144-148
- Andrade AJM, Grande SW, Talsness CE, *et al.* A dose-response study following in utero and lactational exposure to di(2-ethylhexyl)-phthalate(DEHP): non-monotonic dose-response and low dose effects on rat brain aromatase activity. Toxicol, 2006, 227(3):185-192
- Fromme H, Gruber L, Seckin E, *et al.* Phthalates and their metabolites in breast milk-results from the bavarian monitoring of breast milk (BAMBI). Environ Int, 2011, 37(4):

- 715–722
- Gaudin R, Marsan P, Robert A, *et al.* Biological monitoring of occupational exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate: survey of workers exposed to plastisols. *Int Arch Occup Environ Health*, 2008, 81(8): 959–966
- Kondo T, Shono T, Suita S. Age-specific effect of phthalate ester on testicular development in rats. *J Pediatr Surg*, 2006, 41(7): 1290–1293
- Penalver A, Pocerull E, Borrull F, *et al.* Determination of phthalate esters in water samples by solid-phase microextraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *J Chromatogr A*, 2000, 872(1–2): 191–201
- Pogribny IP, Tryndyak VP, Boureiko A, *et al.* Mechanisms of peroxisome proliferator-induced DNA hypomethylation in rat liver. *Mutat Res*, 2008, 644(1–2): 17–23
- Song NR, On JW, Lee J, *et al.* Biomonitoring of urinary di(2-ethylhexyl) phthalate metabolites of mother and child pairs in South Korea. *Environ Int*, 2013, 54: 65–73
- van Wezel AP, van Vlaardingen P, Posthumus R, *et al.* Environmental risk limits for two phthalates, with special emphasis on endocrine disruptive properties. *Ecotoxicol Environ Safe*, 2000, 46(3): 305–321
- Wang JL, Ye YC, Wu WZ. Comparison of di-*n*-methyl phthalate biodegradation by free and immobilized microbial cells. *Biomed Environ Sci*, 2003, 16(2): 126–132
- Xie Z, Ebinghaus R, Temme C, *et al.* Atmospheric concentrations and air-sea exchanges of phthalates in the North Sea (German Bight). *Atmos Environ*, 2005, 39(18): 3209–3219
- Yuan SY, Huang I, Chang BV. Biodegradation of dibutyl phthalate and di-(2-ethylhexyl) phthalate and microbial community changes in mangrove sediment. *J Hazard Mater*, 2010, 184(1): 826–831

(编辑 冯小花)

## The Distribution Characteristics and Risk Assessment of Phthalic Acid Esters (PAEs) in Aquatic Products in Minnan Region

JIANG Linlin<sup>①</sup>

(Fisheries Research Institute of Fujian, Xiamen 361012)

**Abstract** According to the results of the Phthalic Acid Esters (PAEs) content in the aquatic products collected from Minnan region (Xiamen, Zhangzhou, and Quanzhou) in January and July of 2013, we discussed the PAEs residue levels and the distribution characteristics in different aquatic products and evaluated the contamination status and the ecological risk caused by PAEs. The results showed that the content of PAEs in seawater fish varied from  $2.45 \times 10^2$  to  $1.13 \times 10^3$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  (wet weight, similarly hereinafter) and the mean value was  $6.78 \times 10^2$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ . The PAEs content in freshwater fish varied from  $4.36 \times 10^2$  to  $1.37 \times 10^3$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  with the mean value of  $8.73 \times 10^2$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ . The PAEs content in shrimp varied from  $3.22 \times 10^2$  to  $1.27 \times 10^3$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  and the mean value was  $7.76 \times 10^2$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ . The PAEs content in crab varied from  $6.17 \times 10^2$  to  $1.20 \times 10^3$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  with the mean value of  $7.91 \times 10^2$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ . The PAEs content in shellfish varied from  $9.77 \times 10^2$  to  $1.35 \times 10^3$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  and the mean value was  $1.22 \times 10^3$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Butyl benzyl phthalate (BBP) and di-*n*-octyl phthalate (DNOP) were not detected in all aquatic products. The order of other four PAEs residues content was di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) > di-*n*-butyl *ortho*-phthalate (DBP) > diethyl phthalate (DEP) > dimethyl phthalate (DMP). PAEs had different levels of residues in aquatic products, suggesting a common phenomenon for the enrichment of PAEs in the aquatic products. Compared with other domestic regions, the detection rate and the value of DEHP were higher, indicating that part of the ecological environment in Minnan region had been polluted by DEHP. The expose risk index (*ERI*) of DBP and DEHP in organic pollutants through feeding was less than 1, suggesting that the risk of exposure to the PAEs was low and acceptable by consuming the aquatic products.

**Key words** Minnan region; PAEs; Distribution characteristics; Risk assessment

① Corresponding author: JIANG Linlin, E-mail: jllhzau@163.com

# 复合酶提取法对浒苔(*Enteromorpha* sp.) 膳食纤维吸附能力的影响\*



李月欣<sup>1,2</sup> 刘楠<sup>1</sup> 周德庆<sup>1①</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;  
2. 上海海洋大学食品学院 上海 201306)

**摘要** 针对丰富的浒苔资源还未得到有效利用的现状,以浒苔为原料,采用复合酶提取法制备浒苔膳食纤维。浒苔在 55℃、pH=7.7 的条件下,由不同比例的蛋白酶和纤维素酶(5:1、10:1、15:1、20:1 和 25:1)配制的复合酶进行酶解,提取膳食纤维,测定不同提取条件得到的浒苔膳食纤维在模拟体内的环境下(pH=2.0 和 pH=7.0)吸附葡萄糖、胆固醇和亚硝酸盐的能力。结果显示,随着复合酶中蛋白酶比例的升高,膳食纤维对葡萄糖和胆固醇的吸附能力先增强后减弱。在蛋白酶:纤维素酶的比例为 10:1 时,膳食纤维对葡萄糖的最大吸附值为 20.03 mg/g;在蛋白酶:纤维素酶比例为 15:1 时,膳食纤维对胆固醇的最大吸附值为 21.93 mg/g。而浒苔膳食纤维吸附亚硝酸的能力则随着复合酶中蛋白酶比例的升高而逐渐增强,在蛋白酶:纤维素酶比例为 25:1 时,浒苔膳食纤维对亚硝酸盐达到最大吸附值 29.25 μmol/g。在人工肠液中(pH=7.0),膳食纤维对胆固醇的吸附能力较强;在人工胃液中(pH=2.0),膳食纤维对亚硝酸盐的吸附能力较强;膳食纤维对葡萄糖的吸附能力在人工肠、胃液中无显著差异( $P>0.05$ )。推测膳食纤维对亚硝酸盐的吸附主要发生在胃部,对胆固醇的吸附主要发生在肠部,而膳食纤维对葡萄糖的吸附在胃部和肠部同时进行,是一个持续的吸附过程。

**关键词** 复合酶; 浒苔; 膳食纤维; 吸附能力

**中图分类号** S986 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)04-0145-05

浒苔(*Enteromorpha* sp.)是一种大型绿藻,广泛分布于我国东南沿海和青岛海域(林英庭等, 2009)。浒苔资源丰富,近几年呈上升趋势,产量高达几百万 t(宋建侠, 2013)。而对浒苔的处理还停留在掩埋和作为粗加工的饲料等,造成了极大的浪费。浒苔的膳食纤维可占干基的 70%以上,是良好的膳食纤维来源(薛勇等, 2011)。

膳食纤维是一类碳水化合物多聚物,并含有少量的非碳水化合物组分(Rakha *et al*, 2010)。独特的化学结构赋予膳食纤维具有重要的生理功能,膳食纤维能够有效预防高血压(Brownlee, 2011)、心脏病(Debusca

*et al*, 2014)等心脑血管疾病,同时也可以防止肥胖、痔疮(Fuentes-Alventosa *et al*, 2009)、便秘、肠癌(韩冬, 2013)等胃肠疾病。膳食纤维的结构和组分对其生理功能有重要影响(Chen *et al*, 2014),膳食纤维的不同来源及其分离提取过程,导致其结构有很大区别(Huang *et al*, 2013),从而对其理化性质和生理功能产生较大影响(余凡等, 2013)。优化浒苔中膳食纤维的提取工艺,提高膳食纤维的吸附性能,对浒苔资源的有效利用及浒苔功能食品的开发具有重要意义。本研究以浒苔为原料,研究复合酶提取法对浒苔膳食纤维吸附能力的影响,并模拟人体胃、肠道不同 pH 条件,研究

\* 中央级公益性科研院所基本科研业务费(20603022015001)和青岛市市南区科技发展资金项目(2014-14-008-SW)共同资助。李月欣, E-mail: liyuexin20082008@163.com

① 通讯作者: 周德庆, 研究员, E-mail: zhoudeqing@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-07-01, 收修改稿日期: 2014-12-29

浒苔膳食纤维吸附葡萄糖、胆固醇和亚硝酸盐的能力,期望为浒苔资源的高值化利用提供参考,为开发不同生理功能的膳食纤维功能食品提供理论和数据支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 浒苔样品的制备

浒苔于2013年夏季采自山东青岛附近海域,清洗后沥干水分,低温烘干,粉碎后过40目筛,浒苔干粉于干燥器中储存备用。

### 1.2 膳食纤维的提取

采用复合酶法(蛋白酶和纤维素酶)提取浒苔膳食纤维(周静峰等,2011)。在温度为55℃、pH=7.7的环境中,采用蛋白酶和纤维素酶比例分别为5:1、10:1、15:1、20:1、25:1的复合酶对浒苔原料进行酶解(李月欣等,2014)。酶解90 min后,用乙醇分级沉淀酶解液,2 h后抽滤,收集滤渣,60℃烘箱干燥,得到粗膳食纤维。

### 1.3 膳食纤维吸附能力的测定

采用DNS显色法(陈利梅等,2010)测定葡萄糖浓度,根据标准曲线计算葡萄糖含量,通过公式(1)计算膳食纤维吸附葡萄糖的能力。

参考丁卓平等(2004),根据标准曲线计算胆固醇含量,通过公式(2)计算膳食纤维吸附胆固醇能力。

采用盐酸萘乙二胺显色法(张华等,2013),通过公式(3)计算膳食纤维吸附亚硝酸盐的能力。

$$\begin{aligned} & \text{吸附葡萄糖的能力}(\text{mg/g}) \\ & = \frac{\text{吸附前葡萄糖含量}(\text{mg}) - \text{吸附后葡萄糖含量}(\text{mg})}{\text{膳食纤维的含量}(\text{g})} \quad (1) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & \text{吸附胆固醇的能力}(\text{mg/g}) \\ & = \frac{\text{吸附前胆固醇量}(\text{mg}) - \text{吸附后胆固醇量}(\text{mg})}{\text{膳食纤维的含量}(\text{g})} \quad (2) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & \text{吸附NO}_2^- \text{能力}(\mu\text{mol/g}) \\ & = \frac{\text{吸附前NO}_2^- \text{含量}(\mu\text{mol}) - \text{吸附后NO}_2^- \text{含量}(\mu\text{mol})}{\text{膳食纤维的含量}(\text{g})} \quad (3) \end{aligned}$$

### 1.4 数据处理

用SPSS 17.0对试验数据进行分析统计, $P < 0.05$ ,差异显著; $P > 0.05$ ,差异不显著。

## 2 结果

### 2.1 提取条件对膳食纤维吸附葡萄糖能力的影响

分别选取蛋白酶和纤维素酶比例为5:1、10:1、15:1、20:1和25:1的条件下制备的浒苔膳食纤维,测

定其在不同的pH环境(pH=2.0和pH=7.0)吸附葡萄糖的能力。从图1可知,在pH=7.0条件下,蛋白酶和纤维素酶的比例为5:1和10:1时制备的浒苔膳食纤维对葡萄糖的吸附能力较强,分别为21.21 mg/g和21.93 mg/g。随着蛋白酶比例的提高、纤维素酶比例的降低,吸附葡萄糖的能力开始减弱。在蛋白酶和纤维素酶的比例为15:1时,对葡萄糖的吸附能力最弱,为16.80 mg/g。在pH=2.0条件下,复合酶配制比例对膳食纤维吸附葡萄糖的能力无显著影响( $P > 0.05$ )。

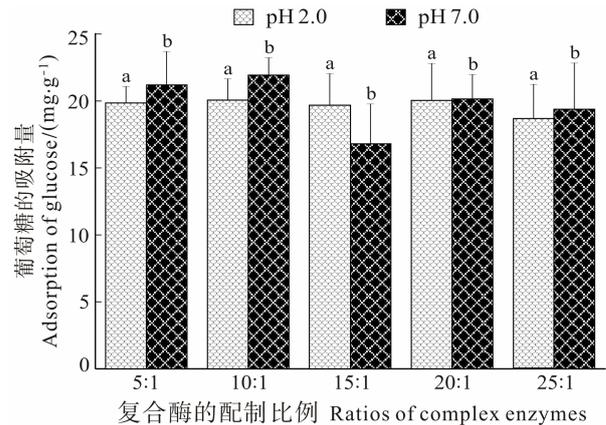


图1 蛋白酶和纤维素酶的比例对膳食纤维吸附葡萄糖能力的影响

Fig.1 Effects of different ratio of protease to cellulase on glucose adsorption to the extracted dietary fiber

图中数据为平均值±标准误(Mean±SE, n=5)

a. 差异不显著( $P > 0.05$ ); b. 差异显著( $P < 0.05$ ). 下同

Results are expressed as Mean±SE (n=5)

a. No significant difference ( $P > 0.05$ ); b. Significant difference ( $P < 0.05$ ). Same in the following figures

### 2.2 提取条件对膳食纤维吸附胆固醇能力的影响

利用不同比例的蛋白酶和纤维素酶的复合酶制备得到的膳食纤维吸附胆固醇能力的测定结果见图2。在pH为2.0的环境下,不同比例配制的复合酶酶解制备的浒苔膳食纤维对胆固醇的吸附无显著差异( $P > 0.05$ )。在pH为7.0的环境下,随着蛋白酶比例的提高,酶解得到的浒苔膳食纤维对胆固醇的吸附能力逐渐增加,在蛋白酶和纤维素酶的比例为15:1时达到最高(21.93 mg/g)。随着复合酶中蛋白酶比例的进一步升高,膳食纤维吸附胆固醇的能力逐渐下降。根据数理统计分析,复合酶比例的变化对制备得到的浒苔膳食纤维吸附胆固醇的能力影响显著( $P < 0.05$ )。

### 2.3 提取条件对膳食纤维吸附亚硝酸盐能力的影响

在不同比例蛋白酶和纤维素酶的条件下制备的

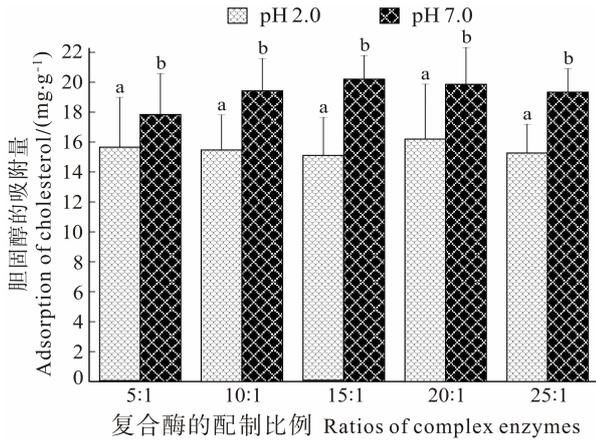


图 2 蛋白酶和纤维素酶的比例对膳食纤维吸附胆固醇能力的影响

Fig.2 Effects of different ratio of protease to cellulase on cholesterol adsorption to the extracted dietary fiber

膳食纤维吸附亚硝酸盐能力见图 3。在 pH 为 2.0 的环境下,任意比例的蛋白酶和纤维素酶酶解得到的膳食纤维对亚硝酸盐的吸附能力都明显高于 pH=7.0, 约是 pH 为 7.0 条件下的 3-5 倍。但酶解过程中不同的复合酶比例条件下制备的膳食纤维在 pH=2.0 条件下吸附亚硝酸盐能力无显著差异( $P>0.05$ )。

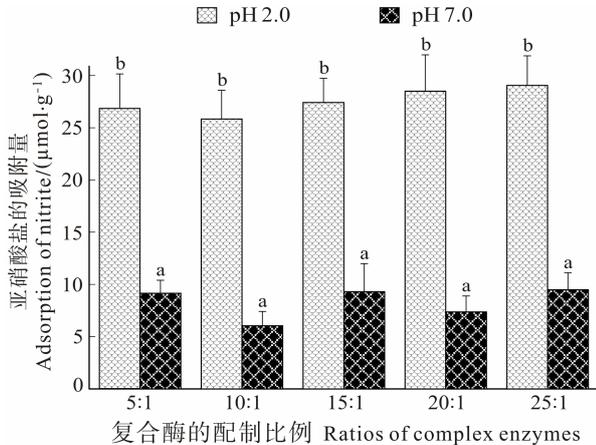


图 3 复合酶中蛋白酶和纤维素酶的比例对膳食纤维吸附亚硝酸盐能力的影响

Fig.3 Effects of different ratio of protease to cellulase on nitrite adsorption to the extracted dietary fiber

### 2.4 不同 pH 环境对膳食纤维吸附能力的影响

根据不同配制比例的复合酶对浒苔膳食纤维吸附能力的影响结果,采用蛋白酶和纤维素酶比例为 20:1 的条件,在 55℃、pH 为 7.7 的条件下,酶解 90 min 制备膳食纤维。在人工胃液和人工肠液中检测不同 pH 环境对膳食纤维吸附过程的影响(图 4-图 6)。在人工

胃液和人工肠液中,膳食纤维对葡萄糖、胆固醇和亚硝酸的吸附在初始阶段均迅速升高,然后逐渐稳定并

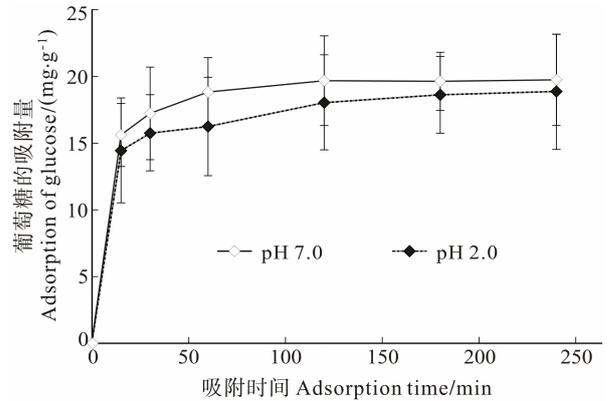


图 4 浒苔膳食纤维在人工胃液和人工肠液中吸附葡萄糖的能力

Fig.4 The adsorption of glucose to the dietary fiber in the simulated gastric fluid and intestinal fluid

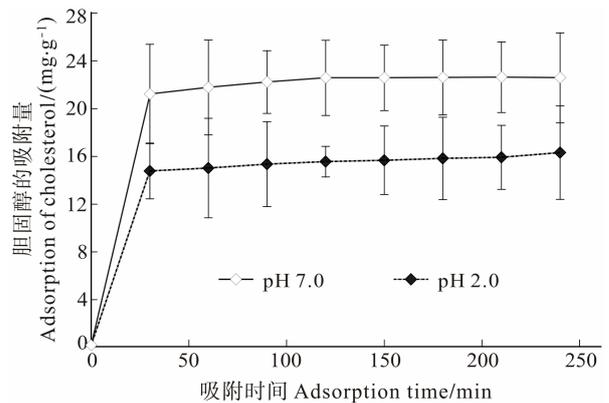


图 5 浒苔膳食纤维在人工胃液和人工肠液中吸附胆固醇的能力

Fig.5 The adsorption of cholesterol to the dietary fiber in the simulated gastric fluid and intestinal fluid

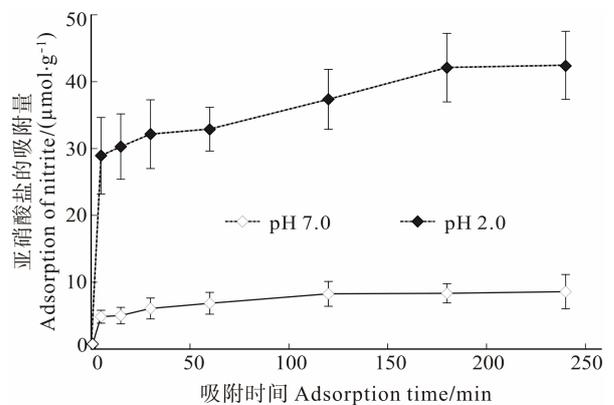


图 6 浒苔膳食纤维在人工胃液和人工肠液中吸附亚硝酸盐的能力

Fig.6 The adsorption of nitrite to the dietary fiber in the simulated gastric fluid and intestinal fluid

达到平衡。pH 环境的不同并没有引起膳食纤维对葡萄糖吸附特性的明显差异,在人工肠液中(pH=7.0),膳食纤维对胆固醇的吸附能力明显高于在人工胃液中(pH=2.0),其吸附能力相差 5.0 mg/g 以上。由图 6 可知,膳食纤维对亚硝酸盐的吸附在短时间内效果极为明显,5 min 内迅速升高,然后趋于平缓并达到平衡。在人工胃液中(pH=2.0),膳食纤维对亚硝酸盐的吸附能力明显强于人工肠液(pH=7.0),高达 5 倍以上。

### 3 讨论

#### 3.1 复合酶配制比例对膳食纤维吸附葡萄糖、胆固醇及亚硝酸盐能力的影响

从浒苔提取膳食纤维的过程中,复合酶中蛋白酶和纤维素酶的配制比例对膳食纤维吸附葡萄糖、胆固醇和亚硝酸盐的能力有一定的影响。分析原因可能是蛋白酶与纤维素酶的相互作用在酶解过程中改变了膳食纤维的结构、组分及功能基团,从而使其对葡萄糖、胆固醇和亚硝酸盐的吸附能力产生了差异。在复合酶配制比例中蛋白酶比例较高,对浒苔酶解时起主要作用,这与黄纪念等(2011)的研究结果相吻合。此外,纤维素酶的量对膳食纤维的理化性质也产生一定影响,这主要是由于纤维素酶是一种复合酶,能够降解纤维素大分子为小分子单糖或多糖,对膳食纤维能够起到一定的改性作用。

#### 3.2 不同 pH 环境对膳食纤维吸附葡萄糖、胆固醇以及亚硝酸盐能力的影响

在人工胃液(pH=2.0)和人工肠液(pH=7.0)两种不同环境中,浒苔膳食纤维对葡萄糖、胆固醇和亚硝酸盐的吸附过程均在短时间内急剧增大,然后逐渐升高,最后达到饱和状态。膳食纤维吸附葡萄糖能力在人工胃液和人工肠液中差异不显著,说明两种环境均有利于膳食纤维对葡萄糖的吸收。由此推测,在消化过程中,膳食纤维可在胃部和肠道中持续吸附葡萄糖,可有效地起到降低人体血糖的作用(张华等,2013)。膳食纤维在人工肠液中吸附胆固醇的能力明显高于在人工胃液中,表明中性条件(pH=7.0)有利于胆固醇的吸附,膳食纤维对胆固醇吸附主要发生在肠道。而膳食纤维在人工肠液中对亚硝酸盐的吸附明显弱于在人工胃液中,酸性条件有利于亚硝酸盐的吸附,推测膳食纤维对亚硝酸盐的吸附主要发生在胃部。这主要是由于酸性条件有利于膳食纤维中的活性基团与  $\text{NO}_2^-$  结合,膳食纤维中含有木聚糖等糖类复合体,这种复合体能够通过糖蛋白、阿魏酸、香豆酸等酚类

发生酰化作用而连接起来,从而抑制 N-硝基化合物的合成,达到吸附亚硝酸盐的目的(王志宏等,2012)。

### 4 结论

采用不同比例的蛋白酶和纤维素酶的复合酶进行酶解提取浒苔膳食纤维,测定不同提取条件获得的膳食纤维吸附葡萄糖、胆固醇和亚硝酸盐的能力。结果显示,在蛋白酶:纤维素酶的比例为 10:1 时,浒苔膳食纤维对葡萄糖的最大吸附值为 20.03 mg/g;在蛋白酶:纤维素酶比例为 15:1 时,浒苔膳食纤维对胆固醇的最大吸附值为 21.93 mg/g。在实验范围内,蛋白酶:纤维素酶比例为 25:1 时,浒苔膳食纤维对亚硝酸盐达到最大吸附值(29.25  $\mu\text{mol/g}$ )。通过模拟人体内环境,研究发现,在人工肠液中,膳食纤维对胆固醇的吸附能力较强;在人工胃液中,膳食纤维对亚硝酸盐的吸附能力较强;膳食纤维对葡萄糖的吸附能力在人工肠、胃液中无显著差异。因此,针对酶解法对膳食纤维吸附特性的影响,可为开发不同生理功能的膳食纤维功能食品提供理论和数据支持。

### 参 考 文 献

- 丁卓平,王明华,刘振华,等.食品中胆固醇含量测定方法的研究与比较.食品科学,2004,25(1):130-135
- 王志宏,薛建斌,平晓丽,等.陈皮膳食纤维对亚硝酸盐的吸附作用.中国实验方剂学杂志,2012,18(8):92-95
- 李月欣,刘楠,周德庆.响应面法优化浒苔膳食纤维酶法提取工艺.食品工业,2014,35(4):52-56
- 张华,段倩,李星科,等.米糠膳食纤维功能理化性质的研究.湖北农业科学,2013,52(21):5293-5295
- 宋建侠.浒苔利用综述.科协论坛,2013(9):140-141
- 余凡,葛亚龙,杨恒拓.苜蓿中膳食纤维的提取工艺及生理功能的研究进展.杭州化工,2013,43(4):8-10,18
- 陈利梅,李德茂,叶乃好.浒苔不溶性膳食纤维理化性质研究.粮油加工,2010(4):106-108
- 林英庭,朱风华,徐坤,等.青岛海域浒苔营养成分分析与评价.饲料工业,2009,30(3):46-49
- 周静峰,何雄,师邱毅.酶法提取高品质浒苔膳食纤维工艺.食品研究与开发,2011,32(3):148-151
- 黄纪念,王长虹,孙强,等.响应面法优化不同蛋白酶制备麦麸膳食纤维.浙江农业科学,2011(2):344-349
- 韩冬.膳食纤维与肠道健康.中国微生态学杂志,2013,25(10):1225-1228
- 薛勇,韩晓银,王超,等.浒苔膳食纤维提取及其功能性初步研究.食品与发酵工业,2011,37(7):193-196
- Brownlee IA. The physiological roles of dietary fibre. Food Hydrocolloids, 2011, 25(2): 238-250
- Chen Y, Ye R, Yin L, et al. Novel blasting extrusion processing

- improved the physicochemical properties of soluble dietary fiber from soybean residue and *in vivo* evaluation. *J Food Eng*, 2014, 120: 1–8
- Debusca A, Tahergorabi R, Beamer SK, *et al.* Physicochemical properties of surimi gels fortified with dietary fiber. *Food Chem*, 2014, 148: 70–76
- Fuentes-Alventosa JM, Rodríguez-Gutiérrez G, Jaramillo-Carmona S. Effect of extraction method on chemical composition and functional characteristics of high dietary fibre powders obtained from asparagus by-products. *Food Chem*, 2009, 113(2): 665–671
- Huang Z, Ye R, Chen J, *et al.* An improved method for rapid quantitative analysis of the insoluble dietary fiber in common cereals and some sorts of beans. *J Cereal Sci*, 2013, 57(3): 270–274
- Rakha A, Åman P, Andersson R. Characterisation of dietary fibre components in rye products. *Food Chem*, 2010, 119(3): 859–867

(编辑 冯小花)

## Effects of Complex Enzymes Extraction on Adsorption Capabilities of Dietary Fiber from *Enteromorpha* sp.

LI Yuexin<sup>1,2</sup>, LIU Nan<sup>1</sup>, ZHOU Deqing<sup>1</sup>①

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

2. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

**Abstract** *Enteromorpha* sp. is widely distributed along the coast of China, particularly in the eastern regions, but it has not been utilized fully. To investigate the adsorption of glucose, cholesterol and nitrite to the dietary fiber extracted from *Enteromorpha* sp. by the method of complex enzymes (protease and cellulase), different ratios of protease to cellulase (5:1, 10:1, 15:1, 20:1, and 25:1) were used to extract dietary fiber from *Enteromorpha* sp. The results showed that the ratio of protease to cellulase in the complex enzymes had obvious effects on the adsorption capabilities of the dietary fiber. With the increased protease in the complex enzymes, the adsorption of glucose and cholesterol to the dietary fiber increased and then decreased. The dietary fiber using the 10:1 ratio of protease and cellulase had highest adsorption of glucose (20.03 mg/g). The dietary fiber using the 15:1 ratio of protease to cellulase had the highest adsorption of cholesterol (21.93 mg/g). With the increased protease, the adsorption of nitrite to the dietary fiber increased. The dietary fiber had highest adsorption of nitrite (29.25 μmol/g) at the 25:1 ratio of protease to cellulase. Furthermore, the adsorption capabilities of the dietary fiber in the simulated gastric fluid at pH 2.0 and the intestinal fluid at pH 7.0 were investigated. The adsorption of cholesterol to the dietary fiber was higher in the simulated intestinal fluid than that in the simulated gastric fluid, while nitrite was the opposite. The adsorption of glucose to the dietary fiber had no significant difference in the simulated intestinal and the simulated gastric fluids. These results indicated that the adsorption of nitrite to dietary fiber happened in the stomach and cholesterol happened in the intestinal, and that the adsorption of glucose to the dietary fiber happened both in the stomach and in the intestinal.

**Key words** Complex enzymes; *Enteromorpha* sp.; Dietary fiber; Adsorption capability

① Corresponding author: ZHOU Deqing, E-mail: zhoudq@ysfri.ac.cn

# 基于电子鼻技术的鱼露与鱼酿酱油的品质分析\*

赵玲 刘淇<sup>①</sup> 曹荣

(中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

**摘要** 通过电子鼻获取鱼露、鱼酿酱油和生抽的气味信息,进行主成分分析(PCA)、线性判别分析(LDA)和负荷加载分析(Loadings),并结合氨基酸态氮、盐分、全氮和游离氨基酸含量,对比分析3种调味品的品质。结果显示,3种调味品中游离氨基酸种类丰富,鱼露中苏氨酸、甘氨酸、丙氨酸、甲硫氨酸、赖氨酸的含量明显高于鱼酿酱油和生抽;生抽和鱼酿酱油中鲜味氨基酸的含量明显高于鱼露,但生抽中必需氨基酸的含量远低于鱼酿酱油和鱼露;3种调味品挥发性成分复杂,电子鼻10个金属传感器能很好地区分3种调味品的挥发性气味,W5S、W1S、W2S号传感器比其他7个传感器有更高的响应值,其中W2S号传感器的响应值变化最显著。这说明电子鼻能较好地地区分鱼露、鱼酿酱油和生抽,虽然3种调味品中第1、2主成分相同,但醇类、氮氧化合物类物质对第1、2主成分的贡献率不同。

**关键词** 电子鼻;鱼露;鱼酿酱油;生抽;品质

**中图分类号** S985 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)04-0150-05

鱼露,又称鱼酱油,是新鲜低值鱼与盐混合发酵形成的气味浓郁的调味品,含有17种氨基酸,其中8种是人体所必需的。鱼酿酱油是近年来新开发的一种以新鲜低值鱼与大豆混合加盐发酵而成的调味品,营养丰富,鲜味独特。电子鼻技术是利用气体传感器阵列的响应曲线来识别样品的挥发性气味,具有快速、操作简单、灵敏度高、重现性好等优点。近年来,电子鼻技术发展迅速,在水产品的新鲜度评价(佟懿等,2010;赵梦醒等,2011、2013)、果蔬品种区分(邹小波等,2007)、肉品检测、酒类鉴别(Chmielew *et al*, 2007)、茶叶审评(Dutta *et al*, 2003)、香精识别(陈晓明等,2007)、谷物霉变检测(Magan *et al*, 2000;邹小波等,2004)、饮料识别(Farnworth *et al*, 2007)、乳制品检测(Brudzew *et al*, 2004)等食品领域得到了广泛应用。

江津津等(2011)采用电子鼻分析了7种鱼露的挥发性气味,表明电子鼻能很好地区分各样品的气味差别。目前,国内外未见关于使用电子鼻分析鱼露和鱼酿酱油品质的研究报道。本研究以鱼露、鱼酿酱油为实验对象,对比生抽,运用电子鼻进行气味分析,结合

氨基酸态氮、盐分、全氮等指标,综合分析3种调味品的品质,为水产调味品的开发应用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验样品** 鱼露、鱼酿酱油由山东威海浦源食品有限公司提供,生产日期为2014年4月;海天金标生抽购于山东青岛大润发超市,生产日期为2014年6月。

**1.1.2 仪器设备** PEN3便携式电子鼻(德国Airsense公司),全自动氨基酸分析仪(日本Hitachi公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 氨基酸态氮的测定** 按照GB/T 5009.39-2003《酱油卫生标准的分析方法》分别测定鱼露、鱼酿酱油和生抽中氨基酸态氮的含量,结果以每100 ml样品中所含氮的克数表示。

**1.2.2 全氮的测定** 按照GB 5009.5-2010《食品中蛋白质的测定方法》分别测定鱼露、鱼酿酱油和生抽中全

\* 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(20603022011005)资助。赵玲, E-mail: zhaoling@ysfri.ac.cn

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

收稿日期: 2014-09-01, 收修改稿日期: 2014-11-21

氮的量, 结果以每 100 ml 样品中所含氮的克数表示。

**1.2.3 盐分的测定** 按照 GB/T 5009.39-2003《酱油卫生标准的分析方法》分别测定鱼露、鱼酿酱油和生抽中盐分含量。

**1.2.4 游离氨基酸的测定** 利用全自动氨基酸分析仪测定鱼露、鱼酿酱油和生抽中的游离氨基酸组成。

**1.2.5 电子鼻分析** 依次分别量取适量的鱼露、鱼酿酱油和生抽, 稀释到 5 ml, 置于 20 ml 顶空瓶中, 加盖密封, 依次用电子鼻进行检测(赵梦醒等, 2011)。采用 Winmuster 软件进行数据的采集与处理, 分析方法包括主成分分析(PCA)、线性判别分析(LDA)和负荷

加载分析(Loadings)。

## 2 结果

### 2.1 鱼露、鱼酿酱油与生抽中氨基酸态氮、全氮及盐分含量的测定

鱼露、鱼酿酱油与生抽中氨基酸态氮、全氮及盐分含量见表 1。根据标准 SB/T 10324-1999 鱼露、Q/WPY0004S 鱼酿酱油和 GB86186-2000 高盐稀态发酵酱油中的规定, 本研究所用鱼露和生抽的质量等级均为一级, 鱼酿酱油的质量等级为特级。

表 1 氨基酸态氮、全氮及盐分含量  
Tab.1 Contents of amino acid nitrogen, total nitrogen and salinity

项目 Items	鱼露 Fish sauce	鱼酿酱油 Fish soy sauce	生抽 Light soy sauce
氨基酸态氮 Amino acid nitrogen (g/100 ml)	0.994±0.018	0.896±0.016	1.323±0.023
全氮 Total nitrogen (g/100 ml)	1.600±0.017	1.620±0.021	1.710±0.025
盐分 Salinity	27.22±0.21	14.35±0.12	16.27±0.16

### 2.2 游离氨基酸的测定

由表 2 可知, 3 种调味品中氨基酸种类丰富, 均含有多种必需氨基酸, 鱼露中 Thr、Gly、Ala、Met、Lys 的含量明显高于鱼酿酱油和生抽, 但生抽中必需氨基酸的含量远低于鱼酿酱油和鱼露。生抽和鱼酿酱油中鲜味氨基酸的比例明显高于鱼露, 这是由于商品生抽和鱼酿酱油中添加了谷氨酸钠等, 而鱼露中没有添加谷氨酸钠等物质; 鱼露中苦味和甜味氨基酸比例高于生抽和鱼酿酱油。氨基酸作为调味品主要的呈味成分, 其组成和含量对其风味有着重要的影响。

### 2.3 鱼露、鱼酿酱油与生抽的电子鼻分析

**2.3.1 电子鼻对鱼露、鱼酿酱油与生抽挥发性气味的响应值** 鱼露、鱼酿酱油与生抽的传感器响应值见图 1。电子鼻的 10 个传感器电导率比值  $G/G_0$  ( $G_0/G$ ) 随时间的变化而变化。图 1 中每一条曲线代表 1 个传感器, 曲线表示挥发性成分通过传感器通道时, 响应值随时间变化的情况。进样初期响应值较低, 随着挥发性成分在传感器表面富集, 响应值不断增大, 最后趋于平缓, 达到稳定状态。因此, 选取 52-59 s 的数据进行分析。W5S、W1S、W2S 号传感器比其他 7 个传感器有更高的响应值, 且 W2S 号传感器的响应值变化最显著。

**2.3.2 主成分分析(PCA)法分析鱼露、鱼酿酱油与生抽的电子鼻响应值** 主成分分析是将多个指标转化为较少的几个综合指标的一种统计方法(赵梦醒等,

表 2 游离氨基酸组成(g/100 g)  
Tab.2 The composition of free amino acids (g/100 g)

氨基酸 Amino acids	鱼露 Fish sauce	鱼酿酱油 Fish soy sauce	生抽 Light soy sauce
Asp	0.572	0.574	0.506
Thr	0.276	0.188	0.194
Ser	0.234	0.200	0.229
Glu	1.103	1.851	4.632
Gly	0.332	0.273	0.225
Ala	0.425	0.351	0.234
Cys	0.089	0.126	0.076
Val	0.323	0.304	0.280
Met	0.124	0.048	0.053
Ile	0.274	0.270	0.269
Leu	0.468	0.424	0.385
Tyr	0.051	0.073	0.094
Phe	0.202	0.170	0.188
Lys	0.520	0.356	0.257
His	0.057	0.104	0.104
Arg	0.073	0.073	0.206
Pro	0.237	0.252	0.196
鲜味氨基酸比例 Flavor amino acid proportion(%)	31.78	43.01	40.77
苦味氨基酸比例 Bitter amino acid proportion(%)	18.88	16.62	11.52
甜味氨基酸比例 Sweet amino acid proportion(%)	28.54	22.42	13.27
必需氨基酸比例 (未包含色氨酸) Essential amino acid proportion (excluding tryptophan(%)	41.50	31.22	20.01
总计 Total	5.270	5.638	8.126

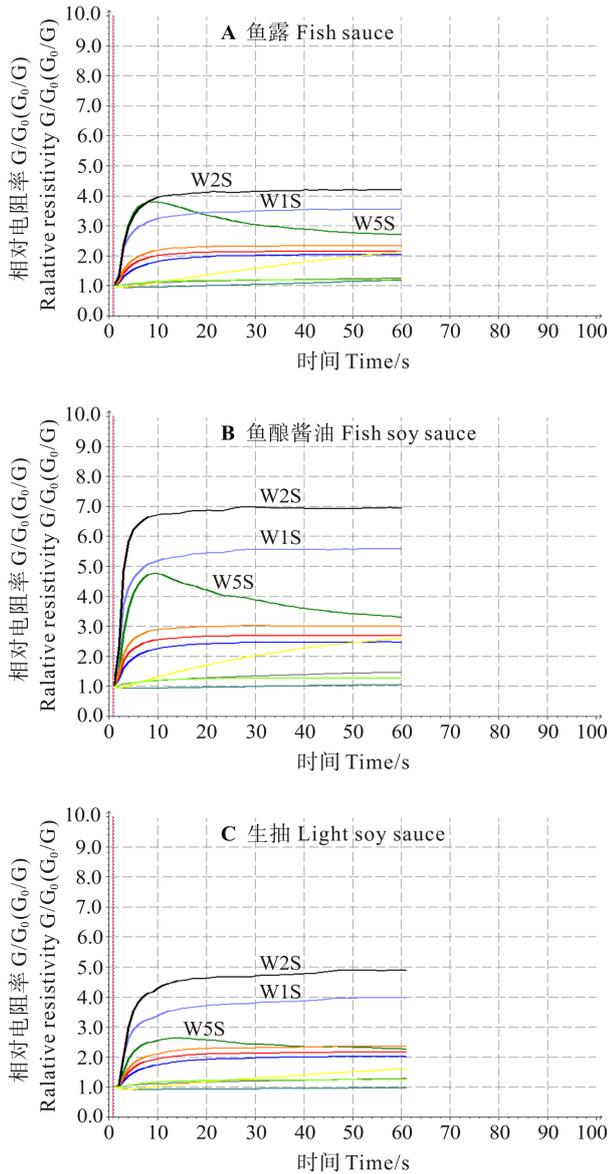


图 1 电子鼻传感器对鱼露、鱼酿酱油与生抽的响应曲线  
Fig.1 Response curves of the electronic nose to fish sauce, fish soy sauce and light soy sauce

2013)。如图 2 所示，第 1 主成分和第 2 主成分的贡献率分别为 99.249%、0.728%，总贡献率为 99.977%。这两个主成分几乎可以包含样品的所有信息，可以用来表示鱼露、鱼酿酱油与生抽的整体信息。从图 2 中可以看出，三者没有重叠区域，区分度较好，表明 3 种调味品的气味有明显差异。

**2.3.3 线性判别法(LDA)分析鱼露、鱼酿酱油与生抽的电子鼻响应值** LDA 分析更加注重样品在空间中的分布状态及彼此之间的距离分析，将样品信号数据通过运算法则投影到某一方向，使得组与组之间的投影尽可能分开(赵梦醒等, 2013)。图 3 为生抽、鱼露与鱼酿酱油电子鼻响应值的 LDA 分析图，由图 3

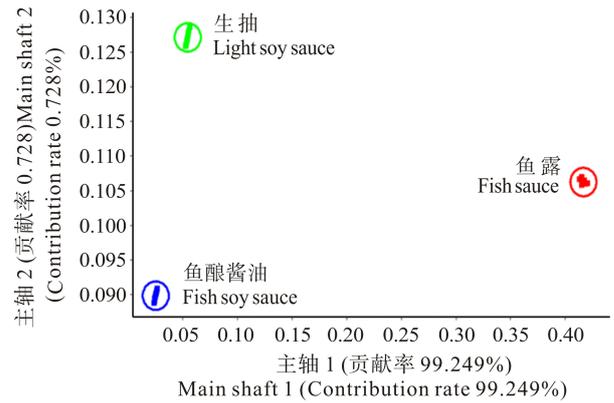


图 2 鱼露、鱼酿酱油与生抽电子鼻响应值的 PCA 分析  
Fig.2 PCA analysis of response values of the electronic nose for fish sauce, fish soy sauce and light soy sauce

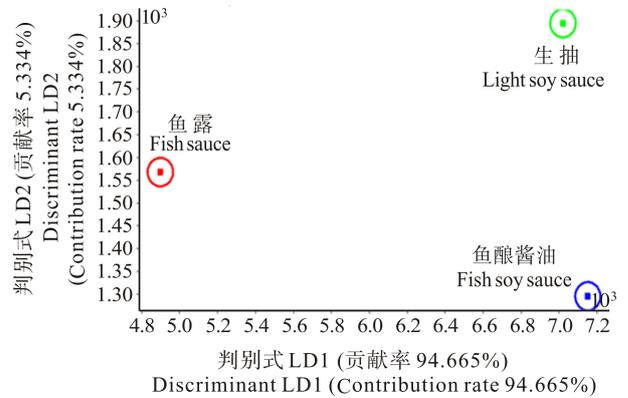


图 3 鱼露、鱼酿酱油与生抽电子鼻响应值的 LDA 分析  
Fig.3 LDA analysis of response values of the electronic nose for fish sauce, fish soy sauce and light soy sauce

可知，判别式 LD1 和判别式 LD2 的贡献率分别为 94.665% 和 5.334%，两判别式的总贡献率为 99.999%。采用 LDA 分析能够区分出样品存在一定差异，能够明显区分鱼露、鱼酿酱油与生抽。

**2.3.4 负荷加载分析** 图 4 为鱼露、鱼酿酱油与生抽的 Loadings 负荷加载分析，总贡献率为 99.57%。若某一传感器的响应值接近于零，说明该传感器的识别作用可以忽略；若某一传感器的响应值越偏离于零，则说明该传感器的识别能力越强。从图 4 可以看出，W2S 号传感器对第 1 主成分的贡献率最大，W5S、W1S 号传感器对第 2 主成分贡献率较大，W3S 号传感器对第 1、2 主成分的贡献率接近于零；W2S、W5S 号传感器对醇类、氮氧化物类物质灵敏，表明三者第 1、2 主成分均为醇类、氮氧化物类物质。这说明鱼露、鱼酿酱油与生抽中第 1、2 主成分相同，但乙醇、氮氧化物类等物质对第 1、2 主成分的贡献率不同。

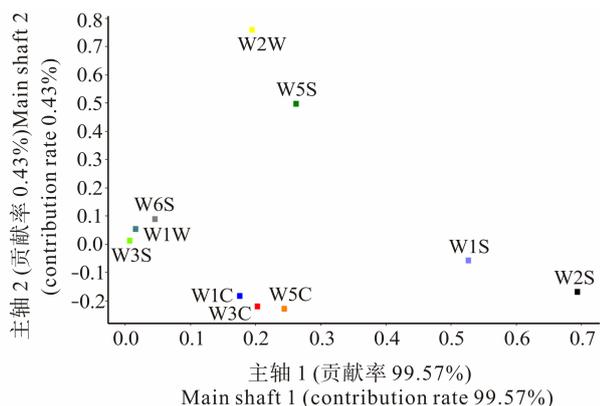


图4 鱼露、鱼酿酱油与生抽电子鼻响应值的 Loadings 分析  
Fig.4 Loadings analysis of response values of the electronic nose for fish sauce, fish soy sauce and light soy sauce

### 3 结论

本研究通过电子鼻获取鱼露、鱼酿酱油与生抽的挥发性气味信息,并结合其氨基酸态氮、全氮、盐分及游离氨基酸含量,对比分析3种调味品的品质。研究结果显示,鱼露和海天金标生抽为一级品,而鱼酿酱油为特级品。3种调味品中游离氨基酸种类丰富,鱼露中 Thr、Gly、Ala、Met、Lys 的含量明显高于鱼酿酱油和生抽,鱼露中苦味和甜味氨基酸比例高于生抽和鱼酿酱油;生抽中必需氨基酸的含量远低于鱼酿酱油和鱼露,相对于植物源蛋白原料而言,水产动物源蛋白原料必需氨基酸含量相对较高;生抽和鱼酿酱油中鲜味氨基酸的含量高于鱼露,这是因为商品生抽和鱼酿酱油中添加了谷氨酸钠的缘故。通过电子鼻数据分析发现,3种调味品挥发性成分复杂,电子鼻10个金属传感器能很好地区分3种调味品的挥发性气味,表明鱼露、鱼酿酱油与生抽之间存在一定差异,

虽然三者的第1、2主成分相同,但醇类、氮氧化合物类等物质对其贡献率不同。

### 参 考 文 献

- 江津津, 陈丽花, 黎海彬, 等. 基于电子鼻的鱼露香气品质识别. 农业工程学报, 2011, 27(12): 374-377
- 佟懿, 谢晶, 肖红, 等. 鲳鱼货架期预测模型的电子鼻评价与研究. 水产学报, 2010, 34(3): 367-374
- 邹小波, 赵杰文. 电子鼻快速检测谷物霉变的研究. 农业工程学报, 2004, 20(4): 121-124
- 邹小波, 赵杰文. 支持向量机在电子鼻区分不同品种苹果中的应用. 农业工程学报, 2007, 23(1): 146-149
- 陈晓明, 马明辉, 李景明, 等. 电子鼻在天然苹果香精检测中的应用. 食品科学, 2007, 28(3): 261-265
- 赵梦醒, 曹荣, 殷邦忠, 等. 电子鼻在对虾新鲜度评价中的应用. 渔业科学进展, 2011, 32(6): 57-62
- 赵梦醒, 丁晓敏, 曹荣, 等. 基于电子鼻技术的鲈鱼新鲜度评价. 食品科学, 2013, 34(6): 143-147
- Brudzew S, Osowski S, Markiew IT. Classification of milk by means of an electronic nose and SVM neural network. Sensors and Actuators B, 2004, 98(2): 291-298
- Chmielew SJ, Sikorska E, Goreki T. Evaluation of the beer aging using an electronic nose. Polish J Food Nutr Sci, 2007, 57(4): 91-93
- Dutta R, Kashw AKR, Bhuyan M. Electronic nose based tea quantity standardization. Neural Networks, 2003, 16(5/6): 847-853
- Farnworth ER, Mckellar RC, Chabot D. Use of an electronic nose to study the contribution of volatiles to orange juice flavor. J Food Quality, 2007, 25(6): 569-576
- Magan N, Evans P. Volatiles as an indicator of fungal activity and differentiation between species, and the potential use of electronic nose technology for early detection of grain spoilage. J Stored Products Res, 2000, 36(4): 319-340

(编辑 刘丛力)

## The Quality Analysis of Fish Sauce and Fish Soy Sauce using Electronic Nose

ZHAO Ling, LIU Qi<sup>①</sup>, CAO Rong

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

**Abstract** In this study, we analyzed the qualities of fish sauce, fish soy sauce and light soy sauce using the electronic nose. An electronic nose captured the flavors of light soy sauce, fish sauce and fish soy sauce, and the information was assessed with principal component analysis (PCA), linear discriminant analysis (LDA) and loadings analysis. The qualities of the sauces were then determined with the results above together with factors such as amino acid nitrogen, total nitrogen, salinity and the content of free amino acids. The results showed that fish sauce and light soy sauce were first-class products, and that fish soy sauce was a super product. There were a variety of free amino acids in the three sauces. The contents of threonine, glycine, alanine, methionine and lysine in fish sauce were higher than those in fish soy sauce and light soy sauce. The content of flavor amino acids in light soy sauce and fish soy sauce was significantly higher than that in fish sauce. This was because sodium glutamate was added into fish soy sauce and light soy sauce, but there was no added substance in fish sauce. However, the content of essential amino acids in light soy sauce was the lowest. The flavors in the light soy sauce, fish sauce and fish soy sauce were complex. The electronic nose responded differently to the three kinds of sauce, and the ten sensors of the electronic nose could distinguish the flavors in fish sauce, fish soy sauce and light soy sauce. Sensors W5S, W1S and W2S had a relatively higher resistivity than others, and the W2S sensor played an important role in recognizing the first and the second principal components. These enabled the electronic nose to identify light soy sauce, fish sauce and fish soy sauce. The first and the second principal components were the same in all three sauces, but the contribution rate of ethanol and nitrogen oxides was different to the first and to the second principal components.

**Key words** Electronic nose; Fish sauce; Fish soy sauce; Light soy sauce; Quality

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

# 《渔业科学进展》编辑委员会

THE EDITORIAL BOARD OF *PROGRESS IN FISHERY SCIENCES*

主 编 Editor-in-Chief 唐启升 TANG Qisheng

副主编 Associate Editors-in-Chief 金显仕 JIN Xianshi 麦康森 MAI Kangsen 孙 松 SUN Song 孔 杰 KONG Jie

顾 问 Advisors (以姓名笔画为序)

苏纪兰 SU Jilan 林浩然 LIN Haoran 赵法箴 ZHAO Fazhen 徐 洵 XU Xun

曹文宣 CAO Wenxuan 雷霖霖 LEI Jilin 管华诗 GUAN Huashi

编 委 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 健 HUANG Jie	董双林 DONG Shuanglin	翟毓秀 ZHAI Yuxiu	魏宝振 WEI Baozhen

编辑部 Editorial Office 常 青 (编辑部主任) CHANG Qing (Chief)

江润林 (责任编辑) JIANG Runlin (Responsible Editor)

冯小花 FENG Xiaohua 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)

第36卷 第4期 2015年8月

PROGRESS IN FISHERY SCIENCES

(Bimonthly, founded in 1980)

Vol.36 No.4 Aug. 2015

主管单位 中华人民共和国农业部

主办单位 中国水产学会

中国水产科学研究院黄海水产研究所

出版单位 科学出版社

地址: 北京东黄城根北街16号, 邮编: 100717

编辑单位 中国水产科学研究院黄海水产研究所

地址: 青岛市南京路106号 邮编: 266071

电话: 0532-85833580

<http://www.yyqxjz.cn>

E-mail: yyqxjz@ysfri.ac.cn

主 编 唐启升

印 刷 青岛星球印刷有限公司

国内发行 青岛市邮政局

订 购 全国各地邮政局

国外发行 中国国际图书贸易总公司

地址: 北京339信箱 邮编: 100044

Supervised

Sponsored

Published

Edited

Editor-in-Chief

Printed

Domestic Distributed by

Subscription

Overseas Distributed by

by Ministry of Agriculture, P.R. China

by Yellow Sea Fisheries Research Institute,  
Chinese Academy of Fishery Sciences  
China Society of Fisheries

by Science Press

Add: 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China

by Yellow Sea Fisheries Research Institute,  
Chinese Academy of Fishery Sciences

Add: 106 Nanjing Road, Qingdao, 266071, China; Tel: 0532-85833580

<http://www.yyqxjz.cn>; E-mail: yyqxjz@ysfri.ac.cn

Tang Qisheng

by Qingdao Xingqiu Printing Co., Ltd.

Post Office of Qingdao

Post Offices All Over China

China International Book Trading Corporation

P.O. Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号

ISSN 2095-9869

CN 37-1466/S

国内邮发代号: 24-153

国外发行代号: 4578Q

国内外公开发行

定 价: 30.00元

ISSN 2095-9869



9 772095 986156